

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-501549

(P2005-501549A)

(43) 公表日 平成17年1月20日(2005.1.20)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
A 6 1 K 38/00
A 6 1 K 39/395
A 6 1 P 1/18
A 6 1 P 15/00

F I

C 1 2 N 15/00
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 P 1/18
 A 6 1 P 15/00
 A 6 1 P 35/00

Z N A A
 T

テーマコード (参考)

4 B O 2 4
 4 B O 6 4
 4 B O 6 5
 4 C O 8 4
 4 C O 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 140 頁) 最終頁に続く

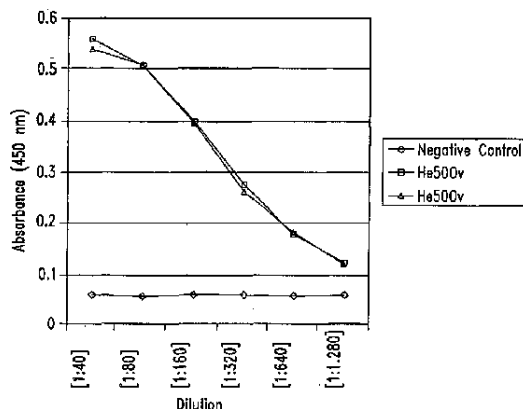
(21) 出願番号 特願2003-525305 (P2003-525305)
 (86) (22) 出願日 平成14年8月29日 (2002.8.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年2月27日 (2004.2.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/009653
 (87) 国際公開番号 W02003/021273
 (87) 国際公開日 平成15年3月13日 (2003.3.13)
 (31) 優先権主張番号 60/316, 537
 (32) 優先日 平成13年8月29日 (2001.8.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501199036
 パシフィック ノースウエスト リサーチ
 インスティテュート
 アメリカ合衆国 ワシントン 98122
 , シアトル, ブロードウェイ 720
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 シュメール, ミヒャエル
 アメリカ合衆国 ワシントン 98122
 , シアトル, イー. ジェファーソン
 ストリート 1920 ナンバービー
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌腫の診断

(57) 【要約】

本発明は悪性症状の検出のための組成物および方法を対象とし、そして可溶性および細胞表面形態のHE 4 aポリペプチド、例えば卵巣癌において過剰発現されるHE 4 aの発見に関する。特に本発明はHE 4 aをコードする核酸配列を提供し、ならびにこのような被験体からの試料中の可溶性および/または細胞表面形態で天然に存在する分子とのHE 4 aポリペプチドに特異的な抗体の反応性を検出することによる、そしてHE 4 aヌクレオチド配列ならびにその他の関連利点を用いたハイブリダイゼーションスクリーニングによる、被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法も提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、以下の工程：抗体と抗原決定基との結合を検出するために十分な条件下でかつそのために十分な時間にわたり、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも 1 つの抗体と被験体からの生物学的試料とを接触させて、該試料中において可溶性形態で天然に存在し、かつ、該少なくとも 1 つの抗体と反応性がある抗原決定基を有する分子の、該生物学的試料中での存在を確定する工程、およびそれから悪性症状の存在を検出する工程を含む方法。

10

【請求項 2】

被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、以下の：抗体と抗原決定基との結合を検出するために十分な条件下でかつそのために十分な時間にわたり、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも 1 つの抗体と被験体からの細胞を含む生物学的試料を接触させて、該少なくとも 1 つの抗体と反応性がある抗原決定基を有する細胞表面分子の前記生物学的試料中での存在を確定する工程、およびそれから悪性症状の存在を検出する工程を含む方法。

【請求項 3】

前記生物学的試料は、血液、血清、漿液、血漿、リンパ、尿、脳脊髄液、唾液、粘膜分泌物、腔分泌物、腹水、胸水、囲心腔液、腹膜液、腹腔液、培地、ならし培地および灌注液からなる群から選択される、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 4】

前記生物学的試料は血清である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記生物学的試料は血漿である、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記生物学的試料は腹水および胸水からなる群から選択される、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記生物学的試料は腔分泌物である、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 8】

H E 4 a 抗原が配列番号 1 1 に記述される配列を有するポリペプチドあるいはその断片または誘導体を含む、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

H E 4 a 抗原ポリペプチドがスプライス改変体である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 H E 4 a 抗原は配列番号 5 に記述される配列を有するポリペプチドあるいはその断片または誘導体を含む、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記 H E 4 a 抗原ポリペプチドはスプライス改変体である、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記 H E 4 a 抗原ポリペプチドは H E 4 a 抗原改変体あるいはその断片または誘導体である、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

前記抗体はポリクローナル抗体を含む、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記抗体は親和性精製抗体を含む、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

50

前記抗体はモノクローナル抗体を含む、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

前記抗体は組換え抗体を含む、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

前記抗体はキメラ抗体を含む、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

前記抗体はヒト化抗体を含む、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

前記抗体は単鎖抗体を含む、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 20】

前記抗体と抗原決定基の結合の検出は放射性核種の検出を含む、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

前記抗体と抗原決定基の結合の検出は蛍光体 (fluorophore) の検出を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 22】

抗体と抗原決定基の結合の検出がアビジン分子とビオチン分子の間の結合事象の検出を含む、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

20

前記抗体と抗原決定基の結合の検出はストレプトアビジン分子とビオチン分子の間の結合事象の検出を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 24】

前記抗体と抗原決定基の結合の検出は酵素反応の生成物の分光光度検出を含む、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

前記少なくとも 1 つの抗体は検出可能に標識される、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

前記少なくとも 1 つの抗体は検出可能に標識されず、抗体と抗原決定基の結合の検出が間

30

【請求項 27】

前記悪性症状は、腺癌、中皮腫、卵巣癌、膵臓癌および非小細胞肺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 28】

被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、以下の工程：抗体と抗原決定基との結合を検出するための条件下でかつそのために十分な時間にわたり、少なくとも 1 つの抗体と被験体からの生物学的試料を接触させて (i) 該試料中の可溶性形態で天然に存在する分子、ならびに (ii) 細胞表面分子からなる群から選択される分子の該生物学的試料中での存在を確定する工程であって、該試料は被験体からの細胞を含み、該分子は該少なくとも 1 つの抗体と反応性がある抗原決定基を有し、該抗体の抗原結合部位は、2H5、3D8 および 4H4 からなる群から選択されるモノクローナル抗体の免疫特異的結合を競合的に抑制する、工程、およびそれから悪性症状の存在を検出する工程を含む、方法。

40

【請求項 29】

被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、以下の工程：抗体と抗原決定基との結合を検出するための条件下でかつそのために十分な時間にわたり、少なくとも 1 つの抗体と被験体からの生物学的試料を接触させて (i) 該試料中の可溶性形態で天然に存在する分子、ならびに (ii) 細胞表面分子からなる群から選択される

50

分子の該生物学的試料中での存在を確定する工程であって、該試料は被験体からの細胞を含み、該分子は該抗体と反応性がある抗原決定基を有し、該抗体の抗原結合部位は、モノクローナル抗体 3 D 8 の免疫特異的結合を競合的に抑制する、工程、およびそれから悪性症状の存在を検出する工程を含む、方法。

【請求項 3 0】

被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、以下の：
抗体と抗原決定基との結合を検出するための条件下でかつそのために十分な時間にわたり、少なくとも 1 つの H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な抗体と被験体からの生物学的試料を接触させて (i) 該試料中の可溶性形態で天然に存在する分子、ならびに (i i) 細胞表面分子からなる群から選択される分子の該生物学的試料中での存在を確定する工程であって、該試料は被験体からの細胞を含み、該分子は該抗体と反応性がある抗原決定基を有し、ここで、該少なくとも 1 つの抗原は、H E 4 a 抗原に免疫特異的に結合する、工程それから悪性症状の存在を検出する工程を含む、方法。 10

【請求項 3 1】

前記 H E 4 a 抗原は、3 D 8、2 H 5 および 4 H 4 からなる群から選択されるモノクローナル抗体とも免疫特異的に反応性がある、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、以下の：
抗体と前記抗原決定基との結合を検出するための条件下でかつそのために十分な時間にわたり、少なくとも 1 つの H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも 1 つの抗体と被験体からの生物学的試料を接触させて (i) 該試料中の可溶性形態で天然に存在する分子、ならびに (i i) 細胞表面分子からなる群から選択される分子の該生物学的試料中での存在を確定する、接触させる工程であって、該試料は被験体からの細胞を含み、該分子は該少なくとも 1 つの抗体と反応性がある抗原決定基を有し、その抗原結合部位は、2 H 5、および 4 H 4 からなる群から選択されるモノクローナル抗体の免疫特異的結合を競合的に抑制し、ここで、該少なくとも 1 つの抗原は、H E 4 a 抗原に免疫特異的に結合する、工程、ならびにそれから悪性症状の存在を検出する工程を含む、方法。 20 30

【請求項 3 3】

前記 H E 4 抗原はモノクローナル抗体 3 D 8 と免疫特異的に反応性がある、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、以下の：
少なくとも 1 つの固定された第一の抗体を H E 4 a 抗原ポリペプチドと特異的に結合させて、免疫複合体を形成するための条件下でかつそのために十分な時間にわたり、該 H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な該少なくとも 1 つの固定された第一抗体と被験体からの生物学的試料とを接触させて、該試料中の可溶性形態で天然に存在する分子の該生物学的試料中での存在を確定する工程であって、該少なくとも 1 つの第一の抗体の抗原結合部位がモノクローナル抗体 3 D 8 の免疫特異的結合を競合的に抑制する、工程、該少なくとも 1 つの固定された第一の抗体と特異的に結合しない試料の構成成分を除去する工程、および該少なくとも 1 つの第二の抗体と該 H E 4 a 抗原ポリペプチドとの特異的結合を検出するための条件下でかつそのために十分な時間にわたり、該免疫複合体を H E 4 a 抗原ポリペプチド少なくとも 1 つの第二の抗体と接触させる工程であって、該少なくとも 1 つの第二の抗体の抗原結合部位がモノクローナル抗体 2 H 5 の免疫特異的結合を競合的に抑制しない、工程、および、悪性症状の存在を検出する工程を含む、方法。 40 50

【請求項 35】

被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、以下の：
少なくとも1つの固定された第一の抗体をH E 4 a 抗原ポリペプチドと特異的に結合させて、それにより免疫複合体を形成するための条件下でかつそのために十分な時間にわたり、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも1つの固定された第一の抗体と被験体からの生物学的試料を接触させて、該試料中の可溶性形態で天然に存在する分子の該生物学的試料中での存在を確定する工程であって、該少なくとも1つの第一の抗体の抗原結合部位がモノクローナル抗体 3 D 8 の免疫特異的結合を競合的に抑制する、工程、
前記少なくとも1つの固定された第一の抗体と特異的に結合しない試料の構成成分を除去する工程；ならびに

10

該少なくとも1つの第二の抗体と該H E 4 a 抗原ポリペプチドの特異的結合を検出するための条件下でかつそのために十分な時間にわたり、該免疫複合体をH E 4 a 抗原ポリペプチドに少なくとも1つの第二の抗体と接触させる工程であって、該少なくとも1つの第二の抗体の抗原結合部位がモノクローナル抗体 2 H 5 の免疫特異的結合を競合的に抑制しない、工程、および、
それから悪性症状の存在を検出する工程を含む、方法。

【請求項 36】

被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、以下の：
少なくとも1つの固定された第一の抗体をメソテリン関連抗原ポリペプチドと特異的に結合させることにより免疫複合体を形成するための条件下でかつそのために十分な時間にわたり、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも1つの固定された第一の抗体と被験体からの生物学的試料を接触させて、該試料中の可溶性形態で天然に存在する分子の該生物学的試料中での存在を確定する工程であって、該少なくとも1つの第一の抗体の抗原結合部位がモノクローナル抗体 3 D 8 の免疫特異的結合を競合的に抑制する、工程、
該少なくとも1つの固定された第一の抗体と特異的に結合しない試料の構成成分を除去する工程；ならびに

20

該少なくとも1つの第二の抗体と該H E 4 a 抗原ポリペプチドの特異的結合を検出するための条件下でかつそのために十分な時間にわたり、該免疫複合体をH E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも1つの第二の抗体と接触させる工程であって、該少なくとも1つの第二の抗体の抗原結合部位はモノクローナル抗体 4 H 4 の免疫特異的結合を競合的に抑制しない、工程、および
それから悪性症状の存在を検出する工程を含む、方法。

30

【請求項 37】

中皮種関連抗原、癌胎児性抗原、C A 1 2 5、シアリルT N、扁平上皮細胞癌抗原、組織ポリペプチド抗原および胎盤アルカリ性ホスファターゼからなる群から選択される悪性症状の少なくとも1つの可溶性マーカーの前記試料中の存在を確定する工程をさらに含む、請求項 1～36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、以下の：
抗体と抗原決定基との結合を検出するための条件下でかつそのために十分な時間にわたり、（i）悪性症状を有する疑いのある一次被験体からの一次生物学的試料、ならびに（i i）悪性症状を有さないことが周知である第二の被験体からの第二の生物学的試料の各々を、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも1つの抗体と接触させて、（i）該試料中の可溶性形態で天然に存在する分子、および（i i）細胞表面分子からなる群から選択される分子の該第一および第二の生物学的試料の各々における存在を確定する工程であって、該第一および第二の生物学的試料は各々、該第一および第二の被験体からの細胞をそれぞれ含み、該分子は、該少なくとも1つの抗体と反応性がある抗原決定基を有する、工程、

40

50

第一の生物学的試料中の該抗体と該抗原決定基の検出可能な結合を、第二の生物学的試料中の該抗体と該抗原決定基の検出可能な結合のレベルと比較する工程、およびそれから悪性症状の存在を検出する工程を含む、方法。

【請求項 39】

被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、以下の工程：H E 4 a 抗原ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体の存在を被験体からの生物学的試料中で検出する工程を含む、方法。

【請求項 40】

前記 H E 4 a 抗原ポリペプチドは、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 11 および配列番号 13 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

H E 4 a 抗原ポリペプチドと特異的に結合するモノクローナル免疫グロブリン可変部を含む H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な抗体であって、前記 H E 4 a 抗原ポリペプチドは、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 11 および配列番号 13 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、抗体。

【請求項 42】

融合タンパク質である、請求項 41 に記載の抗体。

【請求項 43】

単鎖抗体である、請求項 41 に記載の抗体。

【請求項 44】

H E 4 a 抗原ポリペプチドがグリコシル化される、請求項 41 に記載の抗体。

【請求項 45】

(i) 配列番号 11 に記述される H E 4 a 抗原ポリペプチド配列と特異的に結合するが、配列番号 9 に記述されるポリペプチド配列とは特異的に結合しない抗体、(ii) 配列番号 9 に記述されるポリペプチド配列と特異的に結合し、そして配列番号 11 に記述される H E 4 a ポリペプチド配列と特異的に結合する抗体からなる群から選択される、請求項 41 に記載の抗体。

【請求項 46】

モノクローナル抗体 2 H 5、3 D 8 および 4 H 4 からなる群から選択される、請求項 41 に記載の抗体。

【請求項 47】

被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、以下の：該試料中の可溶性形態である天然の抗体の該 H E 4 a ポリペプチドとの結合を検出するための条件下でかつそのために十分な時間にわたり、被験体からの生物学的試料を検出可能に標識された H E 4 a ポリペプチドと接触させる工程、および悪性症状の存在を検出する工程を含む方法。

【請求項 48】

(a) H E 4 a 抗原ポリペプチドおよび少なくとも 1 つの融合ドメインを含む融合タンパク質をコードする核酸分子であって、該ポリペプチドが配列番号 5 に記述されるアミノ酸配列、配列番号 7 に記述されるアミノ酸配列、配列番号 11 に記述されるアミノ酸配列および配列番号 13 に記述されるアミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、融合タンパク質をコードする核酸分子、ならびに

(b) 中等度のストリンジェント条件下で該 (a) の核酸分子とハイブリダイズすることが可能な、そして H E 4 a ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群から選択される単離核酸分子であって、配列番号 9 に記述されるヌクレオチド配列からなる核酸分子ではない、単離核酸分子。

10

20

30

40

50

【請求項 49】

請求項 48 に記載の核酸分子と相補的な少なくとも 15 連続ヌクレオチドを含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 50】

融合ドメインに融合される H E 4 a ポリペプチド配列を含む、融合タンパク質。

【請求項 51】

前記融合ドメインは免疫グロブリンあるいはその改変体または断片である、請求項 50 に記載の融合タンパク質。

【請求項 52】

前記 H E 4 a ポリペプチドに融合されるポリペプチド配列はプロテアーゼにより切断可能である、請求項 50 に記載の融合タンパク質。 10

【請求項 53】

前記ポリペプチド配列はリガンドに対する親和性を有する親和性タグポリペプチドである、請求項 50 に記載の融合タンパク質。

【請求項 54】

請求項 48 に記載の核酸に作動可能に連結される少なくとも 1 つのプロモーターを含む、組換え発現構築物。

【請求項 55】

前記プロモーターは調節されるプロモーターである、請求項 54 に記載の発現構築物。

【請求項 56】

前記 H E 4 a ポリペプチドは第二の核酸配列のポリペプチド産物との融合タンパク質として発現される、請求項 54 に記載の発現構築物。 20

【請求項 57】

前記第二の核酸配列のポリペプチド産物は免疫グロブリン定常部である、請求項 56 に記載の発現構築物。

【請求項 58】

組換えウイルス発現構築物である、請求項 54 に記載の組換え発現構築物。

【請求項 59】

請求項 54 ～ 58 のいずれか一項に記載の組換え発現構築物を含む、宿主細胞。

【請求項 60】

原核生物細胞である、請求項 59 に記載の宿主細胞。 30

【請求項 61】

真核生物細胞である、請求項 59 に記載の宿主細胞。

【請求項 62】

組換え H E 4 a ポリペプチドを産生する方法であって、以下の：

請求項 48 に記載の核酸配列に作動可能に連結される少なくとも 1 つのプロモーターを含む組換え発現構築物を含む宿主細胞を培養する工程を含む方法。

【請求項 63】

前記プロモーターは調節されるプロモーターである、請求項 62 に記載の方法。 40

【請求項 64】

組換え H E 4 a ポリペプチドを産生する方法であって、

請求項 58 に記載の組換えウイルス発現構築物に感染された宿主細胞を培養する工程を含む、方法。

【請求項 65】

試料中の H E 4 a 発現を検出する方法であって、以下の：

(a) 請求項 49 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、配列番号 11 に記述されるアミノ酸配列を有する H E 4 a ポリペプチドあるいはその断片または改変体をコードする核酸配列を含む試料と接触させる工程、および

(b) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする H E 4 a ポリペプチド 50

コード核酸の量を試料中で検出し、それから前記試料中のH E 4 a 発現を検出する工程を含む、方法。

【請求項 6 6】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするH E 4 a ポリペプチドコード核酸の量は、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて確定される、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするH E 4 a ポリペプチドコード核酸の量は、ハイブリダイゼーションアッセイを用いて確定される、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記試料はRNA または cDNA 調製物を含む、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 9】

悪性症状の治療方法であって、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な抗体であって、配列番号 1 1 に記述されるアミノ酸配列を有するH E 4 a 抗原ポリペプチドと特異的に結合するモノクローナル免疫グロブリン可変部を含む抗体を含む組成物を、それを必要とする患者に投与する工程を含む、方法。

【請求項 7 0】

悪性症状を治療する方法であって、配列番号 1 1 に記述されるアミノ酸配列を有するH E 4 a ポリペプチドを含む組成物またはその断片を、それを必要とする患者に投与する工程を含む、方法。

【請求項 7 1】

前記組成物は、配列番号 1 1 に記述されるアミノ酸配列を有するH E 4 a ポリペプチドまたはその断片と特異的に結合することが可能な抗体の患者における産生を誘導する、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記組成物は、配列番号 1 1 に記述されるアミノ酸配列を有するH E 4 a ポリペプチドまたはその断片を特異的に認識可能なTリンパ球を患者において誘導する、請求項 7 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は一般的に、悪性症状（例えば癌）に、特にある種の癌腫（例えば卵巣癌）を診断するための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

癌は、広範な疾患を包含しており、世界中で4人に約1人が罹患している。癌の悪影響の重症度は顕著であり、医療政策および手法に、ならびに一般的に社会に影響を及ぼす。多くの種類の癌の特質は悪性細胞の急速かつ非調節性増殖であるため、癌へのアプローチ改善に際しての中心となる問題は、早期の検出および診断の必要性である。悪性症状の存在を診断するための正確で、信頼できる判定基準を開発するために、多数の試みがなされてきた。特に、癌細胞により独自に発現されるかまたは悪性症状を有する被験体において顕著に高レベルで存在する腫瘍関連抗原として周知である血清学的に限定された抗原性マーカーの使用に向けて努力がなされてきた。

【0 0 0 3】

しかしながら腫瘍関連抗原発現の高不均質性、例えば癌抗原の極端な多様性のために、癌診断に有用である付加的な腫瘍マーカーが必要である。癌関連抗原と反応性の多数のモノクローナル抗体が周知である（例えばP a p s i d e r o , 1 9 8 5 S e m i n . S u r g . O n c o l . 1 : 1 7 1 , A l l u m e t a l . , 1 9 8 6 S u r g . A n n . 1 8 : 4 1 参照）。これらのそしてその他のに記載されたモノクローナル抗体は、種

10

20

30

40

50

々の異なる癌関連抗原、例えば糖タンパク質、糖脂質およびムチンと結合する（例えば Fink et al., 1984 Prog. Clin. Pathol. 9:121; 米国特許第4, 737, 579号; 米国特許第4, 753, 894号; 米国特許第4, 579, 827号; 米国特許第4, 713, 352号参照）。多数のこのようなモノクローナル抗体は、所定の細胞系列または組織型から生じるある腫瘍上では制限発現を示すが、他の腫瘍では示さない腫瘍関連抗原を認識する。

【0004】

特定の種類の悪性疾患を同定するために有用であるようである腫瘍関連抗原の例は相対的にほんのわずかである。例えばモノクローナル抗体 B72.3 は、多数の異なる癌、例えばすべてでないがほとんどの卵巣癌および圧倒的大多数の非小細胞肺癌、結腸癌および乳癌で選択的に発現される高分子量 ($>10^6$ Da) 腫瘍関連ムチン抗原と特異的に結合する（例えば Johnston, 1987 Acta Cytol. 1:537; 米国特許第4, 612, 282号参照）。それにもかかわらず、腫瘍の外科的切除後に細胞関連腫瘍マーカー、例えば B72.3 により認識されるムチン抗原は、実質的腫瘍塊の蓄積前の悪性症状の早期検出が好ましい診断スクリーニングに対する限定的有用性を有し得る。

【0005】

侵襲性外科手術が通常は蓄積腫瘍塊の検出後にのみ示される腫瘍関連抗原に関する外科的切除検体をスクリーニングすることによる特定種類の癌の診断に代わるものは、非侵襲性または最小侵襲性手法により被験体から得られる試料中のこのような抗原を検出するための組成物および方法を提供することである。例えば卵巣およびその他の癌腫においては、一般に、容易に得られる生物学的流体（例えば血清または粘膜分泌物）の試料中で検出可能である多数の可溶性腫瘍関連抗原が存在する。このようなマーカーのひとつは、血流中にも流出される癌関連抗原である CA125 であり、この場合それは血清中で検出可能である（例えば Bast et al., 1983 N. Eng. J. Med. 309:883; Lloyd et al., 1997 Int. J. Canc. 71:842）。血清およびその他の生物学的流体中の CA125 レベルは、卵巣およびその他の癌腫の診断および／または予後プロファイルを提供しようと努力して、他のマーカー、例えば癌胎児性抗原 (CEA)、扁平上皮細胞癌抗原 (SCC)、組織ポリペプチド特異的抗原 (TPS)、シアリル TN ムチン (STN) および胎盤アルカリ性ホスファターゼ (PLAP) のレベルと一緒に測定されてきた（例えば Sarandakou et al., 1997 Acta Oncol. 36:755; Sarandakou et al., 1998 Eur. J. Gynaecol. Oncol. 19:73; Meier et al., 1997 Anticanc. Res. 17 (4B):2945; Kudoh et al., 1999 Gynecol. Obstet. Invest. 47:52; Ind et al., 1997 Br. J. Obstet. Gynaecol. 104:1024; Bell et al. 1998 Br. J. Obstet. Gynaecol. 105:1136; Cioffi et al., 1997 Tumori 83:594; Meier et al. 1997 Anticanc. Res. 17 (4B):2949; Meier et al., 1997 Anticanc. Res. 17 (4B):3019）。

【0006】

しかしながら血清 CA125 の、単独でのまたはその他の周知の指示薬と組合せた、レベル増大は、悪性疾患の、または特定の悪性疾患（例えば卵巣癌）の限定的診断を提供しない。例えば腔液および血清中の CA125、CEA および SCC 増大は、子宮頸部癌および生殖路癌と比較して、良性婦人科学的疾患においてもっとも強く炎症と相関する（例えば Moore et al., 1998 Infect. Dis. Obstet. Gynecol. 6:182; Sarandakou et al., 1997 Acta Oncol. 36:755）。別の実施例として、血清 CA125 増大は、神経芽細胞腫にも随伴し得る（例えば Hirokawa et al., 1998 Surg. Today 28:349）が、CEA および SCC 増大はとりわけ、結腸直腸癌に随伴し得る（

10

20

30

40

50

Gebauer et al., 1997 Anticanc. Res. 17 (4B) : 2939)。別のマーカーである分化抗原メソテリン (mesothelin) は正常中皮細胞の表面で発現され、ある種の癌細胞、例えば上皮性卵巣腫瘍および中皮種でも発現される。メソテリンに関する組成物および方法 (Chang et al., 1992 Canc. Res. 52:181; Chang et al., 1992 Int. J. Canc. 50:373; Chang et al., 1992 Int. J. Canc. 51:548; Chang et al., 1996 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93:136; Chowdhury et al., 1998 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:669; Yamaguchi et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:805; Kojima et al., 1995 J. Biol. Chem. 270:21984)、ならびに構造的に関連するメソテリン関連抗原 (MRA; 例えば Scholler et al., 1999 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96:11531 参照) が当該技術分野で周知であり、例としては、WO00/50900 に、ならびに米国特許出願 09/513, 597 号に記載されたような癌の検出および療法における使用が挙げられる。したがって、用いられるべき付加的マーカー、例えば多因子診断スクリーニングに有用なマーカーがぜひとも必要であることは明らかである (例えば Sarandakou et al., 1998; Kudoh et al., 1999; Ind et al., 1997 参照)。

【0007】

以下でさらに詳細に記載されるように、このような付加的マーカーは、多様な機能を有する小型の酸-および熱安定性分子の異種の群を含み、ヒト精巣上体 4-ジスルフィドコアタンパク質または「HE4」を含むタンパク質の「4-ジスルフィドコア」ファミリー内から有用に提供され得た (Kirchhoff et al., 1991 Biol. Reprod. 45:350-357; Wang et al., 1999 Gene 229:101; Schummer et al., 1999 Gene 238:375)。4-ジスルフィドコアファミリー成員ポリペプチドのアミノ酸配列中の 8 つのコアシステイン残基の保存スペーシングは、緊密な、安定した構造へのこれらの分子のフォールディングを指図すると考えられる。4-ジスルフィドコアファミリーの成員の多くは、プロテアーゼ阻害剤である。しかしながらいくつかのファミリー成員、例えば HE4 に関しては、機能は未だ限定的に確認されてはいない。4-ジスルフィドコアファミリーのタンパク質のその他の成員としては、Wp-タンパク質、例えば SLP-1、および ps20 が挙げられ、そして 4-ジスルフィドコアファミリーのタンパク質の付加的成員がいくつかの種から単離されている。これらのタンパク質は、4-ジスルフィドコアにより安定化されるいくつかの特性、例えばそれらのサイズが小さいこと、ならびにそれらの熱-および酸安定性構造を共有する。これらのタンパク質は分泌細胞により作られ、粘膜分泌物、例えば精漿、乳汁、耳下腺および子宮頸部分泌物中に見出される。

【0008】

4-ジスルフィドコアファミリーの原型分子である Wp-タンパク質は乳漿リンタンパク質としても周知であり、クローン化されている (Dandekar et al., 1982 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3987-3991)。乳漿リンタンパク質は、約 1~2 mg/ml で乳汁中で発現されるが、遺伝子が過メチル化される乳癌によっては発現されない。プロテアーゼに対する阻害活性は、乳漿リンタンパク質に関しては見出されていない。しかしながらトランスジェニック動物中の遺伝子の過剰発現は、哺乳動物肺胞細胞の発達を減損し (Burdon et al., 1991 Mechanisms Dev. 36:67-74)、このことは、乳汁分泌中のこのタンパク質に関する重要な役割を示唆する。別の 4-ジスルフィドコアファミリータンパク質である分泌白血球プロテアーゼ阻害剤 (SLP-1) はヒト子宮頸部からクローン化されたが、他の粘膜分泌物、例えば精漿および耳下腺分泌液中にも存在する (Heinzel et al., 1986 Eur. J. Biochem. 160:61-67)。SL

P-1は、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼおよびカテプシンGの強力な阻害剤である12kDaの二ドメインタンパク質である。キモトリプシンと複合されたSLP-1の結晶構造が発表されている(Grutter et al, 1988 EMBO J. 7:345-351)。これらのデータは、SLP-1ドメインが独立して働き、同時に異なるプロテアーゼを阻害することを示し、そしてその2つがキモトリプシンと結合するドメイン中の小(8アミノ酸)活性部位を同定した。

【0009】

エラフィン、このポリペプチドのアミノ酸配列を確定するためにヒト乾癬皮膚から単離された4-ジスルフィドコアファミリーの単一ドメインタンパク質成員である(Wiedow et al, 1990 J. Biol. Chem. 265:14791-14795)。エラフィンはエラスターゼの強力な阻害剤であるが、その他のプロテアーゼ、例えばトリプシン、キモトリプシン、カテプシンGまたはプラスミンに対する明らかな阻害活性を示さない。エラフィンのアミノ酸配列は、SLP-1のC末端領域(ドメイン1)と38%の相同性を示す。ps20タンパク質をコードする遺伝子が近年、平滑筋から単離されたが、ps20タンパク質は哺乳動物細胞中への遺伝子のトランスフェクションにより発現された(Larsen et al, 1998 J. Biol. Chem. 273:4574-4584)。ps20は癌細胞の増殖を抑制することが見出され、そしてps20は、増殖阻害剤としても言及されてきた。しかしながら今までのところこのタンパク質に関しては、直接的機能活性、例えばプロテアーゼの抑制は記載されていない。

【0010】

上記のように、プロテアーゼ阻害活性は、精巣上体上皮細胞で最初に同定されたHE4に関しては同定されていないが、その他の小型酸および熱安定性プロテイナーゼ阻害剤は精漿から特性化されており、精子を結合し、精子と卵の細胞外マトリクスとの相互作用を調節することにより受精能に一役を果たすと考えられた(Fitz et al., in *Proteases and Biological Controls*, Reich, E., Rifkin, D., Shaw, E. (eds.), 1975 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 737-766; Saling, 1989 *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 11:339-388)。HE4 cDNAは、ヒト精巣上体から最初に単離され(Kirchhoff et al., 1991 *Biol. Reprod.* 45:350-357)、HE4 cDNAは後に、卵巣癌から構築されたcDNAライブラリー中で高頻度で検出された(Wang et al., 1999 *Gene* 229:101; Schummer et al., 1999 *Gene* 238:375)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

上記の理由のために、明らかに、悪性症状(例えば癌腫)の検出および治療のための改良型診断マーカーおよび治療用標的の必要性が存在する。本発明の組成物および方法は、可溶性形態でおよび/または細胞表面で天然に生じるポリペプチドを検出するためにHE4および/またはHE4関連抗原に特異的な抗体を用いて悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法を提供し、そしてその他の関連利点を提供することにより、従来技術のこれらの限界を克服する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明の要約

本発明は、被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングするのに有用な組成物および方法に向けられる。特に本発明は、HE4aとして本明細書中で言及されるHE4ポリペプチドの可溶性および細胞表面形態、または可溶性形態で天然に生ずる、そしてHE4aポリペプチドに特異的である少なくとも1つの抗体と反応性の抗原決定基を有する

H E 4 a 分子が被験体からの生物学的試料中に検出され得る、という予期せぬ知見に関する。

【0013】

本発明の一つの局面は、被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、抗体と抗原決定基との結合を検出するための条件下で、そのために十分な時間、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも1つの抗体と被験体からの生物学的試料（被験体からの少なくとも1つの細胞を含む）を接触させることであって、それにより試料中の可溶性形態で天然に存在するかまたは特定の実施形態では細胞表面分子として存在する、少なくとも1つの抗体と反応性がある抗原決定基を有する分子の生物学的試料中での存在を確定する、接触させること、およびそれから悪性症状の存在を検出することを包含する。実施形態によっては、生物学的試料は、血液、血清、漿液、血漿、リンパ、尿、脳脊髄液、唾液、粘膜分泌物、腔分泌物、腹水、胸水、囲心腔液、腹膜液、腹腔液、培地、ならし培地または灌注液である。

【0014】

ある種の他の実施形態では、H E 4 a 抗原ポリペプチドは、配列番号5、7、9または11のうちのいずれか一つに記述されるアミノ酸配列を有するポリペプチドあるいはその断片または誘導体を含む。別の実施形態では、H E 4 a 抗原ポリペプチド改変体はスプライス改変体である。本発明の特定の実施形態では、抗体はポリクローナル抗体を含み、他の実施形態では抗体は親和性精製抗体を含む。特に好ましい実施形態では、抗体はモノクローナル抗体を含む。別の実施形態では、抗体は組換え抗体を含み、別の実施形態では、抗体はキメラ抗体を含む。別の実施形態では、抗体はヒト化抗体を含む。別の実施形態では、抗体は単鎖抗体を含む。

【0015】

本発明の実施形態によっては、抗体と抗原決定基の結合の検出は、放射性核種の検出を包含する。他の実施形態では、抗体と抗原決定基の結合の検出は、蛍光体の検出を包含する。別の実施形態では、抗体と抗原決定基の結合の検出は、アビジン分子とビオチン分子の間の結合事象の検出を包含し、別の実施形態では、抗体と抗原決定基の結合の検出は、ストレプトアビジン分子とビオチン分子の間の結合事象の検出を包含する。特定の実施形態では、抗体と抗原決定基の結合の検出は、酵素反応の産物の分光光度検出を包含する。本発明の実施形態によっては、上記少なくとも1つの抗体は検出可能に標識され、一方ある種の他の実施形態では、上記少なくとも1つの抗体は検出可能に標識されず、抗体と抗原決定基の結合の検出は間接的である。

【0016】

本発明の特定の実施形態によると、悪性症状は腺癌、中皮腫、卵巣癌、膵臓癌あるいは非小細胞肺癌であり得る。

【0017】

本発明の別の局面は、被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、抗体と抗原決定基との結合を検出するための条件下で、そのために十分な時間、少なくとも1つの抗体と被験体からの生物学的試料を接触させることであって、それにより（i）試料中の可溶性形態で天然に存在する分子、ならびに（ii）細胞表面分子からなる群から選択される分子の生物学的試料中での存在を確定する、接触させること（この場合、上記試料は被験体からの細胞を含み、上記分子は上記少なくとも1つの抗体と反応性がある抗原決定基を有し、その抗原結合部位は、2 H 5、3 D 8 または4 H 4 であるモノクローナル抗体の免疫特異的結合を競合的に抑制する）、およびそれから悪性症状の存在を検出することを包含する方法を提供することである。

【0018】

本発明の別の局面は、被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、抗体と抗原決定基との結合を検出するための条件下で、そのために十分な時間、少なくとも1つの抗体と被験体からの生物学的試料を接触させることであって、それにより（i）試料中の可溶性形態で天然に存在する分子、ならびに（ii）細胞表面分子から

なる群から選択される分子の生物学的試料中での存在を確定する、接触させること（この場合、上記試料は被験体からの細胞を含み、上記分子は上記抗体と反応性がある抗原決定基を有し、その抗原結合部位は、モノクローナル抗体 3 D 8 の免疫特異的結合を競合的に抑制する）、およびそれから悪性症状の存在を検出することを包含する方法を提供する。

【0019】

本発明のさらに別の局面は、被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、抗体と抗原決定基との結合を検出するための条件下で、そのために十分な時間、少なくとも 1 つの H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な抗体と被験体からの生物学的試料を接触させることであって、それにより（i）試料中の可溶性形態で天然に存在する分子、ならびに（i i）細胞表面分子からなる群から選択される分子の生物学的試料中での存在を確定する、接触させること（この場合、上記試料は被験体からの細胞を含み、上記分子は上記少なくとも 1 つの抗体と反応性がある抗原決定基を有し、その抗原結合部位は、2 H 5、3 D 8 および 4 H 4 からなる群から選択されるモノクローナル抗体の免疫特異的結合を競合的に抑制し）、上記少なくとも 1 つの抗原は、H E 4 a 抗原に免疫特異的に結合する、およびそれから悪性症状の存在を検出することを包含する方法を提供する。特定の実施形態では、H E 4 a 抗原はモノクローナル抗体 3 D 8、2 H 5 または 4 H 4 とも免疫特異的に反応性がある。

10

【0020】

別の局面に向けると、本発明は、被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、抗体と抗原決定基との結合を検出するための条件下で、そのために十分な時間、少なくとも 1 つの H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも 1 つの抗体と被験体からの生物学的試料を接触させることであって、それにより（i）試料中の可溶性形態で天然に存在する分子、ならびに（i i）細胞表面分子からなる群から選択される分子の生物学的試料中での存在を確定する、接触させること（この場合、上記試料は被験体からの細胞を含み、上記分子は上記少なくとも 1 つの抗体と反応性がある抗原決定基を有し、その抗原結合部位は、2 H 5 または 4 H 4 であるモノクローナル抗体の免疫特異的結合を競合的に抑制し、上記少なくとも 1 つの抗原は、H E 4 a 抗原に免疫特異的に結合する）、およびそれから悪性症状の存在を検出することを包含する方法を提供する。特定の実施形態では、メソテリン関連抗原は 3 D 8 とも免疫特異的に反応性がある。

20

【0021】

別の局面に向けると、本発明は、被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、少なくとも 1 つの固定された第一の抗体を H E 4 a 抗原ポリペプチドと特異的に結合させ、それにより免疫複合体を形成させるための条件下で、そのために十分な時間、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも 1 つの固定された第一の抗体と被験体からの生物学的試料を接触させることであって、それにより試料中の可溶性形態で天然に存在する分子の生物学的試料中での存在を確定する、接触させること、上記少なくとも 1 つの固定された第一の抗体と特異的に結合しない試料の構成成分を除去すること、および上記少なくとも 1 つの第二の抗体と上記 H E 4 a 抗原ポリペプチドの特異的結合を検出するための条件下で、そのために十分な時間、上記免疫複合体を H E 4 a 抗原ポリペプチド少なくとも 1 つの第二の抗体と接触させること（この場合、上記少なくとも 1 つの第二の抗体の抗原結合部位はモノクローナル抗体 2 H 5 の免疫特異的結合を競合的に抑制しない）、およびそれから悪性症状の存在を検出することを包含する方法を提供する。

30

40

【0022】

本発明のさらに別の局面は、被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、少なくとも 1 つの固定された第一の抗体を H E 4 a 抗原ポリペプチドと特異的に結合させ、それにより免疫複合体を形成させるための条件下で、そのために十分な時間、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも 1 つの固定された第一の抗体と被験体からの生物学的試料を接触させることであって、それにより試料中の可溶性形態で天然に存在する分子の生物学的試料中での存在を確定する、接触させること（この場合、上記少なくとも 1 つの第一の抗体の抗原結合部位はモノクローナル抗体 3 D 8 の免疫特異的

50

結合を競合的に抑制する)、上記少なくとも1つの固定された第一の抗体と特異的に結合しない試料の構成成分を除去すること、および上記少なくとも1つの第二の抗体と上記H E 4 a 抗原ポリペプチドの特異的結合を検出するための条件下で、そのために十分な時間、上記免疫複合体をH E 4 a 抗原ポリペプチド少なくとも1つの第二の抗体と接触させること(この場合、上記少なくとも1つの第二の抗体の抗原結合部位は、モノクローナル抗体2 H 5 の免疫特異的結合を競合的に抑制しない)、およびそれから悪性症状の存在を検出することを包含する方法を提供する。

