

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5110768号
(P5110768)

(45) 発行日 平成24年12月26日(2012.12.26)

(24) 登録日 平成24年10月19日(2012.10.19)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 C 0 7 K 16/32 (2006.01)
 C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A 6 1 K 39/395 L
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 P 35/00
 C 0 7 K 16/32

請求項の数 23 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-513328 (P2004-513328)
 (86) (22) 出願日 平成15年6月16日(2003.6.16)
 (65) 公表番号 特表2006-507803 (P2006-507803A)
 (43) 公表日 平成18年3月9日(2006.3.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2003/002585
 (87) 国際公開番号 W02003/106497
 (87) 国際公開日 平成15年12月24日(2003.12.24)
 審査請求日 平成18年5月25日(2006.5.25)
 審判番号 不服2010-7806 (P2010-7806/J1)
 審判請求日 平成22年4月13日(2010.4.13)
 (31) 優先権主張番号 60/388,313
 (32) 優先日 平成14年6月14日(2002.6.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504149971
 イミューノメディクス、インコーポレイテッド
 IMMUNOMEDICS, INC.
 アメリカ合衆国ニュージャージー州、モリス、プレインズ、アメリカン、ロード、300
 (74) 代理人 100094318
 弁理士 山田 行一
 (74) 代理人 100123995
 弁理士 野田 雅一
 (74) 代理人 100128381
 弁理士 清水 義憲
 (74) 代理人 100107456
 弁理士 池田 成人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体PAM4ならびに膵臓癌の診断および治療のためのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、ヒト抗体の軽鎖および重鎖定常領域を含んでなる、キメラ抗体またはそのフラグメント。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗体またはそのフラグメントを含んでなり、該抗体またはそのフラグメントが少なくとも一種の診断/検出薬および/または少なくとも一種の治療薬に結合されている、癌細胞をターゲティングする診断または治療複合体。

【請求項 3】

診断/検出薬が、放射性核種、造影剤、光活性診断/検出薬、蛍光剤、化学発光剤および生物発光剤からなる群より選択される、請求項 2 に記載の診断複合体。

【請求項 4】

蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリセリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルデヒドおよびフルオロスカミンからなる群より選択される、請求項 3 に記載の診断複合体。

【請求項 5】

化学発光剤が、ルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルからなる群より選択される、請求項 3 に記載の診断複合体。

10

20

【請求項 6】

生物発光剤が、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンからなる群より選択される、請求項 3 に記載の診断複合体。

【請求項 7】

造影剤が、常磁性イオン、超音波増強剤、および放射線不透過性物質からなる群より選択される、請求項 3 に記載の診断複合体。

【請求項 8】

超音波増強剤が、キメラ P A M 4 抗体またはそのフラグメントを含んでなるリポソームである、請求項 7 に記載の診断複合体。

【請求項 9】

放射線不透過性物質が、ヨウ素化合物、バリウム化合物、ガリウム化合物およびタリウム化合物からなる群より選択される、請求項 7 に記載の診断複合体。

【請求項 10】

複合体が、手術中腫瘍診断、内視鏡的腫瘍診断、または血管内腫瘍診断に用いられる、請求項 3 に記載の診断複合体。

【請求項 11】

治療薬が、放射性核種、免疫調節剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素阻害剤、オリゴヌクレオチド、光活性治療薬、細胞傷害剤、抗体、脈管形成阻害剤、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 2 に記載の治療複合体。

【請求項 12】

オリゴヌクレオチドがアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 11 に記載の治療複合体。

【請求項 13】

細胞傷害剤が薬物または毒素である、請求項 11 に記載の治療複合体。

【請求項 14】

免疫調節剤が、サイトカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血因子、コロニー刺激因子 (C S F)、インターフェロン (I F N)、幹細胞増殖因子、エリスロポエチン、トロンプオエチン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 11 に記載の治療複合体。

【請求項 15】

一以上の請求項 1 に記載のキメラ抗体またはそのフラグメントと、ハプテン分子に対して親和性を有する一以上のハプテン結合部位とを含んでなる、多価多重特異性抗体またはそのフラグメント。

【請求項 16】

診断薬または治療薬をさらに含んでなる、請求項 15 に記載の多重特異性抗体またはそのフラグメント。

【請求項 17】

少なくとも二種の請求項 1 に記載のキメラ抗体またはそのフラグメントを含んでなる、抗体融合タンパク質またはそのフラグメント。

【請求項 18】

少なくとも一種の請求項 1 に記載の第一のキメラ抗体またはそのフラグメントと、少なくとも一種の第二の抗体またはそのフラグメントとを含んでなり、該第二の抗体またはそのフラグメントが請求項 1 に記載の抗体またはそのフラグメントではない、抗体融合タンパク質またはそのフラグメント。

【請求項 19】

第二の抗体が癌腫関連抗原と結合する、請求項 18 に記載の抗体融合タンパク質またはそのフラグメント。

【請求項 20】

融合タンパク質またはそのフラグメントが少なくとも一種の診断 / 検出薬および / または治療薬を含んでなる、請求項 19 に記載の抗体融合タンパク質またはそのフラグメント

10

20

30

40

50

。

【請求項 2 1】

請求項 1 に記載のキメラ抗体またはそのフラグメントをコードする DNA 配列を含んでなる、核酸。

【請求項 2 2】

請求項 1 5 に記載の多重特異性抗体またはそのフラグメントを有効成分として含んでなる、医薬であって、

MUC 1 を発現する標的組織と特異的に結合する少なくとも一つのアームと、ターゲッティング可能な複合体と特異的に結合する少なくとも一つの他のアームとを含んでなる、有効量の二重特異性抗体または抗体フラグメントを、被験体に投与し、次いで

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

(i i) D O T A - P h e - L y s (H S G) - T y r - L y s (H S G) - N H ₂ ; および

(i i i) A c - L y s (H S G) D - T y r - L y s (H S G) - L y s (T s c g - C y s) - N H ₂

からなる群より選択される、ターゲッティング可能な複合体を被験体に投与することを含んでなる、MUC 1 を発現する罹患組織を手術中に、内視鏡的にもしくは血管内にて同定および / または治療する方法において用いられる、医薬。

【請求項 2 3】

請求項 1 に記載のキメラ抗体またはそのフラグメントを有効成分として含んでなる、癌の診断または治療に用いられる医薬であって、

該抗体またはそのフラグメントが少なくとも一種の診断薬または治療薬に結合されている、医薬。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【 0 0 0 1】

発明の分野

本発明は一価および多価の単一特異性抗体、ならびに多価多重特異性抗体に関する。詳しくは、本発明は、PAM 4 と呼ばれる、MUC 1 抗原特異的抗体に関する。本発明はさらにキメラ化 PAM 4 抗体およびそのフラグメント、ならびに診断および治療におけるこのような抗体およびそのフラグメントの使用に関する。

【 0 0 0 2】

一つの態様では、本発明の抗体は一以上の同一結合部位を有し、各結合部位は標的抗原または標的抗原上のエピトープに対して親和性を有する。もう一つの態様では、本発明の抗体は標的抗原上の同じ、もしくは異なるエピトープ、または同じ、もしくは異なる標的抗原に対して親和性を有する二以上の結合部位を有するか、あるいは、少なくとも一つの結合部位が標的抗原に対して親和性を有し、少なくとも一つの結語部位がハプテンに対して親和性を有する。本発明はまた、宿主内で本明細書に記載の抗体を発現するのに有用な組換えベクターも記載する。

【 0 0 0 3】

背景技術

膵臓は体がグルコースをエネルギーに変換するのを助けるインスリンと、体が食物を消化するのを助ける酵素を産生する。膵臓癌は、主として膵管の細胞に起こる膵臓の悪性増殖である。この疾病は 9 番目に多い癌の形態であるが、男性および女性での癌による主要な死因のそれぞれ 4 番目および 5 番目である。膵臓の癌はほぼ常に死に至り、5 年後の生存率は 3 % に満たない。

【 0 0 0 4】

膵臓癌の最も一般的な症状は黄疸、異常な痛みと体重減少であり、これらは存在する他の因子とともに、本質的に特異的なものではない。従って、腫瘍増殖の初期ステージで膵臓癌を診断するのは難しい場合が多く、相当な疑ぐりと徹底的な診断的精密検査（検査の

10

20

30

40

50

ための手術を含む場合が多い)を必要とする。内視鏡超音波検査法およびコンピューター断層撮影法は膵臓癌の診断に現在利用できる最良の非侵襲的手段である。しかし、小さな腫瘍の信頼できる検出、ならびに巣状膵炎から膵臓癌を見分けることは厄介である。残念ながら、現在のところ、大多数の患者は、腫瘍がすでに被膜の外へ広がって周囲の器官へ浸潤し、かつ/または著しく転移した後期ステージで診断されている。Gold et al., Crit. Rev. Oncology/Hematology, 39:147-54 (2001). この疾病の後期検出が一般的で、「初期」膵臓癌の診断は臨床の場ではまれである。

【 0 0 0 5 】

膵臓癌に利用できる現行の治療手順は治癒にも至らず、実質的な生存期間の工場にも至っていない。外科的切除が生存の機会を与える唯一の物理療法である。しかし、腫瘍量が大きい

10

【 0 0 0 6 】

膵臓癌の初期検出および診断、ならびに疾病の適切なステージ判断が生存上の利益の向上をもたらすであろう。いくつかの研究室では、血流中への腫瘍関連マーカーの放出、ならびに生検検体内でのマーカー物質の検出に基づく診断法の開発を進めている。膵臓癌の最良の腫瘍関連マーカーはC A 1 9 . 9の免疫アッセイである。このシアリル化Le^aエピトープ構造のレベルの上昇は膵臓癌患者の70%で見られたが、検査した巣状膵炎検体ではいずれも見られなかった。しかし、C A 1 9 . 9レベルは他のいくつかの悪性および良性症状でも上昇が見られたことから、現在、このアッセイは診断に使用できない。しかし、アッセイはモニタリングには有用であり、術後のC A 1 9 . 9血清レベルにおける継続的上昇は予後が短いことを示す。多くの他のモノクローナル抗体(M A b)は発達の種々のステージで診断のための免疫アッセイを用いて報告されている。これらには、限定されるものではないが、D U P A N 2、S P A N 1、B 7 2 . 3、I a 3および種々の抗C E A抗体が含まれる。

20

【 0 0 0 7 】

人工の抗体、特に、M A bおよび操作抗体または抗体フラグメントが幅広く試験され、膵臓癌、ならびに癌、自己免疫疾患、感染症、炎症性疾患、および心血管疾患をはじめとする他の種々のヒト疾患の検出および治療において重要なものであることがわかってきた[Filpula and McGuire, Exp. Opin. Ther. Patents (1999) 9: 231-245]。抗体または抗体由来薬剤の臨床的有用性は、主として、特定の疾患に関連した特定の標的抗原とのその結合能に依存している。選択性は、とりわけ、診断薬または治療薬が体内の正常組織に対して毒性がある場合に、ヒト疾患の検出および治療段階において診断薬または治療薬、例えば、同位元素、薬物、毒素、サイトカイン、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素阻害剤、オリゴヌクレオチド、増殖因子、オリゴヌクレオチド、放射性核種、脈管形成因子阻害剤、または金属を標的位置に送達するのに有用である。放射性標識抗体は、卵巣癌、結腸癌、およびリンパ腫をはじめとする多くの悪性腫瘍において、ある程度の成功をもって用いられている。またこの技術は、膵臓癌にも有用であることが分かっている。しかし、抗C E A抗体およびB 7 2 . 3以外のものでは臨床上の情報は存在しない。

30

【 0 0 0 8 】

このような抗体系の潜在的な制限については、Goldenberg, The American Journal of Medicine, 94: 298-299 (1993)に記載されている。検出および治療技術において重要なパラメーターは、標的細胞が存在する部位に特異的に局在した注入投与量および摂取率、すなわち、正常組織周辺に存在する放射能濃度に対する特異的に結合した抗体の濃度の比である。抗体を血流に注入すると、それは代謝、排出されるため、多くのコンパートメントを通過する。抗体は位置を突きとめ、標的細胞抗原と結合することが可能でなければならないが、その一方で体の他の部分も通過する。抗原のターゲッティングを制御する因子としては、位置、大きさ、抗原密度、抗原接近可能性、病理組織の細胞組成、およびターゲッティングする抗体の薬物動態学が挙げられる。抗体による腫瘍ターゲッティングに特異的に影響を与えるその他の因子としては、腫瘍およびその他の組織の両方における標的抗

40

50

原の発現、および放射性標識した抗体の血液クリアランスが遅いために起こる骨髄毒性が挙げられる。標的腫瘍細胞が付着するターゲティング抗体の量は、腫瘍の血管新生および腫瘍の抗体浸透を妨げる障害、および腫瘍内圧力によって影響を受ける。特に放射線免疫療法では、非標的器官、例えば、肝臓、腎臓または骨髄による非特異的取り込みがこの技術のもう一つの潜在的制限となり、骨髄照射では線量制限毒性がしばしば起こる。

【0009】

標的部位への薬剤の送達のために提案される一つのアプローチはダイレクト・ターゲティングと呼ばれ、診断用または治療用放射性同位元素を含む抗体を用いて特異的抗原をターゲティングするよう設計された技術である。腫瘍に関しては、このダイレクト・ターゲティングアプローチでは、その抗原によって標的腫瘍を認識する放射性標識抗腫瘍単一特異性抗体を用いる。この技術は標識された単一特性抗体を患者に注入し、標的腫瘍に抗体を局在させ、診断または治療上の効用を得ることを含む。結合していない抗体は体内から除去する。このアプローチは他の哺乳類疾患を診断または治療するためにも使用できる。

10

【0010】

もう一つ提案される解決法は、「親和性増強系 (Affinity Enhancement System, AES)」と呼ばれ、特に、診断用または治療用放射性同位元素を含む抗体による腫瘍ターゲティングの欠陥を克服するよう設計された技術である [米国特許第 5,256,395 号 (1993), Barbet et al., Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 14: 153-166 (1999)]。AES では、放射性標識した二価ハプテンと、標的腫瘍および放射性ハプテンの両方を認識する抗腫瘍 / 抗ハプテン二重特異性抗体を用いる。この手法ではまた、価数のより高いハプテンおよび特異性のより高い抗体を用いてもよい。この技術では、抗体を患者に注入し、それを標的腫瘍に局在させることを含む。結合していない抗体が血流からクリアリングされるに十分な時間の後、放射性標識したハプテンを投与する。ハプテンは標的細胞の部位に局在する抗体 - 抗原複合体と結合し、診断上または治療上の効用が得られ、同時に、結合していないハプテンは体内から急速にクリアリングされる。Barbet は、後者が腫瘍表面と結合すると二価ハプテンが二重特異性抗体と架橋し得るという可能性を記述している。結果として、放射性標識複合体はより安定となり、より長い時間腫瘍に留まる。この系は哺乳類の疾患を診断または治療するために使用できる。

20

【0011】

当該技術分野では、ダイレクト・ターゲティング系で有用な多価多重特異性抗体の生産、および親和性増強系で有用な多価多重特異性抗体の生産の必要がある。詳しくは、膵臓癌に有用な診断手段として働き、かつ、標的抗原において高い取り込みを示し、血中濃度は低く、正常な組織および細胞を有毒な医薬から最適に保護する抗体の必要がある。

30

【発明の概要】

【0012】

本発明では、MUC1 のアミノ末端とリピートドメインの開始部との間に位置するドメインに結合する抗体、融合タンパク質およびそのフラグメントが意図される。ある好ましい態様では、抗体、融合タンパク質およびそのフラグメントは PAM4 抗体である。本発明の PAM4 抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントは、好ましくは膵臓癌のムチンに対して、ムチンを用いた感作および / または選択により誘導される。従って、本発明の PAM4 抗体、融合タンパク質およびそのフラグメントは好ましくは膵臓癌細胞に関連する抗原と結合する。

40

【0013】

ある好ましい態様では、PAM4 抗体またはそのフラグメントはキメラ化されているか、あるいは、PAM4 融合タンパク質はキメラ化 PAM4 抗体またはそのフラグメントを含む。また、PAM4 抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントは少なくとも一つの治療薬および / または診断薬と結合させることができることも好ましい。

【0014】

本明細書では、マウス PAM4 MA b の相補性決定領域 (CDR) およびフレームワ

50

ーク領域 (F R) と、ヒト抗体の軽鎖および重鎖定常領域を含んでなり、キメラ化 P A M 4 M A b の軽鎖可変領域の C D R がアミノ酸配列 S A S S S V S S S Y L Y を含んでなる C D R 1 ; アミノ酸配列 S T S N L A S を含んでなる C D R 2 ; およびアミノ酸配列 H Q W N R Y P Y T を含んでなる C D R 3 を含んでなり ; かつ、キメラ化 P A M 4 M A b の重鎖可変領域の C D R がアミノ酸配列 S Y V L H を含んでなる C D R 1 ; アミノ酸配列 Y I N P Y N D G T Q Y N E K F K G を含んでなる C D R 2 ; およびアミノ酸配列 G F G G S Y G F A Y を含んでなる C D R 3 を含んでなる、マウス P A M 4 抗体またはそのフラグメント、およびキメラ化 P A M 4 抗体またはそのフラグメントが意図される。最も好ましくは、キメラ化 P A M 4 抗体またはそのフラグメントは、図 1 A の P A M 4 V_Kヌクレオチド配列および図 1 B の P A M 4 V_Hヌクレオチド配列を含んでなり、かつ / または図 2 A の c P A M 4 V アミノ酸配列および図 2 B の c P A M 4 V_Hアミノ酸配列を含んでなる。また、好ましくは、マウス P A M 4 抗体またはそのフラグメントは図 1 A の P A M 4 V_Kヌクレオチド配列および図 1 B の P A M 4 V_Hヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 1 5 】

本発明のもう一つの態様は、本発明の抗体、融合タンパク質もしくはそのフラグメントのいずれか一つの抗体またはそのフラグメントを含んでなり、その抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントが少なくとも一種の診断 / 検出薬に結合されている抗体成分を含んでなる癌細胞をターゲッティングする診断免疫複合体である。

【 0 0 1 6 】

好ましくは、診断 / 検出薬は放射性核種、造影剤、および光活性診断 / 検出薬からなる群から選択される。さらに好ましくは、診断 / 検出薬は 2 0 ~ 4 , 0 0 0 k e V の間のエネルギーを有する放射性核種であるか、または、¹¹⁰In、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹⁸F、⁵²Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Zr、^{94m}Tc、⁹⁴Tc、^{99m}Tc、¹²⁰I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵⁴-¹⁵⁸Gd、³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵¹Mn、^{52m}Mn、⁵⁵Co、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、^{82m}Rb、⁸³Sr、またはその他の γ 、 β 、もしくは陽電子放射核種からなる群から選択される放射性核種である。また、好ましくは、診断 / 検出薬は、クロム (III)、マンガ (II)、鉄 (III)、鉄 (II)、コバルト (II)、ニッケル (II)、銅 (II)、ネオジ (III)、サマリウム (III)、イッテルビウム (III)、ガドリニウム (III)、パナジ (II)、テルビウム (III)、ジスプロシウム (III)、ホルミウム (III) およびエルビウム (III) を含んでなる金属などの常磁性イオン、またはバリウム、ジアトリアゾエート、エチオド化オイル、クエン酸ガリウム、イオカルム酸、イオセタム酸、ヨーダミド、ヨーシパミド、ヨードキサム酸、イオグラミド、イオヘキソール、イオパミドール、イオパン酸、イオプロセム酸、イオセファム酸、イオセル酸、イオスラミドメグルミン、イオセメ酸、イオタスル、イオテトル酸、イオサラム酸、イオトロキシ酸、イオキサグル酸、イオキソトリアゾ酸、イボデート、メグルミン、メトリザミド、メトリゾエート、プロピリオドンおよび塩化タリウムなどの放射線不透過性物質である。

【 0 0 1 7 】

また、好ましくは、診断 / 検出薬はフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリセリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o - フタルデヒドおよびフルオロスカミンからなる群から選択される蛍光標識化合物、ルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルからなる群から選択される化学発光標識化合物、またはルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンからなる群から選択される生物発光化合物である。もう一つの態様では、本発明の診断免疫複合体は手術中、内視鏡的、または血管内腫瘍診断に用いられる。

【 0 0 1 8 】

本発明のもう一つの態様は、本発明の抗体、融合タンパク質もしくはそのフラグメントのいずれか一つの抗体またはそのフラグメントを含んでなり、その抗体、融合タンパク質

10

20

30

40

50

またはそのフラグメントが少なくとも一種の治療薬に結合されている抗体成分を含んでなる癌細胞をターゲティングする治療免疫複合体である。

【 0 0 1 9 】

好ましくは、治療薬は放射性核種、免疫調節剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、オリゴヌクレオチド、酵素阻害剤、光活性治療薬、細胞傷害剤、脈管形成阻害剤、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【 0 0 2 0 】

一つの態様では、治療薬はオリゴヌクレオチドである。例えば、このオリゴヌクレオチドは b c 1 - 2 および p 5 3 のような癌遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドなどのアンチセンスオリゴヌクレオチドであってよい。

10

【 0 0 2 1 】

ある好ましい態様では、治療薬は薬物または毒素などの細胞傷害剤である。また、好ましくは、薬物はナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、スルホン酸アルキル、ニトロソウレア、ゲムシタピン、トリアゼン、葉酸類似体、アントラサイクリン、タキサン、C O X - 2 阻害剤、ピリミジン類似体、プリン類似体、抗生物質、酵素、酵素阻害剤、エピドドフィロトキシン、プラチナ錯体、ピンカルカロイド、置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、ホルモンアンタゴニスト、エンドスタチン、タキソール、カンプトセシン、S N - 3 8、ドキシソルピシン、およびそれらの類似体、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗有糸分裂剤、抗脈管形成剤、アポトーシス剤、メトトレキサート、C P T - 1 1、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される。

20

【 0 0 2 2 】

もう一つの態様では、治療薬はリシン、アブリン、アルファトキシン、サポリン、リボヌクレアーゼ (R N アーゼ)、D N アーゼ I、ブドウ球菌 (Staphylococcal) 内毒素 - A、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒、シュードモナス (Pseudomonas) 外毒素、およびシュードモナス内毒素からなる群から選択される毒素、サイトカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血因子、コロニー刺激因子 (C S F)、インターフェロン (I F N)、幹細胞増殖因子、エリスロポエチン、トロンプオエチン、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される免疫調節剤、^{3 2} P、^{3 3} P、^{4 7} S c、^{6 4} C u、^{6 7} C u、^{6 7} G a、^{8 6} Y、^{9 0} Y、^{1 1 1} A g、^{1 1 1} I n、^{1 2 5} I、^{1 3 1} I、^{1 4 2} P r、^{1 5 3} S m、^{1 6 1} T b、^{1 6 6} D y、^{1 6 6} H o、^{1 7 7} L u、^{1 8 6} R e、^{1 8 8} R e、^{1 8 9} R e、^{2 1 2} P b、^{2 1 2} B i、^{2 1 3} B i、^{2 1 1} A t、^{2 2 3} R a および ^{2 2 5} A c、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される放射性核種、または色素原および色素からなる群から選択される光活性治療薬である。

30

【 0 0 2 3 】

さらに好ましくは、治療薬はマレイン酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 δ - V - ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 α - グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β - ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼからなる群から選択される酵素である。

