

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4884225号
(P4884225)

(45) 発行日 平成24年2月29日(2012.2.29)

(24) 登録日 平成23年12月16日(2011.12.16)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 16/30 (2006.01)	C O 7 K 16/30 Z N A
C O 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
請求項の数 23 (全 99 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2006-533104 (P2006-533104)	(73) 特許権者	502160545
(86) (22) 出願日	平成16年5月17日(2004.5.17)		ディアデクサス インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2007-516226 (P2007-516226A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(43) 公表日	平成19年6月21日(2007.6.21)		080、サウス サン フランシスコ、オ
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/015258		イスター ポイント ブルバード 343
(87) 国際公開番号	W02004/104173	(74) 代理人	100102842
(87) 国際公開日	平成16年12月2日(2004.12.2)		弁理士 葛和 清司
審査請求日	平成19年5月15日(2007.5.15)	(72) 発明者	ビルキントン, グレン
(31) 優先権主張番号	60/471,068		オーストラリア連邦 3941、ヴィクト
(32) 優先日	平成15年5月16日(2003.5.16)		リア、ライ、オールアラ ストリート 6
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ケラー, ギルバート・アンドレ
(31) 優先権主張番号	60/559,730		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(32) 優先日	平成16年4月5日(2004.4.5)		002、ベルモント、カーメリタ アヴェ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ニュー 22325
微生物の受託番号	ATCC PTA-5202		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 O v r 1 1 5 抗体組成物および使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アメリカンタイプカルチャーコレクション受託番号PTA-5202およびPTA-5917から選択されるハイブリドーマにより産生されるか、または、アメリカンタイプカルチャーコレクション受託番号PTA-5202およびPTA-5917から選択されるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体が結合するエピトープと同一のエピトープへの結合に競合し、インビボで哺乳動物細胞上の O v r 1 1 5 に結合すると内部移行する、単離された抗体。

【請求項 2】

配列番号3の L y s 5 2 ~ L e u 4 3 5 のアミノ酸配列を含む O v r 1 1 5 の断片に結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

配列番号3の V a l 2 0 3 ~ L e u 4 3 5 のアミノ酸配列を含む O v r 1 1 5 の断片に結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 4】

アメリカンタイプカルチャーコレクション受託番号PTA-5916、PTA-5918、PTA-5919およびPTA-5920から選択されるハイブリドーマにより産生されるか、または、アメリカンタイプカルチャーコレクション受託番号PTA-5916、PTA-5918、PTA-5919およびPTA-5920から選択されるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体が結合するエピトープと同一のエピトープへの結合に競合する、インビボで O v r 1 1 5 発現癌細胞の増殖を阻害する、単離された抗体。

【請求項 5】

配列番号 3 の L y s 5 2 ~ L e u 4 3 5 のアミノ酸配列を含む O v r 1 1 5 の断片に結合する、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

配列番号 3 の V a l 2 0 3 ~ L e u 4 3 5 のアミノ酸配列を含む O v r 1 1 5 の断片に結合する、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 7】

増殖阻害剤または細胞毒性剤に結合している、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 8】

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選択される、請求項 7 に記載の抗体。 10

【請求項 9】

モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体を産生する細胞。

【請求項 11】

請求項 4 ~ 8 のいずれかに記載の抗体と薬学的に許容し得る担体とを含む組成物。

【請求項 12】

O v r 1 1 5 発現癌細胞を死滅させるインビトロの方法であって、該方法が、該癌細胞を、請求項 4 ~ 8 のいずれかに記載の抗体または請求項 1 1 に記載の組成物と接触させ、これにより該癌細胞を死滅させることを含む、前記方法。 20

【請求項 13】

癌細胞が、卵巣癌細胞、膵臓癌細胞および結腸癌細胞から選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

抗体を、少なくとも 1 種の化学療法剤と組み合わせて投与する、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 15】

試料中の細胞が O v r 1 1 5 を発現するか否かを決定するためのインビトロの方法であって、該方法が： 30

(a) 細胞の試料と、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の抗体とを、該抗体の O v r 1 1 5 への特異的結合に適する条件の下で接触させること；および

(b) 該抗体の試料中の細胞への結合のレベル、または前記試料中の細胞による該抗体の内部移行のレベルを決定すること

を含み、

ここで、試料中の細胞への該抗体の結合、または該試料中の細胞による該抗体の内部移行が、該試料中の細胞が O v r 1 1 5 を発現することを示す、前記方法。

【請求項 16】

O v r 1 1 5 過剰発現を、これを必要としている被検者において検出する方法であって、 40

(a) 被検者の血清試料を、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の抗体と、該抗体の、前記血清試料中の O v r 1 1 5 への特異的な結合に適する条件の下で混ぜ合わせる、

(b) O v r 1 1 5 の該血清試料中でのレベルを決定すること、

(c) 段階 b において決定した O v r 1 1 5 のレベルを、対照中の O v r 1 1 5 のレベルに対して比較することを含み、

ここで、対照と比較した、被検者からの血清試料中の O v r 1 1 5 のレベルの増大が、被検者における O v r 1 1 5 過剰発現の指標である、前記方法。

【請求項 17】

請求項 4 ~ 8 のいずれかに記載の抗体の、癌を処置するための医薬の製造における使用 50

。

【請求項 1 8】

請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の抗体の、癌を検出するためのイメージング剤の製造における使用。

【請求項 1 9】

癌が、卵巣癌、膵臓癌または結腸癌である、請求項 1 7 または 1 8 に記載の使用。

【請求項 2 0】

請求項 4 ～ 8 のいずれかに記載の抗体を含む、癌を処置するための医薬。

【請求項 2 1】

癌が、卵巣癌、膵臓癌または結腸癌である、請求項 2 0 に記載の医薬。

10

【請求項 2 2】

請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の抗体を含む、癌を検出するためのイメージング剤。

【請求項 2 3】

癌が、卵巣癌、膵臓癌または結腸癌である、請求項 2 2 に記載のイメージング剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本特許出願は、米国仮特許出願通番第60/559,730号、2004年4月5日出願および米国仮特許出願通番第60/471,068号、2003年5月16日出願の優先権を請求し、この各々を、この全体において、参照により本明細書中に導入する。

20

【0 0 0 2】

発明の分野

本発明は、抗Ov r 1 1 5抗体組成物およびOv r 1 1 5を発現する卵巣癌細胞、膵臓癌細胞および結腸癌細胞を死滅させる方法に関する。

【0 0 0 3】

発明の背景

卵巣癌

卵巣の癌は、米国における女性における癌死亡の4番目に一般的な原因であり、23,000を超える新たな症例および約14,000人の死亡が、2001年について予測される。Shridhar, V. et al., Cancer Res. 61(15): 5895-904 (2001); Memarzadeh, S. & Berek, J. S., J. Reprod. Med. 46(7): 621-29 (2001)。アメリカ癌協会は、2004年に、米国のみにおいて卵巣癌の約25,580の新たな症例があると概算している。卵巣癌は、同一の年において、米国において約16,090人の死亡を生じる。ACSウェブサイト: cancer with the extention .org of the world wide web。卵巣癌の発生率は、世界的に重大な懸念であり、191,000と概算される新たな症例が、毎年予測される。Runnebaum, I. B. & Stickeler, E., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 127(2): 73-79 (2001)。不都合なことに、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、入手可能ではないため、診断された女性の約70%が、癌の進行した段階を有し、5年生存率は~25~30%である。Memarzadeh, S. & Berek, J. S., 上記; Nunns, D. et al., Obstet. Gynecol. Surv. 55(12): 746-51。逆に、初期の段階の卵巣癌を有すると診断された女性は、顕著に一層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

40

【0 0 0 4】

卵巣癌の病因論の本発明者らの理解は、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歳前の卵巣癌の発生についての危険は低い一方、卵巣癌の発生率は、30~50歳の間に直線状に上昇し、その後一層遅い速度で上昇し、最高の発生率は、70歳代の女性である。Jeanne M. Schilder et al., Hereditary Ovarian Cancer: Clinical Syndromes and Management, Ovaria

50

n Cancer 182 (Stephen C. Rubin & Gregory P. Sutton編、第2版、2001)中。

【0005】

遺伝的要因に関して、卵巣癌の家族履歴は、当該疾患の発生における最も顕著な危険因子であり、当該危険は、罹患した家族の数、該家族の該女性に対する関係の程度に依存し、特に第1の程度の関係は、当該疾患により影響される。同上。いくつかの遺伝子における突然変異は、卵巣癌に関連しており、これには、両方が乳癌の発生において重要な作用を奏しているBRCA1およびBRCA2、並びに両方が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, Ovarian Cancer 169, 171-73 (Stephen C. Rubin & Gregory P. Sutton編、第2版、2001)中。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、卵巣癌の約10%と関連する。171~72において同上；Schilder et al., 185~86において上記。hMSH2およびhMLH1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。Look, 173において上記；Schilder et al., 184、188~89において上記。

10

【0006】

生殖的要因はまた、卵巣癌の増大したか、または低下した危険と関連している。遅い閉経、未産婦および初経における早期の年齢は、すべて、卵巣癌の上昇した危険と関連している。Schilder et al., 182において上記。1つの理論は、これらの因子により、女性の生命の経過にわたり、排卵サイクルの数が増大し、「絶え間のない排卵」がもたらされると仮定し、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ている。同上；Laura J. Havrilesky & Andrew Berchuck, Molecular Alterations in Sporadic Ovarian Cancer, Ovarian Cancer 25 (Stephen C. Rubin & Gregory P. Sutton編、第2版、2001)中。突然変異は、排卵の結果、当該上皮の破壊および修復が生じ、増大した細胞分裂が必要であり、これにより、検出されない突然変異が生じる可能性が増大するという事実により、説明され得る。同上。この理論についての支持は、すべてが排卵を抑制する妊娠、授乳および経口避妊薬の使用により、卵巣癌を発生することに関する保護効果が付与されるという事実において、見出され得る。同上。

20

【0007】

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、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する酸化防止剤のビタミンAは、保護効果を提供し得る。Look, 169において上記。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)に関連しており、この後者は、隔壁および生理用ナプキン中に存在し得る。169~70において同上。

30

【0008】

卵巣癌についての現在のスクリーニング手順は、ある有用性がある一方、これらの診断的能力において極めて限定されており、疾患が典型的に尚無症候性である際に、癌進行の初期段階において特に緊急である問題が、最も容易に対処される。Walter J. Burdette, Cancer: Etiology, Diagnosis, and Treatment 166 (1998)；Memarzadeh & Berek, 上記；Runnebaum & Stickeler, 上記；Werness & Eltabbakh, 上記。一般的に用いられているスクリーニング試験には、年2回の直腸膣骨盤試験、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膣的超音波検査が含まれる。Burdette, 166において上記。

40

【0009】

骨盤試験によっては、初期の診断の適切な数が得られておらず、他方の方法は、十分正確ではない。同上。1つの研究により、卵巣癌を罹患している患者のわずか15%が、当該患者の骨盤試験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。Look, 174において上記。さらに、CA-125試験は、閉経前の女性において誤った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。174~75

50

において同上。経膈的超音波検査は、現在では、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、良性の、および悪性の腫瘍を確実に区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、主な腹膜の悪性度または卵巣癌を位置させることができない。Schilder et al., 194 ~ 95 において上記。BRCA1、BRCA2、hMSH2 および hMLH1 遺伝子の突然変異についての遺伝子的試験は、現在入手可能であるが、これらの試験は、数人の患者については費用がかかりすぎることがあり、また誤った陰性の、または不確定な結果を生じ得る。Schilder et al., 191 ~ 94 において上記。

【0010】

他の関連するマーカーは、HE4 およびメソセリン(mesothelin)である。Urban et al. 10
Ovarian cancer screening Hematol Oncol Clin North Am. 2003 Aug;17(4):989-1005;
Hellstrom et al., HE4 (WFD C2) タンパク質は卵巣癌についての生物マーカーである、Cancer Res. 2003 Jul 1;63(13):3695-700; Ordonez, 腫瘍診断におけるメソセリン免疫染色の適用、Am J Surg Pathol. 2003 Nov;27(11):1418-28を参照。

【0011】

手術的探索により達成された卵巣癌の段階分類は、当該疾患の処置および管理の経過を決定するにあたり、臨界的に重要である。AJCC Cancer Staging Handbook 187 (Irvin D. Fleming et al.編、第5版、1998); Burdette, 170 において上記; Memarzadeh & Berek, 上記; Shridhar et al., 上記。段階分類は、International Federation of Gynecology and Obstetrics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, Ovarian Cancer 203 (Stephen C. Rubin & Gregory P. Sutton編、第2版、2001)中; Fleming et al.編、188 において上記。段階Ⅰの卵巣癌は、卵巣に限定され、3つの従属段階からなる腫瘍増殖により特徴づけられる。同上。従属段階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、卵巣カプセルは、無傷であり、悪性細胞は、腹水または腹膜洗浄液中に存在しない。同上。従属段階ⅠBは、腫瘍増殖が両方の卵巣に限定される以外は、ⅠAと同一である。同上。従属段階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: カプセル破裂、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。同上。 20 30

【0012】

段階ⅠⅠの卵巣癌は、一方または両方の卵巣を含む腫瘍増殖および骨盤拡張を意味する。同上。従属段階ⅠⅠAは、子宮および/またはファロピウス管における拡張および/または移植を含み、腹水または腹膜洗浄液中に悪性細胞を含まず、一方従属段階ⅠⅠBは、他の骨盤器官および組織中への拡張を含み、再び、腹水または腹膜洗浄液中に悪性細胞を含まない。同上。従属段階ⅠⅠCは、ⅠⅠAまたはⅠⅠBのような骨盤拡張を含むが、腹水または腹膜洗浄液中に悪性細胞を含む。同上。

【0013】

段階ⅠⅠⅠの卵巣癌は、一方または両方の卵巣中に腫瘍増殖を含み、骨盤を越えての腹膜転移および/または領域性リンパ節における転移が、顕微鏡により確認される。同上。 40
従属段階ⅠⅠⅠAは、骨盤の外側の微細な腹膜転移により特徴づけられ、従属段階ⅠⅠⅠBは、最大の寸法で2cmまたはこれ以下の、骨盤の外側の肉眼で見える腹膜転移を含む。同上。従属段階ⅠⅠⅠCは、転移が、最大の寸法において2cmより大きく、領域性リンパ節転移を含み得る以外は、ⅠⅠⅠBと同一である。同上。最後に、段階ⅠⅤは、腹膜転移を除く遠隔転移の存在を示す。同上。

【0014】

手術的段階分類が、現在卵巣癌の管理および処置を評価するための基準である一方、これには顕著な欠点があり、これには、手順の侵入性、複雑さについての可能性および不正確さについての可能性が含まれる。Moore, 206 ~ 208、213 において上記。これらの制限の観点において、卵巣癌の種々の段階における異なる遺伝子発現を理解すること 50

により、および当該疾患の進行を一層良好に評価するのを補助する種々の生物マーカーを得ることにより、代替の段階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); Shridhar et al. 上記; Baeke landt, M. et al., *J. Clin. Oncol.* 18(22): 3775-81.

【 0 0 1 5 】

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 & William J. Hoskins, *Primary Surgical Management of Advanced Epithelial Ovarian Cancer*, Ovarian Cancer 241 (Stephen C. Rubin & Gregory P. Sutton編、第2版、2001)中。例えば、卵巣癌の～90%の症例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、以下のものからなる：(1)総合的な腹部子宮摘出、両側性卵管卵巣摘出術、オメンテクトミー(omentectomy)およびリンパ節切除を含む、細胞減少性手術、続いて(2)パクリタキセル(paclitaxel)およびシスプラチン(cisplatin)またはカルボプラチン(carboplatin)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. アジュバント療法の80%の臨床的応答率にもかかわらず、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。同上。ある患者は、第2の細胞減少性手術および/または第二次化学療法を受け得る。Memarzadeh & Berek、上記。

【 0 0 1 6 】

上記のことから、卵巣癌の再発を検出、診断、モニタリング、段階分類、予見および防止するために用いられる手順は、患者の結果に臨界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、感受性、侵襲性および/またはこれらの費用により制限される。このように、最小の侵襲性を伴って、および合理的な費用において、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作用する、高度に特異的な、および感受性の手順は、高度に望ましい。

【 0 0 1 7 】

従って、人が卵巣癌を発生する傾向があるか否かを予測するための、卵巣癌を診断するための、疾患の進行をモニタリングするための、卵巣癌を段階分類するための、卵巣癌が転移したか否かを決定するための、卵巣癌を画像化するための、および卵巣癌の一層良好な処置のための、一層感受性であり、正確な方法についての大きな必要性がある。

【 0 0 1 8 】

膵臓癌

膵臓癌は、13番目に一般的な癌であり、世界中の癌の死亡の8番目に多い原因である。Donghui Li, *Molecular Epidemiology, Pancreatic Cancer* 3 (Douglas B. Evans et al.編、2002)中。米国において、膵臓の癌は、男性および女性の両方において、4番目に一般的な癌であり、癌死者の5%を占め、全体で死者は30,000人近くである。同上。膵臓癌の比率は、女性よりも男性において高く、白人に対してアフリカアメリカ人において高い。9において同上。膵臓癌の最も顕著な予測の判断材料は、患者の年齢である；白人の中で、膵臓癌の年齢に関連する発生率は、85歳またはこれより年長の区分においてさえも連続的に増大する。3において同上。

【 0 0 1 9 】

約80%の症例が、60～80歳の範囲内の年齢において発生し、80歳代における症例は、これらの40歳代における症例の40倍の、疾患に罹患する危険を経験している。同上。さらに、アメリカ癌協会は、2004年に米国のみにおいて、膵臓癌の約31,800の新たな症例があると見積もっている。膵臓癌は、同一の年において米国で約31,200人の死者をもたらしている。ACSウェブサイト：cancer with the extension .org of the world wide web。研究者および医師の、膵臓癌のための処置を考案する努力にもかかわらず、これは、ほぼ全世界的に致命的なままである。James R. Howe, *Molecular Markers as a Tool for the Early Diagnosis of Pancreatic Cancer*, Pancreatic Cancer 29 (Douglas B. Evans et al.編、2002)中。

【 0 0 2 0 】

年齢に加えて、膵臓癌についての多くの危険因子が、確認されており、これには、喫煙、食事、職業、ある医学的状态、遺伝および分子生物学が含まれる。喫煙は、この疾患に罹患する最も重要な危険因子であり、喫煙と膵臓癌との間の関連は、多くの研究において確立されている。Li, 3 において上記。相対的な危険は、少なくとも 1.5 にのぼり、喫煙のレベル対外的危険の比率は、10 倍に増大する。同上。次に重要な因子は、食事であると見られ、動物性タンパク質および脂肪の摂取に関連して危険が増大し、果実および野菜の摂取に関連して危険が低下する。3 ~ 4 において同上。特定の職業に関して、膵臓癌の過度の率は、化学、石炭およびガス探査、金属工業、革なめし、織物、アルミニウム微粉砕および輸送における作業員に関連していた。4 において同上。多くの医学的状态がまた、膵臓癌の増大した発生率と関連しており、これには、糖尿病、慢性膵炎、胃切除および胆嚢切除が含まれるが、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。同上。

10

【 0 0 2 1 】

遺伝的な遺伝子の因子は、遺伝的膵炎に関して実証されている関連に伴って、10%より低い膵臓癌負担並びに家族性癌症候群遺伝子、例えば h M S H 2 および h M L H 1 (遺伝的非ポリープ症結腸癌)、p 1 6 (家族性異型多発性モル黒色腫(mole-melanoma)) および B R C A 1 / B R C A 2 (乳癌および卵巣癌) における生殖系列突然変異を含む。3 において同上。他の器官が、膵臓よりも高い癌についての遺伝による基礎を有する一方、研究者は、膵臓癌に対する感受性に寄与する 1 または 2 以上の特定の遺伝子的欠陥を特定することができなかった。David H. Berger & William E. Fisher, Inherited Pancreatic Cancer Syndromes, Pancreatic Cancer 73 (Douglas B. Evans et al. 編、2002) 中。

20

【 0 0 2 2 】

分子生物学の観点から、研究により、膵臓癌と多くの遺伝子的突然変異との間の関連が明らかになり、これには、プロトオンコジーン K - r a s の活性化並びに腫瘍抑制遺伝子 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, Pancreatic Cancer 15 (Douglas B. Evans et al. 編、2002) 中。

【 0 0 2 3 】

膵臓腺癌の 1 つの研究において、83% は、K - r a s 活性化を、p 1 6 および p 5 3 の不活性化と共に有していた。同上。K - r a s 突然変異は、80 ~ 95% の膵臓腺癌において見出され、p 5 3、p 1 6 および D P C 4 遺伝子は、膵臓の癌における最も頻繁に欠失した腫瘍抑制遺伝子である。Howe, 29 において上記。p 1 6 遺伝子のホモ接合性欠失、過剰メチル化および突然変異は、膵臓の腺癌の 85 ~ 98% において見出された。同上。K - r a s、p 5 3、p 1 6 および D P C 4 遺伝子における変化の作用により予測され得るように、細胞サイクルの調節の損失は、膵臓における腫瘍形成に対して重要であると見られ、この癌がなぜこの程度に攻撃的であるかを説明することができる。Jean, 15 において上記。

30

【 0 0 2 4 】

また、研究により、この癌と、ある増殖因子および増殖因子レセプターの異常な調節並びにマトリックスメタロプロテイナーゼおよび腫瘍血管新生制御因子の上方調節との間の関連が、明らかになった。同上。上皮細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子、形質転換増殖因子、インシュリン様増殖因子、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作用を奏し得るが、このような作用は、解明されていない。18 ~ 22 において同上。

40

【 0 0 2 5 】

膵臓癌の存在を検出するためのスクリーニング手法の開発は、この致命的な癌のために特に必須である。その理由は、ほとんどの患者が、当該患者の膵臓腫瘍が胆管を詰まらせるかまたは疼痛を誘発するまで存在せず、この時点で、腫瘍は、膵臓を包囲する毛細管およびリンパ管に侵入しているからである。Howe, 29 において上記；不都合なことに、こ

50

の疾患の転移性形態を有する患者は、典型的には、診断の後に1年よりも短期間生存する。Jean et al., 15において上記。コンピュータ断層撮影法(CT)および内視鏡的逆行性胆道膵管造影法(ERCP)により、症候性患者の診断が補助され得る一方、この時点において当該患者が治癒可能であり得る、当該患者の早期の発見を可能にする膵臓腫瘍についてのスクリーニングについて、現在手段はない。Howe, 29において上記。マーカー、例えば癌胎児抗原、並びにヒト結腸癌(CA 19-9およびCA 195)、ヒト卵巣癌(CA 125)およびヒト膵臓癌(SPAN-1およびDUPAN-2)の細胞系に対して発生した抗体は、膵臓癌を有する患者の血清において上昇し得るが、これらのマーカーは、これらが特異性を欠いており、疾患において後期の外見を呈するため、スクリーニング手段として作用するには十分信頼性を有しない。Walter J. Burdette, Cancer: Etiology, Diagnosis, and Treatment 99 (1998); Hasholzner, U. et al., Anticancer Res. 19(4A): 2477-80 (1999)。

10

【0026】

適切なスクリーニング方法のこの欠如のために、医師は、分子生物学の方法を、疾患の初期の診断のための最も有望な手段として用いる手法に、ますます方向転換している。Howe, 30において上記。現在、無症候性個体における膵臓癌の検出を可能にする高度に感受性の、高度に特異的なマーカーはないが、いくつかの生物学的マーカーが、検査されている。同上。顕著な努力が、現在、K-rasに集中しており、研究者は、膵液、胆汁、十二指腸液の試料をスクリーニングするための手法、またはK-ras突然変異を検出するためのERCPブラッシングを考案している。同上。これらの試料の採集が、侵襲性であり、無症候性の患者をスクリーニングするのに特に有用ではないため、研究者は、K-ras突然変異のための血清および排泄物の分析に方向転換し、後者が供給源材料の複雑さにより妨げられるため、前者が最も有望である。35~38、42において同上。さらに、転写因子タンパク質p53の血清レベルが、癌進行と同等であり得るため、p53は、可能な腫瘍マーカーとして同様に研究されている。37において同上; Jean et al., 17において上記。

20

【0027】

膵臓癌が診断された後に、処置の決定が、癌進行の段階を参照してなされる。多くの画像化手法が、膵臓癌を段階分類するために用いられ、コンピュータ断層撮影法(CT)が、これが癌の程度をしばしば過小評価するという事実にもかかわらず、現在一般に好まれる方法である。Harmeet Kaur et al., Pancreatic Cancer: Radiologic Staging, Pancreatic Cancer 86 (Douglas B. Evans et al. 編、2002)中; Ishiguchi, T. et al., Hepatology 48(40): 923-27 (2001)。その理由は、小さい容積の転移が、しばしばCTの分解能を超えているからである。H. J. Kim & K. C. Conlon, Laparoscopic Staging, Pancreatic Cancer 15 (Douglas B. Evans et al. 編、2002)中。MRIは、ある時点において、特に、(1)種々の組織を対比し、(2)パルス配列を改変して病変の視覚化を改善し、人為的結果を最小にし、(3)画像化を行う一方、患者のイオン化放射線への曝露を限定し、および(4)IVヨウ素化コントラスト試薬を用いずに管を視覚化するこの能力の観点から、CTに取って代わり得る。Kaur et al., 87において上記。しかし、現在、MRIは、CTにまさる明確な利点が例証されていない。Kim & Conlon, 116において上記。

30

40

【0028】

種々の超音波手法がまた、現在段階分類において用いられており、これには、経腹壁的超音波(TUS)、内視鏡的超音波(EUS)および手術中の超音波(IUS)が含まれ、EUSが、最も有望なものの1つである。Kaur et al., 86において上記; Richard A. Erickson, Endoscopic Diagnosis and Staging: Endoscopic Ultrasound, Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography, Pancreatic Cancer 97-106 (Douglas B. Evans et al. 編、2002)中。しかし、これらの手法は、各々種々の因子により制限される: TUSは、消化管中のガスおよび腹膜中の脂質により妨げられ、EUSには、超音波検査および内視鏡における顕著な経験が必要であり、広範囲には有用ではない場合があり、IUSは

50

、手術中で用いることができるに過ぎない。Kaur et al., 86において上記。

【0029】

初期の段階であるが、膵臓癌の段階分類を補助するマーカーについての探索は、ある可能な手掛かりを見出した。例えば、研究により、2種の転移抑制遺伝子、即ちnm23-H1およびKAI1が、膵臓癌の段階に依存して異なって発現され、これらの発現が、当該疾患の初期の段階において上方調節され、後期の段階において下方調節されることが、明らかになった。Friess, H. et al., J. Clin. Oncol. 19(9): 2422-32 (2001)。また、研究者は、遺伝子的リンパ節段階分類、特にK-rasプロトオンコジーンにおける突然変異の探索に集中した。Yamada, T. et al., Int'l J. Oncol. 16(6): 1165-71 (2000)。

10

【0030】

同様に、研究により、血漿/血清における突然変異したK-ras配列の存在が、後期の段階の膵臓癌に関連しているが、初期の段階の膵臓癌の存在を、このようにして同様に検出することができることが確認された。Sorenson, G.D., Clin. Cancer Res. 6(6): 2129-37 (2000)。マルチマーカー逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応アッセイを用いる有望な段階分類手法は、膵臓癌段階を、血液および組織試料を以下の腫瘍マーカーのmRNA発現についてアッセイすることにより成功に区別した： - ヒト絨毛性ゴナドトロピン遺伝子、肝細胞増殖因子レセプター遺伝子c-met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): 1037-44 (2000)。

20

【0031】

膵臓癌を段階分類するために一般的に用いられる1つの分類システムは、Union Internationale Contre le Cancer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. 編、第5版、1998)。このシステムは、いくつかの段階に分けられ、この各々は、一次腫瘍(T)、領域性リンパ節(N)および遠隔転移(M)に関して、癌増殖の程度を評価する。同上。

【0032】

段階0は、インサイチュでの癌腫により特徴づけられ(Tis)、領域性リンパ節転移はなく(N0)、遠隔転移はない(M0)。113において同上。段階IおよびIIは、段階0と、腫瘍の区分の観点においてのみ異なる：段階Iは、(1)最大の寸法で2cmもしくはこれ以下(T1)または(2)最大の寸法で2cmを超える(T2)のいずれかである膵臓のみに限定される腫瘍を含み、一方段階IIは、十二指腸、胆管または膵周囲組織中に直接拡大する腫瘍を含む(T3)。同上。段階IIIは、腫瘍区分T1、T2またはT3；領域性リンパ節転移(N1)を含み、これは、単一のリンパ節(pN1a)または複数のリンパ節(pN1b)のいずれかを含み；遠隔転移を含まない(M0)。段階IVAは、胃、脾臓、結腸または隣接する大きい管中への直接的な腫瘍拡大(T4)；すべてのN区分により特徴づけられ；遠隔転移を含まない(M0)。最後に、段階IVBは、すべてのT区分、すべてのN区分および遠隔転移(M1)により特徴づけられる。同上。

30

【0033】

癌を段階分類した後に、疾患のための唯一の一貫して有効な処置は、手術であり、10~15パーセントの患者が、有効に治癒的な切除を受けることができるに過ぎない。Jean et al., 15において上記；Fleming et al. 編、111において上記；William F. Regine, Postoperative Adjuvant Therapy: Past, Present, and Future Trial Development, Pancreatic Cancer 235 (Douglas B. Evans et al. 編、2002)中。さらに、切除を受けた患者の5年生存率は、20パーセントよりも低い。Regine, 235において上記。化学療法剤、例えばゲムシタピン(gemcitabine)および5-フルオロウラシルは、膵臓癌腫に対するある有効性を示した一方、現実には、化学療法により、膵臓癌からの生存に対してほとんど影響が示されていない。Burdette, 101において上記。放射線療法により、この効能に関して矛盾する結果が得られた。同上。しかし、5-フルオロウラシルと組み合わせ

40

50

ての放射線により、ある展望が示された。Regine, 235において上記。

【0034】

膵臓癌の処置における慣用の手法の欠点の観点において、分子生物学の手法を用いる多くの新規な方法が、検査された。顕著な研究が、遺伝子療法の領域において行われ、これには、アンチセンス手法、遺伝子に向けられたプロドラッグ活性化方法、プロモーター遺伝子方法および腫瘍退縮性ウイルス療法が含まれる。Eugene A. Choi & Francis R. Spitz, *Strategies for Gene Therapy, Pancreatic Cancer* 331 (Douglas B. Evans et al. 編、2002)中; Kasuya, H. et al., *Hepatogastroenterology* 48(40): 957-61 (2001)。他の最近の方法は、マトリックスメタロプロテイナーゼ、即ち基底膜の分解による腫瘍細胞の転移および侵入を容易にする酵素の阻害並びに腫瘍周囲間質分解および血管新生におけるこれらの作用に集中した。Alexander S. Rosemurgy, II & Mahmudul Haq, *Role of Matrix Metalloproteinase Inhibition in the Treatment of Pancreatic Cancer, Pancreatic Cancer* 369 (Douglas B. Evans et al. 編、2002)中。

10

【0035】

上記のことから、膵臓癌の再発を検出、診断、モニタリング、段階分類、予見および防止するために用いられる手順は、患者の結果に臨界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、感受性、侵襲性および/またはこれらの費用により制限される。このように、最小の侵襲性を伴って、および合理的な費用において、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作用する、高度に特異的な、および感受性の手順は、高度に望ましい。

20

【0036】

従って、人が膵臓癌を発生する傾向があるか否かを予測するための、膵臓癌を診断するための、疾患の進行をモニタリングするための、膵臓癌を段階分類するための、膵臓癌が転移したか否かを決定するための、膵臓癌を画像化するための、および膵臓癌の一層良好な処置のための、一層感受性であり、正確な方法についての大きな必要性がある。

【0037】

直腸結腸癌

直腸結腸癌は、米国において2番目に一般的な癌死亡の原因であり、男性および女性の両方において3番目に一般的な癌である。M. L. Davila & A. D. Davila, *Screening for Colon and Rectal Cancer, Colon and Rectal Cancer* 47 (Peter S. Edelstein編、2000)中。アメリカ癌協会は、2004年に米国のみにおいて、結腸癌の約106,370の新たな症例および直腸癌の40,570の新たな症例があると見積もっている。結腸癌および直腸癌は、合計で米国で約56,730人の死者をもたらしている。ACSウェブサイト: cancer with the extension .org of the world wide web。直腸結腸癌のほとんどすべての症例は、腺腫様ポリープから生じ、このいくつかは、大きいポリープに成熟し、異常な増殖および発育を受け、最終的には癌に進行する。55~56においてDavila。この進行は、ほとんどの患者において少なくとも10年を要すると見られ、癌が局所化している際に、早期に診断された場合に、これが癌の容易に処置可能な形態となる。56においてDavila; Walter J. Burdette, *Cancer: Etiology, Diagnosis, and Treatment* 125 (1998)。

30

40

【0038】

直腸癌の病因論の本発明者らの理解は、連続的な改良を受けているが、この領域における広範囲の研究により、年齢、遺伝的および非遺伝的状态を含む因子と、環境的/食事性因子との組み合わせが指摘されている。年齢は、直腸結腸癌の発生における重要な危険因子であり、48においてDavila、40歳を超える年齢の男性および女性は、当該癌にますます感受性となる。126においてBurdette。発生率は、生涯の各々のその後の10年において顕著に増大する。48においてDavila。多くの遺伝的および非遺伝的状态はまた、直腸結腸癌の発生の上昇した危険と関連づけられ、これには、家族性腺腫様ポリープ症(FAP)、遺伝性非ポリープ症直腸結腸癌(リンチ(Lynch)症候群またはHNPCC)、

50

直腸結腸癌もしくは腺腫様ポリープの個人的および／または家族的な履歴、炎症性腸疾患、真性糖尿病および肥満が含まれる。47において同上；Henry T. Lynch & Jane F. Lynch, Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndromes), Colon and Rectal Cancer 67-68 (Peter S. Edelstein編、2000)中。

【0039】

直腸結腸癌の増大した危険に関連する環境的／食事性因子には、高脂肪の食事、高い食事性赤肉の摂取および座りがちな生活習慣が含まれる。47においてDavila; Reddy, B. S., Prev. Med. 16(4): 460-7 (1987)。逆に、直腸結腸癌の低下した危険と関連する環境的／食事性因子には、繊維、葉酸、カルシウムの高い食事および閉経後の女性におけるホルモン置換療法が含まれる。50～55においてDavila。結腸癌の危険の低下における酸化防止剤の効果は、明確ではない。53においてDavila。

10

【0040】

結腸癌は、初期の局所的な段階において検出された際には、高度に処置可能であり、スクリーニングは、50歳において開始するすべての成人、特に直腸結腸癌との最初の程度の関連を有する成人のための常習的なケアの一部でなければならない。直腸結腸癌スクリーニングの、他のタイプの癌におけるこの対応物にまさる1つの主な利点は、この前癌病変を検出するのみならず、これらを同様に除去する能力である。56においてDavila。今日用いるにあたり重要な直腸結腸癌スクリーニング試験は、糞便潜血検査、S字結腸鏡検査、大腸鏡検査、二重コントラストバリウム浣腸および癌胎児抗原（CEA）試験である。125においてBurdette；56においてDavila。

20

【0041】

糞便潜血検査（FOBT）は、直腸結腸癌を、排泄物中の血液の量を検出することによりスクリーニングし、この前提は、新生物組織、特に悪性組織が、典型的な粘膜よりも多量に出血しており、出血の量が、ポリープの大きさおよび癌の段階に伴って増大することである。初期の段階の腫瘍の検出において有効である一方、FOBTは、腺腫様ポリープ（前悪性病変）を検出することができず、糞便試料の内容物に依存して、偽りの陽性を生じやすい。56～59においてDavila。S字結腸鏡検査および大腸鏡検査は、対照的に、腸の直接的な視覚化を可能にし、腺腫様ポリープを検出し、生検し、除去することを可能にする。59～60、61においてDavila。

【0042】

これらの手順の利点にもかかわらず、随伴する弱点がある：S字結腸鏡検査は、定義により、S字結腸およびこれより下に限定され、大腸鏡検査は、比較的高価な手順であり、両方は、可能な腸穿孔および出血の危険を共有している。59～60においてDavila。二重コントラストバリウム浣腸（DCBE）は、FOBTよりも良好な、およびほぼ大腸鏡検査と同等に良好な病変の検出を可能にするが、これは、曲がりくねった直腸S状部領域の評価に限定され得る。60においてDavila。癌胎児抗原についての血液のスクリーニングを伴うCEA血液試験は、これが、初期の段階における直腸結腸癌を検出するにあたり有用性が限定されている点で、FOBTの弱点を共有する。125においてBurdette。

30

【0043】

結腸癌が診断された後に、処置の決定は、典型的には、癌進行の段階を参照してなされる。多くの手法が、癌を段階分類するために用いられ（このいくつかはまた、結腸癌についてスクリーニングするために用いられる）、これには、切除した結腸の病理学的試験、S字結腸鏡検査、大腸鏡検査および種々の画像化手法が含まれる。AJCC Cancer Staging Handbook 84 (Irvin D. Fleming et al.編、第5版、1998)；Montgomery, R. C. and Ridge, J.A., Semin. Surg. Oncol. 15(3): 143-150 (1998)。さらに、胸フィルム、肝臓機能試験および肝臓走査を用いて、転移の程度を決定する。84においてFleming。

40

【0044】

コンピュータ断層撮影法および磁気共鳴画像化が、直腸結腸癌をこの一層後期の段階において段階分類するにあたり有用である一方、両方は、両方の方法が、（1）腸壁腫瘍浸潤の深さを明らかにし、（2）悪性の腺症を診断するにあたり有する困難のために、疾患

50

の初期の段階を同定するための許容不能に低い段階分類精度を有する。Thoeni, R. F., Radiol. Clin. N. Am. 35(2): 457-85 (1997)。むしろ、経直腸的超音波 (T R U S) などの手法が、この状況において好ましいが、この手法は、転移を含み得る小さいリンパ節を検出することに関しては、不正確である。David Blumberg & Frank G. Opelka, Neoadjuvant and Adjuvant Therapy for Adenocarcinoma of the Rectum, Colon and Rectal Cancer 316 (Peter S. Edelstein編、2000)中。

【 0 0 4 5 】

いくつかの分類システムは、直腸結腸癌の程度を段階分類するために考案されており、これには、デューク (Duke) のシステムおよび一層詳細には国際対癌連合 - 対癌米国合同委員会 T N M 段階分類システムが含まれ、これは、当該分野における多くにより一層有用な段階分類システムであると考慮されている。1 2 6 ~ 2 7 においてBurdette。臨床的または病理学的段階分類のいずれかのために用いられる T N M システムは、4 つの段階に分けられており、この各々は、一次腫瘍 (T)、領域性リンパ節 (N) および遠隔転移 (M) に関して、癌増殖の程度を評価する。8 4 ~ 8 5 においてFleming。このシステムは、腸壁中への腫瘍の侵入、隣接する構造の侵入の程度、冒された領域性リンパ節の数および遠隔転移が生じるか否かに集中している。8 1 においてFleming。

