

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 7 月 3 日(03.07.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/104270 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/085026
- (22) 国際出願日: 2013 年 12 月 19 日(19.12.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-281525 2012 年 12 月 25 日(25.12.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人鹿児島大学(KAGOSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目 2 1 番 2 4 号 Kagoshima (JP).
- (72) 発明者: 松山 隆美(MATSUYAMA, Takami); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目 2 1 番 2

4 号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 永井 拓(NAGAI, Taku); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目 2 1 番 2 4 号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 蓮井 和久(HASUI, Kazuhisa); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目 2 1 番 2 4 号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 高尾 尊身(TAKAO, Sonshin); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目 2 1 番 2 4 号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP).

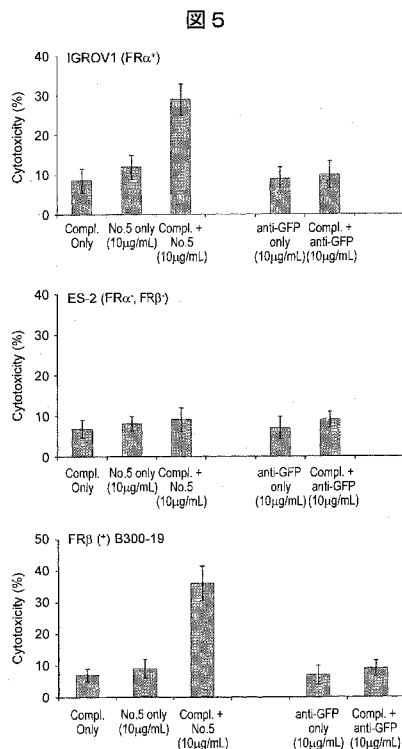
(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー 3 2 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,

[続葉有]

(54) Title: ANTIBODY RECOGNIZING FOLATE RECEPTORS α AND β

(54) 発明の名称: 葉酸リセプター α 及び β を認識する抗体



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide an antibody that immunologically and specifically binds to folate receptor α and folate receptor β . Specifically disclosed is an antibody or a fragment thereof, wherein the amino acid sequences of the CDRH1, CDRH2 and CDRH3 of a heavy chain variable region (VH) are respectively the amino acid sequences of SEQ ID NOS:2, 4 and 6, and the amino acid sequences of the CDRL1, CDRL2 and CDRL3 of a light chain variable region (VL) are respectively the amino acid sequences of SEQ ID NOS:10, 12 and 14.

(57) 要約: 本発明は、葉酸リセプター α 及び葉酸リセプター β に免疫学的に特異的に結合する抗体を提供することを目的とし、具体的には、重鎖可変領域 (VH) の CDRH1、CDRH2 及び CDRH3 のアミノ酸配列がそれぞれ配列番号 2、配列番号 4 及び配列番号 6 のアミノ酸配列であり、並びに軽鎖可変領域 (VL) の CDRL1、CDRL2 及び CDRL3 のアミノ酸配列がそれぞれ配列番号 10、配列番号 12 及び配列番号 14 のアミノ酸配列である抗体又はそのフラグメントに関する。

WO 2014/104270 A1



LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称

葉酸リセプター α 及び β を認識する抗体

技術分野

本発明は、葉酸リセプター α 及び β を認識する抗体、及び当該抗体を含有する癌診断薬及び癌治療薬に関する。

背景技術

葉酸リセプター(FR)は酸化型葉酸のリセプターであり、ヒト細胞ではFR α 、FR β 及びFR γ のアイソフォームが存在することが知られている(非特許文献1)。

FR α は、上皮細胞表面に発現し、種々の癌細胞で発現が増加する。最近では、卵巢癌患者において抗FR α 抗体を用いたフェーズII臨床試験が米国で行われ、その効果が確かめられた(非特許文献2)。また、特許文献1は、抗FR α 抗体を含む卵巢癌治療組成物を開示する。

一方、FR β の発現は健常者組織では少なく、関節リウマチ滑膜、変形性関節症滑膜、肺線維症の肺組織等の炎症組織の活性化マクロファージ表面に発現がみられる(非特許文献3～5)。さらに、本願発明者等は、抗ヒトFR β 抗体を作製し、種々の癌組織に存在する癌関連マクロファージの多くがFR β 発現マクロファージであること、及び膵臓癌においてFR β 発現マクロファージ数が増加した癌は生命予後が悪いことを示した(非特許文献6)。また、本願発明者等は、悪性グリオーマ移植モデルにおいて、抗FR β 抗体イムノトキシンを用いてFR β マクロファージを除去することにより、悪性グリオーマの増殖が抑制されることを示した(非特許文献7)。さらに、特許文献2～4は、FR- β に対する抗体及び該抗体とトキシンとを結合したFR- β 抗体イムノトキシン、並びにこれら抗体及びイムノトキシンを含有する治療剤を開示する。

以上のように、これまで抗FR α 抗体又は抗FR β 抗体イムノトキシン等の抗FR β 抗体結合物の単独使用による癌増殖抑制作用が知られている。しかしながら、

抗 FR α 抗体又はその結合物と抗 FR β 抗体又はその結合物とを用いた併用療法による癌増殖抑制効果は報告されていない。また、FR α と FR β とは、アミノ酸レベルで約 70% の相同性を有するが、これまでに FR α と FR β の双方を認識する抗体は報告されていない。

先行技術文献

特許文献

- 特許文献 1 特許第 4805848 号公報
- 特許文献 2 特許第 4943144 号公報
- 特許文献 3 特開 2010-77026 号公報
- 特許文献 4 国際公開第 2012/128377 号

非特許文献

非特許文献 1 Elnakat H., Ratnam M., Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev.*, 2004 Apr 29;56(8):1067-84

非特許文献 2 Jelovac D., Armstrong DK., Role of farletuzumab in epithelial ovarian carcinoma. *Curr Pharm Des.*, 2012;18(25):3812-5

非特許文献 3 Nakashima-Matsushita N., Homma T., Yu S., Matsuda T., Sunahara N., Nakamura T., Tsukano M., Ratnam M., Matsuyama T., Selective expression of folate receptor beta and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1999 Aug;42(8):1609-16

非特許文献 4 Nagai T., Tanaka M., Hasui K., Shirahama H., Kitajima S., Yonezawa S., Xu B., Matsuyama T., Effect of an immunotoxin to folate receptor beta on bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol.*, 2010 Aug;161(2):348-56

非特許文献 5 Tsuneyoshi Y., Tanaka M., Nagai T., Sunahara N., Matsuda T., Sonoda T., Ijiri K., Komiya S., Matsuyama T., Functional folate receptor beta-expressing macrophages in osteoarthritis synovium and their M1/M2 expression profiles. *Scand J Rheumatol.*, 2012;41(2):132-40

非特許文献6 Kurahara H., Takao S., Kuwahata T., Nagai T., Ding Q., Maeda K., Shinchi H., Matakai Y., Maemura K., Matsuyama T., Natsugoe S., Clinical significance of folate receptor β -expressing tumor-associated macrophages in pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol.*, 2012 Jul;19(7):2264-71

非特許文献7 Nagai T., Tanaka M., Tsuneyoshi Y., Xu B., Michie SA., Hasui K., Hirano H., Arita K., Matsuyama T., Targeting tumor-associated macrophages in an experimental glioma model with a recombinant immunotoxin to folate receptor beta. *Cancer Immunol Immunother.*, 2009 Oct;58(10):1577-86

発明の概要

上述のように、抗FR α 抗体又はその結合物と抗FR β 抗体又はその結合物とを用いた併用療法による癌増殖抑制効果は報告されていない。

従来において、FR α とFR β を介した診断薬又は治療薬として、種々の葉酸結合物が提案されている(Muller C., Folate based radiopharmaceuticals for imaging and therapy of cancer and inflammation. *Curr Pharm Des.*, 2012;18(8):1058-83; Clifton GT., Sears AK., Clive KS., Holmes JP., Mittendorf EA., Ioannides CG., Ponniah S., Peoples GE., Folate receptor α : a storied past and promising future in immunotherapy. *Hum Vaccin.*, 2011 Feb;7(2):183-90; 及び Low PS., Kularatne SA., Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr Opin Chem Biol.*, 2009 Jun;13(3):256-62)。

しかしながら、葉酸は低分子であるため非特異的に吸収されることや健常組織の多くの細胞に発現しているプロトン連結葉酸トランスポーターによっても細胞内に取り込まれるため、これら葉酸結合物の作用はFR α 発現細胞やFR β 発現細胞に特異的とはいえない。また、葉酸結合物の細胞内吸収は血中の葉酸濃度により干渉される。

一方、癌細胞を標的とした抗FR α 抗体又は癌増殖を促進する癌関連マクロファージに向けられた抗FR β 抗体単独の使用に比べて、FR α 及びFR β の双方に特異的な抗FR α/β 抗体やその化合物を得ることができれば、当該抗FR α/β 抗体やその化合物の使用により癌細胞と癌関連マクロファージを同時に傷害することにより、

さらに癌を効果的に治療することができる。また、抗 FR α / β 抗体やその化合物の使用に比べて、従来の抗 FR α 抗体と抗 FR β 抗体の二者併用療法を行う場合、抗 FR α 抗体と FR α 発現癌細胞の結合と、抗 FR β 抗体と FR β 発現マクロファージの結合との間の差異に起因して、両者の適正な使用量の決定が困難であると考えられる。さらに、抗 FR α / β 抗体は、抗 FR α 抗体と抗 FR β 抗体の併用療法に比べて低用量で良く、経済的にも優位である。

そこで、本発明は、上述した実情に鑑み、癌診断薬及び癌治療薬に使用することができる、FR α 及び FR β の双方に特異的に結合する抗体を提供することを目的とする。

上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、FR α 及び FR β の双方に特異的に結合する抗体の作製に成功し、当該抗体が種々の癌組織における癌細胞と癌関連マクロファージに反応し、また当該抗体が補体存在下において、又は当該抗体に基づいて作製したイムノトキシンが FR α 発現癌細胞及び FR β 発現細胞の双方に対して傷害能を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下を包含する。

(1) FR α 及び FR β に免疫学的に特異的に結合する抗体。

(2) 抗体がモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、多重特異性抗体及びそれらのフラグメントから成る群より選択される、(1) 記載の抗体。

(3) ヒト抗体又はヒト化抗体である、(1) 又は (2) 記載の抗体。

(4) 重鎖可変領域(VH)のCDRH1、CDRH2 及び CDRH3 のアミノ酸配列がそれぞれ配列番号 2、配列番号 4 及び配列番号 6 のアミノ酸配列であり、並びに軽鎖可変領域(VL)のCDRL1、CDRL2 及び CDRL3 のアミノ酸配列がそれぞれ配列番号 10、配列番号 12 及び配列番号 14 のアミノ酸配列である抗体又はそのフラグメントである、(1) ~ (3) のいずれか 1 記載の抗体。

(5) (1) ~ (4) のいずれか 1 記載の抗体を含むか、あるいは該抗体に薬剤を結合してなる抗癌性分子標的薬。

(6) 薬剤が、トキシン、細胞障害剤、酵素、サイトカイン及び化学療法薬から成る群より選択される、(5) 記載の抗癌性分子標的薬。

(7) トキシンが細菌由来トキシンである、(6) 記載の抗癌性分子標的薬。

(8) 細菌由来トキシンが、シュードモナス毒素、ジフテリア毒素又はブドウ球菌毒素である、(7) 記載の抗癌性分子標的薬。

(9) 抗癌性分子標的薬がイムノトキシンである、(5) ~ (8) のいずれか1記載の抗癌性分子標的薬。

(10) 細胞障害剤が、抗腫瘍剤、腫瘍増殖抑制剤、腫瘍細胞アポトーシス誘導剤及び放射性核種から成る群より選択される、(6) 記載の抗癌性分子標的薬。

(11) (5) ~ (10) のいずれか1記載の抗癌性分子標的薬と薬学的に許容可能な担体とを含む癌治療用医薬組成物。

(12) (1) ~ (4) のいずれか1記載の抗体に標識を結合してなる癌診断薬。

(13) 標識が発蛍光団、色素又は放射性同位元素である、(12) 記載の癌診断薬。

(14) (1) ~ (4) のいずれか1記載の抗体又は(12) 若しくは(13) 記載の癌診断薬を含む癌診断キット。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2012-281525 号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、(A)抗ヒト FR α / β ラットモノクローナル抗体重鎖領域の塩基配列(配列番号7)及びアミノ酸配列(配列番号8)並びに(B)抗ヒト FR α / β ラットモノクローナル抗体軽鎖領域の塩基配列(配列番号15)及びアミノ酸配列(配列番号16)を示す図である。

図2は、(A)ヒト FR β 発現細胞及び(B)ヒト FR α 発現細胞に対する抗ヒト FR α / β ラットモノクローナル抗体の反応性を示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図3は、ヒト卵巣癌細胞株に対する抗ヒト FR α / β ラットモノクローナル抗体の反応性を示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図4は、卵巣癌組織への抗ヒト FR α / β ラットモノクローナル抗体の反応性を示す免疫染色の結果を示す図である。

図5は、抗ヒト FR α / β ラットモノクローナル抗体の葉酸リセプター発現細胞に対する補体依存的細胞傷害能を示す図である。

図6は、ヒト卵巣癌細胞株 (FR α 発現) 及びヒト FR β 発現細胞に対する抗ヒト FR α / β イムノトキシンの増殖抑制効果を示すグラフである。

図7は、各固形癌の免疫染色における抗ヒト FR α / β ラットモノクローナル抗体による染色パターンを示す。

図8は、マクロファージによる葉酸リセプター α 発現癌細胞の貪食能を促進する抗ヒト FR α / β ラットモノクローナル抗体の効果を示すフローサイトメトリの結果を示す図である。

図9は、FR α 陽性ヒト癌細胞と FR β 陽性マウス浸潤マクロファージを標的とした抗体製剤による癌の治療に関する実験スケジュールと癌細胞移植後の追跡結果を示す。

発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

<定義>

本明細書で使用される「葉酸リセプター(受容体) α 」又は「FR α 」という用語は、被験者の癌細胞表面に発現される受容体タンパク質を意味する。

本明細書で使用される「葉酸リセプター(受容体) β 」又は「FR β 」という用語は、被験者の癌関連マクロファージの細胞表面に発現される受容体タンパク質を意味する。

