

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-36270  
(P2018-36270A)

(43) 公開日 平成30年3月8日(2018.3.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574 Z N A	4 C 0 8 5
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	4 H 0 4 5
<b>CO 7 K 16/30 (2006.01)</b>	CO 7 K 16/30	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 T	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
審査請求 有 請求項の数 23 O L 外国語出願 (全 131 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-194027 (P2017-194027)	(71) 出願人	506031948 モルフォテック、インク、 アメリカ合衆国、19341 ペンシルバ ニア州、エクストン、ウェルシュ プール ロード 210
(22) 出願日	平成29年10月4日 (2017.10.4)	(74) 代理人	110001173 特許業務法人川口国際特許事務所
(62) 分割の表示	特願2013-537884 (P2013-537884) の分割	(72) 発明者	ダニエル・ジエイ・オシヤネツシー アメリカ合衆国、ペンシルバニア・194 73、シユウエンクスビル、ガーロフ・ロ ード・515
原出願日	平成23年11月4日 (2011.11.4)	(72) 発明者	ルイージ・グラツソ アメリカ合衆国、ペンシルバニア・190 10、ブライン・マウル、バーバラ・レイ ン・403
(31) 優先権主張番号	61/410,497		
(32) 優先日	平成22年11月5日 (2010.11.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/508,444		
(32) 優先日	平成23年7月15日 (2011.7.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(特許庁注：以下のものは登録商標)			
I. Tween			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 葉酸受容体アルファ発現癌の診断および予後マーカーとしての葉酸受容体アルファ

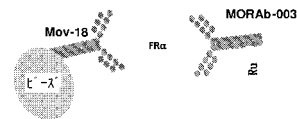
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 癌の早期発見、治療の可能性を高めるための非侵襲的な癌診断、癌発症の危険性レベルの決定および癌進行の予測のための方法を提供する。

【解決手段】 対象がFR 発現癌に罹患しているかどうかを評価するための方法およびキット、FR 発現癌に罹患している対象における卵巣癌の進行を予測するための方法およびキット、対象がFR 発現癌を発症する危険性のレベルを評価するための方法およびキット、FR 発現癌に罹患している対象を癌治療群に階層化するための方法であって、対象由来の試料において細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR ) のレベルを決定し、このレベルを対照試料におけるFR のレベルと比較することを伴う。

【選択図】 図1

Figure 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象が F R 発現癌に罹患しているかどうかを評価するための方法であって、対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルを決定すること、および

細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルと対照試料における F R のレベルを比較することを含み、

対象由来の試料における F R のレベルと対照試料における F R のレベルの間の差は、対象が F R 発現癌に罹患しているという指標であり、

対象由来の試料においての細胞に結合しない F R のレベルは、試料を F R に結合する抗体と接触させることによって評価される、方法。

10

## 【請求項 2】

試料が、尿、血清、血漿および腹水からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

F R 発現癌が、肺癌、中皮腫、卵巣癌、腎臓癌、脳癌、子宮頸癌、鼻咽腔癌、頭頸部の扁平上皮癌腫、子宮内膜癌、乳癌、膀胱癌、膵臓癌、骨癌、下垂体癌、結腸直腸癌および甲状腺髄様癌からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

F R 発現癌が卵巣癌である、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

F R 発現癌が肺癌である、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 6】

F R 発現癌が非小細胞肺癌である、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

非小細胞肺癌が腺癌である、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

約 9 5 0 0 p g / m L 超、約 1 0 , 0 0 0 p g / m L 超、約 1 1 , 0 0 0 p g / m L 超、約 1 2 , 0 0 0 p g / m L 超、約 1 3 , 0 0 0 p g / m L 超、約 1 4 , 0 0 0 p g / m L 超、約 1 5 , 0 0 0 p g / m L 超、約 1 6 , 0 0 0 p g / m L 超、約 1 7 , 0 0 0 p g / m L 超、約 1 8 , 0 0 0 p g / m L 超、約 1 9 , 0 0 0 p g / m L 超または約 2 0 , 0 0 0 p g / m L 超の濃度の試料における F R の存在は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標である、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 9】

試料を下記からなる群から選択される抗体と接触させることによって F R のレベルが決定される、請求項 1 に記載の方法：

( a ) M O R A b - 0 0 3 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

( b ) C D R H 1 として配列番号 1 ( G F T F S G Y G L S )、C D R H 2 として配列番号 2 ( M I S S G G S Y T Y Y A D S V K G )、C D R H 3 として配列番号 3 ( H G D D P A W F A Y )、C D R L 1 として配列番号 4 ( S V S S S I S S N N L H )、C D R L 2 として配列番号 5 ( G T S N L A S ) および C D R L 3 として配列番号 6 ( Q Q W S S Y P Y M Y T ) を含む抗体；

40

( c ) M O V 1 8 抗体；

( d ) M O V 1 8 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

( e ) 5 4 8 9 0 8 抗体；

( f ) 5 4 8 9 0 8 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

( g ) 6 D 3 9 8 抗体；

( h ) 6 D 3 9 8 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

( i ) 2 6 B 3 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

( j ) C D R H 1 として配列番号 5 5 ( G Y F M N )、C D R H 2 として配列番号 5 6 (

50

R I F P Y N G D T F Y N Q K F K G )、CDRH3として配列番号57 ( G T H Y F D Y )、CDRL1として配列番号51 ( R T S E N I F S Y L A )、CDRL2として配列番号52 ( N A K T L A E ) およびCDRL3として配列番号53 ( Q H H Y A F P W T ) を含む抗体；

( k ) 2 6 B 3 抗体；

( l ) 1 9 D 4 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

( m ) CDRH1として配列番号39 ( H P Y M H )、CDRH2として配列番号40 ( R I D P A N G N T K Y D P K F Q G )、CDRH3として配列番号41 ( E E V A D Y T M D Y )、CDRL1として配列番号35 ( R A S E S V D T Y G N N F I H )、CDRL2として配列番号36 ( L A S N L E S ) およびCDRL3として配列番号37 ( Q Q N N G D P W T ) を含む抗体；

( n ) 1 9 D 4 抗体；

( o ) 9 F 3 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

( p ) CDRH1として配列番号31 ( S G Y Y W N )、CDRH2として配列番号32 ( Y I K S D G S N N Y N P S L K N )、CDRH3として配列番号33 ( E W K A M D Y )、CDRL1として配列番号27 ( R A S S T V S Y S Y L H )、CDRL2として配列番号28 ( G T S N L A S ) およびCDRL3として配列番号29 ( Q Q Y S G Y P L T ) を含む抗体；

( q ) 9 F 3 抗体；

( r ) 2 4 F 1 2 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

( s ) CDRH1として配列番号47 ( S Y A M S )、CDRH2として配列番号48 ( E I G S G G S Y T Y Y P D T V T G )、CDRH3として配列番号49 ( E T T A G Y F D Y )、CDRL1として配列番号43 ( S A S Q G I N N F L N )、CDRL2として配列番号44 ( Y T S S L H S ) およびCDRL3として配列番号45 ( Q H F S K L P W T ) を含む抗体；

( t ) 2 4 F 1 2 抗体；

( u ) L K 2 6 H u V K ( 配列番号13 )；L K 2 6 H u V K Y ( 配列番号14 )；L K 2 6 H u V K P W ( 配列番号15 )；およびL K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号16 ) からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む抗体；

( v ) L K 2 6 H u V H ( 配列番号17 )；L K 2 6 H u V H F A I S , N ( 配列番号18 )；L K 2 6 H u V H S L F ( 配列番号19 )；L K 2 6 H u V H I , I ( 配列番号20 )；およびL K 2 6 K O L H u V H ( 配列番号21 ) からなる群から選択される可変領域重鎖を含む抗体；

( w ) 重鎖可変領域L K 2 6 K O L H u V H ( 配列番号21 ) および軽鎖可変領域L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号16 ) を含む抗体；

( x ) 重鎖可変領域L K 2 6 H u V H S L F ( 配列番号19 ) および軽鎖可変領域L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号16 ) を含む抗体；ならびに

( y ) 重鎖可変領域L K 2 6 H u V H F A I S , N ( 配列番号18 ) および軽鎖可変領域L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号16 ) を含む抗体。

#### 【請求項10】

抗体が、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、F a b、F a b ' 2、S c F v、S M I P、アフィボディ、アビマー、パーサボディ、ナノボディおよびドメイン抗体からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項11】

抗体が標識される、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項12】

抗体が、放射性標識、ビオチン標識、発色団標識、蛍光色素標識、E C L 標識および酵素標識からなる群から選択される標識を用いて標識される、請求項11に記載の方法。

#### 【請求項13】

F R のレベルが、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光分析、

10

20

30

40

50

免疫沈降、平衡透析、免疫拡散法、溶液相アッセイ、電気化学発光イムノアッセイ（ECLIA）およびELISAアッセイからなる群から選択される技法を用いて決定される、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

対照試料が、健常対象におけるFR の標準化された対照レベルを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

試料が、試料におけるFR レベルを決定する前にグアニジンで処理される、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

試料が、試料におけるFR のレベルを決定する前に希釈される、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

試料が、試料におけるFR のレベルを決定する前に、遠心分離、ボルテックスまたはその両方かけられる、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

請求項1に記載の方法であって、

対象由来の試料におけるFR のレベルが、試料を

(a) 固体支持体に固定されおよびMORAB - 003抗体と標識されたMOV18抗体、

(b) 固体支持体に固定されおよび24F12抗体と標識された9F3抗体、

(c) 固体支持体に固定されおよび19D4抗体と標識された26B3抗体、ならびに

(d) 固体支持体に固定されおよび26B3抗体と標識された9F3抗体

からなる群から選択される一対の抗体と接触させることによって評価される、方法。

【請求項19】

FR 発現癌に罹患している対象におけるFR 発現癌の進行を評価するための方法であって、

対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルを決定すること、および

細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することを含み、

対照試料におけるFR のレベルと比較して対象由来の試料におけるFR のレベルが増加している場合、癌が急速に進行するという指標であり；および対照試料におけるFR のレベルと比較して対象由来の試料におけるFR のレベルが減少している場合、癌が穏やかに進行するまたは退行するという指標であり、それにより対象におけるFR 発現癌の進行を評価し；

対象由来の試料においての細胞に結合しないFR のレベルは、試料をFR に結合する抗体と接触させることによって評価される、方法。

【請求項20】

FR 発現癌に罹患している対象を少なくとも4つの癌治療群の1つに階層化するための方法であって、

対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルを決定すること、および

細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルに基づいて、少なくとも4つの癌治療群の1つに対象を階層化することを含み、

対象由来の試料において、細胞に結合しないFR のレベルは、試料をFR に結合する抗体と接触させることによって評価される、方法。

【請求項21】

FR 発現癌が卵巣癌であり、および対象が病期I、病期II、病期IIIまたは病期IVの卵巣癌に階層化される、請求項20に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 2 2】

卵巣癌または肺癌を患っている対象における卵巣癌または肺癌の M O R A b - 0 0 3 治療の有効性を監視するための方法であって、

M O R A b - 0 0 3 が予め投与された対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルを決定すること、および

対象由来の試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルと対照試料における F R のレベルを比較することを含み、

対照試料における F R のレベルと比較して、対象由来の試料における F R のレベルが増加している場合、M O R A b - 0 0 3 治療が有効ではないという指標であり；および対照試料における F R のレベルと比較して、対象由来の試料における F R のレベルが減少している場合、M O R A b - 0 0 3 治療が有効であるという指標である、方法。

10

## 【請求項 2 3】

卵巣癌または肺癌を患っている対象が M O R A b - 0 0 3 による治療に応答するかどうかを予測するための方法であって、

対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルを決定すること、および

対象由来の試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルと対照試料における F R のレベルを比較することを含み、

対象由来の試料における F R のレベルと対照試料における F R のレベルとの間の差は、対象が M O R A b - 0 0 3 による治療に応答するという指標である、方法。

20

## 【請求項 2 4】

卵巣癌または肺癌を有する対象を治療するための方法であって、

対象由来の、尿または血清を含む試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルを決定すること、および

細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルと対照試料における F R のレベルを比較し、ここで、対象由来の試料における F R のレベルと対照試料における F R のレベルとの間の差は、対象が卵巣癌または肺癌に罹患しているという指標であること、および

治療有効量の M O R A b - 0 0 3 を対象に投与し、それにより卵巣癌または肺癌を有する対象を治療すること

30

を含む、方法。

## 【請求項 2 5】

対象が F R 発現癌に罹患しているかどうかを評価するための、または対象における F R 発現癌の進行を評価するためのキットであって、

対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルを決定する手段、および

対象が F R 発現癌に罹患しているかどうかを評価するためのまたは F R 発現癌の進行を評価するためのキットの使用説明書

を含むキット。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【背景技術】

## 【0001】

本出願は、2010年11月5日に出願された米国仮特許出願第61/410,497号および2011年7月15日に出願された米国仮特許出願第61/508,444号の出願日の利益を主張し、それらの各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

ヒトにおいて、葉酸に対する高親和性受容体には3つのアイソフォームであるアルファ、ベータおよびガンマが挙げられる。アルファ型およびベータ型は、典型的に、グリコシルホスファチジルイノシトール ( G P I ) アンカーにより細胞膜に結合する。これらの型は細胞外コンパートメントと細胞内コンパートメントとの間を再循環し、細胞内に葉酸を

50

運搬することができる。可溶型のFR は、膜に固定された葉酸受容体に対するプロテアーゼまたはホスホリパーゼの作用によって得ることができる。

【0003】

葉酸受容体アルファ（FR<sub>α</sub>、FR-アルファ、FOLR-1またはFOLR1とも称される）は、様々な上皮組織、例えば、脈絡叢、肺、甲状腺、腎臓、子宮、乳房、卵管、精巢上皮および唾液腺の組織に発現される。Weitman, S D<sup>ら</sup>、Cancer Res 52:3396-3401(1992年); Weitman S D<sup>ら</sup>、Cancer Res 52:6708-6711。FR<sub>α</sub>の過剰発現は、種々の癌、例えば、肺癌（例えば、気管支肺癌、カルチノイド腫瘍および非小細胞肺癌、例えば腺癌）；中皮腫；卵巣癌；腎臓癌；脳癌（例えば、未分化上皮下腫、若年性小脳毛様細胞性星状細胞腫および脳転移）；子宮頸癌；鼻咽腔癌；中胚葉由来の腫瘍；頭頸部の扁平上皮癌腫；子宮内膜癌；卵巣の類内膜腺癌；漿液性嚢胞腺癌；乳癌；膀胱癌；膵臓癌；骨癌（例えば、高悪性度骨肉腫）；下垂体癌（例えば、下垂体腺腫）；結腸直腸癌および甲状腺髄様癌において観察されている。例えば、米国特許第7,754,698号；米国特許出願公開第2005/0232919号；WO2009/132081；Bueno R<sup>ら</sup>、J of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 121(2):225-233(2001年)；Elkanat H & Ratnam M. Frontiers in Bioscience, 11, 506-519(2006年)；Fisher R.E. J Nucl Med, 49:899-906(2008年)；Franklin, W A<sup>ら</sup>、Int J Cancer, Suppl 8:89-95(1994年)；Hartman L.C. Int J Cancer 121:938-942(2007年)；Iwakiri S<sup>ら</sup>、Annals of Surgical Oncology, 15(3):889-899；Parker N. Analytical Biochemistry, 338:284-293(2005年)；Weitman, S D<sup>ら</sup>、Cancer Res 52:3396-3401(1992年)；Saba N.F. Head Neck, 31(4):475-481(2009年)；Yang R<sup>ら</sup>、Clin Cancer Res 13:2557-2567(2007年)を参照されたい。いくつかのタイプの癌（例えば、頭頸部の扁平上皮癌腫）において、より高レベルのFR<sub>α</sub>発現がより悪い予後と関連付けられ、一方、他種の癌（例えば、非小細胞肺癌）において、高レベルのFR<sub>α</sub>発現がより良好な予後と関連付けられる。例えば、Iwakiri S<sup>ら</sup>、Annals of Surgical Oncology, 15(3):889-899；Saba N.F. Head Neck, 31(4):475-481(2009年)を参照されたい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許第7,754,698号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2005/0232919号明細書

【特許文献3】国際公開第2009/132081号

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Weitman, S D<sup>ら</sup>、Cancer Res 52:3396-3401, 6708-6711(1992年)

【非特許文献2】Bueno R<sup>ら</sup>、J of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 121(2):225-233(2001年)

【非特許文献3】Elkanat H & Ratnam M. Frontiers in Bioscience, 11, 506-519(2006年)

【非特許文献4】Fisher R.E. J Nucl Med, 49:899-906(2008年)

【非特許文献5】Franklin, W A<sup>ら</sup>、Int J Cancer, Suppl

10

20

30

40

50

8 : 89 - 95 ( 1994年 )

【非特許文献6】Hartman L.C.ら、Int J Cancer 121 : 938 - 942 ( 2007年 )

【非特許文献7】Iwakiri Sら、Annals of Surgical Oncology、15 ( 3 ) : 889 - 899

【非特許文献8】Parker N.ら、Analytical Biochemistry、338 : 284 - 293 ( 2005年 )

【非特許文献9】Saba N.F.ら、Head Neck、31 ( 4 ) : 475 - 481 ( 2009年 )

【非特許文献10】Yang Rら、Clin Cancer Res 13 : 2557 - 2567 ( 2007年 )

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

癌の早期の発見は、生存率および生活の質を改善する。早期の発見および治療の可能性を高めるため、非侵襲的な癌の診断法、癌発症の危険性レベルの決定法および癌進行の予測法が早急に必要とされている。本発明は、FR 発現癌に対するこれらの必要性を満足させるものである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

20

( 発明の要旨 )

本発明は、対象が肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌に罹患しているかどうかを評価するための方法、FR 発現癌に罹患している対象において、肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌の進行を評価するための方法、FR 発現癌の対象を少なくとも4つの癌治療群のうちの一つに階層化するための方法、卵巣癌または肺癌のMORAb - 003治療の有効性を評価するための方法、および対象が肺癌もしくは卵巣癌などのFR 発現癌に罹患しているかどうかを評価するための、または対象における肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌の進行を評価するためのキットを提供する。

【0008】

対象がFR 発現癌に罹患しているかどうかを評価するための方法

30

第一の態様において、本発明は、対象がFR 発現癌に罹患しているかどうかを、対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( FR ) のレベルを決定し ; 細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( FR ) のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することによって評価する方法を対象とし、対象由来の試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルとの間の差は、対象がFR 発現癌に罹患しているという指標であり、対象由来の試料におけるFR のレベルは、試料をFR に結合する抗体と接触させることによって評価される。特定の実施形態において、試料は、尿、血清、血漿または腹水のいずれかである。

【0009】

別の態様において、本発明は、対象がFR 発現癌に罹患しているかどうかを、対象由来の尿試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( FR ) のレベルを決定し ; 対象由来の尿試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( FR ) のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することによって評価する方法を対象とし、対象由来の尿試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルとの間の差は、対象がFR 発現癌に罹患しているという指標である。さらなる態様において、本発明は、対象がFR を発現する癌に罹患しているかどうかを、対象由来の血清試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( FR ) のレベルを決定し ; 対象由来の血清試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( FR ) のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することによって評価する方法を対象とし、対象由来の血清試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルとの間の差は、対象がFR 発現

40

50

癌に罹患しているという指標である。

【0010】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、FR 発現癌は、肺癌、中皮腫、卵巣癌、腎臓癌、脳癌、子宮頸癌、鼻咽腔癌、頭頸部の扁平上皮癌腫、子宮内膜癌、乳癌、膀胱癌、膵臓癌、骨癌、下垂体癌、結腸直腸癌および甲状腺髄様癌からなる群から選択される。特定の実施形態において、FR 発現癌は卵巣癌である。別の実施形態において、FR 発現癌は、腺癌などの非小細胞肺癌である。

【0011】

別の態様において、本発明は、対象が卵巣癌に罹患しているかどうかを、対象由来の尿試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルを決定することによって評価する方法を対象とし、約 9100 pg/ml を超える濃度での尿試料における細胞に結合しない FR の存在は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標である。

10

【0012】

本発明の前述の態様の種々の態様において、約 9500 pg/ml 超、約 10,000 pg/ml 超、約 11,000 pg/ml 超、約 12,000 pg/ml 超、約 13,000 pg/ml 超、約 14,000 pg/ml 超、約 15,000 pg/ml 超、約 16,000 pg/ml 超、約 17,000 pg/ml 超、約 18,000 pg/ml 超、約 19,000 pg/ml 超または約 20,000 pg/ml 超の濃度での尿試料における FR の存在は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標である。

【0013】

種々の態様において、FR のレベルは、試料を FR に結合する抗体と接触させることによって決定される。例えば、抗体は、下記からなる群から選択される。

20

(a) MORAb-003 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

(b) CDRH1 として配列番号 1 (GFTFSGYGLS)、CDRH2 として配列番号 2 (MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3 として配列番号 3 (HGDDPAWFAY)、CDRL1 として配列番号 4 (SVSSSISSNNLH)、CDRL2 として配列番号 5 (GTSNLAS) および CDRL3 として配列番号 6 (QQWSSYPYMYT) を含む抗体；

(c) MOV18 抗体；

(d) MOV18 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

30

(e) 548908 抗体；

(f) 548908 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

(g) 6D398 抗体；

(h) 6D398 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

(i) 26B3 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

(j) CDRH1 として配列番号 55 (GYFMN)、CDRH2 として配列番号 56 (RIFPYNGDTFYNQKFKG)、CDRH3 として配列番号 57 (GTHYFDY)、CDRL1 として配列番号 51 (RTSENI FSYLA)、CDRL2 として配列番号 52 (NAKT LAE) および CDRL3 として配列番号 53 (QH HYA FPWT) を含む抗体；

40

(k) 26B3 抗体；

(l) 19D4 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

(m) CDRH1 として配列番号 39 (HPYMH)、CDRH2 として配列番号 40 (RIDPANGNTKYDPKFQG)、CDRH3 として配列番号 41 (EEVADYTM DY)、CDRL1 として配列番号 35 (RASESVDTYGNFIH)、CDRL2 として配列番号 36 (LASNLES) および CDRL3 として配列番号 37 (QNNGD PWT) を含む抗体；

(n) 19D4 抗体；

(o) 9F3 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

(p) CDRH1 として配列番号 31 (SGYYWN)、CDRH2 として配列番号 32

50

( Y I K S D G S N N Y N P S L K N )、CDRH3として配列番号33 ( E W K A M D Y )、CDRL1として配列番号27 ( R A S S T V S Y S Y L H )、CDRL2として配列番号28 ( G T S N L A S )およびCDRL3として配列番号29 ( Q Q Y S G Y P L T )を含む抗体；

( q ) 9 F 3 抗体；

( r ) 2 4 F 1 2 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

( s ) CDRH1として配列番号47 ( S Y A M S )、CDRH2として配列番号48 ( E I G S G G S Y T Y Y P D T V T G )、CDRH3として配列番号49 ( E T T A G Y F D Y )、CDRL1として配列番号43 ( S A S Q G I N N F L N )、CDRL2として配列番号44 ( Y T S S L H S )およびCDRL3として配列番号45 ( Q H F S K L P W T )を含む抗体；

( t ) 2 4 F 1 2 抗体；

( u ) L K 2 6 H u V K ( 配列番号13 )；L K 2 6 H u V K Y ( 配列番号14 )；L K 2 6 H u V K P W ( 配列番号15 )；およびL K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号16 ) からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む抗体；

( v ) L K 2 6 H u V H ( 配列番号17 )；L K 2 6 H u V H F A I S , N ( 配列番号18 )；L K 2 6 H u V H S L F ( 配列番号19 )；L K 2 6 H u V H I , I ( 配列番号20 )；およびL K 2 6 K O L H u V H ( 配列番号21 ) からなる群から選択される可変領域重鎖を含む抗体；

( w ) 重鎖可変領域L K 2 6 K O L H u V H ( 配列番号21 ) および軽鎖可変領域L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号16 ) を含む抗体；

( x ) 重鎖可変領域L K 2 6 H u V H S L F ( 配列番号19 ) および軽鎖可変領域L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号16 ) を含む抗体；ならびに

( y ) 重鎖可変領域L K 2 6 H u V H F A I S , N ( 配列番号18 ) および軽鎖可変領域L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号16 ) を含む抗体。

#### 【0014】

特定の実施形態において、抗体は、MORAb - 003抗体と同じエピトープに結合する。別の実施形態において、抗体は、CDRH1として配列番号1 ( G F T F S G Y G L S )、CDRH2として配列番号2 ( M I S S G G S Y T Y Y A D S V K G )、CDRH3として配列番号3 ( H G D D P A W F A Y )、CDRL1として配列番号4 ( S V S S S I S S N N L H )、CDRL2として配列番号5 ( G T S N L A S )およびCDRL3として配列番号6 ( Q Q W S S Y P Y M Y T )を含む。別の実施形態において、抗体はMOV18抗体である。なお別の実施形態において、抗体は、MOV18抗体と同じエピトープに結合する。さらなる実施形態において、抗体は、L K 2 6 H u V K ( 配列番号13 )；L K 2 6 H u V K Y ( 配列番号14 )；L K 2 6 H u V K P W ( 配列番号15 )；およびL K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号16 ) からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む。または、あるいはそれと組み合わせ、抗体は、L K 2 6 H u V H ( 配列番号17 )；L K 2 6 H u V H F A I S , N ( 配列番号18 )；L K 2 6 H u V H S L F ( 配列番号19 )；L K 2 6 H u V H I , I ( 配列番号20 )；およびL K 2 6 K O L H u V H ( 配列番号21 ) からなる群から選択される可変領域重鎖を含む。ある種の実施形態において、抗体は、( i ) 重鎖可変領域L K 2 6 K O L H u V H ( 配列番号21 ) と軽鎖可変領域L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号16 )；重鎖可変領域L K 2 6 H u V H S L F ( 配列番号19 ) と軽鎖可変領域L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号16 )；または重鎖可変領域L K 2 6 H u V H F A I S , N ( 配列番号18 ) と軽鎖可変領域L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号16 ) を含む。

#### 【0015】

特定の実施形態において、前記対象由来の試料におけるFR のレベルは、試料を( a ) 固体支持体に固定されたMOV18抗体と標識されたMORAb - 003抗体；( b ) 固体支持体に固定された9F3抗体と標識された24F12抗体；( c ) 固体支持体に固定された26B3抗体と標識された19D4抗体；および( d ) 固体支持体に固定された

10

20

30

40

50

9 F 3 抗体と標識された 2 6 B 3 抗体からなる群から選択される一対の抗体と接触させることによって評価される。

【 0 0 1 6 】

ある種の実施形態において、抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、Fab、Fab'2、ScFv、SMIP、アフィボディ (affibody)、アビマー (avimer)、バーサボディ (versabody)、ナノボディ (nanobody) およびドメイン抗体からなる群から選択される。または、あるいはそれと組み合わせて、抗体は、例えば、放射性標識、ビオチン標識、発色団標識、蛍光色素標識または酵素標識からなる群から選択される標識で標識される。

【 0 0 1 7 】

ある種の実施形態において、FR のレベルは、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光分析、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散法、溶液相アッセイ、電気化学発光イムノアッセイ (ECLIA) および ELISA アッセイからなる群から選択される技法を用いることによって決定される。

【 0 0 1 8 】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、対照試料は、健常対象における FR の標準化された対照レベルである。

【 0 0 1 9 】

ある種の実施形態において、試料は、試料における FR のレベルを決定する前にグアニジンで処理される。または、あるいはそれと組み合わせて、試料は、試料における FR のレベルを決定する前に希釈される。または、あるいはそれと組み合わせて、試料は、試料における FR のレベルを決定する前に、遠心分離され、ボルテックスされまたはその両方である。

【 0 0 2 0 】

なお別の態様において、本発明は、対象が卵巣癌に罹患しているかどうかを、対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルを決定し；試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルと対照試料における FR のレベルを比較することによって評価する方法を対象とし、対象由来の試料における FR のレベルと対照試料における FR のレベルとの間の差は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標であり、対象由来の試料における FR のレベルは、試料を (a) 固体支持体に固定された MOV 1 8 抗体と標識された MORAb - 0 0 3 抗体、(b) 固体支持体に固定された 9 F 3 抗体と標識された 2 4 F 1 2 抗体、(c) 固体支持体に固定された 2 6 B 3 抗体と標識された 1 9 D 4 抗体、および (d) 固体支持体に固定された 9 F 3 抗体と標識された 2 6 B 3 抗体と接触させることによって評価される。例えば、試料は、尿、血清、血漿または腹水であってもよい。

【 0 0 2 1 】

対象における FR 発現癌の進行を評価するための方法

さらなる態様において、本発明は、FR 発現癌に罹患している対象における FR 発現癌の進行を、対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルを決定し；細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルと対照試料における FR のレベルを比較することによって評価する方法を対象とし、対照試料における FR のレベルと比較した場合の対象由来の試料における FR のレベルの増加は、癌が急速に進行するという指標であり；対照試料における FR のレベルと比較した場合の対象由来の試料における FR のレベルの減少は、癌が穏やかに進行するまたは退行するという指標であり、それにより対象における FR 発現癌の進行を評価し、対象由来の試料における細胞に結合しない FR のレベルは、試料を FR に結合する抗体と接触させることによって評価される。特定の実施形態において、試料は、尿、血清、血漿または腹水である。

【 0 0 2 2 】

別の態様において、本発明は、FR 発現癌に罹患している対象における FR 発現癌

10

20

30

40

50

の進行を、対象由来の尿試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR）のレベルを決定し；対象由来の尿試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR）のレベルと対照試料におけるFRのレベルを比較することによって評価する方法を提供し、対照試料におけるFRのレベルと比較した場合の対象由来の尿試料におけるFRのレベルの増加は、癌が急速に進行するという指標であり；対照試料におけるFRのレベルと比較した場合の対象由来の尿試料におけるFRのレベルの減少は、癌が穏やかに進行するまたは退行するという指標であり、それにより対象におけるFR発現癌の進行を評価する、方法を対象とする。

【0023】

さらなる態様において、本発明は、FR発現癌に罹患している対象におけるFR発現癌の進行を、対象由来の血清試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR）のレベルを決定し；対象由来の血清試料における、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR）のレベルと対照試料におけるFRのレベルを比較することによって評価する方法を提供し、対照試料におけるFRのレベルと比較した場合の対象由来の血清試料におけるFRのレベルの増加は、癌が急速に進行するという指標であり；対照試料におけるFRのレベルと比較した場合の対象由来の血清試料におけるFRのレベルの減少は、癌が穏やかに進行するまたは退行するという指標であり、それにより対象におけるFR発現癌の進行を評価する。

10

【0024】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、FR発現癌は、肺癌、中皮腫、卵巣癌、腎臓癌、脳癌、子宮頸癌、鼻咽腔癌、頭頸部の扁平上皮癌腫、子宮内膜癌、乳癌、膀胱癌、膵臓癌、骨癌、下垂体癌、結腸直腸癌および甲状腺髄様癌からなる群から選択される。特定の実施形態において、FR発現癌は卵巣癌である。別の実施形態において、FR発現癌は、腺癌などの非小細胞肺癌である。

20

【0025】

別の態様において、本発明は、対象が卵巣癌に罹患しているかどうかを、対象由来の尿試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR）のレベルを決定することによって評価する方法を対象とし、約9100pg/mlを超える濃度での尿試料における細胞に結合しないFRの存在は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標である。

30

【0026】

本発明の前述の態様の種々の態様において、約9500pg/ml超、約10,000pg/ml超、約11,000pg/ml超、約12,000pg/ml超、約13,000pg/ml超、約14,000pg/ml超、約15,000pg/ml超、約16,000pg/ml超、約17,000pg/ml超、約18,000pg/ml超、約19,000pg/ml超または約20,000pg/ml超の濃度での尿試料におけるFRの存在は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標である。

40

【0027】

種々の態様において、FRのレベルは、試料をFRに結合する抗体と接触させることによって決定される。例えば、抗体は、下記からなる群から選択される。

40

- (a) MORAb-003抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (b) CDRH1として配列番号1（GFTFSGYGLS）、CDRH2として配列番号2（MISSGGSYTYADSVKG）、CDRH3として配列番号3（HGDDPAWFAY）、CDRL1として配列番号4（SVSSSISSNNLH）、CDRL2として配列番号5（GTSNLA S）およびCDRL3として配列番号6（QQWSSYPYMYT）を含む抗体；
- (c) MOV18抗体；
- (d) MOV18抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (e) 548908抗体；
- (f) 548908抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (g) 6D398抗体；

50

- (h) 6D398抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (i) 26B3抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (j) CDRH1として配列番号55 (GYFMN)、CDRH2として配列番号56 (RIFPYNGDTFYNQKFKG)、CDRH3として配列番号57 (GTHYFDY)、CDRL1として配列番号51 (RTSENI FS YLA)、CDRL2として配列番号52 (NAKT LAE) およびCDRL3として配列番号53 (QH HY A F P W T)を含む抗体；
- (k) 26B3抗体；
- (l) 19D4抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (m) CDRH1として配列番号39 (HPYMH)、CDRH2として配列番号40 (RIDPANGNTKYDPKFQG)、CDRH3として配列番号41 (EEVADY TMDY)、CDRL1として配列番号35 (RASESVDTYGNFIH)、CDRL2として配列番号36 (LASNLES) およびCDRL3として配列番号37 (QNNGD PWT)を含む抗体；
- (n) 19D4抗体；
- (o) 9F3抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (p) CDRH1として配列番号31 (SGYYWN)、CDRH2として配列番号32 (YIKSDGSNNYNPSLKN)、CDRH3として配列番号33 (EWKAMDY)、CDRL1として配列番号27 (RASSTVSYSLH)、CDRL2として配列番号28 (GTSN LAS) およびCDRL3として配列番号29 (QQYSGYPLT)を含む抗体；
- (q) 9F3抗体；
- (r) 24F12抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (s) CDRH1として配列番号47 (SYAMS)、CDRH2として配列番号48 (EIGSGGSYTYYPDTVTG)、CDRH3として配列番号49 (ETT AGYFDY)、CDRL1として配列番号43 (SASQG INNFLN)、CDRL2として配列番号44 (YTSSLHS) およびCDRL3として配列番号45 (QHFSKLPWT)を含む抗体；
- (t) 24F12抗体；
- (u) LK26HuVK (配列番号13)；LK26HuVKY (配列番号14)；LK26HuVKPW (配列番号15)；およびLK26HuVKPW, Y (配列番号16) からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む抗体；
- (v) LK26HuVH (配列番号17)；LK26HuVH FAIS, N (配列番号18)；LK26HuVH SLF (配列番号19)；LK26HuVH I, I (配列番号20)；およびLK26KOLHuVH (配列番号21) からなる群から選択される可変領域重鎖を含む抗体；
- (w) 重鎖可変領域LK26KOLHuVH (配列番号21) および軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16)を含む抗体；
- (x) 重鎖可変領域LK26HuVH SLF (配列番号19) および軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16)を含む抗体；ならびに
- (y) 重鎖可変領域LK26HuVH FAIS, N (配列番号18) および軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16)を含む抗体。

#### 【0028】

特定の実施形態において、抗体は、MORAb-003抗体と同じエピトープに結合する。別の実施形態において、抗体は、CDRH1として配列番号1 (GFTFSGYGLS)、CDRH2として配列番号2 (MISSGGSYTYYADSVKG)、CDRH3として配列番号3 (HGDDPAWFAY)、CDRL1として配列番号4 (SVSSSISNNLH)、CDRL2として配列番号5 (GTSN LAS) およびCDRL3として配列番号6 (QQWSSYPYMYT)を含む。別の実施形態において、抗体はMOV18抗体である。なお別の実施形態において、抗体は、MOV18抗体と同じエピト

10

20

30

40

50

ープに結合する。さらなる実施形態において、抗体は、LK26HuVK（配列番号13）；LK26HuVKY（配列番号14）；LK26HuVKPW（配列番号15）；およびLK26HuVKPW，Y（配列番号16）からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む。または、あるいはそれと組み合わせて、抗体は、LK26HuVH（配列番号17）；LK26HuVHF A I S，N（配列番号18）；LK26HuVH S L F（配列番号19）；LK26HuVH I，I（配列番号20）；およびLK26KOLHuVH（配列番号21）からなる群から選択される可変領域重鎖を含む。ある種の実施形態において、抗体は、（i）重鎖可変領域LK26KOLHuVH（配列番号21）と軽鎖可変領域LK26HuVKPW，Y（配列番号16）；重鎖可変領域LK26HuVH S L F（配列番号19）と軽鎖可変領域LK26HuVKPW，Y（配列番号16）；または重鎖可変領域LK26HuVH F A I S，N（配列番号18）と軽鎖可変領域LK26HuVKPW，Y（配列番号16）を含む。

10

#### 【0029】

特定の実施形態において、対象由来の試料におけるFR のレベルは、試料を（a）固体支持体に固定されたMOV18抗体と標識されたMORAB-003抗体；（b）固体支持体に固定された9F3抗体と標識された24F12抗体；（c）固体支持体に固定された26B3抗体と標識された19D4抗体；および（d）固体支持体に固定された9F3抗体と標識された26B3抗体からなる群から選択される一対の抗体と接触させることによって評価される。

20

#### 【0030】

ある種の実施形態において、抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、Fab、Fab'2、ScFv、SMIP、アフィボディ、アビマー、パーサボディ、ナノボディおよびドメイン抗体からなる群から選択される。または、あるいはそれと組み合わせて、抗体は、例えば、放射性標識、ビオチン標識、発色団標識、蛍光色素標識または酵素標識からなる群から選択される標識で標識される。

#### 【0031】

ある種の実施形態において、FR のレベルは、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光分析、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散法、溶液相アッセイ、電気化学発光イムノアッセイ（ECLIA）およびELISAアッセイからなる群から選択される技術を用いることによって決定される。

30

#### 【0032】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、対照試料は、健常対象におけるFR の標準化された対照レベルである。別の実施形態において、対照試料は、対象から予め得られた試料である。

#### 【0033】

ある種の実施形態において、試料は、試料におけるFR のレベルを決定する前にグアニジンで処理される。または、あるいはそれと組み合わせて、試料は、試料におけるFR のレベルを決定する前に希釈される。または、あるいはそれと組み合わせて、試料は、試料におけるFR のレベルを決定する前に、遠心分離され、ボルテックスされまたはその両方である。

40

#### 【0034】

さらなる態様において、本発明は、卵巣癌に罹患している対象における卵巣癌の進行を、対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルを決定し；試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することによって評価する方法を対象とし、対照試料におけるFR のレベルと比較した場合の対象由来の試料におけるFR のレベルの増加は、卵巣癌が急速に進行するという指標であり；対照試料におけるFR のレベルと比較した場合の対象由来の試料におけるFR のレベルの減少は、卵巣癌が穏やかに進行するまたは退行するという指標であり、それにより対象における卵巣癌の進行を評価することによって評価し、対象由来の試料におけるFR のレベルは、試料を（a）固体支持体に固

50

定されたMOV18抗体と標識されたMORAB-003抗体、(b)固体支持体に固定された9F3抗体と標識された24F12抗体、(c)固体支持体に固定された26B3抗体と標識された19D4抗体、および(d)固体支持体に固定された9F3抗体と標識された26B3抗体と接触させることによって評価される。例えば、試料は、尿、血清、血漿または腹水であってもよい。

#### 【0035】

FR 発現癌を癌治療群に階層化するための方法

さらなる態様において、本発明は、FR 発現癌に罹患している対象を、対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR)のレベルを決定し；細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR)のレベルに基づいて、対象を少なくとも4つの癌治療群の1つに階層化することによって、少なくとも4つの癌治療群の1つに階層化する方法を提供し、対象由来の試料において、細胞に結合しないFRのレベルは、試料をFRに結合する抗体と接触させることによって評価される。例えば、試料は、尿、血清、血漿または腹水からなる群から選択される。

10

#### 【0036】

なお別の態様において、本発明は、FR 発現癌に罹患している対象を、対象由来の尿試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR)のレベルを決定し；試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR)のレベルに基づいて、対象を少なくとも4つの癌治療群の1つに階層化することによって、少なくとも4つの癌治療群の1つに階層化する方法を提供する。さらなる態様において、本発明は、FR 発現癌に罹患している対象を、対象由来の血清試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR)のレベルを決定し；血清試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR)のレベルに基づいて、対象を少なくとも4つの癌治療群の1つに階層化することによって、少なくとも4つの癌治療群の1つに階層化する方法に関する。

20

#### 【0037】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、FR 発現癌は、肺癌、中皮腫、卵巣癌、腎臓癌、脳癌、子宮頸癌、鼻咽腔癌、頭頸部の扁平上皮癌腫、子宮内膜癌、乳癌、膀胱癌、膵臓癌、骨癌、下垂体癌、結腸直腸癌および甲状腺髄様癌からなる群から選択される。特定の実施形態において、FR 発現癌は卵巣癌である。別の実施形態において、FR 発現癌は、腺癌などの非小細胞肺癌である。

30

#### 【0038】

別の態様において、本発明は、対象が卵巣癌に罹患しているかどうかを、対象由来の尿試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR)のレベルを決定することによって評価する方法に関し、約9100pg/mlを超える濃度での尿試料における細胞に結合しないFRの存在は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標である。

#### 【0039】

本発明の前述の態様の種々の態様において、約9500pg/ml超、約10,000pg/ml超、約11,000pg/ml超、約12,000pg/ml超、約13,000pg/ml超、約14,000pg/ml超、約15,000pg/ml超、約16,000pg/ml超、約17,000pg/ml超、約18,000pg/ml超、約19,000pg/ml超または約20,000pg/ml超の濃度での尿試料におけるFRの存在は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標である。

40

#### 【0040】

種々の態様において、FRのレベルは、試料をFRに結合する抗体と接触させることによって決定される。例えば、抗体は、下記からなる群から選択される。

(a) MORAB-003抗体と同じエピトープに結合する抗体；

(b) CDRH1として配列番号1(GFTFSGYGLS)、CDRH2として配列番号2(MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3として配列番号3(HGDDPAWFAY)、CDRL1として配列番号4(SVSSSISSNNLH)、CDRL2として配列番号5(GTSNLAS)およびCDRL3として配列番号6(QQWS