【 0 0 4 6 】

段階 0 は、インサイチュでの癌腫により特徴づけられ (T i s)、ここで、癌細胞は、腺性基底膜 (上皮内) または固有層 (粘膜内) の内側に位置する。この段階において、癌は、領域性リンパ節に拡散せず (N 0)、遠隔転移はない (M 0)。段階 I において、癌の領域性リンパ節への拡散および遠隔転移は尚ないが、腫瘍は、粘膜下に浸潤しているか (T 1) またはさらに進行して、筋固有層に浸潤している (T 2)。段階 I I はまた、癌の領域性リンパ節への拡散および遠隔転移を伴わないが、腫瘍は、漿膜下組織または腹膜に覆われていない結腸周囲もしくは直腸周囲組織に浸潤している (T 3) か、あるいは進行して、他の器官または構造に浸潤しており、および / または臓側腹膜を穿孔している (T 4)。段階 I I I は、T 従属段階のいずれか、遠隔転移がないことおよび 1 ~ 3 個の領域性リンパ節における転移 (N 1) または 4 個もしくは 5 個以上の領域性リンパ節における転移 (N 2) のいずれかにより特徴づけられる。最後に、段階 I V は、T または N 従属段階のいずれかおよび遠隔転移を伴う。8 4 ~ 8 5 においてFleming; 1 2 7 においてBurdette。

【 0 0 4 7 】

現在、結腸癌の病理学的段階分類は、病理学的分類により一層正確な予見が得られるため、臨床的段階分類にまさって好ましい。病理学的段階分類は、典型的には、切除された結腸切片の試験および腹腔の手術的試験を伴う。8 4 においてFleming。臨床的段階分類は、これが、少なくとも病理学的段階分類と同等に正確であるとしたら、段階分類の好ましい方法である。その理由は、これが、この対応物の侵入手順に依存しないからである。

【 0 0 4 8 】

直腸結腸癌の処置に転じて、手術的切除の結果、約 5 0 % の患者についての治癒がもたらされる。照射は、直腸結腸癌の処置において術前および術後の両方で用いられる。化学療法剤、特に 5 - フルオロウラシルはまた、直腸結腸癌の処置における強力な武器である。他の剤には、イリノテカン (irinotecan) およびフロクスリジン (floxuridine)、シスプラチン (cisplatin)、レバミソール (levamisole)、メトトレキセート (methotrexate)、インターフェロン - およびロイコボリン (leucovorin) が含まれる。1 2 5、1 3 2 ~ 3 3 においてBurdette。しかし、3 0 ~ 4 0 % の患者は、手術的切除の後に結腸癌の再発を生じ、これは、多くの患者において死の最終的な原因である。Wayne De Vos, Follow-up After Treatment of Colon Cancer, Colon and Rectal Cancer 225 (Peter S. Edelstein編、2000)。従って、結腸癌患者を、密接にモニタリングして、療法への応答を決定し、持続性の、または再発性の疾患および転移を検出しなければならない。

【 0 0 4 9 】

次のいくつかの段落は、結腸癌の分子的な基礎のいくつかを記載する。F A P の場合に

において、5q21に染色体的に配置された腫瘍抑制遺伝子APC（大腸腺腫様ポリポシス）は、突然変異により不活性化または欠失されている。Alberts et al., Molecular Biology of the Cell 1288（第3版、1994）。APCタンパク質は、細胞付着、アポトーシスおよびc-myc発癌遺伝子の抑圧を含む、多くの機能において作用を奏する。N. R. Hall & R. D. Madoff, Genetics and the Polyp-Cancer Sequence, Colon and Rectal Cancer 8 (Peter S. Edelstein編、2000)。直腸結腸癌を有し、正常なAPC遺伝子を有する患者の中で、65%を超える比率が、癌細胞においてこのような突然変異を有するが、他の組織においては有しない。Alberts et al., 1288において上記。HPNCCの場合において、患者には、腫瘍抑制遺伝子HPNCCにおける異常が現れるが、約15%の腫瘍のみが、突然変異した遺伝子を含む。同上。他の遺伝子のホストはまた、直腸結腸癌 10
 に関係しており、これには、K-ras、N-ras、H-rasおよびc-myc発癌遺伝子、並びに腫瘍抑制遺伝子DCC（結腸癌腫において欠失している）およびp53が含まれる。Hall & Madoff, 8~9において上記；Alberts et al., 1288において上記。

【0050】

Wg/Wntシグナル伝達経路における異常はまた、直腸結腸癌腫の発生に関連している。Taipale, J. and Beachy, P.A. Nature 411: 349-354 (2001)。Wnt1は、マウス乳腺癌内で、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)遺伝子中へのこの挿入により最初に同定された、分泌されたタンパク質遺伝子である。このタンパク質は、ショウジョウバエの翼を有しない(Wg)遺伝子産物に相同的であり、ここで、これは、背側-腹側分節化の 20
 決定のための重要な因子として機能し、ハエ成虫原基の形成を調節する。Wg/Wnt経路は、細胞増殖、死および分化を制御する。Taipal (2001)。Wnt族には、少なくとも13個の要素がある。これらのタンパク質は、主に脊椎動物の中樞神経経(CNS)並びに他の組織、例えば乳腺および腸において発現されることが見出された。Wntタンパク質は、ショウジョウバエにおけるFrizzled遺伝子産物に関連する7つの膜透過ドメインレセプターの族についてのリガンドである。

【0051】

WntをFrizzledに結合させると、下流の標的であるDisheveledの活性が刺激され、これは次に、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 (GSK3) を不活性化させる。Taipal (2001)。通常、活性なGSK3は、大腸腺腫様ポリポシス(APC)タンパク質と 30
 複合体を形成し、他の複合体要素であるβ-カテニンをホスホリル化する。ホスホリル化された後に、β-カテニンは、ユビキチン経路による分解に向けられる。GSK3またはAPC活性が下方調節された際に、β-カテニンは、細胞質中に蓄積され、転写因子のT細胞因子またはリンパ球励起因子(Tcf/Lef)族に結合する。β-カテニンのTcfへの結合により、転写抑圧が放出され、遺伝子転写が誘発される。β-カテニンにより調節された遺伝子の中には、転写リプレッサーEngrailed、形質転換増殖因子-1 (TGF-β) 族要素DecapentaplegicおよびショウジョウバエにおけるサイトカインHedgehogがある。β-カテニンはまた、β-カテニンおよびE-カドヘリンに結合することにより、細胞付着の調節に関与する。

【0052】

他方、β-カテニンのこれらのタンパク質への結合により、細胞質β-カテニンレベル およびこのTCFとの複合が制御される。Taipal (2001)。c-srcまたはv-srcの増殖因子刺激および活性化により、また、β-カテニンレベルが、β-カテニンおよび 40
 この関連するタンパク質であるp120^{cas}のホスホリル化により調節される。ホスホリル化された際に、これらのタンパク質は、E-カドヘリンおよびβ-カテニンへのこれらの結合が低減し、細胞質β-カテニンの蓄積がもたらされる。Reynolds, A.B. et al. Mol. Cell Biol. 14: 8333-8342 (1994)。結腸癌において、c-src酵素活性は、v-srcのレベルに対して増大することが示された。Wg/Wnt経路における成分の変化により、直腸結腸癌腫の発生が促進される。

【0053】

10

20

30

40

50

最もよく知られている変更は、A P C 遺伝子に対してである。Nicola S et al. Hum. Mol. Genet 10:721-733 (2001)。この生殖系列突然変異は、大腸における数百～数千の腺腫様ポリープの出現を生じる。常染色体性に優性に遺伝した F A P および関連する症候群の原因となるのは、遺伝子欠損である。この経路において生じる分子変化は、腫瘍抑制遺伝子、例えば A P C、p 5 3 および直腸結腸癌における欠失 (D C C) の対立遺伝子の欠失、これと組み合わせてプロトオンコジーン、特に c - K i - r a s の突然変異活性化に大いに関与する。Aoki, T. et al. Human Mutat. 3: 342-346 (1994)。これらのすべてにより、直腸結腸癌におけるゲノム不安定性がもたらされる。

【 0 0 5 4 】

直腸結腸癌におけるゲノム不安定性の他の供給源は、D N A ミスマッチ修復 (M M R) 遺伝子の欠失である。細菌における D N A ミスマッチ修復に関与する、細菌 m u t H L S 複合体のヒト相同体 (h M S H 2、h M L H 1、h P M S 1、h P M S 2 および h M S H 6) は、突然変異した際に、H N P C C (約 7 0 ~ 9 0 % の H N P C C) を生じることが示されている。Modrich, P. and Lahue, R. Ann Rev. Biochem. 65: 101-133 (1996) ; および Peltomaeki, P. Hum. Mol. Genet 10: 735-740 (2001)。これらのタンパク質の不活性化により、突然変異の蓄積がもたらされ、ゲノム中に散在する反復性のモノ、ジ、トリ およびテトラヌクレオチド繰り返しの正確な複製における誤りを表す遺伝子不安定性 (マイクロサテライト領域) が生じる。Jass, J.R. et al. J. Gastroenterol Hepatol 17: 17-26 (2002)。古典的な F A P におけるように、c - K i - r a s の突然変異活性化はまた、代替の H N P C C における M S I の促進に必要である。他のタンパク質における突然変異、例えば腫瘍抑制タンパク質ホスファターゼ P T E N (Zhou, X.P. et al. Hum. Mol. Genet 11: 445-450 (2002))、B A X (Buttler, L.M. Aus. N. Z. J. Surg. 69: 88-94 (1999))、カスパーゼ - 5 (Planck, M. Cancer Genet Cytogenet. 134: 46-54 (2002))、T G F - R I I (Fallik, D. et al. Gastroenterol Clin Biol. 24: 917-22 (2000)) および I G F I I - R (Giovannucci E. J. Nutr. 131: 3109S-20S (2001)) はまた、場合によっては M M R 欠陥の原因と同様に、いくつかの直腸結腸腫瘍において見出されている。

【 0 0 5 5 】

数種のチロシンキナーゼは、直腸結腸腫瘍組織または細胞系列、例えば H T 2 9 において上方調節されることが示された。Skoudy, A. et al. Biochem J. 317 (Pt 1): 279-84 (1996)。局所接着キナーゼ (F A K) 並びに結腸上皮細胞中のこの上流のキナーゼ c - s r c および c - y e s は、細胞外マトリックス (E C M) およびインテグリン媒介シグナリング経路により、直腸結腸癌の促進において重要な作用を奏し得る。Jessup, J.M. et al., The molecular biology of colorectal carcinoma, The Molecular Basis of Human Cancer, 251-268 (Coleman W.B. and Tsongalis G.J. 編、2002) 中。c - s r c / F A K 複合体の形成により、V E G F 発現およびアポトーシス阻害が協調的に脱調節され得る。最近の根拠は、インテグリン関与に関係する細胞生存のための特異的なシグナル形質導入経路が、F A K 活性化をもたらし、従って P I - 3 キナーゼおよび a k t を活性化することを示唆する。次に、a k t は、B A D をホスホリル化し、上皮細胞におけるアポトーシスを遮断する。結腸癌における c - s r c の活性化により、V E G F 発現が、低酸素経路により誘発され得る。直腸結腸癌に関係し得る他の遺伝子には、C o x 酵素 (Ota, S. et al. Aliment Pharmacol. Ther. 16 (Suppl 2): 102-106 (2002))、エストロゲン (al-Azawi, F. and Wahab, M. Climacteric 5: 3-14 (2002))、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター - (P P A R -) (Gelman, L. et al. Cell Mol. Life Sci. 55: 932-943 (1999))、I G F - I (Giovannucci (2001))、チミン D N A グリコシラーゼ (TDG) (Hardeland, U. et al. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 68: 235-253 (2001)) および E G F (Mendelsohn, J. Endocrine-Related Cancer 8: 3-9 (2001)) が含まれる。

【 0 0 5 6 】

遺伝子欠失および突然変異は、直腸結腸癌の発生の唯一の原因ではない。D N A メチル化による後成的なサイレンシングはまた、直腸結腸癌抑制遺伝子の機能の損失の原因である。M S I と C p G アイランドメチル化との間の強力な関連は、高い M S I を有する孤発

10

20

30

40

50

性直腸結腸癌において良好に特徴づけられているが、遺伝性起源のものにおいては特徴づけられていない。1つの実験において、MLH1、CDKN2A、MGMT、THBS1、RARβ、APCおよびp14ARF遺伝子のDNAメチル化は、それぞれ80%、55%、23%、23%、58%、35%および50%の、高いMSIを有する40種の孤発性直腸結腸癌において示された。Yamamoto, H. et al. *Genes Chromosomes Cancer* 33: 322-325 (2002); およびKim, K.M. et al. *Oncogene*. 12;21(35): 5441-9 (2002)。発癌物質代謝酵素、例えばGST、NAT、CYPおよびMTHFRはまた、増大したかまたは低下した直腸結腸癌の危険と関連する。Pistorius, S. et al. *Kongressbd Dtsch Ges Chir Kongr* 118: 820-824 (2001); およびPotter, J.D. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 916-932 (1999)。

10

【0057】

上記のことから、直腸結腸癌の再発を検出、診断、モニタリング、段階分類、予見および防止するために用いられる手順は、患者の結果に臨界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、感受性、侵襲性および/またはこれらの費用により制限される。このように、最小の侵襲性を伴って、および合理的な費用において、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作用する、高度に特異的な、および感受性の手順は、高度に望ましい。

【0058】

従って、人が直腸結腸癌を発生する傾向があるか否かを予測するための、直腸結腸癌を診断するための、疾患の進行をモニタリングするための、直腸結腸癌を段階分類するための、直腸結腸癌が転移したか否かを決定するための、および直腸結腸癌を画像化するための、一層感受性であり、正確な方法についての大きな必要性がある。正確な診断に続いて、直腸結腸癌の一層侵襲性でない、および一層有効な処置についての必要性がまたある。

20

【0059】

癌における血管新生

固体腫瘍の増殖および転移はまた、血管新生に依存する。Folkman, J., 1986, *Cancer Research*, 46, 467-473; Folkman, J., 1989, *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 4-6。例えば、2mmより大きく拡大する腫瘍は、これら自体の血液供給を得なければならず、新たな毛細血管の成長を誘発することにより、血液供給を得ることが示されている。これらの新たな血管が、腫瘍中に包埋された後に、これらは、腫瘍が、循環に進入し、遠隔の部位、例えば肝臓、肺または骨に転移するための手段を提供する。Weidner, N., et al., 1991, *The New England Journal of Medicine*, 324(1), 1-8。

30

【0060】

在来の血管からの新たな血管の成長または出現として定義される血管新生は、主に胚発生の間に発生する複雑なプロセスである。このプロセスは、血管に存在する新たな内皮細胞が、幹細胞から分化するよりはむしろ在来の細胞の増殖から生じるという点で、血管形成とは別個である。このプロセスは、侵襲性であり、細胞外マトリックス(ECM)のタンパク質分解、新たな内皮細胞の移動、および新たなマトリックス成分の合成に依存する。血管新生は、循環系の胚形成の発生の間に生じる; しかし、成人のヒトにおいて、血管新生は、病理学的状態への応答として発生するに過ぎない(女性における生殖周期の間を除く)。

40

【0061】

成人における正常な生理学的条件の下で、血管新生は、極めて限定された状況、例えば毛髪成長および創傷治癒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、内皮細胞の移動する柱の形成をもたらす刺激により進行する。タンパク質分解活性は、この「血管の出現」の進行する先端に集中しており、これは、ECMを、細胞の柱が、浸潤し、移動するのを可能にするのに十分破壊する。進行する先端の後方で、内皮細胞は、分化し、互いに接着を開始し、従

50

って新たな基底膜を形成する。次に、細胞は、増殖を停止し、最終的に新たな細動脈または毛細管のための管腔を定める。

【0062】

調節されていない血管新生は、次第に、癌、心血管疾患、関節リウマチ、乾癬および糖尿病性網膜症を含むがこれらには限定されない広範囲の障害の原因となると認識されている。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.

【0063】

特に興味深いのは、血管新生が、これらの成長および転移のために固体腫瘍により必要とされているという観察である。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、単一の異常な細胞として開始し、これは、有用な毛細管床からの距離により、数立方ミリメートルの大きさのみに増殖することができ、これは、長い期間にわたり、さらに増殖および内転移せずに「休眠中の」ままであり得る。次に、いくつかの腫瘍細胞は、血管新生表現型に切り替わって、内皮細胞を活性化し、これは増殖し、新たな毛細血管に成熟する。これらの新たに形成した血管は、一次腫瘍の継続的な増殖を可能にするのみならず、転移性腫瘍細胞の内転移および再コロニー形成(recolonization)をも可能にする。血管新生の切り替えを制御する正確な機構は、良好に理解されていないが、腫瘍本体の新血管新生は、多数の血管新生刺激因子および阻害剤の正味の均衡から生じていると考えられる。Folkman, 1995, 上記。

【0064】

最も有効な血管新生阻害剤の1種は、O'ReillyおよびFolkmanにより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):3 15-28. この発見は、ある一次腫瘍が、遠隔転移の増殖を阻害し得るという現象に基づいていた。O'ReillyおよびFolkmanは、一次腫瘍が、過剰の阻害剤中で血管新生刺激因子を発生することにより、血管新生を開始すると仮定した。しかし、血管新生阻害剤は、循環におけるこれらの比較的長い半減期により、過剰の刺激因子中で二次腫瘍の部位に到達する。正味の結果は、一次腫瘍の増殖および二次腫瘍の阻害である。エンドスタチンは、一次腫瘍により産生されたこのような血管新生阻害剤の増殖する列挙の1つである。これは、比較的大きいタンパク質のタンパク質分解断片である：エンドスタチンは、コラーゲンXVIIII(マウスコラーゲンXVIIII中のアミノ酸H1132~K1315)の20kDa断片である。エンドスタチンは、インビトロで内皮細胞増殖を特異的に阻害し、インビボで血管新生を遮断することが示された。

【0065】

さらに重要なことに、エンドスタチンを、腫瘍を有するマウスに投与することにより、顕著な腫瘍退行がもたらされ、毒性または薬剤耐性は、複数の処置サイクルの後にさえも観察されなかった。Boehm et al., 1997, *Nature* 390(6658):404-407. エンドスタチンが遺伝子的に安定な内皮細胞を標的し、種々の固体腫瘍を阻害するという事実により、これが、抗癌療法のための極めて魅力的な候補となる。Fidler and Ellis, 1994, *Cell* 79(2):185-8; Gastl et al., 1997, *Oncology* 54(3):177-84; Hinsbergh 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た際に、一層有効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.

【0066】

本発明は、慣用の治療方法の制限を克服し、以下の詳細な記載から明らかである追加の利点を提供する、卵巣癌、膵臓癌および結腸癌を処置する代替の方法を提供する。

【0067】

発明の概要

本発明は、インビボで哺乳動物細胞上のO v r 1 1 5に結合する、単離されたO v r 1 1 5抗体に関する。本発明はさらに、インビボで哺乳動物細胞上のO v r 1 1 5に結合すると内部移行する、単離されたO v r 1 1 5抗体に関する。当該抗体は、モノクローナル抗体であってもよい。あるいはまた、抗体は、抗体断片またはキメラもしくはヒト化抗体である。モノクローナル抗体は、アメリカンタイプカルチャーコレクション受託番号PTA-5202、PTA-5916、PTA-5917、PTA-5918、PTA-5919およびPTA-5920の下で寄託されたハイブリドーマの群から選択されたハイブリドーマにより産生され得る。本発明は、さらに、O v r 1 1 5活性を阻害する単離されたO v r 1 1 5抗体に関する。好ましくは、O v r 1 1 5活性は、プロテアーゼ活性である。

【0068】

10

抗体は、アメリカンタイプカルチャーコレクション受託番号PTA-5202、PTA-5916、PTA-5917、PTA-5918、PTA-5919およびPTA-5920の下で寄託されたハイブリドーマの群から選択されたハイブリドーマにより産生されたモノクローナル抗体により結合された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。

【0069】

本発明はまた、結合した抗体に関する。これらは、増殖阻害剤または細胞毒性剤に結合することができる。細胞毒性剤は、毒素、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素および毒素からなる群から選択され得る。毒素の例には、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)が含まれるが、これらには限定されない。

20

【0070】

哺乳動物細胞は、癌細胞であってもよい。好ましくは、抗O v r 1 1 5モノクローナル抗体は、インビボでのO v r 1 1 5発現癌細胞の増殖を阻害する。

抗体は、細菌中で産生され得る。あるいはまた、抗体は、ATCC受託番号PTA-5202、PTA-5916、PTA-5917、PTA-5918、PTA-5919およびPTA-5920を有するハイブリドーマの群から選択されたハイブリドーマにより産生された抗O v r 1 1 5抗体のヒト化された形態であってもよい。

【0071】

好ましくは、癌は、卵巣癌、膵臓癌および結腸癌からなる群から選択されている。本発明はまた、抗体を産生する方法であって、適切な細胞を培養することおよび該抗体を該細胞培養物から回収することを含む、前記方法に関する。

30

本発明はまた、抗体および担体を含む組成物に関する。抗体は、細胞毒性剤に結合することができる。細胞毒性剤は、放射性同位体または他の化学療法剤であってもよい。

【0072】

本発明はまた、O v r 1 1 5発現癌細胞を死滅させる方法であって、該癌細胞を、本発明の抗体と接触させ、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。癌細胞を、卵巣癌細胞、膵臓癌細胞および結腸癌細胞からなる群から選択することができる。

【0073】

卵巣癌、膵臓癌または結腸癌は、卵巣漿液腺癌および結腸腺癌または転移性癌を含む、卵巣上皮癌、膵臓上皮癌または結腸上皮癌であってもよい。

40

本発明はまた、哺乳動物におけるO v r 1 1 5発現癌を寛解する方法であって、治療的に有効な量の抗体を該哺乳動物に投与することを含む、前記方法に関する。

【0074】

さらに、本発明は、容器およびこの中に含まれた組成物を含む製造品であって、該組成物が、本明細書中に記載した抗体を含む、前記製造品に関する。この製造品はまた、追加の成分、例えば組成物を用いて、卵巣癌、膵臓癌および結腸癌を処置することができることを示す添付文書を含むことができる。

【0075】

発明の詳細

50

定義および一般的手法

本明細書中で用いる、ヒト「Ovr115」は、細胞表面上で糖タンパク質として発現され、このヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列が、例えばWO 00/12758-A1、癌特異性遺伝子(CSG)Ovr115(クローンID 1283171); WO 99/36550-A2、ヒトプロテアーゼHUPM-6; WO 01/04141-A2、ヒトセリパンクリン(seripancrin) cDNA; およびWO 00/12708-A2、ヒトPRO1570(UNQ776) cDNA配列(当該公報中の配列番号: 274)中に開示されている通りである、435個のアミノ酸のタンパク質を意味する。Ovr115はまた、REFSEQデータベースにおいて: NM_019894.2 (GI: 34304348) ヒト膜貫通プロテアーゼ、セリン4 (TMPRSS4)、転写物変種1、mRNAとして開示されている。REFSEQは、TMPRSS4(Ovr115)の以下の要約を示す:

【0076】

「この遺伝子は、セリンプロテアーゼ族の要素をコードする。セリンプロテアーゼ類は、種々の生物学的プロセスに関与することが知られており、この機能不全は、しばしばヒト疾患および障害をもたらす。この遺伝子は、膵臓癌腫において過剰発現される遺伝子として同定された。コードされたタンパク質は、N末端アンカー配列およびセリンプロテアーゼドメインを含むグリコシル化細胞外領域と膜結合性である。」

【0077】

Ovr115のアミノ酸52~435は、細胞表面上に位置する。本明細書中で用いるOvr115は、Ovr115生物学的活性を有するタンパク質の対立形質変種および保存的置換突然変異体を含む。

【0078】

ヒト膜貫通プロテアーゼ、セリン4 (TMPRSS4)は、前に新規な膜貫通セリンプロテアーゼ(TMPRSS3)として同定された。Wallrapp et al., 膵臓癌において過剰発現された新規な膜貫通セリンプロテアーゼ(TMPRSS3)、Cancer Res. 60(10):2602-6 (2000)。Ovr115が一層攻撃的な卵巣癌、膵臓癌および結腸癌と明らかに関連しているという本発明者らの発見により、この細胞表面抗原が、これらのおよび場合によっては他の腫瘍のタイプの免疫療法のための魅力的な標的となる。

【0079】

本明細書中で用いる用語「抗体」(Ab)は、これらが所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多選択性抗体(例えば二重選択性抗体)および抗体断片を含む。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。

【0080】

「単離された抗体」は、この天然の環境の成分から同定され、分離され、および/または回収されたものである。この天然の環境の汚染された成分は、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むことができる。好ましくは、抗体を、(1)ローリー法により決定して、95重量%より高い、および最も好ましくは99重量%より高い抗体に、(2)回転カップ配列決定装置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、または(3)SDS-PAGEにより、クマジーブルーもしくは好ましくは銀染色を用いて、還元もしくは非還元条件の下で、均一に精製する。単離された抗体は、抗体の天然の環境の少なくとも1種の成分が存在しないため、組換え細胞内にインサイチュの抗体を含む。しかし、通常、単離された抗体は、少なくとも1つの精製段階により調製される。

【0081】

塩基性4鎖抗体単位は、2つの同一な軽(L)鎖および2つの同一な重(H)鎖から構成されている、ヘテロ四量体糖タンパク質である(IgM抗体は、J鎖と呼ばれる追加のポリペプチドと共に5つの塩基性ヘテロ四量体単位からなり、従って、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、J鎖と共に2~5個の塩基性の4

10

20

30

40

50

鎖単位を含む多価の集合を形成することができる)。IgG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、H鎖に、1つの共有ジスルフィド結合により結合しており、一方2つのH鎖は、互いに、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。各々のH鎖は、N末端において、可変ドメイン(VH)、続いて、 C_H および C_H 鎖の各々について3つの定常ドメイン(C_H)並びに μ および λ アイソタイプについて4つの C_H ドメインを有する。各々のL鎖は、N末端において可変ドメイン(VL)、続いてこの他方の末端において定常ドメイン(C_L)を有する。

【0082】

VLは、VHと共に整列し、CLは、重鎖の第1の定常ドメイン(C_H)と共に整列する。特定の amino 酸残基は、軽鎖および重鎖可変ドメインの間で界面を形成すると考えられる。VHおよびVLの一緒の対形成により、単一の抗原結合部位が形成する。種々の群の抗体の構造および特性について、例えば、Basic and Clinical Immunology, 第8版、Daniel P. Stites, Abba I. Teff and Tristram G. Parslow (編)、Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁および6章を参照。

【0083】

すべての脊椎動物種からのL鎖を、これらの定常ドメインの amino 酸配列に基づいて、カッパおよびラムダと呼ばれる2つの明確に別個のタイプの1つに割り当てることができる。これらの重鎖(C_H)の定常ドメインの amino 酸配列に依存して、免疫グロブリンを、種々の群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つの群があり：IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM、それぞれ γ 、 δ 、 ϵ 、および μ と示される重鎖を有する。および λ 群は、さらに、 C_H 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、従属群に分けられ、例えばヒトは、以下の従属群を表す：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2。

【0084】

用語「可変」は、可変ドメインのあるセグメントが、抗体間の配列において、大きく異なるという事実を意味する。Vドメインは、抗原結合を媒介し、この特定の抗原への特定の抗体の特異性を定める。しかし、可変性は、可変ドメインの1~10の amino 酸範囲にわたり均一に分布していない。代わりに、V領域は、各々9~12個の amino 酸の長さの、「高頻度可変領域」と呼ばれる極度の可変性の比較的短い領域により分離された、15~30個の amino 酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる、比較的不变の伸長からなる。自然の重および軽鎖の可変ドメインは、各々、大きくPシート形状を採り、3つの高頻度可変領域により結合した4つのFRを含み、これは、Pシート構造に結合し、ある場合においてこの一部を形成するループを形成する。各々の鎖における高頻度可変領域は、FRにより密接に一緒に保持され、他方の鎖からの高頻度可変領域と共に、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, 第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与せず、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(ADCC)への関与を示す。

【0085】

用語「高頻度可変領域」は、本明細書中で用いる際には、抗原結合の原因である抗体の amino 酸残基を意味する。高頻度可変領域は、一般的に、「相補的決定領域」または「CDR」(例えば、VL中の約残基24~34(L1)、50~56(L2)および89~97(L3)の周囲、並びにVH中の約1~35(H1)、50~65(H2)および95~102(H3)の周囲；Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))からの amino 酸残基および/または「高頻度可変ループ」(例えば、VL中の残基26~32(L1)、50~52(L2)および91~96(U)、並びにVH中の26~32(H1)、53~55(H2)および96~101(H3)；Chothia an

10

20

30

40

50

d Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) からの当該残基を含む。

【 0 0 8 6 】

本明細書中で用いる用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を表し、即ち、集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能な天然に存在す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、高度に特異性であり、単一の抗原性部位に対して向けられる。さらに、種々の決定因子（エピトープ）に対して向けられる種々の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対して向けられる。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、他の抗体により汚染されずに合成され得るという点で、有利である。改変体「モノクローナル」は、いかなる特定の方法によっても抗体の産生を必要とするものと解釈するべきではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体を、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することができるか、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方法を用いて作成することができる（例えば米国特許第4,816,567号を参照）。「モノクローナル抗体」はまた、ファージ抗体ライブラリーから、例えばClackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)中に記載されている手法を用いて単離することができる。

10

【 0 0 8 7 】

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は、重および/または軽鎖の一部が、特定の種から由来するか、または特定の抗体群もしくは従属群に属する抗体中の対応する配列と同一であるか、またはこれと相同的であり、一方1または2以上の鎖の残りが、他の種から由来するか、または他の抗体群もしくは従属群に属する抗体、並びにこのような抗体の断片中の対応する配列と同一であるか、またはこれと相同的である、「キメラ」抗体を含む（米国特許第4,186,567号；およびMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)を参照）。関連するキメラ抗体は、本明細書中では、非ヒト霊長類（例えば旧世界ザル、類人猿など）から由来する可変ドメイン抗原結合配列およびヒト定常領域配列を含む、「霊長類化された(primatized)」抗体を含む。

20

【 0 0 8 8 】

「無傷の」抗体は、抗原結合部位およびC L並びに少なくとも重鎖定常ドメイン、C H I、C H 2およびC H 3を含むものである。定常ドメインは、自然配列定常ドメイン（例えばヒト自然配列定常ドメイン）またはこのアミノ酸配列変異体であってもよい。好ましくは、無傷の抗体は、1つまたは2つ以上のエフェクター機能を有する。

30

【 0 0 8 9 】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合または可変領域を含む。抗体断片の例には、F a b、F a b'、F (a b') 2およびF v断片；ダイアボディー(diabody)；直線状抗体（米国特許第5,641,870号、例2；Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]を参照）；単一鎖抗体分子；並びに抗体断片から形成する多選択性抗体が含まれる。抗体のパパイン消化により、「F a b」断片および残りの「F c」断片と呼ばれる2種の同一な抗原結合断片が生じ、表示は、容易に結晶する能力を反映している。F a b断片は、H鎖の可変領域ドメイン（V H）および1つの重鎖の第1の定常ドメイン（C H I）と共に完全なL鎖からなる。各々のF a b断片は、抗原結合に関して1価であり、即ち、これは、単一の抗原結合部位を有する。

40

【 0 0 9 0 】

抗体のペプシン処理により、2価の抗原結合活性を有するF a b断片に結合した2つのジスルフィドにほぼ相当し、尚抗原を架橋することができる、単一の大きいF (a b') 2断片が得られる。F a b'断片は、F a b断片と、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C H Iドメインのカルボキシ末端において、追加のいくつかの残基を有することにより異なる。F a b' - S Hは、F a b'についての本明細書中での表示であり、ここで、定常ドメインの1または2以上のシステイン残基は、遊離のチオー

50

ル基を有する。F (a b ') 2 抗体断片は、最初には、これらの間にヒンジシステインを有する 8 つの F a b ' 断片の対として産生された。抗体断片の他の化学的結合はまた、知られている。

【 0 0 9 1 】

F c 断片は、両方の H 鎖がジスルフィドにより一緒に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、あるタイプの細胞上に見出された F c レセプター (F c R) により認識される部分である。

【 0 0 9 2 】

「 F v 」は、完全な抗原認識および結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は、厳密な、非共有的な会合における、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 つのドメインの折り畳みから、6 つの高頻度可変ループ (各々 H および L 鎖からの 3 つのループ) が放射し、これは、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、単一の可変ドメイン (または抗原に特異的な 3 つのみの C D R を含む F v の半分) さえも、抗原を認識し、これを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 0 9 3 】

また「 s F v 」または「 s c F v 」と略される「単鎖 F v 」は、単一のポリペプチド鎖中に結合する V H および V L 抗体ドメインを含む抗体断片である。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 ドメインの間に、s F v が抗原結合に望ましい構造を形成することを可能にするポリペプチドリinkerを含む。s F v の概説のために、Pluckhuth in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第 1 1 3 巻、Rosenburg and Moore 編、Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, 下記を参照。

【 0 0 9 4 】

用語「ダイアボディー」は、V H および V L ドメインの間に短いリンカー (約 5 ~ 1 0 個の残基) を有する s F v 断片 (前の段落を参照) を、V ドメインの鎖間、しかし鎖内ではない対形成が達成され、2 価の断片、即ち 2 つの抗原結合部位を有する断片が得られるように構成することにより調製された、小さい抗体断片を意味する。二重選択性ダイアボディーは、2 つの「クロスオーバー」s F v 断片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 ドメインは、異なるポリペプチド鎖上に存在する。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) 中に一層完全に記載されている。

【 0 0 9 5 】

「自然の配列」のポリペプチドは、自然のものから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。このような自然の配列のポリペプチドを、自然のものから単離することができるか、または組換えもしくは合成手段により産生することができる。従って、自然の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すべて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することができる。

【 0 0 9 6 】

用語「アミノ酸配列変異体」は、ある程度に自然の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 5 のアミノ酸配列変異体は、自然の配列の O v r 1 1 5 と少なくとも約 7 0 % の相同性、好ましくは少なくとも約 8 0 %、一層好ましくは少なくとも約 8 5 %、さらに一層好ましくは少なくとも約 9 0 % の相同性、および最も好ましくは少なくとも約 9 5 % の相同性を有する。アミノ酸配列変異体は、自然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。

【 0 0 9 7 】

抗体の語句「機能的断片または類似体」は、全長抗体と共通する定性的生物学的活性を

10

20

30

40

50

有する化合物である。例えば、抗 I g E 抗体の機能的断片または類似体は、I g E 免疫グロブリンに、このような分子の能力が高度に親和性のレセプターである F c R I に結合する能力を有することを防止するかまたは実質的に低減する方法で、結合することができるものである。

【 0 0 9 8 】

「相同性」は、配列を整列させ、間隙を導入して、所要に応じて最大の百分率の相同性を達成した後に同一であるアミノ酸配列変異体中の残基の百分率として、定義される。整列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、すべての一般的な配列分析アルゴリズム、例えば G A P または B E S T F I T または他の変法の Smith-Waterman 整列により、測定することができる。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。

10

【 0 0 9 9 】

非ヒト（例えば、げっ歯動物）抗体の「ヒト化された」形態は、非ヒト抗体から由来する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、ヒト化された抗体は、受容者の高頻度可変領域からの残基が、非ヒト種（供与者抗体）、例えば所望の抗体特異性、親和性および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類の高頻度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（受容者抗体）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（F R）は、対応する非ヒト残基により置換されている。

20

【 0 1 0 0 】

さらに、ヒト化された抗体は、受容者抗体中または供与者抗体中に見出されない残基を含み得る。これらの変更は、抗体性能をさらに精巧にするためになされる。一般的に、ヒト化された抗体は、少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、ここで、高頻度可変ループのすべてまたは実質的にすべては、非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、F R のすべてまたは実質的にすべては、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化された抗体は、随意にまた、免疫グロブリン定常領域（F c）、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの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。

30

【 0 1 0 1 】

本明細書中で用いる、「内部移行する」抗 O v r 1 1 5 抗体は、哺乳動物細胞上で O v r 1 1 5 に結合することにより（即ち細胞表面 O v r 1 1 5）細胞により吸収される（即ち進入する）ものである。内部移行する抗体は、当然、抗体断片、ヒトまたはヒト化された抗体および抗体結合体を含む。治療的用途のために、インビボでの内部移行が意図される。内部移行した抗体分子の数は、O v r 1 1 5 発現細胞、特に O v r 1 1 5 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、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、抗体に結合した毒素の 1 つの分子の内部移行が、腫瘍細胞を死滅させるのに十分であるように死滅させるにあたり、高度に有効である。

40

【 0 1 0 2 】

抗 O v r 1 1 5 抗体が、哺乳動物細胞上の O v r 1 1 5 に結合すると内部移行するか否かは、以下の実験例において記載するものを含む、種々のアッセイにより決定することができる。例えば、インビボ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発現した O v r 1 1 5 を有することが知られている動物中に導入する。この抗体を、例えば蛍光または金粒子で放射性標識するかまたは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 5 発現腫瘍移植または異種移植を含む N C R ヌードマウス、またはヒト O v r 1 1 5 で形質移入された細胞が導入されたマウス、またはヒト O v r 1 1 5 導入遺伝子を発現する遺伝子組換えマウスが含まれる

50

。適切な対照には、試験抗体が施与されていないかまたは関連しない抗体が施与された動物、および関連する細胞上の他の抗原に対する抗体が施与され、この抗体が、抗原に結合すると内部移行することが知られている動物が含まれる。

【0103】

抗体を、動物に、例えば静脈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、この動物の組織切片を、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、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。インビトロ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不存在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、標識した抗体の存在を、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ーにより、直接視覚化することができる。あるいはまた、定量的な生化学的アッセイにおいて、O v r 1 1 5 発現細胞を含む細胞の集団を、インビトロまたはインビボで、放射性標識した試験抗体と接触させ、細胞（インビボで接触させた場合には、細胞を、次に、好適な量の時間の後に単離する）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。

【0104】

細胞を粉碎し、細胞の各々のバッチと関連する分あたりのプロテアーゼ耐性の、放射線量（カウント毎分（c p m））を、ホモジネートをシンチレーションカウンターを通過させることにより測定する。放射性標識した抗体の既知の特異的な活性に基づいて、細胞あたり内部移行した抗体分子の数を、粉碎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、インビトロで、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。培養培地を加える代わりに、細胞を、試験抗体と、試験管中の等張性溶液、例えばP B S中で、所望の時間にわたり接触させることができる。インビボで、患者に投与された際には、細胞を抗体と、試験抗体を投与するすべての好適な方法、例えば以下に記載する投与方法により、接触させる。