本明細書で使用される「被験者」という用語には、ヒトを含む霊長類、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ等の家畜動物、イヌ、ネコ等のペット動物等の哺乳動物が含まれる。好ましい被験者はヒトである。

本明細書で使用される「FR α 及び FR β に免疫学的に特異的に結合する抗体」又は「抗 FR α / β 抗体」という用語は、抗体が FR α タンパク質及び FR β タンパク質又はそれらの天然変異体以外のタンパク質と結合しないか、又は、実質的に結合しないことを意味する。

<抗 FR α / β 抗体>

本発明で使用される「抗 FR α / β 抗体」は、FR α タンパク質及び FR β タンパク質の双方を認識してこれらタンパク質に結合することができる抗体又はそのフラグメントであり、以下に述べるように、抗体の種類や形態は問わないものとする。これらの抗体は、癌細胞上の細胞表面 FR α タンパク質、及び癌増殖を促進する癌関連マクロファージ上の細胞表面 FR β タンパク質の双方に特異的に結合することを可能にする。

本発明において、上記抗体は、FR α 及び FR β と免疫学的反応により結合するが、FR α 及び FR β 又はそれらと 90%以上、好ましくは 95%以上、さらに好ましくは 98%以上の配列同一性を持つそれらの変異タンパク質以外のタンパク質とは実質的に結合しない。

本発明に係る抗 FR α / β 抗体は、いずれの免疫グロブリン(Ig)クラス(IgA、IgG、IgE、IgD、IgM、IgY 等)及びサブクラス(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2 等)のものであってもよい。また、免疫グロブリンの軽鎖は、 κ 鎖又は λ 鎖のいずれであってもよい。

具体的には、本発明に係る抗 FR α / β 抗体は、例えば、上記クラス又はサブクラスの完全構造を有する抗体又はそれらのフラグメント、組換え抗体、単鎖抗体(scFv)、多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体、ダイアボディ、トリアボディ、ScDb(single chain diabody)、dsFv-dsFv 等)、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体等の抗体或いはそれらのフラグメントである。

本発明で使用可能な抗体のフラグメントは、7 以上、より好ましくは 8~12 又はそれ以上の連続アミノ酸を有する FR α タンパク質抗原エピトープ及び FR β タンパク質抗原エピトープと結合可能である。

抗体フラグメントは、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、Fab_c 等を含む。このようなフラグメントの作製方法は当技術分野で公知であり、例えばパパイン、ペプシン等のプロテアーゼによる抗体分子の消化、或いは公知の遺伝子工学的手法により得ることができる。

以下、本発明において使用するための抗体の作製方法について詳述する。

本発明において使用可能な抗体を作製するにあたり、最初に免疫原(抗原)として使用する FR α タンパク質及び FR β タンパク質又はそれらの断片を調製する。

ここで、断片は、7~10 又はそれ以上(例えば 11~25)の連続アミノ酸から成るアミノ酸配列を有するものである。免疫原として使用することができる FR α タンパク質及び FR β タンパク質の由来は、標的とする FR α 及び FR β と特異的に結合することができる抗体を誘導できるものであるものであれば特に限定されない。

FR α 及び FR β と特異的に結合することができる抗体を誘導するために、FR α (FR β とアミノ酸レベルで約 70%の配列同一性を有する)と FR β とのアラインメントをとり、連続する約 7~20 アミノ酸から成る配列部分で互いに同一性の高い部分配列から成る(ポリ)ペプチドを免疫原として選択することができる。この場合、さらに、FR α タンパク質及び FR β タンパク質の表面構造を、例えば Kyte-Doolittle の親水性-疎水性予測や Chou-Fasman のアミノ酸配列からの二次構造予測(Biochemistry 1974, 13:222-244)を利用して予測し、これらタンパク質の表面に露出する上記(ポリ)ペプチド配列を免疫原として選択することが好ましい。

本発明に係る抗体を作製するための FR α タンパク質及び FR β タンパク質又はそれらの断片に関するヒトを含む哺乳動物 FR α タンパク質及び FR β タンパク質のアミノ酸又は塩基配列情報は、例えば GenBank (NCBI、米国)、EMBL (EBI、欧州)等から入手可能である。GenBank に登録されたヒト FR α のアミノ酸配列及び塩基配列のアクセッション番号としては、例えば NM_016725 (transcript variant 1)、NM_00802 (transcript variant 2)、NM_016729(transcript variant 4)等が挙げられる。一方、GenBank に登録されたヒト FR β のアミノ酸配列及び塩基配列のアクセッション番号は、幾つかの公知のバリエーション(variant)から成り、例えば NM_000803(transcript variant 1)、NM_001113534(transcript variant 2)、NM_001113535(transcript variant 3)等である。FR α タンパク質及び FR β タンパク質又はそれらの断片は、上記の配列情報に基づいて公知のペプチド合成技術や遺伝子組換え技術を利用して製造することができる。

同種又は異種動物における FR α 及び FR β の変異体又はオーソログの検索は、例えばカーリン(Karlin)及びアルトシュル(Altschul)(1993)(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877)に記載されたアルゴリズムや、その改良法であるカーリン及びアルトシュル(1990)(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264)のアルゴリズム

ムを用いて行うことができる。この種のアigorリズムは、アルトシュルら(1990) J. Mol. Biol. 215: 403 の NBLAST 及び XBLAST プログラムに組み込まれている。また、ギャップが導入されたアライメントを得るためには、アルトシュルら (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389 に記載された Gapped BLAST を用いることができる。

ペプチド合成技術には、液相法と固相法が含まれる。これらの方法は、固相を使用するか否かの違いだけであるが、固相法の方が生成物の回収が容易であるという利点を有する。そのため、固相法を有利に使用できる。いずれの方法でも、タンパク質を構成する約 5~10 個の(保護)アミノ酸から成る多数のペプチドを合成し、それらを段階的に伸長してポリペプチドを合成し、最後に保護基を除去して目的のタンパク質を生成し、精製することを含む。ペプチド合成法は、例えば日本生化学編、生化学実験講座 1 巻、タンパク質の化学 IV-化学修飾とペプチド合成-東京化学同人に記載されている。

遺伝子組換え技術による方法は、例えば、FR α タンパク質又は FR β タンパク質をコードする DNA を適当なベクターに連結し、該ベクターを適当な宿主細胞に導入し形質転換し、適当な培地で宿主細胞を培養し、FR α タンパク質又は FR β タンパク質を生産することができる。この手法は当業者に周知であり、使用するベクター、宿主細胞、形質転換法、培養法、タンパク質の精製法等の技術は、例えば、Sambrook ら, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Ausubel ら, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998)等に詳しく記載されている。

抗体産生細胞には、例えば *Spodoptera frugiperda* 細胞等の昆虫細胞、例えば *Saccharomyces cerevisiae* 及び *Schizosaccharomyces pombe* 等の酵母細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巢(CHO)由来細胞、胎仔ハムスター腎細胞、ヒト胎児腎臓株 293、正常イヌ腎臓細胞株、正常ネコ腎臓細胞株、サル腎細胞、アフリカミドリザル腎細胞、COS 細胞、非腫瘍化マウス筋芽細胞 G8 細胞、線維芽細胞株、骨髓腫細胞株、マウス NIH/3T3 細胞、LMTK 細胞、マウス sertoli 細胞、ヒト子宮頸癌細胞、バッファローラット肝細胞、ヒト肺細胞、ヒト肝細胞、マウス乳癌細胞、TRI 細胞、MRC5 細胞、及び FS4 細胞等の哺乳類細胞が包含される。

上記のようにして製造した FR α タンパク質及び FR β タンパク質又はそれらの

断片を免疫原として非ヒト動物を免疫し、以下に記載する方法によって本発明に係る抗体を製造することができる。また、FR α タンパク質及びFR β タンパク質のうちの一方のタンパク質又はその断片を免疫原として調製し、得られた抗体について、免疫原が由来するタンパク質に加えて他方のタンパク質への結合性を調べ、FR α タンパク質及びFR β タンパク質の双方に結合する抗体を本発明に係る抗FR α/β 抗体とすることもできる。或いは、該抗体をコードする重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNAを、免疫した非ヒト動物の脾臓細胞、リンパ系細胞等のmRNAから作製し、このDNAを使用してキメラ抗体等の種々の形態の合成抗体をコードするDNAを合成することができる。

本発明で使用する抗体類には、非限定的に、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体（例えば、キメラ抗体、単鎖抗体、多重特異性抗体、ヒト化抗体等）、ヒト抗体等が含まれる。

ポリクローナル抗体は、上記のようにして作製した免疫原を、哺乳動物（例えばウサギ、ラット、マウス等）に免疫して、抗血清を得ることによって製造することができる。具体的には、上記免疫原を、必要に応じて免疫原性を高めるためのアジュバントと共に、哺乳動物に静脈内、皮下又は腹腔内投与する。アジュバントとしては、市販の完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、水酸化アルミニウム等のアルミニウム塩(Alum)、ムラミルペプチド（細菌細胞壁関連ペプチドの一種）等を使用することができる。その後、数日から数週間の間隔で、1～7回の免疫を行い、最後の免疫日から1～7日後に、ELISA等の酵素免疫測定法等によって抗体価を測定し、最大の抗体価を示した日に採血して抗血清を得ることができる。このようにして取得した抗血清は、そのまま使用してもよいし、或いは、FR α タンパク質及びFR β タンパク質又はそれらの断片ペプチドを固定化した親和性カラム（例えばアガロースゲルカラム使用）に抗血清をアプライし、カラムに結合する抗体を回収することを含む精製処理を行った後に使用してもよい。

モノクローナル抗体は、以下のようにして作製することができる。すなわち、上記のようにして免疫感作した非ヒト哺乳動物から得た抗体産生細胞（例えば脾臓細胞、リンパ系細胞等）と不死化ミエローマ細胞（「骨髓腫細胞」ともいう）から

融合法によってハイブリドーマを調製し、ハイブリドーマをクローン化し、免疫に用いた FR α タンパク質及び FR β タンパク質又はそれらの断片ペプチド抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンをヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地(「HAT 培地」)を用いて選択することによって製造することができる。ハイブリドーマの製造方法は、例えば Kohler 及び Milstein ら (Nature(1975)256: 495-96)の方法に準じて行うことができる。非ヒト哺乳動物の例は、マウス、ラット等のげっ歯類である。また、ミエローマ細胞としては、免疫感作した動物と同じ動物由来の細胞が好ましく使用され、例えばマウスミエローマ細胞、ラットミエローマ細胞等が挙げられる。特に、マウスミエローマ細胞株には、例えば P3-NS1/1-Ag4-1 株、P3-x63-Ag8.653 株、Sp2/0-Ag14 株等が含まれる。抗体産生細胞とミエローマ細胞の融合は、平均分子量約 1,500 のポリエチレングリコール(PEG)を使用するか、或いは電氣的融合法を用いて行うことができる。

キメラ抗体、組換え抗体、単鎖抗体、ヒト化抗体等は、FR α タンパク質及び FR β タンパク質又はそれらの断片ペプチドで免疫感作した非ヒト動物の脾臓細胞とミエローマ細胞から作製された特定のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ由来の該抗体をコードする DNA から製造することができる。

具体的には、上記ハイブリドーマ細胞から全 RNA を抽出し、オリゴ dT カラムと親和的に結合する mRNA を全 RNA から回収し、cDNA を合成し、特定のモノクローナル抗体をコードする DNA をクローニングするか、或いは、公知のイムノグロブリン遺伝子配列に基づいて PCR 法で増幅的に、抗体をコードする DNA を合成し、該 DNA 配列を決定する。ヒト、マウス等の動物の抗体の重鎖(H鎖)と軽鎖(L鎖)における、可変領域並びに相補性決定領域(CDRs)及びフレームワーク領域(FRs)の配列及び位置を、例えば Kabat の EU ナンバリングインデックス(Kabat EA et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Vol. 1, Bethesda (MD): NIH, 1991)に従って決定することができる。

遺伝子組換え技術を用いて組換え抗体の作製法をさらに具体的に説明する。

作製したハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを例えばチャイニーズハムスター

卵巣 (CHO) 細胞等の哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞といった宿主に導入して、宿主において組換え抗体を生産させることができる (P. J. Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, J. W. Goding., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS)。或いは、トランスジェニック動物作製技術を用いて目的抗体の遺伝子座が内在性遺伝子座の領域に置換的に組み込まれたトランスジェニックなマウス、ウシ、ヤギ、ヒツジ又はブタを作製し、FR α タンパク質及び FR β タンパク質又はそれらの断片ペプチドを抗原として免疫した後、そのトランスジェニック動物の血液や乳汁等からその抗体遺伝子に由来する抗体を取得することも可能である。また、上記トランスジェニック動物のなかには、内因性抗体遺伝子を欠失し、且つヒト抗体遺伝子を保有するマウスやウシ等のヒト抗体産生動物も知られているので、このような動物を利用する場合には、ヒト FR α 及び FR β に結合する完全ヒト抗体を得ることができる (例えば WO 96/34096、WO 96/33735、WO 98/24893 等)。さらにまた、該動物の抗体産生細胞 (例えば B 細胞) とミエローマ細胞から作製したハイブリドーマを *in vitro* で培養する場合には、上記のような手法で、モノクローナル抗体を産生することもできる。

作製されたモノクローナル抗体は、当技術分野において公知の方法、例えばプロテイン A あるいはプロテイン G カラムによるクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、硫安塩析法、ゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィー等を適宜組み合わせることにより精製することができる。

キメラ抗体は、H 鎖及び L 鎖における可変領域と定常領域がそれぞれ異なる動物由来のものである抗体を指す。例えば、H 鎖及び L 鎖における可変領域がマウス又はラット抗体由来である一方、定常領域がヒト抗体由来であるような抗体がキメラ抗体であり、この抗体をコードする DNA は、マウス又はラット抗体をコードする DNA 配列中の定常領域をコードする DNA 配列を、ヒト定常領域をコードする DNA 配列で置換した塩基配列を有する。キメラ抗体は、例えば Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature,

