

(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2004-526408

(P2004-526408A)

(43) 公表日 平成16年9月2日(2004.9.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
C O 7 K 1/22	C O 7 K 1/22	4 B O 6 4
C O 7 K 16/18	C O 7 K 16/18	4 B O 6 5
C O 7 K 17/06	C O 7 K 17/06	4 H O 4 5
C O 7 K 17/08	C O 7 K 17/08	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-523957 (P2002-523957)	(71) 出願人	503077202
(86) (22) 出願日	平成13年8月30日 (2001.8.30)		アップステート バイオテクノロジー, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月26日 (2003.2.26)		アメリカ合衆国, 12946 ニューヨーク, レーク プラシッド, オールド パーソン ロード 10
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/026926	(74) 代理人	100066061
(87) 国際公開番号	W02002/018443		弁理士 丹羽 宏之
(87) 国際公開日	平成14年3月7日 (2002.3.7)	(72) 発明者	イーシンジャー, ドミニック
(31) 優先権主張番号	09/653, 755		アメリカ合衆国, 12942 ニューヨーク, キーン, イースト ヒル ロード (番地なし)
(32) 優先日	平成12年9月1日 (2000.9.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホスホチロシン含有タンパク質に対する組換えモノクローナル抗体

(57) 【要約】

4 G 1 0 ハイブリドーマ型特異性を持つ精製または高純度組換えモノクローナル抗体が、抗体鎖および c D N A ポリヌクレオチドに対応するアミノ酸配列をコード化する c D N A 配列を含むポリヌクレオチドと共に開示され、また前記配列の用途が開示される。同じく開示されるのは、分子生物学的手法で有用な対応するタグ標識配列と、前記配列の用途である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

4 G 1 0 モノクローナル抗体と同一の特異性を持つ一つの精製または高純度免疫グロブリン。

【請求項 2】

2 個の軽鎖成分と 2 個の重鎖成分より成り、ここで前記重鎖成分が、ゲル電気泳動で単一バンドを示すことを特徴とする請求項 1 記載の精製または高純度免疫グロブリン。

【請求項 3】

前記免疫グロブリンが、ヒスチジンタグ標識領域を含むことを特徴とする請求項 1 記載の精製または高純度免疫グロブリン。

10

【請求項 4】

2 個の軽鎖成分と 2 個の重鎖成分より成り、ここで前記重鎖成分が、ゲル電気泳動で単一バンドを示すことを特徴とする請求項 3 記載の精製または高純度免疫グロブリン。

【請求項 5】

ヒスチジンタグ標識が、前記抗体の重鎖成分の一部であることを特徴とする請求項 4 記載の精製または高純度免疫グロブリン。

【請求項 6】

そのアミノ酸配列が、配列識別番号 4 の配列とほぼ同一の重鎖成分と、そのアミノ酸配列が配列識別番号 5 の配列とほぼ同一の軽鎖成分とを更に含むことを特徴とする請求項 1 記載の精製または高純度免疫グロブリン。

20

【請求項 7】

そのアミノ酸配列が、配列識別番号 5 の軽鎖成分と、そのアミノ酸配列が配列識別番号 4 の重鎖成分とを更に含むことを特徴とする請求項 1 記載の精製または高純度免疫グロブリン。

【請求項 8】

そのアミノ酸配列が、配列識別番号 6 の配列とほぼ同一の重鎖成分と、そのアミノ酸配列が配列識別番号 5 の配列である軽鎖成分とを更に含むことを特徴とする請求項 2 記載の精製または高純度免疫グロブリン。

【請求項 9】

請求項 6 乃至 8 のいずれか 1 項記載のポリペプチドをコード化する一つの分離組換えポリヌクレオチド。

30

【請求項 10】

前記ポリヌクレオチドが、cDNA であることを特徴とする請求項 9 記載の分離組換えポリヌクレオチド。

【請求項 11】

請求項 9 または 10 記載の補体。

【請求項 12】

請求項 9 乃至 11 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチドを含む一つのベクター。

【請求項 13】

組換え細胞が、前記ベクター内のポリヌクレオチドでコード化されるポリペプチドを発現することを特徴とする請求項 12 記載のベクターを含む一つの組換え細胞。

40

【請求項 14】

組換え細胞が、更に免疫グロブリンを分泌することを特徴とする請求項 13 記載の組換え細胞。

【請求項 15】

発現されるポリペプチドが、抗原に特異的な抗体であることを特徴とする請求項 14 記載の組換え細胞。

【請求項 16】

前記抗体が、ヒト細胞からのホスホチロシン含有タンパク質と正の反応性を示すことを特徴とする請求項 15 記載の組換え細胞。

50

【請求項 17】

請求項 2 または 4 記載のモノクローナル抗体と微小孔ポリマー基質とを含む一つの免疫吸着物質。

【請求項 18】

基質が複数のビーズであり、ここで前記ビーズが約 100 ミクロン径以下であることを特徴とする請求項 17 記載の免疫吸着物質。

【請求項 19】

基質が複数のビーズであり、ここで前記ビーズが約 10 ミクロン径以下であることを特徴とする請求項 17 記載の免疫吸着物質。

【請求項 20】

基質が複数のビーズであり、ここで前記ビーズが約 5 ミクロン径であることを特徴とする請求項 17 記載の免疫吸着物質。

10

【請求項 21】

基質が重合されたアガロースであることを特徴とする請求項 18 記載の免疫吸着物質。

【請求項 22】

基質がタンパク質のヒスチジntag 標識部分と結合できる金属リガンドを含むことを特徴とする請求項 17 記載の免疫吸着物質。

【請求項 23】

前記金属リガンドと請求項 17 記載の抗体との間に更に化学結合を含むことを特徴とする免疫吸着物質。

20

【請求項 24】

サンプル内のホスホチロシン含有タンパク質の存在を検出する方法であって、サンプルを請求項 1 または 2 記載の抗体と接触させ、反応性を試験するステップを含み、ここで正の反応が前記サンプル内でホスホチロシン含有タンパク質またはポリペプチドの存在を示すことを特徴とする方法。

【請求項 25】

請求項 24 記載の方法であって、サンプルを試験するステップが、更にモノクローナル抗体を含む免疫吸着物質にサンプルを接触させることを含むことを特徴とする方法。

【請求項 26】

請求項 24 記載の方法であって、試験のステップが、更に免疫学光法、放射線免疫検定法、免疫沈降法、補体結合反応、競合反応、ウエスタンブロット法、免疫組織化学、フローサイトメトリー、および固相酵素免疫検定法 (ELISA) より成るグループから選択された方法による試験を含むことを特徴とする方法。

30

【請求項 27】

精製または高純度免疫グロブリンを産生する方法であって、以下のステップ、すなわち

(a) 精製されヒスチジntag 標識免疫グロブリンを産生するために精製される免疫グロブリンの重鎖成分の C 末端端部にヒスチジntag 標識配列を挿入し、

(b) 中性条件下で固定化金属アフィニティークロマトグラフィーにより前記ヒスチジntag 標識重鎖ポリペプチドを精製し、また特異的に免疫グロブリンの酸性 pH への露出を

40

予防し、
(c) 精製ヒスチジntag 標識高純度免疫グロブリンを回収する、
ステップを含む方法。

【請求項 28】

請求項 27 記載の方法であって、ここで前記ヒスチジntag 標識重鎖成分が、前記ヒスチジntag 標識重鎖成分をコード化するポリヌクレオチドの発現により産生されることを特徴とする方法。

【請求項 29】

請求項 27 記載の方法であって、ここでステップ (b) での前記 pH が、5.0 の pH 以下になることが許容されないことを特徴とする方法。

50

【請求項 30】

請求項 27 記載の方法であって、ここでステップ (b) での前記 pH が、6.0 の pH 以下になることが許容されないことを特徴とする方法。

【請求項 31】

請求項 27 記載の方法であって、ここで精製される抗体が請求項 4 記載の抗体であることを特徴とする方法。

【請求項 32】

請求項 27 乃至 30 のいずれか 1 項記載の方法により産生されることを特徴とする免疫グロブリン。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】**【発明の属する技術分野】**

本出願は、2000年9月1日にアメリカ合衆国に出願されたアメリカ合衆国特許出願番号 09/653,755 号に基づいて優先権を主張し、その開示は全体を引用例としてここに組み込まれる。

【0002】

本発明は、組換えモノクローナル抗体と、臨床および診断手順を含む科学的手順での用途、とりわけそのようなプロセスがホスホチロシン含有タンパク質の検出を伴う場合での用途に関する。

【0003】

20

【従来の技術】

細胞成長、とりわけ癌で見られる調節できない成長は、少なくとも部分的には、チロシンの水酸基にリン酸塩を加えるプロテインキナーゼの機能に帰属されてきた。同様に、ラウス肉腫ウイルスおよびマウス白血病ウイルスなどの実体による細胞の癌遺伝子形質転換は、ウイルスコード化タンパク質と形質転換細胞で見出されるタンパク質の両方で見られるホスホチロシンの水準で、少なくとも 1 桁大きい著しい増加を来たす。チロシンキナーゼは、このような形質転換プロセスに密接に関係するものと考えられている。

【0004】

ホスホチロシン残基を含有するタンパク質に特異的な抗ホスホチロシンモノクローナル抗体は、このような形質転換プロセスを研究するに際し、また同じくタンパク質でのホスホチロシン残基の検出と、このような成分を含有するタンパク質の検出において、価値のあることが証明された。かくして形質転換生体に存在する癌遺伝子が、未形質転換細胞内で天然同等物または類似体を持つことが発見されたために、チロシンキナーゼは胚発展または再生の間を多分含めて、正常な成長調節に関係してきている。従ってこのようなタンパク質に対して向けられた特異性を持つかなりの量のモノクローナル抗体の利用可能性は、とりわけ方法が大規模でのこのような抗体の産生に利用できる場合には、多大な価値を持つことができる。例えば、モノクローナル抗体は、チロシンキナーゼに対する細胞基質の同定を促進することができ、またその基質のアフィニティー精製を可能にすると共に、疾病をスクリーニングしまた検出するのにきわめて有用であることが示された。

30

【0005】

40

ハイブリドーマの使用を含むものなどのような近代技術は、これらの抗体が、ホスホチロシン含有タンパク質およびポリペプチドに特異的であるような場合に、一般診断および臨床手順に有用な同様な源の高度に特異的で潜在能力のあるモノクローナル抗体を、研究者や臨床医に利用できるようにした。中でもより有用なモノクローナル抗体は、4G10 ハイブリドーマ細胞系から誘導されたものである。4G10 モノクローナル抗体は、小田他、血液、88 巻 (11 号) : 4304 - 13 ページ (1996 年 12 月 1 日刊) により詳細に記載されている。Crkl は、慢性骨髄性白血病患者からの血小板でリン酸化され、トロンボポエチンで刺激された正常血小板で誘導的にリン酸化された構造的チロシンである。しかしこのような抗体が有用である一方、それらは純粋な形態で産生することは容易なことではない。例えば、4G10 細胞系は、必要な抗体の低生産者であり、従ってそれ

50

らが投入される異なった用途すべてを支持するのに十分な量でそのような抗体を得ることは困難であり、また非常に高価である。加えて、一つのロットからも一つのロットへの前記抗体量は、大抵の研究者や臨床医に必要とされるものよりも少ない。

【0006】

より特異的には、精製Hisタグ標識組換え抗体は、ハイブリドーマ源から得られるものよりもより純度が高い。ハイブリドーマタンパク質A精製4G10は、未だに同定されない重鎖ダブレットを持ち、一方本発明のIMAC精製組換え抗体は、高度に純粋で単一重鎖バンドと軽鎖バンドを持つ。更に4G10のホスホチロシン結合性能は、酸露出に感受性であり、必要とされる低pH条件でのタンパク質AまたはGカラムからの溶離は、部分不活性化、従って特異的活性の低下に導かれる。

10

【0007】

本発明はこのような問題を解決し、4G10ハイブリドーマ細胞系から誘導されるものと同じ、または類似した有用性と特異性を含む組換えモノクローナル抗体を提供し、しかも随伴的な高い特異的活性と性能の一貫性を持ちより高い純度を示す組換えモノクローナル抗体を提供する。とりわけ有用なものは、本発明の免疫グロブリンのヒスチジンタグ標識形態である。Hisタグ標識は中性pH条件下でIMAC(固定金属アフィニティークロマトグラフィー)精製を可能にし、そのため組換え抗体は、低pH条件に露出されることは決してない。より大きな純度は、もち論臨床用途でより高度に有用である。

【0008】

Hisタグ標識は、固相用途でのニッケルマトリックスに対し、配向様式での組換え抗体または免疫グロブリンの付着を容易にするという点で、同じように有用である。かくしてHisタグ標識組換え形態はとりわけ有用である。ここに開示された方法は、かくして一般により高い特異活性を持つより純粋でより均一な産物を産出する。

20

【0009】

【発明の簡単な概要】

本発明は、ホスホチロシン成分を含むタンパク質およびポリペプチドに指向する特異性を持つ組換えモノクローナル抗体に関する。

【0010】

従って本発明の目的は、ホスホチロシン含有タンパク質およびポリペプチドに対する特異性を持つ組換えモノクローナル抗体を提供することにある。

30

【0011】

本発明の更なる目的は、そのヌクレオチド配列が、前記組換え抗体および免疫グロブリンの重鎖と軽鎖をコードするcDNAsなどのようなポリヌクレオチドを提供することにある。

【0012】

更にまた本発明の目的は、ホスホチロシン含有タンパク質およびポリペプチドに特異的な組換え抗体を提供することであり、ここで前記抗体はアミノ酸配列および他のタグで標識され、それが研究、診断および臨床目的に前記抗体を使用する際に、それらを容易に分離可能にし、また多様性をもたらすことになる。

【0013】

本発明のも一つの目的は、研究、診断および臨床目的のためにここで開示された組換え抗体を使用する方法を提供することである。

40

【0014】

【発明の詳細説明】

分子生物学と組換え技術についての方法の到来に伴ない、組換え手段により抗体分子を産生し、これにより抗体のポリペプチド構造で見出される特異的アミノ酸配列をコードする遺伝子配列を生成することが今では可能となっている。このような抗体は、前記抗体のポリペプチド鎖をコード化する遺伝子配列をクローニングするか、または特異的エピトープと抗原決定基に親和性を持つ活性四量体(H₂L₂)構造を形成するために、合成鎖の試験管内アセンブリーで前記ポリペプチド鎖の直接合成によるかのいずれかで産生すること

50

ができる。これは異なる種と源からの中和抗体の配列特性を持つ抗体の容易な産生を可能にした。

【0015】

抗体の源には関係なく、または抗体がいかに組換え構築されたか、あるいはウシ、ヤギ、ヒツジなどの遺伝子導入動物を用いて、実験室またはバイオリクターなどの商業的規模の大型細胞培養器を用いて、もしくはプロセスのどの段階でも生体を用いない直接化学合成により、試験管内または生体内でいかにして抗体が合成されるかに拘らず、すべての抗体は類似の全体的な3次元構造を持つ。この構造はしばしばH₂L₂として与えられ、抗体が2個の軽(L)アミノ酸鎖と2個の重(H)アミノ酸鎖を含むという事実を引用する。両鎖は構造的に相補抗原標的と相互作用できる領域を持つ。標的と相互作用する領域は「可変」すなわち「V」領域として引用され、異なる抗原特異性からのアミノ酸配列の差異により特徴付けられる。

10

【0016】

HまたはL鎖のいずれかの可変領域は、抗原標的に特異的に結合することのできるアミノ酸配列を含有する。これらの配列内では、「超可変」と名付けられたより小さな配列があり、その命名の理由は、異なる特異性の抗体の間での極端な可変性のためである。このような超可変領域は、「相補性決定領域」すなわち「CDR」領域としても引用される。このようなCDR領域は、特定の抗原決定基構造に対する抗体の基本的特異性を説明するものとなる。

【0017】

CDRsは、可変領域内でのアミノ酸の非隣接伸長部を表すが、種にかかわらず、可変重鎖領域および軽鎖領域内でのこれら臨界アミノ酸配列の位置的配置は、可変鎖のアミノ酸配列内でも、類似の配置を持つことが発見された。すべての抗体の可変重鎖および可変軽鎖は、それぞれ3個のCDR領域を持ち、そのそれぞれは各軽(L)鎖および重(H)鎖に対して(L1, L2, L3, H1, H2, H3と名付けられており)他のものとは隣接していない。一般に認められているCDR領域は、カバット他、生物学化学ジャーナル、252巻：6609-6616ページ(1977年)に記載されたものである。番号設定計画は図で示されており、ここでCDRはアンダーラインを付与され、番号はカバット計画に基づいている。

20

【0018】

すべての哺乳類種においては、抗体ポリペプチドは定常領域(すなわち高保存的領域)と可変領域を含有し、また後者では、CDRsと、重鎖または軽鎖の可変領域内にあるがCDRの外側にあるアミノ酸配列で構成された所謂「枠組み構造領域」が存在する。

30

【0019】

前記に従って、本発明は、ホスホチロシン成分を含むタンパク質とポリペプチドに指向する特異性を持つ組換えモノクローナル抗体に全般的に指向される。

【0020】

本発明は、更に推定アミノ酸配列(配列識別番号4, 5または6)を持つポリペプチド、同じくこのようなポリペプチドの免疫活性断片、類似体および誘導体に関する。

【0021】

ポリペプチド(配列識別番号4, 5または6など)を引用する場合に、「断片」「誘導体」および「類似体」という用語は、このようなポリペプチドと同じ生物学的機能または活性を基本的に保持する断片、誘導体または類似体を意味する。かくして類似体は、活性成熟ポリペプチドを産生するために、プロタンパク質部分の切断により活性化できるプロタンパク質を含む。このような断片、誘導体および類似体は、生ポリペプチドの免疫活性および/または特異性が保持されるように、配列識別番号4, 5または6のポリペプチドに対する十分な類似性を持たねばならない。本発明に従って、抗体を構成する場合には、このような断片はFabおよびF(ab)₂断片を含むであろうが、本発明は決してこのような断片のみに限定されるものではない。

40

【0022】

50

本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然ポリペプチドであることができ、または一般に合成ポリペプチド、すなわち天然に発生するポリペプチド以外のポリペプチド、望ましくは組換えポリペプチドを意味し、ここで開示された免疫特異性および/または活性を持ち、その免疫活性断片を含むものであってもよい。本発明のポリペプチドを形成する抗体は、1個の重鎖と1個の軽鎖のみより成る天然で二量体のものでもあり、キメラまたはヒト化もしくは他の形態の組換え抗体であってもよい。

【0023】

本発明の免疫グロブリンは、配列識別番号4, 5または6の配列にほぼ同一のアミノ酸配列を持つものを含む。ここで使用されるように、「ほぼ同一」という用語は、ここで開示された配列に少なくとも98%同一の配列、または1個もしくはそれ以上のアミノ酸残基が、置換されるアミノ酸と同じ化学的性質のものである保存または非保存アミノ酸残基(望ましくは保存アミノ酸残基)と置換される場合、例えば疎水性残基が他の疎水性残基に置換され、または酸性残基がも一つの酸性残基により置換され、あるいは塩基性残基がも一つの塩基性残基と置換され、もしくは極性残基がも一つの極性残基と置換され、とりわけそれぞれのアミノ酸が類似のサイズのものである場合などの配列を含むことを意味する。このようなアミノ酸は、類似のサイズと化学的性質のアミノ酸によっても置換されるが、しかしそれは遺伝コードで通常コードされるアミノ酸ではなく、または1個あるいはそれ以上のアミノ酸残基が特殊な置換基を含む場合のものである。本発明の精製または高純度免疫グロブリンは、ポリペプチドの半減期を増加するための化合物(例えばポリエチレングリコールなど)と融合され、あるいは追加のアミノ酸は、リーダー配列または分泌配列、もしくは成熟ポリペプチドまたはプロタンパク質配列の精製に使用される配列などと融合される。このような類似体は、ここでの教示から当業者の範囲内にあるものと見做される。

10

20

【0024】

本発明の免疫グロブリンは、望ましくは分離された形態で提供され、また望ましくは均一性に精製される。

【0025】

本発明のポリペプチドの断片または部分は、ペプチド合成によって対応する全長ポリペプチドを生成するために使用される。つまりこれらの断片は、全長ポリペプチド生成用の中間生成物として使用することができる。本発明のポリヌクレオチドの断片または部分は、本発明の全長ポリヌクレオチドの合成に使用される。

30

【0026】

ここで使用されるように、ポリペプチドに関連して使用される場合の、「部分」、「セグメント」、「断片」という用語は、アミノ酸残基等の残基の連続配列で、長尺の配列の部分集合を形成する配列を引用する。もしポリペプチドが、例えばトリプシン、キモトリプシン、などの一般のエンドペプチターゼ酵素で処理されると、処理の結果生成されたオリゴペプチドは、出発原始ポリペプチドの部分、セグメントまたは断片を表すものとなるであろう。

