

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002 - 541157

(P2002 - 541157A)

(43)公表日 平成14年12月3日(2002.12.3)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 4
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	N 4 B 0 6 5
			T 4 C 0 8 5
			U 4 H 0 4 5
A 6 1 P 17/02		A 6 1 P 17/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 32数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 609452(P2000 - 609452)

(86)(22)出願日 平成12年3月31日(2000.3.31)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月1日(2001.10.1)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/02910

(87)国際公開番号 W000/59943

(87)国際公開日 平成12年10月12日(2000.10.12)

(31)優先権主張番号 199 15 057.5

(32)優先日 平成11年4月1日(1999.4.1)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 ダコ エー エス
DAKO A / S
デンマーク国 グロストループ プロドゥ
クチオンスヴァイ 42

(72)発明者 ゲルデス, ヨハネス
ドイツ連邦共和国 フェルトホースト デ
ー - 23858 シュタインフェルト 79

(72)発明者 ショルツェン, トーマス
ドイツ連邦共和国 ネーリッツ デー - 23
843 ヘレンヴェーク 3

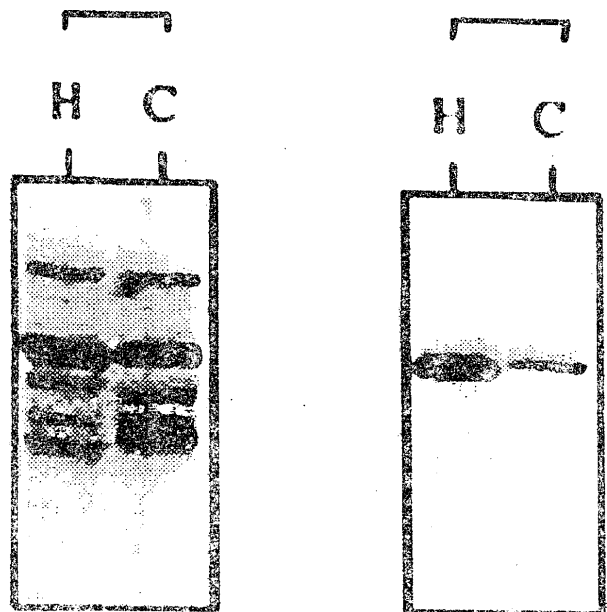
(74)代理人 弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトタンパク質M c m 3に対するモノクローナル抗体、その製造方法、およびその使用

(57)【要約】

本発明は、ヒトM c m 3 タンパク質に対するモノクローナル抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ細胞株、その製造方法およびその使用、本発明のモノクローナル抗体を含有してなる医薬組成物、ある種の疾患の予防および治療のためのその使用、ならびにM c m 3 発現に関連する疾患の予防および治療に関する方法にも関する。本発明のモノクローナル抗体は、免疫組織学および免疫生化学的な検出システムの両方で単一特異的にヒトM c m 3 を検出して結合する。これらのモノクローナル抗体の製造方法は、免疫生化学的方法を用いる余分なハイブリドーマ上清の一次スクリーニング後、免疫組織化学的方法により陽性のハイブリドーマの二次スクリーニングを含む。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫組織学的かつ免疫生化学的にヒトM c m 3を単一特異的に検出して結合する、モノクローナル抗体。

【請求項2】 免疫組織学的かつ免疫生化学的にヒトM c m 3を単一特異的に検出して結合し、それにより寄託番号D S M A C C 2 3 8 8のハイブリドーマ細胞株のモノクローナル抗体と同じ特性を有する、モノクローナル抗体。

【請求項3】 免疫組織学的かつ免疫生化学的にヒトM c m 3を単一特異的に検出して結合し、それにより寄託番号D S M A C C 2 3 8 8のハイブリドーマ細胞株のモノクローナル抗体のエピトープが検出される、モノクローナル抗体。

【請求項4】 生化学的もしくは分子生物学的に改変され得、または合成され得るモノクローナル抗体であって、それによりM c m 3の検出に必要な部分もしくは不必要な部分を完全に、または部分的に欠失するあるいは前記部分が前記抗体にさらなる有利な特性を与える他のもので置換されてなる、請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】 寄託番号D S M A C C 2 3 8 8のハイブリドーマ細胞株により産生される、請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】 ヒトM c m 3を単一特異的に検出し、そして免疫組織学的かつ免疫生化学的に結合するモノクローナル抗体を発現する、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項7】 寄託番号D S M A C C 2 3 8 8の細胞株である、請求項6記載のハイブリドーマ細胞株。

【請求項8】 ヒトM c m 3の検出方法における、請求項1～5いずれか記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項9】 試料中のヒトM c m 3の免疫組織学的、免疫細胞学的または免疫生化学的な検出のための請求項1～5いずれか記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項10】 試料が血清、痰液、尿、および液からなる群より選ばれることを特徴とする、請求項9記載の使用。

【請求項11】 試料が組織または微細針で吸引したものである、請求項9記載の使用。

【請求項12】 免疫生化学的検出がE L I S A、R I A、ウエスタンブロット法、ファー(Far) ウエスタンブロット法、免疫沈降法およびアフィニティークロマトグラフィー工程を含む、請求項9記載の使用。

【請求項13】 免疫細胞学的方法がF A C SおよびM A C Sを含む、請求項9記載の使用。

【請求項14】 免疫組織化学的検出が、蛍光法、放射能による方法、酵素的方法および化学発光法を含む、請求項9記載の使用。

【請求項15】 (i) 免疫生化学的方法によるハイブリドーマの一次スクリーニング工程、

(i i) 免疫組織化学的方法による、工程(i)で陽性のハイブリドーマのスクリーニング工程

を含む、動物がヒトM c m 3で免疫され、モノクローナル抗体が動物の脾臓細胞と骨髄腫細胞との融合後に得られることを特徴とする、請求項1～5いずれか記載の抗体の製造方法。

【請求項16】 請求項1～5いずれか記載のモノクローナル抗体を使用することを特徴とする、精製ヒトM c m 3の製造方法。

【請求項17】 請求項1～5いずれか記載のモノクローナル抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィー工程を含むことを特徴とする、精製ヒトM c m 3の製造方法。

【請求項18】 請求項1～5いずれか記載のモノクローナル抗体を用いる免疫沈降工程を含むことを特徴とする、精製ヒトM c m 3の製造方法。

【請求項19】 請求項1～5いずれか記載のモノクローナル抗体を含有してなる診断用組成物。

【請求項20】 腫瘍(tumour)、アレルギー、自己免疫疾患(auto-immunopathy)、癒痕形成、炎症およびリウマチ病の治療用ならびに移植の防御反応の抑制用の調製物の製造のための請求項1～5いずれか記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項21】 請求項1～5いずれか記載のモノクローナル抗体を製薬学的に許容しうるアジュバントと共に含有してなる、医薬組成物。