312: 604-608; Takeda et al., 1985, Nature, 314: 452-454 に記載される技術を用いて製造することができる。

ヒト化抗体は、H鎖及びL鎖における、CDR領域が非ヒト動物由来のものである一方、定常領域及びフレームワーク領域がヒト由来のものである抗体を指す。例えば、H鎖及びL鎖におけるCDR領域(CDR1、CDR2及びCDR3)がマウス又はラット抗体由来である一方、定常(C)領域及びフレームワーク領域(FR1、FR2、FR3及びFR4)がヒト抗体由来であるような抗体がヒト化抗体であり、この抗体をコードするDNAは、マウス又はラット抗体をコードするDNA配列中の定常領域及びフレームワーク領域をコードするDNA配列を、ヒト定常領域及びフレームワーク領域をコードするDNA配列で置換した塩基配列を有する。ヒト化抗体を作製するための手法は、所謂、CDR移植法と呼ばれるものであり、本発明で使用する抗体のうち特にヒトに投与可能な抗体は、CDR移植法で作製されうるし(Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332:323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596, 1992; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988)、或いは、後述するように、ヒト抗体産生非ヒト動物(例えばマウス)の使用(上記)やファージディスプレイ法等を利用して完全ヒト抗体を作製することができる。

ファージディスプレイ法は、繊維状ファージM13、T7ファージ等のファージを利用して、ファージコートタンパク質と外来ポリペプチド(例えば、組換え抗FR α / β 抗体)を融合した形で発現させることでファージ表面に提示させる方法である(C. Barbas et al., Phage Display: Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001等)。ファージコートタンパク質としては、M13ファージではg3pやg8pを外来ポリペプチドの提示のために利用しうるし、また、T7ファージではg10pを利用しうる。組換え抗FR α / β 抗体として、H鎖可変領域(VH)とL鎖可変領域(VL)とをリンカー(例えば(GGGGS)₃)で結合した単鎖抗体(scFv)、多重特異性抗体(2以上の異なるVHと2以上の異なるVLとの組み合わせを含む抗体)等の合成抗体、(ヒト)抗体の(組換え)H鎖(VHとCH)、L鎖(VLとCL)又はそれらの組み合わせ等が含まれる。

上記の方法で製造可能な本発明で利用される抗体の具体例として、以下のも

のが挙げられるが、それらに限定されない。また、以下の抗体類に加えて、該抗体類の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のそれぞれの相補性決定領域を含む、キメラ抗体、単鎖抗体、多重特異性抗体等の組換え抗体も本発明に係る組成物、キット、診断剤に有効成分として含めることができる。

図 1 に示す、下記の実施例における抗ヒト $\text{FR}\alpha/\beta$ ラットモノクローナル抗体(クローン名: No. 5)由来の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列(配列番号 8、対応する塩基配列: 配列番号 7)、並びに軽鎖可変領域(VL)のアミノ酸配列(配列番号 16、対応する塩基配列: 配列番号 15)を含む抗体又はそのフラグメント。

抗ヒト $\text{FR}\alpha/\beta$ ラットモノクローナル抗体(クローン名: No. 5)由来の重鎖可変領域(VH)の CDRH1、CDRH2 及び CDRH3 のアミノ酸配列(それぞれ配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6)、並びに軽鎖可変領域(VL)の CDRL1、CDRL2 及び CDRL3 のアミノ酸配列(それぞれ配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14)を含む抗体又はそのフラグメント。

上記抗体は、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域、或いはフレームワーク領域又は定常領域に、1~3 個、好ましくは 1 又は 2 個のアミノ酸残基の置換、欠失又は付加(若しくは挿入)の変異を含むことができる。そのような具体例は、以下の通りである。

抗ヒト $\text{FR}\alpha/\beta$ ラットモノクローナル抗体(クローン名: No. 5)由来の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列(配列番号 8、対応する塩基配列: 配列番号 7)において 44 番目のアミノ酸グリシンをシステインに変異させたアミノ酸配列(配列番号 18、その対応する塩基配列: 配列番号 17)、並びに軽鎖可変領域(VL)のアミノ酸配列(配列番号 16、対応する塩基配列: 配列番号 15)において 100 番目のアミノ酸グリシンをシステインに変異させたアミノ酸配列(配列番号 20、その対応する塩基配列: 配列番号 19)を含む抗体又はそのフラグメント。

ヒト化抗体は、例えば上記抗体の H 鎖及び L 鎖の各 CDR1~CDR3、並びに、ヒト由来の H 鎖及び L 鎖の各フレームワーク及び定常領域の配列を含む。該フレームワーク領域及び定常領域のそれぞれのアミノ酸配列は、 $\text{FR}\alpha$ タンパク質及び $\text{FR}\beta$ タンパク質との結合特異性を変更することなく、1~3 個、好ましくは 1 又は 2 個のアミノ酸残基の置換、欠失又は付加(若しくは挿入)の変異を含むことができる。

具体的なヒト化抗体の例を以下に記載する。

重鎖可変領域(VH)のCDRH1、CDRH2及びCDRH3のアミノ酸配列(それぞれ配列番号2、配列番号4、配列番号6)、並びに軽鎖可変領域(VL)のCDRL1、CDRL2及びCDRL3のアミノ酸配列(それぞれ配列番号10、配列番号12、配列番号14)を含むヒト化抗体又はそのフラグメント。

後述の実施例に記載されるように、上記の抗ヒトFR α / β ラットモノクローナル抗体(クローン名: No. 5)にCys置換変異を導入して変異型VH及び変異型VLを作製し、変異型VHにトキシシポリペプチド(例えば緑膿菌由来外毒素(Pseudomonas Exotoxin(PE))を融合させてイムノトキシシVHを作製し、さらに変異型VLを結合して、イムノトキシシを作製することができる。

本発明に係る抗体類は、FR α タンパク質及びFR β タンパク質と免疫学的に特異的に結合するものであり、解離定数(K_d)が、例えば $1 \times 10^{-7}M$ 以下、 $1 \times 10^{-8}M$ 以下、 $1 \times 10^{-9}M$ 以下、 $1 \times 10^{-10}M$ 以下、 $1 \times 10^{-11}M$ 以下、 $1 \times 10^{-12}M$ 以下、 $1 \times 10^{-13}M$ 以下、 $1 \times 10^{-14}M$ 以下、又は $1 \times 10^{-15}M$ 以下である。

<抗癌性分子標的薬>

本発明では、上記の抗体類に薬剤を結合してなる抗癌性分子標的薬が、癌治療薬として、又は癌治療薬の有効成分として、或いは癌治療薬の製造のために使用される。

あるいは、上記の抗体類が補体存在下においてFR α 発現癌細胞及びFR β 発現細胞の双方に対して傷害能(補体依存的細胞傷害能)を有し、あるいはマクロファージによるFR α 発現癌細胞の貪食能(抗体依存性細胞貪食作用ADCP(antibody-dependent cell mediated phagocytosis))を促進することから、上記の抗体類を含むか又はそれから成る抗癌性分子標的薬を、癌治療薬として、又は癌治療薬の有効成分として、或いは癌治療薬の製造のために使用できる。

FR α は、様々な癌(例えば卵巣癌、乳癌、悪性中皮腫、肺癌、大腸癌、悪性黒色腫、グリオブラストーマ、腎臓癌、膵臓癌等)の癌細胞上で発現され、且つFR β は、当該癌増殖を促進する癌関連マクロファージ上で発現される(非特許文献6及び7; Davidson B., The diagnostic and molecular characteristics of malignant mesothelioma and ovarian/peritoneal serous carcinoma. Cytopathology., 2011

Feb;22(1):5-21. doi: 10.1111/j.1365-2303; Parker N., Turk MJ., Westrick E., Lewis JD., Low PS., Leamon CP., Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. Anal Biochem., 2005 Mar 15;338(2):284-93; Sanchez-del-Campo L., Montenegro MF., Cabezas-Herrera J., Rodriguez-Lopez JN., The critical role of alpha-folate receptor in the resistance of melanoma to methotrexate. Pigment Cell Melanoma Res., 2009 Oct;22(5):588-600; Puig-Kroger A., Sierra-Filardi E., Dominguez-Soto A., Samaniego R., Corcuera MT., Gomez-Aguado F., Ratnam M., Sanchez-Mateos P., Corbi AL., Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. Cancer Res. 2009 Dec 15;69(24):9395-403)。また、癌関連マクロファージとしては、例えば浸潤先進部の膵臓癌細胞周囲に存在する FR β 発現マクロファージが挙げられる(特許文献 4)。

従って、抗 FR α / β 抗体に薬剤を結合してなる抗癌性分子標的薬によれば、抗 FR α / β 抗体が FR α 発現癌細胞及び FR β 発現癌関連マクロファージに結合し、抗癌性分子標的薬中の薬剤が、FR α 発現癌細胞の増殖を抑制すると共に、FR β 発現癌関連マクロファージの増殖を抑制することで、癌を治療することができる。あるいは、抗 FR α / β 抗体を含むか又はそれから成る抗癌性分子標的薬によれば、FR α 発現癌細胞及び FR β 発現癌関連マクロファージに結合し、補体依存的細胞傷害により FR α 発現癌細胞の増殖を抑制すると共に、FR β 発現癌関連マクロファージの増殖を抑制することで、癌を治療することができる。

抗癌性分子標的薬による治療対象の癌としては、癌細胞が FR α を発現し、癌関連マクロファージが FR β を発現する癌であれば、特に限定されるものではないが、例えば卵巣癌、乳癌、悪性中皮腫、肺癌、大腸癌、悪性黒色腫、グリオブラストーマ、腎臓癌、膵臓癌、口腔癌(口腔類表皮癌等)等が挙げられる。

抗 FR α / β 抗体に結合させる薬剤としては、特に限定されるものではないが、例えばトキシン、細胞障害剤、酵素、サイトカイン及び化学療法薬等が挙げられる。

トキシン(「毒素」とも称する)には、非限定的に細菌由来毒素、植物由来毒素等の毒素を含み、また内毒素、外毒素等の毒素を含み、例えばジフテリア毒素、シュードモナス毒素、緑膿菌外毒素(*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin) リシン A 鎖(ricin A chain)又は脱糖鎖リシン A 鎖(deglycosylated ricin A chain)、緑膿菌外毒素 PE38、リボゾーム不活性化タンパク質(ribosome inactivating protein)、アブリン A 鎖、モデシン A 鎖、アルファサルシン(alpha-sarcin)、ゲロニン(gelonin)、アスペルギリン(aspergillin)、リストリクトシン(restrictocin)、リボヌクレアーゼ(ribonuclease)、エポドフィロトキシン(epidophyllotoxin)、ジフテリアトキシン(diphtheria toxin)、ジフテリア A 鎖、ブドウ球菌毒素(例えばブドウ球菌エンテロトキシン)等の細菌由来の毒素が含まれる。

腫瘍細胞に対する細胞障害剤には、抗腫瘍剤、腫瘍増殖抑制剤、細胞周期停止誘導剤、DNA 合成阻害剤、転写阻害剤、翻訳・タンパク質合成阻害剤、細胞分裂阻害剤、マイクロチューブル阻害剤、各種シグナル伝達阻害剤、マイクロ RNA、SiRNA、腫瘍細胞アポトーシス誘導剤、放射性核種等が含まれる。

細胞障害剤には、非限定的に、例えばヤマゴボウ抗ウイルス性タンパク質、アブリン、リシン及びその A 鎖、アルトレタミン、アクチノマイシン D、プリカマイシン、プロマイシン、グラミシジン D、ドキソルビシン、コルヒチン、サイトカラシン B、シクロホスファミド、エメチン、マイタンシン、アムサクリン、シスプラチン、エトポシド、エトポシドオルトキノン、テニポシド、ダウノルビシン、ゲムシタビン、ドキソルビシン、ミトキサントラオン(mitoxantraone)、ビスアントレン、ブレオマイシン、メトトレキセート、ビンデシン、ビノレルビン、ポドフィロトキシン、アドリアマイシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、BCNU、タキソール、タルセバ、アバスチン、マイトマイシン、修飾シュードモナスエンテロトキシン A、カリチエアミシン、5-フルオロウラシル、シクロホスファミド等が含まれる。

放射性核種には、非限定的に、例えば鉛-212、ビスマス-212、アスタチン-211、ヨウ素-131、スカンジウム-47、レニウム-186、レニウム-188、サマリウム-153、イットリウム-90、ヨウ素-123、ヨウ素-125、ヨウ素-131、臭素-77、インジウム-111、リン-32、及びホウ素-10 又はアクチニド等の核分裂

性核種を含む放射性同位元素である。ラベル化は、例えばタンパク質のシステイン残基、リジン残基等のアミノ酸残基を介して行うことができる。ラベル化の手法については、例えば Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy (Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

酵素としては、例えば RNA 分解酵素、カスパーゼ等が挙げられる。

サイトカインとしては、例えば IL-2、TNF- α 等が挙げられる。

化学療法薬としては、例えばマイタンシノイド、アウリスタチン、ペメトレゼート等が挙げられる。

本発明に係る抗癌性分子標的薬が上記抗体とトキシンから成る(すなわち、イムノトキシン)であるとき、これらの成分は融合タンパク質の形態をとることができる。この場合、トキシンは、抗体タンパク質の、例えば、可変領域のフレームワーク領域又はC末端領域、あるいは、定常領域のCH3領域又はC末端領域に、必要に応じてリンカー(例えばペプチド)を介して、結合することができる。一方、本発明に係る抗癌性分子標的薬が上記抗体とトキシン又は細胞障害剤から成るとき、これらの成分は、結合のための官能基を介して共有結合又は非共有結合によって結合することができる。例えば、抗体分子中の反応性基、例えばアミノ基、カルボキシル基、水酸基、メルカプト基等の官能基を利用し、反応性基を有するトキシン又は細胞障害剤と反応させることによって分子標的薬を製造しうる。例えばN-スクシンイミジルエステル基、N-スルホスクシンイミジルエステル基、カルボキシル基、アミノ基、メルカプト基、ジスルフィド基等が含まれる。結合には、二官能性カップリング剤、活性エステル、アルデヒド類、ビスアジド、イソシアネート等のカップリング剤を利用しうる。

さらに、他の薬剤についても、抗体に対するトキシン又は細胞障害剤の結合方法に準じて、抗体に結合させ、本発明に係る抗癌性分子標的薬を作製することができる。

<医薬組成物>

本発明はまた、上記の抗癌性分子標的薬を、薬学的に許容可能な担体と共に含む、癌治療用医薬組成物を提供する。

本発明に係る抗癌性分子標的薬は、癌細胞及び癌関連マクロファージの増殖を

抑制するのみならず、転移(特にリンパ節転移又は血行性転移)を抑制することが可能である。これらの転移を抑制することで、他の臓器への腫瘍転移を抑制することができる。

本発明に係る抗癌性分子標的薬は、例えば浸潤性膵臓癌の浸潤先進部に存在する $FR\beta$ 発現マクロファージ(特許文献4)及び当該膵臓癌細胞と特異的に結合するため、膵臓癌を選択的に攻撃し、正常細胞に及ぼす影響を最小に抑えることができる。