【0023】

本発明の別の局面は、被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、少なくとも1つの固定された第一の抗体をH E 4 a 抗原ポリペプチドと特異的に結合させ、それにより免疫複合体を形成させるための条件下で、そのために十分な時間、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも1つの固定された第一の抗体と被験体からの生物学的試料を接触させることであって、それにより試料中の可溶性形態で天然に存在する分子の生物学的試料中での存在を確定する、接触させること(この場合、上記少なくとも1つの第一の抗体の抗原結合部位はモノクローナル抗体3 D 8 の免疫特異的結合を競合的に抑制する)、上記少なくとも1つの固定された第一の抗体と特異的に結合しない試料の構成成分を除去すること、および上記少なくとも1つの第二の抗体とH E 4 a 抗原ポリペプチドの特異的結合を検出するための条件下で、そのために十分な時間、上記免疫複合体をH E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも1つの第二の抗体と接触させること(この場合、上記少なくとも1つの第二の抗体の抗原結合部位はモノクローナル抗体2 H 5 の免疫特異的結合を競合的に抑制しない)、およびそれから悪性症状の存在を検出することを包含する方法を提供する。

【0024】

特定の実施形態では、本発明の方法は、悪性症状の少なくとも1つの可溶性マーカーの試料中の存在を確定すること(上記マーカーはメソテリン関連抗原、癌胎児性抗原、C A 1 2 5、シアリルT N、扁平上皮細胞癌抗原、組織ポリペプチド抗原あるいは胎盤アルカリ性ホスファターゼである)をさらに包含する。

【0025】

本発明の別の局面は、被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法を提供することであって、抗体と抗原決定基との結合を検出するための条件下で、そのために十分な時間、(i)悪性症状を有する疑いのある一次被験体からの一次生物学的試料、ならびに(ii)悪性症状を有さないことが周知である第二の被験体からの第二の生物学的試料の各々を、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも1つの抗体と接触させることであって、それにより(i)試料中の可溶性形態で天然に存在する分子、および(ii)細胞表面分子からなる群から選択される分子の上記一次および第二の生物学的試料の各々における存在を確定する、接触させること(この場合、上記一次および第二の生物学的試料は各々、上記一次および第二の被験体からの細胞をそれぞれ含み、上記分子は、上記少なくとも1つの抗体と反応性がある抗原決定基を有する)、および一次生物学的試料中の上記抗体と上記抗原決定基の検出可能な結合を、第二の生物学的試料中の上記抗体と上記抗原決定基の検出可能な結合のレベルと比較すること、およびそれから悪性症状の存在を検出することを包含する方法を提供することである。

【0026】

別の局面において、本発明は被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、H E 4 a 抗原ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体の存在を被験体からの生物学的試料中で検出することを含む方法を提供する。特定の実施形態において、メソテリン(mesothelin)関連抗原ポリペプチドは、配列番号5、配列番号7、配列番号11または配列番号13のうちのいずれかに記述されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0027】

別の局面に向けると、本発明はH E 4 a 抗原ポリペプチドと特異的に結合するモノクロー

ナル免疫グロブリン可変部を含む、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な抗体であって、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 1 1 または配列番号 1 3 のうちのいずれかに記述されるアミノ酸配列を有する抗体。特定の実施形態では、抗体は融合タンパク質であり、一方ある種の他の実施形態では、抗体は単鎖抗体である。ある種の他の実施形態では、H E 4 a 抗原ポリペプチドはグリコシル化ポリペプチドをさらに含む。別の実施形態では、抗体は配列番号 1 1 に記述される H E 4 a 抗原ポリペプチド配列と特異的に結合するが、配列番号 9 に記述されるポリペプチド配列とは特異的に結合せず、あるいは抗体は配列番号 1 1 に記述される H E 4 a 抗体ポリペプチド配列および配列番号 9 に記述されるポリペプチド配列と特異的に結合する。特定の実施形態において、抗体はモノクローナル抗体 2 H 5、3 D 8 または 4 H 4 である。

10

【0028】

さらに別の局面において、本発明は被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法であって、試料中での可溶性形態で天然で存在する抗体の H E 4 a ポリペプチドとの結合を検出するための条件下で、そのために十分な時間、被験体からの生物学的試料を検出可能に標識された H E 4 a ポリペプチドと接触させること、およびそれから悪性症状の存在を検出することを含む。

【0029】

別の局面に目を向けると、本発明は、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 1 1 または配列番号 1 3 に記述されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである H E 4 a 抗原ポリペプチドをコードする核酸分子であるか、あるいは H E 4 a 抗原ポリペプチドまたは融合タンパク質をコードし、または中等度ストリンジェント条件下で H E 4 a 抗原をコードするこのような核酸分子とハイブリダイズすることが可能な核酸分子である単離核酸分子を提供するが、この場合、単離核酸分子は、配列番号 9 に記述されるヌクレオチド配列からなる核酸分子ではない。特定の実施形態では、本発明は、H E 4 a 抗原ポリペプチドをコードする核酸分子と相補的である少なくとも 1 5 個の連続ヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。

20

【0030】

他の実施形態では、本発明は、H E 4 a 抗原ポリペプチドに融合されるポリペプチド配列を含む融合タンパク質を提供する。さらなる特定の実施形態では、融合ドメインは、免疫グロブリンあるいはその改変体または断片である。さらなる実施形態では、H E 4 a 抗原ポリペプチドに融合されるポリペプチド配列は、プロテアーゼにより切断される。別の実施形態では、ポリペプチド配列は、リガンドに対する親和性を有する親和性タグポリペプチドである。

30

【0031】

他の実施形態では、本発明は、上記のような H E 4 a 抗原ポリペプチドをコードする核酸分子に作動可能に連結される少なくとも 1 つのプロモーターを含む組換え発現構築物を提供する。特定の実施形態では、プロモーターは調節されたプロモーターであり、他の特定の実施形態では、H E 4 a 抗原ポリペプチドが第二の核酸配列のポリペプチド産物との融合タンパク質として発現される。さらなる実施形態では、第二の核酸配列のポリペプチド産物は免疫グロブリン定常部である。別の実施形態では、発現構築物は組換えウイルス発現構築物である。他の実施形態によると、本発明は、本明細書中に提供されるような組換え発現構築物を含む宿主細胞を提供する。1 つの実施形態では、宿主細胞は原核生物細胞であり、別の実施形態では、宿主細胞は真核生物細胞である。

40

【0032】

別の局面では、本発明は、本明細書中に提供されるような H E 4 a 抗原ポリペプチドをコードする核酸分子に作動可能に連結される少なくとも 1 つのプロモーターを含む組換え発現構築物を含む宿主細胞を培養することによって、組換え H E 4 a 抗原ポリペプチドを産生する方法を提供する。特定の実施形態では、プロモーターは調節されたプロモーターである。別の実施形態では、本発明は、組換え H E 4 a 抗原ポリペプチドを発現するために、本明細書で提供される組換えウイルス発現構築物に感染された宿主細胞を培養すること

50

によって、組換えH E 4 a 抗原ポリペプチドを産生する方法を提供する。

【0033】

別の実施形態では、本発明はまた、試料中のH E 4 a 発現を検出する方法であって、上記アンチセンスオリゴヌクレオチドを、配列番号11に記述されるアミノ酸配列を有するH E 4 a ポリペプチドあるいはその断片または改変体をコードする核酸配列を含む試料と接触させること、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするH E 4 a ポリペプチドコード核酸の量を試料中で検出して、それから試料中のH E 4 a 発現を検出することによって、試料中のH E 4 a 発現を検出する方法を提供する。別の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするH E 4 a ポリペプチドコード核酸の量がポリメラーゼ連鎖反応を用いて確定される。別の実施形態では、アンチセンスオリ
10
ゴヌクレオチドとハイブリダイズするH E 4 a ポリペプチドコード核酸の量がハイブリダイゼーションアッセイを用いて確定される。別の実施形態では、試料はRNAまたはcDNA調製物を含む。

【0034】

本発明の他の特定の実施形態によれば、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な抗体であって、配列番号11に記述されるアミノ酸配列を有するH E 4 a 抗原ポリペプチドと特異的に結合するモノクローナル免疫グロブリン可変部を含む抗体を含む組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、悪性症状を治療する方法が提供される。別の実施形態では、本発明は、悪性症状を治療する方法であって、配列番号11に記述されるアミノ酸配列を有するH E 4 a ポリペプチドまたはその断片を含む組成物を、それを必要とする患
20
者に投与することを含む方法が提供される。さらなる特定の実施形態では、組成物は、配列番号11に記述されるアミノ酸配列を有するH E 4 a ポリペプチドまたはその断片と特異的に結合可能な抗体の患者における産生を誘導する。また、さらなる他の特定の実施形態では、組成物は、配列番号11に記述されるアミノ酸配列を有するH E 4 a ポリペプチドまたはその断片を特異的に認識可能なTリンパ球を患者において誘導する。他の特定の
30
実施形態によれば、受胎、避妊、および／または受精能 (f e r t i l i t y) を変更する (例えば適切な対照と比較して統計学的に有意の方法で増大または低減する) 組成物および方法であって、H E 4 a ポリペプチドあるいはその断片または改変体 (例えば融合タンパク質) を投与すること、またはH E 4 a ポリペプチドあるいはその断片または改変体と特異的に結合する免疫グロブリン可変部を含む組成物を投与することを含む、組成物
40
および方法が提供される。ある種の他の実施形態によれば、受胎、避妊および／または受精能を変更する (例えば適切な対照と比較して、統計学的有意の方法で増大または低減する) 組成物および方法であって、H E 4 a ポリペプチドあるいはその断片または改変体 (例えば融合タンパク質) を投与すること、もしくはH E 4 a ポリペプチドあるいはその断片または改変体と特異的に結合する免疫グロブリン可変部を含む組成物を投与することを含む組成物および方法が提供される。

【0035】

本発明のこれらのおよびその他の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照すれば明らかになる。さらに、本発明のある種の局面をより詳細に記述する種々の参照文献が本明細書中に記述されており、したがってそれらのに記載内容は全て、参照により本明細
40
書中に援用される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

発明の詳細な説明

本発明は、一部は、H E 4 に非常によく似ているが、それとは異なる配列を示す、本明細書中に記載されたようなタンパク質の「4-ジスルフィドコア」ファミリーの新規の成員であるH E 4 a の発見に関する (K i r c h h o f f e t a l . , 1991 B i o l . R e p r o d u c t . 45 : 350-357)。本明細書中に示されたように、H E 4 a (H E 4 ではない) は、甚だ予期せぬことに、ある種の悪性疾患において、例えば卵
50
巣癌において、ならびに多数のその他のヒト組織中で、ヒト精巢上皮細胞におけるH E 4

の制限発現パターンとは大いに異なって、過剰発現されることが示されている（K i r c h h o f f e t a l . , 1991）。本発明は、一部は、被験体中で天然に生じるH E 4 aポリペプチドとして本明細書中で言及されるある種の遺伝子産物の細胞表面および／または可溶性形態の検出を提供する本明細書に記載された組成物および方法から得られる意外な利点、例えばある種の癌腫（例えば卵巣癌）を有する被験体におけるこのようなポリペプチドのレベル増大にも関する。したがって本発明は、このような細胞表面および／または可溶性H E 4 aポリペプチドの特異的検出による被験体における悪性症状の検出および診断のための有用な組成物および方法を提供する。

【0037】

以下で詳細に記載されるように、本発明の特定の実施形態は、可溶性および細胞表面形態のH E 4 aおよびH E 4ポリペプチド、例えばH E 4およびH E 4 aポリペプチド抗原および融合タンパク質を含むH E 4 aポリペプチドに関する。ある種の他の実施形態では、本発明は、H E 4 aポリペプチドの断片、誘導体および／または類似体に関する。要するに、本発明の特定の実施形態によれば、被験体からの生物学的試料をヒトH E 4 aポリペプチドに特異的な抗体と接触させることにより、被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法を提供する。H E 4 aポリペプチドおよびH E 4 a-I g融合タンパク質の完全アミノ酸および核酸コード配列は、卵巣癌c D N A由来の核酸分子がK i r c h h o f f e t a l . , (1991)により開示されたようなH E 4とは別個の配列を有する発現産物をコードするという意外な観察、ならびにK i r c h h o f f e t a l . により開示されたようなH E 4発現が精巣上皮細胞に限定される一方、本発明の開示によるH E 4 a発現は卵巣癌において容易に検出可能である、というさらなる予期せぬ観察を含めて、本明細書中に開示されている。

【0038】

本明細書中に記載されているように、当業者がルーチンにそして過度の実験なしで、当該技術分野で周知の方法とともに本発明の教示を用いて、宿主を免疫感作し、H E 4 aポリペプチド特異的抗体産生に関してスクリーニングし得るよう、H E 4 aポリペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体が提供される。例えば組換えH E 4 a発現ベクターおよび宿主細胞（例えば組換えH E 4 a融合タンパク質）の構築は、本明細書中に記載されており、H E 4 a特異的抗体を提供する。

【0039】

本明細書中に開示されたH E 4 aポリペプチドの物理化学的および免疫化学的特性から、そしてここに開示されたH E 4 aをコードする核酸配列を用いて、当業者は、周知の方法に従って特異的抗体を産生および特性化するために用いられ得る組換えH E 4 aも調製し得る。H E 4 aポリペプチドは、適切なプロモーターの制御下で、哺乳動物細胞、酵母、細菌またはその他の細胞中で発現され得る。無細胞翻訳系も、本明細書中に開示されたH E 4 aポリペプチドD N Aコード領域由来のR N Aを用いて、このようなタンパク質を産生するために用いられ得る。原核生物および真核生物宿主とともに用いるための適切なクローニングおよび発現ベクターは、S a m b r o o k e t a l . , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , S e c o n d E d i t i o n , C o l d S p r i n g H a r b o r , N Y , (1989)により記載されている。本発明の好ましい実施形態では、H E 4 aポリペプチドは哺乳動物細胞中で発現され得る。

【0040】

本発明の核酸は、R N Aの形態で、またはD N Aの形態であり、このD N Aはc D N A、ゲノムD N Aおよび合成D N Aを包含する。D N Aは、二本鎖または一本鎖であり得るし、一本鎖である場合には、コード鎖または非コード（アンチセンス）鎖であり得る。本発明に用いるためのH E 4 aポリペプチドをコードするコード配列は、配列番号3、4、6、10または12で提供されるコード配列と同一であり得るし、あるいは遺伝暗号の冗長または縮重の結果として、例えば配列番号10および配列番号12のc D N Aと同一のH E 4 aポリペプチドをコードする異なるコード配列であり得る。したがって本発明は、配

列番号5、配列番号7、配列番号11または配列番号13のアミノ酸配列を有するHE4a抗原ポリペプチドをコードする単離核酸分子、あるいはこのようなHE4aポリペプチドコード核酸とハイブリダイズすることが可能な核酸分子、またはそれらと相補的な配列を有する核酸分子を提供する。

【0041】

改変体は、ネイティブHE4a抗原ポリペプチドまたはその一部分をコードするポリヌクレオチド配列、例えば配列番号10および配列番号12に記述される核酸配列と、好ましくは少なくとも約70%の同一性、さらに好ましくは少なくとも約80%~85%の同一性、もっとも好ましくは少なくとも約90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を示す。同一性%は、当業者に周知のコンピュータアルゴリズムを、例えばAlignまたはBLASTアルゴリズム (Altschul, J. Mol. Biol. 219: 555-565, 1991; Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919, 1992) (これはNCBIウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>) で利用可能である) を用いて配列を比較することにより、容易に確定され得る。デフォルトパラメーターが用いられ得る。

【0042】

ある種の改変体は、ネイティブ遺伝子と実質的に相同である。このようなポリヌクレオチド改変体は、中等度ストリンジェント条件下で、ネイティブHE4a抗原をコードする天然DNAまたはRNA配列 (または相補配列) とハイブリダイズすることが可能である。適切な中等度ストリンジェント条件としては、例えば以下の過程またはそれらの等価物が挙げられる: 5×SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0) の溶液中で予備洗浄する過程; 50℃~65℃、5×SSCでの一晚ハイブリダイズする過程; その後、65℃で20分間、0.1% SDSを含有する2×、0.5×および0.2×SSCの各々で2回洗浄する過程。付加的ストリンジェントなに関しては、条件としては、例えば0.1×SSCおよび0.1% SDS中での60℃で15分間の洗浄、あるいはその等価物が挙げられる。何らかの点で特定の目的となる核酸に対して選択的である適度なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を作り出すための慣例として変更され得るパラメーターを、当業者は容易に理解し、そして、このような条件はとりわけ、ハイブリダイゼーションに関与する特定核酸配列、例えばHE4aポリペプチドをコードする配列番号10および配列番号12として本明細書中に開示されたものの一関数であり得ることをさらに理解する。核酸ハイブリダイゼーション条件の選択に関しては、例えばAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, 1995も参照されたい。

【0043】

HE4aポリペプチド、例えば配列番号11のアミノ酸配列を有するヒトHE4aポリペプチド、または本発明に従って用いるための任意のその他のHE4aポリペプチドをコードする核酸としては: HE4aポリペプチドに関するコード配列のみ; HE4aポリペプチドに関するコード配列および付加的コード配列; HE4aポリペプチドに関するコード配列 (および任意の付加的コード配列) および非コード配列、例えばイントロンあるいはHE4aポリペプチドに関するコード配列の非コード配列5' および/または3' が挙げられるが、これらに限定されない。これらはさらに、例えば調節されたまたは調節可能なプロモーター、エンハンサー、その他の転写調節配列、リプレッサー結合配列、翻訳調節配列または任意のその他の調節核酸配列であり得る1つまたは複数の調節核酸配列を包含し得るが、これらに限定される必要はない。したがって「HE4aポリペプチドをコードする核酸」という用語は、ポリペプチドに関するコード配列のみ、ならびに付加的コードおよび/または非コード配列 (単数または複数) を含む核酸を包含する。

【0044】

本発明はさらに、H E 4 a ポリペプチド、例えば配列番号 1 1 の推定アミノ酸配列を有するヒト H E 4 a ポリペプチドの断片、類似体および誘導体をコードする本明細書中に記載された核酸の改変体に関する。H E 4 a をコードする核酸の改変体は、核酸の天然対立遺伝子改変体または天然に生じない改変体であり得る。当該技術分野で周知であるように、対立遺伝子改変体は、そのいずれかがコード化 H E 4 a ポリペプチドの機能を実質的に変更しない 1 つまたは複数のヌクレオチドの置換、欠失または付加のうちの少なくとも 1 つを有し得る核酸配列の代替的形態である。したがって例えば本発明は、配列番号 5、7 または 1 1 で示されるのと同じ H E 4 a ポリペプチドをコードする核酸、ならびにこのような核酸の改変体を包含し、これらの改変体はこれらのポリペプチドのいずれかの断片、誘導体または類似体をコードし得る。

10

【0045】

H E 4 a の改変体および誘導体は、H E 4 a ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の突然変異により生成され得る。ネイティブアミノ酸配列の変更は、多数の慣用的方法のいずれかにより成し遂げられ得る。突然変異は、ネイティブ配列の断片への結繋を可能にする制限部位が側面に接する突然改変体配列を含有するオリゴヌクレオチドを合成することにより特定の遺伝子座に導入され得る。結繋後、結果として得られる制限再構築配列は、所望のアミノ酸挿入、置換または欠失を有する類似体をコードする。

【0046】

あるいは、変更遺伝子を提供するためにオリゴヌクレオチド位置特異的突然変異誘発手法が用いられ得るが、この場合、予定コドンは置換、欠失または挿入により変更され得る。このような変更の作製方法の例は、Walder et al. (Gene 42:133, 1986); Bauer et al. (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985); Kunkel et al. (Methods in Enzymol. 154:367, 1987); および米国特許第 4, 518, 584 号および第 4, 737, 462 号に開示されている。

20

【0047】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを含むアンチセンス作用物質および H E 4 a ポリペプチドあるいはその改変体または断片をコードする核酸配列に特異的なリボザイムとして使用するための核酸分子の、ならびに遺伝子療法のための標的化送達のための H E 4 a 遺伝子をコードする DNA オリゴヌクレオチドの同定は、当該技術分野で周知の方法を含む。例えばこのようなオリゴヌクレオチドの望ましい特性、長さおよびその他の特徴が周知である。ある種の好ましい実施形態では、このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、本明細書中に提供されるような H E 4 a ポリペプチドをコードする単離核酸分子と相補的な少なくとも 15~30 個の連続ヌクレオチドを含み、ある種の他の好ましい実施形態では、このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、本明細書中に提供されるような H E 4 a ポリペプチドをコードする単離核酸分子と相補的な少なくとも 31~50、51~75、76~125 個またはそれ以上の連続ヌクレオチドを含み得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、スルホン、スルフェート、ケチル、ホスホロジチオネート、ホスホルアミデート、ホスフェートエステルのような結合およびその他のこのような結合を用いることにより、内因性核溶解性酵素による分解に抵抗するよう設計される (例えば Agrwal et al., Tetrahedron Lett. 28:3539-3542 (1987); Miller et al., J. Am. Chem. Soc. 93:6657-6665 (1971); Stetec et al., Tetrahedron Lett. 26:2191-2194 (1985); Moody et al., Nucl. Acids Res. 12:4769-4782 (1989); Uznanski et al., Nucl. Acids Res. 17:1011-1016 (1989))。

30

40

50

ds Res. (1989); Letsinger et al., Tetrahedron 40:137-143 (1984); Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 54:367-402 (1985); Eckstein, Trends Biol. Sci. 14:97-100 (1989); Stein In: Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression, Cohen, Ed, Macmillan Press, London, pp. 97-117 (1989); Jager et al., Biochemistry 27:7237-7246 (1988) 参照)。

【0048】

アンチセンスヌクレオチドは、配列特異的方法で、核酸、例えばmRNAまたはDNAと結合するオリゴヌクレオチドである。相補的配列を有するmRNAに結合される場合、アンチセンスはmRNAの翻訳を防止する(例えば米国特許第5,168,053号(Altman等);米国特許第5,190,931号(Inouye);米国特許第5,135,917号(Burch);米国特許第5,087,617号(Smith)およびClusel et al. (1993) Nucl. Acids Res. 21:3405-3411 (これはダンベルアンチセンスオリゴヌクレオチドを記載する)参照)。三重分子は、二重DNAを結合して、共直線性三重分子を形成し、それにより転写を防止する単一DNA鎖を指す(例えば二重鎖DNA上の標的部に結合する合成オリゴヌクレオチドの製造方法を記載する米国特許第5,176,996号(Hogan等)参照)。

10

20

【0049】

本発明のこの実施形態によれば、特に有用なアンチセンスヌクレオチドおよび三重分子は、HE4aポリペプチドをコードするmRNAの翻訳の抑制が実行されるよう、HE4aポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAのセンス鎖と相補的であるかまたはそれと結合する分子である。

【0050】

リボザイムは、RNA基質、例えばmRNAを特異的に切断して、細胞性遺伝子発現の特異的抑制または妨害を生じるRNA分子である。RNA鎖の切断および/または結繋に参与するリボザイムには少なくとも5つの周知の種類がある。リボザイムは任意のRNA転写体に標的化されて、このような転写体を触媒的に切断し得る(例えば米国特許第5,272,262号;米国特許第5,144,019号、ならびに米国特許第5,168,053号、第5,180,818号、第5,116,742号および第5,093,246号(Cech等)参照)。本発明の特定の実施形態によれば、任意のこのようなHE4amRNA特異的リボザイムまたはこのようなリボザイムをコードする核酸は、宿主細胞に送達されて、HE4a遺伝子発現の抑制を実行し得る。したがってリボザイム等は、核への導入時に、リボザイムが直接転写されるよう、真核生物プロモーター(例えば真核生物ウイルスプロモーター)に連結されたリボザイムをコードするDNAにより宿主細胞に送達され得る。

30

【0051】

生物学的活性を必要とされないアミノ酸残基または配列の種々の付加または置換、あるいは末端または内部残基または配列の欠失をコードする等価のDNA構築物も、本発明に包含される。例えば生物学的活性に不可欠であるというわけではないCys残基をコードする配列は、Cys残基を欠失させるかまたは他のアミノ酸で置換させて、還元時に不正確な分子内ジスルフィド架橋の形成を防止するよう変更され得る。その他の等価物は、KEX2プロテアーゼ活性が存在する酵母系における発現を強化するための隣接二塩基性アミノ酸残基の修飾により調製され得る。EP212,914は、タンパク質中のKEX2プロテアーゼプロセシング部位を不活性化するための部位特異的突然変異誘発の使用を開示する。KEX2プロテアーゼプロセシング部位は、残基を欠失、付加または置換して、Arg-Arg、Arg-LysおよびLys-Arg対をこれらの隣接塩基性残基の発生を排除するよう変更することにより、不活性化される。Lys-Lys対合はKEX2切

40

50

断にかなり低感受性であり、A r g - L y s または L y s - A r g の L y s - L y s への転換は、K E X 2 部位を不活性化するための保存的な、そして好ましいアプローチを示す。

【0052】

適切なDNA配列（単数または複数）は、種々の手法により、選択宿主細胞に適した多数の周知のベクターのいずれかに挿入され得る。概してDNA配列は、当該技術分野で周知の手法により適切な制限エンドヌクレアーゼ部位（単数または複数）に挿入される。クローニング、DNA単離、増幅および精製のための、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼ等を包含する酵素反応のための標準技法、ならびに種々の分離技法は、周知のものであり、当業者に一般的に用いられる。多数の標準技法は、例えばA
u s u b e l e t a l . (1 9 9 3 C u r r e n t P r o t o c o l s i n
M o l e c u l a r B i o l o g y , G r e e n e P u b l . A s s o c . I n c .
& J o h n W i l e y & S o n s , I n c . , B o s t o n , M A) ; S a m b
r o o k e t a l . (1 9 8 9 M o l e c u l a r C l o n i n g , S e c o n d
E d . , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , P l a i n
v i e w , N Y) ; ならびにその他に記載されている。 10

【0053】

哺乳動物発現系の例としては、G l u z m a n , C e l l 23:175 (1981)によりに記載されたサル腎臓線維芽細胞のC O S - 7 株、ならびに適合性ベクターを発現し得るその他の細胞株、例えばC 1 2 7、3 T 3、C H O、H e L a およびB H K 細胞株 20
が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、複製の起点、適切なプロモーターおよびエンハンサー、ならびに任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与体および受容体部位、転写終結配列および5'フランキング非転写化配列を含む。例えばS V 4 0 スプライスおよびポリアデニル化部位に由来するDNA配列を用いて、必要な非転写化遺伝因子を提供し得る。宿主細胞中への構築物の導入は、当業者が熟知している種々の方法、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、D E A E - デキストラン媒介性トランスフェクションまたは電気穿孔 (e l e c t r o p o r a t i o n) (これらに限定されない) により実行され得る (D a v i s e t a l . , 1 9 8 6 , B a s i c
M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y) 。 30

【0054】

本発明はさらに、H E 4 a ポリペプチドに関し、特に悪性症状を検出する方法に関する。好ましい実施形態では、悪性疾患は、H E 4 a ポリペプチドに特異的な少なくとも1つの抗体と反応性がある抗原決定基を有する、天然可溶性分子の生物学的試料中での、あるいは細胞表面の存在を細胞を含む試料中での存在を確定することにより、検出される。別の好ましい実施形態では、悪性疾患は、少なくとも1つの天然H E 4 a ポリペプチドの生物学的試料中での存在を確定することにより、検出される。本明細書中に提供されるように、「H E 4 a 抗原ポリペプチド」または「H E 4 a ポリペプチド」は、その任意の断片、誘導体または類似体を含めた配列番号11のアミノ酸配列を有する任意のポリペプチドを包含し、そして配列番号10または配列番号12を含む核酸分子により、あるいは配列番号10または配列番号12の核酸分子とハイブリダイズすることが可能な核酸分子により 40
コードされる任意のポリペプチド、あるいはその断片、誘導体または類似体も包含する。本発明のある種の好ましい実施形態は、本明細書中に提供されるようなH E 4 a 配列（例えば配列番号10～13）を対象とする組成物および方法を意図するが、これらは、構造、機能および／または細胞型発現あるいは組織分布あるいはその他（例えば抗体限定検出可能エピトープ、ならびに例えばオリゴヌクレオチド限定ハイブリダイゼーション検出）の差に基づいて、K i r c h o f f 等（例えばB i o l . R e p r o d u c t . 45:350; 配列番号8～9）に開示されたH E 4 配列を発現的に除外する。

【0055】

本発明のH E 4 a ポリペプチドは非修飾化ポリペプチドであり得るし、あるいは例えばグリコシル化、リン酸化、脂肪アシル化（例えばグリコシルホスファチジルイノシトール特 50

異的ホスホリパーゼc媒介性加水分解またはその他)、プロテアーゼ切断、脱リン酸化または任意のその他の種類のタンパク質翻訳後修飾(例えば共有的化学結合の形成または切断を包含する修飾)により、翻訳後修飾されたポリペプチドであり得る。

【0056】

「断片」、「誘導体」および「類似体」という用語は、H E 4 a ポリペプチド、H E 4 a 抗原ポリペプチドまたはH E 4 a 融合タンパク質に言及する場合、このようなポリペプチドと本質的に同一の生物学的機能および/または活性を保有する任意のH E 4 a ポリペプチドを指す。したがって類似体としては、H E 4 a 抗原ポリペプチドアイソフォーム、例えば示差的翻訳後修飾化H E 4 a ポリペプチドまたは改変体(例えばスプライス改変体)が挙げられ得る。当該技術分野で周知であるように、「スプライス改変体」は、R N A 転写体の示差的細胞内プロセッシングから生じるポリペプチドの改変体または代替的形態を包含する。例えば2つの別個のm R N A 種は、互いのスプライス改変体であって、この場合、それらは一m R N A 種中の特定のエキソンに対応する配列の全部または一部の封入ならびに他の種からのその非存在によってのみ異なる。当業者が理解するように、その他の構造的関係は、スプライス改変体として一般的にみなされるm R N A 種間に存在し得る。H E 4 a ポリペプチドはさらに、プロタンパク質部分を切断して活性H E 4 a ポリペプチドを生成することにより達成され得るプロタンパク質を包含する。

10

【0057】

H E 4 a ポリペプチドの、またはH E 4 a 抗原ポリペプチドの断片、誘導体および類似体の生物学的機能および/または活性としては、本明細書中に開示されたような、被験体における悪性症状の存在に関してスクリーニングする方法におけるマーカーとしてのこのようなポリペプチドの使用が挙げられるが、これに限定される必要はない。例えば被験体からの試料中で天然で可溶性形態であり、H E 4 a ポリペプチドに特異的な少なくとも1つの抗体と反応性がある抗原決定基を有する分子を検出することにより、H E 4 a ポリペプチドの生物学的機能および/または活性を当業者はモニタリングし得る。さらに、特定の実施形態では、本発明のスクリーニングする方法は、天然で可溶性形態であり、そして(i)悪性症状を有する疑いがある一次被験体からの一次生物学的試料、および(ii)悪性症状がないことが周知である第二の被験体からの第二の生物学的試料の各々において、H E 4 a ポリペプチドに特異的な少なくとも1つの抗体と反応性がある抗原決定基を有する検出可能分子の相対的定量、レベルおよび/または量を比較することを対象とすることに留意すべきである。したがって生物学的試料中のH E 4 a ポリペプチドの相対的定量的存在は、H E 4 a ポリペプチドの生物学的機能および/または活性であり得るが、このような機能および/または活性は、そのように限定されるべきでない。

20

30

【0058】

H E 4 a ポリペプチドの断片、誘導体または類似体は、(i)1つまたは複数のアミノ酸残基が保存または非保存性アミノ酸残基(好ましくは保存アミノ酸残基)で置換されるもの；(ii)付加的アミノ酸、例えばH E 4 a ポリペプチドまたはプロタンパク質配列の精製のために用いられ得るアミノ酸がH E 4 a ポリペプチドに融合されるもの；あるいは(iii)短縮H E 4 a ポリペプチドであり得る。このような断片、誘導体および類似体は、本明細書中の教示から、当業者の範囲内であるとみなされる。

40

【0059】

短縮H E 4 a ポリペプチドは、全長バージョンより短いH E 4 a ポリペプチドを含む任意のH E 4 a ポリペプチド分子であり得る。本発明により提供される短縮分子は短縮生物学的ポリマーを包含し、本発明の好ましい実施形態では、このような短縮分子は、短縮核酸分子または短縮ポリペプチドであり得る。短縮核酸分子は、周知のまたはに記載された核酸分子の全長未満のヌクレオチド配列を有するが、この場合、このような周知のまたはに記載された核酸分子は、当業者がそれを全長分子とみなす限りは、天然、合成または組換え核酸分子であり得る。したがって例えば遺伝子配列に対応する短縮核酸分子は、全長未満の遺伝子を含み、この場合、遺伝子はコードおよび非コード配列、プロモーター、エンハンサーおよびその他の調節配列、フランキング配列等、ならびに遺伝子の一部として

50

認識されるその他の機能性および非機能性配列を含む。別の例では、mRNA配列に対応する短縮核酸分子は、全長未満のmRNA転写体を含有し、これは種々の翻訳化および非翻訳化領域、ならびにその他の機能性および非機能性配列を含み得る。その他の好ましい実施形態では、短縮分子は、特定タンパク質の全長未満のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0060】

本明細書中で用いる場合、「欠失」は、当業者により理解されるようなその一般的意味を有し、例えば本明細書中で提供される短縮分子の場合のような対応する全長分子と比較して、末端または非末端領域からの配列の1つまたは複数の一部分を欠く分子を指し得る。線状生物学的ポリマー（例えば核酸分子またはポリペプチド）である短縮分子は、分子の末端からの1つまたは複数の欠失、あるいは分子の非末端領域からの欠失を有し得るが、この場合、このような欠失は1～1500個の連続ヌクレオチドまたはアミノ酸残基、好ましくは1～500個の連続ヌクレオチドまたはアミノ酸残基、さらに好ましくは1～300個の連続ヌクレオチドまたはアミノ酸残基の欠失であり得る。

【0061】

当該技術分野で周知であるように、2つのポリペプチド間の「類似性」は、ポリペプチドのアミノ酸配列およびそれに対する保存アミノ酸置換を、第二のポリペプチドの配列と比較することにより確定される。2つのポリペプチドまたはヌクレオチド配列間の類似性、あるいは同一性%でさえ、当業者に周知のコンピューターアルゴリズム、例えばBLASTアルゴリズム（Altschul, J. Mol. Biol. 219:555-565, 1991; Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992）（これはNCBIウェブサイト（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>）で利用可能である）を用いて配列を比較することにより、容易に確定され得る。その他の有用なコンピューターアルゴリズムの例は、AlignおよびFASTAのようなプログラムに用いられるものであり、これらは、例えばInstitut de Genetique Humaine, Montpellier, FranceのGenestreamインターネットウェブサイト（www2.igh.cnrs.fr/home.eng.html）でアクセスされ、デフォルトパラメーターとともに用いられ得る。本発明のポリペプチドの断片または一部は、ペプチド合成により対応する全長ポリペプチドを産生するために用いられ、したがって断片は、全長ポリペプチドを産生するための中間体として用いられ得る。

【0062】

「単離される」という用語は、物質がその元の環境（例えばそれが天然に生じる場合には、天然環境）から取り出されることを意味する。例えば生体動物中に存在する天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは単離されないが、天然系中の共存物質のいくつかまたは全部から分離される同一ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、単離される。このようなポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、組成物の一部であり得るし、さらにこのような組成物がその天然環境の一部でない場合は単離される。

【0063】

アフィニティー技法は、本発明の方法に従って用いるためにHE4aポリペプチドを単離するという状況において特に有用であり、そして分離を実行するためにHE4aポリペプチドとの特異的結合相互作用を利用する任意の方法を含み得る。例えばHE4aポリペプチドは共有結合オリゴ糖部分を含有し得るため（例えば実施例に記載される図2参照）、アフィニティー技法、例えばレクチンによる炭水化物結合を可能にする条件下での適切な固定化レクチンとのHE4aポリペプチドの結合は、特に有用なアフィニティー技法であり得る。その他の有用なアフィニティー技法としては、HE4aポリペプチドを単離するための免疫学的技法が挙げられるが、この技法は、複合体中に存在する抗原および抗原決定基に関する部位を併有する抗体間の特異的結合相互作用に拠る。免疫学的技法としては、イムノアフィニティークロマトグラフィー、免疫沈降、固相免疫吸着またはその他のイ

ムノアフィニティー法が挙げられるが、これらに限定される必要はない。これらのおよびその他の有用なアフィニティー技法に関しては、例えばScopes, R. K., Protein Purification: Principles and Practice, 1987, Springer-Verlag NY; Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston; およびHermanson, G. T. et al., Immobilized Affinity Ligand Techniques, 1992, Academic Press, Inc., California (これらのに記載内容は全て、複合体を単離し、特性化するための技法(例えばアフィニティー技法)に関する詳細に関して、参照により本明細書中に援用される)を参照されたい。 10

【0064】

本明細書中に記載されているように、本発明は、HE4aに融合されたポリペプチドを含む融合タンパク質を提供する。このようなHE4a融合タンパク質は、付加的コード配列に枠内で融合されたHE4aコード配列を有する核酸によりコードされて、例えばHE4a融合タンパク質の欠失、単離および／または精製(これらに限定されない)を可能にする付加的機能性または非機能性ポリペプチド配列に融合されたHE4aポリペプチド配列の発現を提供する。このようなHE4a融合タンパク質は、タンパク質-タンパク質親和性、金属親和性または電荷親和性ベースのポリペプチド精製により、あるいはHE4aポリペプチドが融合タンパク質から分離可能であるよう、プロテアーゼにより切断可能である融合配列を含有する融合タンパク質の特異的プロテアーゼ切断により、HE4a融合タンパク質の検出、単離および／または精製を可能にし得る。 20

【0065】

したがってHE4a融合タンパク質は、リガンドとの特異的親和性相互作用によりHE4aの検出および単離を促すためにHE4aに付加されるポリペプチドまたはペプチドを指す親和性タグポリペプチド配列を含み得る。リガンドは、本明細書中に提供されるような特異的結合相互作用により親和性タグが相互作用し得る任意の分子、受容体、対受容体(counter receptor)、抗体等であり得る。このようなペプチドとしては、例えば米国特許第5,011,912号にならびにHopp et al., (1988 Bio/Technology 6:1204)に記載されたようなポリ-Hisまたは 30
は抗原性同定ペプチド、あるいはXPRESS(登録商標)エピトープタグ(Invitrogen, Carlsbad, CA)が挙げられる。親和性配列は、例えば細菌宿主の場合にはマーカーに融合される成熟ポリペプチドの精製のために提供されるpBAD/His(Invitrogen)またはpQE-9ベクターにより供給されるようなヘキサ-ヒスチジンタグであり得るし、あるいは親和性配列は、哺乳動物宿主、例えばCOS-7細胞が用いられる場合には、ヘマグルチニン(HA)タグであり得る。HAタグは、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質由来の抗体限定エピトープに対応する(Wilson et al., 1984 Cell 37:767)。

【0066】

HE4a融合タンパク質は、特に好ましい実施形態では、そして以下でより詳細に記載されるように、さらに、HE4aの検出、単離および／または局在化を促すためにHE4aに付加される免疫グロブリン定常部ポリペプチドを含み得る。免疫グロブリン定常部ポリペプチドは、好ましくはHE4aポリペプチドのC末端に融合される。非限定的理論によれば、本明細書中に提供されるようなHE4a融合タンパク質中の免疫グロブリン(Ig)定常部ドメインの含入は、例えば特定宿主中で用いられる場合、特定のIg領域の免疫原性／非免疫原性特性(すなわち、「自己」対「非自己」)に関連したもの、あるいは融合タンパク質の単離および／または検出を促すものといった利点を提供し得る。Ig融合タンパク質のこれらのおよびその他の利点は、本発明の開示に基づいて、当業者に理解される。抗体由来ポリペプチドの種々の部分(例えばFcドメイン)に融合された異種ポリペプチドを含む融合タンパク質の一般的調製は、例えばAshkenazi et al 40

