

(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2009-534466

(P2009-534466A)

(43) 公表日 平成21年9月24日(2009.9.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/44 (2006.01)	C O 7 K 16/44 Z N A	4 B O 2 4
C12N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 4
C12N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B O 6 5
G01N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 S	4 H O 4 5
G01N 33/566 (2006.01)	G O 1 N 33/566	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-507787 (P2009-507787)
 (86) (22) 出願日 平成19年4月24日 (2007. 4. 24)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年12月16日 (2008.12.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/010076
 (87) 国際公開番号 W02008/054517
 (87) 国際公開日 平成20年5月8日 (2008. 5. 8)
 (31) 優先権主張番号 60/794, 370
 (32) 優先日 平成18年4月24日 (2006. 4. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/856, 614
 (32) 優先日 平成18年11月3日 (2006. 11. 3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 11/788, 949
 (32) 優先日 平成19年4月23日 (2007. 4. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

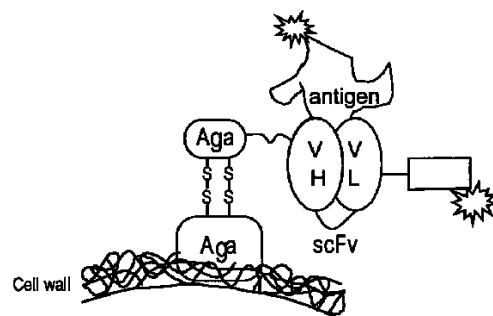
(71) 出願人 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
 パーク アボット パーク ロード 100
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100140523
 弁理士 渡邊 千尋
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫抑制結合抗体並びにその入手及び使用方法

(57) 【要約】

本発明は、とりわけ、少なくとも1種類の目的薬剤（例えば、免疫抑制剤）に免疫特異的に結合する抗体、かかる抗体を製造する方法、及び該抗体を用いた免疫測定法に関する。さらに、本発明は、診断免疫測定用抗体を選択する方法、及び診断免疫測定用抗原を選択する方法にも関する。本発明は、さらに、活性親薬物の主要な代謝産物の1種類以上の存在下における活性親薬物の抗体認識の改善にも関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体が少なくとも 1 種類の選択希釈剤に曝露されなかったとき、又は該選択希釈剤と一緒にインキュベートされなかったときに、 1.9×10^{-11} M 未満の平衡解離定数 (K_D) で免疫抑制剤に特異的に結合する単離抗体。

【請求項 2】

免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシンの標的、インターロイキン 2 鎖遮断薬、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、コルチコステロイド又は免疫抑制代謝拮抗剤である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

抗体が少なくとも 1 種類の選択希釈剤と一緒にインキュベートされるとき、該選択希釈剤に曝露されるとき、又は該選択希釈剤の存在下にあるときに、 1.52×10^{-10} M 未満の平衡解離定数 (K_D) で免疫抑制剤に特異的に結合する単離抗体。

【請求項 4】

選択希釈剤が、緩衝剤、塩、洗浄剤、結合競合剤、溶媒又はこれらの組合せを含む、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシンの標的、インターロイキン 2 鎖遮断薬、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、コルチコステロイド又は免疫抑制代謝拮抗剤である、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 6】

ATCC 受託番号 PTA-7436 のチャイニーズハムスター卵巣細胞系 1-60-46 AM2 CHO 2-577。

【請求項 7】

ATCC 受託番号 PTA-7436 のチャイニーズハムスター卵巣細胞系 1-60-46 AM2 CHO 2-577 から抽出された DNA から作製された抗体。

【請求項 8】

タクロリムス 1-60-46 AM2 CHO 2-577 と命名された、ATCC 受託番号 PTA-7436 のチャイニーズハムスター卵巣細胞系によって産生されるキメラ抗体又はそのタクロリムス結合断片。

【請求項 9】

タクロリムス 1-60-46 AM2 CHO 1-1157 と命名された、ATCC 受託番号 PTA-7446 のチャイニーズハムスター卵巣細胞系。

【請求項 10】

タクロリムス 1-60-46 AM2 CHO 1-1157 と命名された、ATCC 受託番号 PTA-7446 のチャイニーズハムスター卵巣細胞系から抽出された DNA から作製された抗体。

【請求項 11】

タクロリムス 1-60-46 AM2 CHO 1-1157 と命名された、ATCC 受託番号 PTA-7446 のチャイニーズハムスター卵巣細胞系によって産生されるキメラ抗体又はそのタクロリムス結合断片。

【請求項 12】

可変重ドメイン及び可変軽ドメインを有し、可変重ドメインは、重鎖相補性決定領域 (「CDR」) 1、重鎖 CDR 2 及び重鎖 CDR 3 を含み、可変軽ドメインは軽鎖 CDR 1、軽鎖 CDR 2 及び軽鎖 CDR 3 を含み、

(a) 重鎖 CDR 1 は、Gly - Phe - Thr - Phe - Ser - Ser - Tyr - Gly - Met - Ser (配列番号 2) のアミノ酸配列を有し、

(b) 重鎖 CDR 2 は、Thr - Ile - Ser - Ser - Gly - Gly - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Phe (配列番号 33) の式のアミノ酸配列を有し

(式中、Xaa₁ は、トレオニン (Thr)、アラニン (Ala)、リジン (Lys)

10

20

30

40

50

及びグルタミン酸 (G l u) からなる群から選択され、

X a a₂ は、チロシン (T y r) 及びトリプトファン (T r p) からなる群から選択され、

X a a₃ は、トレオニン (T h r) 及びバリン (V a l) からなる群から選択される。)、

(c) 重鎖 C D R 3 は、G l n - T h r - A s p - G l y - T y r - S e r - T r p - P h e - P r o - T y r (配列番号 6) のアミノ酸配列を有し、

(d) 軽鎖 C D R 1 は、L y s - S e r - S e r - X a a₄ - X a a₅ - X a a₆ - V a l - H i s - S e r - T h r - G l y - A s n - T h r - P h e - L e u - G l u (配列番号 3 4) の式のアミノ酸配列を有し

(式中、X a a₄ は、グルタミン (G l n)、アラニン (A l a) 及びグリシン (G l y) からなる群から選択され、

X a a₅ は、セリン (S e r) 及びグリシン (G l y) からなる群から選択され、

X a a₆ は、イソロイシン (I l e) 及びロイシン (L e u) からなる群から選択される。)、

(e) 軽鎖 C D R 2 は、L y s - I l e - S e r - A s n - A r g - P h e - S e r (配列番号 1 1) の式のアミノ酸配列を有し、

(f) 軽鎖 C D R 3 は、P h e - G l n - G l y - X a a₇ - X a a₈ - X a a₉ - P r o - L e u - T h r (配列番号 3 5) の式のアミノ酸配列を有し

(式中、X a a₇ は、セリン (S e r) 及びグリシン (G l y) からなる群から選択され、

X a a₈ は、ヒスチジン (H i s)、アルギニン (A r g)、バリン (V a l)、トレオニン (T h r)、リジン (L y s) 及びセリン (S e r) からなる群から選択され、

X a a₉ は、バリン (V a l)、アラニン (A l a)、アスパラギン酸 (A s p)、システイン (C y s) 及びセリン (S e r) からなる群から選択される。)、

ただし、重鎖 C D R 2 において X a a₁ が T h r であり、X a a₂ が T y r であり、X a a₃ が T h r であり、軽鎖 C D R 1 において X a a₄ が G l n であり、X a a₅ が S e r であり、X a a₆ が I l e である場合、軽鎖 C D R 3 において X a a₇ が S e r であり、X a a₈ が H i s である場合には X a a₉ は V a l 以外であり、又は X a a₇ が S e r であり、X a a₉ が V a l である場合には X a a₈ は H i s 以外であり、又は X a a₈ が H i s であり、X a a₉ が V a l である場合には X a a₇ は S e r 以外である、
タクロリムスに特異的に結合する単離抗体。

【請求項 1 3】

請求項 1、3、7、8、10、11 又は 12 の抗体を含む、タクロリムス用診断免疫測定法。

【請求項 1 4】

免疫抑制剤に特異的に結合する単一の抗体を含む、請求項 1 3 に記載の免疫測定法。

【請求項 1 5】

タクロリムスに対する追加の特異的結合パートナーを更に含む、請求項 1 3 に記載の免疫測定法。

【請求項 1 6】

a) 少なくとも 1 種類の選択希釈剤の存在下で、少なくとも 1 種類の抗体を試料と接触させる段階 (該試料は、該抗体が結合すると考えられる目的エピトープを含み、該抗体は、バイオディスプレイ形式で存在する。)、

b) 抗体の平衡解離定数 (K_D)、分離速度定数 (k_d)、会合速度定数 (k_a) 又は機能活性を求める段階、及び

c) 段階 b) で求めた平衡解離定数、分離速度定数、会合速度定数又は機能活性に基づいて抗体を選択する段階

を含む、抗体が目的エピトープに結合する、診断免疫測定用抗体を選択する方法。

【請求項 1 7】

10

20

30

40

50

選択希釈剤が、緩衝剤、塩、洗浄剤、結合競合剤、溶媒又はこれらの組合せを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

試料が免疫抑制剤を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシンの標的、インターロイキン 2 鎖遮断薬、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、コルチコステロイド又は免疫抑制代謝拮抗剤である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

a) 少なくとも 1 種類の選択希釈剤の存在下で、少なくとも 1 種類の抗体をインキュベートする段階（該抗体はバイオディスプレイ形式で存在する。）、

b) 前記抗体を試料と接触させる段階（該試料は、該抗体が結合すると考えられる目的エピトープを含む。）、

c) 抗体の平衡解離定数 (K_D)、分離速度定数 (k_d)、会合速度定数 (k_a) 又は機能活性を求める段階、及び

d) 段階 c) で求めた平衡解離定数、分離速度定数、会合速度定数又は機能活性に基づいて抗体を選択する段階

を含む、抗体が目的エピトープに結合する、診断免疫測定用抗体を選択する方法。

【請求項 21】

選択希釈剤が、緩衝剤、塩、洗浄剤、結合競合剤、溶媒又はこれらの組合せを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

試験試料が免疫抑制剤を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシンの標的、インターロイキン 2 鎖遮断薬、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、コルチコステロイド又は免疫抑制代謝拮抗剤である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

a) 少なくとも 1 種類の選択希釈剤の存在下で、特異的結合パートナーを試料と接触させる段階（該試料は目的エピトープを含み、特異的結合パートナーは目的エピトープに結合し、該特異的結合パートナーはバイオディスプレイ形式で存在する。）、

b) 特異的結合パートナーの平衡解離定数 (K_D)、分離速度定数 (k_d)、会合速度定数 (k_a) 又は機能活性を求める段階、及び

c) 段階 b) で求めた特異的結合パートナーの平衡解離定数、解離速度定数、会合速度定数又は機能活性に基づいて特異的結合パートナーを選択する段階

を含む、診断免疫測定用試験試料中の目的分析物を検出するための特異的結合パートナーを選択する方法。

【請求項 25】

選択希釈剤が、緩衝剤、塩、洗浄剤、結合競合剤、溶媒又はこれらの組合せを含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

分析物が免疫抑制剤である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシンの標的、インターロイキン 2 鎖遮断薬、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、コルチコステロイド又は免疫抑制代謝拮抗剤である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

(a) 酵母細胞の表面に存在する抗体を含む酵母ディスプレイライブラリーを得る段階、

(b) 結合競合剤の存在下で、前記酵母細胞を薬剤と接触させる段階、

10

20

30

40

50

(c) 前記結合競合剤の存在下で前記薬剤との結合を示す抗体が表面に表示された酵母細胞を特定する段階(かかる結合は、該薬剤に対する特異性が改善されたことを示す。)を含む、酵母ディスプレイを用いて、薬剤に対する特異性が改善された抗体をスクリーニングする方法。

【請求項 29】

前記結合競合剤が過剰に存在する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記薬剤が免疫抑制剤を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記結合競合剤が前記免疫抑制剤の代謝産物である、請求項 29 に記載の方法。

10

【請求項 32】

前記免疫抑制剤が、シクロスポリン及びタクロリムスからなる群から選択される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

前記代謝産物が、M - I、M - II、M - III、M 1、M 8、M 9、M 13、M 17、M 18、M 21 及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

前記代謝産物が M 17 及び M 1 を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

20

(a) バイオディスプレイ形式で存在する抗体を含むライブラリーを得る段階(該抗体は変異を含む。)、

(b) 少なくとも 1 種類の選択希釈剤の存在下で、前記抗体を、エピトープを含む試料と接触させる段階、及び

(c) 前記選択希釈剤の存在下で、変異を含まない類似の抗体の解離速度よりも低い解離速度を示す、前記バイオディスプレイ形式で存在する抗体を特定する段階(かかる低解離速度は、前記エピトープに対する親和性が改善されたことを示す。)を含む、目的エピトープに対する親和性が改善された抗体をスクリーニングする方法。

【請求項 36】

前記抗体を前記試料及び前記選択希釈剤と接触させる段階が同時に、又は逐次的に実施される、請求項 35 に記載の方法。

30

【請求項 37】

選択希釈剤が、緩衝剤、塩、洗浄剤、結合競合剤、溶媒又はこれらの組合せを含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

試料が免疫抑制剤を含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 39】

免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシンの標的、インターロイキン 2 鎖遮断薬、イノシン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、コルチコステロイド又は免疫抑制代謝拮抗剤である、請求項 38 に記載の方法。

40

【請求項 40】

(a) バイオディスプレイ形式で存在する特異的結合パートナーを含むライブラリーを得る段階(該特異的結合パートナーは変異を含む。)、

(b) 少なくとも 1 種類の選択希釈剤の存在下で、前記特異的結合パートナーを、エピトープを含む試料と接触させる段階、及び

(c) 前記選択希釈剤の存在下で、変異を含まない類似の特異的結合パートナーの解離速度よりも低い解離速度を示す、前記バイオディスプレイ形式で存在する特異的結合パートナーを特定する段階(かかる低解離速度は、前記エピトープに対する親和性が改善されたことを示す。)

を含む、目的エピトープに対する親和性が改善された特異的結合パートナーをスクリーニ

50

ングする方法。

【請求項 4 1】

前記抗体を前記試料及び前記選択希釈剤と接触させる段階が同時に、又は逐次的に実施される、請求項 4 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願情報

本願は、2006年11月3日に出願された米国特許出願第60/856,614号、2006年4月24日に
出願された米国特許出願第60/794,370号、及び2007年4月23日に事件番号第8166US01号(Express Mail EV 959284219 US)として出願された米国出願の優先権を主張するものである。

10

【0002】

とりわけ、本発明は、少なくとも1種類の目的薬剤に、例えば免疫抑制剤に、高い結合親和性で免疫特異的に結合する抗体に関する。本発明は、目的薬剤(例えば、免疫抑制剤)に対する抗体を製造する方法、及び該抗体を用いた免疫測定法にも関する。さらに、本発明は、診断免疫測定用抗体を選択する方法、及び診断免疫測定用抗原を選択する方法に関する。本発明は、さらに、活性親薬物の主要な代謝産物の1種類以上の存在下における活性親薬物の抗体認識の改善にも関する。

【背景技術】

20

【0003】

FK506としても知られるタクロリムスは、土壌中の細菌ストレプトミセス ツクバエンス(*Streptomyces tsukubaensis*)によって産生されるマクロライド免疫抑制剤の一般名である(Inamura, N., et al., *Transplantation*, 45(1):206-209(1988)参照)。タクロリムスの第一世代の主要な代謝産物は、13-O-脱メチル化タクロリムス(「M-I」)、31-O-脱メチル化タクロリムス(「M-II」)及び15-O-脱メチル化タクロリムス(「M-III」)である。タクロリムスは、特に肝臓、腎臓又は骨髄移植を受けた患者において、臓器拒絶防止のために静脈内及び経口的に使用されている。

【0004】

30

シクロスポリン(「CsA」)は、ある種の土壤菌類から得られる免疫抑制剤である。CsAは、移植後の臓器拒絶防止のために主に使用されるが、再生不良性貧血などの他の疾病の治療、又は移植片対宿主病(GVHD)の予防にも使用されている。

【0005】

タクロリムスは、シクロスポリンCsAの50-100倍のインピボでの効力がある(Murthy, J.N., et al., *Clinical Biochemistry*, 31(8):613-617(1998)参照)。タクロリムスの免疫抑制効果は、CsAとほぼ同じであり、細胞傷害性T細胞の生成の選択的阻害によると考えられる。同上。分子レベルでは、タクロリムスは、T細胞応答における初期転写活性を選択的に遮断すると考えられる。同上。タクロリムスのこの作用は、イムノフィリンと称する特定の細胞質タンパク質に薬物が結合して、複合体を形成することに起因する。同上。この複合体は、カルシウム依存性カルシニューリン-カルモジュリントランスロケーション経路と相互作用し、IL-2 mRNAの転写に必要なIL-2 遺伝子のエンハンサーポリヌクレオチド配列に結合する転写因子(「NF-AT」)の核移行を阻害する。

40

【0006】

臨床的に、タクロリムスは、移植患者における拒絶発症を減少させることが知られている。タクロリムスは、治療上有益であるが、腎毒性、胃腸管合併症及び神経毒性を含めて、CsAに類似したある毒性を示す。同上。CsAとは異なり、タクロリムスは、多毛症や高コレステロール血症を起こさない。同上。タクロリムスに関係した毒性問題を考慮して、この薬物による治療を受けた患者においてタクロリムスの血中濃度をモニターするた

50

めに、免疫測定法が用いられる。

【0007】

種々の診断免疫測定法が、タクロリムスの血中濃度をモニターするために市販されている。これらの免疫測定法の幾つかは、全血試料からタクロリムスを抽出するために有機溶媒を用いる。有機溶媒は、アッセイに用いる抗体の平衡解離定数 (K_D) を増加させ、及び/又は機能活性を低下させる。抗体の活性が低下すると、アッセイ感度が低下し、精度及び堅牢性が低下するおそれがある。抽出プロセス中に使用する有機溶媒の量を削減することによって、アッセイ感度を増加させる試みが成されている。しかし、溶媒量の削減は、抽出効率、したがってアッセイの再現性に影響を及ぼすことが判明した。

【0008】

同様に、例えば抗シクロスポリン抗体を利用して、CsAの血中濃度をモニターするために、種々の診断免疫測定法が市販されている。最新の文献によれば、CsA代謝産物が生成すると、活性親薬物 (CsA) の濃度がかき消されるおそれがある。CsA免疫抑制剤の適切な用量決定は、臓器移植患者にとって極めて重要である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、かかる診断免疫測定法に使用することができる (親和性、特異性などの) 結合特性が改善された新しい抗体が当分野で求められている。かかる抗体のスクリーニング方法及び入手方法も求められている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

一態様においては、本発明は、抗体が、少なくとも1種類の選択希釈剤 (selection diluent) に曝露されなかったとき、又は該選択希釈剤と一緒にインキュベートされなかったときに、 1.9×10^{-11} M未満の平衡解離定数 (K_D) で免疫抑制剤に特異的に結合する抗体 (例えば、単離抗体) に関する。好ましくは、抗体は、 1.89×10^{-11} Mから 1.0×10^{-13} Mの K_D を有し、より好ましくは 1.89×10^{-11} Mから 1.0×10^{-12} Mの K_D を有する。

【0011】

前記抗体が免疫特異的に結合する免疫抑制剤は、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシンの標的、インターロイキン2 鎖遮断薬、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、コルチコステロイド又は免疫抑制代謝拮抗剤であり得る。

【0012】

別の態様においては、本発明は、抗体が少なくとも1種類の選択希釈剤と一緒にインキュベートされるとき、該選択希釈剤に曝露されるとき、又は該選択希釈剤の存在下にあるときに、 1.52×10^{-10} M未満の K_D で免疫抑制剤に特異的に結合する単離抗体に関する。

【0013】

好ましくは、抗体は、 1.51×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mの K_D を有し、より好ましくは 1.51×10^{-10} Mから 1.0×10^{-11} Mの K_D を有する。前記抗体が免疫特異的に結合する免疫抑制剤は、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシンの標的、インターロイキン2 鎖遮断薬、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、コルチコステロイド又は免疫抑制代謝拮抗剤であり得る。

【0014】

少なくとも1種類の選択希釈剤は、緩衝剤、塩、洗浄剤、結合競合剤 (binding competitor)、溶媒又はこれらの組合せを含み得る。緩衝剤は、MES、MOPS、HEPES、TRIS、リン酸塩、クエン酸塩又はホウ酸塩であり得る。塩は、NaCl、KCl又は硫酸亜鉛であり得る。洗浄剤は、陰イオン洗浄剤、陽イオン洗浄剤、非イオン洗浄剤又は双性イオン洗浄剤であり得る。結合競合剤は、代謝産物ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオ

10

20

30

40

50

チド、ポリヌクレオチド、又は目的エピトープよりも親和性の低い交差反応物であり得る。溶媒は、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ポリエチレングリコール、エチレングリコール、メタノール、エタノール又はこれらの組合せであり得る。

【0015】

別の態様においては、本発明は、ATCC受託番号PTA-7436の(「CHO細胞系：タクロリムス1-60-46 AM2 CHO 2-577」又は「タクロリムス1-60-46 AM2 CHO 2-577」としても知られる)チャイニーズハムスター卵巣細胞系1-60-46 AM2 CHO 2-577、ATCC受託番号PTA-7436のチャイニーズハムスター卵巣細胞系1-60-46 AM2 CHO 2-577から抽出されたDNAから作製された抗体、及びチャイニーズハムスター卵巣細胞系1-60-46 AM2 CHO 2-577(該細胞系はATCC受託番号PTA-7436である。)によって産生されるキメラ抗体又はそのタクロリムス結合断片に関する。

10

【0016】

更に別の態様においては、本発明は、ATCC受託番号PTA-7446の(「CHO細胞系：タクロリムス1-60-46 AM2 CHO 1-1157」又は「タクロリムス1-60-46 AM2 CHO 1-1157」又は「1-1157」としても知られる)チャイニーズハムスター卵巣細胞系1-60-46 AM2 CHO 1-1157、ATCC受託番号PTA-7446のチャイニーズハムスター卵巣細胞系1-60-46 AM2 CHO 1-1157から抽出されたDNAから作製された抗体、及びチャイニーズハムスター卵巣細胞系1-60-46 AM2 CHO 1-1157(該細胞系はATCC受託番号PTA-7446である。)によって産生されるキメラ抗体又はそのタクロリムス結合断片に関する。

20

【0017】

更に別の態様においては、本発明は、タクロリムスに特異的に結合する単離抗体に関する。前記抗体は、可変重ドメイン(heavy domain)及び可変軽ドメイン(light domain)を有し、可変重ドメインは、重鎖相補性決定領域(「CDR」)1、重鎖CDR2及び重鎖CDR3を含み、可変軽ドメインは軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖CDR3を含む。ここで、

30

(a)重鎖CDR1は、Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Tyr-Gly-Met-Ser(配列番号2)のアミノ酸配列を有し、

(b)重鎖CDR2は、Thr-Ile-Ser-Ser-Gly-Gly-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Phe(配列番号33)の式のアミノ酸配列を有し

(式中、Xaa₁は、トレオニン(Thr)、アラニン(Ala)、リジン(Lys)及びグルタミン酸(Glu)からなる群から選択され、

Xaa₂は、チロシン(Tyr)及びトリプトファン(Trp)からなる群から選択され、

Xaa₃は、トレオニン(Thr)及びバリン(Val)からなる群から選択される。)

40

(c)重鎖CDR3は、Gln-Thr-Asp-Gly-Tyr-Ser-Trp-Phe-Pro-Tyr(配列番号6)のアミノ酸配列を有し、

(d)軽鎖CDR1は、Lys-Ser-Ser-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Val-His-Ser-Thr-Gly-Asn-Thr-Phe-Leu-Glu(配列番号34)の式のアミノ酸配列を有し

(式中、Xaa₄は、グルタミン(Gln)、アラニン(Ala)及びグリシン(Gly)からなる群から選択され、

Xaa₅は、セリン(Ser)及びグリシン(Gly)からなる群から選択され、

Xaa₆は、イソロイシン(Ile)及びロイシン(Leu)からなる群から選択される。)

(e)軽鎖CDR2は、Lys-Ile-Ser-Asn-Arg-Phe-Ser(

50

配列番号 11) の式のアミノ酸配列を有し、

(f) 軽鎖 CDR3 は、Phe - Gln - Gly - Xaa₇ - Xaa₈ - Xaa₉ - Pro - Leu - Thr (配列番号 35) の式のアミノ酸配列を有し

