

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532639

(P2004-532639A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004.10.28)

(51) Int.Cl. ⁷		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00	A	4 B O 2 4
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K	39/395	L	4 B O 6 4
A 6 1 K	51/00	A 6 1 K	39/395	T	4 C O 8 4
A 6 1 P	13/08	A 6 1 P	13/08		4 C O 8 5
A 6 1 P	35/00	A 6 1 P	35/00		4 H O 4 5
		審査請求 未請求 予備審査請求 有		(全 398 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号	特願2003-502017 (P2003-502017)		(71) 出願人	500341816	
(86) (22) 出願日	平成14年5月30日 (2002.5.30)			コーネル リサーチ ファンデーション	
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月26日 (2003.11.26)			インコーポレーテッド	
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/017068			アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 4 8	
(87) 国際公開番号	W02002/098897			5 0 イサカ スイート 1 0 5 ソーン	
(87) 国際公開日	平成14年12月12日 (2002.12.12)			ウッドドライブ 2 0	
(31) 優先権主張番号	60/295, 214		(74) 代理人	100089705	
(32) 優先日	平成13年6月1日 (2001.6.1)			弁理士 社本 一夫	
(33) 優先権主張国	米国 (US)		(74) 代理人	100076691	
(31) 優先権主張番号	60/323, 585			弁理士 増井 忠式	
(32) 優先日	平成13年9月20日 (2001.9.20)		(74) 代理人	100075270	
(33) 優先権主張国	米国 (US)			弁理士 小林 泰	
(31) 優先権主張番号	60/362, 810		(74) 代理人	100080137	
(32) 優先日	平成14年3月8日 (2002.3.8)			弁理士 千葉 昭男	
(33) 優先権主張国	米国 (US)			最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 前立腺特異的膜抗原に対する修飾抗体およびその使用

(57) 【要約】

ヒト前立腺特異的膜抗原(PSMA)の細胞外ドメインへの修飾抗体又はその抗原結合断片を提供する。修飾抗PSMA抗体、又はその抗原結合断片は、特定の種、例えばヒトに対して、それらの非修飾カウンターパートに比べて、弱い免疫原性にされている。上記抗体、核酸、組換え発現ベクター並びにこのような抗体及び断片を作製するための宿主細胞を包含する薬剤組成物をも開示する。ヒトPSMAを検出するため、又はPSMA発現細胞、例えばPSMAを発現する癌若しくは前立腺細胞を除去する若しくは殺すための、in vitro又はin vivoでの本発明の抗体の使用方法をも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 22 若しくは配列番号 50 として示されるアミノ酸配列、又は A T C C 受託番号 P T A - 3 7 0 9 若しくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S O 細胞系によって産生される抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む、修飾された抗前立腺特異的膜抗原 (P S M A) 免疫グロブリン。

【請求項 2】

配列番号 25 の核酸残基 2 6 1 ~ 5 8 1、配列番号 52 として示されるヌクレオチド配列、又は A T C C 受託番号 P T A - 3 7 0 9 若しくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S O 細胞系によって産生される抗体の軽鎖可変領域ヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 1 記載の修飾された P S M A 免疫グロブリン。 10

【請求項 3】

配列番号 21 若しくは配列番号 49 として示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は A T C C 受託番号 P T A - 3 7 0 9 若しくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S O 細胞系によって産生される抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列を含む、修飾された抗 P S M A 免疫グロブリン。

【請求項 4】

配列番号 23 の核酸残基 2 6 1 ~ 6 0 5、配列番号 51 として示されるヌクレオチド配列、又は A T C C 受託番号 P T A - 3 7 0 9 若しくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S O 細胞系によって産生される抗体の重鎖可変領域ヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 3 記載の修飾された抗 P S M A 免疫グロブリン。 20

【請求項 5】

配列番号 22 若しくは配列番号 50 として示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又は A T C C 受託番号 P T A - 3 7 0 9 若しくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S O 細胞系によって産生される抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列；及び配列番号 21 若しくは配列番号 49 として示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は A T C C 受託番号 P T A - 3 7 0 9 若しくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S O 細胞系によって産生される抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列を含む、修飾された抗 P S M A 抗体、又はその抗原結合断片。

【請求項 6】

2 つの重鎖及び 2 つの軽鎖を含む、請求項 5 記載の修飾抗体又はその断片。 30

【請求項 7】

重鎖定常領域がヒトのアイソタイプ I g G 1 の重鎖定常領域である、請求項 5 記載の修飾抗体又はその断片。

【請求項 8】

請求項 5 記載の修飾抗体又はその断片、及び製薬的に受容されるキャリアーを含む薬剤組成物。

【請求項 9】

細胞傷害性部分又は検出可能な標識をさらに含む、請求項 5 記載の修飾抗体又はその断片。

【請求項 10】

細胞傷害性部分がサイトトキシン、治療剤又は放射性イオンである、請求項 9 記載の修飾抗体又はその断片。 40

【請求項 11】

放射性イオンがヨウ素 (^{131}I)、インジウム (^{111}In)、イットリウム (^{90}Y) 又はルテリウム (^{177}Lu) である、請求項 10 記載の修飾抗体又はその断片。

【請求項 12】

細胞傷害性部分がメイタンシノイドである、請求項 10 記載の修飾抗体又はその断片。

【請求項 13】

メイタンシノイドがメイタンシノールである、請求項 12 記載の修飾抗体又はその断片。

【請求項 14】

配列番号 25 の核酸残基 261～581、配列番号 52 として示されるヌクレオチド配列を含む軽鎖可変領域、又は ATCC 受託番号 PTA-3709 若しくは PTA-4174 を有する NSO 細胞系によって産生される抗体の軽鎖可変領域ヌクレオチド配列を含む、修飾された抗 P S M A 免疫グロブリンをコードするヌクレオチド配列を有する核酸配列。

【請求項 15】

配列番号 23 の核酸残基 261～605、配列番号 51 として示されるヌクレオチド配列を含む重鎖可変領域、又は ATCC 受託番号 PTA-3709 若しくは PTA-4174 を有する NSO 細胞系によって産生される抗体の重鎖可変領域ヌクレオチド配列を含む、修飾された抗 P S M A 免疫グロブリンをコードするヌクレオチド配列を有する核酸配列。

【請求項 16】

それぞれ、修飾抗 P S M A 抗体又はその抗原結合断片の軽鎖及び重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を有し、該軽鎖可変領域が配列番号 25 の核酸残基 261～581、配列番号 52 として示されるヌクレオチド配列、又は ATCC 受託番号 PTA-3709 若しくは PTA-4174 を有する NSO 細胞系によって産生される抗体の軽鎖可変領域ヌクレオチド配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号 2、配列番号 51 の核酸残基 261～605 として示されるヌクレオチド配列、又は ATCC 受託番号 PTA-3709 若しくは PTA-4174 を有する NSO 細胞系によって産生される抗体の重鎖可変領域ヌクレオチド配列を含む、第 1 及び第 2 核酸配列。

【請求項 17】

修飾抗 P S M A 抗体、又はその抗原結合断片の製造方法であって、配列番号 25 の核酸残基 261～581、配列番号 52 として示されるヌクレオチド配列を含む軽鎖可変領域、又は ATCC 受託番号 PTA-3709 若しくは PTA-4174 を有する NSO 細胞系によって産生される抗体の軽鎖可変領域ヌクレオチド配列をコードする第 1 核酸を用意する工程；

配列番号 23 の核酸残基 261～605、配列番号 51 として示されるヌクレオチド配列を含む重鎖可変領域、又は ATCC 受託番号 PTA-3709 若しくは PTA-4174 を有する NSO 細胞系によって産生される抗体の重鎖可変領域ヌクレオチド配列をコードする第 2 核酸を用意する工程；並びに

前記軽鎖及び重鎖可変領域の発現及び構築を可能にする条件下で、前記第 1 及び第 2 核酸を宿主細胞中に導入する工程

を含む、修飾抗 P S M A 抗体、又はその抗原結合断片の製造方法。

【請求項 18】

第 1 及び第 2 核酸が結合される、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

第 1 及び第 2 核酸が結合されない、請求項 17 記載の方法。

【請求項 20】

宿主細胞が、真核細胞又は原核細胞である、請求項 17 記載の方法。

【請求項 21】

宿主細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

哺乳動物細胞が、リンパ細胞系、NSO 細胞、CHO 細胞、COS 細胞、及びトランスジェニック動物からの細胞から成る群から選択される、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

前立腺細胞又は癌細胞を除去する又は殺す方法であって、該細胞、又は該細胞に近接する血管内皮細胞を、請求項 5 記載の修飾抗体又はその断片に接触させ、該抗体が該細胞、又は該細胞に近接する血管内皮細胞に結合するときに該細胞が除去される又は殺されるようにする方法。

【請求項 24】

対象における前立腺障害又は癌性障害を治療又は予防する方法であって、該対象に、請求項 5 記載の修飾抗体分子を、該障害を治療又は予防するために有効な量で投与することを

10

20

30

40

50

含む方法。

【請求項 25】

修飾抗体又はその断片が細胞傷害性作用因子又は部分と会合する、請求項 23 又は請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

細胞傷害性作用因子又は部分が、代謝拮抗物質、アルキル化剤、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシン C、シスージクロロジアミン白金 (II) (DDP) (シスプラチン)、アントラサイクリン、及び細胞分裂抑制薬から成る群から選択される、請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

修飾抗体又はその断片が、細胞傷害性作用因子と組合わせて投与される、請求項 24 記載の方法。

【請求項 28】

修飾抗体又はその断片を、細胞傷害性部分にカップリングさせる、請求項 25 記載の方法。

【請求項 29】

細胞傷害性部分が、細胞毒素、治療剤又は放射性同位体である、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

放射性同位体がヨウ素 (^{131}I)、イットリウム (^{90}Y) 又はルテチウム (^{177}Lu) である、請求項 29 記載の方法。

【請求項 31】

細胞傷害性部分がメイタンシノイドである、請求項 29 記載の方法。

【請求項 32】

メイタンシノイドがメイタンシノールである、請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

メイタンシノイドが DM1 である、請求項 31 記載の方法。

【請求項 34】

細胞が、悪性、正常、良性又は増殖性前立腺上皮細胞である、請求項 23 記載の方法。

【請求項 35】

細胞が、腎臓、尿路上皮、結腸、直腸、肺、乳房又は肝臓の癌細胞又は転移細胞である、請求項 23 記載の方法。

【請求項 36】

障害が、泌尿生殖器炎症、前立腺炎、良性腫脹、前立腺癌及び睾丸癌から成る群から選択される、請求項 24 記載の方法。

【請求項 37】

障害が、充実性腫瘍、軟組織腫瘍及び転移性病巣から成る群から選択される、請求項 24 記載の方法。

【請求項 38】

充実性腫瘍が、肉腫、腺癌及び癌腫から成る群から選択される悪性腫瘍である、請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

障害が、肺、乳房、リンパ組織、胃腸組織、結腸、直腸、泌尿生殖路、腎細胞、尿路上皮細胞、咽頭、膀胱、肝臓、肺、小腸及び食道に影響を及ぼす悪性腫瘍である、請求項 37 記載の方法。

【請求項 40】

in vitro で前立腺又は癌性細胞を含むサンプル中の PSMA タンパク質の存在を検出する方法であって、(i) 該サンプル又は基準サンプルを請求項 7 記載の修飾抗 PSMA 抗体又はその断片に、抗 PSMA 抗体と PSMA タンパク質との相互作用を発生させる条件下で接触させる工程；及び (ii) 抗 PSMA 抗体と該サンプル又は該基準サンプルとの間の複合体形成を検出する工程であって、基準サンプルに比べてサンプル中の複合

10

20

30

40

50

体形成の統計的に有意な変化がサンプル中の P S M A の存在を表示する工程を含む方法。

【請求項 4 1】

i n v i v o で P S M A の存在を検出する方法であって、(i) 対象に、請求項 7 記載の修飾抗 P S M A 抗体又はその抗原結合断片を検出可能に標識された形で、該修飾抗 P S M A 又はその断片と P S M A タンパク質との相互作用を発生させる条件下において投与する工程；及び (i i) 該抗体又は断片と P S M A との間の複合体形成を検出する工程であって、基準に比べて対象中の複合体形成の統計的に有意な変化が、P S M A の存在を表示する工程を含む方法。

【請求項 4 2】

前立腺障害又は癌性障害の診断又は病期決定方法であって、(i) 該障害を有する又は該障害を有する危険がある対象を確認する工程；(i i) 該障害に罹患した組織又は細胞のサンプルを得る工程；(i i i) 前記サンプル又は対照サンプルを、請求項 7 記載の修飾抗 P S M A 抗体又はその断片に、結合剤と P S M A タンパク質との相互作用を発生させる条件下で接触させる工程；及び (i v) 複合体形成を検出する工程であって、対照サンプルに比べて該抗体又はその断片との複合体形成の統計的に有意な増加が該障害又は該障害のステージを表示する工程を含む方法。 10

【請求項 4 3】

P S M A 発現腫瘍の i n v i v o イメージング方法であって、(i) 対象又は対照対象に、請求項 7 記載の標識された修飾抗 P S M A 抗体又はその断片を、該修飾抗 P S M A 抗体又はその断片と、P S M A タンパク質との相互作用を発生させる条件下で投与する工程；及び (i i) 該抗体又はその断片と、P S M A との間の複合体形成を検出する工程を含む方法。 20

【請求項 4 4】

良性前立腺肥大症又は前立腺癌又は非前立腺癌を有する、又は有すると診断された対象によって経験される疼痛の治療方法であって、該対象に抗 P S M A 抗体を、前立腺疾患又は非前立腺癌に付随する疼痛を治療するために十分な量で投与することを含む方法。

【請求項 4 5】

対象における前立腺癌に付随する転移性病巣の治療方法であって、該対象に請求項 5 記載の修飾抗体分子を、該障害を治療又は予防するために有効な量で投与することを含む方法。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、米国仮出願第 60 / 295, 214 号、2001 年 6 月 1 日出願、第 60 / 323, 585 号、2001 年 9 月 20 日出願、および第 60 / 362, 810 号、2002 年 3 月 8 日出願に優先権を請求し、これらのすべての内容が本明細書に援用される。本発明は、米国防総省助成金番号 D A M D 17-98-1-8594 のもとに、米国政府と共にを行った。米国政府は、本発明に特定の権利を有する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、ヒト前立腺特異的膜抗原 (P S M A) の細胞外ドメインに対する抗体、例えば修飾抗体、例えば脱免疫 (d e i m m u n i z e d) 抗体に関し、そして前立腺障害および癌を治療し、防止し、そして診断する際のその使用に関する。

【0003】

(発明の背景)

前立腺癌は、米国男性において、癌での最も一般的な死因の 1 つである。1999 年、およそ 185, 000 の新たな症例が診断され、そしてこの疾患で 37, 500 人が死亡した (N C I S E E R データ) 。これは、男性で診断される癌すべての約 40 % を占める。1990 年に米国に生まれた男性が、生涯で、臨床的に明らかな前立腺癌と診断される 40

可能性は、およそ8分の1である。発生が近年増加する前であっても、前立腺癌は、男性において、最も蔓延している癌であった（Feldman, A. R. ら (1986) NEJM 315:1394-7）。

【0004】

現在、前立腺癌がひとたび転移したならば（前立腺を超えて広がったならば）、該癌には、非常に限定された治療しかない。現在、全身療法は、多様な型のアンドロゲン（男性ホルモン）枯渇に限定される。大部分の患者は、初期には臨床的改善を示すであろうが、実質的に必ず、アンドロゲン独立細胞が発展する。したがって、内分泌療法は、姑息的であり、そして治癒的ではない。イメージング（例えば骨スキャンまたはCTスキャン）で検出可能な転移性疾患を持つ1387人の患者の研究において、ホルモン療法開始後の対象疾患進行（生化学的／PSA進行を除く）（すなわちアンドロゲン独立性の発展）までの中央値時間は、16～48ヶ月であった（Eisenberger M. A. ら (1998) NEJM 339:1036-42）。これらの患者におけるすべての生存の中央値は、ホルモン治療開始から28～52ヶ月であった（Eisenberger M. A. ら (1998) 上記）。アンドロゲン独立性の発展に続く、有効な標準的療法はなく、そして生存の中央値期間は、9～12ヶ月である（Volllmer, R. T. ら (1999) Clin Can Res 5:831-7; Hudes G. ら, (1997) Proc Am Soc Clin Oncol 16:316a（概要）；Pienta K. J. ら (1994) J Clin Oncol 12(10):2005-12；Pienta K. J. ら (1997) Urology 50:401-7；Tannock I. F. ら, (1996) J Clin Oncol 14:1756-65；Kantoff P. W. ら, (1996) J. Clin. Oncol. 15 (Suppl):25:110-25）。細胞傷害性化学療法は、この年齢群では許容性が劣っており、そして一般的に、無効であり、そして／または実用的でないといみなされる。さらに、前立腺癌は、細胞傷害性剤に比較的耐性である。したがって、化学療法措置は、この患者群において、有意な生存上の利益があると立証されていない。

【0005】

良性過形成の部分的前立腺切除時に、低程度で低段階の前立腺癌が発見された場合、10年未満の余命の男性では、注意深く見守るのが適切である（W. J. Catalona 30, (1994) New Engl. J. Med., 331(15):996-1004）。こうした癌は、検出後、最初の5年間は、まれにしか進行しない。一方、より若い男性では、治癒的治療がしばしばより適切である。

【0006】

前立腺癌が局在しており、そして患者の余命が10年以上である場合、根治的前立腺切除術が、疾患の根絶に対して最も優れた可能性を提供する。歴史的に、この処置の欠点は、癌が検出された時には、大部分の癌が手術の境界を超えて広がってしまっていることである。しかし、前立腺特異的抗原試験の使用によって、前立腺癌のより早期の検出が可能になってきている。その結果、手術はより広範囲でなくなり、合併症がより少なくなる。大きい、高程度の腫瘍を持つ患者では、根治的前立腺切除術による治療が成功する可能性がより低い。 40

【0007】

手術後、血清前立腺特異的抗原濃度が検出可能であるならば、癌が持続していることが示される。多くの場合、前立腺特異的抗原濃度は、放射線治療によって減少させることが可能である。しかし、この濃度はしばしば、2年以内に再度増加する。

【0008】

放射線療法はまた、根治的前立腺切除術の代替法としても広く使用されてきている。一般的に、放射線療法で治療される患者は、より高齢で、そしてより健康でなく、そしてより高い程度で、より臨床的に進行した腫瘍を持つ患者である。特に好ましい処置は、放射領域が、治療する組織の容量に対して適合する（conform）ように設計される、三次 50

元の原体照射法を伴う、外部光線療法；超音波誘導を用いて、放射性化合物の種を移植する、組織内照射療法；並びに外部光線療法および組織内照射療法の併用である。

【0009】

局所的に進行した疾患を持つ患者の治療には、根治的前立腺切除術または放射線療法前またはその後のホルモン療法が利用されてきている。ホルモン療法は、前立腺癌が散在してしまった男性を治療する主な型である。睾丸摘除術は血清テストステロン濃度を減少させ、一方、エストロゲン治療が同様に有益である。エストロゲンに由来するジエチルスチルベストロールが別の有用なホルモン療法であるが、これは、心臓血管傷害性を引き起こす点が不都合である。ロイプロリド、ブセレリン、またはゴセレリンなどのLHRHアゴニスト、あるいはアバレリクスなどの性腺刺激ホルモン放出ホルモンアンタゴニストいずれかを投与すると、テストステロン濃度が最終的に減少する。フルタミドおよび他の非ステロイド性抗アンドロゲン剤は、テストステロンがその細胞内受容体に結合するのを遮断する。その結果、これは、テストステロンの影響を遮断しながら、血清テストステロン濃度を増加させ、そして患者の性的能力を保持するのを可能にする一性的能力は、根治的前立腺切除術および放射線治療後の重要な問題である。

10

【0010】

現存する療法の欠点を考慮すると、前立腺癌などの癌を防止し、そして治療する、改善された様式に対する必要性が存在する。

【0011】

(発明の概要)

20

本発明は、とりわけ、ヒト前立腺特異的膜抗原 (prostate specific membrane antigen) (PSMA) の細胞外ドメインに結合する、抗体、および特に修飾抗体、またはその抗原結合断片を提供する。修飾抗PSMA抗体、またはその抗原結合断片は、既定の種、例えばヒトに対するその非修飾対応物と比較して、より低い免疫原性を与える。修飾抗PSMA抗体、またはその断片は、高い親和性および特異性でヒトPSMAに結合し、そしてしたがって、*in vivo* および *in vitro* で、診断剤、予防剤、または療法剤として使用可能である。したがって、本発明は、抗体、および特に修飾抗PSMA抗体、抗体断片、およびその薬剤組成物と共に、こうした抗体および断片を作成するための核酸、組換え発現ベクターおよび宿主細胞を提供する。*in vitro* または *in vivo* いずれかで、PSMAを検出するために、あるいはPSMA発現細胞、例えばPSMA発現癌細胞、前立腺細胞または血管細胞を除去するかまたは殺すために、本発明の抗体を使用する方法もまた、本発明に含まれる。好ましくは、修飾抗体は、J591、J415、J533またはE99抗体由来の1以上の相補性決定領域(CDR)を有するものである。本明細書に論じるように、修飾抗体は、CDR移植抗体、ヒト化抗体、脱免疫抗体、またはより一般的には、非ヒト抗体、例えばネズミJ591、J415、J533またはE99抗体由来のCDR、およびヒトにおいて、より免疫原性でない、例えばネズミCDRが天然に存在するネズミフレームワークより抗原性でないとして選択されるフレームワークを有する抗体であることが可能である。

30

【0012】

本発明の抗体、例えば修飾抗体は、高い親和性および特異性で、PSMA、好ましくはヒトPSMAと相互作用し、例えばPSMAに結合する。例えば、抗体は、少なくとも 10^7 M^{-1} 、好ましくは $10^8 \text{ M}^{-1} \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}$ の間、または約 10^9 M^{-1} の親和性定数でヒトPSMAに結合する。好ましくは、抗体は、PSMAの細胞外ドメイン、そして最も好ましくはヒトPSMAの細胞外ドメイン (例えばヒトPSMAのアミノ酸44～750) と相互作用し、例えば該ドメインに結合する。

40

【0013】

いくつかの態様において、抗PSMA抗体は、本明細書に記載する抗体、例えばJ591、E99、J415、およびJ533抗体が結合するエピトープのすべてまたは一部と結合する。抗PSMA抗体は、ヒトPSMAに対する、本明細書に記載する抗体、例えばJ591、E99、J415、およびJ533抗体の結合を阻害可能であり、例えば競合的

50

に阻害可能である。抗 P S M A 抗体は、エピトープ、例えばコンホメーション性エピトープまたは直鎖エピトープに結合可能であり、このエピトープは結合されると、本明細書に記載する抗体、例えば J 5 9 1、E 9 9、J 4 1 5、および J 5 3 3 抗体の結合を妨げる。該エピトープは、J 5 9 1、E 9 9、J 4 1 5、または J 5 3 3 抗体に認識されるエピトープに、空間的に近接しているかまたは機能的に関連していることが可能であり、例えば直鎖配列またはコンホメーション性空間において、重複するエピトープまたは隣接するエピトープであることが可能である。

【0014】

いくつかの態様において、抗 P S M A 抗体は、ヒト P S M A のほぼアミノ酸 1 2 0 ~ 5 0 0、好ましくは 1 3 0 ~ 4 5 0、より好ましくは 1 3 4 ~ 4 3 7、または 1 5 3 ~ 3 4 7 の領域内に完全にまたは部分的に位置するエピトープに結合する。好ましくは、該エピトープには、少なくとも 1 つのグリコシル化部位、例えば少なくとも 1 つの N 連結グリコシル化部位（例えばヒト P S M A のほぼアミノ酸 1 9 0 ~ 2 0 0、好ましくはほぼアミノ酸 1 9 5 に位置するアスパラギン残基）が含まれる。

【0015】

ヒト P S M A は、正常、良性過形成、および癌性の前立腺上皮細胞と共に、癌性細胞、例えば腎臓、尿路上皮（例えば膀胱）、精巣、結腸、直腸、肺（例えば非小細胞肺癌）、乳房、肝臓、神経（例えば神経内分泌）、グリア（例えばグリア芽腫）、膵臓（例えば膵管）、黒色腫（例えば悪性黒色腫）、または軟組織肉腫の癌性細胞に近接した血管内皮細胞の表面上に発現される。ヒト P S M A の発現は、膜貫通ドメインを含む N 末端ドメインの一部が欠けているスプライシング変異体、P S M ' がより豊富である、非悪性前立腺細胞上で実質的により低い。膜貫通ドメインを含有する N 末端領域が欠けているため、P S M ' は、主に細胞質内にあり、そして細胞膜上に位置していない。本発明の抗体、例えば修飾抗体は、P S M A を発現する細胞の細胞表面に結合する。P S M A は、通常、細胞膜から細胞にリサイクルされる。したがって、本発明の抗体は、P S M A 再循環過程を通じて、P S M A と共に内部に入り、それによって、抗体にコンジュゲート化した剤、例えば標識剤、細胞傷害性剤、またはウイルス粒子（例えば細胞傷害性剤、例えばアポトーシス促進因子をコードする遺伝子を含むウイルス粒子）の搬送を可能にする。したがって、本明細書に記載する抗体、例えば修飾抗体を用いて、生存する正常、良性過形成および癌性の前立腺上皮細胞と共に、癌性細胞に近接する血管内皮細胞をターゲティングすることが可能である。

【0016】

抗体、例えば修飾抗体は、好ましくは、単一特異性、例えばモノクローナル抗体、またはその抗原結合断片である。抗体、例えば修飾抗体は、全長であることが可能であり（例えば I g G（例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4）、I g M、I g A（例えば I g A 1、I g A 2）、I g D、および I g E、しかし好ましくは I g G）、または抗原結合断片のみを含むことが可能である（例えば F a b、F（a b'）₂ または s c F v 断片、あるいは 1 以上の C D R）。抗体、またはその抗原結合断片は、2 つの重鎖免疫グロブリンおよび 2 つの軽鎖免疫グロブリンを含むことが可能であるし、または一本鎖抗体であることが可能である。抗体は、場合によって、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンまたはミュー定常部遺伝子から選択される定常部を含むことが可能である。好ましい抗 P S M A 抗体には、実質的にヒト抗体、例えばヒト I g G 1 定常部由来の重鎖および軽鎖の定常部、その一部、またはコンセンサス配列が含まれる。

【0017】

好ましい態様において、抗体（またはその断片）は、例えばキメラ抗体、ヒト化抗体、脱免疫抗体、または *in vitro* 生成抗体から選択される組換えまたは修飾抗 P S M A 抗体である。他の態様において、抗 P S M A 抗体は、ヒト抗体である。1 つの態様において、本発明の修飾抗体は、脱免疫抗 P S M A 抗体、例えば E 9 9、J 4 1 5、J 5 3 3 または J 5 9 1 の脱免疫型（例えば、それぞれ、A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 0 1、H B - 1 2 1 0 9、H B - 1 2 1 2 7、および H B - 1 2 1 2 6 を有するハイブリドーマ細胞

株に産生される抗体の脱免疫型)である。好ましくは、修飾抗体は、J 5 9 1またはJ 4 1 5の脱免疫型(本明細書において、それぞれ、「d e J 5 9 1」または「d e J 4 1 5」と称される)である。最も好ましくは、抗体はJ 5 9 1の脱免疫型である。

【0018】

抗P S M A抗体のいかなる組み合わせも本発明の範囲内であり、例えばP S M Aの異なる領域に結合する2以上の抗体、例えばP S M Aの細胞外ドメイン上の2つの異なるエピートープに結合する抗体がある。

【0019】

いくつかの態様において、抗P S M A抗体、例えば修飾抗P S M A抗体またはその抗原結合断片には、少なくとも1つの軽鎖または重鎖の免疫グロブリン(または好ましくは、少なくとも1つの軽鎖免疫グロブリンおよび少なくとも1つの重鎖免疫グロブリン)が含まれる。好ましくは、各免疫グロブリンには、それぞれ、非ヒト抗P S M A軽鎖または重鎖の可変部由来のC D Rに実質的に同一の、少なくとも1つ、2つ、そして好ましくは3つのC D Rを有する、軽鎖または重鎖の可変部が含まれる。例えば、抗体またはその抗原結合断片は：ネズミJ 5 9 1の重鎖可変部(図1 Aに示す配列番号1、2、および3を参照されたい)；ネズミJ 5 9 1の軽鎖可変部(図1 Bに示す配列番号4、5、および6を参照されたい)；ネズミJ 4 1 5の重鎖可変部(図5に示す配列番号29、30、および31を参照されたい)；ネズミJ 4 1 5の軽鎖可変部(図6に示す配列番号32、33、および34を参照されたい)；ネズミJ 5 3 3の重鎖可変部(図9 Aに示す配列番号93、94、および95を参照されたい)；ネズミJ 5 3 3の軽鎖可変部(図10 Aに示す配列番号96、97、および98を参照されたい)；ネズミE 9 9の重鎖可変部(図11 Aに示す配列番号99、100、および101を参照されたい)；またはネズミE 9 9の軽鎖可変部(図12 Aに示す配列番号102、103、および104を参照されたい)に由来する、少なくとも1つ、2つ、そして好ましくは3つのC D Rを有することが可能である。他の態様において、修飾抗体またはその抗原結合断片は、A T C C寄託番号H B-1 2 1 2 6を有する細胞株に産生される抗体、またA T C C寄託番号P T A-3 7 0 9を有する細胞株に産生される脱免疫J 5 9 1抗体の軽鎖または重鎖の可変部由来の、少なくとも1つ、2つ、そして好ましくは3つのC D Rを有することが可能である。他の態様において、修飾抗体またはその抗原結合断片は、A T C C寄託番号H B-1 2 1 0 9を有する細胞株に産生される抗体、またはA T C C寄託番号P T A-4 1 7 4を有する細胞株に産生される脱免疫J 4 1 5抗体の軽鎖または重鎖の可変部由来の、少なくとも1つ、2つ、そして好ましくは3つのC D Rを有することが可能である。さらに他の態様において、修飾抗体またはその抗原結合断片は、A T C C寄託番号H B-1 2 1 2 7を有する細胞株に産生される抗体、またはA T C C寄託番号H B-1 2 1 0 1を有する細胞株に産生される抗体の軽鎖または重鎖の可変部由来の、少なくとも1つ、2つ、そして好ましくは3つのC D Rを有することが可能である。

【0020】

1つの好ましい態様において、修飾抗体またはその抗原結合断片には、同一の非ヒト抗P S M A抗体、例えばネズミJ 5 9 1、J 4 1 5、J 5 3 3またはE 9 9抗体由来の6つのC D Rすべてが含まれる。いくつかの態様において、C D Rは、配列番号1、2、3、4、5および6(ネズミJ 5 9 1重鎖および軽鎖のC D Rに対応する)のアミノ酸配列、A T C C寄託番号H B-1 2 1 2 6を有する細胞株に産生される抗体のC D Rのアミノ酸配列、またはA T C C寄託番号P T A-3 7 0 9を有する細胞株に産生される脱免疫J 5 9 1抗体のC D Rのアミノ酸配列、あるいはそれに実質的に同一の配列を有する。他の態様において、C D Rは、配列番号29、30、31、32、33、および34(ネズミJ 4 1 5重鎖および軽鎖のC D Rに対応する)のアミノ酸配列、A T C C寄託番号H B-1 2 1 0 9を有する細胞株に産生される抗体のC D Rのアミノ酸配列、またはA T C C寄託番号P T A-4 1 7 4を有する細胞株に産生される脱免疫J 4 1 5抗体のC D Rのアミノ酸配列、あるいはそれに実質的に同一の配列を有する。他の態様において、C D Rは、配列番号93、94、95、96、97、および98(ネズミJ 5 3 3重鎖および軽鎖のC D

Rに対応する)のアミノ酸配列、ATCC寄託番号HB-12127を有する細胞株に産生される抗体のCDRのアミノ酸配列、またはそれに実質的に同一の配列を有する。さらに他の態様において、CDRは、配列番号99、100、101、102、103、および104(ネズミE99重鎖および軽鎖のCDRに対応する)のアミノ酸配列、ATCC寄託番号HB-12101を有する細胞株に産生される抗体のCDRのアミノ酸配列、またはそれに実質的に同一の配列を有する。

【0021】

抗体J591、J415、J533およびE99のCDRのアミノ酸配列を以下の表1に提供する。

表1：CDR配列

10

【0022】

【表1A】

名称	生物	図	配列 番号	配列
V _H CDR1 J591	マウス (Mus musculus)	図 1A	1	GYTFTEYTIH
V _H CDR2 J591	マウス	図 1A	2	NINPNNGGTTYNQKFED
V _H CDR3 J591	マウス	図 1A	3	GWNFDY
V _L CDR1 J591	マウス	図 1B	4	KASQDVGTAVD
V _L CDR2 J591	マウス	図 1B	5	WASTRHT
V _L CDR3 J591	マウス	図 1B	6	QQYNSYPLT
V _H CDR1 J415	マウス	図 5	29	GFTFSNYWMN
V _H CDR2 J415	マウス	図 5	30	EIRSQSNNFATHYAESVKG
V _H CDR3 J415	マウス	図 5	31	RWNNF
V _L CDR1 J415	マウス	図 6	32	KASENVGTYVS
V _L CDR2 J415	マウス	図 6	33	GASNRFT
V _L CDR3 J415	マウス	図 6	34	GQSYTFPYT
V _H CDR1 J533	マウス	図 9A	93	GYTFTGYVMH
V _H CDR2 J533	マウス	図 9A	94	YINPYNDVTRYNGKFKG
V _H CDR3 J533	マウス	図 9A	95	GENWYYFDS
V _L CDR1 J533	マウス	図 10A	96	RASESIDSYDNTFMH
V _L CDR2 J533	マウス	図 10A	97	RASILES

10

20

30

40

【 0 0 2 3 】

【 表 1 B 】

V _L CDR3 J533	マウス	図 10A	98	HQSIEDPYT
V _H CDR1 E99	マウス	図 11A	99	GFSLTAYGIN
V _H CDR2 E99	マウス	図 11A	100	VIWPDGNTDYNSTLKS
V _H CDR3 E99	マウス	図 11A	101	DSYGNFKRGWDFD
V _L CDR1 E99	マウス	図 12A	102	KASQNVGSDVA
V _L CDR2 E99	マウス	図 12A	103	STSYRYS
V _L CDR3 E99	マウス	図 12A	104	QQYNSYPLT

10

【 0 0 2 4 】

20

修飾抗 P S M A 抗体またはその抗原結合断片の軽鎖または重鎖の免疫グロブリンは、ヒトまたは非ヒト、例えばげっ歯類の抗体に存在する軽鎖または重鎖の可変フレームワーク（例えばネズミ J 5 9 1、J 4 1 5、J 5 3 3 または E 9 9 抗体重鎖または軽鎖の可変フレームワーク）に由来する軽鎖または重鎖の可変フレームワーク配列をさらに含むことが可能である。いくつかの態様において、軽鎖または重鎖の可変フレームワークは以下から選択可能である：

30

i. ヒト軽鎖または重鎖の可変フレームワーク由来の、少なくとも 5、10、20、30、40、50、60、70、または 80 アミノ酸残基、例えば成熟ヒト抗体、ヒト生殖系列抗体配列、またはヒトコンセンサス抗体配列由来の軽鎖または重鎖の可変フレームワーク残基を含む、軽鎖または重鎖の可変フレームワーク；

i i. ヒト軽鎖または重鎖の可変フレームワーク由来の、少なくとも 5 であるが 30 未満のアミノ酸残基、例えば成熟ヒト抗体、ヒト生殖系列抗体配列、またはヒトコンセンサス抗体配列由来の軽鎖または重鎖の可変フレームワーク残基を含む、軽鎖または重鎖の可変フレームワーク；

i i i. 非ヒト抗体、例えばネズミ抗体（例えば、配列番号 7 または 8（それぞれ、ネズミ J 5 9 1 の重鎖および軽鎖由来；図 1 A および 1 B を参照されたい）、配列番号 3 5 または 3 6（それぞれ、ネズミ J 4 1 5 の重鎖および軽鎖由来；図 5 および 6 を参照されたい）、配列番号 1 0 9 または 1 1 4（それぞれ、ネズミ J 5 3 3 の重鎖および軽鎖由来；図 9 A および 1 0 A を参照されたい）、あるいは配列番号 1 1 9 または 1 2 4（それぞれ、ネズミ E 9 9 の重鎖および軽鎖由来；図 1 1 A および 1 2 A を参照されたい）に示すフレームワーク・アミノ酸配列を有する抗 P S M A 抗体）由来の軽鎖または重鎖の可変フレームワーク、あるいは本明細書に記載するネズミ抗体（例えば、A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 2 6、H B - 1 2 1 0 9、H B - 1 2 1 2 7 または H B - 1 2 1 0 1 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される、ネズミ J 5 9 1、J 4 1 5、J 5 3 3、または E 9 9 抗体）のフレームワーク由来の、少なくとも 5、10、20、30、40、50、60、75、またはそれ以上のアミノ酸残基を含む、軽鎖または重鎖の可変フレームワーク；

40

i v. 非ヒト抗体、例えばネズミ抗体（例えば、配列番号 7 または 8（それぞれ、ネズミ J 5 9 1 の重鎖および軽鎖由来；図 1 A および 1 B を参照されたい）、配列番号 3 5 または 3 6（それぞれ、ネズミ J 4 1 5 の重鎖および軽鎖由来；図 5 および 6 を参照されたい）、配列番号 1 0 9 または 1 1 4（それぞれ、ネズミ J 5 3 3 の重鎖および軽鎖由来；図

50

9 Aおよび10 Aを参照されたい)、あるいは配列番号119または124(それぞれネズミE99の重鎖および軽鎖由来;図11 Aおよび12 Aを参照されたい)に示すフレームワーク・アミノ酸配列を有する抗PSMA抗体)の軽鎖または重鎖の可変部のフレームワークの配列、あるいは本明細書に記載するネズミ抗体(例えば、ATCC寄託番号HB-12126、HB-12109、HB-12127またはHB-12101を有するハイブリドーマ細胞株に産生される、ネズミ抗体)のフレームワークと、少なくとも60%、65%、70%、72%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の同一性を有するか、あるいは、少なくとも1、2、5またはそれ以上の残基、但し10、20、30または40未満の残基が異なるアミノ酸配列を有する、軽鎖または重鎖の可変フレームワーク;あるいは

v. 少なくとも5つのアミノ酸置換を有する、非ヒト、例えばネズミ、例えばJ591またはJ415軽鎖または重鎖の可変部フレームワーク。

10

【0025】

いくつかの態様において、非ヒト抗PSMA抗体またはその抗原結合断片の軽鎖可変部は、配列番号13、14、15、および16(脱免疫J591軽鎖FR1~4に対応する;図2 Bを参照されたい)または配列番号41、42、43、および44(脱免疫J415軽鎖(J415DIVK5)FR1~4に対応する;図6を参照されたい)から選択される、少なくとも1、2、3、そして好ましくは4アミノ酸配列、あるいはATCC寄託番号PTA-3709またはPTA-4174を有する細胞株に産生される抗体由来の、少なくとも1つ、2つ、3つ、そして好ましくは4つの軽鎖フレームワーク領域を有する。

他の態様において、非ヒト抗PSMA抗体またはその抗原結合部分の重鎖可変部は、配列番号9、10、11、および12(脱免疫J591重鎖FR1~4に対応する;図2 Aを参照されたい)または配列番号37、38、39、および40(脱免疫J415重鎖(J415DIVH4)FR1~4に対応する;図5を参照されたい)から選択される、少なくとも1、2、3、そして好ましくは4アミノ酸配列、あるいはATCC寄託番号PTA-3709またはPTA-4174を有する細胞株に産生される抗体の、少なくとも1つ、2つ、3つ、そして好ましくは4つの重鎖フレームワーク領域を有する。他の態様において、重鎖または軽鎖のフレームワークは、それぞれ、配列番号17または配列番号18(脱免疫J591フレームワーク配列に対応する;図2 A~2 Bを参照されたい)、それぞれ、配列番号45または配列番号46(脱免疫J415フレームワーク配列J415DIVH4およびJ415DIVK5に対応する;図5または6を参照されたい)、あるいはATCC寄託番号PTA-3709またはPTA-4174を有する細胞株に産生される抗体の重鎖または軽鎖のフレームワーク配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%またはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。さらに他の態様において、重鎖または軽鎖のフレームワークは、それぞれ配列番号17または配列番号18、それぞれ配列番号45または配列番号46のアミノ酸配列、あるいはATCC寄託番号PTA-3709またはPTA-4174を有する細胞株に産生される抗体の重鎖または軽鎖のフレームワーク配列と、少なくとも1、2、5、またはそれ以上の残基、但し10、20、30、または40未満の残基が異なるアミノ酸配列を有する。好ましくは、重鎖または軽鎖のフレームワーク領域には、それぞれ配列番号17または配列番号18、それぞれ配列番号45または配列番号46に示すアミノ酸配列、あるいはATCC寄託番号PTA-3709またはPTA-4174を有する細胞株に産生される抗体の重鎖または軽鎖のフレームワーク配列が含まれる。

20

30

40

【0026】

他の態様において、修飾抗PSMA抗体の重鎖または軽鎖の可変部は、それぞれ、配列番号21または配列番号22(脱免疫J591の重鎖および軽鎖の可変部に対応する;図2 A~2 Bを参照されたい)、それぞれ、配列番号49または配列番号50(脱免疫J415の重鎖および軽鎖の可変部、J415DIVH4およびJ415DIVK5に対応する;図5または6を参照されたい)、あるいはATCC寄託番号PTA-3709またはPTA-4174を有する細胞株に産生される抗体の重鎖または軽鎖の可変部配列と、少な

50

くとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%またはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。他の態様において、修飾抗PSMA抗体の重鎖または軽鎖の可変部は、それぞれ配列番号21または配列番号22、それぞれ配列番号49または配列番号50のアミノ酸配列、あるいはATCC寄託番号PTA-3709またはPTA-4174を有する細胞株に産生される抗体の重鎖または軽鎖の可変部配列と、少なくとも1、2、5、またはそれ以上の残基、但し10、20、30、または40未満の残基が異なるアミノ酸配列を有する。好ましくは、軽鎖または重鎖の可変部には、それぞれ配列番号21または配列番号22、それぞれ配列番号49または配列番号50に示すアミノ酸配列、あるいはATCC寄託番号PTA-3709またはPTA-4174を有する細胞株に産生される抗体の重鎖または軽鎖の可変部配列が含まれる。

10

【0027】

好ましい修飾抗PSMA抗体には、それぞれ、配列番号21および配列番号22（脱免疫J591の重鎖および軽鎖の可変部に対応する；図2A～2Bを参照されたい）、それぞれ、配列番号49および配列番号50（脱免疫J415の重鎖および軽鎖の可変部、J415DIVH4およびJ415DIVK5に対応する；図5および6を参照されたい）に示すアミノ酸配列を有する、少なくとも1つ、好ましくは2つの軽鎖可変部、および少なくとも1つ、好ましくは2つの重鎖可変部が含まれ、あるいはATCC寄託番号PTA-3709またはPTA-4174を有する細胞株に産生される抗体の、少なくとも1つ、好ましくは2つの修飾軽鎖可変部配列および少なくとも1つ、好ましくは2つの重鎖可変部配列が含まれる。

20

【0028】

他の態様において、抗PSMA抗体の軽鎖または重鎖の可変フレームワーク、またはその抗原結合断片には、ヒト軽鎖または重鎖の可変フレームワーク、例えば成熟ヒト抗体、ヒト生殖系列抗体配列、またはコンセンサス抗体配列由来の軽鎖または重鎖の可変フレームワーク残基由来の、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、16、または17アミノ酸残基が含まれる。

【0029】

いくつかの態様において、ヒト軽鎖可変フレームワーク由来のアミノ酸残基は、ヒト生殖系列抗体配列の同一の位に見られる残基と同一である。好ましくは、ヒト軽鎖可変フレームワーク由来のアミノ酸残基は、ヒト生殖系列抗体配列の同一の位での最も一般的な残基である。好ましくは、修飾抗PSMA抗体の軽鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片は：残基8、9、10、11、20、22、60、63、76、77、78、80、83、87、103、104および106（表2に示すようなKabab番号付け）からなる群より選択される位で、非ヒト抗PSMA軽鎖可変部（例えばネズミJ591軽鎖可変部）のフレームワークと異なるか、またはヒト軽鎖可変フレームワーク（例えばヒト生殖系列、成熟、またはコンセンサス・フレームワーク配列）に由来する、少なくとも1、2、3、5、7、10アミノ酸残基を有する。好ましくは、修飾抗PSMA抗体の軽鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片は：残基8（プロリン）、9（セリン）、10（セリン）、11（ロイシン）、20（スレオニン）、22（スレオニン）、60（セリン）、63（セリン）、76（セリン）、77（セリン）、78（ロイシン）、80（プロリン）、83（フェニルアラニン）、87（チロシン）、103（リジン）、104（バリン）および106（イソロイシン）（表2に示すようなKabab番号付け）からなる群より選択されるヒト軽鎖可変フレームワーク由来の、少なくとも1、2、3、5、7、または10アミノ酸残基を有する。

30

40

【0030】

脱免疫J591軽鎖可変部中のアミノ酸置換を、以下の表2に提供する。左のパネルは、Kabab, E. A. ら（1991）上記にしたがったアミノ酸番号を示し；中央のパネルは、マウス配列中の残基の置換および対応するマウス残基を示し；そして右のパネルは、ヒト生殖系列における対応する位で、最も一般的な残基を示す。

【0031】

50

表 2

【 0 0 3 2 】

【 表 2 】

位 Kabat 番号	マウス配列の 置換	ヒト生殖系列で 最も一般的な 残基
3	V→Q	V
8	H→P	P
9	K→S	S
10	F→S	S
11	M→L	L
20	S→T	T
21	I→L	I
22	I→T	T
42	Q→P	K
58	V→I	V
60	D→S	S
63	T→S	S
76	T→S	S
77	T→S	S
78	V→L	L
80	S→P	P
83	L→F	F
87	F→Y	Y
100	A→P	Q
103	M→K	K
104	L→V	V
106	L→I	I

10

20

30

【 0 0 3 3 】

他の態様において、抗 P S M A 抗体の軽鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片は：残基 1 3、1 5、1 9、4 1、6 3、6 8、および 8 0（図 6 に示すような直鎖番号付け）からなる群より選択される位で、非ヒト抗 P S M A 軽鎖可変部（例えばネズミ J 4 1 5 軽鎖可変部）のフレームワークと異なるか、またはヒト軽鎖可変フレームワーク（例えばヒト生殖系列、成熟、またはコンセンサス・フレームワーク）に由来する、少なくとも 1、2、3、5、または 7 アミノ酸残基を有する。好ましくは、修飾抗体の軽鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片は：残基 1 3（アラニン）、1 5（アラニン）、1 9（メチオニン）、4 1（スレオニン）、6 3（セリン）、6 8（グリシン）、および 8 0（アラニン）（図 6 に示すような直鎖番号付け）からなる群より選択されるヒトコンセンサス軽鎖可変フレームワーク由来の、少なくとも 1、2、3、5、または 7 アミノ酸残基を有する。

40

【 0 0 3 4 】

脱免疫 J 4 1 5 軽鎖可変部中のアミノ酸置換を、以下の表 3 に提供する。左のパネルは、

50

直鎖番号付けを用いたアミノ酸番号を示し；中央のパネルは、マウス配列中の残基の置換および対応するマウス残基を示し；そして右のパネルは、ヒト生殖系列における対応する位で、最も一般的な残基を示す。

【0035】

表3

【0036】

【表3】

位 直鎖番号	マウス配列の 置換	ヒト生殖系列で 最も一般的な 残基
13	I→A	A
15	V→A	A
19	V→M	M
41	E→T	T
63	T→S	S
68	A→G	G
80	T→A	A

10

【0037】

他の態様において、抗PSMA抗体の軽鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片には、配列番号8（ネズミJ591由来；図1Bを参照されたい）、配列番号36（ネズミJ415由来；図6を参照されたい）、配列番号114（ネズミJ533由来；図10Aを参照されたい）、または配列番号124（ネズミE99由来；図12Aを参照されたい）に示す軽鎖可変フレームワーク、あるいはATCC寄託番号HB-12126、HB-12109、HB-12127またはHB-12101を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の軽鎖可変フレームワーク由来の、少なくとも5であるが、80を超えないアミノ酸残基が含まれる。好ましくは、軽鎖可変フレームワークは、非ヒト軽鎖可変フレームワーク、例えば、それぞれ配列番号8または配列番号36に示すネズミJ591またはJ415軽鎖可変フレームワーク、あるいはATCC寄託番号HB-12126またはHB-12109を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の軽鎖可変フレームワークと、少なくとも60%、65%、70%、72%、75%、80%、85%、90%、または94%の同一性を有するか、あるいは少なくとも5、7、10、20、または30アミノ酸残基、但し10、20、30、または40未満のアミノ酸残基が異なる。他の態様において、軽鎖可変フレームワークは、ネズミJ591抗体（配列番号8；図1Bを参照されたい）由来、ネズミJ415抗体（配列番号36；図6を参照されたい）由来、ネズミJ533抗体（配列番号114；図10Aを参照されたい）由来、またはネズミE99抗体（配列番号124；図12Aを参照されたい）由来であるか、あるいはATCC寄託番号HB-12126、HB-12109、HB-12127またはHB-12101を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の軽鎖可変フレームワークである。

20

30

40

【0038】

さらに他の態様において、修飾抗PSMA抗体の軽鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片には、少なくとも5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、または23アミノ酸置換を有する、非ヒト（例えばネズミ）軽鎖可変フレームワーク（例えば配列番号8に示すようなネズミJ591軽鎖可変フレームワーク、またはATCC寄託番号HB-12126を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の軽鎖可変フレームワーク）が含まれる。1つの態様において、非ヒト軽鎖可変フレームワークには：

少なくとも5、6、7、または8の置換を有する、フレームワーク領域1；

50

少なくとも1つの置換を有する、フレームワーク領域2；
 少なくとも5、6、7、8、または9の置換を有する、フレームワーク領域3；あるいは
 少なくとも2、3または4の置換を有する、フレームワーク領域4
 の1以上が含まれる。

【0039】

さらに他の態様において、修飾抗PSMA抗体の軽鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片には、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、または10アミノ酸置換を有する、非ヒト（例えばネズミ）軽鎖可変フレームワーク（例えば配列番号36に示すようなネズミJ415軽鎖可変フレームワーク、またはATCC寄託番号HB-12109を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の軽鎖可変フレームワーク）が含まれる。いくつかの態様において、非ヒト軽鎖可変フレームワークには：
 少なくとも1、2または3の置換を有する、フレームワーク領域1；
 少なくとも1つの置換を有する、フレームワーク領域2；あるいは
 少なくとも1、2または3の置換を有する、フレームワーク領域3
 の1以上が含まれる。

【0040】

置換は：非ヒト残基の保存的置換、あるいは同一の位で、ヒト生殖系列、成熟またはコンセンサス・フレームワーク配列に見られる残基、例えば同一の位のヒト生殖系列配列における最も一般的な残基から選択可能である。いくつかの態様において、軽鎖可変フレームワークは、少なくとも3、4、そして好ましくは5の保存的置換を有する。他の態様において、軽鎖可変フレームワークは、少なくとも5、7、10、15、16、または17アミノ酸残基置換を有し、ここで、置換アミノ酸残基は、同一の位のヒト生殖系列フレームワーク配列における、最も一般的な残基である。

【0041】

いくつかの態様において、非ヒト軽鎖可変フレームワークは：残基3、8、9、10、11、20、21、22、42、58、60、63、76、77、78、80、83、87、100、103、104および106（表2に示すようなKabab番号付け）からなる群より選択される位で、少なくとも1、2、3、5、7、10、11、15、16、17、19、20、21または22アミノ酸置換を有する。置換は：残基3（グルタミン）、8（プロリン）、9（セリン）、10（セリン）11（ロイシン）、20（スレオニン）、21（ロイシン）、22（スレオニン）、42（プロリン）、58（イソロイシン）、60（セリン）、63（セリン）、76（セリン）、77（セリン）、78（ロイシン）、80（プロリン）、83（フェニルアラニン）、87（チロシン）、100（プロリン）、103（リジン）、104（バリン）および106（イソロイシン）（表2に示すようなKabab番号付け）の1以上から選択可能である。

【0042】

他の態様において、非ヒト軽鎖可変フレームワークは：残基13、15、19、41、63、68および80（表3に示すような直鎖番号付け）からなる群より選択される位で、少なくとも1、2、3、5、または7アミノ酸置換を有する。好ましくは、修飾抗体の軽鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片は：残基13（アラニン）、15（アラニン）、19（メチオニン）、41（スレオニン）、63（セリン）、68（グリシン）および80（アラニン）（表3に示すような直鎖番号付け）からなる群より選択される、ヒトコンセンサス軽鎖可変フレームワーク由来の、少なくとも1、2、3、5、7アミノ酸残基を有する。

【0043】

好ましくは、修飾抗PSMA抗体の重鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片は：残基5、40、41、44、82a、83、87、および108（表4に示すようなKabab番号付け）からなる群より選択される位で、非ヒト抗PSMA重鎖可変部（例えばネズミJ591重鎖可変部）と異なるか、またはヒト重鎖可変フレームワーク（例えばヒト生殖系列フレームワーク）に由来する、少なくとも1、2、3、5、7、または8ア

ミノ酸残基を有する。好ましくは、組換え抗体の重鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片は：残基 5（バリン）、40（アラニン）、41（プロリン）、44（グリシン）、82a（セリン）、83（アルギニン）、87（スレオニン）、または108（ロイシン）（表4に示すようなKabat番号付け）からなる群より選択されるヒト重鎖可変フレームワーク由来の、少なくとも1アミノ酸残基を有する。

【0044】

脱免疫J591重鎖可変部中のアミノ酸置換を、以下の表4に提供する。左のパネルは、Kabat, E. A. ら（1991）上記にしたがったアミノ酸番号を示し；中央のパネルは、マウス配列中の残基の置換および対応するマウス残基を示し；そして右のパネルは、ヒト生殖系列における対応する位で、最も一般的な残基を示す。

10

【0045】

表4

【0046】

【表4】

位 Kabat 番号	マウス配列の 置換	ヒト生殖系列で最 も一般的な 残基
5	Q→V	V
11	L→V	L
12	V→K	V
16	T→A	G
17	S→T	S
19	R→K	R
40	S→A	A
41	H→P	P
44	S→G	G
75	S→T	K
76	S→D	N
82a	R→S	S
83	T→R	R
87	S→T	T
108	T→L	L

20

30

【0047】

他の態様において、修飾抗PSMA抗体の重鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片は：残基20、87、94、95、および112（表5に示すような直鎖番号付け）からなる群より選択される位で、非ヒト抗PSMA重鎖可変部（例えばネズミJ415重鎖可変部）と異なるか、またはヒト重鎖可変フレームワーク（例えばヒト成熟、コンセンサス、または生殖系列フレームワーク）に由来する、少なくとも1、2、3、4、5アミノ酸残基を有する。好ましくは、組換え抗体の重鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片は：残基20（イソロイシン）、87（セリン）、94（アラニン）、95（バリン）、および112（バリン）（表5に示すような直鎖番号付け）からなる群より選択されるヒト重鎖可変フレームワーク由来の、少なくとも1、2、3、4、5アミノ酸残基を有する。

40

【0048】

50

脱免疫 J 4 1 5 重鎖可変部中のアミノ酸置換を、以下の表 5 に提供する。左のパネルは、直鎖アミノ酸番号を示し；中央のパネルは、マウス配列中の残基の置換および対応するマウス残基を示し；そして右のパネルは、ヒト生殖系列における対応する位で、最も一般的な残基を示す。

【 0 0 4 9 】

表 5

【 0 0 5 0 】

【表 5】

位 Kabat 番号	マウス配列の 置換	ヒト生殖系列で 最も一般的な 残基
20	L→I	I
87	N→S	S
94	G→A	A
95	I→V	V
112	L→V	V

10

【 0 0 5 1 】

他の態様において、修飾抗 P S M A 抗体の重鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片には、配列番号 7（ネズミ J 5 9 1 由来；図 1 A を参照されたい）、配列番号 3 5（ネズミ J 4 1 5 由来；図 5 を参照されたい）、配列番号 1 0 9（ネズミ J 5 3 3 由来；図 9 A を参照されたい）、または配列番号 1 1 9（ネズミ E 9 9 由来；図 1 1 A を参照されたい）に示す重鎖可変フレームワーク、あるいは A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 2 6、H B - 1 2 1 0 9、H B - 1 2 1 2 7 または H B - 1 2 1 0 1 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の重鎖可変フレームワーク由来の、少なくとも 5 であるが、7 5 または 8 2 を超えないアミノ酸残基が含まれる。好ましくは、重鎖可変フレームワークは、非ヒト重鎖可変フレームワーク、例えば、それぞれ配列番号 7 または配列番号 3 5 に示すネズミ J 5 9 1 または J 4 1 5 重鎖可変フレームワーク、あるいは A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 2 6 または H B - 1 2 1 0 9 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の重鎖可変フレームワークと、少なくとも 6 0 %、6 5 %、7 0 %、8 0 %、8 2 %、8 5 %、9 0 %、または 9 4 % の同一性を有するか、あるいは少なくとも 5、1 0、2 0、または 3 0 残基、但し 1 0、2 0、3 0、または 4 0 未満の残基が異なる。他の態様において、非ヒト重鎖可変フレームワークは、ネズミ J 5 9 1 抗体（配列番号 7；図 1 A を参照されたい）由来、ネズミ J 4 1 5 抗体（配列番号 3 5；図 5 を参照されたい）由来、ネズミ J 5 3 3 抗体（配列番号 1 0 9；図 9 A を参照されたい）由来、またはネズミ E 9 9 抗体（配列番号 1 1 9；図 1 1 A を参照されたい）由来であるか、あるいは A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 2 6、H B - 1 2 1 0 9、H B - 1 2 1 2 7 または H B - 1 2 1 0 1 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の重鎖可変フレームワークである。

20

30

【 0 0 5 2 】

さらに他の態様において、修飾抗 P S M A 抗体の重鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片には、少なくとも 3、5、1 0、1 5、1 6、1 7、1 8、または 1 9 アミノ酸置換を有する、非ヒト（例えばネズミ）重鎖可変フレームワーク（例えばネズミ J 5 9 1 重鎖可変フレームワーク（図 1 A に示すような配列番号 7）、または A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 2 6 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の重鎖可変フレームワーク）が含まれる。1 つの態様において、修飾抗 P S M A 抗体の非ヒト重鎖可変フレームワークには：

40

少なくとも 4、5、または 6 の置換を有する、フレームワーク領域 1；

少なくとも 1、2、または 3 の置換を有する、フレームワーク領域 2；

少なくとも 3、4、または 5 の置換を有する、フレームワーク領域 3；あるいは

50

少なくとも1つの置換を有する、フレームワーク領域4
の1以上が含まれる。

【0053】

さらに他の態様において、修飾抗PSMA抗体の重鎖可変フレームワーク、またはその抗原結合断片には、少なくとも1、2、3、4、または5アミノ酸置換を有する、非ヒト（例えばネズミ）重鎖可変フレームワーク（例えばネズミJ415重鎖可変フレームワーク（図5に示すような配列番号35）、またはATCC寄託番号HB-12109を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の重鎖可変フレームワーク）が含まれる。1つの態様において、修飾抗PSMA抗体の非ヒト重鎖可変フレームワークには：

少なくとも1つの置換を有する、フレームワーク領域1；

少なくとも1、2、または3の置換を有する、フレームワーク領域3；あるいは

少なくとも1つの置換を有する、フレームワーク領域4
の1以上が含まれる。

【0054】

置換は：非ヒト残基の保存的置換、あるいは同一の位で、ヒト生殖系列、成熟またはコンセンサス配列に見られる残基、例えば同一の位のヒト生殖系列における最も一般的な残基から選択可能である。1つの態様において、重鎖可変フレームワークは、少なくとも3、4、5、6、そして好ましくは7の保存的置換を有する。好ましくは、重鎖可変フレームワークは、同一の位で、ヒト生殖系列において、最も一般的な残基による、少なくとも5、6、7、そして好ましくは8の置換を有する。

【0055】

いくつかの態様において、非ヒト重鎖可変フレームワークは：残基5、11、12、16、17、19、40、41、44、75、76、82a、83、87、および108（表3に示すようなKabab番号付け）からなる群より選択される位での、少なくとも1アミノ酸置換を有する。置換は：5（バリン）、11（バリン）、12（リジン）、16（アラニン）、17（スレオニン）、19（リジン）、40（アラニン）、41（プロリン）、44（グリシン）、75（スレオニン）、76（アスパラギン酸）、82a（セリン）、83（アルギニン）、87（スレオニン）、および108（ロイシン）（表4に示すようなKabab番号付け）の1以上から選択可能である。

【0056】

他の態様において、非ヒト重鎖可変フレームワークは：残基20、87、94、95および112（表5に示すような直鎖番号付け）からなる群より選択される位での、少なくとも1アミノ酸置換を有する。置換は：残基20（イソロイシン）、87（セリン）、94（アラニン）、95（バリン）、および112（バリン）（表5に示すような直鎖番号付け）の1以上から選択可能である。

【0057】

抗体J591、J415、J533およびE99の軽鎖および重鎖領域のフレームワーク領域のアミノ酸配列を、以下の表6に提供する。

表6：フレームワーク配列

【0058】

【表6A】

10

20

30

40

名称	生物	図	配列 番号	配列
V _H FR1-FR4 J591	マウス	図 1A	7	EVQLQQSGPELKKPGTSVRISCKTSWVKQS HGKSLEWIGKATLTVDKSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCAAWGQGTTTLTVSS
V _L FR1-FR4 J591	マウス	図 1B	8	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICWYQQKPG QSPKLLIYGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNV QSEDLADYFCFGAGTMLDLK
V _H FR1 (脱免疫) J591	人工的脱免疫 重鎖 J591	図 2A	9	EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTS
V _H FR2 (脱免疫) J591	人工的脱免疫 重鎖 J591	図 2A	10	WVKQAPGKGLEWIG
V _H FR3 (脱免疫) J591	人工的脱免疫 重鎖 J591	図 2A	11	KATLTVDKSTDYAYMELSSLRSEDTAVYYC AA
V _H FR4 (脱免疫) J591	人工的脱免疫 重鎖 J591	図 2A	12	WGQGTLTLTVSS
V _L FR1 (脱免疫) J591	人工的脱免疫 軽鎖 J591	図 2B	13	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTC
V _L FR2 (脱免疫) J591	人工的脱免疫 軽鎖 J591	図 2B	14	WYQQKPGPSPKLLIY
V _L FR3 (脱免疫) J591	人工的脱免疫 軽鎖 J591	図 2B	15	GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADY YC
V _L FR4 (脱免疫) J591	人工的脱免疫 軽鎖 J591	図 2B	16	FGPGTKVDIK
V _H FR1-FR4 (脱免疫) J591	人工的脱免疫 重鎖 J591	図 2A	17	EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSWVKQA PGKGLEWIGKATLTVDKSTDYAYMELSSLR SEDTAVYYCAAWGQGTTTLTVSS
V _L FR1-FR4 (脱免疫) J591	人工的脱免疫 軽鎖 J591	図 2B	18	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCWYQQKPG PSPKLLIYGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFADYYCFGPGTKVDIK
V _H FR1-FR4 J415	マウス	図 5	35	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVAVSWVRQS PEKGLEWVARVVISRDDSKSSVYLQMNNLR AEDTGIIYCTRWGQGTTTLTVSS
V _L FR1-FR4 J415	マウス	図 6	36	NIVMTQFPKSMISVGERVTLTWYQQKPE QSPKMLIYGVPDRFTGSGSATDFILTISV QTEDLVDIYCFGGGKLEMK

10

20

30

40

【 0 0 5 9 】

【 表 6 B 】

V _H FR1 (脱免疫) J415-4	人工的脱免疫 重鎖 J415-4	図 5	37	EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVAS
V _H FR2 (脱免疫) J415-4	人工的脱免疫 重鎖 J415-4	図 5	38	WVRQSPEKGLEWVA
V _H FR3 (脱免疫) J415-4	人工的脱免疫 重鎖 J415-4	図 5	39	RVII SRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTAVYYC TR
V _H FR4 (脱免疫) J415-4	人工的脱免疫 重鎖 J415-4	図 5	40	WGQGTTVTVSS
V _L FR1 (脱免疫) J415-5	人工的脱免疫 軽鎖 J415-5	図 6	41	NIVMTQFPKMSASAGERMTLTC
V _L FR2 (脱免疫) J415-5	人工的脱免疫 軽鎖 J415-5	図 6	42	WYQQKPTQSPKMLIY
V _L FR3 (脱免疫) J415-5	人工的脱免疫 軽鎖 J415-5	図 6	43	GVPDRFSGSGSGTDFILTISSVQAEDLV DY YC
V _L FR4 (脱免疫) J415-5	人工的脱免疫 軽鎖 J415-5	図 6	44	FGGGTKLEMK
V _H FR1-FR4 (脱免疫) J415-4	人工的脱免疫 重鎖 J415-4	図 5	45	EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASWVRQS PEKGLEWVARV IISRDDSKSSVYLQMNSLR AEDTAVYYCTRWGQGTTVTVSS
V _L FR1-FR4 (脱免疫) J415-5	人工的脱免疫 軽鎖 J415-5	図 6	46	NIVMTQFPKMSASAGERMTLTCWYQQKPT QSPKMLIYGVPDRFSGSGSGTDFILTISSV QAEDLVDIYCFGGGTKLEMK
V _H FR1 J533	マウス	図 9A	105	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS
V _H FR2 J533	マウス	図 9A	106	WVKQKPGQVLEWIG
V _H FR3 J533	マウス	図 9A	107	KATLTSDKYSSTAYMELSGLTSEDSAVYYC AR
V _H FR4 J533	マウス	図 9A	108	WGRGATLTVSS
V _H FR1-FR4 J533	マウス	図 9A	109	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASWVKQK PGQVLEWIGKATLTSDKYSSTAYMELSGLT SEDSAVYYCARWGRGATLTVSS
V _L FR1 J533	マウス	図 10A	110	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC
V _L FR2 J533	マウス	図 10A	111	WYQQKPGQPPNLLIF

10

20

30

40

【 0 0 6 0 】

【 表 6 C 】

V _L FR3 J533	マウス	図 10A	112	GIPARFSGSGSGTDFTLTIYPVEADDVATY YC
V _L FR4 J533	マウス	図 10A	113	FGGGTKLEIK
V _L FR1-FR4 J533	マウス	図 10A	114	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCWYQQKPG QPPNLLIFGIPARFSGSGSGTDFTLTIYPV EADDVATYYCFGGGTKLEIK
V _H FR1 E99	マウス	図 11A	115	QVQLKESGPGLVASSQSL SITCTVS
V _H FR2 E99	マウス	図 11A	116	WVRQPPGKGLEWLG
V _H FR3 E99	マウス	図 11A	117	RLNIFKDNSKNQVFLKMSSFQTDDTARYFC AR
V _H FR4 E99	マウス	図 11A	118	WGQGTTLTVSS
V _H FR1-FR4 E99	マウス	図 11A	119	QVQLKESGPGLVASSQSL SITCTVS WVRQP PGKLEWLGRLNIFKDNSKNQVFLKMSSFQ TDDTARYFCARWGQGTTLTVSS
V _L FR1 E99	マウス	図 12A	120	NIVMTQSQKFMSTSPGDRVRVTC
V _L FR2 E99	マウス	図 12A	121	WYQAKPGQSPRILY
V _L FR3 E99	マウス	図 12A	122	GVPDRFTAYGSGTDFTLTITNVQSEDLTEY FC
V _L FR4 E99	マウス	図 12A	123	FGAGTKLELK
V _L FR1-FR4 E99	マウス	図 12A	124	NIVMTQSQKFMSTSPGDRVRVTCWYQAKPG QSPRILYGVDPDRFTAYGSGTDFTLTITNV QSEDLTEYFCFGAGTKLELK

10

20

30

40

50

【0061】

他の態様において、抗 P S M A 抗体、またはその抗原結合断片には、少なくとも 1 つの軽鎖または重鎖の免疫グロブリン、あるいは好ましくは、少なくとも 1 つの軽鎖免疫グロブリンおよび少なくとも 1 つの重鎖免疫グロブリンが含まれる。好ましくは、軽鎖免疫グロブリンには、非ヒト、例えばネズミ、抗 P S M A 軽鎖可変部（例えば、それぞれ配列番号 20（図 1 B を参照されたい）または配列番号 48（図 6 を参照されたい）に示すネズミ J 591 または J 415 軽鎖可変部、あるいは A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 2 6 または 1 2 1 0 9 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の軽鎖可変部）由来の 3 つの C D R、並びに：残基 3、8、9、10、11、20、21、22、42、58、60、63、76、77、78、80、83、87、100、103、104 および 106（表 2 におけるような K a b a t 番号付け）、または残基 13、15、19、41、63、68、および 80（表 3 におけるような直鎖番号付け）からなる群より選択される、1、2、3、4、5、6、7 またはそれ以上の位で、非ヒト、例えばネズミ、抗 P S M A 軽鎖フ

フレームワーク（例えば、それぞれ配列番号 8（図 1 B を参照されたい）または配列番号 36（図 6 を参照されたい）に示すネズミ J 5 9 1 または J 4 1 5 軽鎖フレームワーク、あるいは A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 2 6 または 1 2 1 0 9 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の軽鎖可変フレームワーク）と異なる軽鎖フレームワークを含んでなる、非ヒト軽鎖可変部が含まれる。

【0062】

他の好ましい態様において、重鎖免疫グロブリンには、非ヒト、例えばネズミ、抗 P S M A 重鎖可変部（例えば、それぞれ配列番号 19（図 1 A を参照されたい）または配列番号 47（図 5 を参照されたい）に示すネズミ J 5 9 1 または J 4 1 5 重鎖可変部、あるいは A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 2 6 または H B - 1 2 1 0 9 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の重鎖可変部）由来の 3 つの相補性決定領域（C D R）、並びに：残基 5、11、12、16、17、19、40、41、44、75、76、82 a、83、87、および 108（表 4 におけるような K a b a t 番号付け）、または残基 20、87、94、95 および 112（表 5 におけるような直鎖番号付け）からなる群より選択される、1、2、3、4、5 またはそれ以上の位で、非ヒト、例えばネズミ、抗 P S M A 重鎖フレームワーク（例えば、それぞれ配列番号 7（図 1 A を参照されたい）または配列番号 35（図 5 を参照されたい）に示すネズミ J 5 9 1 または J 4 1 5 重鎖可変部、あるいは A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 2 6 または 1 2 1 0 9 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の重鎖可変フレームワーク）と異なる修飾重鎖フレームワークを含んでなる、非ヒト重鎖可変部が含まれる。

【0063】

さらに他の態様において、修飾抗 P S M A 抗体、またはその抗原結合断片には、少なくとも 1 つの軽鎖または重鎖の免疫グロブリン、あるいはより好ましくは、少なくとも 1 つの軽鎖免疫グロブリンおよび少なくとも 1 つの重鎖免疫グロブリンが含まれる。好ましくは、軽鎖免疫グロブリンには、非ヒト、例えばネズミ、抗 P S M A 軽鎖可変部（例えば配列番号 20（図 1 B を参照されたい）に示すネズミ J 5 9 1 軽鎖可変部、または A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 2 6 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の軽鎖可変部）由来の 3 つの C D R、並びに：

残基 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 または 13 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 1～13 の 1 以上を含む T 細胞エпитープ（図 3 B におけるような番号付け）；

残基 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 8～20 の 1 以上を含む T 細胞エпитープ（図 3 B におけるような番号付け）；

残基 17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 または 29 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 17～29 の 1 以上を含む T 細胞エпитープ（図 3 B におけるような番号付け）；

残基 27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38 または 39 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 27～39 の 1 以上を含む T 細胞エпитープ（図 3 B におけるような番号付け）；

残基 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42 または 43 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 30～43 の 1 以上を含む T 細胞エпитープ（図 3 B におけるような番号付け）；

残基 45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、または 57 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 45～57 の 1 以上を含む T 細胞エпитープ（図 3 B におけるような番号付け）；

残基 56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、または 68 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 56～68 の 1 以上を含む T 細胞エпитープ（図 3 B におけるような番号付け）；

残基 71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、また

10

20

30

40

50

は 83 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 71 ～ 83 の 1 以上を含む T 細胞エピトープ（図 3 B におけるような番号付け）；

残基 73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84 または 85 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 73 ～ 85 の 1 以上を含む T 細胞エピトープ（図 3 B におけるような番号付け）；および

残基 94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、または 106 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 94 ～ 106 の 1 以上を含む T 細胞エピトープ（図 3 B におけるような番号付け）

からなる群より選択される、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個の位で、非ヒト抗 P S M A 軽鎖可変部、例えばネズミ J 591 軽鎖可変部（配列番号 20 または A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 2 6 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の軽鎖可変部）のフレームワークとは異なる修飾軽鎖フレームワークを含んでなる、修飾非ヒト軽鎖可変部が含まれる。

10

【0064】

さらに他の態様において、抗 P S M A 抗体、またはその抗原結合断片には、少なくとも 1 つの軽鎖または重鎖の免疫グロブリン、あるいはより好ましくは、少なくとも 1 つの軽鎖免疫グロブリンおよび少なくとも 1 つの修飾重鎖免疫グロブリンが含まれる。好ましくは、軽鎖免疫グロブリンには、非ヒト、例えばネズミ、抗 P S M A 軽鎖可変部（例えば配列番号 48（図 37）に示すネズミ J 415 軽鎖可変部、または A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 0 9 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の軽鎖可変部）由来の 3 つの C

20

D R、並びに：

残基 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 または 18 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 5 ～ 18 の 1 以上を含む T 細胞エピトープ（図 6 におけるような直鎖番号付け）；

残基 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または 24 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 11 ～ 24 の 1 以上を含む T 細胞エピトープ（図 6 におけるような直鎖番号付け）；

残基 13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または 26 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 13 ～ 26 の 1 以上を含む T 細胞エピトープ（図 6 におけるような直鎖番号付け）；

30

残基 17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または 30 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 17 ～ 30 の 1 以上を含む T 細胞エピトープ（図 6 におけるような直鎖番号付け）；

残基 27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または 40 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 27 ～ 40 の 1 以上を含む T 細胞エピトープ（図 6 におけるような直鎖番号付け）；

残基 31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、または 44 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 31 ～ 44 の 1 以上を含む T 細胞エピトープ（図 6 におけるような直鎖番号付け）；

残基 56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、または 69 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 56 ～ 69 の 1 以上を含む T 細胞エピトープ（図 6 におけるような直鎖番号付け）；

40

残基 60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、または 73 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 60 ～ 73 の 1 以上を含む T 細胞エピトープ（図 6 におけるような直鎖番号付け）；

残基 70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、または 83 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 70 ～ 83 の 1 以上を含む T 細胞エピトープ（図 6 におけるような直鎖番号付け）；

残基 71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83 または 84 の 1 つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基 71 ～ 84 の 1 以上を

50

含むT細胞エピトープ（図6におけるような直鎖番号付け）；

残基73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85
または86の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基73～86の1以上を
含むT細胞エピトープ（図6におけるような直鎖番号付け）；

残基76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88
、89、90、91、または92の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基
76～92の1以上を含むT細胞エピトープ（図6におけるような直鎖番号付け）；およ
び

残基81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93
、または94の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基81～94の1以上 10
を含むT細胞エピトープ（図6におけるような直鎖番号付け）

からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5、6、7個の位で、非ヒト抗
P S M A 軽鎖可変部、例えばネズミJ 4 1 5 軽鎖可変部（配列番号48またはA T C C 寄
託番号H B - 1 2 1 0 9を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の軽鎖可変部）
のフレームワークとは異なる軽鎖フレームワークを含んでなる、修飾非ヒト軽鎖可変部が
含まれる。

【0065】

他の態様において、抗P S M A抗体の重鎖免疫グロブリン、またはその抗原結合断片には
、非ヒト、例えばネズミ、抗P S M A重鎖可変部（例えば配列番号19（図1Aを参照さ
れたい）に示すネズミJ 5 9 1重鎖可変部、またはA T C C 寄託番号H B - 1 2 1 2 6を 20
有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の重鎖可変部）由来の3つのC D R、並び
に：

残基2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14の1つ以上
の、範囲内または隣接する位、あるいは残基2～14の1以上を含むT細胞エピトープ（
図3Aにおけるような番号付け）；

残基10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、また
は22の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基10～22の1以上を含む
T細胞エピトープ（図3Aにおけるような番号付け）；

残基16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、また
は28の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基16～28の1以上を含む 30
T細胞エピトープ（図3Aにおけるような番号付け）；

残基30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、また
は42の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基30～42の1以上を含む
T細胞エピトープ（図3Aにおけるような番号付け）；

残基32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、また
は44の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基32～44の1以上を含む
T細胞エピトープ（図3Aにおけるような番号付け）；

残基43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、また
は55の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基43～55の1以上を含む 40
T細胞エピトープ（図3Aにおけるような番号付け）；

残基46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、また
は58の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基46～58の1以上を含む
T細胞エピトープ（図3Aにおけるような番号付け）；

残基58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、また
は70の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基58～70の1以上を含む
T細胞エピトープ（図3Aにおけるような番号付け）；

残基62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73または
74の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基62～74の1以上を含むT
細胞エピトープ（図3Aにおけるような番号付け）；

残基70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80または81の 50

1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基70～81の1以上を含むT細胞エピトープ（図3Aにおけるような番号付け）；

残基81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、または93の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基81～93の1以上を含むT細胞エピトープ（図3Aにおけるような番号付け）；

残基84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、95、または96の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基84～96の1以上を含むT細胞エピトープ（図3Aにおけるような番号付け）；

残基91、92、93、95、96、97、98、99、100、101、102、または103の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基91～103の1以上を含むT細胞エピトープ（図3Aにおけるような番号付け）；および

残基100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、または112の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基100～112の1以上を含むT細胞エピトープ（図3Aにおけるような番号付け）からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、5、7、10個の位で、非ヒト抗PSMA重鎖可変部（例えば配列番号19のネズミJ591重鎖可変部またはATCC寄託番号HB-12126を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の重鎖可変フレームワーク）のフレームワークとは異なる重鎖フレームワークを含んでなる、非ヒト重鎖可変部が含まれる。

【0066】

他の態様において、抗PSMA抗体の重鎖免疫グロブリン、またはその抗原結合断片には、非ヒト、例えばネズミ、抗PSMA重鎖可変部（例えば配列番号47（図5を参照されたい））に示すネズミJ415重鎖可変部、またはATCC寄託番号HB-12109を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の重鎖可変部）由来の3つのCDR、並びに：

残基10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基10～23の1以上を含むT細胞エピトープ（図5におけるような番号付け）；

残基16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基16～29の1以上を含むT細胞エピトープ（図5におけるような番号付け）；

残基21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、または34の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基21～34の1以上を含むT細胞エピトープ（図5におけるような番号付け）；

残基30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、または43の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基30～43の1以上を含むT細胞エピトープ（図5におけるような番号付け）；

残基35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、または48の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基35～48の1以上を含むT細胞エピトープ（図5におけるような番号付け）；

残基43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、または56の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基43～56の1以上を含むT細胞エピトープ（図5におけるような番号付け）；

残基46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58または59の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基46～59の1以上を含むT細胞エピトープ（図5におけるような番号付け）；

残基49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、または62の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基49～62の1以上を含むT細胞エピトープ（図5におけるような番号付け）；

残基64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76

、または77の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基64～77の1以上を含むT細胞エピトープ（図5におけるような番号付け）；

残基80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、または93の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基80～93の1以上を含むT細胞エピトープ（図5におけるような番号付け）；

残基86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基86～99の1以上を含むT細胞エピトープ（図5におけるような番号付け）；および

残基104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、または117の1つ以上の、範囲内または隣接する位、あるいは残基104～117の1以上を含むT細胞エピトープ（図5におけるような番号付け）

からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5個の位で、非ヒト抗PSMA重鎖可変部（例えば配列番号47のネズミJ591重鎖可変部またはATCC寄託番号HB-12109を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の重鎖可変フレームワーク）のフレームワークとは異なる重鎖フレームワークを含んでなる、非ヒト重鎖可変部が含まれる。

【0067】

さらに他の態様において、抗PSMA抗体、またはその抗原結合断片には、少なくとも1つの軽鎖または重鎖の免疫グロブリン、あるいはより好ましくは、少なくとも1つの軽鎖免疫グロブリンおよび少なくとも1つの重鎖免疫グロブリンが含まれる。好ましくは、軽鎖免疫グロブリンには、非ヒト、例えばネズミ、抗PSMA軽鎖可変部（例えば配列番号20（図1B）に示すネズミJ591軽鎖可変部、またはATCC寄託番号HB-12126を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の軽鎖可変部）由来の3つのCDR、並びに非ヒト抗PSMA軽鎖可変部、例えばネズミJ591軽鎖可変部のフレームワークと、少なくとも1つの位で異なるが、1、2、4～7、12～19、23、31～41、43～49、57、59、61、62、64～75、79、82、83、85～87、89、98、99、101、102、105、および106（図3Bにおけるような番号付け）からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、5、7、10、15、または20残基で、非ヒト抗PSMA軽鎖可変部由来の残基を有する、軽鎖フレームワークを含んでなる、非ヒト軽鎖可変部が含まれる。軽鎖フレームワークは、3、8、9、10、11、20、21、22、42、58、60、63、76、77、78、80、83、87、100、103、および104（図3Bにおけるような番号付け）からなる群より選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、19、20またはそれ以上の残基から選択される位で、異なることが可能である。

【0068】

さらに他の態様において、抗PSMA抗体、またはその抗原結合断片には、少なくとも1つの軽鎖または重鎖の免疫グロブリン、あるいはより好ましくは、少なくとも1つの軽鎖免疫グロブリンおよび少なくとも1つの重鎖免疫グロブリンが含まれる。好ましくは、修飾軽鎖免疫グロブリンには、非ヒト、例えばネズミ、抗PSMA軽鎖可変部（例えば配列番号48（図6）に示すネズミJ415軽鎖可変部、またはATCC寄託番号HB-12109を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の軽鎖可変部）由来の3つのCDR、並びに非ヒト抗PSMA軽鎖可変部、例えばネズミJ415軽鎖可変部のフレームワークと、少なくとも1つの位で異なるが、1～12、14、16～18、20～40、42～62、64～67、69～79、および81～107（図6におけるような直鎖番号付け）からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、5、7、10、15、または20残基で、非ヒト抗PSMA軽鎖可変部由来の残基を有する、軽鎖フレームワークを含んでなる、非ヒト軽鎖可変部が含まれる。修飾軽鎖フレームワークは、13、15、19、41、63、68および80（図6におけるような直鎖番号付け）からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5、6、または7位で、異なることが可能である。

【0069】

他の態様において、修飾抗 P S M A 抗体の重鎖免疫グロブリン、またはその抗原結合断片には、非ヒト、例えばネズミ、抗 P S M A 重鎖可変部（例えば配列番号 19（図 1 A）に示すネズミ J 5 9 1 重鎖可変部、または A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 2 6 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の重鎖可変部）由来の 3 つの C D R、並びに非ヒト抗 P S M A 重鎖可変部のフレームワークと、少なくとも 1 つの位で異なるが、1 ~ 4、6 ~ 10、13 ~ 15、18、20 ~ 25、36 ~ 39、42、43、45 ~ 49、67 ~ 75、78 ~ 83、85、86、88 ~ 90、92 ~ 98、105 ~ 109、および 111 ~ 115（図 3 A におけるような番号付け）からなる群より選択される、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または 14 残基で、非ヒト抗 P S M A 重鎖可変部由来の残基を有する、修飾重鎖フレームワークを含んでなる、非ヒト重鎖可変部が含まれる。修飾重鎖フレームワークは、5、11 ~ 12、16 ~ 17、19、26 ~ 35、40 ~ 41、44、50 ~ 66、76 ~ 77、84、87、91、99 ~ 104、および 110（図 3 A におけるような番号付け）からなる群より選択される、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または 14 位で、異なることが可能である。

【0070】

他の態様において、抗 P S M A 抗体の重鎖免疫グロブリン、またはその抗原結合断片には、非ヒト、例えばネズミ、抗 P S M A 重鎖可変部（例えば配列番号 47（図 5）に示すネズミ J 4 15 重鎖可変部、または A T C C 寄託番号 H B - 1 2 1 0 9 を有するハイブリドーマ細胞株に産生される抗体の重鎖可変部）由来の 3 つの C D R、並びに非ヒト抗 P S M A 重鎖可変部のフレームワークと、少なくとも 1 つの位で異なるが、1 ~ 19、21 ~ 86、88 ~ 93、96 ~ 111、および 113 ~ 116（図 5 におけるような番号付け）からなる群より選択される、少なくとも 1、2、3、4、または 5 残基で、非ヒト抗 P S M A 重鎖可変部由来の残基を有する、重鎖フレームワークを含んでなる、非ヒト重鎖可変部が含まれる。重鎖フレームワークは、20、87、94、95 および 112（図 5 に示すような番号付け）からなる群より選択される位で、異なることが可能である。

【0071】

さらに別の側面において、抗 P S M A 抗体の重鎖免疫グロブリン、またはその抗原結合断片には下記残基：残基 1（グルタミン酸）、2（バリン）、4（ロイシン）、7（セリン）、8（グリシン）、11（ロイシン）、14（プロリン）、15（グリシン）、19（リジン）、20（イソロイシン）、21（セリン）、22（システイン）、25（セリン）、26（グリシン）、28（スレオニン）、29（フェニルアラニン）、32（チロシン）、36（トリプトファン）、37（バリン）、38（アルギニン／リジン）、39（グルタミン）、41（プロリン）、43（リジン）、44（グリシン）、45（ロイシン）、46（グルタミン酸）、47（トリプトファン）、51（イソロイシン）、67（アルギニン／リジン）、73（アスパラギン酸）、75（セリン）、80（チロシン）、85（セリン）、86（ロイシン）、87（アルギニン）、89（グルタミン酸）、90（アスパラギン酸）、91（スレオニン）、92（アラニン）、93（バリン）、94（チロシン）、95（チロシン）96（システイン）、100（トリプトファン）、101（アスパラギン）、105（トリプトファン）、106（グリシン）、107（グルタミン）、108（グリシン）、109（スレオニン）、112（スレオニン）、113（バリン）、114（セリン）、または 115（セリン）（図 3 A に示すような直鎖番号付け）の 1 以上より選択され、そして該残基の 1 以上より選択される位に位置する、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、25、30、35、40、45、または 50 アミノ酸残基を含んでなる、重鎖可変部が含まれる。

【0072】

1 つの態様において、抗 P S M A 抗体の重鎖免疫グロブリン、またはその抗原結合断片には：
残基 1（グルタミン酸）、2（バリン）、4（ロイシン）、7（セリン）、8（グリシン）

)、11(ロイシン)、14(プロリン)、15(グリシン)、19(リジン)、20(イソロイシン)、21(セリン)、22(システイン)、および25(セリン)(図3Aに示すような直鎖番号付け)からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13アミノ酸を有する、フレームワーク領域1；
残基26(グリシン)、28(スレオニン)、29(フェニルアラニン)、および32(チロシン)(図3Aに示すような直鎖番号付け)からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4アミノ酸を有する、CDR1；

残基36(トリプトファン)、37(バリン)、38(アルギニン/リジン)、39(グルタミン)、41(プロリン)、43(リジン)、44(グリシン)、45(ロイシン)、46(グルタミン酸)、および47(トリプトファン)(図3Aに示すような直鎖番号付け)からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10アミノ酸を有する、フレームワーク領域2；

51位(図3Aに示すような直鎖番号付け)での少なくとも1つのイソロイシンを有する、CDR2；

残基67(アルギニン/リジン)、73(アスパラギン酸)、75(セリン)、80(チロシン)、85(セリン)、86(ロイシン)、87(アルギニン)、89(グルタミン酸)、90(アスパラギン酸)、91(スレオニン)、92(アラニン)、93(バリン)、94(チロシン)、95(チロシン)、および96(システイン)(図3Aに示すような直鎖番号付け)からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14アミノ酸を有する、フレームワーク領域3；

残基100(トリプトファン)および101(アスパラギン)(図3Aに示すような直鎖番号付け)からなる群より選択される、少なくとも1、2アミノ酸を有する、CDR3；
または

残基105(トリプトファン)、106(グリシン)、107(グルタミン)、108(グリシン)、109(スレオニン)、112(スレオニン)、113(バリン)、114(セリン)、および115(セリン)(図3Aに示すような直鎖番号付け)からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9アミノ酸を有する、フレームワーク領域4の1以上が含まれる。

【0073】

さらに別の態様において、修飾抗PSMA抗体の軽鎖免疫グロブリン、またはその抗原結合断片には下記残基：残基2(イソロイシン)、4(メチオニン)、5(スレオニン)、6(グルタミン)、8(プロリン)、10(セリン)、12(セリン)、14(セリン)、16(グリシン)、17(グルタミン酸/アスパラギン酸)、18(アルギニン)、20(スレオニン)、21(ロイシン)、22(スレオニン)、23(システイン)、24(リジン)、25(アラニン)、26(セリン)、29(バリン)、30(グリシン)、31(スレオニン)、33(バリン)、35(トリプトファン)、36(チロシン)、37(グルタミン)、38(グルタミン)、39(リジン)、40(プロリン)、43(セリン)、44(プロリン)、45(リジン)、47(ロイシン)、48(イソロイシン)、49(チロシン)、51(アラニン)、52(セリン)、54(アルギニン)、56(スレオニン)、57(グリシン)、59(プロリン)、61(アルギニン)、62(フェニルアラニン)、63(セリン)、64(グリシン)、65(セリン)、66(グリシン)、67(セリン)、68(グリシン)、69(スレオニン)、70(アスパラギン酸)、71(フェニルアラニン)、73(ロイシン)、74(スレオニン)、75(スレオニン)、76(セリン)、77(セリン)、79(グルタミン)、81(グルタミン酸)、82(アスパラギン酸)、85(アスパラギン酸)、86(チロシン)、87(チロシン)、88(システイン)、90(グルタミン)、95(プロリン)、97(スレオニン)、98(フェニルアラニン)、99(グリシン)、101(グリシン)、102(スレオニン)、103(リジン)、105(グルタミン酸/アスパラギン酸)または107(リジン)(図3Bにおけるような直鎖番号付け)の1以上より選択され、そして該残基の1以上より選択される位に位置する、少なくとも、1、2、3、4、5、6、7、8、9、

10、11、12、13、14、20、30、40、50、60、または70アミノ酸を含んでなる、軽鎖可変部が含まれる。

【0074】

1つの態様において、抗PSMA抗体の軽鎖免疫グロブリン、またはその抗原結合断片には：

残基2（イソロイシン）、4（メチオニン）、5（スレオニン）、6（グルタミン）、8（プロリン）、10（セリン）、12（セリン）、14（セリン）、16（グリシン）、17（グルタミン酸／アスパラギン酸）、18（アルギニン）、20（スレオニン）、21（ロイシン）、22（スレオニン）、および23（システイン）（図3Bに示すような直鎖番号付け）からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15アミノ酸を有する、フレームワーク領域1； 10

残基24（リジン）、25（アラニン）、26（セリン）、29（バリン）、30（グリシン）、31（スレオニン）、および33（バリン）（図3Bに示すような直鎖番号付け）からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5、6、7アミノ酸を有する、CDR1；

残基35（トリプトファン）、36（チロシン）、37（グルタミン）、38（グルタミン）、39（リジン）、40（プロリン）、43（セリン）、44（プロリン）、45（リジン）、47（ロイシン）、48（イソロイシン）、および49（チロシン）（図3Bに示すような直鎖番号付け）からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12アミノ酸を有する、フレームワーク領域2； 20

残基51（アラニン）、52（セリン）、54（アルギニン）、および56（スレオニン）（図3Bに示すような直鎖番号付け）からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4アミノ酸を有する、CDR2；

残基59（プロリン）、61（アルギニン）、62（フェニルアラニン）、63（セリン）、64（グリシン）、65（セリン）、66（グリシン）、67（セリン）、68（グリシン）、69（スレオニン）、70（アスパラギン酸）、71（フェニルアラニン）、73（ロイシン）、74（スレオニン）、75（スレオニン）、76（セリン）、77（セリン）、79（グルタミン）、81（グルタミン酸）、82（アスパラギン酸）、85（アスパラギン酸）、86（チロシン）、87（チロシン）、および88（システイン）（図3Bに示すような直鎖番号付け）からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、21、22、23、24アミノ酸を有する、フレームワーク領域3； 30

残基90（グルタミン）、95（プロリン）、97（スレオニン）、および98（フェニルアラニン）（図3Bに示すような直鎖番号付け）からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4アミノ酸を有する、CDR3；または

残基99（グリシン）、101（グリシン）、102（スレオニン）、103（リジン）、105（グルタミン酸／アスパラギン酸）、および107（リジン）（図3Bに示すような直鎖番号付け）からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5、6アミノ酸を有する、フレームワーク領域4の1以上が含まれる。

【0075】

本明細書に記載する抗PSMA抗体、例えば修飾抗PSMA抗体、またはその抗原結合断片は、単独で使用可能であり、例えば、非誘導体型または非コンジュゲート型で、被験者に投与可能であるし、または *in vitro* で使用可能である。他の態様において、抗PSMA抗体、またはその抗原結合断片を、誘導体化するか、または別の分子実体、典型的には標識もしくは療法（例えば細胞傷害性または細胞分裂抑制性）剤に連結することが可能である。分子実体は、例えば別のペプチド、タンパク質（例えば組換えウイルス粒子の例えばウイルスコートタンパク質を含む）、非ペプチド化学的化合物、同位体などであることが可能である。抗PSMA抗体、またはその抗原結合断片を、例えば化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合、または別の方式で、1以上の他の分子実体に、機能可能であるように連結することが可能である。例えば、抗PSMA抗体、またはその抗原結 40 50

合断片を、蛍光標識、生物学的活性酵素標識、放射性同位体（例えば放射性イオン）、核磁気共鳴活性標識、発光標識、または発色団などの標識にカップリングすることが可能である。他の態様において、抗 P S M A 抗体、またはその抗原結合断片を、療法剤、例えば細胞傷害性部分、例えば療法薬剤、放射性同位体、植物、真菌、もしくは細菌起源の分子、または生物学的タンパク質（例えばタンパク質毒素）もしくは粒子（例えばウイルスコートタンパク質を介して、例えば組換えウイルス粒子に）、あるいはそれらの混合物にカップリングすることが可能である。療法剤は、細胞内で活性である薬剤または他の剤、例えば本明細書に記載するような、短距離高エネルギー α 放射体（エミッター）を含む、短距離放射能放射体であることが可能である。いくつかの好ましい態様において、抗 P S M A 抗体、またはその抗原結合断片を、植物または細菌起源の分子（またはその誘導體）、例えばメイタンシノイド（例えばメイタンシノールまたは D M 1 メイタンシノイド、図 1 5 を参照されたい）、タキサン、またはカリケアマイシンにカップリングすることが可能である。放射性同位体は、 α 、 β 、または γ 放射体、あるいは β および γ 放射体であることが可能である。療法剤として有用な放射性同位体には、イットリウム (^{90}Y)、ルテチウム (^{177}Lu)、アクチニウム (^{225}Ac)、プラセオジウム、アスタチン (^{211}At)、レニウム (^{186}Re)、ビスマス (^{212}Bi または ^{213}Bi)、およびロジウム (^{188}Rh) が含まれる。例えば診断剤で使用するための、標識として有用な放射性同位体には、ヨウ素 (^{131}I または ^{125}I)、インジウム (^{111}In)、テクネチウム (^{99m}Tc)、リン (^{32}P)、炭素 (^{14}C)、およびトリチウム (^3H)、または上に列挙される療法的同位体の 1 つが含まれる。また抗 P S M A 抗体、またはその抗原結合断片を、別の抗体に連結して、例えば二特異性または多特異性抗体を形成することが可能である。

10

20

【0076】

別の側面において、本発明は、例えば共有結合によって、プロテオソーム阻害剤またはトポイソメラーゼ阻害剤にカップリングした抗 P S M A 抗体、例えば本明細書に記載する抗体を特徴とする。[(1 R) - 3 - メチル - 1 - [[(2 S) - 1 - オキソ - 3 - フェニル - 2 - [(3 - メルカプトアセチル) アミノ] プロピル] アミノ] ブチル] ボロン酸が適切なプロテオソーム阻害剤である。N, N' - ビス [2 - (9 - メチルフェナジン - 1 - カルボキサミド) エチル] - 1, 2 - エタンジアミンが適切なトポイソメラーゼ阻害剤である。

30

【0077】

別の側面において、本発明は、薬剤的に許容しうるキャリアー、賦形剤または安定化剤、および少なくとも 1 つの抗 P S M A 抗体、例えば本明細書に記載する修飾抗 P S M A 抗体（またはその断片）を含む、組成物、例えば薬剤組成物を提供する。好ましい態様において、抗体を標識または療法剤にコンジュゲート化する。1 つの態様において、組成物、例えば薬剤組成物は、前述の抗 P S M A 抗体の 2 以上の組み合わせを含んでなる。例えば、組成物、例えば薬剤組成物は、例えば、別の抗 P S M A 抗体、または別の腫瘍細胞関連抗原、例えば E G F 受容体、H e r - 2 / n e u などに対する抗体と組み合わせた、脱免疫 J 5 9 1 抗体を含んでなる。抗 P S M A 抗体および薬剤、例えば療法剤（例えば細胞傷害性薬剤または細胞分裂抑制性薬剤、例えば、D M 1、カリケアマイシン、またはタキサン、トポイソメラーゼ阻害剤、または免疫調節剤、例えば I L - 1、2、4、6、または 1 2、インターフェロン・アルファまたはガンマ、あるいは G M - C S F などの免疫細胞増殖因子）の組み合わせもまた、本発明の範囲内である。

40

【0078】

本発明はまた、本明細書に記載する重鎖および軽鎖の免疫グロブリンをコードする核酸配列も特徴とする。例えば、本発明は、本明細書に記載するような修飾抗 P S M A 抗体分子の、それぞれ、修飾重鎖および軽鎖の可変部をコードする、第一の核酸および第二の核酸を特徴とする。別の側面において、本発明は、本発明の核酸を含有する宿主細胞およびベクターを特徴とする。

【0079】

50

別の側面において、本発明は、抗 P S M A 抗体、例えば修飾抗 P S M A 抗体、またはその抗原結合断片を産生する方法を特徴とする。該方法は：

重鎖可変部、例えば本明細書に記載するような修飾重鎖可変部をコードする第一の核酸を提供し；

軽鎖可変部、例えば本明細書に記載するような修飾軽鎖可変部をコードする第二の核酸を提供し；そして

前記の第一の核酸および第二の核酸を、前記軽鎖および重鎖の可変部の発現および組み立てを可能にする条件下で、宿主細胞に導入する

ことを含む。

【0080】

第一の核酸および第二の核酸は、連結されることも、またはされないことも可能であり、例えば、それぞれ、同一のまたは異なるベクター上に発現されることが可能である。

宿主細胞は、真核細胞、例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、または原核細胞、例えば大腸菌 (E. coli) であることが可能である。例えば、哺乳動物細胞は、培養細胞または細胞株であることが可能である。典型的な哺乳動物細胞には、リンパ球細胞株 (例えば NS0)、チャイニーズハムスター卵巢細胞 (CHO)、COS 細胞、卵母細胞、およびトランスジェニック動物由来の細胞、例えば乳腺上皮細胞が含まれる。例えば、本明細書に記載する修飾抗体をコードする核酸を、トランスジェニック動物において発現することが可能である。1つの態様において、核酸は、組織特異的プロモーター (例えば乳腺特異的プロモーター) の制御下に置かれ、そしてトランスジェニック動物において、抗体が産生される。例えば、抗体分子は、トランスジェニックウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギまたはげっ歯類などのトランスジェニック動物のミルク中に分泌される。

【0081】

本発明はまた、細胞、例えば前立腺細胞 (例えば癌性または非癌性前立腺細胞、例えば正常、良性または過形成性前立腺上皮細胞)、または悪性非前立腺細胞、例えば P S M A を発現する血管系、軟組織腫瘍、もしくは転移性病変を有する非前立腺固形腫瘍に見られる細胞 (例えば腎臓、尿路上皮 (例えば膀胱)、結腸、直腸、肺、乳房または肝臓の癌および/またはその転移に見られる細胞) を除去するかまたは殺す方法も特徴とする。本発明の方法には、該細胞、または近くの細胞、例えば該細胞に近接する血管内皮細胞を、該細胞を除去するかまたは殺すのに十分な量の、本明細書に記載するような抗 P S M A 抗体、例えば修飾抗 P S M A 抗体と接触させることが含まれる。あるいは、本明細書に記載するような抗 P S M A 抗体、例えば修飾抗 P S M A 抗体、好ましくは修飾抗 P S M A 抗体断片を、ウイルス粒子、例えばウイルス粒子のコートタンパク質にコンジュゲート化することが可能である。抗 P S M A /ウイルス粒子コンジュゲートを用いて、細胞に感染し、そして例えばアポトーシス促進性遺伝子を発現させる遺伝子操作ウイルス粒子で、前立腺細胞、例えば癌性前立腺細胞をターゲティングし、それによって、該細胞を殺すか、または細胞増殖を阻害することが可能である。

【0082】

該方法は、例えば *in vitro* または *ex vivo* で、培養中の細胞に使用可能である。例えば、前立腺細胞 (例えば悪性または正常、良性または過形成性前立腺上皮細胞) または非前立腺癌性細胞または転移性細胞 (例えば腎臓、尿路上皮 (例えば膀胱)、精巢、結腸、直腸、肺 (例えば非小細胞肺癌)、乳房、肝臓、神経 (例えば神経内分泌)、グリア (例えばグリア芽腫)、脾臓 (例えば脾管)、黒色腫 (例えば悪性黒色腫)、または軟組織肉腫の癌性細胞) を、培地中、*in vitro* で培養することが可能であり、そして接触工程は、修飾抗 P S M A 抗体またはその断片を培地に添加することによって、達成可能である。該方法は、*in vivo* (例えば療法または予防) プロトコルの一部として、被験者に存在する細胞 (例えば前立腺細胞または非前立腺癌性細胞または転移性細胞) に対して行うことが可能である。

【0083】

本発明の方法を用いて、障害、例えば前立腺障害 (例えば癌性または非癌性前立腺障害、

10

20

30

40

50

例えば良性または過形成性前立腺障害）、または非前立腺障害（例えば癌、例えば悪性癌）を治療するかまたは防止するのに有効な量で、被験者に、本明細書に記載する抗体、好ましくは修飾 P S M A 抗体、またはその抗原結合断片を投与することによって、こうした障害を例えば治療するかまたは防止することが可能である。特に好ましい抗体には、J 5 9 1、J 4 1 5、J 5 3 3 または E 9 9 のいずれか由来の C D R を有する修飾抗体、そして特に、これらの抗体の脱免疫型、特に d e J 5 9 1 または d e J 4 1 5 が含まれる。治療または防止可能な前立腺障害の例には、限定されるわけではないが、前立腺炎におけるような尿生殖器炎症（例えば平滑筋細胞の炎症）；良性腫脹、例えば結節過形成（良性前立腺肥大または過形成）；並びに前立腺および／または精巣腫瘍の癌、例えば腺癌または癌腫が含まれる。本明細書に開示する方法および組成物は、前立腺癌に関連する転移性病変を治療するのに特に有用である。いくつかの態様において、患者は、1 以上の前立腺切除術、化学療法、または他の抗腫瘍療法を経験しているだろうし、そして主な標的または単一の標的は、転移性病変、例えば骨髄またはリンパ節の転移であろう。非前立腺癌性障害の例には、限定されるわけではないが、固形腫瘍、軟組織腫瘍、および特に転移性病変が含まれる。固形腫瘍の例には、肺、乳房、リンパ系、胃腸（例えば結腸）、生殖器および尿生殖路（例えば腎細胞、尿路上皮細胞、膀胱細胞）、咽頭、C N S（例えば神経細胞またはグリア細胞）、皮膚（例えば黒色腫）、および脾臓に影響を及ぼすものなどの多様な器官系の悪性腫瘍、例えば肉腫、腺腫、および癌腫と共に、大部分の結腸癌、直腸癌、腎細胞癌腫、肝臓癌、肺非小細胞癌、小腸の癌および食道の癌などの悪性腫瘍を含む、腺癌が含まれる。本明細書に開示される方法および組成物は、前述の癌に関連する転移性病変を治療するのに特に有用である。いくつかの態様において、患者は、組織の外科的除去、化学療法、または他の抗癌療法の 1 以上を経験しているだろうし、そして主な標的または単一の標的は、転移性病変、例えば骨髄またはリンパ節の転移であろう。

【0084】

好ましい態様において、被験者を治療して、障害、例えば前立腺障害を防止する。被験者は、障害のリスクがあるもの、例えば障害に罹患した親類を有する被験者、例えば、該障害を有するかまたは有した、祖父母、親、おじまたはおば、兄弟姉妹、または子どもを持つ被験者、あるいは該障害のリスクと関連付けられる遺伝的特質を有する被験者であることが可能である。好ましい態様において、障害は前立腺障害（例えば癌性または非癌性前立腺障害、例えば良性または過形成性前立腺障害）または非前立腺障害（例えば癌、例えば悪性癌）であり、そして被験者は、該障害を有するかまたは有した、祖父、父、おじ、兄弟、または息子の 1 以上を有するか、あるいは該障害のリスクと関連付けられる遺伝的特質を有する。

【0085】

被験者は、哺乳動物、例えば霊長類、好ましくはより高次の霊長類、例えばヒト（例えば本明細書に記載する障害、例えば前立腺または癌障害を有するかまたはそのリスクがある患者）であることが可能である。1 つの態様において、被験者は、前立腺癌を有する患者（例えば再発性または転移性前立腺癌を患う患者）である。

【0086】

修飾抗 P S M A 抗体またはその断片、例えば本明細書に記載するような修飾抗 P S M A 抗体またはその断片を、被験者に全身投与（例えば経口、非経口、皮下、静脈内、直腸、筋内、腹腔内、鼻内、経皮投与、または吸入もしくは腔内設置によって）、局所投与、あるいは鼻、咽頭および気管支などの粘膜に適用することによって投与することが可能である。

【0087】

本発明の方法、例えば治療法または防止法は：腫瘍サイズ；前立腺癌患者の癌マーカーのレベル、例えば P S A、アルカリホスファターゼ、または血清ヘモグロビンのレベル；例えば骨スキャンにおける新たな病変の出現率；新たな疾患関連症状の出現；例えば減少したかまたは安定した、軟組織塊のサイズ；生活の質、例えば疾患に関連する痛み、例えば骨の痛みの量；または臨床的結果に関連する他のパラメーターいずれかの 1 以上の、例え

ば変化（例えば増加または減少）に関して、被験者を監視する工程をさらに含むことが可能である。被験者を、以下の期間：治療開始前；治療中；または治療の1以上の要素が投与された後の1以上に、監視することが可能である。監視を用いて、同一の修飾抗PSMA抗体またはその断片でのさらなる治療の必要性を、あるいはさらなる剤でのさらなる治療の必要性を、評価することが可能である。一般的に、上述の1以上のパラメーターの減少は、被験者の状態が改善していることの指標となるが、血清ヘモグロビンレベルでは、増加が、被験者の状態の改善と関連する可能性がある。

【0088】

本発明の方法は、被験者由来の核酸またはタンパク質を解析する、例えば被験者の遺伝子型を解析する工程をさらに含むことが可能である。1つの態様において、ヒトPSMAおよび／またはヒトPSMAシグナル伝達の上流または下流構成要素（単数又は複数）、例えばヒトPSMAの細胞外または細胞内活性化因子または阻害剤をコードする核酸を解析する。該解析を用いて、例えば代替治療間、例えば特定の投薬量、搬送様式、搬送時間、補助療法の包含、例えば第二の剤と併用した投与の適切性を評価するか、または選択し、あるいは一般的に、被験者のありうる薬剤応答表現型または遺伝子型を決定することが可能である。核酸またはタンパク質は、治療のいかなる段階でも解析可能であるが、好ましくは修飾抗PSMA抗体またはその断片の投与前に解析して、それによって修飾抗PSMA抗体またはその断片の、被験者の予防的または療法的治療に適した投薬量（単数又は複数）および治療措置（単数又は複数）（例えば治療あたりの量または治療頻度）を決定することが可能である。

【0089】

修飾抗PSMA抗体またはその断片を、単独で、非コンジュゲート化型で用いて、それによって、例えば補体仲介細胞溶解および／またはエフェクター細胞仲介殺細胞など、抗体に依存する殺細胞機構によって、PSMA発現前立腺細胞または癌性細胞を除去するかまたは殺すことが可能である。他の態様において、修飾抗PSMA抗体またはその断片を、物質、例えば細胞傷害性剤または部分、例えば療法薬剤、放射能放射化合物、植物、真菌、もしくは細菌起源の分子、または生物学的タンパク質（例えばタンパク質毒素）もしくは粒子（例えばウイルスコートタンパク質を介して、例えば組換えウイルス粒子に）に結合させることが可能である。例えば、修飾抗PSMA抗体、またはその抗原結合断片を、 α 、 β 、または γ 放射体、あるいは β および γ 放射体などの放射性同位体にカップリングすることが可能である。放射性同位体の例には、ヨウ素（ ^{131}I または ^{125}I ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、ルテチウム（ ^{177}Lu ）、アクチニウム（ ^{225}Ac ）、プラセオジウム、またはビスマス（ ^{212}Bi または ^{213}Bi ）が含まれる。あるいは、抗PSMA抗体、またはその抗原結合断片を、生物学的タンパク質、植物または細菌起源の分子（またはその誘導体）、例えばメイタンシノイド（例えばメイタンシノールまたはDM1）と共にタキサン（例えばタキソールまたはタキソテール）、またはカリケアマイシンにカップリングすることが可能である。メイタンシノイドは、例えば、メイタンシノールまたはメイタンシノール類似体であることが可能である。メイタンシノール類似体の例には、修飾芳香族環を有するもの（例えばC-19-デクロロ（declo-ro）、C-20-デメトキシ、C-20-アシルオキシ）、および他の位に修飾を有するもの（例えばC-9-CH、C-14-アルコキシメチル、C-14-ヒドロキシメチルまたはアセロキシ（aceloxy）メチル、C-15-ヒドロキシ／アシルオキシ、C-15-メトキシ、C-18-N-デメチル、4, 5-デオキシ）が含まれる。メイタンシノールおよびメイタンシノール類似体は、例えば、米国特許第6, 333, 410号に記載され、該特許の内容は、本明細書に援用される。カリケアマイシンは、例えば、プロモ複合体カリケアマイシン（例えばアルファ、ベータまたはガンマプロモ複合体）、ヨード複合体カリケアマイシン（例えばアルファ、ベータまたはガンマヨード複合体）、またはその類似体および模倣体（mimics）であることが可能である。プロモ複合体カリケアマイシンには、 α_1 -BR、 α_2 -BR、 α_3 -BR、 α_4 -BR、 β_1 -BR、 β_2 -BRおよび γ_1 -BRが含まれる。ヨード複合体カリケアマイシンには、 α_1 -I、 α_2 -I、 α

10

20

30

40

50

$\gamma_3 - I$ 、 $\beta_1 - I$ 、 $\beta_2 - I$ 、 $\delta_1 - I$ および $\gamma_1 - B R$ が含まれる。カリケアマイシン、並びにその突然変異体、類似体および模倣体は、例えば米国特許第4,970,198号、1990年11月13日発行、第5,264,586号、1993年11月23日発行、第5,550,246号、1996年8月27日発行、第5,712,374号、1998年1月27日発行、および第5,714,586号、1998年2月3日発行に記載され、これらの内容は本明細書に援用される。メイタンシノールを、例えばN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエートまたはSPPとしても知られる)、4-スクシンイミジルーオキシカルボニルーa-(2-ピリジルジチオ)ートルエン(SMPT)、N-スクシンイミジルー3-(2-ピリジルジチオ)ブチレート(SDPB)、2-イミノチオレーン、またはS-アセチル無水コハク酸を用いて、抗体にカップリングさせることが可能である。

10

【0090】

本発明の方法および組成物は、他の療法様式と併用可能である。1つの態様において、本発明の方法には、被験者に、修飾抗PSMA抗体またはその断片、例えば本明細書に記載するような修飾抗PSMA抗体またはその断片を、細胞傷害性剤と併用して、前記障害を治療するかまたは防止するのに有効な量で投与することが含まれる。抗体および細胞傷害性剤は、同時にまたは連続して投与可能である。他の態様において、本発明の方法および組成物は、外科的方法および／または放射線方法と併用する。さらに他の態様において、該方法は、免疫調節剤、例えばIL-1、2、4、6、または12、あるいはインターフェロン・アルファまたはガンマ、あるいはGM-CSFなどの免疫細胞増殖因子と併用可能である。

20

【0091】

抗PSMA抗体と併用投与可能な典型的な細胞傷害性剤には、微小管阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、代謝拮抗剤、有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、挿入(intercalating)剤、シグナル伝達経路に干渉可能な剤、アポトーシスを促進する剤および放射線が含まれる。

【0092】

前立腺障害、例えば前立腺癌の療法において、抗PSMA抗体は、現存する療法様式、例えば前立腺切除術(部分的または根治的)、放射線療法、ホルモン療法、アンドロゲン除去療法、および細胞傷害性化学療法と併用可能である。典型的には、ホルモン療法は、患者におけるアンドロゲンレベルを減少させるように働き、そして黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)類似体またはアゴニスト(例えばリュープロン、ゾラデックス、ロイプロリド、ブセレリン、またはゴセレリン)と共にアンタゴニスト(例えばアバレリクス)を投与することを伴うことが可能である。非ステロイド性抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ビカルタミド(bicaltamide)、またはニルタミドもまた、ホルモン療法に使用可能であり、これと共に、ステロイド性抗アンドロゲン(例えば酢酸シプロテロンまたは酢酸メガストロール(megastrol))、エストロゲン(例えばジエチルスチルベストロール)、外科的去勢、PROSCARTM、二次または三次ホルモン操作(例えばコルチコステロイド(例えばヒドロコルチゾン、プレドニゾン、またはデキサメタゾン)、ケトコナゾール、および／またはアミノグルテチミドを伴う)、5 α -レダクターゼ阻害剤(例えばフィナステリド(finasteride))、ハーブ剤(例えばPC-SPEs)、下垂体摘出術、および副腎摘出術もまた使用可能である。さらに、ホルモン療法は、断続的に、または上記治療のいずれかとの併用を用いて、例えばロイプロリドおよびフルタミドを併用して、行うことが可能である。

30

40

【0093】

修飾抗PSMAおよび他の療法様式のいかなる併用および順序も使用可能である。修飾抗PSMAおよび他の療法様式を、活性な障害の期間中に、あるいは寛解またはより低活性な疾患の期間中に、投与することが可能である。修飾抗PSMAおよび他の療法様式は、治療前、治療と同時、治療後、または障害の寛解中に、投与可能である。

50

【0094】

別の側面において、*in vitro*で、試料（例えば生物学的試料、例えば血清、精液または尿、あるいは組織生検、例えば前立腺病変または癌性病変由来の組織生検）におけるPSMAタンパク質の存在を検出する方法を特徴とする。本方法を用いて、本明細書に記載する障害、例えば前立腺障害または癌性障害を評価する、例えば該障害を診断するかまたは病期決定することが可能である。該方法には：（i）試料（および場合によって、参照、例えば対照試料）を、本明細書に記載するような修飾抗PSMA抗体、またはその断片と、抗PSMA抗体およびPSMAタンパク質の相互作用が生じるのを可能にする条件下で接触させ；そして（ii）抗PSMA抗体、および試料（および場合によって、参照、例えば対照試料）の間の複合体の形成を検出することが含まれる。複合体の形成は、PSMAタンパク質の存在の指標となり、そして本明細書に記載する治療の適切性または該治療に対する必要性の指標となることが可能である。例えば、参照試料、例えば対照試料と比較した、試料中の複合体形成の統計的に有意な変化は、試料中のPSMAの存在の指標となる。いくつかの態様において、該方法は、1より多い抗PSMA抗体、例えばPSMA上の異なるエピトープに結合する2つの抗PSMA抗体の使用を含むことが可能である。例えば、該方法は、例えば実施例19に記載するように、ELISAアッセイを伴うことが可能である。

10

【0095】

さらに別の側面において、本発明は、*in vivo*で（例えば被験者において*in vivo*イメージングで）PSMAの存在を検出する方法を提供する。該方法を用いて、被験者、例えば哺乳動物、例えば霊長類、例えばヒトの、本明細書に記載する障害、例えば前立腺障害または癌性障害を評価する、例えば該障害を診断するかまたは病期決定することが可能である。該方法には：（i）被験者に、修飾抗PSMA抗体（またはその抗原結合断片）を、修飾抗PSMA抗体（またはその断片）およびPSMAタンパク質の相互作用が生じるのを可能にする条件下で投与し；そして（ii）抗体または断片およびPSMA間の複合体の形成を検出することが含まれる。参照、例えば対照被験者または被験者のベースラインと比較した、被験者における複合体形成の統計的に有意な変化は、PSMA存在の指標となる。

20

【0096】

他の態様において、本明細書に記載するような障害（例えば前立腺障害または癌性障害）を診断するかまたは病期決定する方法を提供する。該方法には：（i）障害を有するかまたは障害を有するリスクがある被験者を同定し；（ii）障害に罹患した組織または細胞の試料を得て；（iii）前記試料または対照試料と、本明細書に記載するような抗PSMA抗体、例えば修飾抗PSMA抗体または断片を、結合剤およびPSMAタンパク質の相互作用が生じるのを可能にする条件下で接触させ；そして（iv）複合体の形成を検出することが含まれる。参照試料、例えば対照試料と比較した、抗体（またはその断片）間の複合体形成の統計的に有意な増加は、障害の指標となるかまたは障害の病期の指標となる。

30

【0097】

好ましくは、*in vivo*および*in vitro*診断法で用いる、修飾抗PSMA抗体またはその断片は、検出可能な物質で、直接または間接的に標識されて、結合している結合剤または結合していない結合剤の検出を容易にする。適切な検出可能物質には、多様な生物学的活性酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、常磁性（例えば核磁気共鳴活性）物質、および放射性物質が含まれる。いくつかの態様において、修飾PSMA抗体またはその断片を放射性イオン、例えばインジウム（ ^{111}In ）、ヨウ素（ ^{131}I または ^{125}I ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、ルテチウム（ ^{177}Lu ）、アクチニウム（ ^{225}Ac ）、ビスマス（ ^{212}Bi または ^{213}Bi ）、イオウ（ ^{35}S ）、炭素（ ^{14}C ）、トリチウム（ ^3H ）、ロジウム（ ^{188}Rh ）、テクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、プラセオジウム、またはリン（ ^{32}P ）とカップリングする。

