

(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2008-539251
(P2008-539251A)

(43) 公表日 平成20年11月13日(2008.11.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18 ZNA	4B024
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B063
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4B064
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00 C	4B065
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-509059 (P2008-509059)
 (86) (22) 出願日 平成18年4月26日 (2006. 4. 26)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年12月25日 (2007. 12. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/015706
 (87) 国際公開番号 W02006/116442
 (87) 国際公開日 平成18年11月2日 (2006. 11. 2)
 (31) 優先権主張番号 60/675, 305
 (32) 優先日 平成17年4月27日 (2005. 4. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/718, 082
 (32) 優先日 平成17年9月16日 (2005. 9. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507006097
 トリパス イメージング, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ノース カロライナ 27215, バーリントン, プランテーション ドライブ 780
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 子宮頸疾患の検出において使用するためのモノクローナル抗体および方法

(57) 【要約】

患者試料中の高悪性度子宮頸疾患を診断するための組成物および方法が提供される。組成物は、MCM2に特異的に結合する、新規モノクローナル抗体、ならびにその変異体および断片を含む。本発明のMCM2抗体の結合特性を有するモノクローナル抗体が、さらに提供される。本発明のMCM2モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本明細書中に開示される。組成物は、患者由来の子宮頸試料中のMCM2の過剰発現を検出することを含む、高悪性度子宮頸疾患を診断するための方法の実施において、使用を提供する。本発明の方法を実施するためのキットが、さらに提供される。MCM2エピトープのアミノ酸配列を含むポリペプチド、および抗体の生成においてこれらのポリペプチドを使用する方法もまた、本発明によって包含される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

M C M 2 に特異的に結合することができるモノクローナル抗体、またはその変異体もしくは断片であって、該モノクローナル抗体は、以下：

(a) A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 8 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 7 C 5 . 6 によって産生されるモノクローナル抗体、

(b) A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 7 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 6 H 6 . 1 9 によって産生されるモノクローナル抗体、

(c) ハイブリドーマ細胞株 2 7 C 5 . 6 または 2 6 H 6 . 1 9 によって産生されるモノクローナル抗体の結合特性を有するモノクローナル抗体、

(d) ハイブリドーマ細胞株 2 7 C 5 . 6 または 2 6 H 6 . 1 9 によって産生されるモノクローナル抗体を結合することができるエピトープに結合するモノクローナル抗体、

(e) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体、

(f) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体、

(g) ハイブリドーマ細胞株 2 7 C 5 . 6 または 2 6 H 6 . 1 9 によって産生されるモノクローナル抗体との競合的結合アッセイにおいて競合するモノクローナル抗体、および

(h) (a) ~ (g) のモノクローナル抗体の抗原結合断片であり、断片が M C M 2 に特異的に結合する能力を維持している、モノクローナル抗体、またはその変異体もしくは断片、

からなる群から選択される、モノクローナル抗体。

【請求項 2】

A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 8 として寄託されている、ハイブリドーマ細胞株 2 7 C 5 . 6 。

【請求項 3】

A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 7 として寄託されている、ハイブリドーマ細胞株 2 6 H 6 . 1 9 。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を産生することができる、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項 5】

少なくとも 1 つの請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を含む、高悪性度子宮頸疾患を診断するためのキット。

【請求項 6】

モノクローナル抗体が、A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 8 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 7 C 5 . 6 によって産生されるモノクローナル抗体、または A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 7 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 6 H 6 . 1 9 によって産生されるモノクローナル抗体である、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 7】

少なくとも 2 つの抗体を含み、第一の抗体が、A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 8 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 7 C 5 . 6 によって産生されるモノクローナル抗体であり、第二の抗体が、A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 7 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 6 H 6 . 1 9 によって産生されるモノクローナル抗体である、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 8】

T o p o 2 A に特異的に結合する抗体をさらに含む、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 9】

各抗体が別々の抗体試薬として提供される、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 10】

抗体の全てが抗体カクテルとして提供される、請求項 7 に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記キットがペルオキシダーゼブロッキング試薬、タンパク質ブロッキング試薬、前記バイオマーカータンパク質への抗体結合を検出するための化学物質、対比染色剤、青みづけ剤、および使用のための手引きをさらに含む、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 1 2】

パブ染色のための試薬をさらに含む、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 1 3】

パブ染色のための試薬が E A 5 0 およびオレンジ G を含む、請求項 1 2 に記載のキット。

【請求項 1 4】

a) 患者から子宮頸試料を得ること、
b) 試料と、M C M 2 に特異的に結合する少なくとも 1 つの請求項 1 に記載のモノクローナル抗体とを接触させること、および
c) M C M 2 への抗体の結合を検出すること
を含む、患者における高悪性度子宮頸疾患を診断するための方法。

10

【請求項 1 5】

モノクローナル抗体が、A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 8 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 7 C 5 . 6 によって産生されるモノクローナル抗体、または A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 7 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 6 H 6 . 1 9 によって産生されるモノクローナル抗体である、請求項 1 4 に記載の方法。

20

【請求項 1 6】

試料と、M C M 2 に特異的に結合する少なくとも 2 つのモノクローナル抗体とを接触させることを含み、第一の抗体が、A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 8 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 7 C 5 . 6 によって産生されるモノクローナル抗体であり、第二の抗体が、A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 7 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 6 H 6 . 1 9 によって産生されるモノクローナル抗体である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

試料と、T o p o 2 A に特異的に結合する抗体とを接触させることをさらに含む、請求項 1 6 に記載の方法。

30

【請求項 1 8】

抗体と試料とを、個々の抗体試薬として連続的に、または抗体カクテルとして同時に接触させる、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

M C M 2 モノクローナル抗体を結合するためのエピトープを含む単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、

(a) 配列番号 3 または 1 4 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、および
(b) 配列番号 3 または 1 4 に対する少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、抗原活性を有するポリペプチド、
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

40

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載のポリペプチドで動物を免疫化することを含む、M C M 2 抗体を生成するための方法。

【請求項 2 1】

(a) 免疫応答を誘発する条件下で請求項 1 9 に記載のポリペプチドで動物を免疫化すること、
(b) 動物から抗体産生細胞を単離すること、
(c) 培養物中で、抗体産生細胞を不死化細胞と融合し、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を形成すること、
(d) ハイブリドーマ細胞を培養すること、および

50

(e) 培養物からモノクローナル抗体を単離することを含む、MCM2モノクローナル抗体を生成するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、MCM2に結合することができる抗体、および、特に子宮頸疾患の診断において、これらの抗体を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

子宮頸の癌腫は、女性において2番目に多い新生物であり、全ての女性の癌のおよそ12%を占め、年におよそ250000人の死亡の原因となる。非特許文献1。集団検診事業が利用可能でない多くの発展途上国において、臨床的問題はより深刻である。これらの国における子宮頸癌は、女性における癌での死亡の第1位の原因である。

【0003】

子宮頸癌の症例の大多数は、扁平上皮癌に相当するが、腺癌も見られる。子宮頸癌は、形態学的に区別することができる明確な非侵襲性上皮内段階を経て発展するので、集団検診によって防ぐことができる。非特許文献2。正常な細胞がどのようにして形質転換するのは理解されていないが、正常な重層上皮から子宮頸上皮内新生物(CIN)を経て浸潤癌への組織病理学的変化の連続スペクトルの概念が、長年にわたって広く認められている。子宮頸癌への前駆体は、当該分野でCINまたは扁平上皮内病変(SIL)としても公知の、異形成である。扁平上皮内異常は、3層(CIN)または2層(ベセズダ)システムを用いることによって分類することができる。ベセズダシステム下で、CINIおよびHPV感染に対応する、低悪性度扁平上皮内病変(LSIL)は、一般に、比較的侵襲性疾患への進行のリスクの低い増殖性HPV感染を示す。LSILおよびHSILの両方とも悪性腫瘍の潜在的前駆体として考察されているが、3層システムにおけるCINIIおよびCINIIIに対応する、高悪性度扁平上皮内病変(HSIL)は、LSILよりも高い、子宮頸癌への進行のリスクを示す。患者試料はまた、このシステム下で、ASCUS(意義が不明な非定型扁平細胞)またはAGUS(意義が不明な非定型腺細胞)として分類することができる。

【0004】

子宮頸癌と、16、18および31型等のリスクの高い型のヒトパピローマウイルス(HPV)による感染との、強力な関連が確立されている。実際、多数の疫学的および分子生物学的証拠によって、HPV感染は子宮頸癌における原因因子として確立されている。さらに、HPVは、高悪性度子宮頸疾患の85%以上の症例において見られる。しかしながら、HPV感染は非常に一般的であり、おそらくは30歳を超える女性の5~15%で起こるが、高悪性度の子宮頸疾患または癌を生じるHPV陽性の女性はほとんどいない。HPV単独の存在は感染のみの指標であり、高悪性度子宮頸疾患の指標ではなく、したがって、HPV感染単独の試験は、多くの偽陽性を生じる。例えば、非特許文献3を参照のこと。

【0005】

現在の文献から、HPVが、下にある子宮頸の組織内で基底幹細胞に感染することが示唆される。成熟ケラチノサイトへの幹細胞の分化は、重層子宮頸上皮への細胞の得られる遊走とともに、HPVウイルス複製および細胞の再感染と関連付けられる。このウイルス複製プロセスの間、細胞周期制御解除、活発な増殖、DNA複製、転写活性化およびゲノム不安定性を含む、いくつかの細胞変化が起こる(非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6)。

【0006】

ほとんどのHPV感染は、自然界では一時的であり、ウイルス感染は12ヶ月間のうちにそれ自体で解決する。1つまたは複数の腫瘍形成サブタイプのHPVでの持続性の感染を生じる個体については、HPV感染のない患者と比較して、新生物の発生のリスクがあ

10

20

30

40

50

る。子宮頸新生物の発生におけるHPVの重要性を考慮すれば、HPVの臨床的検出は、子宮頸新生物発生リスクのある患者の同定における重要な診断手段になっている。子宮頸疾患についてのHPVベースのスクリーニングの臨床的有用性は、その陰性適中率にある。正常なパピニコラウスミアの経緯と組み合わせたHPV陰性結果は、その後の1～3年間の、疾患のない状態および子宮頸新生物発生の低いリスクの優れた指標である。しかしながら、陽性HPV結果は、子宮頸疾患の症状を示さない。むしろこれは感染の指標である。HPV感染の大多数は一時的であり、12ヶ月間のうちに自然になくなるが、リスクの高いHPVウイルスサブタイプでの持続性の感染は、子宮頸新生物の発生の、より高いリスクを示す。HPV試験を補うために、子宮頸新生物と関連のある分子マーカーの同定によって、子宮頸疾患診断に対する臨床的特異性が向上すると予測される。

10

【0007】

パピニコラウ染色子宮頸スミア（パピニコラウスミア）の細胞学的調査は現在、子宮頸癌を検出するための最適な方法である。パブ試験は、60年にわたって実質的に変化しないままである主観的な方法である。しかしながら、その性能に関していくつかの懸念がある。単一のパブ試験の、報告されている感度（試験陽性である疾患陽性の割合）は低く、幅広い変動を示す（30～87%）。単一のパブ試験の特異性（試験陰性である疾患陰性の割合）は、スクリーニング集団中86%と低い場合があり、潜在する高悪性度疾患の判定について、ASCUS PLUS集団中で相当低い場合がある。Baldwinら、前出を参照のこと。LSILまたはCINIとして特徴付けられている相当なパーセンテージのパピニコラウスミアは、実際、高悪性度病変について陽性である。さらに、10%までのパピニコラウスミアは、ASCUS（意義が不明な非定型扁平細胞）として分類され、すなわち、正常、中等度もしくは重症な病変、または腫瘍として、明確な類別を行うことはできない。しかしながら、実験から、10%までのこのASCUS集団が、結果として見落とされる高悪性度病変を有することが示される。例えば、非特許文献7を参照のこと。したがって、高悪性度子宮頸疾患の診断を実施するための信頼できる方法を実施するために、高悪性度子宮頸疾患において選択的に過剰発現される分子バイオマーカーおよびこれらのバイオマーカーの検出のための組成物が必要である。

