

(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2014-507153****(P2014-507153A)**(43) 公表日 **平成26年3月27日(2014.3.27)**

| (51) Int.Cl.                      | F I             | テーマコード (参考) |
|-----------------------------------|-----------------|-------------|
| <b>C12N 15/09 (2006.01)</b>       | C12N 15/00 ZNAA | 2G045       |
| <b>C07K 14/47 (2006.01)</b>       | C07K 14/47      | 4B024       |
| <b>C07K 14/705 (2006.01)</b>      | C07K 14/705     | 4B064       |
| <b>C07K 16/18 (2006.01)</b>       | C07K 16/18      | 4B065       |
| <b>C07K 19/00 (2006.01)</b>       | C07K 19/00      | 4H045       |
| 審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く |                 |             |

(21) 出願番号 特願2013-554425 (P2013-554425)  
 (86) (22) 出願日 平成23年2月17日 (2011.2.17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年10月9日 (2013.10.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/025321  
 (87) 国際公開番号 W02012/112160  
 (87) 国際公開日 平成24年8月23日 (2012.8.23)

(71) 出願人 506275634  
 フジレビオ ダイアグノスティックス インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19  
 355、マルバーン、グレイト バレー  
 パークウェイ、201  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HE 4 a の測定のための組成物および使用方法

## (57) 【要約】

本発明は、対象の卵巣癌を評定するための HE / HE 4 a マーカの使用を包含する。HE / HE 4 a マーカを使用して卵巣癌の診断、悪性度分類およびステージ分類を実施し、卵巣がんと診断された対象の予後および処置有効性を決定する組成物および方法も、包含する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 特許受託番号 10091401 として E C A C C に寄託されたハイブリドーマ細胞株 12A2 により産生されたモノクローナル抗体、

(b) 特許受託番号 14E2 E C A C C 番号\_\_として E C A C C に寄託されたハイブリドーマ細胞株 14E2 により産生されたモノクローナル抗体、

(c) 配列番号 H E 4 a N - W F D C に示されたアミノ酸配列に結合するモノクローナル抗体、

(d) (a) ~ (c) のモノクローナル抗体の抗原結合フラグメントであり、前記フラグメントが H E 4 a に特異的に結合する能力を保持する、モノクローナル抗体、  
 からなる群より選択される、H E 4 a に特異的に結合し得るモノクローナル抗体。

10

## 【請求項 2】

特許受託番号 10091401 として E C A C C に寄託されたハイブリドーマ細胞株 12A2。

## 【請求項 3】

特許受託番号 14E2 E C A C C 番号\_\_として E C A C C に寄託されたハイブリドーマ細胞株 14E2。

## 【請求項 4】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマ細胞株。

## 【請求項 5】

請求項 1 に記載の少なくとも 1 種のモノクローナル抗体を含む卵巣癌を診断するキット。

20

## 【請求項 6】

配列番号 17 に示されたアミノ酸配列に結合するモノクローナル抗体と、配列番号 19 に示されたアミノ酸配列に結合する追加のモノクローナル抗体と、を含む卵巣癌を診断するキット。

## 【請求項 7】

a) 固体担体上に固定された、第一の H E 4 a 抗体である捕捉抗体と、

b) 検出可能な物質で標識された第二の H E 4 a 抗体である、タグ抗体と、

を含み、前記第一または第二の H E 4 a 抗体が、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体である、患者における卵巣癌を診断するキット。

30

## 【請求項 8】

(a) 免疫反応を誘発する条件下、配列番号 1、3 または 5 に示されたアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫化すること、

(b) 前記動物から抗体を産生する細胞を単離すること、

(c) 抗体を産生する細胞を不死化培養細胞と融合して、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を形成すること、

(d) 前記ハイブリドーマ細胞を請求項 1 に従って培養すること、ならびに

(e) モノクローナル抗体を培養物から単離すること、

を含む、H E 4 a モノクローナル抗体を産生する方法。

40

## 【請求項 9】

(a) 配列番号 1 の N - W F D C ドメイン、

(b) 配列番号 17 によりコードされたアミノ酸配列、

(c) H E 4 a によりコードされたアミノ酸配列、または

(d) (a) ~ (c) のいずれか 1 つの変異体もしくはフラグメント、

に結合する H E 4 a 結合剤。

## 【請求項 10】

抗 H E 4 a 抗体または H E 4 a 抗原結合フラグメントである、請求項 9 に記載の結合剤。

## 【請求項 11】

50

HE4a N-WFDC (配列番号17) に選択的に結合する、請求項10に記載の結合剤。

【請求項12】

ポリクローナル、モノクローナル、二特異性、キメラもしくはヒト化抗体、またはそれらの抗原結合フラグメントである、請求項9に記載の結合剤。

【請求項13】

ポリクローナル、モノクローナル、二特異性、キメラもしくはヒト化抗体、または抗原結合フラグメントである、請求項10に記載の結合剤。

【請求項14】

ポリクローナル、モノクローナル、二特異性、キメラもしくはヒト化抗体、または抗原結合フラグメントである、請求項11に記載の結合剤。

10

【請求項15】

検出可能なマーカで標識されている、請求項10に記載の結合剤。

【請求項16】

請求項1のモノクローナル抗体のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する、精製されたアミノ酸配列。

【請求項17】

a) フォワードおよびリバースプライマーを含み、配列番号21 (V4F) と配列番号23 (V4R)、配列番号25 (V2F) と配列番号27 (V2R) からなる群より選択されるプライマーセットで、試料から核酸を増幅させること; b) 増幅された核酸を単離すること、を含む、HE4aポリペプチドをコードする核酸配列を得る方法。

20

【請求項18】

配列番号17であるHE4a N-WFDCの配列に結合する結合蛋白質をコードする単離された核酸分子であって、前記結合蛋白質の変性鎖のアミノ酸配列が、請求項1に記載のモノクローナル抗体のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する、単離された核酸分子。

【請求項19】

請求項18に記載の単離された核酸分子を含むベクター。

【請求項20】

請求項19に記載のベクターを含む単離された宿主細胞。

30

【請求項21】

a) 調節要素に作動可能に連結された請求項18に記載の核酸分子を含むベクターを構築するステップ、

b) 得られたベクターを宿主細胞に形質転換するステップ、

c) 前記結合蛋白質を産生するのに十分な時間および条件で、前記宿主細胞を培養するステップ、

を含む、N-WFDCに結合し得る結合剤を生成する方法。

【請求項22】

請求項21に記載の方法により生成された、単離された結合剤。

【請求項23】

配列番号17であるHE4a N-WFDCのアミノ酸配列を含むFc受容体ポリペプチドに連結された異種HE4aポリペプチドを含む単離された融合蛋白質。

40

【請求項24】

ポリペプチドが、配列番号29 (W1F)、配列番号31 (W1R)、配列番号33 (W2F)、配列番号35 (W2R) によりコードされるプライマーを用いて核酸増幅することにより得られる、請求項22に記載の単離された融合蛋白質。

【請求項25】

HE4a抗原ポリペプチドが、スプライス変異体である、請求項23に記載の融合蛋白質。

【請求項26】

50

対象からの生物学的試料を、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも1種の抗体と、抗原決定基への前記抗体の結合を検出するのに十分な条件および時間で接触させて、前記試料中で可溶性形態であり少なくとも1種の抗体と反応性がある抗原決定基を有する天然由来分子が前記生物学的試料中に存在することを測定すること、ならびにその後、悪性状態の存在を検出すること、を含む、対象における悪性状態の存在をスクリーニングする方法。

【請求項27】

生物学的試料が、血液、血清、漿液 ( s e r o s a l f l u i d )、血漿、リンパ、尿、脳脊髄液、唾液、粘膜分泌液、腔分泌液、腹水、肋膜液、心膜液、腹腔液、腹部液体 ( a b d o m i n a l f l u i d )、培地、コンディション培地および洗浄液からなる群より選択される、請求項26に記載の方法。

10

【請求項28】

対象の細胞を含む生物学的試料を、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも1種の抗体と、抗原決定基への前記抗体の結合を検出するのに十分な条件および時間で接触させて、少なくとも1種の前記抗体と反応性のある前記抗原決定基を有する細胞表面分子が、前記生物学的試料中に存在することを測定すること、ならびにこうして悪性状態の存在を検出すること、を含む、対象における悪性状態の存在をスクリーニングする方法。

【請求項29】

少なくとも1種の抗体が検出可能に標識されている、請求項26に記載の方法。

【請求項30】

少なくとも1種の抗体が検出可能に標識されている、請求項28に記載の方法。

20

【請求項31】

少なくとも1種の抗体が検出可能に標識されておらず、抗原決定基に対する抗体の結合の検出が間接的である、請求項26に記載の方法。

【請求項32】

少なくとも1種の抗体が検出可能に標識されておらず、抗原決定基に対する抗体の結合の検出が間接的である、請求項28に記載の方法。

【請求項33】

H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも1種の固定化第一抗体をH E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的に結合させることにより免疫複合体を形成するのに十分な条件および時間で、対象からの生物学的試料を第一抗体と接触させて、試料中の分子の存在を測定すること；第一抗体に特異的に結合しない試料の構成成分を除去すること；ならびにH E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的で抗原結合部位が固定化第一抗体の抗原結合部位を拮抗阻害しない第二抗体の、H E 4 a 抗原ポリペプチドへの特異的結合を検出するのに十分な条件および時間で、前記免疫複合体を少なくとも1種の第二抗体と接触させ、こうして卵巣癌の存在を検出すること、を含む、対象における卵巣癌の存在をスクリーニングする方法。

30

【請求項34】

固定化第一抗体が、1 2 A 2、1 4 E 2、2 H 5 および3 D 8 からなる群より選択される、請求項33に記載の方法。

40

【請求項35】

第二抗体が、1 2 A 2、1 4 E 2、2 H 5 および3 D 8 からなる群より選択される、請求項33に記載の方法。

【請求項36】

固定化第一抗体が1 4 E 2 である、請求項33に記載の方法。

【請求項37】

第二抗体が1 2 A 2 である、請求項33に記載の方法。

【請求項38】

a) 対象の検査試料中のH E 4 a 抗原を検出すること、

b) 抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件で、前記検査試料を、H E 4 a

50

N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを有する抗体と接触させること、および

c) 前記複合体の存在をディスプレイ上で検出すること、  
を含み、検査試料中の H E 4 a の存在を示す複合体の存在が卵巣癌の存在と相関する、卵巣癌の対象を診断する方法。

【請求項 39】

抗体が、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを含む、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

抗体が、特許受託番号 1 0 0 9 1 4 0 1 として E C A C C を有するハイブリドーマ細胞株により産生されたモノクローナル抗体である、請求項 38 に記載の方法。

10

【請求項 41】

a) 対象の検査試料中の H E 4 a 抗原を検出すること、  
b) 前記検査試料を、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを有する第一抗体と、第一抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件で接触させること、  
c) 検出可能なシグナルを発生し得るシグナル発生化合物に付着された第二抗体を含むコンジュゲートを、第一抗体 / 抗原複合体に、第一抗体 / 抗原 / 第二抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件で添加すること、ならびに  
d) シグナル発生化合物により発生されたシグナルの存在をディスプレイ上で検出すること、  
を含み、検査試料中の H E 4 a 抗原の存在を示すシグナルの存在が卵巣癌の存在と相関する、卵巣癌の対象を診断する方法。

20

【請求項 42】

抗体の少なくとも 1 種が、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

抗体が、特許受託番号 1 0 0 9 1 4 0 1 として E C A C C を有するハイブリドーマ細胞株により産生される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

a) 対象の検査試料中の H E 4 a 抗原を検出すること、  
b) 前記検査試料を、H E 4 a N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを有する抗体と、抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件で接触させること、ならびに  
c) 前記複合体の存在をディスプレイ上で検出すること、  
を含み、検査試料中の H E 4 a 抗原の存在を示す前記複合体の存在が卵巣癌のステージと相関する、卵巣癌の対象の予後判定の方法。

30

【請求項 45】

抗体が、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを含む、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

抗体が、特許受託番号 1 0 0 9 1 4 0 1 として E C A C C を有するハイブリドーマ細胞株により産生されたモノクローナル抗体である、請求項 44 に記載の方法。

40

【請求項 47】

a) 対象の検査試料中の H E 4 a 抗原を検出すること、  
b) 前記検査試料を、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを有する第一抗体と、第一抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件で接触させること、  
c) 検出可能なシグナルを発生し得るシグナル発生化合物に付着された第二抗体を含むコンジュゲートを、第一抗体 / 抗原複合体に、第一抗体 / 抗原 / 第二抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件で添加すること、ならびに  
d) シグナル発生化合物により発生されたシグナルの存在をディスプレイ上で検出する

50

こと、

を含み、検査試料中の H E 4 a 抗原の存在を示すシグナルの存在が卵巣癌のステージと相関する、卵巣癌の対象の予後判定の方法。

【請求項 4 8】

少なくとも 1 つの抗体が、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

抗体が、特許受託番号 1 0 0 9 1 4 0 1 として E C A C C を有するハイブリドーマ細胞株により産生される、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 0】

a ) 対象の検査試料中の H E 4 a 抗原を検出すること、  
 b ) 前記検査試料を、H E 4 a N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを有する抗体と、抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件で接触させること、ならびに  
 c ) 前記複合体の存在をディスプレイ上で検出すること、  
 を含み、検査試料中の H E 4 a 抗原の存在を示す前記複合体の存在が処置の応答性と相関する、卵巣癌の処置を受ける対象をモニタリングする方法。

【請求項 5 1】

抗体が、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

抗体が、特許受託番号 1 0 0 9 1 4 0 1 として E C A C C を有するハイブリドーマ細胞株により産生されたモノクローナル抗体である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 3】

a ) 対象の検査試料中の H E 4 a 抗原を検出すること、  
 b ) 前記検査試料を、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを有する第一抗体と、第一抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件で接触させること、  
 c ) 検出可能なシグナルを発生し得るシグナル発生化合物に付着された第二抗体を含むコンジュゲートを、第一抗体 / 抗原複合体に、第一抗体 / 抗原 / 第二抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件で添加すること、ならびに  
 d ) シグナル発生化合物により発生されたシグナルの存在をディスプレイ上で検出すること、  
 を含み、検査試料中の H E 4 a 抗原の存在を示すシグナルの存在が処置への応答性と相関する、卵巣癌の処置を受ける対象をモニタリングする方法。

【請求項 5 4】

抗体の少なくとも 1 種が、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを含む、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

抗体が、特許受託番号 1 0 0 9 1 4 0 1 として E C A C C を有するハイブリドーマ細胞株により産生される、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

対象から得られた検査卵巣組織試料を、配列番号 H E 4 に示されたポリペプチドに特異的に結合する抗体と接触させること；検査卵巣癌組織試料中のポリペプチドに結合する抗体の量を検出すること；および検査卵巣癌組織試料中のポリペプチドに結合する抗体の量を、所定のカットオフ値と比較すること、を含み、検査卵巣組織試料中のポリペプチドに結合する抗体の量が所定のカットオフ値を超えている場合には検査卵巣癌組織試料が卵巣癌について陽性となり、それにより対象における卵巣癌の有無を検出する、患者における子宮頸癌の有無を検出する方法。

【請求項 5 7】

検査卵巣癌組織試料中のポリペプチドに結合する抗体の量が、免疫組織化学を利用して

10

20

30

40

50

測定される、請求項 5 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、卵巣癌の検出、診断、悪性度分類、ステージ分類、予後のため、ならびに卵巣癌が疑われる、および/または卵巣癌に罹患した対象の処置応答を予測およびモニタリングするための組成物および方法を包含する。患者から得られた試料中の全長 HE 4 a の存在を測定することにより、卵巣癌を検出するイムノアッセイ、結合剤、抗体、および方法も、開示する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

WFDC 2 (HE 4 / HE 4 a) 遺伝子産物は、安定した 4 - ジスルフィド・コア蛋白質のファミリーの一員である。HE 4 は、ヒト精巣上体組織中で初めて観察された、分泌およびグリコシル化蛋白質であり (ヒト精巣上体蛋白質 4 ; HE 4)、卵巣癌をはじめとする特定の癌で過剰発現される。HE 4 / HE 4 a 蛋白質および核酸の特徴づけは、例えば、Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, Krull N (Mar 1992). "A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors". Biol Reprod 45 (2): 350 - 7 (非特許文献 1)、Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, Schummer B, Bednarski DW, Hassell L, Baldwin RL, Karlan BY, Hood L (Dec 1999). "Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas". Gene 238 (2): 375 - 85 (非特許文献 2)、Kirchhoff C (1998). "Molecular characterization of epididymal proteins." Rev. Reprod. 3 (2): 86 - 95 (非特許文献 3)、Kirchhoff C, Osterhoff C, Habben I, et al. (1990). "Cloning and analysis of mRNAs expressed specifically in the human epididymis." Int. J. Androl. 13 (2): 155 - 67 (非特許文献 4)、Hellstroem I, et al; Cancer Res. 2003 Jul 1; 63 (13): 3695 - 700 (非特許文献 5) に報告されている。癌細胞における HE 4 / HE 4 a の過剰発現から、この蛋白質およびその様々なアイソフォームが、癌を検出して癌を有する確率の高い患者を同定する有用なバイオマーカーとなり得ることが示唆される。HE 4 / HE 4 a などの分子マーカーの使用に関係する方法および組成物は、これまでに、米国特許第 7270960 号 (特許文献 1)、米国特許出願公開第 20100311099 号 (特許文献 2)、同第 20080020473 号 (特許文献 3)、同第 20070286865 号 (特許文献 4)、同第 20100047818 号 (特許文献 5)、同第 20090104684 号 (特許文献 6)、および同第 20030108965 号 (特許文献 7) に報告されており、それらの各内容は、全体として本明細書に組み入れられている。

【0003】

HE 4 / HE 4 a 蛋白質は、選択的スプライシングによる異なるアイソフォーム、および異なるグリコシル化パターンからの異なるグリコフォームを有することが報告されている。先の事柄を考慮して、癌を診断するために HE 4 a、それらの変異体、スプライシア

10

20

30

40

50

イソフォーム、およびグリコフォームなどのバイオマーカの過剰発現を検出し得る組成物および結合剤（例えば、抗体）が、当該技術分野で必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許第7270960号

【特許文献2】米国特許出願公開第20100311099号

【特許文献3】米国特許出願公開第20080020473号

【特許文献4】米国特許出願公開第20070286865号

【特許文献5】米国特許出願公開第20100047818号

【特許文献6】米国特許出願公開第20090104684号

【特許文献7】米国特許出願公開第20030108965号

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, Krull N (Mar 1992). "A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors". *Biol Reprod* 45 (2): 350-7

【非特許文献2】Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, Schummer B, Bednarski DW, Hassell L, Baldwin RL, Karlan BY, Hood L (Dec 1999). "Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas". *Gene* 238 (2): 375-85

【非特許文献3】Kirchhoff C (1998). "Molecular characterization of epididymal proteins." *Rev. Reprod.* 3 (2): 86-95

【非特許文献4】Kirchhoff C, Osterhoff C, Habben I, et al. (1990). "Cloning and analysis of mRNAs expressed specifically in the human epididymis." *Int. J. Androl.* 13 (2): 155-67