【請求項22】 請求項1～5いずれか記載のモノクローナル抗体を含有してなる、診断用キット。

【請求項23】 腫瘍診断のためのMcm3、Ki-67およびp27の発現の組み合わせた検出のための診断用キット。

【請求項24】 請求項1～5いずれか記載の抗体を製薬学的に許容しうる担体と共に含有してなる医薬組成物の有効量を被験体に投与する工程を含む、Mcm3発現の活性またはレベルにより引き起こされるか、またはこれが一因となっている疾患を予防または治療する方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

技術分野

本発明は、ヒトタンパク質Mcm3に対するモノクローナル抗体、その製造方法およびその使用に関する。

【0002】

従来技術

Mcmは、最初にパン種の*S. cerevisiae* (*S. cerevisiae*) において記載された。これらのタンパク質は、DNA複製開始に重要な役割を演じることが知られており、このことは、余剰染色体DNAセグメントであるミニクロモソームの伝達率(transmittance)におけるその決定的な役割により、パン種で示された(*Maineら*, *Genetics*, 1984, 106:365-385)。この特徴は、これらのタンパク質をミニクロモソーム維持、Mcmと命名することの根拠となった。Mcmファミリーのタンパク質は、進化に関して高度に保持されている。

【0003】

現在6個のタンパク質(Mcm2、Mcm3、Mcm4、Mcm5、Mcm6、Mcm7)がヒト系統で記載されており、これらは、DNA複製に必要なタンパク質複合体を形成し他の細胞周期に依存した構造とともに、1988年にJ. J. BlowとR. A. Laskey (*Nature*, 332:546-548)によりDNA複製許可(license)因子としてすでに仮定されている。Mcm3タンパク質は、Mcm5と生化学的に強固な結合を形成することにより、重要な役割を演じる(*A. Richter*, *R. Knippers*, *Eur. J. Biochem.*, 1997, 247:136-141)。Mcm3とMcmファミリーの他のメンバーは、細胞周期においてこのような根本的な機能をもっているため、検出システム、好ましくは免疫生化学的かつ免疫組織学的な検出が望まれている。かかる検出は、その方法で医療診断、好ましくは癌診断の新しいパラメーターが達成することができるため必要である。

【0004】

ヒトMcmタンパク質はウサギにおいて免疫原性であることが知られている (Thommesら、Nucleic Acid Res. , 1992 , 20 : 1069 - 1074)。しかしながら、公知のポリクローナル抗血清は、免疫生化学的な解析 (ウエスタンブロット) で単一特異的に反応しないかおよび / またはすぐにかつ常套的な免疫組織学における問題なしに適用できないかのいずれかである (Hu , B .ら、Nucleic Acid Res. , 1993 , 21 : 5289 - 5293)。したがって、医療診断においてMcm3の検出方法として役に立ち得る手近な手段はない。

【0005】

発明の要約

したがって、本発明の目的は、単独でまたは互いに組み合わせて行われる生化学的なシステムや組織学的なシステムでもMcm3タンパク質をすばやく、かつ単一特異的に検出する手段を提供することにある。この検出は、単独でまたは他の公知のマーカールと組み合わせて行われ得る。

【0006】

本発明によれば、これは、Mcm3タンパク質に対する、免疫生化学的および免疫組織化学的な検出システムの両方に適用でき、それにより、これらの検出が単独でまたは組み合わせて行われ得るモノクローナル抗体により達成される。

【0007】

さらに、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが開示される。

【0008】

本発明の他の局面は、本発明のモノクローナル抗体を含有してなる、診断用組成物および検出キットの提供である。

【0009】

さらに他の局面は、試料中におけるMcm3の検出のため本発明のモノクローナル抗体の使用である。

【0010】

さらに、本発明のモノクローナル抗体およびハイブリドーマのそれぞれの産生

に関する方法が開示されている。

【0011】

最後に、本発明は、該モノクローナル抗体を含有してなる医薬調製物および薬物ならびにある種の疾患の治療用薬剤の調製へのモノクローナル抗体の使用に関する。

【0012】

また、異常型M c M 3のレベルもしくは活性に関連する、またはM c M 3の活性もしくはレベルの調節から利益を得ることができる疾患または障害の治療方法は、本発明の範囲内である。前記方法は、例えば、被験体に局所的または全身的のいずれかで、本発明のM C m 3抗体を含有する組成物の薬学上有効量を投与することを含む。

【0013】

発明の詳細な説明

本発明によれば、M c m 3タンパク質に対する、免疫生化学的および免疫組織化学的な検出システムに適用でき、それにより、これらの検出が単独でまたは組み合わせて処理され得るモノクローナル抗体が提供される。

【0014】

本発明のモノクローナル抗体は、あらゆる動物またはヒトから得ることができ、それによりマウスのモノクローナル抗体が好ましい。

【0015】

さらに、前記モノクローナル抗体は、遺伝子操作により生化学的に改変され得る、即ち、それは、M c m 3の認識に必要であり、前記抗体にさらなる有利な特性を与える他の部位と置換される部位を、完全にまたは部分的におそらく欠損している抗体で合成され得る。

【0016】

前記検出を伴う本発明の好ましいモノクローナル抗体、即ち、モノクローナルマウス抗体を産生するハイブリドーマ細胞株は、1999年2月16日に番号DSM ACC 2388下でブラウンシュバイクのドイツ微生物・細胞培養収蔵有限責任会社(Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

) (DSMZ) に寄託された。

【0017】

「抗体」という用語は、本明細書に用いられるように、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、即ち、Mcm3に特異的に結合する(免疫反応する)抗原結合部位を含有する分子をいう。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例には、ペプシンなどの酵素で前記抗体を処理することで生成され得るF(ab)フラグメントおよびF(ab')₂フラグメントが含まれる。本発明は、Mcm3に結合するモノクローナル抗体を提供する。「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、本発明に用いられるように、Mcm3の特定のエピトープと免疫反応することができる唯一の種類抗原結合部位を含む抗体分子の集団をいう。したがって、典型的にはモノクローナル抗体組成物は、免疫反応するMcm3に対する単独の結合親和性を示す。