20

【0008】

ミニ染色体維持（MCM）タンパク質は、真核生物DNA複製において、本質的な役割を果たす。ミニクロモソーム維持（MCM）タンパク質は、DNAへの複製前複合体の負荷、および二本鎖DNA鎖のデノボ合成の間にヘリカーゼとして機能して二本鎖DNAを解くのを助けることによって、DNA複製の早期に機能する。MCMタンパク質のそれぞれは、それらの高度に保存された中央のドメインに、DNA依存的ATPアーゼモチーフを有する。MCMタンパク質のレベルは、一般に、正常な細胞が細胞周期のG0期からG1/S期に進むと、可変の様式で増大する。G0期に、MCM2およびMCM5タンパク質は、MCM7およびMCM3タンパク質よりもずっと豊富でない。MCM6はMCM2、MCM4、およびMCM7とともに複合体を形成し、これはヒストンH3に結合する。また、MCM4、MCM6、およびMCM7の部分複合体はヘリカーゼ活性を有し、これはMCM6のATP結合活性およびMCM4のDNA結合活性によって媒介される。例えば、その全てが参照によって全体が本明細書中に援用される、非特許文献8、非特許文献9、非特許文献10を参照のこと。

30

40

【0009】

初期の刊行物から、MCMタンパク質、および具体的にはMCM-5が、子宮頸疾患（非特許文献11）、ならびに他の癌（非特許文献12）の検出に有用であることが示されている。公開されている文献から、MCM-5に対する抗体が、子宮頸新生物細胞を検出することができることが示される。高悪性度子宮頸疾患の検出の特異性は、MCM-5について示されていない（非特許文献13）。MCM-5発現の検出は高悪性度子宮頸疾患に制限されないが、同定された低悪性度異形成、およびリスクの高いHPVでの感染の後に細胞周期に再び入った増殖細胞においても検出される。MCM-5に加えて、MCM-2およびMCM-7を含むMCMファミリーの他のメンバーが、組織試料中で子宮頸新生

50

物の検出のための潜在的に有用なマーカーであると示されている（非特許文献14、非特許文献15）。最近の結果から、MCM-7が、免疫化学形式を用いた高悪性度子宮頸疾患の検出のための特異的マーカーであるようであることが示された（非特許文献16、非特許文献17）。

【非特許文献1】Baldwinら（2003年）Nature Reviews Cancer 3巻：1～10頁

【非特許文献2】Williamsら（1998年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95巻：14932～14937頁

【非特許文献3】Wrightら（2004年）Obstet. Gynecol. 103：304～309頁

【非特許文献4】Crum（2000年）Modern Pathology 13巻：243～251頁

【非特許文献5】Middletonら（2003年）J. Virol. 77巻：10186～10201頁

【非特許文献6】Pettら（2004年）Cancer Res. 64巻：1359～1368頁

【非特許文献7】Manosら（1999年）JAMA 281巻：1605～1610頁

【非特許文献8】Freemanら（1999年）Clin. Cancer Res. 5巻：2121～2132頁

【非特許文献9】Leiら（2001年）J. Cell Sci. 114巻：1447～1454頁

【非特許文献10】Ishimiら（2003年）Eur. J. Biochem. 270巻：1089～1101頁

【非特許文献11】Williamsら（1998年）Proc Natl Acad Sci U.S.A. 95巻：14932～14937頁

【非特許文献12】Freemanら（1999年）Clin. Cancer Res. 5巻：2121～2132頁

【非特許文献13】Williamsら（1998年）Proc Natl Acad Sci U.S.A. 95：14932～14937頁

【非特許文献14】Freemanら（1999年）Clin Cancer Res. 5巻：2121～2132頁

【非特許文献15】Brakeら（2003年）Cancer Res. 63巻：8173～8180頁

【非特許文献16】Brakeら（2003年）Cancer Res. 63巻：8173～8180頁

【非特許文献17】Malinowskiら（2004年）Acta Cytol. 43：696頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、当該分野において、高悪性度子宮頸疾患において選択的に過剰発現されるバイオマーカーの発現を検出することができる抗体に対する必要性がある。高悪性度疾患を、早期HPV感染および軽度の異形成等の、臨床的疾患と見なされない状態から区別するための方法において、かかる抗体を使用することができる。

【課題を解決するための手段】

【0011】

高悪性度子宮頸疾患を診断するための組成物および方法が提供される。組成物は、本発明の核バイオマーカータンパク質、具体的にはMCMタンパク質、より具体的にはMCM2に結合することができる、モノクローナル抗体を含む。これらのモノクローナル抗体の抗原結合断片および変異体、これらの抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞株

10

20

30

40

50

、ならびに本発明のモノクローナル抗体を含むキットもまた、本明細書中に包含される。

【0012】

本発明の組成物は、高悪性度子宮頸疾患を診断するための方法において使用を提供する。方法は、少なくとも1つの核バイオマーカの過剰発現を検出することを含み、ここで核バイオマーカの過剰発現が高悪性度子宮頸疾患の指標である。具体的には、方法は、本発明の抗体を使用して子宮頸試料中のMCM2の過剰発現を検出することを含む。

【0013】

本発明の組成物はさらに、MCM2モノクローナル抗体に結合することができるエピトープを含む、単離されたポリペプチドを含む。これらのポリペプチドは、MCM2抗体を生成するための方法において使用を提供する。MCM2エピトープのアミノ酸配列をコードする、単離された核酸分子もまた、提供される。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

高悪性度子宮頸疾患を診断するための組成物および方法が提供される。組成物は、高悪性度子宮頸疾患において選択的に過剰発現される核バイオマーカタンパク質、具体的にはMCMタンパク質、より具体的にはMCM2に結合することができる、モノクローナル抗体を含む。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もまた開示される。本明細書中に記載されるモノクローナル抗体を含むキットが、さらに提供される。本組成物は、患者における高悪性度子宮頸疾患を診断するための方法において使用を提供する。

20

【0015】

本発明の組成物は、MCM2に特異的に結合するモノクローナル抗体、またはその変異体もしくは断片を含む。具体的には、27C5・6および26H6・19と呼ばれるMCM2抗体が提供される。MCM2モノクローナル抗体27C5・6および26H6・19を産生するハイブリドーマ細胞株は、2005年4月14日に220110-2209、バージニア州マナッサスのアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)の特許寄託機関に寄託され、それぞれ特許受託番号PTA-6668およびPTA-6667を割り振られた。これらの寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約の規定のもと維持される。これらの寄託は、単に当業者の便宜上なされたものであり、寄託が35U.S.C.第112条のもと必要とされることを認めるものではない。

30

【0016】

モノクローナル抗体27C5・6、および26H6・19の結合特性を有する抗体もまた、本明細書中に開示される。かかる抗体としては、これらの抗体との競合的結合アッセイにおいて競合する抗体、ならびにモノクローナル抗体27C5・6または26H6・19に結合することができるエピトープに結合する抗体が挙げられるが、これらに限定されない。MCM2に特異的に結合する能力を保持するモノクローナル抗体27C5・6および26H6・19の変異体および断片もまた、提供される。組成物はさらに、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細胞株および少なくとも1つの本明細書中に開示されるモノクローナル抗体を含むキットを含む。

【0017】

「抗体」および「免疫グロブリン」(Ig)は、同じ構造上の特徴を有する糖タンパク質である。抗体は抗原に対する結合特異性を示すが、免疫グロブリンとしては、抗体、および抗原特異性を欠く他の抗体様分子の両方が挙げられる。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系によって低レベルで産生され、骨髄腫によって増大したレベルで産生される。

40

【0018】

用語「抗体」および「抗体(複数)」は、天然に生じる形態の抗体ならびに単鎖抗体、キメラおよびヒト化抗体ならびに多特異的抗体等の組換え抗体、ならびに前述のものの全ての断片および誘導体を、広範に包含し、この断片および誘導体は、少なくとも抗原結合部位を有する。抗体誘導体は、抗体に結合したタンパク質または化学的部分を含んでもよ

50

い。用語「抗体」は、最も広範な意味で使用され、完全に集合した抗体、抗原に結合することができる抗体断片（例えば、Fab'、F'(ab)₂、Fv、単鎖抗体、二重特異性抗体）、および前述のものを含む組換えペプチドを包含する。本明細書中で使用される場合、「MCM2抗体」は、MCM2（配列番号1）に特異的に結合する任意の抗体、またはその変異体もしくは断片をいい、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単鎖抗体、および親抗体の抗原結合機能を保持するその断片を含む。

【0019】

本発明のMCM2抗体は、最適には、モノクローナル抗体である。用語「モノクローナル抗体」は、本明細書中で使用される場合、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体をいい、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量存在する場合がある、可能な天然に生じる変異を除いて、同一である。

10

【0020】

「天然の抗体」および「天然の免疫グロブリン」は、通常、2つの同一な軽(L)鎖および2つの同一な重(H)鎖で構成される約150000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に連結されるが、ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で変化する。各重鎖および軽鎖はまた、規則的に間隔を空けた鎖内のジスルフィド架橋を有する。各重鎖は一方の末端に可変ドメイン(VH)とそれに続くいくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の末端に可変ドメインを有し(V_L)、そのもう一方の末端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一の定常ドメインとともに整列し、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインとともに整列する。特定のアミノ酸残基が、軽および重鎖可変ドメインの間に界面を形成すると考えられている。

20

【0021】

用語「可変」は、可変ドメインのある部分が抗体の間で配列が広範囲に異なり、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合および特異性に使用されることをいう。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメイン全体で均一に分布しているわけではない。これは、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる3つのセグメントまたは軽鎖および重鎖可変ドメインの両方における超可変領域において濃縮される。可変ドメインの、より高度に保存された部分は、フレームワーク(FR)領域と呼ばれる。天然の重および軽鎖の可変ドメインは、それぞれ4つのFR領域を含み、大部分、3つのCDRによって連結されたpシート配置を採用し、これが連結したループを形成し、15個の、いくつかの場合においては部分的な、pシート構造を形成する。各鎖中のCDRは、FR領域によって、他の鎖由来のCDRとともに近接してともに保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabatら、NIH Publ. No. 91-3242、I巻、647~669頁(1991年)参照)。

30

【0022】

定常ドメインは、抗原への抗体の結合に直接関与しないが、抗体依存的細胞毒性における抗体の関係等の種々のエフェクター機能を示す。

【0023】

用語「超可変領域」は、本明細書中で使用される場合、抗原結合の原因である抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」由来のアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメイン中の残基24~34(L1)、50~56(L2)および89~97(L3)ならびに重鎖可変ドメイン中の31~35(H1)、50~65(H2)および95~102(H3)、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service, National Institute of Health、メリーランド州ベセスダi25[1991年]）および/または「超可変ループ」由来の残基（すなわち、軽鎖可変ドメイン中の残基26~32(L1)、50~52(L2)および91~96(L3)ならびに重鎖可変ドメイン中の2632(H1)、53~55(H2)および96~101(H3)、ClothiaおよびLesk

40

50

、J. Mol. Biol. 196 巻：901～917 頁 [1987 年]) を含む。「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書中で考えられる超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0024】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片；二重特異性抗体；直鎖状抗体 (Zapataら (1995 年) Protein Eng. 8 (10) 巻：1057～1062 頁)；単鎖抗体分子；ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。抗体のパイン消化によって、それぞれ単一の抗原結合部位を有する「Fab」断片と呼ばれる2つの同一な抗原結合断片、および容易に結晶化することができることを名前が反映している、残りの「Fc」断片が生成される。ペプシン処理によって、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋することができる、F(ab')₂断片が生じる。

10

【0025】

「Fv」は、完全な抗原認識および結合部位を含む最小の抗体断片である。二重鎖Fv種において、この領域は、堅く非共有結合した、1つの重および1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。単鎖Fv種において、軽鎖および重鎖が、二重鎖Fv種のもものと類似した「二量体」構造で結合することができるように、柔軟なペプチドリンカーによって1つの重および1つの軽鎖可変ドメインを共有結合することができる。各可変ドメインの3つのCDRが相互作用してV_H-V_L二量体の表面上の抗原結合部位を定義付けるのは、この配置中である。集合的に、6つのCDRによって抗原結合特異性が抗体に付与される。しかしながら、単一の可変ドメイン (または抗原に対して特異的なCDRを3つしか含まないFvの半分) であっても、完全な結合部位より親和性は低い、抗原を認識して抗原に結合する能力を有する。

20

【0026】

Fab断片はまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一の定常ドメイン (C_H1) を含む。Fab断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つまたは複数のシステインを含む重鎖C_H1ドメインのカルボキシ末端でのいくつかの残基の追加によって、Fab'断片と異なる。Fab'-SHは、本明細書中では、定常ドメインのシステイン残基 (複数可) が遊離チオール基を担持するFab'の名称である。F(ab')₂抗体断片は、元々、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生成された。