40

【0098】

50

別の側面において、本発明は、被験者、例えばヒト被験者に、放射性同位体にコンジュゲート化した抗 P S M A 抗体を投与する際に、異なる組織が曝露される用量、例えば放射線量を決定する方法を提供する。該方法には：（i）放射性同位体、例えば¹¹¹Inで標識された、本明細書に記載するような抗 P S M A 抗体、例えば修飾抗 P S M A 抗体を、被験者に投与し；（i i）大部分の、例えば50%、80%、90%、95%またはそれ以上の放射性同位体が被験者の体から除去されるまでの多様な時点で、異なる組織、例えば前立腺、肝臓、腎臓、または血液に位置する放射性同位体の量を測定し；そして（i i i）解析した各組織が受け取った放射線の総線量を計算することが含まれる。いくつかの態様において、測定は、被験者への放射性標識抗 P S M A 抗体投与（第0日）後、スケジュールされた時点、例えば第1日、第2日、第3日、第5日、第7日、および第12日に行う。いくつかの態様において、1つの放射性同位体、例えばガンマ放射体、例えば¹¹¹Inに関して、組織が受け取る放射線量を用いて、同一組織が、異なる放射性同位体、例えばベータ放射体、例えば⁹⁰Yから受け取るであろう、期待される線量を計算することが可能である。

【0099】

別の側面において、本発明は、前立腺疾患、例えば良性前立腺過形成もしくは前立腺癌、または非前立腺癌、例えば P S M A を発現する血管系を有する癌（例えば腎臓、尿路上皮（例えば膀胱）、精巣、結腸、直腸、肺（例えば非小細胞肺癌）、乳房、肝臓、神経（例えば神経内分泌）、グリア（例えばグリア芽腫）、または脾臓（例えば脾管）の癌、黒色腫（例えば悪性黒色腫）、または軟組織肉腫）を有するか、または該疾患と診断された被験者が経験する痛みを治療する、例えば痛みを減少させる方法の特徴とする。該方法には、本明細書に記載するような抗 P S M A 抗体、例えば修飾抗 P S M A 抗体を、前立腺疾患または非前立腺癌と関連する痛みを治療する、例えば減少させるのに十分な量で、被験者に投与することが含まれる。いくつかの態様において、被験者は、例えば血清 P S A レベルの上昇および痛みの感覚以外には、前立腺疾患または非前立腺癌の徴候を持たない可能性がある。痛みは、骨の痛みと共に、腫脹する前立腺のための閉塞性排尿症状、例えば排尿躊躇または尿流減少、頻尿または夜間多尿に関連する痛みであることが可能である。本発明の修飾抗 P S M A 抗体を用いた痛みの治療は、鎮痛薬、例えば麻薬の必要性を減少させるか、または劇的に低下させるか、または除去することさえ可能である。さらに、痛みを減少させることによって、治療法は、動きに関連する痛みの結果、機能不全となっていた、例えば肢の移動度を回復することが可能である。

【0100】

いくつかの態様において、前立腺疾患または非前立腺癌と関連する痛みを治療する、例えば減少させるのに十分な量で、非コンジュゲート型で、修飾抗 P S M A 抗体を投与する。他の態様において、修飾抗 P S M A 抗体、またはその抗原結合断片を、本明細書に記載するように、誘導体型で、例えば別の機能する分子と連結させて、投与する。

【0101】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および請求項から、より明らかになるであろう。

【0102】

（発明の詳細な説明）

本発明は、とりわけ、ヒト前立腺特異的膜抗原（P S M A）の細胞外ドメインに対する抗体、例えば修飾抗体、またはその抗原結合断片を提供する。修飾抗 P S M A 抗体、またはその抗原結合断片は、既定の種、例えばヒトに対するその非修飾対応物と比較して、より低い免疫原性を与えられている。ヒト P S M A は、正常、良性過形成性上皮細胞（例えば良性前立腺分泌腺房上皮）、および癌性前立腺上皮細胞（例えば前立腺上皮内異常増殖および前立腺腺癌）と共に、癌性細胞、例えば腎臓、尿路上皮（例えば膀胱）、精巣、結腸、直腸、肺（例えば非小細胞肺癌）、乳房、肝臓、神経（例えば神経内分泌）、グリア（例えばグリア芽腫）、脾臓（例えば脾管）、黒色腫（例えば悪性黒色腫）、または軟組織肉腫の癌性細胞に近接した血管内皮細胞の表面上に発現される。本発明の抗体、例えば修

飾抗体は、P S M Aを発現する細胞の細胞表面に結合する。P S M Aは、通常、細胞膜から細胞にリサイクルされる。したがって、本発明の抗体は、P S M A再循環過程を通じて、P S M Aと共に内部に入り、それによって、抗体にコンジュゲート化した剤、例えば標識剤、細胞傷害性剤、またはウイルス粒子（例えば細胞傷害性剤、例えばアポトーシス促進因子をコードする遺伝子を含むウイルス粒子）の搬送(delivery)を可能にする。

【0103】

本発明をより容易に理解可能にするため、まず特定の用語を定義する。詳細な説明を通じて、さらなる定義を示す。

本明細書において、「P S M A」または「前立腺特異的膜抗原」タンパク質は、哺乳動物 P S M A、好ましくはヒト P S M Aタンパク質を指す。ヒト P S M Aには、その内容が本明細書に援用される、I s r a e l i r a (1993) C a n c e r R e s . 53 : 227-230 ; S u r a (1995) C a n c e r R e s . 55 : 1441-1443 ; U S 5, 538, 866、U S 5, 935, 818、および W O 97 / 35616に開示される P S M A c D N Aの2つの選択的スプライシング m R N A変異体（それぞれ約2, 653ヌクレオチドおよび約2, 387ヌクレオチドを含む）にコードされる2つのタンパク質産物、P S M AおよびP S M 'が含まれる。P S M Aの長い転写物は、トランスフェリン受容体と配列相同性を有し、そしてN A A L A Dアーゼ活性を有する、I I型膜貫通受容体として性質決定される、約100~120 k D a分子量のタンパク質産物をコードする（C a r t e r r a (1996) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 93 : 749-753）。したがって、用語「ヒト P S M A」は、I s r a e l i r a (1993) C a n c e r R e s . 53 : 227-230 ; S u r a (1995) C a n c e r R e s . 55 : 1441-1443 ; U S 5, 538, 866、U S 5, 935, 818、および W O 97 / 35616に示されるようなアミノ酸配列を有するかまたは該アミノ酸配列に相同である（例えば少なくとも約85%、90%、95%同一である）か；あるいは（a）天然存在（自然発生）ヒト P S M A核酸配列（例えばI s r a e l i r a (1993) C a n c e r R e s . 53 : 227-230またはU S 5, 538, 866）；（b）天然存在ヒト P S M A配列に縮重した核酸配列；（c）天然存在ヒト P S M A核酸配列に相同な（例えば少なくとも約85%、90%、95%同一の）核酸配列；または（d）ストリンジェントな条件下、例えば非常にストリンジェントな条件下で、前述の核酸配列の1つにハイブリダイズする核酸配列にコードされる、少なくとも2つのタンパク質産物、ヒト P S M AおよびP S M 'を指す。

【0104】

「抗 P S M A抗体」は、P S M A、好ましくはヒト P S M Aタンパク質と相互作用する（例えば結合する）抗体である。好ましくは、抗 P S M A抗体は、P S M Aの細胞外ドメイン、例えばヒト P S M Aのほぼアミノ酸44~750（アミノ酸残基は、U S 5, 538, 866に開示されるヒト P S M A配列に対応する）に位置するヒト P S M Aの細胞外ドメインと相互作用し、例えば結合する。1つの態様において、抗 P S M A抗体は、本明細書に記載する抗体、例えばJ 591、E 99、J 415、およびJ 533のエピトープのすべてまたは一部と結合する。抗 P S M A抗体は、ヒト P S M Aに対する、本明細書に記載する抗体、例えばJ 591、E 99、J 415、およびJ 533の結合を阻害する、例えば競合的に阻害することが可能である。抗 P S M A抗体は、エピトープ、例えばコンホメーション性または直鎖エピトープに結合することが可能であり、これらのエピトープは結合されると、本明細書に記載する抗体、J 591、E 99、J 415、およびJ 533の結合を妨げる。該エピトープは、J 591、E 99、J 415、またはJ 533抗体に認識されるエピトープに対して、空間的にごく近接していることが可能であるし、または機能的に関連することが可能であり、例えば、直鎖配列中で、またはコンホメーション的に重複するエピトープまたは隣接するエピトープであることが可能である。1つの態様において、抗 P S M A抗体は、ヒト P S M Aのほぼアミノ酸120~500、好ましくは130~450、より好ましくは134~437、または153~347の領域内に完全

にまたは部分的に位置するエピトープに結合する（アミノ酸残基は、U S 5, 538, 866に開示されるヒトPSMA配列に対応する）。好ましくは、該エピトープには、少なくとも1つのグリコシル化部位、例えば少なくとも1つのN連結グリコシル化部位（例えばヒトPSMAのほぼアミノ酸190～200、好ましくはほぼアミノ酸195に位置するアスパラギン残基；アミノ酸残基は、U S 5, 538, 866に開示されるヒトPSMA配列に対応する）が含まれる。

【0105】

本明細書に記載する抗PSMA抗体、例えばネズミおよび修飾抗PSMA抗体を産生する細胞株が、ATCCに寄託されている。抗PSMA抗体各々を産生する細胞株のATCC命名を表7に列挙する。

10

【0106】

表7

【0107】

【表7】

抗PSMA抗体	ATCC命名
E99	HB-12101
J415	HB-12109
J533	HB-12127
J591	HB-12126
deJ591	PTA-3709
deJ415	PTA-4174

20

【0108】

好ましい態様において、相互作用、例えば結合は、高い親和性（例えば少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは $10^8 M^{-1} \sim 10^{10} M^{-1}$ の間、または約 $10^9 M^{-1}$ の親和性定数）および特異性で生じる。好ましくは、抗PSMA抗体は、細胞、例えばPSMA発現細胞（例えば前立腺細胞または癌性細胞）を処理し、例えば除去するかまたは殺す。抗PSMA抗体が細胞を処理する、例えば除去するかまたは殺す機構は、本発明の実施に重要でない。1つの態様において、抗PSMA抗体は、該細胞および／または該細胞に近接する血管内皮細胞において発現されるPSMAに結合し、そしてPSMAと共に内部移行することが可能である。これらの態様において、抗PSMA抗体を用いて、第二の部分、例えば標識剤、標識剤、またはウイルス性剤を該細胞にターゲッティングすることが可能である。他の態様において、抗PSMA抗体は、PSMAの細胞外ドメインへの結合に際して、該細胞および／または該細胞に近接する血管内皮細胞の、宿主が仲介する殺傷、例えば補体またはADCCが仲介する殺傷を仲介可能である。該細胞は、抗PSMA抗体が該細胞または該細胞に近接する血管内皮細胞に直接結合することによって、該抗体に直接殺されることが可能である。あるいは、抗PSMA抗体は、近接する細胞への血流が減少し、それによって該細胞が殺されるかまたは除去されるように、抗PSMA抗体が結合する血管内皮細胞を処理して、例えば殺すかまたは除去して、あるいは別の方式で、該血管内皮細胞の特性を変化させることが可能である。抗PSMA抗体の例には、例えば単一特異性抗体、モノクローナル（例えばヒト）抗体、組換え抗体または修飾抗体、例えばキメラ抗体、CDR移植抗体、ヒト化抗体、脱免疫抗体、および*in vitro*生成抗PSMA抗体が含まれる。

30

40

【0109】

50

本明細書において、用語「処理する」または「処理」は、被験者、例えば患者への抗 P S M A 抗体またはその抗原結合断片の適用または投与、あるいは被験者、例えば患者由来の、患者に戻される、単離組織または細胞への適用または投与と定義される。抗 P S M A 抗体またはその抗原結合断片は、単独で、または第二の剤と併用して投与可能である。被験者は、障害（例えば本明細書に記載するような障害）、障害の症状または障害に対する素因を有する患者であることが可能である。治療（t r e a t m e n t）は、障害、障害の症状または障害に対する素因を治癒（c u r e）、回復（h e a l）、軽減（a l l e v i a t e）、免荷（r e l i e v e）、改変（a l t e r）、修復（r e m e d y）、改良（a m e l i o r a t e）、緩和（p a l l i a t e）、改善（i m p r o v e）するかまたはこれらに影響を及ぼすことでありうる。理論に縛られることを望むのではなく、10
治療は、i n v i t r o または i n v i v o で、細胞の阻害、除去、または殺傷を引き起こすか、あるいは別の方式で、細胞、例えば異常な細胞が、障害、例えば本明細書に記載する障害（例えば癌または前立腺障害）を仲介する能力を減少させると考えられる。

【0110】

本明細書において、障害を治療するのに有効な抗 P S M A 抗体の量、または「療法的有効量」は、被験者への単回用量または多数回用量投与に際して、細胞、例えば前立腺細胞または癌細胞（例えば P S M A 発現前立腺細胞または癌細胞、あるいはそれに近接する血管細胞）を治療するのに有効な、あるいはこうした治療の非存在下で期待されるものを超えて、本明細書に記載するような障害を持つ被験者の治癒、軽減、免荷または改善を延長するの10
に有効な、抗体の量を指す。本明細書において、腫瘍の「増殖を阻害する」は、その増殖および転移を遅延するか、中断するか、抑止するかまたは停止することを指し、そして必ずしも、腫瘍性増殖の完全な除去を示さない。20

【0111】

本明細書において、障害を防止するのに有効な抗 P S M A 抗体の量、または抗体の「予防的有効量」は、被験者への単回用量または多数回用量投与に際して、障害、例えば本明細書に記載するような癌または前立腺障害の開始または再発の発生を防止するかまたは遅延させるの10
に有効な、あるいはその症状を治療するのに有効な、抗 P S M A 抗体、例えば本明細書に記載するような抗 P S M A 抗体の量を指す。

【0112】

用語「誘導する」、「阻害する」、「増強する」、「上昇させる」、「増加させる」、「減少させる」または例えば2つの状態間の定量的な相違を示す同様のものは、2つの状態間の相違、例えば統計的にまたは臨床的に有意な相違を指す。例えば、「P S M A を発現する過剰増殖細胞の増殖を阻害するのに有効な量」は、細胞の増殖速度が、未処理細胞とは異なる、例えば統計的に異なるであろうことを意味する。30

【0113】

本明細書において、「特異的結合」は、抗体が：（1）P S M A、例えばヒト P S M A タンパク質に、少なくとも $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ の親和性で結合する特性、および（2）P S M A、例えばヒト P S M A タンパク質に、P S M A 以外の非特異的抗原（例えば B S A、カゼイン）に結合する親和性より、少なくとも2倍、50倍、100倍、1000倍、またはそれ以上の親和性で優先的に結合する特性を指す。40

【0114】

本明細書において、用語「抗体」は、少なくとも1つ、そして好ましくは2つの重（H）鎖可変部（本明細書において V H という形に省略する）、および少なくとも1つ、そして好ましくは2つの軽（L）鎖可変部（本明細書において V L という形に省略する）を含んでなるタンパク質を指す。V H および V L 領域は、さらに、「フレームワーク領域」（F R）と称される、より保存された領域が点在する、「相補性決定領域」（「C D R」）と称される超可変部に細分されることが可能である。フレームワーク領域および C D R の範囲は正確に定義されている（本明細書に援用される、K a b a t, E. A. ら（1991）S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t, 第5版, U. S. D e p a r t m e n t o f H e a 50

l t h a n d H u m a n S e r v i c e s , N I H P u b l i c a t i o n
N o . 9 1 - 3 2 4 2、および C h o t h i a , C . ら (1 9 8 7) J . M o l
B i o l . 1 9 6 : 9 0 1 - 9 1 7 を参照されたい)。好ましくは、各 V H および
V L は、以下の順序：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4
で、アミノ末端からカルボキシ末端に配置される、3つのC D Rおよび4つのF Rで構成
される。

【0115】

抗体のV HまたはV L鎖には、重鎖または軽鎖の定常部のすべてまたは一部がさらに含ま
れることが可能である。1つの態様において、抗体は、2つの重鎖免疫グロブリンおよび
2つの軽鎖免疫グロブリンの4量体であり、ここで重鎖および軽鎖の免疫グロブリンは、
例えばジスルフィド結合によって、相互連結されている。重鎖定常部は、3つのドメイン
、C H 1、C H 2およびC H 3で構成される。軽鎖定常部は、1つのドメイン、C Lで構
成される。重鎖および軽鎖の可変部は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗
体の定常部は、典型的には、免疫系の多様な細胞（例えばエフェクター細胞）および古典
的補体系の第一の構成要素（C 1 q）を含む、宿主組織または因子への抗体の結合を仲介
する。用語「抗体」には、I g A、I g G、I g E、I g D、I g M型（と共にそのサブ
タイプ）の損なわれていない（i n t a c t）免疫グロブリンが含まれ、該免疫グロブリ
ンの軽鎖は、カッパまたはラムダ型のものであることが可能である。

【0116】

本明細書において、用語「免疫グロブリン」は、免疫グロブリン遺伝子に実質的にコード
される、1以上のポリペプチドからなるタンパク質を指す。認識されるヒト免疫グロブリ
ン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ（I g A 1およびI g A 2）、ガンマ（I g G
1、I g G 2、I g G 3、I g G 4）、デルタ、イプシロンおよびミュー定常部遺伝子と
共に、無数の免疫グロブリン可変部遺伝子が含まれる。全長免疫グロブリン「軽鎖」（約
25 k Dまたは214アミノ酸）は、N H 2末端の可変部遺伝子（約110アミノ酸）お
よびC O O H末端のカッパまたはラムダ定常部遺伝子にコードされる。全長免疫グロブリ
ン「重鎖」（約50 k Dまたは446アミノ酸）は、同様に、可変部遺伝子（約116ア
ミノ酸）および他の前述の定常部遺伝子の1つ、例えばガンマ（約330アミノ酸をコード
する）にコードされる。用語「免疫グロブリン」には：非ヒト供給源由来、例えば非ヒ
ト抗体由来、例えばマウス免疫グロブリンまたは別の非ヒト免疫グロブリン由来、コンセ
ンサス配列由来、あるいはファージディスプレイまたは多様性を生成する他の方法いずれ
かに生成される配列由来のC D Rを有し；そして非ヒトフレームワークより、ヒトにおい
て、より抗原性でない、例えば非ヒト免疫グロブリン由来のC D Rの場合、該非ヒトC D
Rを得た非ヒトフレームワークより抗原性でないフレームワークを有する、免疫グロブリ
ンが含まれる。免疫グロブリンのフレームワークは、ヒトフレームワーク、ヒトにおいて
抗原性を減少させるよう修飾したヒト化非ヒトフレームワーク、例えばマウスフレームワ
ーク、または合成フレームワーク、例えばコンセンサス配列であることが可能である。こ
れらは、本明細書において、ときに、修飾免疫グロブリンと称される。修飾抗体、または
その抗原結合断片には、少なくとも1、2、3または4の修飾免疫グロブリン鎖、例えば
少なくとも1または2の修飾免疫グロブリン軽鎖および／または少なくとも1または2の
修飾重鎖が含まれる。1つの態様において、修飾抗体は、2つの修飾重鎖免疫グロブリン
および2つの修飾軽鎖免疫グロブリンの4量体である。

【0117】

本明細書において、「アイソタイプ」は、重鎖定常部遺伝子にコードされる抗体の種類（
例えばI g MまたはI g G 1）を指す。

用語、抗体の「抗原結合断片」（または単に「抗体部分」または「断片」）は、本明細書
において、P S M A（例えばヒトP S M A）に特異的に結合する抗体部分、例えば1以上
の免疫グロブリン鎖が全長でないが、P S M A（例えばヒトP S M Aタンパク質）に特異
的に結合する分子を指す。用語、抗体の「抗原結合断片」内に含まれる結合断片の例には
（i）F a b断片、V L、V H、C LおよびC H 1ドメインからなる一価断片；（i i）

10

20

30

40

50

F (a b ')₂ 断片、ヒンジ領域でのジスルフィド架橋によって連結される2つのF a b断片を含んでなる二価断片；(i i i) V HおよびC H 1ドメインからなるF d断片；(i v) 抗体の単一のアームのV LおよびV HドメインからなるF v断片、(v) V Hドメインからなるd A b断片(W a r dら、(1 9 8 9) N a t u r e 3 4 1 : 5 4 4 - 5 4 6) ；および(v i) 特異的に結合するのに十分なフレームワークを有する、単離相補性決定領域(C D R)、例えば可変部の抗原結合部分が含まれる。軽鎖可変部の抗原結合部分および重鎖可変部の抗原結合部分、例えばF v断片の2つのドメイン、V LおよびV Hを、組換え法を用いて、単一タンパク質鎖として作成可能にする合成リンカーによって、連結することが可能であり、ここで、V LおよびV H領域は対形成して、一価分子を形成する(一本鎖F v (s c F v) として知られる；例えばB i r dら (1 9 8 8) S c i e n c e 2 4 2 : 4 2 3 - 4 2 6 ；およびH u s t o nら (1 9 8 8) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 5 : 5 8 7 9 - 5 8 8 3を参照されたい)。こうした一本鎖抗体もまた、用語、抗体の「抗原結合断片」内に含まれると意図される。当業者に知られる慣用的技術を用いて、これらの抗体断片を得て、そして損なわれていない抗体と同一の方式で、有用性に関して、該断片をスクリーニングする。

【0118】

用語「単一特異性抗体」は、特定の標的、例えばエピトープに単一の結合特異性および親和性を示す抗体を指す。この用語には、「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」が含まれ、これらは、本明細書において、単一の分子組成の抗体またはその断片の調製物を指す。

【0119】

用語「組換え」抗体は、本明細書において、例えば、宿主細胞にトランスフェクションされた組換え発現ベクターを用いて発現される抗体、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離される抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックである動物(例えばマウス)から単離される抗体、あるいはヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のD N A配列にスプライシングすることを伴う、他の手段いずれかによって調製されるか、発現されるか、生成されるか、または単離される抗体のような、組換え手段によって、調製されるか、発現されるか、生成されるか、または単離される抗体を指す。こうした組換え抗体には、ヒト化抗体、C D R移植抗体、キメラ抗体、脱免疫抗体、i n v i t r o生成(例えばファージディスプレイによる)抗体が含まれ、そして場合によって、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する定常部が含まれることが可能である。

【0120】

本明細書において、用語「実質的に同一」(または「実質的に相同」)は、第一および第二のアミノ酸またはヌクレオチド配列が、類似の活性を有するように、第二のアミノ酸またはヌクレオチド配列に対して、十分な数の同一または同等の(例えば類似の側鎖、例えば保守的アミノ酸置換によって)アミノ酸残基またはヌクレオチドを含有する、第一のアミノ酸またはヌクレオチド配列を指す。抗体の場合、第二の抗体は、第一の抗体と同一の特異性を有し、そして第一の抗体の少なくとも50%の親和性を有する。

【0121】

2つの配列間の「相同性」の計算は、以下のように行うことが可能である。最適比較目的で、配列を並列させる(例えば最適並列のため、第一および第二のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入可能であり、そして比較目的のため、非相同配列を無視することが可能である)。好ましい態様において、比較目的のために並列される参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも60%、そしてさらにより好ましくは少なくとも70%、80%、90%、100%である。その後、対応するアミノ酸位またはヌクレオチド位でのアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第一の配列の位が、第二の配列において対応する位と同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合、該分子はその位で同一である(本明細書において、アミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「相同性」と同等である)。2つの配列間の同一

性パーセントは、2つの配列の最適な並列のために導入する必要がある、ギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、配列によって共有される同一の位の数の関数である。

【0122】

配列の比較および2つの配列間の相同性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成可能である。好ましい態様において、2つのアミノ酸配列間の相同性パーセントは、Blossum62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、および16、14、12、10、8、6、または4のギャップ荷重および1、2、3、4、5、または6の長さ荷重を用いて、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムに取り込まれている、NeedlemanおよびWunsch (1970), J. Mol. Biol. 48:444-453のアルゴリズムを用いて決定される。さらに別の好ましい態様において、2つのヌクレオチド配列間の相同性パーセントは、NWsgapdna.CMPマトリックスおよび40、50、60、70、または80のギャップ荷重、および1、2、3、4、5、または6の長さ加重を用いて、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムを用いて決定される。パラメーターの特に好ましい組（および分子が本発明の相同性限界内にあるかどうか決定するのに、どのパラメーターを適用すべきか、実施者がはっきりと知らない場合に使用すべきものは、12のギャップペナルティおよび4のギャップ伸長ペナルティ、および5のフレームシフトギャップペナルティを伴うBlossum62スコアリングマトリックスである。

10

【0123】

本明細書において、用語「低ストリンジェンシー、中程度のストリンジェンシー、高ストリンジェンシー、または非常に高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を記載する。ハイブリダイゼーション反応を行う手引きは、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出すことが可能であり、該文献は本明細書に援用される。水性および非水性法がこの参考文献に記載され、そしてどちらも使用可能である。本明細書で称する特異的ハイブリダイゼーション条件は以下のとおりである：1) 約45℃の6x塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム(SSC)中、その後、少なくとも50℃の0.2xSSC、0.1%SDS中の2回の洗浄（洗浄温度は、低ストリンジェンシー条件では、55℃に増加させることが可能である）の低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件；2) 約45℃の6xSSC中、その後、60℃の0.2xSSC、0.1%SDS中の1回以上の洗浄の中程度のストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件；3) 約45℃の6xSSC中、その後、65℃の0.2xSSC、0.1%SDS中の1回以上の洗浄の高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件；および好ましくは4) 非常に高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、約65℃の0.5Mリン酸ナトリウム、7%SDS、その後、65℃の0.2xSSC、1%SDS中の1回以上の洗浄である。非常に高いストリンジェンシーの条件(4)が好ましい条件であり、そして別に明記されない限り、使用すべき条件である。

20

30

【0124】

本発明の抗体およびその抗原結合断片が、ポリペプチド機能に実質的な影響を持たない、さらなる保存的または非本質的アミノ酸置換を有することが可能であると理解される。特定の置換が許容されるかどうか、すなわち結合活性などの望ましい生物学的特性に不都合に影響を及ぼさないかどうかは、Bowie, Jura (1990) Science 247:1306-1310に記載されるように決定可能である。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基と交換されるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えばアスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えばグリシン、アラニン、バ

40

50

リン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ分岐側鎖を有するアミノ酸(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が含まれる。

【0125】

「非本質的」アミノ酸残基は、生物学的活性を無効にすることなく、またはより好ましくは該活性を実質的に改変することなく、結合剤、例えば抗体の野生型配列から改変可能な残基であり、一方、「本質的」アミノ酸残基は、このような変化を生じる。

【0126】

抗P S M A抗体

多くの種類の抗P S M A抗体、またはその抗原結合断片が本発明の方法で有用である。抗体は、I g G (例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4)、I g M、I g A 1、I g A 2、I g D、またはI g Eを含む、多様なアイソタイプであることが可能である。好ましくは、抗体は、I g Gアイソタイプ、例えばI g G 1である。抗体分子は全長であることが可能である(例えばI g G 1またはI g G 4抗体)し、または抗原結合断片のみを含むことが可能である(例えばF a b、F (a b')₂、F vまたは一本鎖F v断片)。これらには、モノクローナル抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、脱免疫抗体、およびヒト抗体と共に、前述のものの抗原結合断片が含まれる。

【0127】

モノクローナル抗P S M A抗体を本発明の方法で使用することが可能である。好ましくは、モノクローナル抗体は、P S M Aの細胞外ドメイン(すなわち細胞外に位置するP S M Aエピトープ)に結合する。ヒトP S M Aに対する好ましいネズミモノクローナル抗体の例には、限定されるわけではないが、それぞれ、A T C C 寄託番号H B-1 2 1 0 1、H B-1 2 1 0 9、H B-1 2 1 2 7、およびH B-1 2 1 2 6を有するハイブリドーマ細胞株に産生される、E 9 9、J 4 1 5、J 5 3 3およびJ 5 9 1が含まれ、これらはすべてU S 6, 1 0 7, 0 9 0およびU S 6, 1 3 6, 3 1 1に開示され、該特許の内容は、明確に本明細書に援用される。最も好ましくは、ネズミモノクローナル抗体は、H B-1 2 1 2 6に産生されるJ 5 9 1である。

【0128】

P S M Aに対するさらなるモノクローナル抗体は、当該技術分野に知られる技術を用いて生成可能である。モノクローナル抗体は、慣用的なモノクローナル抗体方法論、例えばK o h l e rおよびM i l s t e i n, N a t u r e 2 5 6: 4 9 5 (1 9 7 5)の標準的体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む、多様な技術によって、産生可能である。一般的には、H a r l o w, E. およびL a n e, D. (1 9 8 8) A n t i b o d i e s: A L a b o r a t o r y M a n u a l, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s, ニューヨーク州コールドスプリングハーバーを参照されたい。

【0129】

本発明の目的のために有用な免疫原には、P S M A (例えばヒトP S M A)を所持する細胞(例えば前立腺腫瘍細胞株、例えばL N C a p細胞、あるいは新鮮または凍結前立腺腫瘍細胞); P S M A発現細胞(例えば前立腺腫瘍細胞株、例えばL N C a p細胞、あるいは新鮮または凍結前立腺腫瘍細胞)の膜分画; 単離または精製P S M A、例えばヒトP S M Aタンパク質(例えば生化学的に単離したP S M A、またはその一部、例えばP S M Aの細胞外ドメイン)が含まれる。P S M Aに対する抗体を生成する技術がU S 6, 1 0 7, 0 9 0、U S 6, 1 3 6, 3 1 1に記載され、該特許すべての内容は、明確に本明細書に援用される。

【0130】

ヒトタンパク質に対して向けられるヒトモノクローナル抗体(m A b)は、マウス系でなくヒト免疫グロブリン遺伝子を持つトランスジェニックマウスを用いて生成可能である。目的の抗原で免疫した、これらのトランスジェニックマウス由来の脾臓細胞を用いて、ヒ

10

20

30

40

50

トタンパク質由来のエピトープに特異的親和性を持つヒトmAbを分泌するハイブリドーマを産生する（例えばWoodら、国際特許出願WO 91/00906、Kucheralapatilら、PCT公告WO 91/10741；Lonbergら、国際特許出願WO 92/03918；Kayら、国際特許出願92/03917；Lonberg, N. ら 1994 Nature 368:856-859；Green, L. L. ら 1994 Nature Genet. 7:13-21；Morrison, S. L. ら 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855；Bruggemanら 1993 Year Immunol 7:33-40；Tuailionら 1993 PNAS 90:3720-3724；Bruggemanら 1991 Eur J Immunol 21:1323-1326を参照されたい）。 10

【0131】

本発明で有用な抗PSMA抗体またはその断片はまた、望ましい抗体の免疫グロブリン軽鎖および重鎖をコードするDNAで形質転換した宿主細胞に産生される組換え抗体であることも可能である。組換え抗体は、既知の遺伝子操作技術によって産生可能である。例えば、組換え抗体は、望ましい抗体の免疫グロブリン軽鎖および重鎖をコードするヌクレオチド配列、例えばcDNAまたはゲノムDNAをクローニングすることによって、産生可能である。その後、両方の遺伝子が、それ自体の転写および翻訳発現調節配列に、機能可能であるように連結されるように、これらのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現ベクターに挿入する。発現ベクターおよび発現調節配列は、用いる発現宿主細胞に適合するように選択する。典型的には、両方の遺伝子を同一発現ベクターに挿入する。原核または真核宿主細胞が使用可能である。 20

【0132】

真核細胞は、原核細胞より、適切にフォールディングされ、そして免疫学的に活性である抗体を組み立て、そして分泌する可能性がより高いため、真核宿主細胞における発現が好ましい。しかし、不適切なフォールディングのために不活性である産生抗体はいずれも、周知の方法（KimおよびBaldwin, “Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding”, Ann. Rev. Biochem. 51, pp. 459-89 (1982)）にしたがって再生可能である可能性がある。本発明によればやはり抗体相同体である、軽鎖二量体または重鎖二量体などの、損なわれていない抗体の一部を、宿主細胞が産生することが可能である。 30

【0133】

上記方法に対する変動が本発明で有用であることが理解されるであろう。例えば、抗体の軽鎖または重鎖いずれか（しかし両方ではない）をコードするDNAで宿主細胞を形質転換することが望ましい可能性がある。また、組換えDNA技術を用いて、PSMA結合に必要な、軽鎖および重鎖いずれかまたは両方をコードするDNAのいくつかまたはすべてを除去することも可能であり、例えば特定のアミノ酸を欠失させることによって、定常部を修飾することが可能である。こうした一部切除（truncated）DNA分子から発現される分子が、本発明の方法において有用である。さらに、1つの重鎖および1つの軽鎖が抗PSMA抗体であり、そして他の重鎖および軽鎖が、PSMA以外の抗原、またはPSMAの別のエピトープに特異的である、二官能性抗体を産生可能である。 40

【0134】

当該技術分野に知られる組換えDNA技術によって、キメラ抗体を産生可能である。例えば、ネズミ（または他の種）モノクローナル抗体分子のFc定常部をコードする遺伝子を制限酵素で消化して、ネズミFcをコードする領域を除去して、そしてヒトFc定常部をコードする遺伝子の同等の部分で置換する（Robinsonら、国際特許出願PCT/US86/02269；Akiraら、欧州特許出願184,187；Taniguchi, M.、欧州特許出願171,496；Morrisonら、欧州特許出願173, 50

494; Neubergerら、国際特許出願WO 86/01533; Cabillyら、米国特許第4,816,567号; Cabillyら、欧州特許出願125,023; Betterら(1988 Science 240:1041-1043); Liuら(1987) PNAS 84:3439-3443; Liuら, 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sunら(1987) PNAS 84:214-218; Nishimuraら, 1987, Canc. Res. 47:999-1005; Woodら(1985) Nature 314:446-449; およびShawら, 1988, J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559を参照されたい)。

【0135】

当該技術分野に知られる方法によって、抗体または免疫グロブリン鎖をヒト化することが可能である。ひとたびネズミ抗体を得たら、可変部を配列決定することが可能である。CDRおよびフレームワーク残基の位置を決定することが可能である(本明細書に援用される、Kabata, E. A.ら(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242、およびChothia, C.ら(1987) J. Mol. Biol. 196:901-917を参照されたい)。軽鎖および重鎖の可変部は、場合によって、対応する定常部に連結することが可能である。

【0136】

当該技術分野に認識される技術を用いて、ネズミ抗PSMA抗体を配列決定することが可能である。例えば、10%ウシ胎児血清を補ったRPMI 1640培地中で、培養中、ネズミハイブリドーマJ533、J415およびE99を発現するハイブリドーマを増殖させた。分泌される抗体のアイソタイプは、それぞれ、IgG1 κ 、IgG1 κ 、およびIgG3 κ と確認された。これらのモノクローナル抗体は、J591同様、前立腺特異的膜抗原の外部ドメインに結合する。J591、J533およびE99は、同一エピトープを認識し、一方、J415は独立のエピトープを認識する。10⁷ハイブリドーマ細胞から、各モノクローナル抗体の総RNAを調製した。逆転写酵素、並びにマウス κ 定常部プライマーおよびマウスIgG定常部プライマーを用いて、V_HおよびV_K cDNAを調製した。多様なマウスシグナル配列プライマー(V_Hでは6、そしてV_Kでは7)を用いたPCRによって、第一鎖cDNAを増幅した。増幅DNAをゲル精製し、そしてベクターpT7Blueにクローニングした。PCRによって、正しい挿入物に関して、得たV_HおよびV_K クローンをスクリーニングし、そしてジデオキシ鎖終結法によって、選択したクローンのDNA配列を決定した(表7を参照されたい)。

【0137】

J415に由来する重鎖および軽鎖の可変部のDNAおよびアミノ酸配列を得て、そして図7B(V_H)および8B(V_K)に示す(表5も参照されたい)。CDRの位置を示す。J415 V_Hは、マウス重鎖サブグループIIIC(Kabata EAら、前記)に割り当て可能である。このサブグループのコンセンサス配列に比較したJ415 V_Hの配列を図7Cに示す。J415 V_Kは、マウス・カップ鎖サブグループI(Kabata EAら、前記)に割り当て可能である。このサブグループのコンセンサス配列に比較したJ415 V_Kの配列を図8Cに示す。

【0138】

重鎖および軽鎖の可変部のJ533をコードするDNAおよびアミノ酸配列を得て、そして図9A(V_H)および10A(V_K)に示す(表5もまた参照されたい)。CDRの位置を各図に示す。J533 V_Hは、マウス重鎖サブグループIIA(Kabata EAら, Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991)に割り当て可能である。このサブグループ

10

20

30

40

50

のコンセンサス配列に比較した J 5 3 3 V_H の配列を図 9 B に示す。J 5 3 3 V_K は、マウス・カッパ鎖サブグループ I I I (K a b a t E A ら、前記) に割り当て可能である。このサブグループのコンセンサス配列に比較した J 5 3 3 V_K の配列を図 1 0 B に示す。

【0 1 3 9】

重鎖および軽鎖の可変部の E 9 9 の D N A およびアミノ酸配列を得て、そして図 1 1 A (V_H) および 1 2 A (V_K) に示す(表 5 もまた参照されたい)。C D R の位置を示す。E 9 9 V_H は、マウス重鎖サブグループ I B (K a b a t E A ら、前記) に割り当て可能である。このサブグループのコンセンサス配列に比較した E 9 9 V_H の配列を図 1 1 B に示す。E 9 9 V_K は、マウス・カッパ鎖サブグループ I (K a b a t E A ら、前記) に割り当て可能である。このサブグループのコンセンサス配列に比較した E 9 9 V_K の配列を図 1 2 B に示す。

10

【0 1 4 0】

抗体 J 4 1 5、d e J 4 1 5、J 5 9 1、d e J 5 9 1、J 5 3 3 および E 9 9 の可変部をコードするアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を、以下の表 8 に提供する。

表 8：抗体可変鎖配列

【0 1 4 1】

【表 8 A】

名称	生物	図	配列 番号	配列
V _H J415	マウス	図 7B	125	Gaagtgaagcttgaggagctcggaggagcttggtgca acctggaggatccaatgaaactctcctgtgtgacctg gattcactttcagtaattactggaatgaactgggtccgc cagctccagagaaggggcttgagtgggttgcigaat tagatcgcaatctaataattttgcaacacattatgcgg agctctgigaaggagggtcatcatctcaagagatgat tccaagagtagtgtctaccigcaaatgaacaacttgag agctgaagacactggcatttattactgtaccaggcgat ggaataatttctggggccaaggcaccactctcacagtc tctca
V _H 可変部 J591	マウス	図 1A	19	EVQLQQSGPELKKPGTSVRISCKTSGYTFEYTIHWVK QSHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSS STAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLTVS S
V _H J415 (配列番号 125 の相補鎖)	マウス	図 7B	126	tgaggagactgtgagagtggtgccttggccccagaaat tattccatcgccctgggtacagtaataaalgccagtgtct tcagctctcaagttgttcatcttgccaggtagacactact cttggaaatcatctcttgagatgatgacctccctttca cagactccgcataatgtgttgcaaaattatitagattgc gatctaatttcagcaaccacatcaagcccttctctgg agactggcggaaccagttcatccagtaattactgaaag tgaatccagaggcaacacaggagagtttcatggatcct ccaggttgcaccaagcctctccagactctcaagctt cacttc
V _L J415	マウス	図 8B	127	aacattgtaatgacccaatttcccaaatccatgtccat ttcagtaggagagagggtcaccttgacctgaaggcca gtgagaatgtgggtacttatgtgtcctgggtatcaacag aaaccagaacagctctctaagatgttgataacggggc atccaaccggttacttgggtcccgatcgcttcacag gcagtggaatctgcaacagatttcatctgaccatcagc agtgtgcagactgaagaccttgiagattattactgtgg acagagttacacctttccgtacacgttcggagggggga ccaagctggaaatgaag
V _L 可変部 J591	マウス	図 1B	20	DIYMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTIT NVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLK

10

20

30

40

【 0 1 4 2 】

【 表 8 B 】

50

40

V _H 脱免疫 (配列番号 23 の相補鎖) J591	人工的脱免 疫重鎖 J591	図 4A	24	ggatcctataaaatctctggccatgaagctctgggagctg aggatgtctgtctgcacacagccgggctcccaatgacc ctttctgactcccaagggtgtccctagtccttcatgacc tgaaattcagatacacacatttccccccaacaaatgc agtaaaatctatttaagctgaatagaagagagaggttg taaggactcaccigaggagacggtagcagggtccctt ggccccagtagtcaaagttccaaccagctgcacaataa tagactgcagtatcctcagatcttaggtctgtgagctc catgtaggctgtatcggtaggacttgcctacagttatg tgaccttgctcctgaacttctgattgtagggtggtacca ccattgttaggatgtatgtttccaateccactcaaggcc ctttccaggggcctgcttcacccagtgatggtatatt cagtgaatgtgtatccagaagcttgcaggatatcttc actgtageccccaggttcttccacttcagggtccagactg taccagttggacctcggagtgacacctgtggagagaa aggcaaagtggatgtcatgttcacccatataatgtcc agacctcaagcctgctactgtgagcccccttacctgtag ctgttgctaccaagaagaggatgatcacagctccatccc atggtagggtccctgtgtgtcagtaactgtagagagaa ctgtgatctcatgtttttctgtttgttggtatagacaaa cctatatttaccatgtagattcagaggatttgcatatt cataagctt

10

20

【 0 1 4 4 】

【 表 8 D 】

30

V_I 脱免疫 J591 CDS (122-166) & CDS (249-581)	人工的脱免 疫軽鎖 J591	図 4B	25	aagcttatgaatatgcaaatcctctgaatctacatggt aaatataggtttgtctataaccacaaacagaaaaacatg agatcacagtctctctacagttactgagcacacagga cctcaccatgggatggagctgtatcattcttcttgg tagcaacagctacaggttaaggggtcacagtagcaggc ttgaggcttgacatatataigggtagacaatgacatcc actttgcctttctctccacagggtccactccgacatc cagatgacceagctccctcattccctgtccacatcagt aggagacagggtcacctcaccctgttaagggcagtcag atgtgggtactgtctgtagactggatcaacagaaacca ggaccatctctaaactactgatttatigggcatccac tcggcacactggaaatccctagtcgcttctcaggcagtg gatctgggacagacttcactctcaccatttctagcttt cagcctgaagactttgcagattattactgtcagcaata taacagctatcctctcagcttcggctctgggaccaagg tggaatcaaacgtgagtagaatttaaactttgcttcc tcagttggatcc	10
V_I 脱免疫 (配列番号 25 の相補鎖) J591	人工的脱免 疫軽鎖 J591	図 4B	26	ggatccaactgaggaagcaaatgaaattctactcac gtttgagtgtccacttgggtcccaggaccgaacgtgaga ggatagctgtttatatgtctgacagtaataatctgcaaa gtcttcaggctgaagactagaaatggtagagtgaaagt ctgtcccagatccactgtccctgagaagcgactagggatt ccagtggtgcccagtggaatgcccataaatcagtagttt aggagatgggtcttgggttctgtttgataccagctctacag cagtagccacatcttgactggccttacaggtaggggtg acctgtctctctactgagtgtggacaggatgagggaga cigggtcatctggatgtcggagtggacacctgtggaga gaaaggcaaagtggatgtcattgtcacccatatataatg tccagacctcaagccgtctactgtgagcccccttacctg tagctgtttgctaccaagaagaggatgatacagctccat cccatggtaggttccgtgtgtgtcagtaactgttagaga gaactgtgatctcatgtttttctgtttgttggtatagac aaacctataattaccaatgtagattcagaggatttgcat attcataagctt	30
					40

【 0 1 4 5 】

【 表 8 E 】

V _H 脱免疫 (配列番号 23 の予測される アミノ酸) J591	人工的脱免 疫重鎖 J591	図 4A	27	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVQSGPEVKKPGATVK ISCKTSGYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGG TTYNQKFEDKATLTVDKSTDTAYMELSSLRSEDVAVYY CAAGWNFDYWGQGTLLTVSS
V _L 脱免疫 (配列番号 25 の予測される アミノ酸) J591	人工的脱免 疫軽鎖 J591	図 4B	28	MGWSCIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSTSVGDRV TLTKASQDVGTAVDWYQQKPGPSPKLLIYCASTRHTG IPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADYYCQQYNSYP LTFGPGTKVDIK
V _H 可変部 J415	マウス	図 5	47	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWVR QSPEKGLEWVAEIRSQSNFATHYAESVKGRV IISRDD SKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRRWNNFWGQGTLLTV SS
V _L 可変部 J415	マウス	図 6	48	NIVMTQFPKSMISVGERVTLTKASENVGTIVSWYQQ KPEQSPKMLIYGASNRFTGVPDRFTGSGSATDFILTIS SVQTEDLVYYCGQSYTFPYTFGGGKTLEMK
V _H 可変部 (脱免疫) J415-4	人工的脱免 疫重鎖 J415-4	図 5	49	EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFSNYWMNWVR QSPEKGLEWVAEIRSQSNFATHYAESVKGRV IISRDD SKSSVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTV SS
V _L 可変部 (脱免疫) J415-5	人工的脱免 疫軽鎖 J415-5	図 6	50	NIVMTQFPKSMASAGERMTLTKASENVGTIVSWYQQ KPTQSPKMLIYGASNRFTGVPDRFSGSGSGTDFILTIS SVQAEDLVYYCGQSYTFPYTFGGGKTLEMK
V _H 脱免疫 J415-4	人工的脱免 疫重鎖 J415-4		51	gaagtgaaacttgaggagcttgaggaggcttggtgca accitggagggtccatgaaaatctcctgtgtgcctctg gaticactttcagtaattactggatgaactgggtccgc cagictccagagaaggggcttgagtgggttgctgaaat tagatcgcaatctaataattttgcaacacattatgcgg agtcgttgaaaggagggtcatcatctcaagagatgat tccaagagtagtgtctacctgcaaatgaacagtttgag agctgaagacactgccgtttattactgtaccaggcgat ggaataatttctggggccaaggcaccactgtcacagtc tcctca

10

20

30

40

【 0 1 4 6 】

【 表 8 F 】

V _L 脱免疫 J415-5	人工的脱免 疫輕鎖 J415-5		52	aacattgttaatgacccaatttcccaaatccatgtccgc ctcagcaggagagaggatgaccttgacctgcaaggcca gtgagaatgtgggtacttatgtgtccttggtatcaacag aaaccaacacagtcctctaagatgttgatatacggggc atccaacegggttacctggggteccagatcgcttctccg gcagtggatctggaacagatttcatctgaccatcagc agtgtgcaggcagaagaccttgtagattattactgtgg acagagttacacctttccgtacacgttcggagggggga ccaagctggaaatgaag
V _H 脱免疫 J415-1 CDS (122-160) & CDS (249-608) 成熟(18-133)	人工的脱免 疫重鎖 J415-1	図 7A	53	aagcttatgaataigcaaatcctctgaatctacatggt aaatataggtttgtctataccacaaacagaaaaacatg agatcacagttctctctacagttactgagcacacagga cctcaccatgggatggagcigtatcatcctctcttgg tagcaacagctacaggtaaggggctcacagtagcaggc ttgaggcttgacatataatagggtgacaatgacatcc acttgcctttctctccacaggtgtccactccgaagtg aaacttgaggagctcggaggaggcttggtgcaacctgg agggtccatgaaaatctccigttaaagcctctggattca cttccagtaattactggatgaactgggtccgccagact ccagagaaggggcttgagtggttgccttattagatc gcaatctaaataattttgcaacacattatgcggagctc tgaaaggagggtcatcatctcaagagatgattccaag agtagtgcctacctgcaaatgaacagtttgagagctga agacactgccgtttattactgtaccaggcgtatggaata atttctggggccaaggcaccactgtcacagtcctctca ggtgagtccttacaacctctctcttattcagcttaa atagattttactgcatttgttgggggggaaatgttgt atctgaatttcagggtcatgaaggactaggacaccttg ggagtcagaaagggtcatgggagcccggtgatgca gacagacatcctcagctccagacttcatggccagaga tttataggatcc

10

20

30

40

【 0 1 4 7 】

【 表 8 G 】

V _H 脱免疫 (配列番号 53 の予測される アミノ酸) J415-1	人工的脱免 疫重鎖 J415-1	図 7A	54	MGWSCIIILFLVATGVHSEVKLEESGGGLVQPGGSMKIS CKASGFTFSNYWMNWVRQTPEKGLEWVALIRSQSNNFA THYAESVKGRVVISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTAVYY CTRRWNNFWGQGTITVTVSS
V _H 脱免疫 (配列番号 53 の相補鎖) J415-1	人工的脱免 疫重鎖 J415-1	図 7A	55	ggatccatataaatctctggccatgaagctcgggagcig aggatgctcgtcgtcatcagcccggtcccaatgacc cittctgacitcccaagggtgctcctagtccttcacgacc tgaaatcagatcacacatttccccccaacaaatgc agtaaaatctatttaagctgaatagaagagagaggttg taaggactcacctgaggagacigtgacagtggcgtt ggccccagaaaattatccatcgcttggtacagtaataa acggcagtgcttcagctctcaactgttcatttgcag gtagacactactcttggaatcatctcttgagatgatga ccctccctttcacagactccgcataatgtgttgcaaaa ttattagattgcgatctaataagagcaaccacitcaag cccttctctggagctcggcgaccagttcatccagt aattactgaaagtgaatccagaggctttacaggagatt ttcatggaccctccaggttgcaccaagcctccctccaga ctccccaagtttcacttcggagtggacaccigtggaga gaaaggcaaagtggatgcatgtgtcacccatataatg tccagacctcaagcctgctactgtgagccccctaccgtg tagctgttgctaccaagaagaggatgalacagctccat cccatgggtgaggtccctgtgtgtcagtaactgttagaga gaactgtgatctcatgtttttctgttttggtatagac aaacctatatttaccatgtagattcagaggatttgcatt attcataagctt

10

20

30

【 0 1 4 8 】

【 表 8 H 】

V _L 脱免疫 J415-1 CDS (122-160) & CDS (249-581)	人工的脱免 疫軽鎖 J415-1	図 8A	56	aagcttatgaatatgcaaatccctctgaatctacatggt aaatataggtttgtctataaccacaaacagaaaaacatg agatcacagtctctctacagtiactgagcacacagga cctcaccatgggatggagctgtatcctctctcttgg tagcaacagctacaggttaaggggtcacagtagcagge ttgaggtctggacataatataatgggtgacaatgacatcc acttgcctttctctccacaggtgtccactccaacatt gtaatgacccaatcccccaatccatgtccgctcagc aggagagaggatgacctgacctgcaagggcagtgaga attccggtacttatgtgtcttggtatcaacagaaacca acacagctctcctaagaigtgatatacggggcatccaa ccggttccatgggtcccagatcgcttctccggcagtg gatctggaacagatttcattctgaccgccagcagtgig caggcagaagaccctgtagattattactgtggacagag ttacacctttccgtacacgttcggagggggaccaagc tggaaatgaagcgtgagtagaatttaaactttgcttcc tcagttggatcc
V _L 脱免疫 (配列番号 56 の予測される アミノ酸) J415-1	人工的脱免 疫軽鎖 J415-1	図 8A	57	MGWSCIILFLVATGVHSNIVMTQSPKSMSASAGERMTL TCKASENSGTIVSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFTGVP DRFSGSGSGTDFILTASSVQAEDPVDYYCGQSYTFPYT FGGGTKLEMK

10

20

【 0 1 4 9 】

【 表 8 I 】

30

V _L 脱免疫 (配列番号 56 の相補鎖) J415-1	人工的脱免 疫軽鎖 J415-1	図 8A	58	ggatccaactgaggaagcaaagtttaaatctactcac gcttcatttccagcttggccccctccgaacgigtac ggaaagggtgaactctgtccacagtaataatctacagg gtcttctgccigcacacigtggcggtcagaatgaaat ctgttccagaiccactgccggagaagcgaatctgggacc ccagtgaaaccggttggatgccccgtatatcaacatctt aggagactgtgttggtttctgttgataccaggacacat aagtaaccggaattctcactggccctgcaggtaaggctc atcctctctccctgctgaggcggacatggatttggggga ttgggtcattacaatgttggagtgacacctgtggaga gaaaggcaaagtggatgcatgttcacccatataatg tccagacctcaagcctgctactgtgagccccctacctg tagctgttgctaccaagaagaggatgatacagctccat cccatggigaggctcctgtgtgtcagtaactgtagaga gaactgtgatctcaigtcttctgttctgttggtatagac aaacctataatccatgtagattcagaggatttgcatt attcataagctt
V _H 脱免疫 J415-2	人工的脱免 疫重鎖 J415-2	図 5	59	EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFSNYWMNWVR QTPEKGLEWVALIRSQSNNFATHYAESVKGRVVISRDD SKSSVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTITVTV SS
V _H 脱免疫 J415-3	人工的脱免 疫重鎖 J415-3	図 5	60	EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFSNYWMNWVR QTPEKGLEWVAEIRSQSNNFATHYAESVKGRVVISRDD SKSSVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTITVTV SS
J415 V _H (DI) 大多数の配列	人工的 大多数の 配列	図 5	61	EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFSNYWMNWVR QTPEKGLEWVAEIRSQSNNFATHYAESVKGRVVISRDD SKSSVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTITVTV SS
V _L 脱免疫 J415-2	人工的脱免 疫軽鎖 J415-2	図 6	62	NIVMTQSPKMSASAGERMTLTCKASENVGTIVSWYQQ KPTQSPKMLIYGASNRFTGVPDRFSGSGSGTDFILTAS SVQAEDPVDYYCGQSYTFPYTFGGGTKLEMK
V _L 脱免疫 J415-3	人工的脱免 疫軽鎖 J415-3	図 6	63	NIVMTQSPKMSASAGERMTLTCKASENVGTIVSWYQQ KPTQSPKMLIYGASNRFTGVPDRFSGSGSGTDFILTAS SVQAEDLVDYYCGQSYTFPYTFGGGTKLEMK

10

20

30

40

【 0 1 5 0 】

【 表 8 J 】

V _L 脱免疫 J415-4	人工的脱免 疫軽鎖 J415-4	図 6	64	NIVMTQSPKMSASAGERMTLTCKASENVGTIVSWYQQ KPTQSPKMLIYGASNRFTGVPDRFSGSGSGTDFILTIS SVQAEDLVDYYCGQSYTFPYTFGGGTKLEMK
V _L 脱免疫 J415-6	人工的脱免 疫軽鎖 J415-6	図 6	65	NIVMTQFPKMSASAGERMTLTCKASENVGTIVSWYQQ KPEQSPKMLIYGASNRFTGVPDRFSGSGSGTDFILTIS SVQAEDLVDYYCGQSYTFPYTFGGGTKLEMK
V _L 脱免疫 J415-7	人工的脱免 疫軽鎖 J415-7	図 6	66	NIVMTQFPKMSASAGERVTLTCKASENVGTIVSWYQQ KPTQSPKMLIYGASNRFTGVPDRFSGSGSGTDFILTIS SVQAEDLVDYYCGQSYTFPYTFGGGTKLEMK
V _L 脱免疫 J415-8	人工的脱免 疫軽鎖 J415-8	図 6	67	NIVMTQFPKMSASAGERMTLTCKASENSGTIVSWYQQ KPEQSPKMLIYGASNRFTGVPDRFSGSGSGTDFILTIS SVQAEDLVDYYCGQSYTFPYTFGGGTKLEMK
J415 V _L (DI) 大多数の配列	人工的 大多数の 配列	図 6	68	NIVMTQFPKMSASAGERMTLTCKASENVGTIVSWYQQ KPTQSPKMLIYGASNRFTGVPDRFSGSGSGTDFILTIS SVQAEDLVDYYCGQSYTFPYTFGGGTKLEMK
MuV _H IIIC	マウス	図 7C	69	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFSNYWMNWVR QSPEKGLEWVAEIRLKSDNYATHAESVKGRFTISRDD SKSSVYLQMNNLRAEDTGIIYCTTGGYGGRS ^W FAYWG QGTLVTVSS
J415V _H /MuV _H IIIC 大多数の配列	人工的 大多数の 配列	図 7C	70	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFSNYWMNWVR QSPEKGLEWVAEIRLQSDNFATHAESVKGRV ^I ISRDD SKSSVYLQMNNLRAEDTGIIYCTTGGYGGRS ^W NAFWG QGTLVTVSS
MuV _L 1	マウス	図 8C	71	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNY LAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTD FTLT ^I ISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELK
J415V _L /MuV _L 1 大多数の配列	人工的 大多数の 配列	図 8C	72	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTLSCKASESLLNVGNQKTY VAWYQQKPGQSPKLLIYGASTRESGVPDRFTGSGSGTD FILT ^I ISSVQAEDLAVYYCGNSYSFPLTFGGGTKLELK

10

20

30

【 0 1 5 1 】

【 表 8 K 】

J533 V _H CDS (1-354)	マウス	図 9A	73	gaggtccagctgcagcagctcggacctgagctgggttaa gcctggggcttcagtgaagatgctcgaaggtctctg gatacacattcactggctatgttatgcactgggtgaag cagaagcctggacaggtccttgagtggaatggatataat taatccttacaatgatgttactaggtataatgggaagt tcaaaggcaaggccacactgacctcagacaaatattcc agcacagcctacatggagctcagcggcctgacctctga ggactctgcggtctattactgtgcaagaggggagaact ggctactactttgactcctggggccgaggcgccactctc acagtctctca
J533 V _H (配列番号 73 の予測される アミノ酸)	マウス	図 9A	74	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHWVK QKPGQVLEWIGYINPYNDVTRYNGKFKGKATLTSDKYS STAYMELSGLTSEDSAVYYCARGENWYYFDSWGRGATL TVSS
J533 V _H (配列番号 73 の相補鎖)	マウス	図 9A	75	tgaggagactgtgagagtgccgcctcggccccaggagt caaagtagtaccagttctccctcttgcacaglaaatag accgcagagtcctcagaggctcaggccgctgagctccat gtaggctgtgctggaaatattgtctgaggctcagtggtg ccttgccttltgaacttccattataacctaglaacaatca ttgttaaggattaatataatccaatccactcaaggacctg tccaggcttctgcttcccccagtgcataacaatagccag tgaatgtgtatccagaagccttgcaggacatcttact gaagccccaggcttaaccagctcaggctccagactgctg cagctggacctc
J533 V _L CDS (1-333)	マウス	図 10A	76	gacatigtgctgacccaatctccagcttctttggctgt gtctctaggacagaggccaccataatctgcagagcca gtgaaagtattgatagttatgacaatacttttatgcac tggtaccagcagaaaccaggacagccaccaacctcct catcttctgtgcatccatccatagaatctgggatccctg ccaggctcagtggcagtggtctgggacagacttacc ctcaccatttatectgtggaggctgatgatgttgaac ctattactgtcaccaaagtattaggattccgtacacgt tcggaggggggaccaagctggaaataaaa
J533 V _L (配列番号 76 の予測される アミノ酸)	マウス	図 10A	77	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEIDSYDNTFMH WYQQKPGQPPLLIFRASILESGIPARFSGSGSGTDF LTIPVEADDVATYYCHQSIEDPYTFGGGTKLEIK

10

20

30

40

J533 V _L (配列番号 76 の相補鎖)	マウス	図 10A	78	ttttatttccagcttggccccctccgaacggtacg gaaccicaatacttggtagacagtaataggtagcaaca tcatcagcctccacaggataaatggtaggggtgaagtc tgtccagacccactgccactgaacctggcagggatcc cagattctaggatggatgcacgaaagatgaggagggttg ggtagctgtcctgggttctgtcgtgtaccagtgcataaa agtattgtcataactatcaatacttccactggctcgtc aggataatggtaggccccctgtccttagagacacagccaaa gaagctggagattgggtcagcacaatgtc	10
MuV _H II	マウス	図 9B	79	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYMNWV KQSPGKSLEWIGDINPGNGGTSYNQKFKGKATLTVDKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGYYSSYMAYYAFDY WGQGTTVTVSS	
J533V _H /MuV _H II 大部分の配列	人工的 大部分の 配列	図 9B	80	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTGYMNWV KQSPGQVLEWIGDINPGNGGTSYNGKFKGKATLTVDKS SSTAYMELSGLTSEDSAVYYCARGENSSSYMAYYAFDS WGQGATVTVSS	20
MuV _L -3	マウス	図 10B	81	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDSYGNSFMH WYQQKPGQPPLLIYAASNLESGVPARFSGSGSGTDFT LNIHPVEEDDAATYYCQSSNEDPPWTFGGGTKLEIK	
J533V _L / MuV _L -3 大部分の配列	人工的 大部分の 配列	図 10B	82	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDSYGNSFMH WYQQKPGQPPLNLIYAASILESGVPARFSGSGSGTDFT LTIHPVEADDAATYYCQSSIEDPPYTFGGGTKLEIK	
E99 V _H CDS (1-363)	マウス	図 11A	83	cagggtgcagctaaaggagtcaggacctggcctgggtggc gtcctcacagagcctgtccatcacatgcaccgtctcag gattctcatlaaccgcciatggtatlaactgggttcgc cagcctccaggaaagggtctggagtggcctgggagtgat atggcctgatggaaacacagactataatcaactctca aatccagactgaacatctcaaggacaactccaagaac caagttttcttaaaaatgagcagtttccaaactgatga cacagccagatacttctgtgccagagatctgtatggta acttcaagaggggttggtttgacttctggggccagggc accactctcacagtcctca	30
E99 V _H (配列番号 83 の予測される アミノ酸)	マウス	図 11A	84	QVQLKESGPGLVASSQSLSTCTVSGFSLTAYGINWVR QPPGKGLEWLGVIWPDGNTDYNSTLKSRLNIFKDNSKN QVFLKMSSFQTDRTARYFCARDSYGNFKRGWFDWQGQ TTLTVSS	40

E99 V _H (配列番号 83 の相補鎖)	マウス	図 11A	85	tgaggagactgtgagagtgggtgcccigggcccagaagt caaaccaacccctctgaagttaccatacgaatctctg gcacagaagtatctggctgtgtcatcagtttggaact gtctatttttaagaaaacttgggtcttggagtgtcct tgaagatgttcagtcctggatttgagagtgaattatag tctgtgtttccatcaggccatatacctcccageccactc cagaccctttccctggaggctggcgaaccagttaatac cataggcgggttaatgagaatcctgagacgggtgcattg atggacaggctctgtgaggacgccaccaggccaggctcc tgactccttttagctgcacctg
E99 V _L CDS (1-321)	マウス	図 12A	86	aacattgtgatgaccagctctcaaaaattcatgtccac atcaccaggagacagggtcagggtcaccctgcaaggcca gtcagaaigtgggttctgaigtacctgggtatcaagcg aaaccaggacaatctcctagaatacagatttactcgac atcctaccgttacagtggggtcccctgatcgcttcacag cctatggatctgggacagatttcactctcaccattacc aatgtgcagctctgaagacttgacagagtatttctgtca gcaataataatagctatccctctcacgttcgggtgtcggga ccaagctggagctgaaa
E99 V _L (配列番号 86 の予測される アミノ酸)	マウス	図 12A	87	NIVMTQSQKFMSTSPGDRVRVTCKASQNVGSDVAWYQA KPGQSPRILYSTSRYSGVPDRFTAYGSGTDFTLTIT NVQSEDLTEYFCQQNSYPLTFGAGTKLELK
E99 V _L (配列番号 86 の相補鎖)	マウス	図 12A	88	tttcagctccagcttgggtcccagcacgaacgtgagag gatagctattatattgctgacagaaatactctgtcaag tcttcagactgcacattggtaalgggtgagagtgaatc tgtcccagatccataggctgtgaagcgatcagggaccc cactgiaacggtaggatgtcgaglaaatcagttattcta ggagattgtcctgggttctgcttgataccaggctacatc agaaccacattctgactggccttgagggtgacctga ccctgtctcctgggtgatgtggacatgaatttttgagac tgggtcatcacaatggt
MuV _H IB	マウス	図 11B	89	QVQLKESGPGLVASSQSLSITCTVSGFSLTAYGINWVR QPPGKGLEWLGVIPDGNTDYNSTLKSRLNIFKDNSKN QVFLKMSSFQTDRTARYFCARDSYGNFKRGWFDWGGG TTLTVSS

10

20

30

40

E99V _H /MuV _H IB 大部分の配列	人工的 大部分の 配列	図 11B	90	QVQLKESGPGLVASSQSLSITCTVSGFSLTAYGINWVR QPPGKGLEWLGVIWPDGNTDYNSTLKSRLNIFKDNSKN QVFLKMSSFQTDDTARYFCARDSYGNFKRGWDFWGGQG TTLTVSS
MuV _L -1	マウス	図 12B	91	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNY LAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTD FTLTISVVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELK
E99V _L /MuV _L -1 大部分の配列	人工的 大部分の 配列	図 12B	92	DIVMTQSQSSLAVSAGDKVTVSCKASQSLLNVGSDKNY VAWYQAKPGQSPKLLIYSASTRESGVDPDRFTGSGSGTD FTLTISVVQAEDLAVYFCQNDNSYPLTFGAGTKLELKR A

10

【0155】

ヒト化抗体分子またはCDR移植抗体分子または免疫グロブリンは、CDR移植またはCDR置換によって産生可能であり、ここで、免疫グロブリン鎖の1、2、またはすべてのCDRを交換可能である。例えば、そのすべての内容が明確に本明細書に援用される、米国特許5,225,539; Jonesら 1986 Nature 321:552-525; Verhoeyanら 1988 Science 239:1534; Beidlerら 1988 J. Immunol. 141:4053-4060; Winter、US 5,225,539を参照されたい。

20

【0156】

Winterは、本発明のヒト化抗体を調製するのに使用可能なCDR移植法を記載しており(UK特許出願GB 2188638A、1987年3月26日出願; Winter、US 5,225,539)、この内容は、明確に本明細書に援用される。特定のヒト抗体のCDRすべてを、非ヒトCDRの少なくとも一部と交換することが可能であるし、またはCDRのいくつかのみを、非ヒトCDRと交換することが可能である。あらかじめ決定した抗原に対するヒト化抗体の結合に必要な数のCDRを交換する必要があるのみである。

30

【0157】

抗原結合に直接関与しないFv可変部の配列を、ヒトFv可変部由来の同等の配列と交換することによって、ヒト化抗体を生成可能である。ヒト化抗体を生成するための一般的な方法が、Morrison, S. L., 1985, Science 229:1202-1207、Oira, 1986, BioTechniques 4:214、並びにQueenら、US 5,585,089、US 5,693,761およびUS 5,693,762に提供され、これらのすべての内容が本明細書に援用される。これらの方法には、重鎖または軽鎖の少なくとも1つから、免疫グロブリンFv可変部のすべてまたは一部をコードする核酸配列を単離し、操作し、そして発現することが含まれる。こうした核酸の供給源は、当業者に周知であり、そして例えば、上述のように、あらかじめ決定した標的に対する抗体を産生するハイブリドーマから得ることが可能である。その後、ヒト化抗体またはその断片をコードする組換えDNAを、適切な発現ベクターにクローニングすることが可能である。

40

【0158】

また、本発明の範囲内には、特定のアミノ酸が置換されるか、欠失されるか、または付加されているヒト化抗体がある。特に、好ましいヒト化抗体は、抗原への結合を改善するような、フレームワーク領域におけるアミノ酸置換を有する。例えば、ヒト化免疫グロブリン鎖の、選択される少数のアクセプターフレームワーク残基を、対応するドナーアミノ酸と交換することが可能である。置換の好ましい位置には、CDRに隣接するかまたはCD

50

Rと相互作用可能なアミノ酸残基が含まれる（例えばUS 5, 585, 089を参照されたい）。ドナーからアミノ酸を選択する規準が、US 5, 585, 089、例えばUS 5, 585, 089の12～16欄に記載され、この内容は本明細書に援用される。アクセプターフレームワークは、成熟ヒト抗体フレームワーク配列またはコンセンサス配列であることが可能である。

【0159】

本明細書において、用語「コンセンサス配列」は、関連配列ファミリーにおいて、最も頻繁に存在するアミノ酸（またはヌクレオチド）から形成される配列を指す（例えばWinkler, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, ドイツ・ワインハイム 1987)を参照されたい）。タンパク質ファミリーにおいて、コンセンサス配列中の各位は、ファミリーにおいて、その位に最も頻繁に存在するアミノ酸によって占められる。2つのアミノ酸が、同等に頻繁に存在する場合、どちらがコンセンサス配列に含まれることも可能である。「コンセンサス・フレームワーク」は、コンセンサス免疫グロブリン配列におけるフレームワーク領域を指す。

【0160】

抗体をヒト化する他の技術が、Padlanら EP 519596 A1、1992年12月23日公開に記載される。

抗PSMA抗体、またはその抗原断片はまた、その内容が特に本明細書に援用される、WO 98/52976およびWO 00/34317に開示される方法によって、ヒトT細胞エпитープの特異的欠失または「脱免疫化」によって修飾可能である。簡潔には、抗PSMA抗体のネズミ重鎖および軽鎖の可変部を、MHCクラスIIに結合するペプチドに関して解析可能であり；これらのペプチドは、潜在的なT細胞エпитープに相当する（WO 98/52976およびWO 00/34317に定義されるとおり）。潜在的なT細胞エпитープを検出するため、「ペプチドスレッディング」と称されるコンピュータモデリングアプローチが適用可能であり、そしてさらに、WO 98/52976およびWO 00/34317に記載されるように、ネズミV_HおよびV_L配列に存在するモチーフに関して、ヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベースを検索することが可能である。これらのモチーフは、18の主要なMHCクラスII DRアロタイプのいずれかに結合し、そしてしたがって、潜在的なT細胞エпитープを構成する。検出される潜在的なT細胞エпитープは、可変部において、少数のアミノ酸残基を置換することによって、または好ましくは単一アミノ酸置換によって、除去可能である。ありうる保存的置換を作成する限り、排他的にはではないが、しばしば、ヒト生殖系列抗体配列中のこの位に一般的なアミノ酸を使用することが可能である。ヒト生殖系列配列は、Tomlinson, I. A. ら (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G. P. ら (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5):237-242; Chothia, D. ら (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817に開示される。VBASEディレクトリは、ヒト免疫グロブリン可変部配列の包括的なディレクトリを提供する（Tomlinson, I. A. ら MRC Centre for Protein Engineering, 英国ケンブリッジによって編集）。ネズミのV_HおよびV_L遺伝子の突然変異誘発によって、抗PSMA抗体の脱免疫V_HおよびV_Lを構築した後、突然変異誘発した可変配列を、場合によって、ヒト定常部、例えばヒトIgG1またはκ定常部に融合させることが可能である。

【0161】

いくつかの場合、潜在的なT細胞エпитープには、抗体機能に重要であることが知られるかまたは重要であると予測される残基が含まれるであろう。例えば、潜在的なT細胞エпитープは、通常、CDRに偏る。さらに、潜在的なT細胞エпитープは、抗体構造および結合に重要なフレームワーク残基に存在することが可能である。これらの潜在的なエпитープを除去する変化は、いくつかの場合、例えば該変化を含む鎖および含まない鎖を作成して、そして試験することによる、さらなる吟味を必要とするであろう。可能な場合、C

10

20

30

40

50

D Rと重複する、潜在的なT細胞エピトープを、C D R外部の置換によって除去した。いくつかの場合、C D R内の改変が唯一のオプションであり、そしてしたがってこの置換を含む変異体および含まない変異体を試験すべきである。他の場合、潜在的なT細胞エピトープを除去するのに必要な置換は、抗体結合に重要である可能性があるフレームワーク内の残基位でのものである。これらの場合、この置換を含む変異体および含まない変異体を試験すべきである。したがって、いくつかの場合、いくつかの変異体の脱免疫重鎖および軽鎖の可変部を設計し、そして最適な脱免疫抗体を同定するため、多様な重鎖／軽鎖の組み合わせを試験した。その後、異なる変異体の結合親和性と、脱免疫の度合い、すなわち可変部に残る潜在的なT細胞エピトープの数を組み合わせて考慮することによって、最終脱免疫抗体を選択することが可能である。

10

【0162】

発現のため、適切な宿主細胞、例えばN S OまたはC H O細胞に組換え脱免疫抗体をトランスフェクションして、完全な組換え抗体を産生することが可能である。

1つの態様において、ネズミのV_HおよびV_L遺伝子の突然変異誘発によって、ネズミJ 591領域の脱免疫V_HおよびV_Lを構築した。ネズミJ 591可変部配列を図1A～1Bに示す。ネズミJ 591重鎖および軽鎖の可変部における潜在的なエピトープ（ペプチドスレッディングプログラムを用いて同定）を、それぞれ、図3Aおよび3Bに示す。M H CクラスI Iに結合すると予測される13量体ペプチドを下線で示し、C D Rは図3Aの残基26～35、50～66、および99～104、並びに図3Bの残基24～34、50～56、および89～97に位置し、そして脱免疫重鎖および軽鎖の可変部において改変された残基はボックスに入れる。可能な場合、アミノ酸置換は、ヒト生殖系列重鎖および軽鎖の可変部に一般的に用いられるものである。ペプチドスレッディングソフトウェアを用いた、in silico解析に加えて、ネズミJ 591配列に存在するモチーフに関して、ヒトM H CクラスI I結合ペプチドのデータベースを検索した。

20

【0163】

ネズミJ 591重鎖可変部の以下の13量体（13量体の最初の直鎖残基番号によって標示）は、M H CクラスI Iに結合すると予測され、そしてこれらは、2、10、16、30、32、35、43、46、58、62、70、81、84、91、および100であった（図3A）。ネズミJ 591重鎖可変部において残基に行う変化の根底にある原理の説明を以下に示す（改変された残基が、K a b a t 番号付け系に基づいて同定されていることに注目されたい）：

30

5 Q (R) Vは、残基2の潜在的なエピトープを除去し；

1 1, 1 2 L V (R) V Kは、残基10の潜在的なエピトープを除去し；

1 2 V (R) Kもまた、ヒトM H CクラスI I結合ペプチドのデータベース由来のモチーフを除去するよう変化し；

1 6, 1 7 T S (R) A T、および1 9 R (R) Kは、残基16の潜在的なエピトープを除去し；

残基30のエピトープはC D R 1に渡り、そしてしたがって改変せず；

4 0, 4 1 S H (R) A Pは、残基32および35の潜在的なエピトープを除去し；

4 4 S (R) Gは、43のエピトープに関する結合スコアを減少させ、この13量体はC D R 2に渡り；

40

残基46、58および62のエピトープはC D R 2に渡り、そしてしたがって改変せず；

7 5, 7 6 S S (R) T Dは、残基70の潜在的なエピトープを除去し；

8 2 a R (R) S、8 3 T (R) Rは、残基81および84の潜在的なエピトープを除去し；

8 7 S (R) T、この変化は、ヒトM H CクラスI I結合ペプチドのデータベース由来のモチーフを除去するよう作成され；

残基91のエピトープはC D R 3に渡り、そしてしたがって改変せず；そして

1 0 8 T (R) Lは、残基100の潜在的なエピトープを除去する。

【0164】

M H CクラスI I分子に結合すると予測される、ネズミJ 591軽鎖可変部の次の13量

50

体(mer) (13量体の最初の直鎖残基番号によって標示)は、1、8、17、27、30、31、35、45、47、56、60、71、73、81、94であった(図3B)。ネズミJ591軽鎖可変部において残基に行う変化の根底にある原理の説明を以下に示す(改変された残基が、Kabab番号付け系に基づいて同定されていることに注目されたい)：

3V(R)Qは、残基1の潜在的なエピトープを除去し；

8-11HKFM(R)PSLは、残基8(13)の潜在的なエピトープを除去し；

20-22SII(R)TLTは、残基17および20の潜在的なエピトープを除去し；

21I(R)Lもまた、ヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベース由来のモチーフを除去するよう変化し；

残基27のエピトープはCDR1に渡り、そしてしたがって改変せず；

42Q(R)Pは、残基31のエピトープに関する結合スコアを減少させ；

残基44および47のエピトープはCDR2に渡り、そしてしたがって改変せず；

58V(R)Iは、ヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベース由来のモチーフを除去するよう変化し；

60D(R)S、62T(R)Sは、残基56および60のエピトープを除去し；

76-78TNV(R)SSL、80S(R)P、83L(R)Fは、残基71、73、76および81のエピトープを除去し；

87F(R)YIは、ヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベース由来のモチーフを除去するよう変化し；

100A(R)Pおよび103M(R)Kは、残基94のエピトープを除去し；そして

104L(R)Vおよび106L(R)Iは、ヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベース由来のモチーフを除去するよう変化する。

【0165】

脱免疫J591重鎖および軽鎖の可変部のアミノ酸およびヌクレオチド配列を、それぞれ、図2A～2Bおよび4A～4Bに示す(表8も参照されたい)。

ヒトIgG1またはκ定常部を付加して、そして複合遺伝子をNS0細胞にトランスフェクションして、完全な組換え抗PSMA抗体を産生した。これらの抗体は、元来のネズミ抗体と同程度に効率的にPSMA(LNCaP細胞上)に結合し、そしてヒトにおいて、減少した免疫原性を有するか、またはまったく免疫原性を持たない。

【0166】

脱免疫J415の設計は、脱免疫J591抗体の作成と類似であった。重鎖および軽鎖配列を、HB-12109と称するハイブリドーマからクローニングした。これらの配列を、対照抗体として使用するため、キメラ抗体としてクローニングし、配列決定し、そして発現させた。ネズミV領域配列をペプチドスレッディングに供して、18の異なるヒトMHCクラスIIアロタイプへの結合の解析を通じて、潜在的なT細胞エピトープを同定した。ネズミ配列に関するペプチドスレッディング解析の結果を表9に示す。

【0167】

表9：ネズミJ415配列における潜在的なT細胞エピトープ

【0168】

【表9】

10

20

30

40

配列	潜在的T細胞 の数	潜在的なエピトープの位置 ⁺ (試験した18群のうち、潜在的なMHC 結合因子の数)
ネズミ J415 V _H	12	10(17), 16(13), 21(9), 30(6), 35(16), 43(8), 46(6), 49(8), 64(6), 80(15), 86(15), 104(6)
ネズミ J415 V _K	13	5(5), 11(18), 13(11), 17(5), 27(8), 31(7), 56(15), 60(12), 70(5), 71(11), 73(17), 76(7), 81(17)

10

【0169】

⁺ V_H および V_K に関して、それぞれ、EまたはN、アミノ酸番号1から、SまたはK、アミノ酸番号107および116と番号付けされる、潜在的なエピトープの第一のアミノ酸。

【0170】

一次脱免疫 V_H および V_L 配列を定義した (J415D1VH1、J415D1VK1)。一次脱免疫配列の生成が、最終脱免疫分子の結合に影響を及ぼす可能性がある、少数のアミノ酸置換を必要とするため、3つの他の変異体 V_H S および 7つの他の V_L S を設計した (図5および6を参照されたい)。一次脱免疫 V_H および V_L 領域のヌクレオチド配列を、それぞれ、図7Aおよび8Aに示す。J415のネズミおよび脱免疫V領域のアミ

20

【0171】

ネズミ J415 重鎖可変部において残基に行ういくつかの変化の根底にある原理の説明を以下に示す (改変された残基が、図5に示す直鎖番号付けにしたがって同定されていることに注目されたい) :

20L(R)Iは、残基10および16の潜在的なエピトープを除去し;

87N(R)Sは、残基80および86の潜在的なエピトープを除去し;

94、95GI(R)AVは、残基86の潜在的なエピトープを除去し;そして

112L(R)Vは、残基104の潜在的なエピトープを除去する。

【0172】

ネズミ J415 軽鎖可変部において残基に行ういくつかの変化の根底にある原理の説明を以下に示す (改変された残基が、図6に示す直鎖番号付けにしたがって同定されていることに注目されたい) :

13I Aは、残基5、11および13の潜在的なエピトープを除去し;

15V Aは、残基5、11および13の潜在的なエピトープを除去し;

19V-Mは、残基11、13および17の潜在的なエピトープを除去し;

41E-Tは、残基31の潜在的なエピトープを除去し;

63T-Sは、残基56および60の潜在的なエピトープを除去し;

68A-Gは、残基56および60の潜在的なエピトープを除去し;そして

80T-Aは、残基70、71、73、および76の潜在的なエピトープを除去する。

30

40

【0173】

J415の脱免疫可変部を、重複PCR組換え法によって、構築した。クローニングしたネズミ V_H および V_K 遺伝子を、必要な脱免疫配列へのフレームワーク領域の突然変異誘発のためのテンプレートとして用いた。改変しようとする領域を含む、突然変異誘発プライマー対の組を合成した。ベクターVH-PCR1およびVK-PCR1 (Riechmannら (1988) Nature 332:323-7) をテンプレートとして用いて、リーダーシグナルペプチド、リーダーイントロンおよびネズミ免疫グロブリンプロモーターを含む5' 隣接配列、並びにスプライシング部位およびイントロン配列を含む3' 隣接配列を導入した。生じた脱免疫V領域をpUC19にクローニングし、そして各脱免疫 V_H および V_L に関して、全DNA配列が正しいことを確認した。

50

【0174】

脱免疫重鎖および軽鎖V領域遺伝子を、HindIIIからBamHI断片としてpUC19から切除し、この断片には、ネズミ重鎖免疫グロブリンプロモーター、リーダーシグナルペプチド、リーダーイントロン、V_HまたはV_L配列およびスプライシング部位が含まれる。これらを、それぞれヒトIgG1またはκ定常部、および哺乳動物細胞における選択のためのマーカーを含む発現ベクター、pSVgptおよびpSVhygに移した。発現ベクターにおいて、脱免疫V_HおよびV_Lに関して、DNA配列が正しいことを確認した。

【0175】

NS0（動物細胞培養欧州コレクション、英国ポートンから得た、非免疫グロブリン産生マウス骨髓腫（ECACC番号85110503））細胞への発現ベクターpSVgpt J415VHHuIgG1およびpSVhyg J415VKHuCKのトランスフェクションのため、それぞれ、3および6μgのプラスミドDNAを調製し、そしてその後、トランスフェクション効率を改善するため、PvuIで直線化した。その後、エタノール沈殿させたDNAを、遠心分離によって採取し、そして0.4cmジーンパルサーキューベットにおいて、0.5mlの非選択ダルベッコの修飾イーグル培地（DMEM）（Life Technologies Inc.）に再懸濁した半集密（semi-confluent）フラスコのNS0細胞と混合した。細胞およびDNAを氷上で5分間冷却した後、170V、960μFのパルスを適用した。キューベットをさらに20分間氷上に戻し、その後、20mlの非選択DMEMを含有する75cm²フラスコに移して、24時間回復させた。その後、細胞を採取し、そして選択DMEMに再懸濁し、そして4x96ウェルプレートに、200μl/ウェルで蒔いた。NS0細胞へのdeJ591抗体重鎖および軽鎖のサブユニットをコードする発現ベクターのトランスフェクションのため、同様のプロトコルにしたがった。

【0176】

NS0細胞株を培養し、選択し、そして拡大するため、37℃、5%CO₂および10%FBSで、細胞を増殖させる。NS0細胞の日常的な培養用の非選択培地を調製するため、培地は、USA起源の10%ウシ胎児血清（Life Technologies、ウシ胎児血清、カタログ番号：16000）、抗生物質/抗真菌剤溶液（Life Technologies、カタログ番号：15240）、ゲンタマイシン（Life Technologies、カタログ番号：15710）、ピルビン酸ナトリウム（Life Technologies、カタログ番号：11360-039）を補ったダルベッコの修飾イーグル培地（DMEM）（Life Technologies、カタログ番号：31965-023）である。抗体産生のため、NS0細胞を飽和まで増殖させる際、キサンチンおよびミコフェノール酸を添加せず、そしてFBSを5%に減少させる。

【0177】

NS0トランスフェクトーマ（transfectoma）の培養用の選択培地を調製するため、培地は、USA起源の10%ウシ胎児血清（Life Technologies、ウシ胎児血清、カタログ番号：16000）、抗生物質/抗真菌剤溶液（Life Technologies、カタログ番号：15240）、ゲンタマイシン（Life Technologies、カタログ番号：15710）、ピルビン酸ナトリウム（Life Technologies、カタログ番号：11360-039）、250μg/mlキサンチン（Sigmaカタログ番号：X-3627、0.5M NaOH中、25mg/mlで、ストックを作成）、および0.8μg/mlミコフェノール酸（Sigmaカタログ番号：M-3536、100%エタノール中、2.5mg/mlで、ストックを作成）を補ったダルベッコの修飾イーグル培地（DMEM）（Life Technologies、カタログ番号：31965-023）である。

【0178】

およそ10日後、gpt遺伝子を発現する細胞コロニーが裸眼で可視であった。その後、ヒトIgG1/κスクリーニングELISAのため、以下のプロトコルを用いて、抗体産

生に関してプレートをスクリーニングした。0.7より高い、高ODを持つウェルから、6つの単一のコロニーを選別して、24ウェル細胞培養プレートに移した。5～6日以内に、細胞を、 25 cm^2 フラスコに拡大した。24ウェルおよび 25 cm^2 フラスコ中の飽和培養から、ヒト IgG1/ κ ELISAのための以下のプロトコルを用いて、選択したクローンの抗体産生性をアッセイした。

【0179】

プロトコルの詳細は以下のとおりである。ELISAプレート (Dynatech Immunulon 2) を、炭酸塩/炭酸水素塩コーティング緩衝液 pH 9.6 (Sigma カタログ番号: C-3041) 中、1:1000に希釈したヒツジ α ヒト κ 抗体 (The Binding Site カタログ番号: AU015) を用いて、ウェルあたり $100\text{ }\mu\text{l}$ でコーティングする。コーティングしたプレートを 4°C で一晩または 37°C で1時間インキュベーションする。その後、プレートをPBST (0.05% Tween 20を含むPBS) で3回洗浄する。ウェルあたり $100\text{ }\mu\text{l}$ 、24ウェルプレートから $25\text{ }\mu\text{l}$ + $75\text{ }\mu\text{l}$ のPBSTで、96ウェルプレートに試料を添加する。ブランクウェルをPBSTのみで処理する。反応混合物を室温で1時間インキュベーションする。その後、プレートをPBST (0.05% Tween 20を含むPBS) で3回洗浄する。二次抗体、ペルオキシダーゼをコンジュゲートしたヒツジ α ヒト IgG γ 鎖特異的抗体 (The Binding Site カタログ番号: APO04) を、PBST中1:1000の比で、ウェルあたり $100\text{ }\mu\text{l}$ 、添加する。混合物を室温で1時間インキュベーションする。その後、混合物をPBST (0.05% Tween 20を含むPBS) で3回洗浄する。

【0180】

基質を作成するため、5mlの10xペルオキシダーゼ緩衝液 (Sigma リン酸クエン酸緩衝液錠剤 pH 5.0、P-4809) を用いて、10xペルオキシダーゼ緩衝液を作成する) を加えた45mlの H_2O に、OPD (o-フェニレンジアミン) (Sigma カタログ番号: P-7288) の錠剤を1つ (20mg) 溶解し、使用直前に $10\text{ }\mu\text{l}$ の30% (w/w) 過酸化水素 (Sigma カタログ番号: H1109) を添加する。その後、ウェルあたり $100\text{ }\mu\text{l}$ の基質を添加し、そして室温で5分間または必要に応じてインキュベーションする。発色したら、 $25\text{ }\mu\text{l}$ の12.5% H_2SO_4 を添加することによって反応を停止することが可能である。結果を492nmで読み取る。

【0181】

J591およびJ415脱免疫抗体の発現および拡大

最高の産生性を持つクローンを、 75 cm^2 フラスコ中に拡大し、そしてその後、 $2 \times 175\text{ cm}^2$ フラスコ中に拡大した。 175 cm^2 フラスコの1つ由来の細胞を用いて、5% FBSを含有する非選択DMEMを含有する4x三重層フラスコ (500 cm^2 、Nalge Nunc International) に接種し、他由来の細胞を、以下に詳述するNS0細胞を凍結するプロトコルに詳述されるように凍結した。

【0182】

哺乳動物細胞を凍結保護し、そして液体窒素から細胞を復活させるため、以下の材料: ウシ胎児血清 (Life Technologies カタログ番号: 16000)、DMSO (Sigma カタログ番号: D4540)、2ml凍結試験管 (Nunc または Greiner)、および壁の厚みが1~2cmのポリスチレンボックスが必要である。簡潔には、活発に増殖している細胞を遠心分離 (1000 rpm 、5分間) によって採取し、そして10% DMSO/90% FBS中、約 10^7 細胞/mlで再懸濁する。おおまかな指針として、半集密まで増殖させた細胞を、 75 cm^2 フラスコの場合は1mlに、または 175 cm^2 フラスコの場合は2.5mlに再懸濁すべきである。必要な数の試験管を氷上で冷却し、そして標識する。1mlの部分を標識凍結試験管にアリコートする。凍結試験管を -70°C で、少なくとも4時間、または一晩、ポリスチレンボックスに入れておく。バイアルをケーン (cane) に移し、そして液体窒素中に入れる。保管記録は、キャニスターインデックスおよび中央細胞株インデックス系両方で行うべきである。

【0183】

液体窒素から細胞を融解するため、液体窒素からバイアルを取り除き、そして水浴中で内容物を回転させながら、37℃でインキュベーションすることによって、迅速に融解する。バイアルの外側を70%メタノール変性アルコール(methylated spirits)で清浄化する。懸濁物を一般的な容器に移す。細胞株を増殖させるのに使用しようとする培地を10ml、滴加し、回転させて混合する。遠心分離(1000rpm、5分間)によって細胞を採取する。上清を廃棄する。細胞を20ml増殖培地に再懸濁し、そして75cm²フラスコに移す。生存度が低いと推測される場合、増殖培地に、20%まで過剰な血清を添加して、5mlのみを用いて、そして25cm²フラスコに移す。

【0184】

10~14日後、500ml~1リットルの静置飽和培養を採取した。抗体精製のための以下のプロトコルを用いて、ProSepA(Millipore Ltd.)アフィニティークロマトグラフィーによって、抗体を精製した。ろ過によって精製抗体調製物を滅菌し、そして4℃で保管した。 10

【0185】

抗体精製プロトコルは以下のとおりである：抗体を産生するNS0トランスフェクターマ細胞株を、Nunc三重層フラスコにおいて、DMEM 5%FCS中、フラスコあたり250ml(総体積1l)で、10~14日間、飽和近くまで増殖させる。馴化培地を収集し、そしてベンチ遠心分離装置5minsで、3000rpmで5分間回転させて、細胞を除去する。その後、1/10体積の1M Tris-HCl pH8(Sigmaカタログ番号：T3038)を細胞上清に添加して、これを0.1M Tris-HCl pH 20 8.0にする。0.5~1mlのProsepA(Milliporeカタログ番号：113 111824)を添加し、そして室温で一晩攪拌する。3000rpmで5分間回転させることによって、ProsepAを収集し、その後、Biorad Poly-Prepカラム(カタログ番号：73 1-1550)に充填する。カラムを10ml PBSで洗浄し、その後、0.1MグリシンpH3.0で1ml分画に溶出する。100μlの1M Tris-HCl pH8(Sigma、上述のとおり)を含有する試験管に各分画を収集する。各分画の吸光度を280nmで測定する。抗体を含有する分画をプールし、そしてPBSに対して、室温で一晩透析する。0.2ミクロン・シリンジフィルターを通じろ過によって、調製物を滅菌し、そして各分画の吸光度を280nmで測定する。ヒトIgGに関するELISAによって、抗体濃度を測定する。 30

【0186】

精製抗体は、上述のヒトIgG1/κ ELISAのプロトコルを用いて、定量可能である。

【0187】

J415脱免疫抗体の試験

上に詳述するようなプロトコルにしたがって、LNCap膜調製への結合に関する、ELISAにおいて、J415脱免疫抗体(脱免疫軽鎖サブユニットおよび脱免疫重鎖サブユニットの多様な組み合わせを含む)を試験した。ELISAプレートをLNCap膜調製物でコーティングし、そしてリン酸緩衝生理食塩水中の5%BSAを用いてブロッキングした。J415キメラ抗体(それぞれ、ヒト重鎖および軽鎖の定常部に融合させたネズミ 40 重鎖および軽鎖の可変部)および脱免疫抗体の2倍希釈を適用した。検出には、キメラ抗体およびマウス抗体それぞれに関して、西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgGおよびロバ抗マウスを用いた。オーフェニレンジアミン基質を用いて発色させた。

【0188】

脱免疫J415軽鎖バージョン5と組み合わせた脱免疫J415重鎖バージョン4で構成される抗体は、キメラ抗体に比較した際、LNCap細胞に同等の結合を示す。また、DIVK5を重鎖バージョン1および2と組み合わせた際、LNCap細胞への結合は、組織培養上清を解析した際、キメラ抗体のものと同等である。これらのデータは、精製抗体で確認可能である。軽鎖1、2、3をJ415重鎖バージョン1、2、3、および4のい 50

ずれかと組み合わせた際、抗体はまったく産生されなかった。脱免疫 J 4 1 5 軽鎖バージョン 1、2、および 3 は、構造的グラウンド上で、不全である可能性がある。より高い親和性および減少した免疫原性のための最適な鎖の組み合わせは、D I V H 4 / D I V K 5 である。

【0189】

脱免疫軽鎖バージョン 5 と組み合わせた脱免疫重鎖バージョン 4 で構成される抗体は、キメラ抗体に比較して、L N C a p に対して同等の結合を示した。また、D I V K 5 を重鎖バージョン 1 および 2 と組み合わせた際、L N C a p 細胞への結合は、精製抗体を解析した際、キメラ抗体のものより 2 倍低い。

【0190】

モノクローナル抗 P S M A 抗体はまた、組換え D N A 技術の当業者に知られる他の方法によっても生成可能である。

損なわれていない抗体でない抗 P S M A 抗体もまた、本発明で有用である。こうした抗体は、上述の抗体のいずれに由来することも可能である。例えば、抗原結合断片と共に、上述の抗体由来の全長単量体、二量体または三量体ポリペプチド自体が有用である。この種の有用な抗体相同体には (i) F a b 断片、V L、V H、C L および C H 1 ドメインからなる一価断片；(i i) F (a b ')₂ 断片、ヒンジ領域でのジスルフィド架橋によって連結される 2 つの F a b 断片を含んでなる二価断片；(i i i) V H および C H 1 ドメインからなる F d 断片；(i v) 抗体の単一のアームの V L および V H ドメインからなる F v 断片、(v) V H ドメインからなる d A b 断片 (W a r d ら, (1989) N a t u r e 341:544-546)；および (v i) 単離相補性決定領域 (C D R)、例えば抗原結合断片を提供するのに十分なフレームワークを伴う、1 以上の単離 C D R が含まれる。さらに、F v 断片の 2 つのドメイン、V L および V H は別個の遺伝子にコードされているが、組換え法を用いて、単一タンパク質鎖として作成可能にする合成リンカーによって、これらを連結することが可能であり、ここで、V L および V H 領域は対形成して、一価分子を形成する (一本鎖 F v (s c F v) として知られる；例えば B i r d ら (1988) S c i e n c e 242:423-426；および H u s t o n ら (1988) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 85:5879-5883 を参照されたい)。こうした一本鎖抗体もまた、用語、抗体の「抗原結合断片」内に含まれると意図される。当業者に知られる慣用的技術を用いて、これらの抗体断片を得て、そして損なわれていない抗体と同一の方式で、有用性に関して、該断片をスクリーニングする。

【0191】

抗体断片はまた、化学的方法によって、例えば損なわれていない抗体を、ペプシンまたはパインなどのプロテアーゼで切断し、そして場合によって切断産物を還元剤で処理することによっても産生可能である。あるいは、有用な断片は、一部切除重鎖遺伝子および／または軽鎖遺伝子で形質転換した宿主細胞を用いることによって、産生可能である。

【0192】

抗体の他の部分、例えば定常部を欠失させるか、付加するか、または置換することによって修飾されているモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、脱免疫抗体もまた、本発明の範囲内である。例えば、抗体は以下のように修飾可能である：(i) 定常部を欠失させることによって；(i i) 定常部を別の定常部、例えば抗体の半減期、安定性、もしくは親和性を増加させることを意味する定常部、または別の種もしくは別の抗体クラス由来の定常部と交換することによって；あるいは (i i i) 定常部における 1 以上のアミノ酸を修飾して、例えばとりわけグリコシル化部位の数、エフェクター細胞機能、F c 受容体 (F c R) 結合、補体固定を改変することによって。

【0193】

1 つの態様において、抗体の定常部は、例えば異なる種由来の、別の定常部によって交換可能である。この交換は、分子生物学技術を用いて実行可能である。例えば、V H または V L をコードする核酸を、軽鎖または重鎖の定常部をコードする別の核酸に、機能可能で

10

20

30

40

50

あるように連結することによって、抗体のVLまたはVH領域をコードする核酸を、それぞれ、全長軽鎖遺伝子または全長重鎖遺伝子に変換することが可能である。ヒト軽鎖および重鎖の定常部遺伝子の配列は当該技術分野に知られる。好ましくは、定常部はヒトであるが、他の種、例えばげっ歯類（例えばマウスまたはラット）、霊長類、ラクダ、ウサギ由来の定常部もまた使用可能である。これらの種由来の定常部が当該技術分野に知られる（例えばKabat, E. A.ら（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい）。

【0194】

抗体定常部を改変する方法が当該技術分野に知られる。改変された機能、例えば細胞上のFcR、または補体のC1構成要素などのエフェクターリガンドに対する改変された親和性を持つ抗体は、抗体の定常部分の少なくとも1つのアミノ酸残基を異なる残基と交換することによって、産生可能である（例えば、その内容がすべて本明細書に援用される、EP 388, 151 A1、US 5, 624, 821およびUS 5, 648, 260を参照されたい）。ネズミまたは他の種の免疫グロブリンに適用した際、これらの機能を減少させるかまたは除去する、同様の種類の改変が記載可能である。

【0195】

抗PSMA抗体、またはその抗原結合断片を誘導体化するか、または別の機能分子（例えば別のペプチドまたはタンパク質）に連結することが可能である。したがって、本発明の抗体および抗体部分は、免疫接着分子を含む、本明細書に記載する抗体の誘導体型および別の方式で修飾した型を含むと意図される。例えば、本発明の抗体または抗体部分は、別の抗体（例えば二特異性抗体または二重特異性抗体（diabody））、検出可能剤、細胞傷害性剤、薬剤、および／または抗体または抗体部分と別の分子の会合を仲介可能なタンパク質またはペプチド（ストレプトアビジン・コア領域またはポリヒスチジン・タグなど）などの、1以上の他の分子実体に機能的に連結する（化学的カップリング、遺伝子融合、非共有会合または別の方式によって）ことが可能である。

【0196】

誘導体化抗体の1つの種類は、2以上の抗体（同一種類または異なる種類の、例えば二特異性抗体を生成するため）を架橋することによって産生する。適切な架橋剤には、適切なスペーサーによって分離される2つの異なる反応性基を有するヘテロ二官能性のもの（例えばm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）、またはホモ二官能性のもの（例えばスベリン酸ジスクシンイミジル）が含まれる。こうしたリンカーは、Pierce Chemical Company、イリノイ州ロックフォードから入手可能である。

【0197】

本発明の抗体または抗体部分を誘導体化（または標識）可能な、有用な検出可能剤には、蛍光化合物、多様な酵素、補欠分子族、発光物質、生物発光物質、蛍光放出金属原子、例えばユーロピウム（Eu）、および他のアンタニド類（anthanides）、および放射性物質（以下に記載）が含まれる。典型的な蛍光検出可能剤には、フルオレセイン、フルオレセイン・イソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリトリン等が含まれる。抗体はまた、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコースオキシダーゼ等の検出可能酵素で誘導体化することも可能である。抗体を検出可能酵素で誘導体化する場合、これは、酵素が使用して検出可能な反応産物を産生する、さらなる試薬を添加することによって、検出される。例えば、検出可能剤、西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加は、検出可能な発色反応産物を導く。また、補欠分子族（例えばストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチン）で抗体を誘導体化することも可能である。例えば、抗体をビオチンで誘導体化して、そしてアビジンまたはストレプトアビジン結合の間接的測定を

10

20

30

40

50

通じて、検出することが可能である。適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセイン・イソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン・フルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが含まれ；発光物質の例には、ルミノールが含まれ；そして生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれる。

【0198】

標識抗体は、例えば：(i) アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降などの標準的技術によって、あらかじめ決定した抗原を単離すること；(ii) タンパク質の存在量および発現パターンを評価するため、あらかじめ決定した抗原を検出すること（例えば細胞溶解物または細胞上清において）；(iii) 例えば既定の治療措置の有効性を決定するため、臨床的試験法の一部として、組織中のタンパク質レベルを監視することを含む、いくつかの背景において、診断的および／または実験的に使用可能である。

10

【0199】

抗PSMA抗体またはその抗原結合断片は、別の分子実体、典型的には標識または療法（例えば細胞傷害性または細胞分裂抑制性）剤または部分にコンジュゲート化することが可能である。

【0200】

放射性同位体は、診断適用または療法適用で使用可能である。抗PSMA抗体にカップリング可能な放射性同位体には、限定されるわけではないが、 α 、 β 、または γ 放射体、あるいは β および γ 放射体が含まれる。こうした放射性同位体には、限定されるわけではないが、ヨウ素（ ^{131}I または ^{125}I ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、ルテチウム（ ^{177}Lu ）、アクチニウム（ ^{225}Ac ）、プラセオジウム、アスタチン（ ^{211}At ）、レニウム（ ^{186}Re ）、ビスマス（ ^{212}Bi または ^{213}Bi ）、インジウム（ ^{111}In ）、テクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、リン（ ^{32}P ）、ロジウム（ ^{188}Rh ）、イオウ（ ^{35}S ）、炭素（ ^{14}C ）、トリチウム（ ^3H ）、クロム（ ^{51}Cr ）、塩素（ ^{36}Cl ）、コバルト（ ^{57}Co または ^{58}Co ）、鉄（ ^{59}Fe ）、セレン（ ^{75}Se ）、またはガリウム（ ^{67}Ga ）が含まれる。療法剤として有用な放射性同位体には、イットリウム（ ^{90}Y ）、ルテチウム（ ^{177}Lu ）、アクチニウム（ ^{225}Ac ）、プラセオジウム、アスタチン（ ^{211}At ）、レニウム（ ^{186}Re ）、ビスマス（ ^{212}Bi または ^{213}Bi ）、およびロジウム（ ^{188}Rh ）が含まれる。例えば診断剤で使用するた

20

30

【0201】

本発明は、放射標識抗PSMA抗体および該抗体を標識する方法を提供する。1つの態様において、抗PSMA抗体を標識する方法を開示する。該方法には、抗PSMA抗体、例えば本明細書に記載する抗PSMA抗体を、キレート剤、例えば1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸（DOTA）と接触させ、それによってコンジュゲート化抗体を産生することが含まれる。コンジュゲート化抗体を放射性同位体、例えば ^{111}In 、 ^{90}Y 、イットリウムおよび ^{177}Lu で放射標識し、それによって標識抗PSMA抗体を産生する。抗PSMA抗体を放射標識する詳細な方法は、以下のセクションおよび付随する実施例に、より詳細に記載される。例えば、抗PSMA抗体は、その内容が本明細書に完全に援用される、US 6,029,214、2001年6月1日出願に記載されるように、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸（DOTA）とカップリングさせることによって、 ^{111}In 、 ^{90}Y 、または ^{177}Lu で放射標識することが可能である。抗PSMA抗体をキレートするための詳細な実験プロトコルが、US 6,029,214の実施例16に記載され、これは、本出願に特に援用され、そして以下の実施例1で再現される。

40

【0202】

50

上に論じるように、抗体を療法剤とコンジュゲート化することが可能である。療法的に活性である放射性同位体にはすでに言及した。他の療法剤の例には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド (tenoposide)、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド類、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、メイタンシノイド類、例えばメイタンシノール (米国特許第5, 208, 020号を参照されたい)、CC-1065 (米国特許第5, 475, 092号、第5, 585, 499号、第5, 846, 545号を参照されたい) およびその類似体または相同体が含まれる。療法剤には、限定されるわけではないが、代謝拮抗剤 (例えばメトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルダカルバジン (decarbazine))、アルキル化剤 (例えばメクロレタミン、チオエパ (thioepa) クロラムブシル、CC-1065、メルファラン、カルムスチン (BSNU) およびロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド (cyclophosphamide)、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミン白金 (II) (DDP) シスプラチン)、アントラサイクリン類 (例えばダウノルビシン (以前のダウノマイシン) およびドキシソルビシン)、抗生物質 (例えばダクチノマイシン (以前のアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン (AMC))、および抗有糸分裂剤 (例えばビンクリスチン、ビンブラスチン、タキソールおよびメイタンシノイド類) が含まれる。

【0203】

本発明のコンジュゲートは、既定の生物学的反応を修飾するのに使用可能である。療法剤は、古典的な化学的療法剤に限定されると解釈してはならない。例えば、療法剤は、望ましい生物学的活性を所持するタンパク質またはポリペプチドであることが可能である。こうしたタンパク質には、例えばアブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、またはその構成要素 (例えばシュードモナス外毒素の構成要素はPE38である) などの毒素；腫瘍壊死因子、インターフェロン、神経増殖因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーターなどのタンパク質；または例えばリンホカイン類、インターロイキン-1 (「IL-1」)、インターロイキン-2 (「IL-2」)、インターロイキン-6 (「IL-6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (「GM-CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子 (「G-CSF」)、または他の増殖因子などの生物学的反応修飾因子が含まれることが可能である。同様に、療法剤は、本発明の抗PSMA抗体にコンジュゲート化される (例えば化学的リンカーを介して) か、または融合される (例えばウイルスコートタンパク質を介して) ウイルス粒子、例えば組換えウイルス粒子であることが可能である。ウイルス核酸分子、例えば組換えウイルス核酸分子の、PSMAを発現する細胞、例えば前立腺癌細胞または腫瘍に関連する血管内皮細胞への導入は、抗PSMA抗体/ウイルス粒子コンジュゲートまたは融合体の結合およびエンドサイトーシスに続いて、起こることが可能である。

【0204】

核酸、ベクターおよび宿主細胞

本発明の別の側面は、本発明の修飾抗体および抗原結合断片の組換え発現に使用可能な、単離核酸、ベクターおよび宿主細胞組成物に関する。1つの態様において、抗PSMA抗体、例えば修飾抗PSMA抗体 (例えば脱免疫J591またはJ415抗PSMA抗体)、またはその抗原結合断片の、それぞれ、重鎖および軽鎖の可変部をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、第一の単離核酸および第二の単離核酸を提供する。

【0205】

修飾 (脱免疫) 抗PSMA J591免疫グロブリン軽鎖可変部のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図4Bに示す (それぞれ配列番号25および22)。非コード相補ヌクレオチド配列もまた、図4Bに示す (配列番号26)。J591脱免疫抗PSMA抗体軽

鎖可変部は、以下の領域を含有する：配列番号 25 のほぼヌクレオチド 261～329 にコードされる、配列番号 22 のほぼアミノ酸残基 1～23（直鎖番号付け；配列番号 13 もまた参照されたい）に対応する、FR1 ドメイン；配列番号 25 のほぼヌクレオチド 330～362 にコードされる、配列番号 22 のほぼアミノ酸残基 24～34（直鎖番号付け；配列番号 4 もまた参照されたい）に対応する、CDR1 ドメイン；配列番号 25 のほぼヌクレオチド 363～407 にコードされる、配列番号 22 のほぼアミノ酸残基 35～49（直鎖番号付け；配列番号 14 もまた参照されたい）に対応する、FR2 ドメイン；配列番号 25 のほぼヌクレオチド 408～428 にコードされる、配列番号 22 のほぼアミノ酸残基 50～56（直鎖番号付け；配列番号 5 もまた参照されたい）に対応する、CDR2 ドメイン；配列番号 25 のほぼヌクレオチド 429～524 にコードされる、配列番号 22 のほぼアミノ酸残基 57～88（直鎖番号付け；配列番号 15 もまた参照されたい）に対応する、FR3 ドメイン；配列番号 25 のほぼヌクレオチド 525～551 にコードされる、配列番号 22 のほぼアミノ酸残基 89～97（直鎖番号付け；配列番号 6 もまた参照されたい）に対応する、CDR3 ドメイン；および配列番号 25 のほぼヌクレオチド 552～581 にコードされる、配列番号 22 のほぼアミノ酸残基 98～107（直鎖番号付け；配列番号 16 もまた参照されたい）に対応する、FR4 ドメイン。

10

【0206】

修飾（脱免疫）抗 P S M A J 591 免疫グロブリン重鎖可変部のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図 4 A に示す（それぞれ配列番号 23 および 21）。非コード相補配列もまた、図 4 A に示す（配列番号 24）。J 591 脱免疫抗 P S M A 抗体重鎖可変部は、以下の領域を含有する：配列番号 23 のほぼヌクレオチド 261～335 にコードされる、配列番号 21 のほぼアミノ酸残基 1～25（直鎖番号付け；配列番号 9 もまた参照されたい）に対応する、FR1 ドメイン；配列番号 23 のほぼヌクレオチド 336～365 にコードされる、配列番号 21 のほぼアミノ酸残基 26～35（直鎖番号付け；配列番号 1 もまた参照されたい）に対応する、CDR1 ドメイン；配列番号 23 のほぼヌクレオチド 366～407 にコードされる、配列番号 21 のほぼアミノ酸残基 36～49（直鎖番号付け；配列番号 10 もまた参照されたい）に対応する、FR2 ドメイン；配列番号 23 のほぼヌクレオチド 408～458 にコードされる、配列番号 21 のほぼアミノ酸残基 50～66（直鎖番号付け；配列番号 2 もまた参照されたい）に対応する、CDR2 ドメイン；配列番号 23 のほぼヌクレオチド 459～554 にコードされる、配列番号 21 のほぼアミノ酸残基 67～98（直鎖番号付け；配列番号 11 もまた参照されたい）に対応する、FR3 ドメイン；配列番号 23 のほぼヌクレオチド 555～572 にコードされる、配列番号 21 のほぼアミノ酸残基 99～104（直鎖番号付け；配列番号 3 もまた参照されたい）に対応する、CDR3 ドメイン；および配列番号 23 のほぼヌクレオチド 573～605 にコードされる、配列番号 21 のほぼアミノ酸残基 105～115（直鎖番号付け；配列番号 9 もまた参照されたい）に対応する、FR4 ドメイン。

20

30

【0207】

修飾（脱免疫）抗 P S M A J 415 免疫グロブリン軽鎖可変部（J 415 D I V K 1）のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図 8 A に示す（それぞれ配列番号 56 および 57）。J 415 D I V K 1 の非コード相補ヌクレオチド配列もまた、図 8 A に示す（配列番号 58）。J 415 脱免疫抗 P S M A 抗体軽鎖可変部は、以下の領域を含有する：配列番号 56 のほぼヌクレオチド 261～329 にコードされる、配列番号 57 のほぼアミノ酸残基 1～23（直鎖番号付け；配列番号 41 もまた参照されたい）に対応する、FR1 ドメイン；配列番号 56 のほぼヌクレオチド 330～362 にコードされる、配列番号 57 のほぼアミノ酸残基 24～34（直鎖番号付け；配列番号 32 もまた参照されたい）に対応する、CDR1 ドメイン；配列番号 56 のほぼヌクレオチド 363～407 にコードされる、配列番号 57 のほぼアミノ酸残基 35～49（直鎖番号付け；配列番号 42 もまた参照されたい）に対応する、FR2 ドメイン；配列番号 56 のほぼヌクレオチド 408～428 にコードされる、配列番号 57 のほぼアミノ酸残基 50～56（直鎖番号付け；配列番号 33 もまた参照されたい）に対応する、CDR2 ドメイン；配列番号 56 のほぼ

40

50

ヌクレオチド 4 2 9 ~ 5 2 4 にコードされる、配列番号 5 7 のほぼアミノ酸残基 5 7 ~ 8 8 (直鎖番号付け; 配列番号 4 3 もまた参照されたい) に対応する、F R 3 ドメイン; 配列番号 5 6 のほぼヌクレオチド 5 2 5 ~ 5 5 1 にコードされる、配列番号 5 7 のほぼアミノ酸残基 8 9 ~ 9 7 (直鎖番号付け; 配列番号 3 4 もまた参照されたい) に対応する、C D R 3 ドメイン; および配列番号 5 6 のほぼヌクレオチド 5 5 2 ~ 5 8 1 にコードされる、配列番号 5 7 のほぼアミノ酸残基 9 8 ~ 1 0 7 (直鎖番号付け; 配列番号 4 4 もまた参照されたい) に対応する、F R 4 ドメイン。好ましい修飾 (脱免疫) 抗 P S M A J 4 1 5 免疫グロブリン軽鎖可変部 (J 4 1 5 D I V K 5) のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号 5 0 および 5 2 に示し; J 4 1 5 D I V K 5 は、J 4 1 5 D I V K 1 に関して上に示すのと同一の方式で、その構成要素配列に分割することが可能である。 10

【0208】

修飾 (脱免疫) 抗 P S M A J 4 1 5 免疫グロブリン重鎖可変部のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図 7 A に示す (それぞれ配列番号 5 3 および 5 4)。非コード相補配列もまた、図 7 A に示す (配列番号 5 5)。J 4 1 5 脱免疫抗 P S M A 抗体重鎖可変部は、以下の領域を含有する: 配列番号 5 3 のほぼヌクレオチド 2 6 1 ~ 3 3 5 にコードされる、配列番号 5 4 のほぼアミノ酸残基 1 ~ 2 5 (直鎖番号付け; 配列番号 3 7 もまた参照されたい) に対応する、F R 1 ドメイン; 配列番号 5 3 のほぼヌクレオチド 3 3 6 ~ 3 6 5 にコードされる、配列番号 5 4 のほぼアミノ酸残基 2 6 ~ 3 5 (直鎖番号付け; 配列番号 2 9 もまた参照されたい) に対応する、C D R 1 ドメイン; 配列番号 5 3 のほぼヌクレオチド 3 6 6 ~ 4 0 7 にコードされる、配列番号 5 4 のほぼアミノ酸残基 3 6 ~ 4 9 (直鎖番号付け; 配列番号 3 8 もまた参照されたい) に対応する、F R 2 ドメイン; 配列番号 5 3 のほぼヌクレオチド 4 0 8 ~ 4 6 4 にコードされる、配列番号 5 4 のほぼアミノ酸残基 5 0 ~ 6 8 (直鎖番号付け; 配列番号 3 0 もまた参照されたい) に対応する、C D R 2 ドメイン; 配列番号 5 3 のほぼヌクレオチド 4 6 5 ~ 5 6 0 にコードされる、配列番号 5 4 のほぼアミノ酸残基 6 9 ~ 1 0 0 (直鎖番号付け; 配列番号 3 9 もまた参照されたい) に対応する、F R 3 ドメイン; 配列番号 5 3 のほぼヌクレオチド 5 6 1 ~ 5 7 5 にコードされる、配列番号 5 4 のほぼアミノ酸残基 1 0 1 ~ 1 0 5 (直鎖番号付け; 配列番号 3 1 もまた参照されたい) に対応する、C D R 3 ドメイン; および配列番号 5 3 のほぼヌクレオチド 5 7 6 ~ 6 0 8 にコードされる、配列番号 5 4 のほぼアミノ酸残基 1 0 6 ~ 1 1 6 (直鎖番号付け; 配列番号 4 0 もまた参照されたい) に対応する、F R 4 ドメイン。好ましい修飾 (脱免疫) 抗 P S M A J 4 1 5 免疫グロブリン重鎖可変部 (J 4 1 5 D I V H 4) のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号 5 1 および 4 9 に示し; J 4 1 5 D I V H 4 は、J 4 1 5 D I V H 1 に関して上に示すのと同一の方式で、その構成要素配列に分割することが可能である。 20 30

【0209】

当業者は、抗 P S M A 修飾抗体 (例えば F R ドメイン、例えば F R 1 ~ 4) をコードするヌクレオチド配列は、遺伝暗号および標準的分子生物学技術を用いて、本出願に記載されるヌクレオチド配列およびアミノ酸配列から得ることが可能であると認識するであろう。

【0210】

1 つの態様において、単離核酸は、図 4 A (配列番号 2 3)、図 7 A (配列番号 5 3) もしくは配列番号 5 1 (J 4 1 5 D I V H 4) に示すようなヌクレオチド配列もしくはその相補体 (例えば配列番号 2 4 または配列番号 5 5)、A T C C 寄託番号 P T A - 3 7 0 9 もしくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S 0 細胞株に産生される抗体の重鎖可変部のヌクレオチド配列もしくはその相補体; それに少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % またはそれ以上の同一性を有する配列; あるいは図 4 A (配列番号 2 3)、図 7 A (配列番号 5 3)、配列番号 5 1 に示すヌクレオチド配列、もしくはその相補体 (例えば配列番号 2 4 または配列番号 5 5)、または A T C C 寄託番号 P T A - 3 7 0 9 もしくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S 0 細胞株に産生される抗体の重鎖可変部のヌクレオチド配列、もしくはその相補体に、本明細書に記載するストリンジェントな条件 (例えば非常にストリンジ 40 50

ェントな条件) 下でハイブリダイズ可能な配列を有する、抗 P S M A 修飾抗体重鎖可変部ヌクレオチド配列を含んでなる。

【0211】

別の態様において、単離核酸は、図 2 A (配列番号 2 1) もしくは図 5 (例えば配列番号 4 9) に示すようなアミノ酸配列、または A T C C 寄託番号 P T A - 3 7 0 9 もしくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S O 細胞株に産生される抗体の重鎖可変部のアミノ酸配列; それに少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % またはそれ以上同一である配列; あるいは図 2 A (配列番号 2 1)、図 5 (例えば配列番号 4 9) に示すようなアミノ酸配列、または A T C C 寄託番号 P T A - 3 7 0 9 もしくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S O 細胞株に産生される抗体の重鎖可変部のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に、本明細書に記載するストリンジェントな条件 (例えば非常にストリンジェントな条件) 下でハイブリダイズ可能な配列を有する、抗 P S M A 修飾抗体重鎖可変部アミノ酸配列をコードする。

