

(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2005-528884

(P2005-528884A)

(43) 公表日 平成17年9月29日(2005.9.29)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 4
<b>A 6 1 P 35/00</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 5
<b>A 6 1 P 43/00</b>	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 5
<b>C O 7 K 16/30</b>	A 6 1 P 43/00 1 O 5	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-536404 (P2003-536404)	(71) 出願人	503211596 バイエル・ファーマシユーチカルズ・コーポレーション アメリカ合衆国コネチカット州06516 ウエストヘブン・モーガンレーン400
(86) (22) 出願日	平成14年10月18日(2002.10.18)	(74) 代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月15日(2004.4.15)	(72) 発明者	タケウチ, トシヒコ アメリカ合衆国カリフォルニア州94611 1オークランド・アスコットドライブ65 29
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/033470	(72) 発明者	デウボワーストリングフェロー, ナタリー アメリカ合衆国カリフォルニア州94707 7パークリー・ジアラメダ1008
(87) 国際公開番号	W02003/033674		
(87) 国際公開日	平成15年4月24日(2003.4.24)		
(31) 優先権主張番号	60/343,657		
(32) 優先日	平成13年10月18日(2001.10.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/377,716		
(32) 優先日	平成14年5月2日(2002.5.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MN結合および細胞接着中和活性を有するヒト抗体

## (57) 【要約】

本発明はプロテオグリカンドメイン内のG E E D L P反復を標的とするモノクローナルヒトMN抗体もしくはMN抗体フラグメントより構成される。MN細胞表面タンパク質のプロテオグリカンドメインは4個の同一のこれらG E E D L P反復を含有する。所望のエピトープへの結合は競合的E L I S Aにより確認され、ここでE L I S Aシグナルは本反復を含有するペプチド(P G E E D L P G E E D L P)との共インキュベーションにより減弱されうる。結合のこの阻害はまた、ピアコア(B i a c o r e)アッセイを使用しても確認することができ、ここでは固定されたMNもしくはプロテオグリカンペプチドへの所望の抗体の結合が該ペプチド反復により阻害されうる。ペプチド反復への結合に加え、ヒト抗MN抗体はMN被覆プラスチック製プレートへのC G L - 1細胞の細胞接着を阻害することができる。ヒト抗MN抗体は、F A C Sおよび免疫組織化学的方法を使用して癌細胞および腫瘍中のMN発現を診断および定量するのに使用されている。ヒト抗MN I g G 1が抗体依存性の細胞媒介性の細胞傷害性により腫瘍細胞の溶解を媒介する一例もまた提供される。従って、これらの抗体は、MNがアップレギュレートされている癌の処置に有用であることができるか、もしくは、MNがアップレギュレートされている癌の診断に有用となり得る。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

M N タンパク質を結合するヒト抗体の精製された調製物。

## 【請求項 2】

抗体が M N タンパク質のプロテオグリカンドメインに結合する、請求項 1 記載の精製された調製物。

## 【請求項 3】

抗体が M N タンパク質のプロテオグリカンドメイン内の G E E D L P 反復領域に結合する、請求項 1 記載の精製された調製物。

## 【請求項 4】

抗体が約 0.6 nM ないし約 1800 nM の  $K_d$  でヒト M N タンパク質に結合する、請求項 3 記載の調製物。

## 【請求項 5】

抗体が約 0.6 nM ないし約 90 nM の  $K_d$  でヒト M N タンパク質に結合する、請求項 3 記載の調製物。

## 【請求項 6】

ヒト抗体が配列番号 61 ~ 80 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる V H 3 - C D R 3 領域を含んでなる、請求項 1 記載の精製された調製物。

## 【請求項 7】

ヒト抗体が配列番号 48 ~ 60 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる V H 3 - C D R 1 領域を含んでなる、請求項 1 記載の精製された調製物。

## 【請求項 8】

ヒト抗体が配列番号 64 のアミノ酸を含んでなる V H 3 - C D R 3 領域を含んでなる、請求項 1 記載の精製された調製物。

## 【請求項 9】

ヒト抗体が配列番号 81 のアミノ酸配列を含んでなる V L 1 - C D R 3 領域を含んでなる、請求項 1 記載の精製された調製物。

## 【請求項 10】

配列番号 82 ~ 83 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる V L 2 - C D R 1 領域を含んでなる請求項 1 記載の精製された調製物。

## 【請求項 11】

ヒト抗体が配列番号 84 ~ 89 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる V L 2 - C D R 3 領域を含んでなる、請求項 1 記載の精製された調製物。

## 【請求項 12】

ヒト抗体が配列番号 61 および 84、配列番号 62 および 87、配列番号 63 および 89、配列番号 64 および 84、配列番号 65 および 84、配列番号 66 および 85、配列番号 67 および 88 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 3 および V L 2 - C D R 3 のアミノ酸配列対を含んでなる、請求項 1 記載の精製された調製物。

## 【請求項 13】

ヒト抗体が配列番号 61 および 86、配列番号 61 および 85、配列番号 61 および 87、配列番号 61 および 88、配列番号 61 および 89、配列番号 63 および 86、配列番号 63 および 85、配列番号 63 および 87、配列番号 63 および 88 ならびに配列番号 63 および 84 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 3 および V L 2 - C D R 3 のアミノ酸配列対を含んでなる、請求項 1 記載の精製された調製物。

## 【請求項 14】

ヒト抗体が配列番号 71 および 87、配列番号 61 および 87、配列番号 72 および 87、配列番号 73 および 87、配列番号 74 および 87、配列番号 75 および 87、配列番号 76 および 87、配列番号 77 および 87、配列番号 78 および 87、配列番号 79 および 87 ならびに配列番号 80 および 87 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 3 および V L 2 - C D R 3 のアミノ酸配列対を含んでなる、請求項 1 記載の精製された調製

10

20

30

40

50

物。

【請求項 15】

ヒト抗体が配列番号 61 および 81、配列番号 69 および 81 ならびに配列番号 70 および 81 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 3 および V L 1 - C D R - 3 のアミノ酸配列対を含んでなる、請求項 1 記載の精製された調製物。

【請求項 16】

ヒト抗体が配列番号 61 および 86 および 48、配列番号 61 および 86 および 49、配列番号 61 および 86 および 50、配列番号 61 および 86 および 51、配列番号 61 および 86 および 52、配列番号 61 および 86 および 53、配列番号 61 および 86 および 54、配列番号 61 および 86 および 55、配列番号 61 および 86 および 56 ならびに配列番号 61 および 86 および 57 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 3、V L 2 - C D R 3 および V H 3 - C D R 1 のアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 記載の精製された調製物。

10

【請求項 17】

M N タンパク質を結合するヒト抗体の精製された調製物をコードするヌクレオチド配列。

【請求項 18】

ヌクレオチド配列が配列番号 1 ~ 13 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 1 領域を含んでなる、請求項 17 記載の精製された調製物。

【請求項 19】

ヌクレオチド配列が配列番号 14 ~ 33 よりなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる V H 3 - C D R 3 領域を含んでなる、請求項 17 記載の精製された調製物。

20

【請求項 20】

ヌクレオチド配列が配列番号 34 ~ 36 よりなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる V L 1 - C D R 3 領域を含んでなる、請求項 17 記載の精製された調製物。

【請求項 21】

ヌクレオチド配列が配列番号 37 ~ 38 よりなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる V L 2 - C D R 1 領域を含んでなる、請求項 17 記載の精製された調製物。

【請求項 22】

ヌクレオチド配列が配列番号 39 ~ 44 よりなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる V L 2 - C D R 3 領域を含んでなる、請求項 17 記載の精製された調製物。

30

【請求項 23】

ヌクレオチド配列が配列番号 1 および 14 および 41、配列番号 2 および 14 および 41、配列番号 3 および 14 および 41 ならびに配列番号 4 および 14 および 41 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 1、V H 3 - C D R 3 および V L 2 - C D R 3 のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 17 記載の精製された調製物。

【請求項 24】

ヌクレオチド配列が配列番号 14 および 37 および 41 ならびに配列番号 14 および 38 および 41 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 3、V L 2 - C D R 1 および V L 2 - C D R 3 のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 17 記載の精製された調製物。

40

【請求項 25】

ヌクレオチド配列が配列番号 14 および 41 および 1、配列番号 14 および 41 および 2、配列番号 14 および 41 および 3、配列番号 14 および 41 および 4、配列番号 14 および 41 および 5、配列番号 14 および 41 および 6、配列番号 14 および 41 および 7、配列番号 14 および 41 および 8、配列番号 14 および 41 および 9 ならびに配列番号 14 および 41 および 10 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 3、V L 2 - C D R 3 および V H 3 - C D R 1 のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 17 記載の精製された調製物。

【請求項 26】

ヌクレオチド配列が配列番号 14 および 39、配列番号 15 および 42、配列番号 16

50

および 4 4、配列番号 1 7 および 3 9、配列番号 1 8 および 3 9、配列番号 1 9 および 4 0 ならびに配列番号 2 0 および 4 3 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 3、V L 2 - C D R 3 のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 1 7 記載の精製された調製物。

【請求項 2 7】

ヌクレオチド配列が配列番号 1 4 および 3 4、配列番号 2 2 および 3 4、配列番号 2 2 および 3 5、配列番号 2 2 および 3 6 ならびに配列番号 2 3 および 3 4 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 3、V L 1 - C D R 3 のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 1 7 記載の精製された調製物。

【請求項 2 8】

ヌクレオチド配列が配列番号 1 4 および 4 1、配列番号 1 4 および 4 0、配列番号 1 4 および 4 2、配列番号 1 4 および 4 3、配列番号 1 4 および 4 4、配列番号 1 6 および 4 1、配列番号 1 6 および 4 0、配列番号 1 6 および 4 2、配列番号 1 6 および 4 3 ならびに配列番号 1 6 および 3 9 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 3、V L 2 - C D R 3 のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 1 7 記載の精製された調製物。

10

【請求項 2 9】

ヌクレオチド配列が配列番号 2 4 および 4 2、配列番号 1 4 および 4 2、配列番号 2 5 および 4 2、配列番号 2 6 および 4 2、配列番号 2 7 および 4 2、配列番号 2 8 および 4 2、配列番号 2 9 および 4 2、配列番号 3 0 および 4 2、配列番号 3 1 および 4 2、配列番号 3 2 および 4 2 ならびに配列番号 3 3 および 4 2 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 3、V L 2 - C D R 3 のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 1 7 記載の精製された調製物。

20

【請求項 3 0】

M N 結合抗体をコードする、請求項 1 7 記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

【請求項 3 1】

M N 結合抗体をコードする、請求項 1 8 記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

【請求項 3 2】

M N 結合抗体をコードする、請求項 1 9 記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

30

【請求項 3 3】

M N 結合抗体をコードする、請求項 2 0 記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

【請求項 3 4】

M N 結合抗体をコードする、請求項 2 1 記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

【請求項 3 5】

M N 結合抗体をコードする、請求項 2 2 記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

【請求項 3 6】

M N 結合抗体をコードする、請求項 2 3 記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

40

【請求項 3 7】

M N 結合抗体をコードする、請求項 2 4 記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

【請求項 3 8】

M N 結合抗体をコードする、請求項 2 5 記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

【請求項 3 9】

M N 結合抗体をコードする、請求項 2 6 記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベク

50

ター。

【請求項 4 0】

M N 結合抗体をコードする、請求項 2 7 記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

【請求項 4 1】

M N 結合抗体をコードする、請求項 2 8 記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

【請求項 4 2】

M N 結合抗体をコードする、請求項 2 9 記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

10

【請求項 4 3】

M N 結合抗体を発現する、請求項 3 0 記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 4 4】

M N 結合抗体を発現する、請求項 3 1 記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 4 5】

M N 結合抗体を発現する、請求項 3 2 記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 4 6】

M N 結合抗体を発現する、請求項 3 3 記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 4 7】

M N 結合抗体を発現する、請求項 3 4 記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

20

【請求項 4 8】

M N 結合抗体を発現する、請求項 3 5 記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 4 9】

M N 結合抗体を発現する、請求項 3 6 記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 5 0】

M N 結合抗体を発現する、請求項 3 7 記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 5 1】

M N 結合抗体を発現する、請求項 3 8 記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 5 2】

M N 結合抗体を発現する、請求項 3 9 記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

30

【請求項 5 3】

M N 結合抗体を発現する、請求項 4 0 記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 5 4】

M N 結合抗体を発現する、請求項 4 1 記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 5 5】

M N 結合抗体を発現する、請求項 4 2 記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 5 6】