40

【 0 0 2 4 】

本明細書では、P A M 4 標的抗原に対して親和性を有する一を超える抗原結合部位とハブテン分子に対して親和性を有する一以上のハブテン結合部位を含んでなる、多価多重特異性抗体またはそのフラグメントが意図される。好ましくは、抗体またはそのフラグメントはキメラ化 P A M 4 抗体もしくはそのフラグメントである。また、好ましくは、多価多重特異性抗体またはそのフラグメントは診断 / 検出および / または治療薬をさらに含んでなる。

【 0 0 2 5 】

50

本明細書ではまた、PAM4 標的抗原に対して親和性を有する少なくとも一つの結合部位と、少なくとも一種の診断薬および/または治療薬を運び得る

【化1】

DOTA-D-Asp-D-Lys(HSG)-D-Asp-D-Lys(HSG)-NH₂ (IMP 271);

DOTA-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂ (IMP 277);

DOTA-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂ (IMP 288);

DOTA-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂ (IMP 0281);

DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-NH₂ (IMP 284),

10

からなる群から選択されるターゲッティング可能な構築物/複合体に対して親和性を有する少なくとも一つの結合部位を含んでなる、二重特異性抗体またはそのフラグメントが記載される。本発明で用いるのに好適な他のターゲッティング可能な構築物が、「D-アミノ酸ペプチド」と題された、2003年6月13日出願の米国仮出願(McBride)、代理人整理番号018733/1206に開示されている。

【0026】

本発明のもう一つの態様は、少なくとも二つのPAM4 MAbまたはそのフラグメントを含んでなり、そのMAbまたはそのフラグメントが本発明の抗体およびそのフラグメントのいずれかを含んでなる、抗体融合タンパク質またはそのフラグメントである。また、好ましくは、抗体融合タンパク質またはそのフラグメントは本発明の抗体およびそのフラグメントのいずれか一つの、少なくとも一種の第一のPAM4 MAbまたはそのフラグメントと、本発明の抗体およびそのフラグメントのMAbまたはそのフラグメント以外の、少なくとも一種の第二のMAbまたはそのフラグメントを含んでなる。好ましくは、第二のMAbは、CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72.3、CC49、CEA、aLe^a、Lewis抗原Le(y)により定義される抗体、およびCSApに対する抗体、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、TAG-72、EGFR、CD40、脈管形成因子(例えば、VEGF)、インスリン様増殖因子(IGF)、テネニン、血小板由来増殖因子、IL-6、癌遺伝子の産物およびHER2/neuからなる群から好ましくは選択される癌腫関連抗体である。本発明の抗体融合タンパク質またはそのフラグメントは少なくとも一種の診断および/または治療薬をさらに含み得る。

20

【0027】

また、本発明では、

(a) 本明細書に記載の抗体のいずれか一つのPAM4抗体またはそのフラグメント;

(b) (a)に記載の少なくとも二種のMAbまたはそのフラグメントを含んでなる抗体融合タンパク質またはそのフラグメント;

(c) 本発明のPAM4抗体またはそのフラグメントの該MAbまたはそのフラグメントを含んでなる少なくとも一種の第一のPAM4 MAbまたはそのフラグメントと、本発明の抗体またはそのフラグメントのいずれか一つのMAbまたはそのフラグメント以外の、少なくとも一種の第二のMAbまたはそのフラグメントを含んでなる抗体融合タンパク質またはそのフラグメント; ならびに

40

(d) 本発明の抗体またはそのフラグメントのいずれか一つの該MAbまたはそのフラグメントを含んでなる少なくとも一種の第一のMAbまたはそのフラグメントと、本発明の抗体またはそのフラグメントのいずれか一つのMAbまたはそのフラグメント以外の、少なくとも一種の第二のMAbまたはそのフラグメントを含んでなり、該第二のMAbが癌関連抗体である、抗体融合タンパク質またはそのフラグメント

からなる群から選択されるMAbまたはそのフラグメントをコードする核酸を含んでなるDNA配列である。好ましくは、この癌関連抗体は、CA19.9、DUPAN2、SP

50

AN1、Nd2、B72.3、CC49、CEA、aLe^a、Lewis抗原Le(y)により定義される抗体、CD40、および脈管形成因子(例えば、VEGF)、インスリン様増殖因子(IGF)、テネイシン、血小板由来増殖因子、IL-6、癌遺伝子の産物、MUC1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、TAG-72、EGFR、およびHER2/neuからなる群から選択される。

【0028】

また、本発明には、本発明の抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントのいずれか一つのDNA配列を含んでなる発現ベクターおよび宿主細胞が記載される。

【0029】

本発明のもう一つの態様は、診断薬もしくは治療薬またはそれらの組み合わせを標的に送達する方法であって、(i)少なくとも一種の診断/検出薬および/または治療薬に結合されたPAM4抗体またはそのフラグメントを含んでなる組成物を準備すること、および(ii)本発明の抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントのいずれか一つの診断または治療複合体をそれを必要とする被験体に投与することを含んでなる方法である。好ましくは、診断/検出薬は放射性核種、造影剤、および光活性診断/検出薬からなる群から選択され、治療薬は好ましくは薬物、毒素、細胞傷害剤、サイトカイン、免疫調節剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、増殖因子、放射性核種からなる群から選択される。

【0030】

また、本明細書では、診断/検出薬、治療薬またはそれらの組み合わせを標的に送達する方法であって、(a)PAM4抗原に対して親和性を有し、かつ、一以上のハプテン結合部位を含む本発明の多価多重特異性抗体またはそのフラグメントのいずれか一つの抗体またはそのフラグメントを被験体に投与すること；(b)一定量の非抗体が被験体の血流からクリアリングされるに十分な時間待つこと；および(c)該被験体に、該抗体の結合部位と結合する、診断/検出薬、治療薬またはそれらの組み合わせを含んでなる担体分子を投与することを含んでなる方法が意図される。好ましくは、この担体分子は抗体の一を超える結合部位に結合する。さらに好ましくは、この診断/検出薬または治療薬は、同位元素、薬物、毒素、サイトカイン、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素阻害剤、増殖因子、放射性核種、オリゴヌクレオチドおよび金属からなる群から選択される。

【0031】

一つの態様では、bcl-2発現を阻害するアンチセンス分子などのオリゴヌクレオチドが、引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする米国特許第5,734,033号(Reed)に記載されており、本発明の免疫複合体または抗体融合タンパク質の治療薬部分に結合されているか、または治療薬部分を形成し得る。あるいは、このオリゴヌクレオチドはPAM4抗体またはそのフラグメントと同時に投与してもよいし、逐次投与してもよい。ある好ましい態様では、このオリゴヌクレオチドは癌遺伝子またはbcl-2などB細胞悪性腫瘍の癌遺伝子産物に対して向けられていることが好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0032】

本発明では、癌を診断または治療する方法であって、(a)PAM4抗原に対して親和性を有し、かつ、一以上のハプテン結合部位を含む本発明の多価多重特異性抗体またはそのフラグメントのいずれか一つの抗体またはそのフラグメントをそれを必要とする被験体に投与すること；(b)一定量の非抗体が被験体の血流からクリアリングされるに十分な時間待つこと；および(c)該被験体に、該抗体の結合部位と結合する、診断/検出薬、治療薬またはそれらの組み合わせを含んでなる担体分子を投与することを含んでなる方法が記載される。ある好ましい態様では、癌は膵臓癌である。また、好ましくは、この方法は罹患組織の手術中同定、罹患組織の内視鏡的同定、または罹患組織の血管内同定に使用できる。

【0033】

本発明のもう一つの態様は、被験体において悪性腫瘍を治療する方法であって、(a)該被験体に、PAM4 MA bもしくはそのフラグメント、または本発明の抗体、融合タ

10

20

30

40

50

ンパク質もしくはそのフラグメントのいずれか一つの抗体融合タンパク質またはそのフラグメントを含んでなり、該 P A M 4 M A b もしくはそのフラグメント、または抗体融合タンパク質もしくはそのフラグメントが少なくとも一種の治療薬に結合されている、治療上有効量の抗体またはそのフラグメントを投与すること；および (b) 該 P A M 4 M A b もしくはそのフラグメント、または抗体融合タンパク質もしくはそのフラグメントを医薬上好適な賦形剤中に調剤することを含んでなる方法である。好ましくは、この方法は、本発明の抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントのいずれでもない第二の M A b またはそのフラグメントをさらに含んでなる。さらに好ましくは、この第二の M A b またはそのフラグメントは裸の M A b またはそのフラグメントである。また、好ましくは、第二の M A b またはそのフラグメントは C A 1 9 . 9、D U P A N 2、S P A N 1、N d 2、B 7 2 . 3、C C 4 9、C E A、a L e ^a、L e w i s 抗原 L e (y) により定義される抗体、C S A p に対する抗体、M U C 1、M U C - 2、M U C - 3、M U C - 4、T A G - 7 2、E G F R、C D 4 0、脈管形成因子 (例えば、V E G F)、インスリン様増殖因子 (I G F)、テネイシン、血小板由来増殖因子、I L - 6、癌遺伝子の産物、および H E R 2 / n e u からなる群から選択される。

10

【 0 0 3 4 】

本明細書では、被験体において悪性腫瘍を診断する方法であって、(a) 該被験体に、P A M 4 M A b もしくはそのフラグメント、または本発明の抗体、融合タンパク質もしくはそのフラグメントのいずれか一つの P A M 4 抗体融合タンパク質またはそのフラグメントを含んでなり、該 P A M 4 M A b もしくはそのフラグメント、または P A M 4 抗体融合タンパク質もしくはそのフラグメントが少なくとも一種の診断 / 検出薬に結合されている、診断上有効量の診断複合体を投与すること；および (b) 所望により、該 P A M 4 M A b もしくはそのフラグメント、または抗体融合タンパク質もしくはそのフラグメントを医薬上好適な賦形剤中に調剤することを含んでなる方法が意図される。

20

【 0 0 3 5 】

本発明のもう一つの態様は、被験体において癌細胞を治療する方法であって、(i) 該被験体に、裸の P A M 4 M A b もしくはそのフラグメント、または本発明の裸の抗体、融合タンパク質もしくはそのフラグメントのいずれか一つの、裸の抗体融合タンパク質もしくはそのフラグメントを含んでなる、治療上有効量の組成物を投与すること、および (ii) 該裸の P A M 4 M A b もしくはそのフラグメント、または抗体融合タンパク質もしくはそのフラグメントを医薬上好適な賦形剤中に調剤することを含んでなる方法である。好ましくは、この方法は、本発明の裸の抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントのいずれでもない第二の裸の抗体またはそのフラグメントをさらに含んでなる。例えば、この第二の抗体またはそのフラグメントは C A 1 9 . 9、D U P A N 2、S P A N 1、N d 2、B 7 2 . 3、C C 4 9、C E A、a L e ^a、L e w i s 抗原 L e (y) により定義される抗体、C S A p、M U C 1、M U C - 2、M U C - 3、M U C - 4、T A G - 7 2、E G F R、C D 4 0、脈管形成因子 (例えば、V E G F)、インスリン様増殖因子 (I G F)、テネイシン、血小板由来増殖因子、I L - 6、癌遺伝子の産物、および H E R 2 / n e u からなる群から選択され得る。

30

【 0 0 3 6 】

本発明はまた、被験体において悪性腫瘍を診断する方法であって、(i) 裸の P A M 4 M A b もしくはそのフラグメント、または本発明の裸の抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントのいずれか一つの裸の抗体融合タンパク質もしくはそのフラグメントを含んでなる組成物を用いて、該被験体からの検体に対して in vitro 診断アッセイを行うことを含んでなる方法を記載する。好ましくは、悪性腫瘍は癌である。さらに好ましくは、癌は膵臓癌である。

40

【 0 0 3 7 】

本発明のもう一つの態様は、被験体において P A M 4 抗原を発現する罹患組織を手術中に同定する方法であって、(A) P A M 4 抗原を発現する標的組織と特異的に結合する少なくとも一つのアームと、ターゲッティング可能な複合体と特異的に結合する少なくとも

50

一つの他のアームを含んでなる、有効量の二重特異性抗体または抗体フラグメントを投与すること（ここで、標的組織と特異的に結合する該一つのアームはc P A M 4 抗体またはそのフラグメントである）；および（ B ）下記：

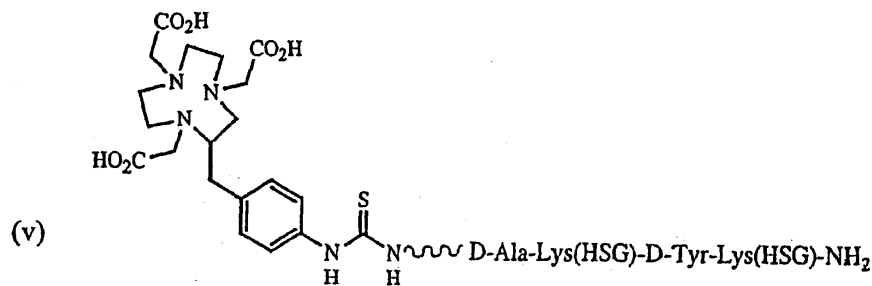
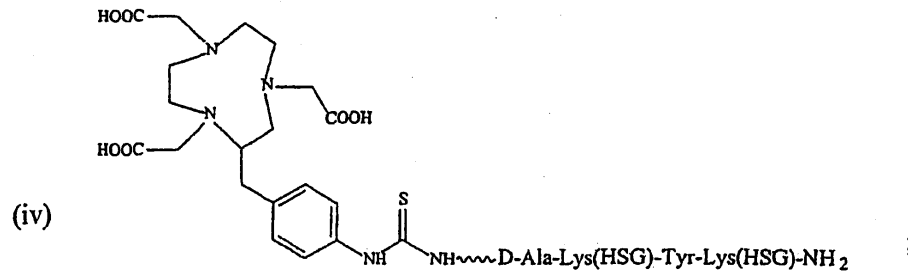
【化 2】

(i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂;

(ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂;

(iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;

10



20

からなる群から選択されるターゲッティング可能な複合体を投与することを含んでなる方法である。

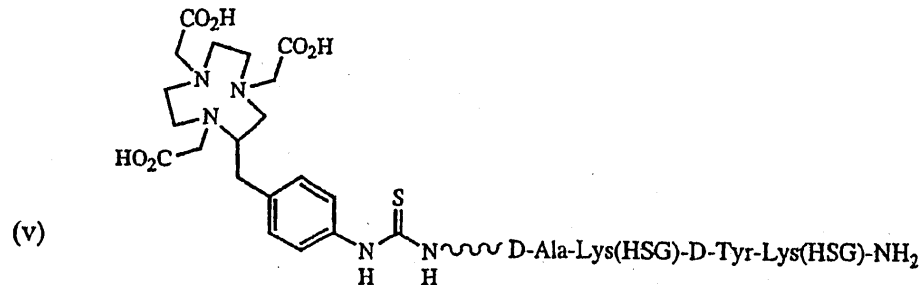
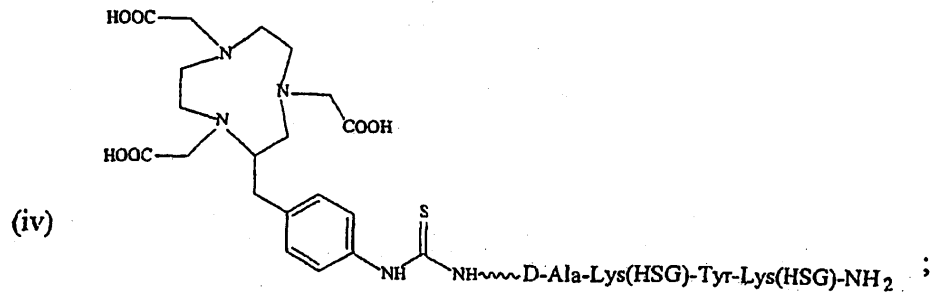
30

【 0 0 3 8 】

また本明細書には、被験体において P A M 4 抗原を発現する罹患組織を内視鏡的に診断する方法であって、（ A ） P A M 4 抗原を発現する標的組織と特異的に結合する少なくとも一つのアームと、ターゲッティング可能な複合体と特異的に結合する少なくとも一つのアームを含んでなる、有効量の二重特異性抗体または抗体フラグメントを投与すること（ここで、標的組織と特異的に結合する該一つのアームはc P A M 4 抗体またはそのフラグメントである）；および（ B ）下記：

【化 3】

- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂;
- (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂;
- (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;



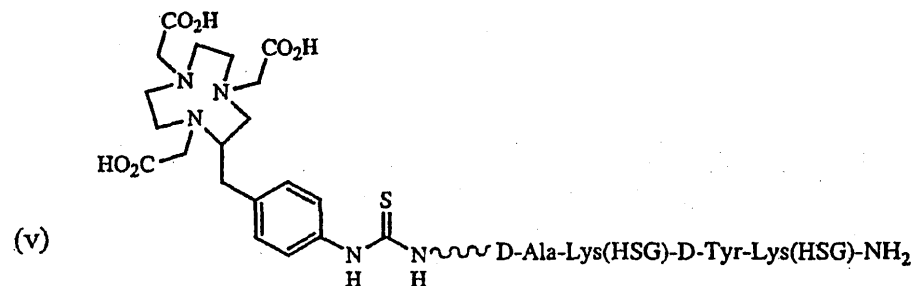
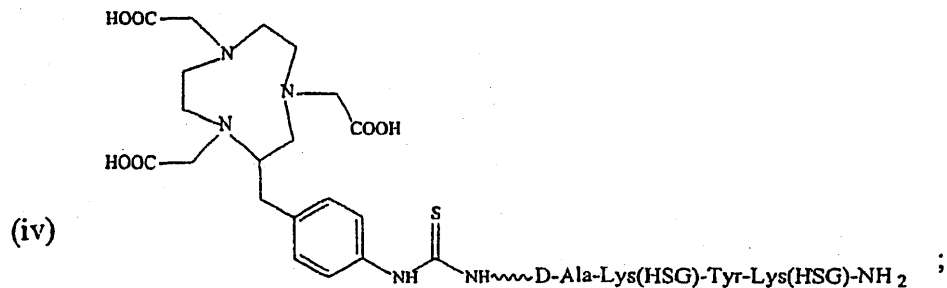
からなる群から選択されるターゲッティング可能な複合体を投与することを含んでなる方法も記載される。

【0039】

本明細書では、被験体においてPAM4抗原を発現する罹患組織を血管内同定する方法であって、(A)PAM4抗原を発現する標的組織と特異的に結合する少なくとも一つのアームと、ターゲッティング可能な複合体と特異的に結合する少なくとも一つの他のアームを含んでなる、有効量の二重特異性抗体または抗体フラグメントを投与すること(ここで、標的組織と特異的に結合する該一つのアームはcPAM4抗体またはそのフラグメントである);および(B)下記:

【化 4】

- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂;
- (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂;
- (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;



からなる群から選択されるターゲッティング可能な複合体を投与すること
を含んでなる方法が意図される。

【0040】

もう一つの態様は、内視鏡手順、血管内カテーテル、または手術中に病変部を検出する方法であって、(a)このような手順を受ける被験体に二重特異性抗体F(ab)₂またはそのF(ab')₂フラグメント、ダイアボディー、トリアボディー、またはテトラボディーを注射し(ここで、該二重特異性抗体またはそのフラグメント、ダイアボディー、トリアボディー、またはテトラボディーは、PAM4抗原と特異的に結合する第一の抗体結合部位を有し、かつ、ハプテンと特異的に結合する第二の抗体結合部位を有する)、この抗体フラグメントを標的部位に結合させること;(b)所望により、この二重特異性フラグメントが注射から約24時間以内に循環からあまりクリアリングされない場合には、ガラクトシル化抗イディオタイプクリアリング剤を用いて非標的抗体フラグメントをクリアリングし、標的部位に迅速に局在し、腎臓からクリアリングする二価の標識ハプテンを注射すること;(c)最初の注射から48時間以内に、検出手段を用いて、標的部位における付着標識の上昇レベルの近距離検出によりハプテンの存在を検出し、該手順を行うこと(ここで、該検出は造影剤またはサブトラクション剤を用いずに行われる)を含んでなる方法である。

【0041】

手術、血管内手順、内視鏡手順中の近距離病変部検出のための方法であって、(a)このような手順に対する被験体に有効量のcPAM4免疫複合体またはそのフラグメントを非経口注射すること;(b)注射から48時間以内にその手順を行うこと;(c)該標識抗体またはそのフラグメントの存在を検出するための検出手段を用いて、接近を受けた被

験体内部を近距離でスキャンすること；および（d）検出手段で、このような部位における該標識抗体またはそのフラグメントの上昇レベルを検出することにより、該標識抗体またはそのフラグメントの付着部位を限局化することを含んでなる方法も本発明で意図される。

【発明の具体的な説明】

【0042】

概説

特に断りのない限り、単数形表現の名詞は複数形の場合も意味する。本明細書において「PAM4抗体」は、マウスおよびキメラ化PAM4抗体を含む。

【0043】

本発明は膵臓癌の診断、検出、ステージ判定、および治療に有用なモノクローナル抗体PAM4に関する。好ましくは、本発明のPAM4抗体およびそのフラグメントはキメラ化されている。マウスPAM4（mPAM4）抗体は、異種移植されたRIP-1ヒト膵臓癌腫に由来する膵臓癌ムチンを免疫原として用いることにより開発されたMUC1抗体である。Gold et al., Int. J Cancer, 57:204-210 (1994). このmPAM4抗体は標的膵臓癌抗原上の独特かつ新規なエピトープを認識する。実施例1に記載されているものなどの免疫組織化学染色研究では、PAM4 MA bが、乳癌、膵臓癌およびその他の癌細胞によって発現されたMUC1抗原のアミノ末端とリピートドメインの開始部の間に位置するドメインに結合し、正常なヒト組織には結合が制限されることが示されている。本発明のPAM4抗体は相対的に膵臓癌に特異的であることから、膵臓癌細胞と優先的に結合する。ある好ましい態様では、PAM4抗体およびそのフラグメントはキメラ化されている。PAM4抗体は膵臓癌に関連するが、膵炎には関連しない抗原によって主として発現される標的エピトープと反応性がある。動物モデルにおいて放射性標識PAM4 MA bを用いた限局化および治療研究では、腫瘍ターゲティングおよび治療効果が示されている。

【0044】

本発明のPAM4抗体は、多くの器官および腫瘍種によって産生される抗原である、MUC1のアミノ末端とリピートドメインの開始部の間に位置するドメインであるPAM4抗原と結合する。本発明の好ましいPAM4抗体は膵臓癌細胞と優先的に結合する。実施例2のPAM4 MA bなどのPAM4 MA bを用いた研究では、この抗体がいくつかの重要な特性を示し、臨床診断および治療適用の候補となることが示されている。PAM4抗原は診断および治療に有用な標的となるので、初期の研究で記載されている非PAM4抗体（CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72.3、aLe^a、およびLewis抗原）により認識されるエピトープとは異なる膵臓癌抗原のエピトープを認識するMA bを得ることが望ましい。

【0045】

本発明のPAM4抗体と組み合わせて、またはともに用いるのに好適な抗体としては、例えば、癌胎児性抗原（CEA）、結腸特異的抗原-p（CSAp）、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、B72.3、Le(y)、HER2/neu、EGFR、脈管形成因子（例えば、VEGF）、インスリン様増殖因子（IGF）、テネイシン、血小板由来増殖因子およびIL-6に対する抗体、ならびに癌遺伝子の産物に対するもの、およびEpstein et al.による特許（米国特許第6,071,491号、同第6,017,514号、同第5,019,368号および同第5,882,626号）に記載のものなど、腫瘍壊死物質に対する抗体が挙げられる。このような抗体は現行のPAM4抗体免疫検出および免疫治療法を補うのに有用であろう。治療適用では、腫瘍細胞に対するエフェクター細胞機能に関与する免疫調節剤に促進作用または阻害作用のある抗体もまた、PAM4抗体単独または他の腫瘍関連抗体（一例としてCD40に対する抗体がある）と組み合わせたPAM4抗体と組み合わせると有用であり得る。Todryk et al., J Immunol Methods, 248:139-147(2001); Turner et al., J Immunol, 166:89-94 (2001). また、癌遺伝子のマーカーもしくは産物に対する抗体、またはVEGFなどの脈管形成因子に対する抗体も