10

【0212】

別の態様において、単離核酸は、配列番号 1、2、および 3、または 2 9、3 0 および 3 1、または 9 3、9 4、および 9 5、または 9 9、1 0 0 および 1 0 1 のアミノ酸配列、あるいは本明細書に記載する配列と 1 または 2 アミノ酸が異なる C D R 配列から選択される抗 P S M A 抗体の重鎖可変部の C D R を、少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つ、そして最も好ましくは 3 つコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる。さらに別の態様において、単離核酸は、図 4 A (配列番号 2 3)、配列番号 5 1、図 7 B (配列番号 1 2 5)、図 9 A (配列番号 7 3)、もしくは図 1 1 A (配列番号 8 3) に示す C D R 1、2、もしくは 3 をコードするヌクレオチド配列、またはその相補体、あるいは本明細書に記載する配列と 1 または 2 アミノ酸が異なる C D R をコードする配列を含んでなる。

20

【0213】

別の態様において、単離核酸は、配列番号 9、1 0、1 1 および 1 2、または 3 7、3 8、3 9 および 4 0、あるいはそれに少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % またはそれ以上同一である配列から選択される抗 P S M A 修飾抗体の重鎖可変フレームワーク領域由来のアミノ酸配列を、少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つ、3 つ、そして最も好ましくは 4 つコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる。

【0214】

さらに別の態様において、単離核酸は、図 4 B (配列番号 2 5)、図 8 A (配列番号 5 6)、もしくは配列番号 5 2 に示すような配列、もしくはその相補体 (例えば配列番号 2 6 または配列番号 5 8)、または A T C C 寄託番号 P T A - 3 7 0 9 もしくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S O 細胞株に産生される抗体の軽鎖可変部のヌクレオチド配列; それに少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % またはそれ以上同一である配列; あるいは図 4 B (配列番号 2 5)、図 8 A (配列番号 5 6)、配列番号 5 2 に示すようなヌクレオチド配列、もしくはその相補体 (例えば配列番号 2 6 または 5 8)、または A T C C 寄託番号 P T A - 3 7 0 9 もしくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S O 細胞株に産生される抗体の軽鎖可変部のヌクレオチド配列、もしくはその相補体に、本明細書に記載するストリンジェントな条件 (例えば非常にストリンジェントな条件) 下でハイブリダイズ可能な配列を有する、抗 P S M A 修飾抗体軽鎖可変部ヌクレオチド配列を含んでなる。別の態様において、単離核酸は、図 2 B (配列番号 2 2) もしくは図 6 (例えば配列番号 5 0) に示すような配列、A T C C 寄託番号 P T A - 3 7 0 9 もしくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S O 細胞株に産生される抗体の軽鎖可変部のアミノ酸配列; それに少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % またはそれ以上の同一性を有する配列; あるいは図 2 B (配列番号 2 2) もしくは図 6 (配列番号 5 0) に示すようなアミノ酸配列、または A T C C 寄託番号 P T A - 3 7 0 9 もしくは P T A - 4 1 7 4 を有する N S O 細胞株に産生される抗体の軽鎖可変部のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に、本明細書に記載するストリンジェントな条件 (例えば非常にストリンジェントな条件) 下でハイブリダイズ可能な配列を有する、抗 P S M A 修飾抗体軽鎖可変部アミノ酸をコードする。

30

40

50

【0215】

別の態様において、単離核酸は、配列番号4、5、および6、または32、33および34、または96、97、および98、または102、103および104のアミノ酸配列から選択される抗PSMA抗体の軽鎖可変部のCDRを、少なくとも1つ、好ましくは2つ、そして最も好ましくは3つコードするヌクレオチド配列、あるいは本明細書に記載する配列と1または2アミノ酸が異なるCDRをコードする配列を含んでなる。

【0216】

さらに別の態様において、単離核酸は、配列番号25に示す軽鎖可変ヌクレオチド配列のCDR1～3をコードする配列、あるいは本明細書に記載する配列と1または2アミノ酸が異なるCDRをコードする配列から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる。別の態様において、単離核酸は、配列番号13、14、15および16、または41、42、43および44から選択される抗PSMA修飾抗体の軽鎖可変フレームワーク領域由来のアミノ酸配列、あるいはそれに少なくとも85%、90%、95%、99%またはそれ以上同一である配列を、少なくとも1つ、好ましくは2つ、3つ、そして最も好ましくは4つコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる。

【0217】

好ましい態様において、抗PSMA抗体の軽鎖および重鎖の可変部をコードするヌクレオチド配列を有する、単離された第一の核酸および第二の核酸があり、各単離核酸は、配列番号1、2、3、4、5、および6、または29、30、31、32、33および34、または93、94、95、96、97、および98、または99、100、101、102、103、および104のアミノ酸配列から選択される、少なくとも1、2、3、4、5、そして好ましくはすべてのCDR、あるいは本明細書に記載する配列と1または2アミノ酸が異なるCDRをコードする配列を有する。

【0218】

核酸は、軽鎖または重鎖の可変部のみをコードすることが可能であるし、または、対応する可変部に機能可能であるように連結した、抗体軽鎖または重鎖の定常部もまたコードすることが可能である。1つの態様において、軽鎖可変部を、カップまたはラムダ定常部から選択される定常部に連結する。好ましくは、軽鎖定常部はラムダ型（例えばヒト・ラムダ型）に由来する。別の態様において、重鎖可変部を、IgG（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgM、IgA1、IgA2、IgD、およびIgEからなる群より選択される抗体アイソタイプの重鎖定常部に連結する。好ましくは、重鎖定常部は、IgG（例えばIgG1）アイソタイプ、例えばヒトIgG1由来である。

【0219】

本発明の核酸は、特定の発現系に好ましい、または好ましくないコドンを含むように選択することが可能である。例えば、核酸は、配列が大腸菌、酵母、ヒト、昆虫、NS0、またはCHO細胞での発現に最適化されるように、少なくとも1つのコドンで、好ましくは少なくとも10%または20%のコドンが改変されているものであることが可能である。

【0220】

好ましい態様において、核酸は提供される配列のものと、例えば以下のように：少なくとも1つであるが、10、20、30、または40ヌクレオチド未満；少なくとも1つであるが、対象の核酸のヌクレオチドの1%、5%、10%または20%未満、異なる（例えば置換、挿入、または欠失によって異なる）。この解析に必要であれば、最大相同性のため、配列を並列すべきである。欠失または挿入、あるいはミスマッチ由来の「ループ」アウトされた配列を相違とみなす。相違は、好ましくは、非必須残基（単数又は複数）または保守的置換（単数又は複数）をコードするヌクレオチドでの相違または変化である。

【0221】

1つの態様において、第一の核酸および第二の核酸は連結され、例えば同一ベクター中に含有される。他の態様において、第一の核酸および第二の核酸は連結されておらず、例えば異なるベクター中に含有される。

10

20

30

40

50

【0222】

別の側面において、本発明は、本発明の核酸、例えば第一の核酸および第二の核酸を含有する、宿主細胞およびベクター（例えば組換え発現ベクター）を特徴とする。

原核または真核宿主細胞が使用可能である。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書において、交換可能に用いられる。こうした用語は、特定の対象細胞のみでなく、こうした細胞の子孫または潜在的子孫も指す。突然変異または環境の影響によって、続く世代に特定の修飾が起こる可能性があるため、こうした子孫は、実際、親細胞に同一でない可能性があるが、それでも、本明細書で用いるような、用語の範囲内に含まれる。宿主細胞は、原核細胞、例えば大腸菌などの細菌細胞、または真核細胞、例えば昆虫細胞、酵母、または好ましくは哺乳動物細胞（例えば培養細胞または細胞株）いずれであることも可能である。他の適切な宿主細胞が当業者に既知である。

10

【0223】

抗PSMA抗体、またはその抗原結合断片を発現させるのに好ましい哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）（例えばR. J. KaufmanおよびP. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621に記載されるような、DHFR選択可能マーカーと共に用いる、UrlaubおよびChasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載されるdhfr-CHO細胞を含む）、リンパ球細胞株、例えばNS0骨髓腫細胞およびSP2細胞、COS細胞、およびトランスジェニック動物由来の細胞、例えば乳腺上皮細胞が含まれる。

20

【0224】

別の側面において、本発明は、ベクター、例えば組換え発現ベクターを特徴とする。本発明の組換え発現ベクターは、原核細胞または真核細胞における、修飾抗体、またはその抗原結合断片の発現のために、設計することが可能である。例えば、本発明のポリペプチドを、大腸菌、昆虫細胞（例えばバキュロウイルス発現ベクターを用いる）、酵母細胞または哺乳動物細胞で発現させることが可能である。適切な宿主細胞は、Goeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, カリフォルニア州サンディエゴにさらに論じられる。あるいは、例えばT7プロモーター制御配列およびT7ポリメラーゼを用いて、組換え発現ベクターを、in vitroで転写し、そして翻訳することが可能である。

30

【0225】

原核生物におけるタンパク質の発現は、融合または非融合タンパク質の発現を指示する構成的または誘導性プロモーターを含有するベクターを用いて、大腸菌で最も頻繁に行われる。融合ベクターは、コードされる抗体、通常、組換え抗体の定常部に、多くのアミノ酸を付加する。

【0226】

抗体鎖遺伝子に加え、本発明の組換え発現ベクターは、機能可能であるように連結され、そして宿主細胞において、抗体鎖遺伝子の発現を調節する制御配列を所持する。

本発明の修飾抗体、またはその抗原結合部分の組換え発現のための典型的な系において、抗体重鎖および抗体軽鎖両方をコードする組換え発現ベクターを、リン酸カルシウム仲介トランスフェクションによって、dhfr-CHO細胞に導入する。組換え発現ベクター内で、抗体重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子は、各々、遺伝子の高レベルの転写を駆動する、エンハンサー／プロモーター制御要素（例えばCMVエンハンサー／AdMLPプロモーター制御要素またはSV40エンハンサー／AdMLPプロモーター制御要素など、SV40、CMV、アデノウイルスなどに由来するもの）に機能可能であるように連結されている。組換え発現ベクターはまた、メトトレキセート選択／増幅を用いて、該ベクターでトランスフェクションされているCHO細胞の選択を可能にする、DHFR遺伝子も所持する。選択される形質転換宿主細胞を培養して、抗体重鎖および軽鎖の発現を可能にして、そして損なわれていない抗体を培地から回収する。標準的な分子生物学技術を用いて、

40

50

組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞にトランスフェクションし、形質転換細胞を選択し、該宿主細胞を培養し、そして培地から抗体を回収する。

【0227】

薬剤組成物

別の側面において、本発明は、組成物、例えば薬剤的に許容しうるキャリアーと共に配合した、本明細書に記載する修飾抗体分子が含まれる、薬剤的に許容しうる組成物を提供する。

【0228】

本明細書において、「薬剤的に許容しうるキャリアー」には、生理学的に適合する、ありとあらゆる溶媒、分散媒体、等張剤および吸収遅延剤等が含まれる。キャリアーは、静脈内、筋内、皮下、非経口、直腸、脊髄または表皮投与（例えば注射または注入による）に適している可能性がある。

【0229】

本発明の組成物は、多様な型であることが可能である。これらには、例えば、液体溶液（例えば注射可能および注入可能溶液）、分散物または懸濁物、リポソームおよび座薬などの液体、半固形および固形投薬型が含まれる。好ましい型は、意図される投与様式および療法的適用に応じる。典型的な好ましい組成物は、注射可能または注入可能溶液の型である。好ましい投与様式は、非経口（例えば静脈内、皮下、腹腔内、筋内）である。好ましい態様において、抗体は、静脈内注入または注射によって投与される。別の好ましい態様において、抗体は、筋内または皮下注射によって投与される。

【0230】

句「非経口投与」および「非経口的に投与される」は、本明細書において、通常、注射による、腸溶性および局所投与以外の投与様式を意味し、そして該句には、限定なしに、静脈内、筋内、動脈内、鞘内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および注入が含まれる。

【0231】

療法組成物は、典型的には、製造および保管条件下で、無菌であり、そして安定であるべきである。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散物、リポソーム、または高濃度の抗体に適した、他の整理された構造として、配合することが可能である。無菌注射可能溶液は、必要に応じて、上に列挙される成分の1つまたはそれらの組み合わせを含む適切な溶媒中に、必要な量の活性化化合物（すなわち抗体または抗体部分）を取り込み、その後、ろ過滅菌することによって、調製可能である。一般的に、分散物は、基本的な分散媒体および上に列挙されるもの由来の必要な他の成分を含有する無菌ビヒクル中に、活性化化合物を取り込むことによって、調製される。無菌注射可能溶液の調製のための無菌粉末の場合、好ましい調製法は、活性成分に加えて、先の無菌ろ過溶液由来のさらなる望ましい成分いずれかの粉末を生じる、真空乾燥および凍結乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングの使用によって、分散物の場合、必要な粒子サイズの維持によって、そして界面活性剤の使用によって、維持することが可能である。注射可能組成物の吸収の延長は、組成物中に、吸収を遅延させる剤、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを含むことによって、達成可能である。

【0232】

本発明の修飾抗体および抗体断片は、当該技術分野に知られる多様な方法によって、投与することが可能であるが、多くの療法適用に関して、好ましい投与経路／投与様式は、静脈内注射または注入である。以下の実施例に記載するように、抗PSMA抗体は、10mg／分未満、好ましくは5mg／分以下の速度の静脈内注入によって投与され、約1～100mg／m²、好ましくは約5～50mg／m²、約7～25mg／m²、そしてより好ましくは、約10mg／m²の用量に達することが可能である。当業者に理解されるであろうように、投与経路および／または投与様式は、望ましい結果に応じて多様であろう。特定の態様において、活性化化合物は、移植物、経皮パッチおよびマイクロカプセルに入

れた搬送系を含む、徐放配合物など、迅速な放出に対して化合物を保護するであろうキャリアと共に調製可能である。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル類、およびポリ乳酸などの、生物分解性、生体適合性ポリマーが使用可能である。こうした配合を調製するための多くの方法が特許されるかまたは当業者に一般的に知られる。例えば Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 監修, Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク, 1978 を参照されたい。

【0233】

特定の態様において、本発明の抗体または抗体部分は、例えば不活性希釈剤または吸収可能食用キャリアと共に、経口投与することが可能である。該化合物（および望ましい場合、他の成分）はまた、硬または軟シェル・ゼラチンカプセルに封入するか、錠剤に圧縮するか、または被験者の食餌に直接取り込むことも可能である。経口療法的投与のため、化合物は賦形剤と共に取り込んで、そして摂取可能錠剤、頬側錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁物、シロップ、ウエーハ等の型で用いることが可能である。非経口投与以外で本発明の化合物を投与するため、化合物をその不活性化を防止する物質でコーティングするか、または化合物を該物質と共に投与することが必要である可能性がある。

【0234】

療法組成物は、当該技術分野に知られる医学的装置を用いて投与することが可能である。投薬措置を調整して、最適な望ましい反応（例えば療法反応）を提供する。例えば、単一の多量用量（bolus）を投与することが可能であるし、いくつかの分割用量を時間に渡って（over time）投与することが可能であるし、あるいは療法状況の要求に示されるように、比例して用量を減少させるかまたは増加させることが可能である。投与を容易にし、そして投薬量を均一にするため、非経口組成物を投薬単位型で配合することが、特に好適である。本明細書において、投薬単位型は、治療しようとする被験者の単位投薬量として適している、物理的に別個の単位を指し；各単位は、必要な薬剂的キャリアーと会合した、望ましい療法効果を生じると計算される、あらかじめ決定された量の活性化合物を含む。本発明の投薬単位型の仕様は、（a）活性化合物の特有の特性および達成しようとする特定の療法効果、並びに（b）こうした活性化合物を治療のために化合する当該技術分野に生得的な、個体における感度の限界によって指定され、そしてこれらに直接応じる。

【0235】

本発明の抗体または抗体部分の療法的または予防的有効量の典型的な限定されない範囲は、 $0.1 \sim 20 \text{ mg/kg}$ 、より好ましくは $1 \sim 10 \text{ mg/kg}$ である。実施例 10 および 12 に記載されるように、抗 P S M A 抗体は、 10 mg/分未満 、好ましくは 5 mg/分以下 の速度の静脈内注入によって投与され、約 $1 \sim 100 \text{ mg/m}^2$ 、好ましくは約 $5 \sim 50 \text{ mg/m}^2$ 、約 $7 \sim 25 \text{ mg/m}^2$ 、そしてより好ましくは、約 10 mg/m^2 の用量に達することが可能である。投薬量値は、軽減しようとする異常の種類および重症度によって、多様である可能性があることに注目すべきである。特定の被験者いずれかに関して、個体の必要性、並びに該組成物を投与するか、またはその投与を監視する人物の専門的な判断にしたがって、時間に渡って、特定の投薬措置を調整すべきであり、そして本明細書に示す投薬量範囲は、例示のためのみであり、そして請求する組成物の範囲または実施を限定することを意図しないことが、さらに理解されるべきである。

【0236】

本発明の薬剤組成物には、本発明の抗体または抗体部分の「療法的有効量」または「予防的有効量」が含まれることが可能である。「療法的有効量」は、望ましい療法的結果を達成するために必要な投薬量および期間の、有効な量を指す。修飾抗体または抗体断片の療法的に有効な量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重などの要因、並びに抗体または抗体部分が、個体において望ましい反応を引き出す能力に応じて多様である可能性がある。療法的に有効な量はまた、修飾抗体または抗体断片のいかなる有毒または有害な影

響も、療法的に有益な効果に圧倒されるものである。「療法的に有効な投薬量」は、好ましくは、未処理被験者に比較して、測定可能なパラメーター、例えば腫瘍増殖率を、少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらにより好ましくは少なくとも約60%、そしてさらにより好ましくは少なくとも約80%、阻害する。化合物が測定可能なパラメーター、例えば癌を阻害する能力は、ヒト腫瘍における有効性を予測する、動物モデル系で評価することが可能である。あるいは、組成物のこの特性は、化合物が阻害する能力を調べることによって、*in vitro*の阻害の場合、当業者に知られるアッセイによって、評価することが可能である。

【0237】

「予防的に有効な量」は、望ましい予防的結果を達成するために必要な投薬量および期間の、有効な量を指す。典型的には、予防的用量は、疾患前または疾患のより早い段階で、被験者において用いられるため、予防的に有効な量は、療法的に有効な量より少ないであろう。 10

【0238】

やはり本発明の範囲内にあるのは、抗PSMA抗体、好ましくは修飾抗体、またはその抗原結合断片を含んでなるキットである。該キットには：使用説明書；他の試薬、例えば標識、療法剤、あるいは抗体を標識もしくは療法剤にキレートするか、または別の方式でカップリングするのに有用な剤、あるいは放射線防護組成物；投与用抗体を調製するための装置または他の材料；薬剤的に許容しうるキャリアー；および被験者に投与するための装置または他の材料を含む、1以上の他の要素が含まれることが可能である。使用説明書には、*in vitro*で、例えば試料、例えば癌または前立腺障害を有する患者由来の生検または細胞において、あるいは*in vivo*において、PSMAを検出する抗PSMA抗体（またはその抗原結合断片）の診断的適用のための指示が含まれることが可能である。指示には、例えば癌または前立腺障害を持つ患者における、示唆される投薬量および/または投与様式を含む、療法的適用の指示が含まれることが可能である。他の指示には、抗体をキレート剤、標識または療法剤にカップリングすることに関する指示、あるいは例えば未反応コンジュゲーション構成要素から、コンジュゲート化抗体を精製するための指示が含まれることが可能である。上に論じるように、キットには、標識、例えば本明細書に記載する標識いずれかが含まれることも可能である。上に論じるように、キットには、療法剤、例えば本明細書に記載する療法剤が含まれることも可能である。キットには、抗体を標識もしくは療法剤にキレートするか、または別の方式でカップリングするのに有用な試薬、例えば本明細書に論じる試薬が含まれることも可能である。例えば、巨大環状キレート剤、好ましくは1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸(DOTA)を含むことも可能である。DOTAは、別個の構成要素として供給することも可能であるし、またはすでに抗体にカップリングさせたDOTA（あるいは他のキレート剤またはコンジュゲート化剤）を供給することも可能である。キレート剤、例えばDOTAを抗体にカップリングさせるために、さらなるカップリング剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)などの剤を供給することが可能である。いくつかの適用において、抗体は、他の構成要素、例えばキレート剤または標識または療法剤、例えば放射性同位体、例えばイットリウムまたはルテチウムと反応するであろう。こうした場合、キットには、反応を実行する、1以上の反応容器、あるいは出発材料または反応中間体から最終産物を分離するのに使用するための分離装置、例えばクロマトグラフィーカラムが含まれることが可能である。 30 40

【0239】

キットはさらに、1以上の別個の薬剤中に、適切なように配合した、診断剤または療法剤、例えば本明細書に記載するような診断剤または療法剤などの、少なくとも1つのさらなる試薬および/または1以上のさらなる抗PSMA抗体（またはその断片）を含有することが可能である。

【0240】

キットはさらに、放射線防護剤を含有することが可能である。同位体、例えば⁹⁰イット 50

リウム (^{90}Y) の放射線分解性が知られる。この放射線分解を克服するため、放射線防護剤が良性である限り、すなわち例えば ^{90}Y などの同位体の抗体への標識反応を阻害しないか、または別の方式で該反応に不都合に影響を及ぼさない限り、例えば反応緩衝液において、放射線防護剤が含まれることも可能である。

【0241】

本発明の配合緩衝液には、ヒト血清アルブミン (HSA) またはアスカルベートなどの放射線防護剤が含まれることが可能であり、これらの剤は、イットリウムまたは他の強い放射性核種のための放射線分解を最小限にする。他の放射線防護剤、すなわちフリーラジカル・スカベンジャー (フェノール、スルフィット (sulfites)、グルタチオン、システイン、ゲンチシン酸、ニコチン酸、パルミチン酸アスカルビル、HOP ($:\text{O}$) H_2I グリセロール、ホルムアルデヒド・スルホキシル酸ナトリウム、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、および SO_2 など) が当該技術分野に知られ、そして本発明の配合緩衝液中にも使用可能である。 10

【0242】

好ましいキットは、患者に投与するため、キレート剤コンジュゲート化タンパク質またはペプチドを、療法的放射性同位体で放射線標識するのに有用なものである。該キットには (i) キレート剤コンジュゲート化抗体を含有するバイアル、(ii) 放射線標識抗体を安定化し、そして患者に投与するための配合緩衝剤を含有するバイアル、および (iii) 放射線標識法を行うための指示が含まれる。該キットは、例えば指示に推奨されるような、穏やかな (amiable) 条件下で、十分な時間、キレート剤コンジュゲート化抗体を放射性同位体またはその塩に曝露することを提供する。十分な純度、比活性および結合特異性を有する放射線標識抗体を産生する。放射線標識抗体を適切な濃度に、例えば配合緩衝液中で希釈して、そしてさらなる精製を伴いまたは伴わずに、患者に直接投与することが可能である。キレート剤コンジュゲート化抗体は凍結乾燥型で供給可能である。 20

【0243】

発明の使用

修飾抗体は、*in vitro* および *in vivo* で、診断的、療法的および予防的有用性を有する。例えば、これらの抗体を、培養中の細胞に、例えば *in vitro* でまたは *ex vivo* で投与するか、あるいは被験者に、例えば *in vivo* で投与して、癌 (前立腺癌および非前立腺癌) と共に、非癌性前立腺状態 (例えば良性過形成性前立腺障害) などの、多様な障害を治療し、防止し、そして／または診断することが可能である。 30

【0244】

本明細書において、用語「被験者」は、ヒトおよび非ヒト動物を含むと意図される。好ましいヒト動物には、PSMA発現細胞、例えば癌細胞または前立腺細胞の異常な機能に特徴付けられる障害を有するヒト患者が含まれる。本発明の用語「非ヒト動物」には、すべての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの、哺乳動物および非哺乳動物が含まれる。

【0245】

1つの態様において、被験者はヒト被験者である。あるいは、被験者は、本発明の修飾抗体が交差反応するPSMA様抗原を発現する哺乳動物であることが可能である。本発明の修飾抗体分子を、療法目的のため、ヒト被験者に投与することが可能である (以下にさらに論じる)。さらに、修飾抗PSMA抗体 (またはその断片) を、獣医学的目的のため、またはヒト疾患の動物モデルとして、修飾抗体が交差反応するPSMA様抗原を発現する非ヒト哺乳動物 (例えば霊長類、ブタまたはマウス) に投与することが可能である。後者に関して、こうした動物モデルは、本発明の抗体の療法的有効性を評価するのに有用である可能性がある (例えば投薬量および投与の時間経過を試験する)。 40

【0246】

療法的使用

1つの態様において、本発明は、細胞、例えば前立腺細胞 (例えば癌性または非癌性の前 50

立腺細胞、例えば正常、良性または過形成性の前立腺上皮細胞）、または悪性非前立腺細胞、例えば非前立腺固形腫瘍、軟組織腫瘍、または転移性病変に見られる細胞（例えば腎臓、尿路上皮（例えば膀胱）、精巣、結腸、直腸、肺（例えば非小細胞肺癌）、乳房、肝臓、神経（例えば神経内分泌）、グリア（例えばグリア芽腫）、脾臓（例えば脾管）の癌および／または転移、黒色腫（例えば悪性黒色腫）、または軟組織肉腫に見られる細胞）を処理する、例えば除去するかまたは殺す方法を提供する。本発明の方法には、該細胞、または近くの細胞、例えば該細胞に近接する血管内皮細胞を、該細胞を処理する、例えば除去するかまたは殺すのに十分な量の、修飾抗 P S M A 抗体、例えば本明細書に記載するような修飾抗 P S M A 抗体と接触させる工程が含まれる。

【0247】

本方法を、培養中の細胞に、例えば *in vitro* でまたは *ex vivo* で用いることが可能である。例えば、前立腺細胞（例えば悪性または正常、良性または過形成性の前立腺上皮細胞）あるいは非前立腺癌性細胞または転移性細胞（例えば腎臓、尿路上皮、結腸、直腸、肺、乳房または肝臓の癌性細胞または転移性細胞）を、培地中、*in vitro* で培養して、そして修飾抗 P S M A 抗体またはその断片を培地に添加することによって、接触工程を達成することが可能である。該方法は、*in vivo*（例えば療法または予防）プロトコルの一部として、被験者に存在する細胞（例えば前立腺細胞または非前立腺癌性細胞または転移性細胞）に対して行うことが可能である。*in vivo* 態様では、接触工程は被験者において達成され、そして該工程には、修飾抗 P S M A 抗体またはその断片が、該細胞、または該細胞に近接する血管内皮細胞に結合し、そして該細胞を処

10

20

【0248】

治療または防止可能な前立腺障害の例には、限定されるわけではないが、前立腺炎におけるような尿生殖器炎症（例えば平滑筋細胞の炎症）；良性肥大、例えば結節過形成（良性前立腺肥大または過形成）；および前立腺および／または精巣腫瘍の癌、例えば腺癌または癌腫が含まれる。

【0249】

本明細書において、用語「癌」には、組織病理学的な種類または侵襲性の段階にかかわらず、癌性増殖または発癌過程のすべての種類、転移性組織あるいは悪性に形質転換された細胞、組織、または臓器が含まれると意図される。

30

【0250】

非前立腺癌性障害の例には、限定されるわけではないが、固形腫瘍、軟組織腫瘍、および転移性病変が含まれる。固形腫瘍の例には、肺、乳房、リンパ系、胃腸（例えば結腸）、および尿生殖路（例えば腎細胞、尿路上皮細胞）、咽頭に影響を及ぼすものなどの多様な器官系の悪性腫瘍、例えば肉腫、腺腫、および癌腫が含まれる。腺癌には、大部分の結腸癌、直腸癌、腎細胞癌腫、肝臓癌、肺非小細胞癌、小腸の癌および食道の癌などの悪性腫瘍が含まれる。前述の癌の転移性病変もまた、本発明の方法および組成物を用いて、治療するかまたは防止することが可能である。

【0251】

本方法は、肺、乳房、リンパ系、胃腸（例えば結腸）、膀胱、尿生殖路（例えば前立腺）、咽頭に影響を及ぼすものなどの多様な器官系の悪性腫瘍と共に、大部分の結腸癌、腎細胞癌腫、前立腺癌および／または精巣腫瘍、肺非小細胞癌、小腸の癌および食道の癌などの悪性腫瘍を含む腺癌を治療するのに有用である可能性がある。

40

【0252】

他の態様において、本発明の抗体を、痛みを経験しているか、または痛みに関連する障害を患う被験者の診断および治療に使用することが可能である。好ましくは、被験者はヒト、例えば本明細書に開示する痛みまたは痛みに関連する障害を持つ患者である。例えば被験者は、前立腺疾患、例えば良性前立腺過形成または前立腺癌、あるいは非前立腺癌、例えば P S M A を発現する血管系を有する癌（例えば腎臓、尿路上皮（例えば膀胱）、精巣

50

、結腸、直腸、肺（例えば非小細胞肺癌）、乳房、肝臓、神経（例えば神経内分泌）、グリア（例えばグリア芽腫）、または膵臓（例えば膵管）の癌、黒色腫（例えば悪性黒色腫）、または軟組織肉腫）を有する可能性がある。痛みは、骨の痛みと共に、腫脹する前立腺のための閉塞性排尿症状、例えば排尿躊躇または尿流減少、頻尿または夜間多尿に関連する痛みであることが可能である。本発明の修飾抗 P S M A 抗体を用いた痛みの治療は、鎮痛薬、例えば麻薬の必要性を減少させるか、または劇的に低下させるか、または除去することさえ可能である。さらに、痛みを減少させることによって、治療法は、動きに関連する痛みの結果、機能不全となっていた、例えば肢の移動度を回復することが可能である。

【0253】

修飾抗体分子を投与する方法を上述する。使用する分子の適切な投薬量は、被験者の年齢および体重、並びに使用する特定の薬剤に応じるであろう。修飾抗体分子は、リガンド結合に関する競合剤として使用して、望ましくない相互作用を阻害し、減少させることが可能である。

【0254】

1つの態様において、抗 P S M A 抗体、例えば修飾抗 P S M A 抗体またはその抗原結合断片を用いて、*in vivo*で、癌性細胞および正常、良性過形成性、および癌性の前立腺上皮細胞を殺すかまたは除去することが可能である。例えば、抗 P S M A 抗体を用いて、本明細書に記載する障害を治療するかまたは防止することが可能である。抗体、例えば修飾抗体（またはその断片）自体を用いるか、あるいは第二の剤、例えば細胞傷害性薬剤、放射性同位体、またはタンパク質、例えばタンパク質毒素またはウイルスタンパク質にコンジュゲート化することが可能である。この方法には：修飾抗体を単独で、または細胞傷害性薬剤とコンジュゲート化して、こうした治療が必要な被験者に投与することが含まれる。

【0255】

抗 P S M A 抗体（またはその断片）は、正常、良性過形成、および癌性の前立腺上皮細胞を認識するため、修飾抗体が結合する細胞はいずれも破壊される。こうした投与は正常前立腺上皮細胞を破壊する可能性があるが、前立腺は生命または生存に必要でないため、これは問題ではない。前立腺は、受精能に間接的に寄与する可能性があるが、本発明の治療を受ける患者にとって、これが現実的な検討材料となる可能性は低い。癌性組織の場合、修飾抗体は、癌性細胞に近接する血管内皮細胞を認識するため、これらの血管内皮細胞への修飾抗体／細胞傷害性薬剤複合体の結合が該血管内皮細胞を破壊し、それによって近接する癌性細胞への血流を遮断し、そしてこうしてこれらの癌性細胞を殺すかまたは除去する。あるいは、修飾抗体は、癌性細胞に近接する血管内皮細胞への結合によって、癌性細胞に近接して局在化する。したがって、適切な修飾抗体（無差別的に、しかし短い範囲に渡ってのみ、細胞を殺すのに有効な物質を含有するものを含む）を使用することによって、癌性組織中の細胞（癌性細胞を含む）を選択的に殺すかまたは除去することが可能である。

【0256】

本発明の抗体を用いて、多様な療法剤、例えば細胞傷害性部分、例えば療法薬剤、放射性同位体、植物、真菌、もしくは細菌起源の分子、または生物学的タンパク質（例えばタンパク質毒素）もしくは粒子（例えばウイルスコートタンパク質を介して、例えば組換えウイルス粒子）、あるいはそれらの混合物を搬送することが可能である。療法剤は、例えば本明細書に記載するような、短距離高エネルギー α 放射体を含む、短距離放射能放射体などの、細胞内で活性である薬剤または他の剤であることが可能である。いくつかの好ましい態様において、抗 P S M A 抗体、またはその抗原結合断片を、植物または細菌起源の分子（またはその誘導體）、例えばメイタンシノイド（例えばメイタンシノールまたは D M 1 メイタンシノイド、図 15 を参照されたい）にカップリングすることが可能である。D M 1 は、メイタンシンのスルフィドリル含有誘導體であり、ジスルフィドリルを介して、これを抗体に連結することが可能であり、該リンカーは、標的細胞内部で、D M 1 を

10

20

30

40

50

放出する。ジスルフィドリンカーは、他のリンカーより、保管中、および血清中、より高い安定性を示す。メイタンシンは、微小管の形成および現存する微小管の脱重合を妨げることによって、細胞殺傷を達成する細胞傷害性剤である。メイタンシンは、現在臨床的に使用されているドキソルビシン、メトトレキセート、およびビンカ・アルカロイドなどの抗癌剤より、100～1000倍、より細胞傷害性である。あるいは、抗PSMA抗体、またはその抗原結合断片をタキサン、カリケアマイシン、プロテオソーム阻害剤、またはトポイソメラーゼ阻害剤にカップリングすることが可能である。〔(1R)-3-メチル-1-[[[(2S)-1-オキソ-3-フェニル-2-[(3-メルカプトアセチル)アミノ]プロピル]アミノ]ブチル]ボロン酸が適切なプロテオソーム阻害剤である。N, N'-ビス[2-(9-メチルフェナジン-1-カルボキサミド)エチル]-1, 2-エタンジアミンが適切なトポイソメラーゼ阻害剤である。

【0257】

酵素的に活性である毒素およびその断片は、ジフテリア毒素A断片、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A（緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サクリン（sacrin）、特定のシナアブラギリ（*Aleurites fordii*）タンパク質、特定のジアンシン（*Dianthin*）タンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（*Phytolacca americana*）タンパク質（PAP、PAPIIおよびPAP-S）、モロディカ・チャランティア（*Morodica charantia*）阻害剤、クルシン（curcin）、クロチン、サボンソウ（*Saponaria officinalis*）阻害剤、ゲロニン、ミトギリ（mitogillin）、レストリクトシン（restrictosin）、フェノマイシン（phenomycin）、およびエノマイシン（enomycin）に例示される。好ましい態様において、抗PSMA抗体をメイタンシノイド、例えばメイタンシノール（米国特許第5,208,020号を参照されたい）、CC-1065（米国特許第5,475,092号、第5,585,499号、第5,846,545号を参照されたい）にコンジュゲート化する。免疫毒素の酵素的に活性であるポリペプチドを調製するための方法が、本明細書に援用されるWO84/03508およびWO85/03508、並びに以下の付随する実施例に記載される。抗体にコンジュゲート化することが可能な細胞傷害性部分の例には、アドリアマイシン、クロラムブシル、ダウノマイシン、メトトレキセート、ネオカルジノスタチン、および白金が含まれる。

【0258】

正常、良性過形成、および癌性の前立腺上皮細胞を殺すかまたは除去するため、第一の抗体、例えば修飾抗体を、プロドラッグ活性化因子と近接した際にのみ活性化されるプロドラッグにコンジュゲート化することが可能である。プロドラッグ活性化因子を、第二の抗体、例えば本発明にしたがった第二の修飾抗体、好ましくは前立腺特異的膜抗原分子の非競合部位に結合するものとコンジュゲート化する。2つの修飾抗体が競合的結合部位または非競合的結合部位のいずれに結合するかは、慣用的な競合的結合アッセイによって決定可能である。例えば、モノクローナル抗体J591、J533、およびE99は、前立腺特異的膜抗原分子の競合的結合部位に結合する。一方、モノクローナル抗体J415は、J591、J533、およびE99が結合する部位と非競合性である結合部位に結合する。したがって、例えば、第一の修飾抗体がJ591、J533、およびE99の1つであることが可能であり、そして第二の修飾抗体がJ415であることが可能である。あるいは、第一の修飾抗体がJ415であることが可能であり、そして第二の修飾抗体がJ591、J533、およびE99の1つであることが可能である。本発明の実施に使用するのに適した薬剤-プロドラッグ対が、Blakeleyら，“ZD2767, an Improved System for Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy That Results in Tumor Regressions in Colorectal Tumor Xenografts,” (1996) Cancer Research, 56:3287-3292に記載されており、該文献は本明細書に援用される。

【0259】

あるいは、抗体、例えば修飾抗体を、腫瘍部位に局在した場合、数細胞直径の殺傷を生じる、高エネルギー放射能放射体、例えば γ 放射体である ^{131}I などの放射性同位体カップリングすることが可能である。例えば、本明細書に援用される、S. E. Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwinら(監修), pp 303-316 (Academic Press 1985)を参照されたい。他の適切な放射性同位体には、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、および ^{211}At などの α 放射体、並びに ^{186}Re および ^{90}Y などの β 放射体が含まれる。前立腺上皮細胞および癌内部の血管内皮細胞は比較的放射感受性であるため、放射療法が特に有効であると予期される。さらに、 Lu^{117} もまた、イメージング剤および細胞傷害性剤両方として、使用可能である。

【0260】

^{131}I 、 ^{90}Y 、および ^{177}Lu で標識した抗体を用いた放射免疫療法(RIT)が、集中的な臨床試験下にある。これら3つの核種の物理的特徴には、有意な相違があり、そしてその結果、腫瘍に対して最大放射線量を搬送するため、放射性核種の選択が重要である可能性がある。 ^{90}Y のより高いベータエネルギー粒子は、大きい腫瘍に適している可能性があるが、小さい腫瘍、および特に骨転移(例えば前立腺癌に一般的であるもの)には必要でない可能性がある。 ^{131}I の比較的低エネルギーのベータ粒子が理想的であるが、放射ヨウ素標識した分子のin vivo脱ハロゲン化が、抗体を内部に入れるのに不都合な主な点である。対照的に ^{177}Lu は、わずか0.2~0.3mmの範囲の低エネルギーベータ粒子を有し、そして ^{90}Y に比較して、骨髄にはるかにより低い放射線量を搬送する。さらに、より長い物理的半減期(^{90}Y に比較して)のため、腫瘍居留時間はより長い。その結果、より高い活性(より多いmCi量)の ^{177}Lu 標識剤を、比較的少ない放射線量で、骨髄に投与することが可能である。多様な癌の治療において、 ^{177}Lu 標識抗体の使用を調べる、いくつかの臨床的研究があった(Mulligan Tら(1995) Clin Cancer Res. 1:1447-1454; Meredith RFら(1996) J Nucl Med 37:1491-1496; Alvarez RDら(1997) Gynecologic Oncology 65:94-101)。

【0261】

本発明の抗体はまた、ウイルス粒子上に存在するウイルス表面タンパク質にコンジュゲート化するか、または融合させることも可能である。例えば、本発明の一本鎖抗PSMA抗体を、ウイルス表面タンパク質に融合させる(例えば融合タンパク質を形成する)ことが可能である。あるいは、本発明の全抗PSMA抗体、またはその断片を、ウイルス表面タンパク質に化学的にコンジュゲート化する(例えば化学的リンカーを介して)ことが可能である。好ましくは、ウイルスが抗PSMA抗体と共に内部に入り、そしてそれによってPSMA発現細胞が感染するように、ウイルスは、エンドサイトーシス膜と融合するもの、例えばインフルエンザウイルスである。ウイルスは、細胞性毒素として遺伝子操作することが可能である。例えば、ウイルスは、細胞に毒性である遺伝子、例えば細胞死促進遺伝子を発現するか、またはこうした遺伝子の発現を誘導することが可能である。好ましくは、こうしたウイルスは、ウイルス複製不能であろう。

【0262】

抗体、例えば本発明の修飾抗体を用いて、天然補体または抗体依存細胞傷害性(ADCC)を介して、in vivoで、抗原発現細胞を直接除去することが可能である。補体に結合するIgG1、2、または3あるいはIgM由来の部分などの補体結合部位を有する、本発明の修飾抗体分子もまた、補体の存在下で使用可能である。1つの態様において、標的細胞を含んでなる細胞集団を、本発明の結合剤および適切なエフェクター細胞でex

v i v o 処理するのを、補体または補体を含有する血清を添加することによって、補うことが可能である。本発明の修飾抗体またはその断片でコーティングした標的細胞の食作用は、補体タンパク質の結合によって改善可能である。別の態様において、修飾抗体またはその断片でコーティングした標的細胞もまた、補体によって溶解可能である。

【0263】

特定の標識を検出するため、本発明の抗体、例えば修飾抗体を用いて、そして装置と共に、キットとして販売することが可能である。

本発明にやはり含まれるのは、P S M A 関連障害を防止するため、本明細書に記載する抗体、例えば修飾抗体を用いることを伴う、細胞を殺すかまたは除去する方法である。例えば、これらの物質を用いて、前立腺癌または他の癌の発展または進行を防止するかまたは遅延させることが可能である。

10

【0264】

前立腺癌および他の癌を治療するための本発明の療法の使用は、いくつかの利点を有する。本発明にしたがった修飾抗体は、癌性細胞（血管内皮細胞を含有する癌性組織の細胞など）および前立腺上皮細胞のみを標的とするため、他の組織には危害を加えない。その結果、こうした修飾抗体での治療は、特に年配の患者には、より安全である。本発明にしたがった治療は、抗体またはその結合部分などの高レベルの修飾抗体、プローブ、またはリガンドを、前立腺癌転移および他の多くの癌の転移が優位を占める骨髄およびリンパ節に導くため、特に有効であると予期される。さらに、前立腺癌の腫瘍部位は、大きさが小さい傾向があり、そしてしたがって細胞傷害性剤で容易に破壊されるため、本発明の方法は、前立腺癌を治療するのに特によく適している。本発明にしたがった治療は、前立腺癌の場合、血清前立腺特異的抗原、および／または病期、グリーソン・スコア、嚢外、精液、小胞または神経周囲浸潤、陽性辺縁（*p o s i t i v e m a r g i n*）、リンパ節関与、疾患に関連する痛み、例えば骨の痛みなどを含む、患者の癌の病理学的特徴などの臨床的パラメーターで効率的に監視することが可能である。あるいは、これらのパラメーターを用いて、こうした治療を使用すべき場合を示すことが可能である。

20

【0265】

本発明はまた、前立腺疾患、例えば良性前立腺過形成または前立腺癌、あるいは非前立腺癌、例えばP S M Aを発現する血管系を有する癌（例えば腎臓、尿路上皮（例えば膀胱）、精巣、結腸、直腸、肺（例えば非小細胞肺癌）、乳房、肝臓、神経（例えば神経内分泌）、グリア（例えばグリア芽腫）、または膵臓（例えば膵管）の癌、黒色腫（例えば悪性黒色腫）、または軟組織肉腫）を有するか、または該疾患と診断された被験者が経験する痛みを治療する、例えば痛みを減少させる方法も特徴とする。該方法には、本明細書に記載するような抗P S M A抗体、例えば修飾抗P S M A抗体を、前立腺疾患または非前立腺癌と関連する痛みを治療する、例えば減少させるのに十分な量で、被験者に投与することが含まれる。被験者は、例えば血清P S Aレベルの上昇および痛みの感覚以外には、前立腺疾患または非前立腺癌の徴候を持たない可能性がある。前立腺癌患者は、しばしば、骨の痛みと共に、腫脹する前立腺のための閉塞性排尿症状、例えば排尿躊躇または尿流減少、頻尿または夜間多尿に関連する痛みを経験する。本発明の修飾抗P S M A抗体を用いた痛みの治療は、鎮痛薬、例えば麻薬の必要性を減少させるか、または劇的に低下させるか、または除去することさえ可能である。痛みを減少させることによって、治療法は、動きに関連する痛みの結果、機能不全となっていた、例えば肢の移動度を回復することが可能である。

30

40

【0266】

本発明の抗体、例えば修飾抗体が、生存前立腺細胞に結合するため、これらの修飾抗体を用いて前立腺癌を治療する療法は、溶解した前立腺細胞の存在に依存しない。同じ理由で、生存正常、良性過形成、または癌性の前立腺上皮細胞（それと共に、癌内部の血管内皮細胞）の位置を決定する診断法およびイメージング法は、本発明の修飾抗体を使用することによって、非常に改善される。さらに、生存および死亡前立腺細胞を区別する能力は、特定の治療措置の有効性を監視するのに特に好都合である可能性がある。

50

【0267】

本発明の抗体、例えば修飾抗体、またはその抗原結合部分は、正常、良性過形成、および癌性の前立腺上皮細胞と共に、癌性細胞に近接する血管内皮細胞中の前立腺特異的膜抗原またはその部分の細胞外ドメインに結合する。その結果、正常、良性過形成、および癌性の前立腺上皮細胞と共に、癌性細胞に近接する血管内皮細胞を殺すか、除去するか、または検出するために、本発明の方法を実施する際には、抗体、例えば修飾抗体が、固定細胞または細胞内抗原ドメインが別の方式で細胞外環境に曝露されている細胞だけでなく、こうした細胞すべてに結合する。その結果、抗体、例えば修飾抗体の結合は、これらの細胞が固定されているかまたはいないか、生存しているかまたは壊死しているかにかかわらず、前立腺上皮細胞が存在する領域に濃縮される。さらに、またはあるいは、これらの抗体、例えばこれらの修飾抗体、またはその結合部分は、正常、良性過形成、および癌性の前立腺上皮細胞中の前立腺特異的膜抗原またはその部分に結合し、そして該抗原と共に内部に入る。

【0268】

併用療法

本明細書に記載する抗PSMA抗体、例えば修飾抗PSMA抗体、またはその抗原結合断片を、他の療法と併用することが可能である。例えば、併用療法には、1以上のさらなる療法剤、例えば1以上の抗癌剤、細胞傷害性剤または細胞分裂抑制性剤、ホルモン治療、ワクチン、および／または他の免疫療法と同時配合され、そして／または同時投与される本発明の組成物が含まれることが可能である。他の態様において、抗PSMA抗体を、手術、放射線療法、凍結手術、および／または熱療法を含む、他の療法治療様式と併用投与する。こうした併用療法は、より低い投薬量で投与される療法剤を好適に利用して、したがって多様な単一療法に関連する、ありうる毒性または合併症を回避することが可能である。

【0269】

「併用」投与する、は、本明細書において、2つ（またはそれ以上）の異なる治療を、被験者が該障害に苦しんでいる経過中に被験者に搬送すること、例えば2以上の治療を、被験者が該障害と診断された後で、そして該障害が治癒するかまたは除去される前に、搬送することを意味する。いくつかの態様において、治療が重複するように、1つの治療の搬送は、第二の搬送が始まる際になお行われている。これはときに、本明細書において、「同時」または「同時搬送」と称される。他の態様において、1つの治療の搬送は、他の治療の搬送が始まる前に終了する。どちらの場合でもいくつかの態様において、治療は、併用投与のため、より有効である。例えば、第一の治療の非存在下で第二の治療を投与した場合に見られるであろうより、第二の治療がより有効であり、例えばより少ない量の第二の治療で同等の効果が見られるか、または第二の治療がより高い度合いまで症状を減少させるし、あるいは第一の治療で同様の状況が見られる。いくつかの態様において、搬送は、症状の減少、または障害に関連する他のパラメーターの減少が、他の治療の非存在下で搬送された際に一方の治療で観察されるであろうより、大きいようなものである。2つの治療の効果は、部分的に相加的であるか、完全に相加的であるか、または相加的よりも高い可能性がある。搬送は、搬送される第一の治療の効果が、第二の治療が搬送される際に、なお検出可能であるようなものであることが可能である。

【0270】

本発明の抗PSMA抗体は、限定されるわけではないが：手術（例えば根治的前立腺切除術）；放射線療法（例えば放射領域が、治療する組織の容量に対して適合するように設計される、三次元の原体照射法を伴う、外部光線療法；超音波誘導を用いて、放射性化合物の種を移植する、組織内照射療法；並びに外部光線療法および組織内照射療法の併用）；根治的前立腺切除術または放射線療法の前にまたはそれらの後に投与することが可能な、ホルモン療法（例えば血清テストステロン濃度を減少させるか、またはテストステロン活性を阻害する治療、例えば黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）類似体またはアゴニスト（例えばリュープロン、ゾラデックス、ロイプロリド、ブセレリン、またはゴセレ

リン) またはアンタゴニスト (例えばアバレリクス) の投与) を含む、前立腺癌を治療するための現存する様式の1以上と併用投与可能である。非ステロイド性抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ピカルチマド、またはニルタミドもまた、ホルモン療法に使用可能であり、これと共に、ステロイド性抗アンドロゲン (例えば酢酸シプロテロンまたは酢酸メゲストロール)、エストロゲン (例えばジエチルスチルベストロール)、PROSCARTM、二次または三次ホルモン操作 (例えばコルチコステロイド (例えばヒドロコルチゾン、プレドニゾン、またはデキサメタゾン)、ケトコナゾール、および/またはアミノグルテチミドを伴う)、5 α -レダクターゼ阻害剤 (例えばフィナステリド)、ハーブ剤 (例えばPC-SPESS)、下垂体摘出術、および副腎摘出術も使用可能である。さらに、ホルモン療法は、断続的に、または上記治療のいずれかと併用して、例えばロイプロリドおよびフルタミドを併用して、行うことが可能である。 10

【0271】

他の態様において、抗PSMA抗体、例えば修飾抗PSMA抗体を、免疫調節剤、例えばIL-1、24、6、または12、あるいはインターフェロン・アルファまたはガンマと併用投与する。以下の実施例14に記載するように、ヒト定常部を有する抗体およびIL-2の併用は、潜在的に、モノクローナル抗体の効力を増進すると予期される。IL-2は、NK細胞およびマクロファージに対するその影響によって、細網内皮系が抗原-抗体複合体を認識するのを増大させるよう機能するであろう。したがって、NK細胞がIFN、GM-CSF、およびTNFを放出するよう刺激することによって、これらのサイトカインは、Fc受容体の細胞表面密度と共に、これらの細胞の食作用能力を増加させるであろう。したがって、体液性アームおよび細胞性アーム両方のエフェクターアームが、人工的に増進されるであろう。正味の効果は、最大反応が得られることが可能であるように、モノクローナル抗体療法の効率を改善することであろう。少数の臨床試験が、IL-2とモノクローナル抗体を併用している (Albertiniら (1997) Clin Cancer Res 3:1277-1288; Frostら (1997) Cancer 80:317-333; Kossmanら (1999) Clin Cancer Res 5:2748-2755)。IL-2は、多量用量または連続注入いずれかで投与することが可能である。したがって、本発明の抗体は、IL-2と併用投与して、その療法能力を最大にすることが可能である。 20

【0272】

診断的使用

1つの側面において、本発明は、PSMAタンパク質の存在をin vitroで (例えば癌性組織または前立腺組織由来の組織生検などの生物学的試料において) またはin vivoで (例えば被験者におけるin vivoイメージングにおいて) 検出する診断法を提供する。該方法には: (i) 修飾抗PSMA抗体またはその断片と試料を接触させ、または被験者に修飾抗PSMA抗体を投与し; (場合によって) (ii) 参照試料、例えば対照試料 (例えば血漿、組織、生検などの対照生物学的試料、あるいは対照被験者) を接触させ; そして (iii) 抗PSMA抗体、および試料または被験者、あるいは対照試料または被験者間の複合体の形成を検出することが含まれ、ここで、対照試料または対照被験者に比較した、試料または被験者における複合体形成の変化、例えば統計的に有意な変化が、試料中にPSMAが存在する指標となる。 30

【0273】

好ましくは、抗PSMA抗体 (またはその断片) を、検出可能物質で直接または間接的に標識して、結合または非結合抗体の検出を容易にする。適切な検出可能物質には、上述のような、そして以下により詳細に記載されるような、多様な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質および放射性物質が含まれる。

【0274】

抗PSMA抗体およびPSMA間の複合体形成は、PSMA抗原に結合する抗体 (または抗体断片) または非結合抗体 (または抗体断片) いずれかを測定するかまたは視覚化することによって、検出可能である。慣用的な検出アッセイ、例えば酵素連結免疫吸着アッセ 40

10

20

30

40

50

イ (E L I S A)、放射免疫アッセイ (R I A) または組織免疫組織化学を使用することが可能である。抗 P S M A 抗体を標識する代わりに、検出可能物質で標識された標準および非標識抗 P S M A 抗体を利用する競合的免疫アッセイによって、試料中の P S M A の存在をアッセイすることが可能である。このアッセイでは、生物学的試料、標識標準および P S M A 結合剤を組み合わせ、そして非標識抗体に結合した標識標準の量を決定する。試料中の P S M A 量は、P S M A 結合剤に結合した標識標準量に反比例する。

【0275】

さらに別の態様において、本発明は、P S M A 発現癌性組織（特にその中の血管内皮細胞）および正常、良性過形成、および癌性の前立腺上皮細胞の存在を *in vivo* で検出する方法を提供する。該方法には、(i) 被験者（例えば癌または前立腺障害を有する患者）に、検出可能マーカーにコンジュゲート化した抗 P S M A 抗体、好ましくは修飾抗体を投与し；(ii) P S M A 発現組織または細胞に対する前記検出可能マーカーを検出する手段に、被験者を曝露することが含まれる。特に好ましい抗体には、J 5 9 1、J 4 1 5、J 5 3 3 または E 9 9 のいずれか由来の C D R を有する修飾抗体、および特にこれらの抗体の脱免疫型、特に d e J 5 9 1 または d e J 4 1 5 が含まれる。

【0276】

本発明にしたがった診断イメージングに有用な標識の例は、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、および ^{188}Rh などの放射標識、フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光標識、核磁気共鳴活性標識、陽電子放出断層撮影（「PET」）スキャナーによって検出可能な陽電子放出同位体、ルシフェリンなどの化学発光物質、並びにペルオキシダーゼまたはホスファターゼなどの酵素マーカーである。経直腸プローブなどの短距離検出装置プローブによって検出可能な同位体などの、短距離放射能放射体もまた、使用可能である。これらの同位体および経直腸検出装置プローブは、併用した場合、前立腺窩再発および骨盤結節疾患を検出するのに特に有用である。当該技術分野に知られる技術を用いて、修飾抗体をこうした試薬で標識することが可能である。例えば、抗体を放射標識するのに関連する技術に関して、本明細書に援用される、Wense l および Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, ニューヨークを参照されたい。また、本明細書に援用される、D. Colcher ら (1986) *Meth. Enzymol.* 121: 802-816 もまた参照されたい。

【0277】

放射標識修飾抗体の場合、修飾抗体を患者に投与し、修飾抗体が反応する抗原を所持する腫瘍に局在させ、そして例えばガンマカメラまたは放出断層撮影を用いた放射核スキニングなどの既知の技術を用いて、*in vivo* で検出するかまたは「イメージング」する。例えば、本明細書に援用される、A. R. Bradwell ら, "Developments in Antibody Imaging", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R. W. Baldwin ら (監修), pp 65-85 (Academic Press 1985) を参照されたい。あるいは、放射標識が陽電子を放出する場合（例えば ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 、および ^{13}N ）、Brookhaven National Laboratory にある Pet VI と称するものなどの、陽電子放出横断軸 (transaxial) 断層撮影スキャナーを用いることが可能である。

【0278】

当該技術分野に知られる標準的部分から、蛍光体および発色団で標識した修飾抗体を調製することが可能である。抗体および他のタンパク質は、約 310 nm までの波長を有する光を吸収するため、蛍光部分は、310 nm より高く、そして好ましくは 400 nm より高い波長で実質的な吸収を有するよう、選択すべきである。多様な適切な蛍光化合物および発色団が、本明細書に援用される、Stryer (1968) *Science*, 162: 526 および Brand, L. ら (1972) *Annual Review of Biochemistry*, 41: 843-868 に記載される。本明細書

に援用される、米国特許第3,940,475号、第4,289,747号、および第4,376,110号に開示されるものなどの慣用法によって、蛍光発色団基で修飾抗体を標識することが可能である。

【0279】

上記の、多くの望ましい特性を有する蛍光物質の1つの群は、キサンテン色素であり、これらには、3,6-ジヒドロキシ-9-フェニルキサントヒドロール由来のフルオレセインおよびレサミン (resamine) および3,6-ジアミノ-9-フェニルキサントヒドロール由来のローダミンおよびリサニム (lissanime) ローダミンBが含まれる。9-オ-カルボキシフェニルキサントヒドロールのローダミンおよびフルオレセイン誘導体は、9-オ-カルボキシフェニル基を有する。フルオレセインイソチオシアネートおよびフルオレスカミンなどの、アミノ基およびイソチオシアネート基などの反応性カップリング基を有するフルオレセイン化合物が容易に入手可能である。蛍光化合物の別の群は、 α または β 位にアミノ基を有するナフチルアミン類である。

【0280】

生存および死亡前立腺上皮細胞を含有する領域間を区別するか、または生存および死亡前立腺上皮細胞を区別することが重要である場合、上述のように標識した本発明の抗体（または本発明の他の修飾抗体）を、対象の抗体を標識するのに用いた標識と区別可能な標識で標識した、生存前立腺上皮細胞のみまたは死亡前立腺上皮細胞のみを認識する、抗体または他の修飾抗体と共に、同時投与することが可能である。多様な位置または時間で2つの標識の濃度を監視することによって、生存および死亡の正常、良性過形成、および癌性の前立腺上皮細胞の空間的および時間的濃度変動を確かめることが可能である。特に、この方法は、生存および死亡の上皮前立腺細胞を両方認識する、本発明の標識抗体、並びに死亡上皮前立腺細胞のみを認識する標識7E11抗体 (Horoszewiczら (1987) Anticancer Research 7:927-936) を用いて、行うことが可能である。

【0281】

他の態様において、本発明は、被験者、例えばヒト被験者に、放射性同位体にコンジュゲート化した抗PSMA抗体を投与した際に、異なる組織が曝露される線量、例えば放射線量を決定する方法を提供する。該方法には：(i) 放射性同位体で標識された、本明細書に記載するような抗PSMA抗体、例えば修飾抗PSMA抗体を、被験者に投与し；(ii) 放射性同位体のある程度またはすべてが被験者の体から除去されるまでの多様な時点で、異なる組織、例えば前立腺、肝臓、腎臓、または血液に位置する放射性同位体の量を測定し；そして(iii) 解析した各組織が受け取った放射線の総線量を計算することが含まれる。測定は、被験者への放射性標識抗PSMA抗体投与（第0日）後、スケジュールされた時点、例えば第1日、第2日、第3日、第5日、第7日および第12日に行うことが可能である。既定の組織に存在し、時間に渡って集積され、そして該放射性同位体の比活性を乗じた放射性同位体濃度を用いて、既定の組織が受け取った線量を計算することが可能である。1つの放射性同位体、例えばガンマー放射体、例えば ^{111}In で標識された抗PSMA抗体を用いて生成された薬理学的情報を用いて、同じ組織が、容易には測定不能である、異なる放射性同位体、例えばベータ放射体、例えば ^{90}Y から受け取るであろう、予期される線量を計算することが可能である。

【0282】

薬理ゲノミクス

予防的および療法的治療法両方に関して、こうした治療は、薬理ゲノミクスの分野から得られる知識に基づいて、特別に調整するかまたは修飾することが可能である。「薬理ゲノミクス」は、本明細書において、臨床的開発中の薬剤、および市場にある薬剤に対する、遺伝子配列決定、統計遺伝学、および遺伝子発現解析などのゲノミクス技術の適用を指す。例えば、Eichelbaum, M. ら (1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23:983-985およびLinder, M. W. ら (1997) Clin. Chem. 43:254-266を参照され

10

20

30

40

50

たい。療法剤の代謝の相違は、薬理学的に活性である薬剤の用量および血中濃度間の関係を改変することによって、重度の毒性または療法的失敗を導く可能性がある。一般的に、2つの種類の薬理遺伝学的状態が区別可能である。薬剤が体に作用する方式を改変する（薬剤作用改変）単一の要因として伝達される遺伝的状态、または体が薬剤に作用する方式を改変する（薬剤代謝改変）単一の要因として伝達される遺伝的状态である。これらの薬理遺伝学的状態は、まれな遺伝子欠陥として、または天然存在多型として、いずれかで生じうる。より具体的には、該用語は、患者の遺伝子が薬剤に対する反応をどのように決定するか（例えば患者の「薬剤反応表現型」または「薬剤反応遺伝子型」）の研究を指す。したがって、本発明の別の側面は、個体の薬剤反応遺伝子型にしたがって、個体の予防的または療法的治療を調整する方法を提供する。

10

【0283】

薬理ゲノミクス研究から生じる情報を用いて、個体の予防的または療法的治療の適切な投薬量および治療措置を決定可能である。この知識は、用量決定または薬剤選択に適用した際、不都合な反応または療法的失敗を回避することが可能であり、そしてしたがって療法組成物、例えば1以上の抗PSMA抗体またはその誘導体型（単数又は複数種類）からなる組成物を、障害、例えば本明細書に記載するような癌または前立腺障害を治療する手段として、患者に投与した際に、療法的または予防的効率を増進することが可能である。

【0284】

1つの態様において、医師または臨床家は、薬剤組成物、例えば1以上の抗PSMA抗体、その誘導体型（単数又は複数種類）、および場合によって第二の剤からなる組成物を、被験者に投与するかどうかを決定する際に、適切な薬理ゲノミクス研究で得た知識の適用を考慮することが可能である。別の態様において、医師または臨床家は、患者に投与される薬剤組成物、例えば本明細書に記載するような薬剤組成物の投薬量、例えば治療あたりの量または治療頻度を決定する際に、こうした知識を適用することを考慮することが可能である。

20

【0285】

さらに別の態様において、医師または臨床家は、臨床試験に参加した被験者群の、1以上の遺伝子座の遺伝子型を決定することが可能であり、ここで、被験者は障害、例えば本明細書に記載するような癌または前立腺障害を示し、そして臨床試験は、薬剤組成物、例えば1以上の抗PSMA抗体、および場合によって第二の剤からなる組成物の効力を試験するように設計され、そして医師または臨床家は、薬剤組成物への反応と、被験者の遺伝子型を相関させることを試みる。

30

【0286】

寄託

ハイブリドーマE99、J415、J533、およびJ591は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の要件にしたがい、そしてこれを満足して、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（“A. T. C. C.”），10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄託されている。ハイブリドーマE99は、1996年5月2日に寄託され、そしてA. T. C. C. 寄託番号HB-12101を得た。ハイブリドーマJ415は、1996年5月30日に寄託され、そしてA. T. C. C. 寄託番号HB-12109を得た。ハイブリドーマJ533およびJ591は、1996年6月6日に寄託され、そしてそれぞれ、A. T. C. C. 寄託番号HB-12127およびHB-12126を得た。

40

【0287】

脱免疫J591を産生するNS0細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC），10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に、2001年9月18日に寄託され、そして寄託番号PTA-3709を割り当てられた。脱免疫J415を産生するNS0細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC），10801 U

50

niversity Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に、2002年3月21日に寄託され、そして寄託番号PTA-4174を割り当てられた。これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条件下で維持されるであろう。この寄託は、当業者の便宜としてのみ行われ、そして寄託が35 U. S. C. § 112下で必要であることの是認ではない。

【0288】

以下の発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、該実施例はさらなる限定と解釈してはならない。本出願全体で引用されるすべての参考文献、係属特許出願および公開特許の内容は、明らかに本明細書に援用される。

【0289】

実施例

実施例1. ^{111} インジウム、 ^{90} イットリウム及び ^{177} ルテチウムに対する抗PSMA抗体のキレート化

修飾抗PSMAモノクローナル抗体を、 ^{111} インジウム、 ^{90} イットリウム又は ^{177} ルテチウムで、該抗体の表面に存在する第1級アミンにキレーター-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-4酢酸(DOTA)の4カルボン酸基の1つを直接カップリングさせることによって放射能標識することができる。次に、DOTAコンジュゲートした抗体(DOTA conjugated antibody)を精製し、滅菌濾過し、バイアルに入れる。使用前に、該精製抗体を、DOTAに結合する望ましい放射能標識と混合することができる。

【0290】

キレート化方法

モノクローナル抗体deJ591を1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-4酢酸(DOTA)とコンジュゲートさせ、続いて、 ^{111} インジウム、 ^{90} イットリウム及び ^{177} ルテチウムで放射能標識した。放射能標識及び品質管理試験を、臨床等級mAb deJ591の3つの個別のバイアルで行なった。

【0291】

deJ591のコンジュゲーション及び精製に用いたすべての試薬は、発熱物質を含まない水から製造した。 NH_4OAC 緩衝液及びリン酸ナトリウム緩衝液の特定の場合には、これらの溶液を、如何なる金属イオンをも除去するために、Chelex 100 (Bio-Rad, CA)で精製した。

【0292】

抗体と、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-4酢酸(DOTA)とのコンジュゲーション

モノクローナル抗体deJ591を、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-4酢酸(DOTA)によって次のように修飾した。簡単に説明すると、deJ591 25 mgを、24時間の期間にわたって、30 kDa microsep遠心分離濃縮器(Pall Filtron, MA)中で濃縮し、1%DTPA (pH 5.0) 5 x 4 mlで洗浄した。次に、抗体緩衝液を、同じ遠心分離手法を用いて、0.1 Mリン酸塩(pH 7.0)に変えた。水2 ml中にDOTA (0.361 mmole) 146 mgとN-ヒドロキシスクシンイミド(0.313 mmole) 36 mgとを溶解して、NaOHでpHを7.3に調節してから、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド10 mgを加えることによって、DOTAの活性エステルを調製した(下記参照)。

【0293】

【化1】

10

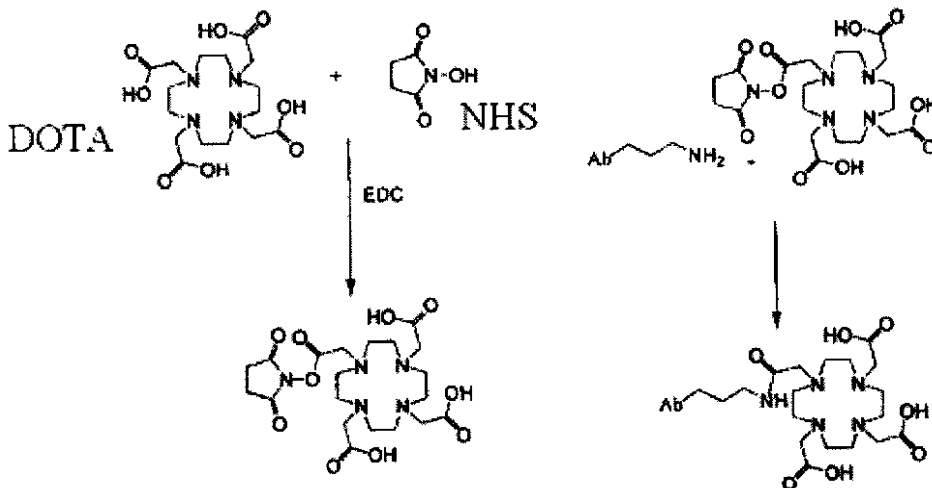
20

30

40

1) 活性エステルの調製

2) コンジュゲーション



10

【0294】

この反応混合物を氷上で1時間冷却してから、deJ591溶液に加えた。得られたDOTA-deJ591を、0.3 M NH₄OAc(20 x 4 ml)による反復洗浄及び遠心分離濃縮によって、過剰なDOTA及び他の反応物質から分離した。精製コンジュゲートを次に0.22 µmフィルターに通しての濾過によって滅菌して、滅菌ポリプロピレン・バイアルに入れて、4°Cで貯蔵した。

20

【0295】

DOTA-deJ591コンジュゲートの濃度を、280 nmにおけるUV吸収を測定することによって分析し、2つの50 µlアリコートに、トレーサー量の¹¹¹InをスパイクしたInCl₃(0.01 M HCl)の1.30 mM溶液20又は30 µlを混合した。混合物を37°Cで16時間インキュベートしてから、シリカゲル含浸ガラス繊維10 cmストリップ(ITLC-SG, Gelman, prod.# 61885)及び1% DTPA(pH 6.0)の溶離剤を用いて、ITLCによって分析した。抗体結合活性(antibody bound activity)は最初の状態に(at the origin)留まり、遊離¹¹¹Inは¹¹¹In-DTPA複合体として溶媒と共に前方に移動する。¹¹¹In及び¹¹¹In-DOTA-J591の相対的量を、0.5のR_fでITLCストリップを切断し、2つの半体をNa(Tl)I検出器でカウントすることによって測定した。¹¹¹InとDOTA-deJ591との間のモル反応比率及び、検出された¹¹¹Inと¹¹¹In-DOTA-J591との実測比率を考察することによって、結合部位の数を算出する。典型的に、5.1モルのDOTAがdeJ591にコンジュゲートする。表10は、deJ591の2つのコンジュゲーションからの結果を示す。

30

【0296】

【表10】

表10: deJ591にコンジュゲートしたDOTA分子の平均数の算出

試験番号	既知 ¹¹¹ In/DOTA-J591	実測 ¹¹¹ In/DOTA-J591	DOTA モル平均数 /mAb
	反応比率	TLC比率	
A	11.76	1.338	5.03
B	17.64	2.469	5.09

40

【0297】

放射能比率

下記放射能標識手段は、¹¹¹Inに関して述べるが、例えば⁹⁰Yは¹⁷⁷Luのような他の放射能標識によっても用いることができる。酢酸アンモニウム緩衝化DOTA-deJ591に¹¹¹In(希HCl

50

中)を加えることによって、放射能標識を達成した。該抗体に対するオートラジオリシスの影響を避けるために、反応時間を最小にし、投与の前に、反応混合物をサイズ排除カラムによって精製した。簡単には、 $^{111}\text{InCl}_3$ (8 mCi, 0.01 M HCl) 20 μl 、DOTA-deJ591 (4 mg/ml, 0.3 M NH_4OAc , pH 7) 400 μl から成る混合物を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間反応させた。次に、反応混合物を PBS 中無菌 1 % HSA 4 x 10 ml (HSA は US 認可アルブミンの規格を満たす; Central Laboratory Blood Transfusion Service Swiss Red Cross, Bern, Switzerland, License No. 647 製造) で平衡化した 16 ml Biogel-P6DG カラム (Bio-Rad, CA) 上で分離した。反応混合物を該カラムに負荷させた後直ちに、これをさらに 2 ml の 1 % HSA PBS で洗浄してから、主要 ^{111}In -DOTA-deJ591 フラクションを 5 ml の 1 % HSA PBS で溶出した。次に、精製 ^{111}In -DOTA-deJ591 を滅菌濾過して、滅菌真空バイアルに入れた。この方法を用いて、7.6 mCi ^{111}In /mg DOTA-deJ591 の比活性を得た。 10

【0298】

^{111}In に関する代替放射能標識手段

下記放射能標識手段は、臨床研究及び安定性研究のための ^{111}In -DOTA-J591 のルーチン調製に用いることができる。DOTA-J591 溶液 (8 mg/ml, 0.3 M 酢酸アンモニウム, pH 7) に、 ^{111}In 塩化物及び酢酸アンモニウム緩衝液 (1 M) を添加することによって、放射能標識を達成する。該抗体に対するオートラジオリシスの影響を避けるために、反応時間は最小にされている。標識 ^{111}In -DOTA-J591 を、サイズ排除カラムを用いて精製し、0.2 m ミリポア膜フィルターを用いて滅菌濾過してから、患者に投与する。

【0299】

簡単には、酢酸アンモニウム (^{111}In の各 mCi に対して 10 μl) を、 ^{111}In -塩化物溶液を含有する反応バイアルに加える。続いて、DOTA-J591 溶液 (^{111}In の各 mCi に対して 30 ml 又は 0.24 mg) を反応バイアルに加え、混合物を穏やかに混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ において 20 ~ 30 分間インキュベートし、該混合物のアリコートを用いて、ITLC (SG 及び 5 mM DTPA, pH 5) を用いて、標識効率を測定するために試験する。結合が最適であるならば (> 70 %), 10 ~ 40 ml の 5 mM DTPA の添加によって、反応を停止させる。

【0300】

遊離 ^{111}In から ^{111}In -DOTA-J591 を分離又は精製するために、1 % ヒト血清アルブミン (US 認可アルブミンの規格を満たす; Central Laboratory Blood Transfusion Service Swiss Red Cross, Bern, Switzerland) によって製造、License No. 647) を含有する PBS 4 x 10 ml で予め洗浄した Biogel-P6DG カラム (Bio-Rad, CA) に、反応混合物を加える。このカラムから 1 % HSA を有する PBS を用いて ^{111}In -DOTA-J591 を溶出し、標識抗体を含有するフラクション (典型的に 5 ~ 8 ml) を滅菌容器中に回収する。ITLC (前記と同じ) を用いて放射化学純度を測定した後に、標識効率が > 95 % である場合には、0.2 m フィルターを用いて標識複合体を滅菌バイアル中に濾過する。最終比活性は典型的に 3 ~ 5 mCi/抗体 mg である。 30

【0301】

^{90}Y による放射能標識

手段は、 ^{111}In に関して上述した手段と、インキュベーション時間が 10 ~ 15 分間であることを除いて、同様である。 ^{90}Y -DOTA-J591 の放射化学純度は > 97 % でなければならない。 40

【0302】

^{177}Lu による放射能標識

手段は、2 つの変更を除いて、上記手段と同様である。酢酸アンモニウムの添加量は減少し (^{177}Lu の各 mCi に対して 3 ~ 5 ml)、インキュベーション時間は僅か 5 分間である。 ^{177}Lu -DOTA-J591 の放射化学純度は > 97 % であるべきである。

【0303】

放射化学純度

放射能標識 DOTA-deJ591 調製物中の遊離 ^{111}In 量を、シリカゲル含浸ガラス繊維サポートと 1 % DTPA (pH 5.5) の移動相とによるインスタント薄層クロマトグラフィー方法を用いて評価した。簡単には、放射能標識 DOTA-deJ591 の一部を 10 cm ITLC-SG ストリップ (Gelman 50

、prod. # 61885)上にスポットし、1% DTPA (pH 5.5)中で展開した。溶媒の先端が該ストリップの末端に達した直後に、該ストリップを溶媒から取り出し、0.5の R_f で切断した。2部分を放射能に関して分析し、次式を用いて、放射化学純度を測定した：

放射化学純度 = (R_f 0 ~ 0.5 中の放射能 (activity)) / (ストリップ中の総放射能)

免疫反応性

^{111}In -D0TA-deJ591調製物の免疫反応性を、Lindmo方法(Lindmo T. et al. (1994) J. Immunol. Methods, 72:77-89, 1994)に従って評価した、この方法は、無限に過剰な抗原への放射能標識抗体の結合を推定する。簡単には、250 μl の総試験量の0.2% BSA 10 mM HEPES中に10,000 cpmの ^{111}In -D0TA-deJ591及び種々な量のLNCaP細胞を含有する5種類の試験溶液を調製した(2通りに)。これらの溶液を4°Cにおいて60分間インキュベートしてから、単離し(遠心分離によって)、氷冷PBSで洗浄した。次に、膜をガンマカウンターで、添加した総放射能を示す基準と共にカウントした。データを次に、Lindmo法を用いて、結合した割合の逆数(reciprocal of the fraction bound)(y-軸)に対する基質濃度の逆数(reciprocal of the substrate concentration)(x-軸)としてプロットした。データを最小二乗線形回帰法(least squares linear regression method)(Sigma Plot)に従ってフィットさせて、yインターセプトを免疫反応性の逆数(reciprocal of the immunoreactivity)と見なした。LNCaP細胞に由来する膜を用いる同様な方法と、その後の該膜の遠心分離単離は、同様な結果を与えた。これらの結果は、72%の平均免疫反応性を与えた(表11参照)。

10

【0304】

20

免疫組織化学

D0TAコンジュゲートし、部分精製されたバルク中間体deJ591に対して免疫組織化学を行なった。結果は、該調製物が前立腺組織に特異的であり、反応性が、裸の(naked) deJ591抗体と同じであることを示した。

【0305】

増殖不能性(sterility)

^{111}In -D0TA-deJ591調製物の増殖不能性を、USP 24/NF 19の方法に従ってチオグリコラート培地を用いて測定した。簡単には、 ^{111}In -D0TA-deJ591調製物の4通りの0.1 mlサンプルを15 mlの流体チオグリコラート培地に移して、混合物を35°Cで14日間インキュベートした。この培地を、4日目、7日目及び14日目に増殖の何らかの徴候に関して目視検査した。3調製物のすべては、増殖を示さなかった(表11参照)。

30

【0306】

内毒素

^{111}In -D0TA-deJ591調製物の内毒素を、USP 24/NF 19に従ってLimulus amoebocyte溶解物(lysate)アッセイを用いて測定した。簡単には、Limulus amoebocyte溶解物キット(Bio Whittaker lot # 7L3790, 感度0.125 EU/ml)を、試験サンプル0.25 mlによって再構成した。4通りの試験サンプル、人為的陽性試験サンプル、陰性対照及び陽性対照を37°Cにおいて60分間インキュベートした。陽性結果は、180°反転によって影響されなかった粘性ゲルの形成によって代表された。1つの調製物は、5 EU/ml未満の値を示した。このアッセイは、投与直前まで患者投与量に対して繰り返すことができる(及び繰り返されるであろう)。

40

【0307】

【表11】

表 1 1 : 放射能標識 ^{111}In -DOTA-deJ591 の分析結果

試験	結果
放射能標識収率	85 %
放射化学純度	>99 %
免疫反応性	72 %
内毒素	<5 Eu/ml
増殖不能性	不能

10

deJ591 の Lot# : BIOV983. 2-2

【0308】

大規模製造／方法

DOTAコンジュゲートしたdeJ591抗体の大規模製造を下記パラグラフで述べる。上記方法論との主要な相違は、該抗体を濃縮し、ダイアフィルトレーションするためのmicrosep遠心分離濃縮器の代わりの攪拌セル(stirred cell)の使用と、該DOTAコンジュゲートしたdeJ591抗体から未反応のDOTA及び他の試薬を除去するためのSephadex G-25カラムの使用であった。これらの変更は、規模の増大によって必要になった。公称1000 mg規模に関する出発物質の比率を表12に記載する。この方法は、出発物質の同様な比率を用いて、スケールアップすることができる。

20

【0309】

【表12】

表 1 2 : 出発物質の単位比率

出発物質	単位比率
deJ591 抗体	Xmg
1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-N,N',N'',N'''-4 酢酸 (DOTA)	1.25 Xmg
N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)	0.275 Xmg
1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC)	0.3 Xmg

30

【0310】

汚染を最小にするために、無菌操作 (aseptic practices)を観察し、製造中に定期的間隔で環境モニタリングを行なった。DOTA-deJ591抗体のコンジュゲーション及び精製に用いるすべての溶液、緩衝液及び試薬は、Water For Injection (WFI)によって製造された。DOTA部分による如何なる遊離金属残渣のキレート化をも避けるために、方法を通して、金属を含まない成分を製造に用いた。酢酸アンモニウム緩衝液及びリン酸ナトリウム緩衝液の特定の場合には、溶液をChelex 100で精製して、如何なる金属イオンをも除去した。滅菌した、発熱物質を含まない及び金属を含まない容器を用いて、反応物質を混合した。Class 100 規格を満たす範囲(area)で、最終バルク滅菌濾過を行なった。

40

【0311】

Chelex 100 (BioRad 又は同等物)カラム上で金属を含まない0.1 Mリン酸ナトリウム pH 7.1中に該抗体を緩衝液交換することによって、deJ591を調製した。次に、30kDカットオフ膜を備えたStirred Cell Unit(Millipore又は同等物)を用いて、抗体を約10 mg/mlに濃縮した。濃縮済み抗体を次に、0.22 µmフィルターに通して滅菌濾過した。

【0312】

50

抗体1gをコンジュゲートするために、金属を含まないリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.1）中の0.87M N-ヒドロキシスクシンイミド2.7mlに、金属を含まないリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.1）中の0.49M DOTA 6.3mlを加えることによって、DOTAの活性エステルを調製した。この混合物に、0.1N水酸化ナトリウムを、DOTAが完全に溶解するまで加えた（0.1M水酸化ナトリウムの、DOTA/NHS溶液に対する比率約1:1）。pHは6.9~7.2であった。溶液を2~8℃で30分間以上冷却した。DOTA/NHS溶液に、リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.1）中1.0M EDC 1.5mlを加えて、2~8℃で1時間以上冷却させた。

【0313】

抗体1gに活性DOTA エステルを加えて、2~8℃において一晚（12~14時間）インキュベートした。DOTAコンジュゲートした抗体を、金属を含まない0.3M酢酸アンモニウム緩衝液（pH 7.2）中のSephadex G-25カラム（Pharmacia 又は同等物）上で精製した。DOTAコンジュゲートした抗体を含有する溶出液フラクションを、30kDカットオフ膜を備えたStirred Cellを用いて、約10mg/mlに濃縮した。DOTAコンジュゲートしたdeJ591抗体を次に、0.3M酢酸アンモニウム（pH 7.2）中でディアフィルトレーションして、過剰な試薬を除去し、8.0mg/mlの最終濃度にまで希釈してから、0.22µmフィルターに通して滅菌濾過した。

【0314】

DOTAコンジュゲートしたdeJ591を、濃度、免疫反応性、コンジュゲーション、内毒素及び増殖不能性に関して試験した。内毒素範囲は、1~5mgの範囲である、必要な放射能標識 DOTAコンジュゲートしたdeJ591抗体の低い臨床投与量に基づく。バッチサイズが小さいために増殖不能性の代わりに、バルク精製済みDOTAコンジュゲートしたdeJ591抗体に対して生物負荷(bioburden)試験を行なった。増殖不能性(21 CFR 610)は、最終的なバイアル入り薬物生成物に対して行なわれる。免疫反応性の目標及びDOTAモル数/抗体は、以前の臨床経験に基づく。72%程度の低い免疫反応性値を有するDOTAコンジュゲートした抗体が、クリニックで上首尾に用いられている。DOTAモル数/抗体は、以前の臨床的ロットからの結果に基づく。

【0315】

タンパク質濃度

DOTA-deJ591のサンプルを、280nmの波長において分光光度計での光学密度によって分析した。これらの算出に用いた吸光係数は A_{280} , $E^{0.1\%}_{1cm} = 1.4$ であった。この分析の作用範囲（0.20D単位~1.20D単位、直線、CV2%未満）内の吸光度読取りを与えるように、試験サンプルを適当に希釈した。タンパク質濃度の受容される範囲は、8.0mg/ml $\pm$ 0.5mg/mlである。

【0316】

内毒素

DOTA-deJ591のサンプルを、確証済みLimulus Amebocyte Lysate試験(LAL) Gel Clot Assay (BioWhittaker又は同等物)を用いて、発熱性物質に関して試験した。0.06EU/ml 感受性溶解物を用いて、ゲル・クロットアッセイに対するある種の化学物質の阻害レベルを克服するために、分析のための内毒素を含まない水中でサンプルを1:10又は1:25のいずれかで希釈した。加工(processing)中の各緩衝液又は中間体サンプルに関して2通りの測定を行なった、サンプル値は、該緩衝液に対して設定された希釈レベルで得られた値以下である必要があった。すべてのサンプルと共に、陽性及び陰性対照並びに阻害対照を実施した。提案された受容される範囲は、DOTA-deJ591 1mgにつき5EU以下であった。

【0317】

生物負荷

DOTA-deJ591のアリコート、流体チオグラート及び大豆-カゼイン・ブロスに直接接種した。14日間のインキュベーション後に、これらの培地を検査した。必然的に、両方の培地は14日間後に増殖を示さなかった。

【0318】

免疫反応性

DOTA-deJ591調製物の免疫反応性を、過剰な抗原の無限量に対する放射能標識抗体の結合を推定するLindmo方法 (Lindmo T. et al.(1994) J. Immunol. Methods 72:77-89)に従って評価した。簡単には、0.2 % BSA 10 mM HEPESの総試験量250 μ l中に10,000 cpmの ^{111}In インジウム標識DOTA-deJ591及び種々な量のLNCaP細胞又は細胞膜を含有する5種類の試験溶液を調製した(2通り)。これらの溶液を4℃で60分間インキュベートしてから、単離し(遠心分離による)、氷冷PBSで洗浄した。次に、これらの膜をガンマーカウンターで、添加した総放射能を示す基準と共にカウントした。データを次に、Lindmo法を用いて、結合した割合の逆数(y-軸)に対する基質濃度の逆数(x-軸)としてプロットした。データを最小二乗線形回帰法(Sigma Plot)に従ってフィットさせて、yインターセプトを免疫反応性の逆数と見なした。免疫反応性の目標は75%以上であった。

【0319】

DOTAモル数/抗体

結合DOTA数/抗体を、インジウムの自然発生同位体及び ^{111}In インジウムによる飽和結合方法を用いて測定した。DOTA-deJ591の複数アリコート(少なくとも2つ)に、10~30 μ lの範囲内の種々の量の、トレーサー量の ^{111}In をスパイクした InCl_3 (0.01 M HCl)の3.0 mM溶液を混合した。混合物を37℃で16時間インキュベートしてから、シリカゲル含浸ガラス繊維10 cmストリップ(ITLC-SG, Gelman,又は同等物)及び1% DTPA (pH 6.0)の溶離剤を用いて、ITLCによって分析した。抗体結合放射能は最初の状態に留まり、遊離 ^{111}In は ^{111}In -DTPA複合体として溶媒と共に前方に移動する。 ^{111}In 及び ^{111}In -DOTA-J591の相対的量を、0.5のRfでITLCストリップを切断し、2つの半体をNa(Tl)I検出器でカウントすることによって測定した。 ^{111}In とDOTA-deJ591との間のモル反応比率及び、検出された ^{111}In と ^{111}In -DOTA-J591との実測比率を考察することによって、結合部位の数を算出した。DOTA分子/抗体の目標数は4~6であった。DOTAコンジュゲートしたdeJ591抗体のサンプルロットの分析結果を以下の表13に示す。

【0320】

【表13】

表13

試験	提案受容範囲	結果
外観	透明無色溶液	透明無色溶液
濃度	8.0mg/ml $\pm$ 0.5mg/ml	8.4mg/ml
内毒素	NMT 5 EU/mg	<1.2EU/mg
生物負荷	増殖なし	増殖なし
免疫反応性	情報のみのため(目標NLT 75%)	95%
DOTA モル数/抗体	情報のみのため(目標4~6DOTA/抗体)	6

【0321】

DOTAコンジュゲートしたdeJ591抗体の以前のロット(Biov983.2-2)及び現在のLot243101に関するDOTAコンジュゲーション数を表14に示す。Lot Biov983.2-2に関するDOTAモル/抗体の平均数は5.06であり、Lot 243101に関しては5.96であった。抗体当りにコンジュゲートしたDOTAモルの数は、Lot 243101に関する方がやや高く、免疫反応性は、表15に示すように、影響されなかった。実際に、Lot 243101の免疫反応性は、比較ロットの免疫反応性よりも高く、このことは有利である。他の小規模臨床的ロットが90%より大きい免疫反応性値を有することは、注目すべきである(データ示さず)。

【0322】

【表14】

表14：deJ591抗体にコンジュゲートしたDOTA分子の平均数の比較

ロット番号	既知 $^{111}\text{In}/\text{DOTA-deJ591}$	実測 $^{111}\text{In}/\text{DOTA-deJ591}$	DOTAモル平均数 /mAb
BIOV983.2-2	反応比率	TLC比率	
A	11.76	1.338	5.03
B	17.64	2.469	5.09
平均			5.06
ロット243101	反応比率	TLC比率	
A	10.98	0.8608	5.90
B	16.46	1.7301	6.03
C	21.95	2.8226	5.74
D	32.93	4.3498	6.15
平均			5.96

A=In-自然/ ^{111}In 溶液10 μl 、B=In-自然/ ^{111}In 溶液15 μl 、C=In-自然/ ^{111}In 溶液20 μl 、D=In-自然/ ^{111}In 溶液30 μl 、

表15：DOTA-deJ591の免疫反応性の比較

試験	ロット BIOV983.2-2	ロット 243101
免疫反応性	72%	95%

【0323】

代替手段

DOTA-J591イムノコンジュゲート (immunoconjugate) の代替合成は、次の通りである：de J591 956.5mgを6回ディアフィльтраーションした。該抗体を30kDa microsep 遠心分離濃縮器(Pall Filtron, MA)で、約15mg/mlまで濃縮し、金属を含まない0.1Mリン酸ナトリウム(pH7.1)で12.5倍に希釈した。この手段は6回行なった。0.1Mの金属を含まないリン酸塩緩衝液5.95ml中のDOTA598mg(1.48mmol)と、0.1Mの金属を含まないリン酸塩緩衝液2.7ml中のN-ヒドロキシスクシンイミド132mg(1.15mmol)とを混合することによって、DOTAの活性エステルを調製した。NaOHによって、pHを6.9~7.2に調節してから、0.1Mの金属を含まないリン酸塩緩衝液1.45ml中の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド144mg(0.75mmol)を添加した。この反応混合物を0.2ミクロン滅菌フィルターに通して濾過して、氷上で1時間冷却してから、deJ591溶液に加えて、2~8℃で14~18時間一晩インキュベートした。得られたDOTA-deJ591を、0.3Mの金属を含まない酢酸アンモニウム中で平衡化させたG-25カラムに通して精製することによって、過剰なDOTA及び他の反応物質から分離した。精製コンジュゲートを攪拌セルユニットで10mg/mlに

まで濃縮し、0.3 M酢酸アンモニウムで洗浄してから、0.22 μ mフィルターに通しての濾過によって滅菌して、滅菌ポリプロピレンバイアルに入れて2～8℃において貯蔵した。

【0324】

さらに他の代替手段は、コンジュゲーション工程に用いるDOTA-NHSモノー活性エステルの量及び純度の良好な制御を達成するため、並びにDOTAがin-situ活性化されるときに生じる、予想外の化学的副反応を制限するために、純粋なDOTA-NHSモノー活性エステル (Macrocyclicsから商業的に入手可能) を必要とするコンジュゲート工程を用いることである。in-situ活性化DOTA (即ち、抗体に加える前に精製されない活性化DOTA)の使用に付随する問題は、DOTA-NHSの可変な生成によるDOTA抗体の取り込み比率の変動；コンジュゲートした抗体から洗浄除去される必要があり、放射性同位体への結合に関して競合しうる、非常に過剰なDOTAの使用を包含する；未反応EDACは、リシンと、タンパク質上のグルタミン酸残基又はアスパラギン酸残基との架橋、したがって好ましくないタンパク質アグリゲートを生じうる；そして、タンパク質が架橋することを可能にし、金属配位のために必要である付加的なカルボキシレート基を用いる、活性化DOTA分子の有意な割合上に、2つ以上の活性エステルが形成される可能性がある。

10

【0325】

DOTAへのそのコンジュゲーションに由来する、抗体結合活性の損失を最少にするために、抗体分子当りに約2～10、好ましくは約5～7個のDOTA分子を取り込むことが望ましい。DOTA-NHSモノー活性化エステル、抗体に比べて3～30倍過剰なDOTA-NHSが、この好ましいレベルのDOTA取り込みを生じる。DOTA-NHSの抗体に対する投入比率(input ratio)7：1、9：1、11：1、15：1、20：1及び30：1を用いて、研究が現在行なわれている。

20

【0326】

プロトコールは、次の通りである。出発物質：リン酸ナトリウム緩衝液(0.1 M、pH 7.1)中のJ591抗体10.5 mg/ml、Chelex 100樹脂(抗体10 mg当り樹脂1 ml)で処理；0.3 M酢酸アンモニウム緩衝液(pH 7.0)、Chelex 100樹脂(緩衝液1 L当り樹脂20 ml)で処理；DOTA-NHS.PF6 (FW 646.4)、Macrocyclics、Dallas、TX。実験方法：3個のポリプロピレン・バイアルに別々に、J591抗体(10.5 mg/ml、143 μ mol)2.0 mlを装入して、氷上で30分間の期間にわたって冷却した。DOTA-NHS3.3 mgを、金属を含まない水(Chelex 100樹脂で処理、氷上で30分間予め冷却)0.356 ml中に溶解して、14.3 nmol/ μ lの濃度にした。該3抗体溶液に、この新たに調製されたDOTA-NHS溶液70、90及び110 μ lを別々に加えた。反応混合物を室温において4時間の期間にわたって磁気攪拌バーでゆっくり攪拌し、次に緩衝液交換のために、CentriCon-30中で0.3 M酢酸アンモニウム緩衝液(pH 7.0、Chelex 100処理)によって、15 mlに希釈した。次に、濃縮物(約1.5 ml)を再び15 mlに希釈してから、1.5 mlに濃縮した。これらの濃縮物を次に0.2 μ mフィルターに通して濾過した。CentriCon管及びフィルターを少量の酢酸アンモニウム緩衝液で洗浄して、最終生成物中に濾過して加えた(それぞれ、総量2 ml)。

30

【0327】

DOTA-NHSの、抗体に対する投入比率7：1、9：1及び11：1を用いてDOTAにコンジュゲートした抗体は、 ^{90}Y 結合安定性及びタンパク質アグリゲート形成に関して分析されている。3種類のコンジュゲートのすべては、 ^{111}In 又は ^{90}Y による標識の2～3日間後に、PBS、DTPAキレートチャレンジャー、血清及びトランスフェリンの存在下で高い割合(high percentage)の安定性を示した。さらに、3種類のコンジュゲートのすべては、工程に関連したアグリゲート形成を殆ど又は全く示さなかった。DOTA-NHSの抗体に対するより高い投入比率を用いて製造された、残りの3コンジュゲートが現在分析されている。

40

【0328】

抗体に対するDOTAのコンジュゲーションは、NHS活性化DOTAに限定されない。DOTA-NHSの代わりに、DOTA-HOBT活性エステルも、例えば、エチルクロロホルメート又はイソブチル

50

クロロホルメート、p-ニトロフェニルエステルの混合無水物の使用のような、当該技術分野で知られた他の活性化方法と同様に、用いることができる。

【0329】

実施例2. LNCaPヒト前立腺腫瘍を有するヌードマウスにおける ^{131}I ー及び ^{111}In ー標識deJ591及びネズミJ415の薬物動態及び生体内分布

PSMA陽性ヒトLNCaP腫瘍を有するヌードマウスにおいて、 ^{131}I 又は ^{111}In で放射能標識されたモノクローナルdeJ591及びネズミJ415抗体の薬物動態、生体内分布及び腫瘍取り込みを分析した。放射能標識MAbsの腫瘍内分配を確認するために、オートラジオグラフィー分析を行なった。

【0330】

deJ591及びJ415を、ヨードゲン方法(iodogen method) (Franker and Speck (1978), Biochem Biophys Res Commun 80:849-57参照)を用いて、400MBq/mg(21,23)の比活性に ^{131}I によって放射能標識した。 ^{111}In の放射能標識に関しては、J415及びdeJ591抗体を最初に1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-4酢酸(DOTA)とコンジュゲートさせ、次に ^{111}In で標識して、200 MBq/mgの比活性を生じた。

【0331】

前立腺癌細胞系LNCaP、DU145及びPC3(American Type Culture Collection, Rockville, MD)を、10%ウシ胎仔血清を補充したRPMI 1640中、37°C、5%CO₂含有雰囲気中で増殖させた。使用前に、細胞をトリプシン処理し、カウントし、Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)中に懸濁させた。生後8~10週間のNu/Nu Balb Cマウスの右及び左側腹部にMatrigel (BD Biosciences, Bedford MA)中の 5×10^6 LNCaP細胞の懸濁液を接種した。14~18日間後に、腫瘍(10~300 mg)が発生した。PSMA陰性DU145及びPC3細胞をヌードマウスに同じ方法で移植した。

【0332】

PSMA陽性及びPSMA陰性腫瘍を有するマウスに、尾静脈から、PBS(pH 7.4、0.2% BSA)200 µl中の80KBqのヨウ素化Mab(400 MBq/mg)を注入した。2、4又は6日間後に動物群(3~8/群)を殺した。主要な器官及び腫瘍を回収した。組織サンプルを秤量し、自動NaI(Tl)カウンター中で適切な基準と共にカウントした。これらの測定相対的活性(measured relative activity)データ(cpm)をバックグラウンド補正して、注入量%/g(%ID/g)として表現する。これらのデータに最小二乗回帰分析(Microcal Origin, Northampton, MA)をも適応して、種々な作用剤の生物学的クリアランスを測定した。J415、J591及び7E11を ^{111}In (100MBq/mg)で標識した。80KBqの ^{111}In 標識Mabを動物群に注入した。種々な器官及び腫瘍組織中の%ID/gを、注入後2~6日目に、 ^{131}I 標識Mabに関して述べたと同様な方法で測定した。

【0333】

イメージング研究のために、動物に2MBqの ^{111}In -DOTA-J591を注入した。注入後1、2、3、4及び6日目に、マウスをケタミン/キシラジン100 mg/kg/10 mg/kg IPによって鎮静させた。マウスを、ピンホール・コリメーターを装備したガンマ・カメラ(Transcam, ADAC Laboratories, Milpitas, CA)で造影した。 ^{111}In の245 KeV光電ピークの20%ウィンドウを用いて、256 x 256マトリックスで1000秒間イメージを得た。

【0334】

数匹(n=20)に関して、回収した腫瘍サンプルを直ちに液体窒素中で冷却して、包埋剤(0.C.T. 4583, Sakura Finetec, Torrance CA)中で凍結させた。20ミクロン切片を切断して、腫瘍切片をアセトンで固定して、1枚の写真用フィルム(Biomax, Kodak, Rochester, NY)と直接接触させたか、又はフィルムへの暴露前にヘマトキシリン/エオシンで染色した。対照動物から腫瘍を収集して、10 µm切片に切断した。これらの切片をtris緩衝液(170 mM, pH 7.4、2 mM CaCl₂及び5 mM KCl含有)中に15分間浸漬し、tris緩衝液(170 mM, pH 7.4)で洗浄し、 ^{131}I -J591 Mabと共に4°Cで1時間インキュベートした。100 nM J591 Mabの存在下で非特異的結合を測定した。これらの切片を次に、PBS(0

10

20

30

40

50

． 2 % BSA含有)で 3 回、Tris緩衝液で 1 回洗浄してから、アセトンで固定し、次に写真用フィルムに暴露した。

【0335】

^{131}I 標識 MAb の生体内分布

LNCaP腫瘍を有するヌードマウスにおいて、 ^{131}I 標識されたdeJ591及びJ415の生体内分布及び腫瘍取り込みを ^{131}I -7E11の生体内分布及び腫瘍取り込みと比較した。注入後 2 日目に、deJ591、J415及び7E11は同じ腫瘍取り込み及び血液プール活性を有した。6 日目に、J415の腫瘍取り込み(15.4 ± 1.1)は、deJ591の腫瘍取り込み(9.58 ± 1.1)に比べて有意に高かった。deJ591及びJ415の両方の血液活性は、7E11の血液活性に比べて有意に低かった。 ^{131}I 標識 MAb に関して、腫瘍／血液比率及び腫瘍／筋肉比率は、J415では J591又は7E11によるよりも有意に高かった。 10

【0336】

PSMA陽性LNCaP腫瘍における放射能標識MAb局在化の特異性を評価するために、選択された器官における ^{131}I 標識deJ591及びJ415の取り込みを、関連性がないIgG抗体の取り込みに比較した。注入後 1 日目に、J415 (12.2 ± 3.24)及びdeJ591 (8.55 ± 1.29)の両方の腫瘍取り込み(注入量 % / g)は、無関係抗体の取り込み(4.41 ± 0.40)に比べて有意に高かった。肺、腎臓、筋肉における取り込みは、3 種類の抗体のすべてで同じであった。第 2 対照研究では、 ^{131}I -deJ591の腫瘍取り込みを、PSMA陰性前立腺腫瘍(PC3及びDU145)を有するヌードマウスにおいて測定した。注入後 4 日目に、 ^{131}I -deJ591の腫瘍取り込みは、PC3腫瘍 ($n = 10$) ではわずかに $0.66 \pm 0.07\%$ ID/gであり、DU145腫瘍 ($n = 6$) では $0.55 \pm 0.03\%$ ID/gであった。これとは対照的に、 ^{131}I -J591の腫瘍取り込みは、PSMA陽性LNCaP腫瘍では $11.4 \pm 1.49\%$ ID/gであり、これはPSMA陰性腫瘍におけるよりも有意に高かった($p < 0.01$)。 20

【0337】

^{111}In 標識 MAb の生体内分布

^{111}In に関しては、deJ591及びJ415の腫瘍取り込みは、経時的に徐々に上昇し、7E11の腫瘍取り込みと全く同じであった。J415及びJ591の両方の血液クリアランスの動力学は、7E11に比べてより迅速である。注入後 6 日目に、J415 (2.63 ± 0.23)及びdeJ591(2.52 ± 0.16)の血液活性は、7E11(4.16 ± 0.21)の血液活性の約 50 % である。その結果として、J415及びdeJ591による腫瘍／血液比率は、7E11の腫瘍／血液比率に比べて有意に高い。肝臓、脾臓及び腎臓におけるこれら 3 種類の抗体の取り込みには、軽微な差が存在するに過ぎなかった。 30

【0338】

ヌードマウスの連続ガンマ・カメラ画像は、 ^{111}In -DOTA-deJ591の強度な腫瘍蓄積を明確に示す。1 日目には、右後 4 分体(right hind quarter)、血液プール及び肝臓上の単一腫瘍(約 250 mg)が良好に眼に見えるようになる。しかし、その後の画像では、血液プールから活性(activity)が除去されているが、腫瘍蓄積は、肝臓活性(liver activity)の蓄積に比べて、徐々に強度になる。

【0339】

オートラジオグラフィー

静脈内注入後 4 ~ 6 日目に、腫瘍試験片 ($n = 20$) をヘマトキシリン (H) 及びエオシン (E) 染色及びオートラジオグラフィーのために回収して、 ^{131}I 標識 MAb の腫瘍内生体内分布を研究した。H 及び E 染色は、研究した試験片のすべてにおいて横断面積の平均 50 % になる、かなりの量の壊死を明らかにする。オートラジオグラフは、3 種類の抗体のすべてに関して焦点的な、幾らか不均質な分布図を明らかにする。興味深いことには、PSMA_{int} 及び PSMA_{ext} に対する MAb による生体内分布図は、殆ど逆のパターン(reciprocal pattern)を示す。即ち、7E11(anti-PSMA_{int})は、明白に、壊死部位への局在を好むが、J415及びJ591(anti-PSMA_{ext})は、生存腫瘍部位内の明白な選択的蓄積を示す。 ^{131}I -J591を組織切片上で直接インキュベートした場合の ex vivo オートラジオグラフィーは、均質な結合パターンを示した。 40

【0340】

結論

PSMA陽性LNCaP腫瘍における放射能標識J591及びJ415の局在は、非常に特異的である。これらの結果は、例えばdeJ591及びdeJ415のようなPSMA特異的インターナリジング抗体(internalizing antibodies)が、PSMA陽性腫瘍の治療のために β 放射する放射性核種(^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu)のデリバリーを目標とする新規な治療法の開発のための理想的なMAbでありうることを、明確に実証する。

【0341】

PSMA_{ext}に対するMAbは、7E11に対しては逆のパターンを有し、局在は生存腫瘍部位に集中した。7E11が十分に血管化した生存腫瘍部位を標的とすることができないことは、恐らく、ProstaScint(登録商標)が骨転移を造影することができないことを説明し、並びにRITトライアルでのその不成功を説明すると思われる。生存腫瘍を標的にすることによって、deJ591及びdeJ415のような、PSMA_{ext}に対するMAbは、より良好な治療効果を有する。さらに、それらが生存細胞を標的にすることができることは、骨髄中の十分に血管化された部位を局在化する(localize)、より十分な可能性を与える。

【0342】

実施例3. ^{90}Y -DOTA-deJ591を用いる動物研究

in vitro及びin vivo動物モデルで、 ^{90}Y -DOTA-deJ591は実質的な抗腫瘍活性を実証している。これらの研究では、免疫不全“ヌード”マウスにPSMA発現ヒト前立腺癌細胞(LNCaP)を筋肉内移植した。幾つかの研究では、同じ動物の反対側の大腿部にPSMA不在ヒト前立腺癌系(PC3)を同時移植した。癌を約2週間の期間にわたって“定着”させ、この期間に、癌は血液供給を発達させて、さらなる増殖を可能にする。治療開始時に、癌移植片は平均すると直径1.0 cm(又は動物体重の約5%)になる。

【0343】

4群のマウスに、1.3、3.7、5.5又は7.4 MBqの ^{90}Y -DOTA-deJ591を単回注入した。1.3 MBq投与量レベルでは、腫瘍増殖速度の最小の低下を含む混合反応が存在した。しかし、3.7~7.4 MBqの投与量では、明白な抗腫瘍投与量-反応関係が見られた。3.7、5.5及び7.4 MBq投与量レベルでは、それぞれ、平均腫瘍容積の30、55及び90%減少と、腫瘍再増殖の10、35及び60日間の進行性投与量関連遅延が存在した。3.7~5.5 MBqを受容したマウスの70%より多くが対照よりも有意に長く生存し、平均生存時間(MST)は、対照の40日間に比べて、80~100日間まで増加した。

【0344】

3群のマウスは1.11、2.22又は3.33 MBqの ^{90}Y -DOTA-huJ591を28日間毎に3回投与で受容した。1.11 MBq投与量レベルでは、75~80日間に最小の腫瘍増殖が生じた。2.22及び3.33 MBq投与量レベルでは、60日目に平均腫瘍サイズの50~70%減少が生じ、その後、腫瘍サイズは徐々に増加した。1.11及び2.22 MBq投与量レベルでは、対照群に比べてMSTが約200%増加した(120日間対40日間)。

【0345】

これらの研究は、 ^{90}Y -DOTA-deJ591治療動物の生残の有意な改良を確認する。PSMA不在癌は治療に反応せず、該治療の特異性を実証する。

【0346】

実施例4. ^{177}Lu -DOTA-deJ591を用いる動物研究

^{177}Lu -DOTA-deJ591で治療された、LNCaP腫瘍を有するヌードマウスは、 ^{90}Y -DOTA-deJ591治療マウスと同様な反応を示した。この研究では、LNCaP腫瘍を有するマウス(300~400 mg)を3群に分割した。対照群は治療を受けなかった。群2は200 μCi の ^{177}Lu -DOTA-deJ591を受容し、群3は300 μCi の ^{177}Lu -DOTA-deJ591を受容した。 ^{177}Lu -DOTA-deJ591は、投与量に依存した形式で、平均腫瘍質量を、この2種類の投与量レベルで80~97%減ずることができた。対照群は、腫瘍サイズの漸進的増加を示した、これは着

10

20

30

40

50

実な体重損失を伴った、該マウスは、低い体質量(body mass)のために53日間までに殺した。200 μ Ciの ^{177}Lu -D0TA-deJ591で治療されたマウスは、注入後20日間までに腫瘍収縮を示したが、その後に、幾つかの動物では腫瘍再増殖が見られた。同じ群はまた、注入後20日目に、約90%（基準重量の）の体質量最低を有し、その後、出発質量の100~105%までの平均体重の着実な上昇を有した。90日目に、11匹のマウスのうちの4匹は触知可能な腫瘍を有さなかった。300 μ Ciの ^{177}Lu -D0TA-deJ591で治療されたマウスは、注入後40日間までに腫瘍収縮を有し、その後、幾つかの動物では腫瘍再増殖が見られた。同じ群はまた、注入後20日目に、約90%の体質量最低を有し、その後、出発質量の105~110%までの平均体重の着実な上昇を有した。90日目に、11匹のマウスのうちの5匹は触知可能な腫瘍を有さなかった。

10

【0347】

実施例5. ^{131}I -J591（ネズミ）によるヒト試験；ホルモン非依存性患者における、モノクローナル抗体(mAb)に前立腺特異的膜抗原の細胞外ドメイン(PSMA_{ext})を標的とさせるI相臨床試験

上昇するPSAレベルと、許容される血液学的機能、肝機能及び腎機能を有するホルモン非依存性患者は、ネズミmAbJ591の単回投与量を受容した。投与量は、3~6患者の群において段階的に増加した(0.5~300mg)。各投与量は、“冷(cold)”mAbにプラスして、トレーサーとして10mCi ^{131}I ヨウ素で標識されたJ5911.0mg以下を包含した。投与量レベルは、次のように0.5~300.0mgの範囲であった：0.5mg、1.0mg、2.0mg、5.0mg、10mg、25mg、50mg、100mg、125mg、150mg、200mg、250mg及び300mg。血液及び尿を回収して、薬物動態、毒性及びヒト抗マウス抗体(HAMA)反応をモニターした。患者を注入日(0日)並びに2、4及び6日に造影して、mAbターゲッティングをフォローした。

20

【0348】

ホルモン非依存性前立腺癌を有する33患者が、トレース標識 ^{131}I -J591のI相生体内分布試験に参加した。これらの患者は、各場合に10mCi ^{131}I とコンジュゲートした、0.5~300.0mgの範囲内の投与量を受容した。疾病部位を慣用的研究(CT/MRI及び/又は骨スキャン)で造影された患者の約80%において、前立腺癌転移の既知部位を造影することができる。軟組織及び骨部位の両方をmAbスキャンで可視化することができた。ターゲッティングは前立腺癌に特異的であり、非癌部位への明らかな局在化はなかった。 ^{131}I -mJ591の平均有効血清滞留時間は、44.0時間(メジアン47.4時間)であると測定された。評価可能な16患者のうちの8人は、ヒト抗ネズミ抗体(HAMA)反応を発達させた。即ち、それらの免疫系は、マウス由来抗体の異物性を認識した。1患者のみが、ネズミ抗体に関連した不利なイベントを有した。この患者は、ネズミmAbに対する重度なアレルギー(アナフィラキシー)反応を有し、これは、患者がそれで以前に治療された他の実験薬物の精製に用いられた、ネズミ抗体への以前(不明)の暴露によるものであると後に判明した。要約すると、33患者をターゲッティングに関して評価した：33患者のうちの27人は陽性の骨スキャンを有し、27人のうちの24人(約90%)は陽性のモノクローナル抗体スキャンを有した；33患者のうちの9人は陽性の軟組織(CTスキャン)を有し、これらの9人のうちの8人(約90%)は陽性のモノクローナル抗体スキャンを有した。

30

40

【0349】

ネズミ抗体を受容する大抵の免疫適合(immunocompetent)患者に生じるHAMA反応の発達は、異種由来抗体(foreign species-derived antibody)による反復治療を不可能にする。複数回治療を可能にするために、ネズミ抗体分子を、異種(マウス)アミノ酸配列を除去して、それらを遺伝学的に既知同種ヒト配列と置換する分子設計手法を用いて、“脱免疫化(de-immunized)”することができる。上述したように、ネズミJ591は脱免疫化を受けて、“deJ591”を生じている。

【0350】

結論として、PSMA_{ext}に対するmAbは、骨及び軟組織の両方の播種性前立腺癌部位をin

50

vivoで特異的に標的とし、有意な“不利”局在化及び有意な毒性を示さなかった。

【0351】

実施例6. ^{90}Y -DOTA-deJ591を用いる単一ヒト患者研究

単一患者をmAb deJ591で治療した。この患者は、大きい低分化型前立腺癌を有し、多重コースの外部ビーム・ラジオグラフィー並びに多重形式のホルモン及び非ホルモン化学療法に失敗していた。該患者は個人患者用INDで治療され、5か月間のコースにわたって、10 mg～200 mgの範囲内のdeJ591投与量を全体で12回受容していた。4回投与量（#1、3、6及び11）を、薬物動態測定及び生体内分布のために ^{131}I ヨウ素及び ^{111}In インジウムいずれかでトレースー放射能標識した。 ^{131}I -deJ591の平均有効血清滞留時間は、投与量に依存して、31.9～51.3時間の範囲であった。既知腫瘍部位への腫瘍局在化は、該5か月間にわたる放射能標識投与量の各々の後に良好であった。投与量12回分(dose twelve)を、血液に150 rad未満の線量をデリバリーするように算出した治療量の ^{90}Y イットリウム(19 mCi)で放射能標識した。この線量は、FDAと相談して決定されたものであり、外部ビームによって及び ^{131}I ヨウ素によってデリバリーされる事前の放射能療法を考慮に入れたものであった。この患者では、検出可能なヒト抗脱免疫化(anti-deimmunized)抗体(免疫)応答は発生しなかった。該患者の血小板数は、 ^{90}Y -DOTA-deJ591投与後5週間目に64,000に低下し(正常:150,000～300,000)(骨髄への照射(radiation)の予想結果として)、その後、正常レベルに自然に回復した。他の血液学的又は非血液学的毒性は生じなかった。該患者は副作用を経験しなかった。該患者のPSAは、deJ591-DOTA- ^{90}Y 投与時の63から36に減退した。腫瘍数又はサイズの測定可能な減少は生じなかった。この患者は、 ^{90}Y -DOTA-deJ591による治療開始後11か月半で、彼の転移前立腺癌のために死亡した。

【0352】

実施例7. ^{111}In -DOTA-deJ591によるヒト試験ー前立腺特異的膜抗原／細胞外ドメイン(PSMAext)に対する ^{111}In インジウム標識脱免疫化モノクローナル抗体(mAb)deJ591のI相試験

この実施例は、この遺伝子操作されたmAbのmAbターゲッティング、毒性、薬物動態(PK)及び免疫原性(ヒト抗脱免疫化Ab)を評価するためのdeJ591の臨床試験の結果を述べる。deJ591は、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)の強力な仲介体である。PSMAは腫瘍中に、但し、すべての癌の正常でない血管内皮に発現されるので、deJ591の診断的及び治療的有用性は前立腺癌を超えて他の癌にも及びうる。

【0353】

再発進行性前立腺癌を有する患者は、 ^{111}In -DOTA-deJ591の1週間毎に4回の投与を受けた。投与量は3患者ずつの群で段階的に増加し、62.5～500 mg/m²(総量)の範囲内であった。投与量レベルを表16に示す。各投与量は、mAb-DOTAキレートを紹介して0.1～5 mCi ^{111}In でトレース標識されたdeJ591 0.02～1.0 mgを包含し、投与量の残部は非標識deJ591から成った。初回投与後に、患者を注入日(0日目)、1、2、4及び7日目に造影した。

【0354】

【表15】

10

20

30

40

表 1 6 : ^{111}In -DOTA-deJ591 投与量

投与量レベル	負荷投与量 (mg/m ²)	維持投与量 (mg/m ²)	総投与量 (mg/m ²)
1	2 5	1 2. 5	6 2. 5
2	5 0	2 5	1 2 5
3	1 0 0	5 0	2 5 0
4	2 0 0	1 0 0	5 0 0

^{111}In -DOTA-deJ591 1～2 mg(0. 2～1 0 mCi)、投与量の残部、“冷” deJ591 として。

【0 3 5 5】

血清PK、免疫反応及び毒性を、少なくとも1 2週間にわたって、各投与後に評価した。最初に1 5患者がこの試験に参加した。1 3患者は4回の計画投与量のすべてを受容した；2患者は1回以下の投与量を受容した。1患者は、迅速な注入速度のために、彼の初回注入の5分間中に低血圧になった。治療を完了しなかった第2患者は、もはや彼を試験適格者にしなかった、迅速な疾患進行のために1週間後に研究から離脱した。この後者の患者も残りの1 3人の患者も、如何なる毒性及び副作用を経験しなかった。1 3患者のうちの1 0人は、陽性の骨スキャンを示し、1 0人すべてが骨部位への優れたmAbターゲッティングを実証した。3患者は、CTスキャンによって測定されるような軟組織疾患を有し、2人はこれらの部位へのmAbターゲッティングを実証したが、 ^{111}In -DOTA-deJ591陰性であった第3患者は、1 8か月間内にサイズを変化させなかった照射済み骨盤腫瘍(pelvic mass)を有した。非前立腺癌部位へのmAbターゲッティングは認められなかった。患者のいずれも該抗体に対する免疫応答を発生させなかった。deJ591の血漿半減期は投与量によって変化した。

【0 3 5 6】

結論として、deJ591は非免疫原性であり、敏感にかつ特異的に骨及び軟組織を標的にする。

【0 3 5 7】

実施例 8. ^{111}In -DOTA-deJ591によるヒト試験；ホルモン不応性(hormone refractory)前立腺癌のターゲッティング

この実施例は、ホルモン不応性前立腺癌を有する患者における、mAbターゲッティング、生体内分布及び薬物動態を評価し、このmAbによる放射免疫療法の抗体投与量を最適化するためのdeJ591の臨床試験の結果を述べる。

【0 3 5 8】

ホルモン不応性前立腺癌を有する2 6患者に、1 8 5 MBqの ^{111}In -DOTAで標識されたdeJ591 1 2 0 mgから成る ^{111}In -DOTA-deJ591の単回投与量を注入した。すべての患者は ^{111}In -DOTA-deJ591注射の0日(注射日)、3及び6日目に全身及びSPECTイメージングを受けた。 ^{111}In -DOTA-deJ591イメージング結果を、CT、MRI及び骨スキャンと比較した。すべての患者は3回の連続測定で上昇するPSAレベルを示した。

【0 3 5 9】

2 6患者のうちの2 2人は、ルーチンのイメージング理学療法で造影可能な疾患を有し、4患者は造影可能な疾患を有さなかった。イメージング・データは、造影可能な疾患を有した2 2人の患者のうちの1 6人(7 2. 7%)における ^{111}In -DOTA-deJ591腫瘍ターゲッティングを明らかにした。ターゲッティングは3日目に最も良く見られた。SPECTイメージングで、付加的な(未知)部位は検出されなかった。標的転移部位は、1 2患者では骨又は骨髄中に、2患者では軟組織中に、2患者では骨及び軟組織の両方に存在した。

【0 3 6 0】

^{111}In -DOTA-deJ591イメージングは、造影可能な疾患を有した22患者のうちの4人(18%)では偽陰性であった。非標的転移部位は、3患者では軟組織中に、1患者では骨及び軟組織の両方に存在した。

【0361】

前立腺中の ^{111}In -DOTA-deJ591の蓄積は、無傷であるが照射された前立腺を有する患者では一般に最少であった。生理的部位のなかで、最高の取り込みは肝臓中で観察され、6日目に取り込みは $27 \pm 1.7\%$ であった。肝臓によって吸収された線量は、 ^{111}In では $2.8 \pm 0.25 \text{ rad/mCi}$ であり、 ^{90}Y では $20.1 \pm 2.1 \text{ rad/mCi}$ であった。 ^{111}In -DOTA-deJ591の血漿クリアランス($T1/2$)は、 34 ± 5 時間であった。

【0362】

^{111}In -DOTA-deJ591は、ホルモン不応性前立腺腫瘍を特異的に標的とし、放射線又はサイトキシンによってホルモン不応性進行前立腺癌を標的とするための効果的なビヒクルである。