50

S Y P Y M Y T ) を含む抗体 ;

( c ) M O V 1 8 抗体 ;

( d ) M O V 1 8 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;

( e ) 5 4 8 9 0 8 抗体 ;

( f ) 5 4 8 9 0 8 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;

( g ) 6 D 3 9 8 抗体 ;

( h ) 6 D 3 9 8 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;

( i ) 2 6 B 3 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;

( j ) C D R H 1 として配列番号 5 5 ( G Y F M N )、C D R H 2 として配列番号 5 6 ( R I F P Y N G D T F Y N Q K F K G )、C D R H 3 として配列番号 5 7 ( G T H Y F D Y )、C D R L 1 として配列番号 5 1 ( R T S E N I F S Y L A )、C D R L 2 として配列番号 5 2 ( N A K T L A E ) および C D R L 3 として配列番号 5 3 ( Q H H Y A F P W T ) を含む抗体 ;

( k ) 2 6 B 3 抗体 ;

( l ) 1 9 D 4 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;

( m ) C D R H 1 として配列番号 3 9 ( H P Y M H )、C D R H 2 として配列番号 4 0 ( R I D P A N G N T K Y D P K F Q G )、C D R H 3 として配列番号 4 1 ( E E V A D Y T M D Y )、C D R L 1 として配列番号 3 5 ( R A S E S V D T Y G N N F I H )、C D R L 2 として配列番号 3 6 ( L A S N L E S ) および C D R L 3 として配列番号 3 7 ( Q Q N N G D P W T ) を含む抗体 ;

( n ) 1 9 D 4 抗体 ;

( o ) 9 F 3 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;

( p ) C D R H 1 として配列番号 3 1 ( S G Y Y W N )、C D R H 2 として配列番号 3 2 ( Y I K S D G S N N Y N P S L K N )、C D R H 3 として配列番号 3 3 ( E W K A M D Y )、C D R L 1 として配列番号 2 7 ( R A S S T V S Y S Y L H )、C D R L 2 として配列番号 2 8 ( G T S N L A S ) および C D R L 3 として配列番号 2 9 ( Q Q Y S G Y P L T ) を含む抗体 ;

( q ) 9 F 3 抗体 ;

( r ) 2 4 F 1 2 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;

( s ) C D R H 1 として配列番号 4 7 ( S Y A M S )、C D R H 2 として配列番号 4 8 ( E I G S G G S Y T Y P D T V T G )、C D R H 3 として配列番号 4 9 ( E T T A G Y F D Y )、C D R L 1 として配列番号 4 3 ( S A S Q G I N N F L N )、C D R L 2 として配列番号 4 4 ( Y T S S L H S ) および C D R L 3 として配列番号 4 5 ( Q H F S K L P W T ) を含む抗体 ;

( t ) 2 4 F 1 2 抗体 ;

( u ) L K 2 6 H u V K ( 配列番号 1 3 ) ; L K 2 6 H u V K Y ( 配列番号 1 4 ) ; L K 2 6 H u V K P W ( 配列番号 1 5 ) ; および L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号 1 6 ) からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む抗体 ;

( v ) L K 2 6 H u V H ( 配列番号 1 7 ) ; L K 2 6 H u V H F A I S , N ( 配列番号 1 8 ) ; L K 2 6 H u V H S L F ( 配列番号 1 9 ) ; L K 2 6 H u V H I , I ( 配列番号 2 0 ) ; および L K 2 6 K O L H u V H ( 配列番号 2 1 ) からなる群から選択される可変領域重鎖を含む抗体 ;

( w ) 重鎖可変領域 L K 2 6 K O L H u V H ( 配列番号 2 1 ) および軽鎖可変領域 L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号 1 6 ) を含む抗体 ;

( x ) 重鎖可変領域 L K 2 6 H u V H S L F ( 配列番号 1 9 ) および軽鎖可変領域 L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号 1 6 ) を含む抗体 ; ならびに

( y ) 重鎖可変領域 L K 2 6 H u V H F A I S , N ( 配列番号 1 8 ) および軽鎖可変領域 L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号 1 6 ) を含む抗体。

**【 0 0 4 1 】**

特定の実施形態において、抗体は、M O R A b - 0 0 3 抗体と同じエピトープに結合す

10

20

30

40

50

る。別の実施形態において、抗体は、CDRH1として配列番号1 (GFTFSGYGLS)、CDRH2として配列番号2 (MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3として配列番号3 (HGDDPAWFAY)、CDRL1として配列番号4 (SVSSSISNNLH)、CDRL2として配列番号5 (GTSNLAS)およびCDRL3として配列番号6 (QQWSSYPYMYT)を含む。別の実施形態において、抗体はMOV18抗体である。なお別の実施形態において、抗体は、MOV18抗体と同じエピトープに結合する。さらなる実施形態において、抗体は、LK26HuVK (配列番号13) ; LK26HuVKY (配列番号14) ; LK26HuVKPW (配列番号15) ; およびLK26HuVKPW, Y (配列番号16) からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む。または、あるいはそれと組み合わせ、抗体は、LK26HuVH (配列番号17) ; LK26HuVHFAIS, N (配列番号18) ; LK26HuVH SLF (配列番号19) ; LK26HuVH I, I (配列番号20) ; およびLK26KOLHuVH (配列番号21) からなる群から選択される可変領域重鎖を含む。ある種の実施形態において、抗体は、(i) 重鎖可変領域LK26KOLHuVH (配列番号21) と軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) ; 重鎖可変領域LK26HuVH SLF (配列番号19) と軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) ; または重鎖可変領域LK26HuVHFAIS, N (配列番号18) と軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) を含む。

10

#### 【0042】

特定の実施形態において、対象由来の試料におけるFR のレベルは、試料を(a) 固体支持体に固定されたMOV18抗体と標識されたMORAB-003抗体 ; (b) 固体支持体に固定された9F3抗体と標識された24F12抗体 ; (c) 固体支持体に固定された26B3抗体と標識された19D4抗体 ; および(d) 固体支持体に固定された9F3抗体と標識された26B3抗体からなる群から選択される一対の抗体と接触させることによって評価される。

20

#### 【0043】

ある種の実施形態において、抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、Fab、Fab'2、ScFv、SMIP、アフィボディ、アビマー、パーサボディ、ナノボディおよびドメイン抗体からなる群から選択される。または、あるいはそれと組み合わせ、抗体は、例えば、放射性標識、ビオチン標識、発色団標識、蛍光色素標識または酵素標識からなる群から選択される標識で標識される。

30

#### 【0044】

ある種の実施形態において、FR のレベルは、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光分析、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散法、溶液相アッセイ、電気化学発光イムノアッセイ(ECLIA)およびELISAアッセイからなる群から選択される技術を用いることによって決定される。

#### 【0045】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、対照試料は、健常対象におけるFR の標準化された対照レベルである。

#### 【0046】

ある種の実施形態において、試料は、試料におけるFR のレベルを決定する前にグアニジンで処理される。または、あるいはそれと組み合わせ、試料は、試料におけるFR のレベルを決定する前に希釈される。または、あるいはそれと組み合わせ、試料は、試料におけるFR のレベルを決定する前に、遠心分離され、ボルテックスされまたはその両方である。

40

#### 【0047】

特定の実施形態において、対象は、病期I、病期II、病期IIIまたは病期IVの卵巣癌に階層化される。

#### 【0048】

さらなる態様において、本発明は、卵巣癌対象を、対象由来の試料において、細胞に結

50

合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルを決定し；試料において細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルに基づいて、対象を少なくとも4つの癌治療群のうちの1つに階層化することによって、少なくとも4つの癌治療群のうちの1つに階層化する方法を提供し、対象由来の試料におけるFRのレベルは、試料を (a) 固体支持体に固定されたMOV18抗体と標識されたMORAB-003抗体、(b) 固体支持体に固定された9F3抗体と標識された24F12抗体、(c) 固体支持体に固定された26B3抗体と標識された19D4抗体、および(d) 固体支持体に固定された9F3抗体と標識された26B3抗体と接触させることによって評価される。例えば、試料は、尿、血清、血漿または腹水であってもよい。

#### 【0049】

卵巣癌または肺癌のMORAb-003治療の有効性を監視するための方法

一態様において、本発明は、卵巣癌または肺癌を患っている対象における卵巣癌または肺癌のMORAb-003治療の有効性を、MORAb-003が予め投与された対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルを決定し；細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルと対照試料におけるFRのレベルを比較することによって監視する方法を提供し、対照試料におけるFRのレベルと比較した場合、対象由来の試料におけるFRのレベルの増加は、MORAb-003治療が有効でないという指標であり；対照試料におけるFRのレベルと比較した場合、対象由来の試料におけるFRのレベルの減少は、MORAb-003治療が有効であるという指標である。特定の実施形態において、対象由来の試料における細胞に結合しないFRのレベルは、試料をFRに結合する抗体と接触させることによって評価される。例えば、試料は、尿、血清、血漿または腹水であってもよい。

#### 【0050】

さらなる態様において、本発明は、卵巣癌または肺癌を患っている対象における卵巣癌または肺癌のMORAb-003治療の有効性を、MORAb-003が予め投与された対象由来の尿試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルを決定し；対象由来の尿試料における、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルと対照試料におけるFRのレベルを比較することによって監視する方法を提供し、対照試料におけるFRのレベルと比較した場合、対象由来の尿試料におけるFRのレベルの増加は、MORAb-003治療が有効でないという指標であり；対照試料におけるFRのレベルと比較した場合、対象由来の尿試料におけるFRのレベルの減少は、MORAb-003治療が有効であるという指標である。

#### 【0051】

なお別の態様において、本発明は、卵巣癌または肺癌を患っている対象における卵巣癌または肺癌のMORAb-003治療の有効性を、MORAb-003が予め投与された対象由来の血清試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルを決定し；対象由来の血清試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルと対照試料におけるFRのレベルを比較することによって監視する方法を対象とし、対照試料におけるFRのレベルと比較した場合、対象由来の血清試料におけるFRのレベルの増加は、MORAb-003治療が有効でないという指標であり；対照試料におけるFRのレベルと比較した場合、対象由来の血清試料におけるFRのレベルの減少は、MORAb-003治療が有効であるという指標である。

#### 【0052】

種々の態様において、FRのレベルは、試料をFRに結合する抗体と接触させることによって決定される。例えば、抗体は、下記からなる群から選択される。

(a) MORAb-003抗体と同じエピトープに結合する抗体；

(b) CDRH1として配列番号1 (GFTFSGYGLS)、CDRH2として配列番号2 (MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3として配列番号3 (HGDDPAWFAY)、CDRL1として配列番号4 (SVSSSISSNNLH)、CDRL2として配列番号5 (GTSNLAS) およびCDRL3として配列番号6 (QQWSS

10

20

30

40

50

- Y P Y M Y T) を含む抗体 ;
- ( c ) M O V 1 8 抗体 ;
- ( d ) M O V 1 8 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- ( e ) 5 4 8 9 0 8 抗体 ;
- ( f ) 5 4 8 9 0 8 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- ( g ) 6 D 3 9 8 抗体 ;
- ( h ) 6 D 3 9 8 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- ( i ) 2 6 B 3 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- ( j ) C D R H 1 として配列番号 5 5 ( G Y F M N )、C D R H 2 として配列番号 5 6 ( R I F P Y N G D T F Y N Q K F K G )、C D R H 3 として配列番号 5 7 ( G T H Y F D Y )、C D R L 1 として配列番号 5 1 ( R T S E N I F S Y L A )、C D R L 2 として配列番号 5 2 ( N A K T L A E ) および C D R L 3 として配列番号 5 3 ( Q H H Y A F P W T ) を含む抗体 ;
- ( k ) 2 6 B 3 抗体 ;
- ( l ) 1 9 D 4 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- ( m ) C D R H 1 として配列番号 3 9 ( H P Y M H )、C D R H 2 として配列番号 4 0 ( R I D P A N G N T K Y D P K F Q G )、C D R H 3 として配列番号 4 1 ( E E V A D Y T M D Y )、C D R L 1 として配列番号 3 5 ( R A S E S V D T Y G N N F I H )、C D R L 2 として配列番号 3 6 ( L A S N L E S ) および C D R L 3 として配列番号 3 7 ( Q Q N N G D P W T ) を含む抗体 ;
- ( n ) 1 9 D 4 抗体 ;
- ( o ) 9 F 3 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- ( p ) C D R H 1 として配列番号 3 1 ( S G Y Y W N )、C D R H 2 として配列番号 3 2 ( Y I K S D G S N N Y N P S L K N )、C D R H 3 として配列番号 3 3 ( E W K A M D Y )、C D R L 1 として配列番号 2 7 ( R A S S T V S Y S Y L H )、C D R L 2 として配列番号 2 8 ( G T S N L A S ) および C D R L 3 として配列番号 2 9 ( Q Q Y S G Y P L T ) を含む抗体 ;
- ( q ) 9 F 3 抗体 ;
- ( r ) 2 4 F 1 2 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- ( s ) C D R H 1 として配列番号 4 7 ( S Y A M S )、C D R H 2 として配列番号 4 8 ( E I G S G G S Y T Y P D T V T G )、C D R H 3 として配列番号 4 9 ( E T T A G Y F D Y )、C D R L 1 として配列番号 4 3 ( S A S Q G I N N F L N )、C D R L 2 として配列番号 4 4 ( Y T S S L H S ) および C D R L 3 として配列番号 4 5 ( Q H F S K L P W T ) を含む抗体 ;
- ( t ) 2 4 F 1 2 抗体 ;
- ( u ) L K 2 6 H u V K ( 配列番号 1 3 ) ; L K 2 6 H u V K Y ( 配列番号 1 4 ) ; L K 2 6 H u V K P W ( 配列番号 1 5 ) ; および L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号 1 6 ) からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む抗体 ;
- ( v ) L K 2 6 H u V H ( 配列番号 1 7 ) ; L K 2 6 H u V H F A I S , N ( 配列番号 1 8 ) ; L K 2 6 H u V H S L F ( 配列番号 1 9 ) ; L K 2 6 H u V H I , I ( 配列番号 2 0 ) ; および L K 2 6 K O L H u V H ( 配列番号 2 1 ) からなる群から選択される可変領域重鎖を含む抗体 ;
- ( w ) 重鎖可変領域 L K 2 6 K O L H u V H ( 配列番号 2 1 ) および軽鎖可変領域 L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号 1 6 ) を含む抗体 ;
- ( x ) 重鎖可変領域 L K 2 6 H u V H S L F ( 配列番号 1 9 ) および軽鎖可変領域 L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号 1 6 ) を含む抗体 ; ならびに
- ( y ) 重鎖可変領域 L K 2 6 H u V H F A I S , N ( 配列番号 1 8 ) および軽鎖可変領域 L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号 1 6 ) を含む抗体。
- 【 0 0 5 3 】**
- 特定の実施形態において、抗体は、M O R A b - 0 0 3 抗体と同じエピトープに結合す

10

20

30

40

50

る。別の実施形態において、抗体は、CDRH1として配列番号1 (GFTFSGYGLS)、CDRH2として配列番号2 (MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3として配列番号3 (HGDDPAWFAY)、CDRL1として配列番号4 (SVSSSISNNLH)、CDRL2として配列番号5 (GTSNLAS)およびCDRL3として配列番号6 (QQWSSYPYMYT)を含む。別の実施形態において、抗体はMOV18抗体である。なお別の実施形態において、抗体は、MOV18抗体と同じエピトープに結合する。さらなる実施形態において、抗体は、LK26HuVK (配列番号13) ; LK26HuVKY (配列番号14) ; LK26HuVKPW (配列番号15) ; およびLK26HuVKPW, Y (配列番号16) からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む。または、あるいはそれと組み合わせて、抗体は、LK26HuVH (配列番号17) ; LK26HuVHFAIS, N (配列番号18) ; LK26HuVH SLF (配列番号19) ; LK26HuVH I, I (配列番号20) ; およびLK26KOLHuVH (配列番号21) からなる群から選択される可変領域重鎖を含む。ある種の実施形態において、抗体は、(i) 重鎖可変領域LK26KOLHuVH (配列番号21) と軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) ; 重鎖可変領域LK26HuVH SLF (配列番号19) と軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) ; または重鎖可変領域LK26HuVHFAIS, N (配列番号18) と軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) を含む。

10

#### 【0054】

特定の実施形態において、対象由来の試料におけるFR のレベルは、試料を(a) 固体支持体に固定されたMOV18抗体と標識されたMORAB-003抗体 ; (b) 固体支持体に固定された9F3抗体と標識された24F12抗体 ; (c) 固体支持体に固定された26B3抗体と標識された19D4抗体 ; および(d) 固体支持体に固定された9F3抗体と標識された26B3抗体からなる群から選択される一対の抗体と接触させることによって評価される。

20

#### 【0055】

ある種の実施形態において、抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、Fab、Fab'2、ScFv、SMIP、アフィボディ、アビマー、パーサボディ、ナノボディおよびドメイン抗体からなる群から選択される。または、あるいはそれと組み合わせて、抗体は、例えば、放射性標識、ビオチン標識、発色団標識、蛍光色素標識または酵素標識からなる群から選択される標識で標識される。

30

#### 【0056】

ある種の実施形態において、FR のレベルは、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光分析、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散法、溶液相アッセイ、電気化学発光イムノアッセイ(ECLIA)およびELISAアッセイからなる群から選択される技術を用いることによって決定される。

#### 【0057】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、対照試料は、健常対象におけるFR の標準化された対照レベルである。別の実施形態において、対照試料は、対象から予め得られた試料である。

40

#### 【0058】

ある種の実施形態において、試料は、試料におけるFR のレベルを決定する前にグアニジンで処理される。または、あるいはそれと組み合わせて、試料は、試料におけるFR のレベルを決定する前に希釈される。または、あるいはそれと組み合わせて、試料は、試料におけるFR のレベルを決定する前に、遠心分離され、ボルテックスされまたはその両方である。

#### 【0059】

対象がMORAb-003治療に応答するかどうかを予測するための方法

一態様において、本発明は、卵巣癌または肺癌などのFR 発現癌を患っている対象がMORAb-003による治療に応答するかどうかを、対象由来の試料において、細胞に

50

結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルを決定し；対象由来の試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することによって予測する方法を提供し、対象由来の試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルの間の差は、対象がMORAb - 003による治療に応答するという指標である。

【0060】

一態様において、本発明は、卵巣癌または肺癌などのFR 発現癌を患っている対象がMORAb - 003による治療に応答するかどうかを、対象由来の尿試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルを決定し；対象由来の尿試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することによって予測する方法を提供し、対象由来の尿試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルの間の差は、対象がMORAb - 003による治療に応答するという指標である。

10

【0061】

さらなる態様において、本発明は、卵巣癌または肺癌などのFR 発現癌を患っている対象がMORAb - 003による治療に応答するかどうかを、対象由来の血清試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルを決定し；対象由来の血清試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することによって予測する方法を提供し、対象由来の血清試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルの間の差は、対象がMORAb - 003による治療に応答するという指標である。

20

【0062】

さらなる実施形態において、FR 発現癌は、肺癌、中皮腫、卵巣癌、腎臓癌、脳癌、子宮頸癌、鼻咽腔癌、頭頸部の扁平上皮癌腫、子宮内膜癌、乳癌、膀胱癌、膵臓癌、骨癌、下垂体癌、結腸直腸癌および甲状腺髄様癌からなる群から選択される。特定の実施形態において、FR 発現癌は卵巣癌である。別の実施形態において、FR 発現肺癌は非小細胞肺癌、例えば腺癌である。

【0063】

さらなる態様において、本発明は、卵巣癌を患っている対象がMORAb - 003による治療に応答するかどうかを、対象由来の尿試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR) のレベルを決定することによって予測する方法を提供し、約9100 pg/mlを超える濃度での尿試料における細胞に結合しないFR の存在は、対象がMORAb - 003による治療に応答するという指標である。

30

【0064】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、約9500 pg/ml超、約10,000 pg/ml超、約11,000 pg/ml超、約12,000 pg/ml超、約13,000 pg/ml超、約14,000 pg/ml超、約15,000 pg/ml超、約16,000 pg/ml超、約17,000 pg/ml超、約18,000 pg/ml超、約19,000 pg/ml超または約20,000 pg/ml超の濃度での尿試料におけるFR の存在は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標である。

40

【0065】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、FR のレベルは、試料をFR に結合する抗体と接触させることによって決定される。例えば、抗体は、下記からなる群から選択される。

(a) MORAb - 003抗体と同じエピトープに結合する抗体；

(b) CDRH1として配列番号1 (GFTFSGYGLS)、CDRH2として配列番号2 (MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3として配列番号3 (HGDDPAWFAY)、CDRL1として配列番号4 (SVSSSISSNNLH)、CDRL2として配列番号5 (GTSNLAS)およびCDRL3として配列番号6 (QQWSSYPYMYT)を含む抗体；

50

- (c) MOV18 抗体 ;
- (d) MOV18 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (e) 548908 抗体 ;
- (f) 548908 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (g) 6D398 抗体 ;
- (h) 6D398 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (i) 26B3 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (j) CDRH1として配列番号55 (GYFMN)、CDRH2として配列番号56 (RIFPYNGDTFYNQKFKG)、CDRH3として配列番号57 (GTHYFDY)、CDRL1として配列番号51 (RTSENIIFS YLA)、CDRL2として配列番号52 (NAKTLAE) およびCDRL3として配列番号53 (QH HYAFPWT) を含む抗体 ;
- (k) 26B3 抗体 ;
- (l) 19D4 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (m) CDRH1として配列番号39 (HPYMH)、CDRH2として配列番号40 (RIDPANGNTKYDPKFQG)、CDRH3として配列番号41 (EEVADY TMDY)、CDRL1として配列番号35 (RASESVDTYGNNFIH)、CDRL2として配列番号36 (LASNLES) およびCDRL3として配列番号37 (QNNGDPWT) を含む抗体 ;
- (n) 19D4 抗体 ;
- (o) 9F3 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (p) CDRH1として配列番号31 (SGYYWN)、CDRH2として配列番号32 (YIKSDGSNNYNPSLKN)、CDRH3として配列番号33 (EWKAMDY)、CDRL1として配列番号27 (RASSTVSYSYLH)、CDRL2として配列番号28 (GTSNLAS) およびCDRL3として配列番号29 (QQYSGYPLT) を含む抗体 ;
- (q) 9F3 抗体 ;
- (r) 24F12 抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (s) CDRH1として配列番号47 (SYAMS)、CDRH2として配列番号48 (EIGSGGSYTYYPDTV TG)、CDRH3として配列番号49 (ETTAGYFDY)、CDRL1として配列番号43 (SASQGINNFLN)、CDRL2として配列番号44 (YTS SLHS) およびCDRL3として配列番号45 (QHFSKLPWT) を含む抗体 ;
- (t) 24F12 抗体 ;
- (u) LK26HuVK (配列番号13) ; LK26HuVKY (配列番号14) ; LK26HuVKPW (配列番号15) ; およびLK26HuVKPW, Y (配列番号16) からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む抗体 ;
- (v) LK26HuVH (配列番号17) ; LK26HuVH FAIS, N (配列番号18) ; LK26HuVH SLF (配列番号19) ; LK26HuVH I, I (配列番号20) ; およびLK26KOLHuVH (配列番号21) からなる群から選択される可変領域重鎖を含む抗体 ;
- (w) 重鎖可変領域LK26KOLHuVH (配列番号21) および軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) を含む抗体 ;
- (x) 重鎖可変領域LK26HuVH SLF (配列番号19) および軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) を含む抗体 ; ならびに
- (y) 重鎖可変領域LK26HuVH FAIS, N (配列番号18) および軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) を含む抗体。
- 【0066】**

特定の実施形態において、抗体は、MORAb - 003 抗体と同じエピトープに結合する。別の実施形態において、抗体は、CDRH1として配列番号1 (GFTFSGYGL

10

20

30

40

50

S)、CDRH2として配列番号2(MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3として配列番号3(HGDDPAWFAY)、CDRL1として配列番号4(SVSSSISNNLH)、CDRL2として配列番号5(GTSNLAS)およびCDRL3として配列番号6(QQWSSYPYMYT)を含む。別の実施形態において、抗体はMOV18抗体である。なお別の実施形態において、抗体は、MOV18抗体と同じエピトープに結合する。さらなる実施形態において、抗体は、LK26HuVK(配列番号13); LK26HuVKY(配列番号14); LK26HuVKPW(配列番号15); およびLK26HuVKPW, Y(配列番号16)からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む。または、あるいはそれと組み合わせて、抗体は、LK26HuVH(配列番号17); LK26HuVHF A I S, N(配列番号18); LK26HuVH S L F(配列番号19); LK26HuVH I, I(配列番号20); およびLK26KOLHuVH(配列番号21)からなる群から選択される可変領域重鎖を含む。ある種の実施形態において、抗体は、(i)重鎖可変領域LK26KOLHuVH(配列番号21)と軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y(配列番号16); 重鎖可変領域LK26HuVH S L F(配列番号19)と軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y(配列番号16); または重鎖可変領域LK26HuVH F A I S, N(配列番号18)と軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y(配列番号16)を含む。

10

#### 【0067】

特定の実施形態において、対象由来の試料におけるFRのレベルは、試料を(a)固体支持体に固定されたMOV18抗体と標識されたMORAB-003抗体; (b)固体支持体に固定された9F3抗体と標識された24F12抗体; (c)固体支持体に固定された26B3抗体と標識された19D4抗体; および(d)固体支持体に固定された9F3抗体と標識された26B3抗体からなる群から選択される一対の抗体と接触させることによって評価される。

20

#### 【0068】

ある種の実施形態において、抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、Fab、Fab'2、ScFv、SMIP、アフィボディ、アビマー、パーサボディ、ナノボディおよびドメイン抗体からなる群から選択される。または、あるいはそれと組み合わせて、抗体は、例えば、放射性標識、ビオチン標識、発色団標識、蛍光色素標識または酵素標識からなる群から選択される標識で標識される。

30

#### 【0069】

ある種の実施形態において、FRのレベルは、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光分析、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散法、溶液相アッセイ、電気化学発光イムノアッセイ(ECLIA)およびELISAアッセイからなる群から選択される技術を用いることによって決定される。

#### 【0070】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、対照試料は、健常対象におけるFRの標準化された対照レベルである。

#### 【0071】

ある種の実施形態において、試料は、試料におけるFRのレベルを決定する前にグアニジンで処理される。または、あるいはそれと組み合わせて、試料は、試料におけるFRのレベルを決定する前に希釈される。または、あるいはそれと組み合わせて、試料は、試料におけるFRのレベルを決定する前に、遠心分離され、ボルテックスされまたはその両方である。

40

#### 【0072】

さらなる態様において、本発明は、卵巣癌または肺癌などのFR発現癌を患っている対象がMORAB-003による治療に应答するかどうかを、対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR)のレベルを決定し; 試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR)のレベルと対照試料におけるFRのレベルを比較することによって予測する方法を提供し、対象由来の試料におけるFRのレベルと

50

対照試料におけるFR のレベルの間の差は、対象がMORAb - 003による治療に  
 応答するという指標であり、対象由来の試料におけるFR のレベルは、試料を(a) 固体  
 支持体に固定されたMOV18抗体と標識されたMORAB - 003抗体；(b) 固体支  
 持体に固定された9F3抗体と標識された24F12抗体；(c) 固体支持体に固定され  
 た26B3抗体と標識された19D4抗体；および(d) 固体支持体に固定された9F3  
 抗体と標識された26B3抗体と接触させることによって評価される。例えば、試料は、  
 尿、血清、血漿または腹水であってもよい。

【0073】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、治療のためのMORAb - 003は、  
 (a) 配列番号7に記載の重鎖アミノ酸配列および配列番号8に記載の軽鎖アミノ酸配列  
 を含む抗体；(b) MORAb - 003抗体と同じエピトープに結合する抗体；または(c)  
 CDRH1として配列番号1(GFTFSGYGLS)、CDRH2として配列番号  
 2(MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3として配列番号3(HGDDP  
 AWFAY)、CDRL1として配列番号4(SVSSSISSNNLH)、CDRL2  
 として配列番号5(GTSNLAS)およびCDRL3として配列番号6(QQWSSY  
 PYMYT)を含む抗体である。

10

【0074】

卵巣癌または肺癌を有する対象を治療するための方法

別の態様において、本発明は、卵巣癌または肺癌を有する対象を、前記対象由来の試料  
 (例えば、尿、血清、血漿または腹水)において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ  
 (FR )のレベルを決定し；細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR )のレベル  
 と対照試料におけるFR のレベルを比較し；治療有効量のMORAb - 003を前記対  
 象に投与することによって治療する方法を提供し、前記対象由来の試料におけるFR の  
 レベルと対照試料におけるFR のレベルとの間の差は、対象が卵巣癌または肺癌に罹患  
 しているという指標である。

20

【0075】

別の態様において、本発明は、卵巣癌または肺癌を有する対象を、前記対象由来の尿試  
 料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR )のレベルを決定し；細胞に  
 結合しない葉酸受容体アルファ(FR )のレベルと対照試料におけるFR のレベルを  
 比較し；治療有効量のMORAb - 003を対象に投与することによって治療する方法を  
 提供し、前記対象由来の尿試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR レベル  
 の間の差は、対象が卵巣癌または肺癌に罹患しているという指標である。

30

【0076】

別の態様において、本発明は、卵巣癌または肺癌を有する対象を、前記対象由来の血清  
 試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR )のレベルを決定し；細胞  
 に結合しない葉酸受容体アルファ(FR )のレベルと対照試料におけるFR のレベル  
 を比較し；治療有効量のMORAb - 003を前記対象に投与することによって治療する  
 方法を提供し、前記対象由来の血清試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR  
 のレベルの間の差は、対象が卵巣癌または肺癌に罹患しているという指標である。

40

【0077】

さらなる態様において、本発明は、卵巣癌を患っている対象を、対象由来の尿試料にお  
 いて、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR )のレベルを決定し；治療有効量の  
 MORAb - 003を前記対象に投与することによって治療する方法を提供し、約910  
 0pg/mlを超える濃度での尿試料における細胞に結合しないFR の存在は、対照が  
 MORAb - 003による治療に応答するという指標である。

【0078】

特定の実施形態において、前記対象に由来する試料において、細胞に結合しないFR  
 のレベルは、試料をFR に結合する抗体と接触させることによって評価される。

【0079】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、約9500pg/mL超、約10,0

50

00 pg/mL超、約11, 000 pg/mL超、約12, 000 pg/mL超、約13, 000 pg/mL超、約14, 000 pg/mL超、約15, 000 pg/mL超、約16, 000 pg/mL超、約17, 000 pg/mL超、約18, 000 pg/mL超、約19, 000 pg/mL超または約20, 000 pg/mL超の濃度での尿試料におけるFRの存在は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標である。

【0080】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、FRのレベルは、試料をFRに結合する抗体と接触させることによって決定される。例えば、抗体は、下記からなる群から選択される。

- (a) MORAb - 003抗体と同じエピトープに結合する抗体； 10
- (b) CDRH1として配列番号1 (GFTFSGYGLS)、CDRH2として配列番号2 (MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3として配列番号3 (HGDDPAWFAY)、CDRL1として配列番号4 (SVSSSISSNNLH)、CDRL2として配列番号5 (GTSNLAS)およびCDRL3として配列番号6 (QQWSSYPYMYT)を含む抗体；
- (c) MOV18抗体；
- (d) MOV18抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (e) 548908抗体；
- (f) 548908抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (g) 6D398抗体； 20
- (h) 6D398抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (i) 26B3抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (j) CDRH1として配列番号55 (GYFMN)、CDRH2として配列番号56 (RIFPYNGDTFYNQKFKG)、CDRH3として配列番号57 (GTHYFDY)、CDRL1として配列番号51 (RTSENI FSYLA)、CDRL2として配列番号52 (NAKT LAE)およびCDRL3として配列番号53 (QH HYAF PWT)を含む抗体；
- (k) 26B3抗体；
- (l) 19D4抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (m) CDRH1として配列番号39 (HPYMH)、CDRH2として配列番号40 (RIDPANGNTKYDPKFQG)、CDRH3として配列番号41 (EEVADYTMDY)、CDRL1として配列番号35 (RASESVDTYGNFIH)、CDRL2として配列番号36 (LASNLES)およびCDRL3として配列番号37 (QQNNGDPWT)を含む抗体； 30
- (n) 19D4抗体；
- (o) 9F3抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (p) CDRH1として配列番号31 (SGYYWN)、CDRH2として配列番号32 (YIKSDGSNNYNPSLKN)、CDRH3として配列番号33 (EWKAMDY)、CDRL1として配列番号27 (RASSTVSYSYLH)、CDRL2として配列番号28 (GTSNLAS)およびCDRL3として配列番号29 (QQYSGYPLT)を含む抗体； 40
- (q) 9F3抗体；
- (r) 24F12抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- (s) CDRH1として配列番号47 (SYAMS)、CDRH2として配列番号48 (EIGSGGSYTYYPDTVTG)、CDRH3として配列番号49 (ETTAGYFDY)、CDRL1として配列番号43 (SASQG INNFLN)、CDRL2として配列番号44 (YTS SLHS)およびCDRL3として配列番号45 (QHFSKL PWT)を含む抗体；
- (t) 24F12抗体；
- (u) LK26HuVK (配列番号13)； LK26HuVKY (配列番号14)； LK 50

26HuVKPW (配列番号15); およびLK26HuVKPW, Y (配列番号16) からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む抗体;

(v) LK26HuVH (配列番号17); LK26HuVH FAIS, N (配列番号18); LK26HuVH SLF (配列番号19); LK26HuVH I, I (配列番号20); およびLK26KOLHuVH (配列番号21) からなる群から選択される可変領域重鎖を含む抗体;

(w) 重鎖可変領域LK26KOLHuVH (配列番号21) および軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) を含む抗体;

(x) 重鎖可変領域LK26HuVH SLF (配列番号19) および軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) を含む抗体; ならびに

(y) 重鎖可変領域LK26HuVH FAIS, N (配列番号18) および軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) を含む抗体。

10

#### 【0081】

特定の実施形態において、抗体は、MORAb-003抗体と同じエピトープに結合する。別の実施形態において、抗体は、CDRH1として配列番号1 (GFTFSGYGLS)、CDRH2として配列番号2 (MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3として配列番号3 (HGDDPAWFAY)、CDRL1として配列番号4 (SVSSSISNNLH)、CDRL2として配列番号5 (GTSNLAS) およびCDRL3として配列番号6 (QQWSSYPYMYT) を含む。別の実施形態において、抗体はMOV18抗体である。なお別の実施形態において、抗体は、MOV18抗体と同じエピトープに結合する。さらなる実施形態において、抗体は、LK26HuVK (配列番号13); LK26HuVKY (配列番号14); LK26HuVKPW (配列番号15); およびLK26HuVKPW, Y (配列番号16) からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む。または、あるいはそれと組み合わせ、抗体は、LK26HuVH (配列番号17); LK26HuVHFAIS, N (配列番号18); LK26HuVH SLF (配列番号19); LK26HuVH I, I (配列番号20); およびLK26KOLHuVH (配列番号21) からなる群から選択される可変領域重鎖を含む。ある種の実施形態において、抗体は、(i) 重鎖可変領域LK26KOLHuVH (配列番号21) と軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16); 重鎖可変領域LK26HuVH SLF (配列番号19) と軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16); または重鎖可変領域LK26HuVH FAIS, N (配列番号18) と軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) を含む。

20

30

#### 【0082】

特定の実施形態において、前記対象由来の試料におけるFR のレベルは、試料を(a) 固体支持体に固定されたMOV18抗体と標識されたMORAB-003抗体; (b) 固体支持体に固定された9F3抗体と標識された24F12抗体; (c) 固体支持体に固定された26B3抗体と標識された19D4抗体; および(d) 固体支持体に固定された9F3抗体と標識された26B3抗体からなる群から選択される一対の抗体と接触させることによって評価される。

#### 【0083】

ある種の実施形態において、抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、Fab、Fab'2、ScFv、SMIP、アフィボディ、アビマー、パーサボディ、ナノボディおよびドメイン抗体からなる群から選択される。または、あるいはそれと組み合わせ、抗体は、例えば、放射性標識、ビオチン標識、発色団標識、蛍光色素標識または酵素標識からなる群から選択される標識で標識される。

40

#### 【0084】

ある種の実施形態において、FR のレベルは、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光分析、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散法、溶液相アッセイ、電気化学発光イムノアッセイ (ECLA) およびELISAアッセイからなる群から選択される技術を用いることによって決定される。

50

## 【 0 0 8 5 】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、対照試料は、健常対象における F R の標準化された対照レベルである。

## 【 0 0 8 6 】

ある種の実施形態において、試料は、試料における F R のレベルを決定する前にグアニジンで処理される。または、あるいはそれと組み合わせて、試料は、試料における F R のレベルを決定する前に希釈される。または、あるいはそれと組み合わせて、試料は、試料における F R のレベルを決定する前に、遠心分離され、ボルテックスされまたはその両方である。

## 【 0 0 8 7 】

さらなる態様において、本発明は、卵巣癌または肺癌を患っている対象を、対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルを決定し；試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルと対照試料における F R のレベルを比較することによって治療する方法を提供し、対象由来の試料における F R のレベルと対照試料における F R のレベルの間の差は、対象が M O R A b - 0 0 3 による治療に応答するという指標であり；対象由来の試料における F R のレベルは、試料を ( a ) 固体支持体に固定された M O V 1 8 抗体と標識された M O R A B - 0 0 3 抗体； ( b ) 固体支持体に固定された 9 F 3 抗体と標識された 2 4 F 1 2 抗体； ( c ) 固体支持体に固定された 2 6 B 3 抗体と標識された 1 9 D 4 抗体；および ( d ) 固体支持体に固定された 9 F 3 抗体と標識された 2 6 B 3 抗体と接触させることによって評価される。例えば、試料は、尿、血清、血漿または腹水であってもよい。

## 【 0 0 8 8 】

本発明の前述の態様の種々の実施形態において、治療のための M O R A b - 0 0 3 は、 ( a ) 配列番号 7 に記載の重鎖アミノ酸配列および配列番号 8 に記載の軽鎖アミノ酸配列を含む抗体； ( b ) M O R A b - 0 0 3 抗体と同じエピトープに結合する抗体；または ( c ) C D R H 1 として配列番号 1 ( G F T F S G Y G L S )、C D R H 2 として配列番号 2 ( M I S S G G S Y T Y Y A D S V K G )、C D R H 3 として配列番号 3 ( H G D D P A W F A Y )、C D R L 1 として配列番号 4 ( S V S S S I S S N N L H )、C D R L 2 として配列番号 5 ( G T S N L A S ) および C D R L 3 として配列番号 6 ( Q Q W S S Y P Y M Y T ) を含む抗体である。

## 【 0 0 8 9 】

## 本発明のキット

一態様において、本発明は、対象が F R 発現癌に罹患しているかどうかを評価するためのキットまたは対象における F R 発現癌の進行を評価するためのキットであって、対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルを決定するための手段；および対象が F R 発現癌に罹患しているかどうかを評価する、または F R 発現癌の進行を評価するキットを使用するための使用説明書を含むキットを提供する。例えば、F R 発現癌は、肺癌、中皮腫、卵巣癌、腎臓癌、脳癌、子宮頸癌、鼻咽腔癌、頭頸部の扁平上皮癌腫、子宮内膜癌、乳癌、膀胱癌、膵臓癌、骨癌、下垂体癌、結腸直腸癌および甲状腺髄様癌からなる群から選択される。特定の実施形態において、F R 発現癌は卵巣癌である。なお別の実施形態において、F R 発現癌は、非小細胞肺癌、例えば腺癌である。さらなる実施形態において、試料は、尿、血清、血漿または腹水のいずれかである。

## 【 0 0 9 0 】

さらなる実施形態において、手段は、葉酸受容体アルファ ( F R ) 結合剤、例えば抗体を含む。さらなる実施形態において、抗体は、下記からなる群から選択される。

( a ) M O R A b - 0 0 3 抗体と同じエピトープに結合する抗体；

( b ) C D R H 1 として配列番号 1 ( G F T F S G Y G L S )、C D R H 2 として配列番号 2 ( M I S S G G S Y T Y Y A D S V K G )、C D R H 3 として配列番号 3 ( H G D D P A W F A Y )、C D R L 1 として配列番号 4 ( S V S S S I S S N N L H )、C D R L