薬学的に許容される担体(又は賦形剤)は、液体及び固体のいずれをも含み、経口製剤又は非経口製剤の種類に応じて適宜選択可能であり、例えば滅菌水、PBS等の緩衝液、生理食塩水、リンゲル液、エタノール、グリセロール、植物油、ゼラチン、スクロース、ラクトース、アミロール、デンプン、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース等を含む。このような担体の他に、上記医薬組成物にはさらに、必要に応じて、滑沢剤、保存料、安定剤、湿潤剤、乳化剤、崩壊剤、可溶化剤、等張化剤、結合剤、緩衝剤、着色剤等の助剤を混合することができる。

本発明に係る医薬組成物は、経口投与、静脈内投与、動脈内投与、粘膜投与、筋肉内投与、皮下投与、頬投与、腹腔内投与、関節内投与、滑膜内投与、胸骨内投与、鼻腔内投与、ボーラス注射、連続注入、患部への直接投与等の投与経路で投与しうる。

該医薬組成物は、上記投与経路に応じて製剤化する。製剤には、非限定的に、例えば注射剤、溶液剤、懸濁剤、錠剤、顆粒剤、粉末剤、噴霧剤、カプセル剤、腸溶製剤、徐放製剤、多層製剤等の種々の剤型に処方しうる。

本発明に係る医薬組成物中の有効成分である抗癌性分子標的薬は、治療上有効量で単位剤型中に含有される。投与用量は、被験者の性別、年齢、体重、重篤度、投与経路、副作用等の様々な要因に応じて変化させうるが、有効成分量は、1日当たり約 $1\mu\text{g}$ 以上、例えば $50\sim 100\mu\text{g}$ 又はそれ以上であるが、これらに限定されない。投与回数は、単回又は複数回のいずれでもよい。

本発明に係る医薬組成物は、癌の従来の治療剤を併用投与することも可能である。従来の治療剤には、例えばゲムシタビン、5-FU、シスプラチン、ジェムザール、TS-1等の医薬品が含まれる。これらの治療剤は、本発明に係る医薬組成物の

投与の前、同時又は後に被験者に投与しうる。

また、本発明は、上述の本発明に係る抗 $\text{FR}\alpha/\beta$ 抗体、抗癌性分子標的薬又は癌治療用医薬組成物の治療上有効量を癌患者に投与することを含む、癌の治療方法に関する。

＜癌の存在又は癌の悪性度の測定方法、癌治療の治療効果の判定方法、並びに、該測定又は判定のための癌診断薬及び癌診断キット＞

本発明はさらに、別の態様において、被験者由来の生物学的サンプル(例えば、組織又は細胞サンプル)を、本発明に係る抗 $\text{FR}\alpha/\beta$ 抗体(発蛍光団、色素、放射性同位元素等のラベルで標識された抗体(癌診断薬)、或いは、非標識抗体)と接触させ、 $\text{FR}\alpha$ 発現癌細胞及び $\text{FR}\beta$ 発現癌関連マクロファージの存在を指標として、癌の存在又は癌の悪性度を測定(検査)する方法を提供する。

例えば、被験者由来の膵臓癌組織サンプルを、本発明に係る抗 $\text{FR}\alpha/\beta$ 抗体(発蛍光団、色素、放射性同位元素等のラベルで標識された抗体(癌診断薬)、或いは、非標識抗体)と接触させて、 $\text{FR}\alpha$ 発現膵臓癌細胞が存在するか否か、及び、 $\text{FR}\beta$ 発現マクロファージが該組織中の先進部の膵臓癌細胞周囲に存在するか否かを調べ、 $\text{FR}\alpha$ 発現膵臓癌細胞が存在し、且つ $\text{FR}\beta$ 発現マクロファージが該先進部の膵臓癌細胞周囲に分布するとき、該組織が浸潤性であり且つ転移性であると判定し、膵臓癌の悪性度又は浸潤性膵臓癌の存在を検査することができる。本明細書で使用される「浸潤」は、腫瘍の運動性の亢進に伴い、病巣組織の深部、そして組織を超えて原発巣からの離脱を意味する。腫瘍の浸潤性は、腫瘍が転移性となり悪性化したことを示す。特許文献4に記載されるように、膵臓癌の先進部が浸潤性となることと、 $\text{FR}\beta$ 発現マクロファージが集積することとが相関しており、 $\text{FR}\alpha$ 発現膵臓癌細胞の存在及び $\text{FR}\beta$ 発現マクロファージの存在を上記抗体又はそのフラグメントを使用して検出することによって、膵臓癌が浸潤性及び転移性であると判定(決定又は同定又は分類又は評価)することができる。

あるいは、本発明は、癌治療を受けているか又は受けた被験者由来の癌組織サンプルを、本発明に係る抗 $\text{FR}\alpha/\beta$ 抗体(発蛍光団、色素、放射性同位元素等のラベルで標識された抗体(癌診断薬)、或いは、非標識抗体)と接触させて、 $\text{FR}\alpha$ 発現癌細胞及び $\text{FR}\beta$ 発現癌関連マクロファージの存在又は不在を指標として癌治療

の治療効果を判定する方法を提供する。

本明細書で使用する「判定する」という用語は、医師の判断、すなわち医療行為を意図したものではなく、医師に検査結果の情報又はデータを提示し、医師の判断を助けるための手段を意味する。従って、「判定する」という用語は、「測定する」、「検査する」、「決定する」又は「評価する」等の用語で置き換えることができる。

本発明はさらに、上記測定又は判定方法等において使用するための癌診断薬又は癌診断キットも提供する。

画像診断の場合、癌診断薬又は癌診断キットに、上記抗体又はそのフラグメントと標識とを結合した複合体を含めることができる。標識には、上記で例示したような発蛍光団、色素、放射性同位元素等が含まれる。

抗体による $FR\alpha$ 発現癌細胞及び $FR\beta$ 発現マクロファージの検出は、ELISA、蛍光抗体法、放射免疫法、サンドイッチ法、組織染色法等によって行うことができる。二次抗体に、例えば酵素(例えばペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等)、発蛍光団(例えば FITC、テトラメチルローダミン、テキサスレッド等)、色素、放射性同位元素等のラベル(標識)を結合したものを使用して、癌細胞及びマクロファージに結合した抗体の複合体を検出する。ラベルの結合には、化学的結合法、ビオチン-(ストレプト)アビジン系を利用する結合法等が含まれる。

画像診断の場合には、薬学的に許容可能な放射性核種や発光体を抗体にラベルし、被験者に該抗体を投与し、PET/CT 等の画像診断技術を使用して画像をとり、癌の存在を判定又は検査することができる。

本発明に係る癌診断キットには、上記(標識された、又は標識されない)抗体又はそのフラグメント或いはそれらを含む造影剤の他に、測定に使用するためのバッファー、ラベル化二次抗体等の試薬、測定手順を記載した使用説明書等を含めることができる。試薬は、別々の容器に密封される。

以上に説明する本発明に係る抗 $FR\alpha/\beta$ 抗体又はその結合物によれば、従来の癌細胞を標的とした抗 $FR\alpha$ 抗体又は癌増殖を促進する癌関連マクロファージに向けられた抗 $FR\beta$ 抗体単独の使用に比べて、 $FR\alpha$ 発現癌細胞、及び $FR\beta$ 発現癌関連マクロファージを同時に傷害することにより癌を効果的に治療することができ

る。また様々な癌の存在、悪性度及び癌治療の治療効果を診断することができ、医薬産業上有用である。

また、従来の抗 FR α 抗体と抗 FR β 抗体の二者併用療法を行う場合、抗 FR α 抗体と FR α 発現癌細胞の結合と、抗 FR β 抗体と FR β 発現マクロファージの結合との間の差異に起因して、両者の適正な使用量の決定が困難である。一方、本発明に係る抗 FR α / β 抗体又はその結合物は、抗 FR α 抗体と抗 FR β 抗体の併用療法に比べて低用量で良く、経済的にも優位である。

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕 抗ヒト FR α / β ラットモノクローナル抗体(クローン名 : No. 5)の作製

〔ヒト FR β 発現細胞の作製〕

関節リウマチ滑膜から Trizol (GibcoBRL)、cDNA synthesis kit (Invitrogen) にて添付説明書に従って全 RNA を抽出後、SuperScript plasmid System (Invitrogen) にて添付説明書に従って cDNA を合成した。次に、1 μ l のリウマチ滑膜 cDNA を Bioneer PCR premix (Bioneer) に加え、10 ピコモル量に調整したセンスプライマー : agaaagacatgggtctggaaatggatg (配列番号 2 1) ; 及びアンチセンスプライマー : catatggactgaactcagccaaggagccagagtt (配列番号 2 2) を加え、94 $^{\circ}$ C 20 秒、58 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 60 秒で 30 サイクル PCR を行い、その後 72 $^{\circ}$ C 5 分で反応させることにより、ヒト FR β 遺伝子を増幅した。増幅した FR β 遺伝子の PCR 産物をプラスミド PCR2.1-TOPO (Invitrogen) にライゲーションを行った。すなわち、PCR 産物 2.5 μ l に NaCl 溶液を 1 μ L、滅菌蒸留水 1.5 μ l、ベクタープラスミド (PCR2.1-TOPO) 1 μ L を加えて室温で 5 分間インキュベートし、その内の 2 μ L を大腸菌 (TOP10F') に加えて氷中で 30 分反応後、42 $^{\circ}$ C 30 秒の熱処理し、氷中で 2 分間静置し、250 μ L の SOC 培地を加えた後、37 $^{\circ}$ C で 1 時間シェーカー内で培養した。培養終了後、LB 培地に撻き、37 $^{\circ}$ C で一晚培養した。

大腸菌培養の為、プレート上より採取した白いコロニーを、アンピシリン (50 mg/mL) 含有 LB 液体培地に加えて 37 $^{\circ}$ C 一晚培養した。大腸菌内のプラスミドの精製は Qiagen プラスミド精製キット (Qiagen) にて行った。組み込まれた FR β 遺伝

子は、制限酵素 EcoRI による処理後、アガロース電気泳動に展開し、約 0.8kb(782bp)の FR β 遺伝子産物を確認後、その部位を切り出し、遺伝子産物の抽出を Quiagen PCR purification kit(Quiagen)にて精製した。次に、予め EcoRI 処理を行った哺乳細胞発現用ベクター pER-BOS(Mizushima et al. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. Nucleic Acid Res. 1990;18(17):5322) と混和し、T4 ligase (Roche)を用いてライゲーションを行った。ライゲーション産物の大腸菌(TOP10F')への遺伝子導入並びに FR β 遺伝子の確認は上記と同様の手法で行った。

pEF-BOS に組み込まれた FR β 遺伝子を確認後、ヒト FR β 遺伝子を含むベクターはマウス B300-19 細胞に遺伝子導入を行った。すなわち、予め 1×10^5 個に調整した各細胞に、20 μ L のリポフェクタミン(GibcoBRL)と混和した FR β 遺伝子含有ベクター 1 μ g を加え、細胞に添加した。遺伝子導入された B300-19 マウス細胞は抗生物質 G418 耐性を獲得するため、1mg/mL の濃度の G418 を含む培地にて遺伝子導入された細胞を選択培養した。遺伝子導入された細胞の FR β 遺伝子導入の確認は PCR 法にて行った。すなわち、 1×10^7 個に調整した各細胞を cDNA synthesis kit(Invitrogen)にて cDNA を合成し、10 ピコモル量に調整したセンスプライマー：agaaagacatgggtcttgaaatggatg(配列番号 21)；及びアンチセンスプライマー：catatggactgaactcagccaaggagccagagtt(配列番号 22)を Bioneer PCR premix(Bioneer)に加え、94°C20 秒、58°C30 秒、72°C60 秒で 30 サイクル PCR を行い、その後 72°C5 分で反応させることにより、ヒト FR β 遺伝子を増幅した。増幅後アガロース電気泳動を行い、FR β 遺伝子が示すバンド 0.8kb を確認した。

[ヒト FR α とヒト FR β の双方に反応するモノクローナル抗体の作製]

ヒト FR β 発現マウス B300-19 細胞を 1×10^7 個に調整し、フロインド完全アジュバンドと混合し、Wister Kyoto ラットの尾根部あるいは腹腔内に免疫した。この操作を 1 週間ごとに 2~4 回繰り返した。

モノクローナル抗体の作製は Kohler の方法(Kohler & Milstein, Nature(1975)256:495-96)に従って行った。すなわち、脾臓あるいは腸骨リンパ節を取り出して単一細胞に解離させ、骨髓腫由来の細胞(NS-1)と細胞融合させてハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマは HAT 選択培地にて培養し、培養上清

中に分泌された抗体の中で、先の FR β 発現細胞と FR α 発現 KB 細胞株 (Human epidermoid carcinoma) の双方に反応するものを選別した。

抗体産生が認められたハイブリドーマのクローン化は、96 穴プレートの各穴当たり 1 細胞となるように調整した限界希釈培養にて行った。

クローン化したハイブリドーマを用いた抗体の採取は、10%FCS、10%NCTC-109 メディウム (Gibco)、1%HT Supplement (Gibco) 及び 1%Antibiotic/Antimycotic Mixed (Nakarai) を含む IMDEM メディウム (Gibco) で培養し、ヤギ抗ラット免疫グロブリンアガロース (Rockland) で精製した。

このようにして、抗ヒト FR α / β ラットモノクローナル抗体 (クローン名: No. 5) を得ることができた (以下、「抗体 No. 5」と称する)。

[抗体 No. 5 のフローサイトメーター (FACS) による FR α 及び FR β に対する反応の実験]

1x10⁵ に調整した FR- β 発現 B300-19 細胞 (図 2 (A)) と FR α 発現 KB 細胞 (図 2 (B)) に、抗体 No. 5 を反応させた。また、FR β を認識する抗体 (94b) (特許文献 4) 及び FR α を認識する抗体 (Mov18) (Miotti S, Canevari S, Menard S, Mezzanzanica D, Porro G, Pupa SM, Regazzoni M, Tagliabue E, Colnaghi MI., Characterization of human ovarian carcinoma-associated antigens defined by novel monoclonal antibodies with tumor-restricted specificity. Int J Cancer. 1987;39(3):297-303.) を陽性コントロールとして、isotype control RatIgG2a (Southern Biotech) を陰性対照抗体として反応させた。更に APC でラベルした抗ラット抗体で更に反応させた。反応終了後の染色性をフローサイトメーターで測定した。