【非特許文献5】Hellstroem I, et al; *Cancer Res.* 2003 Jul 1; 63 (13): 3695-700

【発明の概要】

【0006】

本発明は、対象における卵巣癌を診断する、および卵巣癌を有する確率の高い対象を同定する、組成物および方法を包含する。該組成物は、卵巣癌で過剰発現されるHE4/HE4aの可溶性形態および細胞表面形態に特異的に結合するモノクローナル抗体、それらの変異体およびフラグメントを含む。開示されたHE4a抗体の結合特性を有するモノクローナル抗体も、提供される。HE4/HE4aモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株も、開示される。開示された組成物は、卵巣癌を有する確率の高い対象を同定するための診断方法およびスクリーニング方法において使用を有する。詳細には診断方法は、免疫組織化学(IHC)アッセイまたはダブルサンドイッチELISAアッセイを含むことができる。開示されたHE4aモノクローナル抗体の1種以上を含む、本発明の方法を実践するためのキットも、提供される。HE4aエピトープのアミノ酸配列を含むポリペプチド、および抗体の産生においてこれらのポリペプチドを使用する方法も、開示

10

20

30

40

50

される。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】HE4aドメインおよびヒト/マウスIgGを含む例示的HE4a融合蛋白質の実施形態を示す。

【図2】HE4aの全長HE4a、HE4a-V4およびHE4a-V2ドメインへの、モノクローナル抗体の実施形態(12A2および14E2抗体)の幾つかの結合特異性を示す。この実施例において、MAbs 12A2および14E2は、HE4a-V4変異体および全長HE4aに結合したが、HE4a-V2ドメインには結合しなかった。12A2および14E2 MAbsが、HE4a N-WFDCドメインに結合したことが示される。

10

【図3】融合蛋白質への参照モノクローナル抗体(2H5および3D8抗体)の結合特異性を示す。この実施例において、参照MAbsは、HE4a-V2ドメインおよび全長HE4aに結合するが、HE4a-V4ドメインには結合せず、それらがHE4a C-WFDCドメイン内のエピトープを認識したことが示される。

【図4】N-WFDCおよびC-WFDC HE4aドメインを含むHE4aヌクレオチドおよびペプチド配列を示す。

【図5】N-WFDCおよびC-WFDCへの例示的モノクローナル抗体(12A2)の結合相互作用を示す。この実施例において、12A2の結合特異性は、MAbsをHE4a N-WFDCファージ pVIIII融合蛋白質のみと反応させたファージELISA形式を利用して実証される。

20

【図6】14E2 MAbsと変性および還元HE4a-hIg融合蛋白質との反応性を示す。変性および還元HE4a-hIg融合蛋白質への結合は、14E2 MAbsがHE4a蛋白質の線状エピトープを認識したことを示す。

【図7】捕捉MAbsとして14E2を用い、検出MAbsとして3D8または12A2 MAbsを用いた、サンドイッチ免疫アッセイの用量反応曲線を示す。14E2 MAbsと12A2 MAbsとの組み合わせの結果から、それらが同時に結合し得ること、つまりHE4a N-WFDCドメインの独立したエピトープを検出し得ることが示される。

【図8】幾つかの例のサンドイッチ免疫アッセイおよび2H5 MAbsと組み合わせた12A2 MAbsと14E2 MAbsとの結合を示す。この実施例において、MAbs 12A2および14E2は、全長HE4aのみと反応するが、3D8および2H5のMAbs組み合わせは、FL HE4aおよびHE4a-V2の両方の変異体と反応した。その結果から、12A2および14E2 MAbsが、HE4a N-WFDCドメイン内で暴露されたエピトープを認識する証拠を更に裏づけている。

30

【図9】全長HE4a EIAの用量反応曲線を示す。このアッセイは、捕捉抗体としての2H5 MAbsおよび検出MAbsとしてのHRPコンジュゲート12A2 MAbsに基づいた。その手順を、実施例3に記載された通り実施した。

【図10】実施例3に記載された通りFL HE4a EIAで測定された、健常な対象、良性婦人科疾患の患者および卵巣癌患者におけるHE4aレベルを示す。

【図11】卵巣癌の臨床経過をモニタリングするための例示的全長HE4a免疫アッセイを示す(SD=安定した疾患; R=応答している; PD=進行性疾患)。この実施例において、全長HE4aが、卵巣癌と診断された患者の疾患の臨床経過を追跡するのに有用であることが、全長HE4aから実証された。

40

【図12】HE4a N-WFDCドメインに特異的な例示的MAbsを用いた良性および悪性卵巣組織のIHCを示す。この実施例において、例示的12A2 MAbsは、卵巣癌内の癌細胞に強く結合したが、良性腫瘍内の細胞には結合しなかった。A:漿液性腺癌; B:漿液性腺癌; C:子宮内膜様卵巣癌; D:漿液性腺癌; E:線維腫; F:線維莢膜細胞腫。

【発明を実施するための形態】

【0008】

50

### 詳細な説明

対象における卵巣癌を診断する、および卵巣癌を有する確率の高い対象を同定する、様々な組成物および方法が、提供される。組成物は、HE4/HE4a(卵巣癌細胞中で過剰発現することが示された蛋白質)に結合し得るモノクローナル抗体、を含む。該組成物は、卵巣癌で過剰発現されるHE4/HE4aの可溶性形態および細胞表面形態に特異的に結合するモノクローナル抗体、ならびにそれらの変異体およびフラグメントを含む。本開示のHE4a抗体の結合特性を有するモノクローナル抗体が、更に提供される。本開示のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株も、開示される。より詳細にはHE4aのN-WFDCドメインに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株が、提供される。記載されたモノクローナル抗体を含むキットも、開示される。本発明は、HE4aエピトープのアミノ酸配列を含むポリペプチド、および抗体の産生においてこれらのポリペプチドを使用する方法も包含する。該組成物は、対象における卵巣癌を診断するための「サンドイッチ」ELISA法またはIHC、および卵巣癌を有する確率の高い対象を同定するためのスクリーニング方法に、特別な用途を見出す。

#### 【0009】

一態様において、本開示は、HE4aに特異的に結合し得るモノクローナル抗体を提供する。一実施形態において、モノクローナル抗体は、特許受託番号10091401としてECCCに寄託されたハイブリドーマ細胞株12A2により産生される。別の実施形態において、モノクローナル抗体は、特許受託番号(14E2 ECCCNo )としてECCCに寄託されたハイブリドーマ細胞株14E2により産生される。別の実施

形態において、モノクローナル抗体は、配列番号17 HE4a N-WFDC

(EKTGVCPQLQADQNCTQECVSDSECA

DNLKCCSAGCATFCSLPND)

#### 【0010】

別の態様において、本発明は、配列番号HE4a N-WFDCに示されたアミノ酸配列に結合するモノクローナル抗体、および配列番号19 HE4a C-WFDC

(KEGSCPQVNINFPQL

GLCRDQCQVDSQCPGQMKCCRNGCGKVSCVTPNF)

に示されたアミノ酸配列に結合する追加のモノクローナル抗体を含む卵巣癌を診断するキットを提供する。第一のHE4a抗体である固体担体上に固定された捕捉抗体と、検出可能な物質で標識された第二のHE4a抗体であるタグ抗体と、を含み、前記第一または第二のHE4a抗体が、特許受託番号(14E2 ECCCNo )としてECCCに寄託され、および/または配列番号17 HE4a N-WFDC

(EKTGVCPQLQADQN

CTQECVSDSECADNLKCCSAGCATFCSLPND)

に示されたアミノ酸配列に結合するハイブリドーマ細胞株14E2により産生されたモノクローナル抗体である、患者における卵巣癌を診断するキットも、提供される。

#### 【0011】

本開示は、免疫反応を誘発する条件下、配列番号1、3および5に示されたアミノ酸配列(HE4a; HE4a V2; HE4a V4)およびそれらの変異体を含むポリペプチドで動物を免疫化すること; 該動物から抗体を産生する細胞を単離すること; 抗体を産生する細胞を不死化培養細胞と融合して、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を形成すること; ハイブリドーマ細胞を培養すること; ならびにモノクローナル抗体を培養物から単離すること、を含む、HE4aモノクローナル抗体を産生する方法も提供する。

#### 【0012】

10

20

30

40

50

本開示は、(a) HE 4 a の N - W F D C ドメイン；(b) 配列番号 1 HE 4 a によりコードされたアミノ酸配列、に結合する HE 4 a 結合剤も提供する。一実施形態において、結合剤は、抗 HE 4 a 抗体または HE 4 a 抗原結合フラグメントである。更なる実施形態において、結合剤は、HE 4 a N - W F D C (配列番号 17) に選択的に結合する。更に別の実施形態において、結合剤は、ポリクローナル、モノクローナル、二特異性、キメラもしくはヒト化抗体、またはそれらの抗原結合フラグメントである。別の実施形態において、結合剤は、検出可能なマーカで標識されている。

【0013】

本発明は、特許受託番号 10091401 として ECACC に寄託されたハイブリドーマ細胞株 12A2 により産生されたモノクローナル抗体のアミノ酸配列に対し少なくとも 90% の同一性を有する精製されたアミノ酸配列も包含する。

10

【0014】

別の態様において、モノクローナル抗体のアミノ酸配列に対し少なくとも 90% の同一性を有する配列が、特許受託番号 14E2 ECACC No. として ECACC に寄託されたハイブリドーマ細胞株 14E2 により産生される、精製されたアミノ酸配列が提供される。

【0015】

本開示は、a) 試料からの核酸を、フォワードおよびリバースプライマーを含み、配列番号 21 V4F と配列番号 23 \_\_V4R、配列番号 25 V2F と配列番号 27 V2R からなる群より選択されるプライマーセットで増幅させること；b) 増幅された核酸を単離すること、を含む、HE 4 a ポリペプチドをコードする核酸配列を得る方法も包含する。

20

【0016】

本発明は、配列番号 17 HE 4 a N - W F D C の配列に結合する結合蛋白質をコードする単離された核酸分子であって、該結合蛋白質のアミノ酸配列が、特許受託番号 10091401 として ECACC に寄託されたハイブリドーマ 12A2、または特許受託番号 14E2 ECACC 番号として ECACC に寄託され、および/もしくは配列番号 17 HE 4 a N - W F D C

(E K T G V C P E L Q A D Q N C T Q E C V S D S E C A D N L K C

30

C S A G C A T F C S L P N D)

により示されたアミノ酸配列に結合する細胞株 14E2、により産生されたモノクローナル抗体のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する、単離された核酸分子も包含する。

【0017】

別の態様において、配列番号 17 HE 4 a N - W F D C の配列に結合する結合蛋白質をコードする単離された核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞が、提供される。

【0018】

本開示は、配列番号 17 HE 4 a N - W F D C のアミノ酸配列を含む Fc 受容体ポリペプチドに連結した異種 HE 4 a ポリペプチドを含む単離された融合蛋白質も提供する。一実施形態において、単離された融合蛋白質は、配列番号 29 W1F；配列番号 31 W1R；配列番号 33 W2F；配列番号 35 W2R によりコードされるプライマーを用いて核酸増幅することにより得られる。別の実施形態において、融合蛋白質は、スプライス変異体である異種 HE 4 a 抗原ポリペプチドを含む。

40

【0019】

本発明は、対象からの生物学的試料を、HE 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも 1 種の抗体と、抗原決定基への該抗体の結合を検出するのに十分な条件および時間で接触させて、該試料中で可溶性形態であり少なくとも 1 種の抗体と反応性がある抗原決定基を有する天然由来分子が、該生物学的試料中に存在することを測定すること、ならびにその後、卵巣癌の存在を検出すること、を含む、対象における卵巣癌の存在をスクリーニン

50

グする方法も包含する。一実施形態において、生物学的試料は、血液、血清、漿液 ( s e r o s a l f l u i d )、血漿、リンパ、尿、脳脊髄液、唾液、粘膜分泌液、腔分泌液、腹水、肋膜液、心膜液、腹腔液、腹部液体 ( a b d o m i n a l f l u i d )、培地、コンディション培地および洗浄液からなる群より選択される。

【 0 0 2 0 】

本開示は、対象の細胞を含む生物学的試料を、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも1種の抗体と、抗原決定基への該抗体の結合を検出するのに十分な条件および時間で接触させて、少なくとも1種の該抗体と反応性のある該抗原決定基を有する細胞表面分子が、該生物学的試料中に存在することを測定すること、ならびにこうして卵巣癌の存在を検出すること、を含む、対象における卵巣癌の存在をスクリーニングする方法を更に提供する。一実施形態において、抗体は、検出可能に標識されている。別の実施形態において、抗体は、検出可能に標識されておらず、抗原決定基への抗体の結合の検出は、間接的である。

10

【 0 0 2 1 】

本発明は、H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な少なくとも1種の固定化第一抗体をH E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的に結合させることにより免疫複合体を形成するのに十分な条件および時間で、対象からの生物学的試料を第一抗体と接触させて、試料中の分子の存在を測定すること；第一抗体に特異的に結合しない試料の構成成分を除去すること；ならびにH E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的で抗原結合部位が固定化第一抗体の抗原結合部位を拮抗阻害しない第二抗体の、H E 4 a 抗原ポリペプチドへの特異的結合を検出するのに十分な条件および時間で、該免疫複合体を少なくとも1種の第二抗体と接触させ、こうして卵巣癌の存在を検出すること、を含む、対象における卵巣癌の存在をスクリーニングする方法も包含する。一実施形態において、固定化第一抗体は、1 2 A 2、1 4 E 2、2 H 5 および 3 D 8 からなる群より選択される。一実施形態において、第二抗体は、1 2 A 2、1 4 E 2、2 H 5 および 3 D 8 からなる群より選択される。別の実施形態において、固定化第一抗体は、1 4 E 2 である。更に別の実施形態において、第二抗体は、1 2 A 2 である。

20

【 0 0 2 2 】

対象の検査試料中のH E 4 a 抗原を検出すること；抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件で、該検査試料を、H E 4 a N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを有する抗体と接触させること；および該複合体の存在をディスプレイ上で検出すること、を含み、検査試料中のH E 4 a の存在を示す複合体の存在が卵巣癌の存在と相関する、卵巣癌の対象を診断する方法も、開示される。一実施形態において、抗体は、H E 4 a のアミノ酸N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを含む。別の実施形態において、抗体は、特許受託番号1 0 0 9 1 4 0 1 としてE C A C C を有するハイブリドーマ細胞株により産生されたモノクローナル抗体である、

30

【 0 0 2 3 】

本発明は、対象の検査試料中のH E 4 a 抗原を検出すること；該検査試料を、H E 4 a のアミノ酸N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを有する第一抗体と、第一抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件で接触させること；検出可能なシグナルを発生し得るシグナル発生化合物に付着された第二抗体を含むコンジュゲートを、第一抗体 / 抗原複合体に、第一抗体 / 抗原 / 第二抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件で添加すること；ならびにシグナル発生化合物により発生されたシグナルの存在をディスプレイ上で検出すること、を含み、検査試料中のH E 4 a 抗原の存在を示すシグナルの存在が卵巣癌の存在と相関する、卵巣癌の対象を診断する方法も、包含する。一実施形態において、抗体は、H E 4 a のアミノ酸N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを含む。別の実施形態において、抗体は、特許受託番号1 0 0 9 1 4 0 1 としてE C A C C を有するハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体である。

40

【 0 0 2 4 】

本開示は、対象の検査試料中のH E 4 a 抗原を検出すること；該検査試料を、H E 4 a

50

N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを有する抗体と、抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件で接触させること ; ならびに該複合体の存在をディスプレイ上で検出すること、を含み、検査試料中の H E 4 a 抗原の存在を示す該複合体の存在が卵巣癌のステージと相関する、卵巣癌の対象の予後の方法も包含する。一実施形態において、抗体は、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを含む。別の実施形態において、抗体は、特許受託番号 1 0 0 9 1 4 0 1 として E C A C C を有するハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体である。

**【 0 0 2 5 】**

本発明は、対象の検査試料中の H E 4 a 抗原を検出すること ; 該検査試料を、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを有する第一抗体と、第一抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件で接触させること ; 検出可能なシグナルを発生し得るシグナル発生化合物に付着された第二抗体を含むコンジュゲートを、第一抗体 / 抗原複合体に、第一抗体 / 抗原 / 第二抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件で添加すること ; ならびにシグナル発生化合物により発生されたシグナルの存在をディスプレイ上で検出すること、を含み、検査試料中の H E 4 a 抗原の存在を示すシグナルの存在が卵巣癌のステージと相関する、卵巣癌の対象の予後の方法も包含する。一実施形態において、抗体は、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを含む。別の実施形態において、抗体は、特許受託番号 1 0 0 9 1 4 0 1 として E C A C C を有するハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体である。

10

**【 0 0 2 6 】**

対象の検査試料中の H E 4 a 抗原を検出すること ; 該検査試料を、H E 4 a N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを有する抗体と、抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件で接触させること ; ならびに該複合体の存在をディスプレイ上で検出すること、を含み、検査試料中の H E 4 a 抗原の存在を示す前記複合体の存在が処置の応答性と相関する、卵巣癌の処置を受ける対象をモニタリングする方法も、開示される。一実施形態において、抗体は、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを含む。別の実施形態において、抗体は、特許受託番号 1 0 0 9 1 4 0 1 として E C A C C を有するハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体である。

20

**【 0 0 2 7 】**

本開示は、対象の検査試料中の H E 4 a 抗原を検出すること ; 該検査試料を、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを有する第一抗体と、第一抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件で接触させること ; 検出可能なシグナルを発生し得るシグナル発生化合物に付着された第二抗体を含むコンジュゲートを、第一抗体 / 抗原複合体に、第一抗体 / 抗原 / 第二抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件で添加すること ; ならびにシグナル発生化合物により発生されたシグナルの存在をディスプレイ上で検出すること、を含み、検査試料中の H E 4 a 抗原の存在を示すシグナルの存在が処置への応答性と相関する、卵巣癌の処置を受ける対象をモニタリングする方法を更に提供する。一実施形態において、抗体は、H E 4 a のアミノ酸 N - W F D C に結合する抗原結合ドメインを含む。別の実施形態において、抗体は、特許受託番号 1 0 0 9 1 4 0 1 として E C A C C を有するハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体である。

30

40

**【 0 0 2 8 】**

本発明は、対象から得られた検査卵巣組織試料を、配列番号 H E 4 に示されたポリペプチドに特異的に結合する抗体と接触させること ; 検査卵巣癌組織試料中のポリペプチドに結合する抗体の量を検出すること ; および検査卵巣癌組織試料中のポリペプチドに結合する抗体の量を、所定のカットオフ値と比較すること、を含み、検査卵巣組織試料中のポリペプチドに結合する抗体の量が、所定のカットオフ値を超えている場合には検査卵巣癌組織試料が卵巣癌について陽性となり、それにより対象における卵巣癌の有無を検出する、患者における卵巣癌の有無を検出する方法も提供する。一実施形態において、検査卵巣癌組織試料中ポリペプチドに結合する抗体の量は、免疫組織化学を利用して測定される。

50

## 【0029】

本明細書に開示された方法は、記載された通り、蛋白質の「4 - ジスルフィド・コア」ファミリーの一員であるHE4 / HE4aに関係する。蛋白質の「4 - ジスルフィド・コア」ファミリーは、機能が多岐にわたる小型の酸 - および熱 - 安定性分子の異種群を含み、ヒト精巣上体4 - ジスルフィド・コア蛋白質、または「HE4」を含む (Kirchhoff et al., 1991 Biol. Reprod. 45:350-357; Wang et al., 1999 Gene 229:101; Schummer et al., 1999 Gene 238:375)。HE4 cDNAは、最初、ヒト精巣上体から単離され (Kirchhoff et al., 1991 Biol. Reprod. 45:350-357)、後にHE4 cDNAは、卵巣癌から構成されたcDNAライブラリにおいて高頻度で検出された (Wang et al., 1999 Gene 229:101; Schummer et al., 1999 Gene 238:375)。HE4aの修正された配列が、Hellstrom et al., 2003, Canc. Res. 63:3695-3700および米国特許第7,270,960号に開示された。HE4aは、より初期の発行物でHE4と呼ばれていた分子の推定配列と非常に類似しているが異なるアミノ酸配列を示す。

