

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-521206

(P2009-521206A)

(43) 公表日 平成21年6月4日(2009.6.4)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A	4 B 02 4
C 07 K 16/28 (2006.01)	C 07 K 16/28	Z N A	4 B 06 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15		4 B 06 5
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19		4 C 08 5
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21		4 H 04 5

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-508006 (P2008-508006)	(71) 出願人	506031948 モルフォテック、インク. アメリカ合衆国、19341 ペンシルバニア州、エクストン、ウェルショーブールロード 210
(86) (22) 出願日	平成18年4月24日 (2006.4.24)	(74) 代理人	100104411 弁理士 矢口 太郎
(85) 翻訳文提出日	平成19年12月20日 (2007.12.20)	(74) 代理人	100099656 弁理士 山口 康明
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/016004	(72) 発明者	グラッソ、ルイージ アメリカ合衆国、19004 ペンシルバニア州、バラキンウッド、707 コンショホーケン ステート ロード
(87) 國際公開番号	W02006/116592		
(87) 國際公開日	平成18年11月2日 (2006.11.2)		
(31) 優先権主張番号	60/674,185		
(32) 優先日	平成17年4月22日 (2005.4.22)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

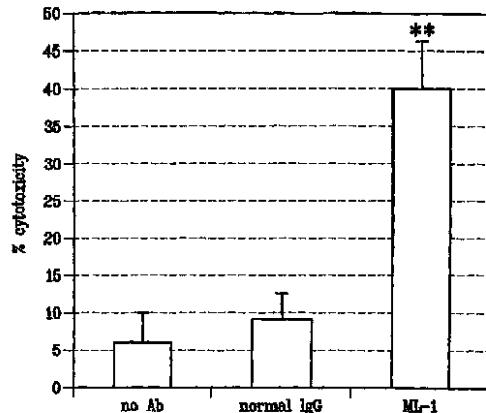
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫エフェクター活性を有する葉酸受容体アルファ陽性細胞に内部移行する抗体

(57) 【要約】

【解決手段】 本発明は、葉酸受容体アルファ (FRA) を発現する細胞に特異的に結合し、二者択一でこの細胞に内部移行し、抗体依存性細胞傷害作用などの免疫エフェクター活性を誘導する能力を有するモノクローナルおよびポリクローナル抗体の利用に関する。前記抗体は、薬物を FRA 発現細胞に特異的に送達し、特に腫瘍細胞および前駆体で免疫エフェクター活性を誘発する際に有用である。また本発明は、本発明の抗体をコードするスクレオチド、前記抗体を発現する細胞、癌細胞を検出する方法、および前記抗体を用いて癌を治療する方法に関する。

【選択図】 図 2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 葉酸受容体アルファ (FRA) に特異的に結合し、さらに (b) 選択的に免疫エフェクター活性を誘発するか、或いは FRA 提示細胞に内部移行する、インアウト抗葉酸受容体アルファ抗体。

【請求項 2】

請求項 1 記載の抗体において、前記抗体は少なくとも約 1×10^{-7} M の親和性で FRA に結合するものである。

【請求項 3】

請求項 1 記載の抗体において、前記抗体は少なくとも約 1×10^{-8} M の親和性で FRA に結合するものである。 10

【請求項 4】

請求項 1 記載の抗体において、前記抗体は少なくとも約 1×10^{-9} M の親和性で FRA に結合するものである。

【請求項 5】

請求項 1 記載の抗体において、前記抗体は少なくとも約 1×10^{-10} M の親和性で FRA に結合するものである。

【請求項 6】

請求項 1 記載の抗体において、前記抗体はキメラ抗体である。

【請求項 7】

請求項 6 記載の抗体において、前記キメラ抗体はヒト - マウスキメラ抗体である。 20

【請求項 8】

請求項 1 記載の抗体において、前記抗体はヒト化抗体である。

【請求項 9】

請求項 1 記載の抗体において、前記抗体は完全ヒト抗体である。

【請求項 10】

請求項 1 記載の抗体において、前記抗体は化学治療物質に結合される。

【請求項 11】

請求項 10 記載の抗体において、前記化学治療物質は放射性核種である。

【請求項 12】

請求項 1 記載の抗体において、FRA は配列 ID 番号 2 のアミノ酸配列を有するものである。 30

【請求項 13】

請求項 1 記載の抗体において、FRA は配列 ID 番号 1 の前記ヌクレオチド配列によってコードされるものである。

【請求項 14】

請求項 1 記載の抗体において、前記免疫エフェクター活性は抗体依存性細胞傷害作用である。

【請求項 15】

請求項 1 記載の抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチド。 40

【請求項 16】

請求項 1 記載の抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 17】

請求項 1 記載の抗体の重鎖および軽鎖をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 18】

請求項 1 記載の抗体を有する薬学的組成物。

【請求項 19】

請求項 18 記載の医薬品において、前記抗体は化学治療物質と結合される。

【請求項 20】

請求項 19 記載の医薬品において、前記化学治療物質は放射性核種である。 50

【請求項 2 1】

請求項 1 記載の抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチドを有するベクター。

【請求項 2 2】

請求項 1 記載の抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチドを有するベクター。

【請求項 2 3】

請求項 1 記載の抗体の重鎖と請求項 1 記載の抗体の軽鎖とをコードするポリヌクレオチドを有するベクター。

【請求項 2 4】

請求項 1 記載の抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチドと、請求項 1 記載の抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチドとを有する発現細胞。 10

【請求項 2 5】

請求項 2 3 記載の前記ベクターを有する発現細胞。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 記載の発現細胞において、前記細胞は哺乳類細胞である。

【請求項 2 7】

請求項 2 4 記載の発現細胞において、前記細胞は哺乳類細胞である。

【請求項 2 8】

請求項 1 記載の抗体を產生する細胞。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 記載の細胞において、前記細胞はハイブリドーマである。 20

【請求項 3 0】

F R A に特異的に結合するインアウト抗体を作製する方法であって、請求項 2 8 記載の細胞を培養する工程と、成長培地から前記抗体を回収する工程とを有する方法。

【請求項 3 1】

F R A 陽性細胞の成長を阻害する方法であって、前記細胞を有する対象にインアウト抗 F R A 抗体を投与する工程を有する方法。

【請求項 3 2】

請求項 3 1 記載の方法において、前記インアウト抗 F R A 抗体は生体分子に結合されるものである。

【請求項 3 3】

請求項 3 1 記載の方法において、前記 F R A 陽性細胞は異型細胞である。 30

【請求項 3 4】

請求項 3 1 記載の方法において、前記対象はヒトである。

【請求項 3 5】

請求項 3 1 記載の方法において、前記抗体は化学治療物質と結合される。

【請求項 3 6】

請求項 3 5 記載の方法において、前記化学治療物質は放射性核種である。

【請求項 3 7】

請求項 3 1 記載の方法において、この方法は、さらに、

細胞傷害性薬を前記被験者に投与する工程を有するものである。 40

【請求項 3 8】

請求項 3 1 記載の方法において、この方法は、さらに、

細胞増殖抑制物質を前記被験者に投与する工程を有するものである。

【請求項 3 9】

請求項 3 1 記載の方法において、この方法は、さらに、

化学治療物質を前記被験者に投与する工程を有するものである。

【請求項 4 0】

請求項 3 1 記載の方法において、前記抗体は非複合型抗体として投与されるものである。
。

【請求項 4 1】

10

20

30

40

50

請求項 3 1 記載の方法において、前記抗体は非複合型抗体と化学治療物質に結合した抗体との混合物として投与されるものである。

【請求項 4 2】

キットであって、F R A に特異的に結合する抗体において、この抗体は選択的に免疫エフェクター活性を誘発するか、或いはF R A 提示細胞に内部移行するものである前記抗体と、対象のF R A 提示細胞の成長を阻害する方法において前記キットを使用するための使用説明書とを有する、キット。

【請求項 4 3】

請求項 4 2 のキットにおいて、このキットは、さらに、
少なくとも 1 つの化学治療物質を有するものである。

10

【請求項 4 4】

請求項 4 2 のキットにおいて、このキットは、さらに、
少なくとも 1 つの診断薬を有するものである。

【請求項 4 5】

請求項 4 2 のキットにおいて、このキットは、さらに、
前記抗体を前記被験者に投与する方法と使用説明書を有するものである。

20

【請求項 4 6】

キットであって、インアウト抗 F R A 抗体と、インビトロまたはインビボで F R A 提示細胞の有無を同定する方法において前記キットを使用するための使用説明書とを有する、キット。

【請求項 4 7】

請求項 4 6 のキットにおいて、このキットは、さらに、
少なくとも 1 つの診断薬を有するものである。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本願は 2005 年 4 月 22 日付け出願の米国特許仮出願第 60 / 674,185 号に対して優先権を主張するものであり、その開示はこの参照によって本明細書に完全に組み込まれる。

【0 0 0 2】

30

本発明は、葉酸受容体アルファ (f o l a t e r e c e p t o r a l p h a : F R A) を発現または提示する細胞 (「F R A 陽性細胞」) に特異的に結合し、前記細胞に選択的に内部移行し、抗体依存性細胞傷害作用などの免疫エフェクター活性を誘導する、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の使用に関する。前記抗体は、薬物を F R A 陽性細胞に特異的に送達し、特に腫瘍細胞および異型細胞で免疫エフェクター活性を誘発させる際に有用である。また本発明は、前記モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体などの抗体誘導体、抗体フラグメントを発現した細胞、F R A 陽性細胞の検出法、および本発明の抗体を用いた癌の治療法に関連する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

40

ヒト膜葉酸結合タンパク質には、
、
、
および
の主に 3 種類の異性体が存在する。

および
異性体は約 70 % のアミノ酸配列相同性を有し、一部の葉酸では、その立体特異性が著しく異なる。両異性体とも、胎児および成人の両方の組織で発現するが、正常組織では一般に少量から中程度の量の F R -
を発現する。しかし、F R -
はあるサブセットの正常上皮細胞にて発現されており、様々な癌腫で著しく上昇することが多い (R oss et al. (1994) Cancer 73 (9) : 2432 - 2443 ; R ettig et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 3110 - 3114 ; Campbell et al. (1991) Cancer Res. 51 : 5329 - 5338 ; Coney et al. (1991) Cancer Res. 51 : 6125 - 6132 ; Weitman et al. (1992)

50

) Cancer Res. 52 : 3396 - 3401 ; Garin-Chesa et al. (1993) Am. J. Pathol. 142 : 557 - 567 ; Holm et al. (1994) APMIS 102 : 413 - 419 ; Franklin et al. (1994) Int. J. Cancer 8 (Suppl.) : 89 - 95 ; Miotti et al. (1987) Int. J. Cancer 39 : 297 - 303 ; および Veggelan et al. (1989) Tumori 75 : 510 - 513)。FR- は 90 % を超える卵巣癌で過剰発現されている (Sudimack and Lee (2000) Adv. Drug Deliv. Rev. 41 (2) : 147 - 62)。さらに、FR- は、乳癌、結腸直腸癌、腎臓癌、および肺癌など (これに限定されるものではないが)、他の多数の癌でも過剰発現されている。

1987 年、Miotti らは、ヒト卵巣癌細胞の抗原を認識する、3種類の新しいモノクローナル抗体について報告した (Miotti et al. (1987) Int. J. Cancer 39 (3) : 297 - 303)。このうちの 1 つが Mov18 と命名されており、これは絨毛癌細胞表面の 38 kDa タンパク質を認識する。Mov18 はマウス IgG1 抗体であり、卵巣癌細胞株 IGROV1 の特異的細胞溶解を媒介する。Alberti ら ((1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 171 (3) : 1051 - 1055) は、Mov18 により認識される抗原は GPI 結合タンパク質であることを示した。その後、これはヒト葉酸結合タンパク質として特定された (Coney et al. (1991) Cancer Res. 51 (22) : 6125 - 6132)。Tomassetti らは、Mov18 が、IGROV1 細胞にある前記葉酸結合タンパク質の可溶型と GPI アンカー型を認識することを示した (Tomassetti et al. (1993) FEBS Lett. 317 (1 - 2) : 143 - 146)。その後の研究では、マウス Mov18 の可変領域をヒト IgG1 () の定常領域と結合させ、キメラ化 Mov18 抗体を作製した。前記キメラ化抗体は、10 ~ 100 倍低い抗体濃度で、IGROV1 細胞のより多く、より特異的な溶解を媒介した (Coney et al. (1994) Cancer Res. 54 (9) : 2448 - 2455)。

【0004】

米国特許第 5,952,484 号明細書では、38 kDa タンパク質 (FR-) に結合するヒト化抗体について報告している。前記抗体は、同名の抗原にちなんで LK26 と名付けられた。元のマウスモノクローナル抗体は、欧州特許出願第 86104170.5 号明細書 (EP0197435) として公表され、米国では米国特許出願番号 4,851,332 号明細書として発行されている) で Rettig によって報告された。

【0005】

卵巣癌は、婦人科悪性腫瘍による死亡の主な原因である。化学療法が推奨される治療であり、いくらか成功を収めてきたが、その 5 年生存期間はまだ 40 % 未満である。