抗体が発現される条件下で請求項 3 1 記載の宿主細胞を培養すること；および宿主細胞培養物からヒト抗体を精製すること

の段階を含んでなるヒト抗体の作成方法。

40

【請求項 5 7】

抗体が発現される条件下で請求項 3 2 記載の宿主細胞を培養すること；および宿主細胞培養物からヒト抗体を精製すること

の段階を含んでなるヒト抗体の作成方法。

【請求項 5 8】

抗体が発現される条件下で請求項 3 3 記載の宿主細胞を培養すること；および宿主細胞培養物からヒト抗体を精製すること

の段階を含んでなるヒト抗体の作成方法。

【請求項 5 9】

抗体が発現される条件下で請求項 3 4 記載の宿主細胞を培養すること；および宿主細胞

50

培養物からヒト抗体を精製すること  
の段階を含んでなるヒト抗体の作成方法。

【請求項 6 0】

抗体が発現される条件下で請求項 3 5 記載の宿主細胞を培養すること；および宿主細胞培養物からヒト抗体を精製すること

の段階を含んでなるヒト抗体の作成方法。

【請求項 6 1】

抗体が発現される条件下で請求項 3 6 記載の宿主細胞を培養すること；および宿主細胞培養物からヒト抗体を精製すること

の段階を含んでなるヒト抗体の作成方法。

10

【請求項 6 2】

抗体が発現される条件下で請求項 3 7 記載の宿主細胞を培養すること；および宿主細胞培養物からヒト抗体を精製すること

の段階を含んでなるヒト抗体の作成方法。

【請求項 6 3】

抗体が発現される条件下で請求項 3 8 記載の宿主細胞を培養すること；および宿主細胞培養物からヒト抗体を精製すること

の段階を含んでなるヒト抗体の作成方法。

【請求項 6 4】

抗体が発現される条件下で請求項 3 9 記載の宿主細胞を培養すること；および宿主細胞培養物からヒト抗体を精製すること

の段階を含んでなるヒト抗体の作成方法。

20

【請求項 6 5】

抗体が発現される条件下で請求項 4 0 記載の宿主細胞を培養すること；および宿主細胞培養物からヒト抗体を精製すること

の段階を含んでなるヒト抗体の作成方法。

【請求項 6 6】

抗体が発現される条件下で請求項 4 1 記載の宿主細胞を培養すること；および宿主細胞培養物からヒト抗体を精製すること

の段階を含んでなるヒト抗体の作成方法。

30

【請求項 6 7】

抗体が発現される条件下で請求項 4 2 記載の宿主細胞を培養すること；および宿主細胞培養物からヒト抗体を精製すること

の段階を含んでなるヒト抗体の作成方法。

【請求項 6 8】

抗体が発現される条件下で請求項 4 3 記載の宿主細胞を培養すること；および宿主細胞培養物からヒト抗体を精製すること

の段階を含んでなるヒト抗体の作成方法。

【請求項 6 9】

a) MN タンパク質がある種の細胞中で発現される状態を有するヒトを提供すること；  
および

b) 有効量のヒト MN 抗体化合物を前記ヒトに投与すること（ここで前記化合物は MN 抗体および細胞傷害性作用物質を包含し、ここで前記細胞傷害性作用物質は前記 MN 発現細胞中で細胞死を誘導することが可能である）

の段階を含んでなる、MN タンパク質がある種の細胞中で発現されるヒトの障害の治療方法。

40

【請求項 7 0】

障害が腎細胞癌、食道癌、子宮頸癌、悪性結腸癌および非小細胞肺癌よりなる群から選択される、請求項 6 9 記載の方法。

【請求項 7 1】

50

抗体が配列番号 61 ~ 80 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 3 領域を含んでなる、請求項 69 記載の方法。

【請求項 72】

抗体が配列番号 48 ~ 60 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 1 領域を含んでなる、請求項 69 記載の方法。

【請求項 73】

抗体が配列番号 81 よりなる V L 1 - C D R 3 領域を含んでなる、請求項 69 記載の方法。

【請求項 74】

抗体が配列番号 82 ~ 83 よりなる群から選択される V L 2 - C D R 1 領域を含んでなる、請求項 69 記載の方法。 10

【請求項 75】

抗体が配列番号 84 ~ 89 よりなる群から選択される V L 2 - C D R 3 領域を含んでなる、請求項 69 記載の方法。

【請求項 76】

a) 試験調製物を MN 抗原に特異的に結合する抗体と接触させること、および  
b) 抗体 - MN 抗原複合体の存在について試験調製物をアッセイすること  
の段階を含んでなる、試験調製物中の MN 抗原の検出方法。

【請求項 77】

抗体が検出可能な標識を含んでなる請求項 76 記載の方法。 20

【請求項 78】

抗体が固体支持体に結合される請求項 76 記載の方法。

【請求項 79】

a) 障害を有することが疑われる患者からのサンプルを、MN に結合するヒト抗体と接触させること；および  
b) 抗体 - MN 複合体の存在についてアッセイして、それにより正常サンプル中の該複合体の量より多い複合体の量の検出が障害を有する見込みのある患者を同定すること、  
の段階を含んでなる、MN タンパク質レベルが上昇する障害の診断を補助する方法。

【請求項 80】

抗体が検出可能な標識を含んでなる請求項 79 記載の方法。 30

【請求項 81】

抗体が固体支持体に結合される請求項 79 記載の方法。

【請求項 82】

抗体が配列番号 61 ~ 80 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 3 領域を含んでなる、請求項 79 記載の方法。

【請求項 83】

抗体が配列番号 48 ~ 60 よりなる群から選択される V H 3 - C D R 1 領域を含んでなる、請求項 79 記載の方法。

【請求項 84】

抗体が配列番号 81 よりなる V L 1 - C D R 3 領域を含んでなる、請求項 79 記載の方法。 40

【請求項 85】

抗体が配列番号 82 ~ 83 よりなる群から選択される V L 2 - C D R 1 領域を含んでなる、請求項 79 記載の方法。

【請求項 86】

抗体が配列番号 84 ~ 89 よりなる群から選択される V L 2 - C D R 3 領域を含んでなる、請求項 79 記載の方法。

【請求項 87】

MN タンパク質に結合するヒト抗体および製薬学的に許容できる担体を含んでなる製薬学的組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は2001年10月18日出願の同時係属中の仮出願第60/343657号明細書および2002年5月3日出願の同時係属中の仮出願第60/377716号明細書に対する優先権を主張しかつ引用することにより組み込む。

## 【0002】

本出願はコンパクトディスク(本出願の一部である)に含有される配列表を引用することにより組み込む。該配列表は、2002年10月3日に作成された、“Human Antibodies That have Mn Binding And Cell Adhesion-Neutralizing Activity (Mn結合および細胞接着中和活性を有するヒト抗体)”と命名された1.44MBのASCIIファイルである。

10

## 【0003】

本発明はMN結合ヒト抗体に関する。

## 【背景技術】

## 【0004】

MNは多数の臨床的癌腫サンプル中で検出されるが、しかし対応する器官の正常組織中には非存在である細胞表面タンパク質である。MNのcDNAはクローン化されており(非特許文献1)、そして予測されるタンパク質はシグナルペプチド、プロテオグリカン関連配列、炭酸脱水酵素ドメイン、膜貫通セグメントおよび短い細胞内尾部よりなる。MNは通常、胃および胆管粘膜(非特許文献2)ならびに小腸中に位置する高度に増殖性の正常細胞(非特許文献3)中で発現される。しかしながら、MNは、100%の腎細胞癌(非特許文献4)、食道癌の100%(非特許文献5)、子宮頸癌の90%以上(非特許文献2)、76%の悪性結腸癌(非特許文献6)、80%の非小細胞肺癌(非特許文献7)および48%の乳癌(非特許文献8)で異所性に発現される。

20

## 【0005】

MNに対する抗体が記述されている。マウスモノクローナル抗体G250はマウスモデルにおいて腎細胞癌の腫瘍サイズの低減に有効である(非特許文献9)。この抗体は後にヒトFc領域およびマウス可変領域を含有するキメラ抗体にされた。キメラG250抗体は66%のみヒトであり、匹敵する完全にヒトの抗体に比較してヒトにおいて免疫原性のより大きな機会につながる。従って、33%マウス抗体での処置はヒトの抗マウス免疫原性応答につながり抗癌治療を無効にするかもしれない。キメラ抗体でのこれらの問題はMNに対する完全にヒトの抗体に対する必要性を明らかに生じさせる。

30

【非特許文献1】Pastorek, J.ら、Oncogene(1994)、9、2877-2888

【非特許文献2】Liao, S.Y.ら、Am J Pathol(1994)、145、598-609

【非特許文献3】Saamio, J.ら、J Histochem Cytochem(1998)46、497-504

40

【非特許文献4】Liao, S.Y.、Cancer Res(1997)57、2827-2831

【非特許文献5】Turner, J.R. Hum Pathol、(1997)28、740-744

【非特許文献6】Saamio, J.ら、Am J Pathol(1998)153、279-285

【非特許文献7】Vermylen, P.ら、Eur Respir J(1999)、14、806-811

【非特許文献8】Chia, S.K.ら、J Clin Oncol.(2001)19、3660-3668

50

【非特許文献9】van Dijk, J.ら、Int. J. Cancer (1994) 56、262 - 268

【発明の開示】

【0006】

[発明の要約]

本発明はプロテオグリカンドメイン内のGEEDLP反復を標的とするモノクローナルヒトMN抗体もしくはMN抗体フラグメントより構成される。MN細胞表面タンパク質のプロテオグリカンドメインは4個の同一のこれらGEEDLP反復を含有する。所望のエピトープへの結合は競合的ELISAにより確認され、ここでELISAシグナルは本反復を含有するペプチド(PGEEDLPGEEDLP)との共インキュベーションにより減弱されうる。結合のこの阻害はまた、ピアコア(BIACore)アッセイを使用しても確認することができ、ここでは固定されたMNもしくはプロテオグリカンペプチドへの所望の抗体の結合が該ペプチド反復により阻害されうる。ペプチド反復への結合に加え、ヒト抗MN抗体はMN被覆プラスチック製プレートへのCGL-1細胞の細胞接着を阻害することができる。ヒト抗MN抗体は、FACSおよび免疫組織化学的方法を使用して癌細胞および腫瘍中のMN発現を診断および定量するのに使用されている。ヒト抗MN IgG1が抗体依存性の細胞媒介性の細胞傷害性により腫瘍細胞の溶解を媒介する一例もまた提供される。従って、これらの抗体は、MNがアップレギュレートされている癌の処置に有用であることができるか、もしくは、MNがアップレギュレートされている癌の診断に有用となり得る。

10

20

[発明の詳細な説明]

本発明はMNに結合するヒト抗体を提供する。これらの抗体は多様な治療および診断目的上有用である。これらの目的は以下を包含する：

ヒトMN抗体の特徴

本明細書で使用される「抗体」は無傷の免疫グロブリン分子(例えばIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgD、IgE、IgA)ならびにヒトMNタンパク質のエピトープに特異的に結合することが可能であるFab、F(ab')<sub>2</sub>、scFvおよびFvを包含する。MNに特異的に結合する抗体は、免疫化学的アッセイで使用される場合に他のタンパク質で提供される検出シグナルより最低5、10もしくは20倍より高い検出シグナルを提供する。好ましくは、ヒトMNに特異的に結合する抗体は免疫化学的アッセイで他のタンパク質を検出せずかつMNを溶液から免疫沈降させることができる。

30

【0007】

本明細におけるVL2および/もしくはVL3への言及はL鎖のラムダ( )クラスを示すことを意図している。

【0008】

MNへのヒト抗体結合のK<sub>d</sub>は、リアルタイム生体分子相互作用分析(real-time Biomolecular Interaction Analysis)(BIA)(SjolanderとUrbaniczky、Anal. Chem. 63、2338 - 2345、1991、およびSzaboら、Curr. Opin. Struct. Biol. 5、699 - 705、1995)のような技術を包含する当該技術分野で既知のいずれかの方法を使用してアッセイすることができる。BIAは相互作用体のいずれも標識することなく実時間で生物特異的相互作用を研究するための技術である(たとえばピアコア[BIAcore]<sup>TM</sup>)。光学的現象、表面プラズモン共鳴(SPR)の変化を生物学的分子間の実時間反応の指標として使用することができる。