10

## 【0030】

HE4蛋白質の複数のアイソフォームが、以下の表1に詳細に報告された。当業者は、各アイソフォームが、特定のHE4 / HE4a抗体の関連するエピトープ配列を含む限り、本開示のHE4 / HE4aモノクローナル抗体が1を超えるHE4アイソフォームに結合し得ることを、理解するであろう。

20

## 【0031】

(表1) HE4アイソフォーム

| HE4アイソフォーム | アクセション番号  | 配列識別番号 |
|------------|-----------|--------|
| 1          | NP_006094 | 配列番号1  |
| 2          | AAL37488  | 配列番号3  |
| 3          | AAL37487  | 配列番号5  |
| 4          | AAL37486  | 配列番号7  |
| 5          | AAL37485  | 配列番号9  |
| 6          | AAH46106  | 配列番号11 |
| 7          | AAO52683  | 配列番号13 |
| 8          | CAA44869  | 配列番号15 |

30

## 【0032】

本明細書で用いられる「対象」は、処置、観察または実験の目的となる動物を指す。「動物」は、冷血および温血の脊椎動物および無脊椎動物、例えば、魚、貝、爬虫類、特に哺乳類を含む。「哺乳類」は、非限定的に、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、霊長類、例えばサル、チンパンジ、および類人猿、およびヒトを含む。

40

## 【0033】

本明細書に開示された方法は、特定の癌を有する対象における高レベルのそのようなポリペプチドをはじめとし、対象における天然由来のHE4aの細胞表面および/または可溶性形態を検出する組成物および方法も包含する。本開示は、それ故、そのような細胞表面および/または可溶性のHE4aポリペプチドの特異的検出による対象における悪性状態 (例えば、卵巣癌) の検出および診断に有用な組成物および方法を提供する。

## 【0034】

50

全長 H E 4 a 抗原の測定のためのイムノアッセイの設計およびモノクローナル抗体の生成、卵巣癌の血清学的診断のための免疫学的アッセイおよびモノクローナル抗体の使用、H E 4 a の組織分析による疾患の臨床経過のモニタリングおよび卵巣癌の診断も、提供される。H E 4 a N - W F D C ドメインに特異的なエピトープに対する新規なモノクローナル抗体の作製、およびこれらの抗体と H E 4 a C - W F D C ドメインに対する抗体との組み合わせにより、全長 H E 4 a の測定に特異的なイムノアッセイを設計することが可能になる。

#### 【 0 0 3 5 】

本明細書に開示された方法によれば、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、対象または生物学的供給源からの生物学的試料中で検出することができる。生物学的試料は、対象もしくは生物学的供給源から、血液試料、生検標本、組織外植片、臓器培養物、生物学的液体または任意の他の組織もしくは細胞調製物を得ることにより提供することができる。対象または生物学的供給源は、ヒトまたは非ヒト動物、一次細胞培養物、非限定的に染色体に組み込まれた組換え核酸配列またはエピソームの組換え核酸配列を含み得る遺伝子操作された細胞株などの培養に適応させた細胞株、不死化または不死化可能な細胞株、体細胞ハイブリッド細胞株、分化または分化可能細胞株、形質転換された細胞株などであってもよい。本明細書に開示された方法の特定の実施形態において、対象または生物学的供給源は、卵巣癌を有する疑いがある、または卵巣癌を有するリスクの疑いがある可能性がある。

10

#### 【 0 0 3 6 】

幾つかの実施形態において、生物学的試料は、対象または生物学的供給源からの少なくとも 1 種の細胞を含み、別の実施形態において、生物学的試料は、別の腫瘍マーカを含む生物学的液体である。生物学的液体は、典型的には生理学的温度の液体であり、対象または生物学的供給源中に存在する、それから採取、発現またはさもなければ抽出された、天然由来の液体を含み得る。特定の組織、臓器または局所領域から得られた特定の生物学的液体、および特定の他の生物学的液体は、対象または生物学的供給源中に全体または全身に位置し得る。生物学的液体の非限定的例としては、血液、血清および漿液、血漿、リンパ、尿、脳脊髄液、唾液、漿液、血漿、リンパ、分泌組織および臓器の粘膜分泌液、腔分泌液、母乳、涙液が挙げられ、腹水、例えば非固形腫瘍に関連するものなども適している。追加の例としては、肋膜液、心膜液、腹腔液、腹部および他の体腔の液が挙げられる。生物学的液体としては、対象または生物学的供給源と接触した液性溶液、例えば細胞または臓器のコンディション培地をはじめとする細胞および臓器の培地、および洗浄液などを更に挙げることができる。別の実施形態において、生物学的試料は、無細胞液性溶液、例えば血清、血漿、または遠心分離された尿の上清である。

20

30

#### 【 0 0 3 7 】

特定の他の実施形態において、生物学的試料は、インタクト細胞を含み、特定の他の好ましい実施形態において、生物学的試料は、H E 4 a 抗原ポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは変異体をコードする核酸配列を含む細胞抽出物を含む。本明細書に開示された方法の更に別の実施形態において、分析の細胞内容物を示すアッセイ実施の前に、細胞が物理的または化学的に破壊または溶解されることが望ましい。

40

#### 【 0 0 3 8 】

本明細書で用いられる、試料中の「可溶性形態の天然由来分子」は、可溶性蛋白質、ポリペプチド、ペプチド、アミノ酸、またはその誘導體；脂質、脂肪酸など、またはそれらの誘導體；炭水化物、糖類など、またはその誘導體；核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン、ピリミジンもしくは関連の分子、またはそれらの誘導體など；あるいはそれらの任意の組み合わせ、例えば糖蛋白質、糖脂質、リポ蛋白質、プロテオリピド、または本明細書に示された生物学的試料の可溶性もしくは無細胞成分である任意の他の生物学的分子であってもよい。「可溶性形態の天然由来分子」は、更に、本明細書に示された生物学的液体をはじめとする生物学的試料中に溶解または存在していて、インタクト細胞の表面に結合していない分子を指す。例えば可溶性形態の天然由来分子としては、限定する必要

50

はないが、溶質；高分子複合体の成分；細胞から流出、分泌または排出された材料；コロイド；微粒子またはナノ粒子または他の微細な懸濁粒子などを挙げるができる。

【0039】

対象における悪性状態（例えば、卵巣癌）の存在は、例えば新生物、腫瘍、非接触阻害細胞または発癌遺伝子により形質転換された細胞などをはじめとし、対象における形成異常、癌性および/または形質転換細胞の存在を指す。限定ではなく例示として、本明細書に開示された方法に関連して、悪性状態は、更に、高レベルのそのようなポリペプチドが対象からの生物学的試料中で検出可能となる手法で、HE4a抗原ポリペプチド（またはHE4aポリペプチド）を分泌、流出、排出または放出することが可能な癌細胞の、対象における存在を指すことができる。幾つかの実施形態において、例えばそのような癌細胞は、カルチノマ細胞などの悪性上皮細胞であり、幾つかの実施形態において、そのような癌細胞は、悪性中皮腫細胞であり、それらは例えば肋膜の裏層（lining pleural）、心膜、腹腔、腹部および他の体腔に見出される扁平上皮細胞または中皮細胞の形質転換された変異体である。

10

【0040】

一実施形態において、卵巣癌の存在を表す卵巣腫瘍細胞は、原発性および転移性卵巣癌細胞を含むことができる。当該技術分野で周知の悪性を分類する基準は、原発性および転移性腫瘍からのヒト卵巣癌細胞株の作製および特徴づけである。他の実施形態において、本開示は、悪性状態が中皮腫、膵臓癌、非小細胞肺癌、または別の癌形態、例えば扁平上皮癌および腺癌などの様々な癌のいずれか、および例えば肉腫および血液悪性疾患（例えば、白血病、リンパ腫、骨髄腫など）となり得ることも企図される。これらおよび他の悪性状態の分類は、当業者に公知であり、本開示は、過度の実験を実施せずにそのような悪性状態におけるHE4aポリペプチドの存在の測定をもたらす。

20

【0041】

参照値は、本明細書に含まれる実施例に示されている。そのような値は、本明細書に開示された方法の実践に適している。しかし、本明細書に開示された方法の使用が、それらの参照値またはそのデータに限定されないことに留意しなければならない。当業者は、特定の要件のための参照値を得ることができる。そのような参照値は、患者が悪性の疑いがある卵巣癌の生検手順を受けて、患者におけるHE4発現を分析することにより得ることができる。そのような参照値を得る方法は、実施例に示されている。加えて他の参照値は、患者の特定のカテゴリーに注目して得ることができる。そのようなカテゴリーは、年齢、遺伝的背景、癌のリスク、薬歴、血液型、物理的性質、例えば体重、および他のカテゴリーを含み得る。

30

【0042】

本明細書に示された通り、対象における悪性状態の存在をスクリーニングする方法は、HE4a抗原ポリペプチドに特異的な抗体またはHE4aポリペプチドに特異的な抗体を用いることができる。HE4a抗原ポリペプチド（またはHE4aポリペプチド）に特異的な抗体は、モノクローナル抗体としてもしくはポリクローナル抗血清として即座に産生されるか、または当該技術分野で周知の方法を用いて所望の特性を有するように設計された遺伝子操作された免疫グロブリン（Ig）として産生することができる。例えば限定ではなく例示として、抗体は、本明細書に開示された方法によるヒトHE4aポリペプチドの検出に用いられ得る、組換えIgG、免疫グロブリン誘導配列を有するキメラ融合蛋白質または「ヒト化」抗体（例えば、米国特許第5,693,762号、同第5,585,089号、同第4,816,567号、同第5,225,539号、同第5,530,101号）を含むことができる。そのような抗体は、以下に記載される通り、HE4aポリペプチドでの免疫化など、本明細書に示された通り調製することができる。例えばHE4aポリペプチドをコードする核酸配列は開示されており、当業者は免疫原としての使用のために、これらのポリペプチドを日常的に調製することができる。例えば、12A2、14E2、2H5、および3D8など、ならびに以下により詳細に記載されるモノクローナル抗体を用いて、本明細書に開示された方法により特定の方法を実践することができる。

40

50

## 【0043】

用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、それらのフラグメント、例えば  $F(a b')_2$  および  $F a b$  フラグメント、ならびに天然由来または組換えにより産生された結合パートナーを含み、 $H E 4 a$  ポリペプチドに特異的に結合する分子である。抗体は、約  $10^4 M^{-1}$  以上、好ましくは約  $10^5 M^{-1}$  以上、より好ましくは約  $10^6 M^{-1}$  以上、およびより好ましくは約  $10^7 M^{-1}$  以上の  $K_D$  で  $H E 4 a$  ポリペプチドと結合する場合に、「免疫特異的」または特異的に結合すると定義される。結合パートナーまたは抗体のアフィニティーは、従来技術を用いて即座に測定することができる。 $H E 4 a$  ポリペプチドの結合パートナーとしての他の蛋白質の測定は、他の蛋白質またはポリペプチドと特異的に相互作用する蛋白質を同定および獲得するための複数の公知方法のいずれか、例えば米国特許第 5, 283, 173 号および同第 5, 468, 614 号に記載された酵母ツーハイブリッドスクリーニングシステムなどを用いて実施することができる。本明細書に開示された方法は、 $H E 4 a$  ポリペプチドに特異的に結合する結合パートナーおよび抗体を調製するための、 $H E 4 a$  ポリペプチド、および  $H E 4 a$  ポリペプチドのアミノ酸配列に基づくペプチドも包含する。

10

## 【0044】

抗体は、一般には、当業者に公知の様々な技術のいずれかにより調製することができる。そのような 1 つの技術において、最初、 $H E 4 a$  ポリペプチドを含む免疫原、例えば表面に  $H E 4 a$  ポリペプチドを有する細胞または単離された  $H E 4 a$  ポリペプチドを有する細胞が、好ましくは 1 種以上のブースター免疫化を組み入れた所定の計画により、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、動物は定期的に採血される。その後、 $H E 4 a$  ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体が、例えば適切な固体担体に結合されたポリペプチドを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、そのような抗血清から精製することができる。

20

## 【0045】

$H E 4 a$  ポリペプチドまたはその変異体に特異的なモノクローナル抗体は、当業者に公知の任意技術により調製することができる。例えばこれらの方法は、所望の特異性を有する抗体を産生することが可能な不死細胞株の調製を含み得る。そのような細胞株を、例えば先に記載された通り免疫化された動物から得られた脾臓細胞から、産生することができる。その後、脾臓細胞は、例えば免疫化された動物と相乗作用のあるような骨髓腫細胞融合パートナーとの融合により、不死化される。例えば、脾臓細胞および骨髓腫細胞は、ポリエチレングリコールまたは非イオン性洗剤などの膜融合促進剤と数分間混和し、その後、ハイブリッド細胞の増殖を支持するが骨髓細胞の増殖は支持しない選択培地に、低密度で播種することができる。選択技術の一例は、 $H A T$ （ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）選択を利用する。十分な時間、通常は約 1 ~ 2 週間の後、ハイブリッドのコロニーが観察される。単一コロニーを選択して、ポリペプチドに対する結合活性について検査する。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。 $H E 4 a$  ポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが、本明細書に開示された方法により企図される。

30

## 【0046】

モノクローナル抗体は、増殖したハイブリドーマコロニーの上清から単離することができる。加えて、ハイブリドーマ細胞株を適切な脊椎動物宿主、例えばマウスまたは他の適切な宿主の腹腔に注入するなど、様々な技術を用いて収率を高めることができる。その後、モノクローナル抗体を、腹水または血液から回収することができる。汚染物を、従来の技術、例えばクロマトグラフィー、ゲルろ過、沈殿、および抽出により、抗体から除去することができる。例えば抗体は、標準の技術を用いた固定化プロテイン G またはプロテイン A でのクロマトグラフィーにより、精製することができる。

40

## 【0047】

特定の実施形態において、抗体の抗原結合フラグメントを、使用することができる。そのようなフラグメントには  $F a b$  フラグメントなどがあり、それは、標準の技術を用いて

50

(例えば、パパイソ消化でF a bおよびF cフラグメントを得ることにより)調製することができる。F a bフラグメントとF cフラグメントは、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カラムで)標準の技術を用いて分離することができる。そのような技術は、当該技術分野で周知であり、例えばWeir, D. M., Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Bostonを参照されたい。

#### 【0048】

特定の態様において、HE4融合蛋白質が、提供される。様々なエフェクター蛋白質をコードする配列にインフレームで結合されたDNA配列によりコードされた免疫グロブリンV領域ドメインのおかげで、予め選択された抗原への特異的結合アフィニティーを有する多機能融合蛋白質は、例えばEP-B1-0318554号、米国特許第5,132,405号、同第5,091,513号および同第5,476,786号に開示された通り、当該技術分野で公知である。そのようなエフェクター蛋白質は、非限定的にピオチン模倣配列、検出可能な標識部分での直接的な共有結合修飾、特異的標識されたレポーター分子への非共有結合、検出可能な基質の酵素修飾または固相担体への固定化(共有または非共有結合)をはじめとする、当業者に熟知された様々な技術のいずれかにより、融合蛋白質の結合を検出するのに用いられ得るポリペプチドドメインを含む。

#### 【0049】

本明細書に開示された方法において用いられる単鎖抗体は、ファージディスプレイなどの方法により生成および選択することもできる(例として、米国特許第5,223,409号参照)。簡潔に述べると、この方法において、DNA配列を、フィラメントファージ、例えばM13の遺伝子IIIまたは遺伝子VIIに挿入することができる。マルチクローニングサイトを有する複数のベクターが、挿入のために開発された(McLafferty, M. A., Kent, K. A., Ladner, R. C. & Markland, W. Gene 128, 29-36 (1993); Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. Science. 1990 Jul 27; 249(4967): 386-390; Smith GP, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. Methods Enzymol. 1993; 217: 228-257)。挿入されたDNA配列は、無秩序に生成させることができ、またはHE4aポリペプチドに結合するための公知結合ドメインの変異体であってもよい。挿入された配列によりコードされたペプチドは、バクテリオファージの表面に提示される。HE4aポリペプチドのための結合ドメインを発現するバクテリオファージは、当該技術分野で周知の方法および本明細書に開示された核酸コード配列を用いて調製された固定化HE4aポリペプチド、例えば組換えポリペプチドに結合することにより選択される。未結合のファージは、典型的には10mM Tris、1mM EDTAを含有し、塩を含まないか、または塩濃度の低い洗浄液により除去される。結合されたファージは、例えば塩含有緩衝液で溶出される。NaCl濃度は、ファージが全て溶出されるまで、段階的に増加させる。典型的には高いアフィニティーで結合するファージ程、高い塩濃度により放出される。溶出されたファージは、細菌宿主内で増殖される。更に選択を実施して、高アフィニティーで結合する幾つかのファージについて選択することができる。その後、結合ファージ内の挿入物のDNA配列が決定される。結合ペプチドの予測されたアミノ酸配列が分かれば、本明細書においてHE4aポリペプチドに特異的な抗体としての使用に十分なペプチドを、組換え手段または合成のいずれかにより作製することができる。組換え手段は、抗体が融合蛋白質として産生された場合に用いられる。該ペプチドは、アフィニティーまたは結合を最大にするために、2種以上の類似または非類似ペプチドのタンデムアレイとして生成させることもできる。

10

20

30

40

50

## 【0050】

この開示において、様々なアッセイ形式が提供される。HE4aポリペプチドに特異的な抗体と反応性のある抗原決定基を検出するために、検出試薬は、典型的には抗体であり、それは本明細書に記載された通り、または当該技術分野で公知の様々な方法のいずれかにより調製することができる。非限定的に酵素免疫測定法(ELISA)、放射免疫測定法(RIA)、免疫蛍光測定法、免疫沈殿法、平衡透析法、免疫拡散法および他の技術をはじめとし、抗体を用いて試料中のポリペプチドを検出する、当業者に公知の様々なアッセイ形式が存在する。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を参照されたい。例えば該アッセイは、生物学的試料からの蛋白質調製物がゲル電気泳動に供されて、適切な膜に移し替えられ、抗体と反応させる、ウェスタンブロット形式で実施されてもよい。その後、膜上の抗体の存在を、当該技術分野で周知であり以下に記載される通り、適切な検出試薬を用いて検出することができる。

10

## 【0051】

別の実施形態において、該アッセイは、標的HE4aポリペプチドに結合してそれを試料の残りから除去するための、固体担体上で固定化された抗体の使用を含む。その後、結合されたHE4aポリペプチドは、別個のHE4aポリペプチド抗原決定基、例えば検出可能なレポーター部分を含む試薬と反応性のある第二抗体を用いて検出されてもよい。非限定的例として、この実施形態によれば、別個の抗原決定基を認識する固定化抗体および第二抗体は、例示的なモノクローナル抗体のうちの2種、2H5および3D8であってもよい。あるいはHE4aポリペプチドを検出可能なレポーター部分で標識し、固定化抗体と試料とのインキュベーションの後、固定化HE4aポリペプチド特異性抗体に結合させる、拮抗アッセイを用いてもよい。試料の成分が、標識されたポリペプチドの抗体への結合を阻害する度合いが、試料と固定化抗体との反応性を示し、結果として試料中のHE4aレベルを示す。

20

## 【0052】

固体担体は、抗体が付着し得る、当業者に公知の任意材料、例えばマイクロタイタープレートの検査ウェル、ニトロセルロースフィルター、または別の適切な膜であってもよい。あるいは担体は、ビーズまたはディスク、例えばガラス、ガラス繊維、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ってもよい。抗体は、特許および科学文献に詳細に記載された当業者に公知の様々な技術を用いて、固体担体に固定されてもよい。