30

【0027】

MCM2抗体の断片は、それらが全長抗体の所望の親和性を保持する限りは、本発明によって包含される。したがって、例えば、MCM2抗体の断片は、MCM2抗原に結合する能力を保持する。かかる断片は、対応する全長抗体と同様の特性によって特徴付けられ、すなわち、断片は、MCM2に特異的に結合する。かかる断片は、本明細書中で、「抗原結合」断片と呼ばれる。

【0028】

抗体の、適した抗原結合断片は、全長抗体の一部、一般にはその抗原結合または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、F(ab')₂、およびFv断片ならびに単鎖抗体分子が挙げられるが、これらに限定されない。「Fab」によって、軽鎖、および重鎖の一部で構成される、免疫グロブリンの一個抗原結合断片が意図される。F(ab')₂によって、両方の軽鎖、および両方の重鎖の一部を含む、免疫グロブリンの二個抗原結合断片が意図される。「単鎖Fv」または「sFv」抗体断片によって、抗体のV_HおよびV_Lドメインを含む断片が意図され、ここでこれらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。例えば、参照によって本明細書中に援用される、米国特許第4946778号、第5260203号、第5455030号、および第5856456号を参照のこと。一般に、Fvポリペプチドはさらに、抗原結合のためのsFvの所望の構造の形成を可能にする、V_HとV_Lドメインとの間のポリペプチドリンカーを含む。sFvの総説については、The Pharmacology of Monoclonal An

40

50

tibodies、113巻、RosenburgおよびMoore編(Springer-Verlag、ニューヨーク州)、269~315頁中のPluckthun(1994年)を参照のこと。

【0029】

抗体または抗体断片は、例えばMcCaffertyら(1990年)Nature 348巻:552~554頁(1990年)および米国特許第5514548号に記載されている技術を用いて生じた抗体ファージライブラリーから単離することができる。Clacksonら(1991年)Nature 352巻:624~628頁およびMarksら(1991年)J. Mol. Biol. 222巻:581~597頁は、それぞれファージライブラリーを使用する、ネズミおよびヒト抗体の単離を記載している。その後の刊行物は、チェーンシャフリング(Marksら(1992年)Bio/Technology 10巻:779~783頁)、ならびに非常に大きなファージライブラリーを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染およびin vivo組換え(Waterhouseら(1993年)Nucleic Acids Res. 21巻:2265~2266頁)による高親和性(nM範囲)ヒト抗体の生成を記載している。したがって、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する、実現性のある代案である。

10

【0030】

抗体断片の生成のために、種々の技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、インタクトな抗体のタンパク質分解消化によって導かれた(例えば、Morimotoら(1992年)Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24巻:107~117頁(1992年)およびBrennanら(1985年)Science 229巻:81頁参照)。しかしながら、これらの断片は、現在、組換え宿主細胞によって直接生成することができる。例えば、抗体断片は、上述の抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、Fab'-SH断片は、大腸菌(E. coli)から直接回収し、化学的に結合させてF(ab')₂断片を形成することができる(Carterら(1992年)Bio/Technology 10巻:163~167頁)。別の手法によると、F(ab')₂断片は、組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。抗体断片の生成のための他の技術は、当業者に明らかになるう。

20

30

【0031】

好ましくは、本発明の抗体は、性質がモノクローナルである。上で示したように、「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を意図し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量存在する場合がある、可能性な天然に生じる変異を除いて同一である。用語は、抗体の種または供給源に関して限定されない。用語は、免疫グロブリン全体、ならびにFab、F(ab')₂、Fv、および抗体の抗原結合機能を保持する他のもの等の断片を包含する。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原性部位、すなわち、本明細書中で下記に定義されるようなMCM2タンパク質内の特定のエピトープを対象とする。さらに、異なる決定基(エピトープ)を対象とする異なる抗体を典型的に含む従来の(ポリクローナル)抗体調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対象とする。装飾成句「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体の集団から得られるような抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の生成を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら(1975年)Nature 256巻:495頁に最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作製されてもよく、または組換えDNA方法によって作製されてもよい(例えば、米国特許第4816567号参照)。「モノクローナル抗体」はまた、例えばClacksonら(1991年)Nature 352巻:624~628頁、Marksら(1991年)J. Mol. Biol. 222巻:581~597頁、および米国特許第5514548号に記載されている技術を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離されてもよい。

40

50

【0032】

モノクローナル抗体は、Kohlerら(1975年)Nature 256巻:495~496頁の方法、またはその改変を用いて、調製することができる。典型的には、抗原を含む溶液でマウスを免疫化する。免疫化は、生理食塩水中の、好ましくはフロイント完全アジュバント等のアジュバント中の、抗原含有溶液を混合または乳化すること、および混合物または乳濁液を非経口的に注入することによって、行うことができる。当該分野で公知の任意の免疫化の方法を用いて、本発明のモノクローナル抗体を得ることができる。動物の免疫化の後、脾臓(および場合により、いくつかの大きいリンパ節)を取り除き、単一の細胞に解離させる。細胞懸濁液を、目的の抗原でコーティングしたプレートまたはウェルに適用することによって、脾臓細胞をスクリーニングしてもよい。抗原に特異的な膜結合免疫グロブリンを発現しているB細胞(すなわち、抗体産生細胞)はプレートに結合し、洗い落とされない。次いで、得られたB細胞、または全ての解離した脾臓細胞を、骨髓腫細胞と融合してモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを形成するよう誘導し、選択培地中で培養する。得られた細胞を段階希釈によって播種し、目的の抗原に特異的に結合する(かつ関連のない抗原に結合しない)抗体の生成についてアッセイする。次いで、選択されたモノクローナル抗体(mAb)分泌ハイブリドーマを、*in vitro*(例えば、組織培養瓶または中空繊維リアクター中)、または*in vivo*(マウスにおける腹水として)のいずれかで培養する。モノクローナル抗体はまた、反復免疫化多重部位技術(RIMMS)を用いて生成することができる。例えば、その全ての全体が参照によって本明細書中に援用される、Kilpatrickら(1997年)Hybridoma 16(4)巻:381~389頁、Wringら(1999年)J. Pharm. Biomed. Anal. 19(5)巻:695~707頁、およびBynumら(1999年)Hybridoma 18(5)巻:407~411頁を参照のこと。

10

20

【0033】

ハイブリドーマの使用の代案として、参照によって本明細書中に援用される米国特許第5545403号、第5545405号、および第5998144号に開示されているように、CHO細胞株等の細胞株において抗体を生成することができる。簡潔に述べると、それぞれ軽鎖および重鎖を発現することができるベクターで細胞株をトランスフェクトする。別々のベクター上の2つのタンパク質をトランスフェクトすることによって、キメラ抗体を生成することができる。別の利点は、抗体の正しいグリコシル化である。モノクローナル抗体はまた、バイオマーカータンパク質で組換えコンビナトリアル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)をスクリーニングし、それによって、バイオマーカータンパク質に結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離することによって、同定および単離することができる。ファージディスプレイライブラリーを生成および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、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01、およびStratagene SurfZAP(商標)Phage Display Kit、カタログ番号240612)。また、抗体ディスプレイライブラリーの生成およびスクリーニングにおける使用について特に影響を受けやすい方法および試薬の例は、例えば、米国特許第5223409号、PCT公開第WO92/18619号、第WO91/17271号、第WO92/20791号、第WO92/15679号、第WO93/01288号、第WO92/01047号、第92/09690号、および第90/02809号、Fuchsら(1991年)Bio/Technology 9巻:1370~1372頁、Hayら(1992年)Hum. Antibod. Hybridomas 3巻:81~85頁、Huseら(1989年)Science 246巻:1275~1281頁、Griffithsら(1993年)EMBO J. 12巻:725~734頁に見ることができる。

30

40

【0034】

本発明のいくつかの態様において、抗体は、組織学的ではなく細胞学的試料の望ましい染色に基づいて選択してもよい。すなわち、特定の実施形態において、抗体は、最終的な

50

試料型（例えば、細胞学調製物）を考慮して、結合特異性について選択される。MCM2等の、目的の特定のバイオマーカーを対象とする抗体を選択し、複数工程のスクリーニングプロセスによって精製する。抗体選択のためのかかる方法は、その全体が参照によって本明細書中に援用される、2005年3月23日に提出された、「Methods and Compositions for the Detection of Cervical Disease」と題された係属中の米国出願第11/087227号に記載されている。

【0035】

本発明のモノクローナル抗体の結合特性を有する抗体もまた提供される。「結合特性」または「結合特異性」は、抗体に関して使用される場合、抗体が比較抗体と同じまたは同様の抗原エピトープを認識することを意味する。かかる抗体の例としては、例えば、競合的結合アッセイにおいて本発明のモノクローナル抗体と競合する抗体が挙げられる。当業者は、標準的な方法を用いて、抗体が競合的に別の抗体を妨げるかどうかを判定することができる。

10

【0036】

「エピトープ」によって、それに対して抗体が生成され、それに対して抗体が結合する、抗原分子の部分が意図される。「MCM2エピトープ」は、MCM2タンパク質の、MCM2モノクローナル抗体が結合する部分を含む。エピトープは、直鎖状アミノ酸残基（すなわち、エピトープ内の残基は直鎖状の様式で次々に連続して配置される）、非直鎖状アミノ酸残基（本明細書中では「非直鎖状エピトープ」と呼ぶ。これらのエピトープは連続して配置されない）、または直鎖状および非直鎖状アミノ酸残基の両方を含むことがある。典型的には、エピトープは、短いアミノ酸配列、例えば長さ約5アミノ酸である。エピトープを同定するための体系的な技術は当該分野で公知であり、例えば、米国特許第4708871号中、および下記の実施例に記載されている。簡潔に述べると、ある方法において、抗原由来の1組の重複しているオリゴペプチドを合成し、各ピンに特有のオリゴペプチドを有するピンの固相配列に結合させる。ピンの配列は、例えばバイオマーカー特異的モノクローナル抗体に対する結合について、全ての96種のオリゴペプチドを同時にアッセイすることができる、96ウェルマイクロタイタープレートを含んでもよい。あるいは、ファージディスプレイペプチドライブラリーキット（New England Biolabs）が、現在、エピトープマッピングのために市販されている。これらの方法を用いて、所定の抗体が結合するエピトープを同定するために、あらゆる可能な連続したアミノ酸のサブセットに対する結合親和性を判定してもよい。エピトープはまた、エピトープ長ペプチド配列を使用して、抗体を得る動物を免疫化する場合、推論によって同定してもよい。

20

30

【0037】

本発明はまた、MCM2モノクローナル抗体を結合するためのエピトープを含む、単離されたポリペプチドを包含する。これらのポリペプチドは、モノクローナル抗体に結合する抗原（すなわち、MCM2）の一部に対応する。かかるポリペプチドは、MCM2に選択的に結合する抗体を生成するための方法において使用を提供する。抗体の生成においてポリペプチドを使用できるかどうかは、本明細書中で「抗原活性」と呼ばれる。例えば、配列番号3、4、および14に示されるアミノ酸配列（配列番号1に示されるMCM2アミノ酸配列中の、それぞれ残基369～382、688～710、および683～692に対応する）は、MCM2モノクローナル抗体、より具体的にはモノクローナル抗体27C5.6および26H6.19によって認識される、エピトープを含む。詳細については実施例4を参照のこと。元々のポリペプチドの抗原活性を保持する配列番号3、4、および14に示されるMCM2エピトープ配列の変異体および断片もまた、提供される。本発明はさらに、MCM2エピトープを含むポリペプチドをコードする、単離された核酸分子、ならびにその変異体および断片を含む。

40

【0038】

MCM2エピトープを含む本発明のポリペプチドは、本明細書中で上述されたように、

50

MCM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体を生成するための方法において使用することができる。かかるポリペプチドはまた、ポリクローナルMCM2抗体の生成において使用することができる。例えば、ポリクローナル抗体は、MCM2エピトープ（すなわち、免疫原）を含むポリペプチドで、適した対象（例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物）を免疫化することによって調製することができる。免疫化した対象中の抗体力価は、固定したバイオマーカータンパク質を使用した酵素免疫測定法（ELISA）を用いる等の標準的な技術によって、経時的にモニタリングすることができる。免疫化の後の適当な時点、例えば抗体力価が最も高いときに、対象から抗体産生細胞を得て、KohlerおよびMilstein（1975年）Nature 256巻：495～497頁によって元々記載されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozborら（1983年）Immunol. Today 4巻：72頁）、EBVハイブリドーマ技術（Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、ReisfeldおよびSell編（Alan R. Liss, Inc.、ニューヨーク州ニューヨーク）、77～96頁中のColeら（1985年））またはトリオーマ技術等の標準的な技術によって、使用してモノクローナル抗体を調製することができる。ハイブリドーマを生成するための技術は周知である（一般に、Coliganら編（1994年）Current Protocols in Immunology（John Wiley & Sons, Inc.、ニューヨーク州ニューヨーク）、Galfrèら（1977年）Nature 266巻：55052頁、Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses（Plenum Publishing Corp.、ニューヨーク州中のKenneth（1980年）、およびLerner（1981年）Yale J. Biol. Med.、54巻：387～402頁参照）。