【0018】

異常型Mcm3活性に「関連する」または「特徴づけられる」疾患、障害または状態は、異常型Mcm3活性により引き起こされるまたはこれが一因となっている被験体における疾患、障害または状態をいう。

【0019】

「処置する」という用語は、本明細書に用いられるように、前記状態または疾患の少なくとも1つの症状を治療する並びに改善することを包含することが意図される。

【0020】

モノクローナル抗Mcm3抗体は、Mcm3免疫原で適当な被験体を免疫化することにより調製することができる。適切な免疫原性調製物は、例えば、組み換式的に発現されたMcm3タンパク質または化学的に合成されたMcm3ポリペプチドを含有し得る。さらに該調製物は、フロイント完全もしくは不完全アジュバントなどのアジュバント、または類似の免疫刺激剤を含有し得る。免疫原性Mcm3調製物での適当な被験体の免疫化は、抗Mcm3抗体応答を誘導する。

【0021】

免疫処理した被験体における抗Mcm3抗体力価は、固定化Mcm3を使用する固定酵素免疫測定法(ELISA)などを用いる標準的な技術により経時的にモニターされ得る。所望であれば、Mcm3に対する抗体分子を、哺乳動物から(例えば、血液から)単離し、さらにプロテインAクロマトグラフィーなどの周知の技術により精製してIgG画分を得ることができる。免疫後の適当な時間に、例えば、抗体力価が最高である場合、抗体産生細胞を被験体から得ることができ、そしてKoehlerとMilstein(1975)Nature 256:495-497)により初めて記載されたハイブリドーマ技術(Brownら、(1981)J. Immunol. 127:539-46; Brownら、(1980)J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yehら、(1976)Proc. Natl. Acad. Sci. US. 476:2997-31; およびYehら(1982)Int. J. Cancer 29:269-75も参照のこと)、さらに最近のヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら(1983)Immunol Today 4:72)、EBVハイブリドーマ技術(Coleら(1985)、モノクローナル抗体と癌治療、Alan R. Liss, Inc., 77-96頁)またはトリオーマ(trioma)技術などの標準的な技術によりモノクローナル抗体を調製するのに使用することができる。モノクローナル抗体ハイブリドーマを製造する技術は、周知である(一般に、R. H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A new Dimension in Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York(1980); E. A. Lerner(1981)Yale J: Biol. Med., 54:387402; M. L. Gefterら、(1977)Somatic Cell Genet. 3:23136)。簡単には、不死化細胞株(典型的には、骨髄腫)を、前記のようにMcm3免疫原で免疫化された哺乳動物由来のリンパ球(典型的には脾細胞)に融合し、そして得られるハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングしてMcm3に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定する。

【0022】

リンパ球と不死化細胞株とを融合するのに使用される、多くの周知のプロトコールのいずれかを、抗Mcm3モノクローナル抗体を発生させる目的に利用することができる(例えば、G. Galfrèら、(1977) Nature 266:55052; Gefterら、Somatic Cell Genet.、上述; Lerner, Yale J. Biol. Med、上述; Kenneth, Monoclonal Antibodies、上述、を参照のこと)。さらに、当業者は、このような方法に多くのバリエーションがあり、同様に有用であり得ることを認識するだろう。典型的には、不死化細胞株(例えば、骨髄腫細胞株)は、リンパ球と同じ哺乳類種に由来する。たとえば、本発明の免疫原性調製物で免疫されたマウス由来のリンパ球を不死化マウス細胞株と融合することにより、マウスハイブリドーマを作製することができる。不死化細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含有する培地(「HAT培地」)に感受性のあるマウス骨髄腫細胞株である。標準的な技術に従い、融合パートナーとして任意の多くの骨髄腫細胞株、例えば、P3-NS1/1-Ag4-1; P3x63-Ag8.653またはSp2/O-Ag14骨髄腫株、を用いることができる。典型的には、HAT感受性のマウス骨髄腫細胞を、ポリエチレングリコール(「PEG」)を用いてマウス脾細胞に融合する。次いで、融合から得られるハイブリドーマ細胞を、未融合の骨髄腫細胞を殺す(未融合の脾細胞は形質転換されないので数日後に死ぬ)HAT培地を用いて選択する。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準ELISAアッセイを用いて、Mcm3に結合する抗体についてハイブリドーマ培地上清をスクリーニングすることにより検出される。

【0023】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製するかわりに、Mcm3で組み換えコンビナトリアル(combinatorial)免疫グロブリンライブラリー(例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー)をスクリーニングすることによりモノクローナル抗Mcm3抗体を同定し、単離することができ、それによりMcm3に結合する免疫グロブリンライブラリーのメンバーを単離する。ファージディスプレイライブラリーをつくり、スクリーニングするためのキットは、市販

されている（例えば、ファルマシアの組み換えファージ抗体システム、カタログ番号27-9400-01；およびストラタジーンSurfZAP（登録商標）ファージディスプレイキット、カタログ番号240612）。さらに、抗体ディスプレイライブラリーを生み出し、スクリーニングする際の使用に特に影響を受けやすい方法や試薬の例は、例えば、Ladnerら、米国特許第5,223,409号；Kangら、PCT国際公開第WO92/18619号；Dowerら、PCT国際公開第WO91/17271号；Winterら、PCT国際公開第WO92/20791号；Marklandら、PCT国際公開第WO92/15679号；Breitlingら、PCT国際公開第WO93/01288号；McCaffertyら、PCT国際公開第WO92/01047号；Garrardら、PCT国際公開第WO92/09690号；Ladnerら、PCT国際公開第WO90/02809号；Fuchsら（1991）Bio/Technology 9:1370-1372；Hayら（1992）Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85；Huseら（1989）Science 246:1275-1281；Griffithsら（1993）EMBO J 12:725-734；Hawkinsら（1992）J. Mol. Biol. 226:889-896；Clarksonら（1991）Nature 352:624-628；Gramら（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580；Garradら（1991）Bio/Technology 9:1373-1377；Hoogenboomら（1991）J. Mol. Biol. 226:4133-4137；Barbasら（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982；およびMcCaffertyら、Nature（1990）348:552-554に見られうる。

【0024】

さらに、標準的な組み換えDNA技術を用いて作製することができる、ヒトおよび非ヒト部位の両方を含有するキメラおよびヒト化モノクローナル抗体などの組み換え抗Mc m3抗体は、本発明の範囲内である。かかるキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の組み換えDNA技術により、例え