30

## 【0053】

特定の実施形態において、試料中のHE4a抗原ポリペプチドを検出するアッセイは、二抗体サンドイッチアッセイである。このアッセイは、最初、固体担体、一般にはマイクロタイタープレートのウェルに固定されているHE4aポリペプチドに特異的な抗体(例えば、12A2、14E2、2H5および3D8などのモノクローナル抗体)を、生物学的試料と接触させて、試料中の、抗体と反応性の抗原決定基を有する、天然由来可溶性分子が、固定化抗体に結合されて(例えば、室温では30分のインキュベーション時間が、一般に十分である)、抗原-抗体複合体または免疫複合体を形成させることにより、実施されてもよい。試料の未結合成分は、その後、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添加されるが、第二抗体の抗原結合部位は、固定化第一抗体の抗原結合部位が、HE4aポリペプチドに結合するのを拮抗阻害しない(例えば、固体担体上の固定化モノクローナル抗体と同一でない2H5または3D8などのモノクローナル抗体)。第二抗体は、本明細書に示された通り検出可能に標識することができる、そのため直接検出することができる。あるいは第二抗体は、検出可能に標識された二次(または「第二段階の」)抗-抗体の使用により、または本明細書に示された

40

50

特異的検出試薬を用いることにより間接的に検出することができる。イムノアッセイを熟知した者は二抗体サンドイッチイムノアッセイにより特定の抗原を免疫学的に検出するための数多くの試薬および構成が存在することを理解しているため、本明細書に開示された方法は、任意の特別な検出手順に限定されない。

#### 【0054】

先に記載された二抗体サンドイッチアッセイを用いる本明細書に開示された方法の特定の実施形態において、HE4a抗原ポリペプチドに特異的な第一の固定化抗体は、ポリクローナル抗体であり、HE4a抗原ポリペプチドに特異的な第二抗体は、ポリクローナル抗体である。非拮抗HE4a抗体の任意の組み合わせを、本明細書に記載された方法と共に用いることができる。モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およびそれらの組み合わせをはじめとする。本明細書に開示された方法の特定の他の実施形態において、HE4a抗原ポリペプチドに特異的な第一の固定化抗体は、モノクローナル抗体であり、HE4a抗原ポリペプチドに特異的な第二抗体は、ポリクローナル抗体である。本明細書に開示された方法の特定の他の実施形態において、HE4a抗原ポリペプチドに特異的な第一の固定化抗体は、ポリクローナル抗体であり、HE4a抗原ポリペプチドに特異的な第二抗体は、モノクローナル抗体である。本明細書に開示された方法の特定の他の非常に好ましい実施形態において、HE4a抗原ポリペプチドに特異的な第一の固定化抗体は、モノクローナル抗体であり、HE4a抗原ポリペプチドに特異的な第二抗体は、モノクローナル抗体である。例えばこれらの実施形態において、本明細書に示されたモノクローナル抗体12A2、14E2、2H5および3D8は、HE4aポリペプチド上で別個の非拮抗的抗原決定基（例えば、エピトープ）を認識するため、これらのモノクローナル抗体の任意の対による組み合わせを用い得ることに留意しなければならない。特に、特定の組み合わせは、特異的全長HE4変異体またはスプライス変異体を検出するのに有用である。本明細書に開示された方法の別の実施形態において、HE4a抗原ポリペプチドに特異的な第一の固定化抗体および/またはHE4a抗原ポリペプチドに特異的な第二抗体は、当該技術分野で公知であり本明細書で参照される抗体の種類の内いずれか、例えば限定ではなく例示として、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、免疫グロブリンV領域融合蛋白質または単鎖抗体であってもよい。当業者は、本明細書に開示された方法が、本明細書に開示および請求された方法における他の抗体形態、フラグメント、誘導体などの使用を包含することを理解するであろう。

#### 【0055】

特定の実施形態において、第二抗体は、酵素、染色剤、放射線核種、発光基、蛍光基またはビオチンなどの検出可能なレポーター部分または標識を含むことができる。任意のレポーター部分または標識は、そのようなシグナルが洗浄後の担体に残る抗体量に直接関連するまたは正比例する限り、本明細書に開示された方法と共に用いることができる。その後、固体担体に結合されたままの第二抗体の量が、特異的で検出可能なレポーター部分または標識に適した方法を用いて測定される。放射性基では、シンチレーションカウントまたはオートラジオグラフィ法が、一般に適切である。抗体-酵素コンジュゲートを、様々なカップリング技術を用いて調製することができる（例として、Scouten, W. H. (1987) A survey of enzyme coupling techniques. Methods in Enzymology 135, 30-65参照）。分光法を用いて、染色剤（例えば酵素反応での発色生成物）、発光基および蛍光基を検出することができる。ビオチンは、異なるレポーター基（一般には、放射性もしくは蛍光基、または酵素）に結合するアビジンまたはストレプトアビジンを用いて検出することができる。酵素のレポーター基は、一般に基質の添加（一般には特定の期間）と、その後の反応生成物の分光分析、分光光度分析または他の分析により検出することができる。標準物および標準的付加を用い、周知技術を利用して試料中の抗原レベルを測定することができる。

#### 【0056】

別の実施形態において、本明細書に開示された方法は、生物学的供給源または対象から

の生物学的試料中の免疫特異的に反応性の抗体の検出により卵巣癌の存在についてスクリーニングするための、本明細書に示された H E 4 a 抗原ポリペプチドの使用を企図する。この実施形態によれば、H E 4 a 抗原ポリペプチド（または本明細書に示されたトランケート型 H E 4 a 抗原ポリペプチドをはじめとするそのフラグメントまたは変異体）は、検出可能に標識され、生物学的試料と接触させて、試料中の可溶性形態の天然由来抗体の H E 4 a 抗原ポリペプチドへの結合を検出する。例えば H E 4 a 抗原ポリペプチドは、即座に検出可能な（例えば、放射性標識された）アミノ酸のインビトロ翻訳の間に取り込みなどの周知方法と協調的に本明細書に開示された配列を用いることにより、または先に記載されたような他の検出可能なレポーター部分を使用することにより、生合成的に標識することができる。本明細書に開示された H E 4 a 融合ポリペプチドなどの特定の H E 4 a ポリペプチドが、特に免疫原性であるペプチドを提供することができ、そのため特異的で検出可能な抗体を生じ得ることを、該方法のこの実施形態が企図することを、当業者は即座に理解するであろう。例えばこの理論によれば、特定の H E 4 a 融合ポリペプチドは、貪欲な免疫反応を誘発する「非自己」抗原を表すことができ、融合ドメインを欠く H E 4 a ポリペプチドは、体液または細胞を介した免疫作用を容易に誘発しない、より類似した「自己」抗原として免疫系により認められ得る。

10

**【 0 0 5 7 】**

本明細書に開示された方法による悪性状態の存在についてのスクリーニング方法は、対象からの生物学的試料中の 1 種を超える腫瘍関連マーカーを検出することにより更に向上させることができる。したがって開示された方法は、天然由来成分と H E 4 a 抗原ポリペプチドに特異的な抗体との反応性を検出することに加えて、当該技術分野で公知の確立された方法および開示された方法を利用して悪性状態の少なくとも 1 種の追加的可溶性マーカーを検出することも包含する。先に述べられた通り、現在は、即座に得られる生物学的液体の試料中で検出可能である可溶性腫瘍関連抗原が複数存在する。

20

**【 0 0 5 8 】**

卵巣癌を有する確率の高い患者を同定する例示的スクリーニング方法は、一般に、卵巣癌中で選択的に過剰発現される複数のバイオマーカーの発現を、患者の身体試料中で検出することを含む。バイオマーカーの過剰発現は、患者が卵巣癌を有する確率が高いことを示す。本開示の方法は、例えば第一のアクセステップが、第一のバイオマーカー（例えば、H E 4 / H E 4 a）またはバイオマーカーパネルの発現を検出するために実施される、「2ステップ」分析を含み得る。第一のバイオマーカーまたはバイオマーカーパネルが、過剰発現されると、第二のアクセステップが実施されて、第二のバイオマーカーまたはバイオマーカーパネルの発現を検出する。第一および第二のバイオマーカーまたはバイオマーカーパネルの過剰発現が、患者が卵巣癌を有する可能性が高いことを示す。

30

**【 0 0 5 9 】**

あるいは、H E 4 a ポリペプチドをコードする核酸配列は、標準の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）技術を用いて検出することができる。適切なプローブおよびプライマーは、本明細書に示された H E 4 a c D N A 配列に基づき、当業者により設計することができる。アクセシは、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、そのような生物体から調製された抽出物および生存する生物体内に見出された液体、から得られた様々な試料のいずれかを用いて実施することができる。

40

**【 0 0 6 0 】**

実施例で用いられる標準的な組換え D N A および分子クローニング技術は、当該技術分野で周知である。

**【 0 0 6 1 】**

本明細書で開示された 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、そして本明細書に開示された H E 4 a をコードする核酸配列を用いて、当業者は、周知の方法により特異的な抗体を産生し、特徴づけるために用いられ得る組換え H E 4 a ポリペプチドを調製することもできる。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

50

ホ乳類細胞、酵母、細菌、または他の細胞中で発現され得る。無細胞翻訳系を用いて、本明細書に開示された H E 4 a ポリペプチド D N A コード領域から得られた R N A を用いてそのような蛋白質を産生することもできる。原核生物および真核生物宿主と共に使用される適切なクローニングおよび発現ベクターは、過去に記載されており、当業者に周知である。本発明の好ましい実施形態において、H E 4 a ポリペプチドは、ホ乳類細胞中で発現される。

【 0 0 6 2 】

それゆえ本発明は、H E 4 a 抗原ポリペプチドをコードする単離された核酸分子、またはそのような H E 4 a ポリペプチドをコードする核酸にハイブリダイズし得る核酸分子、またはそれに相補的な配列を有する核酸分子を提供する。

10

【 0 0 6 3 】

変異体は、ネイティブ H E 4 a 抗原ポリペプチドまたはその部分をコードするポリヌクレオチド配列に対して、好ましくは少なくとも約 7 0 % の同一性、より好ましくは少なくとも約 8 0 ~ 8 5 % の同一性、最も好ましくは少なくとも約 9 0 %、9 2 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % の同一性を示す。% 同一性は、配列を当業者に周知のコンピュータアルゴリズム、例えば A l i g n または B L A S T アルゴリズム ( A l t s c h u l S . F . ( 1 9 9 1 ) A m i n o a c i d s u b s t i t u t i o n m a t r i c e s f r o m a n i n f o r m a t i o n t h e o r e t i c p e r s p e c t i v e . J o u r n a l o f M o l e c u l a r B i o l o g y 2 1 9 : 5 5 5 - 5 6 5 ; H e n i k o f f S , H e n i k o f f J G . A m i n o a c i d s u b s t i t u t i o n m a t r i c e s f r o m p r o t e i n b l o c k s . P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 1 9 9 2 N o v 1 5 ; 8 9 ( 2 2 ) : 1 0 9 1 5 - 9 , N C B I の ウェブサイト ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST> ) から入手可能 ) を用いて比較することにより即座に測定することができる。

20

【 0 0 6 4 】

特定の変異体は、ネイティブの遺伝子に対して実質的に相同性である。そのようなポリヌクレオチド変異体は、ネイティブ H E 4 a 抗原をコードする天然由来 D N A または R N A 配列 ( または相補配列 ) に対して中等度にストリンジェントな ( m o d e r a t e l y s t r i n g e n t ) 条件下でハイブリダイズすることが可能である。適切な、中等度にストリンジェントな条件には、例えば、以下のステップまたはそれらの均等なステップが含まれる : 5 x S S C、0 . 5 % S D S、1 . 0 m M E D T A ( p H 8 . 0 ) の溶液中で予備洗浄して ; 5 x S S C と共に 5 0 ~ 6 5 で一晩ハイブリダイズし ; その後、それぞれ 2 x S S C、0 . 5 x S S C および 0 . 2 x S S C を含有する 0 . 1 % S D S を用いて 6 5 で 2 0 分間の洗浄を 2 回。追加的ストリンジェンシーでは、条件は例えば、6 0 の 0 . 1 x S S C および 0 . 1 % S D S 中で 1 5 分間の洗浄、または均等な条件が含まれてもよい。当業者は、該当する特定の核酸に場合により選択的となる適度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を設定するために、日常的な事柄として変動され得るパラメータを、即座に理解し、更に、そのような条件がハイブリダイゼーションに關与する特定の核酸配列の関数となり得ることを理解するであろう。

30

40

【 0 0 6 5 】

H E 4 a ポリペプチド、または本発明により用いられる任意の他の H E 4 a ポリペプチドをコードする核酸は、非限定的に、H E 4 a ポリペプチドのコード配列のみ ; H E 4 a ポリペプチドのコード配列および追加的コード配列 ; H E 4 a ポリペプチドのコード配列 ( 場合により追加的コード配列 ) および非コード配列、例えば H E 4 a ポリペプチドのコード配列のイントロンまたは非コード配列 5 ' および / または 3 ' を含むことができ、それらは例えば、限定する必要はないが、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、他の転写調節配列、レプレッサー結合配列、翻訳調節配列、または任意の他の調節核酸配列となり得る 1 種以上の調節核酸配列を更に含むことができる。つまり用語「 H

50

「E 4 a ポリペプチドをコードする核酸」は、ポリペプチドのコード配列のみを含む核酸、ならびに追加的コードおよび/または非コード配列（複数可）を含む核酸を包含する。

【0066】

本発明は、更に、H E 4 a ポリペプチド、例えば配列番号 H E 4 の推定されたアミノ酸配列を有するヒト H E 4 a ポリペプチド、のフラグメント、類似体および誘導体をコードする本明細書に記載された核酸の変異体に関する。H E 4 a をコードする核酸の変異体は、核酸の天然由来対立遺伝子もしくはスプライス変異体、または非天然由来変異体であってもよい。当該技術分野で公知の通り、対立遺伝子変異体は、コードされた H E 4 a ポリペプチドの機能を実質的に変化させない、1種以上のヌクレオチドの置換、欠失または付加のうち少なくとも1つを有し得る核酸配列の代替形態である。H E 4 a の変異体および誘導体は、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得てもよい。ネイティブアミノ酸配列の改変は、複数の従来法のいずれかにより実行されてもよい。突然変異は、制限部位がフランクされてネイティブ配列のフラグメントがライゲートされた、突然変異配列を含む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することができる。ライゲーションの後、得られた制限配列は、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。

10

【0067】

あるいは、オリゴヌクレオチド指向性部位特異的突然変異誘発 ( o l i g o n u c l e o t i d e - d i r e c t e d s i t e - s p e c i f i c m u t a g e n e s i s ) 手順を用いて、当業者に周知の通り、所定のコドンが置換、欠失または挿入により改変されている場合がある、改変された遺伝子を提供することができる。

20

【0068】

生物学的活性に必要なとらないアミノ酸残基もしくは配列の様々な付加もしくは置換、または末端もしくは内部残基もしくは配列の欠失をコードする均等な DNA 構築物も、本発明により包含される。例えば、生物学的活性にとって肝要としない C y s 残基をコードする配列は、C y s 残基を欠失または他のアミノ酸と交換させるよう改変させて、復元の際に間違った分子内ジスルフィド架橋が形成するのを防止することができる。他の均等物は、隣接する二塩基性アミノ酸残基を修飾して、K E X 2 プロテアーゼ活性が存在する酵母系における発現を増進することにより、調製することができる。例として、欧州特許第 2 1 2 , 9 1 4 号には、部位特異的突然変異を利用して、蛋白質中の K E X 2 プロテアーゼ処理部位を不活性化することが開示される。K E X 2 プロテアーゼ処理部位は、残基を欠失、付加または置換して A r g - A r g 、 A r g - L y s 、および L y s - A r g 対を改変し、これらの隣接する塩基性残基の出現を排除することにより不活性化される。L y s - L y s 対は、K E X 2 切断を著しく受け難く、A r g - L y s または L y s - A r g から L y s - L y s への変換は、K E X 2 部位を不活性化する保存的で好ましいアプローチを表す。

30

【0069】

適切な DNA 配列（複数可）が、様々な手順により選択された宿主細胞に適した複数の周知ベクターのいずれかに挿入されてもよい。一般的には DNA 配列は、当該技術分野で公知の手順により、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位（複数可）に挿入される。DNA リガーゼ、DNA ポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼなどを含む酵素反応のためのクローニング、DNA 単離、増幅および精製の標準技術、および様々な分離技術は、公知であり、当業者に一般的に用いられる。

40

【0070】

ホ乳類発現系の例としては、G l u z m a n Y . S V 4 0 - t r a n s f o r m e d s i m i a n c e l l s s u p p o r t t h e r e p l i c a t i o n o f e a r l y S V 4 0 m u t a n t s . C e l l . 1 9 8 1 J a n ; 2 3 ( 1 ) : 1 7 5 - 8 2 により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 細胞株が挙げられる。ホ乳類発現ベクターは、複製起点、適切なプロモーターおよ

50

びエンハンサーを含み、任意の必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与部位および受容部位、転写末端配列、ならびに5'フランキング非転写配列も含む。例えばSV40スプライスおよびポリアデニル化部位から得られる、DNA配列を用いて、必要とされるに非転写遺伝要素を提供してもよい。宿主細胞への該構築物の導入は、非限定的に例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストランを介したトランスフェクション、または電気穿孔をはじめとする、当業者に熟知されている様々な方法により実行することができる(Davis, L.G., Dibner, M.D. and Battey, J.F.: Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier, New York, 1986)。

10

**【0071】**

本発明のHE4aポリペプチドは、非修飾ポリペプチドであってもよく、あるいは例えばグリコシル化、リン酸化、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー修飾などを含む脂肪アシル化、ホスファチジルイノシトール特異性ホスホリパーゼcを介した加水分解などのホスホリパーゼ切断、プロテアーゼ切断、脱リン酸化、または任意の他のタイプの蛋白質翻訳後修飾、例えば共有化学結合の形成もしくは切断を含む修飾により、翻訳後修飾されているポリペプチドであってもよい。

**【0072】**

HE4aポリペプチド、HE4a抗原ポリペプチドまたはHE4a融合蛋白質を参照する場合の用語「フラグメント」、「誘導體」および「類似体」は、そのようなポリペプチドと同じ生物学的機能および/または活性を本質的に保持する任意のHE4aポリペプチドを指す。つまり類似体は、HE4a抗原ポリペプチドアイソフォーム、例えば分化により翻訳後修飾されたHE4aポリペプチドまたはスプライス変異体などの変異体を含んでもよい。当該技術分野で周知の通り、「スプライス変異体」は、RNA転写産物の異なる細胞内プロセッシングから生じるポリペプチドの変異体または別の形態を含む。例えば2種の異なるmRNA種は、互いに、1つのmRNA種内の特定のエクソンに対応する配列の全てまたは一部を含むこと、および他の種のもが存在しないことのみが異なる、お互いのスプライス変異体となり得る。当業者に理解される通り、他の構造的関連性は、一般にスプライス変異体とみなされるmRNA種間に存在し得る。HE4aポリペプチドは、プロ蛋白質を更に含み、プロ蛋白質部分を切断して、活性HE4aポリペプチドを産生することにより活性化され得る。