【0039】

モノクローナル抗体のアミノ酸配列変異体または本明細書中に記載されるMCM2エピトープを含むポリペプチドもまた、本発明に包含される。変異体は、目的の抗体をコードするクローニングされたDNA配列中の変異によって調製することができる。変異誘発およびヌクレオチド配列変化の方法は、当該分野で周知である。例えば、参照によって本明細書中に援用される、WalkerおよびGaastra編（1983年）Techniques in Molecular Biology（MacMillian Publishing Company、ニューヨーク）、Kunkel（1985年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82巻：488～492頁、Kunkelら（1987年）Methods Enzymol. 154巻：367～382頁、Sambrookら（1989年）Molecular Cloning: A Laboratory Manual（Cold Spring Harbor、ニューヨーク）、米国特許第4873192号、およびそこで引用されている参考文献を参照のこと。目的のポリペプチドの生物学的活性に影響を及ぼさない、適当なアミノ酸置換基に関する手引きは、参照によって本明細書中に援用される、Atlas of Protein Sequence and Structure（Natl. Biomed. Res. Found.、ワシントン、D.C.）中のDayhoffら（1978年）のモデルに見ることができる。あるアミノ酸を、同様の特性を有する別のアミノ酸と交換すること等の、保存的置換が、好ましい場合がある。保存的置換の例としては、

【0040】

【化1】

Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln, and Phe↔Trp↔Tyr.

が挙げられるが、これらに限定されない。

【0041】

目的のポリペプチドの変異体の構築において、変異体が所望の活性、すなわちバイオマーカーに対する同様の結合親和性を有し続けるように、修飾が行われる。明らかに、変異体ポリペプチドをコードするDNA中で行われる任意の変異は、配列をリーディングフレームの外に配置してはならず、好ましくは、二次mRNA構造を生じる可能性のある相補領域を生じない。欧州特許出願公開第75444号を参照のこと。

【0042】

好ましくは、参照ポリペプチドの変異体は、参照抗体分子のアミノ酸配列に対して、または参照抗体分子の、より短い部分に対して、少なくとも70%または75%配列同一性、好ましくは少なくとも80%または85%配列同一性、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%または95%配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。より好ましくは、分子は、少なくとも96%、97%、98%または99%配列同一性を共有する。本発明の目的のために、同一率は、ギャップ開始ペナルティが12、ギャップ延長ペナルティが2、BLOSUM行列が62のアフィンギャップ検索を用いた、Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムを用いて判定される。Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムは、SmithおよびWaterman(1981年)Adv. Appl. Math. 2巻:482~489頁に教示されている。変異体は、例えば、1~15個のわずかなアミノ酸残基、6~10個等の1~10個の少ないアミノ酸残基、わずか5つ、わずか4、3、2、またはさらには1つのアミノ酸残基だけ、参照抗体と異なる場合がある。

10

20

【0043】

2つのアミノ酸配列の最適な整列に関して、変異体アミノ酸配列の連続したセグメントは、参照アミノ酸配列に関して、さらなるアミノ酸残基または欠失したアミノ酸残基を有する場合がある。参照アミノ酸配列との比較のために使用される連続したセグメントは、少なくとも20個の連続したアミノ酸残基を含み、30、40、50個またはそれより多いアミノ酸残基を含む場合がある。保存的残基置換またはギャップと関連した配列同一性の補正を行うことができる(Smith-Waterman相同性検索アルゴリズム参照)。

【0044】

本発明のMCM2モノクローナル抗体は、下記のような検出可能な物質で標識して、試料中のバイオマーカータンパク質検出を促進してもよい。かかる抗体は、本発明の方法の実施において使用を提供する。本発明の抗体および抗体断片は、検出可能な物質に結合させて、抗体結合の検出を促進することができる。単語「標識」は、本明細書中で使用される場合、「標識」抗体を生じるように抗体に直接または間接的に結合させる、検出可能な化合物または組成物をいう。標識は、それ自体検出可能(例えば、放射性同位体標識または蛍光標識)であるか、または、酵素標識の場合、検出可能である基質化合物もしくは組成物の化学的变化を触媒してもよい。抗体を標識する目的のための、検出可能な物質の例としては、種々の酵素、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挙げられる。適した酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -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挙げられ、適した置換基複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ、適した蛍光物質の例としては、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、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられ、発光物質の例としてはルミノールが挙げられ、生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ、適した放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H が挙げられる。

30

40

【0045】

少なくとも1つの本発明のMCM2モノクローナル抗体を含むキットが、さらに提供さ

50

れる。「キット」によって、MCM2の発現を特異的に検出するための、少なくとも1つの試薬、すなわち抗体を含む任意の製造（例えば、包装または容器）が意図される。キットは、本発明の方法を行うための単位として、販売促進、配送、または販売されてもよい。また、キットは、キットおよびその使用のための方法について記載している包装挿入物を含んでもよい。

【0046】

本発明のキットは、一般に、MCM2を対象とする少なくとも1つのモノクローナル抗体、抗体結合の検出のための化学物質、対比染色剤、および、場合により、陽性染色細胞の同定を促進するための青みづけ剤を含む。本発明にキットにおいて、抗原-抗体結合を検出する任意の化学物質を使用してもよい。いくつかの実施形態において、検出化学物質は、二次抗体に結合した標識ポリマーを含む。例えば、抗原-抗体結合部位での色原体の沈殿を触媒する酵素に結合した二次抗体が提供されてもよい。かかる酵素、および抗体結合の検出においてそれらを使用するための技術は、当該分野で周知である。一実施形態において、キットは、HRP標識ポリマーに結合した二次抗体を含む。結合した抗体と適合性のある色原体（例えば、HRP標識二次抗体の場合のDAB）、および非特異的染色をブロックするための過酸化水素等の溶液が、さらに提供されてもよい。他の実施形態において、モノクローナル抗体に結合するマウスプローブ試薬の使用、その後の、マウスプローブ試薬に結合するHRPに結合したデキストランポリマーの添加によって、バイオマーカータンパク質への抗体結合が検出される。かかる検出試薬は、例えばBiocare Medicalから市販されている。

10

20

【0047】

本発明のキットはさらに、ペルオキシダーゼブロッキング試薬（例えば、過酸化水素）、タンパク質ブロッキング試薬（例えば、精製カゼイン）、および対比染色剤（例えば、ヘマトキシリン）を含んでもよい。青みづけ剤（例えば、Tween-20およびアジ化ナトリウムを含む、水酸化アンモニウムまたはTBS、pH7.4）が、キット中でさらに提供されて、陽性染色細胞の検出を促進してもよい。キットはまた、品質管理目的で、陽性および陰性対照試料を含んでもよい。

【0048】

別の実施形態において、本発明のキットは、2つのMCM2モノクローナル抗体、より具体的にはモノクローナル抗体27C5.6および26H6.19を含む。2つのMCM2モノクローナル抗体およびトポイソメラーゼII（Topo2A）を対象とする第三の抗体を含むキットがさらに提供される。キット中に複数の抗体が存在する場合、各抗体は、個々の試薬として、または、あるいは目的の抗体の全てを含む抗体カクテルとして、提供されてもよい。さらに、キット試薬のいずれかまたは全ては、密閉容器等の、それらを外部環境から保護する容器内で提供されてもよい。本発明のキットは、高悪性度子宮頸疾患の診断において有用であり、パプ染色のための試薬（例えば、EAS0およびオレンジG）をさらに含んでもよい。

30

【0049】

本発明の組成物は、その全体が参照によって本明細書中に援用される、2005年3月23日に提出された、「Methods and Compositions for the Detection of Cervical Disease」と題された係属中の米国出願第11/087227号に開示されているもの等の患者における高悪性度子宮頸疾患の診断のための方法において使用を提供する。「高悪性度子宮頸疾患を診断する」は、例えば、子宮頸疾患の存在を診断または検出すること、疾患の進行をモニタリングすること、および高悪性度子宮頸疾患の指標である細胞または試料を同定または検出することを含むよう意図される。用語、高悪性度子宮頸疾患を診断すること、検出すること、および同定することは、本明細書中で交換可能に使用される。「高悪性度子宮頸疾患」によって、膣拡大鏡によって前悪性病状、悪性病状、中程度から深刻な異形成、および子宮頸癌と分類される状態が意図される。基礎にある高悪性度子宮頸疾患としては、CINI I、CINI II、HSIL、上皮内癌、腺癌、および癌（FIGO I~IV期）の

40

50

組織学的同定が挙げられる。

【0050】

本発明の方法は、高悪性度子宮頸疾患において選択的に過剰発現される少なくとも1つの核バイオマーカーの過剰発現を検出することを含む。「核バイオマーカー」によって、細胞の核において主に発現されるタンパク質の任意の遺伝子が意図される。核バイオマーカーは、細胞の他の部分において、より低い程度発現されてもよい。「高悪性度子宮頸疾患において選択的に過剰発現される」によって、高悪性度子宮頸疾患において目的の核バイオマーカーが過剰発現されるが、いかなる異形成、未成熟な化生細胞も存在しないLSIL、CINI、HPV感染試料として分類される状態、および臨床的疾患と見なされない他の状態においては過剰発現されないことが意図される。したがって、本発明の核バイオマーカーの検出によって、基礎にある高悪性度子宮頸疾患の指標である試料の、良性の増殖、早期HPV感染、または軽度の異形成の指標である試料からの区別が可能になる。特に重要な核バイオマーカーとしては、MCMタンパク質、特にMCM2、およびTopo2Aが挙げられる。

10

【0051】

本発明の特定の態様において、方法は、患者から子宮頸試料を得ること、試料を少なくとも1つの本発明のMCM2モノクローナル抗体と接触させること、およびMCM2への抗体の結合を検出することを含む。他の実施形態において、試料を、MCM2に特異的に結合する少なくとも2つのモノクローナル抗体、具体的にはモノクローナル抗体27C5.6および26H6.19と接触させる。さらなる実施形態において、試料を、これらの2つのMCM2モノクローナル抗体、およびTopo2Aに特異的に結合する第三の抗体と接触させる。抗体結合を検出するための技術は、当該分野で周知である。目的のバイオマーカーへの抗体結合は、抗体結合のレベル、およびしたがって、バイオマーカータンパク質発現のレベルに対応する、検出可能なシグナルを発生する、化学的試薬の使用によって検出してもよい。抗体-抗原結合を検出するための任意の方法を用いて、本発明の方法を行ってもよい。

20

【0052】

本明細書中で使用される場合、「子宮頸試料」は、バイオマーカーの発現を検出することができる、子宮頸由来の細胞、組織、または体液の、任意の採取試料をいう。かかる身体試料の例としては、婦人科学的液体、生検、およびスミアが挙げられるが、これらに限定されない。子宮頸試料は、例えば領域を擦過もしくは綿棒でふき取ること、または針を用いて体液を吸引することを含む種々の技術によって、患者から得てもよい。子宮頸試料を収集するための方法は、当該分野で周知である。特定の実施形態において、子宮頸試料は、特に液体ベースの調製物中に、子宮頸細胞を含む。一実施形態において、子宮頸試料は、例えばSurePath（登録商標）（TriPath Imaging, Inc.）またはThinPrep（登録商標）調製物（CITYC, Inc.）等の、液体ベースの細胞学標本調製ガイドラインに従って収集される。子宮頸試料は、拡大して調べるために、スライドガラスに移してもよい。標本を保存し、調査を促進するために、定着液および染色液をスライドガラス上の細胞に適用してもよい。一実施形態において、子宮頸試料を収集および処理して、参照によって本明細書中に援用される米国特許第5346831号に示されるような、単層試料を提供してもよい。

30

40

【0053】

当業者は、本発明の方法中の工程のいずれかまたは全てが、手動または自動の様式で人員によって実行することができることを認識するであろう。したがって、子宮頸試料調製、抗体、および抗体結合の検出の工程は、自動化されてもよい。本発明の方法はまた、従来のパブ染色技術と組み合わせて、高悪性度子宮頸疾患の、より正確な診断を可能にしてもよい。

