

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-29605

(P2018-29605A)

(43) 公開日 平成30年3月1日(2018.3.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 H O 4 5
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 4 1 B	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 4 5 A	

審査請求 有 請求項の数 42 O L 外国語出願 (全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-190224 (P2017-190224)	(71) 出願人	506137147 エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ ジメント株式会社 東京都文京区小石川四丁目6番10号
(22) 出願日	平成29年9月29日 (2017.9.29)	(74) 代理人	110001139 S K特許業務法人
(62) 分割の表示	特願2014-520368 (P2014-520368) の分割	(74) 代理人	100130328 弁理士 奥野 彰彦
原出願日	平成24年7月13日 (2012.7.13)	(74) 代理人	100130672 弁理士 伊藤 寛之
(31) 優先権主張番号	61/508,444	(72) 発明者	オシャネシィ, ダニエル, ジョン アメリカ合衆国 ペンシルベニア 194 73, シュウェンクスビル, 515 ガーロフ ロード
(32) 優先日	平成23年7月15日 (2011.7.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/604,412		
(32) 優先日	平成24年2月28日 (2012.2.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/604,954		
(32) 優先日	平成24年2月29日 (2012.2.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗葉酸受容体アルファ抗体およびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 乳癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵管癌、卵巣癌、又は肺癌などの、癌の診断方法の提供。

【解決手段】 葉酸受容体アルファに特異的な抗体及びその抗原結合フラグメント、関連ポリヌクレオチド、発現ベクター、抗体を発現する細胞、並びに関連キットの提供。記載した抗体及びその抗原結合フラグメントを使用した、対象者に由来する試料中の葉酸受容体アルファの量を決定すること、及び、このレベルを対照試料または参照試料中の葉酸受容体アルファのレベルと比較することを含む癌の診断方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

葉酸受容体アルファ（FR）に特異的な単離抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

配列番号 26 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1、
 配列番号 27 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2、
 配列番号 28 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3、
 配列番号 30 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1、
 配列番号 31 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2、および
 配列番号 32 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 3

を含むことを特徴とする単離抗体または抗原結合フラグメント。

10

【請求項 2】

前記抗体はマウス抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

前記抗体アイソタイプは Ig G であることを特徴とする請求項 1 もしくは 2 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

前記抗体はキメラ抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

20

【請求項 5】

前記抗体はヒト化抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

配列番号 29 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有することを特徴とする請求項 1 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

配列番号 33 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を有することを特徴とする請求項 1 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

30

【請求項 8】

配列番号 61 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 9】

配列番号 65 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 10】

配列番号 61 のヌクレオチド配列および配列番号 65 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 11】

葉酸受容体アルファ（FR）に特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列であって、

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR 1 が、配列番号 26 のアミノ酸配列を含み、
 前記コードされる抗体の軽鎖 CDR 2 が、配列番号 27 のアミノ酸配列を含み、
 前記コードされる抗体の軽鎖 CDR 3 が、配列番号 28 のアミノ酸配列を含み、
 前記コードされる抗体の重鎖 CDR 1 が、配列番号 30 のアミノ酸配列を含み、
 前記コードされる抗体の重鎖 CDR 2 が、配列番号 31 のアミノ酸配列を含み、および
 前記コードされる抗体の重鎖 CDR 3 が、配列番号 32 のアミノ酸配列を含む

40

ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド配列。

【請求項 12】

配列番号 58 の核酸配列、配列番号 59 の核酸配列、配列番号 60 の核酸配列、配列番号 62 の核酸配列、配列番号 63 の核酸配列、および配列番号 64 の核酸配列を含むことを特徴とする請求項 11 に記載の単離ポリヌクレオチド。

50

【請求項 13】

葉酸受容体アルファ（FR）に特異的に結合する抗体の、抗体軽鎖またはその抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列であって、

前記コードされる抗体の軽鎖CDR1が、配列番号58のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の軽鎖CDR2が、配列番号59のアミノ酸配列を含み、および

前記コードされる抗体の軽鎖CDR3が、配列番号60のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド配列。

【請求項 14】

葉酸受容体アルファ（FR）に特異的に結合する抗体の、抗体重鎖またはその抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列であって、

前記コードされる抗体の重鎖CDR1が、配列番号62のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の重鎖CDR2が、配列番号63のアミノ酸配列を含み、および

前記コードされる抗体の重鎖CDR3が、配列番号64のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド配列。

【請求項 15】

請求項8～14のいずれか1項に記載の単離ポリヌクレオチドを含むことを特徴とするベクター。

【請求項 16】

請求項15に記載のベクターを含むことを特徴とする遺伝子組み換え細胞。

【請求項 17】

前記細胞は真核細胞、植物細胞、または細菌であることを特徴とする請求項16に記載の遺伝子組み換え細胞。

【請求項 18】

前記真核細胞はCHO細胞であることを特徴とする請求項17に記載の遺伝子組み換え細胞。

【請求項 19】

ATCCに寄託され受託番号PTA-11885を有する細胞株によって産生されることを特徴とする、葉酸受容体アルファ（FR）に特異的な単離抗体。

【請求項 20】

1×10^{-8} M以下の解離定数で葉酸受容体アルファ（FR）に結合することが可能であることを特徴とする請求項1～7または19のいずれか1項に記載の単離抗体。

【請求項 21】

約 2.73×10^{-11} Mの解離定数で葉酸受容体アルファ（FR）に結合することが可能であることを特徴とする請求項1～7または19のいずれか1項に記載の単離抗体。

【請求項 22】

葉酸受容体アルファ（FR）に特異的な単離抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、

配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、

配列番号12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、

配列番号14のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、

配列番号15のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および

配列番号16のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含むことを特徴とする単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 23】

前記抗体はマウス抗体であることを特徴とする請求項22に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 24】

前記抗体アイソタイプはIgGであることを特徴とする請求項22もしくは23に記載

10

20

30

40

50

の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 25】

前記抗体はキメラ抗体であることを特徴とする請求項 22 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 26】

前記抗体はヒト化抗体であることを特徴とする請求項 22 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 27】

配列番号 13 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有することを特徴とする請求項 22 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

10

【請求項 28】

配列番号 17 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を有することを特徴とする請求項 22 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 29】

配列番号 45 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 30】

配列番号 49 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 31】

配列番号 45 のヌクレオチド配列および配列番号 49 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

20

【請求項 32】

葉酸受容体アルファ (FR) に特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列であって、

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR1 が、配列番号 10 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR2 が、配列番号 11 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR3 が、配列番号 12 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の重鎖 CDR1 が、配列番号 14 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の重鎖 CDR2 が、配列番号 15 のアミノ酸配列を含み、および

前記コードされる抗体の重鎖 CDR3 が、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド配列。

30

【請求項 33】

配列番号 42 の核酸配列、配列番号 43 の核酸配列、配列番号 44 の核酸配列、配列番号 46 の核酸配列、配列番号 47 の核酸配列、および配列番号 48 の核酸配列を含むことを特徴とする請求項 32 に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 34】

葉酸受容体アルファ (FR) に特異的に結合する抗体の、抗体軽鎖またはその抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列であって、

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR1 が、配列番号 42 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR2 が、配列番号 43 のアミノ酸配列を含み、および

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR3 が、配列番号 44 のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド配列。

40

【請求項 35】

葉酸受容体アルファ (FR) に特異的に結合する抗体の、抗体重鎖またはその抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列であって、

前記コードされる抗体の重鎖 CDR1 が、配列番号 46 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の重鎖 CDR2 が、配列番号 47 のアミノ酸配列を含み、および

前記コードされる抗体の重鎖 CDR3 が、配列番号 48 のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド配列。

【請求項 36】

請求項 29 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の単離ポリヌクレオチドを含むことを特徴とす

50

るベクター。

【請求項 37】

請求項 35 に記載のベクターを含むことを特徴とする遺伝子組み換え細胞。

【請求項 38】

前記細胞は真核細胞、植物細胞、または細菌であることを特徴とする請求項 37 に記載の遺伝子組み換え細胞。

【請求項 39】

前記真核細胞は CHO 細胞であることを特徴とする請求項 38 に記載の遺伝子組み換え細胞。

【請求項 40】

ATCC に寄託され受託番号 PTA - 11884 を有する細胞株によって産生されることを特徴とする、葉酸受容体アルファ (FR) に特異的な単離抗体。

【請求項 41】

1×10^{-8} M 以下の解離定数で葉酸受容体アルファ (FR) に結合することが可能であることを特徴とする請求項 22 ~ 28 または 40 のいずれか 1 項に記載の単離抗体。

【請求項 42】

約 5.67×10^{-10} M の解離定数で葉酸受容体アルファ (FR) に結合することが可能であることを特徴とする請求項 22 ~ 28 または 40 のいずれか 1 項に記載の単離抗体。

【請求項 43】

葉酸受容体アルファ (FR) に特異的な単離抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

配列番号 18 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2、
配列番号 20 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR3、
配列番号 22 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR1、
配列番号 23 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR2、および
配列番号 24 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR3

を含むことを特徴とする単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 44】

前記抗体はマウス抗体であることを特徴とする請求項 43 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 45】

前記抗体アイソタイプは IgG であることを特徴とする請求項 43 もしくは 44 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 46】

前記抗体はキメラ抗体であることを特徴とする請求項 43 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 47】

前記抗体はヒト化抗体であることを特徴とする請求項 43 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 48】

配列番号 21 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有することを特徴とする請求項 43 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 49】

配列番号 25 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を有することを特徴とする請求項 43 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 50】

配列番号 53 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 51】

10

20

30

40

50

配列番号 57 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 52】

配列番号 53 のヌクレオチド配列および配列番号 57 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 53】

葉酸受容体アルファ (FR) に特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列であって、

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR1 が、配列番号 18 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR2 が、配列番号 19 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR3 が、配列番号 20 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の重鎖 CDR1 が、配列番号 22 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の重鎖 CDR2 が、配列番号 23 のアミノ酸配列を含み、および

前記コードされる抗体の重鎖 CDR3 が、配列番号 24 のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド配列。

10

【請求項 54】

配列番号 50 の核酸配列、配列番号 51 の核酸配列、配列番号 52 の核酸配列、配列番号 54 の核酸配列、配列番号 55 の核酸配列、および配列番号 56 の核酸配列を含むことを特徴とする請求項 53 に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 55】

葉酸受容体アルファ (FR) に特異的に結合する抗体の、抗体軽鎖またはその抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列であって、

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR1 が、配列番号 50 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR2 が、配列番号 51 のアミノ酸配列を含み、および

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR3 が、配列番号 52 のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド配列。

20

【請求項 56】

葉酸受容体アルファ (FR) に特異的に結合する抗体の、抗体重鎖またはその抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列であって、

前記コードされる抗体の重鎖 CDR1 が、配列番号 54 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の重鎖 CDR2 が、配列番号 55 のアミノ酸配列を含み、および

前記コードされる抗体の重鎖 CDR3 が、配列番号 56 のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド配列。

30

【請求項 57】

請求項 50 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の単離ポリヌクレオチドを含むことを特徴とするベクター。

【請求項 58】

請求項 57 に記載のベクターを含むことを特徴とする遺伝子組み換え細胞。

【請求項 59】

前記細胞は真核細胞、植物細胞、または細菌であることを特徴とする請求項 58 に記載の遺伝子組み換え細胞。

40

【請求項 60】

前記真核細胞は CHO 細胞であることを特徴とする請求項 59 に記載の遺伝子組み換え細胞。

【請求項 61】

ATCC に寄託され受託番号 PTA - 11886 を有する細胞株によって産生されることを特徴とする、葉酸受容体アルファ (FR) に特異的な単離抗体。

【請求項 62】

1×10^{-8} M 以下の解離定数で葉酸受容体アルファ (FR) に結合することが可能であることを特徴とする請求項 43 ~ 49 または 61 のいずれか 1 項に記載の単離抗体。

【請求項 63】

50

約 1.02×10^{-10} M の解離定数で葉酸受容体アルファ (FR) に結合することが可能であることを特徴とする請求項 43 ~ 49 または 61 のいずれか 1 項に記載の単離抗体。

【請求項 64】

葉酸受容体アルファ (FR) に特異的な単離抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

配列番号 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1、
配列番号 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2、
配列番号 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3、
配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1、
配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2、および
配列番号 8 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 3

を含むことを特徴とする単離抗体または抗原結合フラグメント。

10

【請求項 65】

前記抗体はマウス抗体であることを特徴とする請求項 64 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 66】

前記抗体アイソタイプは IgG であることを特徴とする請求項 64 もしくは 65 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 67】

前記抗体はキメラ抗体であることを特徴とする請求項 64 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

20

【請求項 68】

前記抗体はヒト化抗体であることを特徴とする請求項 64 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 69】

配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有することを特徴とする請求項 64 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 70】

配列番号 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を有することを特徴とする請求項 64 に記載の単離抗体または抗原結合フラグメント。

30

【請求項 71】

配列番号 37 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 72】

配列番号 41 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 73】

配列番号 37 のヌクレオチド配列および配列番号 41 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 74】

葉酸受容体アルファ (FR) に特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列であって、

40

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR 1 が、配列番号 2 のアミノ酸配列を含み、
前記コードされる抗体の軽鎖 CDR 2 が、配列番号 3 のアミノ酸配列を含み、
前記コードされる抗体の軽鎖 CDR 3 が、配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、
前記コードされる抗体の重鎖 CDR 1 が、配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、
前記コードされる抗体の重鎖 CDR 2 が、配列番号 7 のアミノ酸配列を含み、および
前記コードされる抗体の重鎖 CDR 3 が、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド配列。

【請求項 75】

配列番号 34 の核酸配列、配列番号 35 の核酸配列、配列番号 36 の核酸配列、配列番

50

号 38 の核酸配列、配列番号 39 の核酸配列、および配列番号 40 の核酸配列を含むことを特徴とする請求項 74 に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 76】

葉酸受容体アルファ (FR) に特異的に結合する抗体の、抗体軽鎖またはその抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列であって、

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR1 が、配列番号 34 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR2 が、配列番号 35 のアミノ酸配列を含み、および

前記コードされる抗体の軽鎖 CDR3 が、配列番号 36 のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド配列。

【請求項 77】

葉酸受容体アルファ (FR) に特異的に結合する抗体の、抗体重鎖またはその抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列であって、

前記コードされる抗体の重鎖 CDR1 が、配列番号 38 のアミノ酸配列を含み、

前記コードされる抗体の重鎖 CDR2 が、配列番号 39 のアミノ酸配列を含み、および

前記コードされる抗体の重鎖 CDR3 が、配列番号 40 のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド配列。

【請求項 78】

請求項 71 ~ 77 のいずれか 1 項に記載の単離ポリヌクレオチドを含むことを特徴とするベクター。

【請求項 79】

請求項 78 に記載のベクターを含むことを特徴とする遺伝子組み換え細胞。

【請求項 80】

前記細胞は真核細胞、植物細胞、または細菌であることを特徴とする請求項 79 に記載の遺伝子組み換え細胞。

【請求項 81】

前記真核細胞は CHO 細胞であることを特徴とする請求項 80 に記載の遺伝子組み換え細胞。

【請求項 82】

ATCC に寄託され受託番号 PTA - 11887 を有する細胞株によって産生されることを特徴とする、葉酸受容体アルファ (FR) に特異的な単離抗体。

【請求項 83】

1×10^{-8} M 以下の解離定数で葉酸受容体アルファ (FR) に結合することが可能であることを特徴とする請求項 64 ~ 70 または 82 のいずれか 1 項に記載の単離抗体。

【請求項 84】

約 7.15×10^{-10} M の解離定数で葉酸受容体アルファ (FR) に結合することが可能であることを特徴とする請求項 64 ~ 70 または 82 のいずれか 1 項に記載の単離抗体。

【請求項 85】

生体試料中の葉酸受容体アルファ (FR) を検出する方法であって、請求項 1, 19, 22, 40, 43, 61, 64 もしくは 82 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントに前記試料を曝して、葉酸受容体アルファ (FR) を検出することを特徴とする方法。

【請求項 86】

前記生体試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞、組織、手術摘出癌組織、生検、細針吸引試料、または、組織プレパラートに由来することを特徴とする請求項 85 に記載の方法。

【請求項 87】

前記生体試料は、ヒト、齧歯類、非ヒト霊長類、ウサギ、または、犬に由来することを特徴とする請求項 86 に記載の方法。

【請求項 88】

10

20

30

40

50

対象者における葉酸受容体アルファを発現する癌を診断する方法であって、

a. 前記対象者の生体試料を、

i. 請求項 1, 19, 22, 40, 43, 61, 64 もしくは 82 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントに、または

ii. 請求項 1, 19, 22, 40, 43, 61, 64 もしくは 82 のいずれか 1 項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (FR) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝すこと；

b. 前記試料に存在する葉酸受容体アルファ (FR) の量を定量化すること；

c. 前記試料に存在する葉酸受容体アルファ (FR) の量を既知の基準と比較すること；および

d. 前記対象者の葉酸受容体アルファ (FR) レベルが、癌に関連する葉酸受容体アルファ (FR) のレベルの範囲に入るかを判断することを含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 89】

前記生体試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞、組織、手術摘出癌組織、生検、細針吸引試料、または、組織プレパラートに由来することを特徴とする請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

前記癌は、乳癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵管癌、卵巣癌、または肺癌であることを特徴とする請求項 88 に記載の方法。

20

【請求項 91】

前記肺癌は腺癌であることを特徴とする請求項 90 に記載の方法。

【請求項 92】

前記対象者の腺癌細胞が葉酸受容体アルファを発現することが認められることは、前記腺癌細胞が葉酸受容体アルファを発現しない場合に比べて、前記対象者の 5 年生存率が改善された可能性が高いことを示すことを特徴とする請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記対象者の腺癌は、ステージ I、ステージ II、ステージ III またはステージ IV 腺癌であることを特徴とする請求項 92 に記載の方法。

【請求項 94】

前記既知の基準は、葉酸受容体アルファを発現する癌がないと確認された対象者に由来する葉酸受容体アルファ (FR) レベル、または、既知の濃度の葉酸受容体アルファタンパクの調製物を含むことを特徴とする請求項 88 に記載の方法。

30

【請求項 95】

前記既知の基準は、早期ステージにある葉酸受容体アルファを発現する癌を有すると確認された対象者に由来する葉酸受容体アルファ (FR) レベルを含むことを特徴とする請求項 88 に記載の方法。

【請求項 96】

前記既知の基準は、中期ステージにある葉酸受容体アルファを発現する癌を有すると確認された対象者に由来する葉酸受容体アルファ (FR) レベルを含むことを特徴とする請求項 88 に記載の方法。

40

【請求項 97】

前記既知の基準は、後期ステージにある葉酸受容体アルファを発現する癌を有すると確認された対象者に由来する葉酸受容体アルファ (FR) レベルを含むことを特徴とする請求項 88 に記載の方法。

【請求項 98】

前記葉酸受容体アルファを発現する癌は、乳癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵管癌、卵巣癌、または肺癌であることを特徴とする請求項 95 ~ 97 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 99】

50

対象者における葉酸受容体アルファを発現する癌を監視する方法であって、

a. 前記対象者の生体試料を、

i. 請求項 1, 19, 22, 40, 43, 61, 64 もしくは 82 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントに、または

ii. 請求項 1, 19, 22, 40, 43, 61, 64 もしくは 82 のいずれか 1 項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (FR) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝すこと；

b. 前記抗体またはその抗原結合フラグメントが結合した、前記試料に存在する葉酸受容体アルファ (FR) の量を定量化すること；

c. 前記試料に存在する葉酸受容体アルファ (FR) の量を、

i. 既知の基準、または

ii. 前記対象者からより早い時点で得た生体試料のいずれかと比較すること；および

d. 前記対象者の葉酸受容体アルファ (FR) レベルが、癌の進行、退行、または安定を示すかを判断すること

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 100】

前記生体試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞、組織、手術摘出癌組織、生検、細針吸引試料、または、組織プレパラートに由来することを特徴とする請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

前記癌は、乳癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵管癌、または卵巣癌であることを特徴とする請求項 99 に記載の方法。

【請求項 102】

前記癌は肺癌であることを特徴とする請求項 101 に記載の方法。

【請求項 103】

前記肺癌は腺癌であることを特徴とする請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】

前記既知の基準は、癌がないと確認された対象者に由来する葉酸受容体アルファ (FR) レベルを含むことを特徴とする請求項 99 に記載の方法。

【請求項 105】

前記既知の基準は、早期ステージの癌を有すると確認された対象者に由来する葉酸受容体アルファ (FR) レベルを含むことを特徴とする請求項 99 に記載の方法。

【請求項 106】

前記既知の基準は、中期ステージの癌を有すると確認された対象者に由来する葉酸受容体アルファ (FR) レベルを含むことを特徴とする請求項 99 に記載の方法。

【請求項 107】

前記既知の基準は、後期ステージの癌を有すると確認された対象者に由来する葉酸受容体アルファ (FR) レベルを含むことを特徴とする請求項 99 に記載の方法。

【請求項 108】

前記癌は、乳癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵管癌、卵巣癌、または肺癌であることを特徴とする請求項 105 ~ 107 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 109】

対象者における葉酸受容体アルファを発現する癌を処理する方法であって、

a. 前記対象者の生体試料を、

i. 請求項 1, 19, 22, 40, 43, 61, 64 もしくは 82 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントに、または

ii. 請求項 1, 19, 22, 40, 43, 61, 64 もしくは 82 のいずれか 1 項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (FR) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝すこと；

10

20

30

40

50

- b. 前記試料に存在する葉酸受容体アルファ (FR) の量を定量化すること；
- c. 前記試料に存在する葉酸受容体アルファ (FR) の量を既知の基準と比較すること；
- d. 前記対象者の葉酸受容体アルファ (FR) レベルが、癌に関連するFRのレベルの範囲に入るかを判断すること；および
- e. 癌の治療を前記患者に施す、または、癌の治療を処方することを含むことを特徴とする方法。

【請求項110】

前記生体試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞、組織、手術摘出癌組織、生検、細針吸引試料、または、組織プレパラートに由来することを特徴とする請求項109に記載の方法。

10

【請求項111】

前記癌は上皮性起源であることを特徴とする請求項109に記載の方法。

【請求項112】

前記上皮癌は、乳癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵管癌、卵巣癌、または肺癌であることを特徴とする請求項111に記載の方法。

【請求項113】

前記肺癌は腺癌または扁平上皮癌であることを特徴とする請求項112に記載の方法。

【請求項114】

前記癌は卵巣癌であることを特徴とする請求項109に記載の方法。

20

【請求項115】

前記既知の基準は、癌がないと確認された対象者に由来する葉酸受容体アルファ (FR) レベルを含むことを特徴とする請求項109に記載の方法。

【請求項116】

前記既知の基準は、早期ステージの癌を有すると確認された対象者に由来する葉酸受容体アルファ (FR) レベルを含むことを特徴とする請求項109に記載の方法。

【請求項117】

前記既知の基準は、中期ステージの癌を有すると確認された対象者に由来する葉酸受容体アルファ (FR) レベルを含むことを特徴とする請求項109に記載の方法。

【請求項118】

前記既知の基準は、後期ステージの癌を有すると確認された対象者に由来する葉酸受容体アルファ (FR) レベルを含むことを特徴とする請求項109に記載の方法。

30

【請求項119】

前記癌は、乳癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵管癌、卵巣癌、または肺癌であることを特徴とする請求項116～128のいずれか1項に記載の方法。

【請求項120】

請求項88～119のいずれか1項に記載の方法であって、

前記対象者の生体試料を

i. 請求項1, 19, 22, 40, 43, 61, 64もしくは82のいずれか1項に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントに、または

40

ii. 請求項1, 19, 22, 40, 43, 61, 64もしくは82のいずれか1項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (FR) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝すことは、

さらに、前記対象者の前記生体試料を、

iii. 請求項1, 19, 22, 40, 43, 61, 64もしくは82のいずれか1項に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または

iv. 請求項1, 19, 22, 40, 43, 61, 64もしくは82のいずれか1項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (FR) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメント

から選択される第2の抗体またはその抗原結合フラグメントに曝すことを含むことを特徴

50

とする方法。

【請求項 1 2 1】

前記第 2 の抗体は第 1 の抗体とは異なることを特徴とする請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記対象者の前記生体試料は、

i . 請求項 1 もしくは 1 9 に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 2 2 , 4 0 , 4 3 , 6 1 , 6 4 もしくは 8 2 のいずれか 1 項に記載の抗体に曝され；

i i . 請求項 2 2 もしくは 4 0 に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 1 , 1 9 , 4 3 , 6 1 , 6 4 もしくは 8 2 のいずれか 1 項に記載の抗体に曝され、

10

i i i . 請求項 4 3 もしくは 6 1 に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 1 , 1 9 , 2 2 , 4 0 , 6 4 もしくは 8 2 のいずれか 1 項に記載の抗体に曝され、または

i v . 請求項 6 4 もしくは 8 2 に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 1 , 1 9 , 2 2 , 4 0 , 4 3 もしくは 6 1 のいずれか 1 項に記載の抗体に曝される

ことを特徴とする請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記対象者の前記生体試料は、

20

i . 請求項 1 もしくは 1 9 に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 2 2 , 4 0 , 4 3 , 6 1 , 6 4 もしくは 8 2 のいずれか 1 項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され；

i i . 請求項 2 2 もしくは 4 0 に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 1 , 1 9 , 4 3 , 6 1 , 6 4 もしくは 8 2 のいずれか 1 項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、

i i i . 請求項 4 3 もしくは 6 1 に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 1 , 1 9 , 2 2 , 4 0 , 6 4 もしくは 8 2 のいずれか 1 項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、または

30

i v . 請求項 6 4 もしくは 8 2 に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 1 , 1 9 , 2 2 , 4 0 , 4 3 もしくは 6 1 のいずれか 1 項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝される

ことを特徴とする請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記対象者の前記生体試料は、

40

i . 請求項 1 もしくは 1 9 に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 2 2 , 4 0 , 4 3 , 6 1 , 6 4 もしくは 8 2 のいずれか 1 項に記載の抗体に曝され；

i i . 請求項 2 2 もしくは 4 0 に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 1 , 1 9 , 4 3 , 6 1 , 6 4 もしくは 8 2 のいずれか 1 項に記載の抗体に曝され、

i i i . 請求項 4 3 もしくは 6 1 に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 1 , 1 9 , 2 2 , 4 0 , 6 4 もしくは 8 2 のいずれか 1 項に記載の抗

50

体に曝され、または

i v . 請求項 6 4 もしくは 8 2 に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 1 , 1 9 , 2 2 , 4 0 , 4 3 もしくは 6 1 のいずれか 1 項に記載の抗体に曝される

ことを特徴とする請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記対象者の前記生体試料は、

i . 請求項 1 もしくは 1 9 に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 2 2 , 4 0 , 4 3 , 6 1 , 6 4 もしくは 8 2 のいずれか 1 項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、

i i . 請求項 2 2 もしくは 4 0 に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 1 , 1 9 , 4 3 , 6 1 , 6 4 もしくは 8 2 のいずれか 1 項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、

i i i . 請求項 4 3 もしくは 6 1 に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 1 , 1 9 , 2 2 , 4 0 , 6 4 もしくは 8 2 のいずれか 1 項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、または

i v . 請求項 6 4 もしくは 8 2 に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、請求項 1 , 1 9 , 2 2 , 4 0 , 4 3 もしくは 6 1 のいずれか 1 項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ (F R) のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメントに曝される

ことを特徴とする請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記対象者の癌の治療に続いて行われることを特徴とする請求項 9 9 ~ 1 0 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記抗体または抗体フラグメントは、標識されることを特徴とする請求項 8 5 ~ 1 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記標識は、放射性標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、E C L 標識、または酵素であることを特徴とする請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記曝される葉酸受容体アルファ (F R) は細胞に結合している、または結合していないことを特徴とする請求項 8 5 ~ 1 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記試料における葉酸受容体アルファ (F R) の存在は、ウエスタンブロット、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降、電気化学発光免疫アッセイ (E C L I A) または E L I S A を使用して検出されることを特徴とする請求項 8 5 ~ 1 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

生体試料における葉酸受容体アルファ (F R) の存在を検出するためのキットであって、

i . 請求項 1 ~ 7 , 1 9 , 2 2 ~ 2 8 , 4 0 , 4 3 ~ 4 9 , 6 1 , 6 4 ~ 7 0 もしくは

10

20

30

40

50

82のいずれか1項に記載の少なくとも1つの抗体もしくはその抗原結合フラグメント、および/または、

ii. 請求項19, 40, 61または82のいずれか1項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ(FR)のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメント; ならびに

使用しないときに前記抗体を収容するための容器、および、前記抗体の使用の指示を含むことを特徴とするキット。

【請求項132】

生体試料における葉酸受容体アルファ(FR)の存在を検出するためのキットであって、

i. 請求項1~7, 19, 22~28, 40, 43~49, 61, 64~70もしくは82のいずれか1項に記載の少なくとも1つの抗体もしくはその抗原結合フラグメント、および/または、

ii. 請求項19, 40, 61または82のいずれか1項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ(FR)のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメント

を含み、

前記含まれる抗体またはその抗原結合フラグメントが、固体支持体に貼付されていることを特徴とするキット。

【請求項133】

生体試料における葉酸受容体アルファ(FR)の存在を検出するためのキットであって、

i. 請求項1~7, 19, 22~28, 40, 43~49, 61, 64~70もしくは82のいずれか1項に記載の少なくとも1つの抗体もしくはその抗原結合フラグメント、および/または、

ii. 請求項19, 40, 61または82のいずれか1項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ(FR)のエピトープに結合することが可能な抗体もしくはその抗原結合フラグメント