20

30

**【0073】**

HE4aポリペプチドまたはHE4a抗原ポリペプチドのフラグメント、誘導體および類似体の生物学的機能および/または活性は、非限定的に、本明細書に開示された通り、対象における悪性状態の存在をスクリーニングする方法におけるマーカとしてのそのようなポリペプチドの使用を含む。例えば、可溶性形態であり、HE4aポリペプチドに特異的な少なくとも1種の抗体と反応性のある抗原決定基を有する、天然由来分子を、対象からの試料中で検出することにより、当業者は、HE4aポリペプチドの生物学的機能および/または活性をモニタリングしてもよい。更に、特定の実施形態において本発明のスクリーニング方法が、可溶性形態であり、(i)悪性状態を有する疑いのある第一の対象からの第一の生物学的試料、および(ii)悪性状態を有さないことが知られている第二の対象からの第二の生物学的試料、のそれぞれのHE4aポリペプチドに特異的な少なくとも1種の抗体と反応性のある抗原決定基を有する、天然由来の検出可能な分子の相対量、レベルおよび/または総量を比較することに向けられる。したがって生物学的試料中のHE4aポリペプチドの相対量的な存在は、HE4aポリペプチドの生物学的機能および/または活性であってもよいが、そのような機能および/または活性は、そのように限定されてはならない。

40

**【0074】**

HE4aポリペプチドのフラグメント、誘導體もしくは類似体は、(i)アミノ酸残基の1つ以上が、保存もしくは非保存のアミノ酸残基(好ましくは保存的アミノ酸残基)で

50

置換されたもの；(ii) HE4aポリペプチドの精製に用いられ得るアミノ酸またはプロテイン配列をはじめとする、追加のアミノ酸がHE4aポリペプチドに融合されているもの；または(iii) トランケート型HE4aポリペプチドであってもよい。そのようなフラグメント、誘導体および類似体は、本明細書内の技術の当業者の範囲内と思われる。

#### 【0075】

トランケート型HE4aポリペプチドは、全長未満のHE4aポリペプチドを含む任意のHE4aポリペプチド分子であってもよい。本発明により提供されたトランケート型分子は、トランケート型生体ポリマーを包含してもよく、本発明の好ましい実施形態において、そのようなトランケート型分子は、トランケート型核酸分子またはトランケート型ポリペプチドであってもよい。トランケート型核酸分子は、公知または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し、そのような公知または記載された核酸分子は、当業者がそれを完全長分子とみなす限り、天然由来、合成または組換え核酸分子であってもよい。つまり例えば遺伝子配列に対応するトランケート型核酸分子は、完全長未満の遺伝子を含み、該遺伝子は、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他の調節配列、フランクング配列など、ならびに遺伝子の一部として認識される他の機能的および非機能的配列を含む。別の例において、mRNA配列に対応するトランケート型核酸分子は、全長未満のmRNA転写産物を含み、それは様々な翻訳および非翻訳領域、ならびに他の機能的および非機能的配列を含んでいてもよい。別の好ましい実施形態において、トランケート型分子は、特定の蛋白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。

10

20

#### 【0076】

本明細書で用いられる「欠失」は、当業者に理解される共通の意味を有し、例えば本明細書に示されたトランケート型分子の場合と同様に、対応する全長分子に関して末端または非末端領域の配列の部分を1つ以上欠く分子を指すことができる。核酸分子またはポリペプチドなどの直鎖状生体ポリマーであるトランケート型分子は、分子のいずれかの末端の欠失または分子の非末端領域の欠失の1つ以上を有していてもよく、そのような欠失は、1~1500の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基、好ましくは1~500の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基、より好ましくは1~300の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基であってもよい。

30

#### 【0077】

当該技術分野で公知の通り、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への保守的アミノ酸置換を、第二のポリペプチドの配列を比較することにより測定される。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、または%同一性であっても、BLASTアルゴリズムなどの当業者に周知のコンピュータアルゴリズムを用いて配列を比較することにより即座に測定することができる。他の有用なコンピュータアルゴリズムの例は、AlignおよびFASTAなどのプログラムで用いられるものがあり、例えばGenestream internet website of the Institut de Genetique Humaine, Montpellier, France ([www2.igh.cnrs.fr/home\\_eng.html](http://www2.igh.cnrs.fr/home_eng.html))にアクセスしてもよい。本発明のポリペプチドのフラグメントまたは部分は、ペプチド合成により対応する全長ポリペプチドを製造するために用いられてもよく、それゆえフラグメントは、全長ポリペプチドを製造するための中間体として用いられてもよい。

40

#### 【0078】

用語「単離された」は、その材料が本来の環境（例えば、それが天然由来であれば、天然の環境）から取り出されていることを意味する。例えば、生存する動物の体内に存在する天然由来ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、単離されていないが、自然系に共存する材料の一部または全てから分離された同じポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、単離されている。そのようなポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、組成物の一部とな

50

り得、そのような組成物が自然環境の一部ではない場合でも単離することができる。

【0079】

アフィニティー技術は、本発明の方法による使用のためにHE4aポリペプチドを単離する状況において特に有用となり、HE4aポリペプチドとの特異的結合相互作用を発揮して分離を実行する任意の方法を含むことができる。例えばHE4aポリペプチドは、共有結合的に付着されたオリゴ糖部分を含み得るため、レクチンによる炭水化物の結合を可能にする条件下での適切な固定化レクチンへのHE4aポリペプチドの結合などのアフィニティー技術は、特に有用なアフィニティー技術となり得る。他の有用なアフィニティー技術は、HE4aポリペプチドを単離するための免疫学的技術を包含し、その技術は、抗原の抗体結合部位と、複合体中に存在する抗原決定基との特異的結合相互作用に依存する。免疫学的技術としては、限定する必要はないが、免疫アフィニティークロマトグラフィー、免疫沈殿、固相免疫吸着または他の免疫アフィニティー法が挙げられる。

10

【0080】

本明細書に記載された通り、本発明は、HE4aに融合されたポリペプチドを含む融合蛋白質を提供する。そのようなHE4a融合蛋白質は、追加のコード配列にインフレームで融合されたHE4aコード配列を有する核酸によりコードされていて、限定ではなく例として、HE4a融合蛋白質の検出、単離および/または精製を可能にする追加の機能的または非機能的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。そのようなHE4a融合蛋白質は、蛋白質間アフィニティー、金属アフィニティーもしくは電荷アフィニティーを基にしたポリペプチド精製による、またはプロテアーゼにより切断可能な融合配列を含む融合蛋白質の特異的プロテアーゼ切断によるHE4a融合蛋白質の検出、単離および/または精製を可能にして、HE4aポリペプチドを融合蛋白質から分離可能にしてもよい。

20

【0081】

つまりHE4a融合蛋白質は、HE4aに付加されたポリペプチドまたはペプチドを指すアフィニータグポリペプチド配列を含むことで、リガンドとの特異的アフィニティー相互作用を介したHE4aの検出および単離を容易にしてもよい。リガンドは、本明細書に示された特異的結合相互作用を通してアフィニータグが相互作用し得る、任意の分子、受容体、対抗受容体、抗体などであってもよい。そのようなペプチドとしては、例えば、米国特許第5,011,912号およびT. P. Hopp, B. Gallis and K. S. Prickett (1988) A short polypeptide marker sequence useful in protein identification and purification. Bio/Technology 6:1204-1210に記載されたポリ-Hisもしくは抗原同定ペプチド、またはXPRESS(商標)エプトータグ(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)が挙げられる。アフィニティー配列は、細菌宿主の場合にマーカに縮合された成熟ポリペプチドの精製をもたらす、例えばpBAD/His(Invitrogen)もしくはpQE-9ベクターにより供給される、ヘキサ-ヒスチジンタグであってもよく、または例えばアフィニティー配列は、ホ乳類宿主、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)タグであってもよい。HAタグは、インフルエンザヘマグルチニン蛋白質から得られた、抗体に認識されるエピトープに対応する(Wilson IA, Niman HL, Houghten RA, Cherenson AR, Connolly ML, Lerner RA. The structure of an antigenic determinant in a protein. Cell. 1984 Jul;37(3):767-78)。

30

40

【0082】

HE4a融合蛋白質は、特別な実施形態において、そして以下により詳細に記載される通り、HE4aに付加された免疫グロブリン定常領域ポリペプチドを更に含むことで、HE4aの検出、単離および/または位置決定を容易にする。免疫グロブリン定常領域ポリ

50

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、本明細書に示されたHE4a融合蛋白質への免疫グロブリン(Ig)定常領域ドメインの含有は、利点、例えば特定の宿主(即ち、「自己」対「非自己」)において用いられる場合には特定のIg領域の免疫原性/非免疫原性に関連する利点、または融合蛋白質の単離および/もしくは検出を容易にする利点を提供し得る。Ig融合蛋白質のこれらおよび他の利点は、当業者により理解されよう。抗体から得られたポリペプチド(Fcドメインを含む)の様々な部分に融合された異種ペプチドを含む融合蛋白質の一般的調製は、例えば、Ashkenazi A, Marsters SA, Capon DJ, Chamow SM, Figari IS, Pennica D, Goeddel DV, Palladino MA, Smith DH. Protection against endotoxic shock by a tumor necrosis factor receptor immunoadhesin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Dec 1; 88(23): 10535-9、およびByrn et al. (Byrn RA, Mordenti J, Lucas C, Smith D, Marsters SA, Johnson JS, Cossum P, Chamow SM, Wurm FM, Gregory T, et al. Biological properties of a CD4 immunoadhesin. Nature. 1990 Apr 12; 344(6267): 667-70に記載される。HE4a; Fc融合蛋白質をコードする遺伝子融合物が、適切な発現ベクターに挿入される。本発明の特定の実施形態において、HE4a; Fc融合蛋白質が、同じ方法で抗体分子を組み立てて、そこで鎖間ジスルフィド結合がFcポリペプチドを形成し、二量体HE4a融合蛋白質を生成してもよい。

#### 【0083】

HE4aをコードする配列にインフレームに結合したDNA配列によりコードされた免疫グロブリンV領域ドメインを含む融合ポリペプチドのおかげで、予め選択された抗原への特異的結合アフィニティを有するHE4a融合蛋白質も、本明細書に示された変異体およびそのフラグメントを含め、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蛋白質の構築のための一般的方策は、例えば、欧州特許第0318554号; 米国特許第5,132,405号; 同第5,091,513号; および同第5,476,786号に開示される。

#### 【0084】

本発明の核酸は、所望のアフィニティ特性を有する他のポリペプチド、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどの酵素に融合したHE4aポリペプチドを含む融合蛋白質もコードし得る。別の実施例として、HE4a融合蛋白質は、スタフィロコッカス・アウレウスプロテインAポリペプチドに融合したHE4aポリペプチドも含んでいてもよく; プロテインAをコードする核酸、および免疫グロブリン定常領域へのアフィニティを有する融合蛋白質を構築する際のそれらの使用は、例えば米国特許第5,100,788号に概ね開示される。HE4a融合蛋白質の構築のための他の有用なアフィニティポリペプチドは、例えば国際公開第89/03422号パンフレット; 米国特許第5,489,528号; 同第5,672,691号; 国際公開第93/24631号パンフレット; 米国特許第5,168,049号; 同第5,272,254号およびその他に開示されたストレプトアビジン融合蛋白質、ならびにアビジン融合蛋白質(例えば、欧州特許第511,747号参照)を含んでいてもよい。本明細書および引用された参考資料に示される通り、HE4aポリペプチド配列は、全長融合ポリペプチドであってもよく、あるいはその変異体またはフラグメントであってもよい、融合ポリペプチド配列に融合されていてもよい。

#### 【0085】

本発明は、融合蛋白質を細胞核に向かわせるポリペプチド配列を含むことで、小胞体(ER)の内腔に常在するか、古典的なER-ゴルジ分泌経路(例えば、von Heijne, G. (1990) The Signal Peptide. J. Membr

10

20

30

40

50

. Biol. 115, 195-201参照)を介して細胞から分泌されるか、原形質膜に取り込まれるか、膜貫通型細胞表面受容体の細胞質ドメインを含む特異的細胞質成分と会合するか、または当業者に熟知された様々な公知細胞内蛋白質分類メカニズムのいずれかにより特定の細胞小器官位置に向かわせる、HE4a融合蛋白質も企図する(例として、Rothman JE. Mechanisms of intracellular protein transport. Nature. 1994 Nov 3; 372(6501):55-63., Advani RJ, Bae HR, Bock JB, Chao DS, Doung YC, Prekeris R, Yoo JS, Scheller RH. Seven novel mammalian SNARE proteins localize to distinct membrane compartments. J Biol Chem. 1998参照)。したがって、これらおよび関連の実施形態は、該当するポリペプチドを、所定の細胞内、膜または細胞外位置決定に案内する本発明の組成物および方法により包含される。

#### 【0086】

本発明は、本発明の核酸を含むベクターおよび構築物にも関し、詳細には先に示された本発明による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た宿主細胞、ならびに組換え技術による、本発明のHE4aポリペプチドおよび融合蛋白質、またはそれらのフラグメントもしくは変異体の製造にも関する。HE4a蛋白質は、適切なプロモーターの制御下、ホ乳類細胞、酵母、細菌または他の細胞中で発現させることができる。無細胞翻訳系を、本発明のDNA構築物から得られたRNAを用いてそのような蛋白質を製造するのに用いることもできる。

#### 【0087】

一般に組換え発現ベクターは、宿主細胞の形質転換を可能にする複製起点および選択マーカ、例えばE.コリのアンピシリン耐性遺伝子およびS.セレビスエTRP1遺伝子、ならびに下流の構造配列の転写を指向する高発現遺伝子から得られたプロモーターを含む。そのようなプロモーターは、オペロンをコードする解糖酵素、とりわけ3-ホスホグリセラートキナーゼ(PGK)、-ファクター、酸ホスファターゼ、または熱ショック蛋白質などから得ることができる。その非相同的構造配列は、適切な時期に、翻訳開始および終結配列を含んで組み立てられる。場合により非相同配列は、所望の特徴、例えば発現された組換え産物の安定化または簡便な精製、を付与するN-末端同定ペプチドを含む融合蛋白質をコードすることができる。

#### 【0088】

細菌使用に有用な発現構築物は、発現ベクターに、機能的プロモーターを有する作動可能なリーディングフェーズ(operable reading phase)における適切な翻訳開始および終結シグナルと一緒に所望の蛋白質をコードする構造DNA配列を挿入することにより、構築される。該構築物が1つ以上の表現型の選択マーカおよび複製起点を含むことで、ベクター構築物を確実に維持し、所望により、宿主内で増幅させることができる。形質転換に適した原核生物宿主としては、E.コリ、バシラス・サブチリス、サルモネラ・ティフィムリウム、ならびにシュドモナス属、ストレプトマイセス属およびスタフィロコッカス属内の種々の種が挙げられるが、選択の問題として他の種を用いてもよい。宿主内で複製可能および生存可能である限り、いずれかの他のプラスミドまたはベクターが用いられてもよい。

#### 【0089】

代表的であるが非限定的な例として、細菌使用に有用な発現ベクターは、周知のクロニングベクターpBR322(ATCC 37017)の遺伝要素を含む市販のプラスミドから得られる、選択マーカおよび細菌の複製起点を含むことができる。そのような商業的ベクターとしては、例えば、pKK223-3(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)およびGEM1(Promega Biotech, Madison, Wis., USA)が挙げられる。これらのp

B R 3 2 2 「バックボーン」区分が、適切なプロモーターおよび発現させられるべき構造配列と組み合わせられる。

【 0 0 9 0 】

適切な宿主菌株の形質転換および適切な細胞密度への宿主菌株の増殖の後、選択されたプロモーターが、本明細書に示された調節されたプロモーターであるならば、適切な手段（例えば、温度シフトまたは化学的誘発）により誘発され、細胞を更なる期間、培養させる。細胞は、典型的には、遠心分離により回収され、物理的または化学的手段により破壊され、得られた粗抽出物を更なる精製のために保持する。蛋白質の発現において用いられる微生物細胞は、冷凍 - 解凍サイクル、音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用をはじめとする任意の従来法によって破壊することができ、そのような方法は、当業者に周知である。

10

【 0 0 9 1 】

つまり、例えば本明細書に示された本発明の核酸は、H E 4 a 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、様々な発現ベクター構築物の任意の1つに含まれてもよい。そ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のDNA配列、例えばS V 4 0 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の組み合わせ由来のベクター、ウイルスDNA、例えばワクシニアウイルス、アデノウイルス、家禽ポックスウイルスおよび仮性狂犬病が挙げられる。しかし、宿主において複製可能および生存可能である限り、任意の他のベクターを組換え発現構築物の調製に用いてもよい。

20

【 0 0 9 2 】

適切なDNA配列（複数可）は、様々な手順によりベクター内に挿入され得る。一般的にDNA配列は、当該技術分野で公知の手順により、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位（複数可）に挿入される。DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼなどを含む酵素反応のためのクローニング、DNA単離、増幅および精製の標準技術、ならびに様々な分離技術は、公知であり、当業者に一般的に用いられる。複数の公知の標準技術のうちの任意の1つ以上を、用いることができる。

【 0 0 9 3 】

発現ベクターにおけるDNA配列は、mRNA合成に向かわせる少なくとも1種の適切な発現制御配列（例えば、プロモーターまたは調節されたプロモーター）と作動可能に連結される。そのような発現制御配列の代表的な例としては、LTRまたはS V 4 0 のプロモーター、E . コリ lac または trp、ファージ P<sub>L</sub> プロモーター、および原核生物もしくは真核生物細胞またはそれらのウイルスにおいて遺伝子の発現を制御することで知られる他のプロモーターが挙げられる。プロモーター領域は、選択マーカを有するCAT（クロラムフェニコルトランスフェラーゼ）ベクターまたは他のベクターを用いて、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が、p K K 2 3 2 - 8 および p C M 7 である。特定の命名された細菌プロモーターとしては、lac、lacZ、T3、T7、g p t、P<sub>R</sub>、P<sub>L</sub> 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前初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、S V 4 0 初期および後期プロモーター、レトロウイルス由来のLTR、ならびにマウスメタロチオネイン - I プロモーターが挙げられる。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、当業者のレベルに十分含まれ、H E 4 a ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結された少なくとも1種のプロモーターまたは調節されたプロモーターを含む特定の特に好ましい組換え発現構築物の調製が、本明細書に記載される。

30

40

【 0 0 9 4 】

先に述べられた通り、特定の実施形態において、ベクターは、レトロウイルスベクターなどのウイルスベクターであってもよい。例えばレトロウイルスプラスミドベクターを得ることができるレトロウイルスとしては、非限定的に、モロニー Maus 白血病ウイルス；脾壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルスのようなレトロウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、ニワトリ白血病ウイルス、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

50

イルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスが挙げられる。

【0095】

該ウイルスベクターは、1つ以上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、非限定的に、レトロウイルスLTR；SV40プロモーター；およびMiller, et al., *Biotecniques* 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、または任意の他のプロモーター(例えば、非限定的にヒストン、pol III、および -アクチンプロモーターをはじめとする真核生物細胞プロモーターなどの細胞プロモーター)が挙げられる。利用され得る別のウイルスプロモーターとしては、非限定的に、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。適切なプロモーターの選択は、本明細書に含まれる教示から当業者に明白となり、先に記載された調節されたプロモーターまたはプロモーターのいずれかの1つであってもよい。

10

【0096】

該レトロウイルスプラスミドベクターを用いて、パッケージング細胞株を形質導入し、プロデューサー細胞株を形成する。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、非限定的に、全体が本明細書に参考として組み入れられた、Miller, Human Gene Therapy, 1:5~14 (1990)に記載の、PE501、PA317、 -2、 -AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、CRE、CRIP、GP+E-86、GP+envAM12およびDAN細胞株が挙げられる。該ベクターは、当該分野で公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。そのような手段としては、非限定的に、電気穿孔、リボソームの使用、およびリン酸カルシウム沈殿が挙げられる。1つの代替法において、該レトロウイルスプラスミドベクターをリボソーム内に封入するか、または脂質に結合させ、その後、宿主に投与してもよい。