用いられる。V E G F 抗体は、Thorpe et al, 米国特許第 6 , 3 4 2 , 2 2 1 号、同第 5 , 9 6 5 , 1 3 2 号および同第 6 , 0 0 4 , 5 5 4 号に記載されており、引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする。

【 0 0 4 6 】

さらに、臨床サンプル中で P A M 4 抗原を検出するのに有用な二重決定基固相酵素免疫検定法 (E L I S A) の開発のためには、別の P A M 4 様抗体が利用できることが不可欠である。E L I S A 実験は実施例 5 に記載されている。

【 0 0 4 7 】

本発明は M U C 1 抗原のアミノ末端とリピートドメインの開始部の間に位置するドメインに結合し、かつ、診断および治療法に使用できるマウスおよびキメラ抗体およびそのフラグメントを記載する。ある好ましい態様では、P A M 4 抗体はキメラ化されている。本明細書で開示されているようなキメラ抗体は、ある種に由来する抗体、好ましくは齧歯類抗体の相補性決定領域 (C D R) を含む可変ドメインを含む組換えタンパク質であり、同時に、抗体分子の定常ドメインはヒト抗体のものに由来するものである。獣医学適用に関しては、このキメラ抗体の定常ドメインは他の種のものに由来するものであってよい。非ヒトモノクローナル抗体はヒト宿主によっては外来タンパク質として認識され、繰り返し注射すると体液性の過敏反応を招く可能性があることから、マウス P M A 4 抗体またはそのフラグメントのキメラ化は患者が受け得る有害な免疫応答を軽減することができる。マウスに基づくモノクローナル抗体に関しては、これはしばしばヒト抗マウス抗体 (H A M A) 応答と呼ばれる。

【 0 0 4 8 】

本発明の抗体およびそのフラグメントは、ヒト膵臓腫瘍由来の粗ムチン調製物に対して惹起するのが好ましい。これに関して、これに関して、P A M 4 抗体は P A M 4 抗原の実質的に純粋な調製物を用いて得ることができる。実質的に純粋なタンパク質とは、本来そのタンパク質に伴っている細胞成分が実質的に混入しないタンパク質である。

【 0 0 4 9 】

定義

以下の説明において、多数の専門用語が使用されており、以下、本発明の理解を容易にするために定義を示す。

【 0 0 5 0 】

本明細書において、抗体とは、全長 (すなわち、天然に存在するまたは通常の免疫グロブリン遺伝子フラグメント組換えプロセスにより形成される) 免疫グロブリン分子 (例えば I g G 抗体)、または抗体フラグメントのような、免疫グロブリン分子の免疫学的に有効な (すなわち、特異的に結合する) 部分をいう。

【 0 0 5 1 】

抗体フラグメントとは、F (a b ') ₂、F (a b) ₂、F a b '、F a b、F v、s c F v などのような抗体の部分を用いる。構造に関係なく、抗体フラグメントは全長抗体により認識される同じ抗原と結合する。例えば、抗 C D 2 0 モノクローナル抗体フラグメントは、C D 2 0 のエピトープと結合する。「抗体フラグメント」とはまた、特定の抗原に結合して複合体を形成することにより抗体のようにふるまういずれの合成または遺伝子操作タンパク質も含む。例えば、抗体フラグメントとしては、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「F v」フラグメントのような可変領域からなる単離されたフラグメント、軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリンカー (「s c F v タンパク質」) により接続されている組換え単鎖ポリペプチド分子、および超過変領域を模倣したアミノ酸残基からなる最小認識ユニットが挙げられる。

【 0 0 5 2 】

裸の抗体 (naked antibody) は一般的に治療薬または診断 / 検出薬と結合していない抗体である。しかし、それはまた診断 / 検出薬または治療薬と結合していない抗体フラグメントであってもよい。これは抗体分子の F c 部分が、細胞溶解を引き起こす作用をするようメカニズムを設定する補体結合および A D C C (抗体依存性細胞傷害) のようなエフェク

ター機能を提供するためである。しかし、治療機能のためにはこのFc部分は必要なく、アポトーシスなどの他のメカニズム機能を果たす可能性がある。裸の抗体には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の双方、ならびに融合タンパク質、およびキメラ、ヒト化またはヒト抗体のようなある種の組換え抗体が含まれる。

【0053】

キメラ抗体は、一つの種、好ましくは齧歯類の抗体由来の抗体の相補性決定領域(CDR)を含む可変ドメインを含み、この抗体分子の定常ドメインはヒト抗体の定常領域に由来する組換えタンパク質である。獣医学領域への適用のためには、このキメラ抗体の定常ドメインは、ネコまたはイヌのような他の種由来のものであってもよい。

【0054】

ヒト化抗体(humanized antibody)は、一つの種、例えば齧歯類抗体由来の抗体のCDRが齧歯類抗体のHおよびL可変鎖からヒトHおよびL可変ドメインに移された組換えタンパク質である。抗体分子の定常ドメインは、ヒト抗体の定常ドメインに由来する。

【0055】

ヒト抗体は、抗原刺激に応答して特定のヒト抗体を産生するために「操作された」トランスジェニックマウスから得られる抗体である。この技術では、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子座のエLEMENTが、内在性重鎖および軽鎖遺伝子座が標的破壊されている胚幹細胞株由来のマウス系統に導入される。このトランスジェニックマウスはヒト抗原に特異的なヒト抗体を合成することができ、このマウスをヒト抗体を分泌するハイブリドーマを作製するために使用することができる。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得るための方法は、Green et al., Nature Genet. 7:13 (1994), Lonberg et al., Nature 368:856 (1994), およびTaylor et al., Int. Immun. 6:579(1994)に記載されている。完全ヒト抗体はまた、遺伝子または染色体トランスフェクション法ならびにファージディスプレイ技術により構築でき、これらは総て当該技術分野で公知である。例えば、非免疫ドナー由来の免疫グロブリン可変ドメイン遺伝子レパートリーからのin vitroにおけるヒト抗体およびそのフラグメントの産生に関しては、McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)を参照。この技術では、抗体可変ドメイン遺伝子がフレーム内で糸状バクテリオファージの主要または微量コートタンパク質遺伝子へクローニングされ、機能的抗体フラグメントとしてファージ粒子表面上に提示される。この糸状粒子はファージゲノムの単鎖DNAコピーを含み、抗体の機能特性に基づいて選択すれば、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子が選択されることになる。このように、ファージはB細胞のいくつかの特性を模倣する。ファージディスプレイはさまざまな形式で行うことが可能であり、総説としては例えば、Johnson and Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571 (1993)を参照。

【0056】

ヒト抗体はまた、in vitro活性化B細胞により産生させることができる。引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする、米国特許第5,567,610号および同第5,229,275号を参照。

【0057】

治療薬は、個別に、同時にまたは逐次に、抗体部分とともにまたは抗体部分(すなわち抗体、または抗体フラグメント、またはサブフラグメント)と結合させて投与される分子または原子であり、疾病の治療に有用である。治療薬の例としては、抗体、抗体フラグメント、薬物、毒素、ヌクレアーゼ、ホルモン、免疫調節剤、キレート剤、ホウ素化合物、光活性薬または色素および放射性同位元素が挙げられる。

【0058】

診断/検出薬は、抗体部分(すなわち抗体、または抗体フラグメント、またはサブフラグメント)と結合させて投与される分子または原子であり、その抗原を含む細胞を限局化することにより疾病の診断に有用である。有用な診断/検出薬としては、限定されるものではないが、放射性同位元素、色素(ビオチン-スト렙トアビジン複合体など)、造影剤、蛍光化合物または分子、および核磁気共鳴イメージング(MRI)のための増強剤(

10

20

30

40

50

例えば、常磁性イオン）などがある。米国特許第 6,331,175 号は MRI 技術および MRI 増強剤に結合させた抗体の調製について記載しており、その全開示内容は引用することにより本明細書の一部とする。好ましくは、これらの診断/検出薬は放射性同位元素、核磁気共鳴イメージングで使用する増強剤、および蛍光化合物からなる群から選択される。抗体成分に放射性金属または常磁性イオンを付加するためには、イオンを結合させるための多様なキレート基を付着させた長いテールを有する試薬と反応させる必要がある。このようなテールは、ポリリシン、多糖、または例えばエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、ビス-チオセミカルバゾン、ポリミキシン、およびこの目的のために有用なことが公知の基といった、キレート基に結合できるペンダント基を有する他の誘導体化または誘導体化可能な鎖であり得る。キレート剤は標準的な化学法を用いて抗体に結合させる。キレート剤は通常、免疫反応性の損失が最小で、凝集および/または内部架橋が最小となる分子との結合を形成し得る基により抗体に連結される。キレート剤を抗体に結合させるその他の、もっと特殊な方法および試薬は、1989年4月25日出願の「Antibody Conjugates」と題されたHawthorneの米国特許第 4,824,659 号に開示されており、その開示内容は引用することにより本明細書の一部とする。特に有用な金属-キレートの組み合わせとしては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{18}F 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O および ^{76}Br のような一般エネルギー範囲 60 ~ 400 keV の診断用同位元素とともに用いられる 2-ベンジル DTPA ならびにそのモノメチルおよびシクロヘキシル類似体が含まれ、ラジオイメージングに用いられる。同じキレート剤がマンガン、鉄およびガドリニウムのような非放射性金属と錯化した場合は、本発明の抗体とともに使用すると MRI に有用である。NOTA、DOTA、および TETA のような大環状のキレート剤は種々の金属および放射性金属とともに、最も詳しくは、それぞれガリウム、イットリウム、および銅などの放射性核種とともに用いられる。このような金属-キレート錯体は、環のサイズを目的の金属にあわせて調整することにより極めて安定にすることができる。大環状ポリエーテルのような他のリング型キレート剤は、RAIT のための ^{223}Ra のような、安定に結合する核種を対照とするものであり、本発明に包含される。

【0059】

免疫複合体 (immunoconjugate) は、少なくとも一種の治療薬および/または診断/検出薬に結合された抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントである。診断/検出薬は、放射性核種または非放射性核種、造影剤 (核磁気共鳴イメージング、コンピューター断層撮影法または超音波診断法など) を含んでなり、この放射性核種は γ 、 β 、 α 、オージェ電子、または陽電子放射性同位元素であり得る。

【0060】

発現ベクターは、宿主細胞中で発現される遺伝子を含んでなる DNA 分子である。通常、遺伝子発現は構成または誘導プロモーター、組織特異的調節エレメントおよびエンハンサーをはじめとする、特定の調節エレメントの制御下に置かれる。このような遺伝子は調節エレメントに「作動可能なように連結されている」といわれる。

【0061】

組換え宿主は、クローニングベクターまたは発現ベクターのどちらかを含む任意の原核または真核細胞であってもよい。この語はまた、それらの原核または真核細胞、ならびに宿主細胞の染色体もしくはゲノム、または宿主細胞の細胞中にクローニングされた遺伝子を含むように遺伝子操作されたトランスジェニック動物も含む。好適な哺乳類宿主細胞としては、SP2/0 細胞および NS0 細胞のような骨髓腫細胞、ならびにチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ハイブリドーマ細胞株および抗体発現に有用な他の哺乳類宿主細胞が挙げられる。また、mAb および他の融合タンパク質の発現に特に有用なものは WO 0063403 A2 に開示されているヒト細胞株 PER.C6 であり、CHO、COS、Ver o、HeLa、BHK および SP2 などの従来の哺乳類細胞株に比べて 2 ~ 200 倍の組換えタンパク質を産生する。免疫系が改変された特別なトランスジェ

10

20

30

40

50

ニック動物は完全なヒト抗体を作製するために特に有用である。

【 0 0 6 2 】

本明細書において、抗体融合タンパク質とは、特異性が同じまたは異なる二以上の同じまたは異なる天然抗体、単鎖抗体もしくは抗体フラグメントのセグメントが連結されている、組換え生産された抗原結合分子である。融合タンパク質の原子価は、この融合タンパク質が抗原またはエピトープに対して有している結合アームまたは結合部位の総数を示し、すなわち、一価、二価、三価または多価などである。抗体融合タンパク質が多価であるということは、抗原に対する結合において複数の相互作用を利用できることを意味し、従って、抗原に結合する結合力が高まる。特異性は、抗体融合タンパク質がいくつの抗原またはエピトープに結合できるかを示し、すなわち、一重特異性、二重特異性、三重特異性、多重特異性などである。これらの定義により、例えば I g G のような天然の抗体は、結合腕を二本持つために二価であるといえるが、この抗体は一つのエピトープに結合するために一重特異性である。一重特異性、多価融合タンパク質は、エピトープに対して一を超える結合部位を有するが、同じ抗原上の同じまたは異なるエピトープとしか結合せず、例えばダイアボディーは同じ抗原と反応性のある二つの結合部位を有する。融合タンパク質、異なる抗体成分の多価もしくは多重特異性の組み合わせ、または同じ抗体成分の複数のコピーを含んでもよい。この融合タンパク質はさらに治療薬を含んでもよい。このような融合タンパク質に好適な治療薬の例としては、免疫調節剤（「抗体-免疫調節剤融合タンパク質」）および毒素（「抗体-毒素融合タンパク質」）が挙げられる。好ましい一つの毒素としては、リボヌクレアーゼ（R N アーゼ）であり、好ましくは組換え R N アーゼである。

10

20

【 0 0 6 3 】

多重特異性抗体(multispecific antibody)は、同時に少なくとも二つの異なる構造の標的、例えば二つの異なる抗原、同じ抗原上の二つの異なるエピトープ、またはハプテンおよび/または抗原、もしくはエピトープに結合できる抗体である。一つの特異性は、B細胞、T細胞、骨髄性細胞、形質細胞および肥満細胞抗原またはエピトープに対するものであろう。もう一つの特異性は、B細胞上の C D 2 0、C D 1 9、C D 2 1、C D 2 3、C D 4 6、C D 8 0、H L A - D R、C D 7 4、M U C 1 および C D 2 2 のような、同じ細胞種上の異なる抗原に対するものであり得る。多重特異性、多価抗体は一を超える結合部位を有する構築体であり、その結合部位は異なる特異性を有する。例えばダイアボディーでは、一つの結合部位は一つの抗原と反応し、もう一方は他の抗原と反応する。

30

【 0 0 6 4 】

二重特異性抗体(bispecific antibody)は、同時に二つの異なる構造の標的に結合できる抗体である。二重特異性抗体 (b s A b) および二重特異性抗体フラグメント (b s F a b) は、例えば、B細胞、T細胞、骨髄性細胞、形質細胞および肥満細胞抗原またはエピトープに特異的に結合する少なくとも一つのアーム、および治療薬または診断/検出薬を担持するターゲティング可能な複合体に特異的に結合する少なくとも一つの他のアームを有する。分子工学技術を用いて種々の二重特異性融合タンパク質を作製できる。一つの形態においては、二重特異性融合タンパク質は一価であり、例えば一つの抗原に対する一つの結合部位を有する s c F v と第二の抗原に対する単一結合部位を有する F a b フラグメントからなる。もう一つの形態においては、この二重特異性融合タンパク質は二価であり、例えば一つの抗原に対する一つの結合部位を有する I g G および第二の抗原に対する二つの結合部位を有する二つの s c F v からなる。

40

【 0 0 6 5 】

キメラ化 P A M 4 体の調製

特定の抗原に対するモノクローナル抗体は当業者に公知の方法により得ることができる。例えば、Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975)、および Coligan et al.(eds.) , CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, pages 2.5. 1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) [以下「Coligan」]を参照。要するに、P A M 4 M A b は、マウスに P A M 4 抗原を含む組成物を注射し、血清サンプルを採取して抗体産生の存在を確認し、脾臓を摘出

50

してBリンパ球を採取し、そのBリンパ球と骨髓腫細胞を融合させてハイブリドーマを作製し、そのハイブリドーマをクローニングし、PAM4抗原に対する抗体を産生する陽性クローンを選択し、PAM4抗原に対する抗体を産生するクローンを培養し、PAM4抗体をハイブリドーマ培養物から単離することにより得ることができる。本発明のPAM4抗体はPAM4抗原、すなわち、MUC1のアミノ末端とリピートドメインの開始部の間に位置するドメインと結合する。本発明のPAM4抗体は膵臓癌細胞と優先的に結合する。

【0066】

免疫原に対する最初の抗体惹起の後に、その抗体の配列を決定し、次いで組換え技術により作製することができる。マウス抗体および抗体フラグメントのキメラ化は当業者に周知である。キメラ化モノクローナル抗体由来の抗体成分を使用することによってマウス定常領域の免疫原性に伴う潜在的な問題が軽減される。

10

【0067】

マウス免疫グロブリン可変ドメインのクローニングのための一般的な技術は、例えば、引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする、刊行物Orlandi et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:3833 (1989)に記載されている。一般に、PAM4抗体の V_K (可変軽鎖) および V_H (可変重鎖) 配列はRT-PCR、5' - RACEおよびcDNAライブラリースクリーニングなどの種々の分子クローニング手順によって得ることができる。特に、MAb PAM4の V_H および V_K 遺伝子は、ハイブリドーマ細胞からRT-PCRによりPCR増幅によりクローニングし、それらの配列をDNAシーケンシングにより決定した。それらの忠実性を確認するため、クローニングした V_L および V_H 遺伝子を、引用することにより本明細書の一部とするOrlandi et al., (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 3833 (1989))が記載しているように、細胞培養にてキメラAbとして発現させることができる。

20

【0068】

抗体は一般に細胞培養培地から次のようにして単離することができる。トランスフェクトーマ培養物を血清フリー培地に適用する。キメラ化抗体の生産のためには、HSFMを用い細胞を回転瓶中500mlの培養物として細胞を増殖させる。培養物を遠心分子し、上清を0.2μmメンブランで濾過する。濾過した培地をAタンパク質カラム(1×3cm)に流速1ml/分で通す。次にこの樹脂を約10倍カラム量のPBSで洗浄し、10mMEDTAを含有する0.1Mグリシンバッファー(pH3.5)を用いて、Aタンパク質結合抗体をカラムから溶出させる。1.0ml画分を、10μlの3M Tris(pH8.6)の入った試験管に回収し、280/260nmの吸光度からタンパク質濃度を求める。ピーク画分をプールし、PBSの対して透析し、例えばCentricon 30 (Amicon, Beverly, MA)を用いて抗体を濃縮する。抗体濃度は上記のようにELISAにより測定し、その濃度をPBSを用いて約1mg/mlに調整する。保存のためにはサンプルにアジ化ナトリウム0.01%(w/v)を加えると便宜である。

30

【0069】

ある好ましい態様では、キメラ化PAM4抗体または抗体フラグメントはマウスPAM4 MAbの相補性決定領域(CDR)およびフレームワーク領域(FR)と、ヒト抗体の軽鎖および重鎖定常領域を含んでなり、ここでキメラ化PAM4の軽鎖可変領域のCDRは、アミノ酸配列SASSSVSSSYLYを含んでなるCDR1;アミノ酸配列STSNLASを含んでなるCDR2;およびアミノ酸配列HQWNRYPYTを含んでなるCDR3を含んでなり;かつ、キメラ化PAM4 MAbの重鎖可変領域のCDRはアミノ酸配列SYVLHを含んでなるCDR1;アミノ酸配列YINPYNDGTQYNEKFKGを含んでなるCDR2;およびアミノ酸配列GFGGSYGFA Yを含んでなるCDR3を含んでなる。PAM4 MAbは十分確立されている種々の技術によりハイブリドーマ培養物から単離および精製することができる。このような単離技術としては、タンパク質Aセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーが挙げられる。例えば、Coligan at pag

40

50

es 2.7.1-2.7.12およびpages 2.9.1-2.9.3を参照。また、Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, pages 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)も参照。

【 0 0 7 0 】

P A M 4 M A bは当業者に周知の種々の技術によって同定することができる。例えば、P A M 4 M A bのP A M 4抗原に対する結合能力は、間接的免疫蛍光アッセイ、フローサイトメトリー分析、またはウエスタン分析を用いて確認することができる。

【 0 0 7 1 】

P A M 4 抗体フラグメントの生産

本発明はP A M 4 抗体フラグメントの使用を意図する。特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技術により作製し得る。抗体フラグメントは、F (a b ')₂、F a b'、F a b、F v、s F vなどの抗体の抗原結合部分である。例えば、F (a b ')₂フラグメントは、抗体分子のペプシン消化により作製でき、F a b'フラグメントは、F (a b ')₂フラグメントのジスルフィド結合を還元することにより作製できる。これらの方法は、例えば、Goldenbergの米国特許第4,036,945号および同第4,331,647号、ならびにそこに含まれている参照文献により記載されており、これらの特許はその全開示内容を引用することにより本発明の一部とされる。また、Nisonoff et al., Arch Biochem. Biophys. 89: 230 (1960); Porter, Biochem. J. 73: 119 (1959), Edelman et al., in METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1, page 422 (Academic Press 1967)、およびColigan at pages 2.8.1-2.8.10および2.10.-2.10.4も参照。あるいは、所望の特異性を有するモノクローナルF a b'フラグメントの迅速で容易な同定を可能にするには、F a b'発現ライブラリーを構築することができる(Huse et al., 1989, Science, 246:1274-1281)。本発明は抗体および抗体フラグメントを包含する。

【 0 0 7 2 】

単鎖F v分子(s c F v)は、V_LドメインおよびV_Hドメインを含んでなる。このV_LおよびV_Hドメインは組み合わさって標的結合部位を形成している。これらの二つのドメインはペプチドリンカー(L)によりさらに共有結合されている。s c F v分子は、V_Lドメインがs c F v分子のN末端部である場合、V_L-L-V_H、またはV_Hドメインがs c F v分子のN末端部である場合、V_H-L-V_Lと表される。s c F v分子の作製方法、および好適なペプチドリンカーの設計方法は、米国特許第4,704,692号、同第4,946,778号、R. Raag and M. Whitlow,"Single Chain Fvs."FASEB Vol 9: 73-80 (1995) およびR. E. Bird and B. W. Walker,"Single Chain Antibody Variable Regions,"TIBTECH, Vol 9:132-137(1991)に記載されている。これらの参照文献は引用することにより本明細書の一部とされる。

【 0 0 7 3 】

抗体フラグメントは、全長抗体のタンパク質加水分解、またはフラグメントをコードするD N Aの、大腸菌(E.coli)もしくは他の宿主中での発現により調製することができる。抗体フラグメントは、常法により全長抗体のペプシンまたはパパイン消化により得られる。例えば、抗体フラグメントは抗体をペプシンで酵素的に切断して、F (a b ')₂で示される約100 K dのフラグメントを得ることにより作製することができる。このフラグメントはチオール還元剤、および所望によりジスルフィド結合の切断により生じるスルフィドリル基の遮断基を用いてさらに切断することができ、約50 K d F a b'一価フラグメントが得られる。あるいは、パパインを用いる酵素的切断により二つの一価F a bフラグメントと一つのF cフラグメントが直接的に生じる。これらの方法は、例えば、Goldenbergの米国特許第4,036,945号および同第4,331,647号、ならびにそこに含まれる参照文献に記載されており、これらの特許は引用することによりその全開示内が本明細書の一部とされる。また、Nisonoff et al., Arch Biochem. Biophys. 89:230 (1960); Porter, Biochem. J 73:119(1959)、Edelman et al., in METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1, page 422(Academic Press 1967)、および Coligan at pages 2.8. 1-2.8.10および2.10.-2. 10.4.も参照。