【0006】

細胞傷害性薬を用いた卵巣癌および他の癌の治療において困難な問題は、細胞毒が癌組織だけではなく、正常組織にも毒性を示すことが多い点である。癌を治療するためにより良い特異性得るためのアプローチは、癌細胞には発現されているが、正常細胞には発現されていないか、低レベルで発現する特異的抗原を標的にすることが可能な抗体を使用することである。前記抗原の生物活性を阻害し、補体依存性細胞傷害作用 (CDC) および / または抗体依存性細胞傷害作用 (ADCC) による免疫エフェクター機能を誘発することにより、または抗原提示細胞に送達されたときに前記標的細胞を特異的に死滅させる免疫複合体または放射性複合体 (radio-conjugate) を送達することにより、抗原提示細胞を死滅させる抗体を利用にこれらの抗体を用いることが可能となる。抗原提示腫瘍細胞に特異的に結合して効率的に死滅させることができ可能な抗体を見つけることは、多くの癌で困難であることが証明してきた。このことは、免疫エフェクター機能の欠如、または免疫毒素を運ぶ抗体が効率的に内部移行しないため、確実に死滅させることができないことが部分的にその原因となっている。FRA は、卵巣癌、腎臓癌、結腸直腸癌、

および肺癌を含むいくつかの種類の癌に対して、腫瘍特異的な標的化を得るための機会を提示している。

【0007】

本明細書において、例えば、FRA陽性細胞に毒素複合体を送達するため、選択的に(つまり、両方の能力を有するが、一度に1つの能力しか発揮できない)FRA陽性細胞で確実な免疫エフェクター機能を誘発し、FRA陽性細胞に内部移行することが可能なインアウト抗FRA抗体が提供される。本発明の抗体は、卵巣癌、腎臓癌、結腸直腸癌、乳癌、肺癌など(これに限定されるものではないが)FRAを提示する癌に対し、効果的な治療法である。

【発明の開示】

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本明細書において、選択的に、強力な免疫エフェクター機能を誘発し、さらにFRA陽性細胞に内部移行することが可能なFRA特異的抗体が提供され、これを本明細書ではインアウト(インアウト)抗FRA抗体と称する。本明細書に用いられる「インアウト抗体」(「インアウトAbs」)は、選択的に、免疫エフェクター活性を誘発し、標的抗原に結合して抗原提示細胞に内部移行することが可能な抗体を指す。特定の理論に縛られることなく、インアウト抗体は、抗原-抗体提示細胞に補充される免疫エフェクター細胞または生化学物質によって結合されない限り、抗原提示細胞の細胞表面に結合し、一定期間後内部移行すると考えられている。ADCCまたはCDCなどの免疫エフェクター作用を誘発し、内部移行する抗体は以前に報告されているが(Wolff et al.、Monoclonal antibody homodimers: enhanced anti-tumor activity in nude mice. Cancer Res. 1993 Jun 1; 53: 2560-5)、任意の抗原またはエピトープに対してインアウト抗体を発展させることができるかは明らかではない(Kusano et al.、Immunocytochemical study on internalization of anti-carbohydrate monoclonal antibodies. Anticancer Res. 1993 Nov-Dec; 13 (6A): 2207-12)。FRAを標的とするインアウト抗体についてはこれまでに報告されていない。FRA特異的抗体は以前に報告されているが、そのような抗体が前記抗原に結合して内部移行することは知られていない(Cogliati et al.、Preparation and biological characterization of conjugates consisting of ricin and a tumor-specific non-internalizing MAb. Anticancer Res. 11: 417-21, 1991)。細胞表面の抗原を標的にすることができる抗体は、前記細胞表面の抗原に結合したときに、必ずしも免疫エフェクター機能を誘発するものではない(Niwa et al.、Defucosylated chimeric anti-CC chemokine receptor 4 IgG1 with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T-cell leukemia and lymphoma. Cancer Res. 64: 2127-33, 2004; Kikuchi et al.、Apoptosis inducing bivalent single-chain antibody fragments against CD47 showed antitumor potency for multiple myeloma. Leuk. Res. 29: 445-50, 2005; Scott et al.、Immunological effects of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma. Cancer Immun. Feb 22; 5: 3, 2005)。本明細書において、前記細胞表面の抗

20

30

40

50

原F R Aに結合し、選択的に（例えばA D C CまたはC D Cなどの）免疫エフェクター活性を誘発し、抗原陽性細胞に内部移行する抗体が提供される。これらの抗体およびその誘導体は、癌治療に有用である。

【0009】

本発明において、F R Aに特異的に結合するインアウト（インアウト）抗体が提供される。一部の実施形態において、前記抗体はL K 2 6およびM O v 1 8よりも親和性および/または結合活性が高い抗原に結合する。一部の実施形態において、本発明のインアウト抗体は、例えば立体構造エピトープなど、L K 2 6またはM O v 1 8によって結合するエピトープと同じエピトープに結合する。一部の実施形態において、本発明のインアウト抗体はL K 2 6またはM O v 1 8によって結合するエピトープとは異なるエピトープに結合する。

10

【0010】

本発明の抗体は、ヒト-マウスキメラ抗体を含む（これに限定されるものではないが）キメラ抗体であっても良い。本発明の抗体はヒト化されていても良い。本発明の抗体は完全にヒト化されていても良い。本発明の抗体を発現したハイブリドーマ細胞、本発明の抗体をコードしたポリヌクレオチド、本発明の抗体をコードしたポリヌクレオチドを有するベクター、およびトランスフェクトーマと呼ばれる本発明のポリヌクレオチドを有する発現細胞もまた、本発明において提供される。

【0011】

本発明はまた、本発明のインアウト抗体を産生する方法も提供する。一部の方法には、本発明の抗体を発現したトランスフェクトーマまたはハイブリドーマを培養する工程が含まれる。本発明の抗体産生細胞は、細菌、酵母、昆虫細胞、および動物細胞であり、好ましくは哺乳類細胞である。

20

【0012】

本発明はさらに、F R Aの発現亢進と関連する、異型細胞または腫瘍細胞などのF R A陽性細胞の成長を阻害する方法を提供する。一部の実施形態において、そのような方法は、F R A陽性細胞を有する患者に本発明のインアウト抗体を有する組成物を投与する工程を有する。前記方法は、これらに限定されるものではないが、卵巣癌、乳癌、結腸直腸癌、腎臓癌、および肺癌など、様々な異形成疾患の治療に用いることが可能である。好ましい実施形態において、前記患者はヒトである。一部の実施形態において、前記抗体は、これに限定されるものではないが放射性核種、毒素、および細胞傷害性薬または細胞増殖抑制物質など、1若しくはそれ以上の化学療法剤と結合する。他の実施形態において、前記抗体は、1若しくはそれ以上の化学療法剤または生体分子と併用される。さらに他の実施形態において、前記抗体は、抗葉酸化合物と併用される。インアウト抗体は、複合型または非複合型抗体として単独で、または前記複合型または非複合型形態物または別の治療薬と併用して投与することが可能である。

30

【0013】

特異的にF R Aを標的とする治療用抗体を開発するこれまでの試みは、M O v 1 8抗体などのように内部移行が少なく、および/または親和性が低いためにほとんど成功しなかった（Cogliati et al.、Preparation and biological characterization of conjugates consisting of ricin and a tumor-specific non-internalizing MAb. Anticancer Res. 11: 417-21, 1991）。このように内部移行しなかったのは、抗体組成および/またはエピトープの結合のため、親和性が低いか、内部移行が少ないことが原因であった可能性がある。さらに、前記M O v 1 8抗体は、その非複合型は細胞傷害作用自体がないため、免疫複合体として試された。本明細書では、選択的にF R A陽性細胞に内部移行し、免疫エフェクター活性により細胞傷害作用を誘発するインアウト抗体が提供される。

40

【0014】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および実施例から明らかとなる。

50

【発明を実施するための最良の形態】**【0015】**

本明細書において引用したGenBankデータベースの配列の受入番号を含む参照研究、特許、特許出願書類、および科学文献は、当業者の知識を確立するものであり、各資料が具体的かつ個別に参照によって組み込まれるように、これらの資料は、この参照によってその全体が本明細書に完全に組み込まれるものである。本明細書において引用された参照と本明細書の特定の教示の間に不一致があった場合、本明細書の特定の教示を優先することにより解決されるものとする。同様に、当業者に理解される単語または表現の定義と、本明細書で具体的に教示されている単語または表現の定義との間に不一致があった場合、本明細書の単語または表現を優先して解決されるものとする。

10

【0016】

当業者に周知の組み換えDNA技術に関する一般的原理を示した標準的な参考研究には、Ausubel et al. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York (1998); Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2D ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York (1989); Kaufman et al., Eds., HANDBOOK OF MOLECULAR AND CELLULAR METHODS IN BIOLOGY AND MEDICINE, CRC Press, Boca Raton (1995); McPherson, Ed., DIRECTED MUTAGENESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press, Oxford (1991)が含まれる。

20

【0017】

本発明は特定の方法、試薬、化合物、組成物、または生物系に制限されることはなく、当然ながら変更されることは理解されるものとする。また、本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態のみを説明する目的で使用されるものであり、限定する意図はないこともまた理解される。本明細書および添付の請求項に用いられる、単数形の「a」、「an」、および「the」は、その内容が明らかに別のことを示していない限り、複数の言及を含む。従って、例えば「a cell (細胞)」の言及は2若しくはそれ以上の細胞の組み合わせなどを含む。

30

【0018】

本明細書に例挙した各範囲は、本明細書に含まれる特定の数字だけでなく、範囲内のすべての組み合わせおよびサブコンビネーションを含む。

【0019】

本明細書に用いられる「約」という用語は、量、一時的な期間など、測定可能な値を指す場合、特定の値からの±20%または±10%、より好ましくは±5%、さらに好ましくは±1%、まださらによくは±0.1%のばらつきを含むことを意味し、そのようなばらつきは開示された方法を実施する上で適当である。

40

【0020】

本発明は、これに限定されるものではないが癌細胞などのFRA陽性細胞の成長を阻害する方法を提供する。そのような方法を利用し、FRA、好ましくは哺乳類FRA、より好ましくはヒトFRA(配列ID番号1(ヌクレオチド)および2(アミノ酸))に特異的に結合するインアウト抗体を用いて腫瘍性疾患の進行を抑制することができる。本発明の方法は、例えば、ヒトを含む哺乳類の癌を治療するなど、FRA陽性細胞の成長を調整するために使用することが可能である。抑制される癌細胞には、正常ヒト組織に関連してFRAの発現が亢進しているすべての癌細胞、特に卵巣癌、乳癌、結腸直腸癌、肺癌細胞を含む。

【0021】

特定の操作理論にしばられることなく、癌細胞においてFRAの発現が増強されると、

50

前記細胞表面における膜結合型の細胞表面発現が亢進する。従って、一部の癌細胞では、正常組織と比べて F R A の発現が亢進している。従って、前記膜結合型 F R A は癌の抗体療法には理想的な標的である。

【0022】

本明細書において用いられる「エピトープ」という用語は、抗体が特異的に結合する抗原の一部を指す。

【0023】

本明細書で用いられる「立体構造エピトープ」という用語は、連続したアミノ酸以外の抗原のアミノ酸同士の空間関係によって形成される不連続エピトープを指す。

【0024】

本明細書に用いられる「免疫エフェクター活性」、「免疫エフェクター作用」、および「免疫エフェクター機能」という用語は、抗体依存性細胞傷害作用 (antibody-dependent cellular cytotoxicity : ADC) または補体依存性細胞傷害作用 (complement-dependent cytotoxicity : CDC) による抗体の殺細胞力を指す。

【0025】

本明細書に用いられる「インアウト抗体」という用語は、抗原提示細胞に内部移行し、内部移行しない場合は免疫エフェクター活性を誘発することができる抗体を指す。

【0026】

本明細書に用いられる「選択的」という表現は、内部移行または免疫エフェクター活性を誘発する抗体の能力を指す場合、前記抗体が内部移行能力と免疫エフェクター活性誘発能力の両方を有するが、同時に両方を行うことはできないことを意味する。

【0027】

本明細書に用いられる「インビトロでの異型細胞の成長抑制」という用語は、培養中、細胞数が約 5 %、好ましくは約 10 %、より好ましくは約 20 %、より好ましくは約 30 %、より好ましくは約 40 %、より好ましくは約 50 %、より好ましくは約 60 %、より好ましくは約 70 %、より好ましくは約 80 %、より好ましくは約 90 %、最も好ましくは約 100 % 減少することを意味する。インビトロでの腫瘍細胞の成長抑制は、当該分野で既知のアッセイにより測定される。

【0028】

本明細書において用いられる「インビオでの異型細胞の成長抑制」という用語は、微生物の細胞数が約 5 %、好ましくは約 10 %、より好ましくは約 20 %、より好ましくは約 30 %、より好ましくは約 40 %、より好ましくは約 50 %、より好ましくは約 60 %、より好ましくは約 70 %、より好ましくは約 80 %、より好ましくは約 90 %、最も好ましくは約 100 % 減少することを意味する。インビオでの細胞成長の調節は、当該分野で既知のアッセイにより測定することができる。