を含み、

前記含まれる抗体またはその抗原結合フラグメントが、検出可能に標識されていることを特徴とするキット。

【請求項134】

前記対象者の葉酸受容体アルファ(FR)レベルは、前記対象者が患う癌の種類を示すことを特徴とする請求項88~97のいずれか1項に記載の方法。

【請求項135】

前記癌は肺腺癌または肺扁平上皮癌であることを特徴とする請求項134に記載の方法。

【請求項136】

請求項19, 40, 61, または82のいずれか1項に記載の抗体が結合する、葉酸受容体アルファ(FR)のエピトープに結合することが可能であることを特徴とする単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項137】

遺伝子組み換え型であることを特徴とする請求項136に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項138】

請求項19に記載の抗体が結合する葉酸受容体アルファ(FR)エピトープは、配列番号1のアミノ酸残基41~53を含むことを特徴とする請求項136または137のいずれかに記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項139】

請求項61に記載の抗体が結合する葉酸受容体アルファ(FR)エピトープは、配列

10

20

30

40

50

番号1のアミノ酸残基68～80または92～105を含むことを特徴とする請求項136または137のいずれかに記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項140】

請求項61に記載の抗体が結合する葉酸受容体アルファ(FR)エピトープは、配列番号1のアミノ酸残基68～80および92～105を含むことを特徴とする請求項136または137のいずれかに記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項141】

請求項82に記載の抗体が結合する葉酸受容体アルファ(FR)エピトープは、配列番号1のアミノ酸残基199～209を含むことを特徴とする請求項136または137のいずれかに記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項142】

前記抗体は検出可能に標識されていることを特徴とする請求項1～7, 19, 22～28, 40, 43～49, 61, 64～70, 82, 136または137のいずれか1項に記載の単離抗体。

【請求項143】

前記識別可能な標識は、放射性標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、ECL標識、または酵素であることを特徴とする請求項142に記載の抗体。

【請求項144】

前記標識は、ルテニウム、¹¹¹In-DOTA、¹¹¹In-ジエチレントリアミン5酢酸(DTPA)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼおよびベータガラクトシダーゼ、またはポリヒスチジンであることを特徴とする請求項143に記載の抗体。

20

【請求項145】

生体試料における葉酸受容体アルファ(FR)を発現する癌を検出する方法であって、請求項1～7, 19, 22～28, 40, 43～49, 61, 64～70, 82, 136もしくは137のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントに前記試料を曝すこと、および、葉酸受容体アルファ(FR)を検出することを特徴とする方法。

【請求項146】

前記抗体または抗原結合フラグメントは、固体支持体に貼付されていることを特徴とする請求項85～119のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項147】

請求項88～98のいずれか1項に記載の方法であって、葉酸受容体アルファ(FR)を発現する腺癌を有する対象者の好ましい転帰を予測することをさらに含み、前記好ましい転帰は、5年生存率が高くなることであると定義されることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の参照

本出願は、2011年7月15日出願の米国仮出願番号61/508,444、2012年2月28日出願の米国仮出願番号61/604,412、および、2012年2月29日出願の米国仮出願番号61/604,954の利益を主張し、これらの出願の各々は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0002】

本明細書において提供する主題は、葉酸受容体アルファ(FR)に特異的な抗体、ならびに、前記抗体の生産および使用の方法に関する。

【背景技術】

【0003】

ヒトにおいて、葉酸に対して親和性の高い受容体は、アルファ、ベータ、ガンマおよびデルタの4つのアイソフォームで現れる。アルファ、ベータおよびデルタの型は、一般に

50

、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーによって、細胞の膜に結合している。これらは、細胞外区画と細胞内区画との間で循環し、葉酸を細胞内に輸送することができる。葉酸受容体の可溶型は、膜に固定された葉酸受容体に対するプロテアーゼまたはホスホリパーゼの作用によってもたらされるかも知れない。

【 0 0 0 4 】

葉酸受容体アルファ (FR 、 FR アルファ、 F O L R - 1 または F O L R 1 と もいう) は、脈絡叢、肺、甲状腺、腎臓、子宮、乳房、卵管、精巣上体、および唾液腺の上皮組織を含む種々の上皮組織において発現する。 Weitman, S D et al., Cancer Res 52: 3396 - 3401 (1992); Weitman S D et al., Cancer Res 52: 6708 - 6711 (1992)。 FR の過剰発現が、肺癌 (たとえば、カルチノイド腫瘍、および、腺癌などの非小細胞肺癌) ; 中皮腫 ; 卵巣癌 ; 腎臓癌 ; 脳腫瘍 (たとえば、未分化の上皮腫、脳若年性毛様細胞性星細胞腫、および、脳転移) ; 子宮頸癌 ; 上咽頭癌 ; 中胚葉由来腫瘍 ; 頭部および頸部の扁平上皮癌 ; 子宮内膜癌 ; 卵巣の乳頭状漿液性および類子宮内膜腺癌、卵巣の漿液性嚢胞腺癌、乳癌 ; 膀胱癌 ; 膵臓癌 ; 骨肉腫 (たとえば、高悪性度骨肉腫) ; 下垂体癌 (たとえば、下垂体腺腫) ; 結腸直腸癌および甲状腺髄様癌を含む、種々の癌で観察されている。たとえば、米国特許第 US 7, 754, 698 号 ; 米国特許出願第 US 2005 / 0232919 号 ; 国際公報第 WO 2009 / 132081 号 ; Bueno R et al., J of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 121 (2) : 225 - 233 (2001) ; Elkanat H & Ratnam M. Frontiers in Bioscience, 11, 506 - 519 (2006) ; Basal et al., PLoS ONE, 4 (7) : 6292 (2009) ; Fisher R E J Nucl Med, 49: 899 - 906 (2008) ; Franklin, W A et al., Int J Cancer, Suppl 8: 89 - 95 (1994) ; Hartmann L C et al., Int J Cancer 121: 938 - 942 (2007) ; Iwakiri S et al., Annals of Surgical Oncology, 15 (3) : 889 - 899 (2008) ; 欧州特許公報第 EP 2199796 号, Parker N. et al., Analytical Biochemistry, 338: 284 - 293 (2005) ; Weitman, S D et al., Cancer Res 52: 3396 - 3401 (1992) ; Saba N F et al., Head Neck, 31 (4) : 475 - 481 (2009) ; Yang R et al., Clin Cancer Res 13: 2557 - 2567 (2007)、を参照。ある種の癌 (たとえば、頭部および頸部の扁平上皮癌) において、FR の高濃度の発現は不良予後に関連し、一方、他の種の癌 (たとえば、非小細胞肺癌) においては、FR の高濃度の発現は、より好ましい予後に関連する。たとえば、Iwakiri S et al., Annals of Surgical Oncology, 15 (3) : 889 - 899 ; Saba N F et al. Head Neck, 31 (4) : 475 - 481 (2009) を参照。

【 0 0 0 5 】

癌の早期発見は、生存率および生活の質を向上させる。早期の発見および治療の可能性を向上させるために、FR を発現する癌を診断するための、および、既存の FR を発現する癌を監視するための、非侵襲的方法に対する差し迫った必要性が存在する。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 6 】

本明細書において提供するものは、FR に特異的に結合する抗体である。提供される抗体をコードし得る関連ポリヌクレオチド、提供される抗体を発現する細胞の他、関連ペクターおよび検出可能な抗体標識も記載する。さらに、提供される抗体を使用する方法を記載する。たとえば、提供される抗体は、癌を診断すること、癌の進行、退行、または安定を監視すること、対象者における癌の診断を開発すること、患者を癌について治療すべきか否かを判断すること、または、対象者が FR 発現癌を患っており、したがって、F

R 特異的抗腫瘍療法での治療に適するかも知れないか否かを判断すること、に使用されてよい。

【0007】

葉酸受容体アルファ (FR) 特異的抗体

本明細書に記載するものは、単離した抗体、および、FR に特異的に結合する抗原結合フラグメントである。いくつかの実施形態において、抗体および抗原結合フラグメントは、マウス IgG またはその誘導體である。

【0008】

いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号2と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号3と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR2アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号4と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR3アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号6と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号7と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR2アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号8と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR3アミノ酸配列を含んでよい。前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号2と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1アミノ酸配列、配列番号3と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号4と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列を含んでよい。前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号6と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1アミノ酸配列、配列番号7と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号8と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列を含んでよい。前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号2と実質的に同じまたは同一のCDR1アミノ酸配列、配列番号3と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号4と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列を有する軽鎖を含んでよく、また、配列番号6と実質的に同じまたは同一のCDR1アミノ酸配列、配列番号7と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号8と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列を有する重鎖を有してよい。

10

20

30

【0009】

記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号5と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号37と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号9と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号41と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この重鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号5と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および、配列番号9と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、天然型または非還元型のFR に結合することが可能な、9F3・H9・H3・H3・B5・G2(9F3)抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

40

【0010】

いくつかの実施形態において、前記9F3抗体は、2011年5月19日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209)に寄託され、PTA-11887の受託番号を割り当てられた抗体産生細胞によって産生される。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体のF に結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、

50

記載した抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の、軽鎖CDRおよび重鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む。

【0011】

天然型または還元型のFR に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチドも記載する。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号2と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1配列を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号34を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号3と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR2配列を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号35を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号4と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR3配列を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号36を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号6と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1配列を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号38を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号7と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR2配列を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号39を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号8と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR3配列を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号40を含む。前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号2と実質的に同じまたは同一のCDR1配列、配列番号3と実質的に同じまたは同一のCDR2配列、および、配列番号4と実質的に同じまたは同一のCDR3配列、を有する軽鎖を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてもよく、たとえば配列番号34、たとえば配列番号35、および、たとえば配列番号36を含む。前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号6と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1、配列番号7と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、配列番号8と実質的に同じまたは同一のCDR3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてもよく、たとえば配列番号38、たとえば配列番号39、および、たとえば配列番号40を含む。前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号2と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号3と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号4と実質的に同じまたは同一のCDR3、ならびに、配列番号6と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1；配列番号7と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、配列番号8と実質的に同じまたは同一のCDR3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてもよく、たとえば配列番号34、たとえば配列番号35、および、たとえば配列番号36、ならびに、たとえば配列番号38、たとえば配列番号39、および、たとえば配列番号40を含む。CDRの抗原結合配置は、また、抗体様タンパクをCDRの骨組として使用して設計してもよい。このように設計された抗原結合タンパクは、本開示の範囲内である。

【0012】

本明細書に記載のポリヌクレオチドは、配列番号5と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてもよく、たとえば配列番号37を含む。いくつかの実施形態において、記載した単離ポリヌクレオチドは、配列番号9と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてもよく、たとえば配列番号41を含む。いくつかの実施形態において、記載した単離ポリヌクレオチドは、配列番号5と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分、および、配列番号9と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分、を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてもよく、たとえば配列番号37、および、たとえば配列番号41を含む。本明細書において提供する可変領域区分をコードすることが可能な前

10

20

30

40

50

記単離ポリヌクレオチドは、抗体または抗原結合フラグメントを産生するために、同じまたは異なるベクターに含まれてよい。本明細書に記載のポリヌクレオチドは、天然型または還元型のFR に結合することが可能な、9F3抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよい。

【0013】

本明細書には、天然型または還元型のFR に特異的に結合する単離抗体および抗原結合フラグメントを記載する。いくつかの実施形態において、前記抗体または抗原結合フラグメントは、マウスIgGまたはその誘導体である。前記抗体または抗原結合フラグメントは、ヒトの、ヒト化された、またはキメラのものであってよいが、本明細書に例示する抗体または抗原結合フラグメントは、マウスのものである。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号10と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号11と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR2アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号12と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR3アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号14と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号15と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR2アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号16と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR3アミノ酸配列を含んでよい。前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号10と実質的に同じまたは同一のCDR1アミノ酸配列、配列番号11と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号12と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列を有する軽鎖を含んでよい。前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号14と実質的に同じまたは同一のCDR1アミノ酸配列、配列番号15と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号16と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列を有する重鎖を含んでよい。前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号10と実質的に同じまたは同一のCDR1アミノ酸配列、配列番号11と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号12と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列を有する軽鎖、ならびに、さらに、配列番号14と実質的に同じまたは同一のCDR1アミノ酸配列、配列番号15と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号16と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列を有する重鎖を含んでよい。

10

20

30

40

50

【0014】

記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号13と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号45と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号17と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号49と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この重鎖可変領域をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号13と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および、配列番号17と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、天然型FR または還元型FR のいずれかに結合することが可能な19D4 . B7 (19D4) 抗体またはその抗原結合フラグメントが、提供される。

【0015】

いくつかの実施形態において、19D4抗体は、2011年5月19日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209)に寄託され、PTA-11

884の受託番号を割り当てられた抗体産生細胞によって産生される。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体のFRに結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、開示した抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖CDRおよび重鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む。

【0016】

天然型FRまたは還元型FRのいずれかに特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントをコードする、単離ポリヌクレオチドも開示する。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号10と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1配列を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号42を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号11と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR2を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号43を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号12と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR3を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号44を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号14と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号46を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号15と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR2を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号47を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号16と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR3を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号48を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号10と実質的に同じまたは同一のCDR1、配列番号11と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、配列番号12と実質的に同じまたは同一のCDR3、を有する軽鎖を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号42、たとえば配列番号43、および、たとえば配列番号44を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号14と実質的に同じまたは同一のCDR1、配列番号15と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、配列番号16と実質的に同じまたは同一のCDR3、を有する重鎖を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号46、たとえば配列番号47、および、たとえば配列番号48を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号10と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号11と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号12と実質的に同じまたは同一のCDR3、ならびに、配列番号14と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1、配列番号15と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、配列番号16と実質的に同じまたは同一のCDR3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号42、たとえば配列番号43、および、たとえば配列番号44、ならびに、たとえば配列番号46、たとえば配列番号47、および、たとえば配列番号48を含む。CDRの抗原結合配置は、また、抗体様タンパクをCDRの骨組として使用して設計してもよい。このように設計された抗原結合タンパクは、本開示の範囲内である。

【0017】

本明細書に記載のポリヌクレオチドは、配列番号13と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号45を含む。いくつかの実施形態において、記載したポリヌクレオチドは、配列番号17と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号49を含む。いくつかの実施形態において、記載したポリヌクレオチドは、配列番号13と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分、および、配列番号17と実

10

20

30

40

50

質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分、を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号45、および、たとえば配列番号49を含む。本明細書において提供する可変領域区分をコードすることが可能な前記ポリヌクレオチドは、抗体または抗原結合フラグメントを産生するために、同じまたは異なるベクターに含まれてよい。本明細書に記載のポリヌクレオチドは、天然型FR または還元型FR に結合することが可能な19D4抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよい。

【0018】

本明細書には、天然型FR または還元型FR に結合することが可能な、FR に特異的に結合する単離抗体または抗原結合フラグメントに記載する。いくつかの実施形態において、前記抗体または抗原結合フラグメントはマウスのIgGまたはその誘導体である。前記抗体または抗原結合フラグメントは、ヒトの、ヒト化された、またはキメラのものであってよいが、本明細書に例示する抗体または抗原結合フラグメントは、マウスのものである。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号18と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号19と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR2アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号20と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR3アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号22と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号23と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR2アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号24と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR3アミノ酸配列を含んでよい。前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号18と実質的に同じまたは同一のCDR1アミノ酸配列、配列番号19と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号20と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列、を有する軽鎖を含んでよい。前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号22と実質的に同じまたは同一のCDR1アミノ酸配列、配列番号23と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号24と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列、を有する重鎖を含んでよい。前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号18と実質的に同じまたは同一のCDR1アミノ酸配列、配列番号19と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号20と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列、を有する軽鎖、ならびに、さらに、配列番号22と実質的に同じまたは同一のCDR1アミノ酸配列、配列番号23と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号24と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列を有する重鎖を含んでよい。

【0019】

記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号21と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号53と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号25と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号57と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この重鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号21と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および、配列番号25と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、天然型FR または還元型FR のいずれかに結合することが可能な、24F12・B1(24F12)抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【0020】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、24F12抗体は、2011年5月19日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209)に寄託され、PTA-11886の受託番号を割り当てられた抗体産生細胞によって産生される。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体のFRに結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、開示した抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖CDRおよび重鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む。

10

【0021】

FRに特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドも記載する。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号18と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1配列を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号50を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号19と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR2を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号51を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号20と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR3を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号52を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号22と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号54を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号23と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR2を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号55を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号24と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR3を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号56を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号18と実質的に同じまたは同一のCDR1、配列番号19と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、配列番号20と実質的に同じまたは同一のCDR3、を有する軽鎖を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号50、たとえば配列番号51、および、たとえば配列番号52を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号22と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1、配列番号23と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、配列番号24と実質的に同じまたは同一のCDR3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号54、たとえば配列番号55、および、たとえば配列番号56を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号18と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号19と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号20と実質的に同じまたは同一のCDR3、ならびに、配列番号22と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1、配列番号23と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、配列番号24と実質的に同じまたは同一のCDR3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号50、たとえば配列番号51、および、たとえば配列番号52、ならびに、たとえば配列番号54、たとえば配列番号55、および、たとえば配列番号56を含む。CDRの抗原結合配置は、また、抗体様タンパクをCDRの骨組として使用して設計してもよい。このように設計された抗原結合タンパクは、本開示の範囲内である。

20

30

40

【0022】

本明細書に記載のポリヌクレオチドは、配列番号21と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号53を含む。いくつかの実施形態において、記載したポリヌクレオチドは、配列番号25と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区

50

分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 57 を含む。いくつかの実施形態において、記載したポリヌクレオチドは、配列番号 21 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分、および、配列番号 25 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分、を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 53、および、たとえば配列番号 57 を含む。本明細書において提供する可変領域区分をコードする前記ポリヌクレオチドは、抗体または抗原結合フラグメントを産生するために、同じまたは異なるベクターに含まれてよい。本明細書に記載のポリヌクレオチドは、天然型 F R または還元型 F R のいずれかに結合することが可能な 24 F 1 2 抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよい。

10

【0023】

本明細書には、天然型、非還元型、又は化学的に保存されている型のいずれかの、F R に特異的に結合する単離抗体または抗原結合フラグメントに記載する。いくつかの実施形態において、前記抗体または抗原結合フラグメントはマウスの I g G またはその誘導体である。前記抗体または抗原結合フラグメントは、ヒトの、ヒト化された、またはキメラのものであってよいが、本明細書に例示する抗体または抗原結合フラグメントは、マウスのものである。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 26 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 27 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 28 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 30 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 31 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 32 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含んでよい。前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 26 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 27 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列、および、配列番号 28 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列、を有する軽鎖を含んでよい。前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 30 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 31 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列、および、配列番号 32 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列、を有する重鎖を含んでよい。前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 26 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 27 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列、および、配列番号 28 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列、を有する軽鎖、ならびに、さらに、配列番号 30 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 31 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列、および、配列番号 32 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列を有する重鎖を含んでよい。

20

30

【0024】

記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 29 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号 61 と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 33 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号 65 と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この重鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 29 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および、配列番号 33 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、天然型、非還元型、又は化学的

40

50

に保存されている型のFR に結合することが可能な、26B3・F2(26B3)抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【0025】

いくつかの実施形態において、26B3抗体は、2011年5月19日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209)に寄託され、PTA-11885の受託番号を割り当てられた抗体産生細胞によって産生される。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体のFR に結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、開示した抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖CDRおよび重鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む。

10

【0026】

天然型、非還元型、又は化学的に保存されている型のFR に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドも開示する。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号26と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1配列を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号58を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号27と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR2を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号59を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号28と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR3を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号60を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号30と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号62を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号31と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR2を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号63を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号32と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR3を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号64を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号26と実質的に同じまたは同一のCDR1、配列番号27と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、配列番号28と実質的に同じまたは同一のCDR3、を有する軽鎖を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号58、たとえば配列番号59、および、たとえば配列番号60を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号30と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1、配列番号31と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、配列番号32と実質的に同じまたは同一のCDR3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよい、たとえば配列番号62、たとえば配列番号63、および、たとえば配列番号64を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号26と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号27と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号28と実質的に同じまたは同一のCDR3、ならびに、配列番号30と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1、配列番号31と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、配列番号32と実質的に同じまたは同一のCDR3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよい、たとえば配列番号58、たとえば配列番号59、および、たとえば配列番号60、ならびに、たとえば配列番号62、たとえば配列番号63、および、たとえば配列番号64を含む。CDRの抗原結合配置は、また、抗体様タンパクをCDRの骨組として使用して設計してもよい。このように設計された抗原結合タンパクは、本開示の範囲内である。

20

30

40

【0027】

本明細書に記載のポリヌクレオチドは、配列番号29と実質的に同じまたは同一のアミ

50

ノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号61を含む。いくつかの実施形態において、記載したポリヌクレオチドは、配列番号33と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号65を含む。いくつかの実施形態において、記載したポリヌクレオチドは、配列番号29と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分、および、配列番号33と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分、を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号61、および、たとえば配列番号65を含む。本明細書において提供する可変領域区分をコードすることが可能な前記ポリヌクレオチドは、抗体または抗原結合フラグメントを産生するために、同じまたは異なるベクターに含まれてよい。本明細書に記載のポリヌクレオチドは、天然型、非還元型、又は化学的に保存された型のFR に結合することが可能な、26B3抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよい。

10

20

30

40

50

【0028】

FR に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントを発現する細胞と共に、抗体をコードする、または、抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。記載したベクターを発現することが可能な細胞も提供する。これらの細胞は、哺乳類細胞（CHO-K1細胞など）、昆虫細胞（Sf7細胞など）、酵母細胞、植物細胞、または細菌細胞（E. coliなど）であってよい。記載した抗体は、また、本明細書に記載のハイブリドーマ細胞によっても産生される。

【0029】

癌を診断するためのモデル

本明細書では、対象者における上皮性起源の乳癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、卵管癌、卵巣癌または肺癌を診断する方法を提供する。いくつかの実施形態において、記載した方法は、対象者に由来する試料に存在するFR のレベルを決定すること；および、観察されたFR のレベルを対照試料中のFR のレベルと比較することによって、前記対象者がFR を発現する癌を患っているかを評価することを含み、ここで、前記対象者に由来する試料におけるFR のレベルと、対照試料中のFR のレベルとの差が、前記対象者がFR を発現する癌を患っているか否かの目安になる。

【0030】

いくつかの実施形態において、前記対照試料は、FR を発現する癌を患っていない対象者に由来してよい。いくつかの実施形態において、前記対照試料は、FR を発現する癌を患っている対象者に由来してよい。前記対照試料がFR を発現する癌を患っていない対象者に由来するいくつかの実施形態において、前記試料に存在するFR の量が、対照試料について観察される量に対して、増加していることが観察されるということは、評価される前記対象者がFR を発現する癌を患っていることの見安になる。前記対照試料がFR を発現する癌を患っていない対象者に由来するいくつかの実施形態において、前記試料に存在するFR の量が、対照試料について観察される量に対して、減少していることまたは類似していることが観察されるということは、評価される前記対象者がFR を発現する癌を患っていないことの見安になる。前記対照試料がFR を発現する癌を患っている対象者に由来するいくつかの実施形態において、前記試料に存在するFR の量が、対照試料について観察される量に対して、類似していることが観察されるということは、評価される前記対象者がFR を発現する癌を患っていることの見安になる。前記対照試料がFR を発現する癌を患っている対象者に由来するいくつかの実施形態において、前記試料に存在するFR の量が、対照試料について観察される量に対して、減少していることが観察されるということは、評価される前記対象者がFR を発現する癌を患っていないことの見安になる。

【0031】

いくつかの実施形態において、前記対象者に由来する試料におけるFR のレベルは、前記試料を、本明細書に記載の抗体などの、FR に結合する抗体に接触させることによ

って評価される。対象者がFR 産生の増加に関連しない癌を患っているかを判断するために、類似の方法を使用してよい。FR の存在について評価される試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞（つまり、遊離細胞）、組織（たとえば、手術摘出癌組織、細針吸引生検を含む生検）、組織プレパラートなどに由来してよい。

【0032】

いくつかの実施形態において、記載した方法は、対象者に由来する試料に存在する細胞または組織に関連するFR のレベルを決定すること；および、観察されたFR のレベルを対照試料中のFR のレベルと比較することによって、対象者がFR を発現する癌を患っているかを評価することを含み、ここで、前記対象者に由来する試料におけるFR のレベルと、対照試料中のFR のレベルとの差が、前記対象者がFR を発現する癌を患っていることの見当になる。いくつかの実施形態において、前記対象者に由来する試料におけるFR のレベルは、前記試料を、本明細書に記載の抗体などの、FR に結合する抗体に接触させることによって評価される。FR の存在について評価される試料は、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞（つまり、遊離細胞）、組織（たとえば、手術摘出癌組織、細針吸引生検を含む生検）、組織プレパラートなどであってよい。

10

【0033】

いくつかの実施形態において、記載した方法は、対象者に由来する試料に存在する細胞または組織に関連しないFR のレベルを決定すること；および、観察されたFR のレベルを対照試料中のFR のレベルと比較することによって、前記対象者がFR を発現する癌を患っているかを評価することを含み、ここで、前記対象者に由来する試料におけるFR のレベルと、対照試料中のFR のレベルとの差が、前記対象者がFR を発現する癌を患っていることの見当になる。いくつかの実施形態において、前記対象者に由来する試料におけるFR のレベルは、前記試料を、本明細書に記載の抗体などの、FR に結合する抗体に接触させることによって評価される。FR の存在について評価される試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、組織プレパラートなどであってよい。

20

【0034】

記載した方法の様々な実施形態において、前記癌はFR を発現する癌であってよい。特定の実施形態において、前記FR を発現する癌は、卵巣癌である。いくつかの実施形態において、前記FR を発現する癌は、子宮内膜癌である。いくつかの実施形態において、前記FR を発現する癌は、結腸直腸癌である。いくつかの実施形態において、前記FR を発現する癌は、乳癌である。いくつかの実施形態において、前記FR を発現する癌は、甲状腺癌である。いくつかの実施形態において、前記FR を発現する癌は、卵管癌である。他の実施形態において、前記FR を発現する癌は、腺癌などの非小細胞肺癌である。上記に代えて、記載した方法は、扁平上皮癌などの、FR を発現しない癌を特定するために使用されてよい。たとえば、記載した方法は、腺癌などのFR を発現する肺癌と、扁平上皮癌などのFR を発現しない肺癌とを、識別するのに使用することができるであろう。記載した方法は、線維腺腫などのFR を発現する乳癌と、嚢肉腫などのFR を発現しない乳癌とを、識別するのに使用することができるであろう。さらに、記載した方法は、乳頭癌などのFR を発現する甲状腺癌と、髄様癌などのFR を発現しない甲状腺癌とを、識別するのに使用することができるであろう。本明細書に記載のいくつかの実施形態において、対象者におけるFR を発現する癌細胞の検出は、前記対象者がFR に対する治療薬で治療されてよいことを判断するために使用されてよい。いくつかの実施形態において、FR に対する前記治療薬は、ファーレッツマブなどの抗体であってよい。

30

40

【0035】

様々な側面において、FR のレベルは、前記試料をFR に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させることによって、決定される。いくつかの実施形態において、前記試料は、FR に結合する2種以上の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。いくつかの実施形態において、前記試料は、FR に結合する第1の抗

50

体またはその抗原結合フラグメントに接触させ、次いで、FR に結合する第2の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。本明細書に記載のものなどの抗体を、このために使用してよい。たとえば、前記抗体は、

(a) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12、もしくは抗体26B3のいずれか1つと同じエピトープに結合する、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

(b) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12、もしくは抗体26B3のいずれか1つ、もしくはその抗原結合フラグメント；

(c) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12、もしくは抗体26B3のいずれか1つの、重鎖CDRもしくは軽鎖CDRを含む抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

(d) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12、もしくは抗体26B3のいずれか1つの、表1に記載の、重鎖可変領域区分および軽鎖可変領域区分を含む、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；または

(e) ATCCに寄託され、PTA-11887、PTA-11884、PTA-11886、もしくはPTA-11885の受託番号を有する細胞株のいずれか1つによって産生される抗体のアミノ酸配列を有する抗体、もしくはその抗原結合フラグメントで構成される群から選択される。

【0036】

特定の実施形態において、FR のレベルは、ウエスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散、電気化学発光(ECL)イムノアッセイ、免疫組織化学、蛍光活性化細胞分類(FACS)、またはELISAによって決定される。

【0037】

本発明の前述の特徴の様々な実施形態において、対照試料は、健康な対象者のFR の標準対照レベルである。他の実施形態において、対照試料は、既知の濃度のFR タンパク(たとえば、遺伝子組み換えまたは精製FR タンパク試料)であってよい。いくつかの実施形態において、試験される対象者の観察されたFR レベルは、FR を発現する癌を有することが知られている対象者に由来する試料において観察されるFR レベル、または、FR の既知の濃度と比較されてよい。

