

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-510809

(P2010-510809A)

(43) 公表日 平成22年4月8日(2010.4.8)

(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 B O 2 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 105 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-539435 (P2009-539435)	(71) 出願人	502160545
(86) (22) 出願日	平成19年11月27日 (2007.11.27)		ディアデクサス インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成21年7月27日 (2009.7.27)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/085585		080、サウス サン フランシスコ、オ
(87) 国際公開番号	W02008/067283		イスター ポイント ブルバード 343
(87) 国際公開日	平成20年6月5日 (2008.6.5)	(74) 代理人	100102842
(31) 優先権主張番号	60/861, 657		弁理士 葛和 清司
(32) 優先日	平成18年11月27日 (2006.11.27)	(72) 発明者	パプコフ, ジャッキー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
			114、サン フランシスコ、21エステ
		(72) 発明者	イー ストリート 4373
			ディートリッヒ, グンドー
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
			080、サウス サン フランシスコ、グ
			ランド アベニュー 832
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 O v r 1 1 0抗体組成物および使用方法

(57) 【要約】

頭頸部癌、卵巣癌、子宮内膜癌、腎臓癌、膵臓癌、肺癌または乳癌によって発現される O v r 1 1 0 に向けられた、単離された抗体およびその抗原結合フラグメントを提供する。それらを産生するための細胞および方法、ならびに O v r 1 1 0 発現性癌細胞を殺すための、および哺乳動物における O v r 1 1 0 発現性癌の軽減または処置のためのそれらの使用もまた提供する。抗 O v r 1 1 0 抗体は、インビトロおよびインビボで、哺乳動物細胞によって発現される O v r 1 1 0 に結合すると、O v r 1 1 0 の機能を調節するか、または内部移行する。抗 O v r 1 1 0 抗体および担体を含む組成物ならびにその製品またはキットの品物もまた提供する。さらに、抗 O v r 1 1 0 抗体をコードする単離された核酸、該単離された核酸を含む発現ベクター、および該ベクターを含む宿主細胞が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体またはその抗原結合フラグメントが、O v r 1 1 0との結合について参照抗体と競合し、

(a) 配列番号 2、1 2、2 2、3 2 および 4 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および

(b) 配列番号 7、1 7、2 7、3 7 および 4 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域

を含む、前記抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

10

参照抗体が、

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および

(b) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域

を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

参照抗体が、

(a) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および

(b) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域

を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

20

参照抗体が、

(a) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および

(b) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域

を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

参照抗体が、

(a) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および

(b) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域

を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

30

参照抗体が、

(a) 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および

(b) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域

を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

抗体が、ヒト抗体である、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

抗体が、ヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項 7 に記載の抗体。

40

【請求項 10】

O v r 1 1 0 と結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであって、：

(a) C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖可変領域、ここで、軽鎖可変領域 C D R 1 配列が、配列番号 3、1 3、2 3、3 3 および 4 3、ならびにそれらの保存的改変からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む；および

(b) C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖可変領域、ここで、重鎖可変領域 C D R 1 配列が、配列番号 8、1 8、2 8、3 8 および 4 8、ならびにそれらの保存的改変からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、

を含む、前記抗体またはその抗原結合フラグメント。

50

【請求項 1 1】

軽鎖可変領域 C D R 2 配列が、配列番号 4、1 4、2 4、3 4 および 4 4、ならびにそれらの保存的改変からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；重鎖可変領域 C D R 2 配列が、配列番号 9、1 9、2 9、3 9 および 4 9、ならびにそれらの保存的改変からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 0 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 2】

軽鎖可変領域 C D R 3 配列が、配列番号 5、1 5、2 5、3 5 および 4 5、ならびにそれらの保存的改変からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；重鎖可変領域 C D R 3 配列が、配列番号 1 0、2 0、3 0、4 0 および 5 0、ならびにそれらの保存的改変からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 0 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 1 3】

抗体が、ヒト抗体である、請求項 1 0 に記載の抗体。

【請求項 1 4】

抗体が、ヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項 1 0 に記載の抗体。

【請求項 1 5】

O v r 1 1 0 と結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであって、：

(a) 配列番号 3、1 3、2 3、3 3 および 4 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域 C D R 1 ；

20

(b) 配列番号 4、1 4、2 4、3 4 および 4 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域 C D R 2 ；

(c) 配列番号 5、1 5、2 5、3 5 および 4 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域 C D R 3 ；

(d) 配列番号 8、1 8、2 8、3 8 および 4 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域 C D R 1 ；

(e) 配列番号 9、1 9、2 9、3 9 および 4 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域 C D R 2 ；および

(f) 配列番号 1 0、2 0、3 0、4 0 および 5 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域 C D R 3、

30

を含む、前記抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 6】

(a) 配列番号 3 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 C D R 1 ；

(b) 配列番号 4 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 C D R 2 ；

(c) 配列番号 5 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 C D R 3 ；

(d) 配列番号 8 を含む、重鎖可変ドメイン領域 C D R 1 ；

(e) 配列番号 9 を含む、重鎖可変ドメイン領域 C D R 2 ；および

(f) 配列番号 1 0 を含む、重鎖可変ドメイン領域 C D R 3、

を含む、請求項 1 5 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 1 7】

(a) 配列番号 1 3 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 C D R 1 ；

(b) 配列番号 1 4 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 C D R 2 ；

(c) 配列番号 1 5 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 C D R 3 ；

(d) 配列番号 1 8 を含む、重鎖可変ドメイン領域 C D R 1 ；

(e) 配列番号 1 9 を含む、重鎖可変ドメイン領域 C D R 2 ；および

(f) 配列番号 2 0 を含む、重鎖可変ドメイン領域 C D R 3、

を含む、請求項 1 5 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 8】

(a) 配列番号 2 3 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 C D R 1 ；

50

(b) 配列番号 24 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 CDR 2 ;
 (c) 配列番号 25 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 CDR 3 ;
 (d) 配列番号 28 を含む、重鎖可変ドメイン領域 CDR 1 ;
 (e) 配列番号 29 を含む、重鎖可変ドメイン領域 CDR 2 ; および
 (f) 配列番号 30 を含む、重鎖可変ドメイン領域 CDR 3、
 を含む、請求項 15 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 19】

(a) 配列番号 33 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 CDR 1 ;
 (b) 配列番号 34 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 CDR 2 ;
 (c) 配列番号 35 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 CDR 3 ;
 (d) 配列番号 38 を含む、重鎖可変ドメイン領域 CDR 1 ;
 (e) 配列番号 39 を含む、重鎖可変ドメイン領域 CDR 2 ; および
 (f) 配列番号 40 を含む、重鎖可変ドメイン領域 CDR 3、
 を含む、請求項 15 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 20】

(a) 配列番号 43 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 CDR 1 ;
 (b) 配列番号 44 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 CDR 2 ;
 (c) 配列番号 45 を含む、軽鎖可変ドメイン領域 CDR 3 ;
 (d) 配列番号 48 を含む、重鎖可変ドメイン領域 CDR 1 ;
 (e) 配列番号 49 を含む、重鎖可変ドメイン領域 CDR 2 ; および
 (f) 配列番号 50 を含む、重鎖可変ドメイン領域 CDR 3、
 を含む、請求項 15 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 21】

抗体が、ヒト抗体である、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 22】

抗体が、ヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 23】

Ovr 110 と結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであって：

(a) 配列番号 2、12、22、32 および 42 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域；および
 (b) 配列番号 7、17、27、37 および 47 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域、
 を含む、前記抗体またはその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 24】

(a) 配列番号 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域；および
 (b) 配列番号 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域、
 を含む、請求項 23 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 25】

(a) 配列番号 12 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域；および
 (b) 配列番号 17 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域、
 を含む、請求項 23 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 26】

(a) 配列番号 22 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域；および
 (b) 配列番号 27 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域、
 を含む、請求項 23 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 27】

(a) 配列番号 32 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域；および

50

び

(b) 配列番号 37 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域、を含む、請求項 23 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 28】

(a) 配列番号 42 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域；および

(b) 配列番号 47 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域、を含む、請求項 23 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 29】

抗体が、ヒト抗体である、請求項 23 に記載の抗体。

10

【請求項 30】

抗体が、ヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項 23 に記載の抗体。

【請求項 31】

Ovr110 の機能を阻害する、請求項 1 ~ 30 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 32】

Ovr110 の機能が、Ovr110 発現細胞に対する免疫反応の抑制である、請求項 31 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 33】

Ovr110 の免疫反応の抑制が、リンパ球制御を介する、請求項 32 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 34】

リンパ球制御が、T 細胞の活性化、B 細胞の活性化、NK 細胞の活性化、T 細胞の増殖、B 細胞の増殖、NK 細胞の増殖、T 細胞の腫瘍への浸潤、B 細胞の腫瘍への浸潤および NK 細胞の腫瘍への浸潤からなる群から選択される、請求項 33 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 35】

請求項 1 ~ 34 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメント、および薬学的に許容し得る担体を含む、組成物。

【請求項 36】

細胞毒性剤と抱合した請求項 1 ~ 34 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、免疫抱合体。

30

【請求項 37】

請求項 36 に記載の免疫抱合体、および薬学的に許容し得る担体を含む、組成物。

【請求項 38】

細胞毒性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素からなる群から選択される、請求項 36 に記載の免疫抱合体。

【請求項 39】

毒素が、リシン、サポリン、マイタンシノイドおよびカリチアマイシンからなる群から選択される、請求項 38 に記載の免疫抱合体。

40

【請求項 40】

請求項 38 または 39 に記載の免疫抱合体、および薬学的に許容し得る担体を含む、組成物。

【請求項 41】

請求項 1 ~ 34 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントであって該抗体またはその抗原結合フラグメントとは異なる結合特異性を有する第 2 の機能的部位と結合している前記抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、二重特異性分子。

【請求項 42】

請求項 41 に記載の二重特異性分子、および薬学的に許容し得る担体を含む、組成物。

【請求項 43】

50

請求項 1 ~ 3 4 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする、単離された核酸分子。

【請求項 4 4】

(a) 配列番号 1、1 1、2 1、3 1 および 4 1 からなる群から選択される軽鎖可変領域をコードする核酸配列；および

(b) 配列番号 6、1 6、2 6、3 6 および 4 6 からなる群から選択される重鎖可変領域をコードする核酸配列、

を含む、請求項 4 3 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 4 5】

請求項 4 3 に記載の核酸分子を含む、発現ベクター。

10

【請求項 4 6】

請求項 4 5 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 4 7】

ヒト免疫グロブリンの軽および重鎖の導入遺伝子を含むトランスジェニックマウスであって、請求項 1 ~ 3 4 のいずれかに記載の抗体または抗原結合フラグメントを発現する、前記トランスジェニックマウス。

【請求項 4 8】

請求項 4 7 に記載のマウスから作られたハイブリドーマであって、抗体を産生する、前記ハイブリドーマ。

【請求項 4 9】

請求項 1 ~ 3 4 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを産生する、細胞。

20

【請求項 5 0】

抗 O v r 1 1 0 抗体を調製する方法であって、

(a) (i .) 配列番号 3、1 3、2 3、3 3、4 3 からなる群から選択される C D R 1 配列；配列番号 4、1 4、2 4、3 4、4 4 からなる群から選択される C D R 2 配列；および配列番号 5、1 5、2 5、3 5、4 5 からなる群から選択される C D R 3 配列を含む、軽鎖可変領域抗体配列；または

(i i .) 配列番号 8、1 8、2 8、3 8、4 8 からなる群から選択される C D R 1 配列；配列番号 9、1 9、2 9、3 9、4 9 からなる群から選択される C D R 2 配列；配列番号 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0 からなる群から選択される C D R 3 配列を含む、重鎖可変領域抗体配列、

30

を提供すること；

(b) 少なくとも一つ変更された抗体配列を作製するため、軽鎖可変領域抗体配列および重鎖可変領域抗体配列から選択される少なくとも一つの可変領域抗体配列内の少なくとも一つのアミノ酸残基を変更すること；および

(c) 変更された抗体配列を、タンパク質として発現すること、を含む、前記方法。

【請求項 5 1】

O v r 1 1 0 を発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、細胞を、腫瘍細胞の増殖を阻害するのに効果的な量の請求項 1 ~ 3 4 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させることを含む、前記方法。

40

【請求項 5 2】

腫瘍細胞が、卵巣、膀胱、腎臓、膵臓、肺、胸部および頭頸部の腫瘍細胞からなる群より選択される、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

哺乳動物において O v r 1 1 0 発現性癌を軽減する方法であって、治療有効量の請求項 1 ~ 3 4 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを哺乳動物に投与することを含む、前記方法。

【請求項 5 4】

50

O v r 1 1 0 発現性癌が、卵巣癌、膀胱癌、腎臓癌、膵臓癌、肺癌、乳癌および頭頸部の癌からなる群から選択される、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

抗体またはその抗原結合フラグメントが、少なくとも一つの化学療法薬剤と組み合わせて投与される、請求項 5 1 ~ 5 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 6】

化学療法薬剤が、パクリタキセルまたはその誘導体である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

O v r 1 1 0 発現性腫瘍細胞に対する免疫応答の抑制を阻害する方法であって、腫瘍細胞に請求項 1 ~ 3 4 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを接触させることを含む、前記方法。

10

【請求項 5 8】

免疫応答が、T細胞の活性化、B細胞の活性化、NK細胞の活性化、T細胞の増殖、B細胞の増殖、NK細胞の増殖、T細胞の腫瘍への浸潤、B細胞の腫瘍への浸潤、NK細胞の腫瘍への浸潤からなる群から選択される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

哺乳動物中の腫瘍の増殖を阻害する方法であって、治療有効量の、請求項 1 ~ 3 4 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを哺乳動物に投与することを含む、前記方法。

【請求項 6 0】

抗体またはその抗原結合フラグメントが、O v r 1 1 0 . C 6 および O v r 1 1 0 . Q 1 9 からなる群から選択される、請求項 5 9 に記載の方法。

20

【請求項 6 1】

さらに化学療法薬剤を哺乳動物に投与することを含む、請求項 5 9 または 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

化学療法薬剤が、パクリタキセルまたはその誘導体である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

対象における O v r 1 1 0 の過剰発現を検出する方法であって：

(a) 対象からのサンプルを、請求項 1 ~ 3 4 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントと、結合に適した条件下で接触させること；

30

(b) サンプル中の O v r 1 1 0 のレベルを決定すること；および

(c) サンプル中の O v r 1 1 0 のレベルと、コントロールまたは通常範囲中の O v r 1 1 0 のレベルとを比較すること；

を含み、コントロールまたは通常範囲と比較して、対象からのサンプル中の O v r 1 1 0 のレベルの増加が、O v r 1 1 0 の過剰発現の指標となる、前記方法。

【請求項 6 4】

サンプルが、血液、血清、血漿、腹水、尿、腹腔洗浄液および組織を含む群から選択される、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

対象が、卵巣癌、膀胱癌、腎臓癌、膵臓癌、肺癌、乳癌および頭頸部の癌からなる群から選択される癌を有している、請求項 6 3 または 6 4 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この特許出願は、2006年11月27日出願の米国仮出願第60/861,657号の優先権を主張するものであり、その教示は全て、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、抗 O v r 1 1 0 抗体組成物および O v r 1 1 0 発現性の卵巣、膀胱、腎臓、

50

膵臓、肺、胸部または頭頸部の癌細胞を殺すための方法に関する。さらに、本発明は、ヒトの腫瘍を抗Ovr110抗体によって治療するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

卵巣癌

卵巣の癌は、米国女性の癌による死亡の4番目によくある原因であり、2001年には、23,000件以上の新たな症例および大体14,000件の死亡が推定された(Shridhar, V. et al., *Cancer Res.* 61(15): 5895-904 (2001); Memarzadeh, S. & Berek, J. S., *J. Reprod. Med.* 46(7): 621-29 (2001))。米国癌協会(ACS)は、2004年には卵巣癌の新たな症例は約25,580件となり、アメリカにおいて卵巣癌が16,090件の死亡の原因となるだろうと見積もっている(ACSウェブサイト: ワールドワイドウェブのcancer with the extension .org)。

10

【0004】

卵巣癌による1年間の女性の死亡数は、その他の婦人科悪性腫瘍を全て合わせた死亡数より多い。米国における卵巣癌の発生率は、1年間に女性100,000人当たり14.2件と推定され、卵巣癌によって毎年100,000人当たり9人の女性が死亡する。2004年には、新たな診断のうち約70~75%が、推定5年生存率が約15%であるステージIIIおよびIVの癌腫であると考えられる(Jemal et al., *Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2001, with a Special Feature Regarding Survival.* *Cancer* 2004; 101: 3-27)。

20

【0005】

卵巣癌の発症率は世界的に重大な関心事であり、毎年191,000件と推定される新たな症例が予測される(Runnebaum, I. B. and Stickeler, E., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127(2): 73-79 (2001))。不運なことに、卵巣癌を有する女性は、典型的に、疾患が転移するまで無症候性である。卵巣癌についての有効なスクリーニングが利用可能ではないため、診断された女性の約70%が、5年生存率が約25~30%である進行したステージの癌を有する(Memarzadeh, S. & Berek, J. S., 上記; Nunns, D. et al., *Obstet. Gynecol. Surv.* 55(12): 746-51)。逆に、初期のステージの卵巣癌を有すると診断された女性は、顕著により高い生存率を享受している(Werness, B. A. & Eltabbakh, G. H., *Int'l. J. Gynecol. Pathol.* 20(1): 48-63 (2001))。

30

【0006】

卵巣癌の病因についての我々の理解は不完全であるが、この領域における大規模な研究の結果は、年齢、遺伝的特徴、生殖的および食事性/環境的要因の組み合わせを指摘している。年齢は、卵巣癌の発生における重要な危険因子である: 30歳前に卵巣癌を発症する危険性は低い、卵巣癌の発症率は、30~50歳の間に直線的に上昇し、その後はより遅い速度で上昇し、発症率が最高であるのは、70歳代の女性である(Jeanne M. Schlander et al., *Hereditary Ovarian Cancer: Clinical Syndromes and Management*, in *Ovarian Cancer* 182 (Stephen C. Rubin and Gregory P. Sutton eds., 2d ed. 2001))。

【0007】

遺伝的要因に関して、卵巣癌の家族履歴は、当該疾患の発症における最も重要な危険因子であり、その危険性は、罹患した家族の成員の数、その成員の該女性に対する親等、どの特定の一親等の近親者が当該疾患を罹患するかに依存する(同文献)。いくつかの遺伝子における突然変異が卵巣癌に関連しており、これには、両者共に乳癌の発症において重要な作用を奏しているBRCA1およびBRCA2、ならびに両者共に遺伝性非ポリープ症結腸癌と関連しているhMSH2およびhMLH1が含まれる(Katherine Y. Look, *Epidemiology, Etiology, and Screening of Ovarian Cancer*, in *Ovarian Cancer* 169, 171-73 (Stephen C. Rubin and Gregory P. Sutton eds., 2d ed. 2001))。

40

【0008】

染色体17上に位置するBRCA1および染色体13上に位置するBRCA2は、DNA修復に関係する腫瘍抑制遺伝子であり; これらの遺伝子における突然変異は、卵巣癌の

50

約10%と関連する(同文献171-72; 上記Schilder et al., 185-186)。h M S H 2 および h M L H 1 は、DNAミスマッチ修復に関連し、それぞれ染色体2および3上に位置する; 遺伝性卵巣癌腫の約3%は、これらの遺伝子における突然変異のためであると報告されている(上記Look, 173; 上記Schilder et al., 184, 188-89)。

【0009】

生殖的要因もまた、卵巣癌の危険性の増加または低下と関連している。遅い閉経、未産婦および早い年齢の初経は、すべて、卵巣癌の危険性の増大と関連している(上記Schilder et al., 182)。ある理論の仮説によれば、これらの因子により女性の一生の経過にわたる排卵サイクルの数が増大し、「絶え間のない排卵」がもたらされるとし、これは、卵巣上皮に対する突然変異の主要な原因であると考えられる(同文献; Laura J. Havrilesky and Andrew Berchuck, *Molecular Alterations in Sporadic Ovarian Cancer*, in *Ovarian Cancer 25* (Stephen C. Rubin and Gregory P. Sutton eds., 2d ed. 2001))。

10

【0010】

突然変異は、排卵がその上皮の破壊および修復をもたらし、細胞分裂の増加が必要となり、これにより、検出されない突然変異が生じる可能性が増加するという事実によって説明することができる(同文献)。この理論についての支持は、妊娠、授乳および経口避妊薬の使用は、すべて排卵を抑制するが、これらは卵巣癌の発生に関する防御効果を付与するという事実において見出すことができる(同文献)。

【0011】

食事性/環境的要因の中で、動物性脂肪または赤肉の多量の摂取と卵巣癌との間に関連があると見られる一方、酸化防止剤のビタミンAは、遊離基形成を防止し、また正常な細胞分化を維持するのを補助し、防御効果を提供し得る(上記Look, 169)。報告はまた、アスベストおよび含水三ケイ酸マグネシウム(タルク)を、卵巣癌と関連付けており、この後者は、ペッサリーおよび生理用ナプキンに存在し得る(同文献169-70)。

20

【0012】

卵巣癌についての現在のスクリーニング手順は、一定の有用性を示す一方で、その診断能力において極めて限定されており、このことは、疾患が典型的にまだ無症候性であるが最も容易に対処される癌進行の初期ステージにおいて、特に深刻な問題である(Walter J. Burdette, *Cancer: Etiology, Diagnosis, and Treatment* 166 (1998); 上記Memarzadeh & Berek; 上記Runnebaum & Stickeler; 上記Werness & Eltabbakh)。一般的に用いられているスクリーニング試験には、年2回の直腸腔内診、CA-125血清腫瘍マーカーを検出するためのラジオイムノアッセイ、および経腔超音波検査が含まれる(上記Burdette, 166)。

30

【0013】

現在、CA-125は、卵巣癌において用いられる唯一の臨床的に承認された血清マーカーである。CA-125は漿液性癌の多くにおいて増加することが見出されているが、初期の疾患の女性においてはその半数のみでしか増加しない。CA-125の主要な臨床的用途は、卵巣癌の処置を受ける女性における、処置の成功のモニタリングまたは再発の検出である(Markman M. *The Oncologist*; 2: 6-9 (1997))。

【0014】

CA-125は、子宮内膜症などの良性疾患を有する女性においてもしばしば増加するので、そのスクリーニング用マーカーとしての使用は限定されている。したがって、単一で用いても、あるいはCA-125と組み合わせて用いても、卵巣癌の検出のためのより高感度で特異的な新規な血清マーカーの重大な必要性が存在する(Bast RC. Et al., *Early Detection of Ovarian Cancer: Promise and Reality in Ovarian Cancer*. *Cancer Research and Treatment Vol 107* (Stack MS, Fishman, DA, eds., 2001))。

40

【0015】

内診は適切な数の初期診断をもたらしておらず、他の方法は十分に正確ではない(同文献)。一研究により、卵巣癌を罹患している患者のわずか15%が、当該患者の内診の時点において疾患を有すると診断されたことが報告された(上記Look, 174)。さらに、C

50

A - 1 2 5 試験は、閉経前の女性において偽陽性を示す傾向があり、閉経後の女性において予測的価値が低いことが報告された（同文献174-75）。

【 0 0 1 6 】

現在では経膈超音波検査は、卵巣癌をスクリーニングするための好ましい手順であるが、良性と悪性の腫瘍とを高い信頼性で識別することはできず、また卵巣の大きさが正常である場合には、原発腹膜悪性腫瘍または卵巣癌を発見することができない（上記Schilder et al., 194-95）。BRCA1、BRCA2、hMSH2およびhMLH1遺伝子の突然変異についての遺伝子試験は現在利用可能であるが、これらの試験は、一部の患者に対しては費用がかかりすぎることがあり、また偽陰性、もしくは不確定な結果を生じ得る（上記Schilder et al., 191-94）。

10

【 0 0 1 7 】

さらに、現在の試みは、組み合わせて用いることができるバイオマーカーのパネルの同定に集中されている（Bast RC Jr., J Clin Oncol 2003; 21: 200-205）。現在、有望な卵巣血清マーカーとして評価されており、卵巣癌の検出を改善するためのマルチマーカーパネルのメンバーとして使用し得る他のマーカーは、HE4；メソセリン(mesothelin)；カリクレイン5、8、10および11；およびプロスタシンである（Urban et al. Ovarian cancer screening Hematol Oncol Clin North Am. 2003 Aug;17(4):989-1005; Hellstrom et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma, Cancer Res. 2003 Jul 1;63(13):3695-700; Ordonez, Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis, Am J Surg Pathol. 2003 Nov;27(11):1418-28; Diamandis EP et al., Cancer Research 2002; 62: 295-300; Yousef GM et al., Cancer Research 2003; 63: 3958-3965; Kishi T et al., Cancer Research 2003; 63: 2771-2774; Luo LY et al., Cancer Research 2003; 63: 807-811; Mok SC et al., J Natl Cancer Inst 2001; 93 (19): 1437-1439）。

20

【 0 0 1 8 】

外科的探索によって達成される卵巣癌のステージ分類は、当該疾患の処置および管理のコースを決定するにあたり、重要である（AJCC Cancer Staging Handbook 187 (Irvin D. Fleming et al. eds., 5th ed.1998)；上記Burdette, 170；上記Memarzadeh and Berek、；上記Shridhar et al.）。ステージ分類は、国際産科婦人科連合により開発された分類システムを参照して行われる（David H. Moore, Primary Surgical Management of Early Epithelial Ovarian Carcinoma, in Ovarian Cancer 203 (Stephen C. Rubin and Gregory P. Sutton eds., 2d ed. 2001)；上記Fleming et al. eds., 188）。

30

【 0 0 1 9 】

ステージIの卵巣癌は、腫瘍増殖が卵巣に限定されることを特徴とし、3つのサブステージからなる（同文献）。サブステージIAにおいて、腫瘍増殖は1つの卵巣に限定され、卵巣の外部表面上には腫瘍はなく、卵巣莢膜は無傷であり、腹水または腹膜洗浄液中に悪性細胞は存在しない（同文献）。サブステージIBは、腫瘍増殖が両方の卵巣に限定される以外は、A1と同一である（同文献）。サブステージICは、一方または両方の卵巣に限定される腫瘍増殖の存在を示し、また以下の特徴の1つまたは2つ以上を含む：莢膜破裂、一方または両方の卵巣の表面上での腫瘍増殖、および腹水または腹膜洗浄液中に存在する悪性細胞（同文献）。

40

【 0 0 2 0 】

ステージIIの卵巣癌は、一方または両方の卵巣に關与する腫瘍増殖および骨盤への伸展(extension)を意味する（同文献）。サブステージIIAは、子宮および/またはファロピウス管への伸展および/または着床(implant)を含み、腹水または腹膜洗浄液中に悪性細胞を含まず、一方、サブステージIIBは、他の骨盤内器官および組織への伸展を含み、やはり腹水または腹膜洗浄液中に悪性細胞を含まない（同文献）。サブステージIICは、IIAまたはIIBと同様に骨盤への伸展を含むが、腹水または腹膜洗浄液中に悪性細胞を含む（同文献）。

【 0 0 2 1 】

50

ステージ I I I の卵巣癌は、一方または両方の卵巣中に腫瘍増殖を含み、顕微鏡により確認される骨盤を越えての腹膜転移、および / または所属リンパ節における転移を有する (同文献)。サブステージ I I I A は、骨盤外の顕微鏡的な腹膜転移により特徴付けられ、サブステージ I I I B は、最大寸法で 2 c m 以下の、骨盤外の肉眼で見える腹膜転移を含む (同文献)。サブステージ I I I C は、転移が最大寸法において 2 c m より大きく、所属リンパ節への転移を含み得る以外は、I I I B と同一である (同文献)。

最後に、ステージ I V は、腹膜転移を除く遠隔転移の存在を示す (同文献)。

【 0 0 2 2 】

外科的ステージ分類は、現在の卵巣癌の管理および処置を評価するための基準であるが、かなりの欠点を有し、これには、手順の侵襲性、合併症の可能性、および不正確である可能性が含まれる (上記 Moore, 206-208, 213)。これらの制限を考慮して、卵巣癌の種々のステージにおける異なる遺伝子発現を理解することを通して、この疾患の進行のより優れた評価を補助する種々の生物マーカーを得ることによって、代替のステージ分類方法を開発することに、注意が向けられた (Vartiainen, J. et al., *Int'l J. Cancer*, 95(5):313-16 (2001); 上記 Shridhar et al.; Baekelandt, M. et al., *J. Clin. Oncol.* 18(22): 3775-81)。

【 0 0 2 3 】

卵巣癌の処置は、典型的には多面的な攻撃を含み、外科的介入は処置の基礎として作用する (Dennis S. Chi and William J. Hoskins, *Primary Surgical Management of Advanced Epithelial Ovarian Cancer*, in *Ovarian Cancer* 241 (Stephen C. Rubin and Gregory P. Sutton eds., 2d ed. 2001))。例えば、卵巣癌の症例の約 9 0 % にのぼる上皮性卵巣癌の場合において、処置は典型的には以下からなる: (1) 腹式子宮全摘術、両側卵管卵巣摘除術、大網切除術およびリンパ節切除を含む、腫瘍縮小手術、続いて (2) パクリタキセルおよびシスプラチンまたはカルボプラチンのいずれかでのアジュバント化学療法 (Eltabbakh, G.H. & Awtrey, C.S., *Expert Op. Pharmacother.* 2(10): 109-24)。アジュバント療法への臨床応答率が 8 0 % であるにもかかわらず、ほとんどの患者は、処置の 3 年以内に腫瘍の再発を経験している (同文献)。ある患者は、第 2 回目の腫瘍縮小手術および / または第二次化学療法を受ける場合もある (上記 Memarzadeh & Berek)。

【 0 0 2 4 】

上記のことから、卵巣癌の再発を検出、診断、モニタリング、ステージ分類、予見および予防するために用いられる手順は、患者の予後に決定的に重要であることが明らかである。さらに現在の手順は、これらの分析の各々において有用である一方、これらの特異性、感度、侵襲性および / またはこれらの費用のために制限される。このように、侵襲性が最小で適切な費用において、細胞、組織または体液中の新規なマーカーを検出することにより機能する、高度に特異的で高感度の手順が、非常に望ましい。生存率が低く、現在の処置選択肢は患者の予後に対して大きく貢献しないため (しばしば死に至る)、卵巣癌の特異的、効果的治療法に対する緊急の必要性がある。

【 0 0 2 5 】

したがって、ある人が卵巣癌を発生しやすいかどうかを予測するため、卵巣癌の診断のため、疾患の進行のモニタリングのため、卵巣癌のステージ分類のため、卵巣癌が転移したか否かを決定するため、および卵巣癌の画像化のための、より感度が高く正確な方法に対する多大な必要性が存在する。また、卵巣癌のためのより優れた処置の必要性も存在する。

【 0 0 2 6 】

乳癌

乳腺腫瘍癌 (mammary tumor cancer) とも呼ばれる乳癌は、女性の間で 2 番目に一般的な癌であり、米国において診断された癌の 3 分の 1 を占める。9 人に 1 人の女性は、その生涯において乳癌を発生し、1 年間に約 1 9 2 , 0 0 0 件の新たな乳癌の症例が診断され、死者は約 4 2 , 0 0 0 人である (Bever, *Primary Prevention of Breast Cancer*, in *Breast Cancer*, 20-54 (Kelly K Hunt et al., ed., 2001); Kochanek et al., 49 *Nat'*

10

20

30

40

50

I. Vital Statistics Reports 1, 14 (2001))。

【 0 0 2 7 】

乳癌は、20歳未満の若い女性においては極度にまれであり、30歳未満の女性においては非常にまれである。乳癌の発症率は年齢に伴って上昇し、50歳の年齢までに顕著となる。ラテンアメリカ系ではない白人女性が乳癌について最も高い発生率を有し、韓国女性女性是最も低い発生率を有する。乳癌および他の癌を促進する遺伝子変異BRCA1およびBRCA2の保有率の増大は、アッシュケナージ系ユダヤ人(Ashkenazi Jews)において見出される。

【 0 0 2 8 】

これらの同一の群の中で、アフリカ系アメリカ人女性が、乳癌による最も高い死亡率を有し(100,000人あたり31人)、一方中国人女性は、100,000人あたり11人の最も低い死亡率を有する。男性も乳癌を罹患し得るが、これは極度にまれである。米国においては、2004年に、217,440件の乳癌の新しい症例および40,580人の乳癌による死亡が推定されている。(米国癌協会ウェブサイト:ワールドワイドウェブのcancer with the extension .org)。関連する遺伝子的要因を有する症例を除き、乳癌の正確な原因は知られていない。

10

【 0 0 2 9 】

乳癌の処置においては、乳癌の早期の正確なステージ分類が生存に対して重大な影響を有するため、検出およびリスクアセスメントが非常に重要視されている。例えば、初期のステージ(ステージT0、以下に記載する)において検出された乳癌は、92%の5年生存率を有する。逆に、癌が後期のステージ(すなわちステージT4(IV))まで検出されない場合、5年生存率は13%まで低下する(AJCC Cancer Staging Handbook pp. 164-65 (Irvin D. Fleming et al. eds., 5th ed. 1998))。いくつかの検出手法、例えばマンモグラフィおよび生検は、不快感、費用および/または放射線照射量の増加を伴い、乳癌リスクの高い患者のみに処方されるに過ぎない。

20

【 0 0 3 0 】

乳癌のリスクを予測するかまたは検出するための現在の方法は、最適ではない。乳癌の相対的なリスクを予測するための1つの方法は、患者の危険因子を試験し、高リスクの患者についての積極的な(aggressive)診断および処置計画を探求することによる。患者の乳癌のリスクは、年齢の上昇、未産婦、乳癌の家族歴、乳癌の個人歴、早い初経、遅い閉経、最初の満期妊娠の遅い年齢、以前の増殖性乳房疾患、早い年齢での乳房への放射線照射および悪性腫瘍の個人歴に、正に関連している。

30

【 0 0 3 1 】

ライフスタイル要因、例えば脂肪消費量、アルコール消費量、教育および社会経済的地位もまた、乳癌の発生率の増大に関連しているが、直接的な因果関係は確立されていない。これらの危険因子は統計学的に有意である一方で、これらの乳癌との弱い関連性は、その有用性を制限する。乳癌を発症するほとんどの女性は、加齢に伴って到来するリスク以外に、上記した危険因子のいずれも有していない(NIH Publication No. 00-1556 (2000))。

【 0 0 3 2 】

癌を検出するための現在のスクリーニング方法、例えば乳房の自己検査、超音波およびマンモグラフィは、その有効性を低下させる、またはその幅広い採用を妨げるような欠点を有する。乳房自己検査は有用である一方、腫瘍が小さく触診により検出することが困難である初期の段階においては、乳癌の検出について信頼性が低い。超音波測定には、熟練したオペレーターが必要であり、より費用がかかる。マンモグラフィは感度が高い一方で、悪性腫瘍の可能性が疑われる病変の検出において過剰診断となりやすい。また、事前の胸部への照射が乳癌発症率の増大に関連する要因であるため、マンモグラフィにおいて用いられる放射線照射に対する恐れも存在する。

40

【 0 0 3 3 】

現時点において、乳癌予防の適切な方法は存在しない。乳癌予防の現在の方法は、予防

50

的な乳房切除術（癌診断の前に行う乳房切除術）および化学的予防（癌診断の前の化学療法）を含み、これは、乳癌リスクの高い女性の間でさえもこれらの採用が限定されるような思い切った手段である（上記Beyers）。

【0034】

多くの遺伝子マーカーが乳癌と関連付けられてきた。これらのマーカーの例として、癌胎児性抗原（CEA）（Mughal et al., JAMA 249:1881 (1983)）、MUC-1（Frische and Liu, J. Clin. Ligand 22:320 (2000)）、HER-2/neu（Haris et al., Proc.Am.Soc.Clin.Oncology 15:A96 (1996)）、uPA、PAI-1、LPA、LPC、RAKおよびBRCA（Esteve and Fritsche, Serum and Tissue Markers for Breast Cancer, in Breast Cancer, 286-308 (2001)）が挙げられる。これらのマーカーは、限定された感度、低い相関関係および偽陰性についての問題を有し、そのためこれらの初期診断への使用が制限される。例えば、BRCA1遺伝子変異は、乳癌の危険性の増大の指標として有用である一方で、乳癌のわずか6.2%のみがBRCA1陽性であるため、癌診断における使用が限定される（Malone et al., JAMA 279:922 (1998)。Mewman et al., JAMA 279:915 (1998)（3.3%のみの相関関係）も参照のこと）。

10

【0035】

原発部位および疾患発達の程度により、乳癌について4つの主な分類がある。

I. in situでの乳管癌腫（DCIS）：正常な位置に残留する乳管上皮細胞の悪性形質変換。DCISは純粋に局所的な疾患であり、転移することはない。

II. 侵襲性乳管癌腫（IDC）：基底膜を突破して乳房の支持組織中に至る乳管上皮細胞の悪性腫瘍。IDCは、最終的には身体の別の場所に拡大し得る。

20

【0036】

III. in situでの小葉癌腫（LCIS）：乳房の単一の小葉において発生し、小葉壁を貫通して伸展しない悪性腫瘍であり、一般に局所的なままである。

IV. 浸潤性小葉癌腫（ILC）：乳房の単一の小葉において発生し、小葉壁を貫通して隣接する組織中に直接侵入する悪性腫瘍。小葉壁を越えるこの侵襲（invasion）により、ILCは、リンパ管および血管に入り込み、遠隔部位に拡大し得る。

【0037】

予後および処置を決定するために、これらの4つの乳癌の種類を、主な腫瘍の大きさ（T）、リンパ節の関与（N）および転移の存在（M）によりステージ分類した。定義によれば、DCISは局所的なステージIの疾患を表すが、乳癌の他の形態は、ステージIIからステージIVにまでわたり得る。さらに外科的介入および医学的介入の指針となる、追加的な予後因子がある。最も一般的なものは、関与するリンパ節の合計数、ER（エストロゲン受容体）の状態、Her2/neu受容体の状態および組織学的グレードである。

30

【0038】

異なる処置が癌の異なるステージについてより有効であることを認識して、乳癌は適切なステージカテゴリーに診断される。ステージTXは、原発腫瘍が評価できない（すなわち腫瘍が除去されたかまたは乳房組織が除去された）ことを示す。ステージT0は、過形成などの異常を特徴とするが、原発腫瘍の痕跡を伴わない。ステージTisは、in situでの腫瘍、管内癌腫、in situでの小葉癌腫または腫瘍を伴わない乳頭のパジェット病を特徴とする。

40

【0039】

ステージT1（I）は、最大寸法で2cm以下の腫瘍を有することを特徴とする。ステージT1内で、Tmicは、0.1cm以下の微小侵襲を示し、T1aは、0.1~0.5cmの腫瘍を示し、T1bは、0.5~1cmの腫瘍を示し、そしてT1cは、1cm~2cmの腫瘍を示す。ステージT2（II）は、最大寸法で2cm~5cmの腫瘍を特徴とする。大きさが5cmより大きい腫瘍は、ステージT3（III）として分類される。ステージT4（IV）は、胸壁または皮膚への伸展を伴う、任意の大きさの腫瘍を示す。

50

【 0 0 4 0 】

ステージ T 4 内で、T 4 a は、胸壁への腫瘍の伸展を示し、T 4 b は、乳房の皮膚または同一の乳房に限定された衛星皮膚結節の浮腫または潰瘍形成を示し、T 4 c は、T 4 a と T 4 b との組み合わせを示し、そして T 4 d は、炎症性癌腫を示す (AJCC Cancer Staging Handbook pp. 159-70 (Irvin D. Fleming et al. eds., 5th ed. 1998))。標準的なステージ分類に加えて、乳房腫瘍をこれらのエストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体タンパク質状態により分類することができる (Fisher et al., Breast Cancer Research and Treatment 7:147 (1986))。さらなる病理学的状態、例えば H E R 2 / n e u 状態もまた、有用であり得る (Thor et al., J.Nat'l.Cancer Inst. 90:1346 (1998); Paik et al., J.Nat'l.Cancer Inst. 90:1361 (1998); Hutchins et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncology 17:A2 (1998).; および Simpson et al., J.Clin.Oncology 18:2059 (2000))。

10

【 0 0 4 1 】

原発腫瘍のステージ分類に加えて、所属リンパ節への乳癌転移もステージ分類することができる。ステージ N X は、リンパ節を評価することができない (例えば、前に除去された) ことを示す。ステージ N 0 は、所属リンパ節転移がないことを示す。ステージ N 1 は、移動可能な同側性腋窩リンパ節への転移を示す。ステージ N 2 は、互いに、または他の構造に固定された同側性腋窩リンパ節への転移を示す。ステージ N 3 は、同側性内部乳腺リンパ節への転移を示す (同文献)。

【 0 0 4 2 】

ステージ決定は、潜在的な予後値を有し、最適な治療法を設計するための基準を提供する (Simpson et al., J. Clin. Oncology 18:2059 (2000))。一般に、乳癌の病理学的ステージ分類はより正確な予後を与えるため、臨床的ステージ分類より好ましい。しかし、臨床的ステージ分類は、病理学的評価のための組織を得る侵襲性手順に依存しないので、病理学的ステージ分類と同等に正確である場合はより好ましい。乳癌のステージ分類は、異なる侵襲のステージ間で区別され得る細胞、組織または体液中の新たなマーカーを検出することにより改善されるだろう。この分野における進歩により、乳癌患者を処置するためのより迅速で信頼性のある方法が可能となる。

20

【 0 0 4 3 】

乳癌の処置は、一般に、原発腫瘍の正確なステージ分類の後に決定される。主な処置の選択肢には、乳房保存療法 (乳腺腫瘍摘出術、乳房照射および腋窩の外科的病期判定 (surgical staging)) ならびに非定型的乳房切除術が含まれる。追加の処置には、化学療法、局部放射線照射および極端な場合においては、卵巣切除によるエストロゲン産生の停止が含まれる。

30

【 0 0 4 4 】

最近まで、すべての乳癌のための一般的な処置は、乳房切除術であった (Fonseca et al., Annals of Internal Medicine 127:1013 (1997))。しかし、最近のデータは、初期のステージの乳癌について、より極端でない手順が生存の点において同等に有効であり得ることを示す (Fisher et al., J. of Clinical Oncology 16:441 (1998))。初期のステージの乳癌 (すなわちステージ T i s) を有する患者についての処置の選択肢は、乳房を残す手術と、その後の乳房における局所的な放射線療法であり得る。代替的に、乳房切除術を任意に放射線または乳房再構成と組み合わせることができる。これらの処置方法は、乳癌の初期ステージにおいて同等に有効である。

40

【 0 0 4 5 】

ステージ I およびステージ II の乳癌を有する患者には、外科手術と共に化学療法および/またはホルモン療法が必要である。手術は、ステージ III およびステージ IV の患者においては有用性が限定される。したがってこれらの患者は、化学療法および放射線療法のより好ましい候補であって、手術は初めのステージ分類またはその後の再ステージ分類を可能にするための生検に限定される。なぜならば、疾患のこのステージにおいて、癌がほとんど治癒的ではないためである (AJCC Cancer Staging Handbook 84, 164-65 (Irv

50

in D. Fleming et al. eds., 5th ed.1998))。

【 0 0 4 6 】

患者により多くの処置の選択肢を提供する努力において、再発性が低く、術後の放射線処置を伴わない乳腺腫瘍摘出術での処置が可能な、初期ステージの乳癌を明確にする努力が進行中である。多くの試行が初期ステージの乳癌を分類するためになされている一方、術後の放射線処置に対する一致した提言は、これらの研究からは得られていない (Page et al., Cancer 75:1219 (1995); Fisher et al., Cancer 75:1223 (1995); Silverstein et al., Cancer 77:2267 (1996))。