40

【0009】

ピアコア[BIAcore]<sup>TM</sup>アッセイにおいては、本発明のヒト抗体は約0.6 nM(6 × 10<sup>-10</sup> nM)から約1800 nM(1.8 × 10<sup>-6</sup> nM)までの範囲のK<sub>d</sub>でヒトMNに特異的に結合する。図6を参照されたい。本発明のより好ましいヒト抗体はおよそ0.6 nMないし約90 nMのK<sub>d</sub>でヒトMNに特異的に結合し、本発明のもっ

50

とも好ましい抗体はおよそ4 nMの $K_d$ でヒトMNタンパク質を結合する。

【0010】

好ましくは、想定される本発明の抗体は、4個の同一のGEEDLP反復を含有するプロテオグリカンドメイン内のこれらの反復に結合することができる。所望のエピトープへの結合は競合的ELISA(Zavadaら、Br. J. of Cancer 82、1808-1813、2000)のような技術を包含する当該技術分野で既知のいずれかの方法を使用して確認することができ、ここでELISAシグナルは、この反復を含有するペプチド(PGEEDLPGEEDLP)との共インキュベーションにより減弱されうるが、しかしまた該プロテオグリカンドメイン内にある類似のペプチド(PSEEDSPREEEDP)によっては阻害されることができない。このパターンの結合阻害はまた、固定されたMNもしくはプロテオグリカンペプチドへの所望の抗体の結合が該ペプチド反復とのインキュベーションにより阻害されることができ、ピアコア[BIAcore]<sup>TM</sup>技術を使用して確認することができる。好ましくは、本発明の抗体はまた、MN被覆プラスチック製プレートELISAへのMN発現細胞の細胞接着も阻害することができる(Zavadaら、Br. J. of Cancer 82、1808-1813、2000)。

10

【0011】

本発明はMNタンパク質に対する完全にヒトの抗体を生成させるためのMorphoSysファージ-抗体技術を使用する。MorphoSysライブラリーはヒトのバックボーンに基づいており、免疫原性の確率を大きく低下させる。

20

【0012】

上述されたMN結合および細胞接着中和の特徴を有する多数のヒト抗体がMorphoSys HuCAL Fabライブラリーをスクリーニングすることにより同定されている。HuCALライブラリーのため集成されたCDRカセットは、位置95から102までの伸長を包含する5から28アミノ酸残基までの範囲にわたる長さ分布を達成するように設計した。Knappikら、J. Mol. Biol. 296、57-86、2000。上述されたMN結合および細胞接着中和の特徴を有する多数のヒト抗体がMorphoSys HuCAL Fabライブラリーをスクリーニングすることにより同定されている。HuCALライブラリーのため集成されたCDRカセットは、位置95から102までの伸長を包含する5から28アミノ酸残基までの範囲にわたる長さ分布を達成するように設計した。Knappikら、J. Mol. Biol. 296、57-86、2000。本発明のいくつかの態様において、ヒト抗体のVH3-CDR3領域は図2に配列番号61-80に示されるアミノ酸配列を有する。本発明の他の態様において、ヒトMN抗体のVL1-CDR3、VL2-CDR3およびVL2-CDR1領域は、配列番号48-60に示されるところの至適化されたVH3-CDR1配列を伴い図2に配列番号81-89に示されるところのアミノ酸配列を有し、双方は図2に示される。MN結合および細胞接着中和活性を有するヒト抗体を表1および2に示し；これらの抗体内の可変領域(CDR3ループ)を表1および2に示す。

30

[ヒト抗体の取得]

上述されたMN結合および細胞接着中和活性をもつヒト抗体は以下のとおりMorphoSys HuCALライブラリーから同定することができる。ヒトMNをマイクロタイタープレート上に被覆しそしてMorphoSys HuCAL-Fabファージライブラリーとともにインキュベートする(実施例1を参照されたい)。MNに結合しないファージ連結Fabをプレートから洗い流してMNにきつく結合するファージのみを残すことができる。結合されたファージはpHの変化により溶出しかつ大腸菌(E. coli)宿主の感染により増幅することができる。このパニング(panning)過程を1回もしくは2回反復してMNにきつく結合するファージ連結抗体の集団について濃縮することができる。濃縮されたプールからのFabをその後発現させ、精製しかつELISAアッセイでスクリーニングする。同定されたヒットをその後ピアコア[BIAcore]<sup>TM</sup>アッセイを使用して結合について試験し、そしてこれらのヒットを下述されるところの細胞

40

50

接着アッセイでさらにスクリーニングすることができる。

【0013】

HuCAL-Fabライブラリーの初期パニングはまた、第1回に抗原としてMN、次いで第2回にBSAもしくはトランスフェリンのような担体タンパク質に融合されたMNペプチド、および第3回に再度MN抗原を用いて実施することもできる。パニングに使用することができるヒトMNペプチドはヒトMN配列番号45-47を包含する。これらのペプチド配列は、細胞接着に関与すると考えられているMNプロテオグリカン配列由来である。

【0014】

あるいは、パニングは抗原としてMN発現細胞を使用して実施することができる。例えばMN抗原でトランスフェクトした細胞をビオチンで標識することができる。その後、これらのトランスフェクトした細胞を1:10の標識:未標識比で未標識のMNでトランスフェクトされない細胞と混合する。ファージライブラリーを細胞に添加しそしてビオチニル化し、磁石に結合されているストレプトアビジン結合磁性ビーズでMNをもつ細胞を捕捉する。非特異的ファージを洗い流し、そして、磁場を除去することにより、MNをもつ細胞が特異的に溶出される。これらの特異的に結合されたファージはさらなる回の細胞パニングのため増幅することができるか、またはペプチドおよび/もしくはタンパク質のパニングと交替させることができる。

【0015】

スクリーニング過程の詳細は下の特定の実施例に記述する。高度に活性の特異的抗体もしくは抗体フラグメントの他の選択方法は当業者により予見されかつヒトMN抗体を同定するのに使用されることができる。

【0016】

上述された特徴をもつヒト抗体はまた、抗体をコードする発現構築物でトランスフェクトした宿主細胞を包含する抗体を発現するいかなる細胞からも精製することができる。宿主細胞はそれによりヒト抗体が発現される条件下で培養する。精製されたヒト抗体を、当該技術分野で公知の方法を使用して、ある種のタンパク質、炭水化物もしくは脂質のような細胞中で該抗体と通常会合している他の化合物から分離する。こうした方法は、限定されるものでないがサイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム分画、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよび調製的ゲル電気泳動を挙げることができる。精製されたヒト抗体の調製物は最低80%純粋であり;好ましくは、調製物は90%、95%もしくは99%純粋である。調製物の純度はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような当該技術分野で既知のいずれかの手段により評価することができる。本発明の精製されたヒト抗体の調製物は、上述されたMN結合および中和の特徴をもつ1以上の型のヒト抗体を含有する可能性がある。

【0017】

あるいは、ヒト抗体は、固相技術を使用する直接ペプチド合成によるようなそのアミノ酸配列の化学合成方法を使用して製造することができる(Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154, 1963; Robergeら, Science 269, 202-204, 1995)。タンパク質合成は人的技術を使用してもしくは自動化により実施することができる。自動化合成は例えばアプライド バイオシステムズ(Applied Biosystems)431Aペプチド合成機(パーキン エルマー(Perkin Elmer))を使用して達成することができる。場合によっては、ヒト抗体のフラグメントを別個に合成しかつ化学的方法を使用して結合して完全長の分子を製造することができる。

【0018】

新たに合成された分子は調製的高速液体クロマトグラフィーにより実質的に精製することができる(例えばCreighton, PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, WH フリーマン アンド カンパニー(WH Freeman and Co.), ニューヨーク州ニューヨーク, 1983

10

20

30

40

50

)。合成ポリペプチドの組成はアミノ酸分析もしくは(例えばエドマン分解を使用する)配列決定により確認することができる。

[ ヒト抗体の治療的利用性の評価 ]

癌を治療するのに治療上有用である特定の抗体の能力を評価するために、一例として、抗体をマウス異種移植腫瘍モデルにおいて *in vivo* で試験することができる。所望の場合は、ヒト Fab MN 抗体は治療的評価前に Ig G<sub>1</sub> 抗体に転化することができる。本転化は実施例 5 に記述し、また、治療モデルの一例を実施例 9 に記述する。利用性はまた、実施例 13 に記述されるところの抗体依存性の細胞媒介性の細胞傷害性を使用しても試験することができる。

[ ヒト MN 抗体をコードするポリヌクレオチド ]

本発明はヒト MN 抗体をコードするポリヌクレオチドもまた提供する。これらのポリヌクレオチドを例えば治療的もしくは診断的使用のための相当量の抗体を製造するのに使用することができる。

【 0019 】

VH - CDR 3 領域をコードするのに使用することができるポリヌクレオチドを配列番号 14 - 33 に示す。示される VL - CDR 3 領域をコードするのに使用することができるポリヌクレオチドを配列番号 34 - 44 に示す。MorphoSys HuCAL ライブラリーから単離された本発明のヒト抗体の H 鎖および L 鎖をコードするポリヌクレオチドは図 2 に示す。追加の至適化された VH 3 - CDR 1 配列を配列番号 1 - 13 に示す。

【 0020 】

宿主細胞中に存在する本発明のポリヌクレオチドは、膜成分、タンパク質および脂質のような他の細胞成分を含まずに単離することができる。ポリヌクレオチドは細胞により作成されかつ標準的な核酸精製技術を使用して単離することができるか、またはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のような増幅技術を使用して、もしくは自動合成機を使用することにより合成することができる。ポリヌクレオチドの単離方法は当該技術分野で慣例である。ポリヌクレオチドを得るためのいずれかのこうした技術を使用して本発明の抗体をコードする単離されたポリヌクレオチドを得ることができる。例えば制限酵素およびプローブを使用して該抗体をコードするポリヌクレオチドを単離することができる。単離されたポリヌクレオチドは他の分子を含まないか、または最低 70%、80% もしくは 90% 含まない調製物中にある。

【 0021 】

本発明のヒト抗体をコードする cDNA 分子は、鋳型として mRNA を使用する標準的分子生物学技術を用いて作成することができる。その後、cDNA 分子は、当該技術分野で既知かつ Sambrook ら (1989) のような手引き書に開示される分子生物学技術を使用して複製することができる。PCR のような増幅技術を使用して該ポリヌクレオチドの追加のコピーを得ることができる。

【 0022 】

あるいは、合成化学技術を使用して本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを合成することができる。遺伝暗号の縮重は、例えば配列番号 48 - 89 に示されるそれぞれ VH - CDR 3、VH - CDR 1 もしくは VL - CDR 3、L 鎖または H 鎖アミノ酸配列の 1 種を有する抗体をコードする代替のヌクレオチド配列が合成されることを可能にする。

[ ポリヌクレオチドの発現 ]

本発明のヒト抗体をコードするポリヌクレオチドを発現させるために、ポリヌクレオチドを、挿入されたコーディング配列の転写および翻訳に必要な因子を含有する発現ベクターに挿入することができる。当業者に公知である方法を使用して、ヒト抗体をコードする配列ならびに適切な転写および翻訳制御因子を含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、*in vitro* 組換え DNA 技術、合成技術および *in vivo* 遺伝子組換えを包含する。こうした技術は例えば Sambrook ら (1989) および Ausubel ら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、ジョン ワイリー アンド サンズ (John Wiley &

10

20

30

40

50

Sons)、ニューヨーク州ニューヨーク、1995に記述される。下の実施例1-3もまた参照されたい。

#### 【0023】

多様な発現ベクター/宿主系を利用して本発明のヒト抗体をコードする配列を含有かつ発現することができる。これらは、限定されるものでないが、組換えバクテリオファージ、プラスミドもしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌のような微生物；酵母発現ベクターで形質転換された酵母、ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系、ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）または細菌発現ベクター（例えばTiもしくはpBR322プラスミド）で形質転換された植物細胞系、あるいは動物細胞系を挙げることができる。