【0038】

癌を監視する方法

本明細書では、対象者におけるFR を発現する癌を監視する方法を提供する。記載した方法は、癌の治療の前、癌の治療の後、または、癌の治療の前と後の両方に、使用してよい。いくつかの実施形態において、記載した方法は、対象者に由来する試験試料に存在するFR のレベルを決定すること；および、観察されたFR のレベルを、より前の時点での前記対象者の試験試料におけるFR のレベルと比較することによって、FR を発現する癌が進行しているか、退行しているか、または安定を保っているかを評価することを含み、ここで、前記試験試料と、より前の試料とのFR のレベルの差が、癌が進行しているか、退行しているか、または安定を保っているか、の目安となる。その際、試験試料のFR のレベルが、より前の試料について観察されたレベルに対して、上昇することは、FR を発現する癌の進行を示すかも知れない。逆に、試験試料のFR のレベルが、より前の試料について観察されたレベルに対して、減少することは、FR を発現する癌の退行を示すかも知れない。したがって、より前の試料について観察されたレベルに対して、試験試料のFR のレベルに有意な差がないことは、FR を発現する癌について、安定の状態を示すかも知れない。いくつかの実施形態において、前記対象者に由来する試料におけるFR のレベルは、前記試料を、本明細書に記載の抗体などの、FR に結合する抗体に接触させることによって評価される。FR の存在について評価する試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞(つまり、遊離細胞)、組織(たとえば、手術摘出癌組織、細針吸引生検を含む生検)、組織プレパラートなどに由来してよい。

【0039】

いくつかの実施形態において、記載した方法は、対象者に由来する試験試料に存在する細胞または組織に関連するFR のレベルを決定すること；および、観察されたFR のレベルを、同様に、より前の時点で前記対象者から得た試料におけるFR のレベルと比較することによって、FR を発現する癌が進行しているか、退行しているか、または安定を保っているかを評価することを含み、ここで、試験試料と、より前の試料とのFR のレベルの差が、癌が進行しているか、退行しているか、または安定を保っているか、の目安を提供する。その際、試験試料のFR のレベルが、より前の試料について観察されたレベルに対して、上昇することは、FR を発現する癌の進行を示すかも知れない。逆に、試験試料のFR のレベルが、より前の試料について観察されたレベルに対して、減少することは、FR を発現する癌の退行を示すかも知れない。したがって、より前の試料について観察されたレベルに対して、試験試料のFR のレベルに有意な差がないことは、FR を発現する癌について、安定の状態を示すかも知れない。いくつかの実施形態において、前記対象者に由来する試料におけるFR のレベルは、前記試料を、本明細書に記載の抗体などの、FR に結合する抗体に接触させることによって評価される。FR の存在について評価する試料は、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞（つまり、遊離細胞）、組織（たとえば、手術摘出癌組織、細針吸引生検を含む生検）、組織プレパラートなどであってよい。

10

20

30

40

50

【0040】

いくつかの実施形態において、記載した方法は、対象者に由来する試験試料に存在する細胞または組織に関連しないFR のレベルを決定すること；および、観察されたFR のレベルを、同様に、より前の時点で前記対象者から得た試料におけるFR のレベルと比較することによって、FR を発現する癌が進行しているか、退行しているか、または安定を保っているかを評価することを含み、ここで、試験試料と、より前の試料とのFR のレベルの差が、癌が進行しているか、退行しているか、または安定を保っているか、の目安を提供する。その際、試験試料のFR のレベルが、より前の試料について観察されたレベルに対して、上昇することは、FR を発現する癌の進行を示すかも知れない。逆に、試験試料のFR のレベルが、より前の試料について観察されたレベルに対して、減少することは、FR を発現する癌の退行を示すかも知れない。したがって、より前の試料について観察されたレベルに対して、試験試料のFR のレベルに有意な差がないことは、FR を発現する癌について、安定の状態を示すかも知れない。いくつかの実施形態において、前記対象者に由来する試料におけるFR のレベルは、前記試料を、本明細書に記載の抗体などの、FR に結合する抗体に接触させることによって評価される。FR の存在について評価する試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、組織プレパラートなどであってよい。

【0041】

記載した方法の様々な実施形態において、前記癌は、FR を発現する癌であってよい。特定の実施形態において、前記FR を発現する癌は、卵巣癌である。いくつかの実施形態において、前記FR を発現する癌は、子宮内膜癌である。いくつかの実施形態において、前記FR を発現する癌は、結腸直腸癌である。いくつかの実施形態において、前記FR を発現する癌は、乳癌である。いくつかの実施形態において、前記FR を発現する癌は、甲状腺癌である。いくつかの実施形態において、前記FR を発現する癌は、卵管癌である。他の実施形態において、前記FR を発現する癌は、腺癌などの非小細胞肺癌である。

【0042】

様々な側面において、FR のレベルは、前記試料をFR に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させることによって、決定される。いくつかの実施形態において、前記試料は、FR に結合する2種以上の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。いくつかの実施形態において、前記試料は、FR に結合する第1の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させ、次いで、FR に結合する第2の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。本明細書に記載のものなどの抗体を、

このために使用してよい。たとえば、前記抗体は、

(a) 抗体 9 F 3、抗体 1 9 D 4、抗体 2 4 F 1 2、もしくは抗体 2 6 B 3 のいずれか 1 つと同じエピトープに結合する、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

(b) 抗体 9 F 3、抗体 1 9 D 4、抗体 2 4 F 1 2、もしくは抗体 2 6 B 3 のいずれか 1 つ、もしくはその抗原結合フラグメント；

(c) 抗体 9 F 3、抗体 1 9 D 4、抗体 2 4 F 1 2、もしくは抗体 2 6 B 3 のいずれか 1 つの、重鎖 C D R もしくは軽鎖 C D R を含む抗体もしくはその抗原結合フラグメントで構成される群から選択される。

【0043】

特定の実施形態において、FR のレベルは、ウエスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散、電気化学発光 (ECL) イムノアッセイ、免疫組織化学、蛍光活性化細胞分類 (FACS)、または ELISA によって検出される。

10

【0044】

要約した主題の追加の特徴は、発明の詳細な説明および提供した実施例ならびに関連する図面において、より詳しく説明する。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】非還元的条件下での SDS-PAGE による FR の移動パターンを示す図である。FR は、天然 (レーン 2) 型または還元もしくはアルキル化 (レーン 3) 型のいずれかで評価した。

20

【0046】

【図2】水素/重水素交換質量分析およびドッキング法によって予測される、モノクローナル抗体 9 F 3, 2 4 F 1 2, および 2 6 B 3 に対するエピトープ (網掛け領域) を含む FR のアミノ酸残基 (配列番号 1) を示す図である。

【0047】

【図3】SDS-PAGEゲルで行った、FR またはFRホモログFR, FR もしくはFR を発現するCHO細胞に由来する、精製遺伝子組み換え溶解物 (A) および全細胞溶解物 (B) の4つのウエスタンブロットを示す図である。タンパクは、還元剤を含むまたは含まない試料緩衝液中で調製した。パネルA、レーン1は分子量マーカであり、レーン2~5は、それぞれ、0.5 μgの還元FR, FR, FR, およびFR であり、レーン6はブランクであり、レーン7~10は、それぞれ、0.5 μgの非還元FR, FR, FR, およびFR である。陽性のバンドは、各レーンにおける反応性種のみを表し、約38 kDaの分子量に相当する。パネルB、レーン1は分子量マーカであり、レーン2は、還元剤を含まない試料緩衝液中で調製しSDS-PAGEゲルで分画したCHO-FR 全細胞溶解物であり、レーン3は、還元剤を含まない試料緩衝液中で調製しSDS-PAGEゲルで分画したCHO-FR 全細胞溶解物であり、レーン4は、還元剤を含まない試料緩衝液中で調製しSDS-PAGEゲルで分画したCHO-FR 全細胞溶解物である。各パネルは、右に記した抗FR mAbで調べた。FRの分子量は、FR は約38 kDa、FR は約30 kDa、FR は約28 kDa、FR は約26 kDaである。変性された条件、および、還元されていないまたは還元された条件で、それぞれ、FR を認識するLK26抗体およびBN3.2抗体を、陽性対照として使用した。

30

40

【0048】

【図4】モノクローナル抗体 2 6 B 3 でFR の存在を調べた、ホルマリン固定したパラフィン包埋の乳頭状漿液性卵巣癌の組織試料を示す図である。

【0049】

【図5】正常組織におけるFR の発現を示す図である。抗体 2 6 B 3 で染色した正常な肺 (A) および腎臓 (B) の試料は、FR の発現が上皮細胞に強く限定され、主に頂端部に分布することを示す (画像は倍率 20 倍)。

50

【0050】

【図6】抗体26B3または抗体BN3.2を用いて生成した肺腺癌のMスコアを比較するグラフ表示である。

【0051】

【図7】非小細胞肺癌の組織学的サブタイプのFR染色を示す図であり、(A)は20倍での肺腺癌、(B)は40倍での肺腺癌、(C)は20倍での肺腺扁平上皮癌、および、(D)は40倍での肺扁平上皮癌である。

【0052】

【図8】抗体26B3で染色した肺腺癌の重複試料(コア)のMスコアを比較するグラフ表示である。

10

【0053】

【図9】肺腺癌および肺扁平上皮癌のFR分布のMスコアを示す図である。平均Mスコアは、それぞれ、 $19.84 (\pm 18.64)$ および $1.39 (\pm 5.54)$ であった ($p < 0.0001$)。

【0054】

【図10】3つの肺腺癌細針吸引試料(A)、(B)および(C)におけるFRの発現を示す図である。リンパ節FNAからの細胞ブロック材料の抗体26B3での染色は、発現が上皮細胞に限定され、頂端部に分布する、FRの成功裏の染色を示す。

【0055】

【図11】抗体26B3を用いる組織試料の免疫組織化学分析でFR陽性またはFR陰性と判断された、肺腺癌を有する対象者の生存時間関数(死亡または打ち切り(censor))を示す図である。

20

【0056】

【図12】抗体26B3を用いて染色した、倍率20倍または40倍のいずれかでの、代表的な組織マイクロアッセイ(TMA)画像であり、(A)はインサイチュの浸潤性腺癌、(B)~(D)は侵襲的腺癌である。

【0057】

【図13】26B3での染色で決定した、乳癌試料の分子サブタイプ(her-2(+))およびher-2(-))に対するMスコア分布のグラフ表現である。

【0058】

【図14】(A)~(D)は、倍率20倍または40倍のいずれかでの、抗体26B3で染色したステージIV、her2陰性乳癌に由来する、代表的な組織学的試料を示す図である。

30

【0059】

【図15】抗体26B3で染色した、細針吸引によって得た転移性乳癌試料の代表的な画像である。

【0060】

【図16】漿液性卵巣癌におけるFR発現を示す図である。(A)は、3+の強い(右部分)、および2+の中程度の(上左部分)膜染色を見ることが出来る。(B)は、3+の強い周辺の膜の濃い染色を確認する、倍率20倍での同じ範囲(右部分)である。2+の中程度の膜染色(上左部分)は、3+よりもより弱い、薄い染色を有し、周辺的であるか、または内腔境界に局在している。(C)は、1+の弱い膜染色が内腔境界に局在しており、視覚化するために40倍の倍率を要することを示す。(D)は、卵巣表面上皮細胞および下層の皮質間質細胞が、全体的に陰性であることを示す(倍率20倍)。

40

【0061】

【図17】(A)は、FR発現が、倍率40倍で、弱い1+および中程度の2+の強度を有する正常な子宮内膜の内腔境界に限定されることを示す図である。(B)は、倍率20倍で、強い(+3)膜染色が、非定形複雑型増殖症の内腔境界に観察され得ることを示す図である。

【0062】

50

【図18】(A)は、第1等級の子宮内膜腺癌の内腔境界上の強い(+3)FR膜染色を示す図である。さらに、多くの癌細胞が2+または3+の細胞質染色を有する(倍率20倍)。(B)は、FR膜染色(2+および3+)が、第2等級の子宮内膜腺癌の内腔境界上に存在し、細胞質染色が弱いことを示す図である(倍率20倍)。(C)は、倍率40倍で、第3等級の子宮内膜腺癌の癌細胞の約50%が3+の強い周辺膜染色を示し、細胞質染色は弱いことを示す図である。

【0063】

【図19】(A)は、倍率20倍で、約80%の扁平上皮化生細胞が2+および3+のFR膜染色ならびに1+および2+FRの細胞質染色を有する、扁平上皮化生を有する腺癌を示す図である。子宮内膜癌細胞の明瞭な細胞癌は、大きな不規則な核、顕著な仁、および多数の明瞭な細胞質を有する。(B)は、倍率40倍で、これらの癌細胞の大部分が、2+または3+のFR膜染色を有することを示す図である。

10

【0064】

【図20】(A)は、正常な卵管の繊毛細胞および非繊毛細胞が、内腔境界および外側細胞境界に、3+のFR膜染色を有することを示す図である。細胞質染色も明瞭である(倍率20倍)。(B)は、ストローマに多数のリンパ球および血漿細胞を有する慢性卵管炎を示す図である。粘膜細胞は、内腔境界上の3+のFR染色を維持している(倍率20倍)。(C)は、第2等級の管漿液性腺癌細胞が、複合乳頭状突起を形成し、内腔境界および外側細胞境界に3+のFR膜染色を示し、細胞質染色も明瞭であること(倍率20倍)を示す図である。

20

【0065】

【図21】卵巣の皮質漿液/卵管嚢胞を示す図である。表層細胞は3+の強い膜染色および細胞質染色を示す(倍率20倍)。

【発明を実施するための形態】

【0066】

以下の説明は、FRに特異的に結合する抗体およびその抗原結合フラグメントの特徴を、明らかにする。また、これらの抗体および抗原結合フラグメントをコードすることが可能な関連ポリヌクレオチド、前記抗体および抗原結合フラグメントを発現する細胞の他、関連ベクター、および、検出可能な抗体標識、を記述する。さらに、前記抗体および抗原結合フラグメントを使用する方法を記載する。たとえば、提供する抗体および抗原結合フラグメントは、卵巣癌、乳癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵管癌、もしくは肺癌を診断するため、卵巣癌、乳癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵管癌、もしくは肺癌の進行、退行、もしくは安定を監視するために、または、患者が癌の治療を受けるべきか否かを決定するため、もしくは、対象者が、FRを発現する癌を患っており、したがって、FR特異的抗癌療法での治療に適しているか否かを決定するために、使用してよい。

30

定義

【0067】

説明の特徴に関連する様々な用語を、本明細書および特許請求の範囲の全体にわたって使用する。これらの用語は、他に示さない限り、当技術分野におけるそれらの普通の意味を有する。他の特別に定義する用語は、本明細書において提供する定義と整合するように、解釈すべきである。

40

【0068】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用する単数形の「a」、「an」および「the」は、内容がそうではないと明確に述べていない限り、複数の指示対象も含む。したがって、たとえば、「細胞(a cell)」の表現は、2つ以上の細胞の組み合わせなどを含む。

【0069】

本明細書において使用する「約」の用語は、量、期間などの測定可能な値を指すときは、特定された値からの±10%までの変動を含むことを意味し、これは、そのような変動

50

が開示した方法を実施するのに適しているからである。他に示さない限り、本明細書および特許請求の範囲で使用する、含有物の量、分子量などの特性、反応条件などのすべての数字は、すべての例において、「約」という用語で修飾される、と理解すべきである。したがって、逆であると示されない限り、本明細書および添付の特許請求の範囲において示される数値パラメータは、本発明によって得ようとする所望の特性に基づいて変動し得る近似値である。最低限でも、また、特許請求の範囲への均等論の適用を制限しようとするのではなく、各数値パラメータは、少なくとも、記載した有効桁数に照らして、かつ、通常の四捨五入によって、解釈すべきである。

【0070】

本発明の広い範囲を説明する数値範囲およびパラメータは近似値ではあるが、具体的な実施例において説明する数値は、可能な限り正確に記載する。ただし、いかなる数値も、それぞれの試験方法に見られる標準偏差に必然的に起因する何らかの誤差を、本来的に含む。

10

【0071】

「単離」は、生物学的要素（核酸、ペプチドまたはタンパクなど）が、その要素が天然に生じる有機体の他の生物学的要素から、すなわち、染色体上および染色体外の他のDNAおよびRNAならびにタンパクから、実質的に分離され、離れて産生され、または、精製されることを意味する。「単離」されている核酸、ペプチドおよびタンパクは、したがって、標準の精製法によって精製された核酸およびタンパクを含む。「単離」された核酸、ペプチドおよびタンパクは、組成物の一部となり得、そのような組成物が、その核酸、ペプチドまたはタンパクの天然環境の一部でない場合、依然として単離されたままであり得る。この用語は、また、宿主細胞における遺伝子組み換え発現によって調製された核酸、ペプチドおよびタンパク、ならびに、化学的に合成された核酸も包含する。

20

【0072】

同義的に「核酸分子」または「核酸」とも呼ばれる「ポリヌクレオチド」は、あらゆるポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシヌクレオチドを指し、これらは、非修飾のRNAもしくはDNAまたは修飾したRNAもしくはDNAであってよい。「ポリヌクレオチド」には、一本鎖および二本鎖のDNA、一本鎖領域と二本鎖領域とが混在するDNA、一本鎖および二本鎖のRNA、一本鎖領域と二本鎖領域とが混在するRNA、ならびに、一本鎖の、または、より一般には、二本鎖のもしくは一本鎖領域と二本鎖領域とが混在するDNAおよびRNAを含む混成分子、が含まれるが、これらに限られるわけではない。さらに、「ポリヌクレオチド」は、RNAもしくはDNAまたはRNAとDNAの両方を含む三本鎖領域を指す。ポリヌクレオチドの用語には、また、1つ以上の修飾塩基を含有するDNAまたはRNA、および、安定性その他の理由で修飾された骨格を有するDNAまたはRNAも含まれる。「修飾」塩基には、たとえば、トリチル化された塩基およびイノシンなどの、普通ではない塩基が含まれる。DNAおよびRNAには様々な修飾を施してよく、したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的または代謝的に修飾されたポリヌクレオチドの、一般に天然に見られる型の他、ウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学型、を包含する。「ポリヌクレオチド」は、また、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ばれる、比較的短い核酸鎖も包含する。

30

40

【0073】

「実質的に同じ」の意味は、その用語が使用される文脈に応じて、相違し得る。重鎖および軽鎖ならびにそれらをコードする遺伝子においては、天然配列の変動が存在し易いので、アミノ酸配列または本明細書に記載した抗体もしくは抗原結合フラグメントをコードする遺伝子に、それらの結合特性（たとえば、特異性および親和性）にほとんどあるいは全く影響することなく、ある程度の変動が生じることが予想されるであろう。このような予想は、部分的には遺伝子コードの縮退により、また、コードされるタンパクの性質を認め得るほどには変化させない、保存的なアミノ酸配列変動という進化の成功にもよる。したがって、核酸配列の文脈において、「実質的に同じ」は、2つ以上の配列間の、少なくとも65%の同一性を意味する。好ましくは、この用語は、2つ以上の配列間の、少なく

50

とも70%の同一性、より好ましくは、少なくとも75%の同一性、より好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも85%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、より好ましくは、少なくとも91%の同一性、より好ましくは、少なくとも92%の同一性、より好ましくは、少なくとも93%の同一性、より好ましくは、少なくとも94%の同一性、より好ましくは、少なくとも95%の同一性、より好ましくは、少なくとも96%の同一性、より好ましくは、少なくとも97%の同一性、より好ましくは、少なくとも98%の同一性、より好ましくは、少なくとも99%の同一性、または、より高い同一性を指す。このような同一性は、nBLASTアルゴリズム (Altschul et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7) を使用して決定することができる。

10

【0074】

タンパクのアミノ酸配列において生じ得る、タンパク機能に大きく影響しない変動の程度は、核酸配列のそれよりもはるかに低く、これは、同じ縮退原理がアミノ酸配列には当てはまらないからである。したがって、抗体または抗原結合フラグメントの文脈において、「実質的に同じ」は、記載した抗体または抗原結合フラグメントに対する、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する抗体または抗原結合フラグメントを意味する。他の実施形態は、本明細書に記載の抗体もしくは抗原結合フラグメントと有意な同一性を共有しない、骨格、骨組、もしくは他の非結合領域を有するが、結合を生じさせるために必要な、本明細書に記載のそのような配列に対して90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有する、1つ以上のCDRもしくは他の配列を取り込んでいるFR 特異的抗体または抗原結合フラグメントを含む。

20

【0075】

「ベクター」は、他の核酸断片を操作可能に挿入して、その断片の複製または発現を生じさせることが可能な、プラスミド、ファージ、コスミドまたはウイルスなどのレプリコンである。

【0076】

細胞は、外因性のまたは異種のDNAなどの核酸が、細胞内に導入されているときに、「形質転換」されている。形質転換DNAは、細胞のゲノムに統合(共有結合)されても、されなくてもよい。たとえば、原核生物、酵母および哺乳動物細胞において、形質転換DNAは、プラスミドなどのエピソード要素上に保持されてよい。真核細胞に関しては、安定に形質転換された細胞すなわち「安定細胞」は、その形質転換DNAを含有する娘細胞の集団を含む細胞株、またはクローンを確立するその真核細胞の能力によって、証明される。「クローン」は、単一細胞または有糸分裂による、共通の祖先に由来する細胞の集団である。「細胞株」は、何代にもわたるインビトロでの安定した成長が可能な、初代細胞のクローンである。本明細書において提供するいくつかの実施形態において、細胞はDNAの遺伝子導入によって形質転換される。

30

【0077】

「発現」または「産生」の用語は、本明細書において同義に使用され、遺伝子産物の生合成を指す。これらの用語は、RNAへの遺伝子の転写を包含する。これらの用語は、1つ以上のポリペプチドへのRNAの翻訳も包含し、さらに、天然に産する転写後または翻訳後の修飾も包含する。抗体またはその抗原結合フラグメントの発現または産生は、細胞の細胞質内において、または、細胞培養の成長培地などの細胞外環境に対して、なされてよい。

40

【0078】

「処理」または「治療」の用語は、あらゆる客観的または主観的パラメータを含む、症状の軽減、緩和、減少などの、損傷、病状もしくは疾病の緩解もしくは改善のあらゆる成功または成功の証を指し、その疾病を患者にとって耐え易いものにする、悪化もしくは

50

は減退の速度を遅くすること、悪化の終点をより消耗的でないものにする、対象者の身体的もしくは精神的な幸福を改善すること、または、生存の期間を引き延ばすことを含む。治療は、身体的検査、神経学的検査、または精神医学的評価を含む客観的または主観的なパラメータによって、評価されてよい。

【0079】

「抗体」は、別に指定しない限り、各アイソタイプの種々の単量体型または多量体型を含む、免疫グロブリンのすべてのアイソタイプ (I g G , I g A , I g E , I g M , I g D , および I g Y) を指す。

【0080】

抗原結合フラグメントは、特定の抗原に結合親和性を示すかも知れない、あらゆるタンパク様構造である。いくつかの抗原結合フラグメントは、完全抗体の一部であって、親抗体分子の抗原結合特異性を維持する一部から成る。たとえば、抗原結合フラグメントは、少なくとも1つの可変領域 (重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域のいずれか)、または、特定の抗原に結合することが知られている抗体の1つ以上のCDRを含んでよい。好適な抗原結合フラグメントの例には、二重特異性抗体および一本鎖分子の他に、Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc, およびFv分子および一本鎖 (Sc) 抗体、個々の抗体軽鎖、個々の抗体重鎖、抗体鎖またはCDRと他のタンパクとのキメラ融合、タンパクの骨組、重鎖単量体または二量体、軽鎖単量体または二量体、1つの重鎖および1つの軽鎖で構成される二量体などが含まれるが、これらに限られるわけではない。すべての抗体アイソタイプは、抗原結合フラグメントを産生するために使用されてよい。さらに、抗原結合フラグメントは、注目の所与の抗原に対する親和性をもたらす向きで、ポリペプチド断片を首尾よく組み込むことが可能な非抗体タンパク様骨格、たとえば、タンパクの骨組、を含んでよい。抗原結合フラグメントは、遺伝子組み換えで生成してもよいし、完全抗体の酵素的または化学的な開裂によって生成してもよい。「抗体またはその抗原結合フラグメント」の表現は、所与の抗原結合フラグメントがその表現で述べる抗体の1つ以上のアミノ酸区分を組み込んでいることを表すために、使用されてよい。

【0081】

抗体または抗体フラグメントに関連して用いるときの「特異的結合」は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによってコードされるドメインを介した、注目のタンパクの1以上のエピトープへの結合を表すが、これは、抗原分子の混合群を含有する試料において他の分子を実質的に認識し結合する、ということではない。一般に、抗体は、表面プラズモン共鳴アッセイまたは細胞結合アッセイで測定して、約 1×10^{-8} M 未満の Kd で、同種抗原に結合する。

【0082】

「対象者」の用語は、ヒト、ならびに、すべての脊椎動物、たとえば、非ヒト霊長類、マウス、ウサギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの、哺乳類および非哺乳類を含む非ヒト動物を指す。記載した方法の多くの実施形態において、対象者はヒトである。

【0083】

本明細書において使用する「葉酸受容体アルファ」 (FR 、 FRアルファ、FOLR-1またはFOLR1ともいう) の用語は、葉酸に対する高親和性受容体のアルファアイソフォームを指す。膜結合FR は、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーによって、細胞表面に付着する。可溶性のFR は、膜固定葉酸受容体に対するプロテアーゼまたはホスホリパーゼの作用によってもたらされてよい。ヒトFR のアミノ酸配列は、本明細書において、配列番号1として示される。変異体、たとえば、天然に産する対立遺伝子多型または少なくとも1つのアミノ酸置換を含有する配列は、本明細書において使用するこの用語に包含される。当技術分野における熟練者には理解されるように、ヒトFR の細胞結合型および非細胞結合型は、配列番号1の変異型を包含してよい。

【0084】

10

20

30

40

50

本明細書において使用する「試料」の用語は、対象者から分離した類似の液体、細胞または組織（たとえば、手術摘出した癌細胞、細針吸引生検を含む生検）の他、対象者内の液体、細胞または組織、の集合を指す。いくつかの実施形態において、試料は生体液である。生体液は、一般に生理的温度で液体であり、対象者に存在する、対象者から抜き取った、対象者から搾り出した、または他の方法で対象者から抽出した、天然液体を含んでよい。特定の組織、器官または局所領域に由来する一定の生体液、および他の生体液は、対象者または生物学的起源においてより全体的または全身的に位置してよい。生体液の例には、血液、血清および漿膜液、血漿、リンパ液、尿、唾液、嚢胞液、涙、糞便、痰、分泌性の組織または器官の粘膜分泌物、腔分泌物、非固形癌に関連するものなどの腹水、ならびに、気管支洗浄などによって採取される、胸膜、心膜、腹膜、腹部および他の体腔の液が、含まれる。

10

【0085】

生体液には、また、対象者または生物学的起源に接触した溶液、たとえば、細胞または器官培養の培地、細胞または器官馴化培地、洗浄液など、も含まれてよい。本明細書において使用する「試料」の用語は、対象者から除去した物質、または対象者に存在する物質を包含する。

【0086】

FR を発現する癌の進行に関連して使用する「進行」の用語は、癌がより軽度の状態からより重度の状態に変化することを含む。これは、癌の数または重度、転移の程度、癌が成長するまたは広がる速度などの上昇を含み得る。たとえば、「卵巣癌の進行」は、そのような癌がより軽度の状態からより重度の状態に進行すること、たとえば、ステージIからステージIIへ、ステージIIからステージIIIへなどの進行、を含む。

20

【0087】

FR を発現する癌の退行に関連して使用する「退行」の用語は、癌がより重度の状態からより軽度の状態に変化することを含む。これは、癌の数または重度、転移の程度、癌が成長するまたは広がる速度などの低下を含み得る。たとえば、「卵巣癌の退行」は、そのような癌がより重度の状態からより軽度の状態に退行すること、たとえば、ステージIIIからステージIIへ、ステージIIからステージIへなどの退行、を含む。

【0088】

FR を発現する安定した癌に関連して使用する「安定」の用語は、臨床的に関連する期間にわたって、進行癌または退行癌と認定するに足るほど大きく変化しない、または変化しなかった病状を表すことを意図している。

30

【0089】

本明細書において記載する実施形態は、当然ながら変動し得る、特定の方法、試薬、化合物、組成物または生物系に限定されない。

【0090】

FR 特異的抗体および抗原結合フラグメント

本明細書では、単離モノクローナル抗体、および、FR に特異的に結合する抗原結合フラグメントを記載する。抗体分子の一般的な構造は、重鎖および軽鎖を含む抗原結合ドメイン、ならびに、補体結合および抗体受容体との結合を含む様々な機能を奏するFcドメイン、を含む。

40

【0091】

記載した抗体または抗原結合フラグメントには、すべてのアイソタイプ、IgA, IgD, IgE, IgGおよびIgM、ならびに、四本鎖免疫グロブリン構造の合成多量体が含まれる。記載した抗体または抗原結合フラグメントには、また、一般に雌二ワトリまたはシチメンチョウの血清および雌二ワトリまたはシチメンチョウの卵黄に見られる、IgYアイソタイプも含まれる。

【0092】

実施例の欄に開示した抗体または抗原結合フラグメントは、マウス由来である。類似の抗体は、遺伝子組み換え手段によって得られる種に由来してもよい。たとえば、抗体また

50

は抗原結合フラグメントは、キメララット、ヤギ、ウマ、ブタ、ウシ、ニワトリ、ロバ、ヒトなどのものであってよい。ヒトへの投与で使用するために、非ヒト由来の抗体または抗原結合フラグメントは、ヒト患者への投与に際してより低抗原性になるように、遺伝子的または構造的に変えられてよい。