【0029】

本明細書に用いられる「異型細胞」は異常な成長を示す細胞を指す。異常な成長特性の例には、これに限定されるものではないが、軟寒天中での増殖、接触阻害の欠如、無血清状態で細胞周期停止の拒否、および免疫力低下マウスに注入したときの腫瘍形成などが含まれる。異型細胞には、これに限定されるものではないが、腫瘍、過形成などが含まれる。

【0030】

「予防する」という用語は、微生物が感染するか、異形成など異常な状態を発生させる可能性を低下させることを指す。

【0031】

「治療する」という用語は、治療効果を有し、生物体の異常状態を少なくとも部分的に軽減または抑止することを指す。治療とは、抑制された腫瘍成長の維持および寛解の誘発を含む。

【0032】

10

20

30

40

50

「治療効果」は対象者における疾患または異常な状態、その症状、またはその副作用の軽減、除去、または予防を指す。「有効量」は、所望の効果を生じさせるために必要な量を指す。「治療的有効量」は、疾患、状態、または障害を治療するために対象者に投与する場合、その疾患に対する治療効果をもたらすのに十分な量を指す。治療効果は、前記異常な状態の1若しくはそれ以上の症状を、ある程度軽減する。前記異常な状態の治療に関して、治療効果は、(a)細胞の増殖、成長、および/または分化の増加または減少、(b)インビボにおける腫瘍細胞の成長の阻害(つまり遅延化または停止)、(c)細胞死の促進、(d)変性の抑制、(e)前記異常な状態に関連した1若しくはそれ以上の症状のある程度の軽減、および(f)細胞集団の機能強化、の1若しくはそれ以上を指す可能性がある。本明細書に説明した抗体およびその誘導体は、単独、または本発明の組成物の複合体または更なる組成物の併用して前記治療効果を達成する。

10

【0033】

本明細書において用いられる「癌または腫瘍性疾患の進行を阻害する」という用語は、未治療癌細胞が末期疾患に向かうのを調節することと関連し、腫瘍性疾患の末期癌に向かうのを調節して遅延させる治療活動を指す。

【0034】

本明細書に用いられる「腫瘍性疾患」という用語は、組織細胞の異常な増殖によって特徴付けられる状態を指す。

【0035】

本明細書に用いられる「生体分子」という用語は、複合体を形成し、同時投与され、本発明の抗体投与前後に投与され、またはそれ以外で本発明の抗体と関連して使用することができるすべての分子を指す。生体分子には、これらに限定されるものではないが酵素、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、脂質、炭水化物、およびフラグメント、相同体、類似体、または誘導体、およびその組み合わせを含む。生体分子の例には、これらに限定されるものではないが、インターロイキン-2、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、リツキサン、ゼバリン、ハーセブチン、エルビタックス、およびアバスチンを含む。前記生体分子は、天然型、組み換え型、または合成とができ、例えばグリコシリ化、アセチル化、リン酸化、ミリストチル化などにより、その天然型から修飾することもできる。本明細書に用いられる生体分子という用語は、天然型の分子に限定されず、生物由来ではない合成分子を含む。

20

【0036】

本明細書に用いられる「細胞傷害性」または「細胞増殖抑制」物質という用語は、細胞の生存率または増殖する可能性を低下させる物質を指す。細胞傷害性薬または細胞増殖抑制物質は、例えば、これに限定されるものではないがDNAの障害を誘導、細胞周期停止を誘導、DNA合成を阻害、転写を阻害、翻訳またはタンパク質合成を阻害、細胞分裂を阻害、またはアポトーシスを誘導することにより、細胞の生存可能性または増殖を抑制する様々な方法で作用することができる。本明細書に用いられる「化学治療物質」という用語は、腫瘍細胞を選択的に死滅、その成長を抑制、またはその転移を抑制するか、急速に増殖する細胞の細胞周期を混乱させる細胞傷害性物質、細胞増殖抑制物質、および抗腫瘍性物質を指す。化学治療物質の具体的な例には、これらに限定されるものではないが、放射性核種、ヤマゴボウ抗ウイルス性タンパク質、アブリン、リシン、およびそのA鎖、アルトレタミン、アクチノマイシンD、プリカマイシン、プロマイシン、グラミシジンD、ドキソルビシン、コルヒチン、サイトカラシンB、シクロホスファミド、エメチニン、マイタニン、アムサクリン、シスプラチニン、エトポシド、エトポシドオルトキノン、テニポシド、ダウノルビシン、ゲムシタビン、ドキソルビシン、ミトキサントロン(mitoxantrone)、ビサントレン、ブレオマイシン、メトトレキセート、ビンデシン、アドリアマイシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、BCNU、タキソール、タルセバ、アバスチン、マイトマイシン、修飾シュードモナスエンテロトキシンA、カリチェアミシン、5-フルオロウラシル、シクロホスファミド、およびTNF-αおよびTNF-βなどの特定サイトカインが含まれる。

30

40

50

【0037】

「保存的修飾変異体」はアミノ酸および核酸配列の両方に当てはまる。特定の核酸配列に関して、保存的修飾変異体とは、同一或いは基本的に同一であるアミノ酸配列をコードする核酸を指し、または前記核酸がアミノ酸配列をコードしない場合は、基本的に同一の配列を指す。遺伝暗号の縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が特定タンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G、および G C U はすべてアミノ酸のアラニンをコードする。従って、アラニンがコドンで特定されるすべての位置で、コードされるポリペプチドを変化させることなく、前記コドンを前述の対応するコドンのいずれかと変更することができる。そのような核酸変異は「サイレント変異」であり、保存的修飾変異体の一種である。ポリヌクレオチドをコードする本明細書のすべての核酸配列は、前記核酸の考えられるすべてのサイレント変異も描写する。当業者であれば、核酸の各コドン（通常メチオニンの唯一のコドンである A U G と、通常トリプトファンの唯一のコドンである T G G を除く）を修飾し、機能的に同一な分子を生じることができることが理解される。従って、ポリヌクレオチドをコードする核酸の各サイレント変異は、発現生成物について描写された各配列で絶対的であるが、実際のプローブ配列については絶対的ではない。

10

【0038】

例えば、細胞、核酸、タンパク質、またはベクターに関連して用いられる場合の「組み換え型」は、前記細胞、核酸、タンパク質、またはベクターが異種核酸またはタンパク質の導入、または天然型核酸またはタンパク質の変更により修飾されたか、前記細胞がそのように修飾された細胞に由来することを示す。従って、例えば、組み換え型細胞は前記細胞の天然型（非組み換え型）には見られない遺伝子を発現しているか、そうでなければ異常に発現されるか、発現が少ないか、全く発現されていない天然型遺伝子を発現している。

20

【0039】

「核酸」または「ポリヌクレオチド配列」という用語は、5'から3'末端に向かって読み取ったデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖重合体を指す。核酸には、ポリメラーゼにより読み取りを補正することができ、例えば保存的修飾変異体を含む核酸でコードされるポリペプチドの発現を変化させない、修飾ヌクレオチドも含むことができる。

30

【0040】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は本明細書で同義的に使用され、アミノ酸残基の重合体を指す。前記用語は、1若しくはそれ以上のアミノ酸残基が対応する天然型アミノ酸の人工化学的ミメティックであるアミノ酸重合体、および天然型アミノ酸重合体および非天然型アミノ酸重合体にも当てはまる。本発明の抗体を含む本発明のポリペプチドには、保存的修飾変異体を含む。当業者であれば、コード化配列中の单一アミノ酸または少ない割合のアミノ酸を変更、付加、または欠失させる核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列の置換、欠失、または付加は「保存的修飾変異体」であり、前記変化により、アミノ酸が化学的に類似のアミノ酸と置換されることが認識される。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は当該分野で周知である。そのような保存的修飾変異体は、本発明の多型変異体、種間相同体、および対立遺伝子に追加され、これらを除外しない。以下の8群はそれぞれ互いに保存的置換のあるアミノ酸を含み、それは1)アラニン(A)、グリシン(G)；2)アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；3)アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；4)アルギニン(R)、リジン(K)；5)イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；6)フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)；7)セリン(S)、トレオニン(T)；および8)システイン(C)、メチオニン(M)である(33)。「保存的置換」という用語は、非置換親アミノ酸に代わり置換アミノ酸を使用することも含むが、ただしそのようなポリペプチドは必須の結合活性も示す。

40

【0041】

50

「アミノ酸」は、天然型および合成アミノ酸、および前記天然型アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸ミメティックを指す。天然型アミノ酸は、遺伝暗号でコードされたアミノ酸、および後で修飾されたアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタメート、およびD-ホスホセリンである。「アミノ酸類似体」は、天然型アミノ酸と同じ基本的化学構造、つまり、水素、カルボキシリ基、アミノ基、およびR群、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムに結合する炭素を有する化合物を指す。そのような類似体は、修飾されたR群（例えばノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然型アミノ酸と同じ基本的化学構造を保持している。「アミノ酸ミメティック」は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然型アミノ酸と同様に機能する化学化合物を指す。

10

【0042】

本明細書において、アミノ酸は一般的に知られる3文字記号またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionが推奨する1文字記号で称することができる（以下の表1を参照）。同様に、ヌクレオチドは一般的に受け入れられている1文字コードによって称される。

【0043】

【表1】

記号

20

1文字	3文字	アミノ酸
Y	Tyr	L-チロシン
G	Gly	L-グリシン
F	Phe	L-フェニルアラニン
M	Met	L-メチオニン
A	Ala	L-アラニン
S	Ser	L-セリン
I	Ile	L-イソロイシン
L	Leu	L-ロイシン
T	Thr	L-トレオニン
V	Val	L-バリン
P	Pro	L-プロリン
K	Lys	L-リジン
H	His	L-ヒスチジン
Q	Gln	L-グルタミン
E	Glu	L-グルタミン酸
W	Trp	L-トリプトファン
R	Arg	L-アルギニン
D	Asp	L-アスパラギン酸
N	Asn	L-アスパラギン
C	Cys	L-システイン

30

40

【0044】

本明細書において、すべてのアミノ酸配列は、左から右の方向が従来のアミノ末端からカルボキシ末端の方向である式で表されていることに留意すべきである。

【0045】

本明細書に用いられる「インビトロ」または「生体外（ex vivo）」という用語は、人工環境、およびこれらに限定されるものではないが、例えば試験管および細胞培養などの人工的な環境で発生する工程または反応を指す。前記「インビボ」という用語は、

50

自然環境（例えば、動物または細胞）および自然環境で発生する工程または反応を指す。

【0046】

「薬学的に許容される」、「生理学的に忍容性の」、およびその文法的変形形態は、組成、担体、希釈剤、試薬を指す場合は同義的に用いられ、前記組成の投与を阻害する程度の好ましくない生理学的效果を発生させずに、前記物質を人に投与できることを示す。

【0047】

「薬学的に許容される担体」という用語は、適切な医学的判断の範囲内で、妥当な利益／リスク比と釣り合い、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の合併症を生じずに、ヒトおよび動物の組織と接触させて使用するのに適した、試薬、添加物、細胞、成分、物質、組成物、および／または投与形態を指す。本明細書でさらに詳細に説明するとおり、本発明での使用に適した薬学的に許容される担体には、気体、液体、および半固体および固体物質が含まれる。

10

【0048】

特別な記載がない限り、「対象」または「患者」は同義的に用いられ、ヒト患者およびヒト以外の靈長類などの哺乳類、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、およびその他の動物などの実験動物を指す。従って、本明細書に用いられる「対象」または「患者」は、本発明の組成物を投与することが可能なすべての哺乳類患者または被験者を意味する。本発明の一部の実施形態において、前記患者は感染症または炎症性疾患に罹患する。本発明の一部の実施形態において、前記患者は癌と診断される。本発明の典型的な実施形態において、本発明に沿った治療の候補患者を特定するため、一般に認められたスクリーニング方法を採用し、被験者の既存の疾患または状態の状況、または標的となるか疑わしい疾患または状態と関連したリスクファクターを決定する。これらのスクリーニング方法には、例えば、被験者が感染症、炎症性疾患、または癌に罹患しているか否かを決定する検査を含む。このようなルーティンな方法により、臨床医は治療が必要な被験者を選択することができる。

20

【0049】

本明細書に用いられる「治療用化合物」は癌などの疾患または状態の予防または治療に有用な化合物を指す。

【0050】

本明細書に用いられる「併用投与」、「同時投与」、または「併用」には、同時にまたは併用して、一緒に、または互いに前後して活性薬物（例えば、Mabs、化学治療物質、生体分子）を投与することを含む。前記複数の薬物は、すべての薬物が作用部位で十分有効濃度を達成することができる方法で投与される限り、同じ経路または異なる経路で、同時にまたは順次投与することができる。当業者であれば、特定の薬物と本発明の組成を投与する適切なタイミング、順序、および用量を決定することは困難なことではない。