【0105】

インビボでのO v r 1 1 5 発現細胞を結合する際の抗体の内部移行の速度が速くなるに従って、標的O v r 1 1 5 発現細胞に対する一層迅速な所望の死滅または増殖阻害効果を、例えば細胞毒性免疫結合体により、達成することができる。好ましくは、抗O v r 1 1 5 抗体の内部移行の動力学は、これらが、O v r 1 1 5 発現標的細胞の迅速な死滅を好む程度である。従って、抗O v r 1 1 5 抗体は、好ましくはインビボで抗体を投与してから24時間以内に、一層好ましくは約12時間以内に、さらに一層好ましくは約30分～1時間以内に、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のが望ましい。本発明は、インビボで抗O v r 1 1 5 抗体を導入する時間から約15分程度に迅速に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O v r 1 1 5 に結合した際に、数時間以内に、好ましくは1時間以内に、さらに一層好ましくは15～30分以内に、細胞中に内部移行する。

【0106】

試験抗体が、A T C C 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、本発明の抗O v r 1 1 5 抗体により結合された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E L I S A アッセイを、行うことができる。例示的な競合的E L I S A アッセイにおいて、マイクロタイタープレートのO v r 1 1 5 で被覆したウェルまたはO v r 1 1 5 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、次に本発明のビオチン標識した抗O v r 1 1 5 抗体を加える。ウェル中で、またはビーズ上でO v r 1 1 5 抗原に結合した、標識した抗O v r 1 1 5 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

10

20

30

40

50

て測定する。

【0107】

あるいはまた、抗Ovr115抗体を、例えば放射性もしくは蛍光標識またはある他の検出可能な、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した抗Ovr115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。即ち、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従って、一層少量の標識した抗Ovr110抗体が、抗原で被覆したウェルに結合する。候補の競合的な抗体は、候補の競合的抗体が、抗Ovr115抗体の結合を、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）平行して行う対照と比較して、少なくとも20%、好ましくは少なくとも20~50%、さらに一層好ましくは少なくとも50%により遮断することができる場合には、本発明の抗Ovr115抗体と同一のエピトープに実質的に結合するかまたは、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。このアッセイの変更を行って、同一の定量的数値データに到達することができるが、理解される。

【0108】

表示した抗体の「生物学的特性」を有する抗体、例えばモノクローナル抗体Ovr115.A2.1、Ovr115.A11.1、Ovr115.A51.2（またOvr115 A51.2として知られている）、Ovr115.A63.2、Ovr115.D3、Ovr115.D15、Ovr115.D20、Ovr115.D26、Ovr115.D31、Ovr115.D32、Ovr115.D34、Ovr115.D37、Ovr115.D43、Ovr115.D51、Ovr115.D69、Ovr115.D71、Ovr115.D81、Ovr115.D84、Ovr115.D94、Ovr115.F2、Ovr115.F3、Ovr115.F4、Ovr115.F5、Ovr115.F6、Ovr115.F7、Ovr115.F8、Ovr115.F9、Ovr115.F10、Ovr115.F11、Ovr115.F13、Ovr115.F14、Ovr115.F15、Ovr115.F19、Ovr115.F20、Ovr115.F21、Ovr115.F22、Ovr115.F23、Ovr115.F24、Ovr115.F25、Ovr115.F26、Ovr115.F28、Ovr115.F29、Ovr115.F30、Ovr115.F31、Ovr115.F32、Ovr115.F33、Ovr115.F34、Ovr115.F35、Ovr115.F36、Ovr115.F37、Ovr115.F38、Ovr115.F39、Ovr115.F40、Ovr115.F41、Ovr115.F42、Ovr115.F43、Ovr115.F46、Ovr115.F47、Ovr115.F49、Ovr115.F50、Ovr115.F51、Ovr115.F53、Ovr115.F54、Ovr115.F55、Ovr115.F56、Ovr115.F57、Ovr115.F58、Ovr115.F59、Ovr115.F60、Ovr115.F61、Ovr115.F62、Ovr115.F63、Ovr115.F64、Ovr115.F65、Ovr115.F66、Ovr115.F67、Ovr115.F69、Ovr115.F70、Ovr115.F71、Ovr115.F72、Ovr115.F73、Ovr115.F74、Ovr115.F75、Ovr115.F76、Ovr115.F77、Ovr115.F78、Ovr115.F79、Ovr115.F80、Ovr115.F81、Ovr115.F82およびOvr115.F83のすべては、これを同一の抗原に結合する他の抗体と区別する当該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、Ovr115.A2.1、Ovr115.A11.1、Ovr115.A51.2（またOvr115 A51.2として知られている）、Ovr115.A63.2、Ovr115.D3、Ovr115.D15、Ovr115.D20、Ovr115.D26、Ovr115.D31、Ovr115.D32、Ovr115.D34、Ovr115.D37、Ovr115.D43、Ovr115.D51、Ovr115.D69、Ovr115.D71、Ovr115.D81、Ovr115.D84、Ovr115.D94、Ovr115.F2、Ovr115.F3、Ovr115.F4、Ovr115.F5、Ovr115.F6、Ovr115.F7、Ovr115.F8、Ovr115.F9、Ovr115.F10、Ovr115.F11、Ovr115.F13、Ovr115.F14、Ovr115.F15、Ovr115.F19、Ovr115.F20、Ovr115.F21、Ovr115.F22、Ovr115.F23、Ovr115.F24、Ovr115.F25、Ovr115.F26、Ovr115.F28、Ovr115.F29、Ovr115.F30、Ovr115.F31、Ovr115.F32、Ovr115.F33、Ovr115.F34、Ovr115.F35、Ovr115.F36、Ovr115.F37、Ovr115.F38、Ovr115.F39、Ovr115.F40、Ovr115.F41、Ovr115.F42、Ovr115.F43、Ovr115.F46、Ovr115.F47、Ovr115.F49、Ovr115.F50、Ovr115.F51、Ovr115.F53、Ovr115.F54、Ovr115.F55、Ovr115.F56、Ovr115.F57、Ovr115.F58、Ovr115.F59、Ovr115.F60、Ovr115.F61、Ovr115.F62、Ovr115.F63、Ovr115.F64、Ovr115.F65、Ovr115.F66、Ovr115.F67、Ovr115.F69、Ovr115.F70、Ovr115.F71、Ovr115.F72、Ovr115.F73、Ovr115.F74、Ovr115.F75、Ovr115.F76、Ovr115.F77、Ovr115.F78、Ovr115.F79、Ovr115.F80、Ovr115.F81、Ovr115.F82およびOvr115.F83は、Ovr115.A2.1、Ovr115.A11.1、Ovr115.A51.2（またOvr115 A51.2として知られている）、Ovr115.A63.2、Ovr115.D3、Ovr115.D15、Ovr115.D20、Ovr115.D26、Ovr115.D31、Ovr115.D32、Ovr115.D34、Ovr115.D37、Ovr115.D43、Ovr115.D51、Ovr115.D69、Ovr115.D71、Ovr115.D81、Ovr115.D84、Ovr115

.D94、Ovr115.F2、Ovr115.F3、Ovr115.F4、Ovr115.F5、Ovr115.F6、Ovr115.F7、Ovr115.F8、Ovr115.F9、Ovr115.F10、Ovr115.F11、Ovr115.F13、Ovr115.F14、Ovr115.F15、Ovr115.F19、Ovr115.F20、Ovr115.F21、Ovr115.F22、Ovr115.F23、Ovr115.F24、Ovr115.F25、Ovr115.F26、Ovr115.F28、Ovr115.F29、Ovr115.F30、Ovr115.F31、Ovr115.F32、Ovr115.F33、Ovr115.F34、Ovr115.F35、Ovr115.F36、Ovr115.F37、Ovr115.F38、Ovr115.F39、Ovr115.F40、Ovr115.F41、Ovr115.F42、Ovr115.F43、Ovr115.F46、Ovr115.F47、Ovr115.F49、Ovr115.F50、Ovr115.F51、Ovr115.F53、Ovr115.F54、Ovr115.F55、Ovr115.F56、Ovr115.F57、Ovr115.F58、Ovr115.F59、Ovr115.F60、Ovr115.F61、Ovr115.F62、Ovr115.F63、Ovr115.F64、Ovr115.F65、Ovr115.F66、Ovr115.F67、Ovr115.F69、Ovr115.F70、Ovr115.F71、Ovr115.F72、Ovr115.F73、Ovr115.F74、Ovr115.F75、Ovr115.F76、Ovr115.F77、Ovr115.F78、Ovr115.F79、Ovr115.F80、Ovr115.F81、Ovr115.F82およびOvr115.F83（例えば、モノクローナル抗体Ovr115.A2.1、Ovr115.A11.1、Ovr115.A51.2（またOvr115 A51.2として知られている）、Ovr115.A63.2、Ovr115.D3、Ovr115.D15、Ovr115.D20、Ovr115.D26、Ovr115.D31、Ovr115.D32、Ovr115.D34、Ovr115.D37、Ovr115.D43、Ovr115.D51、Ovr115.D69、Ovr115.D71、Ovr115.D81、Ovr115.D84、Ovr115.D94、Ovr115.F2、Ovr115.F3、Ovr115.F4、Ovr115.F5、Ovr115.F6、Ovr115.F7、Ovr115.F8、Ovr115.F9、Ovr115.F10、Ovr115.F11、Ovr115.F13、Ovr115.F14、Ovr115.F15、Ovr115.F19、Ovr115.F20、Ovr115.F21、Ovr115.F22、Ovr115.F23、Ovr115.F24、Ovr115.F25、Ovr115.F26、Ovr115.F28、Ovr115.F29、Ovr115.F30、Ovr115.F31、Ovr115.F32、Ovr115.F33、Ovr115.F34、Ovr115.F35、Ovr115.F36、Ovr115.F37、Ovr115.F38、Ovr115.F39、Ovr115.F40、Ovr115.F41、Ovr115.F42、Ovr115.F43、Ovr115.F46、Ovr115.F47、Ovr115.F49、Ovr115.F50、Ovr115.F51、Ovr115.F53、Ovr115.F54、Ovr115.F55、Ovr115.F56、Ovr115.F57、Ovr115.F58、Ovr115.F59、Ovr115.F60、Ovr115.F61、Ovr115.F62、Ovr115.F63、Ovr115.F64、Ovr115.F65、Ovr115.F66、Ovr115.F67、Ovr115.F69、Ovr115.F70、Ovr115.F71、Ovr115.F72、Ovr115.F73、Ovr115.F74、Ovr115.F75、Ovr115.F76、Ovr115.F77、Ovr115.F78、Ovr115.F79、Ovr115.F80、Ovr115.F81、Ovr115.F82およびOvr115.F83のOvr115への結合と競合するかまたはこの結合を遮断する）により結合されたエピトープと同一のエピトープに結合し、インビボでOvr115発現腫瘍細胞を標的することができ、インビボで哺乳動物細胞上でOvr115に結合する。

【0109】

さらに、Ovr115.A2.1、Ovr115.A11.1、Ovr115.A51.2（またOvr115 A51.2として知られている）、Ovr115.A63.2、Ovr115.D3、Ovr115.D15、Ovr115.D20、Ovr115.D26、Ovr115.D31、Ovr115.D32、Ovr115.D34、Ovr115.D37、Ovr115.D43、Ovr115.D51、Ovr115.D69、Ovr115.D71、Ovr115.D81、Ovr115.D84、Ovr115.D94、Ovr115.F2、Ovr115.F3、Ovr115.F4、Ovr115.F5、Ovr115.F6、Ovr115.F7、Ovr115.F8、Ovr115.F9、Ovr115.F10、Ovr115.F11、Ovr115.F13、Ovr115.F14、Ovr115.F15、Ovr115.F19、Ovr115.F20、Ovr115.F21、Ovr115.F22、Ovr115.F23、Ovr115.F24、Ovr115.F25、Ovr115.F26、Ovr115.F28、Ovr115.F29、Ovr115.F30、Ovr115.F31、Ovr115.F32、Ovr115.F33、Ovr115.F34、Ovr115.F35、Ovr115.F36、Ovr115.F37、Ovr115.F38、Ovr115.F39、Ovr115.F40、Ovr115.F41、Ovr115.F42、Ovr115.F43、Ovr115.F46、Ovr115.F47、Ovr115.F49、Ovr115.F50、Ovr115.F51、Ovr115.F53、Ovr115.F54、Ovr115.F55、Ovr115.F56、Ovr115.F57、Ovr115.F58、Ovr115.F59、Ovr115.F60、Ovr115.F61、Ovr115.F62、Ovr115.F63、Ovr115.F64、Ovr115.F65、Ovr115.F66、Ovr115.F67、Ovr115.F69、Ovr115.F70、Ovr115.F71、Ovr115.F72、Ovr115.F73、Ovr115.F74、Ovr115.F75、Ovr115.F76、Ovr115.F77、Ovr115.F78、Ovr115.F79、Ovr115.F80、Ovr115.F81、Ovr115.F82およびOvr115.F83抗体の生物学的特性を有する抗体は、インビボで哺乳動物細胞上でOvr115に結合した際に、内部移行する。

【0110】

同様に、Ovr115.A2.1、Ovr115.A11.1、Ovr115.A51.2（またOvr115 A51.2として知られている）、Ovr115.A63.2、Ovr115.D3、Ovr115.D15、Ovr115.D20、Ovr115.D26、Ovr115.D31、Ovr115.D32、Ovr115.D34、Ovr115.D37、Ovr115.D43、Ovr115.D51、Ovr115.D69、Ovr115.D71、Ovr115.D81、Ovr115.D84、Ovr115.D94、Ovr115.F2、Ovr115.F3、Ovr115.F4、Ovr115.F5、Ovr115.F6、Ovr115.F7、Ovr115.F8、Ovr115.F9、Ovr115.F10、Ovr115.F11、Ovr115.F13、Ovr115.F14、Ovr115.F15、Ovr115.F19、Ovr115.F20、Ovr115.F21、Ovr115.F22、Ovr115.F23、Ovr115.F24、Ovr115.F25、Ovr115.F26、Ovr115.F28、Ovr115.F29、Ovr115.F30、Ovr115.F31、Ovr115.F32、Ovr115.F33、Ovr115.F34、Ovr115.F35、Ovr115.F36、Ovr115.F37、Ovr115.F38、Ovr115.F39、Ovr115.F40、Ovr115.F41、Ovr115.F42、Ovr115.F43、Ovr115.F46、Ovr115.F47、Ovr115.F49、Ovr115.F50、Ovr115.F51、Ovr115.F53、Ovr115.F54、Ovr115.F55、Ovr115.F56、Ovr115.F57、Ovr115.F58、Ovr115.F59、Ovr115.F60、Ovr115.F61、Ovr115.F62、Ovr115.F63、Ovr115.F64、Ovr115.F65、Ovr115.F66、Ovr115.F67、Ovr115.F69、Ovr115.F70、Ovr115.F71、Ovr115.F72、Ovr115.F73、Ovr115.F74、Ovr115.F75、Ovr115.F76、Ovr115.F77、Ovr115.F78、Ovr115.F79、Ovr115.F80、Ovr115.F81、Ovr115.F82およびOvr115.F83抗体の生物学的特性を有する抗体は、インビボで哺乳動物細胞上でOvr115に結合した際に、内部移行する。

15.F5、Ovr115.F6、Ovr115.F7、Ovr115.F8、Ovr115.F9、Ovr115.F10、Ovr115.F11、Ovr115.F13、Ovr115.F14、Ovr115.F15、Ovr115.F19、Ovr115.F20、Ovr115.F21、Ovr115.F22、Ovr115.F23、Ovr115.F24、Ovr115.F25、Ovr115.F26、Ovr115.F28、Ovr115.F29、Ovr115.F30、Ovr115.F31、Ovr115.F32、Ovr115.F33、Ovr115.F34、Ovr115.F35、Ovr115.F36、Ovr115.F37、Ovr115.F38、Ovr115.F39、Ovr115.F40、Ovr115.F41、Ovr115.F42、Ovr115.F43、Ovr115.F46、Ovr115.F47、Ovr115.F49、Ovr115.F50、Ovr115.F51、Ovr115.F53、Ovr115.F54、Ovr115.F55、Ovr115.F56、Ovr115.F57、Ovr115.F58、Ovr115.F59、Ovr115.F60、Ovr115.F61、Ovr115.F62、Ovr115.F63、Ovr115.F64、Ovr115.F65、Ovr115.F66、Ovr115.F67、Ovr115.F69、Ovr115.F70、Ovr115.F71、Ovr115.F72、Ovr115.F73、Ovr115.F74、Ovr115.F75、Ovr115.F76、Ovr115.F77、Ovr115.F78、Ovr115.F79、Ovr115.F80、Ovr115.F81、Ovr115.F82およびOvr115.F83抗体の生物学的特徴を有する抗体は、抗体の同一のエピトープ結合、標的、内部移行、腫瘍増殖阻害および細胞毒性特性を有する。

10

【0111】

用語「アンタゴニスト」抗体は、最も広い意味で用いられ、本明細書中に開示した自然のOvr115タンパク質の生物学的活性を部分的に、または完全に遮断、阻害または中和する抗体を含む。Ovr115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、Ovr115ポリペプチドまたはOvr115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、通常Ovr115ポリペプチドに関連する1または2以上の生物学的活性における検出可能な変化を測定することを含むことができる。

20

【0112】

「Ovr115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、Ovr115を発現するかまたは過剰発現する癌細胞に結合し、かつこの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Ovr115抗体は、Ovr115発現腫瘍細胞（例えば卵巣癌細胞、膵臓癌細胞および結腸癌細胞）の増殖を、適切な対照と比較して20%より大きく、好ましくは約20%～約50%、およびさらに一層好ましくは50%より大きく（例えば約50%～約100%）阻害し、対照は、典型的には、試験されている抗体で処置していない腫瘍細胞である。増殖阻害を、細胞培養物中の約0.1～30pg/mlまたは約0.5nM～200nM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1～10日後に決定される。インビボでの腫瘍細胞の増殖阻害を、以下の実験例の章において記載するように、種々の方法で決定することができる。抗体は、抗Ovr115抗体の、約1pg/体重1kg～約100mg/体重1kgでの投与により、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、インビボで増殖阻害的である。

30

【0113】

「アポトーシスを誘発する」抗体は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡大、細胞断片化および/または膜小胞（アポトーシス体と呼ばれる）の形成により決定される、計画された細胞死を誘発するものである。細胞は、通常、Ovr115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、膵臓細胞および結腸細胞である。種々の方法は、アポトーシスに関連する細胞の事象を評価するのに有用である。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断片化を、DNAラダリング(laddering)により評価することができ；およびDNA断片化に伴う核/クロマチン縮合を、低二倍体細胞のすべて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。

40

【0114】

抗体「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（自然の配列のFc領域またはアミノ酸配列変異体Fc領域）に寄与する生物学的活性を意味し、抗体アイソタイプに伴って変化

50

する。抗体エフェクター機能の例には、以下のものが含まれる：C1q結合および補体依存性細胞毒性；Fcレセプター結合；抗体依存性細胞媒介細胞傷害（ADCC）；食作用；細胞表面レセプター（例えばB細胞レセプター）の下方調節；およびB細胞活性化。

【0115】

「抗体依存性細胞媒介細胞傷害」または「ADCC」は、ある細胞毒性細胞（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レセプター（FcR）上に結合した、分泌されたIgが、これらの細胞毒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、その後標的細胞を細胞毒で死滅させることを可能にする、細胞毒性の形態を意味する。抗体は、細胞毒性細胞を「武装し(arm)」、このような死滅に絶対に必要である。ADCCを媒介するための主な細胞である、NK細胞は、FcRIIIのみを発現し、一方単球は、FcRI、FcRIIおよびFcRIIIを発現する。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。関連する分子のADCC活性を評価するために、インビトロ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ものを、行うことができる。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。あるいはまた、またはさらに、関連する分子のADCC活性を、インビボで、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。

【0116】

「Fcレセプター」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載する。好ましいFcRは、自然の配列のヒトFcRである。さらに、好ましいFcRは、IgG抗体（ガンマレセプター）に結合するものであり、FcRI、FcRIIおよびFcRIII従属群のレセプターを含み、対立形質の変異体およびあるいはまたこれらのレセプターのスプライシングされた形態を含む。FcRIIレセプターには、FcRIIA（「活性化レセプター」）およびFcRIIB（「阻害レセプター」）が含まれ、これは、主にこの細胞質ドメインにおいて異なる、同様のアミノ酸配列を有する。活性化レセプターFcRIIAは、免疫レセプターチロシンベースの活性化モチーフ（ITAM）を、この細胞質ドメイン中に含む。阻害レセプターFcRIIBは、免疫レセプターチロシンベースの阻害モチーフ（ITIM）を、この細胞質ドメイン中に含む。（Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)中の概説M.を参照）。FcR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)中に概説されている。将来同定されるべきものを含む、他のFcRは、本明細書中の用語「FcR」により包含される。この用語はまた、母系性のIgGの胎児への輸送の原因である新生児レセプター、FcRnを含む(Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)およびKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994))。

【0117】

「ヒトエフェクター細胞」は、1つまたは2つ以上のFcR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FcRIII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、細胞毒性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、自然の供給源、例えば血液から単離することができる。

【0118】

「補体依存性細胞毒性」または「CDC」は、補体の存在下での標的細胞の溶解を意味する。古典的な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抗体（適切な従属群の）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。

【0119】

用語「癌」および「癌性」は、典型的に調節されていない細胞増殖により特徴づけられる哺乳動物の生理学的状態を意味するかまたは記載する。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が含まれるが、これらには限定されない。このような癌の一層特定の例には、扁平細胞癌（例えば上皮性扁平細胞癌）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌が含まれる肺癌、肺の腺癌および肺の扁平癌腫、腹膜の癌、肝細胞性癌、胃腸癌が含まれる胃(gastric or stomach)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(kidney or renal)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、脳および頭および首の癌、並びに関連する転移が含まれる。

10

【0120】

「Ovr115発現細胞」は、細胞表面上で内因性または形質移入したOvr115を発現する細胞である。「Ovr115発現癌」は、細胞表面上に存在するOvr115タンパク質を有する細胞を含む癌である。「Ovr115発現癌」は、この細胞の表面上で、抗Ovr115抗体が、これに結合することができ、癌に関して治療的效果を有するのに十分なレベルのOvr115を産生する。Ovr115を「過剰発現する」癌は、同一の組織のタイプの非癌性細胞と比較して、顕著に高いレベルのOvr115をこの細胞表面において有するものである。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。Ovr115過剰発現は、診断または予見アッセイにおいて、細胞の表面上に存在するOvr115タンパク質の増大したレベルを評価することにより（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。

20

【0121】

あるいはまた、またはさらに、細胞中のOvr115をコードする核酸またはmRNAのレベルを、例えば蛍光のインサイチュハイブリダイゼーション；（FISH；1998年10月に刊行されたWO98/45479を参照）、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）により測定することができる。また、Ovr115過剰発現を、生物学的液体、例えば血清中の発した(shed)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、研究することができる（また、例えば米国特許第4,933,294号、1990年6月12日刊行；WO91/05264、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)を参照）。上記のアッセイとは別に、種々のインビボアッセイが、技術のある実行者に有用である。例えば、細胞を、患者の体内で、随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することができ、この抗体の患者中の細胞への結合を、例えば放射性について外部走査することにより、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、評価することができる。Ovr115発現癌は、卵巣癌、膵臓癌、肺癌または乳癌を含む。

30

【0122】

癌を処置するかまたは癌の症状を寛解する目的のための「哺乳動物」は、ヒト、家畜および養殖の動物、並びに動物園、娯楽用、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、すべての哺乳動物を意味する。好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。

40

【0123】

「処置する」または「処置」または「寛解」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するかまたは遅延させる（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、または障害が防止されるべきであるものが含まれる。被検者または哺乳動物は、本発明の方法により抗Ovr115抗体の治療的な量が施与された後に、患者が、以下の1つまたは2つの観察可能な、および

50

／または測定可能な低減またはこの欠如を示す場合に、O v r 1 1 5 発現癌について成功に「処置される」：癌細胞の数の減少または癌細胞の欠如；腫瘍の大きさの減少；癌の柔軟な組織および骨中への拡大を含む、末梢器官中への癌細胞の浸潤の阻害（即ち、ある程度までの遅延および好ましくは停止）；腫瘍転移の阻害（即ち、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症状の1つまたは2つ以上の、ある程度までの寛解；減少された罹患率および死亡率、並びに生活の質の問題における改善。抗O v r 1 1 5 抗体が、存在する癌細胞の増殖を防止し、かつ／またはこれを死滅させることができる程度に、これは、細胞分裂停止性および／または細胞毒性であり得る。これらの徴候または症状の低減はまた、患者により感じられ得る。

10

【 0 1 2 4 】

疾患における成功した処置および改善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、効能を、例えば、疾患進行のための時間（T T P）を評価し、かつ／または応答率（R R）を決定することにより、測定することができる。

【 0 1 2 5 】

用語「治療的に有効な量」は、被検者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。癌の場合において、薬剤の治療的に有効な量により、癌細胞の数が減少し；腫瘍の大きさが減少し；末梢器官中への癌細胞の浸潤が阻害され（即ち、ある程度まで遅延および好ましくは停止し）；腫瘍転移が阻害され（即ち、ある程度まで遅延および好ましくは停止し）；腫瘍増殖がある程度まで阻害され；かつ／または癌に関連する症状の1つまたは2つ以上が、ある程度まで寛解され得る。「処置する」の前の定義を参照。薬剤が、存在する癌細胞の増殖を防止し、かつ／またはこれを死滅させることができる程度に、これは、細胞分裂停止性および／または細胞毒性であり得る。

20

【 0 1 2 6 】

「慢性の」投与は、1種または2種以上の剤を、急性の方式に対して連続的な方式で投与して、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することを意味する。

「間欠性」投与は、間隔を伴わずに連続的になされず、むしろ自然的に周期的である処置である。

30

【 0 1 2 7 】

1種または2種以上他の治療剤「と組み合わせて」の投与は、すべての順序での、同時の（併用）および連続的な投与を含む。

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た細胞または哺乳動物に無毒である、薬学的に許容し得る担体、添加剤または安定剤が含まれる。

【 0 1 2 8 】

しばしば、生理学的に許容し得る担体は、水性のpH緩衝された溶液である。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個の残基よりも少ない）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。

40

【 0 1 2 9 】

本明細書中で用いる用語「細胞毒性剤」は、細胞の機能を阻害もしくは防止し、かつ／

50

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 $A t^{211}$ 、 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(methotrexate)、アドリアマイシン(adriamycin)、ビンカアルカロイド類(vinca alkaloids)（ビンクリスチン(vincristine)、ビンブラスチン(vinblastine)、エトポシド(etoposide)）、ドキソルビシン(doxorubicin)、メルファラン(melphalan)、マイトマイシン(mitomycin) C、クロラムブシル(chlorambucil)、ダウノルビシン(daunorubicin)または他の挿入剤、酵素およびこの断片、例えば核酸分解酵素、抗生物質、並びに毒素、例えば断片および/またはこの変種を含む、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的に活性な毒素、例えばゲロニン(gelonin)、リシン、サボリン並びに以下に開示する種々の抗腫瘍もしくは抗癌剤を含むことを意図する。他の細胞毒性剤を、以下に記載する。殺腫瘍剤は、腫瘍細胞の破壊を生じる。

【0130】

本明細書中で用いる際には、「増殖阻害剤」は、細胞、特に $O v r 115$ 発現癌細胞の増殖を、インビトロまたはインビボのいずれかで阻害する化合物または組成物を意味する。従って、増殖阻害剤は、S 期において $O v r 115$ 発現細胞の百分率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、細胞サイクル進行を遮断する（S 期以外の位置において）剤、例えば G I 停止および M 期停止を誘発する剤が含まれる。古典的な M 期ブロッカーには、ビンカ類（ビンクリスチンおよびビンブラスチン）、タキサン(taxane)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、エピルビシン(epirubicin)、ダウノルビシン、エトポシドおよびブレオマイシン(bleomycin)が含まれる。G I を停止する剤、例えば DNA アルキル化剤、例えばタモキシフェン(tamoxifen)、プレドニゾン(prednisone)、デカルバジン(dacarbazine)、メクロレタミン(mechlorethamine)、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アラ(ara) - C はまた、S 期停止に波及する。

【0131】

他の情報は、Murakami et al.によるThe Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel編、第1章、題名「細胞サイクル調節、発癌遺伝子および抗悪性腫瘍薬」(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、共にイチイから由来する抗癌薬である。ヨーロッパイイチイから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、微小管を、脱重合を防止することにより安定化し、これにより細胞中での有糸分裂の阻害をもたらす。

【0132】

本明細書中で用いる「標識」は、抗体に直接的に、または間接的に結合して、「標識した」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、単独で検出可能であり得る（例えば放射性同位体標識もしくは蛍光標識）か、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变化を触媒し得る。

【0133】

本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 $O v r 115$ 抗体ポリペプチドを含む、キメラポリペプチドを意味する。タグポリペプチドは、抗体を作成することができるエピトープを提供するのに十分であるが、これが、これが融合する Ig 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、極めて独特であり、従って抗体は、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約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。

【0134】

10

20

30

40

50

「小さい分子」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、適応、使用、投与量、投与、禁忌および/またはこのような治療製品の使用に関する注意についての情報を含む指示を意味するために用いる。

【0135】

「単離された核酸分子」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、天然に自然の配列を伴う、核酸分子、例えば RNA、DNA、または混合ポリマーである。この用語は、この天然に存在する環境から除去さ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。

10

【0136】

「ベクター」は、シャトル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、プラスミド構造物はまた、それぞれ細菌におけるプラスミドの複製および選択のための、複製の起源（例えば複製の *ColE1* 起源）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断片を含む、抗体の発現に必要な対照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。

20

【0137】

本発明の抗 *Ovr115* 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、並びに抗体をコードする核酸が導入された、細菌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。

【0138】

RNA 干渉は、短い干渉 RNA (*siRNA*) により媒介された動物における配列特異性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、一般的に、転写後遺伝子サイレンシングまたは RNA サイレncing 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)。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から由来する、二重らせん RNA (*dsRNA*) の産生に応答して進化した場合がある。細胞中の *dsRNA* の存在により、RNA *i* 応答が誘発されるが、機構は未だ完全には特徴づけられていない。この機構は、プロテインキナーゼ PKP および 2', 5'-オリゴアデニレートシンセターゼの *dsRNA* 媒介活性化からもたらされ、リボヌクレアーゼ L による mRNA の非特異的切断をもたらすインターフェロン応答とは、異なると考えられる。

30

【0139】

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、短い干渉 RNA (*siRNA*) として知られている、*dsRNA* の短い片中への *dsRNA* の加工に関与する (Berstein et al., 2001, *Nature*, 409, 363)。ダイサー活性から由来する短い干渉 RNA は、典型的には、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。ダイサーはまた、翻訳制御に関係する、保存された構造の前駆体 RNA 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)。RNA *i* 応答はまた、一般的に RNA 誘発サイレンシング複合体 (RISC) と呼ばれ、*siRNA* 二本鎖のアンチセンスラセンに相補的な配列を有する一本鎖 RNA の切断を媒介する *siRNA* を含むエンドヌクレアーゼ複合体を特徴づける。標的

40

50

のRNAの切断は、siRNA二本鎖のアンチセンスラセン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)。

【0140】

短い干渉RNAにより媒介されたRNAiは、種々の系において研究された。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により媒介されたRNAiが記載されている。Hammond et al., 2000, Nature, 404, 293には、dsRNAで形質移入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HeLa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。ショウジョウバエ胚可溶化液における最近の作業(Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)により、効率的なRNAi活性を媒介するのに必須のsiRNA長さ、構造、化学的組成および配列についてのある要求が明らかになった。

【0141】

これらの研究により、21ヌクレオチドのsiRNA二本鎖が、2つのヌクレオチド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ラセン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)での置換は、許容されると示された。siRNA二本鎖の中心での単一のミスマッチ配列はまた、RNAi活性を消失すると示された。さらに、これらの研究により、また、標的のRNA中の切断部位の位置が、siRNA案内配列の3'末端ではなく、5'末端により定められることが示される(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ラセン上の5'リン酸塩が、siRNA活性のために必要であること、およびATPを用いて、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)。

【0142】

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しないことが、示された。siRNAの各々の末端上での4個までのヌクレオチドの、デオキシリボヌクレオチドでの置換は、良好に耐容される一方、デオキシリボヌクレオチドでの完全な置換の結果、RNAi活性はもたらされないことが、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。

【0143】

Li et al., 国際PCT公開WO 00/44914およびBeach et al., 国際PCT公開WO 01/68836は、共に、siRNAが、「リン酸塩-糖主鎖またはヌクレオシドのいずれかに対する変更を含んで、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ができる」ことを示唆しているが、いずれの出願にも、いずれの程度まで、これらの変更が、siRNA分子において耐容されるかが教示されておらず、このような変更されたsiRNAのいかなる例も提供されていない。Kreutzer and Limmer、カナダ国特許出願第2,359,180号にはまた、dsRNA構造物において用いて、二重らせん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、ある化学的変更が記載されている。しかし、KreutzerおよびLimmerは、同様に、いずれの程度まで、これらの変更が、siRNA分子において耐容されるかを示しておらず、このような変更されたsiRNAのいかなる例も提供していない。

【0144】

Parrish et al., 2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087は、C. elegansにおけるunc

10

20

30

40

50

- 22 遺伝子を標的する、ある化学的変更を、長い (> 25 nt) siRNA 転写物を用いて試験した。この著者は、チオリン酸塩残基のこれらの siRNA 転写物中への、T7 および T3 RNA 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導入を記載し、「2つの(ホスホロチオエート)変更塩基を有するRNAがまた、RNAi トリガーとしての有効性の顕著な低下を有し(データは示していない); 2つよりも多い残基の(ホスホロチオエート)変更により、インビトロでRNAが大きく不安定になり、我々は、干渉活性をアッセイすることができなかった」ことを観察した。1081において同上。

【0145】

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、ある変更を試験し、デオキシヌクレオチドのリボヌクレオチドでの置換が、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、「干渉活性の顕著な低下を生じる」ことを観察した。同上。さらに、この著者は、siRNA のセンスおよびアンチセンスらせんにおける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、ウラシルでの置換、およびイノシンのグアノシンでの置換を含む、ある塩基変更を試験し、いずれのらせん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、「干渉活性において顕著な低下を生じた」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、アンチセンスらせんにおける導入の結果、RNAi 活性の顕著な低下が同様にもたらされた。

【0146】

Beach et al., 国際PCT公開WO 01/68836には、内因的に誘導されたdsRNA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 et al., 国際PCT公開WO 01/75164には、ショウジョウバエインビトロRNAi系並びに、特定のsiRNA分子の、ある機能的ゲノムおよびある治療的適用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、RNAi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ができないのではないかと疑われている。Li et al., 国際PCT公開WO 00/44914には、ある標的遺伝子の発現の減衰において用いるための、特定のdsRNAの使用が記載されている。Zernicka-Goetz et al., 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dsRNA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 et al., 国際PCT公開WO 99/32619には、遺伝子発現の阻害において用いるための、あるdsRNA分子を細胞中に導入する特定の方法が記載されている。

【0147】

Plaetinck et al., 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dsRNA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。Mello et al., 国際PCT公開WO 01/29058には、dsRNA媒介RNAiに関連する特定の遺伝子の同定が記載されている。Deschamps Depaillette et al., 国際PCT公開WO 99/07409には、ある抗ウイルス剤と組み合わせられた、特定のdsRNA分子からなる特定の組成物が記載されている。Driscoll et al., 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おいて用いるための、特定のDNA構造物が記載されている。Parrish et al., 2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087には、C. elegansのunc-22遺伝子を標的する、特定の化学的に改変されたsiRNA構造物が記載されている。Tuschl et al., 国際PCT公開WO 02/44321には、ある合成siRNA構造物が記載されている。

【0148】

本発明の組成物および方法

本発明は、抗Ovr115抗体を提供する。好ましくは、抗Ovr115抗体は、哺乳動物細胞上の細胞表面Ovr115に結合すると内部移行する。抗Ovr115抗体はまた、Ovr115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。

【0149】

O v r 1 1 5 は、内部移行競合的であることは、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。本発明者らは、本明細書中で、細胞表面 O v r 1 1 5 が、本発明の抗 O v r 1 1 5 抗体により結合すると内部移行競合的であることを例証した。さらに、本発明の抗 O v r 1 1 5 抗体が、インビボで O v r 1 1 5 発現腫瘍細胞を特定の標的にし、これらの細胞を阻害するかまたは死滅させることができることが、例証された。抗 O v r 1 1 5 抗体のこれらのインビボでの腫瘍標的、内部移行および増殖阻害特性により、これらの抗体が、例えば卵巣癌、膵臓癌および結腸癌を含む、種々の癌の処置における治療的使用に極めて好適となる。抗 O v r 1 1 5 抗体の内部移行は、例えば、抗体または抗体結合体が作用の細胞内部位を有する場合、およびこの抗体と結合した細胞毒性剤（例えば毒素カリケアマイシン）が血漿膜を容易に横断しない場合に、好ましい。内部移行は、抗体または抗体と結合した剤が作用の細胞内部位を有しない場合、例えば抗体が腫瘍細胞を A D C C またはある他の機構により死滅させることができる場合には、必要ではない。

10

【0150】

本発明の抗 O v r 1 1 5 抗体はまた、種々の非治療的用途を有する。本発明の抗 O v r 1 1 5 抗体は、O v r 1 1 5 発現癌の診断および段階分類のために有用であり得る（例えば放射性イメージングにおいて）。これらを、単独で、または C A 1 2 5、H E 4 およびメソセリンが含まれるが、これらには限定されない他の卵巣癌マーカーと組み合わせて、用いることができる。この抗体はまた、O v r 1 1 5 を細胞から精製または免疫沈殿するのに、例えば E L I S A またはウエスタンブロットにおいてインビトロで O v r 1 1 5 を検出および定量して、O v r 1 1 5 発現細胞を他の細胞の精製における段階として混合された細胞の集団から死滅させ、排除するのに有用である。本発明の内部移行する抗 O v r 1 1 5 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。

20

【0151】

従って、抗体は、全長の、または無傷な抗体、抗体断片、自然の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の機能的断片を含む。融合抗体において、抗体配列を、異種性のポリペプチド配列に融合させる。抗体を、F c 領域において変更して、所望のエフェクター機能を提供することができる。適切な F c 領域について以下の章において一層詳細に記載するように、細胞表面上に結合した裸の抗体は、細胞毒性を、例えば抗体依存性細胞傷害（A D C C）により、または補体依存性細胞傷害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誘発することができる。あるいはまた、副作用または治療的複雑を最小にするために、エフェクター機能を消失させるかまたは低減させるのが望ましい場合において、ある他の F c 領域を、用いることができる。