【0027】

前記に従って、本発明は、4G10モノクローナル抗体(アップステート バイオテクノロジー, インコーポレイテッド, レイク プラシッド, ニューヨークから商業的に利用可能)と同じ特異性を持つ精製または高純度免疫グロブリンに関する。その用語が直接化学合成を含めてどのように調製されたかに拘らず、モノクローナル抗体などのような抗体を含むこの精製免疫グロブリンは、2個の軽鎖成分と2個の重鎖成分とを含み、ここで前記重鎖成分は、ゲル電気泳動で単一バンドを提示する。これまでに利用できる商業利用可能形態は、重鎖ダブレットを提示し、従って本発明の精製免疫グロブリンよりも低い特異活性と複製能力を示す(比較は図5で示される)。ここで使用されるように、「精製」および「高純度」または「高精製」という用語は、4G10抗体と同一またはほぼ同一の特異性を持つ免疫グロブリンを引用するが、本発明の免疫グロブリンまたは抗体により示されるものと類似のゲルパターンを示し、とりわけここでは、それらは図5で示されるように

40

50

、単一重鎖バンドのみを示し、これまでに利用できる4G10モノクローナル抗体で見出されるダブレットは示さない。

【0028】

一つの実施例において、本発明の高純度または精製免疫グロブリンは、ヒスチジントグ領域を含む。改めて本実施例は、一般に2個の軽鎖成分と2個の重鎖成分とを含み、ここで前記重鎖成分は、ゲル電気泳動で単一バンドを提示する。特異的な実施例において、前記ヒスチジントグは、前記抗体または免疫グロブリンの重鎖成分の部分である。

【0029】

本発明の特異的な実施例において、ここで開示された分離ポリペプチドは、とりわけアミノ酸の特異的配列が、例えば、(配列識別番号6などと共に)一連の6ヒスチジン残基などのヒスチジン残基より成るアミノ酸の特異的配列、および前記ヒスチジン配列などの標識を本発明のポリペプチドに付着させることが必要な前記ポリペプチドでのいずれかの追加変更、を含むタグまたは他の標識を含む。このような配列は、一般にしかし、必ずしもそうである必要はないが、ここで開示されたポリペプチドのCOOH末端に付着される。加えて前記ポリペプチドが本発明のポリヌクレオチドによりコード化される場合には、ヒスチジントグ配列をコード化するヌクレオチド配列などのような前記標識配列をコード化するヌクレオチド配列は、本発明のポリヌクレオチド配列の部分であることができる。

【0030】

本発明の特異的な実施例において、配列識別番号6を持つポリペプチドは、重鎖のC末端がヒスチジン残基より成るヘキサペプチド配列に付着される本発明に基づく重鎖ポリペプチドを表すアミノ酸配列の例である。これに対応するものは、配列識別番号3のヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチドであり、これは配列識別番号6のポリペプチドをコード化し、またその3末端では、前記ヒスチジントグ配列をコーディングするヌクレオチド配列を含む。関心事であるポリペプチドにタグを付けるのに有用な他の標識、タグ、およびアミノ酸配列、構成、その他は、本発明の開示を一度共有すれば、当業者にとって間違いなく想起されるであろう。

【0031】

特異的な実施例において、本発明の高純度または精製された免疫グロブリンは、そのアミノ酸配列が配列識別番号4の配列とほぼ同じである重鎖成分を含む。も一つの特異的な実施例において、本発明の精製または高純度免疫グロブリンは、そのアミノ酸配列が配列識別番号5の配列とほぼ同じである軽鎖成分を含む。望ましい実施例では、本発明の高純度または精製免疫グロブリンは、そのアミノ酸配列が配列識別番号4の配列とほぼ同じである重鎖成分と、そのアミノ酸配列が配列識別番号5の配列とほぼ同じである軽鎖成分とを含む。

【0032】

他の特異的な実施例において、本発明の精製または高純度免疫グロブリンは、そのアミノ酸配列が配列識別番号6の配列とほぼ同じである重鎖成分を含む。望ましい実施例において、前記配列は配列識別番号6のそれである。

【0033】

本発明は更に、本発明の抗体が含まれるポリペプチドをコード化する分離ポリヌクレオチド配列に関する。

【0034】

かくして本発明は、このようなポリヌクレオチドの補体を含むここで開示されたポリペプチドをコード化する分離ポリヌクレオチドに関する。本発明の分離ポリヌクレオチドは、cDNAsを含む。特異的な実施例において、このようなポリヌクレオチドは、配列識別番号1, 2および3ならびに、本発明の免疫グロブリンのポリペプチドにほぼ同一であるタンパク質をコードするように十分に同一である配列を含む。このような可変性は更に遺伝コードの縮重に起因するものである。

【0035】

もひとつの見地において、本発明は更に下記のステップ、すなわち

10

20

30

40

50

(a) ヒスチジントグ標識免疫グロブリンを産生するために、精製される免疫グロブリンの重鎖成分のC末端部にヒスチジントグ配列を挿入し、

(b) 中性条件下で固定金属アフィニティークロマトグラフィーにより、前記ヒスチジントグ標識重鎖ポリペプチドを精製し、免疫グロブリンの酸性pHへの露出を特異的に予防し、

(c) 精製されたヒスチジントグ標識高純度免疫グロブリンを回収する、ステップを含む高精製免疫グロブリンを産生する方法に関する。

【0036】

本発明の方法は、更に以下の方法と例でより詳細に記載される。本発明の方法はまた、精製計画を熟考し、ここで重鎖成分は、そのようなタグ標識鎖をコード化するcDNAなどのような前記ヒスチジントグ標識重鎖成分をコード化するポリヌクレオチドの発現により産生される。このようなcDNAの一つの例は、配列識別番号3のポリヌクレオチド配列である。ここで開示される精製方法の一つの新規な見地は、固定金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)ステップの間、中性または相対的に中性のpH条件を使用することであり、ここでいずれの酸性pH露出をも回避することは免疫グロブリンを保護することになり、これにより高純度または高精製免疫グロブリンを産出できることになる。このような方法は、他の高精製免疫グロブリン(すなわち抗体)、あるいは本発明のものとは異なる特異性を持つものに対してさえもその産生に容易に適用することができる。ここでの開示と調子を合わせながら、避けるべきであるのは、6.5およびそれ以下のpH値であり、望ましくは6.0およびそれ以下、もっとも望ましくは5.5およびそれ以下、とりわけ5.0およびそれ以下、もっとも特別には4.0およびそれ以下のpH値である。

10

20

【0037】

従っても一つの見地において、本発明は(これまでおよび、例で詳細に説明されるように)、本発明に基づき開示される産生および精製方法により産生される免疫グロブリンに指向される。

【0038】

本発明において、配列に関連した場合に、「パーセント同一性」または「パーセント同一である」という用語は、ある配列が、記述または特許請求された配列(基準配列という)と比較できるように整列(比較配列という)されたあとで、前記配列が、記述または特許請求された配列(前記基準配列)と比較されることを意味する。そこでパーセント同一性は次式のように定義される：

30

パーセント同一性 = $100 [1 - (C/R)]$

ここでCは、前記基準配列と比較配列との間の全長にわたって、これら基準配列と比較配列との間に存在する差の数であり、ここで、

(i) 比較配列内の対応する整列された塩基またはアミノ酸を持たない基準配列内にある各塩基またはアミノ酸と、

(ii) 基準配列内に存在する各間隙、および

(iii) 基準配列内にあって、比較配列内にある整列された塩基またはアミノ酸とは異なるところの、整列された各塩基または各アミノ酸、

40

とによって一つの差の値が構成される。また、Rは、整列と基準配列とを加えた全長にわたって基準配列内に存在する塩基またはアミノ酸の数であり、基準配列内に生成された何らかの間隙も塩基またはアミノ酸の数として計数される。

【0039】

もし一つの整列が、比較配列と基準配列との間にあって、かつ、この基準配列に対しては、前記計算によるパーセント同一性が、ある特定の最小のパーセント同一性にほぼ等しいか、またはそれよりも大である場合には、前記比較配列は、基準配列に対して、前記特定の最小のパーセント同一性を持つことになる。これは、整列が、前記算定されたパーセント同一性が前記特定のパーセント同一性より少ないところに存在すると思われる場合であっても、その結果に変わりはない。この整列の境界は、基準配列、すなわち比較されるべ

50

き請求された配列の長さである。

【0040】

ここで開示された組換えポリヌクレオチドとポリペプチドは、開示された配列の光の下でその直接化学合成により調製することができ、あるいは分子生物学の技術で公知である組換え手段により調製することができる。従ってここで使用されるように、また特に注記した場合を除いて、すべての用法は以下で与えられるように定義される。

【0041】

本発明に従って、「DNAセグメント」という用語は、分離された断片の形状、または大きなDNA構築物の1成分として、少なくとも一旦はほぼ純粋な形態で分離されたDNAから誘導されたDNAポリマーのことを引用するものであり、ここで純粋とは、内因的な汚染物質を含まないこと、すなわちそのDNAポリマーの量または濃度が、前記セグメント、およびその成分ヌクレオチド配列の同定、操作、および回収を、通常の生化学的方法、例えばクローニングベクターを使用することによって実行可能である程度に純粋であることを言う。これらのセグメントは、オープンリーディングフレームの形、すなわち翻訳されない内部配列、または真核遺伝子中に普通に存在するイントロン(DNAの介在配列)によって遮断されないという状態で提供される。翻訳されないDNAの配列は、オープンリーディングフレームから下流、すなわちコーディング領域の操作あるいは発現によって干渉されない位置に存在する。

10

【0042】

本発明に従って開示された核酸およびポリペプチド発現産物、並びにこれらの核酸および/またはこれらのポリペプチド発現産物を含有する発現ベクターは、「濃縮形態」という形で得られる。ここで言う「濃縮」とは、物質の濃度が、例えば自然濃度の少なくとも約2, 5, 10, 100あるいは1000倍であることを意味し、望ましくは、0.01重量%、望ましくは少なくとも約0.1重量%である。重量%で約0.5%, 1%, 5%, 10%および20%の濃縮調製物も適用可能である。本発明を含む配列、構築物、ベクター、クローンおよびその他の物質も、望ましくは濃縮または分離した形で得られる。

20

【0043】

本発明の、ポリペプチド(またはポリヌクレオチド)に関連する記述中において、ポリペプチドが「分離される」とは、このような物質が初めの環境(例えばもしそれが自然発生の場合ならば、自然の環境)から取り出されることをいう。例えば、生物体内に存在する自然生成のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは分離されないが、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドでも、それが自然系内の共存物質の一部または全部から取り出されたものは分離されるのである。そのようなポリヌクレオチドが、ある一つのベクターであり得るか、および/またはそれらのポリヌクレオチド、あるいはポリペプチドが、ある一つの組成物の一部であり得るであろうということであり、それらは確かに分離されるが、しかもそのようなベクターまたは組成物が、依然として自然環境の一部ではない、という事情は変わらない。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、望ましくは分離形態で提供され、更に望ましくは、均質な状態になるまで精製される。

30

【0044】

本発明に基づくポリヌクレオチド、および組換えまたは免疫原性ポリペプチドもまた、「精製」された形態にあることができる。「精製」という用語は、必ずしも絶対的な純度を要求するものではなく、むしろ相対的な定義を意図するものであって、関連技術において通曉した人々によって理解される用語として、きわめて高度に精製して調製されたものも、または部分的に精製されて調製されたものも包含されるものとする。例えばcDNAライブラリーから分離された個々のクローンは、電気泳動的な均質性まで精製されてきている。原始物質の精製は、少なくとも望ましくは2または3桁の段階まで、より望ましくは4または5桁の段階まで精製される。更に、重量%で、望ましくは0.001%、あるいは少なくとも0.01%または0.1%の、および更に望ましくは、重量で1%の要求されるポリペプチドも明らかに好適である。

40

【0045】

50

「コーディング領域」という用語は、自然的なゲノム環境において、遺伝子の発現産物に対して、自然的にまたは通常的にコードするその遺伝子の部分であり、これは生体内で遺伝子の原始の発現産物に対してコードする領域である。このコーディング領域は、正常の、変異された、または改変された遺伝子からのものであり、さらにまたDNA配列または遺伝子から、DNA合成に通常の知識を有する者によって知悉された方法により、すべて研究室で合成することができる。

【0046】

本発明に従って、「ヌクレオチド配列」という用語は、デオキシリボヌクレオチドのヘテロポリマーを引用する。一般に本発明によるタンパク質をコード化するDNAセグメントは、cDNA断片と短いオリゴヌクレオチドリンカーとから、または一連のオリゴヌクレオチドから組立てられ、かくして微生物またはウイルスオペロンから誘導された調節要素より成る組換え転写単位内において発現されることが可能な一つの合成遺伝子が形成される。

10

【0047】

「発現産物」という用語は、遺伝コード縮重の結果生じた等量を解読し、かくして同じアミノ酸に対してコード化する遺伝子および何らかの核酸配列の自然的な翻訳産物であるところのポリペプチドまたはタンパク質を意味する。

【0048】

コーディング配列に関連した場合に、「断片」という用語は、発現産物が、完全なコーディング領域の発現産物としての同一の生物学的機能または活性を基本的に保持するような、完全なコーディング領域以下より成るDNAの一部を意味する。

20

【0049】

「プライマー」という用語は、1個のDNA鎖と対になって、DNAポリメラーゼがデオキシリボヌクレオチド鎖の合成を開始する場所となる遊離の3' OH末端を与えるところの短い核酸配列を意味する。

【0050】

「プロモーター」という用語は、RNAポリメラーゼ(重合酵素)を連結して転写を開始することに関与するDNAの一部を意味する。

【0051】

「オープンリーディングフレーム」(ORF)という用語は、終止コドンなしでアミノ酸をコード化する一連のトリプレット(コドン、三塩基連鎖)であって、タンパク質へと(潜在的に)翻訳可能な一つの配列である。

30

【0052】

本発明において、一つのDNA配列は、一本鎖DNAと二本鎖DNAとを含む。かくして特に異なる指定のない限り、特定の配列には、特定配列の一本鎖DNAと、その補体が付随した配列の二重らせん(二本鎖DNA)と、そのような配列の補体とがある。

【0053】

ここで開示された組換え手順に使用される方法は、サンプルック他、分子クローニング：実験室マニュアル、第2版、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク(1989年)、ウー他、遺伝子バイオテクノロジーにおける方法、(CRCプレス、ニューヨーク、1997年)、および組換え遺伝子発現プロトコル、分子生物学における方法、62巻所収(トゥーアン他、フマーナ・プレス、トトワ、ニュージャージー、(1997年)などの概論に記載されており、これらの文献の開示内容は、その全体を本願明細書の一部として組み込まれている。

40

【0054】

本発明は更に、機能的抗原特異的免疫グロブリン分子に関し、それは軽鎖および重鎖、または2個の軽鎖および2個の重鎖のいずれかより成る二量体または四量体構造を含む。本発明の高純度または精製免疫グロブリンは、図5に記載され、また4G10ハイブリドーマ細胞から産生される、現在利用可能な4G10モノクローナル抗体とは区別され、ゲル上の重鎖に対し単一バンドを示す。もち論類似のサイズと化学的性質を持つアミノ酸の置

50

換は、本発明の免疫グロブリンを作り上げる軽鎖および重鎖ポリペプチドの配列を変更するであろうが、ここで開示されたように、ゲル運転で著しく異質のバンドを産生することはないし、かくして現在既知の4G10モノクローナル抗体からは、未だに異なるものとなる。

【0055】

他の実施例においては、本発明は更に、4G10モノクローナル抗体と同じ、または類似の抗原特異性を提示する、精製または高純度免疫グロブリンあるいはモノクローナル抗体に関し、ここで前記抗体は、タンパク質を含有するホスホチロシンと正の反応性を示す。

一つの実施例において、このような精製されまたは高純度免疫グロブリンは、

(a) タンパク質を含有するホスホチロシンとの正の反応性、および

10

(b) ホスホセリンまたはホスホルトレオニンタンパク質との反応性の欠如、を実証する。

【0056】

本発明の他の実施例において、このような免疫グロブリンは、動物細胞からのホスホチロシン含有タンパク質との正の反応性を示し、とりわけ抗体がヒト細胞からのホスホチロシン含有タンパク質との正の反応性を示す場合はそうである。

【0057】

本発明は更に、ここで開示されたポリヌクレオチドを含むベクターに関し、また前記ベクターで形質移入または形質転換された後に、前記ポリヌクレオチドを発現することのできる組換えまたは遺伝子操作細胞に関し、とりわけ特別には、発現されたポリヌクレオチドが細胞から分泌されるポリペプチドに帰着する場合のそれらの細胞に関する。

20

【0058】

一つの実施例では、細胞はここで開示された1個またはそれ以上のベクターで形質移入されて組換え細胞を形成し、この組換え細胞は、前記ベクターに含有されるポリヌクレオチドを発現して少なくとも2個の異なるポリペプチドを形成し、ここで各ポリペプチドは、本発明に基づく抗体の重鎖または軽鎖のいずれかを表わす。このような実施例において、一つの組換え細胞は、本発明に基づく抗体のために軽鎖をコード化するポリヌクレオチドと、重鎖をコーディングするポリヌクレオチドを発現する。このような抗体は次いで細胞内で組立てられ、抗原と結合できる形態で分泌される。

【0059】

このように細胞を遺伝子操作する方法は、文献上で公知である[例えば、モリソン他、アメリカ合衆国特許番号第5,807,715号で開示された方法を参照されたい。この開示は、全体として本出願に引用例として組み込まれている。また越智他、全米科学アカデミー紀要、80巻、6351-55ページ(1983年)、ジョンソン、アメリカ合衆国特許番号第5,824,307号を参照されたい]。このような方法に有用な細胞は、骨髄腫、ハイブリドーマ、プラズマ細胞腫などのリンパ球系細胞、およびCHO細胞などの細胞系である。

30

【0060】

本発明の組換え細胞は、ヒト細胞からのホスホチロシン含有タンパク質と正の反応性を示す抗体を産生する細胞を含む。

40

【0061】

宿主細胞は、例えばクローニングベクターまたは発現ベクターである本発明のベクターで遺伝子操作(形質導入または形質転換あるいは形質移入)される。ベクターは、例えばプラスミド、ウイルス粒子、ファージ、その他の形態であることができる。遺伝子操作宿主細胞は、本発明のプロモーターを活性化し、形質転換体を選択し、または遺伝子を増幅するのに適したように修飾される従来の栄養培地で培養することができる。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択される宿主細胞でこれまでに使用されたものであり、従来の技術に習熟した人々にとっては明らかなものである。

【0062】

本発明のポリヌクレオチドは、組換え技術によりポリペプチドを産生するのに使用するこ

50

とができる。かくして例えば、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドを発現する各種の発現ベクターのいずれか一つに含まれる。このようなベクターは、染色体、非染色体および合成DNA配列、例えばSV40の誘導體；細菌プラスミド；ファージDNA；バキュロウイルス；酵母プラスミド；ワクシニア，アデノウイルス，鶏痘ウイルス，仮性狂犬病などのプラスミドとファージDNA，ウイルスDNAなどの組合せから誘導されるベクターを含む。しかしそれが複製可能で宿主内で生存可能な限り、いずれか他のベクターを使用することもできる。

【0063】

適切なDNA配列は、各種の手順により、ベクター内に挿入することができる。一般にDNA配列は、従来公知の手順により、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。このような手順その他は、従来技術の範囲内にあるものと見做される。

10

【0064】

発現ベクター内のDNA配列は、適切な発現調節配列（プロモーター）に遺伝子操作で連結され、mRNA合成に指向する。前記プロモーターの代表的な実例としては、原核細胞または真核細胞、あるいはそれらのウイルス内の遺伝子の発現を調節するものとして知られているLTRまたはSV40プロモーター、大腸菌lac、またはtrp、ファージラムダP_Lプロモーターおよびその他のプロモーターがある。また発現ベクターには、翻訳開始のためのリボゾーム結合部位、および転写終結配列が含まれる。更に発現ベクターには、発現を増幅するための適切ないくつかの配列も含まれている。

【0065】

更に発現ベクターには、望ましくは選択可能な一つまたは複数個の標識遺伝子が含まれ、これによって形質転換された宿主細胞の選択に対して必要な、例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ耐性等の表現型特質を提供するものであり、あるいは真核細胞培養のためのネオマイシン耐性、もしくは大腸菌内におけるテトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性を提供するものである。

20

【0066】

ここに記載した適切なDNA配列より成るベクター、ならびに適切なプロモーターまたは調節配列は、適切な宿主を形質転換するために使用され、その宿主が所定のタンパク質を発現できるようにする。

【0067】

前記適切な宿主の代表的な実例としては、大腸菌、ストレプトミセス属、ネズミチフス菌等の細菌細胞；酵母菌等の菌類細胞；ショウジョウバエ S2およびSpodoptera Sf9等の昆虫細胞；CHO、COSまたはBowes黒色腫等の動物細胞；アデノウイルス；および植物細胞等である。適切な宿主の選択は、この明細書中の記載により当該技術分野における通常技術を有する人の範囲内にあると見做される。