【0054】

以下の実施例は、例示のために提供され、限定のために提供されるのではない。

【実施例】

50

【0055】

(実施例1)

(MCM2に対するマウスモノクローナル抗体の生成)

MCM2に特異的なマウスモノクローナル抗体を生成した。抗原(免疫原性ポリペプチド)は、全長組換えヘキサヒスチジン標識MCM2タンパク質であった。バキュロウイルス発現系を用いて、Tni細胞中で抗原を発現させた。具体的には、ヘキサヒスチジン標識MCM2のコード配列(配列番号10)を、Tni細胞中での発現のために、pFastBac1プラスミド(Invitrogen)にクローニングした。バキュロウイルス発現系を用いて組換えタンパク質を生成するための方法は、当該分野で周知である。Ni²⁺イオンを負荷したキレート化アガロース(QiagenのNi-NTA)を用いて標識MCM2タンパク質を精製し、免疫原として使用した。免疫原性MCM2ポリペプチドのアミノ酸配列を、配列番号11中に提供する。

10

【0056】

マウス免疫化およびハイブリドーマ融合を、本質的に、Kohlerら(1975年)Nature 256巻:495~496頁に記載されているように行った。溶液中の免疫原性標識MCM2タンパク質で、マウスを免疫化した。免疫化したマウスから抗体産生細胞を単離し、骨髄腫細胞と融合させて、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを形成させた。ハイブリドーマを選択培地中で培養した。得られた細胞を段階希釈によって播種し、MCM2を特異的に結合する(かつ関連のない抗原に結合しない)抗体の生成についてアッセイした。目的のモノクローナル抗体がMCM2タンパク質とのみ反応してヘキサヒスチジン標識と反応しなかったことを確かめるために、選択されたハイブリドーマを、MCM2-FLAG標識タンパク質に対してスクリーニングした。MCM2-FLAGタンパク質のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、それぞれ配列番号12および13に示す。次いで、選択されたモノクローナル抗体(mAb)分泌ハイブリドーマを培養した。

20

【0057】

組換えプロテインAコート樹脂(STREAMLINE(登録商標)、Amersham, Inc.)を用いて、「枯渇した」ハイブリドーマ細胞(すなわち、生存能が0~15%の間に低下するまで増殖した細胞)の培養培地上清から抗体を精製した。低pHとそれに続く迅速なpHの中和を用いて、抗体を溶出させた。280nmで相当な吸光度を有する画分を貯留した。得られた貯留をPBSに透析した。精製された抗体を、さらなる特徴付けに供した。MCM2モノクローナル抗体26H6.19および27C5.6は、両方ともIgG₁アイソタイプであると判定された。これらの抗体のエピトープマッピングの詳細を後述する。

30

【0058】

(実施例2)

(ハイブリドーマ細胞からのモノクローナル抗体の単離)

以下の手順を用いて、ハイブリドーマ細胞からモノクローナル抗体を単離する。

【0059】

(培地調製)

- ・無菌の1000ml保存瓶に100mlのハイクロンウシ胎仔血清(FBS)を加える。
- ・10mlのMEM非必須アミノ酸溶液を加える。
- ・10mlのペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミン溶液を加える。
- ・ExCell1610-HSF培地でおよそ1000mlまで適量にする。
- ・無菌のキャップを瓶上に置き、きつく締める。穏やかに渦を巻かせて混合する。
- ・1000mlの無菌酢酸真空フィルターユニット(0.2µm)を真空ポンプシステムに連結させる。
- ・無菌酢酸真空フィルターユニットに培地溶液のおよそ半分を穏やかに注ぎ、減圧をオンにする。
- ・一旦培地の最初の半分がろ過されると、残った培地をフィルターユニットに注ぎ、ろ過

40

50

を続ける。

・全ての培地がろ過された後、真空フィルターユニットから真空ホースを分離し、減圧ポンプをオフにする。フィルター瓶からフィルターユニットの容器部分を取り除く。新しい無菌の瓶のキャップを瓶上に置く。

・2 ~ 10 で保存する。光から保護する。

【0060】

(最初のハイブリドーマ細胞培養)

・予め温めた37 °CのH₂O槽でストックハイブリドーマ凍結培養物のバイアルを解凍する。

・凍結バイアルの外側に70%エタノールを噴霧する。

・解凍したバイアルを生物学的安全キャビネットに移す。

・凍結バイアルから細胞を取り除き、細胞を15ml遠心チューブに移す。

・7mlの細胞培養培地を、解凍した細胞を含む15ml遠心チューブに滴下する。

・解凍した細胞および培養培地を含む15ml遠心チューブを5分間200gの力で遠心分離する。

・細胞を遠心分離している間に、45mlの細胞培養培地を無菌のT-225フラスコに加える。

・遠心分離の後、細胞ペレットの存在について、チューブを目視検査する。

・細胞ペレットを押し除けないように注意しながら、遠心チューブから培地を除去する。

注意：細胞ペレットがかき乱された場合、遠心分離工程を繰り返す。

・5mlの細胞培養培地を、ペレット化した細胞を含む15ml遠心チューブに加える。

ピペットで移して細胞ペレットを培地に再懸濁する。

・再懸濁した細胞および培養培地の内容物全体を、45mlの培地を含むT-225フラスコに移す。

・T-225フラスコにキャップをする。

・インタクトな細胞の存在について顕微鏡下で観察する。T-225フラスコを直ちにCO₂インキュベータに置き、細胞を一晩インキュベートさせた。

【0061】

(ハイブリドーマ細胞株の拡大)

・細胞培養物を、生存能、濃度、および混入の存在についてモニタリングし続ける。

・最初のT-225フラスコの細胞懸濁液を、濃度がおよそ600000個の細胞/ml ~ 800000個の細胞/mlおよび合計200 ~ 250mlの培地になるまでモニタリングおよび調節する。

・細胞を押し除け、最小細胞密度要件を満たすように、必要に応じてさらなる培地を加える。細胞懸濁液を分割して、1つの新しい無菌のT-225フラスコに移す。2 x T-225フラスコをCO₂インキュベータに入れる。

・濃度がおよそ600000個の細胞/ml ~ 800000個の細胞/ml、および各フラスコについて合計200 ~ 250mlの間の培地になるまで、2 x T-225フラスコの細胞をモニタリングする。

・細胞を押し除け、最小細胞密度要件を満たすように、必要に応じてさらなる培地を加える。細胞懸濁液を分割して、合計4 x T-225フラスコの2つの新しい無菌のT-225フラスコに移す。全てのフラスコをCO₂インキュベータに戻す。

・細胞をモニタリングし、細胞濃度がT-225フラスコ当たりおよそ250mlの総体積(または合計およそ1000ml)でおよそ600000個の細胞/ml ~ 800000個の細胞/mlになるまで、4 x T-225フラスコ中で体積を調節する。

・0% ~ 15%の最終的な生存能で細胞が枯渇するまで増殖するまで、4 x T-225フラスコの細胞をモニタリングし続ける。ここで、細胞培養物上清は、清澄工程の準備ができています。

【0062】

(上清の清澄)

10

20

30

40

50

- ・卓上遠心分離機をオンにする。500 ml チューブアダプタをローターバスケットに入れ、蓋を閉めて温度を 4 ± 4 に設定する。
- ・無菌的技術を用いて、ここで枯濁している4つ全ての T - 225 フラスコから、2 × 500 ml コニカル遠心チューブに培地を注ぐ。
- ・2 × 500 ml は釣り合いが取れていることを確認する。釣り合わせる必要があれば、上清を一方のチューブから他方のチューブに移す。
- ・枯濁した上清を 1350 g (± 40 g) で15分間、2 ~ 10 で遠心分離する。
- ・遠心分離が完了した後、上清を無菌の1000 ml 保存瓶に無菌的に傾瀉し、無菌のキャップを締める。
- ・1 ml を無菌的にマイクロ遠心チューブに移す。マイクロ遠心チューブを試料とともに 2 ~ 10 で保存する(光から保護する)。
- ・清澄させた上清試料は、Easy - Titer (登録商標) アッセイを用いた Ig G 評価の準備ができています。

10

【0063】

(バッファー調製)

(結合バッファー)

- ・およそ600 ml の DI H₂O を清潔なビーカーに加える。
- ・77.28 ml のホウ酸溶液(4% W/V)を加える。清潔な攪拌棒で、室温で攪拌する。
- ・233.76 g の塩化ナトリウムを計り、攪拌し続けながら溶液に入れる。
- ・DI H₂O で溶液をおよそ950 ml にし、攪拌し続ける。
- ・塩化ナトリウムが溶解し、溶液が透明になったら、水酸化ナトリウムで pH を 9.0 ± 0.2 に調節する。
- ・溶液を清潔な1000 ml メスシリンダーに移し、DI H₂O で1000 ml まで適量にする。
- ・完了したバッファーを適切な保存瓶に移す。このバッファーは、使用前に7日間まで保存してもよい。
- ・このプロセス全体を繰り返して、さらなる0.2 l ~ 1.0 l の結合バッファーを調製する。

20

【0064】

(溶出バッファー)

- ・1.725 g の一塩基のリン酸ナトリウムを計り、清潔な攪拌棒を有する清潔な250 ml ビーカーに入れる。
- ・3.676 g のクエン酸ナトリウムを計り、同じ清潔な250 ml ビーカーに入れる。
- ・およそ175 ml の DI H₂O を加え、溶解するまで室温で攪拌する。
- ・4.38 g の塩化ナトリウムを計り、攪拌し続けながら溶液に入れる。
- ・溶液を DI H₂O でおよそ225 ml にし、攪拌し続ける。
- ・塩化ナトリウムが溶解して溶液が透明になったら、塩酸で pH を 3.5 ± 0.2 に調節する。
- ・溶液を清潔な250 ml メスシリンダーに移し、DI H₂O で250 ml まで適量にする。
- ・500 ml 無菌酢酸真空フィルターユニット(0.2 μm)を減圧ポンプシステムに連結し、溶液をろ過滅菌する。
- ・フィルターを取り除き、無菌のキャップで容器を閉める。

30

40

【0065】

(抗体吸着)

- ・清澄させた上清(約1 L)を、清潔な攪拌棒を有する清潔な4000 ml プラスチックビーカーに注ぐ。
- ・およそ等量(約1 L)の結合バッファーを、清澄させた上清を含む清潔な4000 ml プラスチックビーカーに加える。清潔な攪拌棒を加える。

50

- ・清潔なラップでビーカーを覆い、「抗体結合」と貼り紙をする。
- ・表1のデータを用いて、必要なSTREAMLINE（登録商標）プロテインAのおよその量を計算する。

【0066】

【表1】

表1:必要なプロテインA樹脂の体積

上清中のIgG量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1ミリリットル(ml)あたりに 必要なプロテインA樹脂の体積
>180 - \leq 200	12.0
>160 ~ \leq 180	11.0
>140 ~ \leq 160	10.0
>120 ~ \leq 140	9.0
>100 ~ \leq 120	8.0
>80 ~ \leq 100	7.0
>60 ~ \leq 80	6.0
>40 ~ \leq 60	4.5
>20 ~ \leq 40	3.5
\leq 20	2.0

10

20

・清潔な使い捨てカラムおよびバルブ組み立て品をリングスタンドおよびクランプに固定する。バルブを閉める。 30

・瓶を数回逆さにすることによって、適切な量のSTREAMLINEプロテインAビーズを混合する。必要な体積を抜き取り、使い捨てカラムに入れる。

・10mlのDI H₂OでSTREAMLINEプロテインAビーズを洗浄する。バルブを開き、DI H₂Oを排出させる。バルブを閉める。さらなる10mlのDI H₂Oで繰り返す。

・10mlの結合バッファーでSTREAMLINEプロテインAビーズを洗浄する。バルブを開き、結合バッファーを排出させる。バルブを閉める。さらなる10mlの結合バッファーで繰り返す。

・STREAMLINEプロテインAビーズを約10mlの清澄させた上清および結合バッファー溶液(4000mlビーカーから)に再懸濁し、ビーズを、清澄させた上清および結合バッファー溶液を含む4000mlビーカーに移す。必要に応じて繰り返して、いかなる残ったビーズも移す。完了したら、カラムおよびバルブを廃棄する。 40

・2 ~ 10 でおよそ18時間、混合物を活発に混合させる。

・混合が完了したら、攪拌プレートをオフにし、緩衝された上清およびビーズ懸濁液を含む「抗体結合」ビーカーを実験台領域に戻す。STREAMLINEプロテインAビーズをビーカーの底に沈殿させる(およそ5分間)。