20

【0097】

該プロデューサー細胞株は、HE4aポリペプチドまたは融合蛋白質をコードする核酸配列(複数可)を含む感染性レトロウイルスベクター粒子を産生する。その後、そのようなレトロウイルスベクター粒子を用いて、インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、真核生物細胞を形質導入することができる。形質導入された真核生物細胞は、HE4aポリペプチドまたは融合蛋白質をコードする核酸配列(複数可)を発現する。形質導入され得る真核生物細胞としては、非限定的に、胚幹細胞、胚癌細胞に加え、造幹血細胞、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様々な他の培養に適した細胞株が挙げられる。

30

【0098】

ウイルスベクターを用いて組換えHE4a発現構築物を調製する本発明の実施形態の別の例として、1つの好ましい実施形態において、HE4aポリペプチドまたは融合蛋白質の発現に向かわせる組換えウイルス構築物により形質導入された宿主細胞は、ウイルス出芽の間にウイルス粒子により取り込まれる宿主細胞膜の部分から得られる、発現されたHE4aポリペプチドまたは融合蛋白質を含むウイルス粒子を産生することができる。別の好ましい実施形態において、HE4aをコードする核酸配列は、Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology Vol. 39, C. D. Richardson, Editor, Human Press, Totowa, N.J., 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, N.Y., 1992, p16-32 to 1648に記載され

40

50

た通り、バキュロウイルスシャトルベクターにクローニングされ、その後、バキュロウイルスで組換えて、例えばSf9宿主細胞を感染するのに用いられる組換えバキュロウイルス発現構築物を生成させる。

#### 【0099】

別の態様において、本発明は、先に記載された組換えHE4a発現構築物を含む宿主細胞に関する。宿主細胞は、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ってもよい、本発明のベクターおよび/または発現構築物で遺伝子操作（形質導入、形質転換またはトランスフェクト）されている。該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、ファージなどの形態であってもよい。操作された宿主細胞は、適宜、プロモーターを活性化させる、形質転換物を選択する、または特定の遺伝子、例えばHE4aポリペプチドまたはHE4a融合蛋白質をコードする遺伝子を増幅させる、改変された従来の栄養培地で培養することができる。発現のために選択される特定の宿主細胞の培養条件、例えば温度、pHなどは、当業者により即座に明白となろう。

10

#### 【0100】

宿主細胞は、高等な真核生物細胞、例えばホ乳類細胞、もしくは下等な真核生物細胞、例えば酵母細胞であってもよく、または宿主細胞は、原核生物細胞、例えば細菌細胞であってもよい。本発明による適切な宿主の代表的例としては、非限定的に、E.コリ、ストレプトマイセス、サルモネラ・ティフィムリウムなどの細菌細胞；酵母細胞などの真菌細胞；Drosophila 52およびSpodoptera Sj9などの昆虫細胞；CHO細胞、COS細胞、または293細胞などの動物細胞；アデノウイルス；植物細胞、またはインビトロ増殖に既に適用された、もしくはデノボで樹立された任意の適切な細胞が挙げられる。適切な宿主の選択は、本明細書の教示があれば当業者の範囲内であると思われる。

20

#### 【0101】

様々なホ乳類細胞培養系を用いて、組換え蛋白質を発現することもできる。それゆえ本発明は、一部として、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種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り、組換えHE4aポリペプチドを産生する方法に向けられる。特定の実施形態において、プロモーターは、本明細書に示された調節されたプロモーター、例えばテトラサイクリンで抑制可能なプロモーターであってもよい。特定の実施形態において、組換え発現構築物は、本明細書に示された組換えウイルス発現構築物である。ホ乳類発現系の例としては、Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. Cell. 1981 Jan; 23(1): 175-82に記載されたサル腎臓線維芽細胞のCOS-7株、および適合可能なベクターを発現し得る他の細胞株、例えばC127、3T3、CHO、HeLa、およびBHK細胞株が挙げられる。ホ乳類発現ベクターは、例えばMRA発現構築物の調製に関して本明細書に記載された通り、複製起点、適切なプロモーターおよびエンハンサーを含み、そして任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与および受容部位、転写終結配列、および5'フランキング非転写配列を含む。SV40スプライス部位およびポリアデニル化部位から得られるDNA配列を使用して、必要とされる非転写遺伝要素を提供してもよい。宿主細胞への構築物の導入は、非限定的に、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストランを介したトランスフェクション、または電気穿孔法をはじめとする、当業者に熟知された様々な方法により実行することができる(Davis, L.G., Dibner, M.D. and Battey, J.F.: Molecular Biology内のBasic Methods. Elsevier, New York, 1986)。

30

40

#### 【0102】

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）、またはそれらから得られた融合蛋白質は、インタクト宿主細胞；細胞膜、細胞内小胞体もしくはは

50

他の細胞内オルガネラなどのインタクトオルガネラ；あるいは非限定的に細胞ホモジネートもしくは溶解物、単層および多層膜小胞、または他の調製物をはじめとする破壊された細胞調製物の形態の免疫原として有用となり得る。あるいは発現された組換え抗原ポリペプチドまたは融合蛋白質は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、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、免疫アフィニティークロマトグラフィーをはじめとする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はじめとする方法により、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。蛋白質リフォールディングステップは、必要に応じて、成熟蛋白質の構成を完成させる際に用いることができる。最後に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を、最終的な精製ステップに用いることができる。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）または融合蛋白質は、当業者により即座に実践され得る日常的な抗体スクリーニング用の複数のアッセイ構成のいずれかにおいて、標的抗原としても有用となり得る。

10

#### 【0103】

つまり、本発明の方法において用いられる特異的抗体の産生のための免疫原であるHE4a抗原ポリペプチド（またはHE4aポリペプチド）は、天然で精製された生成物もしくは化学合成手順の生成物であってもよく、または原核細胞宿主、もしくは好ましくは真核細胞宿主から組換え技術により生成されてもよい。組換え生成手順において用いられる宿主に応じて、本発明のポリペプチドは、当該技術分野で公知であり本明細書に示された通り、グリコシル化またはさもなければ翻訳後修飾されてもよい。

20

#### 【0104】

本開示の主題を、ここに、以下の実施例を参照しながら記載する。これらの実施例は、例示を目的として示されているに過ぎず、その主題はこれらの実施例に限定されず、むしろ本明細書に示された教示の結果として示された全ての変形例を包含する。

#### 【実施例】

#### 【0105】

本明細書に記載された実験の前に、免疫細胞化学（IHC）アッセイ形式を利用して対象からの試料中のHE4aのN-WFDCドメインを最適に測定し得るプロトコルは発表されていなかった。本開示の態様および実施形態は、全長HE4/HE4aの存在を評定するために同時にまたは組み合わせて用いられる場合に、12A2および14E2モノクローナル抗体が、意外で予測されなかった用途および効能を有する、という意外な発見に由来する。

30

#### 【0106】

本明細書に記載された実験において、予測されなかった高度な/増強された効能を可能にする複数の因子が、発見された。例えば、2H5/3D8との特定の組み合わせにおける12A2/14E2抗体を用いることにより、より特異的な全長HE4認識および結合プロファイルが得られ得ることが、発見された。加えて、検査卵巣癌試料（全長HE4試料を含む）中のHE4の分析の間に、IHCをはじめとする例示的診断における2H5または3D8と組み合わせた12A2もしくは14E2抗体、得られた対応する臨床データおよび/または疾患の相関性を利用することで、HE4プロファイルの評定において意外な程低いバックグラウンドおよび/または驚く程改善された分解能が示されることも発見された。

40

#### 【0107】

例として、HE4モノクローナルAbの生成における免疫化のための組換えHE4融合蛋白質が、開発された。

#### 【0108】

実施例1

#### 【0109】

組換え全長HE4ahIg/mIg、HE4a-V4HIg/mIgおよびHE4a-

50

V2-hIg/mIg融合蛋白質の生成：融合構築物の構築のための高処理能力HE4a cDNAクローンからのHE4a(WFDC2)cDNAの増幅

【0110】

HE4a(WFDC2)遺伝子を、IgGをコードする遺伝子と組み合わせて融合蛋白質を構築し、マウスを免疫化してモノクローナル抗体(MAb)を得た。マウスを、マウスIgテイルを有する融合蛋白質に対して免疫化して、ハイブリドーマを、ヒトIgテイルを有する融合蛋白質に対してスクリーニングした。次に、二重抗原決定基(サンドイッチ)(double determinant)ELISAを開発した。

【0111】

最初はKirchoffらにより発表され(15, 22)、GenBank(アクセッション番号X63187)に寄託されたHE4aのmRNA配列は、HE4aをコードするcDNAをクローニングするオリゴヌクレオチドプライマーの設計のための原理を提供した。HE4a cDNAをクローニングするために、TRIzol(Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)を用いて、製造業者の使用説明書に従い、RNAを卵巣腫瘍、正常な精巣上体、ならびに4007およびOVCA3(24)をはじめとする複数の卵巣腫瘍細胞株から調製した。RNA 1~3 µg、ランダムヘキサマー、およびSuperscript II Reverse Transcriptase(Life Technologies, Inc.)を用い、製造業者の指導に従い、cDNAを調製した。標準条件を利用して、ランダムプライムされたcDNAから、HE4a cDNAをPCR増幅させた。全長HE4aの予測サイズのPCR産物を得て、その後、クローニングした。配列解析により、Kirchoffらの配列およびGenBank(アクセッション番号AY212888)に寄託されたHE4aの正しい配列と比較した差から同定する配列分析を利用して、融合蛋白質を構築した。全長HE4a遺伝子を含む、配列を検証されたcDNAフラグメントをpSPORTにクローニングして、このプラスミドDNAを融合クローンの構築のためのPCR鑄型として用いた。

【0112】

ヒトまたはマウスIgG Fcドメインに融合された完全なHE4a遺伝子産物を取り込んだ融合蛋白質を構築した。クローニングのための適切な制限部位をコードし、最終的な構築物の蛋白質ドメインの必要なインフレーム融合を作製したプライマーを設計した。5'プライマー(配列番号XX: 5'-GTTGTTAAGC TTGCCGCCAT GCCCTGCTTGT CGCCTAGGC-3')は、HindIII部位、最初のATGに隣接する発現を改善するコザック配列、およびHE4a配列に基づくHE4aリーダーペプチドの部分を含んだ。3'プライマー(配列番号XX: 5'-GTTGTTGGAT CCGAAATTGG GAGTGACACA GGACAC-3')は、終止コドンの直前でランゲートされたHE4aコード配列の3'末端を有する、ヒト/マウスIgテイルcDNAへの融合のためのインフレームのBamHI部位を含んだ。PCR増幅反応は、鑄型としてHE4a/pSPORTプラスミド 100 ngを用いて、製造業者の使用説明書に従い(ExTaq; Takara Bio, Inc., Otsu, Shiga, Japan)実施し、増幅(94 で1分間、55 で1分間、および72 で30秒間)を30サイクル実施した。全長HE4aの予測サイズ(400 bp)のPCR産物を得て、その後、QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen, Valencia, CA)を用いて精製した。精製されたPCRフラグメントを制限消化し、QIAex II Gel Extraction Kit(Qiagen)を用いて精製し、マウスIgG2a Fc(mIgG2a)およびヒトIgG1 Fc(hIgG1)を有する融合物中で、先に記載されたpCDNA 3の誘導体であるホ乳類発現ベクターpD18にライゲートした。図1は、FL HE4a-mIgG2aおよびFL HE4a-hIgG1 cDNA構築物がHindIII-XbaIフラグメントとしてpD18のマルチクローニング部位に挿入された方法を概略的に示す。

10

20

30

40

50

## 【0113】

ライゲーション産物を、DH5 細菌細胞に形質転換して、形質転換物を、FL HE 4 a - m I g G 2 a および FL HE 4 a - h I g G 1 融合遺伝子挿入物の存在についてスクリーニングして、配列解析により検証した。加えて蛋白質発現を、これらの単離物からのプラスミドDNAを用いて確認し、記載された通りDEAE-デキストラン技術によりCOS7細胞を一過性トランスフェクトさせた。培養上清を72時間後に回収して、蛋白質アガロース(Repligen, Cambridge, MA)を用いた免疫沈降によりスクリーニングし、SDS-PAGE電気泳動法およびウェスタンブロットを減らした。ウェスタンブロットは、1:5000のヤギ抗ヒトIgG西洋わさびペルオキシダーゼコンジュゲート(Caltag, Burlingame, CA)を用いてプローブし、その後、高度の化学ルミネッセンス(Amersham, Little Chalfont, United Kingdom)を発生させた。ヒトIgG1 Fcテイル(pD18-HE4a-hIgGプラスミド)を融合されている配列検証されたHE4a遺伝子を有するプラスミドDNAを、Bingleら(Bingle L., Singleton V., Bingle C. D. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. Oncogene, 21: 2768-2773, 2002)の発行物に記載されたHE4aスプライスバリエーションHE4a-V4およびHE4a-V2の増幅およびクローニングのための鋳型として用いた。HE4a-V4およびHE4a-V2スプライスバリエーションを、先の全長HE4aについて記載された通り、マウスおよびヒトIgG Fcで融合してクローニングした。層福に用いられたヌクレオチドプライマーを、以下に列挙する。

10

20

## 【0114】

HE4a-V4について：

## 【0115】

フォワードプライマー配列番号3：

5'-GTTGTTACCGGTGCAGCAGAGAAGACTGGCGTGTGCCCC-3'

30

## 【0116】

リバースプライマー配列番号4：

5'-AATCTCCAGAGCCTCCGTGTCTTTAGGTGCCAGTGGAACAGTGCATTGGGCAGAGAGCA-3'

## 【0117】

HE4a-V2について

## 【0118】

フォワードプライマー配列番号5：

5'-GTTGTTACCGGTGCAAAGGAGGGTTCCTGCCCCAG-3'

40

## 【0119】

リバースプライマー配列番号6：

5'-GTTGTTGGATCCGAAATTGGGAGTGACACAGGA-3'

## 【0120】

HE4a Ig - 融合蛋白質の生成

## 【0121】

全長HE4a-mIgG2aおよびHE4a-hIgG1 cDNA構築物ならびにHE4a-V4およびHE4a-V2スプライスバリエーションでの対応する構築物の安定した細胞株を作製した。CHO-DG44細胞を用いて、該当する融合蛋白質を高レベルで発現する安定した細胞株を構築した。安定したCHO細胞株を、プラスミド構築物の高コピ

50

ー電気穿孔、ならびに組換えインスリン (Life Technologies, Inc.)、ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)、L-グルタミン (Invitrogen Corp.)、2×非必須アミノ酸 (Invitrogen Corp.)、および100nMメトトレキサート (Sigma, St. Louis, MO)を含むExcell 302 CHO培地 (JRH Biosciences, Denver, PA)での限定希釈によるメトトレキサート耐性クローンの選択により作製した。その後、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、高産生株についてスクリーニングした。使用済みの上清を大規模培養物から回収して、IgG融合蛋白質をプロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、その後、融合蛋白質をウェスタンブロットにより確認した(データは示さない)。HE4a-hIgG1融合蛋白質は、還元型ゲルおよびウェスタンブロットでは見かけ上の分子量Mw48,000、予測されたアミノ酸配列に基づく予想ではMr36,000超、に移動し、分子がグリコシル化されたことが示唆された。安定したトランスフェクタントを用いて、BALB/cマウスの免疫化に十分な蛋白質を産生した。

#### 【0122】

例として、HE4a N-WFDCドメインに特異的なハイブリドーマおよびモノクローナル抗体を開発した。

#### 【0123】

##### 実施例2

#### 【0124】

HE4a N-WFDCドメインに特異的なハイブリドーマおよびモノクローナル抗体の作製

#### 【0125】

BALB/cマウスを、1週間に2回の割合で、HE4a-V4 mIgGで5回、そして6回目はFL HE4aで免疫化した。最後の免疫化の3日後にマウスを殺処分し、ハイブリドーマを、メソテリンについて過去に記載された通り生成した。ハイブリドーマ上清をHE4a-V4 hIgGについてスクリーニングして、ハイブリドーマ12A2および14E2を、それらとHE4a-V4 hIgGとの反応性に基づいて選択した。ハイブリドーマを標準の手順により2回クローニングして、選択されたクローンをHE4a N-WFDC MA bの産生に用いた。ローラボトル内のDMEM 5%ウシ胎仔血清中に $10^4$ 細胞/mLで播種して10~14日間増殖させることによる、ハイブリドーマクローンのインビトロ培養により、モノクローナル抗体を産生した。その後、モノクローナル抗体を、製造業者の推奨に従ったプロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより、培地から精製した。

#### 【0126】

実施例3 . ME4a N-WFDCドメインに対するMA bの結合特異性の特徴づけ

#### 【0127】

##### 3.1 hIgG HE4a融合蛋白質との反応性

#### 【0128】

その後、12A2および14E2 MA bの特異性を、FL HE4a、HE4a-V4 およびHE4a-V2 hIgG融合蛋白質でのELISAで検査した。12A2および14E2 MA bを、炭酸塩-重炭酸塩緩衝液(C-3041; Sigma)中でのMA b(10 $\mu$ g/mL)のインキュベーションによりマイクロタイタープレートのウェルにコーティングした。上清を除去した後、ウェルを200 $\mu$ l/ウェル GSCブロッキンス緩衝液(Genetic Systems, Seattle)で室温で2時間ブロッッキングした。この後、これを0.1% Tweenを含む200 $\mu$ l/ウェル PBSで4回洗浄した。

#### 【0129】

その後、MA bをコートしたウェルを100 $\mu$ l/ウェルのFL HE4a、HE4a

10

20

30

40

50

- V 4 および H E 4 a - V 2 と共に 2 時間インキュベートした。その後、結合された h I g G H E 4 a 融合蛋白質を、H R P コンジュゲートされた抗 h I g G 1 と共にインキュベートして O D 4 5 0 n m で測定することにより検出した。

【 0 1 3 0 】

1 2 A 2 および 1 4 E 2 M A b を、完全長 H E 4 a および H E - V 4 と反応させたところ、それらが H E 4 a N - W F D C ドメインに特異的であることが示された ( 図 2 )

【 0 1 3 1 】

3 D 8 および 2 H 5 M A b の特異性も、同じ方法論を用いて参照 M A b として検査した ( 図 3 ) 。

【 0 1 3 2 】

3 . 2 ファージ融合蛋白質として提示された H E 4 a ドメインとの反応性

【 0 1 3 3 】

ファージ E L I S A において、ファージコート蛋白質 p V I I I を有する融合蛋白質として発現された H E 4 a N - W F D C ドメインおよび H E 4 a C - W F D C ドメインへの反応性を検査することにより、H E 4 a N - W F D C ドメイン対しての 1 2 A 2 および 1 4 E 2 M A b の特異性を更に確認した。

【 0 1 3 4 】

O v C a r - 3 細胞から単離された m R N A から調製された c D N A は、ファージ提示ベクター f 8 8 - 4 中でのクローニングのための C - および N - 末端 W F D C 領域をコードする遺伝子部分の P C R 増幅の鋳型として働いた。表 2 に列挙された P C R プライマー対を、それぞれアミノ酸残基 3 1 - 7 5 ( N - W F D C ) および 7 6 - 1 2 4 ( C - W F D C ) のコード領域の増幅用に構築した。5 ' 末端では、p V I I I シグナルペプチドおよび p V I I I 成熟コート蛋白質を融合するクローニングのために挿入された H i n d I I I および P s t I の制限部位が存在した。