【0093】

いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、キメラである。本明細書において使用される「キメラ」は、非ヒト哺乳類、齧歯類または爬虫類の抗体アミノ酸配列に由来する少なくとも1つの可変領域の少なくとも何らかの部分を含みながら、抗体またはその抗原結合フラグメントの残余の部分がヒトに由来する、抗体またはその抗原結合フラグメントを指す。たとえば、キメラ抗体は、ヒトFcを有するマウス抗原結合ドメイン、または他のそのような構造のドメインを含んでよい。

10

【0094】

いくつかの実施形態において、抗体はヒト化抗体である。ヒト化抗体は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、または、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含むそのフラグメント（たとえば、Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ もしくは抗体の他の抗原結合サブ配列）であってよい。大部分については、ヒト化抗体は、受容側の相補性決定領域(CDR)に由来する残基が、所望の特異性、親和性および容量を有する、マウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種(供与側抗体)のCDRに由来する残基で置換された、ヒト免疫グロブリン(受容側抗体)である。一般に、ヒト化抗体は、CDR領域のすべてまたはほとんどすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、フレームワーク領域のすべてまたはほとんどすべてがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つの、そして一般には2つの、可変領域のほとんどすべてを含むであろう。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、通常は、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部、を含んでよい。

20

【0095】

本明細書に記載する抗体または抗原結合フラグメントは、様々な形態で存在することができるが、表1に示した抗体可変領域区分またはCDRの1つ以上を含むであろう。表1に記載した抗体のアイソタイプは、保存された配列を有することが知られている各抗体の定常領域に記載するために、括弧内に示されている。

【表 1】

記載した抗体またはその抗原結合フラグメントの抗体区分
 (「Lc」は軽鎖を示し、「Hc」は重鎖を示す)

抗体区分	配列番号	配列
モノクローナル抗体 9 F 3 (マウス I g G 2 a 定常領域)		
Lc CDR1	2	RASSTVSYSYLH
Lc CDR2	3	GTSNLAS
Lc CDR3	4	QQYSGYPLT
Lc 可変領域区分	5	PAIMSASPGEKVTMTTCRASSTVSYSYLHWYQQ KSGASPQLWIYGTSNLASGVPARFSGSGS SLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPLTFGAGTKL ELKRADAAP
Hc CDR1	6	SGYYWN
Hc CDR2	7	YIKSDGSNNYNPSLKN
Hc CDR3	8	EWKAMDY
Hc 可変領域区分	9	ESGPGLVLRPSQSLTCSVTGYSITSGYYWNWIR QFPGSRLEWMGYIKSDGSNNYNPSLKNRISITR DTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYFCTREWKAMD YWGQGSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDT
モノクローナル抗体 1 9 D 4 (マウス I g G 2 a 定常領域)		
Lc CDR1	10	RASESVDTYGNNFIH
Lc CDR2	11	LASNLES
Lc CDR3	12	QQNNGDPWT
Lc 可変領域区分	13	PASLAVSLGQRATISCRASESVDTYGNNFIHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGS FTLTIDPVEADDAATYYCQQNNGDPWTFGGGT KLEIKRADAAP
Hc CDR1	14	HPYMH
Hc CDR2	15	RIDPANGNTKYDPKFQG
Hc CDR3	16	EEVADYTMDY
Hc 可変領域区分	17	GAELVKPGASVKLSCTASGFNIKHPYMHVVKQ RPDQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGGKATTA DTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCGREEVADYT MDYWGQGSVTVSSAKTTPPSVYPLAPV

10

20

30

抗体区分	配列番号	配列
モノクローナル抗体 2 4 F 1 2 (マウス I g G 1 定常領域)		
Lc CDR1	18	SASQGINNFLN
Lc CDR2	19	YTSSLHS
Lc CDR3	20	QHFSKLPWT
Lc 可変領域	21	TSSLSASLGDRVTISCSASQGINNFLNWFYQQKP DGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFGSGSGTDYSLT ISNLEPEDIAIYYCQHFSKLPWTFGGGKLEIKR ADAAP
Hc CDR1	22	SYAMS
Hc CDR2	23	EIGSGGSYTYYPDVTG
Hc CDR3	24	ETTAGYFDY
Hc 可変領域	25	SGGGLVRPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVR QSPEKRLEWVAEIGSGGSYTYYPDVTGRTISR DNAKSTLYLEMSSLRSEDTAIYYCARETTAGYF DYWGQGTTLTVSS
モノクローナル抗体 2 6 B 3 (マウス I g G 1 定常領域)		
Lc CDR1	26	RTSENIYSYLA
Lc CDR2	27	NAKTLAE
Lc CDR3	28	QHHYAFPWT
Lc 可変領域区分	29	PASLSASVGETVTTTCRTSENIYSYLAWFYQQKQ GISPQLLVYNAKTLAEGVPSRFGSGSGTQFSLK INSLQPEDFGSYCQHHYAFPWTFGGGSKLEIK RADAAP
Hc CDR1	30	GYFMN
Hc CDR2	31	RIFPYNGDTFYNQKFKG
Hc CDR3	32	GTHYFDY
Hc 可変領域区分	33	GPELVKPGASVKISCKASDYSFTGYFMNWVMQ SHGKSLEWIGRIFPYNGDTFYNQKFKGRATLTV DKSSSTAHEMELRSLASEDSAVYFCARGTHYFD YWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQT
モノクローナル抗体 9 F 3 (マウス I g G 2 a 定常領域)		
Lc CDR1	34	AGGGCCAGCTCAACTGTAAGTTACAGTACTT GCAC
Lc CDR2	35	GGCACATCCAACCTGGCTTCT
Lc CDR3	36	CAGCAGTACAGTGGTTACCCACTCACG
Lc 可変領域区分	37	CCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAA AGGTCACCATGACCTGCAGGGCCAGCTCAAC TGTAAGTTACAGTACTTGCCTGGTACCAGC

10

20

30

抗体区分	配列番号	配列
		AGAAGTCAGGTGCCTCCCCCAACTCTGGATT TATGGCACATCCAACCTTGGCTTCTGGAGTCCC TGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCT CTTACTCTCTCACAATCAGCAGTGTGGAGGCT GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTA CAGTGGTTACCCACTCACGTTCCGGTGTGGGA CCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGC ACCAAC
Hc CDR1	38	AGTGGTTATTACTGGAAC
Hc CDR2	39	TACATAAAGTCCGACGGTAGCAATAATTACA ACCCATCTCTCAAAAAT
Hc CDR3	40	GAGTGGAAGGCTATGGACTAC
Hc 可変領域区分	41	GAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAGACCTTCTCA GTCTCTGTCTCTCACCTGCTCTGTCACTGGCT ACTCCATCACCAGTGGTTATTACTGGAAGTGG ATCCGGCAGTTTCCAGGAAGCAGACTGGAAT GGATGGGCTACATAAAGTCCGACGGTAGCAA TAATTACAACCCATCTCTCAAAAATCGAATCT CCATCACTCGTGACACATCTAAGAACCAGTTT TTCCTGAAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGA CACAGCTACATAATTTCTGTACAAGGGAGTGG AAGGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACCT CAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACACC CCCATCAGTCTATCCACTGGCCCCTGGGTGTG GAGATACAAC
モノクローナル抗体 19D4 (マウス IgG2a 定常領域)		
Lc CDR1	42	AGAGCCAGTGAAAGTGTGATACTTATGGCA ATAATTTTATAACAC
Lc CDR2	43	CTTGCATCCAACCTAGAATCT
Lc CDR3	44	CAGCAAAATAATGGGGATCCGTGGACG
Lc 可変領域区分	45	CCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAG GGCCACCATATCCTGCAGAGCCAGTGAAAGT GTTGATACTTATGGCAATAATTTTATAACTG GTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCACCCAAA CTCCTCATTTATCTTGCATCCAACCTAGAATC TGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGG TCTAGGACAGACTTACCCTCACCATTGATCC TGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACT GTCAGCAAAATAATGGGGATCCGTGGACGTT CGGTGGAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGG GCTGATGCTGCACCAA
Hc CDR1	46	CACCCCTATATGCAC
Hc CDR2	47	AGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAAT ATGACCCGAAGTTCAGGGC

10

20

30

抗体区分	配列番号	配列
Hc CDR3	48	GAGGAGGTGGCGGACTATACTATGGACTAC
Hc 可変領域区分	49	GGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAG TCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAAC ATTAACACCCCCTATATGCACTGGGTGAAGC AGAGGCCTGACCAGGGCCTGGAGTGGATTGG AAGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAA TATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTA TAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTA CCTACAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGAC ACTGCCGTCTATTACTGTGGTAGAGAGGAGG TGGCGGACTATACTATGGACTACTGGGGTCA AGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAA ACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCC TGTGTG
モノクローナル抗体 24F12 (マウス IgG1 定常領域)		
Lc CDR1	50	AGTGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTTTTTAAAC
Lc CDR2	51	TACACATCAAGTTTACTACTCA
Lc CDR3	52	CAGCACTTTAGTAAGCTTCCGTGGACG
Lc 可変領域区分	53	ACATCCTCCCTGCTGCTCCTCTCTGGGAGACAG AGTCACCATCAGTTGCAGTGCAAGTCAGGGC ATTAACAATTTTTTAAACTGGTATCAGCAGAA ACCAGATGGCACTGTTAAACTCCTGATCTATT ACACATCAAGTTTACTACTCAGGAGTCCCATCA AGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATT ATTCTCTCACCATCAGCAACCTGGAACCTGAA GATATTGCCATATACTATTGTCAGCACTTTAG TAAGCTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACC AAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCAC CAAC
Hc CDR1	54	AGCTATGCCATGTCT
Hc CDR2	55	GAAATTGGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTA TCCAGACACTGTGACGGGC
Hc CDR3	56	GAAACTACGGCGGGCTACTTTGACTAC
Hc 可変領域区分	57	TCTGGGGGAGGCTTAGTGAGGCCTGGAGGGT CCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT ACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTTCG CCAGTCTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTC GCAGAAATTGGTAGTGGTGGTAGTTACACCT ACTATCCAGACACTGTGACGGGCCGATTAC CATCTCCAGAGACAATGCCAAGAGCACCCTG TACCTGGAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGG ACACGGCCATCTATTACTGTGCAAGGGAAAC TACGGCGGGCTACTTTGACTACTGGGGCCAA

10

20

30

抗体区分	配列番号	配列
		GGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA
モノクローナル抗体 26B3 (マウス IgG1 定常領域)		
Lc CDR1	58	CGAACAAGTGAGAATATTTTCAGTTATTTAGCA
Lc CDR2	59	AATGCAAAAACCTTAGCAGAG
Lc CDR3	60	CAACATCATTATGCITTTTCCGTGGACG
Lc 可変領域区分	61	CCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAAC TGTCAACCATCACATGTCGAACAAGTGAGAAT ATTTTCAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAA ACAGGGAATATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATA ATGCAAAAACCTTAGCAGAGGGTGTGCCATC AAGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAG TTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGA AGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCATT ATGCTTTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCTCC AAGCTGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCAC CAAC
Hc CDR1	62	GGCTACTTTTATGAAC
Hc CDR2	63	CGTATTTTTCCTTACAATGGTGATACTTTCTAC AACCAGAAGTTCAAGGGC
Hc CDR3	64	GGGACTCATTACTTTGACTAC
Hc 可変領域区分	65	GGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAG TGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGATTACTCT TTTACTGGCTACTTTATGAACTGGGTGATGCA GAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGA CGTATTTTTCCTTACAATGGTGATACTTTCTAC AACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTGA CTGTAGACAAATCCTCTAGCACAGCCACAT GGAGCTCCGGAGCCTGGCATCTGAGGACTCT GCAGTCTATTTTGTGCAAGAGGGACTCATT CTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACCTCA CTGTCTCTCAGCCAAAACGACACCCCATCT GTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCA AACTAA

10

20

30

40

50

【0096】

本明細書では、FR に特異的に結合する単離抗体または抗原結合フラグメントを詳細に説明する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、マウス IgG またはその誘導体である。抗体または抗原結合フラグメントは、ヒトの、ヒト化した、またはキメラのものであってよいが、本明細書において例示する抗体または抗原結合フラグメントはマウスのものである。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 CDR1 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 3 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 CDR2 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 4 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 CDR3 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 6 と実質的に同じまたは同一の重鎖 CDR1 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 7 と実質的に同じまたは同一の重鎖 CDR2 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 8 と実質的に同じまたは同一の重鎖 CDR3 アミノ酸配列を含んでよい。抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 3 と実質的に同じまたは同一の CDR2 アミノ酸配列、および、配列番号 4 と実質的に同じまたは同一の CDR3 アミノ酸配列を含んでよい。抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 6 と実質的に同じまたは同一の CDR1 アミノ酸配列、配列番号 7 と実質的に同じまたは同一の CDR2 アミノ酸配列、および、配列番号 8 と実質的に同じまたは同一の CDR

R 3 アミノ酸配列を有する重鎖を含んでよい。抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 3 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列、および、配列番号 4 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列を有する軽鎖、ならびに、さらに、配列番号 6 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 7 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列、および、配列番号 8 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列を有する重鎖を含んでよい。

【 0 0 9 7 】

記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 5 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号 3 7 と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 9 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号 4 1 と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この重鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 5 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および、配列番号 9 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。

10

【 0 0 9 8 】

いくつかの実施形態において、抗体は、2011年5月19日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209)に寄託され、PTA-11887の受託番号を割り当てられた抗体産生細胞によって産生される。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体のFR に結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、開示した抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖CDRおよび重鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む。

20

【 0 0 9 9 】

FR に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチドも開示する。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 2 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1 配列を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 3 4 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 3 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 2 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 3 5 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 4 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 3 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 3 6 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 6 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 3 8 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 7 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 2 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 3 9 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 8 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 3 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 4 0 を含む。前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 2 と実質的に同じまたは同一の C D R 1、配列番号 3 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、および、配列番号 4 と実質的に同じまたは同一の C D R 3、を有する軽鎖を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 3 4、たとえば配列番号 3 5、および、たとえば配列番号 3 6 を含む。前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 6 と実質的に同じま

30

40

50

たは同一の重鎖 C D R 1、配列番号 7 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、および、配列番号 8 と実質的に同じまたは同一の C D R 3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 3 8、たとえば配列番号 3 9、および、たとえば配列番号 4 0 を含む。前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 2 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号 3 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、および、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号 4 と実質的に同じまたは同一の C D R 3、ならびに、配列番号 6 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1、配列番号 7 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、および、配列番号 8 と実質的に同じまたは同一の C D R 3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 3 4、たとえば配列番号 3 5、および、たとえば配列番号 3 6、ならびに、たとえば配列番号 3 8、たとえば配列番号 3 9、および、たとえば配列番号 4 0 を含む。C D R の抗原結合配置は、また、抗体様タンパクを C D R の骨組として使用して設計してもよい。このように設計された抗原結合タンパクは、本開示の範囲内である。

【 0 1 0 0 】

本明細書において記載したポリヌクレオチドは、配列番号 5 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 3 7 を含む。いくつかの実施形態において、記載した単離ポリヌクレオチドは、配列番号 9 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 4 1 を含む。いくつかの実施形態において、記載した単離ポリヌクレオチドは、配列番号 5 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分、および、配列番号 9 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分、を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 3 7、および、たとえば配列番号 4 1 を含む。本明細書において提供する可変領域区分をコードすることが可能な前記単離ポリヌクレオチドは、抗体または抗原結合フラグメントを産生するために、同じまたは異なるベクターに含まれてよい。

【 0 1 0 1 】

本明細書では、F R に特異的に結合する単離抗体または抗原結合フラグメントを記載する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、マウス I g G またはその誘導体である。抗体または抗原結合フラグメントは、ヒトの、ヒト化した、またはキメラのものであってよいが、本明細書において例示する抗体または抗原結合フラグメントはマウスのものである。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 0 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 1 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 2 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 4 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 5 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 6 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含んでよい。抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 0 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 1 1 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列、および、配列番号 1 2 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列を有する軽鎖を含んでよい。抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 4 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 1 5 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列、および、配列番号 1 6 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列を有する重鎖を含んでよい。抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 0 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列

、配列番号 11 と実質的に同じまたは同一の CDR2 アミノ酸配列、および、配列番号 12 と実質的に同じまたは同一の CDR3 アミノ酸配列を有する軽鎖、ならびに、さらに、配列番号 14 と実質的に同じまたは同一の CDR1 アミノ酸配列、配列番号 15 と実質的に同じまたは同一の CDR2 アミノ酸配列、および、配列番号 16 と実質的に同じまたは同一の CDR3 アミノ酸配列を有する重鎖を含んでよい。

【0102】

記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 13 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号 45 と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 17 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号 49 と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この重鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 13 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および、配列番号 17 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。

10

【0103】

いくつかの実施形態において、抗体は、2011年5月19日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209)に寄託され、PTA-11884の受託番号を割り当てられた抗体産生細胞によって産生される。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体のFRに結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、開示した抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖CDRおよび重鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む。

20

【0104】

FRに特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチドも開示する。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 10 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 CDR1 配列を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 42 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 11 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 CDR2 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 43 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 12 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 CDR3 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 44 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 14 と実質的に同じまたは同一の重鎖 CDR1 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 46 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 15 と実質的に同じまたは同一の重鎖 CDR2 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 47 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 16 と実質的に同じまたは同一の重鎖 CDR3 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 48 を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号 10 と実質的に同じまたは同一の CDR1、配列番号 11 と実質的に同じまたは同一の CDR2、および、配列番号 12 と実質的に同じまたは同一の CDR3、を有する軽鎖を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 42、たとえば配列番号 43、および、たとえば配列番号 44 を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号 14 と実質的に同じまたは同一の重鎖 CDR1、配列番号 15 と実質的に同じまたは同一の CDR2、および、配列番号 16 と実質的に同じまたは同一の CDR3、を有する抗体またはそ

30

40

50

の抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号46、たとえば配列番号47、および、たとえば配列番号48を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号10と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号11と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号12と実質的に同じまたは同一のCDR3、ならびに、配列番号14と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1、配列番号15と実質的に同じまたは同一のCDR2、および、配列番号16と実質的に同じまたは同一のCDR3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号42、たとえば配列番号43、および、たとえば配列番号44、ならびに、たとえば配列番号46、たとえば配列番号47、および、たとえば配列番号48を含む。CDRの抗原結合配置は、また、抗体様タンパクをCDRの骨組として使用して設計してもよい。このように設計された抗原結合タンパクは、本開示の範囲内である。

10

【0105】

本明細書に記載のポリヌクレオチドは、配列番号13と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号45を含む。いくつかの実施形態において、記載したポリヌクレオチドは、配列番号17と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号49を含む。いくつかの実施形態において、記載したポリヌクレオチドは、配列番号13と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分、および、配列番号17と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分、を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号45、および、たとえば配列番号49を含む。本明細書において提供する可変領域区分をコードすることが可能なポリヌクレオチドは、抗体または抗原結合フラグメントを産生するために、同じまたは異なるベクターに含まれてよい。

20

【0106】

本明細書では、FR に特異的に結合する単離抗体または抗原結合フラグメントを記載する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、マウスIgGまたはその誘導体である。抗体または抗原結合フラグメントは、ヒトの、ヒト化した、またはキメラのものであってよいが、本明細書において例示する抗体または抗原結合フラグメントはマウスのものである。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号18と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR1アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号19と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR2アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号20と実質的に同じまたは同一の軽鎖CDR3アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号22と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR1アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号23と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR2アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号24と実質的に同じまたは同一の重鎖CDR3アミノ酸配列を含んでよい。抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号18と実質的に同じまたは同一のCDR1アミノ酸配列、配列番号19と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号20と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列を有する軽鎖を含んでよい。抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号22と実質的に同じまたは同一のCDR1アミノ酸配列、配列番号23と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号24と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列を有する重鎖を含んでよい。抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号18と実質的に同じまたは同一のCDR1アミノ酸配列、配列番号19と実質的に同じまたは同一のCDR2アミノ酸配列、および、配列番号20と実質的に同じまたは同一のCDR3アミノ酸配列を有する軽鎖、ならびに、さらに、

30

40

50

配列番号 2 2 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 2 3 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列、および、配列番号 2 4 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列を有する重鎖を含んでよい。

【 0 1 0 7 】

記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 1 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号 5 3 と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 5 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号 5 7 と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この重鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 1 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および、配列番号 2 5 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。

10

【 0 1 0 8 】

いくつかの実施形態において、抗体は、2011年5月19日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209)に寄託され、PTA-11886の受託番号を割り当てられた抗体産生細胞によって産生される。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の F R に結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、開示した抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖 C D R および重鎖 C D R を含む。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む。

20

【 0 1 0 9 】

F R に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドも記載する。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 1 8 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1 配列を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 5 0 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 1 9 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 2 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 5 1 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 2 0 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 3 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 5 2 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 2 2 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 5 4 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 2 3 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 2 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 5 5 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 2 4 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 3 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 5 6 を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号 1 8 と実質的に同じまたは同一の C D R 1、配列番号 1 9 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、および、配列番号 2 0 と実質的に同じまたは同一の C D R 3、を有する軽鎖を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 5 0、たとえば配列番号 5 1、および、たとえば配列番号 5 2 を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 2 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1、配列番号 2 3 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、および、配列番号 2 4 と実質的に同じまたは同一の C D R 3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 5 4、たとえば配列番号 5 5、および、たとえば配列番号 5 6 を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号 1 8 と実質的

30

40

50

に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号 1 9 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、および、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号 2 0 と実質的に同じまたは同一の C D R 3、ならびに、配列番号 2 2 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1、配列番号 2 3 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、および、配列番号 2 4 と実質的に同じまたは同一の C D R 3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 5 0、たとえば配列番号 5 1、および、たとえば配列番号 5 2、ならびに、たとえば配列番号 5 4、たとえば配列番号 5 5、および、たとえば配列番号 5 6 を含む。C D R の抗原結合配置は、また、抗体様タンパクを C D R の骨組として使用して設計してもよい。このように設計された抗原結合タンパクは、本開示の範囲内である。

10

【 0 1 1 0 】

本明細書に記載のポリヌクレオチドは、配列番号 2 1 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 5 3 を含む。いくつかの実施形態において、記載したポリヌクレオチドは、配列番号 2 5 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 5 7 を含む。いくつかの実施形態において、記載したポリヌクレオチドは、配列番号 2 1 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分、および、配列番号 2 5 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分、を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 5 3、および、たとえば配列番号 5 7 を含む。本明細書において提供する可変領域区分をコードすることが可能なポリヌクレオチドは、抗体または抗原結合フラグメントを産生するために、同じまたは異なるベクターに含まれてよい。

20

【 0 1 1 1 】

本明細書では、F R に特異的に結合する単離抗体または抗原結合フラグメントを記載する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、マウス I g G またはその誘導体である。抗体または抗原結合フラグメントは、ヒトの、ヒト化した、またはキメラのものであってよいが、本明細書において例示する抗体または抗原結合フラグメントはマウスのものである。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 6 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 7 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 8 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 3 0 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 3 1 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列を含んでよい。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 3 2 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含んでよい。抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 6 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 2 7 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列、および、配列番号 2 8 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列を有する軽鎖を含んでよい。抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 3 0 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 3 1 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列、および、配列番号 3 2 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列を有する重鎖を含んでよい。抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 6 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 2 7 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列、および、配列番号 2 8 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列を有する軽鎖、ならびに、さらに、配列番号 3 0 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 3 1 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列、および、配列番号 3 2 と実質的に同じまたは

30

40

50

同一の C D R 3 アミノ酸配列を有する重鎖を含んでよい。

【 0 1 1 2 】

記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 9 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号 6 1 と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 3 3 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。いくつかの実施形態において、配列番号 6 5 と実質的に同じまたは同一の配列を含む単離ポリヌクレオチドが、この重鎖可変領域アミノ酸配列をコードしてよい。記載した抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 9 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および、配列番号 3 3 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでよい。

10

【 0 1 1 3 】

いくつかの実施形態において、抗体は、2011年5月19日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209)に寄託され、PTA-11885の受託番号を割り当てられた抗体産生細胞によって産生される。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の F R に結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、開示した抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖 C D R および重鎖 C D R を含む。いくつかの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、前記寄託された抗体産生細胞によって産生される抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む。

20

【 0 1 1 4 】

F R に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドも記載する。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 2 6 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1 配列を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 5 8 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 2 7 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 2 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 5 9 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 2 8 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 3 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 6 0 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 3 0 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 6 2 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 3 1 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 2 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 6 3 を含む。いくつかの実施形態において、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号 3 2 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 3 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、たとえば配列番号 6 4 を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 6 と実質的に同じまたは同一の C D R 1、配列番号 2 7 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、および、配列番号 2 8 と実質的に同じまたは同一の C D R 3、を有する軽鎖を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 5 8、たとえば配列番号 5 9、および、たとえば配列番号 6 0 を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号 3 0 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1、配列番号 3 1 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、および、配列番号 3 2 と実質的に同じまたは同一の C D R 3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 6 2、たとえば配列番号 6 3、および、たとえば配列番号 6 4 を含む。前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 6 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1、ヌクレオチド配列によるコーディングが配列番号 2 7 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、および、ヌクレオチド配列によるコーディングが

30

40

50

配列番号 28 と実質的に同じまたは同一の CDR3、ならびに、配列番号 30 と実質的に同じまたは同一の重鎖 CDR1、配列番号 31 と実質的に同じまたは同一の CDR2、および、配列番号 32 と実質的に同じまたは同一の CDR3、を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 58、たとえば配列番号 59、および、たとえば配列番号 60、ならびに、たとえば配列番号 62、たとえば配列番号 63、および、たとえば配列番号 64 を含む。CDR の抗原結合配置は、また、抗体様タンパクを CDR の骨組として使用して設計してもよい。このように設計された抗原結合タンパクは、本開示の範囲内である。

【0115】

本明細書に記載のポリヌクレオチドは、配列番号 29 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 61 を含む。いくつかの実施形態において、記載したポリヌクレオチドは、配列番号 33 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 65 を含む。いくつかの実施形態において、記載したポリヌクレオチドは、配列番号 29 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域区分、および、配列番号 33 と実質的に同じまたは同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域区分、を有する抗体または抗原結合フラグメントをコードしてよく、たとえば配列番号 61、および、たとえば配列番号 65 を含む。本明細書において提供する可変領域区分をコードすることが可能なポリヌクレオチドは、抗体または抗原結合フラグメントを産生するために、同じまたは異なるペク

10

20

【0116】

設計した抗原結合タンパクをコードするポリヌクレオチドも、本開示の範囲内である。いくつかの実施形態において、記載したポリヌクレオチド（および、それらがコードするペプチド）は、リーダー配列を含む。当技術分野において公知のあらゆるリーダー配列を採用してよい。リーダー配列は、制限部位または翻訳開始部位を含んでよいが、これらに限られない。

【0117】

本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントは、記載した抗体または抗原結合フラグメントの生物学的特性（たとえば、結合親和性または免疫エフェクター活性）を維持する、単数または複数のアミノ酸置換、削除または追加を有する変異体を含む。熟練者は、単数または複数のアミノ酸置換、削除または追加を有する変異体を生産するかも知れない。これらの変異体には、（a）1 個以上のアミノ酸残基が、保存的または非保存的アミノ酸で置換された変異体、（b）1 個以上のアミノ酸がペプチドに追加され、またはペプチドから削除された変異体、（c）1 個以上のアミノ酸が置換基を含む変異体、および、（d）ポリペプチドが、たとえば、抗体へのエピトープ、ポリヒスチジン配列、ビオチン部位などの、そのペプチドに有用な特性をもたらす、融合相手、タンパクタグ、もしくは他の化学部位などの、他のペプチドまたはポリペプチドに融合した変異体、が含まれてよい。本明細書に記載した抗体または抗原結合フラグメントは、保存的位置または非保存的位置のいずれかにおいて、1 つの種に由来するアミノ酸残基が他の種の対応残基に代わる変異体を含んでよい。他の実施形態において、非保存的位置のアミノ酸残基が保存的または非保存的残基で置換される。遺伝子的（抑圧、削除、変異など）、化学的、および酵素的な技術を含む、これらの変異体を得る技術は、当技術分野において通常の技術を有する者にとって公知である。

30

40

【0118】

本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントは、IgM、IgD、IgG、IgA および IgE などの、他のいくつかの抗体アイソタイプを含んでよい。抗体またはその抗原結合フラグメントの特異性は、アミノ酸配列、および CDR の配置によって大きく決定される。したがって、1 つのアイソタイプの CDR は、抗原特異性を変化させることなく、他のアイソタイプに移転されてよい。これに代えて、抗原特異性を変化させることな

50

く、ハイブリドーマを1つの抗体アイソタイプから他へと切り換える（同型転換）技術が確立されている。したがって、このような抗体アイソタイプは、記載した抗体または抗原結合フラグメントの範囲内である。