・清潔な使い捨てカラムおよびバルブ組み立て品をリングスタンドおよびクランプに固定する。バルブを閉める。

・清潔な250ml瓶または適した容器に「カラム洗浄液 - 結合後」と貼り紙をする。 50

- ・ 清潔なプラスチックビーカーに「上清 - 結合後」と貼り紙をする。
- ・ 4000 ml ビーカーから、清潔な、貼り紙をした 2 l プラスチックビーカーに、上清を傾瀉し、4000 ml ビーカーの底にビーズを残す。「上清 - 結合後」溶液を含む 2000 ml ビーカーを、清潔なラップで覆い、2 ~ 10 で保存する。
- ・ およそ 15 ml の結合バッファを、傾瀉した 4000 ml 「抗体結合」ビーカーに加える。STREAMLINE プロテイン A ビーズを再懸濁し、それらをカラムに移す。バルブを開き、結合バッファを「カラム洗浄液 - 結合後」容器に排出させる。排出するときにバルブを閉める。
- ・ さらなる結合バッファを加えること、混合すること、および先立つ工程のようにカラムに移すことによって、「抗体結合」ビーカー中のいかなる残った STREAMLINE プロテイン A ビーズも移す。排出するときにバルブを閉める。
- ・ 表 2 のデータを用いて、カラム中の STREAMLINE プロテイン A ビーズを洗浄するのに必要な結合バッファのおよその量を計算する。

【 0 0 6 7 】

【表 2】

表2: カラム洗浄のための結合バッファ一体積

上清中のIgG量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1ミリリットル(ml)あたりに 必要なプロテインA樹脂の体積
$> 180 \sim \leq 200$	各15.0mlで合計5つのカラム洗浄液
$> 160 \sim \leq 180$	各15.0mlで合計5つのカラム洗浄液
$> 140 \sim \leq 160$	各12.5mlで合計5つのカラム洗浄液
$> 120 \sim \leq 140$	各12.5mlで合計5つのカラム洗浄液
$> 100 \sim \leq 120$	各12.5mlで合計5つのカラム洗浄液
$> 80 \sim \leq 100$	各10.0mlで合計5つのカラム洗浄液
$> 60 \sim \leq 80$	各10.0mlで合計5つのカラム洗浄液
$> 40 \sim \leq 60$	各7.5mlで合計5つのカラム洗浄液
$> 20 \sim \leq 40$	各5.0mlで合計5つのカラム洗浄液
≤ 20	各5.0mlで合計5つのカラム洗浄液

10

20

30

40

- ・適切な体積の結合バッファで、適切な洗浄の回数、カラム中のSTREAMLINEプロテインAビーズを洗浄し、「カラム洗浄液 - 結合後」容器に流出液を収集し続ける。
- ・完了したら、バルブを閉める。「カラム洗浄液 - 結合後」容器を2 ~ 10 で保存する。
- ・表3から、カラム中のSTREAMLINEプロテインAビーズを溶出させるのに必要な溶出バッファおよび中和バッファの総体積を判定する。

【0068】

【表 3】

上清中のIgG量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	必要な溶出 バッファーの 総体積(ml)	必要な中和 バッファーの 総体積(ml)	画分当たり に必要な溶出 バッファーの 体積(ml)	画分当たり に必要な中和 バッファーの 体積(ml)
> 180 ~ \leq 200	72	7.2	12	1.2
> 160 ~ \leq 180	66	6.6	11	1.1
> 140 ~ \leq 160	60	6.0	10	1.0
> 120 ~ \leq 140	54	5.4	9	0.9
> 100 ~ \leq 120	48	4.8	8	0.8
> 80 ~ \leq 100	42	4.2	7	0.7
> 60 ~ \leq 80	36	3.6	6	0.6
> 40 ~ \leq 60	27	2.7	4.5	0.45
> 20 ~ \leq 40	21	2.1	3.5	0.35
\leq 20	12	1.2	2	0.2

10

20

- ・ 9つの無菌コニカル遠心チューブに「溶出抗体」、画分# (1~9) と貼り紙をする。
- ・ 画分当たりに必要な、適切な体積の中和バッファー (上述の表「C」から判定する) を、9つの「溶出抗体」画分チューブのそれぞれに入れ、カラムバルブ流出口下にしっかりと置く。
- ・ 中和バッファーを含む「溶出抗体」チューブのそれぞれに溶出液を収集しながら、画分当たりに必要な、適切な体積の溶出バッファー (上述の表3から判定する) で、画分ごとにカラム中のSTREAMLINEプロテインAビーズを溶出させる。
- ・ 溶出が完了したら、数回渦を巻かせることによって、各「溶出抗体」画分チューブを穏やかに混合する。およそ50 μl の画分# 3を取り除き、pH試験紙片上に置いて、溶出液がおよそpH 6.5~8.5の間に中和されていることを確実にする。必要な場合、pHを範囲内にするのに必要な場合、さらなる中和バッファーまたは溶出バッファーを加える。
- ・ pH評価が完了したら、280nm~400nmで各画分の試料の吸光度スキャンを行って、透析プロセスへの進行の前に、溶出液中のIgGのおよその濃度を判定する。

30

【0069】

A280~A400値が0.200以上である場合、画分を溶出液貯留の一部として受け入れる。

【0070】

A280~A400値が0.200未満である場合、画分を溶出液貯留の一部として受け入れない。

40

- ・ 無菌コニカル遠心チューブに「溶出抗体」、「溶出液貯留」と貼り紙をし、貯留の一部として受け入れられた全ての画分を合わせる。
- ・ 溶出貯留の試料の吸光度スキャンを行って、透析プロセスへの進行の前に、溶出液中のIgGのおよその濃度を判定する。
- ・ 溶出液貯留の体積を評価し、IgGのおよその総mgを計算する。
- ・ 溶出液貯留の体積: $\text{__ml} \times \text{__IgG mg/ml} = \text{IgGの__総mg}$
(抗体透析)
- ・ 「溶出抗体」チューブを2 から10 に移す。
- ・ 溶出液のおよその体積および表4のデータを用いて、抗体溶出液を透析するのに必要な

50

透析管系のおよその長さを計算する。

【 0 0 7 1 】

【 表 4 】

溶離剤のおよその体積(ml)	透析管系の体積/長さの比	溶離剤試料に必要なおよその長さ(cm)	20%の上部空間(cm)	試料+上部空間に必要なおよその長さ(cm)	管系を止めるのに必要なおよその長さ(cm)	必要な透析管系のおよその全長(cm)
39.6	2	20	4	24	15	63
36.3	2	18	4	22	15	59
33.0	2	17	3	20	15	55
29.7	2	15	3	18	15	51
26.4	2	13	3	16	15	47
23.1	2	12	2	14	15	43
19.8	2	10	2	12	15	39
14.85	2	7	1	9	15	33
11.55	2	6	1	7	15	29
6.6	2	3	1	4	15	23

10

20

・ 必要な、適切な長さの透析管系を切断する。(Spectra / Por (登録商標) 2 再生セルロース膜、12000 ~ 14000ダルトン分子量カットオフ(MWCO)、16 mm直径、Spectrum Laboratories Inc.、カタログ番号132678)

・ 透析膜管系を1000mlのDIH₂O中で30分より長い間水和する。

・ 表5のデータを用いて、抗体溶出液を透析するのに必要な透析バッファーのおよその体積を計算する。

30

【 0 0 7 2 】

【表5】

表5: 必要な透析バッファの体積			
上清中のIgG量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ミリリットルでの溶出 抗体の最終的な 体積(ml)	必要な透析管系 の長さ(cm)	1リットルあたりに必要 な透析バッファ (1×PBS)の体積
> 180 ~ ≤200	39.6 ml	63 cm	4リットル 完全取替え3回
> 160 ~ ≤180	36.3 ml	59 cm	3.6リットル 完全取替え3回
> 140 ~ ≤160	33.0 ml	55 cm	3.3リットル 完全取替え3回
> 120 ~ ≤140	29.7 ml	51 cm	3.0リットル 完全取替え3回
> 100 ~ ≤120	26.4 ml	47 cm	2.6リットル 完全取替え3回
> 80 ~ ≤100	23.1 ml	43 cm	2.3リットル 完全取替え3回
> 60 ~ ≤80	19.8 ml	39 cm	1.9リットル 完全取替え3回
> 40 ~ ≤60	14.85 ml	33 cm	1.5リットル 完全取替え3回
> 20 ~ ≤40	11.55 ml	29 cm	1.2リットル 完全取替え3回
≤20	6.6 ml	23 cm	0.7リットル 完全取替え3回

10

20

・適切な量の透析バッファを、適した大きさのプラスチックビーカーに入れる。ビーカーに「透析抗体」と貼り紙をする。清潔な攪拌棒を加え、ビーカーを2 ~ 10 で冷蔵庫または低温室内の攪拌プレートに置く。

・透析管系をDI-H₂O中で徹底的にすすぐ。2つの末端の結び目を透析管系の一端からおおよそ7cmで結びつけ、透析管系をしっかりと固定する。

・おおよそ5mlのDI-H₂Oを透析管系に加える。

・透析管系に、「溶出抗体」収集チューブの溶出抗体を充填する。

・2つの末端の結び目を、透析管系の残った開放端から7cmで結びつけ、しっかりと固定する。上部空間が、おおよそ表4から導かれるものであることを確実にする。

・充填し、閉鎖した透析管系を、適切な体積の1×PBS(表5から)を含む透析貯蔵器に入れる。

・清潔なラップでビーカーを覆う。透析試料が自由に回転するが透析物の渦に引き下ろされないように、攪拌プレート上で速度を調節する。透析は、合計24時間の期間中3回のバッファ交換ありで、2 ~ 10 で起こるべきである。

【0073】

(抗体ろ過)

・無菌収集チューブに「透析抗体」と貼り紙をする。

・透析した試料管系を透析ビーカーから取り除く。一端で透析管系を切開し、透析した試料を「透析抗体」遠心チューブに移す。

・別の無菌収集チューブに「透析抗体」と貼り紙をする。

・最終的な透析された体積を保持するのに十分な容量を有する無菌のLuer Lok注射器を選択する。

・Acrodisc(登録商標)注射器フィルターを、注射器の開口部に取り付ける(0.2 μm HT Tuffryn(登録商標)膜、低タンパク質結合、Gelman Laboratories、カタログ番号4192)。注射器からプランジャを取り除き、注射器を直立して保持しながら、透析したモノクローナル抗体を「透析抗体」チューブから注射器に移す。プランジャを戻す。

・Acrodisc(登録商標)注射器フィルターを、開放した無菌の、張り紙をした「透析抗体」収集チューブ上に保持し、注射器プランジャを押し下げて、精製された抗体を

30

40

50

「精製抗体」チューブにろ過する。

- ・ろ過が完了したら、「精製抗体」チューブにキャップをし、2 ~ 10 で保存する。
- ・A280手順を用いて、精製されたモノクローナル抗体の濃度を判定する。

【0074】

(実施例3)

(エピトープマッピングの一般的方法)

(一般的手法)

エピトープマッピングを行って、特定のモノクローナル抗体によって認識される抗原性タンパク質(すなわち、エピトープ)内の直鎖状アミノ酸配列を同定する。エピトープマッピングのための一般的な手法は、一般的に異種発現系において、全長タンパク質、なら

10

びにタンパク質の種々の断片(すなわち、トランケートされた形態)の発現を必要とする。次いで、これらの種々の組換えタンパク質を用いて、特定のモノクローナル抗体が1つまたは複数のトランケートされた形態の標的タンパク質に結合することができるかどうかを判定する。繰り返すトランケーションの使用および重複するアミノ酸領域を有する組換えタンパク質の生成によって、調査中のモノクローナル抗体によって認識される領域を同定することが可能である。ウエスタンブロット分析またはELISAを採用して、調査中の特定のモノクローナル抗体が1つまたは複数の組換えタンパク質断片を結合することができるかどうかを判定する。この手法は、エピトープを含むペプチド領域を最終的に同定し、いくつかの場合において、エピトープを正確に8~11アミノ酸配列にさらに精密に

20

【0075】

(構築物設計および考案)

エピトープマッピングの最初の工程は、ネステッド遺伝子トランケーションの設計である。頻繁に、さらなる分析のために、遺伝子は4つの等しい部分に分割される。

【0076】

(遺伝子クローニング戦略)