ば、Robinsonら、国際出願第PCT/US86/02269号；Akiraら、欧州特許出願第184,187号；Taniguchi, M., 欧州特許出願第171,496号；Morrisonら、欧州特許出願第173,494号；Neubergerら、PCT国際公開第WO86/01533号；Cabillyら、米国特許第4,816,567号；Cabillyら、欧州特許出願第12 S,023号；Betterら(1988) Science 240:1041-1043；Liuら(1987) Proc. Natl Acad. Sci. USA 84:3439-3443；Liuら(1987) J. Immunol. 139:3521-3526；Sunら(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218；Nishimuraら(1987) Canc. Res. 47:999-1005；Woodら(1985) Nature 314:446-449；およびShawら(1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559)；Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207；Oira(1986) Bio Techniques 4:214；Winter、米国特許第5,225,539号；Jonesら(1986) Nature 321:552-525；Verhoeyanら(1988) Science 239:1534；およびSeidlerら(1988) J. Immunol. 141:4053-4060に記載の方法を用いて製造され得る。抗Mcm3モノクローナル抗体は、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降などの標準的な技術によりMcm3を単離するのに使用され得る。抗Mcm3抗体は、Mcm3の発現の存在量およびパターンを評価するためにMcm3タンパク質を(例えば、細胞溶解物または細胞上清において)検出するのに使用され得る。抗Mcm3抗体は、臨床試験の手順の一部として、例えば、所定の治療プログラムの効力を決定するために、組織のタンパク質レベルをモニターするのに、診断的に使用することができる。検出は、検出可能な物質に抗体を結合すること(即ち、物理的に連結すること)により、促進され得る。検出可能な物質の例には、様々な酵素、置換基、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射性物質が含まれる。好適な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性

ホスファターゼ、(- ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼ) が含まれる; 好適な置換基複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる; 好適な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、Cy色素、アレキサ色素またはフィコエリトリンが含まれる; 発光物質の例にはルミノールが含まれる; 生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれ、そして好適な放射性物質の例には ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が含まれる。

【0025】

好ましくは、本発明のモノクローナル抗体は、更に後述する一次スクリーニングストラテジーで製造することができる。多数の調製されるハイブリドーマは、Mcm3タンパク質に対して単一特異的ではないが、または免疫生化学的検出システムにのみ適用できるが、免疫組織学的システムでは適用できない(またはその逆)かのいずれかであるため、生成されるハイブリドーマ細胞の初期試験では、両方の特性を有する本発明のモノクローナル抗体を製造するためにこのストラテジーを必要とする。

【0026】

本発明の特性を有する遺伝学的に改変された抗体および/または合成抗体の作製について、例えば、前記のようにして得られるモノクローナル抗体から開始することができる。これについて、モノクローナル抗体のMcm3結合領域を解析し、前記の検出に必要な部分および不必要な部分を同定するのに好適である。次いで、前記必要な部分は修飾することができ、前記不必要な部分は完全にまたは部分的に除去することができ、そして、それぞれ、抗体にさらに有利な特性を与える部分と置換することができる。また、抗体の結合領域以外の部分は、修飾、除去、または置換され得る。特にDNA組み換え技術は前記測定に好適であることは当業者に公知である。

【0027】

本発明のモノクローナル抗体は、生化学的検出システムおよび組織学的検出シ

ステムの両方において単一特異的にM c m 3を検出することが特徴である。したがって、該抗体は、非常に異なる試料におけるM c m 3発現の迅速な検出に好適である。

【0028】

本明細書の文脈において、「試料」という用語は、本発明の目的に適するすべての種類の試料を包含することが意図される。かかる試料の例は、血清、痰(sputum)、尿、液、組織および生検材料である。特に、該試料は血液試料または婦人科学的試料でありうる。

【0029】

これらの特徴のため、本発明の抗体は、例えばウエスタンブロットまたは免疫沈降により得られる定量的発現パターメータを用い、例えば免疫組織化学により測定される組織トポロジー分散解析が比較に基づいて解析される、診断的課題への適用に非常に好適である。

【0030】

本発明の抗体を用い、M c m 3発現の単一特異的検出が、E L I S A、ウエスタンブロットおよび免疫沈降などの逐一行う免疫生化学的検出法において(本発明ではウエスタンブロットが好ましい)、または免疫組織化学的組織、好ましくは常套手段により固定化およびパラフィン包埋した組織において高い信頼度で行われうる。このため、本発明の抗体は、適切であれば上述のように標識してもよく、あるいは自身もしくは他の試薬に対する標識抗体と組み合わせて使用してもよい。

【0031】

本発明のモノクローナル抗体は、D N A前駆体の集合(assembly)をインビボで阻害し得、それゆえ、細胞増殖を阻害し得る。したがって、これらの抗体またはその上記誘導体は、増加した細胞増殖を伴う疾患状態の治療に好適である。かかる疾患の例は、腫瘍(tumour)、アレルギー、自己免疫疾患、瘢痕形成、炎症およびリウマチ病ならびに移植の防御反応の抑制である。

【0032】

医薬組成物または薬の製造のため、本発明のモノクローナル抗体を単独で、ま

たは一般的な担体、アジュバントおよび/または添加剤と組み合わせて使用しうる。該抗体は、全身、局部、皮下、鞅内および局所の適用ならびに注腸による適用に好適である。このため、それらは、適切な溶媒中に溶解して、好ましくは水溶液として、リポソームの形態で、エマルジョンとして、または固体状態で、例えば粉末として、もしくはマイクロカプセルの形態で適用され得る。

【0033】

あるいはまた、本発明のモノクローナル抗体は、異なる医薬的活性剤を用いる併用療法において投与しうる。本発明のモノクローナル抗体を配合しうるか、あるいはまた併用療法において投与しうる医薬的活性剤は、例えば、他の抗原に対する抗体、特にモノクローナル抗体であり得、したがって、本発明のモノクローナル抗体と、関連する疾患状態の病因に關与する他の抗原に対する1種以上の(モノクローナル)抗体とを含有する「カクテル」を提供する。

【0034】

特に治療上有用な効果を生み出すための、本発明のモノクローナル抗体を配合しうるか、あるいはまた併用療法において投与しうるさらなる活性剤は、治療する疾患状態に依存し、例えば、市販品として入手可能な γ -グロブリンおよび免疫グロブリン製剤、抗生物質、殺菌製品、抗菌剤および抗腫瘍剤またはそれらの2種以上の混合物である。

【0035】

本発明のモノクローナル抗体は、腫瘍の治療において特に有利に使用しうる。すなわち、そのままで、または放線などの、従来の腫瘍治療法を妨害する他の治療法(therapeutical)および治療形態のそれぞれと組み合わせて使用しうる。かかる妨害は、ビンブラスチン(vinblastin)もしくはシスプラチンなどの非特異的細胞分裂抑制因子(cytostatica)において、いずれも副次的に、すなわち反復適用後に生じるか、または腎臓癌腫などの特定の腫瘍に初発的に存在する。