30

【0068】

更に詳細には、本発明は前記広範囲に記載の一つまたはそれ以上の配列より成る遺伝子組み換え構築物が包含される。この構築物は、前進または復帰方向に配向して、本発明の配列が挿入されたプラスミド、またはウイルスベクター等の一つのベクターを備える。この実施例の望ましい見地においては、前記構築物は、更に、例えば前記配列と遺伝子操作で連結されたプロモーターより成る調節配列を有する。きわめて多数の適切なベクターおよびプロモーターが従来技術に習熟した人に知られ、商業的に入手可能である。下記各ベクターは、それらの実例であり、細菌系では：pQE70，pQE60，pQE-9（以上製造者名キアーゲン）；pBS，pD10，ファージスクリプト，psix174，pBluescript SK，pBSKS，pNH8A，pNH16a，pNH18A，pNH46A（以上製造者名ストラタジーン）；pTRC99a，pKK223-3，pKK233-3，pDR540，pRIT5（以上製造者名ファルマシア）；真核細胞系では：pWLNEO，pSV2CAT，pOG44，pXT1，pSG（以上ストラタジーン）；pSVK3，pBPV，pMSG，pSVL（以上ファルマシア）等である。なお宿主内で複製可能で生存可能なならば、いずれのプラスミドあるいはベクターも使用

40

50

できる。

【0069】

プロモーター領域は、CAT（クロラムフェニコール トランスフェラーゼ）ベクターまたは選択可能な遺伝標識を持つ他のベクターを使用することによって、任意の望ましい遺伝子から選択することができる。2個の適切なベクターは、pKK232-8およびpCM7である。特に列挙すべき細菌プロモーターは、lacI, lacZ, T3, T7, gpt, ラムダP_R, P_L, およびtrpである。真核プロモーターは、CMV即時初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルスからのLTRs、およびマウスメタロチオネイン-1である。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、この技術分野の通常の技術の水準内に十分に属する。

10

【0070】

更に他の実施例では、本発明は前記構築物を含む宿主細胞に関する。この宿主細胞は、哺乳動物細胞のような高度な真核細胞でも、酵母菌細胞のような低位の真核細胞でも、また細菌細胞のような原核細胞であってもよい。前記構築物の宿主細胞への導入は、リン酸カルシウム形質移入、DEAEデキストラン仲介形質移入、エレクトロポレーション（電気穿孔法）によって実行可能である（デービス, L., ジブナー, M., バッティ, I., 分子生物学における基本的な方法（1986年）を参照されたい）。

【0071】

宿主細胞内の構築物は、組み換え配列によってコード化された遺伝子産物を産生する従来の様式で 사용할ことができる。選択肢として、本発明のポリペプチドは、従来のペプチド合成機により合成することができる。

20

【0072】

成熟タンパク質は、哺乳類の細胞、酵母菌、細菌または適切なプロモーターで調節された他の細胞内で発現させることができる。細胞のない翻訳組織も、本発明のDNA構築物から誘導されたRNAを使用して前記成熟タンパク質を産生するために使用することができる。原核および真核細胞宿主と共に使用される適切なクローニングおよび発現ベクターは、サムブルック他, 分子クローニング: 実験室マニュアル, 第2版, コールド・スプリング・ハーバー, ニューヨーク（1989年）に記載されている。この文献の開示内容は、本願明細書の一部としてここに組み込まれている。

【0073】

高級な真核細胞によって本発明のポリペプチドをコード化するDNAの転写は、ベクター内にエンハンサー（シスエレメント）配列を挿入することによって促進される。エンハンサーは、DNAのシス作用要素であって、通常約10ないし300塩基対より成り、プロモーターに作用してその転写を促進させる。実例としては、塩基対の複製起点の100ないし270塩基対だけ後期側にあるSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、塩基対の複製起点の後期側にある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等である。

30

【0074】

一般に、組み換え発現ベクターは、複製起点、および宿主細胞の形質転換を可能にする選択可能な遺伝標識、すなわち、大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子、ビール酵母菌Trp1遺伝子、下流構造配列の転写を生起させる高度発現遺伝子から誘導されたプロモーター等である。これらのプロモーターは、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）、因子、酸性ホスファターゼ、熱ショックタンパク質、その他等の解糖酵素をコード化するオペロンから誘導することができる。異種構造配列は、翻訳開始および終結配列、望ましくはさらに、翻訳されたタンパク質を細胞周辺腔または細胞外培地へ分泌させることが可能なリーダー配列より成る適切な段階を経て組み立てられる。選択肢として、前記異種配列は、被発現組み換え産物の安定化または単純精製などの望ましい特性を与えるN末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコード化することができる。

40

【0075】

細菌用の有用な発現ベクターは、望ましいタンパク質をコード化する構造DNA配列と、

50

適切な翻訳開始および終結信号とを、機能プロモーターを有する操作可能な読み取り相に挿入する。このベクターは、一つまたはそれ以上の表現型選択可能な遺伝標識と複製起点とを備え、ベクターの維持を可能にし、必要に応じ、宿主内での増幅を可能にする。形質転換用の適切な原核宿主は、大腸菌、枯草菌、ネズミチフス菌ならびにシュードモナス属、ストレプトミセス属およびブドウ球菌属の種々の種があるが、その他も必要に応じ選択の問題として使用できる。

【0076】

代表的ではあるが限定されない実例として、細菌用の有用な発現ベクターは、公知のクローニングベクター pBR322 (ATCC 37017) の遺伝的要素より成る市販入手可能のプラスミドから誘導された選択可能な遺伝標識、および細菌複製起点を含むことができる。このような市販のベクターは、例えば pKK223-3 (製造者名ファルマシア・ファイン・ケミカルズ, ウプサラ, スウェーデン) および GEM1 (製造者名プロメガ・バイオテック, マジソン, ウイスコンシン, アメリカ合衆国) である。前記 pBR322 の「バックボーン」部分は、適切なプロモーターおよび発現されるべき構造配列に結合されている。

10

【0077】

適切な宿主菌株の形質転換、およびその菌株の適切な細胞密度までの成長に引き続いて、選択されたプロモーターが、適宜の方法 (例えば温度シフトまたは化学的な導入) によって導入され、細胞は更に一定期間培養される。

【0078】

細胞は、遠心分離ののち、物理的または化学的方法で破碎されて通常通りに収穫され、得られた粗抽出物は以後の精製を控えて保存される。

20

【0079】

タンパク質の発現に使用される微生物細胞は、凍結融解、循環、超音波処理、機械的破碎、または細胞溶菌薬剤の使用、等適宜の方法によって破碎されるが、これらはこの技術分野に属する者にとっては周知の方法である。

【0080】

種々の哺乳類細胞培養機構が使用されて、組み換えタンパク質が発現される。哺乳類発現機構の実例は、文献、グラスマン, 細胞, 23巻: 175ページ (1981年) に記載されたサルの腎臓の繊維芽細胞の COS-7系、または適合性ベクターを発現できる種々の細胞系、例えば C127, 3T3, CHO, HeLa および BHK細胞系である。哺乳類発現ベクターは、複製起点、適宜なプロモーターとエンハンサー、および必要なりボゾーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終結配列、および 5' フランキング非転写配列等を含む。SV40スプライスから誘導された DNA配列、およびポリアデニル化部位も使用されて、必要な非転写遺伝要素が提供される。

30

【0081】

本発明のポリペプチドまたは抗体は、ここで開示されたように組換え細胞培養体から回収し、精製することができる。必要に応じ、成熟タンパク質の形状完成のためのタンパク質のリフォールディングステップを適用することもできる。最終的に、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) を IMAC (固定金属アフィニティークロマトグラフィー) と同じように、最終精製ステップとして使用することができる。

40

【0082】

本発明のポリペプチドは、自然的に精製された産物、または化学的な合成手法の産物、あるいは原核もしくは真核細胞の宿主 (例えば細菌、酵母菌、高等植物、昆虫および哺乳類の培養細胞) からの遺伝子組み換え技術により産生された産物のいずれであってもよい。遺伝子組み換え産物過程で使用された宿主に依存して、本発明のポリペプチドは、グリコシル化、あるいは非グリコシル化のいずれかの処理をされる。本発明のポリペプチドは、初期のメチオニンアミノ酸残基を含んでいてもよい。

【0083】

50

本発明はまた、ここで開示された精製または高純度免疫グロブリンおよび微小孔ポリマー基質を含む免疫吸着物質に関する。一つの実施例において、このような微小孔ポリマー基質は複数のビードを含み、前記ビードは、約100ミクロン以下の桁の径を持ち、望ましくは約10ミクロン径以下、もっとも望ましくは約5ミクロン径で、とりわけ望ましい実施例では5ミクロン（またはマイクロメートル）径のビードを使用する。本発明の特異的実施例においては、前記基質は重合されたアガロースである。

【0084】

前記複数のビードなどのような微小孔ポリマー基質を使用するも一つの実施例においては、このような基質は、1個またはそれ以上の金属イオン、または金属リガンドを含み、この金属リガンドは、ヒスチジンタグ標識抗体のヒスチジンタグ標識部分と結合する。この10
ような抗体は、本発明のヒスチジンタグ標識抗体である。これまでに記載したように、このような抗体は、一般に高純度であり、または精製されている（これは、例えば本発明の精製されまたは高純度の4G10特異的抗体で示されたゲルパターンにより測定されたように、ここで開示されたものと同じまたは類似の度合の純度を持つ抗体を意味する）。（金属アフィニティー基質、すなわちとりわけ本発明のヒスチジンタグ標識4G10特異的抗体などのヒスチジンタグ標識タンパク質と結合できる金属リガンドを含む表面、として役立つ）このようなりガンド付着基質は、精製のみ以外の方法で、本発明の抗体のヒスチジンタグ標識部分に付着させるのには有用である。かくしてこのような方法は、検定およびスクリーニングのプロセスに容易に適應され、また精製計画だけに限定されないが、他の異なる用途は、従来の技術に習熟した者に対して間違いなくそれ自身を示唆すると共に20
、しかもそのような用途は、本発明に基づき開示された方法の範囲内にある（ことは間違いない）。

【0085】

前記に従って、本発明は更に、サンプル内のホスホチロシン含有タンパク質の存在を検出する方法に関し、それは本発明の抗体にサンプルを接触させ、その反応性を試験するステップを含み、ここで正の反応は前記サンプル内にホスホチロシン含有タンパク質またはポリペプチドの存在を立証するものとする。

【0086】

本発明の実施例は、サンプルの試験のステップが、更にモノクローナル抗体を含む免疫吸着物質とサンプルを接触させることより成る方法を含む。望ましい実施例においては、試験のステップは更に、免疫蛍光法、放射線免疫検定法、免疫沈降法、補体結合反応、競合的30
反応、ウエスタンブロッティング、免疫組織化学、フローサイトメトリー、および固相酵素免疫検定法（エリザ）より成るグループから選択される方法による検定を含む。

【0087】

本発明のモノクローナル抗体は、ある種の癌を含む各種の疾病の診断で、潜在的な用途を持つホスホチロシン含有タンパク質を分離し、同定するための生物学的医療研究に有用な、高力価で再生産可能な生物学的試薬として役立つ。ホスホチロシン残基を含有する各種の分子に対するアフィニティーを実証した抗体は、対応するcDNAsから組換えにより調製され、4G10ハイブリドーマ細胞系により産生された、商業的利用可能な抗体のそれから区別できない性質を有している。40

【0088】

本発明に基づき開示された抗体の有用性の中でも、チロシンキナーゼの細胞基質を同定して、広範囲でのホスホチロシンタンパク質のアフィニティー精製を可能にし、血小板由来増殖因子（PDGFおよびその細胞受容体）、TGF（腫瘍増殖因子）などの臨床および診断検定を含み、所与の細胞または組織サンプルで、1個または多数のタンパク質のチロシンリン酸化反応状態を測定する用途が存在する。

【0089】

このような有用性の一つの限定されない実例として、細胞または組織サンプルは、本発明のモノクローナル抗体と、収集されたホスホチロシンを含む、タンパク質と結合するモノクローナル抗体の免疫複合体と反応させることができる。このような免疫沈降または免疫50

アフィニティー精製複合体は、所与のサンプルでホスホチロシンタンパク質を同定するために、各種の既知のタンパク質に対する抗体と各種の手順（例えばウエスタンブロッティング、エリザ）により分解し、反応させることができる。この分析は、免疫沈降法またはアフィニティー精製を規模拡大し、ホスホチロシンタンパク質を精製し、それらをエドマン分解法または質量分析法などによるタンパク質配列化などのような分析手順に委ねることにより、新規なホスホチロシンタンパク質の発見に拡張することができる。前記実施例の更なる実施例の一つは、既知のタンパク質の免疫沈降または免疫アフィニティー精製を伴うものであり、ホスホチロシン状態を測定するために、本発明のモノクローナル抗体と生成複合体を反応させることである。

【0090】

単純な TGF 検定法において、尿または血清、あるいは患者からの TGF の潜在的源などの生物学的流体は、例えば A431 からの細胞膜、細胞当たり数多くの受容体を持つヒト表皮癌細胞系などの EGF 受容体の調製物と反応させることができる。アデノシン三リン酸（放射線³²P でガンマリン酸塩に標識されたもの、または³⁵S で標識されたチオ類似体）は、リン酸塩の源として加えられる。TGF の存在下で、EGF 受容体は標識リン酸塩をチロシン残基に取り込むことになるであろう。この反応は次いで終結され、受容体が膜から抽出される。受容体は、次いで（例えば抗体で被覆されたビードを用いて）本発明のモノクローナル抗体と結合され、サンプル内に存在する増殖因子を測定するために放射能が計数される。PDGF の検定は、PDGF 感受性受容体を使用する類似の手順に引き継がれるであろう。他の検定は、神経成長因子受容体、インスリン受容体、インスリン様増殖因子受容体、肉腫ウイルス増殖因子受容体、およびその他を使用する。これらの方法に対する各種の変形、同じくその抗体を使用する他の検定法は、本発明の精神または範囲から離れることなく、従来技術に習熟した人により考案されるであろう。

【0091】

本発明の手順を実行するに当り、特定の緩衝液、培地、試薬、細胞、培養条件その他が、限定されるものではなく、議論が提議される特定の前後関係において、従来技術に習熟した人の一人が関心をもち、価値があると認識するすべての関連する物質を含むように読みとられるべきであることは、当然のことながら理解されねばならない。例えば、一つの緩衝システム、または培養培地をも一つ別のものと置換し、しかも同一ではないにしても類似の結果を達成することはしばしば可能である。従来技術に習熟した者は、過度の実験をすることなく、ここで開示された方法と手順を用いて、彼等の目的に最適に役立つこれらの置換が行えるようなこのようなシステムと方法に関する十分な知識を持つに違いないであろう。

【0092】

本発明は、これから下記の限定されない実施例により、更に詳細に記載されるであろう。これら実施例の開示を行うに際して、本発明に基づき開示された方法の他の異なる実施例も、間違いなく関連する技術に習熟した人にそれ自身を示唆するであろうことはしっかりと心に留めておかねばならない。

【0093】

【発明の実施の形態】

略語：IP, 免疫沈降（法）；HC, 重鎖；LC, 軽鎖；IgG, 免疫グロブリン；Mab, モノクローナル抗体；ELISA, 固相酵素免疫検定法；IMAC, 固定金属アフィニティークロマトグラフィー；SDS-PAGE, ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動；HRP, 西洋ワサビペルオキシダーゼ；ELC, 強化化学発光；PBS, 食塩加リン酸緩衝液；nt, ヌクレオチド, EGF, 上皮増殖因子；EGFr, 上皮増殖因子受容体；CHO, チャイニーズハムスター卵巣細胞。

【0094】

本出願で使用される用語の定義と一般実験手順の説明は、オーサベル, F. M. 他, 分子生物学の最新プロトコル, ワイリー インターサイエンス, ニューヨーク, ニューヨーク, 1999年で見出すことができる。すべてのキットと酵素は、製造業者の指示に基づ

10

20

30

40

50

いて使用された。

【0095】

細胞溶菌液の調製

附着ヒトA431細胞は、2回冷却PBSで洗浄され、次いで細胞をプラスチック製細胞スクレーパーで削り取るにより、氷冷修飾RIPA緩衝液(50mMのトリス塩酸:pH7.4;1%NP-40;0.25%デオキシコール酸ナトリウム;150mM塩化ナトリウム;1mMEDTA;1mMPMSF;それぞれ1マイクログラム/mlのアプロチニン,ロイペプチン,ペプスタチン;1mMのNa₃VO₄;1mMのNaF;1mlの10⁷細胞/100mm皿)で溶解された。細胞懸濁液は遠心管に移され、4、15分ゆっくり揺動して細胞を溶解した。溶菌液は14,000×gで15分遠心分離され、上澄みが直ちに新鮮な管に移された。タンパク質濃度は、クーマシーベース試薬(クーマシー(R)プラスタンパク質検定試薬,ピアス,ロックランド,イリノイ)で測定された。

【0096】

免疫プロット法(ウエスタンプロット法)

個別レーン当り20μgの細胞溶菌液がSDS-PAGEを受け、タンパク質はニトロセルロース膜に移された。ニトロセルロース膜は2回蒸留水で洗浄され、ボンソーレッド溶液で5分染色され、タンパク質バンドを視覚化された。分子量標識はボールペンで標識され、膜は脱脂粉乳3%を含む新鮮調製PBSで20分、室温で絶えず攪拌して遮断された。一次抗体(生または組換え4G10)は、PBS/3%脱脂粉乳で希釈され、膜と共に1乃至2時間室温で、または一晩4で保温される。ニトロセルロース膜は二次抗体(ヤギ抗マウスHRP複合体)で1時間保温される前に5回、それぞれ3乃至5分0.05%トゥーン20含有PBSで洗浄された。膜はECLHRP基質でのタンパク質の最終検出の前に、再び5回洗浄された。

【0097】

マウスIgGエリザ

馴化培地で組換え抗体の水準を測定するために、マウスIgGエリザが、予めコーティングされた96ウエルタンパク質Gストリップ平板を用いて展開された(ピアス,ロックランド,イリノイ)。標準品またはサンプルが、100μl量でウエルに加えられ、37で1時間保温され、次いでPBS3%脂肪乳を30分37で加える前に、PBSで洗浄された。平板は再度洗浄され、100μlの抗マウスHRP二次抗体が1時間37で加えられる。ウエルは次いでPBS内3Xで洗浄され、TMB基質溶液(ピアス,ロックランド,イリノイ)で成育され、50μlの2N硫酸で停止され、450nmで吸光度が測定された。

【0098】

免疫沈降法

タンパク質Aアガロースビードスラリーが、PBSで2回洗浄され、PBSとの50%スラリーで再貯蔵される。細胞溶菌液は、細胞溶菌液1ml当りタンパク質Aアガローススラリー100マイクロリットルを加えることにより、また4で10分オービタルシェーカーで保温することにより事前に清澄化される。タンパク質Aビードは14,000×gで、4で10分遠心分離で除去され、上澄みは新鮮遠心管に移される。細胞溶菌液は、全量500マイクロリットルで免疫沈降抗体(IP抗体)を追加する前に、全細胞タンパク質ml当り約1mgになるようにPBSで希釈される。細胞溶菌液/抗体混合物は2時間または一晩4でオービタルシェーカーで保温される。免疫複合体はタンパク質Aアガローススラリー100マイクロリットルを加えることで捕捉され、1時間または一晩4でオービタルシェーカーで保温される。タンパク質Aビード結合免疫複合体は、5秒、14,000rpmの遠心で収集され、上澄みは廃棄される。ビードは3回、800マイクロリットル氷冷修飾RIPA緩衝液で洗浄され、次いで60マイクロリットルのSDS-PAGE還元緩衝液で再懸濁され、次いでビードから免疫複合体を解離するために5分煮沸される。ビードは遠心により収集され、上澄み分画で行われる。

【 0 0 9 9 】

組換え 4 G 1 0 モノクローナル抗体のクローニング、発現および精製

4 G 1 0 ハイブリドーマ細胞系から抗体重鎖 (H C) および軽鎖 (L C) c D N A s をクローン化するために、2 個の 5' オリゴヌクレオチドプライマーが L C および H C 精製ペプチドの N 末端アミノ酸配列化に基づき設計された。H C 5' コーディング鎖プライマー R A P H C - 5

【 0 1 0 0 】

5'-GCC ACC ATG GAA TGG AGT TGG ATA TTT CTC TTT CTC CTG TCA

GGA ACT GCA GGT GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTG CAR CA

10

(配列識別番号 7)

【 0 1 0 1 】

は、成熟処理 N 末端 H C をコード化する最初の 1 7 n t (ヌクレオチド) に融合されたコザック翻訳開始部位を持つ、N 末端リーダー分泌シグナル配列をコード化する 6 3 塩基オリゴヌクレオチドより成るものであった。L C 5' コーディング鎖プライマー R A P L C - 5