【 0 0 4 7 】

膵臓癌

膵臓癌は、世界で13番目に一般的な癌であり、癌による死亡の第8位の原因である (Donghui Li, Molecular Epidemiology, in Pancreatic Cancer 3 (Douglas B. Evans et al. eds., 2002))。米国においては、膵臓の癌は男性と女性両方において4番目に一般的な癌であり、全体で、癌による死亡の5%およびほぼ30,000人の死亡の原因となっている (同文献)。膵臓癌の割合は女性より男性で高く、白人よりアフリカ系アメリカ人で高い (同文献、9)。膵臓癌の最も重要な予測指標は、患者の年齢である；白人の中では、膵臓癌の年齢に関連する発症率は、85歳以上においてすら連続的に増加する (同文献、3)。

【 0 0 4 8 】

約80%の症例が60~80歳の年齢範囲で起きており、80代では、40代と比べて、疾患を有する危険性が40倍も高い (同文献)。さらに米国癌協会は、2004年に米国のみにて、31,800件の新たな膵臓癌の症例を予測している。膵臓癌は、同年に約31,200人の新たな死亡を引き起こすであろう (ACSウェブサイト:ワールドワイドウェブのcancer with the extention .org)。研究者および医師による膵臓癌の処置を考案するための努力にも関わらず、膵臓癌は例外なく致命的であり続けている (James R. Howe, Molecular Markers as a Tool for the Early Diagnosis of Pancreatic Cancer, in Pancreatic Cancer 29 (Douglas B. Evans et al. eds., 2002))。

【 0 0 4 9 】

年齢の他にも多数の膵臓癌の危険因子が同定されており、喫煙、食生活、職業、一定の医療状態、遺伝、および分子生物学的因子などが含まれる。喫煙はこの疾患を生じる最も重要な危険因子であり、喫煙と膵臓癌との関連は多数の研究によって確立されている (上記Li、3)。相対的危険性は少なくとも1.5に達し、喫煙の程度と共に増大し、外部危険率 (outer risk ratio) は10倍に達する (同文献)。

【 0 0 5 0 】

次に重要な因子は食生活と考えられ、危険性の増加は動物性タンパク質および脂肪の摂取と関連し、危険性の減少は果物および野菜の摂取と関連する (同文献、3-4)。特定の職業に関して、膵臓癌の過大な率は、化学分野、石炭およびガスの探査、金属産業、革なめし業、繊維業、アルミニウム精練業、および輸送業の従事者と関連している (同文献、4)。多くの医学的状態も膵臓癌の発症率の増加と関連し、糖尿病、慢性膵炎、胃切除術、および胆嚢摘出術を含むが、これらの状態と膵臓癌との間の因果関係は確立されていない (同文献)。

【 0 0 5 1 】

遺伝的な遺伝子的要因は、膵臓癌の負荷の10%未満を構成しており、遺伝性膵炎、および家族性の癌症候群遺伝子、例えばhMSH2およびhMLH1 (遺伝性非腺腫性大腸癌)、p16 (家族性非定型多発性ほくろメラノーマ (mole-melanoma)) およびBRCA1/BRCA2 (乳癌および卵巣癌) について関連が記載されている (同文献、3)。いかなる器官における癌についての遺伝性の基盤も、膵臓のそれよりは低いが、しかし研究者らは、ある個人の膵臓癌に対する感受性に影響する特定の遺伝的欠陥を示すことができている (David H. Berger and William E. Fisher, Inherited Pancreatic Cancer Syndromes, in Pancreatic Cancer 73 (Douglas B. Evans et al. eds., 2002))。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

分子生物学の立場から、研究により膵臓癌と多数の遺伝的突然変異との間の関連が明らかとなり、これには、プロトオンコジーン *K - r a s* の活性化、および癌抑制遺伝子 *p 5 3*、*p 1 6*、および *D P C 4* の不活性化が含まれる (Marina E. Jean et al., *The Molecular Biology of Pancreatic Cancer*, in *Pancreatic Cancer* 15 (Douglas B. Evans et al. eds., 2002))。

【 0 0 5 3 】

膵臓腺癌の1つの研究において、83%が、*K - r a s* 活性化、ならびに *p 1 6* および *p 5 3* の不活性化を有していた (同文献)。*K - r a s* の突然変異は、膵臓腺癌の80~95%に見出され、膵臓の癌においては、*p 5 3*、*p 1 6*、および *D P C 4* 遺伝子が、最も頻繁に欠損する癌抑制遺伝子である (上記Howe、29)。*p 1 6* 遺伝子のホモ接合体欠失、過剰メチル化、および突然変異は、膵臓腺癌の85~98%において見出された (同文献)。

10

【 0 0 5 4 】

K - r a s、*p 5 3*、*p 1 6*、および *D P C 4* 遺伝子の改変の役割から予想されるように、細胞サイクルの調節を失うことが、膵臓の腫瘍形成の鍵となることが考えられ、なぜこの癌がこのように攻撃的であるかを説明するかも知れない (上記Jean、15)。研究により、この癌とある種の成長因子および成長因子受容体の異常な調節との間の関連、およびマトリクス・メタロプロテイナーゼと腫瘍血管新生レギュレータの上方調節が明らかにされた (同文献)。上皮細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子、形質転換成長因子、インスリン様成長因子、肝細胞増殖因子、および血管内皮増殖因子は、膵臓癌において種々の役割を果たす可能性があるが、かかる役割は明らかにされていない (同文献、18-22)。

20

【 0 0 5 5 】

膵臓癌の存在を検出するためのスクリーニング技法の開発は、この致死的な癌に対して特に重要であるが、それは、膵臓腫瘍が膵臓を囲む毛細血管およびリンパ管に侵入し、腫瘍が胆管を閉塞するかまたは痛みを引き起こすときまで、殆どの患者が現れないからである (上記Howe、29)；残念ながら、この疾患の転移形態を有する患者は、概して診断後1年未満しか生存しない (上記Jean et al., 15)。コンピュータ断層撮影 (CT) および内視鏡的逆行性胆道膵管造影 (ERCP) は、症候性の患者の診断を支援することができるが、治療し得る時期での早期発見を可能とする膵臓腫瘍のスクリーニングのツールは、現在存在しない (上記Howe、29)。

30

【 0 0 5 6 】

癌胎児性抗原などのマーカー、および、ヒト結腸癌の細胞株に対して生成される抗体 (CA 19-9 および CA 195)、ヒト卵巣癌の細胞株に対して生成される抗体 (CA 125)、およびヒト膵臓癌の細胞株に対して生成される抗体 (SPAN-1 および DUPAN-2) は、膵臓癌患者の血清において上昇するが、これらのマーカーは特異性を欠如し疾患の後期に現れるために、信頼できるスクリーニングのツールとしては十分ではない (Walter J. Burdette, *Cancer: Etiology, Diagnosis, and Treatment* 99 (1998); Hasolzner, U. et al., *Anticancer Res.* 19(4A): 2477-80 (1999))。

40

【 0 0 5 7 】

現在適切なスクリーニング法が存在しないために、医師は、この疾患の早期診断のための最も期待される方法として、分子生物学的方法を用いる技術にますます頼っている (上記Howe、30)。現在、無症候性の患者において膵臓癌を検出し得る、高感度で特異性が高いマーカーは存在しないが、幾つかの生物学的マーカーが検討されている (同文献)。現在相当の努力が *K - r a s* に集中しており、研究者らは、膵液、胆汁、十二指腸液、または ERCP ブラッシングのサンプルをスクリーニングして、*K - r a s* の突然変異を検出する技術を考案している (同文献)。

【 0 0 5 8 】

これらのサンプルの採集は侵襲的であり、無症候性の被験者をスクリーニングするため

50

に特に有用ではないため、研究者らはまた、K - r a s の突然変異用の血清および大便の分析にも頼っており、後者は供給源材料の複雑さによる障害があるために、前者が最も期待できる（同文献、35～38、42）。さらに、転写因子タンパク質 p 5 3 の血清レベルは癌の進行と平行している可能性があるため、p 5 3 も潜在的な腫瘍マーカーとして研究されている（同文献、37；上記Jean et al.、17）。

【 0 0 5 9 】

一旦膵臓癌と診断されると、癌の進行のステージを参照して処置の決定がなされる。多数のイメージング技術が膵臓癌のステージ分類のために用いられ、コンピュータ断層撮影（C T）が現在選択される方法であるが（Harmeet Kaur et al., Pancreatic Cancer: R
10 radiologic Staging, in Pancreatic Cancer 86 (Douglas B. Evans et al. eds., 2002);
Ishiguchi, T. et al., Hepatogastroenterology 48(40): 923-27 (2001)）、C T は、
小容量の転移はしばしばC T の解像度を超えるために、癌の範囲について頻りに過小評価
となる（H. J. Kim and K. C. Conlon, Laparoscopic Staging, in Pancreatic Cancer 1
5 (Douglas B. Evans et al. eds., 2002)）。

【 0 0 6 0 】

M R I は、ある点において、とりわけ以下の能力に関して、C T に取って代わるものである：（1）種々の組織間にコントラストをつける、（2）パルス順序を修正して病変部の視覚化を改善し、アーチファクトを最小化する、（3）イオン化放射への患者の暴露を制限しながらイメージングを行う、および（4）I V ヨウ化コントラスト試薬を使用せずに血管を視覚化する（上記Kaur et al.、87）。しかしながら現在、M R I はC T に対し
20 て明確な利点を示していない（上記Kim and Conlon、116）。

【 0 0 6 1 】

種々の超音波技術もまた、現在ステージ分類に用いられ、これには経腹的超音波検査（T U S）、超音波内視鏡検査（E U S）、および術中超音波検査（I U S）などを含み、E U S は、最も期待されるものの1つである（上記Kaur et al.、86; Richard A. Ericks
on, Endoscopic Diagnosis and Staging: Endoscopic Ultrasound, Endoscopic Retrogra
de Cholangiopancreatography, in Pancreatic Cancer 97-106 (Douglas B. Evans et al
. eds., 2002)）。これらの技術はしかし、それぞれさまざまな要因によって制限される
：T U S は胃腸管のガスおよび腹膜の脂肪によって妨害され、E U S は超音波検査および
内視鏡検査に相当な経験を必要とし、広く利用可能ではない可能性があり、そしてI U S
30 は、手術中にしか使用できない（上記Kaur et al.、86）。

【 0 0 6 2 】

まだ初期の段階ではあるが、膵臓癌のステージ分類を支援するマーカーの探索は、幾つかの可能性のある手がかりを見出した。例えば、2つの転移抑制遺伝子、n m 2 3 - H 1 およびK A I 1 が、膵臓癌のステージに依存して異なって発現され、それらの発現は該疾患の早期のステージでは上方制御され、遅いステージにおいては下方制御されることが、研究により見出された（Friess, H. et al., J. Clin. Oncol. 19(9): 2422-32 (2001)）。研究者らはまた、遺伝性リンパ節ステージ分類に、特にK - r a s プロトオンコジーンにおける突然変異の探索に焦点をあてている（Yamada, T. et al., Int ' l J. Oncol. 16
40 (6): 1165-71 (2000)）。

【 0 0 6 3 】

同様に、研究によって、突然変異したK - r a s 配列の血漿 / 血清における存在が、後期ステージの膵臓癌と関連することを確認したが、ただし、早いステージの膵臓癌の存在もまたこの方法により検出できる（Sorenson, G.D., Clin. Cancer Res. 6(6): 2129-37 (2000)）。マルチマーカー逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（multimarker reverse tran
scriptase-polymerase chain reaction）アッセイを用いる、期待されるステージ分類技術は、以下の腫瘍マーカーのm R N A 発現について血液および組織サンプルを分析することにより、膵臓癌のステージを識別することに成功した：
- ヒト絨毛性ゴナドトロピン遺伝子、肝細胞増殖因子受容体遺伝子c - m e t、および
- 1 , 4 - N - アセチル - ガラクトサミニル - トランスフェラーゼ遺伝子（Bilchik, A. et al., Cancer 88(5): 103
50

7-44 (2000))。

【 0 0 6 4 】

膵臓癌のステージ分類に一般に用いられる分類システムの1つは、国際対がん連合により考案されたTNMシステムである (AJCC Cancer Staging Handbook 3 (Irvin D. Fleming et al. eds., 5th ed. 1998))。このシステムは、数個の段階に分けられ、各々は、原発腫瘍 (T)、所属リンパ節 (N)、および遠隔転移 (M) について癌の増殖の範囲を評価する (同文献)。

【 0 0 6 5 】

ステージ0はin situでの癌腫を特徴とし (Tis)、所属リンパ節への転移はなく (N0)、遠隔転移もない (M0) (同文献、113)。ステージIおよびIIは、腫瘍のカテゴリ-に関してのみ、ステージ0と異なる：ステージIは、膵臓のみに限定される腫瘍を含み、これは、(1)最大寸法が2cm以下であるか (T1)、または(2)最大寸法が2cm以上であり (T2)、一方ステージIIは、十二指腸、胆管または膵臓周辺組織まで直接広がった腫瘍 (T3) を含む (同文献)。

【 0 0 6 6 】

ステージIIIは、腫瘍のカテゴリ-T1、T2またはT3を含む；所属リンパ節転移 (N1) は、単一のリンパ節 (pN1a) または複数のリンパ節 (pN1b) のどちらかを含み；そして遠隔転移はない (M0)。ステージIVAは、胃、膵臓、結腸、または隣接する大きな血管まで直接広がった腫瘍を特徴とし (T4)；任意のNカテゴリ-であり；および、遠隔転移はない (M0)。最後に、ステージIVBは、任意のTカテゴリ-、任意のNカテゴリ-、および遠隔転移 (M1) を特徴とする (同文献)。

【 0 0 6 7 】

一旦癌がステージ分類されると、この疾患に対する、唯一の一定して効果的な処置は外科手術であり、潜在的に治効のある切除術を受けることができるのは10～15%の患者のみである (上記Jeanら、15；上記Flemingら編、111；William F. Regine, Postoperative Adjuvant Therapy: Past, Present, and Future Trial Development, in Pancreatic Cancer 235 (Douglas B. Evans et al. eds., 2002))。さらに、切除術を受けたこれらの患者の5年生存率は20%を下回る (上記Regine、235)。一方、ゲムシタピンおよび5-フルオロウラシルなどの化学療法剤は、膵臓癌に対して一定の有効性を示したが、現実的には、化学療法は膵臓癌からの生存に対してはほとんど効果を示していない (上記Burdette、101)。放射線療法はその有効性について矛盾する結果を示した (同文献) が、5-フルオロウラシルと組み合わせた放射線は、一定の見込みを示した、上記Regine、235)。

【 0 0 6 8 】

従来技術が膵臓癌の処置に失敗していることから、分子生物学の技術を用いる多くの新規なアプローチが検討されている。遺伝子治療の分野で多くの研究がなされ、アンチセンス技術、遺伝子指向的プロドラッグ活性化戦略、プロモーター遺伝子戦略、およびオンコリティックウイルス (oncolytic viral) 療法を含む (Choi and Francis R. Spitz, Strategies for Gene Therapy, in Pancreatic Cancer 331 (Douglas B. Evans et al. eds., 2002); Kasuya, H. et al., Hepatogastroenterology 48(40): 957-61 (2001))。

【 0 0 6 9 】

最近の他のアプローチは、マトリクス・メタロプロテイナーゼの阻害に焦点を当ててきた。マトリクス・メタロプロテイナーゼは、腫瘍細胞の転移および侵入を、該細胞の基底膜の分解を介して、および腫瘍周辺間質分解および血管形成における役割を通して、促進する酵素である (Alexander S. Rosemurgy, II and Mahmudul Haq, Role of Matrix Metalloproteinase Inhibition in the Treatment of Pancreatic Cancer, in Pancreatic Cancer 369 (Douglas B. Evans et al. eds., 2002))。

【 0 0 7 0 】

癌における血管新生

固形腫瘍の増殖および転移は、血管新生にも依存する (Folkman, J., 1986, Cancer Re

10

20

30

40

50

search, 46, 467-473; Folkman, J., 1989, Journal of the National Cancer Institute, 82, 4-6)。例えば、2 mmより大きく広がった腫瘍は、それ自身の血液供給を受けねばならず、これは新しい毛細血管の増殖を誘導することにより達成される。これらの新しい血管が一旦腫瘍に埋め込まれると、それらは、腫瘍細胞が循環に入って、遠隔部位、例えば肝臓、肺または骨などに転移する手段を提供する (Weidner, N., et al., 1991, The New England Journal of Medicine, 324(1), 1-8)。

【0071】

既存の血管からの新たな血管の増殖または発生として定義される血管新生は、主として胚発生中に起こる複雑なプロセスである。このプロセスは、血管を覆う新しい内皮細胞が、幹細胞からの分化ではなく、既存の細胞の増殖により作られる点で、脈管形成から区別される。このプロセスは侵襲的であり、細胞外基質 (ECM) のタンパク質分解、新しい内皮細胞の移動、および新しいマトリクス成分の合成に依存する。血管新生は循環系の胚発生中に起こるが、しかし成長したヒトにおいては、血管新生は病的な状態への反応としてのみ起こる (ただし、女性の生殖周期を除く)。

【0072】

成人の正常な生理的状態のもとでは、血管新生は、毛髪成長および創傷の治癒などの非常に限定された状況においてのみ起こる (Auerbach, W. and Auerbach, R., 1994, Pharmacol Ther. 63(3):265-311; Ribatti et al., 1991, Haematologica 76(4):311-20; Risau, 1997, Nature 386(6626):671-4)。血管新生は、内皮細胞の遊走カラムの形成を引き起こす刺激によって進行する。タンパク質分解活性は、この「血管新生の芽 (vascular sprout)」が前進する先端に集中され、これは、細胞のカラムが侵入し遊走することを許容するのに十分なだけ、ECMを破壊する。前進部の後ろでは内皮細胞が分化し、互いに付着し始めて、新しい基底膜を形成する。細胞は次に増殖を停止し、最終的には新しい細動脈または毛細血管の内腔を規定する。

【0073】

制御されない血管新生が、広い範囲の疾患に対して責任を負うことが次第に認識されてきたが、これには、限定されることなく、癌、心臓血管疾患、関節リウマチ、乾癬および糖尿病性網膜症を含む (Folkman, 1995, Nat Med 1(1):27-31; Isner, 1999, Circulation 99(13):1653-5; Koch, 1998, Arthritis Rheum 41(6):951-62; Walsh, 1999, Rheumatology (Oxford) 38(2):103-12; Ware and Simons, 1997, Nat Med 3(2):158-64)。

【0074】

特に重要であるのは、固形腫瘍がその増殖と転移のために血管新生を必要とするとの観察である (Folkman, 1986 上記; Folkman 1990, J Natl. Cancer Inst., 82(1) 4-6; Folkman, 1992, Semin Cancer Biol 3(2):65-71; Zetter, 1998, Annu Rev Med 49:407-24)。腫瘍は、通常は、利用可能な毛細管ベッドからの距離のために数立方ミリメートルの大きさにまでしか増殖できない単一の異常細胞として始まり、さらなる増殖および播種なしに長期間「潜伏して」留まることができる。

【0075】

いくつかの腫瘍細胞は、次に、血管新生の表現型に切り換わって内皮細胞を活性化し、これは新しい毛細血管へと増殖および成熟する。これらの新しく形成された血管は、原発腫瘍の連続した増殖を許容するのみでなく、転位腫瘍細胞の播種および再コロニー形成を許容する。血管形成の切り換えを制御する正確なメカニズムはよく理解されていないが、腫瘍の新血管形成は、多数の血管形成促進因子と阻害因子との間の、純バランスから生じると考えられている (Folkman, 1995、上記)。

【0076】

最も強力な血管新生阻害剤の1つは、O'ReillyおよびFolkmanによって同定されたエンドスタチンである (O'Reilly et al., 1997, Cell 88(2):277-85; O'Reilly et al., 1994, Cell 79(2):315-28)。この発見は、ある種の原発腫瘍が遠隔転移の成長を阻害できるという現象に基づく。O'ReillyおよびFolkmanは、原発腫瘍が、抑制物質よりも多量の血管形成促進物質を生成することにより、血管新生を開始させるとの仮説を立てた。しか

し血管新生抑制物質は、循環におけるそれらの長い半減期のために、促進剤より多量に二次腫瘍の部位に到達する。

【0077】

このため、最終的には、原発腫瘍の増殖と二次腫瘍の抑制がもたらされる。エンドスタチンは、原発腫瘍により産生される、かかる血管新生抑制物質の増加するリストの中の1つである。エンドスタチンは、より大きなタンパク質のタンパク質分解フラグメントである：エンドスタチンは、コラーゲンXVIIII（マウスコラーゲンXVIIIIのアミノ酸H1132-K1315）の20kDaのフラグメントである。エンドスタチンは、*in vitro*で内皮細胞の増殖を特異的に阻害し、*in vivo*での血管形成を遮断することが示された。より重要なことには、腫瘍を有するマウスにエンドスタチンを投与すると、顕著な腫瘍の退縮を引き起こし、毒性または薬剤耐性は、複数の処置サイクルの後にも観察されなかった（Boehm et al., 1997, Nature 390(6658):404-407）。

10

【0078】

エンドスタチンが遺伝的に安定な内皮細胞を標的化し、種々の固形腫瘍を阻害するという事実は、エンドスタチンを抗癌療法のための非常に魅力的な候補にしている（Fidler and Ellis, 1994, Cell 79(2):185-8; Gastl et al., 1997, Oncology 54(3):177-84; Hinderbergh et al., 1999, Ann Oncol 10 Suppl 4:60-3）。さらに、血管新生阻害剤は、放射線および化学療法剤と組み合わせられる場合により効果的であることが示された（Klement, 2000, J. Clin Invest, 105(8) R15-24. Browder, 2000, Cancer Res. 6-(7) 1878-86, Arap et al., 1998, Science 279(5349):377-80; Mauceri et al., 1998, Nature 394(6690):287-91）。

20

【0079】

上記のように、卵巣癌、膵臓癌、肺癌または乳癌を診断およびステージ分類するための各方法は、用いられる技術によって制限される。したがって、卵巣癌、膵臓癌、肺癌または乳癌を検出するための、感度の高い分子マーカーおよび細胞マーカーの必要性が存在する。処置方法を最適化するために、卵巣癌、膵臓癌、肺癌または乳癌の臨床的および病理学的なステージ分類を含んだ正確なステージ分類のための、分子マーカーの必要性が存在する。さらに、寛解後の卵巣癌、膵臓癌、肺癌または乳癌の再発を検出できるマーカーを含む、癌の処置の進行をモニタリングするための感度の高い分子マーカーおよび細胞マーカーの必要性が存在する。

30

【0080】

本発明は、従来の治療法の制限を克服し、また以下の詳細な記載から明らかであるさらなる利点を提供する、卵巣癌、膵臓癌、肺癌または乳癌を処置するための代替方法を提供する。

【0081】

自己免疫疾患

免疫系の細胞活性は、細胞表面相互作用の複雑なネットワークおよび関連するシグナル伝達プロセスによって制御される。細胞表面受容体はそのリガンドにより活性化されると、シグナルが該細胞へ伝達され、携わるシグナル変換経路に依存して、そのシグナルは抑制性または活性化性（*activatory*）となり得る。多くの受容体系に対して、細胞活性は活性化シグナルと抑制シグナルとの間のバランスによって調節される。これらのいくつかにおいて、リガンドによる細胞表面受容体への結合に関連する正のシグナルが、異なる細胞表面受容体へのリガンドの結合によって伝達される負のシグナルにより、下方調節または阻害されることが知られている。

40

【0082】

これら正および負のシグナル伝達経路の生化学的機構は、多数の既知の免疫系受容体とリガンドとの相互作用について研究されている。正のシグナル伝達を媒介する多くの受容体は、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ITAM）として知られているチロシンホスファターゼリン酸化の部位を含む、細胞質側末端を有する。正のシグナル伝達のための一般的な機構経路には、受容体の細胞質ドメイン上および他のシグナル伝達分子上の部位をリ

50

ン酸化するチロシンキナーゼの活性化が関与している。一旦受容体がリン酸化されると、シグナル伝達分子のための結合部位が生成され、これがシグナル伝達経路を開始させ、細胞を活性化する。

【0083】

抑制経路には、免疫受容抑制性チロシンモチーフ (ITIM) を有する受容体が関与し、これはITAM同様、チロシンキナーゼによりリン酸化される。これらのモチーフを有する受容体は、抑制性シグナル伝達に関連するが、それはこれらのモチーフが、活性化された受容体またはシグナル伝達分子からチロシンを除去することによりシグナル伝達を遮断するチロシンホスファターゼに、結合部位を提供するからである。活性化および抑制の機構の詳細の多くは知られていないが、免疫系における機能バランスが対立する活性化シグナルおよび抑制性シグナルに依存することは明確である。

10

【0084】

正および負のシグナル伝達のバランスにより調節される免疫系活性の一例は、B細胞増殖である。B細胞抗原受容体は、抗体に結合すると正のシグナル伝達を媒介してB細胞増殖をもたらす、B細胞表面免疫グロブリンである。しかし、B細胞はまた、低親和性IgG受容体であるFc.gamma.R11b1も発現する。抗原が、可溶性免疫グロブリンを有する免疫複合体の一部である場合、B細胞抗原受容体およびFc.gamma.R11b1の両方を、それぞれ抗原および可溶性免疫グロブリンを介して結合させることによって、この免疫複合体はB細胞を結合することができる。

20

【0085】

Fc.gamma.R11b1とB細胞受容体複合体との共結合は、活性化シグナルを下方調節し、B細胞増殖を妨害する。Fc.gamma.R11b1受容体はITIMモチーフを含み、このITIMモチーフは、B細胞受容体と共結合すると、ITIMとチロシンホスファターゼとの相互作用を介して抑制性シグナルをB細胞に伝達すると考えられている。

【0086】

ナチュラルキラー (NK) 細胞の細胞溶解活性は、細胞機能を開始させる正のシグナルと活性を妨害する負のシグナルとの間のバランスによって調節される免疫系活性の、他の例である。NK細胞傷害性を活性化させる受容体は完全には理解されていない。しかし、NK細胞が特異的受容体を有する細胞表面MHCクラスI抗原を標的細胞が発現する場合、該標的細胞は、NKによる殺傷から保護される。キラー抑制性受容体 (KIR) として知られるこれらの特異的受容体は、そのMHCリガンドにより関与させられると、負のシグナルを伝達し、NK細胞の細胞傷害性を下方制御する。

30

【0087】

KIRは、免疫グロブリンスーパーファミリーまたはC型レクチンファミリーに属する (Lanier et al., Immunology Today 17:86-91, 1996参照)。既知のヒトNK KIRは、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、その細胞外領域、膜貫通領域および細胞質領域において相違点および類似点を示す。多くのKIRに共通する細胞質ドメインのアミノ酸配列は、YxxL/Vの配列を有するITIMモチーフである。いくつかの場合においては、リン酸化されたITIMは、チロシンホスファターゼを補充し、これがシグナル伝達経路において分子を脱リン酸化し、細胞活性を妨害する (Burshtyn et al., Immunity 4:77-85, 1996参照)。

40

【0088】

KIRは一般に、26個のアミノ酸 [YxxL/V(x).sub.26YxxL/V] によって隔てられたこれらのモチーフの2つを有する。それぞれがヒト白血球抗原 (HLA) C対立遺伝子 (MHCクラスI分子) に特異的な、少なくとも2つのNK細胞受容体が、抑制性受容体および活性化受容体として存在する。これらの受容体は、細胞外の部分で非常に相同であるが、膜貫通部分および細胞質部分では大きな違いを有する。違いの1つは、抑制性受容体におけるITIMモチーフの外観および、活性化受容体におけるITIMモチーフの欠如である (Biassoni et al., Journal. Exp. Med, 183:645-650, 1996参照)。

【0089】

50

マウス肥満細胞により発現される免疫受容体 gp49B1 もまた、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、細胞活性化シグナルを下方制御し、一对の ITIM モチーフを含むことが知られている。gp49B1 はヒト KIR と高度の相同性を有する (Katz et al., Cell Biology, 93: 10809-10814, 1996)。マウス NK 細胞はまた、免疫受容体の一つのファミリーである Ly49 ファミリーを発現し、これは ITIM モチーフを含み、ヒト KIR と類似の態様で機能する。しかし Ly49 免疫受容体はヒト KIR と構造的相同性は有さず、細胞外 C 型レクチンドメインを含み、これにより、レクチンの分子スーパーファミリーのメンバーとなっている (Lanier et al., Immunology Today 17:86-91, 1996 参照)。

【0090】

10

明らかに、対立するキナーゼおよびホスファターゼにより媒介される免疫系の活性化シグナルおよび抑制性シグナルは、免疫系においてバランスを維持するのに非常に重要である。活性化シグナルが優勢な系は、自己免疫および炎症をもたらす。抑制性シグナルが優勢な免疫系は、感染細胞または癌細胞にチャレンジする能力が低い。新しい活性化または抑制性受容体を単離することは、受容体を介して変換される生体信号 (単数または複数) を研究するのに非常に望ましい。さらに、かかる分子を同定することは、自己免疫、炎症および感染に関連する病的な状態を調節および処置する方法を提供する。

【0091】

例えば、ITIM モチーフを有する細胞表面受容体と相互作用する Ovr110 などのリガンドを、拮抗抗体または可溶化受容体と結合させることは、特定の免疫機能を、抑制された免疫機能と関連する疾患状態において活性化させるために用いることができる。一方、Ovr110 に特異的な拮抗抗体、または Ovr110 受容体の可溶化形態を用いて、Ovr110 と細胞表面受容体との相互作用を遮断し、増大した免疫機能と関連する疾患状態における、特定の免疫機能を低減させることができる。逆に、ITIM モチーフが欠如した受容体は、上記のように結合すると活性化シグナルを伝達するため、抗体および可溶化受容体の効果は、上記の逆となる。

20

【0092】

他の例において、Ovr110 は細胞表面受容体 (ITIM / ITAM モチーフを有していても有していなくてもよい) に結合すると考えられ、T 細胞、B 細胞または他のタイプの細胞を通じて免疫システムに対する阻害効果を有することを示した。Ovr110 抗体はこの阻害効果をブロックして、免疫応答を増強することができた。この増強された免疫応答は、抗腫瘍、抗感染症、抗炎症の処置において有益であり得る。

30

【0093】

逆に、アゴニストである Ovr110 mAb は、免疫応答阻害を誘導する反対の効果をも有する。これは組織移植などの外来組織に対して宿主免疫応答が抑制されることが求められている場合の状況に有益である。

さらなる例において、他の B7 ファミリーメンバーとの比較に基づいて、Ovr110 は、免疫系の細胞または他の細胞 (腫瘍細胞そのものなど) 上の活性化性受容体 (activating receptor) に結合し、陽性シグナルを送る。この場合において、アンタゴニスト Ovr110 mAb は、受容体活性化をブロックし、アゴニスト Ovr110 mAb は受容体活性化を活性化する。

40

【0094】

このように、自己免疫疾患を診断およびステージ分類する方法は、用いる技術によって制限される。したがって、自己免疫疾患を検出する感度の高い分子マーカーおよび細胞マーカーの必要性が存在する。処置方法を最適化するために、臨床的および病理学的なステージ分類を含めて自己免疫疾患を正確にステージ分類するための、分子マーカーの必要性が存在する。さらに、緩和後の自己免疫疾患の再発を検出できるマーカーを含む、自己免疫疾患の処置の進行をモニタリングするための感度の高い分子マーカーおよび細胞マーカーの必要性が存在する。

【0095】

50

本発明は、従来の治療法の制限を克服し、また以下の詳細な記載から明らかであるさらなる利点を提供する、自己免疫疾患を処置するための代替方法を提供する。

本発明はまた、腫瘍細胞に直接作用することにより、または癌に対する免疫応答を調節することにより、癌を治療する方法を提供する。

【発明の概要】

【0096】

本発明は、単離された抗体、またはその抗原結合フラグメントであって、抗体またはその抗原結合フラグメントが、Ovr110との結合において参照抗体と競合し、配列番号2、12、22、32および42からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および配列番号7、17、27、37および47からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、前記抗体またはその抗原結合フラグメントに関する。さらに抗体は、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である。

10

【0097】

本発明はさらに、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであって、CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域およびCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変領域を含み、ここで、軽鎖可変領域CDR1配列が、配列番号3、13、23、33および43、ならびにそれらの保存的改変からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域CDR1配列が、配列番号8、18、28、38および48、ならびにそれらの保存的改変からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域CDR2配列が、配列番号4、14、24、34および44、ならびにそれらの保存的改変からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域CDR2配列が、配列番号9、19、29、39および49、ならびにそれらの保存的改変からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域CDR3配列が、配列番号5、15、25、35および45、ならびにそれらの保存的改変からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域CDR3配列が、配列番号10、20、30、40および50、ならびにそれらの保存的改変からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、上記の抗体またはその抗原結合フラグメントに関し、該抗体はOvr110に結合する。

20

【0098】

本発明は、結合した抗体にも関する。これらは、増殖阻害剤または細胞傷害剤に結合してもよい。細胞傷害剤が、毒素、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素からなる群から選択されてもよい。毒素の例として、メイタンシン(maytansin)、メイタンシノイド類(maytansinoids)、サポリン(saporin)、ゲロニン(gelonin)、リシンまたはカリケアマイシン(calicheamicin)が挙げられるが、これらには限定されない。

30

哺乳動物細胞は癌細胞であってもよい。好ましくは、抗Ovr110モノクローナル抗体は、in vivoでOvr110発現癌細胞の増殖を阻害する。哺乳動物細胞はまた、正常細胞であってもよい。

【0099】

抗体は、細菌または哺乳動物細胞中で（または植物、酵母に限定されない他の生物によって）産生されてよい。好ましくは、癌は、卵巣癌、膵臓癌、子宮内膜癌、肺癌および乳癌からなる群から選ばれる。本発明はまた、適切な細胞を培養し、抗体を該細胞培養物から回収することを含む、抗体を産生する方法に関する。

40

本発明はまた、該抗体および担体を含む組成物に関する。

該抗体は、細胞傷害剤に結合してもよい。細胞傷害剤は放射性同位体または他の化学療法薬であり得る。

【0100】

本発明はまた、Ovr110発現癌細胞を死滅させる方法であって、本発明の抗体と該癌細胞を接触させ、これにより該癌細胞を死滅させることを含む、前記方法に関する。癌細胞は、頭頸部癌、卵巣癌、膵臓癌、肺癌、および乳癌からなる群から選択されてよい。

卵巣癌または乳癌は、卵巣漿液性腺癌または乳房浸潤性乳管癌または転移性癌であって

50

もよい。乳癌は、HER-2陰性乳癌であってもよい。本発明はまた、哺乳動物におけるOvr110発現癌を緩和する方法であって、該抗体の治療的に有効な量を該哺乳動物に投与することを含む、前記方法に関する。

【0101】

さらに、本発明は、容器およびその中に収容された組成物を含む製品であって、該組成物が本明細書に記載した抗体を含む、前記製品に関する。この製品はまた、追加の要素、例えば、組成物が、卵巣癌、膵臓癌、子宮内膜癌、肺癌または乳癌を処置するために用いることができることを示す添付文書を含んでもよい。

【0102】

本発明はまた、負のシグナル伝達免疫細胞Ovr110受容体のシグナル伝達を調節する方法であって、Ovr110を請求項3に記載の抗体に結合させ、これにより免疫機能の抑制を低減させることを含む、前記方法に関する。

10

【0103】

さらに、本発明は、免疫反応を調節する方法であって、Ovr110を請求項3に記載の抗体に結合させ、これにより抑制された免疫機能を低減させることを含む、前記方法に関する。調節は免疫反応の増加または免疫反応の抑制の減少であり得る。該免疫反応は、癌細胞を対象にし得る。癌細胞は、頭頸部癌、卵巣癌、膵臓癌、肺癌、子宮内膜癌、および乳癌からなる群から選択され得る。免疫反応は、腫瘍を取り囲むリンパ球数の増加、腫瘍におけるリンパ球の浸潤(infiltration)の増加、またはT細胞、B細胞、NK細胞および他の免疫細胞タイプを含むリンパ球の活性化の増大であってもよい。

20

【0104】

本発明はまた、リンパ球の活性化を増大させる方法であって、Ovr110を抗-Ovr110抗体に結合させ、これにより抑制された免疫機能を低減させることを含む前記方法に関する。リンパ球は、T細胞リンパ球であり得る。

本発明はまた、腫瘍細胞への抗体の結合によって、腫瘍細胞を死滅または阻害する方法に関してもよい。

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】図1は、生きたヒト腫瘍細胞の表面への抗Ovr110抗体の結合を示す免疫蛍光染色である。

30

【図2】図2は、生きたヒト腫瘍細胞による抗Ovr110抗体の取り込みを示す免疫蛍光染色である。

【発明を実施するための形態】

【0106】

定義および一般技術

本明細書中で用いるヒト「Ovr110」とは、細胞表面上に糖タンパク質として発現される、282個のアミノ酸のタンパク質を意味し、Ovr110のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、例えば、WO 00/12758、癌特異的遺伝子(CSG)Ovr110; WO 99/63088、膜結合タンパク質PRO1291; WO00/36107、ヒト卵巣癌抗原; WO 02/02624-A2、ヒトB7様タンパク質(B7-L)などに開示されており、これらの開示はここに参照として明示的に組み込まれる。Ovr110タンパク質は分泌シグナルペプチドを含むため、アミノ酸30~282は、細胞表面のネイティブの成熟タンパク質上に存在する。本明細書中で用いるOvr110には、Ovr110生物学的活性を有するタンパク質の対立遺伝子多型および保存的置換変異体も含まれる。

40

【0107】

Ovr110は文献において、B7x、B7H4、B7S1、B7-H4またはB7h.5として知られている。NCBIのRefSeqデータベースでは、登録番号NM_024626を「T細胞活性化阻害剤1(VTCN1)を含むホモサピエンスVセットドメイン、mRNA」として注記している。このヌクレオチドおよびコードされたタンパク質NP_078902.1には、以下の概要が与えられている：

50

B7H4は、共刺激性タンパク質のB7ファミリー（CD80；NIM 112203参照）に属する。これらのタンパク質は、抗原提示細胞の表面上に発現され、Tリンパ球上のリガンド（例えば、CD28；NIM 186760）と相互作用する。（OMIMにより供給）。

【0108】

Ovr110について検討している文献のリストを下記に示す；これらの開示はここに参照として組み込まれる。

【表1】

Chen Y, Yang C, Xie Z, Zou L, Ruan Z, Zhang X, Tang Y, Fei L, Jia Z, Wu Y. Expression of the novel co-stimulatory molecule B7-H4 by renal tubular epithelial cells. Kidney Int. 2006 Oct 18 [Epub]	10
Ou D, Wang X, Metzger DL, Ao Z, Pozzilli P, James RF, Chen L, Warnock GL. Suppression of human T-cell responses to beta-cells by activation of B7-H4 pathway. Cell Transplant. 2006;15(5):399-410.	
Suh WK, Wang S, Duncan GS, Miyazaki Y, Cates E, Walker T, Gajewska BU, Deenick E, Dawicki W, Okada H, Wakeham A, Itie A, Watts TH, Ohashi PS, Jordana M, Yoshida H, Mak TW. Generation and characterization of B7-H4/B7S1/B7x-deficient mice. Mol Cell Biol. 2006 Sep;26(17):6403-11.	
Krambeck AE, Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Park ES, Kuntz SM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Kwon ED. B7-H4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature: associations with cancer progression and survival. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jul 5;103(27):10391-6. Epub 2006 Jun 23.	
Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H, Chen L, Zou W. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through iL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. J Immunol. 2006 Jul 1;177(1):40-4.	20
Sun Y, Wang Y, Zhao J, Gu M, Giscombe R, Lefvert AK, Wang X. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer. 2006 Aug;53(2):143-51. Epub 2006 Jun 19.	
Bignotti E, Tassi RA, Calza S, Ravaggi A, Romani C, Rossi E, Falchetti M, Odicino FE, Pecorelli S, Santin AD. Differential gene expression profiles between tumor biopsies and short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: Identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy. Gynecol Oncol. 2006 Nov;103(2):405-16. Epub 2006 May 24.	
Mao YX, Chen YJ, Ge Y, Ma HB, Yu JF, Wu HY, Hu YM, Wang Q, Shi Q, Zhang XG. Recombinant human B7-H4 expressed in Escherichia coli inhibits T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion in vitro. Acta Pharmacol Sin. 2006 Jun;27(6):741-6.	
Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, Brumlik M, Cheng P, Curiel T, Myers L, Lackner A, Alvarez X, Ochoa A, Chen L, Zou W. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. J Exp Med. 2006 Apr 17;203(4):871-81. Epub 2006 Apr 10.	30
Simon I, Zhuo S, Corral L, Diamandis EP, Sarno MJ, Wolfert RL, Kim NW. B7-h4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for ovarian cancer.	

【表 2】

Cancer Res. 2006 Feb 1;66(3):1570-5.	
Tringler B, Liu W, Corral L, Torkko KC, Enomoto T, Davidson S, Lucia MS, Heinz DE, Papkoff J, Shroyer KR. B7-H4 overexpression in ovarian tumors. Gynecol Oncol. 2006 Jan;100(1):44-52.	
Ichikawa M, Chen L. Role of B7-H1 and B7-H4 molecules in down-regulating effector phase of T-cell immunity: novel cancer escaping mechanisms. Front Biosci. 2005 Sep 1;10:2856-60.	
Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. Genome Biol. 2005;6(6):223. Epub 2005 May 31.	10
Salceda S, Tang T, Kmet M, Munteanu A, Ghosh M, Macina R, Liu W, Pilkington G, Papkoff J. The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation. Exp Cell Res. 2005 May 15;306(1):128-41.	
Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. Annu Rev Immunol. 2005;23:515-48. Review.	
Tringler B, Zhuo S, Pilkington G, Torkko KC, Singh M, Lucia MS, Heinz DE, Papkoff J, Shroyer KR. B7-h4 is highly expressed in ductal and lobular breast cancer. Clin Cancer Res. 2005 Mar 1;11(5):1842-8.	
Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG, Hurchla MA, Lindsley RC, Hildner K, Scheu S, Pfeffer K, Ware CF, Murphy TL, Murphy KM. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. Nat Immunol. 2005 Jan;6(1):90-8. Epub 2004 Nov 28.	20
Loke P, Allison JP. Emerging mechanisms of immune regulation: the extended B7 family and regulatory T cells. Arthritis Res Ther. 2004;6(5):208-14. Epub 2004 Aug 5. Review.	
Wang S, Chen L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. Microbes Infect. 2004 Jul;6(8):759-66. Review.	
Choi IH, Zhu G, Sica GL, Strome SE, Chevillat JC, Lau JS, Zhu Y, Flies DB, Tamada K, Chen L. Genomic organization and expression analysis of B7-H4, an immune inhibitory molecule of the B7 family. J Immunol. 2003 Nov 1;171(9):4650-4.	
Carreno BM, Collins M. BTLA: a new inhibitory receptor with a B7-like ligand. Trends Immunol. 2003 Oct;24(10):524-7. Review.	
Prasad DV, Richards S, Mai XM, Dong C. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. Immunity. 2003 Jun;18(6):863-73.	30
Sica GL, Choi IH, Zhu G, Tamada K, Wang SD, Tamura H, Chapoval AI, Flies DB, Bajorath J, Chen L. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. Immunity. 2003 Jun;18(6):849-61.	
Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, Yang J, Fallarino F, Loftin SK, Hurchla MA, Zimmerman N, Sim J, Zang X, Murphy TL, Russell JH, Allison JP, Murphy KM. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. Nat Immunol. 2003 Jul;4(7):670-9. Epub 2003 Jun 8.	