(式中、Xaa₇ は、セリン (Ser) 及びグリシン (Gly) からなる群から選択され、

Xaa₈ は、ヒスチジン (His)、アルギニン (Arg)、バリン (Val)、トレオニン (Thr)、リジン (Lys) 及びセリン (Ser) からなる群から選択され、

Xaa₉ は、バリン (Val)、アラニン (Ala)、アスパラギン酸 (Asp)、システイン (Cys) 及びセリン (Ser) からなる群から選択される。)、

ただし、重鎖 CDR2 において Xaa₁ が Thr であり、Xaa₂ が Tyr であり、Xaa₃ が Thr であり、軽鎖 CDR1 において Xaa₄ が Gln であり、Xaa₅ が Ser であり、Xaa₆ が Ile である場合、軽鎖 CDR3 において Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が His である場合には Xaa₉ は Val 以外であり、又は Xaa₇ が Ser であり、Xaa₉ が Val である場合には Xaa₈ は His 以外であり、又は Xaa₈ が His であり、Xaa₉ が Val である場合には Xaa₇ は Ser 以外である。

【0018】

上記抗体においては、(1) Xaa₁ が Thr であり、Xaa₂ が Trp であり、Xaa₃ が Thr であり、Xaa₄ が Gln であり、Xaa₅ が Ser であり、Xaa₆ が Ile であり、Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が His であり、Xaa₉ が Val であり、(2) Xaa₁ が Ala であり、Xaa₂ が Trp であり、Xaa₃ が Thr であり、Xaa₄ が Gln であり、Xaa₅ が Ser であり、Xaa₆ が Ile であり、Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が His であり、Xaa₉ が Val であり、(3) Xaa₁ が Lys であり、Xaa₂ が Trp であり、Xaa₃ が Val であり、Xaa₄ が Gln であり、Xaa₅ が Ser であり、Xaa₆ が Ile であり、Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が His であり、Xaa₉ が Val であり、(4) Xaa₁ が Glu であり、Xaa₂ が Trp であり、Xaa₃ が Thr であり、Xaa₄ が Gln であり、Xaa₅ が Ser であり、Xaa₆ が Ile であり、Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が His であり、Xaa₉ が Val であり、(5) Xaa₁ が Thr であり、Xaa₂ が Tyr であり、Xaa₃ が Thr であり、Xaa₄ が Gln であり、Xaa₅ が Gly であり、Xaa₆ が Ile であり、Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が His であり、Xaa₉ が Val であり、(6) Xaa₁ が Thr であり、Xaa₂ が Tyr であり、Xaa₃ が Thr であり、Xaa₄ が Ala であり、Xaa₅ が Gly であり、Xaa₆ が Ile であり、Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が His であり、Xaa₉ が Val であり、(7) Xaa₁ が Thr であり、Xaa₂ が Tyr であり、Xaa₃ が Thr であり、Xaa₄ が Gly であり、Xaa₅ が Gly であり、Xaa₆ が Leu であり、Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が His であり、Xaa₉ が Val であり、(8) Xaa₁ が Thr であり、Xaa₂ が Tyr であり、Xaa₃ が Thr であり、Xaa₄ が Gln であり、Xaa₅ が Gly であり、Xaa₆ が Leu であり、Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が His であり、Xaa₉ が Val であり、(9) Xaa₁ が Thr であり、Xaa₂ が Tyr であり、Xaa₃ が Thr であり、Xaa₄ が Gln であり、Xaa₅ が Ser であり、Xaa₆ が Ile であり、Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が His であり、Xaa₉ が Ala であり、(10) Xaa₁ が Thr であり、Xaa₂ が Tyr であり、Xaa₃ が Thr であり、Xaa₄ が Gln であり、Xaa₅ が Ser であり、Xaa₆ が Ile であり、Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が Arg であり、Xaa₉ が Ala であり、(11) Xaa₁ が Thr であり、Xaa₂ が Tyr であり、Xaa₃ が Thr であり、Xaa₄ が Gln であり、Xaa₅ が Ser であり、Xaa₆ が Ile であり、Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が His であり、Xaa₉ が Asp であり、(12) Xaa₁ が Thr であり、Xaa₂ が Tyr であり、Xaa₃ が Thr であり、Xaa₄ が Gln であり、Xaa₅ が Ser であり、Xaa₆ が Ile であり、Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が His であり、Xaa₉ が Cys であり、(13) Xaa₁ が Thr であ

10

20

30

40

50

である。

【0019】

上記抗体は、少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露されなかったとき、又は該選択希釈剤と一緒にインキュベートされなかったときに、 1.89×10^{-11} Mから 1.0×10^{-13} Mの K_D を有し得、該抗体が少なくとも1種類の選択希釈剤と一緒にインキュベートされるとき、該選択希釈剤に曝露されるとき、又は該選択希釈剤の存在下にあるときに、 1.51×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mの K_D を有し得る。

【0020】

上記抗体は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、単鎖Fv、単鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド連結Fvs、抗イディオタイプ抗体、又は機能的に活性なそのエピトープ結合断片であり得る。

10

【0021】

更に別の態様においては、本発明は、上記抗体のいずれかを含む、タクロリムス用診断免疫測定法に関する。さらに、前記免疫測定法は、(1)免疫抑制剤に特異的に結合する単一の抗体、又は(2)タクロリムスに対する追加の特異的結合パートナーを含み得る。

【0022】

更に別の態様においては、本発明は、抗体が目的エピトープに結合する、診断免疫測定用抗体を選択する方法に関する。この方法は以下の段階を含み得る。

【0023】

a) 少なくとも1種類の選択希釈剤の存在下で、少なくとも1種類の抗体を試料と接触させる段階(該試料は、該抗体が結合すると考えられる目的エピトープを含み、前記抗体は、バイオディスプレイ(bio-display)形式で存在する。)、

20

b) 抗体の平衡解離定数(K_D)、分離(dissociation)速度定数(k_d)、会合速度定数(k_a)又は機能活性を求める段階、及び

c) 段階b)で求めた平衡解離定数、解離速度定数、会合速度定数又は機能活性に基づいて抗体を選択する段階。

【0024】

或いは、方法は以下の段階を含み得る。

【0025】

a) 少なくとも1種類の選択希釈剤の存在下で、少なくとも1種類の抗体をインキュベートする段階(該抗体はバイオディスプレイ形式で存在する。)、

30

b) 少なくとも1種類の抗体を試料と接触させる段階(該試料は、該抗体が結合すると考えられる目的エピトープを含む。)、

c) 抗体の平衡解離定数(K_D)、分離速度定数(k_d)、会合速度定数(k_a)又は機能活性を求める段階、及び

d) 段階c)で求めた平衡解離定数、分離速度定数、会合速度定数又は機能活性に基づいて抗体を選択する段階。

【0026】

上記方法においては、試料は、カルシニューリン阻害剤、ラバマイシンの標的、インターロイキン2 鎖遮断薬、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、コルチコステロイド、免疫抑制代謝拮抗剤などの免疫抑制剤を含み得る。さらに、上記方法においては、少なくとも1種類の選択希釈剤は、緩衝剤、塩、洗浄剤、結合競合剤、溶媒又はこれらの組合せを含み得る。緩衝剤は、MES、MOPS、HEPES、TRIS、リン酸塩、クエン酸塩又はホウ酸塩であり得る。塩は、NaCl、KCl又は硫酸亜鉛であり得る。洗浄剤は、陰イオン洗浄剤、陽イオン洗浄剤、非イオン洗浄剤又は双性イオン洗浄剤であり得る。結合競合剤は、代謝産物ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドであり得る。溶媒は、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ポリエチレングリコール、エチレングリコール、メタノール、エタノール又はこれらの組合せであ

40

50

り得る。

【0027】

別の実施形態においては、本発明は、タクロリムスに結合する診断免疫測定用抗体を選択する方法に関する。この方法は以下の段階を含み得る。

【0028】

a) 少なくとも1種類の選択希釈剤の存在下で、少なくとも1種類の抗体をタクロリムスと接触させる段階(該抗体はバイオディスプレイ形式で存在する。)、

b) 抗体の平衡解離定数(K_D)、分離速度定数(k_d)、会合速度定数(k_a)又は機能活性を求める段階、及び

c) 段階b)で求めた平衡解離定数、分離速度定数、会合速度定数又は機能活性に基づいて抗体を選択する段階。

10

【0029】

或いは、方法は以下の段階を含み得る。

【0030】

a) 少なくとも1種類の選択希釈剤の存在下で、少なくとも1種類の抗体をインキュベートする段階(該抗体はバイオディスプレイ形式で存在する。)、

b) 少なくとも1種類の選択希釈剤の存在下で、少なくとも1種類の抗体をタクロリムスと接触させる段階、

c) 抗体の平衡解離定数(K_D)、分離速度定数(k_d)、会合速度定数(k_a)又は機能活性を求める段階、及び

d) 段階c)で求めた平衡解離定数、分離速度定数、会合速度定数又は機能活性に基づいて抗体を選択する段階。

20

【0031】

さらに、上記方法においては、少なくとも1種類の選択希釈剤は、緩衝剤、塩、洗浄剤、結合競合剤又は溶媒を含み得る。緩衝剤は、MES、MOPS、HEPES、TRIS、リン酸塩、クエン酸塩又はホウ酸塩であり得る。塩は、NaCl、KCl又は硫酸亜鉛であり得る。洗浄剤は、陰イオン洗浄剤、陽イオン洗浄剤、非イオン洗浄剤又は双性イオン洗浄剤であり得る。結合競合剤は、代謝産物ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドであり得る。溶媒は、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ポリエチレングリコール、エチレングリコール、メタノール、エタノール又はこれらの組合せであり得る。

30

【0032】

更に別の態様においては、本発明は、診断免疫測定用試験試料中の目的分析物を検出するための特異的結合パートナーを選択する方法に関する。この方法は以下の段階を含み得る。

【0033】

a) 少なくとも1種類の選択希釈剤の存在下で、特異的結合パートナーを試料と接触させる段階(該試料は目的エピトープを含み、特異的結合パートナーは目的エピトープに結合し、該特異的結合パートナーはバイオディスプレイ形式で存在する。)、

b) 特異的結合パートナーの平衡解離定数(K_D)、分離速度定数(k_d)、会合速度定数(k_a)又は機能活性を求める段階、及び

c) 段階b)で求めた特異的結合パートナーの平衡解離定数、解離速度定数、会合速度定数又は機能活性に基づいて特異的結合パートナーを選択する段階。

40

【0034】

上記方法においては、試料は、カルシニューリン阻害剤、ラバマイシンの標的、インターロイキン2 鎖遮断薬、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、コルチコステロイド、免疫抑制代謝拮抗剤などの免疫抑制剤を含み得る。さらに、上記方法においては、少なくとも1種類の選択希釈剤は、緩衝剤、塩、洗浄剤、結合競合剤又は溶媒を含み得る。緩衝剤は、MES、MOPS、HEPES、TRIS、リン酸塩、クエン酸塩又はホウ酸塩であり得る。塩は、NaCl、KCl又は硫酸亜鉛であ

50

り得る。洗浄剤は、陰イオン洗浄剤、陽イオン洗浄剤、非イオン洗浄剤又は双性イオン洗浄剤であり得る。結合競合剤は、代謝産物ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドであり得る。溶媒は、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ポリエチレングリコール、エチレングリコール、メタノール、エタノール又はこれらの組合せであり得る。

【0035】

別の実施形態においては、本発明は、酵母ディスプレイを用いて、薬剤に対する特異性が改善された抗体をスクリーニングする方法に関する。この方法は以下の段階を含んでいてもよい。

【0036】

(a) 酵母細胞表面に存在する抗体（例えば、変異していてもよい s c F v）を含む酵母ディスプレイライブラリーを得る段階、

(b) 結合競合剤の存在下で、酵母細胞を薬剤と接触させる段階、

(c) 結合競合剤の存在下で薬剤との結合を示す抗体が表面に表示された酵母細胞を特定する段階（かかる結合は、薬剤に対する特異性が改善されたことを示す。）。

【0037】

この方法は、結合競合剤が目的薬剤よりも過剰に存在して、実施してもよい（例えば、約5から約100倍、約100倍から約1000倍、約5倍、約10倍、約25倍、約100倍又は約200倍過剰）。過剰量は、モル基準（例えば、ナノモル過剰）で計算してもよい。

【0038】

一実施形態においては、薬剤は免疫抑制剤を含み、結合競合剤は免疫抑制剤の代謝産物である。免疫抑制剤は、シクロスポリン及びタクロリムスからなる群から選択してもよく、代謝産物は、M - I、M - II、M - III、M 1、M 8、M 9、M 13、M 17、M 18、M 21及びこれらの組合せからなる群から選択してもよい。

【0039】

別の実施形態においては、結合競合剤（例えば、代謝産物）が複数の結合競合剤（例えば、代謝産物）を含むスクリーニング方法を実施する。複数の結合競合剤（例えば、代謝産物）は、2（例えば、これらだけに限定されないが、M 17とM 1を含めた代謝産物）、3、4、5、6、7、8、9又は10種類の結合競合剤（例えば、代謝産物）を含んでいてもよい。結合競合剤が代謝産物であるときには、複数の代謝産物を、M - I、M - II、M - III、M 1、M 8、M 9、M 13、M 17、M 18及びM 21からなる群から選択してもよい。

【0040】

更に別の好ましい実施形態においては、上記方法によって、スクリーニングを段階的に実施して、好ましい諸特性を有する（例えば、特異性の改善された）抗体を得ることができる。例えば、複数の結合競合剤（例えば、代謝産物）を含む代わりに、1種類以上の結合競合剤（例えば、代謝産物）を用いてスクリーニングを実施し、続いて1種類以上の結合競合剤（例えば、代謝産物）を用いて1ラウンド以上の追加のスクリーニングを実施することができる。

【0041】

さらに、好ましい諸特性（例えば、好ましい親和性、特異性などの好ましい結合特性）を有する抗体を得る本明細書に記載の各スクリーニング方法を組み合わせることができ、同時に、又は逐次的に併用してもよい。例えば、各方法は、目的エピトープに対する親和性が改善された抗体をスクリーニングする方法に関し得る。かかる方法は以下の段階を含み得る。

【0042】

(a) バイオディスプレイ形式で存在する抗体を含むライブラリーを得る段階（該抗体は変異を含む。）、

(b) 少なくとも1種類の選択希釈剤の存在下で、前記抗体を、前記エピトープを含む

10

20

30

40

50

試料と接触させる段階、及び

(c) 前記選択希釈剤の存在下で、変異を含まない類似の抗体の解離速度よりも低い解離速度を示す、前記バイオディスプレイ形式で存在する抗体を特定する段階（かかる低解離速度は、前記エピトープに対する親和性が改善されたことを示す。）。

【0043】

或いは、方法は以下の段階を含み得る。

【0044】

以下の段階を含む、目的エピトープに対する親和性が改善された特異的結合パートナーをスクリーニングする方法。

【0045】

(a) バイオディスプレイ形式で存在する特異的結合パートナーを含むライブラリーを得る段階（該特異的結合パートナーは変異を含む。）、

(b) 少なくとも1種類の選択希釈剤の存在下で、前記特異的結合パートナーを、前記エピトープを含む試料と接触させる段階、及び

(c) 前記選択希釈剤の存在下で、変異を含まない類似の特異的結合パートナーの解離速度よりも低い解離速度を示す、前記バイオディスプレイ形式で存在する特異的結合パートナーを特定する段階（かかる低解離速度は、前記エピトープに対する親和性が改善されたことを示す。）。

【0046】

上記方法においては、前記抗体を前記試料及び前記選択希釈剤と接触させる段階を同時に、又は逐次的に実施することができる。さらに、上記方法においては、少なくとも1種類の選択希釈剤は、緩衝剤、塩、洗浄剤、結合競合剤又は溶媒を含み得る。緩衝剤は、MES、MOPS、HEPES、TRIS、リン酸塩、クエン酸塩又はホウ酸塩であり得る。塩は、NaCl、KCl又は硫酸亜鉛であり得る。洗浄剤は、陰イオン洗浄剤、陽イオン洗浄剤、非イオン洗浄剤又は双性イオン洗浄剤であり得る。結合競合剤は、代謝産物ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドであり得る。溶媒は、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ポリエチレングリコール、エチレングリコール、メタノール、エタノール又はこれらの組合せであり得る。さらに、上記方法においては、試料は、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシンの標的、インターロイキン2 鎖遮断薬、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、コルチコステロイド、免疫抑制代謝拮抗剤などの免疫抑制剤を含み得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0047】

定義

本明細書では「抗体」及び「複数の抗体」という用語は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、（完全又は部分ヒト化）ヒト化抗体、（トリ（例えば、アヒル又はガチョウ）、サメ又はクジラ、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウスなど）又は非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル（*cynomolous monkey*）などのサル、チンパンジーなど）を含めたほ乳動物など、ただしこれらだけに限定されない動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、単鎖Fvs（「scFv」）、単鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド連結Fvs（「sdFv」）、及び（例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含めた）抗イデオタイプ（「抗Id」）抗体、並びに上記のいずれかの機能的に活性なエピトープ結合断片を指す。特に、抗体としては、免疫グロブリン分子、及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片、すなわち、抗原結合部位を含む分子が挙げられる。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、クラス（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂）又はサブクラスであり得る。バイオディスプレイを用いて調製されたコンビナトリー（combinatory）抗

10

20

30

40

50

体ライブラリーのスクリーニングによって親和性（すなわち、 K_D 、 k_d 又は k_a ）が増加した、又は改善された抗体を、本明細書では「親和性成熟（matured）抗体」と称する。

【0048】

本明細書では、特異的結合対（本明細書では、例えば、抗原と抗体）のメンバー間の相互作用に関連した「特異的」又は「特異性」とは、相互作用の選択的反応性を指す。

【0049】

本明細書では「会合速度定数」、「 k_{on} 」又は「 k_a 」という用語は、本明細書では区別なく使用され、その標的抗原に対する抗体の結合強度（結合度）、又は以下で示される抗体と抗原の複合体形成の速度を示す値を指す。

10

【0050】

抗体（「Ab」）+ 抗原（「Ag」） Ab - Ag

会合速度定数を測定する方法は、当分野で周知である。例えば、Biacore（登録商標）（スウェーデン）アッセイを使用することができる。さらに、Sapidyne Instruments（Boise、Idaho）から入手可能であるKinExA（登録商標）（Kinetic Exclusion Assay）アッセイを使用することもできる。

【0051】

本明細書では「バイオディスプレイ」又は「バイオディスプレイ形式」という用語は、目的遺伝子の遺伝子型をそのコードされた表現型に結びつけ、それによって目的形質を示すタンパク質をコードするポリヌクレオチド（DNA）配列を再生することができる、任意のインビトロでのディスプレイシステム又は方法を指す。バイオディスプレイシステム又は方法の例としては、酵母ディスプレイ、ファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、リボソーム/mRNAディスプレイ、DNAディスプレイ及びインビトロ区画化（in vitro compartmentalization）が挙げられるが、これらだけに限定されない。より具体的には、本明細書により詳細に記載するように、タクロリムス1-60-46抗体を構築し、プラスミドにクローン化し、それによって酵母サッカロミセスセレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）の表面での誘導性発現を可能にし、プラスミド上に存在する栄養要求性マーカーによって該酵母宿主に安定に転換した。

20

30

【0052】

本明細書では「結合競合剤」という用語は、その特異的結合パートナーと相互作用又は結合することから、目的エピトープを含む分子と競合又は交差反応する任意の分子を指す。好ましくは、目的エピトープを含む分子と競合又は交差反応する分子は、目的エピトープを含む分子よりも（低い K_D 、高い k_d 、低い k_a など、ただしこれらだけに限定されない）低い親和性で特異的結合パートナーと結合する。結合競合剤の例としては、タクロリムスの代謝産物である13-O-脱メチル化タクロリムス（「M-I」）、31-O-脱メチル化タクロリムス（「M-II」）及び15-O-脱メチル化タクロリムス（「M-III」）、シクロスポリンの代謝産物であるM1、M8、M9、M13、M17、M18又はM21などの代謝産物（例えば、免疫抑制剤を含めて、ただしこれらだけに限定されない薬物の代謝産物）、ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドが挙げられるが、これらだけに限定されない。例えば、シクロスポリン抗体は、親シクロスポリン薬物に対する K_D が 9.5×10^{-10} Mであり、代謝産物M17に対する K_D が 1.45×10^{-8} Mである。

40

【0053】

本明細書では「交差反応する」又は「交差反応性」という用語は、典型的には親和性の異なる2種類のエピトープ、分子又はリガンドが同じ特異的結合パートナー上の同じ部位と反応する能力を指す。

【0054】

50

本明細書では「分離速度定数」、「 k_{off} 」又は「 k_d 」という用語は、本明細書では区別なく使用され、その標的抗原からの抗体の分離強度（分離度）、又は以下で示すように、Ab - Ag複合体が次第に遊離Abと抗原に分離することを示す値を指す。

【0055】



分離速度定数を測定する方法は、当分野で周知である。例えば、Biacore（登録商標）（スウェーデン）アッセイを使用することができる。さらに、Sapidyne Instruments（Boise, Idaho）から入手可能であるKinExA（登録商標）（Kinetic Exclusion Assay）アッセイを使用することもできる。

10

【0056】

本明細書では「阻害定数」、「 K_i 」という用語は、下記式で示されるように、特異的結合対の一方のメンバー（例えば、抗体によって特異的に認識される抗原）の非存在下で、特異的結合対の他方のメンバー（例えば、該抗体）の利用可能な結合部位の50%を占める結合競合剤の濃度を指す。

【0057】

$$K_i = IC_{50} / (1 + ([A] / KD))$$

式中、 IC_{50} は標識抗原の特定の濃度において特異的結合の50%を置換する結合競合剤の濃度に等しく、 $[A]$ は、アッセイに用いる標識抗原の濃度に等しく、 KD は特異的結合対のメンバー（例えば、抗原と抗体）の平衡解離定数に等しい。

20

【0058】

本明細書では「エピトープ」、「複数のエピトープ」又は「目的エピトープ」という用語は、認識され、その特異的結合パートナー上の相補的部に結合可能である、任意の分子上の部位を指す。分子及び特異的結合パートナーは、特異的結合対の一部である。例えば、エピトープは、ポリペプチド、タンパク質、ハプテン、（糖脂質、糖タンパク質、リポ多糖など、ただしこれらだけに限定されない）炭水化物抗原又は多糖であり得、その特異的結合パートナーは、これだけに限定されないが、抗体であり得る。

【0059】

本明細書では「平衡解離定数」又は「 K_D 」という用語は、本明細書では区別なく使用され、分離速度定数（ k_{off} ）を会合速度定数（ k_{on} ）で除算して得られる値を指す。会合速度定数、分離速度定数及び平衡解離定数は、抗原に対する抗体の結合親和性を表すのに用いられる

30

本明細書では「ヒト化」抗体という用語は、所定の抗原に結合可能であり、実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する枠組み領域と、実質的に非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有するCDRとを含む、免疫グロブリン変種又はその断片を指す。通常、ヒト化抗体は、非ヒトである出所からヒト化抗体中に導入された1個以上のアミノ酸残基を有する。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1個、典型的には2個の（Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、Fvなどの）可変ドメインの実質的に全部を含み、CDR領域の全部又は実質的に全部は、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、枠組み（「FR」）領域の全部又は実質的に全部は、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の枠組み（「FR」）領域である。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（「Fc」）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域を含むことが最適である。一般に、抗体は、軽鎖と、重鎖の少なくとも可変ドメインとを含む。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA及びIgEを含めた免疫グロブリンの任意のクラス、並びにIgG₁、IgG₂、IgG₃及びIgG₄を含めた任意のアイソタイプから選択することができる。ヒト化抗体は、1を超えるクラス又はアイソタイプに由来する配列を含み得、所望のエフェクター機能を最適化する特別な定常ドメインの選択は、当業者の範囲内である。