30

【0051】

「免疫グロブリン」または「抗体」は広義に用いられ、抗体分子と様々な抗体由来分子の両方を指し、前記免疫系の主要成分である、高等哺乳動物で生成する一連の糖タンパク質の一員を含む。前記「抗体」という用語は広義の意味で用いられ、望みの生物活性を示す限り、具体的にはモノクローナル抗体、多エピトープ特異性を持つ抗体組成、二重特異性抗体、ダイアボディ（diabodies）、および单鎖分子、また抗体フラグメント（例えば、Fab、Fab'、およびFv）を網羅する。免疫グロブリン分子には抗原結合ドメインを含み、それぞれが軽鎖と、重鎖の末端タンパク質、および補体との結合など様々な機能に必要なFc領域を含む。免疫グロブリンには5種類のクラスがあり、前記Fc領域の重鎖の主要構造が前記免疫グロブリンのクラスを決める。具体的には、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMに對応する。本明細書に用いられる「免疫グロブリン」または「抗体」には、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMのすべてのサブクラスを含み、4鎖の免疫グロブリン構造の天然（例えば、IgAおよびIgM）または合成多量体も指す。抗体は、非共有結合的に、特異的に、および可逆的に抗原と結合する。本明細書に用いるとおり、前記「モノクローナル抗体」とい

40

50

う用語は、かなり均質な抗体集団から得られる抗体を指し、つまり、少量で存在することができ、自然に発生した可能性のある変異を除き、前記集団を有する個々の抗体は同一である。例えば、モノクローナル抗体は抗体産生細胞の單一クローンにより作製することができる。ポリクローナル抗体と異なり、モノクローナル抗体は單一特異的である（例えば、單一抗原の單一エピトープに対して特異的である）。前記「モノクローナル」という修飾語は、かなり均質な抗体集団から得られる抗体の特徴を示し、いかなる特定の方法でも前記抗体の作製が必要であるとは解釈されない。例えば、本発明に従って使用される前記モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256: 495, 1975で最初に報告されたハイブリドーマ法により作製することができるか、組み換えDNA法により作製することができる。前記「モノクローナル抗体」は、例えば、Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991に報告されている技術を利用し、ファージ抗体ライブラリから単離することもできる。

10

【0052】

抗体由来分子は、抗原結合特異性を保持し、例えば、少なくとも1つの可変領域（重鎖または軽鎖可変領域）を有する完全な抗体の一部を有する。抗体由来分子には、例えば、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fdフラグメント、F(v)フラグメント、Fabcフラグメント、Fdフラグメント、Fabcフラグメント、Sc抗体（单鎖抗体）、ダイアボディ、個々の抗体軽鎖、個々の抗体重鎖、抗体鎖と他の分子とのキメラ融合、重鎖单量体または二量体、軽鎖单量体または二量体、重鎖1つと軽鎖1つから成る二量体などの分子を含む。すべてのクラスの免疫グロブリン（例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM）とそのサブクラスが含まれる。

20

【0053】

抗体は毒性または非毒性部分で標識するか、これと結合することができる。毒性部分には、例えば、細菌毒素、ウイルス毒素、放射性同位元素などを含む。抗体は、前記抗体の検出を助けるため、生物学的アッセイ（例えば、放射標識、蛍光標識）で使用するために標識することができる。抗体は、診断または治療の目的で、例えば、放射免疫治療（Garmestani et al., Nucl. Med. Biol., 28: 409, 2001）、画像法および放射免疫誘導手術などの望みの適用部位に直接放射線を照射する放射性同位元素、または特定の抗体／抗原複合体のインビボでの画像化または検出を可能とする標識により、標識／結合することもできる。抗体は、免疫毒素を提供する毒素と結合することもできる（Kreitman, R. J. Adv. Drug Del. Rev., 31: 53, 1998を参照）。

30

【0054】

抗体について、前記「免疫学的に特異的な」という用語は、対象タンパク質の1若しくはそれ以上のエピトープに結合する抗体を指すが、抗原性生体分子の混合集団を含むサンプル中の他の分子を十分認識し、結合することはない。

【0055】

「キメラ」または「キメラ化」抗体（免疫グロブリン）は、所望の生物活性を示す限り、前記重鎖および／または軽鎖の一部が特定の種に由来するか、特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同意であるが、前記鎖の残りの部分が別の種に由来するか、別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体、またそのような抗体のフラグメントの対応する配列と同一または相同意である抗体を指す（Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 6851-6855, 1984）。

40

【0056】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小限の配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそのフラグメント（Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または抗体の他の抗原結合配列など）である。ヒト化抗体は大部分がヒト免疫グロブリン（受容抗体）であり、前記受容抗体の相補性決

50

定領域（C D R）の残基が、望みの特異性、親和性、および能力を有する、マウス、ラット、またはウサギなどの非ヒト種のC D R残基（供与抗体）によって置換される。場合によつては、前記ヒト免疫グロブリンのF vフレームワーク領域（F R）の残基が、対応する非ヒト残基によつて置換される。さらに、ヒト化抗体は、前記供与抗体、または移入されたC D Rまたはフレームワーク配列にはない残基を有することができる。これらの修飾を行い、抗体性能をさらに洗練し、最適化する。一般に、前記ヒト化抗体は少なくとも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有し、前記C D R領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのC D R領域と一致し、前記F R領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のF R領域と一致する。前記ヒト化抗体は、選択的に免疫グロブリン定常領域（F c）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの一部も有する。さらなる詳細については、Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332:323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596, 1992を参照。

10

【0057】

「完全ヒト」とは、抗体などの免疫グロブリンを指し、前記分子全体がヒト由来であるか、前記抗体のヒト型と同一のアミノ酸配列から成る。

【0058】

「ハイブリドーマ」は、培養した腫瘍化リンパ球と、親細胞の特異的免疫力を発現し初回抗原刺激を受けたBまたはTリンパ球との細胞融合生成物を指す。

20

【0059】

他に定義のない限り、本明細書で用いたすべての技術および科学用語は、本発明に関連する当業者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書で説明されたものと同一または同等のいかなる方法および材料も、本発明の検証実施に用いることができるが、好ましい材料および方法が本明細書において説明される。本発明を説明および請求項において、以下の用語が使用される。

【0060】

様々な特許および他の文献が本明細書に引用されており、それぞれの全開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる。

30

【0061】

抗体

本発明の抗体は特異的にF R Aに結合し、インアウト活性（つまり、選択的に免疫エフェクター活性を誘導し、エンドシアリン陽性細胞に内部移行する能力）を示す。一部の実施形態では、前記抗体がL K 2 6またはM O v 1 8と同じエピトープに結合する。他の実施形態では、前記抗体がL K 2 6またはM O v 1 8が結合したエピトープ以外のエピトープと結合する。本発明の抗体が結合するF R Aは好ましくは哺乳類であり、さらに好ましくはヒトである。ヒトF R Aは配列ID番号：1でコードされ、配列ID番号：2のアミノ酸配列を有する。

【0062】

【表2】

40

配列ID番号1：ヒト成熟葉酸受容体アルファのc DNA

```

1 attgcatggg ccaggactga gcttcataat gtctgcataa acgccaaagca ccacaaggaa
61 aaggcaggcc cccgagacaa gtttgcatacgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc
121 tggcttccaa acaccggcca ggaacccat aaggatgttt ctatccata tagattcaac
181 tggaaacctt gtggagagat ggcacccgtcc tgccaaacggc atttcatcca ggacacccgtc
241 ctctacgat gctcccccaa cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc
301 aaagagccgg tactgaacgt gccccgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtggaaatg
361 tggcgcaccc cctacacccgt caagagcaac tggcacaagg gctggaaactg gacttcagg
421 tttaacaatgt ggcgcgtggg agctgcgtgc caaccccttcc attttactt ccccacaccc
481 actgttctgt gcaatggaaat ctggactcac tccatcaagg ttagcaacta cagccgagg
541 agtggccgtc gcatccatgt gtggatccgac ccacccagg gcaaccccaa tgaggagg
601 ggcagggttc atgctgcagc catggatggg gctggggccct gggcagcctg gccttccctg
661 cttagccatgg ccctaattgtc gctgtggctg ctcagc

```

50

【0063】

【表3】

配列ID番号2：ヒト成熟葉酸受容体アルファのポリペプチド配列

```

1 iawartelln vcnnakhkhe kpgpedklhe qcrpwknac cstntsgeah kdvsylyrin
61 wnhcemapka ckrhfigdtc lyecspnlgp wiqqvdqswr kervlnvplc kedceqwted
121 crtsytcksn whkgwnwtsg fnkcavgaac qpffhfyfptp tvcneiwth sykvsnysrg
181 sgrciqmwfd paqgnpneev arfyaaamsg agpwaawpfl lslalmlwl ls

```

【0064】

好みの抗体、および本発明の方法で使用するのに適した抗体には、例えば、完全ヒト抗体、ヒト抗体相同体、単鎖抗体、ヒト化抗体相同体、キメラ抗体、キメラ抗体相同体、および抗体重鎖または軽鎖またはその混合物の単量体または二量体を含む。10

本発明の抗体には、タイプIgA、IgG、IgE、IgD、IgM（およびそのサブタイプ）を含む、すべてのアイソタイプの完全な免疫グロブリンを含む。前記免疫グロブリンの軽鎖は または である。

【0065】

本発明の抗体には、抗原結合特異性を保持する完全な抗体の一部、例えば、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、F(v)フラグメント、重鎖単量体または二量体、軽鎖単量体または二量体、重鎖1つおよび軽鎖1つから成る二量体などを含む。従って、抗原結合フラグメント、および前述の抗体由来の、完全な長さの二量体または三量体ポリペプチドは、それ自体がインアウト活性を生じるために有用である。20

【0066】

齧歯類モノクローナル抗体をヒトの治療薬として直接使用すると、ヒト抗齧歯類抗体（「HARA（human anti-rodent antibody）」）反応が生じ、この反応は前記齧歯類由来抗体を投与した有意に多数の患者において発生することが分かった（Khazaelli, et al. (1994) Immunother. 15: 42-52）。齧歯類のアミノ酸配列がより少ないキメラ抗体は、ヒトで免疫反応を誘発するという問題が回避できると考えられた。20

【0067】

キメラ抗体は組み換えDNA技術によって作製することができ、この技術では、免疫グロブリン軽鎖、重鎖、またはその両方のヒンジおよび定常領域のすべてまたは一部が、別の動物の免疫グロブリン軽鎖または重鎖の対応領域と置換されてきた。この方法では、前記親モノクローナル抗体の抗原結合部分が、別の種の抗体の骨格に移植（グラフト）される。Winterらの欧州特許第EP 0239400号明細書に報告された1つのアプローチでは、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン可変領域のCDRsをマウス可変領域ドメインのCDRsと置換するなど、1つの種の相補性決定領域（CDRs）と別の種のCDRsとの置換について報告している。これらの変化させた抗体は、その後ヒト免疫グロブリン定常領域と組み合わせることにより、置換された前記抗原に特異的なマウスCDRsを除いてはヒトである抗体を形成する。抗体のCDR領域を移植（グラフト）する方法は、例えば、Riechmann, et al. (1988) Nature 332: 23-327およびVerhoeven, et al. (1988) Science 239: 1534-1536において見出される。40

【0068】

限定されない例として、CDRグラフトの実行方法は、前記標的抗原（例えば、FRA）に結合する対象抗体の重鎖および軽鎖のマウスでの配列を決定し、前記CDR DNA配列の遺伝子を操作し、部位特異的突然変異によりこれらのアミノ酸配列を対応するヒトV領域に与えることで、実行することができる。前記望みのアイソタイプのヒト定常領域の遺伝子セグメントを追加し、前記キメラ重鎖および軽鎖遺伝子を哺乳類細胞に同時発現させ、可溶性抗体を作製する。典型的な発現細胞は、チャイニーズハムスター卵巣由来（CHO）細胞である。他の発現細胞には、HEK293および骨髄腫細胞を含む。前記キ50

メラ抗体を作製するのに適した方法は、例えば Jones et al. (1986) Nature 321: 522 - 525; Riechmann (1988) Nature 332: 323 - 327; Queen et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029; および Orlandi et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833において見出される。

【0069】

HARA反応の問題を回避するため、さらに抗体を改良すると、「ヒト化抗体」の開発につながる。ヒト化抗体は組み換えDNA技術により作製され、この技術では、抗原の結合に不必要なヒト免疫グロブリン軽鎖または重鎖のアミノ酸の少なくとも1つが、対応する非ヒト哺乳類免疫グロブリン軽鎖または重鎖のアミノ酸と置換されている。例えば、前記免疫グロブリンがマウスモノクローナル抗体の場合、抗原の結合に必要のない少なくとも1つのアミノ酸が、対応するヒト抗体のその部位にあるアミノ酸を用いて置換されている。いかなる特定の操作理論に縛られることなく、前記モノクローナル抗体の「ヒト化」は外来性免疫グロブリン分子に対するヒトの免疫反応を抑制すると考えられている。