30

【0152】

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し、または実質的にこれに結合することができる。本発明のこの抗 O v r 1 1 5 抗体の生物学的特徴を有する抗体、例えば、特にインビボでの腫瘍標的、内部移行およびすべての細胞増殖阻害または細胞毒性特徴を含む、A T C C 受託番号 PTA-5202、PTA-5916、PTA-5917、PTA-5918、PTA-5919 および PTA-5920 に一致するハイブリドーマにより産生されたモノクローナル抗体の生物学的特徴を有する抗 O v r 1 1 5 抗体もまた、意図される。特定の提供されるのは、ヒト O v r 1 1 5 のアミノ酸 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 ~ 280、280

40

50

～ 290、290～300、300～310、310～320、320～330、330～340、340～350、350～360、360～370、370～380、380～390、390～400、400～410、410～420、420～430、430～435において存在するエピトープに結合する、抗Ovr115抗体である。

【0153】

上記の抗体を産生するための方法を、以下に詳細に記載する。

【0154】

本発明の抗Ovr115抗体は、哺乳動物におけるOvr115発現癌を処置するかまたは癌の1つもしくは2つ以上の症状を寛解するのに、有用である。このような癌には、卵巣癌、膵臓癌および結腸癌、尿路の癌、肺癌、乳癌および前立腺癌が含まれる。このよ
10
うな癌は、さらに特に、卵巣漿液腺癌、乳房浸潤乳管癌、前立腺腺癌、腎臓細胞癌腫、直腸結腸腺癌、肺腺癌、肺扁平細胞癌腫および胸膜中皮腫を含む。乳癌は、HER-2陰性または陽性乳癌であり得る。この癌は、上記のいずれかの転移性癌、例えば卵巣癌、膵臓癌および結腸癌転移を包含する。この抗体は、哺乳動物においてOvr115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。

【0155】

好ましくは、抗体は、インビトロまたはインビボで、細胞上のOvr115に結合することにより、Ovr115発現腫瘍細胞を破壊するもしくは死滅させるか、またはこの
20
ような腫瘍細胞の増殖を阻害するのに有効である。このような抗体は、裸の抗Ovr115抗体（いずれの剤にも結合していない）を含む。インビボでの腫瘍増殖阻害特性を有する裸の抗Ovr115抗体には、以下の実験例に記載する抗体が含まれる。細胞毒性または細胞増殖阻害特性を有する裸の抗体を、さらに、細胞毒性剤と結合させて、これらを、腫瘍細胞破壊において尚一層有効にすることができる。細胞毒性特性を、抗Ovr115抗体に、例えばこの抗体を細胞毒性剤と結合させて、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付与することができる。細胞毒性剤または増殖阻害剤は、好ましくは、小さい分子である。毒素、例えばメイタンシン、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。

【0156】

本発明は、本発明の抗Ovr115抗体および担体を含む組成物を提供する。癌を処置
30
する目的のために、組成物を、このような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、この組成物は、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Ovr115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毒性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Ovr115抗体および担体を含む処方物を提供する。この処方物は、薬学的に許容し得る担体を含む治療的処方物であってもよい。

【0157】

本発明の他の観点は、内部移行する抗Ovr115抗体をコードする、単離された核酸
40
である。HおよびL鎖の両方並びに特に高頻度可変領域残基をコードする核酸、自然の配列の抗体および変異体をコードする鎖、抗体の変更された、およびヒト化された様式が、包含される。

【0158】

本発明はまた、哺乳動物におけるOvr115発現癌を処置するかまたはこの癌の1つ
50
もしくは2つ以上の症状を寛解するのに有用な方法であって、内部移行する抗Ovr115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、前記方法を提供する。この抗体治療組成物を、医師により指示されたように、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、Ovr115発現細胞の増殖を阻害し、これを死滅させる方法である。最後に、本発明はまた、本発明の少なくとも1種の抗体、好ましくはインビボで哺乳動物細胞上のOvr115に結合する、本発明

の少なくとも1種の抗Ovr115抗体または本発明の少なくとも1種の内部移行する抗Ovr115抗体を含むキットおよび製造品を提供する。

【0159】

抗Ovr115抗体を含むキットは、Ovr115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Ovr115細胞死滅アッセイのために、またはOvr115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、Ovr115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Ovr115抗体を含むことができる。インビトロでの、例えばELISAまたはウエスタンブロットにおけるOvr115の検出および定量的ための抗体を含むキットを、提供することができる。検出に有用なこのような抗体に、標識、例えば蛍光または放射性標識を提供することができる。

10

【0160】

抗Ovr115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。これらの手法のいくつかを、さらに例1に記載する。抗体の産生のために用いるべきOvr115抗原は、例えば、膜貫通配列を欠いているOvr115の溶解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。

【0161】

あるいはまた、細胞表面においてOvr115を発現する細胞（例えばOvr115を過剰発現するように形質転換されたCHOまたはNIH-3T3細胞；卵巣、脾臓、肺、乳房もしくは他のOvr115発現腫瘍細胞系）、またはこのような細胞から調製される膜を用いて、抗体を発生することができる。ヒトおよびマウスOvr115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。Ovr115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。Ovr115を、タグ化（例えばエピトープタグ）として、または他の融合タンパク質として発現させて、種々のアッセイにおけるこの単離およびこの同定を容易にすることができる。

20

【0162】

種々の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できる。抗体を発生するのに有用な他の形態のOvr115は、当業者に明らかである。

30

【0163】

タグ

種々のタグポリペプチドおよびこれらのそれぞれの抗体が、当該分野において十分知られている。例には、ポリヒスチジン（ポリ-his）またはポリヒスチジングリシン（ポリ-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タグ並びにこれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7および9E10抗体(Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985))；並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。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により認識される(Eastman Kodak Co., New Haven, CT)。FLAGペプチドを含むタンパク質の精製を、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を用いて行うことができる(Eastman Kodak Co., New Haven, CT)。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(

40

50

Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990))が含まれる。

【0164】

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 (特に合成ペプチドを用いる際) 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、有用であり得る。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、二官能性または誘導化剤、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 R および R¹ が異なるアルキル基である R¹ N = C = N R を用いて結合させることができる。結合体はまた、タンパク質融合として組換え細胞培養物中に作成することができる。

10

【0165】

動物を、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ついて) 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、免疫することができる。1 ヶ月後、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の最初の量の 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、動物を放血させ、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

【0166】

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体を、最初に Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) により記載されたハイブリドーマ方法を用いて作成するか、または組換え DNA 方法 (米国特許第 4,816,567 号) により作成することができる。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、上記したように免疫して、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顕在化させる。あるいはまた、リンパ球を、インビトロで免疫することができる。免疫後、リンパ球を単離し、次に「融合パートナー」、例えば骨髓腫細胞系と、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

【0167】

このように調製したハイブリドーマ細胞を、好適な培養培地中に播種し、この中で増殖させ、この培地は、好ましくは、融合していない融合パートナー、例えば親骨髓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、親骨髓腫細胞が、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 欠乏細胞の増殖を防止する。

40

【0168】

好ましい融合パートナー骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞により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する選択的培地に感受性であるものである。好ましい骨髓腫細胞系は、マウス骨髓腫系、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 マウス腫瘍から由来するもの並びに 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

50

きるX63-Ag8-653細胞である。ヒト骨髓腫細胞およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫(heteromyeloma)細胞系はまた、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))。

【0169】

ハイブリドーマ細胞が増殖する培養培地を、抗原に対して向けら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、免疫沈殿により、またはインビトロ結合アッセイ、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

【0170】

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した後に、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、ハイブリドーマ細胞を、インビボで、腹水腫瘍として、動物において、例えば細胞のマウス中へのi.p.注射により増殖させることができる。

20

【0171】

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、腹水流体または血清から、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もしくはプロテイン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。

【0172】

モノクローナル抗体をコードするDNAを、慣用の手順を用いて(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、このようなDNAの好ましい供給源として作用する。単離した後に、DNAを、発現ベクター中に配置し、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形質移入して、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Phickthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992)を含む。

30

【0173】

さらに、モノクローナル抗体または抗体断片を、McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)中に記載された手法を用いて発生した抗体ファージライブラリー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ーを用いた、それぞれマウスおよびヒト抗体の単離が記載されている。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))、並びに極めて大きいファージライブラリーを構成するための方法としての、組み合わせ感染およびインビボ組換え(Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993))が記載されている。従って、これらの手法は、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。

40

【0174】

50

抗体をコードするDNAを、例えばヒト重鎖および軽鎖定常ドメイン（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り（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り、キメラまたは融合抗体ポリペプチドを産生するように改変することができる。非免疫グロブリンポリペプチド配列を、抗体の定常ドメインで置換することができるか、またはこれらを、抗体の1つの抗原組み合わせ部位の可変ドメインで置換して、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および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を含むキメラの2価の抗体を作成する。

10

【0175】

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、ヒト化された抗体は、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」可変ドメインから採取される。ヒト化は、本質的に、Winterおよび共同研究者の方法に従って（Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)）、高頻度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。従って、このような「ヒト化された」抗体は、キメラ抗体であり（米国特許第4,816,567号）、ここで、無傷のヒト可変ドメイン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、ヒト化された抗体は、典型的には、いくつかの高頻度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、げっ歯動物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。

20

【0176】

ヒト化された抗体の作成において用いるべき、軽および重の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗体がヒトの治療的使用を意図する際には、抗原性およびHAMMA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」方法において、げっ歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列の全体のライブラリーに対してスクリーニングする。げっ歯動物のものに最も近いヒトVドメイン配列を同定し、この中のヒトフレームワーク領域（FR）が、ヒト化抗体のために受容される（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従属群のすべてのヒト抗体のコンセンサス配列から由来する、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された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)）。

30

【0177】

抗体が、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ヒト化されるのが、さらに重要である。この目的を達成するために、好ましい方法において、ヒト化された抗体を、親およびヒト化された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種々の概念的な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、一般的に入手可能であり、当業者に精通されている。

40

【0178】

選択された候補の免疫グロブリン配列の可能な三次元高次構造を例示し、表示するコンピュータプログラムは、入手可能である。これらの表示の検査により、候補の免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある作用の分析、即ちこの抗原に結合する候補の免疫グロブリン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、受容者から選択し、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。一般的に、高頻度可変領域残基は

50

、抗原結合への影響において直接的に、および最も実質的に関与する。

【0179】

ヒト化された抗O v r 1 1 5抗体の種々の形態が、意図される。例えば、ヒト化された抗体は、随意に1種または2種以上の細胞毒性剤と結合して、免疫結合体を生じる抗体断片、例えばF a bであってもよい。あるいはまた、ヒト化された抗体は、無傷の抗体、例えば無傷のI g G 1抗体であってもよい。

【0180】

ヒト抗体

ヒト化の代替として、ヒト抗体を発生することができる。例えば、現在では、免疫により、内因性免疫グロブリン産生の不存在下でヒト抗体の完全なレパートリーを生じることが
10
できる遺伝子組換え動物（例えばマウス）を生じることが可能である。例えば、キメラおよび生殖系列突然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、記載された。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの、このような生殖系列突然変異マウス中への移動の結果、抗原チャレンジによりヒト抗体の産生がもたらされる。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号を参照；および、あるいはまた、ファージ提示手法(McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990))を用いて、
20
ヒト抗体および抗体断片を、インビトロで、免疫していない供与者からの免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーから産生することができる。この手法において、抗体Vドメイン遺伝子を、インフレームで、糸状バクテリオファージ、例えばM 1 3またはf d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断片として表示する。

【0181】

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の結果、また、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。従って、このファージは、B細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージ提示法を、種々の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)中に概説されている。
30
V遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージ提示法のために用いることができる。Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)は、抗オキサゾロン抗体の種々のアレイを、免疫したマウスの脾臓から由来するV遺伝子の小さい無秩序な組み合わせライブラリーから単離した。免疫していないヒト供与者からのV遺伝子のレパートリーを構成することができ、抗原（自己抗原を含む）の種々のアレイに対する抗体を、本質的に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従って単離することができる。また米国特許第5,565,332号および5,573,905号を参照。上記したように、ヒト抗体を、また、インビトロ活性化B細胞により発生することができる（米国特許第5,567,610号および5,229,275号を参照）。

【0182】

抗体断片

ある状況において、全体の抗体よりむしろ抗体断片を用いる利点がある。断片の一層小さい大きさにより、迅速なクリアランスが可能になり、固体腫瘍に対して改善された接近がもたらされ得る。種々の手法が、抗体断片の産生のために開発された。伝統的に、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク質分解消化により由来した（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)を参照）。しかし、これらの断片は、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抗体断片は、すべて、大腸菌において発現され、これから分泌され得、従って大量のこれらの断片の容易な産生が可能になる。抗体断片を、上記した抗体ファージライブラリーから単離す
50

ることができる。

【0183】

あるいはまた、F a b' - S H断片を、大腸菌から直接回収し、化学的に結合させて、F (a b) 2断片を形成することができる(Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992))。他の方法において、F (a b) 2断片を、組換えホスト細胞培養物から直接単離することができる。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含む、増大したインビボでの半減期を有するF a bおよびF (a b) 2断片は、米国特許第5,869,046号に記載されている。抗体断片の産生のための他の手法は、技術のある実行者に明らかである。選択された抗体はまた、一本鎖F v断片(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号を参照。F vおよびs F vは、定常領域を欠いている無傷の組み合わせ部位を有する唯一の種である; 従って、これらは、インビボで用いる間に低下した非特異的結合に適する。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ることができる。Antibody Engineering, Borrebaeck編、上記を参照。抗体断片はまた、例えば米国特許第5,641,870号に記載されているように、「直線状抗体」であってもよい。このような直線状抗体断片は、単一選択性または二重選択性であってもよい。

10

【0184】

二重選択性抗体

二重選択性抗体は、少なくとも2種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。例示的な二重選択性抗体は、O v r 1 1 5タンパク質の2種の異なるエピトープに結合することができる。他のこのような抗体は、O v r 1 1 5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。あるいはまた、抗O v r 1 1 5アームを、白血球、例えばT細胞レセプター分子(例えばC 1 3 3)またはI g GについてのF cレセプター(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 5発現細胞に集中させ、局在化させることができる。二重選択性抗体を、また、細胞毒性剤をO v r 1 1 5を発現する細胞に局在化させるために用いることができる。これらの抗体は、O v r 1 1 5結合アームおよび細胞毒性剤(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)に結合するアームを有する。二重選択性抗体を、全長抗体または抗体断片(例えばF (a b) 2二重選択性抗体)として調製することができる。WO 96/16673には、二重選択性抗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、二重選択性抗E r b B 2 /抗F c R I抗体が開示されている。二重選択性抗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、二重選択性抗E r b B 2 /抗C D 3抗体が教示されている。

20

30

【0185】

二重選択性抗体を作成する方法は、当該分野において知られている。全長二重選択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無秩序な分類のために、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産生し、この中で、1個のみが、正確な二重選択性構造を有する。通常アフィニティークロマトグラフィー段階により行われる、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中に、およびTraunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)中に開示されている。

40

【0186】

種々の方法により、所望の結合特異性(抗体-抗原組み合わせ部位)を有する抗体可変ドメインが、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。好ましくは、この融合は、少なくともヒンジ、C_H2およびC_H3領域の一部を含むI g重鎖定常ドメインとである。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

50

(C H I)を有するのが、好ましい。免疫グロブリン重鎖融合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形質移入する。これにより、構造において用いられる3つのポリペプチド鎖の等しくない比率により、所望の二重選択性抗体の最適な収量が得られる際の態様において、3つのポリペプチド断片の相互の比率を調整する際の一層大きい柔軟性が得られる。しかし、等しい比率での少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現の結果、高い収量が得られる際、または比率が、所望の鎖の組み合わせの収量に対して顕著な影響を及ぼさない際には、2つまたはすべての3つ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。

【0187】

10

好ましくは、この方法における二重選択性抗体は、一方のアーム中に第1の結合特異性を有するハイブリッドの免疫グロブリン重鎖および他方のアーム中のハイブリッドの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)から構成されている。この非対称構造により、所望の二重選択性化合物を、所望でない免疫グロブリン鎖組み合わせから分離するのが容易になり、これは、二重選択性分子の1つのみの半分の部分中の免疫グロブリン軽鎖の存在により、分離の容易な方法が提供されるからであることが、見出された。この方法は、WO 94/04690中に開示されている。二重選択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。

【0188】

20

米国特許第5,731,168号に記載されている他の方法において、一对の抗体分子の間の界面を設計して、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の百分率を最大にすることができる。好ましい界面は、C H 3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の界面からの1つまたは2つ以上の小さいアミノ酸側鎖が、一層大きい側鎖(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、補償的な「空洞」が、第2の抗体分子の界面上に、大きいアミノ酸側鎖を一層小さいもの(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、作成される。これにより、ヘテロ二量体の収量を、他の所望でない最終生成物、例えばホモ二量体に対して増大するための機構が提供される。

【0189】

30

二重選択性抗体には、架橋した、または「ヘテロ結合した(heteroconjugate)」抗体が含まれる。例えば、ヘテロ結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する(米国特許第4,676,980号)、およびH I V感染の処置のための(WO 91/00360、WO 92/200373およびEP 03089)免疫系細胞を標的することが提案されている。ヘテロ結合抗体を、すべての慣用の架橋方法を用いて作成することができる。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号に、多くの架橋手法と共に開示されている。

【0190】

40

二重選択性抗体を抗体断片から生じるための手法はまた、文献に記載されている。例えば、二重選択性抗体を、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、無傷の抗体を、タンパク質分解的に切断して、F (a b ') 2断片を発生させる手順が記載されている。これらの断片は、ジチオール錯化剤、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 '断片を、チオニトロ安息香酸塩(T N B)誘導体に変換する。次に、F a b ' - T N B誘導体の1つを、F a b ' - チオールに、メルカプトエチルアミンで還元することにより再び変換し、等モル量の他のF a b ' - T N B誘導体と混合して、二重選択性抗体を形成する。生成した二重選択性抗体を、酵素の選択的固定化のための剤として用いることができる。

【0191】

50

最近の進行により、大腸菌からのF a b ' - S H断片の直接的な回収が容易になり、これを、化学的に結合して、二重選択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選択性抗体 F (a b ') 2 分子の産生が記載されている。各々の F a b ' 断片は、大腸菌から別個に分泌されており、これに、インビトロでの定方向化学的カップリングを施して、二重選択性抗体を形成した。このようにして形成した二重選択性抗体は、E r b B 2 レセプターを過剰発現する細胞および正常なヒト T 細胞に結合し、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞毒性リンパ球の溶解活性を誘発することができた。

【 0 1 9 2 】

二重選択性抗体断片を、組換え細胞培養物から直接作成し、単離するための種々の手法がまた、記載されている。例えば、二重選択性抗体は、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。

【 0 1 9 3 】

Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記載された「ダイアボディー」手法により、二重選択性抗体断片を作成するための代替の機構が提供された。この断片は、同一の鎖上の 2 つのドメイン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。従って、1 つの断片の V H および V L ドメインを、他の断片の相補的な V L および V H ドメインと対形成し、これにより 2 つの抗原結合部位を形成するように強制する。一本鎖 F v (s F v) 二量体を用いることにより二重選択性抗体断片を作成するための他の方法がまた、報告されている。Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照。

【 0 1 9 4 】

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

【 0 1 9 5 】

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（I g M 群以外である）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、二量体化ドメインおよび 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。好ましい二量体化ドメインは、F c 領域またはヒンジ領域を含む（またはこれからなる）。この筋書きにおいて、抗体は、F c 領域および、F c 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。

【 0 1 9 6 】

本明細書中で好ましい多価抗体は、3 個～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 つ以上の可変ドメインを含む。例えば、1 つまたは 2 つ以上のポリペプチド鎖は、V D 1 (X 1 n - V D 2 - (X 2) n - F c を含むことができ、ここで、V D 1 は、最初の可変ドメインであり、V D 2 は、2 番目の可変ドメインであり、F c は、F c 領域の 1 つのポリペプチド鎖であり、X 1 および X 2 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。例えば、1 つまたは 2 つ以上のポリペプチド鎖は、以下のものを含むことができる：V H - C H I - 柔軟リンカー - V H - C H I - F c 領域鎖；または V H - C H I - V H - C H I - F c 領域鎖。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）の軽鎖可変ドメイン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 個の軽鎖可変ドメイン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ドメインポリペプチドは

、軽鎖可変ドメインを含み、随意にさらにCドメインを含む。

【0197】

他のアミノ酸配列改変

本明細書中に記載した抗Ovr115抗体の1または2以上のアミノ酸配列改変が、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Ovr115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Ovr115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。

【0198】

このような改変には、例えば、抗Ovr115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。最終的な構造物が、所望の特徴を有する場合には、欠失、挿入および置換のすべての組み合わせを行って、最終的な構造物に到達する。アミノ酸変化はまた、抗Ovr115抗体の翻訳後プロセス、例えばグリコシル化部位の数または位置の変化を変化させ得る。

【0199】

変異原性のための好ましい位置である抗Ovr115抗体のある残基または領域の同定に有用な方法は、Cunningham and Wellsにより、Science, 244:1081-1085 (1989)中に記載されているように、「アラニン走査変異原性」と呼ばれる。ここで、抗Ovr115抗体内の残基または標的残基の群(例えば、帯電した残基、例えばarg、asp、his、lysおよびglu)を同定し、中性の、または負に帯電したアミノ酸(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Ovr115抗原との相互作用に影響する。

【0200】

次に、置換に対する機能的な感受性を例証するアミノ酸の位置を、置換の部位において、またはこの部位についてさらなる、または他の変種を導入することにより、精巧にする。従って、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、突然変異自体の性質を、予め決定する必要はない。例えば、所定の部位における突然変異の性能を分析するために、ala走査または無秩序な変異原性を、標的コドンまたは領域において行い、発現された抗Ovr115抗体変異体を、所望の活性についてスクリーニングする。

【0201】

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、並びに単一の、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Ovr115抗体、または細胞毒性ポリペプチドに融合した抗体が含まれる。抗Ovr115抗体分子の他の挿入変更には、酵素に対する(例えばADEPTについての)抗Ovr115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。

【0202】

変異体の他のタイプは、アミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、少なくとも1個のアミノ酸残基を、異なる残基により置換された抗Ovr115抗体分子中に有する。置換変異原性に最も大きく関連する部位には、高頻度可変領域が含まれるが、FR変化がまた、意図される。保存的置換を、「好ましい置換」の見出しの下に、表Iに示す。このような置換により、生物学的活性の変化がもたらされる場合には、表1において「例示的な置換」と命名されているか、またはアミノ酸群に関して以下にさらに記載されている、一層実質的な変化を、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。

【0203】

10

20

30

40

【表 1】

表 I アミノ酸置換

最初の残基	例示的な置換	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; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; 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; ノルロイシン	leu

【0204】

抗体の生物学的特性における実質的な改変が、(a)例えばシートもしくはらせん高次構造としての、置換の領域におけるポリペプチド主鎖の構造、(b)標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖の高を維持することに対するこれらの効果において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群に分けられる：

(1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、lie；(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) 鎖配向に影響する残基：gly、pro；および(6) 芳香族：trp、tyr、phe。

【0205】

非保存性置換は、これらの群の1つの要素の他の群のものでの交換を伴う。抗Ovr115抗体の適切な高次構造を維持する際に伴われないすべてのシステイン残基はまた、一般的にセリンで置換されて、分子の酸化的安定性が改善され、異常な架橋が防止され得る。逆に、1または2以上のシステイン結合を、抗体に加えて、この安定性を改善することができる(特に、抗体が、抗体断片、例えばFv断片である際)。

【0206】

置換変異体の特に好ましいタイプは、親抗体(例えばヒト化またはヒト抗体)の1つまたは2つ以上の高頻度可変領域残基の置換を伴う。一般的に、さらなる発生について選択された、得られた1種または2種以上の変異体は、これらが発生する親抗体に対して改善された生物学的特性を有する。このような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を伴う。要するに、いくつかの高頻度可変領域部位(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る。このようにして生じた抗体変種を、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種を、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。改変のための候補の高頻度可変領域部位を同定する

ために、アラニン走査変異原性を行って、抗原結合に顕著に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。あるいはまた、またはさらに、抗原 - 抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体とヒトO v r 1 1 5 との間の接触点を同定するのが、有益であり得る。このような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。このような変異体が生じた後に、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。

【0207】

抗体の他のタイプのアミノ酸変異体は、抗体の最初のグリコシル化パターンを変化させる。変化させるにより、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に結合しているか、またはOに結合している。Nに結合しているは、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がプロリン以外のすべてのアミノ酸である、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。従って、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成される。

10

【0208】

Oに結合したグリコシル化は、糖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。グリコシル化部位の抗体への添加が、アミノ酸配列を変化させて、これが、上記した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(Nに結合したグリコシル化部位について)ことにより、好都合に達成される。変化はまた、1つまたは2つ以上のセリンまたはスレオニン残基の、最初の抗体の配列への添加、またはこれによる置換により、なされ得る(Oに結合したグリコシル化部位について)。

20

【0209】

抗O v r 1 1 5 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種々の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において)またはオリゴヌクレオチド媒介(もしくは部位特異的な)変異原性、PCR変異原性および抗O v r 1 1 5 抗体の変異体もしくは非変異体方式をコードする、比較的早期に調製された核酸分子のカセット変異原性による調製が含まれるが、これらには限定されない。

30

【0210】

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(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害(CDC)を増強するのが、望ましい場合がある。これを、抗体のFc領域における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。あるいはまた、またはさらに、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。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(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。増強した抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体をまた、Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993)中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。あるいはまた、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能力を有することができる抗体を、設計することができる。Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)を参照。

40

【0211】

50

抗体の血清半減期を増大するために、例えば米国特許第5,739,277号に記載されているように、サルベージレセプター結合エピトープを抗体（特に抗体断片）中に導入することができる。本明細書中で用いる用語「サルベージレセプター結合エピトープ」は、抗体のFc領域のエピトープを意味する。

【0212】

所望の特性を有する抗体についてのスクリーニング

抗体を発生させるための手法は、上記で記載した。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。抗Ovr115抗体の所望の特性には、細胞増殖阻害効果、腫瘍増殖阻害効果、細胞増殖阻害効果、腫瘍増殖阻害効果、細胞死滅効果、腫瘍死滅効果、腫瘍に対する細胞分裂停止効果、タンパク質機能阻害効果およびタンパク質の細胞表面からの除去が含まれる。抗Ovr115抗体の高度に望ましい特性は、Ovr115プロテアーゼ活性の阻害である。

10

【0213】

増殖阻害効果を含む、上記に列挙した本発明の抗Ovr115抗体の所望の特性を、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Ovr115遺伝子での形質移入に続いてOvr115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Ovr115形質移入細胞を、本発明の抗Ovr115モノクローナル抗体で、種々の濃度において、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、またはある他の比色アッセイにより分析することができる。増殖を測定する他の方法は、本発明の抗Ovr115抗体の存在下で、または不存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、細胞を収穫し、DNA中に導入された放射性の量を、シンチレーションカウンターにおいて定量する。適切な正の対照には、選択された細胞系の、当該細胞系の増殖を阻害することが知られている増殖阻害抗体での処理が含まれる。インビボでの腫瘍細胞の増殖阻害を、以下の実験例の章において記載したように、種々の方法において決定することができる。好ましくは、腫瘍細胞は、Ovr115を過剰発現するものである。

20

【0214】

好ましくは、抗Ovr115抗体は、インビトロまたはインビボでOvr115発現腫瘍細胞の細胞増殖を、約0.5～30μg/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%、一層好ましくは約30～100%、およびさらに一層好ましくは約50～100%または70～100%阻害する。増殖阻害を、細胞培養物中で、約0.5～30μg/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てから1～10日後に決定する。抗体は、約1μg/体重1kg～約100mg/体重1kgにおける抗Ovr115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、インビボで増殖阻害的である。

30

【0215】

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、対照に対して評価することができる。PI取り込みアッセイを、補体および免疫エフェクター細胞の不存在において行うことができる。Ovr115発現腫瘍細胞を、培地のみ、または例えば約10μg/mlにおいて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。細胞を、3日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、細胞を、35mmの濾過器でキャップした12×75の管（管あたり1ml、処理群あたり3つの管）中に、細胞凝集塊の除去のために洗浄し、等分する。次に、管に、PI（10μg/ml）を施与する。試料を、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たように、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗体を、

40

50

細胞死誘発抗体として選択することができる。

【0216】

関連する抗体により結合されたO v r 1 1 5上のエピトープに結合する抗体、例えば本発明のO v r 1 1 5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, Harlow and David Lane編(1988)中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O v r 1 1 5抗体と同一の部位またはエピトープに結合するかどうかを決定することができる。あるいはまた、またはさらに、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、例えばアラニン走査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、適切な折り畳みを裏付ける。異なる方法において、O v r 1 1 5の種々の領域に対応するペプチドを、試験抗体または試験抗体および特徴づけられた、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。

10

【0217】

例えば、本発明の抗体により結合された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、O v r 1 1 5含有試料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O v r 1 1 5に結合したO v r 1 1 5抗体のレベルを決定し、混合物中で結合したO v r 1 1 5抗体のレベルに対して、対照混合物に対して比較し、ここで、対照と比較しての混合物中のO v r 1 1 5に結合したO v r 1 1 5抗体のレベルは、本発明の抗O v r 1 1 5抗体により結合されたエピトープへの試験抗体の結合の指標である。O v r 1 1 5に結合したO v r 1 1 5抗体のレベルを、E L I S Aにより決定する。対照は、正の対照または負の対照または両方であってもよい。例えば、対照は、O v r 1 1 5、本発明のO v r 1 1 5抗体および本発明のO v r 1 1 5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O v r 1 1 5抗体は、本明細書中に開示されているもののような標識で標識されている。O v r 1 1 5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ていてもよい。

20

【0218】

免疫結合体

本発明はまた、抗癌剤、例えば細胞毒性剤または増殖阻害剤に結合した抗体を含む免疫結合体での療法に関する。

30

【0219】

このような免疫結合体の発生において有用な化学療法剤は、前に記載した。抗体および1種または2種以上の小さい分子の毒素、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C C 1 0 6 5の結合体並びに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体はまた、本明細書において意図される。

【0220】

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O v r 1 1 5抗体(全長または断片)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。

40

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、ある微生物がまた、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)。合成メイタンシノール並びにこの誘導体および類似体は、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

50

の開示を、本明細書中に、参照により明確に導入する。

【0221】

メイタンシノイド - 抗体結合体

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結合させた。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、この開示を、本明細書中に、参照により明確に導入する。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)には、ヒト直腸結腸癌に対して向けられたモノクローナル抗体C 2 4 2に結合したDMIと表示されたメイタンシノイドを含む免疫結合体が記載されている。この結合体は、培養した結腸癌細胞に対して高度に細胞毒性であると見出され、インビボでの腫瘍増殖アッセイにおいて抗腫瘍活性を示した。

10

【0222】

Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992)には、メイタンシノイドがジスルフィドリンカーを介して、ヒト結腸癌細胞系における抗原に結合するマウス抗体A 7、またはHER-2/neu発癌遺伝子に結合する他のマウスモノクローナル抗体TA-1に結合している免疫結合体が記載されている。TA-1-メイタンシノイド結合体の細胞毒性が、細胞あたり 3×10^5 のHER-2表面抗原を発現するヒト乳癌細胞系SK-BR-3に対してインビトロで試験された。薬剤結合体は、遊離のメイタンシノイド薬剤と同様の程度の細胞毒性を達成し、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的細胞毒性を示した。

20

【0223】

抗Ovr 1 1 5抗体 - メイタンシノイド結合体 (免疫結合体)

抗Ovr 1 1 5抗体 - メイタンシノイド結合体を、抗Ovr 1 1 5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かの生物学的活性を顕著に低下させずに化学的に結合させることにより、調製する。抗体分子あたり結合した平均で3~4個の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ずに標的細胞の細胞毒性を増強させることにおいて効能を示したが、毒素/抗体の1個の分子さえも、裸の抗体の使用にまさって細胞毒性を増強すると予測される。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され得る。好適なメイタンシノイド類は、例えば、米国特許第5,208,020号並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改変されているメイタンシノール類似体、例えば種々のメイタンシノールエステルである。

30

【0224】

例えば米国特許第5,208,020号またはEP特許0 425 235 B1およびChari et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992)中に開示されているものを含む、抗体 - メイタンシノイド結合体を作成するための、当該分野において知られている多くの結合基がある。この結合基には、上記で識別した特許中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、ジスルフィドおよびチオエーテル基が好ましい。抗体およびメイタンシノイドの結合体を、種々の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

40

50

、5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン) を用いて作成することができる。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。

【 0 2 2 5 】

リンカーは、結合のタイプに依存して、メイタンシノイド分子に、種々の位置において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た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改変された C - 1 4 位置、水酸基で改変された 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ール類似体の C - 3 位置において形成する。

【 0 2 2 6 】

カリケアマイシン

関連する他の免疫結合体は、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 5 抗体を含む。カリケアマイシン族の抗生物質は、ピコモル以下の濃度において二重らせん D N A 破壊を発生させることができる。カリケアマイシン族の結合体の調製について、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。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: 3336 (1993), Lode et al. Cancer Research 58: 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、これらには限定されない。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、作用の細胞内部位を有し、原形質膜を容易に横断しない。従って、これらの剤の抗体媒介内部移行による細胞取り込みにより、これらの細胞毒性効果が大幅に増大する。

【 0 2 2 7 】

他の細胞毒性剤

本発明の抗 O v r 1 1 5 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 (streptozocin)、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剤の族並びに 에스페ラマイシン (esperamicin) 類 (米国特許第 5,877,296 号) が含まれる。用いることができる酵素的に活性な毒素およびこの断片には、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の 1 - 5 非結合活性断片、エクソトキシン A 鎖 (Pseudomonas aeruginosa から)、リシン A 鎖、アブリン 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、Phytolacca americana タンパク質 (P A P I、P A P I I、および P A P - S)、momordica charantia 阻害剤、カルシン (curcin)、クロチン (crocin)、sapaonaria officinalis 阻害剤、ゲロニン、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。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 分解酵素) との間に形成した免疫結合体を意図する。

【 0 2 2 8 】

腫瘍の選択的な破壊のために、抗体は、高度に放射性原子を含むことができる。種々の放射性同位体は、放射結合した抗 O v r 1 1 5 抗体の産生のために有用である。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、診断のた

10

20

30

40

50

めに用いられる際には、これは、シンチグラフィ研究のための放射性原子、例えば Tc^{99m} もしくは I^{123} 、または核磁気共鳴 (NMR) 画像法 (また磁気共鳴画像法、*mri* として知られている) 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。

【0229】

放射または他の標識を、結合体中に、既知の方法において導入することができる。例えば、ペプチドを、生合成することができるか、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することができる。標識、例えば Tc^{99m} 、 I^{123} 、 In^{111} 、 Re^{186} 、 Re^{188} を、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 を、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 Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)には、他の方法が詳細に記載されている。

10

【0230】

抗体および細胞毒性剤の結合体を、種々の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) を用いて作成することができる。

20

【0231】

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を参照。リンカーは、細胞中での細胞毒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、用いることができる。

30

【0232】

あるいはまた、抗Ovr115抗体および細胞毒性剤を含む融合タンパク質を、例えば、組換え手法またはペプチド合成により作成することができる。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つの部分をコードする、それぞれの領域を含むことができる。

40

【0233】

さらに、抗体を、腫瘍前標的において用いるために、「レセプター」(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 - レセプター結合体を、患者に投与し、続いて結合していない結合体を、循環から、クリアリング剤を用いて除去し、次に、細胞毒性剤 (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。

【0234】

抗体依存性酵素媒介プロドラッグ療法 (ADEPT)

本発明の抗体を、また、抗体を、プロドラッグ (例えばペプチジル化学療法剤、WO81/0

50

1145を参照)を活性抗癌薬剤に変換するプロドラッグ活性化酵素に結合させることにより、A D E P Tにおいて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。

【0235】

A D E P Tに有用な免疫結合体の酵素成分には、これをこの一層活性な、細胞毒性の形態に変換するようにして、プロドラッグに対して作用することができるすべての酵素が含まれる。本発明の方法において有用な酵素には、リン酸塩含有プロドラッグを遊離の薬剤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の薬剤に変換するのに有用なアリールスルファターゼ；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；ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤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の薬剤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；P-ラクタム類で誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変換するのに有用なP-ラクタマーゼ；並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の薬剤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。

【0236】

あるいはまた、また当該分野において「アブザイム(abzymes)」として知られている、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の活性な薬剤に変換することができる(例えば、Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)を参照)。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。本発明の酵素を、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O v r 1 1 5抗体に共有結合させることができる。

【0237】

あるいはまた、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を、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)を参照)。

【0238】

他の抗体改変

抗体の他の改変が、ここで意図される。例えば、抗体を、種々の非タンパク質ポリマー、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(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)調製した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捕獲することができる。このような手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版、Oslo, A., 編(1980)中に開示されている。

【0239】

本明細書中に開示した抗O v r 1 1 5抗体はまた、免疫リポソームとして処方することができる。「リポソーム」は、薬剤を哺乳動物に送達するのに有用な種々のタイプの脂質、リン脂質および/または界面活性剤で構成されている小さい小胞である。リポソームの成分は、一般的に、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

を含むリボソームは、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および4,544,545号; 並びにW097/38731、1997年10月23日刊行に記載されているように、調製される。増大した循環時間を有するリボソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

【0240】

特に有用なリボソームを、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、発生させることができる。リボソームを、所定の孔の大きさを有するフィルターを通して押し出して、所望の直径を有するリボソームを得る。本発明の抗体のFab'断片を、リボソームに、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結合させることができる。化学療法剤は、随意に、リボソーム内に包含される。Gabizon et al. J. National Cancer Inst.81(19)1484 (1989)を参照。

【0241】

ベクター、宿主細胞および組換え方法

本発明はまた、ヒト化された抗Ovr115抗体、ベクターおよび核酸を含む宿主細胞をコードする、単離された核酸分子、並びに抗体を産生するための組換え手法を提供する。抗体、これをコードする核酸分子の組換え産生のために、これを単離し、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可能な(operable)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、慣用の手順を用いて(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、入手可能である。ベクター成分には、一般的に、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、複製の起源、1種または2種以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、および転写終了配列。

【0242】

シグナル配列成分

本発明の抗Ovr115抗体を、直接的のみならず、好ましくは成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端において特異的な切断部位を有するシグナル配列または他のポリペプチドである、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(即ちシグナルペプチダーゼにより切断される)ものである。自然の抗Ovr115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ついて、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、1ppまたは熱安定性エンテロトキシニンEリーダーの群から選択された原核シグナル配列により、置換する。酵母分泌のために、自然のシグナル配列を、例えば、酵母インベルターゼリーダー、oc因子リーダー(SaccharomycesおよびKluyveromyces cc因子リーダーを含む)または酸ホスファターゼリーダー、Calbicans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、入手可能である。このような前駆体領域についてのDNAを、抗Ovr115抗体をコードするDNAに、読み枠において連結する。

【0243】

複製の起源

発現およびクローニングベクターは、共に、ベクターが、1または2以上の選択された宿主細胞中で複製されるのを可能にする核酸配列を含む。一般的に、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のを可能にするものであり、複製の起源または自己複製配列を含む。このような配列は、種