10

#### 【0024】

制御因子もしくは調節配列は、宿主細胞タンパク質と相互作用して転写および翻訳を実施するベクターの非翻訳領域（エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域）である。こうした因子はそれらの強さおよび特異性が変動する可能性がある。利用されるベクター系および宿主に依存して、構成的および誘導可能なプロモーターを包含するいずれかの数の適する転写および翻訳因子を使用することができる。例えば、細菌の系でクローン化する場合に、BLUESCRIPTファージミド（ストラタジーン（Stratagene）、カリフォルニア州ラホヤ）もしくはpSPORT1プラスミド（ライフテクノロジー（Life Technologies））などのハイブリッドlacZプロモーターのような誘導可能なプロモーターを使用することができる。バキュロウイルスポリヘドリンプロモーターを昆虫細胞中で使用することができる。植物細胞のゲノム（例えば熱ショック、RUBISCOおよび貯蔵タンパク質の遺伝子）または植物ウイルス（例えばウイルスプロモーターもしくはリーダー配列）由来のプロモーターもしくはエンハンサーをベクター中にクローン化することができる。哺乳動物細胞系では哺乳動物遺伝子もしくは哺乳動物ウイルスからのプロモーターが好ましい。複数コピーのヒト抗体をコードするヌクレオチド配列を含有する細胞系を生成させることが必要である場合は、SV40もしくはEBVに基づくベクターを適切な選択可能なマーカーとともに使用することができる。

20

#### [製薬学的組成物]

上述されたヒトMN抗体のいずれも製薬学的に許容できる担体を含んでなる製薬学的組成物中で提供することができる。製薬学的に許容できる担体は好ましくは非発熱原性である。該組成物は単独でもしくは安定化する化合物のような最低1種の他の作用物質とともに投与することができ、それらは、限定されるものでないが生理的食塩水、緩衝生理的食塩水、D-ブドウ糖および水を挙げることができるいずれかの滅菌の生物適合性の製薬学的担体中で投与することができる。多様な水性担体、例えば0.4%生理的食塩水、0.3%グリシンなどを使用してよい。これらの溶液は無菌かつ一般に粒子状物質を含まない。これらの溶液は慣習的な公知の滅菌技術（例えば濾過）により滅菌してよい。該組成物は、pH調節および緩衝剤などのような生理学的条件に近づけるのに必要とされるところの製薬学的に許容できる補助物質を含有してよい。こうした製薬学的製剤中の本発明の抗体の濃度は広範に、すなわち約0.5%未満から、通常は約1%もしくは最低約1%から約15もしくは20重量%まで変動することができ、そして、選択された特定の投与様式に従って、主として液体の容量、粘度などに基づいて選択することができる。米国特許第5,851,525号明細書を参照されたい。所望の場合は、例えばMN結合について異なる $K_d$ をもつ1以上の型のヒト抗体を製薬学的組成物中に包含することができる。

30

40

#### 【0025】

該組成物は単独でまたは他の作用物質、薬物もしくはホルモンとともに患者に投与することができる。有効成分に加え、これらの製薬学的組成物は、製薬学的に使用することができる製剤へと有効成分を加工するのを助長する、賦形剤および補助物質を含んでなる適する製薬学的に許容できる担体を含むことができる。本発明の製薬学的組成物は、限

50

定されるものでないが経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、くも膜下、脳室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻内、非経口、局所、舌下もしくは直腸の手段を挙げることができるいずれかの数の経路により投与することができる。

#### 【0026】

製薬学的組成物を製造した後に、それらは適切な容器中に入れかつ指定された状態の処置のためラベルを付けることができる。こうしたラベル付けは量、頻度および投与方法を包含することができる。

#### [ 診断方法 ]

本発明はまた、限定されるものでないが血清、肺、肝、心、乳房、腎、結腸、細胞培養系もしくは細胞を含まない系（例えば組織ホモジェネート）のサンプルを挙げることができる試験調製物中でヒトMNを検出することができる診断方法も提供する。こうした診断方法は、例えばMNが上昇している障害を診断するのに使用することができる。こうした障害は、限定されるものでないが腎、食道、乳房、子宮頸部、結腸および肺の癌を挙げることができる。診断に使用される場合、正常サンプル中の抗体 - MN複合体の量より大きい患者からの試験サンプル中の該複合体の量の検出は、該障害を有する見込みがあると該患者を同定する。癌組織中のMNの免疫組織化学的検出方法は実施例12に記述する。

10

#### 【0027】

試験調製物を本発明のヒト抗体と接触させ、そして該試験調製物をその後抗体 - MN複合体の存在についてアッセイする。所望の場合は、ヒト抗体は蛍光、放射性同位元素、化学発光、またはワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼもしくはルシフェラーゼのような酵素標識のような検出可能な標識を含むことができる。MNを発現する腫瘍細胞の検出のための蛍光に基づくアッセイを実施例11に示す。

20

#### 【0028】

場合によっては、抗体はアッセイの自動化を適応させることができる固体支持体に結合することができる。適する固体支持体は、限定されるものでないがガラスもしくはプラスチック製スライドガラス、組織培養プレート、マイクロタイターウェル、チューブ、シリコンチップまたはビーズ（限定されるものでないがラテックス、ポリスチレンもしくはガラスビーズを挙げることができる）のような粒子を挙げることができる。共有および非共有結合、受動的吸収、もしくは抗体および固体支持体に結合された結合部分の対の使用を包含する当該技術分野で既知のいずれかの方法を使用して抗体を固体支持体に結合することができる。MNおよび抗体の結合は反応体を含有するのに適するいかなる容器中でも達成することができる。こうした容器の例はマイクロタイタープレート、試験管および微小遠心管を包含する。

30

#### [ 治療法 ]

本発明はまた、MNが上昇されている障害の症状の軽減方法も提供する。これらの障害は、限定されるものでないが腎、食道、乳房、子宮頸部、結腸および肺の癌を挙げることができる。例えば（Liao, S. Y., Cancer Res (1997) 57, 2827 - 2831）、（Turner, J. R. Hum Pathol, (1997) 28, 740 - 744）、（Liao, S. Y. & Am J Pathol (1994), 145, 598 - 609）、（Saamio, J. & Am J Pathol (1998) 153, 279 - 285）および（Vermylen, P. & Eur Respir J (1999), 14, 806 - 811）を参照されたい。

40

#### 【0029】

本発明の一態様において、治療上有効な用量の本発明のヒト抗体を、上述された癌のようなMNが上昇されている障害を有する患者に投与する。

#### [ 治療上有効な用量の決定 ]

治療上有効な用量の決定は当業者の能力内に十分ある。治療上有効な用量は、治療上有効な用量の非存在下で明らかである効力と比較して癌を効果的に治療するのに使用されるヒト抗体の量を指す。

#### 【0030】

50

治療上有効な用量は最初に動物モデル、通常はラット、マウス、ウサギ、イヌもしくはブタで推定することができる。動物モデルはまた、適切な濃度範囲および投与経路を決定するのに使用することができる。こうした情報をその後、ヒトにおける投与に有用な用量および経路を決定するのに使用することができる。皮下マウス異種移植モデルを実施例9に記述する。

【0031】

ヒト抗体の治療的有効性および毒性、例えばED<sub>50</sub>（集団の50%で治療上有効な用量）およびLD<sub>50</sub>（集団の50%に対し致死的な用量）は細胞培養物もしくは実験動物において標準的薬学的手順により決定することができる。治療効果に対する毒性効果の用量比が治療指数であり、そしてそれは比LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>として表すことができる。

10

【0032】

大きな治療指数を表す製薬学的組成物が好ましい。動物試験から得られるデータを使用してヒトの使用のための投薬量範囲を案出する。こうした組成物中に含有される投薬量は、好ましくはほとんどもしくは全く毒性を伴わないED<sub>50</sub>を包含する循環濃度範囲内である。該投薬量は、使用される投薬形態、患者の感受性および投与経路に依存してこの範囲内で変動する。

【0033】

正確な投薬量は処置を必要とする患者に関する因子を鑑み実地医家により決定することができる。投薬量および投与は十分なレベルのヒト抗体を提供するかもしくは所望の効果を維持するように調節する。考慮に入れられる可能性のある因子は、疾患状態の重症度、被験体の全身健康状態、被験体の年齢、重量および性、食餌、投与の時間および頻度、薬物の組合せ剤（1種もしくは複数）、反応の感受性ならびに治療に対する忍容性/応答を包含する。長時間作用型の製薬学的組成物は、特定の製剤の半減期および消失速度に依存して3ないし4日ごと、毎週もしくは2週間ごとに1回投与することができる。

20

【0034】

本発明のヒト抗体をコードするポリヌクレオチドを構築し、そして限定されるものでないがトランスフェリン-ポリカチオン媒介性のDNA移入、裸のもしくは被包化された核酸でのトランスフェクション、リポソーム媒介性の細胞融合、DNA被覆されたラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、電気穿孔法、「遺伝子銃」およびDEAEもしくはリン酸カルシウム媒介性のトランスフェクションを挙げることができる十分に確立した技術を使用して、*ex vivo*もしくは*in vivo*のいずれかで細胞中に導入することができる。

30

【0035】

抗体の有効な*in vivo*投薬量は、約5μgないし約50μg/kg、約50μgないし約5mg/kg、約100μgないし約500μg/kg患者体重、および約200ないし約250μg/kg患者体重の範囲にある。抗体をコードするポリヌクレオチドの投与について、有効な*in vivo*投薬量は約100ngないし約200ng、500ngないし約50mg、約1μgないし約2mg、約5μgないし約500μg、および約20μgないし約100μgのDNAの範囲にある。

【0036】

本発明のヒト抗体を含有する製薬学的組成物の投与様式は、宿主に抗体を送達するいずれの適する経路であることもできる。本発明の製薬学的組成物は非経口投与、すなわち皮下、筋肉内、静脈内もしくは鼻内投与にとりわけ有用である。

40

【0037】

本開示で引用される全部の特許および特許出願は引用することにより本明細書に明らかに組込まれる。上の開示は本発明を一般的に記述する。より完全な理解は以下の特定の実施例への言及により得ることができ、それは具体的説明のみの目的上提供されかつ本発明の範囲を制限することを意図していない。

【実施例1】

【0038】

50

## ヒトコンビナトリアル抗体ライブラリー (HuCAL-Fab 1) の構築

HuCAL-Fab 1のクローニング。HuCAL-Fab 1はFab抗体フラグメント形式の完全に合成のモジュール型ヒト抗体ライブラリーである。HuCAL-Fab 1は抗体ライブラリーから出発して一本鎖形式 (HuCAL-scFv; Knappikら、J. Mol. Biol. 296 (2000) 55) で集成した。HuCAL-Fab 1をファージミド発現ベクターpMORPH18-Fab 1にクローン化した (図3)。このベクターは、線状ファージの短縮された遺伝子IIIタンパク質にC末端で融合されたpHシグナル配列を伴うFdフラグメントを含んでなり、かつ、ompAシグナル配列を伴うL鎖VL-CLをさらに含んでなる。双方の鎖はlacオペロンの制御下にある。定常ドメインC、C'およびCHはHuCALのモジュラー系と完全に適合性の合成遺伝子である (Knappikら、2000)。

10

## 【0039】

最初に、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ライブラリーを、それぞれEcoRV/DraIIIおよびEcoRV/BsiWIを使用する制限消化によりHuCAL-scFvから単離した。これらのV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ライブラリーを、それぞれEcoRV/DraIIIおよびEcoRV/BsiWIで切断したpMORPH18-Fab 1にクローン化した。大腸菌 (E. coli) TG-1中への連結および形質転換後に、それぞれ $4.14 \times 10^8$ および $1.6 \times 10^8$ のライブラリーの大きさを得、双方の場合にHuCAL-scFvのVLの多様性を超えた。

## 【0040】

同様にV<sub>H</sub>ライブラリーをStyI/MunIを使用する制限消化によりHuCAL-scFvから単離した。V<sub>H</sub>ライブラリーを、StyI/MunIで切断したpMORPH18-V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ライブラリーにクローン化した。大腸菌 (E. coli) TG-1中への連結および形質転換後に、(207クローンの配列決定により同定されるところの) 67%の正しいクローンを伴う $2.09 \times 10^{10}$ のライブラリー全体の大きさを得た。

20

## 【0041】

ファージミドレスキュー、ファージ増幅および精製。HuCAL-Fabは $34 \mu\text{g}/\text{ml}$ クロラムフェニコールおよび1%ブドウ糖を含有する2xTY培地 (2xTY-CG) 中で増幅した。37°Cで約0.5のOD<sub>600</sub>でのヘルパーファージ感染 (VC5M13)、遠心分離および2xTY/ $34 \mu\text{g}/\text{ml}$ クロラムフェニコール/ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン中での再懸濁後に細胞を30°Cで一晩成長させた。ファージを上清からPEG沈殿させ (Ausubelら、1998)、PBS/20%グリセロールに再懸濁しそして-80°Cで保存した。2回のパニングの間のファージ増幅は以下のとおり実施した。すなわち、対数中期のTG1細胞を溶出されたファージに感染させ、そして1%のブドウ糖および $34 \mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを補充されたLB寒天上でプレーティングした。30°Cでの一夜インキュベーション後にコロニーを掻き取りかつ0.5のOD<sub>600</sub>に調節した。ヘルパーファージを上述されたとおり添加した。