一般的なクローニング戦略は、PCRベースのクローン化された遺伝子断片の生成で始まる。クローン化断片を効率的に発現させるために、特に小さいアミノ酸領域を使用する場合、クローン化断片は融合タンパク質として、すなわち、系において安定して発現される別の担体タンパク質に融合されて、発現される。緑色蛍光タンパク質(GFP)は、担

30

体タンパク質として頻繁に使用される。GFPは、融合パートナーの一部として含まれてトランケーション断片を安定化させ、その後の*in vitro*タンパク質発現工程の間に発現を向上させる。GFPはまた、抗GFP抗体を用いた融合タンパク質発現の追跡を可能にする。

【0077】

いずれかのメガプライミング手法を用いて、またはpScreen-GFPベクターへのプラスミドクローニングの使用によって、GFP-タンパク質構築物を作製するためのクローニングを行う。一般に、トランケーション断片を、GFP、およびメガプライミングと呼ばれる技術を用いたタンパク質発現に必要な制御配列に融合させる。

【0078】

メガプライミングは、それぞれの断片の末端の相同な領域アニーリングすることおよびアニーリングした一本鎖DNAを熱安定性DNAポリメラーゼで伸長させることによる、2つ以上のDNA断片の結合である。このプロセスによって、2つ以上の、より小さい断片から、それらの共有する配列によってそれらを連結して、1つの大きなDNA断片が生じる。次いで、大きな断片を、標準的PCRを用いて増幅する。

【0079】

メガプライミングをうまく使用できない場合、トランケーション断片を、GFPおよびタンパク質発現制御配列を含むプラスミドにクローニングすることができる。このクローニングによって、エピトープマッピングに必要なGFP/断片融合が生じる。次いで、残りのプロトコルを後述のように進めることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】

(タンパク質発現)

次いで、例えばメガプライミングによって作製される、発現構築物を、ラピッドトランスレーションシステム (R T S) に導入する。R T S は、大腸菌 (E . c o l i) 溶解物由来の、無細胞タンパク質発現系である。この系によって、D N A 鋳型からのタンパク質の迅速な (3 ~ 4 時間) 発現が可能になる。

【 0 0 8 1 】

R T S が十分なレベルのタンパク質発現を生じない場合、トランケーション断片を G F P タンパク質発現プラスミドにクローニングする。次いで、これらの融合プラスミドを、タンパク質発現のために最適化された大腸菌 (E . c o l i) 株に形質転換する。タンパク質発現を、増殖している細菌の培養物中に誘導し、生長の後、細胞を溶解させる。次いで、複雑な細胞溶解物中のタンパク質を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (P A G E) によって分離し、残りのプロトコルは以下と同じである。

10

【 0 0 8 2 】

(タンパク質検出およびエピトープマッピング)

R T S によって生成されたタンパク質断片を、P A G E を用いて分離し、ニトロセルロース膜に移す。次いで、膜結合タンパク質を、溶液中で、調査中の抗体に曝露する。抗体 / タンパク質結合を、当該分野で公知の比色技術を用いて同定する。

【 0 0 8 3 】

全長タンパク質およびトランケートされたタンパク質断片のいくつかのサブセットの抗体結合は、陽性の結果を構成する。タンパク質の特定の部分がないことによって抗体結合が排除される場合、エピトープはこの断片上にある。

20

【 0 0 8 4 】

マッピングされる抗体が、ニトロセルロース膜に結合しているタンパク質を認識しない場合、例えば E L I S A または免疫沈降等の、抗体 / タンパク質相互作用を検出するための代替的方法が用いられる。抗体 / タンパク質相互作用を検出するための方法は、当該分野で周知である。

【 0 0 8 5 】

(エピトープ位置選定をさらに精密にする)

上述のプロトコルは、エピトープの位置選定をタンパク質のおよそ 4 分の 1 まで狭くするだけなので、エピトープの位置選定をさらに分析するために、エピトープを含むと判定された 4 分の 1 のタンパク質に関するプロセスを繰り返す必要がある。非常に大きなタンパク質については、このプロセスを 2 ~ 3 回繰り返して、8 ~ 15 アミノ酸までエピトープを狭める必要がある場合がある。

30

【 0 0 8 6 】

(実施例 4)

(M C M 2 モノクローナル抗体 2 7 C 5 . 6 および 2 6 H 6 . 1 9 についてのエピトープの特徴付け)

本質的に実施例 3 に記載されているように、M C M 2 モノクローナル抗体 2 7 C 5 . 6 および 2 6 H 6 . 1 9 についてのエピトープマッピングを行った。具体的には、P C R を用いて、M C M 2 遺伝子トランケーションを作製し、それに続く R T S によって組換え M C M 2 タンパク質断片を生成し、最後にウエスタンブロッティングによって M C M 2 への抗体結合を検出した。2 回目の P C R において G F P を M C M 2 遺伝子トランケーションと結合させて、R T S における確固として安定した発現を確実にした。

40

【 0 0 8 7 】

M C M 2 の全長コード配列 (配列番号 2、N M _ 0 0 4 5 2 6) は、2 7 1 5 b p のサイズを有する。しかしながら、組換え M C M 2 タンパク質の発現に使用され、M C M 2 抗体の生成の間にマウスの免疫化に使用された c D N A は、2 6 8 8 b p の遺伝子サイズを有した (配列番号 5)。使用した、トランケートされた M C M 2 c D N A は、M C M 2 タンパク質の 5' 末端を欠く 2 7 b p 領域、具体的には断片

50

【 0 0 8 8 】

【 化 2 】

ATGGCGGAATCATCGGAATCCTTCACC (配列番号:6)

10

を有した。MCM2 - 27C5 . 6抗体をエピトープマッピングするために、以下の連続的工程を行った。

【 0 0 8 9 】

MCM2遺伝子は大きく (> 1000bp)、必要なPCRの繰り返しの数を最小限にする必要があるので、遺伝子を、およそ400bpの6つの領域 [1 ~ 6] に等分した。2回目のPCRサイクルの間のメガプライミングを可能にする相同な配列およびpSCREEN - GFPプラスミドへのサブクロニングの第二の選択肢のための制限酵素認識部位を含む、重複する配列を、第一のPCRの間に目的の遺伝子に付加する。1回目のPCRによって、以下のものを含むトランケートされたMCM2ヌクレオチド配列 (配列番号5) の断片が生じた。領域 [1] は1 ~ 426bpであり、領域 [1 ~ 2] は1 ~ 888bpであり、領域 [1 ~ 3] は1 ~ 1377bpであり、領域 [1 ~ 4] は1 ~ 1845bpであり、領域 [1 ~ 5] は1 ~ 2241bpであり、領域 [1 ~ 6] は1 ~ 2688bpであり、最後に、領域 [2 ~ 6] は427 ~ 2688bpであった。個々の領域 (例領域 [5]) は発現されず、領域間の連結配列中に存在した、欠けているエピトープが防がれた。

20

【 0 0 9 0 】

断片サイズはメガプライミングには大きすぎる場合、MCM2の1回目のPCR産物を、pSCREEN - GFP (BamH1 - Xho1) にサブクロニングした。成功しなかった唯一のトランケーションは、全長領域 [1 ~ 6] であった。全長遺伝子の増幅に使用した元々のプライマー、およびトランケーションを、操作して制限酵素認識部位 (5'末端BAMH1、3'末端XHO1) に含めて、pSCREEN - GFPへの直接のサブクロニングを可能にした。

30

【 0 0 9 1 】

RocheのRTS100大腸菌 (E . coli) HYキットを用いたRTS反応におけるタンパク質生成のための鑄型として、作製したGFP - 遺伝子融合を用いた。RTSからのタンパク質生成物をアセトン沈殿させ、変性ポリアクリルアミドゲルに直接ロードし、ウエスタンブロッティングによって分析した。ウエスタンブロットを、27C5 . 6モノクローナル抗体およびGFP抗体で直接プローブした。

40

【 0 0 9 2 】

1回目のRTSの産物を、GFP抗体およびMCM2モノクローナル抗体27C5 . 6の両方でプローブした。領域 [1 ~ 3] で陽性のバンドを検出した。領域 [1 ~ 3] によって包含される断片を開始配列として用いて、上述のプロセスを繰り返した。

【 0 0 9 3 】

2回目のRTSによって、領域MCM2 - 3Q3 (

【 0 0 9 4 】

【化3】

CQSAGPFEVNMEETIYQNYQRIRIQESP (配列番号:7)

10

配列番号1のアミノ酸残基355～382に対応する)中の27C5.6抗体についての陽性の結果が生じた。領域MCM2-3Q3によって包含される断片を開始配列として用いて、上述のプロセスを繰り返した。

【0095】

3回目のRTSによって、領域MCM2-3Q3.2(

【0096】

【化4】

IYQNYQRIRIQESP (配列番号:3)

20

配列番号1のアミノ酸残基369～382に対応する)中の27C5.6抗体についての陽性の結果が生じた。領域MCM2-3Q3.1(

30

【0097】

【化5】

CQSAGPFEVNMEET (配列番号:8)

40

配列番号1のアミノ酸残基355～368に対応する)またはMCM2-3Q3.2(

【0098】

【化6】

EVNMEETIYQNYQR (配列番号:9)

10

配列番号1のアミノ酸残基362～375に対応する)中で、陽性の結果は得られなかった。

【0099】

結果

最初の結果から、MCM2モノクローナル抗体27C5.6のエピトープは、MCM2タンパク質のN末端領域内に位置していることが示された。引き続きのMCM2タンパク質のトランケーションから、27C5.6によって認識されるエピトープが、具体的には配列番号1のアミノ酸残基369～382(

【0100】

20

【化7】

IYQNYQRIRIQESP (配列番号:3)

30

)に対応する、14アミノ酸領域内に位置することが示された。さらなる回のRTSによって、エピトープ位置選定をさらに精密にすることができるかもしれない。

【0101】

上述の同一のプロセスを用いて、MCM2モノクローナル抗体26H6.19のエピトープを同定した。最初の結果から、エピトープがMCM2タンパク質のC末端領域内に位置することが示された。エピトープを、具体的には配列番号1のアミノ酸残基688～710(

【0102】

40

【化8】

PSNKEEGLANGSAAEPAMPNTY (配列番号:4)

50

)に対応する、23アミノ酸領域に予備的に限定した。さらなる分析によって、MCM2モノクローナル抗体26H6.19のエピトープを、配列番号1のアミノ酸残基683～692(

【0103】

【化9】

HVRHPSNKE (配列番号:14)

10

)を含む10アミノ酸領域に、さらに精密にした。

【配列表】

2008539251000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成20年2月5日(2008.2.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

MCM2に特異的に結合することができるモノクローナル抗体、またはその変異体もしくは断片であって、該モノクローナル抗体は、以下：

(a) ATCCに特許受託番号PTA-6668として寄託されているハイブリドーマ細胞株27C5.6によって産生されるモノクローナル抗体、

(b) ATCCに特許受託番号PTA-6667として寄託されているハイブリドーマ細胞株26H6.19によって産生されるモノクローナル抗体、

(c) ハイブリドーマ細胞株27C5.6または26H6.19によって産生されるモノクローナル抗体の結合特性を有するモノクローナル抗体、

(d) ハイブリドーマ細胞株27C5.6または26H6.19によって産生されるモノクローナル抗体を結合することができるエピトープに結合するモノクローナル抗体、

(e) 配列番号3に示されるアミノ酸配列を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体、

(f) 配列番号14のアミノ酸配列を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体、

(g) ハイブリドーマ細胞株27C5.6または26H6.19によって産生されるモノクローナル抗体との競合的結合アッセイにおいて競合するモノクローナル抗体、および

(h) (a)～(g)のモノクローナル抗体の抗原結合断片であり、断片がMCM2に特異的に結合する能力を維持している、モノクローナル抗体、またはその変異体もしくは断片、

からなる群から選択される、モノクローナル抗体。

【請求項2】

ATCCに特許受託番号PTA-6668として寄託されている、ハイブリドーマ細胞株27C5.6。

【請求項3】

A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 7 として寄託されている、ハイブリドーマ細胞株 2 6 H 6 . 1 9 。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を産生することができる、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項 5】

少なくとも 1 つの請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を含む、高悪性度子宮頸疾患を診断するためのキット。

【請求項 6】

モノクローナル抗体が、A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 8 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 7 C 5 . 6 によって産生されるモノクローナル抗体、または A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 7 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 6 H 6 . 1 9 によって産生されるモノクローナル抗体である、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 7】

少なくとも 2 つの抗体を含み、第一の抗体が、A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 8 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 7 C 5 . 6 によって産生されるモノクローナル抗体であり、第二の抗体が、A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 7 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 6 H 6 . 1 9 によって産生されるモノクローナル抗体である、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 8】