【 0 0 7 4 】

抗体フラグメントのもう一つの形態は、単一の相補性決定領域 (C D R) をコードするペプチドである。 C D R は抗体の可変領域のセグメントであり、抗体が結合するエピトープに対し相補的な構造であり、残りの可変領域よりもさらに変化に富んでいる。従って、 C D R はしばしば超過変領域と呼ばれる。可変領域は三つの C D R を含んでなる。 C D R ペプチドは、対象となる抗体の C D R をコードする遺伝子を構築することにより得られる。このような遺伝子は、例えば抗体産生細胞の R N A から可変領域を合成するためのポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を用いて調製される。例えば、Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106(1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies, "in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al.(eds.), pages 166-179 (Cambridge University Press 1995); および Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies, "in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch et al., (eds.), pages 137-185 (Wiley-Liss, Inc. 1995) 参照。

10

【 0 0 7 5 】

重鎖を分離して一価の軽鎖 - 重鎖フラグメントを形成し、さらにフラグメントを切断するような抗体を切断する他の方法、または他の酵素学的、化学的または遺伝学的技術も、それらのフラグメントが無傷の抗体により認識される抗原に結合する限り用いてよい。

【 0 0 7 6 】

キメラ化 P A M 4 抗体融合タンパク質の生産

20

本発明の抗体融合タンパク質は、官能基間のグルタルアルデヒド結合からより特異的な結合まで、種々の常法により調製することができる。本明細書に記載の融合タンパク質を含んでなる抗体および / または抗体フラグメントは好ましくは、別のものに直接共有結合させるか、リンカー部分を介して、または例えばアミン、カルボキシル、フェニル、チオールもしくはヒドロキシル基など、抗体またはフラグメント上の一以上の官能基を介して共有結合させる。グルタルアルデヒドの他、例えばジイソシアネート、ジイソチオシアネート、ビス (ヒドロキシスクシンイミド) エステル、カルボジイミド、マレイミドヒドロキシスクシンイミドエステルなどの種々の通常のリンカーを使用できる。

【 0 0 7 7 】

キメラ化 P A M 4 融合タンパク質を生産する簡単な方法としては、グルタルアルデヒドの存在下で抗体またはフラグメントを混合するものがある。最初のシッフの塩基結合は例えば第二級アミンへのホウ化水素還元により安定化させることができる。非位置特異的リンカーとしてグルタルアルデヒドの代わりにジイソチオシアネートまたはカルボジイミドを使用することもできる。本発明の一つの態様では、抗体融合タンパク質は、一つのキメラ化 P A M 4 M A b またはそのフラグメント含んでなり、この M A b は M U C 1 抗原のアミノ末端とリピートドメインの開始部の間に位置するドメインと結合する。この融合タンパク質およびそのフラグメントは膵臓癌細胞と優先的に結合する。この一価単一特異性 M A b は抗原のダイレクト・ターゲッティングに有用であり、ここでは M A b が治療薬、診断 / 検出薬、またはそれらの組み合わせに結合され、そのタンパク質がそれを必要とする患者に直接投与される。本発明の P A M 4 抗体融合タンパク質およびそのフラグメントは、代わりに、少なくとも二種のキメラ化 P A M 4 M A b またはそのフラグメントを含んでもよく、ここで、この少なくとも二種の M A b またはそのフラグメントは P A M 4 抗原の異なるエピトープと結合する。例えば、これらの M A b は抗原特異的ダイアボディー、トリアボディーおよびテトラボディーを作出することができ、これらは多価であるが、P A M 4 抗原に対して単一特異的である。二以上の s c F v 分子の非共有結合的結合が機能的なダイアボディー、トリアボディーおよびテトラボディーを形成することができる。単一特異性ダイアボディーは同種の s c F v のホモ二量体であり、各 s c F v は、選択された抗体に由来する、短いリンカーによって同じ抗体の V_L ドメインに連結された V_H ドメインを含んでなる。ダイアボディーは二つの s c F v の非共有結合的結合によって形成された二価の二量体であり、二つの F v 結合部位が生じる。トリアボディーは三つの s c

30

40

50

Fvからなる三価の三量体の形成によるもので、三つの結合部位が生じ、また、テトラボディーは四つのscFvからなる四価の四量体であり、四つの結合部位が生じている。数種の単一特異性ダイアボディーが、 V_{H1} -リンカー- V_{L1} を含んでなる組換え遺伝子構築物を含む発現ベクターを用いて作製されている。Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993); Atwell et al., Molecular Immunology 33: 1301-1302 (1996); Holliger et al., Nature Biotechnology 15: 632-631(1997); Helfrich et al., Int. J. Cancer 76: 232-239 (1998); Kipriyanov et al., Int. J. Cancer 77: 763-772 (1998); Holliger et al., Cancer Research 59: 2909-2916(1999)参照。scFvの構築方法は米国特許第4,946,778号(1990)および同第5,132,405号(1992)で開示されている。scFvに基づく多価多重特異性結合タンパク質の作製方法は、米国特許第5,837,242号(1998)、同第5,844,094号(1998)およびWO98/44001(1998)で開示されている。多価単一特異性抗体融合タンパク質は、同じ抗原上または別の抗原上に存在し得る二以上の同種のエピトープと結合する。価数の増加にはさらなる相互作用、親和性の増強、および滞留時間の延長が見込まれる。これらの抗体融合タンパク質はダイレクト・ターゲティング系で使うことができ、ここでは抗体融合タンパク質が治療薬、診断/検出薬、またはそれらの組み合わせに結合され、それを必要とする患者に直接投与される。

【0078】

本発明の好ましい態様は、PAM4標的エピトープ、および脾臓癌抗原に関連する一以上のさらなるエピトープに対して親和性を有する一を超える抗原結合部位を含んでなる多価多重特異性抗体またはそのフラグメントである。この融合タンパク質は、同じまたは異なる抗原上に存在し得る少なくとも二つの異なるエピトープと結合するので、多重特異性である。例えば、この融合タンパク質は一を超える抗原結合部位を含んでよく、第一のものは一つのPAM4抗原エピトープに対して親和性を有し、第二のものはTAG-72またはCEAなどの別の標的抗原に対して親和性を有する。別の例として、CA19.9 MA b (またはそのフラグメント) およびPAM4 MA b (またはそのフラグメント) を含んでもよい、二重特異性PAM4抗体融合タンパク質がある。このような融合タンパク質はCA19.9、ならびにMUC1のアミノ末端とリピートドメインの開始部の間に位置するドメインに対して親和性を有する。本発明ではまた、少なくとも二つの異なるPAM4抗原エピトープに対して親和性を有する一を超える抗原結合部位を含んでなる融合タンパク質も意図される。

【0079】

本発明の抗体融合タンパク質およびそのフラグメントはダイレクト・ターゲティング系で使うことができ、ここでは抗体融合タンパク質が治療薬、診断/検出薬、またはそれらの組み合わせに結合され、それを必要とする患者に直接投与される。

【0080】

本発明のもう一つの好ましい態様は、PAM4標的エピトープに対して親和性を有する一を超える抗原結合部位と、ハプテン分子に対して親和性を有する少なくとも一つのハプテン結合部位を含んでなる多価多重特異性抗体およびそのフラグメントである。例えば、二重特異性PAM4抗体融合タンパク質は679 MA b (またはそのフラグメント) およびPAM4 MA b (またはそのフラグメント) を含んでもよい。モノクローナル抗体679はトリペプチド部分ヒスタミンスクシニルグリシル(HSG)を含む分子に、高い親和性で結合する。このような二重特異性PAM4抗体融合タンパク質は、例えば、上記のように679からF(ab')₂フラグメントを得ることにより調製することができる。679 F(ab')₂フラグメントの鎖内ジスルフィド結合は、軽鎖-重鎖結合が起こらないよう注意しながらシステインで穏やかに還元し、Fab'-SHフラグメントを形成させる。このSH基をビス-マレイミドリンカー(1,1'-(メチレンジ-4,1-フェニレン)ビス-マレイミド)で活性化させる。PAM4 MA bをFab'-SHに変換した後、活性化させたMR23 Fab'-SHフラグメントと反応させて二重特異性PAM4抗体融合タンパク質を得る。このようなものなどの二重特異性抗体融合タンパク

質はアフィニティー増強系で用いることができ、ここでは標的抗原が融合タンパク質でプレターゲットングされ、次に、プレターゲットングにより形成された抗体 - 抗体複合体と結合する診断薬または治療薬でターゲットングされる。

【0081】

二重特異性抗体は、例えばジスルフィド結合を切断し、全IgGまたは好ましくはF(ab')₂フラグメントの混合物を再形成し、一を超えるハイブリドーマを融合して一を超える特異性を有する抗体を生産するなどの種々の従来法、また、遺伝子操作により作製することができる。二重特異性抗体融合タンパク質は異なる抗体の還元的切断によって生じるFab'フラグメントの酸化的切断によって作製されてきた。これは二つの異なる抗体のペプシン消化によって生じた二つの異なるF(ab')₂フラグメントを混合し、還元的切断によりFab'フラグメントの混合物を形成し、次いで、酸化的にジスルフィド結合を再形成して、元のエピトープの各々に特異的なFab'部分を含む二重特異性抗体融合タンパク質を含むF(ab')₂フラグメントの混合物を作製することにより行うのが有利である。抗体融合タンパク質の調製のための一般的技術は、例えばNisonoff et al., Arch Biochem. Biophys. 93: 470 (1961)、Hammerling et al., J. Exp. Med. 128: 1461 (1968)、および米国特許第4,331,647号に見出せる。本発明では、少なくとも一つの第一のPAM4 MA bまたはそのフラグメントと、本発明のPAM4 MA bまたはそのフラグメント以外の少なくとも一つの第二のMA bまたはそのフラグメントを含んでなる抗体融合タンパク質またはそのフラグメントが意図される。

10

【0082】

より選択性の高い結合は、マレイミドヒドロキシスクシンイミドエステルなどのヘテロ二官能性リンカーを用いることで達成することができる。このエステルと抗体またはフラグメントとの反応により抗体またはフラグメント上のアミン基が誘導体化され、次にこの誘導体は例えば遊離スルヒドリル基を有する抗体Fabフラグメント（あるいは、例えばトラウトの試薬によりスルヒドリル基が付加されたより大きなフラグメントまたは完全抗体）と反応させることができる。このようなリンカーは同じ抗体の基を架橋しているとは考えにくく、結合の選択性は向上する。

20

【0083】

抗原結合部位から離れた部位で抗体またはフラグメントを連結するのが有利である。これは、例えば上記のように切断された鎖内スルヒドリル基に連結することで達成することができる。別法としては、酸化された炭化水素部分を有する抗体を、少なくとも一つの遊離アミン官能基を有する別の抗体と反応させることを含む。これにより最初のシッフ塩基(mime)結合が生じ、これは好ましくは、例えばホウ化水素還元により第二級アミンへ還元することにより安定化され、最終複合体が形成される。このような部位特異的結合が、小分子に関しては米国特許第4,671,958号に、大きな付加物に関しては米国特許第4,699,784号に開示されており、これらは引用することにより本明細書の一部とされる。

30

【0084】

多重特異性PAM4抗体融合タンパク質は、二重特異性キメラ化PAM4抗体融合タンパク質にPAM4抗原結合部分を付加することにより得ることができる。例えば、二重特異性抗体融合タンパク質は、上記のビス - マレイミド活性化手順を用いて、二重特異性融合タンパク質を第三のPAM4 MA bまたはフラグメントと結合させる際に用いられる一以上のスルヒドリル基を導入するために2 - イミノチオランと反応させることができる。これらの抗体融合タンパク質生産技術は当業者に周知である。例えば、引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする米国特許第4,925,648号参照。

40

【0085】

12アミノ酸残基長よりも長いリンカー（例えば15または18残基のリンカー）を有するScFvでは、同じ鎖上のV_HとV_Lドメイン間の相互作用が可能であり、一般に単量体、二量体（ダイアボディーと呼ばれる）、および少量のより高次の多量体の混合物が生じる(Kortt et al., Eur. J. Biochem. (1994) 221: 151-157)。しかし、5以下のアミ

50

ノ酸残基のリンカーを有する $S_c F_v$ では、同じ鎖上の V_H と V_L ドメインの分子内対合は妨げられ、異なる鎖上の V_H と V_L ドメインの対合が促される。3 ~ 12 残基の間のリンカーでは主として二量体が形成される (Atwell et al., Protein Engineering (1999) 12: 597-604)。0 ~ 2 残基の間のリンカーでは、 $s_c F_v$ の三量体 (トリアボディーと呼ばれる)、四量体 (テトラボディーと呼ばれる)、またはより高次のオリゴマー構造が形成されるが、オリゴマー化の厳密なパターンはリンカーの長さの他、 V ドメインの組成ならびに方向に依存するようである。例えば、抗ノイラミニダーゼ抗体 NC 10 の $s_c F_v$ では、0 残基のリンカーと用いた場合、主として三量体 (V_H から V_L 方向) または四量体 (V_L から V_H 方向) が生じた (Dolezal et al., Protein Engineering (2000) 13: 565-574)。1 および 2 酸基のリンカーを用いて NC 10 から構築された $s_c F_v$ では、 V_H から V_L 方向で、主としてダイアボディーが形成されたが (Atwell et al., Protein Engineering (1999) 12: 597-604)、これに対して、 V_L から V_H 方向では四量体、三量体、二量体およびより高次の多量体が形成された (Dolezal et al., Protein Engineering (2000) 13: 565-574)。抗 CD 19 抗体 HD 37 から、 V_H から V_L 方向で、構築された $s_c F_v$ については、0 残基リンカーではもっぱら三量体が形成され、1 残基リンカーではもっぱら四量体が形成された (Le Gall et al., FEBS Letters (1999) 453: 164-168)。

【 0 0 8 6 】

発現ベクターおよび宿主細胞

発現ベクターは、宿主細胞中で発現される遺伝子を含んでなる DNA 分子である。通常、遺伝子発現は構成または誘導プロモーター、組織特異的調節エレメントおよびエンハンサーをはじめとする特定の調節エレメントの制御下に置かれる。このような遺伝子は調節エレメントに「作動可能なように連結されている」といわれる。プロモーターは構造遺伝子の転写を指令する DNA 配列である。構造遺伝子はメッセンジャー RNA (mRNA) へと転写される DNA 配列であり、これは次に特定のポリペプチドに特徴的なアミノ酸配列へと翻訳される。典型的には、プロモーターは構造遺伝子の転写開始部位に隣接して遺伝子の 5' 領域に置かれる。プロモーターが誘導プロモーターであれば、誘導因子に应答して転写速度が高まる。これに対し、プロモーターが構成プロモーターであれば、転写速度は誘導因子によって調節を受けない。エンハンサーは転写の開始部位に対してエンハンサーの距離または方向に関係なく、転写効率を高め得る DNA 調節エレメントである。

【 0 0 8 7 】

単離された DNA 分子とは、生物のゲノム DNA に組み込まれていない DNA の断片である。例えば、クローニングされた PAM 4 抗原遺伝子は、哺乳類細胞のゲノム DNA から分離されている DNA 断片である。単離された DNA 分子の別の例としては、生物のゲノム DNA に組み込まれていない化学合成された DNA 分子がある。相補的 DNA (cDNA) は、逆転写酵素によって mRNA 鋳型から形成された一本鎖 DNA 分子である。逆転写の開始には、典型的には mRNA の一部に相補的な短い合成オリゴヌクレオチドがプライマーとして用いられ、第一鎖 DNA が生成する。当業者はまた、このような一本鎖 DNA 分子およびその相補的 DNA 鎖からなる二本鎖 DNA 分子に対しても「cDNA」を用いる。

【 0 0 8 8 】

クローニングベクターは、プラスミド、コスミドまたはバクテリオファージなど、宿主細胞で自律的に複製する能力を有する DNA 分子である。クローニングベクターは典型的には一または少数の制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、この部位に、ベクターの必須の生物学的機能を失わずに定量可能な様式で外来 DNA 配列、ならびにクローニングベクターで形質転換された細胞の同定および選択に用いるのに好適なマーカー遺伝子を挿入することができる。マーカー遺伝子は典型的にはテトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性を与える遺伝子を含む。組換え宿主としては、クローニングベクターが発現ベクターのいずれかを含むいずれの原核または真核細胞であってもよい。この用語はまた、宿主細胞の染色体またはゲノム中にクローニングされた遺伝子を含むよう遺伝子操作された原核または真核細胞も含まれる。発現とは、遺伝子産物の生合成をさす。例えば、構造遺伝

子の場合、発現とは、その構造遺伝子の mRNA への転写および mRNA の一以上のポリペプチドへの翻訳を含む。

【0089】

好適な宿主細胞としては微生物または哺乳類宿主細胞が挙げられる。好ましい宿主としては、MAb およびその他の融合タンパク質の生産のために開発されたヒト細胞系統 PER.C6 がある。よって、本発明の一つの好ましい態様は、PAM4 MAb、複合体、融合タンパク質またはそのフラグメントをコードする DNA 配列を含む宿主細胞である。PER.C6 細胞 (WO 97/00326) は、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) プロモーターの制御下に Ad 血清型 5 (Ad5) E1A - および E1B - コード配列 (Ad5 ヌクレオチド 459 - 3510) を含むプラスミドを用いた、ヒト胎児網膜一次細胞のトランスフェクションにより作製されたものである。E1A および E1B はそれぞれアデノウイルス初期遺伝子活性化タンパク質 1A および 1B である。これらの方法および組成物は、例えばグリコシル化により翻訳後修飾されている、目的のヒト組換えタンパク質の安定発現を作り出すのに特に有用である。PER.C6 は完全に同定されたヒト細胞系統であり、また、実験室での実践に応じて開発されたものであるなど、いくつかの特徴により PER.C6 は組換えタンパク質の生産のための宿主として特に有用なものとなる。さらに、PER.C6 はいずれのヒト由来または動物由来タンパク質も含まない規定の血清フリー培地中の懸濁培養物として増殖させることができ、その増殖は倍加時間約 35 時間の、回転瓶、シェーカーフラスコ、スピンフラスコおよびバイオリアクターに適合している。最後に、E1A が存在すると、CMV エンハンサー/プロモーターの制御下にある遺伝子の発現がアップレギュレートされ、E1B が存在すると、おそらくは組換えトランスジーンの過剰発現によって増強された p53 依存性のアポトーシスが妨げられる。ある態様では、この細胞は従来の哺乳類細胞系統よりも 200 倍高い組換えタンパク質および/またはタンパク質性物質を産生することができる。

【0090】

治療および診断に用いるキメラ化 PAM4 抗体

本発明では、被験体の悪性腫瘍を診断または治療する方法であって、該被験体に、PAM4 MAb もしくはそのフラグメント、または抗体融合タンパク質もしくはそのフラグメントを含んでなる、治療上有効量の治療用複合体を投与することを含んでなる方法が意図され、ここでは、PAM4 MAb もしくはそのフラグメント、または抗体融合タンパク質もしくはそのフラグメントは少なくとも一種の診断薬および/または治療薬と結合され、医薬上好適な賦形剤中に調剤されている。また、癌を診断または治療する方法であって、PAM4 抗原に対する一以上の抗原結合部位および一以上のハプテン結合部位を含んでなる多価多重特異性抗体またはそのフラグメントを、それを必要とする被験体に投与すること、一定量の非抗体が被験体の血流からクリアリングされるに十分な時間待つこと、および該被験体に、その多価多重特異性抗体またはそのフラグメントの結合部位と結合する診断/検出薬、治療薬またはそれらの組み合わせを含んでなる担体分子を投与することを含んでなる方法が好ましい。ある好ましい態様では、癌は脾臓癌である。もう一つの態様では、抗体は多価多重特異性抗体またはそのフラグメントである。

【0091】

in vitro 診断のための MAb の使用は周知である。例えば、Carlsson et al., Bio/Technology 7 (6): 567 (1989) 参照。例えば、MAb は生検サンプル由来の組織における腫瘍関連抗原の存在を検出するのに用いることができる。MAb はまた、ラジオイムノアッセイ、固相酵素免疫検定法、および蛍光免疫アッセイなどの技術を用い、臨床液体サンプル中の腫瘍関連抗原の量を測定するためにも使用できる。

【0092】

本明細書ではまた、悪性腫瘍の in vitro 診断における PAM4 抗体およびそのフラグメント、ならびに PAM4 融合タンパク質およびそのフラグメントの使用も意図される。in vitro 診断のための MAb の使用は周知である。例えば、Carlsson et al., Bio/Technology 7(6):567 (1989) 参照。例えば、MAb は生検サンプル由来の組織における腫瘍関連

抗原の存在を検出するために使用できる。M A b はまた、ラジオイムノアッセイ、固相酵素免疫検定、および蛍光イムノアッセイなどの技術を用い、臨床液体サンプル中の腫瘍関連抗原の量を測定するためにも使用できる。

【 0 0 9 3 】

腫瘍標的化 M A b と毒素との複合体は *in vivo* において癌細胞を選択的に死滅させるために使用できる (Spalding, Bio/Technology 9(8): 701 (1991); Goldenberg, Scientific American Science & Medicine 1(1): 64 (1994))。例えば、試験動物モデルにおける治療研究では、細胞傷害性放射性核種を有する抗体の抗腫瘍活性が証明されている。動物モデルおよび治療研究の考察については実施例 3 および 5 を参照。(Goldenberg et al., Cancer Res. 41: 4354 (1981), Cheung et al., J. Nat'l Cancer Inst. 77: 739 (1986)、および Senekowitsch et al., J. Nucl. Med. 30: 531 (1989))。

10

【 0 0 9 4 】

キメラ化抗体ならびにそのフラグメントは治療法および診断法に用いるのに好適である。従って、本発明では、診断薬もしくは治療薬またはそれらの組み合わせを標的に送達する方法であって、(i) 少なくとも一種の診断薬および / または治療薬に結合された P A M 4 抗体またはそのフラグメントを含んでなる組成物を準備すること、および (ii) その診断または治療用抗体複合体をそれを必要とする被験体に投与することを含んでなる方法が意図される。ある好ましい態様では、P A M 4 抗体およびそのフラグメントはキメラ化されている。もう一つの態様では、本発明のキメラ化 P A M 4 抗体ならびにそのフラグメントは悪性腫瘍を治療する方法で用いられる。

20

【 0 0 9 5 】

また、本明細書では、本発明の抗体のいずれかの P A M 4 M A b もしくはそのフラグメント、または抗体融合タンパク質もしくはそのフラグメントを含んでなる抗体成分を含んでなる、癌細胞を標的とする診断または治療複合体も記載され、ここではこの抗体成分は少なくとも一種の診断薬または少なくとも一種の治療薬に結合されている。好ましくは、診断複合体は光活性診断 / 検出薬、超音波検出剤、または M R I 造影剤である。さらに好ましくは、診断 / 検出薬は 2 0 ~ 4 , 0 0 0 k e V の間のエネルギーを有する放射性核種である。

【 0 0 9 6 】

本発明のもう一つの態様は、悪性腫瘍を診断または治療する方法であって、治療上または診断上有効量の、少なくとも一種の裸の P A M 4 抗体もしくはそのフラグメント、および / または P A M 4 融合タンパク質もしくはそのフラグメントを投与すること、および所望により P A M 4 抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントを医薬賦形剤中に調剤することを含んでなる方法である。