【0363】

実施例9. ^{111}In -DOTA-deJ591又は ^{177}Lu -DOTA-deJ591によるホルモン不応性前立腺癌のターゲッティング

^{111}In -DOTA-deJ591に関して実施例8で述べたような、 ^{177}Lu -DOTA-deJ591によるイメージング研究は、同様な結果を生じている。次の概要は、 ^{177}Lu 及び ^{111}In に関して得られた結果の組み合わせを表す。

【0364】

ホルモン不応性前立腺癌を有する39患者は、これまでに、deJ591を用いた幾つかの臨床試験のいずれかに参加していた。 ^{111}In 標識deJ591又は ^{177}Lu 標識deJ591のいずれかによる核イメージングを、各試験の初期段階として行なった。 γ エミッターである ^{111}In を、“裸の”mAbのトレーサーとして、又は ^{90}Y (放射性核種スキャンで造影しない、純粋な β エミッター)の投与前の代理イメージング剤として用いた。 ^{177}Lu は γ 及び β 粒子の両方を放出し、直接のイメージングを可能にするので、 ^{177}Lu をイメージング剤及び治療剤の両方として用いることができる。抗体スキャンを、各患者に対して得られた標準イメージング研究(骨、CT又はMRスキャン)と比較して、転移部位へのdeJ591ターゲッティングの基礎的感度、特異性及び精度を評価した。骨転移及び軟組織転移を独立的に評価した。

【0365】

骨転移に関しては23患者で、軟組織転移に関しては25患者で結果が得られている。15患者が骨スキャンで骨転移を有し、該骨転移は12患者(80%)においてdeJ591によって正確に標的とされた。これらの12患者において、骨スキャンで見られたすべての癌病巣は、deJ591スキャンで確認された。陰性骨スキャンを有する7患者のすべてが、deJ591スキャンで陰性であった(100%特異性)。軟組織転移に関しては、慣用的なイメージングで軟組織腫瘍(soft tissue masses)を有する9患者のうちの8人が、deJ591を用いた正確なターゲッティングを実証した(89%)。1人の偽陰性患者は、mAbスキャンで見られなかった、8mmと測定された後腹膜アデノパシーを有したが、その骨病巣はすべて標的とされた。立証された軟組織転移を有さない15患者は、陰性のmAbスキャンを有した(100%)。mAbスキャンで確認された病巣以外に初期標準イメージングで軟組織転移を有さない1患者は、その後に、標準イメージングで陽性であると判明した。全体的に見て、軟組織転移及び骨転移に関して標準イメージングとmAbスキャンとの間には91%一致が存在した。

【0366】

deJ591は、大多数の患者において、既知骨転移又は軟組織転移を正確に標的とした。さらに、これまでは未検出の1転移部位が、mAbスキャンで実証され、後に、CTイメージングで確認された。deJ591は、転移前立腺癌病巣に対する、非常に敏感で、特異的な作用剤である。

【0367】

実施例10. ^{90}Y -DOTA-deJ591によるヒト試験;再発した前立腺癌を有する患者における脱

10

20

30

40

50

免疫化 mAb deJ591-DOTA-⁹⁰Yttrium の I 相試験

再発性／再発した前立腺癌を有する患者の⁹⁰Y-DOTA-deJ591療法の投与量段階的上昇の I 相試験を行なった。投与量は 5 mCi/m² から開始し、3～6 患者の群に対して +2.5～5 mCi/m² の増分で段階的に上昇させた。この研究の設計は次のように要約される：¹¹¹In-DOTA-deJ591の生体内分布を測定し、関連した用量決定を行なうために、該抗体を患者に投与し、7～10 日後に、⁹⁰Y-DOTA-deJ591を 5.0、10、15、17.5 及び 20 mCi/m² で投与した。すべての投与は、約 5 mg/分の速度で静脈内注入で行なった。deJ591-DOTAを、⁹⁰Yの所定投与量に達するために 3～5 mCi-⁹⁰Y/mg抗体の比活性で標識し、残部は“冷” deJ591で総deJ591 20 mgにした。投与量は、投与量レベルの間に 6～8 週間を置いて投与した。⁹⁰Y-DOTA-deJ591のその後の投与が考慮された。

10

【0368】

この試験のための対象は、最終的療法（例えば、手術及び／又は照射）後に再発した前立腺癌を有し、彼らのために治療的標準療法は存在しない。

この試験の目的は、（1）再発性及び／又は転移性前立腺癌を有する患者における脱免疫化モノクローナル抗体(mAb)、deJ591-DOTA-⁹⁰イットリウム(⁹⁰Y)の反復（分割）投与量の毒性及び最大耐量(maximum tolerated dose)(MTD)を明確にすること；（2）deJ591-DOTA-⁹⁰Yの薬物動態を明確にすること；（3）deJ591-DOTA-⁹⁰Yに対するヒト抗脱免疫化抗体免疫応答を明確にすること；及び（4）deJ591-DOTA-⁹⁰Yの反復（分割）投与量の予備効力(preliminary efficacy)（反応率）を明確にすることである。

【0369】

治療プロトコール

⁹⁰Y-DOTA-deJ591の結果として2度以上のアレルギー反応を発生させた患者は、もはやDOTA-deJ591を受容せず、毒性に関してフォローされることになる。

【0370】

患者をdeJ591-DOTA-⁹⁰Y投与後少なくとも12週間フォローした。患者の疾患が彼の最後の投与後12週間目に安定であった又は反応した場合には、患者を悪化するまでフォローした。

【0371】

フォローアップ研究は、以下の表17に示した、指定時間における情報を集めることから成るものであった。

【0372】

【表16A】

20

30

表 17 : フォローアップ分析

医療歴	治療日、1、2、4、6、8 及び 12 週間目、その後、悪化まで 12 週間毎	
身体検査 (集中的)	治療日、1、2、4、6、8 及び 12 週間目、その後、悪化まで 12 週間毎	
動作状態(performance status)	治療日、1、2、4、6、8 及び 12 週間目、その後、悪化まで 12 週間毎	10
PSA、PAP、アルカリホスファターゼ	治療日、1、2、4、6、8 及び 12 週間目、その後、悪化まで 12 週間毎	
テストステロン	4 週間目、その後、悪化まで 6 か月間毎	
ヒト抗脱免疫化 A b	治療日、2、4、8 及び 12 週間目	
CBC、示差(differential)、血小板カウント	治療日、1、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6 及び 8 週間目、その後、安定まで 4 週間毎、次に、悪化まで 12 週間毎。ANC<1000 及び/又は血小板<50,000 の場合には、日毎に(qod)モニターする。	20
電解質、BUN、クレアチニン	治療日、1、2、4 及び 8 週間目、次に、安定まで 4 週間毎、次に、悪化まで 12 週間毎。	
総タンパク質、アルブミン、ビリルビン、GGTP、AST、ALT、LDH	治療日、1、2、4 及び 8 週間目、次に、安定まで 4 週間毎、次に、悪化まで 12 週間毎。	30
尿検査	治療日、1、2、及び 4 週間目、次に、正常又はベースラインでないかぎり、4 週間毎。	
CT 又は MRI	12 週間目、次に 12 週間毎 (参加時に測定可能若しくは評価可能な疾患が存在する場合及び/又は患者が“反応者”として分類される場合)。	40
骨スキャン	12 週間目、次に 12 週間毎 (参加時に評価可能な疾患が存在する場合及び/又は患者が“反応者”として分類される場合)。	

【 0 3 7 3 】

【表 1 6 B】

CXR	1 2 週間目、次に 1 2 週間毎（参加時に疾患が存在する場合）
重量	治療日、1、2、4、8 及び 1 2 週間目、次に、悪化まで 1 2 週間毎
食欲	治療日、1、2、4、8 及び 1 2 週間目、次に、悪化まで 1 2 週間毎
骨痛覚	治療日、1、2、4、8 及び 1 2 週間目、次に、悪化まで 1 2 週間毎
鎮痛薬摂取	治療日、1、2、4、8 及び 1 2 週間目、次に、悪化まで 1 2 週間毎

10

【0374】

薬物動態：

^{111}In -DOTA-deJ591の注射後、10分間、1、2、4、24時間並びに2、3、4及び7日目に血液サンプルを得た。血液アリコートを経知 ^{111}In 標準と共に測定することによって、血液中注入量% (%I.D.)を算出した。 ^{90}Y -DOTA-deJ591後に、同じ間隔を置いて、同様な血液サンプルを採取した。血液アリコートを経知 ^{111}In 又は ^{90}Y 標準と共に測定することによって、血液中の%I.D.を算出した。

20

【0375】

毒性

NCI CTEP Common Toxicity Criteria (CTC), version 2 (April, 1999)を用いた。CTEPはCTCを標準化しているので、NCIは、この資料にCTCを含めることを必要としない。すべての治療領域は、CTC version 2.0のコピーにアクセスすることができる。コピーをCTEPウェブサイトからダウンロードすることもできる。

30

【0376】

投与量限定毒性(dose limiting toxicity)(DLT)の定義

血液学的毒性：4度顆粒球減少症 [$\text{ANC} < 500 / \text{mm}^3$]；4度血小板減少症 [血小板数 $< 10,000 / \text{mm}^3$]；又はCTCによって定義されるような、熱性好中球減少症若しくは好中球減少性感染症。他の毒性： ^{90}Y -DOTA-deJ591に帰因する3度以上の非血液学的毒性。

【0377】

最大耐量(MTD)の定義

0/6又は1/6患者がDLTを経験し、次に高い投与量レベルを有する2患者以上がDLTを経験する投与量レベルとしてMTDが定義される。MTDにひと度達したならば、その投与量で少なくとも6患者を評価して、投与計画の毒性及び ^{90}Y -DOTA-deJ591の薬物動態をより良好に決定すべきである。

40

【0378】

アレルギー・イベントは次のように管理される：発疹、心因性掻痒症、蕁麻疹及び喘鳴は、臨床的な必要に応じて、ベナドリル及び／又はステロイドで治療される。アナフィラキシー又はアナフィラキシー様徴候若しくは症状は、臨床的な適応に応じて、ステロイド及び／又はエピネフリンによって治療することができる。

【0379】

研究のためのみの特異的介入(specific interventions)

mAbの薬物動態及び生体内分布を明確にするためのdeJ591の実際の投与及び関連研究の他に、行なわれた他の介入(実験(labs)、イメージング研究、事務所訪問)は標準的手段で

50

ある。実験室試験の幾つかは、通常、前立腺癌のセッティング(setting) (例えば、免疫反応レベル) では行なわれない。他の実験室及びラジオグラフィー手段は、前立腺癌を有する患者の管理では標準的であるが、通常よりも大きな頻度で行なうことができる。

【0380】

治療反応の基準

前立腺癌の進行は、PSAレベルの上昇、骨スキャンでの新しい病巣、新しい疾患関連症状、及び頻度は低い、測定可能な軟組織腫瘍サイズの増大によって明らかになる。反応は一般に、生化学的に (PSA変化) 又は測定可能な病巣 (単数又は複数) のサイズ変化によって評価される。

【0381】

生化学的 (PSA) 反応は、治療後の最低 (nadir) PSAレベルを、治療開始直前に測定されたベースライン治療前PSAと比較することによって判定することができる。 > 50 % の減少が多くの研究者によって実証されており (Petrylak, D.P. et al. (1992) Cancer 70:2870-78; Kelly W.K., et al. (1999) J Clin Oncol 11:607-15; Kantoff P.W., et al. (1999) J Clin Oncol 17:2506-13, 1999; Smith, D.C., et al. (1998) J Clin Oncol 16:1835-43)、改良された生残と関連づけられている。さらに、Scher等 (Scher H.I., et al. (1999) JNCI 91:244-51) は、治療開始後8週間又は12週間目に低下する又はベースラインからの増加を示さないPSAが、治療にも拘わらずそのPSAが上昇する患者に比べて、改良された生残と相関することを実証している。

【0382】

測定可能な疾患を有する患者では：完全な反応は、物理的検査又はイメージング研究による、すべての測定可能な病巣の完全な消失と、2か月間以上新たな病巣が出現しないこととして定義される。部分的反応：すべての測定可能な病巣の最長垂線直径の積の合計の50%以上の減少として定義される。新たな病巣は生じえない。安定な疾患：部分反応の基準を満たさず、2か月間以上進行性疾患の徴候を示さない患者。進行性疾患は、インジケータ病巣の最長垂線直径の積の合計の25%を超える増加、新たな病巣の出現又は治療前ベースラインを超える前立腺特異的抗原の上昇として定義される。

【0383】

反応の持続期間：典型的に、悪化 (progression) の最初の徴候は、血清PSAの上昇である。この試験では、反応の持続期間は、治療開始 (^{90}Y -DOTA-deJ591) から、PSAの確認された上昇、測定可能な病巣 (単数又は複数) の拡大、又はイメージング研究での新たな病巣のいずれかによって悪化が実証されるまでの時間間隔である。PSA上昇は、第2のPSA連続上昇によって確認されなければならない、持続期間は、治療開始から、最初のPSA上昇のときまでとして定義される。

【0384】

結果：

20患者がこのプロトコールによって治療されており、この20人のうちの19人を現在評価することができる。20患者のすべてが1つ以上の形式のホルモン療法に失敗しており、20患者のうちの11人は少なくとも1つの化学療法計画に失敗していた。その上、患者のすべてが上昇するPSAレベル及び150, 000の最小血小板数を有した。

【0385】

血液化学、血液学及びPSAレベルを12週間以上モニターした。血液化学、又は肝臓若しくは腎臓機能に顕著な変化は見られなかった。血小板及び白血球レベルに血液学的変化は、すべての投与量レベルで見られなかった。毒性は用量依存性であり、可逆的な骨髄抑制 (本来の血小板減少症) に限定された。3~4度の血小板減少症が15~20 mCi/m²で見られた。最大耐量は、20 mCi/m²以下であると推定された。 ^{111}In -deJ591イメージング研究に基づいた ^{90}Y -deJ591線量測定推定値は、肝臓、腎臓、脾臓及び骨髄への器官線量が、それぞれ、20、19、18及び1.7 rad/mCiであることを示唆する。如何なる患者も免疫反応を発生させなかった。

【0386】

用量依存性の抗腫瘍効果が認められた。最初の2線量レベル (5 mCi/m^2 及び 10 mCi/m^2) では、11患者のうちの5人 (45%) は、治療にも拘わらず、上昇し続けるPSA値を有したが、11患者のうちの6人 (55%) はPSAレベルの平均23%低下に達した。 15 mCi/m^2 では、4患者のうちの1人 (25%) が悪化した。4患者のうちの3人 (75%) はPSAレベルの平均25%低下に達した。 20 mCi/m^2 では、4患者のすべてがPSAレベルの平均42%低下に達した。これらの4患者のうちの2人は、図13A及びBに示すように、3か月を越えて続く70~85%のPSA低下を示す。PSA最低に達するまでの平均時間は治療後7週間 (範囲: 2~13週間) であった。これらの患者には、測定可能な反応も見られている。PSAレベルが85%低下した患者は、多発性軟組織転移の90%収縮を有した。PSAが70%低下した患者は、40%という軟組織疾患の測定可能な軽減を有した。

10

【0387】

結論:

^{90}Y -D0TA-deJ591は、非免疫原性であり (これは反復治療を可能にする)、毒性は用量依存性の可逆的骨髄抑制に限定されている。重要なことには、 ^{90}Y -D0TA-deJ591は、進行した前立腺癌を有する患者において用量依存性の抗腫瘍効果を有した。I相データは、 ^{90}Y -D0TA-deJ591の単回投与 (20 mCi/m^2 以下) が、前立腺癌の治療のための最適の線量計測法によって安全であることを示唆している。さらに、線量計測法推定値は、多重投与も安全であることを示している。

【0388】

実施例11. ^{90}Y -deJ591を受容した前立腺癌患者におけるPSA反応の徴候

^{90}Y -D0TA-deJ591を受容した2患者は、放射能標識J591による治療前に上昇するPSAレベルを有した (図13A及び13B参照)。プロット上のX軸は時間 (日数) を表す。この軸上の負数は、J591治療前の日数を示す。“0”時点で、患者は治療のための ^{90}Y -J591を受容した。グラフは、治療前の急激に上昇するPSAが数週間の治療内に鋭敏なターンをして、その後の長期間 (少なくとも10週間) 安定になることを実証する。PSAレベルの安定性は、進行性疾患が進行を停止したことを示唆する。高線量の放射能標識J591は、疾患負担の軽減及び/又は腫瘍増殖速度の停止の延長をもたらすことができる。さらに、反復投与も、腫瘍負担の絶対的減少並びに腫瘍増殖速度の停止の実質的延長をもたらすことができる。

20

30

【0389】

実施例12. ^{177}Lu -D0TA-deJ591によるヒト試験; 再発前立腺癌を有する患者における脱免疫化mAb deJ591-D0TA- ^{177}Lu ルテチウムのI相試験

この実施例は、最終的療法 (例えば、手術及び/又は照射) 後に再発した前立腺癌を有する及び/又はホルモン非依存性であり、彼らのために標準療法が存在しない対象の臨床研究を述べる。これらの患者のための治療的療法は現在存在しない。その上、この実施例は ^{177}Lu 標識deJ591を主として扱う。 ^{177}Lu は、 β -エミッター及び γ -エミッターの両方である。このようなものとして、 ^{177}Lu は放射線療法及びイメージングの両方に用いることができる。

【0390】

この試験の目的は、(1) 再発性及び/又は転移性前立腺癌 (Pca) を有する前立腺癌患者における脱免疫化モノクローナル抗体 (mAb)、deJ591-D0TA- ^{177}Lu ルテチウム (^{177}Lu) の毒性及び最大耐量 (MTD) を明確にすること; (2) deJ591-D0TA- ^{177}Lu の薬物動態を明確にすること; (3) deJ591-D0TA- ^{177}Lu の生体内分布及び線量測定を明確にすること; (4) deJ591-D0TA- ^{177}Lu に対するヒト抗脱免疫化抗体 (免疫) 応答を明確にすること; 及び (5) deJ591-D0TA- ^{177}Lu の予備効力 (反応率) を明確にすることである。

40

【0391】

治療プロトコール:

患者は、 5 mg /分以下の注入速度で投与されるdeJ591-D0TA- ^{177}Lu の投与量を受容した。deJ591の総投与量は、依然として 10 mg/m^2 に固定されたままであった。 ^{177}Lu 線量 (mCi/m^2)

50

は、各線量レベルに関して 3～6 患者の群で段階的に上昇した（以下の表 1 5 参照）。De J591-DOTA-¹⁷⁷Lu は、所定の線量の ¹⁷⁷Lu に達するように 3～10 mCi/mg 抗体の比活性で標識したものであり、残部は“冷” deJ591 で 10 mg/m² 総 deJ591 までにした。線量の段階的上昇 (escalation) は、現行の線量レベルで少なくとも 3 患者が重篤な血液学的毒性なく 6 週間以上フォローされるまで、保留された。1 つの線量レベルで最初の 3 患者のいずれかが 6 週間までに 1 度又は 2 度の血液学的毒性を経験する場合には、回復が始まるまで、又は 8 週間のさらなるモニターリングと毒性評価が行なわれるまで、段階的上昇は保留された。いずれかの患者が 3 度又は 4 度の血液学的毒性を経験する場合には、少なくとも 6 患者を該線量レベルで参加させて、段階的上昇の前に、少なくとも 8 週間又は回復が始まるまでフォローする必要があるがあった。いかなる時にも、2 例の線量限定毒性 (dose-limiting toxicity) が特定の線量レベルで見られた場合には、該線量レベルでのさらなる参加は停止される。このような場合には、MTD の決定を助けるために、先行線量レベルに少なくとも 6 患者を参加させるべきである（以下の“毒性”項参照）。

【0392】

¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591 の受容中に 2 度以上のアレルギー反応を発生させた患者は、もはや de J591 を受容せず、毒性に関してフォローされた。

【0393】

【表 1 7】

表 1 8 :

線量レベル	総 deJ591★	¹⁷⁷ Lu 線量
1	10 mg/m ²	10 mCi/m ²
2	10 mg/m ²	15 mCi/m ²
3	10 mg/m ²	30 mCi/m ²
4	10 mg/m ²	45 mCi/m ²
5	10 mg/m ²	60 mCi/m ²
6	10 mg/m ²	75 mCi/m ²
7	10 mg/m ²	90 mCi/m ²
8	10 mg/m ²	105 mCi/m ²

★ 3～10 mCi/mg の比活性での deJ591-DOTA-¹⁷⁷Lu と、“冷” deJ591 による、総 10 mg/m² までの残部とから成る。

【0394】

deJ591-DOTA-¹⁷⁷Lu 投与後、患者を少なくとも 12 週間フォローした。この治療後 12 週間に患者の疾患が安定であるか又は反応している場合には、悪化するまで患者をフォローした。

【0395】

表 1 6 に記載したものを除いて、フォローアップは表 1 4 に上述した通りであった。

【0396】

【表 1 8】

表 1 6

ヒト抗脱免疫化A b	deJ591-DOTA- ¹⁷⁷ Lu 治療日、治療後1、2、4、8及び12週間目、次に、悪化まで12週間毎。
Chem-7 (電解質、BUN、クレアチニン、グルコース包含)	deJ591-DOTA- ¹⁷⁷ Lu 治療日、治療後1、2、4及び8週間目、次に、安定まで4週間毎、次に悪化まで12週間毎。
肝臓パネル(アルブミン、ビリルビン(tot & dir)、AST、ALT、アルカリホスファターゼ包含)	deJ591-DOTA- ¹⁷⁷ Lu 治療日、治療後1、2、4及び8週間目、次に、安定まで4週間毎、次に悪化まで12週間毎。
LDH	deJ591-DOTA- ¹⁷⁷ Lu 治療日、治療後1、2、3及び8週間目、次に、安定まで4週間毎、次に悪化まで12週間毎。

10

20

【0397】

¹⁷⁷Lu-deJ591イメージング：

注入後1時間以内(0日目)及びその後2週間内の付加的な少なくとも5時点(例えば、1、3、5、10及び15日目)で、全身画像を得た。適当なコリメーターを装備したデュアル・ヘッドADACガンマカメラを用いて、ガンマカメラ画像を得た。主要器官(心臓、肝臓、脾臓、腎臓、骨髄、GI管及び膀胱)中の注入線量%(%I.D.)を、問題の領域(regions of interest)(ROI)を描画して(drawing)、各器官の相対的カウント及び各器官からのウォッシュアウトの動力学(kinetics of wash out)を測定することによって算出した。時には、SPECT研究を腹、骨盤及び／又は転移病巣が疑われる領域に対して行なった。可能な場合には、¹⁷⁷Luの既知標準を用いて、腫瘍塊1g当りの注入線量%を算出した。

30

【0398】

毒性：

NCI CTEP Common Toxicity Criteria (CTC), version 2 (April, 1999)を用いた。CTEPはCTCを標準化しているので、NCIは、この資料内にCTCを含めることを必要としない。すべての治療領域をCTC version 2.0のコピーにアクセスさせる。コピーをCTEPウェブサイトからダウンロードすることもできる。

【0399】

3～6人の患者が各線量レベルに参加した(又は参加することになる)。投与量の段階的上昇は、現行レベルで少なくとも3患者が血液学的毒性なく6週間フォローされるまで、抑制された。ある一定投与量レベルで初期3患者のいずれかが6週間までに1度又は2度の血液学的毒性を経験する場合には、さらに毒性を評価するまで、8週間まで段階的上昇を抑制する。いずれかの患者が3度又は4度の血液学的毒性を経験する場合には、少なくとも6患者が該投与量レベルで参加して、段階的上昇の前に、少なくとも8週間フォローされなければならなかった。いずれにせよ、3度又は4度の毒性の2例が特定の投与量レベルで観察された場合には、該投与量レベルでのさらなる参加は停止されることになる。

40

【0400】

投与量限定毒性(DLT)の定義：

血液学的毒性：7日間を超える4度の顆粒球減少症(ANC<500 µl)又は4度の血小板減少症(血小板<10,000)。他の毒性：¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591に帰因する、3度以

50

上の非血液学的毒性。

【0401】

不利なイベントの定義：

不利なイベントとは、原因作用に関係なく、臨床試験中又は治療後4週間に被検患者(research patient)における不都合な医学的発生として定義される。これは、臨床的若しくは実験室的所見、併発性疾患又は、参加の時点(ベースライン)で存在する疾患若しくは状態の憎悪若しくは悪化を包含する。不利なイベントは、重篤な基準(以下参照)のいずれをも満たさない場合には、重篤ではない。

【0402】

原因作用／帰因

すべての臨床的不利なイベント及び異常な実験的値を、実験的作用因子に対する可能な関係に関して評価した。原因作用／帰因の下記カテゴリー：明確、推定、可能、見込みなし、及び無関係を用いる。

【0403】

ベースラインにおいて存在し、実験的療法中に重症度及び頻度において変化しなかった、及び／又は基礎的疾患に妥当に帰因することができる、臨床的に重要である、異常な臨床検査室値を治験担当医師(investigator)が評価し、“無関係”カテゴリーに記録した。それ故、このようなイベントを、この作用剤の安全性の評価に考慮しなかった。

【0404】

先在状態：

この試験では、先在状態(即ち、不利なイベントを報告する期間が始まる前に存在する障害)は、状態が悪化しない限り又は不利なイベントを報告する期間中にエピソードの頻度が増加しない限り、不利なイベントとして報告しない。

【0405】

不利なイベントの定義：

各不利なイベントは、重篤な又は非重篤な、及び予測された又は予測されないとして分類した。不利なイベントは、それが死亡を生じた；それが生命をあやふくした(即ち、対象を死の直接の危険にさらした、遭遇された不利なイベント；より重症になった場合に、仮説的に死を生じたと思われる不利なイベントには該当しない)；それが入院(in-patient hospitalization)を必要とした又は延長した；それが持続の又は重大な障害又は無能を生じた；及びそれが先天的な異常／先天性欠損を生じた場合には、重篤として分類された。

【0406】

等級(grading)

毒性には、Common Toxicity Criteriaスケール又は下記を用いた、0～4のスケールで等級を付けた：

- (1) 0 = 非毒性。
- (2) 1 = 弱毒性、通常一過性、特別な治療を必要とせず、一般に患者の活動を妨害しない。
- (3) 2 = 簡単な治療手段によって改良することができる、中程度の毒性；通常の活動を損なう。
- (4) 3 = 治療の介入を必要とし、通常の活動を妨害する、重度の毒性；入院を必要とすることもしないこともある。
- (5) 4 = 入院を必要とする、生命をあやふくする毒性。
- (6) 5 = 致命的毒性。

【0407】

治療反応の基準：

前立腺癌は、PSAレベルの上昇、骨スキャンでの新しい病巣、新しい疾患関連症状及び頻度は低いものの、測定可能な軟組織腫瘍サイズの増大によって明らかになる。反応は、一般に、生化学的に(PSA変化)又は測定可能な病巣(単数又は複数)のサイズの変化によって評価される。

10

20

30

40

50

【0408】

生化学的(PSA)反応は、上述したように評価した。測定可能な疾患を有する患者において：完全な反応は、物理的な検査又はイメージング研究による、すべての測定可能な病巣の完全な消失と、2か月間を越えて新しい病巣の出現のないこととして定義される。部分的反応は、すべての測定可能な病巣の最長垂線直径の積の合計の50%以上の減少として定義される。新しい病巣は存在しない。安定な疾患：部分的反応の基準を満たさず、2か月間を越えて進行性疾患の徴候のない患者。進行性疾患は、測定不能な(immeasurable)病巣の最長垂線直径の積の合計の25%を超える増加、新しい病巣の出現又は治療前ベースラインを超える前立腺特異的抗原の増加として定義される。

【0409】

反応の持続期間：通常、悪化の第1徴候は、血清PSAの上昇である。この試験では、反応の持続期間は、治療開始から悪化がPSAの上昇、測定可能な病巣（単数又は複数）の拡大又は骨スキャンでの新しい病巣（単数又は複数）によって立証されるまでの時間間隔である。PSA上昇は、PSAの第2連続上昇によって確認されなければならない、持続期間は治療開始からPSAの最初の上昇までの時間として定義される。

【0410】

結果：

CT/Boneスキャンで立証された前立腺癌病巣とPSAレベル上昇とを有するホルモン不応性患者を、I相線量段階的上昇(10～75 mCi/m²)研究に参加させた。すべての患者が1種類以上のホルモン療法に失敗していた。

【0411】

現在まで、19患者（3群の患者、3～6人／群）が¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591 (10 mg/m²)を受容した。各群が異なる線量の¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591: 10、15、30、45又は60 mCi/m² (それぞれ、0.37、0.74、1.11、1.48又は1.85 GBq)を受容した。血液サンプルを2週間採取し、同じ2週間に5回イメージング研究を行なった。血液化学、血液学及びPSAレベルを3か月間以上モニターした。

【0412】

イメージング研究は、¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591の特異的腫瘍局在化を示した。4患者が、¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591イメージングで実証され、その後に慣用的なイメージングによって確認された、以前には未認識の転移巣を有した。線量測定推定値は、肝臓が7.6 ± 3.3 rad/mCiを受容した決定的な器官であることを示す。血液放射能(blood activity)に基づく骨髓への線量は0.7 rad/mCiである。¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591の血漿 T1/2は、43 ± 1.1時間であった。血液化学、肝機能及び腎機能に有意な変化は見られなかった。種々な線量レベルで血液学的変化が観察されたが、60 mCi/m² 線量レベルにおいてさえも、重大な毒性は見られなかった。

【0413】

研究に参加した、最初の9患者は、¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591の線量を10 mCi/m² (3患者)、15 mCi/m² (3患者)及び30 mCi/m² (3患者)のレベルで受容した。すべての患者が1種類以上のホルモン療法に失敗しており、1患者(17%)は少なくとも1つの化学療法計画に失敗していた。毒性は最低であり、2度又は3度の不利なイベントを有する患者はなく、毒性は、可逆的な骨髓抑制、本来の血小板減少症に限定された。いずれの患者も¹⁷⁷Lu-DOTA-J591に対して免疫反応を発生させなかった。

【0414】

これらの最初の9患者には、線量関連抗腫瘍効果が認められた。10 mCi/m² 線量レベルでの治療後に、2患者は、治療にも拘わらず上昇し続けるPSAレベルを有し、残りの患者はPSAレベルの安定化を示した。15 mCi/m²では、2患者がPSAレベルの35%の平均低下を有し、1患者のPSAレベルは治療にも拘わらず進行した。PSAの最低値に達するまでの平均時間は、治療後4週間であった(範囲：2～6週間)。PSAレベルの低下を示し、測定可能な疾患を有さなかった3患者のうちの1人は、治療後18週間目にもPSAレベルの50%低下を有し続けた(図14参照)。これらの患者の一部は、現在、再治療されており

、 ^{177}Lu -DOTA-deJ591の少なくとも3回投与を受けている。

【0415】

結論：

^{177}Lu -J591は非免疫原性（これは、反復治療を可能にすると考えられる）であり、これまで用いられた投与量において低毒性を有する。 ^{177}Lu -J591は、進行した前立腺癌を有する患者において用量関連抗腫瘍効果を有する。約 20 mCi/m^2 であると推定される最大耐量を有する ^{90}Y -DOTA-deJ591とは対照的に、 ^{177}Lu -DOTA-deJ591は 30 mCi/m^2 線量レベルにおいても安全である。 ^{177}Lu -DOTA-deJ591は、 ^{131}I -DOTA-deJ591(in vivoで脱ハロゲン化され、取り込まれるmAbのためには理想的ではない)及び ^{90}Y -DOTA-deJ591の両方に関連した欠点を除去するように思われる。腫瘍組織中の ^{177}Lu -DOTA-deJ591の長い滞留時間も、抗腫瘍反応を増強することができる。

【0416】

実施例13. 非前立腺癌のイメージング

免疫組織化学的研究は、前立腺上皮細胞の他に、無数の充実性腫瘍の血管内皮細胞によってもPSMAが発現されるが、良性組織における正常な血管内皮によっては発現されないことを示す。上述したように、PSMAのこの発現パターンは、実際にあらゆる充実性腫瘍において生じる。

【0417】

血管傷害性療法のための治療剤としての ^{111}In -DOTA-deJ591の価値を評価し、 ^{111}In -DOTA-deJ591の毒性及び最大耐量を特徴付け、 ^{111}In -DOTA-deJ591の薬物動態及び生体内分布を測定し、免疫原性に関して評価するために、 ^{111}In -DOTA-deJ591のIRB認可I相用量段階的上昇試験を開始した。適格な患者は、その腫瘍タイプが新生脈管構造(neovasculature)上にPSMAを発現することが知られている難治性充実性腫瘍悪性度(refractory solid tumor malignancies)を有する患者である。

【0418】

15患者が5mg(3患者)、10mg(6患者)又は20mg(6患者)の ^{111}In -DOTA-deJ591を受容し、14日間後に第2回投与量を受容した。該研究に参加した患者は、8人の腎細胞癌患者、4人の膀胱癌患者、2人の結腸癌患者、及び1人の膵臓癌患者を包含した。すべての患者が、 ^{111}In -DOTA-deJ591注入から0日目(注入日)、2、5及び7日目に全身及びSPECTイメージングを受けた。 ^{111}In -DOTA-deJ591イメージング結果をCTスキャン及び骨スキャンと比較した。

【0419】

イメージングデータは、15患者のうちの10人(腎細胞癌7人、膀胱癌2人、及び結腸癌1人)における ^{111}In -DOTA-deJ591腫瘍ターゲティングを明らかにした。ターゲティングは2日目及び5日目に最も良く観察され、デリバリーされた抗体質量(anbody mass)に無関係であった。SPECTで付加的部位は検出されなかった。標的転移部位は、肺、大腿部、腹膜後、及び頸部リンパ節を包含した。1患者(腎細胞癌を有する)における脳転移が、 ^{111}In -DOTA-deJ591イメージングによって最初に検出され、後にMRIによって確認された。 ^{111}In -DOTA-deJ591イメージングは、15患者のうちの5人(膀胱癌2人、結腸癌1人、膵臓癌1人及び腎細胞癌1人)では偽陰性であった。非標的転移部位は、肝臓、腎臓床(renal bed)、膵臓、肺、及び腹腔リンパ節を包含した。検出されなかった肺病巣は、1cm未満のサイズであった。

【0420】

客観的反応は生じなかったが、結腸癌患者はCEAの50%低下を有し、2患者は、癌痛覚及び動作状態(performance status)の改良を有した。肺、リンパ節及び/又は骨に伸展した疾患を有する、2人の異なる転移腎臓癌患者に、 ^{111}In インジウムで標識されたdeJ591を注入した。注入の2日間以内に撮影された患者の画像は、これらの異なる組織及び器官における既知腫瘍部位への該抗体の顕著な取り込みを実証した。抗体の該取り込みの程度は、実質的であり、かつ迅速である。

【0421】

生理学的部位のなかで、最高の取り込みは肝臓で観察された。血漿クリアランス及び肝臓取り込みは、抗体質量に依存し；低い質量は迅速な血漿クリアランス及び高い肝臓取り込み（取り込み%として）を生じた。deJ591 5 mg、10 mg及び20 mgに対するの血漿クリアランス（T 1 / 2）は、それぞれ、 21 ± 11 時間、 24 ± 6 時間及び 37 ± 8 時間であった。同じ投与量レベルの肝臓取り込みは、それぞれ、 $28\% \pm 14\%$ 、 $17 \pm 7\%$ 及び $13\% \pm 5\%$ であった。

【0422】

これらのデータに基づいて、プロトコールを6連続週間投与するように修正し（10、20、40及び80 mg/週間投与量レベル）、患者が安定した疾患又は反応する疾患を有する場合には、8週間サイクルでの再治療をオプションとした。これまでに、9患者がこのスケジュールでの治療を現在受けている。 10

【0423】

^{111}In -D0TA-deJ591は、充実性腫瘍の血管内皮を特異的に標的とする。これらの試験は、deJ591が、放射能又はサイトトキシンによる充実性腫瘍血管内皮のターゲティングのために有効なアプローチであることを実証する。

【0424】

実施例14. 再発性前立腺癌を有する患者における低用量皮下インターロイキン-2と組み合わせたmAb deJ591のII相試験

この試験のための対象は、最終的療法（例えば、手術及び／又は放射線）後に再発した前立腺癌を有する、及び／又はホルモン非依存性であり、かれらのために標準療法が存在しない対象である。これらの患者のために現在、治療的療法は存在しない。 20

【0425】

この試験の目的は、（1）再発性及び／又は転移性前立腺癌を有する患者における1日低用量皮下IL-2と組み合わせたmAb deJ591の予備的効力（preliminary efficacy）（反応率）を明確にすること；（2）1日低用量皮下IL-2と組み合わせたmAb deJ591の毒性を研究すること；及び（3）免疫反応に対するIL-2の効果をin vitro測定することである。

【0426】

低用量IL-2療法

IL-2は、T細胞、B細胞及びナチュラルキラー(NK)細胞を含めた、あらゆる主要な種類のリンパ球の増殖を促進し、分泌能力を強化する(Smith K.A. (1988) Science 240:169)。抗原選択性T細胞及びB細胞クローンのIL-2刺激膨張が、抗原特異的免疫反応の大きさを決定するが、反応の性質は、付加的なサイトカイン、細胞溶解性分子及び抗体のIL-2促進分泌によって決定される(Smith K.A (1993) Blood 81:1414-1423)。さらに、IL-2は、NK細胞に対するその効果を通して、NK細胞と単球との相互作用を包含する抗原非特異的宿主反応を刺激する。これらの機能の結果として、IL-2は、当然、特に癌の免疫療法における免疫刺激剤として有益であることになる。しかし、IL-2の治療的使用は、IL-2の主要な効果の1つがIL-2反応性細胞による二次的サイトカイン(secondary cytokine)分泌の刺激から成るので、困難である。IL-2の可能な有益な効果の多くは、これらの二次的サイトカインに帰因することができ、これらの二次的サイトカインは、総合的免疫／炎症反応に寄与する、付加的な細胞種類、特に単球を強化し、活性化する。しかし、これらの同じ二次的サイトカインは、あまりに多量に産生されると、重度な毒性をも生じる可能性がある。IL-2は最初、150百万単位(MU)のChiron Corporation IL-2に相当する、非常に高用量で癌の治療に用いられた(Rosenberg S.A (1990) Sci. Am 262:62-69)。この高用量は、化学療法の用量段階的上昇及び用量増大原理を用いて決定され、重大な3又は4度の毒性を付随する。高用量のIL-2は、発熱、悪寒、倦怠、筋肉痛、悪心／嘔吐、低血圧、及びことによると死亡を含めた、重大な副作用を惹起することが知られている。 30 40

【0427】

1990年代に、研究者たちは、連続低用量IL-2の免疫調節効果及び毒性を試験し始めた(Smith K.A (1993) Blood 81:1414-1423; Caligiuri et al. (1991) J Clin Oncol 9:2110-2119; Caligiuri et al. (1993) J Clin Invest 91:123-132; Bernstein et al. (1995) 50

Blood 86:3287-3294)。これらの研究は、1日に1.2 MU程度の低い量のIL-2が最小の毒性でNK細胞の特異的膨張を生じることを実証した。Bernstein et al. (1995) Blood 86:3287-3294; Lalezari et al. (2000) HIV Clin Trials)。可能な副作用は、注入部位反応（通常は、注入部位における発赤）、無力症、インフルエンザ様症候群、悪心、下痢、及び好酸球増加症を包含する。低用量IL-2中のヒトCD3⁺、CD56⁺NK細胞の選択的膨張は、療法の2週間以内に開始し、治療の4～6週間後にプラトー状態に達する(Smith K.A (1993) Blood 81:1414-1423; Fehniger et al. (2000) J Clin Invest 106:117-124)。NK細胞は1か月間の療法後にPBMcsの60～80%程度の多くを占めることができる(Smith K.A (1993) supra)。最近の研究は、NK細胞数の増加が、IL-2依存性NK細胞死の遅延と共に、骨髓プロジェニター(progenitors)からのNK細胞分化の強化に原因することを示唆している(Fehniger et al. (2000) supra)。低用量IL-2投与計画は、毒性を完全に回避するように特に設計されている。 10

【0428】

モノクローナル抗体とIL-2との複合療法：

モノクローナル抗体とIL-2との組み合わせは、恐らく、モノクローナル抗体の効力を強化する筈である。IL-2は、細網内皮系を増強して、NK細胞及びマクロファージに対するその効果によって抗原抗体複合体を認識するように機能する。したがって、NK細胞を刺激して、IFN、GM-CSF及びTNFを放出させることによって、これらのサイトカインはFc受容体の細胞表面密度並びにこれらの細胞の食細胞能力を高める。それ故、体液性アーム及び細胞アームの両方のエフェクター・アームは人為的に高められる。正味の効果は、最大の反応を得ることができるように、モノクローナル抗体療法の効率を改良することである。少数の臨床試験が、IL-2をモノクローナル抗体と組み合わせている(Albertini et al. (1997) Clin Cancer Res 3:1277-1288; Frost et al. (1997) Cancer 80:317-333; Kossman et al. (1999) Clin Cancer Res 5:2748-2755)。このような研究では、IL-2をボラス又は連続注入のいずれかによって静脈内投与した。高用量のIL-2は毒性が付随した。 20

【0429】

前立腺癌におけるIL-2療法：

多様な研究が、in vitro及び前立腺癌動物モデルにおいて、前立腺癌細胞に対するIL-2の効果を試験している、Moody et al. インターロイキン-2トランスフェクトされた(inte rleukin-2 transfected)前立腺癌細胞は、in vivoで局所抗腫瘍効果を生じる(Prostate, 24: 244-251, 1994; Sokoloff et al. (1996) Cancer, 77: 1862-1872; Triest et al. (1998) Clin Cancer Res, 4: 2009-2014; Hautmann et al. (1999) Anticancer Res, 19: 2661-2663; Hillman et al. (1999) Cancer Detect.Prev. 23: 333-342)、とはいえ、進行した前立腺癌を有する患者におけるIL-2の臨床試験は殆ど存在しない。Hillman et al. (1999) supra; Maffezzini et al. (1996) Prostate, 28: 282-286; Morris et al. (2000) Cancer, 89: 1329-1348)。ホルモン不応性前立腺癌を有する患者においてI.V.中用量IL-2(1日に10～15 MU x 4の範囲の用量)のII相試験を行なった。10患者のうちの6人において、PSAレベルの一時的な低下が観察された。このことが抗腫瘍活性からであるのかどうか、又はLNCaP細胞を用いたin vitro研究が報告しているように(Sokoloff et al.(1996) supra)、IL-2がPSA発現に影響したのかどうかは、不明である。いずれの患者においても、測定可能な疾患の退行(regression)は観察されなかった。進行性前立腺癌を有する患者における1日皮下低用量IL-2の効果は試験されていない。 40

【0430】

特定の目的：

(1) 再発性及び／又は転移性前立腺癌を有する患者における1日低用量皮下IL-2と組み合わせたmAb deJ591の予備的効力(反応率)を明確にすること。

【0431】

(2) 1日低用量皮下IL-2と組み合わせたmAb deJ591の毒性を研究すること。

(3) 末梢血単核細胞(PBMC)集団に対するIL-2の効果を測定すること。

(4) mAb deJ591によってADCCを誘発させる、このプロトコールへの患者からのIL-2活性 50

化NK細胞の効果をin vitro測定すること。

【0432】

治療プロトコール：

患者は、1日目から56日目まで1日低用量皮下rIL-2 (1.2×10^6 IU/m²/日)を受容する。3週間のIL-2投与後に、患者はdeJ591をI.V. (25 mg/m^2)によって1週間1回、3連続週間(22日目、29日目及び36日目)受容する。IL-2投与はこの期間中、その後さらに2週間続ける。この8週間計画は、治療の1サイクルを構成する。この1サイクルの終了時に、反応に関して、患者を評価する。治療に反応したか又は安定した疾患を有する患者が、追加の治療サイクルに適格である。少なくとも2週間離れた、PSAの少なくとも2つの連続上昇が存在する場合には、追加のサイクルが開始される。IL-2による3週間の入り(lead in)は、NK細胞集団を顕著に増加させるために充分である筈である。deJ591の用量は、I相¹¹¹In標識deJ591試験からの予備的薬物動態データに基づくものである。抗体の用量は、この方法で治療された患者の追加のデータ分析に基づいて調節される。

10

【0433】

単一サイクルの治療が開始されている。1サイクル後にX線立証によって進行している患者は、研究から除外する。X線立証によって反応したか、又はPSA値の>50%低下を有し、イメージングで安定した疾患を有するか、又は安定したPSAレベルを有し、イメージングで安定した疾患を有する患者は、3~4週間毎に検査される。反応する又は安定した患者は、少なくとも2週間の間隔を置いた、PSAの2連続上昇後の再治療(第2の8週間サイクル)に、実験責任者の裁量及び患者のオプションで適格である。上昇したPSA(治療前の値の>25%)を有し、イメージングで安定した疾患を有する患者は、3~4週間毎に検査される。再治療は、実験責任者の裁量である。再治療を受けるためには、患者は、<1/100の免疫反応タイターを有さなければならず、すべての初期適格及び排除基準(initial Eligibility and Exclusion criteria)を満たさなければならない。再治療は、患者に与えられた初期用量と同じ用量処方で行なわれる。

20

【0434】

患者選択：

試験は、deJ591と組み合わせた低用量IL-2が前立腺癌に活性を有するかどうか確認するためのパイロット研究である。低用量IL-2が前立腺癌患者に活性を有する可能性がある。しかし、deJ591とIL-2との複合効果を研究することは興味深いので、患者をIL-2単独で治療しないこと、又は低用量IL-2での治療の3週間後にPSAが低下した場合に、抗体療法を遅延させないことが決定されている。顕著な活性が観察される場合には、その後にIL-2単独対IL-2とdeJ591の無作為化試験を行なう。前立腺癌患者の如何なる期がこのアプローチから利益を得ることができるかは、不明である。それ故、少なくとも10人の患者をそれぞれのサブグループで治療する：(1)生化学的再発、ホルモン・ナイーブ：根治的前立腺切除術又は放射線療法後のPSA上昇、転移性疾患の証拠なし；(2)生化学的再発、ホルモン不応性：先行の化学療法なしのホルモン療法後にPSA上昇(これらの患者はX線で立証された転移性疾患を有することも有さないこともありうる)；及び(3)先行化学療法を受けており、ホルモン不応性。約30~40人の患者がこの試験に参加する。

30

【0435】

毒性：

毒性は、Cancer Therapy Evaluation Program Common Toxicity Criteria, Version 2.0 (April 1999)を用いてスコアを付ける。

40

【0436】

IL-2用量修正：

IL-2は、血液学的毒性(これは、EPO又はG-CSF又は輸血によって改善することができる)以外の薬物関連4度毒性があった場合には、如何なる研究のためにも永久的に中断する。研究中の如何なる時点でも、ALTが正常の上限の20倍以上である場合には、該患者におけるIL-2療法及びmAb療法の両方を永久的に中断する。容易に改善することができる電解質異常は、永久的な薬物中断を必要としない。

50

【0437】

このプロトコールは、25%から0.9 mU/M²までのIL-2の1回用量レベル減少を可能にする。IL-2を受容する対象は、かれらのIL-2を1度以上の毒性のために24～48時間中断させることができる。IL-2を一時的に中断させうる毒性は、次のとおりである：

迅速に改善することができない1度以上の電解質異常；1度以上の呼吸毒性；3度の局所反応又は、潰瘍を含む、如何なる局部反応も；>38℃の発熱、又は耐え難いインフルエンザ様症候群若しくは硬直；IL-2に関連した又は関連しない、他の3度以上の毒性；オポチュニスティック感染に関連していると疑われる発熱；1度の疲労；及びEP0、G-CSF又は輸血によって改善されうる、2度の血液学的毒性。

【0438】

かれらのIL-2を中断させる対象は、IL-2を、薬物停止後24～48時間以内に同じ用量で又は1回用量レベルを減少して再開させることができる。該対象に対するIL-2用量は、後に、該対象及び現地実験者(local investigator)の裁量で、初期用量まで高めることができる。

【0439】

mAb deJ591:

アレルギー・イベントは、次のように管理する：発疹、心因性掻痒症、蕁麻疹及び喘鳴は、臨床的に必要に応じて、ベナドリル及び／又はステロイドで治療する。アナフィラキシー又はアナフィラキシー様徴候若しくは症状は、臨床的な適応に応じて、ステロイド及び／又はエピネフリンによって治療される。患者は、心肺蘇生術の装備をした総合治験センター(general clinical research center)で治療される。

【0440】

mAbを投与する3週間中に3又は4度の毒性を経験する患者では、両方の薬物を中断する。毒性が1度以下に戻った後に、mAb deJ591の用量を25%低下して、mAbによる治療を再開する。弱めた用量で3度又は4度の毒性が再発した場合には、mAb治療を中断する。IL-2治療は、8週間サイクルを完了させるために続ける。

【0441】

治療反応の基準：

反応は、生化学的(PSA変化)及び／又は測定可能な病巣(単数又は複数)のサイズの変化のいずれかによって、前立腺癌に関する標準的反応基準を用いて評価する(Dawson N.A. (1999) Semin Oncol 26:174-184; Bubley, G.J., et al. (1999) J Clin Oncol, 17:3461-3467)。

【0442】

生化学的(PSA)反応は、上述したように評価する。該疾患を測定する基準は、次のとおりである：完全な反応は、物理的検査又はイメージング研究による、すべての測定可能な病巣の完全な消失と、2か月間以上新たな病巣が出現しないこととして定義される。部分的反応：すべての測定可能な病巣の最長垂線直径の積(the products of the longest perpendicular diameters)の合計の50%以上の減少として定義される。新たな病巣は生じえない。安定な疾患：部分反応の基準を満たさず、2か月間を超えて進行性疾患の徴候を示さない患者。進行性疾患は、インジケータ病巣の最長垂線直径の積の合計の25%を超える増加、新たな病巣の出現又は治療前ベースラインを超える前立腺特異的抗原の上昇として定義される。

【0443】

相関的研究：

免疫学的表現型検査(immunologic phenotyping)：免疫蛍光検査及び表現型検査を、フローサイトメトリーを用いて行なって、PBMC集団を測定し、リンパ球サブセット(T細胞ではCD3、NK細胞ではCD56及び単球ではCD14)の発現を、既述されたように(Bernstein Z.P., et al. (1995) Blood 86:3287-3294; Lalezari J.P., et al. (2000) HIV Clin Trials)、定量する。

【0444】

10

20

30

40

50

NK/Lak細胞による細胞溶解に関する ^{51}Cr 放出アッセイ：標準的クロム放出アッセイを用いて、PBMCs由来NK細胞の、PSMA発現標的細胞を溶解する(lyse)能力を測定する(Cox J.H., et al. (2000) Mol Biotechnol 15:147-154)。既述されたように(Cox J.H. (2000) supra)、Tリンパ球及び残留単球並びにB細胞を除去するために、Ficoll-Hypaque密度勾配、ナイロンウールカラム及びイムノマグネティック・ビーズによる負の選択を用いる一連の精製を用いて、PBMCsからNK細胞を単離する。細胞傷害性アッセイの日に、生存LNCaP細胞(標的細胞)を $100\text{ }\mu\text{Ci}$ 以上の ^{51}Cr で、 37°C において1時間標識し、洗浄し、RPMI中に 5×10^4 細胞/mlの濃度で再懸濁させる、 $0.2 \sim 1.5\text{ }\text{cpm}/\text{細胞}$ を目標とする。

【0445】

付加的アッセイ：

10

例えばIL-2、TNF及びIFNのようなサイトカインの細胞内蓄積の発現を測定するためのアッセイは、Pala P. et al. (2000) J Immunol Methods 234:107-124に記載されている。治療前及び中の患者PBMCs内のこれらのサイトカインの発現を測定することができる。

【0446】

統計的方法：

種々な時点で行なわれる測定による、あらゆる転帰変数(outcome variable)に関して、変動の反復測定分析(Repeated Measures Analysis of Variance)(RMANOVA)を行なって、如何なるパターンの変化をも長期間にわたって(over time)測定する。有意な時間効果を見出した後に、Bonferroni調整ペインワイズ・コントラスト(painwise contrasts)を算出して、どの時点が他の時点とは異なるのかを判断する。多重時点で得られたデータの分析を簡単化するために、長期間にわたって採取した測定値を“統合する(aggregate)”ことを選択することができる。PSAレベルの曲線下面積(AUC)分析を行なうことができる。或いは、“傾斜分析(slope analysis)”を行なうことができる。

20

【0447】

結果の現状：

6患者が参加して、3人が8週間治療を完了しており；2患者はPSA安定化に基づいて再治療されている。3番目の患者は客観的な疾患悪化を有した。毒性は予想されており、マイナーな毒性は、疲労、注入部位反応及び無症候性甲状腺機能異常を包含する。IL-2媒介免疫調節を末梢血に対するフローサイトメトリーによって評価して、mAb治療の前後のリンパ球サブセットの発現を定量する。

30

【0448】

実施例15：メイタンシノイド・サイトトキシンDM1へのdeJ591のコンジュゲーション
この実施例は、deJ591-DM1イムノコンジュゲートの作製方法を述べる。この方法は、当該技術分野で知られた標準方法に基づくものであるので、例えばdeJ415のような、本発明の他の抗体を含めた、他の抗体に一般化することができる。

【0449】

コンジュゲーション方法は、deJ591出発物質(Lot 1552-60S)5gを用いて行なう1実験と、deJ591出発物質(Lots 1552-168、1552-104及び1610-036)6.7g~7.3gを用いる3実験を含む、幾つかの小規模実験に基づく。

【0450】

40

コンジュゲーション方法に関与する工程は次のとおりである：

(1) deJ591抗体5g~7.5gを接線方向流濾過(tangential flow filtration)(10kD NMWC0膜)によって25~30mg/mlにまで濃縮して、5倍量の50mMリン酸カリウム、2mMEDTA、pH6.0に対してディアフィルトレーションする。収率は典型的に98%~100%である。

【0451】

(2) 濃縮抗体を、乳白光を発する場合には、 $0.2\text{ }\mu$ フィルターに通して濾過し、次にN-スキシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPP)によって、20~22mg/ml抗体及び抗体1分子につきSPP7分子の濃度で修飾する。この修飾は50mMリン酸カリウム、2mMEDTA、5%エタノール、pH6.0中で 2.5 ± 0.5 時間行なわれる

50

。修飾器(modification vessel)は500ml丸底フラスコである。

【0452】

(3) 修飾抗体を工程(2)の反応混合物から、ゲル濾過クロマトグラフィー及びSephadex G-25TMカラムを用いて分離する。該カラム負荷はカラム体積の約25%を表し、該クロマトグラフィーは50mMリン酸カリウム、2mM EDTA、pH6.0中で、50cm/時の流速で行なわれる。修飾抗体は、カラム体積の38~75%で溶離する。典型的に、この工程の収率は95%~100%であり、SPPの、抗体に対する比率は、約5.4~5.9 SPP分子/抗体である。

【0453】

(4) 約10mg/mlの濃度で、修飾抗体をDM1と、20±4時間コンジュゲートさせる(抗体にコンジュゲートしたSPP 1分子につきDM1 1.7分子を用いる)。典型的に、反応時間は16.25~17.7時間であり、反応は、電磁気攪拌バーを備えた1L丸底ガラスフラスコ中に行なわれる。該コンジュゲーション反応は、3% DMA、10%スクロース(反応1mlにつきスクロース100mg)中に行なわれる。反応の終了時に、コンジュゲートした抗体を2.0μmフィルターに通して濾過して、分光光度計読取りを行なう。

【0454】

(5) コンジュゲートした抗体を未反応DM1から、Sephadex G-25TMカラムを用いるゲル濾過クロマトグラフィーによって分離する。カラム負荷はカラム体積の22~23%を表し、流速は約50cm/時である。該カラムを20mMスクシネート、5%スクロース(50mg/ml)、pH5.5中で平衡化させ、操作する。該抗体コンジュゲートは、カラム体積の約31%~65%で溶離し、ピーク溶出の開始からピーク後縁の開始までを単一フラクションとして回収し、続いて、15x2%カラム体積フラクション中の残留ピーク物質を分画する。すべてのフラクションを、適当量の50%スクロースの添加によって、100mg/mlのスクロース(10%スクロース)に調節する。2%カラム体積フラクションを、分析サイジング(analytical sizing)(TSK 3000SWL)によって、分析して、選択したフラクション(フラクション1及び2)を主要ピークと共にプールする。フラクションを分析サイジングを用いて分析する、プーリング基準は、24分間ピークが総ピーク面積の<20%を表すことである。典型的に、この工程の収率は、反応混合物及び/又は精製混合物中にスクロースが存在しないラン1552-104を除いて、60%~65%である。溶出した抗体濃度は3.8~4.2mg/mlの範囲であり、DM1/抗体の比率は3.6~3.9の範囲である。

【0455】

(6) 次に、10kD NMWCO接線方向流濾過膜を用いて、抗体コンジュゲートを7~10mg/mlに濃縮し、5倍量の50mMスクシネート、10%スクロース、pH5.5に対してディアフィльтраーションする(入口圧力<10psi)。ディアフィльтраーション後に、抗体コンジュゲートを5mg/mlに調節する。この工程の典型的な収率は92%~100%であり、最終タンパク質濃度は4.85~5.1mg/mlである。

【0456】

(7) 最後に、該抗体コンジュゲートを0.2μmフィルターに通して濾過して、指定量に等分する。工程収率は90%~100%であり、最終DM1-抗体比率は3.5~3.8である。

【0457】

得られたdeJ591-DM1コンジュゲートを外観、濃度、DM1/抗体比率、内毒素、非特異的細胞傷害性、アセトン抽出可能なDM1、分析サイジング、還元及び非還元(reduced and non-reduced)SDS-PAGE、pH、生物負荷、比細胞傷害性(specific cytotoxicity)及びIEFに基づいて分析した。ロット1552-168、1552-104及び1552-036に関する選択した分析結果を、以下の表19に示す。

【0458】

【表19】

表 19

ロット番号	回収量	濃度 (mg/ml)	DM1/抗体	工程回収率 (%)
1552-168	3.85	5.1	3.7	57.2
1552-104	2.75	4.85	3.5	37.8*
1610-036	3.41	5.05	3.8	47.2
平均値	3.34	5.00	3.67	47.4
標準偏差	0.55	0.13	0.15	9.7
% c. v.	16.6	2.6	4.2	20.5

10

*低い回収率は、一部は、コンジュゲーション反応及び第2 G-25ゲル濾過ランにおいてスクロースが存在しない(the lack of sucrose)こと、及び一部は、生成物ピークの先端がチャート・レコーダの故障のために回収されなかったという事実による。

20

【0459】

実施例16. 前立腺癌細胞への細胞傷害性薬物の標的デリバリーのためのmAbの使用
抗PSMA抗体を、例えばメイタンシノイド・クラスの前立腺癌細胞のような、高い細胞傷害能力を有する物質にコンジュゲートさせることができる。メイタンシノイド類は、微小管の形成及び安定化を妨害することによって、それらの細胞傷害性効果を発揮する。メイタンシノイド類は、通常の化学療法剤（例えば、ドキソルビシン、メトトレキサート及びビンカルカロイド）よりも100倍～1000倍大きい細胞傷害能力を有する (Chari, R.V.J. et al. (1992) Cancer Res. 52: 127)。

【0460】

ネズミ抗体及び脱免疫化J591抗体の両方(both murine and deimmunized J591 antibodies)は、立体障害(hindered)ジスルフィド結合を介して、メイタンシノイド、DM1にコンジュゲートされている。この結合は細胞内で切断されて、薬物放出を可能にする。該抗体の一定領域内の1つ以上のリシン残基を、ピリジルジチオ基を含有するリンカーにコンジュゲートさせた、次に、このピリジルジチオ基がメイタンシノイド毒素に結合した。IgG 1モル当りメイタンシノイド 3～4モルの比率が好ましい。

30

【0461】

DM1結合J591抗体の製造方法は、J591をピリジルジチオ基とN-ヒドロキシスクシンイミド脱離基との両方を含有するリンカーと反応させることによって開始する。この場合に、該リンカーはN-スクシンイミジル 4-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(又はSPP)であったが、他のリンカーを用いることもできる。該反応の生成物は、表面露出(surface exposed)リシン基に結合する1つ以上のリンカー基(4-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート)を含有する修飾J591抗体を包含し、該リンカー基はピリジルジチオ反応基と、N-ヒドロキシスクシンイミド脱離基を保持する。次に、J591抗体を反応混合物及びN-ヒドロキシスクシンイミドから、例えばセファデックスG25を用いるゲル濾過によって、分離する。該修飾J591抗体を、該修飾抗体の表面上に今や存在するピリジルジチオ基と反応するチオール基を含有するDM1と反応させ、それによって、J591-DM1イムノコンジュゲート及びチオピリジンを製造する。J591-DM1イムノコンジュゲートを、反応混合物及びチオピリジンから、例えばセファクシルS300カラムを用いるサイズ排除クロマトグラフィーによって単離する。メイタンシノイド・コンジュゲートの製造方法は、米国特許第5,208,020号;第5,475,092号;第5,585,499号;第5,846,5

40

50

45号及び第6, 333, 410号に記載されており、これらの内容は本明細書に援用される。

【0462】

in vivoで前立腺癌細胞の治療におけるネズミJ591-DM1イムノコンジュゲートの効力、毒性及び抗原選択性を評価する研究を以下で述べる。

実験1：in vivoでの効力、毒性及び用量－反応曲線の確立

LNCaP細胞の腫瘍異種移植片をBALB/cマウスの右側腹部に定着させた（ 5×10^6 細胞皮下注入）。腫瘍が目に見えるようになる（7～10mm）まで動物を観察した。次に、動物をPBS、非コンジュゲート化mAbJ591、非コンジュゲート化DM1、mAbJ591とDM1との両方（但し、非コンジュゲート化）、及びJ591-DM1イムノコンジュゲート（100、200、300及び400mcg/日、腹腔内、毎日x5日間）で治療した。mAbJ591を修飾して、ジチオピリジル基を導入して、次に、上述したように、立体障害ジスルフィド結合を介してDM1にコンジュゲートさせた。非コンジュゲート化mAbJ591及びDM1は、等モル濃度で供給した。

【0463】

実験2：PSMA陽性腫瘍に対する選択性

LNCaP細胞（ 5×10^6 細胞、右側腹部に皮下注入）及びPC3細胞（ 3×10^6 細胞、左側腹部に皮下注入）の両方の腫瘍異種移植片をBALB/cマウスに定着させた。LNCaP腫瘍が目に見えるようになるまで動物を観察した（PC3腫瘍も存在したが、非常に小さい）。動物をJ591-DM1イムノコンジュゲート：300mcg/日、腹腔内、毎日x5日間で処置した。

【0464】

実験3：該イムノコンジュゲートの最適投与スケジュールの決定

LNCaP細胞の腫瘍異種移植片をBALB/cマウスの右側腹部に皮下定着させた。腫瘍が目に見えるようになったときに、動物をPBS、非コンジュゲート化mAbJ591、J591-DM1イムノコンジュゲート（300mcg/日、静脈内、毎日x5日間；1コース投与）、J591-DM1イムノコンジュゲート（400mcg/日、静脈内、隔日、10日間に5回量；1コース投与）、及びJ591-DM1イムノコンジュゲート（300mcg/日、静脈内、毎日x5日間；合計で10回量のために2コース投与）で治療した。2コースのJ591-DM1イムノコンジュゲートを受容した動物に関して、第2の5日間コースは腫瘍容積最低（典型的に、第1コースの完了後21～24日目に見られる）のときに投与された。

【0465】

すべての動物を治療の前後に写真撮影して、同定のためにタグを付けた。腫瘍容積を測定し（長さx幅x深さ）、密接にフォローした。動物の体重を毒性の尺度としてフォローした。

【0466】

結果：実験1：

非コンジュゲート化DM1（単独、又は非コンジュゲート化mAbJ591と一緒にした）で治療した、すべてのマウスは、治療の完了後48時間以内に死亡した。400mcg/日の用量でのイムノコンジュゲートは、マウスの50%にとって致死的であった。

300mcg/日の用量では、腫瘍容積の顕著な減少が、幾つかの完全な反応及び最低の毒性を伴って認められた。しかし、これらの完全な反応は持続的ではなく、その後に、腫瘍容積が最低になった後2～20日間に腫瘍サイズの増加が認められた。

【0467】

結果：実験2：

LNCaP腫瘍とPC3腫瘍との両方を有するマウスでは、J591-DM1イムノコンジュゲートによる治療後にLNCaP腫瘍容積は実質的に減少した。これらの動物では完全な反応は達成されなかったが、腫瘍容積最低は平均 0.08 cm^3 であった。治療後のPC3腫瘍容積の着実な増加によって認識されるように、PC3腫瘍増殖はJ591-DM1イムノコンジュゲートによって影響されなかった。

【0468】

実験 3 :

投与経路は異なった（腹腔内に対して静脈内）が、1 コースのJ591-DM1イムノコンジュゲートによる治療は、実験 1 から得られた結果に匹敵した。完全な反応が達成された（21～24 日目）が、これらの結果は持続的ではなかった。400 mcgの隔日投与で治療された動物では、毒性が実証された（体重損失＞総体重の10%）が、すべての動物が最終的には生残した。腫瘍容積はすべての動物で減少したが、完全な反応は達成されなかった。2 コースのJ591-DM1イムノコンジュゲートで治療されたすべての動物は、少なくとも6 日目まで持続した完全な反応を達成した。

【0469】

結論 :

ネズミJ591抗PSMA抗体は、メイタンシノイド・クラスの薬物（例えば、DM1）に効果的にコンジュゲートさせることができる。これらのJ591-DM1イムノコンジュゲートは、in vivoで、PSMA陽性前立腺癌細胞への、この細胞傷害性薬物の非常に選択的な、抗原特異的標的デリバリーを生じる。300 mcg/日の用量で、最少の毒性による最大の腫瘍容積減少が注目された。最適投与スケジュールは、第2回コースを腫瘍容積最低時（21～24 日目）に投与する、2回の5日間コースのJ591-DM1イムノコンジュゲートであるように思われる。

【0470】

実施例 17. deJ591-DM1イムノコンジュゲートの薬物動態及び効力

実施例 16 に記載した実験と並行して、付加の実験をdeJ591-DM1イムノコンジュゲートによって行なった。これらの実験と、それから得られた結果を以下に述べる。

【0471】

deJ591-DM1及びDM1のin vitro薬物動態 :

実験 : LNCaP細胞を96穴プレートに、増殖アッセイのために1000細胞/穴の初期密度で植え付けた。deJ591-DM1又はDM1のある濃度範囲（0.01 nM～100 nM）にわたって穴に加え、一定の時間（0.5、2、8、24、72及び144時間）にわたって細胞と接触させておいた。該期間の終了時に、薬物含有培地を取り出し、実験の開始から全体で144時間が経過するまで、培地を薬物を含まない培地と交換した。次に、増殖に対する薬物暴露の得られた結果を測定した。

【0472】

結果 : Kalns et al. (1995) (Cancer Research 55:5315-5322、この内容は本明細書に援用される) によって開発された方法論を用いた薬物動態分析は、変数（1）暴露時間及び（2）濃度から、観察された効果に対する相対的重要性を考慮するときに、該暴露時間は、DM1に比べてdeJ591-DM1に関してより重要であり、濃度の方がより重要な変数であることを実証する。

【0473】

単回IV投与後のマウスにおけるdeJ591-DM1の血清レベル

実験 : マウスに、deJ591-DM1の静脈内14.5 mg/kg用量を投与し、ヒト抗体に関するELISAアッセイを用いる試験物体(test article)の分析のために血清サンプルを回収した。サンプルは、3マウスの群から、6、24、48、72及び168時間目に回収した。データを二指数方程式(bi-exponential equation)に当てはめて、薬物動態パラメータを算出した。これらのパラメータを用いて、複数回投与後の血清レベルをシミュレートした。

【0474】

結果 : 薬物動態データの分析は、ELISAアッセイで測定した、マウスにおけるdeJ591-DM1の血清半減期が130時間であることを実証した。

CWR22前立腺異種移植片に対する効力への投与間隔の効果

実験 : 雄SCIDマウスにCWR22前立腺腫瘍異種移植片の連続継代によって移植した。これらの腫瘍が200～250 mm³サイズ（外側キャリパー測定から推定）に達したときに、マウスを8匹ずつの処置群に無作為に分けて、ビヒクルのみ（7日間毎）を、又はdeJ591-DM1を、下記スケジュール（7、14、21若しくは28日間毎）のいずれかで投与された

10

20

30

40

50

14. 5 mg/kg抗体コンジュゲート (240 µg/kg DM1に相当) の用量で受容させた。すべての処置は静脈内投与した。腫瘍増殖及び動物健康を、研究を通じて、連続的にモニターし、腫瘍増殖を3日間毎に測定した。

【0475】

結果：投与スケジュールの相違は、SCIDマウスにおけるCWR22異種移植片の観察された腫瘍増殖に明白な効果を及ぼす。腫瘍増殖は、それらが本出願人らのIACUCレギュレーション下で容認される最大サイズに達するまで、21又は28日間間隔のスケジュールでは緩慢な増殖として特徴付けることができる。7又は14日間投与間隔では、腫瘍増殖の見掛け上の遮断が生じ、最後の投与後約30日目に通常の増殖動力学(growth kinetics)が再開した。これらの結果は、薬物動態シミュレーションで考察した場合に、暴露期間と最低有効濃度の維持との間の相関関係を示唆する。 10

【0476】

非コンジュゲート化抗体(deJ591)又は非コンジュゲート化腫瘍阻害剤(DM1)と比較したdeJ591-DM1の効力

実験：雄SCIDマウスにCWR22前立腺腫瘍異種移植片の連続継代によって移植した。これらの腫瘍が200～250 mm³サイズ(外側キャリパー測定から推定)に達したときに、マウスを8匹ずつの処置群に無作為に分けて、ビヒクルのみ、14.5 mg/kg抗体コンジュゲート(240 µg/kg DM1に相当)の用量でのdeJ591-DM1、deJ591-DM1と同じ用量でのdeJ591、又は240 µg/kgの用量で投与されたDM1を受容させた。すべての処置は静脈内に、5回投与のために3日間毎のスケジュールで投与した。腫瘍増殖及び動物健康を、研究を通じて、連続的にモニターし、腫瘍増殖を3日間毎に測定した。 20

【0477】

結果：非コンジュゲート化抗PSMA抗体(deJ591)は、CWR22異種移植片腫瘍増殖の速度及び程度の減少に有意な効果を及ぼさなかった。遊離薬物として投与されたDM1は、若干の腫瘍増殖遅延を生じたが、これは、同じモル当量の活性DM1による同じスケジュールで投与されたdeJ591-DM1に比べて、マイナーな反応であった。deJ591-DM1は、用量の最後の投与後約20日間にわたって、腫瘍増殖を抑制した。

【0478】

異なる用量でのdeJ591-DM1の効力

実験：雄SCIDマウスにCWR22前立腺腫瘍異種移植片の連続継代によって移植した。これらの腫瘍が200～250 mm³サイズ(外側キャリパー測定から推定)に達したときに、マウスを8匹ずつの処置群に無作為に分けて、ビヒクルのみ、14.5 mg/kg抗体コンジュゲート(240 µg/kg DM1に相当)の用量又は7.25 mg/kgの低用量でのdeJ591-DM1を受容させた。すべての処置は静脈内に、5回投与のために7日間毎のスケジュールで投与した。腫瘍増殖及び動物健康を、研究を通じて、連続的にモニターし、腫瘍増殖を3日間毎に測定した。 30

【0479】

結果：deJ591-DM1によるCWR22異種移植片腫瘍増殖阻害に関して、用量－反応関係は明白である。このことは、2種類の異なる用量のdeJ591-DM1に関する7日間の投与間隔研究で実証される。高い用量では、腫瘍増殖が抑制され、初期腫瘍容積が若干減少する。低い用量では、該高い用量に比べて、初期腫瘍容積から同じ減少は存在せず、用量の最後の投与後約10日目に、通常の増殖動力学に迅速に復帰する。 40

【0480】

実施例18. 骨髄バイオプシーで実証された、進行性前立腺癌患者における骨髄関与
進行性前立腺癌への骨髄関与は、ルーチンには、検査されない。本出願人らは、進行したホルモン不応性前立腺癌患者に行なった骨髄バイオプシーの結果に関して報告する。

【0481】

ホルモン不応性前立腺癌患者に、スクリーニング診断研究を行なって、2つのI相放射免疫療法(radioimmunotherapy)臨床試験に対する適格性を調べた。研究は、血清検査、骨スキャン、頭部、胸部、腹部及び骨盤のCTスキャン、並びに腸骨稜から採取した骨髄バイオ 50

プシーを包含した。これまでに、全体で39人の患者をスクリーニングした。

【0482】

すべての患者は、イメージングでの骨若しくは軟組織転移及び／又は血清PSAレベルの3回連続上昇によって判断されて、進行した疾患を有した。すべての患者は、先行ホルモン療法を受けており、大部分は、根治的前立腺切除術(N=15)、放射線療法(N=19)及び／又は化学療法(N=19)を含めた、局所療法を受けていた。16患者(41%)は、骨髄バイオプシーで転移性前立腺癌の組織学的証拠を有した。スクリーニングされた39患者のうちの、13人(33%)は顕著な骨髄関与(>10%関与)を有し、このことは、かれらをこれらの臨床試験への参加に不適格にした。

【0483】

骨髄関与を有する患者は、有意に高い血清アルカリホスファターゼ(ALP)レベル(メジアン374 U/L対96 U/L、 $p < 0.001$)及び有意に低い血清ヘモグロビン(メジアン11.6 g/dl対12.7 g/dl、 $p = 0.02$)を有した。先行化学療法及び／又は先行放射線療法を受けた患者間には、血清ヘモグロビンの差異は存在しなかった。ALPが正常(<120 U/L)又は高い(>120 U/L)場合には、それぞれ、0%及び75%の患者が、骨髄バイオプシーで転移性前立腺癌を有した($p < 0.0001$)。骨スキャンが3つ以上の異なる解剖学的部位(脊椎、胸郭、骨盤、四肢又は頭蓋冠)に骨転移を示した患者は、2つ以下の部位に比べて、骨髄関与を有する可能性が大きい(54%対9%、 $p = 0.01$)。年齢、初期Gleason合計(initial Gleason sum)、血清PSA、PSA倍加時間、軟組織転移の存在、先行局所治療若しくは化学療法、又は他の血液学的パラメータ(WBC、血小板カ

10

20

【0484】

進行した前立腺癌患者における骨髄関与は、ルーチンには検査されないが、非常に少数の症例で存在する。現在の臨床病期研究は骨髄関与を有意に過少評価するが、アルカリホスファターゼの上昇又は血清ヘモグロビンの抑圧が相関関係にある可能性がある。この状況は、臨床試験において、可能な血液学的毒性を有すると見なすべきである。

【0485】

実施例19. 前立腺特異的膜抗原の定量のための新規なサンドイッチ固相酵素免疫検定法(Enzyme-Linked Immunoassay)(ELISA)

理想的には、血清PSMAは、簡単で、迅速な、再現可能及び定量的ELISAアッセイによって検出可能であるべきである。本出願人らの目的は、血清PSMAを測定するためのELISAアッセイを確立することであった。

30

【0486】

96穴プレートに抗PSMA抗体を“キャプチャー(capture)”抗体として塗布した。次に、組換えPSMA(rPSMA)、精液、LNCaP溶解物、並びに基準(rPSMA範囲1.6~1600 ng/ml)を“スパイクされた(spiked)”雄及び雌からの血清の希釈物をこれらの穴に加えた。非競合性ビオチニル化抗PSMA抗体(PSMA上の異なるエピトープを認識する)を“検出(detection)”抗体として加えた。アビジン・ホスファターゼ、続いてp-ニトロフェニルホスフェート(基質)を加えた。次に、光学的密度を測定した。

【0487】

該アッセイのための標準曲線は、5~1600 ng/mlの範囲を通じて直線であった(相関係数>0.99)。このアッセイを用いて、PSMAがLNCaP溶解物、精液及び“スパイクされた”血清中に検出された。

40

【0488】

同等物

当業者は、ルーチンに過ぎない実験を用いて、本明細書に記載した本発明の特定の実施態様の多くの同等物を認識する、又は確認することができるであろう。このような同等物は、特許請求の範囲によって包含されるように意図される。

【図面の簡単な説明】

【0489】

50

【図 1】図 1 A～1 B は、それぞれ、ネズミ J 5 9 1 重鎖および軽鎖の可変部のアミノ酸配列を示す。CDR の位置を図中に示し；アミノ酸番号付けは K a b a t の番号付けにしたがう（K a b a t, E. A. ら（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 を参照されたい）。CDR が C h o t h i a ループおよび K a b a t 超可変部を共に含むとみなされ、そして配列はこれにしたがって注釈付けされていることに注目されたい。重鎖：CDR 1 を配列番号 1 に示し；CDR 2 を配列番号 2 に示し；CDR 3 を配列番号 3 に示し；CDR 領域を除くフレームワークを配列番号 7 に示し；そして CDR 領域を含むフレームワークを配列番号 19 に示す。軽鎖：CDR 1 を配列番号 4 に示し；CDR 2 を配列番号 5 に示し；CDR 3 を配列番号 6 に示し；CDR 領域を除くフレームワークを配列番号 8 に示し；そして CDR 領域を含むフレームワークを配列番号 20 に示す。

【図 2】図 2 A～2 B は、それぞれ、脱免疫 J 5 9 1 重鎖および軽鎖の可変部のアミノ酸配列を示す。CDR の位置を図中に示し；アミノ酸番号付けは K a b a t の番号付けにしたがう（K a b a t, E. A. ら（1991）上記）。CDR が C h o t h i a ループおよび K a b a t 超可変部を共に含むとみなされ、そして配列はこれにしたがって注釈付けされていることに注目されたい。重鎖：CDR 1 を配列番号 1 に示し；CDR 2 を配列番号 2 に示し；CDR 3 を配列番号 3 に示し；フレームワーク 1 を配列番号 9 に示し；フレームワーク 2 を配列番号 10 に示し；フレームワーク 3 を配列番号 11 に示し；フレームワーク 4 を配列番号 12 に示し；CDR 領域を除くフレームワークを配列番号 17 に示し；そして CDR 領域を含むフレームワークを配列番号 21 に示す。軽鎖：CDR 1 を配列番号 4 に示し；CDR 2 を配列番号 5 に示し；CDR 3 を配列番号 6 に示し；フレームワーク 1 を配列番号 13 に示し；フレームワーク 2 を配列番号 14 に示し；フレームワーク 3 を配列番号 15 に示し；フレームワーク 4 を配列番号 16 に示し；CDR 領域を除くフレームワークを配列番号 18 に示し；そして CDR 領域を含むフレームワークを配列番号 22 に示す。

【図 3 A】図 3 A～3 B に、ネズミ J 5 9 1 および脱免疫の重鎖可変部（3 A；それぞれ配列番号 19 および 21）並びに軽鎖可変部（3 B；それぞれ配列番号 20 および 22）の並列を示す。ネズミ J 5 9 1 V H および V K の潜在的 T 細胞エпитープ（ペプチドスレッディングプログラムを用いて同定）を、それぞれ図 3 A～3 B に示す。M H C クラス I I に結合すると予測される 13 量体ペプチドを下線によって示し；CDR は、図 3 A の残基 26～35、50～66、および 99～104、並びに図 3 B の残基 24～34、50～56、および 89～97 に位置し；そして脱免疫重鎖および軽鎖の可変部で改変されている残基はボックスに入れる。可能な場合、アミノ酸置換は、ヒト生殖系列 V H 領域に一般的に用いられるものである。アミノ酸番号付けは直鎖であり、K a b a t にしたがったものではない。

【図 3 B】図 3 A～3 B に、ネズミ J 5 9 1 および脱免疫の重鎖可変部（3 A；それぞれ配列番号 19 および 21）並びに軽鎖可変部（3 B；それぞれ配列番号 20 および 22）の並列を示す。ネズミ J 5 9 1 V H および V K の潜在的 T 細胞エпитープ（ペプチドスレッディングプログラムを用いて同定）を、それぞれ図 3 A～3 B に示す。M H C クラス I I に結合すると予測される 13 量体ペプチドを下線によって示し；CDR は、図 3 A の残基 26～35、50～66、および 99～104、並びに図 3 B の残基 24～34、50～56、および 89～97 に位置し；そして脱免疫重鎖および軽鎖の可変部で改変されている残基はボックスに入れる。可能な場合、アミノ酸置換は、ヒト生殖系列 V H 領域に一般的に用いられるものである。アミノ酸番号付けは直鎖であり、K a b a t にしたがったものではない。

【図 4 A-1】図 4 A～4 B は、それぞれ、脱免疫 J 5 9 1 重鎖および軽鎖の可変部のヌクレオチド配列を示す。図 4 A は、脱免疫 J 5 9 1 重鎖可変部のコードおよび非コードヌクレオチド鎖（それぞれ配列番号 23 および 24）の並列と共に、対応するアミノ酸配列

(配列番号 27) を示す。図 4 B は、脱免疫 J 591 軽鎖可変部のコードおよび非コードヌクレオチド鎖 (それぞれ配列番号 25 および 26) の並列と共に、対応するアミノ酸配列 (配列番号 28) を示す。シグナルペプチドの位置および C D R 1 ~ 3 を、各並列に示す。

【図 4 A - 2】図 4 A ~ 4 B は、それぞれ、脱免疫 J 591 重鎖および軽鎖の可変部のヌクレオチド配列を示す。図 4 A は、脱免疫 J 591 重鎖可変部のコードおよび非コードヌクレオチド鎖 (それぞれ配列番号 23 および 24) の並列と共に、対応するアミノ酸配列 (配列番号 27) を示す。図 4 B は、脱免疫 J 591 軽鎖可変部のコードおよび非コードヌクレオチド鎖 (それぞれ配列番号 25 および 26) の並列と共に、対応するアミノ酸配列 (配列番号 28) を示す。シグナルペプチドの位置および C D R 1 ~ 3 を、各並列に示す。

10

【図 4 A - 3】図 4 A ~ 4 B は、それぞれ、脱免疫 J 591 重鎖および軽鎖の可変部のヌクレオチド配列を示す。図 4 A は、脱免疫 J 591 重鎖可変部のコードおよび非コードヌクレオチド鎖 (それぞれ配列番号 23 および 24) の並列と共に、対応するアミノ酸配列 (配列番号 27) を示す。図 4 B は、脱免疫 J 591 軽鎖可変部のコードおよび非コードヌクレオチド鎖 (それぞれ配列番号 25 および 26) の並列と共に、対応するアミノ酸配列 (配列番号 28) を示す。シグナルペプチドの位置および C D R 1 ~ 3 を、各並列に示す。

【図 4 B - 1】図 4 A ~ 4 B は、それぞれ、脱免疫 J 591 重鎖および軽鎖の可変部のヌクレオチド配列を示す。図 4 A は、脱免疫 J 591 重鎖可変部のコードおよび非コードヌクレオチド鎖 (それぞれ配列番号 23 および 24) の並列と共に、対応するアミノ酸配列 (配列番号 27) を示す。図 4 B は、脱免疫 J 591 軽鎖可変部のコードおよび非コードヌクレオチド鎖 (それぞれ配列番号 25 および 26) の並列と共に、対応するアミノ酸配列 (配列番号 28) を示す。シグナルペプチドの位置および C D R 1 ~ 3 を、各並列に示す。

20

【図 4 B - 2】図 4 A ~ 4 B は、それぞれ、脱免疫 J 591 重鎖および軽鎖の可変部のヌクレオチド配列を示す。図 4 A は、脱免疫 J 591 重鎖可変部のコードおよび非コードヌクレオチド鎖 (それぞれ配列番号 23 および 24) の並列と共に、対応するアミノ酸配列 (配列番号 27) を示す。図 4 B は、脱免疫 J 591 軽鎖可変部のコードおよび非コードヌクレオチド鎖 (それぞれ配列番号 25 および 26) の並列と共に、対応するアミノ酸配列 (配列番号 28) を示す。シグナルペプチドの位置および C D R 1 ~ 3 を、各並列に示す。

30

【図 4 B - 3】図 4 A ~ 4 B は、それぞれ、脱免疫 J 591 重鎖および軽鎖の可変部のヌクレオチド配列を示す。図 4 A は、脱免疫 J 591 重鎖可変部のコードおよび非コードヌクレオチド鎖 (それぞれ配列番号 23 および 24) の並列と共に、対応するアミノ酸配列 (配列番号 27) を示す。図 4 B は、脱免疫 J 591 軽鎖可変部のコードおよび非コードヌクレオチド鎖 (それぞれ配列番号 25 および 26) の並列と共に、対応するアミノ酸配列 (配列番号 28) を示す。シグナルペプチドの位置および C D R 1 ~ 3 を、各並列に示す。

【図 5】図 5 は、J 415 抗体のネズミ重鎖可変部およびいくつかの脱免疫重鎖可変部のアミノ酸配列の並列を示す。ネズミアミノ酸配列を、J 415 V H (配列番号 47) と示し；脱免疫配列を、J 415 D I V H 1 (配列番号 54 のアミノ酸残基 18 ~ 133)、J 415 D I V H 2 (配列番号 59)、J 415 D I V H 3 (配列番号 60)、および J 415 D I V H 4 (配列番号 49) と示す。好ましい配列は J 415 D I V H 4 (配列番号 49) である。アミノ酸置換を、囲んだ残基で示す。コンセンサス配列は「大多数」と示す (配列番号 61)。

40

【図 6】図 6 は、J 415 抗体のネズミ軽鎖可変部およびいくつかの脱免疫軽鎖可変部のアミノ酸配列の並列を示す。ネズミアミノ酸配列を、J 415 V K (配列番号 48) と示し；脱免疫配列を、J 415 D I V K 1 (配列番号 57 のアミノ酸残基 18 ~ 124)、J 415 D I V K 2 (配列番号 62)、J 415 D I V K 3 (配列番号 63)、J 415

50

D I V K 4 (配列番号 64)、J 4 1 5 D I V K 5 (配列番号 50)、J 4 1 5 D I V K 6 (配列番号 65)、J 4 1 5 D I V K 7 (配列番号 66)、および J 4 1 5 D I V K 8 (配列番号 67) と示す。好ましい配列は J 4 1 5 D I V K 5 (配列番号 50) である。アミノ酸置換を、囲んだ残基で示す。コンセンサス配列は「大多数」と示す (配列番号 68)。

【図 7 A-1】図 7 A は、脱免疫 J 4 1 5 重鎖可変部 (J 4 1 5 D I V H 1) の核酸コード配列、アミノ酸配列、および核酸逆相補配列 (それぞれ配列番号 53~55) を示す。シグナル配列、イントロンおよび J 4 1 5 D I V H 1 アミノ酸配列の相対的な位置と共に、いくつかの制限部位を示す。

【図 7 A-2】図 7 A は、脱免疫 J 4 1 5 重鎖可変部 (J 4 1 5 D I V H 1) の核酸コード配列、アミノ酸配列、および核酸逆相補配列 (それぞれ配列番号 53~55) を示す。シグナル配列、イントロンおよび J 4 1 5 D I V H 1 アミノ酸配列の相対的な位置と共に、いくつかの制限部位を示す。 10

【図 7 A-3】図 7 A は、脱免疫 J 4 1 5 重鎖可変部 (J 4 1 5 D I V H 1) の核酸コード配列、アミノ酸配列、および核酸逆相補配列 (それぞれ配列番号 53~55) を示す。シグナル配列、イントロンおよび J 4 1 5 D I V H 1 アミノ酸配列の相対的な位置と共に、いくつかの制限部位を示す。

【図 7 B】図 7 B は、ネズミ J 4 1 5 重鎖可変部の核酸コード配列、アミノ酸配列、および核酸逆相補配列 (それぞれ配列番号 125、47、および 126) を示す。C D R の相対的な位置およびいくつかの制限部位を示す。 20

【図 7 C】図 7 C は、ネズミ J 4 1 5 重鎖可変部のアミノ酸配列 (配列番号 47) および K a b a t サブグループ、ネズミ V H I I I C のコンセンサス配列 (M U V H I I I、配列番号 69) の並列を示す。並列に基づく、コンセンサスの大多数の配列もまた示す (配列番号 70)。

【図 8 A-1】図 8 A は、脱免疫 J 4 1 5 軽鎖可変部 (J 4 1 5 D I V K 1) の核酸コード配列、アミノ酸配列、および核酸逆相補配列 (それぞれ配列番号 56~58) を示す。シグナル配列、イントロンおよび J 4 1 5 D I V K 1 アミノ酸配列の相対的な位置と共に、いくつかの制限部位を示す。

【図 8 A-2】図 8 A は、脱免疫 J 4 1 5 軽鎖可変部 (J 4 1 5 D I V K 1) の核酸コード配列、アミノ酸配列、および核酸逆相補配列 (それぞれ配列番号 56~58) を示す。シグナル配列、イントロンおよび J 4 1 5 D I V K 1 アミノ酸配列の相対的な位置と共に、いくつかの制限部位を示す。 30

【図 8 B】図 8 B は、ネズミ J 4 1 5 軽鎖可変部の核酸コード配列、アミノ酸配列、および核酸逆相補配列 (それぞれ配列番号 127、48、および 128) を示す。C D R の相対的な位置およびいくつかの制限部位もまた示す。

【図 8 C】図 8 C は、ネズミ J 4 1 5 軽鎖可変部のアミノ酸配列 (配列番号 48) および K a b a t サブグループ、ネズミ可変軽鎖のコンセンサス配列 (M u V K I、配列番号 71) の並列を示す。並列に基づく、コンセンサスの大多数の配列もまた示す (配列番号 72)。

【図 9 A】図 9 A は、ネズミ J 5 3 3 重鎖可変部の核酸コード配列、アミノ酸配列、および核酸逆相補配列 (それぞれ配列番号 73~75) を示す。C D R の相対的な位置および制限部位を示す。 40

【図 9 B】図 9 B は、ネズミ J 5 3 3 重鎖可変部のアミノ酸配列 (配列番号 74) および K a b a t サブグループ、ネズミ可変重鎖のコンセンサス配列 (M u V H I I A、配列番号 79) の並列を示す。並列に基づく、コンセンサスの大多数の配列もまた示す (配列番号 80)。

【図 10 A】図 10 A は、ネズミ J 5 3 3 軽鎖可変部の核酸コード配列、アミノ酸配列、および核酸逆相補配列 (それぞれ配列番号 76~78) を示す。C D R の相対的な位置およびいくつかの制限部位を示す。

【図 10 B】図 10 B は、ネズミ J 5 3 3 軽鎖可変部のアミノ酸配列 (配列番号 77) お 50

よび K a b a t サブグループ、ネズミ M u V K I I I のコンセンサス配列（配列番号 8 1）の並列を示す。並列に基づく、コンセンサスの大多数の配列もまた示す（配列番号 8 2）。

【図 1 1 A】図 1 1 A は、ネズミ E 9 9 重鎖可変部の核酸コード配列、アミノ酸配列、および核酸逆相補配列（それぞれ配列番号 8 3 ～ 8 5）を示す。C D R の相対的な位置およびいくつかの制限部位を示す。

【図 1 1 B】図 1 1 B は、ネズミ E 9 9 重鎖可変部のアミノ酸配列（配列番号 8 4）および K a b a t サブグループ、ネズミ可変重鎖のコンセンサス配列（M u V H I B、配列番号 8 9）の並列を示す。並列に基づく、コンセンサスの大多数の配列もまた示す（配列番号 9 0）。

10

【図 1 2 A】図 1 2 A は、ネズミ E 9 9 軽鎖可変部の核酸コード配列、アミノ酸配列、および核酸逆相補配列（それぞれ配列番号 8 6 ～ 8 8）を示す。C D R の相対的な位置およびいくつかの制限部位を示す。

【図 1 2 B】図 1 2 B は、ネズミ E 9 9 軽鎖可変部のアミノ酸配列（配列番号 8 7）および K a b a t サブグループ、ネズミ可変軽鎖のコンセンサス配列（M u V K I、配列番号 9 1）の並列を示す。並列に基づく、コンセンサスの大多数の配列もまた示す（配列番号 9 2）。

【図 1 3 A】図 1 3 A は、 ^{90}Y -D0TA-deJ591 の単回用量で治療された 2 患者に関する時間の関数としての血清 PSA レベルを示す。0 日目は、 ^{90}Y -D0TA-deJ591 を投与した日に相当する。

20

【図 1 3 B】図 1 3 B は、 ^{90}Y -D0TA-deJ591 の単回用量で治療された 2 患者に関する時間の関数としての血清 PSA レベルを示す。0 日目は、 ^{90}Y -D0TA-deJ591 を投与した日に相当する。

【図 1 4】図 1 4 は、 ^{177}Lu -D0TA-deJ591 の単回用量で治療された患者に関する時間の関数としての血清 PSA レベルを示す。0 日目は、 ^{177}Lu -D0TA-deJ591 を投与した日に相当する。

【図 1 5】図 1 5 は、DM1 及びメイタンシン、DM1 を抗体にコンジュゲートさせるために用いられる DM1 のチオール反応基を有さない関連分子の化学構造を示す。

【図 1】

ネズミ J591 重鎖のアミノ酸配列 (CDR を示す、番号付けは Kabat 同様)

EVQLQQSGPELKKPGTSVRISCKTS|GYTFTEYTIH|WVKQSHGKS
 1 10 20 30 40
 CDR1

LEWIG|NINPNNGGTTYNQKFED|KATLTVDKSSSTAYMELRSLTS
 50 60 70 80
 CDR2

EDSAVYYCAA|GWNFDY|WGQGTLLTVSS
 90 100 110
 CDR3

FIG. 1A

【図 2】

脱免疫 J591 重鎖のアミノ酸配列 (CDR を示す、番号付けは Kabat 同様)

EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTS|GYTFTEYTIH|WVKQAPGKG
 1 10 20 30 40
 CDR1

LEWIG|NINPNNGGTTYNQKFED|KATLTVDKSTDATAYMELSSLR
 50 60 70 80
 CDR2

EDTAVYYCAA|GWNFDY|WGQGTLLTVSS
 90 100 110
 CDR3

FIG. 2A

ネズミ J591 軽鎖のアミノ酸配列 (CDR を示す、番号付けは Kabat 同様)

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC|KASQDVGTAVD|WYQQKPGQSP
 1 10 20 30 40
 CDR1

KLLIY|WASTRHT|GVPDRFTGSGSGTDFTLITNVQSEDLADYFC
 50 60 70 80
 CDR2

|QQYNSYPLT|FGAGTMLDLK
 90 100
 CDR3

FIG. 1B

脱免疫 J591 軽鎖のアミノ酸配列 (CDR を示す、番号付けは Kabat 同様)

DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTC|KASQDVGTAVD|WYQQKPGPSP
 1 10 20 30 40
 CDR1

KLLIY|WASTRHT|GIPSRFSGSGSGTDFTLITSSLPEDFADYYC
 50 60 70 80
 CDR2

|QQYNSYPLT|FGPGTKVDIK
 90 100
 CDR3

FIG. 2B

【図 3 A】

J591 VH における T 細胞エピトープの位置

1	EVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTS	10	20	J591 MoVH
1	EVQLVQSGPELVKPGTSVRISCKTS	30	40	J591 DIVH
26	GYTFTEYTIHWWKQSHGKSLIEWIGN	50		J591 MoVH
26	GYTFTEYTIHWWKQSHGKSLIEWIGN	60	70	J591 DIVH
51	INPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKS	80	90	J591 MoVH
51	INPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKS	100		J591 DIVH
76	SSTAYMEELRSLTSEDSAVYYCAAAGW	110		J591 MoVH
76	TDTAAYMEELSLRSEDTAVYYCAAAGW			J591 DIVH
101	NFDYWGGQGTLLTVSS			J591 MoVH
101	NFDYWGGQGTLLTVSS			J591 DIVH

FIG. 3A

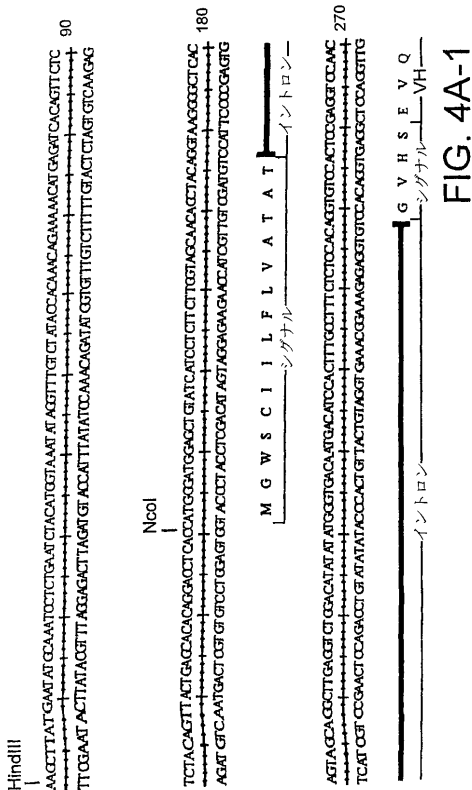
【図 3 B】

J591 VK における T 細胞エピトープの位置

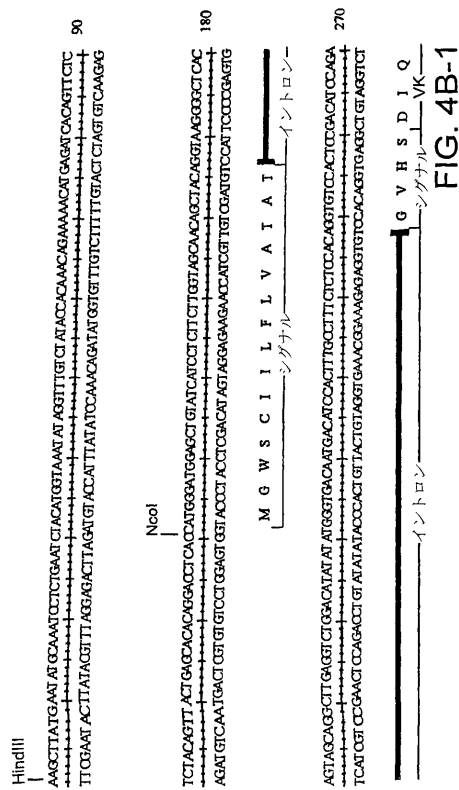
1	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKA	10	20	J591 MoVK
1	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKA	30	40	J591 DIVK
26	SQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYW	50		J591 MoVK
26	SQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYW	60	70	J591 DIVK
51	ASTRHTGVPPDRFTGSGSGTDFTLTI	80	90	J591 MoVK
51	ASTRHTGVPPDRFTGSGSGTDFTLTI	100		J591 DIVK
76	TNVQSEDLADYFCQQYNSSYPITFGA			J591 MoVK
76	SSLQPEDFADYFCQQYNSSYPITFGP			J591 DIVK
101	GTMLDLK			J591 MoVK
101	GTKVDIK			J591 DIVK

FIG. 3B

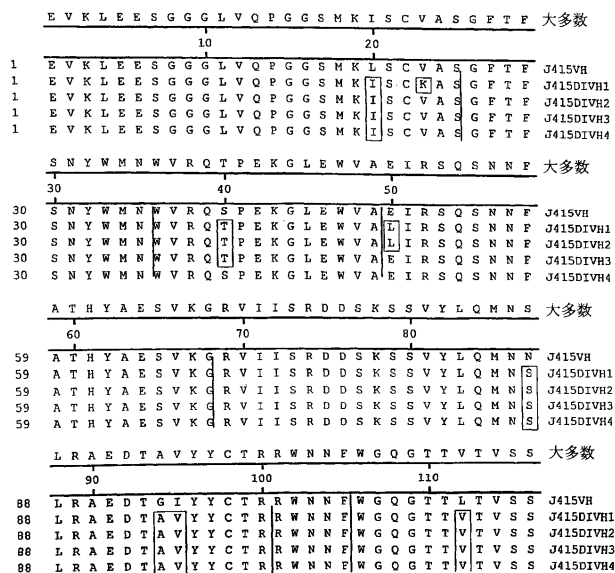
【図 4 A - 1】



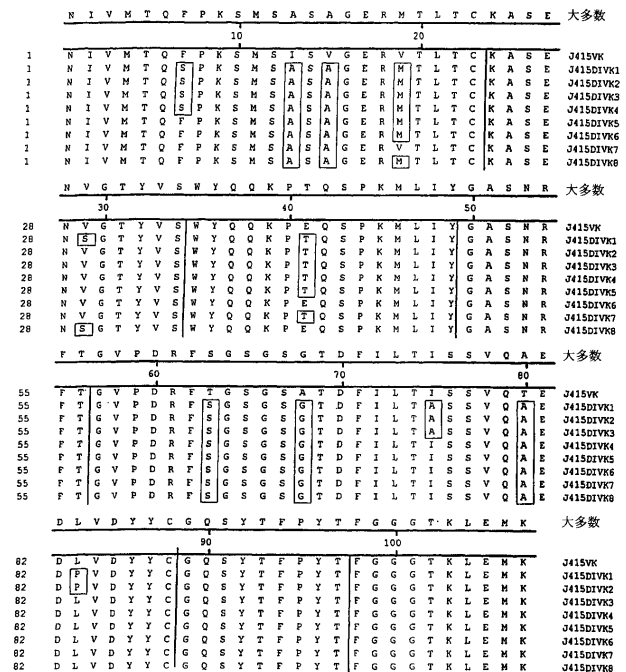
【図 4 B - 1】



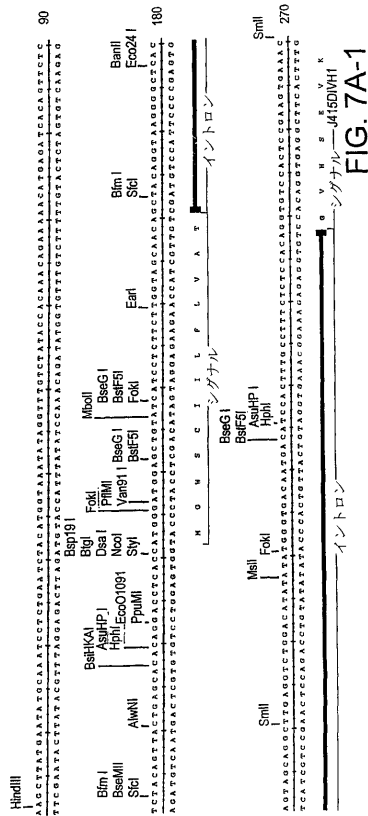
【図 5】



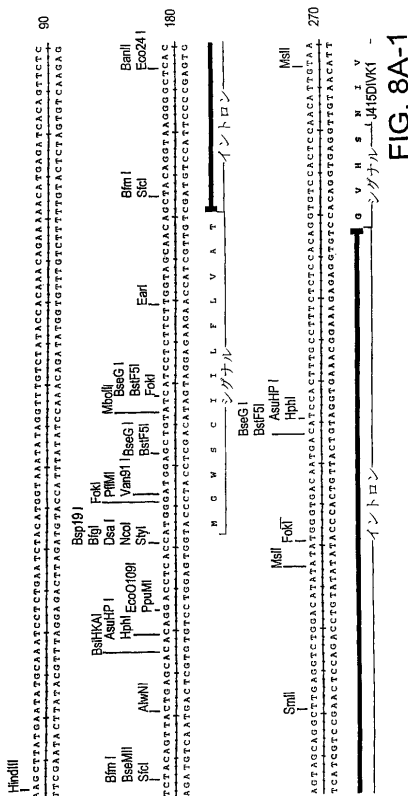
【図 6】



【图 7 A - 1】



【図 8 A - 1】



【図 7 C】

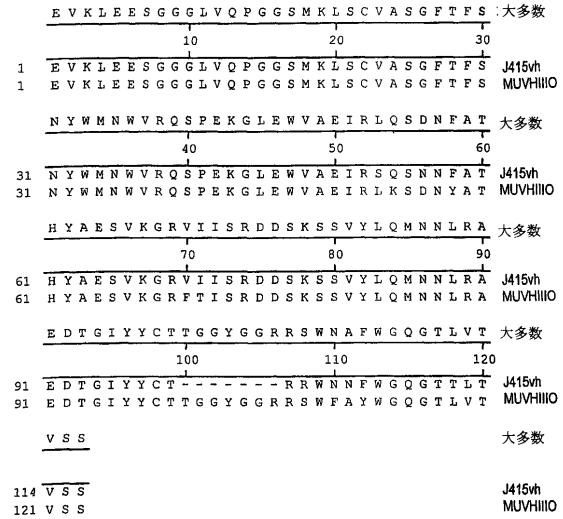


FIG. 7C

【図 8 C】

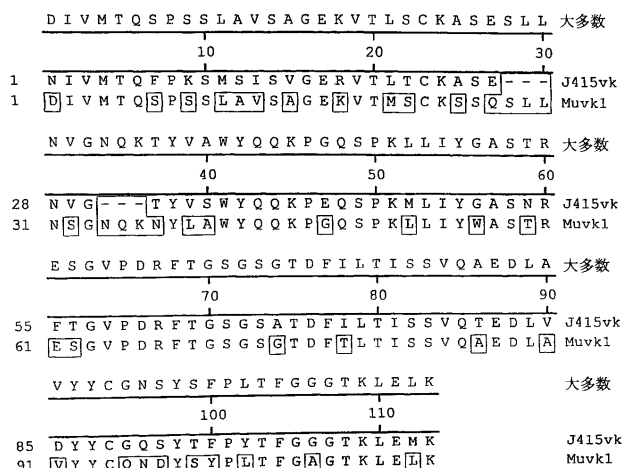


FIG. 8C

【図 9 B】

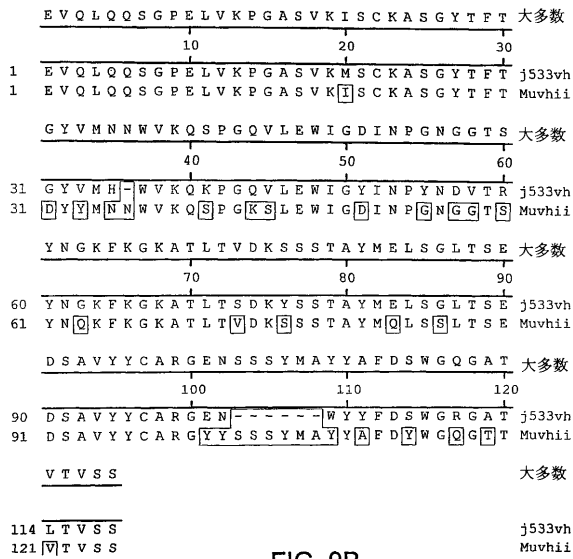


FIG. 9B

【図 10 B】

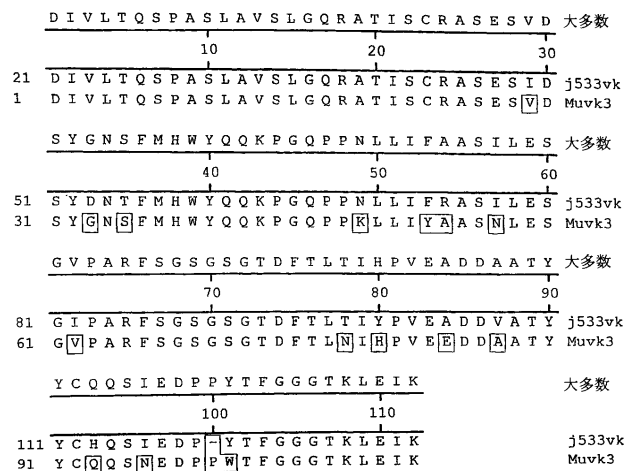


FIG. 10B

【図 11 B】

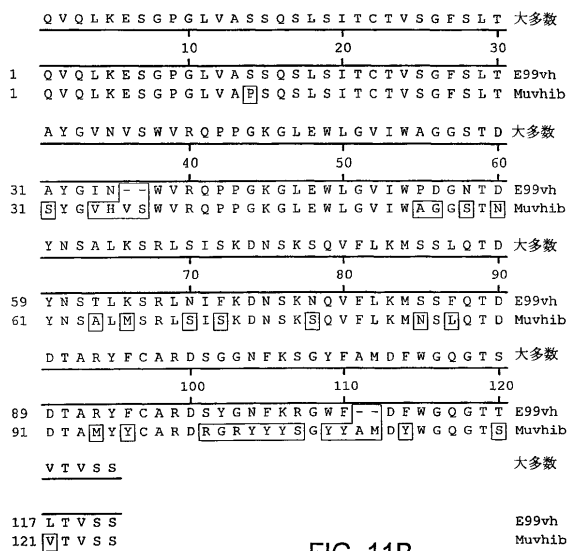


FIG. 11B

【図 12 B】

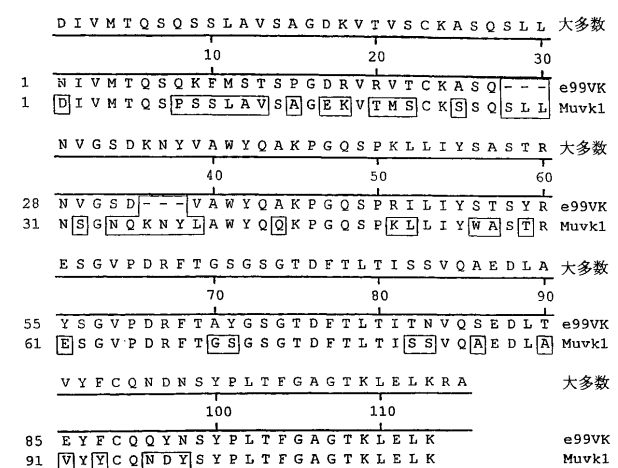
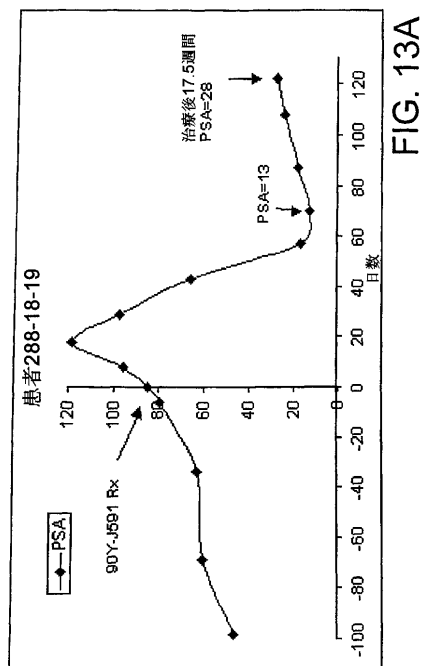
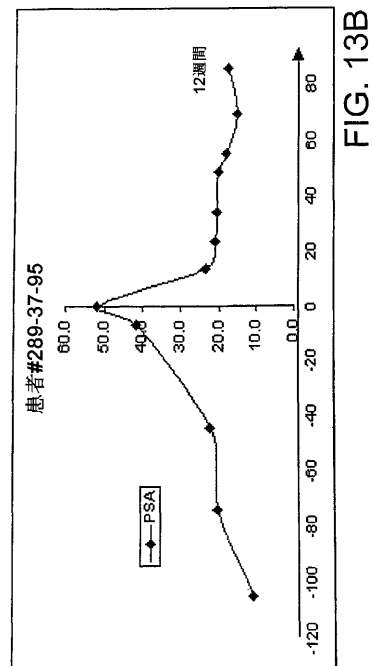


FIG. 12B

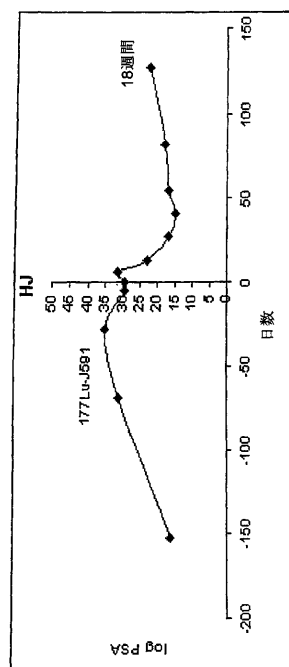
【図 13 A】



【図 13 B】



【図 14】



【図 15】

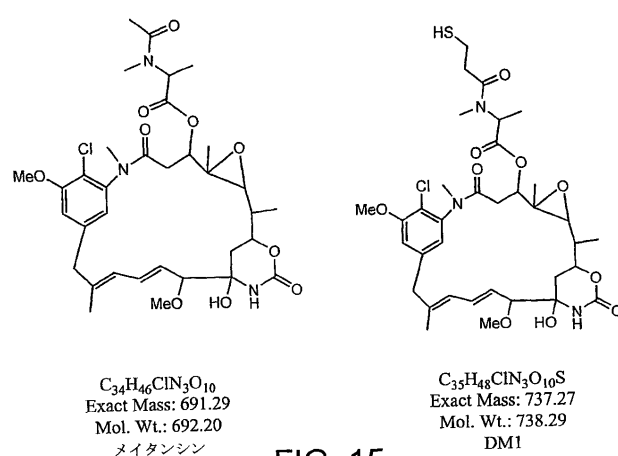


FIG. 15

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
12 December 2002 (12.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/098897 A2

- (51) International Patent Classification: C07K (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US02/17068
- (22) International Filing Date: 30 May 2002 (30.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/295,214 1 June 2001 (01.06.2001) US
60/323,585 20 September 2001 (20.09.2001) US
60/362,810 8 March 2002 (08.03.2002) US
- (71) Applicant: CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC. (US/US); 20 Thornwood Drive, Suite 105, Ithaca, NY 14850 (US).
- (72) Inventors: BANDER, Neil; 525 E. 68th Street, Box 23, Suite E 300, New York, NY 10021 (US). CARR, Francis, J.; Birchlea, The Holdings Balmedie, Aberdeen AB23 8XB (GB). HAMILTON, Anita; 130 Kings Gate, Aberdeen AB15 4BQ (GB).
- (74) Agents: MYERS, Louis et al.; Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report
— with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/098897 A2

(54) Title: MODIFIED ANTIBODIES TO PROSTATE-SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN AND USES THEREOF

(57) Abstract: Modified antibodies, or antigen-binding fragments thereof, to the extracellular domain of human prostate specific membrane antigen (PSMA) are provided. The modified anti-PSMA antibodies, or antigen-binding fragments thereof, have been rendered less immunogenic compared to their unmodified counterparts to a given species, e.g., a human. Pharmaceutical compositions including the aforesaid antibodies, nucleic acids, recombinant expression vectors and host cells for making such antibodies and fragments are also disclosed. Methods of using the antibodies of the invention to detect human PSMA, or to ablate or kill a PSMA-expressing cell, e.g., a PSMA-expressing cancer or prostatic cell, either *in vitro* or *in vivo*, are also provided.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

**MODIFIED ANTIBODIES TO PROSTATE-SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN AND
USES THEREOF****RELATED APPLICATIONS**

This application claims priority to U.S. provisional application number 60/295,214 filed on June 1, 2001, 60/323,585 filed on September 20, 2001, and 60/362,810 filed on March 8, 2002, the contents of all of which are incorporated herein by reference. This invention was made with government support under Department of Defense Grant number DAMD17-98-1-8594. The government has certain rights in the invention.

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention relates to antibodies, e.g., modified, e.g., deimmunized, antibodies, to the extracellular domain of human prostate specific membrane antigen (PSMA) and their uses in treating, preventing, and diagnosing prostatic disorders and cancers.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Prostate cancer is one of the most common causes of cancer deaths in American males. In 1999, approximately 185,000 new cases were diagnosed and 37,500 died of this disease (NCI SEER data). It accounts for about 40% of all cancers diagnosed in men. A male born in the U.S. in 1990 has approximately a 1 in 8 likelihood of being diagnosed with clinically apparent prostate cancer in his lifetime. Even prior to the recent increase in incidence, prostate cancer was the most prevalent cancer in men (Feldman, A.R. et al. (1986) *NEJM* 315:1394-7).

[0003] There is currently very limited treatment for prostate cancer once it has metastasized (spread beyond the prostate). Currently, systemic therapy is limited to various forms of androgen (male hormone) deprivation. While most patients will demonstrate initial clinical improvement, virtually inevitably, androgen-independent cells develop. Endocrine therapy is thus palliative, not curative. In a study of 1387 patients with metastatic disease detectable by imaging (e.g., bone or CT scan), the median time to objective disease progression (excluding biochemical/PSA progression) after initiation of hormonal therapy (i.e., development of androgen-independence) was 16-48 months (Eisenberger M.A., et al. (1998) *NEJM* 339:1036-42). Median overall survival in these patients was 28-52 months from the onset of hormonal treatment (Eisenberger M.A., et al. (1998) *supra.*). Subsequent to developing androgen-independence, there is no effective standard therapy and the median duration of survival is 9-12

WO 02/098897

PCT/US02/17068

months (Vollmer, R. T., et al. (1999) *Clin Can Res* 5: 831-7; Hudes G., et al., (1997) *Proc Am Soc Clin Oncol* 16:316a (abstract); Pienta K.J., et al. (1994) *J Clin Oncol* 12(10):2005-12; Pienta K.J., et al. (1997) *Urology* 50:401-7; Tannock I.F., et al., (1996) *J Clin Oncol* 14:1756-65; Kantoff P.W., et al., (1996) *J. Clin. Oncol.* 15 (Suppl):25:110-25). Cytotoxic chemotherapy is poorly tolerated in this age group and generally considered ineffective and/or impractical. In addition, prostate cancer is relatively resistant to cytotoxic agents. Thus, chemotherapeutic regimen has not demonstrated a significant survival benefit in this patient group.

[0004] For men with a life expectancy of less than 10 years, watchful waiting is appropriate where low-grade, low-stage prostate cancer is discovered at the time of a partial prostatectomy for benign hyperplasia (W.J. Catalona, (1994) *New Engl. J. Med.*, 331(15):996-1004). Such cancers rarely progress during the first five years after detection. On the other hand, for younger men, curative treatment is often more appropriate.

[0005] Where prostate cancer is localized and the patient's life expectancy is 10 years or more, radical prostatectomy offers the best chance for eradication of the disease. Historically, the drawback of this procedure is that most cancers had spread beyond the bounds of the operation by the time they were detected. However, the use of prostate-specific antigen testing has permitted early detection of prostate cancer. As a result, surgery is less extensive with fewer complications. Patients with bulky, high-grade tumors are less likely to be successfully treated by radical prostatectomy.

[0006] After surgery, if there are detectable serum prostate-specific antigen concentrations, persistent cancer is indicated. In many cases, prostate-specific antigen concentrations can be reduced by radiation treatment. However, this concentration often increases again within two years.