40

【0060】

本明細書では「免疫抑制剤に特異的に結合する」という句、及びその類似の用語は、（

50

タクロリムスなど、ただしこれだけに限定されない)免疫抑制剤に特異的に結合し、(代謝産物、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、薬剤、薬物など、ただしこれらだけに限定されない)他の競合物に特異的に結合しない、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質及び抗体を指す。免疫抑制剤に特異的に結合するペプチド、ポリペプチド、タンパク質又は抗体は、例えば、診断免疫測定法、B I A c o r e (登録商標)、K i n E x A (登録商標)、又は当分野で公知の他のアッセイによって測定して、より低い結合親和性で、他の代謝産物、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、薬剤又は薬物に結合し得る。免疫抑制剤に免疫特異的に結合する抗体又は抗体断片は、例えば、診断免疫測定法、B I A c o r e (登録商標)、K i n E x A (登録商標)、又は当業者に公知の他の技術によって特定することができる。ある抗体は、放射性免疫測定法(「R I A」)、酵素結合免疫吸着検定法(「E L I S A」)など、ただしこれらだけに限定されない実験技術によって測定して、任意の交差反応性抗原よりも免疫抑制剤に、より高い結合親和性で免疫特異的に結合する(例えば、Paul, ed., Fundamental Immunology, 2nd ed., Raven Press, New York, pages 332-336 (1989)参照)。例えば、本発明においては、抗体は、(製造者によって禁止された(proscribed))標準アッセイ条件下のK i n E x A (登録商標)アッセイ、特に実施例10に記載のK i n E x A (登録商標)アッセイによって測定して、(リン酸緩衝食塩水(「P B S」)、1%ウシ血清アルブミン(「B S A」)及び10%メタノールを含む選択希釈剤などの)選択希釈剤の非存在下で 1.9×10^{-11} M未満、又は(P B S、1% B S A及び10%メタノールを含む選択希釈剤などの)選択希釈剤に曝露されたときに、該選択希釈剤と一緒にインキュベートしたときに、若しくは該選択希釈剤の存在下で、 1.52×10^{-10} M未満の平衡分離定数(K_D)を免疫抑制剤に対して免疫グロブリンとして示す場合に、免疫抑制剤に免疫特異的に結合する。

10

20

【0061】

本明細書では「免疫抑制剤」という用語は、対象における免疫系の活動を遅らせる、又は停止させる薬物を指す。免疫抑制剤は、対象の免疫系が臓器移植後に免疫応答を開始するのを防止するために、又は過活動性の免疫系によって引き起こされる疾患を治療するために、対象に投与することができる。免疫抑制剤の例としては、シクロスポリン、I S A (T X) 2 4 7、タクロリムス、カルシニューリンなど、ただしこれらだけに限定されないカルシニューリン阻害剤、シロリムス、エベロリムス、F K 7 7 8、T A F A - 9 3 など、ただしこれらだけに限定されないラパマイシン標的、バシリキシマブ、ダクリズマブなど、ただしこれらだけに限定されないインターロイキン2 鎖遮断薬、ミコフェノール酸モフェチルなどのイノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、メトトレキサートなど、ただしこれだけに限定されないジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロンなど、ただしこれらだけに限定されないコルチコステロイド、又はアザチオプリンなど、ただしこれだけに限定されない免疫抑制代謝拮抗剤が挙げられるが、これらだけに限定されない。

30

【0062】

本明細書では、核酸分子に関連した「単離された」という用語は、核酸分子の自然源中に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子を指す。さらに、c D N A分子などの「単離」核酸分子は、他の細胞材料を実質的に含まなくてもよく、又は組換え技術によって製造されたときに培地を実質的に含まなくてもよく、又は化学合成されたときに化学前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含まなくてもよい。

40

【0063】

本明細書では「生理希釈剤」という句は、(試験試料などの)前記試料が由来する対象(好ましくはヒト)のインビボでの生理的条件を模倣、近似又はシミュレートするのに使用することができる任意の液体又は固体材料を指す。生理希釈剤の組成は、重要ではなく、生理希釈剤の使用法に応じて変動する。例えば、生理希釈剤は、少なくとも1種類の緩衝剤(この少なくとも1種類の緩衝剤を使用して試料のp Hを調節する(増加又は減少さ

50

せる)ことができる。) 、少なくとも1種類の塩(この少なくとも1種類の塩を使用して、試料の塩濃度を調節する(増加又は減少させる)ことができる。) 、少なくとも1種類のタンパク質(この少なくとも1種類のタンパク質を使用して、非特異的結合を阻止することができる、又は試料に含まれる他のタンパク質を安定化することができる。) などを含み得る。さらに、生理希釈剤は、少なくとも1種類の緩衝剤、少なくとも1種類の塩、少なくとも1種類のタンパク質などの任意の組合せを含み得る。

【0064】

例えば、試験試料を対象から得た後は、該試験試料が「生理的条件」又は「非生理的条件」にあるとはもはや考えられないことは当分野で周知である。前記試験試料をアッセイに使用する前に、生理希釈剤を使用し、試験試料に添加して、試験試料が由来する対象のインビボでの生理的条件を模倣、近似又はシミュレートすることができ、換言すれば、試験試料をより「生理的のように(physiological-like)」することができる。試験試料は、(a) 7.35から7.45のpHを有するとき、(b) 136から146 mmol/Lのナトリウム塩を含むとき、(c) 3.5から5.1 mmol/Lのカリウム塩を含むとき、(d) 10.7から22.9 μ mol/Lの亜鉛を含むとき、(e) 0.05 mmol/L未満のメタノールを含むとき、又は(f) (a) - (e)の任意の組合せであるときに、生理的条件を模倣、近似若しくはシミュレートする、又は「生理的のよう」であるとみなされる。(試験試料の生理的条件は、参照により本明細書に援用する、Tietz, ed., Clinical Guide to Laboratory Tests, WB Saunders, Philadelphia, PA, page 695 (1983)に記載されている。)

10

20

【0065】

使用可能な緩衝剤の例としては、MES、MOPS、HEPES、TRIS、リン酸塩、クエン酸塩、ホウ酸塩緩衝剤又はこれらの組合せが挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0066】

使用可能な塩の例は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸亜鉛又はこれらの組合せである。

【0067】

使用可能なタンパク質の例は、ウシ血清アルブミン(「BSA」)、アイシングラス、ウシガンマグロブリン又はこれらの組合せである。

30

【0068】

本明細書では「選択希釈剤」という用語は、(a) 前記抗体を前記選択希釈剤と一緒にインキュベートした場合、該選択希釈剤と一緒に使用した場合、若しくは該選択希釈剤に曝露した場合に、少なくとも1種類の抗体の平衡解離定数(K_D)を変えることが当業者に知られている、若しくは少なくとも1種類の抗体の K_D を変える可能性があるとして当業者に考えられている、任意の液体若しくは固体材料、(b) 前記抗体を前記選択希釈剤と一緒にインキュベートした場合、該選択希釈剤と一緒に使用した場合、若しくは該選択希釈剤に曝露した場合に、少なくとも1種類の抗体の機能活性を変えることが当業者に知られている、若しくは少なくとも1種類の抗体の機能活性を変える可能性があるとして当業者に考えられている、任意の液体若しくは固体材料、又は(c) 上記(a) - (b)の任意の組合せである任意の液体又は固体材料を指す。本明細書に記載の選択希釈剤は、種々の方法で使用することができる。しかし、好ましくは、選択希釈剤は、診断免疫測定法の反応条件を近似、模倣又はシミュレートするのに使用される。選択希釈剤の組成は、重要ではなく、選択希釈剤の使用法に応じて変動する。例えば、選択希釈剤は、少なくとも1種類の緩衝剤、少なくとも1種類の塩、少なくとも1種類の洗浄剤、少なくとも1種類の結合競合剤、少なくとも1種類の溶媒などを含み得る。さらに、選択希釈剤は、少なくとも1種類の緩衝剤、少なくとも1種類の塩、少なくとも1種類の洗浄剤、少なくとも1種類の結合競合剤、少なくとも1種類の溶媒などの任意の組合せを含み得る。別の例として、選択希釈剤は、PBS(pH 7.4)、1% BSA及び10%メタノールを含み得る。更に別

40

50

の例として、選択希釈剤は、PBS (pH 7.4)、1% BSA、及び結合競合剤約5から約200 nMを含み得る。しかし、上記したように、結合競合剤の過剰量は、選択希釈剤中の結合競合剤の量が、例えば、約5から約100 nM、約100から約1000 nM、約5 nM、約10 nM、約25 nM、約100 nM又は約200 nMであり得るように変動し得る。

【0069】

90%メタノール、10%エチレングリコール及び(100 mM硫酸亜鉛などの)硫酸亜鉛などの溶媒と少なくとも1種類の塩の組合せを含む、診断アッセイに用いられるアッセイ抽出緩衝剤を使用して、対象の治療の一部としてかかる免疫抑制剤を投与された対象から得られた全血試験試料中に含まれる血清タンパク質からタクロリムスを抽出することができる。続いて、全血試験試料からタクロリムスを抽出するのに用いられたアッセイ抽出緩衝剤は、抗体などの検出試薬に遭遇する前に、希釈される。希釈にもかかわらず、ある量の抽出緩衝剤(例えば、10%メタノール)は試験試料中にまだ存在し(又は残留し)、上記対象におけるタクロリムスの血中濃度をモニターする診断免疫測定法に用いられる抗体の K_D を増加させ、機能活性を低下させ、又は K_D を増加させ、かつ機能活性を低下させることが知られている。当業者は、これらの有機溶媒を含むかかる抽出緩衝剤が、かかる診断免疫測定法用に開発される将来の抗体の K_D を増加させる(したがって、 k_a を減少させ、 k_d を増加させる)可能性があり、機能活性を低下させる可能性があり、又は K_D を増加させ、かつ機能活性を低下させる可能性があることと予想することができる。したがって、PBS、1% BSA及び10%メタノールを含む選択希釈剤などの選択希釈剤を使用して、試験する抗体の K_D を増加させる可能性があり、機能活性を低下させる可能性があり、又は K_D を増加させ、かつ機能活性を低下させる可能性がある診断免疫測定法の反応条件を模倣、近似又はシミュレートすることができる。

10

20

【0070】

更に別の例として、1種類以上の結合競合剤を含む選択希釈剤を使用して、目的エピトープとの結合を1個又は他の分子と競合することができ、又は1個以上の他の分子の結合を妨害して、試験試料中の目的エピトープに結合することができる。具体的には、1種類以上の結合競合剤を含む選択希釈剤は、目的分析物と試験試料の別の成分との結合を置換又は阻止することによって、試験試料の状態を変え得る。或いは、1種類以上の結合競合剤を含む選択希釈剤は、目的分析物に対してより高い特異性を有する(標識抗体などの)検出試薬を試験及び/又は単離するために、使用することができる。例えば、1種類以上の結合競合剤を含む選択希釈剤を使用して、1種類以上の結合競合剤に対して抗体が有する交差反応性の程度を求めることができ、又は1種類以上の結合競合剤との交差反応性が改善された(すなわち低下した)抗体を単離する条件を与えることができる。これらの趣旨に沿って、本発明は、とりわけ、そのそれぞれの主要な代謝産物(例えば、M-I、M-II、M-III、M1、M8、M9、M13、M17、M18及びM21)の1種類以上の存在下で活性親薬物(例えば、シクロスポリン又はタクロリムス)の抗体認識を改善する。

30

【0071】

使用可能な緩衝剤の例としては、MES、MOPS、HEPES、TRIS、リン酸塩、クエン酸塩、ホウ酸塩緩衝剤又はこれらの組合せが挙げられるが、これらだけに限定されない。

40

【0072】

使用可能な塩の例は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸亜鉛又はこれらの組合せである。

【0073】

使用可能な洗浄剤の例としては、陰イオン洗浄剤、陽イオン洗浄剤、非イオン洗浄剤又は双性イオン洗浄剤が挙げられるが、これらだけに限定されない。1種類以上の洗浄剤を含む選択希釈剤を使用して、試験試料などの試料に含まれるタンパク質又は他の目的分析物を安定化及び/又は可溶化し、診断免疫測定法の過程において非特異的結合を阻止し、

50

試料に含まれる細胞を破壊することができる。陰イオン洗剤としては、ケノデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸ナトリウム塩、コール酸、デヒドロコール酸、ジギトニン、ジギトキシゲニン、N,N-ジメチルドデシルアミンN-オキシド、ドクサートナトリウム塩、グリコケノデオキシコール酸ナトリウム塩、グリココール酸水和物、グリココール酸ナトリウム塩水和物、グリコデオキシコール酸一水和物、グリコリトコール酸3硫酸二ナトリウム塩、グリコリトコール酸エチルエステル、N-ラウロイルサルコシンナトリウム塩、N-ラウロイルサルコシン溶液、ドデシル硫酸リチウム、ルゴール溶液、1-オクタンスルホン酸ナトリウム塩、1-ブタンスルホン酸ナトリウム、1-デカンスルホン酸ナトリウム、1-ドデカンスルホン酸ナトリウム、無水1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム、1-ノナンスルホン酸ナトリウム、1-プロパンスルホン酸ナトリウム一水和物、2-プロモエタンスルホン酸ナトリウム、コール酸ナトリウム水和物、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム一水和物、ドデシル硫酸ナトリウム、無水ヘキサンスルホン酸ナトリウム、オクチル硫酸ナトリウム、無水ペンタンスルホン酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、タウロケノデオキシコール酸ナトリウム塩、タウロデオキシコール酸ナトリウム塩一水和物、タウロデオキシコール酸ナトリウム塩水和物、タウロリトコール酸3-硫酸二ナトリウム塩、タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム塩、ウルソデオキシコール酸又はこれらの組合せが挙げられるが、これらだけに限定されない。すべてSigma-Aldrich、St. Louis、MIから入手可能である。

10

【0074】

20

陽イオン洗剤としては、臭化アルキルトリメチルアンモニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウム、臭化ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウム、ベンジルトリメチルアンモニウムテトラクロロヨード、臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム、臭化ドデシルエチルジメチルアンモニウム、臭化ドデシルトリメチルアンモニウム、臭化エチルヘキサデシルジメチルアンモニウム、ジラール試薬T、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム又はこれらの組合せが挙げられるが、これらだけに限定されない。すべてSigma-Aldrich、St. Louis、MIから入手可能である。

【0075】

非イオン洗剤としては、BigCHAP、ビス(ポリエチレングリコールビス[イミダゾイルカルボニル])、Brij(登録商標)35、Brij(登録商標)56、Brij(登録商標)72、Cremophor(登録商標)EL、デカエチレングリコールモノドデシルエーテル、N-デカノイル-N-メチルグルカミン、n-デシル-D-マルチド、n-ドデシル-D-マルチド、ヘプタエチレングリコールモノデシルエーテル、ヘキサエチレングリコールモノドデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノドデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノヘキサデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノオクタデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノテトラデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノドデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノヘキサデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノヘキシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノオクタデシルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールエーテルW-1、ポリオキシエチレン10トリデシルエーテル、ポリオキシエチレン100ステアラート、ポリオキシエチレン20イソヘキサデシルエーテル、サポニン、Span(登録商標)20、Span(登録商標)40、Span(登録商標)60、Span(登録商標)65、Span(登録商標)80、Span(登録商標)85、Terigol、TritonCF-21、TritonCF-32、TritonDF-12、TritonDF-16、TritonGR-5M、TritonQS-15、TritonQS-44、TritonX-100、TritonX-102、TritonX-15、Triton(登録商標)X-100、Triton(登録商標)X-114、TWEEN(登録商標)20、T

30

40

50

WEEN (登録商標) 21、TWEEN (登録商標) 40、TWEEN (登録商標) 60、TWEEN (登録商標) 61、TWEEN (登録商標) 65、TWEEN (登録商標) 80、TWEEN (登録商標) 81、TWEEN (登録商標) 85又はこれらの組合せが挙げられるが、これらだけに限定されない。すべてSigma-Aldrich、St. Louis、MIから入手可能である。

【0076】

双性イオン洗浄剤としては、CHAPS、3-(デシルジメチルアンモニオ)プロパンスルホナート分子内塩、(ドデシルジメチルアンモニオ)プロパンスルホナート分子内塩、3-(N,N-ジメチルミリスチルアンモニオ)プロパンスルホナート、3-(N,N-ジメチルオクタデシルアンモニオ)プロパンスルホナート、3-(N,N-ジメチルオクタデシルアンモニオ)プロパンスルホナート分子内塩、3-(N,N-ジメチルパルミチルアンモニオ)プロパンスルホナート又はこれらの組合せが挙げられるが、これらだけに限定されない。すべてSigma-Aldrich、St. Louis、MIから入手可能である。

10

【0077】

使用可能な溶媒の例は、有機溶媒である。使用可能な有機溶媒の例としては、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ポリエチレングリコール、エチレングリコール、メタノール、エタノール又はこれらの組合せが挙げられるが、これらだけに限定されない。好ましい溶媒は、抗体など、ただしこれだけに限定されない検出試薬と一緒にインキュベートする前に、10%に希釈することができる90%メタノールである。

20

【0078】

本明細書では「特異的結合パートナー」という用語は、特異的結合対のメンバーを意味する。特異的結合対のメンバーは、他方の分子の構造に相補的である少なくとも1つの構造を各々が有する少なくとも2種類の分子を含む。少なくとも2種類の分子は、相補的構造の結合(binding)によって結合し得る。分子という用語は、例えば、Apo酵素と補酵素からなる酵素、複数のサブユニットからなるタンパク質、タンパク質と脂質からなるリポタンパク質などの分子複合体も含む。特異的結合パートナーは、天然物質であり得、又は例えば、化学合成、微生物学的技術及び/又は遺伝子操作方法によって調製されている。特異的結合パートナーの例としては、抗体、抗原、ハプテン、酵素、レクチン、核酸、リプレッサー、オリゴ-及びポリヌクレオチド、プロテインA、プロテインG、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、補体成分C1q、核酸結合タンパク質などが挙げられるが、これらだけに限定されない。特異的結合対としては、抗体-抗原、抗体-ハプテン、オペレーター-リプレッサー、ヌクレアーゼ-ヌクレオチド、ビオチン-アビジン、レクチン-多糖、ステロイド-ステロイド結合タンパク質、薬物-薬物受容体、ホルモン-ホルモン受容体、酵素-基質、IgG-プロテインA、相補的オリゴ又はポリヌクレオチドなどが挙げられるが、これらだけに限定されない。

30

【0079】

本明細書では「厳密な条件」という用語は、6x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(「SSC」)中で、フィルターに結合したDNAとの約45におけるハイブリダイゼーションと、それに続く約50-65における0.2xSSC/0.1%SDSによる1回以上の洗浄を指す。「極めて厳密な条件下」という用語は、フィルターに結合した核酸との6xSSC中での約45におけるハイブリダイゼーションと、それに続く約68における0.1xSSC/0.2%SDSによる1回以上の洗浄、又は当業者に公知である他の厳密なハイブリダイゼーション条件下を指す(例えば、Ausubel, F. M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York at pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3参照)。

40

【0080】

50

本明細書では「対象」と「患者」という用語は、区別なく使用される。本明細書では「対象」及び「複数の対象」という用語は、動物、一態様においては、トリ（例えば、アヒル又はガチョウ）、別の態様においては、サメ又はクジラ、更に別の態様においては、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット及びマウス）及び霊長類（例えば、カニクイザルなどのサル、チンパンジー及びヒト）を含めたほ乳動物を指す。

【0081】

本明細書では「試験試料」という用語は、（目的抗体、目的抗原などの）分析物の出所である対象の体の構成要素を指す。これらの構成要素は、当分野で周知である。例えば、試験試料は、対象の血清、血しょう、全血、リンパ、CNS液、尿又は他の体液に由来する任意の生物試料であり得る。試験試料は、当業者に公知である定常的な技術を用いて調製することができる。

10

【0082】

II. 本発明の抗体

本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに免疫特異的に結合する抗体を提供する。より詳細には、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤に対して高い結合親和性を有する抗体を与える。一態様においては、本明細書に記載の抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに免疫特異的に結合し、（Astellas Pharma, Inc., Tokyo, Japanから入手可能な）（本明細書では「野生型」とも称する）マウスハイブリドーマ細胞系1-60-46によって産生される抗体の K_D 又は k_d と比較して、その平衡解離定数（ K_D ）又は分離速度定数（ k_d 又は k_{off} ）が、少なくとも1.1倍の改善、少なくとも2倍の改善、少なくとも3倍の改善、少なくとも4倍の改善、少なくとも5倍の改善、少なくとも6倍の改善、少なくとも7倍の改善、少なくとも8倍の改善、少なくとも9倍の改善、少なくとも10倍の改善、少なくとも11倍の改善、少なくとも12倍の改善、少なくとも13倍の改善、少なくとも14倍の改善、少なくとも15倍の改善、少なくとも16倍の改善、少なくとも17倍の改善、少なくとも18倍の改善、少なくとも19倍の改善、又は少なくとも20倍の改善を示し得る。 K_D 又は k_d の上記倍数の改善は、前記抗体が、（少なくとも1種類の溶媒など、ただしこれだけに限定されない）少なくとも1種類の選択希釈剤に（診断免疫測定法などにおいて）曝露されなかったとき、又は該選択希釈剤と一緒にインキュベートされなかったときに、示され得る。さらに、これらの抗体は、免疫グロブリンとして、少なくとも1種類の免疫抑制剤に 1.9×10^{-11} M未満の K_D で結合する。好ましくは、これらの抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤に 1.89×10^{-11} Mから 1.0×10^{-13} Mの K_D で結合する。より好ましくは、これらの抗体は、 1.89×10^{-11} Mから 1.0×10^{-12} Mの K_D を示す。さらに、これらの抗体は、scFvとして、少なくとも1種類の免疫抑制剤に 1.3×10^{-4} / sec未満の k_d で結合する。好ましくは、これらの抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤に 1.29×10^{-4} / secから 1.0×10^{-6} / secの k_d で結合する。より好ましくは、これらの抗体は、 1.29×10^{-4} / secから 1.0×10^{-5} / secの k_d を示す。

20

30

40

【0083】

上記抗体が、（少なくとも1種類の選択希釈剤など、ただしこれだけに限定されない）少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露される時（診断免疫測定前、測定中など。少なくとも1種類の選択希釈剤に抗体を曝露するタイミングは重要ではない。）、該選択希釈剤と一緒にインキュベートされる時、又は該選択希釈剤の存在下にある時、これらの抗体は、少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露した後、又は該選択希釈剤と一緒に野生型をインキュベートした後の野生型の K_D 又は k_d と比較して、その K_D 又は k_d が少なくとも1.1倍の改善、少なくとも2倍の改善、少なくとも3倍の改善、少なくとも4倍の改善、少なくとも5倍の改善、少なくとも6倍の改善、少なくとも7倍の改善、少なくとも8倍の改善、少なくとも9倍の改善、少なくとも10倍の改善、少なくとも11倍の改善

50

、少なくとも12倍の改善、少なくとも13倍の改善、少なくとも14倍の改善、少なくとも15倍の改善、少なくとも16倍の改善、少なくとも17倍の改善、少なくとも18倍の改善、少なくとも19倍の改善、又は少なくとも20倍の改善を示し得る。さらに、これらの抗体は、免疫グロブリンとして、少なくとも1種類の免疫抑制剤に 1.52×10^{-10} M未満の K_D で結合する。好ましくは、これらの抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤に 1.51×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mの K_D で結合する。より好ましくは、これらの抗体は、 1.51×10^{-10} Mから 1.0×10^{-11} Mの K_D を有する。さらに、これらの抗体は、s c F vとして、少なくとも1種類の免疫抑制剤に 9.38×10^{-4} / s e c未満の k_d で結合する。好ましくは、これらの抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤に 9.37×10^{-4} / s e cから 1.0×10^{-6} / s e cの k_d で結合する。より好ましくは、これらの抗体は、 9.37×10^{-4} / s e cから 1.0×10^{-5} / s e cの k_d を示す。

10

【0084】

更に別の態様においては、本発明は、チャイニーズハムスター卵巣（以下「CHO」）細胞系1-60-46 AM2 CHO 2-577又はCHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 1-1157によって産生される抗体を提供する。これらの細胞系の各々によって産生される抗体は、タクロリムス上の少なくとも1種類のエピトープに免疫特異的に結合する。より具体的には、これらの細胞系の各々によって産生される抗体は、該抗体が、（少なくとも1種類の溶媒など、ただしこれだけに限定されない）少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露されていないとき（診断免疫測定前、測定中など）、該選択希釈剤と一緒にインキュベートされていないとき、又は該選択希釈剤の存在下にあるときに、タクロリムス上の少なくとも1種類のエピトープに 1.9×10^{-11} M未満の K_D で結合する。好ましくは、これらの抗体は 1.2×10^{-12} Mの K_D を示す。しかし、前記抗体が少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露される場合（診断免疫測定前、測定中など）、又は該選択希釈剤と一緒にインキュベートされる場合、該抗体は、タクロリムス上の少なくとも1種類のエピトープに 1.52×10^{-10} M未満の K_D で免疫特異的に結合する。好ましくは、これらの抗体は、10%メタノール中で 1.3×10^{-11} Mの K_D を示す。さらに、本発明は、CHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 2-577又はCHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 1-1157から抽出された核酸（DNA）から作製される抗体も企図する。また、本発明は、CHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 2-577又はCHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 1-1157によって産生されるキメラ抗体又はその結合断片にも関する。

