

【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3部門第2区分

【発行日】平成23年2月3日(2011.2.3)

【公表番号】特表2010-512324(P2010-512324A)

【公表日】平成22年4月22日(2010.4.22)

【年通号数】公開・登録公報2010-016

【出願番号】特願2009-540318(P2009-540318)

【国際特許分類】

C 07 K	7/08	(2006.01)
C 07 K	14/705	(2006.01)
C 07 K	7/06	(2006.01)
C 07 K	16/28	(2006.01)
A 61 K	45/00	(2006.01)
A 61 K	47/48	(2006.01)
A 61 K	39/395	(2006.01)
A 61 P	35/00	(2006.01)
A 61 P	35/04	(2006.01)
C 12 N	15/09	(2006.01)
C 12 P	21/08	(2006.01)
C 12 N	15/02	(2006.01)

【F I】

C 07 K	7/08	Z N A
C 07 K	14/705	
C 07 K	7/06	
C 07 K	16/28	
A 61 K	45/00	
A 61 K	47/48	
A 61 K	39/395	T
A 61 P	35/00	
A 61 P	35/04	
C 12 N	15/00	A
C 12 P	21/08	
C 12 N	15/00	C

【手続補正書】

【提出日】平成22年12月6日(2010.12.6)

【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】

アミノ酸配列

## 【化1】

CCTKSGCNHPDLDVQYRSG (配列番号: 9), CCTKSGCNHPDLDVQYRS (配列番号: 10),  
CCTKSGCNHPDLDVQYR (配列番号: 11), CCTKSGCNHPDLDVQY (配列番号: 12),  
CCTKSGCNHPDLDVQ (配列番号13), CGSSDMSCERGRHQSL (配列番号: 14) 又は  
KSGCNHPDLD (配列番号16)

からなる、単離されたペプチド。

## 【請求項2】

単離されたペプチドであって、その配列が、(i)ヒトuPARアミノ酸配列(配列番号15)  
の断片からなり；かつ(ii)アミノ酸配列

## 【化2】

CCTKSGCNHPDLDVQYRS (配列番号: 9)又はCGSSDMSCERGRHQSL (配列番号: 14)

を含み；前記ペプチドが80個までのアミノ酸長さである、前記単離されたペプチド。

## 【請求項3】

前記ペプチドが、アミノ酸配列

## 【化3】

CCTKSGCNHPDLDVQYRS (配列番号: 9), CCTKSGCNHPDLDVQYRS (配列番号: 10),  
CCTKSGCNHPDLDVQYR (配列番号: 11), CCTKSGCNHPDLDVQY (配列番号: 12),  
CCTKSGCNHPDLDVQ (配列番号: 13), 又はCGSSDMSCERGRHQSL (配列番号: 14)

からなる、請求項1記載の前記単離されたペプチド。

## 【請求項4】

単離されたペプチドであって、その配列が、(i)ヒトuPARアミノ酸配列(配列番号15)  
の断片からなり、該ペプチドのアミノ末端がCys265であり；かつ(ii)アミノ酸配列

## 【化4】

CCTKSGCNHPDLDVQYRS (配列番号: 10), CCTKSGCNHPDLDVQYR (配列番号: 11),  
CCTKSGCNHPDLDVQY (配列番号: 12), 又はCCTKSGCNHPDLDVQ (配列番号: 13)

を含み；前記ペプチドが80個までのアミノ酸長さである、前記単離されたペプチド。

## 【請求項5】

前記ペプチドが、アミノ酸配列

## 【化5】

KSGCNHPDLD (配列番号: 16)

からなる、請求項1記載の単離されたペプチド。

## 【請求項6】

単離されたペプチドであって、その配列が、(i)ヒトuPARアミノ酸配列(配列番号15)  
の断片からなり、該アミノ末端がLys268であり；かつ(ii)アミノ酸配列

## 【化6】

## KSGCNHPDLD (配列番号:16)

を含み；前記ペプチドが80個までのアミノ酸長さである、前記単離されたペプチド。

## 【請求項7】

前記ペプチドが、50個までのアミノ酸長さである、請求項2、4及び6の何れか一項記載の単離されたペプチド。

## 【請求項8】

前記ペプチドが、30個までのアミノ酸長さである、請求項2、4及び6の何れか一項記載の単離されたペプチド。

## 【請求項9】

前記ペプチドが、20個までのアミノ酸長さである、請求項2、4及び6の何れか一項記載の単離されたペプチド。

## 【請求項10】

ヒトuPAR (配列番号15) の単離された断片であって、前記断片のアミノ末端がアミノ酸番号93～98の何れか一つにあり、かつ前記断片のカルボキシ末端がアミノ酸番号277～283の何れか一つにある、前記単離された断片、又は前記断片の配列と比較して1つ以上の保存的置換を含有するその精製された誘導体であって、前記誘導体が米国培養細胞系統保存機関に寄託され、かつATCC受託番号PTA-8191を割り当てられているモノクローナル抗体ANT-658により結合される、前記誘導体。