[0007] Radiation therapy has also been widely used as an alternative to radical prostatectomy. Patients generally treated by radiation therapy are those who are older and less healthy and those with higher-grade, more clinically advanced tumors. Particularly preferred procedures are external-beam therapy which involves three dimensional, conformal radiation therapy where the field of radiation is designed to conform to the volume of tissue treated; interstitial-radiation therapy where seeds of radioactive compounds are implanted using ultrasound guidance; and a combination of external-beam therapy and interstitial-radiation therapy.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[0008] For treatment of patients with locally advanced disease, hormonal therapy before or following radical prostatectomy or radiation therapy has been utilized. Hormonal therapy is the main form of treating men with disseminated prostate cancer. Orchiectomy reduces serum testosterone concentrations, while estrogen treatment is similarly beneficial. Diethylstilbestrol from estrogen is another useful hormonal therapy which has a disadvantage of causing cardiovascular toxicity. When either LHRH agonists, such as leuprolide, buserelin, or goserelin, or gonadotropin-releasing hormone antagonists, such as Abarelix, are administered testosterone concentrations are ultimately reduced. Flutamide and other nonsteroidal, anti-androgen agents block binding of testosterone to its intracellular receptors. As a result, it blocks the effect of testosterone, increasing serum testosterone concentrations and allows patients to remain potent - a significant problem after radical prostatectomy and radiation treatments.

[0009] In view of the shortcoming of existing therapies, there exists a need for improved modalities for preventing and treating cancers, such as prostate cancer.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0010] This invention provides, *inter alia*, antibodies and particularly, modified antibodies, or antigen-binding fragments thereof, that bind to the extracellular domain of human prostate specific membrane antigen (PSMA). The modified anti-PSMA antibodies, or antigen-binding fragments thereof, have been rendered less immunogenic compared to their unmodified counterparts to a given species, e.g., a human. The modified anti-PSMA antibodies, or fragments thereof, bind to human PSMA with high affinity and specificity, and thus can be used as diagnostic, prophylactic, or therapeutic agents *in vivo* and *in vitro*. Accordingly, the invention provides antibodies and particularly modified anti-PSMA antibodies, antibody fragments, and pharmaceutical compositions thereof, as well as nucleic acids, recombinant expression vectors and host cells for making such antibodies and fragments. Methods of using the antibodies of the invention to detect PSMA, or to ablate or kill a PSMA-expressing cell, e.g., a PSMA-expressing cancer, a prostatic, or a vascular cell, either *in vitro* or *in vivo*, are also encompassed by the invention. Preferably, the modified antibodies are those having one or more complementarity determining regions (CDRs) from a J591, J415, J533 or E99 antibody. As discussed herein, the modified antibodies can be CDR-grafted, humanized, deimmunized, or, more generally, antibodies having the CDRs from a non-human antibody, e.g., murine J591, J415, J533 or E99

WO 02/098897

PCT/US02/17068

antibody, and a framework that is selected as less immunogenic in humans, e.g., less antigenic than the murine frameworks in which a murine CDR naturally occurs.

[0011] The antibodies, e.g., modified antibodies of the invention interact with, e.g., bind to, PSMA, preferably human PSMA, with high affinity and specificity. For example, the antibody binds to human PSMA with an affinity constant of at least 10^7 M^{-1} , preferably between 10^8 M^{-1} and 10^{10} M^{-1} , or about 10^9 M^{-1} . Preferably, the antibody interacts with, e.g., binds to, the extracellular domain of PSMA, and most preferably, the extracellular domain of human PSMA (e.g., amino acids 44-750 of human PSMA).

[0012] In some embodiments, the anti-PSMA antibody binds all or part of an epitope bound by an antibody described herein, e.g., a J591, E99, J415, and J533 antibody. The anti-PSMA antibody can inhibit, e.g., competitively inhibit, the binding of an antibody described herein, e.g., a J591, E99, J415, and J533 antibody, to human PSMA. An anti-PSMA antibody may bind to an epitope, e.g., a conformational or a linear epitope, which epitope when bound prevents binding of an antibody described herein, e.g., a J591, E99, J415, and J533 antibody. The epitope can be in close proximity spatially or functionally-associated, e.g., an overlapping or adjacent epitope in linear sequence or conformational space, to the one recognized by the J591, E99, J415, or J533 antibody.

[0013] In some embodiments, the anti-PSMA antibody binds to an epitope located wholly or partially within the region of about amino acids 120 to 500, preferably 130 to 450, more preferably, 134 to 437, or 153 to 347, of human PSMA. Preferably, the epitope includes at least one glycosylation site, e.g., at least one N-linked glycosylation site (e.g., the asparagine residue located at about amino acids 190-200, preferably at about amino acid 195, of human PSMA).

[0014] Human PSMA is expressed on the surface of normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate epithelial cells, as well as vascular endothelial cells proximate to cancerous cells, e.g., renal, urothelial (e.g., bladder), testicular, colon, rectal, lung (e.g., non-small cell lung carcinoma), breast, liver, neural (e.g., neuroendocrine), glial (e.g., glioblastoma), pancreatic (e.g., pancreatic duct), melanoma (e.g., malignant melanoma), or soft tissue sarcoma cancerous cells. The expression of human PSMA is substantially lower on non-malignant prostate cells where PSM', a splice variant that lacks a portion of the N-terminal domain that includes the transmembrane domain, is more abundant. Due to the absence of the N-terminal region

WO 02/098897

PCT/US02/17068

containing the transmembrane domain, PSM¹ is primarily cytoplasmic and is not located on the cell membrane. The antibodies, e.g., the modified antibodies, of the invention bind to the cell surface of cells that express PSMA. PSMA is normally recycled from the cell membrane into the cell. Thus, the antibodies of the invention are internalized with PSMA through the process of PSMA recirculation, thereby permitting delivery of an agent conjugated to the antibody, e.g., a labeling agent, a cytotoxic agent, or a viral particle (e.g., a viral particle containing genes that encode cytotoxic agents, e.g., apoptosis-promoting factors). Accordingly, antibodies, e.g., modified antibodies, described herein, can be used to target living normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate epithelial cells, as well as vascular endothelial cells proximate to cancerous cells.

[0015] An antibody, e.g., a modified antibody, is preferably monospecific, e.g., a monoclonal antibody, or an antigen-binding fragment thereof. The antibodies, e.g., the modified antibodies, can be full-length (e.g., an IgG (e.g., an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (e.g., IgA1, IgA2), IgD, and IgE, but preferably an IgG) or can include only an antigen-binding fragment (e.g., a Fab, F(ab')₂ or scFv fragment, or one or more CDRs). An antibody, or antigen-binding fragment thereof, can include two heavy chain immunoglobulins and two light chain immunoglobulins, or can be a single chain antibody. The antibodies can, optionally, include a constant region chosen from a kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon or a mu constant region gene. A preferred anti-PSMA antibody includes a heavy and light chain constant region substantially from a human antibody, e.g., a human IgG1 constant region, a portion thereof, or a consensus sequence.

[0016] In a preferred embodiment, the antibodies (or fragments thereof) are recombinant or modified anti-PSMA antibodies chosen from, e.g., a chimeric, a humanized, a deimmunized, or an *in vitro* generated antibody. In other embodiments, the anti-PSMA antibodies are human antibodies. In one embodiment, a modified antibody of the invention is a deimmunized anti-PSMA antibody, e.g., a deimmunized form of E99, J415, J533 or J591 (e.g., a deimmunized form of an antibody produced by a hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12101, HB-12109, HB-12127, and HB-12126, respectively). Preferably, a modified antibody is a deimmunized form of J591 or J415 (referred to herein as "deJ591" or "deJ415", respectively). Most preferably, the antibody is a deimmunized form of J591.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[0017] Any combination of anti-PSMA antibodies is within the scope of the invention, e.g., two or more antibodies that bind to different regions of PSMA, e.g., antibodies that bind to two different epitopes on the extracellular domain of PSMA.

[0018] In some embodiments, the anti-PSMA antibody, e.g., the modified anti-PSMA antibody or antigen-binding fragment thereof, includes at least one light or heavy chain immunoglobulin (or preferably, at least one light chain immunoglobulin and at least one heavy chain immunoglobulin). Preferably, each immunoglobulin includes a light or a heavy chain variable region having at least one, two and, preferably, three CDRs substantially identical to a CDR from a non-human anti-PSMA light or heavy chain variable region, respectively. For example, the antibody or antigen-binding fragment thereof can have at least one, two and preferably three CDRs from: the heavy chain variable region of murine J591 (see SEQ ID NO:1, 2, and 3, depicted in Figure 1A); the light chain variable region of murine J591 (see SEQ ID NO:4, 5, and 6, depicted in Figure 1B); the heavy chain variable region of murine J415 (see SEQ ID NO:29, 30, and 31, depicted in Figure 5); the light chain variable region of murine J415 (see SEQ ID NO:32, 33, and 34, depicted in Figure 6); the heavy chain variable region of murine J533 (see SEQ ID NO:93, 94, and 95, depicted in Figure 9A); the light chain variable region of murine J533 (see SEQ ID NO:96, 97, and 98, depicted in Figure 10A); the heavy chain variable region of murine E99 (see SEQ ID NO:99, 100, and 101, depicted in Figure 11A); or the light chain variable region of murine E99 (see SEQ ID NO:102, 103, and 104, depicted in Figure 12A). In other embodiments, the modified antibody or antigen-binding fragment thereof can have at least one, two, and preferably three CDRs from the light or heavy chain variable region of the antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number HB-12126 or the deimmunized J591 antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number PTA-3709. In other embodiments, the modified antibody or antigen-binding fragment thereof can have at least one, two and preferably three CDRs from the light or heavy chain variable region of the antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number HB-12109 or the deimmunized J415 antibody produced by a cell line having ATCC Accession Number PTA-4174. In still other embodiments, the modified antibody or antigen-binding fragment thereof can have at least one, two and preferably three CDRs from the light or heavy chain variable region of the antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number HB-12127 or the antibody produced by a cell line having ATCC Accession Number HB-12101.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[0019] In one preferred embodiment, the modified antibody or antigen-binding fragment thereof includes all six CDRs from the same non-human anti-PSMA antibody, e.g., a murine J591, J415, J533 or E99 antibody. In some embodiments, the CDRs have the amino acid sequences of SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 and 6 (corresponding to murine J591 heavy and light chain CDRs), the amino acid sequences of the CDRs of the antibody produced by the cell line having ATCC Accession number HB-12126, or the deimmunized J591 antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number PTA-3709, or sequences substantially identical thereto. In other embodiments, the CDRs have the amino acid sequences of SEQ ID NO:29, 30, 31, 32, 33, and 34 (corresponding to murine J415 heavy and light chain CDRs), the amino acid sequences of the CDRs of the antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number HB-12109, or the deimmunized J415 antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number PTA-4174, or sequences substantially identical thereto. In other embodiments, the CDRs have the amino acid sequences of SEQ ID NO:93, 94, 95, 96, 97, and 98 (corresponding to murine J533 heavy and light chain CDRs), the amino acid sequences of the CDRs of the antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number HB-12127, or sequences substantially identical thereto. In still other embodiments, the CDRs have the amino acid sequences of SEQ ID NO:99, 100, 101, 102, 103, and 104 (corresponding to murine E99 heavy and light chain CDRs), the amino acid sequences of the CDRs of the antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number HB-12101, or sequences substantially identical thereto.

[0020] The amino acid sequence of the CDRs for antibodies J591, J415, J533 and E99 are provided below in Table 1.

Table 1: CDR Sequences

NAME	Organism	FIG.	SEQ ID NO:	SEQUENCE
V _H CDR1 J591	Mus musculus	Fig. 1A	1	GYTFTEYTIH
V _H CDR2 J591	Mus musculus	Fig. 1A	2	NINPNNGGTTYNQKFED
V _H CDR3 J591	Mus musculus	Fig. 1A	3	GWNFDY
V _L CDR1	Mus musculus	Fig. 1B	4	KASQDVGTAVD

WO 02/098897

PCT/US02/17068

J591				
V _L CDR2	Mus musculus	Fig. 1B	5	WASTRHT
J591				
V _L CDR3	Mus musculus	Fig. 1B	6	QQYNSYPLT
J591				
V _H CDR1	Mus musculus	Fig. 5	29	GFTFSNYWMN
J415				
V _H CDR2	Mus musculus	Fig. 5	30	EIRSQSNNFATHYAESVKG
J415				
V _H CDR3	Mus musculus	Fig. 5	31	RWNNF
J415				
V _L CDR1	Mus musculus	Fig. 6	32	KASENVGTYVS
J415				
V _L CDR2	Mus musculus	Fig. 6	33	GASNRFT
J415				
V _L CDR3	Mus musculus	Fig. 6	34	GQSYTFPYT
J415				
V _H CDR1	Mus musculus	Fig. 9A	93	GYTFIGYVMH
J533				
V _H CDR2	Mus musculus	Fig. 9A	94	YINPYNDVTRYNGKFKG
J533				
V _H CDR3	Mus musculus	Fig. 9A	95	GENWYYFDS
J533				
V _L CDR1	Mus musculus	Fig. 10A	96	RASESIDSYDNTFMH
J533				
V _L CDR2	Mus musculus	Fig. 10A	97	RASILES
J533				
V _L CDR3	Mus musculus	Fig. 10A	98	HQSIEDPYT
J533				
V _H CDR1	Mus musculus	Fig. 11A	99	GFSLTAYGIN
E99				
V _H CDR2	Mus musculus	Fig. 11A	100	VIWPDGNTDYNSTLKS
E99				
V _H CDR3	Mus musculus	Fig. 11A	101	DSYGNFKRGWFDF
E99				
V _L CDR1	Mus musculus	Fig. 12A	102	KASQNVGSDVA
E99				
V _L CDR2	Mus musculus	Fig. 12A	103	STSYRYS
E99				
V _L CDR3	Mus musculus	Fig. 12A	104	QQYNSYPLT
E99				

[0021] The light or heavy chain immunoglobulin of the modified anti-PSMA antibody or antigen-binding fragment thereof can further include a light chain or a heavy chain variable framework sequence from a light chain or heavy chain variable framework present in a human or a non-human, e.g., rodent, antibody (e.g., the murine J591, J415, J533 or E99 antibody heavy

WO 02/098897

PCT/US02/17068

chain or light chain variable framework). In some embodiments, the light chain or the heavy chain variable framework can be chosen from:

- i a light or heavy chain variable framework including at least 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, or 80 amino acid residues from a human light or heavy chain variable framework, e.g., a light or heavy chain variable framework residue from a mature human antibody, a human germline antibody sequence, or a human consensus antibody sequence;
- ii a light or heavy chain variable framework including at least 5, but less than 30, amino acid residues from a human light chain or heavy chain variable framework, e.g., a light chain or heavy chain variable framework residue from a mature human antibody, a human germline antibody sequence, or a human consensus antibody sequence;
- iii a light or heavy chain variable framework including at least 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75 or more amino acid residues from a light or heavy variable framework from a non-human antibody, e.g., a murine antibody (e.g., an anti-PSMA antibody having the framework amino acid sequence shown in SEQ ID NO:7 or 8 (from the heavy and light chain, respectively, of murine J591; see Figures 1A and 1B), SEQ ID NO:35 or 36 (from the heavy and light chain, respectively, of murine J415; see Figures 5 and 6), SEQ ID NO:109 or 114 (from the heavy and light chain, respectively, of murine J533; see Figures 9A and 10A), or SEQ ID NO:119 or 124 (from the heavy and light chain, respectively, of murine E99; see Figures 11A and 12A), or the framework of a murine antibody described herein (e.g., a murine J591, J415, J533, or E99 antibody produced by a hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126, HB-12109, HB-12127 or HB-12101);
- iv a light or heavy chain variable framework, which has at least 60%, 65%, 70%, 72%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identity with, or which has an amino acid sequence which differs by at least 1, 2, 5, or more residues, but less than 10, 20, 30 or 40 residues from, the sequence of the framework of a light or heavy chain variable region of a non-human antibody, e.g., a murine antibody (e.g., an anti-PSMA antibody having the framework amino acid sequence shown in SEQ ID NO:7 or 8 (from the heavy and light chain, respectively, of murine J591; see Figures 1A and 1B), SEQ ID NO:35 or 36 (from the heavy and light chain, respectively, of murine J415; see Figures 5 and 6), SEQ ID NO:109 or 114 (from the heavy and light chain, respectively,

WO 02/098897

PCT/US02/17068

of murine J533; see Figures 9A and 10A), or SEQ ID NO:119 or 124 (from the heavy and light chain, respectively, of murine E99; see Figures 11A and 12A)), or the framework of a murine antibody described herein (e.g., a murine antibody produced by a hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126, HB-12109, HB-12127 or HB-12101); or

v a non-human, e.g., a murine, e.g., a J591 or J415, light or heavy chain variable region framework which has at least 5 amino acid replacements.

[0022] In some embodiments, the light chain variable region of the non-human anti-PSMA antibody or antigen-binding fragment thereof has at least one, two, three and preferably four amino acid sequences chosen from SEQ ID NO:13, 14, 15, and 16 (corresponding to deimmunized J591 light chain FR's 1-4; see Figure 2B) or SEQ ID NO:41, 42, 43, and 44 (corresponding to deimmunized J415 light chain (J415DIVK5) FR's 1-4; see Figure 6), or at least one, two, three and preferably four light chain framework regions from the antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174. In other embodiments, the heavy chain variable region of the non-human anti-PSMA antibody or antigen binding portion thereof has at least one, two, three, and preferably four amino acid sequences chosen from SEQ ID NO:9, 10, 11, and 12 (corresponding to deimmunized J591 heavy chain FR's 1-4; see Figure 2A) or SEQ ID NO:37, 38, 39, and 40 (corresponding to deimmunized J415 heavy chain (J415DIVH4) FR's 1-4; see Figure 5), or at least one, two, three and preferably four heavy chain framework regions of the antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174. In other embodiments, the heavy or light chain framework has an amino acid sequence which has at least 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% or more identity with SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:18, respectively (corresponding to deimmunized J591 framework sequence; see Figures 2A-2B), SEQ ID NO:45 or SEQ ID NO:46, respectively (corresponding to deimmunized J415 framework sequences J415DIVH4 and J415DIVK5; see Figures 5 or 6), or with the heavy or light chain framework sequence of an antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174. In still other embodiments, the heavy or light chain framework has an amino acid sequence which differs by at least 1, 2, 5, or more residues, but less than 10, 20, 30, or 40 residues, from the amino acid sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:18, respectively, SEQ ID NO:45 or SEQ ID NO:46, respectively, or the heavy or light chain framework sequence of the antibody produced by the

WO 02/098897

PCT/US02/17068

cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174. Preferably, the heavy or light chain framework region includes the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:18, respectively, SEQ ID NO:45 or SEQ ID NO:46, respectively, or the heavy or light chain framework sequence of the antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174.

[0023] In other embodiments, the heavy or light chain variable region of the modified anti-PSMA antibody has an amino acid sequence which has at least 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% or more identity with SEQ ID NO:21 or SEQ ID NO:22, respectively (corresponding to the heavy and light chain variable regions of deimmunized J591; see Figures 2A-2B), SEQ ID NO:49 or SEQ ID NO:50, respectively (corresponding to the heavy and light chain variable regions of deimmunized J415, J415DIVH4 and J415DIVK5; see Figures 5 or 6), or the heavy or light chain variable region sequence of the antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174. In other embodiments, the heavy or light chain variable region of the modified anti-PSMA antibody has an amino acid sequence that differs by at least 1, 2, 5, or more residues, but less than 10, 20, 30, or 40 residues, from the amino acid sequence of SEQ ID NO:21 or SEQ ID NO:22, respectively, SEQ ID NO:49 or SEQ ID NO:50, respectively, or the heavy or light chain variable region sequence of the antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174. Preferably, the light or heavy chain variable region includes the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:21 or SEQ ID NO:22, respectively, SEQ ID NO:49 or SEQ ID NO:50, respectively, or the heavy or light chain variable region sequence of the antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174.

[0024] Preferred modified anti-PSMA antibodies include at least one, preferably two, light chain variable regions and at least one, preferably two, heavy chain variable regions having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:21 and SEQ ID NO:22, respectively (corresponding to the heavy and light chain variable regions of deimmunized J591; see Figures 2A-2B), SEQ ID NO:49 and SEQ ID NO:50, respectively (corresponding to the heavy and light chain variable regions of deimmunized J415, J415DIVH4 and J415DIVK5; see Figures 5 and 6), or at least one, preferably two, modified light chain variable region sequences and at least one, preferably two, heavy chain variable region sequences of the antibody produced by the cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[0025] In other embodiments, the light or heavy chain variable framework of the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, fifteen, sixteen, or seventeen amino acid residues from a human light or heavy chain variable framework, e.g., a light or heavy chain variable framework residue from a mature human antibody, a human germline antibody sequence, or a consensus antibody sequence.

[0026] In some embodiments, the amino acid residue from the human light chain variable framework is the same as the residue found at the same position in a human germline antibody sequence. Preferably, the amino acid residue from the human light chain variable framework is the most common residue at the same position in the human germline antibody sequence. Preferably, the light chain variable framework of the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, has at least one, two, three, five, seven, ten amino acid residues which differ from the framework of the non-human anti-PSMA light chain variable region (e.g., the murine J591 light chain variable region), or which is from a human light chain variable framework (e.g., a human germline, mature, or consensus framework sequence), at a position selected from the group consisting of: residue 8, 9, 10, 11, 20, 22, 60, 63, 76, 77, 78, 80, 83, 87, 103, 104 and 106 (Kabat numbering as shown in Table 2). Preferably, the light chain variable framework of the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, has at least one, two, three, five, seven, or ten amino acid residues from the human light chain variable framework selected from the group consisting of: residue 8 (proline), 9 (serine), 10 (serine), 11 (leucine), 20 (threonine), 22 (threonine), 60 (serine), 63 (serine), 76 (serine), 77 (serine), 78 (leucine), 80 (proline), 83 (phenylalanine), 87 (tyrosine), 103 (lysine), 104 (valine) and 106 (isoleucine) (Kabat numbering as shown in Table 2).

[0027] The amino acid replacements in the deimmunized J591 light chain variable region are provided below in Table 2. The left panel indicates the amino acid number according to Kabat, E.A., *et al.* (1991) *supra*; the middle panel indicates the replacements of the residue in the mouse sequence and the corresponding mouse residues; and the right panel indicates the most common residue in the corresponding position in the human germline.

Table 2

Position Kabat No	Substitution of mouse sequence	Most common in human germline

WO 02/098897

PCT/US02/17068

3	V→Q	V
8	H→P	P
9	K→S	S
10	F→S	S
11	M→L	L
20	S→T	T
21	I→L	I
22	L→T	T
42	Q→P	K
58	V→I	V
60	D→S	S
63	T→S	S
76	T→S	S
77	T→S	S
78	V→L	L
80	S→P	P
83	L→F	F
87	F→Y	Y
100	A→P	Q
103	M→K	K
104	L→V	V
106	L→I	I

[0028] In other embodiments, the light chain variable framework of the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, has at least one, two, three, five, or seven amino acid residues which differ from the framework of a non-human anti-PSMA light chain variable region (e.g., the murine J415 light chain variable region), or which is from a human light chain variable framework (e.g., a human germline, mature, or consensus framework), at a position selected from the group consisting of: residue 13, 15, 19, 41, 63, 68, and 80 (linear numbering as shown in Figure 6). Preferably, the light chain variable framework of the modified antibody, or antigen-binding fragment thereof, has at least one, two, three, five, or seven amino acid residues from the human consensus light chain variable framework selected from the group consisting of: residue 13 (alanine), 15 (alanine), 19 (methionine), 41 (threonine), 63 (serine), 68 (glycine), and 80 (alanine) (linear numbering as shown in Figure 6).

[0029] The amino acid replacements in the deimmunized J415 light chain variable region are provided below in Table 3. The left panel indicates the amino acid number using linear numbering; the middle panel indicates the replacements of the residue in the mouse sequence and

WO 02/098897

PCT/US02/17068

the corresponding mouse residues; and the right panel indicates the most common residue in the corresponding position in the human germline.

Table 3

Position Linear No	Substitution of mouse sequence	Most common in human germline
13	I→A	A
15	V→A	A
19	V→M	M
41	E→T	T
63	T→S	S
68	A→G	G
80	T→A	A

[0030] In other embodiments, the light chain variable framework of the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes at least 5, but no more than 80, amino acid residues from the light chain variable framework shown in SEQ ID NO:8 (from murine J591; see Figure 1B), SEQ ID NO:36 (from murine J415; see Figure 6), SEQ ID NO:114 (from murine J533; see Figure 10A), or SEQ ID NO:124 (from murine E99; see Figure 12A), or the light chain variable framework of an antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126, HB-12109, HB-12127 or HB-12101. Preferably, the light chain variable framework has at least 60%, 65%, 70%, 72%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 94% identity with, or differs by at least 5, 7, 10, 20, or 30 but less than 10, 20, 30, or 40 amino acid residues from, the non-human light chain variable framework, e.g., the murine J591 or J415 light chain variable framework shown in SEQ ID NO:8 or SEQ ID NO:36, respectively, or the light chain variable framework of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126 or HB-12109. In other embodiments, the light chain variable framework is from murine J591 antibody (SEQ ID NO:8; see Figure 1B), from murine J415 antibody (SEQ ID NO:36; see Figure 6), from murine J533 antibody (SEQ ID NO:114; see Figure 10A), or from murine E99 antibody (SEQ ID NO:124; see Figure 12A), or the light chain variable framework of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126, HB-12109, HB-12127 or HB-12101.

[0031] In yet other embodiments, the light chain variable framework of the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes a non-human (e.g., a murine)

WO 02/098897

PCT/US02/17068

light chain variable framework (e.g., a murine J591 light chain variable framework as shown in SEQ ID NO:8 or the light chain variable framework of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126) which has at least 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, or 23 amino acid replacements. In one embodiment, the non-human light chain variable framework includes one or more of:

- a framework region 1 having at least 5, 6, 7, or 8 replacements;
- a framework region 2 having at least one replacement;
- a framework region 3 having at least 5, 6, 7, 8, or 9 replacements; or
- a framework region 4 having at least 2, 3 or 4 replacements.

[0032] In yet other embodiments, the light chain variable framework of the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes a non-human (e.g., a murine) light chain variable framework (e.g., a murine J415 light chain variable framework as shown in SEQ ID NO:36 or the light chain variable framework of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12109) which has at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, or 10 amino acid replacements. In some embodiments, the non-human light chain variable framework includes one or more of:

- a framework region 1 having at least 1, 2 or 3 replacements;
- a framework region 2 having at least one replacement; or
- a framework region 3 having at least 1, 2 or 3 replacements.

[0033] The replacement can be selected from: a conservative substitution of a non-human residue, or a residue found in a human germline, mature or consensus framework sequence at the same position, e.g. the most common residue in the human germline sequence at the same position. In some embodiments, the light chain variable framework has at least 3, 4 and preferably 5 conservative substitutions. In other embodiments, the light chain variable framework has at least 5, 7, 10, 15, 16, or 17 amino acid replacements wherein the replacement amino acid residue is the most common residue in the human germline framework sequence at the same position.

[0034] In some embodiments, the non-human light chain variable framework has at least one, two, three, five, seven, ten, eleven, fifteen, sixteen, seventeen, nineteen, twenty, twenty-one or twenty-two amino acid replacements at a position selected from the group consisting of: residue 3, 8, 9, 10, 11, 20, 21, 22, 42, 58, 60, 63, 76, 77, 78, 80, 83, 87, 100, 103, 104 and 106

WO 02/098897

PCT/US02/17068

(Kabat numbering as shown in Table 2). The replacement can be chosen from one or more of: residue 3 (glutamine), 8 (proline), 9 (serine), 10 (serine), 11 (leucine), 20 (threonine), 21 (leucine), 22 (threonine), 42 (proline), 58 (isoleucine), 60 (serine), 63 (serine), 76 (serine), 77 (serine), 78 (leucine), 80 (proline), 83 (phenylalanine), 87 (tyrosine), 100 (proline), 103 (lysine), 104 (valine) and 106 (isoleucine) (Kabat numbering as shown in Table 2).

[0035] In other embodiments, the non-human light chain variable framework has at least one, two, three, five, or seven amino acid replacements at a position selected from the group consisting of: residue 13, 15, 19, 41, 63, 68 and 80 (linear numbering as shown in Table 3). Preferably, the light chain variable framework of the modified antibody, or antigen-binding fragment thereof, has at least one, two, three, five, seven amino acid residues from the human consensus light chain variable framework selected from the group consisting of: residue 13 (alanine), 15 (alanine), 19 (methionine), 41 (threonine), 63 (serine), 68 (glycine) and 80 (alanine) (linear numbering as shown in Table 3).

[0036] Preferably, the heavy chain variable framework of the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, has at least one, two, three, five, seven, or eight amino acid residues, which differ from the framework of the non-human anti-PSMA heavy chain variable region (e.g., the murine J591 heavy chain variable region), or which is from a human heavy chain variable framework (e.g., a human germline framework), at a position selected from the group consisting of: residue 5, 40, 41, 44, 82a, 83, 87, and 108 (Kabat numbering as shown in Table 4). Preferably, the heavy chain variable framework of the recombinant antibody, or antigen-binding fragment thereof, has at least one amino acid residue from the human heavy chain variable framework selected from the group consisting of: residue 5 (valine), 40 (alanine), 41 (proline), 44 (glycine), 82a (serine), 83 (arginine), 87 (threonine), or 108 (leucine) (Kabat numbering as shown in Table 4).

[0037] The amino acid replacements in the deimmunized J591 heavy chain variable region are provided below in Table 4. The left panel indicates the amino acid number according to Kabat, E.A., et al. (1991) supra; the middle panel indicates the replacements of the residue in the mouse sequence and the corresponding mouse residues; and the right panel indicates the most common residue in the corresponding position in the human germline.

Table 4

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Position Kabat No.	Substitution of mouse sequence	Most common in human germline
5	Q→V	V
11	L→V	L
12	V→K	V
16	T→A	G
17	S→I	S
19	R→K	R
40	S→A	A
41	H→P	P
44	S→G	G
75	S→T	K
76	S→D	N
82a	R→S	S
83	T→R	R
87	S→T	T
108	T→L	L

[0038] In other embodiments, the heavy chain variable framework of the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, has at least one, two, three, four, five amino acid residues, which differ from the framework of a non-human anti-PSMA heavy chain variable region (e.g., the murine J415 heavy chain variable region), or which is from a human heavy chain variable framework (e.g., a human mature, consensus, or germline framework), at a position selected from the group consisting of: residue 20, 87, 94, 95, and 112 (linear numbering as shown in Table 5). Preferably, the heavy chain variable framework of the recombinant antibody, or antigen-binding fragment thereof, has at least one, two, three, four, five amino acid residues from the human heavy chain variable framework selected from the group consisting of: residue 20 (isoleucine), 87 (serine), 94 (alanine), 95 (valine), and 112 (valine) (linear numbering as shown in Table 5).

[0039] The amino acid replacements in the deimmunized J415 heavy chain variable region are provided below in Table 5. The left panel indicates the linear amino acid number; the middle panel indicates the replacements of the residue in the mouse sequence and the corresponding mouse residues; and the right panel indicates the most common residue in the corresponding position in the human germline.

Table 5

Position	Substitution	Most common in

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Kabat No	of mouse sequence	human germline
20	L→I	I
87	N→S	S
94	G→A	A
95	L→V	V
112	L→V	V

[0040] In other embodiments, the heavy chain variable framework of the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes at least 5 but no more than 75 or 82 amino acid residues from the heavy chain variable framework shown in SEQ ID NO:7 (from murine J591; see Figure 1A), SEQ ID NO:35 (from murine J415; see Figure 5), SEQ ID NO:109 (from murine J533; see Figure 9A), or SEQ ID NO:119 (from murine E99; see Figure 11A), or the heavy chain variable framework of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126, HB-12109, HB-12127 or HB-12101. Preferably, the heavy chain variable framework has at least 60%, 65%, 70%, 80%, 82%, 85%, 90%, or 94% identity with, or differs by at least 5, 10, 20, or 30 but less than 10, 20, 30, or 40 residues from, a non-human heavy chain variable framework, e.g., the murine J591 or J415 or heavy chain variable framework shown in SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:35, respectively, or a heavy chain variable framework of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126 or 12109. In other embodiments, the non-human heavy chain variable framework is from murine J591 antibody (SEQ ID NO:7; see Figure 1A), from murine J415 antibody (SEQ ID NO:35; see Figure 5), from murine J533 antibody (SEQ ID NO:109; see Figure 9A), or from murine E99 antibody (SEQ ID NO:119; see Figure 11A), or the heavy chain variable framework of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126, HB-12109, HB-12127 or HB-12101.

[0041] In yet other embodiments, the heavy chain variable framework of the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes a non-human (e.g., a murine) heavy chain variable framework (e.g., a murine J591 heavy chain variable framework (SEQ ID NO:7, as shown Figure 1A, or the heavy chain variable framework of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126) which has at least 3, 5, 10, 15, 16, 17, 18, or 19 amino acid replacements. In one embodiment, the non-human heavy chain variable framework of the modified anti-PSMA antibody includes one or more of:

a framework region 1 having at least 4, 5, or 6 replacements;

WO 02/098897

PCT/US02/17068

a framework region 2 having at least 1, 2, or 3 replacements;
 a framework region 3 having at least 3, 4, or 5 replacements; or
 a framework region 4 having at least one replacement.

[0042] In yet other embodiments, the heavy chain variable framework of the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes a non-human (e.g., a murine) heavy chain variable framework (e.g., a murine J415 heavy chain variable framework (SEQ ID NO:35, as shown in Figure 5, or the heavy chain variable framework of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12109) which has at least 1, 2, 3, 4, or 5 amino acid replacements. In one embodiment, the non-human heavy chain variable framework of the modified anti-PSMA antibody includes one or more of:

a framework region 1 having at least one replacement;
 a framework region 3 having at least 1, 2, or 3 replacements; or
 a framework region 4 having at least one replacement.

[0043] The replacement can be chosen from: a conservative substitution of a non-human residue, or a residue found in a human germline, mature or consensus sequence at the same position, e.g. the most common residue in the human germline at the same position. In one embodiment, the heavy chain variable framework has at least 3, 4, 5, 6 and preferably 7 conservative substitutions. Preferably, the heavy chain variable framework has at least 5, 6, 7 and preferably 8 replacements by the most common residue in the human germline at the same position.

[0044] In some embodiments, the non-human heavy chain variable framework has at least one amino acid replacement at a position selected from the group consisting of: residue 5, 11, 12, 16, 17, 19, 40, 41, 44, 75, 76, 82a, 83, 87, and 108 (Kabat numbering as shown in Table 3). The replacement can be chosen from one or more of: 5 (valine), 11 (valine), 12 (lysine), 16 (alanine), 17 (threonine), 19 (lysine), 40 (alanine), 41 (proline), 44 (glycine), 75 (threonine), 76 (aspartate), 82a (serine), 83 (arginine), 87 (threonine), and 108 (leucine) (Kabat numbering as shown in Table 4).

[0045] In other embodiments, the non-human heavy chain variable framework has at least one amino acid replacement at a position selected from the group consisting of: residue 20, 87, 94, 95 and 112 (linear numbering as shown in Table 5). The replacement can be chosen from

WO 02/098897

PCT/US02/17068

one or more of: residue 20 (isoleucine), 87 (serine), 94 (alanine), 95 (valine), and 112 (valine) (linear numbering as shown in Table 5).

[0046] The amino acid sequence of the framework regions of the light and heavy chains regions of antibodies J591, J415, J533 and E99 are provided in Table 6, below.

Table 6: Framework Sequences

NAME	Organism	FIG.	SEQ ID NO:	SEQUENCE
V _H FR1-FR4 J591	Mus musculus	Fig. 1A	7	EVQLQQSGPELKKPGTSVRISCK TSWVKQSHGKSLEWIGKATLT DKSSSTAYMELRSLTSEDSAVY YCAAWGQGTTTLTVSS
V _L FR1-FR4 J591	Mus musculus	Fig. 1B	8	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC WYQQKPGQSPKLLIYGVPDRFT GSGSGTDFTLTITNVQSEDLADY FCFGAGTMLDLK
V _H FR1 (Deimm) J591	Artificial - deimmunized heavy chain J591	Fig. 2A	9	EVQLVQSGPEVKKPGATVKISC KTS
V _H FR2 (Deimm) J591	Artificial - deimmunized heavy chain J591	Fig. 2A	10	WVKQAPGKGLEWIG
V _H FR3 (Deimm) J591	Artificial - deimmunized heavy chain J591	Fig. 2A	11	KATLTVDKSTDTAYMELSSLRS EDTAVYYCAA
V _H FR4 (Deimm) J591	Artificial - deimmunized heavy chain J591	Fig. 2A	12	WGQGTLTLTVSS
V _L FR1 (Deimm) J591	Artificial - deimmunized light chain J591	Fig. 2B	13	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLC
V _L FR2 (Deimm) J591	Artificial - deimmunized light chain J591	Fig. 2B	14	WYQQKPGSPKLLIY
V _L FR3 (Deimm) J591	Artificial - deimmunized light chain J591	Fig. 2B	15	GIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFADYYC

WO 02/098897

PCT/US02/17068

V _L FR4 (Deimm) J591	Artificial - deimmunized light chain J591	Fig. 2B	16	FGPGTKVDIK
V _H FR1-FR4 (Deimm) J591	Artificial - deimmunized heavy chain J591	Fig. 2A	17	EVQLVQSGPEVKKPGATVKISC KTSWVKQAPGKLEWIGKATLT VDKSTDTAYMELSSLRSEDTAV YYCAAWGQGTLTVSS
V _L FR1-FR4 (Deimm) J591	Artificial - deimmunized light chain J591	Fig. 2B	18	DIQMTQSPSSLSVSGDRVTLTC WYQQKPGPSPKLLIYGIPSRFSGS GSGIDFILTISLQPEDFADYYC FGPGTKVDIK
V _H FR1-FR4 J415	Mus musculus	Fig. 5	35	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLS VASWVRQSPKGLWVAVRVIIS RDDSKSSVYLQMNRLRAEDTGI YYCTRWGQGTTLTVSS
V _L FR1-FR4 J415	Mus musculus	Fig. 6	36	NIVMTQFPKSMISVGERVTLTC WYQQKPEQSPKMLIYGVPDRFT GSGSATDFILTISVQTEDLV DY YCFGGGTKLEMK
V _H FR1 (Deimm) J415-4	Artificial - deimmunized heavy chain J415-4	Fig. 5	37	EVKLEESGGGLVQPGGSMKISC VAS
V _H FR2 (Deimm) J415-4	Artificial - deimmunized heavy chain J415-4	Fig. 5	38	WVRQSPKGLWVA
V _H FR3 (Deimm) J415-4	Artificial - deimmunized heavy chain J415-4	Fig. 5	39	RVISRDSDSKSSVYLQMNRLRAE DTAVYYCTR
V _H FR4 (Deimm) J415-4	Artificial - deimmunized heavy chain J415-4	Fig. 5	40	WGQGTITVTVSS
V _L FR1 (Deimm) J415-5	Artificial - deimmunized light chain J415-5	Fig. 6	41	NIVMTQFPKSMASAGERMTLT C
V _L FR2 (Deimm) J415-5	Artificial - deimmunized light chain J415-5	Fig. 6	42	WYQQKPTQSPKMLIY
V _L FR3 (Deimm) J415-5	Artificial - deimmunized light chain J415-5	Fig. 6	43	GVPDRFSGSGGTDFILTISVQA EDLVYYC

WO 02/098897

PCT/US02/17068

V _L FR4 (Deimm) J415-5	Artificial - deimmunized light chain J415-5	Fig. 6	44	FGGGTKLEMK
V _H FR1-FR4 (Deimm) J415-4	Artificial - deimmunized heavy chain J415-4	Fig. 5	45	EVKLEESGGGLVQPGGSMKISC VASWVRQSPKGLEWVARVVIS RDDSKSSVYLQMNSLRAEDTAV YYCTRWGQGTTVTVSS
V _L FR1-FR4 (Deimm) J415-5	Artificial - deimmunized light chain J415-5	Fig. 6	46	NIVMTQFPKSMASAGERMTLT CWYQQKPTQSPKMLIYGVPRF SGSGSGTDFLTISVQAEDLVY YCFGGGTKLEMK
V _H FR1 J533	Mus musculus	Fig. 9A	105	EVQLQSQGPPELVKPGASVKMSC KAS
V _H FR2 J533	Mus musculus	Fig. 9A	106	WVKQKPGQVLEWIG
V _H FR3 J533	Mus musculus	Fig. 9A	107	KATLTSDKYSSTAYMELSGLTSE DSAVYYCAR
V _H FR4 J533	Mus musculus	Fig. 9A	108	WGRGATLTVSS
V _H FR1-FR4 J533	Mus musculus	Fig. 9A	109	EVQLQSQGPPELVKPGASVKMSC KASWVKQKPGQVLEWIGKATLT SDKYSSTAYMELSGLTSEDSAV YYCARWGRGATLTVSS
V _L FR1 J533	Mus musculus	Fig. 10A	110	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC
V _L FR2 J533	Mus musculus	Fig. 10A	111	WYQQKPGQPPNLLIF
V _L FR3 J533	Mus musculus	Fig. 10A	112	GIPARFSGSGCTDFLTITYPVEA DDVATYYC
V _L FR4 J533	Mus musculus	Fig. 10A	113	FGGGTKLEIK

WO 02/098897

PCT/US02/17068

V _L FR1-FR4 J533	Mus musculus	Fig. 10A	114	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC WYQKPGQPPNLLIFGIPARFSG SGSGTDFLTITYPVEADDVATYY CFGGGTKLEIK
V _H FR1 E99	Mus musculus	Fig. 11A	115	QVQLKESGPGLVASSQSLSTICT VS
V _H FR2 E99	Mus musculus	Fig. 11A	116	WVRQPPGKGLEWLG
V _L FR3 E99	Mus musculus	Fig. 11A	117	RLNIFKDNSKNQVFLKMSSFQTD DTARYFCAR
V _H FR4 E99	Mus musculus	Fig. 11A	118	WGQGTTLTVSS
V _H FR1-FR4 E99	Mus musculus	Fig. 11A	119	QVQLKESGPGLVASSQSLSTICT VSWVRQPPGKGLEWLGRLNIFK DNSKNQVFLKMSSFQTDITARY FCARWGQGTTLTVSS
V _L FR1 E99	Mus musculus	Fig. 12A	120	NIVMTQSQKFMSTSPGDRVRVT C
V _L FR2 E99	Mus musculus	Fig. 12A	121	WYQAKPGQSPRILY
V _L FR3 E99	Mus musculus	Fig. 12A	122	GVPDRFTAYGSGTDFLTITNVQ SEDLTEYFC
V _L FR4 E99	Mus musculus	Fig. 12A	123	FGAGTKLELK
V _L FR1-FR4 E99	Mus musculus	Fig. 12A	124	NIVMTQSQKFMSTSPGDRVRVT CWYQAKPGQSPRILYGVDRFT AYGSGTDFLTITNVQSEDLTEY FCFGAGTKLELK

[0047] In other embodiments, the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes at least one light chain or heavy chain immunoglobulin or, preferably, at least one light chain immunoglobulin and at least one heavy chain immunoglobulin. Preferably, the light chain

WO 02/098897

PCT/US02/17068

immunoglobulin includes a non-human light chain variable region comprising three CDRs from a non-human, e.g., murine, anti-PSMA light chain variable region (e.g., the murine J591 or J415 light chain variable region shown in SEQ ID NO:20 (see Figure 1B) or SEQ ID NO:48 (see Figure 6), respectively, or the light chain variable region of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126 or 12109) and a light chain framework which differs from the framework of the non-human, e.g., murine, anti-PSMA light chain framework (e.g., the murine J591 or J415 light chain framework shown in SEQ ID NO:8 (see Figure 1B) or SEQ ID NO:36 (see Figure 6), respectively, or the light chain variable framework of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126 or 12109) at one, two, three, four, five, six, seven or more positions selected from the group consisting of: residue 3, 8, 9, 10, 11, 20, 21, 22, 42, 58, 60, 63, 76, 77, 78, 80, 83, 87, 100, 103, 104 and 106 (Kabat numbering as in Table 2), or residues 13, 15, 19, 41, 63, 68, and 80 (linear numbering as in Table 3).

[0048] In other preferred embodiments, the heavy chain immunoglobulin includes a non-human heavy chain variable region comprising three complementarity determining regions (CDRs) from a non-human, e.g., murine, anti-PSMA heavy chain variable region (e.g., the murine J591 or J415 heavy chain variable region shown in SEQ ID NO:19 (see Figure 1A) or SEQ ID NO:47 (see Figure 5), respectively, or the heavy chain variable region of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126 or HB-12109) and a modified heavy chain framework which differs from the framework of the non-human, e.g., murine, anti-PSMA heavy chain framework (e.g., the murine J591 or J415 heavy chain framework shown in SEQ ID NO:7 (see Figure 1A) or SEQ ID NO:35 (see Figure 5), respectively, or the heavy chain variable framework of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126 or HB-12109) at one, two, three, four, five or more positions selected from the group consisting of: residue 5, 11, 12, 16, 17, 19, 40, 41, 44, 75, 76, 82a, 83, 87, and 108 (Kabat numbering as in Table 4), or residue 20, 87, 94, 95 and 112 (linear numbering as in Table 5).

[0049] In yet other embodiments, the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes at least one light or heavy chain immunoglobulin or, more preferably, at least one light chain immunoglobulin and at least one heavy chain immunoglobulin. Preferably, the light chain immunoglobulin includes a modified non-human light chain variable region

WO 02/098897

PCT/US02/17068

comprising three CDRs from a non-human, e.g., murine, anti-PSMA light chain variable region (e.g., the murine J591 light chain variable region shown in SEQ ID NO:20 (see Figure 1B), or the light chain variable region of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126) and a modified light chain framework which differs from the framework of the non-human anti-PSMA light chain variable region, e.g., the murine J591 light chain variable region (SEQ ID NO:20 or the light chain variable region of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126), by at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten positions selected from the group consisting of:

a position within or adjacent to one or more of residues 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 or 13, or a T cell epitope which includes one or more of residues 1-13 (numbering as in Figure 3B);

a position within or adjacent to one or more of residues 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20, or a T cell epitope which includes one or more of residues 8-20 (numbering as in Figure 3B);

a position within or adjacent to one or more of residues 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 or 29, or a T cell epitope which includes one or more of residues 17-29 (numbering as in Figure 3B);

a position within or adjacent to one or more of residues 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 or 39, or a T cell epitope which includes one or more of residues 27-39 (numbering as in Figure 3B);

a position within or adjacent to one or more of residues 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 or 43, or a T cell epitope which includes one or more of residues 30-43 (numbering as in Figure 3B);

a position within or adjacent to one or more of residues 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, or 57, or a T cell epitope which includes one or more of residues 45- 57 (numbering as in Figure 3B);

a position within or adjacent to one or more of residues 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, or 68, or a T cell epitope which includes one or more of residues 56-68 (numbering as in Figure 3B);

WO 02/098897

PCT/US02/17068

a position within or adjacent to one or more of residues 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, or 83, or a T cell epitope which includes one or more of residues 71- 83 (numbering as in Figure 3B);

a position within or adjacent to one or more of residues 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 or 85, or a T cell epitope which includes one or more of residues 73-85 (numbering as in Figure 3B); and

a position within or adjacent to one or more of residues 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, or 106, or a T cell epitope which includes one or more of residues 94-106 (numbering as in Figure 3B).

[0050] In yet other embodiments, the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes at least one light or heavy chain immunoglobulin or, more preferably, at least one light chain immunoglobulin and at least one modified heavy chain immunoglobulin. Preferably, the light chain immunoglobulin includes a modified non-human light chain variable region comprising three CDRs from a non-human, e.g., murine, anti-PSMA light chain variable region (e.g., the murine J415 light chain variable region shown in SEQ ID NO:48 (Figure 37), or the light chain variable region of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12109) and a light chain framework which differs from the framework of the non-human anti-PSMA light chain variable region, e.g., the murine J415 light chain variable region (SEQ ID NO:48 or the light chain variable region of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12109), by at least one, two, three, four, five, six, seven positions selected from the group consisting of:

a position within or adjacent to one or more of residues 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 or 18, or a T cell epitope which includes one or more of residues 5-18 (linear numbering as in Figure 6);

a position within or adjacent to one or more of residues 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, or 24, or a T cell epitope which includes one or more of residues residues 11-24 (linear numbering as in Figure 6);

a position within or adjacent to one or more of residues 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, or 26, or a T cell epitope which includes one or more of residues 13-26 (linear numbering as in Figure 6);

WO 02/098897

PCT/US02/17068

a position within or adjacent to one or more of residues 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, or 30, or a T cell epitope which includes one or more of residues 17-30 (linear numbering as in Figure 6);

a position within or adjacent to one or more of residues 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, or 40, or a T cell epitope which includes one or more of residues 27-40 (linear numbering as in Figure 6);

a position within or adjacent to one or more of residues 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, or 44, or a T cell epitope which includes one or more of residues 31-44 (linear numbering as in Figure 6);

a position within or adjacent to one or more of residues 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, or 69, or a T cell epitope which includes one or more of residues 56-69 (linear numbering as in Figure 6);

a position within or adjacent to one or more of residues 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, or 73, or a T cell epitope which includes one or more of residues 60-73 (linear numbering as in Figure 6);

a position within or adjacent to one or more of residues 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, or 83, or a T cell epitope which includes one or more of residues 70-83 (linear numbering as in Figure 6);

a position within or adjacent to one or more of residues 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 or 84, or a T cell epitope which includes one or more of residues 71-84 (linear numbering as in Figure 6);

a position within or adjacent to one or more of residues 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 or 86, or a T cell epitope which includes one or more of residues 73-86 (linear numbering as in Figure 6);

a position within or adjacent to one or more of residues 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, or 92, or a T cell epitope which includes one or more of residues 76-92 (linear numbering as in Figure 6); and

a position within or adjacent to one or more of residues 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, or 94, or a T cell epitope which includes one or more of residues 81-94 (linear numbering as in Figure 6).

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[0051] In other embodiments, the heavy chain immunoglobulin of the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes a non-human heavy chain variable region comprising three CDRs from a non-human, e.g., murine, anti-PSMA heavy chain variable region (e.g., the murine J591 heavy chain variable region shown in SEQ ID NO:19 (see Figure 1A), or the heavy chain variable region of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126) and a heavy chain framework which differs from the framework of the non-human anti-PSMA heavy chain variable region (e.g., the murine J591 heavy chain variable region of SEQ ID NO:19 or the heavy chain variable framework of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126), by at least one, two, three, five, seven, ten positions selected from the group consisting of:

a position within or adjacent to one or more of residues 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, or 14, or a T cell epitope which includes one or more of residues 2-14 (numbering as in Figure 3A);

a position within or adjacent to one or more of residues 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, or 22, or a T cell epitope which includes one or more of residues 10-22 (numbering as in Figure 3A);

a position within or adjacent to one or more of residues 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, or 28, or a T cell epitope which includes one or more of residues 16-28 (numbering as in Figure 3A);

a position within or adjacent to one or more of residues 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, or 42, or a T cell epitope which includes one or more of residues 30-42 (numbering as in Figure 3A);

a position within or adjacent to one or more of residues 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, or 44, or a T cell epitope which includes one or more of residues 32-44 (numbering as in Figure 3A);

a position within or adjacent to one or more of residues 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, or 55, or a T cell epitope which includes one or more of residues 43-55 (numbering as in Figure 3A);

a position within or adjacent to one or more of residues 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, or 58, or a T cell epitope which includes one or more of residues 46-58 (numbering as in Figure 3A);

WO 02/098897

PCT/US02/17068

a position within or adjacent to one or more of residues 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, or 70, or a T cell epitope which includes one or more of residues 58-70 (numbering as in Figure 3A);

a position within or adjacent to one or more of residues 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 or 74, or a T cell epitope which includes one or more of residues 62-74 (numbering as in Figure 3A);

a position within or adjacent to one or more of residues 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 or 81, or a T cell epitope which includes one or more of residues 70-81 (numbering as in Figure 3A);

a position within or adjacent to one or more of residues 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, or 93, or a T cell epitope which includes one or more of residues 81-93 (numbering as in Figure 3A);

a position within or adjacent to one or more of residues 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 95, or 96, or a T cell epitope which includes one or more of residues 84-96 (numbering as in Figure 3A);

a position within or adjacent to one or more of residues 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, or 103, or a T cell epitope which includes one or more of residues 91- 103 (numbering as in Figure 3A); and

a position within or adjacent to one or more of residues 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, or 112, or a T cell epitope which includes one or more of residues 100-112 (numbering as in Figure 3A).

[0052] In other embodiments, the heavy chain immunoglobulin of the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes a non-human heavy chain variable region comprising three CDRs from a non-human, e.g., murine, anti-PSMA heavy chain variable region (e.g., the murine J415 heavy chain variable region shown in SEQ ID NO:47 (see Figure 5), or the heavy chain variable region of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12109) and a heavy chain framework which differs from the framework of the non-human anti-PSMA heavy chain variable region, e.g., the murine J591 heavy chain variable region of SEQ ID NO:47 or the heavy chain variable framework of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12109), by at least one, two, three, four, five positions selected from the group consisting of:

WO 02/098897

PCT/US02/17068

a position within or adjacent to one or more of residues 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 or 23, or a T cell epitope which includes one or more of residues 10-23 (numbering as in Figure 5);

a position within or adjacent to one or more of residues 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, or 29, or a T cell epitope which includes one or more of residues 16-29 (numbering as in Figure 5);

a position within or adjacent to one or more of residues 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, or 34, or a T cell epitope which includes one or more of residues 21-34 (numbering as in Figure 5);

a position within or adjacent to one or more of residues 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, or 43, or a T cell epitope which includes one or more of residues 30-43 (numbering as in Figure 5);

a position within or adjacent to one or more of residues 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, or 48, or a T cell epitope which includes one or more of residues 35-48 (numbering as in Figure 5);

a position within or adjacent to one or more of residues 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, or 56, or a T cell epitope which includes one or more of residues 43-56 (numbering as in Figure 5);

a position within or adjacent to one or more of residues 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 or 59, or a T cell epitope which includes one or more of residues 46-59 (numbering as in Figure 5);

a position within or adjacent to one or more of residues 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, or 62, or a T cell epitope which includes one or more of residues 49-62 (numbering as in Figure 5);

a position within or adjacent to one or more of residues 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, or 77, or a T cell epitope which includes one or more of residues 64-77 (numbering as in Figure 5);

a position within or adjacent to one or more of residues 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, or 93, or a T cell epitope which includes one or more of residues 80-93 (numbering as in Figure 5);

WO 02/098897

PCT/US02/17068

a position within or adjacent to one or more of residues 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99, or a T cell epitope which includes one or more of residues 86-99 (numbering as in Figure 5); and

a position within or adjacent to one or more of residues 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, or 117, or a T cell epitope which includes one or more of residues 104-117 (numbering as in Figure 5).

[0053] In yet other embodiments, the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes at least one light or heavy chain immunoglobulin or, more preferably, at least one light chain immunoglobulin and at least one heavy chain immunoglobulin. Preferably, the light chain immunoglobulin includes a non-human light chain variable region comprising three CDRs from a non-human, e.g., murine, anti-PSMA light chain variable region (e.g., the murine J591 light chain variable region shown in SEQ ID NO:20 (Figure 1B), or the light chain variable region of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126) and a light chain framework which differs from the framework of the non-human anti-PSMA light chain variable region, e.g., murine J591 light chain variable region, by at least one position while having a residue from the non-human anti-PSMA light chain variable region at at least one, two, three, five, seven, ten, fifteen, or twenty residues selected from the group consisting of 1, 2, 4-7, 12-19, 23, 31-41, 43-49, 57, 59, 61, 62, 64-75, 79, 82, 83, 85-87, 89, 98, 99, 101, 102, 105, and 106 (numbering as in Figure 3B). The light chain framework can differ at positions chosen from one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, fourteen, fifteen, sixteen, nineteen, twenty or more residues selected from the group consisting of 3, 8, 9, 10, 11, 20, 21, 22, 42, 58, 60, 63, 76, 77, 78, 80, 83, 87, 100, 103, and 104 (numbering as in Figure 3B).

[0054] In yet other embodiments, the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes at least one light or heavy chain immunoglobulin or, more preferably, at least one light chain immunoglobulin and at least one heavy chain immunoglobulin. Preferably, the modified light chain immunoglobulin includes a non-human light chain variable region comprising three CDRs from a non-human, e.g., murine, anti-PSMA light chain variable region (e.g., the murine J415 light chain variable region shown in SEQ ID NO:48 (Figure 6), or the light chain variable region of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12109) and a light chain framework which differs from the framework of

WO 02/098897

PCT/US02/17068

the non-human anti-PSMA light chain variable region, e.g., murine J415 light chain variable region, by at least one position while having a residue from the non-human anti-PSMA light chain variable region at at least one, two, three, five, seven, ten, fifteen, or twenty residues selected from the group consisting of 1-12, 14, 16-18, 20-40, 42-62, 64-67, 69-79, and 81-107 (linear numbering as in Figure 6). The modified light chain framework can differ at at least one, two, three, four, five, six, or seven positions selected from the group consisting of 13, 15, 19, 41, 63, 68 and 80 (linear numbering as in Figure 6).

[0055] In other embodiments, the heavy chain immunoglobulin of the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes a non-human heavy chain variable region comprising three CDRs from a non-human, e.g., murine, anti-PSMA heavy chain variable region (e.g., the murine J591 heavy chain variable region shown in SEQ ID NO:19 (Figure 1A), or the heavy chain variable region of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12126) and a modified heavy chain framework which differs from the framework of the non-human anti-PSMA heavy chain variable region by at least one position while having a residue from the non-human anti-PSMA heavy chain variable region at at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, or fourteen residues selected from the group consisting of 1-4, 6-10, 13-15, 18, 20-25, 36-39, 42, 43, 45-49, 67-75, 78-83, 85, 86, 88-90, 92-98, 105-109, and 111-115 (numbering as in Figure 3A). The modified heavy chain framework can differ at at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, or fourteen positions selected from the group consisting of 5, 11-12, 16-17, 19, 26-35, 40-41, 44, 50-66, 76-77, 84, 87, 91, 99-104, and 110 (numbering as in Figure 3A).

[0056] In other embodiments, the heavy chain immunoglobulin of the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes a non-human heavy chain variable region comprising three CDRs from a non-human, e.g., murine, anti-PSMA heavy chain variable region (e.g., the murine J415 heavy chain variable region shown in SEQ ID NO:47 (Figure 5), or the heavy chain variable region of the antibody produced by the hybridoma cell line having an ATCC Accession Number HB-12109) and a heavy chain framework which differs from the framework of the non-human anti-PSMA heavy chain variable region by at least one position while having a residue from the non-human anti-PSMA heavy chain variable region at at least one, two, three, four, or five residues selected from the group consisting of 1-19, 21-86, 88-93,

WO 02/098897

PCT/US02/17068

96-111, and 113-116 (numbering as in Figure 5). The heavy chain framework can differ at a positions selected from the group consisting of 20, 87, 94, 95 and 112 (numbering as in Figure 5).

[0057] In yet another aspect, the heavy chain immunoglobulin of the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes a heavy chain variable region comprising at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, twenty, twenty-five, thirty, thirty-five, forty, forty-five, or fifty amino acid residues chosen from one or more of the following residues and located at a position chosen from one or more of: residue 1 (glutamate), 2 (valine), 4 (leucine), 7 (serine), 8 (glycine), 11 (leucine), 14 (proline), 15 (glycine), 19 (lysine), 20 (isoleucine), 21 (serine), 22 (cysteine), 25 (serine), 26 (glycine), 28 (threonine), 29 (phenylalanine), 32 (tyrosine), 36 (tryptophan), 37 (valine), 38 (arginine/lysine), 39 (glutamine), 41 (proline), 43 (lysine), 44 (glycine), 45 (leucine), 46 (glutamate), 47 (tryptophan), 51 (isoleucine), 67 (arginine/lysine), 73 (aspartate), 75 (serine), 80 (tyrosine), 85 (serine), 86 (leucine), 87 (arginine), 89 (glutamate), 90 (aspartate), 91 (threonine), 92 (alanine), 93 (valine), 94 (tyrosine), 95 (tyrosine), 96 (cysteine), 100 (tryptophan), 101 (asparagine), 105 (tryptophan), 106 (glycine), 107 (glutamine), 108 (glycine), 109 (threonine), 112 (threonine), 113 (valine), 114 (serine), or 115 (serine) (linear numbering as shown in Figure 3A).

[0058] In one embodiment, the heavy chain immunoglobulin of the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes one or more of:

a framework region 1 having at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen amino acids selected from the group consisting of residue 1 (glutamate), 2 (valine), 4 (leucine), 7 (serine), 8 (glycine), 11 (leucine), 14 (proline), 15 (glycine), 19 (lysine), 20 (isoleucine), 21 (serine), 22 (cysteine), and 25 (serine) (linear numbering as shown in Figure 3A);

a CDR1 having at least one, two, three, four amino acids selected from the group consisting of residue 26 (glycine), 28 (threonine), 29 (phenylalanine), and 32 (tyrosine) (linear numbering as shown in Figure 3A);

a framework region 2 having at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten amino acids selected from the group consisting of residue 36 (tryptophan), 37 (valine), 38 (arginine/lysine), 39 (glutamine), 41 (proline), 43 (lysine), 44 (glycine), 45 (leucine), 46 (glutamate), and 47 (tryptophan) (linear numbering as shown in Figure 3A);

WO 02/098897

PCT/US02/17068

a CDR2 having at least one isoleucine at position 51 (linear numbering as shown in Figure 3A);

a framework region 3 having at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, fourteen amino acids selected from the group consisting of residue 67 (arginine/lysine), 73 (aspartate), 75 (serine), 80 (tyrosine), 85 (serine), 86 (leucine), 87 (arginine), 89 (glutamate), 90 (aspartate), 91 (threonine), 92 (alanine), 93 (valine), 94 (tyrosine), 95 (tyrosine), and 96 (cysteine) (linear numbering as shown in Figure 3A);

a CDR3 having at least one, two amino acids selected from the group consisting of residue 100 (tryptophan) and 101 (asparagine) (linear numbering as shown in Figure 3A); or

a framework region 4 having at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine amino acids selected from the group consisting of residue 105 (tryptophan), 106 (glycine), 107 (glutamine), 108 (glycine), 109 (threonine), 112 (threonine), 113 (valine), 114 (serine), and 115 (serine) (linear numbering as shown in Figure 3A).

[0059] In yet another embodiment, the light chain immunoglobulin of the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes a light chain variable region comprising at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, fourteen, twenty, thirty, forty, fifty, sixty, or seventy amino acids chosen from one or more of the following residues and located at a position chosen from one or more of: residue 2 (isoleucine), 4 (methionine), 5 (threonine), 6 (glutamine), 8 (proline), 10 (serine), 12 (serine), 14 (serine), 16 (glycine), 17 (glutamate/aspartate), 18 (arginine), 20 (threonine), 21 (leucine), 22 (threonine), 23 (cysteine), 24 (lysine), 25 (alanine), 26 (serine), 29 (valine), 30 (glycine), 31 (threonine), 33 (valine), 35 (tryptophan), 36 (tryrosine), 37 (glutamine), 38 (glutamine), 39 (lysine), 40 (proline), 43 (serine), 44 (proline), 45 (lysine), 47 (leucine), 48 (isoleucine), 49 (tyrosine), 51 (alanine), 52 (serine), 54 (arginine), 56 (threonine), 57 (glycine), 59 (proline), 61 (arginine), 62 (phenylalanine), 63 (serine), 64 (glycine), 65 (serine), 66 (glycine), 67 (serine), 68 (glycine), 69 (threonine), 70 (aspartate), 71 (phenylalanine), 73 (leucine), 74 (threonine), 75 (threonine), 76 (serine), 77 (serine), 79 (glutamine), 81 (glutamate), 82 (aspartate), 85 (aspartate), 86 (tyrosine), 87 (tyrosine), 88 (cysteine), 90 (glutamine), 95 (proline), 97 (threonine), 98 (phenylalanine), 99 (glycine), 101 (glycine), 102 (threonine), 103 (lysine), 105 (glutamate/aspartate), or 107 (lysine) (linear numbering as in Figure 3B).

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[0060] In one embodiment, the light chain immunoglobulin of the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, includes one or more of:

a framework region 1 having at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, fourteen, fifteen amino acids selected from the group consisting of residue 2 (isoleucine), 4 (methionine), 5 (threonine), 6 (glutamine), 8 (proline), 10 (serine), 12 (serine), 14 (serine), 16 (glycine), 17 (glutamate/aspartate), 18 (arginine), 20 (threonine), 21 (leucine), 22 (threonine), and 23 (cysteine) (linear numbering as shown in Figure 3B);

a CDR1 having at least one, two, three, four, five, six, seven amino acids selected from the group consisting of residue 24 (lysine), 25 (alanine), 26 (serine), 29 (valine), 30 (glycine), 31 (threonine), and 33 (valine) (linear numbering as shown in Figure 3B);

a framework region 2 having at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve amino acids selected from the group consisting of residue 35 (tryptophan), 36 (tyrosine), 37 (glutamine), 38 (glutamine), 39 (lysine), 40 (proline), 43 (serine), 44 (proline), 45 (lysine), 47 (leucine), 48 (isoleucine), and 49 (tyrosine) (linear numbering as shown in Figure 3B);

a CDR2 having at least one, two, three, four amino acids selected from the group consisting of residue 51 (alanine), 52 (serine), 54 (arginine), and 56 (threonine) (linear numbering as shown in Figure 3B);

a framework region 3 having at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, fourteen, fifteen, twenty, twenty-one, twenty-two, twenty-three, twenty-four amino acids selected from the group consisting of residue 59 (proline), 61 (arginine), 62 (phenylalanine), 63 (serine), 64 (glycine), 65 (serine), 66 (glycine), 67 (serine), 68 (glycine), 69 (threonine), 70 (aspartate), 71 (phenylalanine), 73 (leucine), 74 (threonine), 75 (threonine), 76 (serine), 77 (serine), 79 (glutamine), 81 (glutamate), 82 (aspartate), 85 (aspartate), 86 (tyrosine), 87 (tyrosine), and 88 (cysteine) (linear numbering as shown in Figure 3B);

a CDR3 having at least one, two, three, four amino acids selected from the group consisting of residue 90 (glutamine), 95 (proline), 97 (threonine), and 98 (phenylalanine) (linear numbering as shown in Figure 3B); or

WO 02/098897

PCT/US02/17068

a framework region 4 having at least one, two, three, four, five, six amino acid selected from the group consisting of residue 99 (glycine), 101 (glycine), 102 (threonine), 103 (lysine), 105 (glutamate/aspartate), and 107 (lysine) (linear numbering as shown in Figure 3B).

[0061] An anti-PSMA antibody, e.g., a modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, described herein can be used alone, e.g., can be administered to a subject, or used *in vitro*, in non-derivatized or unconjugated forms. In other embodiments, the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, can be derivatized or linked to another molecular entity, typically a label or a therapeutic (e.g., a cytotoxic or cytostatic) agent. The molecular entity can be, e.g., another peptide, protein (including, e.g., a viral coat protein of, e.g., a recombinant viral particle), a non-peptide chemical compound, isotope, etc. The anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, can be functionally linked, e.g., by chemical coupling, genetic fusion, non-covalent association or otherwise, to one or more other molecular entities. For example, the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, can be coupled to a label, such as a fluorescent label, a biologically active enzyme label, a radioisotope (e.g., a radioactive ion), a nuclear magnetic resonance active label, a luminescent label, or a chromophore. In other embodiments, the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, can be coupled to a therapeutic agent, e.g., a cytotoxic moiety, e.g., a therapeutic drug, a radioisotope, molecules of plant, fungal, or bacterial origin, or biological proteins (e.g., protein toxins) or particles (e.g., recombinant viral particles, e.g., via a viral coat protein), or mixtures thereof. The therapeutic agent can be an intracellularly active drug or other agent, such as short-range radiation emitters, including, for example, short-range, high-energy α -emitters, as described herein. In some preferred embodiments, the anti-PSMA antibody, or antigen binding fragment thereof, can be coupled to a molecule of plant or bacterial origin (or derivative thereof), e.g., a maytansinoid (e.g., maytansinol or the DM1 maytansinoid, see Fig. 15), a taxane, or a calicheamicin. A radioisotope can be an α -, β -, or γ -emitter, or an β - and γ -emitter. Radioisotopes useful as therapeutic agents include yttrium (^{90}Y), lutetium (^{177}Lu), actinium (^{225}Ac), praseodymium, astatine (^{211}At), rhenium (^{186}Re), bismuth (^{212}Bi or ^{213}Bi), and rhodium (^{188}Rh). Radioisotopes useful as labels, e.g., for use in diagnostics, include iodine (^{131}I or ^{125}I), indium (^{111}In), technetium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), phosphorus (^{32}P), carbon (^{14}C), and tritium (^3H), or one of the therapeutic isotopes listed above. The anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment

WO 02/098897

PCT/US02/17068

thereof can also be linked to another antibody to form, e.g., a bispecific or a multispecific antibody.

[0062] In another aspect, the invention features, an anti-PSMA antibody, e.g., an antibody described herein, coupled, e.g., by covalent linkage, to a proteosome inhibitor or a topoisomerase inhibitor. [(1R)-3-methyl-1-[[[(2S)-1-oxo-3-phenyl-2-[(3-mercaptoacetyl)amino]propyl]amino]butyl] Boronic acid is a suitable proteosome inhibitor. N,N'-bis[2-(9-methylphenazine-1-carboxamido)ethyl]-1,2-ethanediamine is a suitable topoisomerase inhibitor.

[0063] In another aspect, the invention provides, compositions, e.g., pharmaceutical compositions, which include a pharmaceutically acceptable carrier, excipient or stabilizer, and at least one of the anti-PSMA antibodies, e.g., the modified anti-PSMA antibodies (or fragments thereof) described herein. In a preferred embodiment the antibody is conjugated to a label or a therapeutic agent. In one embodiment, the compositions, e.g., the pharmaceutical compositions, comprise a combination of two or more of the aforesaid anti-PSMA antibodies. For example, a composition, e.g., pharmaceutical composition, which comprises a deimmunized J591 antibody, in combination with another anti-PSMA antibody, or an antibody to another tumor cell-associated antigen, e.g., EGF receptor, Her-2/neu, etc. Combinations of the anti-PSMA antibody and a drug, e.g., a therapeutic agent (e.g., a cytotoxic or cytostatic drug, e.g., DM1, calicheamicin, or taxanes, topoisomerase inhibitors, or an immunomodulatory agent, e.g., IL-1, 2, 4, 6, or 12, interferon alpha or gamma, or immune cell growth factors such as GM-CSF) are also within the scope of the invention.

[0064] The invention also features nucleic acid sequences that encode a heavy and light chain immunoglobulin described herein. For example, the invention features, a first and second nucleic acid encoding a modified heavy and light chain variable region, respectively, of a modified anti-PSMA antibody molecule as described herein. In another aspect, the invention features host cells and vectors containing the nucleic acids of the invention.

[0065] In another aspect, the invention features a method of producing an anti-PSMA antibody, e.g., a modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof. The method includes:

providing a first nucleic acid encoding a heavy chain variable region, e.g., a modified heavy chain variable region as described herein;

WO 02/098897

PCT/US02/17068

providing a second nucleic acid encoding a light chain variable region, e.g., a modified light chain variable region as described herein; and

introducing said first and second nucleic acids into a host cell under conditions that allow expression and assembly of said light and heavy chain variable regions.

[0066] The first and second nucleic acids can be linked or unlinked, e.g., expressed on the same or different vector, respectively.

[0067] The host cell can be a eukaryotic cell, e.g., a mammalian cell, an insect cell, a yeast cell, or a prokaryotic cell, e.g., *E. coli*. For example, the mammalian cell can be a cultured cell or a cell line. Exemplary mammalian cells include lymphocytic cell lines (e.g., NS0), Chinese hamster ovary cells (CHO), COS cells, oocyte cells, and cells from a transgenic animal, e.g., mammary epithelial cell. For example, nucleic acids encoding the modified antibody described herein can be expressed in a transgenic animal. In one embodiment, the nucleic acids are placed under the control of a tissue-specific promoter (e.g., a mammary specific promoter) and the antibody is produced in the transgenic animal. For example, the antibody molecule is secreted into the milk of the transgenic animal, such as a transgenic cow, pig, horse, sheep, goat or rodent.

[0068] The invention also features a method of ablating or killing, a cell, e.g., a prostatic cell (e.g., a cancerous or non-cancerous prostatic cell, e.g., a normal, benign or hyperplastic prostatic epithelial cell), or a malignant, non-prostatic cell, e.g., cell found in a non-prostatic solid tumor that, e.g., has vasculature which expresses PSMA, a soft tissue tumor, or a metastatic lesion (e.g., a cell found in renal, urothelial (e.g. bladder), colonic, rectal, pulmonary, breast or hepatic cancers and/or metastases thereof). Methods of the invention include contacting the cell, or a nearby cell, e.g., a vascular endothelial cell proximate to the cell, with an anti-PSMA antibody as described herein, e.g., a modified anti-PSMA antibody, in an amount sufficient to ablate or kill, the cell. Alternatively, an anti-PSMA antibody as described herein, e.g., a modified anti-PSMA antibody, preferably a fragment of a modified anti-PSMA antibody, can be conjugated to a viral particle, e.g., to a coat protein of a viral particle. The anti-PSMA/viral particle conjugate can be used to target prostate cells, e.g., cancerous prostate cells, with genetically engineered viral particles that infect the cells and express, e.g., pro apoptotic genes, to thereby kill the cells or inhibit cell growth.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[0069] The methods can be used on cells in culture, e.g. *in vitro* or *ex vivo*. For example, prostatic cells (e.g., malignant or normal, benign or hyperplastic prostate epithelial cells) or non-prostatic cancerous or metastatic cells (e.g., renal, urothelial (e.g., bladder), testicular, colon, rectal, lung (e.g., non-small cell lung carcinoma), breast, liver, neural (e.g., neuroendocrine), glial (e.g., glioblastoma), pancreatic (e.g., pancreatic duct), melanoma (e.g., malignant melanoma), or soft tissue sarcoma cancerous cells) can be cultured *in vitro* in culture medium and the contacting step can be effected by adding the modified anti-PSMA antibody or fragment thereof, to the culture medium. The method can be performed on cells (e.g., prostatic cells, or non-prostatic cancerous or metastatic cells) present in a subject, as part of an *in vivo* (e.g., therapeutic or prophylactic) protocol.

[0070] Methods of the invention can be used, for example, to treat or prevent a disorder, e.g., a prostatic disorder (e.g., a cancerous or non-cancerous prostatic disorder, e.g., a benign or hyperplastic prostatic disorder), or a non-prostatic disorder (e.g., cancer, e.g., malignant cancer), by administering to a subject an antibody described herein, preferably a modified PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, in an amount effective to treat or prevent such disorder. Particularly preferred antibodies include modified antibodies having CDRs from any of a J591, J415, J533 or E99, and in particular deimmunized versions of these antibodies, particularly deJ591 or deJ415. Examples of prostatic disorders that can be treated or prevented include, but are not limited to, genitourinary inflammation (e.g., inflammation of smooth muscle cells) as in prostatitis; benign enlargement, for example, nodular hyperplasia (benign prostatic hypertrophy or hyperplasia); and cancer, e.g., adenocarcinoma or carcinoma, of the prostate and/or testicular tumors. Methods and compositions disclosed herein are particularly useful for treating metastatic lesions associated with prostate cancer. In some embodiments, the patient will have undergone one or more of prostatectomy, chemotherapy, or other anti-tumor therapy and the primary or sole target will be metastatic lesions, e.g., metastases in the bone marrow or lymph nodes. Examples of non-prostatic cancerous disorders include, but are not limited to, solid tumors, soft tissue tumors, and particularly metastatic lesions. Examples of solid tumors include malignancies, e.g., sarcomas, adenocarcinomas, and carcinomas, of the various organ systems, such as those affecting lung, breast, lymphoid, gastrointestinal (e.g., colon), genitals and genitourinary tract (e.g., renal, urothelial, bladder cells), pharynx, CNS (e.g., neural or glial cells), skin (e.g., melanoma), and pancreas, as well as adenocarcinomas which include

WO 02/098897

PCT/US02/17068

malignancies such as most colon cancers, rectal cancer, renal-cell carcinoma, liver cancer, non-small cell carcinoma of the lung, cancer of the small intestine and cancer of the esophagus. Methods and compositions disclosed herein are particularly useful for treating metastatic lesions associated with the aforementioned cancers. In some embodiments, the patient will have undergone one or more of surgical removal of a tissue, chemotherapy, or other anti-cancer therapy and the primary or sole target will be metastatic lesions, e.g., metastases in the bone marrow or lymph nodes.

[0071] In a preferred embodiment the subject is treated to prevent a disorder, e.g., a prostatic disorder. The subject can be one at risk for the disorder, e.g., a subject having a relative afflicted with the disorder, e.g., a subject with one or more of a grandparent, parent, uncle or aunt, sibling, or child who has or had the disorder, or a subject having a genetic trait associated with risk for the disorder. In a preferred embodiment the disorder is a prostatic disorder (e.g., a cancerous or non-cancerous prostatic disorder, e.g., a benign or hyperplastic prostatic disorder), or a non-prostatic disorder (e.g., cancer, e.g., malignant cancer) and the subject has one or more of a grandfather, father, uncle, brother, or son who has or had the disorder, or a subject having a genetic trait associated with risk for the disorder.

[0072] The subject can be a mammal, e.g., a primate, preferably a higher primate, e.g., a human (e.g., a patient having, or at risk of, a disorder described herein, e.g., a prostatic or a cancer disorder). In one embodiment, the subject is a patient having prostate cancer (e.g., a patient suffering from recurrent or metastatic prostate cancer).

[0073] The modified anti-PSMA antibody or fragment thereof, e.g., a modified anti-PSMA antibody or fragment thereof as described herein, can be administered to the subject systemically (e.g., orally, parenterally, subcutaneously, intravenously, rectally, intramuscularly, intraperitoneally, intranasally, transdermally, or by inhalation or intracavitary installation), topically, or by application to mucous membranes, such as the nose, throat and bronchial tubes.

[0074] The methods of the invention, e.g., methods of treatment or preventing, can further include the step of monitoring the subject, e.g., for a change (e.g., an increase or decrease) in one or more of: tumor size; levels of a cancer marker, e.g., levels of PSA, alkaline phosphatase, or serum hemoglobin for a patient with prostate cancer; the rate of appearance of new lesions, e.g., in a bone scan; the appearance of new disease-related symptoms; the size of soft tissue mass, e.g., a decreased or stabilization; quality of life, e.g., amount of disease

WO 02/098897

PCT/US02/17068

associated pain, e.g., bone pain; or any other parameter related to clinical outcome. The subject can be monitored in one or more of the following periods: prior to beginning of treatment; during the treatment; or after one or more elements of the treatment have been administered.

Monitoring can be used to evaluate the need for further treatment with the same modified anti-PSMA antibody or fragment thereof or for additional treatment with additional agents.

Generally, a decrease in one or more of the parameters described above is indicative of the improved condition of the subject, although with serum hemoglobin levels, an increase can be associated with the improved condition of the subject.

[0075] The methods of the invention can further include the step of analyzing a nucleic acid or protein from the subject, e.g., analyzing the genotype of the subject. In one embodiment, a nucleic acid encoding human PSMA and/or an upstream or downstream component(s) of human PSMA signalling, e.g., an extracellular or intracellular activator or inhibitor of human PSMA, is analyzed. The analysis can be used, e.g., to evaluate the suitability of, or to choose between alternative treatments, e.g., a particular dosage, mode of delivery, time of delivery, inclusion of adjunctive therapy, e.g., administration in combination with a second agent, or generally to determine the subject's probable drug response phenotype or genotype. The nucleic acid or protein can be analyzed at any stage of treatment, but preferably, prior to administration of the modified anti-PSMA antibody or fragment thereof to thereby determine appropriate dosage(s) and treatment regimen(s) of the modified anti-PSMA antibody or fragment thereof (e.g., amount per treatment or frequency of treatments) for prophylactic or therapeutic treatment of the subject.

[0076] The modified anti-PSMA antibody or fragment thereof can be used alone in unconjugated form to thereby ablate or kill the PSMA-expressing prostatic or cancerous cells by, e.g., antibody-dependent cell killing mechanisms such as complement-mediated cell lysis and/or effector cell-mediated cell killing. In other embodiments, the modified anti-PSMA antibody or fragment thereof can be bound to a substance, e.g., a cytotoxic agent or moiety, e.g., a therapeutic drug, a compound emitting radiation, molecules of plant, fungal, or bacterial origin, or a biological protein (e.g., a protein toxin) or particle (e.g., a recombinant viral particle, e.g., via a viral coat protein). For example, the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, can be coupled to a radioactive isotope such as an α -, β -, or γ -emitter, or a β - and γ -emitter. Examples of radioactive isotopes include iodine (^{131}I or ^{125}I), yttrium (^{90}Y),

WO 02/098897

PCT/US02/17068

lutetium (^{177}Lu), actinium (^{225}Ac), praseodymium, or bismuth (^{212}Bi or ^{213}Bi). Alternatively, the anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, can be coupled to a biological protein, a molecule of plant or bacterial origin (or derivative thereof), e.g., a maytansinoid (e.g., maytansinol or DM1), as well as a taxane (e.g. taxol or taxotere), or calicheamicin. The maytansinoid can be, for example, maytansinol or a maytansinol analogue. Examples of maytansinol analogues include those having a modified aromatic ring (e.g., C-19-dechloro, C-20-demethoxy, C-20-acyloxy) and those having modifications at other positions (e.g., C-9-CH₃, C-14-alkoxymethyl, C-14-hydroxymethyl or acetoxyethyl, C-15-hydroxy/acyloxy, C-15-methoxy, C-18-N-demethyl, 4,5-deoxy). Maytansinol and maytansinol analogues are described, for example, in U.S. Patent Number 6,333,410, the contents of which is incorporated herein by reference. The calicheamicin can be, for example, a bromo-complex calicheamicin (e.g., an alpha, beta or gamma bromo-complex), an iodo-complex calicheamicin (e.g., an alpha, beta or gamma iodo-complex), or analogs and mimics thereof. Bromo-complex calicheamicins include α_1 -BR, α_2 -BR, α_3 -BR, α_4 -BR, β_1 -BR, β_2 -BR and γ_1 -BR. Iodo-complex calicheamicins include α_1 -I, α_2 -I, α_3 -I, β_1 -I, β_2 -I, δ_1 -I and γ_1 -BR. Calicheamicin and mutants, analogs and mimics thereof are described, for example, in U.S. Patent Numbers 4,970,198, issued November 13, 1990, 5,264,586, issued November 23, 1993, 5,550,246, issued August 27, 1996, 5,712,374, issued January 27, 1998, and 5,714,586, issued February 3, 1998, the contents of which are incorporated herein by reference. Maytansinol can be coupled to antibodies using, e.g., an N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (also known as N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate or SPP), 4-succinimidyl-oxycarbonyl-a-(2-pyridyldithio)-toluene (SMPT), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)butyrate (SDPB), 2-iminothiolane, or S-acetylsuccinic anhydride.

[0077] The methods and compositions of the invention can be used in combination with other therapeutic modalities. In one embodiment, the methods of the invention include administering to the subject a modified anti-PSMA antibody or fragment thereof, e.g., a modified anti-PSMA antibody or fragment thereof as described herein, in combination with a cytotoxic agent, in an amount effective to treat or prevent said disorder. The antibody and the cytotoxic agent can be administered simultaneously or sequentially. In other embodiments, the methods and compositions of the invention are used in combination with surgical and/or radiation procedures. In yet other embodiments, the methods can be used in combination with

WO 02/098897

PCT/US02/17068

immunodulatory agents, e.g., IL-1, 2, 4, 6, or 12, or interferon alpha or gamma, or immune cell growth factors such as GM-CSF.

[0078] Exemplary cytotoxic agents that can be administered in combination with the anti-PSMA antibodies include antimicrotubule agents, topoisomerase inhibitors, antimetabolites, mitotic inhibitors, alkylating agents, intercalating agents, agents capable of interfering with a signal transduction pathway, agents that promote apoptosis and radiation.

[0079] In therapies of prostatic disorders, e.g., prostate cancer, the anti-PSMA antibodies can be used in combination with existing therapeutic modalities, e.g., prostatectomy (partial or radical), radiation therapy, hormonal therapy, androgen ablation therapy, and cytotoxic chemotherapy. Typically, hormonal therapy works to reduce the levels of androgens in a patient, and can involve administering a leuteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) analog or agonist (e.g., Lupron, Zoladex, leuprolide, buserelin, or goserelin), as well as antagonists (e.g., Abarelix). Non-steroidal anti-androgens, e.g., flutamide, bicalutimide, or nilutamide, can also be used in hormonal therapy, as well as steroidal anti-androgens (e.g., cyproterone acetate or megestrol acetate), estrogens (e.g., diethylstilbestrol), surgical castration, PROSCAR™, secondary or tertiary hormonal manipulations (e.g., involving corticosteroids (e.g., hydrocortisone, prednisone, or dexamethasone), ketoconazole, and/or aminoglutethimide), inhibitors of 5 α -reductase (e.g., finasteride), herbal preparations (e.g., PC-SPES), hypophysectomy, and adrenalectomy. Furthermore, hormonal therapy can be performed intermittently or using combinations of any of the above treatments, e.g., combined use of leuprolide and flutamide.

[0080] Any combination and sequence of modified anti-PSMA and other therapeutic modalities can be used. The modified anti-PSMA and other therapeutic modalities can be administered during periods of active disorder, or during a period of remission or less active disease. The modified anti-PSMA and other therapeutic modalities can be administered before treatment, concurrently with treatment, posttreatment, or during remission of the disorder.

[0081] In another aspect, the invention features methods for detecting the presence of a PSMA protein in a sample *in vitro* (e.g., a biological sample, e.g., serum, semen or urine, or a tissue biopsy, e.g., from a prostatic or cancerous lesion). The subject method can be used to evaluate, e.g., diagnose or stage a disorder described herein, e.g., a prostatic or cancerous disorder. The method includes: (i) contacting the sample (and optionally, a reference, e.g., a

WO 02/098897

PCT/US02/17068

control sample) with a modified anti-PSMA antibody, or fragment thereof, as described herein, under conditions that allow interaction of the anti-PSMA antibody and the PSMA protein to occur; and (ii) detecting formation of a complex between the anti-PSMA antibody, and the sample (and optionally, the reference, e.g., control, sample). Formation of the complex is indicative of the presence of PSMA protein, and can indicate the suitability or need for a treatment described herein. For example, a statistically significant change in the formation of the complex in the sample relative to the reference sample, e.g., the control sample, is indicative of the presence of PSMA in the sample. In some embodiments, the methods can include the use of more than one anti-PSMA antibody, e.g., two anti-PSMA antibodies that bind to different epitopes on PSMA. For example, the method can involve an ELISA assay, e.g., as described in Example 19.

[0082] In yet another aspect, the invention provides a method for detecting the presence of PSMA *in vivo* (e.g., *in vivo* imaging in a subject). The method can be used to evaluate, e.g., diagnose or stage a disorder described herein, e.g., a prostatic or a cancerous disorder, in a subject, e.g., a mammal, e.g., a primate, e.g., a human. The method includes: (i) administering to a subject a modified anti-PSMA antibody (or antigen binding fragment thereof), under conditions that allow interaction of the modified anti-PSMA antibody (or fragment thereof) and the PSMA protein to occur; and (ii) detecting formation of a complex between the antibody or fragment and PSMA. A statistically significant change in the formation of the complex in the subject relative to the reference, e.g., the control subject or subject's baseline, is indicative of the presence of the PSMA.

[0083] In other embodiments, a method of diagnosing or staging a disorder as described herein (e.g., a prostatic or cancerous disorder) is provided. The method includes: (i) identifying a subject having, or at risk of having, the disorder; (ii) obtaining a sample of a tissue or cell affected with the disorder; (iii) contacting said sample or a control sample with an anti-PSMA antibody as described herein, e.g., a modified anti-PSMA antibody or fragment, under conditions that allow interaction of the binding agent and the PSMA protein to occur, and (iv) detecting formation of a complex. A statistically significant increase in the formation of the complex between the antibody (or fragment thereof) with respect to a reference sample, e.g., a control sample, is indicative of the disorder or the stage of the disorder.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[0084] Preferably, the modified anti-PSMA antibody or fragment thereof, used in the *in vivo* and *in vitro* diagnostic methods is directly or indirectly labeled with a detectable substance to facilitate detection of the bound or unbound binding agent. Suitable detectable substances include various biologically active enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, paramagnetic (e.g., nuclear magnetic resonance active) materials, and radioactive materials. In some embodiments, the modified anti-PSMA antibody or fragment thereof is coupled to a radioactive ion, e.g., indium (^{111}In), iodine (^{131}I or ^{125}I), yttrium (^{90}Y), lutetium (^{177}Lu), actinium (^{225}Ac), bismuth (^{212}Bi or ^{213}Bi), sulfur (^{35}S), carbon (^{14}C), tritium (^3H), rhodium (^{188}Rh), technetium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), praseodymium, or phosphorous (^{32}P).

[0085] In another aspect, the invention provides a method for determining the dose, e.g., radiation dose, that different tissues are exposed to when a subject, e.g., a human subject, is administered an anti-PSMA antibody that is conjugated to a radioactive isotope. The method includes: (i) administering an anti-PSMA antibody as described herein, e.g., a modified anti-PSMA antibody, that is labeled with a radioactive isotope, e.g., ^{111}In , to a subject; (ii) measuring the amount of radioactive isotope located in different tissues, e.g., prostate, liver, kidney, or blood, at various time points until most, e.g., 50%, 80%, 90%, 95%, or more, of the radioactive isotope has been eliminated from the body of the subject; and (iii) calculating the total dose of radiation received by each tissue analyzed. In some embodiments, the measurements are taken at scheduled time points, e.g., day 1, 2, 3, 5, 7, and 12, following administration (at day 0) of the radioactively labeled anti-PSMA antibody to the subject. In some embodiments, the radiation dose that a tissue receives for one radioactive isotope, e.g., a gamma-emitter, e.g., ^{111}In , can be used to calculate the expected dose that the same tissue would receive from a different radioactive isotope, e.g., a beta-emitter, e.g., ^{90}Y .

[0086] In another aspect, the invention features methods of treating pain, e.g., reducing pain, experienced by a subject having or diagnosed with prostate disease, e.g., benign prostatic hyperplasia or prostate cancer, or non-prostate cancer, e.g., a cancer having vasculature which expresses PSMA (e.g., renal, urothelial (e.g., bladder), testicular, colon, rectal, lung (e.g., non-small cell lung carcinoma), breast, liver, neural (e.g., neuroendocrine), glial (e.g., glioblastoma), or pancreatic (e.g., pancreatic duct) cancer, melanoma (e.g., malignant melanoma), or soft tissue sarcoma). The methods include administering an anti-PSMA antibody as described herein, e.g., a modified anti-PSMA antibody, to a subject in an amount sufficient to treat, e.g., reduce, the

WO 02/098897

PCT/US02/17068

pain associated with prostate disease or non-prostate cancer. In some embodiments, the subject may have no signs of prostate disease or non-prostate cancer other than, e.g., elevated levels of serum PSA and the sensation of pain. The pain can be bone pain, as well as, pain associated with obstructive voiding symptoms due to enlarged prostate, e.g., urinary hesitancy or diminished urinary stream, frequency or nocturia. The treatment of pain using the modified anti-PSMA antibodies of the invention can lead to a decreased or dramatically lowered need, or even eliminate the need, for analgesics, e.g., narcotics. In addition, by reducing pain, the methods of treatment can restore the mobility of, e.g., limbs, that have become dysfunctional as a result of pain associated with movement.

[0087] In some embodiments, the modified anti-PSMA antibody is administered in an unconjugated form in an amount sufficient to treat, e.g., reduce, pain associated with prostate disease or non-prostate cancer. In other embodiments, the modified anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, is administered in a derivatized form, e.g., linked to another functional molecule, as described herein.

[0088] Other features and advantages of the instant invention will become more apparent from the following detailed description and claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0089] *Figures 1A-1B* depict the amino acid sequence of murine J591 heavy and light chain variable region, respectively. The location of the CDRs is indicated in the Figures; the amino acid numbering is according the Kabat numbering (see, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Note that the CDRs are considered to encompass the Chothia loops and the Kabat hypervariable regions together and the sequences have been annotated accordingly. Heavy Chain: CDR1 is depicted in SEQ ID NO:1; CDR2 is depicted in SEQ ID NO:2; CDR3 is depicted in SEQ ID NO:3; the framework excluding CDR regions is depicted in SEQ ID NO:7; and the framework including CDR regions is depicted in SEQ ID NO:19. Light Chain: CDR1 is depicted in SEQ ID NO:4; CDR2 is depicted in SEQ ID NO:5; CDR3 is depicted in SEQ ID NO:6; the framework excluding CDR regions is depicted in SEQ ID NO:8; and the framework including CDR regions is depicted in SEQ ID NO:20.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[0090] *Figures 2A-2B* depict the amino acid sequence of the deimmunized J591 heavy and light chain variable region, respectively. The location of the CDRs is indicated in the Figures; the amino acid numbering is according to the Kabat numbering (see, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *supra*). Note that the CDRs are considered to encompass the Chothia loops and the Kabat hypervariable regions together and the sequences have been annotated accordingly. Heavy Chain: CDR1 is depicted in SEQ ID NO:1; CDR2 is depicted in SEQ ID NO:2; CDR3 is depicted in SEQ ID NO:3; framework 1 is depicted in SEQ ID NO:9; framework 2 is depicted in SEQ ID NO:10; framework 3 is depicted in SEQ ID NO:11; framework 4 is depicted in SEQ ID NO:12; the framework excluding CDR regions is depicted in SEQ ID NO:17; and the framework including CDR regions is depicted in SEQ ID NO:21. Light Chain: CDR1 is depicted in SEQ ID NO:4; CDR2 is depicted in SEQ ID NO:5; CDR3 is depicted in SEQ ID NO:6; framework 1 is depicted in SEQ ID NO:13; framework 2 is depicted in SEQ ID NO:14; framework 3 is depicted in SEQ ID NO:15; framework 4 is depicted in SEQ ID NO:16; the framework excluding CDR regions is depicted in SEQ ID NO:18; and the framework including CDR regions is depicted in SEQ ID NO:22.

[0091] *Figures 3A-3B* depict an alignment of the murine J591 and deimmunized heavy chain variable regions (3A; SEQ ID NO:19 and 21, respectively) and light chain variable regions (3B; SEQ ID NO:20 and 22, respectively). Potential T cell epitopes (identified using a peptide threading program) in murine J591 VH and VK are shown in Figures 3A-3B, respectively. The 13-mer peptides predicted to bind to MHC class II are indicated by the underline; the CDRs are located at residues 26 to 35, 50 to 66, and 99-104 of Figure 3A and residues 24 to 34, 50 to 56, and 89 to 97 of Figure 3B; and residues altered in the deimmunized heavy and light chain variable regions are boxed. Where possible, amino acid substitutions are those commonly used in human germline VH regions. The amino acid numbering is linear, not according to Kabat.

[0092] *Figures 4A-4B* depict the nucleotide sequences of the deimmunized J591 heavy and light chain variable region, respectively. Figure 4A shows an alignment of the coding and noncoding nucleotide strands of deimmunized J591 heavy chain variable region (SEQ ID NOs:23 and 24, respectively) with the corresponding amino acid sequence (SEQ ID NO:27). Figure 4B shows an alignment of the coding and noncoding nucleotide strands of deimmunized J591 light chain variable region (SEQ ID NOs:25 and 26, respectively) with the corresponding

WO 02/098897

PCT/US02/17068

amino acid sequence (SEQ ID NO:28). The location of the signal peptide and CDRs 1-3 is indicated in each alignment.

[0093] *Figure 5* depicts an alignment of the amino acid sequences for the murine and several deimmunized heavy chain variable regions of the J415 antibody. The murine amino acid sequence is shown as J415VH (SEQ ID NO:47); the deimmunized sequences are depicted as J415DIVH1 (amino acid residues 18 to 133 of SEQ ID NO:54), J415DIVH2 (SEQ ID NO:59), J415DIVH3 (SEQ ID NO:60), and J415DIVH4 (SEQ ID NO:49). The preferred sequence is J415DIVH4 (SEQ ID NO:49). The amino acid replacements are indicated by the boxed residues. A consensus sequence is labeled "majority" (SEQ ID NO:61).

[0094] *Figure 6* depicts an alignment of the amino acid sequences for the murine and several deimmunized light chain variable regions of the J415 antibody. The murine amino acid sequence is shown as J415VK (SEQ ID NO:48); the deimmunized sequences are depicted as J415DIVK1 (amino acid residues 18 to 124 of SEQ ID NO:57), J415DIVK2 (SEQ ID NO:62), J415DIVK3 (SEQ ID NO:63), J415DIVK4 (SEQ ID NO:64), J415DIVK5 (SEQ ID NO:50), J415DIVK6 (SEQ ID NO:65), J415DIVK7 (SEQ ID NO:66), and J415DIVK8 (SEQ ID NO:67). The preferred sequence is J415DIVK5 (SEQ ID NO:50). The amino acid replacements are indicated by the boxed residues. A consensus sequence is labeled "majority" (SEQ ID NO:68).

[0095] *Figure 7A* depicts the nucleic acid coding sequence, the amino acid sequence, and the nucleic acid reverse complement sequence of the deimmunized J415 heavy chain variable region (J415DIVH1) (SEQ ID NO:53-55, respectively). The relative location of the signal sequence, intron and J415DIVH1 amino acid sequence is indicated, as well as some restriction sites.

[0096] *Figure 7B* depicts the nucleic acid coding sequence, the amino acid sequence, and the nucleic acid reverse complement sequence of the murine J415 heavy chain variable region (SEQ ID NO:125, 47, and 126, respectively). The relative locations of the CDRs and some restriction sites are indicated.

[0097] *Figure 7C* depicts an alignment of the amino acid sequence of the murine J415 heavy chain variable region (SEQ ID NO:47) and a consensus sequence for Kabat subgroup murine VHIII (MUVHIII, SEQ ID NO:69). A consensus majority sequence based on the alignment is also shown (SEQ ID NO:70).

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[0098] *Figure 8A* depicts the nucleic acid coding sequence, the amino acid sequence, and the nucleic acid reverse complement sequence of the deimmunized J415 light chain variable region (J415DIVK1) (SEQ ID NO:56-58, respectively). The relative location of the signal sequence, intron and J415DIVK1 amino acid sequence is indicated, as well as some restriction sites.

[0099] *Figure 8B* depicts the nucleic acid coding sequence, the amino acid sequence, and the nucleic acid reverse complement sequence of the murine J415 light chain variable region (SEQ ID NOs:127, 48, and 128, respectively). The relative locations of the CDRs and some restriction sites are also indicated.

[00100] *Figure 8C* depicts an alignment of the amino acid sequence of the murine J415 light chain variable region (SEQ ID NO:48) and a consensus sequence for Kabat subgroup murine variable light chain (MuVKI, SEQ ID NO:71). A consensus majority sequence based on the alignment is also shown (SEQ ID NO:72).

[00101] *Figure 9A* depicts the nucleic acid coding sequence, the amino acid sequence, and the nucleic acid reverse complement sequence of the murine J533 heavy chain variable region (SEQ ID NO:73-75, respectively). The relative locations of the CDRs and restriction sites are indicated.

[00102] *Figure 9B* depicts an alignment of the amino acid sequence of the murine J533 heavy chain variable region (SEQ ID NO:74) and a consensus sequence for Kabat subgroup murine variable heavy chain (MuVHIIA, SEQ ID NO:79). A consensus majority sequence based upon the alignment is also shown (SEQ ID NO:80).

[00103] *Figure 10A* depicts the nucleic acid coding sequence, the amino acid sequence, and the nucleic acid reverse complement sequence of the murine J533 light chain variable region (SEQ ID NO:76-78, respectively). The relative locations of the CDRs and some restriction sites are indicated.

[00104] *Figure 10B* depicts an alignment of the amino acid sequence of the murine J533 light chain variable region (SEQ ID NO:77) and a consensus sequence for Kabat subgroup murine MuVKIII, SEQ ID NO:81). A consensus majority sequence based upon the alignment is also shown (SEQ ID NO:82).

[00105] *Figure 11A* depicts the nucleic acid coding sequence, the amino acid sequence, and the nucleic acid reverse complement sequence of the murine E99 heavy chain variable

WO 02/098897

PCT/US02/17068

region (SEQ ID NO:83-85, respectively). The relative locations of the CDRs and some restriction sites are indicated.

[00106] *Figure 11B* depicts an alignment of the amino acid sequence of the murine E99 heavy chain variable region (SEQ ID NO:84) and a consensus sequence for Kabat subgroup murine variable heavy chain (MuVHIB, SEQ ID NO:89). A consensus majority sequence based upon the alignment is also shown (SEQ ID NO:90).

[00107] *Figure 12A* depicts the nucleic acid coding sequence, the amino acid sequence, and the nucleic acid reverse complement sequence of the murine E99 light chain variable region (SEQ ID NO:86-88, respectively). The relative locations of the CDRs and some restriction sites are indicated.

[00108] *Figure 12B* depicts an alignment of the amino acid sequence of the murine E99 light chain variable region (SEQ ID NO:87) and a consensus sequence for Kabat subgroup murine variable light chain (MuVKI, SEQ ID NO:91). A consensus majority sequence based upon the alignment is also shown (SEQ ID NO:92).

[00109] *Figures 13A and B* depict serum PSA levels as a function of time for two patients that were treated with a single dose of ⁹⁰Y-DOTA-deJ591. Day 0 corresponds to the day on which the ⁹⁰Y-DOTA-deJ591 was administered.

[00110] *Figure 14* depicts the serum PSA levels as a function of time for a patient that was treated with a single dose of ¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591. Day 0 corresponds to the day on which the ¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591 was administered.

[00111] *Figure 15* depicts the chemical structures of DM1 and maytansine, a related molecule that lacks the thiol reactive group of DM1 used to conjugate DM1 to antibodies.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[00112] This invention provides, *inter alia*, antibodies, e.g., modified antibodies, or antigen-binding fragments thereof, to the extracellular domain of human prostate specific membrane antigen (PSMA). The modified anti-PSMA antibodies, or antigen-binding fragments thereof, have been rendered less immunogenic compared to their unmodified counterparts to a given species, e.g., a human. Human PSMA is expressed on the surface of normal, benign hyperplastic epithelial cells (e.g., benign prostate secretory-acinar epithelium), and cancerous prostate epithelial cells (e.g., prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma), as

WO 02/098897

PCT/US02/17068

well as vascular endothelial cells proximate to cancerous cells, e.g., renal, urothelial (e.g., bladder), testicular, colon, rectal, lung (e.g., non-small cell lung carcinoma), breast, liver, neural (e.g., neuroendocrine), glial (e.g., glioblastoma), pancreatic (e.g., pancreatic duct), melanoma (e.g., malignant melanoma), or soft tissue sarcoma cancerous cells. The antibodies, e.g., the modified antibodies, of the invention bind to the cell surface of cells that express PSMA. PSMA is normally recycled from the cell membrane into the cell. Thus, the antibodies of the invention are internalized with PSMA through the process of PSMA recirculation, thereby permitting delivery of an agent conjugated to the antibody, e.g., a labeling agent, a cytotoxic agent, or a viral particle (e.g., a viral particle containing genes that encode cytotoxic agents, e.g., apoptosis-promoting factors).

[00113] In order that the present invention may be more readily understood, certain terms are first defined. Additional definitions are set forth throughout the detailed description.

[00114] As used herein, "PSMA" or "prostate-specific membrane antigen" protein refers to mammalian PSMA, preferably human PSMA protein. Human PSMA includes the two protein products, PSMA and PSM', encoded by the two alternatively spliced mRNA variants (containing about 2,653 and 2,387 nucleotides, respectively) of the PSMA cDNA disclosed in Israeli *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53:227-230; Su *et al.* (1995) *Cancer Res.* 55:1441-1443; US 5,538,866, US 5,935,818, and WO 97/35616, the contents of which are hereby incorporated by reference. The long transcript of PSMA encodes a protein product of about 100-120 kDa molecular weight characterized as a type II transmembrane receptor having sequence homology with the transferrin receptor and having NAALADase activity (Carter *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:749-753). Accordingly, the term "human PSMA" refers to at least two protein products, human PSMA and PSM', which have or are homologous to (e.g., at least about 85%, 90%, 95% identical to) an amino acid sequence as shown in Israeli *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53:227-230; Su *et al.* (1995) *Cancer Res.* 55:1441-1443; US 5,538,866, US 5,935,818, and WO 97/35616; or which is encoded by (a) a naturally occurring human PSMA nucleic acid sequence (e.g., Israeli *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53:227-230 or US 5,538,866); (b) a nucleic acid sequence degenerate to a naturally occurring human PSMA sequence; (c) a nucleic acid sequence homologous to (e.g., at least about 85%, 90%, 95% identical to) the naturally occurring human PSMA nucleic acid sequence; or (d) a nucleic acid sequence that hybridizes to one of the foregoing nucleic acid sequences under stringent conditions, e.g., highly stringent conditions.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00115] An "anti-PSMA antibody" is an antibody that interacts with (e.g., binds to) PSMA, preferably human PSMA protein. Preferably, the anti-PSMA antibody interacts with, e.g., binds to, the extracellular domain of PSMA, e.g., the extracellular domain of human PSMA located at about amino acids 44-750 of human PSMA (amino acid residues correspond to the human PSMA sequence disclosed in US 5,538,866). In one embodiment, the anti-PSMA antibody binds all or part of the epitope of an antibody described herein, e.g., J591, E99, J415, and J533. The anti-PSMA antibody can inhibit, e.g., competitively inhibit, the binding of an antibody described herein, e.g., J591, E99, J415, and J533, to human PSMA. An anti-PSMA antibody may bind to an epitope, e.g., a conformational or a linear epitope, which epitope when bound prevents binding of an antibody described herein, J591, E99, J415, and J533. The epitope can be in close proximity spatially or functionally-associated, e.g., an overlapping or adjacent epitope in linear sequence or conformationally to the one recognized by the J591, E99, J415, or J533 antibody. In one embodiment, the anti-PSMA antibody binds to an epitope located wholly or partially within the region of about amino acids 120 to 500, preferably 130 to 450, more preferably, 134 to 437, or 153 to 347, of human PSMA (amino acid residues correspond to the human PSMA sequence disclosed in US 5,538,866). Preferably, the epitope includes at least one glycosylation site, e.g., at least one N-linked glycosylation site (e.g., an asparagine residue located at about amino acids 190-200, preferably at about amino acid 195, of human PSMA; amino acid residues correspond to the human PSMA sequence disclosed in US 5,538,866).

[00116] Cell lines that produce anti-PSMA antibodies, e.g., murine and modified anti-PSMA antibodies, described herein have been deposited with the ATCC. The ATCC designations of the cell lines that produce each of the anti-PSMA antibodies are listed in Table 7.

Table 7

Anti-PSMA Antibody	ATCC Designation
E99	HB-12101
J415	HB-12109
J533	HB-12127
J591	HB-12126
deJ591	PTA-3709
deJ415	PTA-4174

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00117] In a preferred embodiment, the interaction, e.g., binding, occurs with high affinity (e.g., affinity constant of at least $10^7 M^{-1}$, preferably, between $10^8 M^{-1}$ and 10^{10} , or about $10^9 M^{-1}$) and specificity. Preferably, the anti-PSMA antibody treats, e.g., ablates or kills, a cell, e.g., a PSMA-expressing cell (e.g., a prostatic or cancerous cell). The mechanism by which the anti-PSMA antibody treats, e.g., ablates or kills, the cell is not critical to the practice of the invention. In one embodiment, the anti-PSMA antibody may bind to and be internalized with the PSMA expressed in the cells and/or vascular endothelial cells proximate to the cells. In those embodiments, the anti-PSMA antibody can be used to target a second moiety, e.g., a labeling agent, a labeling agent, or a viral agent, to the cell. In other embodiments, the anti-PSMA antibody may mediate host-mediated-killing, e.g., complement- or ADCC-mediated killing, of the cell and/or the vascular cell proximate thereto, upon binding to the extracellular domain of PSMA. The cell can be killed directly by the anti-PSMA antibody by binding directly to the cell or the vascular endothelial cells proximate thereto. Alternatively, the anti-PSMA antibody can treat, e.g., kill or ablate, or otherwise change the properties of the vascular endothelial cells to which it binds so that blood flow to the cells proximate thereto is reduced, thereby causing the cells to be killed or ablated. Examples of anti-PSMA antibodies include, e.g., monospecific, monoclonal (e.g., human), recombinant or modified, e.g., chimeric, CDR-grafted, humanized, deimmunized, and *in vitro* generated anti-PSMA antibodies.

[00118] As used herein, the term "treat" or "treatment" is defined as the application or administration of an anti-PSMA antibody or antigen binding fragment thereof to a subject, e.g., a patient, or application or administration to an isolated tissue or cell from a subject, e.g., a patient, which is returned to the patient. The anti-PSMA antibody or antigen binding fragment thereof, can be administered alone or in combination with, a second agent. The subject can be a patient having a disorder (e.g., a disorder as described herein), a symptom of a disorder or a predisposition toward a disorder. The treatment can be to cure, heal, alleviate, relieve, alter, remedy, ameliorate, palliate, improve or affect the disorder, the symptoms of the disorder or the predisposition toward the disorder. While not wishing to be bound by theory treating is believed to cause the inhibition, ablation, or killing of a cell *in vitro* or *in vivo*, or otherwise reducing capacity of a cell, e.g., an aberrant cell, to mediate a disorder, e.g., a disorder as described herein (e.g., a cancer or prostatic disorder).

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00119] As used herein, an amount of an anti-PSMA antibody effective to treat a disorder, or a "therapeutically effective amount" refers to an amount of the antibody which is effective, upon single or multiple dose administration to a subject, in treating a cell, e.g., a prostatic or cancer cell (e.g., a PSMA-expressing prostatic or cancer cell, or a vascular cell proximate thereto), or in prolonging curing, alleviating, relieving or improving a subject with a disorder as described herein beyond that expected in the absence of such treatment. As used herein, "inhibiting the growth" of the neoplasm refers to slowing, interrupting, arresting or stopping its growth and metastases and does not necessarily indicate a total elimination of the neoplastic growth.

[00120] As used herein, an amount of an anti-PSMA antibody effective to prevent a disorder, or a "a prophylactically effective amount" of the antibody refers to an amount of an anti-PSMA antibody, e.g., an anti-PSMA antibody as described herein, which is effective, upon single- or multiple-dose administration to the subject, in preventing or delaying the occurrence of the onset or recurrence of a disorder, e.g., a cancer or prostatic disorder as described herein, or treating a symptom thereof.

[00121] The terms "induce", "inhibit", "potentiate", "elevate", "increase", "decrease" or the like, e.g., which denote quantitative differences between two states, refer to a difference, e.g., a statistically or clinically significant difference, between the two states. For example, "an amount effective to inhibit the proliferation of the PSMA-expressing hyperproliferative cells" means that the rate of growth of the cells will be different, e.g., statistically different, from the untreated cells.

[00122] As used herein, "specific binding" refers to the property of the antibody to: (1) to bind to PSMA, e.g., human PSMA protein, with an affinity of at least $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, and (2) preferentially bind to PSMA, e.g., human PSMA protein, with an affinity that is at least two-fold, 50-fold, 100-fold, 1000-fold, or more greater than its affinity for binding to a non-specific antigen (e.g., BSA, casein) other than PSMA.

[00123] As used herein, the term "antibody" refers to a protein comprising at least one, and preferably two, heavy (H) chain variable regions (abbreviated herein as VH), and at least one and preferably two light (L) chain variable regions (abbreviated herein as VL). The VH and VL regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed "complementarity determining regions" ("CDR"), interspersed with regions that are more conserved, termed

WO 02/098897

PCT/US02/17068

"framework regions" (FR). The extent of the framework region and CDRs has been precisely defined (see, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, and Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, which are incorporated herein by reference). Preferably, each VH and VL is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[00124] The VH or VL chain of the antibody can further include all or part of a heavy or light chain constant region. In one embodiment, the antibody is a tetramer of two heavy immunoglobulin chains and two light immunoglobulin chains, wherein the heavy and light immunoglobulin chains are inter-connected by, e.g., disulfide bonds. The heavy chain constant region is comprised of three domains, CH1, CH2 and CH3. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The variable region of the heavy and light chains contains a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the antibodies typically mediate the binding of the antibody to host tissues or factors, including various cells of the immune system (e.g., effector cells) and the first component (C1q) of the classical complement system. The term "antibody" includes intact immunoglobulins of types IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (as well as subtypes thereof), wherein the light chains of the immunoglobulin may be of types kappa or lambda.

[00125] As used herein, the term "immunoglobulin" refers to a protein consisting of one or more polypeptides substantially encoded by immunoglobulin genes. The recognized human immunoglobulin genes include the kappa, lambda, alpha (IgA1 and IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, epsilon and mu constant region genes, as well as the myriad immunoglobulin variable region genes. Full-length immunoglobulin "light chains" (about 25 Kd or 214 amino acids) are encoded by a variable region gene at the NH2-terminus (about 110 amino acids) and a kappa or lambda constant region gene at the COOH-terminus. Full-length immunoglobulin "heavy chains" (about 50 Kd or 446 amino acids), are similarly encoded by a variable region gene (about 116 amino acids) and one of the other aforementioned constant region genes, e.g., gamma (encoding about 330 amino acids). The term "immunoglobulin" includes an immunoglobulin having: CDRs from a non-human source, e.g., from a non-human antibody, e.g., from a mouse immunoglobulin or another non-human immunoglobulin, from a consensus

WO 02/098897

PCT/US02/17068

sequence, or from a sequence generated by phage display, or any other method of generating diversity; and having a framework that is less antigenic in a human than a non-human framework, e.g., in the case of CDRs from a non-human immunoglobulin, less antigenic than the non-human framework from which the non-human CDRs were taken. The framework of the immunoglobulin can be human, humanized non-human, e.g., a mouse, framework modified to decrease antigenicity in humans, or a synthetic framework, e.g., a consensus sequence. These are sometimes referred to herein as modified immunoglobulins. A modified antibody, or antigen binding fragment thereof, includes at least one, two, three or four modified immunoglobulin chains, e.g., at least one or two modified immunoglobulin light and/or at least one or two modified heavy chains. In one embodiment, the modified antibody is a tetramer of two modified heavy immunoglobulin chains and two modified light immunoglobulin chains.

[00126] As used herein, "isotype" refers to the antibody class (e.g., IgM or IgG) that is encoded by heavy chain constant region genes.

[00127] The term "antigen-binding fragment" of an antibody (or simply "antibody portion," or "fragment"), as used herein, refers to a portion of an antibody which specifically binds to PSMA (e.g., human PSMA), e.g., a molecule in which one or more immunoglobulin chains is not full length but which specifically binds to PSMA (e.g., human PSMA protein). Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding fragment" of an antibody include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; (ii) a F(ab')₂ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; (iv) a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody; (v) a dAb fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), which consists of a VH domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR) having sufficient framework to specifically bind, e.g., an antigen binding portion of a variable region. An antigen binding portion of a light chain variable region and an antigen binding portion of a heavy chain variable region, e.g., the two domains of the Fv fragment, VL and VH, can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see e.g., Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Such single chain antibodies are also intended to be

WO 02/098897

PCT/US02/17068

encompassed within the term "antigen-binding fragment" of an antibody. These antibody fragments are obtained using conventional techniques known to those with skill in the art, and the fragments are screened for utility in the same manner as are intact antibodies.

[00128] The term "monospecific antibody" refers to an antibody that displays a single binding specificity and affinity for a particular target, e.g., epitope. This term includes a "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition," which as used herein refer to a preparation of antibodies or fragments thereof of single molecular composition.

[00129] The term "recombinant" antibody, as used herein, refers to antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as antibodies expressed using a recombinant expression vector transfected into a host cell, antibodies isolated from a recombinant, combinatorial antibody library, antibodies isolated from an animal (e.g., a mouse) that is transgenic for human immunoglobulin genes or antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involves splicing of human immunoglobulin gene sequences to other DNA sequences. Such recombinant antibodies include humanized, CDR grafted, chimeric, deimmunized, *in vitro* generated (e.g., by phage display) antibodies, and may optionally include constant regions derived from human germline immunoglobulin sequences.

[00130] As used herein, the term "substantially identical" (or "substantially homologous") is used herein to refer to a first amino acid or nucleotide sequence that contains a sufficient number of identical or equivalent (e.g., with a similar side chain, e.g., conserved amino acid substitutions) amino acid residues or nucleotides to a second amino acid or nucleotide sequence such that the first and second amino acid or nucleotide sequences have similar activities. In the case of antibodies, the second antibody has the same specificity and has at least 50% of the affinity of the same.

[00131] Calculations of "homology" between two sequences can be performed as follows. The sequences are aligned for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in one or both of a first and a second amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment and non-homologous sequences can be disregarded for comparison purposes). In a preferred embodiment, the length of a reference sequence aligned for comparison purposes is at least 30%, preferably at least 40%, more preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, and even more preferably at least 70%, 80%, 90%, 100% of the length of the reference sequence. The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide

WO 02/098897

PCT/US02/17068

positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position (as used herein amino acid or nucleic acid "identity" is equivalent to amino acid or nucleic acid "homology"). The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences, taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences.

[00132] The comparison of sequences and determination of percent homology between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. In a preferred embodiment, the percent homology between two amino acid sequences is determined using the Needleman and Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.* 48:444-453, algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package, using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. In yet another preferred embodiment, the percent homology between two nucleotide sequences is determined using the GAP program in the GCG software package, using a NWSgapdna.CMP matrix and a gap weight of 40, 50, 60, 70, or 80 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. A particularly preferred set of parameters (and the one that should be used if the practitioner is uncertain about what parameters should be applied to determine if a molecule is within a homology limitation of the invention) are a Blossum 62 scoring matrix with a gap penalty of 12, a gap extend penalty of 4, and a frameshift gap penalty of 5.

[00133] As used herein, the term "hybridizes under low stringency, medium stringency, high stringency, or very high stringency conditions" describes conditions for hybridization and washing. Guidance for performing hybridization reactions can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, which is incorporated by reference. Aqueous and nonaqueous methods are described in that reference and either can be used. Specific hybridization conditions referred to herein are as follows: 1) low stringency hybridization conditions in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by two washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at least at 50°C (the temperature of the washes can be increased to 55°C for low stringency conditions); 2) medium stringency hybridization conditions in 6X SSC at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 60°C; 3) high stringency hybridization conditions in 6X SSC at about 45°C, followed by one or more

WO 02/098897

PCT/US02/17068

washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 65°C; and preferably 4) very high stringency hybridization conditions are 0.5M sodium phosphate, 7% SDS at 65°C, followed by one or more washes at 0.2X SSC, 1% SDS at 65°C. Very high stringency conditions (4) are the preferred conditions and the ones that should be used unless otherwise specified.