【 0 1 0 2 】

5'-GCC ACC ATG GAT TTT CTG GTG CAG ATT TTC AGC TTC TTG CTA

ATC AGT GCC TCA GTT GCA ATG TCC AGA GGA GAA AAT GT

20

(配列識別番号 8)

【 0 1 0 3 】

は、成熟処理 N 末端 L C をコード化する最初の 1 7 ヌクレオチドに融合されたコザック翻訳開始部位を持つ、N 末端リーダー分泌シグナル配列をコード化する A 6 3 塩基オリゴヌクレオチドより成るものであった。

【 0 1 0 4 】

H C c D N A の C 末端コード化部分の増幅のための H C 3' 非コーディング鎖プライマーの設計

30

【 0 1 0 5 】

5'-CTA AGC TCA TTT ACC CGG AGA CCG

(配列識別番号 9)

【 0 1 0 6 】

は、4 G 1 0 モノクローナル抗体 H C 定常部が、2 b クラスのものであったという従来の知識に基づくものであった。L C c D N A の C 末端コード化部分の増幅のための L C 3' 非コーディング鎖プライマーの設計

【 0 1 0 7 】

5'-CTC AGG ACC TTT GTC TCT AAC ACT C

40

(配列識別番号 1 0)

【 0 1 0 8 】

は、4 G 1 0 モノクローナル抗体 L C 定常部が、カッパクラスのものであったという従来の知識に基づくものであった。オリゴヌクレオチドは、標準 D N A 合成化学反応を用いる I D T (インテグレイテッド D N A テクノロジーズ , インコーポレイテッド , コーラルビル , アイオワ) で合成された。

【 0 1 0 9 】

50

全RNAは、RNAzol (R) B (テル-テスト, インコーレイトッド, フレンズウッド, テキサス) を使用するPBS洗浄スナップ凍結4G10ハイブリドーマ細胞ペレット(サンプル当り 1×10^7 細胞)から精製された。精製全RNAはエタノール沈殿され、260nmの吸光度で計量化された。第1鎖cDNAは、スーパースクリプト(R)システム(ジブコ BRL, ゲイザーズバーグ, メリーランド)を用いて、オリゴ(dT)で全RNAの2 μ gを逆転写することにより合成された。エクスパンド(R)高忠実度PCRシステム(ベーリンガー・マンハイム, インディアナポリス, インディアナ)は、新規に作られた第1鎖cDNAの1 μ lのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅に使用された。PCR増幅条件は以下の通りであった: PCR成分を94 $^{\circ}$ Cまで加熱した後、1 μ lのcDNAが各管に加えられた。続くサイクル条件は、94 $^{\circ}$ Cで15秒、50 $^{\circ}$ Cで1分、72 $^{\circ}$ Cで1分、LC増幅で17サイクル、HC増幅で21サイクルであり、最終延長は72 $^{\circ}$ Cで10分であった。LCとHCのPCR産物は臭化エチジウム染色アガロースゲルから精製され、真核発現ベクターp cDNA 3.1 (インバイトロゲン・コーポレイション, サンディエゴ, カリフォルニア)にクローンされ、製造業者の指示に基づき大腸菌コンピテント細胞内に形質転換された。各LCまたはHCプラスミド構築物に対して、少なくとも4個の個別大腸菌プラスミドクローンが、標準自動化DNA配列化法により配列され、ヌクレオチドコンセンサス配列マイナスN末端リーダー分泌シグナル配列は、配列識別番号1と配列識別番号2に記載されている。配列識別番号1と配列識別番号2から翻訳された推定ポリペプチド配列は、配列識別番号3と配列識別番号4と称される。

10

20

【0110】

ヘキサヒスチジン配列は、製造業者の指示に従って、商業キット(クイックチェンジ(R)ストラタジーン, ラホーラ, カリフォルニア)を用いて部位指向突然変異誘発により、HCクローンpHC-42のC末端に加えられた。下記の相補オリゴヌクレオチドは、ヘキサヒスチジン配列の導入に使用された: コーディング鎖プライマーHC-His5

【0111】

5'-CTC CCG GTC TCC GGG TAA AGG TGG CCA TCA CCA CCA TCA
CCA TTG AGC TTA GAA GGG CAA TT

30

(配列識別番号11)

【0112】

であり、また非コーディング鎖プライマーHC-His5 は

【0113】

5'-AAT TGC CCT TCT AAG CTC AAT GGT GAT GGT GGT GAT GGC
CAC CTT TAC CCG GAG ACC GGG AG-3'

(配列識別番号12)

【0114】

ヘキサヒスチジンコーディング化領域の成功裡の導入は、DNA配列化により確認されたし、それは配列識別番号6のポリペプチドをコード化する配列識別番号3のポリヌクレオチド配列と一致する。

40

【0115】

タンパク質を含有するホスホチロシンを認識できる分泌機能的組換えモノクローナル抗体を産生するクローン化HCおよびLC cDNAsの能力は、サバンナモニターCOS細胞を遷移的に形質移入することで試験された。HCおよびLCプラスミドは、形質移入薬剤リポフェクタミン(ライフ・テクノロジーズ, ゲイザーズバーグ, メリーランド)と3-4日後に収集された馴化培地とを用いて、COS細胞に遷移的に形質移入された。ヒト上皮癌細胞系A431が、細胞タンパク質を含有するホスホチロシンを特異的に認識する

50

組換え抗体の能力をモニターするために使用された。A 4 3 1 は上皮増殖因子受容体 (E G F r) を過発現し、E G F での刺激に際しては、E G F r の細胞質シグナル形質導入領域、同じく E G F r の信号伝達カスケード下流の成分である多くの他のタンパク質において、チロシン残基のリン酸化に著しい増加が見られる (ハンター, T. およびクーパー, J. A., 細胞, 3 巻: 7 4 1 - 5 2 ページ (1981 年): ゴールドコーン, T. 他, ジャーナル・オブ・バイオロジー・アンド・ケミストリー, 266 巻 (24 号): 16092 - 7 ページ (1991 年), モガール, N., 他, 細胞生物学における現在の見解, 2 巻: 190 - 196 ページ, (1999 年))。ホスホチロシンタンパク質を認識する分泌組換え 4 G 1 0 モノクローナル抗体の能力は、E G F 刺激 A 4 3 1 細胞の全タンパク質細胞溶菌液を免疫プロットングすることにより測定された。図 1 および図 2 は、L C および H C プラスミド、または L C および H C H i s タグ標識プラスミドで同時形質移入された C O S 細胞からの馴化培地は、生 4 G 1 0 が認識するホスホチロシン含有タンパク質の同じ複合体パターンを認識した。空のベクター形質移入対照と二次抗体のみからの馴化培地は、E G F 刺激 A 4 3 1 免疫プロットからいずれのタンパク質バンドも認識しなかった。更に 4 G 1 0 と結合するホスホチロシン結合の競合阻害剤である 50 m M のフェニルホスフェートの追加は、A 4 3 1 ホスホチロシン含有タンパク質の認識を完全に遮断した。

【0116】

商業的販売用に r 4 G 1 0 の十分な量を産生するために、安定した形質移入チャイニーズハムスター卵巣細胞 (C H O) が生成された。C H O 細胞は、組換えモノクローナル抗体を作るためにごく普通に使用され (トリル, J. R. 他, バイオテクノロジーでの現在の見解, 6 巻: 552 - 560 ページ, 1995 年)、またいくつかの高発現細胞系がページとシデムの方法による形質移入と選別により生成された (バイオテクノロジー, 9 巻: 64 - 68 ページ, 1991 年)。要約すると、マウスジヒドロ葉酸レダクラーゼ (D H F R) c D N A (サブマーニ, S. 他, 分子細胞生物学, 1 巻: 854 - 864 ページ) が p c D N A 3.1 のネオマイシンカセットを置換するように L C 発現プラスミドにクローンされたが、一方 H C 発現プラスミドはネオマイシン酸性カセットを保持した。同時形質移入後に、形質転換体は、d h f r⁺ / n e o 耐性の二重表現型を選択され、コロニーはプールされた。高い収量の組換え抗体を産生したクローンを選択するために、プールされたクローンは、組込まれ連結された H C および L C 発現カセットの増幅を可能にする D H F R の競合阻害剤である 10^{-7} M のメトトレキサートの存在下で培養された。メトトレキサート存在下で生き延びた個別クローンは拡張され、抗 I g G エリザにより測定された抗体産生を分泌した。高 r 4 G 1 0 抗体産生クローンは、 10^{-6} M メトトレキサートの存在下での培養により、更なるラウンドの増幅を受け、再び抗体を高い水準で分泌するクローンは、抗 I g G エリザにより同定された。

【0117】

高産生 H i s タグ標識 r 4 G 1 0 C H O クローンは、スピナーフラスコまたはバイオリアクター、および抗体精製のためにプールされる馴化培地で培養された。約 400 m l の C H O - 4 G 1 0 馴化培地は、100 m l の 2.5 M 塩化ナトリウム、p H 8.0 のリン酸ナトリウムを加えて平衡にされた。12 m l のニッケル - I D A カラムは、サンプルがカラムを一度通過する前に 5 カラム量の 0.5 M の塩化ナトリウム、0.05 M の p H 8.0 リン酸ナトリウムで平衡化された。カラムは 30 カラム量の 0.5 M 塩化ナトリウム、0.05 M、p H 8.0 のリン酸ナトリウムで洗浄され、次いで 5 カラム量の 90% 緩衝液 A (0.5 M の塩化ナトリウム、0.05 M、p H 8.0 のリン酸ナトリウム)、および 10% の緩衝液 B (0.5 M の塩化ナトリウム、0.05 M、p H 8.0 のリン酸ナトリウム 0.5 M のイミダゾール) で洗浄された。組換え 4 G 1 0 は 90% 緩衝液 A と 10% 緩衝液 B で出発し、100% 緩衝液 B で終結する 5 カラム量の線型勾配で溶離した。溶離分画は、50 m M の E D T A、p H 8.0 を含む 2 m l 管でその予定された量である 5% に達するまで収集された。I g G エリザで測定されるように、抗体は 150 - 250 m M イミダゾールの範囲内で溶離し、その純度は S D S - P A G E で推定された 95% 純

度よりも高かった。ピーク値分画はプールされ、透析され、濃縮され、緩衝液条件はグリセロールを30%まで追加する前に1×PBS、pH7.5、0.02%アジ化ナトリウムに対して調節された。

【0118】

精製r4G10は、ホスホチロシン含有タンパク質を認識する能力を分析された。図3は、EGF刺激A431細胞溶菌液からのホスホチロシン含有タンパク質を免疫沈降させるr4G10の能力が、生4G10に比較できることを実証している。図4は、精製r4G10を持つA431細胞溶菌液の免疫プロットをプローブすると、生4G10により認識されるホスホチロシン含有タンパク質のユニークなパターンを認識することを実証している。

10

【0119】

SDS-PAGEによる4G10純度の測定

Hisタグ標識組換え4G10は、前記の通り精製され、ポリペプチド数とその大体の平均分子量を測定するために、SDS-PAGEを受けた。PAGE-ONE 4/20%ポリアクリルアミドゲル(アウル・セパレーション・システムズ, ポーツマス, ニューハンプシャー)がレームリの方法(レームリ, 英国, 1970年, ネイチャー, 227巻, 680ページ)に従って、タンパク質の電気泳動隔離のために使用された。タンパク質のサンプルは、各タンパク質6 μ l(1 μ g/ μ l)を4 μ lのdH₂O(蒸留水)と10 μ l 2Xサンプル緩衝液(シグマ, セントルイス, ミズーリ)に加えることにより調製された。サンプルは5分沸騰され、短時間遠心され、各沸騰サンプル20 μ lがゲルに負荷された。このゲルは40mAの電流で2時間800mlの流動緩衝液(3gr/Lのトリスベース, 14.4gr/Lのグリシン, 1g/LのSDS)を用いて電気泳動された。ゲルは次いでそのケーシングから除去され、dH₂Oに5分揺汰された。バイオセーフ・クーマシー(バイオ・ラッド・ラボラトリーズ, ハーキュリーズ, カリフォルニア)が次いでゲルを染色するために使用された。染色はゲルをクーマシーで30分揺汰することより成っていた。続く脱色は、3回10分dH₂Oでの洗浄より成り、一方ゲルはゆるやかに揺汰された。最後にゲルは、ゲル乾燥フレーム(ダイバーシファイド・バイオテック, ボストン, マサチューセッツ)上で2枚のセルロースの間で乾燥された。

20

【0120】

本発明の抗体は、既に記載した手順に基づき精製された。Hisタグ標識組換え4G10にとっては、この精製方法は抗体ホスホチロシン結合活性にとって有害な酸性溶液に抗体を露出することなく、pH中性条件の下で行われ、新規な精製アプローチを記述している。中性またはほぼ中性pHを使用する本方法は、更に他の抗体並びに本発明の4G10特異的抗体を精製するのに有用である。非タグ標識抗体は、タグ標識抗体からタグを除去することにより、あるいは生4G10産物に現在行われているタンパク質Aアフィニティークロマトグラフィーにより調製される。使いやすいプロトコルは以下の通りである。

30

【0121】

タンパク質Aアフィニティークロマトグラフィーによる4G10の精製

200mlの清澄化馴化培地が、2ml/分のフローレートで5mlパック量のタンパク質Aカラムに2回負荷された。カラムは次いでPBS 400mlで洗浄され、pH2.7溶離緩衝液(50mMのグリシン, pH2.7)15mlで溶離され、中和緩衝液(1Mトリス, 1.5Mの塩化ナトリウム, 1mMのEDTA, 0.5%のアジ化ナトリウム)100マイクロリットルを予め加えた1mlの分画が収集される。分画は、即時の中和化を確実なものとするために、使用の前に1mg/mlまで希釈される。

40

【0122】

追加の一般引用文献

1. コーエン, B. 他, 全米科学アカデミー紀要, 87巻: 4458 - 4462ページ, 1990年。
2. ドラッカー, B. J. 他, ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディスン, 321巻, 1383 - 1391ページ。

50

3. 金倉, Y., 他, ジャーナル・オブ・バイオロジー・アンド・ケミストリー, 266 巻: 490 - 495 ページ, 1991年。

【図面の簡単な説明】

【図1】4G10ハイブリドーマ軽鎖および重鎖 cDNA s で形質移入された COS 細胞からの馴化培地でプローブされた EGF (上皮増殖因子) 刺激 A431 細胞抽出物の免疫プロットを示す図。レーン1, HCクローン - 42 および LCクローン 14; レーン2, HCクローン - 42 および LCクローン - 11; レーン3, HCクローン - 44 および LCクローン - 14; レーン4, HCクローン - 44 および LCクローン - 11; レーン5, 1 μg / ml での生 4G10。キロダルトンでの分子量標識が左欄で示される。

【図2】4G10ハイブリドーマ軽鎖および His タグ標識重鎖 cDNA s で形質移入された COS 細胞からの馴化培地でプローブされた EGF 刺激 A431 細胞抽出物の免疫プロットを示す図。レーン1, HCクローン - 3 His および LCクローン - 11; レーン2, HCクローン - 7 His および LCクローン - 11; レーン3, 2 μg / ml での生 4G10; レーン4, 一次抗体プローブ検査に使用される馴化培地に 50 mM のフェニルホスフェートを追加したことを除きレーン1と同じ; レーン5, 一次抗体プローブ検査に使用される馴化培地に 50 mM のフェニルホスフェートを追加したことを除きレーン2と同じ。キロダルトンでの分子量標識が左欄で示される。

10

【図3】EGF 刺激 A431 細胞抽出物の免疫沈降法による免疫プロットを示す図。細胞抽出物 500 μg は、CHO 細胞から精製され、組換えまたは生 4G10 で 2 μg / ml の濃度でプローブされた組換えまたは生 4G10 抗体 4 μg で免疫沈降 (IP) された。レーン1, IP 抗体 = r 4G10 (組換え 4G10), 一次抗体なし; レーン2, IP 抗体 = 生 4G10, 一次抗体なし; レーン3, IP 抗体 = r 4G10, 一次抗体 = r 4G10; レーン4, IP 抗体 = 生 4G10, 一次抗体 = r 4G10; レーン5, IP 抗体 = r 4G10, 一次抗体 = 生 4G10; レーン6, IP 抗体 = 生 4G10, 一次抗体 = 生 4G10。キロダルトンでの分子量標識が左欄で示される。

20

【図4】異なる条件下で貯蔵された精製組換え 4R10, 1 μg / ml でプローブされた EGF 刺激 A431 細胞抽出物の免疫プロットを示す図。レーン1, 一次抗体なし; レーン2, -20 で 30% グリセロールで凍結された組換え 4G10; レーン3, 4 で貯蔵された組換え 4G10。キロダルトンでの分子量標識が左欄で示される。

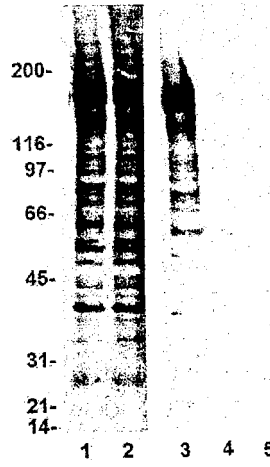
【図5】SDS - PAGE で測定されるように、His タグ標識組換え 4G10 が生 (商業利用可) 4G10 よりも純粋であることを示す図。レーン1, 6 マイクログラムの His タグ標識 r 4G10 (r = 組換え); レーン2, 分子量標識; レーン3, 6 マイクログラムの生 4G10。キロダルトンでの分子量標識が左欄で示される。

30

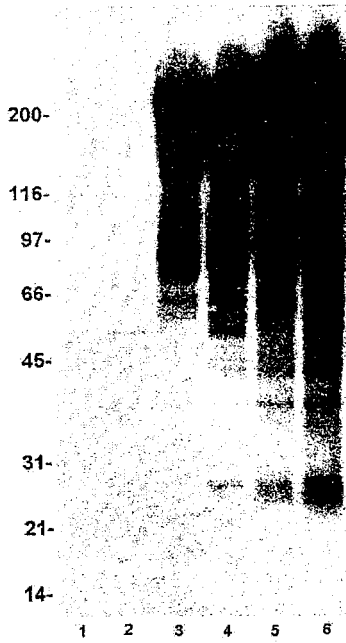
【 図 1 】



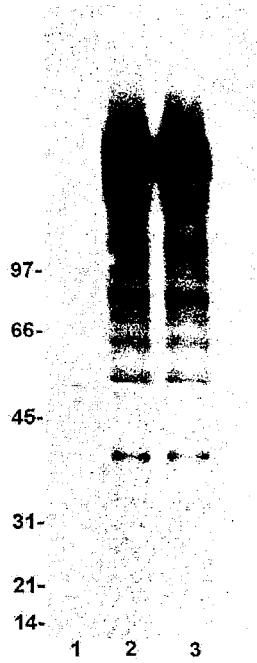
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

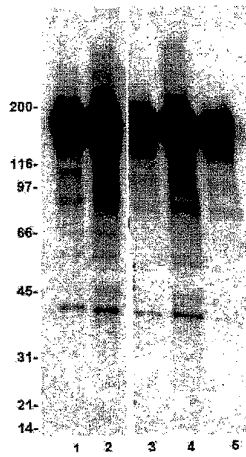
(10) International Publication Number
WO 02/18443 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 16/00 26 Lake View Street, Lake Placid, NY 12946 (US). JELINEK, Thomas, 32 Holly Hill Road, Lake Placid, NY 12946 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/26926
- (22) International Filing Date: 30 August 2001 (30.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/653,755 1 September 2000 (01.09.2000) US
- (71) Applicant: UPSTATE BIOTECHNOLOGY, INC. [US/US]; 10 Old Barn Road, Lake Placid, NY 12946 (US).
- (72) Inventors: ESINGER, Dominic, East Hill Road, Keene, NY 12942 (US). STILES, Lynn, 3 McKenzie Pond Road, Saranac Lake, NY 12983 (US). LAMARCHE, Aruther;
- (74) Agents: GRANT, Alan, J. et al.; Carella, Byrne, Bain, Gillilan, Cecchi, Stewart & Olstein, 6 Becker Farm Road, Roseland, NJ 07068 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European

[Continued on next page]

(54) Title: A RECOMBINANT MONOCLONAL ANTIBODY TO PHOSPHOTYROSINE-CONTAINING PROTEINS

WO 02/18443 A2



(57) Abstract: A purified or highly pure recombinant monoclonal antibody with 4G10-hybridoma type specificity is disclosed along with polynucleotides, including cDNA sequences, encoding the antibody chains and the amino acid sequences corresponding to said cDNA polynucleotides and uses for said sequences. Also disclosed are corresponding tagged sequences useful in molecular biological techniques and uses for said sequences.

WO 02/18443 A2



patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/18443

PCT/US01/26926

**A RECOMBINANT MONOCLONAL ANTIBODY TO
PHOSPHOTYROSINE-CONTAINING PROTEINS**

5

This application claims priority of U.S. Serial No. 09/653,755, filed 1 September 2000, the disclosure of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

10

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the field of recombinant monoclonal antibodies and their uses in clinical and scientific procedures, including diagnostic procedures, especially where such processes involve the detection of phosphotyrosine-containing proteins.