【0036】

かかる抗体の投与量は、治療している症状および治療のレシピエントにより変わるが、成人患者に対して1~約100mgの範囲であり、好ましくは1~10mgを、通常、ある一定期間、毎日投与する。1~5mgを投与する二部投与(

two part dosing) 治療プログラム (regime) が好ましい。

【 0 0 3 7 】

別の好ましい態様では、M c m 3 の検出は、タンパク質 K i - 6 7 および p 2 7 の検出と組み合わせて行われる。

【 0 0 3 8 】

過去 1 6 年間で組織病理学的診断に使用された細胞周期関連タンパク質のうち、最も言及されたものの1つは K i - 6 7 タンパク質である (Scholzen T および Gerdes J (2000) J Cell Physiol 182: 311-322; Gerdes J, Schwab U, Lemke H および Stein H (1983). Int. J. Cancer 31, 13-20)。K i - 6 7 タンパク質は、増殖中の細胞において発現されるが、細胞が休止状態に入ると速やかに消失する (Baisch, H および Gerdes, J (1987). Cell Tissue Kinet. 20 (4), 387-391)。臨床研究により、K i - 6 7 抗原は、多くの異なるヒト新生物、例えば、乳癌 (Jansen RL, Hupperets PS, Arends JW, Joosten-Achjanie SR, Volovics A, Schouten HC および Hillen HF (1998). Br. J. Cancer, 78:460-465)、軟組織肉腫、髄膜腫(meningeoma) (Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ および Lohse CM (1998). Cancer 82: 2262-2269)、前立腺癌 (Mahal RD, Lester S, Corless C, Richie JP, Chandra R, Probert KJ および Dutta A (1996) Cancer Res 56(18):4159-63) および非ホジキンリンパ腫 (Gerdesら (1984), J. Immunol. 133:1710-1715) における独立した予後マーカーであることが示されている。

【 0 0 3 9 】

タンパク質 p 2 7 は、細胞周期中の規定のチェックポイントでサイクリン依存性キナーゼ複合体に結合し、不活化することにより細胞周期の進行を調節するサイクリン依存性キナーゼインヒビター (C D K I) ファミリーに属する (Toyoshima H および Hunter T (1994) Cell 78(1):67-74)。p 2 7 の発現は、正常発達組織における、また無調節化 (deregulated) 成長を示す腫瘍における分化の強力なマーカーとしての役割を果たす (Lloyd RV, Jin L, Qian X および Kulig E (1997) Am J Path 150: 401-407., Zhang P, Wong C, DePinho RA, Harper JW および Elledge SJ (1998) Genes Dev 12(20):3162-3167)。

【0040】

3種のタンパク質を同時に検出する、組織の組み合わせ染色を行うことは、個々の腫瘍成長を決定する細胞の増殖プロセスおよび分化プロセスのより詳細な評価を可能にする。MCM3タンパク質は、増殖を停止したが、p27タンパク質発現の非存在により最終的に分化していない細胞において発現されるが、Ki-67は増殖中の細胞のみで発現される。p27は、休止細胞において見出され得るが、増殖中の細胞では見られない。Ki-67、MCM3およびp27は、障害性細胞成長および腫瘍形成(tumorigenesis)の詳細な特徴付けに適する相補的生物学的特性を規定する一組のパラメータを提供する。腫瘍診断はまた、これらのマーカーの組み合わせ評価から利益を得ることもあり、これは、個々の患者にとって最も適切な治療概念を選択するのに役立つ。

【0041】

本発明を以下の実施例により説明する。

【0042】

実施例

実施例1

本発明のモノクローナル抗体の産生

マウスを免疫処置(immunisation)に用いた。組換えヒトMcm3タンパク質を抗原として用いた。

【0043】

免疫処置および融合の説明

1日目: 100 μ lのPBS(リン酸緩衝生理食塩水)中100 μ gのMcm3タンパク質を、100 μ lのフロイントアジュバントと完全かつ十分に混合し、続いてマウスに注射した。

【0044】

14日目: 100 μ lのPBS中50 μ gのMcm3タンパク質を、100 μ lのフロイントアジュバントと完全かつ十分に混合し、続いてマウスに注射した。

。

【0045】

21日目：100 μ lのPBS中50 μ gのMc m3タンパク質を、100 μ lのフロイントアジュバントと完全かつ十分に混合し、続いてマウスに注射した。

【0046】

37日目：100 μ lのPBS中50 μ gのMc m3タンパク質を、100 μ lのフロイントアジュバントと完全かつ十分に混合し、続いてマウスに注射した。

【0047】

39日目にマウスを無痛的に屠殺した。脾臓細胞を取り出し、骨髄腫細胞と融合した。完全成長に達したハイブリドーマを得た。

【0048】

ハイブリドーマ上清みのスクリーニングとクローン化

まず、完全成長に達したハイブリドーマの上清みをスポット・ブロット (spot-blot) ・アッセイにおいて試験した。このため、1mlの組換えヒトMc m3含有(2ng/ml)PBSを、1cm \times 0.5cmの大きさのニトロセルロース膜片に置いた。これらの小片を48穴プレートに置き、15分間室温で乾燥した。続いて、ブロッキングバッファー (puffer) (PBS、0.005 Tween 20、4%ゼラチン) とともに45分間室温でインキュベートした。PBS (0.05% Tween 20、0.5%ゼラチン) での数回の洗浄工程後、ハイブリドーマ上清みとともに60分間室温でインキュベートした。PBS (0.05% Tween 20、0.5%ゼラチン) での数回の洗浄工程後、市販品として入手可能なホスファターゼ結合ヤギ抗マウス抗体 (Dianova、ハンブルク) (製造業者の指示書に従って1:10000に希釈) を添加した。PBS (0.05% Tween 20、0.5%ゼラチン) とともに室温で1時間インキュベートした後、アルカリホスファターゼ検出反応を、顕色溶液 (36mM 5'-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート; 400mMニトロブルーテトラゾリウム、100mM Tris-HCl、pH9.5、100mM NaCl、5mM MgCl₂) を用い、10分間室温で行った。