【0119】

本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントは、約 1×10^{-8} M 未満の解離定数 (K_D) を含む、FR に対する結合親和性 (M で表す) を有する。1つの実施形態において、抗体 9F3 は、FR に、 7.15×10^{-10} M の親和性を有する。1つの実施形態において、抗体 19D4 は、FR に、 5.67×10^{-10} M の親和性を有する。1つの実施形態において、抗体 24F12 は、FR に、 1.02×10^{-10} M の親和性を有する。1つの実施形態において、抗体 26B3 は、FR に、 2.73×10^{-11} M の親和性を有する。1つの実施形態において、抗体 9F3 は、FR に、約 6.5×10^{-10} M ~ 約 8×10^{-10} M の親和性を有する。1つの実施形態において、抗体 19D4 は、FR に、約 5×10^{-10} M ~ 約 6.5×10^{-10} M の親和性を有する。1つの実施形態において、抗体 24F12 は、FR に、約 0.5×10^{-10} M ~ 約 2×10^{-10} M の親和性を有する。1つの実施形態において、抗体 26B3 は、FR に、約 1×10^{-11} M ~ 約 3.5×10^{-11} M の親和性を有する。

10

【0120】

本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターも提供される。前記ベクターは、発現ベクターであり得る。したがって、注目のポリペプチドをコードする配列を有する遺伝子組み換え発現ベクターは、本開示の範囲内であると考えられる。発現ベクターは、次のものに限定されないが、制御配列（たとえば、プロモーター、エンハンサー）、選択マーカー、ポリアデニル化シグナルなどの、1つ以上の追加の配列を含有してよい。多種多様な宿主細胞を形質転換するためのベクターが公知であり、これには、プラスミド、ファージミド、コスミド、パキユロウイルス、バクミド、細菌人工染色体 (BAC)、酵母人工染色体 (YAC) の他、細菌、酵母およびウイルスのベクターが含まれるが、これらに限られない。

20

【0121】

本明細書記載の範囲内である遺伝子組み換え発現ベクターには、適する制御要素に操作可能に結合されてよい、少なくとも1つの遺伝子組み換えタンパクをコードする、合成の、ゲノムの、または cDNA 由来の核酸フラグメントが含まれる。このような制御要素には、転写プロモーター、適する mRNA リボソーム結合部位をコードする配列、ならびに、転写および翻訳を制御する配列が含まれてよい。発現ベクター、特に哺乳類の発現ベクターには、複製起点、発現させる遺伝子に結合した好適なプロモーターおよびエンハンサー、他の 5' もしくは 3' 隣接非転写配列、5' もしくは 3' 非翻訳配列（必要なりボソーム結合部位など）、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、または転写終結配列などの、1つ以上の非転写要素も含まれてよい。宿主に複製の能力をもたらす複製起点もまた、組み込まれてよい。

30

【0122】

脊椎動物細胞の形質転換に使用される発現ベクターにおける転写および翻訳の制御配列は、ウイルス源によって提供されてよい。例示的ベクターは、Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983) に記載されているように、構築されてよい。

40

【0123】

いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントをコードする配列は、次の遺伝子のプロモーターなどの、強力な構成的プロモーターの制御下に置かれる：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Hprt)、アデノシンデアミナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ベータアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチンなど。さらに、多くのウイルスプロモーターが、真核細胞において構造的に機能し、記載した実施形態との使用に適している。このようなウイルスプロモーターには、限定するわけではないが、サイトメガロウイルス (CMV) 前初期プロモーター、SV40 の前

50

期および後期プロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーター、モロニー白血病ウイルスの長い末端反復、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、エプスタイン・バー・ウイルス(EBV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、および、他のレトロウイルス、ならびに、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーター、が含まれる。1つの実施形態において抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする配列は、メタロチオネインプロモーター、テトラサイクリン誘導性プロモーター、ドキシサイクリン誘導性プロモーター、R^{2'}、5'-オリゴアデニル酸シンセターゼ、M_x遺伝子、ADARIなどの、1つ以上のインターフェロン刺激応答要素(ISRE)を含むプロモーターなどの、誘導性プロモーターの制御下に置かれる。

【0124】

本明細書に記載したベクターは、1つ以上の配列内リボソーム進入部位(IRES)を含有してよい。融合ベクターへのIRES配列の含有は、いくつかのタンパクの発現を増進させるために有益であるかも知れない。いくつかの実施形態において、ベクターシステムは、前述の核酸配列のいずれかの上流または下流に位置してよい、1つ以上のポリアデニル化部位(たとえば、SV40)を含むであろう。ベクター成分は、遺伝子産物の発現に最適の間隔を提供する(つまり、ORF間の「スペーサ」ヌクレオチドの導入による)態様で、連続的に連結または配列されて、または、別の様式で配置されてよい。IRESモチーフなどの調節要素も、また、発現に最適の間隔を提供するように配置されてよい。

【0125】

前記ベクターは、当技術分野で周知の選択マーカーを含んでよい。選択マーカーには、ポジティブ選択マーカーおよびネガティブ選択マーカーが含まれ、たとえば、抗生物質抵抗性遺伝子(たとえば、ネオマイシン抵抗性遺伝子、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子、カナマイシン抵抗性遺伝子、テトラサイクリン抵抗性遺伝子、ペニシリン抵抗性遺伝子)、グルタメートシンターゼ遺伝子、ガンシクロビル選択のためのHSV-TK, HSV-TK誘導体、または、6-メチルプリン選択のための細菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼ遺伝子(Gadi et al., 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000))がある。選択マーカーまたはクローニング部位をコードする核酸配列は、注目のポリペプチドまたはクローニング部位をコードする核酸配列の、上流または下流に位置してよい。

【0126】

本明細書に記載のベクターは、記載した抗体または抗原結合フラグメントをコードする遺伝子で、種々の細胞を形質転換するのに使用されてよい。たとえば、ベクターは、抗体または抗原結合フラグメントを産生する細胞を生産するのに使用されてよい。したがって、他の側面は、本明細書に記載および例示した抗体または抗原結合フラグメントなどの、FRに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする、核酸配列を含むベクターで形質転換された宿主細胞を、特徴とする。

【0127】

外来遺伝子を細胞に導入する数多くの技術が、当技術分野において知られており、本明細書に記載および例示した様々な実施形態に従って、記載した方法を実施するための遺伝子組み換え細胞を構築するのに使用してよい。使用される技術は、異種遺伝子配列が子孫細胞により引き継ぎ可能かつ発現可能であり、受容細胞の必要な発育および生理的機能が妨害されないように、宿主細胞への異種遺伝子配列の安定した導入を提供すべきである。使用されるかも知れない技術には、限定するわけではないが、染色体導入(たとえば、細胞融合、染色体媒介遺伝子導入、微小細胞媒介遺伝子導入)、物理的方法(たとえば、トランスフェクション、スフェロプラスト融合、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リボソームキャリア)、ウイルスベクター導入(たとえば、遺伝子組み換えDNAウイルス、遺伝子組み換えRNAウイルス)など(Cline, 29 Pharmac. Ther. 69-92 (1985))に記載)が含まれるが、これらに限られない。リン酸カルシウム沈降、および、細菌プロトプラストの哺乳類細胞でのポリエチレン

10

20

30

40

50

リコール (P E G) 誘導融合も、また、細胞を形質変換するのに使用してよい。

【 0 1 2 8 】

本明細書に記載した抗体または抗原結合フラグメントの発現に適する細胞は、好ましくは真核細胞、より好ましくは植物、齧歯類またはヒト起原の細胞であり、たとえば、とりわけ、NSO, CHO, CHOK1, perC.6, Tk-ts13, BHK, HEK293細胞, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L細胞, C127, 3T3, HeLa, NS1, Sp2/0骨髓腫細胞, および、BHK細胞株、などであるが、これらに限られない。さらに、抗体の発現は、ハイブリドーマ細胞を用いて行ってもよい。ハイブリドーマを生産する方法は、当技術分野において確立されている。

【 0 1 2 9 】

本明細書に記載した発現ベクターで形質転換した細胞は、本明細書に記載した抗体または抗原結合フラグメントの遺伝子組み換え発現について、選択またはスクリーニングされてよい。遺伝子組み換え陽性細胞は、増殖され、高レベル発現、増強成長特性、または、たとえば、タンパク修飾もしくは変更した翻訳後修飾による、所望の生化学的特性を有するタンパクを産生する能力などの、所望の表現型を発現するサブクローンについて、スクリーニングされる。これらの表現型は、所与のサブクローンの本来的な特性によるかも知れず、あるいは、突然変異によるかも知れない。突然変異は、化学物質、UVの波長の光、放射、ウイルス、挿入突然変異原、DNA不整合修復の阻害、または、これらの方法の組み合わせ、によって達成することができる。

【 0 1 3 0 】

本明細書では、試料を本明細書に記載した抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させることによって、試料中のFRを検出する方法を提供する。本明細書に記載したように、試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞（つまり、遊離細胞）、組織（たとえば、手術摘出癌組織、細針吸引生検を含む生検）、組織プレパラートなどに由来してよい。いくつかの実施形態において、記載した方法は、試料を以下のものに接触させることによって、試料中のFRを検出することを含む：

(a) 抗体 9 F 3、抗体 1 9 D 4、抗体 2 4 F 1 2、もしくは抗体 2 6 B 3 のいずれか 1 つと同じエピトープに結合する、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

(b) 抗体 9 F 3、抗体 1 9 D 4、抗体 2 4 F 1 2、もしくは抗体 2 6 B 3 のいずれか 1 つ、もしくはその抗原結合フラグメント；

(c) 抗体 9 F 3、抗体 1 9 D 4、抗体 2 4 F 1 2、もしくは抗体 2 6 B 3 のいずれか 1 つの、表 1 に記載の、重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 アミノ酸配列ならびに軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 アミノ酸配列を含む、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

(d) 抗体 9 F 3、抗体 1 9 D 4、抗体 2 4 F 1 2、もしくは抗体 2 6 B 3 のいずれか 1 つの、表 1 に記載の、重鎖可変領域区分および軽鎖可変領域区分を含む、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；または

(e) A T C C に寄託され、P T A - 1 1 8 8 7、P T A - 1 1 8 8 4、P T A - 1 1 8 8 6、もしくは P T A - 1 1 8 8 5 の受託番号を有する細胞株のいずれか 1 つによって産生される抗体のアミノ酸配列を有する抗体、もしくはその抗原結合フラグメント。

【 0 1 3 1 】

いくつかの実施形態において、試料は本明細書に記載した 1 つ以上の抗体または抗原結合フラグメントに接触させてよい。たとえば、試料は、第 1 の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させ、その後、第 2 の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよく、ここで、第 1 の抗体または抗原結合フラグメントと、第 2 の抗体または抗原結合フラグメントは、同じ抗体または抗原結合フラグメントではない。いくつかの実施形態において、第 1 の抗体またはその抗原結合フラグメントは、試料に接触させる前に、マルチウェルプレート、クリップまたは類似の基板などの、表面に貼付してよい。他の実施形態において、第 1 の抗体またはその抗原結合フラグメントは、試料に接触させる前に、何物

10

20

30

40

50

に接触させてよい。1つの実施形態において、試料は、まず、ATCC受託番号PTA-11885を有する細胞株によって産生される抗体と同じエピトープに結合することが可能な、抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させ、次いで、別個に、ATCC受託番号PTA-11887を有する細胞株によって産生される抗体と同じエピトープに結合することが可能な、第2の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。1つの実施形態において、試料は、まず、ATCC受託番号PTA-11885を有する細胞株によって産生される抗体と同じエピトープに結合することが可能な、抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させ、次いで、別個に、ATCC受託番号PTA-11886を有する細胞株によって産生される抗体と同じエピトープに結合することが可能な、第2の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。1つの実施形態において、試料は、まず、ATCC受託番号PTA-11886を有する細胞株によって産生される抗体と同じエピトープに結合することが可能な、抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させ、次いで、別個に、ATCC受託番号PTA-11884を有する細胞株によって産生される抗体と同じエピトープに結合することが可能な、第2の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。1つの実施形態において、試料は、まず、ATCC受託番号PTA-11886を有する細胞株によって産生される抗体と同じエピトープに結合することが可能な、抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させ、次いで、別個に、ATCC受託番号PTA-11885を有する細胞株によって産生される抗体と同じエピトープに結合することが可能な、第2の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。1つの実施形態において、試料は、まず、ATCC受託番号PTA-11886を有する細胞株によって産生される抗体と同じエピトープに結合することが可能な、抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させ、次いで、別個に、ATCC受託番号PTA-11885を有する細胞株によって産生される抗体と同じエピトープに結合することが可能な、第2の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。1つの実施形態において、試料は、まず、ATCC受託番号PTA-11886を有する細胞株によって産生される抗体と同じエピトープに結合することが可能な、抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させ、次いで、別個に、ATCC受託番号PTA-11887を有する細胞株によって産生される抗体と同じエピトープに結合することが可能な、第2の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。

10

20

30

40

50

【0133】

記載した抗体または抗原結合フラグメントは、検出可能に標識してよい。いくつかの実施形態において、標識した抗体または抗原結合フラグメントは、本明細書に記載した方法でFRを検出するのを容易にするかも知れない。多くのこのような標識が、当技術分野における熟練者にはすぐに判る。たとえば、好適な標識には、放射性標識、蛍光標識(DyLight(登録商標)649など)、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、EC L標識、または酵素が含まれるが、これらに限られると理解すべきではない。より具体的には、記載した標識には、ルテニウム、 ^{111}In -DOTA、 ^{111}In -ジエチレントリアミン5酢酸(DTPA)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼおよびベータガラクトシダーゼ、ポリヒスチジン(HISタグ)、アクリジン染料、シアニン染料、フルオロン染料、オキサジン染料、フェナントリジン染料、ローダミン染料、Alexafluor(登録商標)染料などが含まれる。

【0134】

記載した抗体または抗原結合フラグメントは、試料中のFRを検出する種々のアッセイで使用してよい。いくつかの好適なアッセイには、ウエスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散、電気化学発光(ECL)イムノアッセイ、免疫組織化学、蛍光活性化細胞分類(FACS)、またはELISAアッセイが含まれるが、これらに限られると理解すべきではない。

【0135】

本明細書に記載したいくつかの実施形態において、対象者におけるFRを発現する癌の検出は、対象者がFRに向けられた治療剤で治療されてよいことを決定するために、使用してよい。いくつかの実施形態において、FRに向けられた治療剤は、ファールツズマブなどの抗体であってよい。

【0136】

癌を診断する方法

本明細書では、対象者における上皮性起源の、卵巣癌、乳癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、

子宮内膜癌、卵管癌、または肺癌を診断する方法を提供する。いくつかの実施形態において、上述のように、組織学的試料、細針吸引生検試料、摘出癌組織、循環細胞、循環癌細胞などの試料中のFRを検出することは、試料を取得した対象者における癌を診断する能力を提供する。いくつかの実施形態において、試料を採取した対象者が癌を有することが既に知られているかも知れないが、対象者が患っている癌の種類は未だ診断されていないかも知れず、または、予備的診断が不明瞭であるかも知れず、したがって、対象者から取得した試料におけるFRを検出することは、癌の診断を可能とし、または明瞭化することを可能にする。

【0137】

いくつかの実施形態において、記載した方法は、対象者に由来する試料に存在するFRの量を決定し、観察されたFRの量を対照試料中のFRの量と比較することによって、対象者がFRを発現する癌を患っているかを評価することを含み、ここで、対象者に由来する試料中のFRの量と対照試料中のFRの量との差が、対象者がFRを発現する癌を患っていることの見当になる。いくつかの実施形態において、対象者に由来する試料中のFRの量は、試料を、本明細書に記載した抗体などのFRに結合する抗体に接触させることによって、評価される。対象者が高いFR産生に関連しない癌を患っているかを決定するために、類似の方法を使用してもよい。FRの存在について評価される試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞（つまり、遊離細胞）、組織（たとえば、手術摘出癌組織、細針吸引生検を含む生検）、組織プレパラートなどに由来してよい。いくつかの実施形態において、対象者はヒトである。

10

20

【0138】

いくつかの実施形態において、FRを発現する癌を診断する方法は、対象者の生体試料をFRに特異的な抗体またはその抗原結合フラグメント（表1に示した抗体およびフラグメントに由来するものなど）に接触させ、抗体またはその抗原結合フラグメントが結合した試料中に存在するFRの量を定量し、試料中に存在するFRの量を既知の標準と比較し、対象者のFRレベルが癌に関連するFRのレベルの範囲に入るかを判断することを含むであろう。追加の実施形態において、診断方法には、癌に特異的な治療を施すまたは処方する追加の過程が続き得る。いくつかの実施形態において、癌に特異的な治療は、ファーレッツマブなどの、FRを発現する癌に向けられるものでよい。

30

【0139】

いくつかの実施形態において、記載した方法には、対象者に由来する試料に存在する細胞または組織に関連するFRの量を決定し、観察されたFRの量を対照試料中のFRの量と比較することによって、対象者がFRを発現する癌を患っているかを評価することを含み、ここで、対象者に由来する試料中のFRの量と対照試料中のFRの量との差が、対象者がFRを発現する癌を患っていることの見当になる。

【0140】

いくつかの実施形態において、対照試料は、FRを発現する癌を患っていない対象者に由来してよい。いくつかの実施形態において、対照試料は、FRを発現する癌を患っている対象者に由来してよい。対照試料がFRを発現する癌を患っていない対象者に由来するいくつかの実施形態において、試料に存在するFRの量が対照試料について観察される量に対して高いことが観察されるということは、評価される対象者がFRを発現する癌を患っていることの見当になる。対照試料がFRを発現する癌を患っていない対象者に由来するいくつかの実施形態において、試料に存在するFRの量が対照試料について観察される量に対して低いまたは同程度であることが観察されるということは、評価される対象者がFRを発現する癌を患っていないことの見当となる。対照試料がFRを発現する癌を患っている対象者に由来するいくつかの実施形態において、試験試料に存在するFRの量が対照試料について観察される量に対して同程度であることが観察されるということは、評価される対象者がFRを発現する癌を患っていることの見当となる。対照試料がFRを発現する癌を患っている対象者に由来するいくつかの実施形態

40

50

において、試験試料に存在する F R の量が対照試料について観察される量に対して低いことが観察されるということは、評価される対象者が F R を発現する癌を患っていないことの見安になる。

【 0 1 4 1 】

いくつかの実施形態において、対象者に由来する試料における F R の量は、試料を、本明細書に記載した抗体などの、F R に結合する抗体に接触させることによって評価される。F R の存在について評価される試料は、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞（つまり、遊離細胞）、組織（たとえば、手術摘出癌組織、細針吸引生検を含む生検）、組織プレパラートなどでよい。

【 0 1 4 2 】

いくつかの実施形態において、記載した方法は、対象者に由来する試料に存在する細胞または組織に関連しない F R の量を決定し、観察された F R の量を対照試料中の F R の量と比較することによって、対象者が F R を発現する癌を患っているかを評価することを含み、ここで、対象者に由来する試料中の F R の量と対照試料中の F R の量との差が、対象者が F R を発現する癌を患っていることの見安になる。いくつかの実施形態において、対象者に由来する試料中存在中の F R の量は、試料を、本明細書に記載した抗体などの、F R に結合する抗体に接触させることによって評価される。F R の存在について評価される試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、組織プレパラートなどでよい。

【 0 1 4 3 】

記載した方法の様々な実施形態において、癌は、F R を発現する癌であってよい。特定の実施形態において、F R を発現する癌は、卵巣癌である。いくつかの実施形態において、F R を発現する癌は、子宮内膜癌である。いくつかの実施形態において、F R を発現する癌は、結腸直腸癌である。いくつかの実施形態において、F R を発現する癌は、乳癌である。いくつかの実施形態において、F R を発現する癌は、甲状腺癌である。いくつかの実施形態において、F R を発現する癌は、卵管癌である。他の実施形態において、F R を発現する癌は、腺癌などの非小細胞肺癌である。上記に代えて、記載した方法は、扁平上皮癌などの、F R を発現しない癌を診断するために使用されてよい。

【 0 1 4 4 】

様々な側面において、F R の量は、試料を、F R に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させることによって、決定される。いくつかの実施形態において、試料は、F R に結合する 2 種以上の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。いくつかの実施形態において、試料は、F R に結合する第 1 の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させ、次いで、F R に結合する第 2 の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。本明細書に記載のものなどの抗体を、このために使用してよい。たとえば、抗体は、

(a) 抗体 9 F 3、抗体 1 9 D 4、抗体 2 4 F 1 2、もしくは抗体 2 6 B 3 のいずれか 1 つと同じエピトープに結合する、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

(b) 抗体 9 F 3、抗体 1 9 D 4、抗体 2 4 F 1 2、もしくは抗体 2 6 B 3 のいずれか 1 つ、もしくはその抗原結合フラグメント；

(c) 抗体 9 F 3、抗体 1 9 D 4、抗体 2 4 F 1 2、もしくは抗体 2 6 B 3 のいずれか 1 つの、表 1 に記載の、重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 アミノ酸配列ならびに軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 アミノ酸配列を含む、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

(d) 抗体 9 F 3、抗体 1 9 D 4、抗体 2 4 F 1 2、もしくは抗体 2 6 B 3 のいずれか 1 つの、表 1 に記載の、重鎖可変領域区分および軽鎖可変領域区分を含む、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；または

(e) A T C C に寄託され、P T A - 1 1 8 8 7、P T A - 1 1 8 8 4、P T A - 1 1 8 8 6、もしくは P T A - 1 1 8 8 5 の受託番号を有する細胞株のいずれか 1 つによって産生される抗体のアミノ酸配列を有する抗体、もしくはその抗原結合フラグメント

10

20

30

40

50

で構成される群から選択される。

(a) ~ (e) に記載した抗体または抗原結合フラグメントの様々な組み合わせは、検出方法を記載した総説部において詳述したように、記載した診断方法を実行するために、「第1」および「第2」の抗体または抗原結合フラグメントを提供するのに使用してよい。

【0145】

一定の実施形態において、FR の量は、ウエスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散、電気化学発光 (ECL) イムノアッセイ、免疫組織化学、蛍光活性化細胞分類 (FACS)、または ELISA アッセイ、によって決定される。

【0146】

記載した診断方法の様々な実施形態において、対照試料が使用される。対照試料は、使用する方法が適切に機能することを確実にする、陽性または陰性の対照であってよく、たとえば、この種のアッセイ対照は、免疫組織化学アッセイに普通に使用されるかも知れない。これに代えて、対照試料は、健康な対象者における FR の量の標準対照であってよい。いくつかの実施形態において、試験対象者の観察された FR レベルは、FR を発現する癌を有することが知られている対照対象者に由来する試料において観察された FR

レベルと比較してよい。いくつかの実施形態において、対照対象者の FR を発現する癌は、腺癌などの、卵巣癌、子宮内膜癌、結腸直腸癌、乳癌、甲状腺癌、卵管癌、または肺癌である。いくつかの実施形態において、対照対象者は、ステージ I の卵巣癌、子宮内膜癌、結腸直腸癌、乳癌、甲状腺癌、卵管癌、または肺癌 (たとえば、腺癌) などの、FR を発現する早期ステージの癌を有することが知られている。いくつかの実施形態において、対照対象者は、ステージ II の卵巣癌、子宮内膜癌、結腸直腸癌、乳癌、甲状腺癌、卵管癌、または肺癌 (たとえば、腺癌) などの、FR を発現する中期ステージの癌を有することが知られている。いくつかの実施形態において、対照対象者は、ステージ III またはステージ IV の卵巣癌、子宮内膜癌、結腸直腸癌、乳癌、甲状腺癌、卵管癌、または肺癌 (たとえば、腺癌) などの、FR を発現する後期ステージの癌を有することが知られている。

【0147】

本明細書で提供する診断方法は、また、対象者が診断後に5年生存する可能性が比較的高いか低かを予測することを可能にするかも知れない、基準も提供する。いくつかの実施形態において、記載した方法は、腺癌を有する対象者にとっての良好な転帰を予測するのに使用してよく、ここで、良好な転帰とは、5年生存率が高くなることであると定義される。本明細書で提供するデータが示すように、FR を発現しないステージ I またはステージ II の腺癌を有すると判断された対象者は、FR を発現するステージ I またはステージ II の腺癌を有すると判断された対象者よりも、2倍以上5年以内に死亡し易い。したがって、本明細書に記載した診断方法は、この知見と組み合わせて、癌を有すると判断された対象者の5年生存可能性を予測する方法を可能にしてよい。いくつかの実施形態において、この方法は、腺癌を有すると判断された対象者の5年生存可能性を予測するのに使用される。

【0148】

いくつかの実施形態において、記載した診断方法は、対象者の生体試料を、FR に特異的な抗体またはその抗原結合フラグメント (表1に示した抗体およびフラグメントに由来するものなど) に接触させ、抗体またはその抗原結合フラグメントが結合した試料中に存在する FR の量を定量し、試料中に存在する FR の量を既知の標準と比較し、対象者の FR レベルが FR を発現する癌の存在を示すかを決定し、これによって、癌であると診断された後に対象者が5年生存する可能性の予測を可能にするを含む。いくつかの実施形態において、対象者は、腺癌を有することが知られており、または、腺癌を有すると判断されている。いくつかの実施形態において、対象者はヒトである。

【0149】

癌を監視する方法

10

20

30

40

50

本明細書では、対象者における上皮性起源の癌を監視する方法を提供する。いくつかの実施形態において、記載した方法は、対象者に由来する試験試料に存在するFRの量を決定し、観察されたFRのレベルを、より前の時点に対象者から得た試料におけるFRの量と比較することによって、FRを発現する癌が進行しているか、退行しているか、または安定を保っているかを評価することを含み、ここで、試験試料と、より前の試料とのFRの量の差が、癌が進行しているか、退行しているか、または安定を保っているか、の目安となる。その際、試験試料のFRの量が、より前の試料について観察された量に対して、上昇することは、FRを発現する癌の進行を示すかも知れない。逆に、試験試料のFRの量が、より前の試料について観察された量に対して、減少することは、FRを発現する癌の退行を示すかも知れない。したがって、より前の試料について観察された量に対して、試験試料のFRの量に有意な差がないことは、FRを発現する癌について、安定の状態を示すかも知れない。いくつかの実施形態において、対象者に由来する試料におけるFRの量は、試料を、本明細書に記載した抗体などの、FRに結合する抗体に接触させることによって評価される。FRの存在について評価する試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞（つまり、遊離細胞）、組織（たとえば、手術摘出癌組織、細針吸引生検を含む生検）、組織プレパラートなどに由来してよい。いくつかの実施形態において、対象者はヒトである。

【0150】

いくつかの実施形態において、FRを発現する癌を監視する方法は、対象者の生体試料をFRに特異的な抗体またはその抗原結合フラグメント（表1に示した抗体およびフラグメントに由来するものなど）に接触させ、抗体またはその抗原結合フラグメントが結合した試料中に存在するFRの量を定量し、試料中に存在するFRの量を、より前の時点の同じ対象者に由来する試料におけるFRの量であると決定されたFRの量と比較し、対象者のFRレベルが経時的に変化しているかを判断すること、を含むであろう。試験試料のFRの量が、より前の試料について観察された量に対して、上昇することは、FRを発現する癌の進行を示すかも知れない。逆に、試験試料のFRの量が、より前の試料について観察された量に対して、減少することは、FRを発現する癌の退行を示すかも知れない。したがって、より前の試料について観察された量に対して、試験試料のFRの量に有意な差がないことは、FRを発現する癌について、安定の状態を示すかも知れない。いくつかの実施形態において、試料のFRのレベルは、既知の標準のみと、または、既知の標準およびより前の時点に評価した試料について観察されたFRのレベルと、比較してよい。いくつかの実施形態において、既知の標準は、既知の濃度のFRタンパク（たとえば、遺伝子組み換えしたまたは精製したFRタンパク試料）でよい。追加の実施形態において、診断方法には、癌に特異的な治療を施す追加の過程が続き得る。いくつかの実施形態において、癌に特異的な治療は、ファーレッツマブなどの、FRを発現する癌に向けられるものでよい。

【0151】

いくつかの実施形態において、記載した方法は、対象者に由来する試験試料に存在する細胞または組織に関連するFRの量を決定し、観察されたFRの量を、同様に、より前の時点に対象者から得た試料におけるFRの量と比較することによって、FRを発現する癌が、進行しているか、退行しているか、または安定を保っているかを評価することを含み、ここで、試験試料と、より前の試料とのFRの量の差が、癌が進行しているか、退行しているか、または安定を保っているか、の目安を提供する。その際、試験試料のFRの量が、より前の試料について観察された量に対して、上昇することは、FRを発現する癌の進行を示すかも知れない。逆に、試験試料のFRの量が、より前の試料について観察された量に対して、減少することは、FRを発現する癌の退行を示すかも知れない。したがって、より前の試料について観察された量に対して、試験試料のFRの量に有意な差がないことは、FRを発現する癌について、安定の状態を示すかも知れない。いくつかの実施形態において、対象者に由来する試料におけるFRの量は、試料を、本明細書に記載の抗体などの、FRに結合する抗体に接触させることによって評価

10

20

30

40

50

される。FR の存在について評価する試料は、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞（つまり、遊離細胞）、組織（たとえば、手術摘出癌組織、細針吸引生検を含む生検）、組織プレパラートなどでよい。