20

BACKGROUND OF THE INVENTION

Cellular growth, especially the uncontrolled growth seen in cancers, has, at least partly, been attributed to the functions of protein kinases that add phosphate to the hydroxyl group of tyrosine. In a similar way, oncogenic transformation of cells by entities such as Rous sarcoma virus and murine leukemia virus, leads to a significant increase, by at least an order of magnitude, in the level of phosphotyrosines seen in both virus-encoded proteins and proteins found in the transformed cells. Tyrosine kinases are believed intimately involved in such transformation processes.

WO 02/18443

PCT/US01/26926

Anti-phosphotyrosine monoclonal antibodies specific for proteins containing phosphotyrosine residues have proven valuable in studying such transformation processes, as well as in the detection of phosphotyrosine residues in proteins and detection of proteins containing such moieties. Thus, because oncogenes present in transforming organisms have been found to have natural counterparts, or homologs, within the untransformed cells, tyrosine-kinases have been implicated in normal growth control, possibly including during embryonic development or regeneration. Consequently, the availability of significant quantities of monoclonal antibodies with specificity directed toward such proteins can be of far reaching value, especially where methods are available for the production of such antibodies on a high scale. For example, monoclonal antibodies can facilitate the identification of cellular substrates for tyrosine kinases and make possible affinity purification of their substrates as well as being highly useful in screening for, and detecting, diseases.

Modern technology, such as that involving the use of hybridomas, has made available to researchers and clinicians alike sources of highly specific and potent monoclonal antibodies useful in general diagnostic and clinical procedures, such as where these antibodies are specific for phosphotyrosine-containing proteins and polypeptides. Among the more useful monoclonal antibodies are those derived from the 4G10 hybridoma cell line. The 4G10 monoclonal antibody is described further in Oda et al, *Blood*, **88**(11):4304-13 (Dec. 1, 1996). Crkl is constitutively tyrosine phosphorylated in platelets from chronic myelogenous leukemia patients and inducibly phosphorylated in normal platelets stimulated by thrombopoietin. However, while such antibodies are useful, they are not easy to produce in pure form. For example, the 4G10 cell line is a low producer of the required antibodies and therefore it is difficult, as well as expensive, to procure such antibodies in sufficient quantity to support all

WO 02/18443

PCT/US01/26926

the different uses to which they might be put. In addition, the quality of said antibodies from one lot to another may also be less than what is desired by most researchers and clinicians.

5 More specifically, the purified His tagged recombinant antibody is purer than what can be obtained from the hybridoma source. The hybridoma Protein A purified 4G10 has an as yet unidentified heavy chain doublet whereas the IMAC purified recombinant antibody of the present invention is highly pure with a single heavy chain band and light chain
10 band. Furthermore, the phosphotyrosine binding properties of 4G10 are sensitive to acid exposure and elution from Protein A or G columns with the required low pH conditions leads to partial inactivation and thus a lower specific activity.

15 The present invention solves such problems by offering a recombinant monoclonal antibody comprising utility and specificity the same or similar to that derived from the 4G10 hybridoma cell line but showing much greater purity with concomitant high specific activity and consistency of performance. Especially useful is the histidine-tagged form
20 of the immunoglobulin of the present invention. The His tag allows for IMAC (immobilized metal affinity chromatography) purification under neutral pH conditions so that the recombinant antibody is never exposed to low pH conditions. Greater purity is, of course, highly useful in clinical applications.

25 The His tag is also useful in that it facilitates attachment of the recombinant antibody or immunoglobulin in an orientated fashion to Nickel matrices for solid phase applications. Thus, the His tagged recombinant form is particularly useful. The methods disclosed herein thus afford a
30 purer and more uniform product with generally higher specific activity.

WO 02/18443

PCT/US01/26926

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a recombinant monoclonal antibody having specificity directed to proteins and polypeptides comprising phosphotyrosine moieties.

5

It is therefore an object of the present invention to provide for a recombinant monoclonal antibody having specificity for phosphotyrosine-containing proteins and polypeptides.

10

It is a further object of the present invention to provide polynucleotides, such as cDNAs, whose nucleotide sequences code for the heavy and light chains of the aforementioned recombinant antibodies and immunoglobulins.

15

It is a still further object of the present invention to provide recombinant antibodies specific for phosphotyrosine-containing proteins and polypeptides wherein said antibodies are tagged with sequences of amino acids, and other tags, making them easily isolatable as well as affording versatility in using said antibodies for research, diagnostic and clinical purposes.

20

It is another object of the present invention to provide a method of using the recombinant antibodies disclosed herein for research, diagnostic and clinical uses.

25

30

WO 02/18443

PCT/US01/26926

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows an immunoblot of EGF (epidermal growth factor) stimulated A431 cell extracts probed with conditioned media from COS cells transfected with 4G10 hybridoma light chain and heavy chain cDNAs. Lane 1, HC clone-42 and LC clone-14; Lane 2, HC clone-42 and LC clone-11; Lane 3, HC clone-44 and LC clone-14; Lane 4, HC clone-44 and LC clone-11; Lane 5, native 4G10 at 1 µg/ml. Molecular weight markers in kilodaltons are indicated at the left.

10

Figure 2 shows an immunoblot of EGF stimulated A431 cell extracts probed with conditioned media from COS cells transfected with 4G10 hybridoma light chain and His-tagged heavy chain cDNAs. Lane 1, HC clone-3His and LC clone-11; Lane 2, HC clone-7His and LC clone-11; Lane 3, native 4G10 at 2 µg/ml; Lane 4, same as Lane 1 except for the addition of 50 mM phenylphosphate to the conditioned media used for primary antibody probing; Lane 5, same as Lane 2 except for the addition of 50 mM phenylphosphate to conditioned media used for primary antibody probing. Molecular weight markers in kilodaltons are indicated at the left.

20

Figure 3 shows an immunoprecipitation immunoblot of EGF stimulated A431 cell extracts. 500 µg of cell extract was immunoprecipitated (IP) with 4 µg of recombinant or native 4G10 antibody purified from CHO cells and probed with recombinant or native 4G10 at a concentration of 2 µg/ml. Lane 1, IP-antibody = r4G10 (recombinant 4G10), no primary antibody; Lane 2, IP-antibody = native 4G10, no primary antibody; Lane 3, IP-antibody = r4G10, primary antibody = r4G10; Lane 4, IP-antibody = native 4G10, primary antibody = r4G10; Lane 5, IP-antibody = r4G10, primary antibody = native

30

WO 02/18443

PCT/US01/26926

4G10; Lane 6, IP-antibody = native 4G10, primary antibody = native 4G10. Molecular weight markers in kilodaltons are indicated at the left.

Figure 4 shows an immunoblot of EGF stimulated A431 cell extracts probed with 1 ug/ml purified recombinant 4G10 stored under different conditions. Lane 1, No primary antibody. Lane 2, Recombinant 4G10 frozen at -20 °C in 30% glycerol. Lane 3, Recombinant 4G10 stored at 4 °C. Molecular weight markers in kilodaltons are indicated at the left.

10

Figure 5 shows that His-tagged recombinant 4G10 is purer than native (commercially available) 4G10 as determined by SDS-PAGE. Lane 1, 6 micrograms of His-tagged r4G10 (r = recombinant); Lane 2, Molecular weight marker; Lane 3, 6 micrograms of native 4G10. Molecular weight markers in kilodaltons are indicated at the left.

DETAILED SUMMARY OF THE INVENTION

20

With the advent of methods of molecular biology and recombinant technology, it is now possible to produce antibody molecules by recombinant means and thereby generate gene sequences that code for specific amino acid sequences found in the polypeptide structure of the antibodies. Such antibodies can be produced by either cloning the gene sequences encoding the polypeptide chains of said antibodies or by direct synthesis of said polypeptide chains, with *in vitro* assembly of the synthesized chains to form active tetrameric (H₂L₂) structures with affinity for specific epitopes and antigenic determinants. This has permitted the ready production of antibodies having sequences characteristic of neutralizing antibodies from different species and sources.

WO 02/18443

PCT/US01/26926

Regardless of the source of the antibodies, or how they are recombinantly constructed, or how they are synthesized, *in vitro* or *in vivo*, using transgenic animals, such as cows, goats and sheep, using
5 large cell cultures of laboratory or commercial size, in bioreactors or by direct chemical synthesis employing no living organisms at any stage of the process, all antibodies have a similar overall 3 dimensional structure. This structure is often given as H₂L₂ and refers to the fact that antibodies commonly comprise 2 light (L) amino acid chains and 2 heavy (H) amino
10 acid chains. Both chains have regions capable of interacting with a structurally complementary antigenic target. The regions interacting with the target are referred to as "variable" or "V" regions and are characterized by differences in amino acid sequence from antibodies of different antigenic specificity.

15

The variable regions of either H or L chains contains the amino acid sequences capable of specifically binding to antigenic targets. Within these sequences are smaller sequences dubbed "hypervariable" because of their extreme variability between antibodies of differing specificity.
20 Such hypervariable regions are also referred to as "complementarity determining regions" or "CDR" regions. These CDR regions account for the basic specificity of the antibody for a particular antigenic determinant structure.

25 The CDRs represent non-contiguous stretches of amino acids within the variable regions but, regardless of species, the positional locations of these critical amino acid sequences within the variable heavy and light chain regions have been found to have similar locations within the amino acid sequences of the variable chains. The variable heavy and
30 light chains of all antibodies each have 3 CDR regions, each non-contiguous with the others (termed L1, L2, L3, H1, H2, H3) for the

WO 02/18443

PCT/US01/26926

respective light (L) and heavy (H) chains. The accepted CDR regions have been described by Kabat et al, *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977). The numbering scheme is shown in the figures, where the CDRs are underlined and the numbers follow the Kabat scheme.

5

In all mammalian species, antibody polypeptides contain constant (i.e., highly conserved) and variable regions, and, within the latter, there are the CDRs and the so-called "framework regions" made up of amino acid sequences within the variable region of the heavy or light chain but outside the CDRs.

In accordance with the foregoing, the present invention is directed generally to a recombinant monoclonal antibody having specificity directed to proteins and polypeptides comprising phosphotyrosine moieties.

The present invention further relates to a polypeptide which has the deduced amino acid sequence (SEQ ID NO: 4, 5 or 6), as well as immunologically active fragments, analogs and derivatives of such polypeptide.

The terms "fragment," "derivative" and "analog" when referring to a polypeptide (such as SEQ ID NO: 4, 5 or 6), means a fragment, derivative or analog of the polypeptide that retains essentially the same biological function or activity as such polypeptide. Thus, an analog includes a proprotein which can be activated by cleavage of the proprotein portion to produce an active mature polypeptide. Such fragments, derivatives and analogs must have sufficient similarity to the polypeptide of SEQ ID NO: 4, 5 or 6 so that the immunological activity and/specificity of the native polypeptide is retained. In accordance with the present invention, when

WO 02/18443

PCT/US01/26926

composing antibodies, such a fragment would include Fab and F(ab')₂ fragments but the invention is in no way limited only to such fragments.

The polypeptide of the present invention may be a recombinant
5 polypeptide, a natural polypeptide or, in general, a synthetic polypeptide,
meaning a polypeptide other than one occurring naturally, preferably a
recombinant polypeptide having the immunological specificity and/or activity
disclosed herein and including immunologically active fragments thereof.
The antibodies formed of the polypeptides of the present invention may
10 likewise be dimeric in nature, consisting of only one heavy and one light
chain, or may be chimeric or humanized or other form of recombinant
antibody.

The immunoglobulins of the present invention include those with
15 amino acid sequences substantially identical to the sequences of SEQ ID
NO: 4, 5 or 6. As used herein, the term "substantially identical" includes
sequences at least 98% identical to the sequences disclosed herein or
sequences wherein (i) one or more of the amino acid residues are
substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue
20 (preferably a conserved amino acid residue) which is of the same chemical
character as the amino acid being substituted for, such as where a
hydrophobic residue is replaced by another hydrophobic residue, or where
an acidic residue is replaced by another acidic residue, or where a basic
residue is replaced by another basic residue, or where a polar residue is
25 replaced by another polar residue, especially where the respective amino
acids are of similar size. Such amino acids may also be replaced by amino
acids of similar size and chemical character but which are not amino acids
normally coded for by the genetic code or where one or more of the amino
acid residues includes a specialized substituent group. The purified, or highly
30 pure, immunoglobulins of the present invention may also be fused with
another compound, such as a compound to increase the half-life of the

WO 02/18443

PCT/US01/26926

polypeptide (for example, polyethylene glycol), or where the additional amino acids are fused to the mature polypeptide, such as a leader or secretory sequence or a sequence which is employed for purification of the mature polypeptide or a proprotein sequence. Such analogs are deemed to
5 be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

The immunoglobulins of the present invention are preferably provided in an isolated form, and preferably are purified to homogeneity.

10 Fragments or portions of the polypeptides of the present invention may be employed for producing the corresponding full-length polypeptide by peptide synthesis; therefore, the fragments may be employed as intermediates for producing the full-length polypeptides. Fragments or portions of the polynucleotides of the present invention may be used to
15 synthesize full-length polynucleotides of the present invention.

As used herein, the terms "portion," "segment," and "fragment," when used in relation to polypeptides, refer to a continuous sequence of residues, such as amino acid residues, which sequence forms a subset of
20 a larger sequence. For example, if a polypeptide were subjected to treatment with any of the common endopeptidases, such as trypsin or chymotrypsin, the oligopeptides resulting from such treatment would represent portions, segments or fragments of the starting polypeptide.

25 In accordance with the foregoing, the present invention relates to a purified or highly pure immunoglobulin having the same specificity as 4G10 monoclonal antibody (available commercially from Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY). This purified immunoglobulin, which term includes antibodies, such as monoclonal antibodies, regardless of
30 how prepared, including by direct chemical synthesis, comprises two light chain components and two heavy chain components wherein said heavy chain components exhibit a single band on gel electrophoresis. The

WO 02/18443

PCT/US01/26926

commercially available form heretofore available exhibits a heavy chain doublet and thus shows lower specific activity and reproducibility than the purified immunoglobulin of the present invention (comparison shown in Figure 5). As used herein, the terms "purified" and "highly pure" or 5 "highly purified" refer to immunoglobulins having the same or substantially the same specificity as the 4G10 antibody but showing a gel pattern similar to that exhibited by the immunoglobulins, or antibodies, of the present invention, especially in that they exhibit only a single heavy chain band, as shown in Figure 5, and not the doublet found for 10 previously available 4G10 monoclonal antibody.

In one embodiment, highly pure or purified immunoglobulin of the present invention comprises a histidine tag region. Again, this embodiment commonly comprises two light chain components and two 15 heavy chain components wherein said heavy chain components exhibit a single band on gel electrophoresis. In a specific embodiment, said histidine tag is part of the heavy chain component of said antibody or immunoglobulin.

20 In specific embodiments of the present invention, the isolated polypeptides disclosed herein may comprise tags or other markers, including specific sequences of amino acids, especially where said sequence is composed of histidine residues, for example, a run of 6 histidine residues (such as with the polypeptide of SEQ ID NO: 6), and 25 any additional alterations in said polypeptide necessary for attaching said marker, such as said histidine sequence, to the polypeptides of the invention. Such sequences are commonly, but need not necessarily be, attached to the COOH-terminal of the polypeptide sequences disclosed herein. In addition, where said polypeptide is encoded by a polynucleotide 30 of the present invention, a nucleotide sequence encoding said marker

WO 02/18443

PCT/US01/26926

sequence, such as a nucleotide sequence encoding a histidine tag sequence, may be part of the polynucleotide sequences of the invention.

In specific embodiments of the present invention, the polypeptide
5 having SEQ ID NO: 6 is an example of an amino acid sequence
representing a heavy chain polypeptide according to the present invention
wherein the C-terminal of said chain has attached thereto a hexapeptide
sequence composed of histidine residues. Corresponding to this is the
polynucleotide having the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 3, which
10 encodes the polypeptide of SEQ ID NO: 6, and comprises at its 3'-end a
nucleotide sequence coding for said histidine tag sequence. Other
markers, tags, and amino acid sequences, configurations, and the like,
useful for tagging the polypeptide of interest will no doubt occur to those
of skill in the art once possessed of the disclosure of the present
15 invention.

In a specific embodiment, the highly pure or purified
immunoglobulin of the present invention comprises a heavy chain
component whose amino acid sequence is substantially the same as the
20 sequence of SEQ ID NO: 4. In another specific embodiment, the purified
or highly pure immunoglobulin of the present invention comprises a light
chain component whose amino acid sequence is substantially the same as
the sequence of SEQ ID NO: 5. In a preferred embodiment, the highly
pure or purified immunoglobulin of the present invention comprises a
25 heavy chain component whose amino acid sequence is substantially the
same as the sequence of SEQ ID NO: 4 and a light chain component
whose amino acid sequence is substantially the same as the sequence of
SEQ ID NO: 5.

30 In other specific embodiments, the purified or highly pure
immunoglobulin of the present invention comprises a heavy chain

WO 02/18443

PCT/US01/26926

component whose amino acid sequence is substantially the same as the sequence of SEQ ID NO: 6. In a preferred embodiment, said sequence is that of SEQ ID NO: 6.

5 The present invention also relates to isolated polynucleotide sequences encoding the polypeptides of which the antibodies of the present invention are comprised.

Thus, the present invention relates to an isolated polynucleotide
10 encoding a polypeptide as disclosed herein including the complements of such polynucleotides. The isolated polynucleotides of the present invention include cDNAs. In specific embodiments, such polynucleotides include the polynucleotides having the sequences of SEQ ID NOs. 1, 2, and 3 and sequences sufficiently identical thereto so as to encode a
15 protein substantially identical to the polypeptides of the immunoglobulins of the present invention. Such variability may also be due to the degeneracy of the genetic code.

In another aspect, the present invention also relates to a method of
20 producing a highly purified immunoglobulin comprising the steps of:

(a) inserting a histidine tag sequence at the C-terminal end of the heavy chain component of an immunoglobulin to be purified to produce a histidine tagged immunoglobulin;

(b) purifying said histidine tagged heavy chain polypeptide by
25 immobilized metal affinity chromatography under neutral conditions and specifically preventing exposure of the immunoglobulin to acidic pH;

(c) recovering the purified histidine tagged highly purified immunoglobulin.

30 The methods of the invention are further described in more detail in the methods and examples below. The methods of the present invention

WO 02/18443

PCT/US01/26926

also contemplate purification schemes wherein the heavy chain component is produced by expression of a polynucleotide encoding said histidine tagged heavy chain component, such as a cDNA encoding such a tagged chain. One example of such a cDNA is the polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 3. A novel aspect of the methods of purification disclosed herein is the use of neutral, or relatively neutral, pH conditions during the immobilized metal affinity chromatography (IMAC) step in that, avoidance of any acidic pH exposure preserves the immunoglobulin, thereby affording highly pure or purified immunoglobulins. Such methodology may be readily applied to the production of other highly purified immunoglobulins (i.e., antibodies), even those with specificities different from those of the present invention. In keeping with the disclosure herein, to be avoided are pH values of 6.5 and below, preferably 6.0 and below, most preferably 5.5 and below, especially 5.0 and below and most especially 4.0 and below.

In another aspect, therefore, the present invention is directed to an immunoglobulin produced by the methods of production and purification disclosed according to the present invention (as detailed above and in the examples).

In accordance with the present invention, the term "percent identity" or "percent identical," when referring to a sequence, means that a sequence is compared to a claimed or described sequence after alignment of the sequence to be compared (the "Compared Sequence") with the described or claimed sequence (the "Reference Sequence"). The Percent Identity is then determined according to the following formula:

$$\text{Percent Identity} = 100 [1 - (C/R)]$$

30

WO 02/18443

PCT/US01/26926

wherein C is the number of differences between the Reference Sequence and the Compared Sequence over the length of alignment between the Reference Sequence and the Compared Sequence wherein (i) each base or amino acid in the Reference Sequence that does not have a corresponding
5 aligned base or amino acid in the Compared Sequence and (ii) each gap in the Reference Sequence and (iii) each aligned base or amino acid in the Reference Sequence that is different from an aligned base or amino acid in the Compared Sequence, constitutes a difference; and R is the number of bases or amino acids in the Reference Sequence over the length of the
10 alignment with the Compared Sequence with any gap created in the Reference Sequence also being counted as a base or amino acid.

If an alignment exists between the Compared Sequence and the Reference Sequence for which the percent identity as calculated above is
15 about equal to or greater than a specified minimum Percent Identity then the Compared Sequence has the specified minimum percent identity to the Reference Sequence even though alignments may exist in which the hereinabove calculated Percent Identity is less than the specified Percent Identity. The alignment boundary is the length of the Reference Sequence or
20 claimed sequence that is being compared.

