

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成19年7月26日(2007.7.26)

【公表番号】特表2006-505277(P2006-505277A)

【公表日】平成18年2月16日(2006.2.16)

【年通号数】公開・登録公報2006-007

【出願番号】特願2004-551530(P2004-551530)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 K	47/48	(2006.01)
A 6 1 K	49/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/02	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
C 0 7 K	1/22	(2006.01)
C 0 7 K	16/28	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 P	21/08	(2006.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
G 0 1 N	33/574	(2006.01)
C 1 2 N	15/02	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)
A 6 1 K	51/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	47/48	
A 6 1 K	49/00	A
A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 0 7 K	1/22	
C 0 7 K	16/28	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	21/08	
G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/53	U
G 0 1 N	33/574	D
C 1 2 N	15/00	C
C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 N	5/00	B
A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	49/02	

## 【手続補正書】

【提出日】平成19年5月25日(2007.5.25)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0120

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0120】

[170] 2.1. 表面の予測

[171] 構造が解明されている抗体セットの可変領域残基の溶媒露出度を、ネズミMy9-6抗体可変領域の表面残基を予測するのに用いた。127の独特の抗体構造ファイルのセット(図3)について、アミノ酸の溶媒露出度を、MCソフトウェアパッケージ(Pedersenら、1994年、J. Mol. Biol. 235(3):959-973)を用いて計算した。この127の構造のセットに由来する、最も類似した10の軽鎖及び重鎖アミノ酸配列を、NCBIウェブサイト [ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) の配列整列化ソフトウェアを用いて決定した。これらの10の抗体可変領域の各可変領域残基についての平均溶媒露出度を、エクセル集計表を用いて計算し、そして30%よりも大きな平均露出度を伴う位置を、表面残基とみなした。25%~35%の平均露出度を伴う位置を、両側に隣接する2つの同一な残基を有するこれらの構造のみについて、個々の残基の露出度を計算することによって、さらにみなした。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0137

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0137】

[201] 種々のcDNAクローン及びペプチド配列解析から得た蓄積データは、図8に示される最終的なネズミMy9-6軽鎖及び重鎖配列を提供した。Kabata及びAbM定義を用いて、3つの軽鎖及び重鎖CDRを同定した(図8及び9)。NCBI IgBlastデータベースの検索により、muMy9-6抗体軽鎖可変領域は、マウスIgV<sub>H</sub> 8-27生殖系列遺伝子に由来する可能性が最も高く、一方、重鎖可変領域は、IgV<sub>H</sub> V102生殖系列遺伝子に由来する可能性が最も高いことが、示唆される(図10)。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0170

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0170】

【図1】[35] 図1は、競合結合実験の結果を示す。<sup>125</sup>I-標識My9-6抗体(3×10<sup>-9</sup>M)のCD33陽性U-937細胞への結合を、濃度を増加させたMy9あるいはMy9-6抗体の存在下で、アッセイした。

【図2】[36] 図2は、軽鎖シグナル配列に対するMy9-6縮重プライマーを示す。

【図3】[37] 図3は、muMy9-6可変領域の表面を予測するのに用いたブルックヘブンのデータベースに由来する、127の抗体構造のファイル名を示す。

【図4】[38] 図4は、16のMy9-6の表面再構築化型ならびにキメラMy9-6抗体を構築するのに用いたPCRプライマーを示す。

【図5】[39] 図5は、ヒト化抗体を構築しそして発現するのに用いたプラスミドを示す。(A):軽鎖クローニングプラスミド。(B):重鎖クローニングプラスミド。(C):哺乳動物抗体発現プラスミド。

【図 6】[40] 図 6 A は、R T - P C Rにより生成した m u M y 9 - 6 軽鎖の c D N A クローンに由来するアミノ酸配列と比較した、エドマン配列決定の結果を示す。[41] 図 6 B は、C D R 1 及び C D R 2 配列をそれぞれ含有する、1 3 1 9 D a 及び 1 1 2 2 D a のペプチドフラグメントの M S - M S 配列解析による結果を示す。C D R 配列は、太字で表す。