．（PNAS USA 88：10535，1991）およびByrne et al.（Nature 344：677，1990）によりに記載されている。HE4a：Fc融合タンパク質をコードする遺伝子融合は、適切な発現ベクター中に挿入される。本発明の特定の実施形態では、HE4a：Fc融合タンパク質は、非常によく似た抗体分子にアセンブルされ、この場合、鎖間ジスルフィド結合がFcポリペプチド間に形成されて、二量体HE4a融合タンパク質を生じる。

【0067】

HE4aをコードする配列に枠内で連結されたDNA配列によりコードされる免疫グロブリンV領域ドメインを含む融合ポリペプチドに基づいて予備選定抗原に対する特異的結合親和性を有するHE4a融合タンパク質も、本明細書中に提供されるようなその改変体および断片を含めて、本発明の範囲内である。免疫グロブリンV領域融合ポリペプチドを有する融合タンパク質の構築のための一般的戦略は、例えばEP0318554；米国特許第5，132，405号；米国特許第5，091，513号および米国特許第5，476，786号に開示されている。

10

【0068】

本発明の核酸は、所望の親和性特性、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼのような酵素を有するその他のポリペプチドに融合されたHE4aポリペプチドを含む融合タンパク質もコードし得る。別の例としては、HE4a融合タンパク質は、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）プロテインAポリペプチドに融合されたHE4aポリペプチドも含む。プロテインAコード核酸、および免疫グロブリン定常部に対する親和性を有する融合タンパク質の構築におけるそれらの使用は、一般的に、例えば米国特許第5，100，788号に開示されている。HE4a融合タンパク質の構築のためのその他の有用な親和性ポリペプチドとしては、例えばWO89/03422、米国特許第5，489，528号、米国特許第5，672，691号、WO93/24631、米国特許第5，168，049号、米国特許第5，272，254号およびその他に開示されたようなストレプトアビジン融合タンパク質、ならびにアビジン融合タンパク質（例えばEP511，747参照）が挙げられ得る。本明細書中に、そして引用参考文献中に提供されているように、HE4aポリペプチド配列は、全長融合ポリペプチドであり得るとともに代替的にその改変体または断片であり得る融合ポリペプチド配列に融合され得る。

20

30

【0069】

本発明は、融合タンパク質を細胞核に向かわせるポリペプチド配列であって、当業者が精通している種々の周知の細胞内タンパク質分類メカニズムのいずれかにより、小胞体（ER）の管腔中に存在し、古典的ER-ゴルジ分泌経路を介して細胞から分泌され（例えばvon Heijne, J. Membrane Biol. 115：195-201，1990参照）、形質膜中に組み入れられ、特定の細胞質構成成分（例えば膜貫通細胞表面受容体の細胞質ドメイン）と会合し、または特定の細胞下位置に向けられるポリペプチド配列を含有するHE4a融合タンパク質も意図する（例えばRothman, Nature 372：55-63，1994、Adrani et al., J. Biol. Chem. 273：10317およびそこに引用された参考文献参照）。したがってこれらのおよび関連の実施形態は、予備限定細胞内、膜または細胞外局在化に対して当該ポリペプチドを標的化することを対象とする当該組成物および方法を包含する。

40

【0070】

本発明は、本発明の核酸を含むベクターおよび構築物に関し、特に上記のような本発明のHE4aポリペプチドをコードする任意の核酸を含む「組換え発現構築物」、本発明のベクターおよび／または構築物で遺伝子操作される宿主細胞、そして組換え技法による本発明のHE4aポリペプチドおよび融合タンパク質、あるいはその断片または改変体の産生にも関する。HE4aタンパク質は、適切なプロモーターの制御下で、哺乳動物細胞、酵母、細菌またはその他の細胞中で発現され得る。無細胞翻訳系も、本発明のDNA構築物由来のRNAを用いてこのようなタンパク質を産生するために用いられ得る。原核生物お

50

よび真核生物宿主とともに用いるための適切なクローニングおよび発現ベクターは、例えば Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York, (1989) により記載されている。

【0071】

一般に、組換え発現ベクターは、複製の起点、ならびに宿主細胞の形質転換を可能にする選択可能マーカー、例えば大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子およびビール酵母菌 (*S. cerevisiae*) TRP1 遺伝子、ならびに下流構造配列の転写を指図する高発現遺伝子由来のプロモーターを含む。このようなプロモーターは、解糖酵素、例えば、特に、3-ホスホグリセレートキナーゼ (PGK)、 α -因子、酸性ホスファターゼ、または熱ショックタンパク質をコードするオペロンに由来し得る。異種構造配列は、翻訳開始および終結配列を用いて、適切な段階でアッセンブルされる。任意に、異種配列は、例えば所望の特徴、例えば発現組換え産物の安定化または簡易精製を付与する N 末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードし得る。

【0072】

細菌使用のための有用な発現構築物は、機能性プロモーターを用いて作動可能読取り段階に適切な翻訳開始および終結シグナルと一緒に所望のタンパク質をコードする構造 DNA 配列を発現ベクター中に挿入することにより、構築される。構築物は、ベクター構築物の保持を保証し、望ましい場合には、宿主内での増幅を提供するために、1 つまたは複数の表現型選択可能マーカーおよび複製の起点を含み得る。形質転換のための適切な原核生物宿主としては、大腸菌、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、ならびにシュードモナス属、ストレプトミセス属およびブドウ球菌属内の種々の種が挙げられるが、その他も選択物として用いられ得る。任意のその他のプラスミドまたはベクターは、それらが複製可能で、かつ宿主中で生育可能である限り、用いられ得る。

【0073】

細菌使用のための有用な発現ベクターの代表的なしかし非限定例は、選択可能マーカー、および周知のクローニングベクター pBR322 (ATCC 37017) の遺伝因子 (genetic element) を含む市販のプラスミドに由来する複製の細菌起点を含み得る。このような市販ベクターとしては、例えば pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) および GEM1 (Promega Biotech, Madison, Wisconsin, USA) が挙げられる。これらの pBR322 「主鎖」 区分は、適切なプロモーターおよび発現される構造配列と併合される。

【0074】

適切な宿主株の形質転換および適切な細胞密度への宿主株の増殖後、適切な手段 (例えば温度シフトまたは化学的誘導) により、本明細書中に提供されるような調節プロモータが誘導され、細胞がさらなる期間、培養される。細胞は、典型的には遠心分離により収穫され、物理的または化学的手段により破壊され、その結果生じた粗製抽出物がさらなる精製のために保持される。タンパク質の発現に用いられる微生物細胞は、任意の便利な方法により、例えば凍結解凍循環、音波処理、機械的破壊または細胞溶解剤の使用により破壊され得る。このような方法は、当業者には周知である。

【0075】

したがって例えば本明細書中で提供されるような本発明の核酸は、HE4a ポリペプチドを発現するための組換え発現構築物として種々の発現ベクター構築物のいずれかに含まれ得る。このようなベクターおよび構築物としては、染色体、非染色体および合成 DNA 配列、例えば SV40 の誘導體、細菌プラスミド、ファージ DNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドおよびファージ DNA、ウイルス DNA、例えばワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルスおよび仮性狂犬病ウイルスの組合せに由来するベクターが挙げられる。しかしながら任意のその他のベクターは、それが複製可能であり、宿主中で

生育可能である限り、組換え発現構築物の調製のために用いられ得る。

【0076】

適切なDNA配列（単数または複数）は、種々の手法によりベクター中に挿入され得る。概してDNA配列は、当該技術分野で周知の手法により適切な制限エンドスクレアーゼ部位（単数または複数）に挿入される。クローニング、DNA単離、増幅および精製のための、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドスクレアーゼ等を包含する酵素反応のための標準技法、ならびに種々の分離技法は、周知のものであり、当業者に一般的に用いられる。多数の標準技法は、例えばAusubel et al. (1993 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA); Sambrook et al. (1989 Molecular Cloning, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis et al. (1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Plainview, NY); ならびにその他に記載されている。

10

【0077】

発現ベクター中のDNA配列は、少なくとも1つの適切な発現制御配列（例えばプロモーターまたは調節プロモータ）に作動可能に連結されて、mRNA合成を指図する。このような発現制御配列の代表例としては、LTRまたはSV40プロモーター、大腸菌lacまたはtrp、ラムダファージP_Lプロモーター、ならびに原核生物細胞または真核生物細胞あるいはそれらのウイルス中の遺伝子の発現を制御することが周知であるその他のプロモーターが挙げられる。プロモーター領域は、CAT（クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）ベクターまたはその他のベクターを選択可能マーカーとともに用いて、任意の所望の遺伝子から選択され得る。2つの適切なベクターは、pKK232-8およびpCM7である。特定の命名された細菌プロモーターとしては、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダP_R、P_Lおよびtrpが挙げられる。真核生物プロモーターとしては、CMV極初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルスからのLTR、ならびにマウスメタロチオネイン-Iが挙げられる。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、十分に当業者のレベル内であり、HE4aポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結される少なくとも1つのプロモーターまたは調節プロモータを含むある種の特に好ましい組換え発現構築物の調製の選択が、本明細書中に記載されている。

20

30

【0078】

上記のように、特定の実施形態では、ベクターはウイルスベクター、例えばレトロウイルスベクターである。例えばレトロウイルスプラスミドベクターが得られるレトロウイルスとしては、モロニーネズミ白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、レトロウイルス、例えばラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、鳥類白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルスおよび哺乳動物腫瘍ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0079】

ウイルスベクターは、1つまたは複数のプロモーターを含む。用いられ得る適切なプロモーターとしては、レトロウイルスLTR、SV40プロモーター、ならびにMiller, et al., Biotechniques 7:980-990 (1989)に記載されたヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、あるいは任意のその他のプロモーター（例えば細胞プロモーター、例えば真核生物細胞プロモーター、例えばヒストン、polaIIIおよびβ-アクチンプロモーター）が挙げられるが、これらに限定されない。用いられ得るその他のウイルスプロモーターとしては、アデノウイルスプロモーター、チミジンキナーゼ(TK)プロモーターおよびB19パルボウイルスプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。適切なプロモーターの選択は、本明細書中に含ま

50

れる教示から当業者には明らかであり、上記のような調節プロモータまたはプロモーターの中からであり得る。

【0080】

レトロウイルスプラスミドベクターは、パッケージング細胞株を形質導入して、プロデューサー細胞株を生成するために用いられる。トランスフェクトされ得るパッケージング細胞の例としては、Miller, Human Gene Therapy, 1: 5-14 (1990) (このに記載内容は全て、参照により本明細書中に援用される)に記載されているようなPE501、PA317、 Ψ -2、 Ψ -AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、 Ψ CRE、 Ψ CRIP、GP+E-86、GP+envAm12およびDAN細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。ベクターは、当該技術分野で周知の任意の手段により、パッケージング細胞を形質導入し得る。このような手段としては、電気穿孔、リポソームの使用、ならびにリン酸カルシウム沈降が挙げられるが、これらに限定されない。一代替的方法では、レトロウイルスプラスミドベクターはリポソーム中に封入されるかまたは脂質に結合されて、次に宿主に投与され得る。

【0081】

プロデューサー細胞株は、HE4aポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸配列(単数または複数)を含む感染性レトロウイルスベクター粒子を生成する。このようなレトロウイルスベクター粒子は次に、*in vitro*または*in vivo*で真核生物細胞を形質導入するために用いられ得る。形質導入化真核生物細胞は、HE4aポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸(単数または複数)を発現する。形質導入され得る真核生物細胞としては、胚性幹細胞、胚性癌腫細胞、ならびに造血性幹細胞、肝細胞、線維芽細胞、筋芽細胞、ケラチノサイト、内皮細胞、気管支上皮細胞および種々のその他の培養適応細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。

【0082】

組換えHE4a発現構築物を調製するためにウイルスベクターが用いられる本発明の実施形態の別の例として、好ましい一実施形態では、HE4aポリペプチドまたは融合タンパク質の発現を指図する組換えウイルス構築物により形質導入される宿主細胞は、ウイルス出芽中にウイルス粒子により組み入れられる宿主細胞膜の一部に由来する発現されたHE4aポリペプチドまたは融合タンパク質を含有するウイルス粒子を産生し得る。別の好ましい実施形態では、HE4aコード核酸配列は、例えばBaculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology Vol. 39, C. D. Richardson, Editor, Human Press, Totowa, NJ, 1995; Piwnicka-Worms, 「Expression of Proteins in Insect Cells Using Baculoviral Vectors」 Section II in Chapter 16 in: Short Protocols in Molecular Biology, 2nd Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, New York, New York, 1992, pages 16-32 to 16-48に記載されているように、バキュロウイルスシャトルベクター中でクローン化され、これは次に、バキュロウイルスで組換えられて、組換えバキュロウイルス発現構築物を生じ、Sf9宿主細胞を感染させるために用いられ得る。

【0083】

別の局面では、本発明は、上記の組換えHE4a発現構築物を含有する宿主細胞に関する。宿主細胞は通常、例えばクローニングベクター、シャトルベクターまたは発現構築物であり得る本発明のベクターおよび/または発現構築物を用いて遺伝子工学処理される(形質導入、形質転換、またはトランスフェクトされる)。ベクターまたは構築物は、例えばプラスミド、ウイルス粒子、ファージ等の形態であり得る。工学処理宿主細胞は、プロモーターを活性化し、形質転換体を選択し、または特定の遺伝子、例えばHE4aポリペプチドまたはHE4a融合タンパク質をコードする遺伝子を増幅するのに適しているように修飾された慣用的栄養培地中で培養され得る。発現のために選択された特定の宿主細胞の

ための培養条件、例えば温度、pH等は、当業者には容易に明らかになる。

【0084】

宿主細胞は、高等真核生物細胞、例えば哺乳動物細胞または下等真核生物細胞、例えば酵母細胞であり得るか、あるいは宿主細胞は、原核生物細胞、例えば細菌細胞であり得る。本発明の適切な宿主細胞の代表例としては、細菌細胞、例えば大腸菌、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)；真菌細胞、例えば酵母；昆虫細胞、例えばショウジョウバエ (*Drosophila*) S2およびヨトウ類 (*Spodoptera sf9*)；動物細胞、例えばCHO、COSまたは293細胞；アデノウイルス；植物細胞、あるいは*in vitro* propagationにすでに適合されたかまたは*de novo*でそのように確立された任意の適切な細胞が挙げられるが、これらに限定されない。適切な宿主の選択は、本明細書中の教示から当業者の範囲内であるとみなされる。

10

【0085】

種々の哺乳動物細胞培養系も組換えタンパク質を発現するために用いられ得る。したがって本発明は、一部は、HE4aをコードする核酸配列に作動可能に連結された少なくとも1つのプロモーターを含む組換え発現構築物を含む宿主細胞を培養することによる、組換えHE4aポリペプチドの産生方法に向けられる。特定の実施形態では、プロモーターは、本明細書中に提供されるような調節プロモーター、例えばテトラサイクリン抑制性プロモーターであり得る。特定の実施形態では、組換え発現構築物は、本明細書中に提供されるような組換えウイルス発現構築物である。哺乳動物発現系の例としては、Gluzman, Cell 23:175 (1981) によりに記載されたサル腎臓線維芽細胞のCOS-7株、ならびに適合性ベクターを発現可能なその他の細胞株、例えばC127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞株が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、例えばMRA発現構築物の調製に関して本明細書中に記載されているように、複製の起点、適切なプロモーターおよびエンハンサーを、ならびに任意に必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与体および受容体部位、転写終結配列および5'フランキング非転写化配列も含む。SV40スプライス由来のDNA配列およびポリアデニル化部位を用いて、必要な非転写化遺伝要素を提供し得る。宿主細胞中への構築物の導入は、当業者が熟知している種々の方法、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクションまたは電気穿孔（これらに限定されない）により実行され得る (Davis et al., 1986 Basic Methods in Molecular Biology)。

20

30

【0086】

発現された組換えHE4a抗原ポリペプチド（またはHE4aポリペプチド）またはそれから得られる融合タンパク質は、無傷宿主細胞；無傷細胞小器官、例えば細胞膜、細胞内小胞またはその他の細胞小器官；あるいは破壊細胞調製物、例えば細胞ホモジネートまたは溶解物、単一膜および多重膜小胞またはその他の調製物（これらに限定されない）の形態で、免疫原として有用であり得る。あるいは、発現された組換えメソテリン関連抗原ポリペプチド（またはメソテリンポリペプチド）または融合タンパク質は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈降、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー（例えばイムノアフィニティークロマトグラフィー）、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた方法により、組換え細胞培養から回収され、精製され得る。タンパク質リョールディング過程は、必要な場合、成熟タンパク質の立体配置を完成する場合に用いられ得る。最後に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、最終精製過程のために用いられ得る。発現された組換えHE4a抗原ポリペプチド（またはHE4aポリペプチド）または融合タンパク質は、当業者により容易に実施され得るルーチン抗体スクリーニングのためのいくつかのアクセシ立体配置のいずれかにおける標的抗原としても有用であり得る。

40

【0087】

50

したがって本発明の方法に用いられる特異的抗体の産生のための免疫原であるH E 4 a 抗原ポリペプチド（またはH E 4 a ポリペプチド）は、天然精製産物、または化学合成手法の産物であってもよく、あるいは原核生物宿主から、または好ましくは真核生物宿主から組換え技法により産生されてもよい。組換え産生手法に用いられる宿主によっては、本発明のポリペプチドはグリコシル化されるか、またはそうでなければ、当該技術分野で周知であるように、そして本明細書中に提供されるように、翻訳後修飾され得る。

【0088】

本発明によれば、可溶性ヒトH E 4 a 抗原ポリペプチド（またはH E 4 a ポリペプチド）は、被験体または生物学的供給源からの生物学的試料中で検出され得る。生物学的試料は、被験体または生物学的供給源から、血液試料、生検検体、組織外植片、器官培養、生物学的流体または任意のその他の組織または細胞調製物を得ることにより提供され得る。被験体または生物学的供給源は、ヒトまたは非ヒト動物、一次細胞培養または培養適応細胞株、例えば染色体的組込みまたはエピソード性組換え核酸配列、不死化または不死化可能細胞株、体細胞ハイブリッド細胞株、分化または分化可能細胞株、形質転換細胞株等を含むし得る遺伝子工学処理細胞株（これらに限定されない）であり得る。本発明のある種の好ましい実施形態では、被験体または生物学的供給源は、悪性症状を有する疑いがあるかまたは有する危険性があり得るが、この悪性症状は、ある種のさらに好ましい実施形態では、卵巣癌、例えば卵巣癌腫であり、本発明のある種のその他の好ましい実施形態では、被験体または生物学的供給源は、このような疾患の危険性または存在を有さないことが周知であり得る。

10

20

【0089】

ある種の好ましい実施形態では、生物学的試料は、被験体または生物学的供給源からの少なくとも1つの細胞を含み、ある種のその他の好ましい実施形態では、生物学的試料は、可溶性ヒトメソテリン関連抗原ポリペプチドを含有する生物学的流体である。生物学的流体は、典型的には生理学的温度で液体であり、被験体または生物学的供給源中に存在し、それから引き抜かれ、それから発現されるかまたはそうでなければ抽出され得る天然に存在する流体を含み得る。特定の組織、器官または局在化領域由来のある種の生物学的流体、ならびにある種のその他の生物学的流体は、被験体または生物学的供給源中により全体的または系統的に置かれ得る。生物学的流体の例としては、血液、血清および漿液、血漿、リンパ、尿、脳脊髄液、唾液、分泌組織および器官の粘膜分泌物、腔分泌物、腹水、例えば非固形腫瘍に関連したもの、胸水、囲心腔液、腹膜液、腹腔またはその他の体腔液等が挙げられる。生物学的流体としては、被験体または生物学的供給源と接触する溶液、例えば細胞および器官培地（例えば細胞または器官ならし培地）、灌注液等も挙げられる。ある種の非常に好ましい実施形態では、生物学的試料は血清であり、他の非常に好ましい実施形態では、生物学的試料は血漿である。その他の好ましい実施形態では、生物学的試料は無細胞溶液である。

30

【0090】

ある種のその他の好ましい実施形態では、生物学的試料は無傷細胞を含み、ある種のその他の好ましい実施形態では、生物学的試料は、配列番号11または13に記述されるアミノ酸配列を有するH E 4 a 抗原ポリペプチドあるいはその断片または改変体をコードする核酸配列を含有する細胞抽出物を含む。

40

【0091】

試料中の「可溶性形態で天然に存在する分子」とは、可溶性タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、アミノ酸、またはそれらの誘導体；脂質、脂肪酸等、またはそれらの誘導体；炭水化物、糖等、またはそれらの誘導体、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン、ピリミジンまたは関連分子、あるいはそれらの誘導体等；あるいはそれらの任意の組合せ、例えば糖タンパク質、糖脂質、リポタンパク質、プロテオリピド、あるいは本明細書中に提供されるような生物学的試料の可溶性または無細胞構成成分である任意のその他の生物学的分子であり得る。「可溶性形態で天然に存在する分子」とはさらに、溶液中に存在するかまたは生物学的試料、例えば本明細書中に提供されるような生物学的流体中に存在す

50

る、そして無傷細胞の表面に結合されない分子を指す。例えば可溶性形態で天然に存在する分子としては、溶質；高分子複合体の構成成分；細胞から脱粒され、分泌され、または輸送される物質；コロイド；マイクロ粒子またはナノ粒子あるいはその他の微小懸濁粒子等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0092】

被験体における悪性症状の存在は、被験体における異形成細胞、癌性細胞および／または形質転換細胞の存在、例えば新性細胞、腫瘍細胞、非接触阻害化細胞または癌遺伝子的形質転換細胞等を指す。例証として、本発明の状況においては、悪性症状は、このようなポリペプチドのレベル増大が被験体からの生物学的試料中で検出可能であるような方法で、H E 4 a 抗原ポリペプチド（またはH E 4 a ポリペプチド）を分泌し、脱粒し、輸出し、または放出することができる癌細胞の被験体中での存在をさらに指し得るが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、例えばこのような癌細胞は、悪性上皮細胞、例えば癌腫細胞であり、特に好ましい実施形態では、このような癌細胞は、例えば胸腔、囲心腔、腹膜、腹腔およびその他の体腔を裏打ちすることが判明している扁平上皮細胞または中皮細胞の形質転換化改変体である悪性中皮腫細胞である。

10

【0093】

本発明の最も好ましい実施形態では、その存在が悪性症状の存在を意味する腫瘍細胞は、卵巢癌細胞、例えば原発性および転移性卵巢癌細胞である。原発性および転移性腫瘍からのヒト卵巢癌細胞株の確立および特性化である（例えばO V C A R - 3、A m e r . T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n , M a n a s s a s , V A ; Y u a n e t a l . , 1997 Gynecol. Oncol. 66:378）と同様に、悪性疾患を卵巢癌と分類するための判定基準は、当該技術分野で周知である（例えばB e l l e t a l . 1998 Br. J. Obstet. Gynaecol. 105:1136 ; M e i e r e t a l . , 1997 Anticancer Res. 17 (4B) : 3019 ; M e i e r e t a l . 1997 Anticancer Res. 17 (4B) : 2949 ; C i o f f i e t a l . , 1997 Tumori 83:594 ; およびそれらに引用された参考文献参照）。その他の実施形態では、悪性症状は、中皮腫、膵臓癌、非小細胞肺癌または別の形態の癌、例えば種々の癌腫（例えば扁平上皮細胞癌および腺癌）のいずれか、ならびに例えば肉腫および血液学的悪性疾患（例えば白血病、リンパ腫、骨髄腫等）であり得る。これらのおよびその他の悪性症状の分類は当業者に周知であり、本発明の開示は、過度の実験を伴わずに、このような悪性症状におけるH E 4 a ポリペプチドの存在を確定する。

20

30

【0094】

本明細書中に提供されるように、被験体における悪性症状の存在に関するスクリーニング方法は、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な抗体またはH E 4 a ポリペプチドに特異的な抗体の使用を特徴づけ得る。

【0095】

H E 4 a 抗原ポリペプチド（またはH E 4 a ポリペプチド）に特異的である抗体は、モノクローナル抗体として、またはポリクローナル抗血清として容易に生成され、あるいは当該技術分野で周知の方法を用いて望ましい特性を有するよう設計される遺伝子工学処理化免疫グロブリン（I g）として産生され得る。例えば限定ではなく例証として、抗体は、組換えI g G、免疫グロブリン由来配列を有するキメラ融合タンパク質、または本発明のヒトH E 4 a ポリペプチドの検出のためにすべて用いられ得る「ヒト化」抗体（例えば米国特許第5, 693, 762号、第5, 585, 089号、第4, 816, 567号、第5, 225, 539号、第5, 530, 101号およびそれらに引用された参考文献参照）を包含し得る。このような抗体は、本明細書中に提供されるように、例えば以下に記載されるようにH E 4 a ポリペプチドを用いた免疫感作により、調製され得る。例えば本明細書中に提供されるように、免疫原として用いるためにこれらのポリペプチドを当業者がルーチンに調製し得るよう、H E 4 a ポリペプチドをコードする核酸配列が開示される。例えばモノクローナル抗体、例えば以下でさらに詳細に記載される2 H 5、3 D 8 および

40

50

4 H 4 は、本発明によるある種の方法を実施するために用いられ得る。

【0096】

「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、それらの断片、例えば $F(ab')_2$ および Fab 断片、ならびに HE4a ポリペプチドを特異的に結合する分子である任意の天然に存在するかまたは組換え的に産生される結合相手を包含する。抗体は、それらが約 $10^4 M^{-1}$ 以上の、好ましくは約 $10^5 M^{-1}$ 以上の、さらに好ましくは約 $10^6 M^{-1}$ 以上の、さらにより好ましくは約 $10^7 M^{-1}$ 以上の K_a で HE4a ポリペプチドを結合する場合、「免疫特異的」であるまたは特異的に結合すると定義される。結合相手または抗体の親和性は、慣用的技法を用いて、例えば Scatchard et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660 (1949) により記載された技法を用いて、容易に確定され得る。HE4a ポリペプチドの結合相手としてのその他のタンパク質の確定は、他のタンパク質またはポリペプチドと特異的に相互作用するタンパク質を同定し、得るための多数の周知の方法のいずれか、例えば米国特許第 5,283,173 号および米国特許第 5,468,614 号または等価物に記載されたような酵母二ハイブリッドスクリーニング系を用いて、実施され得る。本発明は、HE4a ポリペプチドと特異的に結合する結合相手および抗体を調製するための、HE4a ポリペプチド、ならびに HE4a ポリペプチドのアミノ酸配列を基礎にしたポリペプチドの使用も包含する。

【0097】

抗体は一般に、当業者に周知の種々の技法のいずれかにより調製され得る（例えば Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 参照）。このような一技法では、好ましくは 1 つまたは複数の追加免疫感作を組み入れる予定スケジュールに従って、HE4a ポリペプチドを含む免疫原、例えばその表面に HE4a ポリペプチドを有する細胞または単離 HE4a ポリペプチドが、最初に適切な動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、ヒツジおよびヤギ）に注射され、動物は定期的に血を抜き取られる。次に、HE4a ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体が、例えば適切な固体支持体に結合されたポリペプチドを用いて、アフィニティークロマトグラフィーにより、このような抗血清から精製され得る。

【0098】

HE4a ポリペプチドまたはそれらの改変体に特異的なモノクローナル抗体は、例えば Kohler and Milstein (1976 Eur. J. Immunol. 6:511-519) の技法およびその改良技法を用いて、調製され得る。要するにこれらの方法は、所望の特異性（すなわち当該メソテリンポリペプチドとの反応性）を有する抗体を産生可能な不死細胞株の調製を包含する。このような細胞株は、例えば、上記のように免疫感作された動物から得られる脾臓細胞から産生され得る。脾臓細胞は次に、例えば、骨髓腫細胞融合相手、好ましくは免疫感作動物と同系であるものとの融合により免疫感作される。例えば脾臓細胞および骨髓腫細胞は、膜融合促進剤、例えばポリエチレングリコールまたは非イオン性洗剤と 2～3 分間併合され、次に、ハイブリッド細胞の増殖を支持するが骨髓腫細胞の増殖は支持しない選択培地上で低密度でプレート化され得る。好ましい選択技法は、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）選択を用いる。十分な時間の後、通常は約 1～2 週間後、ハイブリッドのコロニーが観察される。単一コロニーが選択され、ポリペプチドに対する結合活性に関して試験される。高い反応性および特異性を有するハイブリドーマが好ましい。HE4a ポリペプチドと特異的に結合するモノクローナル抗体を生じるハイブリドーマが、本発明により意図される。

【0099】

モノクローナル抗体は、増殖中のハイブリドーマコロニーの上清から単離され得る。さらに、収量を増強するために、種々の技法、例えば適切な脊椎動物宿主（例えばマウス）の腹腔中へのハイブリドーマ細胞株の注射が用いられ得る。次にモノクローナル抗体が腹水または血液から採取され得る。慣用的技法により、例えばクロマトグラフィー、ゲル濾

過、沈降および抽出により、夾雑物が抗体から除去される。例えば抗体は、標準技法を用いて固定化プロテインGまたはプロテインA上でのクロマトグラフィーにより、精製され得る。

【0100】

特定の実施形態内では、抗体の抗原結合断片の使用が選択され得る。このような断片としては、標準技法を用いて（例えばFabおよびFc断片を生成するためのパパインを用いた消化により）調製され得るFab断片が挙げられる。FabおよびFc断片は、標準技法を用いて、アフィニティークロマトグラフィーにより（例えば固定化プロテインAカラム上で）分離され得る（例えばWeir, D. M., *Handbook of Experimental Immunology*, 1986, Blackwell Scientific, Boston参照）。 10

【0101】

種々のエフェクタータンパク質をコードする配列にインフレームで連結されるDNA配列によりコードされる免疫グロブリンV領域ドメインにより、予備選定抗原に対する特異的結合親和性を有する多機能性融合タンパク質は、例えばEP-B1-0318554、米国特許第5,132,405号、米国特許第5,091,513号および米国特許第5,476,786号に開示されているように、当該技術分野で周知である。このようなエフェクタータンパク質は、当業者が熟知している種々の技法、限定はされないが例えばビオチン模倣配列（例えばLuo et al., 1998 *J. Biotechnol.* 65:225およびそこに引用された参考文献参照）、検出可能標識部分を用いた直接共有 20
的修飾、特異的標識レポーター分子との非共有結合、検出可能基質の酵素的修飾、あるいは固相支持体上での免疫感作（共有的または非共有的）のいずれかにより融合タンパク質の結合を検出するために用いられ得るポリペプチドドメインを包含する。

【0102】

本発明に用いるための単鎖抗体は、ファージディスプレイのような方法によっても生成され、選択され得る（例えば米国特許第5,223,409号；Schlebusch et al., 1997 *Hybridoma* 16:47；およびそれらに引用された参考文献参照）。要するにこの方法では、DNA配列は、線維状ファージ、例えばM13の遺伝子IIIまたは遺伝子VIIに挿入される。多重クローニング部位を有するいくつかのベクターが、挿入のために開発されている（McLafferty et al., 30
Gene 128:29-36, 1993；Scott and Smith, *Science* 249:386-390, 1990；Smith and Scott, *Methods Enzymol.* 217:228-257, 1993）。挿入DNA配列は無作為に生成されるか、またはHE4aポリペプチドとの結合のための周知の結合ドメインの改変体であり得る。単鎖抗体は、この方法を用いて容易に生成され得る。一般に挿入物は、6～20アミノ酸をコードする。挿入配列によりコードされるペプチドは、バクテリオファージの表面に表示される。HE4aポリペプチドに関する結合ドメインを発現するバクテリオファージは、固定化HE4aポリペプチド、例えば当該技術分野で周知の方法および本明細書中に開示されるような核酸コード配列を用いて調製される組換えポリペプチドと結合することにより選択される。非結合ファージは、典型的には10mMのトリス 40
、1mMのEDTAを含有し、塩を有さないかまたは低塩濃度を有する洗浄液により除去される。結合ファージは、例えば塩を含有する緩衝剤で溶離される。NaCl濃度は、すべてのファージが溶離されるまで、段階的に増大される。典型的には、高親和性で結合するファージは、より高い塩濃度により放出される。溶離ファージは、細菌宿主中で増殖される。さらに数回の選択を実施して、高親和性で結合する多少のファージに関して選択し得る。次に、結合ファージ中の挿入物のDNA配列が決定される。一旦、結合ペプチドの予測アミノ酸配列が分かれば、HE4aポリペプチドに特異的な抗体として本明細書中で用いるのに十分なペプチドは、組換え手段により、または合成的に作製され得る。組換え手段は、抗体が融合タンパク質として産生される場合に用いられる。ペプチドは、親和性または結合を最大にするために、2つ以上の類似のまたは類似でないペプチドのタンデム 50

アレイとしても生成され得る。

【0103】

HE4aポリペプチドに特異的な抗体と反応性がある抗原決定基を検出するためには、検出試薬は典型的には抗体であり、これは本明細書中に記載されたように調製され得る。試料中のポリペプチドを検出するための抗体を用いるために当業者に周知の種々のアッセイフォーマットが存在し、例としては、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、免疫蛍光測定法、免疫沈降法、平衡透析、免疫拡散法およびその他の技法が挙げられるが、これらに限定されない（例えばHarlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Weir, D. M., *Handbook of Experimental Immunology*, 1986, Blackwell Scientific, Boston参照）。例えばアッセイは、ウエスタンブロットフォーマットで実施され得るが、この場合、生物学的試料からのタンパク質調製物はゲル電気泳動に付され、適切な膜に移されて、抗体と反応させられる。次に、当該技術分野で周知であり、かつ以下に記載されるような適切な検出試薬を用いて、膜上の抗体の存在が検出され得る。

【0104】

別の実施形態では、アッセイは、標的HE4aポリペプチドと結合し、それを残りの試料から除去するために固体支持体上に固定された抗体の使用を包含する。結合HE4aポリペプチドは次に、別個のHE4aポリペプチド抗原決定基と反応性の第二の抗体、例えば検出可能レポーター部分を含有する試薬を用いて検出され得る。非限定的な例として、この実施形態によると、固定化抗体、ならびに別個の抗原決定基を認識する第二の抗体は、モノクローナル抗体2H5、3D8および4H4から選択される本明細書中に記載されるモノクローナル抗体のうちの任意の2つであり得る。あるいは、HE4aポリペプチドが検出可能レポーター部分で標識されて、固定化抗体と試料とのインキュベーション後に固定化HE4aポリペプチドに特異的な固定化抗体と結合させられる、競合アッセイが利用され得る。試料の構成成分が標識ポリペプチドと抗体との結合を阻害する程度は、試料と固定化抗体との反応性を示し、その結果、試料中のHE4aのレベルを示す。

【0105】

抗体が結合され得る固体支持体は、当業者に周知の任意の材料、例えばマイクロタイタープレート中の試験ウェル、ニトロセルロースフィルターまたは別の適切な膜であり得る。あるいは支持体は、ビーズまたは円板、例えばガラス、ファイバークラス、ラテックスまたはプラスチック、例えばポリスチレンまたはポリ塩化ビニルであり得る。抗体は、特許および科学文献中に詳細に記載されている当業者に周知の種々の技法を用いて、固体支持体上に固定され得る。

【0106】

ある種の好ましい実施形態では、試料中のHE4a抗原ポリペプチドの検出のためのアッセイは、二抗体サンドイッチアッセイである。このアッセイは、試料中に天然に存在し、抗体と反応性がある抗原決定基を有する可溶性分子が固定化抗体に結合されて（例えば室温で30分間のインキュベーション時間で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ように、まず、固体支持体に、一般的には微小滴定プレートのウェルに固定されたHE4aポリペプチド特異的抗体（例えば2H5、3D8または4H4等のモノクローナル抗体）を、生物学的試料と接触させることにより実施され得る。次に、試料の非結合構成成分が、固定化免疫複合体から除去される。次に、HE4a抗原ポリペプチドに特異的な第二抗体が付加されるが、この場合、第二の抗体の抗原結合部位は、固定化第一抗体の抗原結合部位とHE4aポリペプチド（例えば固体支持体上に固定されたモノクローナル抗体と同一でない2H5、3D8または4H4のようなモノクローナル抗体）との結合を競合的に阻害しない。第二の抗体は、直接検出され得るよう、本明細書中に提供されるように検出可能に標識され得る。あるいは第二の抗体は、検出可能に標識された第二の（または「第二段階」）抗抗体の使用により、または本明細書中に提供され

るような特異的検出試薬の使用により、間接的に検出され得る。イムノアッセイに精通した者は、二抗体サンドイッチイムノアッセイにおいて特定抗原（例えばメソテリン（mesothelin）ポリペプチド）を免疫学的に検出するための多数の試薬および立体配置が存在することを理解するので、本発明の方法は、いかなる特定の検出手法にも限定されない。

【0107】

上述の二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では、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な一次固定化抗体はポリクローナル抗体であり、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な第二の抗体はポリクローナル抗体である。本発明のある種のその他の実施形態では、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な一次固定化抗体はモノクローナル抗体であり、統一のため、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な第二の抗体はポリクローナル抗体である。本発明のある種のその他の実施形態では、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な一次固定化抗体はポリクローナル抗体であり、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な第二の抗体はモノクローナル抗体である。本発明のある種のその他の非常に好ましい実施形態では、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な一次固定化抗体はモノクローナル抗体であり、H E 4 a 抗原ポリペプチド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では、これらのモノクローナル抗体の任意の対方式の組合せが用いられ得るよう、本明細書中に提供されるようなモノクローナル抗体 2 H 5、3 D 8 および 4 H 4 は、H E 4 a ポリペプチド上の別個の、非競合的抗原決定基（例えばエピトープ）を認識する、ということに留意すべきである。本発明のその他の好ましい実施形態では、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な一次固定化抗体および／または H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な第二の抗体は、当該技術分野で周知であり、かつ本明細書中で言及される、例えば限定ではなく例証として、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片、免疫グロブリン V 領域融合タンパク質または単鎖抗体と呼ばれる抗体の種類のいずれかであり得る。本発明は、本明細書中に開示され、特許請求された方法におけるその他の抗体形態、断片、誘導体等の使用を包含すると、当業者は理解する。

【0108】

ある種の特に好ましい実施形態では、第二の抗体は、検出可能レポーター部分または標識、例えば酵素、染料、放射性核種、発光基、蛍光基またはビオチン等を含有し得る。次に、固体支持体に結合されたままの第二の抗体の量が、特異的検出可能レポーター部分または標識に適した方法を用いて確定される。放射性基に関しては、シンチレーション計数またはオートラジオグラフ法が一般に適している。抗体-酵素接合体は、種々のカップリング技法を用いて調製され得る（概説に関しては、例えば S c o u t e n , W . H . , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 135:30-65, 1987 参照）。分光分析法は、染料（例えば酵素反応の比色分析産物）、発光基および蛍光基を検出するために用いられ得る。ビオチンは、異なるレポーター基（一般的に放射性基または蛍光基または酵素）に結合されたアビジンまたはストレプトアビジンを用いて検出され得る。酵素レポーター基は一般に、基質の付加（一般に特定時間の）と、その後の分光分析、分光光度分析または反応産物のその他の分析により検出され得る。標準および標準付加は、周知の技法を用いて、試料中のメソテリンポリペプチドのレベルを確定するために用いられ得る。

【0109】

別の実施形態では、本発明は、生物学的供給源または被験体からの生物学的試料中の免疫特異的反応性抗体の検出により悪性症状の存在に関してスクリーニングするための、本明細書中に提供されるような H E 4 a 抗原ポリペプチドの使用を意図する。この実施形態によれば、H E 4 a 抗原ポリペプチド（あるいはその断片または改変体、例えば本明細書中に提供されるような短縮 H E 4 a 抗原ポリペプチド）は検出可能に標識され、生物学的試料と接触されて、試料中の天然で可溶性形態の抗体の H E 4 a 抗原ポリペプチドとの結合が検出される。例えば H E 4 a 抗原ポリペプチドは、周知の方法、例えば容易に検出可能な（例えば放射性標識された）アミノ酸の i n v i t r o 翻訳中の取り込みと呼応して