々の細菌、酵母およびウイルスについて十分知られている。プラスミド p B R 3 2 2 からの複製の起源は、ほとんどのグラム陰性細菌に適し、2 μ プラスミド起源は、酵母に適し、種々のウイルス起源 (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。一般的に、複製成分の起源は、哺乳動物発現ベクターについては必要ではない (S V 4 0 起源は、典型的には、これが早期のプロモーターを含むためのみで用いることができる)。

【 0 2 4 4 】

選択遺伝子成分

発現およびクローニングベクターは、また選択可能なマーカーと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し、(b) 栄養要求性欠乏を補完し、または (c) 複雑な培地から入手可能ではない臨界的に重要な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。異種性遺伝子で成功に形質転換されたこれらの細胞は、薬剤耐性を付与するタンパク質を産生し、従って選択計画より長く生存する。このような優性の選択の例は、薬剤ネオマイシン、マイコフェノール酸およびヒグロマイシンを用いる。

【 0 2 4 5 】

哺乳動物細胞に適する選択可能なマーカーの他の例は、抗 O v r 1 1 5 抗体核酸、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、メトトレキセート (M t x)、即ち D H F R の競合的アンタゴニスト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 を用いる際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 A T C C C R L - 9 0 9 6) である。

【 0 2 4 6 】

あるいはまた、抗 O v r 1 1 5 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された宿主細胞 (特に内因性 D H F R を含む野生型宿主) を、選択可能なマーカー、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 号を参照。

【 0 2 4 7 】

酵母において用いるの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. 440 76 または PEP4 Jones, Genetics, 85:12 (1977) のための選択マーカーを提供する。次に、酵母宿主細胞ゲノム中の t r p 1 病変の存在により、トリプトファンの不存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が得られる。同様に、L e u 2 欠乏酵母菌株 (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。

【 0 2 4 8 】

さらに、1 . 6 p m 環状プラスミド p K D I から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。あるいはまた、組換え子ウシキモシンの大規模な産生のための発現系は、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多コピー発現ベクターはまた、開示されている。

10

20

30

40

50

Bio/Technology, 9:968-975 (1991)。

【 0 2 4 9 】

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、ホスト生物により認識されるプロモーターを含み、抗Ovr 1 1 5抗体核酸に作動的に結合している。原核ホスト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(t r p)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Ovr 1 1 5抗体をコードするDNAに作動的に結合したShine-Dalgar

10

【 0 2 5 0 】

プロモーター配列は、真核生物について知られている。事実上すべての真核遺伝子は、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が豊富な領域を有する。多くの遺伝子の転写の開始から70～80塩基上流に見出される他の配列は、CNC AAT領域であり、ここでNは、すべてのヌクレオチドであってもよい。ほとんどの真核遺伝子の3'末端において、ポリA尾のコード配列の3'末端への添加のためのシグナルであってもよいAATAA配列がある。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。酵母ホスト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、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド

20

【 0 2 5 1 】

増殖条件により制御された転写の追加の利点を有する誘導性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、並びにマルトースおよびガラクトース利用の原因となる酵素についてのプロモーター領域である。酵母発現において用いるのに適する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

【 0 2 5 2 】

哺乳動物ホスト細胞中のベクターからの抗Ovr 1 1 5抗体転写は、このようなプロモーターが、ホスト細胞系と適合性である場合には、例えば、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の、熱ショックプロモーターからの、ウイルス、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)、ウシバピローマウイルス、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サルウイルス40(SV40)のゲノムから得られたプロモーターにより、制御される。

40

【 0 2 5 3 】

SV40ウイルスの初期の、および後期のプロモーターは、また複製のSV40ウイルス起源を含むSV40制限断片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座の早期のプロモーターは、HindIII-E制限断片として好都合に得られる。ベクターとしてウシバピローマウイルスを用いる哺乳動物ホストにおいて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。この系の変更は、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cDNAの発現について、Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)を参照。あるいはまた、Rous Sarcoma Virusの長い末端繰り返しを、プロモーターとして用いることができる。

50

【 0 2 5 4 】

エンハンサー要素成分

高等真核生物による本発明の抗O v r 1 1 5抗体をコードするDNAの転写は、しばしば、エンハンサー配列をベクター中に挿入することにより、増強される。多くのエンハンサー配列が、現在哺乳動物遺伝子（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。例には、複製起源の後期の側上のSV40エンハンサー（bp 100 ~ 270）、サイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、複製起源の後期の側上のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。また真核プロモーターの活性化のためのエンハンシング要素について、Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)を参照。エンハンサーを、ベクター中に、抗O v r 1 1 5抗体コード配列に5'または3'の位置においてスプライシングすることができるが、好ましくは、プロモーターから5'部位に位置する。

10

【 0 2 5 5 】

転写終了成分

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の細胞）において用いられる発現ベクターはまた、転写を終了させるのに、およびmRNAを安定化させるのに必要な配列を含む。このような配列は、真核またはウイルスDNAまたはcDNAの5'、および場合によっては3'末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 5抗体をコードするmRNAの末翻訳部分中のポリアダニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。1つの有用な転写終了成分は、ウシ成長ホルモンポリアダニル化領域である。WO 94/11026およびこの中に開示されている発現ベクターを参照。

20

【 0 2 5 6 】

宿主細胞の選択および形質転換

ここでのベクター中でDNAをクローニングするかまたは発現するのに適する宿主細胞は、原核、酵母または上記した高等真核細胞である。この目的に適する原核生物には、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、例えばEscherichia、例えば大腸菌、エンテロバクター、Erwinia、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、並びに桿菌、例えばB. subtilisおよびB. licheniformis（例えばDD 26 6,710、1989年4月12日刊行中に開示されているB. licheniformis 41P）、シュードモナス属、例えばP. aeruginosa、並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、大腸菌294（ATCC 31,446）であるが、他の菌株、例えば大腸菌B、大腸菌X 1776（ATCC 31,537）および大腸菌W 3110（ATCC 27,325）が好適である。これらの例は、限定的であるよりむしろ例示的である。

30

【 0 2 5 7 】

特にグリコシル化およびFcエフェクター機能が必要ではない際に、例えば治療的抗体が、細胞毒性剤（例えば毒素）に結合しており、免疫結合体が、単独で、腫瘍細胞破壊における有効性を示す際に、全長抗体、抗体断片および抗体融合タンパク質を、細菌中に産生することができる。全長抗体は、循環において一層長い半減期を有する。大腸菌の産生は、比較的迅速であり、比較的費用効率的である。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現について、翻訳開始領域（TIR）並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。これらの特許を、参照により本明細書中に導入する。発現の後に、抗体を、大腸菌細胞ペーストから可溶性画分中に単離し、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。最終的な精製を、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して、行うことができる。

40

50

【 0 2 5 8 】

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O v r 1 1 5抗体コードベクターに適するクローニングまたは発現ホストである。*Saccharomyces cerevisiae*または一般的なパン酵母は、初等の真核ホスト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、例えば*Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*ホスト、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. drosophilae* (ATCC 36,906)、*K. thermotolerans*および*K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); カンジダ; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*、例えば*Schwanniomyces occidentalis*; 並びに糸状真菌類、例えばパンカビ属、アオカビ属、*Tolypocladium*およびコウジカビ属ホスト、例えば*A. nidulans*および*A. niger*が、ここで一般的に入手可能であり、有用である。

10

【 0 2 5 9 】

グリコシル化された抗O v r 1 1 5抗体の発現に適するホスト細胞は、多細胞生物から由来する。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並びにホスト、例えば*Spodoptera frugiperda* (イモムシ)、*Aedes aegypti* (カ)、*Aedes albopictus* (カ)、*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ホスト細胞が、同定されている。形質移入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B m - 5菌株が、公的に入手可能であり、このようなウイルスを、ここで、特に*Spodoptera frugiperda*細胞の形質移入のための本発明のウイルスとして用いることができる。

20

【 0 2 6 0 】

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、ホスト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を参照。

【 0 2 6 1 】

30

しかし、脊椎動物細胞において興味が最も大きく、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。有用な哺乳動物ホスト細胞系の例は、SV 40により形質転換したサル腎臓CV 1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); 仔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 (TM 4、Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); サル腎臓細胞 (CV 1 ATCC CCL 70); アフリカグリーンサル腎臓細胞 (VERO - 76、ATCC CRL 1587); ヒト子宮頸癌腫細胞 (HEp 2、ATCC CCL 2); イヌ腎臓細胞 (MDCK、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 (W 138、ATCC CCL 75); ヒト肝臓細胞 (Hep G 2、1413 8065); マウス乳腺腫瘍 (MMT 060562、ATCC CCL 5 1); TRI細胞 (Mather et al., *Annals N. Y Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5細胞; FS 4細胞; およびヒト肝細胞腫系列 (Hep G 2) である。

40

【 0 2 6 2 】

ホスト細胞を、上記した発現またはクローニングベクターで、抗O v r 1 1 5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、慣用の栄養素培地中で

50

培養する。

【0263】

ホスト細胞の培養

本発明の抗Ovr115抗体を産生するために用いられるホスト細胞を、種々の培地中で培養することができる。商業的に入手できる培地、例えばハムのFIO(Sigma)、基礎培地(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)およびダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)(Sigma)は、ホスト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、ホスト細胞のための培養培地として用いることができる。これらの培地のすべてに、所要に応じて、ホルモンおよび/または他の増殖因子(例えばインシュリン、トランスフェリンもしくは上皮細胞増殖因子)、塩(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を、また、当業者に知られている適切な濃度で含有させることができる。培養条件、例えば温度、pHなどは、発現のために選択されたホスト細胞について前に用いられているものであり、通常の当業者には明らかである。

【0264】

抗Ovr115抗体の精製

組換え手法を用いた際に、抗体を、細胞内で、細胞膜周辺腔中で産生するか、または培地中に直接分泌することができる。抗体が、第1の段階として、細胞内で産生された場合には、粒子状残骸、ホスト細胞または溶解した断片のいずれかを、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。要するに、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。細胞残骸を、遠心分離により除去することができる。抗体が、培地中に分泌される際には、このような発現系からの上清を、一般的に、先ず商業的に入手できるタンパク質濃縮フィルター、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを用いて濃縮する。プロテアーゼ阻害剤、例えばPMSFを、前述の段階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、外来性の汚染物の増殖を防止することができる。

【0265】

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、抗体中に存在するすべての免疫グロブリンFcドメイン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))。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のために推薦される(Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (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、他のマトリックスが、入手できる。機械的に安定なマトリックス、例えば制御された孔のガラスまたはポリ(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することができるよりも迅速な流速および短い加工時間が可能になる。抗体が、CH3ドメインを含む場合において、Bakerbond ABX(登録商標)樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)が、精製のために有用である。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別、エタノー

ル沈殿、逆相HPLC、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paraギン酸カラム）上でのクロマトグラフィー、等電点電気泳動、S I D S - P A G E および硫酸アンモニウム沈殿がまた、回収されるべき抗体に依存して入手可能である。

【0266】

1または2以上のすべての予備の精製段階に続いて、関連する抗体および汚染物を含む混合物に、約2.5～4.5のpHにおいて溶離緩衝液を用いて、好ましくは低い塩濃度（例えば約0～0.25Mの塩）において行われる低pH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。

【0267】

医薬処方物

本発明において用いる抗体の医薬処方物を、貯蔵のために、所望の程度の純度を有する抗体を随意的薬学的に許容し得る担体、添加剤または安定剤(Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol, A.編(1980))と、凍結乾燥した処方物または水性溶液の形態で混合することにより、調製する。許容し得る担体、添加剤または安定剤は、用いられる用量および濃度において、受容者に対して無毒性であり、これには、緩衝液、例えば酢酸、トリス、リン酸、クエン酸および他の有機酸類；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10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；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；トニシファイヤー(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Zn-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(PEG)が含まれる。抗体は、好ましくは、5～200mg/ml、好ましくは10～100mg/mlの濃度での抗体を含む。

【0268】

ここでの処方物はまた、所要に応じて、処置される特定の適応のための1種より多い活性化合物、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Ovr115抗体に加えて、1種の処方物において、Ovr115上の異なるエピトープに結合する追加の抗体、例えば第2の抗Ovr115抗体、またはある他の標的、例えば特定の癌の増殖に影響する増殖因子に対する抗体を含むのが、望ましい場合がある。あるいはまた、またはさらに、この組成物は、さらに、化学療法剤、細胞毒性剤、サイトカイン、増殖阻害剤、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。このような分子は、好適に、意図される目的のために有効な量で、組み合わせて存在する。

【0269】

活性成分をまた、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、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捕獲することができる。このような手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol, A.編(1980)中に開示されている。

10

20

30

40

50

【0270】

持続放出製剤を、調製することができる。持続放出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-グルタミン酸およびエチル-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）並びにポリ-D-（-）ヒドロキシ酪酸が含まれる。

10

【0271】

インビボでの投与のために用いるべき処方物は、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。

【0272】

抗Ovr115抗体を用いた方法および処置

本発明において、細胞表面上のOvr115に結合すると内部移行する抗Ovr115抗体を用いて、Ovr115発現癌細胞、特に卵巣癌、膵臓癌、肺癌または乳癌により特徴づけられる癌、例えば卵巣漿液腺癌または乳房浸潤乳管癌および関連する転移を有する、これを必要としている被検者を処置する。

【0273】

癌は、一般的に、Ovr115発現細胞を含み、従って抗Ovr115抗体は、これに結合することができる。癌が、Ovr115分子の過剰発現により特徴づけられ得る一方、本出願は、さらに、Ovr115過剰発現癌であるとは考慮されない癌を処置するための方法を提供する。

20

【0274】

本発明はまた、Ovr115を過剰発現する細胞を検出するための方法および、Ovr115を発現する細胞を検出するにあたり、または患者からの血清中のOvr115を検出するにあたり有用な診断キットに関する。この方法は、細胞含有試験試料を本発明の抗体と混ぜ合わせる、試験試料を、試験試料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試料において結合する抗体のレベルを、細胞の対照試料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むことができる。好適な対照は、例えば、試験試料と同一のタイプの正常な細胞の試料またはOvr115過剰発現細胞を含まないことが知られている細胞試料である。このような対照試料より高いOvr115結合のレベルは、Ovr115を過剰発現する細胞を含む試験試料の指標である。あるいはまた、対照は、Ovr115を過剰発現する細胞を含むことが知られている細胞の試料であり得る。このような場合において、対照試料に類似した、またはこれを超える試験試料におけるOvr115抗体結合のレベルは、Ovr115を過剰発現する細胞を含む試験試料の指標である。

30

【0275】

Ovr115過剰発現を、種々の診断アッセイで検出することができる。例えば、Ovr115の過剰発現を、免疫組織化学（IHC）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、IHCアッセイを施し、以下のようにしてOvr115タンパク質染色強度基準と一致させることができる。

40

スコア0 染色は観察されないか、または腫瘍細胞の10%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10%を超える比率において検出される。細胞は、これらの膜の一部において染色されるに過ぎない。

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10%を超える比率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10%を超える比率におい

50

て観察される。

O v r 1 1 5 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 5 を過剰発現しないとして特徴づけることができ、一方2+または3+のスコアを有する腫瘍を、O v r 1 1 5 を過剰発現するとして特徴づけることができる。

【0276】

あるいはまた、またはさらに、F I S Hアッセイ、例えばINFORM (登録商標) (Ventana, Arizonaにより販売されている) またはPATHVISION (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って、腫瘍におけるO v r 1 1 5 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 5 過剰発現または増幅を、インビボ診断アッセイを用いて、例えばO v r 1 1 5 に結合し、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。

10

【0277】

O v r 1 1 5 を発現するかまたは過剰発現する細胞を含むことが疑われる試料を、本発明の抗体と、抗体のO v r 1 1 5 への特異的な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 5 抗体への結合および/または内部移行は、O v r 1 1 5 を発現する細胞の指標である。結合のレベルを決定し、好適な対照と比較することができ、ここで、対照と比較して上昇したレベルの結合したO v r 1 1 5 は、O v r 1 1 5 過剰発現の指標である。O v r 1 1 5 を過剰発現する細胞を含むことが疑われる試料は、癌細胞試料、特に卵巣癌、例えば卵巣漿液腺癌または乳癌、例えば乳房浸潤乳管癌の試料であってもよい。被検者からの血清試料を、また、被検者からの血清試料を本発明のO v r 1 1 5 抗体と混ぜ合わせ、抗体に結合したO v r 1 1 5 のレベルを決定し、このレベルを対照と比較することにより、O v r 1 1 5 のレベルについてアッセイすることができ、ここで、対照と比較して上昇したレベルの患者の血清中のO v r 1 1 5 は、患者中の細胞によるO v r 1 1 5 の過剰発現の指標である。被検者は、癌、例えば卵巣癌、例えば卵巣漿液腺癌または乳癌、例えば乳房浸潤乳管癌を有し得る。

20

【0278】

現在、癌の段階に依存して、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 5 抗体療法は、毒性および化学療法の副作用を十分に耐容しない年長の患者において、放射線療法が限定された有用性を有する転移性疾患において、およびアンドロゲン剥脱処置に耐性である前立腺癌腫の管理のために、特に望ましい場合がある。本発明の腫瘍標的および内部移行抗O v r 1 1 5 抗体は、O v r 1 1 5 発現癌、例えば卵巣癌、膵臓癌、肺癌または乳癌を、疾患の最初の診断の際に、または再発の間に寛解するのに有用である。治療的用途のために、抗O v r 1 1 5 抗体を、特に卵巣癌、膵臓癌、肺癌または乳癌のために、また特に発した細胞が到達し得ない場合において、単独で、あるいは例えばホルモン、抗血管新生剤もしくは放射線標識した化合物との、または手術、寒冷療法および/または放射線療法との組み合わせ療法において、用いることができる。抗O v r 1 1 5 抗体処置を、他の形態の慣用の療法と組み合わせて、化学療法薬剤、例えばタキソテア (Taxotere) (登録商標) (ドセタキセル)、タキソール (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と連続して、前または後慣用療法で投与し、特に良好な危険の患者において、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用いることができる。

30

40

【0279】

癌、特に、アンドロゲン独立および/または転移性卵巣癌、膵臓癌、肺癌もしくは乳癌を処置するかまたは寛解するための、本発明の方法において、癌患者に、抗O v r 1 1 5 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。特に、パクリタキセルおよび改変した誘導体 (例えばEP0600517を参照) との組み合わせ療法が、意図される。抗O v r 1 1 5 抗体を、治療的に有効な用量の化学療

50

法剤と共に投与する。抗Ovr115抗体をまた、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。米医薬品便覧(PDR)には、種々の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。治療的に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技術のある医師に精通されている他の要因に依存し、医師により決定することができる。

【0280】

特に、細胞毒性剤と結合した抗Ovr115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、Ovr115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し、これが結合する癌細胞の死滅における免疫結合体の増大した治療効果がもたらされる。好ましくは、細胞毒性剤は、癌細胞における核酸を標的するかまたはこれに干渉する。このような細胞毒性剤の例は、上記した通りであり、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が含まれる。

【0281】

抗Ovr115抗体または免疫結合体を、ヒト患者に、既知の方法、例えば静脈内投与により、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。抗体または免疫結合体を、腫瘍本体中に直接注射することができる。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Ovr115抗体の投与と組み合わせることができる。

【0282】

組み合わせられた投与には、個別の処方物または単一の医薬処方物を用いた同時投与、およびいずれかの順序での連続的投与が含まれ、ここで好ましくは、両方(またはすべて)の活性剤が、これらの生物学的活性を同時に奏する期間がある。好ましくは、このような組み合わせられた療法の結果、相乗的な治療効果がもたらされる。

【0283】

また、1または2以上の抗Ovr115抗体の投与を、特定の癌に関連する他の腫瘍抗原に対して向けられた抗体の投与と組み合わせるのが、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Ovr115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「混合物」に関する。混合物はまた、Ovr115の他のエピトープに向けら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。

【0284】

本発明の抗体治療処置方法は、種々の化学療法剤の混合物の同時投与を含む、抗Ovr115抗体(または2種以上の抗体)および1種または2種以上の化学療法剤または増殖阻害剤の組み合わせられた投与を含むことができる。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セタキセル)および/またはアントラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤のための調製および投与計画を、製造者の指示に従って、または技術のある開業医により実験的に決定されたように、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また、Chemotherapy Service、M.C. Perry編、Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)中に記載されている。

【0285】

抗体を、抗ホルモン化合物;例えば抗エストロゲン化合物、例えばタモキシフェン;抗プロゲステロン化合物、例えばオナプリストン(EP 616 812を参照);または抗アンドロゲン化合物、例えばフルタミドと、このような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、アンドロゲン独立癌である場合には、患者は

、予め抗アンドロゲン療法を受けていてもよく、癌がアンドロゲン独立となった後に、抗 O v r 1 1 5 抗体（および随意に本明細書中に記載した他の剤）を、患者に投与することができる。

【 0 2 8 6 】

時々、また心臓保護剤（療法に関連する心筋機能障害を防止するかまたは減少させるために）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のが、有益であり得る。前述の療法計画に加えて、患者に、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、これと同時に、またはこの後に施すことができる。前述の同時投与された剤のすべてに適する投与量は、ここで用いられたものであり、剤および抗 O v r 1 1 5 抗体の組み合わせられた作用（相乗作用）のために低下され得る。

10

【 0 2 8 7 】

疾患の防止または処置のために、投与量および投与の方式を、既知の基準により医師により選択する。抗体の適切な投与量は、前に定義したように、処置されるべき疾患のタイプ、疾患の重篤度および経過、抗体が予防的目的で投与されるか治療的目的で投与されるか、前の療法、患者の臨床的な履歴および抗体への応答並びに付随する医師の裁量に依存する。抗体を、患者に、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、抗体を、静脈内注入により、または皮下注射により投与する。

【 0 2 8 8 】

疾患のタイプおよび重篤度に依存して、約 1 p g / 体重 1 k g ~ 約 5 0 m g / 体重 1 k g（例えば約 0 . 1 ~ 1 5 m g / k g / 用量）の抗体を、例えば、1種もしくは2種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の投与量とすることができる。投与計画は、約 4 m g / k g の最初の負荷用量を投与し、続いて約 2 m g / k g の抗 O v r 1 1 5 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、他の投与計画が、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 1 p g / k g ~ 1 0 0 m g / k g またはこれ以上の範囲内であり得る。状態に依存する、数日またはこれより長い期間にわたる繰り返された投与のために、処置を、疾患症状の所望の抑制が発生するまで持続させる。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。

20

【 0 2 8 9 】

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意図する。抗体をコードする核酸分子のこのような投与は、表現「抗体の治療的に有効な量を投与する」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発生させることに関する、1996年3月14日刊行のWO 96/07321を参照。

30

【 0 2 9 0 】

核酸分子（随意にベクター中に包含される）を患者の細胞中に導入するための2つの主な方法がある；インビボおよびエクスピボ。インビボ送達について、核酸分子を、患者中に、通常抗体が必要である部位において、直接注射する。エクスピボ処置について、患者の細胞を除去し、核酸分子を、これらの単離した細胞中に導入し、改変した細胞を、患者に、直接、または例えば多孔質膜内にカプセル封入し、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号を参照）。核酸分子を生存可能な細胞中に導入するのに有用な種々の手法がある。この手法は、核酸が、培養した細胞中にインビトロで移送されるか、意図されたホストの細胞中にインビボ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インビトロで移送するのに適する手法には、リボソーム、電気穿孔法、マイクロ注射、細胞融合、D E A E - デキストラン、リン酸カルシウム沈殿方法などの使用が含まれる。遺伝子のエクスピボ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。

40

【 0 2 9 1 】

現在好ましいインビボの核酸分子移送手法には、ウィルスベクター（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

50

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)での形質移入が含まれる。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、Anderson et al., Science 256:808-813 (1992)を参照。またWO 93/25673およびこの中に引用されている参考文献を参照。

【0292】

製造品およびキット

本発明はまた、Ovr115過剰発現細胞の検出および/またはOvr115発現癌、特に卵巣癌、膵臓癌および結腸癌の処置に有用な物質を含む、製造品に関する。製造品は、容器および、本発明の抗体を含む、この中に含まれた組成物を含む。組成物はさらに、担体を含むことができる。製造品はまた、容器上またはこれに関連する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、ビン、バイアル、シリンジなどが含まれる。容器を、種々の材料、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。容器は、Ovr115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、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種の活性な剤は、本発明の抗Ovr115抗体である。

【0293】

ラベルまたは添付文書は、組成物が、Ovr115発現細胞を検出し、および/または卵巣癌、膵臓癌および結腸癌、またはさらに特に卵巣漿液腺癌、乳房浸潤乳管癌、前立腺腺癌、腎臓細胞癌腫、直腸結腸腺癌、肺腺癌、肺扁平細胞癌腫および複数の中皮腫を、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。乳癌は、HER-2陰性または陽性乳癌であってもよい。癌は、前述のすべての転移性癌、例えば卵巣癌、膵臓癌および結腸癌転移を包含する。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とができる。さらに、製造品は、さらに、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の容器を含むことができる。この物質を、検出可能なラベル、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、薬学的に許容し得る緩衝液、例えば注射用の静菌性水(BWF 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ース溶液を含むことができる。製造品は、さらに、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針およびシリンジを含む、商業的な、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る。

【0294】

また、種々の目的のために、例えばOvr115細胞死滅アッセイのために、Ovr115を細胞から精製もしくは免疫沈澱するために、またはOvr115の存在を血清試料中で検出するもしくは細胞試料中のOvr115発現細胞の存在を検出するために有用なキットを提供する。Ovr115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Ovr115抗体を含むことができる。Ovr115をインビトロで、例えばELISAまたはウエ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。製造品について、キットは、容器および本発明の抗体を含むこの中に含まれた組成物を含む。キットはさらに、容器上の、またはこれに関連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、他の成分、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、例えば標識、例えば本明細書中に開示したもの、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るか、またはキットはまた、対照の抗体を含むことができる。追加の成分は、キット内の別個の容器内にあってもよい。ラベルまたは添付文書は、組成物の記載および意図されたインビトロ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。

【0295】

例

例1:モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの産生および単離

本発明の以下のMAb/ハイブリドーマを、以下に記載する:

Ovr115.A2.1、Ovr115.A11.1、Ovr115.A51.2（またOvr115 A51.2として知られている）、Ovr115.A63.2、Ovr115.D3、Ovr115.D15、Ovr115.D20、Ovr115.D26、Ovr115.D31、Ovr115.D32、Ovr115.D34、Ovr115.D37、Ovr115.D43、Ovr115.D51、Ovr115.D69、Ovr115.D71、Ovr115.D81、Ovr115.D84、Ovr115.D94、Ovr115.F2、Ovr115.F3、Ovr115.F4、Ovr115.F5、Ovr115.F6、Ovr115.F7、Ovr115.F8、Ovr115.F9、Ovr115.F10、Ovr115.F11、Ovr115.F13、Ovr115.F14、Ovr115.F15、Ovr115.F19、Ovr115.F20、Ovr115.F21、Ovr115.F22、Ovr115.F23、Ovr115.F24、Ovr115.F25、Ovr115.F26、Ovr115.F28、Ovr115.F29、Ovr115.F30、Ovr115.F31、Ovr115.F32、Ovr115.F33、Ovr115.F34、Ovr115.F35、Ovr115.F36、Ovr115.F37、Ovr115.F38、Ovr115.F39、Ovr115.F40、Ovr115.F41、Ovr115.F42、Ovr115.F43、Ovr115.F46、Ovr115.F47、Ovr115.F49、Ovr115.F50、Ovr115.F51、Ovr115.F53、Ovr115.F54、Ovr115.F55、Ovr115.F56、Ovr115.F57、Ovr115.F58、Ovr115.F59、Ovr115.F60、Ovr115.F61、Ovr115.F62、Ovr115.F63、Ovr115.F64、Ovr115.F65、Ovr115.F66、Ovr115.F67、Ovr115.F69、Ovr115.F70、Ovr115.F71、Ovr115.F72、Ovr115.F73、Ovr115.F74、Ovr115.F75、Ovr115.F76、Ovr115.F77、Ovr115.F78、Ovr115.F79、Ovr115.F80、Ovr115.F81、Ovr115.F82およびOvr115.F83。M A bがクローニングされている場合には、これは、「X . 1」の命名を得る。例えば、A 7の最初のクローンを、A 7 . 1と呼び、A 7の第2のクローンを、A 7 . 2と呼ぶなど。本発明の目的のために、A 7への言及は、すべてのクローン、例えばA 7 . 1、A 7 . 2などを含む。

【0296】

免疫原および抗原（組換えタンパク質、H AおよびH i s タグおよび形質移入した細胞）
O v r 1 1 5 セリンプロテアーゼドメイン配列およびタンパク質産生

タバコエッチングウイルスプロテアーゼ（T E V）認識部位、V a l 2 0 3 から L e u 4 3 5 までのO v r 1 1 5 のセリンプロテアーゼドメインをコードするO v r 1 1 5（T M P R S S 4）構造物を、インフレイムで、グルタチオンS - トランスフェラーゼ（G S T）のC末端にクローニングして、O v r 1 1 5 構造物が、標準的な手法を用いて486個のアミノ酸のG S T融合タンパク質として発現されるようにした。O v r 1 1 5 の精製を、グルタチオンセファロースカラムにより完了した。

【0297】

O v r 1 1 5 セリンプロテアーゼドメイン構造物アミノ酸配列（G S T配列に下線を付し、T E V配列に二重下線を付し、タグ配列を太字とした）（配列番号1）

【表2】

MAPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEENLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYID
GDVKLTQSMALIRYIADKHNLGGCPKERAELSMLEGAVLDIRYGVSR
IAYSKDFETLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFK
KRIEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRHNQTS
SLYKKAGFENLYFOGVVGGEEASVDSWPQVSIQYDKQHVC
GSILDPHWLTAAHCFRKHTDVFNWKVRAGSDKLG
SFPSLAVAKIIIEFNPMYPKDNDIALMKLQFPLTFSGTVR
PICLPFFDEELTPATPLWI
IGWGFTKQNGGKMSDILLQASVQVIDSTRCNAD
DAYQGEVTEKMMCAGIPEGGVDTCQGD
SGGPLMYQSDQWHVVGIVSWG
YCGGPSTPGVYTKVSAYLNWIYNVWKAELS
NWSHPQFEK

【0298】

O v r 1 1 5 細胞外断片配列およびタンパク質産生

マウスの免疫およびM A bの産生のために、分子の予測された細胞外部分（L y s 5 2 ~ L e u 4 3 5）のみを構成する、O v r 1 1 5 の組換えタンパク質断片を発生させて、外部の細胞表面に結合するモノクローナル抗体（M A b）を選択した。L y s 5 2 からL e u 4 3 5 までのO v r 1 1 5 の領域をコードするO v r 1 1 5（T M P R S S 4）構造物を、コドンL e u 4 3 5 のすぐ下流の6個のヒスチジンタグでクローニングし、DシリーズM A bの産生のための標準的なバキュロウイルス手法を用いて、昆虫細胞中で発現させた。M A bのFシリーズの産生のために、このタンパク質を、標準的な発現ベクター中

にクローニングし、標準的な手法を用いて哺乳動物細胞中に発現させた。O v r 1 1 5 を、N i - N T A 樹脂を用いて精製した。

【 0 2 9 9 】

O v r 1 1 5 細胞外構造物 (O v r 1 1 5 L y s 5 2 ~ L e u 4 3 5) アミノ酸配列 (6 個のヒスチジントグ配列を太字とした) (配列番号 2)

【 表 3 】

MKVILDKYYFLCGQPLHFI PRKQLCDGELDCPLGEDEEHCVKSFPEGPAVAVRLSKDRS
TLQVLDSATGNWFSACFDNFTEALAEACRQMGYSSKPTFRAVEIGPDQDLVDVEITEN
SQELMRNSSGPGCLSGSLVSLHCLACGKSLKTPRVVGEEASVDSWPWQVSIQYDKQHV
CGGSILDPHWVLTAAHCFRKHDTDFNWKVRAGSDKLGSFPSLAVAKIIIEFNPMYPKD
NDIALMKLQFPLTFSGTVRPICLPFFDEELTPATPLWIIGWGFTKQNGGKMSDILLQAS
VQVIDSTRCNADDAYQGEVTEKMMCAGIPEGGVDTCCQDSSGGPLMYQSDQWHVVGIVSW
GYGCGGPSTPGVYTKVSAYLNWIYNVWKAELHHHHHH

10

【 0 3 0 0 】

安定な O v r 1 1 5 L M T K マウス細胞系の発生

全長 H A タグ化 O v r 1 1 5 (M e t 1 ~ L e u 4 3 5) を、哺乳動物ベクター中に H A タグでクローニングした後に、マウス L M T K 細胞中に形質移入した。個別のクローンを、培養において 1 週間後に、抗 H A 抗体 (Covance, Richmond, CA) を用いたウエスタンブロットにより、O v r 1 1 5 の発現についてチェックした。

20

【 0 3 0 1 】

O v r 1 1 5 形質移入 L M T K および 2 9 3 F アミノ酸配列 (配列番号 3)

【 表 4 】

MDPDSQPLNSLDVKPLRKPRIPMETFRKVGIPIIALLSLASIIIVVVLKIVILDKYYF
LCGQPLHFI PRKQLCDGELDCPLGEDEEHCVKSFPEGPAVAVRLSKDRSTLQVLDSATGN
WFSACFDNFTEALAEACRQMGYSSKPTFRAVEIGPDQDLVDVEITENSQELMRNSSGPG
CLSGSLVSLHCLACGKSLKTPRVVGEEASVDSWPWQVSIQYDKQHVCGGSILDPHWVLT
AAHCFRKHDTDFNWKVRAGSDKLGSFPSLAVAKIIIEFNPMYPKDNDIALMKLQFPLTF
SGTVRPICLPFFDEELTPATPLWIIGWGFTKQNGGKMSDILLQASVQVIDSTRCNADDAY
QGEVTEKMMCAGIPEGGVDTCCQDSSGGPLMYQSDQWHVVGIVSWGYGCGGPSTPGVYTKV
SAYLNWIYNVWKAELDPAFLYKVVRSRMASYPYDVPDYASL

30

【 0 3 0 2 】

トランジェントな 2 9 3 F 形質移入細胞の発生

O v r 1 1 5 (配列番号 : 3) を、ヒト 2 9 3 F 細胞 (Invitrogen) 中に、哺乳動物発現ベクター P C D N A 3 . 1 ベクター中にクローニングした後に形質移入した。1 , 0 0 0 , 0 0 0 個の細胞 / m l においてフリースタイル培地 (GIBCO) 中で培養した、5 0 m l の 2 9 3 F 細胞を、製造者のガイドラインに従って、2 9 3 フェクチン形質移入試薬 (Invitrogen) を用いて形質移入した。DNA、2 9 3 フェクチンを、O P T I - M E M 培地 (GIBCO) 中で混合した。細胞を、形質移入の 4 8 時間後に、分析のために用いた。

【 0 3 0 3 】

P r o 1 0 4 (テスティシン (Testisin) 1 発現配列およびタンパク質産生)

P r o 1 0 4 を用いて、交差反応性ハイブリドーマクローンをスクリーニングした。その理由は、この抗原がまた、卵巣癌および膵臓癌において上方調節され、これがまた、有効に交差反応性のセリンプロテアーゼドメインを含んでいたからである。

ミツパチメレチン (melletin) 分泌シグナル、I l e 4 2 から T r p 2 9 7 までの P r o 1 0 4 の領域および 6 個のヒスチジントグをコードする P r o 1 0 4 構造物を、クローニングし、標準的な手法を用いて発現させた。P r o 1 0 4 を、N i - N T A 樹脂を用いて精製した。

【 0 3 0 4 】

P r o 1 0 4 (I l e 4 2 ~ T r p 2 9 7) 発現アミノ酸配列 (下線を付した部分は、ミ

40

50

ツバチメレチン分泌シグナルを表し、太字は、ヘキサヒスチジントグを表す) (配列番号 4)

【表 5】

MKFLVNVALVFMVYISYIYADPMAIVGGEDAELGRWPWQGSRLWDSHVCVSVLLSHRW
ALTAAHCFETYSDLSDPGWMVQFGQLTSMPSFWSLQAYYTRYFVSNIYLSPRYLGNSPY
 DIALVKLSAPVTTYTKHIQPICLQASTFEFENRTDCWVTGWGYIKEDALPSPHTLQEVQV
 AIINNSMCNHLFLKYSFRKDIFGDMVCAGNAQGGKDACFGDSGGPLACNKNGLWYQIGVV
 SWGVGCGRPNRPGVYTNISHHFEWIKLMAQSGMSQPDPSWHHHHHH

【0305】

10

Pro104 (テストイシン) LMTK細胞発現配列およびタンパク質産生

組換え部位から下流のC末端に位置するHAタグコドンを含む、Pro104 (Met 1 ~ Val 314) をコードする全長構造物を、標準的な哺乳動物発現手法を用いて発現させた。

【0306】

Pro104 形質移入 LMTK アミノ酸配列 (配列番号 5)

【表 6】

MGARGALLLALLLARAGLRKPESQEAAPLSGPGCRRVITSRIVGGEDAELGRWPWQGSRL
LWDSHVCVSVLLSHRWALTAHCFETYSDLSDPGWMVQFGQLTSMPSFWSLQAYYTRYF
 VSNYLSPRYLGNSPYDIALVKLSAPVTTYTKHIQPICLQASTFEFENRTDCWVTGWGYIK
 EDEALPSPHTLQEVQVAIINNSMCNHLFLKYSFRKDIFGDMVCAGNAQGGKDACFGDSGG
 PLACNKNGLWYQIGVVSQGVGCGRPNRPGVYTNISHHFEWIKLMAQSGMSQPDPSWPLL
 FFPLLWALPLLGPVDPAPFLYKVVRSRMASYPYDVPDYASL

20

【0307】

免疫

A シリーズ MAb の発生のために、マウスを、自然のタンパク質のセリンプロテアーゼドメイン (Val 203 ~ Leu 435) に相当する、発現した可溶性 Ovr 115 組換えタンパク質で免疫した。8 匹の BALB/c マウスの群を、両方の後ろの足蹠中に、皮内で免疫した。すべての注射は、足あたり 25 μ L であった。マウスあたり 10 μ g の抗原の最初の注射 (1 日目) は、等しい容積対容積比で Titermax gold アジュバント (Sigma, Saint Louis, MS) と混合されたダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) においてであった。マウスあたり 10 μ g の抗原のその後の注射は、5、9、12、16、19、23、26、29、30 日目に行い、マウスあたり 20 μ L の DPBS および 5 μ L の Adju-phos アジュバント (Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY) 中の抗原からなっていた。33 日目の最後の追加免疫注射は、DPBS のみで希釈した抗原からなっていた。融合は、37 日目に生じた。

30

【0308】

D シリーズおよび F シリーズ MAb の発生のために、マウスを、上記のように、可溶性昆虫発現または哺乳動物発現 Ovr 115 組換えタンパク質 (それぞれ) で免疫した。これらのタンパク質の両方は、自然の Ovr 115 タンパク質の完全な細胞外ドメイン (Lys 52 ~ Leu 435) に相当して、インビボ治療および診断有用性を共に有する MAb を発生させた。