【図 7】[42] 図 7 は、1 7 8 8 D a ペプチドの M S - M S 配列解析による結果、及び 2 つの c D N A クローンに由来する対応した配列を示す。

【図 8 - A】[43] 図 8 A は、ネズミ M y 9 - 6 抗体の軽鎖可変領域の c D N A 配列及び推定アミノ酸配列 ( 配列番号 9 5 ) を示す。3 つの C D R を下線で示す。

【図 8 - B】[44] 図 8 B は、ネズミ M y 9 - 6 抗体の重鎖可変領域の c D N A 配列及び推定アミノ酸配列 ( 配列番号 9 6 ) を示す。3 つの C D R を下線で示す。

【図 9】[45] 図 9 は、K a b a t の定義によって決定された軽鎖及び重鎖 C D R を示す。

【図 1 0】[46] 図 1 0 は、8 - 2 7 及び V 1 0 2 遺伝子の生殖系列配列とともに整列化させた、ネズミ M y 9 - 6 抗体の軽鎖及び重鎖アミノ酸配列を示す。点 ( . ) は、配列が同一であることを示す。

【図 1 1 - A】[47] 図 1 1 A 及び B は、ブルックヘブンのデータベースに解明されているファイルを有する、m u M y 9 - 6 配列に最も相同的な 1 0 の軽鎖 ( A ) 及び重鎖 ( B ) 抗体配列を示す。配列を、最も相同的なものから最も相同的でないものへの順番で整列化した。

【図 1 1 - B】[47] 図 1 1 A 及び B は、ブルックヘブンのデータベースに解明されているファイルを有する、m u M y 9 - 6 配列に最も相同的な 1 0 の軽鎖 ( A ) 及び重鎖 ( B ) 抗体配列を示す。配列を、最も相同的なものから最も相同的でないものへの順番で整列化した。

【図 1 2】[48] 図 1 2 A 及び B は、m u M y 9 - 6 抗体軽鎖 ( A ) 及び重鎖 ( B ) の各 K a b a t 位置の平均露出度を示す。1 0 の最も相同的な軽鎖及び重鎖配列の各 K a b a t 位置の相対的な溶媒露出度を、平均しそして x 軸上に表す。

【図 1 3 - A】[49] 図 1 3 A は、M C ソフトウェアを用いて計算した、1 0 の最も相同的な軽鎖構造の残基の溶媒露出度を示し、そして、エクセルを用いて作表した各 K a b a t 位置の平均を示す。この表は、2 5 % よりも大きな平均溶媒露出度である、C D R でない位置のデータを示す。表面残基を、3 0 % よりも大きな平均溶媒露出度である残基として定義する。2 5 % ~ 3 5 % の平均露出度である位置を、その位置及び両側に隣接する 2 つの位置にて同一の残基を有する構造のみの平均露出度を計算することによって、さらに解析した。N A は、同一の隣接する位置が利用可能でないことを指す。位置 1 5 及び 7 0 は、最終列に与えられた最終的な表面予測に到達するのに、さらに計算を要した。

【図 1 3 - B】[50] 図 1 3 B は、M C ソフトウェアを用いて計算した、1 0 の最も相同的な重鎖構造の残基の溶媒露出度を示し、そして、エクセルを用いて作表した各 K a b a t 位置の平均を示す。この表は、2 5 % よりも大きな平均溶媒露出度である、C D R でない位置のデータを示す。表面残基を、3 0 % よりも大きな平均溶媒露出度である残基として定義する。2 5 % ~ 3 5 % の平均露出度である位置を、その位置及び両側に隣接する 2 つの位置にて同一の残基を有する構造のみの平均露出度を計算することによって、さらに解析した。N A は、同一の隣接する位置が利用可能でないことを指す。

【図 1 4】[51] 図 1 4 は、C D R 残基から 5 以内に入る M y 9 - 6 フレームワークの表面残基を示す。

【図 1 5】[52] 図 1 5 は、K a b a t データベースから抽出した上位 5 つのヒト配列を示す。整列化を、S R ( P e d e r s e n , 1 9 9 3 年 ) によって行った。C D R から 5 以内に入る m u M y 9 - 6 の残基を、下線で示す。