10

20

30

40

50

- 2として配列番号5 (G T S N L A S) およびCDRL3として配列番号6 (Q Q W S S Y P Y M Y T) を含む抗体 ;
- (c) MOV18抗体 ;
- (d) MOV18抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (e) 548908抗体 ;
- (f) 548908抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (g) 6D398抗体 ;
- (h) 6D398抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (i) 26B3抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (j) CDRH1として配列番号55 (G Y F M N)、CDRH2として配列番号56 (R I F P Y N G D T F Y N Q K F K G)、CDRH3として配列番号57 (G T H Y F D Y)、CDRL1として配列番号51 (R T S E N I F S Y L A)、CDRL2として配列番号52 (N A K T L A E) およびCDRL3として配列番号53 (Q H H Y A F P W T) を含む抗体 ;
- (k) 26B3抗体 ;
- (l) 19D4抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (m) CDRH1として配列番号39 (H P Y M H)、CDRH2として配列番号40 (R I D P A N G N T K Y D P K F Q G)、CDRH3として配列番号41 (E E V A D Y T M D Y)、CDRL1として配列番号35 (R A S E S V D T Y G N N F I H)、CDRL2として配列番号36 (L A S N L E S) およびCDRL3として配列番号37 (Q Q N N G D P W T) を含む抗体 ;
- (n) 19D4抗体 ;
- (o) 9F3抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (p) CDRH1として配列番号31 (S G Y Y W N)、CDRH2として配列番号32 (Y I K S D G S N N Y N P S L K N)、CDRH3として配列番号33 (E W K A M D Y)、CDRL1として配列番号27 (R A S S T V S Y S Y L H)、CDRL2として配列番号28 (G T S N L A S) およびCDRL3として配列番号29 (Q Q Y S G Y P L T) を含む抗体 ;
- (q) 9F3抗体 ;
- (r) 24F12抗体と同じエピトープに結合する抗体 ;
- (s) CDRH1として配列番号47 (S Y A M S)、CDRH2として配列番号48 (E I G S G G S Y T Y Y P D T V T G)、CDRH3として配列番号49 (E T T A G Y F D Y)、CDRL1として配列番号43 (S A S Q G I N N F L N)、CDRL2として配列番号44 (Y T S S L H S) およびCDRL3として配列番号45 (Q H F S K L P W T) を含む抗体 ;
- (t) 24F12抗体 ;
- (u) LK26HuVK (配列番号13) ; LK26HuVKY (配列番号14) ; LK26HuVKPW (配列番号15) ; およびLK26HuVKPW, Y (配列番号16) からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む抗体 ;
- (v) LK26HuVH (配列番号17) ; LK26HuVH FAIS, N (配列番号18) ; LK26HuVH SLF (配列番号19) ; LK26HuVH I, I (配列番号20) ; およびLK26KOLHuVH (配列番号21) からなる群から選択される可変領域重鎖を含む抗体 ;
- (w) 重鎖可変領域LK26KOLHuVH (配列番号21) および軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) を含む抗体 ;
- (x) 重鎖可変領域LK26HuVH SLF (配列番号19) および軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) を含む抗体 ; ならびに
- (y) 重鎖可変領域LK26HuVH FAIS, N (配列番号18) および軽鎖可変領域LK26HuVKPW, Y (配列番号16) を含む抗体。

【0091】

ある種の実施形態において、抗体は標識され、限定されないが、放射性標識、ビオチン標識、発色団標識、蛍光色素標識または酵素標識が挙げられる。

【0092】

なお別の実施形態において、キットは、対象由来の試料を得るための手段を含む。

【0093】

本発明は、以下の詳細な説明および図面によってさらに例示される。

【図面の簡単な説明】

【0094】

【図1】実施例に記載される尿におけるFR を評価するための電気化学発光イムノアッセイ (ECLIA) 法の概要図を示す。固体支持体に結合されたMOV18抗体は尿中のFR に結合した。その後、FR は、Ru標識されたMORAb-003抗体に結合することによって検出された。

10

【図2】ECLIAによって測定した場合、卵巣癌対象の尿および正常な対照対象の尿におけるFR レベルの分布を示す図である (実施例1参照)。

【図3】イムノプロットングを用いた卵巣癌患者の尿中のFR (レーン1上の淡いバンド、レーン2上の明確なバンド) の検出を示す図である (実施例5参照)。

【図4】実施例7に記載されるように、尿をグアニジンにより処置した後、ECLIAによって測定した場合、卵巣癌対象の尿および正常な対照対象の尿におけるFR レベルの分布を示す図である。

【図5】実施例7に記載されるように、尿をグアニジンにより処置した後、尿中のFR レベルのECLIA測定の感受性および特異性を示すROC曲線を示す図である。曲線下面積 (AUC) は、卵巣癌を対照対象から区別する試験の精度を測定する。9100pg/mLのカットオフ値 (これを超える値は試験結果が異常と考えられた) を用いた。

20

【図6】クレアチニンレベルについて修正後、卵巣癌 (OC) および正常な対照対象におけるFR レベルの分布を示す図である。FR のクレアチニン修正済みのレベルにおける卵巣癌患者と対照の間に統計学的な有意差がある ( $p = 0.007$ ) (実施例8参照)。

【図7】グアニジン処理された尿試料の電気化学発光アッセイ (ECLIA) を用いて決定されたクレアチニン修正済みのFR レベルのROC分析を示す図である (実施例8参照)。

30

【図8】実施例9に記載されるように、試料におけるFR (すなわち、FR) のレベルを評価するために用いられた酵素イムノアッセイ (EIA) 法の概要図である。MOV-18は、生物学的液体からFR を結合する捕捉抗体として役割を果たした。FR は、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされたアビジン (アビジン-HRP) を用いて検出されるビオチン化MORAb-003に結合することによって検出された。

【図9】実施例9に記載されるように、1工程および2工程のインキュベーション手法を用いて、血清中のFR の測定のために得られた結果を示す図である。

【図10】実施例11に記載されるように、ヒト血漿中のFR のレベルを評価するための酵素イムノアッセイ (EIA) 法により使用された捕捉抗体および検出抗体の3種の組み合わせの概要図である。

40

【図11】実施例11に記載されるように、捕捉抗体および検出抗体の3種の組み合わせによるEIAを用いて決定された個々の対象についてのFR の血漿濃度 (pg/mL) を示す図である。

【図12】OD値とFR 濃度の間の関係を示す図である (実施例11参照)。

【図13】EIAを用いて決定された、卵巣癌対象および正常な対照対象における血漿FR 濃度の分布を示す図である (実施例12参照)。

【図14】EIAおよびECLIAを用いて決定されたFR 血漿濃度間の相関を示す図である (実施例12参照)。

【図15】血清および尿中のFR レベルのECLIA測定値間の相関を示す図である。肺癌患者についての相関は、 $r = 0.24$  (上段パネル) であり、卵巣癌患者についての

50

相関は  $r = -0.76$  (下段パネル)であった(実施例13参照)。

【図16】対1を用いて行われたアッセイについての血清対血漿のFRレベルの相関を示す図である(実施例16参照)。

【図17】対2を用いて行われたアッセイについての血清対血漿のFRレベルの相関を示す図である(実施例16参照)。

【図18】対1対対2を用いて行われたアッセイについての血清FRレベルの相関を示す図である(実施例16参照)。

【図19】対1対対2を用いて行われたアッセイについての血漿FRレベルの相関を示す図である(実施例16参照)。

【図20】対2を用いて行われたアッセイについての血清FRレベルの日中の相関を示す図である(実施例16)。

【発明を実施するための形態】

【0095】

本発明は、少なくとも一部には、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ(FR)が、対照試料と比較して、肺癌または卵巣癌などのFR発現癌を有する対象の生体液、例えば尿または血清においてレベルが増加することが見出されるという予期せぬ発見に基づいている。さらに、本発明は、少なくとも一部には、試料中のFRレベルを評価するために必要な感受性を示す免疫アッセイの同定に基づき、この場合、そうすることの従前の試みは繰り返し失敗している。結果として、本発明は、対象由来の試料において、細胞に結合しないFRのレベルを評価することによって、FR発現癌を診断するための方法を提供することによって、卵巣癌などのFR発現癌についてFRに基づく診断アッセイを開発するという従前の試みの中で得られた課題を克服する。

【0096】

したがって、対象がFR発現癌を有するまたはそれを発症する危険性にあるかどうかを評価するための方法およびキット、さらにFR発現癌の進行を評価するための方法およびキットが提供される。種々の実施形態において、方法は、対象における卵巣癌の存在、程度または発症の危険性の評価において、対照レベルと比較した場合、試料、例えば、尿および血清において、細胞に結合しないFRのレベルの比較を伴う。特定の実施形態において、方法は、試料、例えば、尿または血清において、細胞に結合しないFRのレベルの評価において、MORAb-003抗体、MORAb-003抗体またはCDRH1として配列番号1(GFTFSGYGLS)、CDRH2として配列番号2(MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3として配列番号3(HGDDPAWFAY)、CDRL1として配列番号4(SVSSSISNNLH)、CDRL2として配列番号5(GTSNLAS)およびCDRL3として配列番号6(QQWSSYPYMYT)を有する抗体と同じエピトープに結合する抗体の使用を伴う。その代わりにまたはそれに加えて、MOV18抗体もしくはMOV18抗体と同じエピトープに結合する抗体、548908抗体、548908抗体と同じエピトープに結合する抗体、6D398抗体もしくは548908抗体と同じエピトープに結合する抗体は、本発明の方法に従って用いら

【0097】

本発明の種々の態様は、以下のサブセクションにおいて、さらに詳細に説明される。

【0098】

I. 定義

本明細書で使用するとき、以下の用語の各々は、このセクションにおける用語と関連付けられた意味を有する。

【0099】

冠詞「1つの(a)」および「1つの(an)」とは、本明細書において、冠詞の文法上目的語の1つまたは1を超える(すなわち、少なくとも1つ)を指す。例えば、「1つ

10

20

30

40

50

の要素 ( an element ) は、1つの要素または1を超える要素を意味する。

【0100】

本明細書で使用するとき、用語「対象」とは、ヒトおよび非ヒト動物、例えば獣医学的対象を指す。用語「非ヒト動物」は全ての脊椎動物を含み、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、マウス、ウサギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、トリ、両生類および爬虫類が挙げられる。好ましい実施形態において、対象はヒトである。

【0101】

用語「癌」または「腫瘍」は、当該技術分野において周知であり、例えば、対象において、癌を引き起こす細胞に典型的な特徴、例えば制御されない増殖、不死性、転移能、急速な成長および増殖速度、およびある種の特徴的形態学的状態を有する細胞の存在を指す。癌細胞は、多くの場合、腫瘍の形態であるが、このような細胞は対象内で単独で存在してもよく、または白血病細胞などの非腫瘍形成性癌細胞であってもよい。本明細書で使用するとき、用語「癌」には、前癌状態の癌および悪性癌が含まれる。

10

【0102】

本明細書で使用するとき、「FR 発現癌」には、癌細胞がFR を発現することによって特徴付けられる任意のタイプの癌が含まれる。特定の実施形態において、FR 発現癌は、癌細胞が、FR の増加レベルが対象由来の生物学的試料において検出され得るような様式で、FR を分泌し、脱落し、運び出したりは放出することができることによって特徴付けられる癌性状態を含む。FR 発現癌には、限定されないが、肺癌（例えば、気管支肺胞癌腫、カルチノイド腫瘍および非小細胞肺癌、例えば腺癌）；中皮腫；卵巣癌；腎臓癌；脳癌（例えば、未分化上衣腫および若年性小脳毛様細胞性星状細胞腫）；子宮頸癌；鼻咽腔癌；中胚葉由来の腫瘍；頭頸部の扁平上皮癌腫；子宮内膜癌；卵巣の類内膜腺癌；漿液性嚢胞腺癌；乳癌；膀胱癌；膵臓癌；骨癌（例えば、高悪性度骨肉腫）；下垂体癌（例えば、下垂体腺腫）が挙げられる。例えば、米国特許第7,754,698号；米国出願公開第2005/0232919号；WO2009/132081；Bueno Rら、J of Thoracic and Cardiovascular Surgery、121(2)：225-233(2001年)；Elkanat H & Ratnam M. Frontiers in Bioscience、11、506-519(2006年)；Franklin, WAら、Int J Cancer、Suppl 8：89-95(1994年)；Hartman L.C.ら、Int J Cancer 121：938-942(2007年)；Iwakiri Sら、Annals of Surgical Oncology、15(3)：889-899；Weitman, SDら、Cancer Res 52：3396-3401(1992年)；Saba N.F.ら、Head Neck、31(4)：475-481(2009年)；Yang Rら、Clin Cancer Res 13：2557-2567(2007年)を参照されたい。特定の実施形態において、FR 発現癌は卵巣癌である。別の実施形態において、FR 発現癌は、非小細胞肺癌などの肺癌である。他の実施形態において、FR 発現癌は、結腸直腸癌および甲状腺髄様癌である。

20

30

【0103】

本明細書で使用するとき、「FR 発現癌に罹患している」対象は、資格のある臨床医によって（例えば、本発明の方法によって）このような癌であることを臨床的に診断されたもの、またはこのような癌の1もしくはそれを超える兆候または症状（例えば、生物学的液体中のFR のレベル増加）を示し、その後、資格のある臨床医によって（例えば、本発明の方法によって）このような癌であることを臨床的に診断されたものである。また、FR 発現癌の動物モデルとして役割を果たす非ヒト対象は、「FR 発現癌に罹患している」対象たる用語の範囲内であってもよい。

40

【0104】

用語「卵巣癌」とは、当該技術分野において認識されている疾患を指し、上皮性卵巣癌（EOC；西洋諸国における卵巣癌の90%超）、胚細胞腫瘍（卵巣癌の約2-3%）、および間質性卵巣癌の各々を含む。卵巣癌は、腫瘍組織の分化に基づいて、異なる群に階層

50

化される。グレード I において、腫瘍組織は十分に分化している。グレード II において、腫瘍組織は中程度に十分に分化している。グレード III において、腫瘍組織は不十分に分化している。このグレードは、グレード I および II よりも少ない良好な予後と相関する。

#### 【0105】

卵巣癌は、癌の転移に基づいて異なる病期に階層化される。一般的に、病期 I は、1 つ（病期 IA）または両方（病期 IB）の卵巣周囲の嚢内に限定されるが、いくつかの病期 I（すなわち、病期 IC）の癌において、悪性細胞が、腹水中、腹膜洗浄液（peritoneal rinse fluid）中または卵巣表面上に検出されてもよい。病期 II は、1 つまたは両方の卵巣から他の骨盤構造への腫瘍の拡大または転移を伴う。病期 IIA において、腫瘍は、子宮、卵管または両方に拡大または転移している。病期 IIB は、骨盤への腫瘍の拡大を伴う。病期 IIC は、悪性細胞が腹水中、腹膜洗浄液中または卵巣の表面上に検出され得る病期 IIA または IIB である。病期 III において、腫瘍は、小腸もしくは網への少なくとも 1 つの悪性拡大を含み、微視的サイズ（病期 IIIA）もしくは巨視的サイズ（2 センチメートル未満の径、病期 IIIB；2 センチメートルを超える径、病期 IIC）の骨盤外腹膜インプラントを形成しまたは後腹膜もしくは鼠径リンパ節に転移している（病期 IIC の代替の指標）。病期 IV において、腫瘍の遠隔（すなわち、腹膜でない）転移が検出され得る。

10

#### 【0106】

卵巣癌の種々の病期の継続期間は、現在知られていないが、各々、少なくとも約 1 年であると考えられている（Richardson, 1969年, Am. J. Obstet. Gynecol. 105:386）。予後は病期の記号の増加に伴って減少する。例えば、病期 I、II、III および IV の卵巣癌であると診断されたヒト対象についての 5 年生存率は、それぞれ、80%、57%、25% および 8% である。

20

#### 【0107】

前述の卵巣癌のタイプ、グループおよび病期の各々は、本明細書で使用される用語「卵巣癌」に包含される。

#### 【0108】

本明細書で使用するとき、用語「肺癌」は、いくつかの症例において、転移をもたらす制御されない細胞増殖を伴う肺組織の疾患を指す。肺癌は、男性および女性の癌に関連した死亡の最も共通した原因である。大部分の原発性肺癌は、肺の癌腫であり、上皮細胞由来である。肺癌の主なタイプは、小細胞肺癌腫（SCLC）および非小細胞肺癌腫（NSCLC）である。特定の実施形態において、FR 発現癌は、非小細胞肺癌腫である。

30

#### 【0109】

小細胞肺癌または小細胞肺癌腫（SCLC）は肺の悪性癌であり、この場合、癌細胞は扁平形状であり、細胞質が少量である；したがって、SCLC は、「燕麦細胞癌腫」と呼ばれることもある。一般的に、SCLC は NSCLC よりも転移性であり、扁平上皮癌腫と組み合わせて観察されることがある。

#### 【0110】

本明細書で使用するとき、用語「非小細胞肺癌」は、非小細胞肺癌腫（NSCLC）としても知られ、小細胞肺癌腫（SCLC）以外の上皮性肺癌を指す。腺癌、扁平上皮癌腫および大細胞肺癌腫の 3 つの主要なサブタイプが存在する。他のあまり一般的でないタイプの非小細胞肺癌には、多形性のカルチノイド腫瘍、唾液腺癌腫および未分類の癌腫が挙げられる。腺癌は肺癌の約 40% を占め、喫煙をしたことがない人々における最も共通のタイプの肺癌である。扁平上皮癌腫は、肺癌の約 25% を占める。肺の扁平上皮癌腫は、女性よりも男性において共通し、他のタイプの肺癌腫よりもタバコ喫煙の前歴とさらにより高い相関性がある。少なくとも 4 つの改変体（乳頭状、小細胞、明細胞および類基底）の肺の扁平上皮癌腫がある。大細胞肺癌腫は、肺において形質転換した上皮細胞由来の異種グループの悪性新生物である。大細胞肺癌腫は、小細胞癌腫、扁平上皮癌腫または腺癌の光学顕微鏡的特徴を欠損している癌腫である。

40

50

## 【0111】

異なる病期分類システムをSCLCおよびNSCLCに用いる。SCLCは、同側の半胸部に限定される制限された疾患として分類され、または同側の半胸部を超えた転移を伴う広範囲の疾患として分類される。

## 【0112】

NSCLCは、腫瘍 - 結節 - 転移 (TNM) 病期分類システムを用いて分類されてもよい。Spira J & Etinger, D. S. Multidisciplinary management of lung cancer, N Engl J Med, 350:382 - (2004年) (下記ではSpiraとする); Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, H 10  
aller DGら (eds), AJCC Cancer Staging Manual, 6th edition, New York: Springer-Verlag, 2002:167 - 77 (下記ではGreeneとする); Sobin LH, Witte kind CH (eds), International Union Against Cancer, TNM classification of malignant tumours, 6th edition, New York: Wiley-Liss (2002年) (下記ではSobinとする) を参照されたい。さらに、NSCLCは、典型的には、下記の分類スキームによって決定される癌の病期に従って治療される ([http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/Patient/page2# 20](http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/Patient/page2#Keypoint10) Keypoint10参照)。

## 【0113】

潜伏 (隠れた) 病期において、癌細胞は唾液 (肺から喀出される粘液) 中に見出されるが、腫瘍は、画像もしくは気管支鏡検査法によって肺において見出すことができずまたは腫瘍は非常に小さいため検査することができない。

## 【0114】

病期0 (上皮内癌腫 (carcinoma in situ)) において、異常な細胞は、気道内部に見出される。これらの異常な細胞は癌となり、隣接する正常組織内に広がる場合がある。また、病期0は上皮内癌腫とも呼ばれる。

## 【0115】

病期Iは、癌が形成されており、病期IAとIBに分類される。 30

## 【0116】

病期IAにおいて、腫瘍は肺においてのみ存在し、3センチメートル以下である。

## 【0117】

病期IBにおいて、癌はリンパ節までには広がらずまたは以下の1もしくは複数当てはまる: (i) 腫瘍の大きさが3センチメートルを超えるが、5センチメートルより大きくない; (ii) 癌が主要気管支に広がり、気管が気管支に接続する場所の下少なくとも2センチメートルであり; (iii) 癌が、肺を覆う膜の最内層に広がっている; (iv) 肺の一部が、気管が気管支に接続する領域において、崩壊しているまたは肺炎 (肺の炎症) を発症している。 40

## 【0118】

病期IIAにおいて、癌は、原発性腫瘍と同じ胸部側のある種のリンパ節に広がっている; 癌は、(a) 5cmもしくはそれ未満である、(b) 主要気管支に広がっている、および/または(c) 肺の内膜 (lung lining) の最内層に広がっている。または、癌はリンパ節に広がっていない; 癌は、(d) 5cmより大きい7cmより大きくない、(e) 主要気管支に広がっている、および/または(f) 肺の内膜の最内層に広がっている。肺の一部は崩壊しているまたは炎症を起こしている場合がある。病期IIAは、腫瘍の大きさ、腫瘍が見つかった場所、およびリンパ節に癌が存在するかどうかにより2つのセクションに分けられる。第一のセクションにおいて、癌は、腫瘍と同じ胸部側のリンパ節に広がっている。癌を有するリンパ節が肺内にあるまたは気管支の近傍にある。 50

また、以下の1つもしくは複数が当てはまる：(i)腫瘍の大きさが5センチメートルよりは大きくない；(ii)癌が主要気管支に広がり、気管が気管支に接続する場所の下の少なくとも2センチメートルであり；(iii)癌が、肺を覆う膜の最内層に広がっている；(iv)肺の一部が、気管が気管支に接続する領域において、崩壊しているまたは肺炎（肺の炎症）を発症している。第二のセクションにおいて、癌はリンパ節までには広がらずおよび以下の1つもしくは複数が当てはまる：(i)腫瘍の大きさが5センチメートルを超えるが、7センチメートルよりは大きくない；(ii)癌が主要気管支に広がり、気管が気管支に接続する場所の下の少なくとも2センチメートルであり；(iii)癌が、肺を覆う膜の最内層に広がっている；(iv)肺の一部が、気管が気管支に接続する領域において、崩壊しているまたは肺炎（肺の炎症）を発症している。

10

## 【0119】

病期IIBにおいて、癌は、原発性腫瘍と同じ胸部側のある種のリンパ節に広がっている；癌は、(a)5cmより大きい、7cmよりは大きくない、(b)主要気管支に広がっている、および/または(c)肺の内膜の最内層に広がっている。肺の一部は、崩壊しているまたは炎症を起こしている場合がある。あるいは、(d)癌は、7cmより大きい；(e)主要気管支、(f)横隔膜、(g)胸壁もしくは胸壁の内膜に広がっている、および/または(h)心臓周囲の膜に広がっている。同じ肺葉に1つまたは複数の別々の腫瘍があり得る；癌が横隔膜を調節する神経に広がっている場合がある；肺全体が崩壊しているまたは炎症を起こしている場合がある。病期IIBは、腫瘍の大きさ、腫瘍が見つかった場所、およびリンパ節に癌が存在するかどうかにより2つのセクションに分けられる。第一のセクションにおいて、癌は、腫瘍と同じ胸部側のリンパ節近傍に広がっている。癌を有するリンパ節が肺内にあるまたは気管支の近傍にある。また、以下の1つもしくは複数が当てはまる：(i)腫瘍の大きさが5センチメートルを超えるが、7センチメートルよりは大きくない；(ii)癌が主要気管支に広がり、気管が気管支に接続する場所の下の少なくとも2センチメートルであり；(iii)癌が、肺を覆う膜の最内層に広がっている；(iv)肺の一部が、気管が気管支に接続する領域において、崩壊しているまたは肺炎（肺の炎症）を発症している。第二のセクションにおいて、癌はリンパ節までには広がらずおよび以下の1つもしくは複数が当てはまる：(i)腫瘍の大きさが7センチメートルを超える；(ii)癌が主要気管支（および気管が気管支に接続する場所の下の2センチメートル未満であり）、胸壁、横隔膜または横隔膜を調節する神経に広がっている；(iii)心臓周囲の膜もしくは胸壁の内膜に広がっている、(iv)肺全体が崩壊しているまたは肺炎（肺の炎症）を発症している、(v)同じ肺葉に1つまたは複数の別々の腫瘍が存在している。

20

30

## 【0120】

病期IIIAは、腫瘍の大きさ、腫瘍が見つかった場所、(もしあれば)どのリンパ節が癌を有するかにより3つのセクションに分けられる。病期IIIAの第一のセクションにおいて、癌は、腫瘍と同じ胸部側のリンパ節に広がっている。癌を有するリンパ節は、胸骨（胸の骨）近傍にあるまたは気管支が肺に入る場所にある。また、腫瘍は任意の大きさであってもよい；肺の一部（気管が気管支に接続する場所）または肺全体が崩壊しているまたは肺炎（肺の炎症）を発症しているてもよい；同じ肺葉に1つまたは複数の別々の腫瘍が存在してもよい；および癌が以下のいずれかに広がっていてもよい：(i)主要な気管支であるが、気管が気管支に接続する領域ではない、(ii)胸壁、(iii)横隔膜および横隔膜を調節する神経、(iv)肺周囲の膜または胸壁の内膜、(v)心臓周囲の膜。病期IIIAの第二のセクションにおいて、癌は、腫瘍と同じ胸部側のリンパ節に広がっている。癌を有するリンパ節は、肺内または気管支近傍にある。また、腫瘍は任意の大きさであってもよい；肺全体が崩壊しているまたは肺炎（肺の炎症）を発症しているてもよい；癌を有する肺葉のいずれかに1つまたは複数の別々の腫瘍が存在してもよい；および癌が以下のいずれかに広がっていてもよい：(i)主要な気管支であるが、気管が気管支に接続する領域ではない、(ii)胸壁、(iii)横隔膜および横隔膜を調節する神経、(iv)肺周囲の膜または胸壁の内膜、(v)心臓または心臓周囲の膜、(vi)

40

50

心臓にもたらすまたは心臓からもたらされる主要な血管、(v i) 気管、(v i i) 食道、(v i i i) 喉頭 (v o i c e b o x) を調節する神経、(i x) 胸骨 (胸の骨) または背骨、(x) 竜骨 (気管が気管支に接続する場所)。病期 I I I A の第三のセクションにおいて、癌はリンパ節に広がっておらず、腫瘍は任意の大きさであってもよく、および癌は以下のいずれかに広がっている：(i) 心臓、(i i) 心臓にもたらすまたは心臓からもたらされる主要な血管、(i i i) 気管、(i v) 食道、(v) 喉頭 (v o i c e b o x) を調節する神経、(v i) 胸骨 (胸の骨) または背骨、(v i) 竜骨 (気管が気管支に接続する場所)。

【0121】

病期 I I I B は、腫瘍の大きさ、腫瘍が見つかった場所、どのリンパ節が癌を有するかにより2つのセクションに分けられる。第一のセクションにおいて、癌は、鎖骨上のリンパ節または腫瘍と反対の胸部のリンパ節に広がっている；腫瘍は任意の大きさであってもよい；肺の一部 (気管が気管支に接続している場所) または肺全体が崩壊しているまたは肺炎 (肺の炎症) を発症していてもよい；癌を有する肺葉のいずれかに1つまたは複数の別々の腫瘍が存在していてもよい；および癌は以下のいずれかに広がっていてもよい：(i) 主要な気管、(i i) 胸壁、(i i i) 横隔膜および横隔膜を調節する神経、(i v) 肺周囲の膜または胸壁の内膜、(i v) 心臓または心臓周囲の膜、(v) 心臓にもたらすまたは心臓からもたらされる主要な血管、(v i) 気管、(v i i) 食道、(v i i i) 喉頭 (v o i c e b o x) を調節する神経、(i x) 胸骨 (胸の骨) または背骨、(x) 竜骨 (気管が気管支に接続する場所)。病期 I I I B の第二のセクションにおいて、癌は、腫瘍と同じ胸部側のリンパ節に広がっている；癌を有するリンパ節は胸骨 (胸の骨) の近傍または気管支が肺に入る場所にある；腫瘍は任意の大きさであってもよい；同じ肺の異なる肺葉に別々の腫瘍が存在していてもよい；および癌は以下のいずれかに広がっていてもよい：(i) 心臓、(i i) 心臓にもたらすまたは心臓からもたらされる主要な血管、(i i i) 気管、(i v) 食道、(v) 喉頭 (v o i c e b o x) を調節する神経、(v i) 胸骨 (胸の骨) または背骨、(v i i) 竜骨 (気管が気管支に接続する場所)。

【0122】

病期 I V において、腫瘍は任意の大きさであってもよく、癌はリンパ節に広がっていてもよい。以下の1つまたは複数が当てはまる：両肺において1つまたは複数の腫瘍が存在する；癌が肺または心臓の周囲の体液に見出される；癌が他の生体部分、例えば脳、肝臓、副腎、腎臓または骨に広がっている。

【0123】

したがって、前述の発明の様々な実施形態において、肺癌は、対象の試料 (例えば、尿または血清) における正常細胞または癌細胞などの細胞に結合しない F R のレベルの評価に基づいて、前記病期 (例えば、潜在的な、病期 0、病期 I A、病期 I B、病期 I I A、病期 I I B、病期 I I I A、病期 I I I B または病期 I V) のいずれかに階層化されてもよい。

【0124】

本明細書で使用するとき、用語「葉酸受容体アルファ」(F R、F R - アルファ、F O L R - 1 または F O L R 1 とも称される) とは、葉酸に対する高親和性受容体のアルファアイソフォームを指す。膜に結合した F R は、グリコシルホスファチジルイノシトール (G P I) アンカーによって細胞表面に結合し、細胞外コンパートメントと細胞内コンパートメントの間を再循環し、葉酸を細胞に輸送することができる。F R は、様々な上皮組織に発現し、女性の生殖器系、胎盤、乳房、近位尿細管、脈絡叢、肺および唾液腺の組織が挙げられる。F R の可溶形態は、膜に固定された葉酸受容体へのプロテアーゼまたはホスホリパーゼの作用によって誘導され得る。

【0125】

ヒト F R のコンセンサスなヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、本明細書において、それぞれ配列番号 24 および 25 に記載されている。改変体、例えば、天然に存在す

10

20

30

40

50

る対立遺伝子改変体または少なくとも1つのアミノ酸置換を含む配列は、本明細書で使用される用語によって包含される。

【0126】

本明細書で使用するとき、用語「細胞に結合しない」とは、癌細胞などの細胞の細胞膜に結合しないFRを指す。特定の実施形態において、細胞に結合しないFRは、いずれの細胞にも結合せず、生物学的液体、例えば尿または血清に自由に浮遊または可溶化されている。例えば、FRは、正常細胞または癌細胞から、例えば癌細胞の表面から生物学的液体に脱落され、分泌されまたは運び出されてもよい。

【0127】

細胞に結合しない葉酸受容体アルファの「レベル」とは、本明細書で使用するとき、タンパク質レベルの測定のために、当該技術分野において知られている任意の方法を用いて決定される、葉酸受容体アルファタンパク質のレベルを指す。このような方法には、例えば、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、高拡散クロマトグラフィー、液体またはゲル沈降反応、吸光分光法、比色分析法、分光学的定量法、フローサイトメトリー、免疫拡散法(一重または二重)、液相アッセイ、免疫電気泳動、ウェスタンブロットティング、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素免疫吸着法(ELISA)、免疫蛍光アッセイおよび電気化学発光イムノアッセイ(以下に例示される)などが挙げられる。特定の実施形態において、レベルは、本明細書においてより詳細に記載されている抗体に基づく技術を用いて決定される。

10

20

【0128】

一般的に、ウェスタンブロットティングおよび免疫蛍光技術のための固体支持体上で、細胞に結合しないFRに特異的な抗体または結合タンパク質のいずれかを固定することが好ましい。適切な固相支持体または担体には、抗原または抗体を結合することができる任意の支持体が含まれる。周知の支持体または担体には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、斑癩岩および磁鉄鉱が挙げられる。

【0129】

当業者は、抗体または抗原に結合するのに適切な他の多くの担体を知っており、本発明を用いた使用にこのような支持体を適合することができる。例えば、対象試料(例えば、尿または血清)から単離されたタンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で移動し、ニトロセルロースなどの固相支持体に固定され得る。次に、支持体は、適切な緩衝液で洗浄され、続いて、標識された抗体で処理され得る。その後、固相支持体は、2度目の緩衝液で洗浄され、未結合の抗体を除去することができる。次に、固体支持体に結合した標識量は、従来手段によって検出され得る。電気泳動技術を用いてタンパク質を検出する手段は、当業者に周知である(概して、R. Scopes(1982年) Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher, (1990年) Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc., N.Y. 参照)。

30

40

【0130】

他の標準的な方法は、当業者に周知であるイムノアッセイ技術を含み、Principles And Practice Of Immunoassay, 2nd Edition, Price and Newman, eds., MacMillan(1997年)およびAntibodies, A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Ch. 9(1988年)に見出すことができ、各々は、その全体として、参照により本明細書に組み込まれる。

【0131】

葉酸受容体アルファの発現レベルを決定するためにイムノアッセイにおいて使用される

50

抗体は、検出可能なレベルで標識化されてもよい。用語「標識化される」とは、結合剤または抗体に関して、結合剤または抗体に検出可能な基質をカップリングさせる（すなわち、物理的に連結させる）ことによる結合剤または抗体の直接標識、および直接的に標識される別の試薬との反応性による結合剤または抗体の間接標識を包含することを意図する。間接標識の例には、蛍光標識された二次抗体を用いた一次抗体の検出が含まれる。一実施形態において、抗体は、標識され、例えば、放射性標識され、発色団標識され、フルホロフォア標識されまたは酵素標識される。別の実施形態において、抗体は、細胞に結合しないFR に特異的に結合する抗体誘導体（例えば、基質とコンジュゲートされた抗体またはタンパク質 - リガンド対（例えば、ピオチン - ストレプトアビジン）のタンパク質もしくはリガンドとコンジュゲートされた抗体、または抗体断片（例えば、一本鎖抗体、単離された抗体超可変領域））である。

10

## 【0132】

本発明の一実施形態において、プロテオーム法、例えば質量分析法を用いる。質量分析法は、化合物をイオン化し、荷電分子（またはその断片）を生じさせ、それらの質量対荷電の比を測定することからなる分析技術である。典型的な質量分析手法において、試料は対象から得られ、質量分析計に装填し、その成分（例えば、FR）を異なる方法によって（例えば、それらを電子ビームにより衝撃を与えることによって）イオン化し、荷電粒子（イオン）の形成をもたらす。次に、粒子が電磁場を通過するため、粒子の質量対荷電の比は、イオンの運動から計算される。

## 【0133】

例えば、タンパク質結合チップへの尿または血清などの試料の塗布を伴うマトリックス関連レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）または表面エンハンス型レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析計（SELDI-TOF MS）（Wright, G. L., Jr. ら、（2002年）Expert Rev Mol Diagn 2:549; Li, J. ら、（2002年）Clin Chem 48:1296; Laronga, C ら、（2003年）Dis Markers 19:229; Petricoin, E. F. ら、（2002年）359:572; Adam, B. L. ら、（2002年）Cancer Res 62:3609; Tolson, J. ら、（2004年）Lab Invest 84:845; Xiao, Z. ら、（2001年）Cancer Res 61:6029）を用いて、FR のレベルを決定することができる。

20

30

## 【0134】

さらに、細胞に結合しないFR のレベルを決定するためのインビボ技術は、検出可能な分子に結合し、FR を変換する、FR に対して試行される標識された抗体を対象に導入することを含む。対象において、細胞に結合しない検出可能なFR の存在、レベルまたは位置は標準的な画像化技術を用いて決定されてもよい。

## 【0135】

用語「試料」とは、本明細書で使用するとき、対象から単離された類似の液体、細胞または組織、および対象内に存在する液体、細胞または組織の回収物を指す。好ましい実施形態において、試料は、癌細胞に結合しないFR を含む生物学的液体である。生物学的液体は、典型的には、生理学的温度の液体であり、対象または生物学的供給源に存在する、そこから採取された、そこで発現している、または他にはそこから抽出された天然に存在する液体を含んでもよい。ある種の生物学的液体は、特定の組織、臓器または局所化された領域から誘導され、ある種の他の生物学的液体は対象または生物学的供給源において、より全体的にまたは全身的に位置付けられてもよい。生物学的液体の例には、血液、血清および漿膜液、血漿、リンパ液、尿、脳脊髄液、唾液、眼液、嚢胞液、涙滴、糞便、喀痰、分泌組織および臓器の粘液分泌物、腔分泌物、婦人科液、腹水、例えば非固形腫瘍、胸腔、心膜腔、腹膜腔、腹腔および他の体腔、気管支洗浄によって回収される液体などが挙げられる。特定の実施形態において、試料は尿または血清である。別の実施形態において、試料は腹水を含まずまたは腹水試料ではない。別の実施形態において、試料は腹膜液

40

50

を含まずまたは腹膜液ではない。

【0136】

一実施形態において、試料は対象から取り出される。別の実施形態において、試料は対象内に存在する。また、生物学的液体は、対象または生物学的供給源と接触した溶液を含み、例えば、細胞および臓器培養液、例えば細胞または臓器の馴化培地、洗浄液などが挙げられる。

【0137】

いくつかの実施形態において、ほんの一部の試料は、細胞に結合しないFR のレベルを決定するためにアッセイに供され、または試料の種々の部分は、細胞に結合しないFR のレベルを決定するために種々のアッセイに供される。また、多数の実施形態において、試料は、アッセイの前に物理的または化学的手段によって前処理されてもよい。例えば、実施例のセクションにおいてより詳細に検討されている実施形態において、試料、例えば、尿試料は、細胞に結合しないFR について試料をアッセイする前に、遠心分離、希釈および/または可溶化物質を用いた処理（例えば、グアニジン処理）に供された。このような技術は、本発明のアッセイの精度、信頼性および再現性を高めるために役立つ。

10

【0138】

用語「対照試料」とは、本明細書で使用する時、いずれかの臨床的に関連する対照試料を指し、例えば、卵巣癌に罹患していない健常対象由来の試料、評価されるべき対象よりも低い重度または遅い進行性の卵巣癌を有している対象由来の試料、いくつかの他のタイプの癌または疾患を有する対象由来の試料などが含まれる。対照試料は、1つまたは複数の対象由来の試料を含んでもよい。また、対照試料は、評価されるべき対象由来から早期時点で作られる試料であってもよい。例えば、対照試料は、疾患の早期の病期での肺癌もしくは卵巣癌などのFR 発現癌の発症前、または治療もしくは一部の治療の付与前に評価されるべき対象から採取される試料であり得る。また、対照試料は、肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌の、動物モデルからの試料、または動物モデル由来の組織または細胞株からの試料であってもよい。一群の測定値からなる対照試料における細胞に結合しないFR のレベルは、例えば、平均、中央値またはモード値を含む中心傾向の測定などの任意の適切な統計学的測定に基づいて決定されてもよい。

20

【0139】

用語「対照レベル」とは、対象由来の試料におけるFR のレベルと比較するために使用されるFR の容認されたレベルまたは予め決定されたレベルを指す。一実施形態において、FR の対照レベルは、穏やかな疾患進行を有する対象由来の試料における細胞に結合しないFR のレベルに基づく。別の実施形態において、細胞に結合しないFR の対照レベルは、急速な疾患進行を有する対象由来の試料におけるレベルに基づく。別の実施形態において、FR の対照レベルは、影響されていない、すなわち、疾患でない対象、すなわち、肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌を有しない対象由来の試料における細胞に結合しないFR のレベルに基づいている。なお別の実施形態において、FR の対照レベルは、卵巣癌の治療の付与前に、対象由来の試料における細胞に結合しないFR のレベルに基づく。別の実施形態において、FR の対照レベルは、試験化合物と接触していない、肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌を有する対象由来の試料における細胞に結合しないFR のレベルに基づく。別の実施形態において、FR の対照レベルは、試験化合物と接触していない肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌を有しない対象由来の試料における細胞に結合しないFR のレベルに基づく。一実施形態において、FR の対照レベルは、肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌の動物モデル、肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌の動物モデル由来の細胞または細胞株由来の試料における細胞に結合しないFR のレベルに基づく。

30

40

【0140】

一実施形態において、対照は、標準化された対照であり、例えば、肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌を有しない対象の集団由来の細胞に結合しないFR のレベルの平均を用いて事前に決定された対照が挙げられる。本発明のなお他の実施形態において、FR

50

の対照レベルは、肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌を有する対象由来の非癌性試料における細胞に結合しないFR のレベルに基づく。例えば、開腹術または他の医療手法が卵巣の一部における卵巣癌の存在を示す場合、FR の対照レベルは、卵巣の影響されていない部分を用いて決定されてもよく、この対照レベルは、卵巣の影響された部分におけるFR のレベルと比較されてもよい。同様に、生検または他の医療手法が肺の一部における肺癌の存在を示す場合、FR の対照レベルは、肺の影響されていない部分を用いて決定されてもよく、この対照レベルは、肺の影響された部分におけるFR のレベルと比較されてもよい。

#### 【0141】

本明細書で使用するとき、対象由来の試料（すなわち、試験試料）における細胞に結合しない葉酸受容体アルファのレベルと対照試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファのレベルの間の「差」は、2つの試料における葉酸受容体アルファのレベルの任意の臨床的に関連するおよび/または統計学的に有意な差を広く指す。例示的な実施形態において、差は、実施例6に示される例である受信者動作特性（ROC）分析を用いて決定されるカットオフ値に基づいて選択される。

10

#### 【0142】

他の実施形態において、差は、細胞に結合しないFR のレベルを決定するための方法の検出限界より大きくなる必要がある。差は、評価法の標準誤差よりも少なくとも大きいことが好ましく、好ましくは少なくとも評価法の標準誤差の約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約100倍、約500倍、約1000倍またはそれらを超える。差は、任意の適切なパラメータ的または非パラメータ的記述統計学または比較を含む任意の適切な比較によって評価されてもよい。例えば、細胞に結合しないFR のレベルの「増加」は、対照試料におけるFR のレベルの約2倍、より好ましくは約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍またはそれらを超える試験試料におけるレベルを指してもよい。また、増加は、好ましくは、対照試料におけるFR の平均レベルを超える少なくとも約1.5、より好ましくは約2、約3、約4、約5またはそれを超える標準偏差である試験試料におけるレベルを指す場合がある。同様に、細胞に結合しないFR のレベルの「減少」は、対照試料におけるFR のレベルの約2倍、より好ましくは約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍またはそれらを下回る試験試料にお

20

30

#### 【0143】

本明細書で使用するとき、FR 結合剤、例えば抗FR 抗体と「試料を接触させる」たる用語には、試料またはその任意の部分を薬剤または抗体で暴露し、試料の少なくとも一部が薬剤または抗体と接触するようになることが含まれる。試料またはその一部は、何らかの方法で変更されてもよく、例えば、それを薬剤または抗体と接触させる行為の前に、それを物理的または化学的な処置（例えば、希釈またはグアニジン処理）に供することによって変更されてもよい。

40

#### 【0144】

用語「抗体」は、本明細書で使用するとき、ジスルフィド結合によって相互に連結されている2つの重（H）鎖と2つの軽（L）鎖の4つのポリペプチド鎖、および任意の機能的（すなわち、抗原結合）断片、変異体、改変体またはそれらの誘導体を含み、それはIg分子の本質的なエピトープ結合特徴を保持している。このような変異、改変または誘導抗体フォーマットは当該技術分野において知られ、Fab断片、Fab'断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fd断片、Fabc断片、Sc抗体（一本鎖抗体）、ダイアボディ（diabody）、個々の抗体軽鎖、個々の抗体重鎖、抗体鎖間のキメラ融合体などを含む。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1