40

【0309】

ハイブリドーマ融合

マウスを、免疫プロトコルの完了時に絶命させ、排出するリンパ節 (膝窩) 組織を、無菌の解剖により採集した。リンパ節細胞を、無菌のふるいを通して D MEM 中に押圧し、T 細胞を抗 CD90 (Thy 1.2) で被覆した磁性ビーズ (Miltenyl Biotech, Baraisch-Gladbach, Germany) により除去することにより、分散させた。

【0310】

50

次に、これらの主なB細胞が豊富なリンパ節細胞を、連続的な骨髓腫細胞系 P 3 × 6 3 A g 8 . 6 5 3 (Kearney, J.F. et al., J. Immunology 123: 1548-1550, 1979)との電子-細胞融合(BTX, San Diego, CA)により不死化した。成功に融合した細胞を、標準的なヒポキサンチン、アザセリン(HA)(Sigma)含有選択培地(DMEM/10%FBS)中で培養することにより、選択した。これらの融合培養物を、直ちにプレートあたり10,000,000個の細胞で、96ウェル培養プレートのウェル中に分布させた。培養物を96ウェル培養プレート中に分布させ、直ちに続いて融合させることにより、一層広範囲の種類の単一の特異的な抗体を産生するハイブリドーマクローンの選択が容易になった。ウェルからの上清液を、ELISAにより、Ovr115セリンプロテアーゼドメイン-GST融合タンパク質、Ovr115細胞外ドメインに対する反応性についてスクリーニングし、セリンプロテアーゼPro104発現タンパク質での交差反応性はなかった。

10

【0311】

単一の細胞からの遺伝子的に均一な子孫からなるモノクローナル培養物を、上記したスクリーニング手順の後に、単一の生存可能な細胞を2つの96ウェルプレートのウェル中に、フローサイトメトリー(Coulter Elite)を用いて分類することにより、確立した。得られたマウスB細胞ハイブリドーマ培養物を、標準的な組織培養手法を用いて拡張させた。選択されたハイブリドーマを、10%DMSOを有する胎児ウシ血清(FBS)中で凍結保存し、-196℃で液体窒素中に貯蔵して、生存可能なクローン培養物の維持を確実にした。

【0312】

20

抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングおよび選択

ハイブリドーマ細胞系を、Ovr115特異性抗体の産生のために、酵素結合固相イムノアッセイ(ELISA)により選択した。Ovr115またはPro104タンパク質を、96ウェルポリスチレンEIAプレート(VWR)のウェルに非特異的に吸着させた。(DPBS)中で0.91mg/mLにおいて、50μLのOvr115またはPro104タンパク質を、96ウェルポリスチレンEIAプレートのウェル中で、一晩4℃でインキュベートした。プレートを、0.05%のTween 20、pH7.4を有するトリス緩衝生理食塩水(TBST)で2回洗浄した。次に、プレートウェルを排出し、非特異的結合能力を、アッセイウェルをTBST/0.5%ウシ血清アルブミン(TBST/BSA)で完全に満たし、室温(RT)で30分間インキュベートすることにより、遮断した。次に、プレートウェルを排出し、50μLのハイブリドーマ培養培地試料を、ウェルに加え、1時間RTでインキュベートした。

30

【0313】

次に、ウェルを、(TBST)で3回洗浄した。次に、TBST/BSAで1:5000に希釈した100μLのアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マウスIgG(Fc)(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)を、各々のウェルに加え、1時間RTでインキュベートした。次に、ウェルを、TBSTで3回洗浄した。次に、1mg/mLでの1Mのジエタノールアミン緩衝液、pH8.9(Sigma)中の100μLのアルカリホスファターゼ基質パラニトロフェニルホスフェート(pNPP)(Sigma)を、各々のウェルに加え、20分間RTでインキュベートした。結合したアルカリホスファターゼ活性を、視覚可能な黄色の発色により示した。酵素反応を、溶液の吸光度を405nmの波長において測定することにより、定量した。最高の吸光度の値を生じる培養物を、拡張およびさらなる評価のために選択する。

40

【0314】

Ovr115MAbのELISAスクリーニング

2週間の培養の後に、Ovr115セリンプロテアーゼドメインについて1.0より大きい、およびPro104について0.2より小さいELISA吸光度値を生じる上清を有するハイブリドーマを、25個の96ウェル培養プレートから、新たな96ウェル培養プレート中に再配列させ、さらに1週間培養した。

【0315】

50

さらに1週間の培養の後に、Ovr115セリンプロテアーゼドメイン(表1)について1.0より大きい、およびPro104について0.2より小さいELISA吸光度値を生じる上清を有する12のハイブリドーマを、96ウェル培養プレート中への細胞分類(Coulter Elite)による単一の細胞クローニングのために選択した。

【0316】

クローニングしたOvr115MAbのELISAスクリーニングからの結果

2週間の培養の後に、各々の親ハイブリドーマからの2つのハイブリドーマクローンからの上清を、Ovr115について1.5より大きい、およびPro104について0.2より小さいELISA吸光度値の発生について、試験した。Ovr115セリンプロテアーゼドメインでの最初の免疫からのクローンOvr115.A2.1、Ovr115.A11.1、Ovr115.A51.2およびOvr115.A63.2並びにOvr115の昆虫または哺乳動物のいずれかを発現する完全な細胞外ドメインでの免疫からのOvr115.D3、Ovr115.D15、Ovr115.D20、Ovr115.D26、Ovr115.D31、Ovr115.D32、Ovr115.D37、Ovr115.D43、Ovr115.D51、Ovr115.D69、Ovr115.D71、Ovr115.D81、Ovr115.D84、Ovr115.F2、Ovr115.F3、Ovr115.F4、Ovr115.F5、Ovr115.F6、Ovr115.F7、Ovr115.F8、Ovr115.F9、Ovr115.F10、Ovr115.F11、Ovr115.F13、Ovr115.F14、Ovr115.F15、Ovr115.F19、Ovr115.F20、Ovr115.F21、Ovr115.F22、Ovr115.F23、Ovr115.F24、Ovr115.F25、Ovr115.F26、Ovr115.F28、Ovr115.F29、Ovr115.F30、Ovr115.F31、Ovr115.F32、Ovr115.F33、Ovr115.F34、Ovr115.F35、Ovr115.F36、Ovr115.F37、Ovr115.F38、Ovr115.F39、Ovr115.F40、Ovr115.F41、Ovr115.F42、Ovr115.F43、Ovr115.F46、Ovr115.F47、Ovr115.F49、Ovr115.F50、Ovr115.F51、Ovr115.F53、Ovr115.F54、Ovr115.F55、Ovr115.F56、Ovr115.F57、Ovr115.F58、Ovr115.F59、Ovr115.F60、Ovr115.F61、Ovr115.F62、Ovr115.F63、Ovr115.F64、Ovr115.F65、Ovr115.F66、Ovr115.F67、Ovr115.F69、Ovr115.F70、Ovr115.F71、Ovr115.F72、Ovr115.F73、Ovr115.F74、Ovr115.F75、Ovr115.F76、Ovr115.F77、Ovr115.F78、Ovr115.F79、Ovr115.F80、Ovr115.F81、Ovr115.F82およびOvr115.F83を、免疫組織化学的、免疫蛍光および機能的試験についての大規模化のために、選択した。MAbを、さらに、ヒトセリンプロテアーゼテストティシン、膵臓トリプシン、肺トリプターゼおよびカリクレイン(kallikrein)(Cal Biochem, San Diego, CA)並びにプラスミンおよびウロキナーゼ(American Diagnostica, Greenwich, CT)、並びにマウステストティシンとの反応性についてスクリーニングし、これらのセリンプロテアーゼのいずれかと反応性である場合には、さらなる特徴づけから除外した。

【0317】

Ovr115MAbの細胞表面結合についてのFACSスクリーニング

LMTK-Ovr115-HA安定形質移入体を、DMEM/10%FBS+P/S中で増殖させた。染色の1日前に、細胞を、酪酸ナトリウムを5mMの最終濃度に加えることにより刺激した。LMTK-Ovr115-HA細胞を、10mlのCa²⁺/Mg²⁺非含有DPBSで1回洗浄し、次に7mlの温かい(37℃)Cellstripper(Mediatech, Herndon, VA)を、150cm²のフラスコあたり加えた。次に、細胞を、5分間37℃で、フラスコを軽くたたいて厳密に付着した細胞を除去しながらインキュベートした。細胞を除去し、数回ピペットで採取して、凝集体を破壊し、次に直ちにDMEM/10%FBS/5mM酪酸ナトリウム中に配置した。次に、細胞を、5分間1300rpmで遠心分離して沈降させ、DMEM/10%FBS/5mM酪酸ナトリウム中に再懸濁させた。ヒト293F細胞を、上記したようにトランジェントに形質移入した。細胞を、37℃で30分の回収時間にわたりインキュベートした。染色の前に、細胞の生存可能性を、Guava Viacount (Guava Cytometers, City, CA)を用いて測定し、>90%生存可能である場合には、これらを、96ウェルv底プレート(VWR)中に分布させて、MAbで染色した。

【0318】

細胞を、96ウェルv底プレート中に、0.5~1.0×10⁶個の細胞/ウェルにおいて等分し、2分間1500rpmにおいて遠心分離した。上清を吸引し、プレートを、ボルテックスミキサー上で短時間振盪して細胞を再懸濁させ、次に200μlのDPBS

/ 3 % F B S / 0 . 0 1 % アジ化 N a (F A C S 緩衝液) を、各々のウェルに加えた。遠心分離および吸引を繰り返し、次に 2 5 μ L のハイブリドーマ上清の連続的希釈または精製した M A b を、細胞に加えた。プレートを、氷上で 1 5 分間貯蔵し、次に前述のように、2 0 0 μ L の F A C S 緩衝液中で洗浄し、遠心分離した。この洗浄手順を、2 回繰り返し、次に 2 5 μ L のフィコエリスリン (P E) 結合ロバ抗マウス I g G F c 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) を、細胞に加えた。氷上で 1 5 分後、細胞を、前述のように 2 回洗浄し、次に 2 5 0 μ L の F A C S 緩衝液中に再懸濁させて、細胞選別機またはフローサイトメーター上で分析した。ある場合において、分析前に 4 で一晩貯蔵するために、1 3 3 μ L の F A C S 緩衝液および 6 7 μ L の 1 % パラホルムアルデヒド / D P B S を、固定のために各々のウェルに加え、次に、容積を、D P B S で 2 5 0 μ L に増大させた。染色した細胞を、Elite 蛍光活性化細胞選別機 (F A C S) (Beckman-Coulter, Miami, FL) 上で分析した。

10

【 0 3 1 9 】

F A C S 分析による D シリーズおよび F シリーズ M A b のいくつかの細胞表面結合を例証する結果を、以下の表 1 A、B、C および D に列挙する。F A C S 分析により細胞表面発現を例証する代表的な実験の結果を、図 1 A および 1 B に示す。M A b O v r 1 1 5 . D 3 の結合、続いてロバ抗マウス I g - P E 結合体 (D A M P E) の結合の結果、9 4 % の O v r 1 1 5 形質移入マウス L M T K 細胞が陽性であり、D A M P E 単独で染色した細胞よりも 4 9 倍高い蛍光強度 (平均蛍光強度) がもたらされた。

【 0 3 2 0 】

20

Ovr115.D3 および Ovr115.D43 のみが、O v r 1 1 5 形質移入マウス L M T K 細胞に顕著に結合した (表 1 A) 一方、いくつかのさらにクローニングされた D シリーズ M A b (Ovr115.D15.3、Ovr115.D32.2、Ovr115.D37.1、Ovr115.D43.1 および Ovr115.D84.2) は、O v r 1 1 5 形質移入 2 9 3 F 細胞の 5 0 % よりも大きく、強力に結合した (M F I は、アイソタイプ対照よりも 4 ~ 7 6 倍高かった) が、非形質移入 2 9 3 F 細胞には顕著に結合しなかった (表 1 B) 。

【 0 3 2 1 】

O v r 1 1 5 形質移入 2 9 3 F および非形質移入 2 9 3 F 細胞に対してスクリーニングした F シリーズ M A b について (表 1 C)、Ovr115.F4、Ovr115.F9、Ovr115.F14、Ovr115.F21、Ovr115.F22、Ovr115.F23、Ovr115.F24、Ovr115.F30、Ovr115.F31、Ovr115.F32、Ovr115.F35、Ovr115.F37、Ovr115.F38、Ovr115.F43、Ovr115.F46、Ovr115.F47、Ovr115.F55、Ovr115.F57、Ovr115.F61、Ovr115.F62、Ovr115.F63、Ovr115.F64、Ovr115.F66、Ovr115.F71、Ovr115.F72、Ovr115.F74、Ovr115.F75、Ovr115.F76、Ovr115.F79 および Ovr115.F83 は、O v r 1 1 5 形質移入 2 9 3 F 細胞の 5 0 % よりも大きく、強力に結合した (M F I は、アイソタイプ対照よりも 4 ~ 1 3 1 倍高かった) が、非形質移入 2 9 3 F 細胞には顕著に結合しなかった (表 1 C) 。

30

【 0 3 2 2 】

選択された数の O v r 1 1 5 特異性 D シリーズおよび F シリーズクローンをまた、O v r 1 1 5 m R N A 陽性 (Q P C R +) 腫瘍細胞系 A 4 3 1 の細胞表面への結合について、F A C S により試験した (表 1 D) 。

40

【 0 3 2 3 】

【表 7】

表 1 A : 形質移入 LMTK 細胞における O v r 1 1 5 D シリーズ M A b を F A C S 試験した結果

MAb	陽性の細胞%	平均の蛍光強度 (MFI)
DAMPE 結合体	0.6	2.15
正の対照 抗 -HA MAb	61	19.0
Ovr115.D3	94	28.2
Ovr115.D15	11	4.58
Ovr115.D20	80	6.35
Ovr115.D34	4.3	2.53
Ovr115.D43	60	3.13
Ovr115.D71	8.9	3.23
Ovr115.D84	9.8	4.06
Ovr115.D94	8.2	2.68

10

【 0 3 2 4 】

表 1 A は、モノクローナル抗体 Ovr115.D3 および Ovr115.D20 が、50% より大きい O v r 1 1 5 形質移入 L M T K 細胞に結合したことを例証する。さらに、Ovr115.D3 および Ovr115.D20 は、非形質移入 293 F 細胞よりも 4 倍を超えて高い強度で、O v r 1 1 5 形質移入 293 F 細胞に結合した。

20

【 0 3 2 5 】

さらに、Ovr115.D3 は、正の対照である抗 H A M A b よりも約 1.5 倍高い強度で結合した。

表 1 A の結果は、これらの M A b、特に Ovr115.D3 が、結合した薬剤、毒素、酵素、プロドラッグ活性化分子または同位体を伴って、または伴わずに、O v r 1 1 5 発現細胞の免疫療法に適することを示す。

【 0 3 2 6 】

【表 8】

表 1 B : 形質移入 293 F 細胞における O v r 1 1 5 D シリーズ M A b クローン を F A C S 試験した結果

30

MAb	Ovr115-形質移入 293F		非形質移入 293F	
	陽性の細胞%	MFI	陽性の細胞%	MFI
DAMPE	1.7	0.567	1.6	0.524
アイソタイプ 対照 Pro104.D116	11.6	1.04	5.1	0.832
Ovr115.D3.3	30.3	2.02	66.1	2.43
Ovr115.D15.3	89.7	14.6	12.9	0.921
Ovr115.D20.1	39.1	2.17	40.2	1.71
Ovr115.D26.1	28.9	1.68	6.1	0.786
Ovr115.D31.1	39.5	2.45	4.7	0.779
Ovr115.D32.2	67.7	4.26	10.7	1.06
Ovr115.D37.1	91.1	9.27	17.7	1.28
Ovr115.D43.1	92.9	12.6	14.2	1.16
Ovr115.D69.1	72.5	5	54.8	2.36
Ovr115.D71.1	47.1	2.88	6.1	0.773
Ovr115.D81.3	34.8	2.33	5.3	0.786
Ovr115.D84.2	97.4	76.3	5.5	0.827

40

【 0 3 2 7 】

表 1 B は、モノクローナル抗体 Ovr115.D15.3、Ovr115.D32.2、Ovr115.D37.1、Ovr115.D43.1 および Ovr115.D84.2 がすべて、50% より大きい O v r 1 1 5 形質移入 293 F 細胞に結合したことを例証する。さらに、Ovr115.D15.3、Ovr115.D32.2、Ovr115.D37.1、Ovr1

50

15.D43.1およびOvr115.D84.2はすべて、非形質移入293F細胞よりも4倍を超えて高い強度で、Ovr115形質移入293F細胞に結合した。

【0328】

さらに、Ovr115.D15.3、Ovr115.D32.2、Ovr115.D37.1、Ovr115.D43.1およびOvr115.D84.2はすべて、負のアイソタイプ対照よりも4倍を超えて高い強度で、Ovr115形質移入293F細胞に結合した。

表1Bの結果は、これらのMAb、特にOvr115.D15.3、Ovr115.D32.2、Ovr115.D37.1、Ovr115.D43.1およびOvr115.D84.2が、結合した薬剤、毒素、酵素、プロドラッグ活性化分子または同位体を伴って、または伴わずに、Ovr115発現細胞の免疫療法に適することを示す。

【0329】

【表9】

表1C：形質移入293F細胞におけるOvr115FシリーズMAbをFACS試験した結果

MAb	Ovr115- 形質移入 293F		非形質移入 293F	
	陽性の細胞%	MFI	陽性の細胞%	MFI
アイソタイプ対照 Pro104.D9.1	5.7	1.22	1.5	0.954
正の対照 5E9C11	99.4	71.1	99.8	54.3
Ovr115.F2	10.4	1.53	5	1.45
Ovr115.F3	25.7	2.22	5.8	1.56
Ovr115.F4	74.8	5.17	5.7	1.65
Ovr115.F5	23.4	2.05	3	1.34
Ovr115.F6	41.8	2.85	4.1	1.54
Ovr115.F7	11.3	1.57	5.7	1.62
Ovr115.F8	38.2	2.6	8.8	1.88
Ovr115.F9	69.3	8.49	4.4	1.48
Ovr115.F10	9.1	1.32	6.1	1.64
Ovr115.F11	7.7	1.17	6.1	1.6
Ovr115.F13	32.1	2.65	6.6	1.65
Ovr115.F14	95.3	117.1	4.4	1.36
Ovr115.F15	35	2.51	5.4	1.45
Ovr115.F19	38	2.71	13.2	2.14
Ovr115.F20	35.7	2.49	4.5	1.37
Ovr115.F21	60.2	4.14	6.8	1.67
Ovr115.F22	54.4	5.66	4.7	1.39
Ovr115.F23	63.5	7.63	3	1.33
Ovr115.F24	56.1	4.2	4.4	1.37
Ovr115.F25	7.2	1.22	3.1	1.26
Ovr115.F26	8.9	1.39	5.6	1.55
Ovr115.F28	72.4	7.92	23.8	2.6
Ovr115.F29	40	2.62	7.7	1.68
Ovr115.F30	57	7.18	4	1.36
Ovr115.F31	59.1	5.8	12.9	2.09
Ovr115.F32	61.5	4.87	9.6	1.89
Ovr115.F33	57.2	3.92	17.1	2.27
Ovr115.F34	27	2.31	4	1.35
Ovr115.F35	54.6	3.79	11.2	1.94
Ovr115.F36	26.3	2.04	6.9	1.72

【0330】

【表 10】

Ovr115.F37	73.1	6.09	5.4	1.5
Ovr115.F38	58	8.37	7.3	1.7
Ovr115.F39	38	2.71	4.2	1.37
Ovr115.F40	43.8	3.2	5.8	1.55
Ovr115.F41	18.2	2.01	8.5	1.72
Ovr115.F42	11.3	1.63	7.2	1.67
Ovr115.F43	57.4	3.8	5.2	1.47
Ovr115.F46	84.5	12.6	7.7	1.72
Ovr115.F47	78.9	6.52	4.8	1.5
Ovr115.F49	25.1	2.31	11.4	1.92
Ovr115.F50	35.2	2.85	9.3	1.822
Ovr115.F51	48.2	3.1	27.9	2.81
Ovr115.F53	93.8	145.1	22.5	2.52
Ovr115.F54	85.8	9.37	17.4	2.13
Ovr115.F55	80.4	25.1	5.2	1.48
Ovr115.F56	49.5	3.78	6.1	1.56
Ovr115.F57	48.3	3.76	28.6	2.79
Ovr115.F58	76.8	5.28	86.8	7.07
Ovr115.F59	32.9	2.66	15.8	2.3
Ovr115.F60	47.9	3.74	24.3	2.71
Ovr115.F61	83.8	11.5	6.7	1.58
Ovr115.F62	62.7	4.44	5.7	1.54
Ovr115.F63	69.8	5.47	9	1.82
Ovr115.F64	95.8	160.3	6.6	1.7
Ovr115.F65	41.5	2.76	14.5	2
Ovr115.F66	50.7	3.36	9.4	1.88
Ovr115.F67	66.3	7.04	14.4	2.14
Ovr115.F69	76.8	22.2	32.4	2.91
Ovr115.F70	36.2	2.55	5.8	1.51
Ovr115.F71	92.4	104.7	6.5	1.62
Ovr115.F72	73.2	9.89	7.7	1.69
Ovr115.F73	22.5	2.09	7.2	1.62
Ovr115.F74	95.5	117.2	8.1	1.68
Ovr115.F75	93	81.3	7.1	1.64
Ovr115.F76	80.4	9.19	12.2	2.02
Ovr115.F77	28.2	2.3	8.4	1.79
Ovr115.F78	34.2	2.68	7.3	1.6
Ovr115.F79	75.5	8.44	8.4	1.73
Ovr115.F80	27.2	2.24	7.5	1.72
Ovr115.F81	45.3	3.48	16.5	2.17
Ovr115.F82	55	5.42	12.6	1.94
Ovr115.F83	59.9	19.3	11	4.84

【0331】

表1Cは、モノクローナル抗体Ovr115.F4、Ovr115.F9、Ovr115.F14、Ovr115.F21、Ovr115.F22、Ovr115.F23、Ovr115.F24、Ovr115.F28、Ovr115.F30、Ovr115.F31、Ovr115.F32、Ovr115.F33、Ovr115.F35、Ovr115.F37、Ovr115.F43、Ovr115.F46、Ovr115.F47、Ovr115.F53、Ovr115.F54、Ovr115.F55、Ovr115.F61、Ovr115.F62、Ovr115.F63、Ovr115.F64、Ovr115.F69、Ovr115.F71、Ovr115.F72、Ovr115.F74、Ovr115.F75、Ovr115.F76、Ovr115.F79、Ovr115.F82およびOvr115.F83がすべて、50%より大きいOvr115形質移入293F細胞に結合したことを例証する。

【0332】

さらに、Ovr115.F9、Ovr115.F14、Ovr115.F22、Ovr115.F23、Ovr115.F30、Ovr115.F37、Ovr115.F46、Ovr115.F47、Ovr115.F53、Ovr115.F54、Ovr115.F55、Ovr115.F61、Ovr115.F64、Ovr115.F69、Ovr115.F71、Ovr115.F72、Ovr115.F74、Ovr115.F75、Ovr115.F76およびOvr115.F79はすべて、非形質移入293F細胞よりも4倍を超えて高い強度で、Ovr115形質移入293F細胞に結合した。さらに、Ovr115.F14、Ovr115.F53、Ovr115.F55、Ovr115.F64、Ovr115.F71、Ovr115.F74およびOvr115.F75はすべて、非形質移入293F細胞よりも15倍を超えて高い強度で、Ovr115形質移入293F細胞に結合した。

【0333】

10

20

30

40

50

さらに、Ovr115.F9、Ovr115.F14、Ovr115.F22、Ovr115.F23、Ovr115.F30、Ovr115.F37、Ovr115.F46、Ovr115.F47、Ovr115.F53、Ovr115.F54、Ovr115.F55、Ovr115.F61、Ovr115.F64、Ovr115.F69、Ovr115.F71、Ovr115.F72、Ovr115.F74、Ovr115.F75、Ovr115.F76およびOvr115.F79はすべて、負のアイソタイプ対照よりも4倍を超えて高い強度で、Ovr115形質移入293F細胞に結合した。さらに、Ovr115.F14、Ovr115.F53、Ovr115.F55、Ovr115.F64、Ovr115.F71、Ovr115.F74およびOvr115.F75はすべて、負のアイソタイプ対照よりも15倍を超えて高い強度で、Ovr115形質移入293F細胞に結合した。

【0334】

表1Cの結果は、これらのMAb、特にOvr115.F14、Ovr115.F53、Ovr115.F55、Ovr115.F64、Ovr115.F71、Ovr115.F74およびOvr115.F75が、結合した薬剤、毒素、酵素、プロドラッグ活性化分子または同位体を伴って、または伴わずに、Ovr115発現細胞の免疫療法に適することを示す。

【0335】

【表11】

表1D：A431QPCR(+)腫瘍細胞系におけるOvr115DおよびFシリーズMAbをFACS試験した結果

MAb	A431細胞	
	陽性の細胞%	MFI
MAbなし	0.5	0.401
DAMPE	1.3	0.442
アイソタイプ対照 Prol04.D9.1	4.5	0.589
Ovr115.D15.3	6.4	0.625
Ovr115.D20.1	58.4	1.91
Ovr115.D31.1	8.3	0.637
Ovr115.D32.2	7	0.633
Ovr115.D43.1	4	0.531
Ovr115.D84.2	34.1	1.26
Ovr115.F9.2	3.9	0.557
Ovr115.F21.1	6	0.649
Ovr115.F30.1	86.3	3.78
Ovr115.F32.2	12	0.762
Ovr115.F55.2	14.4	0.848
Ovr115.F64.2	3.8	0.544
Ovr115.F75.1	87.4	4.07
Ovr115.F76.2	95.4	7.66
Ovr115.F79.2	4.2	0.57

【0336】

表1Dは、モノクローナル抗体Ovr115.D20.1、Ovr115.F30.1、Ovr115.F75.1およびOvr115.F76.2がすべて、50%より大きいA431腫瘍細胞に結合したことを例証する。さらに、Ovr115.D84.2は、30%より大きいA431腫瘍細胞に結合した。

さらに、Ovr115.F30.1、Ovr115.F75.1およびOvr115.F76.2はすべて、負のアイソタイプ対照よりも6倍を超えて高い強度で結合した。

表1Dの結果は、これらのMAb、特にOvr115.F30.1、Ovr115.F75.1およびOvr115.F76.2が、結合した薬剤、毒素、酵素、プロドラッグ活性化分子または同位体を伴って、または伴わずに、腫瘍の免疫療法に適することを示す。

【0337】

Ovr115 MAbアイソタイプ

MAbのアイソタイプを、商業的に入手できるマウスモノクローナル抗体アイソタイプ化イムノアッセイ試験キット(IsoStrip, Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN)を用いて決定した。アイソタイプ化の結果を、表2に列挙する。

【0338】

【表 1 2】

表 2 : O v r 1 1 5 M A b アイソタイプ

クローン	抗体アイソタイプ
Ovr115.A2.1	IgG2b - カッパ
Ovr115.A11.1	IgG2b - カッパ
Ovr115.A51.2	IgG1 - カッパ
Ovr115.A52.1	IgG2a - カッパ
Ovr115.A63.2	IgG2b - カッパ
Ovr115.D3.3	IgG1 - カッパ
Ovr115.D15.3	IgG1 - カッパ
Ovr115.D20.1	IgG1 - カッパ
Ovr115.D26.1	IgG1 - カッパ
Ovr115.D31.2	IgG1 - カッパ
Ovr115.D37.1	IgG3 - カッパ
Ovr115.D43.1	IgG1 - カッパ
Ovr115.D71.1	IgG1 - カッパ
Ovr115.D84.2	IgG1 - カッパ
Ovr115.F21.1	IgG1 - カッパ
Ovr115.F30.1	IgG1 - カッパ
Ovr115.F76.2	IgG1 - カッパ

10

【 0 3 3 9 】

O v r 1 1 5 M A b 親和性分析

結合動力学および親和性定数を、表面プラスモン共鳴測定から、BIAcore 3000機器(Biacore, Piscataway, NJ)を用いて計算した。実験を設計して、オンレート、オフレートおよび O v r 1 1 5 M A b についての親和性値を同時に発生させた。

20

【 0 3 4 0 】

ウサギ抗マウス I g G F c 抗体(Biacore)を、C M 5 センサーチップ(Biacore)の流動細胞 2、3 および 4 上で、標準的なアミンカップリング(Biacore)により固定化した。流動細胞 1 を、基準の減算のためのブランク表面として用い、これを活性化し、次にエタノールアミンで不活性化させた。O v r 1 1 5 M A b を、ウサギ抗マウス I g G F c で被覆したチップ上に捕集し、続いて抗原を結合させた。従って、これらの測定は、真性の 1 : 1 の親和性を表し、I g G 抗体の 2 価の性質のために直接的な抗原固定化について観察される結合活性効果であってはならない。M A b を、H B S E P 緩衝液(Biacore)で、1 5 μ g / mL に希釈し、複数の管に分けて、サイクルの間の蒸発を最小にした。

30

【 0 3 4 1 】

M A b を、流動細胞を通して、2 分間 2 0 μ L / 分において通過させた。M A b 捕集レベルは、流動細胞あたり 2 0 0 ~ 3 0 0 応答単位 (R U) の範囲内であった。M A b 捕集に続いて、表面を 3 分間放置して安定化した。次に、O v r 1 1 5 B (1 . 5 6 m g / m L) 抗原を、捕集した M A b 上を 2 0 μ L / 分において、流動細胞において、およびブランク流動細胞を通して、4 分間、1 4 4、7 2、3 6、1 8、9、4 . 5 μ g / mL の連続的濃度において流した。O v r 1 1 5 分子量が、3 5 k D であるため、これらの抗原濃度は、4 . 1 1、2 . 0 6、1 . 0 3、0 . 5 1 4、0 . 2 5 7、0 . 1 2 9 μ M に相当する。2 つの複製サイクルを、各々の抗原濃度または緩衝液について行った。4 2 0 秒の解離時間が、サイクル間で可能であり、チップ表面の抗マウス I g G F c 抗体またはブランク表面への再生を、1 0 0 m M のグリシン、p H 1 . 7 5 を流動細胞を通して 3 0 秒間 1 0 0 μ L / 分において流すことにより、行った。

40

【 0 3 4 2 】

得られたデータを、BiaEvaluationソフトウェア(Biacore)により、グローバルフィット同時 k a / k d 推測ラングミュア結合を用いて分析した。ソフトウェアの R m a x パラメーターを、局所に設定して、抗マウス I g G F c 捕集段階における主要でない変化を補償することを可能にした。1 0 \cdot ⁸ ~ 1 0 \cdot ⁹ M の範囲内である、表 3 に示す計算された親和性は、1 0 m g / k g より低い、またはこれに等しいインビボでの治療用量を達成するのに十分高い。

【 0 3 4 3 】

50

【表 13】

表3: Ovr115 MA b親和性

MAb クローン	解離定数 (結合活性)	オフレート	会合定数	会合速度
	KD (M)	kd (1/s)	KA (1/M)	ka (1/Ms)
Ovr115.A2.1	7.43E-09	4.04E-04	2.22E+08	8.99E+04
Ovr115.A11.1	1.23E-08	9.53E-04	1.08E+08	1.03E+05
Ovr115.A63.2	8.11E-09	5.20E-04	1.54E+08	8.00E+04

10

【0344】

ウエスタンブロット

ウエスタンブロット分析のためのタンパク質抽出物を、細胞溶解緩衝液(1% NP-40、10 mMのリン酸ナトリウム、pH 7.2、150 mMの塩化ナトリウム)中に、Ovr115-293Tトランジェント形質移入体および哺乳動物腺癌細胞系から調製した。タンパク質を、NuPAGE 4~12%ビス-トリスゲル(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)上での電気泳動により、変性条件下で、Novex-XCell II Minicellゲル装置(Invitrogen, Life Tech)において分離し、その後PVD膜に、XCell II Blot Module(Invitrogen Life Technologies)を用いて移送した。タンパク質の移送に続いて、膜を、1%遮断試薬(Cat#1096176, Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN)中で遮断し、精製した一次抗体(Ovr115モノクローナル抗体:A2.1、A11.1、A51.2、A52.1およびA63.2)と共に、次にセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG(Cat.#115-036-062, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)と共に4℃で一晩インキュベートし、最後にECLアドバンストウエスタンブロッティング検出キット(Cat.#RPN2135, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)を用いて、化学発光により視覚化した。

20

【0345】

脱グリコシル化実験を、Ovr115-293T形質移入体からのタンパク質抽出物に対して、ペプチドN-グリコシダーゼF(PNGアーゼF、Cat#P0704S, New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)を用いて、製造者により提供された指示により、行った。次に、脱グリコシル化された試料を、前述のようにウエスタンブロッティングにより分析した。要するに、100 µgのタンパク質抽出物を、糖タンパク質変性緩衝液/0.5% SDS/1%ベータ-メルカプトエタノール中で、100℃で10分間変性させた。これに続いて、キット反応緩衝液(New England Biolabs)を、1%のNP-40および50 mMのリン酸ナトリウムの最終濃度で加え、その後100単位のPNGアーゼFを加え、37℃で4時間インキュベートした。

30

【0346】

ウエスタンブロット実験の結果を、表4に要約する。記載したように、Ovr115 MA b A2.1, A11.1, A51.2およびA63.2は、Ovr115-293T形質移入体の全体の細胞可溶化液からの、約50 kDaおよび28 kDaの2つの主要なバンドを特異的に検出する。変性するSDS-PAGEゲルにおいて、これらの2つのバンドは、それぞれOvr115タンパク質の予測された全長形態および切断された活性化されたセリンプロテアーゼサブユニットを表す。Ovr115 MA b A52.1は、いかなる特異的なタンパク質バンドをも検出せず、従ってさらなる研究から除外した。SDS-PAGEにおいて観察されたOvr115の全長形態が、~48 kDaの予測された分子量よりも大きかったため、本発明者らは、Ovr115形質移入293T細胞の全体の細胞可溶化液を、PNGアーゼFで脱グリコシル化した。この処理により、全長Ovr115タンパク質の遊走が、Ovr115 MA b A51.2およびA63.2により検出されたように、~50 kDaから~48 kDaに変化した。脱グリコシル化は、28 kDaタンパク質の分子量に影響しなかった。このことは、予測されたN-グリコシル化部位が、Ovr1

40

50

15のセリンプロテアーゼ触媒サブユニット中に存在しないという観察と整合する。

【0347】

Ovr115の発現を、膵臓腺癌細胞系MiaPaca2、Panc1、PL45および結腸腺癌細胞系HCT116において分析した。～28kDaのバンドが、MiaPaca2において観察され、これは、分析した残りの細胞系においては存在しなかった。これは、Mab A51.2の最高の程度の内部移行が、MiaPaca2細胞系において観察され、この研究において分析した残りの細胞系においてはほとんどまたは全く観察されなかった、免疫蛍光研究(例2)から得られたデータと直接関連している。

【0348】

【表14】

表4

	MAb				
	Ovr115.A2 .1	Ovr115.A1 1.1	Ovr115.A5 1.2	Ovr115.A52. 2	Ovr115.A6 3.2
Ovr115- 293T	+	+	++	-	+
	～50kDa及び ～28kDaにお いて2つのバ ンド。～26k Daにおいて 主要でない バンド	～50kDa 及び～28kDa において2つの バンド	～50kDa 及び～28kDa において2つの バンド	非特異的 さらなる分析 から除外	～50kDa及び ～28kDaにお いて2つのバ ンド。～26k Daにおいて 主要でない バンド
脱グリコシル 化 Ovr115- 293T			50kDaバンドは ～48kDaに変化 した。28kDa バンドは不変		50kDaバンドは ～48kDaに変化 した。28kDa バンドは不変
MiaPaca2			28kDa		
Panc1, PL45 HCT116			-		

【0349】

例2：免疫蛍光により例証された、生きている癌細胞におけるOvr115 MA bの細胞表面結合

以下の癌細胞系を、本研究において用いた：卵巣癌OvCar-3、卵巣癌CaOV-3、TOV-112D、TOV-21G、SKOV-3；膵臓癌MIA Paca-2、AsPC-1、PANC-1、PL-45、CaPan2；結腸癌HCT116、HT29および乳癌SKBr-3。卵巣癌OvCar-3、卵巣癌CaOV-3、TOV-112D、TOV-21G、SKOV-3細胞、膵臓癌CaPan2細胞および結腸癌細胞HT29は、Ovr115を発現する。対照の結腸癌HCT116細胞は、Ovr115を発現しない。

【0350】

細胞を、18mmガラス製カバーガラス上に播種し、37℃で、10%胎児ウシ血清およびペニシリンおよびストレプトマイシンを含むDMEM中で、48時間培養し、その後Ovr115 MA bで処理した。

【0351】

Aシリーズ(Ovr115.A2.1; Ovr115.A11.1; Ovr115.A51.2; Ovr115.A52.1; Ovr115.A63.2)、DシリーズおよびFシリーズ(Ovr115.F9.2; Ovr115.F21.1; Ovr115.F30.1; Ovr115.F32.2; Ovr115.F55.2; Ovr115.F62.2; Ovr115.F64.2; Ovr115.F74.2; Ovr115.F75.1; Ovr115.F76.2; Ovr115.F79.2)のOvr115 MAbを、試験して、Ovr115発現癌細胞の細胞表面への抗体の結合を、蛍光顕微鏡観察により例証した。一次MAbを、培地に、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度で加え、37で1時間インキュベートした。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の3%ホルムアルデヒドで固定した後に、細胞を、二次Cy3標識したロバ抗マウス(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)と共に、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で30分間インキュベートした。洗浄に続いて、細胞を、Vectastain、即ちDAPIを含む培地(Vector, Burlingame, CA)中に載置して、細胞核を視覚化し、対比染色を提供し、適切な蛍光フィルターを備えたZeiss蛍光顕微鏡Axiophotにおいて観察した。顕微鏡写真を、CCDカメラで得た。

【0352】

試験した5種のAシリーズMAb(Ovr115 A2.1; Ovr115 A11.1; Ovr115 A51.2; Ovr115 A52.1; Ovr115 A63.2)のうち、4種の抗体(Ovr115 A2.1; Ovr115 A11.1; Ovr115 A51.2; Ovr115 A63.2)は、Ovr115発現細胞への結合を例証した。図2は、Ovr115 A51.2の、卵巣癌CaOV-3癌細胞の表面への結合を示す。Ovr115についての特異的な標識を示す、当該領域におけるほとんどの細胞は、明らかに、細胞の細胞膜を装飾することが見られる(矢印)。