【図 1 6 - A】[53] 図 1 6 A 及び B は、1 6 のヒト化 M y 9 - 6 軽鎖可変領域配列 ( A ) 及び 1 6 のヒト化重鎖可変領域配列 ( B ) を、マウス M y 9 - 6 と整列化させたものを示す。点 ( . ) は、ヒト化型 1 . 0 と配列が同一であることを表す。ネズミとヒトの M y

9 - 6 で異なる表面残基を、下線で示す。

【図 1 6 - B】[53] 図 1 6 A 及び B は、1 6 のヒト化 M y 9 - 6 軽鎖可変領域配列 ( A ) 及び 1 6 のヒト化重鎖可変領域配列 ( B ) を、マウス M y 9 - 6 と整列化させたものを示す。点 ( . ) は、ヒト化型 1 . 0 と配列が同一であることを表す。ネズミとヒトの M y 9 - 6 で異なる表面残基を、下線で示す。

【図 1 7】[54] 図 1 7 は、H L - 6 0 膜及び H L - 6 0 全細胞における直接的結合アッセイならびに H L - 6 0 膜における競合的結合アッセイによって計算された、M y 9 - 6 の  $K_D$  値を示す。N = 2 である \* を除き、N = 3。

【図 1 8】[55] 図 1 8 は、h u M y 9 - 6 V 1 . 0 に対する結合曲線を示す。( A ) : H L - 6 0 膜における直接的結合。( B ) : H L - 6 0 全細胞における直接的結合。( C ) : H L - 6 0 膜における競合的結合。

【図 1 9】[56] 図 1 9 は、H L - 6 0 細胞における M y 9 - 6 - D M 1 及び M y 9 - 6 抗体の結合性を比較したものを示す。

【図 2 0】[57] 図 2 0 は、C D 3 3 発現ヒト腫瘍細胞に対する M y 9 - 6 - D M 1 の *i n v i t r o* 細胞毒性を示す。

【図 2 1】[58] 図 2 1 は、H L - 6 0 異種移植片を有する S C I D マウスにおける、M y 9 - 6 - D M 1 の有効性実験の結果を示す。H L - 6 0 腫瘍の増殖における、M y 9 - 6 - D M 1 ( A ) 及び修飾されていない M y 9 - 6 抗体 ( C ) の効果を、評価した。マウス体重を、毒性の指標としてモニターした ( B 、 D ) 。

【図 2 2】[59] 図 2 2 は、H L - 6 0 異種移植片を有する S C I D マウスにおいて、M y 9 - 6 - D M 1 の有効性を非結合型の薬物であるメイタンシンと比較したものを示す ( A ) 。マウス体重を、毒性の指標としてモニターした ( B ) 。2 例の治療マウスにおいて再発した腫瘍を、M y 9 - 6 - D M 1 の第二クールで治療した。

【図 2 3】[60] 図 2 3 A 及び B は、大きな H L - 6 0 異種移植片を有する S C I D マウスにおいて、M y 9 - 6 - D M 1 の抗腫瘍有効性を標準的な化学療法と比較したものを示す ( A ) 。マウス体重を、毒性の指標としてモニターした ( B ) 。2 例の治療マウスにおいて再発した腫瘍を、M y 9 - 6 - D M 1 の第二クールで再治療した。

【図 2 4】[61] 図 2 4 A 及び B は、H L - 6 0 生存モデルにおいて、M y 9 - 6 - D M 1 の抗腫瘍有効性をゲムツズマブ・オゾガマイシン及び標準的な化学療法と比較したものを示す。H L - 6 0 細胞を、S C I D マウスに静脈内注射した。示した治療を、細胞注射後第 1 1 日に開始した。治療は、ゲムツズマブ・オゾガマイシン ( 1 日 4 回 x 3 ) を除き、1 日 1 回 x 5 の静脈内投与であった。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2006505277000001.app