、本明細書中に開示された配列を用いることにより、あるいはその他の検出可能レポーター部分、例えば上記のものを用いることにより、生合成的に標識され得る。理論に結び付けて考えたくはないが、本発明のこの実施形態は、ある種のH E 4 aポリペプチド、例えば本明細書中に開示されたH E 4 a融合ポリペプチドが、特に免疫原性であるために特異的かつ検出可能な抗体を生じるポリペプチドを提供し得る、ということを意図する。例えばこの理論によれば、ある種のH E 4 a融合ポリペプチドは、強烈な免疫応答を引き起こす「非自己」抗原を示し得るが、一方、融合ドメインを欠くH E 4 aポリペプチドは、体液性または細胞媒介性免疫を容易に引き出さない、より類似する「自己」抗原として、免疫系により見られ得る。

【0110】

10

上記のように、本発明は、一部は、可溶性形態のH E 4 a抗原ポリペプチドが被験体中に天然に存在し、例えばある種の癌腫を有する被験体においてこのような可溶性H E 4 aポリペプチドのレベルが増大する、という意外な知見に関する。

【0111】

本発明による悪性症状の存在に関するスクリーニング方法は、被験体からの生物学的試料中の2つ以上の腫瘍関連マーカーの検出により、さらに強化され得る。したがって、特定の実施形態では、本発明は、H E 4 a抗原ポリペプチドに特異的な抗体との天然に存在する可溶性試料構成成分の反応性を検出するほかに、当該技術分野で周知の、そして本明細書中に提供されるような確立された方法を用いた悪性症状の少なくとも1つの付加的な可溶性マーカーの検出も包含するスクリーニング方法を提供する。上記のように、容易に得られる生物学的流体の試料中に検出可能であるいくつかの可溶性腫瘍関連抗原が一般的に存在する。例えば本発明の特定の実施形態は、Scholler et al. (1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11531)に記載され、そして米国特許出願09/523, 597号にも記載されているような新規の可溶性メソテリン関連抗原(MRA)ポリペプチドのようなポリペプチドを含むヒトメソテリンポリペプチドに関する。

20

【0112】

本明細書中に提供されるように、「メソテリンポリペプチド」は、以下のペプチド：

EVEKTACPSGKKAREIDES (配列番号14)

を含むアミノ酸配列を有し、そしてさらに、MAb K-1 (Chang et al., 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:136; MAb K-1は、例えばSignet Laboratories, Inc., Dedham, MAから入手可能である)の、あるいはU. S. A. N. 09/513, 597に提供されたようなモノクローナル抗体OV569、4H3、3G3または1A6の免疫特異的結合を競合的に阻害する抗原結合部位を有する少なくとも1つの抗体と反応性がある少なくとも1つの抗原決定基を有する可溶性ポリペプチドである。

30

【0113】

したがって、本発明により用いるためのこれらの付加的な可溶性腫瘍関連抗原としては、メソテリンおよびメソテリン関連抗原、CEA、CA125、シアリルTN、SCC、TPSおよびPLAPが挙げられるが、これらに限定されず、例えば、Bast et al., 1983 N. Eng. J. Med. 309:883; Liloyd et al., 1997 Int. J. Canc. 71:842; Sarandakou et al., 1997 Acta Oncol. 36:755; Sarandakou et al., 1998 Eur. J. Gynaecol. Oncol. 19:73; Meier et al., 1997 Anticanc Res. 17(4B):2945; Kudoh et al., 1999 Gynecol. Obstet. Invest. 47:52; Ind et al., 1997 Br. J. Obstet. Gynaecol. 104:1024; Bell et al. 1998 Br. J. Obstet. Gynaecol. 105:1136; Cioffi et al., 1997 Tumor i 83:594; Meier et al. 1997 Anticanc. Res. 1

40

50

7 (4B) : 2949 Meier et al., 1997 Anticanc. Res. 17 (4B) : 30119を参照、そしてさらに、生物学的試料中のそれらの存在が本明細書中に提供されるような少なくとも1つの悪性症状の存在と相関し得る任意の周知のマーカーが挙げられ得る。

【0114】

あるいは、HE4aポリペプチドをコードする核酸配列は、標準ハイブリダイゼーションおよび／またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技法を用いて検出され得る。本明細書中に提供されるHE4a cDNA配列に基づいて、適切なプローブおよびプライマーが当業者により設計され得る。アッセイは一般に、生物学的供給源、例えば真核生物細胞、細菌、ウイルス、このような生物体から調製される抽出物、ならびに生体内に見出される流体から得られる種々の試料のいずれかを用いて実施され得る。 10

【0115】

以下の実施例は例証として提供されるものであり、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0116】

（実施例1：ヒト試料中のHE4a発現の実時間PCR検出）
ワシントン大学（University of Washington）、スウェーデン病院（Swedish Hospital）およびフレッド・ハッチンソン癌リサーチセンター（Fred Hutchinson Cancer Research Center）（すべてワシントン州シアトル所在）により認可された手法に従って、158例のヒト組織生検または生検からのRNA試料を得た。正常組織（副腎、骨髄、脳、結腸、子宮内膜、胃、心臓、腎臓、肝臓、肺、肺、乳腺、骨格筋、骨格筋、子宮筋層、末梢神経、末梢血リンパ球調製物、唾液腺、皮膚、小腸、脊髄、脾臓、脾臓、気管、胸腺、子宮、末梢血リンパ球培養および40例の正常卵巣）からの、良性卵巣病変（13例の漿液性嚢腺腫）からの、境界悪性疾患の2例の卵巣腫瘍からの、3例のI期粘液性卵巣癌腫からの、3例のI期漿液性卵巣癌腫からの、37例のIII期漿液性卵巣癌腫からの、7例のIV期漿液性卵巣癌腫からの試料、転移性卵巣癌腫からの組織の6例の試料、および卵巣癌を有する女性からの2例の卵管が含まれた。組織試料はすべて、治療前の女性から採取し、各腫瘍の一部は、直ちに液体窒素中に入れて、残りの検体はルーチン組織学検査に付した。組織病理学的検査で80%より多い腫瘍細胞からなることが判明した、そして壊死を伴わない試料のみを、ハイブリダイゼーションおよび実時間PCR実験に用いた。卵巣表面上皮培養（OSE、B. Karlán, Cedars Sinai Hospital, Los Angeles, CAから入手）からのRNA、ならびに3例の付加的OSE試料（R. Hernandez, University of Washington, Seattle, WA）も含まれた。全151例（非悪性組織94例および癌57例）を、下記のようにHE4aを含めた当該遺伝子の過剰発現の実時間定量的PCR確認のために保存した。 20 30

【0117】

実時間定量的PCRを、以下のように実施した。HE4実時間PCRプライマーは、以下の：

AGCAGAGAGAGACTGGCGTGTT（フォワード）（配列番号15）

および

GAAAGGGAGAGAGCTGTGGTCA（リバーズ）（配列番号16）

であった。

【0118】

これらのプライマーは、427塩基長（bp）のPCR産物を生じた。メーカーに特定されたようにオリゴdTプライマーおよびSuperscript II逆転写酵素（Life Technologies, Inc., Bethesda, MD）を用いて、総RNAを逆転写した。ABI7700機（PE Biosystems, Foster City, CA）およびSYBR-Greenプロトコルを用いて、実時間定量的PCR 40 50

を実施した。白血球 cDNA 調製物の 2 倍連続希釈の 5 つの複製物を、標準 (S31 i i i 1 2 5、これは、従来の実験では、正常および悪性組織において普遍的に発現されることが実証された。Schummer et al., 1999 Gene 1999 参照) の増幅のための鋳型として役立てた。

【0119】

GenBank 寄託番号: U61734、フォワードプライマー: CGACGCTTC TCAAGGCCAA (配列番号 17)

リバースプライマー: ATGGAAGCCCCAAGCTGCTGA (配列番号 18)。

【0120】

負の対照は、酵素を用いずに逆転写された卵巣癌腫からの総 RNA からなり、そして一ウエルは、いかなる鋳型も伴わずに PCR の全構成成分を含有した。全行程を二重反復試験で実施した。単一 PCR 帯域の存在に関して、各行程をアガロースゲル上で分析し、人工帯域を排除した。各 96 ウエルプレートに関する結果を、PCR 機のメーカーにより提供されたソフトウェア (シーケンスデテクター (Sequence Detector) (登録商標)) を用いて分析した。この分析は、標準に対する該核酸配列 (HE4a) の発現レベルの確定を可能にした。

10

【0121】

発現値は、図 1 に示したように、内部標準に対して任意の単位で示したが、測定の標準単位での mRNA 分子の絶対量を反映しなかった。平均 HE4a 発現レベルの振幅およびこれらの値とその他の周知の遺伝子 (注目すべきは高発現遺伝子としての β アクチン) の比較に基づいて、図 1 は、HE4a をコードする転写体が中等度～高度の相対レベルで発現されたことを示す。

20

【0122】

(実施例 2: HE4a をコードする核酸配列のクローニングおよび発現)

高生産量 HE4a cDNA クローンからの HE4a 融合構築物 cDNA の増幅: Kirchoff 等 (1991) により最初に発表された HE4 に関する cDNA 配列 (配列番号 8) を、GenBank 寄託番号 X63187 に寄託し、本明細書中に記載されるような HE4a をコードする cDNA (配列番号 10) をクローン化するためのオリゴヌクレオチドプライマー設計の基礎を提供した。高生産量 cDNA アレイを用いて示差的発現された遺伝子産物として同定され、単離された HE4a に関する cDNA を、pSPORT

30

【0123】

HE4 コード配列 (配列番号 8) の一部は、推定分泌シグナルペプチドをコードすると思われた。したがってこのネイティブリーダーペプチドを最初の構築物に用いて、できるだけ多くの分子の構造を保存した。さらに、HE4a は相対的に小さく、配列はいかなる異常な構造的特徴、例えば膜貫通ドメインまたは細胞質ターゲティング配列も含有しなかったため、ヒト IgG1 Fc ドメインに融合された完全 HE4a 遺伝子産物を組み入れた融合タンパク質を設計した。クローニングに適した制限部位をコードするプライマーを設計し、最終構築物のためのタンパク質ドメインの必要な枠内融合を作製した。5' プライマー (配列番号 1 または HE4-5') は 39-mer で、これは HindIII 部位、最初の ATG に隣接する発現を改良するための Kozak 配列、ならびに前に公表された HE4 配列を基礎にした HE4a リーダーペプチドの一部を包含した。3' プライマー (配列番号 2 または HE4-3'-1) は 36-mer で、これはヒト Ig 尾部 cDNA への融合のための枠内 BamHI 部位を含み、HE4 コード配列の 3' 末端は STOP コドン直前で切頭された。これら 2 つのプライマーを 50 pmol で、そして 1 ng の HE4/pSPORT プラスミドを鋳型として用いて、PCR 増幅反応を実施した。50 μ l の反応物は、2.5 単位 (0.5 ml) の ExTaq DNA ポリメラーゼ (Takara Shuzo Biomedical, Otsu, Shiga, Japan)、希釈緩衝

40

50

液およびヌクレオチドも、パッケージ挿入使用説明書にしたがって含入した。94℃で30秒、60℃で30秒および72℃で30秒の増幅プロフィールで、反応物を30回増幅した。全長HE4に関する予測サイズ（約400塩基対）のPCR産物を得た。

【0124】

これらの断片を制限消化し、精製して、ヒトIgG1挿入物をすでに含有する適切に消化された哺乳動物発現プラスミドに結繋した。結繋産物をDH5α細菌細胞中で形質転換させて、形質転換体をHE4-hIgG1融合遺伝子挿入物の存在に関してスクリーニングした。次に、ABI Prism 310 (PE Biosystems) シーケンサーでBigDyeターミネーターサイクルシーケンシングキット (PE Biosystems, Foster City, CA) を用いて、いくつかの単離物からのプラスミドDNAをシーケンシングした。さらに、これらの単離物からのプラスミドDNAをまた、に記載されたように (Hayden et al., 1994 Ther. Immunol. 1:3) COS7細胞のDEAE-デキストラン-過性トランスフェクションにより、トランスフェクトした。培養上清を72時間後に採取し、プロテインA-アガロースを用いた免疫沈降、還元性SDS-PAGE電気泳動およびウェスタンブロットティングによりスクリーニングした (図2)。ヤギ抗ヒトIgG接合体を1:5000で用いて、その後ECL現像を用いて、ウェスタンブロットをプローブした。

10

【0125】

配列分析からの結果は、得られたHE4aコード配列（配列番号10）および推定アミノ酸配列（配列番号11）は、公表済みHE4コード（配列番号8）および翻訳化（配列番号9）配列とはいくつかの位置で異なる、ということを示した。したがって配列は、正常ヒト精巣上体からおよびいくつかの腫瘍細胞株から得られるcDNAから、および原発性腫瘍RNAから得て、そして配列番号10に記載されるようなHE4aコード配列および配列番号11に記載される推定コード化アミノ酸配列を確認した。

20

【0126】

腫瘍細胞株からのHE4cDNAのクローニング：メーカーの使用説明書に従って、Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用いて、いくつかの卵巣腫瘍細胞株、例えば4007およびOVCAR3（例えばHellstrom et al., 2001 Canc. Res. 61:2420参照）から、RNAを調製した。メーカーの指示に従って1~3μgのRNA、無作為六量体およびSuperscript II逆転写酵素 (Life Technologies) を用いて、cDNAを調製した。1μgのcDNA、2.5単位 (0.5ml) のExTaq DNAポリメラーゼ (Takara Shuzo Biomedical, Otsu, Shiga, Japan)、希釈緩衝液およびヌクレオチドを、パッケージ挿入使用説明書にしたがって含入する50μlの反応液中の無作為プライム化cDNAならびにHE4-5'およびHE4-3'-1特異的プライマーから、HE4cDNAをPCR増幅した。94℃で30秒、60℃で30秒および72℃で30秒の増幅プロフィールで、反応物を30回増幅した。腫瘍由来cDNAからのHE4のPCR増幅のために、HE4-5'およびHE4-3'-1オリゴヌクレオチドを再び用いた。全長HE4に関する予測サイズのPCR産物を得て、配列分析のために、断片をpT-AdvantAgeベクター (Clontech, Palo Alto, CA) 中でクローン化した。挿入物を有するクローンを上記と同様にシーケンシングし、腫瘍RNA試料からのPCR断片は、上記の元のクローンと同一のHE4a配列をコードすることが判明した。これらのHE4a配列は、HE4に関する公表済み配列とは異なっていた (Kirchhoff et al., 1991)。同様に、HE4aコード配列は、正常精巣上体（配列番号10）から、ならびに原発性腫瘍組織cDNA（配列番号12）から得られ、したがって上記の新規HE4a配列と適合したが、しかしKirchhoff et al. (1991) のHE4配列（配列番号8）とは異なった。

30

40

【0127】

HE4Ig融合タンパク質の産生：上記のpCDNA3の誘導体である哺乳動物発現ベク

50

ターpD18の多クローニング部位に、HindIII-XbaI断片として、HE4-hIgG1 cDNA構築物（配列番号7）を挿入した（Hayden et al., 1996 Tissue Antigens 48:242）。構築物を、上記（Hayden et al., 1994 Ther. Immunol. 1:3）のようにDEAE-デキストラン-過性トランスフェクションにより、最初にトランスフェクトした。いくつかの単離物からのプラスミドDNAを調製し、COS7細胞を一過性トランスフェクトするために用いた。培養上清を72時間後に採取し、プロテインA-アガロースを用いた免疫沈降、還元性SDS-PAGE電気泳動およびウェスタンブロッティングによりスクリーニングした（図2）。

【0128】

CHO-DG44細胞（Urlaub et al. 1986 Somat. Cell. Mol. Genet. 12:55）を用いて、高レベルの当該融合タンパク質を発現する安定株を構築した。pD18ベクター中で高コピー電気穿孔により（Hayden et al., 1996 Tissue Antigens 48:242; Barsoum, 1990 DNA Cell Biol. 9:293）、ならびに組換えインスリン（Life Technologies, Gaithersburg, MD）、ピルビン酸ナトリウム（Irvine Scientific, Santa Ana, CA）、グルタミン（Irvine Scientific）、MEMのための2×非必須アミノ酸（Irvine Scientific）および100nMのメトトレキセート（Sigma, St. Louis, MO）を含有するエクセル302CHO培地（JRH Biosciences, Denver, PA）中での限定希釈によるメトトレキセート耐性クローンの選択により、HE4Igを発現する安定CHO株を作製した。次に耐性クローンからの培養上清をIgGサンドイッチELISAによりアッセイして、高産生株に関してスクリーニングした。消耗上清を大規模培養から採取し、2mlプロテインA-アガロース（Repligen, Cambridge, MA）カラム上でのプロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより、HE4Igを精製した。融合タンパク質を0.1Mクエン酸塩緩衝液（pH2.7）中の0.8ml分画としてカラムから溶離し、100μlの1Mトリスベース（pH10.5）を用いて中和した。溶離分画を280nmでの吸光度に関してアッセイし、融合タンパク質を含有する分画をプールして、7リットルのPBS（pH7.4）中で一晚透析し、0.2μmの注射器フィルターユニット（Millipore, Bedford, MA）を通して濾過滅菌した。

【0129】

安定トランスフェクト体を用いて、BALB/cマウスの感作のために十分なタンパク質を産生した。マウスを最初に10μgの精製HE4-hIgG1融合タンパク質を用いて、4週間間隔で腹腔内（IP）注射した。この免疫感作プロトコルを用いた初回注射および2回の追加免疫後、10μgのタンパク質+TiterMax金アジュバントIPを、次にさらに2回の追加免疫のSCをマウスに注射した後、脾臓を摘出した。感作マウスからの脾臓細胞を骨髓腫相手P3-X63-Ag8-653と融合することにより、ハイブリドーマを作製した。

【0130】

HE4Ig融合タンパク質のウェスタン分析：10%Tris/BisNOVEXゲル（Invitrogen, San Diego, CA）上でのSDS-PAGE電気泳動により、タンパク質試料を分解し、半乾燥ブロッティングによりPVDF膜（Millipore）上に移した。PBS/0.25%NP-40またはTBS-T（50mMのトリスHCl、pH7.6、0.15MのNaClおよび0.05%のTween-20）中の5%脱脂乾燥乳（Carnation）中で、4℃で一晚インキュベートすることにより、膜を遮断して、非特異的抗体結合を防止した。膜を、HRP-ヤギ抗ヒトIgG（1/10,000）とともに、またはTBS-T中のHRP-ストレプトアビジン（1:5000）（Caltag）とともに、室温または4℃で1時間、静かに攪拌しながらインキュベートした。TBS-Tで2回すすぎ、4回洗浄後、ECL（登録商標）（Amers

10

20

30

40

50

ham, Little Chalfont, UK) 試薬中で60秒間、膜をインキュベートし、帯域の可視化のためにオートラジオグラフィーフィルムに曝露した(図2)。培養上清から、または精製試料のプロテインA溶離液から融合タンパク質試料を採取し、50 μ lのプロテインAアガロース(Repligen, Cambridge, MA)を用いてプロテインAを沈降させた。免疫沈降物を洗浄し、緩衝剤を投入したSDS-PAGE還元試料中に再懸濁して、沸騰させ、次に10% Tris/Bis NOVEXゲル(Invitrogen, San Diego, CA)上でのSDS-PAGE電気泳動により分解し、半乾燥ブロッティングによりPVDF膜(Millipore)上に移した。PBS/0.25% NP-40またはTBS-T(50mMのトリスHCl、pH7.6、0.15MのNaClおよび0.05%のTween-20)中の5%脱脂乾燥乳(Carnation)中で、4℃で1時間から一晩インキュベートすることにより、膜を遮断して、非特異的抗体結合を防止した。膜を、HRP-ヤギ抗ヒトIgG(1/10,000)とともにインキュベートし、TBS-T中で洗浄して、ECL(登録商標)(Amersham, Little Chalfont, UK)試薬中で60秒間、曝露した。次にECL-ブロットを、帯域の可視化のためにオートラジオグラフィーフィルムに曝露した。図2のレーン1は、CTLA4-hIgG1トランスフェクト化COS7細胞の上清からの免疫沈降試料を含有し、レーン3およびレーン4はHE4-hIgG1融合タンパク質培養上清を含有し、レーン5は偽トランスフェクト化COS上清を含有した。HE4-hIgG1融合タンパク質は、還元ゲルまたはウエスタンブロット上で約48kDaの見かけのMrで走行し、予測アミノ酸配列に基づいて予測された39kDaより大きかったが、これは、分子がグリコシル化されたことを示唆する。

【0131】

HE4-mIgG2a融合タンパク質の構築および発現：HE4-hIgG1融合遺伝子と同様の構築物を作製したが、しかしヒトIgG Fc断片の代わりにネズミIgG2aドメインを用いた。マウスの免疫感作がヒトIg尾部融合ドメインの免疫原性により影響を受けないう、代替尾を用いた。mIgG2a尾部の既存のcDNAクローンは、上記のHE4aクローンに関して枠外にあり、したがってmIgG2aカセットをこのようなプラスミドから再増幅して、枠内融合ドメインを作製した。用いたフォワードセンスプライマーは、

mIgG2aBAMIF：

5'-gttggtcggaatccgagcccgaggcccaacaatcaag-3' (配列番号19)

であり、一方、リバースアンチセンスプライマーを以下のように命名した：

mIgG2a3'Xba+S：

5'-gttggtttctagattatcatttaccggagtcgggagaaagctc-3' (配列番号20)

用いた鋳型は、ネズミIgG2a Fcドメインに融合されるが、コドンスペーシングに関する枠害の融合接合部に制限部位を有さないネズミCTLA4を含有した。HE4との融合遺伝子が完全HE4-mIgG2a融合タンパク質の発現を生じるよう、新規のオリゴヌクレオチドは、フレームシフトを作製し、BamHI部位でのリーディングフレームを変更する。ヒト融合遺伝子に関してに記載したのと同様に、PCR産物を増幅し、サブクローニングして、プロセッシングした。HE4-ヒトIgG1融合タンパク質に関して上記したのと同様に、分子をpD18哺乳動物発現ベクター中でサブクローニングし、安定CHOクローンを生成し、癒合タンパク質を発現させた。

【0132】

(実施例3：HE4aに特異的なモノクローナル抗体)

抗HE4aMabの生成：最初の実験で、上記と同様に調製したHE4a-hIgG融合タンパク質を用いて、アジュバントを用いた場合と用いない場合とで、数匹のBALB/cマウスを免疫感作した。これらのマウスにおいて高抗体力価が観察されたが、hIgG尾を有する対照融合タンパク質(CTLA4-hIg融合)に対して同様に高い力価が観

察されたため、抗体はH E 4 aに特異的でなかった。したがって、H E 4 a-m I g G融合タンパク質を免疫感作のために用いた。図3は、メーカーの使用説明書に従ってH E 4 a-m I g G+アジュバント (T i t e r M a x (商品名)、C y t R x C o r p . , N o r c r o s s , G A) で各々2回免疫感作された(尾部に皮下投与された)2匹のB A L B / cマウス(1605および1734)におけるH E 4 aに対して高力価(h i g h t i t e r e d)抗体をもたらした2つの免疫感作からの結果を示す。高いH E 4 a特異的抗体力価を示すマウスからの脾臓細胞を用いて標準方法により、H E 4 a特異的ハイブリドーマを調製した。図4は、マウス1605(その血清データを図3に示す)からの脾臓細胞を用いて作製されたハイブリドーマの、E L I S Aによる初回試験を示す。3つのウェルは、H E 4 a-h I g Gに対して高反応性を示した。その後、限定希釈によるクローニング後に、3つのハイブリドーマ2 H 5、3 D 8および4 H 4をこれらのウェルから単離した。ハイブリドーマ2 H 5および3 D 8は、競合アッセイにより異なるエピトープを確認することが判明した。

10

【0133】

腫瘍診断のためのE L I S Aの構築および適用：上記で言及した2つのM A b 2 H 5および3 D 8を用いて、血清およびその他の流体中のメソテリン／M P Fおよび関連抗原を測定するE L I S A (S c h o l l e r e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 96, 11531, 1999)の作製に用いたのと同様のアプローチを用いて、二重決定因子(「サンドイッチ」)E L I S Aを構築した。図5は、D M E M培地中で希釈されたH E 4 a-h I g Gを用いて調製された標準曲線の一例を示す。図に示したように、1 n gのレベルのH E 4 a-h I g Gで、シグナルを検出した。図5は、卵巣癌腫株(4007)からの非希釈培地が検出可能シグナルを示した、ということも示す。図6は、卵巣癌を診断された患者(O V 50で示す)からの腹水が、試験した最高希釈(1:1280)で依然として検出可能であったH E 4 a抗原を含有した、ということを示す。

20

【0134】

用いた2つの抗体の最適量を確定することにより、初回H E 4 a E L I S Aを改良した。これらの抗体の1つである2 H 5をビオチニル化し、他方の抗体3 D 8を、試験プレートの底に結合させることにより固定した。アッセイのための2つのモノクローナル抗体のそれぞれの用量は、2.5および100 μ g / m lであった。異なるM a bおよび直前に記載した使用中のM a bの用量を除いて、アッセイ方法は、メソテリン／M P Fおよび関連分子に関してに記載したものと同一であった(S c h o l l e r e t a l . , 1999 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 96, 11531)。

30

【0135】

卵巣癌を有する患者からのならびに種々の対照からの血清の予備試験は、H E 4 aタンパク質が、卵巣癌を有する患者、例えば早期疾患を有する患者の有意の分画で増大されるが、バックグラウンドが非常に低い対照血清中では増大されないことを示した。上記のサンドイッチE L I S Aアッセイおよび約400名の患者からのコード化血清試料(S w e d i s h H o s p i t a l , S e a t t l e , W Aにより提供された)を用いた試験では、卵巣癌と診断された患者からの全試料が、H E 4 a E L I S Aにより陽性であると正しくスコアされ、これはさらに擬陽性と予測されることはなかった。したがって、理論に結び付けて考えたくはないが、血清およびその他の体液中のH E 4 aタンパク質に関するアッセイは、それにより卵巣癌に関する既存の診断アッセイ(例えばC A 125)に対する臨床的に有益な補足物を提供し得ることが意図される。さらに、E L I S Aは卵巣癌の診断を補助するその能力に関して今まで調べられてきたが、H E 4 aコード抗原を過剰発現する任意の腫瘍にも同様に適用可能であるはずである。同一のE L I S Aまたはその変法は、将来的な試験がこのようなものを同定する場合には、H E 4関連分子の試験にも適用可能であるはずである。

40

【0136】

細胞表面でのH E 4タンパク質の発現：卵巣癌細胞株を負の対照としてのB細胞株とともに

50

に用いて、フローサイトメトリーを用いて実施した試験は、H E 4 aコード抗原がいくつかの卵巣癌の間で、細胞表面で発現される、ということを示した。用いた細胞株および用いたフローサイトメトリー技法は、以前に記載されている (H e l l s t r o m e t a l . , 2 0 0 1 C a n c e r R e s . 6 1 , 2 4 2 0) 。例えば、O V C A R 3細胞の93%が陽性であり、同様に卵巣癌株4010からの細胞の71%および卵巣癌株H E 5 0 O Vからの細胞の38%が陽性であったが、一方、試験した別の10例の卵巣癌株からは20%未満の細胞が陽性であった。このことは、非限定理論によると、細胞表面のH E 4 a抗原は、H E 4 a特異的抗体媒介性および／またはH E 4 a特異的T細胞媒介性療法といったような免疫療法戦略のための標的を提供する、ということを示唆する。

【0137】

10

(実施例4：H E 4 aエピトープを標的化する予防的および治療的ワクチン)

上記の組成物および方法を用いて、ある種の腫瘍（特に悪性卵巣腫瘍）中でのH E 4 aコード核酸配列の増幅および／またはH E 4 a過剰発現の検出を実施し、H E 4 a発現レベルを正常組織中のレベルと比較する。腫瘍中のH E 4 a特異的モノクローナル抗体規定エピトープの出現増大は、癌療法における適用可能性を有する予防的または防止的ワクチンに対する標的として用いられるH E 4 aエピトープの同定を提供する。このようなワクチンはまた、受精能（特定の実施形態では、四ージスルフィドコアファミリーの成員、例えばS l p - 1によるプロテアーゼ阻害に関する周知のアッセイを用いたH E 4 aプロテアーゼ阻害またはプロテアーゼ強化活性の実証により反映され得る）を有用に変更し得る（例えば適切な対照と比較して、統計学的に有意の方法で増大または低減する）。ワクチン製造のための多様なアプローチが確認されており、多数の概論に記載されている（例えば、H e l l s t r o m a n d H e l l s t r o m , I n H a n d b o o k i n E x p e r i m e n t a l P h a r m a c o l o g y , v o l . “ V a c c i n e s ” , S p r i n g e r , H e i d e l b e r g , p . 4 6 3 , 1 9 9 9 による）。これらの例としては、タンパク質、融合タンパク質およびペプチド、DNAプラスミド、組換えウイルス、抗イディオタイプ抗体、ペプチドエピトープでi n v i t r oでパルス処理された樹状細胞、ならびに抗イディオタイプ抗体の使用が挙げられるが、これらに限定されない。ワクチンは、単独で、またはアジュバントおよび／またはリンホカイン、例えばG M C S Fと組合せて、用いられ得る。非限定的な理論によれば、T細胞は細胞表面のM H C分子の状況で存在するエピトープを認識するが、循環抗原または免疫複合体と反応しないため、上記のような循環可溶性H E 4 aタンパク質の検出は、T細胞媒介性免疫を誘導するワクチンの使用を妨害するとは予測されない。

20

30

【0138】

上記から、説明のために本発明の特定の実施形態を本明細書中に記載してきたが、本発明の精神および範囲を逸脱することなく種々の変更が成され得る、と理解される。したがって本発明は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される。

【0139】

本明細書中では、「含む (c o m p r i s e) 」とは、「包含する、または～からなる」ことを意味し、そして「～を含む (c o m p r i s i n g) 」とは「～を包含する、または～からなる」ことを意味する。

40

【0140】

特定の形態で、または開示された機能、あるいは開示された結果を得るための方法または過程を実施するための手段に関して表された上記の説明または添付の特許請求の範囲あるいは添付の図面に示された特質は、適宜、別個に、またはこのような特質の任意の組合せで、その多様な形態で本発明を実現するために利用され得る。

【図面の簡単な説明】

【0141】

【図1A】図1は、ヒト試料のパネルにおけるc D N AをコードするH E 4 aの実時間P C R検出を示す。

【図1B】図1は、ヒト試料のパネルにおけるc D N AをコードするH E 4 aの実時間P

50

C R 検出を示す。

【図 2】図 2 は、発現 H E 4 a 融合タンパク質のウエスタンブロット分析を示す。

【図 3】図 3 は、E L I S A による 2 匹の免疫マウス（1 6 0 5 および 1 7 3 4）からの血清中の H E 4 a - m I g 融合タンパク質と反応性がある抗体の検出を表す。

【図 4】図 4 は、E L I S A を用いたハイブリドーマ上清のスクリーニングならびに H E 4 a 特異的ハイブリドーマ抗体の検出の代表的結果を表す。

【図 5】図 5 は、捕獲試薬として固定化 H E 4 a 特異的モノクローナル抗体 3 D 8 を、検出試薬としてビオチニル化 H E 4 a 特異的モノクローナル抗体 2 H 5 を用いた二重決定因子サンドイッチ E L I S A による H E 4 a - h I g G 融合タンパク質の検出を示す。卵巣癌細胞株 4 0 0 7 (Δ) からの上清液中の可溶性 H E 4 a の検出も示されている。

【図 6】図 6 は、卵巣癌患者からの連続希釈腹水中の H E 4 a 抗原のサンドイッチ E L I S A による検出を示す。

10

【図 1 A】

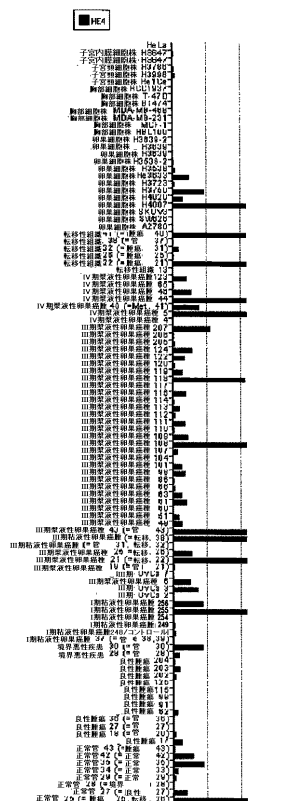


Fig. 1A

【図 1 B】

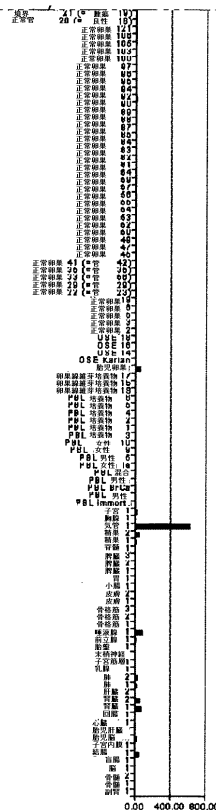


Fig. 1B

【図 3】

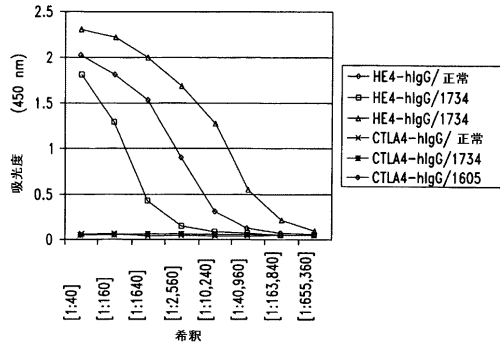


Fig. 3

【図 4】

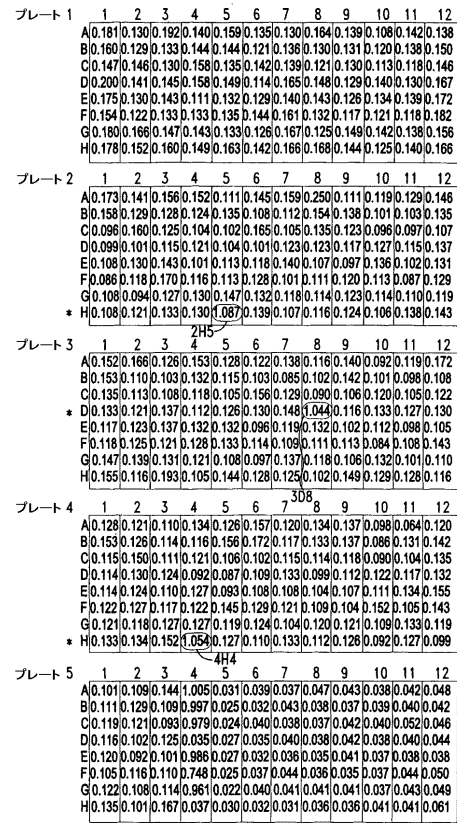


Fig. 4

【図 5】

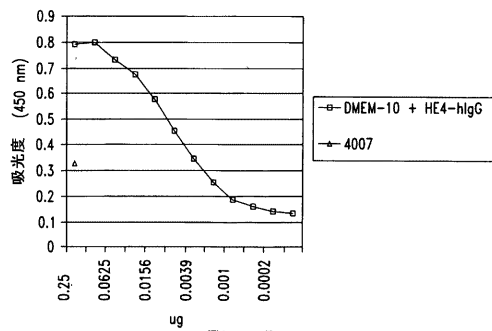


Fig. 5

【図 6】

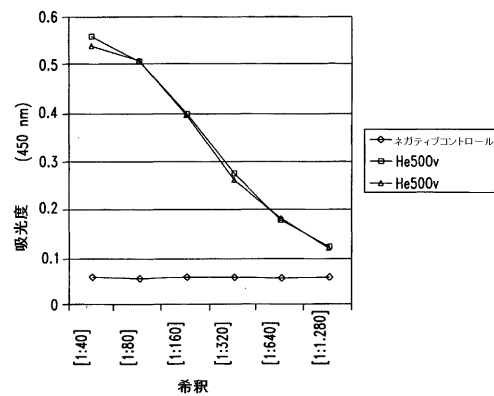


Fig. 6

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/021273 A2(51) International Patent Classification: G01N 33/574,
C07K 16/30, C12N 15/62, 15/11, 15/85, 5/10, C12Q 1/68(74) Agent: FORRESTER KETLEY & CO; Forrester House,
52 Bounds Green Road, London N11 2EY (GB).

(21) International Application Number: PCT/EP02/09653

(22) International Filing Date: 29 August 2002 (29.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 50/316,537 29 August 2001 (29.08.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PACIFIC
NORTHWEST RESEARCH INSTITUTE [US/US];
720 Broadway, Seattle, WA 98122 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SCHUMMER,
Michel [DE/US]; 1920 E. Jefferson St. #B, Seattle, WA
98122 (US). HELLSTROM, Ingegerd [US/US]; 3925
Northeast Surber Drive, Seattle, WA 98105 (US). HELL-
STROM, Karl, Erik [US/US]; 3925 Northeast Surber
Drive, Seattle, WA 98105 (US). LEDBETTER, Jeffrey,
A. [US/US]; 18798 Ridgelfield Road N.W., Shoreline,
WA 98177 (US). HAYDEN-LEDBETTER, Martha
[US/US]; 18798 Ridgelfield Road N.W., Shoreline, WA
98177 (US).(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:

without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/021273 A2

(54) Title: DIAGNOSIS OF CARCINOMAS

(57) Abstract: The invention is directed to compositions and methods for the detection of a malignant condition, and relates to the discovery of soluble and cell surface forms of HIE4a polypeptides, including HIE4a that is overexpressed in ovarian carcinoma. In particular the invention provides a nucleic acid sequence encoding HIE4a, and also provides a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject by detecting reactivity of an antibody specific for a HIE4a polypeptide with a molecule naturally occurring in soluble and/or cell surface form in a sample from such a subject, and by hybridization screening using an HIE4a nucleotide sequence, as well as other related advantages.

DIAGNOSIS OF CARCINOMAS

TECHNICAL FIELD

The present invention relates generally to malignant conditions such as cancer, and in particular to methods and compositions for diagnosing certain
5 carcinomas such as ovarian carcinoma.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Cancer includes a broad range of diseases, affecting approximately one in four individuals worldwide. The severity of the adverse impact of cancer is profound, influencing medical policy and procedure as well as society generally.
10 Because a hallmark of many types of cancer is rapid and unregulated proliferation of malignant cells, an overarching problem in improving approaches to cancer is the need for early detection and diagnosis. Numerous attempts have been made to develop accurate and reliable criteria for diagnosing the presence of a malignant condition. In particular, efforts have been directed to the use of serologically defined antigenic
15 markers known as tumor associated antigens, which are either uniquely expressed by cancer cells or are present at markedly higher levels in subjects having a malignant condition.

However, due to the high heterogeneity of tumor associated antigen expression, for example the extreme diversity of carcinoma antigens, there is a need for
20 additional tumor markers that are useful in cancer diagnosis. Many monoclonal antibodies reactive with carcinoma associated antigens are known (see, *e.g.*, Papsidero, 1985 *Semin. Surg. Oncol.* 1:171, Allum et al., 1986 *Surg. Ann.* 18:41). These and other described monoclonal antibodies bind to a variety of different carcinoma associated antigens including glycoproteins, glycolipids and mucins (see, *e.g.*, Fink et al., 1984
25 *Prog. Clin. Pathol.* 9:121; U.S. Patent No. 4,737,579; U.S. Patent No. 4,753,894; U.S. Patent No. 4,579,827; U.S. Patent No. 4,713,352). Many such monoclonal antibodies recognize tumor associated antigens that exhibit restricted expression on some but not other tumors originating in a given cell lineage or tissue type.

There are only relatively few examples of tumor associated antigens that appear to be useful for identifying a particular type of malignancy. Monoclonal antibody B72.3, for example, specifically binds to a high molecular mass ($>10^6$ Da) tumor-associated mucin antigen that is selectively expressed on a number of different
5 carcinomas, including most if not all ovarian carcinomas and an overwhelming majority of non-small cell lung carcinomas, colon carcinomas and breast carcinomas (see, e.g., Johnston, 1987 *Acta Cytol.* 1:537; U.S. 4,612,282). Nevertheless, detection of cell-associated tumor markers such as the mucin antigen recognized by B72.3 following surgical resection of a tumor may be of limited usefulness for diagnostic screening, in
10 which early detection of a malignant condition prior to accumulation of substantial tumor mass is preferred.