【 0 1 3 5 】

( 表 2 ) H E 4 a N - および C - W F D C の増幅に用いられた P C R プライマー

| プライマー | 配列                                       | WFDC   |
|-------|--|--------|
| W1F   | 5'-TGCTAAGCTTTGCCGAGAAGACTGGCGTGTGCCC-3' | N-WFDC |
| W1R   | 5'-CCTTCTGCAGGATCATTGGGCAGAGAGCAG-3'     | N-WFDC |
| W2F   | 5'-TGCTAAGCTTTGCCAAGGAGGGTTCCTGCCCCCA-3' | C-WFDC |
| W2R   | 5'-CCTTCTGCAGGGAAATTGGGAGTGACACAGGA-3'   | C-WFDC |

【 0 1 3 6 】

W F D C 領域を別々に、最終的な容量 2 5  $\mu$  l 中に、1  $\mu$  M の各フォワードプライマーおよびリバースプライマー、7 5 m M T r i s - H C l ( 2 5 で p H 8 . 8 )、2 0 m M ( N H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S O <sub>4</sub>、0 . 1 % ( v / v ) T w e e n 2 0、2 m M M g C l <sub>2</sub>、0 . 0 2  $\mu$  /  $\mu$  l T a q - ポリメラーゼ ( A b g e n e , S u r r e y , U K )、および 0 . 1 m M 各デオキシヌクレオチドを含む反応混合物中で、0 . 5  $\mu$  l c D N A から次の温度サイクルを 3 0 回繰り返して増幅させた；9 5 、 5 0 および 7 2 で 3 0 秒インキュベート。

【 0 1 3 7 】

H i n d I I I および P s t I で消化された P C R 産物および f 8 8 - 4 を一緒にライゲートして、E . コリ J M 1 0 9 にトランスフェクトし、その後、クローンを L B プレート上でテトラサイクリンを用いて選択した。各構築物の 2 つのクローンを、E . コリ

10

20

30

40

50

J M 1 0 9 中 で 増 幅 さ せ て 、 二 本 鎖 D N A を D N A 配 列 決 定 の た め に 調 製 し た 。 D N A 配 列 決 定 は 、 B i g d y e ターミナー v 1 . 1 サイクルシーケンスキットおよび f 8 8 - 4 ベクター特異性プライマーを用いて実施した。配列決定反応は、分析のために C y b e r G e n e A B ( H u d d i n g e , S w e d e n ) に 送 付 し た 。 配 列 の 生 デー タ を 、 無 料 ソ フ ト ウ ェ ア C h r o m a s v e r s i o n 1 . 4 5 ( T e c h n e l y s i u m P t y L t d . , A u s t r a l i a ) を 用 い て 解 析 し た 。 ヌ ク レ オ チ ド 配 列 決 定 に よ り 、 リーダーペプチドおよび成熟ファージコート蛋白質 p V I I I の インフレームでの挿入を検証した。H E 4 a 挿入物により、H E 4 a 配列 ( ア ク セ シ ョ ン 番 号 A Y 2 1 2 8 8 8 ) に 対 す る 同 一 性 を 実 証 し た ( 図 4 ) 。

【 0 1 3 8 】

ファージ E L I S A

【 0 1 3 9 】

配列を検証されたファージクローンを増幅、精製して P E G / N a C l を 用 い て 濃 縮 し 、 ファージ E L I S A アッセイにおいて抗原として使用するために P B S 中 の 1 % B S A で 希 釈 し た 。 P B S 中 の 1 % B S A で 1 μ g / m l に 希 釈 さ れ た M A b 3 D 8 お よ び 2 H 5 な ら び に 1 0 0 μ l クローン培地中の M A b 1 2 A 2 を 、 ヤギ抗マウス I g G ( J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h ) で コートされたウェルで固定化した ( 1 0 0 μ l / ウェル ) 。 プレート を 密 閉 し て 、 室 温 で 一 晩 貯 蔵 し た 。 H E 4 a M A b で コートされたウェルを 3 回 洗 浄 し 、 容 量 1 0 0 μ l / ウェルのファージ粒子を添加した。 2 時 間 イ ン キ ュ ベー ト し た 後 、 ウェル を 洗 浄 し て 、 ウサギ抗 M 1 3 抗 体 ( 所 内 で 作 製 ) を 添 加 し た 。 イ ン キ ュ ベー シ ョ ン お よ び 洗 浄 後 に 、 H R P 標 識 さ れ た ブ タ 抗 ウ サ ギ 抗 体 ( D a k o ) を 添 加 し た 。 最 終 的 な 洗 浄 の 後 、 T M B 基 質 を 添 加 し て 、 プレート を 5 分 間 イ ン キ ュ ベー ト し た 後 6 2 0 n m で 測 定 し た ( 図 5 ) 。

【 0 1 4 0 】

ファージ蛋白質 p V I I I を 有 す る 融 合 蛋白質として提示された N - W F D C お よ び C - W F D C ドメインを用いたファージ E L I S A 試験、ならびに H E 4 a - V 2 、 H E 4 a - V 4 お よ び F L H E 4 a h I g G 1 融 合 蛋白質への反応性から、 1 2 A 2 お よ び 1 4 E 2 M A b が H E 4 a N - W F D C ドメインに特異的であることが確認された。

【 0 1 4 1 】

3 . 3 1 2 A 2 お よ び 1 4 E 2 M A b に よ り 認 識 さ れ た エピトープの特徴づけ

【 0 1 4 2 】

1 2 A 2 お よ び 1 4 E 2 M A b に よ り 認 識 さ れ た エピトープのタイプ、即ち線状またはコンホメーション依存性のエピトープを、変性および還元された H E 4 a 抗原に対する抗体の反応性を検査することにより測定した。未希釈および 5 倍希釈の、全長 H E 4 a - h I g G 1 を 産 生 す る 安 定 し た 細胞株の使用済み培地を、 7 0 ° で 変 性 さ せ て 、 還 元 条件 下 、 S D S - P A G E で 分 離 し た 。 蛋白質を、標準技術により P V D F 膜上にプロットした。膜を一次 H E 4 a 抗体と共にインキュベートした後、結合した抗体を H R P ブ タ 抗 マウス抗体 ( D a k o ) に よ り ト レースした。H R P 抗体を、A m e r s h a m ( 商 標 ) E C L ( 商 標 ) 検 出 シ ス テ ム を 用 い て 化 学 ル ミ ネ ス セ ンスにより検出した。

【 0 1 4 3 】

M A b 1 2 A 2 では、変性および還元された H E 4 a 抗原への反応性が実証されなかったことから ( データは示さない ) 、 その抗体がコンホメーション依存性エピトープを認識することが示された。その一方で、M A b 1 4 E 2 では、グリコシル化 H E 4 a - h I g G 1 融 合 分子の予測サイズであるおよそ 4 8 k D a の バンドへの特異的染色が実証された。より高濃度の抗原のレーンでは、そのサイズの約 2 倍のバンドが観察された。このバンドは、抗原の二量体を表し、F c 部分中のジスルフィド結合が完全に破壊されていない可能性が最も高い。ウェスタンプロットデータから、M A b 1 4 E 2 が線状エピトープを認識することが示される ( 図 6 ) 。

【 0 1 4 4 】

3 . 4 作製された H E 4 N - W F D C 特異性抗体の独立したエピトープ

10

20

30

40

50

## 【0145】

12A2 MA bと14E2 MA bとの、変性および還元されたHE4a抗原への反応性の差から、2種の抗体がHE4a N-WFDCドメイン内の2種の独立したエピトープを認識することが示される。

## 【0146】

12A2および14E2 MA bによるHE4a N-WFDCドメイン中の独立したエピトープの認識を、サンドイッチイムノアッセイにおいて12A2および14E2 MA bを組み合わせることにより更に確認した。MA b 14E2を、検出抗体としてのHRP標識されたMA b 12A2と組み合わせ、捕捉MA bとして用い、HE4a抗原での用量反応曲線を決定した。濃縮されたハイブリドーマ培地中のMA b 14E2を、ヤギ抗マウス抗体(Jackson ImmunoResearch Lab)をコートされたマイクロウェル中で捕捉した。洗浄後に、HE4a EIAキット(Fujirebio Diagnostics Inc)からの25μlのHE4a抗原(0~900pM)を添加し、その後、HRP標識された12A2 MA bを添加した。対照実験として、HE4a EIA中で用いられた14E2 MA b固相およびHRP標識されたトレーサMA b 3D8を用いて並行試験を実施した。MA b 3D8は、C-末端WAP領域を標的とすることで知られ、それゆえMA b 14E2とサンドイッチEIA対を形成するはずである。インキュベーションおよび洗浄ステップの後、TMB基質を添加して、30分間のインキュベーションステップの後、吸収を620nmで分析した。MA b 3D8および12A2の両者とも、MA b 14E2との用量反応曲線を実証した(図7)。

10

20

## 【0147】

還元HE4a抗原との異なる反応性に加え、12A2 MA bおよび14E2 MA bのサンドイッチイムノアッセイの正の用量反応曲線から、MA b 14E2およびMA b 12A2がHE4a N-WFDCドメインに特異的な独立したエピトープを認識することが示された。

## 【0148】

全長HE4aに特異的なイムノアッセイも、開発した。

## 【0149】

実施例4

30

## 【0150】

全長HE4aに特異的なイムノアッセイの確立

## 【0151】

全長HE4a(FL HE4a)に特異的なアッセイを、N-WFDCおよびC-WFDCドメインに特異的な抗体を用いることにより設計した。

## 【0152】

本発明の一態様において、HE4a N-WFDCドメインに特異的な抗体を、HE4a C-WFDCドメインに特異的な抗体と組み合わせることで、全長HE4aに特異的なイムノアッセイの設計を可能にしたが、HE4a N-WFDCドメイン、HE4a C-WFDCドメイン、HE4a-V4変異体またはHE4a-V2変異体のいずれかを検出することはできなかった。

40

## 【0153】

最初の実験において、本発明による12A2 MA bおよび14E2 MA bならびにHE4a C-WFDCドメインに反応性の3D8 MA b(Hellstrom et al; The HE4 (WFDC2) Protein Is a Biomarker for Ovarian Carcinoma; Cancer Res July 1, 2003 63; 3695)を、検出抗体としてのHE4a C-WFDCドメインに対して反応性の2H5 MA bを用いたサンドイッチアッセイにおいて、捕捉抗体として用いた。サンドイッチアッセイにおいて、異なる捕捉MA bを実施例2の記載と類似の手順を用いて、マイクロタイターウェルで免疫化し、FL HE4a、HE4

50

a - V 4 および H E 4 a - V 2 ドメインの h I g F c 融合蛋白質と共にインキュベートした。その後、ビオチン化 2 H 5 M A b と共にインキュベートした後、ストレプトアビジン H R P と共にインキュベートして、O P D H R P 基質とのインキュベーション後に O D 4 5 0 n m を測定することにより、結合された H E 4 a 蛋白質を検出した。サンドイッチアッセイから、1 2 A 2 M A b または 1 4 E 2 M A b と 2 H 5 M A b との組み合わせが F L H E 4 a 融合蛋白質のみを検出するが、3 D 8 M A b と 2 H 5 M A b との組み合わせが F L H E 4 a および H E 4 a V 2 変異体の両方を検出することが実証された ( 図 8 ) 。

【 0 1 5 4 】

F L H E 4 a に特異的なイムノアッセイの設計のための好ましい構成において、2 H 5 M A b を捕捉抗体として用い、1 2 A 2 M A b を検出抗体として用いた。2 H 5 M A b を、標準的手順を利用してビオチン - N H R S カブロン酸エステル ( S i g m a C h e m i c a l C o , U S ) でビオチン化して、捕捉抗体として用いた。1 2 A 2 M A b は、ナコーネ ( N a k o n e ) 法の変形により H R P とコンジュゲートさせた。ビオチン化された 2 H 5 M A b および H R P コンジュゲートされた 1 2 A 2 M A b を、以下のプロトコルによるワンステップ E I A において使用した。

10

【 0 1 5 5 】

アッセイ手順：

【 0 1 5 6 】

F L H E 4 a - h I g G 組換え抗原 ( P B S 中 0 ~ 1 0 0 0 p M 、 6 0 g / L B S A , p H 7 . 2 ) 2 5 μ l + アッセイ緩衝液中の 1 μ g / m l ビオチン 2 H 5 M A b および 1 μ g / m l H R P 1 2 A 2 M A b の 1 0 0 μ l を、ストレプトアビジンをコートしたマイクロタイタープレート ( K a i v o g e n O y , T u r k u , F i n l a n d ) に入れる。

20

【 0 1 5 7 】

2 . 振とうしながら 1 時間 ± 1 0 分間インキュベートする。

【 0 1 5 8 】

3 . 5 m M T r i s 緩衝液 , 0 . 0 5 % T w e e n 4 0 、 p H 7 . 7 5 で 6 回洗浄する。

【 0 1 5 9 】

4 . 1 0 0 μ l T M B ( N e o g e n , U S ) を添加する。

30

【 0 1 6 0 】

5 . 3 0 分間 ± 5 分間インキュベートする。

【 0 1 6 1 】

6 . E L I S A リーダで O D 6 2 0 n m を測定する。

【 0 1 6 2 】

P B S 、 6 0 g / L B S A で希釈された H E 4 a - h I g G を用いた用量反応曲線の例を、図 9 に示す。アッセイの感度は、< 5 p M であり、健常な対象に見出される感度よりも有意に低かった。つまりそのアッセイは、卵巣癌であることが分かっている、または卵巣癌の疑いのある健常対象および個体における F L H E 4 a の測定に適している。

40

【 0 1 6 3 】

本試験の目的は、例示的アッセイ形式で全長 H E 4 の存在を評定する能力を評価することにより、新しい 1 2 A 2 M A b の適切性を評定することである。

【 0 1 6 4 】

実施例 5

【 0 1 6 5 】

全長 H E 4 a に特異的なイムノアッセイを用いた卵巣癌の診断

【 0 1 6 6 】

本開示の一態様において、抗体を用いて、卵巣癌の血清診断のイムノアッセイを設計した。実施例 3 に記載された 1 2 A 2 M A b と組み合わせた 2 H 5 M A b を用いた F L

50

HE4aのイムノアッセイを、健常な個体、良性婦人科疾患の患者、および卵巣癌患者の血清試料中の全長HE4aの濃度を測定するために用いた。

【0167】

FL HE4aのレベルは、卵巣癌患者では、良性婦人科疾患患者または健常対象に比較して有意に高かった ( $p < 0.001$ ) (表3、図10)。

【0168】

(表3) 健常な個体、良性婦人科疾患の患者、および卵巣癌患者のHE4aレベル

|         | n  | HE4A pM<br>平均 | 95% CI |        | SE     | SD     |
|---------|----|---------------|--------|--------|--------|--------|
| 健常      | 50 | 84            | 77     | 91まで   | 3,4    | 24,4   |
| 良性婦人科疾患 | 82 | 122           | 98     | 146まで  | 11,9   | 108,5  |
| 卵巣癌     | 25 | 2967          | 319    | 5614まで | 1282,8 | 6413,8 |

10

【0169】

この試験の目的は、卵巣癌を測定してその経過をモニタリングする能力を評価することにより、新しい12A2 MA b / 全長HE4アッセイ形式の適切性を評定することである。

【0170】

実施例6

【0171】

FL HE4aの測定による卵巣癌の疾患経過のモニタリング

【0172】

本発明の別の態様において、実施例3によるFL HE4aを測定するためのイムノアッセイを利用して、卵巣がんと診断された患者の疾患の臨床経過を追跡した。

【0173】

卵巣癌患者3名のFL HE4aレベルを、疾患の臨床経過と対応させて図11に示す。FL HE4aレベルは、疾患の臨床経過に従っており、卵巣癌の治療効果および再発疾患の検出を拡充する (full) のに適している。

30

【0174】

例として、本試験の目的は、HE4a組織試料を測定する際の新しい12A2 MA b / 全長HE4アッセイ形式の適切性を評定することである。

【0175】

実施例7

【0176】

組織切片における、HE4aの測定による卵巣癌の診断

【0177】

本発明の追加的態様において、HE4aのN-WFDCドメインに特異的な抗体を、卵巣癌が疑われる患者から得られた組織または細胞と共にインキュベートし、組織または細胞への抗体の結合を測定することにより、卵巣癌の診断方法を提供する。

40

【0178】

組織アレイスライド (Super Bio Chips) を、製造業者の使用説明書に従って脱パラフィンを行った。抗原賦活化では、10mMクエン酸緩衝液 pH 6.0 中でスライドに10分間マイクロ波を照射した。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で5分間インキュベートすることにより、内在性ペルオキシダーゼをクエンチした。好ましい構成において、組織切片を12A2 MA bと共に室温で1時間インキュベートした。結合12A2 MA bの視覚化のために、En Vision + System - HRP (Dako AS, Denmark) を、製造業者の使用説明書に従って使用した。スライドは、ヘマトキシリン (Dako Cytomation) で対比染色し、顕微鏡測定により分析した。異なる卵巣

50

癌切片（図12A～D）を、HE4 a N - W F D Cについて染色し、非癌性組織から得た組織は、陰性であった（図12E～F）。

【0179】

特許、発行物、科学文献、ウェブサイト、および他の文書、ならびに本明細書で参照または記述される材料は全て、本発明が属する技術分野の当業者の技術レベルを示しており、そのような参照された文書および材料はそれぞれ、その全体が個別に参照により組み入れられている場合、または全体として本明細書に示されている場合と同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。出願人は、任意のそのような特許、発行物、科学文献、ウェブサイト、電子的に入手した情報、および他の参照された材料または文書からのあらゆる材料を、本明細書に物理的に組み入れる権利を有する。

10

【0180】

用いられた用語および表現は、説明の用語として用いられており、限定としてではなく、図示および記載された特色の任意の均等物またはその一部を除外するような用語および表現の使用を意図するものではなく、様々な改良が請求された本発明の範囲内で可能であると認識される。つまり、本発明は好ましい実施形態および任意の特色により具体的に開示されており、本明細書に開示された概念の改良および変更は、当業者に依存されてもよく、そのような改良および変更は、添付の特許請求の範囲に定義された本発明の範囲内とみなされる。

【0181】

本発明を、広範に、そして包括的に記載した。包括的開示に含まれるより狭い分類および亜属の群も、本発明の一部を形成する。これは、本発明の包括的記述を、任意の目的物をその属から除外する条件または否定的限定付きで含み、除外された材料が本明細書に具体的に列挙されているかにかかわらず。

20

【0182】

他の実施形態は、以下の特許請求の範囲内である。加えて、本発明の特徴または態様が、マーカッシュ群に関して記載されていれば、本発明がそれによりマーカッシュ群の任意の個々の構成物または構成物の亜群に関しても記載されることを、当業者は認識するであろう。

【0183】

配列表

30

**SEQUENCE LISTING:**

SEQ ID No 1:

WAP four-disulfide core domain protein 2 precursor

Homo sapiens

ACCESSION NP\_006094

124aa

1 mpacrlgpla aallsl11lf gftlvsgtga ektgvcpelq adqntqecv sdsecadnlk  
 61 ccsagcatfc slpndkegsc pqvninfpql glcrdqcvd sqcpqgmkc rncgkvscv  
 121 tpnf

10

SEQ ID NO 3:

WAP domain containing protein HE4-V4

Homo sapiens

ACCESSION AAL37488

102 aa

1 mpacrlgpla aallsl11lf gftlvsgtga ektgvcpelq adqntqecv sdsecadnlk  
 61 ccsagcatfc slpnalfhwh lktrrlweis gpxrrptwd ss

20

SEQ ID No 5:

WAP domain containing protein HE4-V3

Homo sapiens

ACCESSION AAL37487

73 aa

1 mlqvqvnlpv splptypysf fypdkegscp qvninfpqlg lcrdqcvds qcpgqmkccr  
 61 nrcgkvscvt pnf

30

SEQ ID No 7:

WAP domain containing protein HE4-V2

Homo sapiens

ACCESSION AAL37486

76 aa

1 mpacrlgpla aallsl11lf gftlvsdkeg scpqvninfp qlglcrdqcv vdsqcpgqmk  
 61 ccrngcgkvs cvtpnf

40

SEQ ID No 9:

WAP domain containing protein HE4-V1

Homo sapiens

ACCESSION AAL37485

80 aa

1 mpacrlgpla aallsl1llf gftlvsgtga ektgvcpelq adqntqecv sdsecadnlk  
61 ccsagcatfc llcpngqlae

10

SEQ ID No 11:

WAP four-disulfide core domain 2

Homo sapiens

ACCESSION AAH46106

124aa

1 mpacrlgpla aallsl1llf gftlvsgtga ektgvcpelq adqntqecv sdsecadnlk  
61 ccsagcatfc slpndkegsc pqvninfpql glcrdqcvd sqcpqmkcc rngcgkvscv  
121 tpnf

20

SEQ ID No 13:

HE4 protein

Homo sapiens

ACCESSION AA052683

124aa

1 mpacrlgpla aallsl1llf gftlvsgtga ektgvcpelq adqntqecv sdsecadnlk  
61 ccsagcatfc slpndkegsc pqvninfpql glcrdqcvd sqcpqmkcc rngcgkvscv  
121 tpnf

30

SEQ ID No 15:

HE4 protein

Homo sapiens

ACCESSION CAA44869

125aa

1 mpacrlgpla aallsl1llf gftlvsgtga ektgvcpelq adqntqecv sdsecadnlk  
61 ccsagcatfc llcpndkegs cpqvninfpq lgldrdqcv dtqcpqmkc crngcgkvsc  
121 vtpnf

40

SEQ ID No 17:

HE4a N-WFDC

Homo sapiens

E K T G V C P E L Q A D Q N C T Q E C V S D S E C A  
D N L K C C S A G C A T F C S L P N D

SEQ ID No 19:

HE4a C-WFDC

Homo sapiens

K E G S C P Q V N I N F P Q L G L C R D Q C Q V D S  
Q C P G Q M K C C R N G C G K V S C V T P N F

SEQ ID No 21:

HE4a-V4: Forward primer

5'-GTTGTTACCGGTGCAGCAGAGAAGACTGGCGTGTGCCCC-3'

SEQ ID No 23:

HE4a-V4 Reverse primer

5'-AATCTCCCAGAGCCTCCGTGTCTTTAGGTGCCAGTGGAACAGTGCATTGGGCAGAGAGCA-3'

SEQ ID No 25:

HE4a-V2: Forward primer

5'-GTTGTTACCGGTGCAAAGGAGGGTTCCTGCCCCCAG-3'

SEQ ID No 27:

HE4a-V2: Reverse primer:

5'- GTTGTGGATCCGAAATTGGGAGTGACACAGGA-3'

SEQ ID No 29:

PCR primer used to generate N-WFDC domain

W1F 5- TGCTAAGCTTTGCCGAGAAGACTGGCGTGTGCCC - 3' N-WFDC

SEQ ID No 31:

PCR primer used to generate N-WFDC domain

10

20

30

40

W1R 5'- CCTTCTGCAGGATCATTGGGCAGAGAGCAG - 3' N-WFDC

SEQ ID No 33:

PCR primer used to generate C-WFDC domain

W2F 5'- TGCTAAGCTTTGCCAAGGAGGGTTCCTGCCCCCA - 3' C-WFDC

SEQ ID No 35:

PCR primer used to generate C-WFDC domain

10

W2R 5'- CCTTCTGCAGGGAAATTGGGAGTGACACAGGA - 3' C-WFDC

SEQ ID No 37:

583 bp mRNA

H.sapiens HE4 mRNA for extracellular proteinase inhibitor  
homologue.

ACCESSION X63187

20

```

1 ccctgcacc cgccecgca tagcaccatg cctgcttgtc gcctaggccc gctagccgcc
61 gccctcctcc tcagcctgct gctgttcggc ttcaccctag tctcaggcac aggagcagag
121 aagactggcg tgtgccccga gctccaggct gaccagaact gcacgcaaga gtgctgtctc
181 gacagcgaat gcgcccacaa cctcaagtgc tgcagcgcgg gctgtgccac cttctgcctt
241 ctctgcccc aatgataagga gggttcctgc cccaggtga acattaactt tccccagctc
301 ggctctgtc gggaccagtg ccagggtggac acgcagtgtc ctggccagat gaaatgctgc
361 cgcaatggct gtgggaaggt gtctgtgtc actcccaatt tctgaggtcc agccaccacc
421 aggctgagca gtgaggagag aaagtttctg cctggccctg catctggttc cagcccacct
481 gccctcccct ttttcgggac tctgtattcc ctcttggggg gaccacagct tctcccttcc
541 ccaaccaata aagtaaccac tttcagcaaa aaaaaaaaaa aaa

```

30

SEQ ID No 39:

486 bp mRNA

Homo sapiens HE4 protein (WFDC2) mRNA, complete cds.

ACCESSION AY212888

```

1 tgagagaaag cggccgcacc cgccecgca tagcaccatg cctgcttgtc gcctaggccc
61 gctagccgcc gccctcctcc tcagcctgct gctgttcggc ttcaccctag tctcaggcac
121 aggagcagag aagactggcg tgtgccccga gctccaggct gaccagaact gcacgcaaga
181 gtgctgtctc gacagcgaat gcgcccacaa cctcaagtgc tgcagcgcgg gctgtgccac
241 cttctgtctc ctgcccattg ataaggaggg ttctgcccc caggtgaaca ttaactttcc

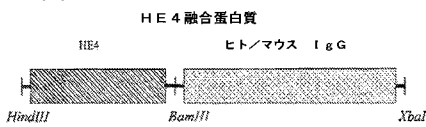
```

40

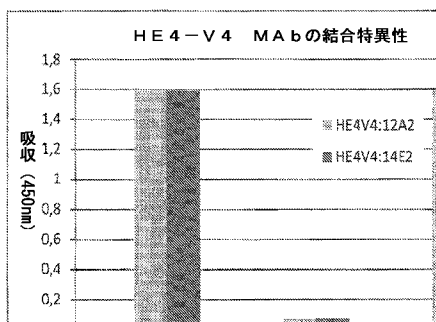
```

301 ccagctcggc ctctgtcggg accagtgcc aaggacagc cagtgtcctg gccagatgaa
361 atgctgccgc aatggctgtg ggaagggtgc ctgtgtcact cccaatttct gagctccggc
421 caccaccagg ctgagcagtg aagatagaaa gttttgtgct ggccctgcag cgtgttacag
481 cccacc
    
```

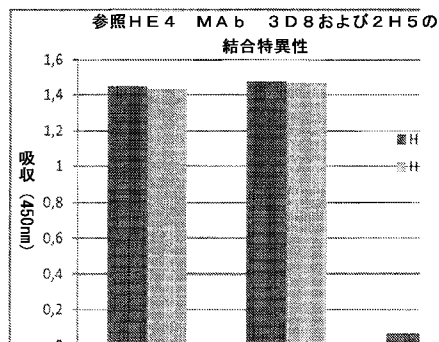
【図1】



【図2】



【図3】

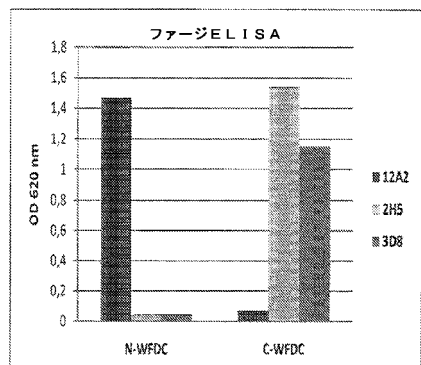


【図4】

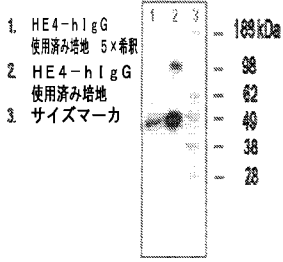
```

                N P A C R L Q D
2  gggagaaagggtgcggacccggcaggcaatgcaatgcaatgcaatgcaatggggggg 61 太字=リーダー配列
  L A A A L D P S L C F G F Z L V E G Q
62  ggaagaggagggcctcctccagcctctgtgtgtgtggtctcaactcaactctcaggcaca 121
  G A E K T S T C P S I Q A R G D D C T U K
122  ggaagaggagggcctcctccagcctctgtgtgtgtggtctcaactcaactctcaggcaca 181 黒字=N-WFDC
  C V H U S S C A D D L E C C S A C D A T
162  ggcctctcggacacacccacacacccacacacccacacacccacacacccacacaccc 241
  F C D L F P B S F G F G F S G S R M R F
242  ctccagctctcggacacacccacacacccacacacccacacacccacacacccacacaccc 321
  C V H U S S C A D D L E C C S A C D A T
362  cagctcggacacacccacacacccacacacccacacacccacacacccacacaccc 381  黒字=C-WFDC
  C V H U S S C A D D L E C C S A C D A T
382  cgtcggacacacccacacacccacacacccacacacccacacacccacacaccc 421
  C V H U S S C A D D L E C C S A C D A T
482  acacacccacacacccacacacccacacacccacacacccacacacccacacaccc 481
  ccacc
    
```

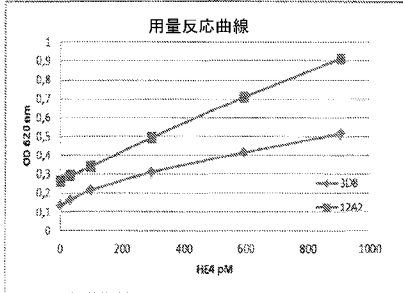
【図5】



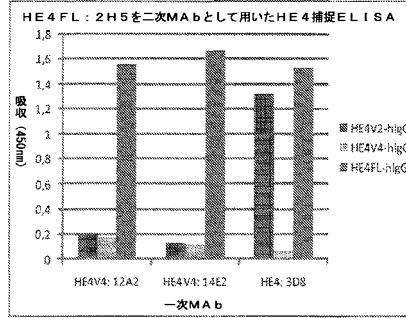
【 図 6 】



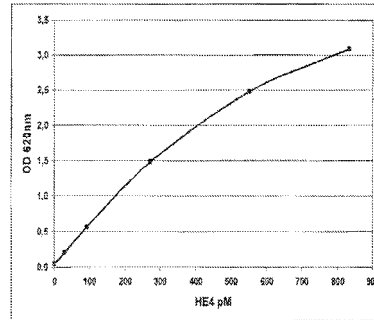
【 図 7 】



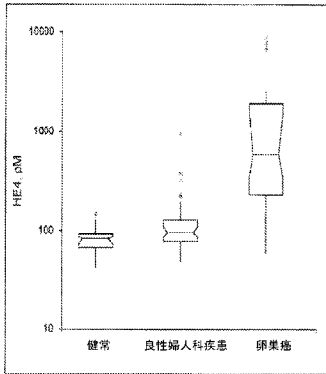
【 図 8 】



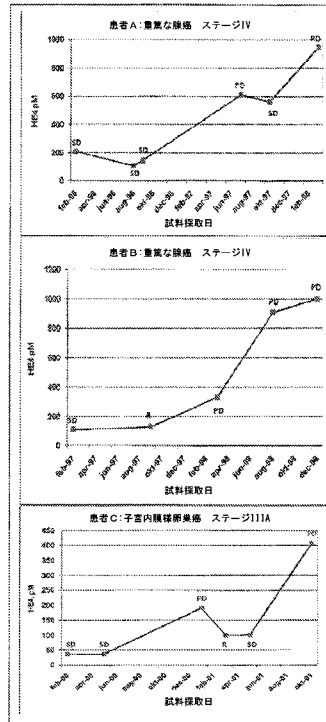
【 図 9 】



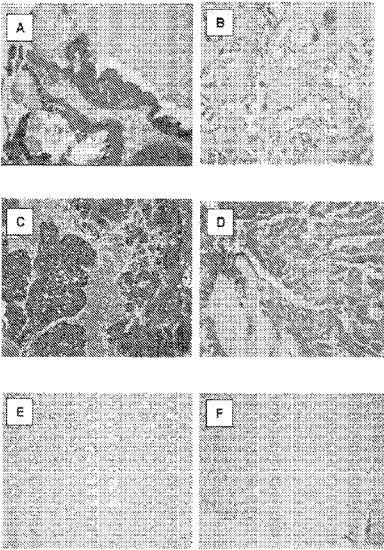
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 1 2 】



【 配列表 】

2014507153000001.xml

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |   | International application No.<br>PCT/US 11/25321   |
|--|---|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - C12P 21/04; C12N 5/16 (2011.01)<br>USPC - 435/70.21; 435/344.1<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>USPC - 435/70.21, 344.1<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>USPC - 435/332, 344; 424/130.1, 138.1 (text search, see terms below)<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>PubWEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB); Google/Scholar (text search, see terms below)<br>Search Terms: Patent deposit, No.10091401, HE4\$, WFDC\$, human, epididymis protein 4, ovarian, cancer, antibod\$, 12A2, 14E2, 2H5, 3D8, soluble, surface, membrane  |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |
| X<br>---<br>Y<br>---<br>A  | US 2003/0108965 A1 (SCHUMMER et al.) 12 June 2003 (12.06.2003); Figure 5, paras [0002], [0014], [0016], [0022], [0040], [0041], [0095], [0101]-[0105], [0142], [0144] | 26-35, 38, 39, 41, 42<br>36, 37, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 53, 54<br>1, 2, 4, 5, 7, 16, 40, 43, 46, 49, 52, 55 |
| Y  | US 2009/0075307 A1 (FISCHER et al.) 19 March 2009 (19.03.2009); paras [0091]-[0095], [0103], [0132]-[0135]  | 36, 37   |
| Y<br>---<br>A  | US 2008/0020473 A1 (MOORE et al.) 24 January 2008 (24.01.2008); Abstract, paras [0013], [0022]  | 44, 45, 47, 48, 50, 51, 53, 54<br>46, 49, 52, 55   |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.  |   |  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>21 April 2011 (21.04.2011)  |   | Date of mailing of the international search report<br><b>18 MAY 2011</b>                                     |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-3201  |   | Authorized officer:<br>Lee W. Young<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774                   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/25321

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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.: 3, 6, 8-15, 17-25, 56, 57  
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:  
Claim 3 lacks appropriate and clear designation for the ECACC Patent Deposit number as drafted and is therefore unsearchable.  
Claims 6, 8-15 and 17-25 comprise specific nucleic acid sequences. However, the CRF filed on 25 March 2011 contained errors and could not be entered into ISA/US's search system/tool. Therefore ISA/US is unable to provide a search of the sequences.  
Claim 56 and 57 lack the required sequence identifiers as required by Annex C of the AI to clearly ascertain to meaning of "SEQ ID NO:HE4" and is therefore unsearchable.
  
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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.              | F I            | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|------------|
| C 1 2 N 1/15 (2006.01)   | C 1 2 N 1/15   |            |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01)   | C 1 2 N 1/19   |            |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01)   | C 1 2 N 1/21   |            |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01)   | C 1 2 N 5/00   | 1 0 1      |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01)  | C 1 2 N 5/00   | 1 0 2      |
| C 0 7 K 16/46 (2006.01)  | C 1 2 P 21/08  |            |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01)  | C 0 7 K 16/46  |            |
| G 0 1 N 33/543 (2006.01) | G 0 1 N 33/53  | D          |
| G 0 1 N 33/574 (2006.01) | G 0 1 N 33/53  | Y          |
| G 0 1 N 33/577 (2006.01) | G 0 1 N 33/543 | 5 0 1 D    |
| G 0 1 N 33/48 (2006.01)  | G 0 1 N 33/574 | A          |
|                          | G 0 1 N 33/574 | D          |
|                          | G 0 1 N 33/577 | B          |
|                          | G 0 1 N 33/48  | P          |

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ヘルストロム インジェガード

アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル ノースイースト スーパー 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 ワシントン州 シアトル ノースイースト スーパー ドライブ 3 9 2 5

(72)発明者 レイクロフト ジョン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 クレイトン マウンテアー プレイス 5 0

(72)発明者 フェルメー クリスティアン

スウェーデン王国 ベストラ フロランダ ラダジャルスガタン 7

(72)発明者 ロイジー エヴァ

スウェーデン王国 ベストラ フロランダ スクリパレガタン 7 8

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 AA26 BA14 BB24 BB35 CA25 CA26 CB01  
CB02 CB03 CB07 CB15 CB26 CB30 FA16 FA29 FB01 FB03  
FB15 GC10 GC12  
4B024 AA12 BA44 BA53 BA80 CA04 CA07 DA02 EA03 EA04 FA20  
4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA14  
4B065 AA91X AA91Y AA93Y AB01 AC14 BA02 BA08 CA24 CA25 CA46  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA51 FA74

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于测量HE4a的组合物和方法  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2014507153A</a>  | 公开(公告)日 | 2014-03-27 |
| 申请号            | JP2013554425   | 申请日     | 2011-02-17 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 富士瑞生物诊断公司  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | FUJIREBIO诊断公司  |         |            |
| [标]发明人         | ヘルストロムインジェガード<br>ヘルストロムカールエリック<br>レイクロフトジョン<br>フェルメークリステイアン<br>ロイジーエヴァ   |         |            |
| 发明人            | ヘルストロム インジェガード<br>ヘルストロム カール-エリック<br>レイクロフト ジョン<br>フェルメー クリステイアン<br>ロイジー エヴァ   |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10<br>C12P21/08 C07K16/46 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/48   |         |            |
| CPC分类号         | C07K16/3069 G01N33/57411 G01N33/57449 G01N2800/52 A61K38/17 A61K38/18 A61K38/19<br>A61K39/395 A61K48/00 C07K14/435 C07K14/475 C07K16/18 C07K16/22 C07K16/24 C07K16/28<br>C07K16/30 G01N33/574 C07K2317/14  |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21<br>C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12P21/08 C07K16/46 G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/543.501.D<br>G01N33/574.A G01N33/574.D G01N33/577.B G01N33/48.P  |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/BB35 2G045<br>/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB15 2G045/CB26<br>2G045/CB30 2G045/FA16 2G045/FA29 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB15 2G045/GC10 2G045<br>/GC12 4B024/AA12 4B024/BA44 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02<br>4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA20 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064<br>/CC24 4B064/DA14 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065<br>/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20<br>4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA74 |         |            |
| 代理人(译)         | 清水初衷<br>井上隆一<br>佐藤俊光<br>小林智彦<br>渡边真一<br>正人大关<br>五十嵐弘   |         |            |
| 其他公开文献         | JP5887364B2<br>JP2014507153A5  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |
| 摘要(译)          |  |         |            |

本发明包括使用HE / HE4a标记物来评估受试者中的卵巢癌。还包括使用HE / HE4a标记物进行卵巢癌的诊断，分级和分期，确定已被诊断患有卵巢癌的受试者的预后和治疗效果的组合物和方法。

(表2) HE4a N-およびC-WFDCの増幅に用いられたPCRプライマー

| プライマー | 配列                                      | WFDC   |
|-------|---|--------|
| W1F   | 5'-TGCTAAGCTTTGCCGAGAAGACTGGCCTGTGCC-3' | N-WFDC |
| W1R   | 3'-CCTTCTGCAGGATCATTGGCAGAGAGCAG-3'     | N-WFDC |
| W2F   | 5'-TGCTAAGCTTTGCCAAGGAGGGTTCCTGCCCCA-3' | C-WFDC |
| W2R   | 3'-CCTTCTGCAGGAAATTGGGACTGACACAGGA-3'   | C-WFDC |