【0049】

スポット・プロット試験において陽性であったハイブリドーマ上清みを、続いて免疫組織学的に試験した。このため、パラフィン切片、例えば扁桃を標準的な手法(2×100%キシレン、2×100%EtOH、2×70%EtOH、2×40%EtOH)に従って脱水した後、水中で手短に洗浄した。次いで、加圧炉(pressure cooker)内で1~5分間、クエン酸バッファーpH6(1lに対して2.1gクエン酸一水和物をpH6に2N NaOHで調整する)中で切片を加熱(cook)した。炉を開口した後、切片を直ちに冷(RT)TBS中で洗浄し、続いて加湿チャンバ内で30分間、ハイブリドーマ上清みとともにインキュベートした。TBS中で数回洗浄した後、切片に結合した抗体を間接イムノペルオキシダーゼ法により検出し、ヘマラムで染色し、包埋し、鏡検にて評価した。

【0050】

本発明の抗体は以下の染色パターンを示す。該抗体は、増殖領域の細胞の核と主に反応し、これは、ヒト扁桃の胚中心内の暗いゾーンの細胞がMc m3に対して陽性に染色されるという事実により示される。同様に、正常粘膜の基底層付近の細胞はMc m3特異的抗体と反応する。Mc m3染色はまた、口腔粘膜の非増殖細胞コンパートメントに属する中間層および上層にも見られたということは注目に値する。

【0051】

スポット・プロットおよび免疫組織学の両方において陽性であったハイブリドーマをクローン化し、それらがモノクローナルとなるまで再クローン化した。独立したモノクローナル抗体を得た。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を、ブラウンシュヴァイクのDeutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen(DSMZ)に、1999年2月16日に番号DSMACC2388で寄託した。

【0052】

実施例2

ポリクローナルウサギ抗Mc m3抗体および本発明のモノクローナル抗体を用いた細胞溶解物のウエスタンプロット解析

細胞株HELA(H)およびCHO(C)の細胞溶解物を、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 (SDS PAGE) に供した。ゲル中で分離したタンパク質を、wet - ブロッキングチャンバ内のニトロセルロース膜に一晩で移した。次いで、希釈したウサギ抗Mcm3抗血清 (Hu, B.ら、Nucleic Acid Res., 1993, 21: 5289-5293) (0.15 μ g/ml) とともに1時間室温でこの膜をインキュベートした。PBS (0.05% Tween 20、0.5%ゼラチン) での数回の洗浄工程後、市販品として入手可能なホスファターゼ結合ヤギ - ウサギ抗体 (製造業者 (Dianova、ハンブルク) の指示書に従って1:10000に希釈) を添加した。1時間室温でインキュベートし、もう一度TNT - バッファー (150mM NaCl、10mM Tris pH7.5、0.05% Tween 20) 中で洗浄した後、製造業者の指示書に従って、ECLシステム (Amersham Life Science、ブラウンシュヴァイク) を用いる化学蛍光法により検出を行った。

【0053】

図1において確認できるように、ポリクローナル抗Mcm3ウサギ抗体は、見かけ分子量105kDaの予期した明白な主タンパク質のバンドに加えて、分子量が50kDa~90kDaの範囲のさらなるタンパク質を示すことが判明した。

【0054】

本発明のモノクローナル抗Mcm3抗体は、見かけ分子量105kDaの予期したタンパク質のバンドのみを示した。

【0055】

さらに、免疫組織化学的研究において、本発明のモノクローナル抗体は、Mcm3の検出に対する有用性を示す。

【0056】

実施例3

本発明の抗Mcm3抗体を用いる免疫沈降

1 μ gの抗Mcm3一次抗体を10 μ lのDynaビーズ (Dynal M280ヒツジ抗マウス、Dynal、ハンブルク) に添加し、回転下4 で30分間インキュベートする。

【0057】

細胞調製物 (1×10^6 細胞) を、プロテアーゼインヒビターを含有する免疫沈降バッファー (18 mM Tris / HCl、150 mM NaCl、0.3% ヘキサデシルメチル - アンモニウムブロミド、5 mM EDTA および 1 mM DTT) 中に入れ、5 分間加熱し、氷上で冷却し、遠心分離 (5 分間、1400 rpm) する。過剰の液体を Dynal ビーズ / 一次抗体複合体に添加し、ローラー上で 30 分間 4 でインキュベートする。

【0058】

次いで、Dynal 磁気濃縮器内にチューブを 20 秒間入れ、過剰の液体を除去する。磁気ビーズを 500 μ l の NET (Tris / HCl 18 mM、NaCl 150 mM、EDTA 5 mM、DTT 1 mM) 中に再懸濁し、再度磁気濃縮器内に入れ、20 秒後に上清みを除去する。このようにして、ビーズを数回洗浄する。

【0059】

こうして精製した Mcm3 を、次いで SDS - PAGE により解析しうる。

【0060】

実施例 4

永久細胞株細胞の核における本発明の抗 Mcm3 抗体のマイクロインジェクション

マイクロインジェクションのために CELLocate (登録商標) カバーガラス上で HEp-2 を培養し、対数増殖期間において使用した。本発明の抗 Mcm3 抗体および関連性のない対照抗体のそれぞれを、光学顕微鏡の制御 (control) 下 (インジェクション圧 130 hPa ; インジェクション時間 0.3 ~ 0.5 秒)、トランスジェクター (transjector) およびマイクロマニピュレータ (micro manipulator) で核内にマイクロインジェクトした。次いで、インジェクトされた細胞を、プロモデソキシウリジン (BrdU) 含有 (0.1 mM) 培地とともに 6 時間培養した。固定化 (5 分間、4% パラホルムアルデヒド、室温) 後、カバーガラスを Tris 緩衝生理食塩水 (TBS) 中で 3 回洗浄し、100% EtOH 中で 10 分間 - 20 でインキュベートした後、直接 0.1% Tri

t o n X - 1 0 0 T B S 中に 1 0 分間室温で移すことにより接着性細胞の透過を行った。次いで、市販品として入手可能な C y 3 結合ヤギ抗マウス抗体 (D i a n o v a 、 ハ ン プ ル ク) (製造業者の指示書に従って P B S / 1 0 % ウシ血清アルブミン中で希釈) を用いてインジェクトされた抗体を検出した。細胞内に固定化された B r d U の検出のために 2 M H C l 中で 6 0 分間 3 7 ° で調製物をまずインキュベートした。続いて、調製物をまず蒸留水で数回洗浄し、次いで P B S で 2 回洗浄した。次に、加湿チャンバ内で一晩 4 ° で、市販品として入手可能な F I T C 標識抗 B r d U 抗体 (B o e h r i n g e r M a n n h e i m , M a n n h e i m) (製造業者の指示書に従って希釈) とともにインキュベートを行った。次いで、調製物を十分に 5 回 P B S 中で 1 0 分間洗浄し、 9 0 % グリセロール中 D A B C O (1 , 4 - ジアザビスクロ [2 , 2 , 2] オクタン) で覆い、蛍光顕微鏡で評価した。