図 2 に示すように、抗体 No. 5 は FR- β 発現 B300-19 細胞と FR α 発現 KB 細胞のいずれにも反応した。

次いで、卵巣癌細胞株 IGROV1、OVACAR3 及び SKOV3 に、抗体 No. 5 を反応させた。FR α を認識する抗体 (Mov18) を陽性コントロールとして、isotype control RatIgG2a (Southern Biotech) を陰性対照抗体として反応させた。更に APC でラベルした抗ラット抗体で更に反応させた。反応終了後の染色性をフローサイトメーターで測定した。

図3に示すように、抗体 No. 5 は、Mov18 抗体に比べて IGROV1 には強陽性であったが、Mov18 抗体が反応する OVACAR3 では反応せず、これらの抗体のエピトープが異なることが示唆された。

[抗体 No. 5 を用いた卵巣癌組織の免疫染色]

卵巣癌患者から得られた癌組織を、抗体 No. 5、抗 FR α 抗体 (Mov18)、抗 FR β 抗体 (94b) 及び抗 CD68 抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG 抗体あるいはペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体で反応させ、DAB 発色試薬 (DAKO 社) を用いて発色させた。

図4は同一標本におけるそれぞれの抗体による2箇所の染色パターンを示す。抗体 No. 5 は、FR α 陽性癌細胞と癌組織に浸潤する FR β (+) マクロファージに反応することが示された。

[当該抗体 No. 5 の葉酸リセプター発現細胞に対する補体依存的細胞傷害能]

96 穴プレートの各ウェルに、RPMI 培地にて 5×10^4 個/ $50 \mu\text{L}$ に調整した IGROV、ES-2 及びヒト FR β 発現 B300-19 細胞を撒いた後、RPMI 培地で $1 \mu\text{g}/25 \mu\text{L}$ の濃度に調整した抗体 No. 5、陰性対照の抗 GFP 抗体、或いは $25 \mu\text{L}$ の RPMI 培地を各ウェルに添加した。次に、RPMI 培地で 50% に希釈したウサギ補体血清 (シグマアルドリッチ) $25 \mu\text{L}$ 、或いは RPMI 培地 $25 \mu\text{L}$ を添加した (各ウェル当たり 5×10^4 個/ $100 \mu\text{L}$ となり、抗体の終濃度は $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、補体の終濃度は 12.5% となる)。無添加対照群 (ベースライン群) は、 $50 \mu\text{L}$ の RPMI 培地を添加した細胞を用いた。さらにベースライン群は細胞数の希釈系列を作製した。陽性対照群 (最大細胞障害群) は、 $50 \mu\text{L}$ の 2% Triton X-100 を含む RPMI 培地を添加した細胞を用いた。設定した各群につき 4 ウェルを使用し、 CO_2 インキュベーター (37°C) にて 2 時間培養を行った。培養終了後、cell counting kit-8 (同仁化学) を各ウェルに加え、生存細胞が示す培養液中の吸光度 (450 nm) をマイクロプレートリーダー (Biorad 社) にて計測した。ベースライン群の細胞数の希釈系列が示す吸光度の減少と、Triton X-100 添加群 (最大細胞障害群) が示す吸光度をプロットした後、各ウェルが示す吸光度から細胞傷害率を算出した。

図5に示すように抗ヒト FR α/β 抗体は、補体存在において FR α 発現細胞株 (上段)、FR β 発現細胞株 (下段) に細胞傷害能を示したが、FR α と FR β のいずれも発

現していない細胞株(中段)では、補体存在下においても細胞傷害能を示さなかった。当該結果は、補体の存在する生体内において、抗ヒト FR α / β 抗体の FR α 発現癌増殖抑制能を示唆する結果である。

〔実施例 2〕 抗体 No. 5 の抗体遺伝子からの抗ヒト FR α / β イムノトキシン(分子標的薬)の作製

[抗体 No. 5 の抗体遺伝子の決定]

抗体 No. 5 を産生するラットハイブリドーマクローン No. 5 を 1×10^7 個にそれぞれ調整し、cDNA synthesis kit (Invitrogen) にて cDNA を合成した。次に、Ig-Prime Kit 及びラット抗体重鎖領域のクローニング用にデザインしたプライマー：caccatggagttacttttgag(配列番号 2 3)を用い、重鎖(以後「VH」)及び軽鎖(以後「VL」)の遺伝子を PCR にて増幅させた。

増幅した VH 遺伝子及び VL 遺伝子の PCR 産物をプラスミド PCR2.1-TOPO(Invitrogen)にライゲーションし、大腸菌(TOP10F')に遺伝子導入した。次に、大腸菌よりプラスミドを精製し、VH 遺伝子及び VL 遺伝子の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は BigDye Terminator V3.1 cycle sequencing kit(ABI)を用いて PCR を行い、ABI 310 DNA sequencer にて解析した。

このようにして、抗体 No. 5 の抗体遺伝子として、VH 遺伝子(塩基配列：配列番号 7 及びその対応アミノ酸配列：配列番号 8)、CDRH1 遺伝子(塩基配列：配列番号 1 及びその対応アミノ酸配列：配列番号 2)、CDRH2 遺伝子(塩基配列：配列番号 3 及びその対応アミノ酸配列：配列番号 4)及び CDRH3 遺伝子(塩基配列：配列番号 5 及びその対応アミノ酸配列：配列番号 6)、並びに VL 遺伝子(塩基配列：配列番号 1 5 及びその対応アミノ酸配列：配列番号 1 6)、CDRL1 遺伝子(塩基配列：配列番号 9 及びその対応アミノ酸配列：配列番号 1 0)、CDRL2 遺伝子(塩基配列：配列番号 1 1 及びその対応アミノ酸配列：配列番号 1 2)及び CDRL3 遺伝子(塩基配列：配列番号 1 3 及びその対応アミノ酸配列：配列番号 1 4)を決定した(図 1)。

[免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)遺伝子にシステインの変異を導入]

抗体 No. 5 の免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)遺伝子(配列番号 7)において、対応するアミノ酸配列(配列番号 8)の 44 番目のアミノ酸グリシンに対するコドン(塩基配列 ggt)をシステインに対するコドン(塩基配列 tgt)に変異させるように

デザインしたプライマーを作製し(センス:agcctccgggaaagtgtctggagtggatg(配列番号24)及びアンチセンス:catccactccagacactttcccgaggct(配列番号25))、Quick change site-directed mutagenesis kit(Stratagene)を用いて、抗体No.5のVH遺伝子を含むプラスミドpCR2.1-TOP0 VHに変異誘発処理を行った。このPCR反応は、反応液を95°C30秒、55°C60秒、68°C4分のサイクルを12回連続して行った。

次に、反応後のDNAを大腸菌XL1-Blueに遺伝子導入し、0.1 mg/mLのアンピシリンを含むLB培地で選択培養した。選択した形質転換体のプラスミドをQIAprep spin Miniprep KIT(Qiagen)により精製した。さらに塩基配列をBig Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit(ABI)とABI310シーケンサーにて決定し、抗体No.5のVH(配列番号8)において44番目のグリシンがシステイン(塩基配列tgt)に変異したことを確認した。得られた変異VH遺伝子の塩基配列は配列番号17の塩基配列であり、その対応アミノ酸配列は配列番号18のアミノ酸配列である。

[タンパク質発現ベクターpRK79PE38に変異を導入したVHを挿入]

次に、PE38遺伝子を含むpRK79ベクターpRK79PE38(Kreitman RJ, Bailon P, Chaudhary VK, FitzGerald DJ, Pastan., Recombinant immunotoxins containing anti-Tac(Fv) and derivatives of Pseudomonas exotoxin produce complete regression in mice of an interleukin-2 receptor-expressing human carcinoma. Blood. 1994 Jan 15;83(2):426-34.)への、抗体No.5のVH遺伝子に変異を導入した変異VH遺伝子(配列番号17)の挿入を以下の方法にて行った。

変異VH遺伝子の5'末端部と3'末端部のアニーリングプライマーとしてcatatgcaggtgcagctgaaggag(配列番号26)とggaagcttttgaggagactgtgaccatga(配列番号27)をそれぞれデザインした。アニーリングプライマーにはそれぞれ制限酵素であるNdeIがあり、この部位でのクローニングにより、atgを開始コドンとしたタンパク質の発現が可能である。また、もう片方のアニーリングプライマーにはHindIII部位が挿入されており、この部位でのクローニングにより、変異VH遺伝子とPE遺伝子が結合した融合タンパク質の発現が可能である。

これらのプライマーの組み合わせと pfu DNA polymerase (Stratagene) を使って変異を導入したプラスミドの PCR を行った。この反応は 94°C 20 秒、55°C 30 秒、72°C 60 秒で 30 サイクル PCR を行い、その後 72°C 5 分で反応させた。次に、PCR 産物を精製し、精製産物に制限酵素 NdeI (New England Biolabs) と HindIII (New England Biolabs) を加えて反応後、電気泳動に展開し、QIAquick gel extraction kit (Qiagen) を用いてゲルから目的の大きさの DNA を回収した。回収した DNA に、制限酵素処理した変異導入 VH 遺伝子と同様の制限酵素で処理した pRK79PE38 を添加し、さらに Ligation High (Toyobo) を用いて変異 VH 遺伝子と pRK79PE38 のライゲーション反応を行った。ライゲーション反応終了、大腸菌 TOP10F' (Invitrogen) に遺伝子導入し、0.1 mg/mL のアンピシリンを含む LB 培地にて形質転換体を選択した。選択した形質転換体のプラスミド pRK79-VHPE を QIAprep spin Miniprep KIT (Qiagen) により精製した。さらに塩基配列を Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (ABI) と ABI310 シーケンサーにて塩基配列を決定した (変異 VH (配列番号 18) を含むラット抗ヒト FR α / β イムノトキシン VHPE)。

[免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子にシステイン変異を導入]

抗体 No. 5 の免疫グロブリン軽鎖可変領域 (VL) 遺伝子 (配列番号 15) において、対応するアミノ酸配列 (配列番号 16) の 100 番目のアミノ酸グリシンに対するコドン (塩基配列 gga) をシステインに対するコドン (塩基配列 tgt) に変異させるようにデザインしたプライマーを作製した (catatggacatccagatgacacagtct (配列番号 28) 及び gaattcctattttcaattccagcttggtgccacaaccgaacgt (配列番号 29))。

これらのプライマーの組み合わせと pfu DNA polymerase (Stratagene) を使って抗体 No. 5 の VL 遺伝子を含むプラスミドの PCR を行った。この反応は 94°C 20 秒、55°C 30 秒、72°C 60 秒で 30 サイクル PCR を行い、その後 72°C 5 分で反応させた。

次に、PCR 産物を精製し、精製産物に制限酵素 NdeI (New England Biolabs) と EcoRI (New England Biolabs) を加えて反応後、電気泳動に展開し、QIAquick gel extraction kit (Qiagen) を用いてゲルから目的の大きさの DNA を回収した。回収した DNA に、制限酵素処理した変異導入 VL 遺伝子と同様の制限酵素で処理した pRK79PE38 を添加し、さらに Ligation High (Toyobo) を用いて変異 VL 遺伝子と pRK79PE38 のライゲーション反応を行った。ライゲーション反応終了、大腸菌

TOP10F' (Invitrogen)に遺伝子導入し、0.1 mg/mL のアンピシリンを含む LB 培地にて形質転換体を選択した。選択した形質転換体のプラスミド pRK79-VL を QIAprep spin Miniprep KIT (Qiagen)により精製した。さらに塩基配列を Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (ABI)と ABI310 シーケンサーにて決定し、抗体 No. 5 の VL (配列番号 16)において 100 番目のアミノ酸がシステインに変異していることや、終始コドン tag が配置されていることを確認した(変異 VL (塩基配列: 配列番号 19; その対応アミノ酸配列: 配列番号 20)を含むラット抗ヒト FR α / β イムノトキシン VL)。

[リコンビナントタンパク質封入体の調製]

上記の変異導入 VH 遺伝子を組み込んだプラスミド pRK79-VHPE、変異導入 VL 遺伝子を組み込んだプラスミド pRK79-VL を 50 ng 調整し、タンパク質発現用大腸菌 BL21 (DE3)に遺伝子導入した。遺伝子が導入された大腸菌の選抜は 0.1mg/mL のアンピシリンを含む LB 培地にて 37°C 15~18 時間の培養で行った。

選択終了後の大腸菌は 1000 mL のスーパーストックス培地で 37°C の条件で培養し、可視吸光度 600 nm で 1.0-1.5 に到達するまで培養した。培養後、IPTG (isopropyl-beta-D-thio-galactopyranoside)を終濃度 1 mM になるように培地に添加し、さらに 90 分間 37°C で培養した。培養終了後、遠心分離にて大腸菌を回収後、50 mM トリス緩衝液 (pH 7.4、20 mM EDTA を含む)を用いて 200 mL となるまで懸濁した。懸濁後、卵白リゾチームを最終濃度 0.2 mg/mL となるように加え、室温で 1 時間反応させて大腸菌の破壊を行った。破壊後、20,000 x g で遠心分離を行い、沈殿を回収した。沈殿物はさらに 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.4、2.5% の TritonX-100、0.5 M NaCl、20 mM EDTA を含む)で 200 mL となるまで懸濁し、卵白リゾチームを最終濃度 0.2 mg/mL となるように加え、室温で 1 時間反応させた。反応終了後、20,000 x g で遠心分離を行い、沈殿を回収した。沈殿はさらに 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.4、2.5% の TritonX-100、0.5 M NaCl、20 mM EDTA を含む)で 200 mL となるまで懸濁し、十分混和させた後、20,000 x g で遠心分離を行い、沈殿を回収した。この操作を 5 回繰り返した後の沈殿物をリコンビナントイムノトキシン封入体とし、さらに 0.1M トリス緩衝液 (pH8.0、6 M グアニジン塩酸塩、1mM EDTA を含む)で溶解させ、最終濃度 10 mg/mL となるように調節した。

[可溶化した VHPE と VL のカップリングとリフォールディング、精製]