An alternative to the diagnosis of a particular type of cancer by screening surgically resected specimens for tumor associated antigens, where invasive surgery is usually indicated only after detection of an accumulated tumor mass, would be to
15 provide compositions and methods for detecting such antigens in samples obtained from subjects by non-invasive or minimally invasive procedures. In ovarian and other carcinomas, for example, there are currently a number of soluble tumor associated antigens that are detectable in samples of readily obtained biological fluids such as serum or mucosal secretions. One such marker is CA125, a carcinoma associated
20 antigen that is also shed into the bloodstream, where it is detectable in serum (e.g., Bast et al., 1983 *N. Eng. J. Med.* 309:883; Lloyd et al., 1997 *Int. J. Canc.* 71:842). CA125 levels in serum and other biological fluids have been measured along with levels of other markers, for example, carcinoembryonic antigen (CEA), squamous cell carcinoma antigen (SCC), tissue polypeptide specific antigen (TPS), sialyl TN mucin (STN) and
25 placental alkaline phosphatase (PLAP), in efforts to provide diagnostic and/or prognostic profiles of ovarian and other carcinomas (e.g., Sarandakou et al., 1997 *Acta Oncol.* 36:755; Sarandakou et al., 1998 *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 19:73; Meier et al., 1997 *Anticanc. Res.* 17(4B):2945; Kudoh et al., 1999 *Gynecol. Obstet. Invest.* 47:52; Ind et al., 1997 *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 104:1024; Bell et al. 1998 *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 105:1136; Cioffi et al., 1997 *Tumori* 83:594; Meier et al. 1997 *Anticanc. Res.* 17(4B):2949; Meier et al., 1997 *Anticanc. Res.* 17(4B):3019).

Elevated levels of serum CA125 alone or in combination with other known indicators, however, do not provide a definitive diagnosis of malignancy, or of a particular malignancy such as ovarian carcinoma. For example, elevated CA125, CEA and SCC in vaginal fluid and serum correlate most strongly with inflammation in

5 benign gynecological diseases, relative to cervical cancer and genital tract cancers (*e.g.*, Moore et al., 1998 *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 6:182; Sarandakou et al., 1997 *Acta Oncol.* 36:755). As another example, elevated serum CA125 may also accompany neuroblastoma (*e.g.*, Hirokawa et al., 1998 *Surg. Today* 28:349), while elevated CEA and SCC, among others, may accompany colorectal cancer (Gebauer et al., 1997

10 *Anticanc. Res.* 17(4B):2939). Another marker, the differentiation antigen mesothelin, is expressed on the surfaces of normal mesothelial cells and also on certain cancer cells, including epithelial ovarian tumors and mesotheliomas. Compositions and methods pertaining to mesothelin (Chang et al., 1992 *Canc. Res.* 52:181; Chang et al., 1992 *Int. J. Canc.* 50:373; Chang et al., 1992 *Int. J. Canc.* 51:548; Chang et al., 1996 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93:136; Chowdhury et al., 1998 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95:669; Yamaguchi et al., 1994 *J. Biol. Chem.* 269:805; Kojima et al., 1995 *J. Biol. Chem.* 270:21984) and structurally related mesothelin related antigen (MRA; see, *e.g.*, Scholler et al., 1999 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96:11531) are known in the art, including uses in cancer detection and therapies as described in WO 00/50900 and in U.S. Application

20 No. 09/513,597. Thus the compelling need for additional markers to be used, including markers useful in multi-factor diagnostic screening, is apparent. (See, *e.g.*, Sarandakou et al., 1998; Kudoh et al., 1999; Ind et al., 1997.)

As described in greater detail below, such additional markers might be usefully provided from within the "four-disulfide core" family of proteins, which

25 comprises a heterogeneous group of small acid- and heat-stable molecules of divergent function and which includes human epididymal four-disulfide core protein, or "HE4" (Kirchhoff et al., 1991 *Biol. Reprod.* 45:350-357; Wang et al., 1999 *Gene* 229:101; Schummer et al., 1999 *Gene* 238:375). The conserved spacing of eight core cysteine residues in the amino acid sequences of four-disulfide core family member polypeptides

30 is thought to direct the folding of these molecules into a compact and stable structure. Many of the members of the four-disulfide core family are protease inhibitors; however,

for some family members, including HE4, no function has yet been definitively identified. Other members of the four-disulfide core family of proteins include Wp-protein, SLP-1, and ps20, and additional members of the four-disulfide core family of proteins have been isolated from several species. These proteins share several
5 properties, including their small size and their heat- and acid-stable structure, which is stabilized by the four-disulfide core. These proteins are made by secretory cells, and are found in mucous secretions such as seminal plasma, milk, parotid, and cervical secretions.

The prototype molecule of the four-disulfide core family, Wp-protein, is
10 also known as the whey phosphoprotein, and has been cloned (Dandekar et al., 1982 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3987-3991). Whey phosphoprotein is expressed in milk at approximately 1-2 mg/ml, but is not expressed by breast carcinomas, where the gene is hypermethylated. No inhibitory activity towards proteases has been found for whey phosphoprotein. However, overexpression of the gene in transgenic animals impairs
15 development of mammary alveolar cells (Burdon et al, 1991 *Mechanisms Dev.* 36: 67-74), suggesting an important role for this protein during lactation. The secretory leukocyte protease inhibitor (SLP-1), another four-disulfide core family protein, was cloned from human cervix uteri, but is also present in other mucus secretions including seminal plasma and parotid secretions (Heinzel et al, 1986 *Eur. J. Biochem.* 160: 61-
20 67). SLP-1 is a two domain protein of 12 kDa that is a potent inhibitor of trypsin, chymotrypsin, elastase, and cathepsin G. The crystal structure of SLP-1 complexed with chymotrypsin has been published (Grutter et al, 1988 *EMBO J.* 7: 345-351). These data showed that SLP-1 domains can work independently and simultaneously to inhibit different proteases, and identified a small (8 amino acids) active site in domain two that
25 binds to chymotrypsin.

Elafin is a single domain protein member of the four-disulfide core family that was isolated from human psoriatic skin to determine the amino acid sequence of this polypeptide (Wiedow et al, 1990 *J. Biol. Chem.* 265: 14791-14795). Elafin is a potent inhibitor of elastase, but does not exhibit apparent inhibitory activity
30 toward other proteases such as trypsin, chymotrypsin, cathepsin G or plasmin. The amino acid sequence of elafin shows 38% homology with the C-terminal region

(domain 1) of SLP-1. The gene encoding the ps20 protein was recently isolated from smooth muscle, and the ps20 protein was expressed by transfection of the gene into mammalian cells (Larsen et al, 1998 *J. Biol. Chem.* 273: 4574-4584). ps20 was found to inhibit growth of carcinoma cells, and ps20 has been referred to as a growth inhibitor; however, no direct functional activity such as inhibition of proteases has been described so far for this protein.

As noted above, no protease inhibitory activity has been identified for HE4, which was initially identified in epididymal epithelial cells, although other small acid and heat stable proteinase inhibitors have been characterized from seminal plasma, and are thought to play a role in fertility by binding to spermatozoa and regulating the interaction of spermatozoa with the extracellular matrices of the egg (Fitz et al., in *Proteases and Biological Controls*, Reich, E., Rifkin, D., Shaw, E. (eds.), 1975 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 737-766; Saling, 1989 *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 11: 339-388). HE4 cDNA was first isolated from human epididymis (Kirchhoff et al., 1991 *Biol. Reprod.* 45:350-357), and HE4 cDNA was later detected with high frequency in cDNA libraries constructed from ovarian carcinomas (Wang et al., 1999 *Gene* 229:101; Schummer et al., 1999 *Gene* 238:375).

For reasons given above, clearly there is a need for improved diagnostic markers and therapeutic targets for the detection and treatment of malignant conditions, such as carcinomas. The compositions and methods of the present invention overcome these limitations of the prior art by providing a method of screening for the presence of a malignant condition using antibodies specific for HE4 and/or HE4-related antigens to detect polypeptides that naturally occur in soluble form and/or on cell surfaces, and offer other related advantages.

25 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to compositions and methods useful in screening for the presence of a malignant condition in a subject. In particular, the invention relates to the unexpected finding that soluble and cell surface forms of HE4 polypeptides referred to herein as HE4a, or HE4a molecules naturally occurring in soluble form and having an antigenic determinant reactive with at least one antibody

that is specific for an HE4a polypeptide, can be detected in a biological sample from a subject.

It is one aspect of the invention to provide a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising contacting a biological sample from a subject with at least one antibody specific for a HE4a antigen polypeptide to determine the presence in the biological sample of a molecule naturally occurring in soluble form in the sample, or occurring as a cell surface molecule in certain embodiments wherein the sample comprises at least one cell from the subject, the molecule having an antigenic determinant that is reactive with the at least one antibody, under conditions and for a time sufficient to detect binding of the antibody to the antigenic determinant, and therefrom detecting the presence of a malignant condition. In some embodiments the biological sample is blood, serum, serosal fluid, plasma, lymph, urine, cerebrospinal fluid, saliva, a mucosal secretion, a vaginal secretion, ascites fluid, pleural fluid, pericardial fluid, peritoneal fluid, abdominal fluid, culture medium, conditioned culture medium or lavage fluid.

In certain other embodiments, the HE4a antigen polypeptide comprises a polypeptide having the amino acid sequence set forth in any one of SEQ ID NOS:5, 7, 9 or 11, or a fragment or derivative thereof. In another embodiment the HE4a antigen polypeptide variant is a splice variant. In certain embodiments of the invention, the antibody comprises a polyclonal antibody, and in other embodiments the antibody comprises an affinity purified antibody. In particularly preferred embodiments the antibody comprises a monoclonal antibody. In another embodiment the antibody comprises a recombinant antibody and in another embodiment the antibody comprises a chimeric antibody. In another embodiment, the antibody comprises a humanized antibody. In another embodiment, the antibody comprises a single chain antibody.

In some embodiments of the invention, detection of binding of the antibody to an antigenic determinant comprises detection of a radionuclide. In other embodiments, detection of binding of the antibody to an antigenic determinant comprises detection of a fluorophore. In another embodiment, detection of binding of the antibody to an antigenic determinant comprises detection of a binding event between an avidin molecule and a biotin molecule and in another embodiment detection of

binding of the antibody to an antigenic determinant comprises detection of a binding event between a streptavidin molecule and a biotin molecule. In certain embodiments detection of binding of the antibody to an antigenic determinant comprises spectrophotometric detection of a product of an enzyme reaction. In some embodiments
5 of the invention, the at least one antibody is detectably labeled, while in certain other embodiments the at least one antibody is not detectably labeled and detection of binding of the antibody to an antigenic determinant is indirect.

According to certain embodiments of the invention, the malignant condition may be adenocarcinoma, mesothelioma, ovarian carcinoma, pancreatic
10 carcinoma or non-small cell lung carcinoma.

It is another aspect of the invention to provide a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising contacting a biological sample from a subject with at least one antibody to determine the presence in the biological sample of a molecule selected from the group consisting of (i) a molecule
15 naturally occurring in soluble form in the sample, and (ii) a cell surface molecule wherein the sample comprises a cell from the subject, the molecule having an antigenic determinant that is reactive with the at least one antibody, the antigen combining site of which competitively inhibits the immunospecific binding of a monoclonal antibody that is 2H5, 3D8 or 4H4, under conditions and for a time sufficient to detect binding of the
20 antibody to the antigenic determinant, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

Another aspect of the invention provides a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising contacting a biological sample from a subject with at least one antibody to determine the presence in the
25 biological sample of a molecule selected from the group consisting of (i) a molecule naturally occurring in soluble form in the sample, and (ii) a cell surface molecule wherein the sample comprises a cell from the subject, the molecule having an antigenic determinant that is reactive with the antibody, the antigen combining site of which competitively inhibits the immunospecific binding of monoclonal antibody 3D8, under
30 conditions and for a time sufficient to detect binding of the antibody to the antigenic determinant, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

Still another aspect of the invention provides a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising contacting a biological sample from a subject with at least one antibody specific for a HE4a antigen polypeptide to determine the presence in the biological sample of a molecule selected
5 from the group consisting of (i) a molecule naturally occurring in soluble form in the sample, and (ii) a cell surface molecule wherein the sample comprises a cell from the subject, the molecule having an antigenic determinant that is reactive with the antibody, under conditions and for a time sufficient to detect binding of the at least one antibody to the antigenic determinant, wherein the at least one antibody immunospecifically
10 binds to HE4a antigen, and therefrom detecting the presence of a malignant condition. In certain embodiments, the HE4a antigen is also immunospecifically reactive with monoclonal antibody 3D8, 2H5 or 4H4.

Turning to another aspect, the invention provides a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising contacting a biological
15 sample from a subject with at least one antibody specific for a HE4a antigen polypeptide to determine the presence in the biological sample of a molecule selected from the group consisting of (i) a molecule naturally occurring in soluble form in the sample, and (ii) a cell surface molecule wherein the sample comprises a cell from the subject, the molecule having an antigenic determinant that is reactive with the at least
20 one antibody, the antigen combining site of which competitively inhibits the immunospecific binding of a monoclonal antibody that is 2H5 or 4H4, under conditions and for a time sufficient to detect binding of the antibody to the antigenic determinant, wherein the at least one antibody immunospecifically binds to HE4a antigen, and therefrom detecting the presence of a malignant condition. In certain embodiments the
25 mesothelin related antigen is also immunospecifically reactive with monoclonal antibody 3D8.

Turning to another aspect, the invention provides a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising contacting a biological sample from a subject with at least one immobilized first antibody specific for a HE4a
30 antigen polypeptide to determine the presence in the biological sample of a molecule naturally occurring in soluble form in the sample, under conditions and for a time

sufficient to specifically bind the at least one immobilized first antibody to the HE4a antigen polypeptide and thereby form an immune complex; removing constituents of the sample that do not specifically bind to the at least one immobilized first antibody; and contacting the immune complex with at least one second antibody specific for a HE4a antigen polypeptide, wherein the antigen combining site of the at least one second antibody does not competitively inhibit the antigen combining site of the at least one immobilized first antibody, under conditions and for a time sufficient to detect specific binding of the at least one second antibody to the HE4a antigen polypeptide, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

10 In yet another aspect the invention provides a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising contacting a biological sample from a subject with at least one immobilized first antibody specific for a HE4a antigen polypeptide to determine the presence in the biological sample of a molecule naturally occurring in soluble form in the sample, wherein the antigen combining site of
15 the at least one first antibody competitively inhibits the immunospecific binding of monoclonal antibody 3D8 under conditions and for a time sufficient to specifically bind the at least one immobilized first antibody to the HE4a antigen polypeptide and thereby form an immune complex; removing constituents of the sample that do not specifically bind to the at least one immobilized first antibody; and contacting the immune complex
20 with at least one second antibody specific for a HE4a antigen polypeptide, wherein the antigen combining site of the at least one second antibody does not competitively inhibit the immunospecific binding of monoclonal antibody 2H5, under conditions and for a time sufficient to detect specific binding of the at least one second antibody to the HE4a antigen polypeptide, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

25 In another aspect, the invention provides a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising contacting a biological sample from a subject with at least one immobilized first antibody specific for a HE4a antigen polypeptide to determine the presence in the biological sample of a molecule naturally occurring in soluble form in the sample, wherein the antigen combining site of
30 the at least one first antibody competitively inhibits the immunospecific binding of monoclonal antibody 3D8 under conditions and for a time sufficient to specifically bind

the at least one immobilized first antibody to the HE4a antigen polypeptide and thereby form an immune complex; removing constituents of the sample that do not specifically bind to the at least one immobilized first antibody; and contacting the immune complex with at least one second antibody specific for a HE4a antigen polypeptide, wherein the antigen combining site of the at least one second antibody does not competitively inhibit the immunospecific binding of monoclonal antibody 4H4, under conditions and for a time sufficient to detect specific binding of the at least one second antibody to the mesothelin related antigen polypeptide, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

10 In certain embodiments the subject invention method further comprises determining the presence in the sample of at least one soluble marker of a malignant condition, wherein the marker is a mesothelin related antigen, carcinoembryonic antigen, CA125, sialyl TN, squamous cell carcinoma antigen, tissue polypeptide antigen, or placental alkaline phosphatase.

15 It is another aspect of the invention to provide a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising contacting each of (i) a first biological sample from a first subject suspected of having a malignant condition, and (ii) a second biological sample from a second subject known to be free of a malignant condition, with at least one antibody specific for a HE4a antigen polypeptide to determine the presence in each of the first and second biological samples of a molecule selected from the group consisting of (i) a molecule naturally occurring in soluble form in the sample, and (ii) a cell surface molecule wherein the first and second biological samples each comprise, respectively, a cell from the first and second subjects, the molecule having an antigenic determinant that is reactive with the at least one antibody, under conditions and for a time sufficient to detect binding of the antibody to the antigenic determinant, and comparing a level of detectable binding of the antibody to the antigenic determinant in the first biological sample to a level of detectable binding of the antibody to the antigenic determinant in the second biological sample, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

30 In another aspect, the invention provides a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising detecting in a biological

sample from the subject the presence of an antibody that immunospecifically binds to a HE4a antigen polypeptide. In certain embodiments the mesothelin related antigen polypeptide comprises a polypeptide having the amino acid sequence set forth in any one of SEQ ID NOS:5, 7, 11 or 13.

5 Turning to another aspect, the invention provides an antibody specific for a HE4a antigen polypeptide, comprising a monoclonal immunoglobulin variable region that specifically binds to a HE4a antigen polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in any one of SEQ ID NOS:5, 7, 11 or 13. In certain embodiments the antibody is a fusion protein, while in certain other embodiments the antibody is a
10 single chain antibody. In certain other embodiments, the HE4a antigen polypeptide further comprises a glycosylated polypeptide. In another embodiment, the antibody specifically binds to a HE4a antigen polypeptide sequence set forth in SEQ ID NO:11 but does not specifically bind to a polypeptide sequence set forth in SEQ ID NO:9, or the antibody specifically binds to both the HE4a antigen polypeptide sequence set forth
15 in SEQ ID NO:11 and to the polypeptide sequence set forth in SEQ ID NO:9. In certain embodiments the antibody is monoclonal antibody 2H5, 3D8 or 4H4.

In still another aspect, the invention provides a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising contacting a biological sample from a subject with a detectably labeled HE4a polypeptide, under conditions and
20 for a time sufficient to detect binding to the HE4a polypeptide of an antibody naturally occurring in soluble form in the sample, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

Turning to another aspect, the invention provides an isolated nucleic acid molecule that is a nucleic acid molecule encoding a HE4a antigen polypeptide, the
25 polypeptide comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS:5, 7, 11 or 13; or that is a nucleic acid molecule that encodes a HE4a antigen polypeptide or fusion protein or that is capable of hybridizing to such a nucleic acid molecule encoding a HE4a antigen under moderately stringent conditions, wherein the isolated nucleic acid molecule is not a nucleic acid molecule consisting of the nucleotide sequence set forth
30 in SEQ ID NO:9. In certain embodiments the invention provides an antisense

oligonucleotide comprising at least 15 consecutive nucleotides complementary to the nucleic acid molecule encoding a HE4a antigen polypeptide.

In other embodiments, the present invention provides a fusion protein comprising a polypeptide sequence fused to a HE4a antigen polypeptide. In certain further embodiments, the fusion domain is an immunoglobulin or a variant or fragment thereof. In certain further embodiments, the polypeptide sequence fused to a HE4a antigen polypeptide is cleavable by a protease. In another embodiment, the polypeptide sequence is an affinity tag polypeptide having affinity for a ligand.

In other embodiments, the invention provides a recombinant expression construct comprising at least one promoter operably linked to a nucleic acid molecule encoding a HE4a antigen polypeptide as described above. In certain embodiments the promoter is a regulated promoter and in certain other embodiments the HE4a antigen polypeptide is expressed as a fusion protein with a polypeptide product of a second nucleic acid sequence. In a further embodiment the polypeptide product of the second nucleic acid sequence is an immunoglobulin constant region. In another embodiment the expression construct is a recombinant viral expression construct. According to other embodiments, the invention provides a host cell comprising a recombinant expression construct as provided herein. In one embodiment the host cell is a prokaryotic cell and in another embodiment the host cell is a eukaryotic cell.

In another aspect, the invention provides a method of producing a recombinant HE4a antigen polypeptide by culturing a host cell comprising a recombinant expression construct comprising at least one promoter operably linked to a nucleic acid molecule encoding a HE4a antigen polypeptide as provided herein. In certain embodiments the promoter is a regulated promoter. In another embodiment the invention provides a method of producing a recombinant HE4a antigen polypeptide, by culturing a host cell infected with the recombinant viral expression construct as provided herein for expression of recombinant HE4a antigen polypeptide.

The present invention also provides, in another embodiment, a method for detecting HE4a expression in a sample by contacting an antisense oligonucleotide as described above with a sample comprising a nucleic acid sequence encoding a HE4a polypeptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11, or a fragment

or variant thereof; and detecting in the sample an amount of HE4a polypeptide-encoding nucleic acid that hybridizes to the antisense oligonucleotide, and therefrom detecting HE4a expression in the sample. In another embodiment the amount of HE4a polypeptide-encoding nucleic acid that hybridizes to the antisense oligonucleotide is
5 determined using polymerase chain reaction. In another embodiment the amount of HE4a polypeptide-encoding nucleic acid that hybridizes to the antisense oligonucleotide is determined using a hybridization assay. In another embodiment the sample comprises an RNA or cDNA preparation.

According to certain other embodiments of the present invention, there is
10 provided a method for treating a malignant condition, comprising administering to a patient in need thereof a composition comprising an antibody specific for a HE4a antigen polypeptide, the antibody comprising a monoclonal immunoglobulin variable region that specifically binds to a HE4a antigen polypeptide having an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11. In another embodiment the invention provides a
15 method for treating a malignant condition, comprising administering to a patient in need thereof a composition comprising a HE4a polypeptide having an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11, or a fragment thereof. In certain further embodiments the composition induces production in the patient of an antibody that is capable of specifically binding to a HE4a polypeptide having an amino acid sequence set forth in
20 SEQ ID NO:11, or a fragment thereof, and in certain other further embodiments the composition induces in the patient a T lymphocyte that is capable of specifically recognizing a HE4a polypeptide having an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11, or a fragment thereof. According to certain other embodiments, compositions and methods are provided that alter (*e.g.*, increase or decrease in a statistically
25 significant manner relative to an appropriate control) conception, contraception and/or fertility, comprising administering a HE4a polypeptide or fragment or variant thereof (including a fusion protein), or administering a composition comprising an immunoglobulin variable region that specifically binds to a HE4a polypeptide or fragment or variant thereof.

30

These and other aspects of the present invention will become evident upon reference to the following detailed description and attached drawings. In addition, various references are set forth herein which describe in more detail certain aspects of this invention, and are therefore incorporated by reference in their entireties.

5 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows real-time PCR detection of HE4a encoding cDNA in a panel of human samples.

Figure 2 shows western blot analysis of expressed HE4a fusion proteins.

Figure 3 depicts detection of antibodies reactive with HE4a-mIg fusion protein in sera from two immune mice (1605 and 1734) by ELISA.

Figure 4 depicts representative results of screening hybridoma supernatants and detection of HE4a-specific hybridoma antibodies using ELISA.

Figure 5 shows detection of HE4a-hIgG fusion protein by double-determinant sandwich ELISA using immobilized HE4a-specific monoclonal antibody 3D8 as the capture reagent and biotinylated HE4a-specific monoclonal antibody 2H5 as the detection reagent. Also shown is detection of soluble HE4a in supernatant fluid from ovarian carcinoma cell line 4007 (Δ).

Figure 6 shows detection by sandwich ELISA of HE4a antigen in serially diluted ascites fluid from an ovarian carcinoma patient.

20

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention pertains in part to the discovery of HE4a, a new member of the "four-disulfide core" family of proteins as described herein, which exhibits a sequence that is highly similar to, but distinct from, HE4 (Kirchhoff et al., 1991 *Biol. Reproduct.* 45:350-357). As described herein, HE4a (and not HE4) is most unexpectedly shown to be overexpressed in certain malignancies, for example in ovarian carcinomas, as well as in a number of other human tissues, in marked contrast to the restricted expression pattern of HE4 in human epididymal epithelial cells (Kirchhoff et al., 1991). The present invention also pertains in part to surprising

25

advantages that derive from compositions and methods described herein, which provide detection of cell surface and/or soluble forms of certain gene products referred to herein as HE4a polypeptides that occur naturally in subjects, including elevated levels of such polypeptides in subjects having certain carcinomas (*e.g.*, ovarian carcinomas). The invention therefore provides useful compositions and methods for the detection and diagnosis of a malignant condition in a subject by specific detection of such cell surface and/or soluble HE4a polypeptides.

As described in detail below, certain embodiments of the invention relate to HE4a polypeptides, which include soluble and cell surface forms of HE4a and HE4 polypeptides, including HE4 and HE4a polypeptide antigens and fusion proteins. In certain other embodiments, the invention relates to fragments, derivatives and/or analogs of HE4a polypeptides. Briefly, according to certain embodiments of the present invention, there is provided a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject by contacting a biological sample from the subject with an antibody specific for a human HE4a polypeptide. The complete amino acid and nucleic acid coding sequences of HE4a polypeptides and HE4a-Ig fusion proteins are disclosed herein, including the surprising observation that a nucleic acid molecule derived from ovarian carcinoma cDNA encodes an expressed product having a sequence distinct from HE4 as described by Kirchhoff et al. (1991), and the further unexpected observation that whereas HE4 expression as disclosed by Kirchhoff et al. is limited to epididymal epithelial cells, HE4a expression according to the present disclosure is readily detectable in ovarian carcinomas.

As described herein, monoclonal antibodies that specifically recognize HE4a polypeptides are provided, such that those having ordinary skill in the art may routinely and without undue experimentation immunize a host and screen for HE4a polypeptide-specific antibody production using the present teachings along with methodologies well known in the art. For example, construction of recombinant HE4a expression vectors and host cells, including recombinant HE4a fusion proteins, is described herein and provides HE4a-specific antibodies.

From the physicochemical and immunochemical properties of HE4a polypeptides disclosed herein, and using the presently disclosed nucleic acid sequences

encoding HE4a, a person having ordinary skill in the art may also prepare a recombinant HE4a polypeptide that can be used to produce and characterize specific antibodies according to well known methodologies. HE4a polypeptides can be expressed in mammalian cells, yeast, bacteria, or other cells under the control of appropriate
5 promoters. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the HE4a polypeptide DNA coding regions disclosed herein. Appropriate cloning and expression vectors for use with prokaryotic and eukaryotic hosts are described by Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, (1989). In preferred embodiments of the
10 invention, HE4a polypeptides are expressed in mammalian cells.

The nucleic acids of the present invention may be in the form of RNA or in the form of DNA, which DNA includes cDNA, genomic DNA, and synthetic DNA. The DNA may be double-stranded or single-stranded, and if single stranded may be the coding strand or non-coding (anti-sense) strand. A coding sequence which encodes an
15 HE4a polypeptide for use according to the invention may be identical to the coding sequences provided in SEQ ID NOS:3, 4, 6, 10 or 12 or may be a different coding sequence, which, as a result of the redundancy or degeneracy of the genetic code, encodes the same HE4a polypeptide as, for example, the cDNAs of SEQ ID NOS:10 and 12. The present invention therefore provides an isolated nucleic acid molecule that
20 encodes a HE4a antigen polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NOS:5, 7, 11 or 13, or a nucleic acid molecule capable of hybridizing to such an HE4a polypeptide-encoding nucleic acid, or a nucleic acid molecule having a sequence complementary thereto.

Variants preferably exhibit at least about 70% identity, more preferably
25 at least about 80%-85% identity and most preferably at least about 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to a polynucleotide sequence that encodes a native HE4a antigen polypeptide or a portion thereof, such as, for example, the nucleic acid sequences set forth in SEQ ID NOS:10 and 12. The percent identity may be readily determined by comparing sequences using computer algorithms well known to those of
30 ordinary skill in the art, such as Align or the BLAST algorithm (Altschul, *J. Mol. Biol.* 219:555-565, 1991; Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-

10919, 1992), which is available at the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>). Default parameters may be used.

Certain variants are substantially homologous to a native gene. Such polynucleotide variants are capable of hybridizing under moderately stringent conditions to a naturally occurring DNA or RNA sequence encoding a native HE4a antigen (or a complementary sequence). Suitable moderately stringent conditions include, for example, the following steps or their equivalent: prewashing in a solution of 5 X SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0); hybridizing at 50°C-65°C, 5 X SSC, overnight; followed by washing twice at 65°C for 20 minutes with each of 2X, 0.5X and 10 0.2X SSC containing 0.1% SDS. For additional stringency, conditions may include, for example, a wash in 0.1X SSC and 0.1% SDS at 60 °C for 15 minutes, or the equivalent. A person having ordinary skill in the art will readily appreciate the parameters that may be varied as a routine matter to create appropriately stringent hybridization conditions that are in some way selective for a particular nucleic acid of interest, and will further 15 appreciate that such conditions may be a function, *inter alia*, of the particular nucleic acid sequences involved in the hybridization, such as, for example, those disclosed herein as SEQ ID NOS:10 and 12, which encode HE4a polypeptides. See also, *e.g.*, Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, 1995, regarding selection of nucleic acid hybridization conditions.

20 The nucleic acids which encode HE4a polypeptides, for example the human HE4a polypeptides having the amino acid sequences of SEQ ID NO:11 or any other HE4a polypeptides for use according to the invention, may include, but are not limited to: only the coding sequence for the HE4a polypeptide; the coding sequence for the HE4a polypeptide and additional coding sequence; the coding sequence for the 25 HE4a polypeptide (and optionally additional coding sequence) and non-coding sequence, such as introns or non-coding sequences 5' and/or 3' of the coding sequence for the HE4a polypeptide, which for example may further include but need not be limited to one or more regulatory nucleic acid sequences that may be a regulated or regulatable promoter, enhancer, other transcription regulatory sequence, repressor 30 binding sequence, translation regulatory sequence or any other regulatory nucleic acid sequence. Thus, the term "nucleic acid encoding an HE4a polypeptide" encompasses a

nucleic acid which includes only coding sequence for the polypeptide as well as a nucleic acid which includes additional coding and/or non-coding sequence(s).

The present invention further relates to variants of the herein described nucleic acids which encode for fragments, analogs and derivatives of an HE4a polypeptide, for example the human HE4a polypeptides having the deduced amino acid sequence of SEQ ID NO:11. The variants of the nucleic acids encoding HE4a may be naturally occurring allelic variants of the nucleic acids or non-naturally occurring variants. As is known in the art, an allelic variant is an alternate form of a nucleic acid sequence which may have at least one of a substitution, a deletion or an addition of one or more nucleotides, any of which does not substantially alter the function of the encoded HE4a polypeptide. Thus, for example, the present invention includes nucleic acids encoding the same HE4a polypeptides as shown in SEQ ID NOS:5, 7 or 11, as well as variants of such nucleic acids, which variants may encode a fragment, derivative or analog of any of these polypeptides.

15 Variants and derivatives of HE4a may be obtained by mutations of nucleotide sequences encoding HE4a polypeptides. Alterations of the native amino acid sequence may be accomplished by any of a number of conventional methods. Mutations can be introduced at particular loci by synthesizing oligonucleotides containing a mutant sequence, flanked by restriction sites enabling ligation to fragments of the native sequence. Following ligation, the resulting reconstructed sequence encodes an analog having the desired amino acid insertion, substitution, or deletion.

Alternatively, oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis procedures can be employed to provide an altered gene wherein predetermined codons can be altered by substitution, deletion or insertion. Exemplary methods of making such alterations are disclosed by Walder et al. (*Gene* 42:133, 1986); Bauer et al. (*Gene* 37:73, 1985); Craik (*BioTechniques*, January 1985, 12-19); Smith et al. (*Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981); Kunkel (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488, 1985); Kunkel et al. (*Methods in Enzymol.* 154:367, 1987); and U.S. Patent Nos. 4,518,584 and 4,737,462.

30 Identification of nucleic acid molecules for use as antisense agents, which includes antisense oligonucleotides and ribozymes specific for nucleic acid

sequences encoding HE4a polypeptides or variants or fragments thereof; and of DNA oligonucleotides encoding HE4a genes for targeted delivery for genetic therapy, involve methods well known in the art. For example, the desirable properties, lengths and other characteristics of such oligonucleotides are well known. In certain preferred
 5 embodiments such an antisense oligonucleotide comprises at least 15-30 consecutive nucleotides complementary to an isolated nucleic acid molecule encoding an HE4a polypeptide as provided herein, and in certain other preferred embodiments such an antisense oligonucleotide may comprise at least 31-50, 51-75, 76-125 or more consecutive nucleotides complementary to an isolated nucleic acid molecule encoding
 10 an HE4a polypeptide as provided herein. Antisense oligonucleotides are typically designed to resist degradation by endogenous nucleolytic enzymes by using such linkages as: phosphorothioate, methylphosphonate, sulfone, sulfate, ketyl, phosphorodithioate, phosphoramidate, phosphate esters, and other such linkages (*see, e.g., Agrwal et al., Tetrahedron Lett.* 28:3539-3542 (1987); Miller et al., *J. Am. Chem.*
 15 *Soc.* 93:6657-6665 (1971); Stec et al., *Tetrahedron Lett.* 26:2191-2194 (1985); Moody et al., *Nucl. Acids Res.* 12:4769-4782 (1989); Uznanski et al., *Nucl. Acids Res.* (1989); Letsinger et al., *Tetrahedron* 40:137-143 (1984); Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* 54:367-402 (1985); Eckstein, *Trends Biol. Sci.* 14:97-100 (1989); Stein In: *Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression*, Cohen, Ed, Macmillan
 20 Press, London, pp. 97-117 (1989); Jager et al., *Biochemistry* 27:7237-7246 (1988)).

Antisense nucleotides are oligonucleotides that bind in a sequence-specific manner to nucleic acids, such as mRNA or DNA. When bound to mRNA that has complementary sequences, antisense prevents translation of the mRNA (*see, e.g., U.S. Patent No. 5,168,053 to Altman et al.; U.S. Patent No. 5,190,931 to Inouye, U.S.*
 25 *Patent No. 5,135,917 to Burch; U.S. Patent No. 5,087,617 to Smith and Clusel et al. (1993) Nucl. Acids Res.* 21:3405-3411, which describes dumbbell antisense oligonucleotides). Triplex molecules refer to single DNA strands that bind duplex DNA forming a colinear triplex molecule, thereby preventing transcription (*see, e.g., U.S. Patent No. 5,176,996 to Hogan et al., which describes methods for making*
 30 *synthetic oligonucleotides that bind to target sites on duplex DNA).*

According to this embodiment of the invention, particularly useful antisense nucleotides and triplex molecules are molecules that are complementary to or bind the sense strand of DNA or mRNA that encodes an HE4a polypeptide such that inhibition of translation of mRNA encoding the HE4a polypeptide is effected.

5 A ribozyme is an RNA molecule that specifically cleaves RNA substrates, such as mRNA, resulting in specific inhibition or interference with cellular gene expression. There are at least five known classes of ribozymes involved in the cleavage and/or ligation of RNA chains. Ribozymes can be targeted to any RNA transcript and can catalytically cleave such transcripts (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 10 5,272,262; U.S. Patent No. 5,144,019; and U.S. Patent Nos. 5,168,053, 5,180,818, 5,116,742 and 5,093,246 to Cech et al.). According to certain embodiments of the invention, any such HE4a mRNA-specific ribozyme, or a nucleic acid encoding such a ribozyme, may be delivered to a host cell to effect inhibition of HE4a gene expression. Ribozymes, and the like may therefore be delivered to the host cells by DNA encoding 15 the ribozyme linked to a eukaryotic promoter, such as a eukaryotic viral promoter, such that upon introduction into the nucleus, the ribozyme will be directly transcribed.

Equivalent DNA constructs that encode various additions or substitutions of amino acid residues or sequences, or deletions of terminal or internal residues or sequences not needed for biological activity are also encompassed by the 20 invention. For example, sequences encoding Cys residues that are not essential for biological activity can be altered to cause the Cys residues to be deleted or replaced with other amino acids, preventing formation of incorrect intramolecular disulfide bridges upon renaturation. Other equivalents can be prepared by modification of adjacent dibasic amino acid residues to enhance expression in yeast systems in which KEX2 25 protease activity is present. EP 212,914 discloses the use of site-specific mutagenesis to inactivate KEX2 protease processing sites in a protein. KEX2 protease processing sites are inactivated by deleting, adding or substituting residues to alter Arg-Arg, Arg-Lys, and Lys-Arg pairs to eliminate the occurrence of these adjacent basic residues. Lys-Lys pairings are considerably less susceptible to KEX2 cleavage, and conversion of Arg-Lys or Lys-Arg to Lys-Lys represents a conservative and preferred approach to inactivating 30 KEX2 sites.

The appropriate DNA sequence(s) may be inserted into any of a number of well known vectors appropriate for the selected host cell by a variety of procedures. In general, the DNA sequence is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) by procedures known in the art. Standard techniques for cloning, DNA isolation, 5 amplification and purification, for enzymatic reactions involving DNA ligase, DNA polymerase, restriction endonucleases and the like, and various separation techniques are those known and commonly employed by those skilled in the art. A number of standard techniques are described, for example, in Ausubel et al. (1993 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., 10 Boston, MA); Sambrook et al. (1989 *Molecular Cloning*, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); and elsewhere.

Examples of mammalian expression systems include the COS-7 lines of monkey kidney fibroblasts, described by Gluzman, *Cell* 23:175 (1981), and other cell lines capable of expressing a compatible vector, for example, the C127, 3T3, CHO, 15 HeLa and BHK cell lines. Mammalian expression vectors will comprise an origin of replication, a suitable promoter and enhancer, and also any necessary ribosome binding sites, polyadenylation site, splice donor and acceptor sites, transcriptional termination sequences, and 5' flanking nontranscribed sequences. DNA sequences derived, for example, from SV40 splice and polyadenylation sites may be used to provide the 20 required nontranscribed genetic elements. Introduction of the construct into the host cell can be effected by a variety of methods with which those skilled in the art will be familiar, including but not limited to, for example, calcium phosphate transfection, DEAE-Dextran mediated transfection, or electroporation (Davis et al., 1986 *Basic Methods in Molecular Biology*).

25 The present invention further relates to HE4a polypeptides and in particular to methods for detecting a malignant condition. In a preferred embodiment, malignancy is detected by determining the presence in a biological sample of a naturally occurring soluble molecule, or in a sample comprising a cell the presence of a cell surface molecule, having an antigenic determinant reactive with at least one antibody 30 specific for a HE4a polypeptide. In another preferred embodiment, malignancy is detected by determining the presence in a biological sample of at least one naturally

occurring HE4a polypeptide. As provided herein, a "HE4a antigen polypeptide" or "HE4a polypeptide" includes any polypeptide having an amino acid sequence of SEQ ID NO:11, including any fragment, derivative or analog thereof, and also includes any polypeptide encoded by a nucleic acid molecule comprising SEQ ID NO:10 or 12, or by
5 a nucleic acid molecule capable of hybridizing to a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:10 or 12, or a fragment, derivative or analog thereof. Certain preferred embodiments of the present invention contemplate compositions and methods directed to HE4a sequences as provided herein (*e.g.*, SEQ ID NOS:10-13) but which expressly exclude, on the basis of differences in structure, function and/or cell type expression or
10 tissue distribution, or the like (including antibody-defined detectable epitopes and also including oligonucleotide-defined hybridization detection), HE4 sequences disclosed in Kirchoff et al. (*e.g.*, 1991 *Biol. Reproduct.* 45:350; SEQ ID NOS:8-9).