【 0 0 6 1 】

対照抗体をインジェクトされたほとんどすべての細胞が、 B r d U もまた取り込み、したがって、実験中、正常な細胞周期を経過したことがわかった。対照的に、本発明の抗 M c m 3 抗体をインジェクトした細胞の 2 0 % ~ 5 0 % のみが B r d U を取り込んだ。したがって、これらの細胞の増殖は本発明の抗体により阻害された。

【 0 0 6 2 】

参考文献

1. Maineら, Genetics, 1984, 106:365-385
2. J.J. Blow および R.A. Laskey, Nature, 1988, 332:546-548
3. A. Richter, R. Knippers, Eur. J. Biochem., 1997, 247:136-141
4. Thommesら, Nucleic Acid Res., 1992, 20:1069-1074
5. Hu, B. ら, Nucleic Acid Res., 1993, 21:5289-5293
6. KoehlerおよびMilstein, Nature, 1975, 256:495-497
7. Brownら, J. Immunol., 1981, 127:539-46 (1981)
8. Brownら, J. Biol. Chem., 1980, 255:4980-83
9. Yehら, Proc. Natl. Acad. Sci. US. 4 76:2997-3 1 (1976)
10. Yeh ら, Int. J. Cancer, 1982, 29:269-75

11. Kozborら, Immunol Today, 1983, 4:72
12. Coleら, (1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96 頁
13. R. H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A new Dimension in Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980)
14. E. A. Lerner, Yale J: Biol. Med., 1981, 54:387402
15. M. L. Gefterら, Somatic Cell Genet., 1977, 3
16. G. Galfre ら, Nature, 1977, 266:55052
17. Ladnerら, 米国特許第5,223,409 号
18. Kangら, PCT 国際公開第WO 92/18619 号
19. Dower ら, PCT 国際公開第 WO 91/17271号
20. Winterら, PCT 国際公開第 WO 92/20791号
21. Marklandら, PCT 国際公開第 WO 92/15679号
22. Breitling ら, PCT 国際公開第 WO 93/01288号
23. McCaffertyら, PCT 国際公開第 WO 92/01047号
24. Garrard ら, PCT 国際公開第 WO 92/09690号
25. Ladnerら, PCT 国際公開第 WO 90/02809号
26. Fuchs ら, Bio/Technology, 1991, 9:1370-1372
27. Hay ら, Hum. Antibod. Hybridomas, 1992, 3:81-85
28. Huseら, Science, 1989, 246:1275-1281
29. Griffiths ら, EMBO J, 1993, 12:725-734
30. Hawkins ら, J. Mol. Biol., 1992, 226:889-896
31. Clarksonら, Nature, 1991, 352:624-628
33. Gramら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89:35763580
34. Garradら, Bio/Technology, 1991, 9:1373-1377
35. Hoogenboomら, J \ tUC. Acid Res., 1991, 19:4133-4137
36. Barbasら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88:7978-7982
37. McCaffertyら, Nature, 1990, 348:552-554
38. Robinsonら, 国際特許出願第 PCT/US86/02269 号

39. Akira ら, 欧州特許出願第 184,187号
40. Taniguchi, M., 欧州特許出願第 171,496号
41. Morrisonら, 欧州特許出願第 173,494号
42. Neuberger ら, PCT 国際公開第 WO 86/01533号
43. Cabilly ら, 米国特許第4,816,S67 号
44. Cabilly ら, 欧州特許出願第 12 S,023 号
45. Betterら, Science, 1988, 240:1041-1043
46. Liu ら, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1987, 84:3439-3443
47. Liu ら, J. Immunol., 1987, 139:3521-3526
48. Sun ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84:214-218
49. Nishimura ら, Canc. Res., 1987, 47:999-1005
50. Woodら, Nature, 1985, 314:446-449
51. Shawら, J. Natl. Cancer Inst., 1988, 80:1553-1559)
52. Morrison, S. L., Science, 1985, 229:1202-1207
53. Oiら, Bio Techniques 1986, 4:214
54. Winter, 米国特許第5,225,539 号
55. Jones ら, Nature, 1986, 321:552-525
56. Verhoeyan ら, Science, 1988, 239:1534
57. Seidler ら, J. Immunol., 1988, 141:4053-4060
58. Scholzen T および Gerdes J, J Cell Physiol, 2000, 182:311-322
59. Gerdes J, Schwab U, Lemke H および Stein H, Int. J. Cancer, 1983, 31, 13-20
60. Baisch, H および Gerdes, J, Cell Tissue Kinet., 1987, 20(4), 387-391
61. Mashal RD, Lester S, Corless C, Richie JP, Chandra R, Propert KJ, および Dutta A, Cancer Res, 1996, 56(18):4159-63
62. Toyoshima H, および Hunter T, Cell, 1994, 78(1):67-74
63. Lloyd RV, Jin L, Qian X, および Kulig E, Am J Path 1997, 150:401-407
64. Zhang P, Wong C, DePinho RA, Harper JW, および Elledge SJ, Genes Dev . 1998, 12(20):3162-3167.

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明のモノクローナル抗体（右側）および当該技術分野で公知のポリクローナル抗体（左側）を用いるウエスタンブロットを示す。本発明の抗体は、1つのバンドのみを認識し、一方ポリクローナル抗体は50～90kDaの範囲のさらなるバンドを検出することが明確に示されている。HはHeLa細胞およびCはCHO細胞を示す。

【図1】

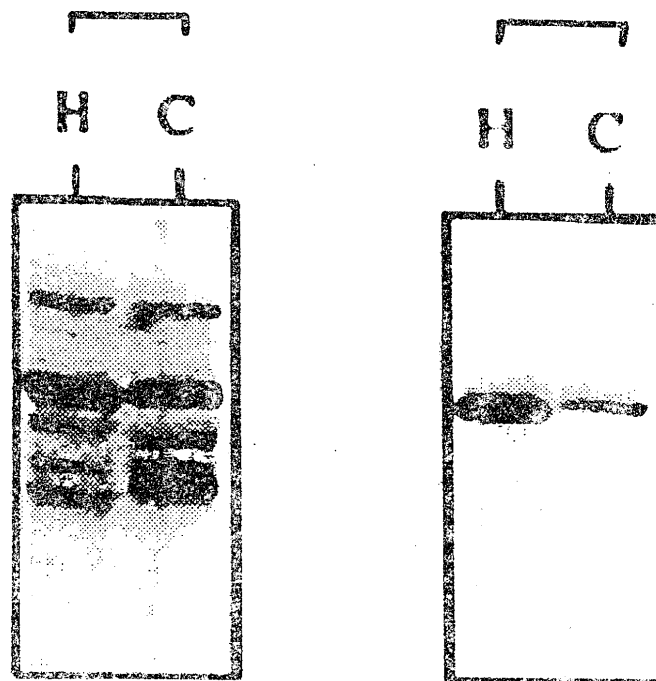


Fig.1

【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年4月26日(2001.4.26)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】請求項23