30

【 0 0 9 7 】

治療用組成物は少なくとも一種のキメラ化 P A M 4 抗体またはそのフラグメントを単独かつ非結合型で、他のヒト化またはキメラ抗体、ヒト抗体、治療薬または免疫調節剤など、他の抗体またはそのフラグメントと結合して、あるいは結合させずに組み合わせて含有する。同じまたは異なるエピトープまたは抗原に対する裸のまたは結合型の抗体を本発明の一以上の P A M 4 抗体またはそのフラグメントと組み合わせてもよい。

40

【 0 0 9 8 】

よって、本発明は、P A M 4 融合タンパク質およびそのフラグメントを含む P A M 4 抗体およびそのフラグメントの、裸の抗体またはフラグメントとして単独での投与、あるいは多モード療法としての投与を意図する。好ましくは、この抗体はキメラ化 P A M 4 抗体またはそのフラグメントである。本発明の多モード療法はさらに、裸の抗体、融合タンパク質の形で、または免疫複合体としての他の抗体の投与を伴う、裸の抗 P A M 4 抗体による免疫療法を含む。例えば、キメラ化 P A M 4 抗体は別の裸のキメラ化 P A M 4 もしくはその他の抗体、あるいは同位元素、一以上の化学療法剤、サイトカイン、毒素またはそれらの組み合わせと結合されたヒト化 P A M 4 もしくはその他の抗体と組み合わせてもよい。例えば、本発明は、C A 1 9 . 9、D U P A N 2、S P A N 1、N d 2、B 7 2 . 3

50

、C C 4 9、l a 3、a L e ^a 抗体、他の L e w i s 抗原（例えば、L e (y)）、なら
びに癌胎児性抗原（C E A）、結腸特異的抗原 - p (C S A p)、M U C 1、M U C 2、
M U C 3、M U C 4、H E R 2 / n e u、E G F R、脈管形成因子（例えば、V E G F）
、インスリン様増殖因子（I G F）、テネイシン、血小板由来増殖因子、および I L - 6
に対する抗体、ならびに癌遺伝子の産物および腫瘍壊死物質に対する抗体などの他の腫瘍
腫瘍関連抗体の前に、または組み合わせて、またはその後に、裸のまたは結合型の P A M
4 抗体またはそのフラグメントを処置することを意図する。これらの固形腫瘍抗体は裸で
あってもよいし、あるいはとりわけ薬物、毒素、同位元素、内部照射または免疫調節剤と
組み合わせてもよい。また、本発明では、キメラ化 P A M 4 抗体と毒素の融合タンパク質
を用いてもよい。裸の抗体として、または部分的に裸で、部分的に治療薬または免疫調節
剤と結合したものとして多くの異なる組み合わせを構築してもよい。あるいは、細胞傷害
剤などの他の治療薬または放射線と組み合わせて投与する（連続的、同時または逐次に施
与する）ために、種々の裸の抗体の組み合わせを用いてもよい。

10

【 0 0 9 9 】

診断薬または治療薬に結合された本明細書に記載の単一特異性結合タンパク質は P A M
4 陽性腫瘍を直接ターゲティングする。これらの単一特異性分子は標的抗原と選択的に
結合し、分子上の結合部位の数が増すにつれ、標的細胞に対する親和性が増し、所望の場
所に見られる滞留時間が長くなる。さらに、非抗原結合分子は身体から速やかにクリアリ
ングされ、正常組織の暴露が最小となる。多重特異性抗体の使用は A E S 系におけるもの
であり、ここで、P A M 4 はその後の診断薬または治療薬の特異的送達のために陽性腫瘍
をプレターゲティングする。これらの薬剤はヒスタミンスクシニルグリシル（H S G）
含有ペプチドによって運ばれる。6 7 9 と呼ばれるマウスモノクローナル抗体（I g G 1
， K）は高い親和性でトリペプチド部分 H S G を含む分子と結合する (Morel et al, Mole
cular immunology, 27, 995-1000, 1990)。6 7 9 M A b は c P A M 4 とともに、H S
G と標的抗原に結合する二重特異性抗体を形成することができる。また、この代わりにハ
プテンを用いてもよい。これらの抗体は標的抗原に選択的に結合し、親和性の増強および
所望の場所での滞留時間の延長を可能とする。さらに、非抗原結合ダイアボディーは身体
から速やかにクリアリングされ、正常組織の暴露が最小となる。P A M 4 抗体およびその
フラグメントならびに複合体は、癌などの哺乳類の疾患の診断および治療に使用すること
ができる。

20

30

【 0 1 0 0 】

本発明に従う診断または治療を目的とした診断薬または治療薬の標的への送達は、P A
M 4 抗体またはそのフラグメントを診断薬または治療薬とともに準備すること、およびそ
の抗体をそれを必要とする被験体に投与することを含む。さらに診断では、既知の技術を
用いて結合したタンパク質を検出する工程が必要である。

【 0 1 0 1 】

この適用に関して、「診断」または「治療」の用語は互換的に使用できる。診断は通常
、組織の特定の組織学的状態を判定することをさし、検出は特定の抗原を含む組織、病変
部または生物を認識および限局化する。

【 0 1 0 2 】

本発明の抗体およびそれらのフラグメントの、診断薬または治療薬を伴う投与は、哺乳
類では静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜腔内、髄腔内、局所的カテーテルを
通じた灌流、または直接病巣注射により行うことができる。抗体を注射により投与する場
合には、投与は点滴、または単回もしくは複数回のボース注射によればよい。

40

【 0 1 0 3 】

診断薬または治療薬を伴う抗体は医薬上許容される注射用ビヒクル、好ましくはリン酸
緩衝生理食塩水（P B S）中、生理的 p H および濃度で、ヒトまたは哺乳類の治療および
診断用キットとして提供してもよい。この製剤は、特にヒトでの使用を意図する場合には
無菌であることが好ましい。このようなキットの任意の成分としては、安定剤、緩衝剤、
標識試薬、放射性同位元素、常磁性化合物、クリアランスを促進するための第二の抗体、

50

および通常のシリンジ、カラム、バイアルなどが挙げられる。

【0104】

裸の抗体での療法

治療上有効量の裸のキメラ化PAM4抗体もしくはそれらのフラグメント、またはPAM4融合タンパク質もしくはそのフラグメントは、医薬上許容される賦形剤中に調剤することができる。また、裸のキメラ化PAM4抗体およびそれらのフラグメントの効力は、これらの裸の抗体を、一以上の他の裸の抗体、あるいは薬物、毒素、免疫調節剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素阻害剤、オリゴヌクレオチド、治療用放射性核種、脈管形成阻害剤などをはじめとする一以上の治療薬と結合され、PAM4抗体またはそのフラグメントと同時に、または逐次に、または指示された投与計画に従って投与される、キメラ化PAM4抗体の一以上の免疫複合体で補うことにより増強することもできる。裸のPAM4抗体およびそのフラグメントを補い得る裸の抗体は同じ腫瘍種に向けられたものでもよいし、あるいは、選択された裸の抗体の抗腫瘍作用を増強すべく補充することができる免疫調節細胞（例えば、CD40⁺細胞）に対して向けられたものでもよい。

10

【0105】

一つの態様では、bcl-2発現を阻害するアンチセンス分子などのオリゴヌクレオチドが、引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする米国特許第5,734,033号(Reed)に記載されており、本発明の免疫複合体または抗体融合タンパク質の治療薬部分に結合されているか、または治療薬部分を形成し得る。あるいは、このオリゴヌクレオチドは本発明の裸の、または結合されているPAM4抗体またはそのフラグメントと同時に投与してもよいし、逐次投与してもよい。ある好ましい態様では、このオリゴヌクレオチドは癌遺伝子またはbcl-2などB細胞悪性腫瘍の癌遺伝子産物に対して向けられていることが好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

20

【0106】

PAM4免疫複合体

本発明はまた、治療または診断のため、少なくとも一種の治療薬および/または診断/検出薬に結合されたキメラ化PAM4抗体およびそのフラグメントの使用を意図する。免疫療法では、その目的は、非標的組織への暴露を最小限にしつつ、細胞傷害量の放射性、毒素、または薬物を標的細胞へ送達することである。本発明のPAM4抗体は、脾臓腫瘍の診断および治療に使用できる。

30

【0107】

本発明のいずれの抗体、抗体融合タンパク質およびその断片を、一種以上の治療薬または診断/検出薬と結合させてもよい。一般に、一種の治療薬または診断/検出薬がそれぞれの抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントに結合されるが、一を超える治療薬および/または診断/検出薬を同じ抗体または抗体フラグメントに結合させることもできる。Fc領域が存在しなければ（例えば免疫複合体の抗体成分としても用いられる抗体が抗体フラグメントである場合）、全長抗体または抗体フラグメントの軽鎖可変領域へ炭水化物部分を導入することができる。例えば、Leung et al., J. Immunol. 154: 5919 (1995); Hansen et al., 米国特許第5,443,953号(1995), Leung et al., 米国特許第6,254,868号参照（ここで、これらは総て、引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする）。この操作された炭水化物部分を用いて治療薬または診断/検出薬を結合させる。

40

【0108】

抗体の炭水化物部分を介して抗体成分にペプチドを結合させる方法は当業者に周知である。例えば、Shih et al., Int. J. Cancer 41: 832 (1988); Shih et al., Int. J. Cancer 46: 1101 (1990); およびShih et al., 米国特許第5,057,313号を参照（ここで、これらは総て、引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする）。一般的な方法としては、炭水化物部分が酸化された抗体成分を、少なくとも一つの遊離アミン基を有し、かつ、複数のペプチドが付加された担体ポリマーと反応させることを含む。この反応により最初のシッフ塩基（イミン）結合が生じ、これは第二級アミンへの還元

50

より安定化され最終の複合体を形成し得る。

【0109】

本発明の抗体融合タンパク質およびそのフラグメントは二種以上の抗体またはそのフラグメントを含んでなり、この融合タンパク質を構成する各々の抗体は少なくとも一種の治療薬および/または診断/検出薬を含むことができる。例えば、抗体融合タンパク質は一つの抗体(二つの抗原結合部位)および抗体フラグメント、二つの抗体フラグメント、または二つの抗体を含んでよい。次に、この抗体融合タンパク質は少なくとも一種の診断/検出薬および/または治療薬と結合させることができる。

【0110】

よって、抗体融合タンパク質の一以上の抗体またはフラグメントは結合した一を超える治療薬および/または診断/検出薬を含むことができる。さらに、これらの治療薬は同一である必要はなく、異なる治療薬であってもよく、例えば、薬物および放射性同位元素を同じ融合タンパク質へ結合させることができる。特に、IgGは¹³¹Iで放射性標識し、薬物と結合させることができる。この¹³¹IはIgGのチロシンへ導入でき、薬物はIgGリジンのεアミノ基へ結合させることができる。また、治療薬および診断/検出薬は双方とも還元されたSH基、および炭水化物側鎖に結合させることもできる。

【0111】

多種多様な診断薬および治療薬(例えば、薬物、毒素、免疫調節剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、オリゴヌクレオチド、酵素阻害剤、治療用放射性核種、脈管形成阻害剤など)が、本発明の抗体と同時にしくは逐次投与可能であり、または有利には本発明の抗体と結合させることができる。本明細書に列挙された治療薬は、上記のように裸の抗体とは別に投与しても有用である薬剤である。治療薬としては、例えば、ビンカルカロイド、アントラサイクリン、エピトフィロトキシン、タキサン、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗生物質、COX-2阻害剤、SN-38、抗有糸分裂剤、抗脈管形成剤およびアポトーシス剤、特にドキソルピシン、メトトレキサート、タキソール、CPT-11、カンプトテカン、およびこれらまたは他の種類の抗癌剤由来の他のものなどが挙げられる。同時または逐次投与のため、あるいは免疫複合体および抗体融合タンパク質の調製のために有用な他の癌化学療法剤としては、ナイトロジェンマスタード、ゲムシタピン、スルホン酸アルキル、ニトロソウレア、トリアゼン、葉酸類似体、COX-2阻害剤、ピリミジン類似体、プリン類似体、プラチナ錯体、ホルモンなどが挙げられる。好適な化学療法剤はREMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995およびGOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)、ならびにこれらの刊行物の改訂版に記載されている。実験薬のような他の好適な化学療法剤も、当業者に公知である。

【0112】

一つの態様では、bcl-2発現を阻害するアンチセンス分子などのオリゴヌクレオチドは本発明の免疫複合体または抗体融合タンパク質の治療薬部分に結合されているか、または治療薬部分を形成し得る。あるいは、このオリゴヌクレオチドは本発明の裸の、または結合されているPAM4抗体またはそのフラグメントと同時に投与してもよいし、逐次投与してもよい。ある好ましい態様では、このオリゴヌクレオチドは癌遺伝子またはbcl-2などB細胞悪性腫瘍の癌遺伝子産物に対して向けられていることが好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0113】

一つの態様では、本発明のキメラ化PAM4抗体およびそのフラグメントをゲムシタピンに結合させる。もう一つの態様では、本発明の裸の、または結合型のキメラPAM4抗体または抗体フラグメントの前、後または同時にゲムシタピンを与える。好ましくは、結合型のキメラPAM4抗体または抗体フラグメントを放射性核種に結合させる。

【0114】

毒素は動物、植物または微生物起原のものであり得る。シュードモナス外毒素のような毒素も複合化し得るし、あるいは本発明のPAM4およびcPAM4抗体の免疫複合体の

10

20

30

40

50

治療薬部分を形成することができる。このような複合体または他の融合タンパク質の調製に適切に使用される他の毒素としては、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ（RNアーゼ）、DNアーゼI、ブドウ球菌内毒素-A、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒、シュードモナス外毒素、およびシュードモナス内毒素が挙げられる。例えば、Pastan et al., Cell 47:641(1986)、およびGoldenberg, CA-A Cancer Journal for Clinicians 44:43(1994)参照。本発明で用いるのに好適なさらなる毒素は当業者に公知であり、引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする米国特許第6,077,499号に開示されている。

【0115】

サイトカインのような免疫調節剤もまた結合させ得るし、あるいはPAM4およびcPAM4免疫複合体の治療薬部分を形成することができるし、あるいは本発明のキメラ化PAM4抗体もしくはそのフラグメント、またはPAM4融合タンパク質もしくはそのフラグメントに結合させずに投与することができる。PAM4融合タンパク質またはそのフラグメントは、異なる抗原に結合する一以上の抗体またはそのフラグメントを含んでなり得る。例えば、融合タンパク質はPAM4抗原ならびに免疫調節細胞または因子と結合し得る。あるいは、被験体に、裸のPAM4抗体、融合タンパク質、またはそのフラグメントを与え、サイトカインを個別に投与することができ、このサイトカインは裸のPAM4抗体の投与前、同時または投与後に投与することができる。本明細書において「免疫調節剤」としては、サイトカイン、幹細胞増殖因子、腫瘍壊死因子（TNF）などのリンホトキシン、ならびにインターロイキン（例えば、インターロイキン-1（IL-1）、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18およびIL-21）、コロニー刺激因子（例えば、顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）および顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子（GM-CSF））、インターフェロン（例えば、インターフェロン- α 、 β および γ ）、「S1因子」と呼ばれる幹細胞増殖因子、エリスロポエチンおよびトロポポエチンなどの造血因子が挙げられる。好適な免疫調節剤部分の例としては、IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、インターフェロン- γ 、TNF- α などが挙げられる。

【0116】

あるいは、本発明の抗体およびフラグメントは、抗体を酵素と連結することにより、検出可能なように標識することができる。この抗体-酵素複合体を適当な基質の存在下でインキュベートすると、酵素部分は基質と反応して、例えば分光光度的、蛍光測定的または視覚的手段により検出することができる化学部分を生じる。抗体を検出可能に標識するために使用できる酵素の例としては、マレイン酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 δ -V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 α -グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。

【0117】

治療薬または診断/検出薬は、ジスルフィド結合形成を介して還元された抗体成分のヒンジ領域に結合することができる。あるいは、このようなペプチドはN-スクシニル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート（SPDP）のようなヘテロ二官能性架橋剤を用いて抗体成分に結合させることができる。Yu et al., Int. J. Cancer 56:244(1994)。このような結合に関する一般的な技術は当該技術分野で周知である。例えば、Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING (CRC Press 1991); Upeslakis et al., "Modification of Antibody by Chemical Methods," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch et al.(eds), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION

, Ritter et al.(eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995) 参照。あるいは、治療薬または診断/検出薬は抗体のFc領域の炭化水素部分を介して結合させることもできる。この炭化水素基は、チオール基に結合している同じ薬剤の付加量を増大させるためにも使用できるし、あるいはこの炭化水素部分は異なるペプチドに結合するためにも使用できる。

【0118】

本発明の方法では、ターゲッティング可能な構築物は罹患組織を検出するのに有用な以上の放射性同位元素を含んでもよい。特に有用な診断用放射性核種としては、限定されるものではないが、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154}\text{-}$ ^{158}Gd 、 ^{32}P 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{55}Co 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{83}Sr 、またはその他の γ 、 β 、もしくは陽電子放射核種が挙げられ、好ましくは20~4,000keVの範囲、より好ましくは25~4,000keVの範囲、いっそうより好ましくは25~1,000keVの範囲、なおより好ましくは70~700keVの範囲の崩壊エネルギーを有するのが好ましい。有用な陽電子放出放射性核種の総崩壊エネルギーは好ましくは<2,000keV、より好ましくは1,000keV未満、最も好ましくは<700keVである。 γ 線検出を用いる診断/検出薬として有用な放射性核種としては、限定されるものではないが、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{75}Se 、 ^{97}Ru 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 $^{114\text{m}}\text{In}$ 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{169}Yb 、 ^{197}Hg 、および ^{201}Tl が挙げられる。有用なガンマ線放出放射性核種の崩壊エネルギーは好ましくは20~2000keV、より好ましくは60~600keV、最も好ましくは100~300keVである。

【0119】

本発明の方法では、ターゲッティング可能な構築物は罹患組織の治療に有用な一種以上の放射性同位元素を含んでよい。特に有用な治療用放射性核種としては、限定されるものではないが、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、および ^{211}Pb が挙げられる。治療用放射性核種は好ましくは20~6,000keVの範囲、好ましくはオージェ放射核種に関しては60~200keVの範囲、 β 放射核種については100~2,500keV、および α 放射核種については4,000~6,000keVの崩壊エネルギーを有する。有用な β 放射核種の最大崩壊エネルギーは好ましくは20~5,000keV、より好ましくは100~4,000keV、最も好ましくは500~2,500keVである。また、オージェ放射粒子を伴って実質的に崩壊する放射性核種も好ましい。例えば、Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189mおよびIr-192がある。有用な β 粒子放射性核種の崩壊エネルギーは好ましくは<1,000keV、より好ましくは<100keV、最も好ましくは<70keVである。また、 α 粒子の生成を伴って実質的に崩壊する放射性核種も好ましい。このような放射性核種としては、限定されるものではないが、Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213およびFm-255が挙げられる。有用な α 粒子放出放射性核種の崩壊エネルギーは好ましくは2,000~10,000keV、より好ましくは3,000~8,000keV、最も好ましくは4,000~7,000keVである。

【0120】

10

20

30

40

50

例えば、 ^{67}Cu は61.5というその半減期と β 粒子と γ 線を豊富に供給することから放射線免疫療法のためのより有望な放射性同位元素と考えられるが、これはキレート剤p-プロモアセタミド-ベンジル-テトラエチルアミン四酢酸(TEETA)を用いてPAM4抗体と結合させることができる。Chase, 前掲。あるいは、エネルギーに富んだ β 粒子を放出する ^{90}Y は、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)を用いてPAM4抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントに結合させることができる。

【0121】

可能性のあるさらなる放射性同位元素としては、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{75}Br 、 ^{198}Au 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{77}Br 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Tm 、 ^{197}Pt 、 ^{109}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{161}b 、 ^{166}Ho 、 ^{919}Au 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{201}Tl 、 ^{225}Ac 、 ^{76}Br 、 ^{169}Yb などが挙げられる。

【0122】

もう一つの態様では、放射線増感剤を本発明の裸の、または結合型のPAM4抗体またはそのフラグメントと組み合わせて使用することができる。例えば、放射性増感剤は放射性標識PAM4抗体または抗体フラグメントと組み合わせて使用することができる。放射線増感剤は、放射性標識抗体または抗体フラグメント単独で処理した場合に比べ、効力の増強が可能である。放射線増感剤は、引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする、D. M. Goldenberg (ed.), CANCER THERAPY WITH RADIOLABELED ANTIBODIES, CRC Press (1995)に記載されている。

【0123】

熱中性子活性化療法のためホウ素付加物を付加した担体を有する本発明のPMA4抗体もしくはそのフラグメント、またはPAM4融合タンパク質もしくはそのフラグメントも通常同様にして達成される。しかし、中性子照射を行う前に非標的PAM4免疫複合体がクリアリングされるまで待つのが有利である。クリアランスはPAM4抗体に結合する抗体を用いて促進することができる。この一般原理を記載したものとしては、米国特許第4,624,846号を参照。例えば、カルボランなどのホウ素付加物をPAM4抗体に結合させることができる。カルボランは当該技術分野で周知のようにペンダント側鎖上のカルボキシル官能基を用いて調製することができる。アミノデキストランなどの担体へのカルボランの結合はカルボランおよび縮合物のカルボキシル基を担体上のアミンで活性化されることにより達成することができる。次に、この中間複合体をPAM4抗体と結合させる。PAM4抗体複合体を投与した後、熱中性子の照射でホウ素付加物を活性化し、 α 放射により崩壊して毒性の高い、短期の作用を生じる放射性原子へと変換させる。

【0124】

さらに本発明は、被験体の癌を診断する方法を含む。診断は、医薬上好適な賦形剤中に調剤した診断上有効量の診断用複合体を投与し、該標識を検出することによって達成すればよい。PAM4抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントは診断/検出薬と結合させてもよいし、または、診断/検出薬とは結合させずに、診断/検出薬の投与前、同時もしくは投与後に投与してもよい。診断/検出薬として使用できる放射性薬剤は上記で述べた。好適な非放射性診断/検出薬は磁気共鳴イメージング、X線、コンピューター断層撮影法または超音波法に好適な造影剤である。磁気イメージング剤としては、例えば、本発明の抗体とともに用いる場合は、マンガ、鉄およびガドリニウムなどの非放射性金属を、2-ベンジル-DTPAならびにそのモノメチルおよびシクロヘキシル類似体を含む金属キレート剤の組み合わせと錯化したものを含む。引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする、2001年10月10日出願の米国出願番号09/921,290参照。

【0125】

本発明で意図されるMRI造影剤のような造影剤としては、例えば、ガドリニウムイオ

10

20

30

40

50

ン、ランタンイオン、ジスプロシウムイオン、鉄イオン、マンガンイオンまたはその他同等の標識、C T造影剤、および超音波造影剤が本発明における使用に好適である。

【0126】

本発明に好適な常磁性イオンとしては、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)およびエルビウム(III)が挙げられ、ガドリニウムが特に好ましい。

【0127】

X線イメージングなどのその他の場合に有用なイオンとしては、限定されるものではないが、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)、および特にビスマス(III)が挙げられる。蛍光標識としては、ローダミン、フルオレセインおよびレノグラフィンが挙げられる。ローダミンおよびフルオレセインはイソチオシアネート中間体を介して結合させる場合が多い。