上記で調製した VHPE と VL を混和させ、リコンビナント二重鎖 Fv 抗 FR α / β イムノトキシンを作製した。

まず、0.5 mL の VHPE、0.25 mL の VL を混和し、ジチオトレイトール(DTT)を最終濃度 10 mg/mL となるように加え、室温で 4 時間の還元処理を行った。処理後、75 mL の 0.1 M トリス緩衝液(pH8.0、0.5 M アルギニン、0.9 mM 酸化型グルタチオン、2mM EDTA を含む)に溶解させた。この溶液を 10°C で 40 時間放置することによって、VH と VL を結合させた。結合終了後、分子量 10,000 カットの遠心濃縮器(Centricon 10、Amicon)で 5 mL まで濃縮し、さらに 50 mL の トリス緩衝液(pH 7.4、0.1 M 尿素、1 mM EDTA を含む)で希釈した。この希釈液をリコンビナントイムノトキシン精製の出発物質とした。

次に、トリス緩衝液(pH 7.4、1 mM EDTA を含む)で平衡化したイオン交換カラム Hi-Trap Q(GE)に、30 mL/時間の流速で、上記出発物質を吸着させた後、トリス緩衝液(pH 7.4、1 mM EDTA を含む)で洗浄した。洗浄後、吸着したリコンビナントタイプイムノトキシンの溶出をトリス緩衝液(pH 7.4、0.3 M NaCl、1 mM EDTA を含む)で行った。溶出サンプルはトリス緩衝液(pH 7.4、1 mM EDTA を含む)で透析した後、イオン交換カラム POROS HQ(POROS)でさらに精製した。すなわち、透析した精製物質を 10 mL/分の流速で吸着させ、トリス緩衝液(pH 7.4、1 mM EDTA を含む)で洗浄後、上記緩衝液に 0 M から 1.0 M の NaCl 勾配を設定することにより、リコンビナントタイプイムノトキシンの溶出を行った。精製リコンビナントタイプイムノトキシンの最終調製は TSK300SW(Tosoh)ゲル濾過クロマトグラフィーにて行った。まず、75%の消毒用エタノールで 48 時間洗浄することによって TSK300SW カラム中のエンドトキシン除去を行った。次に日本薬局方注射用蒸留水で洗浄し、その後日本薬局方生理食塩水で TSK300SW カラムの平衡化を行った。平衡化終了後、リコンビナントタイプイムノトキシンを投与し、流速 0.25 mL/分でカラムからの溶出液を採取した。採取後、0.22 μ m の濾過滅菌機で処理し、純度を SDS-PAGE にて確認後、-80°C で保存した。

[SDS-PAGE による純度検定]

SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミド電気泳動)は

0.1%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含む 12%ポリアクリルアミドの平板ゲルを用い、移動相には終濃度 0.1%の SDS、130 mM グリシン、25 mM トリスを含む水溶液を用いた。各サンプルは終濃度 0.1%の SDS を含む 100 mM トリス緩衝液 pH6.5 で調整し、5 分間の煮沸処理を行った。煮沸終了後、平板ゲルにサンプルを投与し、30 mA の定電流で電気泳動を展開させた。展開後、0.05%のクマシーブリアントブルーR 溶液(ナカライテスク)でリコンビナントタイプイムノトキシンの染色を行った。

〔実施例 3〕組換えイムノトキシンの卵巢癌(IGROV1 細胞株)及び FR β 発現細胞の増殖抑制

24 穴プレートの各ウェルに、 2.5×10^5 個/mL に調整したヒト卵巢癌 IGROV1 細胞株及びヒト FR β 発現 B300-19 細胞を撒き、さらに各ウェルに終濃度 2000-0 ng/mL の濃度となるように調整した実施例 2 で作製した組換え抗ヒト FR α/β イムノトキシン或いは陰性対照タンパク質 VH-PE を添加後、48 時間から 96 時間の培養を行った。培養終了後、cell counting kit-8(同仁化学)を各ウェルに加え、培養液中の吸光度をマイクロプレートリーダー(Biorad 社)にて計測した。

結果を図 6 に示す。図 6 に示すように、組換え抗ヒト FR α/β イムノトキシンは FR α 発現細胞株、FR β 発現細胞株のいずれに対しても細胞傷害能を示した。当該結果は、抗ヒト FR α/β 抗体と細胞傷害能を持つ薬剤の結合物が FR α 発現癌の分子標的薬として有用であることを示唆する結果である。

〔実施例 4〕抗体 No. 5 を用いた肺癌、乳癌及び膵臓癌の免疫染色

肺癌、乳癌及び膵臓癌患者から得られた癌組織を、FR α に対する抗体(癌細胞に反応)、抗体 No. 5、FR β に対する抗体(マクロファージと反応)と反応させ、次いでペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG あるいはペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体で反応させ、DAB 発色試薬(DAKO)を用いて発色させた。

図 7 は、各固形癌の免疫染色におけるそれぞれの抗体による染色パターンを示す。抗体 No. 5 は、肺癌では 19 例中 6 例、乳癌では 14 例中 4 例、膵臓癌 3 例中 2 例において癌細胞と浸潤マクロファージいずれにも反応することが示された。

〔実施例 5〕マクロファージによる葉酸リセプター α 発現癌細胞の貪食能を促進する抗体 No. 5 の評価(ADCP(antibody-dependent cell mediated phagocytosis))

法による解析)

ヘパリン入り注射器で健常人から血液 50ml を採血した。採血した血液をリン酸バッファー、pH7.4 (PBS) で 3 倍に希釈した後、希釈血液を 50ml ファルコンチューブ内の 15ml の Lymphoprep 液 (Fresenius Kabi Norge AS) 上に重層させ、ブレーキ無しで 2500rpm で 15 分間遠心した。次いで、単球及びリンパ球を含む層を集め、3 倍量の PBS を加え、1500rpm で 8 分間遠心した。遠心後、上清を捨て、残ったペレットを崩し、PBS を 50ml 加え、さらに 800rpm で 5 分間遠心した。遠心後、上清の PBS を捨て、ペレットを崩し、10% 牛胎児血清 (MP Biomeicals)、1% Antibiotic/Antimycotic mixed solution (Nakarai) を含む IMDM 培養液 (Gibco) を 10ml 加え、この細胞浮遊液を 10ml シャーレに移し、5% 炭酸ガス下で 37°C 培養装置内で 30 分間静置し、単球を付着させた。次いで、PBS にてシャーレを 5 回洗浄し、再び付着単球に培養液を加えた。さらに、25ng/ml になるように M-CSF (Pepro Tech) を加えた。M-CSF 入り培養液を、3 日目及び 6 日目に交換した。7 日目に付着細胞 (単球からマクロファージに分化した細胞) を外し、 1×10^6 /ml になるように培養液にて調整し、この細胞浮遊液 100 μ l を 96 穴の丸底プレートのウェルに加えた。

一方、KB 細胞 (ヒト口腔類表皮癌由来 ; FR α 発現) の PE 標識はセルラベリングキット (シグマ) を用いた。簡単には、KB 細胞 1×10^7 を含む 1ml の PBS に PE 標識試薬 3.75 μ l を 1 分間加えた。その後、 2×10^5 /ml になるよう培養液にて調整し、上述のマクロファージを含むウェルに 100 μ l 加え、さらに各ウェルに各種抗体を 10 μ g/ml になるように加えた。実験は Triplicate で行った。

培養 6 時間後に、同じ操作を行ったウェルを混ぜ、ファルコンチューブに移し、FITC 標識抗 CD14 抗体 (マウス IgG₁, South Biotech) と FITC 標識抗 CD11b 抗体 (マウス IgG₁, South Biotech) あるいはネガティブコントロールとして FITC 標識抗体 (マウス IgG₁, South Biotech) で 30 分間染色した。2 重染色の解析はフローサイトメーター (CyAn、ベックマンコールター) にて行った。

図 8 は、その解析結果を示す。A のパネルは PE 標識した KB 細胞である。B のパネルは FITC 標識抗 CD14 抗体と FITC 標識抗 CD11b 抗体に反応したマクロファージである。マクロファージが KB 細胞を貪食した場合は、PE と FITC で標識された細

胞が存在することになる。コントロール抗体(ラット IgG_{2a}、South Biotech)添加群(Cのパネル)に比べて抗体 No. 5 添加群(Dのパネル)は ADCP 能(図の R9 領域の増加)を示したが、抗体 No. 5 の F(ab')₂ 添加群(Eのパネル)では ADCP 能は見られず、抗体 No. 5 (抗ヒト FR α / β ラットモノクローナル抗体)の ADCP 能はマクロファージの Fc リセプター依存であることが示された。この結果は抗ヒト FR α / β ラットモノクローナル抗体の投与がマクロファージによる葉酸リセプター α 発現癌細胞の貪食を促進させ、癌細胞の増殖を抑制することを示唆している。

〔実施例 6〕FR α 陽性ヒト癌細胞と FR β 陽性マウス浸潤マクロファージを標的とした抗体製剤による癌の治療効果

9-12 週齢の NOD/SCID マウス(メス)に、 1×10^7 個に調整した IGROV-1 ヒト癌細胞(卵巣癌由来; FR α 発現)を腹腔内に移植した(Day0)。癌細胞移植 4 日後に、0.5 mL の 3%チオグリコレート培地を腹腔内に投与してマウスマクロファージ(FR β 発現)を誘発させ、さらに 8 日、15 日、22 日後に、100 μ g に調整した各抗体を腹腔内に投与した。人道的エンドポイントを 45 日とした死亡日を追跡した。

図 9 は、実験スケジュールと癌細胞移植後の追跡結果を示す。陰性対照群の生存率は 0 であったのに対して、抗体 No. 5 (抗ヒト FR α / β ラットモノクローナル抗体であり、この実験系ではヒト癌細胞にのみ反応し、マウスマクロファージには反応しない) 及び抗マウス FR β 抗体の単独投与群では生存率の改善が認められた。さらに両者の併用によりエンドポイントまでの生存率は 100%を示した。この結果は FR α 発現癌細胞と FR β 発現マクロファージの除去が、卵巣癌の治療に有効であることを示唆している。

産業上の利用可能性

本発明に係る抗癌性分子標的薬によれば、FR α を発現する癌細胞、及び FR β を発現し、且つ癌増殖を促進する癌関連マクロファージを同時に傷害することにより、癌を効果的に治療することができる。また、本発明に係る抗 FR α / β 抗体又は癌診断薬によれば、様々な癌の局在、悪性度及び癌治療の治療効果を診断することができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. 葉酸リセプター α 及び葉酸リセプター β に免疫学的に特異的に結合する抗体。
2. 抗体がモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、多重特異性抗体及びそれらのフラグメントから成る群より選択される、請求項1記載の抗体。
3. ヒト抗体又はヒト化抗体である、請求項1又は2記載の抗体。
4. 重鎖可変領域(VH)のCDRH1、CDRH2及びCDRH3のアミノ酸配列がそれぞれ配列番号2、配列番号4及び配列番号6のアミノ酸配列であり、並びに軽鎖可変領域(VL)のCDRL1、CDRL2及びCDRL3のアミノ酸配列がそれぞれ配列番号10、配列番号12及び配列番号14のアミノ酸配列である抗体又はそのフラグメントである、請求項1～3のいずれか1項記載の抗体。
5. 請求項1～4のいずれか1項記載の抗体を含むか、あるいは該抗体に薬剤を結合してなる抗癌性分子標的薬。
6. 薬剤が、トキシン、細胞障害剤、酵素、サイトカイン及び化学療法薬から成る群より選択される、請求項5記載の抗癌性分子標的薬。
7. トキシンが細菌由来トキシンである、請求項6記載の抗癌性分子標的薬。
8. 細菌由来トキシンが、シュードモナス毒素、ジフテリア毒素又はブドウ球菌毒素である、請求項7記載の抗癌性分子標的薬。
9. 抗癌性分子標的薬がイムノトキシンである、請求項5～8のいずれか1項記載の抗癌性分子標的薬。
10. 細胞障害剤が、抗腫瘍剤、腫瘍増殖抑制剤、腫瘍細胞アポトーシス誘導剤及び放射性核種から成る群より選択される、請求項6記載の抗癌性分子標的薬。
11. 請求項5～10のいずれか1項記載の抗癌性分子標的薬と薬学的に許容可能な担体とを含む癌治療用医薬組成物。
12. 請求項1～4のいずれか1項記載の抗体に標識を結合してなる癌診断薬。

1 3. 標識が発蛍光団、色素又は放射性同位元素である、請求項 1 2 記載の癌診断薬。

1 4. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載の抗体又は請求項 1 2 若しくは 1 3 記載の癌診断薬を含む癌診断キット。

1

(A)

```

<-----FWR1----->
Q V Q L K E S G P G L V Q P S Q T L S L T C T V S G F S L T
CAGGTGACGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGTCTGGTGAGCCCTCAGACACCCCTGTCCTCAGCTGCTCTGGGTTCTCATTAACC

<-----FWR2----->
S N S V S W V R Q P P G K G L E W M G
AGCAATAGTGAAGC TGGGTTGCCAGCCTCCGGGAAAGGCTCTGGAGTGGATGGGA

<-----CDR2----->
A I W S G G S T D Y N S A L K S
GCAATATGGAGTGGTGAAGCACAGATTATAATTTCAGCTCTCAATCC

<-----FWR3----->
R L S I S K D T S K S Q V F L K M N S L Q T E D T A I Y F C T R
CGACTGAGCATCAGTAAGGACACCTCCAGAGGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGAAGACACAGCCATTACTTCTGTACCCGA

<-----CDR3----->
Y Y G Y T Y F A Y W G Q G V M V T V S S
TACTACGGGTATACCTACTTTGCTTAC TGGGGCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCICA

```

(B)

```

<-----FWR1----->
D I Q M T Q S P A S L S A S L E E I V T I T C Q A S Q D I G N W L A
GACATCCAGATGACACAGTCTCCTGCCCTCCCTGCTGTCATCTCTGGAAGAAATTTGTCAACCATCAGATGC CAGGCAAGCCCAAGACATTGGTAATTGGTTGGCA

<-----FWR2----->
W Y Q Q K P G K S P Q L L I Y D A I R L A D
TGGTATCAGCAGAAACCGGGAATCTCCTCAGCTCCTGATTTATGATGCAATCAGATTGGCAGAT

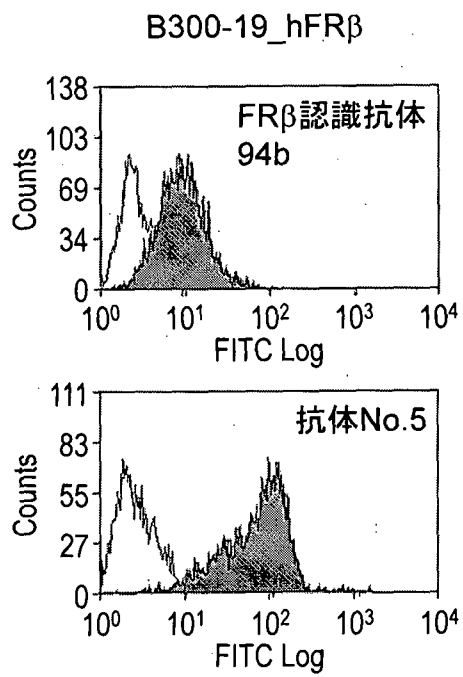
<-----FWR3----->
G V P S R F S G S R S G T Q Y S L K I S R L Q V E D
GGGTCCCATCAGGTTTCAGGGCAGTAGATCTGGCACACAGTATTCTTTAAGATCAGCAGACTACAGGTTGAAGAT

<-----CDR3----->
I G D Y Y C Q Q G Q S N P R T F G G G T K L E L K
ATTGGAGACTATTACTGTCAACAGGGTCAAAGTAATCCTCGGACG TTCGGTGGAGGCCACCAAGCTGgaattgaaa

```

図 2

(A)



(B)