The recombinant polynucleotides and polypeptides disclosed herein may be prepared by direct chemical synthesis thereof in light of the sequences disclosed or may be prepared by recombinant means well
25 known in the molecular biological arts. Consequently, as used herein and except as noted otherwise, all terms are defined as given below.

In accordance with the present invention, the term "DNA segment" refers to a DNA polymer, in the form of a separate fragment or
30 as a component of a larger DNA construct, which has been derived from DNA isolated at least once in substantially pure form, i.e., free of contaminating endogenous materials and in a quantity or concentration

WO 02/18443

PCT/US01/26926

enabling identification, manipulation, and recovery of the segment and its component nucleotide sequences by standard biochemical methods, for example, using a cloning vector. Such segments are provided in the form of an open reading frame uninterrupted by internal nontranslated sequences, or introns, which are typically present in eukaryotic genes. Sequences of non-translated DNA may be present downstream from the open reading frame, where the same do not interfere with manipulation or expression of the coding regions.

The nucleic acids and polypeptide expression products disclosed according to the present invention, as well as expression vectors containing such nucleic acids and/or such polypeptides, may be in "enriched form." As used herein, the term "enriched" means that the concentration of the material is at least about 2, 5, 10, 100, or 1000 times its natural concentration (for example), advantageously 0.01%, by weight, preferably at least about 0.1% by weight. Enriched preparations of about 0.5%, 1%, 5%, 10%, and 20% by weight are also contemplated. The sequences, constructs, vectors, clones, and other materials comprising the present invention can advantageously be in enriched or isolated form.

"Isolated" in the context of the present invention with respect to polypeptides (or polynucleotides) means that the material is removed from its original environment (*e.g.*, the natural environment if it is naturally occurring). For example, a naturally-occurring polynucleotide or polypeptide present in a living organism is not isolated, but the same polynucleotide or polypeptide, separated from some or all of the co-existing materials in the natural system, is isolated. Such polynucleotides could be part of a vector and/or such polynucleotides or polypeptides could be part of a composition, and still be isolated in that such vector or composition is not part of its natural environment. The polypeptides and polynucleotides of the present

WO 02/18443

PCT/US01/26926

invention are preferably provided in an isolated form, and preferably are purified to homogeneity.

The polynucleotides, and recombinant or immunogenic polypeptides, disclosed in accordance with the present invention may also be in "purified" form. The term "purified" does not require absolute purity; rather, it is intended as a relative definition, and can include preparations that are highly purified or preparations that are only partially purified, as those terms are understood by those of skill in the relevant art. For example, individual clones isolated from a cDNA library have been conventionally purified to electrophoretic homogeneity. Purification of starting material or natural material to at least one order of magnitude, preferably two or three orders, and more preferably four or five orders of magnitude is expressly contemplated. Furthermore, claimed polypeptide which has a purity of preferably 0.001%, or at least 0.01% or 0.1%; and even desirably 1% by weight or greater is expressly contemplated.

The term "coding region" refers to that portion of a gene which either naturally or normally codes for the expression product of that gene in its natural genomic environment, i.e., the region coding *in vivo* for the native expression product of the gene. The coding region can be from a normal, mutated or altered gene, or can even be from a DNA sequence, or gene, wholly synthesized in the laboratory using methods well known to those of skill in the art of DNA synthesis.

In accordance with the present invention, the term "nucleotide sequence" refers to a heteropolymer of deoxyribonucleotides. Generally, DNA segments encoding the proteins provided by this invention are assembled from cDNA fragments and short oligonucleotide linkers, or from a series of oligonucleotides, to provide a synthetic gene which is

WO 02/18443

PCT/US01/26926

capable of being expressed in a recombinant transcriptional unit comprising regulatory elements derived from a microbial or viral operon.

5 The term "expression product" means that polypeptide or protein that is the natural translation product of the gene and any nucleic acid sequence coding equivalents resulting from genetic code degeneracy and thus coding for the same amino acid(s).

10 The term "fragment," when referring to a coding sequence, means a portion of DNA comprising less than the complete coding region whose expression product retains essentially the same biological function or activity as the expression product of the complete coding region.

15 The term "primer" means a short nucleic acid sequence that is paired with one strand of DNA and provides a free 3'OH end at which a DNA polymerase starts synthesis of a deoxyribonucleotide chain.

20 The term "promoter" means a region of DNA involved in binding of RNA polymerase to initiate transcription.

The term "open reading frame (ORF)" means a series of triplets coding for amino acids without any termination codons and is a sequence (potentially) translatable into protein.

25 As used herein, reference to a DNA sequence includes both single stranded and double stranded DNA. Thus, the specific sequence, unless the context indicates otherwise, refers to the single strand DNA of such sequence, the duplex of such sequence with its complement (double stranded DNA) and the complement of such sequence.

30 Methods useful in the recombinant procedures disclosed herein are described in such compendiums as Sambrook, et al., Molecular Cloning: A

WO 02/18443

PCT/US01/26926

Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Wu et al, *Methods in Gene Biotechnology* (CRC Press, New York, NY, 1997), and *Recombinant Gene Expression Protocols*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 62, (Tuan, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 1997), the disclosures of which are hereby incorporated by reference in their entirety.

The present invention further relates to a functional, antigen-specific immunoglobulin molecule, which includes dimeric or tetrameric structures comprised of either a light and heavy chain, or two light plus two heavy chains. The highly pure or purified immunoglobulins of the present invention show a single band for the heavy chain on a gel as described in Figure 5 and as distinguished from the presently available 4G10 monoclonal antibody produced from 4G10 hybridoma cells. Of course, substitution of amino acids of similar size and chemical properties will alter the sequence of the light and heavy chain polypeptides making up the immunoglobulins of the present invention but will not produce distinctly separate bands on gels run as disclosed herein and thus will still differ from the presently known 4G10 monoclonal antibody.

20

In other embodiments, the present invention further relates to purified or highly pure immunoglobulins or monoclonal antibodies exhibiting the same or similar antigenic specificity as 4G10 monoclonal antibody and wherein said antibody demonstrates positive reactivity with phosphotyrosine containing proteins. In a one embodiment, such purified or highly pure immunoglobulins demonstrate:

- (a) positive reactivity with phosphotyrosine containing proteins; and
- (b) lack of reactivity with phosphoserine or phosphothreonine proteins.

30

In other embodiments of the present invention, such immunoglobulins exhibit positive reactivity with phosphotyrosine-

WO 02/18443

PCT/US01/26926

containing proteins from animal cells, especially wherein the antibody demonstrates positive reactivity with phosphotyrosine-containing proteins from human cells.

5 The present invention also relates to vectors comprising a polynucleotide as disclosed herein and to recombinant or genetically engineered cells capable of expressing said polynucleotides after transfected or transformed with said vectors, most especially where the expressed polynucleotides result in polypeptides that are secreted from
10 the cells.

In one embodiment, a cell is transfected with one or more of the vectors disclosed herein to form a recombinant cell that expresses the polynucleotides contained in said vector to form at least two different
15 polypeptides wherein each polypeptide represents either the heavy or the light chain of an antibody according to the present invention. In such an embodiment, a recombinant cell expresses a polynucleotide encoding a light chain and another polynucleotide encoding a heavy chain for an antibody according to the invention. Such antibodies are then assembled
20 within the cell and secreted in a form capable of binding to an antigen.

Methods of genetically engineering such cells are well known in the literature [see, for example, the methods disclosed in Morrison et al, U.S. Patent 5, 807,715, the disclosure of which is hereby incorporated by
25 reference in its entirety; see also Ochi et al, *PNAS*, **80**, 6351-55 (1983); Johnson, U.S. Patent 5,824,307]. Cells useful for such methods include most lymphoid cells, such as myelomas, hybridomas, and plasmacytomas, as well as cell lines such as CHO cells.

WO 02/18443

PCT/US01/26926

Recombinant cells of the present invention include cells producing antibodies that demonstrate positive reactivity with phosphotyrosine-containing proteins from human cells.

Host cells are genetically engineered (transduced or transformed or
5 transfected) with the vectors of this invention which may be, for example, a cloning vector or an expression vector. The vector may be, for example, in the form of a plasmid, a viral particle, a phage, etc. The engineered host cells can be cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for activating promoters, selecting transformants or amplifying the genes of
10 the present invention. The culture conditions, such as temperature, pH and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan.

The polynucleotides of the present invention may be employed for
15 producing polypeptides by recombinant techniques. Thus, for example, the polynucleotide may be included in any one of a variety of expression vectors for expressing a polypeptide. Such vectors include chromosomal, nonchromosomal and synthetic DNA sequences, e.g., derivatives of SV40; bacterial plasmids; phage DNA; baculovirus; yeast plasmids; vectors derived
20 from combinations of plasmids and phage DNA, viral DNA such as vaccinia, adenovirus, fowl pox virus, and pseudorabies. However, any other vector may be used as long as it is replicable and viable in the host.

The appropriate DNA sequence may be inserted into the vector by a
25 variety of procedures. In general, the DNA sequence is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) by procedures known in the art. Such procedures and others are deemed to be within the scope of those skilled in the art.

30 The DNA sequence in the expression vector is operatively linked to an appropriate expression control sequence(s) (promoter) to direct mRNA

WO 02/18443

PCT/US01/26926

synthesis. As representative examples of such promoters, there may be mentioned: LTR or SV40 promoter, the *E. coli. lac* or *trp*, the phage lambda P_L promoter and other promoters known to control expression of genes in prokaryotic or eukaryotic cells or their viruses. The expression vector also
5 contains a ribosome binding site for translation initiation and a transcription terminator. The vector may also include appropriate sequences for amplifying expression.

In addition, the expression vectors preferably contain one or more
10 selectable marker genes to provide a phenotypic trait for selection of transformed host cells such as dihydrofolate reductase or neomycin resistance for eukaryotic cell culture, or such as tetracycline or ampicillin resistance in *E. coli*.

15 The vector containing the appropriate DNA sequence as hereinabove described, as well as an appropriate promoter or control sequence, may be employed to transform an appropriate host to permit the host to express the protein.

20 As representative examples of appropriate hosts, there may be mentioned: bacterial cells, such as *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*; fungal cells, such as yeast; insect cells such as *Drosophila S2* and *Spodoptera Sf9*; animal cells such as CHO, COS or Bowes melanoma; adenoviruses; plant cells, etc. The selection of an appropriate host is
25 deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

More particularly, the present invention also includes recombinant constructs comprising one or more of the sequences as broadly described
30 above. The constructs comprise a vector, such as a plasmid or viral vector, into which a sequence of the invention has been inserted, in a forward or

WO 02/18443

PCT/US01/26926

reverse orientation. In a preferred aspect of this embodiment, the construct further comprises regulatory sequences, including, for example, a promoter, operably linked to the sequence. Large numbers of suitable vectors and promoters are known to those of skill in the art, and are commercially available. The following vectors are provided by way of example; Bacterial: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, pD10, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBSKS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene); pTRC99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia); Eukaryotic: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). However, any other plasmid or vector may be used as long as they are replicable and viable in the host.

Promoter regions can be selected from any desired gene using CAT (chloramphenicol transferase) vectors or other vectors with selectable markers. Two appropriate vectors are pKK232-8 and pCM7. Particular named bacterial promoters include lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P_R, P_L and trp. Eukaryotic promoters include CMV immediate early, HSV thymidine kinase, early and late SV40, LTRs from retrovirus, and mouse metallothionein-I. Selection of the appropriate vector and promoter is well within the level of ordinary skill in the art.

In a further embodiment, the present invention relates to host cells containing the above-described constructs. The host cell can be a higher eukaryotic cell, such as a mammalian cell, or a lower eukaryotic cell, such as a yeast cell, or the host cell can be a prokaryotic cell, such as a bacterial cell. Introduction of the construct into the host cell can be effected by calcium phosphate transfection, DEAE-Dextran mediated transfection, or electroporation (Davis, L., Dibner, M., Battey, J., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

30

WO 02/18443

PCT/US01/26926

The constructs in host cells can be used in a conventional manner to produce the gene product encoded by the recombinant sequence. Alternatively, the polypeptides of the invention can be synthetically produced by conventional peptide synthesizers.

5

Mature proteins can be expressed in mammalian cells, yeast, bacteria, or other cells under the control of appropriate promoters. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention.

10 Appropriate cloning and expression vectors for use with prokaryotic and eukaryotic hosts are described by Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

15 Transcription of the DNA encoding the polypeptides of the present invention by higher eukaryotes is increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are *cis*-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp that act on a promoter to increase its transcription. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the
20 replication origin bp 100 to 270, a cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers.

Generally, recombinant expression vectors will include *origins* of
25 replication and selectable markers permitting transformation of the host cell, e.g., the ampicillin resistance gene of *E. coli* and *S. cerevisiae* Trp1 gene, and a promoter derived from a highly-expressed gene to direct transcription of a downstream structural sequence. Such promoters can be derived from operons encoding glycolytic enzymes such as 3-phosphoglycerate kinase
30 (PGK), α -factor, acid phosphatase, or heat shock proteins, among others. The heterologous structural sequence is assembled in appropriate phase

WO 02/18443

PCT/US01/26926

with translation initiation and termination sequences, and preferably, a leader sequence capable of directing secretion of translated protein into the periplasmic space or extracellular medium. Optionally, the heterologous sequence can encode a fusion protein including an N-terminal identification peptide imparting desired characteristics, e.g., stabilization or simplified purification of expressed recombinant product.

Useful expression vectors for bacterial use are constructed by inserting a structural DNA sequence encoding a desired protein together with suitable translation initiation and termination signals in operable reading phase with a functional promoter. The vector will comprise one or more phenotypic selectable markers and an origin of replication to ensure maintenance of the vector and to, if desirable, provide amplification within the host. Suitable prokaryotic hosts for transformation include *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* and various species within the genera *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and *Staphylococcus*, although others may also be employed as a matter of choice.

As a representative but nonlimiting example, useful expression vectors for bacterial use can comprise a selectable marker and bacterial origin of replication derived from commercially available plasmids comprising genetic elements of the well known cloning vector pBR322 (ATCC 37017). Such commercial vectors include, for example, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). These pBR322 "backbone" sections are combined with an appropriate promoter and the structural sequence to be expressed.

Following transformation of a suitable host strain and growth of the host strain to an appropriate cell density, the selected promoter is induced by appropriate means (e.g., temperature shift or chemical induction) and cells are cultured for an additional period.

WO 02/18443

PCT/US01/26926

Cells are typically harvested by centrifugation, disrupted by physical or chemical means, and the resulting crude extract retained for further purification.

5

Microbial cells employed in expression of proteins can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents, such methods are well known to those skilled in the art.

10

Various mammalian cell culture systems can also be employed to express recombinant protein. Examples of mammalian expression systems include the COS-7 lines of monkey kidney fibroblasts, described by Gluzman, Cell, 23:175 (1981), and other cell lines capable of expressing a compatible vector, for example, the C127, 3T3, CHO, HeLa and BHK cell lines. Mammalian expression vectors will comprise an origin of replication, a suitable promoter and enhancer, and also any necessary ribosome binding sites, polyadenylation site, splice donor and acceptor sites, transcriptional termination sequences, and 5' flanking nontranscribed sequences. DNA sequences derived from the SV40 splice, and polyadenylation sites may be used to provide the required nontranscribed genetic elements.

20

The polypeptides, or antibodies, of the present invention are recovered and purified from recombinant cells as disclosed herein. Protein refolding steps can be used, as necessary, in completing configuration of the mature protein. Finally, high performance liquid chromatography (HPLC) can be employed for final purification steps as well as IMAC (immobilized metal affinity chromatography).

25

A polypeptide of the present invention may be a naturally purified product, or a product of chemical synthetic procedures, or produced by

30

WO 02/18443

PCT/US01/26926

recombinant techniques from a prokaryotic or eukaryotic host (for example, by bacterial, yeast, higher plant, insect and mammalian cells in culture). Depending upon the host employed in a recombinant production procedure, the polypeptides of the present invention may be glycosylated or may be
5 non-glycosylated. Polypeptides of the invention may also include an initial methionine amino acid residue.

The present invention also relates to an immunosorbent material comprising the purified or highly pure immunoglobulins as disclosed herein
10 and a microporous polymeric substrate. In one embodiment, such microporous polymeric substrate comprises a plurality of beads, said beads having diameters on the order of no larger than about 100 microns, preferably no larger than about 10 microns, most preferably about 5 microns with an especially preferred embodiment using beads 5 microns
15 (or micrometers) in diameter. In a specific embodiment of the present invention, the substrate is polymerized agarose.

In another embodiment using such microporous polymeric substrate, such as the aforementioned plurality of beads, such substrate
20 comprises one or more metal ions, or other metal ligands, which metal ligands bind the histidine tagged portion of a histidine tagged antibody. Such an antibody may be the histidine tagged antibody of the invention. As described herein, such antibodies are commonly highly pure or purified (meaning an antibody with the same or similar degree of purity of that
25 antibody disclosed herein as determined, for example, by the gel pattern shown for the purified or highly pure 4G10-specific antibody of the invention). Such a ligand-attached substrate (serving as a metal affinity matrix, i.e., a surface comprising a metal ligand capable of binding to a histidine tagged protein, such as an antibody, especially a histidine tagged
30 4G10-specific antibody of the present invention) is useful for attaching to the histidine-tagged portion of the antibodies of the present invention in

WO 02/18443

PCT/US01/26926

methods other than just for purification. Thus, such methods are easily adapted to assay and screening processes and are not limited to purification schemes although other and different uses will no doubt suggest themselves to those skilled in the art yet such uses are still
5 within the methods disclosed according to the present invention.

In accordance with the foregoing, the present invention further relates to a method of detecting the presence of phosphotyrosine-containing proteins in a sample comprising the steps of contacting the
10 sample with an antibody of the present invention and testing for reactivity wherein a positive reaction demonstrates the presence of a phosphotyrosine-containing protein or polypeptide in said sample.

Specific embodiments of the present invention comprise methods
15 wherein the step of testing the sample further comprises contacting the sample with an immunosorbent material which includes the monoclonal antibodies. In preferred embodiments, the step of testing further comprises testing by a method selected from the group consisting of immunofluorescence, radioimmunoassay, immunoprecipitation,
20 complement fixation, competitive reaction, Western blotting, immunohistochemistry, flow cytometry, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The monoclonal antibodies of the present invention serve as a high
25 titer, reproducible, biological reagent useful in biological/medical research for isolating and identifying phosphotyrosine-containing proteins, with potential uses in diagnosis of a variety of diseases, including certain cancers. The antibodies, which have demonstrated affinity for a variety of
30 molecules containing phosphotyrosine residues, were prepared recombinantly from corresponding cDNAs and have properties

WO 02/18443

PCT/US01/26926

indistinguishable from those of commercially available antibodies produced by the 4G10 hybridoma cell line.

Among the utilities for the antibodies disclosed according to the present invention include applications to identify cellular substrates for tyrosine kinases and make possible the affinity purification of a wide variety of phosphotyrosine-proteins, including clinical and diagnostic assays for such things as platelet-derived growth factors (PDGF - and its cellular receptor), TGF (tumor growth factor) and determining the tyrosine phosphorylation status of one or multiple proteins in a given cell or tissue sample.

In one non-limiting example of such utility, a cell or tissue sample can be reacted with the monoclonal antibodies of the present invention and the immune complex of monoclonal antibody bound to proteins containing phosphotyrosines collected. Such an immunoprecipitation or immunoaffinity purification complex can be resolved and reacted by a variety of procedures (e.g. Western blotting, ELISA) with antibodies to the various known proteins to identify the phosphotyrosine proteins in the given sample. This analysis can be extended to the discovery of novel phosphotyrosine proteins by scaling up the immunoprecipitation or immunoaffinity purification and purifying the phosphotyrosine proteins and subjecting them to analytical procedures such as protein sequencing by Edman degradation or mass spectrometry. A further example of the aforementioned embodiment involves the immunoprecipitation or immunoaffinity purification of a known protein or proteins and reacting the resulting complex with the monoclonal antibodies of the present invention for determining phosphotyrosine status.

In a simple TGF assay method, a biological fluid, such as urine or blood serum, or other potential source of TGF from a patient can be

WO 02/18443

PCT/US01/26926

reacted with a preparation of EGF receptors, for example, cell membranes
from A431, a human epidermal carcinoma cell line with numerous EGF
receptors per cell. Adenosine triphosphate (labeled in the .gamma.-
phosphate with radioactive ^{32}P or a thio analog labeled with ^{35}S) is added
5 as a source of phosphate. In the presence of TGF, the EGF receptor will
incorporate labeled phosphate into its tyrosine residues. The reaction may
then be terminated and the receptors extracted from the membrane. The
receptors are then bound to monoclonal antibodies of the present
invention (for example, using beads coated with the antibodies) and the
10 radioactivity counted to provide a measure of the growth factor present in
the sample. Assays for PDGF would follow a similar procedure employing
a PDGF-sensitive receptor. Other assays may employ nerve growth factor
receptors, insulin receptors, insulin-like growth factor receptors, sarcoma
growth factor receptors and the like. Various modifications to these
15 methods as well as other assay techniques employing our antibodies may
be devised by those skilled in the art without departing from the spirit or
scope of invention.