【0353】

DシリーズMAbを、生存可能な、非透過性Ovr115形質移入293T細胞への結合について、蛍光顕微鏡観察により試験した。表3Aに列挙したMAbのすべては、Ovr115.D20.1およびOvr115.D26.1を除いて、10%の形質移入した細胞に結合した。さらに、Ovr115.D15.3、Ovr115.D37.1、Ovr115.D69.1およびOvr115.D81.3はすべて、50%より大きい形質移入した細胞に結合し、非形質移入293T細胞に顕著に結合しなかった。これらの結果は、例1におけるFACS結果と整合する。

【0354】

【表15】

表3A: Ovr115 DシリーズMAbの形質移入した293T細胞への結合

MAb	生存可能な非透過性細胞	
	Ovr115- 形質移入 293T	非形質移入 293T
Ovr110.D3.3	+ / + + + , 10-15%	-
Ovr110.D15.3	+ / + + + + , >50%	-
Ovr110.D20.1	+ / + + , -5%	-
Ovr110.D26.1	+ , <5%	-
Ovr110.D31.1	+ / + + , -20%	+ / -
Ovr110.D32.2	+ / + + , -10%	-
Ovr110.D37.1	+ / + + + , >50%	-
Ovr110.D43.1	+ / + + + + , -20%	-
Ovr110.D69.1	+ / + + + + , >50%	-
Ovr110.D71.1	+ / + + + + , -10%	-
Ovr110.D81.3	+ / + + , >50%	-
Ovr110.D84.2	+ / + + + + , -20%	-

【0355】

DシリーズMAbを、さらに、蛍光顕微鏡観察により、生存可能な、非透過性Ovr115形質移入293T細胞への、およびOvr115 mRNAに対してQPCR陽性(+)または陰性(-)のいずれかである腫瘍細胞系への結合について試験した。表3Bは、Ovr115.D15.3、Ovr115.D37.1、Ovr115.D69.1およびOvr115.D81.3がすべて、顕著な比率の形質移入した細胞に結合し、非形質移入293T細胞に顕著に結合しなかったことを示す。

【0356】

Ovr115形質移入293T細胞への顕著な結合を例証しないにもかかわらず、Ovr115.D20.1は、20～30%のQPCR陽性腫瘍細胞系SKBR3に結合した。さらに、Ovr115.D15.3、Ovr115.D20.1、Ovr115.D31.1、Ovr115.D71.1およびOvr115.D81.3はすべて、10～50%のQPCR陽性腫瘍細胞系HT29に結合した。表3Bにおけるこれらの結果は、組換え的に発現された、および腫瘍発現したOvr115に対するMAb特異性におけるある差異を示し、これはまた、例1におけるFACS結果と整合した。

【0357】

【表16】

表3B：Ovr115DシリーズMAbの形質移入した293T細胞
およびmRNA陽性腫瘍細胞系への蛍光顕微鏡観察による結合

MAb	生存可能な非透過性細胞				
	Ovr115- 形質移入 293T	293T	SKBR3 (QPCR +)	HCT116 (QPCR -)	HT29 (QPCR +)
結合体	-	-	-	-	-
Ovr115.D3.3	+/+ 1-3%	-	-	-	+/- <1%
Ovr115.D15.3	+/++ ~40%	-	-	-/+ <5%	+/- >50%
Ovr115.D20.1	+ ~1%	-	±/+ 20-30%	+/-	+/- 10-15%
Ovr115.D31.1	+/+++ 15-20%	+/-	-	-	+/- ~30%
Ovr115.D32.2	+/+ <5%	-	-	-	-
Ovr115.D37.1	+/+ ~40%	-	-	-	-
Ovr115.D43.1	+/+++ <5%	-	-	-	-
Ovr115.D69.1	+/+ ~40%	-/+	-	-	-
Ovr115.D71.1	+/+ <5%	-/+	-	-	+/- ~20%
Ovr115.D81.3	+/+ ~40%	-/+	-	-/+	+/- ~30%
Ovr115.D84.2	+/+++ <5%	-/+	-	-	-

【0358】

FシリーズMAbを、蛍光顕微鏡観察により、Ovr115 mRNAに対してQPCR陽性(+)または陰性(-)のいずれかである腫瘍細胞系への結合について試験した。表3Cは、Ovr115.F64.2、Ovr115.F74.2、Ovr115.F75.1およびOvr115.F76.2がすべて、20～100%の2種のQPCR陽性腫瘍細胞(HCT29およびCaPan2)に結合したが、QPCR陰性細胞系HCT116には結合しなかったことを示す。さらに、表3Cにおける免疫蛍光データは、例1におけるFACSデータを補完する。特異的に、Ovr115.F75.1およびOvr115.F76.2は、QPCR陽性腫瘍細胞系A431への結合についての強力に陽性の結果を例証した。

【0359】

【表17】

表3C：Ovr115 FシリーズMAbのmRNA陽性腫瘍細胞系への
蛍光顕微鏡観察による結合

MAb	生存可能な非透過性細胞		
	HCT116 (QPCR -)	HT29 (QPCR +)	CaPAN2 (QPCR +)
結合体	-	-	-
Ovr115.F9.2	-	-	-
Ovr115.F21.1	-	-	-
Ovr115.F30.1	-	-	-
Ovr115.F32.2	-	-	-
Ovr115.F55.2	-	-	-
Ovr115.F62.2	-	-	-
Ovr115.F64.2	-	+/- ~40%	+/+, 100%
Ovr115.F74.2	-	+/+ ~40%	+/+, 70-80%
Ovr115.F75.1	-	+/- 20-30%	+/+, 70-80%
Ovr115.F76.2	-	+/+ 100%	+, > 50%
Ovr115.F79.2	-	-	-

【0360】

生きている癌細胞中でのOvr115 MAbの細胞表面結合は、免疫蛍光により例証された。

いくつかのOvr115 DシリーズおよびFシリーズMAbは、顕著な数の腫瘍細胞発現Ovr115 mRNAへの細胞表面結合を、蛍光顕微鏡観察により例証した。免疫蛍光強度は、細胞表面結合を明確に観察するのに十分であった。この免疫蛍光データは、これらのMAbが、結合した薬剤、毒素、酵素、プロドラッグ活性化分子または同位体を伴って、または伴わずに、Ovr115発現細胞の免疫療法に適することを例証する。

【0361】

生きている癌細胞における結合および内部移行

本研究を、蛍光抗体を用いて行った。抗体を、蛍光色素Cy3で標識することにより、抗体結合および内部移行を、蛍光顕微鏡観察により視覚化することができる。この手法は、十分に確立されている。Ovr115を発現しないHCT116細胞を、負の対照として用いた。

【0362】

Cy3結合

Ovr115 A2.1 ; Ovr115 A11.1 ; Ovr115 A51.2 ; Ovr115 A63.2 MAbを、Cy3で標識した。Cy3結合を、標準的な手順および製造者のガイドラインに従って行った。要するに、1mgの抗体を、0.1M重炭酸塩緩衝液(pH9.3)に対して60分間透析し、Cy3染料と混合し、RTで2時間インキュベートし、次にPierce Slide-A Lyzer透析カセット中に移送して、2リットルのPBS中で6時間、4℃において透析した。この操作を、6回繰り返した。Cy3結合抗体を回収し、濃度を、分光計において、280nmで測定した。

【0363】

次に、Ovr115 A2.1 ; Ovr115 A11.1 ; Ovr115 A51.2 ; Ovr115 A63.2 MAbを、10μg/mlの濃度で、細胞と共に37℃で、水チャンバー中で60分間インキュベートし、PBS中で洗浄し、PBS中の3%ホルムアルデヒドで10分間固定した。固定に続いて、細胞を有するカバーガラスを、DAPIを含む培地(Vectastain)中に載置して、細胞核を視覚化し、適切な蛍光フィルターを備えたZeiss蛍光顕微鏡Axiophotにおいて観察した。顕微鏡写真を、カラーCCDカメラで得た。

【0364】

結果

Cy3-Ovr115.A2.1 ; Ovr115.A11.1 ; Ovr115.A51.2 ; Ovr115.A63.2で処理した癌細胞の免疫蛍光顕微鏡観察により、Ovr115を発現する卵巣癌および膵臓癌細胞が、種々の程度で蛍光抗体に結合し、これを内部移行することができることが示された。図3Aは、卵巣癌CaOV3細胞、即ちOvr115を発現する細胞系の細胞表面への、Cy3-A51.2の結合を示す(矢印)。多くの内部移行小胞は、細胞の細胞質において検出された。Cy3-A51.2は、非イクスプレッサー(expressor)対照細胞HCT116に結合しなかった(図3B)。Cy-Ovr115 A51.2の結合に続いて、卵巣癌細胞により内部移行した。図4は、卵巣TOV-112D(図4A)およびTOV-21G(図4B)癌細胞におけるCy3-Ovr115 A51.2内部移行を示す。多くの内部移行小胞は、細胞質において見られた。さらに、Golgi装置の周辺におけるエンドソームの存在に対応する核周囲標識が、見られた(矢印)。

【0365】

図5は、4種の膵臓癌細胞系のうちの3種における、Cy3-A51.2の結合(図5Aおよび図5C)並びに内部移行(図5B、矢印)を示す。この結合パターンは、別個の細胞表面ドメイン(図5Aおよび図5C、矢印)に相当した。内部移行パターン染色を、Golgi装置に近接して位置するエンドソームに相当する傾向がある核周囲小胞の存在により、特徴づけた(図5B、矢印)。Cy3-A51.2は、膵臓細胞系PL-45に結合しなかった。その理由は、おそらく、この細胞系が、Ovr115を発現しないからである(図5D)。

O v r 1 1 5 M A b は、O v r 1 1 5 発現癌細胞の細胞表面上でO v r 1 1 5 に結合することにより、インピトロで内部移行する。

【 0 3 6 6 】

免疫組織化学により評価された腫瘍および正常組織におけるO v r 1 1 5 分布：

組織：乳癌、卵巣癌および正常な隣接する組織のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを、National Disease Research Interchange (Philadelphia, PA) から得た。正常な器官のO C T 包埋ブロックを、Zoion (Hawthorne, NY) から得た。

【 0 3 6 7 】

ホルマリン固定パラフィン包埋切片についての免疫組織化学的染色

ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから切断した厚さ 6 μ m の切片を、4 5 で焼成し、Histoclear 中で脱パラフィンし、P B S まで一連のエタノールにより再水和した。抗原検索を、切片スライドを 1 0 m M のクエン酸ナトリウム緩衝液 (p H 6 . 0) 中で 1 2 0 、 1 5 ~ 1 7 P S I で、デクロッキング(decloaking)チャンバー(Biocare, Walnut Creek, CA) 中で 1 0 分間沸騰することにより行った。内因性ペルオキシダーゼ活性を、3 % 過酸化水素溶液で 1 5 分間処理することにより、停止した。スライドを、1 % B S A と共にインキュベートして、非特異性抗体結合を遮断し、次に、1 0 μ g / m l の濃度で 1 時間、室温で D A K O オートステイナー (autostainer) (Dako Co., Carpinteria, CA) 中で用いた、4 種の異なる一次 O v r 1 1 5 M A b と反応させた。0 . 5 % の Tween-20 を有する T B S 緩衝生理食塩水 (T B S) 中で洗浄した後に、スライドを、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (H R P) に結合した二次抗体としての抗マウス I g G と共にインキュベートした。0 . 5 % の Tween-20 を有する T B S 中で洗浄した後に、切片を、3 , 3 ' -ジアミノベンジジン色素原により、2 ~ 5 分間視覚化し (Immunovision Technologies, Co. Daly City, CA)、ヘマトキシリンで対比染色し、その後脱水後に Permount 培地中に載置した。一次抗体と同一の濃度の正常なマウス I g G を、負の対照とした。

【 0 3 6 8 】

O C T 包埋凍結未固定切片についての免疫組織化学的染色

スライドを、クリオチャンバー (cryochamber) 中で、5 ~ 8 μ m に、適切な温度において切断し、少なくとも 3 0 分間室温で風乾した。要するに、スライドを、T B S 中で洗浄して、O C T を除去し、室温でインキュベートした。I H C を、Immunovision Power Vision Kit (Immunovision Technologies Co. Daly City, CA) を用いて行った。要するに、スライドを、T B S - T 中で洗浄して、O C T を除去し、O v r 1 1 5 に対する一連の異なる一次抗体と共に、1 時間室温でインキュベートした。次に、これらを、4 % パラホルムアルデヒド固定液中で、1 0 分間室温で後固定し、上記したようにして処理した。

【 0 3 6 9 】

いくつかの実験において、切片を、二次 C y 3 標識したロバ抗マウス (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA) で、1 0 μ g / m l の濃度で 3 0 分間処理した。洗浄に続いて、臨床的試料スライドを、Vectastain、即ち D A P I を含む培地 (Vector, Burlingame, CA) 中に載置して、細胞核を視覚化し、適切な蛍光フィルターを備えた Zeiss 蛍光顕微鏡 Axiophot において観察した。顕微鏡写真を、C C D カメラで得た。

【 0 3 7 0 】

結果

Ovr115.A2.1 ; Ovr115.A11.1 ; Ovr115.A51.2 ; Ovr115.A63.2 ; Ovr115.D15 および Ovr115.D84 を用いて、卵巣癌および膵臓癌の切片を免疫標識した。図 6 および 7 は、Ovr115.A51.2、Ovr115.D15 および Ovr115.D84 を用いた免疫蛍光により評価された卵巣腫瘍における O v r 1 1 5 の分布を示す。図 6 A および 6 B において染色した卵巣癌細胞の核の位置を、それぞれ図 6 C および 6 D に示す。図 6 および図 7 の両方において、強力な免疫蛍光シグナルが、上皮細胞の細胞表面上で見られ、このことは、O v r 1 1 5 が、細胞表面上で発現されたことを示す。

【 0 3 7 1 】

図 8 A は、卵巣癌臨床的試料において Ovr115.D84 を用いて得られた I H C 結果を示す。

5つの卵巣癌臨床的試料のうちの3つ(60%)が、腫瘍の上皮細胞の細胞表面上での強力な標識を示した(矢印)。特異的な標識は、正常なマウスIgGをOvr115.D84の代わりに用いた際には、観察されなかった(図8B)。

【0372】

卵巣癌に加えて、4つの膵臓癌臨床的試料のうちの3つ(75%)が、Ovr115の発現を示した。図9Aは、膵臓腺癌の臨床的試料において、Ovr115.D84を用いて得られた免疫標識パターンを示す。標識は、上皮細胞の細胞表面に限定された(矢印)。特異的な標識は、正常なマウスIgGをOvr115.D84の代わりに用いた際には、観察されなかった(図9B)。図10Aおよび10Bは、漿液性卵巣乳頭腺癌からの凍結切片の、Ovr115.D43.1による標識および、正常なヒト心臓、肝臓および腎臓の凍結切片における標識の欠如を例証する。卵巣および膵臓上皮細胞の両方の細胞膜は、Ovr115.D84により明確に標識されており、このことは、この合成に続いて、Ovr115が細胞表面に輸送されることを示す。Ovr115発現を、また、多くの重要臓器からの正常な組織において分析し、背景を超えていないことが見出された。

【0373】

凍結切片および固定されたパラフィン包埋した組織の切片の、DシリーズおよびFシリーズMAbでの標識についての試験からのさらなるデータを、以下の表4A、4B、4Cおよび4Dに要約する。

【0374】

【表18】

表4A：正常な、および卵巣癌組織からの凍結切片におけるFシリーズMAbの免疫組織化学的試験の結果

	濃度	正常な組織				卵巣癌
		心臓	肝臓	腎臓	卵巣	(陽性/試験した合計の数)
IgG	10 μ g/ml	-	-	-	-	
F21.1	10 μ g/ml	-	-	-	-	2/5
F29.2	10 μ g/ml	-	-	-	-	0/5
F30.1	10 μ g/ml	-	-	-	-	5/5
F32.2	10 μ g/ml	-	-	-	-	5/5
F55.2	10 μ g/ml	-	-	-	-	0/5
F62.2	10 μ g/ml	-	-	-	-	0/5
F64.2	10 μ g/ml	-	-	-	-	2/5
F74.2	10 μ g/ml	-	-	-	-	3/5
F75.1	10 μ g/ml	-	-	-	-	3/5
F76.2	10 μ g/ml	-	-	-	-	1/5
F79.2	10 μ g/ml	-	-	-	-	2/5

【0375】

表4Aは、Ovr115.F21.1、Ovr115.F30.1、Ovr115.F64.2、Ovr115.F74.2、Ovr115.F75.1、Ovr115.F76.2およびOvr115.F79.2がすべて、卵巣癌組織からの凍結切片と反応したが、正常な心臓、肝臓、腎臓または卵巣からの凍結切片とは反応しなかったことを示す。特に、Ovr115.F30.1、Ovr115.F32.2、Ovr115.F74.2およびOvr115.F75.1は、50%を超える卵巣癌標本において反応した。Ovr115.F64.2、Ovr115.F74.2、Ovr115.F75.1、Ovr115.F76.2およびOvr115.F79.2を、10 μ g/mlにおいて、凍結した正常な組織の一層広範囲のパネルにおいて試験した際に(以下の表4B)、Ovr115.F64.2、Ovr115.F74.2、Ovr115.F75.1、Ovr115.F79.2は、再び、正常な心臓、肝臓、腎臓、胃、膀胱、精巣、結腸、卵巣、前立腺、膵臓、肺または乳房からの組織の凍結切片における背景標識を超えなかった。Ovr115.F76.2は、同様に、これらの正常な組織における反応性を有せず、細胞質の弱い標識についての例外であったが、1つの正常な膵臓における低い百分率の細胞を有する細胞表面膜では違っていた。これらの組織の多くは、関連するセリンプロテアーゼ、例えばコリン、ヘプシンおよびテストイシンを含むことが知られており、これはさらに、Ovr1

15タンパク質についてのOvr115FシリーズMAbの高い特異性を示した。

【0376】

【表19】

表4B：正常な組織からの凍結切片におけるFシリーズMAbの免疫組織化学的スクリーニングの結果

	Hrt	Liv	Kid	Sto	Bld	Tes	Col	Ova	Pro	Pan	Lng	Brt
IgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F64.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F74.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F75.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F76.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+C 20%	-	-
F79.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

10

【0377】

次に、Ovr115.F64.2、Ovr115.F74.2、Ovr115.F75.1、Ovr115.F76.2およびOvr115.F79.2を、ホルマリン固定したパラフィン包埋した（FFPE）組織からの切片において試験し、結果を、以下の表4Cに要約する。Ovr115.F74.2およびOvr115.F79.2は共に、卵巣癌を有する2/4の患者からのFFPE切片と反応したが、心筋におけるOvr115.F79.2のある弱い反応性を除いて、正常な器官からのFFPE切片とは反応せず、これは、標識が心筋の凍結切片においては明らかではなかったため、固定の人為的結果であり得る。Ovr115.F74.2およびOvr115.F76.2は、卵巣癌を有する1/4の患者からのFFPE切片と反応したが、正常な器官からのFFPE切片とは反応しなかった。

20

【0378】

【表20】

表4C：正常な、および卵巣癌組織からのFFPE切片におけるFシリーズMAbの免疫組織化学的試験の結果

MAb	濃度	正常な器官			卵巣癌標本			
		心臓	肝臓	腎臓	9803	6918	8395	9313
IgG	10μg/ml	-	-	-	-	-	-	-
F64.2	10μg/ml	心筋 +/-	-	-	-	-	-	-
F74.2	10μg/ml	-	-	-	-	-	-	+/-
F75.1	10μg/ml	-	-	-	+	-	-	+/-
F76.2	10μg/ml	-	-	-	-	-	-	+
F79.2	10μg/ml	心筋 +/-	-	-	+	-	+	-

30

【0379】

Ovr115は、高い百分率の卵巣癌および膵臓癌の症例において発現される。Ovr115が、癌細胞の細胞表面上で発現されるという事実により、これが、抗体に基づく療法のための理想的な標的となる。上記に示したいくつかのOvr115MAbは、Ovr115に特異的であり、正常な重要臓器からの新鮮な凍結組織と反応しない。

40

【0380】

【表 2 1】

表 4 D : 未固定の、および F F P E の結腸癌組織における D および F シリーズ M A b の免疫組織化学的試験の結果

Mab		凍結組織			FFPE 癌
Ovr115	濃度	癌	NAT	正常	
D15.3	10 μ g/ml	Ca +++ 7/7	Epi +++ 1/1	Epi +++ 2/2	Ca +++ 1/1
D20.1	10 μ g/ml	Ca +++ 7/7	Epi +++ 1/1	Epi +++ 2/2	Ca +++ 1/1
D43.1	5 μ g/ml	Ca +++ 6/6	Epi +++ 1/1	Epi +++ 2/2	Ca +++ 1/1
F30.1	10 μ g/ml	Ca +++ 6/6	Epi - 1/1	Epi - 2/2	
F64.2	10 μ g/ml	Ca + 3/3	Epi + 1/1	Epi ++ 2/2	
F75.1	10 μ g/ml	Ca + 1/3	Epi - 1/1	Epi - 2/2	
F76.2	0.5 μ g/ml	Ca + 4/6	Epi - 1/1	Epi - 2/2	
E-カドヘリン	0.25 μ g/ml	+	+	+	+
IgG1	10 μ g/ml	-	-	-	-

10

【 0 3 8 1 】

前記の表 4 D において、染色は、細胞のタイプ、染色スコア (+ 、 + + または + + +) および陽性 / 試料により特徴づけられる。以下の略語を用いて、細胞のタイプを示す ; E p i : 上皮、C a : 癌細胞。

表 4 D が、正常な隣接および正常な結腸組織染色が、結腸癌組織に類似した強度を有することを示すが、正常な隣接および正常な結腸組織染色のパターンは、一層先端性および焦点性であるか、または結腸癌組織における遍在する染色と比較して限定されている。

20

【 0 3 8 2 】

図 1 1 A および 1 1 C は、特に結腸癌細胞における、それぞれ凍結結腸腺癌において Ovr115.F64.2 での、および F F P E 結腸腺癌において Ovr115.D43.1 での、陽性の膜染色を例証する。さらに、図 1 1 B および 1 1 D は、マウス I g G 1 を凍結結腸腺癌において Ovr115.F64.2 でおよびマウス I g G 1 を F F P E 結腸腺癌組織において Ovr115.D43.1 で交換した際に、結腸癌において陽性の染色がないことを示す。これらの結果は、抗 O v r 1 1 5 抗体が、O v r 1 1 5 を発現する結腸癌細胞に特異的に結合することを示す。

従って、O v r 1 1 5 M A b は、結合した薬剤、毒素、酵素、プロドラッグ活性化分子または同位体を伴う、または伴わない免疫療法のための標的腫瘍に対する適切な特異性を提供する。

30

【 0 3 8 3 】

例 3 : O v r 1 1 5 のマウスモノクローナル E L I S A 検出
競合 E L I S A

高結合ポリスチレンプレート (Corning Life Sciences (MA)) を、1 μ g / ウェルの抗 O v r 1 1 5 M A b と共に 4 で一晩被覆した。被覆溶液を、吸引して除去し、遊離の結合部位を、3 0 0 μ l / ウェルの Superblock-TBS (Pierce Biotechnology, Illinois) で、1 時間室温 (R T) で遮断した。T B S / 0 . 1 % の Tween20 で 4 回洗浄した後に、1 0 0 μ l のアッセイ緩衝液 (T B S 緩衝液、p H 7 . 4、1 % の B S A、1 % の子ウシ血清、1 % のマウス血清、0 . 1 % の Tween20) を、負の対照 (= ノイズ) として加え、1 0 0 μ l の組換え O v r 1 1 5 (1 0 0 n g / m l) を、正の対照 (= シグナル) として加えた。5 0 μ l の未標識「被覆」M A b (2 0 μ g / m l) を加え、R T で振盪しながらインキュベートした。1 0 分後、5 0 μ l のビオチニル化「検出」M A b (2 μ g / m l) を、各々のウェルに加え、1 時間 R T で振盪しながらインキュベートした。洗浄後、1 0 0 μ l のアルカルホスファターゼ結合ストレプトアビジン (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA) を、各々のウェルに加え、振盪しながら 3 0 分間 R T でインキュベートした。次に、洗浄後、プレートを、1 \times D E A 緩衝液 (Pierce Biotechnology, Illinois) 中の p N P P 基質を用いて、3 0 分間 R T で発色させた。反応を、1 0 0 μ l / ウェルの 1 N の N a O H を用いて停止し、プレートを、4 0 5 n m で、Spectramax 190 プレート

40

50

リーダー(Molecular Devices, CA)を用いて読み取った。

【0384】

未関連抗体(抗LpLPA2抗体4B4)を、抗体の被覆として、および検出としての対照として用いた。すべての試料を、2つ1組で実行し、分析のために、各々の抗体対についてのシグナル/ノイズ比を、計算した。Ovr115 MA bを用いた競合ELISAの結果を、表5に示す。

【0385】

【表22】

表5：競合ELISAによる抗体対の同定(シグナル対ノイズ比)

		検出 MA b												
		A2.1	A11.1	A51.2	A52.1	A63.2	F21.1	F32.2	F62.2	F64.2	F74.2	F75.1	F76.2	F9.2
捕集 MA b	A52.1	1.6	1.2	1.5	1.0	2.2	2.7	1.5	1.1	2.2	0.9	0.5	4.7	2.7
	A63.2	1.0	1.3	2.2	1.1	1.3	2.7	2.1	1.1	5.2	02.5	11.5	14.8	2.6
	D43.1	1.7	1.2	1.2	1.0	0.6	4.6	2.1	1.1	4.4	9.0	7.5	10.7	4.9
	D71.1	1.3	1.2	1.1	5.7	9.2	1.2	1.9	1.2	4.1	5.2	6.7	8.5	4.4
	F21.1	1.2	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.1	1.0	1.2	1.5	1.4	1.7	1.0
	F30.1	1.9	1.6	2.6	1.1	4.6	9.4	2.7	1.1	2.6	7.7	5.7	11.4	6.7
	F55.2	1.8	1.4	2.3	1.1	3.8	7.2	2.4	1.1	3.4	6.4	5.4	9.7	5.8
	F62.2	1.5	1.1	1.8	1.1	2.5	6.0	1.9	1.0	3.6	11.4	2.2	12.8	6.2
	F64.2	2.3	1.4	2.4	1.1	3.5	6.0	2.5	1.1	1.1	3.1	1.4	10.4	5.2
	F74.2	2.1	1.4	1.9	1.1	0.3	6.1	2.0	1.1	1.0	1.1	1.0	2.6	3.9
	F75.1	1.9	1.4	1.9	1.1	3.1	5.3	1.9	1.1	1.0	1.5	1.1	8.7	3.8
	F76.2	1.6	1.4	1.5	1.0	2.5	4.3	1.6	1.2	2.4	5.5	5.0	1.3	3.2
	F79.2	2.4	1.7	3.2	1.2	6.2	13.3	3.3	1.1	5.5	12.6	9.7	16.0	4.3
	F9.2	2.2	1.5	1.8	1.1	3.6	5.4	2.3	1.1	0.7	9.5	5.2	1.1	1.1
	対照	1.1	1.1	1.3	1.0	1.4	1.0	1.2	1.0	1.5	1.0	1.0	1.1	1.6

下線を付した値は、当該MA b対についての好ましいシグナル対ノイズ比を示す。

【0386】

Aシリーズからの5種のMA b、Dシリーズからの2種のMA bおよびFシリーズからの13種のMA bを試験するチェッカー盤ELISAの結果を、上記の表中に示す。抗体を、すべての可能な組み合わせにおける被覆および検出抗体として試験した。結果を、特異的なシグナル/ノイズ比として示す。前記の表5における下線を付した値は、当該MA b対についての好ましいシグナル対ノイズ比を示す。検出抗体とのインキュベーションの間、10倍高い濃度の被覆抗体を、ウェルに加えて、自己対形成を防止した。自己対形成は、抗原を部分的に多量体化した際に観察され得、エピトープマッピング結果を混同し得る。競合的/遮断的ELISAアッセイによる試験により、抗原が多量体形態である際に、抗体が、同一のエピトープに結合することができないことが確認される。

【0387】

データは、1種の極めて抗原性のエピトープが、Aシリーズ、DシリーズおよびFシリーズからの抗体(A52.1、D43.1、F30.1、F55.1、F62.1およびF79.1)により認識されることを示唆する。他のエピトープは、F74.1、F75.1およびF64.1により認識される。最初の2種のエピトープとは別個に、F76.1およびF9.1により認識される第3のエピトープがある。MA b Ovr115.D71およびOvr115.F21は、Ovr115.A63.2のものと近接するエピトープと反応し得る。その理由は、これらのMA bが、組み合わせて、比較的低いシグナルを生じ、一方他方のエピトープが、互いに、並びにOvr115.D71/Ovr115.F21およびOvr115 63.2エピトープから明らかにすべて独特であるからである。表5における結果から誘導されたOvr115 MA bのエピトープマップを、図12に示す。要するに、本発明者らは、Ovr115 MA bが、この対形成分析からの少なくとも4種の別個のエピトープにおいて検出されたことを観察することができる。

【0388】

さらに、すべての抗体を、直接的なELISAにおいて、組換え昆虫および組換え哺乳動物タンパク質を被覆のために用いて試験した。結果は、Aシリーズ抗体が、293細胞からの組換えOvr115についてよりも、昆虫由来のOvr115について高い親和性を有する一方、Fシリーズは、両方のタンパク質に高い親和性で結合することを示す。従

って、本発明者らは、癌細胞系および血清におけるその後の実験のために、Fシリーズからの抗体を用いた。

【0389】

サンドイッチELISA

高結合ポリスチレンプレート(Corning Life Sciences (MA))を、 $1\mu\text{g}/\text{ウェル}$ の抗Ovr115 MA bで4で一晩被覆した。遊離の結合部位を、 $300\mu\text{l}/\text{ウェル}$ のSuperblock-TBS (Pierce Biotechnology, Illinois)で、1時間室温(RT)で遮断した。TBS/0.1%のTween20で4回洗浄した後に、 $100\mu\text{l}$ のアッセイ緩衝液および $20\mu\text{l}$ の標準(250、125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9および $0\text{ng}/\text{ml}$ Ovr115)または試料を、1時間のインキュベーションのために加えた。洗浄後、 $100\mu\text{l}$ のビオチニル化抗体($1\mu\text{g}/\text{ml}$)を、1時間のインキュベーションのために加えた。洗浄後、 $100\mu\text{l}$ のアルカルホスファターゼ結合ストレプトアビジン(Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA)を、各々のウェルに加え、振盪しながら30分間RTでインキュベートした。プレートを洗浄し、次に、 $1\times\text{DEA}$ 緩衝液(Pierce Biotechnology, Illinois)中のpNPP基質を用いて、30分間RTで発色させた。反応を、 $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ の1NのNaOHを用いて停止し、プレートを、 405nm で、Spectramax 190プレートリーダー(Molecular Devices, CA)を用いて読み取った。

【0390】

数種の異なる組み合わせの抗体を試験して、組織抽出物および血清試料における自然のOvr115の検出のための、高い感受性および特異性を有するサンドイッチELISAアッセイを確立した。図13は、培地(上清)並びにOvr115形質移入293T細胞からの細胞抽出物並びにOvr115 mRNA陽性腫瘍細胞系CaOv3、LNCAPおよびLoVoからの抽出物中での種々のMA b対を用いた、サンドイッチELISAによるOvr115タンパク質の検出を例証する。これらのデータは、Ovr115 MA bを、患者からの血液、血清または他の体液中でのOvr115の検出のために用いることの有用性を示す。

【0391】

例4：抗Ovr115活性スクリーニングアッセイ

基質スクリーニング

蛍光タンパク質基質(TR-XまたはFL標識BSA、カゼインおよび卵巣アルブミン)並びにローダミンB標識ペプチドを、Molecular Probes (Eugene, OR)から購入して、Ovr115特異性をスクリーニングした。アッセイ緩衝液を、製造者のプロトコルに従って用い、基質に依存して変化させた。一般的に、アッセイを、 $10\sim 20\text{mM}$ のトリス/HCl pH7.5中で行った。タンパク質基質についての最終的な濃度は、ペプチド基質について $10\mu\text{g}/\text{ml}$ および $100\mu\text{M}$ であった。Ovr115についての最終的な濃度は、 $34\mu\text{g}/\text{ml}$ ($0.73\mu\text{M}$)であった。すべてのアッセイを、96ウェルプレートにおいて行った。反応を、以下の蛍光読み取り(TR-X標識についてEx 590nm/Em 650nm並びにFLおよびローダミンB標識についてEx 485nm/Em 530nm)によりモニタリングした。基質スクリーニングにより、ローダミン110、ビス-(CBZ-L-フェニルアラニル-L-アルギニンアミド)、二塩酸塩; また(CBZ-Phe-Arg)₂-R110またはFRとして知られているものが、Ovr115により容易に加水分解されることが示された。

【0392】

アッセイ様式およびスクリーニング結果

基質スクリーニング、動的分析およびアッセイ最適化に続いて、以下の抗Ovr115活性アッセイ様式を開発した。 $25\mu\text{l}$ のOvr115($17.2\mu\text{g}/\text{ml}$)を、 $50\mu\text{l}$ の抗体溶液(0.5または6.2倍mol過剰)に加え、室温で15~30分間インキュベートした。インキュベーションの後に、反応を、 $25\mu\text{l}$ の基質($5\mu\text{M}$ のFRペプチド)を加えることにより、開始した。pH7.5におけるTBSを、緩衝溶液に対し

て用いた。負の対照として、O v r 1 1 5を加えないか、または120 mMのベンザミジンを、O v r 1 1 5に対する阻害剤として加えた。O v r 1 1 5に対するベンザミジンについての阻害濃度 (I C 5 0) は、0 . 3 1 6 mMであることが、決定された。正の対照として、抗O v r 1 1 5抗体を加えないか、または無関連の抗体を加えた。

【 0 3 9 3 】

図14は、O v r 1 1 5活性の阻害についてのO v r 1 1 5抗体のスクリーニングの結果を示す。この図面は、0 . 1 9 μ M (0 . 5 倍m o l 過剰) の濃度におけるM A b O v r 1 1 5 . F 9 . 2、O v r 1 1 5 . F 2 1 . 1、O v r 1 1 5 . F 3 0 . 1、O v r 1 1 5 . F 3 2 . 2、O v r 1 1 5 . F 5 5 . 2、O v r 1 1 5 . F 6 2 . 2およびO v r 1 1 5 . F 7 6 . 2が、O v r 1 1 0抗体 (正の対照) と比較して、O v r 1 1 5活性を顕著に低下させることを例証する。抗O v r 1 1 5抗体よりも高い濃度の結果、O v r 1 1 5活性のさらなる低下がもたらされた。O v r 1 1 5活性のこの低下は、プロテアーゼ活性部位の遮断、O v r 1 1 5の立体的妨害またはO v r 1 1 5タンパク質の高次構造上の変化のためであり得る。

【 0 3 9 4 】

従って、M A b O v r 1 1 5 . F 9 . 2、O v r 1 1 5 . F 2 1 . 1、O v r 1 1 5 . F 3 0 . 1、O v r 1 1 5 . F 3 2 . 2、O v r 1 1 5 . F 5 5 . 2、O v r 1 1 5 . F 6 2 . 2およびO v r 1 1 5 . F 7 6 . 2の結合により、O v r 1 1 5の活性が顕著に低下する。抗O v r 1 1 5活性スクリーニングデータは、O v r 1 1 5 M A bが、結合した薬剤、毒素、酵素、プロドラッグ活性化分子または同位体を伴う、または伴わないO v r 1 1 5発現細胞の免疫療法に適することを例証する。

【 0 3 9 5 】

例5 : O v r 1 1 5の機能的確証

細胞および細胞培養物

RK3E、HT-29、CAPAN-2およびHCT-116細胞系を、アメリカンタイプカルチャーコレクション (Manassas, VA) から購入した。細胞を、L - グルタミンおよび4 . 5 g / Lのグルコースを有し、10 % F B Sおよび100 U / m Lのペニシリン / ストレプトマイシン (Cel Igro) を補足したD M E M (Invitrogen) 中で増殖させた。すべての細胞を、加湿した37 インキュベーター中で、5 % C O ₂ と共に保持した。

【 0 3 9 6 】

S D S - P A G E およびウエスタンイムノブロット分析

腫瘍細胞またはウイルス感染細胞単層からの抽出物を、氷上で、可溶化緩衝液 (1 % N P 4 0、10 mM N a ₂ P O ₄、0 . 1 5 M N a C l) とプロテアーゼ阻害剤との混合物 (Roche Inc.) を用いて調製した。ヒト腫瘍からのタンパク質抽出物または異種移植実験からの収穫した腫瘍を、スナップ凍結 (snap-frozen) の、細分化した腫瘍組織の抽出緩衝液 (50 mM トリス - H C l、p H 7 . 2、150 mM N a C l、5 mM E D T A、0 . 5 % I G - P a l およびプロテアーゼ阻害剤) 中での均一化、続いて超音波処理および次に微量遠心管中での遠心分離により調製して、抽出物を浄化した。20 ~ 50 μ g のタンパク質抽出物を、各々のゲルレーンについて用い ; タンパク質の等しい濃度を、同一のゲルについてのタンパク質レベル比較のために評価した。浄化した抽出物を、等しい容積の2 x 濃縮Laemmli試料緩衝液 (Invitrogen) と混合し、70 に10分間加熱し、次に、プレキャスト (pre-cast) 4 ~ 12 % S D S - ポリアクリルアミドミニゲル (Nupage, Invitrogen) をM E S 実行緩衝液 (Nupage; Invitrogen) と共に用いて分析した。

【 0 3 9 7 】

ゲルを、Immobilon-P 0 . 4 5 μ m膜 (Invitrogen) に、1 x Nupage移送緩衝液および10 % メタノールを用いて移送した。膜を洗浄し、1時間室温でP B S中の5 % 脱脂乾燥乳を0 . 0 5 % のTween-20と共に用いて遮断した。膜を、一次抗体と共に一晩、0 . 0 5 % のTween-20を含むP B S中の5 % 脱脂乾燥乳中でインキュベートした。O v r 1 1 5 (F 2 1 . 1) に対して向けられたマウスモノクローナル抗体を、ハウス中に産生し、1 μ g / m l の最終濃度で用いた。一次抗体インキュベーションに続いて、膜を、室温で10分間4回、0 . 0 5 % のTween-20を含む1 x P B S中で洗浄した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン (Jackson Lab Inc.) を、P B S中の5 % 脱脂

乾燥乳および0.05%のTween-20中で、1時間室温で用いて(1:10, 000希釈)、一次モノクローナル抗体を検出した。膜を、4回10分間、0.05%のTween-20を含む1×PBS中で洗浄し、続いて製造者の指示(Amersham)に従って、増強した化学発光(ECL)試薬を用いて検出し、X線フィルム(Kodak)に露光した。