The HE4a polypeptide of the invention may be an unmodified polypeptide or may be a polypeptide that has been posttranslationally modified, for example by
15 glycosylation, phosphorylation, fatty acylation including glycosylphosphatidylinositol anchor modification or the like, phospholipase cleavage such as phosphatidylinositol-specific phospholipase c mediated hydrolysis or the like, protease cleavage, dephosphorylation or any other type of protein posttranslational modification such as a modification involving formation or cleavage of a covalent chemical bond.

20 The terms "fragment," "derivative" and "analog" when referring to HE4a polypeptides, HE4a antigen polypeptides or HE4a fusion proteins, refers to any HE4a polypeptide that retains essentially the same biological function and/or activity as such polypeptide. Thus, an analog may include a HE4a antigen polypeptide isoform such as a differentially posttranslationally modified HE4a polypeptide or a variant such as a
25 splice variant. As is well known in the art, a "splice variant" includes variant or alternative forms of a polypeptide that arise from the differential intracellular processing of an RNA transcript. For example, two distinct mRNA species may be splice variants of one another where they differ only by the inclusion of all or a portion of a sequence corresponding to a particular exon in one mRNA species and its absence from the other
30 species. As those familiar with the art will appreciate, other structural relationships can exist between mRNA species that would be generally regarded as splice variants. A

HE4a polypeptide further includes a proprotein which can be activated by cleavage of the proprotein portion to produce an active HE4a polypeptide.

Biological functions and/or activities of fragments, derivatives and analogs of HE4a polypeptides or of HE4a antigen polypeptides include, but need not be limited to, the use of such polypeptides as markers in a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject as disclosed herein. For example, by detecting in a sample from the subject a molecule naturally occurring in soluble form and having an antigenic determinant that is reactive with at least one antibody specific for a HE4a polypeptide, one skilled in the art may be monitoring a biological function and/or activity of an HE4a polypeptide. Further, it should be noted that in certain embodiments the subject invention method of screening is directed to comparing relative quantities, levels and/or amounts of a detectable molecule naturally occurring in soluble form and having an antigenic determinant that is reactive with at least one antibody specific for a HE4a polypeptide in each of (i) a first biological sample from a first subject suspected of having a malignant condition, and (ii) a second biological sample from a second subject known to be free of a malignant condition. Accordingly, the relative quantitative presence of a HE4a polypeptide in a biological sample may be a biological function and/or activity of a HE4a polypeptide, although such function and/or activity should not be so limited.

A fragment, derivative or analog of a HE4a polypeptide may be (i) one in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably a conserved amino acid residue); (ii) one in which additional amino acids are fused to the HE4a polypeptide, including amino acids that may be employed for purification of the HE4a polypeptide or a proprotein sequence; or (iii) a truncated HE4a polypeptide. Such fragments, derivatives and analogs are deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

A truncated HE4a polypeptide may be any HE4a polypeptide molecule that comprises less than a full length version of the HE4a polypeptide. Truncated molecules provided by the present invention may include truncated biological polymers, and in preferred embodiments of the invention such truncated molecules may be

truncated nucleic acid molecules or truncated polypeptides. Truncated nucleic acid molecules have less than the full length nucleotide sequence of a known or described nucleic acid molecule, where such a known or described nucleic acid molecule may be a naturally occurring, a synthetic or a recombinant nucleic acid molecule, so long as one skilled in the art would regard it as a full length molecule. Thus, for example, truncated nucleic acid molecules that correspond to a gene sequence contain less than the full length gene where the gene comprises coding and non-coding sequences, promoters, enhancers and other regulatory sequences, flanking sequences and the like, and other functional and non-functional sequences that are recognized as part of the gene. In another example, truncated nucleic acid molecules that correspond to a mRNA sequence contain less than the full length mRNA transcript, which may include various translated and non-translated regions as well as other functional and non-functional sequences. In other preferred embodiments, truncated molecules are polypeptides that comprise less than the full length amino acid sequence of a particular protein.

As used herein "deletion" has its common meaning as understood by those familiar with the art, and may refer to molecules that lack one or more of a portion of a sequence from either terminus or from a non-terminal region, relative to a corresponding full length molecule, for example, as in the case of truncated molecules provided herein. Truncated molecules that are linear biological polymers such as nucleic acid molecules or polypeptides may have one or more of a deletion from either terminus of the molecule or a deletion from a non-terminal region of the molecule, where such deletions may be deletions of 1-1500 contiguous nucleotide or amino acid residues, preferably 1-500 contiguous nucleotide or amino acid residues and more preferably 1-300 contiguous nucleotide or amino acid residues.

As known in the art "similarity" between two polypeptides is determined by comparing the amino acid sequence and conserved amino acid substitutes thereto of the polypeptide to the sequence of a second polypeptide. Similarity between two polypeptide or nucleotide sequences, or even the percent identity, may be readily determined by comparing sequences using computer algorithms well known to those of ordinary skill in the art, such as the BLAST algorithm (Altschul, *J. Mol. Biol.* 219:555-565, 1991; Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919, 1992),

which is available at the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>). Default parameters may be used. Examples of other useful computer algorithms are those used in programs such as Align and FASTA, which may be accessed, for example, at the Genestream internet website of the Institut de Genetique Humaine, 5 Montpellier, France (www2.igh.cnrs.fr/home.eng.html) and used with default parameters. Fragments or portions of the polypeptides of the present invention may be employed for producing the corresponding full-length polypeptide by peptide synthesis; therefore, the fragments may be employed as intermediates for producing the full-length polypeptides.

10 The term "isolated" means that the material is removed from its original environment (e.g., the natural environment if it is naturally occurring). For example, a naturally occurring polypeptide or polynucleotide present in a living animal is not isolated, but the same polypeptide or polynucleotide, separated from some or all of the co-existing materials in the natural system, is isolated. Such polypeptides or 15 polynucleotides could be part of a composition, and still be isolated in that such composition is not part of its natural environment.

Affinity techniques are particularly useful in the context of isolating HE4a polypeptides for use according to the methods of the present invention, and may include any method that exploits a specific binding interaction with a HE4a polypeptide 20 to effect a separation. For example, because HE4a polypeptides may contain covalently attached oligosaccharide moieties (see, e.g., Fig. 2 as described in the Examples), an affinity technique such as binding of a HE4a polypeptide to a suitable immobilized lectin under conditions that permit carbohydrate binding by the lectin may be a particularly useful affinity technique. Other useful affinity techniques include 25 immunological techniques for isolating a HE4a polypeptide, which techniques rely on specific binding interaction between antibody combining sites for antigen and antigenic determinants present in the complexes. Immunological techniques include, but need not be limited to, immunoaffinity chromatography, immunoprecipitation, solid phase immunoadsorption or other immunoaffinity methods. For these and other useful 30 affinity techniques, see, for example, Scopes, R.K., *Protein Purification: Principles and Practice*, 1987, Springer-Verlag, NY; Weir, D.M., *Handbook of Experimental*

Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston; and Hermanson, G.T. et al., *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, 1992, Academic Press, Inc., California; which are hereby incorporated by reference in their entireties, for details regarding techniques for isolating and characterizing complexes, including affinity techniques.

5 As described herein, the invention provides a fusion protein comprising a polypeptide fused to a HE4a. Such HE4a fusion proteins are encoded by nucleic acids that have the HE4a coding sequence fused in frame to an additional coding sequence to provide for expression of a HE4a polypeptide sequence fused to an additional functional or non-functional polypeptide sequence that permits, for example by way of illustration
10 and not limitation, detection, isolation and/or purification of the HE4a fusion protein. Such HE4a fusion proteins may permit detection, isolation and/or purification of the HE4a fusion protein by protein-protein affinity, metal affinity or charge affinity-based polypeptide purification, or by specific protease cleavage of a fusion protein containing a fusion sequence that is cleavable by a protease such that the HE4a polypeptide is
15 separable from the fusion protein.

Thus, HE4a fusion proteins may comprise affinity tag polypeptide sequences, which refers to polypeptides or peptides added to HE4a to facilitate detection and isolation of the HE4a via a specific affinity interaction with a ligand. The ligand may be any molecule, receptor, counterreceptor, antibody or the like with which
20 the affinity tag may interact through a specific binding interaction as provided herein. Such peptides include, for example, poly-His or the antigenic identification peptides described in U.S. Patent No. 5,011,912 and in Hopp et al., (1988 *Bio/Technology* 6:1204), or the XPRESS™ epitope tag (Invitrogen, Carlsbad, CA). The affinity sequence may be a hexa-histidine tag as supplied, for example, by a pBAD/His
25 (Invitrogen) or a pQE-9 vector to provide for purification of the mature polypeptide fused to the marker in the case of a bacterial host, or, for example, the affinity sequence may be a hemagglutinin (HA) tag when a mammalian host, e.g., COS-7 cells, is used. The HA tag corresponds to an antibody defined epitope derived from the influenza hemagglutinin protein (Wilson et al., 1984 *Cell* 37:767).

30 HE4a fusion proteins may, in particularly preferred embodiments and as described in greater detail below, further comprise immunoglobulin constant region

polypeptides added to HE4a to facilitate detection, isolation and/or localization of HE4a. The immunoglobulin constant region polypeptide preferably is fused to the C-terminus of a HE4a polypeptide. According to non-limiting theory, inclusion of immunoglobulin (Ig) constant region domains in HE4a fusion proteins as provided
5 herein may offer advantages, for example, those associated with the immunogenic/non-immunogenic properties of particular Ig regions when used in particular hosts (*i.e.*, "self" vs. "non-self"), or those which facilitate isolation and/or detection of a fusion protein. These and other advantages of Ig fusion proteins will be appreciated by those familiar with the art, based on the present disclosure. General preparation of fusion
10 proteins comprising heterologous polypeptides fused to various portions of antibody-derived polypeptides (including the Fc domain) has been described, *e.g.*, by Ashkenazi et al. (*PNAS USA* 88:10535, 1991) and Byrn et al. (*Nature* 344:677, 1990). A gene fusion encoding the HE4a:Fc fusion protein is inserted into an appropriate expression vector. In certain embodiments of the invention, HE4a:Fc fusion proteins may be
15 allowed to assemble much like antibody molecules, whereupon interchain disulfide bonds form between Fc polypeptides, yielding dimeric HE4a fusion proteins.

HE4a fusion proteins having specific binding affinities for pre-selected antigens by virtue of fusion polypeptides comprising immunoglobulin V-region domains encoded by DNA sequences linked in-frame to sequences encoding HE4a are
20 also within the scope of the invention, including variants and fragments thereof as provided herein. General strategies for the construction of fusion proteins having immunoglobulin V-region fusion polypeptides are disclosed, for example, in EP 0318554; U.S. 5,132,405; U.S. 5,091,513; and U.S. 5,476,786.

The nucleic acid of the present invention may also encode a fusion
25 protein comprising a HE4a polypeptide fused to other polypeptides having desirable affinity properties, for example an enzyme such as glutathione-S-transferase. As another example, HE4a fusion proteins may also comprise a HE4a polypeptide fused to a *Staphylococcus aureus* protein A polypeptide; protein A encoding nucleic acids and their use in constructing fusion proteins having affinity for immunoglobulin constant
30 regions are disclosed generally, for example, in U.S. Patent 5,100,788. Other useful affinity polypeptides for construction of HE4a fusion proteins may include streptavidin

fusion proteins, as disclosed, for example, in WO 89/03422; U.S. 5,489,528; U.S. 5,672,691; WO 93/24631; U.S. 5,168,049; U.S. 5,272,254 and elsewhere, and avidin fusion proteins (see, e.g., EP 511,747). As provided herein and in the cited references, HE4a polypeptide sequences may be fused to fusion polypeptide sequences that may be
5 full length fusion polypeptides and that may alternatively be variants or fragments thereof.

The present invention also contemplates HE4a fusion proteins that contain polypeptide sequences that direct the fusion protein to the cell nucleus, to reside in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER), to be secreted from a cell via the classical ER-Golgi secretory pathway (see, e.g., von Heijne, *J. Membrane Biol.* 115:195-201, 1990), to be incorporated into the plasma membrane, to associate with a specific cytoplasmic component including the cytoplasmic domain of a transmembrane cell surface receptor or to be directed to a particular subcellular location by any of a variety of known intracellular protein sorting mechanisms with which those skilled in
10 the art will be familiar (See, e.g., Rothman, *Nature* 372:55-63, 1994, Adrani et al., 1998 *J. Biol. Chem.* 273:10317, and references cited therein.). Accordingly, these and related embodiments are encompassed by the instant compositions and methods directed to targeting a polypeptide of interest to a predefined intracellular, membrane or extracellular localization.

The present invention also relates to vectors and to constructs that include nucleic acids of the present invention, and in particular to "recombinant expression constructs" that include any nucleic acids encoding HE4a polypeptides according to the invention as provided above; to host cells which are genetically engineered with vectors and/or constructs of the invention and to the production of
25 HE4a polypeptides and fusion proteins of the invention, or fragments or variants thereof, by recombinant techniques. HE4a proteins can be expressed in mammalian cells, yeast, bacteria, or other cells under the control of appropriate promoters. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention. Appropriate cloning and expression
30 vectors for use with prokaryotic and eukaryotic hosts are described, for example, by

Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York, (1989).

Generally, recombinant expression vectors will include origins of replication and selectable markers permitting transformation of the host cell, *e.g.*, the
5 ampicillin resistance gene of *E. coli* and *S. cerevisiae* TRP1 gene, and a promoter derived from a highly-expressed gene to direct transcription of a downstream structural sequence. Such promoters can be derived from operons encoding glycolytic enzymes such as 3-phosphoglycerate kinase (PGK), α -factor, acid phosphatase, or heat shock proteins, among others. The heterologous structural sequence is assembled in
10 appropriate phase with translation initiation and termination sequences. Optionally, the heterologous sequence can encode a fusion protein including an N-terminal identification peptide imparting desired characteristics, *e.g.*, stabilization or simplified purification of expressed recombinant product.

Useful expression constructs for bacterial use are constructed by
15 inserting into an expression vector a structural DNA sequence encoding a desired protein together with suitable translation initiation and termination signals in operable reading phase with a functional promoter. The construct may comprise one or more phenotypic selectable markers and an origin of replication to ensure maintenance of the vector construct and, if desirable, to provide amplification within the host. Suitable
20 prokaryotic hosts for transformation include *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* and various species within the genera *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and *Staphylococcus*, although others may also be employed as a matter of choice. Any other plasmid or vector may be used as long as they are replicable and viable in the host.

As a representative but non-limiting example, useful expression vectors
25 for bacterial use can comprise a selectable marker and bacterial origin of replication derived from commercially available plasmids comprising genetic elements of the well known cloning vector pBR322 (ATCC 37017). Such commercial vectors include, for example, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and GEM1 (Promega Biotec, Madison, Wisconsin, USA). These pBR322 "backbone" sections are
30 combined with an appropriate promoter and the structural sequence to be expressed.

Following transformation of a suitable host strain and growth of the host strain to an appropriate cell density, the selected promoter, if it is a regulated promoter as provided herein, is induced by appropriate means (*e.g.*, temperature shift or chemical induction) and cells are cultured for an additional period. Cells are typically harvested
5 by centrifugation, disrupted by physical or chemical means, and the resulting crude extract retained for further purification. Microbial cells employed in expression of proteins can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents; such methods are well known to those skilled in the art.

10 Thus, for example, the nucleic acids of the invention as provided herein may be included in any one of a variety of expression vector constructs as a recombinant expression construct for expressing a HE4a polypeptide. Such vectors and constructs include chromosomal, nonchromosomal and synthetic DNA sequences, *e.g.*, derivatives of SV40; bacterial plasmids; phage DNA; baculovirus; yeast plasmids;
15 vectors derived from combinations of plasmids and phage DNA, viral DNA, such as vaccinia, adenovirus, fowl pox virus, and pseudorabies. However, any other vector may be used for preparation of a recombinant expression construct as long as it is replicable and viable in the host.

The appropriate DNA sequence(s) may be inserted into the vector by a
20 variety of procedures. In general, the DNA sequence is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) by procedures known in the art. Standard techniques for cloning, DNA isolation, amplification and purification, for enzymatic reactions involving DNA ligase, DNA polymerase, restriction endonucleases and the like, and various separation techniques are those known and commonly employed by those
25 skilled in the art. A number of standard techniques are described, for example, in Ausubel et al. (1993 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA); Sambrook et al. (1989 *Molecular Cloning*, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis et al. (1982 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); and elsewhere.

30 The DNA sequence in the expression vector is operatively linked to at least one appropriate expression control sequences (*e.g.*, a promoter or a regulated

promoter) to direct mRNA synthesis. Representative examples of such expression control sequences include LTR or SV40 promoter, the *E. coli lac* or *trp*, the phage lambda P_L promoter and other promoters known to control expression of genes in prokaryotic or eukaryotic cells or their viruses. Promoter regions can be selected from
 5 any desired gene using CAT (chloramphenicol transferase) vectors or other vectors with selectable markers. Two appropriate vectors are pKK232-8 and pCM7. Particular named bacterial promoters include *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, lambda P_R, P_L and *trp*. Eukaryotic promoters include CMV immediate early, HSV thymidine kinase, early and late SV40, LTRs from retrovirus, and mouse metallothionein-I. Selection of the
 10 appropriate vector and promoter is well within the level of ordinary skill in the art, and preparation of certain particularly preferred recombinant expression constructs comprising at least one promoter or regulated promoter operably linked to a nucleic acid encoding a HE4a polypeptide is described herein.

As noted above, in certain embodiments the vector may be a viral vector
 15 such as a retroviral vector. For example, retroviruses from which the retroviral plasmid vectors may be derived include, but are not limited to, Moloney Murine Leukemia Virus, spleen necrosis virus, retroviruses such as Rous Sarcoma Virus, Harvey Sarcoma virus, avian leukosis virus, gibbon ape leukemia virus, human immunodeficiency virus, adenovirus, Myeloproliferative Sarcoma Virus, and mammary tumor virus.

The viral vector includes one or more promoters. Suitable promoters
 20 which may be employed include, but are not limited to, the retroviral LTR; the SV40 promoter; and the human cytomegalovirus (CMV) promoter described in Miller, et al., *Biotechniques* 7:980-990 (1989), or any other promoter (*e.g.*, cellular promoters such as eukaryotic cellular promoters including, but not limited to, the histone, pol III, and β -
 25 actin promoters). Other viral promoters which may be employed include, but are not limited to, adenovirus promoters, thymidine kinase (TK) promoters, and B19 parvovirus promoters. The selection of a suitable promoter will be apparent to those skilled in the art from the teachings contained herein, and may be from among either regulated promoters or promoters as described above.

The retroviral plasmid vector is employed to transduce packaging cell
 30 lines to form producer cell lines. Examples of packaging cells which may be

transfected include, but are not limited to, the PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+E-86, GP+envAm12, and DAN cell lines as described in Miller, *Human Gene Therapy*, 1:5-14 (1990), which is incorporated herein by reference in its entirety. The vector may transduce the packaging cells through any

5 means known in the art. Such means include, but are not limited to, electroporation, the use of liposomes, and calcium phosphate precipitation. In one alternative, the retroviral plasmid vector may be encapsulated into a liposome, or coupled to a lipid, and then administered to a host.

The producer cell line generates infectious retroviral vector particles

10 which include the nucleic acid sequence(s) encoding the HE4a polypeptides or fusion proteins. Such retroviral vector particles then may be employed, to transduce eukaryotic cells, either *in vitro* or *in vivo*. The transduced eukaryotic cells will express the nucleic acid sequence(s) encoding the HE4a polypeptide or fusion protein. Eukaryotic cells which may be transduced include, but are not limited to, embryonic stem cells,

15 embryonic carcinoma cells, as well as hematopoietic stem cells, hepatocytes, fibroblasts, myoblasts, keratinocytes, endothelial cells, bronchial epithelial cells and various other culture-adapted cell lines.

As another example of an embodiment of the invention in which a viral vector is used to prepare the recombinant HE4a expression construct, in one preferred

20 embodiment, host cells transduced by a recombinant viral construct directing the expression of HE4a polypeptides or fusion proteins may produce viral particles containing expressed HE4a polypeptides or fusion proteins that are derived from portions of a host cell membrane incorporated by the viral particles during viral budding. In another preferred embodiment, HE4a encoding nucleic acid sequences are

25 cloned into a baculovirus shuttle vector, which is then recombined with a baculovirus to generate a recombinant baculovirus expression construct that is used to infect, for example, Sf9 host cells, as described in *Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology* Vol. 39, C. D. Richardson, Editor, Human Press, Totowa, NJ, 1995; Pivnicka-Worms, "Expression of Proteins in Insect Cells Using Baculoviral Vectors,"

30 Section II in Chapter 16 in: *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd Ed.,

Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, New York, New York, 1992, pages 16-32 to 16-48.

In another aspect, the present invention relates to host cells containing the above described recombinant HE4a expression constructs. Host cells are genetically
5 engineered (transduced, transformed or transfected) with the vectors and/or expression constructs of this invention which may be, for example, a cloning vector, a shuttle vector or an expression construct. The vector or construct may be, for example, in the form of a plasmid, a viral particle, a phage, etc. The engineered host cells can be cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for activating
10 promoters, selecting transformants or amplifying particular genes such as genes encoding HE4a polypeptides or HE4a fusion proteins. The culture conditions for particular host cells selected for expression, such as temperature, pH and the like, will be readily apparent to the ordinarily skilled artisan.

The host cell can be a higher eukaryotic cell, such as a mammalian cell,
15 or a lower eukaryotic cell, such as a yeast cell, or the host cell can be a prokaryotic cell, such as a bacterial cell. Representative examples of appropriate host cells according to the present invention include, but need not be limited to, bacterial cells, such as *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*; fungal cells, such as yeast; insect cells, such as *Drosophila S2* and *Spodoptera Sf9*; animal cells, such as CHO, COS or 293 cells;
20 adenoviruses; plant cells, or any suitable cell already adapted to *in vitro* propagation or so established *de novo*. The selection of an appropriate host is deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

Various mammalian cell culture systems can also be employed to express recombinant protein. The invention is therefore directed in part to a method of
25 producing a recombinant HE4a polypeptide, by culturing a host cell comprising a recombinant expression construct that comprises at least one promoter operably linked to a nucleic acid sequence encoding a HE4a. In certain embodiments, the promoter may be a regulated promoter as provided herein, for example a tetracycline-repressible promoter. In certain embodiments the recombinant expression construct is a
30 recombinant viral expression construct as provided herein. Examples of mammalian expression systems include the COS-7 lines of monkey kidney fibroblasts, described by

Gluzman, *Cell* 23:175 (1981), and other cell lines capable of expressing a compatible vector, for example, the C127, 3T3, CHO, HeLa and BHK cell lines. Mammalian expression vectors will comprise an origin of replication, a suitable promoter and enhancer, and also any necessary ribosome binding sites, polyadenylation site, splice donor and acceptor sites, transcriptional termination sequences, and 5' flanking nontranscribed sequences, for example as described herein regarding the preparation of MRA expression constructs. DNA sequences derived from the SV40 splice, and polyadenylation sites may be used to provide the required nontranscribed genetic elements. Introduction of the construct into the host cell can be effected by a variety of methods with which those skilled in the art will be familiar, including but not limited to, for example, calcium phosphate transfection, DEAE-Dextran mediated transfection, or electroporation (Davis et al., 1986 *Basic Methods in Molecular Biology*).

The expressed recombinant HE4a antigen polypeptides (or HE4a polypeptides), or fusion proteins derived therefrom, may be useful as immunogens in the form of intact host cells; intact organelles such as cell membranes, intracellular vesicles or other cellular organelles; or disrupted cell preparations including but not limited to cell homogenates or lysates, uni- and multilamellar membrane vesicles or other preparations. Alternatively, expressed recombinant mesothelin related antigen polypeptides (or mesothelin polypeptides) or fusion proteins can be recovered and purified from recombinant cell cultures by methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography including immunoaffinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Protein refolding steps can be used, as necessary, in completing configuration of the mature protein. Finally, high performance liquid chromatography (HPLC) can be employed for final purification steps. Expressed recombinant HE4a antigen polypeptides (or HE4a polypeptides) or fusion proteins may also be useful as target antigens in any of a number of assay configurations for routine antibody screening, which can be readily performed by those having ordinary skill in the art.

The HE4a antigen polypeptide (or HE4a polypeptide) that is an immunogen for the production of a specific antibody to be used in the method of the present invention may thus be a naturally purified product, or a product of chemical synthetic procedures, or produced by recombinant techniques from a prokaryotic or, 5 preferably, a eukaryotic host. Depending upon the host employed in a recombinant production procedure, the polypeptides of the present invention may be glycosylated or otherwise posttranslationally modified as known in the art and as provided herein.

According to the present invention, a soluble human HE4a antigen polypeptide (or HE4a polypeptide) may be detected in a biological sample from a 10 subject or biological source. Biological samples may be provided by obtaining a blood sample, biopsy specimen, tissue explant, organ culture, biological fluid or any other tissue or cell preparation from a subject or a biological source. The subject or biological source may be a human or non-human animal, a primary cell culture or culture adapted cell line including but not limited to genetically engineered cell lines 15 that may contain chromosomally integrated or episomal recombinant nucleic acid sequences, immortalized or immortalizable cell lines, somatic cell hybrid cell lines, differentiated or differentiable cell lines, transformed cell lines and the like. In certain preferred embodiments of the invention, the subject or biological source may be suspected of having or being at risk for having a malignant condition, which in certain 20 further preferred embodiments may be an ovarian cancer such as ovarian carcinoma, and in certain other preferred embodiments of the invention the subject or biological source may be known to be free of a risk or presence of such disease.

In certain preferred embodiments the biological sample comprises at least one cell from a subject or biological source, and in certain other preferred 25 embodiments the biological sample is a biological fluid containing a soluble human mesothelin related antigen polypeptide. Biological fluids are typically liquids at physiological temperatures and may include naturally occurring fluids present in, withdrawn from, expressed or otherwise extracted from a subject or biological source. Certain biological fluids derive from particular tissues, organs or localized regions and 30 certain other biological fluids may be more globally or systemically situated in a subject or biological source. Examples of biological fluids include blood, serum and serosal

fluids, plasma, lymph, urine, cerebrospinal fluid, saliva, mucosal secretions of the secretory tissues and organs, vaginal secretions, ascites fluids such as those associated with non-solid tumors, fluids of the pleural, pericardial, peritoneal, abdominal and other body cavities, and the like. Biological fluids may also include liquid solutions
5 contacted with a subject or biological source, for example, cell and organ culture medium including cell or organ conditioned medium, lavage fluids and the like. In certain highly preferred embodiments the biological sample is serum, and in certain other highly preferred embodiments the biological sample is plasma. In other preferred embodiments the biological sample is a cell-free liquid solution.

10 In certain other preferred embodiments the biological sample comprises an intact cell, and in certain other preferred embodiments the biological sample comprises a cell extract containing a nucleic acid sequence encoding a HE4a antigen polypeptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS:11 or 13, or a fragment or variant thereof.

15 A "molecule naturally occurring in soluble form" in a sample may be a soluble protein, polypeptide, peptide, amino acid, or derivative thereof; a lipid, fatty acid or the like, or derivative thereof; a carbohydrate, saccharide or the like or derivative thereof; a nucleic acid, nucleotide, nucleoside, purine, pyrimidine or related molecule, or derivative thereof, or the like; or any combination thereof such as, for example, a
20 glycoprotein, a glycolipid, a lipoprotein, a proteolipid, or any other biological molecule that is a soluble or cell-free constituent of a biological sample as provided herein. A "molecule naturally occurring in soluble form" further refers to a molecule that is in solution or present in a biological sample, including a biological fluid as provided herein, and that is not bound to the surface of an intact cell. For example, a molecule
25 naturally occurring in soluble form may include but need not be limited to a solute; a component of a macromolecular complex; a material that is shed, secreted or exported from a cell; a colloid; a microparticle or nanoparticle or other fine suspension particle; or the like.

30 The presence of a malignant condition in a subject refers to the presence of dysplastic, cancerous and/or transformed cells in the subject, including, for example neoplastic, tumor, non-contact inhibited or oncogenically transformed cells, or the like.

By way of illustration and not limitation, in the context of the present invention a malignant condition may refer further to the presence in a subject of cancer cells that are capable of secreting, shedding, exporting or releasing a HE4a antigen polypeptide (or a HE4a polypeptide) in such a manner that elevated levels of such a polypeptide are detectable in a biological sample from the subject. In preferred embodiments, for example, such cancer cells are malignant epithelial cells such as carcinoma cells, and in particularly preferred embodiments such cancer cells are malignant mesothelioma cells, which are transformed variants of squamous cell epithelial or mesothelial cells that are found, for example, lining pleural, pericardial, peritoneal, abdominal and other body cavities.

In the most preferred embodiments of the invention, tumor cells, the presence of which signifies the presence of a malignant condition, are ovarian carcinoma cells, including primary and metastatic ovarian carcinoma cells. Criteria for classifying a malignancy as ovarian carcinoma are well known in the art (see, *e.g.*, Bell et al., 1998 *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 105:1136; Meier et al., 1997 *Anticancer Res.* 17(4B):3019; Meier et al. 1997 *Anticancer Res.* 17(4B):2949; Cioffi et al., 1997 *Tumori* 83:594; and references cited therein) as are the establishment and characterization of human ovarian carcinoma cell lines from primary and metastatic tumors (*e.g.*, OVCAR-3, Amer. Type Culture Collection, Manassas, VA; Yuan et al., 1997 *Gynecol. Oncol.* 66:378). In other embodiments, the malignant condition may be mesothelioma, pancreatic carcinoma, non-small cell lung carcinoma or another form of cancer, including any of the various carcinomas such as squamous cell carcinomas and adenocarcinomas, and also including sarcomas and hematologic malignancies (*e.g.*, leukemias, lymphomas, myelomas, etc.). Classification of these and other malignant conditions is known to those having familiarity with the art, and the present disclosure provides determination of the presence of a HE4a polypeptide in such a malignant condition without undue experimentation.

As provided herein, the method of screening for the presence of a malignant condition in a subject may feature the use of an antibody specific for a HE4a antigen polypeptide or an antibody specific for a HE4a polypeptide.

Antibodies that are specific for a HE4a antigen polypeptide (or a HE4a polypeptide) are readily generated as monoclonal antibodies or as polyclonal antisera, or may be produced as genetically engineered immunoglobulins (Ig) that are designed to have desirable properties using methods well known in the art. For example, by way of
5 illustration and not limitation, antibodies may include recombinant IgGs, chimeric fusion proteins having immunoglobulin derived sequences or "humanized" antibodies (see, *e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,693,762; 5,585,089; 4,816,567; 5,225,539; 5,530,101; and references cited therein) that may all be used for detection of a human HE4a polypeptide according to the invention. Such antibodies may be prepared as provided
10 herein, including by immunization with HE4a polypeptides as described below. For example, as provided herein, nucleic acid sequences encoding HE4a polypeptides are disclosed, such that those skilled in the art may routinely prepare these polypeptides for use as immunogens. For instance, monoclonal antibodies such as 2H5, 3D8 and 4H4, which are described in greater detail below, may be used to practice certain methods
15 according to the present invention.

The term "antibodies" includes polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, fragments thereof such as $F(ab')_2$, and Fab fragments, as well as any naturally occurring or recombinantly produced binding partners, which are molecules that specifically bind a HE4a polypeptide. Antibodies are defined to be
20 "immunospecific" or specifically binding if they bind HE4a polypeptide with a K_a of greater than or equal to about $10^4 M^{-1}$, preferably of greater than or equal to about $10^5 M^{-1}$, more preferably of greater than or equal to about $10^6 M^{-1}$ and still more preferably of greater than or equal to about $10^7 M^{-1}$. Affinities of binding partners or antibodies can be readily determined using conventional techniques, for example those described
25 by Scatchard et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660 (1949). Determination of other proteins as binding partners of a HE4a polypeptide can be performed using any of a number of known methods for identifying and obtaining proteins that specifically interact with other proteins or polypeptides, for example, a yeast two-hybrid screening system such as that described in U.S. Patent No. 5,283,173 and U.S. Patent No. 5,468,614, or the
30 equivalent. The present invention also includes the use of a HE4a polypeptide, and

peptides based on the amino acid sequence of a HE4a polypeptide, to prepare binding partners and antibodies that specifically bind to a HE4a polypeptide.

Antibodies may generally be prepared by any of a variety of techniques known to those of ordinary skill in the art (see, e.g., Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). In one such technique, an immunogen comprising a HE4a polypeptide, for example a cell having a HE4a polypeptide on its surface or an isolated HE4a polypeptide is initially injected into a suitable animal (e.g., mice, rats, rabbits, sheep and goats), preferably according to a predetermined schedule incorporating one or more booster immunizations, and the animals are bled periodically. Polyclonal antibodies specific for the HE4a polypeptide may then be purified from such antisera by, for example, affinity chromatography using the polypeptide coupled to a suitable solid support.

Monoclonal antibodies specific for HE4a polypeptides or variants thereof may be prepared, for example, using the technique of Kohler and Milstein (1976 *Eur. J. Immunol.* 6:511-519), and improvements thereto. Briefly, these methods involve the preparation of immortal cell lines capable of producing antibodies having the desired specificity (i.e., reactivity with the mesothelin polypeptide of interest). Such cell lines may be produced, for example, from spleen cells obtained from an animal immunized as described above. The spleen cells are then immortalized by, for example, fusion with a myeloma cell fusion partner, preferably one that is syngeneic with the immunized animal. For example, the spleen cells and myeloma cells may be combined with a membrane fusion promoting agent such as polyethylene glycol or a nonionic detergent for a few minutes, and then plated at low density on a selective medium that supports the growth of hybrid cells, but not myeloma cells. A preferred selection technique uses HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine) selection. After a sufficient time, usually about 1 to 2 weeks, colonies of hybrids are observed. Single colonies are selected and tested for binding activity against the polypeptide. Hybridomas having high reactivity and specificity are preferred. Hybridomas that generate monoclonal antibodies that specifically bind to HE4a polypeptides are contemplated by the present invention.

Monoclonal antibodies may be isolated from the supernatants of growing hybridoma colonies. In addition, various techniques may be employed to enhance the yield, such as injection of the hybridoma cell line into the peritoneal cavity of a suitable vertebrate host, such as a mouse. Monoclonal antibodies may then be harvested from the ascites fluid or the blood. Contaminants may be removed from the antibodies by conventional techniques, such as chromatography, gel filtration, precipitation, and extraction. For example, antibodies may be purified by chromatography on immobilized Protein G or Protein A using standard techniques.

Within certain embodiments, the use of antigen-binding fragments of antibodies may be preferred. Such fragments include Fab fragments, which may be prepared using standard techniques (*e.g.*, by digestion with papain to yield Fab and Fc fragments). The Fab and Fc fragments may be separated by affinity chromatography (*e.g.*, on immobilized protein A columns), using standard techniques. See, *e.g.*, Weir, D.M., *Handbook of Experimental Immunology*, 1986, Blackwell Scientific, Boston.

Multifunctional fusion proteins having specific binding affinities for pre-selected antigens by virtue of immunoglobulin V-region domains encoded by DNA sequences linked in-frame to sequences encoding various effector proteins are known in the art, for example, as disclosed in EP-B1-0318554, U.S. Patent No. 5,132,405, U.S. Patent No. 5,091,513 and U.S. Patent No. 5,476,786. Such effector proteins include polypeptide domains that may be used to detect binding of the fusion protein by any of a variety of techniques with which those skilled in the art will be familiar, including but not limited to a biotin mimetic sequence (see, *e.g.*, Luo et al., 1998 *J. Biotechnol.* 65:225 and references cited therein), direct covalent modification with a detectable labeling moiety, non-covalent binding to a specific labeled reporter molecule, enzymatic modification of a detectable substrate or immobilization (covalent or non-covalent) on a solid-phase support.

Single chain antibodies for use in the present invention may also be generated and selected by a method such as phage display (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,223,409; Schlebusch et al., 1997 *Hybridoma* 16:47; and references cited therein). Briefly, in this method, DNA sequences are inserted into the gene III or gene VIII gene of a filamentous phage, such as M13. Several vectors with multicloning sites have been

developed for insertion (McLafferty et al., *Gene* 128:29-36, 1993; Scott and Smith, *Science* 249:386-390, 1990; Smith and Scott, *Methods Enzymol.* 217:228-257, 1993). The inserted DNA sequences may be randomly generated or may be variants of a known binding domain for binding to a HE4a polypeptide. Single chain antibodies may readily
5 be generated using this method. Generally, the inserts encode from 6 to 20 amino acids. The peptide encoded by the inserted sequence is displayed on the surface of the bacteriophage. Bacteriophage expressing a binding domain for a HE4a polypeptide are selected by binding to an immobilized HE4a polypeptide, for example a recombinant polypeptide prepared using methods well known in the art and nucleic acid coding
10 sequences as disclosed herein. Unbound phage are removed by a wash, typically containing 10 mM Tris, 1 mM EDTA, and without salt or with a low salt concentration. Bound phage are eluted with a salt containing buffer, for example. The NaCl concentration is increased in a step-wise fashion until all the phage are eluted. Typically, phage binding with higher affinity will be released by higher salt
15 concentrations. Eluted phage are propagated in the bacteria host. Further rounds of selection may be performed to select for a few phage binding with high affinity. The DNA sequence of the insert in the binding phage is then determined. Once the predicted amino acid sequence of the binding peptide is known, sufficient peptide for use herein as an antibody specific for a HE4a polypeptide may be made either by
20 recombinant means or synthetically. Recombinant means are used when the antibody is produced as a fusion protein. The peptide may also be generated as a tandem array of two or more similar or dissimilar peptides, in order to maximize affinity or binding.

To detect an antigenic determinant reactive with an antibody specific for a HE4a polypeptide, the detection reagent is typically an antibody, which may be
25 prepared as described herein. There are a variety of assay formats known to those of ordinary skill in the art for using an antibody to detect a polypeptide in a sample, including but not limited to enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), immunofluorimetry, immunoprecipitation, equilibrium dialysis, immunodiffusion and other techniques. See, e.g., Harlow and Lane,
30 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Weir, D.M., *Handbook of Experimental Immunology*, 1986, Blackwell Scientific, Boston. For

example, the assay may be performed in a Western blot format, wherein a protein preparation from the biological sample is submitted to gel electrophoresis, transferred to a suitable membrane and allowed to react with the antibody. The presence of the antibody on the membrane may then be detected using a suitable detection reagent, as is well known in the art and described below.

In another embodiment, the assay involves the use of an antibody immobilized on a solid support to bind to the target HE4a polypeptide and remove it from the remainder of the sample. The bound HE4a polypeptide may then be detected using a second antibody reactive with a distinct HE4a polypeptide antigenic determinant, for example, a reagent that contains a detectable reporter moiety. As a non-limiting example, according to this embodiment the immobilized antibody and the second antibody which recognize distinct antigenic determinants may be any two of the monoclonal antibodies described herein selected from the monoclonal antibodies 2H5, 3D8 and 4H4. Alternatively, a competitive assay may be utilized, in which a HE4a polypeptide is labeled with a detectable reporter moiety and allowed to bind to the immobilized HE4a polypeptide specific antibody after incubation of the immobilized antibody with the sample. The extent to which components of the sample inhibit the binding of the labeled polypeptide to the antibody is indicative of the reactivity of the sample with the immobilized antibody, and as a result, indicative of the level of HE4a in the sample.

The solid support may be any material known to those of ordinary skill in the art to which the antibody may be attached, such as a test well in a microtiter plate, a nitrocellulose filter or another suitable membrane. Alternatively, the support may be a bead or disc, such as glass, fiberglass, latex or a plastic such as polystyrene or polyvinylchloride. The antibody may be immobilized on the solid support using a variety of techniques known to those in the art, which are amply described in the patent and scientific literature.