【0128】

また、金属は磁気共鳴イメージング技術用のものなど、診断/検出薬においても有用である。これらの金属としては、限定されるものではないが、ガドリニウム、マンガン、鉄、クロム、銅、コバルト、ニッケル、ジスプロシウム、レニウム、ユーロピウム、テルビウム、ホルミウムおよびネオジムが挙げられる。抗体成分に放射性金属または常磁性イオンを付加するためには、イオンを結合させるための多様なキレート基を付着させた長い尾部を有する試薬と反応させる必要がある。このような尾部は、ポリリシン、多糖、または例えばエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、ビス-チオセミカルバゾン、ポリミキシン、およびこの目的のために有用なことが公知の基といった、キレート基に結合できるペンダント基を有する他の誘導体化または誘導体化可能な鎖であり得る。キレート剤は標準的な化学法を用いてPAM4抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントに結合させる。キレート剤は通常、免疫反応性の損失が最小で、凝集および/または内部架橋が最小となる分子との結合を形成し得る基により抗体に連結される。キレート剤を抗体に結合させるその他の、もっと特殊な方法および試薬は、1989年4月25日出願の「Antibody Conjugates」と題されたHawthorneの米国特許第4,824,659号に開示されており、引用することによりその開示内容を本明細書の一部とする。特に有用な金属-キレートの組み合わせとしては、一般エネルギー範囲20~2,000keVの診断用同位元素とともに用いられる2-ベンジルDTPAならびにそのモノメチルおよびシクロヘキシル類似体が挙げられる。同じキレート剤がマンガン、鉄およびガドリニウムのような非放射性金属と錯化した場合は、本発明の抗体とともに使用するとMRIに有用である。NOTA、DOTA、およびTEETAのような大環状のキレート剤は種々の金属および放射性金属とともに、最も詳しくは、それぞれガリウム、イットリウム、および銅などの放射性核種とともに用いられる。このような金属-キレート錯体は、環のサイズを目的の金属にあわせて調整することにより極めて安定にすることができる。大環状ポリエーテルのような他のリング型キレート剤は、RAITのための ^{223}Ra のような、安定に結合する核種を対照とするものであり、本発明に包含される。

【0129】

X線およびコンピューター断層撮影を増強するためには放射線不透性剤および造影剤が用いられるが、これらにはヨウ素化合物、バリウム化合物、ガリウム化合物、タリウム化合物などが含まれる。特定の化合物としては、バリウム、ジアトリアゾエート、エチオド化オイル、クエン酸ガリウム、イオカルム酸、イオセタム酸、ヨーダミド、ヨージパミド、ヨードキサム酸、イオグラミド、イオヘキソール、イオパミドール、イオパン酸、イオプロセム酸、イオセファム酸、イオセル酸、イオスラミドメグルミン、イオセメ酸、イオタスル、イオテトル酸、イオサラム酸、イオトロキシ酸、イオキサグル酸、イオキソトリアゾ酸、イボデート、メグルミン、メトリザミド、メトリゾエート、プロピリオドンおよ

10

20

30

40

50

び塩化タリウムが含まれる。

【0130】

本発明の抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントはまた、蛍光化合物で標識することもできる。蛍光標識M A bの存在は抗体を適当な波長の光に曝し、生じた蛍光を検出することにより決定される。蛍光標識化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリセリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o - フタルデヒドおよびフルオロスカミンが挙げられる。蛍光標識抗体は特にフローサイトメトリー分析に有用である。

【0131】

あるいは、本発明の抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントは、抗体と化学発光化合物を結合させることにより検出可能に標識することができる。化学発光タグ付きM A bの存在は、化学反応の経過の間に生じる発光の存在を検出することにより決定される。化学発光標識化合物の例としては、ルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルが挙げられる。

【0132】

同様に、生物発光化合物を用いて本発明の抗体およびそのフラグメントを標識することもできる。生物発光は触媒タンパク質が化学発光反応の効力を高める生体系で見られる一種の化学発光である。生物発光タンパク質の存在は発光の存在を検出することにより決定される。標識に有用な生物発光化合物としては、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンが挙げられる。

【0133】

よって、被験体において悪性腫瘍を診断する方法であって、被験体由来の検体（体液、組織または細胞）に対して、裸のP A M 4 M A bもしくはそのフラグメント、または裸の抗体融合タンパク質もしくはそのフラグメントを含んでなる組成物を用いてin vitro診断アッセイを行うことを含んでなる方法が記載される。細胞または組織においてP A M 4の存在を検出するには免疫組織化学が使用できる。好ましくは、診断される悪性腫瘍は癌である。最も好ましくは、癌は膵臓癌である。

【0134】

これに加えて、D T P A、D O T A、T E T AまたはN O T Aのようなキレート剤または好適なペプチドに、蛍光分子のような検出可能な標識または、重金属もしくは放射性核種のような細胞傷害剤を結合させることができる。例えば、治療上有用な免疫複合体は、光活性薬または色素を抗体融合タンパク質に結合させることにより得られる。蛍光色素のような蛍光組成物、および他の色素原、または可視光線に感受性のあるポルフィリンのような色素は好適な光線を病巣に当てることにより病巣の検出および治療に使用されてきた。治療においては、これは光照射、光療法または光線力学療法と呼ばれている（Jori et al. (eds.), PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES (Libreria Progett o 1985); van den Bergh, Chem. Britain 22:430 (1986)）。さらに、光療法を行うためにはモノクローナル抗体が光活性化色素と結合させられてきた。Mew et al., J. Immunol. 130:1473(1983); 前掲, Cancer Res. 45:4380 (1985); Oseroff et al., Proc. Natl. Ac ad. Sci. USA 83:8744 (1986); 前掲, Photochem. Photobiol. 46:83 (1987); Hasan et al., Prog. Clin. Biol. Res. 288:471 (1989); Tatsuta et al., Lasers Surg. Med. 9:422 (1989); Pelegrin et al., Cancer 67:2529 (1991)。しかし、これらの初期の研究には、特に抗体フラグメントまたはサブフラグメントの使用を伴った内視鏡療法の適用は含まれていなかった。従って本発明は、光活性薬または色素を含んでなる免疫複合体の治療的使用を意図する。

【0135】

治療目的では、本発明のP A M 4抗体およびそのフラグメントは治療上有効量で患者に投与する。抗体は、投与される量が生理学上有意であれば、「治療上有効量」で投与されると言われる。その存在が受容患者の生理に検出可能な変化をもたらす場合に、薬剤は生理学上有意である。

【0136】

診断/検出薬は、抗体部分、すなわち、抗体もしくは抗体フラグメント、またはサブフラグメント、融合タンパク質、およびそのフラグメントに結合させて投与し得る分枝または原子であり、疾病関連抗原を含む細胞を限局化することにより疾病を診断/検出する上で有用である。有用な診断/検出薬としては、限定されるものではないが、放射性同位元素、色素（ビオチン-ストレプトアビジン複合体を伴うものなど）、放射線不透過性物質（例えば、ヨウ素、バリウム、ガリウムおよびタリウム化合物など）、造影剤、蛍光化合物または分子、および磁気共鳴イメージング（MRI）のための増強剤（例えば、常磁性イオン）が挙げられる。米国特許第6,331,175号はMRI技術およびMRI増強剤に結合された抗体の調製を記載し、引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする。好ましくは、診断/検出薬は核イメージング、内視鏡検査および血管内検査のための放射性同位元素、磁気共鳴イメージングまたは超音波検査法で用いる増強剤、X線およびコンピューター断層撮影法のための放射線不透過剤および造影剤、ならびに内視鏡蛍光透視法を含む蛍光透視法のための蛍光化合物からなる群から選択される。抗体と結合されているか、または二重特異性プレターゲットティング法で用いられる蛍光剤および放射活性剤は、特に γ 、 β および陽電子放射核種を伴い、引用することによりその全開示内を本明細書の一部とするGoldenbergの米国特許第5,716,595号、同第6,096,289号および米国出願番号09/348,818に開示されているような、悪性腫瘍などの罹患組織または細胞塊に関連する標的抗原の内視鏡検査、手術中検査または血管内検査に特に有用である。内視鏡適用は、結腸などの内視鏡検査が可能な構造に換算している場合に用い得る。陽電子放射断層撮影法に有用な放射性核種としては、限定されるものではないが、F-18、Mn-51、Mn-52m、Fe-52、Co-55、Cu-62、Cu-64、Ga-68、As-72、Br-75、Br-76、Rb-82m、Sr-83、Y-86、Zr-89、Tc-94m、In-110、I-120およびI-124が挙げられる。有用な陽電子放出放射性核種の総崩壊エネルギーは好ましくは<2,000 keV、より好ましくは1,000 keV未満、最も好ましくは<700 keVである。 γ 線検出を用いる診断/検出薬として有用な放射性核種としては、限定されるものではないが、Cr-51、Co-57、Co-58、Fe-59、Cu-67、Ga-67、Se-75、Ru-97、Tc-99m、In-111、m-114m、I-123、I-125、I-131、Yb-169、Hg-197、およびTl-201が挙げられる。有用な γ 線放出放射性核種の崩壊エネルギーは好ましくは20~2000 keV、より好ましくは60~600 keV、最も好ましくは100~300 keVである。

【0137】

in vitro診断

本発明は生体サンプルをPAM4抗原の存在に関してin vitroスクリーニングするための、PAM4抗体（PAM4融合タンパク質およびそのフラグメントを含む）の使用を意図する。このような免疫アッセイでは、PAM4抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントは以下に記載されるように、液相で用いてもよいし、固相担体に結合させてもよい。ある好ましい態様では、PAM4抗体またはそのフラグメントはキメラ化されている。さらに好ましくは、PAM4融合タンパク質はキメラ化PAM4抗体を含んでなる。

【0138】

生体サンプルがPAM4抗原を含むかどうかを判定するためのスクリーニング方法の一例として、ラジオイムノアッセイ（RIA）がある。例えば、RIAの一形態では、試験下の物質を放射性標識PAM4抗原の存在下でPAM4抗原MAbと混合する。この方法では、試験物質の濃度は、MAbと結合している標識PAM4抗原の量と反比例し、遊離している標識PAM4抗原の量と直接相関する。他の好適なスクリーニング法も当業者には容易に明らかになる。

【0139】

あるいは、PAM4抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントが固相担体に結合されているin vitroアッセイを行うこともできる。例えば、ポリマーをコーティングしたビ

ーズ、プレートまたは試験管などの不溶性の支持体にM A bを結合させるためには、M A bをアミノデキストランのようなポリマーに結合させればよい。

【 0 1 4 0 】

他の好適なin vitroアッセイも当業者には容易に明らかになる。検出可能なように標識されたP A M 4抗体およびP A M 4抗原の固有濃度はインキュベーションの温度および時間、ならびにその他のアッセイ条件はサンプル中のP A M 4抗原の濃度、サンプルの性質などをはじめとする種々の因子によって異なる。P A M 4抗体のサンプルの結合活性は周知の方法に従って測定することができる。当業者ならば通常の実験を用いて各測定に関して実施可能で最適なアッセイ条件を決定することができるであろう。

【 0 1 4 1 】

特定の条件に関する慣例または必要に応じて洗浄、攪拌、振盪、濾過などの他の工程をアッセイに加えてもよい。

【 0 1 4 2 】

生体サンプル中のP A M 4抗原の存在は固相酵素免疫検定アッセイ(E L I S A)を用いて判定することができる。直接競合E L I S Aでは、純粋または半精製抗原調製物を、試験する体液または細胞抽出物に不溶な固相支持体に結合させ、検出可能なように標識した一定量の可溶性抗体を加えれば、固相抗原と標識抗体の間で形成された二元複合体の検出および/または定量が可能となる。

【 0 1 4 3 】

これに対し、「二部位E L I S A」または「サンドイッチアッセイ」としても知られる「二重決定基」E L I S Aでは少量の抗原しか必要とせず、このアッセイでは抗原の大量精製の必要はない。このように二重決定基E L I S Aは、臨床サンプル中の抗原の検出に関しては直接競合E L I S Aと呼ばれる。例えば、生検検体中のc - m y c癌タンパク質の定量のための二重決定基E L I S Aの使用(Field et al., Oncogene 4: 1463 (1989); Spandidos et al., AntiCancer Res. 9: 821 (1989))参照。

【 0 1 4 4 】

二重決定基E L I S Aでは、一定量の非標識M A bまたは抗体フラグメント(「キャプチャー抗体」)を固相支持体に結合させ、試験サンプルをキャプチャー抗体と接触させ、検出可能なように標識した可溶性抗体(または抗体フラグメント)を加えればキャプチャー抗体、抗原および標識抗体の間で形成された三元複合体の検出および/または定量が可能となる。抗体フラグメントとは、 $F(a b')_2$ 、 $F(a b)_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ などのような抗体の部分という。本発明では、抗体フラグメントP A M 4抗原のエピトープと結合するP A M 4 M A bの部分である。「抗体フラグメント」とはまた、特定の抗原に結合して複合体を形成することにより抗体のようにふるまういずれの合成または遺伝子操作タンパク質も含む。例えば、抗体フラグメントとしては、軽鎖可変領域からなる単離されたフラグメント、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「F v」フラグメント、および軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリンカーにより連結されている組換え単鎖ポリペプチド分子が挙げられる。抗体融合タンパク質とは、同じ、または異なる特異性を有する同じ、または異なる単鎖抗体または抗体フラグメントの、二以上のセグメントが連結されている、組換え生産された抗原結合分子である。融合タンパク質は単一の抗体成分、異なる抗体成分の多価または多重特異性の組み合わせ、または同じ抗体成分の複数コピーを含み得る。融合タンパク質はさらに、診断/検出薬および/または治療薬に結合された抗体または抗体フラグメントを含んでもよい。P A M 4抗体には、キメラ化およびマウス抗体、その抗体フラグメント、免疫複合体およびそのフラグメント、ならびに抗体融合タンパク質およびそのフラグメントが含まれる。

【 0 1 4 5 】

二重決定基E L I S Aを行う方法は周知である。例えば、Field et al., 前掲、Spandidos et al., 前掲、およびMoore et al., "Twin-Site ELISAs for fos and myc Oncoproteins Using the AMPAK System," in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, pages 273-281 (The Humana Press, Inc. 1992)参照。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 6 】

二重決定基 E L I S A では、可溶性抗体または抗体フラグメントは、キャプチャー抗体によって認識されるエピトープとは異なる P A M 4 エピトープと結合しなければならない。二重決定基 E L I S A は生検サンプル中に P A M 4 抗原が存在するかどうかを確認するために行うことができる。あるいは、このアッセイは体液の臨床サンプル中に存在する P A M 4 抗原を定量するために行うこともできる。この定量アッセイは精製された P A M 4 抗原の希釈物を含めて行うことができる。

【 0 1 4 7 】

本発明の P A M 4 M A b、融合タンパク質およびそのフラグメントはまたアッセイキットの製造にも適している。このようなキットはバイアル、試験管などのような一以上の密閉収容手段（これらの各収容手段は免疫アッセイの個々のヨウ素を含む）に収容するように区画化されている輸送手段を含んでなってもよい。

10

【 0 1 4 8 】

例えば、固相支持体に固定化されたキャプチャー抗体を含む収容手段と、液相として検出可能なように標識された抗体を含むさらなる収容手段が存在してもよい。さらなる収容手段には P A M 4 抗原の連続希釈物を含む標準液を含んでもよい。P A M 4 抗原の標準液は、横座標にプロットした P A M 4 抗原の濃度と縦座標上の検出シグナルを用いて標準曲線を作成するために使用できる。P A M 4 抗原を含むサンプルから得られた結果をこのようなプロットから推定し、生体サンプル中の P A M 4 抗原の濃度を得ることができる。

【 0 1 4 9 】

20

本発明の P A M 4 抗体、融合タンパク質およびそのフラグメントはまた、組織学的験体から作製した組織切片中の P A M 4 抗原の存在を検出するためにも使用できる。このような *in situ* 検出を用いて P A M 4 抗原の存在を判定したり、また、検査組織における P A M 4 抗原の分布を調べたりすることができる。*in situ* 検出は、検出可能なように標識した P A M 4 抗体を凍結組織切片に適用することで達成することができる。研究によれば、P A M 4 抗原はパラフィン包埋切片において保存される。*in situ* 検出の一般技術は当業者に周知である。例えば、Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application," in MAMMALIAN DEVELOPMENT: A PRACTICAL APPROACH 113-38 Monk (ed.) (IRL Press 1987)、および Coligan at pages 5.8.1-5.8.8 参照。

【 0 1 5 0 】

30

P A M 4 抗体、融合タンパク質およびそのフラグメントは好適ないずれかのマーカー部分、例えば放射性同位元素、酵素、オリゴヌクレオチド、蛍光標識、色素、色素原、化学発光標識、生物発光標識または常磁性標識で検出可能なように標識することができる。このような検出可能なように標識された P A M 4 抗体を作製および検出する方法は当業者に周知であり、また、以下にもさらに詳細に記載する。

【 0 1 5 1 】

マーカー部分は γ カウンターまたはシンチレーションカウンターを用いるなどの手段、またはオートラジオグラフィーによって検出される放射性同位元素であってもよい。ある好ましい態様では、診断用複合体は γ 線、 β 線または陽電子放出同位元素である。本明細書においてマーカー部分とは、所定の条件下でシグナルを生じる分子をさす。マーカー部分の例としては、放射性同位元素、酵素、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識および常磁性標識が挙げられる。本明細書において、診断薬または治療薬とは、診断または治療に有用な複合体を形成するように抗体部分と結合されている分子または原子である。診断薬または治療薬の例としては薬物、毒素、オリゴヌクレオチド、免疫調節剤、サイトカイン、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、オリゴヌクレオチド、酵素阻害剤、同位元素、他の抗体、キレート剤、色素、色素原、ホウ素化合物、およびマーカー部分が挙げられる。

40

【 0 1 5 2 】

当業者ならば本発明に従って使用できる他の好適な標識を知っている。マーカー部分と P A M 4 抗体との結合は当該技術分野で公知の標準技術を用いて達成することができる。

50

これに関する典型法は、Kennedy et al., Clin. Chim. Acta 70:1 (1976)、Schurs et al., Clin. Chim. Acta 81:1 (1977)、Shih et al., Int'l J. Cancer 46:1101 (1990)に記載されている。

【 0 1 5 3 】

上記の *in vitro* および *in situ* 検出法を診断または病状の病期判定の補助に用いてもよい。例えば、このような方法は膵臓癌など、PAM4 抗原を発現する腫瘍を検出するのに用いることができる。

【 0 1 5 4 】

in vivo 診断

本発明はまた、*in vivo* 診断のための PAM4 抗体の使用も意図する。放射性標識 MAb を用いた診断イメージングの方法は周知である。イムノシンチグラフィ技術では、例えば抗体を γ 線放出放射性同位元素で標識し、患者へ導入する。 γ 線を放出する放射性同位元素の位置および分布を検出するにはガンマカメラを用いる。例えば、Srivastava (ed.), RADIOLABELED MONOCLONAL ANTIBODIES FOR IMAGING AND THERAPY (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," in REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, Gennaro et al. (eds.), pp. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990)、および Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," in BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY 227-49, Pezzuto et al. (eds.) (Chapman & Hall 1993) 参照。

【 0 1 5 5 】

診断イメージングでは、放射性同位元素を PAM4 抗体に直接または中間的官能基を用いることで間接的に結合させればよい。有用な中間的官能基としては、エチレンジアミン四酢酸およびジエチレントリアミン五酢酸などのキレート剤が挙げられる。例えば、Shih et al., 前掲、および米国特許第 5,057,313 号参照。

【 0 1 5 6 】

患者に送達する線量は最小の半減期、最小の身体残留、および検出と正確な測定が可能な最少の同位元素量の最良の組み合わせとして同位元素を選択することで可能な限り低レベルに維持される。PAM4 抗体と結合させることができ、かつ、診断イメージングに適切な放射性同位元素の例としては ^{99m}Tc および ^{111}In がある。

【 0 1 5 7 】

PAM4 抗体、融合タンパク質およびそのフラグメントはまた、*in vivo* 診断目的での常磁性イオンおよび種々の放射線造影剤で標識することができる。磁気共鳴イメージングに特に有用な造影剤は、ガドリニウム、マンガン、ジスプロシウム、ランタン、または鉄イオンを含んでなる。さらなる薬剤としては、クロム、銅、コバルト、ニッケル、レニウム、ユーロピウム、テルビウム、ホルミウムまたはネオジムが挙げられる。PAM4 抗体およびそのフラグメントはまた、超音波造影 / 増強剤と結合させることもできる。例えば、超音波造影剤はキメラ化 PAM4 IgG またはそのフラグメントを含んでなるリポソームである。また、超音波造影剤はガス充填されたりポソームであるのが好ましい。

【 0 1 5 8 】

これに関して、二重特異性抗体は造影剤と結合させることができる。例えば、二重特異性抗体は超音波イメージングで用いるための一種以上のイメージ増強剤を含んでなってもよい。ある好ましい態様では、造影剤はリポソームである。リポソームはリポソームの外面に共有結合された二価の DTPA-ペプチドを含んでなるのが好ましい。リポソームがガス充填されているのがいっそう好ましい。

【 0 1 5 9 】

医薬上好適な賦形剤

治療適用において PAM4 抗体の作用期間を制御するためにさらなる薬学的方法を用いてもよい。徐放性製剤は PAM4 抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントと複合体形成するか、それらを吸着するポリマーの使用を通じて調製することができる。例えば、生体適合性ポリマーとしては、ポリ(エチレン-co-酢酸ビニル)マトリックスおよびステラリン酸二量体とセバシン酸の無水共重合体マトリックスが挙げられる。Sherwood e

10

20

30

40

50

t al., Bio/Technology 10: 1446 (1992)。このようなマトリックスからの P A M 4 抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントの放出速度は P A M 4 抗体、融合タンパク質またはそのフラグメントの分子量、マトリックス内の P A M 4 抗体の量、および分散している粒子の大きさによって異なる。Saltzman et al., Biophys. J. 55: 163 (1989); Sherwood et al., 前掲。その他の固相投与形は Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990)、および Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990) およびそれらの改訂版(1990)に記載されている。

【 0 1 6 0 】

被検体に送達されるキメラ化 P A M 4 抗体およびそのフラグメントは、抗体、免疫複合体、融合タンパク質またはそのフラグメント単独から構成されるか、または一以上の医薬上好適な賦形剤、一以上の付加的成分またはこれらのある組み合わせを含み得る。

【 0 1 6 1 】

本発明の免疫複合体、裸の抗体およびそのフラグメントは医薬上有用な組成物を調製するための公知の方法に従って調剤され、それによりこの免疫複合体または裸の抗体は混合物中で医薬上好適な賦形剤と合わさる。滅菌リン酸緩衝生理食塩水は医薬上好適な賦形剤の一例である。他の好適な賦形剤は当業者に周知である。例えば、Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990)、および Gennaro(ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990) およびそれらの改訂版を参照。

【 0 1 6 2 】

本発明の免疫複合体または裸の抗体は、例えばボーラス注射または点滴による静脈内投与のために調剤できる。注射製剤は、例えばアンプルのような単位投与形、または保存剤を加えた複数回投与用容器で提供することができる。この組成物は油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルションの形態をとってもよく、沈殿防止剤、安定剤および/または分散剤のような処方剤を含むことができる。あるいは、その活性成分は使用前に例えば滅菌パイロジェンフリー水のような好適なビヒクルで構成するための粉末形態であってもよい。