【 0 1 0 9 】

3つの独立した出版物の群は、マウスおよびヒトにおけるOvr110を、共刺激分子のT細胞B7ファミリーの新たなメンバー、T細胞の機能の活性化/阻害を非常にしっかりと制御する分子の重要なクラスと同定した(Prasad et al., B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation, Immunity 18:863-73 (2003)、Sica et al., B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity, Immunity 18:849-61 (2003)、およびZang et al., B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation, Proc. Natl Acad. Sci USA 100:10388-92 (2003))。

【 0 1 1 0 】

B7S1マウス遺伝子の、推定されるアミノ酸配列(Prasad 2003)は、本発明者らが以前同定したOvr110分子と高度に相同的であり、ヒトB7-H4/B7x分子の推定される配列(Sica 2003、Zang 2003)はOvr110と同一であった。さらなる出版物は、乳癌(Tringer 2005、Salceda 2005)、卵巣癌(Salceda 2005、Tringer 2006、Simo

10

20

30

40

50

n 2006、Kryczek J Exp Med 2006、Bignotti 2006)、肺癌(Sun 2006)および腎細胞癌(Krambeck 2006、Chen 2006)を含む様々な癌におけるB7-H4の過剰発現を示した。

さらに、機能的研究は、B7-H4と抑制マクロファージ集団との関連(Kryczek J Exp Med 2006)、腫瘍血管新生(Krambeck 2006)およびインターロイキン因子産生およびT細胞の活性化、増殖および腫瘍への浸潤を含む免疫制御(Mao 2006、Kryczek J Immunol 2006)について解明した。

【0111】

本発明者らは以前抗Ovr110抗体を産生し特定し、それはWO 2004/010756、WO 2006/053110およびWO 2006/074418に記載されており、これらは本発明の一部として、参照として本明細書に明示的に組み込まれる。フローサイトメトリーによる間接的な免疫蛍光分析により、さらに、上記の筆者らによって記載されているように、本発明者らのOvr110モノクローナル抗体が活性化したTリンパ球集団および腫瘍細胞へ結合することを確認した。以前および本明細書に記載された、本発明のこれらの抗体は、Ovr110に特異的に結合し、それらが、活性化、増殖および腫瘍浸潤などのT細胞(および他の免疫細胞)制御、免疫学的監視の回避(免疫応答の抑制)、インターロイキン因子(IL-2、IL-6、IL-10、IL-x)産生、腫瘍血管新生およびベータ細胞活性化を含む、B7-H4の機能を調節するための理想的な治療の候補となる特性を実証する。

10

【0112】

さらに、本発明の抗体は、乳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、肺癌、膵臓癌、腎細胞癌および頭頸部癌を患った人々への治療剤として有用である。該抗体は、Ovr110発現癌細胞を死滅すること、Ovr110発現腫瘍の増殖を阻害すること、Ovr110発現腫瘍を退縮させること、Ovr110発現腫瘍を有する個体の生存時間を延長すること、Ovr110発現腫瘍の転移を減少させること、Ovr110発現腫瘍に対する免疫応答を誘導すること、Ovr110発現細胞に対する免疫応答阻害を減少することまたはOvr110発現細胞の血管形成または血管新生を減少することにより、治療的效果を有し得る。

20

【0113】

本明細書において用語「抗体」(Ab)とは、それが所望の生物学的活性を示す限りにおいて、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性(multispecific)抗体(例えば二重特異性抗体)、および抗体フラグメントを含む。用語「免疫グロブリン」(Ig)は、本明細書中では、「抗体」と同義的に用いる。

30

【0114】

「単離された抗体」は、その天然の環境の成分から同定、分離および/または回収されたものである。その天然の環境の混入成分は、抗体の診断的または治療的使用を妨げる物質であり、酵素、ホルモンおよび他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含み得る。好ましくは、抗体を、(1)ローリー法により決定される抗体の重量によって95%より高くまで、および最も好ましくは99%より高くまで精製するか、(2)回転カップ配列決定装置(spinning cup sequenator)を用いることにより、N末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15個の残基を得るのに十分な程度に精製するか、または(3)SDS-PAGEにより、還元性の条件もしくは非還元性の条件の下で、クマシーブルーもしくは好ましくは銀染色を用いて、均質に精製する。単離された抗体は、in situで組換え細胞内にある抗体を含む。なぜならば、その抗体の天然の環境のうちの少なくとも1種類の成分が存在しないためである。しかし、通常、単離された抗体は、少なくとも1つの精製ステップにより調製される。

40

【0115】

基本的な4鎖の抗体単位は、2つの同一の軽(L)鎖、および2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である(IgM抗体は、5つの基本のヘテロ四量体単位と、J鎖と呼ばれる追加のポリペプチドとからなり、したがって、10個の抗原結合部位を含み、一方分泌されたIgA抗体は、重合して、2~5個の基本の4鎖単位とJ鎖とを含む多価集合体を形成することができる)。

50

【 0 1 1 6 】

I g G の場合において、4鎖単位は、一般的に、約150,000ダルトンである。各々のL鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によりH鎖に結合しており、一方2つのH鎖は、H鎖アイソタイプに依存して、1つまたは2つ以上のジスルフィド結合により互いに結合している。各々のH鎖およびL鎖はまた、規則的に離間した鎖内ジスルフィド架橋を有する。各H鎖は、N末端において、可変領域(VH)を有し、続いて、および鎖の各々について3つの定常領域(CH)ならびに[LおよびFアイソタイプについて4つのCH領域を有する。各6L鎖は、N末端において可変領域(VL)、続いてその他方の末端において定常領域(CL)を有する。

【 0 1 1 7 】

VLはVHと共に整列し、CLは、重鎖の第1の定常領域(CH1)と共に整列する。特定の amino 酸残基は、軽鎖可変領域と重鎖可変領域の間で界面を形成すると考えられている。VHとVLとの対形成により、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造および特性については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Teff and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton and Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6を参照されたい。

【 0 1 1 8 】

すべての脊椎動物種由来のL鎖は、これらの定常領域の amino 酸配列に基づいて、カッパおよびラムダと呼ばれる2つの明確に識別できる種類の1つに割り当てることができる。これらの重鎖(CH)の定常領域の amino 酸配列に依存して、免疫グロブリンを、異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てることができる。免疫グロブリンの5つのクラス：I g A、I g D、I g E、I g GおよびI g Mがあり、それぞれ、およびμと示される重鎖を有する。およびクラスは、さらに、C_Hの配列および機能における比較的主要でない差異に基づいてサブクラスに分けられ、例えばヒトは、以下のサブクラスを発現する：I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1およびI g A 2。

【 0 1 1 9 】

用語「可変」とは、可変領域の一定のセグメントが、抗体間で配列が大きく異なるという事実を意味する。V領域は抗原結合を媒介し、ある特定の抗体の特定の抗原への特異性を規定する。しかし、可変性は、可変領域の1~10個の amino 酸範囲にわたって均一に分散されてはいない。その代わりに、V領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる15~30個の amino 酸の比較的不变の伸長物からなり、これは、「超可変領域」と呼ばれる各々が9~12 amino 酸長の極めて可変性の高いより短い領域により分離されている。ネイティブの重鎖および軽鎖の可変領域は、各々4つのFRを含み、主としてPシート立体配置を採り、3つの超可変領域により結合されており、この領域は、Pシート構造に結合するループを形成し、そしてある場合はPシート構造の一部を形成する。

【 0 1 2 0 】

各々の鎖における超可変領域は、FRによりまとめて密接に保持され、他方の鎖からの超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)参照)。定常領域は、抗体の抗原への結合には直接関与しないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体の抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)への関与を示す。

【 0 1 2 1 】

用語「超可変領域」とは、本明細書中で用いる場合、抗体の抗原結合に関与する amino 酸残基を意味する。超可変領域は一般に、「相補性決定領域」または「CDR」からの amino 酸残基(例えば、VL中のおよその残基24~34(L1)、5056(L2)および89~97(L3)の周囲、ならびにVH中のおよそ1~35(H1)、50~65(H2)および95~102(113)の周囲; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))および/または「超可変ループ」(例えば、VL中の残

10

20

30

40

50

基 26 ~ 32 (L 1)、50 ~ 52 (L 2) および 91 ~ 96 (U)、ならびに V H 中の 26 ~ 32 (H 1)、53 ~ 55 (1 - 1 2) および 96 ~ 101 (H 3) ; Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) からの残基を含む。

【 0 1 2 2 】

本明細書中で用いる場合、用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る天然に存在する可能性のある突然変異体を除いて、同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原性部位に指向される。さらに、異なる決定因子（エピトープ）に対して指向される異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各々のモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定因子に指向される。これらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、これらが、他の抗体が混入することなく合成され得るという点で、有利である。

10

【 0 1 2 3 】

修飾語句「モノクローナル」は、特定の方法による抗体の産生を必要とすることと解釈すべきではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ方法により調製しても、または細菌性、真核生物動物もしくは植物細胞における組換えDNA方法を用いて作製してもよい（例えば米国特許第4,816,567号参照）。「モノクローナル抗体」は、また、ファージ抗体ライブラリから、例えばClackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)に記載されている手法を用いて単離してもよい。

20

【 0 1 2 4 】

本明細書中のモノクローナル抗体は、これらが所望の生物学的活性を示す限りにおいて「キメラ」抗体ならびにそのフラグメントを含み、該「キメラ」抗体とは、その重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同的であり、一方、残りの1または2以上の鎖が、他の種に由来するかまたは他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同的であるものである（米国特許第4,816,567号；およびMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)参照）。本明細書において重要なキメラ抗体は、非ヒト霊長類（例えば旧世界ザル、類人猿など）に由来する可変領域抗原結合配列およびヒト定常領域配列を含む「霊長類化 (primatized)」抗体を含む。

30

【 0 1 2 5 】

「完全な」抗体は、抗原結合部位、ならびにC L、ならびに少なくとも重鎖定常領域、C H I、C H 2 および C H 3 を含むものである。定常領域は、ネイティブ配列定常領域（例えばヒトネイティブ配列定常領域）であっても、そのアミノ酸配列変異体であってもよい。好ましくは、完全な抗体は、1つまたは2つ以上のエフェクター機能を有する。

【 0 1 2 6 】

「抗体フラグメント」は、完全な抗体の一部、好ましくは完全な抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体フラグメントの例には、F a b、F a b'、F (a b') 2 および F v フラグメント；ダイアボディー (diabody)；直鎖状抗体（米国特許第5,641,870号、Example 2；Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]参照）；一本鎖抗体分子；ならびに抗体フラグメントから形成される多重得意性抗体が含まれる。抗体のパイン消化により、「F a b」フラグメントと呼ばれる2つの同一の抗原結合フラグメント、および残りの「F c」フラグメントが生じ、表示は、容易に結晶化する能力を反映している。F a b フラグメントは、L鎖全体、ならびにH鎖の可変領域ドメイン (V H) および1つの重鎖の第1定常領域 (C H I) からなる。

40

【 0 1 2 7 】

各々の F a b フラグメントは、抗原結合に関して1価である。すなわち、各々の F a b フラグメントは、単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理により1つの大きい

50

F (a b ') 2 フラグメントが得られ、これは、ジスルフィド架橋された 2 つの F a b フラグメントにほぼ相当し、2 価の抗原結合活性を有し、なお抗原を架橋することができる。F a b ' フラグメントは、抗体ヒンジ領域からの 1 つまたは 2 つ以上のシステインを含む追加のいくつかの残基を C H I 領域のカルボキシ末端において有することにより、F a b フラグメントとは異なる。F a b ' - S H は、定常領域の 1 または 2 以上のシステイン残基が遊離のチオール基を有する F a b ' についての、本明細書中での表示である。F (a b ') 2 抗体フラグメントは、もともとはこれらの間にヒンジのシステインを有する 8 つの F a b ' フラグメントの対として産生された。抗体フラグメントの他の化学的結合も知られている。

【 0 1 2 8 】

F c フラグメントは、両方の H 鎖がジスルフィドによりまとめて保持されたカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、F c 領域における配列により決定され、この領域はまた、ある種の細胞上に見出される F c 受容体 (F c R) により認識される部分である。

【 0 1 2 9 】

「 F v 」は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。このフラグメントは、密接な非共有結合における、1 つの重鎖および 1 つの軽鎖の可変領域ドメインの二量体からなる。これらの 2 つの領域の折り畳みから、6 つの超可変ループ (H および L 鎖からそれぞれ 3 つのループ) が発出し、これらは、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変領域 (または抗原に特異的な C D R を 3 つのみ含む F v の半分) ですら、抗原を認識し結合する能力を有するが、完全な結合部位よりも低い親和性においてである。

【 0 1 3 0 】

「単鎖 F v 」は、「 s F v 」または「 s c F v 」とも略記され、これは単一のポリペプチド鎖に結合した V H および V L 抗体領域を含む抗体フラグメントである。好ましくは、s F v ポリペプチドは、さらに V H および V L 領域の間にポリペプチドリンカーを含み、これによって、s F v は、抗原結合のための所望の構造を形成することができる。s F v の概説については、以下を参照のこと : Pluckthun による The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995、下記。

【 0 1 3 1 】

用語「ダイアボディー」とは、小さい抗体フラグメントを意味し、これは、V ドメインの鎖内ではなく鎖間に対形成がもたらされ、これによって 2 価のフラグメント、すなわち 2 つの抗原結合部位を有するフラグメントが得られるように、V H および V L 領域の間に短いリンカー (約 5 ~ 1 0 残基) を有する s F v フラグメント (前の段落参照) を構築することにより調製される。二重特異性ダイアボディーは、2 つの「クロスオーバー」 s F v フラグメントのヘテロ二量体であり、ここで、2 つの抗体の V H および V L 領域は、異なるポリペプチド鎖に存在する。ダイアボディーは、例えば EP 404,097; WO 93/11161; および Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) において、より完全に説明され、該開示は参照により、本明細書に明示的に組み込まれる。

【 0 1 3 2 】

「ネイティブ配列」のポリペプチドは、天然のものに由来するポリペプチド (例えば抗体) と同一のアミノ酸配列を有するものである。このようなネイティブ配列のポリペプチドは、天然のものから単離しても、または組換えもしくは合成手段により産生してもよい。したがって、ネイティブ配列のポリペプチドは、天然に存在するヒトポリペプチド、マウスポリペプチドまたは任意の他の哺乳動物種からのポリペプチドのアミノ酸配列を有してもよい。

【 0 1 3 3 】

用語「アミノ酸配列変異体」とは、ある程度にネイティブ配列のポリペプチドと異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。通常、O v r 1 1 0 のアミノ酸配列変異

10

20

30

40

50

体は、ネイティブ配列のOvr110と少なくとも約70%の相同性、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約85%、さらにより好ましくは少なくとも約90%の相同性、および最も好ましくは少なくとも約95%の相同性を有する。アミノ酸配列変異体は、ネイティブのアミノ酸配列のアミノ酸配列内のある位置において、置換、欠失および/または挿入を有し得る。

【0134】

代替的な転写スプライシングから産生されるOvr110の変異体の例は、WO 2004/053079中のOvr110v1およびdv-B7-H4 (Genebank登録番号DQ103575および上記Sun et al.)を含み、該開示は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる。本発明の抗体は上記で論じた治療的活性を、これらのOvr110変異体に対しても有する。

10

【0135】

語句、抗体の「機能的フラグメントまたは類似体」とは、全長抗体と共通する定性的生物学的活性を有する化合物である。例えば、抗IgE抗体の機能的フラグメントまたは類似体は、高親和性の受容体であるFcRIに結合するIgE免疫グロブリン分子の能力を有することを防止または実質的に低減するような様式で、IgE免疫グロブリンに結合することができるものである。

【0136】

「相同性」とは、最大のパーセンテージの相同性を達成するために、配列をアラインメントさせ、所要に応じて間隙を導入した後に同一である、アミノ酸配列変異体中の残基のパーセンテージとして定義される。アラインメントのための方法およびコンピュータプログラムは、当該分野において十分知られている。配列の類似性を、任意の一般的な配列分析アルゴリズム、例えばGAPまたはBESTFITまたは他の変法のSmith-Watermanアラインメントにより測定してもよい。T. F. Smith and M. S. Waterman, J. Mol. Biol. 147:195-197 (1981) およびW.R. Pearson, Genomics 11:635-650 (1991)を参照のこと。

20

【0137】

非ヒト(例えば、げっ歯動物)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト抗体由来の最小の配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの部分について、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の抗体特異性、親和性および能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)、例えばマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類の、超可変領域からの残基により置換されている、ヒト免疫グロブリン(受容体抗体)である。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基により置換されている。

30

【0138】

さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体中またはドナー抗体中に見出されない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能をさらに精巧にするために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変領域の実質的にすべてを含み、ここで、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてとは、非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、FRのすべてまたは実質的にすべてとは、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、任意にまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部を含む。さらなる詳細については、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照されたい。

40

【0139】

本明細書中において、「内部移行する」抗Ovr110抗体は、哺乳動物細胞上でOvr110(すなわち細胞表面Ovr110)に結合すると、細胞により取り込まれる(すなわち進入する)ものである。内部移行する抗体は、当然、抗体フラグメント、ヒトまたはヒト化抗体および抗体結合体を含む。治療的用途のために、in vivoでの内部移行が意図される。

50

【0140】

内部移行する抗体分子の数は、O v r 1 1 0 発現細胞、特にO v r 1 1 0 発現癌細胞を死滅させるのに十分または適切な数である。抗体または抗体結合体の効能に依存して、いくつかの例において、単一の抗体分子の細胞中への取り込みは、該抗体が結合する標的細胞を死滅させるのに十分である。例えば、ある毒素は、殺傷能力が高いので、抗体に結合した毒素の1分子の内部移行が、腫瘍細胞を死滅させるのに十分である。

【0141】

抗O v r 1 1 0 抗体が、哺乳動物細胞上のO v r 1 1 0 に結合する際に内部移行するかどうかは、以下の実験例において記載するものを含むさまざまなアッセイにより決定することができる。例えば、*in vivo*での内部移行を試験するために、試験抗体を標識し、ある細胞の表面上でO v r 1 1 0 を発現することが知られている動物中に導入する。この抗体を、放射性標識するかまたは、例えば蛍光または金粒子で標識することができる。

このアッセイに適する動物には、哺乳動物、例えばヒトO v r 1 1 0 発現腫瘍移植または異種移植を含むヌードマウスまたはS C I Dマウス、またはヒトO v r 1 1 0 をトランスフェクトした細胞が導入されたマウス、またはヒトO v r 1 1 0 導入遺伝子を発現する遺伝子組換えマウスが含まれる。

【0142】

適切なコントロールには、試験抗体が投与されていないかまたは関連しない抗体が投与された動物、および目的の細胞上の他の抗原に対する抗体（この抗体は抗原に結合すると内部移行することが知られている）が投与された動物が含まれる。抗体を、動物に、例えば静脈内注射または腹腔内注射により投与することができる。好適な時間間隔において、この動物からの腫瘍または組織切片を、既知の方法を用いて、または以下の実験例中に記載したように調製し、光学顕微鏡または電子顕微鏡により、結合および内部移行、および細胞中の内部移行した抗体の位置について分析することができる。PETなどの、生きている動物のイメージング方法もまた腫瘍に対する抗体の一特定を実施するのに用いることができる。

【0143】

*in vitro*での内部移行について、細胞を、組織培養皿中で、培養培地に加えられた関連する抗体の存在または非存在下においてインキュベートし、所望の時点において顕微鏡分析のために加工することができる。細胞中の内部移行した標識抗体の存在を、顕微鏡により、または放射性標識した抗体を用いる場合にはオートラジオグラフィにより、直接的に視覚化することができる。代替的に、定量的な生化学的アッセイにおいて、O v r 1 1 0 発現細胞を含む細胞の集団を、*in vitro*または*in vivo*で放射性標識した試験抗体と接触させ、細胞（*in vivo*で接触させた場合には、次に、好適な時間の後に細胞を単離する）を、プロテアーゼで処理するか、またはこれに酸洗浄を施して、細胞表面上の内部移行していない抗体を除去する。

【0144】

細胞を粉砕し、細胞の各々のバッチに付随するプロテアーゼ耐性の1分当たりの放射線計測値（cpm）の値を、ホモジネートをシンチレーションカウンターに通過させることにより測定する。放射性標識抗体の既知の特定の活性に基づいて、細胞あたり内部移行した抗体分子の数を、粉砕した細胞のシンチレーションカウントから推定することができる。細胞を*in vitro*で、好ましくは溶液形態で、例えば、細胞を培養皿またはフラスコ中の細胞培養培地に加え、抗体を培地と十分に混合して、抗体に対する細胞の均一な曝露を確実にすることにより、抗体と「接触」させる。培養培地に加える代わりに、細胞を試験抗体とを試験管内のPBSなどの等張性溶液中で所望の時間にわたり接触させることができる。患者に投与された際には、細胞は抗体と*in vivo*で試験抗体を投与する任意の好適な方法、例えば以下に記載する投与方法により接触させられる。

【0145】

*in vivo*でO v r 1 1 0 発現細胞に結合した際の抗体の内部移行の速度が速くなるにしたがって、例えば細胞傷害性免疫結合体による標的O v r 1 1 0 発現細胞に対する所望の

10

20

30

40

50

死滅または増殖阻害効果を、より迅速に達成することができる。好ましくは、抗Ovr110抗体の内部移行動態は、Ovr110発現標的細胞の迅速な死滅に有利なものである。

【0146】

したがって、抗Ovr110抗体は、in vivoで抗体を投与してから好ましくは24時間以内、より好ましくは約12時間以内、さらにより好ましくは約30分～1時間以内、最も好ましくは約30分以内に、内部移行の迅速な速度を示すことが望ましい。本発明は、in vivoまたはin vitroで抗Ovr110抗体を導入した時から約15分もの速さで内部移行する抗体を提供する。抗体は、好ましくは、細胞表面上のOvr110に結合した際に、数時間以内、好ましくは1時間以内、さらにより好ましくは15～30分以内に、細胞中に内部移行する。

10

【0147】

試験抗体が、本発明の抗Ovr110抗体(ATCCに寄託されたハイブリドーマにより産生された抗体を含む)が結合するエピトープと同一のエピトープに結合することについて競合することができるか否かを試験するために、クロスブロッキング(cross-blocking)アッセイ(例えば競合的ELISAアッセイ)を行うことができる。例示的な競合的ELISAアッセイにおいては、Ovr110で被覆したマイクロタイタープレートのウェルまたはOvr110で被覆したセファロースビーズを、候補の競合的抗体と共に、またはこれを伴わずにプレインキュベートし、次にビオチン標識した本発明の抗Ovr110抗体を加える。ウェル中またはビーズ上でOvr110抗原に結合した、標識抗Ovr110抗体の量を、アビジン-ペルオキシダーゼ結合体および適切な基質を用いて測定する。

20

【0148】

あるいは、抗Ovr110抗体を、例えば放射性標識もしくは蛍光標識または幾つかの他の検出可能な標識および測定可能な標識で標識することができる。抗原に結合する標識抗Ovr110抗体の量は、候補の競合的抗体(試験抗体)が、抗原上の同一のエピトープに結合することについて競合する能力に対して逆相関を有する。すなわち、同一のエピトープへの試験抗体の親和性が大きくなるにしたがって、標識した抗Ovr110抗体の抗原被覆ウェルへの結合がより少なくなる。

30

【0149】

候補の競合的抗体の不存在において(しかし、既知の非競合的抗体の存在下であってもよい)平行して行うコントロールと比較して、候補の競合的抗体が、抗Ovr110抗体の結合を少なくとも20%、好ましくは少なくとも20～50%、さらにより好ましくは少なくとも50%遮断することができる場合には、候補の競合的抗体は、本発明の抗Ovr110抗体と同一のエピトープに実質的に結合する抗体であるか、または、これと同一のエピトープに結合することについて競合する抗体であると考えられる。同一の定量的数値データに到達するために、このアッセイの変化を行うことが可能であると理解される。

【0150】

指定された抗体、例えば次のモノクローナル抗体Ovr110.A7.1、Ovr110.A10.1、Ovr110.A13.1、Ovr110.A31.1、Ovr110.A57.1、Ovr110.A72.1(前にOvr110A22.1として同定)、Ovr110.A77.1、Ovr110.A87.1、Ovr110.A89、Ovr110.A99.1、Ovr110.A102.1、Ovr110.A107、Ovr110.C1、Ovr110.C2、Ovr110.C3.2、Ovr110.C4、Ovr110.C5.1、Ovr110.C5.3、Ovr110.C6.3、Ovr110.C7.1、Ovr110.C8、Ovr110.C9.1、Ovr110.C10.1、Ovr110.C11.1、Ovr110.C12.1、

40

【0151】

Ovr110.C13、Ovr110.C14、Ovr110.C15、Ovr110.C16.1、Ovr110.C17.1、Ovr110.D9.1、Ovr110.I1

50

、Ovr110.I2、Ovr110.I3、Ovr110.I4、Ovr110.I6
 、Ovr110.I7、Ovr110.I8、Ovr110.I9、Ovr110.I1
 0、Ovr110.I11、Ovr110.I13、Ovr110.I14、Ovr11
 0.15、Ovr110.I16、Ovr110.I17、Ovr110.I18、Ov
 r110.I20、Ovr110.I21、Ovr110.I22、Ovr110.J1
 、Ovr110.J2、Ovr110.J3、

【0152】

Ovr110.Q1、Ovr110.Q3、Ovr110.Q4、Ovr110.Q5、
 Ovr110.Q6、Ovr110.Q7、Ovr110.Q8、Ovr110.Q9、
 Ovr110.Q10、Ovr110.Q11、Ovr110.Q12、Ovr110. 10
 Q13、Ovr110.Q14、Ovr110.Q15、Ovr110.Q16、Ovr
 110.Q17、Ovr110.Q18、Ovr110.Q19、Ovr110.Q20
 、Ovr110.Q21、Ovr110.Q22、Ovr110.Q23、Ovr110
 .Q24、Ovr110.Q25、Ovr110.Q26およびOvr110.Q27の
 「生物学的特性」を有する抗体は、同一の抗原に結合する他の抗体から区別する、その指
 定抗体の生物学的特徴の、1つまたは2つ以上を有するものであり、

【0153】

Ovr110.A7.1、Ovr110.A10.1、Ovr110.A13.1、Ov
 r110.A31.1、Ovr110.A57.1、Ovr110.A72.1(前にO
 vr110A22.1として同定)、Ovr110.A77.1、Ovr110.A87 20
 .1、Ovr110.A89、Ovr110.A99.1、Ovr110.A102.
 1、Ovr110.A107、Ovr110.C1、Ovr110.C2、Ovr110
 .C3.2、Ovr110.C4、Ovr110.C5.1.、Ovr110.C5.3
 、Ovr110.C6.3、Ovr110.C7.1、Ovr110.C8、Ovr11
 0.C9.1、Ovr110.C10.1、Ovr110.C11.1、Ovr110.
 C12.1、

【0154】

Ovr110.C13、Ovr110.C14、Ovr110.C15、Ovr110.
 C16.1、Ovr110.C17.1、Ovr110.D9.1、Ovr110.I1 30
 、Ovr110.I2、Ovr110.I3、Ovr110.I4、Ovr110.I6
 、Ovr110.I7、Ovr110.I8、Ovr110.I9、Ovr110.I1
 0、Ovr110.I11、Ovr110.I13、Ovr110.I14、Ovr11
 0.15、Ovr110.I16、Ovr110.I17、Ovr110.I18、Ov
 r110.I20、Ovr110.I21、Ovr110.I22、Ovr110.J1
 、Ovr110.J2、Ovr110.J3、

【0155】

Ovr110.Q1、Ovr110.Q3、Ovr110.Q4、Ovr110.Q5、
 Ovr110.Q6、Ovr110.Q7、Ovr110.Q8、Ovr110.Q9、
 Ovr110.Q10、Ovr110.Q11、Ovr110.Q12、Ovr110.
 Q13、Ovr110.Q14、Ovr110.Q15、Ovr110.Q16、Ovr 40
 110.Q17、Ovr110.Q18、Ovr110.Q19、Ovr110.Q20
 、Ovr110.Q21、Ovr110.Q22、Ovr110.Q23、Ovr110
 .Q24、Ovr110.Q25、Ovr110.Q26およびOvr110.Q27は

【0156】

Ovr110.A7.1、Ovr110.A10.1、Ovr110.A13.1、Ov
 r110.A31.1、Ovr110.A57.1、Ovr110.A72.1(前にO
 vr110A22.1として同定)、Ovr110.A77.1、Ovr110.A87
 .1、Ovr110.A89、Ovr110.A99.1、Ovr110.A102.1
 、Ovr110.A107、Ovr110.C1、Ovr110.C2、Ovr110. 50

C 3 . 2、O v r 1 1 0 . C 4、O v r 1 1 0 . C 5 . 1 .、O v r 1 1 0 . C 5 . 3、
O v r 1 1 0 . C 6 . 3、O v r 1 1 0 . C 7 . 1、O v r 1 1 0 . C 8、O v r 1 1 0
. C 9 . 1、O v r 1 1 0 . C 1 0 . 1、O v r 1 1 0 . C 1 1 . 1、O v r 1 1 0 . C
1 2 . 1、

【 0 1 5 7 】

O v r 1 1 0 . C 1 3、O v r 1 1 0 . C 1 4、O v r 1 1 0 . C 1 5、O v r 1 1 0 .
C 1 6 . 1、O v r 1 1 0 . C 1 7 . 1、O v r 1 1 0 . D 9 . 1、O v r 1 1 0 . I 1
、O v r 1 1 0 . I 2、O v r 1 1 0 . I 3、O v r 1 1 0 . I 4、O v r 1 1 0 . I 6
、O v r 1 1 0 . I 7、O v r 1 1 0 . I 8、O v r 1 1 0 . I 9、O v r 1 1 0 . I 1
0、O v r 1 1 0 . I 1 1、O v r 1 1 0 . I 1 3、O v r 1 1 0 . I 1 4、O v r 1 1
0 . 1 5、O v r 1 1 0 . I 1 6、O v r 1 1 0 . I 1 7、O v r 1 1 0 . I 1 8、O v
r 1 1 0 . I 2 0、O v r 1 1 0 . I 2 1、O v r 1 1 0 . I 2 2、O v r 1 1 0 . J 1
、O v r 1 1 0 . J 2、O v r 1 1 0 . J 3、

10

【 0 1 5 8 】

O v r 1 1 0 . Q 1、O v r 1 1 0 . Q 3、O v r 1 1 0 . Q 4、O v r 1 1 0 . Q 5、
O v r 1 1 0 . Q 6、O v r 1 1 0 . Q 7、O v r 1 1 0 . Q 8、O v r 1 1 0 . Q 9、
O v r 1 1 0 . Q 1 0、O v r 1 1 0 . Q 1 1、O v r 1 1 0 . Q 1 2、O v r 1 1 0 .
Q 1 3、O v r 1 1 0 . Q 1 4、O v r 1 1 0 . Q 1 5、O v r 1 1 0 . Q 1 6、O v r
1 1 0 . Q 1 7、O v r 1 1 0 . Q 1 8、O v r 1 1 0 . Q 1 9、O v r 1 1 0 . Q 2 0
、O v r 1 1 0 . Q 2 1、O v r 1 1 0 . Q 2 2、O v r 1 1 0 . Q 2 3、O v r 1 1 0
. Q 2 4、O v r 1 1 0 . Q 2 5、O v r 1 1 0 . Q 2 6およびO v r 1 1 0 . Q 2 7が
結合するものと同じエピトープに結合し、

20

【 0 1 5 9 】

例えば、以下のモノクローナル抗体 O v r 1 1 0 . A 7 . 1、O v r 1 1 0 . A 1 0 . 1
、O v r 1 1 0 . A 1 3 . 1、O v r 1 1 0 . A 3 1 . 1、O v r 1 1 0 . A 5 7 . 1、
O v r 1 1 0 . A 7 2 . 1 (前に O v r 1 1 0 A 2 2 . 1 として同定)、O v r 1 1 0 .
A 7 7 . 1、O v r 1 1 0 . A 8 7 . 1、O v r 1 1 0 . A 8 9、O v r 1 1 0 . A 9 9
. 1、O v r 1 1 0 . A 1 0 2 . 1、O v r 1 1 0 . A 1 0 7、O v r 1 1 0 . C 1、O
v r 1 1 0 . C 2、O v r 1 1 0 . C 3 . 2、O v r 1 1 0 . C 4、O v r 1 1 0 . C 5
. 1 .、O v r 1 1 0 . C 5 . 3、O v r 1 1 0 . C 6 . 3、O v r 1 1 0 . C 7 . 1、
O v r 1 1 0 . C 8、O v r 1 1 0 . C 9 . 1、O v r 1 1 0 . C 1 0 . 1、O v r 1 1
0 . C 1 1 . 1、O v r 1 1 0 . C 1 2 . 1、

30

【 0 1 6 0 】

O v r 1 1 0 . C 1 3、O v r 1 1 0 . C 1 4、O v r 1 1 0 . C 1 5、O v r 1 1 0 .
C 1 6 . 1、O v r 1 1 0 . C 1 7 . 1、O v r 1 1 0 . D 9 . 1、O v r 1 1 0 . I 1
、O v r 1 1 0 . I 2、O v r 1 1 0 . I 3、O v r 1 1 0 . I 4、O v r 1 1 0 . I 6
、O v r 1 1 0 . I 7、O v r 1 1 0 . I 8、O v r 1 1 0 . I 9、O v r 1 1 0 . I 1
0、O v r 1 1 0 . I 1 1、O v r 1 1 0 . I 1 3、O v r 1 1 0 . I 1 4、O v r 1 1
0 . 1 5、O v r 1 1 0 . I 1 6、O v r 1 1 0 . I 1 7、O v r 1 1 0 . I 1 8、O v
r 1 1 0 . I 2 0、O v r 1 1 0 . I 2 1、O v r 1 1 0 . I 2 2、O v r 1 1 0 . J 1
、O v r 1 1 0 . J 2、O v r 1 1 0 . J 3、

40

【 0 1 6 1 】

O v r 1 1 0 . Q 1、O v r 1 1 0 . Q 3、O v r 1 1 0 . Q 4、O v r 1 1 0 . Q 5、
O v r 1 1 0 . Q 6、O v r 1 1 0 . Q 7、O v r 1 1 0 . Q 8、O v r 1 1 0 . Q 9、
O v r 1 1 0 . Q 1 0、O v r 1 1 0 . Q 1 1、O v r 1 1 0 . Q 1 2、O v r 1 1 0 .
Q 1 3、O v r 1 1 0 . Q 1 4、O v r 1 1 0 . Q 1 5、O v r 1 1 0 . Q 1 6、O v r
1 1 0 . Q 1 7、O v r 1 1 0 . Q 1 8、O v r 1 1 0 . Q 1 9、O v r 1 1 0 . Q 2 0
、O v r 1 1 0 . Q 2 1、O v r 1 1 0 . Q 2 2、O v r 1 1 0 . Q 2 3、O v r 1 1 0
. Q 2 4、O v r 1 1 0 . Q 2 5、O v r 1 1 0 . Q 2 6およびO v r 1 1 0 . Q 2 7の
、O v r 1 1 0 への結合について競合するか、またはO v r 1 1 0 への結合を遮断し、in

50

*vivo*でOvr110発現腫瘍細胞を標的化することができ、*in vivo*で哺乳動物細胞上のOvr110に結合して内部移行することができる。

【0162】

同様に、Ovr110.A7.1、Ovr110.A10.1、Ovr110.A13.1、Ovr110.A31.1、Ovr110.A57.1、Ovr110.A72.1(前にOvr110A22.1として同定)、Ovr110.A77.1、Ovr110.A87.1、Ovr110.A89、Ovr110.A99.1、Ovr110.A102.1、Ovr110.A107、Ovr110.C1、Ovr110.C2、Ovr110.C3.2、Ovr110.C4、Ovr110.C5.1、Ovr110.C5.3、Ovr110.C6.3、Ovr110.C7.1、Ovr110.C8、Ovr110.C9.1、Ovr110.C10.1、Ovr110.C11.1、Ovr110.C12.1、

10

【0163】

Ovr110.C13、Ovr110.C14、Ovr110.C15、Ovr110.C16.1、Ovr110.C17.1、Ovr110.D9.1、Ovr110.I1、Ovr110.I2、Ovr110.I3、Ovr110.I4、Ovr110.I6、Ovr110.I7、Ovr110.I8、Ovr110.I9、Ovr110.I10、Ovr110.I11、Ovr110.I13、Ovr110.I14、Ovr110.I15、Ovr110.I16、Ovr110.I17、Ovr110.I18、Ovr110.I20、Ovr110.I21、Ovr110.I22、Ovr110.J1、Ovr110.J2、Ovr110.J3、

20

【0164】

Ovr110.Q1、Ovr110.Q3、Ovr110.Q4、Ovr110.Q5、Ovr110.Q6、Ovr110.Q7、Ovr110.Q8、Ovr110.Q9、Ovr110.Q10、Ovr110.Q11、Ovr110.Q12、Ovr110.Q13、Ovr110.Q14、Ovr110.Q15、Ovr110.Q16、Ovr110.Q17、Ovr110.Q18、Ovr110.Q19、Ovr110.Q20、Ovr110.Q21、Ovr110.Q22、Ovr110.Q23、Ovr110.Q24、Ovr110.Q25、Ovr110.Q26およびOvr110.Q27抗体の生物学的特性を有する抗体は、前記抗体と同じエピトープ結合、標的化、内部移行、腫瘍増殖阻害および細胞傷害性の特性を有する。

30

【0165】

用語「アンタゴニスト」抗体とは、最も広い意味で用いられ、本明細書中に開示されるネイティブのOvr110タンパク質の生物学的活性を、部分的、または完全に、遮断、阻害または中和する抗体を含む。Ovr110ポリペプチドのアンタゴニストを同定するための方法は、Ovr110ポリペプチドまたはOvr110を細胞表面上で発現する細胞を、候補のアンタゴニスト抗体と接触させること、および、Ovr110ポリペプチドと通常関連する1または2以上の生物学的活性の検出可能な変化を測定することを含んでもよい。アゴニスト抗体は、Ovr110の機能を増強、活性化または促進する抗体を含む。

40

【0166】

「Ovr110を発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する抗体」または「増殖阻害」抗体は、*in vitro*または*in vivo*で、Ovr110を発現するかまたは過剰発現する癌細胞に結合して、測定可能な増殖阻害をもたらすものである。好ましい増殖阻害抗Ovr110抗体は、Ovr110発現腫瘍細胞(例えば卵巣癌細胞、膵臓癌細胞、子宮内膜癌細胞、頭頸部癌細胞、腎細胞癌細胞、肺癌細胞および乳癌細胞)の増殖を、適切なコントロールと比較して20%以上、好ましくは約20%~約50%、およびさらにより好ましくは50%以上(例えば約50%~約100%)阻害し、該コントロールは、典型的には、試験する抗体で処置していない腫瘍細胞である。

【0167】

50

増殖阻害を、細胞培養物中の約 $0.1 \sim 30 \text{ pg/mL}$ または約 $0.5 \text{ nM} \sim 200 \text{ nM}$ の抗体濃度で測定することができ、ここで、増殖阻害は、腫瘍細胞を抗体に曝露した $1 \sim 10$ 日後に決定される。in vivoでの腫瘍細胞の増殖阻害は、下記の実験例の章において記載するように、さまざまな方法で決定することができる。抗Ovr110抗体を、約 $1 \text{ pg/体重}1 \text{ kg} \sim$ 約 $100 \text{ mg/体重}1 \text{ kg}$ で投与することにより、腫瘍の大きさまたは腫瘍細胞増殖の減少が、抗体の最初の投与から約5日～3ヶ月以内、好ましくは約5～30日以内にもたらされる場合に、抗体はin vivoで増殖阻害性である。

【0168】

「アポトーシスを誘発する」抗体は、アネキシンVの結合、DNAのフラグメント化、細胞収縮、小胞体の拡大、細胞フラグメント化および/または膜小胞の形成（アポトーシス体と呼ばれる）により決定される、プログラムされた細胞死を誘発する抗体である。細胞は通常Ovr110を過剰発現するものである。好ましくは、細胞は、腫瘍細胞、例えば卵巣細胞、膵臓細胞、肺細胞または乳房細胞である。種々の方法が、アポトーシスに関連する細胞の事象を評価するのに利用可能である。

10

【0169】

例えば、ホスファチジルセリン（PS）転座をアネキシン結合により測定することができ；DNAフラグメント化を、DNAラダリング（laddering）により評価することができ；およびDNAフラグメント化に伴う核/クロマチン縮合を、低二倍体細胞の任意の増大により評価することができる。好ましくは、アポトーシスを誘発する抗体は、アネキシン結合アッセイにおいて、未処理細胞に対して約2～50倍、好ましくは約5～50倍、最も好ましくは約10～50倍のアネキシン結合の誘発をもたらすものである。

20

【0170】

抗体「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（ネイティブ配列のFc領域またはアミノ酸配列変異体Fc領域）に起因する生物学的活性を意味し、抗体アイソタイプにより変化する。抗体エフェクター機能の例には：C1q結合および補体依存性細胞傷害；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介細胞傷害作用（ADCC）；食作用；細胞表面受容体（例えばB細胞受容体）の下方調節；およびB細胞活性化が含まれる。

【0171】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」とは、細胞傷害性細胞（例えばナチュラルキラー（NK）細胞、好中球およびマクロファージ）上に存在するFc受容体（FcR）上に結合した、分泌されたIgが、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原を有する標的細胞に特異的に結合してその後標的細胞を細胞毒で殺傷することを可能にするような、細胞傷害性の形態を意味する。抗体は細胞傷害性細胞を「武装させ（arm）」、このような殺傷に絶対的に必要である。ADCCを媒介するための主な細胞であるNK細胞は、FcRIIのみを発現し、一方単球は、FcRI、FcRIIおよびFcRIIIを発現する。

30

【0172】

造血細胞におけるFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。目的分子のADCC活性を評価するために、in vitro ADCCアッセイ（例えば米国特許第5,500,362号または5,821,337号に記載されているアッセイ）を行ってもよい。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。代替的に、またはさらに、目的の分子のADCC活性を、in vivoで、例えばClynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)に開示されているような動物モデルにおいて評価することができる。

40

【0173】

「Fc受容体」または「FcR」とは、抗体のFc領域に結合する受容体を説明する。好ましいFcRは、ネイティブ配列のヒトFcRである。さらに、好ましいFcRは、IgG抗体（ガンマ受容体）を結合するものであり、FcRI、FcRIIおよびFcRIIIサブクラスの受容体を含み、対立遺伝子多型および代替的にこれらの受容体の

50

スプライシングされた形態を含む。Fc RII受容体には、Fc RIIA（「活性化受容体」）およびFc RII B（「抑制受容体」）が含まれ、これらは、主にこの細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化受容体Fc RII Aは、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ITAM）をその細胞質ドメイン中に含む。

【0174】

抑制受容体Fc RII Bは、免疫受容体チロシンベースの抑制モチーフ（ITIM）を、その細胞質ドメイン中に含む（Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)のreview M.を参照）。Fc Rは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); およびde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126.330-41 (1995)において概説されている。将来同定されるべきものを含む、他のFc Rは、本明細書中の用語「Fc R」により包含される。この用語はまた、母系性のIg Gの胎児への輸送に関連する新生児受容体、Fc Rnを含む（Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)およびKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)）。

10

【0175】

「ヒトエフェクター細胞」は、1つまたは2つ以上のFc Rを発現しエフェクター機能を発揮する白血球である。好ましくは、この細胞は、少なくともFc RIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を発揮する。ADCCを媒介するヒト白血球の例には、末梢血液単核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞および好中球が含まれ；PBMCおよびNK細胞が好ましい。エフェクター細胞を、天然の供給源、例えば血液から単離することができる。

20

【0176】

「補体依存性細胞傷害」または「CDC」とは、補体の存在下での標的細胞の溶解を意味する。古典的補体経路の活性化は、補体系（C1q）の第1の成分の、これらの同族の抗原に結合する（適切なサブクラスの）抗体への結合により開始される。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているCDCアッセイを行うことができる。