## 【請求項11】

抗体を製造する方法であって、

- (i) 請求項1～9の何れか一項記載のペプチドを使用して哺乳動物を免疫化すること；
  - (ii) 該哺乳動物から脾細胞を単離すること；
  - (iii) 該脾細胞を骨髄腫細胞へ融合させること；及び
  - (iv) 該ペプチドを結合する抗体を分泌するハイブリドーマを選別すること；
- を含む、前記方法。

## 【請求項12】

抗体を製造する方法であって、

- (i) 請求項10記載の断片又は誘導体を使用して哺乳動物を免疫化すること；
  - (ii) 前記哺乳動物から脾細胞を単離すること；
  - (iii) 前記脾細胞を骨髄腫細胞へ融合させること；及び
  - (iv) 前記断片を結合する抗体を分泌するハイブリドーマを選別すること；
- を含む、前記方法。

## 【請求項13】

抗体を製造する方法であって、

- (i) ヒトuPAR (配列番号15) の(a)

## 【化7】

CCTKSGCNHPDLDVQ~~Y~~RSG (配列番号: 9), CCTKSGCNHPDLDVQ~~Y~~RS (配列番号: 10),  
CCTKSGCNHPDLDVQ~~Y~~R (配列番号: 11), CCTKSGCNHPDLDVQY (配列番号: 12),  
CCTKSGCNHPDLDVQ (配列番号: 13) 又はKSGCNHPDLD (配列番号:16)

；及び(b)

## 【化8】

CGSSDMSCERGRHQSL(配列番号:14)

によって定義されるコンホメーション依存的エピトープを含むペプチドを使用して哺乳動物を免疫化することであって、前記ペプチドが200個までのアミノ酸長さであること；

- (i) 前記哺乳動物から脾細胞を単離すること；
  - (ii) 前記脾細胞を骨髄腫細胞へ融合させること；及び
  - (iii) 前記ペプチドを結合する抗体を分泌するハイブリドーマを選別すること；
- を含む、前記方法。

## 【請求項14】

(i) ヒトuPAR(配列番号15)の(a)

## 【化9】

CCTKSGCNHPDLDVQYRSG(配列番号:9), CCTKSGCNHPDLDVQYRS(配列番号:10),  
CCTKSGCNHPDLDVQYR(配列番号:11), CCTKSGCNHPDLDVQY(配列番号:12)又は  
CCTKSGCNHPDLDVQ(配列番号:13)

；及び(b)

## 【化10】

CGSSDMSCERGRHQSL(配列番号:14)

によって定義されるコンホメーション依存的エピトープを含むペプチドを使用して哺乳動物を免疫化することであって、前記ペプチドが200個までのアミノ酸長さであること；

- (i) 前記哺乳動物から脾細胞を単離すること；
  - (ii) 前記脾細胞を骨髄腫細胞へ融合させること；及び
  - (iii) 前記ペプチドを結合する抗体を分泌するハイブリドーマを選別すること；
- を含む、請求項13記載の方法。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0016】

本発明は、uPAR特異的モノクローナル抗体であるATN-658のエピトープの特徴づけに一部基づいている。従って、本発明は、アミノ酸配列

## 【化1】

CCTKSGCNHPDLDVQYRSG(配列番号:9), CCTKSGCNHPDLDVQYRS(配列番号:10),  
CCTKSGCNHPDLDVQYR(配列番号:11), CCTKSGCNHPDLDVQY(配列番号:12),  
CCTKSGCNHPDLDVQ(配列番号:13), CGSSDMSCERGRHQSL(配列番号:14)又は  
KSGCNHPDLD(配列番号:16)

からなる単離された又は精製されたペプチドを提供する。また、エピトープ配列は、より長い配列の一部、例えば、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150又は200アミノ酸であり、該より長めの配列は、ヒトuPARの断片であり、該エピトープ配列を含む。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