50

および I g A 2 ) またはサブクラスであってもよい。

【 0 1 4 5 】

各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書において H C V R または V H と略される）および重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、3つのドメインである C H 1、C H 2 および C H 3 で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書において L C V R または V L と省略される）および軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は1つのドメインである C L で構成される。V H および V L 領域は、相補性決定領域（C D R）と呼ばれる超可変性の領域にさらに下位に分割することができ、フレームワーク領域（F R）と呼ばれる、より保存されている領域が散在している。各 V H および V L は、以下：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4 の順番でアミノ末端からカルボキシ末端に配列されている3つの C D R と4つの F R で構成される。軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロンとして分類され、それぞれ、I g G、I g M、I g A、I g D および I g E として抗体のアイソタイプを画定する。

10

【 0 1 4 6 】

重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、宿主の組織または因子への免疫グロブリンの結合を仲介し得て、免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）および典型的な補体系の第一のコンポーネント（C 1 q）を含む。

【 0 1 4 7 】

抗体の「抗原結合部分」なる用語は、本明細書で使用するとき、抗原（例えば、細胞に結合しない F R）に特異的に結合する能力を保持している抗体の1つまたは複数の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、全長の抗体の断片によって果たされてもよい。抗体の「抗原結合部分」なる用語内に包含される結合断片の例には、( i ) F a b 断片、V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C L および C H 1 ドメインからなる一価断片；( i i ) F ( a b ' )<sub>2</sub> 断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つの F a b 断片を含む二価断片；( i i i ) V<sub>H</sub> および C H 1 ドメインからなる F d 断片；( i v ) 抗体の単一アームの V<sub>L</sub> および V<sub>H</sub> ドメインからなる F v 断片；( v ) V H および V L ドメインを含む d A b；( v i ) V<sub>H</sub> ドメインからなる d A b 断片（Wardら、( 1989年 ) Nature 341, 544 - 546）；( v i i ) V H または V L ドメインからなる d A b；および( v i i i ) 単離された相補性決定領域（C D R）または( i x ) 合成リンカーによって場合により接続されてもよい2つまたはそれを超える単離された C D R の組み合わせが挙げられる。さらに、F v 断片の2つのドメインである V<sub>L</sub> および V<sub>H</sub> は別々の遺伝子によってコードされているが、それらは、一価分子（一本鎖 F v ( s c F v )）として知られる；例えば、Birdら、( 1988年 ) Science 242, 423 - 426；および Hustonら、( 1988年 ) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879 - 5883 参照）を形成するために、V<sub>L</sub> および V<sub>H</sub> 領域が対をなして単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって、組換え法を用いて接続され得る。また、このような単一鎖抗体は、抗体の「抗原結合部分」なる用語に包含されることが意図される。これらの抗体断片は、当業者に知られている慣用的な技術を用いて得られ、断片は、無傷な抗体と同様の方法で有用性についてスクリーニングされる。抗原結合部分は、組換え D N A 技術によってまたは無傷な免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的切断によって生成することができる。

20

30

40

【 0 1 4 8 】

用語「抗体」は、本明細書で使用するとき、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体、天然に存在するまたは当技術分野で周知の方法に従い組換え的に生成される抗体を含む。

【 0 1 4 9 】

一実施形態において、本発明の方法に用いるための抗体は二重特異性抗体である。「二重特異性抗体」は、2種の重鎖/軽鎖対および2種の結合部位を有する人工的なハイブリ

50

ッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結を含む様々な方法によって生成することができる。例えば、Songsivilai & Lachmann、(1990年) Clin. Exp. Immunol.、79、315-321; Kostelnyら、(1992年) J. Immunol. 148、1547-1553を参照されたい。

#### 【0150】

別の実施形態において、本発明の方法に用いられる抗体は、例えば、全内容が参照により本明細書に組み込まれるPCT出願公開WO94/04678に記載されているラクダ抗体である。

#### 【0151】

V<sub>H</sub>Hとして同定されている小さい単一の可変領域であるラクダ抗体の領域は、標的に対して高親和性を有する小タンパク質を得るように遺伝子操作によって得ることができ、「ラクダナノボディ」として知られる低分子量の抗体誘導性タンパク質をもたらす。U. S. Pat. No. 5,759,808参照;さらに、Stijlemansら、2004年 J. Biol. Chem. 279:1256-1261; Dumoulinら、2003年 Nature 424:783-788; Pleschbergerら、2003年 Bioconjugate Chem. 14:440-448; Cortez-Retamozoら、2002年 Int. J. Cancer 89:456-62; Lauwereysら、1998年 EMBO J. 17:3512-3520を参照されたい。ラクダ抗体および抗体断片の遺伝子操作されたライブラリーは、例えば、Abllynx, Ghent, Belgiumから市販されている。したがって、本発明の特徴は、FRに高親和性であるラクダナノボディである。

#### 【0152】

本発明の他の実施形態において、本発明の方法に用いられる抗体は、ダイアボディ、一本鎖ダイアボディまたはジダイアボディ(di-diabody)である。

#### 【0153】

ダイアボディは、二価の二重特異性分子であり、これは、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインが、単一のポリペプチド鎖に発現し、同鎖上の2つのドメイン間で対形成ができないような短いリンカーによって接続されている。V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインは別の鎖の相補的ドメインと対をなし、それによって、2つの抗原結合部位を創作する(例えば、Holligerら、1993年 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljakら、1994年 Structure 2:1121-1123参照)。ダイアボディは、同じ細胞内で構造V<sub>HA</sub>-V<sub>LB</sub>とV<sub>HB</sub>-V<sub>LA</sub>(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>立体構造)またはV<sub>LA</sub>-V<sub>HB</sub>とV<sub>LB</sub>-V<sub>HA</sub>(V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>立体構造)のいずれかを有する2つのポリペプチド鎖を発現することによって生成することができる。それらの大部分は細菌において可溶形態で発現し得る。

#### 【0154】

一本鎖ダイアボディ(scDb)は、約15アミノ酸残基のリンカーを用いて、2つのダイアボディ形成ポリペプチド鎖を接続することによって生成される(Holliger and Winter、1997年 Cancer Immunol. Immunother.、45(3-4):128-30; Wuら、1996年 Immunotechnology、2(1):21-36参照)。scDbは、可溶性活性型単量体の形態で細菌中に発現し得る(Holliger and Winter、1997年 Cancer Immunol. Immunother.、45(34):128-30; Wuら、1996年 Immunotechnology、2(1):21-36; Pluckthun and Pack、1997年 Immunotechnology、3(2):83-105; Ridgwayら、1996年 Protein Eng.、9(7):617-21参照)。

#### 【0155】

ダイアボディは、Fcに融合し、「ジダイアボディ」を生成することができる(Luら

10

20

30

40

50

、2004年 J. Biol. Chem.、279(4):2856-65参照)。

【0156】

また、抗体の機能的特性を示すが、それらのフレームワークと他のポリペプチド(例えば、抗体遺伝子がコードするポリペプチドまたはインビボで抗体遺伝子の組換えによって生成されるポリペプチド以外のポリペプチド)由来の抗原結合部分を誘導するFR結合分子は、本発明の方法において使用されてもよい。これらの結合分子の抗原結合ドメイン(例えば、FR結合ドメイン)は、指向進化過程を通じて生成される。例えば、U.S. Pat. No. 7,115,396を参照されたい。抗体の可変領域の構造に類似した全折り畳み構造(「免疫グロブリン様」折り畳み構造)を有する分子は、適した足場タンパク質である。抗原結合分子の誘導に適した足場タンパク質には、フィブロネクチンまたはフィブロネクチン二量体、テネイシン、N-カドヘリン、E-カドヘリン、ICAM、チチン、GCSF受容体、サイトカイン受容体、グリコシダーゼ阻害剤、抗生物質色素タンパク質、ミエリン膜接着分子P0、CD8、CD4、CD2、クラスI MHC、T細胞抗原受容体、CD1、C2およびVCAM-1のIセットドメイン、ミオシン結合タンパク質CのIセット免疫グロブリンドメイン、ミオシン結合タンパク質HのIセット免疫グロブリンドメイン、テロキンのIセット免疫グロブリンドメイン、NCAM、トゥイツチン(twitchin)、ニューログリアン(neuroglian)、成長ホルモン受容体、エリストポエチン受容体、プロラクチン受容体、インターフェロン-ガンマ受容体、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ/グルクロニダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、トランスグルタミナーゼ、T細胞抗原受容体、スーパーオキシドジスムターゼ、組織因子ドメイン、シトクロームF、緑色蛍光タンパク質、GroELおよびタウマチンが挙げられる。

10

20

【0157】

抗体との関連で使用される場合の「特異的結合」または抗体断片は、対象とするタンパク質の1つまたは複数のエピトープに対する、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子の断片によってコードされるドメインを介した結合を表し、抗原性分子の混合集団を含む試料中の他の分子を実質的に認識および結合しない。典型的には、抗体は、表面プラズモン共鳴アッセイまたは細胞結合アッセイによって測定した場合、約 $1 \times 10^{-8}$  M未満のKdを有する同種抗原に結合する。

【0158】

本明細書で使用するとき、葉酸受容体アルファ「結合剤」には、細胞に結合しないFRに結合する抗体および非抗体結合剤が含まれる。非抗体結合剤または結合分子を生じさせるために、クローンライブラリーが作製され得て、この場合、抗原結合表面を形成する足場タンパク質の領域(例えば、抗体可変ドメイン免疫グロブリンの折り畳み構造のCDRに対して位置および構造において類似した領域)の配列は無作為化される。ライブラリークローンは、対象とする抗原(例えば、FR)への特異的結合についておよび他の機能(例えば、FRの生物学的活性の阻害)について試験される。選択されたクローンは、さらなる無作為化および選択のための基礎として用い、抗原に対して高親和性の誘導体を生成することができる。

30

【0159】

高親和性結合分子は、例えば、U.S. Pat. No. 6,818,418および7,115,396; Roberts and Szostak、1997年 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297; U.S. Pat. No. 6,261,804; U.S. Pat. No. 6,258,558; および Szostakら、WO98/31700(各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている、足場としてのフィブロネクチンIII( $^{10}$ F<sub>n</sub>3)の10番目のモジュールを用いて生じさせる。

40

【0160】

非抗体結合分子は、二量体または多量体として生成され、標的抗原に対する結合活性を増加させることができる。例えば、抗原結合ドメインは、Fc-Fc二量体を形成する抗体の定常領域(Fc)を有する融合体として発現される。例えば、全内容が参照により本

50

明細書に組み込まれる U . S . P a t . N o . 7 , 1 1 5 , 3 9 6 を参照されたい。

【 0 1 6 1 】

「抗原」は、免疫系によって認識される分子である；該用語は元々は「抗体生成因子」に由来し、抗体に特異的に結合する分子を含む。分子レベルにおいて、抗原は、抗体の抗原結合部位で結合されるその能力によって特徴付けられる。本発明において、抗原は F R であり、例えば、細胞 F R またはその一部に結合しない F R である。

【 0 1 6 2 】

本明細書で使用するとき、用語「エピトープ」は、抗体によって結合され得る抗原（例えば、F R）の分子表面特徴を指す。抗原性分子は、通常、「大きな」生物学的ポリマーであり、大抵、特異的抗体に対する相互作用点として作用し得るいくつかの表面特徴を示す。任意のこのような区別可能な分子特徴はエピトープを構成する。したがって、大部分の抗原は、いくつかの区別可能な抗体によって結合される潜在性を有し、その各々は、典型的には、特定のエピトープに特異的である。本発明の一実施形態において、結合剤、例えば抗体は、受容体の膜結合形態においてではなく、細胞に結合しない受容体の形態で利用可能である F R 上のエピトープに結合する。例えば、抗体は、M O R A B - 0 0 3 が結合する F R 上の同じエピトープに結合してもよい。

【 0 1 6 3 】

本明細書で使用するとき、語句「F R 発現癌に罹患している対象における F R 発現癌の進行」には、重症度の低い状態からより重症度の高い状態のこのような癌の進行を含む。これは、腫瘍の数または重症度、転移の程度、癌が成長しているおよび広がっている速度などの増加を含むことができる。例えば、「卵巣癌の進行」は、病期 I から病期 I I、病期 I I から病期 I I I などの進行などの重症度の低い状態からより重症度の高い状態のこのような癌の進行を含む。あるいは、語句「F R 発現癌に罹患している対象における F R 発現癌の進行」は、重症度の高い状態からより重症度の低い状態の F R 発現癌の退行を指してもよい。例えば、一実施形態において、「卵巣癌の進行」は、病期 I V から病期 I I I、病期 I I I から病期 I I などの退行を指す。他の実施形態において、「F R 発現癌に罹患している対象における F R 発現癌の進行」は、F R 発現癌の症状の開始から決定される生存率または F R 発現癌の診断時からの生存率を指してもよい。

【 0 1 6 4 】

本明細書で使用するとき、用語「階層化されること」とは、当該技術分野において許容されている階層化と同様に、例えば、癌の広がり程度に基づいて、適切な病期に F R 発現癌、例えば卵巣癌または肺癌を特徴付けることを指す。例えば、階層化することは、F R 発現癌を病期 I、病期 I I、病期 I I I または病期 I V に特徴付けることを含む。ある種の実施形態において、病期 I は、生体の一部に局在化される癌を指す。ある種の実施形態において、病期 I I および病期 I I I は、局所的に進行した癌を指し、この場合、病期間の区別は、多くの場合、特定の癌に特異的である。最終的に、病期 I V は、しばしば転移しているまたは他の臓器にもしくは生体全体に広がっている癌を指す。

【 0 1 6 5 】

本明細書で使用するとき、用語「生存」とは、癌に対して治療された対象の生命の存続を指す。一実施形態において、生存は、腫瘍が再発しないことを指す。本明細書で使用するとき、用語「再発」は、腫瘍の初期治療が付与された対象における腫瘍または癌性細胞の再増殖を指す。腫瘍は、生体の発生部位または別の部分において再発してもよい。一実施形態において、再発する腫瘍は、対象が治療された原発性腫瘍と同じタイプである。例えば、対象が卵巣癌の腫瘍を有し、治療され、その後、別の卵巣癌の腫瘍を発症した場合、腫瘍は再発している。さらに、癌は、当初生じたものとは異なる臓器または組織において再発し得る。

【 0 1 6 6 】

I I . 本発明の方法およびキット

本発明は、少なくとも部分的には、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) が、対照試料と比較して、F R 発現癌を有する対象の生体液、例えば、尿または血清にお

10

20

30

40

50

いてレベル増加して見出されるという予期せぬ発見に基づいている。さらに、本発明は、少なくとも一部には、試料中の細胞に結合しないFR のレベルを評価するのに必要な感受性を示す免疫学的アッセイの同定に基づいており、同様の従来の試みは失敗を繰り返していた。実際に、本発明は、試料、例えば尿または血清中の細胞に結合しないFR のレベルを正確に評価することができる免疫学的アッセイを提供することによって、肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌についてのFR に基づく診断アッセイを開発する従来の試みの中で観察された課題を克服する。

【0167】

したがって、対象がFR 発現癌を有するまたは発症する危険性にあるかどうかを評価し、さらにFR 発現癌の進行を評価するための方法およびキットが提供される。種々の実施形態において、方法は、対象における卵巣癌の存在、程度または発症の危険性の評価において、対照レベルと比較して、試料、例えば尿および血清において、細胞に結合しないFR のレベルの比較を伴う。

10

【0168】

A. 診断方法、予測方法、危険性評価方法および階層化方法

具体的には、本発明は、対象が肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌に罹患しているかどうかを評価するための診断方法、肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌の進行を予測するための予後方法、および対象がFR 発現癌を発症する危険性のレベルを評価するための危険性評価方法を提供する。さらに、本発明は、肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌を癌治療群に階層化するための階層化方法を提供する。本明細書に検討されている本発明の種々の態様および実施形態は、非制限的であり、本明細書で検討されているまたは以下で特許請求されている方法およびキットのいずれかに適用してもよい、記載されている特定の実施形態の全ての可能な組み合わせを包含することが意図される。

20

【0169】

本発明の方法は、FR 発現癌を診断し、FR 発現癌の進行を予測しまたは対象がFR 発現癌を発症する危険性のレベルを評価するために、熟練の実施者によって用いられる任意の他の方法と組み合わせて行うことができる。

【0170】

一態様において、本発明は、対象がFR 発現癌に罹患しているかどうかを、対象由来の試料（例えば尿または血清）において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルを決定し；細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することによって、対象がFR 発現癌に罹患しているかどうかを評価するための方法を提供し、対象由来の試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルの間の差は、対象がFR 発現癌に罹患しているという指標である。特定の実施形態において、対象由来の試料におけるFR のレベルは、細胞に結合しないFR に結合し、試料を（a）MORAb-003抗体と同じエピトープに結合する抗体；および（b）CDRH1としての配列番号1（GFTFSGYGLS）、CDRH2としての配列番号2（MISSGGSYTYADSVKG）、CDRH3としての配列番号3（HGDDPAWFAY）、CDRL1としての配列番号4（SVSSSISSNNLH）、CDRL2としての配列番号5（GTSNLAS）およびCDRL3としての配列番号6（QQWSSYPYMYT）を含む抗体からなる群から選択される抗体と接触させることによって評価される。一実施形態において、試料は、尿および血清からなる群から選択される。

30

40

【0171】

別の態様において、本発明は、対象が肺癌または卵巣癌などのFR 発現癌に罹患しているかどうかを、対象由来の尿試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルを決定し；対象由来の尿試料における葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルと対照試料におけるFR レベルを比較することによって評価するための方法を提供し、対象由来の尿試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルの間の差は、対象がFR 発現癌に罹患しているという指標である。

50

## 【0172】

別の態様において、本発明は、対象がFR 発現癌に罹患しているかどうかを、対象由来の血清試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR ) のレベルを決定し ; 対象由来の血清試料における葉酸受容体アルファ (FR ) のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することによって評価するための方法を提供し、対象由来の血清試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルの間の差は、対象がFR 発現癌に罹患しているという指標である。特定の実施形態において、対象は、血清中のFR のレベルを増大させる薬剤、例えばステロイドで処理されていない。特定の実施形態において、FR 発現癌は卵巣癌であり、対象は、血清中のFR のレベルを増大させる薬剤、例えばステロイドで処理されていない。

10

## 【0173】

本発明の方法およびキットにおいて、FR 発現癌には、癌細胞がFR を発現することによって特徴付けられる癌が含まれる。特定の実施形態において、FR は、癌細胞から、例えば癌細胞の表面から対象の生物学的液体に放出される。FR 発現癌には、肺癌 (例えば、気管支肺癌、カルチノイド腫瘍および非小細胞肺癌、例えば腺癌) ; 中皮腫 ; 卵巣癌 ; 腎臓癌 ; 脳癌 (例えば、未分化上皮腫および若年性小脳毛様細胞性星状細胞腫) ; 子宮頸癌 ; 鼻咽腔癌 ; 中胚葉由来の腫瘍 ; 頭頸部の扁平上皮癌腫 ; 子宮内膜癌 ; 卵巣の類内膜腺癌 ; 漿液性嚢胞腺癌 ; 乳癌 ; 膀胱癌 ; 膵臓癌 ; 骨癌 (例えば、高悪性度骨肉腫) ; および下垂体癌 (例えば下垂体腺腫) が含まれる。特定の実施形態において、FR 発現癌は卵巣癌である。

20

## 【0174】

本発明の方法およびキットのある種の実施形態において、FR 発現癌は肺癌である。より特定の実施形態において、肺癌は非小細胞肺癌腫 (NSCLC) である。1つのこのような実施形態において、NSCLCは、腺癌、扁平上皮肺癌腫、大細胞肺癌腫、多形型NSCLC、カルチノイド腫瘍、唾液腺癌腫および未分類の癌腫からなる群から選択される。好ましい実施形態において、NSCLCは腺癌である。代替の実施形態において、肺癌は小細胞肺癌腫 (SCLC) である。別の実施形態において、肺癌は、気管支肺癌腫である。なお別の実施形態において、肺癌は肺カルチノイド腫瘍である。

## 【0175】

また、本発明は、対象が卵巣癌に罹患しているかどうかを、対象由来の尿試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR ) のレベルを決定することによって評価する方法を提供し、約3000 a . u . / mlを超える濃度での尿試料におけるFR の存在は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標である。特定の実施形態において、約4000 a . u . / ml、約5000 a . u . / ml、約6000 a . u . / ml、約7000 a . u . / ml、約8000 a . u . / ml、約9000 a . u . / ml、約10,000 a . u . / ml、約11,000 a . u . / ml、約12,000 a . u . / ml、約13,000 a . u . / ml、約14,000 a . u . / ml、約15,000 a . u . / ml、約16,000 a . u . / ml、約17,000 a . u . / ml、約18,000 a . u . / ml、約19,000 a . u . / ml、約20,000 a . u . / ml、約21,000 a . u . / ml、約22,000 a . u . / ml、約23,000 a . u . / ml、約24,000 a . u . / ml、約25,000 a . u . / ml、約26,000 a . u . / ml、約27,000 a . u . / ml、約28,000 a . u . / ml、約29,000 a . u . / mlまたは約30,000 a . u . / mlを超える濃度での尿試料におけるFR の存在は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標である。

30

40

## 【0176】

なお別の態様において、本発明は、対象が卵巣癌に罹患しているかどうかを、対象由来の尿試料における葉酸受容体アルファ (FR ) のレベルを決定することによって評価するための方法を提供し、約9100 pg / mlを超える濃度での尿試料におけるFR の存在は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標であり、または約9100 pg / ml未満の濃度は、対象が卵巣癌に罹患していないという指標である。例えば、約9500 pg

50

/mL、約10,000 pg/mL、約11,000 pg/mL、約12,000 pg/mL、約13,000 pg/mL、約14,000 pg/mL、約15,000 pg/mL、約16,000 pg/mL、約17,000 pg/mL、約18,000 pg/mL、約19,000 pg/mL、約20,000 pg/mL、約21,000 pg/mL、約22,000 pg/mL、約23,000 pg/mL、約24,000 pg/mL、約25,000 pg/mL、約26,000 pg/mL、約27,000 pg/mL、約28,000 pg/mL、約29,000 pg/mL、約30,000 pg/mL、約40,000 pg/mL、約50,000 pg/mL、約60,000 pg/mL、約70,000 pg/mL、約80,000 pg/mL、約90,000 pg/mL、約100,000 pg/mLまたは約150,000 pg/mLを超える濃度での尿試料におけるFRの存在は、対象が卵巣癌に罹患しているという指標である。

10

## 【0177】

本発明の前述の態様のある種の実施形態において、対象由来の試料（例えば、尿試料または血清試料などの試料）における細胞に結合しないFRのレベルは、対照試料におけるFRのレベルと比較され、レベル間の差は、対象が肺癌または卵巣癌などのFR発現癌に罹患しているという指標である。特定の実施形態において、差は、対照試料におけるFRのレベルと比較した場合、対象由来の試料における細胞に結合しないFRのレベルの増加を構成し、この増加はFR発現癌の存在または増殖を示す。あるいは、差はFRのレベルの減少を構成し、この減少は、FR発現癌の不存在または退行を示す。本明細書で使用するとき、対象由来の試料（すなわち、試験試料）における細胞に結合しない葉酸受容体アルファのレベルと対照試料における葉酸受容体アルファのレベルの間の「差」は、2つの試料における葉酸受容体アルファのレベルの任意の臨床的に関連する変化（増加もしくは減少を含む）および/または統計学的に有意な差を広く指す。例示的な実施形態において、差は、実施例6に示される例である受信者動作特性（ROC）を用いて決定されるカットオフ値に基づいて選択される。最適なカットオフ値は、使用されるアッセイ法および条件に依存して変更してもよい。他の実施形態において、差は、細胞に結合しないFRのレベルを決定するための方法の検出限界より大きくなる必要がある。差は、評価法の標準誤差よりも少なくとも大きいことが好ましく、好ましくは少なくとも評価法の標準誤差の約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約15倍、約20倍、25倍、約100倍、約500倍、約1000倍またはそれらを超える。差は、任意の適切なパラメータ的または非パラメータ的記述統計学または比較を含む任意の適切な比較によって評価されてもよい。例えば、FRのレベルの「増加」は、ROC分析を用いて決定されるカットオフ値を超えるレベルを指す場合がある。また、対照試料におけるFRのレベルよりも2多い、より好ましくは約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%、約150%、約200%、約300%、約400%、約500%、約600%、約700%、約800%、約900%または約1000%多い試験試料におけるレベルを指す場合がある。また、増加は、対照試料におけるFRの平均レベルを上回る標準偏差が、好ましくは少なくとも1.5であり、より好ましくは約2、約3、約4、約5またはそれを超える試験試料におけるレベルを指す場合がある。同様に、細胞に結合しないFRのレベルの「減少」は、ROC分析を用いて決定されるカットオフ値を超えない試験試料におけるレベルを指す場合がある。また、それは、対照試料におけるFRのレベルの約5%未満、約10%未満、約15%未満、約20%未満、約25%未満、約30%未満、約40%未満、約50%未満、約60%未満、約70%未満、約80%未満または約90%未満である試験試料におけるレベルを指してもよい。また、減少は、好ましくは、対照試料におけるFRの平均レベルを下回る少なくとも約1.5、より好ましくは約2、約3、約4、約5またはそれを下回る標準偏差である試験試料におけるレベルを指す場合がある。

20

30

40

## 【0178】

本発明の方法およびキットに有用な試料は、細胞に結合しないFRの検出可能なレベ

50

ルを含み得る任意の組織、細胞、生検または生体液を含む。一実施形態において、試料は、組織、細胞、全血、血漿、頬腔擦取物 ( buccal scrape )、唾液、脳脊髄液、糞便または気管支肺胞洗浄液であってもよい。いくつかの実施形態において、試料は、FR 発現腫瘍試料またはFR 発現癌が見られる可能性がある組織もしくは細胞の試料である。好ましい実施形態において、試料は尿または血清試料である。

#### 【0179】

生体試料は、当該技術分野において知られている様々な技術によって、例えば、生検の使用によってまたはある領域を擦取りもしくは拭き取ることによってまたは生体液を吸引するための針を用いることによって対象から得ることができる。種々の生体試料を回収するための方法は、当該技術分野において周知である。

10

#### 【0180】

FR タンパク質レベルの検出および定量に適した試料は、新鮮なもの、凍結されたもの、または当業者に知られている方法に従って固定されたものでもよい。適切な組織試料は、さらなる分析のために、好ましくは薄片にされ、顕微鏡スライドに置かれる。固体試料、すなわち組織試料は、可溶化および/または均質化され、次に可溶性抽出物として分析されてもよい。また、液体試料は、物理的または化学的処置に供されてもよい。いくつかの実施形態において、尿試料は、遠心分離、ボルテックス、希釈および/または可溶化物質を用いた処理 (例えば、グアニジン処理) によって処理される。

#### 【0181】

一実施形態において、新鮮に得られた生検試料は、例えば、液体窒素またはジフルオロジクロロメタンを用いて凍結される。凍結試料は、例えば、OCTを用いて薄片化するために載せられ、クリオスタットにおいて連続的に薄片化される。連続切片は、顕微鏡スライドガラス上に回収される。免疫組織化学染色について、スライドは、例えば、クロムミョウバン、ゼラチンまたはポリ-L-リジンを用いて被覆され、薄片がスライドに貼りついていることを確認してもよい。別の実施形態において、薄片化前に試料を固定し、包埋する。例えば、組織試料は、例えばホルマリンに固定され、連続的に脱水され、例えばパラフィンに包埋されてもよい。

20

#### 【0182】

試料が得られれば、細胞に結合しないFR の検出および定量に適切な当該技術分野において知られている任意の方法が、以下のセクション (B) に記載されるように、(核酸レベルまたは好ましくはタンパク質レベルで) 使用されてもよい。例示的な方法は、当該技術分野において周知であり、限定されないが、ウェスタンブロット、ノーザンブロット、サザンブロット、免疫組織化学、液相アッセイ、ELISA、例えば増幅ELISA、免疫沈降、免疫蛍光、フローサイトメトリー、免疫細胞化学、質量分析解析、例えばMALDI-TOFおよびSELDI-TOF、核酸ハイブリダイゼーション技術、核酸逆転写法および核酸増幅法を含む。

30

#### 【0183】

多数の実施形態において、試料 (例えば、尿または血清) における細胞に結合しないFR のレベルは、試料をFR に結合する抗体と接触させることによって評価される。FR に結合する抗体は、当該技術分野において知られ、(i) 欧州特許出願公開第86104170.5号 (Rettig) (その全内容は参照により本明細書に組み込まれる) に記載されるマウスモノクローナルLK26抗体 (その重鎖および軽鎖は配列番号22および23として本明細書に示されている); (ii) 国際公開第2004/113388号および米国特許第5,646,253号 (そのそれぞれの全内容は参照により本明細書に組み込まれる) に記載されるMORAB-003抗体を含む。また、モノクローナル抗体MOV18およびMOV19はFR 分子 (従来、gp38/FBPとして知られている) 上の異なるエピトープに結合する。Miotti, S.ら. Int J Cancer, 38:297-303 (1987年)。例えば、MOV18抗体は、Coneyら. Cancer Res, 51:6125-6132 (1991年) に教示されるように、配列番号26 (TELLNVXMNAK\*XKEKPXPX\*KLXXQX) (12位で

40

50

トリプトファンまたはヒスチジン残基が可能であり、21位でアスパラギン酸またはグルタミン酸残基が可能であることに留意されたい)として本明細書に記載されているエピートープに結合する。

#### 【0184】

本明細書で使用するとき、用語「MORAb-003」とは、FR に特異的に結合し、配列番号7に記載される成熟重鎖アミノ酸配列および配列番号8に記載される成熟軽鎖配列を含む抗体を指す。MORAb-003について対応するプレタンパク質アミノ酸配列は、配列番号9(重鎖)および配列番号10(軽鎖)に記載されている。MORAb-003抗体は、以下のCDR:CDRH1として配列番号1、CDRH2として配列番号2、CDRH3として配列番号3、CDRL1として配列番号4、CDRL2として配列番号5およびCDRL3として配列番号6を含む。MORAb-003抗体を産生する細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209)に2006年4月24日に寄託され、寄託番号第PTA-7552と指定された。

10

#### 【0185】

FR に結合し、本発明の方法に使用するための他の抗体は、9F3.H9.H3.H3.B5.G2(9F3とも称する)、19D4.B7(19D4とも称する)、24F12.B1(24F12とも称する)および26B3.F2(26B3とも称する)を含む。これらの抗体、それらのCDRおよびそれらの重鎖および軽鎖可変領域のアミノ酸配列、ならびにそれらをコードし得るポリヌクレオチド配列を表33に示す。いくつかの実施形態において、これらの抗体は、マウスIgGまたはその誘導体である。他の実施形態において、抗体はヒト、ヒト化またはキメラである。

20

#### 【0186】

9F3

いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号27に実質的に同じであるまたは同一である軽鎖CDR1アミノ酸配列を含む抗体または抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号28に実質的に同じであるまたは同一である軽鎖CDR2アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号29に実質的に同じであるまたは同一である軽鎖CDR3アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号31に実質的に同じであるまたは同一である重鎖CDR1アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号32に実質的に同じであるまたは同一である重鎖CDR2アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号33に実質的に同じであるまたは同一である重鎖CDR3アミノ酸配列を含む。FR に結合する抗体は、配列番号27に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号28に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号29に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する軽鎖を含んでもよい。FR に結合する抗体は、配列番号31に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号32に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号33に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する重鎖を含んでもよい。FR に結合する抗体は、配列番号27に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号28に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号29に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する軽鎖を含んでもよく、また、配列番号31に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号32に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号33に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する重鎖を有してもよい。

30

40

#### 【0187】

FR に結合する抗体は、配列番号30に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ

50

酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでもよい。FR に結合する抗体は、配列番号34に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでもよい。FR に結合する抗体は、軽鎖および重鎖可変領域を含んでもよく、軽鎖可変領域は、配列番号30に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域は、配列番号34に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、FR の天然型または非還元型のいずれかと結合し得る、9F3・H9・H3・H3・B5・G2(9F3)抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、抗体はマウスIgG2a定常領域を有する。

【0188】

いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209)に2011年5月19日に寄託され、寄託番号第PTA-11887とし帰属された抗体産生細胞によって生成される抗体である。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、寄託された抗体産生細胞によって生成される抗体の軽鎖および重鎖CDRの1つまたは複数を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、寄託された抗体産生細胞によって生成される抗体の軽鎖および重鎖可変領域を含む。

【0189】

19D4

いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号35に実質的に同じであるまたは同一である軽鎖CDR1アミノ酸配列を含む抗体または抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号36に実質的に同じであるまたは同一である軽鎖CDR2アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号37に実質的に同じであるまたは同一である軽鎖CDR3アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号39に実質的に同じであるまたは同一である重鎖CDR1アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号40に実質的に同じであるまたは同一である重鎖CDR2アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号41に実質的に同じであるまたは同一である重鎖CDR3アミノ酸配列を含む。FR に結合する抗体は、配列番号35に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号36に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号37に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する軽鎖を含んでもよい。FR に結合する抗体は、配列番号39に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号40に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号41に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する重鎖を含んでもよい。FR に結合する抗体は、配列番号35に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号36に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号37に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する軽鎖を含んでもよく、また、配列番号39に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号40に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号41に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する重鎖を有してもよい。

【0190】

FR に結合する抗体は、配列番号38に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでもよい。FR に結合する抗体は、配列番号42に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでもよい。FR に結合する抗体は、軽鎖および重鎖可変領域を含んでもよく、ここで、軽鎖可変領域は、配列番号38に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域は、配列番号42に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含む。いつ

10

20

30

40

50

くかの実施形態において、FR に結合する抗体は、FR の天然型または非還元型のいずれかと結合し得る、19D4 . B7 (19D4) 抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、抗体はマウスIgG2a定常領域を有する。

【0191】

いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Blvd.、Manassas、Virginia 20110-2209)に2011年5月19日に寄託され、寄託番号第PTA-11884とし帰属された抗体産生細胞によって生成される抗体である。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、寄託された抗体産生細胞によって生成される抗体の軽鎖および重鎖CDRの1つまたは複数を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、寄託された抗体産生細胞によって生成される抗体の軽鎖および重鎖可変領域を含む。

10

【0192】

24F12

いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号43に実質的に同じであるまたは同一である軽鎖CDR1アミノ酸配列を含む抗体または抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号44に実質的に同じであるまたは同一である軽鎖CDR2アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号45に実質的に同じであるまたは同一である軽鎖CDR3アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号47に実質的に同じであるまたは同一である重鎖CDR1アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号48に実質的に同じであるまたは同一である重鎖CDR2アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号49に実質的に同じであるまたは同一である重鎖CDR3アミノ酸配列を含む。FR に結合する抗体は、配列番号43に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号44に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号45に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する軽鎖を含んでもよい。FR に結合する抗体は、配列番号47に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号48に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号49に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する重鎖を含んでもよい。FR に結合する抗体は、配列番号43に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号44に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号45に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する軽鎖を含んでもよく、また、配列番号47に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号48に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号49に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する重鎖を有してもよい。

20

30

【0193】

FR に結合する抗体は、配列番号46に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでもよい。FR に結合する抗体は、配列番号50に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでもよい。FR に結合する抗体は、軽鎖および重鎖可変領域を含んでもよく、ここで、軽鎖可変領域は、配列番号46に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域は、配列番号50に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、FR の天然型または非還元型のいずれかと結合し得る、24F12 . B1 (24F12) 抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、抗体はマウスIgG1定常領域を有する。

40

【0194】

いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、アメリカン・タイプ・カルチ

50

ャー・コレクション(10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209)に2011年5月19日に寄託され、寄託番号第PTA-11886とし帰属された抗体産生細胞によって生成される抗体である。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、寄託された抗体産生細胞によって生成される抗体の軽鎖および重鎖CDRの1つまたは複数を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、寄託された抗体産生細胞によって生成される抗体の軽鎖および重鎖可変領域を含む。

【0195】

26B3

いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号51に実質的に同じであるまたは同一である軽鎖CDR1アミノ酸配列を含む抗体または抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号52に実質的に同じであるまたは同一である軽鎖CDR2アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号53に実質的に同じであるまたは同一である軽鎖CDR3アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号55に実質的に同じであるまたは同一である重鎖CDR1アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号56に実質的に同じであるまたは同一である重鎖CDR2アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、配列番号57に実質的に同じであるまたは同一である重鎖CDR3アミノ酸配列を含む。FR に結合する抗体は、配列番号51に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号52に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号53に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する軽鎖を含んでもよい。FR に結合する抗体は、配列番号55に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号56に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号57に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する重鎖を含んでもよい。FR に結合する抗体は、配列番号51に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号52に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号53に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する軽鎖を含んでもよく、また、配列番号55に実質的に同じであるまたは同一であるCDR1アミノ酸配列；配列番号56に実質的に同じであるまたは同一であるCDR2アミノ酸配列；および配列番号57に実質的に同じであるまたは同一であるCDR3アミノ酸配列を有する重鎖を有してもよい。

【0196】

FR に結合する抗体は、配列番号54に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでもよい。FR に結合する抗体は、配列番号58に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでもよい。FR に結合する抗体は、軽鎖および重鎖可変領域を含んでもよく、ここで、軽鎖可変領域は、配列番号54に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域は、配列番号58に実質的に同じであるまたは同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、FR の天然型または非還元型のいずれかと結合し得る、26B3.F2(26B3)抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、抗体はマウスIgG1定常領域を有する。

【0197】

いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209)に2011年5月19日に寄託され、寄託番号第PTA-11885として帰属された抗体産生細胞によって生成される抗体である。いくつかの実施形態において、FR に結合する抗体は、寄託された抗体産生細胞によって生成される抗体の軽鎖および重鎖CDRの1つまたは複数を含む。いくつかの実施

形態において、F R に結合する抗体は、寄託された抗体産生細胞によって生成される抗体の軽鎖および重鎖可変領域を含む。

【0198】

C D Rの抗原結合配置は、C D R足場のような抗体様タンパク質を用いて操作されてもよい。操作された抗原結合タンパク質は、F R に結合する抗体の範囲内に含まれる。

【0199】

F R に結合する他の試薬抗体は当該技術分野において知られ、現在、複数のこのような試薬抗体は、以下の表に列挙されるように、(<http://www.biocompare.com>にて抗F R 抗体のサーチに基づく)市販されている。

【0200】

【表 1】

生成物	会社	量	応用	反応性
マウス抗ヒトFR $\alpha$ 精製されたMaxPabポリクローナル抗体、非コンジュゲート	Abnova Corporation	50 $\mu$ g	検出抗体、ウェスタンブロット(トランスフェクトされた溶解物)	ヒト
マウス抗ヒトFR $\alpha$ 精製されたMaxPabポリクローナル抗体、非コンジュゲート	Abnova Corporation	50 $\mu$ g	検出抗体、ウェスタンブロット(トランスフェクトされた溶解物)	ヒト
ウサギ抗ヒトFR $\alpha$ 精製されたMaxPabポリクローナル抗体、非コンジュゲート	Abnova Corporation	100 $\mu$ g	検出抗体、ウェスタンブロット(トランスフェクトされた溶解物)	ヒト
ウサギ抗FR $\alpha$ ポリクローナル抗体、非コンジュゲート	Avina Systems Biology	50 $\mu$ g	ウェスタンブロット	ヒト、サル、ラット
ウサギ抗ヒトFR $\alpha$ ポリクローナル抗体、非コンジュゲート	GeneTex	100 $\mu$ L	ウェスタンブロット。他の応用におけるこの生成物の有用性は決定されていない。	ヒト
ヤギ抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )ポリクローナル、ビオチンコンジュゲート	LifeSpan BioSciences	10mg	ELISA(1:4000-1:20000)、免疫蛍光、免疫組織化学、ウェスタンブロット	ウシ
ヤギ抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )ポリクローナル、ビオチンコンジュゲート	LifeSpan BioSciences	提供されない	ELISA(1:5000-1:250000)、ウェスタンブロット	ウシ
ヤギ抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )ポリクローナル、Hrpコンジュゲート	LifeSpan BioSciences	20mg	ELISA(1:2000-1:10000)、免疫組織化学、ウェスタンブロット	ウシ
ヤギ抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )ポリクローナル、Hrpコンジュゲート	LifeSpan BioSciences	1000 $\mu$ g	ELISA(1:2000-1:12000)、ゲルシフト、免疫組織化学(1:100-1:200)、免疫組織化学	ウシ
ヤギ抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )ポリクローナル、Hrpコンジュゲート	LifeSpan BioSciences	2000 $\mu$ g(200 $\mu$ l)	ELISA、ウェスタンブロット	ウシ
ヤギ抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )ポリクローナル、Hrpコンジュゲート	LifeSpan BioSciences	提供されない	ELISA、免疫組織化学(凍結切片)、免疫組織化学(パラフィン)、ウェスタンブロット	ウシ
ヤギ抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )ポリクローナル、非コンジュゲート	LifeSpan BioSciences	50mg	ELISA(1:10000-1:40000)、免疫沈降、ウェスタンブロット	ウシ
ヤギ抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )ポリクローナル、非コンジュゲート	LifeSpan BioSciences	10000 $\mu$ g	ELISA(1:10000-1:40000)、免疫沈降、ウェスタンブロット	ウシ