20

30

【0085】

別の態様においては、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞系1-60-46によって産生される抗体の誘導体又は変種である。より具体的には、本発明者らは、抗体が少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露されたかどうか、又は該選択希釈剤と一緒にインキュベートされたかどうかにかかわらず、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに対して高い結合親和性を示す、ハイブリドーマ細胞系1-60-46によって産生される抗体の誘導体又は変種である抗体を製造できることを発見した。より具体的には、本発明の抗体は、少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露されないとき、該選択希釈剤と一緒にインキュベートされないとき、又は該選択希釈剤の存在下にあるときに、免疫グロブリンとして、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに 1.9×10^{-11} M未満の K_D で、好ましくは 1.89×10^{-11} Mから 1.0×10^{-13} Mの K_D で、より好ましくは 1.89×10^{-11} Mから 1.0×10^{-12} Mの K_D で結合する。s c F vとして、本発明の抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに 1.3×10^{-4} / s e c未満の k_d で、好ましくは 1.29×10^{-4} / s e cから 1.0×10^{-6} / s e cの k_d で、より好ましくは 1.29×10^{-4} / s e cから 1.0×10^{-5} / s e cの k_d で結合する。

40

【0086】

これに対し、これらの抗体が、少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露されるとき、該選

50

択希釈剤と一緒にインキュベートされるとき、又は該選択希釈剤の存在下にあるときには、これらの抗体は、免疫グロブリンとして、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに 1.52×10^{-10} M未満の K_D で、好ましくは 1.51×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mの K_D で、より好ましくは 1.51×10^{-10} Mから 1.0×10^{-11} Mの K_D で結合する。s c F vとして、本発明の抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに 9.38×10^{-4} / s e c未満の k_d で、好ましくは 9.37×10^{-4} / s e cから 1.0×10^{-6} / s e cの k_d で、より好ましくは 9.37×10^{-4} / s e cから 1.0×10^{-5} / s e cの k_d で結合する。本発明の誘導抗体又は変種抗体は、野生型によって産生される抗体のアミノ酸配列と比較したときに、重鎖相補性決定(「CDR」)領域の少なくとも1つ(例えば、重鎖CDR1、重鎖CDR2及び/又は重鎖CDR3)における(少なくとも1つの欠失、付加、置換又はこれらの任意の組合せなどの)少なくとも1つの変異、軽鎖CDR領域(例えば、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び/又は軽鎖CDR3)における(少なくとも1つの欠失、付加、置換又はこれらの任意の組合せなどの)少なくとも1つの変異、又は重鎖CDR領域の少なくとも1つにおける(少なくとも1つの欠失、付加、置換又はこれらの任意の組合せなどの)少なくとも1つの変異と軽鎖CDR領域の少なくとも1つにおける少なくとも1つの変異とを含み得る。さらに、本発明の抗体は、抗体の枠組み領域(「FR」)など、ただしこれだけに限定されない、CDR以外の抗体の一部又は部分における(少なくとも1つの欠失、付加、置換又はこれらの任意の組合せなどの)1つ以上の他の変異も含み得る。かかる誘導体を作製する方法は、当分野で周知であり、部位特異的変異誘発、及びPCR媒介変異誘発の使用を含む。これについては、後により詳細に考察する。

10

20

【0087】

より具体的には、別の態様においては、本発明の抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合し、Thr - Ile - Ser - Ser - Gly - Gly - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Phe(配列番号33)の式のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2を含む。

【0088】

式中、Xaa₁は、トレオニン(Thr)、アラニン(Ala)、リジン(Lys)及びグルタミン酸(Glu)からなる群から選択され、

30

Xaa₂は、チロシン(Tyr)及びトリプトファン(Trp)からなる群から選択され、

Xaa₃は、トレオニン(Thr)及びバリン(Val)からなる群から選択され、

ただし、Xaa₂がチロシン(Tyr)であり、Xaa₃がトレオニン(Thr)であるときには、Xaa₁はトレオニン(Thr)以外である。

【0089】

更に別の態様においては、本発明の抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合し、配列番号15、16、17又は18で示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR2を含む。別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体であって、配列番号15、16、17又は18のアミノ酸配列と少なくとも35%、好ましくは少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む抗体に関する。

40

【0090】

更に別の態様においては、本発明の抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合し、Lys - Ser - Ser - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Val - His - Ser - Thr - Gly - Asn - Thr - Phe - Leu - Glu(配列番号34)の式のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1を含む。

50

【0091】

式中、X a a₄ は、グルタミン (G l n)、アラニン (A l a) 及びグリシン (G l y) からなる群から選択され、

X a a₅ は、セリン (S e r) 及びグリシン (G l y) からなる群から選択され、

X a a₆ は、イソロイシン (I l e) 及びロイシン (L e u) からなる群から選択され、

ただし、X a a₅ がセリン (S e r) であり、X a a₆ がイソロイシン (I l e) であるときには、X a a₄ はグルタミン (G l n) 以外である。

【0092】

更に別の態様においては、抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合し、配列番号19、20、21又は22のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1を含む。別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体であって、配列番号19、20、21又は22のアミノ酸配列と少なくとも35%、好ましくは少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む抗体に関する。

10

【0093】

更に別の態様においては、本発明の抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合し、P h e - G l n - G l y - X a a₇ - X a a₈ - X a a₉ - P r o - L e u - T h r (配列番号35) の式のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む。

20

【0094】

式中、X a a₇ は、セリン (S e r) 及びグリシン (G l y) からなる群から選択され、

X a a₈ は、ヒスチジン (H i s)、アルギニン (A r g)、バリン (V a l)、トレオニン (T h r)、リジン (L y s) 及びセリン (S e r) からなる群から選択され、

X a a₉ は、バリン (V a l)、アラニン (A l a)、アスパラギン酸 (A s p)、システイン (C y s) 及びセリン (S e r) からなる群から選択され、

30

ただし、X a a₈ がヒスチジン (H i s) であり、X a a₉ がバリン (V a l) であるときには、X a a₇ はセリン (S e r) 以外である。

【0095】

更に別の態様においては、抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合し、配列番号23、24、25、26、27、28、29、30、31又は32のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む。

【0096】

別の態様においては、本発明は、配列番号23、24、25、26、27、28、29、30、31又は32のアミノ酸配列と少なくとも35%、好ましくは少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体に関する。

40

【0097】

更に別の態様においては、本発明の抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合し、以下のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、重鎖CDR2、重鎖CDR3、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽可変CDR3を有する。

【0098】

(a) 重鎖CDR1は、G l y - P h e - T h r - P h e - S e r - S e r - T y r -

50

G l y - M e t - S e r (配列番号 2) のアミノ酸配列を有し、

(b) 重鎖 C D R 2 は、T h r - I l e - S e r - S e r - G l y - G l y - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - P h e (配列番号 3 3) の式のアミノ酸配列を有し

(式中、X a a ₁ は、トレオニン (T h r) 、アラニン (A l a) 、リジン (L y s) 及びグルタミン酸 (G l u) からなる群から選択され、

X a a ₂ は、チロシン (T y r) 及びトリプトファン (T r p) からなる群から選択され、

X a a ₃ は、トレオニン (T h r) 及びバリン (V a l) からなる群から選択される。) 、

(c) 重鎖 C D R 3 は、G l n - T h r - A s p - G l y - T y r - S e r - T r p - P h e - P r o - T y r (配列番号 6) のアミノ酸配列を有し、

(d) 軽鎖 C D R 1 は、L y s - S e r - S e r - X a a ₄ - X a a ₅ - X a a ₆ - V a l - H i s - S e r - T h r - G l y - A s n - T h r - P h e - L e u - G l u (配列番号 3 4) の式のアミノ酸配列を有し

(式中、X a a ₄ は、グルタミン (G l n) 、アラニン (A l a) 及びグリシン (G l y) からなる群から選択され、

X a a ₅ は、セリン (S e r) 及びグリシン (G l y) からなる群から選択され、

X a a ₆ は、イソロイシン (I l e) 及びロイシン (L e u) からなる群から選択される。) 、

(e) 軽鎖 C D R 2 は、L y s - I l e - S e r - A s n - A r g - P h e - S e r (配列番号 1 1) の式のアミノ酸配列を有し、

(f) 軽鎖 C D R 3 は、P h e - G l n - G l y - X a a ₇ - X a a ₈ - X a a ₉ - P r o - L e u - T h r (配列番号 3 5) の式のアミノ酸配列を有し

(式中、X a a ₇ は、セリン (S e r) 及びグリシン (G l y) からなる群から選択され、

X a a ₈ は、ヒスチジン (H i s) 、アルギニン (A r g) 、バリン (V a l) 、トレオニン (T h r) 、リジン (L y s) 及びセリン (S e r) からなる群から選択され、

X a a ₉ は、バリン (V a l) 、アラニン (A l a) 、アスパラギン酸 (A s p) 、システイン (C y s) 及びセリン (S e r) からなる群から選択される。) 、

ただし、重鎖 C D R 2 において X a a ₁ が T h r であり、X a a ₂ が T y r であり、X a a ₃ が T h r であり、軽鎖 C D R 1 において X a a ₄ が G l n であり、X a a ₅ が S e r であり、X a a ₆ が I l e である場合、軽鎖 C D R 3 において X a a ₇ が S e r であり、X a a ₈ が H i s である場合には X a a ₉ は V a l 以外であり、又は X a a ₇ が S e r であり、X a a ₉ が V a l である場合には X a a ₈ は H i s 以外であり、又は X a a ₈ が H i s であり、X a a ₉ が V a l である場合には X a a ₇ は S e r 以外である。

【 0 0 9 9 】

好ましくは、上記各式の各抗体は、上記各式中の X a a ₁ - X a a ₈ が下記表 A に示すアミノ酸残基を有する、重鎖 C D R 1 、重鎖 C D R 2 、重鎖 C D R 3 、軽鎖 C D R 1 、軽鎖 C D R 2 及び軽鎖 C D R 3 を含む。

【 0 1 0 0 】

10

20

30

40

【表 1】

表A

Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Xaa ₅	Xaa ₆	Xaa ₇	Xaa ₈	Xaa ₉
Thr	Trp	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Val
Ala	Trp	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Val
Lys	Trp	Val	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Val
Glu	Trp	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Val
Thr	Tyr	Thr	Gln	Gly	Ile	Ser	His	Val
Thr	Tyr	Thr	Ala	Gly	Ile	Ser	His	Val
Thr	Tyr	Thr	Gly	Gly	Leu	Ser	His	Val
Thr	Tyr	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	His	Val
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Ala
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	Arg	Ala
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Asp
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Cys
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Ser
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Gly	Arg	Cys
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Gly	Val	Cys
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	Thr	Cys
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	Lys	Cys
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
Ala	Trp	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser
Ala	Trp	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	His	Ala
Ala	Trp	Thr	Gln	Ser	Ile	Gly	Arg	Cys
Ala	Trp	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
Ala	Trp	Thr	Gln	Gly	Leu	Gly	Arg	Cys
Thr	Tyr	Thr	Gln	Gly	Leu	Gly	Arg	Cys
Thr	Tyr	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser
Lys	Trp	Val	Gln	Gly	Leu	Ser	His	Ser
Glu	Trp	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	His	Ser
Glu	Trp	Thr	Gln	Ser	Ile	Gly	Val	Cys
Glu	Trp	Thr	Gly	Gly	Leu	Ser	His	Ser
Ala	Trp	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	His	Ser

10

20

30

【0101】

I I I . 核酸分子

本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する本発明の抗体をコードする、一般に単離された、1種類以上の核酸分子を規定する。一態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに結合する抗体であって、野生型によって産生される抗体と比較したときにその K_D 又は k_d が少なくとも1.1倍の改善、少なくとも2倍の改善、少なくとも3倍の改善、少なくとも4倍の改善、少なくとも5倍の改善、少なくとも6倍の改善、少なくとも7倍の改善、少なくとも8倍の改善、少なくとも9倍の改善、少なくとも10倍の改善、少なくとも11倍の改善、少なくとも12倍の改善、少なくとも13倍の改善、少なくとも14倍の改善、少なくとも15倍の改善、少なくとも16倍の改善、少なくとも17倍の改善、少なくとも18倍の改善、少なくとも19倍の改善、又は少なくとも20倍の改善を示し得る抗体をコードする単離核酸分子を提供する。本発明は、本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。 K_D 又は k_d の上記倍数の改善は、前記抗体が、(少なくとも1種類の溶媒など、ただしこれだけに限定されない)少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露されなかったとき(診断免疫測定前、測定中など)、又は該選択希釈剤と一緒にインキュベートされなかったときに、示され得る。

40

【0102】

50

別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤と一緒に、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに結合する抗体であって、「野生型」によって産生される抗体と比較したときにその K_D 又は k_d が少なくとも1.1倍の改善、少なくとも2倍の改善、少なくとも3倍の改善、少なくとも4倍の改善、少なくとも5倍の改善、少なくとも6倍の改善、少なくとも7倍の改善、少なくとも8倍の改善、少なくとも9倍の改善、少なくとも10倍の改善、少なくとも11倍の改善、少なくとも12倍の改善、少なくとも13倍の改善、少なくとも14倍の改善、少なくとも15倍の改善、少なくとも16倍の改善、少なくとも17倍の改善、少なくとも18倍の改善、少なくとも19倍の改善、又は少なくとも20倍の改善を示し得る抗体をコードする単離核酸分子を提供する。本発明は、本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。平衡解離定数の上記倍数の改善は、前記抗体が、(少なくとも1種類の溶媒など、ただしこれだけに限定されない)少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露された、若しくはされるとき(診断免疫測定前、測定中など)、又は該選択希釈剤と一緒にインキュベートされた、若しくはされるときに、示され得る。

10

20

30

40

50

【0103】

更に別の態様においては、本発明は、免疫グロブリンとして、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体であって、 1.9×10^{-11} M未満の K_D 、好ましくは 1.89×10^{-11} Mから 1.0×10^{-13} Mの K_D 、より好ましくは 1.89×10^{-11} Mから 1.0×10^{-12} Mの K_D を有する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。本発明は、さらに、s c F vとして、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体であって、 1.3×10^{-4} / s e c未満の k_d 、好ましくは 1.29×10^{-4} / s e cから 1.0×10^{-6} / s e cの k_d 、より好ましくは 1.29×10^{-4} / s e cから 1.0×10^{-5} / s e cの k_d を有する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。本発明は、本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。上記 K_D 又は k_d 値は、前記抗体が、(少なくとも1種類の溶媒など、ただしこれだけに限定されない)少なくとも1種類の選択希釈剤に(診断免疫測定法などにおいて)曝露されなかったとき、該選択希釈剤と一緒にインキュベートされなかったとき、又は該選択希釈剤の存在下にあるときに、示される。

【0104】

更に別の態様においては、本発明は、免疫グロブリンとして、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体であって、 1.52×10^{-10} M未満の K_D 、好ましくは 1.51×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mの K_D 、より好ましくは 1.51×10^{-10} Mから 1.0×10^{-11} Mの K_D を有する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。本発明は、さらに、s c F vとして、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体であって、 9.38×10^{-4} / s e c未満の k_d 、好ましくは 9.37×10^{-4} / s e cから 1.0×10^{-6} / s e cの k_d 、より好ましくは 9.37×10^{-4} / s e cから 1.0×10^{-5} / s e cの k_d を有する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。本発明は、本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。上記 K_D 又は k_d 値は、前記抗体が、(少なくとも1種類の溶媒など、ただしこれだけに限定されない)少なくとも1種類の選択希釈剤に(診断免疫測定法などにおいて)曝露された、若しくはされるとき、該選択希釈剤と一緒にインキュベートされた、若しくはされるとき、又は該選択希釈剤の存在下にあるときに、示される。

【0105】

更に別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。前記核酸分子は、CHO細胞1-60-46 AM2 CHO 2-577又はCHO細胞系1

- 60 - 46 AM2 CHO 1 - 1157によって産生される抗体のポリヌクレオチド配列を含む。本発明は、本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0106】

別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。ここで、前記抗体は、マウスハイブリドーマ細胞系1 - 60 - 46によって産生される抗体の誘導体又は変種を含む。上で考察したように、本発明者らは、抗体が、少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露されないとき、該選択希釈剤と一緒にインキュベートされないとき、又は該選択希釈剤の存在下にあるときに、免疫グロブリンとして、 1.9×10^{-11} M未満の K_D で、好ましくは 1.89×10^{-11} Mから 1.0×10^{-13} Mの K_D で、より好ましくは 1.89×10^{-11} Mから 1.0×10^{-12} Mの K_D で、又はscFvとして、 1.3×10^{-4} / sec未満の k_d で、好ましくは 1.29×10^{-4} / secから 1.0×10^{-6} / secの k_d で、より好ましくは 1.29×10^{-4} / secから 1.0×10^{-5} / secの k_d で、特異的に高結合親和性を示す、マウスハイブリドーマ細胞系1 - 60 - 46によって産生される抗体の誘導体又は変種である抗体が生成され得ることを発見した。これに対し、これらの抗体が、少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露されるとき、該選択希釈剤と一緒にインキュベートされるとき、又は該選択希釈剤の存在下にあるとき、これらの抗体は、免疫グロブリンとして、 1.52×10^{-10} M未満の K_D で、好ましくは 1.51×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mの K_D で、より好ましくは 1.51×10^{-10} Mから 1.0×10^{-11} Mの K_D で、又はscFvとして、 9.38×10^{-4} / sec未満の k_d で、好ましくは 9.37×10^{-4} / secから 1.0×10^{-6} / secの k_d で、より好ましくは 9.37×10^{-4} / secから 1.0×10^{-5} / secの k_d で、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに結合する。

【0107】

本発明の誘導抗体又は変種抗体は、野生型によって産生される抗体のアミノ酸配列と比較したときに、重鎖CDR領域の少なくとも1つ（例えば、重鎖CDR1、重鎖CDR2又は重鎖CDR3）における（少なくとも1つの欠失、付加、置換又はこれらの任意の組合せなどの）少なくとも1つの変異、軽鎖CDR領域（例えば、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2又は軽鎖CDR3）における（少なくとも1つの欠失、付加、置換又はこれらの任意の組合せなどの）少なくとも1つの変異、又は重鎖CDR領域の少なくとも1つにおける少なくとも1つの変異と軽鎖CDR領域の少なくとも1つにおける少なくとも1つの変異とを含む。例えば、アミノ酸置換をもたらす部位特異的変異誘発及びPCR媒介変異誘発を含めて、当業者に公知の標準技術を使用して、本発明の抗体をコードする核酸分子に（少なくとも1つの欠失、付加、置換又はこれらの任意の組合せなどの）変異を導入することができる。一態様においては、誘導体は、野生型によって産生される最初の抗体に比べて、15個未満のアミノ酸置換、10個未満のアミノ酸置換、又は7個未満のアミノ酸置換を含む。一態様においては、誘導体は、1個以上の予測される非必須アミノ酸残基（すなわち、抗体が少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに免疫特異的に結合するのに重要ではないアミノ酸残基）においてなされる保存的アミノ酸置換を有する。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、電荷の類似した側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるアミノ酸置換である。電荷の類似した側鎖を有するアミノ酸残基の系列は、当分野で定義されている。これらの系列としては、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が挙げられる。或いは、

飽和変異誘発などによって、コード配列の全部又は一部に沿って変異を無作為に導入することができ、得られる変異体を生物活性についてスクリーニングして、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープとの高い結合親和性を示す変異体を特定することができる。変異誘発後、コードされた抗体を発現させることができ、抗体の活性を求めることができる。

【0108】

別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。前記抗体は、Thr - Ile - Ser - Ser - Gly - Gly - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Phe (配列番号33)の式のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2の式のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2を有する。

10

【0109】

式中、Xaa₁は、トレオニン (Thr)、アラニン (Ala)、リジン (Lys) 及びグルタミン酸 (Glu) からなる群から選択され、

Xaa₂は、チロシン (Tyr) 及びトリプトファン (Trp) からなる群から選択され、

Xaa₃は、トレオニン (Thr) 及びバリン (Val) からなる群から選択され、

ただし、Xaa₂がチロシン (Tyr) であり、Xaa₃がトレオニン (Thr) であるときには、Xaa₁はトレオニン (Thr) 以外である。

20

【0110】

本発明は、上記アミノ酸配列を有する重鎖CDR2を有する抗体をコードする本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0111】

別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。前記抗体は、配列番号15、16、17又は18のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2を含む (又は、からなる)。本発明は、配列番号15、16、17又は18のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2を含む抗体をコードする本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

30

【0112】

別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。前記抗体は、Lys - Ser - Ser - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Val - His - Ser - Thr - Gly - Asn - Thr - Phe - Leu - Glu (配列番号34)の式のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1を有する。

【0113】

式中、Xaa₄は、グルタミン (Gln)、アラニン (Ala) 及びグリシン (Gly) からなる群から選択され、

Xaa₅は、セリン (Ser) 及びグリシン (Gly) からなる群から選択され、

40

Xaa₆は、イソロイシン (Ile) 及びロイシン (Leu) からなる群から選択される、

ただし、Xaa₅がセリン (Ser) であり、Xaa₆がイソロイシン (Ile) であるときには、Xaa₄はグルタミン (Gln) 以外である。

【0114】

本発明は、上記アミノ酸配列を有する軽鎖CDR1を有する抗体をコードする本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0115】

別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類

50

のエピトープに特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。前記抗体は、配列番号19、20、21又は22のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1を含む(又は、からなる)。本発明は、配列番号19、20、21又は22のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1を含む抗体をコードする本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0116】

別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。前記抗体は、Phe-Gln-Gly-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Pro-Leu-Thr(配列番号35)の式のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を有する。

10

【0117】

式中、Xaa₇は、セリン(Ser)及びグリシン(Gly)からなる群から選択され、

Xaa₈は、ヒスチジン(His)、アルギニン(Arg)、バリン(Val)、トレオニン(Thr)、リジン(Lys)及びセリン(Ser)からなる群から選択され、

Xaa₉は、バリン(Val)、アラニン(Ala)、アスパラギン酸(Asp)、システイン(Cys)及びセリン(Ser)からなる群から選択され、

ただし、Xaa₈がヒスチジン(His)であり、Xaa₉がバリン(Val)であるときには、Xaa₇はセリン(Ser)以外である。

20

【0118】

本発明は、上記アミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を有する抗体をコードする本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0119】

別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。前記抗体は、配列番号23、24、25、26、27、28、29、30、31又は32のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む(又は、からなる)。本発明は、配列番号23、24、25、26、27、28、29、30、31又は32のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む抗体をコードする本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

30

【0120】

別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。前記抗体は、配列番号15、16、17若しくは18のアミノ酸配列の重鎖CDR2、配列番号19、20、21若しくは22のアミノ酸配列の軽鎖CDR1、配列番号23、24、25、26、27、28、29、30、31若しくは32のアミノ酸配列の軽鎖CDR3、又はこれらのアミノ酸配列の任意の組合せを含む(又は、からなる)。本発明は、配列番号15、16、17若しくは18のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、配列番号19、20、21若しくは22のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、配列番号23、24、25、26、27、28、29、30、31若しくは32のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、又はこれらのアミノ酸配列の任意の組合せを含む抗体をコードする本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

40

【0121】

別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。前記抗体は、以下のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR1、重鎖CDR2、重鎖CDR3、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽可変CDR3を有する。

【0122】

50

(a) 重鎖 CDR1 は、Gly - Phe - Thr - Phe - Ser - Ser - Tyr - Gly - Met - Ser (配列番号 2) のアミノ酸配列を有し、

(b) 重鎖 CDR2 は、Thr - Ile - Ser - Ser - Gly - Gly - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Phe (配列番号 33) の式のアミノ酸配列を有し