一実施態様において、本発明は、(i)本発明のペプチド(場合により精製されている)を使用して哺乳動物を免疫化すること；(ii)該哺乳動物から脾細胞を単離すること；(iii)該脾細胞を骨髄腫細胞へ融合させること；及び(iv)ハイブリドーマを選別することを含む、抗体を製造する方法を提供する。別の実施態様において、本発明は、(i)ヒトuPAR(配列番号15)の(a)

【化2】

CCTKSGCNHPDLDVQYRSG(配列番号:9), CCTKSGCNHPDLDVQYRS(配列番号:10),  
CCTKSGCNHPDLDVQYR(配列番号:11), CCTKSGCNHPDLDVQY(配列番号:12)又は  
CCTKSGCNHPDLDVQ(配列番号:13)

；及び(b)

【化3】

CGSSDMSCERGRHQSL(配列番号:14)

によって定義されるコンホメーション依存的エピトープを含むエピトープを使用して哺乳動物を免疫化すること；(ii)該哺乳動物から脾細胞を単離すること；(iii)該脾細胞を骨髄腫細胞へ融合させること；及び(iv)該ペプチドを結合する抗体を分泌するハイブリドーマを選別することを含む、抗体を製造する方法を提供する。いくつかの実施態様において、本発明は、(i)ヒトuPAR(配列番号15)の(a)

【化4】

KSGCNHPDLD(配列番号16)

；及び(b)

【化5】

CGSSDMSCERGRHQSL(配列番号14)

によって定義されるコンホメーション依存的エピトープを含むエピトープを使用して哺乳動物を免疫化すること；(ii)該哺乳動物から脾細胞を単離すること；(iii)該脾細胞を骨髄腫細胞へ融合させること；及び(iv)該ペプチドを結合する抗体を分泌するハイブリドーマを選別することを含む、抗体を製造する方法を提供する。特定の実施態様において、抗体を製造する方法は、(i)ヒトuPAR(配列番号15)の(a)

【化6】

KSGCNHPDLD(配列番号16)

；及び(b)

【化7】

CGSSDMSCERGRHQSL(配列番号14)

によって定義されるコンホメーション依存的エピトープを含む(場合により精製されている)ヒトuPARの断片を使用して哺乳動物を免疫化すること；(ii)該哺乳動物から脾細胞

を単離すること；(iii)該脾細胞を骨髄腫細胞へ融合させること；及び(iv)該断片に結合する抗体を分泌するハイブリドーマを選別することを含む。一実施態様において、抗体を製造する方法は、(i)ヒトuPAR(配列番号15)のドメイン2及び3を含むヒトuPARの断片(場合により精製されている)を使用して哺乳動物を免疫化すること；(ii)該哺乳動物から脾細胞を単離すること；(iii)該脾細胞を骨髄腫細胞へ融合させること；及び(iv)該断片を結合する抗体を分泌するハイブリドーマを選別することを含む。別の実施態様において、抗体を製造する方法は、(i)ヒトuPAR(配列番号15)の単離された断片のアミノ末端がアミノ酸番号93～98の何れか1つにあり、かつ該断片のカルボキシ末端がアミノ酸277～283の何れか1つにある該断片、又は該断片の配列に対して保存的置換のみを含有するその誘導体を使用して、哺乳動物を免疫化すること；(ii)該哺乳動物から脾細胞を単離すること；(iii)該脾細胞を骨髄腫細胞へ融合させること；及び(iv)該断片を結合する抗体を分泌するハイブリドーマを選別することを含む。具体的な実施態様において、哺乳動物は、非ヒト哺乳動物、例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ラット、ネコ、イヌ等である。別の実施態様において、哺乳動物はヒトである。ファージディスプレイを使用して抗体を製造する方法も、本発明によって包含される。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

本発明は、アミノ酸配列

【化8】

CCTKSGCNHPDLDVQYRSG(配列番号:9), CCTKSGCNHPDLDVQYRS(配列番号:10),  
CCTKSGCNHPDLDVQYR(配列番号:11), CCTKSGCNHPDLDVQY(配列番号:12)又は  
CCTKSGCNHPDLDVQ(配列番号:13)

によって定義されるエピトープへ免疫特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を提供する。ある実施態様において、抗原又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列

【化9】

KSGCNHPDLD(配列番号16)

によって定義されるエピトープへ免疫特異的に結合する。ある実施態様において、アミノ酸残基268にあるエピトープを変異させることは、抗体の免疫特異的結合親和性を低下させ又は消滅させる。別段の明白な記載がない限り、ヒトuPAR配列におけるアミノ酸番号に対する本願におけるすべての引用が、図1において示される22個のアミノ末端の酸を欠失する加工されたuPARのアミノ末端から付番することを指すことは留意されるべきである。また、本発明は、(i)