【0152】

いくつかの実施形態において、記載した方法は、対象者に由来する試料に存在する細胞または組織に関連しないFR の量を決定し、観察されたFR の量を、同様に、より前の時点に対象者から得た試料におけるFR の量と比較することによって、FR を発現する癌が、進行しているか、退行しているか、または安定を保っているかを評価することを含み、ここで、試験試料と、より前の試料とのFR の量の差が、癌が進行しているか、退行しているか、または安定を保っているか、の目安を提供する。その際、試験試料のFR の量が、より前の試料について観察された量に対して、上昇することは、FR を発現する癌の進行を示すかも知れない。逆に、試験試料のFR の量が、より前の試料について観察された量に対して、減少することは、FR を発現する癌の退行を示すかも知れない。したがって、より前の試料について観察された量に対して、試験試料のFR の量に有意な差がないことは、FR を発現する癌について、安定の状態を示すかも知れない。いくつかの実施形態において、対象者に由来する試料におけるFR の量は、試料を、本明細書に記載の抗体などの、FR に結合する抗体に接触させることによって評価される。FR の存在について評価する試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、組織プレパラートなどでよい。

10

【0153】

記載した方法の様々な実施形態において、癌は、FR を発現する癌であってよい。特定の実施形態において、FR を発現する癌は、卵巣癌である。いくつかの実施形態において、FR を発現する癌は、子宮内膜癌である。いくつかの実施形態において、FR を発現する癌は、結腸直腸癌である。いくつかの実施形態において、FR を発現する癌は、乳癌である。いくつかの実施形態において、FR を発現する癌は、甲状腺癌である。いくつかの実施形態において、FR を発現する癌は、卵管癌である。他の実施形態において、FR を発現する癌は、腺癌などの非小細胞肺癌である。

20

【0154】

様々な側面において、FR の量は、試料を、FR に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させることによって、決定される。いくつかの実施形態において、試料は、FR に結合する2種以上の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。いくつかの実施形態において、試料は、FR に結合する第1の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させ、次いで、FR に結合する第2の抗体またはその抗原結合フラグメントに接触させてよい。本明細書に記載のものなどの抗体を、このために使用してよい。たとえば、抗体は、

30

(a) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12、もしくは抗体26B3のいずれか1つと同じエピトープに結合する、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

(b) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12、もしくは抗体26B3のいずれか1つ、もしくはその抗原結合フラグメント；

(c) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12、もしくは抗体26B3のいずれか1つの、表1に記載の、重鎖CDR1、CDR2およびCDR3アミノ酸配列ならびに軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3アミノ酸配列を含む、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

40

(d) 抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12、もしくは抗体26B3のいずれか1つの、表1に記載の、重鎖可変領域区分および軽鎖可変領域区分を含む、抗体ならびにその抗原結合フラグメント；または

(e) ATCCに寄託され、PTA-11887、PTA-11884、PTA-11886、もしくはPTA-11885の受託番号を有する細胞株のいずれか1つによって産生される抗体のアミノ酸配列を有する抗体、もしくはその抗原結合フラグメントで構成される群から選択される。

50

(a) ~ (e) に記載した抗体または抗原結合フラグメントの様々な組み合わせは、検出方法を記載した総説部において詳述したように、記載した監視方法を実行するために、「第1」および「第2」の抗体または抗原結合フラグメントを提供するのに使用してよい。

【0155】

特定の実施形態において、FR のレベルは、ウエスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散、電気化学発光 (ECL) イムノアッセイ、免疫組織化学、蛍光活性化細胞分類 (FACS)、または ELISA アッセイによって決定される。

【0156】

要約した主題の追加の特徴は、発明の詳細な説明および提供した実施例ならびに関連する図面において、より詳しく説明する。

10

【0157】

FR を検出するためのキット

本明細書では、試料における FR を検出するためのキットを提供する。これらのキットには、1つ以上の、本明細書に記載した FR に特異的な抗体または抗原結合フラグメント、および、キットを使用するための指示が含まれる。いくつかの実施形態において、記載したキットで提供される抗体またはその抗原結合フラグメントは、

(a) 抗体 9F3、抗体 19D4、抗体 24F12、もしくは抗体 26B3 のいずれか1つと同じエピトープに結合する、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

(b) 抗体 9F3、抗体 19D4、抗体 24F12、もしくは抗体 26B3 のいずれか1つ、もしくはその抗原結合フラグメント；

20

(c) 抗体 9F3、抗体 19D4、抗体 24F12、もしくは抗体 26B3 のいずれか1つの、表1に記載の、重鎖 CDR1、CDR2 および CDR3 アミノ酸配列ならびに軽鎖 CDR1、CDR2 および CDR3 アミノ酸配列を含む、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

(d) 抗体 9F3、抗体 19D4、抗体 24F12、もしくは抗体 26B3 のいずれか1つの、表1に記載の、重鎖可変領域区分および軽鎖可変領域区分を含む、抗体ならびにその抗原結合フラグメント；または

(e) ATCC に寄託され、PTA-11887、PTA-11884、PTA-11886、もしくは PTA-11885 の受託番号を有する細胞株のいずれか1つによって産生される抗体のアミノ酸配列を有する抗体、もしくはその抗原結合フラグメントの1つ以上であってよい。

30

【0158】

提供される抗体または抗原結合フラグメントは、溶液；凍結乾燥；基板、担体もしくはプレートへの貼付；または、検出可能な標識への結合、の形態であってよい。

【0159】

記載したキットは、また、本明細書に記載した方法を実施するのに有用な、追加の要素も含んでよい。例として、キットは、対象者から試料を得るための手段、対照試料、たとえば、徐々に進行している癌を有する対象者および/もしくは癌を有しない対象者から得た試料、1つ以上の試料区画、ならびに/または、本発明の方法の性能および組織固有の対照/基準を記載した指示教材、を含んでよい。

40

【0160】

FR のレベルを決定する方法は、さらに、たとえば、FR のレベルを決定するためのアッセイで使用する緩衝液または他の試薬、を含み得る。指示は、たとえば、アッセイを実施するための、印刷した指示、および/または、FR の発現のレベルを評価するための指示、であり得る。

【0161】

記載したキットは、また、対象者から試料を単離するための手段も含んでよい。これらの手段は、対象者から液体または組織を得るために使用することが可能な、1つ以上の器具または試薬、を含み得る。対象者から試料を得るための手段は、また、血清などの血液

50

成分を血液試料から単離するための手段も含んでよい。好ましくは、キットは、ヒトの対象者について使用するよう設計される。

【0162】

記載したキットは、また、一次抗体または二次抗体の非特異的結合を減少させるために試料に適用することが可能な、ブロッキング剤も含んでよい。ブロッキング剤の例にはウシ血清アルブミン(BSA)があり、これは使用の前に緩衝液で希釈してもよい。Block AceおよびELISA Synblock (AbD serotec)、Background Punisher (BIOCARE MEDICAL)、ならびに、Starting Block (Thermo Fisher Scientific)などの、他の市販のブロッキング剤が、当技術分野で知られている。記載したキットは、また、抗体に基づく検出アッセイにおいて陽性の結果を生じるに足るほどにはFR に結合しない、陰性対照一次抗体を含んでよい。さらに、記載したキットは、抗体9F3、抗体19D4、抗体24F12または抗体26B3FR などの、一次抗体に結合することが可能な二次抗体を含んでよい。いくつかの実施形態において、試料に結合した一次抗体の検出を可能にするために、二次抗体は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)またはフルオロフォアなどの、検出可能な標識に結合されてよい。記載したキットは、結合した二次抗体の存在が試料上で検出されることを可能にする、比色分析または化学発光法の基質も含んでよい。いくつかの実施形態において、比色分析または化学発光法の基質は、2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS); 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB); 3, 3'-ジアミノベンジジン(DAB); SuperSignal (Thermo Fisher Scientific); ELC試薬Thermo Fisher Scientific)、または、当技術分野で通常の技術を有する者に公知の、他のそのような試薬であってよい。

【0163】

以下の実施例は、先の開示を補足し、本明細書に記載した主題のよりよい理解を提供するものである。これらの実施例は、記載した主題を限定するものと考えべきではない。本明細書に記載した実施例および実施形態は、例示を目的とするのみであり、それらを考慮した種々の修飾または変更は、当技術分野における熟練者には明白であり、本発明の真の範囲に含まれ、本発明の真の範囲から逸脱することなく実施することが可能である、と理解すべきである。

【0164】

実施例1 - 遺伝子組み換えヒトFR の発現および精製

本明細書に記載した研究に関連する実験を行うために、いくつかの葉酸受容体アルファ(FR)を発現する細胞系または細胞株を生成して、FRを発現する細胞基質を産生させ、または精製遺伝子組み換えヒトFRタンパクを産生させた。使用した1つの発現系は、バキュロウイルスを介して遺伝子組み換えヒトFRを発現したSf9昆虫細胞株であった。この系は、昆虫細胞発現に最適化したリーダー配列、N末端6xヒスチジン(6xhis)エピトープタグ、および完全な天然GPI附着部位、を含有するヒトFR配列を用いて調製した。次いで、この細胞を1Lの振とうフラスコ中で培養し、Sf9の対数期培養物を、1未満の感染多重度(MOI)にて、遺伝子組み換えバキュロウイルスに感染させた。30Lの培養物からの細胞を収穫し、溶解させ、10mMの3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸(CHAPS)を含有する1Xリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で、2回抽出した。NaCl濃度を300mMに調節し、0.2μm膜でろ過した。清澄な上清を、2M NaCl, 1mM CHAPSを有するpH7.4の1X PBSを洗浄緩衝液として用い、これに続いて、10mM 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、3M MgCl₂, 1mM CHAPS, pH6.8で溶出する、アフィニティークロマトグラフィーで精製した。ピーク画分を、1X PBS, pH7.4に対して繰り返し透析し、SDS-PAGEで純度分析し、ピシンコニン酸アッセイ(BCA)で定量し、等分して-80にて保存した。

10

20

30

40

50

【0165】

ヒトFR を安定して発現し分泌するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株を、ヒト免疫グロブリンカッパーリーダー配列、および、GPI 付着部位に代わるC末端6 x his エピトープタグを含有する、ヒト葉酸受容体アルファ (FR) 配列を用いて生成した。生成後、FR 発現CHO細胞を、25Lスケールで、ウエーブバッグ内で培養した。分泌されたFR タンパクを精製するために、深層ろ過により細胞上清から細胞残屑を除去し、次いで、細胞上清を、タンジェント流ろ過で10倍に濃縮し、50mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl、1mMイミダゾール、pH8.0にて、透析ろ過した。これを、FPLCを用いるプレパックTalon (登録商標) IMACカラムに担持させた。結合しなかった物質を、50mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl、5mMイミダゾール、pH8.0を用いて洗い流し、結合したタンパクを、50mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl、pH8.0中の直線勾配の5mM~100mMのイミダゾール、を用いて溶出した。ピーク画分を、1X PBS, pH7.4に対して繰り返し透析し、SDS-PAGEで純度分析し、BCAアッセイで定量し、等分して-80にて保存した。

10

【0166】

ヒト葉酸受容体ベータ (FR)、ヒト葉酸受容体ガンマ (FR)、および、ヒト葉酸受容体デルタ (FR) についても、類似の細胞系を生成した。簡潔に述べると、ヒト免疫グロブリンカッパーリーダー配列、および、GPI 付着部位に代わるC末端6 x his エピトープタグを含有する、FR、FR またはFRデルタのいずれかの構築物を、293F細胞の1L培養物を一次的に形質転換するのに、使用した。遺伝子組み換えFRタンパクを、ヒトFR について上述したように精製した。

20

【0167】

メソテリンは多くの調査において陰性対照として機能するので、ヒト免疫グロブリンカッパーリーダー配列、および、GPI 付着部位に代わるC末端6 x his エピトープタグを含有する、ヒトメソテリン配列を安定して発現し分泌するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株も生成した。ヒトメソテリンを発現するCHO細胞を、25Lスケールで、ウエーブバッグ内で培養した。ヒトメソテリンタンパクを精製するために、中空糸ろ過により細胞上清から残屑を除去し、次いで、清澄にした上清を、タンジェント流ろ過で10倍に濃縮した。上清NaCl濃度を、300mM NaClおよび0.5mMイミダゾールに調節した。これを、FPLCを用いるプレパックTalon (登録商標) IMACカラムに担持させた。結合しなかった物質を、50mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl、3mMイミダゾール、pH8.0、を用いて洗い流し、結合したタンパクを、50mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl、150mMイミダゾール、pH8.0、を用いて溶出した。ピーク画分を、50mMリン酸カリウム、pH7.5に対して繰り返し透析した。硫酸アンモニウムを加えて1Mの最終濃度とし、その後、50mMリン酸カリウム、pH7.5中の1M~0M硫酸アンモニウムの段階勾配を用いて、フェニルセファロースカラムで最後の精製を行った。ピーク画分を、1X PBS、pH7.4に対して繰り返し透析し、SDS-PAGEで純度分析し、BCAアッセイで定量し、等分して-80にて保存した。

30

40

【0168】

実施例2 - 精製した還元、アルキル化FR の生成

FR の還元しアルキル化した抗原型を生成すべく試みた。タンパクを還元するために、精製したFR を、遠心ろ過機 (Amicon Ultra, 3kD MW limit) を用いて、リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) 中2mg/mLまで濃縮した。タンパク濃度は、BCAアッセイ (Thermo Scientific) を用いて決定した。得られたFR を、8M尿素/PBS中で1:1に希釈して、4M尿素含有PBS中1mg/mLというFR の最終濃度とした。ジチオスレイトール溶液 (PBS中500mM) を、10mMの最終濃度まで加えた。溶液を65にて1時間インキュベートし、室温まで冷却した。

50

【0169】

次いで、リン酸緩衝生理食塩水中の1Mのヨードアセタミド溶液を、還元した葉酸受容体溶液に、10mMの最終濃度まで加え、反応を、室温にて30分間、暗所に保った。タンパクはこれらの条件下で、可溶のままであった。免疫付与に用いる最終の還元FRは、4Mの尿素、10mMのDTTおよび10mMのヨードアセタミドを含有するリン酸緩衝生理食塩水中で保存した。

【0170】

図1に、非還元的条件下でSDS-PAGEで分析した、天然FRタンパクとそのタンパクの還元、アルキル化型との、移動の差を示す。

【0171】

実施例3 - FRを用いるハイブリドーマの生産

8週齢の雌Balb/cマウスを、ヘキサヒスチジンタグを付したFRタンパク(n=5)、または、還元、アルキル化FRタンパク(n=5)で、免疫処理した。第0日に行った初期の腹腔内免疫処理には、完全フロイントアジュバント(Rockland, Cat# D614-0050)と1:1(v:v)で混合したそれぞれの免疫原の50μgを含めた。次いで、マウスに、14日後およびその後21日毎に、完全フロイントアジュバント(Rockland, Cat# D615-0050)と1:1(v:v)で混合した50μg免疫原を、追加投与した。初期の免疫処理後24日およびその後21日毎に、免疫処理したマウスから血液試料を収集した。

【0172】

収集した血液試料を、直接酵素結合免疫測定法(EIA)によって、FRに対して分析した。プレートをFRタンパク(PBS、0.02Mリン酸カリウム、0.15M塩化ナトリウム中の1mg/mL溶液、pH7.2、の100mL)で被覆し、4にてインキュベートし、0.2% Tween(登録商標)-20(PBST; Rockland, Cat# MB-075-1000)を含有するPBSで洗浄し、3%フィッシュゲル(Sigma)で、室温にて1時間ブロックした。個々のマウス血清試料の3倍希釈系列を、室温にて1時間結合させ、次いで、プレートをPBSTで3回洗浄し、続いて、プレートを、HRP結合ウサギ抗マウス抗体(Rockland, Cat# 610-4320)で、37にて30分、1:2500にて、調べた。TMB基質(Rockland, Cat# TMBE-100)を加え、30分後に、1MHCLを加えることによって、反応を停止させ、その後、450nmでの吸光度読み取り(Microplate Reader "Benchmark"; Biorad)を行った。すべての試料を、陰性対照としてのヘキサヒスチジンタグ遺伝子組み換えメソテリン(メソテリン-His₆)タンパクに対して、カウンタースクリーニングした。

【0173】

最も高い抗原特異的滴定値を示したマウスから脾臓を採取し、脾細胞とSp2/0 Ag14骨髄腫細胞(ATTC CRL1581)との電気融合(Hybridoma(商標) Model CEEF-50B Waveform Generator; Cellctis, Romainville, France)によって、ハイブリドーマを調製した。その後、ハイブリドーマ上清を、ELISAによって、FRおよび上述の遺伝子組み換えメソテリン-His₆に対してスクリーニングし、陽性の親の融合細胞株を選択した。

【0174】

遺伝子組み換えヒトFR(rhFR)に反応する抗体を産生すると判断して選択した親細胞株を、限界希釈法でサブクロニングした。次いで、これらの細胞によって産生された抗体を、FR結合について再試験し、Clonotyping(商標) System(Southern Biotech, Birmingham, AL)を用いてアイソタイプ分類した。これらのクローンからの上清を、さらに、ELISAによって、ヒト葉酸受容体の3つの追加のアイソフォーム(FR, FRおよびFR)に対してスクリーニングし、受容体特異性を決定した。プレートを、それぞれのFRアイソフォーム

10

20

30

40

50

の1 µg/mL溶液で、4 にて被覆し、0.2% Tween (登録商標) - 20 (Rockland, Cat# MB-075-1000) を含有するPBSで洗浄し、3% フィッシュゲル (Sigma) でブロックした。培養液上清の3倍希釈系列を、室温にて1時間結合させ、その後、プレートを洗浄し、上述のように、HRP結合抗マウス抗体で調べた。FR , FR およびFR に反応する抗体を産生するクローンは、さらなる分析のために選択しなかった。

【0175】

選択した4つのハイブリドーマクローン、19D4-B7, 26B3-F2, 24F12-B1, および9F3-H9-H3-H3-B5-G2を、2011年5月19日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託したところ、これらは、PTA-11884, PTA-11885, PTA-11886, およびPTA-11887の受託番号を、それぞれ割り当てられた。

【0176】

実施例4 - FR に対する精製モノクローナル抗体の生成

選択した細胞株を、マイコプラズマ試験キット (Rockland, Cat# MAB-012) を用いて、マイコプラズマについて試験し、その後、無血清培地 (Invitrogen, Cat# 12045-076) および5%低IgG FBS (0.1 µg/mL) (Gibco, Cat# 16250-078) を収容した1Lローラーボトルに、 0.5×10^5 細胞/mLにて播種した。培養物を、37 にて14日または21日のいずれかにわたって生育させ、その後、上清を収穫し、50 kDaを過膜 (Spectrum Labs, Rancho Dominguez CA) を通して、約10倍に濃縮し、次いで、タンパククロマトグラフィー (Rockland, Cat# PA50-00-0025) を用いて精製した。結合した抗体を、0.1 Mクエン酸ナトリウム、抗体アイソタイプに応じてpH 3.5/4.5で溶出し、緩衝液を、12~14 kDa膜チュービング (membranous tubing) (Spectrum Labs, Rancho Dominguez CA) を用いる透析によって、PBSに対して交換した。精製した抗体を、0.22 µm Express (商標) PLUS Stericups (Millipore, Billerica MA) を用いて除菌ろ過し、さらなる試験のために4 にて貯蔵した。

【0177】

選択した4つのハイブリドーマクローン (9F3-H9, 19D4-B7, 24F12-B1, および26B3-F2) の重鎖および軽鎖の配列を決定すべく試みた。まず、RNAqueous (登録商標) キット (Ambion) を用い、製造者のプロトコルに従って、各ハイブリドーマ細胞株から全RNAを単離した (各 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ の細胞ペレット)。NanoDrop (商標) 8000分光光度計 (Thermo Scientific) を用いて、RNAを定量した。

【0178】

次いで、単離したRNAを、Mastercycler (登録商標) EP Gradient Thermocycler (Eppendorf) で、各ハイブリドーマについて3重に行ったマルチプレックスRT-PCRを介して、増幅した。まず、各ハイブリドーマについて、2つの別個の遺伝子特異的cDNA増幅 (1 µg RNA/反応) を行って、Ig再構成の間、どのIgの重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子が使用されるかを決定した。各カクテルは、潜在的マウスIg V 遺伝子ファミリー (IgHv, IgKv) およびIg定常領域遺伝子 (IgHc_{gamma}, IgKc) のいずれかにアニールするように設計した、独特のファミリー特異的プライマーで構成した。SuperScript (登録商標) III One-Step RT-PCR System withを用いて、Platinum (登録商標) Taq High Fidelity (Invitrogen) で、55 °C、30分および95 °C、2分の後、95 °C、1分、55 °C、1分、68 °C、1分の40サイクル、および、最後に68 °C、10分の終了ステップという条件にて、cDNAの生成および増幅を行った。DNA産物を2%アガロースゲルで電

10

20

30

40

50

気泳動した。適当なバンドを切除し、QIAquick (登録商標) Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて、製造者のプロトコルに従って、ゲル精製した。精製したDNAを、配列決定 (GENEWIZ, Inc., South Plainfield, NJ) に付して、各ハイブリドーマによって発現される生殖細胞系列遺伝子区分を決定した。

【0179】

次いで、各ハイブリドーマについて同定した特定の遺伝子に適するさらなるRT-PCR分析を、上記と同じRNA源および(マルチプレックスRT-PCR混合物で用いたファミリー特異的プライマーとは対照的な)遺伝子特異的プライマー、を用いて行った。クロニングを容易にするために、増幅したIg cDNAをフュージョン(In-Fusion) (IF) 発現ベクターに入れ、また、各遺伝子特異的プライマーに、相同クロスオーバーを可能にするであろうベクター適合リンカー配列を包含させた。他のすべての試薬およびサーモサイクラ-条件は、上述のマルチプレックスRT-PCR実験に用いたものと同じである。

【0180】

実施例5: FR への抗体結合の特性評価

FR に対する精製モノクローナル抗体の結合特性を、表面プラズモン共鳴 (SPR) 実験によって決定した。すべてのSPR実験は、BIAcore T100を用い、研究等級CM5チップ (GE Healthcare) で、製造者の指示どおりに、25 に行った。始めに、マウス抗体捕捉キット (GE Healthcare) において提供された抗マウスIgGを、CM5センサーチップにアミド結合させることによって、固定した。第4のフローセルを対照として用いながら、マウス抗FR モノクローナル抗体 (26B3, 24F12, 19D4または9F3) を、結合サイクルごとに個々のフローセル上で捕捉した。結合実験は、HBS-P (GE Healthcare) を泳動用バッファとして、30 μ L / 分の流量で行った。各モノクローナル抗体試料 (0.5 μ g / mL) を、3分にわたって注射して抗体を捕捉した。様々な濃度の精製遺伝子組み換えヒトFR (rh-FR) (1 nM ~ 30 nM) を、FR 特異的表面および対照表面に3分にわたって注射し、シングルサイクルカイネティクス法を用いて、結合センサーグラム (sensogram) を記録した。解離プロファイルを25分間監視した。結合と結合との間に、表面を10 mMグリシン (pH 1.7) の30 μ l注射で再生した。センサーグラムを処理し、BIAcore T100評価ソフトウェア (バージョン2.0.1) を用いて、1:1ラングミュア結合モデルに当てはめた。抗体26B3, 24F12, 19D4, および9F3の結合特性のいくつかを表2に示す。

【表2】

FR α 特異的抗体の結合特性				
短縮型クローン名	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Chi.Sq
26B3	5.24x10 ⁵	1.43x10 ⁻⁵	2.73x10 ⁻¹¹	2.48
24F12	3.93x10 ⁵	3.99x10 ⁻⁵	1.02x10 ⁻¹⁰	1.08
19D4	4.27x10 ⁵	2.42x10 ⁻⁴	5.67x10 ⁻¹⁰	0.656
9F3	4.34x10 ⁵	3.10x10 ⁻⁴	7.15x10 ⁻¹⁰	1.89

【0181】

実施例6: 選択したFR 特異的抗体のエピトープマッピング

FR 特異的抗体26B3, 24F12, および9F3を、Octet QKを用いるエピトープ結合調査において、さらに評価した。結果は、精製ヒトFR に高い親和性を有する26B3および24F12が、FR への結合について、互いに競合することを示した。したがって、これらの抗体は、同じエピトープを共有するか、または、相互にすぐ近くのエピトープを有するかも知れない。結果は、また、9F3抗体は、FR への結合について、他のFR 特異的抗体と競合しないので、9F3が独自のエピトープを有することを示す。

【0182】

10

20

30

40

50

追加のエピトープマッピング調査を、水素/重水素交換質量分析を用いるE x S A R (商標)およびドッキング法によって行った。抗体9 F 3, 2 4 F 1 2および2 6 B 3についてのこれらの調査の結果を、図2に示す。抗体2 6 B 3のエピトープについては、これらのデータは、フローサイトメトリーによる天然FR を認識する2 6 B 3の能力を考えると、エピトープが天然、膜アンカー構造で到達可能であることを示唆している。さらに、これらのデータは、M A b 2 6 B 3によって認識されるエピトープのコンホメーション制約が、還元ウエスタンブロット上でタンパクを検出することができないことによって明らかにされるように、システイン1 1 1とジスルフィド架橋を形成するFR タンパクの位置1 8 5のシステインに、関連していることも示唆している。

【0183】

実施例7: 変性型および化学保存型のFR の認識

上記FR 特異的抗体のいずれかが変性型のFR を認識し得るかを判断するために、実験を行った。これらの分析のために、G P I結合ヒトFR , または を安定して発現するC H O K 1細胞を、C o m p l e t e M i n i P r o t e a s e I n h i b i t o r C o c k t a i l (R o c h e D i a g n o s t i c s , I n d i a n a p o l i s , I N)およびP M S F (1 0 0 n M)で補完した1 . 1 % O B G緩衝液(5 0 m M T r i s - H C l , p H 7 . 5 , 1 5 0 m M N a C l , 1 . 1 % O B G)に溶解し、氷上に15分置いた。溶解物を、13, 000 rpmでの15分間の遠心分離によって事前清澄して、残屑を除去した。還元試料および変性試料について、同量(20 μg)のタンパクを、5%メルカプトエタノールと40 mM D T Tを含有する、N u P A G E (登録商標) L D S試料緩衝液(I n v i t r o g e n)中で10分間沸騰させた。タンパクを、4 - 12%ビス-トリスゲル(I n v i t r o g e n)上のS D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(S D S - P A G E)を用いて分離し、P V D F膜に移した。膜を、5%脱脂乳を加えたP B S Tで、室温にて1時間ブロックし、その後、膜をP B S Tで2回洗浄した。FR に特異的な精製マウスモノクローナル抗体9 F 3, 1 9 D 4, 2 4 F 1 2または2 6 B 3(1 μg/mL)を用いて、免疫プロットングを行い、前記抗体をヤギ抗マウスH R P結合抗体で検出し、S u p e r S i g n a l W e s t P i c o化学発光基質(P i e r c e , R o c k f o r d , I L)を用いて可視化した。発光は、O m e g a 1 2 i C分子画像化システム(U l t r a - L u m , C l a r e m o n t , C A)を用い、U l t r a Q u a n t (商標) 6 . 0ソフトウェア(U l t r a - L u m)で、可視化した。

【0184】

精製した葉酸受容体調製物を用いて、ウエスタンブロット分析も行った。これらの実験のために、実施例1で記載したように生成した、0 . 5 μgの精製ヒトFR , , または を、20 mM D T Tを有するまたは有しない1 X S D S - P A G E試料ローディング緩衝液(I n v i t r o g e n)中でインキュベートし、10分間沸騰させ、4~12%勾配S D S - P A G Eゲルで電気泳動した。タンパクをP V D F膜に移し、プロットを上述のように調べた。ゲルを、B e n c h m a r k (商標)プレステインドプロテインラダー(N o v e x (登録商標))を用いて、泳動させた。精製遺伝子組み換えFRタンパクを使用するゲルも、銀染色を介して可視化して、同量のタンパクが担持されたことを確認した。

【0185】

ウエスタンブロット分析から、抗体1 9 D 4, 9 F 3, 2 4 F 1 2および2 6 B 3は、非還元FR を認識するが、還元試料および変性試料への結合は、これらの抗体のいずれについても検出されないことが示される(図3(A)および(B))。

【0186】

これらの抗体のいずれかが、ホルマリン固定パラフィン包埋漿液性乳頭状卵巣癌試料に結合し得るかを判断するために、免疫組織化学(I H C)調査も行った。M A C H 4 (商標) U n i v e r s a l H R P - P o l y m e r D e t e c t i o n K i t (B i o c a r e M e d i c a l)を用いて、FR について間接I H C試験を行った。ホル