[00134] It is understood that the antibodies and antigen binding fragment thereof of the invention may have additional conservative or non-essential amino acid substitutions, which do not have a substantial effect on the polypeptide functions. Whether or not a particular substitution will be tolerated, i.e., will not adversely affect desired biological properties, such as binding activity can be determined as described in Bowie, JU et al. (1990) *Science* 247:1306-1310. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine).

[00135] A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of the binding agent, e.g., the antibody, without abolishing or more preferably, without substantially altering a biological activity, whereas an "essential" amino acid residue results in such a change.

Anti-PSMA Antibodies

[00136] Many types of anti-PSMA antibodies, or antigen-binding fragments thereof, are useful in the methods of this invention. The antibodies can be of the various isotypes, including: IgG (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD, or IgE. Preferably, the antibody is an IgG isotype, e.g., IgG1. The antibody molecules can be full-length (e.g., an IgG1 or IgG4 antibody) or can include only an antigen-binding fragment (e.g., a Fab, F(ab')₂, Fv or a single chain Fv fragment). These include monoclonal antibodies, recombinant antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies, deimmunized antibodies, and human antibodies, as well as antigen-binding fragments of the foregoing.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00137] Monoclonal anti-PSMA antibodies can be used in the methods of the invention. Preferably, the monoclonal antibodies bind to the extracellular domain of PSMA (i.e., an epitope of PSMA located outside of a cell). Examples of preferred murine monoclonal antibodies to human PSMA include, but are not limited to, E99, J415, J533 and J591, which are produced by hybridoma cell lines having an ATCC Accession Number HB-12101, HB-12109, HB-12127, and HB-12126, respectively, all of which are disclosed in US 6,107,090 and US 6,136,311, the contents of which are expressly incorporated by reference. Most preferably, the murine monoclonal antibody is J591, produced by HB-12126.

[00138] Additional monoclonal antibodies to PSMA can be generated using techniques known in the art. Monoclonal antibodies can be produced by a variety of techniques, including conventional monoclonal antibody methodology e.g., the standard somatic cell hybridization technique of Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). See generally, Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[00139] Useful immunogens for the purpose of this invention include PSMA (e.g., human PSMA)-bearing cells (e.g., a prostate tumor cell line, e.g., LNCap cells, or fresh or frozen prostate tumor cells); membrane fractions of PSMA-expressing cells (e.g., a prostate tumor cell line, e.g., LNCap cells, or fresh or frozen prostate tumor cells); isolated or purified PSMA, e.g., human PSMA protein (e.g., biochemically isolated PSMA, or a portion thereof, e.g., the extracellular domain of PSMA). Techniques for generating antibodies to PSMA are described in US 6,107,090, US 6,136,311, the contents of all of which are expressly incorporated by reference.

[00140] Human monoclonal antibodies (mAbs) directed against human proteins can be generated using transgenic mice carrying the human immunoglobulin genes rather than the mouse system. Splenocytes from these transgenic mice immunized with the antigen of interest are used to produce hybridomas that secrete human mAbs with specific affinities for epitopes from a human protein (see, e.g., Wood et al. International Application WO 91/00906, Kucherlapati et al. PCT publication WO 91/10741; Lonberg et al. International Application WO 92/03918; Kay et al. International Application 92/03917; Lonberg, N. et al. 1994 *Nature* 368:856-859; Green, L.L. et al. 1994 *Nature Genet.* 7:13-21; Morrison, S.L. et al. 1994 *Proc.*

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Bruggeman et al. 1993 *Year Immunol* 7:33-40; Tuailon et al. 1993 *PNAS* 90:3720-3724; Bruggeman et al. 1991 *Eur J Immunol* 21:1323-1326).

[00141] Anti-PSMA antibodies or fragments thereof useful in the present invention may also be recombinant antibodies produced by host cells transformed with DNA encoding immunoglobulin light and heavy chains of a desired antibody. Recombinant antibodies may be produced by known genetic engineering techniques. For example, recombinant antibodies may be produced by cloning a nucleotide sequence, e.g., a cDNA or genomic DNA, encoding the immunoglobulin light and heavy chains of the desired antibody. The nucleotide sequence encoding those polypeptides is then inserted into expression vectors so that both genes are operatively linked to their own transcriptional and translational expression control sequences. The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used. Typically, both genes are inserted into the same expression vector. Prokaryotic or eukaryotic host cells may be used.

[00142] Expression in eukaryotic host cells is preferred because such cells are more likely than prokaryotic cells to assemble and secrete a properly folded and immunologically active antibody. However, any antibody produced that is inactive due to improper folding may be renaturable according to well known methods (Kim and Baldwin, "Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", *Ann. Rev. Biochem.* 51, pp. 459-89 (1982)). It is possible that the host cells will produce portions of intact antibodies, such as light chain dimers or heavy chain dimers, which also are antibody homologs according to the present invention.

[00143] It will be understood that variations on the above procedure are useful in the present invention. For example, it may be desired to transform a host cell with DNA encoding either the light chain or the heavy chain (but not both) of an antibody. Recombinant DNA technology may also be used to remove some or all of the DNA encoding either or both of the light and heavy chains that is not necessary for PSMA binding, e.g., the constant region may be modified by, for example, deleting specific amino acids. The molecules expressed from such truncated DNA molecules are useful in the methods of this invention. In addition, bifunctional antibodies may be produced in which one heavy and one light chain are anti-PSMA antibody and the other heavy and light chain are specific for an antigen other than PSMA, or another epitope of PSMA.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00144] Chimeric antibodies can be produced by recombinant DNA techniques known in the art. For example, a gene encoding the Fc constant region of a murine (or other species) monoclonal antibody molecule is digested with restriction enzymes to remove the region encoding the murine Fc, and the equivalent portion of a gene encoding a human Fc constant region is substituted (see Robinson et al., International Patent Publication PCT/US86/02269; Akira, et al., European Patent Application 184,187; Taniguchi, M., European Patent Application 171,496; Morrison et al., European Patent Application 173,494; Neuberger et al., International Application WO 86/01533; Cabilly et al. U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly et al., European Patent Application 125,023; Better et al. (1988 *Science* 240:1041-1043); Liu et al. (1987) *PNAS* 84:3439-3443; Liu et al., 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al. (1987) *PNAS* 84:214-218; Nishimura et al., 1987, *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-449; and Shaw et al., 1988, *J. Natl Cancer Inst.* 80:1553-1559).

[00145] An antibody or an immunoglobulin chain can be humanized by methods known in the art. Once the murine antibodies are obtained, the variable regions can be sequenced. The location of the CDRs and framework residues can be determined (see, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, and Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, which are incorporated herein by reference). The light and heavy chain variable regions can, optionally, be ligated to corresponding constant regions.

[00146] Murine anti-PSMA antibodies can be sequenced using art-recognized techniques. As an example, hybridomas expressing murine hybridomas J533, J415 and E99 were propagated in culture in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum. The isotype of the antibodies secreted was confirmed as IgG1 κ , IgG1 κ , and IgG3 κ respectively. These monoclonal antibodies, like J591, bind to the external domain of prostate specific membrane antigen. J591, J533 and E99 recognize the same epitope, while J415 recognizes an independent epitope. Total RNA for each monoclonal was prepared from 10^7 hybridoma cells. V_H and V_K cDNA was prepared using reverse transcriptase and mouse κ constant region and mouse IgG constant region primers. The first strand cDNAs were amplified by PCR using a variety of mouse signal sequence primers (6 for V_H and 7 for V_K). The amplified DNAs were gel-purified and cloned into the vector pT7Blue. The V_H and V_K clones obtained were screened for correct inserts by

WO 02/098897

PCT/US02/17068

PCR and the DNA sequence of selected clones determined by the dideoxy chain termination method (see Table 7).

[00147] The DNA and amino acid sequences for the heavy and light chain variable regions from J415 were obtained and are shown in Figures 7B (V_H) and 8B (V_K) (also, see Table 5). The location of the CDRs is shown. J415 V_H can be assigned to Mouse Heavy Chains Subgroup IIIC (Kabat EA *et al*; *ibid*). The sequence of J415 V_H compared to the consensus sequence for this subgroup is shown in Figure 7C. J415 V_K can be assigned to Mouse Kappa Chains Subgroup I (Kabat EA *et al*; *ibid*). The sequence of J415 V_K compared to the consensus sequence for this subgroup is shown in Figure 8C.

[00148] The DNA and amino acid sequences encoding the heavy and light chain variable regions J533 were obtained and are shown in Figures 9A (V_H) and 10A (V_K) (see also Table 5). The location of the CDRs is shown in each figure. J533 V_H can be assigned to Mouse Heavy Chains Subgroup IIA (Kabat EA *et al*; Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991). The sequence of J533 V_H compared to the consensus sequence for this subgroup is shown in Figure 9B. J533 V_K can be assigned to Mouse Kappa Chains Subgroup III (Kabat EA *et al*; *ibid*). The sequence of J533 V_K compared to the consensus sequence for this subgroup is shown in Figure 10B.

[00149] The DNA and amino acid sequences of the heavy and light chain variable regions of E99 were obtained and are shown in Figures 11A (V_H) and 12A (V_K) (see also Table 5). The location of the CDRs is shown. E99 V_H can be assigned to Mouse Heavy Chains Subgroup IB (Kabat EA *et al*; *ibid*). The sequence of E99 V_H compared to the consensus sequence for this subgroup is shown in Figure 11B. E99 V_K can be assigned Mouse Kappa Chains Subgroup I (Kabat EA *et al*; *ibid*). The sequence of E99 V_K compared to the consensus sequence for this subgroup is shown in Figure 12B.

[00150] The amino acid sequence and nucleotide sequences encoding the variable region of antibodies J415, delJ415, J591, delJ591, J533 and E99 are provided below in Table 8.

Table 8: Antibody variable chain sequences

NAME	Organism	FIG.	SEQ ID NO:	SEQUENCE
V_H J415	Mus musculus	Fig. 7B	125	gaagtgaagcttgaggagctctgaggagccttgctgcaacctgg aggatccatgaactctctctgtgttgcctctggattcaatttcagtaat

WO 02/098897

PCT/US02/17068

				tactggatgaactgggtccgcagctccagaagaagggccttgag tgggtgctgaattagatgcgaatctaataatttgcacacattatg cggagctctggaaggagggtcatcatcacaagatgatcca agagtagtctctacctgcaaatgaacactgagagctgaagaca ctggcatttattctgtaccagcggatggaataattctgggcca ggcaccactctcacagtctctca
V _H Variable Region J591	Mus musculus	Fig. 1A	19	EVQLQQSGPELKKPGTSSVRISCKTSGYTFT EYTIHWVKQSHGKSLIEWIGNINPNNGGTT YNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSITS EDSAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLLTVSS
V _H J415 (complementar y strand of SEQ ID NO:125)	Mus musculus	Fig. 7B	126	tggagagactgtgagagtggtgcttgcccagaaattccat cgccctggtagagtaataatgccagtgctctcagctcgaagtgtc atttgcagtgtagacactctctggatcatctctgagatgatgacc ctccctttcacagactccgataatgttgcaaatattatgattgc gatctaatttcagcaaccactcaagccctctctctggagactggc ggacccagttcatccagtaattactgaaagtgaatccagagggca cacaggagagtttcagatctccaggttgcaaccaagctcctcc agactctcnaagttcacttc
V _L J415	Mus musculus	Fig. 8B	127	aacattgtaatgcccaatttcccaatccatgtccattcagtagga gagagggtcaccttgacctgcaaggccagtgagaattgggtact tatgtctctggatcaacagaaacagagacagctcctcgaagtgt gatatacggggatcccaacgggttcactgggtcccgatcgctt cacaggcagtgagatctgcaacagatttactctgacatcagcagt gtgcagactgaagacctgtagattattactgtgcagaggttacac cttccgtacacgttcgaaggaggaccaaagctggaatgaag
V _L Variable Region J591	Mus musculus	Fig. 1B	20	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIKASQDV GTAVDWYQKPGQSPKLLIYWASTRHTG VPDRFTSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYF CQQYNSYPLTFGAGTMLDLK
V _L J415 (complementar y strand of SEQ ID NO:127)	Mus musculus	Fig. 8B	128	cttcatttcagcttggtcccccctccgaactgtgacgaaaggtgt aactctgtccacagtaataatcacaaggtctcagctctgcacactg ctgatgttcagaaagaatctgttgagatccactgctgtgaagc gatcggggaccccgtagaacgggttgatgccccgtatataca tcttaggagacgttctgggtttctgtgataccagacacataagtac ccacattctcactgaccttgaggtcaaggtgacctctctcact gaaatggacatggatttgggaattgggtcattacaatgtt
V _H Variable Region (Deimm) J591	Artificial - deimmunized heavy chain J591	Fig. 2A	21	EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFT EYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGGTT YNQKFEDKATLTVDKSTDTAYMELSSIRS EDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLLTVSS
V _L Variable Region (Deimm) J591	Artificial - deimmunized light chain J591	Fig. 2B	22	DIQMTQSPSSLSSTVGDRVTLTCKASQDV GTAVDWYQKPGSPKLLIYWASTRHTGI PSRFTSGSGTDFLTITSLQPEDFADYYCQ QYNSYPLTFGPGTKVDIK
V _H Deimmunized J591 CDS (122- 166)	Artificial - deimmunized heavy chain J591	Fig. 4A	23	aagccttatgaatgcaaatcctctgaaatctacatgtaaatataggt ttgtctataccacaacagaaaacatgagatcacagttctctctac agttactgagcacacaggaacctcaccatgggatggagctgtatcat ccctctctgttagcaacagctacagtgtagggctcagatgacga ggcttgaggtctgacatatataggtgcaatgaatccactttg cctttctccacaggtgtccactccaggtccaactgtagcagctct

WO 02/09897

PCT/US02/17068

& CDS (249-605)				ggacctgaagtgaaagacccctgggctacagtgaaagatcctg caagactctggatacacatctcaatataccatacctgggtga agcaggccctctggaagggccttgatggatggaaacatcaatc ctaacatgggtggaccactacaatcagaatggagacaagg ccacactaactgtagacaagtcaccgatacagctacatggagc tcagcagcctaagatctgaggatactcagctctatttggcagct gggtggaacttgactactggggccaagggaacctgctacccgtc cctcagctgagctctacacacctctctctctatcagcttaacatagat ttatcgtcatttgggggggaaatgtgtgtatctgaattcaggatc tgaaggactaggacaccttgggagtcagaaaaggctcatggga gcccggctgatgcagacagatcctcagctccagactctatg gccagagattataggatcc
V _H Deimmunized (complementar y strand of SEQ ID NO.23) J591	Artificial - deimmunized heavy chain J591	Fig. 4A	24	ggatcctataaatctctggccatgaagctgggagctgaggatgto tgtctcatcagccgggctcccaatgacctctgactcccaag ggtccctagctcctcatgactgaatcagatacacatctccccc cccaacaatgcagtaaatctatttaagctgaatagaagagagag gttgtaaggactcacctgaggagacggtgagcagggtccctggc ccagtagtcaaaagtccaaccagctgcacataaagactgcatg atctcagatcttagctgctgagctcagtaggctgtagcggggg actgtctacagttaggtggcctgtctcgaactctgattgttaggt ggtaccacattgttaggattgattttccaactcactcaagccctt tcaggggcctgtctcaccagctgtatgtatatactgaatgtgt atccagaagctgtaggatactcactgtagcccgagctcttc actcaggtccagactgaccagttggagctcggagtgacacct gtgagagaaaaggcaagtgatgtcattgtcaccatataatgt ccagacctcaagcctgtactgtgagcccttacctgtagctgtgc taacagaagaggatgatacagctccatccatggtgagctcctgt gtgctcagtaactgtagagagaactgtgactcagttttctgtttgt ggtatagacaacactatatttaacctgagatcagaggattgcala ttcataagctt
V _L Deimmunized J591 CDS (122-166) & CDS (249-581)	Artificial - deimmunized light chain J591	Fig. 4B	25	aagcttatgaatgcaaatccctctgaatctacatggtaatatagggt ttgtctatccacaacagaaaaacatgagatcacagttctctctac agttaactgagcacacaggaacctcaccatggatggagctgatalcat cctctcttctgtagcaacagctacaggtgaagggtcacagtagca ggcttgagggtctggacatataatgggtgaacatgacatccatttg cccttctctcagaggtgtcactccacatcagatgaccagctct ccctcatccctgtccacatcagtaggagacagggtcacccctcaact gtaaggccagtcagatgtgggactgctgtagactggtatcaaca gaacacaggaacctctcctaactatgatttattggcactcaactc ggcacactggaaatccctagtcgtctctcagcagtgatctggga cagacttcaactctcaccattctagtcttcagcctgaagacttgcag attatattctgtagcaataaacaagctatccctcagcttctggtcctg ggaccaaaggtggacatcaaacgtgagtagaatttaacttgccttc ctcagttggatcc
V _L Deimmunized (complementar y strand of SEQ ID NO.25) J591	Artificial - deimmunized light chain J591	Fig. 4B	26	ggatccaactgagggaagcaagtttaactctactcagtttgatgt ccaccttgggtccaggaccgaacgtgagagatagctgtatattg ctgacagtaataatctgcaagctctcaggctgaagactagaatg gtgagagtgaagctctgtccagatccactgctggaagcgacta gggattccagtggtccgagtggaatgcccaataatcagtagtttag gagatggtcctgtttctgtgtataccagctctacagcagtaaccaca tcttgactgacctacaggtgagggtgacctgtctctctactgaggt

WO 02/09897

PCT/US02/17068

				gaacaggatgagggagactgggtcatctgagtcggagtgga caccgtggagagaaggcaagtgatgcattgacccatata tatgtccagacctcaagcctgctactgtgagccctacccttagct gtgtccaagaagaaggatgatacagctccatccatggtagg tctgtgtgctcagtaactgagagagaactgtgactcatgtttct gttgtggatagacaacctatattaccatgtaggtcagaggatt gcatattcataagctt
V _H Deimmunized (predicted a.a. of SEQ ID NO:23) J591	Artificial - deimmunized heavy chain J591	Fig. 4A	27	MGWSCILFLVATATGVHSEVQLVQSPGE VKKPGATVKISCKTSGYTFEYTHHWKQ APKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKA TLTVDKSTDATYMESSLRSEDYAVYYCA AGWNFDYWGGTLLTVSS
V _L Deimmunized (predicted a.a. of SEQ ID NO:25) J591	Artificial - deimmunized light chain J591	Fig. 4B	28	MGWSCILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSL STSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQQK PGPSPKLLIYCASTRHTGIPSRFSGSGSGTD FILTISSLQPEDFADYYCQQYNSTPLTGP GTKVDIK
V _H Variable Region J415	Mus musculus	Fig. 5	47	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTF SNYWMNWVRQSPKGLVWVAEIRSQSN FATHYAESVKGRVIRDDSKSSVYLQMN NLRAEDTGIYYCTRRWNNFWGQGTTLTV SS
V _L Variable Region J415	Mus musculus	Fig. 6	48	NIVMTQFPKSMSSISVGERVTLTCKASENV TYVSWYQQKPEQSPKMLIYGASNRFTGVP DRFTGSGSATDFILTISSVQTEDLVYYCG QSYTFPYTFGGGKLEMK
V _H Variable Region (Deimm) J415-4	Artificial - deimmunized heavy chain J415-4	Fig. 5	49	EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFS NYWMNWVRQSPKGLVWVAEIRSQSNF ATHYAESVKGRVIRDDSKSSVYLQMN LRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTS S
V _L Variable Region (Deimm) J415-5	Artificial - deimmunized light chain J415-5	Fig. 6	50	NIVMTQFPKSMSSASAGERMTLTCKASENV GTYVSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFTGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLVYYC GQSYTFPYTFGGGKLEMK
V _H Deimmunized J415-4	Artificial - deimmunized heavy chain J415-4		51	gaagtgaactgaggagctcggaggagcctgtgcaacctgg agggctcatgaaaatctcctgtgtgtcctctgattcattcagtaa ttaactggatgaactggctccgccagctctccagagaaggagctga gtgggtgtcgaattagatgcgaatcctaataattgcaacacattat gcggagctctggaaggagggtcatcatcctcaagagatgattcc aagagtagtctctacctgcaatgaacagtttgagagctgaagaca ctgcctgttattactgtaccagggcagtggaataattctgggcca ggaccactgtcagctcctca
V _L Deimmunized	Artificial - deimmunized		52	aacattgtaatgacccaattcccaatccatgtccgctcagcagg agagaggatgacctgacctgcaaggccagtgaagaatgggga

WO 02/098897

PCT/US02/17068

J415-5	light chain J415-5			cttatgtctctctggtatcaacagaacccaacacagtccttaagatg ttgatatacggggcgaacccaacgggttcactgggtccagatcgct tctccggcagtgatctggaacagatttcaatctgacacagcagc gtgcaggcagaagacctgttagatttaactgtgacacaggtaca cctttccgtacacgttcggagcggggaacacagctggaaatgaag
V _H Deimmunized J415-1 CDS (122- 160) & CDS (249- 608) Mature (18- 133)	Artificial - deimmunized heavy chain J415-1	Fig. 7A	53	aagcttatgaatfatgcaaatcctctgaatctacatgtaaatataggt ttgtctataccacaacagaacaaacatgagatcacagttctctctac agttactgagcacacaggaacctcaccatgggatggatctatfaca tctctctctgttagcaacagctacaggttaagggtctcacagtagc aggcttgaggtctggacatatataatgggtgacaatgacatccatt gctttctctccacaggtgtccactccgagtgaaacttgaggagt ctggagaggcctgtgtgcaactggagggtccatgaaatctcct gtaaagcctctggttcaactttcagtaattcaggtgaactgggtcc gccagactccagagaagggtgtggtgtgtctctattatagatc gcaatctaataatttgcacacattttggggagctctgtgaaaggga gggtcatcatcagagatgattccaaagatgtgtctacatccctgca aatgaacagtttgagagctgaagacatgccgtttattactgtacca ggcgtatggaataattctggggccaaggcaccactgtcacagctct cctcaggtgagctccttacaactctctctctcattcagctaaatagat ttatctgcatgtgtggggggaaatgtgtgtatctgaatttcaggctca tgaaggactaggacaccttgagggtgaggaagaggtcatttgga gcccgggtgtgtgacagacagatcctcagctccagactcatg gccagagattataggatcc
V _H Deimmunized (predicted a.a. of SEQ ID NO.53) J415-1	Artificial - deimmunized heavy chain J415-1	Fig. 7A	54	MGWSCIILFLVATGVHSEVKLEESGGGLV QPGGSMKISCKASGFTFSNYWMNVVRQT PEKGLEWVALIRSQSNFATHYAESVKGR VIISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTAVYYC TRRWNNFWGQTTVTVSS
V _H Deimmunized (complementar y strand of SEQ ID NO.53) J415-1	Artificial - deimmunized heavy chain J415-1	Fig. 7A	55	ggatcctataaactctgtgccatgaagctcggagctgaggtatc tgtctgcatcagccggcctcccaatgacctttctgactccaaag gtgtccctagtccttcatgacctgaattcagatacacacattccccc cccaacaatgcagtaaatctatttaagctgaataagaagagag gttgtgaaggactcacctgaggagactgtgacagtggtgtccttggc cccagaataatttccatcgccgtgacagataatnaacggcagtgct tcagctctcaaatctgttcattgaggtagacactactcttgaaatca tctcttgagatgatgacctccttccagagactcgcataatgtgtt gcaaaatattagattgcgtactaataagagcaacccatcaagcc ccttctctggtgtcggcgaccaggttcacagtaattatcgtaaa gtgaatccagaggcttlacaggagatttcatggacctccagggtg caccgaagcctcccaagactcctcaagtttcaactcggagtggaaca cctgtgagagaagaagcaaatgagtgatgtcattgtcaccatataata tgtccagacotcaagcctgtactgtgagcccttacctgtgagctgt tgtaccagaagaaggatgatacagctcctccatgtgaggtgtc ctgtgtgtcagtaactgtgagagagaactgtgactcatgttttctgt ttgtgtatagacaacataattaccatgtagatcagaggaattg catattcataagctt
V _L Deimmunized	Artificial - deimmunized	Fig. 8A	56	aagcttatgaatfatgcaaatcctctgaatctacatgtaaatataggt ttgtctataccacaacagaacaaacatgagatcacagttctctctac

WO 02/098897

PCT/US02/17068

J415-1 CDS (122-160) & CDS (249-581)	light chain J415-1			agttactgagcacacaggacccaccatgggagtgagctgtatca tctcttcttgtagcaacagctacaggtgaagggtcacagtagc aggcttgaggtctgacatataatgggtgacatgacatccattt goccttctccacagggtgccactccaactgtaagtacccaatc ccccaaatccatgctcgcctcagcagagagagatgacctgac ctgcaaggccagtgagaattccggtacttatgtctgtgtataac agaaccaacacagctctcctaaagtgtgatafacgggcaiccaa ccgggtcactgagggtccagatgcttctccggcagtgatctgga acagatttattctgacccagcagtggtgagcagagagacct gtgatttattctgagacagagttacaccttccgtacacgttggga ggggggaccaagctggaagtgaagcgtgagtagaatttaacctt gcttccatggtggatcc
V_L Deimmunized (predicted a.a. of SEQ ID NO:56) J415-1	Artificial - deimmunized light chain J415-1	Fig. 8A	57	MGWSCILFLVATGVHSNIVMTQSPKSM ASAGERMTLTCKASENSGTYVSWYQQK TQSPKMLIYGASNRFTGVDRFSGSGSGTD FILTASSVQAEDPVDYYCGQSYTFPYTFGG GTKLEMK
V_L Deimmunized (complementar y strand of SEQ ID NO:56) J415-1	Artificial - deimmunized light chain J415-1	Fig. 8A	58	ggatcccaactgaggaagcaagtttaattctactcacgcttattc cagcttggtcccccctccgaacgtgtagcgaagggtgaactctgt ccacagtaataatctacagggcttctgctgcacactgctggcgg tcagaatgaaatctgtccagatccactccgggaagcgatctgg gaccccaagtgaacgggttgatgcccgtatatacaacatcttagga gactgtgtgtgttctgtgataccagacacataagaccggaatt ctcactgctctgagctcaagctcatctctctctctgtagcgcg gacatgatttggggattgggtcattcaatgttgagtgacac ctgtggagagaagcgaaggtggatgcatgttaccatataatata gtccagacctcaagcctgctactgtgagcccttacctgtagctgt gtaccagaagaggatgatacagctccatccatggtgaggtcc tggtgtcctagtaactgtagagaagctgtgactcagttttctgttt gtgtagtagacaacctatatttaccatgagattcagagatttgc attcataagctt
V_H Deimmunized J415-2	Artificial - deimmunized heavy chain J415-2	Fig. 5	59	EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFS NYWMNWVRQTPEKGLEWVALIRSQSNNF ATHYAESVKGRVIISRDDSKSSVYLQMN LRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTITVTS S
V_H Deimmunized J415-3	Artificial - deimmunized heavy chain J415-3	Fig. 5	60	EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFS NYWMNWVRQTPEKGLEWVAEIRSQSNNF ATHYAESVKGRVIISRDDSKSSVYLQMN LRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTITVTS S
J415 V_H (DI) majority sequence	Artificial - majority sequence	Fig. 5	61	EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFS NYWMNWVRQTPEKGLEWVAEIRSQSNNF ATHYAESVKGRVIISRDDSKSSVYLQMN LRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTITVTS S
V_L Deimmunized J415-2	Artificial - deimmunized light chain	Fig. 6	62	NIVMTQSPKSMASASAGERMTLTCKASENV GTYVSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFTGV PDRFSGSGSGTDFILTASSVQAEDPVDYYC

WO 02/09897

PCT/US02/17068

V _L Deimmunized J415-3	Artificial - deimmunized light chain J415-3	Fig. 6	63	GQSYTFPYTFGGGKLEMK NIVMTQSPKMSASAGERMTLTCKASENV GTIVSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFTGV PDRFSGSGSGTDFTLTASSVQAEDLVDYYC GQSYTFPYTFGGGKLEMK
V _L Deimmunized J415-4	Artificial - deimmunized light chain J415-4	Fig. 6	64	NIVMTQSPKMSASAGERMTLTCKASENV GTIVSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFTGV PDRFSGSGSGTDFTLTSSVQAEDLVDYYC GQSYTFPYTFGGGKLEMK
V _L Deimmunized J415-6	Artificial - deimmunized light chain J415-6	Fig. 6	65	NIVMTQFPKMSASAGERMTLTCKASENV GTIVSWYQQKPEQSPKMLIYGASNRFTGV PDRFSGSGSGTDFTLTSSVQAEDLVDYYC GQSYTFPYTFGGGKLEMK
V _L Deimmunized J415-7	Artificial - deimmunized light chain J415-7	Fig. 6	66	NIVMTQFPKMSASAGERMTLTCKASENV GTIVSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFTGV PDRFSGSGSGTDFTLTSSVQAEDLVDYYC GQSYTFPYTFGGGKLEMK
V _L Deimmunized J415-8	Artificial - deimmunized light chain J415-8	Fig. 6	67	NIVMTQFPKMSASAGERMTLTCKASENS GTIVSWYQQKPEQSPKMLIYGASNRFTGV PDRFSGSGSGTDFTLTSSVQAEDLVDYYC GQSYTFPYTFGGGKLEMK
J415 V _L (DI) majority sequence	Artificial - majority sequence	Fig. 6	68	NIVMTQFPKMSASAGERMTLTCKASENV GTIVSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFTGV PDRFSGSGSGTDFTLTSSVQAEDLVDYYC GQSYTFPYTFGGGKLEMK
MuV _H IIC	Mus musculus	Fig. 7C	69	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVAVSGFTF SNYWMNWVRQSPKGLWVAEIRLKSDN YATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMN NLRAEDTGIYYCTTGYYGRRSWFAFWG QGTLVTSS
J415V _H /MuV _H IIC majority sequence	Artificial - majority sequence	Fig. 7C	70	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVAVSGFTF SNYWMNWVRQSPKGLWVAEIRLKSDN FATHYAESVKGRVHSRDDSKSSVYLQMN NLRAEDTGIYYCTTGYYGRRSWNAFWG QGTLVTSS
MuV _L 1	Mus musculus	Fig. 8C	71	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSL NSGNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS TRESGVPRFTGSGSGTDFTLTSSVQAED LAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELK
J415V _L /MuV _L 1 majority sequence	Artificial - majority sequence	Fig. 8C	72	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTLSCKASESL NVGNQKTYVAWYQQKPGQSPKLLIYGAS TRESGVPRFTGSGSGTDFTLTSSVQAEDL AVYYCGNSYSFPLTFGGGKLELK
J533 V _H CDS (1-354)	Mus musculus	Fig. 9A	73	gaggtccagctgcagcagctgagactgagctgtaagcctggg gcttcagtgagatgctcgaagcctctgatacactcactgg ctatgatatgactggctgaagcgaagcctggacaggtcctgag tgattggatataaactctacatgatgtactaggtatattggga agttcaaggcaaggccacactgacctcagacaaatattccagca cagcctacatgagactcagcggcctgacactcgaaggactctggg totattactgccaagaggaggaactgtactactttgactcctgg

WO 02/098897

PCT/US02/17068

J533 V _H (predicted amino acid of SEQ ID NO:73)	Mus musculus	Fig. 9A	74	gcccagagcgcacactctcaggtctcctca EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF TGYVMHWVKQKPGQVLEWIGYINPYNDV TRYNGKFKGKATLTSDKYSSTAYMELSGL TSEDSAVYYCARGENWYFDSWGRGATL TVSS
J533 V _H (complementar y strand of SEQ ID NO:73)	Mus musculus	Fig. 9A	75	tgaggagactgtgagagtgccgctcggcccaaggatcaagt agtaccagttctccctcttgcacagtaatagaccagagctcctc agaggfcaggccgctgagctccatgtagctgctggaalattg tctgaggtcaggtggtgcttgccttgaactccattataccatgta acatcatgtgaaggattaataatataccaatccactcaaggacgtcc aggcttctgcttaccagtgataacatagccagtgatgtgtatc cagaagcctgtcaggacatcttcaactgaagcccaaggcttaacca gctcaggtccagactgctgcagctggacctc
J533 V _L CDS (1-333)	Mus musculus	Fig. 10A	76	gacattgtgctgacccaatctccaagcttcttggctgtctctagga cagaggccacacatactcgaagccagtgaaagtattgatagt atgacaaactttatgacatgtagcagcagaaccaggacagcc accacacccctctatcttctgtgacatccatagaaatctggatcc ctgcaggtttcagtgagcagtggtctgaggacagacttaccctca ccattatctctgaggagctgatgattgcaacattactatctcacc aaagtattgagatccgtacacgttggaggagggaaccagctg gaaataaaa
J533 V _L (predicted amino acid of SEQ ID NO:76)	Mus musculus	Fig. 10A	77	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEIDS YDNTFMHWYQKPGQPPNLLIFRASILES GIPARFSGSGGTDFLTITYPVEADDAATY YCHQSIEDPYTFGGGTGLEIK
J533 V _L (complementar y strand of SEQ ID NO:76)	Mus musculus	Fig. 10A	78	ttttattccagcttggccccctccgaacgtgtacggatcctcaat acttgggtgacagtaataaggtgcaacatcatcagctccacagat aaatgggtgagggtgaagctctgcccagaccactgcccactgaacc tgccagggatccagattctaggatggaatgcaagaagaatgagg agggttgggtgctgctgctgttctgtgtgacagtgataaaagt atgtcataactatacaatacttcaatgctctgagggataggtggtc cctctctctagagacacagccaagaagctggagattgggtcag cacaatgtc
MuV _{HII}	Mus musculus	Fig. 9B	79	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFT DYVMNNWVKQSPGKSLWIGDINPGNGG TSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCARGYSSSYMAYYAFDYW GQGTTVTVSS
J533V _H /MuV _{HII} majority sequence	Artificial - majority sequence	Fig. 9B	80	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFT GYVMNNWVKQSPGQVLEWIGDINPGNGG TSYNGKFKGKATLTVDKSSSTAYMELSGL TSEDSAVYYCARGENSSSYMAYYAFDSW GQGATVTVSS
MuV _{L-3}	Mus musculus	Fig. 10B	81	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDS YGNFPMHWYQKPGQPKLLIYAASNLES GVPARFSGSGGTDFLTNIHPVEEDDAATY YCCQSNEDPPWTFGGGTGLEIK
J533V _L /	Artificial -	Fig.	82	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDS

WO 02/098897

PCT/US02/17068

MuV_L-3 majority sequence		10B		YGN5FMHWYQKPGQPPNLLIFAASILES GVPARFSGSGSGTDFLTTHPVEADDAATY YCQQSIEDPPYTFGGGKLEIK
E99 V_H CDS (1-363)	Mus musculus	Fig. 11A	83	cagggtcagctaaaggagtcaggacctggtggtggtcctc acagagcgtgtccatcacatgcccgctcaggtatctcatlaacc gcctatgttataactggttcgccagcctccagaaagggtctgg agtggctggaggtgataggtgatggaaacacagactataatc aactctcaaatccagactgaacatctcaaggacaactccaagAAC cagttttcttaaaatgagcaggttccaaactgagacacagccag atactctgtgccagagattcgtatggttaactcaagagcgttggtt tgactctggggccagggcaccactctcacagctctctca
E99 V_H (predicted amino acid of SEQ ID NO:83)	Mus musculus	Fig. 11A	84	QVQLKESGPGLVASSQSLSTCTVSGFSLT AYGINWVRQPPGKGLEWLGVIWPDGNTD YNSTLKSRLNIFKDNSKNQVFLKMSSFQT DDTARYFCARDSYGNFKRGWDFWQGQT TLTVSS
E99 V_H (complementar y strand of SEQ ID NO:83)	Mus musculus	Fig. 11A	85	tgaggagactgtgagagtggtgacctggcccccagaagtcAAC aacccctctggaagtlaccatacgaatctctggcacagagctatctg gctgtgtcatcagtttgaacactgctcattttaagaacacttggttctt ggagttgtccttggaagatgttcaggtctggattgagagttgaattata gtctgtgtttccatcaggccatactaccagccactccagaccct ttcctggaggtctgggaaccagtttaaccatagccggttaataga gaatctgagacaggtgcatgtgagtcagagcctctgtgaggagcc caccagccaggtcctgactctttagctgcacctg
E99 V_L CDS (1-321)	Mus musculus	Fig. 12A	86	aacattgfatgaccagctcacaanaatcatgtccatcacaccagg agacaggtgacgggtcacctgcaaggccagtcagaatgtgggt ctgatgtgacctgtatcagcgaacaccaggaacaatctctagaat actgatttactgacatctacagttacagtgagggtcctgatcgtt cacagcctatggtatctggagagatttactctccatcaacaatg tgcagctcgaagactgacagagatttctgtcagaatataatagct atctctcactggttgggtctgggaccaagctggagctgaaa
E99 V_L (predicted amino acid of SEQ ID NO:86)	Mus musculus	Fig. 12A	87	NIVMTQSQKFMSTSPGDRVRVTCKASQNV GSDVAWYQAKPGQSPRLIYSTSYRYSGVP DRFTAYGSGTDFLTITINQSEDLTEYFCQ QYNSYPLTFGAGTKLELK
E99 V_L (complementar y strand of SEQ ID NO:86)	Mus musculus	Fig. 12A	88	tttcagctccagctgtgtccagcaccgaactgagaggatagcta ttatatgtgacagaaatactctgcaagcttcagactgcacattg gtaattggtgagagtgaaatctgtccagatccatagcgtggaagc gatcagggaccccactgaacgttaggtatgtcagtaaatcagta ttctaggagattgtcctgttgcctgatacagcagctacatcagaac ccacattctgactggcctgaggtgacctgacctgtctctggt gatgtgacatgaattttgagactgggtcatcaaatgtt
MuV_HIB	Mus musculus	Fig. 11B	89	QVQLKESGPGLVASSQSLSTCTVSGFSLT AYGINWVRQPPGKGLEWLGVIWPDGNTD YNSTLKSRLNIFKDNSKNQVFLKMSSFQT DDTARYFCARDSYGNFKRGWDFWQGQT TLTVSS
E99V_H/MuV_H IB	Artificial - majority	Fig. 11B	90	QVQLKESGPGLVASSQSLSTCTVSGFSLT AYGINWVRQPPGKGLEWLGVIWPDGNTD

WO 02/098897

PCT/US02/17068

majority sequence	sequence			YNSTLKSRINIFKDNSKNQVFLKMSSFQT DDTARYFCARDSYGNFKRGWDFWQGQT TLTVSS
MuV_L-1	Mus musculus	Fig. 12B	91	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSL NSGNQKNYLAWYQKPGQSPKLLIYWAS TRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAED LAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELK
E99V_L/MuV_L-1 majority sequence	Artificial - majority sequence	Fig. 12B	92	DIVMTQSPSSLAVSAGDKVTVSCASQSL LNVGSDKNYVAWYQAKPGQSPKLLIYSAS TRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAED LAVYFCQNDNSYPLTFGAGTKLELKRA

[00151] Humanized or CDR-grafted antibody molecules or immunoglobulins can be produced by CDR-grafting or CDR substitution, wherein one, two, or all CDRs of an immunoglobulin chain can be replaced. See e.g., U.S. Patent 5,225,539; Jones et al. 1986 *Nature* 321:552-525; Verhoeyan et al. 1988 *Science* 239:1534; Beidler et al. 1988 *J. Immunol.* 141:4053-4060; Winter US 5,225,539, the contents of all of which are hereby expressly incorporated by reference.

[00152] Winter describes a CDR-grafting method that may be used to prepare the humanized antibodies of the present invention (UK Patent Application GB 2188638A, filed on March 26, 1987; Winter US 5,225,539), the contents of which is expressly incorporated by reference. All of the CDRs of a particular human antibody may be replaced with at least a portion of a non-human CDR or only some of the CDRs may be replaced with non-human CDRs. It is only necessary to replace the number of CDRs required for binding of the humanized antibody to a predetermined antigen.

[00153] Humanized antibodies can be generated by replacing sequences of the Fv variable region that are not directly involved in antigen binding with equivalent sequences from human Fv variable regions. General methods for generating humanized antibodies are provided by Morrison, S. L., 1985, *Science* 229:1202-1207, by Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214, and by Queen et al. US 5,585,089, US 5,693,761 and US 5,693,762, the contents of all of which are hereby incorporated by reference. Those methods include isolating, manipulating, and expressing the nucleic acid sequences that encode all or part of immunoglobulin Fv variable regions from at least one of a heavy or light chain. Sources of such nucleic acid are well known to those skilled in the art and, for example, may be obtained from a hybridoma producing an antibody against a predetermined target, as described above. The recombinant DNA encoding

WO 02/098897

PCT/US02/17068

the humanized antibody, or fragment thereof, can then be cloned into an appropriate expression vector.

[00154] Also within the scope of the invention are humanized antibodies in which specific amino acids have been substituted, deleted or added. In particular, preferred humanized antibodies have amino acid substitutions in the framework region, such as to improve binding to the antigen. For example, a selected, small number of acceptor framework residues of the humanized immunoglobulin chain can be replaced by the corresponding donor amino acids. Preferred locations of the substitutions include amino acid residues adjacent to the CDR, or which are capable of interacting with a CDR (see e.g., US 5,585,089). Criteria for selecting amino acids from the donor are described in US 5,585,089, e.g., columns 12-16 of US 5,585,089, the contents of which are hereby incorporated by reference. The acceptor framework can be a mature human antibody framework sequence or a consensus sequence.

[00155] As used herein, the term "consensus sequence" refers to the sequence formed from the most frequently occurring amino acids (or nucleotides) in a family of related sequences (See e.g., Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987). In a family of proteins, each position in the consensus sequence is occupied by the amino acid occurring most frequently at that position in the family. If two amino acids occur equally frequently, either can be included in the consensus sequence. A "consensus framework" refers to the framework region in the consensus immunoglobulin sequence.

[00156] Other techniques for humanizing antibodies are described in Padlan et al. EP 519596 A1, published on December 23, 1992.

[00157] The anti-PSMA antibody, or antigen fragment thereof, may also be modified by specific deletion of human T cell epitopes or "deimmunization" by the methods disclosed in WO 98/52976 and WO 00/34317, the contents of which are specifically incorporated by reference herein. Briefly, the murine heavy and light chain variable regions of an anti-PSMA antibody can be analyzed for peptides that bind to MHC Class II; these peptides represent potential T-cell epitopes (as defined in WO 98/52976 and WO 00/34317). For detection of potential T-cell epitopes, a computer modelling approach termed "peptide threading" can be applied, and in addition a database of human MHC class II binding peptides can be searched for motifs present in the murine V_H and V_L sequences, as described in WO 98/52976 and WO 00/34317. These motifs bind to any of the 18 major MHC class II DR allotypes, and thus constitute potential T

WO 02/098897

PCT/US02/17068

cell epitopes. Potential T-cell epitopes detected can be eliminated by substituting small numbers of amino acid residues in the variable regions, or preferably, by single amino acid substitutions. As far as possible conservative substitutions are made, often but not exclusively, an amino acid common at this position in human germline antibody sequences may be used. Human germline sequences are disclosed in Tomlinson, I.A. *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; Cook, G. P. *et al.* (1995) *Immunol. Today* Vol. 16 (5): 237-242; Chothia, D. *et al.* (1992) *J. Mol. Bio.* 227:799-817. The V BASE directory provides a comprehensive directory of human immunoglobulin variable region sequences (compiled by Tomlinson, I.A. *et al.* MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). After the deimmunized V_H and V_L of an anti-PSMA antibody are constructed by mutagenesis of the murine V_H and V_L genes. The mutagenized variable sequence can, optionally, be fused to a human constant region, e.g., human IgG1 or κ constant regions.

[00158] In some cases a potential T cell epitope will include residues which are known or predicted to be important for antibody function. For example, potential T cell epitopes are usually biased towards the CDRs. In addition, potential T cell epitopes can occur in framework residues important for antibody structure and binding. Changes to eliminate these potential epitopes will in some cases require more scrutiny, e.g., by making and testing chains with and without the change. Where possible, potential T cell epitopes that overlap the CDRs were eliminated by substitutions outside the CDRs. In some cases, an alteration within a CDR is the only option, and thus variants with and without this substitution should be tested. In other cases, the substitution required to remove a potential T cell epitope is at a residue position within the framework that might be critical for antibody binding. In these cases, variants with and without this substitution should be tested. Thus, in some cases several variant deimmunized heavy and light chain variable regions were designed and various heavy/light chain combinations tested in order to identify the optimal deimmunized antibody. The choice of the final deimmunized antibody can then be made by considering the binding affinity of the different variants in conjunction with the extent of deimmunization, i.e., the number of potential T cell epitopes remaining in the variable region.

[00159] The recombinant deimmunized antibody can be transfected into a suitable host cell for expression, for example, NS0 or CHO cells, to produce complete recombinant antibodies.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00160] In one embodiment, deimmunized V_H and V_L of murine J591 regions were constructed by mutagenesis of the murine V_H and V_L genes. The murine J591 variable region sequences are shown in Figures 1A-1B. Potential epitopes (identified using a peptide threading program) in murine J591 heavy chain and light chain variable regions are shown in Figures 3A and 3B, respectively. The 13-mer peptides predicted to bind to MHC class II are indicated by the underline, the CDRs are located at residues 26 to 35, 50 to 66, and 99 to 104 of Figure 3A and residues 24 to 34, 50 to 56, and 89 to 97 of Figure 3B, and residues altered in the deimmunized heavy and light chain variable regions are boxed. Where possible, amino acid substitutions are those commonly used in human germline heavy and light chain variable regions. In addition to the *in silico* analysis using the peptide threading software, a database of human MHC class II binding peptides was searched for motifs present in the murine J591 sequence.

[00161] The following 13-mers (labelled by first linear residue number of the 13-mer) of the murine J591 heavy chain variable region were predicted to bind to MHC Class II were 2, 10, 16, 30, 32, 35, 43, 46, 58, 62, 70, 81, 84, 91, and 100 (Figure 3A). An explanation of the rationale behind changes made to the residues in the murine J591 heavy chain variable region is set forth below (note residues altered are identified under the Kabat numbering system):

5Q→V removes the potential epitope at residue 2;
 11,12LV→VK remove the potential epitope at residue 10;
 12V→K is also changed to remove a motif from the database of human MHC class II binding peptides;
 16,17TS→AT, and 19R→K remove the potential epitope at residue 16;
 the epitope at residue 30 spans CDR1 and is therefore unaltered;
 40,41SH→AP removes potential epitopes at residues 32 and 35;
 44S→G reduces binding score for epitope at 43, this 13 mer spans CDR2;
 the epitopes at residues 46, 58 and 62 span CDR2, and are thus unaltered;
 75,76SS→TD remove the potential epitope at residue 70;
 82aR→S, 83T→R remove potential epitopes at residues 81 and 84;
 87S→T this change made to remove a motif from the database of human MHC class II binding peptides;
 the epitope at residue 91 spans CDR3 and is therefore unaltered; and

WO 02/098897

PCT/US02/17068

108T→L removes the potential epitope at residue 100.

[00162] The following 13-mers (labelled by first linear residue number of the 13-mer) of the murine J591 light chain variable region that were predicted to bind to MHC Class II molecules were 1, 8, 17, 27, 30, 31, 35, 45, 47, 56, 60, 71, 73, 81, 94 (Figure 3B). An explanation of the rationale behind changes made to the residues in the murine J591 light chain variable region is set forth below (note residues altered are identified under the Kabat numbering system):

3V→Q removes potential epitope at residue 1;
 8-11HKFM→PSSL removes potential epitope at residue 8(13);
 20-22SII→TLT removes potential epitopes at residues 17 and 20;
 21I→L is also changed to remove a motif from the database of human MHC class II binding peptides;
 the epitope at residue 27 spans CDR1 and is therefore unaltered;
 42Q→P reduces the binding score for the epitope at residue 31;
 the epitopes at residues 44 and 47 span CDR2 and are thus unaltered;
 58V→I is changed to remove a motif from the database of human MHC class II binding peptides;
 60D→S, 62T→S removes the epitopes at residues 56 and 60;
 76-78TNV→SSL, 80S→P, 83L→F removes the epitopes at residues 71, 73, 76, and 81;
 87F→Y I is changed to remove a motif from the database of human MHC class II binding peptides;
 100 A→P and 103 M→K remove the epitope at residue 94; and
 104 L→V and 106 L→I are changed to remove a motif from the database of

human MHC class II binding peptides.

[00163] The amino acid and nucleotide sequences for the deimmunized J591 heavy and light chain variable regions are shown in Figures 2A-2B and 4A-4B, respectively (see also Table 8).

[00164] Human IgG1 or κ constant regions were added and the composite genes transfected into NS0 cells to produce complete recombinant anti-PSMA antibodies. These

WO 02/098897

PCT/US02/17068

antibodies bound to PSMA (on LNCap cells) as efficiently as the original murine antibody, and have reduced or no immunogenicity in man.

[00165] The design of deimmunized J415 was similar to the making of the deimmunized J591 antibody. The heavy and light chain sequences were cloned from the hybridoma designated HB-12109. These sequences were cloned, sequenced and expressed as a chimaeric antibody for use as a control antibody. The murine V region sequences were subjected to peptide threading to identify potential T cell epitopes, through analysis of binding to 18 different human MHC class II allotypes. The results of the peptide threading analysis for the murine sequences are shown in Table 9.

Table 9: Potential T cell epitopes in murine J415 sequences

Sequence	Number of potential T cell	Location of potential epitopes+ (no. of potential MHC binders from 18 groups tested)
Murine J415 V _H	12	10(17), 16(13), 21(9), 30(6), 35(16), 43(8), 46(6), 49(8), 64(6), 80(15), 86(15), 104(6)
Murine J415 V _K	13	5(5), 11(18), 13(11), 17(5), 27(8), 31(7), 56(15), 60(12), 70(5), 71(11), 73(17), 76(7), 81(17)

*first amino acid of potential epitope, numbering E or N amino acid number 1 to S or K amino acid number 107 and 116 for V_H and V_K respectively.

[00166] Primary deimmunized V_H and V_L sequences were defined (J415DIVH1, J415DIVK1). As generation of the primary deimmunized sequences requires a small number of amino acid substitutions that might affect the binding of the final deimmunized molecule, three other variant V_HS and seven other V_LS were designed (see Figures 5 and 6). The nucleotide sequences for the primary deimmunized V_H and V_L regions are shown in Figures 7A and 8A, respectively. Comparisons of the amino acid sequences of the murine and deimmunized V regions of J415 are shown in Figure 5 for V_H and Figure 6 for V_L.

[00167] An explanation of the rational behind some of the changes made to the residues in the murine J415 heavy chain variable region is set forth below (note residues altered are identified according to the linear numbering shown in Figure 5):

20L→I removes the potential epitope at residues 10 and 16;

87N→S removes the potential epitopes at residues 80 and 86;

WO 02/098897

PCT/US02/17068

94,95GI→AV remove the potential epitope at residue 86; and

112L→V removes the potential epitope at residue 104.

[00168] An explanation of the rational behind some of the changes made to the residues in the murine J415 light chain variable region is set forth below (note residues altered are identified according to the linear numbering shown in Figure 6):

13I A removes the potential epitopes at residues 5, 11 and 13;

15V A removes the potential epitopes at residues 5, 11, and 13;

19V-M removes the potential epitopes at residues 11, 13, and 17;

41E-T removes the potential epitope at residue 31;

63T-S removes the potential epitopes at residues 56 and 60;

68A-G removes the potential epitopes at residues 56 and 60; and

80T-A removes the potential epitopes at residues 70, 71, 73, and 76;

[00169] The deimmunized variable regions for J415 were constructed by the method of overlapping PCR recombination. The cloned murine V_H and V_K genes were used as templates for mutagenesis of the framework regions to the required deimmunized sequences. Sets of mutagenic primer pairs were synthesized encompassing the regions to be altered. The vectors $VH\text{-}PCR1$ and $VK\text{-}PCR1$ (Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-7) were used as templates to introduce 5' flanking sequence including the leader signal peptide, leader intron and the murine immunoglobulin promoter, and 3' flanking sequence including the splice site, and intron sequences. The deimmunized V regions produced were cloned into pUC19 and the entire DNA sequence was confirmed to be correct for each deimmunized V_H and V_L .

[00170] The deimmunized heavy and light chain V-region genes were excised from pUC19 as *HindIII* to *BamHI* fragments, which include the murine heavy chain immunoglobulin promoter, the leader signal peptide, leader intron, the V_H or V_L sequence and the splice site. These were transferred to the expression vectors pSVgpt and pSVhyg, which include human IgG1 or κ constant regions respectively and markers for selection in mammalian cells. The DNA sequence was confirmed to be correct for the deimmunized V_H and V_L in the expression vectors.

[00171] For the transfection of expression vectors pSVgptJ415VHHuIgG1 and pSVhygJ415VKHuCK into NS0 (a non-immunoglobulin producing mouse myeloma, obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures, Porton UK (ECACC No. 85110503)) cells, 3 and 6 μ g of plasmid DNA respectively was prepared and then linearized with *PvuII* to

WO 02/098897

PCT/US02/17068

improve transfection efficiency. The ethanol precipitated DNA was then mixed with a semi-confluent flask of NS0 cells that had been harvested by centrifugation and resuspended in 0.5 ml of non-selective Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)(Life Technologies Inc.) in a 0.4 cm gene pulser cuvette. The cells and DNA were chilled on ice for 5 minutes before a pulse of 170V, 960µF was applied. The cuvette was returned to ice for a further 20 minutes before being transferred to a 75cm² flask containing 20mls non-selective DMEM to recover for 24 hours. The cells were then harvested and resuspended in selective DMEM and plated over 4x96 well plates, 200 µl/well. A similar protocol was followed for the transfection of expression vectors encoding the del591 antibody heavy chain and light chain subunits into NS0 cells.

[00172] To culture, select, and expand NS0 cell lines, the cells are grown at 37°C, 5%CO₂ and 10% FBS. To prepare non-selective medium for routine culture of NS0 cells, the culture medium is Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)(Life Technologies, Catalogue No: 31965-023) supplemented with 10% fetal bovine serum of USA origin (Life Technologies, Fetal Bovine Serum Cat No: 16000), Antibiotic/Antimycotic solution (Life Technologies, Cat No: 15240), Gentamycin (Life Technologies, catalogue No: 15710), Sodium pyruvate (Life Technologies, Catalogue No: 11360-039). When growing NS0 cells up to saturation for antibody production do not add the xanthine and mycophenolic acid and the FBS is reduced to 5%.

[00173] To prepare selective medium for culture of NS0 transfectomas, the culture medium is Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)(Life Technologies, Catalogue No: 31965-023) supplemented with 10% foetal bovine serum of USA origin (Life Technologies, Fetal Bovine Serum Cat No: 16000), Antibiotic/Antimycotic solution (Life Technologies, Cat No: 15240), Gentamycin (Life Technologies, catalogue No: 15710), Sodium pyruvate (Life Technologies, Catalogue No: 11360-039), 250 µg/ml xanthine (Sigma Catalogue No: X-3627, stock made up at 25 mg/ml in 0.5M NaOH), and 0.8 µg/ml mycophenolic acid (Sigma Catalogue No: M-3536, stock made up at 2.5 mg/ml in 100% ethanol).

[00174] After approximately 10 days the cell colonies expressing the *gpt* gene were visible to the naked eye. The plates were then screened for antibody production using the following protocol for human IgG1/κ Screening ELISA. 6 single colonies were picked from wells with high ODs greater than 0.7 into a 24 well cell culture plate. Within 5-6 days the cells were expanded into a 25cm² flask. The antibody productivity of the selected clones was assayed using

WO 02/098897

PCT/US02/17068

the following protocol for human IgG1/ κ ELISA from saturated cultures in the 24 well and 25cm² flasks.

[00175] The details of the protocol are as follows. ELISA plates (Dynatech Immulon 2) are coated with 100 μ L per well with sheep α human κ antibody (The Binding Site Cat No: AU015) diluted 1:1000 in carbonate/bicarbonate coating buffer pH9.6 (Sigma Cat: C-3041). The coated plate is incubated at 4°C overnight or 1 hr at 37°C. The plate is then washed 3 times with PBST (PBS with 0.05%Tween 20). The samples are added, 100 μ L per well from 24 well plates, 25 μ L +75 μ L PBST for 96 well plates. Blank wells are treated with PBST only. The reaction mixture is incubated at room temperature for 1 hr. Then, the plate is wash 3 times with PBST (PBS with 0.05%Tween 20). The secondary antibody, peroxidase conjugated sheep α human IgG γ chain specific is added (The Binding Site Cat No: APO04) at a ratio of 1:1000 in PBST, 100 μ L per well. The mixture is incubated at room temperature for 1 hour. The mixture is then washed 3 times with PBST (PBS with 0.05%Tween 20).

[00176] To make up the substrate, one tablet (20 mg) of OPD (o-PHENYLENE DIAMINE) (Sigma Cat No: P-7288) is dissolved in 45 ml of H₂O plus 5ml 10 x peroxidase buffer (make 10 x peroxidase buffer with Sigma phosphate citrate buffer tablets pH 5.0, P-4809), add 10 μ L 30%(w/w) hydrogen peroxide (Sigma Cat No: H1109) just before use. The substrate is then added at 100 μ L per well and incubate RT for 5 min or as required. When the color develops, the reaction can be stopped by adding 25 μ L 12.5% H₂SO₄. The results are read at 492 nm.

Expression and expansion of J591 and J415 Deimmunized Antibodies

[00177] The clones with the highest productivity were expanded into a 75 cm² flask and then into 2x 175 cm² flasks. The cells from one of the 175 cm² flask was used to inoculate 4x triple layer flasks (500 cm², Nalge Nunc International) containing non selective DMEM containing 5% FBS, cells from the other were frozen as detailed in the protocol for freezing NSO cells detailed below.

[00178] To cryoprotect mammalian cells and resurrect cells from liquid nitrogen, the following materials are needed: Fetal Bovine serum (Life Technologies Cat No: 16000), DMSO (Sigma, Cat No: D4540), 2 ml cryotubes (Nunc or Greiner), and polystyrene box with walls 1 - 2

WO 02/098897

PCT/US02/17068

cm thick. Briefly, actively growing cells are harvested by centrifugation (1000 rpm, 5 min) and resuspended at about 10^7 cells/ml in 10% DMSO/90% FBS. As a rough guide, cells grown to a semi-confluency should be resuspended in 1 ml for a 75 cm² flask or 2.5 ml for a 175 cm² flask. A required number of tubes are cooled and labeled in ice. 1 ml portions are aliquoted to labeled cryotubes. The cryotubes are placed in polystyrene box at -70°C for at least 4 h, or overnight. The vials are transferred to canes and place in liquid nitrogen. A record of the storage should be made both in the canister index and the central cell line indexing system.

[00179] To thaw the cells from liquid nitrogen, the vial is removed from liquid nitrogen and contents are thawed quickly by incubation at 37°C, while swirling in a waterbath. The outside of the vial is cleaned with 70% methylated spirits. The suspension is transferred to a universal container. 10 ml of the medium to be used to propagate the cell line is added dropwise, swirling to mix. The cells are harvested by centrifugation (1000 rpm, 5 min). The supernatant is discarded. The cells are resuspended in 20 ml growth medium and transfer to a 75 cm² flask. If low viability is suspected, extra serum can be added to the growth medium to 20%, use only 5 ml, and transfer to a 25 cm² flask.

[00180] After 10-14 days the 500 ml to 1 liter static saturated cultures were harvested. Antibody was purified, by ProSepA (Millipore Ltd.) affinity chromatography using the following protocol for antibody purification. The purified antibody preparation was sterilized by filtration and stored at 4°C.

[00181] The antibody purification protocol is as follows: NS0 transfectoma cell line producing antibody is grown in DMEM 5% FCS in Nunc Triple layer flasks, 250 ml per flask (total volume 1L) for 10 - 14 days until nearing saturation. Conditioned medium collected and spun at 3000 rpm for 5 min in bench centrifuge 5 mins to remove cells. $1/10^{\text{th}}$ volume 1M Tris-HCl pH 8 (Sigma Cat: T3038) is then added to cell supernatant to make this 0.1 M Tris-HCl pH8. 0.5 to 1 ml Prosep A (Millipore Cat: 113 111824) is added and stirred overnight at room temperature. Prosep A collected by spinning at 3000 rpm for 5 mins then packed into a Biorad Poly-Prep column (Cat: 73 1-1550). The column is washed with 10ml PBS, then eluted in 1 ml fractions with 0.1M Glycine pH 3.0. Each fraction is collected into a tube containing 100 microL 1M Tris-HCl pH 8 (Sigma, as above). Absorbance of each fraction is measured at 280 nm. Fractions containing the antibody are pooled and dialyzed against PBS overnight at room temperature. The preparation is sterilized by filtration through a 0.2 micron syringe filter and the

WO 02/098897

PCT/US02/17068

absorbance of each fraction is measured at 280nm. The antibody concentration is determined by ELISA for human IgG.

[00182] The purified antibody can be quantified using the protocol for Human IgG1/ κ ELISA described above.

Testing of J415 Deimmunized antibodies

[00183] The J415 deimmunized antibodies (including various combinations of the deimmunized light chain and heavy chain subunits) were tested in an ELISA for binding to LNCap membrane preparation following the protocol as detailed above. ELISA plates were coated with LNCap membrane preparation and blocked with 5% BSA in phosphate buffered saline. Doubling dilutions of the J415 chimeric antibody (murine variable heavy and light chain regions fused to human constant heavy and light chain regions, respectively) and the deimmunized antibodies were applied. Detection was with horseradish peroxidase conjugated goat anti-human IgG and donkey anti-mouse for chimeric and mouse antibodies respectively. Color was developed with o-phenylene diamine substrate.

[00184] The antibody composed of deimmunized J415 heavy chain version 4 combined with deimmunized J415 light chain version 5 shows equivalent binding to LNCap cells as compared to the chimeric antibody. Also, when DIVK5 is combined with heavy chain versions 1 and 2, binding to LNCap cells is equivalent to that of the chimeric antibody when tissue culture supernatant is analyzed. These data can be confirmed with purified antibody. When light chains 1, 2, 3 were combined with any of the J415 heavy chain versions 1, 2, 3, and 4 no antibody was produced. Deimmunized J415 light chain versions 1, 2, and 3 may be defective on structural grounds. The best chain combination for higher affinity and decreased immunogenicity is DIVH4/DIVK5.

[00185] The antibody composed of deimmunized heavy chain version 4 combined with deimmunized light chain version 5 showed equivalent binding to LNCap compared to the chimeric antibody. Also, when DIVK5 is combined with heavy chain versions 1 and 2, binding to LNCap cells is two-fold less than that of the chimeric when purified antibody is analyzed.

[00186] Monoclonal anti-PSMA antibodies can also be generated by other methods known to those skilled in the art of recombinant DNA technology.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00187] Anti-PSMA antibodies that are not intact antibodies are also useful in this invention. Such antibodies may be derived from any of the antibodies described above. For example, antigen-binding fragments, as well as full-length monomeric, dimeric or trimeric polypeptides derived from the above-described antibodies are themselves useful. Useful antibody homologs of this type include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; (ii) a F(ab')₂ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; (iv) a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody; (v) a dAb fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), which consists of a VH domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR), e.g., one or more isolated CDRs together with sufficient framework to provide an antigen binding fragment. Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, VL and VH, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see e.g., Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding fragment" of an antibody. These antibody fragments are obtained using conventional techniques known to those with skill in the art, and the fragments are screened for utility in the same manner as are intact antibodies.

[00188] Antibody fragments may also be produced by chemical methods, e.g., by cleaving an intact antibody with a protease, such as pepsin or papain, and optionally treating the cleaved product with a reducing agent. Alternatively, useful fragments may be produced by using host cells transformed with truncated heavy and/or light chain genes.

[00189] Monoclonal, chimeric, humanized, deimmunized antibodies, which have been modified by, e.g., deleting, adding, or substituting other portions of the antibody, e.g., the constant region, are also within the scope of the invention. For example, an antibody can be modified as follows: (i) by deleting the constant region; (ii) by replacing the constant region with another constant region, e.g., a constant region meant to increase half-life, stability or affinity of the antibody, or a constant region from another species or antibody class; or (iii) by modifying one or more amino acids in the constant region to alter, for example, the number of

WO 02/098897

PCT/US02/17068

glycosylation sites, effector cell function, Fc receptor (FcR) binding, complement fixation, among others.

[00190] In one embodiment, the constant region of the antibody can be replaced by another constant region from, e.g., a different species. This replacement can be carried out using molecular biology techniques. For example, the nucleic acid encoding the VL or VH region of an antibody can be converted to a full-length light or heavy chain gene, respectively, by operatively linking the VH or VL-encoding nucleic acid to another nucleic acid encoding the light or heavy chain constant regions. The sequences of human light and heavy chain constant region genes are known in the art. Preferably, the constant region is human, but constant species from other species, e.g., rodent (e.g., mouse or rat), primate, camel, rabbit can also be used. Constant regions from these species are known in the art (see e.g., Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

[00191] Methods for altering an antibody constant region are known in the art. Antibodies with altered function, e.g. altered affinity for an effector ligand, such as FcR on a cell, or the C1 component of complement can be produced by replacing at least one amino acid residue in the constant portion of the antibody with a different residue (see e.g., EP 388,151 A1, US 5,624,821 and US 5,648,260, the contents of all of which are hereby incorporated by reference). Similar type of alterations could be described which if applied to the murine, or other species immunoglobulin would reduce or eliminate these functions.

[00192] An anti-PSMA antibody, or antigen-binding fragment thereof, can be derivatized or linked to another functional molecule (e.g., another peptide or protein). Accordingly, the antibodies and antibody portions of the invention are intended to include derivatized and otherwise modified forms of the antibodies described herein, including immunoadhesion molecules. For example, an antibody or antibody portion of the invention can be functionally linked (by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other molecular entities, such as another antibody (e.g., a bispecific antibody or a diabody), a detectable agent, a cytotoxic agent, a pharmaceutical agent, and/or a protein or peptide that can mediate association of the antibody or antibody portion with another molecule (such as a streptavidin core region or a polyhistidine tag).

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00193] One type of derivatized antibody is produced by crosslinking two or more antibodies (of the same type or of different types, *e.g.*, to create bispecific antibodies). Suitable crosslinkers include those that are heterobifunctional, having two distinctly reactive groups separated by an appropriate spacer (*e.g.*, *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester) or homobifunctional (*e.g.*, disuccinimidyl suberate). Such linkers are available from Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

[00194] Useful detectable agents with which an antibody or antibody portion of the invention may be derivatized (or labeled) to include fluorescent compounds, various enzymes, prosthetic groups, luminescent materials, bioluminescent materials, fluorescent emitting metal atoms, *e.g.*, europium (Eu), and other anthanides, and radioactive materials (described below). Exemplary fluorescent detectable agents include fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, 5-dimethylamine-1-naphthalenesulfonyl chloride, phycoerythrin and the like. An antibody may also be derivatized with detectable enzymes, such as alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, β -galactosidase, acetylcholinesterase, glucose oxidase and the like. When an antibody is derivatized with a detectable enzyme, it is detected by adding additional reagents that the enzyme uses to produce a detectable reaction product. For example, when the detectable agent horseradish peroxidase is present, the addition of hydrogen peroxide and diaminobenzidine leads to a colored reaction product, which is detectable. An antibody may also be derivatized with a prosthetic group (*e.g.*, streptavidin/biotin and avidin/biotin). For example, an antibody may be derivatized with biotin, and detected through indirect measurement of avidin or streptavidin binding. Examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; and examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin.

[00195] Labeled antibodies can be used, for example, diagnostically and/or experimentally in a number of contexts, including (i) to isolate a predetermined antigen by standard techniques, such as affinity chromatography or immunoprecipitation; (ii) to detect a predetermined antigen (*e.g.*, in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the protein; (iii) to monitor protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, *e.g.*, to determine the efficacy of a given treatment regimen.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00196] An anti-PSMA antibody or antigen-binding fragment thereof may be conjugated to a another molecular entity, typically a label or a therapeutic (e.g., a cytotoxic or cytostatic) agent or moiety.

[00197] Radioactive isotopes can be used in diagnostic or therapeutic applications. Radioactive isotopes that can be coupled to the anti-PSMA antibodies include, but are not limited to α -, β -, or γ -emitters, or β - and γ -emitters. Such radioactive isotopes include, but are not limited to iodine (^{131}I or ^{125}I), yttrium (^{90}Y), lutetium (^{177}Lu), actinium (^{225}Ac), praseodymium, astatine (^{211}At), rhenium (^{186}Re), bismuth (^{212}Bi or ^{213}Bi), indium (^{111}In), technetium (^{99}Tc), phosphorus (^{32}P), rhodium (^{188}Rh), sulfur (^{35}S), carbon (^{14}C), tritium (^3H), chromium (^{51}Cr), chlorine (^{36}Cl), cobalt (^{60}Co or ^{57}Co), iron (^{59}Fe), selenium (^{75}Se), or gallium (^{67}Ga). Radioisotopes useful as therapeutic agents include yttrium (^{90}Y), lutetium (^{177}Lu), actinium (^{225}Ac), praseodymium, astatine (^{211}At), rhenium (^{186}Re), bismuth (^{212}Bi or ^{213}Bi), and rhodium (^{188}Rh). Radioisotopes useful as labels, e.g., for use in diagnostics, include iodine (^{131}I or ^{125}I), indium (^{111}In), technetium (^{99}Tc), phosphorus (^{32}P), carbon (^{14}C), and tritium (^3H), or one or more of the therapeutic isotopes listed above.

[00198] The invention provides radiolabeled anti-PSMA antibodies and methods of labeling the same. In one embodiment, a method of labeling an anti-PSMA antibody is disclosed. The method includes contacting an anti-PSMA antibody, e.g. an anti-PSMA antibody described herein, with a chelating agent, e.g., 1,4,7,10-tetraazacyclododecane- N , N' , N'' , N''' -tetraacetic acid (DOTA), to thereby produced a conjugated antibody. The conjugated antibody is radiolabeled with a radioisotope, e.g., ^{111}In , ^{90}Y and ^{177}Lu , to thereby produce a labeled anti-PSMA antibody. Detailed procedures for radiolabeling an anti-PSMA antibody are described in more detail in the sections below and the appended examples. For example, the anti-PSMA antibodies can be radiolabeled with ^{111}In , ^{90}Y , or ^{177}Lu by coupling with 1,4,7,10-tetraazacyclododecane- N , N' , N'' , N''' -tetraacetic acid (DOTA) as described in USSN 60/295,214, filed on June 1, 2001, the contents of which are incorporated by reference in its entirety. Detailed experimental protocols for chelating anti-PSMA antibodies are described in Example 16 of USSN 60/295,214, which is specifically incorporated by reference in the present application and is reproduced below as Example 1.

[00199] As is discussed above the antibody can be conjugated to a therapeutic agent. Therapeutically active radioisotopes have already been mentioned. Examples of other

WO 02/098897

PCT/US02/17068

therapeutic agents include taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, teniposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, puromycin, maytansinoids, *e.g.*, maytansinol (see US Patent No. 5,208,020), CC-1065 (see US Patent Nos. 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545) and analogs or homologs thereof. Therapeutic agents include, but are not limited to, antimetabolites (*e.g.*, methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), alkylating agents (*e.g.*, mechlorethamine, thioepa chlorambucil, CC-1065, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine (CCNU), cyclophosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, and cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) . cisplatin), anthracyclines (*e.g.*, daunorubicin (formerly daunomycin) and doxorubicin), antibiotics (*e.g.*, dactinomycin (formerly actinomycin), bleomycin, mithramycin, and anthramycin (AMC)), and anti-mitotic agents (*e.g.*, vincristine, vinblastine, taxol and maytansinoids).

[00200] The conjugates of the invention can be used for modifying a given biological response. The therapeutic agent is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the therapeutic agent may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, diphtheria toxin, or a component thereof (*e.g.*, a component of pseudomonas exotoxin is PE38); a protein such as tumor necrosis factor, interferon, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator; or, biological response modifiers such as, for example, lymphokines, interleukin-1 ("IL-1"), interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-6 ("IL-6"), granulocyte macrophage colony stimulating factor ("GM-CSF"), granulocyte colony stimulating factor ("G-CSF"), or other growth factors. Similarly, the therapeutic agent can be a viral particle, *e.g.*, a recombinant viral particle, that is conjugated (*e.g.*, via a chemical linker) or fused (*e.g.*, via a viral coat protein) to an anti-PSMA antibody of the invention. Introduction of the viral nucleic acid molecules, *e.g.*, recombinant viral nucleic acid molecules, into cells, *e.g.*, prostate cancer cells or vascular endothelial cells associated with tumors, that express PSMA can occur following binding and endocytosis of the anti-PSMA antibody/viral particle conjugate or fusion.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Nucleic Acids, Vectors and Host Cells

[00201] Another aspect of the invention pertains to isolated nucleic acid, vector and host cell compositions that can be used for recombinant expression of the modified antibodies and antigen-binding fragment of the invention. In one embodiment, a first and second isolated nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding heavy and light chain variable regions, respectively, of an anti-PSMA antibody, e.g., a modified anti-PSMA antibody (e.g., a deimmunized J591 or J415 anti-PSMA antibody), or an antigen fragment thereof, are provided.

[00202] The nucleotide and amino acid sequence of the modified (deimmunized) anti-PSMA J591 immunoglobulin light chain variable region is shown in Figures 4B (SEQ ID NO:25 and 22, respectively). The non-coding complementary nucleotide sequence is also shown in Figure 4B (SEQ ID NO:26). The J591 deimmunized anti-PSMA antibody light chain variable region contains the following regions: an FR1 domain corresponding to about amino acid residues 1-23 of SEQ ID NO:22 (linear numbering; see also SEQ ID NO:13), which is encoded by about nucleotides 261-329 of SEQ ID NO:25; a CDR1 domain corresponding to about amino acid residues 24-34 of SEQ ID NO:22 (linear numbering; see also SEQ ID NO:4), which is encoded by about nucleotides 330-362 of SEQ ID NO:25; an FR2 domain corresponding to about amino acid residues 35-49 of SEQ ID NO:22 (linear numbering; see also SEQ ID NO:14), which is encoded by about nucleotides 363-407 of SEQ ID NO:25; a CDR2 domain corresponding to about amino acid residues 50-56 of SEQ ID NO:22 (linear numbering; see SEQ ID NO:5), which is encoded by about nucleotides 408-428 of SEQ ID NO:25; an FR3 domain corresponding to about amino acid residues 57-88 of SEQ ID NO:22 (linear numbering; see also SEQ ID NO:15), which is encoded by about nucleotides 429-524 of SEQ ID NO:25; a CDR3 domain corresponding to about amino acid residues 89-97 of SEQ ID NO:22 (linear numbering; see also SEQ ID NO:6), which is encoded by about nucleotides 525-551 of SEQ ID NO:25; and an FR4 domain corresponding to about amino acid residues 98-107 of SEQ ID NO:22 (linear numbering; see also SEQ ID NO:16), which is encoded by about nucleotides 552-581 of SEQ ID NO:25.

[00203] The nucleotide and amino acid sequence of the modified (deimmunized) anti-PSMA J591 immunoglobulin heavy chain variable region is shown in Figure 4A (SEQ ID NO:23 and 21, respectively). The non-coding complementary sequence is also shown in Figure 4A (SEQ ID NO:24). The J591 deimmunized anti-PSMA antibody heavy chain variable region

WO 02/098897

PCT/US02/17068

contains the following regions: an FR1 domain corresponding to about amino acid residues 1-25 of SEQ ID NO:21 (linear numbering; see also SEQ ID NO:9), which is encoded by about nucleotides 261-335 of SEQ ID NO:23; a CDR1 domain corresponding to about amino acid residues 26-35 of SEQ ID NO:21 (linear numbering; see also SEQ ID NO:1), which is encoded by about nucleotides 336-365 of SEQ ID NO:23; an FR2 domain corresponding to about amino acid residues 36-49 of SEQ ID NO:21 (linear numbering; see also SEQ ID NO:10), which is encoded by about nucleotides 366-407 of SEQ ID NO:23; a CDR2 domain corresponding to about amino acid residues 50-66 of SEQ ID NO:21 (linear numbering; see also SEQ ID NO:2), which is encoded by about nucleotides 408-458 of SEQ ID NO:23; an FR3 domain corresponding to about amino acid residues 67-98 of SEQ ID NO:21 (linear numbering; see also SEQ ID NO:11), which is encoded by about nucleotides 459-554 of SEQ ID NO:23; a CDR3 domain corresponding to about amino acid residues 99-104 of SEQ ID NO:21 (linear numbering; see also SEQ ID NO:3), which is encoded by about nucleotides 555-572 of SEQ ID NO:23; and an FR4 domain corresponding to about amino acid residues 105-115 of SEQ ID NO:21 (linear numbering; see also SEQ ID NO:9), which is encoded by about nucleotides 573-605 of SEQ ID NO:23.

[00204] The nucleotide and amino acid sequence of the modified (deimmunized) anti-PSMA J415 immunoglobulin light chain variable region (J415DIVK1) is shown in Figure 8A (SEQ ID NO:56 and 57, respectively). The non-coding complementary nucleotide sequence of J415DIVK1 is also shown in Figure 8A (SEQ ID NO:58). The J415 deimmunized anti-PSMA antibody light chain variable region contains the following regions: an FR1 domain corresponding to about amino acid residues 1-23 of SEQ ID NO:57 (linear numbering; see also SEQ ID NO:41), which is encoded by about nucleotides 261-329 of SEQ ID NO:56; a CDR1 domain corresponding to about amino acid residues 24-34 of SEQ ID NO:57 (linear numbering; see also SEQ ID NO:32), which is encoded by about nucleotides 330-362 of SEQ ID NO:56; an FR2 domain corresponding to about amino acid residues 35-49 of SEQ ID NO:57 (linear numbering; see also SEQ ID NO:42), which is encoded by about nucleotides 363-407 of SEQ ID NO:56; a CDR2 domain corresponding to about amino acid residues 50-56 of SEQ ID NO:57 (linear numbering; see also SEQ ID NO:33), which is encoded by about nucleotides 408-428 of SEQ ID NO:56; an FR3 domain corresponding to about amino acid residues 57-88 of SEQ ID NO:57 (linear numbering; see also SEQ ID NO:43), which is encoded by about nucleotides 429-

WO 02/098897

PCT/US02/17068

524 of SEQ ID NO:56; a CDR3 domain corresponding to about amino acid residues 89-97 of SEQ ID NO:57 (linear numbering; see also SEQ ID NO:34), which is encoded by about nucleotides 525-551 of SEQ ID NO:56; and an FR4 domain corresponding to about amino acid residues 98-107 of SEQ ID NO:57 (linear numbering; see also SEQ ID NO:44), which is encoded by about nucleotides 552-581 of SEQ ID NO:56. The nucleotide and amino acid sequences of the preferred modified (deimmunized) anti-PSMA J415 immunoglobulin light chain variable region (J415DIVK5) are shown in SEQ ID NO:50 and 52, respectively; J415DIVK5 can be broken down into its component sequences in a manner identical to that shown above for J415DIVK1.

[00205] The nucleotide and amino acid sequence of the modified (deimmunized) anti-PSMA J415 immunoglobulin heavy chain variable region is shown in Figure 7A (SEQ ID NO:53 and 54, respectively). The non-coding complementary sequence is also shown in Figure 7A (SEQ ID NO:55). The J415 deimmunized anti-PSMA antibody heavy chain variable region contains the following regions: an FR1 domain corresponding to about amino acid residues 1-25 of SEQ ID NO:54 (linear numbering; see also SEQ ID NO:37), which is encoded by about nucleotides 261-335 of SEQ ID NO:53; a CDR1 domain corresponding to about amino acid residues 26-35 of SEQ ID NO:54 (linear numbering; see also SEQ ID NO:29), which is encoded by about nucleotides 336-365 of SEQ ID NO:53; an FR2 domain corresponding to about amino acid residues 36-49 of SEQ ID NO:54 (linear numbering; see also SEQ ID NO:38), which is encoded by about nucleotides 366-407 of SEQ ID NO:53; a CDR2 domain corresponding to about amino acid residues 50-68 of SEQ ID NO:54 (linear numbering; see also SEQ ID NO:30), which is encoded by about nucleotides 408-464 of SEQ ID NO:53; an FR3 domain corresponding to about amino acid residues 69-100 of SEQ ID NO:54 (linear numbering; see also SEQ ID NO:39), which is encoded by about nucleotides 465-560 of SEQ ID NO:53; a CDR3 domain corresponding to about amino acid residues 101-105 of SEQ ID NO:54 (linear numbering; see also SEQ ID NO:31), which is encoded by about nucleotides 561-575 of SEQ ID NO:53; and an FR4 domain corresponding to about amino acid residues 106-116 of SEQ ID NO:54 (linear numbering; see also SEQ ID NO:40), which is encoded by about nucleotides 576-608 of SEQ ID NO:53. The nucleotide and amino acid sequences of the preferred modified (deimmunized) anti-PSMA J415 immunoglobulin heavy chain variable region (J415DIVH4) are

WO 02/098897

PCT/US02/17068

shown in SEQ ID NO:51 and 49, respectively; J415DIVH4 can be broken down into its component sequences in a manner identical to that shown above for J415DIVH1.

[00206] It will be appreciated by the skilled artisan that nucleotide sequences encoding anti-PSMA modified antibodies (e.g., FR domains, e.g., FR1-4), can be derived from the nucleotide and amino acid sequences described in the present application using the genetic code and standard molecular biology techniques.

[00207] In one embodiment, the isolated nucleic acid comprises an anti-PSMA modified antibody heavy chain variable region nucleotide sequence having a nucleotide sequence as shown in Figure 4A (SEQ ID NO:23), Figure 7A (SEQ ID NO:53) or SEQ ID NO:51 (for J415DIVH4) or a complement thereof (e.g., SEQ ID NO:24 or SEQ ID NO:55), the nucleotide sequence of the heavy chain variable region of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174 or a complement thereof; a sequence at least 85%, 90%, 95%, 99% or more identity thereto; or a sequence capable of hybridizing under stringent conditions described herein (e.g., highly stringent conditions) to a nucleotide sequence shown in Figure 4A (SEQ ID NO:23), Figure 7A (SEQ ID NO:53), SEQ ID NO:51, or a complement thereof (e.g., SEQ ID NO:24 or SEQ ID NO:55), or the nucleotide sequence of the heavy chain variable region of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174, or a complement thereof.

[00208] In another embodiment, the isolated nucleic acid encodes an anti-PSMA modified antibody heavy chain variable region amino acid sequence having an amino acid sequence as shown in Figure 2A (SEQ ID NO:21) or Figure 5 (e.g., SEQ ID NO:49), or the amino acid sequence of the heavy chain variable region of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174; a sequence at least 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto; or a sequence capable of hybridizing under stringent conditions described herein (e.g., highly stringent conditions) to a nucleotide sequence encoding the amino acid sequence as shown in Figure 2A (SEQ ID NO:21), Figure 5 (e.g., SEQ ID NO:49), or the amino acid sequence of the heavy chain variable region of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174.

[00209] In another embodiment, the isolated nucleic acid comprises a nucleotide sequence encoding at least one, preferably two, and most preferably three, CDRs of the heavy chain variable region of the anti-PSMA antibody chosen from the amino acid sequences of SEQ ID

WO 02/098897

PCT/US02/17068

NO:1, 2, and 3, or 29, 30 and 31, or 93, 94, and 95, or 99, 100 and 101, or a CDR sequence which differs by one or two amino acids from the sequences described herein. In yet another embodiment, the isolated nucleic acid comprises a nucleotide sequence encoding CDRs 1, 2, or 3 shown in Figure 4A (SEQ ID NO:23), in SEQ ID NO:51, in Figure 7B (SEQ ID NO:125), in Figure 9A (SEQ ID NO:73), or in Figure 11A (SEQ ID NO:83), or a complement thereof, or a sequence encoding a CDR that differs by one or two amino acids from the sequences described herein.

[00210] In another embodiment, the isolated nucleic acid comprises a nucleotide sequence encoding at least one, preferably two, three and most preferably four amino acid sequences from the heavy chain variable framework region of the anti-PSMA modified antibody chosen from SEQ ID NO:9, 10, 11 and 12, or 37, 38, 39 and 40, or a sequence at least 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto.

[00211] In yet another embodiment, the isolated nucleic acid comprises an anti-PSMA modified antibody light chain variable region nucleotide sequence having a sequence as shown in Figure 4B (SEQ ID NO:25), Figure 8A (SEQ ID NO:56), or SEQ ID NO:52, or a complement thereof (e.g., SEQ ID NO:26 or 58), or the nucleotide sequence of the light chain variable region of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174; a sequence at least 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto; or a sequence capable of hybridizing under stringent conditions described herein (e.g., highly stringent conditions) to the nucleotide sequence as shown in Figure 4B (SEQ ID NO:25), Figure 8A (SEQ ID NO:56), SEQ ID NO:52, or a complement thereof (e.g., SEQ ID NO:26 or 58), or the nucleotide sequence of the light chain variable region of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174, or a complement thereof. In another embodiment, the isolated nucleic acid encodes an anti-PSMA modified antibody light chain variable region amino acid sequence having a sequence as shown in Figure 2B (SEQ ID NO:22) or in Figure 6 (e.g., SEQ ID NO:50), the amino acid sequence of the light chain variable region of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174; a sequence at least 85%, 90%, 95%, 99% or more identity thereto; or a sequence capable of hybridizing under stringent conditions described herein (e.g., highly stringent conditions) to a nucleotide sequence encoding the amino acid sequence as shown in Figure 2B (SEQ ID NO:22) or in Figure 6 (SEQ ID NO:50), or the amino acid sequence of the

WO 02/098897

PCT/US02/17068

light chain variable region of the antibody produced by the NSO cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174.

[00212] In another embodiment, the isolated nucleic acid comprises a nucleotide sequence encoding at least one, preferably two, and most preferably three, CDRs of the light chain variable region of the anti-PSMA antibody chosen from the amino acid sequences of SEQ ID NO:4, 5, and 6, or 32, 33, and 34, or 96, 97, and 98, or 102, 103, and 104, or a sequence encoding a CDR which differs by one or two amino acids from the sequences described herein.

[00213] In yet another embodiment, the isolated nucleic acid comprises a nucleotide sequence selected encoding CDRs 1-3 of the light chain variable nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:25, or a sequence encoding a CDR which differs by one or two amino acids from the sequences described herein. In another embodiment, the isolated nucleic acid comprises a nucleotide sequence encoding at least one, preferably two, three and most preferably four amino acid sequences from the light chain variable framework region of the anti-PSMA modified antibody chosen from SEQ ID NO:13, 14, 15, and 16, or 41, 42, 43, and 44, or a sequence at least 85%, 90%, 95%, 99% or more identical thereto.

[00214] In a preferred embodiment, there is an isolated first and second nucleic acid which have nucleotide sequences encoding a light chain and the heavy chain variable regions of an anti-PSMA antibody, respectively, wherein each isolated nucleic acid has at least one, two, three, four, five and preferably all CDRs chosen from the amino acid sequences of SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, and 6, or 29, 30, 31, 32, 33 and 34, or 93, 94, 95, 96, 97, and 98, or 99, 100, 101, 102, 103, and 104, or sequence encoding a CDR which differs by one or two amino acids from the sequences described herein.

[00215] The nucleic acid can encode only the light chain or the heavy chain variable region, or can also encode an antibody light or heavy chain constant region, operatively linked to the corresponding variable region. In one embodiment, the light chain variable region is linked to a constant region chosen from a kappa or a lambda constant region. Preferably, the light chain constant region is from a lambda type (e.g., a human type lambda). In another embodiment, the heavy chain variable region is linked to a heavy chain constant region of an antibody isotype selected from the group consisting of IgG (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD, and IgE. Preferably, the heavy chain constant region is from an IgG (e.g., an IgG1) isotype, e.g., a human IgG1.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00216] Nucleic acids of the invention can be chosen for having codons, which are preferred, or non-preferred, for a particular expression system. E.g., the nucleic acid can be one in which at least one codon, at preferably at least 10%, or 20% of the codons has been altered such that the sequence is optimized for expression in *E. coli*, yeast, human, insect, NS0, or CHO cells.

[00217] In a preferred embodiment, the nucleic acid differs (e.g., differs by substitution, insertion, or deletion) from that of the sequences provided, e.g., as follows: by at least one but less than 10, 20, 30, or 40 nucleotides; at least one but less than 1%, 5%, 10% or 20% of the nucleotides in the subject nucleic acid. If necessary for this analysis the sequences should be aligned for maximum homology. "Looped" out sequences from deletions or insertions, or mismatches, are considered differences. The differences are, preferably, differences or changes at nucleotides encoding a non-essential residue(s) or a conservative substitution(s).

[00218] In one embodiment, the first and second nucleic acids are linked, e.g., contained in the same vector. In other embodiments, the first and second nucleic acids are unlinked, e.g., contained in different vectors.

[00219] In another aspect, the invention features host cells and vectors (e.g., recombinant expression vectors) containing the nucleic acids, e.g., the first and second nucleic acids, of the invention.

[00220] Prokaryotic or eukaryotic host cells may be used. The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably herein. Such terms refer not only to the particular subject cell, but to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term as used herein. A host cell can be any prokaryotic, e.g., bacterial cells such as *E. coli*, or eukaryotic, e.g., insect cells, yeast, or preferably mammalian cells (e.g., cultured cell or a cell line). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

[00221] Preferred mammalian host cells for expressing the anti-PSMA antibodies, or antigen-binding fragments thereof, include Chinese Hamster Ovary (CHO cells) (including dhfr-CHO cells, described in Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, used with a DHFR selectable marker, e.g., as described in R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982)

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Mol. Biol. 159:601-621), lymphocytic cell lines, e.g., NS0 myeloma cells and SP2 cells, COS cells, and a cell from a transgenic animal, e.g., e.g., mammary epithelial cell.

[00222] In another aspect, the invention features a vector, e.g., a recombinant expression vector. The recombinant expression vectors of the invention can be designed for expression of the modified antibodies, or an antigen-binding fragment thereof, in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, polypeptides of the invention can be expressed in *E. coli*, insect cells (e.g., using baculovirus expression vectors), yeast cells or mammalian cells. Suitable host cells are discussed further in Goeddel, (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA. Alternatively, the recombinant expression vector can be transcribed and translated *in vitro*, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

[00223] Expression of proteins in prokaryotes is most often carried out in *E. coli* with vectors containing constitutive or inducible promoters directing the expression of either fusion or non-fusion proteins. Fusion vectors add a number of amino acids to an antibody encoded therein, usually to the constant region of the recombinant antibody.

[00224] In addition to the antibody chain genes, the recombinant expression vectors of the invention carry regulatory sequences that are operatively linked and control the expression of the antibody chain genes in a host cell.

[00225] In an exemplary system for recombinant expression of a modified antibody, or antigen-binding portion thereof, of the invention, a recombinant expression vector encoding both the antibody heavy chain and the antibody light chain is introduced into dhfr-CHO cells by calcium phosphate-mediated transfection. Within the recombinant expression vector, the antibody heavy and light chain genes are each operatively linked to enhancer/promoter regulatory elements (e.g., derived from SV40, CMV, adenovirus and the like, such as a CMV enhancer/AdMLP promoter regulatory element or an SV40 enhancer/AdMLP promoter regulatory element) to drive high levels of transcription of the genes. The recombinant expression vector also carries a DHFR gene, which allows for selection of CHO cells that have been transfected with the vector using methotrexate selection/amplification. The selected transformant host cells are cultured to allow for expression of the antibody heavy and light chains and intact antibody is recovered from the culture medium. Standard molecular biology

WO 02/098897

PCT/US02/17068

techniques are used to prepare the recombinant expression vector, transfect the host cells, select for transformants, culture the host cells and recover the antibody from the culture medium.

Pharmaceutical Compositions

[00226] In another aspect, the present invention provides compositions, e.g., pharmaceutically acceptable compositions, which include a modified antibody molecule described herein, formulated together with a pharmaceutically acceptable carrier.

[00227] As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. The carrier can be suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous, parenteral, rectal, spinal or epidermal administration (e.g., by injection or infusion).

[00228] The compositions of this invention may be in a variety of forms. These include, for example, liquid, semi-solid and solid dosage forms, such as liquid solutions (e.g., injectable and infusible solutions), dispersions or suspensions, liposomes and suppositories. The preferred form depends on the intended mode of administration and therapeutic application. Typical preferred compositions are in the form of injectable or infusible solutions. The preferred mode of administration is parenteral (e.g., intravenous, subcutaneous, intraperitoneal, intramuscular). In a preferred embodiment, the antibody is administered by intravenous infusion or injection. In another preferred embodiment, the antibody is administered by intramuscular or subcutaneous injection.

[00229] The phrases "parenteral administration" and "administered parenterally" as used herein means modes of administration other than enteral and topical administration, usually by injection, and includes, without limitation, intravenous, intramuscular, intraarterial, intrathecal, intracapsular, intraorbital, intracardiac, intradermal, intraperitoneal, transtracheal, subcutaneous, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subarachnoid, intraspinal, epidural and intrasternal injection and infusion.

[00230] Therapeutic compositions typically should be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage. The composition can be formulated as a solution, microemulsion, dispersion, liposome, or other ordered structure suitable to high antibody concentration. Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound

WO 02/098897

PCT/US02/17068

(i.e., antibody or antibody portion) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying that yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof. The proper fluidity of a solution can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prolonged absorption of injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent that delays absorption, for example, monostearate salts and gelatin.

[00231] The modified antibodies and antibody-fragments of the present invention can be administered by a variety of methods known in the art, although for many therapeutic applications, the preferred route/mode of administration is intravenous injection or infusion. As described in the Examples below, the anti-PSMA antibody can be administered by intravenous infusion at a rate of less than 10 mg/min, preferably less than or equal to 5 mg/min to reach a dose of about 1 to 100 mg/m², preferably about 5 to 50 mg/m², about 7 to 25 mg/m², and more preferably, about 10 mg/m². As will be appreciated by the skilled artisan, the route and/or mode of administration will vary depending upon the desired results. In certain embodiments, the active compound may be prepared with a carrier that will protect the compound against rapid release, such as a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Many methods for the preparation of such formulations are patented or generally known to those skilled in the art. See, e.g., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[00232] In certain embodiments, an antibody or antibody portion of the invention may be orally administered, for example, with an inert diluent or an assimilable edible carrier. The compound (and other ingredients, if desired) may also be enclosed in a hard or soft shell gelatin capsule, compressed into tablets, or incorporated directly into the subject's diet. For oral

WO 02/098897

PCT/US02/17068

therapeutic administration, the compounds may be incorporated with excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like. To administer a compound of the invention by other than parenteral administration, it may be necessary to coat the compound with, or co-administer the compound with, a material to prevent its inactivation.

[00233] Therapeutic compositions can be administered with medical devices known in the art.

[00234] Dosage regimens are adjusted to provide the optimum desired response (e.g., a therapeutic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subjects to be treated; each unit contains a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on (a) the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of sensitivity in individuals.

[00235] An exemplary, non-limiting range for a therapeutically or prophylactically effective amount of an antibody or antibody portion of the invention is 0.1-20 mg/kg, more preferably 1-10 mg/kg. As described in Examples 10 and 12, the anti-PSMA antibody can be administered by intravenous infusion at a rate of less than 10 mg/min, preferably less than or equal to 5 mg/min to reach a dose of about 1 to 100 mg/m², preferably about 5 to 50 mg/m², about 7 to 25 mg/m², and more preferably, about 10 mg/m². It is to be noted that dosage values may vary with the type and severity of the condition to be alleviated. It is to be further understood that for any particular subject, specific dosage regimens should be adjusted over time according to the individual need and the professional judgment of the person administering or supervising the administration of the compositions, and that dosage ranges set forth herein are exemplary only and are not intended to limit the scope or practice of the claimed composition.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00236] The pharmaceutical compositions of the invention may include a "therapeutically effective amount" or a "prophylactically effective amount" of an antibody or antibody portion of the invention. A "therapeutically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic result. A therapeutically effective amount of the modified antibody or antibody fragment may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the antibody or antibody portion to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the modified antibody or antibody fragment is outweighed by the therapeutically beneficial effects. A "therapeutically effective dosage" preferably inhibits a measurable parameter, e.g., tumor growth rate by at least about 20%, more preferably by at least about 40%, even more preferably by at least about 60%, and still more preferably by at least about 80% relative to untreated subjects. The ability of a compound to inhibit a measurable parameter, e.g., cancer, can be evaluated in an animal model system predictive of efficacy in human tumors. Alternatively, this property of a composition can be evaluated by examining the ability of the compound to inhibit, such inhibition *in vitro* by assays known to the skilled practitioner.

[00237] A "prophylactically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired prophylactic result. Typically, since a prophylactic dose is used in subjects prior to or at an earlier stage of disease, the prophylactically effective amount will be less than the therapeutically effective amount.

[00238] Also within the scope of the invention are kits comprising an anti-PSMA antibody, preferably a modified antibody, or antigen-binding fragment thereof. The kit can include one or more other elements including: instructions for use; other reagents, e.g., a label, a therapeutic agent, or an agent useful for chelating, or otherwise coupling, an antibody to a label or therapeutic agent, or a radioprotective composition; devices or other materials for preparing the antibody for administration; pharmaceutically acceptable carriers; and devices or other materials for administration to a subject. Instructions for use can include instructions for diagnostic applications of the anti-PSMA antibodies (or antigen-binding fragment thereof) to detect PSMA, *in vitro*, e.g., in a sample, e.g., a biopsy or cells from a patient having a cancer or prostatic disorder, or *in vivo*. The instructions can include instructions for therapeutic application including suggested dosages and/or modes of administration, e.g., in a patient with a

WO 02/098897

PCT/US02/17068

cancer or prostatic disorder. Other instructions can include instructions on coupling of the antibody to a chelator, a label or a therapeutic agent, or for purification of a conjugated antibody, e.g., from unreacted conjugation components. As discussed above, the kit can include a label, e.g., any of the labels described herein. As discussed above, the kit can include a therapeutic agent, e.g., a therapeutic agent described herein. The kit can include a reagent useful for chelating or otherwise coupling a label or therapeutic agent to the antibody, e.g., a reagent discussed herein. For example, a macrocyclic chelating agent, preferably 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N, N', N'', N'''-tetraacetic acid (DOTA), can be included. The DOTA can be supplied as a separate component or the DOTA (or other chelator or conjugating agent) can be supplied already coupled to the antibody. Additional coupling agents, e.g., an agent such as N-hydroxysuccinimide (NHS), can be supplied for coupling the chelator, e.g., DOTA, to the antibody. In some applications the antibody will be reacted with other components, e.g., a chelator or a label or therapeutic agent, e.g., a radioisotope, e.g., yttrium or lutetium. In such cases the kit can include one or more of a reaction vessel to carry out the reaction or a separation device, e.g., a chromatographic column, for use in separating the finished product from starting materials or reaction intermediates.

[00239] The kit can further contain at least one additional reagent, such as a diagnostic or therapeutic agent, e.g., a diagnostic or therapeutic agent as described herein, and/or one or more additional anti-PSMA antibodies (or fragments thereof), formulated as appropriate, in one or more separate pharmaceutical preparations.

[00240] The kit can further contain a radioprotectant. The radiolytic nature of isotopes, e.g., ^{90}Y (yttrium) is known. In order to overcome this radiolysis, radioprotectants may be included, e.g., in the reaction buffer, as long as such radioprotectants are benign, meaning that they do not inhibit or otherwise adversely affect the labeling reaction, e.g., of an isotope, such as ^{90}Y , to the antibody.

[00241] The formulation buffer of the present invention may include a radioprotectant such as human serum albumin (HSA) or ascorbate, which minimize radiolysis due to yttrium or other strong radionuclides. Other radioprotectants are known in the art and can also be used in the formulation buffer of the present invention, i.e., free radical scavengers (phenol, sulfites, glutathione, cysteine, gentisic acid, nicotinic acid, ascorbyl palmitate, HOP(O)H₂I glycerol, sodium formaldehyde sulfoxylate, Na₂S₂O₄, Na₂S₂O₃, and SO₂, etc.).

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00242] A preferred kit is one useful for radiolabeling a chelator- conjugated protein or peptide with a therapeutic radioisotope for administration to a patient. The kit includes (i) a vial containing chelator-conjugated antibody, (ii) a vial containing formulation buffer for stabilizing and administering the radiolabeled antibody to a patient, and (iii) instructions for performing the radiolabeling procedure. The kit provides for exposing a chelator-conjugated antibody to the radioisotope or a salt thereof for a sufficient amount of time under amiable conditions, e.g., as recommended in the instructions. A radiolabeled antibody having sufficient purity, specific activity and binding specificity is produced. The radiolabeled antibody may be diluted to an appropriate concentration, e.g., in formulation buffer, and administered directly to the patient with or without further purification. The chelator- conjugated antibody may be supplied in lyophilized form.

Uses of the Invention

[00243] The modified antibodies have *in vitro* and *in vivo* diagnostic, therapeutic and prophylactic utilities. For example, these antibodies can be administered to cells in culture, e.g. *in vitro* or *ex vivo*, or in a subject, e.g., *in vivo*, to treat, prevent, and/or diagnose a variety of disorders, such as cancers (prostatic and non-prostatic cancers), as well as non-cancerous prostatic conditions (e.g., benign hyperplastic prostatic disorders).

[00244] As used herein, the term "subject" is intended to include human and non-human animals. Preferred human animals include a human patient having a disorder characterized by abnormal functioning of a PSMA-expressing cell, e.g., a cancer cell or a prostatic cell. The term "non-human animals" of the invention includes all vertebrates, e.g., mammals and non-mammals, such as non-human primates, sheep, dog, cow, chickens, amphibians, reptiles, etc.

[00245] In one embodiment, the subject is a human subject. Alternatively, the subject can be a mammal expressing a PSMA-like antigen with which a modified antibody of the invention cross-reacts. A modified antibody molecule of the invention can be administered to a human subject for therapeutic purposes (discussed further below). Moreover, a modified anti-PSMA antibody (or fragment thereof) can be administered to a non-human mammal expressing the PSMA-like antigen with which the modified antibody cross-reacts (e.g., a primate, pig or mouse) for veterinary purposes or as an animal model of human disease. Regarding the latter, such

WO 02/098897

PCT/US02/17068

animal models may be useful for evaluating the therapeutic efficacy of antibodies of the invention (e.g., testing of dosages and time courses of administration).

Therapeutic Uses

[00246] In one embodiment, the invention provides a method of treating, e.g., ablating or killing, a cell, e.g., a prostatic cell (e.g., a cancerous or non-cancerous prostatic cell, e.g., a normal, benign or hyperplastic prostatic epithelial cell), or a malignant, non-prostatic cell, e.g., cell found in a non-prostatic solid tumor, a soft tissue tumor, or a metastatic lesion (e.g., a cell found in renal, urothelial (e.g., bladder), testicular, colon, rectal, lung (e.g., non-small cell lung carcinoma), breast, liver, neural (e.g., neuroendocrine), glial (e.g., glioblastoma), pancreatic (e.g., pancreatic duct) cancer and/or metastasis, melanoma (e.g., malignant melanoma), or soft tissue sarcoma). Methods of the invention include the steps of contacting the cell, or a nearby cell, e.g., a vascular endothelial cell proximate to the cell, with a modified anti-PSMA antibody, e.g., a modified anti-PSMA antibody as described herein, in an amount sufficient to treat, e.g., ablate or kill, the cell.

[00247] The subject method can be used on cells in culture, e.g. *in vitro* or *ex vivo*. For example, prostatic cells (e.g., malignant or normal, benign or hyperplastic prostate epithelial cells) or non-prostatic cancerous or metastatic cells (e.g., renal, an urothelial, colon, rectal, lung, breast or liver, cancerous or metastatic cells) can be cultured *in vitro* in culture medium and the contacting step can be effected by adding the modified anti-PSMA antibody or fragment thereof, to the culture medium. The method can be performed on cells (e.g., prostatic cells, or non-prostatic cancerous or metastatic cells) present in a subject, as part of an *in vivo* (e.g., therapeutic or prophylactic) protocol. For *in vivo* embodiments, the contacting step is effected in a subject and includes administering the modified anti-PSMA antibody or fragment thereof to the subject under conditions effective to permit both binding of the antibody or fragment to the cell, or the vascular endothelial cell proximate to the cell, and the treating, e.g., the killing or ablating of the cell.

[00248] Examples of prostatic disorders that can be treated or prevented include, but are not limited to, genitourinary inflammation (e.g., inflammation of smooth muscle cells) as in prostatitis; benign enlargement, for example, nodular hyperplasia (benign prostatic hypertrophy or

WO 02/098897

PCT/US02/17068

hyperplasia); and cancer, e.g., adenocarcinoma or carcinoma, of the prostate and/or testicular tumors.

[00249] As used herein, the term "cancer" is meant to include all types of cancerous growths or oncogenic processes, metastatic tissues or malignantly transformed cells, tissues, or organs, irrespective of histopathologic type or stage of invasiveness.

[00250] Examples of non-prostatic cancerous disorders include, but are not limited to, solid tumors, soft tissue tumors, and metastatic lesions. Examples of solid tumors include malignancies, e.g., sarcomas, adenocarcinomas, and carcinomas, of the various organ systems, such as those affecting lung, breast, lymphoid, gastrointestinal (e.g., colon), and genitourinary tract (e.g., renal, urothelial cells), pharynx. Adenocarcinomas include malignancies such as most colon cancers, rectal cancer, renal-cell carcinoma, liver cancer, non-small cell carcinoma of the lung, cancer of the small intestine and cancer of the esophagus. Metastatic lesions of the aforementioned cancers can also be treated or prevented using the methods and compositions of the invention.

[00251] The subject method can be useful in treating malignancies of the various organ systems, such as those affecting lung, breast, lymphoid, gastrointestinal (e.g., colon), bladder, genitourinary tract (e.g., prostate), pharynx, as well as adenocarcinomas which include malignancies such as most colon cancers, renal-cell carcinoma, prostate cancer and/or testicular tumors, non-small cell carcinoma of the lung, cancer of the small intestine and cancer of the esophagus.

[00252] In other embodiments, the antibodies of the invention can be used for the diagnosis and treatment of a subject experiencing pain or suffering from a pain-associated disorder. Preferably, the subject is a human, e.g., a patient with pain or a pain-associated disorder disclosed herein. For example, the subject could have a disease of the prostate, e.g., benign prostatic hyperplasia or prostate cancer, or non-prostate cancer, e.g., a cancer having vasculature which expresses PSMA (e.g., renal, urothelial (e.g., bladder), testicular, colon, rectal, lung (e.g., non-small cell lung carcinoma), breast, liver, neural (e.g., neuroendocrine), glial (e.g., glioblastoma), or pancreatic (e.g., pancreatic duct) cancer, melanoma (e.g., malignant melanoma), or soft tissue sarcoma). The pain can be associated with bones, as well as with obstructive voiding symptoms due to enlarged prostate, e.g., urinary hesitancy or diminished urinary stream, frequency or nocturia. The treatment of pain using the modified anti-PSMA

WO 02/098897

PCT/US02/17068

antibodies of the invention can lead to a decreased or dramatically lowered need, or even eliminate the need, for analgesics, e.g., narcotics. In addition, by reducing pain, the methods of treatment can restore the mobility of, e.g., limbs, that have become dysfunctional as a result of pain associated with movement.

[00253] Methods of administering modified antibody molecules are described above. Suitable dosages of the molecules used will depend on the age and weight of the subject and the particular drug used. The modified antibody molecules can be used as competitive agents for ligand binding to inhibit, reduce an undesirable interaction.

[00254] In one embodiment, the anti-PSMA antibodies, e.g., the modified anti-PSMA antibodies, or antigen-binding fragments thereof, can be used to kill or ablate cancerous cells and normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate epithelial cells *in vivo*. For example, the anti-PSMA antibodies can be used to treat or prevent a disorder described herein. The antibodies, e.g., the modified antibodies, (or fragments thereof) can be used by themselves or conjugated to a second agent, e.g., a cytotoxic drug, radioisotope, or a protein, e.g., a protein toxin or a viral protein. This method includes: administering the modified antibody, alone or conjugated to a cytotoxic drug, to a subject requiring such treatment.

[00255] Since the anti-PSMA antibodies (or fragments thereof) recognize normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate epithelial cells, any such cells to which the modified antibodies bind are destroyed. Although such administration may destroy normal prostate epithelial cells, this is not problematic, because the prostate is not required for life or survival. Although the prostate may indirectly contribute to fertility, this is not likely to be a practical consideration in patients receiving the treatment of the present invention. In the case of cancerous tissues, since the modified antibodies recognize vascular endothelial cells that are proximate to cancerous cells, binding of the modified antibody/cytotoxic drug complex to these vascular endothelial cells destroys them, thereby cutting off the blood flow to the proximate cancerous cells and, thus, killing or ablating these cancerous cells. Alternatively, the modified antibodies, by virtue of their binding to vascular endothelial cells that are proximate to cancerous cells, are localized proximate to the cancerous cells. Thus, by use of suitable modified antibodies (including those containing substances effective to kill cells nondiscriminatingly but only over a short range), cells in cancerous tissue (including cancerous cells) can be selectively killed or ablated.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00256] The antibodies of the present invention may be used to deliver a variety of therapeutic agents, e.g., a cytotoxic moiety, e.g., a therapeutic drug, a radioisotope, molecules of plant, fungal, or bacterial origin, or biological proteins (e.g., protein toxins) or particles (e.g., a recombinant viral particles, e.g., via a viral coat protein), or mixtures thereof. The therapeutic agent can be an intracellularly active drug or other agent, such as short-range radiation emitters, including, for example, short-range, high-energy α -emitters, as described herein. In some preferred embodiments, the anti-PSMA antibody, or antigen binding fragment thereof, can be coupled to a molecule of plant or bacterial origin (or derivative thereof), e.g., a maytansinoid (e.g., maytansinol or the DM1 maytansinoid, see Figure 15). DM1 is a sulfhydryl-containing derivative of maytansine that can be linked to antibodies via a disulfide linker that releases DM1 when inside target cells. The disulfide linkers display greater stability in storage and in serum than other linkers. Maytansine is a cytotoxic agent that effects cell killing by preventing the formation of microtubules and depolymerization of extant microtubules. It is 100- to 1000-fold more cytotoxic than anticancer agents such as doxorubicin, methotrexate, and vinca alkaloid, which are currently in clinical use. Alternatively, the anti-PSMA antibody, or antigen binding fragment thereof, can be coupled to a taxane, a calicheamicin, a proteasome inhibitor, or a topoisomerase inhibitor. [(1R)-3-methyl-1-[[[(2S)-1-oxo-3-phenyl-2-[(3-mercaptoacetyl)amino]propyl]amino]butyl]] Boronic acid is a suitable proteasome inhibitor. N,N'-bis[2-(9-methylphenazine-1-carboxamido)ethyl]-1,2-ethanediamine is a suitable topoisomerase inhibitor.

[00257] Enzymatically active toxins and fragments thereof are exemplified by diphtheria toxin A fragment, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, α -sacrin, certain *Aleurites fordii* proteins, certain Dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins (PAP, PAPII and PAP-S), *Morodica charantia* inhibitor, curcin, crotin, *Saponaria officinalis* inhibitor, gelonin, mitogillin, restrictocin, phenomycin, and enomycin. In a preferred embodiment, the anti-PSMA antibody is conjugated to maytansinoids, e.g., maytansinol (see US Patent No. 5,208,020), CC-1065 (see US Patent Nos. 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545). Procedures for preparing enzymatically active polypeptides of the immunotoxins are described in W084/03508 and W085/03508, which are hereby incorporated by reference, and in the appended Examples below. Examples of cytotoxic moieties that can be conjugated to the antibodies include adriamycin, chlorambucil, daunomycin, methotrexate, neocarzinostatin, and platinum.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00258] To kill or ablate normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate epithelial cells, a first antibody, e.g., a modified antibody, can be conjugated with a prodrug which is activated only when in close proximity with a prodrug activator. The prodrug activator is conjugated with a second antibody, e.g., a second modified antibody according to the present invention, preferably one that binds to a non-competing site on the prostate specific membrane antigen molecule. Whether two modified antibodies bind to competing or non-competing binding sites can be determined by conventional competitive binding assays. For example, monoclonal antibodies J591, J533, and E99 bind to competing binding sites on the prostate specific membrane antigen molecule. Monoclonal antibody J415, on the other hand, binds to a binding site that is non-competing with the site to which J591, J533, and E99 bind. Thus, for example, the first modified antibody can be one of J591, J533, and E99, and the second modified antibody can be J415. Alternatively, the first modified antibody can be J415, and the second modified antibody can be one of J591, J533, and E99. Drug-prodrug pairs suitable for use in the practice of the present invention are described in Blakely et al., "ZD2767, an Improved System for Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy That Results in Tumor Regressions in Colorectal Tumor Xenografts," (1996) *Cancer Research*, 56:3287-3292, which is hereby incorporated by reference.

[00259] Alternatively, the antibody, e.g., the modified antibody, can be coupled to high energy radiation emitters, for example, a radioisotope, such as ^{131}I , a γ -emitter, which, when localized at the tumor site, results in a killing of several cell diameters. See, e.g., S.E. Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al. (eds.), pp 303-316 (Academic Press 1985), which is hereby incorporated by reference. Other suitable radioisotopes include α -emitters, such as ^{212}Bi , ^{213}Bi , and ^{211}At , and β -emitters, such as ^{186}Re and ^{90}Y . Radiotherapy is expected to be particularly effective, because prostate epithelial cells and vascular endothelial cells within cancers are relatively radiosensitive. Moreover, Lu^{117} may also be used as both an imaging and cytotoxic agent.

[00260] Radioimmunotherapy (RIT) using antibodies labeled with ^{131}I , ^{90}Y , and ^{177}Lu is under intense clinical investigation. There are significant differences in the physical characteristics of these three nuclides and as a result, the choice of radionuclide can be important in order to deliver maximum radiation dose to the tumor. The higher beta energy particles of ^{90}Y

WO 02/098897

PCT/US02/17068

may be good for bulky tumors, but it may not be necessary for small tumors and especially bone metastases, (e.g. those common to prostate cancer). The relatively low energy beta particles of ^{131}I are ideal, but *in vivo* dehalogenation of radioiodinated molecules is a major disadvantage for internalizing antibody. In contrast, ^{177}Lu has low energy beta particle with only 0.2-0.3 mm range and delivers much lower radiation dose to bone marrow compared to ^{90}Y . In addition, due to longer physical half-life (compared to ^{90}Y), the tumor residence times are higher. As a result, higher activities (more mCi amounts) of ^{177}Lu labeled agents can be administered with comparatively less radiation dose to marrow. There have been several clinical studies investigating the use of ^{177}Lu labeled antibodies in the treatment of various cancers. (Mulligan T et al. (1995) *Clin Cancer Res.* 1: 1447-1454; Meredith RF, et al. (1996) *J Nucl Med* 37:1491-1496; Alvarez RD, et al. (1997) *Gynecologic Oncology* 65: 94-101).

[00261] The antibodies of the invention can also be conjugated or fused to viral surface proteins present on viral particles. For example, a single-chain anti-PSMA antibody of the present invention could be fused (e.g., to form a fusion protein) to a viral surface protein. Alternatively, a whole anti-PSMA antibody of the present invention, or a fragment thereof, could be chemically conjugated (e.g., via a chemical linker) to a viral surface protein. Preferably, the virus is one that fuses with endocytic membranes, e.g., an influenza virus, such that the virus is internalized along with the anti-PSMA antibody and thereby infects PSMA-expressing cells. The virus can be genetically engineered as a cellular toxin. For example, the virus could express or induce the expression of genes that are toxic to cells, e.g., cell death promoting genes. Preferably, such viruses would be incapable of viral replication.

[00262] The antibodies, e.g., the modified antibodies of the invention, can be used directly *in vivo* to eliminate antigen-expressing cells via natural complement or antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Modified antibody molecules of the invention, which have complement binding sites, such as portions from IgG1, -2, or -3 or IgM which bind complement can also be used in the presence of complement. In one embodiment, *ex vivo* treatment of a population of cells comprising target cells with a binding agent of the invention and appropriate effector cells can be supplemented by the addition of complement or serum containing complement. Phagocytosis of target cells coated with modified antibodies or fragments thereof of the invention can be improved by binding of complement proteins. In another embodiment

WO 02/098897

PCT/US02/17068

target cells coated with the modified antibodies or fragments thereof can also be lysed by complement.

[00263] The antibodies, e.g., the modified antibodies, of the present invention can be used and sold together with equipment, as a kit, to detect the particular label.

[00264] Also encompassed by the present invention is a method of killing or ablating cells which involves using the antibodies described herein, e.g., the modified antibodies for preventing a PSMA-related disorder. For example, these materials can be used to prevent or delay development or progression of prostate or other cancers.

[00265] Use of the therapeutic methods of the present invention to treat prostate and other cancers has a number of benefits. Since the modified antibodies according to the present invention only target cancerous cells (such as cells of cancerous tissues containing vascular endothelial cells) and prostate epithelial cells, other tissue is spared. As a result, treatment with such modified antibodies is safer, particularly for elderly patients. Treatment according to the present invention is expected to be particularly effective, because it directs high levels of modified antibodies, such as antibodies or binding portions thereof, probes, or ligands, to the bone marrow and lymph nodes where prostate cancer metastases and metastases of many other cancers predominate. Moreover, the methods of the present invention are particularly well-suited for treating prostate cancer, because tumor sites for prostate cancer tend to be small in size and, therefore, easily destroyed by cytotoxic agents. Treatment in accordance with the present invention can be effectively monitored with clinical parameters, such as, in the case of prostate cancer, serum prostate specific antigen and/or pathological features of a patient's cancer, including stage, Gleason score, extracapsular, seminal, vesicle or perineural invasion, positive margins, involved lymph nodes, disease related pain, e.g., bone pain, etc. Alternatively, these parameters can be used to indicate when such treatment should be employed.