10

20

30

40

ヤギ抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )ポリクローナル、非コンジュゲート	LifeSpan BioSciences	1ml	ELISA(1:3000-1:9000)、免疫沈降、ウェスタンブロット	ウシ	
ヤギ抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )ポリクローナル、非コンジュゲート葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )	LifeSpan BioSciences	提供されない	ELISA(1:3000-1:9000)、免疫沈降、ウェスタンブロット	ウシ	
マウス抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )モノクローナル、非コンジュゲート	LifeSpan BioSciences	200 $\mu$ g	ELISA	ウシ	10
マウス抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )モノクローナル、非コンジュゲート	LifeSpan BioSciences Folate Receptor Alpha(FR $\alpha$ )	200 $\mu$ g	ELISA	ヒト	
マウス抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )モノクローナル、非コンジュゲート	LifeSpan BioSciences	200 $\mu$ g	ELISA	ヒト	
マウス抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )モノクローナル、非コンジュゲート	LifeSpan BioSciences	200 $\mu$ g	ELISA	提供されない	20
マウス抗ヒト葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )モノクローナル、非コンジュゲート、クローン6d398	LifeSpan BioSciences	100 $\mu$ l	ELISA(1-10 $\mu$ g/ml)、フローサイトメトリー、免疫組織化学、免疫組織化学(凍結切片)	サル	
ウサギ抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )ポリクローナル、非コンジュゲート	LifeSpan BioSciences	1ml	ELISA	ウシ	30
ウサギ抗ウシ葉酸受容体アルファ(FR $\alpha$ )ポリクローナル、非コンジュゲート	LifeSpan BioSciences	提供されない	提供されない	ウシ	
マウス抗ヒトFR $\alpha$ ポリクローナル抗体、非コンジュゲート、クローン葉酸受容体1(成人)	Novus Biological	0.05ml	ウェスタンブロット、ELISA		
マウス抗ヒトFR $\alpha$ ポリクローナル、非コンジュゲート	Novus Biologicals	0.05mg	ELISA、ウェスタンブロット	ヒト	40
ヤギ抗ヒトFR $\alpha$ 親和性精製されたポリクローナル抗体、ビオチンコンジュゲート	R&D Systems	50 $\mu$ g	ウェスタンブロット	ヒト	
ヤギ抗ヒトFR $\alpha$ 親和性精製されたポリクローナル抗体、非コンジュゲート	R&D Systems	100 $\mu$ g	フローサイトメトリー、ウェスタンブロット	ヒト	

マウス抗ヒトFR $\alpha$ モノクローナル抗体、アロフィコシアニンコンジュゲート、クローン548908	R&D Systems	100Tests	フローサイトメトリー	ヒト
マウス抗ヒトFR $\alpha$ モノクローナル抗体、フィコエリトリンコンジュゲート、クローン548908	R&D Systems	100Tests	フローサイトメトリー	ヒト
マウス抗ヒトFR $\alpha$ モノクローナル抗体、非コンジュゲート、クローン548908	R&D Systems	100 $\mu$ g	フローサイトメトリー、免疫組織化学、ウェスタンブロット	ヒト
マウス抗ヒトFR $\alpha$ モノクローナル抗体、非コンジュゲート	United States Biological	100 $\mu$ g	ELISA、フローサイトメトリー、免疫組織化学、ウェスタンブロット	ヒト

10

20

30

40

50

## 【0201】

好ましい実施形態において、FR に結合する抗体は、マウスLK26重鎖および軽鎖から誘導され、以下のCDR:CDRH1として配列番号1(GFTFSGYGLS)、CDRH2として配列番号2(MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3として配列番号3(HGDDPAWFAY)、CDRL1として配列番号4(SVSSSISSNLH)、CDRL2として配列番号5(GTSNLAS)およびCDRL3として配列番号6(QQWSSYPYMYT)の少なくとも1つを含む。本発明に使用され得る抗FR抗体に関連するので、その内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,646,253号を参照されたい。さらなる突然変異は、米国特許第5,646,253号(その内容が参照により本明細書に組み込まれる)に教示されるフレームワーク領域において行われてもよい。

## 【0202】

別の好ましい実施形態において、抗体は、LK26HuVK(配列番号13)、LK26HuVKY(配列番号14)、LK26HuVKPW(配列番号15)およびLK26HuVKPW,Y(配列番号16)からなる群から選択される可変領域軽鎖;およびLK26HuVH(配列番号17)、LK26HuVHFAIS,N(配列番号18)、LK26HuVHSLF(配列番号19)、LK26HuVHI,I(配列番号20)およびLK26KOLHuVH(配列番号21)からなる群から選択される可変領域重鎖を含む。米国特許第5,646,253号および米国特許第6,124,106号を参照されたい。別の実施形態において、抗体は、重鎖可変領域LK26KOLHuVH(配列番号21)および軽鎖可変領域LK26HuVKPW,Y(配列番号16)を含む。別の実施形態において、抗体は、重鎖可変領域LK26HuVHSLF(配列番号19)および軽鎖可変領域LK26HuVKPW,Y(配列番号16)を含む。さらなる実施形態において、抗体は、重鎖可変領域LK26HuVHFAIS,N(配列番号18)および軽鎖可変領域LK26HuVKPW,Y(配列番号16)を含む。

## 【0203】

いくつかの実施形態において、試料は、FRを抗体結合に近づけるようにするために修飾されることを必要としてもよい。免疫細胞化学法または免疫組織化学法の具体的な局面において、スライドは、前処理緩衝液に移され、場合により抗原の接近性を増大させるために加熱されてもよい。前処理緩衝液中での試料の加熱は細胞の脂質二重層を崩壊し、抗原(新鮮な被検査物中の場合であってもよいが、典型的には固定された被検査物において生じるものではない)(すなわち、FRタンパク質)を抗体結合により近づけるようにする。用語「前処理緩衝液」とは、本明細書において置き換え可能に使用され、特に抗体結合についてFRタンパク質の接近性を増大させることによって、免疫染色について

細胞学または組織学試料を調製するために使用される緩衝液を指す。前処理緩衝液は、pH特異的塩溶液、ポリマー、洗剤 (detergent) または非イオン性もしくは陰イオン性界面活性剤、例えばエチルオキシ化陰イオン性もしくは非イオン性界面活性剤、アルカノエートもしくはアルコキシレートまたはさらにこれらの界面活性剤の混和物またはさらに胆汁塩の使用を含んでもよい。前処理緩衝液は、例えば、0.1%から1%のデオキシコール酸ナトリウム塩の溶液またはラウレス-13-カルボン酸ナトリウム (例えば、Sandopan LS) または/およびエトキシ化アニオン錯体の溶液であってもよい。いくつかの実施形態において、前処理緩衝液はまたスライド保存緩衝液として用いられてもよい。特定の実施形態において、試料、例えば尿試料は、遠心分離され、ボルテックスされ、希釈されおよび/またはグアニジン処理に供される。

10

**【0204】**

抗体結合についてFRタンパク質をより近づけるようにするための任意の方法は、本発明の実施に用いられてもよく、当該技術分野において知られている抗原回復法が挙げられる。例えば、Bibbora、(2002年) Acta. Cytol. 46: 25-29; Saqira、(2003年) Diagn. Cytopathol. 27: 365-370; Bibbora、(2003年) Anal. Quant. Cytol. Histol. 25: 8-11 (各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる) を参照されたい。

**【0205】**

FRタンパク質の接近性を増大させるための前処理後、試料は、適切なブロッキング剤、例えば過酸化水素などのペルオキシダーゼブロッキング試薬を用いてブロッキングされてもよい。いくつかの実施形態において、試料は、抗体の非特異的な結合を妨げるために、タンパク質ブロッキング試薬を用いてブロッキングされてもよい。タンパク質ブロッキング試薬は、例えば、精製されたカゼインを含んでもよい。次に、FRに特異的に結合する抗体、特にモノクローナルまたはポリクローナル抗体を試料と共にインキュベートする。

20

**【0206】**

抗体結合を検出するための技術は当該技術分野において周知である。FRへの抗体結合は、抗体結合のレベル、したがってFRタンパク質発現のレベルに対応する検出可能なシグナルを生じさせる化学的試薬の使用を介して検出されてもよい。本発明の免疫組織化学法または免疫細胞化学法の1つにおいて、抗体結合は、標識されたポリマーにコンジュゲートされる二次抗体の使用を介して検出される。標識されたポリマーの例には、限定されないが、ポリマー-酵素コンジュゲートが含まれる。これらの複合体中の酵素は、典型的には、抗原-抗体結合部位でのクロマゲン (chromagen) の堆積物を触媒するために使用され、それにより、対象とするバイオマーカーの発現レベルに対応する細胞染色をもたらす。酵素は、限定されないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) およびアルカリホスファターゼ (AP) を含む。

30

**【0207】**

本発明の1つの免疫組織化学法または免疫細胞化学法において、FRタンパク質に結合する抗体は、二次抗体にコンジュゲートされたHRP標識ポリマーの使用を介して検出される。また、抗体結合は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に結合する種特異的プローブ試薬、および種特異的プローブ試薬に結合する、HRPにコンジュゲートしたポリマーの使用を介して検出され得る。スライドは、任意のクロマゲン、例えば、クロマゲン3, 3-ジアミノベンジジン (DAB) を用いて抗体結合に対して染色され、次に、ヘマトキシリンおよび場合により水酸化アンモニウムまたはTBS/Tween-20などの青味剤を用いて対比染色される。他の適したクロマゲンには、例えば、3-アミノ-9-エチルカルバゾール (AEC) が含まれる。本発明のいくつかの態様において、スライドは、細胞染色、例えば蛍光染色 (すなわち、FR発現) を評価するために、細胞検査技師および/または病理学者によって顕微鏡的に検査される。あるいは、試料は、陽性染色細胞の同定を促進するコンピュータソフトウェアの支援により、自動化顕微鏡を介してまたはヒトによって検査されてもよい。

40

50

## 【0208】

本発明の好ましい実施形態において、抗体は標識される。例えば、抗体結合の検出は、抗FR抗体を検出可能な基質にカップリングさせることによって促進され得る。検出可能な基質の例には、種々の酵素、補欠分子群、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが含まれる；適切な補欠分子群複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる；適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオロセイン、フルオロセインイソシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオロセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが含まれる；発光物質の例には、ルミノールが含まれる；生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが含まれる；適切な放射性物質の例には、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ または $^3\text{H}$ が含まれる。特定の実施形態において、抗体は、放射線標識、発色団標識、蛍光色素標識または酵素標識で標識される。

10

## 【0209】

本発明の一実施形態において、凍結試料は、上記されるように調製され、続いて、例えばTris-緩衝化生理食塩水(TBS)を用いて適切な濃度に希釈されたFRに対する抗体を用いて染色される。一次抗体は、ビオチン化された抗免疫グロブリンにおいてスライドをインキュベートすることによって検出され得る。このシグナルは、場合により、増幅され、抗原のジアミノベンジジン沈殿を用いて視覚化されてもよい。さらに、スライドは、場合により、例えばヘマトキシリンを用いて対比染色され、細胞を視覚化してもよい。

20

## 【0210】

別の実施形態において、固定化され、包埋された試料は、凍結切片について上記したように、FRに対する抗体で染色され、対比染色される。さらに、試料は、場合により、抗体染色を視覚化するために、シグナルを増幅する薬剤で処理されてもよい。例えば、ピオチニル-チラミドのペルオキシダーゼ触媒される堆積物は、順にペルオキシダーゼコンジュゲートされたストレプトアビジン(触媒されたシグナル増幅(CSA)システム, DAKO, Carpinteria, CA)と反応し、これを用いてもよい。

30

## 【0211】

当業者は、本発明の方法を実施するために使用される具体的な抗体の濃度は、結合するための時間、FRに対する抗体の特異性のレベルおよび試料の調製法などの因子に依存して変化することを認識する。さらに、複数の抗体を用いた場合、必要とされる濃度はその順番によって影響を受ける場合があり、この場合、抗体は、例えば、カクテルとして同時にまたは個々の抗体試薬として連続的に試料に適用される。さらに、FRへの抗体結合を視覚化するために使用される検出化学は、所望のシグナル対ノイズ比を生じさせるように最適化されていなければならない。本発明の一実施形態において、プロテオミック法、例えば質量分析法を用いて、FRタンパク質を検出および定量する。例えば、タンパク質結合チップへの試料、例えば血清の塗布を伴うマトリックス関連レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)または表面エンハンス型レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析(SELDI-TOF MS)(Wright, G. L., Jrら、(2002年)Expert Rev Mol Diagn 2:549; Li, Jら、(2002年)Clin Chem 48:1296; Laronga, Cら、(2003年)Dis Markers 19:229; Petricoin, E. F.ら、(2002年)359:572; Adam, B. L.ら、(2002年)Cancer Res 62:3609; Tolson, J.ら、(2004年)Lab Invest 84:845; Xiao, Z.ら、(2001年)Cancer Res 61:6029)を用いて、FRタンパク質を検出および定量することができる。質量分析法は、例えば、米国特許第5,622,824号、同第5,605,798号および同第5,547,835号(各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる)に記

40

50

載されている。

【0212】

本発明は、さらに、少なくとも部分的には、卵巣癌または非小細胞肺癌などのFR 発現癌の予後マーカーとして、すなわち進行および/または重症度のバイオマーカーとして、FR の同定に基礎を置く。したがって、本発明は、対象由来の試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することによって、卵巣癌に罹患している対象におけるFR 発現癌の進行を評価するための方法を提供し、対照試料と比較した、対象由来の試料（例えば尿または血清試料）におけるFR のレベルの差は、癌が急速に進行しているという指標である。同様に、対象がFR 発現癌を発症する危険性のレベルを評価する方法は、対象由来の試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することを伴い、対照試料と比較した、対象由来の試料（例えば尿または血清試料）におけるFR のレベルの差は、対象が、健常個体における通常危険性と比較して、FR 発現癌を発症する危険性のレベルが高いという指標である。

10

【0213】

一実施形態において、差は増加である。別の実施形態において、差は減少である。いくつかのタイプの癌（例えば、頭頸部の扁平上皮癌腫、卵巣癌）において、高レベルのFR 発現はより悪い予後と関連し、一方、他のタイプの癌（例えば、非小細胞肺癌）において、高レベルのFR 発現は良好な予後と関連する。このようにして、1つの特定の実施形態において、FR 発現癌は、卵巣癌または頭頸部の扁平上皮癌腫であり、差は増加である。別の特定の実施形態において、FR 発現癌は小細胞肺癌であり、差は減少である。

20

【0214】

ある種の態様において、本発明は、FR 発現癌に罹患している対象におけるFR 発現癌の進行を、対象由来の試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することによって評価するための方法を提供し、対照試料と比較した、対象由来の試料（例えば尿または血清試料）におけるFR のレベルの増加は、癌が急速に進行しているという指標であり、または対照試料におけるFR のレベルと比較した、対象由来の試料におけるFR のレベルの減少は、癌が穏やかに進行するもしくは退行するという指標である。同様に、対象がFR 発現癌を発症する危険性のレベルを評価するための方法は、対象由来の試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することを伴い、対照試料と比較した、対象由来の試料（例えば尿または血清試料）におけるFR のレベルの増加は、健常個体における通常危険性と比較して、FR 発現癌を発症する危険性のレベルが高いという指標であり、または対照試料におけるFR のレベルと比較した、対象由来の試料におけるFR のレベルの減少は、対象が、健常個体における通常危険性と比較して、FR 発現癌を発症する危険性のレベルが低いという指標である。

30

【0215】

当該技術分野において知られている任意の分析的な方法を用いた、任意の臨床的に関連するまたは統計学的に有意な増加または減少は、本発明の予後、危険性評価および他の方法に用いることができる。一実施形態において、FR のレベルの増加は、実施例6に例示されるROC分析を用いて決定されるカットオフ値を超えるレベルを指す。別の実施形態において、FR のレベルの減少は、ROC分析を用いて決定されるカットオフ値を超えない試験試料のレベルを指す。

40

【0216】

他の実施形態において、増加または減少は、FR のレベルを決定するための方法の検出限界よりも大きくなければならない。さらなる実施形態において、増加または減少は、評価法の標準誤差よりも少なくとも大きく、好ましくは少なくとも評価法の標準誤差の約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約100倍、約500倍、約1000倍またはそれらを超える差がある。いくつかの実施形態において、増加または減少は、パラメータ的または非パラメ

50

一時的記述統計学、比較、回帰分析などを用いて評価される。

【0217】

他の実施形態において、増加または減少は、対照試料におけるFR のレベルよりも約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%、約150%、約200%、約300%、約400%、約500%、約600%、約700%、約800%、約900%または約1000%多いまたは少ない対象由来の試料におけるレベルである。代替の実施形態において、増加または減少は、対照試料におけるFR の平均レベルの上または下の標準偏差が少なくとも1.5であり、より好ましくは約2、約3、約4、約5またはそれを超える対象由来の試料におけるレベルである。本明細書で使用する時、語句「FR 発現癌に罹患している対象におけるFR 発現癌の進行」とは、重症度の低い癌状態から重症度の高い癌状態のFR 発現癌の進行を指す場合がある。これは、腫瘍の数または重症度、転移の程度、癌が成長しているおよび広がっている速度などの増加を含むことができる。ある種の実施形態において、進行は、重症度が低い病期から重症度が高い病期への進行であり、病期は当該技術分野において知られている病期スキームに従って評価される。一実施形態において、FR 発現癌は卵巣癌である場合、進行は、病期Iから病期II、病期IIから病期IIIなどを指す。別の実施形態において、FR 発現癌が非小細胞肺癌(NSCLC)である場合、進行は、病期0から病期IA、病期IAから病期IB、病期IBから病期IIA、病期IIAから病期IIB、病期IIBから病期IICなどの進行を指す。別の実施形態において、FR 発現癌が非小細胞肺癌(NSCLC)である場合、進行は、TNM分類システムにより決定される重症度が低い病期から重症度が高い病期への進行を指す。Spira; Greene; Sobinを参照されたい。

10

20

【0218】

あるいは、語句「FR 発現癌に罹患している対象におけるFR 発現癌の進行」とは、重症度の高い癌状態から重症度の低い癌状態のFR 発現癌の退行を指し、例えば、腫瘍の数または重症度、転移の程度、癌が成長しているおよび広がっている速度などの減少が挙げられる。ある種の実施形態において、進行は、重症度が高い病期から重症度が低い病期への進行であり、病期は当該技術分野において知られている病期スキームに従って評価される。一実施形態において、FR 発現癌は卵巣癌である場合、進行は、病期IVから病期III、病期IIIから病期IIなどを指す。別の実施形態において、FR 発現癌が非小細胞肺癌(NSCLC)である場合、進行は、病期IVから病期IIIB、病期IIIBから病期IIIA、病期IIIAから病期IIBなどを指す。別の実施形態において、FR 発現癌が非小細胞肺癌(NSCLC)である場合、進行は、TNM分類システムにより決定される重症度が高い病期から重症度が低い病期への進行を指す。Spira; Greene; Sobinを参照されたい。

30

【0219】

さらなる実施形態において、FR のレベルは、対象がFR 発現癌に罹患している可能性、対象におけるFR 発現癌の進行、FR 発現癌を発症する危険性のレベル、FR 発現について治療される対象における癌の再発の危険性、FR 発現癌について治療される対象の生存、FR 発現癌を治療するための治療計画の有効性などを、当業者に知られている回帰分析の方法を含んでもよい本発明の方法を用いて計算するために使用され得る。例えば、適切な回帰モデルには、限定されないが、CART(例えば、Hill, T, およびLewicki, P. (2006年) "STATISTICS Methods and Applications" StatSoft, Tulsa, OK)、Cox(例えば、www.evidence-based-medicine.co.uk)、指数関数、正規および対数正規(例えば、www.obgyn.cam.ac.uk/mrg/statsbook/stsurvan.html)、ロジスティック(例えば、www.en.wikipedia.org/wiki/Logistic\_regression)、パラメータ的、非パラメータ的、半パラメータ的(例えば、www.socserv.mcmaster.ca/jfoxBooks/Companion)、

40

50

線形（例えば、[www.en.wikipedia.org/wiki/Linear\\_regression](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Linear_regression)）または付加（例えば、[www.en.wikipedia.org/wiki/Generalized\\_additive\\_model](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Generalized_additive_model)）が挙げられる。

#### 【0220】

一実施形態において、回帰分析はFR のレベルを含む。さらなる実施形態において、回帰分析は、追加の臨床的および/または分子共変を含んでもよい。このような臨床的共変は、限定されないが、対象の年齢、腫瘍ステージ、腫瘍グレード、腫瘍サイズ、治療計画、例えば化学療法および/または放射線療法、臨床転帰（例えば、再発、疾患特異的生存、治療の失敗）、および/または診断後の時間、治療開始後の時間および/または治療完了後の時間の関数としての臨床転帰を含む。分子共変は、限定されないが、付加的分子マーカー値を含むことができる。例えば、FR 発現癌が卵巣癌である実施形態において、このようなマーカーには、例えば、血清CA125レベル、血清DF3レベルおよび/または血漿LPAレベルを含んでもよい。

10

#### 【0221】

他の態様において、本発明は、治療または治療計画の有効性を監視するための方法を提供する。例えば、本発明は、卵巣癌または肺癌に罹患している対象における卵巣癌または肺癌のMORAb-003治療の有効性を監視するための方法を提供する。具体的には、方法は、前記対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルを決定し、前記対象はMORAb-003を予め投与され；細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することを伴い、対照試料におけるFR のレベルと比較した、前記対象由来の試料FR のレベルの増加または無変化は、MORAb-003治療が有効でないという指標であり；対照試料におけるFR のレベルと比較した、前記対象由来の試料におけるFR のレベルの減少は、MORAb-003治療が有効であるという指標である。

20

#### 【0222】

例えば、対照試料は、治療計画に供されていない対象由来であってもよく、試験試料は、治療計画の少なくとも一部に供された対象由来であってもよい。あるいは、試験試料および対照試料は、同じ対象由来であってもよい。例えば、試験試料は、MORAb-003などの治療薬の投与後、対象由来の試料であってもよい。対照試料は、治療薬の投与前または治療計画の初期病期での対象由来の試料であってもよい。したがって、対照試料と比較して、試験試料におけるFR の発現のレベルの減少は、治療がFR 発現癌、例えば卵巣癌の進行を減少させたという指標である。高レベルのFR が悪い予後と関連するFR 発現癌、例えば卵巣癌または頭頸部の扁平上皮癌腫について、対照試料と比較した、試験試料におけるFR の発現のレベルの減少は、治療が、FR 発現癌に罹患している対象において、FR 発現癌の進行の遅延または癌の退行の要因に有効であるという指標である。好ましい実施形態において、FR 発現癌は卵巣癌である。

30

#### 【0223】

本発明のこの態様の種々の実施形態において、試料は尿、血清、血漿または腹水であってもよい。特定の実施形態において、試料は尿または血清である。さらに、FR は、試料をFR に結合する抗体と接触させ、場合により本明細書に記載されている抗体と、本明細書に記載されているアッセイ法を用いて決定されてもよい。

40

#### 【0224】

種々の実施形態において、MORAb-003治療抗体は、(a)配列番号7に記載の重鎖アミノ酸配列および配列番号8に記載の軽鎖アミノ酸配列を含む抗体；(b)MORAb-003抗体と同じエピトープに結合する抗体；または(c)CDRH1として配列番号1(GFTFSGYGLS)、CDRH2として配列番号2(MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3として配列番号3(HGDDPAWFAY)、CDRL1として配列番号4(SVSSSISSNNLH)、CDRL2として配列番号5(GTSNLAS)およびCDRL3として配列番号6(QQWSSYPYMYT)を含む抗体で

50

ある。

【0225】

特定の実施形態において、FR 発現癌は卵巣癌である。他の実施形態において、FR 発現癌は肺癌である。より特定の実施形態において、肺癌は非小細胞肺癌（NSCLC）である。1つのこのような実施形態において、NSCLCは、腺癌、扁平上皮肺癌腫、大細胞肺癌腫、多形型NSCLC、カルチノイド腫瘍、唾液腺癌腫および未分類の癌腫からなる群から選択される。好ましい実施形態において、NSCLCは腺癌である。代替の実施形態において、肺癌は小細胞肺癌腫（SCLC）である。別の実施形態において、肺癌は、気管支肺癌腫である。なお別の実施形態において、肺癌は肺カルチノイド腫瘍である。

10

【0226】

別の態様において、本発明は、試料におけるFR の決定されたレベルに基づいて、FR 発現癌を有する対象を癌治療群に階層化するための方法を提供する。好ましい実施形態において、方法は、FR 発現癌を有する対象を少なくとも4つの癌治療群のうちの1つに階層化することを伴う。他の実施形態において、方法は、FR 発現癌を有する対象を少なくとも約2個、約3個、約4個、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個または約10個の癌治療群のうちの1つに階層化することを伴う。

【0227】

本発明に従って、FR のレベルは、FR 発現癌の重症度、すなわち病期と関連付けられてもよい。例えば、卵巣癌は、本明細書に記載されている癌の重症度に基づいて異なる病期に階層化される。したがって、本発明は、卵巣癌を病期I、例えば病期IA、病期IBもしくは病期IC；病期II、例えば病期IIA、病期IIBもしくは病期IIC；病期III、例えば病期IIIA、病期IIIBもしくは病期IIIC；または病期IVの卵巣癌に階層化するための方法を提供する。

20

【0228】

SCLSまたはNSCLCは、本明細書に記載されるように、癌の重症度に基づいて異なる病期に階層化されてもよい。したがって、本発明は、肺癌、例えばSCLSまたはNSCLCを潜在的な（隠された）病期；病期0；病期I、例えば病期IAおよび病期IB；病期II、例えば病期IIAおよび病期IIB；病期III、例えば病期IIIAおよび病期IIIB；または病期IVの肺癌に階層化するための方法を提供する。

30

【0229】

なお別の態様において、本発明は、少なくとも部分的には、FR がFR 発現癌を治療するための予後バイオマーカーとして役割を果たし得るという所見に基づいている。具体的には、本発明の方法は、対象が、例えばMORAb-003による治療に应答するかどうか、および例えばMORAb-003を用いた治療を開始するかどうかまたは治療をいつ開始するかを対象におけるFR のレベルを評価することによって評価するための方法を提供する。

【0230】

一態様において、本発明は、FR 発現癌、例えば卵巣癌または肺癌を患っている対象がMORAb-003による治療に应答するかどうかを、前記対象由来の試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルを決定し；前記対象由来の試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ（FR ）のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較することによって予測するための方法を提供し、前記対象由来の試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルの間の差は対象がMORAb-003による治療に应答するという指標である。

40

【0231】

ある種の実施形態において、対照試料と比較した場合、試験試料における癌細胞に結合しないFR のレベルの間の差の程度は、対象がMORAb-003による治療に应答するというを示す。評価法の標準誤差の少なくとも約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約100

50

倍、約500倍、約1000倍またはそれを超える差は、対象がMORAb-003による治療に应答するというを示す。または、あるいはそれと組み合わせて、少なくとも約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%、約150%、約200%、約300%、約400%、約500%、約600%、約700%、約800%、約900%または約1000%の差は、対象がMORAb-003による治療に应答するというを示す。または、あるいはそれと組み合わせて、少なくとも1.5であり、より好ましくは約2、約3、約4、約5またはそれを超える標準誤差の差は、対象がMORAb-003による治療に应答するというを示す。

#### 【0232】

種々の実施形態において、MORAb-003治療抗体は、(a)MORAb-003抗体と同じエピトープに結合する抗体；または(b)CDRH1として配列番号1(GFTFSGYGLS)、CDRH2として配列番号2(MISSGGSYTYADSVKG)、CDRH3として配列番号3(HGDDPAWFAY)、CDRL1として配列番号4(SVSSSISSNNLH)、CDRL2として配列番号5(GTSNLAAS)およびCDRL3として配列番号6(QQWSSYPYMYT)を含む抗体である。

#### 【0233】

種々の実施形態において、試料は、尿、血漿、血清または腹水である。特定の実施形態において、試料は尿または血清である。さらなる実施形態において、FR発現癌は、肺癌、中皮腫、卵巣癌、腎臓癌、脳癌、子宮頸癌、鼻咽腔癌、頭頸部の扁平上皮癌腫、子宮内膜癌、乳癌、膀胱癌、膵臓癌、骨癌、下垂体癌、結腸直腸癌および甲状腺髄様癌からなる群から選択される。特定の実施形態において、FR発現癌は卵巣癌である。別の実施形態において、FR発現癌は非小細胞肺癌、例えば腺癌である。

#### 【0234】

B. FR発現癌を検出するための抗FR抗体に基づくアッセイ

試料中のポリペプチドを検出するための抗体を用いる、当業者に知られている様々なアッセイフォーマットがあり、例えば、限定されないが、酵素免疫吸着法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫蛍光分析、免疫沈降、溶液相アッセイ、平衡透析、免疫拡散法および他の技術が挙げられる。例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988年；Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology, 1986年、Blackwell Scientific、Bostonを参照されたい。例えば、アッセイはウェスタンブロットフォーマットにおいて行われてもよく、生物学的試料からのタンパク質調製は、ゲル電気泳動に置かれ、適切なメンブレンに転写され、抗体と反応させるようにする。次に、メンブレン上の抗体の存在は、当該技術分野において周知であり、以下に記載されるように、適切な検出試薬を用いて検出され得る。

#### 【0235】

別の実施形態において、アッセイは、標的FRポリペプチドに結合する、固体支持体に固定された抗体の使用を伴い、該ペプチドを試料の残余物から取り出す。次に、結合したFRポリペプチドは、区別されるFRポリペプチド抗原決定基と反応性である二次抗体、例えば検出可能なレポーター部分を含む試薬を用いて検出され得る。非制限的な例として、本実施形態に従って、固定化された抗体、および区別される抗原決定基を認識する二次抗体は、本明細書に記載されているMORAb-003、MOV18、548908、6D398またはその改変体から選択される、本明細書に記載されている任意の2つのモノクローナル抗体であってもよい。あるいは、競合アッセイを用いてもよく、この場合、FRは検出可能なレポーター部分で標識され、固定された抗体と試料のインキュベーション後、固定された抗FR抗体に結合することを可能にする。試料の成分が、抗体への標識されたポリペプチドの結合を阻害する程度は、試料と固定された抗体の反応性を示し、結果として、試料におけるFRのレベルを示す。

10

20

30

40

50

## 【0236】

固体支持体は、抗体が結合され得る、当業者に知られている任意の材料であってもよく、例えばマイクロタイタープレートの試験ウェル、ニトロセルロースフィルターまたは別の適切なメンブレンが挙げられる。あるいは、支持体は、ビーズもしくはディスク、例えばガラス、ファイバーガラス、ラテックスまたはプラスチック、例えばポリスチレンもしくはポリ塩化ビニルであってもよい。抗体は、特許および科学文献に十分に記載されている、当業者に知られている様々な技術を用いて固体支持体に固定化され得る。

## 【0237】

ある種の好ましい実施形態において、試料中のFRを検出するためのアッセイは2抗体サンドイッチアッセイである。このアッセイは、最初に、固体支持体、通常はマイクロタイタープレートのウェルに固定化されているFR 特異的抗体（例えば、本明細書に記載されているMORAb-003、MOV18、548908、6D398またはその改変体）を生物学的試料と接触させることによって行うことができ、その結果、試料中に天然に存在し、抗体と反応性である抗原決定基を有する可溶性分子を固定化された抗体に結合させるようにし（例えば、室温にて30分のインキュベーション時間が一般的に十分である）、抗原-抗体複合体または免疫複合体を形成する。次に、試料の未結合の構成物は、固定された免疫複合体から除かれる。次に、FR に特異的な二次抗体が添加され、二次抗体の抗原結合部位は、FR に対する固定された一次抗体（例えば、固体支持体に固定されたモノクローナル抗体と同じでない、本明細書に記載されているMORAb-003、MOV18、548908、6D398またはその改変体）の抗原結合部位の結合を競合的に阻害しない。二次抗体は、本明細書に提供されるように検出可能に標識されてもよく、その結果、直接検出されてもよい。あるいは、二次抗体は、検出可能に標識された第二（または「第二段階」）の抗-抗体の使用を介して、または本明細書に提供されている特異的検出試薬を用いることによって間接的に検出されてもよい。本発明の方法は、イムノアッセイに精通している者が、2抗体サンドイッチイムノアッセイにおいて特定の抗原（例えばFR）を免疫学的に検出するための多数の試薬および構成があることを認めるため、任意の特定の検出手法に限定されない。

## 【0238】

上述される2抗体サンドイッチアッセイを用いる本発明のある種の好ましい実施形態において、FR に特異的な固定化された第一の抗体はポリクローナル抗体であり、FR に特異的な第二の抗体はポリクローナル抗体である。本発明のある種の他の実施形態において、FR に特異的な固定化された第一の抗体はモノクローナル抗体であり、FR に特異的な第二の抗体はポリクローナル抗体である。本発明のある種の他の実施形態において、FR に特異的な固定化された第一の抗体は、ポリクローナル抗体であり、FR に特異的な第二の抗体はモノクローナル抗体である。本発明のある種の他の実施形態において、FR に特異的な固定化された第一の抗体はモノクローナル抗体であり、FR に特異的な第二の抗体はモノクローナル抗体である。例えば、これらの実施形態において、本明細書に記載されているモノクローナル抗体であるMORAb-003、MOV18、548908、6D398またはその改変体は、本明細書に提供され、FR ポリペプチド上の区別される、非競合的な抗原決定基（例えばエピトープ）を認識し、そのためにこれらのモノクローナル抗体の任意の一对の組み合わせを用いてもよい。本発明の他の好ましい実施形態において、FR に特異的な固定された第一の抗体、および/またはFR に特異的な第二の抗体は、当該技術分野において知られている任意の種類抗体であってもよく、本明細書において、例として、限定されないが、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、免疫グロブリンV領域融合タンパク質または一本鎖抗体を指す。当該技術に精通している者は、本発明が、本明細書に開示され、特許請求される方法において他の抗体形態、断片、誘導体などの使用を包含することを認識する。

## 【0239】

ある種の特に好ましい実施形態において、第二の抗体は、酵素、色素、放射性核種、発光基、蛍光基またはビオチンなどの検出可能なレポーター部分または標識を含んでもよい

10

20

30

40

50

。次に、固体支持体に結合した状態にある第二の抗体の量は、特定の検出可能なレポーター部分または標識に適した方法を用いて決定される。放射性基について、シンチレーションカウントまたはオートラジオグラフ法が一般的に適切である。抗体-酵素コンジュゲートは、様々なカップリング技術を用いて調製され得る（概説として、例えば、Scouten, W. H., Methods in Enzymology 135: 30-65、1987年を参照）。分光法は、色素（例えば、酵素反応の比色生成物を含む）、発光基および蛍光基を検出するために使用されてもよい。ビオチンは、異なるレポーター基（通常、放射性もしくは蛍光基または酵素）にカップリングされるアビジンまたはストレプトアビジンを用いて検出することができる。酵素レポーター基は、一般的に、基質の添加（一般的に、特定の期間）、続く反応産物の分光学的、分光光度的または他の分析によって検出され得る。標準および標準的な添加は、周知の技術を用いて、試料中のメソセリンポリペプチドのレベルを決定するために用いられてもよい。

10

20

30

40

50

#### 【0240】

本発明に従うFR 発現癌の存在をスクリーニングするための方法は、対象由来の生物学的試料における1を超える腫瘍関連マーカーの検出によってさらに向上させてもよい。したがって、ある種の実施形態において、本発明はまた、細胞に結合しないFR の反応性の検出に加えて、当該技術分野において知られ、本明細書に提供されている確立した方法を用いて、悪性状態の少なくとも1つの付加的な可溶性マーカーの検出を含むスクリーニング法を提供する。上記されるように、容易に得られる生物学的液体の試料において検出可能な多数の可溶性腫瘍関連抗原が現に存在する。

#### 【0241】

##### C. 本発明のキット

本発明はまた、対象がFR 発現癌に罹患しているかどうかを評価し、FR 発現癌の進行を評価し、対象がFR 発現癌を発症する危険性のレベルを評価しまたはFR 発現癌の治療もしくは治療計画の有効性を監視するためのキットを提供する。これらのキットは、FR の発現レベルを決定するための手段、およびFR 発現癌の進行を評価し、対象がFR 発現癌を発症する危険性のレベルを評価し、またはFR 発現癌に対する治療もしくは治療計画の有効性を監視するためのキットを使用するための使用説明書を含む。

#### 【0242】

本発明のキットは、場合により、本発明の方法の実施に有用な追加の成分を含んでもよい。例えば、キットは、対象由来の試料、対照試料、例えば癌の進行が穏やかな対象由来の試料および/または癌を有しない対象由来の試料、1つまたは複数の試料コンパートメントを得るための手段、および本発明の方法の実施および組織特異的対照/標準を記載する使用説明資料を含んでもよい。

#### 【0243】

FR のレベルを決定するための手段は、上記で検討されたように、タンパク質レベルを評価し、および本明細書において検討されているMORAb-003抗体を用いるための、当該技術分野において知られている方法を含む。このようにして、例えば、一実施形態において、FR のレベルは、対象由来の試料（例えば尿または血清）を葉酸受容体アルファ（FR ）結合剤と接触させることによって評価される。好ましい実施形態において、結合剤は抗体である。FR に結合する多数のタイプの抗体は、本発明の方法において上記で検討され、また、本発明のキットに用いられてもよい。

#### 【0244】

FR のレベルを決定するための手段は、例えば、FR のレベルを決定するためのアッセイにおいて使用するための緩衝液または他の試薬をさらに含むことができる。使用説明書は、例えば、アッセイを行うための印刷された使用説明書および/またはFR の発現のレベルを評価するための印刷された使用説明書であってもよい。

#### 【0245】

また、本発明のキットは、対象から試料を単離するための手段を含んでもよい。これらの手段は、対象から液体または組織を得るために使用され得る装置または試薬の1つまた

は複数の種目を含むことができる。また、対象から試料を得るための手段は、血液試料から血液成分、例えば血清を単離するための手段を含んでもよい。好ましくは、キットはヒト対象用に設計されている。

#### 【0246】

##### III. スクリーニングアッセイ

さらなる実施形態において、本発明はまた、試料中のFR のレベルを監視および比較することによって、癌、例えばFR 発現癌、または癌細胞、例えば卵巣癌細胞の増殖、進行および/または攻撃性 (aggressiveness) を調節する調節因子、すなわち候補もしくは試験化合物または薬剤 (例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣薬、ペプチド (peptide)、小分子または他の薬物) を同定するための方法 (本明細書において「スクリーニングアッセイ」とも称される) を提供する。このようなアッセイは、典型的には、癌または癌細胞に対する活性が測定されるべきである試験化合物または試験化合物の組み合わせを含む。本明細書に記載されるアッセイなどのアッセイを介して同定される化合物は、例えば、FR 発現癌または癌細胞、例えば卵巣癌細胞の攻撃性の調節、例えば阻害、改善、治療または予防に有用であり得る。試料中のFR のレベルを監視することによって、FR 発現癌が進行しているまたは退行しているかどうかを決定し、試験化合物が所望の効果を有するかどうかを決定することができる。例えば、FR 発現癌が、高レベルのFR が悪い予後と関連付けられる実施形態において、試験化合物の投与後のFR のレベルの減少は、試験化合物の有効性を示す。対照的に、試験化合物の投与後のFR のレベルの増加は、試験化合物が卵巣癌の治療に有効でないことを示す。対照的に、FR 発現癌が、高レベルのFR が良好な予後と関連付けられる癌である実施形態において、試験化合物の投与後のFR のレベルの増加は、試験化合物の有効性を示す。対照的に、試験化合物の投与後のFR のレベルの減少は、卵巣癌の治療に有効でないことを示す。

10

20

#### 【0247】

本発明のスクリーニングアッセイに使用される試験化合物は、任意の利用可能な供給源から得ることでき、例えば、天然および/または合成の化合物の系統的ライブラリーが含まれる。また、試験化合物は当該技術分野において知られているコンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチにいずれかによって得ることができ、例えば、生物学的ライブラリー；ペプチドライブラリー (ペプチドの機能性を有するが、酵素分解に耐性である新規の非ペプチド骨格を有し、それにも関わらず、生物活性を保持している分子のライブラリー；例えば、Zuckermannら、1994年、J. Med. Chem. 37: 2678-85参照)；空間的に指定可能な並行固相または液相ライブラリー；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を用いた合成ライブラリー法が挙げられる。生物学的ライブラリーおよびペプチドライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定され、一方、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の小分子ライブラリーに応用可能である (Lam、1997年、Anticancer Drug Des. 12: 145)。

30

#### 【0248】

分子ライブラリーを合成するための方法の例は、当該技術分野において、例えば、Dewittら、(1993年) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909；Erbら、(1994年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422；Zuckermannら、(1994年) J. Med. Chem. 37: 2678；Choら、(1993年) Science 261: 1303；Carrellら、(1994年) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059；Carrellら、(1994年) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061；Galloppら、(1994年) J. Med. Chem. 37: 1233に見出すことができる。

40

#### 【0249】

50

化合物のライブラリーは、溶液（例えば、Houghten、1992年、Biotechniques 13:412-421）、またはビーズ（Lam、1991年、Nature 354:82-84）、チップ（Fodor、1993年、Nature 364:555-556）、細菌および/または孢子（Ladner、USP5,223,409）、プラスミド（Cullら、1992年、Proc Natl Acad Sci USA 89:1865-1869）またはファージ（Scott and Smith、1990年、Science 249:386-390; Devlin、1990年、Science 249:404-406; Cwirllaら、1990年、Proc Natl Acad Sci 87:6378-6382; Felici、1991年、J. Mol. Biol. 222:301-310; Ladner、上述）に存在してもよい。

10

## 【0250】

本発明は、さらなる限定として解釈されるべきでない以下の実施例によってさらに例証される。本出願を通じて引用されている全ての参考資料、特許および公開された特許出願および図面は、全体として参照により本明細書に明確に組み込まれる。

## 【実施例】

## 【0251】

## [実施例1]

電気化学発光イムノアッセイ（ECLIA）によって測定される卵巣癌を有するまたは有しないヒト対象由来の尿試料におけるFR レベルの決定

20

## 材料および方法

尿試料をヒト対象から得て、卵巣癌に罹患している対象および卵巣癌に罹患していない正常な対照対象を含んでいた。尿試料におけるFR のレベルは、以下の手法に従って、電気化学発光イムノアッセイ（ECLIA）を用いて決定された（Nambara、（1999年）Analytical Science 15:1087-1093参照）。