In certain preferred embodiments, the assay for detection of HE4a antigen polypeptide in a sample is a two-antibody sandwich assay. This assay may be performed by first contacting a HE4a polypeptide-specific antibody (*e.g.*, a monoclonal antibody such as 2H5, 3D8 or 4H4) that has been immobilized on a solid support,

commonly the well of a microtiter plate, with the biological sample, such that a soluble molecule naturally occurring in the sample and having an antigenic determinant that is reactive with the antibody is allowed to bind to the immobilized antibody (*e.g.*, a 30 minute incubation time at room temperature is generally sufficient) to form an antigen-antibody complex or an immune complex. Unbound constituents of the sample are then removed from the immobilized immune complexes. Next, a second antibody specific for a HE4a antigen polypeptide is added, wherein the antigen combining site of the second antibody does not competitively inhibit binding of the antigen combining site of the immobilized first antibody to a HE4a polypeptide (*e.g.*, a monoclonal antibody such as 2H5, 3D8 or 4H4 that is not the same as the monoclonal antibody immobilized on the solid support). The second antibody may be detectably labeled as provided herein, such that it may be directly detected. Alternatively, the second antibody may be indirectly detected through the use of a detectably labeled secondary (or "second stage") anti-antibody, or by using a specific detection reagent as provided herein. The subject invention method is not limited to any particular detection procedure, as those having familiarity with immunoassays will appreciate that there are numerous reagents and configurations for immunologically detecting a particular antigen (*e.g.*, a mesothelin polypeptide) in a two-antibody sandwich immunoassay.

In certain preferred embodiments of the invention using the two-antibody sandwich assay described above, the first, immobilized antibody specific for a HE4a antigen polypeptide is a polyclonal antibody and the second antibody specific for a HE4a antigen polypeptide is a polyclonal antibody. In certain other embodiments of the invention the first, immobilized antibody specific for a HE4a antigen polypeptide is a monoclonal antibody and the second antibody specific for a HE4a antigen polypeptide is a polyclonal antibody. In certain other embodiments of the invention the first, immobilized antibody specific for a HE4a antigen polypeptide is a polyclonal antibody and the second antibody specific for a HE4a antigen polypeptide is a monoclonal antibody. In certain other highly preferred embodiments of the invention the first, immobilized antibody specific for a HE4a antigen polypeptide is a monoclonal antibody and the second antibody specific for a HE4a antigen polypeptide is a monoclonal antibody. For example, in these embodiments it should be noted that monoclonal

antibodies 2H5, 3D8 and 4H4 as provided herein recognize distinct and non-competitive antigenic determinants (*e.g.*, epitopes) on HE4a polypeptides, such that any pairwise combination of these monoclonal antibodies may be employed. In other preferred embodiments of the invention the first, immobilized antibody specific for a
5 HE4a antigen polypeptide and/or the second antibody specific for a HE4a antigen polypeptide may be any of the kinds of antibodies known in the art and referred to herein, for example by way of illustration and not limitation, Fab fragments, F(ab')₂ fragments, immunoglobulin V-region fusion proteins or single chain antibodies. Those familiar with the art will appreciate that the present invention encompasses the use of
10 other antibody forms, fragments, derivatives and the like in the methods disclosed and claimed herein.

In certain particularly preferred embodiments, the second antibody may contain a detectable reporter moiety or label such as an enzyme, dye, radionuclide, luminescent group, fluorescent group or biotin, or the like. The amount of the second
15 antibody that remains bound to the solid support is then determined using a method appropriate for the specific detectable reporter moiety or label. For radioactive groups, scintillation counting or autoradiographic methods are generally appropriate. Antibody-enzyme conjugates may be prepared using a variety of coupling techniques (for review see, *e.g.*, Scouten, W.H., *Methods in Enzymology* 135:30-65, 1987). Spectroscopic
20 methods may be used to detect dyes (including, for example, colorimetric products of enzyme reactions), luminescent groups and fluorescent groups. Biotin may be detected using avidin or streptavidin, coupled to a different reporter group (commonly a radioactive or fluorescent group or an enzyme). Enzyme reporter groups may generally be detected by the addition of substrate (generally for a specific period of time),
25 followed by spectroscopic, spectrophotometric or other analysis of the reaction products. Standards and standard additions may be used to determine the level of mesothelin polypeptide in a sample, using well known techniques.

In another embodiment, the invention contemplates the use of a HE4a antigen polypeptide as provided herein to screen for the presence of a malignant
30 condition by detection of immunospecifically reactive antibodies in a biological sample from a biological source or subject. According to this embodiment, a HE4a antigen

polypeptide (or a fragment or variant thereof including a truncated HE4a antigen polypeptide as provided herein) is detectably labeled and contacted with a biological sample to detect binding to the HE4a antigen polypeptide of an antibody naturally occurring in soluble form in the sample. For example, the HE4a antigen polypeptide
5 may be labeled biosynthetically by using the sequences disclosed herein in concert with well known methods such as incorporation during *in vitro* translation of a readily detectable (*e.g.*, radioactively labeled) amino acid, or by using other detectable reporter moieties such as those described above. Without wishing to be bound by theory, this embodiment of the invention contemplates that certain HE4a polypeptides such as the
10 HE4a fusion polypeptides disclosed herein, may provide peptides that are particularly immunogenic and so give rise to specific and detectable antibodies. For example, according to this theory certain HE4a fusion polypeptides may represent "non-self" antigens that provoke an avid immune response, while HE4a polypeptides that lack fusion domains may be viewed by the immune system as more resembling "self"
15 antigens that do not readily elicit humoral or cell-mediated immunity.

As noted above, the present invention pertains in part to the surprising finding that soluble forms of HE4a antigen polypeptides occur naturally in subjects, including elevated levels of such soluble HE4a polypeptides in subjects having certain carcinomas.

20 A method of screening for the presence of a malignant condition according to the present invention may be further enhanced by the detection of more than one tumor associated marker in a biological sample from a subject. Accordingly, in certain embodiments the present invention provides a method of screening that, in addition to detecting reactivity of a naturally occurring soluble sample component with
25 an antibody specific for a HE4a antigen polypeptide, also includes detection of at least one additional soluble marker of a malignant condition using established methods as known in the art and provided herein. As noted above, there are currently a number of soluble tumor associated antigens that are detectable in samples of readily obtained biological fluids. For example, certain embodiments of the invention relate to human
30 mesothelin polypeptides, which include polypeptides such as the novel soluble mesothelin related antigen (MRA) polypeptide described in Scholler et al. (1999 *Proc.*

Nat. Acad. Sci. USA 96:11531) and as also described in U.S. Application No. 09/513,597.

As provided herein, a "mesothelin polypeptide" is a soluble polypeptide having an amino acid sequence that includes the peptide:

5

EVEKTACPSGKKAREIDES

SEQ ID NO:14

10 and further having at least one antigenic determinant reactive with at least one antibody having an antigen combining site that competitively inhibits the immunospecific binding of MAb K-1 (Chang et al., 1996 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93:136; MAb K-1 is available from, *e.g.*, Signet Laboratories, Inc., Dedham, MA) or of monoclonal antibodies OV569, 4H3, 3G3 or 1A6 as provided in U.S.A.N. 09/513,597.

15 Thus, these additional soluble tumor associated antigens for use according to the present invention may include, but need not be limited to, mesothelin and mesothelin related antigen, CEA, CA125, sialyl TN, SCC, TPS and PLAP, (see *e.g.*, Bast et al., 1983 *N. Eng. J. Med.* 309:883; Lloyd et al., 1997 *Int. J. Canc.* 71:842; Sarandakou et al., 1997 *Acta Oncol.* 36:755; Sarandakou et al., 1998 *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 19:73; Meier et al., 1997 *Anticanc. Res.* 17(4B):2945; Kudoh et al., 1999 *Gynecol. Obstet. Invest.* 47:52; Ind et al., 1997 *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 104:1024; Bell et al. 1998 *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 105:1136; Cioffi et al., 1997 *Tumori* 83:594; Meier et al. 1997 *Anticanc. Res.* 17(4B):2949; Meier et al., 1997 *Anticanc. Res.* 17(4B):3019) and may further include any known marker the presence of which in a biological sample
25 may be correlated with the presence of at least one malignant condition, as provided herein.

Alternatively, nucleic acid sequences encoding HE4a polypeptides may be detected, using standard hybridization and/or polymerase chain reaction (PCR) techniques. Suitable probes and primers may be designed by those of ordinary skill in
30 the art based on the HE4a cDNA sequences provided herein. Assays may generally be performed using any of a variety of samples obtained from a biological source, such as eukaryotic cells, bacteria, viruses, extracts prepared from such organisms and fluids found within living organisms.

The following Examples are offered by way of illustration and not by way of limitation.

EXAMPLES

EXAMPLE 1

5 REAL-TIME PCR DETECTION OF HE4A EXPRESSION IN HUMAN SAMPLES

One hundred and fifty-eight human tissue biopsies, or RNA samples from biopsies, were obtained according to the procedures approved by the institutional review boards of the University of Washington, Swedish Hospital and Fred Hutchinson Cancer Research Center, all of Seattle, Washington. Samples from normal tissues
 10 (adrenal gland, bone marrow, brain, colon, endometrium, stomach, heart, kidney, liver, lung, lung, mammary gland, skeletal muscle, skeletal muscle, myometrium, peripheral nerve, peripheral blood lymphocyte preparations, salivary gland, skin, small intestine, spinal cord, spleen, spleen, trachea, thymus, uterus, peripheral blood lymphocyte culture, and 40 normal ovaries), from benign ovarian lesions (13 serous cystadenomas),
 15 from 2 ovarian tumors of borderline malignancy, from 3 stage I mucinous ovarian carcinomas, 3 stage I serous ovarian carcinomas, 37 stage III serous ovarian carcinomas, 7 stage IV serous ovarian carcinomas, 6 samples of tissue from metastatic ovarian carcinoma, and 2 tubes from women with ovarian cancers were included. All tissue samples were obtained from women prior to therapy, and a portion of each tumor was
 20 immediately placed in liquid nitrogen, with the remainder of the specimen submitted for routine histology. Only those samples which on histopathologic examination were found to be composed of more than 80% tumor cells, and which were without necrosis, were used for hybridization and real time PCR experiments. RNA from an ovarian surface epithelial culture (OSE, obtained from B. Karlan, Cedars Sinai Hospital, Los
 25 Angeles, CA), and three additional OSE samples (obtained from R. Hernandez, University of Washington, Seattle, WA) were also included. In all, 151 (94 non-malignant tissues and 57 cancers) were reserved for realtime quantitative PCR confirmation of overexpression of genes of interest, including HE4a as described below.

Real-time quantitative PCR was performed as follows. The HE4 real-time PCR primers were:

AGCAGAGAAGACTGGCGTGT (forward) [SEQ ID NO:15]

5 and

GAAAGGGAGAAGCTGTGGTCA (reverse) [SEQ ID NO:16].

These primers generated a PCR product of 427 bp length. Total RNA was reverse transcribed using oligo-dT primer and Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Inc., Bethesda, MD) as specified by the manufacturer. Real-time quantitative PCR was performed using an ABI7700 machine (PE Biosystems, Foster City, CA) and the SYBR-Green protocol. Five duplicates of a 2-fold serial dilution of a white blood cell cDNA preparation served as a template for the amplification of the standard (S31iii125, which in previous experiments was demonstrated to be universally expressed in normal and malignant tissues, *see* Schummer et al., 1999 *Gene* 1999).

GenBank accession number: U61734, forward primer: CGACGCTTCTTCAAGGCCAA, SEQ ID NO:17

reverse primer: ATGGAAGCCCAAGCTGCTGA SEQ ID NO:18.

20 The negative controls consisted of total RNA from an ovarian carcinoma which was reverse transcribed without the enzyme and one well containing all components of the PCR without any template. All runs were performed in duplicate. Each run was analyzed on an agarose gel for the presence of a single PCR band to eliminate artifactual bands. The results for each 96-well plate were analyzed using software (Sequence Detector™) provided by the manufacturer of the PCR machine; this analysis permits determination of expression levels of a nucleic acid sequence of interest (HE4a) relative to the standard.

25 The expression values, as shown in Figure 1, were depicted in arbitrary units relative to the internal standard and did not reflect absolute quantities of mRNA molecules in standard units of measure. Based on the amplitude of the mean HE4a expression levels and comparison of these values to those of other known genes

(notably beta actin as a highly expressed gene), Figure 1 shows that transcripts encoding HE4a were expressed at moderate-to-high relative levels.

EXAMPLE 2

CLONING AND EXPRESSION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES ENCODING HE4A

5 Amplification of HE4a fusion construct cDNA from high throughput
HE4a cDNA clone: The cDNA sequence for HE4 (SEQ ID NO:8) as originally
published by Kirchoff et al., (1991) was deposited in GenBank Accession # X63187 and
provided the basis for oligonucleotide primer design to clone cDNA encoding HE4a
10 (SEQ ID NO:10), as described herein. The cDNA for HE4a, identified and isolated as
a differentially expressed gene product using high throughput cDNA arrays, was cloned
in pSPORT as an 840 base pair fragment. This cDNA was used as template in PCR
reactions to amplify HE4a in a form appropriate for creating synthetic fusion protein
genes, as described in this Example.

A portion of the HE4 coding sequence (SEQ ID NO:8) appeared to
15 encode a presumed secretory signal peptide; therefore, this native leader peptide was
used in initial constructs to preserve as much of the molecule's structure as possible. In
addition, because HE4a was relatively small and the sequence did not contain any
unusual structural features such as transmembrane domains or cytoplasmic targeting
sequences, a fusion protein was designed that incorporated the complete HE4a gene
20 product fused to the human IgG1 Fc domain. Primers were designed that encoded
appropriate restriction sites for cloning and created the necessary in-frame fusions of
protein domains for the final construct. The 5' primer (SEQ ID NO:1, or HE4-5') was a
39-mer that included a HindIII site, a Kozak sequence to improve expression adjacent to
the first ATG, and a portion of the HE4a leader peptide based on the previously
25 published HE4 sequence. The 3' primer (SEQ ID NO:2, or HE4-3'-1) was a 36-mer that
included an in-frame BamHI site for fusion to the human -Ig tail cDNA, with the 3' end
of the HE4 coding sequence truncated just before the STOP codon. PCR amplification
reactions were performed using these two primers at 50 pmol and 1 ng HE4/pSPORT
plasmid as template. Fifty microliter reactions also included 2.5 units (0.5 ml) ExTaq
30 DNA polymerase (TaKaRa Shuzo Biomedical, Otsu, Shiga, Japan), diluted buffers and

nucleotides according to package insert directions. Reactions were amplified for 30 cycles, with an amplification profile of 94°C, 30 seconds, 60°C, 30 seconds, and 72°C, 30 seconds. PCR products of the expected size (approximately 400 base pairs) for the full length HE4 were obtained.

5 These fragments were restriction digested, purified, and ligated into the appropriately digested mammalian expression plasmid already containing the human IgG1 insert. Ligation products were transformed into DH5 α bacterial cells and transformants screened for the presence of HE4-hIgG1 fusion gene inserts. Plasmid DNA from several isolates was then sequenced using the BigDye Terminator Cycle
10 Sequencing Kit (PE Biosystems, Foster City, CA) on an ABI Prism 310 (PE Biosystems) sequencer. In addition, plasmid DNA from these isolates was also transfected by DEAE-Dextran transient transfections of COS7 cells as described (Hayden et al., 1994 *Ther. Immunol.* 1:3). Culture supernatants were harvested after 72 h and screened by immunoprecipitation with protein A-agarose, reducing SDS-PAGE
15 electrophoresis, and Western blotting (Figure 2). Western blots were probed using a goat anti-human IgG conjugate at 1:5000, followed by ECL development.

Results from the sequence analysis indicated that the HE4a coding sequence obtained (SEQ ID NO:10) and the deduced amino acid sequence (SEQ ID NO:11) differed from the published HE4 coding (SEQ ID NO:8) and translated (SEQ
20 ID NO:9) sequences at several positions. Sequences were therefore also obtained from cDNAs derived from normal human epididymis and from several tumor cell lines and primary tumor RNA, and the HE4a coding sequence as set forth in SEQ ID NO:10, and the deduced encoded amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11, were confirmed.

Cloning HE4 cDNA from Tumor Cell Lines: RNA was prepared from
25 several ovarian tumor cell lines, including 4007 and OVCAR3 (see, e.g., Hellstrom et al., 2001 *Canc. Res.* 61:2420), using Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instructions. cDNA was prepared using 1-3 μ g RNA, random hexamers, and Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) according to manufacturer's directions. HE4 cDNA was PCR amplified from the
30 random primed cDNA in 50 μ l reactions containing 1 μ g cDNA, 2.5 units (0.5 ml) ExTaq DNA polymerase (TaKaRa Shuzo Biomedical, Otsu, Shiga, Japan), diluted

5 buffers and nucleotides according to insert directions, and HE4-5' and HE4-3'-I specific primers. Reactions were amplified for 30 cycles, with an amplification profile of 94°C, 30 seconds, 60°C, 30 seconds, and 72°C, 30 seconds. The HE4-5' and HE4-3'-I oligonucleotides were again used for PCR amplification of HE4 from the tumor derived
 10 cDNAs. PCR products of the expected size for the full length HE4 were obtained and the fragments were cloned into pT-AdvanTAge vectors (Clontech, Palo Alto, CA) for sequence analysis. Clones with inserts were sequenced as described above, and the PCR fragments from the tumor RNA samples were found to encode HE4a sequence identical to the original clones described above; these HE4a sequences differed from the
 15 published sequence for HE4 (Kirchhoff et al., 1991). Similarly, HE4a coding sequence was obtained from normal epidymis (SEQ ID NO:10) and from primary tumor tissue cDNAs (SEQ ID NO:12), and thus matched the new HE4a sequence described above but differed from the HE4 sequence (SEQ ID NO:8) of Kirchhoff et al. (1991).

15 Production of HE4Ig fusion protein. The HE4-hlgG1 cDNA construct (SEQ ID NO:7) was inserted as a HindIII-XbaI fragment into the multiple cloning site of the mammalian expression vector pD18, a derivative of pCDNA 3 as described previously (Hayden et al., 1996 *Tissue Antigens* 48: 242). Constructs initially were transfected by DEAE-Dextran transient transfections as described (Hayden, et al., 1994
 20 *Ther. Immunol.* 1: 3). Plasmid DNA from several isolates was prepared and used to transiently transfect COS7 cells. Culture supernatants were harvested after 72 h and screened by immunoprecipitation with protein A-agarose, reducing SDS-PAGE electrophoresis, and Western blotting (Figure 2).

CHO-DG44 cells (Urlaub et al. 1986 *Somat. Cell. Mol. Genet.* 12: 55)
 25 were used to construct stable lines expressing high levels of the fusion proteins of interest. Stable CHO lines expressing HE4Ig were created by high copy electroporation in the pD18 vector (Hayden et al., 1996 *Tissue Antigens* 48: 242; Barsoum, 1990 *DNA Cell Biol.* 9: 293) and selection of methotrexate-resistant clones by limiting dilution in Excell 302 CHO media (JRH Biosciences, Denver, PA) containing recombinant insulin
 30 (Life Technologies, Gaithersburg, MD), sodium pyruvate (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), glutamine (Irvine Scientific), 2X non-essential amino acids for MEM (Irvine

Scientific) and 100 nM methotrexate (Sigma, St. Louis, MO). Culture supernatants from resistant clones were then assayed by IgG sandwich ELISA to screen for high producing lines. Spent supernatants were harvested from large-scale cultures and HE4Ig was purified by protein A affinity chromatography over a 2-ml protein A-agarose (Repligen, Cambridge, MA) column. Fusion protein was eluted from the column as 0.8-ml fractions in 0.1 M citrate buffer (pH 2.7), and neutralized using 100 µl of 1 M Tris base (pH 10.5). Eluted fractions were assayed for absorbance at 280 nm, and fractions containing fusion protein were pooled, dialyzed overnight in several liters of PBS (pH 7.4), and filter sterilized through 0.2-µm syringe filter units (Millipore, Bedford, MA).

Stable transfectants were used to produce enough protein for immunization of BALB/c mice. Mice were initially injected intraperitoneally (IP) with 10 micrograms of purified HE4-hIgG1 fusion protein at 4 week intervals. After a primary injection and two boosts using this immunization protocol, mice were subsequently injected with 10 µg protein plus TiterMax Gold adjuvant IP and then SC for two more boosts prior to harvest of spleens. Hybridomas were made by fusing spleen cells from immunized mice with the myeloma partner P3-X63-Ag8-653.

Western analysis of HE4Ig fusion proteins. Protein samples were resolved by SDS-PAGE electrophoresis on a 10% Tris/Bis NOVEX gel (Invitrogen, San Diego CA), and transferred by semi-dry blotting onto PVDF membranes (Millipore). The membranes were blocked to prevent nonspecific antibody binding by incubation in 5% nonfat dry milk (Carnation) in PBS/0.25% NP-40 or TBS-T (50 mM Tris HCl, pH 7.6, 0.15 M NaCl, and 0.05% Tween-20) overnight at 4°C. The membranes were incubated with HRP-goat anti-human IgG (1/10,000) or with HRP-Streptavidin (1:5000) (Caltag) in TBS-T for 1 h at room temperature or 4°C, with gentle agitation. After two rinses and four washes with TBST, the membrane was incubated in ECLTM (Amersham, Little Chalfont, UK) reagent for 60 s and exposure to autoradiography film for visualization of the bands (Figure 2). Fusion protein samples were harvested from culture supernatants or from protein A eluates of purified samples and protein A precipitated using 50 µl protein A agarose (Repligen, Cambridge, MA). Immune-precipitates were washed and resuspended in SDS-PAGE reducing sample

loading buffer, boiled, then resolved by SDS-PAGE electrophoresis on a 10% Tris/Bis NOVEX gel (Invitrogen, San Diego CA), and transferred by semi-dry blotting onto PVDF membranes (Millipore). The membranes were blocked to prevent nonspecific antibody binding by incubation in 5% nonfat dry milk (Carnation) in PBS/0.25% NP-40 or TBS-T (50 mM Tris HCl, pH 7.6, 0.15 M NaCl, and 0.05% Tween-20) from 1 hour to overnight at 4^o C. The membranes were incubated with HRP-goat anti-human IgG (1/10,000), washed in TBS-T, and exposed to ECLTM (Amersham, Little Chalfont, UK) reagent for 60 s. ECL-blot were then exposed to autoradiography film for visualization of the bands. Figure 2, Lane 1 contained immunoprecipitated samples from supernatant of CTLA4-hIgG1 transfected COS7 cells, Lanes 3 and 4 contained HE4-hIgG1 fusion protein culture supernatants, and Lane 5 contained mock transfected COS supernatant. The HE4-hIgG1 fusion protein runs at an apparent Mr of approximately 48 kDa on reduced gels or Western blots, larger than the 39 kDa expected based on the predicted amino acid sequence, suggesting that the molecule was glycosylated.

Construction and Expression of HE4-mIgG2a Fusion Proteins: A similar construction to the HE4-hIgG1 fusion gene was also made, but substituting the murine -IgG2a domain for the human IgG Fc fragment. The alternate tail was used so that immunizations of mice would not be affected by immunogenicity of the human Ig tail fusion domain. Existing cDNA clones of the mIgG2a tail were out of frame with respect to the HE4a clone described above, so the -mIgG2a cassette was reamplified from such plasmids to create an in-frame fusion domain. The forward, sense primer used was

mIgG2aBAMIF:

5'-gtgtcggatccgagccagggcccaatcaag-3' [SEQ ID NO:19],

while the reverse, antisense primer was designated

mIgG2a3'Xba+S:

5'-gtgtttctagattatcattaccggagtcgggagaagctc-3' [SEQ ID NO:20].

The template used contained murine CTLA4 fused to the murine IgG2a Fc domain, but with the restriction site at the fusion junction out of frame with respect to the codon spacing. The new oligonucleotides created a frameshift, altering the reading frame at the BamHI site so that the fusion gene with HE4 would result in expression of a complete HE4-mIgG2a fusion protein. PCR products were amplified, subcloned, and processed as described for the human fusion genes. Molecules were subcloned into the pD18 mammalian expression vector, stable CHO clones generated, and fusion protein expressed as described above for the HE4-human IgG1 fusion proteins.

EXAMPLE 3

MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR HE4A

Generation of anti-HE4a Mabs. In initial experiments, several BALB/c mice were immunized with HE4a-hIgG fusion proteins prepared as described above, with and without adjuvant. Although high antibody titers were seen in these mice, the antibodies were not specific for HE4a, since equally high titers were seen against a control fusion protein having the hIgG tail (CTLA4-hIg fusion). Therefore, HE4a-mIgG fusion protein was used for immunization. Figure 3 illustrates the results from two immunizations that led to high titered antibodies against HE4a in two BALB/c mice (1605 and 1734) that were each twice immunized with HE4a-mIgG plus adjuvant (TiterMax®, CytRx Corp., Norcross, GA) according to the manufacturer's instructions, given subcutaneously in the tail. HE4a-specific hybridomas were prepared by standard methodologies using spleen cells from mice exhibiting high HE4a-specific antibody titers. Figure 4 shows the initial testing, by ELISA, of hybridomas made by using

spleen cells from mouse 1605 (whose serum data are shown in Fig. 3). Three wells displayed high reactivity against HE4a-hIgG. Three hybridomas, 2H5, 3D8 and 4H4, were subsequently isolated from these wells following cloning by limiting dilution. Hybridomas 2H5 and 3D8 were found to identify different epitopes according to competition assays.

5 Construction and application of an ELISA for tumor diagnosis. A double determinant ("sandwich") ELISA was constructed, using a similar approach as that employed to make an ELISA which measures mesothelin/MPF and related antigens in serum and other fluids (Scholler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11531, 1999) using the two MAbs 2H5 and 3D8 referred to above. Figure 5 shows an example of a standard curve, prepared by using HE4a-hIgG diluted in DMEM culture medium. As illustrated in the figure, a signal was detected at the 1 ng level of HE4a-hIgG. Fig. 5 also shows that undiluted culture medium from an ovarian carcinoma line (4007) gave a detectable signal. Figure 6 shows that ascites fluid from a patient (designated OV50) diagnosed with ovarian carcinoma contained HE4a antigen which was still detectable at the highest dilution tested (1:1280).

10 The initial HE4a ELISA was improved by establishing the optimal amounts of the two antibodies used. One of these antibodies, 2H5, was biotinylated and the other antibody, 3D8 was immobilized by permitting it to become bound to the bottom of the test plate; the respective doses of the two monoclonal antibodies for the assay were 2.5 and 100 µg/ml. Except for the different MAbs and doses of the MAbs being used, as just noted, the assay methods were identical to those described for mesothelin/MPF and related molecules (Scholler et al., 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11531).

25 Preliminary testing of sera from patients with ovarian carcinoma and a variety of controls indicated that the HE4a protein was elevated in a significant fraction of patients with ovarian carcinoma, including patients with early disease, and not in control sera for which the background is very low. In a study using the above described sandwich ELISA assay and coded serum samples from approximately 400 patients (provided by Swedish Hospital, Seattle, WA), all samples from patients diagnosed with ovarian cancer were correctly scored as positive by the HE4a ELISA, which further

predicted no false positives. It is therefore contemplated, without wishing to be bound by theory, that assaying for HE4a protein in sera and other body fluids may thereby provide a clinically beneficial complement to existing diagnostic assays for ovarian carcinoma (such as CA125). Furthermore, although the ELISA has so far been
5 investigated with respect to its ability to aid the diagnosis of ovarian carcinoma, it should be equally applicable to any tumor that overexpresses the HE4a encoded antigen. The same ELISA, or a modification of it, should also be applicable for studies of HE4-related molecules, if future studies will identify such.

Expression of HE4 protein at the cell surface. Studies performed with
10 flow cytometry, using ovarian carcinoma cell lines with a B cell line as a negative control, showed that the HE4a encoded antigen was expressed at the cell surface among some ovarian carcinomas. The cell lines used and the flow cytometry technique employed have been previously described (Hellstrom et al., 2001 *Cancer Res.* 61, 2420). For example, 93% of OVCAR 3 cells were positive, as were 71% of cells from
15 ovarian cancer line 4010 and 38% of cells from ovarian cancer line HE50OV, while less than 20% of cells were positive from another 10 ovarian carcinoma lines tested. This suggested that HE4a antigen at the cell surface may, according to non-limiting theory, provide a target for immunotherapeutic strategies such as HE4a-specific antibody-mediated and/or HE4a-specific T-cell mediated therapies.

20

EXAMPLE 4

PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC VACCINES TARGETING HE4A EPTOPES

25 Detection of the amplification of HE4a-encoding nucleic acid sequences and/or of HE4a overexpression in certain tumors (particularly malignant ovarian tumors) is performed employing the compositions and methods described above, and HE4a expression levels are compared to those in normal tissues. The increased occurrence of HE4a-specific monoclonal antibody-defined epitopes in tumors provides
30 for the identification of HE4a epitopes that are used as targets for prophylactic or preventive vaccines with applicability in cancer therapy; such vaccines may also

usefully alter (e.g., increase or decrease in a statistically significant manner relative to a suitable control) fertilization (which may in certain embodiments be reflected by demonstration of HE4a protease-inhibitory or protease-enhancing activity using well known assays for protease inhibition by members of the four-disulfide core family, such as Slp-1). A large variety of approaches to make vaccines has been identified and described in many review articles (e.g., by Hellstrom and Hellstrom, In *Handbook in Experimental Pharmacology*, vol. "Vaccines", Springer, Heidelberg, p. 463, 1999). These include, but are not restricted to, the use of proteins, fusion proteins and peptides, DNA plasmids, recombinant viruses, anti-idiotypic antibodies, dendritic cells pulsed with peptide epitopes in vitro, and anti-idiotypic antibodies. The vaccines may be used alone or in combinations with adjuvants, and/or lymphokines, such as GMCSF. According to non-limiting theory, detection of circulating soluble HE4a proteins as described above would not be expected to interfere with the use of vaccines inducing T cell-mediated immunity, since the T cells recognize epitopes presented in the context of MHC molecules on cell surfaces but do not react to circulating antigen or immune complexes.

From the foregoing, it will be appreciated that, although specific embodiments of the invention have been described herein for purposes of illustration, various modifications may be made without deviating from the spirit and scope of the invention. Accordingly, the invention is not limited except as by the appended claims.

In the present specification "comprises" means "includes or consists of" and "comprising" means "including or consisting of".

The features disclosed in the foregoing description, or the following claims, or the accompanying drawings, expressed in their specific forms or in terms of a means for performing the disclosed function, or a method or process for attaining the disclosed result, as appropriate, may, separately, or in any combination of such features, be utilised for realising the invention in diverse forms thereof.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising:

contacting a biological sample from a subject with at least one antibody specific for an HE4a antigen polypeptide to determine the presence in said biological sample of a molecule naturally occurring in soluble form in said sample and having an antigenic determinant that is reactive with said at least one antibody, under conditions and for a time sufficient to detect binding of said antibody to said antigenic determinant, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

2. A method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising:

contacting a biological sample comprising a cell from a subject with at least one antibody specific for an HE4a antigen polypeptide to determine the presence in said biological sample of a cell surface molecule having an antigenic determinant that is reactive with said at least one antibody, under conditions and for a time sufficient to detect binding of said antibody to said antigenic determinant, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

3. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the biological sample is selected from the group consisting of blood, serum, serosal fluid, plasma, lymph, urine, cerebrospinal fluid, saliva, a mucosal secretion, a vaginal secretion, ascites fluid, pleural fluid, pericardial fluid, peritoneal fluid, abdominal fluid, culture medium, conditioned culture medium and lavage fluid.

4. The method of claim 1 wherein the biological sample is serum.

5. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the biological sample is plasma.

6. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the biological sample is selected from the group consisting of ascites fluid and pleural fluid.

7. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the biological sample is a vaginal secretion.

8. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the HE4a antigen comprises a polypeptide having the sequence set forth in SEQ ID NO:11, or a fragment or derivative thereof.

9. The method of claim 8 wherein the HE4a antigen polypeptide is a splice variant.

10. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the HE4a antigen comprises a polypeptide having the sequence set forth in SEQ ID NO:5, or a fragment or derivative thereof.

11. The method of claim 10 wherein the HE4a antigen polypeptide is a splice variant.

12. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the HE4 antigen polypeptide is a HE4a antigen variant or a fragment or derivative thereof.

13. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the antibody comprises a polyclonal antibody.

14. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the antibody comprises an affinity purified antibody.

15. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the antibody comprises a monoclonal antibody.

16. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the antibody comprises a recombinant antibody.

17. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the antibody comprises a chimeric antibody.

18. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the antibody comprises a humanized antibody.

19. The method of either claim 1 or claim 2 wherein the antibody comprises a single chain antibody.

20. The method of either claim 1 or claim 2 wherein detection of binding of the antibody to an antigenic determinant comprises detection of a radionuclide.

21. The method of either claim 1 or claim 2 wherein detection of binding of the antibody to an antigenic determinant comprises detection of a fluorophore.

22. The method of either claim 1 or claim 2 wherein detection of binding of the antibody to an antigenic determinant comprises detection of a binding event between an avidin molecule and a biotin molecule.

23. The method of either claim 1 or claim 2 wherein detection of binding of the antibody to an antigenic determinant comprises detection of a binding event between a streptavidin molecule and a biotin molecule.

24. The method of either claim 1 or claim 2 wherein detection of binding of the antibody to an antigenic determinant comprises spectrophotometric detection of a product of an enzyme reaction.

25. The method of either claim 1 or claim 2 wherein said at least one antibody is detectably labeled.

26. The method of either claim 1 or claim 2 wherein said at least one antibody is not detectably labeled and wherein detection of binding of the antibody to an antigenic determinant is indirect.

27. The method of claim 1 wherein the malignant condition is selected from the group consisting of adenocarcinoma, mesothelioma, ovarian carcinoma, pancreatic carcinoma and non-small cell lung carcinoma.

28. A method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising:

contacting a biological sample from a subject with at least one antibody to determine the presence in said biological sample of a molecule selected from the group consisting of (i) a molecule naturally occurring in soluble form in said sample, and (ii) a cell surface molecule wherein said sample comprises a cell from the subject, said molecule having an antigenic determinant that is reactive with said at least one antibody, the antigen combining site of which competitively inhibits the immunospecific binding of a monoclonal antibody selected from the group consisting of 2H5, 3D8 and 4H4 under conditions and for a time sufficient to detect binding of said antibody to said antigenic determinant,

and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

29. A method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising:

contacting a biological sample from a subject with at least one antibody to determine the presence in said biological sample of a molecule selected from the group consisting of (i) a molecule naturally occurring in soluble form in said sample, and (ii) a cell surface molecule wherein said sample comprises a cell from the subject, said molecule having an antigenic determinant that is reactive with said antibody, the antigen combining site of which competitively inhibits the immunospecific binding of monoclonal antibody 3D8, under conditions and for a time sufficient to detect binding of said antibody to said antigenic determinant,

and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

30. A method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising:

contacting a biological sample from a subject with at least one antibody specific for a HE4a antigen polypeptide to determine the presence in said biological sample of a molecule selected from the group consisting of (i) a molecule naturally occurring in soluble form in said sample, and (ii) a cell surface molecule wherein said sample comprises a cell from the subject, said molecule having an antigenic determinant that is reactive with said antibody, under conditions and for a time sufficient to detect binding of said at least one antibody to said antigenic determinant,

wherein said at least one antibody immunospecifically binds to HE4a antigen, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

31. The method of claim 30 wherein the HE4a antigen is also immunospecifically reactive with a monoclonal antibody selected from the group consisting of 3D8, 2H5 and 4H4.

32. A method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising:

contacting a biological sample from a subject with at least one antibody specific for a HE4a antigen polypeptide to determine the presence in said biological sample of a molecule selected from the group consisting of (i) a molecule naturally occurring in soluble form in said sample, and (ii) a cell surface molecule wherein said sample comprises a cell from the subject, said molecule having an antigenic determinant that is reactive with said at least one antibody, the antigen combining site of which competitively inhibits the immunospecific binding of a monoclonal antibody selected from the group consisting of 2H5 and 4H4, under conditions and for a time sufficient to detect binding of said antibody to said antigenic determinant,

wherein said at least one antibody immunospecifically binds to an HE4a antigen, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

33. The method of claim 32 wherein the HE4 antigen is also immunospecifically reactive with monoclonal antibody 3D8.

34. A method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising:

contacting a biological sample from a subject with at least one immobilized first antibody specific for a HE4a antigen polypeptide to determine the presence in said biological sample of a molecule naturally occurring in soluble form in said sample, under conditions and for a time sufficient to specifically bind said at least one immobilized first antibody to said HE4a antigen polypeptide and thereby form an immune complex;

removing constituents of the sample that do not specifically bind to said at least one immobilized first antibody; and

contacting said immune complex with at least one second antibody specific for a HE4a antigen polypeptide, wherein the antigen combining site of said at least one second antibody does not competitively inhibit the antigen combining site of said at least one immobilized first antibody, under conditions and for a time sufficient to

detect specific binding of said at least one second antibody to said HE4a antigen polypeptide, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

35. A method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising:

contacting a biological sample from a subject with at least one immobilized first antibody specific for a HE4a antigen polypeptide to determine the presence in said biological sample of a molecule naturally occurring in soluble form in said sample, wherein the antigen combining site of said at least one first antibody competitively inhibits the immunospecific binding of monoclonal antibody 3D8 under conditions and for a time sufficient to specifically bind said at least one immobilized first antibody to said HE4a antigen polypeptide and thereby form an immune complex;

removing constituents of the sample that do not specifically bind to said at least one immobilized first antibody; and

contacting said immune complex with at least one second antibody specific for a HE4a antigen polypeptide, wherein the antigen combining site of said at least one second antibody does not competitively inhibit the immunospecific binding of monoclonal antibody 2H5, under conditions and for a time sufficient to detect specific binding of said at least one second antibody to said HE4a antigen polypeptide, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

36. A method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising:

contacting a biological sample from a subject with at least one immobilized first antibody specific for a HE4a antigen polypeptide to determine the presence in said biological sample of a molecule naturally occurring in soluble form in said sample, wherein the antigen combining site of said at least one first antibody competitively inhibits the immunospecific binding of monoclonal antibody 3D8 under conditions and for a time sufficient to specifically bind said at least one immobilized first antibody to said mesothelin related antigen polypeptide and thereby form an immune complex;

removing constituents of the sample that do not specifically bind to said at least one immobilized first antibody; and

contacting said immune complex with at least one second antibody specific for a HE4a antigen polypeptide, wherein the antigen combining site of said at least one second antibody does not competitively inhibit the immunospecific binding of monoclonal antibody 4H4, under conditions and for a time sufficient to detect specific binding of said at least one second antibody to said HE4a antigen polypeptide, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

37. The method of any one of claims 1-36 further comprising determining the presence in said sample of at least one soluble marker of a malignant condition selected from the group consisting of a mesothelin related antigen, carcinoembryonic antigen, CA125, sialyl TN, squamous cell carcinoma antigen, tissue polypeptide antigen, and placental alkaline phosphatase.

38. A method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising:

contacting each of (i) a first biological sample from a first subject suspected of having a malignant condition, and (ii) a second biological sample from a second subject known to be free of a malignant condition, with at least one antibody specific for a HE4a antigen polypeptide to determine the presence in each of said first and second biological samples of a molecule selected from the group consisting of (i) a molecule naturally occurring in soluble form in said sample, and (ii) a cell surface molecule wherein said first and second biological samples each comprise, respectively, a cell from said first and second subjects, said molecule having an antigenic determinant that is reactive with said at least one antibody, under conditions and for a time sufficient to detect binding of said antibody to said antigenic determinant, and comparing a level of detectable binding of said antibody to said antigenic determinant in the first biological sample to a level of detectable binding of said antibody to said antigenic determinant in the second biological sample, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

39. A method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising:

detecting in a biological sample from the subject the presence of an antibody that immunospecifically binds to a HE4a antigen polypeptide.

40. The method of claim 39 wherein the HE4a antigen polypeptide comprises a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11 and SEQ ID NO:13.

41. An antibody specific for a HE4a antigen polypeptide, comprising: a monoclonal immunoglobulin variable region that specifically binds to a HE4a antigen polypeptide, wherein said HE4a antigen polypeptide comprises a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11 and SEQ ID NO:13.

42. The antibody of claim 41 which is a fusion protein.

43. The antibody of claim 41 which is a single chain antibody.

44. The antibody of claim 41 wherein the HE4a antigen polypeptide is glycosylated.

45. The antibody of claim 41 that is selected from the group consisting of (i) an antibody that specifically binds to a HE4a antigen polypeptide sequence set forth in SEQ ID NO:11 but that does not specifically bind to a polypeptide sequence set forth in SEQ ID NO:9, (ii) an antibody that specifically binds to a polypeptide sequence set forth in SEQ ID NO:9 and that specifically binds to a HE4a polypeptide sequence set forth in SEQ ID NO:11.