【 0 1 6 3 】

また、免疫複合体、裸の抗体、およびそのフラグメントは哺乳類に皮下投与または他の非経口経路でも投与できる。ある好ましい態様では、P A M 4 抗体またはそのフラグメントは一用量当たり 20 ~ 2000 mg タンパク質の用量で投与される。さらに、投与は点滴でも単回または複数回のボーラス注射によってもよい。一般に、ヒトにおいては投与される免疫複合体、融合タンパク質または裸の抗体の用量は、患者の年齢、体重、身長、性別、全身の健康状態、および以前の病歴といった因子によって異なる。通常、単回の静脈点滴として約 1 mg / kg ~ 20 mg / kg の範囲の用量の免疫複合体、抗体融合タンパク質または裸の抗体をレシピエントに与えるのが望ましいが、状況によってはより低い、またはより高い用量を投与してもよい。この用量は必要に応じて繰り返してもよく、例えば、1 週間に 1 回の投与を 4 ~ 10 週間、好ましくは 1 週間に 1 回の投与を 8 週間、そしてより好ましくは、1 週間に 1 回の投与を 4 週間繰り返してもよい。また、1 週間おきの投与を数ヶ月といったように低い頻度で投与してもよい。用量および日程を適宜調節して、種々の非経口経路により投与してよい。

【 0 1 6 4 】

本発明の P A M 4 抗体、融合タンパク質およびそのフラグメントは医薬上有用な組成物を調製する既知の方法に従って調剤することができ、それにより P A M 4 抗体は混合物中で医薬上許容される担体と合わさる。組成物は、その投与が受容患者によって許容される場合、「医薬上許容される担体」とであると言われる。滅菌リン酸緩衝生理食塩水は医薬上許容される担体の一例である。他の好適な担体は当業者に周知である。例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Ed. (1990) 参照。

【 0 1 6 5 】

治療目的では、治療上有効な量の免疫複合体、または裸の抗体を哺乳類に投与する。ヒト以外の動物被検体もまた意図されるが、本発明の好適な被検体は通常ヒトである。抗体製剤は、投与される量が生理学上有意であれば、「治療上有効量」で投与されると言われる。薬物は、その存在が受容哺乳類の生理に検出可能な変化をもたらす場合に、生理学上有意である。

【実施例】

【0166】

以下の実施例は本発明の態様を例示するものであり、特許請求の範囲を何ら限定するものではない。

【0167】

下記実施例はPAM4 MA bおよびCaPan1ヒト膵臓癌を用いた実験的研究を述べる。CaPan1ヒト膵臓癌は皮下および正所双方の異種移植片として担持される。MA bおよび薬剤は生存期間に著しい向上をもたらした。高濃度のPAM4モノクローナル抗体は、異種移植ヒト腫瘍モデルをターゲティングし、最初の患者群の大多数の膵臓腫瘍をターゲティングすることが示される。患者の血液中のPAM4反応性抗原を定量するためにin vitro免疫アッセイを用いると、膵炎ならびに他の疾病および正常群から膵臓癌を識別する能力が有望であることが明らかである。

【0168】

PAM4 MA bを用いた臨床試験は、患者の大部分の病変部がターゲティングされたこと、および正常組織における取り込みが示されなかったことを示している。線量計測によれば、10～20 cGy/mCiを腫瘍に送達することができ、腫瘍対赤色髄比は3：1～10：1であったことが示された。これらのデータは、PAM4が膵臓癌の治療の第一相試験の進展に有用であることを示唆している。

【0169】

実施例1 免疫組織化学染色研究

正常成体組織に対する免疫組織化学によれば、PAM4反応性エピトープが胃腸管に制限され、染色は弱かったが、明らかに陽性であることを示した(表1)。膵管、細導管、腺房および島細胞を含む正常な膵臓組織は染色は陰性であった。抗原として組織ホモジネートを用いたPAM4に基づく酵素免疫アッセイは全般的に免疫組織化学データを支持した(表2)。PAM4エピトープは正常な膵臓およびその他の非胃腸管組織には存在しなかった。腫瘍組織では、PAM4は25のうち21の膵臓癌(85%)と反応性があった(表3)。PAM4反応性は腫瘍同定のステージと相関しているようであった。例えば、よく分化した膵臓腫瘍およびある程度分化した膵臓腫瘍21のうち20が陽性であり、一方、分化の不十分な腫瘍では4つのうち1つだけが陽性であった。一般に、分化の不十分な腫瘍は総ての膵臓癌の10%に満たない。

【0170】

これらの研究により、PAM4反応性および組織分布(正常なものと癌の双方)は、CA19.9、DUPAN2、SPAN1、Nd2、B72.3、およびLewis抗原に関して報告されているものとは異なることが示された。これらのMA bのあるもので行った交差遮断研究と考え合わせると、そのデータはPAM4 MA bは独特かつ新規なエピトープを認識することを示唆する。CA19.9、DUPAN2、およびaLe^aと比べた場合、PAM4はその組織分布により制限があるものと思われ、高いパーセンテージの膵臓腫瘍と反応性がある。さらに、同じ濃度でも反応全体の強度が大きく、腫瘍内の高いパーセンテージの細胞と反応性がある。最後に、PAM4は、慢性膵炎検体12のうち3と弱い反応性を示すに過ぎず、一方、CA19.9およびDUPAN2は12総ての検体と強い反応性を示した。特異性は用いるアッセイのタイプおよび試験する組織の範囲および数、正常膵臓組織と腫瘍膵臓組織を識別するPAM4の能力によって異なることが認識されるが、は臨床適用の発展的検討を行うためには、癌検体の大きなパーセンテージと反応するその能力ならびに高い反応強度が重要な原理であった。

【0171】

【表 1】

表 1 : MA b PAM4 を用いた正常成体組織の免疫ペルオキシダーゼ染色

組織	染色 反応
脾臓 (22) ^a	
脾管	-
腺房	-
脾島	-
顎下腺 (2)	-
食道 (2)	-
胃 (3)	+粘液分泌細胞
十二指腸 (3)	+杯状細胞
空腸 (3)	+杯状細胞
回腸 (3)	+杯状細胞
結腸 (5)	+杯状細胞
肝臓 (3)	-
胆嚢 (2)	-
気管支 (3)	-
肺 (3)	-
心臓 (3)	-
脾臓 (3)	-
腎臓 (3)	-
膀胱 (3)	-
前立腺 (2)	-
精巣 (2)	-
子宮 (2)	-
卵巣 (2)	-

^a 括弧内は調べた個々の検体の数

【表 2】

表 2 : E I Aによる正常成体組織ホモジネートとのモノクローナル抗体PAM4反応性

組織	ug/g 組織 ^a
脾臓	6.4
食道	8.1
胃	61.3
十二指腸	44.7
空腸	60.6
結腸	74.5
肝臓	0.0
胆嚢	5.6
心臓	3.7
脾臓	3.4
腎臓	6.6
膀胱	4.9
甲状腺	3.5
副腎	1.3
子宮	2.6
精巣	3.9
CaPan1 脾臓腫瘍	569

^a 値は 2 つの剖検検体の平均

【 0 1 7 3 】

【表 3】

表 3 : 数種のモノクローナル抗体の膵臓腫瘍との免疫組織化学的反応性

	分化	PAM4	CA19.9	aLe ^a	DUPAN2
1	W	+++	-	-	+++
2	M	++	+++	+++	+
3	M	+	-	+	+
4	M	+++	+++	+++	+
5	M	++	+	-	-
6	M	+	ND	ND	ND
7	M	+++	+++	+++	+++
8	M	+	-	-	+++
9	M	++	+	++	-
10	M	++	++	++	+++
11	M	++	+++	+++	+
12	M	++	+	+	+++
13	M	+	+++	+++	+
14	M	++	+	+	++
15	M	+++	+	+	++
16	M	+	+	++	-
17	M	-	+	+	-
18	M	++	++	++	++
19	M	+++	+	+++	++
20	M	+	-	-	-
21	M	+++	+++	+	++
22	P	+	+	+	+++
23	P	-	-	-	-
24	P	-	-	-	-
25	P	-	-	+	-
合計		21/25	17/24	18/24	16/24

-: 陰性; +: 5~20%の組織が染色; ++: 21~50%の組織が染色; +++: >50%の組織が染色;

W, M, P: 十分な分化、ある程度分化、分化不十分; 転移組織; ND: 実施せず

【表 4】

表 4 : M A b P A M 4 による腫瘍組織の免疫ペルオキシダーゼ染色

組織	陽性／総数
脾臓	21/25
結腸	10/26
胃	1/5
肺	1/15
乳房	0/30
卵巣	0/10
前立腺	0/4
肝臓	0/10
腎臓	0/4

10

【 0 1 7 5 】

実施例 2 放射性標識 P A M 4 の in vivo 生体分布および腫瘍ターゲッティング

P A M 4 の最初の生体分布研究は、予測される分化の範囲にわたる、一連の 4 種の異なる異種移植ヒト脾臓腫瘍において行った。用いた 4 つの腫瘍系統 A s P c 1、B x P c 3、H s 7 6 6 T および C a P a n 1 は、腫瘍内に ^{131}I -P A M 4 の濃縮を示し（範囲は 3 日目で 2.1% ~ 4.8% I D / g）、同時に投与された非特異的なイソタイプ合致 A g 8 抗体（範囲は 3 日目で 3.6% ~ 9.3% I D / g）よりも有意に高かった（ $p < 0.01 \sim 0.001$ ）。この生体分布データを用いて、A s P c 1、B x P c 3、H s 7 6 6 T および C a P a n 1 それぞれに注射量 12, 230; 10, 684; 6, 835; および 15, 843 c G y / m C i の腫瘍に対する潜在的線量を見積もった。実際の最大許容量（M T D）0.7 m C i では、P A M 4 は異種移植腫瘍モデルの各々に実質的な線量をもたらすことができた。各腫瘍系統において、放射性標識 P A M 4 の血液レベルは非特異的 A g 8 よりも有意に低かった（ $p < 0.01 \sim 0.001$ ）。P A M 4 からの血液への潜在線量は A g 8 のものより 1.4 ~ 4.4 倍低かった。P A M 4 からの腫瘍への線量を P A M 4 から血液への線量に対してノーマライズしたところ、腫瘍が受け取った線量は 2.2; 3.3; 3.4 であり、それぞれ血液よりも 13.1 倍高かった。重要なことに、非腫瘍組織に対する潜在線量は最小であった。

20

30

【 0 1 7 6 】

C a P a n 1 腫瘍モデルを用い、P A M 4 の生体分布を抗 C E A 抗体である M N 1 4 と比べた。腫瘍内の P A M 4 の濃度は初期の時点では M N 1 4 よりもずっと高く、3 日目の腫瘍：血液比は M N 1 4 では 2.7 ± 1.9 であるのに対し、P A M 4 では 12.7 ± 2.3 であった。腫瘍内への P A M 4 の取り込みは初期の時点で M N 1 4 より有意に高かったが（1 日目では $p < 0.001$ ；3 日目では $p < 0.01$ ）、線量計測によれば、14 日の試験期間にわたって、M N 1 4 に比べ、P A M 4 から腫瘍へは 3.2 倍高い線量であったに過ぎなかったことが示された。これは P A M 4 が腫瘍から迅速にクリアランスされるためであり、従って後の時点では、腫瘍内には 2 種の抗体とも同等濃度が存在していた。腫瘍からの P A M 4 の迅速なクリアランスは B x P c 3 および H s 7 6 6 T においても注目されたが、A s P c 1 腫瘍モデルでは見られなかった。これらの知見は、例えば結腸直腸癌における G 9 および B 7 2.3 などの他の抗ムチン抗体に関して報告されているもの（各々、M N 1 4 抗体と比べた場合に長い保持時間を示した）とは異なった。P A M 4 の代謝についての研究から得られた結果は、まず腫瘍細胞に結合した後、抗体が迅速に放出され、おそらくは異化作用を受けるか、または抗原：抗体複合体として隔離される。これは、血液クリアランスが極めて速いことを除けば、患者における抗体の使用にとって好ましくない意味を持つであろう。これらのデータは、 ^{131}I が治療適用のための同位元素の適当な選択肢とはなり得ないことを示唆する。頻繁に投与できる ^{90}Y または ^{188}Re

40

50

R eのような短命な同位元素がより効果的な試薬であるといえよう。

【0177】

P A M 4は、C a P a n 1腫瘍モデルを除き、正常組織へのターゲッティングの証拠は示されず、C a P a n 1腫瘍モデルでは、小さいが、実質的に有意な脾臓取り込みが見られた(範囲は3日目で3.1~7.5% I D / g)。この種の脾臓ターゲッティングは抗ムチン抗体B 7 2.3およびC C 4 9の臨床適用で見られている。重要なことに、これらの研究では、また、脾臓ターゲッティングが抗体の取り込みに影響しなかったし、各スキャンの解釈の妨げとならなかった。これらの研究から、脾臓ターゲッティングが脾臓中の交差反応抗原によるものでなく、F_c受容体による結合によるものでもなく、むしろ以下の可能性：脾臓にトラップされた抗原の直接ターゲッティング、または血液中で形成されたか、または腫瘍部位から放出された抗原：抗体複合体の間接的取り込みの一以上によるものであったことを示唆した。後者には血液中に免疫複合体が存在することが必要であるが、5分といった初期および7日目といった後期の検体をゲル濾過(H P L C, G F - 250カラム)により調べた場合には見られず、放射性標識抗体は本来のものとして溶出した。前者の説明は、C a P a n 1腫瘍が大量のP A M 4反応性抗原を産生し、検討した他の腫瘍細胞系統よりも100~1000倍高いという点でより可能性が高いと思われる。これらの他の腫瘍系統においてP A M 4による脾臓ターゲッティングがないということから、この減少は過剰な抗原産生に関連したものであることが示唆される。いずれにせよ、脾臓ターゲッティングはタンパク質用量をもとの2 μ gから10 μ gに引き上げることによって克服することができる。脾臓にトラップされた抗原の多くはおそらく放射性標識抗体よりも非標識P A M 4と複合体形成した。タンパク質用量を増すことで、腫瘍または非腫瘍組織へのP A M 4のターゲッティングに悪影響は無かった。実際、タンパク質用量を100 μ gまで引き上げたところ、C a P a n 1腫瘍内の放射性標識P A M 4濃度が二倍を超えた。

【0178】

実施例3 無胸腺ヌードマウスにおける正所脾臓腫瘍モデルの開発

動物モデルにおける脾臓癌の臨床像をさらに近似させるため、出願者らは脾臓のヘッドに直接腫瘍細胞を注入することにより正所モデルを開発した。正所C a P a n 1腫瘍は、腹水が貯留し、10~14週間で死に至るまでは明らかな徴候なく次第に成長した。移植後3~4週間で、動物は触知可能な約0.2 gの腫瘍を発達させた。成長8週間以内に約1.2 gの一次腫瘍が、肝臓および脾臓への転移を伴って見られた(転移腫瘍1~3個/動物; 各腫瘍<0.1 g)。10~14週間で腹水の貯留を伴う横隔膜のシーディング(seeding)が明らかになった。通常、腹水の形成および副次的な黄疸が腫瘍成長の最初の明らかな徴候であった。腹水は腹腔内における体液の蓄積であり、黄疸は血中の過剰な胆汁色素による皮膚および眼の黄化である。この時点で腫瘍は1~2 gとかなり大きくなり、動物は死に至るまで長くて3~4週間でしかなかった。

【0179】

4週齢の正所腫瘍(約0.2 g)を担持する動物に投与した腫瘍放射性標識¹³¹I-P A M 4は、1日目に7.9±3.0の局在インデックス(localization indice)で一次腫瘍への特異的ターゲッティングを示し、14日目には22.8±15.3に高まった。タンパク質の組織への特異的ターゲッティングの形跡は見られなかった。肝臓および脾臓への腫瘍転移が見られた場合には、両転移ともターゲッティングされ、高い濃度の放射性標識抗体を有した。さらに、約半分の動物が切開部位に皮下腫瘍を発症した。同じ動物の正所および皮下腫瘍のターゲッティングにおいて有意な差はなく、動物が付加的な腫瘍を持つ持たないにかかわらず、正所腫瘍のターゲッティングにおいて有意な差はなかった。見積もられたP A M 4から一次腫瘍および血液への線量はそれぞれ6,704および1,655 c G y / m C iであった。

【0180】

実施例4 循環腫瘍抗原の定量のための酵素免疫アッセイの開発

ウサギポリクローナル抗脾臓ムチン由来非標識精製I g GとともにP A M 4をキャプチ

ヤー試薬として用い、次いで検出試薬としてペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギIgGを用いる酵素免疫アッセイを開発した。このアッセイの使用から次のような結果が得られた。

【0181】

アッセイによって検出された抗原の範囲内で、得られた変動係数値は10%に満たなかった。25の健常個体からの血清を調べたところ、平均±S.D.は4.0±3.1単位であった。次に、陽性応答の限界値を平均+2S.D.=10.2単位に設定した。全37人の膵臓癌患者のうち32人、すなわち86%がこのアッセイで陽性であり、13人の膵炎患者では3人だけが陽性であった。PAM4抗原は直腸結腸癌患者の55%(18/33)で上昇したが、この数字は免疫組織化学によりPAM4と反応性のある結腸直腸癌検体の40%とだいたい同じである。他の癌では、16人の卵巣癌患者のうち4人、20人の乳癌患者のうち5人でPAM4抗原陽性であり、彼らは総て疾病の進展を示した。また、下記の表5で示されるように、膵臓癌の中央値(84.5単位)は、これらの症例の圧倒的多数が後期で大きな腫瘍負荷を有していたとしても、他の総ての癌の群(胆管癌を除く)よりも10倍高いオーダーであった。

【0182】

【表5】

表5： 血清とのPAM4反応性

	n	単位/ml				
		平均	SD	中央値	範囲	陽性% ^a
正常	25	4.0	3.1	4.7	0.0-9.4	0%
膵炎	13	14.6	20.3	6.8	0.4-66.7	23%
膵臓 CA	37	317.5	427.1	84.5	0.9-1000	86%
胆汁 CA	8	155.4	343.8	37.8	6.6-1000	63%
肝癌 CA	30	7.9	8.0	6.4	0.0-32.8	30%
結腸直腸 CA	33	50.0	171.6	11.8	3.4-1000	55%
肺 CA	38	25.8	44.6	9.3	0.0-196.0	39%
乳房 CA	20	11.1	18.5	5.8	0.0-83.3	25%
卵巣 CA	16	68.9	248.4	5.5	0.0-1000	25%
非ホジキン リンパ腫	14	6.6	3.1	7.5	2.2-12.8	14%

^a 限界値 10.2 単位/ml (平均値±2S.D.)

【0183】

これらの知見に加え、管理におけるこのPAM4アッセイの使用の可能性を検討するため、同所モデルで予備試験を行った。同所CaPan1腫瘍(腫瘍重0.15gと推定)の移植後2週間の時点で、血中に検出可能な抗原を有していた動物はいなかった。4週間の時点(腫瘍重は0.2gと推定)では、5個体のうち1個体で検出可能なレベルの抗原(72単位)を示し、6週間の時点(腫瘍重0.4gと推定)では、5個体のうち4個体で定量可能な抗原(範囲は98~6080単位)を有していた。血清が運ぶ抗原が検出できる最初の時点の決定という点での重大な制限因子は得られる血液の量が限られていることであったが、繰り返し採血できた。その後、血清はアッセイ前に1:10希釈した。

【0184】

実施例5 膵臓癌の試験的放射免疫療法

治療用¹³¹I-PAM4の使用に関する最初の試験は、無胸腺マウスで皮下異種移植片として成長させたCaPan1腫瘍を用いて行った。同等量の非特異的Ag8の治療効果とも比較する試験において、0.25gの腫瘍を担持する動物に350μCiの¹³¹I-PAM4を投与した。1cm³の腫瘍を担持する動物への¹³¹I-PAM4の投与のMTDは700μCiである。5週間目よ6週間目で、PAM4処置した動物は劇的な

腫瘍退縮を示し、27週間でも8個体のうち5個体で腫瘍のないままであった。無処置ならびにAg8処置動物は、腫瘍成長の急速な進行を示し、この二つの対照群の間で有意な差は見られなかった。7週間で、無処置群の腫瘍は最初の時点の 20.0 ± 14.6 倍成長したが、 ^{131}I -Ag8処置腫瘍は 4.9 ± 1.8 倍しか成長しなかった。この時点で、PAM4腫瘍はもとの大きさの 0.1 ± 0.1 倍に退縮し、無処置 ($p < 0.001$) および非特異的Ag8処置 ($p < 0.01$) 動物の双方の間に有意差があった。

【0185】

CaPan1腫瘍は ^{131}I -PAM4処置に感受性があったが、結果、すなわち、腫瘍の退縮または進行は最初の腫瘍の大きさをはじめとする多くの因子に依存する。従って、0.25g、0.5g、1.0g、または2.0gのCaPan1腫瘍負荷を有する動物群を一回量の $350 \mu\text{Ci}$ ^{131}I -PAM4で処置した。最初の腫瘍の大きさが0.25gおよび0.5gの動物の大多数(各群10個体のうち9個体)は少なくとも処置6週間後に腫瘍退縮または成長阻害を示した。1.0g腫瘍群では、7個体のうち5個体で6週間の間、腫瘍成長がなく、2.0g腫瘍群では、9個体のうち6個体で6週間の間、腫瘍成長がなく、その後、進行した。350 μCi 一回では翁腫瘍には効果がなく、一回投与はあまり適切な投与計画とは言えないが、毒性試験は放射免疫療法を複数回行うことができることを示している。平均1.0gのCaPan1腫瘍を担持する動物に、350 μCi ^{131}I -PAM4を一回か二回、0時点と4週間目に施与するか、無処置とした。無処置群の平均生存期間は 3.7 ± 1.0 週間であった(生存とは腫瘍が 5 cm^3 に達する時間と定義)。動物は3週間といった早期に死に至り、6週間を過ぎて生き残った動物はいなかった。350 μCi ^{131}I -PAM4の一回投与により、生存期間は 18.8 ± 4.2 週間まで有意に延長された($p < 0.0001$)。動物の死亡の範囲は3週間から25週間まで延長された。26週間の試験期間の終了時に生存していた動物はいなかった。

【0186】

一回投与群に比べて二回投与群では生存期間の有意な延長が見られた。動物の半数が、腫瘍の大きさ $1.0 \sim 2.8 \text{ cm}^3$ で、26週間の時点で生存しており、平均腫瘍成長率は最初の腫瘍サイズのは 1.6 ± 0.7 倍であった。26週間目に生存していなかった動物については、平均生存期間(17.7 ± 5.3 週間)は一回投与群と同程度であった。

【0187】

PAM4による治療試験では正所腫瘍モデルも用いた。4週齢の正所腫瘍(腫瘍重0.25gと推定)を担持する動物群を無処置のままか、350 μCi ^{131}I -PAM4または350 μCi の ^{131}I -非特異的Ag8の一回投与で処置した。無処置動物は10週までに死亡率50%を示し、15週間目に生存しているものはいなかった。腫瘍成長4週間目に非特異的 ^{131}I -Ag8を投与した動物は7週間で死亡率50%を示し、14週間目に生存しているものはいなかった。この二群の間に統計学的(ログランク解析)に有意な差はなかったが、Ag8処置動物の約半数で放射線毒性が起こった可能性がある。しかし、放射性標識PAM4は、無処置またはAg8処置動物と比べた場合に有意な生存利益をもたらした($p < 0.001$)、試験の終了時6週間の時点で生存率70%であった。この時点で生存していた動物を屠殺し、腫瘍の大きさを測定した。動物は平均重1.2gの腫瘍を有しており、また、7個体のうち4個体で1または2箇所の小さな($< 0.1 \text{ g}$)転移の形跡があった。成長6週間の時点で、これらの腫瘍は8週齢の腫瘍に典型的なものであった。