10

20

30

40

50

マリン固定パラフィン包埋標本を、正に荷電したガラススライド上で、5ミクロンにて切片とし、60にて約60分加熱した。スライドを、各3分のキシレンの3連続浴中で脱パラフィンして、各3分の100%アルコールの3連続浴に移し、その後、各3分の95%アルコールの3連続浴に移し、次いで、脱イオン(DI)水で5分すすいだ。次いで、調製した試料を、DI水で1:10に希釈したDiv a熱誘導エピトープ賦活緩衝液(Biocare Medical)で前処理し、500mlのDI水で満たしておいた加圧脱被覆室の内部に置いた。試料を脱被覆室内で15分インキュベートし、その際、加圧インキュベーションを、16PSIにて125の最高温度に30秒間到達させ、その後、15分冷却して95に下げた。次いで、スライドを室温にて15分冷却した。冷却後、スライドを、各3分のTris緩衝生理食塩水/0.1% Tween-20(登録商標)洗浄緩衝液(TBST)の3連続浴で洗浄した。後続の緩衝液洗浄も、すべてこの方法で行った。次いで、スライドを、ペルオキシダーゼ-1(Biocare Medical)ブロッキング溶液中で、室温にて5分ブロックし、TBSTで洗浄し、次いで、Background Sniper(Biocare Medical)無血清ユニバーサルブロッキング試薬を、室温にて10分適用した。試料をブロックした後、スライドを、Universal Negative Control - マウス使用準備済陰性対照抗体(Dako, 陰性アイソタイプ組織用)又はAntibody Diluent(Dako)で希釈した26B3抗体を2.5µg/ml用いて、室温にて60分インキュベートした。次いで、スライドをTBSTで洗浄し、MACH4(商標) Mouse Probe Primary Antibody Enhancer(Biocare Medical MACH4(商標)キットで提供)と、室温にて15分インキュベートした。次いで、スライドをTBSTで再び洗浄し、Polymer-HRP試薬(Biocare Medical MACH4キットで提供)と、室温にて20分インキュベートした。インキュベーション後、スライドをTBSTで洗浄し、3,3'-ジアミノベンジジン4塩酸塩(DAB)溶液(Dako)と、室温にて5分インキュベートした。次いで、スライドを、DI水で3回、各30~60秒間徹底的にすすぎ、ヘマトキシリン(Dako)で2分、対比染色し、TBSTで洗浄し、各30秒の95%および100%アルコールの3連続浴で脱水し、各30秒のキシレンの3連続浴で清浄にした。最後に、分析に先立ち、カバースリップをスライドに適用した。

10

20

30

40

【0187】

抗原は、組織の破壊的性質の固定により、三次構造を欠いているので、ホルマリン固定パラフィン包埋組織の免疫組織化学を有効にするためには、抗体は、注目の抗原の直線状エピトープを認識しなければならない、と一般に考えられている。したがって、抗体26B3がこのアッセイにおいてFRを認識し得た(図4)ということは、この抗体は、ウエスタンブロットで還元FRおよび変性FRを認識しないので、驚くべきことであった。さらに、正常の組織について観察される、抗体26B3でのFR染色のパターンは、様々な程度の発現を示す膵臓、甲状腺、肺、唾液腺、腎臓、下垂体、頸部および乳房(表3)での、他の種々の抗体および技術を用いた先に発行されている文献に合致している。図5に示すように、正常の肺切片(A)および正常の腎臓切片(B)によって例示される正常の組織における染色パターンは、上皮細胞に非常に制限され、一般に尖頂的(apical)な性質である。

【表 3】

正常ヒト組織におけるFR α の発現

組織タイプ	染色 (数/強度)	コメント
大脳	0/3	
小脳	0/3	
副腎	0/3	
卵巣	0/3	
膵臓	3/3; 2+	導管細胞および腺房細胞の管腔に限る
甲状腺	2/5; 1+(まばら)	濾胞細胞の細胞質染色
下垂体	3/3; 1+	主に細胞質
精巣	0/3	
乳房	3/3; 1+/2+	管腔染色および膜染色した導管細胞
脾臓	0/3	
扁桃腺	0/3	
狭腺	0/3	
骨髄	0/3	
肺	3/3; 2+	気管支細胞および肺胞細胞の染色
心臓	0/3	
食道	0/3	
胃	0/2	
小腸	0/3	
結腸	0/3	
肝臓	0/3	
唾液腺	3/3; 3+	導管細胞および腺房細胞
腎臓	3/3; 3+	近位尿細管細胞の管腔染色
前立腺	0/3	
子宮内膜	0/3	
頸部	1/3; 1+	子宮頸管細胞
骨格筋	0/3	
皮膚	0/3	
神経	0/3	
中皮 (経膜および肺)	3/3; 2+	肺胞細胞

10

20

30

【0188】

実施例 8 : 天然型FR の認識

フローサイメトリ調査を行って、選択したFR 特異的抗体の天然タンパクに結合する能力を評価した。これらの調査のために、FR を発現するチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を採取し、洗浄し、氷冷増殖培地(10% FBSで補完したRPMI)に再懸濁した。細胞を、氷上で1時間、9F3, 19D4, 24F12または26B3(1 μ g/mL)とインキュベートし、洗浄し、次いで、FITC結合二次抗体[1:100希釈](Southern Biotech, Birmingham, AL)とインキュベートした。分析に先立ち、成長できない細胞を排除するために、細胞を、7-アミノ-アクチノマイシンD(7-ADD)(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)で標識した。FR を発現しないCHO細胞も、また、陰性対照として、同じ実験手順に付した。細胞を、EasyCyte(商標)Flow Cytometry

40

50

meter (Guava (登録商標) Technologies, Hayward, CA) で分析した。表 4 に示したデータは、4 つの抗体すべてが、天然 FR に結合し得ることを示す。

【表 4】

FR α 特異的抗体は細胞表面に発現した FR α を認識する

標的	抗体について観察された幾何平均：			
	9F3	26B3	24F12	19D4
細胞のみ	2.7	2.7	2.7	2.0
CHOK1	5.9	5.7	5.9	---
FR α	759.5	853.7	777.0	1130.5
FR β	6.1	5.9	6.6	---
FR Δ	5.6	5.4	5.9	---

10

【0189】

実施例 9： 卵巣癌を有することが知られている対象者の血清における FR の検出

本明細書に記載した FR に特異的な抗体が、卵巣癌を有することが知られている患者の血清における FR を検出し得るかを判断するために、電気化学発光調査を行った。これらの実験のために、MAb 26B3 を捕捉 MAb として使用し、75 μ g/mL の濃度で ECL プレートに加えた。プレートを洗浄し、50 μ L の試料血清を各ウェルに加えて、2 時間インキュベートした。血清試料は、健康な女性（陰性対照）および卵巣癌患者から得た。試料を PBST (0.01% Tween (登録商標) 20 を含有するリン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4) で、1:4 に希釈した。インキュベーションの後、試料を PBST で洗浄し、約 13 標識 / IgG 分子の割合にて Ru で標識した 25 μ L / ウェルの MAb 19D4 (1 μ g/mL) を、結合試料を検出するために各ウェルに加えた。2 時間のインキュベーション期間の後、プレートを PBST で洗浄し、2X MSD Buffer T で読み取った。表 5 に示した結果は、血清中の FR は、モノクローナル抗体 26B3 および 19D4 を用いて、捕捉し検出することができることを示している。

20

【表 5】

FR α の相対血清レベル

分類(n)	平均 FRA pg/mL	標準偏差
正常(15)	223	74
卵巣癌(15)	1815	3896

30

【0190】

実施例 10： 卵巣癌を有することが知られている対象者の血清および尿における FR の検出

次に、本明細書に記載した FR に特異的な抗体が、卵巣癌を有することが知られている患者の血清および尿における FR を検出し得るかを判断するために、電気化学発光調査を行った。これらの実験のために、MAb 26B3 を捕捉 MAb として使用し、75 μ g/mL の濃度で ECL プレートに加えた。プレートを洗浄し、50 μ L の試料血清を各ウェルに加えて、2 時間インキュベートした。対応する血清試料および尿試料は、健康な女性（陰性対照）および卵巣癌患者から得た。試料（血清または尿）を PBST (0.01% Tween (登録商標) 20 を含有するリン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4) で、1:4 に希釈した。インキュベーションの後、試料を PBST で洗浄し、約 13 標識 / IgG 分子の割合にて Ru で標識した 25 μ L / ウェルの MAb 19D4 (1 μ g/mL) を、結合試料を検出するために各ウェルに加えた。2 時間のインキュベーション期間の後、プレートを PBST で洗浄し、2X MSD Buffer T で読み取った。表 6 に示した結果は、血清および尿中の FR は、モノクローナル抗体 26B3 および 19D4 を用いて、捕捉し検出することができることを示している。

40

Microsystems, Buffalo Grove, IL)。したがって、FRの検出の特異性および感受性の双方について、抗体BN3.2を抗体26B3と比較するために、種々の組織型の肺癌を含有する市販のTMAを用いて調査を行った。両抗体は、他の組織サブタイプ、特に扁平上皮癌と比べて、腺癌に対する特異性が高かった。ただし、抗体26B3はBN3.2よりも感受性が有意に高く、両者は、それぞれ、26/36(72%; Mスコア平均 \pm SD = 19.84 \pm 18.64)および22/36(61%; Mスコア平均 \pm SD = 11.38 \pm 14.25)の腺癌試料を確認した($p < 0.0001$)。これらのデータは、抗体BN3.2は、FFPE組織試料上のFR発現の検出に関して、抗体26B3よりも感受性が有意に低く、図6に示すように、肺腺癌試料について観察されたこれら2つの抗体のMスコアの関係は、直線ではない。

10

【0195】

実施例13：肺の腺癌を有することが知られている対象者におけるFRの検出

抗体26B3で検出されるFR陽性組織構造の存在が、特定の型の肺癌に関連しているかを判断するために、実験を行った。正常試料ならびにステージI、ステージII、ステージIIIおよびステージIVの肺癌標本の癌試料を重複して有する組織マイクロアレイを、実施例7において記載したように、抗体26B3を用いるIHC染色を介して、FR発現について評価した。表6のデータに見られるように、FRは、扁平上皮癌よりも腺癌に関連しており、このことは、陽性染色が限定されていることを示した。

【表7】

癌組織試料の組織評価

20

膜染色		膜陽性		合計	
		陰性	陽性		
組織構造群	腺癌	数 組織構造群内%	11 28.9%	27 71.1%	38 100.0%
	扁平上皮癌	数 組織構造群内%	28 90.3%	3 9.7%	31 100.0%
	他の癌	数 組織構造群内%	17 81.0%	4 19.0%	21 100.0%
	正常	数 組織構造群内%	2 20.0%	8 80.0%	10 100.0%
合計		数 組織構造群内%	58 58.0%	42 42.0%	100 100.0%

30

【0196】

組織マイクロアッセイ内の89の組織試料について、さらなる分析を行ったところ、36(40%)が腺癌、32(36%)が扁平上皮癌、2(2%)が腺扁平上皮癌、および、残余の19(21%)が様々な組織構造であった(図8)。FR陽性の全体的割合は、組織サブタイプごとに、大きく異なった。腺癌のかなり大きな割合は、扁平上皮癌と比べてとき、FRについて陽性であった(72%対13%、 $p < 0.0001$)。4つの陽性扁平上皮癌試料のうち、1つのみが、両試料について3+染色を示し、1つが、両試料について中程度(2+)の染色を有し、他の2つは、1つの試料において弱く陽性であった(5~10%の癌細胞が1+)。さらに、腺扁平上皮癌試料も、また、FRについて陽性を示し、染色はこれらの試料の腺癌部分のみに限られていた(図7)。

40

【表 8】

NSCLCタイプ#にわたるFR α 発現の分布

変数	FR α 陰性 N (%)	FR α 陽性 N (%)	合計	P 値*
癌組織				
正常	1 (10%)	9 (90%)	10	
扁平上皮癌	28 (87%)	4 (14%)	32	<0.0001
大細胞癌	3 (60%)	2 (40%)	5	
小細胞癌	7 (87%)	1 (13%)	8	
神経内分泌癌	4 (67%)	2 (33%)	6	
腺癌**	10 (16%)	28 (74%)	38	
癌悪性度				
悪性度 1	1 (20%)	4 (80%)	5	0.517
悪性度 2	5 (22%)	18 (78%)	23	
悪性度 3	4 (40%)	6 (60%)	10	
癌ステージ				
ステージI	4 (29%)	11 (71%)	15	0.563
ステージII	2 (17%)	10 (83%)	12	
ステージIII+IV***	4 (36)	7 (64)	11	
性別				
女性	3 (18%)	14 (82%)	17	0.46
男性	7 (33%)	14 (67%)	21	

米国Biomax Lung Cancer TMA (catalog # BC041114; 90症例、重複コア)
 * フィッシャーの正確確率検定またはカイ二乗検定により決定したP値:
 扁平上皮癌対腺癌 p<0.0001; 男性対女性 p=0.46; ステージ p=0.563; 悪性度 p=0.517
 ** 2つの腺扁平上皮癌症例を含み、両者は腺癌部分のみにおいてFR α に陽性
 *** ステージIVは1症例のみ

10

20

【0197】

重複腺癌組織構造試料のMスコア分析は、抗体26B3による染色において変動をほとんど示さず(図8)、抗体26B3染色の頑健性を反映していた。また、腺癌組織サブタイプ内でのステージおよび悪性度によるMスコアの検査は、疾病のステージまたは悪性度のいずれも、Mスコアによって定義される染色の程度と関連していないことを示した(データ不図示)。

【0198】

肺腺癌および扁平上皮癌の試料のFR α 染色についてのMスコア分布を、図9に示す。抗体26B3で染色した腺癌および扁平上皮癌の試料の平均(±SD)Mスコアは、それぞれ、19.84(±18.64)および1.39(±5.54)であった(p<0.0001)。腺癌のMスコアは、また、他のすべての肺癌組織タイプと比べたとき、有意に高かった。さらに、癌の組織構造が腺癌であることの見込み(odds)を判断するために、木解析を行った。21.7を超えるMスコアは、1.6というオッズ比(OR)となり、FR α が、主として腺癌組織において発現することを立証した(解析不図示)。

30

【0199】

ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織ブロックは、後期肺癌においては外科的切除が普通行われないので、後期肺癌と診断された患者からはめったに得られない。したがって、細針吸引(FNA)標本がFR α IHCに適するかを判断するために、後期肺癌は小生検または細胞材料を介して診断されることが最も多いので、Mab26B3を用いて調査を行った。これらの調査のために、胸部リンパ節吸引物の細胞学的評価によって診断され(図10)、FR α 陽性の割合(63%)が、肺癌TMAに基づいて評価された組織学的標本に見られるFR α 陽性の割合に、匹敵することが明らかにされた、9人の後期腺癌患者から試料を得た。小さい試料サイズにすぎないが、これらのデータは、細胞標本が、後期腺癌患者におけるFR α 発現を判断するために、適する組織源であるかも知れないことを示唆している。

40

実施例14 - FR α は、CK+/CD45-細胞によって発現されるが、非小細胞肺癌を有することが知られている患者の血液から単離されたCK-/CD45+細胞によっては発現されない

非小細胞肺癌を有することが知られている患者の、循環癌細胞(CTC)上でのFR α の発現プロファイルを決定するために、調査を行った。これらの調査のために、血液試料

50

を15人の健康な提供者および5人のステージIV肺癌患者から得て、ApoCell's ApoStream (商標) システムを用いて、CTCを濃縮にした。濃縮の後、各試料を、サイトケラチン(CK)、CD45(タンパクチロシンホスファターゼタイプC)、核およびFRについて、染色した。FR染色は、一次抗体として抗体26B3を用いて行い、これを、次に、DyLight(登録商標)649に結合させたマウス特異的二次抗体で、検出した。表9に示すように、FRの発現は、CK+/CD45-CTCによって観察されたが、CK-/CD45+CTCでは観察されなかった。

【表9】

非小細胞肺癌を有することが知られている患者の循環癌細胞によるFRαの発現

患者識別コード	CK-/CD45+ 数	CK-/CD45+/FRα+ %	FRα MFI(CK-/CD45+)
患者1	2,270	0.0	NA
患者2	24,462	0.0	NA
患者3	26,503	0.0	NA
患者4	16,540	0.0	NA
患者5	2,652	0.0	NA

患者識別コード	血液7.5mL中 CK+/CD45- 細胞数	CK+/CD45-/FRα+ %	FRα MFI(CK+/CD45-)
患者1	55	15.6	82,195
患者2	105	32.8	172,669
患者3	216	9.3	146,521
患者4	57	15.7	179,027
患者5	47	8.1	277,335

10

20

【0200】

実施例15: FRを発現する肺腺癌を有するおよび有しない対象者の5年生存

抗体26B3によって検出されたFR陽性組織構造の存在が、5年生存の改善または低減のいずれに関連し得るかを判断するために、実験を行った。正常および癌ステージIまたはステージII腺癌の肺組織標本を、実施例7に記載したように、IHC染色に付き、次いで、読み取った。3+, 2+, 1+および0の強度の癌上の染色の百分率を記録した。患者の複製または三重複製と解釈される177のスライドが存在した。評価可能な臨床および組織学的データと組み合わせるとき、53の評価可能な症例が特定された。分析は、人口、臨床、および非小細胞肺腺癌という診断後5年での生存状態、に関連するデータに鑑みて行った。

30

【0201】

Mスコアの最適なカットポイントを決定するために、受信者動作特性(ROC)分析を行った。診断の正確性は、この分析において重要でないが、陰性試験の診断尤度比に対する陽性試験の診断尤度比の比は、重要であった。これらの比は、Pepe MS, The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction, New York: Oxford University Press (2003)に記載されているように定義される。10というカットポイントにおいて、尤度比は最大値6.62に達した。Mのこの値を、染色したスライドを陽性と判定するのに選択した。

40

【0202】

カプラン・マイヤー生存関数を、予後因子として、FRに関連して生成した。ログランク検定は、FRに陽性であることが非致死性事象にとって有益である(Chi-sq = 7.34, df = 1, p = 0.007)ことを示した。図11は、26B3検出によりFR陽性およびFR陰性と判断された、ステージIおよびステージII腺癌の群についての生存関数を表す。5年では危険率は2.42である。これは、FRについて陰性(M < 10)である癌を有する対象者が、FR陽性(M = 0)の癌を有する対象者よりも、2.5倍、5年以内に死亡し易い、ことを示している。

50

【0203】

実施例 16 : 葉酸受容体アルファの発現はトリプルネガティブ型の乳癌に関連する

乳癌組織試料による F R の発現を評価するために、調査を行った。分析は、実施例 7 で記載したように、抗体 26B3 で染色した組織マイクロアレイ (T M A) 試料、および、実施例 7 で記載したように、調製し、抗体 26B3 で染色した F F P E 組織構造試料を用いて行った。

【 0 2 0 4 】

乳癌 T M A (U . S . B i o M A X c a t a l o g # B R 1 5 0 3 a ; 7 2 症例、重複コア) 上に存在する組織構造の分布を図 10 に示すが、表した症例の大部分は、浸潤性腺管癌 (I D C) と識別されている。 T M A には、2 つの正常な乳房試料が含まれており、これらは、 M A b 2 6 B 3 により F R 発現について陽性と判断された。正常な乳房における染色は、導管細胞に限定し、管腔染色および膜染色した。3 つの線維腺腫症例のうち 2 つ (6 7 %)、嚢肉腫症例の 0 / 2 (0 %)、および、インサイチュ腺管癌症例の 1 / 6 (1 7 %) は、 F R について陽性であった。単一の浸潤性小葉癌 (I L C) は、 F R 染色に陰性であった。5 9 の I D C 試料のうち、1 8 (3 1 %) は、 F R に陽性であった (図 1 2)。この T M A については陽性の場合が少ないので、ステージまたは悪性度に対する F R 発現の有効な分析は可能ではないが、試料の大部分が T 1 または T 2 のいずれかであることに注目すべきである。 F R 発現は、 E R / P R 陽性癌よりも E R / P R 陰性癌に関連し ($p = 0 . 0 1 2$)、トリプルネガティブ乳癌 (T N B C) に関連する (E R / P R + または H e r 2 + 対 E R / P R / H e r 2 - , $p < 0 . 0 0 0 1$)。

10

20

【 0 2 0 5 】

1 8 の F R 陽性 I D C 症例のうち、2 つ (1 1 %) のみが H e r 2 陽性であり、大多数 (8 9 %) が H e r 2 陰性であることを意味した。これらのデータは、 F R 陽性が、 H e r 2 陰性をより厳密に追跡することを示唆している。さらに、1 8 の F R 陽性 I D C 症例のうち、3 つはエストロゲン受容体 (E R) 陽性であり、4 つはプロゲステロン受容体 (P R) 陽性であるが、すべての E R / P R 陽性 / F R 陽性症例は、 H e r 2 陰性であった。 F R 陽性 I D C 症例のうち、1 2 / 1 8 (6 7 %) は、トリプルネガティブ乳癌 (T N B C) であり、 F R は、非常に弱い予後 T N B C 分子サブタイプについて、マーカーおよび標的となるかも知れないことを示唆している。 T M A を全体として見ると、すべての H e r 2 陽性症例のうち、2 / 1 3 (1 5 %) のみが F R についても陽性であるのに対し、 H e r 2 陰性症例の 1 6 / 4 6 (3 5 %) は、 F R 陽性でもあり、 F R の発現が H e r 2 の発現と負に相関するという示唆を支持していた。この T M A についての、分子サブタイプ (h e r - 2 (+) および h e r - 2 (-)) に対する M スコアの分布の表現を、図 1 3 に示す。

30

【 0 2 0 6 】

上述の T M A は、主として、初期乳癌、ステージ I、6 / 6 0 (1 0 %) ; ステージ I I , 4 4 / 6 0 (7 3 %) ; ステージ I I I , 1 0 / 6 0 (1 7 %) から成る。したがって、この T M A に基づいて得られた結果を確認し拡張するために、0 ~ 1 0 0 % にわたる既知の E R / P R 発現を有する、ステージ I V (T 4) H e r 2 陰性乳癌に由来する 6 1 の F F P E 組織ブロックを、評価した (F F P E 組織ブロックは、 G e n z y m e G e n e t i c s の保存記録から得た)。全 6 1 のこれらの試料は、原発癌ではなく、転移に由来する。この調査の結果を表 1 1 に要約する。

40

【表 10】

癌組織構造	FR α 陽性		合計	P値*
	N (%)	N (%)		
正常	2 (100%)	0 (0%)	2	
線維腺腫	2 (67%)	1 (33%)	3	
嚢肉腫	0 (0%)	2 (100%)	2	
DCIS - インサイチュの腺管癌	1 (17%)	5 (83%)	6	
ILC - 浸潤性小葉癌	0 (0%)	1 (100%)	1	
IDC - 浸潤性腺管癌	18 (31%)	41 (69%)	59	
全癌:	21 (30%)	50 (70%)	71	
IDC分子サブタイプ				
分析:				
ER/PR+	4 (14%)	24 (86%)	28	0.012
ER/PR-	14 (45%)	17 (55%)	31	
Her2+	2 (15%)	11 (85%)	13	0.307
Her2-	16 (35%)	30 (65%)	46	
ER/PR/Her2-	12 (67%)	6 (33%)	18	<0.0001 (ER/PR+またはHer2+ 対 ER/PR/Her2-)
T1	3 (43%)	4 (57%)	7	
T2	10 (26%)	29 (74%)	39	
T3	5 (63%)	3 (37%)	8	
T4	0 (0%)	5 (100%)	5	
N0	18 (35%)	33 (65%)	51	
N1/N2**	0 (0%)	8 (100%)	8	0.092
悪性度1	1 (14%)	6 (86%)	7	0.393
悪性度2	12 (36%)	21 (64%)	33	
悪性度3	5 (26%)	14 (74%)	19	

* フィッシャーの正確確率検定を用いる2X2分割表解析を介して計算したP値

** N1/N2試料の4/8 (50%)はHer2+であった

【0207】

FR α の発現(図14)がこれらの患者の22/61(36%)で見られ、疾病の早期ステージで判断されたFR α 陽性標本/癌の患者の百分率が、Her2陰性集団の後期ステージの転移疾病において維持される(TMA陽性=35%;ステージIV転移疾病=36%)ことを、示している。22人のFR α 陽性ステージIV転移患者のうち、3人(14%)のみがER/PRに何らかの陽性を示し、そのような陽性は低い範囲(30%まで)内であった。したがって、19/22(86%)のFR α 陽性患者は、トリプルネガティブ分子サブタイプであった。再び、これらのデータは、全FR α 陽性患者の67%がトリプルネガティブサブタイプであるTMA上の早期ステージ疾病において得られたデータに匹敵する。

10

20

30

40

【表 1 1】

癌分子サブタイプ	転移乳癌試料の分子サブタイプにおけるFR α 陽性の分布		合計	P値*
	FR α 陽性 N(%)	FR α 陰性 N(%)		
全試料:	22 (36%)	39 (64%)	61	
ER/PR+	3 (14%)	20 (86%)	23	
ER/PR/Her2-	19 (50%)	19 (50%)	38	0.0054 (ER/PR+ 対 ER/PR/Her2-)
悪性度1	3 (30%)	7 (70%)	10	
悪性度2	11 (28%)	28 (72%)	39	1.0 (悪性度1 対 悪性度2)
悪性度3	8 (67%)	4 (33%)	12	0.037 (悪性度1または2 対 悪性度3)

*² フィッシャーの正確確率検定を用いる2x2分割表解析を介して計算したP値

【0208】

さらに、ステージIV転移疾病に由来する試料を、リンパ節、骨、皮膚、肝臓を含むいくつかの転移部位のほか、主として胸膜および穿刺から得た生体液ならびに細針吸引(FNA)試料、から得た。これらの「生体液生検」のいくつかは、FRについて陽性に染色され(図15)、記載したIHC方法論が多数の試料タイプに一般的に適用できることを示唆している。

【0209】

実施例17: 葉酸受容体アルファの発現についての組織婦人科癌試料の評価

卵巣、子宮内膜および卵管を含む婦人科悪性腫瘍におけるFRの発現を評価するために、免疫組織化学調査を行った。分析は、実施例7で記載したように、抗体26B3で染色した組織マイクロアレイ(TMA)試料、および、実施例7で記載したように、調製し、抗体26B3で染色したFFPE組織構造試料を用いて行った。市販の組織マイクロアレイを、卵巣癌(catalog # OV1921; 96症例、重複コア)、子宮内膜癌(catalog # EMC1021; 102症例、単一コア)、卵管癌(catalog # UTE601; 30症例、重複コア)について、US Biomax, Inc. (Rockville, MD)から得た。

【0210】

試料は、膜染色について陽性の癌細胞の割合が、あらゆる強度において5%以上である場合に、FR発現について陽性であると考えた。試料が、完全に欠けている、または、成長できる細胞の数が評価には不十分な壊死組織から成る、のいずれかであると婦人科病理学者が判断した場合は、試料を拒絶して分析に含めなかった。子宮内膜試料のうち、6つは、腺癌のない非定形複雑型増殖症のみを含有していた。細胞タイプおよび悪性度の組織学的分類は、WHOの乳房および女性生殖器の分類(Classification of Breast and Female Genital Organs)(Tavassoli and Devilee)に基づいて行った。FIGOおよびTNMシステムに基づく臨床ステージはTMAの製造者(US Biomax)によって提供された。

【0211】

所与の癌タイプ内でのFRの発現の陽性率を、陽性結果の定義($\pm 5\%$ 癌細胞膜染色)に従って陽性に染色された癌の割合として、計算した。組織構造、ステージまたは悪性度などの群間での、FR陽性についての差を、2x2分割表およびフィッシャーの正確確率検定を用いて評価した。平均値の差は、検定に関連するp値が、その検定についてのボンフェローニ補正第1種過誤(最大第1種過誤=0.05)よりも小さい場合に、有意に差があるとした。

【0212】

膜および細胞質の染色強度は、0、染色なし; 1+, 弱い; 2+, 中程度; および3+, 強い、とスコア付けした。試料における各強度の細胞の割合も決定した。組織は、4x

10

20

30

40

50

、10×、20×および40×の対物レンズ下で分析した。強い膜染色(3+)は、4×で容易に可視化され、10×で確認した。中程度の膜染色(2+)は、10×で可視可能であり、20×で確認した。弱い染色(1+)は、20×または40×を必要とした(図16)。3+染色の存在において、膜は、頂端部および外側の細胞境界において、濃かった。接線方向断面において、完全な周パターンが明瞭であった(図16(A)および(B))。2+膜染色は、強度が弱くて3+よりも薄く、通常は頂端内腔境界に、たまには外側細胞境界に、局在した。1+の弱い膜は、一般に、内腔境界に限られた。付随の細胞質染色は、癌のタイプに依存して、変動した。

【0213】

卵巣癌TMA上の94の評価可能な試料のうち、70(74%)は漿液タイプ、10(11%)は粘液性、4(4%)は類内膜性、3(3%)は透明細胞タイプ、残余の7(8%)は混合型希少癌であった。卵巣癌の87試料のうち、各細胞タイプのFR陽性率は、漿液タイプでは100%(70/70)、粘液性では80%(8/10)、類内膜性では75%(3/4)、および、透明細胞タイプでは67%(2/3)であった。漿液タイプと粘液性タイプの差は、フィッシャーの正確確率検定で、p値0.014で、有意である(図12)。FR状態は、組織学的悪性度または臨床ステージについて、有意ではなかった。共存する細胞質染色は、漿液タイプにおいては、通常2+または3+であり、他の癌タイプにおいては、より弱く、より低い頻度であった。

【表12】

卵巣癌の組織学タイプ、臨床ステージおよび組織学的悪性度に関するFRα陽性の分布

癌組織構造*	FRα陽性		合計	P値**
	FRα陰性 N(%)	FRα陽性 N(%)		
漿液癌	0(0%)	70(100%)	70	0.014
粘液癌	2(20%)	8(80%)	10	
類内膜癌	1(25%)	3(75%)	4	
透明細胞癌	1(33%)	2(67%)	3	
合計	4(5%)	83(95%)	87	
ステージII	4(9%)	41(91%)	45	0.15
ステージIII	0(0%)	29(100%)	29	
ステージIV	0(0%)	13(100%)	13	
悪性度1	2(15%)	11(85%)	13	NS***
悪性度2	1(3%)	31(97%)	32	NS
悪性度3	1(3%)	39(97%)	40	NS