(式中、Xaa₁ は、トレオニン (Thr)、アラニン (Ala)、リジン (Lys) 及びグルタミン酸 (Glu) からなる群から選択され、

Xaa₂ は、チロシン (Tyr) 及びトリプトファン (Trp) からなる群から選択され、

Xaa₃ は、トレオニン (Thr) 及びバリン (Val) からなる群から選択される。)

10

(c) 重鎖 CDR3 は、Gln - Thr - Asp - Gly - Tyr - Ser - Trp - Phe - Pro - Tyr (配列番号 6) のアミノ酸配列を有し、

(d) 軽鎖 CDR1 は、Lys - Ser - Ser - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Val - His - Ser - Thr - Gly - Asn - Thr - Phe - Leu - Glu (配列番号 34) の式のアミノ酸配列を有し

(式中、Xaa₄ は、グルタミン (Gln)、アラニン (Ala) 及びグリシン (Gly) からなる群から選択され、

Xaa₅ は、セリン (Ser) 及びグリシン (Gly) からなる群から選択され、

Xaa₆ は、イソロイシン (Ile) 及びロイシン (Leu) からなる群から選択される。)

20

(e) 軽鎖 CDR2 は、Lys - Ile - Ser - Asn - Arg - Phe - Ser (配列番号 11) の式のアミノ酸配列を有し、

(f) 軽鎖 CDR3 は、Phe - Gln - Gly - Xaa₇ - Xaa₈ - Xaa₉ - Pro - Leu - Thr (配列番号 35) の式のアミノ酸配列を有し

(式中、Xaa₇ は、セリン (Ser) 及びグリシン (Gly) からなる群から選択され、

Xaa₈ は、ヒスチジン (His)、アルギニン (Arg)、バリン (Val)、トレオニン (Thr)、リジン (Lys) 及びセリン (Ser) からなる群から選択され、

Xaa₉ は、バリン (Val)、アラニン (Ala)、アスパラギン酸 (Asp)、システイン (Cys) 及びセリン (Ser) からなる群から選択され、

30

ただし、重鎖 CDR2 において Xaa₁ が Thr であり、Xaa₂ が Tyr であり、Xaa₃ が Thr であり、軽鎖 CDR1 において Xaa₄ が Gln であり、Xaa₅ が Ser であり、Xaa₆ が Ile である場合、軽鎖 CDR3 において Xaa₇ が Ser であり、Xaa₈ が His である場合には Xaa₉ は Val 以外であり、又は Xaa₇ が Ser であり、Xaa₉ が Val である場合には Xaa₈ は His 以外であり、又は Xaa₈ が His であり、Xaa₉ が Val である場合には Xaa₇ は Ser 以外である。

【0123】

本発明は、上記アミノ酸配列を有する、重鎖 CDR1 領域、重鎖 CDR2 領域、重鎖 CDR3 領域、軽鎖 CDR1 領域、軽鎖 CDR2 領域及び軽鎖 CDR3 領域を有する抗体をコードする本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

40

【0124】

さらに、本発明は、少なくとも 1 種類の免疫抑制剤上の少なくとも 1 種類のエピトープに特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子も提供する。前記抗体は、上記配列を有する、重鎖 CDR1、重鎖 CDR2、重鎖 CDR3、軽鎖 CDR1、軽鎖 CDR2 及び軽鎖 CDR3 を含み、Xaa₁ - Xaa₈ は、上記表 A に示すアミノ酸残基を有する。本発明は、本明細書に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。核酸分子は、上記アミノ酸配列を有する、重鎖 CDR1 領域、重鎖 CDR2 領域、重鎖 CDR3 領域、軽鎖 CDR1 領域、軽鎖 CDR2 領域及び軽鎖 CDR3 領域を有する抗体をコードし、Xaa₁ - Xaa₈ は、表 A に示す

50

アミノ酸残基を有する。

【0125】

更に別の態様においては、本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。前記抗体は、CHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 2-577又はCHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 1-1157によって産生される。本発明は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体をコードする核酸分子と厳密な条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。前記抗体は、CHO細胞系1-60-46 M2 CHO 2-577又はCHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 1-1157によって産生される。

10

【0126】

IV. 本発明の抗体の調製方法

本発明の抗体は、当業者に公知である定常的な技術を用いて調製することができる。

【0127】

一態様においては、本発明の抗体は、宿主細胞における免疫グロブリン軽鎖及び重鎖遺伝子の組換え発現によって調製することができる。抗体を組換え発現させるために、軽鎖及び重鎖が宿主細胞中で発現され、好ましくは、宿主細胞を培養する培地中に分泌され、この培地から抗体を回収することができるように、抗体の免疫グロブリン軽鎖及び重鎖をコードする核酸分子を有する1個以上の組換え発現ベクターを宿主細胞に移入する。Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York, (1989)、Ausubel, F.M. et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1989)及び米国特許第4,816,397号に記載の方法などの標準組換え核酸(DNA)方法を使用して、抗体重鎖及び軽鎖遺伝子を得、これらの遺伝子を組換え発現ベクターに組み入れ、ベクターを宿主細胞に導入する。

20

【0128】

本発明の抗体を発現させるために、軽鎖及び重鎖領域をコードする核酸分子を最初に得る。これらの核酸分子は、抗体1-60-46を発現するマウスハイブリドーマ細胞系から得ることができ、(部位特異的変異誘発などの)当分野で周知の手段によって改変して、例えば、CHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 2-577又はCHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 1-1157によって産生される抗体を含めて、本発明の抗体を生成することができる。抗体1-60-46を発現するマウスハイブリドーマ細胞系は、Astellas Pharma, Inc., Tokyo, Japanから入手可能である。抗体1-60-46のVH及びVL遺伝子の核酸配列を図2並びに配列番号43及び45に示す。

30

【0129】

例えば、1-60-46可変重(VH)及び可変(VL)核酸断片を得た後、これらの配列、又はCDRなどのこれらの配列内の特定の領域を変異させて、本明細書に開示するAM2又はAM2関連(図6-7及び10参照)アミノ酸配列をコードすることができる。1-60-46 VH及びVL DNA配列によってコードされるアミノ酸配列をAM2又はAM2関連配列と比較して、AM2関連配列中の異なるアミノ酸残基を特定する。起こすべきヌクレオチド変化を決定する遺伝コードを用いて、変異配列が、AM2又はAM2関連アミノ酸配列をコードするように、抗体1-60-46の適切なヌクレオチドを変異させる。(PCR産物が変異を含むように、変異核酸がPCRプライマー中に組み入れられる)PCR媒介変異誘発、部位特異的変異誘発などの標準方法によって、1-60-46配列の変異誘発を実施することができる。

40

50

【0130】

或いは、別の態様においては、化学合成装置を用いて、当業者に公知である定常的な技術によって、VH及びVL鎖をコードする核酸分子を合成することができる。例えば、セクションIIIに記載の核酸分子由来のVH及びVL鎖を、当分野で公知の定常的な技術によって化学合成することができる。担体に結合した3'末端塩基から出発して、ヌクレオチドを段階的に結合させる。5'末端(most 5')ヌクレオチドの付加後、ヌクレオチドを固体担体から切り離し、脱塩、続いてポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下「PAGE」)(Midland Certified Reagents、Midland、TX)によって精製する。

【0131】

(上述したようにVH及びVL遺伝子の増幅及び変異誘発によって)AM2又はAM2関連VH及びVLセグメントをコードする核酸断片を得た後、これらの核酸断片を標準組換えDNA技術によって更に操作して、例えば、可変領域遺伝子を(完全長抗体鎖遺伝子、Fab断片遺伝子又はscFv遺伝子など、ただしこれらだけに限定されない)抗体に転化することができる。これらの操作においては、VL又はVHをコードする核酸断片を、抗体定常領域、柔軟なリンカーなど、別のタンパク質をコードする別の核酸断片に作用可能に連結する。本明細書では「作用可能に連結する」という用語は、2個の核酸断片によってコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように2個の核酸断片を連結することを意味するものとする。

【0132】

別法では、scFv遺伝子を(抗体1-60-46のCDR領域などの)野生型CDR領域を用いて構築し、次いで当分野で公知の技術を用いて変異させることができる。

【0133】

VH領域をコードする単離核酸分子は、VHをコードする核酸分子を重鎖定常領域(CH1、CH2及びCH3)をコードする別の核酸分子に作用可能に連結することによって、完全長重鎖遺伝子に転化することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は当分野で公知である(例えば、Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242(1991)参照)。別の態様においては、本発明は、ヒト重鎖定常領域のすべての公知アロタイプを含めて、ただしこれらだけに限定されない、すべての公知ヒト重鎖定常領域を更に包含する。これらの領域を包含する核酸断片は、標準PCR増幅によって得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM又はIgD定常領域であり得る。

【0134】

VL領域をコードする単離核酸分子は、VLをコードする核酸分子を軽鎖定常領域CLをコードする別の核酸分子に作用可能に連結することによって、完全長軽鎖遺伝子(及びFab軽鎖遺伝子)に転化することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当分野で公知である(例えば、Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242(1991)参照)。本発明は、ヒト軽鎖定常領域のすべての公知アロタイプを含めて、ただしこれらだけに限定されない、すべての公知ヒト軽鎖定常領域を包含する。これらの領域を包含する核酸断片は、標準PCR増幅によって得ることができる。軽鎖定常領域は、カッパ又はラムダ定常領域であり得るが、最も好ましくはカッパ定常領域である。

【0135】

特定の重鎖又は軽鎖領域内のFR及びCDR領域の具体的名称は、かかる領域を識別す

10

20

30

40

50

るのに用いられる慣行又は付番方式に応じて変わり得ることを理解されたい(例えば、すべて当業者に公知である、Chothia、Kabat、Oxford Molecular's AbM modeling software)。本発明では、Oxford Molecular's AbM modeling software付番方式を用いる。

【0136】

s c F v 遺伝子を作製するために、VH及びVLをコードする核酸断片を、アミノ酸配列GPAKELTPLKEAKVS(配列番号36)によってコードされるリンカーなどの柔軟なリンカーをコードする別の断片に作用可能に連結する。本発明に使用可能な他のリンカー配列の例は、Bird et al., Science 242:423-426(1988)、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988)及びMcCafferty et al., Nature, 348:552-554(1990)に記載されている。

10

【0137】

本発明の抗体又は抗体部分を発現させるために、上述したように得られた部分又は完全長軽鎖及び重鎖をコードする核酸分子を、遺伝子が転写及び翻訳調節配列に作用可能に連結されるように発現ベクターに挿入する。本明細書では「作用可能に連結する」という用語は、ベクター内の転写及び翻訳調節配列が、抗体遺伝子の転写及び翻訳を調節する所期の機能を果たすように、抗体遺伝子をベクターに連結することを意味するものとする。発現ベクター及び発現制御配列は、使用する発現宿主細胞に適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子と抗体重鎖遺伝子は別個のベクターに挿入することができ、又はより典型的には、両方の遺伝子を同じ発現ベクターに挿入する。抗体遺伝子を発現ベクターに標準方法(例えば、抗体遺伝子断片上とベクター上の各相補的制限酵素切断部位の連結、又は制限酵素切断部位がない場合には平滑末端連結)によって挿入する。軽鎖又は重鎖配列を挿入する前に、発現ベクターは抗体定常領域配列を既に有し得る。例えば、VH及びVL配列を完全長抗体遺伝子に転化する一手法は、VHセグメントがベクター内のCH「セグメント」に作用可能に連結され、VLセグメントがベクター内のCLセグメントに作用可能に連結されるように、それぞれ重鎖定常領域及び軽鎖定常領域を既にコードする発現ベクターにこれらの配列を挿入することである。これに加えて、又はこれとは別に、組換え発現ベクターは、宿主細胞由来の抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることができる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、ベクター中にクローン化することができる。単一のペプチドは、免疫グロブリン(immunoglobulin)シグナルペプチド又は異種シグナルペプチド(すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド)であり得る。

20

30

【0138】

抗体鎖遺伝子に加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞中で抗体鎖遺伝子の発現を制御する制御配列を有し得る。「制御配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー、及び抗体鎖遺伝子の転写又は翻訳を制御する他の発現調節要素(例えば、ポリアデニレーションシグナル)を含むものとする。かかる制御配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されている。制御配列の選択を含めて、発現ベクターの設計は、形質転換すべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質発現レベルなどの要因によって左右され得ることを当業者は理解されたい。ほ乳動物宿主細胞発現用の好ましい制御配列としては、(CMVプロモーター/エンハンサーなどの)サイトメガロウイルス(以下「CMV」)、(SV40プロモーター/エンハンサーなどの)シミアンウイルス40(以下「SV40」)、(アデノウイルス主要後期プロモーター(「AdMLP」)などの)アデノウイルス及びポリオーマに由来するプロモーター及び/又はエンハンサーなど、ほ乳動物細胞中で高レベルのタンパク質発現を誘導するウイルス要素などが挙げられる

40

50

。ウイルス調節エレメント及びその配列の更なる記述については、例えば、米国特許第5,168,062号、米国特許第4,510,245号及び米国特許第4,968,615号を参照されたい。

【0139】

抗体鎖遺伝子及び制御配列に加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞中でベクターの複製を調節する配列（例えば、複製開始点）、選択マーカー遺伝子などの追加の配列を含み得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターを導入した宿主細胞の選択を容易にする（例えば、米国特許第4,399,216号、同4,634,665号及び同5,179,017号参照）。例えば、典型的には、選択マーカー遺伝子は、ベクターを導入した宿主細胞にG418、ハイグロマイシン、メトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する。好ましい選択マーカー遺伝子としては、メトトレキサート選択/増幅を用いたdhfr-宿主細胞用ジヒドロ葉酸還元酵素（以下「DHFR」）遺伝子、G418選択用ネオマイシン（以下「neo」）遺伝子などが挙げられる。

10

【0140】

軽鎖及び重鎖の発現の場合、重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクターを標準技術によって宿主細胞に移入する。「移入」という用語の多様な形態は、外因性DNAを原核生物又は真核生物宿主細胞に導入するのに一般に使用される多種多様な技術、例えば、電気穿孔法、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン移入などを包含するものとする。原核生物宿主細胞でも真核生物宿主細胞でも本発明の抗体を発現することは理論的に可能であるが、真核細胞、最も好ましくはほ乳動物宿主細胞における抗体の発現が最も好ましい。というのは、かかる真核細胞、特にほ乳動物細胞は、適切に折り置かれた免疫学的に活性な抗体を組み立て、分泌する可能性が原核細胞よりも高いからである。抗体遺伝子の原核生物発現は、活性な抗体を高収率で産生するには効果的でないことが報告された（Boss, M. A. and Wood, C. R., Immunology Today 6:12-13 (1985)参照）。

20

【0141】

本発明の組換え抗体を発現するのに好ましいほ乳動物宿主細胞としては、（例えば、R. J. Kaufman and P. A. Sharp, Mol. Biol. 159:601-621 (1982)に記載のDHFR選択可能マーカーと併用される、Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 (1980)に記載のdhfr-CHO細胞を含めた）CHO細胞、NSO骨髓腫細胞、COS細胞、HEK-293細胞、SP2細胞などが挙げられる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターをほ乳動物宿主細胞に導入するときには、抗体は、宿主細胞中での抗体の発現に十分な期間、より好ましくは宿主細胞が成長する培地中に抗体を分泌するのに十分な期間、宿主細胞を培養することによって産生される。抗体は、標準タンパク質精製法によって培地から回収することができる。

30

【0142】

宿主細胞は、Fab断片、F(ab')断片、scFv分子など、完全抗体の一部を産生するのに使用することができる。上記手順の変形手順も本発明の範囲内であることを理解されたい。例えば、本発明の抗体の軽鎖又は重鎖（ただし、両方ではない。）をコードする核酸分子を宿主細胞に移入することが望ましい場合もある。組換えDNA技術を使用して、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに結合するのに不要である軽鎖及び重鎖の一方又は両方をコードする核酸分子の一部又は全部を除去することもできる。かかる切断型核酸分子から発現される分子も本発明の抗体に包含される。

40

【0143】

本発明の抗体又はその抗原結合部の組換え発現の好ましい系においては、抗体重鎖と抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターを、リボソームによって媒介される移入によってdhfr-CHO細胞に導入する。組換え発現ベクター内では、抗体重鎖及び軽鎖遺伝子は、高レベルの遺伝子転写をもたらすCMVエンハンサー/AΔMLPプロモータ

50

ー調節エレメントに各々作用可能に連結される。組換え発現ベクターは、ベクターが移入されたCHO細胞を選択することができるDHFR遺伝子も有する。ヒポキサンチンとチミジンを含まない培地中で細胞を培養して、移入ベクターからDHFR遺伝子を獲得したCHO細胞を得た。抗原特異的スクリーニング法を用いて、最大量の抗体を発現するクローンを特定した。個々のクローンを拡大し、常法に従って再スクリーニングした。タクロリムス1-60-46 AM2 CHO 2-577及びタクロリムス1-60-46 AM2 CHO 1-1157の2つの細胞系を、更なる特性評価用を選択した。選択した形質転換宿主細胞を培養して、抗体重鎖及び軽鎖を発現させ、完全抗体を培地から回収する。標準分子生物学技術を使用して、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞に移入し、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、抗体を培地から回収する。

10

【0144】

上記(forgoing)を考慮して、本発明の別の態様は、本発明の抗体及び抗体部分の組換え発現に使用することができる核酸、ベクター及び宿主細胞組成物に関する。AM2及びその変種の重鎖CDR2領域をコードするアミノ酸配列は、配列番号16で示される。AM2軽鎖CDR1領域をコードするアミノ酸配列は、配列番号22で示される。AM2軽鎖CDR3をコードするアミノ酸配列は、配列番号23で示される。

【0145】

V. 組換え抗体の選択

本明細書に開示するAM2又はAM2関連抗体を含めて、本発明の抗体は、コンビナトリアル抗体ライブラリーのスクリーニングによって単離することができる。コンビナトリアル抗体ライブラリーは、ファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、リボソーム/mRNAディスプレイ、DNAディスプレイ、インビトロ区画化など、ただしこれらだけに限定されない当分野で公知のバイオディスプレイ技術を用いて調製することができる。例えば、コンビナトリアル抗体ライブラリーは、ネズミ、キメラ、ヒト化又はヒトVL及びVH cDNAを用いて調製される、scFv酵母ディスプレイライブラリーなどの組換えコンビナトリアルライブラリーである。かかるライブラリーの調製及びスクリーニング方法は当分野で公知である。(pYD1ベクター、Invitrogen、Carlsbad、Californiaなどの)酵母ディスプレイライブラリー作製用市販ベクターに加えて、抗体ディスプレイライブラリーの作製及びスクリーニング用に特に適した方法及び試薬の例は、例えば、Boder E.T. and Witttrup K.D., Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, Methods Enzymol., 328:430-44(2000)、Boder E.T. and Witttrup K.D., Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, Nat Biotechnol 15(6):553-7(June 1997)及びHawley and Hawley, eds., Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols, 2nd ed., Humana Press, Totowa, NJ, pages 311-332(2004)に記載されている。

20

30

40

【0146】

好ましい実施形態においては、本明細書のセクションIIに記載の抗体のいずれかなどの高結合親和性抗体を単離するために、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに免疫特異的に結合することが知られている抗体をまず使用して、酵母(好ましくは、サッカロミセス セレビスエ)の表面でscFvとして発現されるネズミ重鎖及び軽鎖配列を作製する。(ハイブリドーマ細胞系1-60-46によって産生される抗体などの)これらの抗体scFvを分析して、これらの抗体の分離速度定数(すなわち、 k_{off} 又は k_d)を求める。次いで、かかる構築体を、好ましくは(以下「bt-tacro」と記述する)ピオチン化タクロリムス抗原を用いて、スクリーニングする。

50

次いで、分離速度定数データを平均蛍光強度（「MFI」）対時間（秒）としてプロットすることができる。一次減衰式（decay equation）によって、データを適合させることができる。使用可能なかかる式の例は、

$$y = m_1 * \exp(-m_2 * M_0) + m_3$$

である。式中、 m_1 は、ゼロ時における最大蛍光であり（* = 掛け算及び \exp = 指数）

、 m_2 は分離速度定数であり（off速度を求める式は当業者に周知である。）、

M_0 は時間 x であり（ x は、測定した時間である。）、

m_3 は系から発生するバックグラウンドである。

【0147】

分離速度定数データを使用して、分離速度が改善された本発明の抗体を変異原ライブラリーから特定することができる。

【0148】

好ましいVH/VL対のVH及びVLセグメントは、好ましくは自然免疫応答（natural immune response）中の抗体の親和性成熟の原因であるインビボ体細胞変異プロセスに類似したプロセスにおけるVHのCDR2領域、VLのCDR1領域及び/又はCDR3領域内で、無作為に変異し得る。このインビボでの親和性成熟は、標的CDR内の3個のアミノ酸をコードする縮重一本鎖オリゴヌクレオチドで各CDRの一部を置換することによって実施することができる。各CDRの一部を新しい無作為化配列（最高8000の可能性）で置換することは、酵母における相同組換えによって実施することができる（例えば、実施例4参照）。これらの無作為に変異させたVH及びVLセグメントを、scFvに関連した少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープとの結合について分析することができる。次いで、蛍光が改善されたscFvであって、（a）生理希釈剤（PBS（pH7.4）及び1%BSA）の存在下で、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに結合し、 $1.3 \times 10^{-4} / \text{sec}$ 未満の k_d 、好ましくは $1.29 \times 10^{-4} / \text{sec}$ から $1.0 \times 10^{-6} / \text{sec}$ の k_d 、より好ましくは $1.29 \times 10^{-4} / \text{sec}$ から $1.0 \times 10^{-5} / \text{sec}$ の k_d を有するscFv、又は（b）少なくとも1種類の選択希釈剤の存在下で、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに結合し、 $9.38 \times 10^{-4} / \text{sec}$ 未満の k_d 、好ましくは $9.37 \times 10^{-4} / \text{sec}$ から $1.0 \times 10^{-6} / \text{sec}$ の k_d 、より好ましくは $9.37 \times 10^{-4} / \text{sec}$ から $1.0 \times 10^{-5} / \text{sec}$ の k_d を有するscFvを単離し、CDR変異を配列決定によって特定することができる。

【0149】

結合親和性を更に増加させるために、上記変異原ライブラリーから単離された個々の変異を組み合わせる。好ましい実施形態においては、VL遺伝子のCDR1領域において得られた異なる変異及び/又はVL遺伝子のCDR3領域において得られた異なる変異と一緒にされた、VH遺伝子のCDR2領域において得られた異なる変異を含むscFv遺伝子を構築する。別の実施形態として、VL遺伝子のCDR1領域において得られた異なる変異とVL遺伝子のCDR3領域において得られた異なる変異とを含むscFv遺伝子を構築する。これらの変異体の組合せを作製する遺伝子操作は、当分野で公知の技術を用いる。次いで、蛍光の改善された組合せ変異scFvクローンであって、（a）少なくとも1種類の生理希釈剤（PBS（pH7.4）及び1%BSA）の存在下で、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに結合し、 $1.3 \times 10^{-4} / \text{sec}$ 未満の k_d 、好ましくは $1.29 \times 10^{-4} / \text{sec}$ から $1.0 \times 10^{-6} / \text{sec}$ の k_d 、より好ましくは $1.29 \times 10^{-4} / \text{sec}$ から $1.0 \times 10^{-5} / \text{sec}$ の k_d を有するscFvクローン、又は（b）少なくとも1種類の選択希釈剤の存在下で、少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露後、又は少なくとも1種類の選択希釈剤と一緒にインキュベートした後、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに結合し、 $9.38 \times 10^{-4} / \text{sec}$ 未満の k_d 、好ましくは $9.37 \times 10^{-4} / \text{sec}$

10

20

30

40

50

から $1.0 \times 10^{-6} / \text{sec}$ の k_d 、より好ましくは $9.37 \times 10^{-4} / \text{sec}$ から $1.0 \times 10^{-5} / \text{sec}$ の k_d を有する s c F v クローンを分析し、C D R 変異を配列決定によって検証することができる。

【0150】

組換え s c F v ディスプレイライブラリーのスクリーニング後、所望の特性を有するクローンを転化用を選択する。選択した抗体をコードする核酸分子を（例えば、酵母発現ベクター由来の）ディスプレイパッケージから回収し、標準組換え D N A 技術によって他の発現ベクターにサブクロニングすることができる。必要に応じて、核酸を更に操作して（例えば、追加の定常領域などの追加の免疫グロブリンドメインをコードする核酸に連結された）本発明の他の抗体形態を作製することができる。コンビナトリアルライブラリーのスクリーニングによって単離した組換えヒト抗体を発現させるために、上記セクション I V で詳述したように、抗体をコードする D N A を組換え発現ベクターにクローン化し、ほ乳動物宿主細胞に導入する。