【0188】

実施例6 理学的ジェムザール(Gemzar)化学療法と ^{131}I -PAM4の組み合わせ

ゲムシタピン(ジェムザール)と ^{131}I -PAM4放射免疫療法の併用の最初の試験はチェッカーボードアレイとして行い、ジェムザール一回量(0、100、200、500mg/kg)に対して ^{131}I -PAM4一回量([MTD = 700 μCi] MTDの100%、75%、50%、0%)とした。組み合わせのMTDは500mg/kgジ

エムザールと $350 \mu\text{Ci } ^{131}\text{I} - \text{PAM4}$ (50%MTD) であることが分かった。毒性は、最大値を無毒として体重減少により測定するが、体重の20%の減少とする。組み合わせ処置プロトコールはジェムザール単独よりも有意に効果が高かったが、放射免疫療法単独より効果が高いとは言えなかった。次の試験は、真の相乗的治療効果が見られるかどうかを調べるため、低容量のジェムザールと放射免疫療法で行った。約 1 cm^3 (体重の約5%) の腫瘍を担持する動物に、0、3、6、9および12日目にジェムザール 100 mg/kg を投与し、0日目に $100 \mu\text{Ci}$ の $^{131}\text{I} - \text{PAM4}$ を施与した。治療効果が見られ、統計学的に有意 ($p < 0.0001$) な退縮 (5個のうち2個の腫瘍が 0.1 cm^3 未満) および/またはジェムザール単独と比べて腫瘍の成長阻害を伴っていた。さらに注目すべきは、体重の点で、毒性が見られなかったことである。この組み合わせ処置プロトコールは、必要であれば、上記の放射免疫療法単独試験で行ったように、4週目に二回目の処置をはじめ、複数回施与することができる。

【0189】

実施例7 手術不能膵臓癌腫を有する患者の治療

広範な手術不能膵臓腺癌、実質的な体重減少 (30ポンドを超える)、嗜眠および虚弱を伴う56歳の男性に $^{90}\text{Y} - \text{PAM4}$ 放射性標識キメラ化抗体を 30 mCi の ^{90}Y の用量で、および 50 mg の抗体タンパク質を2時間静脈点滴で投与した。5日後、次に患者にゲムシタピン化学療法の標準的なコースを施与した。数ヶ月後、療法による副作用の形跡がなければ、この治療計画を繰り返す。追跡検査中、数ヶ月後、患者は活動的になり、体重減少も遅くなるものと推測された。膵臓のCTスキャンは、安定疾病または腫瘍塊の若干の減少を示唆するものと思われた。数ヶ月後に検査を繰り返すと、コンピューター断層撮影法により、腫瘍重の実質的減少を示すはずであり、従って、患者に対し、膵臓腫瘍塊の切除を考慮し得る。

【0190】

実施例8 二重特異的 $\text{PAM4} \times 734$ および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ または ^{111}In 標識ペプチドハプテンによるプレターゲティング

プレターゲティングアプローチを用いた膵臓癌のイメージングに関して、発明者らは、キメラ $\text{PAM4} (\text{cPAM4}) \text{Fab'}$ およびマウス $734 (\text{m734}) \text{Fab'}$ からなる二重特異性 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 抗体 (bsMAB) を調製した。 m734 抗体は In-DTPA 複合体を認識する。この bsMAB を ^{125}I で標識し、ヒト膵臓癌異種移植片 (CaPan1) を担持する無胸腺ヌードマウスに注射した ($7 \mu\text{Ci}$; $15 \mu\text{g}$)。キメラリツキシマブ (抗 CD20 モノクローナル抗体) および m734 から作製した非ターゲティング $\text{F}(\text{ab}')_2$ 抗体 bsMAB を ^{131}I で標識し、対照として同時注射した。種々の時点 (注射後4、24、36、48および72時間後) でマウスを解剖し、組織を摘出し、計数してグラム当たりの注入量 (% ID/g) を求めた。対照 bs リツキシマブに比べて、各時点での bsPAM4 の腫瘍取り込み量は有意に高かった ($p < 0.032$ より良好)。このタイプのプレターゲティング系を用いた発明者らのこれまでの実験から、良好な腫瘍:非腫瘍比を得るには1% ID/g 未満の血液レベルが必要であることが示唆された。 bsPAM4 の投与後36時間では、血中 $1.10 \pm 0.40\% \text{ID/g}$ であったが、注射後48時間では $0.56 \pm 0.08\% \text{ID/g}$ まで下がった。これら二つの時点での腫瘍取り込みはそれぞれ $6.43 \pm 1.50\% \text{ID/g}$ および $5.37 \pm 2.38\% \text{ID/g}$ であった。これらの値は、36時間および48時間の時点でそれぞれ腫瘍中 $0.65 \pm 0.33\% \text{ID/g}$ および $0.47 \pm 0.19\% \text{ID/g}$ ($p < 0.018$ および $p < 0.0098$) であった対照 bs リツキシマブよりも有意に高かった。しかし、血液クリアランス速度はまさに同等で、有意な差はなかった。

【0191】

これらのデータに基づき、放射性標識ペプチド-ハプテンを bsMAB の投与後40時間目に投与した CaPan1 腫瘍担持マウスでプレターゲティング実験を行った。二種類のペプチド IMP-192 および IMP-156 を用い、各々は 734 MAB による認識のための二価 DTPA を含有するが、一方は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 安定結合のために特異的な付

加的な基を含まない (IMP - 192)。腫瘍担持マウス (腫瘍体積 $\sim 0.30 \text{ cm}^3$) に ^{125}I -bsPAM4 ($6 \mu\text{Ci}$; $15 \mu\text{g}$) を投与し、40 時間後に放射性標識ペプチド - ハプテン ($34.5 \mu\text{Ci}$; 1.5×10^{-11} モル; bsMAb: ペプチド = 10:1) を投与した。一方のマウス群に $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識 IMP 192 を投与し、もう一方のマウス群には ^{111}In 標識 IMP 156 を投与した。非特異的ターゲティングの対照としては、放射性標識ペプチドの投与前に ^{125}I -bsリツキシマブを投与した二群、および ^{111}In または $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識ペプチド単独を投与した別の二群を含んだ。

【0192】

ペプチドを投与した後、2 時間および 24 時間でマウスを屠殺し、腫瘍および種々の組織について %ID/g を求めた。発明者らのこれまでの知見と一致して、非ターゲティング対照 bsリツキシマブに比べて腫瘍における bsPAM4 は有意に高く、それぞれ $8.2 \pm 3.4\%$ および $0.3 \pm 0.08\%$ ID/g ($p < 0.0001$) であった。このことから、 ^{111}In -IMP 156 ($20.2 \pm 5.5\%$ ID/g 対 $0.9 \pm 0.1\%$ ID/g、 $p < 0.0001$) という有意に高い腫瘍取り込みであることが解釈される。bsPAM4 でプレターゲティングされたマウスにおける $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IMP 192 の腫瘍取り込みも、bsリツキシマブでプレターゲティングされたもの ($16.8 \pm 4.8\%$ ID/g 対 $1.1 \pm 0.2\%$ ID/g、 $p < 0.0005$) よりも有意に高かった。単独で用いた場合の各ペプチドの腫瘍取り込みは、bsPAM4 を投与したマウスの場合よりも有意に低かった (それぞれ、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IMP 192 および ^{111}In -IMP 156 に関して $0.2 \pm 0.05\%$ ID/g および $0.1 \pm 0.03\%$ ID/g、 $p < 0.0004$ および $p < 0.0001$)。

【0193】

3 時間の時点と同様、ペプチド注射後 24 時間 (bsMAb 投与から 64 時間後) での腫瘍中の bsPAM4 は、bsリツキシマブよりも有意に高かった (それぞれ $6.4 \pm 2.2\%$ ID/g 対 $0.2 \pm 0.09\%$ ID/g; $p < 0.0001$)。この時点で、bsPAM4 でプレターゲティングされたマウスの腫瘍では $11.1 \pm 3.5\%$ ID/g、 ^{111}In -IMP 156 および $12.9 \pm 4.2\%$ ID/g、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IMP 192 に対して、bsRIT でプレターゲティングされた腫瘍では $0.5 \pm 0.2\%$ ID/g および $0.4 \pm 0.03\%$ ID/g であった (それぞれ $p < 0.0008$ および $p < 0.0002$)。ペプチド単独を投与したマウスでは、bsPAM4 プレターゲティングペプチドの場合と比べ、腫瘍における $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IMP 192 ($0.06 \pm 0.02\%$ ID/g、 $p < 0.0007$) および ^{111}In -IMP 156 ($0.09 \pm 0.02\%$ ID/g、 $p < 0.0002$) は有意に低かった。

【0194】

【表 6】

表 6 初期時点での腫瘍：非腫瘍組織比						
組織	プレターゲッティング ¹¹¹ In-ペプチド (3 時間)		プレターゲッティング ^{99m} Tc-ペプチド (3 時間)		¹²⁵ I-bsPAM4 F(ab') ₂ (4 時間)	
	平均値	(±STD)	平均値	(±STD)	平均値	(±STD)
	腫瘍	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00
腫瘍	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
肝臓	36.07	11.74	16.66	7.19	2.34	0.61
脾臓	33.40	20.62	14.62	9.12	2.15	0.74
腎臓	7.79	2.81	8.13	3.33	1.10	0.20
肺	44.55	12.99	15.75	5.85	1.58	0.37
血液	36.47	8.28	9.93	5.21	0.47	0.11
骨	123.24	40.00	—	—	—	—
網状骨	378.00	124.57	—	—	—	—
脾臓	155.55	30.07	73.29	32.85	4.65	1.23
腫瘍重(g) (±STD)	0.189	(0.070)	0.174	(0.050)	0.179	(0.139)

【0195】

上記の表はこれらの群について、放射性標識産物の投与後の初期の各時点における種々の組織の腫瘍：非腫瘍比（T：NT）を示している。bsPAM4 × m734F(ab')₂ の投与後4時間において、腫瘍：血液比は2：1より小さかったことに着目することが重要である。しかし、投与後3時間では、プレターゲッティング¹¹¹In-IMP156および^{99m}Tc-IMP192は、調べた総ての組織に関して有意に高い腫瘍：非腫瘍比を示し、特に腫瘍：血液比は36：1および9：1に相当した（それぞれp<0.001およびp<0.011）。発明者らが24時間時点の腫瘍：血液比を調べたところ、¹²⁵I-bsPAM4単独では4：1であるのに対し、プレターゲッティング¹¹¹In-IMP156および^{99m}Tc-IMP192はそれぞれ274：1および80：1と、有意に高い値を示した（p<0.0002）。これらのデータは、このプレターゲッティングbsPAM4アプローチが、非腫瘍組織には最小の線量で腫瘍へ高い線量を送達する、半減期の短い高エネルギー放射性同位元素とともに使用できることを強く示唆するものである。

【0196】

当業者には、本発明の生成物、組成物、方法および方法に対して種々の変形や変更をなし得ることが自明である。よって、本発明は、それらが付属の特許請求の範囲およびそれらの等価物の範囲内にある限り、このような変形や変更を含むものとする。

【0197】

上記で挙げた総ての刊行物、特許、および特許出願の開示は、その各々が個々に引用することにより本明細書の一部とされるのと同様に、引用することによりその全開示内容が明らかに本明細書の一部とされる。

【図面の簡単な説明】

【0198】

【図1A】マウスPAM4のクローニングされたV遺伝子および推定アミノ酸配列を示す。図1AはPAM4 V_kのDNAおよびアミノ酸配列を示す。図1BはPAM4 V_HのDNAおよびアミノ酸配列を示す。対応するDNA配列によりコードされるアミノ酸配列はヌクレオチド配列の下に一文字コードで示されている。ヌクレオチド配列のナンバリングは右側にある。CDR領域のアミノ酸残基は太字と下線で示されている。アミノ酸残基の上にナンバリングすることで示しているように、アミノ酸残基にはKabab_tのIg分子ナンバリング法を用いている。文字によりナンバリングされているアミノ酸残基はKabab_tのナンバリング法で定義された挿入残基である。これらの挿入残基はそれまでの残

基と同じ進数を有する。例えば、図1Bの残基82、82A、82Bおよび82Cは、それぞれ82、A、BおよびCとして示される。

【図1B】マウスPAM4のクローニングされたV遺伝子および推定アミノ酸配列を示す。図1AはPAM4 V_kのDNAおよびアミノ酸配列を示す。図1BはPAM4 V_HのDNAおよびアミノ酸配列を示す。対応するDNA配列によりコードされるアミノ酸配列はヌクレオチド配列の下に一文字コードで示されている。ヌクレオチド配列のナンバリングは右側にある。CDR領域のアミノ酸残基は太字と下線で示されている。アミノ酸残基の上にナンバリングすることで示しているように、アミノ酸残基にはKabatのIg分子ナンバリング法を用いている。文字によりナンバリングされているアミノ酸残基はKabatのナンバリング法で定義された挿入残基である。これらの挿入残基はそれまでの残基と同じ進数を有する。例えば、図1Bの残基82、82A、82Bおよび82Cは、それぞれ82、A、BおよびCとして示される。

10

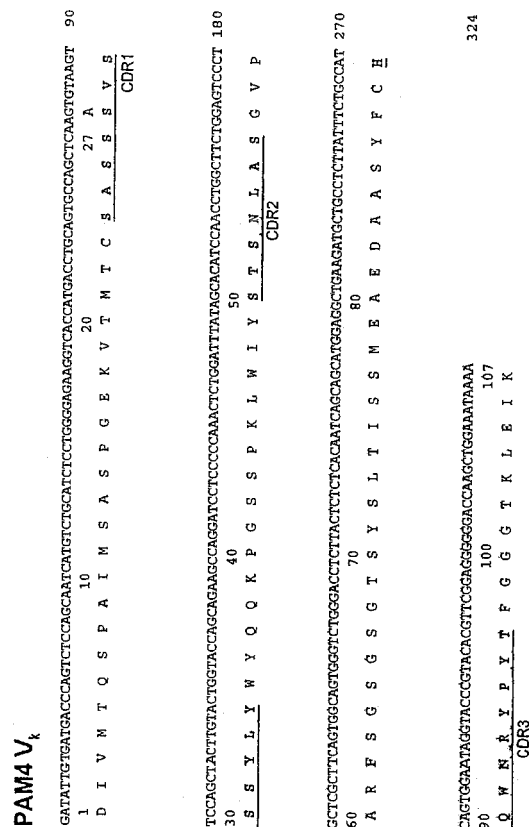
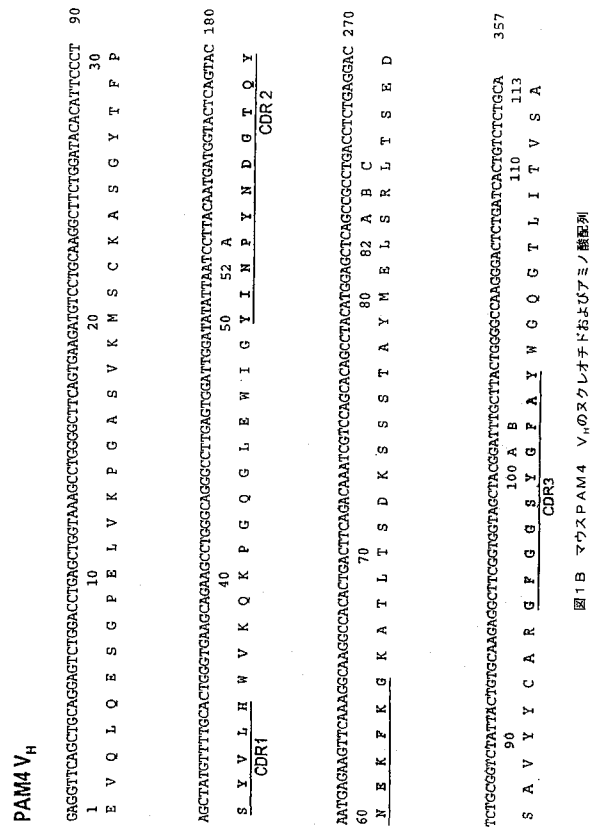
【図2】Sp2/0細胞で発現されたキメラPAM4(cPAM4)重鎖および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。図2AはcPAM4 V_kのアミノ酸配列を示す。図2BはcPAM4 V_Hのアミノ酸配列を示す。キメラPAM4 V_HおよびV_kの別のバリエーションが図2Cおよび2Dに示されている。このアミノ酸配列の違いはPAM4可変領域を発現させるために用いるベクターに存在する配列によるものである。これらの配列は一文字コードで示されている。CDR領域のアミノ酸残基は太字と下線で示されている。アミノ酸のナンバリングについては図1の場合と同様である。

【図3】マウスPAM4(菱形で示される)と比較した場合の、キメラ化PAM4抗体であるcPAM4の結合活性(四角で示される)を示す。結果は、この抗原への¹³¹I-mPAM4結合と競合する場合、cPAM4抗体およびmPAM4の結合活性が匹敵するものであることを示す。キメラ抗体は、ある種に由来する抗体の相補性決定領域(CDR)を含む可変ドメインを含みながら、抗体領域の定常領域はヒト抗体に由来する組換えタンパク質である。

20

【図1A】

【図1B】

図1A マウスPAM4 V_kのヌクレオチドおよびアミノ酸配列図1B マウスPAM4 V_Hのヌクレオチドおよびアミノ酸配列

1 10 20 27 A 30 40
DIQLTQSPALMSASPGKVTMTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGSSPKLWIY
50 60 70 80 90
STSNLASGVPARFSGSGTSYSLTISSEAEADAASYFCHQWNRYPYTFG
100 108
GGTKLEIKR

cPAM4V_K

FIG.2A.

2 A

1 10 20 27 A 30 40
DIVMTQSPALMSASPGKVTMTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGSSPKLWIY
50 60 70 80 90
STSNLASGVPARFSGSGTSYSLTISSEAEADAASYFCHQWNRYPYTFG
100 107
GGTKLEIK

cPAM4V_K

FIG.2C.

2 C

1 10 20 30 40 50
QVQLQESGPVELVKPGASVKMSCKASGYTFPPSYVLHWVKQKPGQGLEWIGY
52 A 60 70 80 82 A B C
INPYNDGTQYNEKFKGKATILTSDDKSSSTAYMELSLRLTSEDSAVYYCARGF
100 A B 110 113
GGSYGFAYWGQTLITVSA

cPAM4V_H

FIG.2B.

2 B

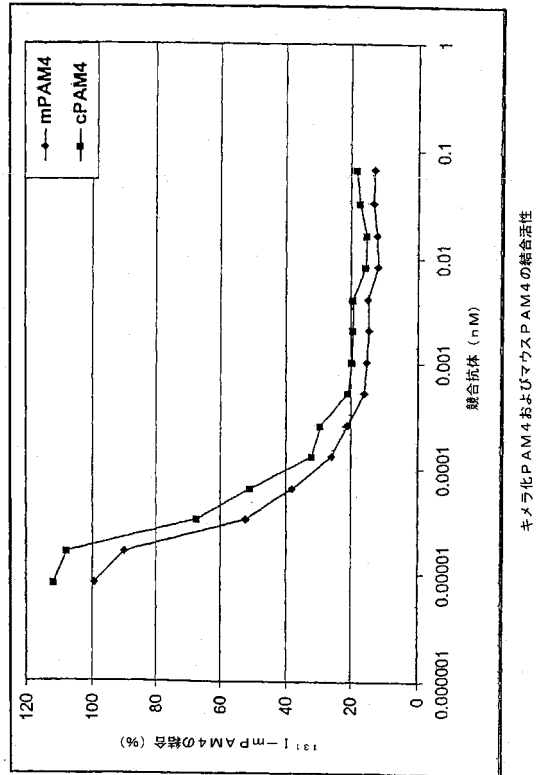
1 10 20 30 40 50
EVQLQESGPVELVKPGASVKMSCKASGYTFPPSYVLHWVKQKPGQGLEWIGY
52 A 60 70 80 82 A B C
INPYNDGTQYNEKFKGKATILTSDDKSSSTAYMELSLRLTSEDSAVYYCARGF
100 A B 110 113
GGSYGFAYWGQTLITVSS

cPAM4V_H

FIG.2D.

2 D

【図 3】



【配列表】

0005110768000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 19/00 (2006.01) C 0 7 K 16/46
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 0 7 K 19/00
C 1 2 P 21/08

(74)代理人 100139000

弁理士 城戸 博兒

(74)代理人 100152191

弁理士 池田 正人

(72)発明者 デイビッド、ブイ・ゴールド

アメリカ合衆国ニュージャージー州、メトウチェン、ロス、アベニュー、60

(72)発明者 デイビッド、エム・ゴールドンバーグ

アメリカ合衆国ニュージャージー州、メンダム、キャロライス、ファーム、ロード、1

(72)発明者 ハンス、ハンセン

アメリカ合衆国ミシシッピ州、ピカユネ、アングラー、ドライブ、6014

合議体

審判長 鵜飼 健

審判官 富永 みどり

審判官 田中 晴絵

(56)参考文献 Int. J. Cancer, 1994年 4月15日, Vol. 57, No. 2, pp. 204 - 210
Cancer Res., 1995年12月 1日, Vol. 55, No. 23 Suppl., pp. 5911s - 5915s
Int. J. Cancer, 1997年 5月16日, Vol. 71, No. 4, pp. 660 - 667
Clin. Cancer Res., 2001年10月, Vol. 7, No. 10, pp. 3186 - 3192

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

C07K16/00-16/46

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CAplus(STN)

专利名称(译)	单克隆抗体PAM 4及其在胰腺癌诊断和治疗中的应用		
公开(公告)号	JP5110768B2	公开(公告)日	2012-12-26
申请号	JP2004513328	申请日	2003-06-16
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司 IMMUNOMEDICS , INC		
申请(专利权)人(译)	李宙卢武铉梅迪库斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	李宙卢武铉梅迪库斯公司		
[标]发明人	デイビッドブイゴールド デイビッドエムゴールドデンバーグ ハンスハンセン		
发明人	デイビッド、ブイ.ゴールド デイビッド、エム.ゴールドデンバーグ ハンス、ハンセン		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P35/00 C07K16/32 C07K16/46 C07K19/00 C12P21/08 C07K16/18 A61K51/10 C07K16/28 C07K16/44 C12N15/13 C12N15/62 C12N15/63 G01N33/53		
CPC分类号	A61K51/1057 A61K2039/505 A61P35/00 C07K16/2896 C07K16/44 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/54 C07K2317/565		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.L A61K39/395.T A61P35/00 C07K16/32 C07K16/46 C07K19/00 C12P21/08		
代理人(译)	清水义 池田 成人 池田正人		
审查员(译)	肯·鹈饲		
优先权	60/388313 2002-06-14 US		
其他公开文献	JP2006507803A JP2006507803A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及单价和多价单特异性抗体，以及单价和多价多特异性抗体。这些抗体的一个实施方案具有一个或多个相同的结合位点，每个结合位点结合靶抗原或靶抗原上的表位。这些抗体的另一个实施方案是结合位点对一种靶抗原或不同靶抗原上的不同表位具有亲和力，或对一种靶抗原和半抗原具有两种亲和力。它有上面的绑定站点。本发明还涉及用于在宿主中表达这些功能性抗体的重组载体。更具体地，本发明涉及称为PAM4的肿瘤相关抗体。本发明还涉及嵌合的PAM4抗体以及此类抗体在诊断和治疗中的用途。