## 【0252】

## i. マイクロビーズへの抗体被覆

モノクローナル抗葉酸受容体アルファ抗体をマイクロビーズ（Dynabeads M-450 Epoxy、Dynal）の表面全体に被覆した。36mgのマイクロビーズを0.15mol/Lリン酸緩衝生理食塩水pH7.8（PBS）中の1.2mLの抗体MOV18（0.36mg/mL、Enzo Life Science）と混合し、16時間、室温にて穏やかに混合した。次に、マイクロビーズは、0.1%の正常なウサギ血清（NRS）、150mmol/LのNaCl、0.01% Tween 20 pH7.5を含む50mMのHEPES緩衝液（洗浄緩衝液）で5回洗浄された。その後、被覆されたマイクロビーズは、20%NRS、150mmol/LのNaClおよび0.01% Tween 20 pH7.5を含む1.2mLの50mM HEPES緩衝液（反応緩衝液）中に懸濁され、未結合表面をブロッキングし、3.5時間、室温にて穏やかに混合した。最後に、マイクロビーズは、洗浄緩衝液で5回洗浄され、10%NRS、150mmol/LのNaCl、10mmol/LのEDTA-2Naおよび0.01% Tween 20 pH7.5を含む1.2mLの50mMのHEPES緩衝液（反応緩衝液）で再懸濁され、マイクロビーズの濃度を30mg/mLにした。マイクロビーズを4 にて使用するまで保存した。

30

40

## 【0253】

## ii. ルテニウム-キレート-NHS（Ru）を用いた抗体標識

PBS中の1mLのMORAB-003（1mg/mL）は、14μLのRu（10mg/mL）と混合され、抗体とRuの初期モル比は1:20であり、30分間、室温にて遮光して振とうした。反応は、25μLの2mol/Lグリシン溶液を添加することによって停止させ、その後、20分間インキュベートした。標識された抗体は、PBSで溶出させるSephadex G-25（GE Healthcare）を用いたゲル濾過によって精製された。最初に溶出された黄色の画分を回収し、抗体およびRuの濃度は、P

50

ierce BCAタンパク質アッセイキット(Thermo Scientific)の手段およびそれぞれ455nmの吸収によって決定された。最終モル比は、式：最終モル比 = [ (455での吸収) / 13700 ] / [ Ab (mg/mL / 150000) ] によって計算された。標識された抗体を4にて使用するまで保存した。

【0254】

iii. 一工程イムノアッセイ

抗体被覆されたマイクロビーズは、Picolumi 8220 (Sanko, Tokyo, Japan) の試薬表に設定され、その後、反応緩衝液中で1.5mg/mlの濃度(作業溶液)を調節した。Ru標識された抗体は、Picolumi 8220の試薬表に設定され、その後、抗体の濃度を反応緩衝液中2μg/ml(作業溶液)を調節した。

10

【0255】

10μlの尿(反応緩衝液中で1:51に希釈される)または標準のFR(反応緩衝液中に調製される)および100μLの反応緩衝液は、反応管(Sanko, Tokyo, Japan)に分配され、Picolumi 8220に設定された。

【0256】

以下の工程は、Picolumi 8220によって自動的に行った。25μlのビーズ(作業溶液)および180μlのRu標識された抗体(作業溶液)を分配した。30±2にてインキュベーションの26分後、ビーズを洗浄し、300μLの電解質溶液(Sanko, Tokyo, Japan)を用いて懸濁した。続いて、洗浄されたビーズを電極に移動させ、電気化学発光(ECL)発光を測定した。

20

【0257】

全てのECL測定は二点測定で行われた。

【0258】

結果

表1は、卵巣癌罹患の個々の対象および非罹患女性対照対象におけるFRの尿レベルを示す。

【0259】

## 【表 2】

表1: 卵巣癌の対象および正常な女性対照対象の尿におけるFR $\alpha$ レベル

群	試料 #	FR $\alpha$ (pg/mL)
卵巣癌	1	27800
	2	40242
	3	85580
	4	4994
	5	2017
	6	3781
	7	29469
	8	47456
	9	4479
	10	11920
	11	18352
	12	162017
	13	30630
	14	14431
	15	11801
	16	13470
	17	11563
	18	22185
	19	52106
正常な対照	20	8491
	21	4885
	22	3595
	23	21301
	24	22757
	25	16578
	26	6081
	27	4195
	28	12169
	29	20639

10

20

30

## 【0260】

図 2 は、表 1 に記載されるように、卵巣癌の対象および正常な女性の対照対象における尿中のFR $\alpha$ レベルの分布を示す。

## 【0261】

表 2 は、卵巣癌群および正常な女性対照群におけるFR $\alpha$ レベルについての対象数 (n)、平均、標準偏差 (SD)、最大 (Max.) および最小 (Min.) 値を概要する。

40

## 【0262】

## 【表 3】

表2: 尿FR $\alpha$  測定の概要

	FR $\alpha$ (pg/mL)	
	卵巣癌	正常な女性
N	19	10
平均	31279	12069
SD	37895	7654
最大	162017	22757
最小	2017	3595

10

## 【0263】

## 検討

高レベルのFR $\alpha$  は、卵巣癌の対象の尿において検出された。さらに、FR $\alpha$  のレベルは、卵巣癌と正常な女性の対照群の間で有意に異なっていた ( $p = 0.03$ 、片側)。

## 【0264】

## [実施例 2]

希釈直線性 - 電気化学発光イムノアッセイ (ECLIA) によって測定される連続希釈された尿試料におけるFR $\alpha$  レベルの決定

希釈直線性はアッセイの精度の測定である。2つの尿試料は、10倍および100倍に連続希釈された。各試料のFR $\alpha$  レベルは、実施例1に記載されるように測定し、誤差率を評価するために比較された。誤差率は以下のように計算された：

## 【0265】

## 【数 1】

$$\frac{[(\text{希釈試料におけるFR}\alpha) * (\text{希釈倍数})] - (\text{未希釈試料におけるFR}\alpha)}{(\text{未希釈試料におけるFR}\alpha)} * 100$$

20

30

結果は表3に記載される。

## 【0266】

## 【表 4】

表3: 尿についての希釈直線性

試料	希釈因子	FR $\alpha$ (pg/mL)	誤差 (%)
1	1	25037	-
	10	2601	4
	100	279	11
2	1	16649	-
	10	1696	2
	100	173	4

40

## 【0267】

前述の結果は、ヒト尿試料におけるFR $\alpha$  のレベルの評価における希釈直線性を示し、許容される誤差内において、尿は、FR $\alpha$  の正確なレベルを保持しながら、少なくとも100の倍数まで希釈することができる。したがって、尿試料の希釈は、FR $\alpha$  のレベルの決定前に考慮されてもよい。

50

【 0 2 6 8 】

[ 実施例 3 ]

尿試料の遠心分離 - 再現性の対処

具体的な尿試料についての E C L I A アッセイの再現性はまた試験された。例えば、表 4 に反映されるように、同じ試料の E C L I A アッセイは様々な結果をもたらした。

【 0 2 6 9 】

【 表 5 】

表4. 試料の遠心分離無しでの再現性

10

試料	ECLカウント	
	試験 1	試験 2
1	29380	15046
2	20912	17227

【 0 2 7 0 】

尿試料における不溶性物質（沈殿物）の存在は、F R のレベルの測定において観察された変動性に起因するものと仮説を立てた。結果として、F R のレベルの測定前の、尿沈渣を除くための試料の遠心分離は、アッセイの精度および再現性を高めるためにオプションとして考えられた。

20

【 0 2 7 1 】

表 5 は、E C L I A アッセイの実施前に、3つの試料を遠心分離した際に得られた結果を示す。

【 0 2 7 2 】

【 表 6 】

表5. 試料の遠心分離による再現性

30

試験	FR $\alpha$ 濃度 (ng/mL)		
	試料 1	試料 2	試料 3
1	10.4	9.2	13.3
2	10.5	8.9	14.0
3	10.3	9.2	13.4
平均	10.4	9.1	13.6
SD	0.1	0.1	0.3
CV(%)	1.0	1.1	2.2

40

【 0 2 7 3 】

上記したように、結果は、遠心分離が F R 濃度のより一貫した測定を与えたことを示す。

【 0 2 7 4 】

さらに、2つの試料は、( i ) 遠心分離 ( 2 0 0 0  $\times$  g、2 分間 ) および F R の測定のために除かれた上清 ( 表 6 において、以下試料「 A 」として示されている ) および ( i i ) 実施例 1 に記載される E C L I A アッセイによる F R レベルの測定前、遠心分離、続くボルテックス ( 表 6 において、以下試料「 B 」として示されている ) に供された。結果は、以下の表 6 に反映される。

50

【 0 2 7 5 】

【 表 7 】

表6:尿中のFR $\alpha$ レベルにおける遠心分離の効果

試料	遠心分離後の沈渣あり	A/B	FR $\alpha$ (pg/mL)	差 (%)
1	Yes (++)	A	13678	-
		B	16559	21
2	Yes (+)	A	12271	-
		B	13206	8

10

【 0 2 7 6 】

差 (%) は以下のように決定された :

【 0 2 7 7 】

【 数 2 】

20

$$\frac{([\text{B}] \text{におけるFR}\alpha \text{のレベル}) - ([\text{A}] \text{におけるFR}\alpha \text{のレベル}) * 100}{([\text{A}] \text{におけるFR}\alpha \text{のレベル})}$$

【 0 2 7 8 】

表 6 に示されるように、ECLIA アッセイによって決定されたFR のレベルは、尿が沈殿物を除くために遠心分離によって浄化されたかどうかまたは尿は沈渣を懸濁もしくは分散するためにボルテックスされたかどうかによって依存して変化する。したがって、ある種の実施形態において、尿試料の遠心分離またはボルテックスはFR のレベルを決定する前に行われてもよい。

30

【 0 2 7 9 】

[ 実施例 4 ]

電気化学発光イムノアッセイ (ECLIA) によって決定された卵巣癌を有するまたは有しないヒト対象由来の遠心分離された尿試料におけるFR レベルの決定

実施例 3 の結果に基づいて、対象におけるFR レベルを評価するためのアッセイは遠心分離工程を導入するために修正された。FR レベルは、実施例 1 において使用されたものと同じ試料において決定され、卵巣癌を有する対象群および正常な女性の対照対象の群を含んだ。

【 0 2 8 0 】

材料および方法

使用された方法は、尿試料を 10000 x g で 1 分間遠心分離し、その後、得られた上清を反応緩衝液中で 1 : 5 に希釈したことを除いて、実施例 1 に記載される通りであった。

40

【 0 2 8 1 】

結果

表 7 は、卵巣癌に罹患している対象および健常な女性の対照対象由来の遠心分離された尿試料および遠心分離されていない尿試料におけるFR のレベルを示す。

【 0 2 8 2 】

## 【表 8】

表7: 卵巣癌および正常な対照群における尿FR $\alpha$ レベル

群	試料 #	FR $\alpha$ (pg/mL)		遠心分離後の 沈渣
		遠心分離なし	遠心分離あり	
卵巣癌	1	27800	23960	+
	2	40242	37852	+
	3	85580	78976	+
	4	4994	3766	+
	5	2017	1512	-
	6	3781	3443	-
	7	29469	25728	+
	8	47456	16556	+
	9	4479	3357	-
	10	11920	5020	+
	11	18352	16695	-
	12	162017	82705	+
	13	30630	4496	+
	14	14431	8786	+
	15	11801	10582	-
	16	13470	5611	+
	17	11563	5463	+
	18	22185	14443	+
	19	52106	38327	-
正常な対照	20	8491	6867	+
	21	4885	3754	-
	22	3595	3529	-
	23	21301	15047	+
	24	22757	4850	+
	25	16578	14366	+
	26	6081	5201	-
	27	4195	3135	-
	28	12169	499	+
	29	20639	2439	+

10

20

30

40

## 【0283】

表7に記載される結果によれば、遠心分離は、表6に以前に示されるように、いくつかの試料におけるFR $\alpha$ レベルの測定値の減少をもたらした。

## 【0284】

## [実施例5]

イムノプロットティングによる尿沈渣におけるFR $\alpha$ の検出

実施例3および4に示された結果に基づいて、尿沈渣/沈殿物におけるFR $\alpha$ の存否はウェスタンプロットティングを用いて評価された。

## 【0285】

材料および方法

50

2人の卵巣癌患者由来の尿試料は、FR 濃度がそれぞれ18,747 pg/mLと145,564 pg/mLとして測定され(表10(上述)参照)、以下の手法に供された。対照試料は、HeLa細胞溶解物10 μg、肝組織溶解物20 μgおよび卵巣癌組織溶解物20 μgからなっていた。

- ・900 μLの尿を2分間、10000 gにて遠心分離した。
- ・上清を除いた。
- ・残りのペレットを15 μLのPAGE試料緩衝液(292 mMのLDS含有)に溶解し、続いて70 にて10分間煮沸した。
- ・全試料(約20 μL)をNuPAGEビス-トリスゲル(Invitrogen)に充填した。
- ・電気泳動後、タンパク質をPVDFメンブレンに転写した。
- ・1%スキムミルク/0.05%Tween 20/PBSをブロッキングのために添加した。
- ・メンブレンを0.05%Tween 20/PBSで洗浄した。
- ・2 μg/mLのモノクローナル抗体548908(R&D Systems)0.5 mLを添加し、60分間、室温にてインキュベートした。
- ・メンブレンを0.05%Tween 20/PBSで洗浄した。
- ・10 mLの抗マウスIgG-HRP(DAKO p0447、1:2000)を添加し、60分間インキュベートした。
- ・メンブレンを0.05%Tween 20/PBSで洗浄した。
- ・Pierce ECL基質をメンブレンに添加した。
- ・基質からメンブレンを除き、次に、LAS-3000(FUJIFILM)システムを用いて画像化した。

10

20

30

40

50

#### 【0286】

##### 結果

得られたイムノプロットを図3に示す。この図において、レーン1から5は、以下の供給源から検出されたFR に対応する：

- (1)測定されたFR レベルが18,747 pg/mLである卵巣癌患者由来の尿
- (2)測定されたFR レベルが145,564 pg/mLである卵巣癌患者由来の尿
- (3)HeLa細胞溶解物：10 μg
- (4)肝組織溶解物：20 μg
- (5)卵巣癌組織溶解物：20 μg

#### 【0287】

ウェスタンプロットのレーン6は分子量マーカを表し、レーン1、2、3および5において観察されたバンドはFR の予期された分子量で移動することを示す。

#### 【0288】

レーン3と5は陽性対照試料であり、レーン4は陰性対照試料である。レーン1の薄いバンドおよびレーン2の明確なバンドは、FR が、ウェスタンプロッティングによる卵巣癌患者の尿沈渣において検出され得ることを示す。

#### 【0289】

##### [実施例6]

電気化学発光イムノアッセイ(ECLIA)によるグアニジン処理された正常ヒト尿試料におけるFR レベルの決定

遠心分離がFR レベルの減少をもたらした実施例4の結果、および遠心分離から得られた尿沈渣が免疫反応性FR を含むことが示された実施例5の結果に基づいて、方法は、FR のより定量的および正確な測定を得るために、尿の沈渣を可溶化させるように追求された。

#### 【0290】

この点において、FR レベルを評価する前のグアニジンによる正常な女性の尿試料の処置を試みた。

## 【0291】

用いられた方法は、尿試料が、緩衝液（PBS）中の6Mグアニジンまたは緩衝液単独のいずれかと1：1比で混合されたことを除き、実施例1に記載される通りであった。続いて、尿試料を反応緩衝液中で1：51に希釈した。

## 【0292】

このアッセイの結果を表8に示す。

## 【0293】

## 【表9】

表8:グアニジン処理の有無による正常な尿FR $\alpha$ レベル

試料		グアニジン処理	FR $\alpha$ (pg/mL)
	Std Ag	あり	83964
		なし	82512
正常な尿	1	あり	9431
		なし	7796
	2	あり	5713
		なし	4066
	3	あり	9687
		なし	9428

10

20

## 【0294】

この実験の結果は、グアニジンがFR測定と干渉しないことを示す。純粋な抗原対照（Std Ag）について観察され得るように、グアニジン処理および続く希釈の方法は、FRの測定に影響がない。さらに、評価された3つ全ての尿試料において、FRのレベルは、グアニジンで処理されていない試料と比較して、グアニジンで処理された（可溶化された）試料において高かった。

## 【0295】

尿試料のグアニジン前処理の信頼性は、3つの試料をグアニジンに暴露し、ECLIAアッセイを用いて、各グアニジン処理された試料のFR濃度を3回測定することによってさらに評価された。結果は、以下の表9に反映される：

30

## 【0296】

## 【表10】

表9：グアニジン処理された尿のアッセイ間の再現性

試験	FR $\alpha$ (pg/mL)		
	試料 1	試料 2	試料 3
1	9210	5477	9889
2	9638	5405	10047
3	10192	5812	10944
平均	9680	5565	10293
SD	492	217	569
CV(%)	5.1	3.9	5.5

40

## 【0297】

上述されるように、結果は、FRアッセイ前の尿のグアニジン処理は、CVが非常に低いFR濃度の一致した測定値を与えたことを示す。

## 【0298】

## [実施例7]

電気化学発光イムノアッセイ（ECLIA）によって測定される卵巣癌を有するおよび卵巣癌を有しないヒト対象由来のグアニジン処理された尿試料におけるFRレベルの決

50

定

グアニジン処理はFR アッセイと干渉しないことが示された実施例6の結果に基づいて、変更されたアッセイプロトコルを用いて、実施例1における卵巣癌を有するおよび卵巣癌を有しない対象由来の尿試料においてFR を測定した。

【0299】

以下のアッセイプロトコルを用いた：

材料および方法

用いられた方法は、尿試料が、反応緩衝液中の6Mグアニジン緩衝液と1：1比に混合され、続いて1：26に希釈されたことを除き、実施例1に記載される通りであった。

【0300】

結果

表10は、卵巣癌に罹患している対象および健常な女性の対照対象由来のグアニジン処理された尿試料におけるFR のレベルを示す。

【0301】

【表11】

表10：卵巣癌および正常な対照群における尿FR $\alpha$ レベル

群	試料#	FR $\alpha$ (pg/mL)
卵巣癌	1	27015
	2	37315
	3	79579
	4	285
	5	1864
	6	2902
	7	27914
	8	51864
	9	2699
	10	9455
	11	18396
	12	145564
	13	19046
	14	10440
	15	10977
	16	9199
	17	18223
	18	18747
	19	51098
正常対照	20	8012
	21	3797
	22	3323
	23	20976
	24	6941
	25	14512
	26	7286
	27	2789
	28	2617
29	7233	

【0302】

図4は、グアニジン処理を含む変更されたプロトコルを用いて、卵巣癌に罹患している対象および正常な女性の対照対象の尿におけるFR レベルの分布を示す。これらの群

の間の統計学的に有意な差が観察された。表 1 1 はこれらの結果を要約する。

【 0 3 0 3 】

【 表 1 2 】

表 1 1 : 尿FR $\alpha$ 測定の概要

	FR $\alpha$ (pg/mL)	
	卵巣癌	正常な対照
n	19	10
平均	28557	7749
SD	34990	5850
最大	145564	20976
最小	285	2617

10

【 0 3 0 4 】

この実験からのデータを用いて、受信者動作特性 ( R O C ) 分析を行った。図 5 は、尿をグアニジンで処理した後、尿における F R レベルの E C L I A 測定の感受性および特異性の R O C 曲線を示す。A U C は曲線下の面積であり、これは、対照対象からの卵巣癌の区別において試験の精度を測定する。

【 0 3 0 5 】

9 1 0 0 p g の F R / m L の任意のカットオフ値を用いると、表 1 2 に示されるように、A U C は 0 . 7 0 であり、陽性予測値は 7 0 % であり、陰性予測値は 8 0 % であった。このカットオフ値を用いると、1 5 / 1 9 の卵巣癌患者は、F R 濃度が 9 1 0 0 p g / m L 超であり、8 / 1 0 の正常な対象は F R 濃度が 9 1 0 0 p g / m L 未満であった。

20

【 0 3 0 6 】

【 表 1 3 】

表 1 2 : 尿測定に関するグアニジン処理

	卵巣癌	対照
試料数	19	10
陽性	15	2
予測値 (%)	78.9	80.0

30

【 0 3 0 7 】

[ 実施例 8 ]

電気化学発光イムノアッセイ ( E C L I A ) によるグアニジン処理された尿試料において決定された F R 濃度のクレアチニン補正

F R の濃度は、卵巣癌患者および正常な女性対照由来のグアニジン処理された尿試料の E C L I A を用いて予め決定された ( 実施例 7 、 表 1 0 参照 ) 。ここで、これらの F R 濃度は、糸球体濾過率について標準化するために、尿のクレアチニンレベルについて補正された。得られた値を R O C 分析に供した。

40

【 0 3 0 8 】

方法

尿のクレアチニンレベルは、厚生労働省によって承認されている試験キットである d e t e r m i n e r L C R E ( K y o w a M e d e x 、 日本 ) によって決定された。尿の F R 濃度について補正された値は以下のように計算された :

$$\begin{aligned}
 & \text{尿の F R クレアチニン補正 ( n g / g )} \\
 & = ( \text{尿 F R ( n g / L )} \times 1 0 0 0 ) / ( \text{尿クレアチニン ( m g / d L )} \times 1 0 ) \\
 & = ( \text{尿 F R ( n g / L )} \times 1 0 0 0 ) / \text{尿クレアチニン ( m g / L )} \\
 & = \text{尿 F R ( n g / L )} / \text{尿クレアチニン ( g / L )} \\
 & = \text{尿 F R ( n g )} / \text{尿クレアチニン ( g )}
 \end{aligned}$$

50

または

$$= 1 / 1000 \times \text{尿FR} (\mu\text{g}) / \text{尿クレアチニン} (\text{g})$$

【0309】

結果

表13は、得られたクレアチニン補正されたFRレベルを示す。

【0310】

【表14】

表13：グアニジン処理された尿試料のECLIAを用いて決定されたクレアチニン補正されたFR $\alpha$ レベル

群	試料 #	FR $\alpha$ (pg/mL)	補正されたFR $\alpha$ ( $\mu\text{g}$ FR $\alpha$ / gクレアチニン)
卵巣癌	1	27015	11.6
	2	37315	37.8
	3	79579	33.9
	4	285	0.6
	5	1864	6.7
	6	2902	7.1
	7	27914	54.9
	8	51864	17.1
	9	2699	13.5
	9	9455	14.5
	10	18396	23.1
	11	145564	66.0
	12	19046	9.1
	13	10440	8.5
	14	10977	7.4
	15	9199	5.9
	16	18223	13.0
17	18747	9.6	
正常対照	18	3797	7.7
	19	3323	7.9
	20	20976	10.7
	21	6941	4.3
	22	14512	8.6
	23	7286	13.8
	24	2789	4.3
	25	2617	1.9
	26	7233	3.1

10

20

30

40

【0311】

図6は、尿クレアチニンレベルの補正後、卵巣癌(OC)および正常な女性の対照対象におけるFRレベルの分布を示す。FRのクレアチニン補正されたレベルにおける卵巣癌患者と対照の間に統計学的に有意な差がある( $p = 0.007$ )。

【0312】

卵巣癌および正常な対照対象についての要約データを表14に示す。

【0313】

## 【表 15】

表 14：クレアチニン補正されたFR $\alpha$ レベルについての要約統計量

	FR $\alpha$ ( $\mu\text{g/g}$ -クレアチニン)	
	卵巣癌	正常な対照
<b>n</b>	18	9
平均	18.9	6.9
<b>SD</b>	17.9	3.9
最大	66.0	13.8
最小	0.6	1.9

10

## 【0314】

クレアチニン補正されたFR $\alpha$ レベルをさらにROC分析に供した。ROC曲線を図7に示す。表15は、クレアチニン補正された試験の種々のカットオフ値について、感受性、特異性および曲線下面積(AUC)を示す。

20

## 【0315】

## 【表 16】

表 15：クレアチニン補正されたFR $\alpha$ 試験の種々のカットオフ値についての感受性、特異性およびAUC

カットオフ	感受性	特異性	AUC
3.0	94.4%	11.1%	0.67
4.0	94.4%	22.2%	0.70
5.0	94.4%	44.4%	0.78
6.0	88.9%	44.4%	0.74
9.0	66.7%	77.8%	0.70

30

## 【0316】

前述されるように、卵巣癌患者の尿と健常な女性の対照対象由来の尿の間に明確な区別がある。

## 【0317】

## [実施例9]

酵素免疫アッセイ(EIA)およびその最適化

40

## 1. 酵素免疫アッセイ(EIA)

マイクロタイタープレートへの抗体被覆

モノクローナル抗葉酸受容体アルファ抗体は、以下のようにマイクロタイタープレート(Nunc-イムノプレート、Thermo Scientific)の表面に被覆された。50 mmol/Lの炭酸塩緩衝液pH 9.4中の100  $\mu\text{l}$ の抗体(吸光度は280 nmにて0.02)をウェルに分注し、続いて、16時間、4にて被覆した。次に、マイクロタイターは、0.05% Tween 20(PBS-T)を含むPBSで2回洗浄された。その後、20%の正常なウサギ血清pH 7.8を含む0.15 mLのPBSをウェルに分注し、未結合表面をブロッキングし、続いて、1時間、室温にてブロッキングした。最後に、マイクロタイターは、PBS-Tで2回洗浄された。抗体被覆されたプレート

50

を乾燥させ、使用するまでアルミニウムバッグ中に4℃にて維持した。

#### 【0318】

##### ビオチン標識

ビオチン標識は、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (製造番号21338、Thermo Scientific) について、製造業者の推奨に従って行った。要約すると、0.4 mLのPBS中の1 mgの抗体は、10 mMのSulfo-NHS-LC-LC-Biotinの0.013 mLと混合され、抗体とビオチンの初期のモル比は1:20であり、続いて、30分間、室温にてインキュベートされた。ビオチンをカップリングさせた抗体は、PBSで溶出されるPD-10カラム (GE Healthcare) を用いるゲル濾過によって精製され、未反応のビオチンを除いた。ビオチンの取り込みのレベルを決定するために、EZ Biotin定量キット (製造番号28005、Thermo Scientific) を用いた。ビオチン標識された抗体を使用するまで-80℃にて保存した。

10

#### 【0319】

##### 二工程イムノアッセイ

第一の反応について、40 µLの血漿または標準抗原および60 µLの50 mM HEPES緩衝液 (10% NRS、150 mmol/LのNaCl、10 mmol/LのEDTA-2Na、0.01% Tween 20 pH 7.5) (反応緩衝液) を抗体被覆ウェルに分注した。プレートを18時間、4℃にてインキュベートし、続いて、PBS-Tで5回洗浄した。第二の反応について反応緩衝液中の10 µg/mLのビオチン標識された抗体の100 µLを分注した。プレートを1時間、室温にてインキュベートし、続いてPBS-Tで5回洗浄した。100 µLの西洋ワサビペルオキシダーゼ標識されたストربتアビジン (Pierce) を分注した。室温にて30分のインキュベーション後、プレートをPBS-Tで5回洗浄した。最後に、発色について、100 µLのTMB溶液 (KPL) を分注し、15分間遮光して維持した。100 µLの1 NのHClの添加より発色を停止させた後、450 nmでの吸光度をプレートリーダーを用いて読み込んだ。全ての洗浄工程は、自動プレートウォッシャー (AMW-8、BioTec、日本) によって自動的に行われ、全てのEIA測定は2点測定で行われた。

20

#### 【0320】

図8は、捕捉抗体としてMOV18、および検出抗体としてビオチン化されたMORAb-003を用いたEIAアッセイを示す。

30

#### 【0321】

##### 2. EIA手法の最適化

上記EIA手法は、部分的には、この手法を最適化するために設計された以下の実験に基づいて達成された。

#### 【0322】

第一に、アビジン-HRP、ビオチン標識された抗体およびHRP標識された抗体を比較した。HRP標識された抗体と比較すると、ビオチン標識された抗体およびアビジン-HRPは、より高いシグナルを与えた；したがって、ビオチン標識された抗体とアビジン-HRPを採用した。

40

#### 【0323】

第二に、一工程および二工程のインキュベーション手法を比較した。図9に示されるように、二工程のインキュベーション手法は、より高いシグナルを与え、したがって採用された。

#### 【0324】

第三に、第二のインキュベーション時間を最適化するために、1から4時間のインキュベーション時間を比較した。結果は、1時間のインキュベーション時間は最大のシグナル対ノイズ比を与え、したがって、続いて、1時間のインキュベーション時間を採用した。

#### 【0325】

第四に、ビオチン標識された抗体の作業濃度、HRP標識された抗体の作業濃度および

50

試料体積を最適化するために、E I Aアッセイの上記の記載の通り、種々の濃度を採用した。最適値の濃度は上記される。

【0326】

[実施例10]

電気化学発光イムノアッセイ (ECLIA) および酵素イムノアッセイ (EIA) を用いたヒト血漿におけるFR $\alpha$ の比較

FR $\alpha$ のレベルは、実施例1と図1 (捕捉抗体としてMORAb-003および標識された検出抗体としてルテニウム (Ru) 標識されたMOV-18を用いる) に記載されている電気化学発光アッセイ (ECLIA) および実施例9と図8に記載されている酵素イムノアッセイ (EIA) を用いて、卵巣癌患者および健常な女性の対照から採取されたヒト血漿試料において測定された。両アッセイにおいて、40 $\mu$ Lの血漿をアッセイした。

【0327】

表16は、EIAとECLIAを用いて決定されるように、卵巣癌および正常な対照対象におけるFR $\alpha$ の血漿レベルを示す。

【0328】

【表17】

表16: EIA法およびECLIA法を用いて決定されたFR $\alpha$ の血漿濃度

群	試料#	FR $\alpha$ 濃度 (pg/mL)	
		EIA	ECLIA
卵巣癌	1	10	73
	2	<10	200
	3	56	286
	4	44	286
	5	353	1606
	6	83	494
健常な対照	7	110	127
	8	162	112
	9	88	252
	10	180	254
	11	262	471
	12	206	396

【0329】

ただ1つの例外を除いて、対象の全てについての結果は、EIAを用いて血清において検出されたFR $\alpha$ の濃度は、ECLIAを用いて検出されたレベルよりも低いことを示し、これは、EIAアッセイが、形式を合わせると、捕捉抗体 (MOV-18) および検出抗体 (MORAb-003) のこの特定の組み合わせを用いた場合、ECLIAアッセイほど感受性でないことを示す。したがって、他のタイプの抗体を用いたさらなる実験は、より感受性のあるEIA手法を開発するために実施された。

【0330】

[実施例11]

ヒト血漿におけるFR $\alpha$ のEIA測定のための異なるタイプの抗体の実施可能性

1. 抗体の組み合わせの予備実験

捕捉 / 検出抗体の種々の組み合わせを考慮した。予備実験は、表 17 に記載される結果を示した。

【 0 3 3 1 】

【 表 1 8 】

表17

		捕捉抗体							
		MORAB-003		MOV18		548908(R&D)		6D398	
ビオチン標識された検出抗体	003	ブランク	低い	ブランク	低い	ブランク	低い	ブランク	低い
		Std.	-	Std.	+++	Std.	++	Std.	++
		1-S	-	1-S	++	1-S	++	1-S	+
	MOV18	ブランク	低い	ブランク	高い	ブランク	高い	ブランク	高い
		Std.	+	Std.	-	Std.	-	Std.	-
		1-S	++	1-S	+++	1-S	++	1-S	+++
548908							ブランク	低い	
							Std.	-	
								1-S	++

10

【 0 3 3 2 】

20

2. 種々の抗体の組み合わせを用いた E I A アッセイの比較および E C L I A アッセイとの比較

卵巣癌患者および正常な健常女性の対照由来の血漿における F R のレベルは、捕捉抗体とビオチン標識された抗体の異なる組み合わせを用いた酵素免疫吸着法 ( E I A ) により測定され、 E C L I A アッセイを用いて測定された F R のレベルと比較された。

【 0 3 3 3 】

材料および方法

E C L I A 法は実施例 1 に記載され、図 1 ( 捕捉抗体として M O R A b - 0 0 3 抗体、および標識された検出抗体として M o v - 1 8 抗体を用いる ) に示される通りであった。 E I A 法は、捕捉 / 検出抗体の 3 つの異なる組み合わせを用いることを除いて、実施例 9 に記載され、図 1 0 に示される通りであった : M O V 1 8 / M O R A b - 0 0 3 、 5 4 8 9 0 8 / M O R A b - 0 0 3 および 6 D 3 9 8 / M O R A b - 0 0 3 。 抗体 5 4 8 9 0 8 と 6 D 3 9 8 は市販されている。 5 4 8 9 0 8 抗体は R & D S y s t e m ( N o r t h L a s V e g a s , N V ) から得られ、 6 D 3 9 8 抗体は U S B i o l o g i c a l ( S w a m p s c o t t , M A 0 1 9 0 7 ) から得られた。

30

【 0 3 3 4 】

結果

E I A 法および E C L I A 法を用いて決定された F R の濃度 ( p g / m L ) を図 1 8 に示す。さらに、捕捉 / 検出抗体の種々の組み合わせを用いた E I A によって決定された F R の濃度 ( p g / m l ) は、図 1 1 に図示されている。

40

【 0 3 3 5 】

## 【表 19】

表 18 : 捕捉抗体および検出抗体の種々の組み合わせによる E I A 法および E C L I A 法を用いて決定された F R  $\alpha$  の血漿濃度 ( p g / m L ) 。

群	試料#	EIA 548908- MORAb-003	EIA 6D398- MORAb-003	EIA MOV18- MORAb-003	ECLIA MOV18- MORAb-003
卵巣癌	1	176	2	10	217
	2	85	<0	-	165
	3	257	35	-	296
	4	117	42	44	322
	5	2048	370	353	1335
	6	447	63	83	390
正常対照	7	247	66	110	137
	8	213	110	162	185
	9	367	78	88	219
	10	364	152	180	228
	11	804	224	262	388
	12	473	194	206	318

10

20

## 【 0 3 3 6 】

表 18 におけるデータは、54908 - M O R A b - 0 0 3 の組み合わせを用いた E I A による F R レベルの測定は、E C L I A アッセイを用いて得られた結果と最も類似する結果を得ることを示す。定量的分析を行い、この観察を確認した。さらに、これらのデータは、F R の検出が抗体および採用された抗体の組み合わせに非常に依存することを示す。したがって、異なる抗体の組み合わせは、生物学的液体中の F R を決定するために使用され得る。さらに、E I A と E C L I A アッセイフォーマットから得られたデータは類似しているため、種々のアッセイフォーマットが F R の決定のために使用され得る。

30

## 【 0 3 3 7 】

E I A 法に使用された捕捉抗体および検出抗体の 3 つの組み合わせの各々について、回帰分析を行い、E I A により決定された F R の濃度 ( p g / m L ) は、E C L I A アッセイにより決定された濃度と相関していた。このアッセイの結果を図 19 および図 12 に示す。

## 【 0 3 3 8 】

## 【表 20】

表19：ECLIAによって測定されたFR $\alpha$ の血漿濃度と捕捉抗体および  
検出抗体の3つの組み合わせを用いたEIAによって測定された濃度の相関性

捕捉抗体－ 検出抗体	548098- MORAb-003	6D398- MORAb-003	MOV18- MORAB-003
r	0.960	0.781	0.715
傾き	1.595	0.285	0.223
切片	-87.06	-0.64	58.62

10

## 【0339】

548098 - MORAb - 003 捕捉 - 検出酌み交わせを用いたEIAについての結果はECLIAについての結果と非常に相関した ( $r = 0.96$ )。

## 【0340】

## [実施例12]

卵巣癌患者由来の試料におけるEIAとECLIAによって決定されたFR の血漿レベル

血清FR レベルの測定は、卵巣癌患者 ( $n = 17$ ) 群および正常対照 ( $n = 35$ ) 群において、ECLIAおよびEIAを用いて決定された。EIA測定について、548908 捕捉抗体 / MORAb - 003 検出抗体の組み合わせを採用した。EIA手法は、他には実施例9に記載される通りであった。ECLIA手法は、実施例1に記載される通りであった。結果を表20に示す。

20

## 【0341】

## 【表 2 1】

表 2 0 : E I A と E C L I A を用いて決定された卵巣癌患者および  
正常対照における血漿 F R  $\alpha$  濃度

群	試料#	EIA	ECLIA
		pg/mL	pg/mL
卵巣癌	1	245	217
	2	247	223
	3	194	229
	4	2613	1335
	5	154	153
	6	319	215
	7	516	390
	8	370	271
	9	933	449
	10	4768	4502
	11	385	266
	12	251	322
	13	404	349
	14	338	371
	15	4147	2344
	16	179	165
	17	380	296
対照	18	232	181
	19	372	173
	20	332	189
	21	380	203
	22	376	290
	23	406	217
	24	281	182
	25	348	191
	26	490	247
	27	253	137
	28	368	185
	29	338	195
	30	289	219
	31	338	206
	32	406	226
	33	365	228
	34	501	280
	35	806	388
	36	613	286
	37	380	250
	38	420	281
	39	393	280
	40	552	284

10

20

30

40

	41	664	318
	42	429	261
	43	499	286
	44	310	218
	45	281	217
	46	215	202
	47	293	217
	48	380	256
	49	270	195
	50	393	234
	51	425	308
	52	226	199

10

## 【0342】

図13は、EIAを用いて決定された卵巣癌を有する対象および正常な女性の対照対象における血漿FR濃度の分布を示す。

## 【0343】

表21は、EIAを用いて決定された卵巣癌および正常な女性の対照対象における血漿FR濃度についての要約記述統計量を示す。

20

## 【0344】

## 【表22】

表21：EIAを用いて決定される卵巣癌対象および正常な女性の対照対象におけるFR $\alpha$ 血漿濃度の概要

	FR $\alpha$ (pg/mL)	
	卵巣癌	正常な対照
<b>n</b>	<b>17</b>	<b>35</b>
平均	<b>967</b>	<b>389</b>
<b>SD</b>	<b>1438</b>	<b>126</b>
最大	<b>4768</b>	<b>806</b>
最小	<b>154</b>	<b>215</b>

30

## 【0345】

図14は、さらに、EIAとECLIAを用いて決定されたFR血漿濃度間の相関を示す。相関は高い( $r = 0.95$ )。

## 【0346】

40

## [実施例13]

電気化学発光イムノアッセイ(ECLIA)によって測定された肺癌患者および卵巣癌患者由来の合致した尿および血清試料におけるFRレベルの決定

FRレベルは、ECLIAを用いて、肺癌患者および卵巣癌患者由来の合致した尿および血清試料において決定され、試料は同じ患者から採取された。また、血清と尿のFRレベル間の相関を決定した。

## 【0347】

## 材料および方法

利用されたECLIA法は実施例1に記載される通りである。グアニジンは、実施例6に記載されるように、尿沈渣を可溶化するために用いられた。

50

【 0 3 4 8 】

結果

肺癌患者および卵巣癌患者由来の血清および尿の E C L I A アッセイの結果を表 2 2 に示す。

【 0 3 4 9 】

【表 2 3 】

表 2 2 : E C L I A によって決定されるように、肺癌患者および卵巣癌患者の合致した尿および血清試料における F R  $\alpha$  濃度

群	セット ID	血清	尿
		pg/mL	pg/mL
肺癌	1	146	2009
	2	153	4496
	3	206	-
	4	70	3562
	5	195	12381
	6	352	21873
	7	198	11296
	8	120	18570
	9	275	4455
	10	163	8662
	11	145	5294
	12	178	-
	13	165	1106
	14	187	7446
	15	168	11167
	16	217	24448
	17	142	6724
	18	177	14514
	19	236	822
	20	101	4826
	21	145	7723
	22	213	9887
	23	143	7422
	24	253	3376
	25	421	8045
卵巣癌	26	282	9414
	27	1605	7651
	28	240	13059
	29	695	10549

10

20

30

【 0 3 5 0 】

肺癌患者の血清および尿の F R レベルについての要約データを表 2 3 に示す。

【 0 3 5 1 】

## 【表 2 4】

表 2 3 : E C L I A によって決定された肺癌患者における合致した血清および尿試料における F R  $\alpha$  濃度についての要約統計量

肺癌	F R $\alpha$ (pg/mL)	
	血清	尿
n	25	23
平均	191	8700
SD	75	6291
最大	421	24448
最小	70	822

10

## 【 0 3 5 2】

卵巣癌患者の血清および尿の F R  $\alpha$  レベルについての要約データを表 2 4 に示す。

## 【 0 3 5 3】

## 【表 2 5】

表 2 4 : E C L I A によって決定された卵巣癌患者の合致した血清および尿試料における F R  $\alpha$  濃度についての要約統計量

20

卵巣癌	F R $\alpha$ (pg/mL)	
	血清	尿
n	4	4
平均	705	10168
SD	634	2266
最大	1605	13059
最小	240	7651

30

## 【 0 3 5 4】

図 1 5 は、同じ患者から採取された合致した血清および尿試料における F R  $\alpha$  レベルの E C L I A 測定値間の相関を示す。肺癌患者についての相関は  $r = 0.24$  (上段パネル) であり、卵巣癌患者についての相関は  $r = -0.76$  (下段パネル) であった。

## 【 0 3 5 5】

40

これらのデータは、特に肺癌患者について示されるように、尿対血清において測定された F R  $\alpha$  濃度間の相関の相対的欠失を示す。さらに、これらのデータは、F R  $\alpha$  が、肺癌患者対正常な対照の血清におけるバックグランドレベルを超えて基本的には検出できず、一方、F R  $\alpha$  はこれらの患者の尿において検出可能であることを示す。

## 【 0 3 5 6】

## [ 実施例 1 4 ]

卵巣癌を有する患者、肺癌を有する患者および正常な対照由来の血清試料における F R  $\alpha$  のレベルの評価

卵巣癌を有する患者、肺癌を有する患者および正常な対照の血清における F R  $\alpha$  レベルを評価した。血清の F R  $\alpha$  レベルは、捕捉 - 検出抗体の 2 種の対を用いて E C L I A によ