10

【0151】

V I . 診断免疫測定法

別の態様においては、本発明は、試験試料中の少なくとも1種類の免疫抑制剤（すなわち、分析物）の定性（q u a l i t a t i v e）及び/又は定量化に使用することができる診断免疫測定法に関する。本発明の診断免疫測定法は、（順方向及び逆方向競合阻害アッセイを含めた）競合阻害形式、蛍光偏光形式など、ただしこれらだけに限定されない、当分野で公知の任意の形式を用いて実施することができる。

20

【0152】

試験試料中の少なくとも1種類の免疫抑制剤を定性的に検出する診断免疫測定法においては、少なくとも1種類のその免疫抑制剤の少なくとも1種類のエピトープに結合する少なくとも1種類の抗体を、少なくとも1種類の免疫抑制剤を含むと考えられ、又は含むことが知られ、抗体-免疫抑制剤免疫複合体を形成する、少なくとも1個の試験試料と接触させる。本明細書のセクション I I に記載の抗体をかかると免疫測定法に使用して、少なくとも1個の試験試料中がかかると抗体-免疫抑制剤免疫複合体を形成することができる。次いで、これらの免疫複合体を、当業者に公知である定常的な技術を用いて検出することができる。例えば、本発明の抗体を、検出可能な標識で標識して、抗体-免疫抑制剤複合体の存在を検出することができる。或いは、試験試料中の少なくとも1種類の免疫抑制剤を、検出可能な標識で標識し、生成した抗体-免疫抑制剤免疫複合体を、当業者に公知である定常的な技術を用いて検出することができる。検出可能な標識、及びその抗体との結合については、後により詳細に考察する。

30

【0153】

本発明者らは、診断免疫測定法が、本発明の抗体を用いて実施できることを発見した。より具体的には、本発明の抗体を前記免疫測定法に使用することができる。好ましくは、本発明の抗体は、免疫グロブリンとして、（a）前記抗体が少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露されなかったとき、該選択希釈剤と一緒にインキュベートされなかったとき、又は該選択希釈剤の存在下にあるときに、 $1.9 \times 10^{-11} \text{ M}$ 未満の K_D で、好ましくは $1.89 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ の K_D で、最も好ましくは $1.89 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ の K_D で、又は（b）前記抗体が少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露されたとき、該選択希釈剤と一緒にインキュベートされたとき、又は該選択希釈剤の存在下にあるときに（抗体は、免疫測定前又は測定中に、少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露し、又は該選択希釈剤と一緒にインキュベートすることができ、曝露又はインキュベーションのタイミングは重要ではない。）、 $1.52 \times 10^{-10} \text{ M}$ 未満の K_D で、好ましくは $1.51 \times 10^{-10} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ の K_D で、最も好ましくは $1.51 \times 10^{-10} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ の K_D で、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する。S c F v として、本発明の抗体は、（a）前記抗体が少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露されなかったとき、該選択希釈剤と一緒にインキュベートされなかったとき、又は該選択希釈剤の

40

50

存在下にあるときに、 $1.3 \times 10^{-4} / \text{sec}$ 未満の k_d で、好ましくは $1.29 \times 10^{-4} / \text{sec}$ から $1.0 \times 10^{-6} / \text{sec}$ の k_d で、より好ましくは $1.29 \times 10^{-4} / \text{sec}$ から $1.0 \times 10^{-5} / \text{sec}$ の k_d で、又は(b)前記抗体が少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露されたとき、該選択希釈剤と一緒にインキュベートされたとき、又は該選択希釈剤の存在下にあるときに(抗体は、免疫測定前又は測定中に、少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露し、又は該選択希釈剤と一緒にインキュベートすることができ、曝露又はインキュベーションのタイミングは重要ではない。)、 $9.38 \times 10^{-4} / \text{sec}$ 未満の k_d で、好ましくは $9.37 \times 10^{-4} / \text{sec}$ から $1.0 \times 10^{-6} / \text{sec}$ の k_d で、より好ましくは $9.37 \times 10^{-4} / \text{sec}$ から $1.0 \times 10^{-5} / \text{sec}$ の k_d で、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する。

10

【0154】

好ましい実施形態においては、公知濃度の少なくとも1種類の免疫抑制剤の標識抗原の一定分量を用いて、順方向競合アッセイ形式における(本発明の抗体などの)抗体との結合について、試験試料中の少なくとも1種類の免疫抑制剤と競合させることができる。免疫抑制剤の抗原、及び該抗原を作製する方法は、当分野で周知であり、市販されている。免疫抑制剤又は該免疫抑制剤の抗原は、当業者に公知である任意の検出可能な標識で標識することができる。非限定的な例として、検出可能な標識は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P などの放射性標識、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリペルオキシダーゼ、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼなどの酵素標識、アクリジニウムエステル、ルミナル(luminal)、イソルミノール、チオエステル、スルホンアミド、フェナントリジニウムエステルなどの化学発光標識、フルオレセイン(5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'-6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロ-フルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナートなど)、ローダミン、フィコピリンタンパク質、R-フィコエリトリン、量子ドット(硫化亜鉛でキャッピングされたセレン化カドミウム)などの蛍光標識、温度測定(thermometric)標識、又は免疫ポリマーゼ連鎖反応標識であり得る。標識、標識手順及び標識検出の序論は、Polak and Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2nd ed., Springer Verlag, N.Y. (1997)及びHaugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1996)に記載されている。これは、Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregonによって刊行された総合ハンドブック・カタログである。例えば、本明細書の実施例に記載のように、ビオチン化タクロリムス又はアクリジニウム-タクロリムス抗原を前記競合形式で使用することもできる。

20

30

【0155】

順方向競合アッセイにおいては、(本発明の抗体などの)固定化抗体を試験試料、標識された免疫抑制剤、又は免疫抑制剤の抗原と逐次的に、又は同時に接触させることができる。免疫抑制剤又は該免疫抑制剤の抗原は、当業者に公知である任意の検出可能な標識で標識することができる。このアッセイでは、本発明の抗体を固体担体に固定することができる。さらに、必要に応じて、固体担体を誘導体化して、抗体上の種々の官能基と反応させることができる。かかる誘導体化は、無水マレイン酸、N-ヒドロキシスクシンイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなど、ただしこれらだけに限定されないある種のカップリング剤を使用する必要がある。或いは、本発明の抗体は、微粒子などの固体担体に固定された、抗異種(antisppecies)抗体などの抗体と結合させることができる(実施例9参照)。

40

【0156】

抗体(又は複数の抗体)-免疫抑制剤複合体を形成させるために、標識された免疫抑制剤又は該免疫抑制剤の抗原、試験試料及び抗体をインキュベートする。インキュベーション

50

ンは、pH約4.5から約10.0で、温度約2 から約45 で、少なくとも約1分から約18時間、好ましくは約1 - 24分間、最も好ましくは約4 - 18分間実施することができる。次いで、2種類の抗体 - 免疫抑制剤複合体が生成する。具体的には、生成した抗体 - 免疫抑制剤複合体の一方は、検出可能な標識を含み、他方の抗体 - 免疫抑制剤複合体は、検出可能な標識を含まない。抗体 - 免疫抑制剤複合体は、検出可能な標識を定量する前に、試験試料の残部から分離し得るが、分離しなくてもよい。次いで、抗体 - 免疫抑制剤複合体を試験試料の残部から分離する、しないにかかわらず、抗体 - 免疫抑制剤複合体中の検出可能な標識を定量する。例えば、酵素標識を使用する場合、標識された複合体を、発色などの定量化可能な反応を与える標識用基質と反応させる。標識が放射性標識である場合、シンチレーションカウンターを用いて標識を定量する。標識が蛍光標識である場合、(「励起波長」として知られる)1色の光で標識を刺激し、刺激に応じて標識によって発せられる(「発光波長」として知られる)別の色を検出することによって標識を定量する。標識が化学発光標識である場合、視覚的に、又は照度計、X線フィルム、高速写真フィルム、CCDカメラなどを用いて、発せられた光を検出することによって標識を定量する。次いで、抗体 - 免疫抑制剤複合体中の検出可能な標識の量を検量線と比較することによって、試験試料中の少なくとも1種類の免疫抑制剤の濃度を求めることができる。検量線は、公知濃度の少なくとも1種類の免疫抑制剤の段階希釈、質量分析、重量測定、及び当分野で公知の他の技術によって、作製することができる。

10

【0157】

抗体 - 免疫抑制剤複合体は、固体担体などの固体担体に抗体を結合させ、次いで試験試料の残部を固体担体との接触から解除することによって、試験試料から分離することができる。例えば、少なくとも第1の抗体がウェル、ビーズなどの固体担体に結合している場合、分離は、(試験試料からの)流体を固体担体との接触から解除することによって実施することができる。

20

【0158】

逆方向競合アッセイにおいては、固定された免疫抑制剤、又は該免疫抑制剤の抗原を、試験試料及び少なくとも1種類の標識抗体と逐次的に、又は同時に接触させることができる。少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体の例は、CHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 2-577又はCHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 1-1157によって産生される抗体である。抗体は、当業者に公知である任意の検出可能な標識で標識することができる。検出可能な標識は、抗体に直接、又はカップリング剤を介して、結合させることができる。使用可能なカップリング剤の例は、Sigma-Aldrich、St. Louis、MOから市販されているEDAC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)である。使用可能な他のカップリング剤は、当分野で公知である。検出可能な標識を抗体に結合させる方法は、当分野で公知である。さらに、CPSP-アクリジニウムエステルとしても知られるN10-(3-スルホプロピル)-N-(3-カルボキシプロピル)-アクリジニウム-9-カルボキサミド、SPSP-アクリジニウムエステルとしても知られるN10-(3-スルホプロピル)-N-(3-スルホプロピル)-アクリジニウム-9-カルボキサミドなど、検出可能な標識と抗体のカップリングを促進する末端基を既に含む多数の検出可能な標識を購入又は合成することができる。

30

40

【0159】

免疫抑制剤、又は該免疫抑制剤の抗原は、順方向競合形式に関連して上で考察した固体担体などの固体担体と結合させることができる。

【0160】

固定された免疫抑制剤、又は該免疫抑制剤の抗原、試験試料及び少なくとも1種類の標識抗体を、サンドイッチアッセイ形式に関連して上述した条件と類似の条件下でインキュベートする。次いで、2種類の免疫抑制剤 - 抗体複合体が生成する。具体的には、生成した免疫抑制剤 - 抗体複合体の一方は、固定され、検出可能な標識を含み、他方の免疫抑制剤 - 抗体複合体は、固定されず、検出可能な標識を含む。固定されていない免疫抑制剤 -

50

抗体複合体、及び試験試料の残部は、洗浄などの当分野で公知の技術によって、固定された免疫抑制剤 - 抗体複合体の存在から除去される。固定されていない免疫抑制剤抗体複合体を除去した後、次いで、固定された免疫抑制剤 - 抗体複合体中の検出可能な標識を定量する。次いで、免疫抑制剤複合体中の検出可能な標識の量を検量線と比較することによって、試験試料中の少なくとも1種類の免疫抑制剤の濃度を求めることができる。検量線は、公知濃度の少なくとも1種類の免疫抑制剤の段階希釈、質量分析、重量測定、及び当分野で公知の他の技術によって、作製することができる。

【0161】

蛍光偏光アッセイでは、一実施形態において、抗体又は機能的に活性なその断片を、少なくとも1種類の免疫抑制剤を含むと考えられる非標識試験試料とまず接触させて、非標識免疫抑制剤 - 抗体複合体を形成する。次いで、非標識免疫抑制剤 - 抗体複合体を蛍光標識免疫抑制剤、又は該免疫抑制剤の抗原に接触させる。標識免疫抑制剤、又は該免疫抑制剤の抗原は、抗体又は機能的に活性なその断片との結合について、試験試料中の少なくとも1種類の任意の非標識免疫抑制剤と競合する。形成された標識免疫抑制剤 - 抗体複合体の量を求め、試験試料中の免疫抑制剤の量を検量線を用いて求める。

10

【0162】

好ましくは、蛍光偏光アッセイに用いられる抗体は、免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する。少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体の例は、CHO細胞系 1 - 60 - 46 AM2 CHO 2 - 577又はCHO細胞系 1 - 60 - 46 AM2 CHO 1 - 1157によって産生される抗体である。

20

【0163】

抗体、標識免疫抑制剤、又は該免疫抑制剤の標識抗原、試験試料、及び少なくとも1種類の標識抗体を、順方向競合アッセイ形式に関連して上述した条件と類似の条件下でインキュベートする。

【0164】

或いは、別の実施形態においては、抗体又は機能的に活性なその断片を、蛍光標識免疫抑制剤、又は免疫抑制剤の抗原と、少なくとも1種類のその免疫抑制剤を含むと考えられる非標識試験試料とに同時に接触させて、標識免疫抑制剤 - 抗体複合体と非標識免疫抑制剤 - 抗体複合体の両方を形成する。形成された標識免疫抑制剤 - 抗体複合体の量を求め、試験試料中の免疫抑制剤の量を検量線を用いて求める。この免疫測定法に用いられる抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する。少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体の例は、CHO細胞系 1 - 60 - 46 AM2 CHO 2 - 577又はCHO細胞系 1 - 60 - 46 AM2 CHO 1 - 1157によって産生される抗体である。

30

【0165】

或いは、更に別の実施形態においては、(CHO細胞系 1 - 60 - 46 AM2 CHO 2 - 577又はCHO細胞系 1 - 60 - 46 AM2 CHO 1 - 1157によって産生される抗体などの本発明の抗体などの)抗体、又は機能的に活性なその断片を、蛍光標識免疫抑制剤、又は該免疫抑制剤由来の抗原にまず接触させて、標識免疫抑制剤 - 抗体複合体を形成する。次いで、標識免疫抑制剤 - 抗体複合体を、免疫抑制剤又は免疫抑制剤の抗原を含むと考えられる非標識試験試料に接触させる。試験試料中の少なくとも1種類の任意の非標識免疫抑制剤は、抗体又は機能的に活性なその断片との結合について、標識免疫抑制剤又は免疫抑制剤の抗原と競合する。形成された標識免疫抑制剤 - 抗体複合体の量を求め、試験試料中の免疫抑制剤の量を検量線を用いて求める。この免疫測定法に用いられる抗体は、少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する。少なくとも1種類の免疫抑制剤上の少なくとも1種類のエピトープに特異的に結合する抗体の例は、CHO細胞系 1 - 60 - 46 AM2 CHO 2 - 577又はCHO細胞系 1 - 60 - 46 AM2 CHO 1 - 1157によって産生される抗体である。

40

50

【0166】

V I I . 抗体及び特異的結合パートナーを選択する方法

本発明は、抗体又は特異的結合パートナーを選択する方法も提供する。本明細書に記載の方法に従って選択された抗体又は特異的結合パートナーを診断免疫測定法に使用して、試験試料中の分析物を検出することができ、試験試料中の分析物を定量することができ、又は試験試料中の分析物を検出して、試験試料中の分析物を定量することができる。

【0167】

一態様においては、本発明は、(親和性成熟抗体などの)抗体を選択する方法に関する。方法は、少なくとも1種類の選択希釈剤の存在下で、少なくとも1種類の抗体を試料と接触させることを含む。或いは、方法は、少なくとも1種類の抗体を少なくとも1種類の選択希釈剤と一緒にまずインキュベートし、次いで少なくとも1種類の抗体を試料と接触させることを含む。少なくとも1種類の抗体、試料及び少なくとも1種類の選択希釈剤、又は事前のインキュベーションの場合には、少なくとも1種類の抗体及び少なくとも1種類の選択希釈剤、続いて少なくとも1種類の抗体及び試料を接触させる順序は重要ではなく、逐次的に、又は同時に実施することができる。さらに、方法に用いられる抗体、試料又は両方の量も重要ではない。試料が由来する対象のインビボでの生理的条件を近似、模倣又はシミュレートする(換言すれば、試験試料をより「生理的のように」する)ために、試料を少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露する前に、少なくとも1種類の生理希釈剤を試験試料に添加してもよい(試験試料に添加すべき生理希釈剤の量は、当業者が容易に決定することができる。)。前記試料を少なくとも1種類の生理希釈剤に曝露する場合、少なくとも1種類の選択希釈剤を試験試料に添加すると、又は試験試料を少なくとも1種類の選択希釈剤に曝露すると、少なくとも1種類の選択希釈剤は、試験試料の状態を変化させ、「非生理学的」にすると予想される。例えば、少なくとも1種類の生理希釈剤を試験試料に添加する場合、少なくとも1種類の選択希釈剤を試験試料に添加すると、試験試料のpHが上昇又は低下し、試験試料中のナトリウム又はカリウム塩の量が増加し、試験試料中の溶媒の量が増加し得る。

10

20

【0168】

方法に用いられる試料は、少なくとも1種類の目的エピトープを含む分析物源である。試料は、対象から得られる試験試料であり得、又は対象に由来しなくてもよいが、それでもなお少なくとも1種類の目的エピトープを含む分析物を含む。試料は、これらだけに限定されないが、目的とする抗体、抗原、ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含み得る。例えば、試料は、タクロリムス、シクロスポリンなどの免疫抑制剤(すなわち、薬物自体)であり得る。或いは、試料は、対象から得られる、タクロリムス又はシクロスポリンを含む全血試料であり得る。或いは、試料は、アビジンで標識されたタンパク質を含み得る。

30

【0169】

本明細書に記載の方法において試験用に選択された少なくとも1種類の抗体は、少なくとも1種類の目的エピトープに結合することが当業者に知られている(すなわち、少なくとも1種類の抗体は、目的エピトープを含む分析物(抗原)に対する特異的結合パートナーであることが知られている。)。好ましくは、抗体及び抗原は、特異的結合対の一部である。例えば、試料は、タクロリムス(すなわち、薬物自体)であり得る。抗体は、タクロリムスに結合する、本明細書に記載のハイブリドーマ細胞系1-60-46、CHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 2-577又はCHO細胞系1-60-46 AM2 CHO 1-1157から産生される抗体であり得る。本明細書に記載の方法を実施する前に、少なくとも1種類の抗体の平衡解離定数(K_D)、分離速度定数(k_d)、会合速度定数(k_a)又は機能活性を選択希釈剤の存在下及び非存在下で該方法において試験し、ベースライン測定として役立つことを判定することが、必須ではないが、好ましい。

40

【0170】

50

好ましくは、本明細書に記載の方法用に選択された選択希釈剤は、(a) 該方法において試験される少なくとも1種類の抗体の K_D を増加させる(したがって k_a を減少させ、及び/又は k_d を増加させる)ことが当業者に知られ、又は該方法において試験される少なくとも1種類の抗体の K_D を増加させる可能性があるとして該当業者に考えられており、(b) もし前記少なくとも1種類の抗体が、該選択希釈剤と一緒にインキュベートされるとしたら、又は(診断免疫測定前又は測定中に使用されるなど、ただしこれらだけに限定されずに)該選択希釈剤と一緒に、若しくは該選択希釈剤の存在下で使用されるとしたら、該方法において試験される少なくとも1種類の抗体の機能活性を低下させることが当業者に知られ、又は該方法において試験される少なくとも1種類の抗体の機能活性を低下させる可能性があるとして該当業者に考えられており、又は(c) (a) - (b)の任意の組合せである。

10

【0171】

90%メタノールと10%エチレングリコール(及び場合によっては100mM硫酸亜鉛)の組合せなどの1種類以上の有機溶媒を含むアッセイ抽出緩衝剤を用いて、対象の治療の一部としてこの免疫抑制剤を投与された対象から得られた全血試験試料からタクロリムスを抽出する。本発明者らは、診断免疫測定法に使用されるこれらのアッセイ抽出緩衝剤が、該免疫測定法に用いられる1種類以上の抗体の K_D 、機能活性、又は K_D と機能活性の両方を変化させることを発見した。したがって、本明細書に記載の方法においては、選択希釈剤を用いて、診断免疫測定法の反応条件を近似、シミュレート又は模倣することが好ましい。選択希釈剤を用いて診断免疫測定法の反応条件を近似、シミュレート又は模倣することによって、本発明の方法は、当業者が、診断免疫測定法において、この方法に従って選択されない抗体よりも高い親和性又は機能活性を示す抗体を選択できるようにする。

20

【0172】

方法を容易にするために、方法に用いられる少なくとも1種類の抗体の全部又は一部のみを(バイオディスプレイなどの)本明細書のセクションIV及びVに記載の技術を用いて、該抗体の表現型を該抗体の遺伝子型に結びつけるように、発現させることができる。好ましくは、これによって、選択圧の適用後に、すなわち非生理的条件をもたらす選択希釈剤とのインキュベーション、又は結合競合剤を含む選択希釈剤とのインキュベーション後に、目的形質(例えば、有機溶媒の存在下の解離速度の減少)を示す前記抗体の遺伝子を単離することができる。さらに、出発抗体遺伝子配列に種々の変化を導入する組換えライブラリーを、当業者に公知の方法、及び本明細書のセクションIV及びVに記載の方法を用いて、構築することができる。方法に用いられる試料は、酵素免疫測定法(「EIA」)プレート中に存在する吸収剤ポリマー、Sephacrose、ガラスなど、ただしこれらだけに限定されない他のマトリックスなど、ただしこれらだけに限定されない固体担体に固定することができ、当業者に公知の手段によって天然又は組換え細胞系の細胞表面で(未変性形態、組換え形態などで)発現させることができる。或いは、試料を固定せず、溶液中に単に存在させることができる。さらに、少なくとも1種類の抗体、試料又は両方を、セクションVIに記載の技術を用いて、検出可能な標識で標識することができる。

30

【0173】

抗体(又は複数の抗体)-分析物複合体、分析物-抗体複合体、又は抗体(複数の抗体)-分析物複合体と分析物-抗体複合体の組合せを形成させるために、少なくとも1種類の抗体、試料及び少なくとも1種類の選択希釈剤、又は(抗体を少なくとも1種類の選択希釈剤と一緒に前もってインキュベートした場合)少なくとも1種類の抗体と試料をインキュベートする。インキュベーションは、pH約4.5から約10.0で、温度約2から約45で、少なくとも約1分から約48時間実施することができる。

40

【0174】

インキュベーション後、所望の形質に対して表現型の向上を示す抗体を、望ましくない抗体の除去後に、選択的に富化する。望ましくない抗体は、表現型特性の向上した抗体と同じ程度には固定試料に結合し得ないので、洗浄によって除去することができる。或いは

50

、所望の形質に対して表現型の向上を示す抗体を、セクションVIに記載のようにレポーターシステムを用いて望ましくない抗体から富化して、所望の抗体を明確にし、続いて望ましくない抗体から分離することができる。非限定的な好ましい実施形態は、蛍光標識された試料と併せて、蛍光活性化細胞選別（「FACS」）を使用して、所望の表現型の向上した抗体を選択的に特定し、単離する。試料上の重複していないエピトープに結合し得る第2の蛍光標識試薬が利用可能である場合、非標識試料を用いて、FACSと併せて、所望の表現型の向上した抗体を特定し、単離することもできる。典型的には、富化された、表現型形質の向上したクローンを増幅し、選択プロセスを繰り返して、更に富化し、精製する。

【0175】

複数ラウンドの上記選択後、少なくとも1種類の抗体の K_D 、 k_d 、 k_a 若しくは機能活性又はその組合せを、当分野で公知の定常的な技術を用いて求めることができる。例えば、 K_D 、 k_d 又は k_a をKinExA（登録商標）又はBiacore（登録商標）アッセイによって求めることができる。抗体の機能活性を求める方法も当分野で周知であり、KinExA（登録商標）及びBiacore（登録商標）アッセイ、放射性免疫測定法（「RIA」）、酵素免疫測定法（「EIA」）、化学発光免疫測定法（「CIA」）、蛍光相関分光法（「FCS」）、蛍光活性化細胞選別（「FACS」）又は蛍光偏光免疫測定法（「FPIA」）が挙げられるが、これらだけに限定されない。試験（及び場合によってはベースライン測定）された他の抗体と比較したときに、選択希釈剤の存在下で最良の K_D 、 k_d 若しくは k_a 又は機能活性を示す抗体は、改善された抗体（例えば、親和性成熟抗体）であるとみなされ、診断免疫測定法における使用などの更なる開発用に選択される。