【0398】

図15は、Ovr115MAb、特にOvr115.F21.1が、ヒト細胞系および卵巣腫瘍における自然のOvr115タンパク質を認識することを例証する。

【0399】

レトロウイルスベクター構成

Ovr115をコードするcDNAを、腫瘍cDNA調製からのPCRにより得た。cDNAを、pLXSNベクター(BD Bioscience/Clontech)のHpaIクローニング部位中にクローニングし、配列を立証した。プロテアーゼ活性を欠いている突然変異体Ovr115タンパク質を、変異原性に向けられたオリゴヌクレオチドを用いることにより構成して、触媒的3つ組セリン残基385をアラニンに変換した。得られた突然変異体のcDNAの配列を立証し、pLXSNベクター中にクローニングした。pLAPSN、即ちアルカリホスファターゼ(AP)をコードするレトロウイルス発現ベクターを、BD Bioscience/Clontech (pLXSN-AP)から購入し、負の対照として用いた。アポトーシスアッセイのための正の対照として用いた、活性化されたv-Rasをコードするレトロウイルス発現ベクターを、pCMV-RasV12からのRasV12 cDNAをpLXSN(BD Bioscience/Clontech)中にサブクローニングすることにより、構成した。

【0400】

ウイルス産生

狭宿主性ウイルスを用いて、RK3E細胞を感染した。ウイルス産生のために、293T細胞を、6ウェル皿のウェルあたり 8×10^5 個の細胞の密度で、Biocoatコーラゲン被覆プレート(BD)上に播種した。24時間後、細胞を、製造者の推薦に従って、プラスミドで、PLUS試薬(Invitrogen)を加えたりポフェクタミンを用いて形質移入した。ウイルスプラスミドDNA: pLXSN-Ovr115野生型、pLXSN-Ovr115突然変異体、pLXSN-APまたはpLXSN-Rasと、pVpack-EcoおよびpVpackGP(Stratagene)とを、3時間形質移入し、その後細胞を、20%のFBSを含むDMEM中で、一晚増殖させた。次に、培地を、10%FBS + 100U/mLのPen/Strepを補足したDMEMに交換し、ウイルス含有培地を、24時間後に収穫し、0.45 μmのポリスルホンフィルターを通して濾過した。

【0401】

ウイルス感染および選択

ポリブレン(臭化ヘキサジメトリン; Sigma)を、新鮮なウイルス含有培地に、4 μg/mLの最終濃度で加えた。前日に100 mm²の皿あたり 3×10^5 個の細胞の密度で播種したRK3E細胞を、Ca²⁺およびMg²⁺を含むリン酸緩衝生理食塩水(cellgro)で1回洗浄した。ウイルス含有培地を、細胞に直接適用し、次に3時間、37°Cで、時々回旋しながらインキュベートした。培地を、新鮮な増殖培地で交換し、細胞を、37°Cで60~72時間インキュベートし、この時点で、350 μg/mLの最終濃度のG418硫酸塩(Cellgro)を、増殖培地に加えて、ウイルスに感染した細胞を選択した。G418選択に続いて、細胞のプールを、すべてのその後の実験のために用いた。ウイルス感染した、選択された細胞における、異所性のタンパク質の発現を、イムノプロットにより立証し、APの発現を、染色によりモニタリングした。

【0402】

柔軟寒天アッセイ

柔軟寒天アッセイを、6ウェルプレート(Corning)を用いて行った。2 mLの底部の寒天ベース層は、0.8%の寒天、イスコーブ(ISCove)の培地(Invitrogen)中の10%FBSからなっていた。トリプシン処理した細胞を、0.4%の寒天、イスコーブの培地中の10%FBS中に懸濁させ、固化させたベース層の最上部上に、5 mLの最終容積におい

て適用した。3つの異なる生存可能な細胞数、即ち 10^5 、 10^4 および 5×10^3 個の細胞を、2つ1組でウェルあたり寒天中に播種した。0.8%の寒天、イスコープの培地中の10% FBS からの最後の2 mlの層を、固化させた細胞層の最上部上に適用した。次に、寒天プレートを、37 で約10～14日間、コロニーが出現するまでインキュベートした。コロニーを、さらに放置して増殖させ、2～4週間にわたり計数した。柔軟な寒天を、毎週増殖培地を供給することにより、維持した。

【0403】

図16Aは、柔軟な寒天アッセイを行うために採用される段階の簡単な図式である。図16Bおよび16Cは、Ovr115発現細胞の顕著なコロニー増殖およびAP発現細胞の限定された増殖を例証する。さらに、プロテアーゼ活性を欠いている、突然変異したOvr115を発現する細胞は、限定されたコロニーを産生するに過ぎず、このことは、Ovr115プロテアーゼ活性が、細胞増殖のために必須であることを示す。図16Dは、Ovr115野生型およびプロテアーゼ活性を欠いているOvr115突然変異体が、柔軟な寒天コロニーにおいて細胞により産生されることを確認する、ウエスタンブロットである。

【0404】

腫瘍異種移植

APまたはOvr115のいずれかを発現するRK3E細胞のレトロウイルスに感染したG418選択プールを、皮下的にSCIDノーマウスマウス(Charles River Laboratories)中に注射した。9匹のマウスを、群あたり用い、 $100 \mu\text{l}$ のPBS中の 5×10^6 個の細胞を、マトリゲルを用いずに移植した。腫瘍形成を、触診およびノギス測定によりモニタリングし、腫瘍容積を、式： $(\text{長さ} \times \text{幅}^2) / 2$ を用いて計算した。

【0405】

前述の柔軟寒天アッセイにおける、Ovr115またはAPを発現するRK3E細胞を、連続性のための腫瘍異種移植実験のために用いた。図17は、Ovr115を発現する細胞についての、APを発現する細胞と比較しての、時間経過に伴う平均の腫瘍容積の顕著な増大を例証する。このデータは、Ovr115発現およびOvr115活性が、腫瘍進行における結果であることを示す。図18は、Ovr115が異種移植実験において発生した腫瘍により発現されたことを確認するウエスタンブロットである。

【0406】

アポトーシスアッセイ

レトロウイルス感染および選択によりAP(負の対照)、Ras(正の対照)またはOvr115を発現する、 2×10^5 個のRK3E細胞を、血清を含まない培養培地中に懸濁させ、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)(Sigma)被覆プレート上でインキュベートした。37 で24時間後、細胞を、遠心分離により収穫し、「Guava Nexin V-PEキット」(Guava Technologies Inc.)でのアポトーシスについて評価した。洗浄後、約 10^5 個の細胞を、 $40 \mu\text{l}$ の供給された緩衝液中に際懸濁させ、各々 $5 \mu\text{l}$ のアネキシンV(+)および7-AAD(-)を加えた。氷上での20分のインキュベーションに続いて、細胞を、Guava PCA機器を用いて、製造者の指示に従って分析した。

【0407】

図19は、APを発現する細胞(負の対照)よりも少ない、Ovr115を発現する細胞が、アポトーシスを受けることを例証する。さらに、Ovr115を発現する初期のアポトーシス細胞の低い百分率は、Rasを発現する細胞(正の対照)とほぼ同一である。

【0408】

例6: Ovr115-MAbおよび抗マウスMAbサポリン結合体とのインキュベーションによるHT29結腸腫瘍細胞の死滅

実験を、HT29結腸腫瘍細胞をMAb-zapヤギ抗マウスIgサポリン結合体(Advanced Targeting Systems, San Diego, CA)と予め混合したOvr115-MAbと共にインキュベートし、細胞生存率を72および96時間において測定することにより、行って、これらのOvr115発現細胞に対する有効な死滅効果を検出した。1日目において

10

20

30

40

50

、HT29細胞を、96ウェルの平坦底の、無菌の細胞培養プレート(Corning)中に、3つ1組のウェルで、1,500個の細胞/75 μ L/ウェルで、10%FBS、P/Sを有するF12培地中に配置した。プレートを、37 $^{\circ}$ Cで5%CO₂中で一晩インキュベートした。2つ1組のプレートを、設置して、72時間および96時間における読み取りを可能にした。2日目において(0時間)、25 μ Lの4 \times 最終的なMAb濃度のみ、または25 μ Lの4 \times MAb Zapと予め混合した25 μ Lの4 \times MAb、または25 μ Lの4 \times MAb Zapのみ、または25 μ Lの培地のみを、96ウェルプレートのウェルに3つ1組で、100 μ Lの最終容積に加えた。最終的なMAb濃度は、2 μ g/mL、0.4 μ g/mL、0.08 μ g/mLおよび0 μ g/mLであり、MAb Zapの最終的な濃度は、1 μ g/mLであった。

10

【0409】

培地のみ、MAbのみ(2 μ g/mLのみ)およびMAb Zapのみを有する3つ1組のウェルを、負の対照として用いた。抗トランスフェリンレセプターMAb 5E9(ATCC, Manassus, VA)を、死滅のための正の対照のMAbとして用いた。プレートを、5分間穏和に振盪して、試薬を混合し、次に37 $^{\circ}$ Cで5%CO₂中でインキュベートした。5日目に(72時間)、10 μ LのAlamar Blue貯蔵溶液(Biosource International, Camarillo, CA)を、最初の群のプレートのウェルに加え、これらを、37 $^{\circ}$ Cで5%CO₂中で2~7時間インキュベートした。次に、プレートを、SpectraMAX GeminiEM分光光度計(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)(発光=590nm、励起=560nmおよびオートカットオフ(Autocutoff)=570nm)上で分析し、生存率を、培地のみを有する対照のウェルの百分率として表現した。

20

【0410】

【表23】

表6: Ovr115 MAbおよびMAb Zap サポリン結合体によるHT29死滅

MAb クローン	MAbでのHT29 陽性パーセント (If)*	培地のみを有するウェルと比較しての成長阻害パーセント				
		MAb Zap	MAb (2 μ g/mL)	MAb + MAb Zap w/ サポリン 結合体		
				MAb (0.08 μ g/mL)	MAb (0.4 μ g/mL)	MAb (2 μ g/mL)
5E9 TFR	-	0	2	18	58	35
アイソタイプ 対照	-	1	-	-10	-4	-6
D20.1	10-15	0	20	10	-15	12
D84.2	-	0	-3	3	6	15
F21.1	-	2	12	8	-2	-12
F30.1	-	1	16	-12	0	-2
F76.2	100	0	10	0	15	18

30

* 例2において詳述した免疫蛍光顕微鏡観察

【0411】

Ovr115.D20.1、Ovr115.D84.2、Ovr115.F21.1、Ovr115.F30.1およびOvr115.F76.1を試験した結果を、上記の表6に示す。明らかなように、MAb Zapのみは、HT29細胞の増殖を阻害しなかった(0~2%の阻害)。同様に、無関係のアイソタイプ対照であるMAbは、HT29細胞の増殖を阻害しなかった。Ovr115.D20.1、Ovr115.F21.1、Ovr115.F30.1およびOvr115.F76.1MAbのみのHT29細胞とのインキュベーションにより、20%、12%、16%および10%のHT29細胞の増殖阻害(それぞれ)が生じた。一方、MAb Zap サポリン結合体を加えた際には、Ovr115.D20.1、Ovr115.D84.2、Ovr115.F21.1およびOvr115.F76.1MAbは、8~18%のHT29腫瘍細胞の増殖阻害を生じた。

40

【0412】

Ovr115.F76.2は、特に、MAb Zapと共に0.04および2.0 μ g/mLの濃度

50

において、M A b Z a pのみよりも15～18%大きい増殖阻害を生じた。さらに、Ovr115.D20.1は、M A b Z a pと共に0.08および2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において、M A b Z a pのみによる0%の阻害と比較して10～12%の増殖阻害を生じた。同様に、Ovr115.D84.2は、M A b Z a pと共に0.4および2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において、M A b Z a pのみによる0%の阻害と比較して6～15%の増殖阻害を生じた。同様の結果が、C a p a nヒト膵臓癌細胞およびS K B R 3ヒト乳癌細胞で観察された。

【0413】

結論として、Ovr115発現HT29腫瘍細胞の増殖阻害が、インビボで容易に達成可能なM A bの濃度において、治療的目的のために得られた。これらのインビトロデータは、上記のOvr115 M A bが、結合した薬剤、毒素、酵素、プロドラッグまたは同位体を伴う、または伴わないインビボでの腫瘍細胞の標的に適することを示す。

10

【0414】

例7：寄託

細胞系およびDNAの寄託

ハイブリドーマ細胞系を、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.A.に位置するアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)で寄託し、受託番号が付与された。

以下のハイブリドーマ細胞系を、ATCCで寄託した。Ovr115 A51.2、Ovr115.D20.1、Ovr115.D84.2、Ovr115.F21.1、Ovr115.F30.1およびOvr115.F76.2。上記の寄託されたハイブリドーマ細胞系の名称を、参照の好都合のために短縮することができる。例えば、A01.1は、Ovr115.A01.1に相当する。これらのハイブリドーマは、ATCCで寄託されたクローン(これらの完全な名称と共に)に相当する。表7は、ATCCで寄託されたハイブリドーマクローン、付与されたATCC受託番号および寄託の日付を列挙する。

20

【0415】

【表24】

表7：ATCC寄託

ハイブリドーマ	ATCC 受託番号	寄託日
Ovr115 A51.2	PTA-5202	2003年5月16日
Ovr115.D20.1	PTA-5916	2004年4月16日
Ovr115.D84.2	PTA-5917	2004年4月16日
Ovr115.F21.1	PTA-5918	2004年4月16日
Ovr115.F30.1	PTA-5919	2004年4月16日
Ovr115.F76.2	PTA-5920	2004年4月16日

30

【0416】

これらの寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約(ブダペスト条約)の規定の下でなされた。これは、寄託の日付から30年の生存可能な培養物の維持を確実にする。生物は、ブダペスト条約の規約の下で、ATCCにより入手可能にされており、diaDexus, Inc.とATCCとの間の合意が施されており、これは、最初に到来するすべての、関連する米国特許の刊行またはすべての米国の、もしくは外国の特許出願の公共への公開の際に、培養の子孫の公共への永久的な、および制限されない入手可能性を確実にし、35 USC § 122およびこれに準拠する長官の規則(886 O G 638に対する特定の参照を有する37 CFR § 1.14を含む)に従って米国の特許および商標局長官によりこれに権利を付与するべきものとする決定されたものに対する子孫の入手可能性を確実にする。

40

【0417】

本出願の譲受人は、寄託された培養物が、好適な条件の下で培養された際に死滅するかまたは失われるかまたは破壊された場合に、これらを、公告に際して同一の培養物の生存可能な標本と即座に交換することに同意した。寄託された菌株の入手可能性は、この特許法に従ってすべての政府の権力の下に付与された権利に違反して本発明の実施の許諾とし

50

て考慮されるべきではない。これらの寄託をなすことは、いかなる意味によっても、寄託が、本発明を可能にするのに必要であることを承認するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0418】

【図1A】Ovr115形質移入マウスLMTK細胞のFACS分析の結果を示す図である。

【図1B】Ovr115・F76・2 MA bがA431(QPCR+)細胞系に結合する、FACS分析の結果を示す図である。

【図2】Ovr115 A51・2が、生きている卵巣CaOV3癌細胞の表面に結合することを示す図である。

10

【図3】Ovr115 Cy3-A51・2が、生きている卵巣CaOV3癌細胞に結合することを示す図である。

【図4】Ovr115 Cy3-A51・2が、生きている卵巣癌細胞に結合し、内部移行することを示す図である。

【0419】

【図5】Ovr115 Cy3-A51・2が、生きている膵臓癌細胞に結合することを示す図である。

【図6】卵巣癌細胞中でのOvr115の局所化を示す図である。

【図7】卵巣癌細胞中でのOvr115の局所化を示す図である。

【図8】Ovr115・D84が、卵巣癌腫瘍における上皮細胞を標識することを示す図である。

20

【図9】Ovr115・D84が、膵臓癌腫瘍における上皮細胞を標識することを示す図である。

【図10】卵巣漿液乳頭腺癌、Ovr115・D43・1で免疫標識した未固定のOCT凍結切片を示す図である。

【0420】

【図11】Ovr115・F64・2およびOvr115・D43・1が、対照のマウスIgG1と比較して、凍結した、およびFFPEの結腸腺癌細胞を特異的に標識することを示す図である。

【図12】Ovr115に結合するモノクローナル抗体についてのエピトープマップである。

30

【図13】腫瘍細胞および形質移入細胞可溶化液におけるOvr115の、Ovr115・D43およびFシリーズMA bを用いたサンドイッチELISA検出を示す図である。

【図14】Ovr115 MA bでの抗Ovr115活性スクリーニングを示す図である。

【0421】

【図15】Ovr115 mAbが、ヒト細胞系および卵巣腫瘍における自然のOvr115タンパク質を認識することを、ウエスタンブロット(mAb Ovr115・F21・1)により示す図である。

【図16】Ovr115の過剰発現による上皮細胞の形質転換を示す図である。

40

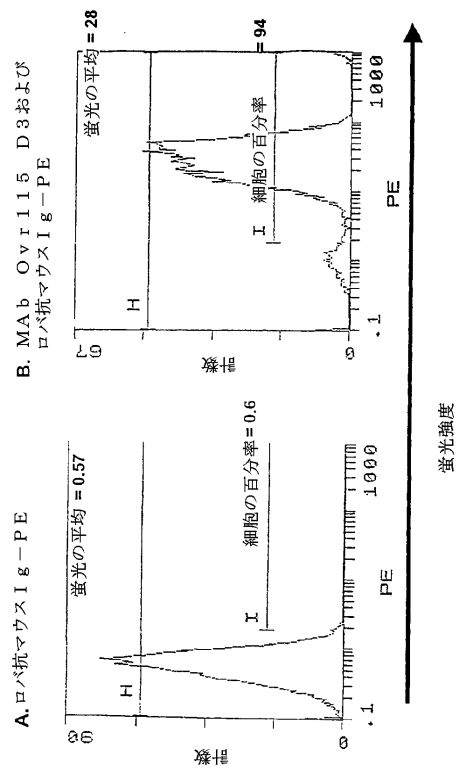
【図17】Ovr115の過剰発現により、SCIDベージュマウスにおいてSQ腫瘍増殖が誘発されることを示す図である。

【図18】腫瘍異種移植からのOvr115タンパク質の発現を示す図である。

【図19】Ovr115の過剰発現により、RK3E細胞がアポトーシスから保護されることを示す図である。

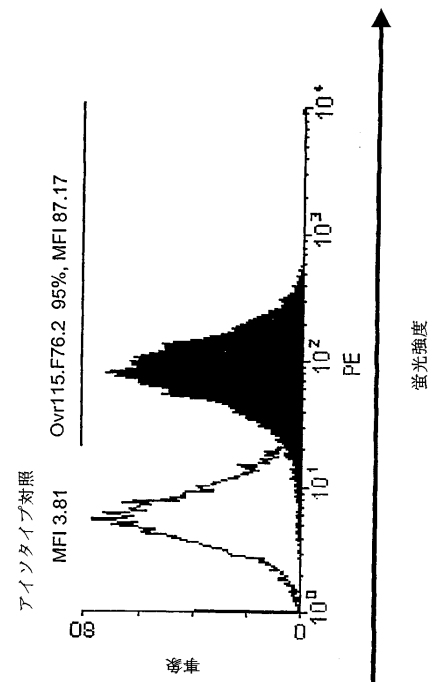
【図 1 A】

図1A: Ovr115形質移入マウスLMTK細胞のFACS分析の結果



【図 1 B】

図 1B: Ovr115, F76. 2 MA bは、A431 (QPCR+) 細胞系に結合する



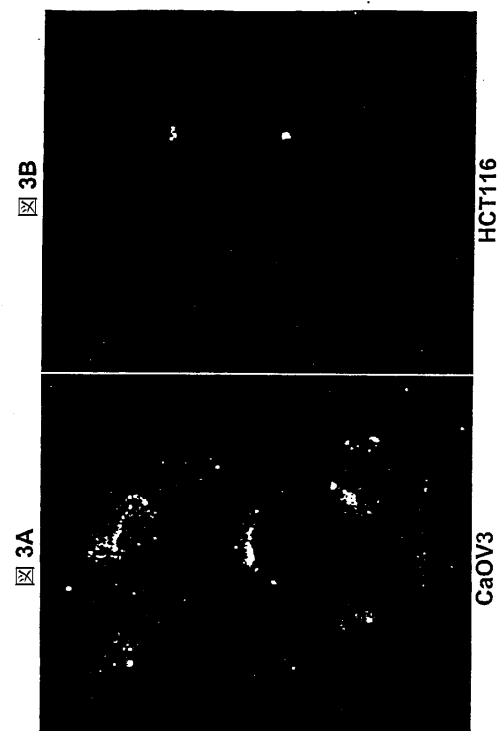
【図 2】

図 2: Ovr115-A51. 2は、生きている卵巣CaOV3 癌細胞の表面に結合する



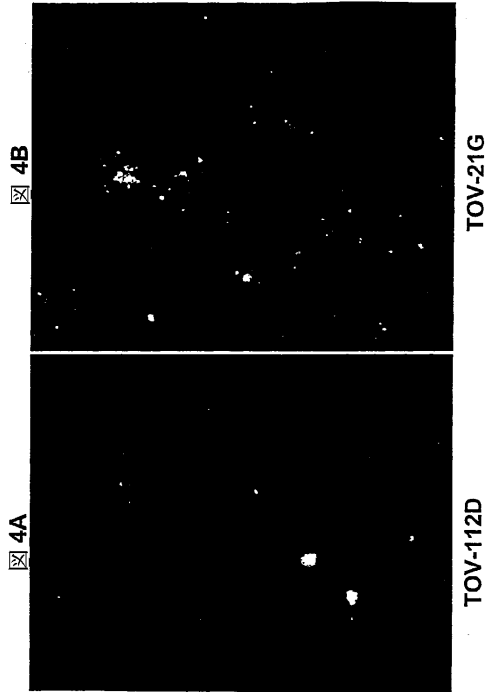
【図 3】

図3: Cy3-A51. 2は、生きている卵巣CaOV-3 癌細胞に結合する



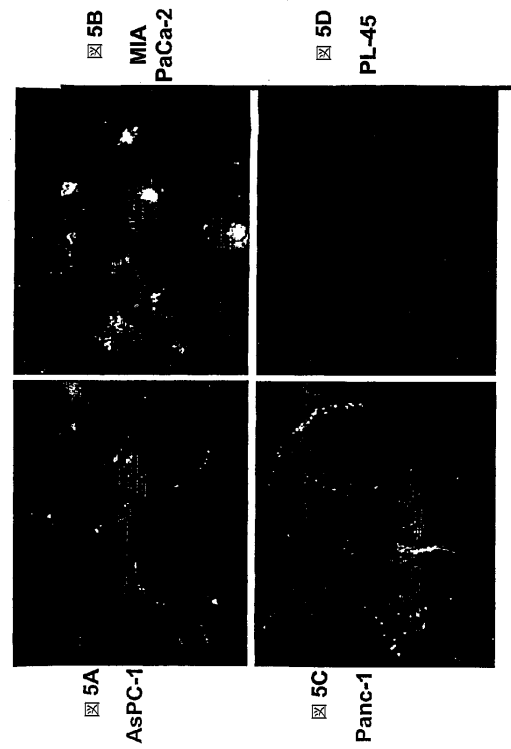
【 図 4 】

図 4 : Cy3-A51. 2は、生きている卵巣癌細胞に結合し、内部移行する



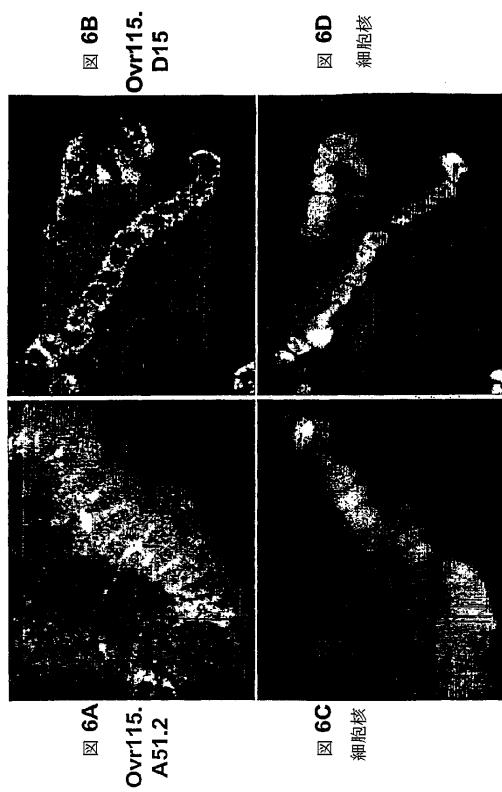
【 図 5 】

図 5 : Cy3-A51. 2は、生きている胰腺癌細胞に結合する



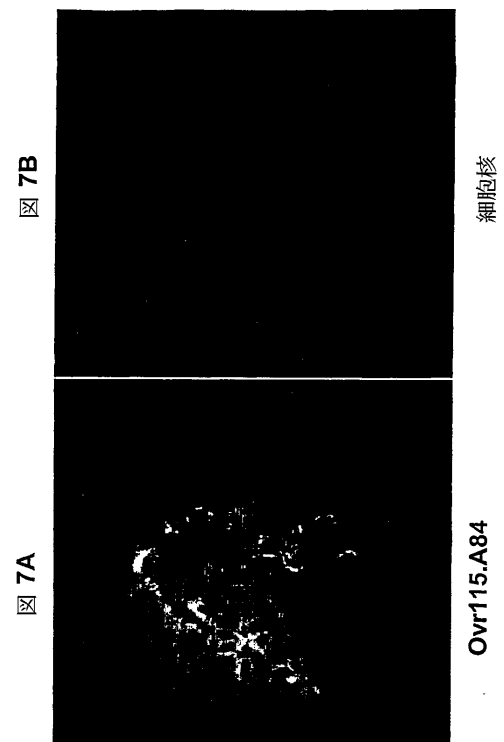
【 図 6 】

図 6 : 卵巣癌細胞中でのOvr115の局所化



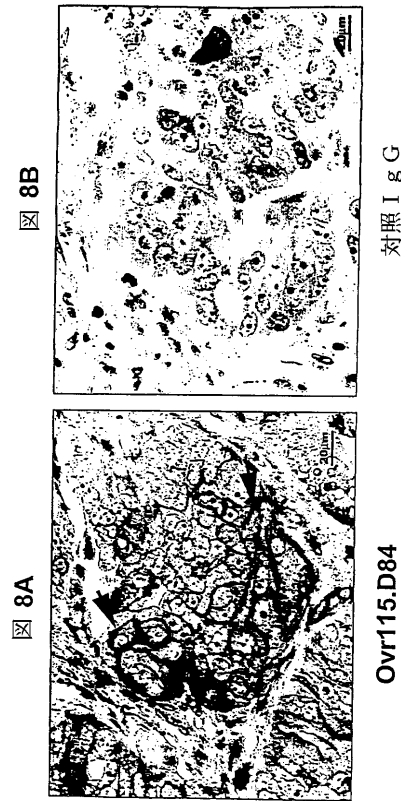
【 図 7 】

図 7 : 卵巣癌細胞中でのOvr115の局所化



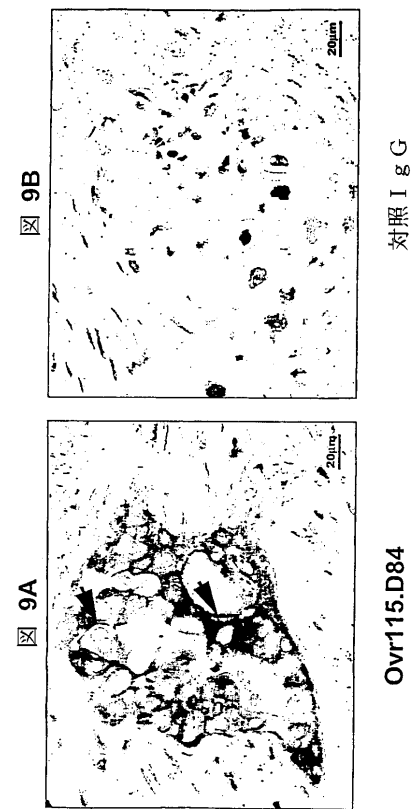
【図 8】

図 8 : Ovr115. D84 は、卵巣癌腫瘍における上皮細胞を標識する



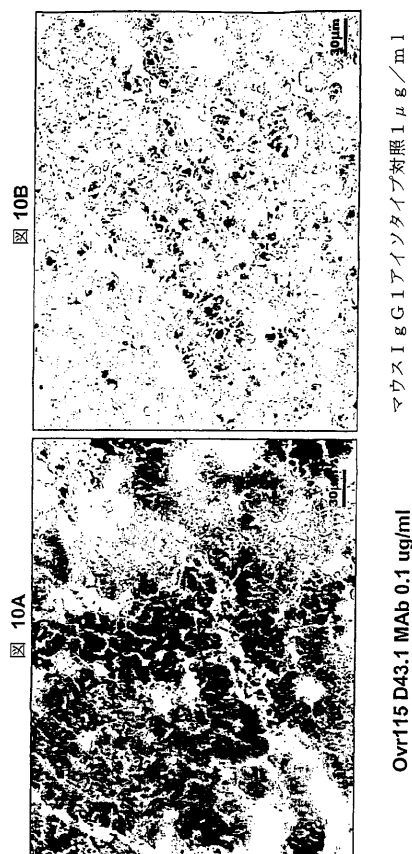
【図 9】

図 9 : Ovr115. D84 は、膀胱癌腫瘍における上皮細胞を標識する



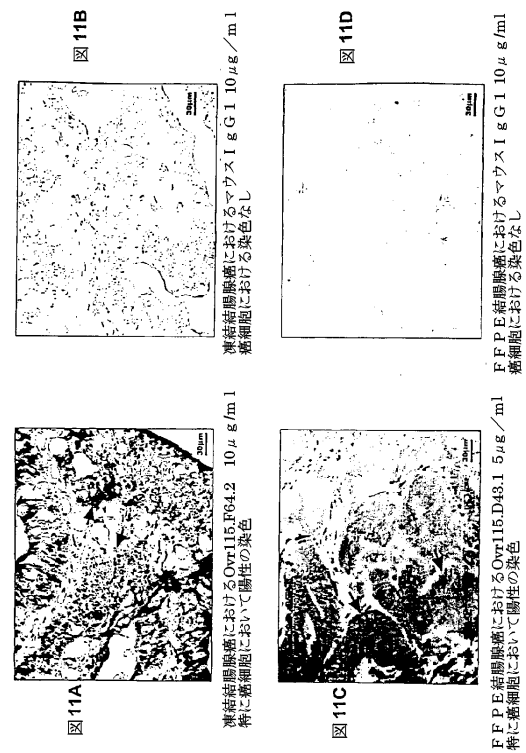
【図 10】

図 10 : 卵巣漿液乳頭腺癌、Ovr115. D43. 1 で免疫標識した
未固定の OCT 凍結切片



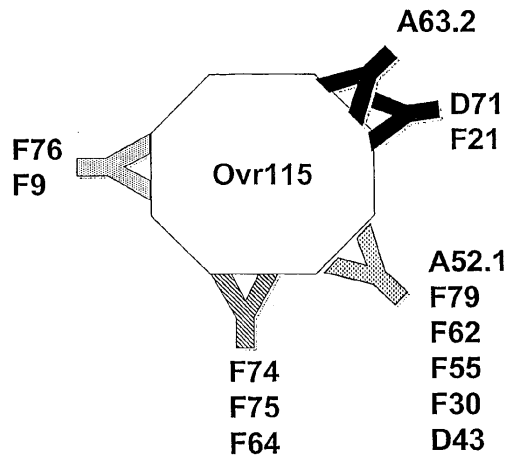
【図 11】

図 11 : Ovr115. F64.2 および Ovr115. D43. 1 標識結腸腺癌細胞



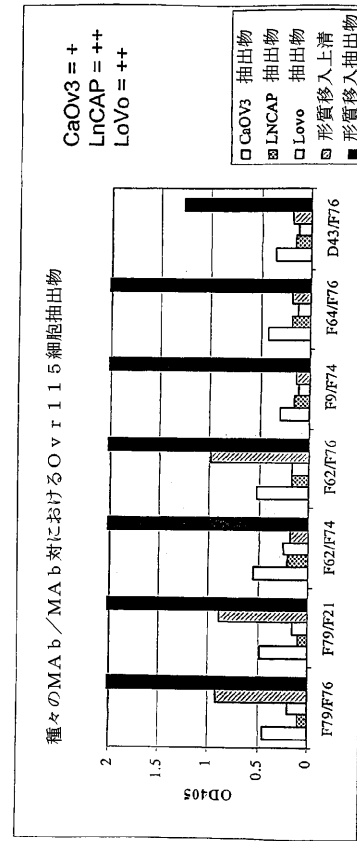
【図 12】

図12: Ovr115 MA b についての
エピトープマップ



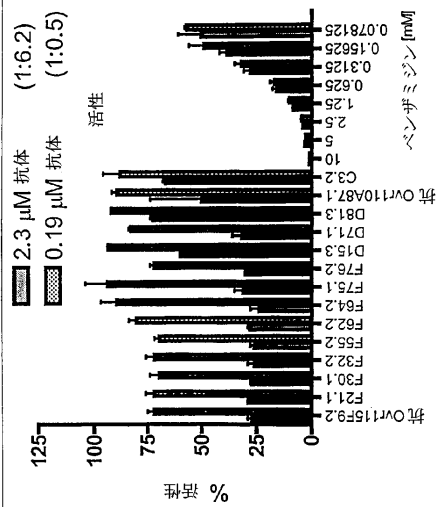
【図 13】

図13: 腫瘍細胞および形質移入細胞可溶性液におけるOvr115の、
Ovr115、D43およびFシリースMA bを用いたサンド
イッチELISA検出



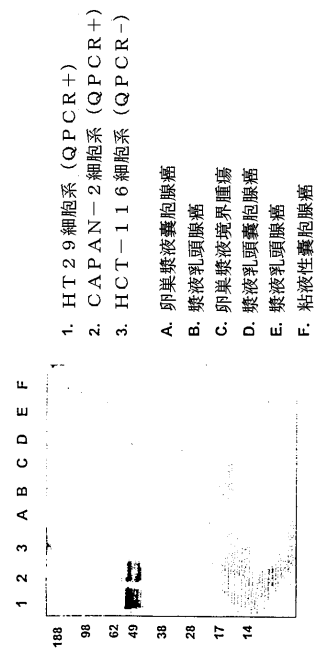
【図 14】

図14: Ovr115 MA bでの抗Ovr115活性スクリーニング



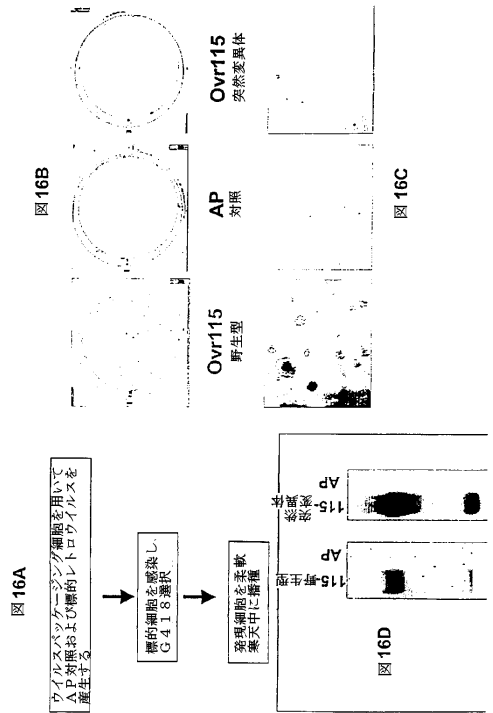
【図 15】

図15. ウェスタンブロット (mAb Ovr115, F21.1) により、
Ovr115 MA bは、ヒト細胞系および卵巣腫瘍における自然の
Ovr115タンパク質を認識する



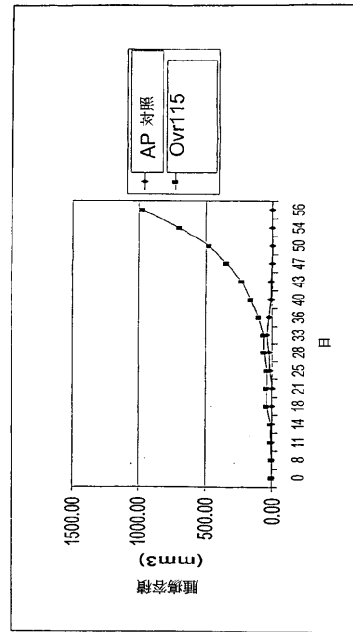
【図 16】

図16. Ovr115の過剰発現による上皮細胞の形質転換



【図 17】

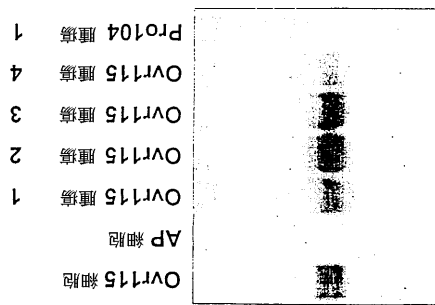
図17. Ovr115の過剰発現により、SCIDベージュマウスにおいてSQ腫瘍増殖が誘発される



Ovr115またはAP (図16) を発現する、凍天アッセイにおける細胞を、腫瘍異種移植のために用いた。

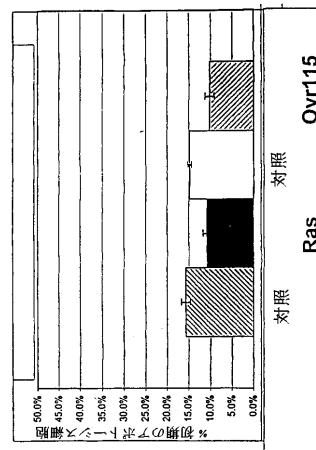
【図 18】

図18. 腫瘍異種移植からのOvr115タンパク質の発現



【図 19】

図19. Ovr115の過剰発現により、RK3E細胞がアポトーシスから保護される



【配列表】

0004884225000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/574	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	

微生物の受託番号 ATCC PTA-5916

微生物の受託番号 ATCC PTA-5917

微生物の受託番号 ATCC PTA-5918

微生物の受託番号 ATCC PTA-5919

微生物の受託番号 ATCC PTA-5920

(72)発明者 リー, ウェンルー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0、サウス サン フランシスコ、ストーンゲート
ドライブ 8 4 3

(72)発明者 コーラル, ローラ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 7、サン フランシスコ、コール ストリート 1
0 5 2

(72)発明者 サイモン, アイリス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 0、サン フランシスコ、プレシタ アヴェニュー
2 7 8

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 特表 2 0 0 2 - 5 2 3 7 6 0 (J P , A)

特表 2 0 0 3 - 5 0 6 0 1 7 (J P , A)

国際公開第 0 2 / 0 0 6 3 1 7 (W O , A 1)

Cancer Research, 1998, Vol.58, pp.4055-4060

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 1/00-19/00

C12N 1/00- 7/08

PubMed

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

UniProt/GeneSeq