【0177】

用語「癌」および「癌性」とは、制御されない細胞増殖を特徴とする哺乳動物の生理学的状態を意味するかまたは説明する。癌の例には、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫および白血病またはリンパ様悪性腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。このような癌のより特定の例には、扁平細胞癌（例えば上皮性扁平細胞癌）、ならびに小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌および肺の扁平癌腫を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞性癌、胃腸癌を含む胃癌、膵臓癌、グリア芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路の癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、直腸癌、直腸結腸癌、子宮内膜または子宮の癌腫、唾液腺癌腫、腎臓癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝臓癌腫、肛門癌腫、陰茎癌腫、黒色腫、多発性骨髄腫およびB細胞リンパ腫、脳腫瘍、頭頸部癌、ならびに関連する転移が含まれる。

30

【0178】

「Ovr110発現細胞」とは、内因性のまたはトランスフェクトされたOvr110を細胞表面上で発現する細胞である。「Ovr110発現癌」とは、細胞表面上に存在するOvr110タンパク質を有する細胞を含む癌である。「Ovr110発現癌」は、抗Ovr110抗体が結合して癌について治療的効果を有することができるために十分なレベルのOvr110を、この細胞の表面上で産生する。Ovr110を「過剰発現する」癌は、同一の組織型の非癌性細胞と比較して顕著に高いレベルのOvr110を、この細胞表面において有するものである。

40

【0179】

このような過剰発現は、遺伝子増幅により、または増大した転写もしくは翻訳により生じ得る。Ovr110過剰発現は、診断または予後診断アッセイにおいて、細胞の表面上に存在するOvr110タンパク質の増大したレベルを評価すること（例えば免疫組織化学的アッセイ；FACS分析）により決定され得る。代替的に、または付加的に、細胞中

50

のOvr110がコードする核酸またはmRNAのレベルを、例えば、蛍光in situハイブリダイゼーション；(FISH；1998年10月に刊行されたW098/45479参照)、サザンブロッティング、ノーザンブロッティングまたはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)手法、例えばリアルタイム定量的PCR(RT-PCR)により測定してもよい。

【0180】

また、Ovr110過剰発現を、生物学的液体例えば血清中における抗原を、例えば抗体に基づくアッセイを用いて測定することにより、検討してもよい(また、例えば米国特許第4,933,294号、1990年6月12日刊行；W091/05264、1991年4月18日刊行；米国特許第5,401,638号、1995年3月28日刊行；およびSias et al. J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)参照)。熟練した実施者は、上記のアッセイの他にも、多様なin vivoアッセイを利用することができる。

10

【0181】

例えば、患者の体内の細胞を任意に検出可能な標識、例えば放射性同位体で標識した抗体に曝露して、患者における該抗体の細胞への結合を、例えば放射性についての外部走査により、または前に抗体に曝露した患者から採取した生検を分析することにより評価してもよい。Ovr110発現癌は、卵巣癌、膵臓癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、腎細胞癌、肺癌または乳癌を含む。体液は、身体の全ての内液、分泌液、放出および派生される液体を含み、例えば、血液、血漿、血清、尿、唾液、痰、涙、腹水、腹腔洗浄液、リンパ液、胆汁、精液、膿汁、羊水、房水、耳垢、乳糜、糜粥、腸液、月経、乳、粘液、胸膜液、汗、腔の潤滑液、嘔吐物、脳脊髄液および滑液である。

20

【0182】

癌を処置するかまたは癌の症状を緩和する目的のための「哺乳動物」とは、任意の哺乳動物を意味し、ヒト、家畜(domestic and farm animals)、ならびに動物園の、スポーツの、またはペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを含む。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0183】

「処置する」または「処置」または「緩和」は、治療的処置および予防的または防止的手段の両方を意味し、ここで、目的は、標的となる病理学的状態または障害を防止または遅延させる(低下させる)ことである。処置を必要としているものには、すでに障害を有しているもの、および障害を有する傾向があるもの、または障害が予防されるべきであるものが含まれる。対象または哺乳動物は、本発明の方法により抗Ovr110抗体の治療量が投与された後に、患者が、以下の1または2以上の観察可能なおよび/または測定可能な低減または欠如を示す場合に、Ovr110発現癌について首尾よく「処置される」：

30

【0184】

癌細胞数の減少または癌細胞の欠如；腫瘍の大きさの減少；軟組織および骨中への癌の拡大を含む、癌細胞の末梢器官中への浸潤の阻害(すなわち、ある程度までの遅延および好ましくは停止)；腫瘍転移または血管形成の阻害(すなわち、ある程度までの遅延および好ましくは停止)；腫瘍増殖のある程度までの阻害；および/または特定の癌に関連する1つまたは2つ以上の症状の、ある程度までの緩和；罹患率および死亡率の低下、ならびに生活の質の問題における改善。抗Ovr110抗体が、存在する癌細胞の増殖を防止し、および/またはこれを死滅させることができる程度までを、細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性であるものとすることができる。これらの徴候または症状の低減はまた、患者により感知され得る。

40

【0185】

疾患における処置および改善の成功を評価するための上記のパラメーターは、医師に十分知られている常習的な手順により容易に測定可能である。癌療法のために、例えば疾患の無増悪期間(time to disease progression: TTP)を評価し、および/または奏功率(response rate: RR)を決定することにより、効能を測定することができる。

【0186】

50

用語「治療有効量」は、対象または哺乳動物における疾患または障害を「処置する」のに有効な抗体または薬剤の量を意味する。癌の場合、薬剤の治療有効量により、癌細胞数が減少し；腫瘍サイズが減少し；末梢器官中への癌細胞の浸潤が阻害され（すなわち、ある程度まで遅延および好ましくは停止され）；腫瘍転移が阻害され（すなわち、ある程度まで遅延および好ましくは停止され）；腫瘍増殖がある程度まで阻害され；および/または癌に関連する症状の1つまたは2つ以上が、ある程度まで緩和され得る。前記「処置する」の定義を参照されたい。薬剤は、存在する癌細胞の増殖を防止および/または死滅させることができる程度に細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性であり得る。

【0187】

「慢性」投与とは、急性の方式とは対照的に、1種または2種以上の薬剤を、長期間にわたり最初の治療的効果（活性）が維持されるように、連続的な方式で投与することを意味する。

「間欠性」投与とは、中断なく連続的には行われず、むしろ周期的な性質の処置である。

【0188】

1種または2種以上の他の治療剤と「組み合わせる」の投与は、任意の順序での、同時（併用）投与および連続投与を含む。

本明細書中で用いる「担体」には、用いられる投与量および濃度において曝露される細胞または哺乳動物に対して無毒であり、薬学的に許容される担体、添加剤または安定剤が含まれる。

【0189】

しばしば、生理学的に許容し得る担体は、水性のpH緩衝溶液である。生理学的に許容し得る担体の例には、緩衝液、例えばリン酸、クエン酸および他の有機酸；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10個未満の残基）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリシン；グルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む単糖類、二糖類および他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖アルコール類、例えばマンニトールもしくはソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；および/または非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）およびPLURONICS（登録商標）が含まれる。

【0190】

本明細書中で用いる用語「細胞傷害剤」は、細胞の機能を阻害もしくは防止する物質、および/または細胞の破壊を生じる物質を意味する。この用語は、放射性同位体（例えばAt 211、I 131、I 125、Y 90、Re 186、Re 188、Sm 153、Bi 212、P 32、およびLuの放射性同位体）、化学療法剤、例えばメトトレキセート、アドリアマイシン（adriamycin）、ピンカルカロイド類（ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド）、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシンまたは他の挿入剤、酵素およびこのフラグメント、例えば核酸分解酵素、抗生物質、ならびに毒素、例えば小分子毒素または細菌、真菌、植物もしくは動物起源の酵素として活性な毒素であって、これらのフラグメントおよび/または変種を含むもの、例えばゲロニン（gelonin）、リシン、サポリンならびに以下に開示するさまざまな抗腫瘍剤または抗癌剤を含むことを意図する。他の細胞傷害剤を以下に記載する。殺腫瘍剤は、腫瘍細胞の破壊をもたらす。

【0191】

本明細書中で用いる際には、「増殖阻害剤」は、細胞、特にOvr 110発現癌細胞の増殖を、in vitroまたはin vivoのいずれかで阻害する化合物または組成物を意味する。したがって、増殖阻害剤は、S期においてOvr 110発現細胞のパーセンテージを顕著に減少させるものであってもよい。増殖阻害剤の例には、（S期以外の位置において）細胞サイクル進行を遮断する剤、例えばGI停止およびM期停止を誘発する剤が含まれる。

10

20

30

40

50

【0192】

古典的なM期ブロッカーには、ピンカ類（ピンクリスチンおよびピンラスチン）、タキサン類およびトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エビルピシン、ダウノルビシン、エトポシドおよびブレオマイシンが含まれる。GIを停止する剤はまたS期停止に波及し、例えばDNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシルおよびara-Cである。

【0193】

さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer (MendelsohnおよびIsrael編)の第1章、表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」(Murakamiら)(WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁中に見出すことができる。タキサン類（パクリタキセルおよびドセタキセル）は、共にイチイに由来する抗癌薬である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhone-Poulenc Rorer）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Myers Squibb）の半合成類似体である。パクリタキセルおよびドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管の組み立てを促進し、脱重合を防止することにより微小管を安定化させ、これにより細胞中での有糸分裂の阻害をもたらす。

【0194】

本明細書中で用いる「標識」とは、抗体に直接的または間接的に接合して、「標識された」抗体を生じる検出可能な化合物または組成物を意味する。標識は、それ自体が検出可能であってもよく（例えば放射性同位体標識もしくは蛍光標識）、または、酵素的標識の場合においては、検出可能な基質化合物もしくは組成物の化学的変化を触媒するものであってもよい。

【0195】

明細書中で用いる用語「エピトープタグ化」は、「タグポリペプチド」に融合した抗Ovr110ポリペプチドを含む、キメラポリペプチドを意味する。抗Ovr110ポリペプチドは抗Ovr110抗体、またはその抗原フラグメントであってよい。タグポリペプチドは、抗体が作られ得るエピトープを提供するのには十分であるが、融合する付加されたポリペプチドの活性に干渉しない程度に十分短い残基を有する。タグポリペプチドはまた、好ましくは、極めてユニークであり、したがってそれに対する抗体は、他のエピトープと実質的に交差反応しない。好適なタグポリペプチドは、一般的に、少なくとも6個のアミノ酸残基および通常8～50個のアミノ酸残基（好ましくは約10～20個のアミノ酸残基）を有する。

【0196】

「小分子」とは、本明細書中では、約500ダルトンより小さい分子量を有すると定義される。

用語「添付文書」は、慣例的に治療製品の市販の包装中に含まれ、このような治療製品の使用に関する適応、使用、投与量、投与、禁忌および/または注意についての情報を含む使用説明書を意味するために用いる。

【0197】

「単離された核酸分子」は、核酸分子、例えばRNA、DNA、または混合ポリマーであって、これらは実質的に他のゲノムDNA配列およびタンパク質または複合体、例えばリボゾームおよびポリメラーゼから分離され、必然的にネイティブ配列を伴う。この用語は、この天然に存在する環境から取り除かれた核酸分子を包含し、組換えまたはクローン化DNA単離物および、化学的に合成された類似体または異種性の系により生物学的に合成された類似体を含む。実質的に純粋な核酸分子は、核酸分子の単離された形態を含む。

【0198】

「ベクター」は、シャトルベクターおよび発現ベクターを含み、例えばプラスミド、コスミドまたはファージミドを含む。典型的に、プラスミド構成物（construct）はまた、細菌におけるプラスミドの複製および選択のための、複製の起点（例えば複製のColE

1 起点) および選択可能なマーカー(例えばアンピシリンまたはテトラサイクリン耐性)をそれぞれ含む。「発現ベクター」は、原核生物、例えば細菌または真核生物細胞における、本発明の抗体フラグメントを含む抗体の発現に必要なコントロール配列または調節要素を含むベクターを意味する。好適なベクターを以下に開示する。

【0199】

本発明の抗Ovr110抗体を産生する細胞には、親ハイブリドーマ細胞、例えばATCCに寄託されたハイブリドーマ、ならびに抗体をコードする核酸が導入された細菌、酵母および真核生物宿主細胞が含まれる。好適な宿主細胞を、以下に開示する。

【0200】

RNA干渉は、低分子干渉RNA(sRNA)により媒介される、動物における配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを意味する(Fire et al., 1998, Nature, 391, 806)。植物における対応するプロセスは、一般に、転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAサイレンシングと呼ばれ、また真菌における停止を意味する。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、種々の植物相および門により一般的に共有された、外来の遺伝子の発現を防止するために用いられる、進化的に保存された細胞防御機構であると考えられる(Fire et al., 1999, Trends Genet., 15, 358)。

10

【0201】

外来の遺伝子発現からのこのような保護は、相同的な単鎖RNAまたはウイルスゲノムRNAを特異的に破壊する細胞応答による、ウイルス感染または宿主ゲノム中へのトランスポゾン要素の無秩序な一体化に由来する二本鎖RNA(dsRNA)の産生に20
 応答して、進化した場合がある。細胞中のdsRNAの存在によりRNAi応答が誘発されるが、機構は未だ完全には特徴付けられていない。この機構は、プロテインキナーゼPKRおよび2', 5'-オリゴアデニレートシンターゼのdsRNA媒介活性化からもたらされ、結果としてリボヌクレアーゼLによるmRNAの非特異的切断を生じさせるインターフェロン応答とは、異なると考えられる。

20

【0202】

細胞中に長いdsRNAが存在すると、ダイサーと呼ばれるリボヌクレアーゼIII酵素の活性が刺激される。ダイサーは、低分子干渉RNA(sRNA)として知られている、dsRNAの短いフラグメントへのdsRNAの加工に関与する(Berstein et al., 2001, Nature, 409, 363)。ダイサー活性に由来する低分子干渉RNAは、典型的には、30
 長さが約21~23ヌクレオチドであり、約19個の塩基対二本鎖を含む。

30

【0203】

ダイサーはまた、翻訳制御に関係する、保存された構造のRNA前駆体からの21および22ヌクレオチドの小さい一時的なRNA(stRNA)の切除に関係していた(Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834)。RNAi応答はまた、sRNA二本鎖のアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する、一般にRNA誘発サイレンシング複合体(RISC)と呼ばれるsRNAを含むエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とする。標的RNAの切断は、sRNA二本鎖のアンチセンス鎖に相補的な領域の中央において起こる(Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。

40

【0204】

低分子干渉RNAが媒介するRNAiは、種々の系において研究されている。Fire et al., 1998, Nature, 391, 806は、C. Elegans中のRNAiを最初に観察した。Wianny and Goetz, 1999, Nature Cell Biol., 2, 70には、マウス胚におけるdsRNAにより媒介されるRNAiが記載されている。Hammond et al., 2000, Nature, 404, 293には、dsRNAをトランスフェクトしたショウジョウバエ細胞中のRNAiが記載されている。Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494には、ヒト胚腎臓およびHEL細胞を含む培養した哺乳動物細胞中の、合成21ヌクレオチドRNAの二本鎖の導入により誘発されたRNAiが記載されている。

【0205】

ショウジョウバエ胚ライセートにおける最近の研究(Elbashir et al., 2001, EMBO J.

50

、20, 6877)により、効率的なRNAi活性を媒介するために必須のsiRNA長さ、構造、化学組成および配列についての一定の必要条件が明らかになった。これらの研究により、21ヌクレオチドのsiRNA二本鎖が、2個のヌクレオチド3'-オーバーハングを含む際に、最も活性であることが示された。さらに、2'-デオキシ(2'-H)または2'-O-メチルヌクレオチドを有する一方または両方のsiRNA鎖の完全な置換により、RNAi活性が消失し、一方3'末端siRNAオーバーハングヌクレオチドのデオキシヌクレオチド(2'-H)による置換は、耐容されることが示された。siRNA二本鎖の中心での単一のミスマッチ配列はまた、RNAi活性を消失させることが示された。

【0206】

さらに、これらの研究は、標的のRNA中の切断部位の位置が、siRNAガイド配列の3'末端よりは、5'末端により定められることも示す(Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。他の研究により、siRNA二本鎖の標的相補的鎖上の5'リン酸塩がsiRNA活性のために必要であること、および、ATPによってsiRNA上の5'リン酸塩部分が維持されることが示された(Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309)。

【0207】

研究により、2個のヌクレオチド3'-オーバーハングを有する21量体のsiRNA二本鎖の3'-オーバーハングセグメントをデオキシリボヌクレオチドで置換することは、RNAi活性に対して悪影響を有さないことが示された。siRNAの各末端上での4個までのヌクレオチドの、デオキシリボヌクレオチドによる置換は良好に耐容される一方、デオキシリボヌクレオチドによる完全な置換はRNAi活性をもたらしなことが報告された(Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。さらにElbashir et al.、上記はまた、siRNAの2'-O-メチルヌクレオチドでの置換により、RNAi活性が完全に消失されることを報告している。

【0208】

Liらによる国際PCT公開WO 00/44914およびBeachらによる国際PCT公開WO 01/68836は共に、siRNAが、「リン酸塩-糖骨格またはヌクレオシドのいずれかに対する修飾を含むことができ、少なくとも1個の窒素または硫黄ヘテロ原子を含む」ことを示唆しているが、いずれの出願にも、これらの修飾がどの程度までsiRNA分子において耐容されるかが教示されておらず、かかる修飾されたsiRNAのいかなる例も提供されていない。

【0209】

KreutzerおよびLimmerによるカナダ国特許出願第2,359,180号にはまた、dsRNA構成物において用いて、二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼPKR、特に2'-アミノまたは2'-O-メチルヌクレオチド、および2'-Oまたは4'-Cメチレン架橋を含むヌクレオチドの活性化を妨げるための、ある化学的修飾が記載されている。しかし、KreutzerおよびLimmerは、同様に、これらの修飾がどの程度までsiRNA分子において耐容されるかを示しておらず、かかる修飾されたsiRNAのいかなる例も提供していない。

【0210】

Parrish et al., 2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087は、C. elegansにおけるunc-22遺伝子を標的化するある化学修飾を、長い(>25nt)siRNA転写物を用いて試験した。この著者は、T7およびT3RNAポリメラーゼを有するチオリン酸塩ヌクレオチド類似体を包含させることによる、これらのsiRNA転写物中へのチオリン酸塩残基の導入を記載し、「2つの(ホスホロチオエート)修飾塩基を有するRNAもまた、RNAiトリガーとしての有効性の顕著な低下を有し(データは示されず); 2つよりも多い残基の(ホスホロチオエート)修飾により、in vitroでRNAが大きく不安定化され、我々は、干渉活性を分析することができなかった」ことを観察した。同上1081。

【0211】

この著者はまた、長いsiRNA転写物中のヌクレオチド糖の2'位置において、ある

10

20

30

40

50

修飾を試験し、デオキシヌクレオチドのリボヌクレオチドによる置換が、「干渉活性を顕著に低下させた」ことを観察し、特にウリジンのチミジンへの、および/またはシチジンのデオキシシチジンへの置換の場合においてそうであった。同上。さらに、この著者は、*s i R N A*のセンスおよびアンチセンス鎖における4 - チオウラシル、5 - プロモウラシル、5 - ヨードウラシル、3 - (アミノアリル)ウラシルの、ウラシルへの置換、およびイノシンのグアノシンへの置換を含む、ある塩基修飾を試験し、いずれの鎖中に含まれる際にも、4 - チオウラシルおよび5 - プロモウラシルがすべて良好に耐容される一方、イノシンが「干渉活性を顕著に低下させた」ことを見出した。5 - ヨードウラシルおよび3 - (アミノアリル)ウラシルの、アンチセンス鎖における導入の結果、*R N A i*活性の顕著な低下ももたらされた。

10

【0212】

Beachらによる国際PCT公開WO 01/68836には、内因的に誘導された*d s R N A*を用いた、遺伝子発現を減衰する特定の方法が記載されている。Tuschlらによる国際PCT公開WO 01/75164には、*in vitro*のショウジョウバエ*R N A i*系ならびに、特定の*s i R N A*分子の、ある機能的ゲノムおよびある治療的用途のための使用が記載されている；しかし、Tuschl, 2001, Chem. Biochem., 2, 239-245では、「インターフェロン応答を活性化する危険」のために、*R N A i*を用いて遺伝子的疾患またはウイルス感染を治療することは、できないのではないかと疑っている。

【0213】

Liらによる国際PCT公開WO 00/44914には、ある標的遺伝子の発現の減衰に用いるための、特定の*d s R N A*の使用が記載されている。Zernicka-Goetzらによる国際PCT公開WO 01/36646には、哺乳動物細胞における特定の遺伝子の発現を、ある*d s R N A*分子を用いて阻害するための、ある方法が記載されている。Fireらによる国際PCT公開WO 99/32619には、遺伝子発現の阻害に用いるための、ある*d s R N A*分子を細胞中に導入する特定の方法が記載されている。Plaetinckらによる国際PCT公開WO 00/01846には、細胞中の特定の表現型を付与する原因となる特定の遺伝子を、特定の*d s R N A*分子を用いて同定するためのある方法が記載されている。

20

【0214】

Melloらによる国際PCT公開WO 01/29058には、*d s R N A*媒介*R N A i*に関する特定の遺伝子の同定が記載されている。Deschamps Depailletteらによる国際PCT公開WO 99/07409には、ある抗ウイルス剤と組み合わされた、特定の*d s R N A*分子からなる特定の組成物が記載されている。Driscollらによる国際PCT公開WO 01/49844には、標的の生物における遺伝子サイレンシングの促進に用いるための、特定の*D N A*構成物が記載されている。Parrish et al., 2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087には、*C. elegans*の*u n c - 2 2*遺伝子を標的にする、特定の化学的に修飾された*s i R N A*構成物が記載されている。Tuschlらによる国際PCT公開WO 02/44321には、ある合成*s i R N A*構成物が記載されている。

30

【0215】

本発明の組成物および方法

本発明は、抗Ovr110抗体を提供する。好ましくは、抗Ovr110抗体は、哺乳動物細胞上の細胞表面Ovr110に結合すると内部移行する。代替的に、抗Ovr110抗体は、細胞上の生来のOvr110タンパク質と結合することによって、Ovr110の機能を阻害する。抗Ovr110抗体はまた、Ovr110を有する腫瘍細胞を破壊するか、またはこの破壊をもたらすことができる。

40

【0216】

Ovr110が内部移行能力を有することは、明らかではなかった。さらに、抗体が内部移行する能力は、親和性、結合活性、および抗体のアイソタイプ、およびこれが結合するエピトープを含むいくつかの要因に依存する。全ての抗体 - 抗原ペアが内部移行能力を示すわけではないことはよく知られている。本発明者は、本明細書中で、細胞表面Ovr110が本発明の抗Ovr110抗体により結合されると内部移行能力を得ることを実証

50

した。

【0217】

さらに、本発明の抗Ovr110抗体が、*in vitro*または*in vivo*でOvr110発現腫瘍細胞を特定の標的化し、これらの細胞を阻害または死滅させることができることが、実証された。これらの*in vivo*での抗Ovr110抗体の腫瘍標的化、内部移行および増殖阻害特性により、これらの抗体は、治療的使用、例えば、卵巣癌、膵臓癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、腎臓癌、肺癌または乳癌を含むさまざまな癌の処置において、極めて好適となる。抗Ovr110抗体の内部移行は、例えば、抗体または抗体結合体が細胞内作用部位を有する場合、およびこの抗体に結合した細胞傷害剤（例えば毒素カリケアマイシン）が細胞膜を容易に横断しない場合に、好ましい。内部移行は、抗体または抗体に結合した剤が細胞内作用部位を有さない場合、例えば抗体が、ADCCまたはある他の機構により腫瘍細胞を死滅させることができる場合には、必要ではない。

10

【0218】

本発明の抗Ovr110抗体はまた、さまざまな非治療的用途を有する。本発明の抗Ovr110抗体は、Ovr110発現癌の診断およびステージ分類のために有用となり得る（例えば放射性イメージングまたは他のイメージング方法において）。これらを単独で、または他の卵巣癌マーカーと組み合わせて用いることができ、該マーカーには、限定されることなく、CA125、HE4およびメソセリンが含まれる。この抗体はまた、Ovr110を細胞から精製または免疫沈殿するために、*in vitro*、例えばELISAまたはウェスタンブロットにおいてまたはIHCによってなど、Ovr110を検出および定量するために、他の細胞の精製における1ステップとしてOvr110発現細胞を混合細胞の集団から死滅させ排除するために有用である。

20

【0219】

本発明の内部移行する抗Ovr110抗体は、本明細書中で「抗体」の定義により包含される種々の形態であってもよい。したがって、抗体は、全長または無傷な抗体、抗体フラグメント、ネイティブ配列の抗体またはアミノ酸変異体、ヒト化、キメラまたは融合抗体、免疫結合体およびこれらの機能的フラグメントを含む。融合抗体においては、抗体配列は、異種性のポリペプチド配列に融合される。抗体を、Fc領域において修飾して、所望のエフェクター機能を提供することができる。以下の章においてより詳細に記載するように、適切なFc領域を用いて、細胞表面上に結合した裸（naked）の抗体は、例えば抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）により、または補体依存性細胞傷害作用において補体を獲得することにより、またはある他の機構により、細胞傷害性を誘発することができる。あるいは、エフェクター機能を消失させるかまたは低減させて、副作用または治療の合併症を最小にするのが望ましい場合において、ある他のFc領域を用いることができる。

30

【0220】

抗体は、本発明の抗体により結合された同一のエピトープに結合することについて競合することができ、または実質的にこれに結合する。本発明のこの抗Ovr110抗体の生物学的特徴を有する抗体も意図され、例えば、配列番号1~50を含むモノクローナル抗体の生物学的特徴、特に*in vivo*腫瘍標的化、内部移行およびあらゆる細胞増殖阻害または細胞傷害性特徴を含む、を有する抗Ovr110抗体である。

40

【0221】

具体的に提供されるのは、ヒトOvr110のアミノ酸30~40、40~50、50~60、60~70、70~80、80~90、90~100、100~110、110~120、120~130、130~140、140~150、150~160、160~170、170~180、180~190、190~200、200~210、210~220、220~230、230~240、240~250、250~260、260~270、270~282または21~35、31~45、41~55、51~65、61~75、71~85、81~95、91~105、101~115、111~125、121~135、131~145、141~155、151~165、161~175、171~185、181~195、191~205、201~215、211~225、

50

221~235、231~245、241~255、251~258において存在するエピトープに結合する、抗Ovr110抗体である。

【0222】

上記抗体を生産する方法を以下にさらに詳細に説明する。

本発明の抗Ovr110抗体は、哺乳動物におけるOvr110発現癌を処置、または癌の1つもしくは2つ以上の症状の緩和に有用である。このような癌は、卵巣癌、膵臓癌、肺または乳癌、尿道癌、肺癌、乳癌、大腸癌、膵臓癌、および卵巣癌、特に前立腺腺癌、腎細胞癌、結腸直腸腺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、および胸膜中皮腫を含む。癌は、上記の任意の転移性癌、例えば、卵巣癌転移、膵臓癌転移、肺癌転移または乳癌転移を包含する。

10

【0223】

この抗体は、哺乳動物におけるOvr110を発現する癌細胞の少なくとも一部に結合することができ、好ましくはHAMA応答を誘発しないかまたはこれを最小化するものである。好ましくは、抗体は、*in vivo*または*in vitro*で、細胞上のOvr110に結合すると、Ovr110発現癌細胞を破壊または死滅させるか、またはかかる腫瘍細胞の増殖を阻害するのに、有効なものである。かかる抗体は、裸の抗Ovr110抗体(いかなる剤にも結合していないもの)を含む。裸の抗Ovr110抗体は、タキサンまたは癌処置に用いられる他の剤などの他の治療剤と組み合わせて効能を示す。*in vivo*での腫瘍増殖阻害特性を有する裸の抗Ovr110抗体には、以下の実験例に記載する抗体が含まれる。

20

【0224】

いくつかの場合において、裸の抗体の機能は、タキサンまたは癌処置に用いられる他の剤などの他の化学療法剤との組合せにおいてのみ明らかであってよい。細胞傷害特性または細胞増殖阻害特性を有する裸の抗体を、さらに細胞傷害剤と結合させて、これらを腫瘍細胞破壊においてより一層有効にすることができる。例えばこの抗体を細胞傷害剤と結合させて、以下に記載するように免疫結合体を形成することにより、抗Ovr110抗体に細胞傷害性特性を付与することができる。細胞傷害剤または増殖阻害剤は、好ましくは小分子である。毒素、例えばメイタンシン、メイタンシノイド、サポリン、ゲロニン、リシンまたはカリケアマイシンおよびこれらの類似体または誘導体が好ましい。

30

【0225】

本発明は、本発明の抗Ovr110抗体および担体を含む組成物を提供する。癌の処置のために、組成物をかかる処置を必要としている患者に投与することができ、ここで組成物は免疫結合体としてまたは裸の抗体として存在する、1種または2種以上の抗Ovr110抗体を含むことができる。さらにこの組成物は、これらの抗体を、他の治療剤、例えば化学療法剤を含む細胞傷害剤または増殖阻害剤と組み合わせて、含むことができる。本発明はまた、本発明の抗Ovr110抗体および担体を含む製剤を提供する。この製剤は、薬学的に許容し得る担体を含む治療用製剤であってもよい。

【0226】

本発明の他の局面は、内部移行する抗Ovr110抗体をコードする、単離された核酸である。HおよびL鎖の両方ならびに特に超可変領域の残基をコードする核酸、ネイティブ配列の抗体および変異体をコードする鎖、抗体の修飾物およびヒト化された様式が包含される。

40

【0227】

本発明はまた、哺乳動物におけるOvr110発現癌を処置するか、またはこの癌の1つもしくは2つ以上の症状を緩和するために有用な方法であって、内部移行する抗Ovr110抗体の治療有効量を該哺乳動物に投与することを含む、前記方法を提供する。この抗体治療組成物を、医師により指示されるとおり、短期間(急性)もしくは慢性的に、または間欠的に投与することができる。また提供されるのは、Ovr110発現細胞の増殖を阻害し、これを死滅させる方法である。

【0228】

50

最後に、本発明はまた、本発明の少なくとも1種の抗体、好ましくは本発明の少なくとも1種の内部移行する抗Ovr110抗体を含む、キットおよび製品を提供する。抗Ovr110抗体を含むキットは、Ovr110発現の検出において、または治療的もしくは診断的アッセイにおいて、例えばOvr110細胞死滅アッセイのために、またはOvr110の細胞からの精製および/または免疫沈殿のために、用途が見出される。例えば、Ovr110の単離および精製のために、キットは、固体支持体、例えば組織培養プレートまたはビーズ（例えばセファロースビーズ）に結合した抗Ovr110抗体を含むことができる。in vitroでの、例えばELISAまたはウェスタンブロットにおけるOvr110の検出および定量のための抗体を含むキットを、提供することができる。検出に有用な抗体は、標識、例えば蛍光または放射性標識と共に提供してもよい。

10

【0229】

抗Ovr110抗体の産生

以下に、本発明において有用な抗体の産生のための例示的な手法を記載する。手法のいくつかを、さらに例1に記載する。抗体の産生のために用いるべきOvr110抗原は、例えば、膜貫通配列を欠いているOvr110の可溶性形態またはタンパク質の選択された部分に対する合成ペプチドを含む、全長ポリペプチドまたはこの一部であってもよい。

【0230】

あるいは、その細胞表面においてOvr110を発現する細胞（例えばOvr110を過剰発現するように形質転換（transform）されたCHOまたはNIH-3T3細胞；卵巣、脾臓、肺、乳房もしくは他のOvr110発現腫瘍細胞系）、またはかかる細胞から調製される膜を用いて、抗体を生成することができる。ヒトおよびマウスOvr110のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、前に示したように入手可能である。Ovr110は、標準的な組換えDNA方法を用いて、原核細胞、例えば細菌細胞、または真核細胞において組換え的に産生し、これから単離することができる。Ovr110を、タグ化して（例えばエピトープタグ）、または他の融合タンパク質として発現させて、さまざまなアッセイにおけるその単離およびその同定を容易にすることができる。

20

【0231】

さまざまなタグおよび融合配列に結合する抗体または結合タンパク質は、以下に詳しく述べるように入手可能である。抗体を生成するのに有用なOvr110の他の形態は、当業者に明らかである。

30

【0232】

タグ

さまざまなタグポリペプチドおよびこれらのそれぞれの抗体が、当該分野においてよく知られている。例には、ポリヒスチジン（poly-his）またはポリヒスチジグリシン（poly-his-gly）タグ；インフルエンザHAタグポリペプチドおよびこの抗体12CA5（Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)）；c-mycタグならびにこれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7および9E10抗体（Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)）；ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D（gD）タグおよびこの抗体（Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)）が含まれる。

40

【0233】

FLAGペプチド（Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)）は、抗FLAG M2モノクローナル抗体（Eastman Kodak Co., New Haven, CT）により認識される。FLAGペプチドを含むタンパク質の精製は、免疫親和性クロマトグラフィーにより、アガロースに共有結合した抗FLAG M2モノクローナル抗体を含むアフィニティマトリックス（Eastman Kodak Co., New Haven, CT）を用いて行ってもよい。他のタグポリペプチドには、KT3エピトープペプチド[Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]；
- チューブリンエピトープペプチド（Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)）；およびT7遺伝子タンパク質ペプチドタグ（Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)）が含まれる。

50

【0234】

ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、動物、好ましくは非ヒト動物において、関連する抗原およびアジュバントの複数の皮下 (s c) または腹腔内 (i p) 注射により生じる。関連する抗原を、免疫すべき種において免疫原性であるタンパク質に結合させることが (特に合成ペプチドを用いる場合)、有用であり得る。

【0235】

例えば、抗原を、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H)、血清、ウシチログロブリン、または大豆トリプシン阻害剤に、二官能化または誘導化剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル (システイン残基による結合)、N - ヒドロキシスクシンイミド (リシン残基による)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、S O C l₂ または R¹ N = C = N R (式中、R および R¹ は異なるアルキル基である) を用いて結合させてもよい。結合体はまた、組換え細胞培養においてタンパク質融合として作製してもよい。

10

【0236】

抗原、免疫原性結合体または誘導体に対して、例えば 5 ~ 100 p g のタンパク質または結合体 (それぞれウサギまたはマウスに対して) を、3 容量の完全フロイントアジュバントと混ぜ合わせ、溶液を皮内に複数の部位において注射することにより、動物を免疫する。1 ヶ月後、この動物を、完全フロイントアジュバント中のペプチドまたは結合体を最初の量の 1/5 ~ 1/10 で、複数の部位における皮下注射により追加免疫する。7 ~ 14 日後に動物から採血し、血清を、抗体力価についてアッセイする。動物を、力価が水平状態になるまで追加免疫する。また、凝集剤、例えばミョウバンを好適に用いて、免疫応答を増強する。

20

【0237】

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、最初に Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) に記載されたハイブリドーマ方法を用いて作製しても、または組換え DNA 方法 (米国特許第 4,816,567 号) によって作製してもよい。ハイブリドーマ方法において、マウスまたは他の適切な宿主動物、例えばハムスターを、上記のように免疫して、免疫のために用いられるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生することができるリンパ球を誘導する。あるいは、in vitro でリンパ球を免疫することができる。免疫の後、リンパ球を単離し、次に「融合パートナー」、例えば骨髄腫細胞系と、好適な融合剤、例えばポリエチレングリコールを用いて融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する (Goding, Monoclonal Antibodies. Principles and Practice, pp 103 (Academic Press, 1986))。

30

【0238】

このように調製したハイブリドーマ細胞を好適な培養培地に蒔き、この中で増殖させる。この培地は好ましくは、融合していない融合パートナー、例えば親骨髄腫細胞の増殖または生存を阻害する 1 種または 2 種以上の物質を含む。例えば、親骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチン グアニン ホスホリボシルトランスフェラーゼ (H G P R T または H P R T) を欠いている場合には、ハイブリドーマのための選択的な培養培地は、典型的にヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含み (H A T 培地)、この物質が、H G P R T 欠損細胞の増殖を防止する。

40

【0239】

好ましい融合パートナー骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベル産生を支持し、融合していない親細胞に対して選択される選択的培地に高感度であるものである。好ましい骨髄腫細胞系は、マウス骨髄腫系、例えば Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA から入手できる M O P C - 21 および M P C - I I マウス腫瘍に由来するもの、ならびに S P - 2 および誘導体、例えばアメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville, Maryland USA から入手できる X 63 - A g 8 - 653 細胞である。

50

【0240】

また、ヒト骨髓腫細胞系およびマウス - ヒトヘテロ骨髓腫(heteromyeloma)細胞系は、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); およびBrodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

【0241】

ハイブリドーマ細胞が増殖する培養培地を、抗原に指向されたモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性を、免疫沈降により、またはin vitro結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)または酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)により決定する。

10

【0242】

モノクローナル抗体の結合親和性を、例えば、Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)に記載されているScatchard分析により決定することができる。所望の特異性、親和性および/または活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定すると、クローンを制限希釈手順によりサブクロニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp 103 (Academic Press, 1986))。この目的に適する培養培地には、例えばD - MEMまたはRPMI - 1640培地が含まれる。さらに、例えばマウス中への細胞の腹腔内注射により、ハイブリドーマ細胞を動物における腹水腫瘍としてin vivoで増殖させることができる。

20

【0243】

サブクロンにより分泌されたモノクローナル抗体を、培養培地、腹水または血清から、慣用の抗体精製手順、例えばアフィニティークロマトグラフィー(例えばプロテインAまたはプロテインG - セファロースを用いて)またはイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析などにより好適に分離する。

【0244】

モノクローナル抗体をコードするDNAを、慣用的な手順を用いて(例えばマウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)容易に単離し、配列決定する。ハイブリドーマ細胞は、かかるDNAの好ましい供給源として作用する。

30

【0245】

単離した後に、DNAを発現ベクター中に入れ、次にこれを、他の方法では抗体タンパク質を産生しない原核または真核宿主細胞、例えば大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞または骨髓腫細胞に形質転換またはトランスフェクトして、組換え宿主細胞中にモノクローナル抗体の合成を得ることができる。抗体をコードするDNAの、細菌における組換え発現についての概説記事は、Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993)およびPhuckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992)を含む。

【0246】

さらに、モノクローナル抗体または抗体フラグメントを、McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)に記載された手法を用いて、生成した抗体ファージライブラリから単離することができる。Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)には、ファージライブラリを用いたマウスおよびヒト抗体の単離がそれぞれ記載されている。

40

【0247】

その後の刊行物には、高親和性(nM範囲)ヒト抗体の、連鎖混合による産生(Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992))、ならびに極めて大きいファージライブラリを構成するための方法として、組み合わせ感染およびin vivo組換え(Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993))が記載されている。したがってこれら

50

の手法は、モノクローナル抗体を単離するための、伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ手法に代わる実行可能な代替法である。

【0248】

抗体をコードするDNAを修飾して、キメラまたは融合抗体ポリペプチドを産生することができ、この修飾は例えば、ヒト重鎖および軽鎖定常領域（CHおよびCL）配列を、相同的なマウス配列で置換することによる（米国特許第4,816,567号；およびMorrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)）、または免疫グロブリンコード配列を、非免疫グロブリンポリペプチド（異種性ポリペプチド）についてのコード配列の全部または一部と融合することによる修飾である。

【0249】

非免疫グロブリンポリペプチド配列は抗体の定常領域と置換することができ、または、1つの抗原への特異性を有する1つの抗原組み合わせ部位と、異なる抗原への特異性を有する他の抗原組み合わせ部位とを含むキメラの2価の抗体を作製するために、抗体の1つの抗原結合部位の可変領域と置換する。

【0250】

ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野において記載されている。好ましくは、ヒト化抗体は、この中に非ヒトである供給源から導入された1つまたは2つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基はしばしば「移入」残基と呼ばれ、これは、典型的には、「移入」可変領域から採取される。ヒト化は、本質的に、Winterおよび共同研究者らの方法にしたがって(Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988))、超可変領域配列をヒト抗体の対応する配列で置換することにより行うことができる。

【0251】

したがって、このような「ヒト化」抗体はキメラ抗体であり（米国特許第4,816,567号）、ここで、無傷のヒト可変領域より顕著に小さいものが、非ヒト種からの対応する配列により置換されている。実際にヒト化抗体は、典型的には、いくつかの超可変領域残基および場合によってはいくつかのFR残基が、げっ歯類抗体における同様の部位からの残基により置換されている、ヒト抗体である。

【0252】

ヒト化抗体の作製において用いるべき、軽鎖および重鎖の両方のヒト可変領域の選択は、抗体のヒトの治療的使用を意図する際には、抗原性およびHAM A応答（ヒト抗マウス抗体）を低減するのに極めて重要である。いわゆる「ベストフィット」方法によれば、げっ歯類抗体の可変領域の配列を、既知のヒト可変領域配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。

【0253】

げっ歯類のそれに最も近いヒトV領域配列を同定し、この中のヒトフレームワーク領域（FR）が、ヒト化抗体として受け入れられる(Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987))。他の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する、特定のフレームワーク領域を用いる。同一のフレームワークを、いくつかの異なるヒト化抗体のために用いることができる(Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993))。

【0254】

抗原に対する高い結合親和性および他の好ましい生物学的特性を維持して、抗体をヒト化することがさらに重要である。この目的を達成するために、好ましい方法によれば、ヒト化抗体を、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを用いて、親配列の分析のプロセスおよびさまざまな概念的ヒト化生成物により調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般に入手可能であり、当業者に精通されている。

10

20

30

40

50

【0255】

選択された免疫グロブリン候補配列の予想される三次元高次構造を例示して表示するコンピュータプログラムが、利用可能である。これらの表示の検査により、免疫グロブリン候補配列の機能において、可能性のある残基の作用の分析、すなわちこの抗原に結合する免疫グロブリン候補の能力に影響する残基の分析が可能になる。このようにして、FR残基をレシピエントから選択して組み合わせ、配列を移入して、所望の抗体特性、例えば1または2以上の標的抗原への増大した親和性を達成することができる。一般に、超可変領域残基は、抗原結合への影響において直接的かつ最も実質的に関与する。

【0256】

ヒト化抗Ovr110抗体のさまざまな形態が意図される。例えば、ヒト化抗体は、任意に1種または2種以上の細胞傷害剤と結合して免疫結合体を生じる抗体フラグメント、例えばFabであってもよい。あるいは、ヒト化抗体は、完全な抗体、例えば完全なIgG1抗体であってもよい。

10

【0257】

ヒト抗体

ヒト化に変わる方法として、ヒト抗体を生成することができる。例えば現在では、免疫されると、内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の完全なレパートリーを産生することができる遺伝子組換え動物（例えばマウス）を作製することが可能である。例えば、キメラの生殖系列変異マウスにおける抗体重鎖接合領域（ J_H ）遺伝子のホモ接合性欠失の結果、内因性抗体産生の完全な阻害がもたらされることが記述された。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイを、かかる生殖系列変異マウスに移した結果、抗原チャレンジによりヒト抗体の産生がもたらされる。

20

【0258】

例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); 米国特許第5,545,806号、5,569,825号、5,591,669号（すべてGenPharm）；5,545,807号参照；あるいは、ファージ提示手法(McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990))を用いて、ヒト抗体および抗体フラグメントをin vitroで、免疫化していない供与者からの免疫グロブリン可変(V)領域遺伝子レパートリーから産生することができる。

30

【0259】

この手法によれば、抗体V領域遺伝子をインフレームで、糸状バクテリオファージ、例えばM13またはfdの主要な、または主要でない被覆タンパク質遺伝子のいずれかの中にクローニングし、ファージ粒子の表面上の機能的抗体フラグメントとして提示する。糸状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むため、抗体の機能的な特性に基づく選択によっても、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択がもたらされる。

30

【0260】

したがって、このファージは、B細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージ提示法は、さまざまな様式で行うことができ、これは例えば、Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)に概説されている。V遺伝子セグメントのいくつかのソースを、ファージ提示法のために用いてもよい。Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)は、抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを、免疫したマウスの脾臓に由来するV遺伝子の小さいランダムな組み合わせライブラリから単離した。