【化10】

CCTKSGCNHPDLDVQYRSG(配列番号:9), CCTKSGCNHPDLDVQYRS(配列番号:10),  
CCTKSGCNHPDLDVQYR(配列番号:11), CCTKSGCNHPDLDVQY(配列番号:12)又は  
CCTKSGCNHPDLDVQ(配列番号:13)

；及び(ii)ヒトuPAR(配列番号15)内の

【化11】

## CGSSDMSCERGRHQSL (配列番号14)

によって定義されるコンホメーション依存的エピトープへ免疫特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施態様において、抗体又はその抗原結合断片は、(i)

【化12】

## KSGCNHPDLD (配列番号16)

;及び(ii)ヒトuPAR(配列番号15)内の

【化13】

## CGSSDMSCERGRHQSL (配列番号14)

によって定義されるコンホメーション依存的エピトープへ免疫特異的に結合する。いくつかの実施態様において、ヒトuPARにおける位置268にあるK(Lys)残基がE(Glu)残基へ(uPAR K268E)又はA(Ala)残基へ(uPAR K268A)変異する場合、エピトープに対する抗体の結合は、該抗体による該結合の低下によって示される。好ましくは、結合の量は、抗体とuPAR K268E又はuPAR K268Aとの共免疫沈降によって示される。他の実施態様において、ヒトuPARにおける位置273にあるH(His)残基がA(Ala)残基へ変異する場合(uPAR H273A)、エピトープに対する抗体の結合は、該抗体による該結合の低下によって示される。好ましくは、結合の量は、抗体とuPAR H273Aとの共免疫沈降によって示される。具体的な実施態様において、ヒトuPARにおける位置275又は277にあるD(Asp)残基がA(Ala)残基へ変異する場合(それぞれuPAR D275A又はuPAR D277A)、エピトープに対する抗体の結合は、該抗体による該結合の低下によって示される。好ましくは、結合の量は、抗体とuPAR D275A又はuPAR D277Aそれぞれとの共免疫沈降によって示される。上述の実施態様において、例えば、抗体による結合の低下は、抗体と共免疫沈降する野生型uPAR(例えば、膜結合型uPAR若しくはsuPAR)又はsuPARの断片(例えば、D2D3 suPAR)の量に対する、抗体と共免疫沈降する変異したuPAR(例えば、uPAR K268E、uPAR K268A、uPAR H273A、uPAR D275A、又はuPAR D277A)の減少した量によって示される。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

【表2】

表2: uPARエピトープ配列

配列	ヒトuPARのアミノ酸 <sup>1</sup>	配列番号
CCTKSGCNHPDLDVQYRSG	265-283	9
CCTKSGCNHPDLDVQYRS	265-282	10
CCTKSGCNHPDLDVQYR	265-281	11
CCTKSGCNHPDLDVQY	265-280	12
CCTKSGCNHPDLDVQ	265-279	13
CGSSDMSCERGRHQSL	98-114	14
KSGCNHPDLD	268-277	16

<sup>1</sup>アミノ酸の番号付けは、uPARの加工された形態を反映する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0051

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0051】

(5.2. uPAR抗体)

本発明は、配列番号9、10、11、12又は13のアミノ酸配列によって定義されるuPARのエピトープへ免疫特異的に結合する、単離された抗体又はその抗原結合断片を提供する。また、本発明は、(i)

【化16】

CCTKSGCNHPDLDVQYRSG (配列番号: 9), CCTKSGCNHPDLDVQYRS (配列番号: 10),  
CCTKSGCNHPDLDVQYR (配列番号: 11), CCTKSGCNHPDLDVQY (配列番号: 12) 又は  
CCTKSGCNHPDLDVQ (配列番号: 13)

; 及び (ii) ヒトuPAR (配列番号15) 内での

【化17】

CGSSDMSCERGRHQSL (配列番号14)

によって定義されるコンホメーション依存的エピトープへ免疫特異的に結合する、単離された抗体又はその抗原結合断片を提供する。本発明は、配列番号16のアミノ酸配列によって定義されるuPARのエピトープへ免疫特異的に結合する、単離された抗体又はその抗原結合断片を提供する。また、本発明は、(i)

【化18】

KSGCNHPDLD (配列番号16)