[00266] The invention also features methods of treating pain, e.g., reducing pain, experienced by a subject having or diagnosed with prostate disease, e.g., benign prostatic hyperplasia or prostate cancer, or non-prostate cancer, e.g., a cancer having vasculature which expresses PSMA (e.g., renal, urothelial (e.g., bladder), testicular, colon, rectal, lung (e.g., non-small cell lung carcinoma), breast, liver, neural (e.g., neuroendocrine), glial (e.g., glioblastoma), or pancreatic (e.g., pancreatic duct) cancer, melanoma (e.g., malignant melanoma), or soft tissue sarcoma). The methods include administering an anti-PSMA antibody as described herein, e.g.,

WO 02/098897

PCT/US02/17068

a modified anti-PSMA antibody, to a subject in an amount sufficient to treat, e.g., reduce, the pain associated with prostate disease or non-prostate cancer. The subject may have no signs of prostate disease or non-prostate cancer other than, e.g., elevated levels of serum PSA and the sensation of pain. Patients that have prostate cancer often experience bone pain, as well as, pain associated with obstructive voiding symptoms due to enlarged prostate, e.g., urinary hesitancy or diminished urinary stream, frequency or nocturia. The treatment of pain using the modified anti-PSMA antibodies of the invention can lead to a decreased or dramatically lowered need, or even eliminate the need, for analgesics, e.g., narcotics. By reducing pain, the methods of treatment can restore the mobility of, e.g., limbs, that have become dysfunctional as a result of pain associated with movement.

[00267] Because the antibodies, e.g., the modified antibodies, of the present invention bind to living prostate cells, therapeutic methods for treating prostate cancer using these modified antibodies are not dependent on the presence of lysed prostate cells. For the same reasons, diagnostic and imaging methods which determine the location of living normal, benign hyperplastic, or cancerous prostate epithelial cells (as well as vascular endothelial cells within cancers) are much improved by employing the modified antibodies of the present invention. In addition, the ability to differentiate between living and dead prostate cells can be advantageous, especially to monitor the effectiveness of a particular treatment regimen.

[00268] The antibodies, e.g., the modified antibodies, or antigen-binding portions thereof, of the present invention bind to extracellular domains of prostate specific membrane antigens or portions thereof in normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate epithelial cells as well as vascular endothelial cells proximate to cancerous cells. As a result, when practicing the methods of the present invention to kill, ablate, or detect normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate epithelial cells as well as vascular endothelial cells proximate to cancerous cells, the antibodies, e.g., the modified antibodies, bind to all such cells, not only to cells which are fixed or cells whose intracellular antigenic domains are otherwise exposed to the extracellular environment. Consequently, binding of the antibodies, e.g., the modified antibodies, is concentrated in areas where there are prostate epithelial cells, irrespective of whether these cells are fixed or unfixed, viable or necrotic. Additionally or alternatively, these antibodies, e.g., these modified antibodies, or binding portions thereof, bind to and are internalized with prostate

WO 02/098897

PCT/US02/17068

specific membrane antigens or portions thereof in normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate epithelial cells.

Combination Therapy

[00269] The anti-PSMA antibodies described herein, e.g., the modified anti-PSMA antibodies, or antigen-binding fragments thereof, may be used in combination with other therapies. For example, the combination therapy can include a composition of the present invention coformulated with, and/or coadministered with, one or more additional therapeutic agents, e.g., one or more anti-cancer agents, cytotoxic or cytostatic agents, hormone treatment, vaccines, and/or other immunotherapies. In other embodiments, the anti-PSMA antibodies are administered in combination with other therapeutic treatment modalities, including surgery, radiation, cryosurgery, and/or thermotherapy. Such combination therapies may advantageously utilize lower dosages of the administered therapeutic agents, thus avoiding possible toxicities or complications associated with the various monotherapies.

[00270] Administered "in combination", as used herein, means that two (or more) different treatments are delivered to the subject during the course of the subject's affliction with the disorder, e.g., the two or more treatments are delivered after the subject has been diagnosed with the disorder and before the disorder has been cured or eliminated. In some embodiments, the delivery of one treatment is still occurring when the delivery of the second begins, so that there is overlap. This is sometimes referred to herein as "simultaneous" or "concurrent delivery." In other embodiments, the delivery of one treatment ends before the delivery of the other treatment begins. In some embodiments of either case, the treatment is more effective because of combined administration. For example, the second treatment is more effective, e.g., an equivalent effect is seen with less of the second treatment, or the second treatment reduces symptoms to a greater extent, than would be seen if the second treatment were administered in the absence of the first treatment, or the analogous situation is seen with the first treatment. In some embodiments, delivery is such that the reduction in a symptom, or other parameter related to the disorder is greater than what would be observed with one treatment delivered in the absence of the other. The effect of the two treatments can be partially additive, wholly additive, or greater than additive. The delivery can be such that an effect of the first treatment delivered is still detectable when the second is delivered.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00271] Anti-PSMA antibodies of the invention can be administered in combination with one or more of the existing modalities for treating prostate cancers, including, but not limited to: surgery (e.g., radical prostatectomy); radiation therapy (e.g., external-beam therapy which involves three dimensional, conformal radiation therapy where the field of radiation is designed to conform to the volume of tissue treated; interstitial-radiation therapy where seeds of radioactive compounds are implanted using ultrasound guidance; and a combination of external-beam therapy and interstitial-radiation therapy); hormonal therapy, which can be administered before or following radical prostatectomy or radiation (e.g., treatments which reduce serum testosterone concentrations, or inhibit testosterone activity, e.g., administering a leuteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) analog or agonist (e.g., Lupron, Zoladex, leuprolide, buserelin, or goserelin) or antagonists (e.g., Abarelix). Non-steroidal anti-androgens, e.g., flutamide, bicalutimide, or nilutamide, can also be used in hormonal therapy, as well as steroidal anti-androgens (e.g., cyproterone acetate or megestrol acetate), estrogens (e.g., diethylstilbestrol), PROSCAR™, secondary or tertiary hormonal manipulations (e.g., involving corticosteroids (e.g., hydrocortisone, prednisone, or dexamethasone), ketoconazole, and/or aminoglutethimide), inhibitors of 5 α -reductase (e.g., finasteride), herbal preparations (e.g., PC-SPEs), hypophysectomy, and adrenalectomy. Furthermore, hormonal therapy can be performed intermittently or using combinations of any of the above treatments, e.g., combined use of leuprolide and flutamide.

[00272] In other embodiments, the anti-PSMA antibodies, e.g., the modified anti-PSMA antibodies, are administered in combination with an immunomodulatory agent, e.g., IL-1, 24, 6, or 12, or interferon alpha or gamma. As described in Example 14 below, the combination of antibodies having a human constant regions and IL-2 potentially is expected to enhance the efficacy of the monoclonal antibody. IL-2 will function to augment the reticuloendothelial system to recognize antigen-antibody complexes by its effects on NK cells and macrophages. Thus, by stimulating NK cells to release IFN, GM-CSF, and TNF, these cytokines will increase the cell surface density of Fc receptors, as well as the phagocytic capacities of these cells. Therefore, the effector arm of both the humoral and cellular arms will be artificially enhanced. The net effect will be to improve the efficiency of monoclonal antibody therapy, so that a maximal response may be obtained. A small number of clinical trials have combined IL-2 with a monoclonal antibody (Albertini et al. (1997) *Clin Cancer Res* 3:1277-1288; Frost et al. (1997)

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Cancer 80:317-333; Kossman et al. (1999) *Clin Cancer Res* 5:2748-2755). IL-2 can be administered by either bolus or continuous infusion. Accordingly, the antibodies of the invention can be administered in combination with IL-2 to maximize their therapeutic potential.

Diagnostic Uses

[00273] In one aspect, the present invention provides a diagnostic method for detecting the presence of a PSMA protein *in vitro* (e.g., in a biological sample, such as a tissue biopsy, e.g., from a cancerous or prostatic tissue) or *in vivo* (e.g., *in vivo* imaging in a subject). The method includes: (i) contacting the sample with a modified anti-PSMA antibody or fragment thereof, or administering to the subject, the modified anti-PSMA antibody; (optionally) (ii) contacting a reference sample, e.g., a control sample (e.g., a control biological sample, such as plasma, tissue, biopsy) or a control subject)); and (iii) detecting formation of a complex between the anti-PSMA antibody, and the sample or subject, or the control sample or subject, wherein a change, e.g., a statistically significant change, in the formation of the complex in the sample or subject relative to the control sample or subject is indicative of the presence of PSMA in the sample.

[00274] Preferably, the anti-PSMA antibody (or fragment thereof) is directly or indirectly labeled with a detectable substance to facilitate detection of the bound or unbound antibody. Suitable detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials and radioactive materials, as described above and described in more detail below.

[00275] Complex formation between the anti-PSMA antibody and PSMA can be detected by measuring or visualizing either the antibody (or antibody fragment) bound to the PSMA antigen or unbound antibody (or antibody fragment). Conventional detection assays can be used, e.g., an enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), an radioimmunoassay (RIA) or tissue immunohistochemistry. Alternative to labeling the anti-PSMA antibody, the presence of PSMA can be assayed in a sample by a competition immunoassay utilizing standards labeled with a detectable substance and an unlabeled anti-PSMA antibody. In this assay, the biological sample, the labeled standards and the PSMA binding agent are combined and the amount of labeled standard bound to the unlabeled antibody is determined. The amount of PSMA in the sample is inversely proportional to the amount of labeled standard bound to the PSMA binding agent.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00276] In still another embodiment, the invention provides a method for detecting the presence of PSMA-expressing cancerous tissues (particularly the vascular endothelial cells therein) and normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate epithelial cells *in vivo*. The method includes (i) administering to a subject (e.g., a patient having a cancer or prostatic disorder) an anti-PSMA antibody, preferably a modified antibody, conjugated to a detectable marker; (ii) exposing the subject to a means for detecting said detectable marker to the PSMA-expressing tissues or cells. Particularly preferred antibodies include modified antibodies having CDRs from any of a J591, J415, J533 or E99, and in particular deimmunized versions of these antibodies, particularly deJ591 or deJ415.

[00277] Examples of labels useful for diagnostic imaging in accordance with the present invention are radiolabels such as ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{125}I , ^3H , ^{14}C , and ^{188}Re , fluorescent labels such as fluorescein and rhodamine, nuclear magnetic resonance active labels, positron emitting isotopes detectable by a positron emission tomography ("PET") scanner, chemiluminescers such as luciferin, and enzymatic markers such as peroxidase or phosphatase. Short-range radiation emitters, such as isotopes detectable by short-range detector probes, such as a transrectal probe, can also be employed. These isotopes and transrectal detector probes, when used in combination, are especially useful in detecting prostatic fossa recurrences and pelvic nodal disease. The modified antibody can be labeled with such reagents using techniques known in the art. For example, see Wensel and Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York, which is hereby incorporated by reference, for techniques relating to the radiolabeling of antibodies. See also, D. Colcher et al. (1986) *Meth. Enzymol.* 121: 802-816, which is hereby incorporated by reference.

[00278] In the case of a radiolabeled modified antibody, the modified antibody is administered to the patient, is localized to the tumor bearing the antigen with which the modified antibody reacts, and is detected or "imaged" *in vivo* using known techniques such as radionuclear scanning using e.g., a gamma camera or emission tomography. See e.g., A.R. Bradwell et al., "Developments in Antibody Imaging", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al., (eds.), pp 65-85 (Academic Press 1985), which is hereby incorporated by reference. Alternatively, a positron emission transaxial tomography scanner, such as designated Pet VI located at Brookhaven National Laboratory, can be used where the radiolabel emits positrons (e.g., ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , and ^{13}N).

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00279] Fluorophore and chromophore labeled modified antibodies can be prepared from standard moieties known in the art. Since antibodies and other proteins absorb light having wavelengths up to about 310 nm, the fluorescent moieties should be selected to have substantial absorption at wavelengths above 310 nm and preferably above 400 nm. A variety of suitable fluorescent compounds and chromophores are described by Stryer (1968) *Science*, 162:526 and Brand, L. et al. (1972) *Annual Review of Biochemistry*, 41:843-868, which are hereby incorporated by reference. The modified antibodies can be labeled with fluorescent chromophore groups by conventional procedures such as those disclosed in U.S. Patent Nos. 3,940,475, 4,289,747, and 4,376,110, which are hereby incorporated by reference.

[00280] One group of fluorescers having a number of the desirable properties described above is the xanthene dyes, which include the fluoresceins derived from 3,6-dihydroxy-9-henylxanthhydryl and resamines and rhodamines derived from 3,6-diamino-9-phenylxanthhydryl and lissamine rhodamine B. The rhodamine and fluorescein derivatives of 9-o-carboxyphenylxanthhydryl have a 9-o-carboxyphenyl group. Fluorescein compounds having reactive coupling groups such as amino and isothiocyanate groups such as fluorescein isothiocyanate and fluorescamine are readily available. Another group of fluorescent compounds are the naphthylamines, having an amino group in the α or β position.

[00281] In cases where it is important to distinguish between regions containing live and dead prostate epithelial cells or to distinguish between live and dead prostate epithelial cells, the antibodies of the present invention (or other modified antibodies of the present invention), labeled as described above, can be coadministered along with an antibody or other modified antibody which recognizes only living or only dead prostate epithelial cells labeled with a label which can be distinguished from the label used to label the subject antibody. By monitoring the concentration of the two labels at various locations or times, spatial and temporal concentration variations of living and dead normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate epithelial cells can be ascertained. In particular, this method can be carried out using the labeled antibodies of the present invention, which recognize both living and dead epithelial prostate cells, and labeled 7E11 antibodies (Horoszewicz et al. (1987) *Anticancer Research* 7:927-936), which recognize only dead epithelial prostate cells.

[00282] In other embodiments, the invention provide methods for determining the dose, e.g., radiation dose, that different tissues are exposed to when a subject, e.g., a human subject, is

WO 02/098897

PCT/US02/17068

administered an anti-PSMA antibody that is conjugated to a radioactive isotope. The method includes: (i) administering an anti-PSMA antibody as described herein, e.g., a modified anti-PSMA antibody, that is labeled with a radioactive isotope to a subject; (ii) measuring the amount of radioactive isotope located in different tissues, e.g., prostate, liver, kidney, or blood, at various time points until some or all of the radioactive isotope has been eliminated from the body of the subject; and (iii) calculating the total dose of radiation received by each tissue analyzed. The measurements can be taken at scheduled time points, e.g., day 1, 2, 3, 5, 7, and 12, following administration (at day 0) of the radioactively labeled anti-PSMA antibody to the subject. The concentration of radioisotope present in a given tissue, integrated over time, and multiplied by the specific activity of the radioisotope can be used to calculate the dose that a given tissue receives. Pharmacological information generated using anti-PSMA antibodies labeled with one radioactive isotope, e.g., a gamma-emitter, e.g., ^{111}In , can be used to calculate the expected dose that the same tissue would receive from a different radioactive isotope which cannot be easily measured, e.g., a beta-emitter, e.g., ^{90}Y .

Pharmacogenomics

[00283] With regards to both prophylactic and therapeutic methods of treatment, such treatments may be specifically tailored or modified, based on knowledge obtained from the field of pharmacogenomics. "Pharmacogenomics", as used herein, refers to the application of genomics technologies such as gene sequencing, statistical genetics, and gene expression analysis to drugs in clinical development and on the market. See, for example, Eichelbaum, M. *et al.* (1996) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23:983-985 and Linder, M.W. *et al.* (1997) *Clin. Chem.* 43:254-266. Differences in metabolism of therapeutics can lead to severe toxicity or therapeutic failure by altering the relation between dose and blood concentration of the pharmacologically active drug. In general, two types of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic conditions transmitted as a single factor altering the way drugs act on the body (altered drug action) or genetic conditions transmitted as single factors altering the way the body acts on drugs (altered drug metabolism). These pharmacogenetic conditions can occur either as rare genetic defects or as naturally-occurring polymorphisms. More specifically, the term refers the study of how a patient's genes determine his or her response to a drug (e.g., a patient's "drug response phenotype," or "drug response genotype.") Thus, another aspect of the

WO 02/098897

PCT/US02/17068

invention provides methods for tailoring an individual's prophylactic or therapeutic treatment according to that individual's drug response genotype.

[00284] Information generated from pharmacogenomic research can be used to determine appropriate dosage and treatment regimens for prophylactic or therapeutic treatment of an individual. This knowledge, when applied to dosing or drug selection, can avoid adverse reactions or therapeutic failure and thus enhance therapeutic or prophylactic efficiency when administering a therapeutic composition, e.g., a composition consisting of one or more anti-PSMA antibodies, or derivatized form(s) thereof, to a patient, as a means of treating a disorder, e.g., a cancer or prostatic disorder as described herein.

[00285] In one embodiment, a physician or clinician may consider applying knowledge obtained in relevant pharmacogenomics studies when determining whether to administer a pharmaceutical composition, e.g., a composition consisting of one or more anti-PSMA antibodies, derivatized form(s) thereof, and optionally a second agent, to a subject. In another embodiment, a physician or clinician may consider applying such knowledge when determining the dosage, e.g., amount per treatment or frequency of treatments, of a pharmaceutical composition, e.g., a pharmaceutical composition as described herein, administered to a patient.

[00286] In yet another embodiment, a physician or clinician may determine the genotypes, at one or more genetic loci, of a group of subjects participating in a clinical trial, wherein the subjects display a disorder, e.g., a cancer or prostatic disorder as described herein, and the clinical trial is designed to test the efficacy of a pharmaceutical composition, e.g., a composition consisting of one or more anti-PSMA antibodies, and optionally a second agent, and wherein the physician or clinician attempts to correlate the genotypes of the subjects with their response to the pharmaceutical composition.

Deposits

[00287] Hybridomas E99, J415, J533, and J591 have been deposited pursuant to, and in satisfaction of, the requirements of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure with the American Type Culture Collection ("A.T.C.C.") at 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Hybridoma E99 was deposited on May 2, 1996, and received A.T.C.C. Designation Number HB-12101. Hybridoma J415 was deposited on May 30, 1996, and received A.T.C.C.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Designation Number HB-12109. Hybridomas J533 and J591 were deposited on June 6, 1996, and received A.T.C.C. Designation Numbers HB-12127 and HB-12126, respectively.

[00288] An NS0 cell line producing deimmunized J591 was deposited with American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, on September 18, 2001 and assigned Accession Number PTA-3709. An NS0 cell line producing deimmunized J415 was deposited with American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, on March 21, 2002 and assigned Accession Number PTA-4174. These deposits will be maintained under the terms of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure. This deposit was made merely as a convenience for those of skill in the art and is not an admission that a deposit is required under 35 U.S.C. §112.

[00289] The following invention is further illustrated by the following examples, which should not be construed as further limiting. The contents of all references, pending patent applications and published patents, cited throughout this application are hereby expressly incorporated by reference.

EXAMPLES

Example 1 - Chelation Of Anti-PSMA Antibodies To ¹¹¹Indium, ⁹⁰Yttrium, and ¹⁷⁷Lutetium

[00290] The modified anti-PSMA monoclonal antibodies can be radiolabeled with ¹¹¹Indium, ⁹⁰Yttrium, or ¹⁷⁷Lutetium by directly coupling one of the four carboxylic acid groups of the chelator 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA) to primary amines present on the surface of the antibodies. The DOTA conjugated antibody is then purified, sterile filtered, and vialled. Prior to use, the purified antibodies can be mixed with the desired radiolabel which binds to DOTA.

Chelation Process

[00291] Monoclonal antibody deJ591 was conjugated with 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N', N'', N'''-tetraacetic acid (DOTA) and subsequently radiolabeled with ¹¹¹In, ⁹⁰Y and ¹⁷⁷Lu. Radiolabeling and quality control tests were performed on three separate vials of clinical grade mAb deJ591.

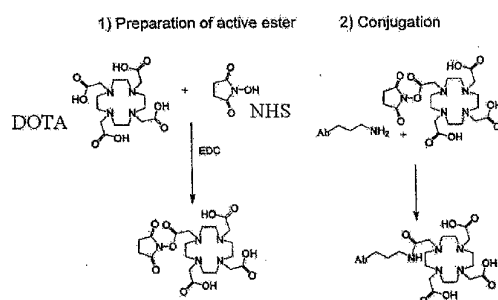
WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00292] All reagents used in the conjugation and purification of deJ591 were made from pyrogen-free water. In the specific case of NH_4OAc buffer and sodium phosphate buffer, the solutions were purified with Chelex 100 (Bio-Rad, CA) to remove any metal ions.

Conjugation of Antibody with 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane- N , N' , N'' , N''' -tetraacetic acid (DOTA)

[00293] The monoclonal antibody deJ591 was modified with 1,4,7,10-tetraazacyclododecane- N , N' , N'' , N''' -tetraacetic acid (DOTA) as follows. Briefly, 25 mg of deJ591 was concentrated in a 30 kDa microsep centrifugal concentrator (Pall Filtron, MA) and washed with 5 x 4 mL of 1% DTPA (pH 5.0), over a period of 24 hours. The antibody buffer was then changed to 0.1 M phosphate (pH 7.0) using the same centrifugal technique. An active ester of DOTA was created by dissolving 146 mg DOTA (0.361 mmoles) and 36 mg N-hydroxysuccinimide (0.313 mmoles) in 2 ml of water and adjusting the pH to 7.3 with NaOH, prior to the addition of 10 mg of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (see below).



This reaction mixture was cooled on ice for 1 hour before being added to the deJ591 solution. The resultant DOTA-deJ591 was separated from the excess DOTA and other reactants by repeated washing with 0.3 M NH_4OAc (20 x 4 mL) and centrifugal concentration. The purified conjugate was then sterilized by filtration through a 0.22 μm filter and stored in a sterile polypropylene vial at 4°C.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00294] The concentration of the DOTA-deJ591 conjugate was assayed by determining the UV absorption at 280 nm and two 50 μ L aliquots mixed with either 20 or 30 μ L of a 1.30 mM solution of InCl_3 (0.01 M HCl) spiked with a tracer amount of ^{111}In . The mixture is incubated at 37°C for 16 hours and then analyzed by ITLC, using silica gel impregnated glass fiber 10 cm strip (ITLC-SG, Gelman, prod. # 61885) and an eluant of 1% DTPA (pH 6.0). The antibody bound activity remains at the origin and free ^{111}In moves with the solvent front as an ^{111}In -DTPA complex. The relative amounts of ^{111}In and ^{111}In -DOTA-J591 is determined by cutting the ITLC strip at a Rf of 0.5 and counting the two halves with a Na(Tl)I detector. The number of binding sites is calculated by considering the molar reaction ratio between ^{111}In and DOTA-deJ591 and the observed ratio of ^{111}In and ^{111}In -DOTA-J591 detected. Typically, 5.1 molecules of DOTA are conjugated to deJ591. Table 10 shows the results from two conjugations of deJ591.

Table 10: Calculation of the Mean Number of DOTA Molecules Conjugated to deJ591

Test number	Known ^{111}In /DOTA-J591	Observed ^{111}In /DOTA-J591	Mean number of DOTA mols per mAb
	Reaction ratio	TLC ratio	
A	11.76	1.338	5.03
B	17.64	2.469	5.09

Radiolabeling

[00295] The following radiolabeling procedure is described for ^{111}In , but may be used with other radiolabels such as ^{90}Y or ^{177}Lu . Radiolabeling was achieved by adding the ^{111}In (in dilute HCl) to the ammonium acetate buffered DOTA-deJ591. To avoid the effects of autoradiolysis on the antibody, the reaction time was minimized and the reaction mixture purified with a size exclusion column prior to administration. Briefly, a mixture composed of 20 μ L of $^{111}\text{InCl}_3$ (8 mCi, 0.01 M HCl, 400 μ L DOTA-deJ591 (4 mg/ml, 0.3 M NH_4OAc , pH 7) was allowed to react at 37°C for 20 minutes. The reaction mixture was then separated on a 16 mL Biogel-P6DG column (Bio-Rad, CA) equilibrated with 4 x 10 mL of sterile 1% HSA in PBS (HSA meets specification for US licensed albumin; manufactured by Central Laboratory Blood Transfusion Service Swiss Red Cross, Bern, Switzerland, License No. 647). Once the reaction mixture was loaded onto the column, it was washed with a further 2 mL of 1% HSA PBS, before

WO 02/098897

PCT/US02/17068

the main ^{111}In -DOTA-deJ591 fraction was eluted with 5 mL of 1% HSA PBS. The purified ^{111}In -DOTA-deJ591 was then sterile filtered into a sterile evacuated vial. Using this method, specific activity of 7.6 mCi ^{111}In /mg DOTA-deJ591 was achieved.

Alternative Radiolabeling Procedure for ^{111}In

[00296] The following radiolabeling procedure can be used for the routine preparation of ^{111}In -DOTA-J591 for clinical studies and stability studies. Radiolabeling is achieved by the addition of ^{111}In chloride and Ammonium acetate buffer (1 M) to DOTA-J591 solution (8 mg/mL, 0.3 M Ammonium acetate, pH 7). To avoid the effects of autoradiolysis on the antibody, the reaction time has been minimized. The labeled ^{111}In -DOTA-J591 is purified using a size exclusion column and sterile filtered using a 0.2m millipore membrane filter prior to administration to patients.

[00297] Briefly, ammonium acetate, (10 μL for each mCi of ^{111}In) is added to a reaction vial containing ^{111}In -chloride solution. Subsequently, the DOTA-J591 solution (30 mL or 0.24 mg for each mCi of ^{111}In) is added to the reaction vial and the mixture is gently mixed and incubated at 37°C for 20-30 min. An aliquot of the mixture is tested to determine labeling efficiency using ITLC (SG and 5 mM DTPA, pH 5). If the binding is optimal (>70%), the reaction is stopped by the addition of 10-40 mL of 5 mM DTPA.

[00298] In order to separate or purify ^{111}In -DOTA-J591 from free ^{111}In , the reaction mixture is applied on a Biogel-P6DG column (Bio-Rad, CA), prewashed with 4 x 10 mL of PBS containing 1% Human Serum Albumin (meets specification for US licensed albumin; manufactured by Central Laboratory Blood Transfusion Service Swiss Red Cross, Bern, Switzerland, License No. 647). The ^{111}In -DOTA-J591 is eluted from the column using PBS with 1% HSA and the fractions containing the labeled antibody (typically 5-8 mL) are collected into a sterile container. Following determination of radiochemical purity using ITLC (as before), and if the labeling efficiency is >95%, the labeled complex is filtered into a sterile vial using 0.2m Filter. The final specific activity is typically 3-5 mCi/mg of antibody.

Radiolabeling with ^{90}Y

[00299] The procedure is identical to the procedure described above for ^{111}In , except the incubation time is 10-15 min. Radiochemical purity of ^{90}Y -DOTA-J591 must be >97%.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Radiolabeling with ^{177}Lu

[00300] The procedure is similar to the procedure described above except for two changes. The amount of Ammonium acetate added is reduced (3-5 mL for each mCi of ^{177}Lu) and the incubation time is only 5 min. Radiochemical purity of ^{177}Lu -DOTA-J591 should be >97%.

Radiochemical Purity

[00301] The amount of free ^{111}In in radiolabeled DOTA-deJ591 preparations was evaluated using the instant thin layer chromatography method with a silica gel impregnated glass fiber support and a mobile phase of 1% DTPA (pH 5.5). Briefly, a portion of the radiolabeled DOTA-deJ591 was spotted on a 10 cm ITLC-SG strip (Gelman, prod. # 61885) and developed in 1% DTPA (pH 5.5). Once the solvent front had reached the end of the strip, it was removed from the solvent and cut at a R_f of 0.5. The two portions were assayed for radioactivity and the radiochemical purity determined using the following equation:

$$\text{Radiochemical purity} = (\text{Activity in between } R_f 0 \text{ and } 0.5) / (\text{Total activity in strip})$$

Immunoreactivity

[00302] The immunoreactivity of the ^{111}In -DOTA-deJ591 preparations was assessed according to the method of Lindmo (Lindmo T. et al. (1994) *J. Immunol. Methods*, 72:77-89, 1994) that extrapolates the binding of the radiolabeled antibody at an infinite excess of antigen. Briefly, five test solutions were prepared (in duplicate) containing 10,000 cpm of ^{111}In -DOTA-deJ591 and various amounts of LNCaP cells, in a total test volume of 250 μL of 0.2 % BSA 10 mM HEPES. The solutions were incubated at 4°C for 60 minutes prior to being isolated (by centrifugation) and washed with ice cold PBS. The membranes were then counted in a gamma counter with standards representing the total radioactivity added. The data was plotted using the Lindmo method as the reciprocal of the substrate concentration (x-axis) against the reciprocal of the fraction bound (y-axis). The data was then fitted according to a least squares linear regression method (Sigma Plot) and the y intercept taken as the reciprocal of the immunoreactivity. A similar method using membranes derived from LNCaP cells, and subsequent centrifugation

WO 02/098897

PCT/US02/17068

isolation of the membranes, gave similar results. The results gave an average immunoreactivity of 72% (see Table 11).

Immunohistochemistry

[00303] Immunohistochemistry was performed on the DOTA conjugated, partially purified, bulk intermediate deJ591. The results showed that the preparation was specific to prostate tissue and the reactivity was equivalent to the naked deJ591 antibody.

Sterility

[00304] The sterility of ^{111}In -DOTA-deJ591 preparations was determined using thioglycollate medium according to the method of USP 24/NF 19. Briefly, quadruplicate 0.1 mL samples of the ^{111}In -DOTA-deJ591 preparations were transferred to 15 mL of fluid thioglycollate medium and the mixture incubated at 35°C for 14 days. The media were visually inspected on the 4th, 7th and 14 days of any signs of growth. All three preparations showed no growth (See Table 11).

Endotoxin

[00305] The endotoxin of ^{111}In -DOTA-deJ591 preparations was determined using the Limulus amebocyte lysate assay according to the USP 24/NF 19. Briefly, a Limulus amebocyte lysate kit (Bio Whittaker lot # 7L3790, sensitivity 0.125 EU/mL) was reconstituted with 0.25 mL of test sample. The quadruplicate test samples, artificially positive test samples, negative controls and positive controls were incubated at 37°C for 60 minutes. Positive results were typified by the formation of a viscous gel that was unaffected by 180° inversion. The single preparation gave a value of less than 5 EU/mL. This assay can (and will) be repeated on the patient dose immediately prior to administration.

Table 11: Analytical Results of Radiolabeled ^{111}In -DOTA-deJ591

Test	Result
Radiolabeling yield	85%
Radiochemical Purity	>99%
Immunoreactivity	72%
Endotoxin	<5 EU/mL

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Sterility	Sterile

Lot # of deJ591: BIOV983.2-2

Large-Scale Manufacture/Process

[00306] The large-scale manufacture of the DOTA conjugated deJ591 antibody is described in the following paragraphs. The major differences from the above methodology were the use of a stirred cell, instead of a microsep centrifugal concentrator to concentrate and diafilter the antibody and the use of a Sephadex G-25 column to remove the unreacted DOTA and other reagents from the DOTA conjugated antibody. These changes were necessitated by the increase in scale. The ratios of the starting materials are given in Table 12 for a nominal 1000 milligram scale. The process may be scaled up using equivalent ratios of starting materials.

Table 12: Unit Ratios of Starting Materials

Starting Material	Unit Ratio
deJ591 antibody	X mgs
1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA)	1.25 X mgs
N-hydroxysuccinimide (NHS)	0.275 X mgs
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)	0.3 X mgs

[00307] Aseptic practices were observed in order to minimize contamination and environmental monitoring was conducted at periodic intervals during the manufacture. All solutions, buffers and reagents used in the conjugation and purification of DOTA-deJ591 antibody were made with Water For Injection (WFI). Throughout the process, metal free components were used in the manufacture in order to avoid the chelation of any free metal residues by the DOTA moiety. In the specific case of ammonium acetate buffer and sodium phosphate buffer, the solutions were purified with Chelex 100 to remove any metal ions. Sterile, pyrogen free and metal free containers were used to mix reactants. The final bulk sterile filtration was conducted in an area that meets Class 100 specifications.

[00308] The deJ591 was prepared by buffer exchanging the antibody into metal free, 0.1 M Sodium Phosphate, pH 7.1, over a Chelex 100 (BioRad or equivalent) column. The antibody was then concentrated to approximately 10 mg/mL using a Stirred Cell Unit (Millipore or

WO 02/098897

PCT/US02/17068

equivalent) equipped with a 30kD cut-off membrane. The concentrated antibody was then sterile-filtered through a 0.22 μ m filter.

[00309] To conjugate one gram of antibody, the active ester of DOTA was prepared by adding 6.3 mL of 0.49 M DOTA in metal free, Sodium Phosphate Buffer, pH 7.1, to 2.7 mL of 0.87 M N-hydroxysuccinimide in metal free, Sodium Phosphate Buffer, pH 7.1. To this mixture, 0.1 N Sodium Hydroxide was added until the DOTA was completely dissolved (approximately a 1:1 ratio of 0.1 M Sodium Hydroxide to DOTA/NHS solution). The pH was between 6.9 and 7.2. The solution was cooled for not less than 30 minutes at 2-8°C. To the DOTA/NHS solution, 1.5 mL of 1.0 M of EDC in Sodium Phosphate Buffer, pH 7.1, was added and allowed to cool at 2-8°C for not less than 1 hour.

[00310] The active DOTA ester was added to 1 gram of antibody and incubated overnight (12-14 hrs) at 2-8°C. The DOTA conjugated antibody was purified over a Sephadex G-25 column (Pharmacia or equivalent) in metal free, 0.3 M Ammonium Acetate Buffer, pH 7.2. The eluate fraction containing the DOTA conjugated antibody was concentrated using a Stirred Cell equipped with a 30 kD cut-off membrane to approximately 10 mg/mL. The DOTA conjugated deJ591 Antibody was then diafiltered in 0.3 M Ammonium Acetate, pH 7.2 to remove any excess reagents and diluted to a final concentration of 8.0 mg/mL prior to sterile filtering through a 0.22 μ m filter.

[00311] DOTA conjugated deJ591 was tested for concentration, immunoreactivity, conjugation, endotoxin, and sterility. The endotoxin limit is based on the low clinical dose of the radiolabeled DOTA conjugated deJ591 antibody required, which ranges from 1 to 5 mg. Bioburden testing was performed on the bulk purified DOTA conjugated antibody instead of sterility because of the small batch sizes. Sterility (21 CFR 610) will be performed on the final vial drug product. The target for immunoreactivity and number of DOTA moles per antibody was based on previous clinical experience. DOTA conjugated antibody with immunoreactivity values of as low as 72% have been successfully used in the clinic. The number of DOTA moles per antibody is based on the results from previous clinical lots.

Protein Concentration

[00312] A sample of DOTA-deJ591 was analyzed by optical density in a spectrophotometer at a wavelength of 280 nm. The extinction coefficient used for these

WO 02/098897

PCT/US02/17068

calculations was $A_{280} \cdot E_{1\text{ cm}}^{0.1\%} = 1.4$. The test sample was suitably diluted to give an absorbance reading in the working range of the assay (0.2 OD units to 1.2 OD units, linear, CV less than 2%). The acceptable limit for protein concentration is $8.0 \text{ mg/mL} \pm 0.5 \text{ mg/mL}$.

Endotoxin

[00313] Samples of DOTA-deJ591 were tested for pyrogens using a validated Limulus Amebocyte Lysate test (LAL) Gel Clot Assay (BioWhittaker or equivalent). A 0.06 EU/mL sensitivity Lysate was utilized and samples were diluted either 1:10 or 1:25 in Endotoxin free water for analysis in order to overcome the inhibition level of certain chemicals to the gel clot assay. Duplicate determinations were made for each buffer or intermediate sample during processing and the sample values needed to be equal to or less than the value obtained at the dilution level set for that buffer. A positive and negative control, as well as an inhibition control, was run with every sample. The proposed acceptable limits were not more than 5 EU per mg of DOTA-deJ591.

Bioburden

[00314] Aliquots of DOTA-deJ591 were directly inoculated in fluid thioglycollate and soybean-casein broth. The media were examined after fourteen days of incubation. As necessary, both media showed no growth after fourteen days.

Immunoreactivity

[00315] The immunoreactivity of the DOTA-deJ591 preparations was assessed according to the method of Lindmo (Lindmo T. et al. (1994) *J. Immunol. Methods* 72:77-89) which extrapolates the binding of the radiolabeled antibody at an infinite amount of excess antigen. Briefly five test solutions were prepared (in duplicate) containing 10,000 cpm of $^{111}\text{Indium}$ labeled-DOTA-deJ591 and various amounts of LNCaP cells or cell membranes, in a total test volume of 250 μL of 0.2 % BSA 10 mM HEPES. The solutions were incubated at 4°C for 60 minutes prior to being isolated (by centrifugation) and washed with ice cold PBS. The membranes were then counted in a gamma counter with standards representing the total radioactivity added. The data was plotted using the Lindmo method as the reciprocal of the substrate concentration (x-axis) against the reciprocal of the fraction bound (y-axis). The data

WO 02/098897

PCT/US02/17068

was then fitted according to a least squares linear regression method (Sigma Plot) and the y intercept used as the reciprocal of the immunoreactivity. The target for immunoreactivity was not less than 75%.

Number of DOTA Moles per antibody

[00316] The number of DOTA bound per antibody was determined using a saturation binding method with natural occurring isotope of Indium and ^{111}In . Multiple aliquots (minimum two) of DOTA-deJ591 were mixed with various amounts, ranging from 10 to 30 μL , of a 3.0 mM solution of InCl_3 (0.01 M HCl) spiked with a tracer amount of ^{111}In . The mixture was incubated at 37°C for 16 hours and then analyzed by ITLC, using silica gel impregnated glass fiber 10 cm strip (ITLC-SG, Gelman, or equivalent) and an eluant of 1% DTPA (pH 6.0). The antibody bound activity remains at the origin and free ^{111}In moves with the solvent front as an ^{111}In -DTPA complex. The relative amounts of ^{111}In and ^{111}In -DOTA-J591 was determined by cutting the ITLC strip at a R_f of 0.5 and counting the two halves with a Na(Tl)I detector. The number of binding sites was calculated by considering the molar reaction ratio between ^{111}In and DOTA-deJ591 and the observed ratio of ^{111}In and ^{111}In -DOTA-J591 detected. The target number of DOTA molecules per antibody was between 4 and 6.

[00317] The analytical results for a sample lot of DOTA conjugated deJ591 antibody are shown below in Table 13.

Table 13

Test	Proposed Acceptable Limits	Results
Appearance	Clear Colorless Solution	Clear Colorless Solution
Concentration	8.0 mg/mL $\pm$ 0.5 mg/mL	8.4 mg/mL
Endotoxin	NMT 5 EU per mg	<1.2 EU/mg
Bioburden	No growth	No growth
Immunoreactivity	For Information Only (Target NLT 75%)	95%
Number of DOTA moles per Antibody	For Information Only (Target 4-6 DOTA per Antibody)	6

[00318] The DOTA conjugation numbers for a previous lot of DOTA conjugated antibody (Biov983.2-2) and current Lot 243101 are shown in Table 14. The average number of DOTA moles per antibody for Lot Biov983.2-2 was 5.06 and for Lot 243101 was 5.96. Although the

WO 02/098897

PCT/US02/17068

number of moles of DOTA conjugated per antibody was slightly higher for Lot 243101, the immunoreactivity was not affected as shown in Table 15. In fact, the immunoreactivity for Lot 243101 was higher than that for the comparison lot, which is beneficial. It should be noted that other small-scale clinical lots have had immunoreactivity values of greater than 90% (data not shown).

Table 14: Comparison of the Mean Number of DOTA Molecules Conjugated to deJ591 antibody

Lot number	Known ¹¹¹ In/DOTA-deJ591	Observed ¹¹¹ In/DOTA-deJ591	Mean number of DOTA mols per mAb
BIOV983.2-2	Reaction ratio	TLC ratio	
A	11.76	1.338	5.03
B	17.64	2.469	5.09
Ave			5.06
Lot 243101	Reaction ratio	TLC ratio	
A	10.98	0.8608	5.90
B	16.46	1.7301	6.03
C	21.95	2.8226	5.74
D	32.93	4.3498	6.15
Ave			5.96

A= 10 μ L of In-natural/¹¹¹In solution, B= 15 μ L of In-natural/¹¹¹In solution, C=20 μ L of In-natural/¹¹¹In solution, D=30 μ L of In-natural/¹¹¹In solution

Table 15: Comparison of Immunoreactivity of DOTA-deJ591

Test	Lot BIOV983.2-2	Lot 243101
Immunoreactivity	72%	95%

Alternatives

[00319] An alternative synthesis of the DOTA-J591 immunoconjugate is as follows: 956.5 mg of deJ591 was diafiltered six times. The antibody was concentrated in a 30 kDa microsep centrifugal concentrator (Pall Filtron, MA) to approximately 15 mg/mL and diluted 12.5 fold with metal free 0.1 M Sodium phosphate at pH 7.1. This procedure was performed six times. An active ester of DOTA was created by mixing 598 mg of DOTA (1.48 mmoles) in 5.95 mL 0.1 M metal free phosphate buffer and 132 mg N-hydroxysuccinimide (1.15 mmoles) in 2.7 mL of 0.1 M metal free phosphate buffer. The pH was adjusted to 6.9-7.2 with NaOH, prior to the addition of 144 mg (0.75 mmoles) of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide in 1.45

WO 02/098897

PCT/US02/17068

mL 0.1 M metal free phosphate buffer. This reaction mixture was filtered through a 0.2 micron sterile filter and cooled on ice for 1 hour before being added to the deJ591 solution and incubated overnight at 2-8°C for 14-18 hours. The resultant DOTA-deJ591 was separated from the excess DOTA and other reactants by purifying it through a G-25 column equilibrated in 0.3 M metal free ammonium acetate. The purified conjugate was concentrated to 10 mg/mL in a stirred cell unit and washed with 0.3 M ammonium acetate, then sterilized by filtration through a 0.22 um filter and stored in a sterile polypropylene vial at 2-8°C.

[00320] Yet another alternative is to use a conjugation process that involves pure DOTA-NHS mono-active ester (commercially available from Macrocylics) so as to achieve better control over the amount and purity of the DOTA-NHS mono-active ester used in the conjugation process, as well as to limit unanticipated chemical side-reactions produced when DOTA is activated in-situ. Problems associated with the use of in-situ activated DOTA (i.e., DOTA activated without any purification prior to being added to the antibody) include: fluctuation of DOTA/antibody incorporation ratio due to the variable generation of DOTA-NHS; the use of a large excess of DOTA which needs to be purified away from the conjugated antibody and can compete for binding to radioactive isotopes; unreacted EDAC can result in the cross-linking of lysine and glutamic or aspartic acid residues on proteins and consequently the formation of undersired protein aggregates; and there is the possibility that two or more active esters are formed on a significant fraction of the activated DOTA molecules which enables proteins to become crosslinked and uses additional carboxylate groups that are needed for metal coordination.

[00321] To minimize the loss of antibody binding activity resulting from its conjugation to DOTA, it is desirable to incorporate about 2-10, preferably about 5-7 DOTA molecules per antibody molecule. Using DOTA-NHS monoactivated ester, a 3-30 fold excess of DOTA-NHS relative to antibody produces this desired level of DOTA incorporation. Studies are currently being conducted using input ratios of DOTA-NHS to antibody of 7:1, 9:1, 11:1, 15:1, 20:1, and 30:1.

[00322] The protocol is as follows. Starting materials: J591 antibody, 10.5 mg/ml is sodium phosphate buffer (0.1M, pH 7.1), treated with Chelex 100 resin (1 ml resin per 10 mg of antibody); 0.3 M ammonium acetate buffer (pH 7.0), treated with Chelex 100 resin (20 ml resin per one liter buffer); DOTA-NHS.PF6 (FW 646.4), Macrocylics, Dallas, TX. Experimental

WO 02/098897

PCT/US02/17068

procedures: Three polypropylene vials were separately charged with 2.0 ml of J591 antibody (10.5 mg/ml, 143 nmol) and chilled on ice over a period of 30 minutes. 3.3 mg of DOTA-NHS were dissolved in 0.356 ml of metal-free water (treated with Chelex 100 resin and pre-chilled on ice for 30 minutes) to give a concentration of 14.3 nmol per microliter. To the three antibody solutions were separately added 70, 90, and 110 microliters of this freshly prepared DOTA-NHS solution. The reaction mixtures were slowly stirred with magnetic stirring bars at room temperature over a period of 4 hours, and then diluted with 0.3 M ammonium acetate buffer (pH 7.0, Chelex 100 treated) to 15 ml in CentriCon-30 for buffer exchange. The concentrates (about 1.5 ml) were then diluted again to 15 ml and concentrated down to 1.5 ml. These concentrates were then filtered through 0.2 micron filters. The CentriCon tube and filters were washed with a small amount of ammonium acetate buffer and filtered into final products (total of 2.0 ml each).

[00323] Antibodies conjugated to DOTA using the 7:1, 9:1, and 11:1 input ratio of DOTA-NHS to antibody have been analyzed for ^{90}Y binding stability and the formation of protein aggregates. All three conjugates displayed a high percentage of stability after 2-3 days of labeling with ^{111}In or ^{90}Y , in the presence of PBS, DTPA chelate challenger, serum and transferrin. In addition, all three conjugates displayed little or no process-related aggregate formation. The remaining three conjugates, produced using the higher DOTA-NHS to antibody input ratios, are currently being analyzed.

[00324] The conjugation of DOTA to antibodies is not limited to NHS activated DOTA. The DOTA-HOBT active ester can be used in place of DOTA-NHS, as well as other activation methods known in the art, such as the use of a mixed anhydride of ethyl chloroformate or isobutyl chloroformate, p-nitrophenyl ester.

Example 2- Pharmacokinetics and Biodistribution of ^{131}I - and ^{111}In -labeled deJ591 and murine J415 in Nude Mice Bearing LNCaP Human Prostate Tumors

[00325] In nude mice bearing PSMA-positive human LNCaP tumors, the pharmacokinetics, biodistribution and tumor uptake of monoclonal deJ591 and murine J415 antibodies radiolabeled with ^{131}I or ^{111}In was analyzed. Autoradiographic studies were performed to identify intra-tumoral distribution of radiolabeled MAbs.

[00326] De J591 and J415 were labeled with ^{131}I using the iodogen method (see Franker and Speck (1978), *Biochem Biophys Res Commun* 80:849-57) to a specific activity of

WO 02/098897

PCT/US02/17068

400MBq/mg (21, 23). For ^{111}In labeling, the J415 and deJ591 antibodies were first conjugated with 1,4,7,10-tetraazacyclododecane- $\text{N},\text{N}',\text{N}'',\text{N}'''$ -tetraacetic acid (DOTA) and then labeled with ^{111}In to produce specific activities of 200 MBq/mg.

[00327] Prostate carcinoma cell lines LNCaP, DU145 and PC3 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown in RPMI 1640, supplemented with 10 % fetal calf serum, at a temperature of 37°C in an environment containing 5% CO_2 . Prior to use, the cells were trypsinized, counted and suspended in Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA). Nu/Nu Balb C mice 8-10 weeks of age were inoculated, in the right and left flanks, with a suspension of 5×10^6 LNCaP cells in Matrigel (BD Biosciences, Bedford MA). After a period of 14-18 days, tumors (100-300 mg) had developed. The PSMA-negative DU145 and PC3 cells were implanted in nude mice in an identical manner.

[00328] The PSMA-positive and PSMA-negative tumor bearing mice were injected, via the tail vein, with 80 KBq of the iodinated MAb (400 MBq/mg) in 200 μL of PBS (pH 7.4, 0.2% BSA). Groups of animals (3-8/group) were sacrificed after 2, 4 or 6 days. The major organs and tumors were recovered. The tissue samples were weighed and counted, with appropriate standards in an automatic NaI(Tl) counter. These measured relative activity data (cpm) were background corrected and expressed as a percentage of the injected dose per gram (%ID/g). These data were also fitted with a least squares regression analysis (Microcal Origin, Northampton, MA) to determine the biological clearance of the various agents. J415, J591 and 7E11 were labeled with ^{111}In (100MBq/mg). 80KBq of the ^{111}In labeled MAbs were injected in groups of animals. The %ID/g in various organs and tumor tissues was determined at 2-6 days post injection in a similar way as described for ^{131}I labeled MAbs.

[00329] For the imaging studies, animals were injected with 2 MBq of ^{111}In -DOTA-J591. On days 1, 2, 3, 4 and 6 post-injection, the mice were sedated with ketamine/xylazine 100 mg/kg/10 mg/kg IP. The mice were imaged with a gamma camera (Transcam, ADAC Laboratories, Milpitas, CA) equipped with a pinhole collimator. The images were acquired in a 256 x 256 matrix for 1000 seconds using a 20% window of 245 KeV photopeak of ^{111}In .

[00330] For several animals ($n=20$), harvested tumor samples were immediately cooled in liquid nitrogen and frozen in embedding medium (O.C.T. 4583, Sakura Finetec, Torrance CA). Twenty micron sections were cut and the tumor sections were either fixed with acetone and placed in direct contact with a sheet of photographic film (Biomax, Kodak, Rochester, NY) or

WO 02/098897

PCT/US02/17068

stained with hematoxylin/eosin prior to exposure of the film. Tumors from control animals were collected and cut into 10 μm sections. These sections were soaked in tris buffer (170 mM, pH 7.4, with 2 mM CaCl_2 and 5 mM KCl) for 15 minutes, washed with Tris buffer (170 mM, pH 7.4) and incubated with ^{131}I -J591 MAb for 1 hour at 4°C . Non-specific binding was determined in the presence of 100 nM J591 MAb. These sections were then washed 3 times with PBS (containing 0.2% BSA) and once with Tris buffer prior to being fixed with acetone and then exposed to photographic film.

Biodistribution of ^{131}I labeled MAbs

[00331] In nude mice bearing LNCaP tumors, the biodistribution and tumor uptake of ^{131}I labeled deJ591 and J415 was compared to that of ^{131}I -7E11. At 2 days post injection deJ591, J415, and 7E11 had similar tumor uptake and blood pool activity. On day 6, the tumor uptake of J415 (15.4 ± 1.1) was significantly higher compared to that of deJ591 (9.58 ± 1.1). The blood activity of both deJ591 and J415 was significantly lower compared to that of 7E11. With the ^{131}I labeled MAbs, the tumor/blood and tumor/muscle ratios were significantly higher with J415 than with J591 or with 7E11.

[00332] In order to assess the specificity of radiolabeled MAb localization in PSMA-positive LNCaP tumors, the uptake of ^{131}I labeled deJ591 and J415 in selected organs was compared to that of an irrelevant IgG antibody. At one day post injection, the tumor uptake (%injected dose/gram) of both J415 (12.2 ± 3.24) and deJ591 (8.55 ± 1.29) was significantly higher compared to that of an irrelevant antibody (4.41 ± 0.40). The uptake in lungs, kidney, muscle was similar with all three antibodies. In a second control study, the tumor uptake of ^{131}I -deJ591 was determined in nude mice bearing the PSMA-negative prostate tumors (PC3 and DU145). At 4 days post injection, the tumor uptake of ^{131}I -deJ591 was only 0.66 ± 0.07 % ID/g in PC3 tumors ($n=10$) and 0.55 ± 0.03 %ID/g in DU145 tumors ($n=6$). In contrast, the tumor uptake of ^{131}I -J591 was 11.4 ± 1.49 % ID/g in PSMA-positive LNCaP tumors, significantly greater than in PSMA-negative tumors ($p < 0.01$).

Biodistribution of ^{111}In labeled MAbs

[00333] With ^{111}In , the tumor uptake of deJ591 and J415 gradually increased with time and is quite similar to that of 7E11. The kinetics of blood clearance for both J415 and J591 is

WO 02/098897

PCT/US02/17068

faster compared to 7E11. At 6 days post-injection, the blood activity of J415 (2.63 ± 0.23) and deJ591 (2.52 ± 0.16) is about 50% that of 7E11 (4.16 ± 0.21). As a consequence, the tumor/blood ratios with J415 and deJ591 are significantly higher compared to that of 7E11. There were minor differences in the uptake of these three antibodies in liver, spleen and kidney.

[00334] The serial gamma camera images of a nude mouse clearly show the intense tumor accumulation of ^{111}In -DOTA-deJ591. On day 1, the single tumor (ca 250 mg) on the right hind quarter, the blood pool and the liver are well visualized. But in the later images, while the activity has cleared from the blood pool, the tumor accumulation become gradually more intense compared to that of liver activity.

Autoradiography

[00335] Tumor specimens ($n = 20$) were harvested for hematoxylin (H) and eosin (E) staining and autoradiography to study the intra-tumoral biodistribution of ^{131}I -labeled MAbs 4 to 6 days after intravenous injection. The H and E stains reveal a considerable amount of necrosis, averaging 50% of the cross-sectional area, in all specimens studied. The autoradiographs reveal a focal, somewhat heterogeneous, distribution pattern with all three antibodies. Interestingly, the biodistribution pattern with MAbs to PSMA_{int} and PSMA_{ext} reveal almost reciprocal patterns. That is, 7E11 (anti- PSMA_{int}) distinctly favors localization to areas of necrosis whereas J415 and J591 (anti- PSMA_{ext}) demonstrate a distinct preferential accumulation in areas of viable tumor. Ex vivo autoradiography, where ^{131}I -J591 was incubated directly on the tissue section, demonstrated a homogeneous binding pattern.

Conclusions

[00336] The localization of radiolabeled J591 and J415 in PSMA positive LNCaP tumors is highly specific. These results clearly demonstrate that PSMA-specific internalizing antibodies such as deJ591 and deJ415 may be the ideal MAbs for the development of novel therapeutic methods to target the delivery of beta emitting radionuclides (^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu) for the treatment of PSMA-positive tumors.

[00337] MAbs to PSMA_{ext} had a reciprocal pattern to 7E11, with localization concentrated in areas of viable tumor. The inability of 7E11 to target well vascularized, viable tumor sites probably explains the inability of ProstaScint® to image bone metastases as well as to explain its

WO 02/098897

PCT/US02/17068

failure in RIT trials. By targeting viable tumors, mAbs to PSMA_{ext}, like deJ591 and deJ415, will have a better therapeutic effect. In addition, their ability to target viable tumor imparts better ability to localize well-vascularized sites in the bone marrow.

Example 3 - Animal Studies Using ⁹⁰Y-DOTA-deJ591

[00338] In *in vitro* and *in vivo* animal models, ⁹⁰Y-DOTA-deJ591 has demonstrated substantial anti-tumor activity. In these studies, immunodeficient 'nude' mice were implanted intramuscularly with PSMA-expressing human prostate cancer cells (LNCaP). In some studies, the same animals were simultaneously implanted in the opposite thigh with a PSMA-absent human prostate cancer line (PC3). Cancers were allowed to 'establish' for a period of approximately 2 weeks during which time the cancer develops a blood supply allowing further growth. At the time of treatment initiation, the cancer implants average 1.0 cm in diameter (or approximately 5% of the animal's body weight).

[00339] Four groups of mice received a single injection of 1.3, 3.7, 5.55 or 7.4 MBq of ⁹⁰Y-DOTA-deJ591. At a 1.3 MBq dose level, there was a mixed response with minimal reduction in tumor growth rate. However, at doses between 3.7-7.4 MBq, a clear anti-tumor dose-response relationship was observed. There was a 30, 55 and 90% reduction in mean tumor volume and a progressive dose-related delay in tumor re-growth of 10, 35 and 60 days at 3.7, 5.55, and 7.4 MBq dose levels, respectively. More than 70% of mice that received 3.7-5.55 MBq lived significantly longer than the controls and the mean survival time (MST) increased to 80-100 days compared to 40 days for controls.

[00340] Three groups of mice received 1.11, 2.22 or 3.33 MBq of ⁹⁰Y-DOTA-huJ591 every 28 days for 3 doses. At the 1.11 MBq dose level, there was minimal tumor growth during a period of 75-80 days. At 2.22 and 3.33 MBq dose levels, there was a 50-70% reduction in the mean tumor size at day 60 followed by gradual increase in tumor size thereafter. The MST increased by about 200% at 1.11 and 2.22 MBq dose levels compared to control group (120 vs. 40 days).

[00341] These studies confirm significant improvement in survival of the ⁹⁰Y-DOTA-deJ591 treated animals. The PSMA-absent cancers do not respond to treatment demonstrating the specificity of the treatment.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Example 4 - Animal Studies Using ^{177}Lu -DOTA-deJ591

[00342] Nude mice bearing LNCaP tumors treated with ^{177}Lu -DOTA-deJ591 exhibited a response similar to the ^{90}Y -DOTA-deJ591 treated animals. In this study mice with LNCaP tumors (300-400 mg) were divided into three groups. A control group received no treatment. Group-2 received 200 μCi and Group-3 received 300 μCi of ^{177}Lu -DOTA-deJ591. ^{177}Lu -DOTA-deJ591 was, in a dose dependent manner, able to reduce the mean tumor mass by 80-97% at the two dose levels. The control group showed a progressive increase in tumor size, which was accompanied by a steady loss of body weight and the mice were sacrificed by fifty-three days because of low body mass. The animals treated with 200 μCi ^{177}Lu -DOTA-deJ591 had tumor shrinkage up to twenty days post injection, and thereafter tumor regrowth was seen in some animals. The same group also had a nadir in body mass of about 90% (of baseline wt) at twenty days post injection, but thereafter a steady rise in the mean body weight to 100-105% of the starting mass. At ninety days, four out of eleven mice had no palpable tumors. The mice treated with 300 μCi of ^{177}Lu -DOTA-deJ591 had tumor shrinkage up to forty days post injection, and thereafter tumor regrowth was seen in some animals. The same group also had a nadir in body mass of about 90% at twenty days, but thereafter a steady rise in the mean body weight to 105-110 % of the starting mass. At ninety days, five out of eleven mice had no palpable tumors.

Example 5 - Human Trial with ^{131}I -J591 (murine); Phase I Clinical Trial Targeting A Monoclonal Antibody (mAb) To The Extracellular Domain Of Prostate Specific Membrane Antigen (Psm_{ext}) In Hormone-Independent Patients

[00343] Hormone-independent patients with rising PSA levels and acceptable hematologic, hepatic and renal function received a single dose of murine mAb J591. Doses are escalated (from 0.5-300 mg) in groups of three to six patients. Each dose included ≤ 1.0 mg J591 labeled with 10 mCi ^{131}I iodine as a tracer plus "cold" mAb. The dose levels used ranged from 0.5 to 300.0 mg as follows: 0.5 mg, 1.0 mg, 2.0 mg, 5.0 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, and 300 mg. Blood and urine were collected to monitor pharmacokinetics, toxicity and human anti-mouse antibody (HAMA) response. Patients were imaged on the day of injection (day 0), as well as days 2, 4 and 6 to track mAb targeting.

[00344] Thirty-three patients with hormone-independent prostate cancer were entered into the phase I biodistribution trial of trace-labeled ^{131}I -J591. These patients received doses ranging

WO 02/098897

PCT/US02/17068

from 0.5 to 300.0 mg, in each case conjugated with 10mCi ^{131}I . In approximately 80% of patients where disease sites had been imaged by conventional studies (CT/MRI and/or bone scan), known sites of prostate cancer metastases can be imaged. Both soft tissue and bony sites could be visualized on mAb scan. Targeting was specific for prostate cancer sites without apparent localization to non-cancer sites. The mean effective serum residence time of ^{131}I -mJ591 was determined to be 44.0 hours (median 47.4 hrs). Eight out of sixteen evaluable patients developed a human anti-murine antibody (HAMA) response. That is, their immune systems recognized the foreign nature of the mouse-derived antibody. Only one patient had an adverse event related to the murine antibody. This patient had a severe allergic (anaphylactic) reaction to the murine mAb later determined to be due to prior (unknown) exposure to murine antibody used in purification of another experimental drug with which the patient had previously been treated. In sum, thirty-three patients were evaluated for targeting: twenty-seven out of thirty-three patients had positive bone scans, with twenty-four out of twenty-seven (about 90%) having positive monoclonal antibody scans; nine out of thirty-three patients had positive soft tissue (CT scans), with eight out of these nine (about 90%) having positive monoclonal antibody scans.

[00345] Development of a HAMA response, which occurs in most immunocompetent patients who receive murine antibodies, precludes repeated treatments with a foreign species-derived antibody. In order to allow for multiple treatments, murine antibody molecules can be "de-immunized" using molecular engineering techniques which remove foreign (mouse) amino acid sequences and replace them genetically with known homologous human sequences. As indicated above, murineJ591 has undergone de-immunization resulting in "deJ591".

[00346] In conclusion, mAb to PSMA_{ect} targets *in vivo* specifically to disseminated prostate cancer sites in both bone and soft tissue with no significant 'adverse' localization and no significant toxicity.

Example 6 - Single Human Patient Study Using ^{90}Y -DOTA-deJ591

[00347] A single patient was treated with mAb deJ591. This patient had bulky, poorly differentiated prostate cancer and had failed multiple courses of external beam radiotherapy as well as multiple forms of hormonal and non-hormonal chemotherapy. The patient was treated under a single patient IND and received a total of twelve doses of deJ591 over a course of five months, ranging from 10 mg to 200 mg. Four doses (#1, 3, 6 and 11) were trace-radiolabeled

WO 02/098897

PCT/US02/17068

with either ^{131}I iodine or ^{111}In indium for pharmacokinetic determinations and biodistribution. The mean effective serum residence time of ^{131}I -deJ591 ranged from 31.9 to 51.3 hours, depending on the dose. Tumor localization to known tumor sites was excellent after each of the radiolabeled doses over the five month period. Dose twelve was radiolabeled with a therapeutic quantity of ^{90}Y trium (19mCi) calculated to deliver less than a 150 rad dose to the blood. This dose was determined in consultation with the FDA and took into account prior radiotherapy delivered by external beam and by ^{131}I iodine. No detectable human anti-deimmunized antibody (immune) response developed in this patient. The patient's platelet count dropped to 64,000 (normal: 150,000-300,000) at five weeks post ^{90}Y -DOTA-deJ591 administration (as an anticipated result of radiation to the bone marrow) prior to spontaneously returning to normal levels. No other hematologic or non-hematologic toxicity occurred. The patient experienced no side effects. The patient's PSA declined from 63 at the time of deJ591-DOTA- ^{90}Y administration to 36. No measurable reduction in tumor number or size occurred. This patient succumbed to his metastatic prostate cancer ten and one-half months after initiating treatment with ^{90}Y -DOTA-deJ591.

Example 7 - Human Trial with ^{111}In -DOTA-deJ591 - Phase I Trial of ^{111}In labeled deimmunized Monoclonal Antibody (mAb) deJ591 to Prostate Specific Membrane Antigen/Extracellular Domain (PSMAext)

[00348] This example describes the results of a clinical trial of deJ591 to assess mAb targeting, toxicity, pharmacokinetics (PK) and immunogenicity (human anti-deimmunized Ab) of this genetically engineered mAb. DeJ591 is a strong mediator of antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC). As PSMA is expressed in tumor, but not normal, vascular endothelium of all cancers, the diagnostic and therapeutic utility of deJ591 may extend beyond prostate cancer to other cancers.

[00349] Patients with recurrent, progressing prostate cancer received four weekly doses of ^{111}In -DOTA-deJ591. Doses were escalated in cohorts of three patients and ranged from 62.5-500 mg/m² (total). Dose level is shown in Table 16. Each dose included 0.02-1.0 mg deJ591 trace-labeled with 0.1-5 mCi ^{111}In via a mAb-DOTA chelate, with the remainder of the dose consisting of unlabeled deJ591. After the first dose, patients were imaged on the day of injection (day 0) and days 1, 2, 4 and 7.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Table 16: ¹¹¹In-DOTA-deJ591 Dosage

Dose Level	Loading Dose (mg/m ²)	Maintenance Dose (mg/m ²)	Total Dose (mg/m ²)
1	25	12.5	62.5
2	50	25	125
3	100	50	250
4	200	100	500

1-2mg ¹¹¹In-DOTA-deJ591 (0.2-10 mCi), with the balance of the dose as "cold" deJ591.

[00350] Serum PK, immune reaction and toxicity were evaluated after each dose for a minimum of 12 weeks.

[00351] Fifteen patients were initially entered in the trial. Thirteen patients received all four planned doses; two patients received ≤ 1 dose. One patient became hypotensive 5 minutes into his first infusion due to a rapid infusion rate. The second patient who did not complete treatment was withdrawn from the study after one week due to rapid disease progression rendering him no longer eligible. Neither this latter patient nor the remaining thirteen patients experienced any toxicity or side effects. Ten out of the thirteen patients had positive bone scans; all ten demonstrated excellent mAb targeting to bony sites. Three patients had soft tissue disease as measured by a CT scan; two demonstrated mAb targeting to these sites, while the third patient that was ¹¹¹In-DOTA-deJ591 negative had a radiated pelvic mass that had not changed size in >18 months. No mAb targeting to non-prostate cancer sites was noted. None of the patients developed an immune reaction to the antibody. Plasma half-life of deJ591 varied with dose.

[00352] In conclusion, deJ591 is non-immunogenic and targets sensitively and specifically to both bone and soft tissue.

Example 8 - Human Trial with ¹¹¹In-DOTA-deJ591: Targeting of Hormone Refractory Prostate Cancer

[00353] This example describes the results of a clinical trial of deJ591 to assess mAb targeting, biodistribution, and pharmacokinetics and to optimize antibody dose for radioimmunotherapy with this mAb in patients exhibiting hormone refractory prostate cancer.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00354] Twenty-six patients exhibiting hormone refractory prostate cancer were injected with a single dose of ^{111}In -DOTA-deJ591, consisting of 20mg deJ591 labeled with 185 MBq of ^{111}In -DOTA. All patients underwent whole body and SPECT imaging on days 0 (the day of injection), 3, and 6 of ^{111}In -DOTA-deJ591 injection. ^{111}In -DOTA-deJ591 imaging results were compared with CT, MRI, and bone scan. All patients had rising PSA levels on three consecutive measurements.

[00355] Twenty-two of the twenty-six patients had imagable disease on routine imaging modalities, while four patients had no imagable disease. Imaging data revealed ^{111}In -DOTA-deJ591 tumor targeting in sixteen of the twenty-two (72.7%) patients who had imagable disease. Targeting was best observed on day 3. No additional (unknown) sites were detected on SPECT imaging. Targeted metastatic sites were in the bone or bone marrow in twelve patients, in the soft tissue in two patients, and in both the bone and soft tissue in two patients.

[00356] ^{111}In -DOTA-deJ591 imaging was false negative in four of the twenty-two (18%) patients who had imagable disease. Non-targeted metastatic sites were in the soft tissue in three patients and in both the bone and soft tissue in one patient.

[00357] Accumulation of ^{111}In -DOTA-deJ591 in the prostate gland was generally minimal in patients with intact but irradiated prostate. Among physiological sites, highest uptake was observed in the liver, with $27\pm 1.7\%$ uptake at day 6. The absorbed dose by the liver was 2.8 ± 0.25 rads/mCi with ^{111}In and 20.1 ± 2.1 rads/mCi with ^{90}Y . Plasma clearance ($T_{1/2}$) of ^{111}In -DOTA-deJ591 was 34 ± 5 hours.

[00358] ^{111}In -DOTA-deJ591 specifically targets hormone refractory prostate tumors and is an effective vehicle to target hormone refractory advanced prostate cancer with radioactivity or cytotoxins.

Example 9 - Targeting of Hormone Refractory Prostate Cancer with ^{111}In -DOTA-deJ591 or ^{177}Lu -DOTA-deJ591

[00359] Imaging studies with ^{177}Lu -DOTA-deJ591, like those described in Example 8 for ^{111}In -DOTA-deJ591, have produced similar results. The following summary represents a combination of the results obtained for ^{177}Lu and ^{111}In .

[00360] Thirty-nine patients with hormone-refractory prostate cancer have thus far been enrolled in one of several clinical trials utilizing deJ591. Nuclear imaging with either ^{111}In or

WO 02/098897

PCT/US02/17068

¹⁷⁷Lu labeled deJ591 was performed as an initial step of each trial. ¹¹¹In, which is a γ -emitter, was used either as tracer for "naked" mAb or as a surrogate imaging agent prior to the administration of ⁹⁰Y (a pure β emitter which does not image on radionuclide scans). ¹⁷⁷Lu emits both γ and β particles, allowing direct imaging, and can be used as both an imaging and a therapeutic agent. The antibody scans were compared to standard imaging studies (bone, CT or MR scans) obtained on each patient to assess the underlying sensitivity, specificity, and accuracy of deJ591 targeting to metastatic sites. Bony and soft tissue metastases were evaluated independently.

[00361] Results have been obtained for bony metastasis in twenty-three patients, and soft-tissue metastasis in twenty-five patients. Fifteen patients had bone metastases on bone scan, which were accurately targeted by deJ591 in twelve patients (80%). In these twelve patients, every cancerous lesion seen on bone scan was identified on the deJ591 scan. All seven patients with negative bone scans were negative on the deJ591 scan (100% specificity). For soft tissue metastases, eight out of nine patients with soft tissue masses on conventional imaging demonstrated accurate targeting using deJ591 (89%). The one false negative patient had retroperitoneal adenopathy measuring 8mm not seen on mAb scan, but whose bony lesions were all targeted. Fifteen patients without documented soft tissue metastases had negative mAb scans (100%). One patient without soft tissue metastases on initial standard imaging but lesions identified on mAb scan subsequently proved positive on standard imaging. Overall, there was a 91% concordance between standard imaging and mAb scans for soft tissue and bony metastases.

[00362] DeJ591 accurately targets known bony or soft tissue metastases in the vast majority of patients. Additionally, one previously unseen metastatic site was demonstrated on mAb scan and later confirmed with CT imaging. DeJ591 is a highly sensitive and specific agent for targeting metastatic prostate cancer lesions.

Example 10 - Human Trial with ⁹⁰Y-DOTA-deJ591; Phase I Trial of De-immunized mAb deJ591-DOTA-⁹⁰Yttrium In Patients With Relapsed Prostate Cancer

[00363] A phase I trial of escalating doses of ⁹⁰Y-DOTA-deJ591 therapy of patients with recurrent/relapsing prostate cancer was conducted. Doses started at 5 mCi/m² and were escalated in increments of +2.5-5 mCi/m² for cohorts of three to six patients. The design of this study is summarized as follows: ¹¹¹In-DOTA-deJ591 was administered to patients so as to determine the

WO 02/098897

PCT/US02/17068

biodistribution of the antibody and the associated dosimetry; and ^{90}Y -DOTA-deJ591 was administered 7-10 days later at 5.0, 10, 15, 17.5, and 20 mCi/m². All administrations were by intravenous infusion at a rate of about 5mg/min. DeJ591-DOTA was labeled at a specific activity between 3-5mCi- ^{90}Y /mg antibody to reach the defined dose of ^{90}Y , with the balance brought up to 20 mg total deJ591 with "cold" deJ591. Dosages were administered with 6-8 weeks between dose levels. Subsequent doses of ^{90}Y -DOTA-deJ591 were allowed.

[00364] The subjects for this trial had prostate cancer that had relapsed after definitive therapy (e.g. surgery and/or radiation) and for whom no curative standard therapy exists.

[00365] The objectives of this trial are to: (1) define the toxicity and maximum tolerated dose (MTD) of repeated (fractionated) doses of de-immunized monoclonal antibody (mAb) deJ591-DOTA- ^{90}Y (Yttrium (^{90}Y)) in patients who have recurrent and/or metastatic prostate cancer; (2) define the pharmacokinetics of deJ591-DOTA- ^{90}Y ; (3) define the human anti-deimmunized antibody immune response to deJ591-DOTA- ^{90}Y ; and (4) define the preliminary efficacy (response rate) of repeated (fractionated) doses of deJ591-DOTA- ^{90}Y .

Treatment Protocol:

[00366] Patients who developed $\geq$ grade 2 allergic reaction as a result of ^{90}Y -DOTA-deJ591 would not receive further DOTA-deJ591 and would be followed for toxicity.

[00367] Patients were followed for a minimum of 12 weeks after the deJ591-DOTA- ^{90}Y administration. If the patient's disease was stable or responding at 12 weeks after his last dose, he was followed until progression.

[00368] The follow-up study consisted of gathering the information shown in Table 17, below, at the indicated times.

Table 17: Follow-up Analyses

Medical history	Day of Rx, week 1, 2, 4, 6, 8, and 12, then every 12 weeks thereafter until progression
Physical exam (focused)	Day of Rx, week 1, 2, 4, 6, 8, and 12, then every 12 weeks thereafter until progression
Performance status	Day of Rx, week 1, 2, 4, 6, 8, and 12, then every 12 weeks thereafter until progression
PSA, PAP, alkaline phosphatase	Day of Rx, week 1, 2, 4, 6, 8, and 12, then every 12 weeks thereafter until progression
Testosterone	Week 4, then every 6 months thereafter until

WO 02/098897

PCT/US02/17068

	progression
Human anti-deimmunized Ab	Day of Rx, week 2, 4, 8, and 12
CBC, differential, platelet count	Day of Rx, week 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, and 8, then every 4 weeks thereafter until stable, and then every 12 weeks until progression. Monitor qod if ANC <1000 and/or platelets <50,000
Electrolytes, BUN, creatinine	Day of Rx, week 1, 2, 4, and 8, then every 4 weeks until stable, and then every 12 weeks until progression
Total protein, albumin, bilirubin, GGTP, AST, ALT, LDH	Day of Rx, week 1, 2, 4, and 8, then every 4 weeks until stable, and then every 12 weeks until progression
Urinalysis	Day of Rx, week 1, 2, and 4, then every 4 weeks unless normal or baseline
CT or MRI	Week 12, then every 12 weeks (if measurable or evaluable disease present at entry and/or if patient classified as a "responder")
Bone scan	Week 12, then every 12 weeks (if evaluable disease present at entry and/or if patient classified as a "responder")
CXR	Week 12, then every 12 weeks (if disease present at entry)
Weight	Day of Rx, week 1, 2, 4, 8, and 12, then every 12 weeks until progression
Appetite	Day of Rx, week 1, 2, 4, 8, and 12, then every 12 weeks until progression
Bone pain	Day of Rx, week 1, 2, 4, 8, and 12, then every 12 weeks until progression
Analgesic intake	Day of Rx, week 1, 2, 4, 8, and 12, then every 12 weeks until progression

Pharmacokinetics:

[00369] Following injection of ^{111}In -DOTA-del591, blood samples were obtained at 10 min, 1, 2, 4, 24 hours and days 2, 3, 4 and 7. The percent injected dose (% I.D.) in blood was determined by measuring an aliquot of blood along with a known ^{111}In standard. Similar blood samples were taken at the same interval after the ^{90}Y -DOTA-del591. The % I.D. in blood was determined by measuring an aliquot of blood along with a known ^{111}In or ^{90}Y standard.

Toxicity:

[00370] NCI CTEP Common Toxicity Criteria (CTC), version 2 (April, 1999) was utilized. Since CTEP has standardized the CTC, the NCI does not require inclusion of the CTC

WO 02/098897

PCT/US02/17068

within this document. All treatment areas have access to a copy of the CTC version 2.0. A copy may also be downloaded from the CTEP web site.

Definition of Dose Limiting Toxicity (DLT):

[00371] Hematologic toxicity: grade 4 granulocytopenia [ANC <500/mm³]; grade 4 thrombocytopenia [platelet count < 10,000/mm³]; or febrile neutropenia or neutropenic infection as defined by the CTC. Other toxicity: grade $\geq$ 3 non-hematologic toxicity attributable to ⁹⁰Y-DOTA-deJ591.

Definition of Maximum Tolerated Dose (MTD):

[00372] The MTD is defined as the dose level at which 0/6 or 1/6 patients experience DLT with the next higher dose level having 2 or more patients experiencing DLT. Once the MTD has been reached, at least 6 patients should be evaluated at that dose to better determine the toxicities of the regimen and the pharmacokinetics of ⁹⁰Y-DOTA-deJ591.

[00373] Allergic events will be managed as follows: rash, pruritis, urticaria and wheezing will be treated with benadryl and/or steroids as clinically appropriate. Anaphylaxis or anaphylactoid signs or symptoms can be treated with steroids and/or epinephrine as clinically indicated.

Specific interventions solely for the purpose of the study:

[00374] Other than the actual administration of deJ591 and related studies to define the pharmacokinetics and biodistribution of the mAb, the other interventions (labs, imaging studies, office visits) performed are standard procedures. Some of the lab tests would not typically be done in the setting of prostate cancer (e.g., immune reaction levels). Other lab and radiographic procedures, although standard in the management of patients with prostate cancer, may be done at greater frequency than typical.

Criteria for therapeutic response:

[00375] Prostate cancer progression is manifest by rising PSA levels, new lesions on bone scan, new disease-related symptoms and, less commonly, increasing size of a measurable soft

WO 02/098897

PCT/US02/17068

tissue mass. Response is commonly assessed either biochemically (PSA change) or by change in size of a measurable lesion/s.

[00376] Biochemical (PSA) response can be determined by comparing the nadir PSA level after therapy to the baseline, pre-treatment PSA determined just prior to initiating therapy. A decline of >50% has been demonstrated by numerous investigators (Petrylak, D.P. et al. (1992) *Cancer* 70:2870-78; Kelly W.K., et al. (1999) *J Clin Oncol* 11:607-15; Kantoff P.W., et al. (1999) *J Clin Oncol* 17:2506-13, 1999; Smith, D.C., et al. (1998) *J Clin Oncol* 16:1835-43) to correlate with improved survival. In addition, Scher, et al (Scher H.L., et al. (1999) *JNCI* 91:244-51) have demonstrated that a PSA which either declines or shows no increase from baseline at either 8 or 12 weeks after initiating therapy correlates with improved survival compared to patients whose PSA rises despite therapy.

[00377] In patients with measurable disease: complete response is defined as complete disappearance of all measurable lesions by physical examination or imaging studies with no appearance of new lesions for ≥ 2 months. Partial response: is defined as a 50% or greater reduction in the sum of the products of the longest perpendicular diameters of all measurable lesions. There may be no new lesions. Stable disease: patients who do not meet the criteria of partial response and who are without signs of progressive disease for ≥ 2 months. Progressive disease is defined as a greater than 25% increase in the sum of the products of the longest perpendicular diameters of the indicator lesions, the appearance of new lesions or a rise in prostate specific antigen above pre-treatment baseline.

[00378] Duration of response: typically, the first sign of progression will be a rise in serum PSA. In this trial the duration of response will be the time interval from treatment initiation (^{90}Y -DOTA-deJ591) until progression is documented by either a confirmed rise in PSA, enlargement of the measurable lesion/s, or new lesion/s on imaging studies. The rising PSA must be confirmed by a second, serially rising PSA and the duration will be defined as the time from initiation of treatment to the time of the first rising PSA.

Results:

[00379] Twenty patients have been treated according to this protocol, and nineteen of the twenty can currently be evaluated. All twenty patients had failed one or more forms of hormone therapy, and eleven of the twenty patients had failed at least one chemotherapy regimen.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Furthermore, the patients all had increasing PSA levels and a minimum platelet count of 150,000.

[00380] Blood chemistry, hematology and PSA levels were monitored for twelve weeks or longer. No significant changes were observed in blood chemistry, or liver or kidney functions. Hematological changes in platelets and white blood cell levels were observed at all dose levels. Toxicity was dose-related and limited to reversible myelosuppression (primarily thrombocytopenia). Grade 3-4 thrombocytopenia was observed at 15-20 mCi/m². The maximum tolerated dose was estimated to be less than or equal to 20 mCi/m². ⁹⁰Y-deJ591 radiation dosimetry estimates based on ¹¹¹In-deJ591 imaging studies indicate that the organ dose to liver, kidney, spleen, and bone marrow are 20, 19, 18, and 1.7 rads/mCi, respectively. No patients developed an immune reaction.

[00381] Dose-related anti-tumor effects were noted. At the first two dose levels (5 and 10 mCi/m²), five out of the eleven (45%) patients had PSA values that continued to increase despite treatment, while six out of the eleven (55%) patients achieved an average 23% reduction in PSA levels. At 15 mCi/m², one out of the four patients (25%) progressed, while three out of the four (75%) patients achieved an average 25% reduction in PSA levels. At 20 mCi/m², all four patients achieved an average 42% reduction in PSA levels. Two of these four patients have PSA declines of 70-85% continuing beyond 3 months, as shown in Figures 13A and B. Mean time to PSA nadir was 7 weeks post-treatment (range: 2-13 weeks). Measurable responses have also been seen in these patients. The patient in whom the PSA level declined by 85% had 90% shrinkage of multiple soft tissue metastases. The patient with the 70% decline in PSA had a measurable decrease in soft tissue disease of 40%.

Conclusions:

[00382] ⁹⁰Y-DOTA-deJ591 is non-immunogenic (which would allow for repeated treatments) and toxicity has been limited to dose-related, reversible myelosuppression. Importantly, ⁹⁰Y-DOTA-deJ591 has dose-related anti-tumor effects in patients with advanced prostate cancer. Phase I data indicates that a single administration of ⁹⁰Y-DOTA-deJ591 (less than or equal to 20 mCi/m²) is safe with optimal dosimetry for the treatment of prostate cancer. In addition, the radiation dosimetry estimates indicate that multiple administrations are also safe.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Example 11 - Evidence of PSA Responses in Prostate Cancer Patients Receiving ⁹⁰Y-deJ591

[00383] Two patients receiving ⁹⁰Y-DOTA-deJ591 had rising PSA levels prior to treatment with radiolabeled J591 (see Figures 13A and 13B). The X-axis on the plots represents time (in days). Negative numbers on this axis indicate days prior to J591 treatment. At the "0" time point, the patients received ⁹⁰Y-J591 for therapy. The graphs demonstrate that the rapidly rising PSA prior to treatment takes a sharp turn within a few weeks of treatment and becomes stable for a long period of time thereafter (at least ten weeks). The stability of the PSA level indicates that the progressive disease has stopped progressing. Higher doses of radiolabeled J591 may lead to a decrease in the disease burden and/or a prolongation of the cessation of tumor growth rate. In addition, repeated doses may also lead to absolute declines in the tumor burden as well as substantial prolongation of cessation of tumor growth rate.

Example 12 - Human Trial with ¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591; Phase I Trial of De-immunized mAb deJ591-DOTA-¹⁷⁷Lutetium In Patients With Relapsed Prostate Cancer

[00384] This example describes a clinical study of subjects who have prostate cancer that has relapsed after definitive therapy (e.g., surgery and/or radiation) and/or who are hormone independent and for whom no standard therapy exists. There is currently no curative therapy for these patients. Furthermore, the example focuses on ¹⁷⁷Lu labeled deJ591. ¹⁷⁷Lu is both a beta- and a gamma-emitter. As such, it can be used for both radiotherapy and imaging.

[00385] The objectives of this trial were to: (1) define the toxicity and maximum tolerated dose (MTD) of de-immunized monoclonal antibody (mAb) deJ591-DOTA-¹⁷⁷Lutetium (¹⁷⁷Lu) in patients with prostate cancer who have recurrent and/or metastatic prostate cancer (Pca); (2) define the pharmacokinetics of deJ591-DOTA-¹⁷⁷Lu; (3) define the biodistribution and dosimetry of deJ591-DOTA-¹⁷⁷Lu; (4) define the human anti-de-immunized antibody (immune) response to deJ591-DOTA-¹⁷⁷Lu; and (5) define the preliminary efficacy (response rate) of deJ591-DOTA-¹⁷⁷Lu.

Treatment Protocol:

[00386] Patients received a dose of deJ591-DOTA-¹⁷⁷Lu administered at an infusion rate of ≤ 5 mg/min. The total dose of deJ591 remained fixed at 10 mg/m². The ¹⁷⁷Lu dose (in mCi/m²) was escalated in cohorts of three to six patients for each dose level (see Table 15

WO 02/098897

PCT/US02/17068

below). DeJ591-DOTA-¹⁷⁷Lu was labeled at a specific activity between 3-10 mCi/mg antibody to reach the defined dose of ¹⁷⁷Lu, with the balance brought up to 10/m² mg total deJ591 with "cold" deJ591. Dose escalation was withheld until at least three patients at the ongoing dose level had been followed for ≥ 6 weeks without serious hematologic toxicity. If any of the initial three patients at a dose level experience grade 1 or 2 hematologic toxicity by 6 weeks, escalation was withheld until recovery began or until 8 weeks of further monitoring and evaluation of toxicity had occurred. If any patient experienced grade 3 or 4 hematologic toxicity, at least six patients needed to be entered at that dose level and followed for a minimum of 8 weeks or until recovery begins prior to escalation. If, at any time, two instances of dose-limiting toxicity were observed at a given dose level, further entry at that dose level will be halted. In such a case, at least 6 patients should be entered at the prior dose level to aid in defining MTD (see "Toxicity" section below).

[00387] Patients who develop $\geq$ grade 2 allergic reaction while receiving ¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591 did not receive further deJ591 and were followed for toxicity.

Table 18

Dose Level	Total deJ591*	¹⁷⁷ Lu Dose
1	10 mg/m ²	10 mCi/m ²
2	10 mg/m ²	15 mCi/m ²
3	10 mg/m ²	30 mCi/m ²
4	10 mg/m ²	45 mCi/m ²
5	10 mg/m ²	60 mCi/m ²
6	10 mg/m ²	75 mCi/m ²
7	10 mg/m ²	90 mCi/m ²
8	10 mg/m ²	105 mCi/m ²

*consisting of deJ591-DOTA-¹⁷⁷Lu at specific activity between 3-10 mCi/mg with the balance to 10 mg/m² total with "cold" deJ591.

[00388] Patients were followed for a minimum of 12 weeks after the deJ591-DOTA-¹⁷⁷Lu administration. If the patient's disease was stable or responding at 12 weeks after his treatment, he was followed until progression.

[00389] Except as noted in Table 16, follow-up was as described above in Table 14.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Table 16

Human anti-deimmunized Ab	Day of deJ591-DOTA- ¹⁷⁷ Lu Rx, post-Rx week 1, 2, 4, 8, and 12, then every 12 weeks until progression
Chem-7 (including Electrolytes, BUN, creatinine, glucose)	Day of deJ591-DOTA- ¹⁷⁷ Lu Rx, post-Rx week 1, 2, 4, and 8, then every 4 weeks until stable, and then every 12 weeks until progression
Liver panel (including: albumin, bilirubin (tot & dir), AST, ALT, (alkaline phosphatase)	Day of deJ591-DOTA- ¹⁷⁷ Lu Rx, post-Rx week 1, 2, 4, and 8, then every 4 weeks until stable, and then every 12 weeks until progression
LDH	Day of deJ591-DOTA- ¹⁷⁷ Lu Rx, post-Rx week 1, 2, 3, and 8, then every 4 weeks until stable, and then every 12 weeks until progression

¹⁷⁷Lu-deJ591 Imaging:

[00390] Total body images were obtained within 1 hour post-infusion (day 0) and at least 5 additional time points in the subsequent 2 weeks (e.g., days 1, 3, and 5, 10, 15). The gamma camera images were obtained using a dual head ADAC gamma camera fitted with an appropriate collimator. The percent injected dose (% I.D.) in major organs (heart, liver, spleen, kidneys, bone marrow, GI tract and bladder) was estimated by drawing regions of interest (ROI) and determining the relative counts in each organ and kinetics of wash out from each organ. SPECT studies were sometimes performed on the abdomen, pelvis and/or areas of suspected metastatic lesions. Where possible, using known standards of ¹⁷⁷Lu, percent injected dose in tumor was estimated per gram of tumor mass.

Toxicity:

[00391] NCI CTEP Common Toxicity Criteria (CTC), version 2 (April, 1999) was utilized. Since CTEP has standardized the CTC, the NCI does not require inclusion of the CTC within this document. All treatment areas have access to a copy of the CTC version 2.0. A copy may also be downloaded from the CTEP web site.

[00392] Three to six patients were entered (or will be entered) at each dose level. Dose escalation was withheld until at least three patients at the ongoing dose level had been followed for 6 weeks without hematologic toxicity. If any of the initial three patients at a dose level experience grade 1 or 2 hematologic toxicity by 6 weeks, escalation will be withheld until 8 weeks to further evaluate toxicity. If any patient experiences grade 3 or 4 hematologic toxicity,

WO 02/098897

PCT/US02/17068

at least six patients had to be entered at that dose level and followed for a minimum of 8 weeks prior to escalation. If, at any time, two instances of grade 3 or grade 4 toxicity were observed at a given dose level, further entry at that dose level would be terminated.

Definition of Dose Limiting Toxicity (DLT):

[00393] Hematologic toxicity: Grade 4 granulocytopenia (ANC < 500/ ul) for > 7 days or grade 4 thrombocytopenia (platelets < 10,000). Other toxicity: grade $\geq$ 3 non-hematologic toxicity attributable to ^{177}Lu -DOTA-deJ591.

Adverse Event Definition:

[00394] An adverse event is defined as any untoward medical occurrence in a research patient during a clinical trial or 4 weeks-posttreatment, regardless of causality. This includes clinical or laboratory findings, inter-current illness or an exacerbation or progression of a disease or a condition present at the time of entry (baseline). An adverse event is non-serious if it does not meet any of the serious criteria (see below).

Causality/Attribution:

[00395] All clinical adverse events and abnormal laboratory values were evaluated by for potential relationship to the experimental agent. The following categorizes of causality/attribution will be utilized: definite, probable, possible, unlikely, and unrelated.

[00396] Abnormal clinical laboratory values of clinical significance which were present at baseline and did not change in severity or frequency during the experimental therapy and/or which can reasonably be attributed to the underlying disease were evaluated by the investigator and recorded in the "unrelated" category. Such events, therefore, were not be considered in the evaluation of the safety of this agent.

Preexisting Conditions:

[00397] In this trial, a preexisting condition (that is, a disorder present before the adverse event reporting period started) is not reported as an adverse event unless the condition worsens or episodes increase in frequency during the adverse event reporting period.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Adverse Event Definitions:

[00398] Each adverse event was classified as serious or non-serious and/ expected or unexpected. An adverse event is classified as serious if it: it resulted in death; it was life-threatening (i.e., the encountered adverse event placed the subject at immediate risk of death; it does not apply to an adverse event which hypothetically might have caused death if it had been more severe); it required or prolonged in-patient hospitalization; it resulted in persistent or significant disability or incapacity; and it resulted in a congenital anomaly/birth defect.

Grading:

[00399] Toxicity was graded on a scale of 0-4 using either the Common Toxicity Criteria scales or the following:

- (1) 0 = no toxicity.
- (2) 1 = mild toxicity, usually transient, requiring no special treatment and generally not interfering with patient activity.
- (3) 2 = moderate toxicity which may be ameliorated by simple therapeutic measures; impairs usual activities.
- (4) 3 = severe toxicity requiring therapeutic intervention and interrupting usual activities. Hospitalization may or may not be required.
- (5) 4 = life threatening toxicity which requires hospitalization.
- (6) 5 = a fatal toxicity.

Criteria for therapeutic response:

[00400] Prostate cancer is manifest by rising PSA levels, new lesions on bone scan, new disease-related symptoms and, less commonly, increasing size of a measurable soft tissue mass. Response is commonly assessed either biochemically (PSA change) or by change in size of a measurable lesion/s.

[00401] Biochemical (PSA) response was determined as described above. In patients with measurable disease: Complete response is defined as complete disappearance of all measurable lesions by physical examination or imaging studies with no appearance of new lesions for > 2 months. Partial response: is defined as a 50% or greater reduction in the sum of the products of

WO 02/098897

PCT/US02/17068

the longest perpendicular diameters of all measurable lesions. There may be no new lesions. Stable disease: patients who do not meet the criteria of partial response and who are without signs of progressive disease for > 2 months. Progressive disease is defined as a greater than 25% increase in the sum of the products of the longest perpendicular diameters of the immeasurable lesions, the appearance of new lesions or a rise in prostate specific antigen above pre-treatment baseline.

[00402] Duration of response: Typically, the first sign of progression will be a rise in serum PSA. In this trial the duration of response will be the time interval from treatment initiation until progression is documented by either a rise in PSA, enlargement of the measurable lesion/s, or new lesion/s on bone scan. The rising PSA must be confirmed by a second, serially rising PSA and the duration will be defined as the time from initiation of treatment to the time of the first rising PSA.

Results:

[00403] Hormone refractory patients with CT/Bone scan documented prostate cancer lesions and increasing PSA levels were enrolled in a Phase I dose-escalation (10-75 mCi/m²) study. All of the patients had failed one or more forms of hormone therapy.

[00404] To date, nineteen patients (three groups of patients, 3-6/group) have received ¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591 (10 mg/m²). Each group received a different dose of ¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591: 10, 15, 30, 45, or 60 mCi/m² (0.37, 0.74, 1.11, 1.48, or 1.85 GBq, respectively). Blood samples were obtained for two weeks, and imaging studies were performed five times during the same two weeks. Blood chemistry, hematology, and PSA levels were monitored for three months or longer.

[00405] Imaging studies showed specific tumor localization of ¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591. Four patients had previously unrecognized metastatic foci demonstrated upon ¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591 imaging, which was subsequently confirmed by conventional imaging. The radiation dosimetry estimates show that the liver is the critical organ receiving 7.6+/-3.3 rads/mCi. Dose to bone marrow based on blood activity is 0.7 rads/mCi. Plasma T1/2 of ¹⁷⁷Lu-DOTA-deJ591 was 43+/-11 hours. No significant changes were observed in blood chemistry, or liver or kidney function. Hematological changes were observed at different dose levels, but even at the 60 mCi/m² dose level, no serious toxicity was observed.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00406] The first nine patients that entered the study received a dose of ^{177}Lu -DOTA-deJ591 at levels of 10 mCi/m² (three patients), 15 mCi/m² (three patients), and 30 mCi/m² (three patients). All patients had failed one or more forms of hormone therapy, and one (17%) patient had failed at least one chemotherapy regimen. Toxicity was minimal, with no patients having grade 2 or 3 adverse events, and limited to reversible myelosuppression, primarily thrombocytopenia. No patients developed an immune response to ^{177}Lu -DOTA-J591.

[00407] Among these first nine patients, dose-related anti-tumor effects were noted. Following treatment at the 10 mCi/m² dose level, two patients had PSA levels that continued to rise despite treatment, while the remaining patient showed stabilization of PSA levels. At 15 mCi/m², two patients had a mean decrease of 35% in PSA levels, while one patient's PSA levels progressed despite therapy. Mean time to PSA nadir was 4 weeks post treatment (range: 2-6 weeks). One of the three patients that exhibited a decrease in PSA levels, who did not have measurable disease, continued to have 50% reduced PSA levels even at 18 weeks post-treatment (see Figure 14). Some of these patients are currently being retreated and have received at least three doses of ^{177}Lu -DOTA-deJ591.

Conclusions:

[00408] ^{177}Lu -J591 is non-immunogenic (which would allow for repeated treatments) and has low toxicity at doses used thus far. It has dose-related anti-tumor effects in patients with advanced prostate cancer. In contrast to ^{90}Y -DOTA-deJ591, which has a maximum tolerated dose estimated to be about 20 mCi/m², ^{177}Lu -DOTA-deJ591 is safe even at a 30 mCi/m² dose level. ^{177}Lu -DOTA-deJ591 appears to eliminate disadvantages associated with both ^{131}I -DOTA-deJ591 (which is dehalogenated in vivo and is not ideal for mAbs that are internalized) and ^{90}Y -DOTA-deJ591. The longer residence time of ^{177}Lu -DOTA-deJ591 in tumor tissue may also augment the anti-tumor response.

Example 13 - Imaging Non-Prostate Cancers

[00409] In addition to prostate epithelial cells, immunohistochemical studies show that PSMA is also expressed by vascular endothelial cells of numerous solid tumors, but not by normal vascular endothelium in benign tissues. As discussed above, this expression pattern of PSMA occurs in virtually all solid tumors.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00410] An IRB approved Phase I dose escalation trial of ^{111}In -DOTA-deJ591 was initiated to assess its value as an therapeutic agent for vasculotoxic therapy, to define its toxicity and maximum tolerated dose, to determine its pharmacokinetics and biodistribution, and to assess for immunogenicity. Eligible patients were those with refractory solid tumor malignancies whose tumor types are known to express PSMA on the neovasculature.

[00411] Fifteen patients received 5mg (three patients), 10mg (six patients), or 20mg (six patients) of ^{111}In -DOTA-deJ591, followed by a second dose 14 days later.

[00412] Patients the participated in the study included eight renal cell cancer patients, four bladder cancer patients, two colon cancer patients, and one pancreas cancer patient. All patients underwent whole body and SPECT imaging on days 0 (the day of injection), 2, 5, and 7 of ^{111}In -DOTA-deJ591 injection. The ^{111}In -DOTA-deJ591 imaging results were compared with CT and bone scans.

[00413] Imaging data revealed ^{111}In -DOTA-deJ591 tumor targeting in ten of the fifteen patients (7 renal cell cancer, 2 bladder cancer, and 1 colon cancer). Targeting was best observed on days 2 and 5, and was independent of antibody mass delivered. No additional sites were detected on SPECT. Targeted metastatic sites included: lungs, femur, retroperitoneal and cervical lymph nodes. Brain metastasis in one patient (with renal cell cancer) was first detected by ^{111}In -DOTA-deJ591 imaging and later confirmed by MRI. ^{111}In -DOTA-deJ591 imaging was false negative in five of the fifteen patients (2 bladder cancer, 1 colon cancer, 1 pancreas cancer, and 1 renal cell cancer). Non-targeted metastatic sites included: liver, renal bed, pancreas, lungs, and celiac lymph nodes. Undetected lung lesions measured less than 1cm in size.

[00414] No objective responses occurred, although a colon cancer patient had a 50% decline in CEA and two patients had improvement in cancer pain and performance status.

[00415] Two different patients with metastatic kidney cancer, having disease that had spread to the lungs, lymph nodes, and/or bones, were injected with deJ591 labeled with ^{111}In . Images of the patients, taken within 2 days of injection, demonstrated significant uptake of the antibody in the known tumor sites in these varying tissues and organs. The extent of the uptake of antibody is both substantial and rapid.

[00416] Among physiological sites, highest uptake was observed in the liver. Plasma clearance and liver uptake were dependent upon antibody mass; lower mass resulted in faster plasma clearance and higher liver uptake (in terms of percentage uptake). Plasma clearance

WO 02/098897

PCT/US02/17068

(1/2) for 5mg, 10mg, and 20mg of deJ591 were 21+/-11 hours, 24+/-6 hours, and 37+/-8 hours, respectively. Liver uptake for the same dose levels was 28%+/-14%, 17%+/-7%, and 13%+/-5%, respectively.

[00417] Based on these data, the protocol was revised to provide dosing for 6 consecutive weeks (10, 20, 40 and 80 mg/week dose levels) with the option for re-treatment on 8 week cycles if patients have stable or responding disease. To date, nine patients are currently receiving treatment on this schedule.

[00418] ¹¹¹In-DOTA-deJ591 specifically targets vascular endothelium of solid tumors. These trials demonstrate that deJ591 is an effective approach to targeting solid tumor vascular endothelium with radioactivity or cytotoxins.

Example 14 - Phase II Trial of mAb deJ591 in combination with Low-dose Subcutaneous Interleukin-2 in Patients with Recurrent Prostate Cancer

[00419] The subjects for this trial have prostate cancer which has relapsed after definitive therapy (e.g. surgery and/or radiation) and/or who are hormone independent and for whom no standard therapy exists. There is currently no curative therapy for these patients.

[00420] The objectives of the trial are to: (1) To define the preliminary efficacy (response rate) of mAb deJ591 in combination with daily low-dose subcutaneous IL-2 in patients who have recurrent and/or metastatic prostate cancer; (2) to study the toxicity of mAb deJ591 in combination with daily low-dose subcutaneous IL-2; and (3) to measure in vitro the effect of IL-2 on the immune response.

Low-Dose IL-2 Therapy:

[00421] IL-2 promotes the proliferation and enhances the secretory capacity of all major types of lymphocytes, including T cells, B cells, and natural killer (NK) cells (Smith K.A. (1988) *Science* 240:169). The IL-2 stimulated expansion of antigen-selected T-cell and B-cell clones determines the magnitude of antigen-specific immune responses, while the quality of the response is determined by IL-2 promoted secretion of additional cytokines, cytolytic molecules and antibodies (Smith K.A (1993) *Blood* 81:1414-1423). In addition, through its effects on NK cells, IL-2 stimulates antigen-nonspecific host reactions that involve an interplay between NK cells and monocytes. As a result of these functions, it follows that IL-2 should be useful as an

WO 02/098897

PCT/US02/17068

immune stimulant, particularly in cancer immunotherapy. The therapeutic use of IL-2, however, is made difficult because one of its major effects consists of the stimulation of secondary cytokine secretion by IL-2-responsive cells. Many of the potential beneficial effects of IL-2 can be attributed to these secondary cytokines that recruit and activate additional cell types, especially monocytes, that contribute to the total immune/inflammatory reaction. However, these same secondary cytokines, when produced in too large amounts, can also lead to severe toxicity. IL-2 was first used in very high doses for the treatment of cancer, equivalent to 150 million units (MU) of Chiron Corporation IL-2 (Rosenberg S.A. (1990) *Sci. Am* 262:62-69). This high dose was determined using the dose-escalation and dose-intensification principles of chemotherapy, and was associated with significant grade 3 and 4 toxicity. IL-2 in high doses is known to cause serious side effects including fever, rigors, malaise, myalgia, nausea/vomiting, hypotension and possibly death.

[00422] In the 1990s, researchers began to examine the immunomodulatory effects and toxicities of continuous low dose IL-2 (Smith K.A. (1993) *Blood* 81:1414-1423; Caligiuri et al. (1991) *J Clin Oncol* 9:2110-2119; Caligiuri et al. (1993) *J Clin Invest* 91:123-132; Bernstein et al. (1995) *Blood* 86:3287-3294). These studies demonstrated that doses of IL-2 as low as 1.2 MU daily resulted in the specific expansion of NK cells with minimal toxicity. Bernstein et al. (1995) *Blood* 86:3287-3294; Lalezari et al. (2000) *HIV Clin Trials*). Potential side effects include injection site reactions (usually redness at the injection site), asthenia, flu-like symptoms, nausea, diarrhea and eosinophilia. The selective expansion of human CD3⁺, CD56⁺ NK cells during low-dose IL-2 begins within 2 weeks of therapy and plateaus after 4-6 weeks of treatment (Smith K.A. (1993) *Blood* 81:1414-1423; Fehniger et al. (2000) *J Clin Invest* 106:117-124). NK cells can account for as many as 60%-80% of PBMCs after one month of therapy (Smith K.A. (1993) *supra*). Recent studies suggest that increased NK cell number results from enhanced NK-cell differentiation from bone marrow progenitors, combined with a delay in IL-2 dependent NK-cell death (Fehniger et al. (2000) *supra*). The low-dose IL-2 regimens have been specifically designed to completely avoid toxicity.

Combination Monoclonal Antibody and IL-2 Therapy:

[00423] The combination of monoclonal antibodies and IL-2 potentially should enhance monoclonal antibody efficacy. IL-2 will function to augment the reticuloendothelial system to

WO 02/098897

PCT/US02/17068

recognize antigen-antibody complexes by its effects on NK cells and macrophages. Thus, by stimulating NK cells to release IFN γ , GM-CSF, and TNF, these cytokines will increase the cell surface density of Fc receptors, as well as the phagocytic capacities of these cells. Therefore, the effector arm of both the humoral and cellular arms will be artificially enhanced. The net effect will be to improve the efficiency of monoclonal antibody therapy, so that a maximal response may be obtained. A small number of clinical trials have combined IL-2 with a monoclonal antibody (Albertini et al. (1997) *Clin Cancer Res* 3:1277-1288; Frost et al. (1997) *Cancer* 80:317-333; Kossman et al. (1999) *Clin Cancer Res* 5:2748-2755). In such studies, IL-2 was administered intravenously by either bolus or continuous infusion. Toxicity was associated with higher doses of IL-2.

IL-2 Therapy in Prostate Cancer:

[00424] A variety of studies have examined the effects of IL-2 on prostate cancer cells *in vitro* and in prostate cancer animal models, Moody et al. Interleukin-2 transfected prostate cancer cells generate a local antitumor effect *in vivo* (*Prostate*, 24: 244-251, 1994; Sokoloff et al. (1996) *Cancer*, 77: 1862-1872; Triest et al. (1998) *Clin Cancer Res*, 4: 2009-2014; Hautmann et al. (1999) *Anticancer Res*, 19: 2661-2663; Hillman et al. (1999) *Cancer Detect. Prev.* 23: 333-342), although there have been few clinical trials of IL-2 in patients with advanced prostate cancer. Hillman et al. (1999) *supra*; Maffezzini et al. (1996) *Prostate*, 28: 282-286; Morris et al. (2000) *Cancer*, 89: 1329-1348). A Phase II trials of I.V. intermediate dose IL-2 (dose ranging from 10-15 MU daily x 4) in patients with hormone refractory prostate cancer was conducted. In six out of ten patients, a transient decline in PSA levels was observed. It is unclear if this was from anti-tumor activity, or if IL-2 affected PSA expression, as had been reported *in vitro* studies using LNCaP cells (Sokoloff et al. (1996) *supra*). No regression of measurable disease was observed in any patient. The effect of daily sub-cutaneous low-dose IL-2 in patients with progressive prostate cancer has not been examined.

Specific Aims:

- (1) To define the preliminary efficacy (response rate) of mAb deJ591 in combination with daily low-dose subcutaneous IL-2 in patients who have recurrent and/or metastatic prostate cancer.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

- (2) To study the toxicity of mAb deJ591 in combination with daily low-dose subcutaneous IL-2.
- (3) To measure the effect of IL-2 on the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) population.
- (4) To measure in vitro the effect of IL-2 activated NK cells from patients on this protocol to induce ADCC with mAb deJ591.

Treatment Protocol:

[00425] Patients receive daily low-dose subcutaneous rIL-2 (1.2×10^6 IU/m²/day) on day 1 through day 56. After three weeks of IL-2 administration, patients receive deJ591 by I.V. (25 mg/m²) once a week for three consecutive weeks (on days 22, 29, and 36). IL-2 administration is continued during this period another two weeks afterwards. This 8-week regimen constitutes one cycle of therapy. Patients are evaluated for response at the end of one cycle. Patients who have responded to therapy or have stable disease are eligible for additional cycles of therapy. Additional cycles will be initiated when there is at least two consecutive rises in PSA at least 2 weeks apart. A three-week lead in with IL-2 should be sufficient to significantly increase the NK cell population. The dose of deJ591 is based on preliminary pharmacokinetic data from the Phase I ¹¹¹In-labeled deJ591 trial. The dose of antibody will be adjusted based on additional data analysis of patients treated in this manner.

[00426] A single cycle of treatment has been initiated. Patients who progress by radiographic documentation after one cycle will be removed from the study. Patients who responded by radiographic documentation, or who had stable disease by imaging with >50% decline in PSA value, or who had stable disease by imaging with stable PSA levels, will be examined every 3-4 weeks. Responding or stable patients will be eligible for re-treatment (a second 8-week cycle) following 2 consecutive PSA rises at least 2 weeks apart, at the discretion of the Principal Investigator and the option of the patient. Patients who have stable disease by imaging with a rising PSA (>25% of pre-treatment value) will be examined every 3-4 weeks. Re-treatment will be at the discretion of the Principal Investigator. In order to be retreated, the patient must have an immune reaction titer <1/100 and satisfy all initial Eligibility and Exclusion criteria. Re-treatment will be at the identical dose formulation as the initial dose given to the patient.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Patient Selection:

[00427] The trial is a pilot study to ascertain if low-dose IL-2 in combination with deJ591 has activity in prostate cancer. It is possible that low-dose IL-2 may have activity in prostate cancer patients. However, it has been decided not to treat patients with IL-2 alone, or delay antibody therapy, if the PSA declines after 3 weeks of therapy on low-dose IL-2, as it will be interesting to study the combined effect of deJ591 with IL-2. If significant activity is observed, a subsequent randomized trial of IL-2 alone vs. IL-2 with deJ591 will be conducted. It is unclear which stage of patient with prostate cancer might benefit from this approach. Therefore, at least ten patients will be treated, each in the following subgroups: 1) Biochemical relapse, hormone naive: rising PSA following radical prostatectomy or radiation therapy, without evidence of metastatic disease; 2) Biochemical relapse, hormone refractory: rising PSA following hormonal therapy without prior chemotherapy (these patients may or may not have radiographic documented metastatic disease); and 3) Hormone refractory, having received prior chemotherapy. About 30-40 patients will be enrolled on this trial.

Toxicity:

[00428] Toxicity will be scored using the Cancer Therapy Evaluation Program Common Toxicity Criteria, Version 2.0 (April 1999).

IL-2 Dosage modifications:

[00429] IL-2 will be permanently discontinued for any study drug-related Grade 4 toxicity except hematologic (which can be corrected with EPO or G-CSF or blood transfusions). If at any time during the study, ALT is ≥ 20 times the upper limit of normal, both IL-2 and mAb therapy will be permanently discontinued in that subject. Electrolyte abnormalities that can be readily corrected will not require permanent drug discontinuation.

[00430] This protocol allows for one dose level reduction of IL-2 of 25% to 0.9 mU/M². Subjects receiving IL-2 may have their IL-2 interrupted for $\geq$ Grade 1 toxicity for 24-48 hours. Toxicities that may cause IL-2 to be temporarily interrupted are:

Electrolyte abnormalities Grade 1 or higher that cannot be rapidly corrected;
Grade 1 or higher respiratory toxicity;

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Grade 3 local reaction or any local reaction involving ulceration;
Fever > 38 °C, or intolerable flu-like symptoms or rigors;
Other Grade 3 or greater toxicity, either related or unrelated to IL-2;
Fever suspected to be related to an opportunistic infection;
Grade 1 fatigue; and
Grade 2 hematologic toxicity that can be corrected with EPO, G-CSF, or blood transfusions.

[00431] Subjects who have their IL-2 interrupted can have it resumed at the same dose or at one dose level reduction within 24-48 hours of stopping drug. The dose of IL-2 for that subject may later be increased to the initial dose at the discretion of the subject and the local investigator.

MAb deJ591:

[00432] Allergic events will be managed as follows: rash, pruritis, urticaria and wheezing will be treated with benadryl and/or steroids as clinically appropriate. Anaphylaxis or anaphylactoid signs or symptoms will be treated with steroids and/or epinephrine as clinically indicated. Patients will be treated in a general clinical research center equipped for cardiopulmonary resuscitation.

[00433] Both drugs will be discontinued in patients who experience any grade 3 or 4 toxicity during the three weeks when mAb is administered. Treatment with mAb will resume at a 25% reduction in dose of mAb deJ591 after the toxicity has returned to grade I or less. If grade 3 or 4 toxicity recurs on attenuated doses, mAb treatment will be discontinued. IL-2 treatment will continue for completion of the 8-week cycle.

Criteria for therapeutic response:

[00434] Response will be assessed either biochemically (PSA change) and/or by change in size of a measurable lesion/s using standard response criteria for prostate cancer (Dawson N.A. (1999) *Semin Oncol* 26:174-184; Bubley, G.J., et al. (1999) *J Clin Oncol*, 17:3461-3467)

[00435] Biochemical (PSA) response will be determined as described above. Criteria for measuring the disease is as follows: Complete response is defined as complete disappearance of

WO 02/098897

PCT/US02/17068

all measurable lesions by physical examination or imaging studies with no appearance of new lesions for ≥ 2 months. Partial response: is defined as a 50% or greater reduction in the sum of the products of the longest perpendicular diameters of all measurable lesions. There may be no new lesions. Stable disease: patients who do not meet the criteria of partial response and who are without signs of progressive disease for > 2 months. Progressive disease is defined as a greater than 25% increase in the sum of the products of the longest perpendicular diameters of the indicator lesions, the appearance of new lesions or a rise in prostate specific antigen above pre-treatment baseline.

Correlative Studies:

[00436] Immunologic Phenotyping: Immunofluorescence and phenotyping will be performed using flow cytometry to measure the PBMC population and to quantify expression of lymphocyte subsets (CD3 for T cells, CD56 for NK cells and CD14 for monocytes) as previously described (Bernstein Z.P., et al. (1995) *Blood* 86:3287-3294; Lalezari J.P., et al. (2000) *HIV Clin Trials*).

[00437] ^{51}Cr -Release Assay For Cytolysis By NK/Lak Cells: A standard chromium release assay will be used to measure the ability of NK cells derived from PBMCs to lyse PSMA expressing target cells (Cox J.H., et al. (2000) *Mol Biotechnol* 15:147-154). NK cells will be isolated from PBMCs using a series of purifications using Ficoll-Hypaque density gradient, nylon wool columns and negative selection with immunomagnetic beads to remove T lymphocytes and residual monocytes as well as B cells, as described. (Cox J.H. (2000) *supra*). On the day of the cytotoxicity assay, viable LNCaP cells (target cells) are labeled with no less than 100 μCi of ^{51}Cr for 1 hr in a 37°C , washed, and resuspend in RPMI at a concentration of 5×10^4 cells/ml, with a goal of 0.2 to 1.5 cpm per cell.

Additional Assays:

[00438] Assays to measure expression of intracellular accumulation of cytokines, such as IL-2, TNF, and IFN, are described in Pala P. et al. (2000) *J Immunol Methods* 234:107-124. Expression of these cytokines in patients PBMCs before and on therapy can be measured.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Statistical Methods:

[00439] For all outcome variable with measurements taken at various time points, a Repeated Measures Analysis of Variance (RMANOVA) will be carried out to determine any patterns of change over time. Upon finding a significant time effect, Bonferroni- adjusted pairwise contrasts will be calculated to determine which time points differ from one another. To simplify the analysis for data obtained at multiple time points, one may choose to “aggregate” the measurement values taken over time. An area under the curve (AUC) analysis for the PSA levels can be carried out. Alternatively, a “slope analysis” may be carried out.

Current Status of Results:

[00440] Six patients have been entered and three have completed 8 weeks of therapy; two patients are being retreated based on PSA stabilization. A third patient had objective disease progression. Toxicities have been expected and minor including fatigue, injection site reactions and asymptomatic thyroid function abnormalities. IL-2 mediated immune modulation is being evaluated by flow cytometry on peripheral blood to quantify expression of lymphocyte subsets pre- and post-mAb treatment.

Example 15: Conjugation of deJ591 to the maytansinoid cytotoxin DM1

[00441] This example describes a process for the production of the deJ591-DM1 immunoconjugate. The process is based on standard methods known in the art and can therefore be generalized to other antibodies, including other antibodies of the invention such as deJ415.

[00442] The methods of conjugation are based on several small scale experiments, including one experiment performed using 5g of deJ591 starting material (Lot 1552-60S) and three experiments performed using between 6.7g and 7.3g of deJ591 starting material (Lots 1552-168, 1552-104, and 1610-036).

[00443] The steps involved in the methods of conjugation are as follows:

- 1) 5g to 7.5g of deJ591 antibody is concentrated by tangential flow filtration (10kD NMWCO membranes) to 25-30 mg/ml and diafiltered against 5 volumes of 50mM potassium phosphate, 2mM EDTA, pH 6.0. The yield is typically between 98% and 100%.
- 2) The concentrated antibody is filtered through a 0.2 μ filter, if opalescent, and then modified with N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)propionate (SPP) at a concentration of 20-22 mg/ml antibody and 7 molecules of SPP per molecule of antibody. The modification is

WO 02/098897

PCT/US02/17068

done in 50mM potassium phosphate, 2mM EDTA, 5% ethanol, pH 6.0, for 2.5 +/- 0.5 hours. The modification vessel is a 500ml round bottom flask.

3) The modified antibody is separated from the reaction mixture of step 2) using gel filtration chromatography and a Sephadex G-25™ column. The column load represents about 25% of the column volume and the chromatography is done in 50mM potassium phosphate, 2mM EDTA, pH 6.0, at a flow rate of 50 cm/hr. The modified antibody elutes between 38-75% column volume. Typically the yield of this step between 95% and 100% and the SPP to antibody ratio is about 5.4 to 5.9 SPP molecule/antibody.

4) At a concentration of about 10mg/ml, the modified antibody is conjugated with DM1 (using 1.7 molecules of DM1/molecule of SPP conjugated to the antibodies) for 20 +/- 4 hours. Typically, the reaction time is between 16.25 and 17.7 hours and is carried out in a 1L round bottom glass flask equipped with a magnetic stirring bar. The conjugation reaction is done in 3% DMA, 10% sucrose (100mg sucrose/ml of reaction). At the end of the reaction the conjugated antibody is filtered through a 2.0 µ filter and a spectrophotometric reading is taken.

5) The conjugated antibody is separated from unreacted DM1 by gel filtration chromatography using a Sephadex G-25™ column. The column load represents 22-23% of the column volume and the flow rate is about 50 cm/hr. The column is equilibrated and run in 20mM succinate, 5% sucrose (50mg/ml), pH 5.5. The antibody conjugate elutes between about 31% and 65% of column volume, and is collected from the start of the peak elution to the start of the peak trailing edge as a single fraction, followed by fractionation of the remaining peak material in 15x2% column volume fractions. All fractions are adjusted to 100mg/ml of sucrose (10% sucrose) through the addition of appropriate amounts of 50% sucrose. The 2% column volume fractions are assayed by analytical sizing (TSK 3000SWL) and selected fractions (fractions 1 and 2) are pooled together with the main peak. The fractions are assayed using analytical sizing with the pooling criterion being the 24 minute peak representing <20% or the total peak area. Typically the yield of this step is between 60% and 65% with the exception of run 1552-104 where there was no sucrose present in the reaction and/or purification mixture. The eluted antibody concentration ranges from 3.8 to 4.2 mg/ml and the ratio of DM1/antibody ranges from 3.6 to 3.9.

6) The antibody conjugate is then concentrated to 7-10 mg/ml using a 10kD NMWCO tangential flow filtration membrane and diafiltered against 5 volumes of 50mM

WO 02/098897

PCT/US02/17068

succinate, 10% sucrose, pH 5.5 (Inlet Pressure < 10 psi). Following diafiltration the antibody conjugate is adjusted to 5 mg/ml. Typical yield for this step is between 92% and 100%, with the final protein concentration being between 4.85 and 5.1 mg/ml.

7) Finally, the antibody conjugate is filtered through a 0.2 µm filter and aliquoted to the specified volumes. Step yield is between 90% and 100% and the final DM1-antibody ratio is 3.5 to 3.8.

[00444] The resulting deJ591-DM1 conjugates were analyzed according to appearance, concentration, DM1/antibody ratio, endotoxin, non-specific cytotoxicity, acetone extractable DM1, analytical sizing, reduced and non-reduced SDS-PAGE, pH, bioburden, specific cytotoxicity, and IEF. Selected analytical results for lots 1552-168, 1552-104, and 1552-036 are shown in Table 19, below.

Table 19

Lot No.	Amount Recovered	Concentration (mg/ml)	DM1/antibody	Process Recovery (%)
1552-168	3.85	5.1	3.7	57.2
1552-104	2.75	4.85	3.5	37.8*
1610-036	3.41	5.05	3.8	47.2
Mean	3.34	5.00	3.67	47.4
Standard Dev.	0.55	0.13	0.15	9.7
% c.v.	16.6	2.6	4.2	20.5

* Lower recovery due partly to the lack of sucrose in the conjugation reaction and the second G-25 gel filtration run and partly to the fact that the front end of the product peak was not collected due to a malfunction in the chart recorder.