40

【0261】

免疫していないヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構成して、抗原（自己抗原を含む）の多様なアレイに対する抗体を、基本的にはMarks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)またはGriffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)により記載された手法にしたがって単離してもよい。また米国特許第5,565,332号および5,573,905号も参照されたい。上記のように、ヒト抗体もまた、in vitro活性化B細胞により生成することができる（米国特許第5,567,610号および5,229,275号参照）。

50

【0262】

抗体フラグメント

ある状況においては、完全抗体よりむしろ抗体フラグメントを用いる方に利点がある。より小さいサイズのフラグメントにより、迅速なクリアランスが可能になり、固形腫瘍へのアクセスの改善がもたらされ得る。さまざまな手法が、抗体フラグメントの産生のために開発された。伝統的には、これらのフラグメントは、無傷の抗体のタンパク質分解消化から誘導された（例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)；およびBrennan et al., Science, 229:81 (1985)参照）。

【0263】

しかしこれらのフラグメントは、現在では、組換え宿主細胞により直接産生することができる。F a b、F vおよびS c F v抗体フラグメントはすべて、大腸菌において発現され、分泌されることができ、したがって大量のフラグメントの容易な産生が可能になる。抗体フラグメントを、上記した抗体ファージライブラリから単離することができる。あるいは、F a b' - S Hフラグメントを、大腸菌から直接回収し、化学的に結合させて、F (a b) 2フラグメントを形成することができる(Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992))。

【0264】

他のアプローチにおいて、F (a b) 2フラグメントを、組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含む、増大したin vivoでの半減期を有するF a bおよびF (a b) 2フラグメントは、米国特許第5,869,046号に記載されている。抗体フラグメントの産生のための他の手法は、熟練した実施者に明らかである。選択された抗体はまた、一本鎖F vフラグメント(s c F v)であってもよい。WO 93/16185；米国特許第5,571,894号および米国特許第5,587,458号参照、該開示は参照によって明示的に本明細書に組み込まれる。

【0265】

F vおよびs F vは、完全な組み合わせ部位を有し定常領域を欠く唯一の種である；したがって、これらは、in vivoでの使用における非特異的結合の低減に適する。s F v融合タンパク質を構成して、s F vのアミノまたはカルボキシ末端のいずれかにおいてエフェクタータンパク質の融合を得てもよい。Antibody Engineering, ed. Borrebaeck、上記参照。抗体フラグメントはまた、例えば米国特許第5,641,870号に記載されているように、「直鎖状抗体」であってもよい。かかる直鎖状抗体フラグメントは、単一特異性または二重特異性であってもよい。

【0266】

二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、O v r 1 1 0タンパク質の2つの異なるエピトープに結合することができる。他のかかる抗体は、O v r 1 1 0結合部位を、他のタンパク質についての結合部位と組み合わせることができる。あるいは、抗O v r 1 1 0アームを白血球上のトリガー分子、例えばT細胞受容体分子（例えばC 1 3 3）、またはI g GについてのF c受容体(F c R)、例えばF c R I (C D 6 4)、F c R I I (C D 3 2)およびF c R I I I (C D 1 6)上のトリガー分子に結合するアームと組み合わせ、細胞防御機構をO v r 1 1 0発現細胞に集中させ、局在化させることができる。

【0267】

二重特異性抗体はまた、O v r 1 1 0を発現する細胞に細胞傷害剤を局在化させるために用いることもできる。これらの抗体は、O v r 1 1 0結合アームおよび細胞傷害剤（例えばサポリン、抗インターフェロン、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセートまたは放射性同位体ハプテン）を結合するアームを有する。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体フラグメント（例えばF (a b) 2二重特異性抗体）として調製することができる。WO 96/16673には、二重特異性抗E r b B 2 /抗F c R I I I抗体が記載されており、米国特許第5,837,234号には、二重特異性抗E r b B 2 /抗F c R I抗体が

10

20

30

40

50

開示されている。二重特異性抗 E r b B 2 / F c 抗体は、WO98/02463中に示されている。米国特許第5,821,337号には、二重特異性抗 E r b B 2 / 抗 C D 3 抗体が教示されている。WO 96/16673、米国特許第5,837,234号、WO98/02463、米国特許第5,821,337号は、参照によって本明細書に明示的に組み込まれる。

【0268】

二重特異性抗体を作製する方法は、当該分野において知られている。全長二重特異性抗体の伝統的な産生は、2つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の同時発現に基づいており、ここで、2つの鎖は異なる特異性を有する(Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな分類により、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10個の異なる抗体分子の可能な混合物を生成し、この中で1個のみが、正確な二重特異性構造を有する。通常はアフィニティークロマトグラフィーの工程により行われる正確な分子の精製は、いくらか面倒であり、生成物の収量は低い。同様の手順はWO 93/08829およびTraunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されており、該開示は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる。

10

【0269】

異なるアプローチによれば、所望の結合特異性(抗体 - 抗原組み合わせ部位)を有する抗体可変領域が、免疫グロブリン定常領域配列に融合される。好ましくは、この融合は、少なくともヒンジ領域、C_H2領域、およびC_H3領域の一部を含むI g重鎖定常領域との融合である。軽鎖結合に必要な部位を含み、融合の少なくとも1つに存在する第1の重鎖定常領域(C_HI)を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物および所望により免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、好適な宿主細胞中に同時コトランスフェクトする。

20

【0270】

これにより、構築において異なる比率の3つのポリペプチド鎖が用いられる態様において、3つのポリペプチドフラグメントの相互割合の調整における柔軟性が拡大し、所望の二重特異性抗体の最適な収量を提供する。しかし、少なくとも2つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現の結果、高い収量が得られる場合、または、所望の鎖の組み合わせの収量に対してこの比率が顕著な影響を及ぼさない場合には、2つまたは3つ全てのポリペプチド鎖についてのコード配列を、単一の発現ベクター中に挿入することが可能である。

30

【0271】

好ましくは、このアプローチにおける二重特異性抗体は、一方のアームにおいて第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他方のアームにおけるハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対(第2の結合特異性を提供する)から構成される。この非対称構造により、所望の二重特異性化合物が、所望でない免疫グロブリン鎖の組み合わせから容易に分離されることが見出され、これは、二重特異性分子の片半分のみ免疫グロブリン軽鎖が存在することにより、容易な分離方法が提供されるからである。このアプローチはWO 94/04690に開示されており、該開示は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる。二重特異性抗体を生じるさらなる詳細について、例えば、Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照する。

40

【0272】

米国特許第5,731,168号(該開示は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる)に記載されている他のアプローチによれば、一对の抗体分子間の接触面を設計して、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体のパーセンテージを最大にすることができる。好ましい接触面は、C_H3領域の少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の接触面からの1つまたは2つ以上の小さいアミノ酸側鎖が、より大きい側鎖(例えばチロシンまたはトリプトファン)で置換される。1つまたは2つ以上の大きい側鎖と同一であるか、またはこれと類似した大きさの補填的な「空洞」が、第2の抗体分子の接触面上に、大きいアミノ酸側鎖をより小さいもの(例えばアラニンまたはスレオニン)で置換することにより作り出される。これにより、ヘテロ二量体の収量を、例えばホモ二量体などの他の所望でない最終生成物より多くするための機構が提供される。

50

【0273】

二重特異性抗体には、架橋した抗体、または「ヘテロ抱合した(heteroconjugate)」抗体が含まれる。例えば、ヘテロ抱合体中の抗体の一方をアビジンに結合させ、他方をビオチンに結合させることができる。このような抗体は、例えば、所望でない細胞に対して(米国特許第4,676,980号、該開示は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる)、およびHIV感染の処置のため(WO 91/00360、WO 92/200373およびEP 03089、該開示は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる)、免疫系細胞を標的化するために提案されている。ヘテロ抱合抗体を、任意の好都合な架橋方法を用いて作製することができる。好適な架橋剤は当該分野において十分知られており、米国特許第4,676,980号(該開示は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる)に、多くの架橋手法と共に開示されている。

10

【0274】

二重特異性抗体を抗体フラグメントから生成するための手法は、文献にも記載されている。例えば、二重特異性抗体は化学的結合を用いて調製することができる。Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)には、完全な抗体をタンパク質分解によって切断して、F(a b')₂フラグメントを生成する手順が記載されている。これらのフラグメントは、ジチオール錯化剤、亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元されて、近隣のジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を防止する。次に、生じたF a b'フラグメントを、チオニトロ安息香酸塩(TNB)誘導体に変換する。次に、F a b' - TNB誘導体の1つを、メルカプトエチルアミンで還元することによりF a b' - チオールに再び変換し、等モル量の他のF a b' - TNB誘導体と混合して、二重特異性抗体を形成する。産生した二重特異性抗体を、酵素の選択的固定化のための因子として用いることができる。

20

【0275】

最近の進歩により、大腸菌からのF a b' - S Hフラグメントの直接的な回収が容易になり、これを化学的に結合して、二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)には、完全にヒト化された二重特異性抗体F(a b')₂分子の産生が記載されている。各々のF a b'フラグメントは大腸菌から別個に分泌されており、これに、in vitroでの定方向化学的カップリングを施して、二重特異性抗体を形成した。このようにして形成した二重特異性抗体は、Er b B 2受容体を過剰発現する細胞および正常なヒトT細胞に結合することができ、またヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発することができた。

30

【0276】

二重特異性抗体フラグメントを組換え細胞培養物から直接作製し、単離するためのさまざまな手法も記載されている。例えば、二重特異性抗体が、ロイシンジッパーを用いて産生された。Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。F o sおよびJ u nタンパク質からのロイシンジッパーペプチドが、2種の異なる抗体のF a b'部分に、遺伝子融合により結合された。抗体ホモ二量体をヒンジ領域において還元してモノマーを形成し、次に再び酸化して抗体ヘテロ二量体を形成する。また、この方法を抗体ホモ二量体の産生のために用いることができる。

40

【0277】

Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)に記載された「ダイアポディー」手法により、二重特異性抗体フラグメントを作製するための代替の機構が提供された。このフラグメントは、同一の鎖の2つの領域間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーによりV Lに結合するV Hを含む。したがって、1つのフラグメントのV HおよびV L領域を、他のフラグメントの相補的なV LおよびV H領域と強制的に対形成させ、これにより2つの抗原結合部位を形成する。一本鎖F v(s F v)二量体を用いることによる、二重特異性抗体フラグメントを作製するための他の方法も報告されている。Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。

2よりも大きい価数を有する抗体が、企図される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)。

50

【0278】

多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、2価の抗体よりも迅速に内部移行する（および/または異化する）ことができる。本発明の抗体は、3つまたは4つ以上の抗原結合部位を有する（IgMクラス以外である）多価の抗体（例えば4価の抗体）であってもよく、これは、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により、容易に産生され得る。多価の抗体は、二量体化領域および3つまたは4つ以上の抗原結合部位を含むことができる。好ましい二量体化領域は、Fc領域またはヒンジ領域を含む（またはこれらからなる）。

【0279】

この筋書きにおいて、抗体は、Fc領域およびFc領域に対する3つまたは4つ以上の抗原結合部位アミノ末端を含む。本明細書における好ましい多価抗体は、3～約8個、しかし好ましくは4個の抗原結合部位を含む（またはこれらからなる）。多価抗体は、少なくとも1つのポリペプチド鎖（および好ましくは2つのポリペプチド鎖）を含み、ここで、1つまたは2つ以上のポリペプチド鎖は、2つまたは3つ以上の可変領域を含む。例えば、1つまたは2つ以上のポリペプチド鎖は、VD1(X1n-VD2-(X2)n-Fcを含むことができ、ここで、VD1は、最初の可変領域であり、VD2は、2番目の可変領域であり、Fcは、Fc領域の1つのポリペプチド鎖であり、X1およびX2は、アミノ酸またはポリペプチドを表し、nは、0または1である。

【0280】

例えば、1つまたは2つ以上のポリペプチド鎖は：VH-CHI-柔軟リンカー-VH-CHI-Fc領域鎖；またはVH-CHI-VH-CHI-Fc領域鎖を含んでも良い。本明細書中の多価抗体は、好ましくは、さらに、少なくとも2つ（および好ましくは4つ）の軽鎖可変領域ポリペプチドを含む。本明細書中の多価抗体は、例えば、約2個～約8個の軽鎖可変領域ポリペプチドを含むことができる。本明細書中で意図する軽鎖可変領域ポリペプチドは、軽鎖可変領域を含み、任意にさらにCL領域を含む。

【0281】

他のアミノ酸配列修飾

本明細書中に記載した抗Ovr110抗体の1または2以上のアミノ酸配列修飾が、意図される。例えば、抗体の結合親和性および/または他の生物学的特性を改善するのが望ましい場合がある。抗Ovr110抗体のアミノ酸配列変異体を、適切なヌクレオチド変化を抗Ovr110抗体核酸中に導入することにより、またはペプチド合成により調製する。

【0282】

かかる修飾には、例えば、抗Ovr110抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および/またはこの中への挿入、および/またはこの置換が含まれる。最終的な構成物が所望の特徴を有することを前提として、最終的な構成物に到達するために欠失、挿入および置換のあらゆる組み合わせを行う。アミノ酸変化はまた、抗Ovr110抗体の翻訳後プロセスを変えることができ、例えばグリコシル化部位の数または位置を変化させることができる。

【0283】

変異原性のための好ましい位置である抗Ovr110抗体のある残基または領域の同定に有用な方法は、CunninghamおよびWellsにより、Science, 244:1081-1085 (1989)に記載されているように、「アラニンスキャンニング変異誘発」と呼ばれる。ここで、抗Ovr110抗体内の残基または標的残基の群（例えば、荷電した残基、例えばarg、asp、his、lysおよびglu）を同定し、中性の、または負に荷電したアミノ酸（最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン）により置換して、アミノ酸のOvr110抗原との相互作用に影響を及ぼす。

【0284】

次に、置換に対する機能的な感受性を示すアミノ酸の位置を、置換の部位において、ま

10

20

30

40

50

たは置換の部位について、さらなる変種または他の変種を導入することにより精巧にする。したがって、アミノ酸配列の変更を導入するための部位が予め決定されている一方、変異の性質それ自体を予め決定する必要はない。例えば、所定の部位における変異の性能を分析するために、ala スキャンニングまたはランダムな変異誘発を標的コドンまたは領域において行い、発現された抗Ovr110抗体変異体を所望の活性についてスクリーニングする。

【0285】

アミノ酸配列挿入には、1個の残基から100個またはこれ以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲内のアミノおよび/またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を有する抗Ovr110抗体、または細胞傷害性ポリペプチドに融合した抗体が含まれる。抗Ovr110抗体分子の他の挿入変異体には、酵素に対する(例えばADEPTについての)抗Ovr110抗体のNもしくはC末端への融合、または抗体の血清半減期を増大させるポリペプチドへの融合が含まれる。

10

【0286】

変異体の他の種類は、アミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、異なる残基により置換された少なくとも1個のアミノ酸残基を、抗Ovr110抗体分子中に有する。置換変異誘発のための最も重要な標的とされる部位には、超可変領域が含まれるが、FR変化もまた企図される。保存的置換を、「好ましい置換」の項目の下に表Iに示す。かかる置換により生物学的活性の変化がもたらされる場合には、表Iにおいて「例示的な置換」と命名されているか、またはアミノ酸クラスに関して以下にさらに記載する、さらに実質的な変化を導入し、生成物を所望の特性についてスクリーニングすることができる。

20

【0287】

【表3】

表I アミノ酸置換

元の残基	置換の例	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala;	ile
Lys (K)	arg; gin; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala;	leu

30

40

【0288】

抗体の生物学的特性における実質的な改変は、(a)例えばシートもしくはらせん構造としての、置換領域におけるポリペプチド骨格の構造、(b)標的部位における分子の電

50

荷もしくは疎水性、または(c)側鎖の容積(bulk)、を維持することに対する効果が顕著に異なる置換を選択することにより達成される。天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいてグループに分けられる：

(1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；(2) 中性の親水性：cys、ser、thr；(3) 酸性：asp、glu；(4) 塩基性：asn、gin、his、lys、arg；(5) 鎖の配向に影響する残基：gly、pro；および(6) 芳香族：trp、tyr、phe。

【0289】

非保存的置換は、これらの群の1つの要素を他の群のもので交換することを伴う。抗Ovr110抗体の適切な立体構造の維持に関与しない任意のシステイン残基もまた、一般的にはセリンで置換されることができ、分子の酸化に対する安定性を改善し、異常な架橋を防止する。逆に、システイン結合(単数または複数)を抗体に付加して、その安定性を改善することができる(特に、抗体が、例えばFvフラグメントなどの抗体フラグメントである場合)。

【0290】

置換変異体の特に好ましい種類は、親抗体(例えばヒト化またはヒト抗体)の1つまたは2つ以上の超可変領域残基の置換を伴う。一般に、さらなる開発のために選択された、得られた変異体(単数または複数)は、これらを生成する親抗体に比べて改善された生物学的特性を有する。かかる置換変異体を生じるための好都合な方法は、ファージ提示法を用いた親和性成熟(affinity maturation)を含む。簡単に述べると、いくつかの超可変領域部位(例えば6~7部位)を変異させて、各々の部位において可能なアミノ酸置換のすべてを生じさせる。

【0291】

このようにして生じた抗体変異体を、糸状ファージ粒子から、各々の粒子内に包装されたM13の遺伝子III生成物への融合物として、1価の様式で提示する。次に、ファージ提示された変異体を、本明細書中に開示したように、これらの生物学的活性(例えば結合親和性)についてスクリーニングする。修飾のための候補の超可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング変異誘発を行って、抗原結合に顕著に寄与する超可変領域残基を同定することができる。

【0292】

代替的に、または付加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体とヒトOvr110との間の接触点を同定することが有益であり得る。かかる接触残基および隣接する残基は、本明細書中で詳しく述べる手法による置換のための候補である。かかる変異体が生じると、変異体のパネルに、本明細書中に記載したようにスクリーニングを施し、1つまたは2つ以上の関連するアッセイにおける優れた特性を有する抗体を、さらなる発生について選択することができる。

【0293】

抗体の他の種類のアミノ酸変異体は、抗体のもとのグリコシル化パターンを変化させる。変化させることにより、抗体中に見出される1つもしくは2つ以上の炭水化物部分の欠失、および/または抗体中に存在しない1つもしくは2つ以上のグリコシル化部位の添加を意味する。抗体のグリコシル化は、典型的には、N結合型またはO結合型である。N結合型は、炭水化物部分が、アスパラギン残基の側鎖に結合していることを意味する。Xがプロリン以外の任意のアミノ酸である、トリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニンは、炭水化物部分のアスパラギン側鎖への酵素的結合のための認識配列である。

【0294】

したがって、これらのトリペプチド配列のいずれかが、ポリペプチド中に存在することにより、有効なグリコシル化部位が作製される。O結合型グリコシル化は、糖であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースのうちの1つの、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはスレオニンへの結合を意味するが、5-ヒドロキシ

10

20

30

40

50

プロリンまたは5-ヒドロキシリシンもまた用いることができる。アミノ酸配列を変化させて、(N結合型グリコシル化部位について)これが上記のトリペプチド配列の1つまたは2つ以上を含むようにすることにより、抗体へのグリコシル化部位の添加が好都合に達成される。変化はまた、(O結合型グリコシル化部位について)、1つまたは2つ以上のセリンまたはスレオニン残基の、もとの抗体の配列への添加、またはこれによる置換によってもなされ得る。

【0295】

抗Ovr110抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子を、当該分野において知られているさまざまな方法により調製する。これらの方法には、自然の供給源からの単離(天然に存在するアミノ酸配列変異体の場合)またはオリゴヌクレオチド媒介(もしくは部位特異的な)変異誘発、PCR変異誘発、および抗Ovr110抗体の変異体もしくは非変異体のバージョンをコードする前もって調製された核酸分子のカセット変異誘発による調製が含まれるが、これらには限定されない。

10

【0296】

本発明の抗体を、エフェクター機能に関して改変して、例えば抗体の抗原依存性細胞媒介細胞傷害作用(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害作用(CDC)を増強することが望ましい場合がある。これは、抗体のFc領域中に1つまたは2つ以上のアミノ酸置換を導入することにより達成することができる。代替的に、または付加的に、1個または2個以上のシステイン残基をFc領域中に導入して、これによりこの領域における鎖間ジスルフィド結合形成を可能にすることができる。

20

【0297】

このようにして生じたホモ二量体抗体は、改善された内部移行能力および/または増大した補体媒介細胞死滅および抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)を有することができる(Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)およびShopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照のこと)。増強した抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体もまた、Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993)に記載されたように、ヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製することができる。あるいは、二重のFc領域を有し、これにより増大した補体溶解およびADCC能力を有し得る抗体を、設計することができる(Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)参照のこと)。

30

【0298】

抗体の血清半減期を増加させるために、例えば米国特許第5,739,277号に記載されているように、サルベージ受容体結合エピトープを抗体(特に抗体フラグメント)中に導入することができる。本明細書中で用いる用語「サルベージ受容体結合エピトープ」は、抗体のFc領域のエピトープを意味する。

【0299】

所望の特性を有する抗体についてのスクリーニング

抗体を生成するための手法を、上に記載した。さらに、所望により、ある生物学的特性を有する抗体を選択することができる。

本発明の抗Ovr110抗体の増殖阻害効果を、当該分野において知られている方法により、例えば内因的にまたはOvr110遺伝子のトランスフェクション後にOvr110を発現する細胞を用いて、評価することができる。例えば、以下の例1に提供する腫瘍細胞系およびOvr110をトランスフェクトされた細胞を、本発明の抗Ovr110モノクローナル抗体で、さまざまな濃度において、数日(例えば2~7日)にわたり処理し、クリスタルバイオレットもしくはMTTで染色し、または他の比色アッセイにより分析することができる。

40

【0300】

増殖を測定する他の方法は、本発明の抗Ovr110抗体の存在下で、または不在下で処理した細胞による³H-チミジン取り込みを比較することによる。抗体処理の後、細胞を収集し、DNA中に導入された放射能の量をシンチレーションカウンタにおいて定量する。適切なポジティブコントロールには、選択された細胞系の、当該細胞系の増殖を阻害

50

することが知られている増殖阻害抗体による処理が含まれる。

【0301】

*in vivo*での腫瘍細胞の増殖阻害を、以下の実験例の節において記載するように、種々の方法により決定することができる。好ましくは、腫瘍細胞は、Ovr110を過剰発現するものである。好ましくは、抗Ovr110抗体は、*in vitro*または*in vivo*でOvr110発現腫瘍細胞の細胞増殖を、約0.5~30 μ g/mLの抗体濃度において、未処理の腫瘍細胞と比較して、約25~100%、さらに好ましくは約30~100%、およびさらにより好ましくは約50~100%または70~100%、阻害する。

【0302】

増殖阻害は、細胞培養物中で、約0.5~30 μ g/mLまたは約0.5nM~200nMの抗体濃度において測定することができる。ここで、増殖阻害を、腫瘍細胞を抗体に曝露した1~10日後に決定する。約1 μ g/体重1kg~約100mg/体重1kgでの抗Ovr110抗体の投与により、抗体の最初の投与から約5日~3ヶ月以内、好ましくは約5~30日以内に腫瘍の大きさまたは腫瘍細胞増殖の減少がもたらされた場合に、抗体は*in vivo*で増殖阻害性である。

10

【0303】

細胞死を誘発する抗体を選択するために、例えばプロピジウムヨージド(PI)、トリパンブルーまたは7AAD取り込みにより示される膜完全性の損失を、コントロールに対して評価することができる。PI取り込みアッセイは、補体および免疫エフェクター細胞の不在において行うことができる。Ovr110発現腫瘍細胞は、培地のみ、または例えば約10 μ g/mLの適切なモノクローナル抗体を含む培地と共にインキュベートする。

20

【0304】

細胞は、3日間の期間にわたりインキュベートする。各々の処理に続いて、細胞は、細胞凝集塊の除去のため、洗浄して35mmの濾過器でキャップした12x75の管(1管あたり1mL、処理群あたり3つの管)中に等分する。次に、管にPI(10 μ g/mL)を施与する。サンプルをFACSCAN(登録商標)フローサイトメーターおよびFACSCONVERT(登録商標)CellQuestソフトウェア(Becton Dickinson)を用いて分析することができる。PI取り込みにより決定される、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗体を、細胞死誘発抗体として選択することができる。抗体はまた、他の細胞の癌に関連のある生物学的特性または細胞移動、細胞接着、サイトカイン、または成長因子分泌などの特性を含む他の免疫機構を改変する。

30

【0305】

例えば本発明のOvr110抗体などの興味の対象となる抗体により結合されるOvr110上のエピトープに結合する抗体についてスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されているような、常習的なクロスブロッキングアッセイを行うことができる。このアッセイを用いて、試験抗体が本発明の抗Ovr110抗体と同一の部位またはエピトープに結合するか否かを決定することができる。

【0306】

代替的に、または付加的に、エピトープマッピングを、当該分野において知られている方法により行うことができる。例えば、抗体配列をアラニンスキャニングなどにより変異誘発して、接触残基を同定することができる。変異体抗体を最初にポリクローナル抗体との結合について試験して、適切な折り畳みを確保する。異なる方法においては、Ovr110の種々の領域に対応するペプチドを、試験抗体を用いた、または試験抗体および特徴付けられるかもしくは既知のエピトープを有する抗体を用いた、競合アッセイにおいて用いることができる。

40

【0307】

例えば、本発明の抗体により結合されるエピトープに結合する抗体についてスクリーニングするための方法は、Ovr110含有サンプルを試験抗体および本発明の抗体と混ぜ合わせて、混合物を形成することを含むことができ、次に混合物中のOvr110に結合

50

したOvr110抗体のレベルを決定し、混合物中で結合したOvr110抗体のレベルについてコントロール混合物に対して比較し、ここで、コントロールと比較しての混合物中のOvr110に結合したOvr110抗体のレベルは、本発明の抗Ovr110抗体により結合されるエピトープへの試験抗体の結合の指標である。

【0308】

Ovr110に結合したOvr110抗体のレベルは、ELISAにより決定する。コントロールは、ポジティブコントロールまたはネガティブコントロールまたは両方であってもよい。例えば、コントロールは、Ovr110、本発明のOvr110抗体および本発明のOvr110抗体により結合されるエピトープに結合することが知られている抗体の混合物であってもよい。抗Ovr110抗体は、本明細書中に開示されているような標識で標識されている。Ovr110は、固体支持体、例えば組織培養プレートまたはビーズ、例えばセファロスビーズに結合していてもよい。

【0309】

免疫抱合体

本発明はまた、抗癌剤、例えば細胞傷害剤または増殖阻害剤に結合した抗体を含む免疫抱合体 (immunoconjugate) を用いる療法に関する。

このような免疫抱合体の生成において有用な化学療法剤は上に記載した。抗体および1種または2種以上の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド類、トリコテンおよびCC1065の結合体ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導體もまた、本明細書において企図される。

【0310】

メイタンシンおよびメイタンシノイド類

好ましくは、本発明の抗Ovr110抗体 (全長またはフラグメント) を、1または2以上のメイタンシノイド分子に結合させる。

メイタンシノイド類は、チューブリン重合を阻害することにより作用する、有糸分裂阻害剤である。メイタンシンは、キャストアフリカ低木 *Maytenus serrata* から最初に単離された (米国特許第3,896,111号)。その後、ある微生物もまた、メイタンシノイド類、例えばメイタンシノールおよびC-3メイタンシノールエステルを産生することが見出された (米国特許第4,151,042号)。

【0311】

合成メイタンシノールならびにこの誘導體および類似体は、例えば、米国特許第4,137,230号; 4,248,870号; 4,256,746号; 4,260,608号; 4,265,814号; 4,294,757号; 4,307,016号; 4,308,268号; 4,308,269号; 4,309,428号; 4,313,946号; 4,315,929号; 4,317,821号; 4,322,348号; 4,331,598号; 4,361,650号; 4,364,866号; 4,424,219号; 4,450,254号; 4,362,663号; および4,371,533号に開示されており、これらの開示は、本明細書において参考として明示的に援用される。

【0312】

メイタンシノイド - 抗体抱合体

これらの治療指数を改善する試行において、メイタンシンおよびメイタンシノイド類を腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体に抱合させた。メイタンシノイド類を含む免疫結合体およびこれらの治療的使用は、例えば、米国特許第5,208,020号、5,416,064号および欧州特許EP 0 425 235 B1に開示されており、これらの開示は、本明細書において参考として明示的に援用される。

【0313】

Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) には、ヒト直腸結腸癌に指向されたモノクローナル抗体C242に結合した、DMIと表示されるメイタンシノイドを含む免疫抱合体が記載されている。この抱合体は、培養した結腸癌細胞に対して高度に細胞傷害性であることが見出され、in vivoでの腫瘍増殖アッセイにおいて抗腫瘍活性を示した。Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992) には、ヒト結腸癌細胞系における抗原に結合するマウス抗体A7、またはHER-2/neu発癌遺伝子に結合す

10

20

30

40

50

る他のマウスモノクローナル抗体 T A . 1 に、メイタンシノイドがジスルフィドリンカーを介して結合している免疫結合体が記載されている。

【 0 3 1 4 】

T A . 1 - メイタンシノイド結合体の細胞傷害性が、細胞あたり 3×10^5 の H E R - 2 表面抗原を発現するヒト乳癌細胞系 S K - B R - 3 に対して *in vitro* で試験された。薬剤抱合体は、遊離のメイタンシノイド薬剤と同様の程度の細胞傷害性を達成し、これは、抗体分子あたりのメイタンシノイド分子の数を増大させることにより増大し得る。A 7 - メイタンシノイド結合体は、マウスにおいて低い全身細胞傷害性を示した。

【 0 3 1 5 】

抗 O v r 1 1 0 抗体 - メイタンシノイド抱合体 (免疫抱合体)

10

抗 O v r 1 1 0 抗体 - メイタンシノイド抱合体を、抗 O v r 1 1 0 抗体をメイタンシノイド分子に、抗体またはメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性も顕著に低下させることなく、化学的に結合させることにより調製する。一つの抗体分子あたり平均 3 ~ 4 個結合したメイタンシノイド分子が、抗体の機能または溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞の細胞傷害性を増強させることにおいて効能を示したが、1 個の毒素分子 / 抗体ですら、裸の抗体の使用にまさって細胞傷害性を増強すると予測される。

【 0 3 1 6 】

メイタンシノイド類は、当該分野において十分知られており、既知の手法により合成するかまたは自然の供給源から単離することができる。好適なメイタンシノイド類は、例えば、米国特許第 5,208,020 号ならびに上記で言及した他の特許および非特許刊行物中に開示されている。好ましいメイタンシノイド類は、メイタンシノールおよび、芳香環またはメイタンシノール分子の他の位置において修飾されているメイタンシノール類似体、例えばさまざまなメイタンシノールエステル類である。

20

【 0 3 1 7 】

当該分野において知られている、抗体 - メイタンシノイド抱合体を作製するための、多くの結合基があり、例えば米国特許第 5,208,020 号または欧州特許 0 425 235 B1 および Chari et al. *Cancer Research* 52: 127-131 (1992) に開示されているものを含む。該結合基には、上記で識別した特許に開示されているジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、光不安定基、ペプチダーゼ不安定基またはエステラーゼ不安定基が含まれ、ジスルフィド基およびチオエーテル基が好ましい。

30

【 0 3 1 8 】

抗体とメイタンシノイドの結合体をさまざまな二官能性タンパク質カップリング剤、例えば N - スクシンイミジル (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (S P D P)、スクシンイミジル - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、イミノチオラン (I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体 (例えばジメチルアジピミデート H C L)、活性エステル類 (例えばスベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類 (例えばグルタルアルデヒド)、ビス - アジド化合物 (例えばビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導体 (例えばビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) エチレンジアミン)、ジイソシアネート類 (例えばトルエン 2 , 6 ジイソシアネート) およびビス活性フッ素化合物 (例えば 1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン) を用いて作製することができる。特に好ましいカップリング剤には、ジスルフィド結合を提供するための、N - スクシンイミジル (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (S P D P) (Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 [1978]) および N - スクシンイミジル (2 - ピリジルチオ) ペンタノエート (S P P) が含まれる。

40

【 0 3 1 9 】

リンカーは結合の種類に依存して、さまざまな位置においてメイタンシノイド分子に結合していてもよい。例えば、エステル結合は、慣用のカップリング手法を用いて、水酸基との反応により形成し得る。反応は、水酸基を有する C - 3 位置、ヒドロキシメチルで修飾された C - 1 4 位置、水酸基で修飾された C - 1 5 位置、および水酸基を有する C - 2 0 位置において起こり得る。好ましくは、結合は、メイタンシノールまたはメイタンシノ

50

ール類似体の C - 3 位置において形成される。

【 0 3 2 0 】

カリケアマイシン

重要な他の免疫抱合体は、1 または 2 以上のカリケアマイシン分子に結合した抗 O v r 1 1 0 抗体を含む。カリケアマイシンファミリーの抗生物質は、ピコモル以下の濃度において二本鎖 D N A 破壊を発生させることができる。カリケアマイシンファミリーの結合体の調製については、米国特許第 5,712,374 号、5,714,586 号、5,739,116 号、5,767,285 号、5,770,701 号、5,770,710 号、5,773,001 号、5,877,296 号 (すべて American Cyanamid Company) を参照のこと。

【 0 3 2 1 】

用いることができるカリケアマイシンの構造的類似体には、 1^I 、 2^I 、 3^I 、N - アセチル - 1^I 、P S A G および 1^I (Hinman et al. Cancer Research 53: 33 36 (1993), Lode et al. Cancer Research 5 8: 2925-2928 (1998) および American Cyanamid の前述の米国特許明細書) が含まれるが、これらに限定されない。抗体を結合させることができる他の抗腫瘍薬剤は、葉酸代謝拮抗薬である Q F A である。カリケアマイシンおよび Q F A は共に、細胞内作用部位を有し、細胞膜を容易に横断しない。したがって、抗体媒介内部移行によるこれらの薬剤の細胞への取り込みにより、これらの細胞傷害性効果が大幅に増大する。

【 0 3 2 2 】

他の細胞傷害剤

本発明の抗 O v r 1 1 0 抗体に結合することができる他の抗腫瘍剤には、B C N U、ストレプトゾイシン (streptozoicin)、ピンクリスチンおよび 5 - フルオロウラシル、米国特許第 5,053,394 号および 5,770,710 号に記載されている、集合的に L L - E 3 3 2 8 8 複合体と知られている薬剤のファミリーならびにエスペラミシン類 (米国特許第 5,877,296 号) が含まれる。

【 0 3 2 3 】

用いることができる酵素的として活性な毒素およびこのフラグメントには、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の 1 - 5 非結合活性フラグメント、エクソトキシン A 鎖 (Pseudomonas aeruginosa 由来)、リシン A 鎖、アプリン A 鎖、モデッシン A 鎖、アルファ - サルシン、Aleurites fordii タンパク質、ジアンチン (dianthin) タンパク質、Phytolaca americana タンパク質 (P A P I、P A P I I、および P A P - S)、

【 0 3 2 4 】

momordica charantia 阻害剤、カルシン (curcin)、クロチン (crocin)、sapaonaria officinalis 阻害剤、ゲロニン (gelonin)、マイトジェリン (mitogellin)、レストリクトシン (restrictocin)、フェノマイシン (phenomycin)、エノマイシン (enomycin) およびトリコテセン (tricothecene) 類が含まれる。例えば 1993 年 10 月 28 日に刊行された WO 93/21232 を参照のこと。本発明は、さらに、抗体と、核酸分解活性を有する化合物 (例えば リボヌクレアーゼ または D N A エンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ; D N A s e) との間に形成される免疫抱合体を意図する。

【 0 3 2 5 】

腫瘍の選択的な破壊のために、抗体は放射性の高い原子を含むことができる。さまざまな放射性同位体が、放射結合した抗 O v r 1 1 0 抗体の産生のために使用可能である。例には、A t 211 、I 131 、I 125 、I n 111 、Y 90 、R e 186 、R e 188 、S m 153 、B i 212 、P 32 、および L u の放射性同位体が含まれる。結合体が診断に用いられる場合には、これは、シンチグラフィ検査のための放射性原子、例えば T c 99m もしくは I 123 、または核磁気共鳴 (NMR) 画像法 (磁気共鳴画像法、m r i) としても知られている) のためのスピン標識、例えば ヨウ素 - 123、ヨウ素 - 131、インジウム - 111、フッ素 - 19、炭素 - 13、窒素 - 15、酸素 - 17、ガドリニウム、マンガンもしくは鉄を含むことができる。

【 0 3 2 6 】

10

20

30

40

50

放射標識または他の標識を、既知の方法により抱合体中に導入することができる。例えば、ペプチドを、生合成しても、または、例えば水素の代わりにフッ素 - 19 を含む好適なアミノ酸前駆体を用いて化学的アミノ酸合成により合成してもよい。標識、例えば Tc^{99m} 、 I^{123} 、 In^{111} 、 Re^{186} 、 Re^{188} は、ペプチド中のシステイン残基を介して結合することができる。イットリウム - 90 は、リシン残基を介して結合することができる。IODOGEN法 (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) を用いて、ヨウ素を導入することができる。「Monoclonal Antibodies in Immuno-scintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989) には、他の方法が詳細に記載されている。

【0327】

抗体および細胞傷害剤の結合体を、さまざまな二官能性タンパク質カップリング剤、例えば N - スクシンイミジル (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP)、スクシンイミジル - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、イミノチオラン (IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体 (例えばジメチルアジピミデート HCL)、活性エステル類 (例えばスベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類 (例えばグルタルアルデヒド)、ビス - アジド化合物 (例えばビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導体 (例えばビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン)、ジイソシアネート類 (例えばトルエン 2, 6 ジイソシアネート) およびビス活性フッ素化合物 (例えば 1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン) を用いて作製することができる。

【0328】

例えば、リシン免疫毒素を、Vitetta et al. Science 238: 1098 (1987) に記載されているようにして調製することができる。炭素標識 1 - イソチオシアナトベンジルメチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、ラジオヌクレオチド (radionucleotide) の抗体への結合のための例示的なキレート剤である。WO 94/11026 参照。リンカーは、細胞中での細胞傷害性薬剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であってもよい。例えば、酸不安定リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992); 米国特許第 5,208,020 号) を用いてもよい。

【0329】

あるいは、抗 Ovr 110 抗体および細胞傷害剤を含む融合タンパク質を、組換え手法またはペプチド合成などにより作製することができる。DNA の長さは、互いに隣接しているか、または結合体の所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により分離されている、結合体の 2 つの部分にコードするそれぞれの領域を含むことができる。

【0330】

さらに、腫瘍の前標的化において用いるために、抗体を「受容体」(例えばストレプトアビジン) に結合させることができ、ここで、抗体 - 受容体結合体を患者に投与し、続いて結合していない結合体を循環から洗浄剤 (clearing agent) を用いて除去し、次に、細胞傷害剤 (例えばラジオヌクレオチド) に結合する「リガンド」(例えばアビジン) を投与する。

【0331】

抗体依存性酵素媒介プロドラッグ療法 (ADEPT)

プロドラッグ (例えばペプチジル化学療法剤、WO81/01145 参照、該開示は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる) を活性抗癌薬剤に変換するプロドラッグ活性化酵素に、抗体を抱合させることにより、本発明の抗体を ADEPT においても用いることができる。例えば、WO 88/07378 および米国特許第 4,975,278 号を参照、該開示は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる。

【0332】

ADEPT に有用な免疫抱合体の酵素成分には、プロドラッグに対して作用でき、これをより活性な細胞傷害性の形態に変換する任意の酵素が含まれる。本発明の方法において

10

20

30

40

50

有用な酵素には、リン酸塩含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なアルカリホスファターゼ；硫酸塩含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なアリアルスルファターゼ；無毒性フルオロシトシンを抗癌薬剤である5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；

【0333】

ペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なプロテアーゼ、例えばセラチア (*serratia*) プロテアーゼ、テルモリシン (*thermolysin*)、サブチリシン (*subtilisin*)、カルボキシペプチダーゼ類およびカテプシン類 (例えばカテプシンBおよびL)；Dアミノ酸置換基を含むプロドラッグを変換するのに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用な炭水化物切断酵素、例えばO-ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ；

10

【0334】

P-ラクタム類で誘導体化された薬剤を遊離薬物に変換するのに有用なP-ラクタマーゼ；ならびにこれらのアミン窒素においてそれぞれフェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基で誘導体化された薬剤を遊離薬物に変換するのに有用なペニシリンアミダーゼ類、例えばペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼが含まれるが、これらには限定されない。

【0335】

あるいは、当該分野において「アブザイム (*abzymes*)」としても知られている、酵素活性を有する抗体を用いて、本発明のプロドラッグを遊離活性薬物に変換することができる (例えば、Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)参照)。アブザイムを腫瘍細胞集団に送達するための酵素-アブザイム結合体を、本明細書中に記載したようにして調製することができる。本発明の酵素は、当該分野において十分知られている手法、例えば上記したヘテロ二官能性架橋試薬を用いることにより、抗Ovr110抗体に共有結合させることができる。

20

【0336】

あるいは、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分に結合した本発明の抗体の、少なくとも抗原結合領域を含む融合タンパク質は、当該分野において十分知られている組換えDNA手法を用いて構成することができる (例えばNeuberger et al., *Nature*, 312: 604-608 (1984)参照)。

30

【0337】

他の抗体修飾

抗体の他の修飾が本明細書において企図される。例えば、抗体は、さまざまな非タンパク質ポリマーの1種、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン類またはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとのコポリマーの1種に結合させることができる。抗体はまた、例えばコアセルベーション手法によりまたは界面重合により調製したマイクロカプセル中に (例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ(メチルメタシレート)マイクロカプセル)、コロイド状薬剤送達系 (例えばリポソーム、アルブミン微粒子、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル) 中、またはマクロエマルジョン中に封入することができる。かかる手法は、Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)に開示されている。

40

【0338】

本明細書中に開示した抗Ovr110抗体はまた、免疫リポソームとして製剤化することができる。「リポソーム」は、さまざまなタイプの脂質、リン脂質および/または、薬剤を哺乳動物に送達するのに有用な界面活性剤で構成される小さい小胞である。リポソームの成分は、一般に、生体膜の脂質配置と同様に、二層形態において配置されている。抗体を含むリポソームは、当該分野において知られている方法により、例えばEpstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980)；米国特許第4,485,045号および4,544,545号；ならびに199

50

7年10月23日刊行のW097/38731、該開示は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる、に記載されているように調製される。

【0339】

循環時間が延長されるリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されており、該開示は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる。特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発方法により生成することができる。リポソームを所定の孔の大きさを有するフィルターを通して押し出すことにより、所望の直径を有するリポソームを得る。本発明の抗体のFab'フラグメントを、Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)に記載されているようにして、ジスルフィド交換反応によりリポソームに結合させることができる。化学療法剤は、必要に応じてリポソーム内に包含される。Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989)参照。

10

【0340】

ベクター、宿主細胞および組換え方法

本発明はまた、ヒト化抗Ovr110抗体コードする単離された核酸分子、該核酸を含むベクターおよび宿主細胞、ならびに抗体を産生するための組換え手法を提供する。抗体の組換え産生のために、これをコードする核酸分子を単離し、さらなるクローニング(DNAの増幅)のために複製可能なベクター中に挿入するか、または発現のためのプロモーターを有する作動的な結合においてベクター中に挿入する。モノクローナル抗体をコードするDNAは、慣用的な手順を用いて(例えば抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸分子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)容易に単離され、配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクター成分には一般に以下の1種または2種以上が含まれるが、これらには限定されない:シグナル配列、複製の起点、1種または2種以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終結配列。