46. The antibody of claim 41 selected from the group consisting of monoclonal antibodies 2H5, 3D8 and 4H4.

47. A method of screening for the presence of a malignant condition in a subject comprising:

contacting a biological sample from a subject with a detectably labeled HE4a polypeptide, under conditions and for a time sufficient to detect binding to said HE4a polypeptide of an antibody naturally occurring in soluble form in said sample, and therefrom detecting the presence of a malignant condition.

48. An isolated nucleic acid molecule selected from the group consisting of:

(a) a nucleic acid molecule encoding a fusion protein comprising a HE4a antigen polypeptide and at least one fusion domain, the polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:5, the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:7, the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11 and the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:13; and

(b) a nucleic acid molecule capable of hybridizing to a nucleic acid molecule of (a) under moderately stringent conditions and encoding a HE4a polypeptide,

wherein the isolated nucleic acid molecule is not a nucleic acid molecule consisting of the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:9.

49. An antisense oligonucleotide comprising at least 15 consecutive nucleotides complementary to the nucleic acid molecule of claim 48.

50. A fusion protein comprising a HE4a polypeptide sequence fused to a fusion domain.

51. The fusion protein of claim 50 wherein the fusion domain is an immunoglobulin or a variant or fragment thereof.

52. The fusion protein of claim 50 wherein the polypeptide sequence fused to a HE4a polypeptide is cleavable by a protease.

53. The fusion protein of claim 50 wherein the polypeptide sequence is an affinity tag polypeptide having affinity for a ligand.

54. A recombinant expression construct comprising at least one promoter operably linked to a nucleic acid of claim 48.

55. The expression construct of claim 54 wherein the promoter is a regulated promoter.

56. An expression construct according to claim 54 wherein the HE4a polypeptide is expressed as a fusion protein with a polypeptide product of a second nucleic acid sequence.

57. The expression construct of claim 56 wherein the polypeptide product of said second nucleic acid sequence is an immunoglobulin constant region.

58. A recombinant expression construct according to claim 54 wherein the expression construct is a recombinant viral expression construct.

59. A host cell comprising a recombinant expression construct according to any one of claims 54-58.

60. A host cell according to claim 59 wherein the host cell is a prokaryotic cell.

61. A host cell according to claim 59 wherein the host cell is a eukaryotic cell.

62. A method of producing a recombinant HE4a polypeptide, comprising:

culturing a host cell comprising a recombinant expression construct comprising at least one promoter operably linked to a nucleic acid sequence of claim 48.

63. The method of claim 62 wherein the promoter is a regulated promoter.

64. A method of producing a recombinant HE4a polypeptide, comprising:

culturing a host cell infected with the recombinant viral expression construct of claim 58.

65. A method for detecting HE4a expression in a sample, comprising:

(a) contacting an antisense oligonucleotide according to claim 49 with a sample comprising a nucleic acid sequence encoding a HE4a polypeptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11 or a fragment or variant thereof; and

(b) detecting in the sample an amount of HE4a polypeptide-encoding nucleic acid that hybridizes to the antisense oligonucleotide, and therefrom detecting HE4a expression in the sample.

66. A method according to claim 65, wherein the amount of HE4a polypeptide-encoding nucleic acid that hybridizes to the antisense oligonucleotide is determined using a polymerase chain reaction.

67. A method according to claim 65, wherein the amount of HE4a polypeptide-encoding nucleic acid that hybridizes to the antisense oligonucleotide is determined using a hybridization assay.

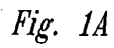
68. A method according to claim 65, wherein the sample comprises an RNA or cDNA preparation.

69. A method for treating a malignant condition, comprising administering to a patient in need thereof a composition comprising an antibody specific for a HE4a antigen polypeptide, said antibody comprising a monoclonal immunoglobulin variable region that specifically binds to a HE4a antigen polypeptide having an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11.

70. A method for treating a malignant condition, comprising administering to a patient in need thereof a composition comprising a HE4a polypeptide having an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11, or a fragment thereof.

71. The method of claim 70 wherein the composition induces production in the patient of an antibody that is capable of specifically binding to a HE4a polypeptide having an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11, or a fragment thereof.

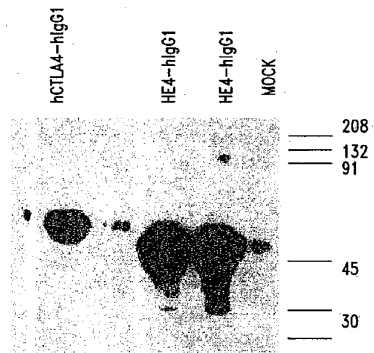
72. The method of claim 70 wherein the composition induces in the patient a T lymphocyte that is capable of specifically recognizing a HE4a polypeptide having an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11, or a fragment thereof.



Normal Uterus	26	(Benign)	159
Normal Uterus	27	(Benign)	160
Normal Uterus	28	(Benign)	161
Normal Uterus	29	(Benign)	162
Normal Uterus	30	(Benign)	163
Normal Uterus	31	(Benign)	164
Normal Uterus	32	(Benign)	165
Normal Uterus	33	(Benign)	166
Normal Uterus	34	(Benign)	167
Normal Uterus	35	(Benign)	168
Normal Uterus	36	(Benign)	169
Normal Uterus	37	(Benign)	170
Normal Uterus	38	(Benign)	171
Normal Uterus	39	(Benign)	172
Normal Uterus	40	(Benign)	173
Normal Uterus	41	(Benign)	174
Normal Uterus	42	(Benign)	175
Normal Uterus	43	(Benign)	176
Normal Uterus	44	(Benign)	177
Normal Uterus	45	(Benign)	178
Normal Uterus	46	(Benign)	179
Normal Uterus	47	(Benign)	180
Normal Uterus	48	(Benign)	181
Normal Uterus	49	(Benign)	182
Normal Uterus	50	(Benign)	183
Normal Uterus	51	(Benign)	184
Normal Uterus	52	(Benign)	185
Normal Uterus	53	(Benign)	186
Normal Uterus	54	(Benign)	187
Normal Uterus	55	(Benign)	188
Normal Uterus	56	(Benign)	189
Normal Uterus	57	(Benign)	190
Normal Uterus	58	(Benign)	191
Normal Uterus	59	(Benign)	192
Normal Uterus	60	(Benign)	193
Normal Uterus	61	(Benign)	194
Normal Uterus	62	(Benign)	195
Normal Uterus	63	(Benign)	196
Normal Uterus	64	(Benign)	197
Normal Uterus	65	(Benign)	198
Normal Uterus	66	(Benign)	199
Normal Uterus	67	(Benign)	200
Normal Uterus	68	(Benign)	201
Normal Uterus	69	(Benign)	202
Normal Uterus	70	(Benign)	203
Normal Uterus	71	(Benign)	204
Normal Uterus	72	(Benign)	205
Normal Uterus	73	(Benign)	206
Normal Uterus	74	(Benign)	207
Normal Uterus	75	(Benign)	208
Normal Uterus	76	(Benign)	209
Normal Uterus	77	(Benign)	210
Normal Uterus	78	(Benign)	211
Normal Uterus	79	(Benign)	212
Normal Uterus	80	(Benign)	213
Normal Uterus	81	(Benign)	214
Normal Uterus	82	(Benign)	215
Normal Uterus	83	(Benign)	216
Normal Uterus	84	(Benign)	217
Normal Uterus	85	(Benign)	218
Normal Uterus	86	(Benign)	219
Normal Uterus	87	(Benign)	220
Normal Uterus	88	(Benign)	221
Normal Uterus	89	(Benign)	222
Normal Uterus	90	(Benign)	223
Normal Uterus	91	(Benign)	224
Normal Uterus	92	(Benign)	225
Normal Uterus	93	(Benign)	226
Normal Uterus	94	(Benign)	227
Normal Uterus	95	(Benign)	228
Normal Uterus	96	(Benign)	229
Normal Uterus	97	(Benign)	230
Normal Uterus	98	(Benign)	231
Normal Uterus	99	(Benign)	232
Normal Uterus	100	(Benign)	233
Normal Uterus	101	(Benign)	234
Normal Uterus	102	(Benign)	235
Normal Uterus	103	(Benign)	236
Normal Uterus	104	(Benign)	237
Normal Uterus	105	(Benign)	238
Normal Uterus	106	(Benign)	239
Normal Uterus	107	(Benign)	240
Normal Uterus	108	(Benign)	241
Normal Uterus	109	(Benign)	242
Normal Uterus	110	(Benign)	243
Normal Uterus	111	(Benign)	244
Normal Uterus	112	(Benign)	245
Normal Uterus	113	(Benign)	246
Normal Uterus	114	(Benign)	247
Normal Uterus	115	(Benign)	248
Normal Uterus	116	(Benign)	249
Normal Uterus	117	(Benign)	250
Normal Uterus	118	(Benign)	251
Normal Uterus	119	(Benign)	252
Normal Uterus	120	(Benign)	253
Normal Uterus	121	(Benign)	254
Normal Uterus	122	(Benign)	255
Normal Uterus	123	(Benign)	256
Normal Uterus	124	(Benign)	257
Normal Uterus	125	(Benign)	258
Normal Uterus	126	(Benign)	259
Normal Uterus	127	(Benign)	260
Normal Uterus	128	(Benign)	261
Normal Uterus	129	(Benign)	262
Normal Uterus	130	(Benign)	263
Normal Uterus	131	(Benign)	264
Normal Uterus	132	(Benign)	265
Normal Uterus	133	(Benign)	266
Normal Uterus	134	(Benign)	267
Normal Uterus	135	(Benign)	268
Normal Uterus	136	(Benign)	269
Normal Uterus	137	(Benign)	270
Normal Uterus	138</		

Fig. 1B

3/6

*Fig. 2*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

4/6

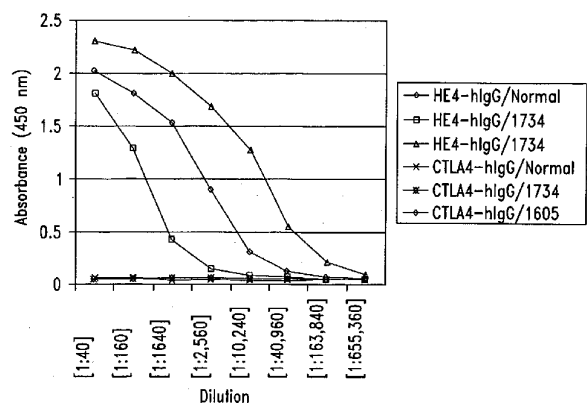


Fig. 3

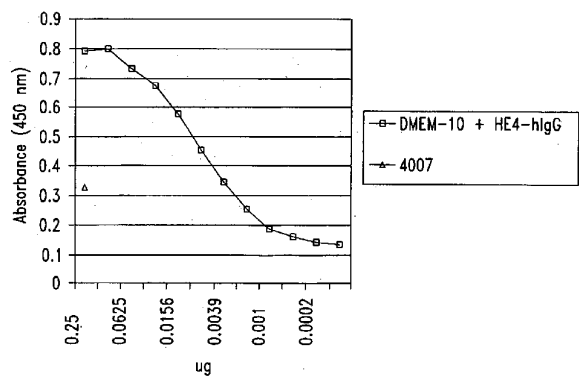


Fig. 5

5/6

Plate 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.181	0.130	0.192	0.140	0.159	0.135	0.130	0.164	0.139	0.108	0.142	0.138
B	0.160	0.129	0.133	0.144	0.144	0.121	0.136	0.130	0.131	0.120	0.138	0.150
C	0.147	0.146	0.130	0.158	0.135	0.142	0.139	0.121	0.130	0.113	0.118	0.146
D	0.200	0.141	0.145	0.158	0.149	0.114	0.165	0.148	0.129	0.140	0.130	0.167
E	0.175	0.130	0.143	0.111	0.132	0.129	0.140	0.143	0.126	0.134	0.139	0.172
F	0.154	0.122	0.133	0.133	0.135	0.144	0.161	0.132	0.117	0.121	0.118	0.182
G	0.180	0.166	0.147	0.143	0.133	0.126	0.167	0.125	0.149	0.142	0.138	0.156
H	0.178	0.152	0.160	0.149	0.163	0.142	0.166	0.168	0.144	0.125	0.140	0.166

Plate 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.173	0.141	0.156	0.152	0.111	0.145	0.159	0.250	0.111	0.119	0.129	0.146
B	0.158	0.129	0.128	0.124	0.135	0.108	0.112	0.154	0.138	0.101	0.103	0.135
C	0.096	0.160	0.125	0.104	0.102	0.165	0.105	0.135	0.123	0.096	0.097	0.107
D	0.099	0.101	0.115	0.121	0.104	0.101	0.123	0.123	0.117	0.127	0.115	0.137
E	0.108	0.130	0.143	0.101	0.113	0.118	0.140	0.107	0.097	0.136	0.102	0.131
F	0.086	0.118	0.170	0.116	0.113	0.128	0.101	0.111	0.120	0.113	0.087	0.129
G	0.108	0.094	0.127	0.130	0.147	0.132	0.118	0.114	0.123	0.114	0.110	0.119
* H	0.108	0.121	0.133	0.130	0.087	0.139	0.107	0.116	0.124	0.106	0.138	0.143

2H5

Plate 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.152	0.166	0.126	0.153	0.128	0.122	0.138	0.116	0.140	0.092	0.119	0.172
B	0.153	0.110	0.103	0.132	0.115	0.103	0.085	0.102	0.142	0.101	0.098	0.108
C	0.135	0.113	0.108	0.118	0.105	0.156	0.129	0.090	0.106	0.120	0.105	0.122
* D	0.133	0.121	0.137	0.112	0.126	0.130	0.148	0.044	0.116	0.133	0.127	0.130
E	0.117	0.123	0.137	0.132	0.132	0.096	0.119	0.132	0.102	0.112	0.098	0.105
F	0.118	0.125	0.121	0.128	0.133	0.114	0.109	0.111	0.113	0.084	0.108	0.143
G	0.147	0.138	0.131	0.121	0.108	0.097	0.137	0.118	0.106	0.132	0.101	0.110
H	0.155	0.116	0.193	0.105	0.144	0.128	0.125	0.102	0.149	0.129	0.128	0.116

308

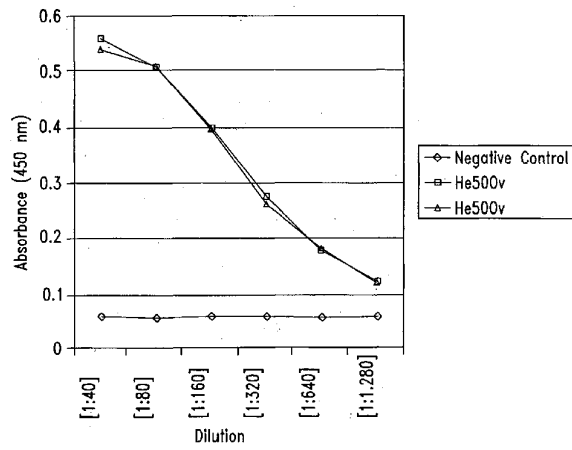
Plate 4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.128	0.121	0.110	0.134	0.126	0.157	0.120	0.134	0.137	0.098	0.064	0.120
B	0.153	0.126	0.114	0.116	0.156	0.172	0.117	0.133	0.137	0.086	0.131	0.142
C	0.115	0.150	0.111	0.121	0.106	0.102	0.115	0.114	0.118	0.090	0.104	0.135
D	0.114	0.130	0.124	0.092	0.087	0.109	0.133	0.099	0.112	0.122	0.117	0.132
E	0.114	0.124	0.110	0.127	0.093	0.108	0.108	0.104	0.107	0.111	0.134	0.155
F	0.122	0.127	0.117	0.122	0.145	0.129	0.121	0.109	0.104	0.152	0.105	0.143
G	0.121	0.118	0.127	0.127	0.119	0.124	0.104	0.120	0.121	0.109	0.133	0.119
* H	0.133	0.134	0.152	0.054	0.127	0.110	0.133	0.112	0.126	0.092	0.127	0.099

4H4

Plate 5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.101	0.109	0.144	1.005	0.031	0.039	0.037	0.047	0.043	0.038	0.042	0.048
B	0.111	0.129	0.109	0.997	0.025	0.032	0.043	0.038	0.037	0.039	0.040	0.042
C	0.119	0.121	0.093	0.979	0.024	0.040	0.038	0.037	0.042	0.040	0.052	0.046
D	0.116	0.102	0.125	0.035	0.027	0.035	0.040	0.038	0.042	0.038	0.040	0.044
E	0.120	0.092	0.101	0.986	0.027	0.032	0.036	0.035	0.041	0.037	0.038	0.038
F	0.105	0.116	0.110	0.748	0.025	0.037	0.044	0.036	0.035	0.037	0.044	0.050
G	0.122	0.108	0.114	0.961	0.022	0.040	0.041	0.041	0.041	0.037	0.043	0.049
H	0.135	0.101	0.167	0.037	0.030	0.032	0.031	0.036	0.036	0.041	0.041	0.061

Fig. 4

6/6

*Fig. 6*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SEQUENCE LISTING

<110> Pacific Northwest Research Institute
Schummer, Michel
Hellstrom, Ingegerd
Hellstrom, Karl Erik
Ledbetter, Jeffrey A.
Hayden-Ledbetter, Martha

<120> DIAGNOSIS OF CARCINOMAS

<130> 730033.412PC

<140> PCT
<141> 2002-08-27

<160> 20

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5' PCR primer for HE4 coding region. Native
secretory signal peptide included. HindIII site and
Kozak consensus sequence upstream of ATG

<400> 1
gttgtaagc ttgcgcgcac gctgcttgt cgcctagc 39

<210> 2
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' antisense PCR primer for HE4 coding region STOP
codon deleted/substitute in-frame BamHI
restriction site for cloning

<400> 2
gttggtggat ccgaaattgg gactgacaca ggacac 36

<210> 3
<211> 390
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3

2

```

aagcttgcgc ccatgcctgc ttgtgccta ggcgcctag cgcgcgcct cctctcagc 60
ctgctgctgt tcggcttcac cctagtctca ggcacaggag cagagaagac tggcgtgtgc 120
cccgagctcc aggtgaacca gaactgcacg caagagtgcg tctcggacag cgaatgcgcc 180
gacaaacctca agtgctgcag cgcgggctgt gccaccttct gctctctgcc caatgataag 240
gagggttctt gcccccaggt gaacattaac tttcccacgc tcggcctctg tcgggaccag 300
tgccaggtag acagccagtg tcttgccacg atgaatgct gccgcaatgg ctgtgggaag 360
gtgtcctctg tcactcccaa tttcggtacc

```

<210> 4
 <211> 1077
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

```

<400> 4
atgcctgctt gtgcctagg cccgctagcc gccgcctcc tctcagcct gctgctgttc 60
ggcttcaccc tagtctcagg cacaggagca gagaagactg gcgtgtgccc cgagctccag 120
gctgaccaga actgcacgca agagtgcgtc tcggacagcg aatgcgcgca caacctcaag 180
tgctgcagcg cgggctgtgc caccttctgc tctctgccc atgataagga gggttcctgc 240
ccccagtgga acattaaact tcccacgctc ggctctgttc gggaccagtg ccaggtggac 300
agccagtgtc ctggccagat gaaatgctgc cgcattggtc gtgggaaggt gtcctgtgtc 360
actcccaatt tcggatccga gcccaaatct tgtgacaaaa ctacacatg cccacgtgc 420
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 480
acctcatga tctcccggac cctgaggtc acatgcgtgg tgggtgacgt gagccacgaa 540
gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacgcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 600
aagccgcggg aggaagcagc caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 660
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 720
gcccccatcg agaaaacaat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 780
acctgcctcc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgtc 840
aaaggcttct atcccagca catgcctgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 900
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgaaggct ccttcttctc ctacagcaag 960
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaagct tctcatgctc cgtgatgcat 1020
gaggctctgc acaaccacta cagcgagaag agcctctccc tgttccggg taaatga 1077

```

<210> 5
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 5
Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15
Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys
20 25 30
Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu
35 40 45
Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala
50 55 60
Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser Cys
65 70 75 80
Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln
85 90 95
Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn
100 105 110
Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe Gly Ser Glu Pro
115 120 125
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
130 135 140
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

```

3

145 150 155 160
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 165 170 175
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 180 185 190
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 195 200 205
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 210 215 220
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 245 250 255
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 260 265 270
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 275 280 285
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 290 295 300
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 305 310 315 320
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 325 330 335
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 340 345 350
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 6
 <211> 1098
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Human-Mouse synthetic fusion gene

<400> 6
 aaagcttgccg coactgctgc ttgtcgcta ggcgcgctag cgcgcgcct cctcctcagc 60
 ctgctgctgt tcggcttcac cctagtctca ggcacaggag cagagaagac tggcgtgtgc 120
 ccgagctcc aggtgacca gaactgcacg caagagtgcg tctcggacag cgaatgcgcc 180
 gacacctca agtgcctcag cgcgggctgt gccacctctt gctctctgcc caatgataag 240
 gaggttctct gcccccaggt gaacattaac ttccccagc tcggcctctg tcgggaccag 300
 tgcaggtgg acagccagtg tcttgccag atgaatgct gccccaatgg ctgtgggaag 360
 gtgtcctgtg tcactcccaa ttctggatcc gagcccagag ggcccacaat caagccctgt 420
 cctccatgca aatgcccagc accgaattca gctggtacct catcgtctt catcttccct 480
 ccaaagatca aggatgtact catgatctcc ctgagcccca tagtcacatg tgtggtggtg 540
 gatgtgagcg aggatgacct agatgtccag atcagctggt ttgtgaacaa cgtggaagta 600
 cacacagctc agacacaaac ccatagagag gattacaaca gtactctccg ggtggtcagt 660
 gccctcccca tccagcacca ggactggatg agtggcaagg agttcaaatg caaggtcaac 720
 aacaaagacc tcccagcgcc catcgagaga accatctcaa aacccaaagg gtcagtgaag 780
 gctccacagg tatatgtctt gctccacca gaagaagaga tgactaagaa acaggtcact 840
 ctgacctgca tggtcacaga cttcatgcct gaagacattt acgtggagtg gaccaacaac 900
 gggaaaacag agctaaacta caagaacact gaaccagctc tggactctga tggttcttac 960
 ttcatgtaca gcaagctgag agtgaaaag aagaactggg tggaaagaaa tagctactcc 1020
 tgttcagtgg tccacgaggg tctgcacaa caccacacga ctaagagctt ctcctggact 1080
 ccgggtaaat gatctaga 1098

4

<210> 7
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Human-Mouse fusion protein

<400> 7
 Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys
 20 25 30
 Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu
 35 40 45
 Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala
 50 55 60
 Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser Cys
 65 70 75 80
 Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln
 85 90 95
 Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn
 100 105 110
 Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe Gly Ser Glu Pro
 115 120 125
 Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro
 130 135 140
 Asn Ser Ala Gly Thr Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys
 145 150 155 160
 Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val
 165 170 175
 Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn
 180 185 190
 Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr
 195 200 205
 Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
 210 215 220
 Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg
 245 250 255
 Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
 260 265 270
 Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
 275 280 285
 Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
 290 295 300
 Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
 305 310 315 320
 Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
 325 330 335
 Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
 340 345 350
 Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 355

5

```

<210> 8
<211> 583
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
ccccgcacc cgcgccgca tagcaccatg cctgcttgc gcctaggccc gctagccgcc      60
gcctctctcc tcagcctgct gctgttcggc ttcacctag tctcaggcac aggagcagag      120
aagaetggcg tgtgcccga gctccaggct gaccagaact gcacgcaaga gtgcgtctcg      180
gacagcgaat gcgcgcacaa cctcaagtgc tgcagcgcgg gctgtgccac cttctgcttc      240
ctctgcccga atgataagga gggttcctgc ccccaagtgga acattaactt tccccagctc      300
ggcctctgtc gggaccaagt ccaggtggac acgcaagtgc ctggccagat gaaatgctgc      360
cgcaatggct gtgggaaggt gtccgtgtgc actcccaatt tctgaggtcc agccaccacc      420
aggctgagca gtgaggagag aaagtctctg cctggccctg catctggttc cagccaccct      480
gcctccctct ttttcgggac tctgtattcc ctcttggggt gaccacagct tctcccttcc      540
ccaccacata aagtaaccac tttagcagaa aaaaaaaaaa aaa                        583

<210> 9
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser      15
1 5 10
Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys      30
20 25 30
Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu      45
35 40 45
Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala      60
50 55 60
Gly Cys Ala Thr Phe Cys Leu Leu Cys Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser      75
65 70 75
Cys Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp      90
85 90 95
Gln Cys Gln Val Asp Thr Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg      110
100 105 110
Asn Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe      125
115 120 125

<210> 10
<211> 486
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
tgagagaaag cggccgcacc cgcgccgca tagcaccatg cctgcttgc gcctaggccc      60
gctagccgcc gccctctctc tcagcctgct gctgttcggc ttcacctag tctcaggcac      120
aggagcagag aagactggcg tgtgcccga gctccaggct gaccagaact gcacgcaaga      180
gtgcgtctcg gacagcgaat gcgcgcacaa cctcaagtgc tgcagcgcgg gctgtgccac      240
cttctgtctc ctgcccgaat ataaggaggg ttctgcccc caggtgaaca ttaactttcc      300
ccagctcggc ctctgtcggg accagtgcca ggtggacagc cagtgctctg gccagatgaa      360
atgctgcgcg aatggctgtg ggaaggtgtc ctgtgtcaat cccaatttct gagctccggc      420
caccaccagg ctgagcagtg aagatagaaa gtttctgcct ggccctgcag cgtgttacag      480
ccacac

<210> 11

```

6

<211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys
 20 25 30
 Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu
 35 40 45
 Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala
 50 55 60
 Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser Cys
 65 70 75 80
 Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln
 85 90 95
 Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn
 100 105 110
 Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe
 115 120

<210> 12
 <211> 374
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 coattgcctgc ttgtcgctta ggcocgctag ccgocgcoct cctcctcagc ctgctgctgt 60
 toggcttcac cctagtctca ggcacaggag cagagaagac tggcgtgtgc ccgagctcc 120
 aggtcgacca gaactgcacg caagagtgcg tctcggacag cgaatgcgcc gacaacctca 180
 agtgcgtcag cgcgggtgtg gccaccttct gtctctctgc caatgataag gagggtctct 240
 gcccacaggt gaacattaac ttcccccagc tcggcctctg tcgggaccag tgcaggttg 300
 acagccagtg tctcggccag atgaaatgct gccgcaatgg ctgtgggaag gtgtcctgtg 360
 tcaactccaa ttcc 374

<210> 13
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys
 20 25 30
 Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu
 35 40 45
 Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala
 50 55 60
 Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser Cys
 65 70 75 80
 Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln
 85 90 95
 Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn
 100 105 110
 Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe
 115 120

7

```

<210> 14
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile
1          5          10          15
Asp Glu Ser

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward HE4 real-time PCR primer

<400> 15
agcagagaag actggcgtgt                20

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse HE4 real-time PCR primer

<400> 16
gaaagggaga agctgtggtc a                21

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 17
cgacgcttct tcaaggccaa                20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 18
atggaagccc aagctgctga                20

<210> 19
<211> 36

```

8

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Forward sense primer
<400> 19
gttgctggat ccgagcccag agggcccaca atcaag 36
<210> 20
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Reverse anti- sense primer
<400> 20
gttgtttcta gattatcatt taccgggagt ccgggagaag ctc 43

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/021273 A3(51) International Patent Classification: G01N 33/574,
C07K 16/30, C12N 15/62, 15/11, 15/85, 5/10, C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/JP02/09653

(22) International Filing Date: 29 August 2002 (29.08.2002)

(25) Filing Language: English

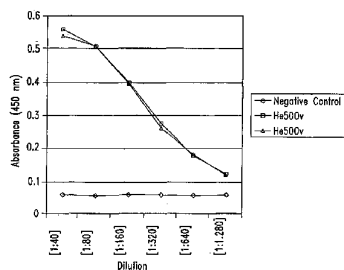
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/316,537 29 August 2001 (29.08.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PACIFIC
NORTHWEST RESEARCH INSTITUTE [US/US];
720 Broadway, Seattle, WA 98122 (US).Northeast Surber Drive, Seattle, WA 98105 (US). HELL-
STROM, Karl, Erik [US/US]; 3925 Northeast Surber
Drive, Seattle, WA 98105 (US). LEDBETTER, Jeffrey,
A. [US/US]; 18798 Ridgfield Road N.W., Shoreline,
WA 98177 (US). HAYDEN-LEDBETTER, Martha
[US/US]; 18798 Ridgfield Road N.W., Shoreline, WA
98177 (US).(74) Agent: FORRESTER KETLEY & CO, Forrester House,
52 Bounds Green Road, London N11 2BY (GB).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[Continued on next page]

(54) Title: DIAGNOSIS OF CARCINOMAS



(57) Abstract: The invention is directed to compositions and methods for the detection of a malignant condition, and relates to the discovery of soluble and cell surface forms of H14a polypeptides, including H14a that is overexpressed in ovarian carcinomas. In particular the invention provides a nucleic acid sequence encoding H14a, and also provides a method of screening for the presence of a malignant condition in a subject by detecting reactivity of an antibody specific for a H14a polypeptide with a molecule naturally occurring in soluble and/or cell surface form in a sample from such a subject, and by hybridization screening using an H14a nucleotide sequence, as well as other related advantages.

WO 03/021273 A3

WO 03/021273 A3 

ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI parent (BU, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
4 December 2003

Published:

— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/09653
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/574 C07K16/30 C12N15/62 C12N15/11 C12N15/85 C12N5/10 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 16354 A (GENE LOGIC, INC.) 8 March 2001 (2001-03-08) the whole document	1-27, 30-72
X	EP 1 033 401 A (GENSET) 6 September 2000 (2000-09-06) the whole document	1-27, 30-72
X	WO 01 59064 A (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 16 August 2001 (2001-08-16) the whole document	1-27, 30-72

	--- --	
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim(s) or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 June 2003		7. 10. 03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentkan 2 NL - 2280 LV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Giry, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/EP 02/09653

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHMANDT R. ET AL.: "Differential expression of the secreted protease inhibitor, HE4, in epithelial ovarian cancer." GYNECOLOGIC ONCOLOGY, vol. 80, no. 2, February 2001 (2001-02), page 319 XP009012136 the whole document	1-27, 30-72
Y	WO 00 50900 A (PACIFIC NORTHWEST RESEARCH INSTITUTE) 31 August 2000 (2000-08-31) cited in the application the whole document	1-27, 30-72
Y	SCHUMMER M. ET AL.: "Comparative hybridization of an array of 21 500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas." GENE, vol. 238, 1999, pages 375-385, XP002243823 cited in the application the whole document	1-27, 30-72
Y	WO 00 77191 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.) 21 December 2000 (2000-12-21) the whole document	1-27, 30-72
P,X	WO 02 00677 A (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 3 January 2002 (2002-01-03) the whole document	1-27, 30-72
P,X	BINGLE L. ET AL.: "The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms." ONCOGENE, vol. 21, no. 17, 18 April 2002 (2002-04-18), pages 2768-2773, XP009012121 the whole document	1-27, 30-72
E	WO 02 071 928 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 19 September 2002 (2002-09-19) the whole document	1-27, 30-72
A	EP 0 440 321 A (IHF GMBH) 7 August 1991 (1991-08-07) the whole document	1-27, 30-72

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 02/09653
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2.	☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3.	☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
1.	☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2.	☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-27, 30-72	
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/EP 02 09653

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: 1-27, 30-72

Methods for the detection of a soluble form or of a cell surface HE4a antigen, antibodies specific for a HE4a antigen, nucleic acids encoding a HE4a antigen, (recombinant) fusion proteins comprising a HE4a antigen, and their uses in methods for treating a malignant condition.

2. Claims: 28-29

Methods for screening for the presence of a malignant condition comprising the use of antibodies directed to "a molecule occurring in soluble form" or to "a cell surface molecule", the said antibodies having certain binding specificities.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 information on patent family members

 International Application No.
 PCT/EP 02/09653

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0116354 A	08-03-2001	AU 7347300 A	26-03-2001
EP 1033401 A	06-09-2000	JP 2001269182 A	02-10-2001
WO 0159064 A	16-08-2001	AU 2950801 A	07-08-2001
		AU 3095801 A	07-08-2001
		AU 3645901 A	07-08-2001
		AU 3646001 A	07-08-2001
		AU 3646101 A	07-08-2001
		AU 3646201 A	07-08-2001
		AU 3646301 A	07-08-2001
		AU 3646401 A	07-08-2001
		AU 3646501 A	07-08-2001
		AU 3646601 A	07-08-2001
		AU 3794301 A	07-08-2001
		AU 3794401 A	07-08-2001
		AU 3794701 A	07-08-2001
		AU 3794901 A	07-08-2001
		AU 3795001 A	07-08-2001
		AU 3795101 A	07-08-2001
		AU 3795201 A	07-08-2001
		AU 3795301 A	07-08-2001
		AU 3795401 A	07-08-2001
		AU 3795501 A	07-08-2001
		AU 3795701 A	07-08-2001
		AU 3795801 A	07-08-2001
		AU 3972601 A	07-08-2001
		AU 3972701 A	07-08-2001
		AU 3972801 A	07-08-2001
		AU 4140201 A	07-08-2001
		AU 4140301 A	07-08-2001
		AU 4140401 A	07-08-2001
		AU 4140501 A	07-08-2001
		AU 4140601 A	07-08-2001
		AU 4140701 A	07-08-2001
		AU 4140801 A	07-08-2001
		AU 4140901 A	07-08-2001
		AU 4141001 A	07-08-2001
		AU 4141101 A	20-08-2001
		AU 4141201 A	07-08-2001
		AU 4141301 A	07-08-2001
		AU 4141401 A	07-08-2001
		AU 4141501 A	07-08-2001
		AU 4141601 A	07-08-2001
		AU 4141701 A	07-08-2001
		AU 4141801 A	07-08-2001
		AU 4141901 A	07-08-2001
		AU 4313401 A	07-08-2001
		AU 4313501 A	07-08-2001
		AU 4313601 A	07-08-2001
		AU 4313701 A	14-08-2001
		AU 4526201 A	07-08-2001
		AU 4719001 A	07-08-2001
		AU 4719101 A	07-08-2001
WO 0050900 A	31-08-2000	AU 3007200 A	14-09-2000
		CA 2369433 A	31-08-2000
		EP 1169645 A	09-01-2002

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1999)

International Application No.
PCT/EP 02/09653

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0050900	A		JP	2002538434	A	12-11-2002
WO 0077191	A	21-12-2000	US	6313269	B	06-11-2001
			EP	1224274	A	24-07-2002
WO 0200677	A	03-01-2002	AU	3645901	A	07-08-2001
			AU	3646001	A	07-08-2001
			AU	3972801	A	07-08-2001
			AU	4140501	A	07-08-2001
			AU	4140601	A	07-08-2001
			AU	4140701	A	07-08-2001
			AU	4140801	A	07-08-2001
			AU	4140901	A	07-08-2001
			AU	4141001	A	07-08-2001
			AU	4141101	A	20-08-2001
			AU	4141201	A	07-08-2001
			AU	4141301	A	07-08-2001
			AU	4141401	A	07-08-2001
			AU	4141501	A	07-08-2001
			AU	4141601	A	07-08-2001
			AU	4141701	A	07-08-2001
			AU	4141801	A	07-08-2001
			AU	4313701	A	14-08-2001
			AU	4719001	A	07-08-2001
			AU	4905201	A	07-08-2001
			AU	4905301	A	07-08-2001
			AU	5076701	A	07-08-2001
			AU	5076801	A	07-08-2001
			AU	5076901	A	07-08-2001
			AU	5077001	A	07-08-2001
			AU	5077101	A	20-08-2001
			AU	5077201	A	07-08-2001
			AU	5287801	A	07-08-2001
			AU	5287901	A	07-08-2001
			AU	5516201	A	07-08-2001
			AU	5791201	A	07-08-2001
			AU	6096901	A	07-08-2001
			AU	6289901	A	18-10-2001
			AU	6678701	A	08-01-2002
			CA	2392398	A	02-08-2001
			CA	2392422	A	02-08-2001
			CA	2392428	A	02-08-2001
			CA	2392438	A	02-08-2001
			CA	2392450	A	16-08-2001
			CA	2392751	A	02-08-2001
			CA	2392757	A	02-08-2001
			CA	2393002	A	02-08-2001
			CA	2393616	A	02-08-2001
			CA	2393618	A	02-08-2001
			CA	2393652	A	02-08-2001
			CA	2393912	A	02-08-2001
			CA	2393954	A	02-08-2001
			CA	2394022	A	02-08-2001
			CA	2394039	A	02-08-2001
			CA	2394841	A	02-08-2001
WO 02071928	A	19-09-2002	US	2003087250	A	08-05-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No.
PCT/EP 02/09653

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0440321 A	07-08-1991	DE 4002981 A	08-08-1991
		DE 4038189 A	04-06-1992
		AT 175719 T	15-01-1999
		DE 59109085 D	25-02-1999
		DK 440321 T	30-08-1999
		EP 1277837 A	22-01-2003
		EP 0878544 A	18-11-1998
		ES 2127192 T	16-04-1999
		GR 3029608 T	30-06-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/82	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/82	C 0 7 K 16/32	
C 0 7 K 16/32	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/574	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/574	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/577	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N,O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ヘルストロム, インジェガード
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 5, シアトル, ノースイースト サーバー ドライブ
3 9 2 5

(72)発明者 ヘルストロム, カール エリック
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 5, シアトル, ノースイースト サーバー ドライブ
3 9 2 5

(72)発明者 レドベター, ジェフリーエー.
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 7 7, ショアライン, リッジフィールド ロード エヌ
. ダブリュ. 1 8 7 9 8

(72)発明者 ハイデンーレドベター, マーサ
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 7 7, ショアライン, リッジフィールド ロード エヌ
. ダブリュ. 1 8 7 9 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA36 CA04 CA09 CA11 DA02 DA05 DA06 DA11
DA12 EA04 FA02 GA11 HA12
4B064 AG27 AG31 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01
DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA23 CA24 CA25
CA45 CA46
4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 NA14 ZA662 ZA812
ZB212 ZB261
4C085 AA14 BB01 BB11 CC23 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA53 CA41 DA76 DA86 EA28
EA51 FA72 FA74

专利名称(译)	癌的診断		
公开(公告)号	JP2005501549A	公开(公告)日	2005-01-20
申请号	JP2003525305	申请日	2002-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	西北太平洋RES INST		
申请(专利权)人(译)	西北太平洋研究所		
[标]发明人	シュメールミヒヤエル ヘルストロムインジェガード ヘルストロムカールエリック レドベタージェフリーエー ハイデンレドベターマーサ		
发明人	シュメール, ミヒヤエル ヘルストロム, インジェガード ヘルストロム, カール エリック レドベター, ジェフリーエー. ハイデン-レドベター, マーサ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61P1/18 A61P15/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/81 C07K14/82 C07K16/18 C07K16/30 C07K16/32 C07K16/40 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/18 A61P15/00 C07K14/811 C07K16/18 C07K16/30 C07K16/3069 C07K16/40 C07K2319/00 C07K2319/30 G01N33/57449 G01N33/57488 G01N2333/705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.T A61P1/18 A61P15/00 A61P35/00 A61P43/00.105 C07K14/82 C07K16/32 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/574.Z G01N33/577.B C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA36 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA23 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZA662 4C084/ZA812 4C084/ZB212 4C084/ZB261 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA53 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/316537 2001-08-29 US		
其他公开文献	JP2005501549A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及及用于检测恶性疾病的组合物和方法，并且涉及发现HE4a多肽的可溶性和细胞表面形式，包括在卵巢癌中过表达的HE4a。特别地，本发明提供了编码HE4a的核酸序列，并且还提供了通过检测对HE4a多肽具有特异性的抗体与天然存在于可溶性和/或可溶性分子中的反应性来筛选受试者中是否存在恶性疾病的方法。这种受试者的样品中的细胞表面形式，以及通过使用HE4a核苷酸序列的杂交筛选，以及其他相关优点。