; 及び (ii) ヒトuPAR (配列番号15) 内での

【化19】

CGSSDMSCERGRHQSL (配列番号14)

によって定義されるコンホメーション依存的エピトープへ免疫特異的に結合する、単離された抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

表2におけるエピトープ配列は、本発明の抗体の製造のための免疫原として使用される。一実施態様において、アミノ酸配列

【化20】

CCTKSGCNHPDLDVQYRSG (配列番号: 9), CCTKSGCNHPDLDVQYRS (配列番号: 10),  
CCTKSGCNHPDLDVQYR (配列番号: 11), CCTKSGCNHPDLDVQY (配列番号: 12),  
CCTKSGCNHPDLDVQ (配列番号13), KSGCNHPDLD (配列番号16) 又は  
CGSSDMSCERGRHQSL (配列番号: 14)

からなるペプチドが使用される。

別の実施態様において、アミノ酸配列

【化21】

CCTKSGCNHPDLDVQYRSG (配列番号: 9), CCTKSGCNHPDLDVQYRS (配列番号: 10),

CCTKSGCNHPDLDVQYR (配列番号: 11), CCTKSGCNHPDLDVQY (配列番号: 12),

CCTKSGCNHPDLDVQ (配列番号: 13), 又は CGSSDMSCERGRHQSL (配列番号: 14)

を含む20、30、40、50、60又は100個までのアミノ酸のヒトuPARの断片が使用される。一実施態様において、アミノ酸配列

【化22】

KSGCNHPDLD (SEQ ID NO: 16)

を含む20、30、40、50、60又は100個までのアミノ酸のヒトuPARの断片が使用される。さらに別の実施態様において、(i)

【化23】

CCTKSGCNHPDLDVQYRSG (配列番号: 9), CCTKSGCNHPDLDVQYRS (配列番号: 10),

CCTKSGCNHPDLDVQYR (配列番号: 11), CCTKSGCNHPDLDVQY (配列番号: 12) 又は

CCTKSGCNHPDLDVQ (配列番号: 13)

; 及び (ii) ヒトuPAR (配列番号15) 内での

【化24】

CGSSDMSCERGRHQSL (配列番号14)

によって定義されるコンホメーション依存的エピトープを含むペプチドが使用される。具体的な実施態様において、(i)

【化25】

KSGCNHPDLD (配列番号16)

; 及び (ii) ヒトuPAR (配列番号15) 内での

【化26】

CGSSDMSCERGRHQSL (配列番号14)

を含み又はそれに代わるものとして (i) 及び (ii) からなるペプチドが使用される。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0258

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0258】

非相同的ミドリザル残基の各々を、対応するヒト残基へ変化させた（例えば、アミノ酸125をMからVへ変化させ、アミノ酸192をHからRへ変化させた等）。すべてのアミノ酸番号は、すなわち22個のアミノ酸シグナルペプチドを除去した後のヒトuPARの成熟した加工された形態を指す。S2細胞における一過性発現後の変異したサルsuPARを免疫沈降させるATN-658の能力について、これらの変化の効果を評価した。結合を回復した唯一の変異は、アミノ酸268をEからKへ変異させる場合であった（図5B参照）。アミノ酸262及び264を変

異させることは、サルuPARに対するATN-658の結合に何ら効果を有さなかつたので、エピトープのN末端をアミノ酸265として定義した。アミノ酸267で出発するヒトuPARのアラニン系統的変異導入法は、エピトープの一部であるとして、アミノ酸277(D)を通じてアミノ酸268(K)を同定した(図6)。Vajdosらの文献(2002, J Mol Biol. 320(2):415-28)、Nishiharaらの文献(2001, J Immunol. 167(6):3266-75)、及びZhangらの文献(1999, Int Immunol. 11(12): 1935-44)を参照されたい。ヒトuPARにおいてアミノ酸268(K)、273(H)、275(D)、又は277(D)をAlaへ変異させ多結果、共免疫沈降アッセイによって示されるように、変異したヒトuPARに対するATN-658の低下した結合が生じた。エピトープは連續的であるように見えるが、uPARがATN-658によって認識される能力を低下が破壊する点において、該エピトープはコンホメーション依存的エピトープであり得る。このことは、エピトープを安定化するように見えるエピトープ(Cys266~Cys271)内にジスルフィドループがあるという事実によるようである。エピトープ配列を以下に示す。

【化27】

C C T K S G C N H P D L D V Q Y R S G (配列番号9)

【手続補正9】

【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】

2010512324000001.app