20

【0341】

シグナル配列成分

本発明の抗Ovr110抗体は、直接組換え的に産生するだけでなく、異種性ポリペプチドとの融合ポリペプチドとして組換え的に産生することができ、ここで該異種性ポリペプチドは、好ましくは、シグナル配列、または成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端において特定の切断部位を有する他のポリペプチドである。選択された異種性シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞により認識され、加工される(すなわちシグナルペプチダーゼにより切断される)ものである。

30

【0342】

ネイティブの抗Ovr110抗体シグナル配列を認識および加工しない原核宿主細胞に対しては、シグナル配列を、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppまたは熱安定性エンテロトキシンIリーダーの群から選択される原核シグナル配列により置換する。酵母での分泌のために、ネイティブのシグナル配列を、例えば、酵母インペルターゼリーダー、oc因子リーダー(SaccharomycesおよびKluyveromyces c c因子リーダーを含む)、または酸ホスファターゼリーダー、C albicansグルコアミラーゼリーダー、またはWO 90/13646に記載されているシグナルにより置換することができる。哺乳動物細胞発現において、哺乳動物シグナル配列およびウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペスgDシグナルが利用可能である。かかる前駆体領域についてのDNAは、抗Ovr110抗体をコードするDNAにリーディング・フレームにおいて連結する。

40

【0343】

複製起点

発現およびクローニングベクターは共に、ベクターを1または2以上の選択された宿主細胞中で複製することを可能にする核酸配列を含む。一般に、クローニングベクターにおいて、この配列は、ベクターが宿主染色体DNAとは独立して複製されることを可能にするものであり、複製起点または自己複製配列を含む。種々の細菌、酵母およびウイルス

50

についてのかかる配列が、よく知られている。プラスミド p B R 3 2 2 からの複製起点はほとんどのグラム陰性細菌に好適であり、2 μプラスミド起点は酵母に好適であり、多様なウイルス起点 (S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V または B P V) は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般に、哺乳動物発現ベクターについては、複製起点コンポーネントは必要ではない (S V 4 0 起点は、典型的には、これが初期プロモーターを含むとの理由のみにより用いられ得る)。

【0344】

選択遺伝子成分

発現およびクローニングベクターは、選択マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含むことができる。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質または他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートもしくはテトラサイクリンに対する耐性を付与するタンパク質、(b) 栄養要求性欠乏を補完するタンパク質、または(c) 複合培地から得られない必須栄養素を供給するタンパク質をコードし、例えば、これは、桿菌についての D - アラニンラセマーゼをコードする遺伝子である。選択スキームの1つの例では、宿主細胞の増殖を停止する薬剤を用いる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換された細胞は、薬剤耐性を付与するタンパク質を産生し、したがって選択レジメンを生き延びる。このような優性選択の例においては、薬剤であるネオマイシン、マイコフェノール酸およびヒグロマイシンを用いる。

10

【0345】

哺乳動物細胞に適する選択可能なマーカーの別の例は、抗 O v r 1 1 0 抗体核酸を吸収することについて競合性の細胞を同定することを可能にするものであり、例えば D H F R、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン - I および - 1 1、好ましくは霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどである。例えば、D H F R 選択遺伝子で形質転換される細胞を、先ず D H F R の競合的アンタゴニストであるメトトレキセート (M t x) を含む培養培地中ですべての形質転換体を培養することにより同定する。野生型の D H F R を用いる場合の適切な宿主細胞は、D H F R 活性が欠乏しているチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞系 (例えば ATCC CRL-9096) である。

20

【0346】

あるいは、抗 O v r 1 1 0 抗体、野生型 D H F R タンパク質および他の選択可能なマーカー、例えばアミノグリコシド 3' - ホスホトランスフェラーゼ (A P H) をコードする D N A 配列で形質転換または同時形質転換 (co-transform) された宿主細胞 (特に内因性 D H F R を含む野生型宿主) は、選択可能なマーカーのための選択剤、例えばアミノグリコシド抗生物質、例えばカナマイシン、ネオマイシンまたは G 4 1 8 のための選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。米国特許第4,965,199号参照。

30

【0347】

酵母における使用に適する選択遺伝子は、酵母プラスミド Y R p 7 中に存在する t r p 1 遺伝子である (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979))。t r p 1 遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠いている酵母の、突然変異菌株、例えば ATCC No. 44076 または PEP4 Jones, Genetics, 85:12 (1977) のための選択マーカーを提供する。次いで、酵母宿主細胞ゲノム中の t r p 1 異常の存在は、トリプトファンの不在下での増殖により形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、L e u 2 欠損酵母菌株 (ATCC 20,622 または 38,626) は、L e u 2 遺伝子を有する既知のプラスミドにより補完される。

40

【0348】

さらに、1.6 μm 環状プラスミド p K D I に由来するベクターを、Kluyveromyces 酵母の形質転換のために用いることができる。あるいは、組換え仔ウシキモシンの大規模な産生のための発現系が K. lactis について報告された。Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990)。Kluyveromyces の工業的な菌株による、成熟組換えヒト血清アルブミンの分泌のための安定なマルチコピー発現ベクターも開示されている。Fleer et al., Bio/Tech

50

nology, 9:968-975 (1991)。

【0349】

プロモーター成分

発現およびクローニングベクターは、通常、宿主生物により認識されるプロモーターを含み、抗Ovr110抗体核酸に作動的に連結している。原核宿主と共に用いるのに適するプロモーターには、phoAプロモーター、P-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼプロモーター、トリプトファン(trp)プロモーター系およびハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーターが含まれる。しかし、他の既知の細菌性プロモーターが好適である。細菌系において用いるためのプロモーターはまた、抗Ovr110抗体をコードするDNAに作動的に連結したShine-Dalgarno(S.D.)配列を含む。

10

【0350】

真核生物についてのプロモーター配列は、公知である。事実上すべての真核生物遺伝子は、転写が開始される部位から約25~30塩基上流に位置する、ATリッチな領域を有する。多くの遺伝子において転写開始部位から70~80塩基上流に見出される他の配列は、CNCAAT領域であり、ここでNは、任意のヌクレオチドであってよい。ほとんどの真核生物遺伝子の3'末端において、ポリAテールのコード配列を3'末端へ添加するためのシグナルとなり得るAATAA配列がある。

【0351】

これらの配列のすべてを、真核発現ベクター中に好適に挿入する。酵母宿主と共に用いるのに適するプロモーター配列の例には、3-ホスホグリセレートキナーゼまたは他の解糖酵素についてのプロモーター、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒドホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコースホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼおよびグルコキナーゼについてのプロモーターが含まれる。

20

【0352】

生育条件により転写が制御されるというさらなる利点を有する誘導プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒドホスフェートデヒドロゲナーゼ、ならびにマルトースおよびガラクトースに關与する酵素についてのプロモーター領域である。酵母での発現における使用に好適なベクターおよびプロモーターは、さらに、EP 73,657に記載されている。酵母エンハンサーはまた、酵母プロモーターと共に有利に用いられる。

30

【0353】

哺乳動物宿主細胞中のベクターからの抗Ovr110抗体転写は、プロモーターが宿主細胞系と適合性であれば、例えば、ポリオマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましくはシミアン・ウイルス40(SV40)などのウイルスのゲノムから得られたプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター(例えばアクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター)から得られたプロモーター、熱ショックプロモーターから得られたプロモーターにより制御される。

40

【0354】

SV40ウイルスの初期および後期のプロモーターは、SV40ウイルスの複製起点も含むSV40制限フラグメントとして好都合に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの即時型早期プロモーターは、HindIII-E制限フラグメントとして好都合に得られる。ベクターとしてウシパピローマウイルスを用いる哺乳動物宿主においてDNAを発現するための系は、米国特許第4,419,446号に開示されている。この系の改変は、米国特許第4,601,978号に記載されている。また単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモ

50

ーターの制御の下での、マウス細胞におけるヒト P - インターフェロン c D N A の発現については、Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)を参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウイルスの長い末端リピートをプロモーターとして用いることができる。

【 0 3 5 5 】

エンハンサーエレメント成分

本発明の抗 O v r 1 1 0 抗体をコードする D N A の高等真核生物による転写は、エンハンサー配列をベクター中に挿入することにより多くの場合増強される。現在多数のエンハンサー配列が、哺乳動物遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインシュリン）から知られている。しかし、典型的には、真核細胞ウイルスからのエンハンサーを用いる。

10

【 0 3 5 6 】

例として、複製起点の後期側（late side）の S V 4 0 エンハンサー（b p 1 0 0 ~ 2 7 0）、サイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核プロモーターの活性化のためのエンハンサーエレメントについては、Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)も参照。エンハンサーは、抗 O v r 1 1 0 抗体コード配列に対して 5 ' または 3 ' の位置において、ベクター中にスプライシング挿入することができるが、好ましくは、プロモーターから 5 ' 側の部位に位置させる。

【 0 3 5 7 】

転写終結成分

真核宿主細胞（酵母、真菌類、昆虫、植物、動物、ヒトまたは他の多細胞生物からの有核細胞）において用いられる発現ベクターはまた、転写を終結させるのに、および m R N A を安定化させるのに必要な配列を含む。かかる配列は、真核またはウイルス D N A または c D N A の 5 '、および場合によっては 3 ' の未翻訳領域から一般的に入手できる。これらの領域は、抗 O v r 1 1 0 抗体をコードする m R N A の未翻訳部分中のポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含む。1つの有用な転写終結成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO 94/11026 およびこの文献中に開示されている発現ベクターを参照のこと。

20

【 0 3 5 8 】

宿主細胞の選択および形質転換

本明細書において、ベクター中で D N A をクローニングするかまたは発現するために好適な宿主細胞は、上記の原核、酵母または高等真核細胞である。この目的に好適な原核生物には、真性細菌、例えばグラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、腸内細菌科、大腸菌属、例えば E. coli、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属、例えば Salmonella typhimurium、セラチア属、例えば Serratia marcescans、および赤痢菌属、ならびに桿菌、例えば B. subtilis および B. licheniformis（例えば DD 266,710、1989年4月12日刊行に開示されている B. licheniformis 41P）、シュードモナス属、例えば P. aeruginosa、ならびにストレプトマイセス属が含まれる。1つの好ましい大腸菌クローニング宿主は、E. coli 294 (ATCC 31,446) であるが、他の菌株、例えば E. coli B、E. coli X1776 (ATCC 31,537) および E. coli W31 10 (ATCC 27,325) が好適である。これらの例は、限定的というよりむしろ例示的である。

30

40

【 0 3 5 9 】

全長抗体、抗体フラグメントおよび抗体融合タンパク質は、細菌において産生することができ、特にグリコシル化および F c エフェクター機能が必要ではない場合、例えば治療的抗体が細胞傷害剤（例えば毒素）に結合しており、免疫抱合体が単独で腫瘍細胞破壊における有効性を示す場合に、細菌において産生することができる。全長抗体は、循環においてより長い半減期を有する。大腸菌での産生はより迅速で費用効率的である。

【 0 3 6 0 】

細菌における抗体フラグメントおよびポリペプチドの発現については、翻訳開始領域（T I R）ならびに発現および分泌を最適化するためのシグナル配列を記載している。例え

50

ば、米国特許第5,648,237号(Carter et al.)、米国特許第5,789,199号(Joly et al.)および米国特許第5,840,523号(Simmons et al.)を参照のこと。これらの特許を、参照として本明細書中に援用する。発現の後に、可溶化区分における大腸菌細胞ペーストから抗体を単離し、アイソタイプに依存して、例えばプロテインAまたはGカラムにより精製することができる。最終的な精製は、例えばCHO細胞中で発現された抗体を精製するための方法と同様に行うことができる。

【0361】

原核生物に加えて、真核微生物、例えば糸状真菌類または酵母が、抗Ovr110抗体コードベクターに適するクローニングまたは発現宿主である。Saccharomyces cerevisiaeまたは一般的なパン酵母は、下等な真核宿主微生物の中で最も一般的に用いられている。しかし、多くの他の属、種および菌株が一般に入手可能で有用であり、例えばSchizosaccharomyces pombe; Kluyveromyces宿主、例えばK. lactis、K. fragilis (ATCC 12,424)、K. bulgaricus (ATCC 16,045)、K. wickerhamii (ATCC 24,178)、K. waltii (ATCC 56,500)、K. drosophilum (ATCC 36,906)、K. thermotoleransおよびK. marxianus; yarrowia (EP 402,226); Pichia pastoris (EP 183,070); カンジダ属; Trichoderma reesia (EP 244,234); Neurospora crassa; Schwanniomyces、例えばSchwanniomyces occidentalis; ならびに糸状真菌類、例えばパンカビ属、アオカビ属、Tolyocladiumおよびコウジカビ属宿主、例えばA. nidulansおよびA. nigerなどである。

10

【0362】

グリコシル化された抗Ovr110抗体の発現に適する宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例には、植物および昆虫細胞が含まれる。多くのバキュロウイルス菌株および変異体ならびに宿主、例えばSpodoptera frugiperda (鱗翅目幼虫)、Aedes aegypti (蚊)、Aedes albopictus (蚊)、Drosophila melanogaster (ショウジョウバエ)およびBombyx moriからの対応する許容的な昆虫宿主細胞が、同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス菌株、例えばAutographa californica NPVのL-1変種およびBombyx mori NPVのBm-5菌株が公的に入手可能であり、かかるウイルスは、ここで本発明のウイルスとして、特にSpodoptera frugiperda細胞のトランスフェクションのために用いることができる。

20

【0363】

綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、シロイヌナズナおよびタバコの植物細胞培養物もまた、宿主として用いることができる。植物細胞培養物におけるタンパク質の産生において有用なクローニングおよび発現ベクターは、当業者に知られている。例えばHiatt et al., Nature (1989) 342: 76-78、Owen et al. (1992) Bio/Technology 10: 790-794、Artsaenko et al. (1995) The Plant J 8: 745-750およびFecker et al. (1996) Plant Mol Biol 32: 979-986参照。

30

【0364】

しかしながら、脊椎動物細胞への関心が最も大きく、培養物(組織培養物)中の脊椎動物細胞の増殖が常習的な手順となった。有用な哺乳動物宿主細胞系の例は、SV40により形質転換したサル腎臓CV1系列(COS-7、ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓系列(293または懸濁液培養物中で増殖するためにサブクローニングした293細胞、Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977); ベビーハムスター腎臓細胞(BHK、ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞/ - DHFR (CHO、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); マウスセルトリ細胞(TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); サル腎臓細胞(CVI ATCC CCL 70); アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76、ATCC CRL1587); ヒト子宮頸癌腫細胞(HEL4、ATCC CCL 2); イヌ腎臓細胞(MDKC、ATCC CCL 34); バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A、ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL 75); ヒト肝臓細胞(Hep G2、1413 8065); マウス乳腺腫瘍(MMT 060562、ATCC CCL5 1); TRI細胞(Mather et al., Annals N. Y Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5細胞; FS4細胞; およびヒト肝細胞腫系列(Hep G2)である。

40

50

【0365】

宿主細胞を、上記の発現ベクターまたはクローニングベクターを用いて抗Ovr110抗体産生のために形質転換し、プロモーターを誘発するか、形質転換体を選択するか、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように改変した、慣用的な栄養培地中で培養する。

【0366】

宿主細胞の培養

本発明の抗Ovr110抗体を産生するために用いられる宿主細胞は、さまざまな培地中で培養することができる。市販の培地、例えばHam's F10 (Sigma)、基礎培地(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)およびダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(Sigma)は、宿主細胞を培養するのに適する。さらに、Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes et al., Anal. Biochem.102:255 (1980)、米国特許第4,767,704号；4,657,866号；4,927,762号；4,560,655号；もしくは5,122,469号；WO 90/03430；WO 87/00195；または米国特許Re. 30,985号に記載されている培地のいずれかを、宿主細胞のための培養培地として用いることができる。

10

【0367】

これらの培地のすべてに、必要に応じてホルモンおよび/または他の成長因子(例えばインシュリン因子、トランスフェリン因子もしくは上皮細胞成長因子)、塩類(例えば塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウムおよびリン酸塩)、緩衝液(例えばHEPES)、ヌクレオチド類(例えばアデノシンおよびチミジン)、抗生物質(例えばGENTAMYCIN(登録商標)薬剤)、微量元素(通常マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物として定義される)、およびグルコースまたは同等のエネルギー源を補足することができる。すべての他の必要な補足物もまた、当業者に知られている適切な濃度で含有することができる。培養条件、例えば温度、pHなどは、発現のために選択された宿主細胞について前に用いられているものであり、通常当業者には明らかである。

20

【0368】

抗Ovr110抗体の精製

組換え手法を用いる場合、抗体を細胞内で細胞膜周辺腔または培地に直接分泌して産生することができる。細胞内で抗体を産生する場合は、第1のステップとして粒子状残骸、宿主細胞または溶解したフラグメントのいずれかを、例えば遠心分離または限外濾過により除去する。Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)には、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順が記載されている。

30

【0369】

簡単に述べると、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTAおよびフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)の存在下で、約30分にわたり融解させる。細胞残骸は遠心分離により除去することができる。抗体を培地に分泌する場合は、このような発現系からの上清は一般に、先ず、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmiconまたはMillipore Pelliconの限外濾過ユニットを用いて濃縮する。例えばPMSFなどのプロテアーゼ阻害剤は、前述のステージのいずれかにおいて導入して、タンパク質分解を阻害することができ、抗生物質を導入して、外来性の混入物の増殖を防止することができる。

40

【0370】

細胞から調製された抗体組成物を、例えばヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析およびアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製することができ、アフィニティークロマトグラフィーが、好ましい精製手法である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFc領域の種およびアイソタイプに依存する。プロテインAを用いて、ヒト 1、 2または 4重鎖に基づく抗体を精製することができる(Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。

【0371】

50

プロテイン G が、すべてのマウスアイソタイプおよびヒト 3 のために推奨される (Gus s et al., EMBO J. 5:15671575 (1986))。アフィニティリガンドが付着したマトリックスは、最も頻繁にはアガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。機械的に安定なマトリックス、例えば細孔性ガラス (controlled pore glass) またはポリ (スチレンジビニル) ベンゼンにより、アガロースを用いて達成し得るよりも速い流速および短い加工時間が可能になる。抗体が C H 3 領域を含む場合、Bakerbond ABX (登録商標) 樹脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) が、精製に有用である。

【 0 3 7 2 】

タンパク質精製のための他の手法、例えばイオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相 H P L C、シリカ上でのクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE (登録商標) 上でのクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂 (例えばポリアスパラギン酸カラム) 上でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、S I D S - P A G E および硫酸アンモニウム沈殿もまた、回収されるべき抗体に依存して利用可能である。

10

【 0 3 7 3 】

1 または 2 以上のすべての予備的精製ステップに続いて、関連する抗体および混入物を含む混合物に、p H 約 2 . 5 ~ 4 . 5 の溶離緩衝液を用いて、好ましくは低い塩濃度 (例えば約 0 ~ 0 . 2 5 M の塩) において行われる低 p H 疎水性相互作用クロマトグラフィーを施すことができる。

【 0 3 7 4 】

医薬製剤

20

本発明にしたがって用いる抗体の医薬製剤を、保管のために所望の程度の純度を有する抗体を随意的薬学的に許容される担体、賦形剤または安定剤と混合し (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))、凍結乾燥した製剤または水性溶液の形態において調製する。許容される担体、賦形剤または安定剤は、用いられる用量および濃度においてレシピエントに対して無毒性であり、

【 0 3 7 5 】

緩衝液、トリス、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸類などの緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；保存剤 (例えば塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン類、例えばメチルもしくはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3 - ペンタノールおよび m - クレゾール)；低分子量 (約 1 0 個の残基よりも小さい) ポリペプチド類；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン類；親水性ポリマー類、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸類、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリシン；

30

【 0 3 7 6 】

グルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む単糖類、二糖類および他の炭水化物；キレート剤、例えば E D T A；強壯剤類 (tonicifier)、例えばトレハロースおよび塩化ナトリウム；糖類、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトール；界面活性剤、例えばポリソルベート；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属複合体類 (例えば Z n - タンパク質複合体類)；および / または非イオン系界面活性剤、例えば TWEEN (登録商標)、PLURONICS (登録商標) もしくはポリエチレングリコール (P E G) を含む。抗体は、好ましくは、5 ~ 2 0 0 m g / m L、好ましくは 1 0 ~ 1 0 0 m g / m L の濃度での抗体を含む。

40

【 0 3 7 7 】

ここでの製剤はまた、処置される特定の適応のための必要に応じて、1 種より多い活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有するものを含むことができる。例えば、内部移行する抗 O v r 1 1 0 抗体に加えて、1 つの製剤において、追加の抗体、例えば O v r 1 1 0 上の異なるエピトープに結合する第 2 の抗 O v r 1 1 0 抗体、または、例えば特定の癌の増殖に影響する成長因子などの他の標的に対する抗体を含むの

50

が望ましい場合がある。代替的に、または付加的に、この組成物はさらに、化学療法剤、細胞傷害剤、サイトカイン、成長阻害剤 (growth inhibitory agent)、抗ホルモン剤および/または心臓保護剤 (cardioprotectant) を含むことができる。かかる分子は、好適に、意図される目的のために有効な量で、組み合わせ存在する。

【0378】

活性成分はまた、例えばコアセルベーション手法または界面重合により調製したマイクロカプセルに封入することができ、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル中に、コロイド状薬剤送達系(例えばリポソーム、アルブミン微粒子、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)において、またはマクロエマルジョンにおいて封入することができ、かかる手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, O sol, A. Ed. (1980)に開示されている。

10

【0379】

徐放製剤を調製してもよい。徐放製剤の好適な例には、抗体を含む固体疎水性ポリマー類の半透過性マトリックスが含まれ、このマトリックスは、成形した物品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリックスの例には、ポリエステル類、ヒドロゲル類(例えばポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド類(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸のコポリマー類、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー類、例えばLUPRON DEPOT(登録商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成された注射可能な微粒子)、ならびにポリ-D-()ヒドロキシ酪酸が含まれる。

20

in vivoでの投与のために用いるべき製剤は、無菌でなければならない。これは、無菌濾過膜を通しての濾過により容易に達成される。

【0380】

抗Ovr110抗体を用いた方法および処置

本発明によれば、Ovr110に結合してOvr110の活性を調節するまたは細胞表面上のOvr110に結合すると内部移行する抗Ovr110抗体を用いて、Ovr110発現癌細胞を特徴とする癌、特に卵巣漿液性腺癌または乳房浸潤性乳管癌、および関連する転移などの卵巣癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、腎臓癌、膵臓癌、肺癌または乳癌を有する、かかる処置を必要としている被験体を処置する。

30

【0381】

前記の癌は一般にOvr110発現細胞を含み、抗Ovr110抗体はこれに結合することができる。前記の癌はOvr110分子の過剰発現により特徴付けることができるが、本出願はさらに、Ovr110過剰発現癌であるとは考えられない癌を処置するための方法も提供する。

【0382】

本発明はまた、Ovr110を過剰発現する細胞を検出するための方法および、Ovr110を発現する細胞を検出するにあたり、または患者の血清中のOvr110の検出に有用な診断キットに関する。該方法は、細胞含有試験サンプルを本発明の抗体と混ぜ合わせる、試験サンプルを、試験サンプル中の細胞に結合する抗体についてアッセイすること、および試験サンプルにおいて結合する抗体のレベルを、細胞のコントロールサンプルにおいて結合する抗体のレベルに対して比較することを含んでもよい。

40

【0383】

好適なコントロールは、例えば、試験サンプルと同一種類の正常な細胞のサンプル、またはOvr110過剰発現細胞を含まないことが知られている細胞サンプルである。かかるコントロールサンプルより高いOvr110結合レベルは、試験サンプルがOvr110を過剰発現する細胞を含むことを示す。あるいは、コントロールは、Ovr110を過剰発現する細胞を含むことが知られている細胞のサンプルであってもよい。このような場合において、試験サンプルにおける、コントロールサンプルに類似したOvr110抗体

50

結合レベル、またはコントロールサンプルを超える O v r 1 1 0 抗体結合レベルは、試験サンプルが O v r 1 1 0 を過剰発現する細胞を含むことを示す。

【 0 3 8 4 】

O v r 1 1 0 過剰発現は、さまざまな診断アッセイにより検出することができる。例えば、O v r 1 1 0 の過剰発現は、免疫組織化学法 (I H C) によりアッセイすることができる。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織切片に、I H C アッセイを施し、O v r 1 1 0 タンパク質染色強度の以下の基準と一致させることができる。

【 0 3 8 5 】

スコア 0 染色は観察されない、または腫瘍細胞の 1 0 % 未満において膜染色が観察される。

スコア 1 + わずかな / 辛うじて知覚可能な膜染色が、腫瘍細胞の 1 0 % 以上において検出される。細胞は、それらの膜の一部のみ染色されている。

スコア 2 + 弱い、ないし中程度の完全な膜染色が、腫瘍細胞の 1 0 % 以上において観察される。

スコア 3 + 中程度ないし強い完全な膜染色が、腫瘍細胞の 1 0 % 以上において観察される。

【 0 3 8 6 】

O v r 1 1 0 発現についての 0 または 1 + のスコアを有する腫瘍を、O v r 1 1 0 を過剰発現しないものとして特徴付けることができ、一方 2 + または 3 + のスコアを有する腫瘍を、O v r 1 1 0 を過剰発現するものとして特徴付けることができる。

【 0 3 8 7 】

代替的に、または付加的に、F I S H アッセイ、例えば I N F O R M (登録商標) (Ventana, Arizona により販売されている) または P A T H V I S I O N (登録商標) (VySiS, Illinois) を、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織において行い、腫瘍における O v r 1 1 0 過剰発現の程度 (存在する場合には) を決定することができる。O v r 1 1 0 過剰発現または増幅を、in vivo 診断アッセイを用いて評価することができ、例えば O v r 1 1 0 を結合する、検出可能な標識 (例えば放射性同位体または蛍光標識) で標識した分子 (例えば本発明の抗体) を投与し、患者を該標識の局在について外部から走査することにより、評価することができる。

【 0 3 8 8 】

O v r 1 1 0 を発現または過剰発現する細胞を含むことが疑われるサンプルを、本発明の抗体と、抗体の O v r 1 1 0 への特異的結合に適する条件の下で、混ぜ合わせる。本発明の O v r 1 1 0 抗体の結合および / または内部移行は、O v r 1 1 0 を発現する細胞を示す。結合レベルを決定して好適なコントロールと比較することができ、ここで、コントロールと比較して上昇した結合 O v r 1 1 0 のレベルは、O v r 1 1 0 過剰発現を示す。O v r 1 1 0 を過剰発現する細胞を含むことが疑われるサンプルは、癌細胞サンプル、特に卵巣癌、例えば卵巣漿液性腺癌、または乳癌、例えば乳房浸潤性乳管癌、のサンプルであってもよい。

【 0 3 8 9 】

被験体の血清サンプルを本発明の O v r 1 1 0 抗体と混ぜ合わせ、抗体に結合した O v r 1 1 0 のレベルを決定し、このレベルをコントロールと比較することにより、被験体からの血清サンプルもまた O v r 1 1 0 のレベルについてアッセイすることができ、ここで、コントロールと比較して、患者の血清中における O v r 1 1 0 の上昇したレベルは、患者の細胞による O v r 1 1 0 の過剰発現を示す。被験体は、例えば、卵巣癌、例えば卵巣漿液性腺癌、または乳癌、例えば乳房浸潤性乳管癌、などの癌を有している可能性がある。

【 0 3 9 0 】

現在、癌のステージに依存して、卵巣癌、膵臓癌、肺癌または乳癌の処置は、以下の療法の 1 種または組み合わせを含む：癌組織を除去するための手術、放射線療法、アンドロゲン剥脱 (例えばホルモン療法)、および化学療法。抗 O v r 1 1 0 抗体療法は、化学療

10

20

30

40

50

法の毒性および副作用を十分に耐容しない年長の患者において、放射線または化学療法の有用性が限定された転移性疾患において、特に望ましい場合がある。

【0391】

本発明の腫瘍標的化および内部移行抗Ovr110抗体は、Ovr110発現癌、例えば卵巣癌、膵臓癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、腎臓癌、肺癌または乳癌を、疾患の最初の診断の際に、または再発の間に緩和させるのに有用である。治療的用途のために、抗Ovr110抗体を単独で、または例えば他の抗体、化学療法薬、ホルモン、抗血管新生剤もしくは放射標識した化合物との組合せ、または手術、凍結療法および/または放射線療法との組合せ療法において、特に卵巣癌、膵臓癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、腎臓癌、肺癌もしくは乳癌のために、また特に排出された細胞が到達し得ない場合において用いることができる。

10

【0392】

抗Ovr110抗体による処置は、他の形態の従来療法と組み合わせて、前または後慣用療法に連続して投与することができ、化学療法薬剤、例えばTaxotere（登録商標）（ドセタキセル）、Taxol（登録商標）（パクリタキセル）、エストラムスチンおよびマイトキサントロンは、転移性およびホルモン抵抗性卵巣癌、膵臓癌、肺癌または乳癌の処置において、特に危険の少ない患者において用いることができる。癌、特に、アンドロゲン非依存性および/または転移性卵巣癌、膵臓癌、肺癌もしくは乳癌を処置または緩和するための、本発明の方法において、癌患者に、抗Ovr110抗体を、1種または2種以上の前の化学療法剤での処置と組み合わせて投与することができる。

20

【0393】

特に、パクリタキセルおよび修飾した誘導体（例えばEP0600517参照）との組合せ療法が企図される。抗Ovr110抗体を、治療的に有効な用量の化学療法剤と共に投与する。抗Ovr110抗体はまた、化学療法と組み合わせて投与して、化学療法剤、例えばパクリタキセルの活性および効能を増強することができる。米国医薬品便覧（PDR）には、さまざまな癌の処置において用いられている当該剤の投与量が開示されている。治療上有効なこれらの前述の化学療法薬剤の投薬計画および投与量は、処置される特定の癌、疾患の程度および当該分野における熟練した医師が精通している他の要因に依存し、医師により決定されることができる。

【0394】

特に、細胞傷害剤と結合した抗Ovr110抗体を含む免疫結合体を、患者に投与することができる。好ましくは、Ovr110タンパク質に結合した免疫結合体は、細胞により内部移行され、この抗体が結合する癌細胞の死滅における免疫結合体の治療効果の増強をもたらされる。好ましくは、細胞傷害剤は、癌細胞の核酸を標的化するかまたはこれに干渉する。かかる細胞傷害剤の例は上記の通りであり、メイタンシン、メイタンシノイド類、サポリン、ゲロニン、リシン、カリケアマイシン、リボヌクレアーゼおよびDNAエンドヌクレアーゼを含む。

30

【0395】

抗Ovr110抗体または免疫抱合体を、ヒト患者に、静脈内投与などの既知の方法にしたがって、例えば大量瞬時投与として、またはある期間にわたる連続的な注入により、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内（intracerebrospinal）、皮下、関節内、滑膜内（intrasynovial）、くも膜下腔内、経口、局所的または吸入経路により投与する。抗体または免疫抱合体を、腫瘍本体に直接注射してもよい。抗体の静脈内または皮下投与が好ましい。他の治療計画を、抗Ovr110抗体の投与と組み合わせてもよい。

40

【0396】

組み合わせ投与には、個別の製剤または単一の医薬製剤を用いた同時投与、およびいずれかの順序での連続的投与が含まれ、ここで、両方（またはすべて）の活性剤が、その生物学的活性を同時に奏する期間があることが好ましい。好ましくは、かかる組み合わせ療法の結果、相乗的な治療効果がもたらされる。

【0397】

50

また、1種または2種以上の抗Ovr110抗体の投与を、特定の癌に関連する他の腫瘍抗原に指向された抗体の投与と組み合わせることが、望ましい場合がある。このようにして、本発明はまた、本発明の1種または2種以上の抗体および、Ovr110発現腫瘍細胞と関連する他の腫瘍抗原に結合する少なくとも1種の他の抗体を含む、抗体「カクテル」に関する。該カクテルはまた、Ovr110の他のエピトープに指向された抗体を含むことができる。好ましくは、他の抗体は、本発明の抗体の結合およびまたは内部移行に干渉しない。

【0398】

本発明の抗体治療処置方法は、抗Ovr110抗体（単数または複数）および1種または2種以上の化学療法剤もしくは増殖阻害剤の組合せ投与を含むことができ、さまざまな化学療法剤のカクテルの同時投与を含む。化学療法剤には、例えば、リン酸エストラムスチン、プレドニムスチン、シスプラチン、5-フルオロウラシル、メルファラン、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素およびヒドロキシ尿素タキサン類（例えばパクリタキセルおよびドキシタキセル）および/またはアントラサイクリン抗生物質が含まれる。かかる化学療法剤のための調製および投与スケジュールは、製造者の指示にしたがって、または技術のある施術者が経験的に決定するようにして用いることができる。このような化学療法のための調製および投与計画は、Chemotherapy Service, Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも説明されている。

10

【0399】

抗体を、抗ホルモン化合物；例えばタモキシフェンなどの抗エストロゲン化合物；オナプリストン（EP 616 812参照）などの抗プロゲステロン化合物；またはフルタミドなどの抗アンドロゲン化合物と、かかる分子について知られている投与量で混ぜ合わせることができる。処置されるべき癌がエストロゲン非依存性癌である場合には、患者は予め抗エストロゲン療法を受けていてもよく、癌がエストロゲン非依存性となった後に、抗Ovr110抗体（および任意に本明細書中に記載した他の薬剤）を、患者に投与することができる。

20

【0400】

時には、心臓保護剤（療法に付随する心筋機能障害を予防するかまたは低減させるため）または1種もしくは2種以上のサイトカインを患者に同時投与することも有益であり得る。前述の療法計画に加えて、患者に対して、癌細胞の手術的除去および/または放射線療法を、抗体療法の前に、抗体療法と同時に、または抗体療法の後に施してもよい。前述の同時投与される任意の薬剤に好適な投与量は、ここで用いられたものであり、薬剤と抗Ovr110抗体との組み合わせられた作用（相乗作用）のために減少させることもできる。

30

【0401】

疾患の予防または処置のために、投与量および投与の方式を、既知の基準にしたがって医師が選択する。抗体の好適な投与量は、上記において定義した、処置すべき疾患の種類、疾患の重篤度および経過、抗体が予防目的で投与されるのか治療目的で投与されるのか、前の療法、患者の臨床履歴および抗体への応答ならびに担当医の裁量に依存する。抗体は、患者に対して、1回でまたは一連の処置にわたり好適に投与する。好ましくは抗体は、静脈内注入により、または皮下注射により投与する。疾患の種類および重篤度に依存して、約1pg/体重1kg～約50mg/体重1kg（例えば約0.1～15mg/kg/用量）の抗体を、例えば、1もしくは2以上の別個の投与による、または連続的な注入による、患者への投与のための最初の候補投与量とすることができる。

40

【0402】

投与計画は、約4mg/kgの最初の負荷用量を投与し、続いて約2mg/kgの抗Ovr110抗体の用量を毎週維持することを含むことができる。しかし、他の投与計画も有用であり得る。典型的な毎日の投与量は、前述の要因に依存して、約1pg/kg～100mg/kgまたはこれ以上の範囲内であり得る。状態に依存した、数日またはこれより長い期間にわたる繰り返し投与については、疾患症状の所望の抑制がもたらされるまで

50

処置を持続させる。この療法の進行を、慣用の方法およびアッセイにより、および医師または他の当業者に知られている基準に基づいて、容易にモニタリングすることができる。

【0403】

抗体タンパク質の患者への投与に加えて、本出願は、遺伝子療法による抗体の投与を企図する。抗体をコードする核酸分子のこのような投与は、「抗体の治療有効量を投与する」との表現により包含される。例えば、遺伝子療法を用いて細胞内抗体を生成することに関する、1996年3月14日刊行のWO 96/07321（該開示は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる）を参照のこと。

【0404】

核酸分子（任意にベクターに包含されている）を患者の細胞中に導入するための、*in vivo*および*ex vivo*の2つの主要な方法がある。*in vivo*送達に対しては、核酸分子を患者に直接、通常は抗体が必要である部位において注射する。*ex vivo*処置に対しては、患者の細胞を取り出し、核酸分子をこれらの単離した細胞中に導入し、修飾した細胞を、患者に、直接、または例えば多孔質膜内に封入し、これを患者中に移植して、投与する（例えば米国特許第4,892,538号および5,283,187号参照、該開示は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる）。

【0405】

核酸分子を生存細胞中に導入するために利用可能なさまざまな手法がある。これらの手法は、核酸が、培養した細胞中に*in vitro*で移送されるか、または目的の宿主の細胞中に*in vivo*で移送されるかに依存して変化する。核酸を哺乳動物細胞中に*in vitro*でトランスファーするのに適した手法には、リポソームの使用、電気穿孔法、マイクロ注射、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿方法などが含まれる。遺伝子の*ex vivo*送達のために共通して用いられるベクターは、レトロウイルスベクターである。

【0406】

現在の好ましい*in vivo*の核酸分子移送手法には、ウイルスベクター（例えばアデノウイルス、単純ヘルペスウイルスまたはアデノ関連ウイルス）および脂質に基づく系（遺伝子の脂質媒介移送に有用な脂質は、例えばDOTMA、DOPEおよびDC-Cholである）を用いたトランスフェクションが含まれる。現在知られている遺伝子マーキングおよび遺伝子療法プロトコルの概説については、Anderson et al., Science 256:808-813 (1992)を参照のこと。またWO 93/25673およびこの文献中に引用されている参考文献を参照のこと。

【0407】

製品およびキット

本発明はまた、Ovr110過剰発現細胞の検出および/またはOvr110発現癌、特に卵巣癌、膵臓癌、肺癌もしくは乳癌の処置に有用な物質を含む製品に関する。製品は、容器およびこの中に収容された組成物を含み、該組成物は本発明の抗体を含む。該組成物はさらに、担体を含むことができる。製品はまた、容器上にまたはこれに付随してラベルまたは添付文書を含むことができる。好適な容器には、例えば、瓶、バイアル、シリンジなどが含まれる。容器は、さまざまな材料、例えばガラスまたはプラスチックから形成することができる。

【0408】

容器は、Ovr110発現細胞を検出し、および/または癌状態を処置するのに有効な組成物を保持し、また無菌のアクセス口を有することができる（例えば、この容器は、静脈内溶液袋または皮下組織注射針により貫通可能な栓を有するバイアルであってもよい）。組成物中の少なくとも1種の活性薬剤は、本発明の抗Ovr110抗体である。ラベルまたは添付文書は、組成物が、Ovr110発現細胞を検出し、および/または卵巣癌、膵臓癌、肺癌もしくは乳癌、またはより具体的に、卵巣漿液性腺癌、もしくは乳房浸潤性乳管癌を、これを必要としている患者において処置するのに用いられることを示す。

【0409】

ラベルまたは添付文書は、さらに、抗体組成物を癌患者に投与するための指示を含むこ

10

20

30

40

50

とができる。さらに、製品は、本発明の抗体を検出する物質、例えば本発明の抗体に結合する第2の抗体を含む第2の容器をさらに含むことができる。この物質は、検出可能な標識、例えば本明細書中に開示したもので標識することができる。第2の容器は、例えば、薬学的に許容される緩衝液、例えば注射用の静性水（B W F I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液およびデキストロス溶液を含むことができる。製品はさらに、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料を含むことができ、これらには他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針およびシリンジが含まれる。

【0410】

さまざまな目的に有用なキットが提供され、例えばO v r 1 1 0細胞殺傷アッセイのため、O v r 1 1 0を細胞から精製もしくは免疫沈澱するため、または血清サンプル中のO v r 1 1 0の存在を検出するかもしくは細胞サンプル中のO v r 1 1 0発現細胞の存在を検出するために有用なキットである。O v r 1 1 0の単離および精製のために、キットは、固体支持体、例えば組織培養プレートまたはビーズ（例えばセファロースビーズ）に結合した抗O v r 1 1 0抗体を含むことができる。O v r 1 1 0をin vitroで、例えばE L I S Aまたはウェスタンブロットにおいて検出し定量するための抗体を含むキットを提供することができる。

10

【0411】

製品と同様に、キットは容器およびこの中に収容される組成物であって本発明の抗体を含む該組成物を含む。キットはさらに、容器上またはこれに付随するラベルまたは添付文書を含むことができる。キットは、追加の成分を含むことができ、例えば希釈剤および緩衝液、本発明の抗体に結合する物質、これは、例えば本明細書中に開示したような標識、例えば放射性標識、蛍光標識を含むことができる第2の抗体もしくは酵素を含むことができ、またはキットはまたコントロールの抗体を含むことができる。追加の成分は、キット内の別の容器内にあってもよい。ラベルまたは添付文書は、組成物の説明および、意図されたin vitroまたは診断的使用のための指示を提供することができる。

20

【実施例1】

【0412】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの産生および単離

本発明の以下のM A b /ハイブリドーマ：O v r 1 1 0 . Q 1、O v r 1 1 0 . Q 3、O v r 1 1 0 . Q 4、O v r 1 1 0 . Q 5、O v r 1 1 0 . Q 6、O v r 1 1 0 . Q 7、O v r 1 1 0 . Q 8、O v r 1 1 0 . Q 9、O v r 1 1 0 . Q 10、O v r 1 1 0 . Q 11、O v r 1 1 0 . Q 12、O v r 1 1 0 . Q 13、O v r 1 1 0 . Q 14、O v r 1 1 0 . Q 15、O v r 1 1 0 . Q 16、O v r 1 1 0 . Q 17、O v r 1 1 0 . Q 18、O v r 1 1 0 . Q 19、O v r 1 1 0 . Q 20、O v r 1 1 0 . Q 21、O v r 1 1 0 . Q 22、O v r 1 1 0 . Q 23、O v r 1 1 0 . Q 24、O v r 1 1 0 . Q 25、O v r 1 1 0 . Q 26、O v r 1 1 0 . Q 27を以下に説明する。

30

【0413】

M A bがクローニングされている場合、これは「X . 1」の命名を得る。例えば、O v r 1 1 0 . Q 3の最初のクローンをQ 3 . 1と呼び、Q 3の第2のクローンをQ 3 . 2と呼ぶ。本発明の目的のために、Q 3についての言及は、すべてのクローン、例えばQ 3 . 1、Q 3 . 2などを含む。

40

【0414】

免疫原および抗原

抗体産生、スクリーニングおよび特徴付けのため、様々な組換えタンパク質、膜、調製物およびトランスフェクトされた細胞を、以下に記載するように調製した。

以下に記載するO v r 1 1 0構築物のため、O v r 1 1 0のコード領域の核酸分子を、様々な発現ベクターに、組換えタンパク質を産生するために挿入した。これらの核酸配列をプライマーを用いて単離した。該プライマーの設計は、当業者にとって慣用的なものである。いくつかの場合において、使用したプライマーは以下に記載の各構築物に含まれる。

50

【0415】

描写の目的のため、各構築物によってコードされた予測されるアミノ酸配列もまた含まれる。しかしながら、構築物は自然発生的な変異体（例えば対立遺伝子多型、SNPs）をプライマーによって単離されたOvr110領域内に含み得る。これらの変異配列、およびそれらに結合する抗体もまた、本明細書に記載の発明の一部と考える。

【0416】

Ovr110構築物1（Hisタグされたもの）

Ovr110タンパク質全長、Met1からLys282、をコードする核酸分子が、クローニングサイトの3'末端に2つの中間アミノ酸、AlaおよびSer、ならびに6Hisタグをコードする配列を含む改変されたベクターに挿入された。Ovr110核酸断片が挿入された得られたベクターは、6HisタグがOvr110タンパク質のC末端に融合した組換えOvr110融合タンパク質をコードする。全長Ovr110Hisタグタンパク質をコードするこの組換えプラスミドを、本明細書中において「Ovr110構築物1」と呼ぶ。Ovr110構築物1によってコードされる代表的なアミノ酸配列が、配列番号51に提示されている。

10

【0417】

【化1】

Ovr110構築物1 Amino酸配列 (配列番号51)

```
MASLGQILFWSIIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQ
WLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGN
ANLEYKTGAFSMPEVNVVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKV
VSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLM
LKASHHHHHH
```