T o p o 2 A に特異的に結合する抗体をさらに含む、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 9】

各抗体が別々の抗体試薬として提供される、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 10】

抗体の全てが抗体カクテルとして提供される、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 11】

前記キットがペルオキシダーゼブロッキング試薬、タンパク質ブロッキング試薬、前記バイオマーカータンパク質への抗体結合を検出するための化学物質、対比染色剤、青みづけ剤、および使用のための手引きをさらに含む、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 12】

パブ染色のための試薬をさらに含む、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 13】

パブ染色のための試薬が E A 5 0 およびオレンジ G を含む、請求項 12 に記載のキット。

【請求項 14】

a) 患者由来の子宮頸試料を提供すること、
b) 試料と、M C M 2 に特異的に結合する少なくとも 1 つの請求項 1 に記載のモノクローナル抗体とを接触させること、および
c) M C M 2 への抗体の結合を検出すること
を含む、患者における高悪性度子宮頸疾患の診断を支援するための方法。

【請求項 15】

モノクローナル抗体が、A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 8 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 7 C 5 . 6 によって産生されるモノクローナル抗体、または A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 7 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 6 H 6 . 1 9 によって産生されるモノクローナル抗体である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

試料と、M C M 2 に特異的に結合する少なくとも 2 つのモノクローナル抗体とを接触させることを含み、第一の抗体が、A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 8 として寄託されているハイブリドーマ細胞株 2 7 C 5 . 6 によって産生されるモノクローナル抗体であり、第二の抗体が、A T C C に特許受託番号 P T A - 6 6 6 7 として寄託されているハイ

ブリドーマ細胞株 26H6.19 によって産生されるモノクローナル抗体である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

試料と、Topo2A に特異的に結合する抗体とを接触させることをさらに含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

抗体と試料とを、個々の抗体試薬として連続的に、または抗体カクテルとして同時に接触させる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

MCM2 モノクローナル抗体を結合するためのエピトープを含む単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、

(a) 配列番号 3 または 14 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、および

(b) 配列番号 3 または 14 に対する少なくとも 90% の配列同一性を有し、抗原活性を有するポリペプチド、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 20】

請求項 19 に記載のポリペプチドで非ヒト動物を免疫化することを含む、MCM2 抗体を生成するための方法。

【請求項 21】

(a) 免疫応答を誘発する条件下で請求項 19 に記載のポリペプチドで非ヒト動物を免疫化すること、

(b) 該動物から抗体産生細胞を単離すること、

(c) 培養物中で、抗体産生細胞を不死化細胞と融合し、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を形成すること、

(d) ハイブリドーマ細胞を培養すること、および

(e) 培養物からモノクローナル抗体を単離することを含む、MCM2 モノクローナル抗体を生成するための方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2006/015706
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/18 C12N5/20 G01N33/574 G01N33/68 G01N33/577 C07K14/47 ADD. C07K16/40 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 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) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANONYMOUS: "Product datasheet for ab6153" [Online] 11 October 2000 (2000-10-11), pages 1-3, XP002406746 Retrieved from the Internet: URL: http://www.abcam.com/index.html?pagecode=fig=datasheet&intAbID=6153> [retrieved on 2006-11-10]	1,2,4
Y	the whole document ----- -/--	5-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw 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. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 November 2006		Date of mailing of the international search report 15-02-2007
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 840-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Siaterli, Maria

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/082006/015706

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application and necessary to the claimed invention, the International search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
- table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- on paper
- in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the International application as filed
- filed together with the International application in electronic form
- furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/015706**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 14-18 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional 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, 4-18 (all partially) and 2 (completely)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2006/015706

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1 & 4-18 (all partially) and 2 (completely)

monoclonal anti MCM2 antibody binding to SEQ ID NO 3 and uses thereof

2. claims: 1 & 4-18 (all partially) and 3 (completely)

monoclonal anti MCM2 antibody binding to SEQ ID NO 14 and uses thereof

3. claims: 19-21

a polypeptide comprising an epitope for binding an MCM2 monoclonal antibody wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of (a) a polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO 3 or 14; and, (b) a polypeptide having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO 3 or 14, wherein the polypeptide has antigenic activity and uses thereof

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2006/015706

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANONYMOUS: "Product datasheet for ab17788"[Online] 2 March 2005 (2005-03-02), pages 1-3, XP002406747 Retrieved from the Internet: URL:http://www.abcam.com/index.html?pageco nfig=datasheet&intAbID=17788> [retrieved on 2006-11-10]	1,2,4
Y	the whole document -----	5-18
X	GOING J J ET AL: "Aberrant expression of minichromosome maintenance proteins 2 and 5, and Ki-67 in dysplastic squamous oesophageal epithelium and Barrett's mucosa." GUT. MAR 2002, vol. 50, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 373-377, XP002406753 ISSN: 0017-5749	1,2,4
Y	page 374, left-hand column, lines 6-11 page 374, left-hand column, line 22 - right-hand column, line 9 -----	5-18
X	MUKHERJEE G ET AL: "Biologic factors and response to radiotherapy in carcinoma of the cervix." INTERNATIONAL JOURNAL OF GYNECOLOGICAL CANCER : OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL GYNECOLOGICAL CANCER SOCIETY. 2001 MAY-JUN, vol. 11, no. 3, May 2001 (2001-05), pages 187-193, XP002406881 ISSN: 1048-891X page 189, left-hand column, lines 27-29 page 189, right-hand column, lines 7-9,40-46 page 191, right-hand column, lines 25-31 page 191, left-hand column, paragraph 3 -----	1,2,4-18
X	TAN DONG-FENG ET AL: "MCM2 - a promising marker for premalignant lesions of the lung: a cohort study" BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 1, no. 1, 25 June 2001 (2001-06-25), pages 6-12, XP021004532 ISSN: 1471-2407	1,2,4-14
Y	page 8, left-hand column, paragraph 3; figure 1 page 11, left-hand column, paragraphs 3,4 -----	15-18

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/015706

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KRÜGER STEFAN ET AL: "Prognostic value of MCM2 immunoreactivity in stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder." EUROPEAN UROLOGY. FEB 2003, vol. 43, no. 2, February 2003 (2003-02), pages 138-145, XP002406882 ISSN: 0302-2838	5-13
Y	page 140, left-hand column, paragraph 2 page 144, right-hand column, last paragraph	15-18
X	EP 1 489 177 A1 (JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY [JP]; GINKGO BIOMEDICAL RES INST CO [JP];) 22 December 2004 (2004-12-22) example 6	1,2,4
Y	EP 1 388 734 A1 (MTM LAB AG [DE]) 11 February 2004 (2004-02-11) paragraph [0048]; claims 28-30	5-18
X	FREEMAN A ET AL: "Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 5, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 2121-2132, XP002399767 ISSN: 1078-0432 cited in the application	1-4
Y	page 2127, left-hand column, paragraphs 2,3; table 3 page 2128, right-hand column, paragraphs 1,2 page 2131, left-hand column, paragraph 2	5-18
Y	BRAKE TIFFANY ET AL: "Comparative analysis of cervical cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of minichromosome maintenance protein 7 as an informative biomarker for human cervical cancer." CANCER RESEARCH. 1 DEC 2003, vol. 63, no. 23, 1 December 2003 (2003-12-01), pages 8173-8180, XP002406883 ISSN: 0008-5472 page 8177, left-hand column, paragraphs 2,3 page 8174, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, line 2	15-18
	----- -/-- -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2006/015706

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MUSHIKA M ET AL: "Detection of proliferative cells in dysplasia, carcinoma in situ, and invasive carcinoma of the uterine cervix by monoclonal antibody against DNA polymerase alpha." CANCER. 15 MAR 1988, vol. 61, no. 6, 15 March 1988 (1988-03-15), pages 1182-1186, XP008071265 ISSN: 0008-543X -----	
T	ANONYMOUS: "Data sheet minichromosome maintenance protein 2 mouse monoclonal antibody"[Online] pages 1-2, XP002407007 Retrieved from the Internet: URL:http://www.vision-bio.com/pdfs/products/mcm2-u.pdf> [retrieved on 2006-11-13] the whole document -----	
P,X	WO 2005/095964 A2 (TRIPATH IMAGING INC [US]; FISCHER TIMOTHY J [US]; MALINOWSKI DOUGLAS P) 13 October 2005 (2005-10-13) page 21, line 23 - line 26 page 33, line 18 - line 30; claims 17,28,39,53,64; example 8; tables 14,40 -----	5-18
P,X	MALINOWSKI DOUGLAS P: "Molecular diagnostic assays for cervical neoplasia: emerging markers for the detection of high-grade cervical disease." BIOTECHNIQUES. APR 2005, vol. Suppl, April 2005 (2005-04), pages 17-23, XP008071145 ISSN: 0736-6205 page 20, right-hand column, paragraph 2 - left-hand column, paragraph 2 -----	15-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/015706

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1489177	A1	22-12-2004	AU 2003221356 A1 22-09-2003
			WO 03076623 A1 18-09-2003
			US 2005250166 A1 10-11-2005
EP 1388734	A1	11-02-2004	AT 261126 T 15-03-2004
			AU 2003262554 A1 23-02-2004
			CA 2487048 A1 12-02-2004
			CN 1675550 A 28-09-2005
			DE 60200248 D1 22-04-2004
			DE 60200248 T2 27-01-2005
			DK 1388734 T3 03-05-2004
			WO 2004013632 A1 12-02-2004
			ES 2215957 T3 16-10-2004
			JP 2005534313 T 17-11-2005
			MX PA04012648 A 23-03-2005
			US 2004023288 A1 05-02-2004
			WO 2005095964
CA 2560782 A1 13-10-2005			

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D

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

(72)発明者 フィッシャー, ティモシー ジェイ.
 アメリカ合衆国 ノース カロライナ 27613, ラーレイ, スワローテイル レーン 6
 609

(72)発明者 マリノフスキ, ダグラス ピー.
 アメリカ合衆国 ノース カロライナ 27278, ヒルズバラ, ディモックス ミル ロー
 ド 1005

(72)発明者 テイラー, エイドリアン ジェイ.
 アメリカ合衆国 ノース カロライナ 27713, ダラム, スプレディング オーク コー
 ト 11

Fターム(参考) 4B024 AA12 BA43 DA02 GA03
 4B063 QA19 QQ08 QR55 QS33
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA14
 4B065 AA92X AB05 AC14 BA08 CA25 CA44
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA51 FA74

专利名称(译)	单克隆抗体和用于检测宫颈疾病的方法		
公开(公告)号	JP2008539251A	公开(公告)日	2008-11-13
申请号	JP2008509059	申请日	2006-04-26
申请(专利权)人(译)	Toripasu成像公司		
[标]发明人	フィッシャーティモシージェイ マリノフスキダグラスピー テイラーエイドリアンジェイ		
发明人	フィッシャー, テイモシー ジェイ. マリノフスキ, ダグラス ピー. テイラー, エイドリアン ジェイ.		
IPC分类号	C07K16/18 C12P21/08 C12N5/10 C12N15/02 C12Q1/02 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/57411 C07K14/4738 C07K16/3069 C07K2317/34		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/08 C12N5/00.B C12N15/00.C C12Q1/02 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA43 4B024/DA02 4B024/GA03 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR55 4B063/QS33 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA14 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/675305 2005-04-27 US 60/718082 2005-09-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于诊断患者样品中的高度子宫颈疾病的组合物和方法。该组合物包括特异性结合MCM2的单克隆抗体及其变体和片段。还提供了具有本发明MCM2抗体结合特征的单克隆抗体。本文还公开了产生本申请的MCM2单克隆抗体的杂交瘤细胞系。该组合物可用于诊断高级别宫颈疾病的实践方法，包括检测来自患者的宫颈样品中MCM2的过表达。进一步提供了用于实施本申请方法的试剂盒。包含MCM2表位的氨基酸序列的多肽和在抗体的产生中使用这些多肽的方法也包括在本申请中。

上清中のIgG量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1ミリリットル(ml)あたりに 必要なプロテインA樹脂の体積
>180 - \leq 200	12.0
>160 ~ \leq 180	11.0
>140 ~ \leq 160	10.0
>120 ~ \leq 140	9.0
>100 ~ \leq 120	8.0
>80 ~ \leq 100	7.0
>60 ~ \leq 80	6.0
>40 ~ \leq 60	4.5
>20 ~ \leq 40	3.5
\leq 20	2.0