10

【0070】

Queen et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029 - 10033 および国際公開第WO 90/07861号パンフレットでは、ヒト化抗体の調製について報告している。ヒトおよびマウスの可変フレームワーク領域は、タンパク質配列の相同性が最適となるように選択される。前記マウス可変領域の三次構造はコンピューターによりモデル化され、相同意的なヒトのフレームワークに重ね合わせることにより、アミノ酸残基と前記マウスCDRsとの最適な相互作用が示された。これにより、抗原に対する結合親和性(CDRを移植したキメラ抗体を作製する際は通常低下する)が向上した抗体が開発された。ヒト化抗体を作製する代替アプローチは当該分野で周知であり、例えば Tempest (1991) Biotechnology 9: 266 - 271において報告されている。

20

【0071】

本発明の抗体には、例えば、あらゆるタイプの分子と前記抗体との共有結合により、共有結合が前記抗体のエピトープへの結合を阻害しないように修飾された誘導体を含む。適切な誘導体の例には、これに限定されるものではないが、グリコシリ化抗体およびフラグメント、アセチル化抗体およびフラグメント、ポリエチレングリコール化抗体およびフラグメント、リン酸化抗体およびフラグメント、およびアミド化抗体およびフラグメントが含まれる。本発明の抗体とその誘導体は、それ自体、既知の保護基/封鎖基、タンパク質分解的切断、細胞のリガンドまたは他のタンパク質との結合などにより誘導体化されても良い。さらに、本発明の抗体とその誘導体は、1若しくはそれ以上の非古典的アミノ酸を含んでいても良い。

30

【0072】

本発明の抗体には、単一または複数のアミノ酸置換、欠失、付加、または交換され、本発明の抗体の生物学的特性(例えば、内部移行、結合親和性または結合活性、または免疫エフェクター活性)を保持した変異体が含まれる。当業者であれば、単一または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、または交換された変異体を作製することができる。これらの変異体には、とりわけ、(a) 1若しくはそれ以上のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸と置換された変異体、(b) 1若しくはそれ以上のアミノ酸がポリペプチドに追加されるか、ポリペプチドから欠失した変異体、(c) 1若しくはそれ以上のアミノ酸が置換基を含む変異体、および(d) 例えば、抗体エピトープ、ポリヒスチジン配列、ビオチン部分など、前記ポリペプチドに有用な特性を与えることができる、融合パートナー、タンパク質標識、または他の化学部分など、別のペプチドまたはポリペプチドと、前記ポリペプチドが融合した変異体を含む。本発明の抗体は、保存的または非保存的な位置で、1種のアミノ酸残基が別の種の対応する残基と置換された変異体を含む。別の実施形態において、非保存的な位置のアミノ酸残基は保存的または非保存的残基と置換される。遺

40

50

伝的（抑制、欠失、変異など）、化学的、および酵素的技術を含む、これらの変異体を得る技術は、当業者に周知である。本発明の抗体には抗体フラグメントが含まれる。「フラグメント」とはポリペプチド配列を指し、好ましくは少なくとも約40、より好ましくは少なくとも約50、より好ましくは約60、より好ましくは少なくとも約70、より好ましくは少なくとも約80、より好ましくは少なくとも約90、より好ましくは少なくとも約100アミノ酸長であり、例えば、F R A結合親和性または結合活性、内部移行能力、免疫エフェクター活性など、前記完全な長さの配列の生物活性または免疫活性を一部保持する。

【0073】

本発明には、F R A関連癌患者の末梢血単核細胞に由来する抗体など、完全ヒト抗体も含む。そのような細胞は骨髄腫細胞と融合し、例えば完全ヒト抗F R A抗体を産生するハイブリドーマ細胞を形成することができる。10

【0074】

本発明の抗体とその誘導体は、解離定数(K_d)が 1×10^{-2} 未満である結合親和性を有する。一部の実施形態によると、前記 K_d は 1×10^{-3} 未満である。他の実施形態によると、前記 K_d は 1×10^{-4} 未満である。一部の実施形態によると、前記 K_d は 1×10^{-5} 未満である。さらに他の実施形態によると、前記 K_d は 1×10^{-6} 未満である。他の実施形態によると、前記 K_d は 1×10^{-7} 未満である。他の実施形態によると、前記 K_d は 1×10^{-8} 未満である。他の実施形態によると、前記 K_d は 1×10^{-9} 未満である。他の実施形態によると、前記 K_d は 1×10^{-10} 未満である。さらに他の実施形態によると、前記 K_d は 1×10^{-11} 未満である。一部の実施形態によると、前記 K_d は 1×10^{-12} 未満である。他の実施形態によると、前記 K_d は 1×10^{-13} 未満である。他の実施形態によると、前記 K_d は 1×10^{-14} 未満である。さらに他の実施形態によると、前記 K_d は 1×10^{-15} 未満である。20

【0075】

いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、本発明の抗体は、前記抗体の両方の「アーム(arm)」(F_{ab} フラグメント)の増加された親和力により、F R A分子を分離するため、特にF R Aの結合に有用であると考えられている。このため前記抗体の解離定数(K_d)が低下し、前記観察された親和性(K_D)が全体的に上昇する。さらに、本発明の抗体は、前記抗体-抗原複合体の内部移行を可能にするエピトープに結合する必要がある。本発明の抗体は正常組織よりも腫瘍組織に強固に結合し、細胞傷害性を有する免疫細胞を引き寄せ、結合薬物を送達し治療効果を追加するために内部移行することができるため、これらの特徴は腫瘍の標的化に特に適している。30

【0076】

本発明の抗体は、単独、または細胞傷害性薬または細胞増殖抑制物質など、1若しくはそれ以上の生体分子または化学治療物質と併用して使用することが可能である。一部の実施形態では、前記化学治療物質が、鉛-212、ビスマス-212、アスタチン-211、ヨウ素-131、スカンジウム-47、レニウム-186、レニウム-188、イットリウム-90、ヨウ素-123、ヨウ素-125、臭素-77、インジウム-111、およびホウ素-10またはアクチニドなどの核分裂性核種を含む（これに限定されるものではないが）放射性同位元素である。他の実施形態では、前記化学治療物質がリシン、修飾シュードモナスエンテロトキシンA、カリケアマイシン、アドリアマイシン、5-フルオロウラシルなどを含む（これに限定されるものではないが）毒素または細胞傷害性薬である。そのような薬物への抗体および抗体フラグメントの結合方法は、文献に知られている。40

【0077】

本発明には、本発明のインアウト抗体を產生する細胞も含まれる。本発明の抗体產生細胞は細菌、酵母、昆虫、動物細胞であり、好ましくは哺乳類細胞である。例えば、本発明の抗体產生細胞には、例えばSpodoptera frugiperda細胞などの昆虫細胞、例えば酵母(Saccharomyces cerevisiae)およびSch

10

20

30

40

50

izosaccharomyces pombe) 細胞などの酵母細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣由来細胞、胎仔ハムスター腎細胞、ヒト胎児腎臓株 293、正常イヌ腎臓細胞株、正常ネコ腎臓細胞株、サル腎細胞、アフリカミドリザル腎細胞、COS 細胞、および非腫瘍化マウス筋芽細胞 G8 細胞、線維芽細胞株、骨髄腫細胞株、マウス NIH / 3T3 細胞、LMTK 細胞、マウス ser tolli 細胞、ヒト子宮頸癌細胞、バッファローラット肝細胞、ヒト肺細胞、ヒト肝細胞、マウス乳癌細胞、TRI 細胞、MRC 5 細胞、および FS4 細胞などの哺乳類細胞を含む。抗体産生細胞は 2006 年 4 月 24 日に Amer. Type Cult. Coll. (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) に掲載され、受入番号 _____ を割り当てられた。本発明のインアウト抗体の例は、そのような細胞によって產生された抗体である。

【0078】

核酸

本発明には、本発明の抗 FRA 抗体の重鎖および / または軽鎖をコードする核酸も含まれる。本明細書において用いられる「核酸」または「核酸分子」は、一本鎖または二本鎖のすべての DNA または RNA 分子を指し、一本鎖の場合は直鎖または環状型の相補的配列の分子を指す。核酸分子について考察する場合、5' から 3' 方向の配列を提供する通常の慣習に従い、特定の核酸分子の配列または構造について本明細書に説明することがある。本発明の一部の実施形態では、核酸分子は「単離」されている。この用語は、核酸分子に用いられる場合、由来する生物体の天然型ゲノムに隣接する配列から分離された核酸分子を指す。例えば、「単離核酸」は、プラスミドまたはウイルスベクターなどのベクターに挿入されるか、原核または真核細胞または宿主微生物のゲノム DNA に組み込まれた DNA 分子を有する。RNA に用いる場合、前記「単離核酸」という用語は、主に、上記に定義した単離 DNA 分子によってコードされる RNA 分子を指す。あるいは、前記用語は、天然の状態（つまり、細胞または組織中）で関連すると考えられる他の核酸から十分分離された RNA 分子を指す。単離核酸（DNA または RNA）は、さらに生物学的方法または合成法によって直接作製されたか、その作製中に存在する他の成分から分離された分子を示す。

【0079】

本発明の核酸には、本発明の核酸と少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも約 90%、より好ましくは少なくとも約 95%、最も好ましくは少なくとも約 98% の相同性を有する核酸を含む。特定の配列を指す場合の「%類似性」、「%同一性」および「%相同性」という用語は、ウィスコンシン大学 GCG ソフトウェアプログラムに定義されたとおりに使用する。本発明の核酸には相補的核酸も含む。いくつかの例では、前記配列を並べたとき、完全に相補的となる（ミスマッチなし）。他の例では、前記配列に最高約 20% のミスマッチがある。

【0080】

本発明の核酸には、本発明の核酸のフラグメントも含まれる。「フラグメント」は、好ましくは少なくとも約 10 核酸長、より好ましくは約 40 核酸、最も好ましくは約 100 核酸長の核酸配列を指す。「フラグメント」は、1 若しくはそれ以上の欠失、挿入、または置換を含む、少なくとも約 100 連続ヌクレオチド長を意味することもできる。「フラグメント」は、遺伝子の全コード化配列を意味し、5' および 3' 非翻訳領域を含む場合がある。

【0081】

本発明の核酸はベクターにクローニングすることもできる。「ベクター」はプラスミド、コスミド、バクミド、ファージ、人工染色体（BAC、YAC）またはウイルスなどのレプリコンであり、これに別の遺伝子配列または遺伝要素（DNA または RNA）を挿入し、結合した配列または要素の複製を作ることができる。「レプリコン」は例えば、プラスミド、コスミド、バクミド、ファージ、人工染色体（BAC、YAC）またはウイルスなどの遺伝的要素であり、大部分は独自の制御で複製することができる。レプリコンは RN

10

20

30

40

50

AまたはDNAとすることができる、一本鎖または二本鎖とすることができる。いくつかの実施形態では、前記発現ベクターに構成的に活性なプロモーターセグメント（これに限定されるものではないが、CMV、SV40、伸長因子、またはLTR配列）またはステロイド誘導pINDベクター（*In vitro* gen）などの誘導プロモーター配列を含み、前記核酸の発現を制御することができる。本発明の発現ベクターは、さらに例えば内部リボソーム侵入部位などの制御配列を有することもある。前記発現ベクターは、例えばトランスフェクションにより細胞に導入することができる。

【0082】

本発明の抗体をコードする核酸は、組み換えにより発現させることができる。本発明の発現細胞には、例えば*S podoptera frugiperda*細胞など、既知の昆虫発現細胞株を含む。前記発現細胞株は、例えば*Saccharomyces cerevisiae*および*Schizosaccharomyces pombe*細胞などの酵母細胞株とすることもできる。前記発現細胞は、例えば、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞、胎仔ハムスター腎細胞、ヒト胎児腎臓株293、正常イヌ腎臓細胞株、正常ネコ腎臓細胞株、サル腎細胞、アフリカミドリザル腎細胞、COS細胞、および非腫瘍化マウス筋芽細胞G8細胞、線維芽細胞株、骨髄腫細胞株、マウスNIH/3T3細胞、LMTK細胞、マウスsertoli細胞、ヒト子宮頸癌細胞、バッファローラット肝細胞、ヒト肺細胞、ヒト肝細胞、マウス乳房腫瘍細胞、TRI細胞、MRC5細胞、およびFS4細胞などの哺乳類細胞とすることもできる。本発明の核酸は、例えばトランスフェクションにより細胞に導入することができる。組み換えにより発現された抗体は、例えば細胞の成長培地から回収することができる。

10

20

30

40

50

【0083】

抗FRAインアウト抗体の作製法

免疫化動物

本発明では、FRAに特異的に結合するインアウトモノクローナル抗体を作製する方法も提供する。FRAは、タンパク質を単離および精製するための様々な既知の技術を利用し、細胞または組み換え系から精製することができる。例えば、これに限定されるものではないが、FRAは前記タンパク質の見かけ上の分子量に基づき、前記タンパク質をSDS-PAGEゲルに流し、前記タンパク質を膜にプロットすることで単離することができる。その後、FRAに対応する適切なサイズのバンドを膜から切り取り、直接動物で免疫原として利用するか、まず前記タンパク質を前記膜から抽出または溶出してから利用することができる。代替例として、前記タンパク質はサイズ排除クロマトグラフィーのみ、または他の単離および精製法との併用で単離することができる。他の精製法は、Zola, MONOCLONAL ANTIBODIES: PREPARATION AND USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES AND ENGINEERED ANTIBODY DERIVATIVES (BASICS: FROM BACKGROUND TO BENCH) Springer-Verlag Ltd., New York, 2000; BASIC METHODS IN ANTIBODY PRODUCTION AND CHARACTERIZATION, Chapter 1, "Antibody Purification Methods," Howard and Beutell, Eds., CRC Press, 2000; ANTIBODY ENGINEERING (SPRINGER LAB MANUAL.), Kontemann and Dubel, Eds., Springer-Verlag, 2001などの標準的な参考書籍で参照可能である。