In carrying out the procedures of the present invention it is of
20 course to be understood that reference to particular buffers, media,
reagents, cells, culture conditions and the like are not intended to be
limiting, but are to be read so as to include all related materials that one
of ordinary skill in the art would recognize as being of interest or value in
the particular context in which that discussion is presented. For example,
25 it is often possible to substitute one buffer system or culture medium for
another and still achieve similar, if not identical, results. Those of skill in
the art will have sufficient knowledge of such systems and methodologies
so as to be able, without undue experimentation, to make such
substitutions as will optimally serve their purposes in using the methods
30 and procedures disclosed herein.

WO 02/18443

PCT/US01/26926

The present invention will now be further described by way of the following non-limiting examples. In applying the disclosure of these examples, it should be kept clearly in mind that other and different embodiments of the methods disclosed according to the present invention will no doubt suggest themselves to those of skill in the relevant art.

Example

10 **Abbreviations:** IP, immunoprecipitation; HC, heavy chain; LC, light chain; IgG, immunoglobulin; Mab, monoclonal antibody; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatography; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; HRP, horseradish peroxidase; ECL, enhanced
15 chemiluminescence; PBS, phosphate buffered saline; nt, nucleotide; EGF, epidermal growth factor; EGFR epidermal growth factor receptor; CHO, Chinese Hamster Ovary;

The definitions of nomenclature and descriptions of general
20 laboratory procedures used in this application can be found in Ausubel, F.M. *et al.*, Current Protocols In Molecular Biology. Wiley Interscience, New York, NY. 1999. All kits and enzymes were used according to the manufacture's instructions.

25 Preparation of Cell Lysates

Adherent human A431 cells were twice washed with cold PBS and subsequently lysed with ice-cold modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.25% Na-deoxycholate; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 microgram/ml each Aprotinin, leupeptin, pepstatin; 1 mM
30 Na_3VO_4 ; 1 mM NaF; 1 ml per 10^7 cells/100 mm dish) by scraping cells off the dish with a plastic cell scraper. The cell suspension was transferred into a centrifuge tube and gently rocked at 4 °C for 15 minutes to lyse

WO 02/18443

PCT/US01/26926

the cells. Lysates are centrifuged at 14,000 x g for 15 minutes and the supernatant immediately transferred to a fresh tube. Protein concentration was determined with a Coomassie-based reagent (Coomassie® Plus Protein Assay Reagent, Pierce, Rockland, IL).

5

Immunoblotting (Western Blotting)

Twenty µg of cell lysates per individual lane were subjected to SDS-PAGE and proteins transferred to a nitrocellulose membrane. The nitrocellulose membrane is washed twice with distilled H₂O and stained with Ponceau Red solution for 5 minutes to visualize protein bands. The molecular weight markers are marked with a ball point pen and the membrane blocked in freshly prepared PBS containing 3% nonfat dry milk for 20 minutes at room temperature with constant agitation. Primary antibody (native or recombinant 4G10) is diluted in PBS/3% nonfat dry milk and incubated with the membrane for 1 to 2 hours at room temperature or overnight at 4 °C. The nitrocellulose membrane is washed five times for 3 to 5 minutes each with PBS containing 0.05% Tween 20 before incubation with the secondary antibody (goat-anti-mouse HRP conjugate) for 1 hour. The membrane is washed five times again before final detection of proteins with an ECL HRP substrate.

Mouse IgG ELISA.

To measure levels of recombinant antibody in conditioned media, a mouse IgG ELISA was developed using precoated 96 well protein G strip plates (Pierce, Rockland, IL). Standards or samples are added in a 100 µl volume to wells and incubated at 37 °C for 1 hour and then washed with PBS prior to adding PBS 3% non-fat milk for 30 min at 37 °C. The plates are washed again and 100 µl of a anti-mouse HRP secondary antibody is added for 1 hour at 37 °C. Wells are then washed 3X in PBS and developed with TMB substrate solution (Pierce, Rockland, IL), stopped with 50 µl of 2 N H₂SO₄, and absorbance at 450 nm determined.

WO 02/18443

PCT/US01/26926

Immunoprecipitation.

A Protein A agarose bead slurry is washed twice with PBS and restored to a 50% slurry with PBS. The cell lysate is precleared by adding 100 microliters of the protein A agarose slurry per 1 ml of cell lysate and
5 incubating at 4 °C for 10 minutes on an orbital shaker. The protein A beads are removed by centrifugation at 14,000 × g at 4 °C for 10 minutes and supernatant transferred to a fresh centrifuge tube. The cell lysate is diluted with PBS to approximately 1 mg/ml total cell protein before addition of the immunoprecipitating antibody (IP-antibody) in a total
10 volume of 500 microliters. The cell lysate/antibody mixture is incubated for 2 hours or overnight at 4 °C on an orbital shaker. The immuno-complex is captured by adding 100 microliters of the protein A agarose slurry and incubated for either 1 hour or overnight at 4 °C on an orbital shaker. The protein A bead-bound immuno-complex is collected by
15 centrifugation for 5 seconds at 14,000 rpm and the supernatant discarded. The beads are washed 3 times with 800 microliters ice-cold modified RIPA buffer and then resuspended in 60 microliters of SDS-PAGE reducing buffer and boiled for 5 minutes to dissociate the immunocomplexes from the beads. The beads are collected by
20 centrifugation and SDS-PAGE is performed with the supernatant fraction.

Cloning, Expression and Purification of the recombinant 4G10 monoclonal Antibody.

25 In order to clone the antibody heavy chain (HC) and light chain (LC) cDNAs from the 4G10 hybridoma cell line, two 5' oligonucleotide primers were designed based on the N-terminal amino acid sequencing of the LC and HC purified peptides. The HC 5' coding strand primer RAPHC-5
30

WO 02/18443

PCT/US01/26926

5'-GCC ACC ATG GAA TGG AGT TGG ATA TTT CTC TTT CTC CTG TCA
GGA ACT GCA GGT GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTG CAR CA

(SEQ ID NO: 7)

5

consisted of 63 base oligonucleotide encoding the N-terminal leader
secretion signal sequence with a Kozak translation initiation site fused to
the first 17 nt (nucleotide) encoding the mature processed N-terminal HC.
The LC 5' coding strand primer RAPLC-5

10

5'-GCC ACC ATG GAT TTT CTG GTG CAG ATT TTC AGC TTC TTG CTA
ATC AGT GCC TCA GTT GCA ATG TCC AGA GGA GAA AAT GT

(SEQ ID NO: 8)

15

consisted of A 63 base oligonucleotide encoding the N-terminal leader
secretion signal sequence with a Kozak translation initiation site fused to
the first 17 nucleotides encoding the mature processed N-terminal LC.

20

Design of the HC 3' non-coding strand primer

5'-CTA AGC TCA TTT ACC CGG AGA CCG (SEQ ID NO: 9)

for amplification of the C-terminal encoding portion of the HC cDNA was
based on prior knowledge that the 4G10 monoclonal antibody HC
constant region was of the class γ 2b. Design of the LC 3' non-coding
strand primer

25

5'-CTC AGG ACC TTT GTC TCT AAC ACT C (SEQ ID NO: 10)

30

WO 02/18443

PCT/US01/26926

for amplification of the C-terminal encoding portion of the LC cDNA was based on prior knowledge that the 4G10 monoclonal antibody LC constant region was of the class kappa. Oligonucleotides were synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) using standard DNA synthesis chemistries.

Total RNA was purified from PBS washed snap-frozen 4G10 hybridoma cell pellets (approximately 1×10^7 cells per sample) using RNAzol™B (Tel-Test Inc, Friendswood, TX). Purified total RNA was ethanol precipitated and quantified by absorbance at 260 nm. First strand cDNA was synthesized by reverse transcribing 2 µg of total RNA with oligo(dT) using the SuperScript™ system (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). The Expand™ High Fidelity PCR system (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) was used for polymerase chain reaction (PCR) amplification of 1 µl of newly made first strand cDNA. PCR amplification conditions were as follows: after heating PCR components to 94°C, 1 µl of cDNA was added to each tube. Subsequent cycling conditions were 94°C for 15 s, 50°C for 1 min, and 72°C for 1 min for 17 cycles for LC amplification and 21 cycles for HC amplification with a final extension of 72°C for 10 min. LC and HC PCR products were purified from ethidium bromide stained agarose gels and cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) and transformed into *E. coli* competent cells according to the manufacture's instructions. For each LC or HC plasmid construct, at least 4 individual *E. coli* plasmid clones were sequenced by standard automated DNA sequencing methods and the nucleotide consensus sequence minus the N-terminal leader secretion signal sequence are described in SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2. The deduced polypeptide sequence translated from SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2 are designated SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4.

WO 02/18443

PCT/US01/26926

A hexa-histidine sequence was added to the C-terminus of the HC clone pHC-42 by site directed mutagenesis using a commercial kit (QuickChange™, Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacture's instructions. The following complementary oligonucleotides were used for
5 introducing the hexa-histidine sequence: coding strand primer HC-His 5'

5'-CTC CCG GTC TCC GGG TAA AGG TGG CCA TCA CCA CCA TCA
CCA TTG AGC TTA GAA GGG CAA TT

(SEQ ID NO: 11)

10

and non-coding strand primer HC-His 5'

5'-AAT TGC CCT TCT AAG CTC AAT GGT GAT GGT GAT GGC
CAC CTT TAC CCG GAG ACC GGG AG-3'

15

(SEQ ID NO: 12)

Successful introduction of the hexa-histidine encoding region was confirmed by DNA sequencing and corresponds to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 3 which encodes the polypeptide of SEQ ID NO:
20 6.

The ability of the cloned HC and LC cDNAs to produce a secreted functional recombinant monoclonal antibody capable of recognizing phosphotyrosine containing proteins was initially examined by transiently
25 transfecting African green monkey COS cells. HC and LC plasmids were transiently transfected into COS cells using the transfection agent Lipofectamine (Life Technologies, Gaithersburg, MD) and the conditioned media collected 3 to 5 days later. The human epidermoid carcinoma cell line A431 was used to monitor the ability of the recombinant antibody to
30 specifically recognize phosphotyrosine containing cellular proteins. A431 overexpress the Epidermal Growth Factor receptor (EGFr) and upon

WO 02/18443

PCT/US01/26926

stimulation with EGF there is a marked increase in phosphorylation of tyrosine residues in the cytoplasmic signal transducing region of the EGFR as well as many other proteins that are components of the signaling cascade downstream of the EGFR (Hunter, T. and Cooper, J.A., *Cell* 5 3:741-52 (1981); Goldkorn, T. et al., *J. Biol. Chem.*, **266**(24):16092-7 (1991); Moghal, N., et al., *Curr Opin Cell Biol.* 2:190-6 (1999). The ability of the secreted recombinant 4G10 monoclonal antibody to recognize phosphotyrosine proteins was determined by immunoblotting total protein cell lysates of EGF stimulated A431 cells. Figures 1 and 2 10 clearly demonstrate that the conditioned media from COS cells co-transfected with LC and HC plasmids or LC and HC His-tagged plasmids recognized the same complex pattern of phosphotyrosine containing proteins that native 4G10 recognizes. Conditioned media from empty vector transfection controls and secondary antibody alone did not 15 recognize any protein bands from the EGF stimulated A431 immunoblots. Furthermore, the addition of 50 mM phenylphosphate, a competitive inhibitor of phosphotyrosine binding to 4G10, completely blocked recognition of A431 phosphotyrosine containing proteins.

20 In order to produce sufficient quantities of r4G10 for commercial sale, stable transfected Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines were generated. CHO cells are routinely used for making recombinant monoclonal antibodies (Trill, J.R. et. al., *Current Opinion in Biotechnology*, 6:553-560, 1995) and several high expressing cell lines were generated 25 by transfection and selection by the method of Page and Sydenham (*Biotechnology*, 9:64-68, 1991). Briefly, the mouse dihydrofolate reductase (DHFR) cDNA (Subramani, S. et. al., *Mol. Cell. Biol.* 1:854-864) was cloned into the LC expression plasmid such that it replaced the Neomycin resistance cassette of pcDNA3.1 whereas the HC expression 30 plasmid retained the Neomycin resistance cassette. After co-transfection transformants were selected for the double phenotype of dhfr⁺/neo

WO 02/18443

PCT/US01/26926

resistance and colonies were pooled. To select for clones that produced high amounts of recombinant antibody, the pooled clones were cultured in the presence of 10^{-7} M methotrexate, a competitive inhibitor of DHFR that allows for amplification of the integrated linked HC and LC expression cassettes. Individual clones that survived methotrexate were expanded and secreted antibody production measured by an anti-IgG ELISA. High r4G10 antibody producing clones were subjected to a further round of amplification by culturing in the presence of 10^{-6} M methotrexate and again clones secreting high levels of antibody were identified by the anti-IgG ELISA.

The high producing his-tagged r4G10 CHO clones were cultured in spinner flasks or bioreactors and conditioned media pooled for antibody purification. Approximately 400 ml of CHO-4G10 conditioned media was equilibrated by adding 100 ml of 2.5 M NaCl, Sodium Phosphate pH 8.0. A 12 ml Nickel-IDA column was equilibrated with 5 column volumes of 0.5 M NaCl, 0.05 M Sodium Phosphate pH 8.0 before the sample was passed over the column once. The column was washed with 30 column volumes of 0.5 M NaCl, 0.05 M Sodium Phosphate pH 8.0 and then washed with 5 column volumes of 90% Buffer A (0.5 M NaCl, 0.05 M Sodium Phosphate pH 8.0) and 10% Buffer B (0.5 M NaCl, 0.05 M Sodium Phosphate pH 8.0 0.5 M Imidazole). Recombinant 4G10 was eluted with a 5 column volume linear gradient starting with 90% Buffer A, 10% Buffer B finishing with 100% Buffer B. Eluted fractions were collected in 2 ml tubes containing 50 mM EDTA pH 8.0 to 5% of their programmed volume. As determined by an IgG ELISA, the antibody eluted in the range of 150-250 mM Imidazole and was greater than 95% pure as assessed by SDS-PAGE. Peak fractions were pooled, dialyzed, concentrated, and buffer conditions adjusted to 1X PBS, pH 7.5, 0.02% sodium azide before the addition of glycerol to 30%.

WO 02/18443

PCT/US01/26926

- Purified r4G10 was analyzed for its ability to recognize phosphotyrosine containing proteins. Figure 3 demonstrates that the ability of r4G10 to immunoprecipitate phosphotyrosine containing proteins from EGF stimulated A431 cell lysates is comparable to native 4G10.
- 5 Figure 4 demonstrates that probing an immunoblot of A431 cell lysates with purified r4G10 recognizes the unique pattern of phosphotyrosine containing proteins that is recognized by native 4G10.

10 Determination of 4G10 purity by SDS Page

- His-tagged recombinant 4G10 was purified as described and subjected to SDS-PAGE for determination of the number of polypeptides and their approximate molecular weights. A PAGE-ONE 4/20% polyacrylamide gel (Owl Separation Systems, Portsmouth, NH) was used
- 15 for electrophoretic separation of proteins according to the method of Laemmli (Laemmli, U.K., 1970, Nature, 227, p680). Protein samples were prepared by adding 6 μ l of each protein(1 μ g/ μ l) to 4 μ l dH₂O (distilled water) and 10 μ l 2X Sample Buffer (Sigma, St. Louis, MO). Samples were boiled for 5 min, centrifuged briefly, and 20 μ l of each boiled sample was
- 20 loaded on the gel. The gel was electrophoresed using 800 ml of running buffer (3 gr/L Tris base, 14.4 gr/L Glycine, 1 g/L SDS) with 40mAmps of current for 2 hrs. The gel was then removed from its casing and rocked in dH₂O for 5 min. Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) was then used to stain the gel. Staining consisted of rocking
- 25 the gel in the Coomassie for 30 min. The subsequent destaining consisted of three, 10 min. washes with dH₂O, while gently rocking the gel. Finally, the gel was dried between two sheets of cellulose on a gel drying frame (Diversified Biotech, Boston, MA).
- 30 The antibody of the present invention was purified according to the already described procedure. For the His-tagged recombinant 4G10 the

WO 02/18443

PCT/US01/26926

purification procedure is performed under pH neutral conditions without exposing the antibody to acidic solutions that are detrimental to antibody phosphotyrosine binding activity and represents a novel purification approach. This method, employing neutral or near-neutral pH, is also
5 useful in purifying other antibodies as well as the 4G10-specific antibody of the present invention. The non-tagged antibody is prepared from the tagged antibody by removal of the tag or by Protein A affinity chromatography as is currently done for the native 4G10 product. A convenient protocol follows.

10

Purification of 4G10 by Protein A Affinity Chromatography

Two hundred ml of clarified Conditioned medium is loaded twice on to a 5 ml packed volume Protein A column at a flow rate of 2ml/min. The
15 column is then washed with 400 ml of PBS and eluted with 15 ml of pH 2.7 Elution buffer (50mM Glycine, pH 2.7) and 1 ml fractions that have been pre-spiked with 100 microliters of neutralization buffer (1M Tris, 1.5M NaCl, 1mM EDTA, 0.5% sodium azide) are collected. Fractions are immediately mixed after collecting to ensure prompt neutralization. The
20 antibody peak fractions are pooled and diluted to 1 mg/ml prior to use.

Additional General References:

1. Cohen, B., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**: 4458-4462, 1990.
- 25 2. Druker, B.J., *et al.*, New Eng. J. Med. **321**: 1383-1391, 1989.
3. Kanakura, Y., *et al.*, J. Biol. Chem. **266**: 490-495, 1991.

WO 02/18443

PCT/US01/26926

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A purified or highly pure immunoglobulin having the same specificity as 4G10 monoclonal antibody.
- 5
2. The purified or highly pure immunoglobulin of claim 1 comprising two light chain components and two heavy chain components wherein said heavy chain components exhibit a single band on gel electrophoresis.
- 10
3. The purified or highly pure immunoglobulin of claim 1 wherein said immunoglobulin comprises a histidine tag region.
4. The purified or highly pure immunoglobulin of claim 3 comprising two light chain components and two heavy chain components wherein
- 15 said heavy chain components exhibit a single band on gel electrophoresis.
5. The purified or highly pure immunoglobulin of claim 4 wherein said histidine tag is part of the heavy chain component of said antibody.
- 20
6. The purified or highly pure immunoglobulin of claim 1 further comprising a heavy chain component whose amino acid sequence is substantially the same as the sequence of SEQ ID NO: 4 and a light chain component whose amino acid sequence is substantially the same as the sequence of SEQ ID NO: 5.
- 25
7. The purified or highly pure immunoglobulin of claim 1 further comprising a light chain component whose amino acid sequence is the sequence of SEQ ID NO: 5 and whose heavy chain component is the sequence of SEQ ID NO: 4.
- 30

WO 02/18443

PCT/US01/26926

8. The purified or highly pure immunoglobulin of claim 2 further comprising a heavy chain component whose amino acid sequence is substantially the same as the sequence of SEQ ID NO: 6 and a light chain component whose amino acid sequence is the sequence of SEQ ID NO: 5.
- 5
9. An isolated recombinant polynucleotide encoding a polypeptide of claims 6, 7, and 8.
10. The isolated recombinant polynucleotide of claim 9 wherein said polynucleotide is a cDNA.
- 10
11. The complement of claim 9 or 10.
12. A vector comprising a polynucleotide of claim 9, 10, and 11.
- 15
13. A recombinant cell comprising the vector of claim 12 wherein said cell expresses the polypeptide encoded by the polynucleotide in said vector.
- 20
14. The recombinant cell of claim 13 wherein said cell also secretes an immunoglobulin.
15. The recombinant cell of claim 14 wherein the expressed polypeptide is an antibody specific for an antigen.
- 25
16. The recombinant cell of claim 15 wherein said antibodies demonstrate positive reactivity with phosphotyrosine-containing proteins from human cells.
- 30
17. An immunosorbent material comprising the monoclonal antibodies of claim 2 or claim 4 and a microporous polymeric substrate.

WO 02/18443

PCT/US01/26926

18. The immunosorbent material of claim 17 wherein the substrate is a plurality of beads wherein said beads are no larger than about 100 microns in diameter.
- 5
19. The immunosorbent material of claim 17 wherein the substrate is a plurality of beads wherein said beads are no larger than about 10 microns in diameter.
- 10
20. The immunosorbent material of claim 17 wherein the substrate is a plurality of beads wherein said beads are about 5 microns in diameter.
21. The immunosorbent material of claim 18 wherein the substrate is polymerized agarose.
- 15
22. The immunosorbent material of claim 17 wherein the substrate comprises a metal ligand capable of binding to the histidine-tagged portion of a protein.
- 20
23. The immunosorbent material of claim 22 further comprising a chemical linkage between said metal ligand and the antibodies of claim 17.
24. A method of detecting the presence of phosphotyrosine-containing proteins in a sample comprising the steps of contacting the sample with an antibody of claim 1 or 2 and testing for reactivity wherein a positive reaction demonstrates the presence of a phosphotyrosine-containing protein or polypeptide in said sample.
- 25

WO 02/18443

PCT/US01/26926

25. The method of claim 24 wherein the step of testing the sample further comprises contacting the sample with an immunosorbent material which includes the monoclonal antibodies.