Example 16: Use of the mAbs for targeted delivery of cytotoxic drugs to prostate cancer cells

[00445] Anti-PSMA antibodies can be conjugated to substances with high cytotoxic potential, such as drugs of the maytansinoid class. Maytansinoids exert their cytotoxic effects by interfering with the formation and stabilization of microtubules. They have 100- to 1000-fold greater cytotoxic potential than conventional chemotherapeutic agents (such as doxorubicin, methotrexate, and Vinca alkaloids) (Chari, R.V.J. et al. (1992) *Cancer Res.* 52: 127).

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00446] Both murine and deimmunized J591 antibodies have been conjugated to the maytansinoid, DM1, via a hindered disulfide bond. This bond is cleaved intracellularly allowing release of the drug. One or more lysine residues in the constant regions of the antibodies were conjugated to a linker containing a pyridyldithio group, which was, in turn, coupled to a maytansinoid toxin. A ratio of 3 to 4 moles of maytansinoid per mole of IgG is preferred.

[00447] The process for the DM1-linked J591 antibodies starts by reacting J591 with a linker that contains both a pyridyldithio group and a N-hydroxysuccinimide leaving group. In this case, the linker was N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)propionate (or SPP), although other linkers can be used. The products of the reaction include modified J591 antibodies that contain one or more linker groups (4-(2-pyridyldithio)propionone) attached to surface exposed lysine groups, with the linker groups retaining the pyridyldithio reactive groups, and N-hydroxysuccinimide leaving groups. The J591 antibodies are then separated from the reaction mixture and N-hydroxysuccinimide by gel filtration, e.g., using sephadex G25. The modified J591 antibodies are reacted with DM1, which contains a thiol group that reacts with the pyridyldithio groups now present on the surface of the modified antibody, thereby producing J591-DM1 immunoconjugates and thiopyridine. The J591-DM1 immunoconjugate is isolated from the reaction mixture and thiopyridine by size exclusion chromatography, e.g., using a sephacryl S300 column. Methods for preparing maytansinoid conjugates are described in US Patent Nos. 5,208,020; 5,475,092; 5,585,499; 5,846,545; and 6,333,410, the contents of which are incorporated by reference.

[00448] A study evaluating the efficacy, toxicity, and antigen selectivity of the murine J591-DM1 immunoconjugate in the treatment of prostate cancer cells *in vivo* is described below.

Experiment 1: Establish Efficacy, Toxicity, and Dose-Response Curves In-Vivo

[00449] Tumor xenografts of LNCaP cells were established in the right flank of BALB/c mice (5×10^6 cells injected subcutaneously). Animals were observed until tumors were visible (7 - 10 mm). Animals were then treated with PBS, unconjugated mAb J591, unconjugated DM1, both mAb J591 and DM1 but unconjugated, and J591-DM1 immunoconjugate (100, 200, 300, and 400 mcg/day intraperitoneal qday x 5 days). The mAb J591 was modified to introduce dithiopyridyl groups and then conjugated to DM1 via a hindered disulfide bond, as described above. Unconjugated mAb J591 and DM1 were given in equimolar concentrations.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Experiment 2: Selectivity for PSMA-positive tumors

[00450] Tumor xenografts of both LNCaP cells (5×10^6 cells injected subcutaneously in the right flank) and PC3 cells (3×10^6 cells injected subcutaneously in the left flank) were established in BALB/c mice. Animals were observed until LNCaP tumors were visible (PC3 tumors were present but much smaller). Animals treated with J591-DM1 immunoconjugate: 300 mcg/day intraperitoneal qday x 5 days

Experiment 3: Determine optimal dosing schedule for the immunoconjugate

[00451] Tumor xenografts of LNCaP cells were established subcutaneously in the right flank of BALB/c mice. When tumors were visible, animals were treated with PBS, unconjugated mAb J591, J591-DM1 immunoconjugate (300 mcg/day intravenously qday x 5 days; one course given), J591-DM1 immunoconjugate (400 mcg/day intravenously every other day for 5 doses in 10 days; one course given), and J591-DM1 immunoconjugate (300 mcg/day intravenously qday x 5 days; two courses given for a total of 10 doses). For animals receiving 2 courses of J591-DM1 immunoconjugate, the second 5-day course was given at tumor volume nadir (typically seen on days 21 - 24 after completion of the first course).

[00452] All animals were photographed pre- and post-treatment and tagged for identification. Tumor volume was determined (length x width x depth) and closely followed. Animal weight was followed as a measure of toxicity.

Results: Experiment 1:

[00453] All mice treated with unconjugated DM1 (either alone or with unconjugated mAb J591) died within 48 hours of treatment completion. Immunoconjugate at doses of 400 mcg/day was lethal to 50% of the mice. With doses of 300 mcg/day, significant reductions in tumor volume were noted with several complete responses and minimal toxicity. These complete responses were not durable, however, with subsequent increases in tumor size noted 2 - 20 days after tumor volume nadir.

Results: Experiment 2:

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00454] In mice with both LNCaP and PC3 tumors, LNCaP tumor volume decreased substantially after treatment with the J591-DM1 immunoconjugate. Although complete responses were not achieved in these animals, tumor volume nadirs averaged 0.08 cm³. PC3 tumor growth was not affected by the J591-DM1 immunoconjugate as noted by a steady increase in PC3 tumor volume after treatment.

Experiment 3:

[00455] Although route of administration was different (intravenous vs. intraperitoneal), treatment with one course of J591-DM1 immunoconjugate paralleled the results obtained from Experiment 1. Complete responses were achieved (at days 21 - 24) but these results were not durable. In animals treated with every other day dosing of 400 mcg, toxicity was demonstrated (weight loss > 10 % of total body weight) but all animals eventually survived. Tumor volume decreased in all animals but complete responses were not achieved. All animals treated with 2 courses of J591-DM1 immunoconjugate have achieved complete responses lasting at least through day 66.

Conclusions:

[00456] Murine J591 anti-PSMA antibody can be conjugated effectively to drugs of the maytansinoid class (such as DM1). These J591-DM1 immunoconjugates provide highly selective, antigen-specific targeted delivery of this cytotoxic drug to PSMA-positive prostate cancer cells in-vivo. The greatest reduction in tumor volume with minimal toxicity was noted at a dose of 300 mcg/day. The optimal dosing schedule appears to be two 5-day courses of J591-DM1 immunoconjugate with the second course given at tumor volume nadir (day 21 - 24).

Example 17 – Pharmacodynamics and Efficacy of the deJ591-DM1 immunoconjugate

[00457] In parallel to the experiments described in Example 16, additional experiments were performed with the deJ591-DM1 immunoconjugate. The experiments and results obtained therefrom are described below.

In vitro pharmacodynamics of deJ591-DM1 and DM1:

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00458] Experiment: LNCaP cells were plated into 96 well plates at an initial density of 1000 cells per well for a proliferation assay. deJ591-DM1 or DM1 was added to the wells over a range of concentrations (0.01 nM to 100 nM) and left in contact with the cells for defined periods of time (0.5, 2, 8, 24, 72 and 144 hours). At the end of that period the drug containing media was removed and replaced with drug free media until a total of 144 hours elapsed from the start of the experiment. The resulting effect of drug exposure on proliferation was then determined.

[00459] Results: The pharmacodynamic analysis using the methodology developed by Kalns et al. (1995), Cancer Research 55:5315-5322, the contents of which are incorporated herein by reference, indicates that when considering the relative importance to observed effect from the variables (1) time of exposure and (2) concentration, that exposure time is more important for deJ591-DM1 compared to DM1, where concentration is the more important variable.

Serum levels of deJ591-DM1 in mice after a single IV dose

[00460] Experiment: Mice were administered an intravenous 14.5 mg/kg dose of deJ591-DM1 and sera samples collected for analysis of the test article using an ELISA assay for human antibody. Samples were collected from groups of 3 mice at 6, 24, 48, 72 and 168 hours. Data were fit to a bi-exponential equation to determine pharmacokinetic parameters. These parameters were used to simulate serum levels after multiple dosing.

[00461] Results: Analysis of the pharmacokinetic data indicated a serum half life of deJ591-DM1 in mice as measured in the ELISA assay, to be 130 hours.

Effect of dose interval on efficacy against CWR22 prostate xenografts

[00462] Experiment: Male SCID mice were implanted by serial passage of CWR22 prostate tumor xenograft. When these tumors reached 200 – 250 mm³ size (estimated from external caliper measurement), mice were randomized into treatment groups of 8 to receive vehicle only (every 7 days) or deJ591-DM1 at a dose of 14.5 mg/kg antibody conjugate (equivalent to 240 ug/kg DM1) given on one of the following schedules (every 7, 14, 21, or 28 days). All treatments were given intravenously. Tumor growth and animal health were continually monitored throughout the study with tumor growth measured every 3 days.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

[00463] Results: Differences in the schedule of administration have distinct effects on the observed tumor growth for the CWR22 xenograft in SCID mice. The tumor growth can be characterized as slowed growth for the schedule of 21 or 28 day dosing interval until they reached the maximum size permitted under our IACUC regulations. For the 7 and 14 day dosing interval schedule, there is an apparent block in tumor growth with a resumption of normal growth kinetics approximately 30 days after the last dose. The results when considered with the pharmacokinetic simulation suggest a relationship between duration of exposure and maintaining a minimum effective concentration.

Efficacy of deJ591-DM1 compared to the unconjugated antibody (deJ591) or the unconjugated tumor inhibitory agent (DM1)

[00464] Experiment: Male SCID mice were implanted by serial passage of CWR22 prostate tumor xenograft. When these tumors reached 200 – 250 mm³ size (estimated from external caliper measurement), mice were randomized into treatment groups of 8 to receive vehicle only, deJ591-DM1 at a dose of 14.5 mg/kg antibody conjugate (equivalent to 240 ug/kg DM1), deJ591 at the same dose as deJ591-DM1, or DM1 given at a dose of 240 ug/kg. All treatments were given intravenously and on a schedule of every three days for 5 doses. Tumor growth and animal health were continually monitored throughout the study with tumor growth measured every 3 days.

[00465] Results: The unconjugated anti-PSMA antibody (deJ591) had no significant effect on reduction in the rate or extent of CWR22 xenograft tumor growth. DM1 administered as free drug produced some tumor growth delay, but was a minor response compared to the deJ591-DM1 administered on the same schedule with the same molar equivalent of the active DM1. The deJ591-DM1 produced a suppression of tumor growth for approximately 20 days following the last administered dose.

Efficacy of deJ591-DM1 at different doses

[00466] Experiment: Male SCID mice were implanted by serial passage of CWR22 prostate tumor xenograft. When these tumors reached 200 – 250 mm³ size (estimated from external caliper measurement), mice were randomized into treatment groups of 8 to receive vehicle only, deJ591-DM1 at a dose of 14.5 mg/kg antibody conjugate (equivalent to 240 ug/kg

WO 02/098897

PCT/US02/17068

DM1), or a lower dose of 7.25 mg/kg. All treatments were given intravenously and on a schedule of every seven days for 5 doses. Tumor growth and animal health were continually monitored throughout the study with tumor growth measured every 3 days.

[00467] Results: A dose response relationship is evident for the CWR22 xenograft tumor growth inhibition by deJ591-DM1. This is shown on a 7 day dosing interval study for 2 different doses of deJ591-DM1. At the higher dose, there is suppression of tumor growth with some reduction from the initial tumor volume. At the lower dose there is not the same reduction from initial tumor volume and there is a more rapid return to normal growth kinetics of approximately 10 days following the last dose administered compared to the higher dose.

Example 18 -- Bone marrow involvement in advanced prostate cancer patients demonstrated on bone marrow biopsy

[00468] Bone marrow involvement in advanced prostate cancer is not routinely examined. We report on the results of bone marrow biopsies performed on advanced, hormone-refractory prostate cancer patients.

[00469] Screening diagnostic studies were performed on hormone-refractory prostate cancer patients to determine eligibility for two phase I radioimmunotherapy clinical trials. Studies included serologic testing, bone scan, CT scans of the head, chest, abdomen and pelvis, and a bone marrow biopsy taken from the iliac crest. A total of Thirty-nine patients have been screened thus far.

[00470] All patients had advanced disease as determined by bony or soft tissue metastases on imaging and/or three consecutive rises in serum PSA levels. All patients had received prior hormonal therapy, and the majority had received local therapy, including radical prostatectomy (N=15), radiotherapy (N=19), and/or chemotherapy (N=19). Sixteen patients (41%) had histologic evidence of metastatic prostate cancer on bone marrow biopsy. Of the thirty-nine screened patients, thirteen (33%) had significant bone marrow involvement (>10% involvement), making them ineligible for entry into these clinical trials.

[00471] Patients with bone marrow involvement had significantly higher serum alkaline phosphatase (ALP) levels (median 374 U/L vs. 96 U/L, $p<0.001$) and significantly lower serum hemoglobin (median 11.6 g/dL vs. 12.7 g/dL, $p=0.02$). There was no difference in serum hemoglobin between patients with prior chemotherapy and/or prior radiotherapy. When the ALP

WO 02/098897

PCT/US02/17068

was normal (<120 U/L) or elevated (>120 U/L,) 0% and 75% of patients, respectively, had metastatic prostate cancer on bone marrow biopsy ($p<0.0001$). Patients with bone scans indicating bony metastases in three or more different anatomic sites (spine, thorax, pelvis, appendicular or calvarium) vs. two or less sites, were more likely to have bone marrow involvement (54% vs. 9%, $p=0.01$). Age, initial Gleason sum, serum PSA, PSA doubling time, the presence of soft-tissue metastases, prior local treatment or chemotherapy, or other hematologic parameters (WBC, platelet count) were not significantly different between the two groups.

[00472] Bone marrow involvement in advanced prostate cancer patients is not routinely examined, but is present in a large minority of cases. Current clinical staging studies may significantly underestimate bone marrow involvement, although elevation of alkaline phosphatase or depressed serum hemoglobin may be correlative. This situation should be considered in clinical trials carrying potential hematologic toxicity.

Example 19: A Novel Sandwich Enzyme-Linked Immunoassay (ELISA) for Quantification of Prostate-Specific Membrane Antigen

[00473] Ideally, serum PSMA should be detectable with a simple, rapid, reproducible and quantitative ELISA assay. Our objective was to establish an ELISA assay to measure serum PSMA.

[00474] Ninety-six well plates were coated with an anti-PSMA antibody as a "capture" antibody. Dilutions of serum from males and females "spiked" with recombinant PSMA (rPSMA), semen, LNCaP lysates, as well as the standard (rPSMA range 1.6-1600 ng/ml) were then added to these wells. A non-competing biotinylated anti-PSMA antibody (that recognizes a different epitope on PSMA) was then added as the "detection" antibody. Avidin phosphatase followed by p-nitrophenyl phosphate (substrate) was added. Optical densities were then measured.

[00475] The standard curve for the assay was linear through a range of 5-1600 ng/ml (correlation coefficient $> .99$). Using this assay, PSMA was detected in LNCaP lysate, semen, and "spiked" serum.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

Equivalents

[00476] Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents of the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

We claim:

1. A modified anti-prostate specific membrane antigen (PSMA) immunoglobulin, comprising the amino acid sequence shown as SEQ ID NO:22 or SEQ ID NO:50, or the light chain variable region amino acid sequence of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174.

2. The modified PSMA immunoglobulin of claim 1, which is encoded by the nucleotide sequence shown as nucleic acid residues 261-581 of SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:52, or the light chain variable region nucleotide sequence of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174.

3. A modified anti-PSMA immunoglobulin, comprising a heavy chain variable region, comprising the amino acid sequence shown as SEQ ID NO:21 or SEQ ID NO:49, or the heavy chain variable region amino acid sequence of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174.

4. The modified anti-PSMA immunoglobulin of claim 3, which is encoded by the nucleotide sequence shown as nucleic acid residues 261-605 of SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:51, or the heavy chain variable region nucleotide sequence of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174.

5. A modified anti-PSMA antibody, or an antigen-binding fragment thereof, comprising:
a light chain variable region comprising the amino acid sequence shown as SEQ ID NO:22 or SEQ ID NO:50, or the light chain variable region amino acid sequence of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174; and
a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence shown as SEQ ID NO:21 or SEQ ID NO:49, or the heavy chain variable region amino acid sequence of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

6. The modified antibody, or fragment thereof, of claim 5, which comprises two heavy chains and two light chains.
7. The modified antibody, or fragment thereof, of claim 5, wherein the heavy chain constant region is of human isotype IgG1.
8. A pharmaceutical composition comprising the modified antibody, or fragment thereof, of claim 5, and a pharmaceutically acceptable carrier.
9. The modified antibody, or fragment thereof, of claim 5, further comprising a cytotoxic moiety or a detectable label.
10. The modified antibody, or fragment thereof, of claim 9, wherein the cytotoxic moiety is a cytotoxin, a therapeutic agent or a radioactive ion.
11. The modified antibody, or fragment thereof, of claim 10, wherein the radioactive ion is iodine (^{131}I), indium (^{111}In), yttrium (^{90}Y) or lutetium (^{177}Lu).
12. The modified antibody, or fragment thereof, of claim 10, wherein the cytotoxic moiety is maytansinoid.
13. The modified antibody, or fragment thereof, of claim 12, wherein the maytansinoid is maytansinol.
14. A nucleic acid sequence having a nucleotide sequence encoding a modified anti-PSMA immunoglobulin, comprising a light chain variable region comprising the nucleotide sequence shown as nucleic acid residues 261-581 of SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:52, or the light chain variable region nucleotide sequence of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

15. A nucleic acid sequence having a nucleotide sequence encoding a modified anti-PSMA immunoglobulin, comprising a heavy chain variable region comprising the nucleotide sequence shown as nucleic acid residues 261-605 of SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:51, or the heavy chain variable region nucleotide sequence of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174.

16. A first and second nucleic acid sequences having nucleotide sequences encoding light and heavy chain variable regions, respectively, of a modified anti-PSMA antibody or an antigen binding fragment thereof, wherein the light chain variable region comprises the nucleotide sequence shown as nucleic acid residues 261-581 of SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:52, or the light chain variable region nucleotide sequence of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174; and the heavy chain variable region comprises the nucleotide sequence shown as nucleic acid residues 261-605 of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:51, or the heavy chain variable region nucleotide sequence of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174.

17. A method of producing a modified anti-PSMA antibody, or antigen binding fragment thereof, comprising:

providing a first nucleic acid encoding a light chain variable region comprising the nucleotide sequence shown as nucleic acid residues 261-581 of SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:52, or the light chain variable region nucleotide sequence of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174;

providing a second nucleic acid encoding a heavy chain variable region comprising the nucleotide sequence shown as nucleic acid residues 261-605 of SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:51, or the heavy chain variable region nucleotide sequence of the antibody produced by the NS0 cell line having ATCC Accession Number PTA-3709 or PTA-4174; and

introducing said first and second nucleic acids into a host cell under conditions that allow expression and assembly of said light and heavy chain variable regions.

18. The method of claim 17, wherein the first and second nucleic acids are linked.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

19. The method of claim 17, wherein the first and second nucleic acids are unlinked.
20. The method of claim 17, wherein the host cell is a eukaryotic or prokaryotic cell.
21. The method of claim 20, wherein the host cell is a mammalian cell.
22. The method of claim 21, wherein the mammalian cell is selected from the group consisting of a lymphocytic cell line, NS0 cell, CHO cell, COS cell, and a cell from a transgenic animal.
23. A method of ablating or killing a prostatic cell or a cancer cell, comprising contacting the cell, or a vascular endothelial cell proximate to cell, with the modified antibody, or fragment thereof of claim 5, such that the cell is ablated or killed upon binding of the antibody to the cell or the vascular endothelial cell proximate thereto.
24. A method of treating, or preventing, a prostatic or cancerous disorder, in a subject, comprising administering to the subject the modified antibody molecule of claim 5, in an amount effective to treat or prevent the disorder.
25. The method of claim 23 or 24, wherein the modified antibody, or fragment thereof, is associated with a cytotoxic agent or moiety.
26. The method of claim 25, wherein the cytotoxic agent or moiety is selected from the group consisting of an antimetabolite, an alkylating agent, cyclophosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclines, and an anti-mitotic agent.
27. The method of claim 24, wherein modified antibody, or fragment thereof, is administered in combination with a cytotoxic agent.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

28. The method of claim 25, wherein modified antibody, or fragment is coupled to a cytotoxic moiety.

29. The method of claim 28, wherein the cytotoxic moiety is a cytotoxin, a therapeutic agent or a radioactive isotope.

30. The method of claim 29, wherein the radioactive isotope is iodine (^{131}I), yttrium (^{90}Y) or lutetium (^{177}Lu).

31. The method of claim 29, wherein the cytotoxic moiety is maytansinoid.

32. The method of claim 31, wherein the maytansinoid is maytansinol.

33. The method of claim 31, wherein the maytansinoid is DM1.

34. The method of claims 23, wherein the cell is a malignant, normal, benign or hyperplastic, prostate epithelial cells.

35. The method of claim 23, wherein the cell is a renal, an urothelial, colon, rectal, lung, breast or liver, cancerous or metastatic cell.

36. The method of claim 24, wherein the disorder is selected from the group consisting of genitourinary inflammation, prostatitis, benign enlargement, prostatic cancer and testicular cancer.

37. The method of claim 24, wherein the disorder is selected from the group consisting of solid tumors, soft tissue tumors, and metastatic lesions.

38. The method of claim 37, wherein the solid tumors are malignancies selected from the group consisting of sarcomas, adenocarcinomas, and carcinomas.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

39. The method of claim 37, wherein the disorder is a malignancy affecting lung, breast, lymphoid tissue, gastrointestinal tissue, colon, rectum, genitourinary tract, renal cells, urothelial cells, pharynx, bladder, liver, lung, small intestine and esophagus.

40. A method for detecting the presence of a PSMA protein, in a sample comprising prostatic or cancerous cells, *in vitro*, comprising: (i) contacting the sample or a reference sample with the modified anti-PSMA antibody, or fragment thereof, of claim 7, under conditions that allow interaction of the anti-PSMA antibody and the PSMA protein to occur; and (ii) detecting formation of a complex between the anti-PSMA antibody, and the sample or the reference sample, wherein a statistically significant change in the formation of the complex in the sample relative to a reference sample is indicative of the presence of PSMA in the sample.

41. A method for detecting the presence of PSMA *in vivo*, comprising: (i) administering to a subject the modified anti-PSMA antibody, or antigen binding fragment thereof, of claim 7, in detectably labeled form, under conditions that allow interaction of the modified anti-PSMA antibody, or fragment thereof, and the PSMA protein to occur; and (ii) detecting formation of a complex between the antibody or fragment and PSMA, wherein a statistically significant change in the formation of the complex in the subject relative to a reference is indicative of the presence of the PSMA.

42. A method of diagnosing or staging, a prostatic or cancerous disorder, comprising: (i) identifying a subject having, or at risk of having, the disorder; (ii) obtaining a sample of a tissue or cell affected with the disorder; (iii) contacting said sample or a control sample with the modified anti-PSMA antibody or fragment thereof of claim 7, under conditions that allow interaction of the binding agent and the PSMA protein to occur, and (iv) detecting formation of a complex, wherein a statistically significant increase in the formation of the complex between the antibody or fragment thereof with respect to the control sample, is indicative of the disorder or the stage of the disorder.

43. A method for *in vivo* imaging PSMA-expressing tumors comprising: (i) administering to a subject, or a control subject a labeled modified anti-PSMA antibody or

WO 02/098897

PCT/US02/17068

fragment thereof of claim 7, under conditions that allow interaction of the modified anti-PSMA antibody or fragment thereof and the PSMA protein to occur; and (ii) detecting formation of a complex between the antibody or fragment and PSMA.

44. A method of treating pain experienced by a subject having or diagnosed with benign prostatic hyperplasia or prostate cancer, or non-prostate cancer, comprising: administering an anti-PSMA antibody to a subject in an amount sufficient to treat the pain associated with prostate disease or non-prostate cancer.

45. A method for treating metastatic lesions associated with prostate cancer in a subject, comprising administering to the subject the modified antibody molecule of claim 5, in an amount effective to treat or prevent the disorder.

WO 02/098897

PCT/US02/17068

1/33

Amino Acid Sequence of Murine J591 Heavy Chain (CDRs are marked
numbering as Kabat)

EVQLQQSGPELKKPGTSVRISCKTS|GYTFTEYTIH|WVKQSHGKS
1 10 20 30 40
 CDR1

LEWIG|NINPNNGGTTYNQKFED|KATLTVDKSSSTAYMELRSLTS
 50 60 70 80
 CDR2

EDSAVYYCAA|GWNFDY|WGQGTTLTVSS
 90 100 110
 CDR3

FIG. 1A

Amino Acid Sequence of Murine J591 Light Chain (CDRs are marked
numbering as Kabat)

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC|KASQDVGTAVD|WYQQKPGQSP
1 10 20 30 40
 CDR1

KLLIY|WASTRHT|GVPDRFTGSGSGTDEFTLTITNVQSEDLADYFC
 50 60 70 80
 CDR2

|QQYNSYPLT|FGAGTMLDLK
 90 100
 CDR3

FIG. 1B

WO 02/098897

PCT/US02/17068

2/33

Amino Acid Sequence of DeImmunised J591 Heavy Chain (CDRs are marked, numbering as Kabat)

```
EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTS|GYTTFEYTIH|WVKQAPGKG
1      10      20      30      40
                        CDR1

LEWIG|NINPNNGGTTYNQKFED|KATLTVDKSTDYAMELSSLSR
      50      60      70      80
                CDR2

EDTAVYYCAA|GWNFDY|WGQGTLTIVSS
      90      100     110
                CDR3
```

FIG. 2A

Amino Acid Sequence of DeImmunised J591 Light Chain (CDRs are marked, numbering as Kabat)

```
DIQMTQSPSSSLSTSVGDRVTLTTC|KASQDVGTAVD|WYQQKPGPSP
1      10      20      30      40
                        CDR1

KLLIY|WASTRHT|GIFSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADYYC
      50      60      70      80
                CDR2

|QQYNSYPLT|FGPGTKVDIK
      90      100
                CDR3
```

FIG. 2B

WO 02/098897

PCT/US02/17068

3/33

Location of T cell epitopes in J591 VH

	10	20	
1	E V Q L Q Q S G P E L V K P G T S V R I S C K T S		J591 MoVH
1	E V Q L V Q S G P E V K K P G A T V K I S C K T S		J591 DIVH
26	30	40	50
26	G Y T F T E Y T I H W V K Q S H G K S L E W I G N		J591 MoVH
	G Y T F T E Y T I H W V K Q A P G K G L E W I G N		J591 DIVH
51	60	70	
51	I N P N N G G T T Y N Q K F E E D K A T L T V D K S		J591 MoVH
	I N P N N G G T T Y N Q K F E E D K A T L T V D K S		J591 DIVH
76	80	90	100
76	S S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C A A G W		J591 MoVH
	T D T A Y M E L S L R S E D T A V Y Y C A A G W		J591 DIVH
101	110		
101	N F D Y W G Q G T T L T V S S		J591 MoVH
	N F D Y W G Q G T L L T V S S		J591 DIVH

FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 3B

WO 02/098897

PCT/US02/17068

5/33

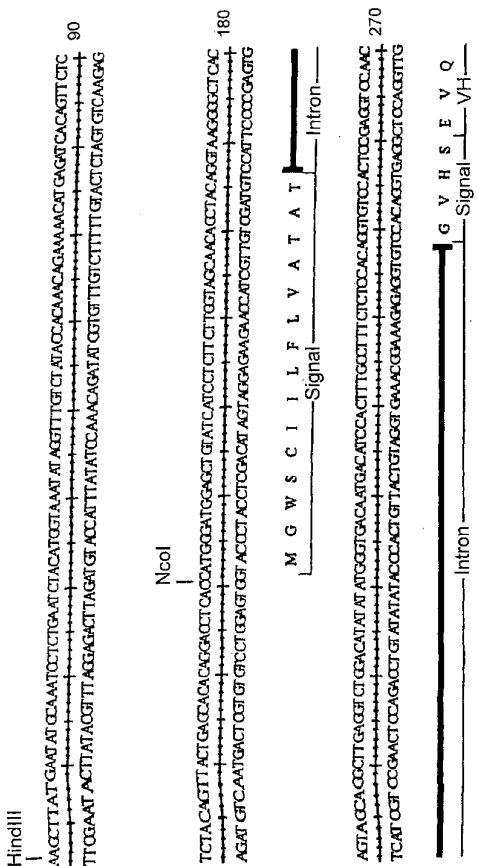
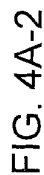


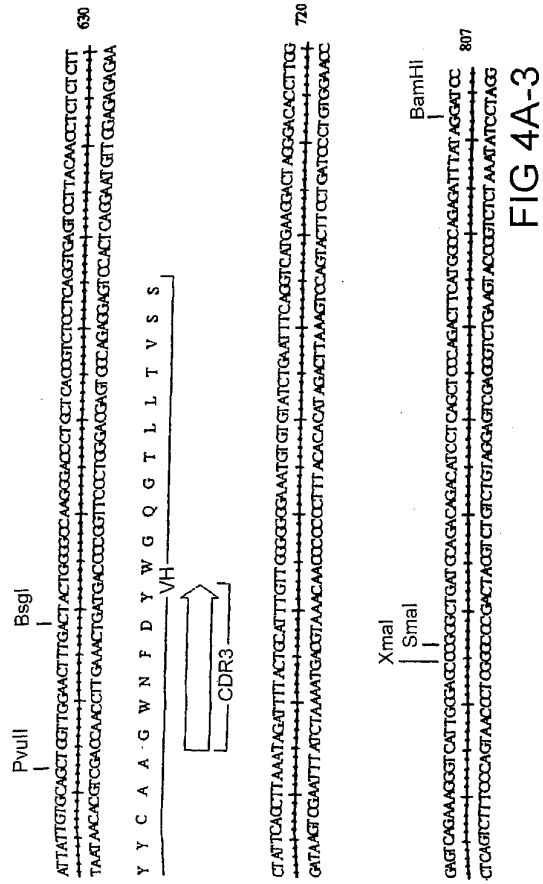
FIG. 4A-1



WO 02/098897

PCT/US02/17068

7/33



WO 02/098897

PCT/US02/17068

8/33

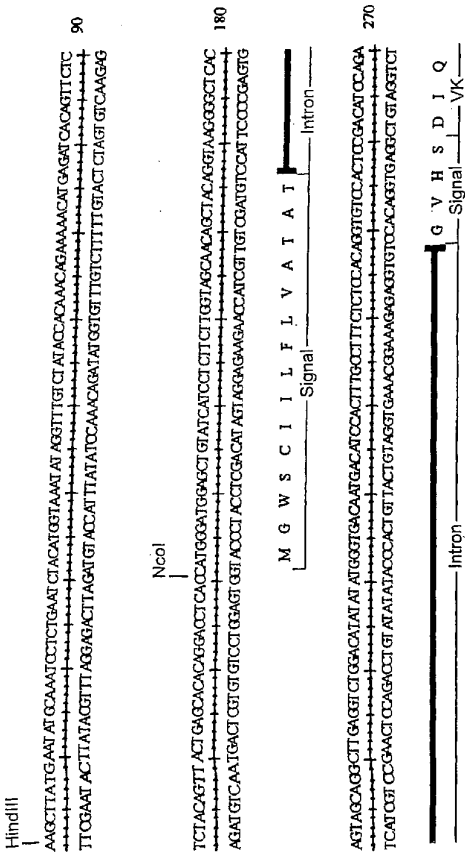
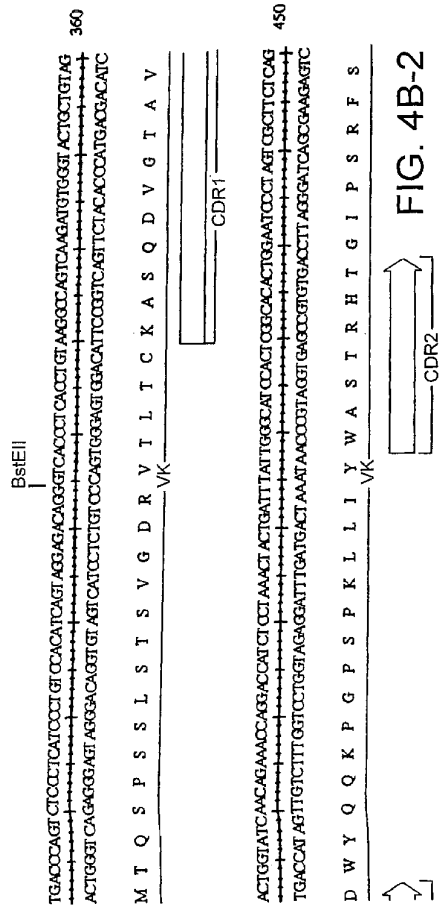


FIG. 4B-1

WO 02/098897

PCT/US02/17068

9/33



540

GCAGTGGATCTGGACAGACCTTCACTCCACCACTTTCTAGTCTTCAGGCTGAGACTTTGGAGTTATTACTGTCAAGATATAACAAGCT
CGTCACTAGACCTTGTCTGAAGTGGAGTGGTAAAGATCAGACGTGGAGACTCTGAAAGGTCTAATATGACAGTGGTATATTGTGA

G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A D Y Y C Q Q Y N S

—VK—

CDR3

BamHI

ATCCTCTCAAGTTTGGTCCCTGGGACCAAGGTGGAGCATCAAGGTGAGTAGAATTTAACTTTTCCTTCCTCAAGTTGGATCC 620
TAGAGAGGTGCAAGCAGAGACCTGGTTCACACTGTAGTTTGGAGTCTATCTTAAATTTGAACGAAAGGATCAAGCTAGG

Y P L T F G P G T K V D I K

—VK—

CDR3

FIG. 4B-3

FIG. 4B-3

	E	V	K	L	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	M	K	I	S	C	V	A	S	G	F	T	F	Majority		
	10										20																			
1	E	V	K	L	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	M	K	I	S	C	V	A	S	G	F	T	F	J415VH		
1	E	V	K	L	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	M	K	I	S	C	V	A	S	G	F	T	F	J415D1VH1		
1	E	V	K	L	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	M	K	I	S	C	V	A	S	G	F	T	F	J415D1VH2		
1	E	V	K	L	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	M	K	I	S	C	V	A	S	G	F	T	F	J415D1VH3		
1	E	V	K	L	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	M	K	I	S	C	V	A	S	G	F	T	F	J415D1VH4		
	30										40										50									
	S	N	Y	W	M	N	W	V	R	Q	T	P	E	K	G	L	E	W	V	A	E	I	R	S	Q	S	N	N	F	Majority
30	S	N	Y	W	M	N	W	V	R	Q	T	P	E	K	G	L	E	W	V	A	E	I	R	S	Q	S	N	N	F	J415VH
30	S	N	Y	W	M	N	W	V	R	Q	T	P	E	K	G	L	E	W	V	A	E	I	R	S	Q	S	N	N	F	J415D1VH1
30	S	N	Y	W	M	N	W	V	R	Q	T	P	E	K	G	L	E	W	V	A	E	I	R	S	Q	S	N	N	F	J415D1VH2
30	S	N	Y	W	M	N	W	V	R	Q	T	P	E	K	G	L	E	W	V	A	E	I	R	S	Q	S	N	N	F	J415D1VH3
30	S	N	Y	W	M	N	W	V	R	Q	T	P	E	K	G	L	E	W	V	A	E	I	R	S	Q	S	N	N	F	J415D1VH4
	60										70										80									
	A	T	H	Y	A	E	S	V	K	G	R	V	I	S	R	D	D	S	K	S	V	Y	L	Q	M	N	S	Majority		
59	A	T	H	Y	A	E	S	V	K	G	R	V	I	S	R	D	D	S	K	S	V	Y	L	Q	M	N	S	J415VH		
59	A	T	H	Y	A	E	S	V	K	G	R	V	I	S	R	D	D	S	K	S	V	Y	L	Q	M	N	S	J415D1VH1		
59	A	T	H	Y	A	E	S	V	K	G	R	V	I	S	R	D	D	S	K	S	V	Y	L	Q	M	N	S	J415D1VH2		
59	A	T	H	Y	A	E	S	V	K	G	R	V	I	S	R	D	D	S	K	S	V	Y	L	Q	M	N	S	J415D1VH3		
59	A	T	H	Y	A	E	S	V	K	G	R	V	I	S	R	D	D	S	K	S	V	Y	L	Q	M	N	S	J415D1VH4		
	90										100										110									
	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	W	N	N	F	W	G	Q	T	T	V	T	V	S	S	Majority	
88	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	W	N	N	F	W	G	Q	T	T	V	T	V	S	S	J415VH	
88	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	W	N	N	F	W	G	Q	T	T	V	T	V	S	S	J415D1VH1	
88	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	W	N	N	F	W	G	Q	T	T	V	T	V	S	S	J415D1VH2	
88	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	W	N	N	F	W	G	Q	T	T	V	T	V	S	S	J415D1VH3	
88	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	W	N	N	F	W	G	Q	T	T	V	T	V	S	S	J415D1VH4	

FIG. 5

WO 02/098897

PCT/US02/17068

12/33

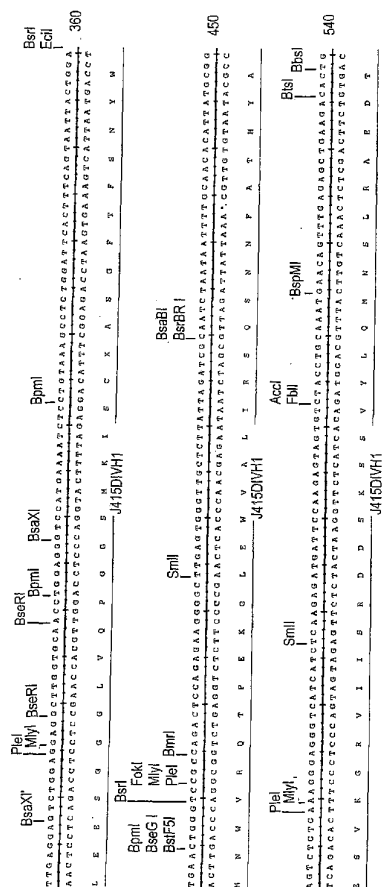
N I V M T Q F P K S M S A S A G E R M T L T C K A S E																												Majority									
10														20																							
1	N	I	V	M	T	Q	F	P	K	S	M	S	A	S	A	G	E	R	V	T	L	T	C	K	A	S	E	J415VK									
1	N	I	V	M	T	Q	S	P	K	S	M	S	A	S	A	G	E	R	M	T	L	T	C	K	A	S	E	J415DIVK1									
1	N	I	V	M	T	Q	S	P	K	S	M	S	A	S	A	G	E	R	M	T	L	T	C	K	A	S	E	J415DIVK2									
1	N	I	V	M	T	Q	S	P	K	S	M	S	A	S	A	G	E	R	M	T	L	T	C	K	A	S	E	J415DIVK3									
1	N	I	V	M	T	Q	S	P	K	S	M	S	A	S	A	G	E	R	M	T	L	T	C	K	A	S	E	J415DIVK4									
1	N	I	V	M	T	Q	F	P	K	S	M	S	A	S	A	G	E	R	M	T	L	T	C	K	A	S	E	J415DIVK5									
1	N	I	V	M	T	Q	F	P	K	S	M	S	A	S	A	G	E	R	M	T	L	T	C	K	A	S	E	J415DIVK6									
1	N	I	V	M	T	Q	F	P	K	S	M	S	A	S	A	G	E	R	V	T	L	T	C	K	A	S	E	J415DIVK7									
1	N	I	V	M	T	Q	F	P	K	S	M	S	A	S	A	G	E	R	M	T	L	T	C	K	A	S	E	J415DIVK8									
Majority																																					
30														40														50									
28	N	V	G	T	Y	V	S	W	Y	Q	Q	K	P	E	Q	S	P	K	M	L	I	Y	G	A	S	N	R	J415VK									
28	N	S	G	T	Y	V	S	W	Y	Q	Q	K	P	T	Q	S	P	K	M	L	I	Y	G	A	S	N	R	J415DIVK1									
28	N	V	G	T	Y	V	S	W	Y	Q	Q	K	P	T	Q	S	P	K	M	L	I	Y	G	A	S	N	R	J415DIVK2									
28	N	V	G	T	Y	V	S	W	Y	Q	Q	K	P	T	Q	S	P	K	M	L	I	Y	G	A	S	N	R	J415DIVK3									
28	N	V	G	T	Y	V	S	W	Y	Q	Q	K	P	T	Q	S	P	K	M	L	I	Y	G	A	S	N	R	J415DIVK4									
28	N	V	G	T	Y	V	S	W	Y	Q	Q	K	P	T	Q	S	P	K	M	L	I	Y	G	A	S	N	R	J415DIVK5									
28	N	V	G	T	Y	V	S	W	Y	Q	Q	K	P	T	Q	S	P	K	M	L	I	Y	G	A	S	N	R	J415DIVK6									
28	N	S	G	T	Y	V	S	W	Y	Q	Q	K	P	T	Q	S	P	K	M	L	I	Y	G	A	S	N	R	J415DIVK7									
28	N	S	G	T	Y	V	S	W	Y	Q	Q	K	P	T	Q	S	P	K	M	L	I	Y	G	A	S	N	R	J415DIVK8									
Majority																																					
60														70														80									
55	F	T	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	A	T	D	F	I	L	T	I	S	S	V	Q	A	E	J415VK									
55	F	T	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	I	L	T	I	S	S	V	Q	A	E	J415DIVK1									
55	F	T	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	I	L	T	I	S	S	V	Q	A	E	J415DIVK2									
55	F	T	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	I	L	T	I	S	S	V	Q	A	E	J415DIVK3									
55	F	T	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	I	L	T	I	S	S	V	Q	A	E	J415DIVK4									
55	F	T	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	I	L	T	I	S	S	V	Q	A	E	J415DIVK5									
55	F	T	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	I	L	T	I	S	S	V	Q	A	E	J415DIVK6									
55	F	T	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	I	L	T	I	S	S	V	Q	A	E	J415DIVK7									
55	F	T	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	I	L	T	I	S	S	V	Q	A	E	J415DIVK8									
Majority																																					
90														100																							
82	D	L	V	D	Y	Y	C	G	Q	S	Y	T	F	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	M	K	J415VK										
82	D	P	V	D	Y	Y	C	G	Q	S	Y	T	F	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	M	K	J415DIVK1										
82	D	P	V	D	Y	Y	C	G	Q	S	Y	T	F	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	M	K	J415DIVK2										
82	D	L	V	D	Y	Y	C	G	Q	S	Y	T	F	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	M	K	J415DIVK3										
82	D	L	V	D	Y	Y	C	G	Q	S	Y	T	F	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	M	K	J415DIVK4										
82	D	L	V	D	Y	Y	C	G	Q	S	Y	T	F	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	M	K	J415DIVK5										
82	D	L	V	D	Y	Y	C	G	Q	S	Y	T	F	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	M	K	J415DIVK6										
82	D	L	V	D	Y	Y	C	G	Q	S	Y	T	F	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	M	K	J415DIVK7										
82	D	L	V	D	Y	Y	C	G	Q	S	Y	T	F	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	M	K	J415DIVK8										

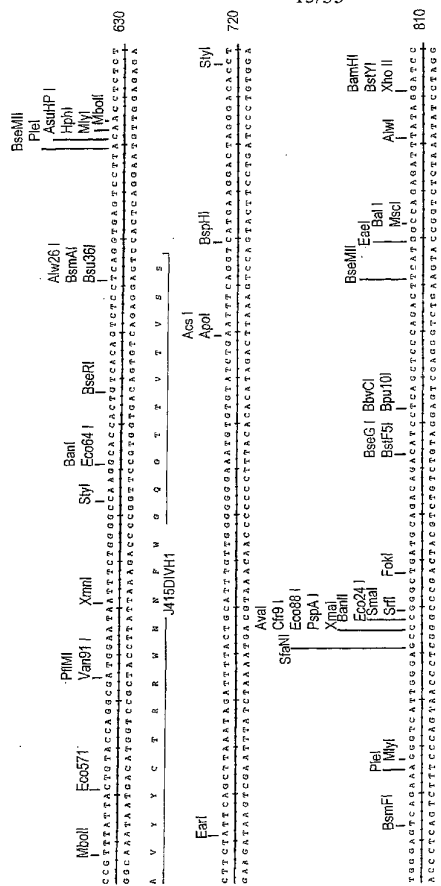
FIG. 6

[illegible]

FIG. 7A-1

FIG. 7A-2





PCT/US02/17068

FIG. 7B

WO 02/098897

PCT/US02/17068

17/33

	E V K L E E S G G G L V Q P G G S M K L S C V A S G F T F S	Majority
	10 20 30	
1	E V K L E E S G G G L V Q P G G S M K L S C V A S G F T F S	J415vh
1	E V K L E E S G G G L V Q P G G S M K L S C V A S G F T F S	MUVHIIIIO
	N Y W M N W V R Q S P E K G L E W V A E I R L Q S D N F A T	Majority
	40 50 60	
31	N Y W M N W V R Q S P E K G L E W V A E I R S Q S N N F A T	J415vh
31	N Y W M N W V R Q S P E K G L E W V A E I R L K S D N Y A T	MUVHIIIIO
	H Y A E S V K G R V I I S R D D S K S S V Y L Q M N N L R A	Majority
	70 80 90	
61	H Y A E S V K G R V I I S R D D S K S S V Y L Q M N N L R A	J415vh
61	H Y A E S V K G R F T I S R D D S K S S V Y L Q M N N L R A	MUVHIIIIO
	E D T G I Y Y C T T G G Y G G R R S W N A F W G Q G T L V T	Majority
	100 110 120	
91	E D T G I Y Y C T - - - - - R R W N N F W G Q G T T L T	J415vh
91	E D T G I Y Y C T T G G Y G G R R S W F A Y W G Q G T L V T	MUVHIIIIO
	V S S	Majority
114	V S S	J415vh
121	V S S	MUVHIIIIO

FIG. 7C

WO 02/098897

PCT/US02/17068

18/33

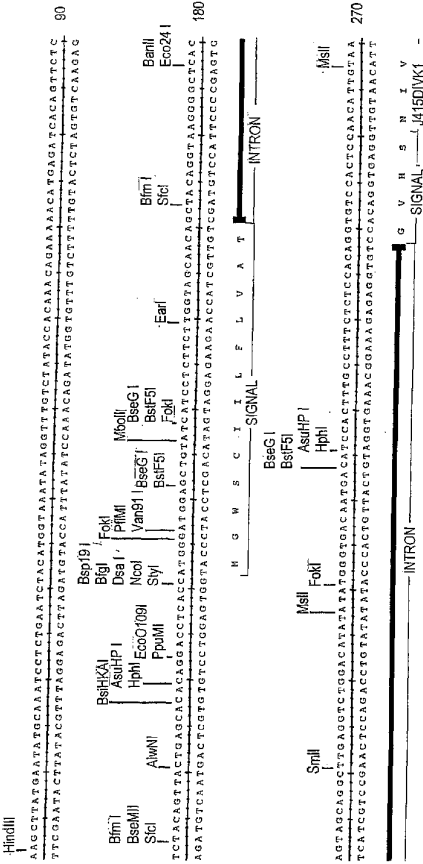
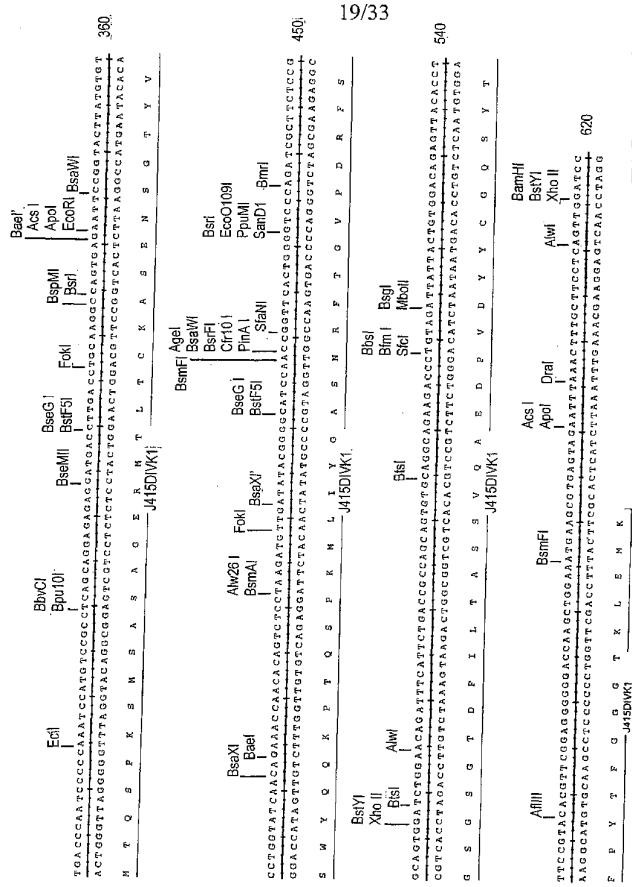


FIG. 8A-1

WO 02/098897

PCT/US02/17068



WO 02/098897

PCT/US02/17068

20/33

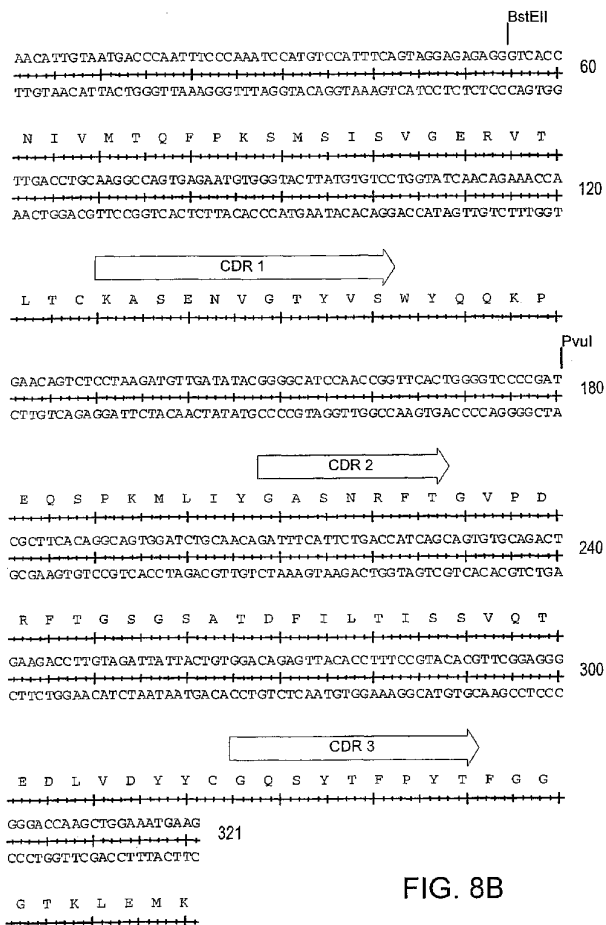


FIG. 8B

	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	A	V	S	A	G	E	K	V	T	L	S	C	K	A	S	E	S	L	L	Majori
									10											20											30
1	N	I	V	M	T	Q	F	P	K	S	M	S	I	S	V	G	E	R	V	T	L	T	C	K	A	S	E	-	-	J415vk	
1	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	L	A	V	S	A	G	E	K	V	T	M	S	C	K	S	Q	S	L			Muvkl	
	N	V	G	N	Q	K	T	Y	V	A	W	Y	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	I	Y	G	A	S	T	R	Majori		
									40											50										60	
28	N	V	G	-	-	-	T	Y	V	S	W	Y	Q	K	P	E	Q	S	P	K	M	L	I	Y	G	A	S	N	R	J415vk	
31	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	A	W	Y	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	I	Y	W	A	S	T	R	Muvkl		
	E	S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	T	D	F	I	L	T	I	S	S	V	Q	A	E	D	L	A	Majori		
									70											80											90
55	F	T	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	A	T	D	F	I	L	T	I	S	S	V	Q	T	E	D	L	V	J415vk	
61	E	S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	T	D	F	I	L	T	I	S	S	V	Q	A	E	D	L	A	Muvkl		
	V	Y	C	G	N	S	Y	S	F	P	L	T	F	G	G	T	K	L	E	L	K								Majori		
									100											110											
85	D	Y	C	G	O	S	Y	T	F	P	Y	T	F	G	G	T	K	L	E	M	K								J415vk		
91	V	Y	C	G	N	D	Y	S	F	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	K								Muvkl		

WO 02/098897

PCT/US02/17068

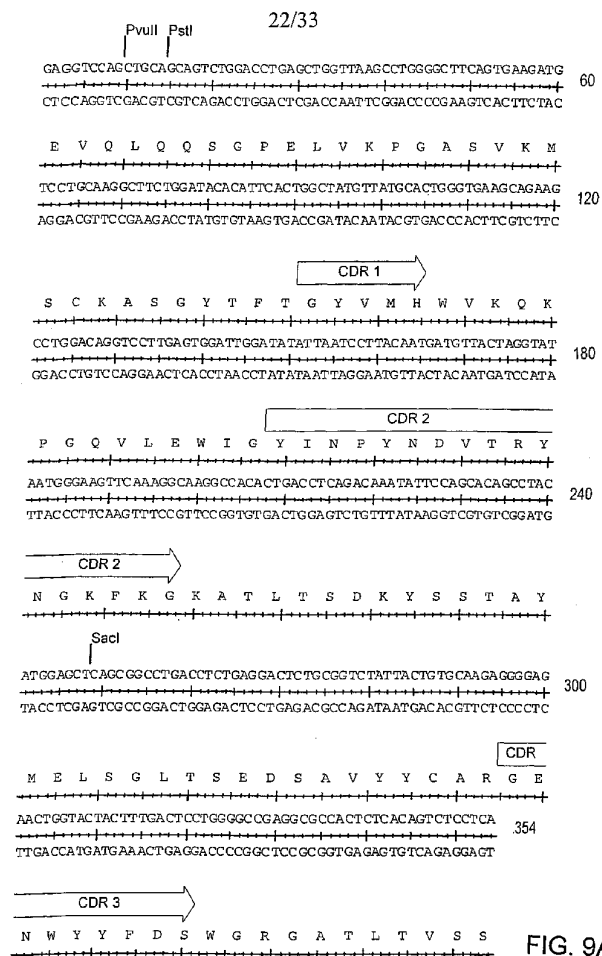


FIG. 9A

WO 02/098897

PCT/US02/17068

23/33

1
1

EVQLQQSGPELVKPGASVKISKASGYTFT
102030
EVQLQQSGPELVKPGASVKISKASGYTFTj533vh
EVQLQQSGPELVKPGASVKISKASGYTFTMuvhii

GYVMNNVVKQSPGVLEWIGDINPGNGGTS
405060
GYVMNHVVKQKPGQVLEWIGYINPYNDVTRj533vh
31DYVMNNVVKQSPGKSLLEWIGDINPENGTS
31Muvhii

YNGKFKGKATLTVDKSSSTAYMELSLTSE
708090
YNGKFKGKATLTSDKYSSTAYMELSLTSEj533vh
61YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSLTSEMuvhii

DSAVYYCARGENSSYMAYYAFDSWGGAT
100110120
DSAVYYCARGENSSYMAYYAFDSWGGATj533vh
91DSAVYYCARGYYSSTAYMAYYAFDYNWGGT
Muvhii

VTVSS
Majori

114LTVSS
121VTVSS
j533vh
Muvhii

FIG. 9B

WO 02/098897

PCT/US02/17068

24/33

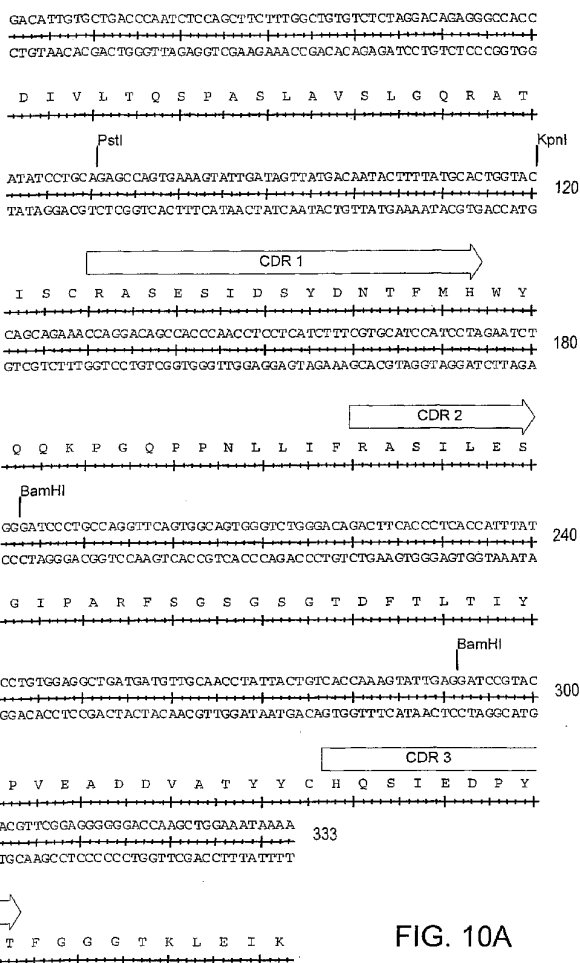


FIG. 10A

WO 02/098897

PCT/US02/17068

25/33

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESD Majori
10 20 30
21 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESID j533vk
1 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVD Muvk3
SYGNSFMHWYQQKPGQPPNLLIFASILES Majori
40 50 60
51 SYDNTEFMHWYQQKPGQPPNLLIFRASILES j533vk
31 SYGN[Q]FMHWYQQKPGQPPNLLIYAS[Q]ILES Muvk3
GVPARFSGSGGTDFTLTHPVEADDAATY Majori
70 80 90
81 GIPARFSGSGGTDFTLTHPVEADDAATY j533vk
61 G[V]PARFSGSGGTDFTLN[H]PVEEDDAATY Muvk3
YCCQSIEDPPYTFGGGKLEIK Majori
100 110
111 YCHQSIEDP[Y]TFGGGKLEIK j533vk
91 YC[Q]QS[Q]EDP[W]TFGGGKLEIK Muvk3

FIG. 10B

WO 02/098897

PCT/US02/17068

26/33

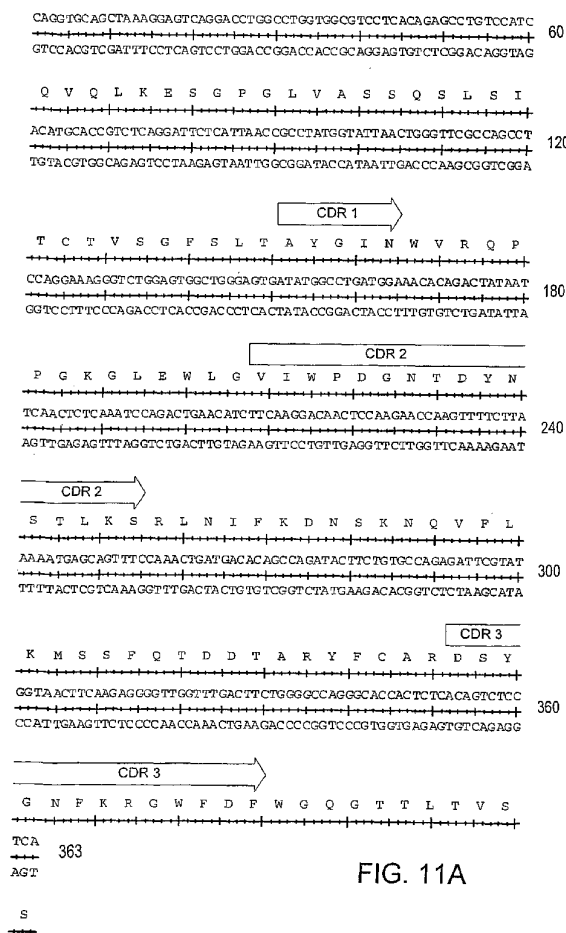


FIG. 11A

WO 02/098897

PCT/US02/17068

27/33

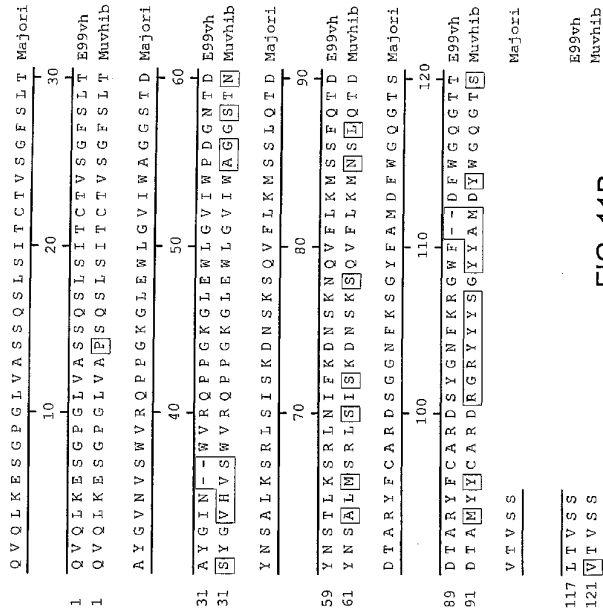


FIG. 11B

WO 02/098897

PCT/US02/17068

28/33

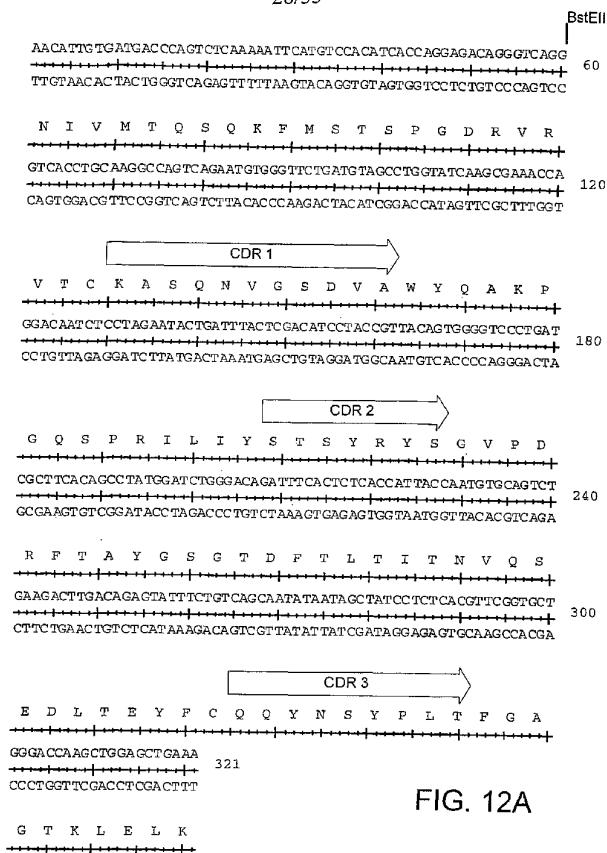


FIG. 12A

	D	I	V	M	T	Q	S	S	L	A	V	S	A	G	D	K	V	T	V	S	C	K	A	S	Q	S	L	L	Majori

FIG. 12B

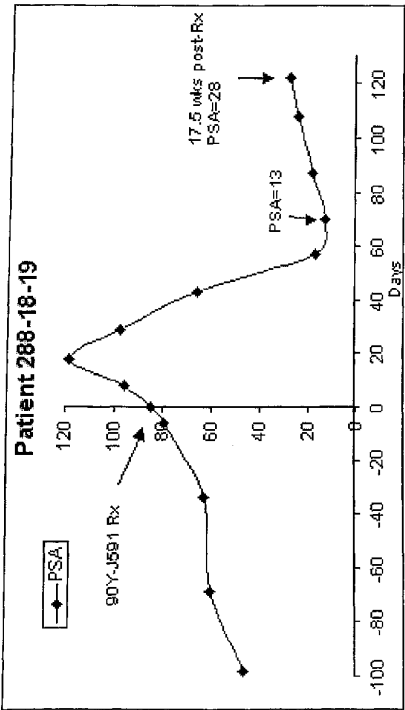


FIG. 13A

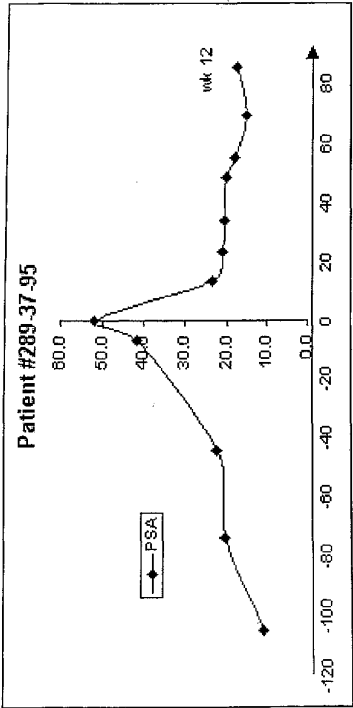


FIG. 13B

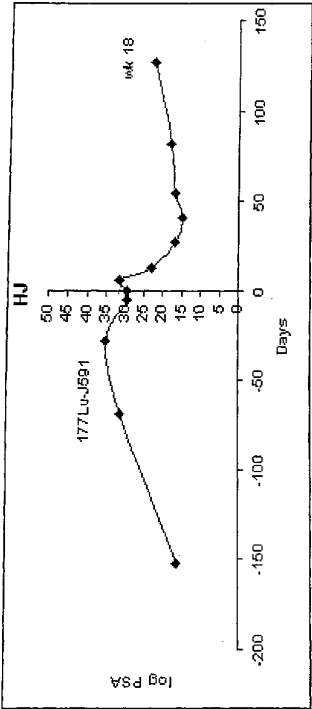
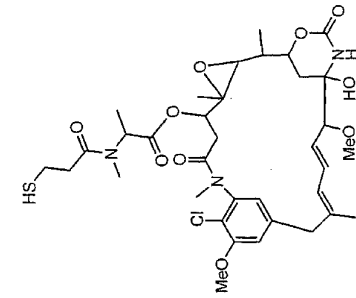


FIG. 14

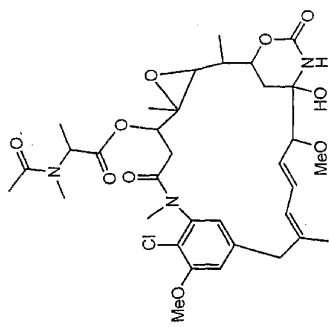
WO 02/098897

PCT/US02/17068

33/33



$C_{33}H_{48}ClN_3O_{10}S$
Exact Mass: 737.27
Mol. Wt.: 738.29
DM1



$C_{34}H_{46}ClN_3O_{10}$
Exact Mass: 691.29
Mol. Wt.: 692.20
Maytansine

FIG. 15

WO 02/098897

1/39

PCT/US02/17068

SEQUENCE LISTING

<110> Cornell Research Foundation, Inc.

<120> MODIFIED ANTIBODIES TO PROSTATE-SPECIFIC
MEMBRANE ANTIGEN AND USES THEREOF

<130> 10448-163W01

<150> 60/323,585

<151> 2001-09-20

<150> 60/362,810

<151> 2002-03-08

<150> 60/295,214

<151> 2001-06-01

<160> 128

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Ile His
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
1 5 10 15
Asp

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Gly Trp Asn Phe Asp Tyr
1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Asp
1 5 10

WO 02/098897

2/39

PCT/US02/17068

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5
Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 7
<211> 82
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Trp Val Lys Gln Ser His Gly
20 25 30
Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
35 40 45
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
50 55 60
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
65 70 75 80
Ser Ser

<210> 8
<211> 80
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Ile Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
20 25 30
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
35 40 45
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Glu Asp
50 55 60
Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys
65 70 75 80

<210> 9
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized heavy chain J591

WO 02/098897

3/39

PCT/US02/17068

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser
20 25

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized heavy chain J591

<400> 10
Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10
Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 11
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized heavy chain J591

<400> 11
Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized heavy chain J591

<400> 12
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys
20

<210> 14
<211> 15

WO 02/098897

4/39

PCT/US02/17068

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized light chain J591

<400> 14
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Pro Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1           5           10           15

<210> 15
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized light chain J591

<400> 15
Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1           5           10           15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys
20          25          30

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized light chain J591

<400> 16
Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
1           5           10

<210> 17
<211> 82
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized heavy chain J591

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

```

WO 02/098897

5/39

PCT/US02/17068

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> deimmunized light chain J591

<400> 18

```

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

```

<210> 19

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

```

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

```

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

```

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

```

WO 02/098897

6/39

PCT/US02/17068

<210> 21
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized heavy chain J591

<400> 21
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 22
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized light chain J591

<400> 22
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30
 Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Pro Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 23
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (122)...(166)
 <221> CDS
 <222> (249)...(605)

WO 02/098897

7/39

PCT/US02/17068

<223> deimmunized heavy chain J591

```

<400> 23
aagcttatga atagcaaat cctctgaatc tacatggtaa ataggggtt gtctatacca    60
caaacagaaa aacatgagat cacagttctc tctacagtta ctgagcacac aggacctoac    120
c atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca    166
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
  1         5         10        15

ggtaaggggc tcacagtacg aggccttgagg tctggacata tatatgggtg acaatgacat    226
ccactttgcc tttctctcca ca ggt gtc cac tcc gag gtc caa ctg gta cag    278
              Gly Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln
                20        25

tct gga cct gaa gtg aag aag cct ggg gct aca gtg aag ata tcc tgc    326
Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys
      30         35         40

aag act tct gga tac aca ttc act gaa tat acc ata cac tgg gtg aag    374
Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Lys
      45         50         55

cag gcc cct gga aag ggc ctt gag tgg att gga aac atc aat cct aac    422
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Asn
      60         65         70

aat ggt ggt acc acc tac aat cag aag ttc gag gac aag gcc aca cta    470
Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu
      75         80         85

act gta gac aag tcc acc gat aca gcc tac atg gag ctc agc agc cta    518
Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
      90         95        100       105

aga tct gag gat act gca gtc tat tat tgt gca gct ggt tgg aac ttt    566
Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Trp Asn Phe
     110        115        120

gac tac tgg ggc caa ggg acc ctg ctc acc gtc tcc tca ggtgagtcct    615
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser
     125        130

tacaacctct ctcttctatt cagcttaaat agattttact gcatttgttg ggggggaaat    675
gtgtgtatct gaatttcagg tcatgaagga ctaggagcac cttgggagtc agaaagggtc    735
attgggagcc cgggctgatg cagacagaca tcttcagctc ccagacttca tggccagaga    795
tttataggat cc

```

<210> 24
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized heavy chain J591

```

<400> 24
ggatcctata aatctctggc catgaagtct gggagctgag gatgtctgtc tgcattcagcc    60
cgggctccca atgacctttt ctgactccca aggtgtccct agtccctcat gacctgaaat    120
tcagatacac acatttcccc cccaacaaat gcagtaaaat ctatttaagc tgaatagaag    180
agagaggttg taaggactca cctgaggaga cgtgagcagc ggtcccttgg ccccgtagt    240

```


WO 02/098897

8/39

PCT/US02/17068

```

caaggttcca accagctgca caataataga ctgcagttatc ctacagatctt agggctgctga 300
gctccatgta ggctgtatcg gtggacttgt ctacagttag tgtggccttg tcttcgaact 360
tctgattgta ggtggtacca ccatgttttag gattgatgtt tccaatccac tcaaggccct 420
ttccaggggc ctgcttcaac cagtgtatgg tatattcagt gaatgtgtat ccagaagctt 480
tgcaggatat ctctactgta gccccaggct tottcaacttc aggtccagac tgtaccagtt 540
ggacotcgga gtggacacct gtggagagaa aggcacaagt gatgtcattg tcaaccatat 600
atatgtccag acctcaagcc tgcactactgt agcccccctac ctgtagctgt tgcaccaag 660
aagaggatga tacagctcca tcccatggtg aggtcctgtg tgcctcagtaa ctgtagagag 720
aactgtgac tcactgtttt ctgtttgtgg tatagacaaa cctatatatta ccatgtagat 780
tcagaggatt tgcataattca taagctt 807

<210> 25
<211> 620
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (122)...(166)

<221> CDS
<222> (249)...(581)

<223> deimmunized light chain J591

<400> 25
aagcttatga atatgcaaat cctctgaatc taactggtaa atabaggttt gtctatacca 60
caaacagaaa aacatgagat cacagttctc totacagtta ctgagocac aggaactcac 120
c atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 166
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
1 5 10 15

ggtaaggggc tcacagtagc aggccttgagg tctggacata tatatgggtg acaatgacat 226
ccactttgoc ttctcttcca ca ggt gtc cac tcc gac atc cag atg acc cag 278
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
20 25

tct ccc tca tcc ctg tcc aca tca gta gga gac agg gtc acc ctc acc 326
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Leu Thr
30 35 40

tgt aag gcc agt caa gat gtg ggt act gct gta gac tgg tat caa cag 374
Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Asp Trp Tyr Gln Gln
45 50 55

aaa cca gga cca tct cct aaa cta ctg att tat tgg gca tcc act cgg 422
Lys Pro Gly Pro Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
60 65 70

cac act gga atc cct agt cgc ttc tca ggc agt gga tct ggg aca gac 470
His Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
75 80 85

tto act ctc acc att tct agt ctt cag cct gaa gac ttt gca gat tat 518
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asp Tyr
90 95 100 105

tac tgt cag caa tat aac agc tat cct ctc acg ttc ggt cct ggg acc 566
Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr
110 115 120

```

WO 02/098897

9/39

PCT/US02/17068

aag gtg gac atc aaa cgtgagtaga atttaaaatt tgcttctca gttggatcc 620
Lys Val Asp Ile Lys
125

<210> 26
<211> 620
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized light chain J591

<400> 26
ggatccaact gaggaagcaa agtttaaatt ctactcacgt ttgatgtcca ccttggtccc 60
aggaccgaac gtgagaggat agctgttata ttgctgacag taataactcy caaagtcttc 120
aggctgaaga ctagaatagg tgagagtga gtcctgtccc gatccaactgc ctgagaagcg 180
actagggatt ccagtgtgccc gagtggatgc ccaataaatc agtagtttag gagatggtcc 240
tggtttctgt tgataccagt ctacagcagt accacatct tgactggcct tacaggtgag 300
ggtgacctgt tctcctactg atgtggacag ggatgagggg gactgggtca tctggatgtc 360
ggagtggaga cctgtggaga gaaaggcaaa gtggatgtca ttgtcaccga tatatatgtc 420
cagaccctcaa cctgtctact gtgagccctt tacctgtagc tgttgotacc aagaagagga 480
tgatacagct ccattccatg gtgaggtcct gtgtgtctag taactgtaga gagaactgtg 540
attcctatgtt ttctgtgttg tggtatagac aaacctatat ttaccatgta gattcagagg 600
atttgatat tcaatagctt 620

<210> 27
<211> 134
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized heavy chain J591

<400> 27
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys
20 25 30
Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45
Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn
65 70 75 80
Gln Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp
85 90 95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125
Leu Leu Thr Val Ser Ser
130

<210> 28
<211> 126
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized light chain J591

WO 02/098897

10/39

PCT/US02/17068

<400> 28
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Thr
20 25 30
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
35 40 45
Gly Thr Ala Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Pro Ser Pro Lys
50 55 60
Leu Leu Ile Tyr Cys Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Ile Pro Ser Arg
65 70 75 80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser
100 105 110
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
115 120 125

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 29
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn
1 5 10

<210> 30
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 30
Glu Ile Arg Ser Gln Ser Asn Asn Phe Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 31
Arg Trp Asn Asn Phe
1 5

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 32
Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

WO 02/098897

11/39

PCT/US02/17068

<400> 33
 Gly Ala Ser Asn Arg Phe Thr
 1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 34
 Gly Gln Ser Tyr Thr Phe Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 35
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 36
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 36
 Asn Ile Val Met Thr Gln Phe Pro Lys Ser Met Ser Ile Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser
 20 25 30
 Pro Lys Met Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
 35 40 45
 Ser Ala Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Thr Glu Asp
 50 55 60
 Leu Val Asp Tyr Tyr Cys Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 65 70 75 80

<210> 37
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized heavy chain J415-4

<400> 37
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

WO 02/098897

12/39

PCT/US02/17068

Ser Met Lys Ile Ser Cys Val Ala Ser
20 25

<210> 38
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized heavy chain J415-4

<400> 38
Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 39
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized heavy chain J415-4

<400> 39
Arg Val Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg
20 25 30

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized heavy chain J415-4

<400> 40
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 41
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized light chain J415-5

<400> 41
Asn Ile Val Met Thr Gln Phe Pro Lys Ser Met Ser Ala Ser Ala Gly
1 5 10 15
Glu Arg Met Thr Leu Thr Cys
20

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

WO 02/098897

13/39

PCT/US02/17068

<223> deimmunized light chain J415-5

<400> 42

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Met	Leu	Ile	Tyr
1				5					10				15	

<210> 43

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> deimmunized light chain J415-5

<400> 43

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Ile
1				5					10				15		
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Val	Asp	Tyr	Tyr	Cys
			20					25				30			

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> deimmunized light chain J415-5

<400> 44

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Met	Lys
1				5				10	

<210> 45

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> deimmunized heavy chain J415-4

<400> 45

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

<210> 46

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> deimmunized light chain J415-5

WO 02/098897

14/39

PCT/US02/17068

```

<400> 46
Asn Ile Val Met Thr Gln Phe Pro Lys Ser Met Ser Ala Ser Ala Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Met Thr Leu Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Thr Gln Ser
 20           25           30
Pro Lys Met Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35           40           45
Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp
 50           55           60
Leu Val Asp Tyr Tyr Cys Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 65           70           75           80

<210> 47
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 47
Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1           5           10           15
Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20           25           30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35           40           45
Ala Glu Ile Arg Ser Gln Ser Asn Asn Phe Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50           55           60
Ser Val Lys Gly Arg Val Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65           70           75           80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85           90           95
Tyr Cys Thr Arg Arg Trp Asn Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100          105          110
Thr Val Ser Ser
 115

<210> 48
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 48
Asn Ile Val Met Thr Gln Phe Pro Lys Ser Met Ser Ile Ser Val Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Tyr
 20           25           30
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Met Leu Ile
 35           40           45
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50           55           60
Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Thr
 65           70           75           80
Glu Asp Leu Val Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Thr Phe Pro Tyr
 85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 100          105

<210> 49
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

WO 02/098897

15/39

PCT/US02/17068

<220>

<223> deimmunized heavy chain J415-4

<400> 49

```

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

```

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> deimmunized light chain J415-5

<400> 50

```

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

```

<210> 51

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> deimmunized heavy chain J415-4

<400> 51

```

gaagtgaac ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggagggtc catgaaaatc    60
tcctgtgttg cctctggatt cactttcagt aattactgga tgaactgggt cggccagtct    120
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagatcgc aatctaataa ttttgcaaca    180
cattatgcgg agtctgtgaa agggagggtc atcatctcaa gagatgattc caagagtagt    240
gtctacctgc aaatgaacag tttgagagct gaagacactg cggtttatta ctgtaccagg    300
cgatggaata atttctgggg ccaaggcacc actgtcacag tctcctca    348

```


WO 02/098897

16/39

PCT/US02/17068

<210> 52
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized light chain J415-5

<400> 52	
aacattgtaa tgacccaatt toccaaatcc atgtccgcct cagcaggaga gaggatgacc	60
ttgacctgca aggccagtga gaatgtgggt acctatgtgt cctggatca acagaaacca	120
acacagtctc ctaagatgtt gataacggg gcatccaacc ggttccactgg ggtcccagat	180
cgcttctcog gcaatggatc tggaaacagat ttcattctga ccatcagcag tgtgcaaggca	240
gaagacccttg tagattatta ctgtggacag agttacacct ttccgtacac gttcggaggg	300
gggaccaagc tggaaatgaa g	321

<210> 53
 <211> 810
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized heavy chain J415-1

<221> CDS
 <222> (122)...(160)

<221> CDS
 <222> (249)...(608)

<400> 53	
aagcttatga atatgcgaat cctctgaatc tacatggtaa atataggttt gtctatacca	60
caaacagaaa aaatgagat cacagttctc tctacagtta ctgagcacac aggaacctcac	120
c atg gga tgg agc tgt atc abc ctc ttc ttg gta gca aca gctacagga	170
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr	
1 5 10	
aggggctcac agtagcaggc ttgaggtctg gacatatata tgggtgacaa tgacatccac	230
tttgcttttc tctccaca ggt gtc cac tcc gaa gtg aaa ctt gag gag tct	281
Gly Val His Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser	
15 20	
gga gga ggc ttg gtg caa cct gga ggg tcc atg aaa atc tcc tgt aaa	329
Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys	
25 30 35 40	
gcc tct gga ttc act ttc agt aat tac tgg atg aac tgg gtc cgc cag	377
Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln	
45 50 55	
act cca gag aag ggg ctt gag tgg gtt gct ctt att aga tgc caa tct	425
Thr Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Arg Ser Gln Ser	
60 65 70	
aat aat ttt gca aca cat tat gog gag tct gtg aaa ggg agg gtc atc	473
Asn Asn Phe Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Val Ile	
75 80 85	
atc tca aga gat gat tcc aag agt agt gtc tac ctg caa atg aac agt	521
Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser	

WO 02/098897 17/39 PCT/US02/17068

90 95 100

tts aga gct gaa gac act gcc gtt tat tac tgt acc agg cga tgg aat 569
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Trp Asn
 105 110 115 120

aat ttc tgg ggc caa gcc acc act gtc aca gtc tcc tca ggtgagtcct 618
 Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 125 130

tacaacctct ctctctctatt cagcttaaat agattttact gcatttgttg ggggggaaat 678
 gtgtgtatct gaatttcaagg tcatgaagga ctaggacac ctggggagtc agaaagggtc 738
 attgggagcc cgggctgatg cagacagaca tcttcagctc ccagacttca tggccagaga 798
 ttatataggat cc 810

<210> 54
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized heavy chain J415-1

<400> 54
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Gly Val His
 1 5 10 15
 Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 20 25 30
 Gly Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn
 35 40 45
 Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp
 50 55 60
 Val Ala Leu Ile Arg Ser Gln Ser Asn Asn Phe Ala Thr His Tyr Ala
 65 70 75 80
 Glu Ser Val Lys Gly Arg Val Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser
 85 90 95
 Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Trp Asn Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 115 120 125
 Val Thr Val Ser Ser
 130

<210> 55
 <211> 810
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized heavy chain J415-1

<400> 55
 ggatcctata aatctctggc catgaagtct gggagctgag gatgtctgtc tgcacagcc 60
 cgggctccca atgacctttt ctgactccca aggtgtccct agtccctcat gacctgaaat 120
 tcagatacac acatttccccc cccaacaaat gcagtaaaat ctatttaagc tgaatagaag 180
 agagaggttg taaggactca ctgaggaga ctgtgacagt ggtgccttgg cccagaaat 240
 tattcoatcg cctggtacag taataaacgg cagtgtcttc agctctcaaa ctgttcaatt 300
 cgaggtagac actactcttg gaataatctc ttgagatgat gacctccct ttcacagact 360
 ccgcataatg tgttgcaaaa ttattagatt gcgatctaatt aagagcaacc cactcaagcc 420
 ccttctctgg agtctggcgg acccagttca tccagtaatt actgaaagtg aatccagagg 480
 ctttacagga gattttcaatg gacctccag gttgcaccaa gctcctcca gactcctcaa 540

WO 02/098897

18/39

PCT/US02/17068

```

gtttcaacttc ggagtgagaca cctgtggaga gaaaggcaaa gtggahgtca ttgtcaccca 600
tataatgttc cagacctcaa gcctgtact gtgagccct taactgtagc tgttgctacc 660
aagaagagga tgatacagct ccattccatg gtgaggtcct gtgtgctcag taactgtaga 720
gagaactgtg atctcatggt tttctgtttg tggatatagc aaacctatat ttaccatgta 780
gattcagagg atttgcatac tcataagctt 810

<210> 56
<211> 620
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized light chain J415-1

<221> CDS
<222> (122)...(160)

<221> CDS
<222> (249)...(581)

<400> 56
aagcttatga atatgcaaat cctctgaatc tacatggtaa atataggttt gtctatacca 60
caaacagaaa aacatgagat cacsgttctc tctacagtta ctgagcacac aggacctcac 120
c atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gctacaggta 170
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr
1 5 10

aggggctcac agtagcagge ttgaggtctg gacatatata tgggtgacaa tgacatccac 230
tttgcccttc tctccaca ggt gtc cac tcc aac att gta atg acc caa tcc 281
Gly Val His Ser Asn Ile Val Met Thr Gln Ser
15 20

ccc aaa tcc atg tcc gcc tca gca gga gag agg atg acc ttg acc tgc 329
Pro Lys Ser Met Ser Ala Ser Ala Gly Glu Arg Met Thr Leu Thr Cys
25 30 35 40

aag gcc agt gag aat tcc ggt act tat gtg tcc tgg tat caa cag aaa 377
Lys Ala Ser Glu Asn Ser Gly Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys
45 50 55

cca aca cag tct cct aag atg ttg ata tac ggg gca tcc aac cgg ttc 425
Pro Thr Gln Ser Pro Lys Met Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Phe
60 65 70

act ggg gtc cca gat cgc ttc tcc ggc agt gga tct gga aca gat ttc 473
Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
75 80 85

att ctg acc gcc agc agt gtg cag gca gaa gac cct gta gat tat tac 521
Ile Leu Thr Ala Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Pro Val Asp Tyr Tyr
90 95 100

tgt gga cag agt tac acc ttt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag 569
Cys Gly Gln Ser Tyr Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
105 110 115 120

ctg gaa atg aag cgtgagtaga atttaaactt tgcttctca gttggatcc 620
Leu Glu Met Lys

```

WO 02/098897

19/39

PCT/US02/17068

<210> 57
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized light chain J415-1

<400> 57
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Gly Val His
 1 5 10 15
 Ser Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Ala Ser Ala
 20 25 30
 Gly Glu Arg Met Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Ser Gly Thr
 35 40 45
 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Thr Gln Ser Pro Lys Met Leu
 50 55 60
 Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ala Ser Ser Val Gln
 85 90 95
 Ala Glu Asp Pro Val Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Thr Phe Pro
 100 105 110
 Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 115 120

<210> 58
 <211> 620
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized light chain J415-1

<400> 58
 ggatccaact gaggaagcaa agtttaaatt ctactcagc ttcatttcca gcttggtccc 60
 ccctccgaac gtgtacggaa aggtgtaact ctgtccacag taataatota cagggtcttc 120
 tgcctgcaca ctgtcgagg tcagaatgaa atctgttcca gatccactgc cggagaagcg 180
 atctgggacc ccagtgaacc ggttggaagc cccgtatata acatctttag gagactgtgt 240
 tggttttctg tgataccagg acacataagt accggaattc tcactggcct tgcagggtcaa 300
 ggtcactctc tctctgctg aggcggacat ggatttgggg gattgggtca ttacatgttt 360
 ggagtggaca cctgtggaga gaaaggcaaa gtggatgtca ttgtcaccca tatatatgtc 420
 cagactcaca gccgtctact gtgagccctt tacctgtagc tgttgctacc aagaagagga 480
 tgatacagct ccatcccatg gtgaggtcct gtgtgctcag taactgtaga gagaactgtg 540
 atctcatgtt tttctgtttg tggatatagc aaacctatat ttaccatgta gattcagagg 600
 atttgcatac tcataagctt 620

<210> 59
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized heavy chain J415-2

<400> 59
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val

WO 02/098897

20/39

PCT/US02/17068

```

      35          40          45
Ala Leu Ile Arg Ser Gln Ser Asn Asn Phe Ala Thr His Tyr Ala Glu
  50          55          60
Ser Val Lys Gly Arg Val Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
  65          70          75          80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      85          90          95
Tyr Cys Thr Arg Arg Trp Asn Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
  100          105          110
Thr Val Ser Ser
  115

```

<210> 60
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized heavy chain J415-3

```

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

```

<210> 61
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> majority sequence

```

<400> 61
Glu Val Lys Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1          5          10          15
Ser Met Lys Ile Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
  20          25          30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
  35          40          45
Ala Glu Ile Arg Ser Gln Ser Asn Asn Phe Ala Thr His Tyr Ala Glu
  50          55          60
Ser Val Lys Gly Arg Val Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
  65          70          75          80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      85          90          95
Tyr Cys Thr Arg Arg Trp Asn Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
  100          105          110

```

WO 02/098897

21/39

PCT/US02/17068

Thr Val Ser Ser
115

<210> 62
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized light chain J415-2

<400> 62
Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Ala Ser Ala Gly
1 5 10 15
Glu Arg Met Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Tyr
20 25 30
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Thr Gln Ser Pro Lys Met Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ala Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Pro Val Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Thr Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
100 105

<210> 63
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized light chain J415-3

<400> 63
Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Ala Ser Ala Gly
1 5 10 15
Glu Arg Met Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Tyr
20 25 30
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Thr Gln Ser Pro Lys Met Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ala Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Leu Val Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Thr Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
100 105

<210> 64
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> deimmunized light chain J415-4

<400> 64
Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Ala Ser Ala Gly

WO 02/098897

22/39

PCT/US02/17068

```

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

```

<210> 65
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized light chain J415-6

```

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

```

<210> 66
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized light chain J415-7

```

<400> 66
Asn Ile Val Met Thr Gln Phe Pro Lys Ser Met Ser Ala Ser Ala Gly
1           5           10           15
Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Tyr
                20           25           30
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Thr Gln Ser Pro Lys Met Leu Ile
                35           40           45
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
                50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
        65           70           75           80
Glu Asp Leu Val Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Thr Phe Pro Tyr
                85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
                100           105

```

WO 02/098897

23/39

PCT/US02/17068

<210> 67
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> deimmunized light chain J415-8

<400> 67
 Asn Ile Val Met Thr Gln Phe Pro Lys Ser Met Ser Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Met Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Ser Gly Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Met Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Val Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Thr Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 100 105

<210> 68
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> majority sequence

<400> 68
 Asn Ile Val Met Thr Gln Phe Pro Lys Ser Met Ser Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Met Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Thr Gln Ser Pro Lys Met Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Val Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Thr Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 100 105

<210> 69
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 69
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

WO 02/098897

PCT/US02/17068

24/39

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Gly Gly Tyr Gly Gly Arg Arg Ser Trp Phe Ala Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 70
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> majority sequence

<400> 70
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Leu Gln Ser Asp Asn Phe Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Val Ile Ile Ser Arg Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Gly Gly Tyr Gly Gly Arg Arg Ser Trp Asn Ala Phe
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 71
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 71
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110
 Lys

<210> 72

WO 02/098897

25/39

PCT/US02/17068

<211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> majority sequence

<400> 72
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Ser Leu Leu Asn Val
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Thr Tyr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Asn
 85 90 95
 Ser Tyr Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110
 Lys

<210> 73
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(354)

<400> 73
 gag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtt aag cct ggg gct 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac aca ttc act ggc tat 96
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cct gga cag gtc ctt gag tgg att 144
 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga tat att aat cct tac aat gat gtt act agg tat aat ggg aag ttc 192
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Arg Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 aaa ggc aag gcc aca ctg acc tca gac aaa tat tcc agc aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ctc agc ggc ctg acc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca aga ggg gag aac tgg tac tac ttt gac tcc tgg ggc cga gcc gcc 336
 Ala Arg Gly Glu Asn Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Arg Gly Ala

WO 02/098897

26/39

PCT/US02/17068

100 105 110 354

act ctc aca gtc tcc tca
Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 74
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 74
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Arg Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Glu Asn Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Arg Gly Ala
100 105 110
Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 75
<211> 354
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 75
tgaggagact gtgagagtgg cgctctggcc ccaggagtca aagtagtacc agttctcccc 60
tcttgacacag taatagaccg cagagtcctc agaggtcagg ccgctgagct ccatgtaggc 120
tgtgtctgaa tattgtctgt aggtcagtggt ggccttgctt ttgaacttcc cattatacct 180
agtaacatca ttgtaaggat taatatatcc aatccactca aggacctgtc caggettctg 240
cttcacccag tgcataacat agccagtgaa tgtgtatcca gaagccttgc aggacatctt 300
cactgaagcc ccaggcttaa ccagctcagg tccagactgc tgcagctgga cctc 354

<210> 76
<211> 333
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(333)

<400> 76
gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta gga 48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt att gat agt tat 96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asp Ser Tyr
20 25 30

WO 02/098897 27/39 PCT/US02/17068

gac aat act ttt atg cac tgg tac cag cag aaa cca gga cag oca ccc 144
 Asp Asn Thr Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

aac ctc ctc atc ttt cgt gca tcc atc cta gaa tct ggg atc cct gcc 192
 Asn Leu Leu Ile Phe Arg Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc acc att tat 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Tyr
 65 70 75 80

cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cac caa agt att 288
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ile
 85 90 95

gag gat ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 333
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 77
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 77
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Asn Thr Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Asn Leu Leu Ile Phe Arg Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Tyr
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ile
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 78
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 78
 ttttatttcc agcttggtcc cccctccgaa cgtgtacgga tctcaatac ttgtgtgaca 50
 gtaaataggtt gcaacatcat cagctccac aggataaatg gtgagggtga agtctgtccc 120
 agacccaactg ccaactgaacc tggcagggat ccagattct aggatggatg cagcaaatg 180
 gagagaggttg ggtggtgtc ctggtttctg ctggtaccag tgcataaaag tattgtcata 240
 actatcaata ctttcaactgg ctctgcagga tatggtggcc ctctgtccta gagacacagc 300
 caaagaagct ggagattggg tcagcacaat gtc 333

<210> 79
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 79

WO 02/098897

PCT/US02/17068

28/39

```

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20     25     30
Tyr Met Asn Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp
35     40     45
Ile Gly Asp Ile Asn Pro Gly Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys
50     55     60
Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65     70     75     80
Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
85     90     95
Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Met Ala Tyr Tyr Ala Phe
100    105    110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115    120    125

```

<210> 80
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> majority sequence

```

<400> 80
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20     25     30
Val Met Asn Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp
35     40     45
Ile Gly Asp Ile Asn Pro Gly Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gly Lys
50     55     60
Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65     70     75     80
Tyr Met Glu Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
85     90     95
Cys Ala Arg Gly Glu Asn Ser Ser Ser Tyr Met Ala Tyr Tyr Ala Phe
100    105    110
Asp Ser Trp Gly Gln Gly Ala Thr Val Thr Val Ser Ser
115    120    125

```

<210> 81
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

<400> 81
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1      5      10      15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20     25     30
Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35     40     45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50     55     60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65     70     75     80
Pro Val Glu Glu Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85     90     95

```

WO 02/098897

29/39

PCT/US02/17068

Glu Asp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 82
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> majority sequence

<400> 82
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Asn Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ile
 85 90 95
 Glu Asp Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 83
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(363)

<400> 83
 cag gtg cag cta aag gag tca gga cct ggc ctg gtg gcg tcc tca cag 48
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Ser Ser Gln
 1 5 10 15
 agc ctg tcc atc aca tgc acc gtc tca gga ttc tca tta acc gcc tat 96
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ala Tyr
 20 25 30
 ggt att aac tgg gtt cgc cag cct cca gga aag ggt ctg gag tgg ctg 144
 Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 gga gtg ata tgg cct gat gga aac aca gac tat aat tca act ctc aaa 192
 Gly Val Ile Trp Pro Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Lys
 50 55 60
 tcc aga ctg aac atc ttc aag gac aac tcc aag aac caa gtt ttc tta 240
 Ser Arg Leu Asn Ile Phe Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 aaa atg agc agt ttc caa act gat gac aca gcc aga tac ttc tgt gcc 288
 Lys Met Ser Ser Phe Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

WO 02/098897

30/39

PCT/US02/17068

```

aga gat tcg tat ggt aac ttc aag agg ggt tgg ttt gac ttc tgg ggc      336
Arg Asp Ser Tyr Gly Asn Phe Lys Arg Gly Trp Phe Asp Phe Trp Gly
      100                      105                      110

cag ggc acc act ctc aca gtc tcc tca      363
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
      115                      120

<210> 84
<211> 121
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 84
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Ser Ser Gln
1          5          10          15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ala Tyr
20         25         30
Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35         40         45
Gly Val Ile Trp Pro Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Lys
50         55         60
Ser Arg Leu Asn Ile Phe Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu
65         70         75
Lys Met Ser Ser Phe Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Phe Cys Ala
85         90         95
Arg Asp Ser Tyr Gly Asn Phe Lys Arg Gly Trp Phe Asp Phe Trp Gly
100        105        110
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115        120

<210> 85
<211> 363
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 85
tgaggagact gtgagagtgg tgccttgccc ccagaagtca aaccaacccc tcttgaagtt      60
accatagcaa tctctggcac agaagtatct ggctgtgtca tcagtttgga aactgctcat      120
ttttaagaaa acctgtgtct tggagttgtc cttgaagatg ttcagtctgg atttgagagt      180
tgaattatag tctgtgtttc catcaggcca tatcaatccc agccaactca gaccetttcc      240
tggaggctgg cgaacccaat taataccata gccgggtaat gagaatcctg agacggtgca      300
tgtgatggac aggcctctgt aggcagccac caggccaggt cctgaactct ttagctgcac      360
ctg                                     363

<210> 86
<211> 321
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(321)

<400> 86
aac att gtg atg acc cag tct caa aaa ttc atg tcc aca tca cca gga      48
Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Pro Gly
1          5          10          15

gac agg gtc agg gtc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggt tct gat      96

```

WO 02/098897

31/39

PCT/US02/17068

```

Asp Arg Val Arg Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asp
      20                      25                      30
gta gcc tgg tat caa gcg aaa cca gga caa tct cct aga ata ctg att    144
Val Ala Trp Tyr Gln Ala Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Ile Leu Ile
      35                      40                      45
tac tcc aca tcc tac cgt tac agt ggg gtc cct gat cgc ttc aca gcc    192
Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Ala
      50                      55                      60
tat gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att acc aat gtg cag tot    240
Tyr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
      65                      70                      75                      80
gaa gac ttg aca gag tat ttc tgt cag caa tat aat agc tat cct ctc    288
Glu Asp Leu Thr Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
      85                      90                      95
acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa    321
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
      100                      105

<210> 87
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 87
Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Pro Gly
      1                      5                      10                      15
Asp Arg Val Arg Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asp
      20                      25                      30
Val Ala Trp Tyr Gln Ala Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Ile Leu Ile
      35                      40                      45
Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Ala
      50                      55                      60
Tyr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
      65                      70                      75                      80
Glu Asp Leu Thr Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
      85                      90                      95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
      100                      105

<210> 88
<211> 321
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 88
tttcagctcc agcttggtcc cagcaccgaa cgtgagagga tagctattat attgctgaca    60
gaaatactct gtcaagtctt cagactgcac attggtaatg gtgagagtga aatctgtccc    120
agatccatag gctgtgaagc gatcagggac cccactgtaa cggtaggatg tcgagtaaat    180
cagtattota ggagattgtc ctgggtttgc ttgataccag gctacatcag aaccacatt    240
ctgaactggcc ttgcagggtg cctgaccct gtctcctggg gatgtggaca tgaatttttg    300
agactgggtc atcacatgt t                                     321

<210> 89
<211> 121
<212> PRT

```


WO 02/098897

32/39

PCT/US02/17068

<213> Mus musculus

<400> 89

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Ser Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Pro Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Asn Ile Phe Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Ser Ser Phe Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Ser Tyr Gly Asn Phe Lys Arg Gly Trp Phe Asp Phe Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 90

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> majority sequence

<400> 90

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Ser Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Pro Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Asn Ile Phe Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Ser Ser Phe Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Ser Tyr Gly Asn Phe Lys Arg Gly Trp Phe Asp Phe Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 91

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 91

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

WO 02/098897

33/39

PCT/US02/17068

```

65           70           75           80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
      85           90           95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
      100          105          110
Lys

```

<210> 92
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> majority sequence

```

<400> 92
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1           5           10           15
Asp Lys Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Leu Leu Asn Val
20          25          30
Gly Ser Asp Lys Asn Tyr Val Ala Trp Tyr Gln Ala Lys Pro Gly Gln
35          40          45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50          55          60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65          70          75          80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Asn
85          90          95
Asp Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100         105         110
Lys Arg Ala
115

```

<210> 93
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

<400> 93
Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Val Met His
1           5           10

```

<210> 94
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

<400> 94
Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Arg Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1           5           10          15
Gly

```

<210> 95
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

<400> 95
Gly Glu Asn Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser

```

WO 02/098897

34/39

PCT/US02/17068

1 5
<210> 96
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 96
Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asp Ser Tyr Asp Asn Thr Phe Met His
1 5 10 15

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 97
Arg Ala Ser Ile Leu Glu Ser
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 98
His Gln Ser Ile Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 99
Gly Phe Ser Leu Thr Ala Tyr Gly Ile Asn
1 5 10

<210> 100
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 100
Val Ile Trp Pro Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 101
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 101
Asp Ser Tyr Gly Asn Phe Lys Arg Gly Trp Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 102
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

WO 02/098897

35/39

PCT/US02/17068

<400> 102
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asp Val Ala
1 5 10
<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 103
Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5
<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 104
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 105
<211> 25
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 105
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
20 25
<210> 106
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 106
Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10
<210> 107
<211> 32
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 107
Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30
<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 108
Trp Gly Arg Gly Ala Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

WO 02/098897

36/39

PCT/US02/17068

<210> 109
<211> 82
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 109
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Val Leu Glu Trp Ile Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Tyr
35 40 45
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser
50 55 60
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Arg Gly Ala Thr Leu Thr Val
65 70 75 80
Ser Ser

<210> 110
<211> 23
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 110
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
20

<210> 111
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 111
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Asn Leu Leu Ile Phe
1 5 10 15

<210> 112
<211> 32
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 112
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Tyr Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 113
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 113
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 114

WO 02/098897

37/39

PCT/US02/17068

<211> 80
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 114
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
20 25 30
Pro Asn Leu Leu Ile Phe Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
35 40 45
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Tyr Pro Val Glu Ala Asp Asp
50 55 60
Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
65 70 75 80

<210> 115
<211> 25
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 115
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Ser Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 116
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 116
Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10

<210> 117
<211> 32
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 117
Arg Leu Asn Ile Phe Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15
Met Ser Ser Phe Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 118
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 118
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 119
<211> 82
<212> PRT
<213> Mus musculus

WO 02/098897

38/39

PCT/US02/17068

<400> 119
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Ser Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly
 20 25 30
 Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Leu Asn Ile Phe Lys Asp Asn Ser
 35 40 45
 Lys Asn Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Phe Gln Thr Asp Asp Thr
 50 55 60
 Ala Arg Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 65 70 75 80
 Ser Ser

<210> 120
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 120
 Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Arg Val Thr Cys
 20

<210> 121
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 121
 Trp Tyr Gln Ala Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Ile Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 122
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 122
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Ala Tyr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Thr Glu Tyr Phe Cys
 20 25 30

<210> 123
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 123
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 1 5 10

<210> 124
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 124
 Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Pro Gly

WO 02/098897

39/39

PCT/US02/17068

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

<210> 125
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 125
 gaagtgagac ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 60
 tccctgtgtg cctctggatt cactttcagt aattactgga tgaactgggt ccgcoagtc 120
 ccagagaggg ggcttgagtg ggttgcctgaa attagatcgc aatctaataa ttttgcaaca 180
 catatagcgg agtctgtgaa agggagggtc atcatctcaa gagatgaltc caagagttagt 240
 gtctacactgc aaatgaacaa cttgagagct gaagacactg gcatttatta ctgtaccagg 300
 cgatggaata atttctgggg ccaaggcacc actctcacag tctctcca 348

<210> 126
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 126
 tgaggagact gtgagagtgg tgccttgccc ccagaaatta ttccatcgcc tggtaacgta 60
 ataaatgcca gtgtcttcag ctctcaagtt gttoatttgc aggtagacac tactcttggg 120
 atcatctctc gagatgatga cctccctttt cacagactcc gcataatgtg ttgcaaaaat 180
 attagattgc gatctaattt cagcaaccca ctcaagcccc ttctctggag actggcggac 240
 ccagttcctc cagtaattac tgaagtgaat tccagaggca acacaggaga gtttcatgga 300
 tctctcaggt tgcaccaagc ctctccaga ctctcaagc ttcacttc 348

<210> 127
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 127
 aacattgtaa tgaccaatt tcccaaatcc atgtcoattt cagtaggaga gagggtcacc 60
 ttgacctgca aggccagtg gaattgtgggt acttatgtgt cctggtatca acagaaacca 120
 gaacagtcct ctaagatggt gatatacggg gcataccaac gggttactgg ggtcccgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcattctga ccatcagcag tgtccagact 240
 gaagaccttg tagattatta ctgtggacag agttacacct ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaatgaa g 321

<210> 128
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 128
 ctccatttcc agcttgggtc cccctccgaa cgtgtacgga aagggtgaac tctgtccaca 60
 gtaataatct acaaggtctt cagtctgcac acgtctgatg gtcagaatga aatctgttgc 120
 agatccactg cctgtgaagc gatcggggac cccagtgaac cggttgatg ccccgatat 180
 caacatctta ggagactggt ctgggtttctg ttgataccag gacacataag taaccacatt 240
 ctcactggcc ttgcaggtea aggtgacctt ctctctactt gaaatggaca tggatttggg 300
 aaattgggtc attacaatgt t 321

PCT/US02/17068

**American Type Culture Collection**

12301 Parklawn Drive • Rockville, MD 20852 USA • Telephone: (301) 231-6500 Telex: 094-066 ATCCNORTH • FAX: 301-770-2547

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE****INTERNATIONAL FORM****RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Laboratory of Urological Oncology
Attn: Neil H. Bander, M.D.
Cornell Medical Center - Box 23
1300 York Avenue
New York, NY 10021

Deposited on Behalf of: Cornell University (a/o Dr. Neil H. Bander)

Identification Reference by Depositor:

ATCC Designation

Mouse hybridoma Prost E89

HB-12101

The deposits were accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic description indicated above.The deposits were received ☒ by this International Depository Authority and have been accepted.**AT YOUR REQUEST:**☒ We will inform you of requests for the strains for 30 years.

The strains will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strains, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strains.

If the cultures should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace them with living cultures of the same.

The strains will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the cultures cited above was tested May 7, 1996. On that date, the cultures were viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Rockville, Md. 20852 USA

Signature of person having authority to represent ATCC:

Date: May 8, 1996

Barbara M. Holley, Administrator, Patent Depository

cc: Michael L. Goldman
Lauren S. Stich

PCT/US02/17068

**American Type Culture Collection**

12301 Parklawn Drive • Rockville, MD 20852 USA • Telephone: (301)334-5500 Telex: 898-055 ATCCNDRYH • FAX: 301-770-1527

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Cornell Medical Center
Attn: Dr. Neil H. Bander or Ms. Lauren Stich
Department of Urology
525 East 68 Street (Box 23, Rm. E-300)
New York, NY 10021

Deposited on Behalf of: Cornell Medical Center

Identification Reference by Depositor:

ATCC Designation

Mouse hybridoma prost J415

HB-12109

The deposit was accompanied by: ☐ a scientific description ☒ a proposed taxonomic description indicated above.The deposit was received May 30, 1996 by this International Depository Authority and has been accepted.AT YOUR REQUEST: ☒ We will inform you of requests for the strain for 30 years.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strain.

If the culture should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace it with living culture of the same.

The strain will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the culture cited above was tested June 5, 1996. On that date, the culture was viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Rockville, Md. 20852 USA

Signature of person having authority to represent ATCC:

Barbara M. Hailey
Barbara M. Hailey, Administrator, Patent Depository

Date: June 5, 1996

cc: ☒ Michael L. Goldman
H. Walter Haeussler

30/08 '02 JUN 23:02 IN TX/RA 61181

PCT/US02/17068

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703 365-2700 • FAX: 703 365-2745

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE****INTERNATIONAL FORM****RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Weill Medical College of Cornell University
Laboratory of Urological Oncology
Attn: Neil H. Bander
E-300
1300 York Avenue
New York, NY 10021

Deposited on Behalf of: Weill Medical College of Cornell University (Cornell Research Foundation)

Identification Reference by Depositor:

Patent Deposit Designation

Murine NSO myeloma cell line: 109ES J415 DIVH4 DIVK5

PTA-4174

The deposit was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic description indicated above.The deposit was received March 21, 2002 by this International Depository Authority and has been accepted.AT YOUR REQUEST: ☒ We will inform you of requests for the strain for 30 years.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strain.

If the culture should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace it with living culture of the same.

The strain will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the culture cited above was tested April 3, 2002. On that date, the culture was viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:

Marie Harris
Marie Harris, Patent Specialist, ATCC Patent Depository

Date: April 16, 2002

cc: Louis Myers

(Ref: Docket or Case No.: 10448/163001 MP101-140P3RCP1)

30/09 '02 JUN 23:02 IN TX/RX 61181

PCT/US02/17068

**American Type Culture Collection**

12301 Parklawn Drive • Rockville, MD 20852 USA • Telephone: (301)591-5500 Telex: 908-766 ATCCROV • FAX: (301)816-4340

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**INTERNATIONAL FORM**RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.1
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**To: (Name and Address of Depositor or Attorney)**

New York Hospital-Cornell Medical Center
Attn: Neil H. Bander, M.D.
Laboratory of Urological Oncology, Rm. E-300 (Box 23)
525 E. 68 Street
New York, NY 10021

Deposited on Behalf of: Dr. Neil H. Bander, Department of Urology, Cornell Medical Center

Identification Reference by Depositor:**ATCC Designation**

Mouse hybridoma Prost J591

HB-12126

Mouse hybridoma Prost J533

HB-12127

The deposits were accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic description indicated above.The deposits were received June 6, 1996 by this International Depository Authority and have been accepted.**AT YOUR REQUEST:**☒ We will inform you of requests for the strains for 30 years.

The strains will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strains, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strains.

If the cultures should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace them with living cultures of the same.

The strains will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the cultures cited above was tested June 12, 1996. On that date, the cultures were viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Rockville, Md. 20852 USA

Signature of person having authority to represent ATCC:

Date: June 13, 1996

Barbara M. Hailey, Administrator, Patent Depository

cc: ☒ Michael L. Goldman
H. Walter Haeussler

30/09 '02 JUN 23:02 IN TX/RX 81181

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
12 December 2002 (12.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/098897 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 39/395, C07K 16/00, 16/28, 16/30, C12N 15/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/17068
- (22) International Filing Date: 30 May 2002 (30.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/295,214 1 June 2001 (01.06.2001) US
60/323,585 20 September 2001 (20.09.2001) US
60/362,810 8 March 2002 (08.03.2002) US
- (71) Applicant: CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC. [US/US]; 20 Thornwood Drive, Suite 105, Ithaca, NY 14850 (US).
- (72) Inventors: BANDER, Neil; 525 E. 68th Street, Box 23, Suite E 300, New York, NY 10021 (US). CARR, Francis, J.; Birchlea, The Holdings Balmedie, Aberdeen AB23 8XB (GB). HAMILTON, Anita; 130 Kings Gate, Aberdeen AB15 4BQ (GB).
- (74) Agents: MYERS, Louis et al.; Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description
- (88) Date of publication of the international search report: 1 May 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/098897 A3

(54) Title: MODIFIED ANTIBODIES TO PROSTATE-SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN AND USES THEREOF

(57) Abstract: Modified antibodies, or antigen-binding fragments thereof, to the extracellular domain of human prostate specific membrane antigen (PSMA) are provided. The modified anti-PSMA antibodies, or antigen-binding fragments thereof, have been rendered less immunogenic compared to their unmodified counterparts to a given species, e.g., a human. Pharmaceutical compositions including the aforesaid antibodies, nucleic acids, recombinant expression vectors and host cells for making such antibodies and fragments are also disclosed. Methods of using the antibodies of the invention to detect human PSMA, or to ablate or kill a PSMA-expressing cell, e.g., a PSMA-expressing cancer or prostatic cell, either *in vitro* or *in vivo*, are also provided.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/17068
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/395; C07K 16/00, 16/28, 16/30; C12N 15/00 US CL : 530/387.1, 387.3, 388.1, 388.8, 388.85, 391.3, 391.7; 435/188, 69.6; 424/130.1, 133.1, 135.1, 141.1, 155.1, 156.1, 178.1, 179.1, 183.1		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Continuation Sheet		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,136,311 A (BANDER) 24 October 2000 (24/10/00), see entire document, especially Table 1, column 12.	1-13, 17-23, 25, 26, 28-35
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 October 2002 (03.10.2002)		Date of mailing of the international search report 24 JAN 2003
Name and mailing address of the ISA/US Committee of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20535 Facsimile No. (703) 305 3230		Authorized officer Larry R. Helms Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/17068
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐ Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2.	☐ Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3.	☐ Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2.	☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-13, 17-23, 25, 26, 28-35	
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/17068

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

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

Group I, claim(s) 1-13, 17-23, 25-26, 28-35, drawn to an anti-PSMA antibody, method of making, and method of ablating or killing a prostate cell.

Group II, claim(s) 14-16, drawn to nucleic acids.

Group III, claim(s) 24-27, 36-39, drawn to a method of treating or preventing a prostatic or cancerous disorder by administration of an antibody to a subject.

Group IV, claim(s) 40, drawn to a method of detecting the presence of PSMA protein in vitro.

Group V, claim(s) 41, drawn to a method of detecting PSMA in vivo.

Group VI, claim(s) 42, drawn to a method of diagnosis or staging prostatic or cancerous disorder.

Group VII, claim(s) 43, drawn to a method of in vivo imaging.

Group VIII, claim(s) 44, drawn to a method of treating pain.

Group IX, claim(s) 45, drawn to a method of treating metastatic lesions. The inventions listed as Groups I-IX do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Pursuant to 37 C.F.R. 1.475 (d), the ISA/US considers that where multiple products and processes are claimed, the main invention shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of each of the other categories related thereto. Accordingly, the main invention of Group I, comprises the first product of an antibody to PSMA and a method making and using such antibody. Further pursuant to 37 C.F.R. 1.475 (d), the ISA/US considers that any features which the subsequently recited products and methods share with the main invention does not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 and that each of such products and methods accordingly defines a separate invention.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 1:

530/387.1, 387.3, 388.1, 388.8, 388.85, 391.3, 391.7; 435/188, 69.6; 424/130.1, 133.1, 135.1, 141.1, 155.1, 156.1, 178.1, 179.1, 183.1

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/17068

CAPLUS, MEDLINE, WEST, USPATFULL, BIOSIS, SWISPROT, PIR, GENEMBL, EST, GENESEQ, SPTREMBL
search terms: SEQ ID NO:22, 50, 25, 52, 21, 49, 23, 51, anti-prostate specific membrane antigen, PSMA, antibody, anti-PSMA,
prostate, treatment.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/18	C O 7 K 16/18	Z N A
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 33/574	G O 1 N 33/574	A
	A 6 1 K 43/00	

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

(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行

(74)代理人 100106080
弁理士 山口 晶子

(72)発明者 バンダー, ニール
アメリカ合衆国ニューヨーク州10021, ニューヨーク, イースト・シックスティーエイツスト
リート 525, ボックス23, スイート イー300

(72)発明者 カール, フランシス・ジェイ
イギリス国アバディーン エイビー23 8エックスビー, ザ・ホールディングス・バルメディー
, パーチリー

(72)発明者 ハミルトン, アニータ
イギリス国アバディーン エイビー15 4イーキュー, キングスゲイト 130

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA02 DA02 GA11 HA15
4B064 AG27 CA10 CC24 DA05
4C084 AA12 NA14 ZA81 ZB26
4C085 AA14 AA21 AA26 BB31 DD61 EE01
4H045 AA11 BA10 CA44 DA76 EA28 FA74

专利名称(译)	针对前列腺特异性膜抗原的修饰抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2004532639A	公开(公告)日	2004-10-28
申请号	JP2003502017	申请日	2002-05-30
[标]申请(专利权)人(译)	康乃尔研究基金会有限公司		
申请(专利权)人(译)	康奈尔大学研究基金会有限公司		
[标]发明人	バンダーニール カールフランシスジェイ ハミルトンアニータ		
发明人	バンダー,ニール カール,フランシス・ジェイ ハミルトン,アニータ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61K47/48 A61K51/00 A61K51/10 A61P13/08 A61P35/00 C07K16/18 C07K16/30 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/574		
CPC分类号	A61K47/6869 A61K51/1072 A61K2039/505 A61P13/08 A61P25/04 C07K16/3069 C07K2317/56		
FI分类号	C12N15/00.A A61K39/395.L A61K39/395.T A61P13/08 A61P35/00 C07K16/18.ZNA C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/574.A A61K43/00		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CC24 4B064/DA05 4C084/AA12 4C084/NA14 4C084/ZA81 4C084/ZB26 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA26 4C085/BB31 4C085/DD61 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA44 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫 山口明子		
优先权	60/295214 2001-06-01 US 60/323585 2001-09-20 US 60/362810 2002-03-08 US		
其他公开文献	JP2004532639A5 JP4619651B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了修饰的抗体或其抗原结合片段至人前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的细胞外结构域。与其对给定物种 (例如人) 的未修饰的对应物相比, 经修饰的抗PSMA抗体或其抗原结合片段具有较低的免疫原性。还公开了包含上述抗体, 核酸, 重组表达载体和用于制备此类抗体和片段的宿主细胞的药物组合物。还提供了使用本发明的抗体在体外或体内检测人PSMA, 或消融或杀死表达PSMA的细胞, 例如表达PSMA的癌症或前列腺细胞的方法。

(51) Int. Cl. ⁷		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00	A	4 B 0 2 4
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K	39/395	L	4 B 0 6 4
A 6 1 K	51/00	A 6 1 K	39/395	T	4 C 0 8 4
A 6 1 P	13/08	A 6 1 P	13/08		4 C 0 8 5
A 6 1 P	35/00	A 6 1 P	35/00		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	有 (全 398 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2003-502017 (P2003-502017)	(71) 出願人	500341816		
(86) (22) 出願日	平成14年5月30日 (2002.5.30)		コーネル リサーチ ファundation		
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月26日 (2003.11.26)		インコーポレーテッド		
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/017068		アメリカ合衆国 ニューヨーク州	1 4 8	
(87) 国際公開番号	W02002/098897		5 0 イサカ スイート	1 0 5	ソー
(87) 国際公開日	平成14年12月12日 (2002.12.12)		ウッドドライブ	2 0	
(31) 優先権主張番号	60/295,214	(74) 代理人	100089705		
(32) 優先日	平成13年6月1日 (2001.6.1)		弁理士 社本 一夫		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100076691		
(31) 優先権主張番号	60/323,585		弁理士 増井 忠武		
(32) 優先日	平成13年9月20日 (2001.9.20)	(74) 代理人	100075270		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 泰		
(31) 優先権主張番号	60/362,810	(74) 代理人	100080137		
(32) 優先日	平成14年3月8日 (2002.3.8)		弁理士 千葉 昭男		
(33) 優先権主張国	米国 (US)				
最終頁に続く					