【0176】

第2の態様においては、本発明は、試験試料中の分析物を検出するための特異的結合パートナーを選択する方法に関する。方法は、少なくとも1種類の選択希釈剤の存在下で、特異的結合パートナーを試料と接触させることを含む。特異的結合パートナー、試料及び少なくとも1種類の選択希釈剤を接触させる順序は重要ではなく、逐次的に、又は同時に実施することができる。さらに、方法に用いられる特異的結合パートナー又は試料の量も重要ではない。

【0177】

方法に用いられる試料は、少なくとも1種類の目的エピトープを含む分析物源である。試料は、対象から得られる試験試料であり得、又は対象に由来しなくてもよいが、それでもなお少なくとも1種類の目的エピトープを含む分析物を含む。試料は、これらだけに限定されないが、目的とする抗体、抗原、ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含み得る。例えば、試料は、タクロリムス、シクロスポリンなどの免疫抑制剤（すなわち、薬物自体）であり得る。或いは、試料は、対象から得られる、タクロリムス又はシクロスポリンを含む全血試料であり得る。

【0178】

本明細書に記載の方法における試験用に選択された少なくとも1種類の特異的結合パートナーは、試験試料中の分析物に含まれる少なくとも1種類の目的エピトープに結合することが当業者に知られている。例えば、試料は、タクロリムス又はシクロスポリン（すなわち、薬物自体）であり得る。特異的結合パートナーは、（血清などの）試験試料中に存在する、サイクロフィリン、FK結合タンパク質（「FKBP」）など、ただしこれらだけに限定されないタンパク質であり得る。本明細書に記載の方法を実施する前に、少なくとも1種類の特異的結合パートナーの平衡解離定数（ K_D ）、分離速度定数（ k_d ）、会合速度定数（ k_a ）又は機能活性を選択希釈剤の存在下及び非存在下で該方法において試験し、ベースライン測定として役立つことを判定することが、必須ではないが、好ましい。

【0179】

10

20

30

40

50

好ましくは、本明細書に記載の方法用に選択された選択希釈剤は、(a) 該方法において試験される少なくとも1種類の抗体の K_D を増加させる(したがって k_a を減少させ、及び/又は k_d を増加させる)ことが当業者に知られ、又は該方法において試験される少なくとも1種類の抗体の K_D を増加させる可能性があるとして該当業者に考えられており、(b) もし前記少なくとも1種類の抗体が、該選択希釈剤と一緒にインキュベートされるとしたら、又は(診断免疫測定前又は測定中に使用されるなど、ただしこれらだけに限定されずに)該選択希釈剤と一緒に、若しくは該選択希釈剤の存在下で使用されるとしたら、該方法において試験される少なくとも1種類の抗体の機能活性を低下させることが当業者に知られ、又は該方法において試験される少なくとも1種類の抗体の機能活性を低下させる可能性があるとして該当業者に考えられており、又は(c) (a) - (b)の任意の組合せである。

10

【0180】

上述したように、90%メタノールと10%エチレングリコール(及び場合によっては100mM硫酸亜鉛)の組合せなどの1種類以上の有機溶媒を含むアッセイ抽出緩衝剤を用いて、対象の治療の一部としてこの免疫抑制剤を投与された対象から得られた全血試験試料からタクロリムスを抽出する。したがって、本明細書に記載の方法においては、選択希釈剤を用いて、診断免疫測定法の反応条件を近似、シミュレート又は模倣することが好ましい。診断免疫測定法の反応条件を近似、シミュレート又は模倣する選択希釈剤を使用することによって、本発明の方法は、当業者が、診断免疫測定用の更に評価することができる改善された特異的結合パートナーを選択できるようにする。

20

【0181】

方法を容易にするために、方法に用いられる少なくとも1種類の特異的結合パートナーの全部又は一部のみを、本明細書のセクションIV及びVに記載の技術を用いて、該抗体の表現型を該抗体の遺伝子型に結びつけるように、発現させることができる。好ましくは、これによって、選択圧の適用後に、すなわち非生理的条件をもたらす選択希釈剤とのインキュベーション、又は結合競合剤を含む選択希釈剤とのインキュベーション後に、目的形質(例えば、有機溶媒の存在下の解離速度の減少)を示す前記特異的結合パートナーの遺伝子を単離することができる。さらに、出発特異的結合パートナー遺伝子配列に種々の変化を導入する組換えライブラリーを、当業者に公知の方法、及び本明細書のセクションIV及びVに記載の方法を用いて、構築することができる。方法に用いられる試料は、酵素免疫測定法(「EIA」)プレート中に存在する吸収剤ポリマー、Sephacrose、ガラスなど、ただしこれらだけに限定されない他のマトリックスなど、ただしこれらだけに限定されない固体担体に固定することができ、当業者に公知の手段によって天然又は組換え細胞系の細胞表面で(未変性形態、組換え形態などで)発現させることができる。或いは、試料を固定せず、溶液中に単に存在させることができる。さらに、少なくとも1種類の特異的結合パートナー、試料又は両方を、セクションVIに記載の技術を用いて、検出可能な標識で標識することができる。

30

【0182】

特異的結合パートナー(又は複数の特異的結合パートナー)-分析物複合体を形成するために、特異的結合パートナー、試料及び少なくとも1種類の選択希釈剤をインキュベートする。インキュベーションは、pH約4.5から約10.0で、温度約2 から約45 で、少なくとも約1分から約48時間実施することができる。

40

【0183】

インキュベーション後、所望の形質に対して表現型の向上を示す特異的結合パートナーを、望ましくない特異的結合パートナーの除去後に、選択的に富化する。望ましくない特異的結合パートナーは、表現型特性の向上した特異的結合パートナーと同じ程度には固定試料に結合し得ないので、洗浄によって除去することができる。或いは、所望の形質に対して表現型の向上を示す特異的結合パートナーを、セクションVIに記載のようにレポーターシステムを用いて望ましくない特異的結合パートナーから富化して、所望の特異的結合パートナーを明確にし、続いて望ましくない特異的結合パートナーから分離することが

50

できる。非限定的な好ましい実施形態は、蛍光標識された試料と併せて、蛍光活性化細胞選別（「FACS」）を使用して、所望の表現型の向上した特異的結合パートナーを選択的に特定し、単離する。試料上の重複していないエピトープに結合し得る第2の蛍光標識試薬が利用可能である場合、非標識試料を用いて、FACSと併せて、所望の表現型の向上した特異的結合パートナーを特定し、単離することもできる。典型的には、富化された、表現型形質の向上したクローンを増幅し、選択プロセスを繰り返して、更に富化し、精製する。

【0184】

複数ラウンドの上記選択後、特異的結合パートナー - 分析物複合体を形成した特異的結合パートナーの K_D 、 k_d 、 k_a 若しくは機能活性を、当分野で公知の定常的な技術を用いて求めることができる。例えば、 K_D 、 k_d 又は k_a をKinExA（登録商標）又はBiacore（登録商標）アッセイによって求めることができる。特異的結合パートナーの機能活性を求める方法も当分野で周知であり、KinExA（登録商標）及びBiacore（登録商標）アッセイ、放射性免疫測定法、酵素免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光相関分光法、蛍光活性化細胞選別又は蛍光偏光免疫測定法が挙げられるが、これらだけに限定されない。試験された他の特異的結合パートナーと比較したときに、分析物との結合において最良の K_D 、 k_d 若しくは k_a 又は機能活性を示す特異的結合パートナーは、改善されたとみなされ、診断免疫測定法における使用などの更なる開発用に選択される。以下、非限定的な例として、本発明の実施例を記述する。

【実施例1】

【0185】

免疫グロブリン遺伝子の同定

メッセンジャーRNAを抗タクロリムス1-60-46ハイブリドーマ細胞から市販キットを用いて単離した。Novagen（（Merck KGaA、Darmstadt、Germanyの系列会社である）Novagen、Cat No. 69831-3）から購入したマウスIgプライマーセットキットを用いて、キットに含まれる免疫グロブリン遺伝子特異的プライマーと一緒に、1-60-46 mRNAを逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応法に利用した。生成したPCR産物の配列を決定し、免疫グロブリン可変重鎖及び可変軽鎖遺伝子を特定した（図2、6及び7A-7B並びに配列番号1-14、43及び45参照）。

【実施例2】

【0186】

タクロリムス1-60-46mAbから単鎖抗体断片（scFv）への転化

酵母ディスプレイシステムを用いて、（下記）未変異（野生型（「wt」））抗タクロリムスタンパク質及び抗タクロリムスタンパク質ライブラリーを、酵母結合タンパク質AGA2との融合物として酵母表面で発現させた（Boder and Witttrup, Nature Biotechnology, 15: 553-557 (June 1997) 参照）。PCR single overlap extension（「SOE」）によって、可変重鎖遺伝子（「VH」）と可変軽鎖遺伝子（「VL」）を配列GPAKELTPLKEAKVS（配列番号36）の柔軟なリンカーを介して連結して、WT 1-60-46 scFv構築体を作製した（図1参照）。プライマーTacro scFv VH順方向 - (GCGGCCCAAGCCGGCCATGGCCGAGGTGGAAT TGGTGGAGTCTGGG（配列番号47））及びTacro scFv VL逆方向 (CGCCTCCTTCAAGGGGCGTCAACTCCTTGGCGGGACCTG CAGAGACAGTGACCAGAGTCCC（配列番号48））を用いて、1-60-46 VH遺伝子（配列番号43）を増幅した。プライマーTacro scFv VL順方向 - (AAGGAGTTGACGCCCTGAAGGAGGCGAAGGTCTCTGATGTTTTGATGACCCAAACTCCA（配列番号49））及びTacro scFv VL逆方向 (GACTCGAGGGCGGCGCCCGTTTCA GCTCCAGCTTGGTCCC（配列番号50））を用いて、1-60-46 VL

遺伝子（配列番号45）を増幅した。続いて、1-60-46 scFv DNAを酵母ディスプレイベクターpYD1（Invitrogen、Carlsbad、California）に標準分子生物学技術を用いてクローン化した。このベクターは、ガラクトース誘導性プロモーター、C末端V5エピトプタグ並びにそれぞれEBY100及びE. coli（E. coli）選択用のトリプトファン及びアンピシリンマーカーを含む。タクロリムスWT 1-60-46 scFv_pYDベクターをDH5 E. coliに転換し、配列を検証した。

【0187】

タクロリムスWT 1-60-46 scFv_pYDベクターをトリプトファン欠乏S.セレビスエ系統EBY100にGietzとSchiestlの方法を用いて転換した（Schiestl and Gietz, Current Genetics, 16(5-6):339-46(Dec. 1989)）。形質転換反応物の希釈物を（トリプトファンを欠く）選択的グルコースプレート（2%グルコース（0.67%酵母窒素ベース、0.105%Hollenberg Supplement Media（「HSM」）-trp（トリプトファン）-ura（ウラシル）、1.8%細菌寒天、18.2%ソルビトール、0.86%NaH₂PO₄ H₂O、1.02%Na₂HPO₄ 7H₂O））に蒔き、30℃で48-72時間インキュベートした。選択グルコース培地に個々のコロニーを接種し、30℃で16-20時間振とう増殖させた。細胞0.5 OD₆₀₀/ml（1×10⁷（「1e7細胞」）/0.5OD/ml）を選択ガラクトース培地に移すことによって、タンパク質発現をコロニー中で誘導した。コロニーを20℃で16-24時間振とうし、次いで（「bt-tacro」と称する）分子の32位に結合したビオチン基を有するタクロリムス抗原（Abbott Laboratories、Abbott Park、Illinois）及び抗V5モノクローナル抗体（Invitrogen、Carlsbad、California）との結合についてフローサイトメトリーによって分析した。フローサイトメトリーアッセイでは、1-60-46 scFvを発現する酵母細胞を、bt-tacro及び抗V5モノクローナル抗体、続いてストレプトアビジン：フィコエリトリン（SA:PE、BD Pharmingen）及びヤギ抗マウス免疫グロブリン-Alexa Fluora 488（GAM:488、（Invitrogen、Carlsbad、Californiaの系列会社である）Molecular Probes）と一緒にインキュベートした。図1Cに示すフローサイトメトリーデータの二変量プロットは、1-60-46 scFv（抗V5）の完全長表面発現、及び1-60-46 scFvとbt-tacroの結合（SA:PE）を示す。

【実施例3】

【0188】

酵母上の1-60-46 scFvの解離速度分析

0.05OD酵母（1×10⁶細胞）を100nM bt-tacro（10倍モル過剰）及び抗V5抗体（2.5ug/ml）で室温で30-60分間飽和させることによって、酵母上の1-60-46 scFv及び1-60-46変種の解離速度測定値を測定した。（a）（リン酸緩衝食塩水（「PBS」）、pH7.4及び1%ウシ血清アルブミン（「BSA」）で構成された生理希釈剤、及び（b）（PBS、BSA及び10%メタノールで構成された）選択希釈剤中で反応を実施した。次いで、細胞を2回洗浄し、100倍モル過剰の非標識タクロリムス（Astellas Pharma, Inc.、Tokyo、Japan）と一緒に適切な希釈剤（上記生理希釈剤又は選択希釈剤）中で室温でインキュベートした。個々の試料を種々の時点で抜き取り、フローサイトメトリーによって分析して、二次染色試薬SA:PE（1:200希釈）及びGAM:488（1:100希釈）の添加後に残留した結合bt-tacroの量を求めた。図1Dは、平均蛍光強度（「MFI」）対時間（秒）としてプロットした解離速度データである（図1D参照）。一次指数減衰式（ $y = m1 * \exp(-m2 * m0) + m3$ ）によって、データを適合させた。WT 1-60-46 scFvの解離は、10%メタノールなしで1×1

10

20

30

40

50

$0.4 (\pm 2 \times 10^{-5}) / \text{sec}$ 、10%メタノールありで $9 \times 10^{-4} (\pm 2 \times 10^{-4}) / \text{sec}$ と求められた。1-60-46 scFv 半減期 ($t_{1/2} = \ln 2 / k_{off}$) は、10%メタノールの非存在下で115分、10%メタノールの存在下で13分であった。

【実施例4】

【0189】

1-60-46 CDR 変異原ライブラリーの作製

抗タクロリムス抗体 1-60-46 の全6個のCDR (図3、4、6及び7A-7B並びに配列番号2、4、6、9、11及び13参照) を変異誘発に供した。3連続CDRアミノ酸位置を無作為に変異させた、8000個のメンバーで構成された個々のライブラリーを作製した (図3及び4参照)。特定の重鎖又は軽鎖可変領域内のCDR領域の具体的な名称は、かかる領域を識別するのに用いられる慣行又は付番方式に応じて変わり得ることを理解されたい (例えば、すべて当業者に公知である、Chothia、Kabats、Oxford Molecular's AbM modeling software、IMGT V-quest)。しかし、かかる名称は重要ではない。各CDRの特定の領域を欠く、直線化されたpYD1ベクターをPCRによって調製し、酵母に固有の相同組換えシステムを用い、Gietzライブラリー転換プロトコル (Schiestl and Gietz, Current Genetics, 16(5-6):339-46 (Dec 1989) 参照) を用いて、標的CDR中の3アミノ酸変異原性ウィンドウ内の全19個のアミノ酸置換候補をコードする縮重一本鎖オリゴヌクレオチドで「ギャップ」を置換した。転換された酵母細胞を、再構成されたベクター上に存在する栄養要求性トリプトファンマーカを用いて選択的に回収した。合計50個のライブラリーを作製した。図3及び4に模式的に示す。

【実施例5】

【0190】

1-60-46 変異原ライブラリーの選択

解離速度選別戦略によって、(PBS、1%BSA及び10%メタノールで構成された) 選択希釈剤中で結合特性が改善された全50個の変異原ライブラリーから1-60-46変種を特定した。各CDR領域内の個々のライブラリーを選択前にプールした (例えば、H1ライブラリー1-8を組み合わせて、H1マスターライブラリーを作製した)。しかし、各CDRマスターライブラリーは、選択プロセス中に互いに別個のままにされた。1-60-46変異原ライブラリーをまず選択希釈剤中で室温でbt-tacroで20分間飽和させ、10分間氷冷した。親wt 1-60-46 scFvよりも結合が改善された変種を選択するために、細胞を洗浄し、次いで選択希釈剤中で室温で100倍モル過剰で65-72分間 ($5 \times \text{WT scFv } t_{1/2}$) インキュベートした。解離インキュベーション後、細胞を再冷却し、洗浄し、標識した。個々の細胞上に残留したbt-tacro抗原の量をSA:PE (1:200希釈) を用いて検出した。抗原結合を、抗V5 mAb (2ug/ml) 及びGaM-488 (1:100希釈) を用いた個々の細胞上のscFv発現量に対して正規化した。対照試料を調製して蛍光補償 (fluorescence compensation) を設定し、非特異的結合をモニターした。比較のために、(PBS、pH7.4及び1%BSAで構成された) 生理希釈剤中でインキュベートした試料も調製した。所望の結合特性を有する変種の集団を、FACS Aria細胞選別機 (Becton Dickinson, San Jose, CA) を用いて蛍光活性化細胞選別 (「FACS」) によって選択的に富化した。

【0191】

各ライブラリー試料について3ラウンドの選択を実施した。代表的なライブラリーを図5に示す。各ラウンドの選択は、scFv発現シグナルに対してプロットされた、SA:PE (抗原結合性) チャネル中で最大の蛍光度を有する細胞の0.1% - 1%を選択的に通過させること (gating) からなつた。選択された細胞を収集し、デキストロースを含む培地中で30で2-3日間再増殖させた (選択ラウンド出力 (selectio

n round output))。デキストロースは、ガラクトースプロモーターからの発現を阻害し、それによって s c F v 発現を阻止する。各ライブラリーの一定分量を取り出して、保存用の各ラウンド出力とした。次いで、s c F v 発現のために、ガラクトースを含む培地を用いて、20 で 12 - 24 時間出力を誘導し、選択プロセスを繰り返した。選択希釈剤中で解離速度を減少させる変異を含むライブラリーは、選択の各ラウンドを通して次第に鮮明になった (H2、L1 及び L3) のに対して、有利な変化を欠くライブラリーは鮮明にならず、それ以上分析しなかった。第3ラウンドの選別後の細胞の一定分量を選択培地に蒔いて、更なる分析用に個々のクローンを得た。

【実施例6】

【0192】

10

選択された 1 - 60 - 46 変種の分析

上記選択から (PBS、1%BSA 及び 10%メタノールで構成された) 選択希釈剤中で b t - t a c r o との結合が改善された各マスター C D R ライブラリー (H2、L1 及び L3) 由来の幾つかの個々のクローンから s c F v 領域を P C R によって増幅した。ベクター特異的プライマー (p Y D 4 1 順方向 - T A G C A T G A C T G G T G G A C A G C (配列番号 37) 及び p Y D 4 1 逆方向 - C G T A G A A T C G A G A C C G A G (配列番号 38)) を用いて s c F v 遺伝子を増幅し、配列を決定して、アミノ酸置換を確認した。図6及び7は、得られた各独特のクローンの配列決定結果を強調したものである。

【0193】

20

各独特のクローンを誘導して、s c F v を発現させ、選択された変異 s c F v の結合特性をフローサイトメトリーによって評価した。各変異体の解離速度 (k_{off}) を、10%メタノールの存在下及び非存在下で、反応中に、上で概説したように評価した (図8参照)。すべての変異クローンは、WT 1 - 60 - 46 s c F v に比べて両反応条件下で k_{off} が 2 から 8 倍改善し、最良のクローン (L3 - 1A) の解離速度は、10%メタノール中で $1.2 \times 10^{-4} / \text{sec}$ であった。

【0194】

30

各マスター C D R ライブラリーからの、解離速度の改善が最大であるクローンを更に特性評価した。b t - t a c r o 抗原に対する平衡解離定数 (K_D) を、(a) (PBS、pH 7.4 及び 1%BSA で構成された) 生理希釈剤と、(b) (PBS、1%BSA 及び 10%メタノールで構成された) 選択希釈剤の両方で求めた。s c F v 発現を誘導された酵母クローンを、種々の濃度の b t - t a c r o (抗原濃度の範囲) と混合し、適切な希釈剤中で平衡にした (4 - 18 時間)。反応物を氷上でクエンチし、洗浄し、上述したようにフローサイトメトリー測定用に標識した (例えば、Hawley and Hawley, eds., Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols, 2nd ed., Humana Press, Totowa, NJ, pages 311 - 332 (2004) 参照)。抗体正規化、抗原結合平均蛍光強度を抗原濃度に対してプロットし、非線形最小二乗適合 ($y = m_1 + m_2 * m_0 / (m_3 + m_0)$) によって K_D を求めた。変異体は、WT 1 - 60 - 46 s c F v に比べて 2 から 8 倍の改善を含み、最大親和性クローン (H2 - 1A) は、10%メタノール中で $K_D = 1.3 \times 10^{-10} \text{ M}$ であった。

40

【実施例7】

【0195】

タクロリムス 1 - 60 - 46 コンビナトリアル変異クローンの作製及び分析

各マスター C D R ライブラリーからの、解離速度が最も改善したクローンを用いて、個々の変異の種々の組合せを含む s c F v 遺伝子を構築した。この手法によって、個々の変異を組み合わせると結合特性が更に向上するかどうかを判定することができる。H2 (H2 - 1A、H2 - 1B、H2 - 3B)、L1 (L1 - 1B、L1 - 4A) 及び L3 (L3 - A、L3 - 1A、L3 - 2A、L3 - 1B、L3 - 2B) C D R 領域に種々の変異を含むコンビナトリアルクローンを P C R 増幅によって構築し、当業者に公知である定常的な技術を用いて組み合わせた。コンビナトリアル変異クローンの配列を検証し、更なる特性

50

評価用に、上述したように酵母に転換した。(上述したように)各コンビナトリアル変異クローンを誘導してs c F vを発現させ、結合特性をフローサイトメトリーによって評価した。

【0196】

各クローンに対する解離速度を(PBS、1%BSA及び10%メタノールで構成された)選択希釈剤を用いて求めた。さらに、幾つかのクローンを(PBS、pH7.4及び1%BSAで構成された)生理希釈剤中でも分析した(図8及び9参照)。タクロリムス1-60-46組合せ変異クローンの多くは、 k_{off} が10倍を超える改善を示し、最良のクローン(H2-1A/L3-1A)の解離速度は10%メタノール中で $5.5 \times 10^{-5} / \text{sec}$ であり、一般に最初のタクロリムス1-60-46変異体のどれよりも、特にWT 1-60-46クローンよりもかなり改善された。bt-tacro抗原に対する平衡解離定数も上記選択希釈剤中で求めた。変異の大部分のコンビナトリアル組合せは、最初のタクロリムス1-60-46変異体とWT 1-60-46クローンの両方に比べて親和性が改善する(図8及び9参照)。クローンH2-1A/L1-1B/L3-Aは、 K_D が $3.8 \times 10^{-11} \text{ M}$ であった。

10

【実施例8】

【0197】

酵母ディスプレイ由来の抗体のクローニング及び発現

可変ドメインをPCR増幅し、続いてこれらのドメインをpBOSベクター中に存在する完全なIgG2a定常領域又は領域に連結することによって、選択タクロリムス1-60-46変異s c F vクローン(図10参照)をネズミIg2a/抗体(IgG)に転化した(Mizushima and Nagata, Nucleic Acids Research, 18:5322, (1990))。選択1-60-46変異体VH遺伝子を、Tacro VH IgG2a順方向-(TTC TTG TCG CG ATTT TAAAAGGTGTCCAGTGC GAGGTGGAATTGGTGGAGTCT(配列番号51))及びTacro VH IgG2a逆方向-(TGTTT TAGCGCTTG CAGAGACAGTGAC CAGAGT(配列番号52))を用いたPCRによって増幅した。選択1-60-46変異体VL遺伝子を、Tacro VL mCk順方向-(CCCGGCTCGCGATGCGATGTTT T GATGACCCAAACT(配列番号53))及びTacro VL Ck逆方向-(AGCATCAGCGCTCGC CCGTTTTCAGCTCCAGCTT(配列番号54))を用いたPCRによって増幅した。重鎖領域と軽鎖領域をコードするpBOSプラスミドを、HEK-293又はCOS細胞に過渡的に移入し、細胞培養から生成した上清をプロテインA Sepharoseカラムによって精製した。タクロリムス1-60-46 AM1 IgGは、H2-1A、L1-1B及びL3-2B変異を含む。タクロリムス1-60-46 AM2 IgGは、H2-1A、L1-1B及びL3-A変異を含む。タクロリムス1-60-46 AM3 IgGは、H2-1A及びL3-2B変異を含む。タクロリムス1-60-46 AM4 IgGは、H2-1A、L1-1B及びL3-1A変異を含む。タクロリムス1-60-46 AM5 IgGは、H2-1B、L1-1B及びL3-1B変異を含む。精製IgGをリン酸緩衝食塩水(「PBS」)中に透析し、280nmにおける吸光度を測定することによって定量した。次いで、精製抗体をアッセイの実施及び親和性測定によって評価した。