5 26. The method of claim 24 wherein the step of testing further comprises testing by a method selected from the group consisting of immunofluorescence, radioimmunoassay, immunoprecipitation, complement fixation, competitive reaction, Western blotting, immunohistochemistry, flow cytometry, and enzyme-linked
10 immunosorbent assay (ELISA).

27. A method of producing a purified or highly pure immunoglobulin comprising the steps of:

(a) inserting a histidine tag sequence at the C-terminal end of the
15 heavy chain component of an immunoglobulin to be purified to produce a histidine tagged immunoglobulin;

(b) purifying said histidine tagged heavy chain polypeptide by immobilized metal affinity chromatography under neutral conditions and specifically preventing exposure of the immunoglobulin to acidic pH;

20 (c) recovering the purified histidine tagged highly purified immunoglobulin.

28. The method of claim 27 wherein said histidine tagged heavy chain component is produced by expression of a polynucleotide encoding
25 said histidine tagged heavy chain component.

29. The method of claim 27 wherein said pH in step (b) is not permitted to go below a pH of 5.0.

30 30. The method of claim 27 wherein said pH in step (b) is not permitted to go below a pH of 6.0.

WO 02/18443

PCT/US01/26926

31. The method of claim 27 wherein the antibody being purified is the antibody of claim 4.

32. The immunoglobulin produced by the method of claim 27, 28,
5 29 or 30.

10

15

20

25

45

WO 02/18443

PCT/US01/26926

Fig. 1

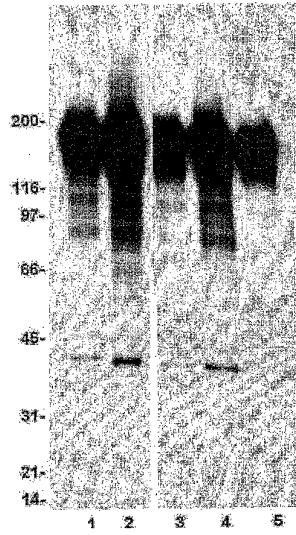


Fig. 2

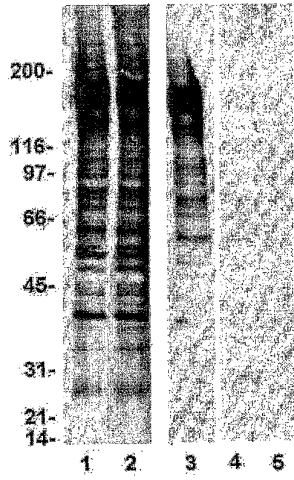
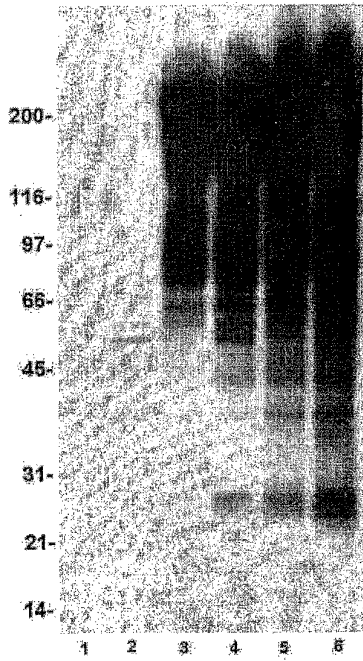


Fig. 3



WO 02/18443

PCT/US01/26926

Fig. 4

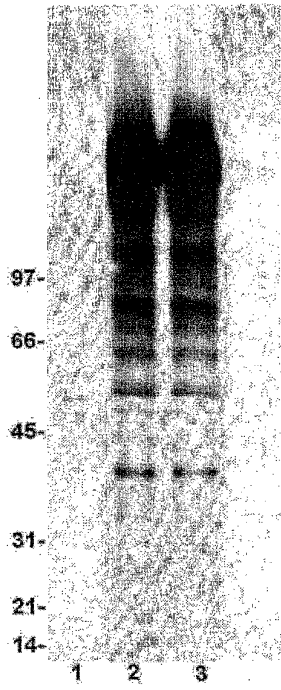
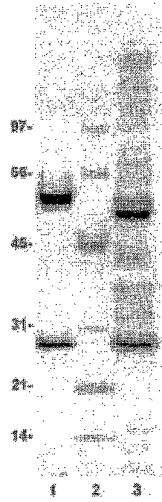


Fig. 5



WO 02/18443

PCT/US01/26926

SEQUENCE LISTING

<110> Eisinger, Dominic P.
 Stiles, Lynn
 LeMarche, Arthur
 Jelinek, Thomas

<120> Recombinant Monoclonal Antibody Specific for
 Phosphotyrosine-Containing Proteins

<130> 724650-8

<140>
 <141>

<150> US/09/653,755
 <151> 2000-09-01

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 1365
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:cDNA for heavy
 chain of recombinant antibody

<400> 1
 gaggtccagc tgcarcagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgatgata 60
 tcctgcagga cttctgcata cacattcact gaaaacaccg tgcactgggt gaagcagagc 120
 catggagaga gcottgagtg gattggaggt attaatcctt actatggtgg ttctatcttc 180
 agcccgaagt tcaagggcaa ggccaatg actgtagaca agtccctcag cacagcctac 240
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggtat tctgcagtct attactgtgc aagaagggtc 300
 ggggcgtact actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcaactgtct ctcagccaaa 360
 acaacacccc catcagtcta tccaactggcc cctgggtgtg gagatacaac tggttcctcc 420
 gtgactctgg gatgcctggt caagggctac ttccctgagt cagtgcactg gaacttggac 480
 tctggatccc tgtccagcag tgtgcacacc ttcccagctc tcctgcagtc tggactctac 540
 actatgagca gctcagtgac tgtcccctcc agcaccctgg caagtcagac cgtcacctgc 600
 agcgttgctc acccagccag cagcaccacg gtggacaata aacttgagcc cagcgggccc 660
 attcaacaa tcaaccctg tctcactgc aaggagtgtc acaaatgccc agtctctaac 720
 ctcgagggtg gacctccgt ctctactctc cctccaata tcaaggatgt actcatgatc 780
 tcctgcacac ccaaggtcac gtgtgtggtg gtggatgtga gcagagatga cccagagctc 840
 cagatcaagc ggtttgtgaa caacgtggaa gtacacacag ctacagaca aacctataga 900
 gaggtataca acagtactat ccgggtggtc agcaccctcc coactccagca ccaggactgg 960
 atgattggca agggattcaa atgcaaggtc aacaacaaag acctcccact acccatcgag 1020
 agaaccatct caaaaattaa aggcctagtc agagctccac aagtatacat ctgtccgcca 1080
 ccagcagagc agttgtccag gaaagatgct agtctcactt gcctggtcgt gggcttcaac 1140
 cctggagaca tcagtgtgga gtggaccagc aatgggcata cagaggagaa ctacaaggac 1200
 accgcaccag tcctggactc tgacggttct tacttcatat atagcaagct caatatgaaa 1260
 acaagcaagt gggcgaaaac agattccttc tcatgcaagc tgagacaaga gggctgaaa 1320
 aattactacc tgaagaagac catctcccggt tctccgggta aatga 1365

<210> 2
 <211> 645

WO 02/18443

PCT/US01/26926

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:cDNA for light chain of recombinant antibody

<400> 2

```

gaaaatgtgc tcaccagtc tcagcaatc atgtctgcat ctccagggga aaagtcacc 60
atgacctgca gggccagctc aagtgaagt tccagttact tgcactggta tcggcagaag 120
tcaggctgct cccccaaact ctggatttat agsacatoca acttggcttc tggagtcctc 180
gctcggcttca gtggcagctg gctcggggac tcttactctc tcacaatcag cagtggtggag 240
gctgaaagtg ctggcaacta tctctgcccag cagtacagtg gttaccggac gtcgggtgga 300
ggcaccagc tggaaatcaa aggggtgat gctgcaccaa ctgtatccat ctccocaca 360
tccagtgagc agttaacatc tggagtgcc tcagtcgtgt gcttctttaa caactctac 420
ccagagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaa tgggtctctg 480
aacagttgga ctgacagga cagcaaac acgacctaca gcctgagcag caccctcaca 540
ttgaccaagc acgagatga acgacatac agctatact gtgaggccac tcacaagaca 600
tcaacttcc ccatctcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag 645

```

<210> 3

<211> 1389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:cDNA for heavy chain of recombinant antibody with 3'-histidine tag sequence

<400> 3

```

gaggtccagc tgcxrcagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtcatgata 60
tcctgcagga ctctgcata cacattcaact gaaaacacgc tgcactgggt gaagcagagc 120
catggagaga gccttgagtg gattggaggt attaatcctt actatggttg ttctatcttc 180
agccggaagt tcaaggccaa ggccacattg actgtagaca agtctctcag cacagcctac 240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcaagtct attactgtgc aagaagggtc 300
ggggcgtact actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagcttc ctacgcaaaa 360
acaacacccc catcagtcta tccactggcc cctgggtgtg gagatacaac tggttcctcc 420
gtgactctgg gatgectgtt caagggtctac ttccctgagt cagtgaactgt gaattggaac 480
tctggatccc tgtccagcag tgtgcaaccc ttcccagctc tctctcagtc tggactctac 540
actatgagca gctcagtgac tgtcccctcc agcaccctgg caagtccagc cgtcacctgc 600
agcgttgctc acccagccag cagcaccacg gtggacaaaa aacttgagcc cagcgggccc 660
atttcaacaa tcaacccctg tctccatgc aaggagtgtc acaaatgccc agctctaac 720
ctcgaggttg gaccatccgt ctctcatctc ctcccaata tcaaggatgt actcatgatc 780
tccctgacac ccaaggtcac gtgtgtggtg gtggatgtga gcagagatga cccagagctc 840
cagatcagct ggtttgtgaa caagtgga gtacacacag ctcaagacaca aacctatags 900
gagattaca acagtatcat cgggtgtgac agcaccctcc ccattccagca ccaggactgg 960
atgagtgga agagttcaa atgcaaggtc aacaacaaag aacctccatc acccatcag 1020
agAACcAtct caaaaattaa aggcctagtc agagctccac agtatacat ctgtccgcc 1080
ccagcagagc agttgtcccg gaagatgtc agtctcaatt gcctggtctg gggcttcaac 1140
cctggagaca tcagtggtga gtggaccacg aatgggcata cagaggagaa ctacaagga 1200
accgcaaccg tcctggactc tgaccgttct tacttcatat atagcaagct caatatgaa 1260
acaagcaagt gggagaaac agattccttc tcatgcaacg tgagacacga gggctgtaa 1320
aattactacc tgaagaagac catctcccgg tctccgggta aagtgggcca tcaccacca 1380
caccattga 1389

```

<210> 4

WO 02/18443

PCT/US01/26926

<211> 454
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Amino acid
 sequence for heavy chain of recombinant antibody

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Met Ile Ser Cys Arg Thr Ser Ala Tyr Thr Phe Thr Glu Asn
 20 25 30
 Thr Val His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Gly Ser Ile Phe Ser Pro Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Ala Gly Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr
 180 185 190
 Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205
 Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile
 210 215 220
 Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn
 225 230 235 240
 Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp
 245 250 255
 Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270

WO 02/18443

PCT/US01/26926

Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
 275 280 285

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
 290 295 300

Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
 305 310 315 320

Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
 325 330 335

Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala
 340 345 350

Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys
 355 360 365

Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile
 370 375 380

Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp
 385 390 395 400

Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys
 405 410 415

Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys
 420 425 430

Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile
 435 440 445

Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 5
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Amino acid
 sequence for light chain of recombinant antibody

<400> 5
 Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Arg Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

WO 02/18443

PCT/US01/26926

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu
65 70 75 80
Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110
Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125
Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile
130 135 140
Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160
Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190
Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 6
<211> 462
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Amino acid
sequence for heavy chain of recombinant antibody
with C-terminal histidine tag sequence

<400> 6
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Met Ile Ser Cys Arg Thr Ser Ala Tyr Thr Phe Thr Glu Asn
20 25 30
Thr Val His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Gly Ser Ile Phe Ser Pro Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

WO 02/18443

PCT/US01/26926

	85	90	95
Ala Arg Arg Ala Gly Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	100	105	110
Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro	115	120	125
Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly	130	135	140
Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn	145	150	155
Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln	165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr	180	185	190
Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser	195	200	205
Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile	210	215	220
Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn	225	230	235
Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp	245	250	255
Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp	260	265	270
Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn	275	280	285
Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn	290	295	300
Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp	305	310	315
Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro	325	330	335
Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala	340	345	350
Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys	355	360	365
Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile	370	375	380
Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp	385	390	395

WO 02/18443

PCT/US01/26926

Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys
 405 410 415

Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys
 420 425 430

Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile
 435 440 445

Ser Arg Ser Pro Gly Lys Gly Gly His His His His His His
 450 455 460

<210> 7
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:HC 5' coding
 strand primer RAPHC-5

<400> 7
 gccaccatgg aatggagttg gatatttctc tttctctgt caggaactgc agtgtccac 60
 tctgaggtcc agctgcarca 80

<210> 8
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: LC 5'-coding
 strand primer RAPLC-5.

<400> 8
 gccaccatgg atttctggg gcagatttcc agcttcttgc taatcagtc ctcagttgca 60
 atgtccagag gagaaaatgt 80

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:HC 3'
 non-coding strand primer

<400> 9
 ctaagctcat ttaccggag acog 24

<210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

WO 02/18443

PCT/US01/26926

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:LC 3'
non-coding strand primer

<400> 10
ctcaggacct ttgtctctaa cactc 25

<210> 11
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:HC His 5'
coding strand primer

<400> 11
ctcccgtct ccgggtaaag gtggccatca ccaccatcac cattgagott agaagggcaa 60
tt 62

<210> 12
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:HC His 5'
non-coding strand primer

<400> 12
aattgccott ctaagctcaa tggatggt ggtgatggcc acctttacc ggagaccggg 60
ag 62

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/018443 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/63, 5/10, 15/13, A61K 31/7088, C07K 16/44, G01N 33/53, 33/574, 33/538, C12N 15/09
- (21) International Application Number: PCT/US01/26926
- (22) International Filing Date: 30 August 2001 (30.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/653,755 1 September 2000 (01.09.2000) US
- (71) Applicant: UPSTATE BIOTECHNOLOGY, INC. [US/US]; 10 Old Barn Road, Lake Placid, NY 12946 (US).
- (72) Inventors: ESINGER, Dominic; East Hill Road, Keene, NY 12942 (US); STILES, Lynn; 3 McKenzie Pond Road, Saranac Lake, NY 12983 (US); LAMARCHE, Aruther; 26 Lake View Street, Lake Placid, NY 12946 (US); JELINEK, Thomas; 32 Holly Hill Road, Lake Placid, NY 12946 (US).
- (74) Agents: GRANT, Alan, J. et al.; Carella, Byrne, Bain, Gillilan, Cecchi, Stewart & Olstein, 6 Becker Farm Road, Roseland, NJ 07068 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NI, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
13 February 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/018443 A3

(54) Title: A RECOMBINANT MONOCLONAL ANTIBODY TO PHOSPHOTYROSINE-CONTAINING PROTEINS

(57) Abstract: A purified or highly pure recombinant monoclonal antibody with 4G10-hybridoma type specificity is disclosed along with polynucleotides, including cDNA sequences, encoding the antibody chains and the amino acid sequences corresponding to said cDNA polynucleotides and uses for said sequences. Also disclosed are corresponding tagged sequences useful in molecular biological techniques and uses for said sequences.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/26926
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/63 C12N15/10 C12N15/13 A61K31/7088 C07K16/44 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/538 C12N15/09		
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) IPC 7 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) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, PAJ, 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 97 42501 A (BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA) 13 November 1997 (1997-11-13) page 5, line 32	1,6,7
Y	---	2-5, 8-16, 27-32
Y	WEGENER ANNE-MARIE KARIN ET AL: "Distinct domains of the CD3-gamma chain are involved in surface expression and function of the T cell antigen receptor." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 'Online!' vol. 270, no. 9, 1995, pages 4675-4680, XP002210423 ISSN: 0021-9258 Retrieved from the Internet: <URL:http://www.jbc.org/cgi/content/full/270/9/4675> 'retrieved on 2002-08-21' page 3 -page 4 ---	17-26
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim 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 21 August 2002		Date of mailing of the international search report 11/09/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 6618 Patentstr. 2 NL - 2250 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3340, Telex 551 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wagner, R

Form PCT/ISA/210 [continued] (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/US 01/26926

C./Continuation DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUNANDA R NARAYANAN: "PREPARATIVE AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF PROTEINS" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol. 658, no. 2, 14 January 1994 (1994-01-14), pages 237-258, XP000425927 ISSN: 0021-9673 page 250	2-5, 8-32
Y	KANAKURA Y ET AL: "PHORBOL 12-MYRISTATE 13-ACETATE INHIBITS GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR-INDUCED PROTEIN TYROSINE PHOSPHORYLATION IN A HUMAN FACTOR-DEPENDENT HEMATOPOIETIC CELL LINE" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 1, 1991, pages 490-495, XP002210429 ISSN: 0021-9258 page 490	24
A	JEAN YIN JEN WANG: "ANTIBODIES FOR PHOSPHOTYROSINE: ANALYTICAL AND PREPARATIVE TOOL FOR TYROSYL-PHOSPHORYLATED PROTEINS" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 172, 1988, pages 1-7, XP001022648 the whole document	1-32
A	MAYER A ET AL: "Exemplifying guidelines for preparation of recombinant DNA products in phase I trials in cancer: Preparation of a genetically engineered anti-CEA single chain Fv antibody." EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, vol. 34, no. 7, June 1998 (1998-06), pages 968-976, XP004284972 ISSN: 0959-8049 page 970	1-32
A	TRILL JOHN J ET AL: "Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells." CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, vol. 6, no. 5, 1995, pages 553-560, XP002921621 ISSN: 0958-1669 cited in the application the whole document	1-32

1

Form PCT/ISA 210 (continuation of second sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
	International application No. PCT/US 01/26926
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 9-16 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. <input type="checkbox"/>	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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
,	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input type="checkbox"/>	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	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01/26926

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 9-16

-Present claims 9-16 relate to an extremely large number of possible polynucleotides. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the polynucleotides claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the polynucleotides identified by Seq. Id. Nos 1-3.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersIn International Application No
PCT/US 01/26926

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9742501	A	13-11-1997	CA 2253776 A1 13-11-1997
			EP 0901628 A1 17-03-1999
			JP 2000517415 T 26-12-2000
			WO 9742501 A1 13-11-1997
			US 6071707 A 06-06-2000

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/543	5 2 5 C
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/548	
G 0 1 N 33/548	G 0 1 N 33/553	
G 0 1 N 33/553	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 スタイルズ, リン

アメリカ合衆国, 1 2 9 8 3 ニューヨーク, サラナク レーク, マッケンジー ポンド ロード
3

(72) 発明者 ラマーシュ, アルサー

アメリカ合衆国, 1 2 9 4 6 ニューヨーク, レーク ブラシッド, レーク ビュー ストリート
2 6

(72) 発明者 ジェリネック, トマス

アメリカ合衆国, 1 2 9 4 6 ニューヨーク, レーク ブラシッド, ハリー ヒル ロード 3 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA04 DA02 DA06 EA04 GA11 HA15
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA90X AA91X AA93Y AB01 BA02 CA25 CA44 CA46
4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 CA40 DA76 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	抗磷酸酪氨酸蛋白的重组单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2004526408A	公开(公告)日	2004-09-02
申请号	JP2002523957	申请日	2001-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	上州生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Upstate Biotechnology公司, 公司		
[标]发明人	イーシンジャードミニック スタイルズリン ラマーシュアルーザー ジェリネットマス		
发明人	イーシンジャー,ドミニック スタイルズ,リン ラマーシュ,アルーザー ジェリネット,トマス		
IPC分类号	G01N33/53 C07K1/22 C07K16/06 C07K16/18 C07K17/06 C07K17/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/13 C12P21/02 G01N33/543 G01N33/548 G01N33/553		
CPC分类号	C07K16/18 C07K16/065		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K1/22 C07K16/18 C07K17/06 C07K17/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/543.525.C G01N33/548 G01N33/553 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024 /HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045 /EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	丹羽浩之		
优先权	09/653755 2000-09-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了具有4G10杂交瘤类型特异性的纯化或高纯度重组单克隆抗体，其中多核苷酸包含编码对应于抗体链和cDNA多核苷酸的氨基酸序列的cDNA序列，并公开了所述序列的用途。这一点。还公开了可用于分子生物学技术和所述序列的用途的相应标签序列。