50

り評価された；対 1、ここでは 9 F 3 は捕捉駆体であり、2 4 F 1 2 は検出抗体であり、対 2、ここでは 2 6 B 3 は捕捉抗体であり、1 9 D 4 は検出抗体であった。

【0357】

FR 対は、全校正曲線および 1 : 4 に希釈された 1 9 6 個の個々の血清を用いて試験された。1つの実験において、1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  にて、2 6 B 3 はプレートロット上の CR 処理後の捕捉抗体 (75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+ B、+ T) として用いられ、1 9 D 4 は検出抗体として用いられた。別の実験において、1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  にて、9 F 3 は捕捉抗体として用いられ、2 4 F 1 2 は検出抗体として用いられた。各々は CR 処理 (ロット 1 0 0 7 0) され、標識対タンパク質比 (L/P) は 1 3 . 3 であった。希釈剤 1 0 0 (Meso Scale Discovery、Gaithersburg、Maryland) + ヒト抗マウス抗体 (HAMA) + mIgG を試料および校正について使用した。希釈剤 3 (Meso Scale Discovery、Gaithersburg、Maryland) を検出に使用した。

10

【0358】

以下のプロトコールを ECLIA のために使用した。試料を 5 0  $\mu\text{L}$  / ウェルにて添加した。試料を 2 時間振とうし、続いて、洗浄剤 Tween 20 を有するリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液 (PBST) を用いて洗浄した。検出抗体を 2 5  $\mu\text{L}$  / ウェルにて添加した。試料を 2 時間振とうし、PBST を用いて洗浄した。最後に、試料の電気化学発光 (ECL) の放出を 2 x MSD (登録商標) 緩衝液 T を用いて読み込んだ。

20

【0359】

結果を以下の表 2 5 に示す。

【0360】

【表 2 6】

表25:卵巣癌を有する患者、肺癌を有する患者および正常な対照の血清におけるFR $\alpha$ レベル

MSD 試料試験 番号	試料 タイプ	LLOQ <sup>1</sup> =1pg/ mL	LLOQ <sup>1</sup> =5pg/ mL	病期	グレード	性別	コメント
		FR $\alpha$ -対2 調節された バックファイ ット(backfit) 濃度 <sup>2</sup> (pg/mL)	FR $\alpha$ 対1 調節された バックファイ ット(backfit) 濃度 <sup>2</sup> (pg/mL)				
1	卵巣 血清	3760	3585	III	2	F	腺癌-卵巣
2	卵巣 血清	223	273	III	3	F	腺癌-卵巣
3	卵巣 血清	950	3346	IIIC		F	乳頭漿液性癌腫
4	卵巣 血清	3827	968	III	2	F	腺癌-卵巣
5	卵巣 血清	251	468	IV	2	F	腺癌-卵巣
6	卵巣 血清	199	328	IIIC	2	F	嚢胞腺癌
7	卵巣 血清	166	257	IC	2	F	嚢胞腺癌
8	卵巣 血清	182	248	IIIC	2	F	嚢胞腺癌

9	卵巣血清	155	6%	265	2%	IIIC	2	F	嚢胞腺癌
10	卵巣血清	145	9%	253	5%	IIIC	2	F	嚢胞腺癌
11	卵巣血清	142	5%	186	1%	IIB	1	F	漿液性腺癌
12	卵巣血清	299	5%	456	2%	IB	3	F	漿液性腺癌
13	卵巣血清	315	0%	768	8%	IIIB	高いグレード	F	卵巣の漿液性嚢胞腺癌
14	卵巣血清	168	6%	351	1%	I	高いグレード	F	卵巣の漿液性嚢胞腺癌
15	卵巣血清	187	8%	263	1%	I	十分から中程度の分化	F	卵巣の乳頭漿液性嚢胞腺癌
16	卵巣血清	423	3%	229	5%	IA	低分化	F	卵巣のムチン性嚢胞腺癌
17	卵巣血清	86	7%	289	1%	I	中程度の分化	F	卵巣の乳頭嚢胞腺癌
18	卵巣血清	57	3%	255	1%	I	十分な分化	F	卵巣のムチン性嚢胞腺癌
19	卵巣血清	108	1%	393	1%	III	中程度の分化	F	卵巣の乳頭ムチン性嚢胞腺癌
20	卵巣血清	207	3%	328	1%	不明	低分化	F	卵巣の乳頭嚢胞腺癌
21	卵巣血清	66	0%	254	1%	不明	高いグレード	F	卵巣の腺癌

22	卵巣血清	108	2%	197	2%	III	低いグレード	F	卵巣の乳頭嚢胞腺癌
23	卵巣血清	201	2%	457	1%	II	高いグレード	F	卵巣の乳頭漿液性嚢胞腺癌
24	卵巣血清	477	1%	808	11%	III	高いグレード	F	卵巣の漿液性嚢胞腺癌
25	卵巣血清	423	3%	613	3%	n/a	n/a	F	移行細胞癌腫
26	卵巣血清	249	8%	432	1%	n/a	2	F	卵巣癌腫-類内膜型
27	卵巣血清	152	7%	235	2%	IV	2	F	卵巣癌腫-漿液性乳頭型
28	卵巣血清	1409	5%	1287	3%	IIIC	3	F	卵巣癌腫-漿液型
29	卵巣血清	443	2%	547	2%	IIIC	2	F	卵巣癌腫-漿液性乳頭型
30	卵巣血清	208	1%	298	13%	IA	1	F	卵巣癌腫-漿液型
31	卵巣血清	114	9%	344	1%	IIIB	2	F	卵巣癌腫-漿液性乳頭型
32	卵巣血清	223	4%	157	133%	IIIC	1	F	卵巣癌腫-漿液性乳頭型
33	卵巣血清	5034	1%	4405	1%	IIIC	3	F	移行細胞癌腫
34	卵巣血清	32966	6%	23228	4%	IV	n/a	F	卵巣癌腫-漿液性乳頭型

35	卵巣 血清	94	6%	188	3%	n/a	3	F	明細胞腺癌
36	卵巣 血清	866	6%	1317	1%	IIIC	3	F	低分化の腺癌
37	卵巣 血清	2916	8%	3121	0%	IV	3	F	卵巣癌腫-漿液性乳頭型
38	卵巣 血清	679	4%	1037	17%	IV	3	F	卵巣癌腫-漿液型
39	卵巣 血清	294	8%	478	3%	IIIC	3	F	卵巣癌腫-漿液性乳頭型
40	卵巣 血清	2037	4%	12	74%	IIIC	3	F	卵巣癌腫-漿液型
41	卵巣 血清	16289	6%	10431	3%	IIIC	2	F	卵巣癌腫-漿液性乳頭型
42	卵巣 血清	386	6%	736	6%	n/a	3	F	卵巣癌腫-漿液性乳頭型
43	卵巣 血清	1474	6%	2382	3%	IIIC		F	骨盤の乳頭漿液性嚢胞腺癌
44	卵巣 血清	169	2%	438	1%	I	3	F	卵巣の腺癌
45	卵巣 血清	257	4%	635	10%	I	高いグレード	F	卵巣の腺癌
46	卵巣 血清	184	6%	393	0%	IIIC	低分化	F	卵巣の腺癌
47	卵巣 血清	251	6%	659	1%	IIA	2	F	卵巣の腺癌

48	卵巣血清	165	2%	394	7%	I	2	F	卵巣の腺癌
49	卵巣血清	64	7%	245	6%	IIIB	未分化	F	卵巣の漿液性嚢胞腺癌
50	卵巣血清	90	3%	203	3%	IIIC		F	漿液性腺癌nos
51	卵巣血清	167	3%	376	11%	IIIC	高いグレード	F	漿液性乳頭腺癌nos
52	卵巣血清	112	4%	260	5%	IIIC	高いグレード	F	漿液性腺癌nos
53	卵巣血清	198	2%	340	6%	IV	高いグレード	F	漿液性嚢胞腺癌nos
54	卵巣血清	134	3%	363	6%	I	中程度の分化	F	卵巣の乳頭ムチン性嚢胞腺癌
55	卵巣血清	118	5%	304	10%	IB	高いグレード	F	卵巣の乳頭漿液性嚢胞腺癌
56	卵巣血清	107	1%	326	4%	IIIB	高いグレード	F	卵巣の乳頭漿液性嚢胞腺癌
57	卵巣血清	728	1%	1670	2%	IIIB		F	卵巣の乳頭漿液性嚢胞腺癌
58	卵巣血清	2138	1%	3257	2%	IIIC		F	卵巣の乳頭腺癌
59	卵巣血清	167	4%	410	1%	III		F	卵巣の乳頭漿液性嚢胞腺癌
60	卵巣血清	3054	4%	3285	14%	IIIC	高いグレード	F	卵巣の漿液性癌腫

61	卵巣 血清	97	3%	215	0%	IIIB	高いグレード 中程度から低い 分化	F	卵巣の乳頭漿液性嚢胞腺癌
63	肺 血清	61	3%	366	10%	IA		M	肺の腺癌
64	肺 血清	106	1%	319	4%	IB		M	肺の腺癌
65	肺 血清	49	2%	257	1%	IB	中程度の分化	M	肺の腺癌
66	肺 血清	75	2%	301	2%	II	3	M	腺癌
67	肺 血清	79	3%	283	8%	II	2	M	腺癌
68	肺 血清	145	2%	492	0%	II	2	F	腺癌
69	肺 血清	142	2%	367	6%	IV	n/a	F	腺癌
70	肺 血清	103	2%	231	7%	IV	n/a	F	腺癌
71	肺 血清	153	1%	311	3%	IIIB	n/a	F	腺癌
72	肺 血清	54	3%	124	6%	IIIA	不明	M	大固形細胞癌腫
73	肺 血清	183	3%	391	10%	IIIB	不明	F	腺癌
74	肺 血清	91	2%	199	7%	不明	3	M	低分化の非角化扁平上皮癌腫

75	肺 血清	89	7%	221	2%	IIIB	3	F	低分化の腺癌
76	肺 血清	139	1%	330	1%	IA	2	F	中程度分化の腺癌
77	肺 血清	197	3%	452	7%	IIIA	2	F	中程度分化の腺癌
78	肺 血清	52	3%	183	5%	IIIA	n/a	F	多形癌腫
79	肺 血清	80	3%	249	8%	IIIA	n/a	M	多形癌腫
80	肺 血清	72	1%	158	7%	IIIA	2	F	中程度分化の腺癌
81	肺 血清	130	12%	221	1%	IA	3	M	大固形細胞癌腫
82	肺 血清	81	6%	155	1%	IB	不明	M	大固形細胞癌腫
83	肺 血清	127	4%	278	3%	IIIB	不明	F	大固形細胞癌腫
84	肺 血清	129	3%	240	2%	不明	不明	F	大固形細胞癌腫
85	肺 血清	135	2%	231	7%	IIIB	2	M	中程度分化の腺癌
86	肺 血清	235	1%	330	0%	IV	2	M	腺癌
87	肺 血清	243	5%	396	2%	IV	3	F	低分化の腺癌

88	肺 血清	204	3%	572	6%	IA	中程度の分化	F	肺の扁平上皮癌腫
89	肺 血清	54	9%	214	4%	IB	中程度の分化	M	肺の腺癌
90	肺 血清	116	7%	270	0%	IB	中程度の分化	F	肺のムチン性腺癌
91	肺 血清	117	3%	292	5%	IIA	中程度の分化	M	肺の腺癌
92	肺 血清	248	1%	578	2%	不明	中程度の分化	M	肺の腺癌
93	肺 血清	86	2%	300	9%	IB	低分化	M	肺の腺癌
94	肺 血清	33	6%	117	5%	IIIA	中程度から低い 分化	M	肺の腺癌
95	肺 血清	36	3%	196	3%	IIIA	低分化	M	肺の腺癌
96	肺 血清	237	3%	722	4%	IB	十分な分化	M	肺の腺癌
97	肺 血清	82	9%	286	2%	IB	低分化	M	肺の腺癌
98	肺 血清	112	1%	431	0%	IB	十分から中程度 の分化	F	肺の腺癌
99	肺 血清	137	5%	379	0%	IA	中程度の分化	F	肺の肺胞性腺癌
100	肺 血清	65	2%	181	9%	IA	中程度から低い 分化	M	肺の腺癌

	肺 血清	119	6%	280	4%	IB		M	肺の腺癌
101	正常血清	119	6%	280	4%			M	
102	正常血清	187	6%	391	2%			F	
103	正常血清	337	4%	560	6%			F	
104	正常血清	203	4%	405	3%			F	
105	正常血清	97	3%	311	2%			F	
106	正常血清	210	11%	393	6%			F	
107	正常血清	135	9%	271	6%			M	
108	正常血清	145	2%	225	3%			F	
109	正常血清	182	4%	257	5%			M	
110	正常血清	186	5%	297	2%			M	
111	正常血清	129	8%	197	4%			M	
112	正常血清	133	4%	254	4%			M	
113	正常血清	136	1%	298	9%			M	

10

20

30

40

114	正常血清	189	3%	321	1%			M	
115	正常血清	167	1%	257	6%			M	
116	正常血清	159	1%	315	1%			M	
117	正常血清	166	3%	270	1%			M	
118	正常血清	197	2%	339	0%			M	
119	正常血清	148	1%	389	4%			M	
120	正常血清	198	4%	833	9%			M	
121	正常血清	101	3%	137	0%			M	
122	正常血清	111	8%	266	1%			M	
123	正常血清	96	0%	172	2%			M	
124	正常血清	224	1%	249	7%			M	
125	正常血清	203	8%	312	1%			M	
126	正常血清	277	10%	388	5%			M	

10

20

30

40

127	正常血清	191	4%	272	4%			F	
128	正常血清	206	4%	297	3%			F	
129	正常血清	204	15%	194	3%			F	
130	正常血清	156	1%	106	2%			F	
131	正常血清	177	3%	195	3%			F	
132	正常血清	109	0%	148	5%			M	
134	正常血清	116	1%	281	1%			F	
135	正常血清	182	7%	250	6%			M	
136	正常血清	324	2%	475	7%			F	
137	正常血清	122	18%	191	1%			F	
138	正常血清	135	7%	185	1%			F	
139	正常血清	264	4%	372	2%			F	
140	正常血清	105	4%	188	5%			M	

10

20

30

40

141	正常血清	374	0%	649	0%				M	
142	正常血清	93	7%	162	7%				M	
143	正常血清	143	7%	326	4%				F	
144	正常血清	108	3%	202	2%				F	
145	正常血清	153	8%	341	3%				F	
146	正常血清	448	8%	400	5%				F	
147	正常血清	109	4%	196	3%				F	
148	正常血清	142	6%	218	1%				F	
149	正常血清	174	4%	309	9%				F	
150	正常血清	185	5%	270	2%				F	
151	正常血清	180	3%	241	0%				M	
152	正常血清	125	5%	314	4%				F	
153	正常血清	270	0%	449	2%				F	

10

20

30

40

154	正常血清	127	9%	232	1%			M	
155	正常血清	251	3%	415	6%			F	
156	正常血清	121	1%	349	0%			M	
157	正常血清	137	8%	223	0%			M	
158	正常血清	77	3%	173	6%			M	
159	正常血清	143	4%	223	7%			F	
160	正常血清	121	5%	411	8%			M	
161	正常血清	99	8%	199	3%			F	
162	正常血清	158	2%	236	0%			F	
163	正常血清	138	7%	235	3%			F	
164	正常血清	175	18%	290	2%			F	
165	正常血清	339	4%	589	8%			M	
166	正常血清	155	4%	372	1%			F	

10

20

30

40

167	正常血清	166	0%	278	1%			M	
168	正常血清	231	7%	377	3%			M	
169	正常血清	148	10%	255	3%			F	
170	正常血清	172	2%	312	4%			M	
171	正常血清	146	6%	344	1%			M	
172	正常血清	158	3%	306	4%			M	
173	正常血清	145	2%	274	6%			F	
174	正常血清	163	12%	279	1%			M	
175	正常血清	83	5%	196	0%			M	
176	正常血清	102	7%	282	5%			M	
177	正常血清	140	3%	330	6%			M	
178	正常血清	174	9%	277	15%			F	
179	正常血清	295	3%	281	8%			M	

10

20

30

40

180	正常血清	67	4%	308	13%			F	
181	正常血清	115	3%	324	0%			F	
182	正常血清	128	5%	287	0%			F	
183	正常血清	128	1%	112	79%			M	
184	正常血清	76	3%	147	53%			F	
185	正常血清	264	7%	377	4%			F	
186	正常血清	146	13%	258	3%			M	
187	正常血清	132	0%	264	1%			F	
188	正常血清	92	4%	249	1%			M	
189	正常血清	89	11%	251	4%			F	
190	正常血清	135	5%	268	4%			M	
191	正常血清	177	4%	394	3%			F	
192	正常血清	184	8%	367	2%			F	

10

20

30

40

<b>193</b>	正常血清	156	3%	387	5%			F	
<b>194</b>	正常血清	118	8%	275	4%			M	
<b>195</b>	正常血清	74	7%	217	6%			M	
<b>196</b>	正常血清	185	8%	373	5%			F	
<b>197</b>	正常血清	159	3%	378	2%			F	
<b>198</b>	正常血清	94	2%	245	1%			F	

<sup>1</sup>LLOQは定量の下限である。

<sup>2</sup>調節されたバックフィット濃度は試料希釈を考慮するために調節される。

10

20

30

40

50

前述のデータに基づいて、9F3、2412、26B3および19D4抗体は、対象由来の生物学的試料、例えば血清におけるFR のレベルの検出に有用であった。さらに、(i) 捕捉抗体としての9F3および検出抗体としての24F12、および(ii) 捕捉抗体としての26B3および検出抗体としての19D4の特定の組み合わせは、生物学的試料においてFR のレベルを評価することができ、特に有効であった。

#### 【0362】

##### [実施例15]

3種の検出抗体および捕捉抗体の対を用いた尿におけるFR のレベルの評価  
尿試料におけるFR のレベルの検出における3つの抗FR 抗体対の能力を評価した。用いられた抗体対は以下の通りであった：(1) 検出抗体として26B3および捕捉抗体として9F3、および(2) 検出抗体として24F12および捕捉抗体として9F3。

10

#### 【0363】

##### 方法

2つの抗体対は、完全な較正曲線、および6Mグアニジン、3MグアニジンまたはPBS対照のいずれかにおいて、2分間、1:1希釈で前処理された尿を用いて試験された。以下の尿試料を試験した：1:80に希釈された3つのヒト尿プール、および1:80に希釈された5つのヒトの個々の尿(男性1人、女性4人)。

#### 【0364】

プレートは、150 $\mu$ g/mL、+B、+Tにて、4spot STD((Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland))上にバイオドット(Biodot)し、ウェルあたり1捕捉であった。検出は1 $\mu$ g/mLで行った。希釈剤100+HAMA+mIgGを試料および較正に用いた。希釈剤3を検出に用いた。希釈剤は、Meso Scale Discoveryから得られる市販の希釈剤であった。

20

#### 【0365】

以下のプロトコールをECLIAに用いた。試料を50 $\mu$ L/ウェルにて添加した。試料を2時間振とうした。試料は、洗浄剤Tween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)溶液(PBST)で洗浄された。検出抗体を25 $\mu$ L/ウェルにて添加した。試料を2時間振とうし、続いて、PBSTで洗浄した。試料の電気化学発光(ECL)の放出を2 $\times$ MSD緩衝液Tを用いて読み込んだ。

30

#### 【0366】

これらの実験の結果を表26から27に示す。

#### 【0367】

【表 27】

表26:検出抗体として26B3および捕捉抗体として9F3を用いた尿におけるFR $\alpha$  レベルの検出

検出	26B3							
捕捉	9F3							
	6Mグアニジン			3Mグアニジン			PBS対照	
サンプルID	調節されたバックフィット濃度 pg/mL	%CV	対照の%	調節されたバックフィット濃度 pg/mL	%CV	対照の%	調節されたバックフィット濃度 pg/mL	%CV
尿プール1	13,252	2%	114%	14,505	10%	124%	11,655	17%
尿プール2	14,827	5%	133%	17,039	4%	152%	11,187	5%
尿プール3	11,280	5%	119%	9,065	10%	96%	9,479	9%
尿個々1	1,747	3%	99%	1,754	6%	100%	1,760	12%
尿個々2	40,505	7%	145%	46,622	5%	167%	27,920	13%
尿個々3	1,623	1%	117%	1,496	5%	108%	1,381	4%
尿個々4	12,091	2%	86%	14,941	5%	107%	13,996	13%
尿個々5	22,829	2%	128%	24,607	8%	137%	17,899	5%
	平均	3%	<u>118%</u>	平均	7%	<b>124%</b>	平均	10%
					6M条件との差	<u>6%</u>		

10

20

【0368】

【表 28】

表28:検出抗体として26B3および捕捉抗体として9F3を用いた尿におけるFR $\alpha$  レベルの検出

検出	26B3					
捕捉	9F3					
	3Mグアニジン			PBS対照		
サンプルID	調節されたバックフィット濃度 pg/mL	%CV	対照の%	調節されたバックフィット濃度 pg/mL	%CV	
尿個々2	33,824	4%	98%	34,569	2%	
尿個々3	2,086	4%	99%	2,107	3%	
尿個々4	15,283	5%	97%	15,696	2%	
尿個々5	24,955	4%	92%	26,991	3%	
	平均	4%	<u>97%</u>	平均	3%	

30

40

【0369】

前述のデータに基づいて、9F3、24F12、26B3および19D4抗体は、対象由来の生物学的試料におけるFR $\alpha$  のレベルの検出に有用であった。さらに、(1)検出抗体としての26B3および捕捉抗体としての9F3、および(2)検出抗体としての2

50

4 F 1 2 および捕捉抗体としての 9 F 3 の組み合わせは、生物学的試料において F R のレベルを評価することができ、特に有効であった。

【 0 3 7 0 】

実験の第二セットは、上記のプロトコールに従い、同じ 2 対の抗体を用い、1 : 8 0 に希釈した 4 人の女性のヒトの個々の尿を用いて行われた。尿は、3 M グアニジンまたは P B S 対照のいずれかにおいて 2 分間、1 : 1 希釈で前処理された。結果を表 2 8 から 2 9 に示す。

【 0 3 7 1 】

【表 2 9】

表29:検出抗体として24F12および捕捉抗体として9F3を用いた尿におけるFR $\alpha$ レベルの検出

検出	24F12				
捕捉	9F3				
	3Mグアニジン			PBS対照	
サンプルID	調節されたバック フィット濃度 pg/mL	%CV	対照の%	調節されたバック フィット濃度 pg/mL	%CV
尿個々2	38,455	4%	106%	36,414	6%
尿個々3	2,447	2%	109%	2,250	2%
尿個々4	15,303	3%	81%	18,964	8%
尿個々5	27,216	0%	95%	28,651	5%
	平均	2%	<u>98%</u>	平均	5%

【 0 3 7 2 】

【表 3 0】

表29:検出抗体として24F12および捕捉抗体として9F3を用いた尿におけるFR $\alpha$ レベルの検出

検出	24F12				
捕捉	9F3				
	3Mグアニジン			PBS対照	
サンプルID	調節されたバックフ ィット濃度 pg/mL	%CV	対照の%	調節されたバックフ ィット濃度 pg/mL	%CV
尿個々2	38,455	4%	106%	36,414	6%
尿個々3	2,447	2%	109%	2,250	2%
尿個々4	15,303	3%	81%	18,964	8%
尿個々5	27,216	0%	95%	28,651	5%
	平均	2%	<u>98%</u>	平均	5%

【 0 3 7 3 】

この第二セットの実験の結果は、第一セットの実験の結果をさらに確認し、細胞に結合しない F R のレベルが、例えば、尿において、E C L I A アッセイなどのアッセイを用い、2 6 B 3、9 F 3、2 4 F 1 2 抗体を用いて、確実に評価され得ることを示す。さらに、結果は、このようなアッセイが、F R に結合する検出抗体と捕捉抗体の対(例えば、検出抗体として 2 6 B 3 と捕捉抗体として 9 F 3、および検出抗体として 2 4 F 1 2 と捕捉抗体として 9 F 3)を用いて F R を効果的に検出することができることを示す。

【 0 3 7 4 】

[ 実施例 1 6 ]

血清および血漿における F R のレベルの評価

F R のレベルは、別々の 2 日に血清および血漿の試料において評価された。試料の由来の対象は、正常な対象または卵巣癌または肺癌を有する患者のいずれかであった。

【 0 3 7 5 】

F R レベルを評価するためのプロトコールは、上記の実施例 1 4 に記載のものと同じであった。また、F R レベルを評価するための用いられた抗体の対は実施例 1 4 と同じであった。すなわち、対 1、ここでは 9 F 3 は捕捉駆体であり、2 4 F 1 2 は検出抗体であり、対 2、ここでは 2 6 B 3 は捕捉抗体であり、1 9 D 4 は検出抗体であった。

10

【 0 3 7 6 】

結果を表 3 0 に示す。

【 0 3 7 7 】

【表 3 1】

表30:異なる日に血清および血漿試料において評価されたFR $\alpha$ のレベル

ドナーID	疾患	生物学的試料確認された診断	病期	第1日 FR $\alpha$ / 対1 血清 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対1 血清 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対1 血漿 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対1 血漿 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対2 血清 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対2 血清 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対2 血漿 (pg/mL)	第2日 FR $\alpha$ / 対2 血漿 (pg/mL)
17168	卵巣	血清FRA-対1対2	I	1236	1282	1466	1183	1298	1384	1410	1336
46464	卵巣	漿液性癌腫	IIIC	1589	1848	2027	2147	1966	2018	2066	2210
47219	卵巣	腺癌	不明	447	432	1208	748	435	446	695	577
47721	卵巣	乳頭漿液性嚢胞腺癌	IIIB	1307	1400	2291	2100	1642	1479	1940	1807
48185	卵巣	腺癌	不明	1058	1038	883	652	918	872	811	781
48254	卵巣	腺癌	IIIC	511	495	3030	2569	506	445	1332	1370
48258	卵巣	腺癌	不明	471	552	1978	1070	629	547	978	798
48282	卵巣	腺癌	不明	375	388	688	536	446	407	540	428
48698	卵巣	癌腫、未分化	IIIB	279	231	308	225	340	255	328	228
49028	卵巣	漿液性癌腫	IIIC	727	590	158	169	468	526	192	192
49030	卵巣	漿液性癌腫	IIIC	215	205	695	485	362	291	734	590
49033	卵巣	漿液性嚢胞腺癌	IIIC	579	457	805	717	511	451	629	668
49071	卵巣	漿液性嚢胞腺癌	IV	335	338	1884	1462	559	457	1224	1028
49092	卵巣	乳頭嚢胞腺癌	不明	272	228	1235	615	399	334	678	535
49258	卵巣	乳頭漿液性嚢胞腺癌	IIIB	201	190	343	142	328	253	368	244
49335	卵巣	漿液性嚢胞腺癌	IIIB	1904	1698	1560	1485	1879	1503	1868	1627
49369	卵巣	漿液性癌腫	IIIC	2451	2805	2589	2641	3402	2659	2898	2605
49551	卵巣	漿液性癌腫	III	408	385	364	342	505	432	436	418
50009	卵巣	漿液性癌腫	IIIC	2887	4127	2641	3811	4466	3914	3533	3519

10

20

30

40

ドナーID	疾患	生物学的試料確認された診断	病期	第1日 FR $\alpha$ / 対1 血清 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対1 血清 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対1 血漿 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対1 血漿 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対2 血清 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対2 血清 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対2 血漿 (pg/mL)	第2日 FR $\alpha$ / 対2 血漿 (pg/mL)
50370	卵巣	漿液性嚢胞腺癌	IIIB	619	570	788	611	813	762	708	758
50378	卵巣	乳頭漿液性嚢胞腺癌	I	410	387	330	256	388	464	381	387
50460	卵巣	乳頭漿液性嚢胞腺癌	IIIB	254	274	688	414	284	272	489	420
50467	卵巣	明細胞腺癌	I	427	314	414	300	272	313	292	309
50635	卵巣	漿液性嚢胞腺癌	IA	247	227	462	367	355	345	392	392
51503	卵巣	乳頭嚢胞腺癌	I	291	250	925	651	315	326	818	498
51504	卵巣	ム子ン性嚢胞腺腫、境界悪性腫瘍	I	224	184	2438	1395	225	240	916	856
51506	卵巣	乳頭ム子ン性嚢胞腺癌	III	270	258	713	324	335	384	457	424
52949	卵巣	腺癌	不明	446	436	288	257	435	483	395	390
52952	卵巣	乳頭漿液性嚢胞腺癌	不明	480	415	451	376	310	351	299	321
52957	卵巣	乳頭漿液性嚢胞腺癌	III	373	334	274	221	318	374	303	330
52978	卵巣	乳頭ム子ン性嚢胞腺癌	II	348	318	533	429	525	559	596	624
52980	卵巣	漿液性嚢胞腺癌	III	627	630	1447	1019	834	905	964	996
DLSN-057	正常			309	402	413	394	515	527	509	531
DLSN-056	正常			273	254	483	498	480	458	522	524
DLSN-052	正常			282	289	293	298	446	483	438	401
DLSN-049	正常			282	256	351	320	363	394	430	359
DLSN-048	正常			362	399	454	434	746	722	824	639
DLSN-047	正常			188	176	208	167	275	263	251	212
DLSN-046	正常			295	321	276	240	354	310	315	257
DLSN-045	正常			259	259	259	189	292	279	273	235
DLSN-044	正常			244	236	246	254	284	273	284	271

ドナーID	疾患	生物学的試料確認された診断	病期	第1日 FR $\alpha$ / 対1 血清 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対1 血清 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対1 血漿 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対1 血漿 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対2 血清 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対2 血清 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対2 血漿 (pg/mL)	第2日 FR $\alpha$ / 対2 血漿 (pg/mL)
DLSN-042	正常			245	199	210	185	328	301	285	258
DLSN-040	正常			392	376	408	406	481	499	502	413
DLSN-039	正常			463	470	469	446	617	599	567	528
DLSN-037	正常			256	231	256	223	367	338	351	289
DLSN-029	正常			285	270	348	337	453	417	418	351
DLSN-023	正常			265	254	286	298	458	402	370	386
DLSN-020	正常			237	238	311	287	530	496	504	446
DLSN-011	正常			344	328	210	207	688	603	297	267
DLSN-039	正常			196	178	204	183	259	219	242	248
DLSN-047	正常				336		385		489		429
DLSN-052	正常				226		208		346		315
DLSL-012	肺				340		220		529		375
DLSL-015	肺				199		180		236		292
DLSL-023	肺				581		347		568		523
DLSL-031	肺				400		251		415		343
DLSL-034	肺				133		138		299		331
1	肺				238		339		462		460
3	肺				120		185		203		334
6	肺				295		1646		431		868
18	肺				328		288		466		418
18639	肺				124		333		128		216
18640	肺				246		275		221		221

ドナーID	疾患	生物学的試料確認された診断	病期	第1日 FR $\alpha$ / 対1 血清 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対1 血清 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対1 血漿 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対1 血漿 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対2 血清 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対2 血清 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対2 血漿 (pg/mL)	第2日 FR $\alpha$ / 対2 血漿 (pg/mL)
50666	肺				372		357		405		338
2	肺				214		327		274		269
4	肺				347		625		526		575
7	肺				224		308		421		452
12	肺				409		424		778		725
13	肺				509		590		1251		1360
14	肺				250		250		409		357
15	肺				502		466		606		594
16	肺				153		274		246		275
19	肺				357		905		428		576
DLS4-0002	肺				234		245		410		347
DLS4-0004	肺				472		520		507		538
DLSO-007	卵巣				389		593		574		544
DLSO-008	卵巣				175		295		386		364
DLSO-009	卵巣				232		331		299		349
DLSO-014	卵巣				265		300		430		467
DLSO-020	卵巣				536		261		453		389
DLSO-026	卵巣										
DLSO-027	卵巣				290		140		269		218
DLSO-028	卵巣				357		207		397		18
DLSO-029	卵巣				412		236		369		361
DLSO-030	卵巣				387		498		595		616

ドナーID	疾患	生物学的試料確認された診断	病期	第1日 FR $\alpha$ / 対1 血清 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対1 血清 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対1 血漿 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対1 血漿 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対2 血清 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対2 血清 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対2 血漿 (pg/mL)	第2日 FR $\alpha$ / 対2 血漿 (pg/mL)
DLSO-031	卵巣				348		496		353		413
DLSO-034	卵巣				197		222		308		346
DLSO-035	卵巣				144		540		298		587
DLSO-023	卵巣				404		216		423		337
DLSO-025	卵巣				306		156		301		272
DLSO-026	卵巣				231		293		406		378
DLSO-032	卵巣				151		190		240		255
DLSO-018	卵巣				155		340		303		343
DLSO-019	卵巣				350		330				
DLSO-021	卵巣				359		365		346		434
DLSO-024	卵巣				260		140		338		318
10001627	卵巣				1481		1396		1583		1655
11025393	卵巣				5241		4069		4998		5486
11025394	卵巣				473		371		488		518
110025395	卵巣				3215		2920		3466		4043
110025397	卵巣				109		145		245		232
110025398	卵巣				476		497		613		543
110025399	卵巣				166		145		234		229
110025402	卵巣				219		221		389		357
110025403	卵巣				7529		6990		13033		11888
110025405	卵巣				510		508		836		835
5	卵巣				164		328		252		375

ドナーID	疾患	生物学的試料確認された診断	病期	第1日 FR $\alpha$ / 対1 血清 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対1 血清 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対1 血漿 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対1 血漿 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対2 血清 (pg/ml)	第2日 FR $\alpha$ / 対2 血清 (pg/ml)	第1日 FR $\alpha$ / 対2 血漿 (pg/mL)	第2日 FR $\alpha$ / 対2 血漿 (pg/mL)
8	卵巣				251		709		473		573
9	卵巣				249		743		482		561
10	卵巣				288		569		412		446
11	卵巣				180		417		310		397
17	卵巣				296		760		342		628
110025392	卵巣				1094		2210		907		1294

10

20

30

40

50

前述のデータに基づいて、9F3、2412、26B3および19D4抗体は、対象由来の生物学的試料、例えば血清または血漿におけるFR のレベルの検出に有用であった。さらに、(i) 捕捉抗体としての9F3および検出抗体としての24F12、および(ii) 捕捉抗体としての26B3および検出抗体としての19D4の特定の組み合わせは、生物学的試料においてFR のレベルを評価することができ、特に有効であった。

【0379】

対1と対2の両方を用いて行われたアッセイについて、血清と血漿のFR レベルの間に高い相関があった。図16は、対1を用いて行われたアッセイについて、血清対血漿のFR レベルにおいて相関を示す(実施例16参照)。R<sup>2</sup>値は0.8604であった。図17は、対2を用いて行われたアッセイについて、血清対血漿のFR レベルにおいて相関を示す(実施例16参照)。R<sup>2</sup>値は0.9766であった。

10

【0380】

血清と血漿の試料の両方について、対1と対2を用いて測定されたFR レベル間に高い相関があった。図18は、対1対対2を用いて行われたアッセイについて血清FR レベルにおいて相関を示す(実施例16参照)。R<sup>2</sup>値は0.9028であった。図19は、対1対対2を用いて行われたアッセイについて血漿FR レベルにおいて相関を示す(実施例16参照)。R<sup>2</sup>値は0.8773であった。

【0381】

また、結果は、異なる日で測定されたFR レベル間に高い相関があることを示した。図20は、対2を用いて行われたアッセイについて、血清FR レベルにおいて日間の相関を示す。R<sup>2</sup>値は0.9839であった。

20

【0382】

均等物

当業者は、本明細書に記載されている本発明の特定の実施形態の多数の均等物を認識し、またはたかが日常的な実験を用いてそれを確認することができる。このような均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。従属請求項に開示された実施形態のいずれかの組み合わせは、本発明の範囲内にあることが意図される。

【0383】

【表 3 2】

表 3 3 : 配列

配列番号	説明	配列
1	MORAB-003 CDRH1	GFTFSGYGLS
2	MORAB-003 CDRH2	MISSGGSYTYADSVKG
3	MORAB-003 CDRH3	HGDDPAWFAY
4	MORAB-003 CDRL1	SVSSSISSNNLH
5	MORAB-003 CDRL2	GTSNLAS
6	MORAB-003 CDRL3	QQWSSYPYMYT
7	MORAb-003 重鎖成熟 ポリペプチド アミノ酸配列	1 EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCSASGFTFS GYGLSWVRQA PGKGLEWVAM 51 ISSGGSYTY ADSEVKGRFAI SRD <del>NA</del> KNTLF LQMSL <del>LR</del> PED TGVYFCARHG 101 DDP <del>AW</del> FAYWG QGTPVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP <del>AV</del> LQSSG LYSLS <del>SV</del> TV PSSSLG <del>T</del> QTY 201 ICNVN <del>HK</del> PSN TKVDK <del>VE</del> PK SCDK <del>TH</del> CPP CPAP <del>EL</del> LGGP SVFLF <del>PP</del> KPK 251 DILMISRTPE VTCV <del>VD</del> VSH EDPEV <del>KFN</del> WY VDGVE <del>VHN</del> AK TKPREEQYNS 301 TYRV <del>SV</del> LTIV L <del>HQD</del> WLN <del>KE</del> YKCR <del>VSN</del> KAL PA <del>PIE</del> KTISK AKGQ <del>PRE</del> PQV 351 YTL <del>PP</del> SRDEL TKNQ <del>VS</del> LTCL VKGF <del>YPS</del> DIA VEWES <del>NGQ</del> PE NNYK <del>TT</del> PPVL 401 DSDG <del>SFF</del> LYS KLTVD <del>KSR</del> WQ QGNV <del>FSC</del> SVM HEAL <del>HNHY</del> TQ KSL <del>SL</del> SPGK
8	MORAb-003 軽鎖成熟 ポリペプチド アミノ酸配列	1 DIQLTQSPSS LSASV <del>GD</del> RVT ITCSV <del>SSS</del> IS SNNL <del>H</del> HWYQK PGKAP <del>K</del> PWIY 51 GTSNLAS <del>V</del> P SRFSG <del>S</del> SGT DYTFTI <del>SSL</del> Q PEDIAT <del>YYC</del> Q QWSSYPYMYT 101 FGQGT <del>K</del> VEIK RTVAAP <del>S</del> VFI FPPS <del>D</del> EQLKS GTASV <del>V</del> CLLN NFYP <del>P</del> REAKVQ 151 WKVD <del>N</del> ALQSG NSQES <del>V</del> TEQD SKDST <del>Y</del> SLSS TLTL <del>S</del> KADYE KHKV <del>Y</del> ACEVT 201 HQGL <del>S</del> SPVTK SFNRGEC
9	MORAb-003 重鎖全長 プレタンパク質 アミノ酸配列	1 MGWSCIILFL VATATGVHSE VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CSASGFTFSG 51 YGLSWVRQAP GKGLEWVAMI SSGGSYTYA DSVKGRFAIS RDN <del>AKN</del> CLFL 101 QMSL <del>LR</del> PEDT G <del>VY</del> FCARHG DPAWFAYWGQ GTPVTVSSAS TKGPSVFPLA 151 PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTS <del>GVH</del> T FPAVLQSSGL 201 YLS <del>SV</del> VTVP SSSLG <del>T</del> QTYI CNVNHKPSNT KV <del>DK</del> KVEPKS CDK <del>TH</del> TCPC 251 PAPELLGGPS VFLF <del>PP</del> KPKD TLMISRTPEV TCVV <del>VD</del> VSHE DPEV <del>KFN</del> WYV 301 DGVE <del>VHN</del> AKT KPREEQYNS YRV <del>SV</del> LTIV L <del>HQD</del> WLN <del>KE</del> Y KCKV <del>S</del> NKALP 351 APIE <del>K</del> TISKA KGQ <del>PRE</del> PQVY TLPP <del>SR</del> DEL <del>T</del> KNQ <del>V</del> SLTCLV KGFY <del>PS</del> DI <del>AV</del> 401 EWE <del>S</del> NGQ <del>PE</del> N NYK <del>TT</del> PPVLD SDG <del>S</del> F <del>F</del> LYSK LTVD <del>KSR</del> WQ GNV <del>F</del> S <del>C</del> SVMH 451 EAL <del>HNHY</del> TQK SL <del>SL</del> SPGK
10	MORAb-003 軽鎖全長 プレタンパク質 アミノ酸配列	1 MGWSCIILFL VATATGVHSD IQLTQSPSSL SASV <del>GD</del> RVTI TCSV <del>SSS</del> ISS 51 NNL <del>H</del> HWYQKPK GKAP <del>K</del> PWIYG TSNLASGVPS RFSG <del>S</del> SGSD TD YFTI <del>SSL</del> QP 101 EDIAT <del>YYC</del> QQ WSSYPYMYTF GQGT <del>K</del> VEIKR TVAAP <del>S</del> VFIF PPS <del>D</del> EQLKSG 151 TASV <del>V</del> CLLNN FY <del>P</del> REAKVQW KVD <del>N</del> ALQSGN SQES <del>V</del> TEQDS KDST <del>Y</del> SLST 201 LTLS <del>K</del> ADYEK HKV <del>Y</del> ACEVTH QGL <del>S</del> SPVTKS FNRGEC
11	MORAb-003 重鎖 スクレオチド	1 ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT 51 CCACTCCGAG GTCCA <del>ACT</del> TGG TGGAGAGCGG TGGAGGTGTT GTGCAACCTG 101 GCCGGTCCCT GCGCCTGTCC TGC <del>TC</del> CGCAT CTGGCTT <del>CAC</del> CTCAGCGGC 151 TATGGGTGT CTTGGGTGAG ACAGGCACCT GGAAAAGGTC TTGAGTGGGT 201 TGCAATGATT AGTAGTGGTG GTAGTTATAC C <del>TACT</del> TATGCA GACAGTGTGA 251 AGGGTAGATT TGCAATATCG CGAGACAACG CCAAGAACAC ATTGTTCCTG 301 CAAATGGACA GCCTGAGACC CGAAGACACC GGGGTCTATT TTIGTCAAG 351 ACATGGGGAC GATCCCGCCT GGTT <del>CG</del> CTTA TTGGGGCAA GGGACCCCGG 401 TCACCGTCTC CTCAGCCTCC ACCAAGGGCC CATCGGCTCT CCCCTGGCA 451 CCCTCCTCCA AGAGCACCTC TGGGGCACA GCGGCCCTGG CTGCTCCGGT 501 CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC 551 TGACCAGCGG CGTGACACCC TTCCCGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC 601 TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCC TCCAGCAGCT TGGGCACCCA