30

## 【実施例2】

## 【0042】

## 固相パニング

マキシソープ [Maxisorp]<sup>TM</sup> マイクロタイタープレート (ヌンク (Nunc)) のウェルをPBS中ヒトMNタンパク質で被覆した ( $2 \mu\text{g}/\text{ウェル}$ )。PBS中5%脱脂粉乳でブロックした後に、上のとおり精製した1~5x10<sup>12</sup> HuCAL-Fabファージを20°Cで1時間添加した。数回の洗浄段階後に、結合されたファージを100mMトリエチルアミンでのpH溶出により溶出し、そしてその後1Mトリス-CI pH7.0でした。3回のパニングを実施し、各回の間に上述されたとおりにファージ増幅を実施した。

40

## 【実施例3】

## 【0043】

50

発現のための選択したFabフラグメントのサブクローニング

選択したHuCAL FabフラグメントのFabをコードする挿入物を発現ベクターpMORPHx7\_\_FSにサブクローニングして、可溶性Fabの迅速な発現を助長した。選択したHuCAL FabクローンのDNA調製物をXbaI/EcoRIで消化してかようにFabをコードする挿入物(ompA-VLおよびphoA-Fd)を切り離れた。XbaI/EcoRIで切断したpMORPHx7ベクター(以前はscFv挿入物を担持)中への精製した挿入物のサブクローニングは、pMORPHx9\_\_Fab1\_\_FSと呼称されるFab発現ベクターを導く(図4)。このベクター中で発現されるFabは検出および精製のための2種のC末端標識(FLAGおよびStrept)を担持する。

10

#### 【実施例4】

##### 【0044】

ELISAによるMNに結合するFabフラグメントの同定

マキシソープ(Maxisorp)ELISAプレートのウェルを、被覆緩衝液で希釈された5μg/mlの濃度のヒトMNの100μl/ウェルの溶液で被覆した。個々のFabの発現を30で12時間の0.5mM IPTGで誘導した。可溶性Fabを浸透圧ショックにより周辺質から抽出し(Ausubelら、1998)そしてELISAで使用した。Fabフラグメントを抗Fab抗体(ダイアノバ(Dianova))で検出した。370nmの値を、ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG抗体およびPOD可溶性基質(ロシュダイアグノスティクス(Roche Diagnostics))の添加後に読み取った。

20

#### 【実施例5】

##### 【0045】

HuCAL免疫グロブリン発現ベクターの構築

H鎖のクローニング。pcDNA3.1+(インヴィトロジェン(Invitrogen))のマルチクローニング部位を除去し(NheI/ApaI)、そして、HuCALの設計に使用した制限部位と適合性のスタッファーをリーダー配列(NheI/EcoRI)、VHドメイン(EcoRI/BlnI)および免疫グロブリン定常領域(BlnI/ApaI)の連結のため挿入した。リーダー配列(EMBL M83133)はコザック配列(Kozak、1987)を装備された。ヒトIgG1(PIR J00228)、IgG4(EMBL K01316)および血清IgA1(EMBL J00220)の定常領域を、約70塩基の長さをもつ重複するオリゴヌクレオチドへと切断した。サイレント突然変異を導入してHuCALの設計と非適合性の制限部位を除去した。オリゴヌクレオチドは重複伸長PCRにより継ぎ合わせた。

30

##### 【0046】

L鎖のクローニング。pcDNA3.1/Zeo+(インヴィトロジェン(Invitrogen))のマルチクローニング部位を2種の異なるスタッファーにより置き換えた。  
-スタッファーは -リーダー(NheI/EcoRV)、HuCAL-scFv V -ドメイン(EcoRV/BsiWI、)および 鎖定常領域(BsiWI/ApaI)の挿入のための制限部位を提供した。  
-スタッファー中の対応する制限部位は、NheI/EcoRV(1-リーダー)、EcoRV/HpaI(VL-ドメイン)およびHpaI/ApaI(鎖定常領域)であった。  
-リーダー(EMBL Z00022)ならびに -リーダー(EMBL L27692)は双方ともコザック配列を装備された。ヒト (EMBL J00241)および 鎖(EMBL M18645)の定常領域は上述されたとおり重複伸長PCRにより集成した。

40

##### 【0047】

IgGを発現するCHO細胞の生成。CHO-K1細胞をIgGのHおよびL鎖発現ベクターの等モル混合物でコトランスフェクトした。二重耐性トランスフェクション体を600μg/ml G418および300μg/mlゼオシン(インヴィトロジェン(Invitrogen))次いで限界希釈で選択した。単クローンの上清を捕捉ELISA

50

(下を参照されたい)によりIgG発現について評価した。陽性クローンを、10%超低IgG-FCS(ライフテクノロジーズ(Life Technologies))補充RPMI-1640培地中で増殖させた。上清のpHを8.0に調節しかつ滅菌濾過後に、溶液を標準的プロテインAカラムクロマトグラフィー(ポロス(Poros)20A、PEバイオシステムズ(PE Biosystems))にかけた。

【実施例6】

【0048】

CDR3ライブラリーの設計

Vの位置1および2。元のHuCALマスター遺伝子はそれらの真正のN末端、すなわちVL1:QS(CAGAGC)、VL2:QS(CAGAGC)およびVL3:SY(AGCTAT)を伴い構築した。これらのアミノ酸を含有する配列は第WO97/08320号明細書に示される。HuCALライブラリー構築の間に最初の2アミノ酸をDIに変えてライブラリーのクローニングを助長した(EcoRI部位)。全部のHuCALライブラリーは5'端にEcoRV部位GATATC(DI)をもつVL遺伝子を含有する。全部のHuCAL遺伝子(マスター遺伝子およびライブラリー中の全遺伝子)は5'端にDIを含有する。

10

【0049】

VHの位置1。元のHuCALマスター遺伝子はそれらの真正のN末端、すなわち第一のアミノ酸としてQ(=CAG)を伴うVH1A、VH1B、VH2、VH4およびVH6、ならびに第一のアミノ酸としてE(=GAA)を伴うVH3およびVH5を伴い構築した。これらのアミノ酸を含有する配列は第WO97/08320号明細書に示される。HuCAL Fab1ライブラリー中で、全部のVH鎖は第一の位置にQ(=CAG)を含有する。

20

【0050】

V1/V3の位置85。CDR3ライブラリーを導入するのに使用したカセット突然変異誘発手順(Knappikら、J.Mol.Biol.296、57-86、2000)のため、V1およびV3の位置85はTもしくはVのいずれかである可能性がある。従って、HuCAL scFv1ライブラリー構築の間に、V1およびV3の位置85を以下のとおり変えた。すなわち、元のV1、85T(コドンACC);V1ライブラリー、85Tもしくは85V(TRIMコドンACTもしくはGTT);元のV3、85V(コドンGTG);V3ライブラリー、85Tもしくは85V(TRIMコドンACTもしくはGTT);同じことがHuCAL Fab1に当てはまる。

30

【0051】

CDR3の設計。一定を保った全CDR3残基を表1および2に示す。

【0052】

CDR3の長さ。設計されたCDR3の長さ分布は以下のとおりである。変えられた残基は図2に示されるところの配列表中に示す。VCDR3、8アミノ酸残基(位置89ないし96)(ときに7残基)、Q90は固定;VCDR3、8ないし10アミノ酸残基(位置89ないし96)(ときに7-10残基)、Q89、S90および92は固定;ならびにVHCDR3、5ないし28アミノ酸残基(位置95ないし102)(ときに4-28)、D101は固定。

40

【実施例7】

【0053】

エピトープマッピングのための競合ELISA

ヌンク(Nunc)マキシソープ(Maxisorp)マイクロタイタープレートを、5μg/mLの濃度のPBS中MNもしくはMN-ペプチド結合BSA100μLで4で一夜被覆した。各ウェルはPBS中5%脱脂乳でマイクロタイタープレート振とう機上RTで2時間ブロックする。プレートを0.05%トゥイーン(Tween)-20を含むPBSで洗浄する。ウェルあたり200μLの抗体または抗体+プロテオグリカンペプチドA、BもしくはC(配列番号20-22)をウェルに添加する。抗体およびプロ

50

テオグリカンペプチド濃度は50% 終点の決定において最大の容易さを生じるよう至適化した。これらの抗体/ペプチド混合物をマイクロタイタープレート振とう機上RTで1.5時間インキュベートした。ELISAプレートは0.05% トゥイーン(Tween) - 20を含有するTBSで迅速に5回洗浄する。結合された抗体を、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗Fab IgG(シグマ(Sigma))を使用して試験した。TBS-トゥイーン(Tween)でさらに洗浄した後に100 $\mu$ LのBM Blue POD基質(ロシュ(Roche))を添加する。30分のインキュベーション後に吸光度を370nmで読み取る。

【実施例8】

【0054】

10

細胞接着アッセイ

50mM重炭酸緩衝液pH9.2中の1 $\mu$ g/mLの精製されたMNを30 $\mu$ Lの滴で細菌学的5cmペトリ皿の底に1.5時間吸着させた。滴を除去しかつPBSで3回すすいだ。その後、滴をDMEM中50%ウシ胎児血清でブロックした。滴を30mLの20~100 $\mu$ g/mL抗MN IgGもしくは対照としてのPBSおよび無関係の抗体でさらに処理した。PBSで滴を洗浄した後に、斑点(spot)を30 $\mu$ LのCGL-1細胞懸濁物(10<sup>5</sup>細胞/mL)とともにインキュベートしかつ一夜インキュベートした。MN被覆されたプレートへのCGL-1細胞の接着を遮断する抗MN抗体の能力を、滴をPBSで洗浄した後に評価した。本実験の一例を図5に示し、ここでは20 $\mu$ g/mLの抗MN抗体MN-3(図5A)が、対照のガンマグロブリン(図5B)および抗体処

20

【実施例9】

【0055】

皮下異種移植癌モデル

抗MN抗体の抗腫瘍効果を、免疫不全マウスの皮下異種移植モデルを使用して評価した。HT-29細胞は10% FBSを補充されたDMEM中で接着培養物として維持した。6~7週齢のSCIDマウスに、0.1mLの培地中の1 $\times$ 10<sup>7</sup>細胞を右脇腹に皮下に接種した。モノクローナル抗体を500 $\mu$ gの用量で毎日i.p.投与した。対照マウスはPBSもしくは無関係のモノクローナル抗体で処理した。腫瘍を滑りカリパスで週2回測定した。抗腫瘍効果は、対照処置に対して抗MN抗体処置の腫瘍サイズを比較すること

30

【実施例10】

【0056】

免疫複合体を用いる皮下異種移植癌モデル

抗MN抗体を、当該技術分野で既知であるプロトコル(例えばC. Liuら、Proc. Natl. Acad. Sci. (1996)、93、8618-8623)を使用して細胞傷害性の低分子に複合させた。HT-29細胞は10% FBSを補充されたDMEM中で接着培養物として維持した。6~7週齢の雌性CB-17 SCIDマウスに、0.1mLの培地中の1 $\times$ 10<sup>7</sup>腫瘍細胞を右脇腹に皮下に接種した。腫瘍サイズが65mm<sup>3</sup>に達した後に、動物に0.5mgの抗体複合体を連続5日間毎日注入した。対照マウスはPBS、無関係のモノクローナル抗体もしくは遊離の複合されない薬物で処理した。腫瘍を滑りカリパスで週2回測定した。抗腫瘍効果は、対照処置に対して抗MN抗体処置の腫瘍サイズを比較することにより評価した。

40

【実施例11】

【0057】

蛍光標示式細胞分取アッセイ(FACSアッセイ)

細胞を診断ツールとしてMN発現についてアッセイすることができる。接着細胞系については、最初にそれらの培地を除去すること、それらを氷冷PBSで1回すすぐこと、およびそれらをPBS中1mM EDTAで細胞系に依存して5ないし10分間処理すること(フラスコを定期的に叩くことにより促進する)により、それらのフラスコから細胞を