【0084】

抗FRAインアウト抗体を作製する1つの戦略には、FRA発現細胞を持つ動物を免疫化することを含む。そのように免疫化した動物は、前記タンパク質に対する抗体を産生する。ハイブリドーマ法（Kohler&Milstein, (1975) Nature 256: 495-497を参照）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4: 72を参照）、お

およびヒトモノクローナル抗体を作製するEBVハイブリドーマ法(Cole, et al. MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985, pp. 77-96を参照)を含む(これに限定されるものではないが)、モノクローナル抗体を作製する標準的な方法が知られている。

【0085】

本発明の抗体は、インビボまたはインビトロで作製することができる。インビボでの抗体作製においては、一般的に動物がエンドシアリンの免疫原性部分で免疫化される。前記抗原または抗原陽性細胞は、一般的に免疫原性を促進するアジュバントと併用される。アジュバントは免疫化に使用する種によって異なる。アジュバントの例には、(これに限定されるものではないが)フロイント完全アジュバント('FCA(Freund's complete adjuvant)')、フロイント不完全アジュバント('FIA(Freund's incomplete adjuvant)')、無機質ゲル(例えば、水酸化アルミニウム)、界面活性物質(例えば、リゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン)、ペプチド、油性乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン('KLH(keyhole limpet hemocyanin)')、ジニトロフェノール('DNP(dinitrophenol)')、およびカルメット・グラン桿菌('BCG(Bacille Calmette-Guerin)')およびcorynebacterium parvumなどの潜在的に有用なヒトアジュバントを含む。そのようなアジュバントは当該分野で周知である。

10

20

【0086】

免疫化は周知の方法により達成することができる。用量と免疫化法は、免疫化される哺乳類の種、その免疫状態、体重、および/または表面積の計算値などに依存する。典型的には、免疫化する哺乳類から血清を採取し、例えば、以下に説明する適切なスクリーニング法により抗FRA抗体を分析する。

30

【0087】

免疫化動物の脾細胞は、(前記抗体産生B細胞を含む)前記脾細胞と骨髄腫株などの不死化細胞株を融合することで不死化することができる。典型的には、骨髄腫細胞株は前記脾細胞ドナーと同じ種のものとする。一実施形態では、前記不死化細胞株がヒポキサンチン、アミノブテリン、およびチミジンを含む培地('HAT培地')に感受性を示す。一部の実施形態では、前記骨髄腫細胞がエプスタインバーウイルス(EBV)感染陰性である。好適な実施形態では、前記骨髄腫細胞がHAT感受性、EBV陰性、およびIg発現陰性である。すべての適切な骨髄腫を使用することができる。マウスハイブリドーマは、マウス骨髄腫細胞株(例えば、P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653、またはSp2/O-Ag14骨髄腫株)により作製することができる。これらのマウス骨髄腫株はATCCから入手できる。これらの骨髄腫細胞は、前記ドナー脾細胞のポリエチレンリコール('PEG')、好ましくは1500分子量のポリエチレンリコール('PEG1500')に融合する。前記融合で得られるハイブリドーマ細胞は、未融合の骨髄腫細胞と非生産的に融合された骨髄腫細胞を死滅させるHAT培地で選択される。未融合の脾細胞は培養時に短期間で死滅する。いくつかの実施形態では、前記骨髄腫細胞が免疫グロブリン遺伝子を発現しない。

40

【0088】

以下に説明するようなスクリーニング方法で検出される、所望の抗体を产生するハイブリドーマは、培養または動物で抗体を作製するために使用することができる。例えば、前記ハイブリドーマ細胞は、前記ハイブリドーマ細胞が前記培地に前記モノクローナル抗体を十分分泌できる条件および時間で、培養液中で培養することができる。これらの技術と培地は、当業者に周知である。或いは、前記ハイブリドーマ細胞を非免疫化動物の腹膜に注入することができる。前記細胞は腹腔で増殖し、前記抗体を分泌し、これが腹水として蓄積する。前記腹水は、前記モノクローナル抗体が豊富な供給源として、腹腔からシリジで抜くことができる。

50

【0089】

ヒト抗体を作製するための別の限定されない方法は米国特許第5,789,650号明細書に報告されており、この明細書では、自らの内因性免疫グロブリン遺伝子が不活性化され、別の種（例えば、ヒト）の抗体を產生するトランスジェニック哺乳類について説明している。前記異種抗体の遺伝子は、ヒト免疫グロブリン遺伝子によってコードされている。再配列されていない免疫グロブリンのコード領域を含む導入遺伝子は、非ヒト動物に導入される。得られたトランスジェニック動物は、前記トランスジェニック免疫グロブリン配列を機能的に再配列し、ヒト免疫グロブリン遺伝子でコードされた様々なアイソタイプの抗体レパートリーを产生することができる。前記トランスジェニック動物のB細胞は、その後、不死化細胞株（例えば、骨髄腫細胞）と融合させるなど、様々な方法のいずれかによって不死化される。

10

【0090】

抗FRAインアウト抗体は、当該分野で既知の様々な技術によりインビトロで調整することができる。例えば、（これに限定されるものではないが）抗FRA完全ヒトモノクローナル抗体は、インビトロで初回抗原刺激したヒト脾細胞を用いて調整することができる（Boerner et al. (1991) J. Immunol. 147: 86-95）。

20

【0091】

或いは、例えば、本発明の抗体を「レパートリークローニング」により調整することができる（Persson et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2432-2436；およびHuang and Stollar (1991) J. Immunol. Methods 141: 227-236）。さらに、米国特許第5,798,230号明細書では、エピスタインバーウイルス核抗原2（EBNA2）を発現したエピスタインバーウイルスに感染させることで不死化した、ヒトB抗体産生B細胞のヒトモノクローナル抗体の調整について報告している。その後不死化に必要なEBNA2を不活化し、抗体力値を上昇させる。

20

【0092】

別の実施形態では、抗FRA インアウト抗体が末梢血単核細胞（「PBMCs」）のインビトロでの免疫化によって形成される。これは、例えば文献に報告された方法を用いるなど、当該分野で既知の方法により達成することができる（Zafiroopoulos et al. (1997) J. Immunological Methods 200: 181-190）。

30

【0093】

抗FRAインアウト抗体を作製する別の戦略では、FRAの膜結合型の領域に対応するペプチドを持つ動物を免疫化する工程を含み、これにより確実な免疫エフェクター活性を保持する抗体を内部移行させる。そのように免疫化した動物は、前記タンパク質に対する抗体を產生する。ハイブリドーマ法（Kohler & Milstein, (1975) Nature 256: 495-497を参照）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4: 72を参照）、およびヒトモノクローナル抗体を作製するEBVハイブリドーマ法（Cole, et al. MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985, pp. 77-96を参照）を含む（これに限定されるものではないが）モノクローナル抗体を作製する標準的な方法が知られている。

40

【0094】

本発明の一実施形態では、インビトロでの免疫化法がハイブリドーマ細胞の定向進化により補完され、PMS1、PMS2、PMS2-134、PMSR2、PMSR3、MLH1、MLH2、MLH3、MLH4、MLH5、MLH6、PMSL9、MSH1、およびMSH2などのミスマッチ修復遺伝子のドミナントネガティブ対立遺伝子が、前記脾細胞の融合後に前記ハイブリドーマ細胞に導入されるか、融合前に前記骨髄腫細胞に導入

50

される。前記ドミナントネガティブ突然変異を含む細胞は超変異となり、形質移入していない対照細胞よりも高い割合で変異を蓄積する。前記突然変異細胞のプールから、高親和性抗体を產生するか、高力価抗体を產生するか、単純に特定の条件でより早く、良好に増殖するクローニングをスクリーニングすることができる。ミスマッチ修復遺伝子のドミナントネガティブ対立遺伝子を用いて超変異細胞を作製する方法は、2000年11月4日発行の米国特許第6,146,894号明細書に報告されている。代わりに、Nicolaidesらが2002年7月18日公開のWO 02/054856「Chemical Inhibitors of Mismatch Repair」に報告した、ミスマッチ修復の化学的阻害剤を用いて、ミスマッチ修復を阻害することもできる。ミスマッチ修復遺伝子のドミナントネガティブ対立遺伝子またはミスマッチ修復の化学的阻害剤を用いて抗体を強化する方法は、クローニング免疫グロブリン遺伝子も発現した哺乳類の発現細胞に適用されることもある。前記ドミナントネガティブ対立遺伝子をオフとし、誘導できる場合は前記細胞から排除することで、前記細胞をもう一度遺伝的に安定させ、異常に高い割合で突然変異が蓄積しないようにできるという点において、前記ドミナントネガティブ対立遺伝子を発現する細胞は「矯正」することができる。

10

【0095】

インアウト抗体のスクリーニング

FRAに特異的に結合するインアウト抗体のスクリーニングは、酵素免疫吸着測定法(ELISA)を利用し、免疫エフェクター活性を持つ抗体をスクリーニングする、および/または内部移行をアッセイすることで達成することができる。免疫エフェクター活性を示す抗体は、抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)または補体依存性細胞傷害作用(CDCC)をモニターする標準的な免疫エフェクター法を利用することで同定することができる。内部移行可能な抗体は、前記抗体を蛍光色素またはプロドラッグなどの検出可能な標識と結合させ、可視化した内部移行能力または毒性をモニターすることで、同定可能である。1若しくはそれ以上のこれらのアッセイ(ELISA、免疫エフェクター法、および内部移行法)は、本発明のインアウト抗体を同定する任意の順序で実行することができる。

20

【0096】

例えば、前記ELISAは、抗原(タンパク質全体またはペプチド)を免疫化したコティングマイクロタイプレートを有することもある。陽性反応を示したクローニングの抗体は、FRAに対するELISAを基本としたアッセイで反応性をスクリーニングすることができる。葉酸受容体アルファ型に特異的な抗体は、1若しくはそれ以上の他の葉酸受容体アイソタイプを利用し、ELISAで同定することができる。FRAに対して反応性を示す抗体を產生するクローニングは、さらなる発展と開発のために選択される。インアウト活性を示すFRA反応性抗体は、例えば、抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)または補体依存性細胞傷害作用(CDCC)をモニターする標準的な免疫エフェクター法を用いて確認することができる。免疫エフェクター活性を示すFRA特異的抗体については、次に蛍光色素またはプロドラッグと結合し、可視化した内部移行能力、またはプロドラッグが内部移行し、前記抗体が遊離することで前記毒素が生じる際に発生する毒性をモニターすることができる。

30

【0097】

抗体の薬学的組成物

本発明の別の観点によると、本発明の抗エンドシアリン抗体の医薬品を特徴としている。前記医薬品を使用し、患者のエンドシアリン陽性細胞の成長を抑制または軽減することができる。特定の実施形態では、前記医薬品が製剤化され、注射または注入により投与される。

40

【0098】

本発明の薬学的組成物は、さらに1若しくはそれ以上の生体分子、化学治療物質を有していても良い。一部の実施形態において、前記抗体は生体分子または化学治療物質に結合する。適切な化学治療物質は、これに限定されるものではないが、鉛-212、ビスマス-212、アスタチン-211、ヨウ素-131、スカンジウム-47、レニウム-18

50

6、レニウム-188、イットリウム-90、ヨウ素-123、ヨウ素-125、臭素-77、インジウム-111、およびホウ素-10またはアクチニドなどの核分裂性核種を含む放射性同位元素を含む。他の実施形態では、前記化学治療物質がリシン、修飾シュードモナスエンテロトキシンA、カリケアマイシン、アドリアマイシン、5-フルオロウラシルなどを含む（これに限定されるものではないが）、毒素または細胞傷害性薬である。

【0099】

本発明の医薬品は、薬学的に許容される担体または媒体とともに製剤化されることもある。適切な薬学的に許容される担体には、水、P B S、食塩水（リンガー溶液など）、アルコール、オイル、ゼラチン、およびラクトース、アミロール、またはデンプンなどの炭水化物、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、およびポリビニル・ピロリジンを含む。そのような製剤は滅菌し、望ましい場合は、潤滑剤、保存料、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響する塩、緩衝液、および着色剤などの助剤と混合することができる。本発明での使用に適した薬学的担体は当該分野で既知であり、例えばPharmaceutical Sciences（第17版、Mack Pub. Co., ペンシルバニア州イーストン）に説明されている。

10

【0100】

キット

本発明のさらに別の観点では、インビトロまたはインビボでF R A陽性細胞の成長を阻害または抑制するキットが提供される。また、インビトロまたはインビボでF R A陽性細胞の有無を確認するキットも提供される。