10

20

30

40

		<p>651 GACCTACATC TGCAACGTGA ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA  701 AGAAAGTTGA GCCCAAATCT TGTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC  751 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA  801 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCGGAC CCTGAGGTC ACATGCGTGG  851 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG  901 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA  951 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCTG CACCAGGACT  1001 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA  1051 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC  1101 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG  1151 TCAGCCTGAC CTGCCCTGGT AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG  1201 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC  1251 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCT ATATTCAAAG CTCACCGTGG  1301 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT  1351 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCTCCGG  1401 GAAATGA</p>	10
12	MORAb-003 軽鎖 ヌクレオチド	<p>1 ATGGGATGGA GCTGIATCAT CCTCTCTTGG GTAGCAACAG CTACAGGTGT  51 CCACTCCGAC ATCCAGCTGA CCCAGAGCCC AAGCAGCCTG AGCGCCAGCG  101 TGGGTGACAG AGTGACCATC ACCTGTAGTG TCAGCTCAAG TATAAGTTCC  151 AACAACTTGC ACTGGTACCA GCAGAAGCCA GGTAAGGCTC CAAAGCCATG  201 GATCTACGGC ACATCCAACC TGGCTTCTGG TGIGCCAAGC AGATTACAGCG  251 GTAGCGGTAG CGGIACCGAC TACACCTTCA CCATCAGCAG CCTCCAGCCA  301 GAGGACATCG CCACCTACTA CTGCCAACAG TGGAGTAGTT ACCCGTACAT  351 GTACACGTTG GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA AATCAAACGA ACTGTGGCTG  401 CACCATCTGT CTTTATCTTC CCGCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA  451 ACTGCCCTCG TTGIGTGCCI GCTGAAIAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA  501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA  551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC  601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA  651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG  701 GAGAGTGTTA A</p>	20
13	LK26HuVK	<p>DIQLTQSPSSLSASVGDRVT  ITCSVSSSISNNLHWYQQK  PGKAPKLLIYGTSNLAGVPT  SRFSGSGSGTDFTFISSLQ  PEDIATYYCQQWSSYPMYT  FGQGTKVEIK*</p>	
14	LK26HuVKY	<p>DIQLTQSPSSLSASVGDRVT  ITCSVSSSISNNLHWYQQK  PGKAPKLLIYGTSNLAGVPT  SRFSGSGSGIDYIFTFISSLQ  PEDIATYYCQQWSSYPMYT  FGQGTKVEIK*</p>	30
15	LK26HuVKPW	<p>DIQLTQSPSSLSASVGDRVT  ITCSVSSSISNNLHWYQQK  PGKAPKPWIYGTSNLAGVPT  SRFSGSGSGTDFTFISSLQ  PEDIATYYCQQWSSYPMYT  FGQGTKVEIK</p>	
16	LK26HuVKPW, Y	<p>DIQLTQSPSSLSASVGDRVT  ITCSVSSSISNNLHWYQQK  PGKAPKPWIYGTSNLAGVPT  SRFSGSGSGTDYTFISSLQ  PEDIATYYCQQWSSYPMYT  FGQGTKVEIK</p>	40
17	LK26HuVH	<p>QVQLQESGPGLVKPSQTLISL  TCTASGFTFSGYGLSWVRQP  PGRGLEWVAMISGGSYTY  ADSVKGRVTMLRDTSKNQFS  LRLSSVTAADTAVYYCARHG  DDPAWFAYWGQGSIVTVSS</p>	

18	LK26HuVHFAIS, N	QVQLQESGPGGLVLRPSQILSL TCTASGFTFSGYGLSWVRQP PGRGLEWVAMISSGGSYTTY ADSVKGRFAISRDNQFNS LRLSSVTAADTAVYYCARHG DDPAWFAYWGQGSGLVTVSS*								
19	LK26HuVHSLF	QVQLQESGPGGLVLRPSQILSL TCTASGFTFSGYGLSWVRQP PGRGLEWVAMISSGGSYTTY ADSVKGRVIMLRDTSKNSLF LRLSSVTAADTAVYYCARHG DDPAWFAYWGQGITVIVSS*								
20	LK26HuVHI, I	QVQLQESGPGGLVLRPSQILSL TCTASGFTFSGYGLSWVRQP PGRGLEWVAMISSGGSYTTY ADSVKGRVIMLRDTSKNSLF LRLSSVTAADTAVYYCARHG DDPAWFAYWGQGSGLVTVSS*								10
21	LK26KOLHuVH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFTFSGYGLSWVRQA PGKGLEWVAMISSGGSYTTY ADSVKGRFAISRDNKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARHG DDPAWFAYWGQGITVIVSS*								
22	マウス IK26 Ab 重鎖配列	QVXLQXSGGDLVKPGGSLKL SCAASGFTFSGYGLSWVRQT PDKRLEWVAMISSGGSYTTY ADSVKGRFAISRDNKNSLF LQMSLKSDDTAIYICARHG DDPAWFAYWGQGLTVVSA*								20
23	マウス IK26 Ab 軽鎖配列	DIELTQSPALMAASPEKVT ITCSVSSSISNNLHWYQQK SETSPKPIYGTSLNLAGVLP LRFKRGSGTSLYSLTISME AEDAATYYCQQWSSYPMYT FGGGKLEIK*								
24	コンセンサス ヒトFRα ヌクレオチド配列	tcaaggttaa acgacaagga cagacatggc tcagcggatg acaacacagc tgctgctcct tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggg tcagacaagg attgcatggg ccaggactga gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa aagccaggcc ccgaggacaa gttgcatgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc tgttctacca acaccagcca ggaagcccat aaggatggtt cctacctata tagattcaac tggaaacct gtggagagat ggcacctgcc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc ctctacagat gctcccccaa cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc aaagagcggg tactgaacgt gcccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat tgtcgcacct cctacacctg caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg ttaacaagt gcgcagtggg agctgcctgc caacctttcc atttctactt ccccaacacc actggttctgt gcaatgaaat ctggactcac tctacaagg tcagcaacta cagccgaggg agtggccgct gcatccagat gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggaggtg gcgaggttct atgctgcagc catgagtggg gctgggcccet gggcagcctg gcctttcctg cttagcctgg ccctaagtct gctgtggctg ctcagctgac ctccttttac cttctgatac ctggaaatcc ctgcctctgt cagccccaca gclcccaacl alllggllcc lgclccalgg lcgggcclcl gacagccacl ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat ttggaaaaaa aaaaaaaaaa aa								30
25	コンセンサス ヒトFRα アミノ酸配列	maqrmmtqll lllvwvavvg eaqtriawar tellnvcnna khhkekpape dklheqcrpw rknaccstnt sqeahkdvsy lyrfnwnhcg emapackrhf iqdtclyecs pnlgpwiqqv dqswrkervl nvplckedce qwedcrtst tcksnwhkgw nwtsgfnkca vgaacqpfhf yfpptvln eiwthsykvs nysrgsgrci qmwfdpaqgn pneearfya aamsgagpwa awpflslsl mllwlls								40

26	Mov-18 エピソード配列	TELLNVXMNAK*XKEKXPX *KLXXQX	
27	9F3 軽鎖 CDR1	RASSTVSYSLH	
28	9F3 軽鎖 CDR2	GTSNLAS	
29	9F3 軽鎖 CDR3	QQYSGYPLT	
30	9F3	PAIMSASPGEKVTMTCRASSTVSYSLHWYQQKSGASPQLWIYGTSNLAS GVPARFSGSGSSTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPLTFGAGTKLELK RADAAP	
31	9F3 重鎖 CDR1	SGYYWN	10
32	9F3 重鎖 CDR2	YIKSDGSNNYNPSLKN	
33	9F3 重鎖 CDR3	EWKAMDY	
34	9F3	ESGPGLVRPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGSRLEWMGYIKSDG SNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYFCTREWKAMDYW GQGTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDT	
35	19D4 軽鎖 CDR1	RASEVDTYGNNFIH	
36	19D4 軽鎖 CDR2	LASNLES	
37	19D4 軽鎖 CDR3	QQNNGDPWT	20
38	19D4 軽鎖可変領域	PASLAVSLGQRATISCRASEVDTYGNNFIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL ESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNGDPWTFGGGTKL EIKRADAAP	
39	19D4 重鎖 CDR1	HPYMH	
40	19D4 重鎖 CDR2	RIDPANGNTKYDPKFQG	
41	19D4 重鎖 CDR3	EEVADYTMDY	
42	19D4 重鎖可変領域	GAELVKPGASVKLSCTASGFNIKHPYMHVVKQRPDQGLEWIGRIDPANG NTKYDPKFQ GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTA VYYCGREEVADYTM DYWGQGTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPV	30
43	24F12 軽鎖 CDR1	SASQGINNFLN	
44	24F12 軽鎖 CDR2	YTSSLHS	
45	24F12 軽鎖 CDR3	QHFSKLPWT	
46	24F12 軽鎖可変領域	TSSLASLGDRTVITSCSASQGINNFLN WYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVP SRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIAIYYCQHFSKLPWTFGGGTKLEIKRADA AP	
47	24F12 重鎖 CDR1	SYAMS	
48	24F12 重鎖 CDR2	EIGSGGSYTYYPDTVIG	40
49	24F12 重鎖 CDR3	ETTAGYFDY	

50	24F12 重鎖可變領域	SGGGLVPRGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQSPEKRLEWVAEIGSGGS YTYYPDVTVTGRFTISRDNASTLYLEMSSLRSEDTAIYYCARETTAGYFDY WGQGTTLTVSS	
51	26B3 輕鎖 CDR1	RTSENIFFSYLA	
52	26B3 輕鎖 CDR2	NAKTLAE	
53	26B3 輕鎖 CDR3	QHYYAFPWT	
54	26B3 輕鎖可變領域	PASLSASVGETVTITCRTSENIFFSYLAWYQQKQGISPQLLVYNAKTLAEGV PSRFSGSGGTQFSLKINSLOPEDFGSYCYQHYYAFPWTFGGGSKLEIKRA DAAP	10
55	26B3 重鎖 CDR1	GYFMN	
56	26B3 重鎖 CDR2	RIFPYNGDTFYNQKFKG	
57	26B3 重鎖 CDR3	GTHYFDY	
58	26B3 重鎖可變領域	GPELVKPGASVKISCKASDYSFTGYFMNWVMQSHGKSLEWIGRIFPYNGD TFYNQKFKGRATLTVDKSSSTAHEMLRSLASEDSAVYFCARGTHYFDYW GQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQT	
59	9F3 輕鎖 CDR1	AGGGCCAGCTCAACTGTAAGTTACAGTTACTTGAC	
60	9F3 輕鎖 CDR2	GGCACATCCAACCTGGCTTCT	20
61	9F3 輕鎖 CDR3	CAGCAGTACAGTGGTTACCCACTCAG	
62	9F3 輕鎖可變領域	CCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAGGTCACCATGACCTGC AGGGCCAGCTCAACTGTAAGTTACAGTTACTTGCACTGGTACCAGCAG AAGTCAGGTGCCTCCCCCAACTCTGGATTTATGGCACATCCAACCTGG CTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTA CTCTCTCACAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAC TGCCAGCAGTACAGTGGTTACCCACTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAG CTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC	
63	9F3 重鎖 CDR1	AGTGGTTATTACTGGAAC	
64	9F3 重鎖 CDR2	TACATAAAGTCCGACGGTAGCAATAATTACAACCCATCTCTCAAAAAT	30
65	9F3 重鎖 CDR3	GAGTGGAAGGCTATGGACTAC	
66	9F3 重鎖可變領域	GAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAGACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACCT GCTCTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATTACTGGAACCTGGAT CCGGCAGTTTCCAGGAAGCAGACTGGAATGGATGGGCTACATAAAGTC CGACGGTAGCAATAATTACAACCCATCTCTCAAAAATCGAATCTCCAT CACTCGTGACACATCTAAGAACCAGTTTTTCCIGAAGTTGAATTCTGTG ACTACTGAGGACACAGCTACATATTCTGTACAAGGGAGTGGAAAGGCT ATGGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAA ACAACACCCCATCAGTCTATCCACTGGCCCTGGGTGTGGAGATACA AC	
67	19D4 輕鎖 CDR1	AGAGCCAGTGAAAGTGTGATACTTATGGCAATAATTTTATACAC	40
68	19D4 輕鎖 CDR2	CTTGCATCCAACCTAGAATCT	
69	19D4 輕鎖 CDR3	CAGCAAAATAATGGGGATCCGTGGACG	

70	19D4 輕鎖可變領域	CCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCA GAGCCAGTGAAAGTGTTGATACTTATGGCAATAATTTTATACACTGGT ACCAGCAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATTATCTTGCAT CCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTA GGACAGACTTCACCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTG CAACCTATTACTGTCAGCAAATAATGGGGATCCGTGGACGTTCCGGTG GAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAA
71	19D4 重鎖 CDR1	CACCCCTATATGCAC
72	19D4 重鎖 CDR2	AGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGACCCGAAGTCCAG GGC
73	19D4 重鎖 CDR3	GAGGAGGTGGCGGACTATACTATGGACTAC
74	19D4 重鎖可變領域	GGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACA GCTTCTGGCTTCAACATTAACACCCCTATATGCACTGGGTGAAGCAG AGGCCTGACCAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAAT GGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACA GCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTACAGCTCAGCAGCCTGACA TCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGGTAGAGAGGAGGTGGCGGAC TATACTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTACCGTCTCCTCA GCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCCTGTGTG
75	24F12 輕鎖 CDR1	AGTGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTTTTTAAAC
76	24F12 輕鎖 CDR2	TACACATCAAGTTTACACTCA
77	24F12 輕鎖 CDR3	CAGCACTTTAGTAAGCTTCCGTGGACG
78	24F12 輕鎖可變領域	ACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCA GTGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTTTTTAAACTGGTATCAGCAGAAAC CAGATGGCACTGTAAACTCCTGATCTATTACACATCAAGTTTACACTC AGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTC TCTACCATCAGCAACCTGGAACCTGAAGATATTGCCATATACTATTGT CAGCACTTTAGTAAGCTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTG GAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC
79	24F12 重鎖 CDR1	AGCTATGCCATGTCT
80	24F12 重鎖 CDR2	GAAATTGGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTATCCAGACACTGTGACG GGC
81	24F12 重鎖 CDR3	GAAACTACGGCGGGCTACTTTGACTAC
82	24F12 重鎖可變領域	TCTGGGGGAGGCTTAGTGAGGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAGCTATGCCATGCTTGGGTTCGCC AGTCTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCAGAAATTGGTAGTGGTG GTAGTTACACCTACTATCCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCATCTC CAGAGACAATGCCAAGAGCACCTGTACCTGGAAATGAGCAGTCTGAG GTCTGAGGACACGGCCATCTATTACTGTGCAAGGGAAACTACGGCGGG CTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
83	26B3 輕鎖 CDR1	CGAACAAGTGAGAATATTTTCAGTTATTTAGCA
84	26B3 輕鎖 CDR2	AATGCAAAAACCTTAGCAGAG
85	26B3 輕鎖 CDR3	CAACATCATTATGCTTTTCCGTGGACG

10

20

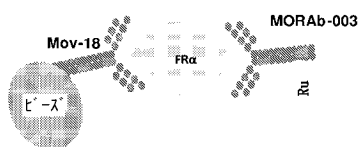
30

40

86	26B3 輕鎖可變領域	CCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTC GAACAAGTGAGAATATTTTCAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAAC AGGGAATATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAG AGGGTGTGCCATCAAGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTT CTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACT GTCAACATCATTATGCTTTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCTCCAAGCT GAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC
87	26B3 重鎖 CDR1	GGTACTTTATGAAC
88	26B3 重鎖 CDR2	CGTATTTTTCCTTACAATGGTGATACTTTCTACAACCAGAAGTTCAAGG GC
89	26B3 重鎖 CDR3	GGGACTCATTACTTTGACTAC
90	26B3 重鎖可變領域	GGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAG GCTTCTGATTACTCTTTTACTGGCTACTTTATGAACTGGGTGATGCAGA GCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTATTTTTCCTTACAATG GTGATACTTTCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTG TAGACAAATCCTCTAGCACAGCCACATGGAGCTCCGGAGCCTGGCAT CTGAGGACTCTGCAGTCTATTTTGTGCAAGAGGGACTCATTACTTTGA CTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACTGTCTCCTCAGCCAAAACGAC ACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAA

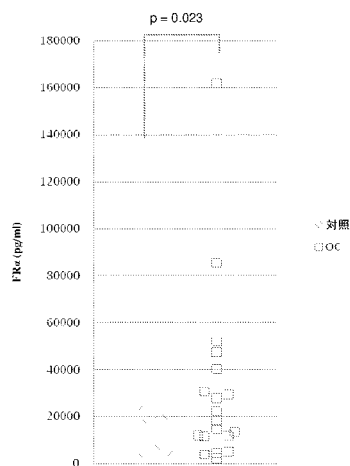
【 図 1 】

Figure 1



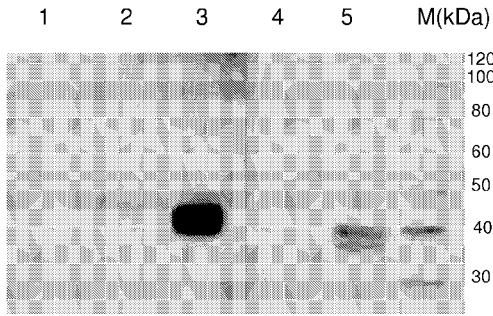
【 図 2 】

Figure 2



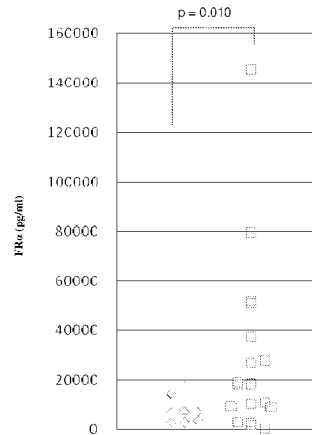
【 図 3 】

Figure 3



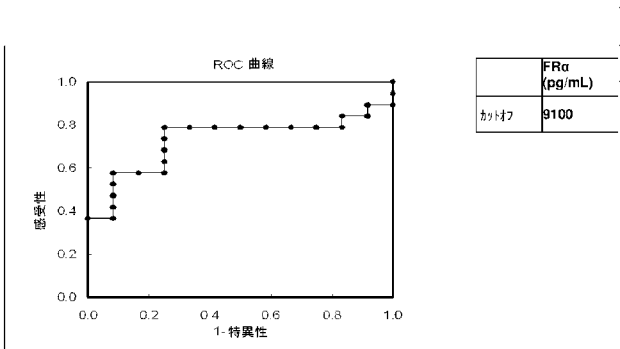
【 図 4 】

Figure 4



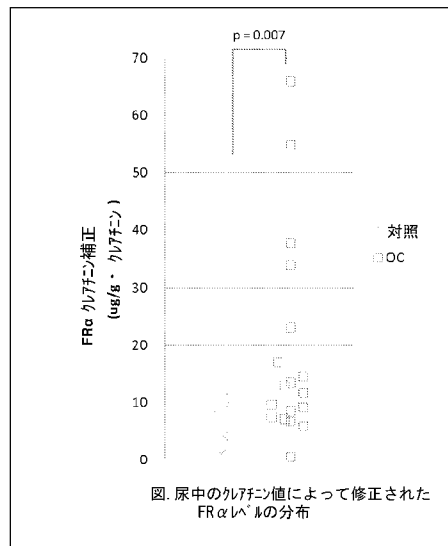
【 図 5 】

Figure 5



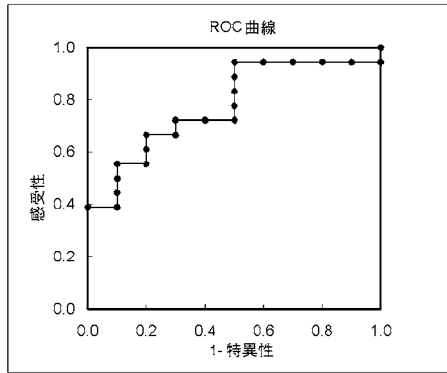
【 図 6 】

Figure 6



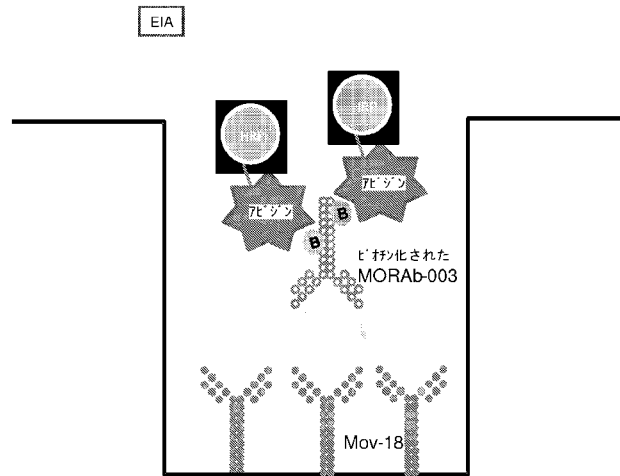
【 図 7 】

Figure 7



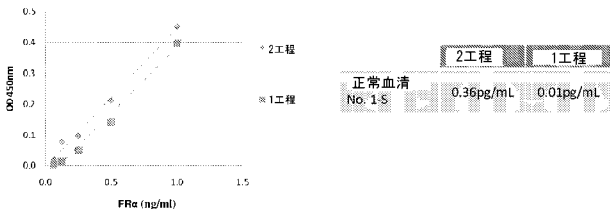
【 図 8 】

Figure 8



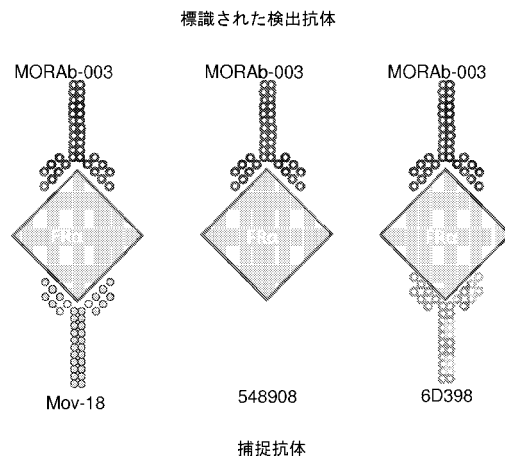
【 図 9 】

Figure 9



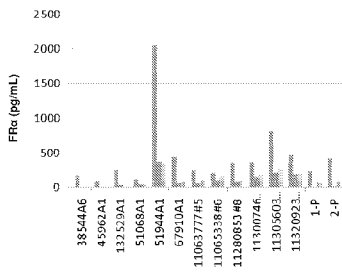
【 図 10 】

Figure 10



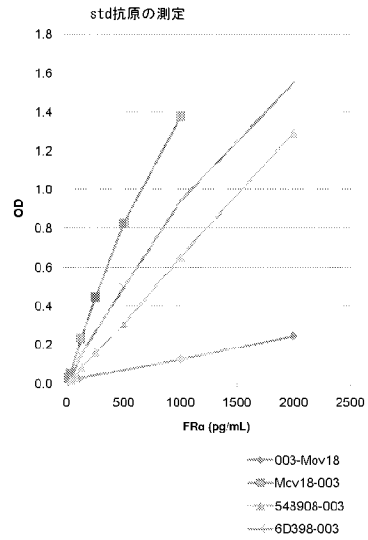
【 図 1 1 】

Figure 11



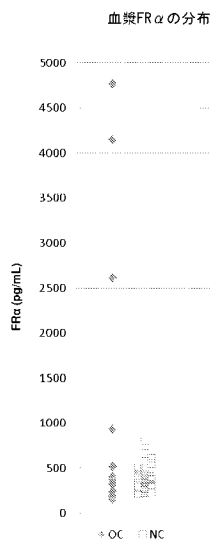
【 図 1 2 】

Figure 12



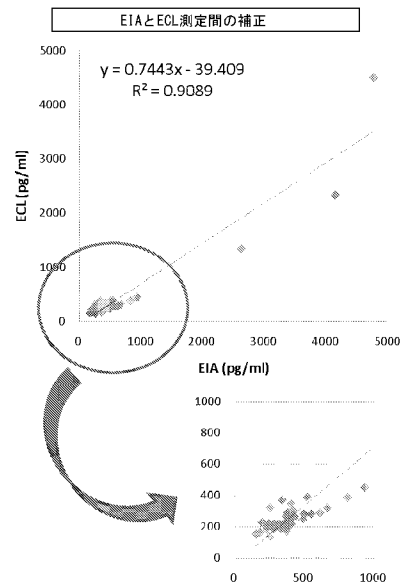
【 図 1 3 】

Figure 13



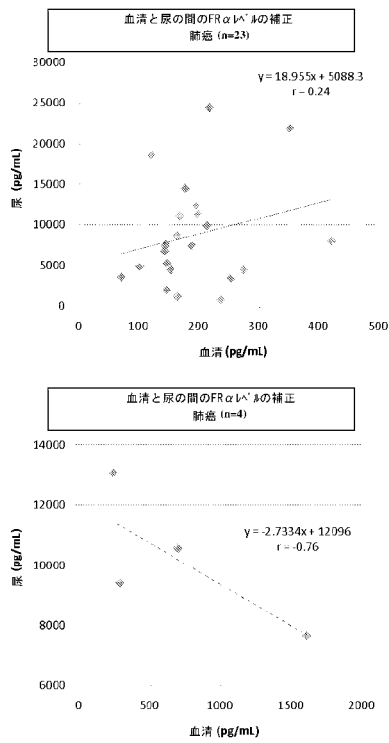
【 図 1 4 】

Figure 14



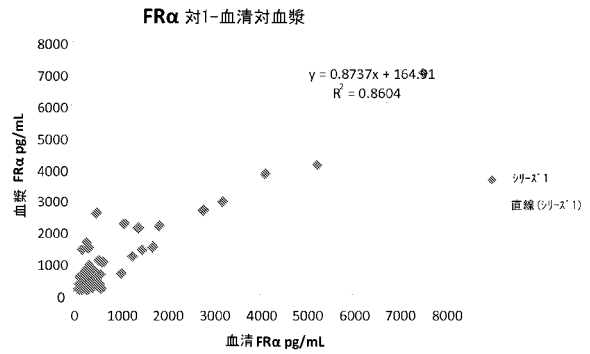
【 図 1 5 】

Figure 15



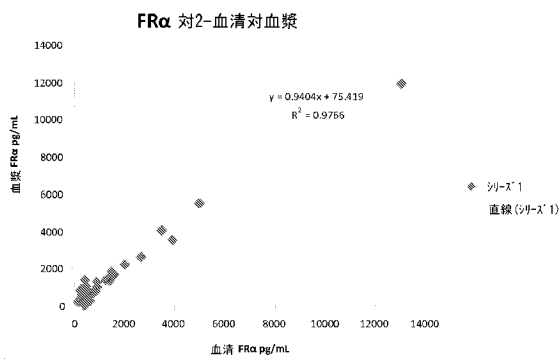
【 図 1 6 】

Figure 16



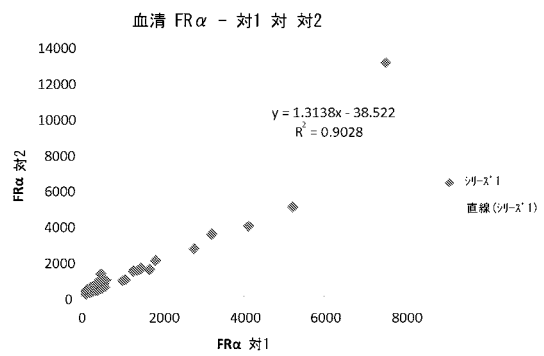
【 図 1 7 】

Figure 17



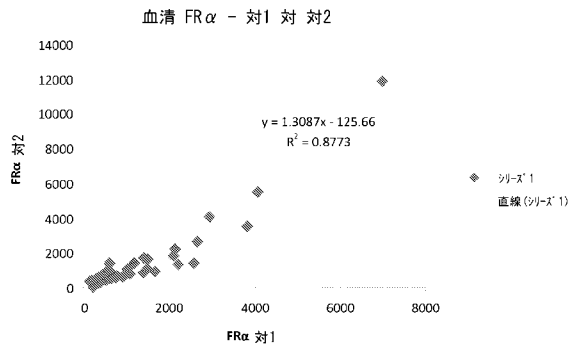
【 図 1 8 】

Figure 18



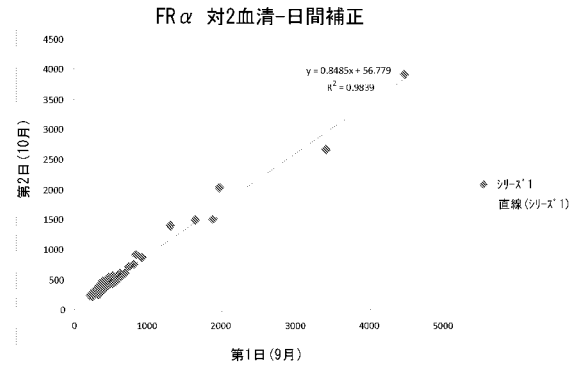
【 図 1 9 】

Figure 19



【 図 2 0 】

Figure 20



## 【 配 列 表 】

2018036270000001.app

## 【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平成29年11月1日 (2017.11.1)

## 【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

## 【 請 求 項 1 】

対象がFR 発現癌に罹患しているかどうかを評価するためのデータを提供する方法であって、

対象由来の血清試料または血漿試料をFR に結合する抗体と接触させ、これにより、前記試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR ) のレベルを決定すること；および

細胞に結合しない葉酸受容体アルファ (FR ) のレベルと対照試料におけるFR のレベルを比較すること；

を含み、

対象由来の試料におけるFR のレベルと対照試料におけるFR のレベルの間の差は、対象がFR 発現癌に罹患しているという指標である、方法。

## 【 請 求 項 2 】

試料が、血清である、請求項1に記載の方法。

## 【 請 求 項 3 】

FR 発現癌が、肺癌、中皮腫、卵巣癌、腎臓癌、脳癌、子宮頸癌、鼻咽腔癌、頭頸部

の扁平上皮癌腫、子宮内膜癌、乳癌、膀胱癌、膵臓癌、骨癌、下垂体癌、結腸直腸癌および甲状腺髄様癌からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

F R 発現癌が卵巣癌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

F R 発現癌が肺癌である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

F R 発現癌が非小細胞肺癌である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

非小細胞肺癌が腺癌である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

試料を下記からなる群から選択される抗体と接触させることによって F R のレベルが、決定される、請求項 1 に記載の方法：

- ( a ) M O R A b - 0 0 3 抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- ( b ) C D R H 1 として配列番号 1 ( G F T F S G Y G L S )、C D R H 2 として配列番号 2 ( M I S S G G S Y T Y Y A D S V K G )、C D R H 3 として配列番号 3 ( H G D D P A W F A Y )、C D R L 1 として配列番号 4 ( S V S S S I S S N N L H )、C D R L 2 として配列番号 5 ( G T S N L A S ) および C D R L 3 として配列番号 6 ( Q Q W S S Y P Y M Y T ) を含む抗体；
- ( c ) M O V 1 8 抗体；
- ( d ) M O V 1 8 抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- ( e ) 5 4 8 9 0 8 抗体；
- ( f ) 5 4 8 9 0 8 抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- ( g ) 6 D 3 9 8 抗体；
- ( h ) 6 D 3 9 8 抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- ( i ) 2 6 B 3 抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- ( j ) C D R H 1 として配列番号 5 5 ( G Y F M N )、C D R H 2 として配列番号 5 6 ( R I F P Y N G D T F Y N Q K F K G )、C D R H 3 として配列番号 5 7 ( G T H Y F D Y )、C D R L 1 として配列番号 5 1 ( R T S E N I F S Y L A )、C D R L 2 として配列番号 5 2 ( N A K T L A E ) および C D R L 3 として配列番号 5 3 ( Q H H Y A F P W T ) を含む抗体；
- ( k ) 2 6 B 3 抗体；
- ( l ) 1 9 D 4 抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- ( m ) C D R H 1 として配列番号 3 9 ( H P Y M H )、C D R H 2 として配列番号 4 0 ( R I D P A N G N T K Y D P K F Q G )、C D R H 3 として配列番号 4 1 ( E E V A D Y T M D Y )、C D R L 1 として配列番号 3 5 ( R A S E S V D T Y G N N F I H )、C D R L 2 として配列番号 3 6 ( L A S N L E S ) および C D R L 3 として配列番号 3 7 ( Q Q N N G D P W T ) を含む抗体；
- ( n ) 1 9 D 4 抗体；
- ( o ) 9 F 3 抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- ( p ) C D R H 1 として配列番号 3 1 ( S G Y Y W N )、C D R H 2 として配列番号 3 2 ( Y I K S D G S N N Y N P S L K N )、C D R H 3 として配列番号 3 3 ( E W K A M D Y )、C D R L 1 として配列番号 2 7 ( R A S S T V S Y S Y L H )、C D R L 2 として配列番号 2 8 ( G T S N L A S ) および C D R L 3 として配列番号 2 9 ( Q Q Y S G Y P L T ) を含む抗体；
- ( q ) 9 F 3 抗体；
- ( r ) 2 4 F 1 2 抗体と同じエピトープに結合する抗体；
- ( s ) C D R H 1 として配列番号 4 7 ( S Y A M S )、C D R H 2 として配列番号 4 8 ( E I G S G G S Y T Y Y P D T V T G )、C D R H 3 として配列番号 4 9 ( E T T A G Y F D Y )、C D R L 1 として配列番号 4 3 ( S A S Q G I N N F L N )、C D R L 2 とし

て配列番号 44 ( Y T S S L H S ) および C D R L 3 として配列番号 45 ( Q H F S K L P W T ) を含む抗体 ;

( t ) 2 4 F 1 2 抗体 ;

( u ) L K 2 6 H u V K ( 配列番号 1 3 ) ; L K 2 6 H u V K Y ( 配列番号 1 4 ) ; L K 2 6 H u V K P W ( 配列番号 1 5 ) ; および L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号 1 6 ) からなる群から選択される可変領域軽鎖を含む抗体 ;

( v ) L K 2 6 H u V H ( 配列番号 1 7 ) ; L K 2 6 H u V H F A I S , N ( 配列番号 1 8 ) ; L K 2 6 H u V H S L F ( 配列番号 1 9 ) ; L K 2 6 H u V H I , I ( 配列番号 2 0 ) ; および L K 2 6 K O L H u V H ( 配列番号 2 1 ) からなる群から選択される可変領域重鎖を含む抗体 ;

( w ) 重鎖可変領域 L K 2 6 K O L H u V H ( 配列番号 2 1 ) および軽鎖可変領域 L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号 1 6 ) を含む抗体 ;

( x ) 重鎖可変領域 L K 2 6 H u V H S L F ( 配列番号 1 9 ) および軽鎖可変領域 L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号 1 6 ) を含む抗体 ; ならびに

( y ) 重鎖可変領域 L K 2 6 H u V H F A I S , N ( 配列番号 1 8 ) および軽鎖可変領域 L K 2 6 H u V K P W , Y ( 配列番号 1 6 ) を含む抗体。

【請求項 9】

抗体が、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、F a b、F a b ' 2、S c F v、S M I P、アフィボディ、アビマー、パーサボディ、ナノボディおよびドメイン抗体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

抗体が標識される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

抗体が、放射性標識、ビオチン標識、発色団標識、蛍光色素標識、E C L 標識および酵素標識からなる群から選択される標識を用いて標識される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

F R のレベルが、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光分析、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散法、溶液相アッセイ、電気化学発光イムノアッセイ ( E C L I A ) および E L I S A アッセイからなる群から選択される技法を用いて決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

対照試料が、健常対象における F R の標準化された対照レベルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

試料が、試料における F R レベルを決定する前にグアニジンで処理される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

試料が、試料における F R のレベルを決定する前に希釈される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

試料が、試料における F R のレベルを決定する前に、遠心分離、ボルテックスまたはその両方かけられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

請求項 1 に記載の方法であって、対象由来の試料における F R のレベルが、試料を

( a ) 固体支持体に固定されおよび M O R A B - 0 0 3 抗体と標識された M O V 1 8 抗体、

( b ) 固体支持体に固定されおよび 2 4 F 1 2 抗体と標識された 9 F 3 抗体、

( c ) 固体支持体に固定されおよび 1 9 D 4 抗体と標識された 2 6 B 3 抗体、ならびに

( d ) 固体支持体に固定されおよび 2 6 B 3 抗体と標識された 9 F 3 抗体

からなる群から選択される一対の抗体と接触させることによって決定される、方法。

【請求項 18】

F R 発現癌に罹患している対象における F R 発現癌の進行を評価するためのデータを提供する方法であって、

対象由来の血清試料または血漿試料を F R に結合する抗体と接触させ、これにより、前記試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルを決定すること；および

細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルと対照試料における F R のレベルを比較し、これにより、対象における F R 発現癌の進行を評価するための指標を得ること；

を含む、方法。

【請求項 19】

F R 発現癌に罹患している対象を少なくとも 4 つの癌治療群の 1 つに階層化するためのデータを提供する方法であって、

対象由来の血清試料または血漿試料を F R に結合する抗体と接触させ、これにより、前記試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルを決定することを含み、

細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルが、対象を少なくとも 4 つの癌治療群の 1 つに階層化するための指標である、方法。

【請求項 20】

F R 発現癌が卵巣癌であり、および対象が病期 I、病期 II、病期 III または病期 IV の卵巣癌に階層化される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

卵巣癌または肺癌を患っている対象における卵巣癌または肺癌の M O R A b - 0 0 3 治療の有効性を監視するためのデータを提供する方法であって、

M O R A b - 0 0 3 が予め投与された対象由来の血清試料または血漿試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルを決定すること、および

対象由来の試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルと対照試料における F R のレベルを比較し、それにより M O R A b - 0 0 3 治療の有効性を監視すること；

を含む、方法。

【請求項 22】

卵巣癌または肺癌を患っている対象が M O R A b - 0 0 3 による治療に应答するかどうかを予測するためのデータを提供する方法であって、

対象由来の血清試料または血漿試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルを決定すること、および

対象由来の試料における細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルと対照試料における F R のレベルを比較することを含み、

対象由来の試料における F R のレベルと対照試料における F R のレベルとの間の差が、対象が M O R A b - 0 0 3 による治療に应答するかどうかの指標である、方法。

【請求項 23】

対象が F R 発現癌に罹患しているかどうかを評価するための、または対象における F R 発現癌の進行を評価するためのキットであって、

対象由来の試料において、細胞に結合しない葉酸受容体アルファ ( F R ) のレベルを決定する手段、および

対象が F R 発現癌に罹患しているかどうかを評価するためのまたは F R 発現癌の進行を評価するためのキットの使用説明書

を含むキット。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 15/00	(2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	

(72)発明者 シヤンホン・ワン

アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19301、パオリ、デボン・サークル・11

(72)発明者 チイミン・チャオ

アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19083、ハイバータウン、イースト・ラングホーン・アベニュー・10

(72)発明者 エリザベス・ブルツク・サマーズ

アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19375、ユニオンビル、ピー・オー・ボツクス・158

Fターム(参考) 4C085 AA14 CC23 EE01

4H045 DA76 EA20 EA50

【外国語明細書】

2018036270000001.pdf

专利名称(译)	诊断叶酸受体 $\alpha$ 表达癌症和叶酸受体 $\alpha$ 作为预后标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018036270A</a>	公开(公告)日	2018-03-08
申请号	JP2017194027	申请日	2017-10-04
[标]申请(专利权)人(译)	莫佛泰克公司		
申请(专利权)人(译)	Morphotek, 油墨.		
[标]发明人	ダニエルジェイオシヤネツシー ルイーシグラツソ シヤンホンワン チイミンチャオ エリザベスブルツクサマーズ		
发明人	ダニエル・ジェイ・オシヤネツシー ルイーシ・グラツソ シヤンホン・ワン チイミン・チャオ エリザベス・ブルツク・サマーズ		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C07K16/30 A61K39/395 A61P35/00 A61P15/00 A61P11/00		
CPC分类号	A61P11/00 A61P15/00 A61P15/08 A61P35/00 A61K39/395 G01N33/57423 G01N33/57449 G01N33/57484 G01N33/82 G01N2800/52 G01N2800/56 G01N33/57488 G01N33/574		
FI分类号	G01N33/574.ZNA G01N33/53.D C07K16/30 A61K39/395.T A61P35/00 A61P15/00 A61P11/00 G01N33/574.AZN.A		
F-TERM分类号	4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50		
优先权	61/410497 2010-11-05 US 61/508444 2011-07-15 US		
其他公开文献	JP6554152B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

需要解决的问题：提供一种早期检测癌症的方法，增加治疗可能性的非侵入性癌症诊断，确定癌症发病风险水平和预测癌症发展。用于评估受试者是否患有FR $\alpha$ 表达癌症的方法和试剂盒，用于预测患有FR $\alpha$ 表达癌症的受试者中卵巢癌进展的方法和试剂盒，用于评估开发致癌基因的风险水平的方法和试剂盒，FR $\alpha$ 表达将患有癌症表达的受试者分级为癌症治疗组的人涉及确定不与来自受试者的样品中的细胞结合的叶酸受体 $\alpha$  (FR $\alpha$ ) 的水平并将该水平与对照样品中的FR $\alpha$ 水平进行比较的方法。

Figure 1