50

はがす。細胞を遠沈し(1500rpm、5分)かつ氷冷染色緩衝液(10%FBS、0.1%アジ化ナトリウム、PBS)で細胞を1回洗浄する。細胞を200 $\mu$ l中百万個の細胞で氷冷染色緩衝液に再懸濁する。一次抗体を $3.2E-11$ ないし $3.2E-8$ Mで添加しかつ氷上で1時間インキュベートする。結合されない抗体を氷冷染色緩衝液で洗浄する。細胞ペレットを200 $\mu$ lの氷冷染色緩衝液に再懸濁し、そして200 $\mu$ lの細胞あたり20 $\mu$ lのFITC結合抗ヒト二次抗体(ファーマーミンゲン(Pharmingen))を添加する。氷上で1時間インキュベートする。結合されない抗体を洗浄し、そして細胞を200 $\mu$ lの染色緩衝液中2.5 $\mu$ g/mlヨウ化プロピジウム(PI)(シグマ(Sigma))に再懸濁する(死細胞について排除(gate)するため)。PIを取り込む細胞を排除する(gating out)FACS分析を始める。PC3mm2ヒト前立腺癌細胞は図7に示されるところのFACSにより示されるところMNを発現する。赤線はヒト抗MN抗体での染色を表す一方、黒線は対照のアイソタイプを一致させたヒト抗体を表す。

10

**【実施例12】****【0058】**

腫瘍サンプルの免疫組織化学的分析

腫瘍切片をMN発現について試験することができる。MNは癌で高度に発現されかつ低発現レベルが正常組織に存在するため、MN発現を分析することは患者サンプル中の癌の診断および検出に有用である。組織切片の分析に標準的免疫組織化学的技術を使用することができる。PC-3前立腺癌を含有する組織切片をSCIDマウスに埋植した。20マイクログラム/mlの抗MN抗体を脱蠟パラフィン切片とともにインキュベートし、そしてペルオキシダーゼ結合二次抗体を使用してスライドガラスを発色させ、また、DAB色原体を使用して発色させた。強い膜関連シグナルが容易に観察され、そして前立腺癌細胞中の高いMN発現に特徴的である。

20

**【実施例13】****【0059】**

抗体依存性の細胞媒介性の細胞傷害性アッセイ(ADCCアッセイ)

抗MN IgGの抗腫瘍活性はADCCアッセイにより媒介させることができる。MNを発現するPC-3mm2細胞およびMNを発現しないHCT-116細胞を、250ng/ml、1000ng/mlもしくは2000ng/mlのヒト抗MN IgG1もしくは対照ヒトIgG1抗ジゴキシン抗体とともにインキュベートする。ヒトPBMCをエフェクターとして50:1、25:1および5:1の比の標的比でこれらの細胞に添加する。クロム-51放出アッセイを実施して標的細胞の溶解のレベルを測定する。少量の溶解がHCT-116もしくはPC-3mm2細胞の存在下で対照抗体もしくは抗体なしのインキュベーションに際して観察される。この自発的レベルの溶解は50:1、25:1および5:1の標的エフェクター比についてそれぞれ10~15%、5~10%もしくは2~3%である。同様に、MNを発現しないHCT-116細胞の溶解は抗MN抗体とともにインキュベートされた場合に0~10%範囲にあった。しかしながら、ヒト抗MN IgGとともにインキュベートされた場合のPC-3mm2細胞の溶解は対照より有意により高かった。40、50および60%の溶解が、50:1の標的:エフェクター比で250ng/ml、1000ng/mlおよび2000ng/mlを使用した場合に観察された。同様に、30、33および38%の溶解が25:1の比で観察され、そして最後に8、10および15%の溶解が5:1の標的:エフェクター比で観察された。これらの実験は、ヒト抗MN抗体が抗腫瘍性ADCC活性を媒介しかつ癌の治療的処置に使用してよいことを示す。

30

40

**【0060】**

## 【表1】

## 表1および2

## 注記

## HuCAL配列の概要に関する注記(HuCALライブラリー scFv1, scFv2, scFv3およびFab1)

1. 番号付け:	番号付けはVλの位置9を除きVBASEに従う。VBASEではギャップが位置10に設定されている。 <b>Chothia et al. (1992) J. Mol. Biol., 227, 776-798, Tomlinson et al. (1995) EMBO J., 14, 4628-4638</b> および <b>Williams et al. (1996) J. Mol. Biol., 264, 220-232</b> も参照されたい。	10
2. 制限部位:	部位の位置はタンパク質配列のまとめで大まかに示されるのみである。 詳細な位置についてはDNA配列の概要もしくはVectorNTIマスター遺伝子配列ファイル(共有データベース中で見出すことができる)を使用されたい。	
3. Vλ位置1&2:	元のHuCALマスター遺伝子は真正のN末端を伴い構築されている: <b>Vλ1: QS (CAGAGC)</b> <b>Vλ2: QS (CAGAGC)</b> <b>Vλ3: SY (AGCTAT)</b> このアミノ酸を含有する配列はすなわち特許出願およびPDB構造モデルファイル中で見出すことができる。 HuCALライブラリー構築の間に最初の2アミノ酸をDIに変えてライブラリーのクローニングを助長した(EvoRV 部位) 全HuCALライブラリーは5'端にEcoRV部位GATATC(DI)をもつVλ遺伝子を含有する 全HuCAL遺伝子(マスター遺伝子およびライブラリー中の遺伝子)は5'端にDIを含有する	20
4. VH位置1:	元のHuCALマスター遺伝子はそれらの真正のN末端を伴い構築されている: <b>VH1A, VH1B, VH2, VH and VH6</b> は <b>Q (=CAG)</b> を第一のアミノ酸としてもつ。 <b>VH3</b> および <b>VH5</b> は <b>E (=GAA)</b> を第一のアミノ酸としてもつ。 FLAG配列(DYKD)に融合された全HuCALVH鎖は第一の位置に <b>E (=GAA)</b> を含有する。 (HuCALライブラリー-scFv1.2および3)。 HuCAL Fab1ライブラリーでは、全VH鎖が第一の位置に <b>Q (=CAG)</b> を含有する。	
5. Vκ1/Vκ3 位置 85:	<b>HuCAL scFv 1</b> ライブラリー構築の間にVκ1およびVκ3の位置85が変えられた: 元の <b>Vκ1 : 85T (コドン ACC)</b> ライブラリー <b>Vκ1 : 85T</b> もしくは <b>85V (TRIM コドン ACT</b> もしくは <b>GTT)</b> 元の <b>Vκ3 : 85V (コドン GTG)</b> ライブラリー <b>Vκ3 : 85T</b> もしくは <b>85V (TRIM コドン ACT</b> もしくは <b>GTT)</b> <b>HuCAL scFv2</b> および <b>3</b> ならびに <b>HuCAL Fab1</b> はこの位置に関して <b>HuCAL scFv1</b> のようである。	30
6. CDR3の設計:	配列の概要で、一定を保った全CDR3配列を示す。	
7. CDR3の長さ:	設計されたCDR3の長さ分布をここに示す。配列の概要で変えられた残基をカッコ(x)に示す。 <b>Vκ CDR3:</b> 8アミノ酸残基(位置89ないし96)(ときに7残基) : Q90固定。 <b>Vλ CDR3:</b> 8ないし10アミノ酸残基(位置89ないし96)(ときに7-10残基) : Q89,S90,D92固定。 <b>VH CDR3:</b> 5ないし28アミノ酸残基(位置95ないし102)(ときに4-28残基) : D101固定。	

【表 2】

表1

配列の概要 HuCAL ライブラリー-scFv1, scFv2, scFv3およびFab1

**VL**

位置

フレームワーク

位置	1	2	3
EcoRV	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4		
VLx1	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C		
VLx2	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C		
VLx3	D I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C		
VLx4	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C		
VLx1	D I V L T Q P P - S V S G A P G Q R V T I S C		
VLx2	D I A L T Q P A - S V S G S P G Q S I T I S C		
VLx3	D I E L T Q P P - S V S V A P G Q T A R I S C		
EcoRV			

**VH**

位置

フレームワーク

位置	1	2	3
MieI	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8		
VH1A	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S		
VH1B	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S		
VH2	Q V Q L K E S G P A L V K P T Q T L T L T C T F S		
VH3	Q V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S		
VH4	Q V Q L L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S		
VH5	Q V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S		
VH6	Q V Q L L Q S G P G L V K P S Q T L S L T C A I S		
BspEI			

【 0 0 6 2 】

10

20

30

40



【表 4】

表1

7レ-Δ7-74																													
8																													
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9										
BbsI										BbsI																			
P	E	D	F	A	Y	Y	C			T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T							
A	E	D	V	G	V	Y	C			T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T							
P	E	D	F	A	Y	Y	C			T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T							
A	E	D	V	A	V	Y	C			T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T							
BbsI										BbsI																			
S	E	D	E	A	D	Y	Y	C			V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G							
A	E	D	E	A	D	Y	Y	C			V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G							
A	E	D	E	A	D	Y	Y	C			V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G							
BbsI										BbsI																			
7レ-Δ7-73										7レ-Δ7-74																			
9										10										11									
1	2	a	b	c	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3				
EagI										EagI										EagI									
E	L	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S				
E	L	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S				
T	M	T	N	M	D	P	V	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	G	Q	G	T	L	V	T	V				
Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	W	G	Q	G	T	L	V	T	V				
K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	W	G	Q	G	T	L	V	T	V				
Q	W	S	S	L	K	A	S	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	W	G	Q	G	T	L	V	T	V				
Q	L	N	S	V	T	P	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	W	G	Q	G	T	L	V	T	V				
BstXI										BstXI										BstXI									
7レ-Δ7-73										7レ-Δ7-74										7レ-Δ7-74									

【 0 0 6 4 】

10

20

30

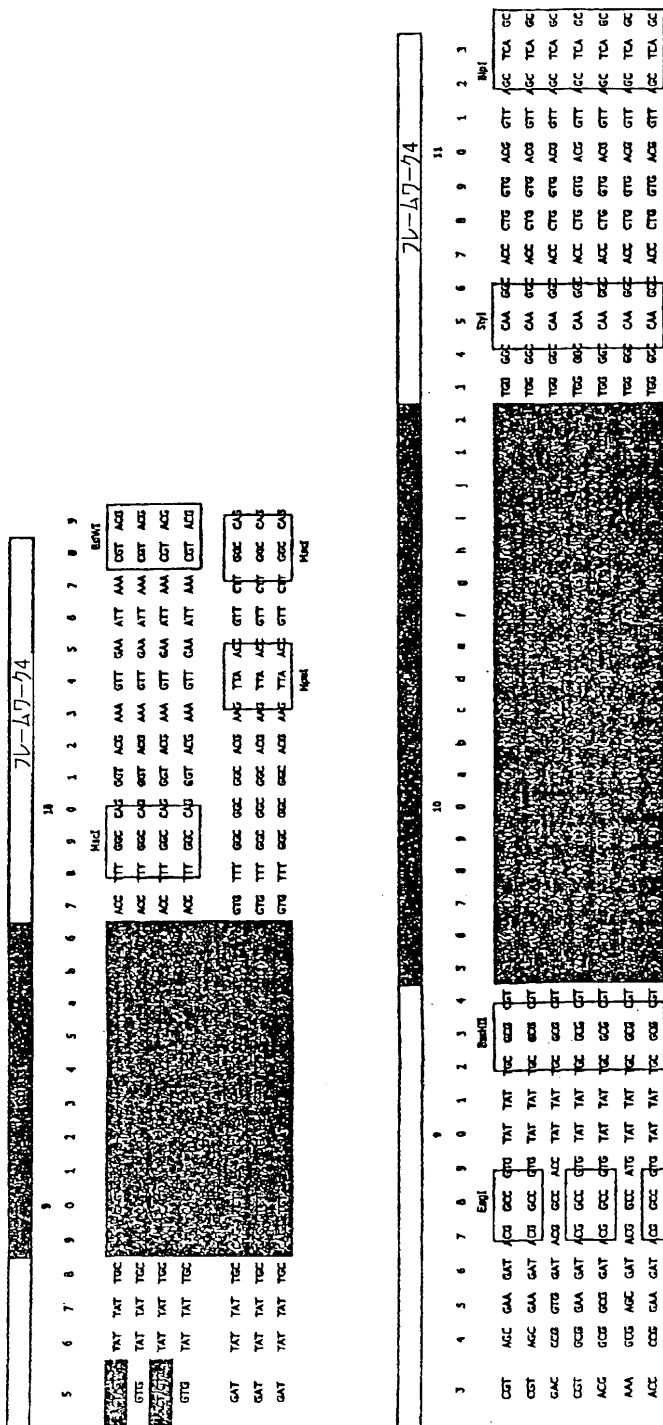
40





【表7】

表2



10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】PC3mm2ヒト前立腺癌細胞はFACSによりアッセイされるとおりMNを発現する。