20

【0101】

本発明のキットは、本発明の抗体または抗体組成、およびF R A陽性細胞、好ましくは異型細胞の成長をインビトロまたはインビボで阻害または抑制する方法、または生物サンプル中のF R A陽性細胞、好ましくは異型細胞の有無を同定する方法において、前記キットを使用するための使用説明書を有する。前記キットは少なくとも1つの生体分子、抗葉酸化合物、または化学治療物質を有することができる。前記キットは、少なくとも1つの診断試薬を有することができる。診断試薬の例は、例えば放射性、蛍光性、または発色試薬（例えば、¹¹¹In-DOTA）などの（これに限定されるものではないが）検出可能な標識である。前記検出可能な標識は酵素を有することもある。前記キットは、前記抗体または抗体組成を、例えば注射または注入により投与するための使用説明書および/または手段を有することもある。

30

【0102】

F R A陽性細胞の検出法

本発明の方法には、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、または肺癌細胞を含む（これに限定されるものではないが）、表面にF R Aを提示する、異型細胞などの細胞を検出する方法を含む。前記方法は、生物サンプルに対してインビトロで、またはインビボで実行することができる。本発明に沿ったF R A陽性細胞の検出方法は、本発明の抗F R A抗体を生物サンプルと接触させる工程または本発明の抗F R A抗体を患者に投与する工程（前記抗体は例えば放射性、蛍光性、または発色試薬（例えば、¹¹¹In-DOTA）などの（これに限定されるものではないが）検出可能な標識で標識される）、および前記抗体の細胞への結合を決定する工程を有する。前記検出可能な標識は酵素とすることもある。

40

【0103】

F R A陽性細胞の成長を抑制する方法

本発明のアウト抗F R A抗体は、インビトロまたはインビボでF R A陽性細胞の成長を抑制するための使用に適している。本発明の方法は、F R Aの発現増加に伴う腫瘍状態を有すると同定されたヒトおよび非ヒト動物での使用に適している。本発明の利益を受ける非ヒト動物には、ペット、外来性（例えば、動物園の動物）および国産家畜を含む。好ましくは、前記非ヒト動物は哺乳類である。

【0104】

本発明は、正常組織に関連し、新生物でF R Aの発現が増加することで特徴付けられる

50

、形成異常症を有すると同定されたヒトまたは動物患者での使用に適している。そのような患者がそのような状態を治療する必要があると同定されると、前記状態の治療を達成するため、本発明の方法が適応されることがある。治療可能な異型組織には、（これに限定されるものではないが）肺、脾臓、および前立腺を含む。

【0105】

本発明で使用される抗体とその誘導体は、カプセル、錠剤、水性懸濁液、溶液など、許容される剤形であれば経口投与することができる。前記抗体とその誘導体は、非経口投与することもできる。その場合、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑膜内、胸骨内、鼻腔内、局所、くも膜下腔内、肝内、病巣内、および頭蓋内注射または注入法の投与経路とする。一般に前記抗体と誘導体は、筋肉内または静脈内注射として提供される。

10

【0106】

本発明の抗体と誘導体は、単独、または許容されるアジュバント、賦形剤、および添加物を含む、薬学的に許容される担体との併用で投与することができる。

【0107】

本発明の抗体と誘導体は、1若しくはそれ以上の抗葉酸化合物を併用して投与することもできる。前記抗葉酸化合物には、これに限定されるものではないが、5'-フルオロ-2'-デオキシ-ウリジン-5'-リン酸（FdUMP）、5'-フルオロウラシル（5-FU）、L-5'-ホルミルテトラヒドロ葉酸（「ロイコボリン」）、N-[5-(N-(3',4'-ジヒドロ-2'-メチル-4'-オキソキナゾリン-6'-イル-メチル)-アミノ)-2'-テニル]-L-グルタミン酸（「ZD1649」；「トムデックス」としても知られる）（Jackman et al. (1991) Cancer Res. 51: 5579-5586）、N-(4-(2-(2-アミノ-4',7'-ジヒドロ-4'-オキソ-3H-ピロロ[2',3'-D]ピリミジン-5'-イル)-エチル)-ベンゾイル]-L-グルタミン酸（「マルチターゲット葉酸」（multi-targeted anti folate: MTA）、「LY231514」、「ALIMTA」、および「ペメトレキセド」としても知られる）（Taylor et al. (1992) J. Med. Chem. 35: 4450-4454；Shih et al. (1997) Cancer Res. 57: 1116-1123）、(S)-2-(5)-((1,2-ジヒドロ-3'-メチル-1'-オキソベンゾ(f)キナゾリン-9'-イル)-メチル)-アミノ)-オキソ-2'-イソインドリニル)-グルタル酸（「GW1843U89」）（Hanlon and Ferone (1996) Cancer Res. 56: 3301-3306）；(2S)-2-{O-フルオロ-p-[N-(2',7'-ジメチル-4'-オキソ-3',4'-ジヒドロ-キナゾリン-6'-イル-メチル)-N-プロパ-2'-イニル)アミノ]ベンズアミド}-4-(テトラゾール-5'-イル)-酪酸（「ZD9331」）（Jackman et al. (1997) Clin. Cancer Res. 3: 911-921）；3',4'-ジヒドロ-アミノ-6'-メチル-4'-オキソ-5'-((4'-ピリジルチオ)-キナゾリン（「AG337」；「チミタック(Thymitaq)」としても知られる）（Webber et al. (1996) Cancer Chemother. Pharmacol. 37: 509-517；Rafi et al. (1998) J. Clin. Oncol. 16: 1331-1341）、およびN-(4-アミノ-4-デオキシブテロイル)-N-(ヘミフタロイル-L-オルニチン）（「PT523」）（Rhee et al. (1994) Mol. Pharmacol. 45: 783-791；Rowowsky (1999) Curr. Med. Chem. 6: 329-352）を含む。前記抗葉酸化合物は、本発明の抗FR-抗体の前後、または同時に投与することができる。投与される抗葉酸化合物の量は現在使用されている用量とするか、増減することができ、これは前記患者に対して有害作用を生じずに、腫瘍の成長抑制または腫瘍の除去を達成することを基本に、医師が容易に決定することができる。

20

30

40

【0108】

本発明の抗体は、別の治療薬または診断薬の前後、または同時に投与することができる。例えば、本発明のインアウト抗体は単独、またはアドリアマイシン、ドキソルビシン、

50

ゲムシタビン、または5-フルオロウラシルなど（これに限定されるものではないが）細胞傷害性薬と併用して投与することができる。本発明のインアウト抗体は単独、またはタルセバおよびアバスチンなど（これに限定されるものではないが）細胞増殖抑制物質と併用して投与することができる。本発明のインアウト抗体と誘導体は単独、またはワクチン剤と併用して投与することができる。本発明のインアウト抗体および誘導体は単独、またはインターロイキン-2、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、リツキサン、ゼバリン、ハーセプチニン、エルビタックス、アバスチンなど（これに限定されるものではないが）別の生体分子と併用して投与することができる。

【0109】

本発明のインアウト抗体および誘導体は、非複合型または複合型抗体の均一混合物として、または非複合型または複合型インアウト抗体の不均一混合物として投与することができる。10

【0110】

有効量は様々な因子によって決まり、これは体重、治療目標、最高耐量、使用される特定の製剤、投与経路などの様々なパラメーターによって、特定患者の用量を調整する熟練医師の権限の範囲内である。一般に、前記抗体またはその誘導体の用量レベルは、1日約0.001および約100mg/kg体重の範囲が適切である。いくつかの実施形態では、前記抗体またはその誘導体の用量が1日約0.1～約50mg/kg体重である。他の実施形態では、前記用量が約0.1mg/kg体重/日～約20mg/kg体重/日である。さらに他の実施形態では、前記用量が約0.1mg/kg体重/日～約10mg/kg体重/日である。投与はボーラスまたは注入とすることができます。投与は、1日1回または1日複数回とすることができます。さらに、投与は一定期間に複数回とすることができます。いくつかの実施形態では、前記用量を1～14日おきに投与する。いくつかの実施形態では、前記抗体またはその誘導体が腹腔内に約3～1mg/kgの用量で投与される。他の実施形態では、前記抗体またはその誘導体は静脈内に約5～12.5mg/kgで提供される。さらに他の実施形態では、前記抗体またはその誘導体が、血漿レベルを少なくとも約1ug/mlに維持するように提供される。20

【0111】

治療が有効であるかについては、様々な方法で評価することができる。1つの実施形態では、腫瘍成長の進行が遅くなったことで治療が有効であると判断する。他の実施形態では、前記腫瘍の縮小（つまり、前記腫瘍サイズの減少）によって治療が有効であると決定される。他の実施形態では、前記腫瘍の転移が抑制されたことで治療が有効であると決定される。さらに他の実施形態において、治療の有効性は、体重増加、体力回復、疼痛軽減、視界の回復、成長、および健康回復および疾患の抑制に関する前記患者からの主観的指標などの徴候を含む、前記患者の満足感（well-being）向上により決定される。30

【0112】

以下の実施例は、本発明を図示するために提供されるものであり、本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。

【実施例1】

【0113】

FRAに結合可能なインアウト抗体

前記モノクローナル抗体ML-1は、ヒトIgG1定常領域にFRA特異的マウス抗体の可変ドメインのCDRをグラフトすることで開発された。前記抗体はFRAタンパク質およびFRA発現癌細胞に特異的に結合することが示され、Biacore（登録商標）を用いた場合、約5nMの結合定数を有することが分かった。FRA特異的な結合を証明するため、当業者が使用する方法に従い、96ウェルフォーマットで組み換えFRAを用いて抗原特異的ELISAが行われた（図1A）。ELISAに反応することが分かった抗体は、製造業者のプロトコールに従い、さらにFACS分析によりFRA結合を分析した。図1Bに前記FACS分析の代表的なデータを示しており、それによるとFRA発現40

卵巣腫瘍細胞はヌル細胞と対照的にML-1結合が陽性であった。抗原特異的ELISAは、FRA発現細胞全体、そのようなFRA発現細胞から得られた膜標本、または全FRAアミノ酸配列を含む合成重複ペプチドを用いてフォーマットすることもできる。

【実施例2】

【0114】

免疫エフェクター活性に対するML-1抗体の活性は、FRA発現OVCAR-3細胞株について、標準的な抗体依存性細胞傷害(ADCC)分析により評価した。簡潔に述べると、OVCAR-3標的細胞を完全成長培地(10%FBS、2mM-L-グルタミン含有RPMI-1640)中、平底96ウェルマイクロプレートに播種した。翌日、前記完全培地を100u1のCHO-CD無血清培地(Sigma)と交換し、抗体含有ならし培地50μlを標的細胞に追加し、37で20分間インキュベートした。その後、2×10⁵のエフェクター細胞を含む100u1の無血清培地を加え、5%CO₂、37で5~6時間インキュベートした。エフェクター細胞はヒト末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells: PBMCs)から誘導し、健常ドナーから単離した(Interstate Blood Bankより購入)。ADCCにて使用する前に、PBMCsを約10ng/mlのヒト組み換え型インターロイキン2(R&D Systems)を含む完全RPMI中に2.5×10⁶/mlで播種し、37、5%CO₂にて3日間、PBMCsを活性化した。次に、活性化PBMCsをエフェクター細胞：標的細胞比を5:1としてOVCAR-3細胞に追加し、この培地を37、5%CO₂にて5~6時間インキュベートした。各ウェルから上清を回収し、ELISAプレートに移し、以下のとおりADCCを分析行った。ADCCは乳酸脱水素酵素(lactase dehydrogenase: LDH)、標準分析においてADCCの測定に使用される内因性酵素の放出によってモニターした。LDHは、100μlのLDH基質(Roche)を上清に添加し、周囲温度で10分間インキュベートすることによってモニターし、LDHによって変換された化学物質は分光光度法でOD₄₉₀にて検出可能であった。LDH活性は、溶解標的細胞から放出される前記LDH酵素の量と比例する。490nmの吸光度(OD₄₉₀)は分光光度法で得られる。2%トリトンXを「最大値(max)」の陽性対照としてエフェクター細胞単独に追加し、抗体は加えてないがPBMCを伴った標的細胞は「自然値(spontaneous)」としての陰性対照とした。LDH値を取得し、以下の式により細胞傷害性の割合を決定した。(サンプル値-自然値)/(最大値-自然値)×100%(式中、「自然値」=エフェクター細胞不在下での標的細胞の溶解、「最大値」=2%トリトン混在下での標的細胞の溶解)。100ng/mlのMORAb-A92(精製タンパク質A)により誘発された細胞傷害性を陽性対照として使用する。100ng/mlの正常ヒトIgG1抗体を用い、非特異的細胞傷害性をモニターする。前記%細胞傷害性を各ウェル/クローンの抗体濃度で割って得られた比(つまり、比=50(%) / 100(n g / ml) = 0.5)を、エフェクター機能が高いと考えられるリードクローンを選択する基準として設定する。