* 1移行細胞癌、1扁平上皮癌、1胚性癌、2卵黄嚢腫瘍、および、2顆粒膜細胞腫は、分析に含めなかった

** フィッシャーの正確確率検定またはカイ二乗検定により決定したP値；漿液癌対粘液癌 P=0.014

*** NS=有意性なし

【0214】

子宮内膜試料において、正常では80%(4/5)が(図17(A))、非定形複雑型増殖症では100%(6/6)が(図17(B))、88の類内膜型および1つの透明細胞型を含む(図18および図19)腺癌では89%(80/90)が、FRを発現した。8つの類内膜腺癌は、扁平上皮化生の領域を包含していた。正常な子宮内膜において、膜染色は、弱く、頂部内腔境界に限られていた(図17(A))。非定形複雑型増殖症および癌において、染色は主に内腔に位置し、いくつかの症例では、外側細胞境界に追加の染色があった(図17(B))。3+の膜染色の存在において、細胞質染色は、強度が、強い(図18(A))から弱い(図18(B)および(C))まで変動した。1+または2+の膜染色を有する癌は、細胞質染色をめったに表さなかった。扁平上皮化生細胞および透明細胞の大部分は、中程度から強い膜染色を示した(図19(A)および(B))。

【0215】

悪性度1の癌の100%、悪性度2の癌の96%、および悪性度3の癌の96%において、FRの発現は陽性であった(悪性度1対悪性度3、p値=0.0029；悪性度2対悪性度3、p値=0.034)。FR状態は、T1対T2/3およびステージI対ス

10

20

30

40

50

ページ I I / I I I に関して、有意ではなかった。

【 0 2 1 6 】

正常な卵管の 1 7 のコア、慢性卵管炎の 1 6 の試料、および、2 0 の卵管漿液癌は、膜染色および細胞質染色に強く陽性であった（図 2 0 (A) ~ (C) ）。

【 0 2 1 7 】

実施例 1 8 : 葉酸受容体アルファの発現についての組織学的結腸直腸試料の評価

結腸直腸組織試料における F R の発現を評価するために、免疫組織化学調査を行った。分析は、U S B i o m a x (c a t a l o g # B C 0 5 1 1 1 1) から得た組織マイクロアレイ (T M A) 試料を用いて行った。T M A は、結腸直腸癌を有することが知られている対象者に由来する 9 0 の重複試料、および、1 0 の正常な結腸直腸癌試料を包含していた。試料を、実施例 7 で記載したように、抗体 2 6 B 3 で染色した。結腸直腸癌を有することが知られている対象者に由来する 9 0 の試料のうち、1 8 (2 0 %) が F R 発現について陽性であったのに対し、正常試料はどれも陽性ではなかった。さらに、陽性の染色は、一般に、中程度ないし弱く、疾病のステージへの明らかな関連は、認められなかった。

10

【 0 2 1 8 】

実施例 1 9 : 葉酸受容体アルファの発現についての組織学的甲状腺試料の評価

甲状腺組織試料における F R の発現を評価するために、免疫組織化学調査を行った。分析は、U S B i o m a x (c a t a l o g # T H 8 0 2 a) から得た組織マイクロアレイ (T M A) 試料を用いて行った。試料を、実施例 7 で記載したように、抗体 2 6 B 3 で染色した。甲状腺乳頭癌は、F R 膜発現について強く陽性であり (2 6 / 2 8 , 9 3 %) 、5 つの試料すべてが F R 染色に陰性の髄様癌から識別可能で、先の報告に合致していた。興味深いことに、濾胞状腺種は、大濾胞型および小濾胞型に分けることが可能であり、これらは、それぞれ、3 / 1 3 (2 3 %) および 1 8 / 2 2 (8 2 %) が F R 発現について陽性を示した。ある程度の陽性が、T M A 上の少数のヒュルトレ細胞癌試料においても (2 / 3 , 6 7 %) 、濾胞腺癌試料においても (3 / 7 , 4 3 %) 見られた。結果の概要を、表 1 3 に示す。

20

【 表 1 3 】

甲状腺組織試料における F R α の発現

甲状腺癌組織構造サブタイプ (N = 78)	F R α 陽性 N (%)	F R α 陰性 N (%)
乳頭癌、2 8 (3 6 %)	26 (93%)	2 (7%)
髄様癌、5 (6 %)	0 (0%)	5 (100%)
濾胞状腺種、大濾胞型、1 3 (1 7 %)	3 (23%)	10 (77%)
濾胞状腺種、小濾胞型、2 2 (2 8 %)	18 (82%)	4 (18%)
ヒュルトレ細胞癌、3 (4 %)	2 (67%)	1 (33%)
濾胞腺癌、7 (9 %)	3 (43%)	4 (57%)

30

【 図 1 】

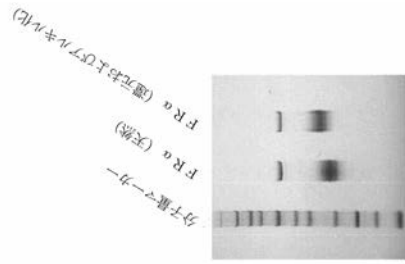
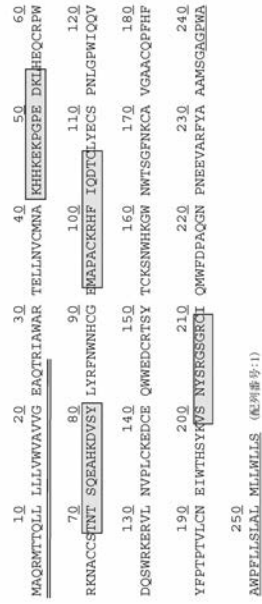


Figure 1

【 図 2 】



説明
 残基 1～24 (二重下線) = シタル配列 (r-h-Fcαに存在する)
 残基 41～53 (線付け) = MAb 9F3 (PTA-11887) エピトープ
 残基 68～80 (上びらびら) = MAb 24F12 (PTA-11886) エピトープ
 残基 159～209 (線付け) = MAb 26B3 (PTA-11885) エピトープ
 残基 256～287 (下線) = GPI-アンカー配列 (r-h-Fcαに存在する)

Figure 2

【 図 3 】

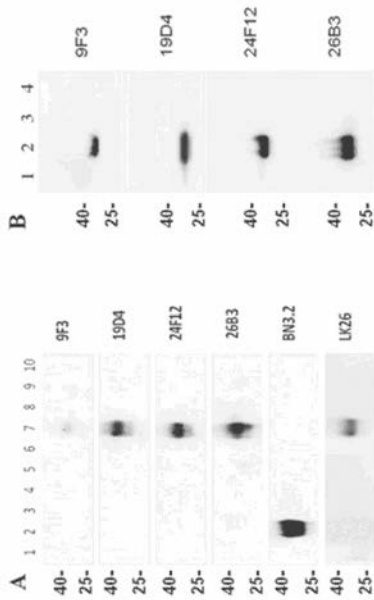


Figure 3

【 図 4 】

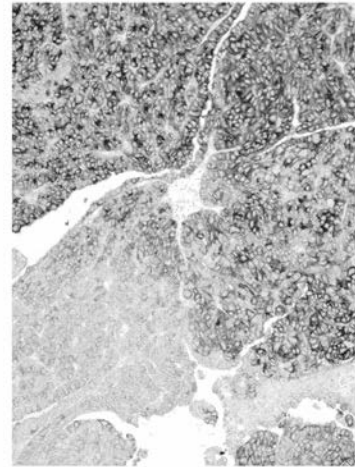


Figure 4

【 図 5 】

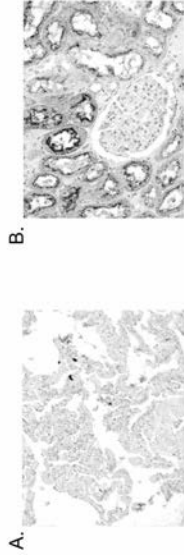


Figure 5

【 図 6 】

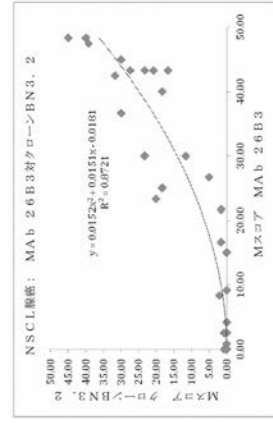


Figure 6

【 図 7 】

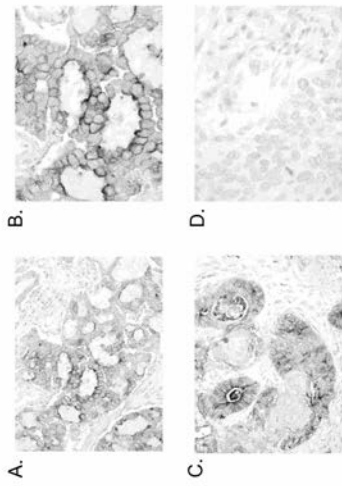


Figure 7

【 図 8 】

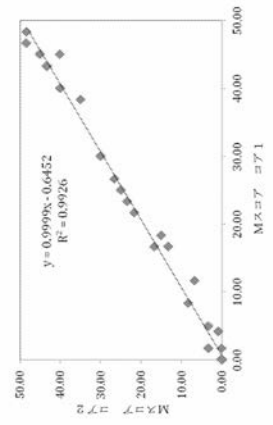


Figure 8

【 図 9 】

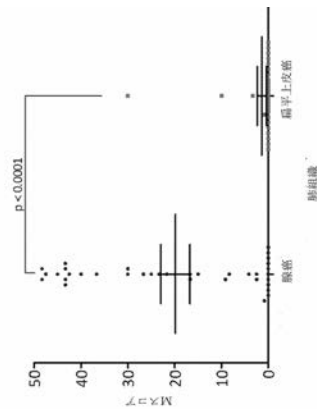


Figure 9

【 図 1 0 】

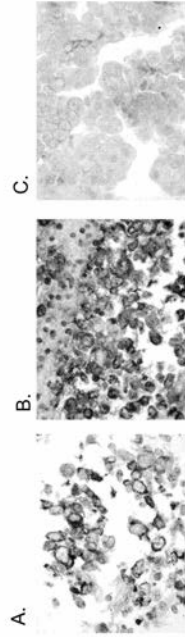


Figure 10

【 図 1 1 】

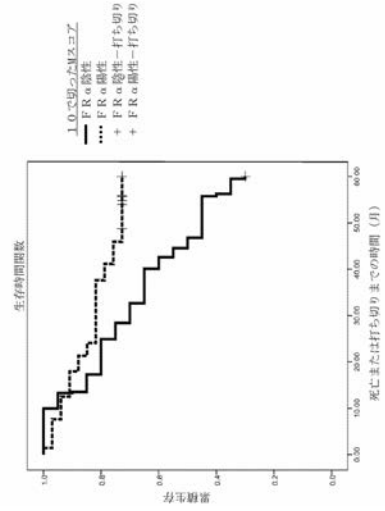


Figure 11

【 図 1 2 】

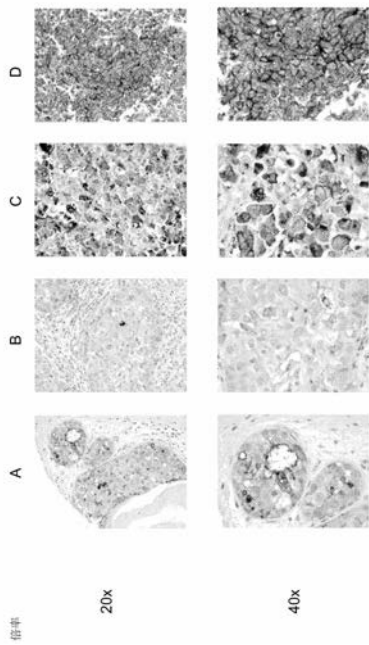


Figure 12

【 図 1 3 】

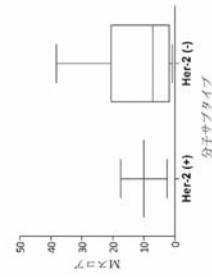


Figure 13

【 図 1 4 】

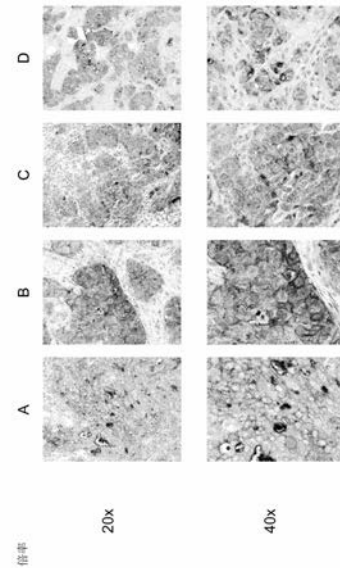


Figure 14

【 図 1 5 】

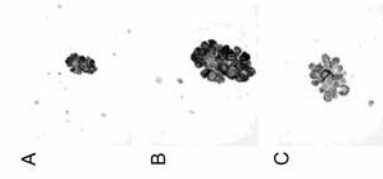


Figure 15

【 図 1 6 】

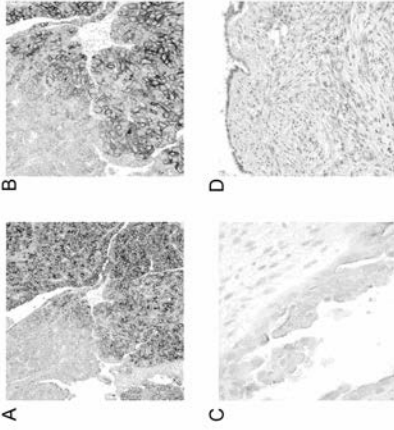


Figure 16

【 図 1 7 】

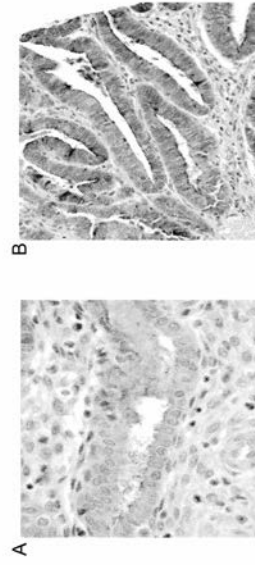


Figure 17

【 図 1 8 】

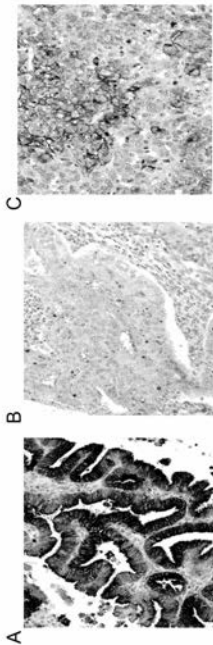


Figure 18

【 図 1 9 】

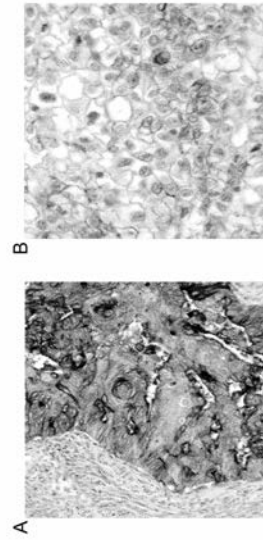


Figure 19

【図 20】

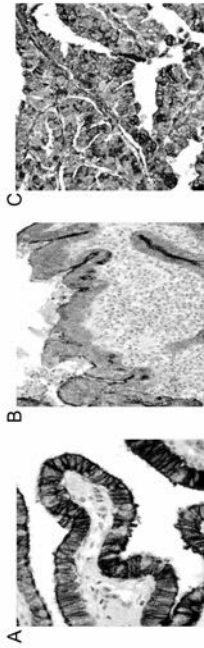


Figure 20

【図 21】

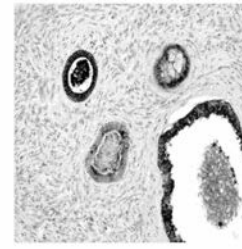


Figure 21

【配列表】

2018029605000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年10月2日(2017.10.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

a. 配列番号：10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、配列番号：11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、配列番号：12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、配列番号：14のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号：15のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、及び、配列番号：16のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3、

b. 配列番号：18のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、配列番号：19のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、配列番号：20のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、配列番号：22のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号：23のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、及び、配列番号：24のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3、

又は、

c. 配列番号：2のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、配列番号：3のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、配列番号：4のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、配列番号：6のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号：7のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、及び、配列番号：8のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含むことを特徴とする、葉酸受容体アルファ(FR)に特異的な、単離抗体。

【請求項 2】

前記抗体は、マウス抗体、キメラ抗体又はヒト化抗体であることを特徴とする請求項1に記載の単離抗体。

【請求項 3】

前記選択肢aの単離抗体であって、

配列番号：13のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号：17のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むことを特徴とする請求項1に記載の単離抗体。

【請求項 4】

前記選択肢bの単離抗体であって、

配列番号：21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号：25のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むことを特徴とする請求項1の単離抗体。

【請求項 5】

前記cの単離抗体であって、

配列番号：5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号：9のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むことを特徴とする請求項1の単離抗体。

【請求項 6】

a. 前記コードされる抗体の軽鎖CDR1が、配列番号：10のアミノ酸配列を含み、前記コードされる抗体の軽鎖CDR2が、配列番号：11のアミノ酸配列を含み、前記コードされる抗体の軽鎖CDR3が、配列番号：12のアミノ酸配列を含み、前記コードされる抗体の重鎖CDR1が、配列番号：14のアミノ酸配列を含み、前記コードされる抗体の重鎖CDR2が、配列番号：15のアミノ酸配列を含み、及び、前記コードされる抗体の重鎖CDR3が、配列番号：16のアミノ酸配列を含む、

b. 前記コードされる抗体の軽鎖CDR1が、配列番号：18のアミノ酸配列を含み、前記コードされる抗体の軽鎖CDR2が、配列番号：19のアミノ酸配列を含み、前記コードされる抗体の軽鎖CDR3が、配列番号：20のアミノ酸配列を含み、前記コードされる抗体の重鎖CDR1が、配列番号：22のアミノ酸配列を含み、前記コードされる抗体の重鎖CDR2が、配列番号：23のアミノ酸配列を含み、及び、前記コードされる抗体の重鎖CDR3が、配列番号：24のアミノ酸配列を含む、

又は、

c. 前記コードされる抗体の軽鎖CDR1が、配列番号：2のアミノ酸配列を含み、前記コードされる抗体の軽鎖CDR2が、配列番号：3のアミノ酸配列を含み、前記コードされる抗体の軽鎖CDR3が、配列番号：4のアミノ酸配列を含み、前記コードされる抗体の重鎖CDR1が、配列番号：6のアミノ酸配列を含み、前記コードされる抗体の重鎖CDR2が、配列番号：7のアミノ酸配列を含み、及び、前記コードされる抗体の重鎖CDR3が、配列番号：8のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする葉酸受容体アルファ(FR)特異的な抗体をコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 7】

前記選択肢aの単離ポリヌクレオチドであって、

配列番号：45及び49の塩基配列を含むことを特徴とする請求項6に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 8】

前記選択肢aの単離ポリヌクレオチドであって、

配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：47及び配列番号：48の塩基配列を含むことを特徴とする請求項6に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 9】

前記選択肢bの単離ポリヌクレオチドであって、

配列番号：53及び57の塩基配列を含むことを特徴とする請求項6に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 10】

前記選択肢bの単離ポリヌクレオチドであって、

配列番号：50、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56及び配列番号：56の塩基配列を含むことを特徴とする請求項6に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項11】

前記選択肢cの単離ポリヌクレオチドであって、

配列番号：37及び41の塩基配列を含むことを特徴とする請求項6に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項12】

前記選択肢cの単離ポリヌクレオチドであって、

配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：39及び配列番号：40の塩基配列を含むことを特徴とする請求項6に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項13】

請求項6から12のいずれか1項に記載の単離ポリヌクレオチドを含むことを特徴とするベクター。

【請求項14】

請求項13に記載のベクターを含むことを特徴とする遺伝子組み換え細胞。

【請求項15】

前記細胞は真核細胞、植物細胞又は細菌であることを特徴とする請求項14に記載の組み換え細胞。

【請求項16】

A T C C に寄託され受託番号PTA-11884、PTA-11886又はPTA-11887を有する細胞株によって生産されることを特徴とする、葉酸受容体アルファ(FR)に特異的な単離抗体。

【請求項17】

生体試料中の葉酸受容体アルファ(FR)又はFR を発現する癌を検出する方法であって、請求項1から5若しくは16のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントに前記試料を曝して、FR を検出することを特徴とする方法。

【請求項18】

前記生体試料は、ヒト、齧歯類、非ヒト霊長類、ウサギ又は犬に由来することを特徴とする請求項17に記載の方法。

【請求項19】

対象者における葉酸受容体アルファ(FR)を発現する癌を発見する方法であって、

a. 前記対象者から抽出した生体試料を請求項1から5又は16のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントに曝すこと；

b. 前記試料に存在するFR の量を定量化すること；

及び、

c. 前記試料に存在するFR の量を既知の標準と比較すること、を含み、

癌に関連するFR のレベルの範囲に入るFR レベルは、FR を発現する癌を示すことを特徴とする方法。

【請求項20】

前記FR を発現する癌は、肺腺癌であり、

前記対象者の肺腺癌細胞がFR を発現することが認められることは、前記肺腺癌細胞が葉酸受容体アルファを発現しない場合に比べて、前記対象者の5年生存率が改善された可能性が高いことを示すことを特徴とする請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記生体試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環癌細胞、組織に関連しない細胞、組織、手術摘出癌組織、生検、細針吸引試料、又は、組織プレパラートに由来することを特徴とする請求項17から20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記癌は、乳癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵管癌又は卵巣癌であることを特徴とする請求項19に記載の方法。

【請求項 23】

前記癌は肺癌であることを特徴とする請求項19に記載の方法。

【請求項 24】

前記肺癌は腺癌であることを特徴とする請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

前記既知の基準は、

- a. 癌がないと確認された対象者に由来する葉酸受容体アルファ (FR) レベル、又は、既知の濃度の葉酸受容体アルファタンパクの調製物、
- b. 早期ステージにある葉酸受容体アルファを発現する癌を有すると確認された対象者に由来するFR レベル、
- c. 中期ステージにある葉酸受容体アルファを発現する癌を有すると確認された対象者に由来するFR レベル、
又は、
- d. 後期ステージにある葉酸受容体アルファを発現する癌を有すると確認された対象者に由来するFR レベル
を含むことを特徴とする請求項19に記載の方法。

【請求項 26】

前記癌は、乳癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵管癌、卵巣癌、又は肺癌であることを特徴とする請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

前記曝すことの工程の後に、前記対象者の生体試料を

- i. 請求項1の抗体、
- ii. 請求項16の抗体、
- iii. 配列番号：26のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、配列番号：27のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、配列番号：28のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、配列番号：30のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号：31のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、及び、配列番号：32のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む葉酸受容体アルファ (FR) に特異的な単離抗体
又は、
- iv. ATCCに寄託され受託番号PTA-11885を有する細胞株によって生産される葉酸受容体アルファ (FR) に特異的な単離抗体
から選択される第2の抗体又はその抗原結合フラグメントに曝すことを更に含むことを特徴とする請求項19から25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 28】

前記第2の抗体は第1の抗体とは異なることを特徴とする請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

前記対象者の前記生体試料は、請求項1又は請求項16に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントに曝され、次いで、

- iv. 配列番号：26のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、配列番号：27のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、配列番号：28のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、配列番号：30のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号：31のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、及び、配列番号：32のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む葉酸受容体アルファ (FR) に特異的な単離抗体、
又は、
- v. ATCCに寄託され受託番号PTA-11885を有する細胞株によって生産される葉酸受容体アルファ (FR) に特異的な単離抗体
に曝されることを特徴とする請求項27に記載の方法。

【請求項 30】

前記抗体又は前記抗体フラグメントは、標識されることを特徴とする請求項17から29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記標識は、放射性標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、ECL標識又は酵素であることを特徴とする請求項30に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記曝される葉酸受容体アルファ(FR)は細胞に結合している、又は結合していないことを特徴とする請求項17から29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記試料における葉酸受容体アルファ(FR)の存在は、ウエスタンブロット、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降、電気化学発光免疫アッセイ(ECLIA)又はELISAを使用して検出されることを特徴とする請求項17から29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 4】

生体試料における葉酸受容体アルファ(FR)の存在を検出するためのキットであって、請求項1から5又は16のいずれか1項に記載の少なくとも1つの抗体又はその抗原結合フラグメント、及び

使用しないときに前記抗体を収容するための容器、並びに、前記抗体の使用の指示を含むことを特徴とするキット。

【請求項 3 5】

生体試料における葉酸受容体アルファ(FR)の存在を検出するためのキットであって、請求項1から5又は16のいずれか1項に記載の少なくとも1つの抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、前記含まれる抗体又はその抗原結合フラグメントが、固体支持体に貼付されていることを特徴とするキット。

【請求項 3 6】

生体試料における葉酸受容体アルファ(FR)の存在を検出するためのキットであって、請求項1から5又は16のいずれか1項に記載の少なくとも1つの抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、前記含まれる抗体又はその抗原結合フラグメントが、検出可能に標識されていることを特徴とするキット。

【請求項 3 7】

前記生体試料は、肺癌組織であり、前記対象者の葉酸受容体アルファ(FR)のレベルは、FRを発現する肺癌と、FRを発現しない肺癌とを識別することを特徴とする請求項17又は18に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記FRを発現する肺癌は、肺腺癌であり、前記FRを発現しない肺癌は、肺扁平上皮であることを特徴とする請求項37に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記抗体は検出可能な標識を含むことを特徴とする請求項1から5又は16のいずれか1項に記載の単離抗体。

【請求項 4 0】

前記識別可能な標識は、放射性標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、ECL標識又は酵素であることを特徴とする請求項39に記載の抗体。

【請求項 4 1】

前記標識は、ルテニウム、 ^{111}In -DOTA、 ^{111}In -ジエチレントリアミン5酢酸(DTPA)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ及びベータガラクトシダーゼ又はポリヒスチジンであることを特徴とする請求項40に記載の抗体。

【請求項 4 2】

前記抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に貼付されていることを特徴とする請求項17から26のいずれか1項に記載の方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/543 5 7 5

G 0 1 N 33/53 Y

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 BA50 BA60 BA70 BA71 CA40 DA76 EA51 FA74
GA26

【外国語明細書】

2018029605000001.pdf

专利名称(译)	抗叶酸受体α抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2018029605A	公开(公告)日	2018-03-01
申请号	JP2017190224	申请日	2017-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	卫材株式会社		
申请(专利权)人(译)	卫材研发管理有限公司		
[标]发明人	オシャネシイダニエルジョン		
发明人	オシャネシイ, ダニエル, ジョン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 G01N33/574 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/28 C07K2317/34 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/92 G01N33/57407 G01N33/57415 G01N33/57419 G01N33/57423 G01N33/57442 G01N33/57449 G01N33/57484 G01N33/82 G01N2800/52 G01N2800/56 G01N33/57492		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 G01N33/574.A G01N33/543.541.B G01N33/543.545.A G01N33/543.575 G01N33/53.Y C07K16/28.ZNA C07K17/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/06.100 C12N15/13 C12N15/63 C12N5/10 C12P21/08		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA50 4H045/BA60 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	伊藤裕之		
优先权	61/508444 2011-07-15 US 61/604412 2012-02-28 US 61/604954 2012-02-29 US		
其他公开文献	JP6526143B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：为癌症提供诊断方法，如乳腺癌，甲状腺癌，结肠直肠癌，子宫内膜癌，输卵管癌，卵巢癌或肺癌。 解决方案：提供了对叶酸受体α特异性的抗体及其抗原结合片段，相关多核苷酸，表达载体，表达抗体的细胞和相关试剂盒。使用所描述的抗体和其抗原结合片段，确定来自受试者的样品中叶酸受体α的量，和叶酸受体α对照样品或参考样品的给电平的电平诊断癌症的方法，包括比较。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特開2018-29605 (P2018-29605A)
		(43) 公開日 平成30年3月1日 (2018.3.1)
(5) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考) 4H045
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	ZNA A
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	
G01N 33/574 (2006.01)	G01N 33/574	A
G01N 33/543 (2006.01)	G01N 33/543	541 B
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/543	545 A
審査請求 有 請求項の数 42 OL 外国語出願 (全 93 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号	特願2017-190224 (P2017-190224)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成29年9月29日 (2017.9.29)	エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社
(62) 分割の表示	特願2014-520368 (P2014-520368) の分割	東京都文京区小石川四丁目6番10号
原出願日	平成24年7月13日 (2012.7.13)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	61/508,444	110001139
(32) 優先日	平成23年7月15日 (2011.7.15)	S K 特許業務法人
(33) 優先権主張国	米国 (US)	100130328
(31) 優先権主張番号	61/604,412	(74) 代理人
(32) 優先日	平成24年2月28日 (2012.2.28)	弁理士 奥野 彰彦
(33) 優先権主張国	米国 (US)	100130672
(31) 優先権主張番号	61/604,954	(74) 代理人
(32) 優先日	平成24年2月29日 (2012.2.29)	弁理士 伊藤 寛之
(33) 優先権主張国	米国 (US)	オシャネシイ, ダニエル, ジョン
		アメリカ合衆国 ペンシルベニア 19473, シュウエンクスビル, 515
		ガーロフ ロード
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 抗葉酸受容体アルファ抗体およびその使用		