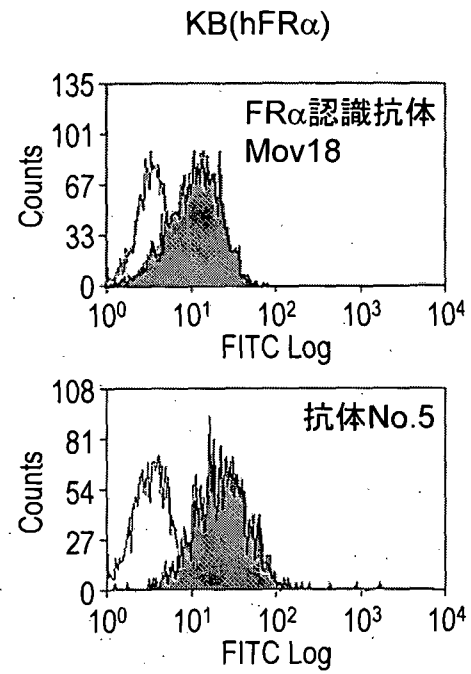


図 3

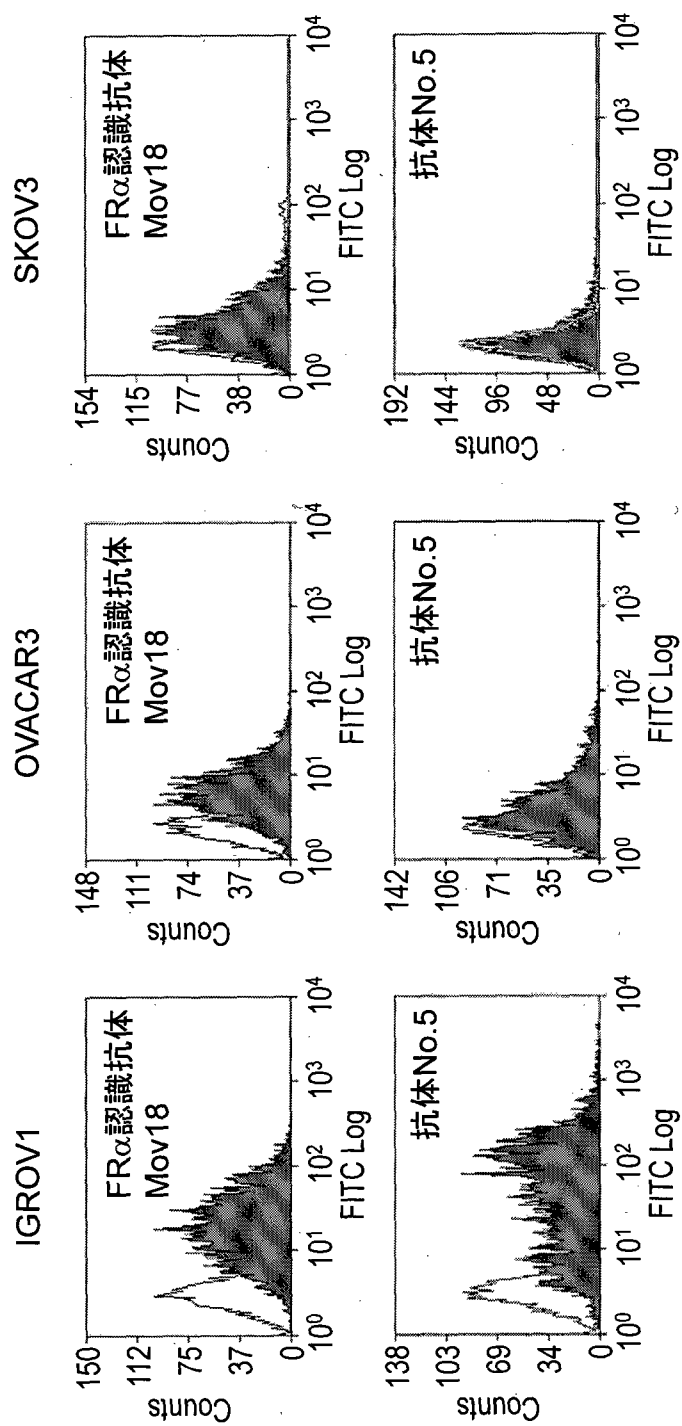


図 4

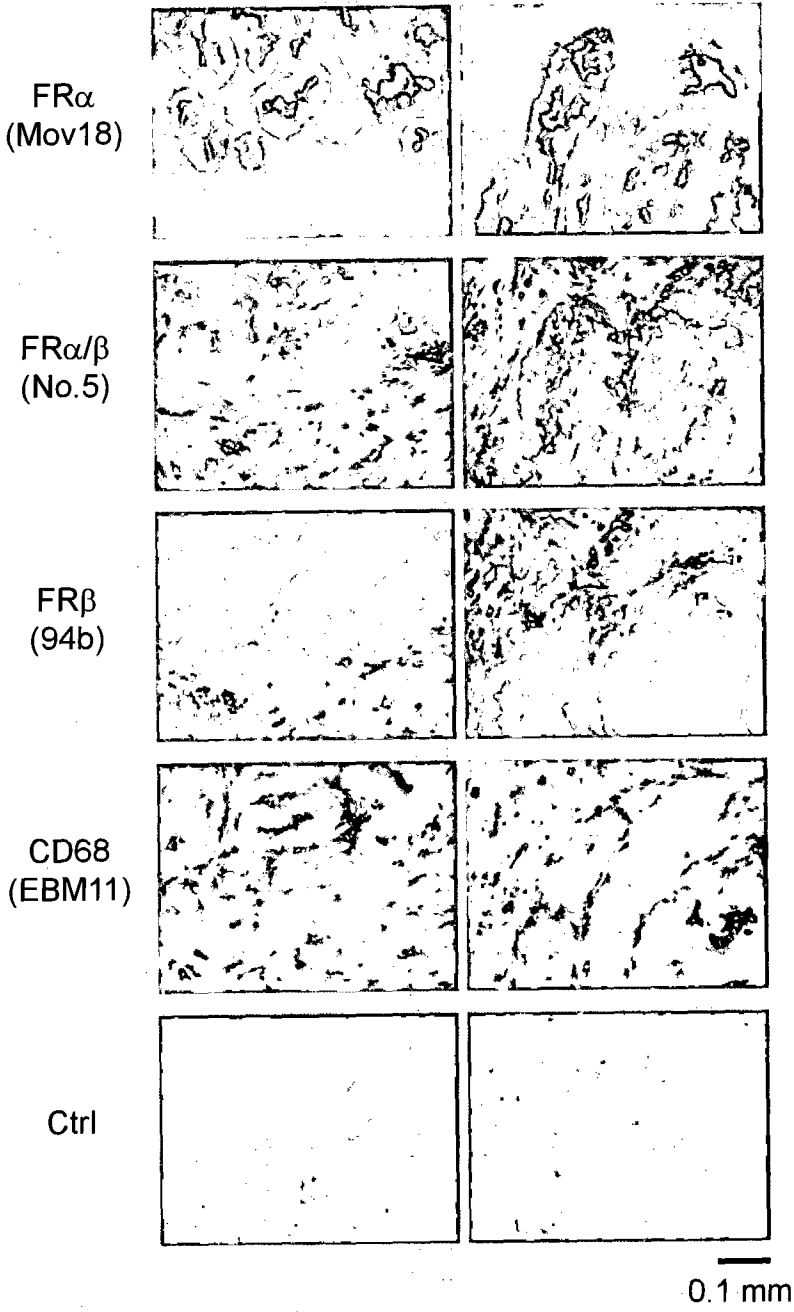


図 5

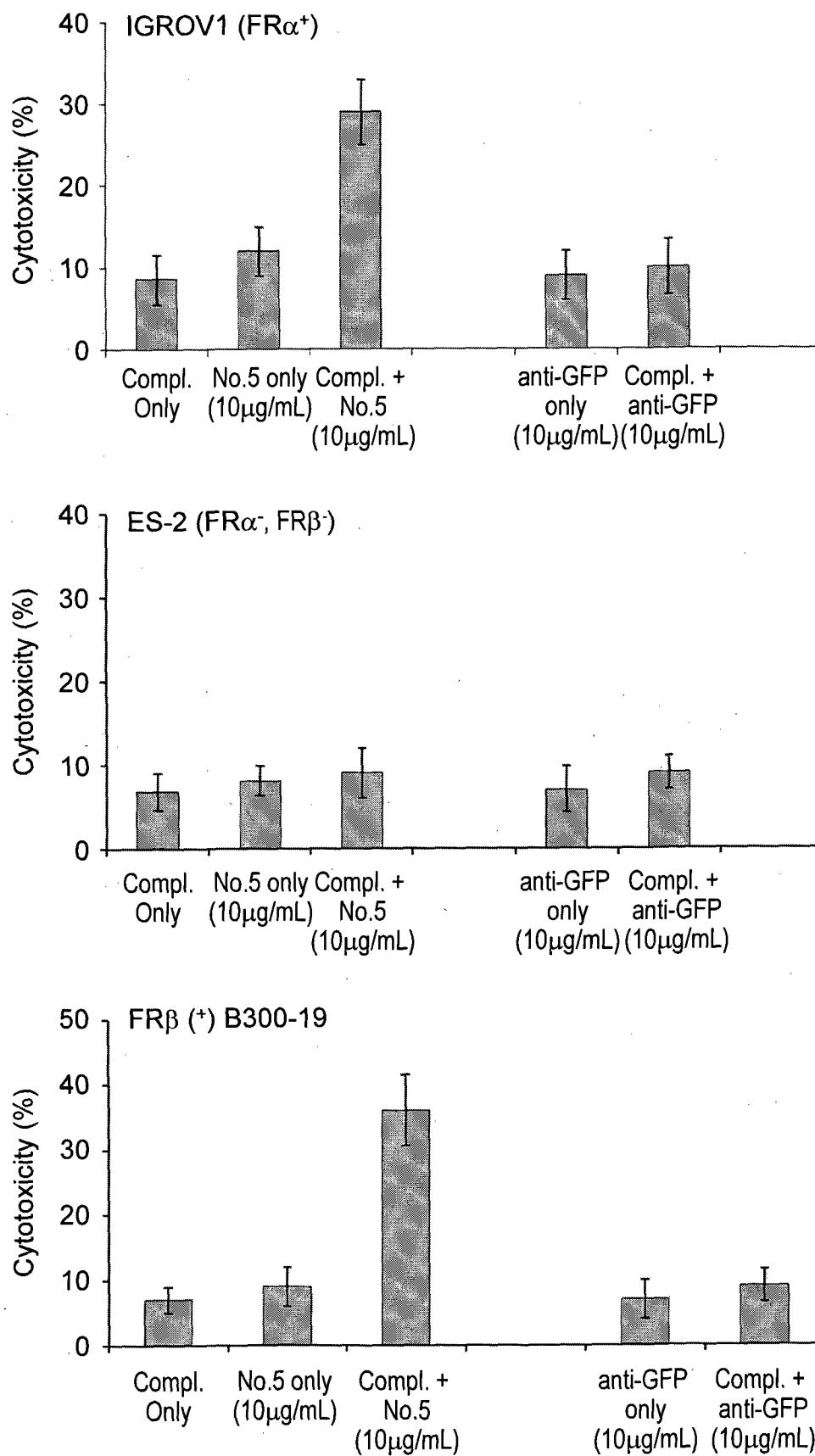


図 6

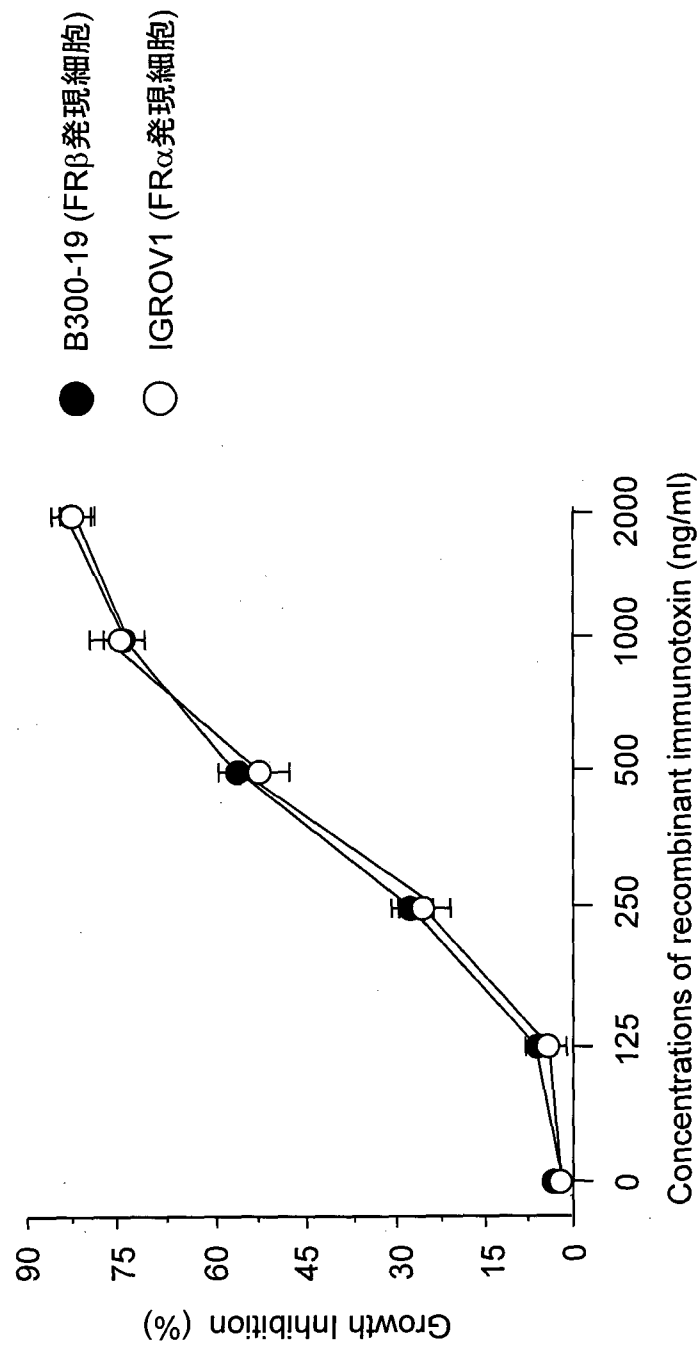


図 7

	FR $\alpha\beta$ 陽性
肺癌(扁平上皮癌13例、小細胞癌6例)	6/19
乳癌(14例)	4/14
膵臓癌(3例)	2/3

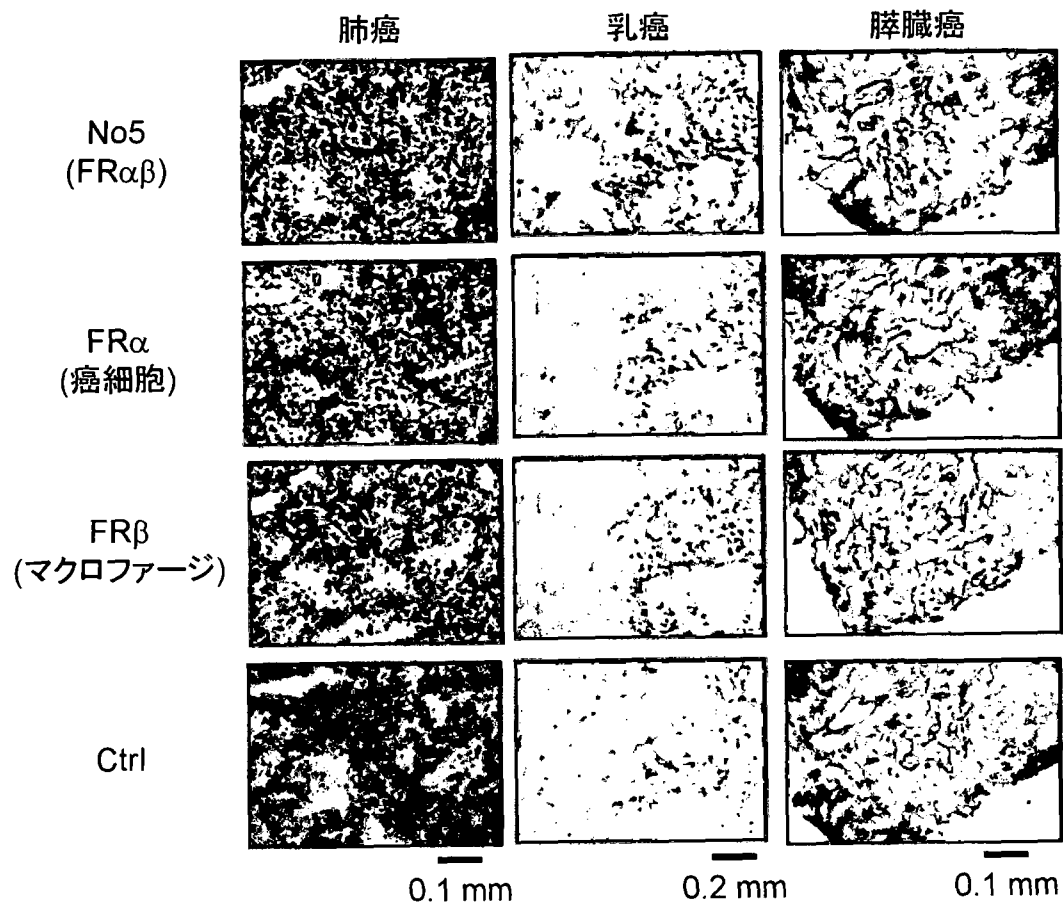


図 8

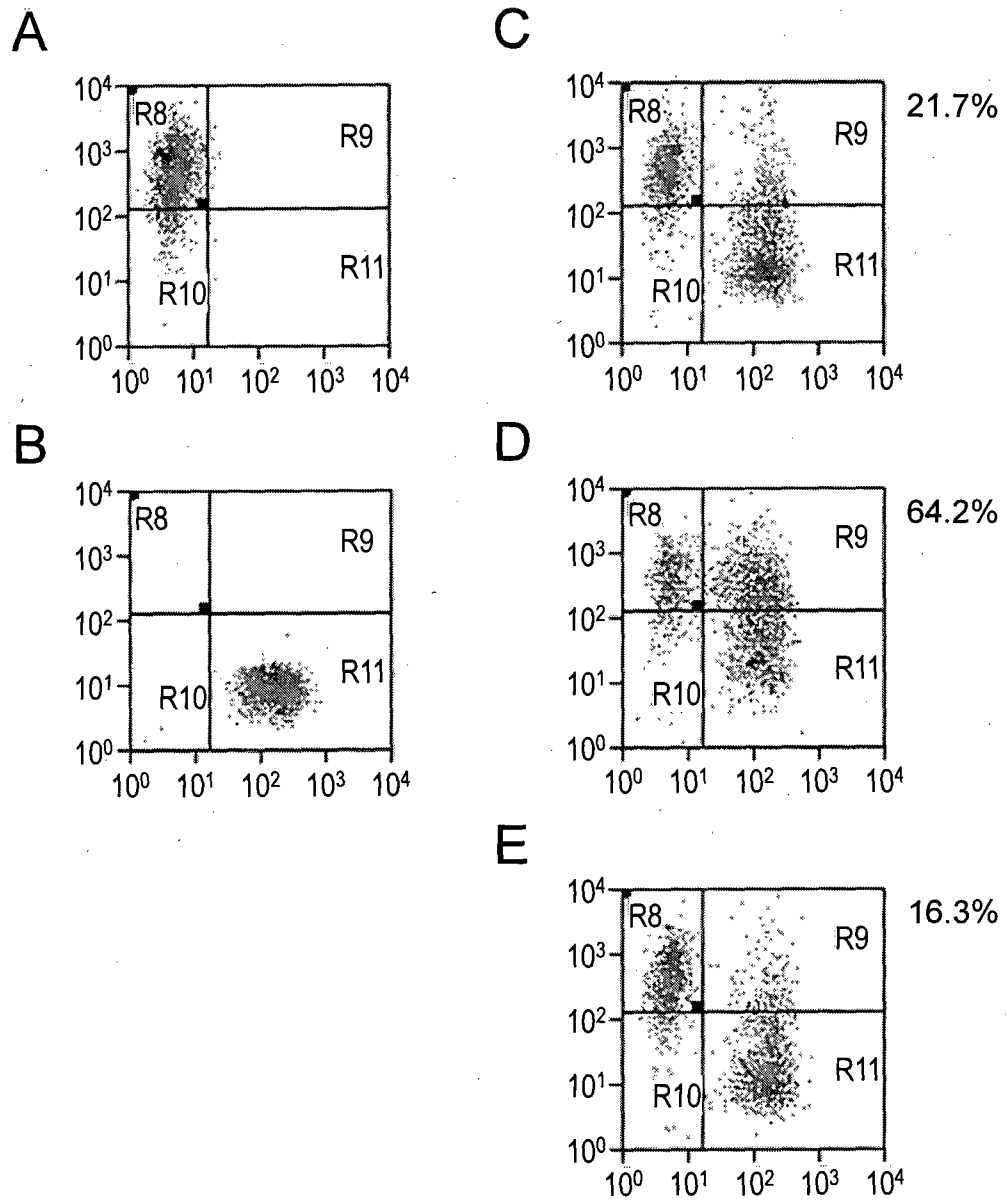
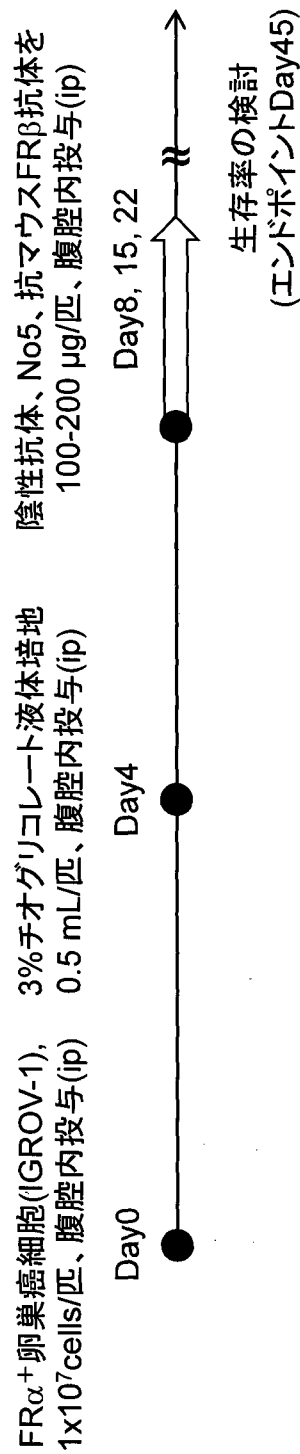


図 9



処置群	生存数/総匹	死亡日 (エンドポイント45日)
陰性対照抗体(抗GFP抗体)	0/3	移植27, 34, 38日後死亡
No5(抗ヒトFR α 抗体)	2/3	移植35日後死亡
抗マウスFR β 抗体	2/3	移植32日後死亡
No5 + 抗マウスFR β 抗体	3/3	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/085026

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K49/00(2006.01)i, A61K51/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12P21/02(2006.01)n, C12P21/08(2006.01)n

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)

C07K16/28, A61K38/00, A61K39/395, A61K49/00, A61K51/00, A61P35/00, A61P43/00, C12N15/09, C12P21/02, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY/CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	ROSS, J. F. et al., Folate Receptor Type beta Is a Neutrophilic Lineage Marker and Is Differentially Expressed in Myeloid Leukemia, Cancer, 1999.01.15, 85(2), pp. 348-357, MATERIALS AND METHODS Antibodies, FIGURE 1	1, 2/1-3, 5-14 /4
X/Y/A	CONEY, L. R. et al., Cloning of a tumor-associated antigen: MOv18 and MOv19 antibodies recognize a folate-binding protein, Cancer Research, 1991.11.15, 51(22), pp. 6125-6132, ABSTRACT, Fig. 3	1-3/1-3, 5-14 /4
X/Y/A	EBEL, W. et al., Preclinical evaluation of MORAb-003, a humanized monoclonal antibody antagonizing folate receptor-alpha, Cancer Immunity, 2007.03.09, 7, p. 6, ABSTRACT	1-3/1-3, 5-14 /4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
24 March, 2014 (24.03.14)

Date of mailing of the international search report
01 April, 2014 (01.04.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/085026

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 2008-500025 A (Morphotek, Inc.), 10 January 2008 (10.01.2008), paragraphs [0002], [0043], [0114] to [0119] & US 2005/0232919 A1 & WO 2005/080431 A2	1-3, 5-14/4
Y/A	WO 2012/128377 A1 (Kagoshima University), 27 September 2012 (27.09.2012), pages 1 to 6; fig. 1 (Family: none)	1-3, 5-14/4
A	CLIFTON, G. T. et al, Folate receptor alpha: A storied past and promising future in immunotherapy, Human Vaccines, 2011.02.01, 7(2), pp. 183-190	1-14
P,A	MÜLLER, C. et al, Prospects in Folate Receptor -Targeted Radionuclide Therapy, Frontiers in Oncology, 2013.09.24, 3: 249, doi: 10.3389/ fonc.2013.00249	1-14

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K16/28(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K49/00(2006.01)i, A61K51/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12P21/02(2006.01)n, C12P21/08(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K16/28, A61K38/00, A61K39/395, A61K49/00, A61K51/00, A61P35/00, A61P43/00, C12N15/09, C12P21/02, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

REGISTRY/CaPlus/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, Thomson Innovation

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y/ A	ROSS, J. F. et al., Folate Receptor Type beta Is a Neutrophilic Lineage Marker and Is Differentially Expressed in Myeloid Leukemia, Cancer, 1999.01.15, 85(2), pp. 348-357, MATERIALS AND METHODS Antibodies, FIGURE 1	1, 2/ 1-3, 5-14/ 4

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 4 . 0 3 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

0 1 . 0 4 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

吉田 知美

4 B

5 3 7 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y/ A	CONEY, L. R. et al., Cloning of a tumor-associated antigen: MOv18 and MOv19 antibodies recognize a folate-binding protein, Cancer Research, 1991.11.15, 51(22), pp. 6125-6132, ABSTRACT, Fig. 3	1-3/ 1-3, 5-14/ 4
X/ Y/ A	EBEL, W. et al., Preclinical evaluation of MORAb-003, a humanized monoclonal antibody antagonizing folate receptor-alpha, Cancer Immunity, 2007.03.09, 7, p. 6, ABSTRACT	1-3/ 1-3, 5-14/ 4
Y/ A	JP 2008-500025 A (モルフォテック、インク.) 2008.01.10, 段落【0002】、【0043】、【0114】～【0119】、& US 2005/0232919 A1 & WO 2005/080431 A2	1-3, 5-14/ 4
Y/ A	WO 2012/128377 A1 (国立大学法人鹿児島大学) 2012.09.27, 第1～6頁、図1 (ファミリーなし)	1-3, 5-14/ 4
A	CLIFTON, G. T. et al, Folate receptor alpha: A storied past and promising future in immunotherapy, Human Vaccines, 2011.02.01, 7(2), pp. 183-190	1-14
P, A	MÜLLER, C. et al, Prospects in Folate Receptor-Targeted Radionuclide Therapy, Frontiers in Oncology, 2013.09.24, 3: 249, doi: 10.3389/fonc.2013.00249	1-14