20

構築物1によって発現するOvr110タンパク質を、構築物1をトランスフェクトした293F細胞の細胞培養物から、標準の技術を用いてカラム精製した。集めた画分からのサンプルを、タンパク質の純度を評価するため、SDS-PAGEおよびウェスタンブロット分析に供した。

【0418】

Ovr110-hFc（TM付き）

成熟Ovr110タンパク質、アミノ酸Gly30からLys282、をコードする核酸分子を、クローニングサイトの5'末端にヒトスタニオカルシン1（STC）からのアミノ酸分泌シグナル配列をコードする配列、およびクローニングサイトの3'末端に2つの中間アミノ酸、AlaおよびSer、ならびにヒトFc領域（hFc）をコードする配列を含む改変されたベクターに挿入した。Ovr110核酸断片が挿入された得られたベクターは、N末端にSTC分泌シグナルを有し、hFcがOvr110タンパク質のC末端に融合した、組換えOvr110融合タンパク質をコードする。成熟Ovr110-hFcタンパク質をコードするこの組換えプラスミドを、本明細書中において「Ovr110構築物2」と呼ぶ。Ovr110構築物2によってコードされる代表的なアミノ酸配列を、配列番号52に提示する。

30

【0419】

【化2】

Ovr110構築物2アミノ酸配列 (配列番号52)

```
MLQNSAVLLVLVISASADIGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHE
FKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPE
VNVVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLYNVTINNTYSCM
IENDIAKATGDIKVTESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMKASTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPKPKDITLMSIRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SSGQPENNYNTTPMMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

40

構築物2によって発現するOvr110タンパク質を、構築物2をトランスフェクトし

50

た293F細胞の細胞培養物から、標準の技術を用いてカラム精製した。集めた画分からのサンプルを、タンパク質の純度を評価するため、SDS-PAGEおよびウェスタンブロット分析に供した。

【0420】

Ovr110を過渡的にトランスフェクトした293F

Invitrogen社(Carlsbad, CA)から入手した293Fセルラインからの細胞を過渡的(transiently)にトランスフェクトしてOvr110を発現させた。Ovr110のアミノ酸1~282をコードする核酸分子(6HisタグのないOvr110構築物1)が哺乳動物発現ベクター、PCDNA3.1にクローンされ、組換えベクターを、ヒト293F細胞(Invitrogen)をトランスフェクトするのに用いた。10⁶細胞/mLでフリースタイル培地(freestyle medium)(Invitrogen)中で培養した293Fの50mLを、293フェクチン(fectin)トランスフェクション試薬(Invitrogen)を用いて、製造者のガイドラインに従ってトランスフェクトした。DNA、細胞および293フェクチンをOPTI-MEM培地(GIBCO)に混合した。細胞をトランスフェクションの48時間後に分析に用いた。Ovr110を発現する293F細胞を、本明細書中において293F-Ovr110細胞と呼ぶ。

10

【0421】

Ovr110を安定的にトランスフェクトしたCHO

ハムスターCHO細胞を、Invitrogen社のプロトコルにしたがって、PCDN5/FRIT/TOベクターで安定的(stably)にトランスフェクトして、CHO-FlpIn安定セルラインを作成した。CHO-FlpIn細胞を、10%のウシ胎児血清(FBS)入りHam's F12培地で培養した。Ovr110(6-HisタグのないOvr110構築物1)を、pOG44FlpリコンビナーゼでCHO-FlpInに2μgのOvr110DNA、18マイクロgのPOG44DNAおよびリポフェクタミン2000を用いて、6ウェルプレート中でInvitrogen社のプロトコルに記載されているようにコトランスフェクトした。安定トランスフェクト株の選択は、ヒグロマイシンBを300μg/mLで添加したHam's F12培地+10%のFBS中で、トランスフェクションの10~15日後に行った。

20

【0422】

ヒグロマイシンB耐性細胞のOvr110タンパク質発現を、抗Ovr110モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットで検査した。生存クローン培養物(各々12~15クローン)を確実に維持するために、Ovr110発現を示した細胞を拡大(expand)し、スケールアップし、10%のDMSO入りFBS中で凍結保存および液体窒素中で-196で保管した。

30

【0423】

Ovr110を安定的にトランスフェクトされたRK3E

Ovr110を安定的に発現するRK3E細胞を、Phoenix Retrovirus Expression System(Orbigen, San Diego, CA)を用いて作成した。レトロウイルスベクターPLXSN(pLAPSN、BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)に挿入されたOvr110のアミノ酸1~282をコードする核酸分子(6-HisタグのないOvr110構築物1)を、Phoenix-Ecoパッケージング細胞にトランスフェクトした。二日後、培養培地を収集し、0.45μmのポリスルホン酸フィルターで濾過した。感染の1日前に、RK3E細胞を10cmプレート上に5×10⁵個分割した。8μg/mLのポリブレン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)をウイルス含有培地に、目標細胞への添加前に添加した。7時間後、ウイルス培地を新鮮な生育培地に取り替えた。安定的に感染した細胞を0.5mg/mLのG418で選択した。Ovr110を安定的に発現するRK3E細胞を、本明細書中においてRK3E-Ovr110細胞と呼ぶ。

40

【0424】

CHO-Ovr110からの膜調製

細胞膜調製のため、7億6000万個のOvr110発現CHO細胞(上記)を20m

50

Lの氷冷低張緩衝液(プロテアーゼ阻害処理した10 mMのトリス塩酸pH7.4、1 mMのEDTA、3 mMのMgCl₂、1 mMのEGTA)に懸濁した。サンプルを、25 mLのルースペスル(A)付きBellco Dounce(Bellco Dounce with loose pestle(A))中で、30ストロークで均質化し、氷上に15~20分放置した。サンプルを、2000 rpmで5分間、4 で、GS6KR Beckman 遠心分離器中で回転した。上清を、25 mLのタイトペスル(B)付きBellco Dounce(Bellco Dounce with tight pestle(B))中で、30ストロークで均質化し、氷上に15~20分放置した。サンプルを、20000 rpmで1時間、4 で、GS6KR Beckman 遠心分離器中で回転した。ペレットは膜画分を含み、それを2 mLのPBSで再懸濁した後、ウェスタンブロット分析で内容物確認を行った。

【0425】

免疫

マウスを、Ovr110で安定的にトランスフェクトしたCHO細胞の膜調製物で免疫し、体液中および細胞表面上のOvr110に結合可能な抗Ovr110MAbsを作成させた。Eight BALB/cマウスを、週に2回、5週間免疫付与した。免疫は、両後ろ足蹠に、片足につき25 µlのPBS中の10 µgのCHO-Ovr110膜を皮内投与することで行われた。

【0426】

ハイブリドーマ融合

最終免疫の4日後、マウスを犠牲にし、吸い出したリンパ節(膝窩)組織を無菌解剖器(sterile dissection)で収集した。リンパ節細胞はTenbroeckの組織グラインダー(tissue grinder)(Wheaton #347426, VWR, Brisbane, CA)を用いて分散され、その後無菌こし器(sterile sieve)(VWR)でDMEM中に押し出し、T細胞を抗CD90(Thy1.2)でコートされた電磁ビーズ(Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany)を通して取り除いた。

【0427】

これらの初代B細胞(primary B-cell)豊富なリンパ節細胞を、連続ミエローマセルラインP3x63Ag.653(Kearney, J.F. et al., J. Immunology 123: 1548-1550, 1979)との電気細胞融合(BTX, San Diego, CA)によって不死化した。ミエローマおよびB細胞は1対1の比で融合に供した。これらの融合培養物を、96ウェル培養プレートのウェル(Coaster #3585, VWR)に、プレート当たり200万個の細胞で分配した。首尾良く融合された細胞を、2.85 µMのアザセリン、50 µMのヒポキサンチン(HA)(Sigma)または50 µMのヒポキサンチン、0.2 µMのアミノプテリン、8 µMのチミジン(HAT)(Sigma)を含む、組換えヒトIL-6を0.5 ng/mL補完された選択培地(DMEM/15%FBS)内で培養することで選択した。培養物を、選択およびIL-6補完物のない培地(DMEM/10%FBS)に移し、引き続き拡大および抗体産生した。

【0428】

ウェルからの上清を、Ovr110に対する反応性について、抗体結合固相免疫法(ELISA)、フローサイトメトリーおよび抗体内部移行によってスクリーンした。単一細胞からの遺伝的に統一された子孫からなるモノクローナル培養物を、単一の生存細胞を2つの96ウェルプレートのウェルに、フローサイトメトリー(Coulter Elite; Beckman-Coulter, Miami, FL)を利用して分類することで、スクリーニング手順のあとに樹立した。得られたマウスB細胞ハイブリドーマ培養物を、標準的な組織培養技術を用いて拡大した。生きたクローン培養物の維持を保証するために、選択されたハイブリドーマを、10%のDMSO入りウシ胎児血清(FBS)中に凍結保存し、液体窒素中で-196 で保管した。

【0429】

Ovr110特異抗体産生ハイブリドーマのELISAスクリーニングおよび選択

ハイブリドーマ細胞を、Ovr110特異抗体の産生について、サンドイッチELISAおよび細胞ELISAによって選択した。

10

20

30

40

50

【0430】

サンドイッチ E L I S A

ヒト I g G F c に特異的であり、マウス F c と最小の交差反応性であるヤギ抗血清 (P B S 中 $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、 $100 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ 、Jackson ImmunoResearch P/N 109-005-098, West Grove, PA) を、4 で一晩インキュベートすることによって、E I A プレートの表面に非特異的に吸着させた。プレートウェルを空にし、T B S T / 0.5% ウシ血清アルブミン (T B S T / B S A) でウェル ($300 \mu\text{L} / \text{ウェル}$) を満たし、室温 (R T) で30分以上インキュベートすることにより、非特異的結合能力をブロックした。ウェルを空にし、T B S T / B S A (上記) 中の $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ の組換え O v r 1 1 0 - h F c (O v r 1 1 0 構築物 2 によってコードされる) $100 \mu\text{L}$ で満たした。

10

【0431】

1時間以上のインキュベーション後、ウェルを空にし、 $50 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ の T B S T / B S A で満たした。ハイブリドーマ培養培地サンプルをウェルに添加 ($50 \mu\text{L}$) し、1時間インキュベートした。ウェルを T B S T で3度洗浄した。 $100 \mu\text{L}$ の、ヒト F c と最小の交差反応性を有するアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マウス I g G (F c) (P / N115-055-071, Jackson ImmunoResearch)、 $1:5000$ で T B S T / B S A 中に希釈したものを、それぞれのウェルに添加し、1時間以上インキュベートした。ウェルを T B S T で3度洗浄した。 1M ジエタノールアミン緩衝液 (p H 8.9) (Pierce) 中の $1\text{mg} / \text{mL}$ のアルカリホスファターゼ基質パラニトロフェニルリン酸 (p N P P) (Sigma) を $100 \mu\text{L}$ それぞれのウェルに添加し、20分インキュベートした。酵素反応を、溶液の 405nm 波長の吸収を計測することで定量した。 0.50 以上の吸光度となったハイブリドーマ上清を、O v r 1 1 0 特異的であると考えた。

20

【0432】

細胞 E L I S A

細胞 E L I S A のために、抗体と O v r 1 1 0 またはアルカリホスファターゼを安定的に形質導入した R K 3 E 細胞 (それぞれ R K 3 E - O v r 1 1 0、R K 3 E - A P ; ネガティブコントロール) との結合を評価した。 $100 \mu\text{L}$ の生育培地中の 25000 個の細胞を、ポリ - D - リジン (#15600; Pierce) でコートされた 96 ウェルプレートのウェルごとに入れた (plated)。細胞を一晩インキュベートし、 $50 \mu\text{L}$ のハイブリドーマ上清を各ウェルに添加した。細胞を氷上で30分インキュベートし、ウェルを空にして2度 T B S T / B S A で洗浄した。

30

【0433】

$100 \mu\text{L}$ のストレプトアビジン - H R P 結合体 (#21126; Pierce)、T B S T / B S A 中に $1:20000$ で希釈されたものを、各ウェルに添加し、細胞を30分インキュベートした。ウェルを T B S T / B S A で2度洗浄した。 $100 \mu\text{L}$ の H R P 基質 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン (#S1599; Dako Cytomation, Carpinteria, CA) を添加した。通常は20分後、 $100 \mu\text{L}$ の 1N 塩酸を添加して反応を停止した。酵素反応を、溶液の 450nm 波長の吸収を計測することで定量した。R K 3 E - O v r 1 1 0 と R K 3 E - A P との O D 値の比率が 1.5 以上となったハイブリドーマ上清を、O v r 1 1 0 特異的であると考えた。

40

【0434】

O v r 1 1 0 特異抗体を分泌するハイブリドーマを、Q 1、Q 3、Q 4、Q 5、Q 6、Q 7、Q 8、Q 9、Q 10、Q 11、Q 12、Q 13、Q 14、Q 15、Q 16、Q 17、Q 18、Q 19、Q 20、Q 21、Q 22、Q 23、Q 24、Q 25、Q 26 および Q 27 と指定した。

【0435】

O v r 1 1 0 抗体の細胞表面結合についてのフローサイトメトリースクリーニング

選択されたハイブリドーマ上清を、O v r 1 1 0 でトランスフェクトされた 293F 細胞および腫瘍細胞株の細胞表面染色フローサイトメトリーで分析した。以下の腫瘍細胞株を用いた: S K B R 3、Z R - 7 5 - 1 および H e L a。S K B R 3 および Z R 7 5 - 1

50

細胞は、QPCRによって決定されたようにOvr110RNAを発現し、ウェスタンブロットによって決定されたようにOvr110タンパク質を発現する。HeLa細胞はOvr110RNAまたはタンパク質を発現しない。

【0436】

293F細胞を、293フェクチン(Invitrogen)をトランスフェクション試薬として用いて、Ovr110(上記)で一時的にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を10mlのCa²⁺/Mg²⁺を含まないDPBSで一度洗浄し、7mlの暖かい(37℃)Cellstripper(Mediatech, Herndon, VA)を150cm²フラスコ毎に添加した。強くくっついた細胞を離すためにフラスコを叩きながら、細胞を37℃で5分間インキュベートした。細胞を取り除き、凝集体を壊すために数回ピペティングし、すぐにDMEM/10%FBS/5mMの酪酸ナトリウム中に置かれた。そこで細胞を、5分間1300rpmで遠心し、DMEM/10%FBS/5mMの酪酸ナトリウム中に再懸濁した。該細胞を37℃で30分インキュベートした(回復期)。染色に先立って、細胞の生存能力を、Guava Viacount(Guava Cytometers, Foster City, CA)を用いて計測し、90%以上の生存能力の培養物をMAbsによる染色に選択した。

10

【0437】

MAb染色で選択された培養物からの細胞を、96ウェルV底プレート(VWR)に、0.5~1.0×10⁶細胞/ウェルに等分し、2分間1500rpmで遠心した。上清を吸引し、プレートをボルテックスミキサー上で簡単に振とうして細胞を再懸濁し、200μLのDPBS/3%FBS/0.01%ナトリウムアジド(FACS緩衝液)を各ウェルに添加した。遠心および吸引を繰り返し、25μLのハイブリドーマ上清または精製MAbを細胞に加えて逐次希釈した。プレートを15分間氷上に置き、その後上記のように、200μLのFACS緩衝液中で洗浄および遠心した。

20

【0438】

この洗浄手順を2度繰り返し、25μLのフィコエリトリン(PE)結合ロバ抗マウスIgG Fc抗体(Jackson Immunoreserch Laboratories)を細胞に添加した。氷上で15分後、上記のように細胞を2度洗浄し、250μLのFACS緩衝液で懸濁し、分析のためにセルソーターまたはフローサイトメーターに置いた。特定の場合においては、分析の前に4℃で一晩置き、133μLのFACS緩衝液および67μLの1%パラホルムアルデヒド/DPBSを、固定のために各ウェルに添加し、体積をDPBSで250μLに増加させた。染色された細胞をElite蛍光活性化セルソーター(FACS)(Beckman-Coulter)で分析した。

30

【0439】

ほとんどのハイブリドーマ上清はOvr110トランスフェクト293F細胞およびOvr110陽性腫瘍細胞と強く反応し、Ovr110陰性細胞とほとんど結合しないか弱い結合を示した。細胞表面に局在しないリシンおよび細胞表面に局在するCD71の抗体を、ネガティブおよびポジティブコントロールとしてそれぞれ用いた。細胞表面染色の結果を表1および2に示す。

【表 4】

表1. Ovr110発現細胞のハイブリドーマ上清による細胞表面染色

サンプル	Ovr110-トランスフェクト 293F 細胞		非トランスフェクト転換 293F 細胞	
	陽性細胞 %	平均蛍光強度 (MFI)	陽性細胞 %	平均蛍光強度 (MFI)
抗リシン	1.6	0.297	0.9	0.278
抗CD71	97.9	9.15	95	4.21
Ovr110.Q1	96.2	23.3	1.1	0.29
Ovr110.Q3	95.3	13.6	1	0.287
Ovr110.Q4	89.8	8.32	1.7	0.311
Ovr110.Q5	84.6	4.89	0.8	0.273
Ovr110.Q6	97.4	7.12	71.1	1.27
Ovr110.Q7	27	1.02		
Ovr110.Q8	2.5	0.331		
Ovr110.Q9	84.3	1.96	83.5	1.72
Ovr110.Q10	1.8	0.317		
Ovr110.Q11	95.7	26	0.7	0.282
Ovr110.Q12	96.6	31.8	0.8	0.29
Ovr110.Q13	2.1	0.316		
Ovr110.Q14	97	28.2	1.6	0.326
Ovr110.Q15	97.3	32.9	0.8	0.277
Ovr110.Q16	22.2	0.49		
Ovr110.Q17	97.5	30.5	0.8	0.296
Ovr110.Q18	3.9	0.341		
Ovr110.Q19	95.7	24.5	1.2	0.309
Ovr110.Q20	99.8	12.9	1.2	0.293
Ovr110.Q21	18.7	0.45		
Ovr110.Q23	94.7	17.9	0.6	0.296
Ovr110.Q24	3.2	0.36		
Ovr110.Q25	96.8	25.3	4	0.371
Ovr110.Q26	89.2	8.08	0.9	0.286
Ovr110.Q27	91.8	6.09	0.8	0.278

10

20

【 0 4 4 0 】

30

【表 5】

表2. 腫瘍細胞株のハイブリドーマ上清による細胞表面染色

サンプル	SKBR3		HeLa	
	陽性細胞 %	平均蛍光強度 (MFI)	陽性細胞 %	平均蛍光強度 (MFI)
抗リシン	0.9	0.255	1.1	0.261
抗CD71	97.5	15.1	99.2	11.1
Ovr110.Q1	95.3	3.76	1	0.27
Ovr110.Q3	54.9	1.01	0.7	0.266
Ovr110.Q4	23.7	0.678	8.5	0.32
Ovr110.Q5	1.3	0.259		
Ovr110.Q6	84.1	1.06	98.5	3.67
Ovr110.Q7	63.5	1.6	16.3	0.367
Ovr110.Q8	12.4	0.346	15	0.367
Ovr110.Q9	56.6	0.919	87.7	1.68
Ovr110.Q10	4	0.289		
Ovr110.Q11	98.7	9.71	0.6	0.25
Ovr110.Q12	98.8	12	4.2	0.295
Ovr110.Q13	42.8	0.945	76.8	1.44
Ovr110.Q14	97.3	5.82	12.9	0.348
Ovr110.Q15	98.6	10.5	0.8	0.253
Ovr110.Q16	4.5	0.288		
Ovr110.Q17	97.4	6.67	0.6	0.253
Ovr110.Q18	18.6	0.649		
Ovr110.Q19	98.9	10.4	8.1	0.328
Ovr110.Q20	79.6	1.18	97.9	4.49
Ovr110.Q21	7.9	0.325		
Ovr110.Q23	97.1	4.35	3.4	0.303
Ovr110.Q24	44	0.916	82.3	1.82
Ovr110.Q25	97.4	4.95	24.5	0.815
Ovr110.Q26	8.3	0.314		
Ovr110.Q27	87.7	1.48	1	0.265

10

20

30

【0441】

ELISAおよびフローサイトメトリー実験からのデータに基づいて、次のハイブリドーマを、セルソーティング (Coulter Elite) によって単細胞クローニングに選択して96ウェル培養プレートに入れた: Q1、Q3、Q11、Q12、Q15、Q19、Q23およびQ27。2週間の培養後、各親ハイブリドーマからの3つまでのハイブリドーマクローンからの上清を、フローサイトメトリーによるOvr110トランスフェクト293F細胞染色について試験した。抗体を選択したクローンの上清から精製し、Ovr110トランスフェクト293F細胞および腫瘍細胞の染色によって再分析した。

【0442】

組み替えOvr110で免疫付与したマウスから得られた抗Ovr110MAbs C3.2およびC6.3をコントロールとして含めた。Ovr110.C3.2およびOvr110.C6.3抗体を、PCT/US2004/014490およびPCT/US2005/040707にすでに記載されており、該開示は参照により、本明細書に明示的に組み込まれる。結果を表3および4に示す。全ての選択されたQMAbsは、トランスフェクトされた293F細胞の原形質膜上および腫瘍細胞上のネイティブのOvr110タンパク質を認識する。QシリーズMAbs、特にQ1.2、Q11.12.3、Q12.2、Q15.2、Q19.6、Q23.6およびQ27.4、の染色強度は、ポジティブコントロールMAbs C3.2およびC6.3と同等またはそれより大きなOvr110発現細胞 (トランスフェクトされたおよびOvr110陽性腫瘍細胞) の生存細胞結合を示した。

40

50

【 0 4 4 3 】

【 表 6 】

表3. Ovr110トランスフェクト293F細胞の精製MAbsによる細胞表面染色

	Ovr110トランスフェクト 293F 細胞		モックトランスフェクト 293F 細胞	
	陽性細胞 %	MFI	陽性細胞 %	MFI
抗リシン	1.1	0.27	0.9	0.292
抗CD71	98.4	10	91.6	5.1
C3.2	91.1	3.5	3.9	0.343
Q1.2	92.8	4.53	12.2	0.433
Q3.1	93.6	4.12	4.9	0.379
Q11.12.3	93.8	5.47	40.4	0.959
Q12.2	94.3	5.25	34.1	0.81
Q15.2	94.2	5.49	33.3	0.765
Q19.6	91.9	5.25	42	1
Q23.6	92.6	4.98	33.7	0.773
Q27.4	95.2	5.48	34	0.799

10

【 0 4 4 4 】

【 表 7 】

表4: 腫瘍細胞株の精製MAbsによる細胞表面染色

	ZR-75-1		SKBR3		HeLa	
	陽性細胞 %	MFI	陽性細胞 %	MFI	陽性細胞 %	MFI
抗リシン	1.4	0.27	0.9	0.29	1.1	0.30
抗CD71	74.6	0.96	99.2	12.40	99.5	9.39
C3.2	32.1	0.46	25.6	0.52	0.6	0.23
C6.3	60.7	0.68	39.6	0.71	4.9	0.37
Q1.2	76.9	1.50	86.5	2.76	0.7	0.24
Q3.1	45.1	0.59	54.2	0.89	3.3	0.31
Q11.12.3	96.4	4.68	98.4	5.95	0.6	0.23
Q12.2	94.1	3.76	95.3	4.86	0.7	0.24
Q15.2	93	2.78	87.9	2.77	0.5	0.23
Q19.6	95.6	4.11	95.2	4.64	0.4	0.24
Q23.6	92.7	3.25	93.9	3.85	0.3	0.22
Q27.4	93.3	2.92	94.8	3.90	0.5	0.24

20

30

【 0 4 4 5 】

Ovr110MAbアイソタイプ

抗Ovr110MAbsのアイソタイプを、市販で入手可能なマウスモノクローナル抗体アイソタイプングイムノアッセイテストキット (IsoStrip, Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN) を用いて決定した。アイソタイプングの結果を表5に列挙する。

【 表 8 】

表5: Ovr110MAb アイソタイプ

クローン	アイソタイプ
Q3.1	IgG1 カッパ
Q11.12.3	IgG1 カッパ
Q12.2	IgG1 カッパ
Q15.2	IgG1 カッパ
Q19.6	IgG1 カッパ
Q23.6	IgG1 ラムダ
Q27.4	IgG1 カッパ

40

【 0 4 4 6 】

Ovr110抗体の親和性測定

50

E L I S A およびフローサイトメトリー

O v r 1 1 0 抗体の組替およびネイティブO v r 1 1 0 タンパク質への結合をダイレクトE L I S A、サンドイッチE L I S A およびフローサイトメトリーで分析した。ダイレクトE L I S A のために、プレートをP B S 中 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 組換O v r 1 1 0 タンパク質 $100 \mu\text{l}$ で一晚コートした。ウェルを空にし、30分以上 $300 \mu\text{l}$ のT B S T / B S A でブロックした。ウェルを空にし、 $300 \mu\text{l}$ のT B S T で洗浄し、T B S T / B S A 中 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体 $100 \mu\text{l}$ で満たした。1時間のインキュベーションの後、ウェルを洗浄し、結合抗体をサンドイッチE L I S A プロトコルで記載したように検出した。

【0447】

サンドイッチE L I S A およびフローサイトメトリー実験を、精製抗体 (T B S T / B S A 中 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$) をハイブリドーマ上清の代わりに用いた以外は、上記のように行った。

ダイレクトおよびサンドイッチE L I S A に用いた組換O v r 1 1 0 タンパク質はO v r 1 1 0 構築物1および2でそれぞれコードされ、ネイティブにO v r 1 1 0 を発現するZ R 7 5 - 1 をフローサイトメトリー実験に用いた。

表6はネガティブコントロール抗体抗リシンと特異的O v r 1 1 0 抗体との結合比率を列記したものである。特異抗体のネガティブコントロール抗体抗リシンに対するOD値 (E L I S A 実験について) またはM F I 値 (フローサイトメトリー実験について) の比率を列記する。

【0448】

【表9】

表6: Ovr110抗体の組換えおよびネイティブOvr110タンパク質への結合

	ダイレクト ELISA	サンドイッチ ELISA	フロー サイトメトリー
x-リシン	1.0	1.0	1.0
A87.1	31.3	17.7	2.2
C6.3.2.1.2	34.4	18.5	2.5
Q11.12.3	7.3	9.3	17.3
Q12.2	3.6	3.3	13.9
Q19.6	7.2	6.8	15.2
Q23.6	6.0	3.9	12.0
Q27.2	13.2	7.5	10.7

【0449】

O v r 1 1 0 . A 8 7 . 1 およびO v r 1 1 0 C 6 . 3 . 2 . 1 . 2 など代表されるAおよびCシリーズからの抗体は、組換えO v r 1 1 0 タンパク質に非常に良好に結合するが、Z R 7 5 - 1 細胞上のネイティブO v r 1 1 0 への結合は弱い。Qシリーズの抗体は、組換えO v r 1 1 0 タンパク質にはAおよびCシリーズの抗体ほど強く結合しないが、Z R 7 5 - 1 細胞上のネイティブO v r 1 1 0 へは非常に良好に結合する。

【0450】

解離定数

抗O v r 1 1 0 Qシリーズ抗体とネイティブO v r 1 1 0 タンパク質の親和性を決定するため、抗体を、製造者の指示に従ってNHS-Fluorescein (#46100, Pierce) で標識した。標識された抗体を 100000 個のZ R 7 5 - 1 細胞と共に、F A C S 緩衝液中で2時間室温でインキュベートした。抗体を、 160 nM から 5 nM までの範囲の、6つの異なる濃度で使用した。細胞をF A C S 緩衝液で2度洗浄して結合していない抗体を取り除き、細胞の平均蛍光強度 (M F I) をフローサイトメトリーで分析した。ネガティブコントロールにより発生するM F I 値を、同じ抗体濃度の抗O v t 1 1 0 抗体により発生するM F I から減じた。結合曲線 (抗体濃度に対して正味のM F I 値をプロットしたものを)、ソフトウェアPrism (GraphPad) で分析した。1領域部位モデルを仮定する非線形減衰に

よって解離定数 K_D を計算した。結果を以下の表 7 にまとめる。

【 0 4 5 1 】

【 表 1 0 】

表7: Ovr110抗体の解離定数

mAb	K_D [nM]
Q11.12.3	0.74
Q12.2	0.64
Q19.6	0.53
Q23.6	5.66
Q27.4	4.76
C6.3.2.1.2	33.05

10

【 0 4 5 2 】

上に示したように、抗 Ovr 1 1 0 Q シリーズ抗体は、Ovr 1 1 0 . C 6 . 3 . 2 . 1 . 2 抗体などの C シリーズ抗体よりも、ネイティブの Ovr 1 1 0 に対する高い親和性を有する。抗体 Q 1 1 . 1 2 . 3、Q 1 2 . 2 および Q 1 9 . 6 は、Z R 7 5 - 1 上のネイティブ Ovr 1 1 0 タンパク質に、それぞれ解離定数 0 . 7 4 n M、0 . 6 4 n M および 0 . 5 3 n M で、非常に強く結合する。

【 0 4 5 3 】

抗 Ovr 1 1 0 抗体とネイティブ Ovr 1 1 0 との優先的な結合およびネイティブ Ovr 1 1 0 に対する高い親和性は、抗 Ovr 1 1 0 抗体が診断薬または治療薬として有用であることを示している。ナノモラーまたはピコモラー範囲の親和性を有する抗体は、治療薬として有用であると考えられる。Ovr 1 1 0 M A b s Q 1 1 . 1 2 . 3、Q 1 2 . 2、Q 1 9 . 6、Q 2 3 . 6 および Q 2 7 . 4 は、治療薬としてのその有用性を示す K_D 値および結合特性（生存細胞結合）を有する。これらの特性は抗 Ovr 1 1 0 Q シリーズ抗体が、診断薬または治療薬としての利用に、既に記載された抗 Ovr 1 1 0 抗体より適していることを示している。

20

【 0 4 5 4 】

Ovr 1 1 0 抗体 I g G 重鎖および軽鎖の構造的特性

ハイブリドーマ Q 1 1、Q 1 2、Q 1 9、Q 2 3 および Q 2 7 からの抗体の、I g G 重鎖および軽鎖の可変領域のヌクレオチド配列を、商業的に入手可能なキット、例えば RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) および 5' RACE System (Invitrogen)、を用いて決定した。重鎖 C D R 2 および C D R 3 領域ならびに軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 領域を同定するために、抗体の重鎖および軽鎖の配列を、Kabat の C D R 領域決定システム (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて評価した。抗体の重鎖 C D R 1 領域を Clothia & Lesk (J. Mol. Biol. (1987) 196, 901-917) に記載されているように決定した。

30

【 0 4 5 5 】

Ovr 1 1 0 . Q 1 1 の軽鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列を、配列番号 1 および 2 にそれぞれ示す。軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 領域を配列番号 3、4 および 5 にそれぞれ示す。

40

【化3】

Ovr110.Q11_LCVD.na, 配列番号1:

GAAAATGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAGGTCACCATGACCTGTAGT
GCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAAGCACCTCCCCAAACTCTGGATTTAT
GACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCAGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAAACTCCTACTCTCTC
ACGATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTATTACTGTTTTTCAGGGGAGTGGGTACCCATTCACG
TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAACGGGCTGAT

Ovr110.Q11_LCVD.aa, 配列番号2:

ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSSTSPKLWIYDTSKSLASGVPGRFSGSGNSYSL
TISSMEAEDVATYYCFQSGYPFTFGSGTKLEIKRAD

10

Ovr110.Q11_LCVD_CDR1, 配列番号3:

SASSSVSYMH

Ovr110.Q11_LCVD_CDR2, 配列番号4:

DTSKSLAS

Ovr110.Q11_LCVD_CDR3, 配列番号5:

FQSGYPFT

【0456】

Ovr110.Q11の重鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列を、配列番号6および7にそれぞれ示す。軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域を配列番号8、9および10にそれぞれ示す。

20

【化4】

Ovr110.Q11_HCVD.na, 配列番号6:

GATGTACAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACCTGCTCTGTC
ACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATTTCTGGAGCTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAATGG
ATGGGCTTCATAAGCTACGACGGTACCAATAGCTACAACCCATCTCTCAAAAATCGGATCTCCATTACTCGT
GACACATCTAAGAACCAGTTTTTCTGAGGTTGAATTCTGTGACTAAAGAGGACACAGCTACATATTACTGT
GCCAGGAAGTTACTATGGCTACGCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCAGCCAAA
ACG

30

Ovr110.Q11_HCVD.aa, 配列番号7:

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYFWSWIRQFPGNKLEWGMFISYDGTNSYNPSLKNRISITR
DTSKNQFFLRLLNSVTKEDTATYYCARKLLWLRFDYWGQGTLLTVSSAKT

Ovr110.Q11_HCVD_CDR1, 配列番号8:

GYSITSGYFWS

Ovr110.Q11_HCVD_CDR2, 配列番号9:

FISYDGTNSYNPSLKN

Ovr110.Q11_HCVD_CDR3, 配列番号10:

KLLWLRFDY

40

【0457】

Ovr110.Q12の軽鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列を、配列番号11および12にそれぞれ示す。軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域を配列番号13、14および15にそれぞれ示す。

【化5】

Ovr110.Q12_LCVD.na, 配列番号11:

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGT
GCCAGCTCAGGTATAAGTTACATGCACCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCACCACCCCAAAAGATGGATTTAT
GACGCATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTATTCTCTC
ACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCATCAGCGCGTAGTTACCCATTACAG
TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACGGGCTGAT

Ovr110.Q12_LCVD.aa, 配列番号12:

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSGISYMHWYQKPGTTPKRWIYDASKLASGVPSRFSGSGSGTSYSL
TISSMEAEDAATYYCHQRRSYPFTEFGSGTKLEIKRAD

10

Ovr110.Q12_LCVD_CDR1, 配列番号13:

SASSGISYMH

Ovr110.Q12_LCVD_CDR2, 配列番号14:

DASKLAS

Ovr110.Q12_LCVD_CDR3, 配列番号15:

HQRRSYPFT

【0458】

Ovr110.Q12の重鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列を、配列番号16および17にそれぞれ示す。軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域を配列番号18、19および20にそれぞれ示す。

【化6】

Ovr110.Q12_HCVD.na, 配列番号16:

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTACAGTGAAGCTGTCTGCAAGACT
TCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATC
GGAGAGATTGATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAATCAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTA
GACACATCCTCCACCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCTATTACTGT
GCAAGAGAGTATGGTAACAACGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCC
AAAACG

Ovr110.Q12_HCVD.aa, 配列番号17:

QVQLQPGAEELVKPGATVKLSCKTSGYTFSTSYMHVWVQRPGGLEWIGEIDPSDSYTNYNQKFKGKATLTV
DTSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREYGNNDAMDYWGQGTSVTVSSAKT

30

Ovr110.Q12_HCVD_CDR1, 配列番号18:

GYTFSTSYMH

Ovr110.Q12_HCVD_CDR2, 配列番号19:

EIDPSDSYTNYNQKFKG

Ovr110.Q12_HCVD_CDR3, 配列番号20:

EYGNNDAMDY

【0459】

Ovr110.Q19の軽鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列を、配列番号21および22にそれぞれ示す。軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域を配列番号23、24および25にそれぞれ示す。

40

【化7】

Ovr110.Q19_LCVD.na, 配列番号21:

GAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGTATATCTAGGGGAAAAGGTCACCATGACCTGCAGT
GCCAGCTTAAGTGTAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAAGCACCTCCCCAAACTCTGGATTTAT
GACACATCCAAAGTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAAACTCTTATTCTCTC
ACGATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTATTACTGTTTTTCAGGGGAGTGGGTACCCATTCAG
TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAACGGGCTGAT

Ovr110.Q19_LCVD.aa, 配列番号22:

EIVLTQSPAIMSVYLGEKVTMTCSASLSVSYMHVYQKSSSTSPKLWIYDTSKVASGVPGRFSGSGNSYSL
TISSMEAEDVATYYCFQSGYPFTFGSGTKLEIKRAD

10

Ovr110.Q19_LCVD_CDR1, 配列番号23:

SASLSVSYMH

Ovr110.Q19_LCVD_CDR2, 配列番号24:

DTSKVAS

Ovr110.Q19_LCVD_CDR3, 配列番号25:

FQSGYPFT

【0460】

Ovr110.Q19の重鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列を、配列番号26および27にそれぞれ示す。軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域を配列番号28、29および30にそれぞれ示す。

20

【化8】

Ovr110.Q19_HCVD.na, 配列番号26:

GATGTACTGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAAGCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACCTGTTCTGTC
ACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATTTCTGGAAGTGGATCCGGCAGTTCCGGGAAACAAACTGGAATGG
ATGGGCTACATAAGCTACGACGGTGGCAATAGCTACAACCCATCTCTCAAAAATCGAATCTCCATCACTCGT
GACACATCTAAGAACCAGTTTTCTGAGGATGAAATCTGTGACTGCTGAGGACACAGCTACATATTACTGT
GCAAGGAAGGCACTATGGTTACGCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTCTCACAGTCTCTCAGCCAAA
ACG

Ovr110.Q19_HCVD.aa, 配列番号27:

DVLLQESGPGLVKASQSLTCSVTGYSITSGYFVNWIRQFPGNKLEWNGYISYDGGNSYNPSLKNRISITR
DTSKNQFFLRMKSVTAEDTATYYCARKALWLRFDYWGQTTTLVSSAKT

30

Ovr110.Q19_HCVD_CDR1, 配列番号28:

GYSITSGYFVN

Ovr110.Q19_HCVD_CDR2, 配列番号29:

YISYDGGNSYNPSLKN

Ovr110.Q19_HCVD_CDR3, 配列番号30:

KALWLRFDY

【0461】

Ovr110.Q23の軽鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列を、配列番号31および32にそれぞれ示す。軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域を配列番号33、34および35にそれぞれ示す。

40

【化9】

Ovr110.Q23_LCVD.na, 配列番号31:
 CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAACAGTCACACTCACTTGTGCTCA
 AGTACTGGGGCTGTTACAACACTAGTAACTATGCCAACTGGGTCCAAGAAAACCAGATCATTATTCACTGGT
 CTAATAGGTGGTACCGACAACCGACCTCCAGGTGTTCCCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAG
 GCTGCCCTCACCATCACAGGGACACAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTGTGGTACAGCAAC
 CATTGGGTGTTCCGGTGGAGGAACCAAACCTGACTGTCTAGGCCAGCCCAAG

Ovr110.Q23_LCVD.aa, 配列番号32:
 QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANVWVQEKPDHLEFTGLIGGTDNRPPGVPARFSGSLIGDK
 AALTITGTQTEDEAIYFCALWYSNHVWVFGGGTKLTVLGQPK

10

Ovr110.Q23_LCVD_CDR1, 配列番号33:
 RSSTGAVTTSNYAN

Ovr110.Q23_LCVD_CDR2, 配列番号34:
 LIGGTDNRPP

Ovr110.Q23_LCVD_CDR3, 配列番号35:
 ALWYSNHVW

【0462】

Ovr110.Q23の重鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列を、配列番号36および37にそれぞれ示す。軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域を配列番号38、39および40にそれぞれ示す。

20

【化10】

Ovr110.Q23_HCVD.na, 配列番号36:
 CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGTTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATTTCCCTGCAAGGCT
 ACTGGCTACACATTCACTAGCTACTGGATAGAGTGGGTAAGCAGAGGCTGGACATGGCCTTGAGTGGATT
 GGAGAGATTTTACCTGGAAGTGGTATTACTAAGTACAATGAGAAGTCAAGACCAAGGCCACATTCCTGCA
 GATACATCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGT
 GCAAGATATTACTTCCGGCAGTGTCAACTTTTACTTTGACTGCTGGGGCCAAGGTACCACTCTCACAGTCTCC
 TCAGCCAAAACG

Ovr110.Q23_HCVD.aa, 配列番号37:
 QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHLEWIGELPGSGITKYNEKFKTKATFTA
 DTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYFGSVNIFYFDCWGQGTTLTVSSAKT

30

Ovr110.Q23_HCVD_CDR1, 配列番号38:
 GYTFSSYWIE

Ovr110.Q23_HCVD_CDR2, 配列番号39:
 EILPGSGITKYNEKFKT

Ovr110.Q23_HCVD_CDR3, 配列番号40:
 YYFGSVNIFYFDC

【0463】

Ovr110.Q27の軽鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列を、配列番号41および42にそれぞれ示す。軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域を配列番号43、44および45にそれぞれ示す。

40

【化 1 1】

Ovr110.Q27_LCVD.na, 配列番号 41:

GACATTGTGCTGACCCAGTCCCACAAAATCATGTCAACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAG
 GCCAGTCAGGATGTGAGAACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAATTAAGTATT
 AAGTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACT
 TTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGAGCAACATTATAGTAATCCGACG
 TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGAT

Ovr110.Q27_LCVD.aa, 配列番号 42:

DIVLTQSHKIMSTSVGDRVSITCKASQDVRTAVAWYQQKPGQSPKLLIKSASYRYTGVDPDRFSGSGSGTDFE
 FTISSVQAEDLAVYYCQQHYSNPTFGGGTKLEIKRAO

Ovr110.Q27_LCVD_CDR1, 配列番号 43:

KASQDVRTAVA

10

【化 1 2】

Ovr110.Q27_LCVD_CDR2, 配列番号 44:

SASYRYT

Ovr110.Q27_LCVD_CDR3, 配列番号 45:

QQHYSNPT

【0 4 6 4】

Ovr110.Q27の重鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列を、配列番号46および47にそれぞれ示す。軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域を配列番号48、49および50にそれぞれ示す。

20

【化 1 3】

Ovr110.Q27_HCVD.na, 配列番号 46:

CAGGTCAGCCCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGCAAGACCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCT
 TCTGGCTACACCTTTACTACCTACTGGATGCAGTGGGTAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAGTGGATT
 GGGGCTATTTATCCTGGAGATGGTGATACTCGGTACACTCAGAAGTTCAAGGGCAAGCCACATTGACTGCA
 GATAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCTTGGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT
 GCAATTAAGTGGGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACG

Ovr110.Q27_HCVD.aa, 配列番号 47:

QVQPQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTTYWMQWVKQRPGQGLEWIGAIYPGDGDTRYTQKFKGKATLTA
 DKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCAINWGYAMDYWGQGTSTVTVSSAKT

30

Ovr110.Q27_HCVD_CDR1, 配列番号 48:

GYTFTTYWMQ

Ovr110.Q27_HCVD_CDR2, 配列番号 49:

AIYPGDGDTRYTQKFKG

Ovr110.Q27_HCVD_CDR3, 配列番号 50:

NWKYAMDY

【0 4 6 5】

例 2 : Ovr110 M A b s のエピトープマッピング

Qシリーズ由来の抗体のパネルによって認識されるエピトープを競合ELISAおよび重複ペプチドをスクリーニングすることによって、ELISAに基づく検査を通じた抗体との反応性について特定した。

40

【0 4 6 6】

競合ELISA

競合ELISAのため、QシリーズM A b sを、抗Ovr110 M A b s A 8 7 . 1 およびC 6 . 3 (P C T / U S 2 0 0 4 / 0 1 4 4 9 0 およびP C T / U S 2 0 0 5 / 0 4 0 7 0 7 に記載、該開示は参照により、本明細書に明示的に組み込まれる)をポジティブコントロールとして、抗リシン抗体T F T B 1 (ATCC, Manassas, VA)をネガティブコン

50

トロールとして、平行して評価した。

【0467】

精製抗体を Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, #21335) でビオチン化した。組換え Ovr110 を、上記のサンドイッチ ELISA プロトコルにおいて記載したように、プレートにコートした。ウェルを、TBS/T/BSA 中 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ の非標識抗体 (「ブロッキング抗体」) $50 \mu\text{L}$ で満たし、30 分間インキュベートした。 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ のビオチン化抗体 (検出抗体) を $50 \mu\text{L}$ /ウェルで添加し、プレートを 15 分間インキュベートした。プレートを TBS/T で洗浄し、ウェルを $100 \mu\text{L}$ /ウェルのストレプトアビジン-HRP (Pierce, #21126) で満たした。30 分のインキュベーション後、プレートを TBS/T で洗浄し、 $100 \mu\text{L}$ /ウェルの HRP 基質 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (#S1599; Dako Cytomation, Carpinteria, CA) を添加した。 $100 \mu\text{L}$ の 1N 塩酸を添加して反応を停止した。酵素反応を、溶液の 450nm 波長吸収を計測することで定量した。

10

【0468】

各抗体をブロッキングおよび検出抗体として、全ての可能な組み合わせについて試験した。競合 ELISA の結果を、特異シグナル/ノイズ比として、表 8 に示す、つまり与えられた列の各シグナルを、同じ抗体がブロッキングおよび検出として用いられたときに得られるシグナルで割った。非標識ブロッキング MAb s を Y 軸に、標識検出 MAb s を X 軸に示した。

20

【表 11】

表 8: 競合 ELISA による Ovr110 MAb の組み合わせ

	Q11.12.3	Q19.6	Q12.2	Q27.4	Q23.6	Q15.2	Q3.1	A87.1	C6.3
Q11.12.3	1.0	1.0	1.0	4.7	4.5	11.7	1.3	6.4	1.2
Q19.6	1.0	1.0	1.1	4.7	4.8	11.7	1.3	6.6	1.2
Q12.2	1.2	1.1	1.0	4.3	3.6	11.6	1.4	6.7	1.2
Q27.4	5.5	6.5	3.1	1.0	1.0	11.8	1.4	6.7	1.2
Q23.6	5.2	6.0	2.8	2.2	1.0	2.9	1.4	6.7	1.2
Q15.2	5.2	5.6	3.0	4.9	0.7	1.0	1.3	6.5	1.2
Q3.1	2.2	1.7	0.8	5.1	3.9	11.0	1.0	6.5	1.2
A87.1	5.0	5.2	2.8	4.8	4.4	11.1	1.3	1.0	0.1
C6.3	5.2	5.9	3.0	4.6	4.4	10.6	1.3	6.0	1.0
リシン	5.0	5.3	2.8	4.9	4.8	11.0	1.3	6.4	1.1

30

【0469】

競合 ELISA の結果は、Q MAb s が A87.1 および C6.3 とは異なるエピトープで結合することを示す。MAb s Q11.12.3、Q12.2 および Q19.6 は、お互いにブロックしているため、重複するエピトープで結合する。MAb s Q23.6 および 27.4 は、Q11.12.3、Q12.2 および Q19.6 によって認識されるエピトープとは異なる、重複するエピトープで結合する。

40

【0470】

ペプチドマッピング

24 のペプチドを SynPep (Dublin, CA) に発注した。ペプチド 1 ~ 23 は、5 つのアミノ酸が重複する、隣接した 15 マーのペプチドであった。ペプチド 24 は 8 つのアミノ酸を含んでいた。ペプチド配列は、シグナル配列後のアミノ酸 G21 から開始し、A258 で終了した。これらのペプチドは、成熟 Ovr110 タンパク質の細胞外領域に及ぶ。ペプチドを 1 ~ 3 mg の範囲で少量のアリコートにおいて 0.2 ~ 0.5 mL の水に溶解した。PBS 中で各ペプチドの 1 : 400 希釈を行い、 $50 \mu\text{l}$ を、96-well 4X Coaster plates (#3690; Coaster Corporation; Cambridge, MA) の各ウェルに、正副 2 通りに添加し、一晩放置した。

50

【0471】

次の日、プレートをはじめいて乾かし、T B S T / B S A で約 1 時間ブロックした。抗 O v r 1 1 0 抗体 (5 0 μ L) を、どちらかに、ウェル毎約 1 μ g / m L 添加し、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを T B S T 洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。二次結合体、ヤギ抗マウス Ig Fc-AP (Pierce, Rockford, IL) を T B S T / B S A 溶液中で 1 : 5 0 0 に希釈し、5 0 μ l を各ウェルに添加した。プレートを室温で 1 時間振とうした。5 0 μ L の基質を各ウェルに添加する前にプレートを 3 度洗浄し、室温で 3 5 分インキュベートした。使用した基質は 1 × D E A 中の p N P P (1 m g / m l) であった。検定を可視化するため、SpectraMaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 上で、プレートを 4 0 5 n m で読み取った。バックグラウンドシグナルは 0 . 2 O D 未満であった。

【 0 4 7 2 】

抗体 Q 3 . 1 は、1 . 4 O D のシグナルによってペプチド 2 3 にマップされた。抗体 Q 4 および Q 5 は、それぞれ 1 . 9 O D および 1 . 8 O D のシグナルによって、ペプチド 1 3 にマップされた。

他の Q シリーズ抗体 Q 1、Q 7、Q 8、Q 1 1、Q 1 2、Q 1 3、Q 1 4、Q 1 5、Q 1 7、Q 1 9、Q 2 0、Q 2 3、Q 2 5、Q 2 6 および Q 2 7 はペプチドにマップされず、上記 O v r 1 1 0 発現細胞との結合を示したことを併せて、これらの M A b s は O v r 1 1 0 上の立体配座エピトープに結合することを示唆する。

【 0 4 7 3 】

例 3 : O v r 1 1 0 M A b s の細胞結合

治療薬としての有用性を示すため、上記の抗 O v r 1 1 0 Q シリーズ抗体を O v r 1 1 0 発現癌細胞との結合、O v r 1 1 0 発現癌細胞による内部移行、および O v r 1 1 0 発現癌細胞の毒素結合二次抗体による殺傷について評価した。以下の実施例における全てのセルラインはアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC; Manassas, VA) から得た。

【 0 4 7 4 】

免疫蛍光法による Q シリーズ M A b s の腫瘍細胞に対する表面結合

抗 O v r 1 1 0 Q シリーズ抗体を、Z R - 7 5 - 1 (乳癌)、R L 9 5 . 2 細胞 (子宮内膜癌)、O V C A R 3 細胞 (卵巣癌) および H e L a 細胞 (頸部癌) を含む様々な生存腫瘍細胞の表面への結合能力について評価した。Z R - 7 5 - 1、R L 9 5 . 2 および O V C A R 3 は O v r 1 1 0 タンパク質発現について陽性であるが、H e L a は陰性である。これらのセルラインを滅菌 1 2 m m ガラスカバースリップ上に播種し、3 7 ° C、D M E M / 1 0 % F B S 中で 4 8 時間、一次抗体による処置前に培養した。

【 0 4 7 5 】

抗 O v r 1 1 0 Q シリーズ m A B s およびコントロール抗体を最終濃度 5 μ g / m l で培地に添加し、氷上で 1 時間インキュベートした。カバースリップを 1 × P B S で 3 度洗浄した。続いてリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中の 4 % ホルムアルデヒドで固定し、これらの細胞を、5 μ g / m l の濃度の二次 Cy 3 標識ロバ抗マウス (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) で 4 5 分インキュベートした。続いて洗浄し、カバースリップをベクタスタチン (Vector, Burlingame, CA)、細胞核の可視化のための D A P I 含有培地、中にマウントし、適切な蛍光フィルターを装備した Zeiss Axiophot 蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss, Thornwood, NY) で観察した。顕微鏡写真を C C D カメラを用いて記録した。抗トランスフェリン受容体 (T f n R) は細胞表面に局在しているので、A T T C (Manassas, VA) から抗 T f n R M A b 5 E 9 をポジティブコントロールとして用いた。

【 0 4 7 6 】

図 1 は、抗 O v r 1 1 0 抗体が O v r 1 1 0 を発現する腫瘍細胞に結合している、生きた細胞表面の模範的な蛍光染色像を示す。図 1 A、1 B および 1 C は m A B O v r 1 1 0 . Q 1 2 . 2 の乳癌 (Z R - 7 5 - 1)、子宮内膜癌 (R L 9 5 . 2) および卵巣癌 (O V C A R 3) 細胞それぞれに対して結合した、細胞表面結合を示す。O v r 1 1 0 を発現しない H e L a 細胞 (図 1 D) においては、染色が観察されなかった。以下の表 9 は表

10

20

30

40

50

面結合実験の結果を外用する。プラス記号は染色強度を表す。

【0477】

【表12】

表9. 生きた癌細胞へのOvr110抗体の表面結合

Ovr110 mAbs	ZR-75-1	RL95.2	OVCAR3	HeLa
Q1.2	++	++	+/-	--
Q3.1	++	+	--	--
Q11.12.3	+++	++	+	--
Q12.2	+++	++	+	--
Q15.2	+++	+++	+	--
Q19.6	++	+++	+	--
Q23.6	++	++	+	--
Q27.4	++	+	+/-	--
抗TfnR	+	+++	++	+++
mAbなし	--	--	--	--

図1および表7の結果は、抗Ovr110 mAbsが、Ovr110を発現する腫瘍細胞表面上のネイティブOvr110に特異的に結合し、診断薬および治療薬として有用であることを示す。

【0478】

生きた腫瘍細胞によるQシリーズMAbsの内部移行

精製mAbsをAlexa Fluor 488 (Molecular Probe, Eugene, OR)にて、製造者の指示に従って標識した。以下の癌細胞株を本研究に用いた：ZR-75-1 (乳癌)、SKBR3 (乳癌)およびHeLa (頸部癌)。ウェスタンブロットは、ZR-75-1およびSKBR3細胞はOvr110タンパク質を発現し、HeLaはしないことを確認した。細胞をカバースリップに2日間播種し、細胞を完全に付着させた。そこでAlexa-488で標識したmAbsを生きた細胞に5 μg/mLの濃度で24時間、5%CO₂濃度の37インキュベーターにて添加した。そして、細胞を1xPBSで3度洗浄した。mAbsの表面染色は、細胞を10 μg/mLの抗Alexa488ウサギ抗体 (Molecular Probe, Eugene, OR)で、氷上で1時間インキュベートすることでクエンチした。1xPBSで3度洗浄した後、細胞を4%ホルムアルデヒドで10分間、室温で固定した。ホルムアルデヒド残渣を、細胞を1度1xPBSで洗浄することで取り除いた。

【0479】

カバースリップをベクタスタチン (Vector, Burlingame, CA)、細胞核の可視化のためのDAPI含有培地、中にマウントし、適切な蛍光フィルターを装備したZeiss Axiophot 蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss, Thornwood, NY)で観察した。顕微鏡写真をCCDカメラを用いて記録した。抗トランスフェリン受容体 (TfnR)は細胞表面に局在しているため、ATTC (Manassas, VA)からの抗TfnR MAbs 5E9をポジティブコントロールとして用いた。リシンは哺乳動物細胞には発現しておらず、細胞表面に局在化していないので、抗リシンMAbs TFTB1 (ATCC, Manassas, VA)をネガティブコントロールとして用いた。

【0480】

図2は、抗Ovr110抗体のOvr110を発現する腫瘍細胞による内部移行の模範的な蛍光染色像を示す。図2Aおよび2BはそれぞれmAb Ocr110.11.12.3のZR-75-1およびSKBR3乳癌腫瘍細胞への内部移行を示す。Ovr110を発現しないHeLa細胞 (図2C)においては、内部移行は観察されなかった。下記の表10は内部移行実験の結果を外用する。プラス記号 (+)は内部移行を示した細胞における染色強度を示し、n/dは内部移行が観察されなかったことを示す。

【0481】

10

20

30

40

【表 1 3】

表10.

Alexa488標識 Ovr110 Abs	ZR-75-1における 内部移行	SKBR3における 内部移行	HeLa1における 内部移行
抗リシン	--	--	--
抗TfnR	+++	+++	+++
Q1.2	n/d	n/d	n/d
Q3.1	n/d	n/d	n/d
Q11.12.3	+++	+++	--
Q12.2	+	+	--
Q15.2	n/d	n/d	n/d
Q19.6	++	++	--
Q23.6	++	++	--
Q27.4	+/-	+/-	--

10

図 2 および表 1 0 の結果は、抗 O v r 1 1 0 m A b s が、意外にも、生きた O v r 1 1 0 発現癌細胞に内部移行され、治療薬として有用であることを示す。

【 0 4 8 2】

Q シリーズ M A b s M A b - Z A P サポリン結合体による腫瘍細胞殺傷

Z R - 7 5 - 1 (乳 癌)、S K B R 3 (乳 癌) お よ び H C T 1 1 6 (O v r 1 1 0 陰 性 大 腸 癌) 細 胞 株 から の 腫 瘍 細 胞 を、そ れ ぞ れ 3 0 0 0、3 0 0 0、1 5 0 0 個 / ウ ェ ル で、9 6 ウ ェ ル プ レ ー ト に 播 種 し、接 着 の た め 一 晩 放 置 し た。翌 日 (0 日 目)、Advanced Targeting Systems (San Diego, CA) から の ヤ ギ 抗 マ ウ ス I g サ ポ リ ン 結 合 体 m A B - Z A P 1 μ g / m L と と も に ま た は な し で、モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 0 . 4 お よ び 2 . 0 μ g / m L を 生 き た 細 胞 に 添 加 し た。m A b - Z A P は、内 部 移 行 の 際、細 胞 を 殺 傷 す る サ ポ リ ン を 放 出 す る。ト ラ ン ス フ ェ リ ン 受 容 体 (T f n R) が 細 胞 表 面 に 局 在 し、内 部 移 行 が 可 能 な た め、A T T C (M a n a s s a s, V A) から の 抗 T f n R M A b 5 E 9 を ポ ジ テ ィ ブ コ ン ト ロ ー ル M A b と し て 用 い た。リ シ ン は 細 胞 表 面 に 局 在 し て い な い の で、抗 リ シ ン M A b T F T B 1 (A T C C, M a n a s s a s, V A) を 殺 傷 の ネ ガ テ ィ ブ コ ン ト ロ ー ル と し て 用 い た。5 日 目 に、細 胞 生 存 率 を、P r o m e g a (M a d i s o n, W I) から の C e l l T i t e r G l o L u m i n e s c e n t C e l l V i a b i l i t y a s s a y を 用 い て 計 測 し た。

20

30

【 0 4 8 3】

結 果 を 下 記 表 1 1 a、1 1 b お よ び 1 1 c に、M A b s + M A b - Z A P に て 処 理 さ れ た 細 胞 と 未 処 理 細 胞 と の、増 殖 の 比 較 の パ ー セ ン テ ー ジ と し て 提 示 す る。細 胞 増 殖 の パ ー セ ン テ ー ジ は、サ ン プ ル の 蛍 光 単 位 を、各 プ レ ー ト の 培 地 の み (1 0 0 %) に 標 準 化 す る こ と に よ っ て 計 算 し た。

【表 1 4】

表11a. Q-シリーズOvr110 MAbおよびMAb-ZAPサボリン結合体によるZR-75-1細胞殺傷

MAbクローン	培地のみのウェルと比較した増殖パーセンテージ			
	MAbのみ		MAbと1.0ug/mL mAb-ZAP	
	MAb (0.4 ug/mL)	MAb (2.0 ug/mL)	MAb (0.4 ug/mL)	MAb (2.0 ug/mL)
抗リシン	107.1%	104.9%	92.3%	95.4%
抗TfnR	104.8%	116.5%	35.0%	49.3%
Q1.2	106.0%	99.2%	85.8%	83.9%
Q3.1	97.6%	103.0%	103.6%	104.2%
Q11.12.3	108.6%	112.8%	31.5%	44.3%
Q12.2	113.1%	102.3%	38.0%	67.7%
Q15.2	95.3%	98.6%	45.6%	57.8%
Q19.6	99.1%	99.6%	28.1%	46.5%
Q23.6	102.4%	97.2%	37.5%	45.5%
Q27.4	101.3%	98.3%	60.6%	69.5%

10

【 0 4 8 4】

【表 1 5】

表11b. Q-シリーズOvr110 MAbおよびMAb-ZAPサボリン結合体によるSKBR3の殺傷

MAbクローン	培地のみのウェルと比較した増殖パーセンテージ			
	MAbのみ		MAbと1.0ug/mL mAb-ZAP	
	MAb (0.4 ug/mL)	MAb (2.0 ug/mL)	MAb (0.4 ug/mL)	MAb (2.0 ug/mL)
抗リシン	96.6%	102.2%	82.7%	86.6%
抗TfnR	93.9%	94.35	18.4%	44.6%
Q1.2	n/d	n/d	n/d	n/d
Q3.1	n/d	n/d	n/d	n/d
Q11.12.3	98.2%	95.3%	32.7%	47.7%
Q12.2	95.2%	100.7%	58.5%	68.4%
Q15.2	93.3%	100.9%	67.8%	81.7%
Q19.6	97.6%	97.4%	49.8%	25.0%
Q23.6	98.8%	101.2%	68.9%	73.6%
Q27.4	98.9%	101.2%	68.9%	73.6%

20

30

【 0 4 8 5】

【表 1 6】

表11c. Q-シリーズOvr110 MAbおよびMAb-ZAPサボリン結合体によるHCT116の殺傷

MAbクローン	培地のみのウェルと比較した増殖パーセンテージ			
	MAbのみ		MAbと1.0ug/mL mAb-ZAP	
	MAb (0.4 ug/mL)	MAb (2.0 ug/mL)	MAb (0.4 ug/mL)	MAb (2.0 ug/mL)
抗リシン	98.3%	97.4%	97.4%	99.1%
抗TfnR	103.0%	109.4%	10.0%	24.9%
Q1.2	n/d	n/d	n/d	n/d
Q3.1	n/d	n/d	n/d	n/d
Q11.12.3	102.6%	100.7%	106.7%	101.9%
Q12.2	104.3%	104.7%	101.4%	102.5%
Q15.2	105.8%	102.2%	103.7%	104.0%
Q19.6	97.9%	101.8%	100.1%	102.2%
Q23.6	99.4%	101.0%	98.3%	99.4%
Q27.4	97.2%	97.5%	99.0%	99.8%

40

【 0 4 8 6】

表 1 1 a、1 1 b および 1 1 c の結果は、抗 O v r 1 1 0 M A b s が内部移行する毒素と共に、生きた O v r 1 1 0 発現癌細胞に特異的に結合、内部移行および殺傷することを示している。毒素は二次抗体との抱合 (conjunction) を通して、または一次抗 O v r 1

50

10 抗体との直接的抱合を通して、内部移行し得る。Qシリーズ抗Ovr110抗体は、Ovr110発現腫瘍細胞を殺傷する治療薬として有用である。

【0487】

例4：Ovr110MAbの治療的効果

抗Ovr110モノクローナル抗体を、Ovr110発現腫瘍に対する治療的抗腫瘍効果について評価した。MAbsを単一の剤および知られた低分子抗腫瘍化合物との組合せで、ヒト腫瘍モデル中で評価した。

【0488】

ZR-75-1の同所性異種移植

本出願人らの以前の免疫組織化学およびウェスタンイムノブロット研究は、ZR-75-1腫瘍中のOvr110の高レベル発現を示している。したがって、パクリタキセルをポジティブコントロール化合物として用いたZR-75-1ヒト乳癌腫瘍同所性異種移植モデルを、Ovr110MAbsの効果の評価に用いた。パクリタキセルは、乳および卵巣腫瘍を含む婦人科系腫瘍に対する効果を有することで知られる低分子薬剤である。抗Ovr110抗体抗腫瘍効果を、単一剤および治療処方との組み合わせによる、研究される(in-study)腫瘍の増殖阻害(TGI)および対象の生存における総合的な増加を決定することによって評価した。

【0489】

材料および方法

モノクローナル抗体Ovr110.C6.3.2.1.2およびOvr110.Q19.6は上記およびすでにPCT/US2004/014490およびPCT/US2005/040707に記載されており、該開示は参照により本明細書に明示的に組み込まれる。MAbsはクローンハイブリドーマの上清から精製され、使用されるまで-20で貯蔵された。パクリタキセル(ロット番号R026849)はIngusions Solutions, Inc.(Bedford, NH)から受け取り、室温で保存され、生理食塩水に最終作業濃度(0.5mg/ml)で溶解させた。

【0490】

ZR-75-1腫瘍細胞株を、ATCC(Manassas, VA)から獲得し、Infectious Microbe PCR Amplification Test(IMPACT)(生物学的サンプル内におけるネズミ科の病原菌を検出するPCR検査のパネル)によるクリアランスの後、異種移植研究に用いた。培養物を15%のウシ胎児血清を添加したRPMI 1640中で、5%CO₂大気中で維持した。培養物をT225組織培養フラスコ中で、1:5の分割比で、植菌に適した数の細胞が得られるまで拡大した。

【0491】

ICR SCIDマウス、IcrTac:ICR-Prkdc^{scid}をTaconic(Hudson, NY)から入手した。マウスは5から6週齢で受け取り、操作の前4日間順応させた。動物を個々独立したアンモニアフリーの環境に収容した。全ての手続を、TGen Drug Development Services Institutional Animal Care and Use Committee(Protocol #06002, 2006年3月承認)の制度ガイドラインの下で行った。

【0492】

異種移植

各マウスに、ZR-75-1腫瘍細胞(1.0 × 10⁷個/マウス)を含む50%培地/50%マトリゲル細胞懸濁液0.1mlを、#4乳腺脂肪帯(mammary fat pad)中に同所的に接種した。

接種後24日、腫瘍を計測し、腫瘍重量を式：

$$\text{腫瘍重量 (mg)} = (a \times b^2) / 2$$

式中「b」は最小径および「a」は最大径を表す

を用いて計算した。樹立した腫瘍が一旦約71mgに達したら、マウスを様々な処理およびコントロール群に対で整合させた(1日目、n=10)。

【0493】

10

20

30

40

50

1日目において、Ovr110.C6.3.2.1.2(100mg/kg)、Ovr110.Q19.6(100mg/kg)およびパクリタキセル(5mg/kg)を、単一剤としてまたは組み合わせて腹腔内投与した。モノクローナル抗体の投与計画は、2週を4週間であり、パクリタキセルは1~5日目に投与した。1日目の最初に、マウスの体重および腫瘍の計測を週に2回モニタリングした。各マウスの個別の腫瘍が、約1000mgの終点に達した時、調節されたCO₂による窒息によりマウスを安楽死させた。

【0494】

データ評価および統計的手法

腫瘍増殖阻害(TGI)を以下の式:

【数1】

$$TGI = \left[1 - \frac{(\bar{x}_{\text{処置(最終)}} - \bar{x}_{\text{処置(第1日)}})}{(\bar{x}_{\text{対照(最終)}} - \bar{x}_{\text{対照(第1日)}})} \right] \times 100\%$$

式中 \bar{x} は腫瘍重量を表す、
を用いて計算した。

【0495】

1日目の開始時のサイズから逆行する腫瘍を、1日目および最終日の平均の群から取り除き、TGIを計算する前にそれぞれの群の新たな平均を計算した。1日目の腫瘍重量に対して逆行を見せた腫瘍について、個別の腫瘍縮小(TS)を以下の式を用いて計算した。

各群の平均腫瘍縮小を計算し、報告した。

【数2】

$$TS = \left[1 - \frac{(\text{腫瘍重量}_{\text{(最終)}})}{(\text{腫瘍重量}_{\text{(第1日)}})} \right] \times 100\%$$

全ての統計的分析をGraphPad Prism(登録商標)v4ソフトウェアで行った。生存時間を、 Kaplan-Meier法を用いて計算した。生存曲線を対数ランクテストを用いて比較し、生存時間中央値を計算し、報告した。相対的な腫瘍重量の分析をANOVAによって、ダネットの多重比較ポスト試験を有用化して完成した。

【0496】

結果

Ovr110.C6.3.2.1.2およびOvr110.Q19.6抗体については耐性があり、明らかな毒性は観察されなかった。

効力を、研究される(in-study)腫瘍の増殖阻害(TGI)および単一剤処置レジメンおよび組み合わせ処置レジメンの生存の全体的な増加を決定することで評価した。TGIは23日目(それぞれの群において全ての動物がまだ残っていた最後の日)に決定した。結果を以下の表12にまとめる。

【0497】

単一剤として投与したOvr110.C6.3.2.1.2およびOvr110.Q19.6モノクローナル抗体は、腫瘍の増殖をそれぞれ39.1%および39.7%阻害した。単一剤Ovr110.C6.3.2.1.2およびOvr110.Q19.6は、ビヒクルコントロールと比較して顕著な相対腫瘍重量の減少をもたらした。単一剤mAbsの処置レジメンは、ビヒクルコントロールと比較して生存時間の長さの増大を示した。パクリタキセル単一剤治療は、腫瘍増殖阻害についてはOvr110.C6.3.2.1.2およびOvr110.Q19.6単一剤治療に対して顕著に優れてはいなかったが、ビヒクルコントロールと同様の生存時間の増大を示した。

【0498】

Ovr110.C6.3.2.1.2またはOvr110.Q19.6とパクリタキセルとの組み合わせ治療法は、ビヒクルコントロールと比較して顕著に低い腫瘍重量中央値

10

20

30

40

50

の結果となった。Ovr110.C6.3.2.1.2とパクリタキセルとの組み合わせ (TGI = 40.6%) は、腫瘍増殖の現象において有効性を見せた。Ovr110.Q19.6とパクリタキセルとの組み合わせは、組み合わせの個別の構成成分それぞれと比較したとき、顕著に有効性を増強した (TGI = 65.4%)。

【0499】

【表17】

表12. ヒト腫瘍に対するOvr110 MAb効力

処置群	#マウス	用量 (mg/kg)	IP投与スケジュール	群の腫瘍重量	23日目におけるTGI %	コントロールに対する相対腫瘍重量P値	平均生存 (日)	死亡
コントロール ビヒクル	10	---	2x週毎x4	748.6 ± 53.2	---	---	28	0
C6	10	100	2x週毎x4	483.7 ± 36.2	39.1	P<0.01	31.5	0
Q19	10	100	2x週毎x4	479.7 ± 39.7	39.7	P<0.01	33	0
Pac	10	5	QD x 5	461.5 ± 45.8	42.3	P<0.01	35	0
C6 Pac	10	100 5	2x週毎x4 QD x 5	473.5 ± 42.9	40.6	P<0.01	30	0
Q19 Pac	10	100 5	2x週毎x4 QD x 5	305.8 ± 25.6	65.4	P<0.01	37	0

注: Ovr110.C6.3.2.1.2 = C6, Ovr110.Q19.6 = Q19, パクリタキセル = Pac

10

20

30

40

【0500】

総合的に、抗腫瘍活性は単一剤Ovr110.C6.3.2.1.2およびOvr110.Q19.6抗体治療群において早期に観察され、ビヒクルコントロールと比較して統計的に有意な効力が観察された。各抗体とパクリタキセルとの組み合わせはコントロールに対して有意性を維持した。Ovr110.Q19.6とパクリタキセルとの組み合わせは、Ovr110.Q19.6およびパクリタキセルの単一剤と比較して、腫瘍重量の有意な低下をもたらし、さらなる相互作用を提示した。統計的に有意な生存時間の増大は測定されなかったものの、抗体で処置された対象についての生存時間の中央値の増大がまた観察されるという傾向があった。

【0501】

ZR-75-1同所性異種移植研究2

パクリタキセルをポジティブコントロール化合物としたZR-75-1ヒト乳癌腫瘍の同所性異種移植モデルの二番目の研究を、Ovr110 MAb sおよび投薬の効力の評価に用いた。評価されたOvr110抗体は、Ovr110.C6.3.2.1.2、Ovr110.Q19.6、Ovr110.Q11.12.3、Ovr110.Q12.2およびOvr110.Q27.4を含む。研究および評価は、上記のように、次の変更を入れて実施された。各群のマウスの数は8であり、15日目および35日目の腫瘍増殖阻害のみが決定された。結果を以下の表13にまとめる。

【0502】

【表 18】

表13. ヒト腫瘍に対するOvr110 MAb効力

処理群	#マウス	用量 (mg/kg)	IP投与 スケジュール	15日目に おけるTGI%	35日目に おけるTGI%
ビヒクルコントロール	8	---	2x 週毎 x 4	---	---
C6	8	50	2x 週毎 x 4	46.3	10
Q19	8	50	2x 週毎 x 4	69	24.1
Q19	8	100	2x 週毎 x 4	78.5	35
Q11	8	50	2x 週毎 x 4	53.3	24.1
Q12	8	50	2x 週毎 x 4	57	39
Q27	8	50	2x 週毎 x 4	31.4	15.5
Pac	8	5	QD x 5	55.3	15.8

注: Ovr110.C6.3.2.1.2 = C6, Ovr110.Q19.6 = Q19, Ovr110.Q11.12.3 = Q11, Ovr110.Q12.2 = Q12, Ovr110.Q27.4 = Q27, パクリタキセル = Pac

10

【0503】

上に示したように。抗腫瘍活性をOvr110.C6.3.2.1.2およびOvr110.Q19.6抗体処置群について観察した。Ovr110.Q19.6はまた、半分の投与量である50mg/kgで抗腫瘍活性を示し、Ovr110.Q19.6およびOvr110.Q19.6と同じエピトープで結合する抗体の高い効力を示唆した。さらに、Ovr110.Q11.12.3、Ovr110.Q12.2およびOvr110.Q27.4は、それぞれの処置群において抗腫瘍活性を示した。

20

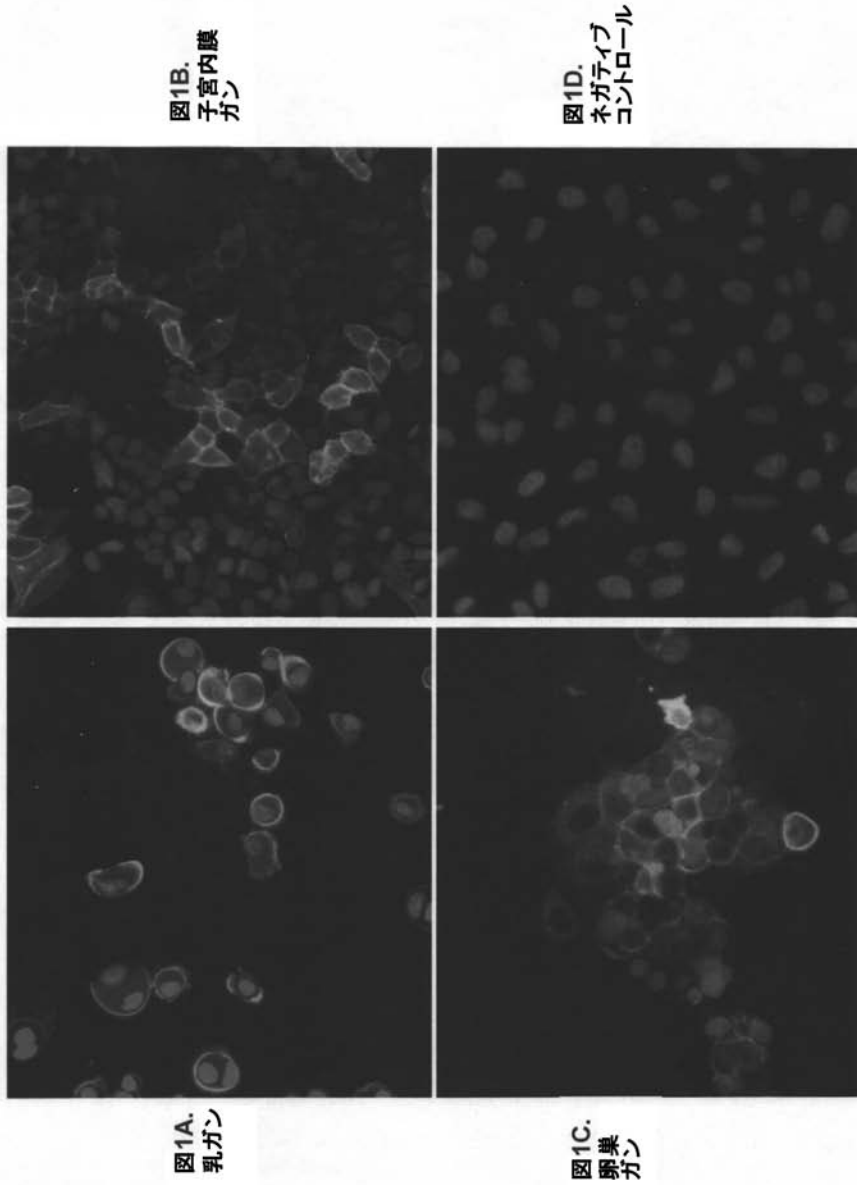
【0504】

Ovr110抗体抗腫瘍有効性の結論

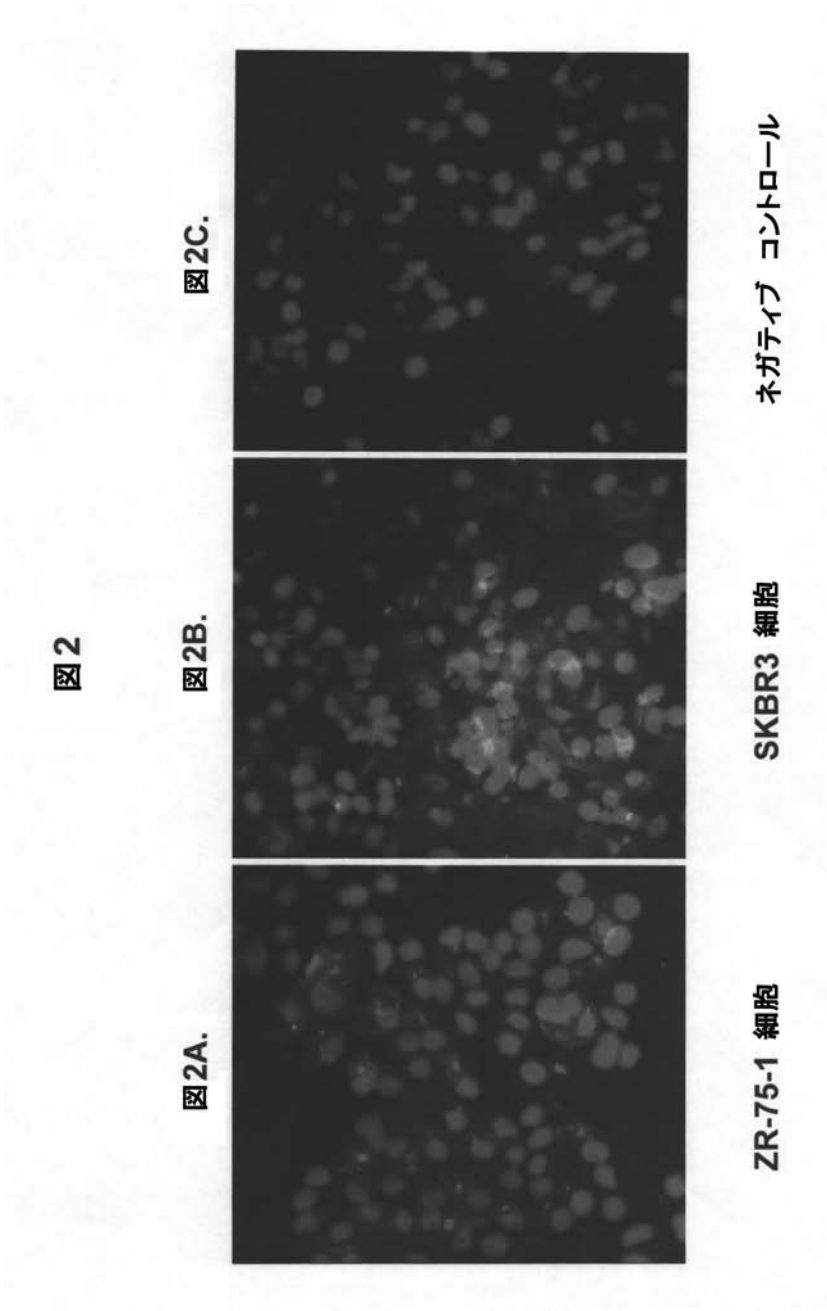
上記マウス異種移植モデルからの結果は、抗Ovr110抗体が、哺乳動物におけるヒト腫瘍に対して、治療剤として有用であることを示す。とくに、ヒト腫瘍を有する哺乳動物に投与された抗Ovr110抗体は経時的な腫瘍増殖の減少、経時的な腫瘍重量の減少、および生存時間の増大を示した。

【 図 1 】

図 1



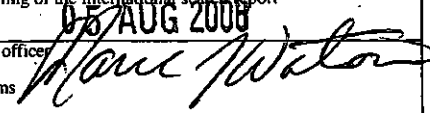
【 図 2 】



【 配列表 】

2010510809000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/85585
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A61K 39/395(2006.01);C07K 16/46(2006.01) USPC: 424/133.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched PubMed, Google Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Ovr110 antibody		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Pilkington et al. OVR110 ANTIBODY COMPOSITIONS AND METHODS OF USE. Publication date: 11/25/2004	1-65
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 19 June 2008 (19.06.2008)		Date of mailing of the international search report 05 AUG 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT. Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Larry Helms  Telephone No. 571-272-7222

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 6
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 13/10 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/10	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 15/14 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/14	
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 31/715 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 K 31/7028 (2006.01)	A 6 1 K 37/20	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 31/7028	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 A	
	G 0 1 N 33/53 D	

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

(72)発明者 リュー, シュー - フイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 6 5、レッドウッド シティ、#エイチ、コーク ハーバー サークル 4 4 1

(72)発明者 ノワコウスキー, アグネス

アメリカ合衆国 テキサス州 7 8 7 0 4、オースティン、#1 0 7、イーストサイド ドライブ 1 5 0 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA53 CA02 DA02 EA02 EA04 GA10 GA13 HA04
 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 CD07 CE06 CE12 DA01 DA13
 4B065 AA90X AA92X AA93X AA97X AB01 AB02 AC14 BA02 BA05 BA08
 BB03 BB12 BB19 BD14 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA19 DA34 MA02 NA05 ZA022 ZA592 ZA812 ZB262 ZB352 ZC412
 4C085 AA14 AA16 BB31 CC02 CC23 DD62 EE01
 4C086 AA01 AA02 BA02 EA10 MA02 MA04 NA05 ZA02 ZA59 ZA81
 ZB26
 4H045 AA11 BA41 DA76 EA20 EA51 FA74 GA23 GA26

专利名称(译)	Ovr1 10抗体组合物和使用方法		
公开(公告)号	JP2010510809A	公开(公告)日	2010-04-08
申请号	JP2009539435	申请日	2007-11-27
申请(专利权)人(译)	Diadokusasu公司		
[标]发明人	パプコフジャッキー ディートリッヒグンドー リュースューファイ ノワコウスキーアグネス		
发明人	パプコフ,ジャッキー ディートリッヒ,グンドー リュースューファイ ノワコウスキー,アグネス		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/46 C12N15/02 A01K67/027 A61P43/00 A61P37/06 A61K45/00 A61P35/00 A61P15/00 A61P13/10 A61P13/12 A61P1 /18 A61P11/00 A61P15/14 A61P25/00 A61K31/337 A61K39/395 A61K31/715 A61K31/7028 G01N33 /574 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/39558 A61K45/06 A61K47/6817 A61K47/6823 A61K47/6849 A61K51/1027 A61K2039/505 A61P1/18 A61P11/00 A61P13/10 A61P13/12 A61P15/00 A61P15/14 A61P25/00 A61K47/6855 C07K16 /2827 C07K16/30 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/73 C07K2317/77 C07K2317/92 C12N9/96 A61K2300/00 C07K16/18 C07K2317/76 G01N33/57492		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00. 102 C07K16/46 C12N15/00.C A01K67/027 A61P43/00.111 A61P37/06 A61K45/00 A61P35/00 A61P15 /00 A61P13/10 A61P13/12 A61P1/18 A61P11/00 A61P15/14 A61P25/00 A61K31/337 A61K39/395.T A61K37/20 A61K31/7028 G01N33/574.A G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA53 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024 /GA10 4B024/GA13 4B024/HA04 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CD07 4B064/CE06 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065 /AA93X 4B065/AA97X 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/BA08 4B065/BB03 4B065/BB12 4B065/BB19 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084 /AA19 4C084/DA34 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/ZA022 4C084/ZA592 4C084/ZA812 4C084 /ZB262 4C084/ZB352 4C084/ZC412 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB31 4C085/CC02 4C085 /CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BA02 4C086/EA10 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZA02 4C086/ZA59 4C086/ZA81 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045 /BA41 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74 4H045/GA23 4H045/GA26		
优先权	60/861657 2006-11-27 US		
其他公开文献	JP5391073B2 JP2010510809A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了针对由头颈癌，卵巢癌，子宫内膜癌，肾癌，胰腺癌，肺癌或乳腺癌表达的Ovr110的分离的抗体及其抗原结合片段。还提供了用于其生产的细胞和方法，以及它们用于杀死表达Ovr110的癌细胞和减轻或治疗哺乳动物中表达Ovr110的癌症的方法。抗Ovr110抗体调节Ovr110功能或在体外和体内与哺乳动物细胞表达的Ovr110结合后内化。还提供了包含抗Ovr110抗体和载体的组合物以及制品或其试剂盒。另外，提供了编码抗Ovr110抗体的分离的核酸，含有分离的核酸的表达载体和含有载体的宿主细胞。

<p>Chen Y, Yang C, Xie Z, Zou L, Ruan Z, Zhang X, Tang Y, Fei L, Jia Z, Wu Y. Expression of the novel co-stimulatory molecule B7-H4 by renal tubular epithelial cells. <i>Kidney Int.</i> 2006 Oct 18 [Epub].</p>
<p>Ou D, Wang X, Metzger DL, Ao Z, Pozzilli P, James RF, Chen L, Warnock GL. Suppression of human T-cell responses to beta-cells by activation of B7-H4 pathway. <i>Cell Transplant.</i> 2006;15(5):399-410.</p>
<p>Suh WK, Wang S, Duncan GS, Miyazaki Y, Cates E, Walker T, Gajewska BU, Deenick E, Dawicki W, Okada H, Wakeham A, Ilie A, Watts TH, Ohashi PS, Jordana M, Yoshida H, Mak TW. Generation and characterization of B7-H4/B7S1/B7X-deficient mice. <i>Mol Cell Biol.</i> 2008 Sep;28(17):8403-11.</p>
<p>Krambeck AE, Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Park ES, Kuntz SM, Leibovich BC, Blute ML, Chevli JC, Kwon ED. B7-H4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature: associations with cancer progression and survival. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 2006 Jul 5;103(27):10391-6. Epub 2006 Jun 23.</p>
<p>Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H, Chen L, Zou W. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. <i>J Immunol.</i> 2006 Jul 1;177(1):40-4.</p>
<p>Sun Y, Wang Y, Zhao J, Gu M, Giacombe R, Lefvert AK, Wang X. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. <i>Lung Cancer.</i> 2006 Aug;53(2):143-51. Epub 2006 Jun 19.</p>
<p>Bignotti E, Tassi RA, Calza S, Ravaggi A, Romani C, Rossi E, Falchetti M, Odicino FE, Pecorelli S, Santini AD. Differential gene expression profiles between tumor biopsies and short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: Identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy. <i>Gynecol Oncol.</i> 2006 Nov;103(2):405-16. Epub 2006 May 24.</p>
<p>Mao YX, Chen YJ, Ge Y, Ma HB, Yu JF, Wu HY, Hu YM, Wang Q, Shi Q, Zhang XG. Recombinant human B7-H4 expressed in <i>Escherichia coli</i> inhibits T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion in vitro. <i>Acta Pharmacol Sin.</i> 2006 Jun;27(6):741-6.</p>
<p>Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, Brumlik M, Cheng P, Curiel T, Myers L, Lackner A, Alvarez X, Ochoa A, Chen L, Zou W. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. <i>J Exp Med.</i> 2006 Apr 17;203(4):871-81. Epub 2006 Apr 10.</p>
<p>Simon I, Zhuo S, Corral L, Diamandis EP, Sarno MJ, Wollert RL, Kim NN. B7-H4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for ovarian cancer.</p>