【図2】配列番号1から配列番号83までの配列

50

【図3】 Fabディスプレイベクター pMORPH18 Fab 1

【図4】 pMORPHx9\_Fab1\_FSのベクター地図

【図5】 抗MN抗体MN-3での細胞接着の遮断の画像

【図6】 MN抗体1から39についての抗体結合対。ピアコア (BIAcore) 結合親和性を表示する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer Corporation Takeuchi, Toshi		10
<120> Human Antibodies That Have MN Binding and Cell Adhesion-Neutralizing Activity		
<130> MSB-7289		
<160> 83		
<170> PatentIn version 3.1		
<210> 1		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 1		
ggatttacct ttagcgagag ggccatgacc	30	
<210> 2		20
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 2		
ggatttacct ttagcgggc catgatgacg	30	
<210> 3		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 3		
ggatttacct ttagcgggag catgatggcc	30	
<210> 4		30
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 4		
ggatttacct ttagcgactg ggcgatgacg	30	
<210> 5		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 5		
tctgctactc gttttgatta t	21	
<210> 6		40
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		

<400> 6 aatggtactc gtatggatgt t	21	
<210> 7 <211> 24 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 7 ggtattgttc gtggtatgga tcat	24	
<210> 8 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		10
<400> 8 ggtggttctc gttatgatgt t	21	
<210> 9 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 9 aatattacta agtctgatgt t	21	
<210> 10 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		20
<400> 10 ggtggtactc gttttgatta t	21	
<210> 11 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 11 aatggtcgta atcttgatta t	21	
<210> 12 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		30
<400> 12 actgctactc gttttgatta t	21	
<210> 13 <211> 45 <212> DNA <213> Homo sapiens		

<400> 13 aagcctttta ctggaagta ttgggtcat actggtttg atatt	45	
<210> 14 <211> 45 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 14 aaacctttta ctggaagta ttgggtcat actggtttg atatt	45	
<210> 15 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		10
<400> 15 aatggcctgc gtatggatgt t	21	
<210> 16 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 16 aatctgctgc gtatggatgt t	21	
<210> 17 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		20
<400> 17 aatgcggtgc gtatggatgt t	21	
<210> 18 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 18 aatgcgatgc gtatggatgt t	21	
<210> 19 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		30
<400> 19 aatgccctcc gtatggatgt t	21	
<210> 20 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		

<400> 20 aatgtgctgc gtatggatgt t	21	
<210> 21 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 21 ggggggacgc gtatggatgt t	21	
<210> 22 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		10
<400> 22 cagggcacc c gtatggatgt t	21	
<210> 23 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 23 aatggcgtgc gtatggatgt t	21	
<210> 24 <211> 21 <212> DNA <213> Homo sapiens		20
<400> 24 aatggcatcc gtatggatgt t	21	
<210> 25 <211> 42 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 25 acgggtacta gcagcgatag gacggcctc cgaagtacg cc	42	
<210> 26 <211> 42 <212> DNA <213> Homo sapiens		30
<400> 26 acgggtacta gcagcgatgt gtccggcctc aacatcgtgt cc	42	
<210> 27 <211> 30 <212> DNA <213> Homo sapiens		

<400> 27 cagagccgtg actatgagaa gcctatgatt	30	
<210> 28 <211> 30 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 28 cagagccgag actatgagaa gcctatgatt	30	
<210> 29 <211> 30 <212> DNA <213> Homo sapiens		10
<400> 29 cagagccgag actatgagaa gcctatgatt	30	
<210> 30 <211> 30 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 30 cagagctatg accgtgcttt taagtctgtt	30	
<210> 31 <211> 27 <212> DNA <213> Homo sapiens		20
<400> 31 cagagctatg accataagaa gactgag	27	
<210> 32 <211> 30 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 32 cagagctatg acatgtttgc tcgtgttatt	30	
<210> 33 <211> 30 <212> DNA <213> Homo sapiens		30
<400> 33 cagagctatg accgtcttta taagaagctt	30	
<210> 34 <211> 30 <212> DNA <213> Homo sapiens		

<400> 34  
cagagctatg accgggctta tcgacttctt 30

<210> 35  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 35  
cagagctatg accgttctcg ttatgct 27

<210> 36 10  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 36  
Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp  
1 5 10 15

Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro  
20 25 30

<210> 37 20  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 37  
Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro  
1 5 10

<210> 38  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 38  
Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro  
1 5 10

30

<210> 39  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 39  
Ser Ala Thr Arg Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 40  
<211> 7

40

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 40

Asn Gly Thr Arg Met Asp Val  
 1 5

<210> 41  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 41

Gly Ile Val Arg Gly Met Asp His  
 1 5

10

<210> 42  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Gly Gly Ser Arg Tyr Asp Val  
 1 5

<210> 43  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 43

20

Asn Ile Thr Lys Ser Asp Val  
 1 5

<210> 44  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Gly Gly Thr Arg Phe Asp Tyr  
 1 5

30

<210> 45  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 45

Asn Gly Arg Asn Leu Asp Tyr  
 1 5

40

<210> 46  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 46

Thr Ala Thr Arg Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 47  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 47

Lys Pro Phe Thr Gly Lys Tyr Trp Gly His Thr Gly Phe Asp Ile  
 1 5 10 15

10

<210> 48  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 48

Lys Pro Phe Thr Gly Lys Tyr Trp Gly His Thr Gly Phe Asp Ile  
 1 5 10 15

<210> 49  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 49

20

Asn Gly Leu Arg Met Asp Val  
 1 5

<210> 50  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 50

Ser Ala Thr Arg Phe Asp Tyr  
 1 5

30

<210> 51  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 51

Asn Leu Leu Arg Met Asp Val  
1 5

<210> 52  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 52

Asn Ala Val Arg Met Asp Val  
1 5

<210> 53  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 53

10

Asn Ala Met Arg Met Asp Val  
1 5

<210> 54  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 54

20

Asn Ala Leu Arg Met Asp Val  
1 5

<210> 55  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 55

Asn Val Leu Arg Met Asp Val  
1 5

<210> 56  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 56

30

Gly Gly Thr Arg Met Asp Val  
1 5

<210> 57  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

40

<400> 57

Gln Gly Thr Arg Met Asp Val  
1 5

<210> 58  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 58

Asn Gly Val Arg Met Asp Val  
1 5

10

<210> 59  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 59

Asn Gly Ile Arg Met Asp Val  
1 5

<210> 60  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20

<400> 60

Gly Phe Thr Phe Ser Glu Arg Ala Met Thr  
1 5 10

<210> 61  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 61

Gly Phe Thr Phe Ser Ala Ala Met Met Thr  
1 5 10

30

<210> 62  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 62

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Met Met Ala  
1 5 10

<210> 63

40

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 63

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Trp Ala Met Thr  
 1 5 10

<210> 64  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 64

10

Ser Ala Thr Arg Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 65  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 65

Gln Ser Arg Asp Tyr Glu Lys Pro Met Ile  
 1 5 10

<210> 66  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 66

20

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Arg Thr Arg Pro Pro Lys Tyr Ala  
 1 5 10

<210> 67  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 67

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Ser Gly Leu Asn Ile Val Ser  
 1 5 10

30

<210> 68  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 68

Gln Ser Tyr Asp Arg Ala Phe Lys Ser Val  
 1 5 10

40

<210> 69  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 69

Gln Ser Tyr Gly His Lys Lys Thr Glu  
 1 5

<210> 70  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 70

Gln Ser Tyr Asp Met Phe Ala Arg Val Ile  
 1 5 10

10

<210> 71  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 71

Gln Ser Tyr Asp Arg Leu Tyr Lys Lys Leu  
 1 5 10

<210> 72  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 72

Gln Ser Tyr Asp Arg Ala Tyr Arg Leu Leu  
 1 5 10

20

<210> 73  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 73

Gln Ser Tyr Asp Arg Ser Arg Tyr Ala  
 1 5

30

<210> 74  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 74

ggatttacct ttagcagcta tgcgatgagc	30	
<210> 75		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 75		
ggatttacct ttgtgaagag catggtggtg	30	
<210> 76		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		10
<400> 76		
ggatttacct ttagcaggaa cctgatgacc	30	
<210> 77		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 77		
ggatttacct ttgagcggtg gatgggggcg	30	
<210> 78		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		20
<400> 78		
ggatttacct ttagcaggag gatgatggtc	30	
<210> 79		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 79		
ggatttacct ttagcaggtg gatgatggtc	30	
<210> 80		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		30
<400> 80		
ggatttacct ttagcgagag catgatgacg	30	
<210> 81		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 81		

ggatttacct ttagctggca catgatgacg

30

<210> 82  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 82  
ggatttacct ttagctccgt gatgatgacg

30

<210> 83  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 83  
ggatttacct ttagcgggag catgatgacg

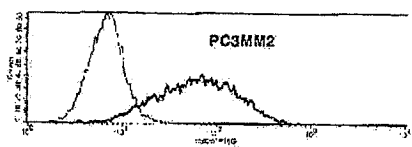
30

10

20

【 1 】

FIGURE 1



【 2 a 】

FIGURE 2  
配列情報

配列番号	配列情報	DNA配列
1	MS-COR1	GGATTACCTTAGCGAGGAGGCGATGACG
2		GGATTACCTTAGCGGCGCCCATGATGAGG
3		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGCC
4		GGATTACCTTAGCGACCTGGCGGATGAGC
5		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
6		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
7		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
8		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
9		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
10		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
11		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
12		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
13		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
14	MS-COR2	TCTGCTAGCGTGTGATGAT
15		AATGGAACGGATGATGAT
16		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
17		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
18		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
19		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
20		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
21		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
22		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
23		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
24		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
25		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
26		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
27		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
28		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
29		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
30		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
31		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
32		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
33		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
34		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
35		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
36		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
37		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
38		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
39		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
40		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
41		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
42		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
43		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
44		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
45		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
46		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
47		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
48		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
49		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
50		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
51		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
52		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
53		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
54		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
55		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
56		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
57		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
58		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
59		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
60		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
61		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
62		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
63		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
64		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
65		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
66		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
67		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
68		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
69		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
70		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
71		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
72		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
73		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
74		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
75		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
76		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
77		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
78		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
79		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
80		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
81		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
82		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
83		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
84		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
85		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
86		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
87		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
88		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
89		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
90		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
91		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
92		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
93		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
94		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
95		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
96		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
97		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
98		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
99		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG
100		GGATTACCTTAGCGGAGGAGCGATGAGG

【 図 2 b 】

FIGURE 2  
配列情報

34	VL1-CDR3	CAAGACCGTGAATATAGAGAGCCATATGAT
35	2	CAAGCCGGAGCATAGAGAGCCATATGAT
36	3	CAAGCCGGAGCATAGAGAGCCATATGAT
37	VL3-CDR1	ACGGGTACTAGACGCAATAGAGAGCCGGCAATAGACC
38	1	ACGGGTACTAGACGCAATAGAGAGCCGGCAATAGACC
39	2	ACGGGTACTAGACGCAATAGAGAGCCGGCAATAGACC
40	VL3-CDR2	CAGAGCTATGACCGCGCTTATAGTCTGTT
41	1	CAGAGCTATGACCGCGCTTATAGTCTGTT
42	2	CAGAGCTATGACCGCGCTTATAGTCTGTT
43	3	CAGAGCTATGACCGCGCTTATAGTCTGTT
44	4	CAGAGCTATGACCGCGCTTATAGTCTGTT
45	5	CAGAGCTATGACCGCGCTTATAGTCTGTT
46	6	CAGAGCTATGACCGCGCTTATAGTCTGTT
46	7	GEEDPREDSPREDFPDELPGSEEDP
47	8	AGEEDTQSEEDP
47	9	PREESPREEDP
48	VH5-CDR1	GFPSRWAVT
49	1	GFPSRWAVT
50	2	GFPSRWAVT
51	3	GFPSRWAVT
52	4	GFPSRWAVT
53	5	GFPSRWAVT
54	6	GFPSRWAVT
55	7	GFPSRWAVT
56	8	GFPSRWAVT
57	9	GFPSRWAVT
58	10	GFPSRWAVT
59	11	GFPSRWAVT
60	12	GFPSRWAVT
60	13	GFPSRWAVT