【0115】

ML-1の分析において、対照Igあり、または抗体なしでインキュベートした細胞のADCC活性増強力(p=0.018)を示している(図2)。図2は、ML-1が強力な抗体依存性細胞傷害性(ADCC)活性を誘発することを証明している。FRAを発現する腫瘍細胞株OVCAR3(標的と呼ぶ)をヒトPBMCsのみ(抗体なし)、ML-1、または対照Ig(正常IgG)とインキュベートした。細胞溶解時に発生する乳酸脱水素酵素(LDH)の放出をモニターすることにより、細胞培養液の殺細胞を分析した。ML-1はFRA発現細胞上でADCC活性を有していた。これらのデータは、ML-1が免疫エフェクター機能を介して細胞傷害作用を有するという所見を支持するものである。

【実施例3】

【0116】

ML-1はFRA発現細胞に結合すると内部移行する。この所見は、Hum-ZAP分

10

20

30

40

50

析を用いた図3に示した。第2の免疫毒素は、2次抗体とリボソーム不活化タンパク質サポリンの複合体である。試験している1次抗体が内部移行すると、前記サポリンは前記2次抗体と結合して前記細胞に運ばれる。内部移行したサポリンがそのIgG複合体から一旦分離すると、タンパク質合成が阻害され、最終的に細胞死が引き起こされる。Hum-ZAP(Advanced Targeting Systems, cat#IT-22)は、ヒトモノクローナル抗体を認識するアフィニティー精製したヤギ抗ヒトIgG(分子量210kDa)の2次化学的複合体である。対照分子のヤギIgG-SAP(Advanced Targeting Systems cat#IT-19)は、正常なヤギIgGとサポリンの複合体である。簡潔に述べると、10%FCS、2.0mMグルタミン、1.0mMピルビン酸ナトリウム、および0.1mM MEM非必須アミノ酸を含む80u1の RPMI 1640中の平底96ウェル組織培養プレートに、2500/ウェルで細胞を播種した。24時間後、10u1の1次抗体ML-1またはMORAb-A92を10u1のHum-ZAPまたはヤギIgG-SAPとともに添加し、総量を100u1にした。実験では抗体の滴定を行い、1次抗体および2次抗体を対照として含めた。4日後、分光光度法により生存細胞数を読み取るPromega CellTiter(登録商標)細胞傷害性アッセイ(cat# G3581)を用いて、細胞の生存率を評価した。すべての検査は3回ずつ行った。データは処理および未処理ウェルを比較することにより評価し、結果は対照のパーセントとして表した。図3に示すとおり、ML-1はFRAを過剰発現したOVCAR-3細胞に内部移行した。ML-1非複合体(四角)と対照的に、サポリンに結合したML-1(ダイアモンド)で処理することにより細胞は死滅したが、アイソタイプ対照抗体MORAb-A92は複合または非複合毒素形態で細胞を死滅させなかった(それぞれ三角およびX)。対照としてFRAを発現していない細胞を用い、ML-1は毒素複合体または非複合体で毒性作用を有していないことが示された。これらのデータは、ML-1がFRA提示細胞に内部移行するという所見を支持するものである。

【図面の簡単な説明】

【0117】

【図1A】図1は、ELISAおよびFACSによる、FRA特異的結合抗体ML-1について示した図である。図1Aは、インアウト活性を有するFRA特異的抗体について示した図である(ML-1)。様々な量の組み換え型FRA抗原に特異的に結合可能な抗体を同定したELISAを示した図である。ELISAは、精製標本、半精製標本、膜標本、またはFRA発現細胞全体を用いてフォーマットすることも可能である。

【図1B】図1は、ELISAおよびFACSによる、FRA特異的結合抗体ML-1について示した図である。図1Bは、FRA-ヌルH226細胞では結合が認められないが、FRA発現細胞(IGROV-1)に結合するML-1のFACS分析結果を示した図である。これらのデータは、ウエスタンプロット分析により確認された。

【図2】図2は、ML-1が強い抗体依存性細胞傷害(antibody-dependent cellular cytotoxicity:ADCC)活性を誘発することを示した図である。FRAを発現する腫瘍細胞株OVCA3(標的と呼ぶ)は、ヒト末梢血単核細胞(peripheral blood mononuclear cells:PBMCs)単独(抗体なしのレーン)、ML-1と共に、または対照IgG(正常IgG)とインキュベートした。細胞溶解時に発生する乳酸脱水素酵素(lactate dehydrogenase:LDH)の放出をモニターすることにより、細胞培養物の死滅について分析した。ML-1はFRA発現細胞に対してADCC活性を有する。

【図3】図3は、ML-1がFRA発現細胞に内部移行することを示した図である。図3は、アイソタイプ対照抗体MORAb-A92は複合体毒素形態または非複合毒素で細胞を死滅させなかつたが(それぞれ三角およびX)、サポリンに結合したML-1(ダイアモンド)の殺細胞力をML-1非複合体(四角)と対比し示した図である。対照としてFRAを発現していない細胞を用い、ML-1は毒素複合体または非複合体で毒性作用を示さないことが分かった(図示せず)。これらのデータは、ML-1がFRA提示細胞に内

10

20

30

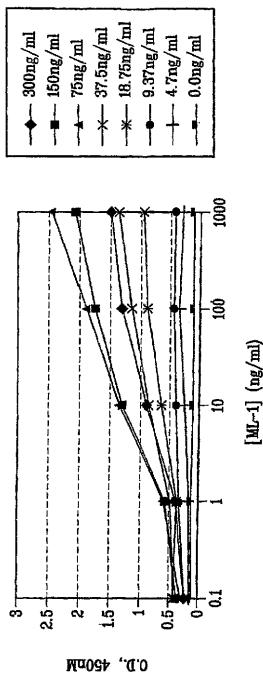
40

50

部移行するという所見を支持している。データは処理および未処理のウェルを比較することによって評価しており、結果は対照のパーセントとして表している。

Fig. A

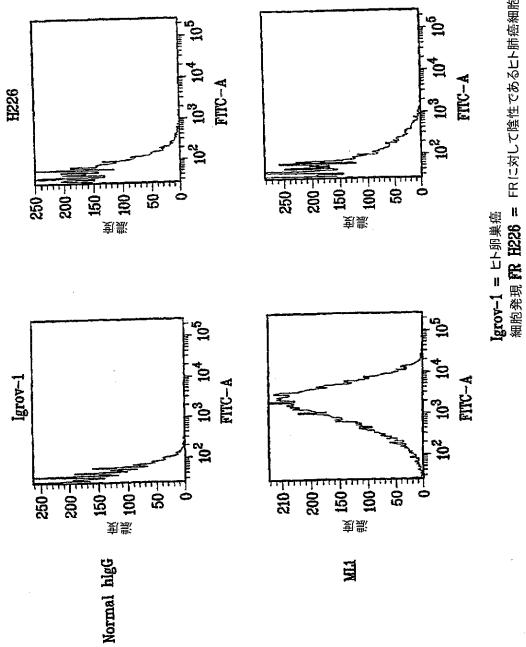
15 ヤギ血清を用いたブロック
HRP複合体を用いた検出



【図 1 A】

【図 1 B】

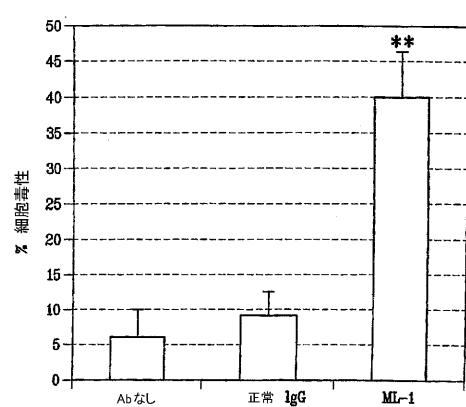
Fig. B



IgG-1 = ヒト卵巣癌
細胞発現 FR HE226 = FR1に対して陰性であるヒト肺癌細胞

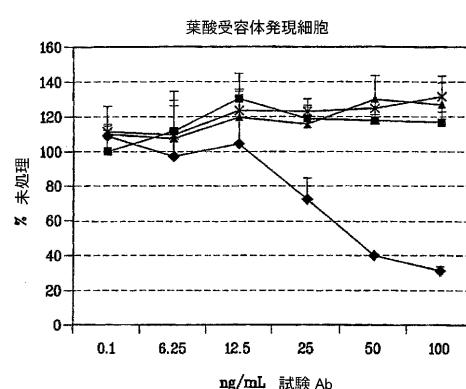
【図2】

FIG. 2



【図3】

FIG. 3



【配列表】

2009521206000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/016004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/30 C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/113388 A2 (MORPHOTEK INC [US]; GRASSO LUIGI [US]; NICOLAIDES NICHOLAS C [US]; SAS) 29 December 2004 (2004-12-29) paragraphs [0009] - [0014]; claims 1-30	1-47
X	US 5 952 484 A (WALLACE THOMAS PAUL [GB] ET AL) 14 September 1999 (1999-09-14) columns 3-7; claims 1-6	1-47
		-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
'E' earlier document but published on or after the international filing date		
'L' document which may throw doubt on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the international search report	
31 January 2007	15/02/2007	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Bernhardt, Wiebke	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/016004

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZANTEN-PRZYBYSZ VAN I ET AL: "Cellular and humoral responses after multiple injections of unconjugated chimeric monoclonal antibody MOv18 in ovarian cancer patients: A pilot study" JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY, SPRINGER INTERNATIONAL, BERLIN, DE, vol. 128, no. 9, September 2002 (2002-09), pages 484-492, XP002339136 ISSN: 0171-5216 abstract; figure 1	1-30, 42-47
X	CONEY L ET AL: "Chimeric murine-human antibodies directed against folate binding receptor are efficient mediators of ovarian carcinoma cell killing" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 54, no. 9, 1994, pages 2448-2455, XP002989898 ISSN: 0008-5472 abstract page 2451 - page 2452	1-47
P, X	WO 2005/080431 A2 (MORPHOTEK INC [US]; GRASSO LUIGI [US]; NICOLAIDES NICHOLAS C [US]; SAS) 1 September 2005 (2005-09-01) paragraphs [0001] - [0019]; claims 1-91	1-47
A	POUL M-A ET AL: "Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 301, no. 5, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 1149-1161, XP004461688 ISSN: 0022-2836 abstract; figures 1-4	1-47
A	SHIELDS R L ET AL: "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcgammaRI, FcgammaRII, FcgammaRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcgammaR" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 276, no. 9, 2 March 2001 (2001-03-02), pages 6591-6604, XP002271092 ISSN: 0021-9258 abstract	1-47
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/016004

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHINKAWA T ET AL: "The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 278, no. 5, 31 January 2003 (2003-01-31), pages 3466-3473, XP002355427 ISSN: 0021-9258 abstract	1-47
A	BALINT R F ET AL: "ANTIBODY ENGINEERING BY PARSIMONIOUS MUTAGENESIS" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 137, no. 1, 27 December 1993 (1993-12-27), pages 109-118, XP002031537 ISSN: 0378-1119 page 110, right-hand column	2-5
A	LITTLE M ET AL: "Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 8, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 364-370, XP004215163 ISSN: 0167-5699 page 367; figure 3	15, 16, 21, 22
A	CONEY L R ET AL: "CLONING OF A TUMOR-ASSOCIATED ANTIGEN: MOV18 AND MOV19 ANTIBODIES RECOGNIZE A FOLATE-BINDING PROTEIN" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 51, no. 22, 15 November 1991 (1991-11-15), pages 6125-6132, XP000572108 ISSN: 0008-5472 abstract; figures 1-7	1-47
A	WOLFF E A ET AL: "MONOClonal ANTIBODY HOMODIMERS: ENHANCED ANTITUMOR ACTIVITY IN NUDE MICE" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 53, no. 11, 1 June 1993 (1993-06-01), pages 2560-2565, XP008061639 ISSN: 0008-5472 cited in the application abstract; figures 1-7	1-47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/016004

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 31-41 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2006/016004

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2004113388	A2	29-12-2004	AU CA EP	2004249673 A1 2526647 A1 1626991 A2		29-12-2004 29-12-2004 22-02-2006
US 5952484	A	14-09-1999	AU AU CA EP WO US	696946 B2 2118595 A 2185115 A1 0749483 A1 9524482 A1 5646253 A		24-09-1998 25-09-1995 14-09-1995 27-12-1996 14-09-1995 08-07-1997
WO 2005080431	A2	01-09-2005	AU CA EP	2005214331 A1 2556027 A1 1716179 A2		01-09-2005 01-09-2005 02-11-2006

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
	A 6 1 K 39/395	N
	A 6 1 K 39/395	L
	A 6 1 P 35/00	

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

(72)発明者 ニコライデス、ニコラス、シー .

アメリカ合衆国、19061 ペンシルバニア州、ブースウィン、4 サイダー ミル コート

(72)発明者 サス、フィリップ、エム .

アメリカ合衆国、19403 ペンシルバニア州、オーデュボン、1903 ブラック ホーク サークル

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA43 BA61 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA01
 GA11 HA08
 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA05
 4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 AB02 BA02 BA08 CA24
 CA25 CA44
 4C085 AA13 AA14 AA16 AA21 BB11 BB41 BB43 CC02 DD62 EE01
 GG01
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74