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【請求項23】 腫瘍診断のためのMcm3、Ki-67およびp27の発現の組み合わせた検出のための、請求項22記載の診断用キット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC, EP 00/02910

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C07K16/18	C12N5/16 C12N5/18 G01N33/53 A61K39/395
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	C12N G01N
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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HU B ET AL: "The P1 family: a new class of nuclear mammalian proteins related to the yeast Mcm replication proteins." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (1993 NOV 25) 21 (23) 5289-93., XP000941330 cited in the application page 5289, right-hand column page 5290 ---	1-24
A	SOMEYA A ET AL: "The possible involvement of replication-related proteins with a DEAD-box-like motif in cell-free DNA replication of Xenopus eggs." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, (1995 JUL 26) 212 (3) 1098-106., XP000941401 the whole document --- -/--	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input 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 citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 October 2000		14.12.00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Menessier, T

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC, EP 00/02910

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THOMMES P ET AL: "Properties of the nuclear P1 protein, a mammalian homologue of the yeast Mcm3 replication protein." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (1992 MAR 11) 20 (5) 1069-74., XP002150915 cited in the application the whole document -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 00/02910

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. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 24 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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. 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.:
1-22 and 24

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: 1-22 and 24

Claims 1-5 which are each directed to an anti-human Mcm3 monoclonal antibody.

Claims 6-7 which are each directed to a hybridoma secreting such an antibody.

Claims 8-14 which are each directed to the use of such an antibody in a detection method for human Mcm3.

Claims 15-18 which are each directed to a process for the production of such an antibody.

Claim 19 which is directed to diagnostic composition comprising such an antibody.

Claim 20 which is directed to the use of such an antibody for the production of therapeutical preparations.

Claim 21 which is directed to a pharmaceutical preparation comprising such antibodies.

Claim 22 which is directed to a diagnostic kit comprising such an antibody.

Claim 24 which is directed to a method of preventing or treating a disease involving the administration of such an antibody.

2. Claim : 23

Claim 23 which is directed to a diagnostic kit for the combined detection of the "expression" of Mcm3, Ki-67 and p27.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P 29/00	1 0 1	A 6 1 P 29/00	1 0 1
		35/00	
		37/06	
		37/08	
C 0 7 K 1/22		C 0 7 K 1/22	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53		33/574	A
		33/577	B
		C 1 2 R 1:91	
//(C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:91)			
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	シヨルツェン, トーマス ドイツ連邦共和国 ネーリッツ デー - 23843 ヘレンヴェーク 3		
(72)発明者	エンドル, エルマー ドイツ連邦共和国 ハンブルク デー - 22399 クプフェルタイツヒヴェーク 22		
(72)発明者	ヴォーレンベルク, クラウディア ドイツ連邦共和国 ハンブルク デー - 22399 クプフェルタイツヒヴェーク 22		
(72)発明者	パローン - ルーア, ベッティーナ ドイツ連邦共和国 ヴェステラーデ デー - - 23815 エーラーズ 13		

- (72)発明者 ハーン, マルグリット
ドイツ連邦共和国 ボルステール デー -
23845 パルカレー 40アー
- (72)発明者 プリラ, パトリシア
ドイツ連邦共和国 ハンブルク デー -
22769 シュトレーゼマンシュトラッセ
128
- (72)発明者 ズツヴィンスキ, ヨハンナ
ドイツ連邦共和国 ヴィーマースドルフ
デー - 24649 ベッカートヴィーテ 1
- (72)発明者 クニッパース, ロルフ
ドイツ連邦共和国 コンスタンツ デー -
78464 コーバーレヴェーク 17
- F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
DA13 DA14
4B065 AA92X AB05 CA25 CA44
CA46
4C085 AA14 BB11 DD21 DD62 DD63
EE01 EE06 FF24
4H045 AA11 CA40 DA76 EA22 EA28
EA50 EA51 FA72 GA26

专利名称(译)	抗人蛋白质Mcm3的单克隆抗体，其制备方法及其用途		
公开(公告)号	JP2002541157A	公开(公告)日	2002-12-03
申请号	JP2000609452	申请日	2000-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	丹麦达科有限公司		
申请(专利权)人(译)	Dako公司ER ES		
[标]发明人	ゲルデスヨハネス ショルツェントーマス エンドルエルマー ヴォーレンベルククラウディア バローンルーアベッティーナ ハーンマルグリット プリラパトリシア ズツヴィンスキヨハンナ クニッパースロルフ		
发明人	ゲルデス,ヨハネス ショルツェン,トーマス エンドル,エルマー ヴォーレンベルク,クラウディア バローン-ルーア,ベッティーナ ハーン,マルグリット プリラ,パトリシア ズツヴィンスキ,ヨハンナ クニッパース,ロルフ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P17/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K1/22 C07K16/14 C07K16/18 C12N5/10 C12N5/18 C12N5/20 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P17/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/14 Y10S435/975		
FI分类号	C07K16/18 A61K39/395.N A61K39/395.T A61K39/395.U A61P17/02 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K1/22 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/574.A G01N33/577.B C12R1/91 C12N5/00.B		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD21 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF24 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/GA26		
优先权	19915057 1999-04-01 DE		
其他公开文献	JP4980516B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了针对人Mcm3蛋白的单克隆抗体，产生该抗体的杂交瘤细胞系，其制备方法及其用途，包含本发明的单克隆抗体的药物组合物以及某些疾病的预防和治疗。其用于和预防和治疗与Mcm3表达有关的疾病。本发明的单克隆抗体用免疫组织学和免疫生物化学检测系统单特异性地检测并结合人Mcm3。产生这些单克隆抗体的方法包括使用免疫生物化学方法初步筛选过量的杂交瘤上清液，然后通过免疫组织化学方法二次筛选阳性杂交瘤。