【 図 2 c 】

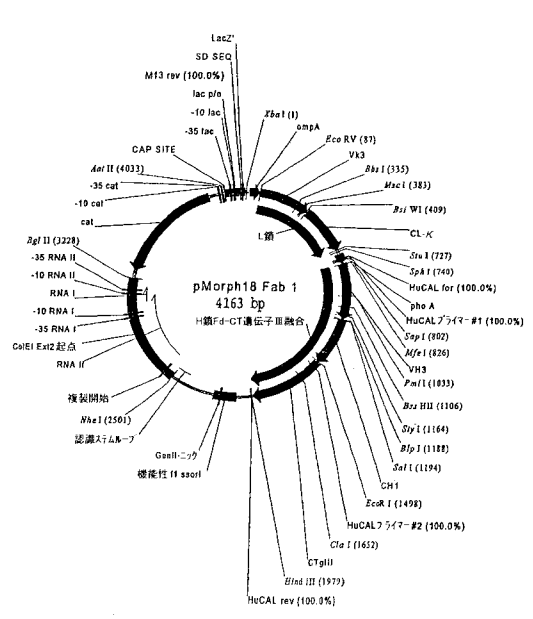
FIGURE 2  
配列情報

61	VH4-CDR3	SAATREIV
62	1	SAATREIV
63	2	NGIRADIV
64	3	GIWRGMDH
65	4	GGSRIVDV
66	5	GGSRIVDV
67	6	GGSRIVDV
68	7	NGRNLDY
69	8	TAATREIV
70	9	IKPFRVWNGTQDI
71	10	IKPFRVWNGTQDI
72	11	IKPFRVWNGTQDI
73	12	NLLLRMDV
74	13	NAVRMDV
75	14	NAVRMDV
76	15	NAVRMDV
77	16	NGSRMDV
78	17	GGSRMDV
79	18	QGSRMDV
80	19	NGSRMDV
80	20	NGSRMDV
81	VL1-CDR3	QSRDYEDVMI
82	1	QSRDYEDVMI
83	VL2-CDR1	GTSSDRPREPKA
84	2	GTSSDRPREPKA
85	VL2-CDR2	QRYDRAKSY
86	1	QRYDRAKSY
87	2	QRYDRAKSY
88	3	QRYDRAKSY
89	4	QRYDRAKSY
90	5	QRYDRAKSY
90	6	QRYDRAKSY

【 図 3 】

FIGURE 3

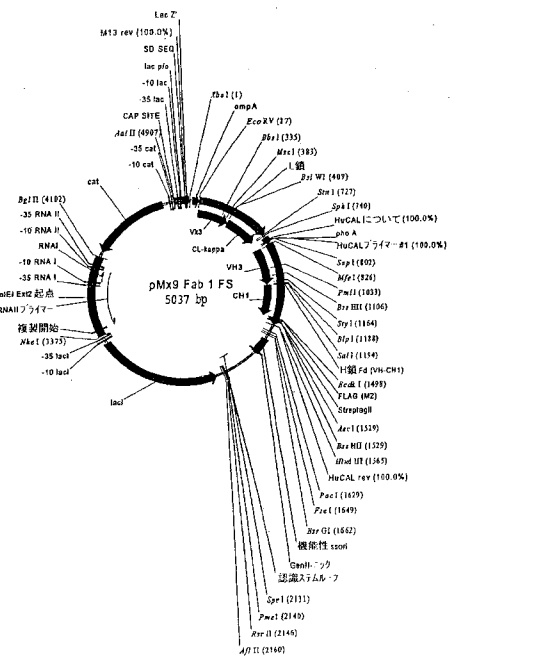
Fabディスプレイベクター-pMORPH18 Fab 1



【 図 4 】

FIGURE 4

pMORPHx9\_Fab1\_FS のベクター地図



【 図 5 】

Figure 5  
抗MN抗体MN-3による細胞接着の遮断



A. 20 ug/mL Ab MN-3  
B. 20 ug/mL IgG  
C. 抗体処置なし

【 図 6 a 】

FIGURE 6  
H/L鎖対

抗体	H鎖/L鎖	7057が抗体に結合する ヒトCDR3領域に対する 結合親和性	7057が抗体に結合する ヒトCDR3領域に対する 結合率	MN細胞結合分子の 阻害 (0.01 ug/ml Fab)
1	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-1	1.82E-08	75.00%	>95%
2	VH3-CDR3-2VL2-CDR3-4	3.96E-08	95.00%	>95%
3	VH3-CDR3-3VL2-CDR3-6	4.65E-09	74.00%	>95%
4	VH3-CDR3-4VL2-CDR3-1	6.40E-08	75.00%	ND
5	VH3-CDR3-5VL2-CDR3-1	8.56E-07	32.00%	ND
6	VH3-CDR3-6VL2-CDR3-2	ND	46.00%	ND
7	VH3-CDR3-7VL2-CDR3-5	ND	51.00%	ND
8	VH3-CDR3-1VL1-CDR3-1	ND	73.00%	ND
9	VH3-CDR3-9VL1-CDR3-1	ND	ND	ND
10	VH3-CDR3-9VL1-CDR3-2	ND	ND	ND
11	VH3-CDR3-9VL1-CDR3-3	ND	ND	ND
12	VH3-CDR3-10VL1-CDR3-1	ND	ND	ND
13	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3	6.03E-08	ND	ND
14	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-2	ND	ND	ND
15	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-4	9.00E-08	ND	ND
16	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-5	9.50E-08	ND	ND
17	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-6	ND	ND	ND
18	VH3-CDR3-3VL2-CDR3-3	ND	ND	ND
19	VH3-CDR3-3VL2-CDR3-2	ND	ND	ND
20	VH3-CDR3-3VL2-CDR3-4	ND	ND	ND
21	VH3-CDR3-3VL2-CDR3-5	ND	ND	ND
22	VH3-CDR3-3VL2-CDR3-1	ND	ND	ND

ND = 測定されない

【 図 6 b 】

Figure 6  
H/L鎖対

抗体	H鎖/L鎖対	7057が抗体に結合する ヒトCDR3領域に対する 結合親和性	7057が抗体に結合する ヒトCDR3領域に対する 結合率	MN細胞結合 分子の阻害 (0.01 ug/ml Fab)
23	VH3-CDR1-1VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3	5.84E-09	ND	ND
24	VH3-CDR1-2VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3	3.31E-09	ND	ND
25	VH3-CDR1-3VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3	4.88E-09	ND	ND
26	VH3-CDR1-4VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3	3.57E-09	ND	ND
27	VH3-CDR3-1VL2-CDR1-1VL2-CDR3-3	9.47E-09	ND	ND
28	VH3-CDR3-1VL2-CDR1-2VL2-CDR3-3	3.85E-09	ND	ND
29	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-4	8.10E-09	ND	ND
30	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-4	3.11E-09	ND	ND
31	VH3-CDR3-13VL2-CDR3-4	1.23E-09	ND	ND
32	VH3-CDR3-13VL2-CDR3-4	1.34E-09	ND	ND
33	VH3-CDR3-14VL2-CDR3-4	1.23E-09	ND	ND
34	VH3-CDR3-16VL2-CDR3-4	1.61E-09	ND	ND
35	VH3-CDR3-16VL2-CDR3-4	3.15E-09	ND	ND
36	VH3-CDR3-17VL2-CDR3-4	2.87E-09	ND	ND
37	VH3-CDR3-18VL2-CDR3-4	4.65E-09	ND	ND
38	VH3-CDR3-18VL2-CDR3-4	1.85E-09	ND	ND
39	VH3-CDR3-20VL2-CDR3-4	1.82E-08	ND	ND
40	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3VH3-CDR1-1	5.70E-09	ND	ND
41	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3VH3-CDR1-2	8.05E-10	ND	ND
42	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3VH3-CDR1-3	ND	ND	ND
43	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3VH3-CDR1-4	ND	ND	ND
44	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3VH3-CDR1-5	2.08E-09	ND	ND
45	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3VH3-CDR1-6	6.06E-10	ND	ND
46	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3VH3-CDR1-7	8.05E-10	ND	ND
47	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3VH3-CDR1-8	4.18E-09	ND	ND
48	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3VH3-CDR1-9	1.08E-09	ND	ND
49	VH3-CDR3-1VL2-CDR3-3VH3-CDR1-10	ND	ND	ND

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/33470
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : C07K 16/00, 16/30		
US CL : 530/387.1, 388.1, 388.15, 388.8, 388.85		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/387.1, 388.1, 388.15, 388.8, 388.85		
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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GRABMAIER et al. Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250. Int. J. Cancer. 2000, Vol.85, pages 865-870, especially pages 865-6.	1-5
Y	GREEN et al. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. Nature Genetics. 1994, Vol.7, pages 13-21, see entire document.	1-5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 06 February 2003 (06.02.2003)		Date of mailing of the international search report <b>28 APR 2003</b>
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Larry R. Helms <i>Valerie Bell-Harris for</i> Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/33470

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

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

1.  Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claim Nos.: 11-14 and 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:  
Claims 11-14 and 16 were not searched because the application does not have a sequence for SEQ ID NO:84-89 in the CRF supplied with the application.
3.  Claim 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:  
Please See Continuation Sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-10, 15, 87
- Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/33470

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-16, 87, drawn to a human antibody which binds MN protein.

Group II, claim(s) 17-68, drawn to nucleic acids, expression vectors, host cells and method of expression.

Group III, claim(s) 69-75, drawn to a method of treating a human.

Group IV, claim(s) 76-78, drawn to a method of detecting MN antigen.

Group V, claim(s) 79-86, drawn to a method to aid in diagnosing a disorder.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The technical Feature linking Groups I-V appears to be that they all relate to a human antibody to MN protein. However, Grabmaier et al (Int J. Cancer 85:865-870, 2000) in view of Green et al (Nature Genetics 7:13-21, 1994) would make the technical feature obvious. Grabmaier et al teaches the MN protein and antibodies to such and therapeutic benefits of administration of the antibody and in view of Green et al who teaches human antibodies for therapy it would have rendered the technical feature obvious. Therefore, the technical feature linking the inventions of Groups I-V does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2, as it does not contribute over the prior art.

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, WEST, CANCERLIT.

search terms: MN protein, proteoglycan, antibody, human antibody, SEQ ID NOS.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/30	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, 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, N O, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 マーフィー, ジョン・イー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 6 1 8 オークランド・ハーバードコート 4 9

(72) 発明者 リンケンバーガー, ジュリー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 5 6 モラガ・レームブルバード 2 9 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 CA01 CA20 DA02 DA06 EA04 GA11 HA01  
 HA11 HA17  
 4B064 AG27 CA02 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA01X AA26X AA57X AA90X AA93Y AB01 AC15 BA02 BD15 CA25  
 CA44 CA46  
 4C085 AA13 AA14 BB01 CC03 DD23 DD33 DD34 DD38 DD43 EE01  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 DA76 EA20 EA50 FA74 GA21

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005528884A5</a>	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2003536404	申请日	2002-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	拜耳杉更好的用户蒂卡尔的企业庸率		
申请(专利权)人(译)	拜耳杉机俞蒂卡尔的企业庸率		
[标]发明人	タケウチトシヒコ デウボワストリングフエローナタリー マーフィー・ジョン・イー リンケンバーガー・ジュリー		
发明人	タケウチ,トシヒコ デウボワ-ストリングフエロー,ナタリー マーフィー,ジョン・イー リンケンバーガー,ジュリー		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 G01N33/53 C12N5/10		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 C07K16/18 C07K16/3038 C07K2317/565 C07K2317/732		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61P43/00.105 C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B024/HA17 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC15 4B065/BA02 4B065/BD15 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/DD23 4C085/DD33 4C085/DD34 4C085/DD38 4C085/DD43 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA21		
优先权	60/343657 2001-10-18 US 60/377716 2002-05-02 US		
其他公开文献	JP2005528884A		

#### 摘要(译)

本发明由在蛋白多糖结构域内靶向GEEDLP重复的单克隆人类MN抗体或MN抗体片段组成。MN细胞表面蛋白的蛋白聚糖结构域含有四个相同的GEEDLP重复。通过竞争性ELISA证实与所需表位的结合，其中可通过与含有该重复的肽(PGEEDLPGEEDLP)共温育来减弱ELISA信号。这种结合抑制作用也可以使用Biacore测定来证实，其中所需抗体与固定化MN或蛋白聚糖肽的结合可以被肽重复序列抑制。除了与肽重复结合之外，人类抗MN抗体还可以抑制CGL-1细胞与MN包被的塑料板的细胞粘附。已经使用人抗-MN抗体使用FACS和免疫组织化学方法诊断和定量癌细胞和肿瘤中的MN表达。还提供了一个实例，其中人抗MN IgG1通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性介导肿瘤细胞的裂解。