20

30

40

【実施例9】

【0198】

タクロリムス1-60-46変異IgG免疫測定評価

親和性成熟抗タクロリムス抗体(AM1、AM2、AM3)を、ヤギ抗マウスIgG(「GAM」)で被覆された常磁性微粒子に個々に固定した。これらの粒子を調製するために、GAMを粒子に共有結合させ、次いで抗タクロリムス抗体を含有する緩衝安定化溶液と粒子を混合した。GAMと抗タクロリムスは、微粒子表面に安定な複合体を形成した。これらの抗タクロリムス-GAM-常磁性微粒子を、ARCHITECT(登録商標)装

50

置 (Abbott Laboratories、Abbott Park、Illinois) を用いて、競合形式の自動タクロリムスアッセイで試験した。

【0199】

アッセイでは、上記装置によって、アッセイ抽出緩衝剤 (すなわち90%メタノール、10%エチレングリコール及び100mM硫酸亜鉛) を含む試験試料を微粒子及びトレーサー試薬と混合する。トレーサー分子は、アクリジニウムの32位にリンカーを介して共有結合したタクロリムスを含む (Abbott Laboratories、Abbott Park、Illinois)。トレーサーと試料由来のタクロリムスとは、微粒子上の限定数の抗タクロリムス結合部位を競合する。インキュベーション時間後、微粒子を磁石に引きつけ、次いで洗浄して、結合していない材料を除去する。次いで、上記装置によって、誘発 (triggering) 溶液を添加して、結合したトレーサーのアクリジニウム部分における化学発光を惹起する。化学発光を光度計によって測定する。化学発光シグナル量は、試料中のタクロリムス量に逆比例する。

10

【0200】

アッセイの低濃度タクロリムス検出能力は、抗タクロリムス抗体からトレーサーを移動させるタクロリムスの能力に直接関係する。このタクロリムスの能力は、薬物に対する抗体の親和性に直接関係する。図10の結果によれば、野生型抗体を用いて、タクロリムス濃度3ng/mLの試料は、トレーサーの約40%を移動させ得た。3種類の親和性成熟抗体 (AM 1-3) の場合、同じ3ng/mLタクロリムス試料は、78-80%を移動させた。この移動が多いほど、組換え抗体を用いて、より低いタクロリムス濃度を検出することができる。

20

【実施例10】

【0201】

タクロリムス1-60-46変異IgG抗体の親和性測定

ネズミハイブリドーマ細胞系1-60-46によって産生された1-60-46 AM 2 IgGと1-60-46 WT mAb IgGの平衡解離定数を、Sapidyne Instruments (Boise、Idaho) から入手可能なKinetic Exclusion Assay (KinExA (登録商標)) によって求めた (Darling and Brault, ASSAY and Drug Development Technologies, 2(6): 647-657 (2004) 参照)。一定量のIgG抗体 (AM2又はWT) を種々の濃度 (10^{-8} Mから 10^{-13} M) の (Astellas Pharma, Inc.、Tokyo、Japanから市販されている) タクロリムス薬物と一緒にインキュベートし、試料採取前に平衡にした (2時間から14時間)。固相に固定されたbt-tacro上に抗体: タクロリムス反応混合物を注入することによって、空いた結合部位の量を求めた。続いて、Cy5 (GAM-Cy5) 蛍光色素とのヤギ抗マウスポリクローナル抗体複合体 (GAM) を注入することによって、固相に固定されたbt-tacroに結合したタクロリムスIgG抗体を検出した。GAM-Cy5結合度は、固定bt-tacroに結合したタクロリムスIgGの量に比例し、適切な波長で励起した後に検出された。製造者 (Sapidyne Instruments、Boise、Idaho) によって提供されたソフトウェアを用いて、空いた結合部位の量と反応試料中に存在する抗原の量とを分析することによって、 K_D を求めた。(a) (PBS、pH7.4及び1%BSAで構成された) 生理希釈剤及び(b) (PBS、1%BSA及び10%メタノールで構成された) 選択希釈剤中で実験を実施した。結果を下記表Bに要約する。生理希釈剤中の1-60-46 AM2 IgGの K_D は、 1.2×10^{-12} Mであった。これは、1-60-46 WT IgG値 1.9×10^{-11} Mの16倍の改善である。選択希釈剤中の1-60-46 AM2 IgGの K_D は、 1.3×10^{-11} Mであった。これは、1-60-46 WT IgG値 1.5×10^{-10} Mの12倍の改善である。

30

40

【0202】

【表 2】

表B

	KD (MeOHなし)	改善倍率	Kd (10% MeOH)	改善倍率
1-60-46 WT IgG	1.9×10^{-11} M	1x	1.52×10^{-10} M	1x
1-60-46 AM2 IgG	1.2×10^{-12} M	16x	1.3×10^{-11} M	12x

【実施例 1 1】

【0203】

10

タクロリムス 1 - 60 - 46 AM2 IgG 安定は乳動物細胞系開発
 チャイニーズハムスター卵巣細胞に、当業者に公知である技術を用いて、タクロリムス
 1 - 60 - 46 AM2 IgG 重鎖 (「HC」) (図 11 (配列番号 39) 参照) 及び
 IgG 軽鎖 (「LC」) (図 12 (配列番号 41)) 遺伝子配列を含むプラスミドを移入
 した。ある栄養素を欠く培地中でジヒドロ葉酸還元酵素機能を回復した後、安定な細胞系
 を確認した (Urlaub et al., Cell, 33: 405 - 412 (19
 83) 参照)。タクロリムス 1 - 60 - 46 AM2 CHO 2 - 577 と命名された
 チャイニーズハムスター卵巣細胞系は、ブダペスト条約に従って American Ty
 pe Culture Collection (「A.T.C.C」) (Manassas,
 VA) に 2006 年 3 月 15 日に寄託され、ATCC 受託番号 PTA - 7436 を割
 り当てられた。タクロリムス 1 - 60 - 46 AM2 CHO 1 - 1157 と命名され
 たチャイニーズハムスター卵巣細胞系は、ブダペスト条約に従って A.T.C.C (Ma
 nassas, VA) に 2006 年 3 月 27 日に寄託され、ATCC 受託番号 PTA - 7
 446 を割り当てられた。

20

【実施例 1 2】

【0204】

抗シクロスポリン (「CsA」) ハイブリドーマ 29 - 56 - 14 免疫グロブリン遺伝
 子の特定、及び単鎖抗体断片 (scFv) への転化

図 16 は、CsA、及び本明細書では「AM1 又は M17」と称する CsA 代謝産物の
 構造である。CsA 及びその代謝産物は、参照により本明細書に援用する Kahan e
 t al., "Consensus Document: Hawk's Cay M
 eeting on Therapeutic Drug Monitoring of
 Cyclosporine," Clin. Chem., 36/8: 1510 - 1
 516 (1990) に詳述されている。

30

【0205】

CsA に対する免疫グロブリン遺伝子を特定し、実施例 1 及び 2 に記載の手順を用いて
 scFv に転化した。メッセンジャー RNA を抗 CSA 29 - 56 - 14 マウスハイブ
 リドーマ細胞 (Novartis, Basel, Switzerland) から市販キッ
 トを用いて単離した。Novagen (Merck KGaA, Darmstadt,
 Germany の系列会社である) Novagen, Cat No. 69831 - 3) か
 ら購入したマウス Ig プライマーセットキットを用いて、キットに含まれる免疫グロブリン
 遺伝子特異的プライマーと一緒に、29 - 56 - 14 ハイブリドーマ mRNA を逆転写
 酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応法に利用した。生成した PCR 産物の配列を決定し、免疫グ
 ロブリン可変重鎖及び可変軽鎖遺伝子を特定した (図 13 A 及び 13 B 参照)。

40

【0206】

酵母ディスプレイシステムを用いて、未変異 (野生型 (「WT」)) 及び変異抗シクロ
 スポリン可変軽鎖及び重鎖タンパク質を、酵母結合タンパク質 AGA2 との融合物として
 酵母表面で発現させた (図 1 B 及び Boder and Witttrup, Natur
 e Biotechnology, 15: 553 - 557 (June 1997) 参照
)。PCR single overlap extension (「SOE」) によっ

50

て、可変重遺伝子(「VH」)と可変軽遺伝子(「VL」)を配列GPAKELTPLKEAKVS(配列番号36)の柔軟なリンカーを介して連結して、WTシクロスポリン29-56-14 scFv構築体を作製した。

【0207】

以下のプライマー、すなわち、CsA scFv VH順方向 - GGCCCAAGCCGGCCATGGCCGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGG(配列番号59)とCsA scFv VH 40逆方向 - CTTCTGCCTCCTTCAAGGGGCGTCAACTCCTTGGCGGGACCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCC(配列番号60)を用いて、29-56-14 VH遺伝子(図13A、配列番号5)を増幅した。

10

【0208】

プライマー: CsA scFv VL 40順方向 - CAAGGAGTTGACGCCCTTGAAAGGAGGCGAAGGTCTCTGACATTTGTACTGACCCAAATCTCC(配列番号61)とCsA scFv VL逆方向 - TCTAGACTCGAAGGGCGGCGCCCGTTTGAATTTCCAGGTTGGTGC(配列番号62)を用いて、29-56-14 VL遺伝子(図13B、配列番号57)を増幅した。

【0209】

続いて、29-56-14 scFv DNAを酵母ディスプレイベクターpYD1(Invitrogen、Carlsbad、California)に標準分子生物学技術を用いてクローン化した。このベクターは、ガラクトース誘導性プロモーター、C末端V5エピトプタグ並びにそれぞれEBY100及びE.コリ選択用のトリプトファン及びアンピシリンマーカを含む。シクロスポリンWT 29-56-14 scFv_pYDベクターをDH5 E.コリに転換し、配列を検証した。

20

【0210】

シクロスポリンWT 29-56-14 scFv_pYDベクターをトリプトファン欠乏S.セレビスエ系統EBY100にGietzとSchiestlの方法を用いて転換した(Schiestl and Gietz, Current Genetics, 16(5-6):339-46(Dec. 1989))。形質転換反応物の希釈物を(トリプトファンを欠く)選択的グルコースプレート(2%グルコース(0.67%酵母窒素ベース、0.105%Hollenberg Supplement Media(「HSM」)-trp(トリプトファン)-ura(ウラシル)、1.8%細菌寒天、18.2%ソルビトール、0.86%NaH₂PO₄ H₂O、1.02%Na₂HPO₄ 7H₂O))に蒔き、30℃で48-72時間インキュベートした。選択グルコース培地に個々のコロニーを接種し、30℃で16-20時間振とう増殖させた。細胞0.5 OD₆₀₀/ml(1×10⁷(「1e7細胞」)/0.5 OD/ml)を選択ガラクトース培地に移すことによって、タンパク質発現をコロニー中で誘導した。コロニーを20℃で16-24時間振とうし、次いで「bt-CsA」と称する)環式ウンデカペプチドの1位に結合したビオチン基を有するシクロスポリン抗原及び抗V5との結合についてフローサイトメトリーによって分析した。フローサイトメトリーアッセイでは、29-56-14 scFvを発現する酵母細胞を、bt-CsA及び抗V5抗体、続いてストレプトアビジン:フィコエリトリン(SA:PE、BD Pharmingen)及びヤギ抗マウス免疫グロブリン-Alexa Fluora 488(GAM:488、(Invitrogen、Carlsbad、Californiaの系列会社である)Molecular Probes)と一緒にインキュベートした。図1Cと類似したフローサイトメトリーデータの二変量プロットが得られ、29-56-14 scFv(抗V5)の完全長表面発現、及び29-56-14 scFvとbt-tacroの結合(SA:PE)を示した。

30

40

【実施例13】

【0211】

酵母細胞上で発現された29-56-14 scFvのCsAに対する親和性測定

50

b t - C s A 抗原に対する平衡解離定数 (K_D) を (P B S、p H 7 . 4 及び 1 % B S A で構成された) 生理希釈剤中で求めた。s c F v 発現を誘導された酵母クローンを、種々の濃度の b t - C s A と混合し、(a) (P B S、p H 7 . 4 及び 1 % B S A で構成された) 生理希釈剤及び (b) (P B S、1 % B S A 及び 1 0 % メタノールで構成された) 選択希釈剤中で平衡にし (4 - 1 8 時間)、氷冷し、洗浄し、フローサイトメトリー測定用に標識した。抗体正規化、抗原結合平均蛍光強度を抗原濃度に対してプロットし、非線形最小二乗適合 ($y = m_1 + m_2 * m_0 / (m_3 + m_0)$) によって K_D を求めた。W T C s A 2 9 - 5 6 - 1 4 s c F v K_D は、生理希釈剤中で 5.6×10^{-10} M、選択希釈剤中で 2.0×10^{-9} M であった。b t - C s A に対する K_D 値を、過剰の競合剤の存在下で変異原ライブラリーのスクリーニングに用いた。

10

【実施例 1 4】

【0 2 1 2】

2 9 - 5 6 - 1 4 C D R 変異原ライブラリーの作製

抗シクロスポリン抗体 2 9 - 5 6 - 1 4 の全 6 個の C D R を、実施例 4 に記載の手順によって変異誘発に供した。3 連続 C D R アミノ酸位置を無作為に変異させた、8 0 0 0 個のメンバーで構成された個々のライブラリー。各 C D R の特定の領域を欠く、直線化された p Y D 1 ベクターを P C R によって調製し、酵母に固有の相同組換えシステムを用い、G i e t z ライブラリー転換プロトコル (S c h i e s t l a n d G i e t z , C u r r e n t G e n e t i c s , 1 6 (5 - 6) : 3 3 9 - 4 6 (D e c 1 9 8 9)) を用いて、標的 C D R 中の 3 アミノ酸変異原性ウィンドウ内の全 1 9 個のアミノ酸置換候補をコードする、縮重一本鎖オリゴヌクレオチドで「ギャップ」を置換した。転換された酵母細胞を、再構成されたベクター上に存在する栄養要求性トリプトファンマーカを用いて選択的に回収した。合計 5 3 個の C D R 変異原ライブラリーを作製し、個々の C D R 変異原ライブラリーを組み合わせ、8 個の C D R プールライブラリーを作製した。各 C D R 領域内の個々のライブラリーを選択前にプールした (例えば、H 1 ライブラリー 1 - 8 を組み合わせ、H 1 マスターライブラリーを作製した。)。しかし、各 C D R マスターライブラリーは、選択プロセス中に互いに別個のままにされた。

20

【実施例 1 5】

【0 2 1 3】

M 1 7 競合剤の存在下における 2 9 - 5 6 - 1 4 変異原ライブラリーの選択

フローサイトメトリー選別を用いた競合的選択戦略によって、2 0 - 1 0 0 倍モル過剰の C s A 代謝産物 (M 1 7) の存在下で、b t - C s A に対する結合特性が改善された 8 プールの C D R 変異原ライブラリーから 2 9 - 5 6 - 1 4 変種を特定した。初期ラウンドのライブラリースクリーニングでは、2 9 - 5 6 - 1 4 変異原ライブラリーを、(P B S、1 % B S A 及び 1 0 % メタノールで構成された) 選択希釈剤中で 1 n M b t - C s A + 2 0 n M M 1 7 と一緒に室温で終夜インキュベートした。細胞を洗浄し、個々の細胞上に残留した b t - C s A 抗原の量を S A : P E (1 : 2 0 0 希釈) を用いて検出した。抗原結合を、抗 V 5 m A b (2 . 5 u g / m l) 及び G a M - 4 8 8 (1 : 2 0 0 希釈) を用いた個々の細胞上の s c F v 発現量に対して正規化した。対照試料を調製して蛍光補償を設定し、非特異的結合をモニターした。b t - C s A 結合が改善された変種の集団を、F A C S A r i a 細胞選別機 (B e c t o n D i c k i n s o n、S a n J o s e、C A) を用いて蛍光活性化細胞選別 (F A C S) によって選択的に富化した。

30

40

【0 2 1 4】

4 ラウンドの選択を各ライブラリープールに対して実施した。各ラウンドの選択は、s c F v 発現シグナルに対してプロットされた、S A : P E (抗原結合性) チャンネル中で最大の蛍光度を有する細胞の 0 . 1 % - 0 . 5 % を選択的に通過させることからなされた。選択された細胞を収集し、デキストロースを含む培地中で 3 0 で 2 - 3 日間再増殖させた (選択ラウンド出力)。デキストロースは、ガラクトースプロモーターからの発現を阻害し、それによって s c F v 発現を阻止する。各ライブラリーの一定分量を取り出して、保存用の各ラウンド出力とした。次いで、s c F v 発現のために、ガラクトースを含む培地

50

を用いて、20 で12 - 24時間出力を誘導し、M17代謝産物競合剤100 nM (100倍モル過剰)を用いて選択プロセスを繰り返した。M17競合剤の存在下でbt - CsAの結合を増加させる変異を含むライブラリーは、選択の各ラウンドを通して次第に鮮明になった。第4ラウンドの選別後の細胞の一定分量を選択培地に蒔いて、更なる分析用に個々のクローンを得た。

【実施例16】

【0215】

M17代謝産物との交差反応性が低下した、選択された29 - 56 - 14変種の配列解析

実施例15に記載の選択から過剰のM17代謝産物の存在下でbt - CsAとの結合が改善された各マスターCDRライブラリー(H1、H2、H3 - 1、H3 - 2、L1 - 1、L1 - 2、L2及びL3)由来の幾つかの個々のクローンからscFv領域をPCRによって増幅した。ベクター特異的プライマー(pYD41順方向 - TAGCATGACTGGTGGACAGC (配列番号37)及びpYD41逆方向 - CGTAGAATCGAGACCGAG (配列番号38))を用いてscFv遺伝子を増幅し、配列を決定して、CDRアミノ酸置換を確認した。

【実施例17】

【0216】

シクロスポリン29 - 56 - 14コンビナトリアル変異クローンの作製及び分析

各マスターCDRライブラリーから4ラウンドのフローサイトメトリー選択後に確認されたCDR変異体配列を用いて、個々の変異の異なる組合せを含むscFv遺伝子を構築した。H1、H2、H3、L2及びL3 CDR領域に種々の変異を含むコンビナトリアルクローンをPCR増幅によって構築し、当業者に公知の技術を用いて組み合わせた。コンビナトリアル変異クローンの配列を検証し、実施例15に記載したように、M17競合剤100 nM (100倍モル過剰)の存在下における更なるフローサイトメトリー選択用に、上述したように酵母に転換した。M17代謝産物の存在下でbt - CsAに対する特異性の改善されたコンビナトリアル変異クローンを富化するのにわずか1ラウンドの競合的選別しか必要としなかった。

【0217】

ベクター特異的プライマー(pYD41順方向 - TAGCATGACTGGTGGACAGC (配列番号37)及びpYD41逆方向 - CGTAGAATCGAGACCGAG (配列番号38))を用いてscFv遺伝子を増幅し、配列を決定して、複数のCDRアミノ酸置換を確認した。配列解析によって、CDR H2、H3、L2及びL3における変異をコードするわずか4個の組合せからなる集団を特定した(図14参照)。IC50データに基づいて、変異コンビナトリアルクローンR2 - 9を最良のクローンとして選択した。WT及び変異コンビナトリアルクローンを、0から5 uMのM17競合剤濃度の存在下で、0.5 nM bt - CsAと一緒に終夜インキュベートした。(a) (PBS、pH7.4及び1%BSAで構成された)生理希釈剤及び(b) (PBS、1%BSA及び10%メタノールで構成された)選択希釈剤中で試験したクローンR2 - 9のIC50データを図15に示す。クローンR2 - 9においてコードされた変異は、WT CsA 29 - 56 - 14と比較して、M17代謝産物のIC50を30 - 100倍増加させる。

【実施例18】

【0218】

M17及びM1競合剤の存在下における29 - 56 - 14変異原ライブラリーの選択
この実施例は、シクロスポリン親薬物に対する選択を改善し、主要な代謝産物に対する特異性を低下させる(低交差反応性)抗シクロスポリン抗体によってコードされるCDR(相補性決定領域)変異を選択する、酵母ディスプレイを用いたスクリーニング方法を記述する。

【0219】

抗シクロスポリンマウスハイブリドーマ29 - 56 - 14は、免疫グロブリン重鎖及び

10

20

30

40

50

軽鎖からなる単鎖構築体 (s c F v) が酵母細胞表面で発現されるモデル系であった。C D R 走査手法を利用した複数の抗原結合部位における変異をコードする s c F v 酵母ライブラリーを、結合競合剤として 5 - 2 0 0 倍モル過剰の A M 1 (M 1 7) 代謝産物と A M 9 (M 1) 代謝産物の一緒の存在下で、ビオチン化 C s A との結合の改善についてフローサイトメトリーによってスクリーニングした。幾つかの重鎖及び軽鎖 C D R における変異をコードする異なる酵母クローンを単離した。これらの酵母クローンは、C s A 野生型酵母対照と比較して、A M 1 (M 1 7) に対する K_i (阻害定数) が最高 1, 0 0 0 倍増加し、A M 9 (M 1) に対する 5 倍を超える K_i を示した。C s A に対する親和性の最小変化は、A M 1 (M 1 7) 及び A M 9 (M 1) に対する結合が減少した変異体で認められた。本実施例及び前の実施例で使用したスクリーニング手法によって、免疫抑制剤に対する改善された特異性、及び代謝産物に対するより好都合な交差反応性 (より低い結合) を有する抗体を開発することができる方法であって、最終的に診断免疫測定法に利用することができる方法が確立されたことが、これらの結果から確認される。

10

20

30

40

50

【 0 2 2 0 】

当業者は、本発明が、その目的を実行して、記載した成果及び効果、並びに本発明に固有の成果及び効果を得るのに、十分に適合していることを容易に理解するはずである。本明細書に記載する組成物、処方、方法、手順、処置、分子、具体的化合物は、好ましい実施形態の現時点での典型であり、例示であって、本発明の範囲を限定するものではない。本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、本明細書に開示する本発明に種々の置換及び改変をなし得ることを、当業者は容易に理解できるはずである。

【 0 2 2 1 】

本明細書で言及するすべての特許及び刊行物は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示している。すべての特許及び刊行物は、個々の刊行物が参照により援用されるように具体的かつ個々に指示されたごとく、同じ程度に参照により本明細書に援用される。

【 0 2 2 2 】

本明細書に説明的に記述された本発明は、本明細書に具体的に開示しない任意の要素、制約の非存在下で適切に実施し得る。すなわち、例えば、本明細書の各例においては、「含む」、「から本質的になる」及び「からなる」という用語のいずれも、他の 2 つの用語のどちらかと置換し得る。使用した用語及び表現は、説明の用語として使用され、限定的な用語ではない。かかる用語及び表現の使用においては、示した、また、記述した特徴又はその一部の任意の等価物を除外することを意図したものではない。そうではなく、特許請求する本発明の範囲内で種々の改変が可能であることを認識されたい。したがって、本発明を好ましい実施形態、及び必須ではない特徴によって具体的に開示したが、本明細書で開示する概念の改変及び変形が当業者によってなされ得るものであり、かかる改変及び変形は、添付の特許請求の範囲に規定された本発明の範囲内にあるとみなされることを理解すべきである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 2 2 3 】

【 図 1 A 】 図 1 A はタクロリムスの構造である。図 1 B は、s c F v 抗体の酵母細胞表面ディスプレイの概略図である。図 1 C は、フローサイトメトリーアッセイによって測定された、野生型 (「WT」) 1 - 6 0 - 4 6 s c F v 酵母による s c F v 発現と抗原結合を示す二変量プロットである。図 1 D は、タクロリムス W T 1 - 6 0 - 4 6 s c F v フローサイトメトリーの解離速度アッセイプロットである。

【 図 1 B 】 図 1 A はタクロリムスの構造である。図 1 B は、s c F v 抗体の酵母細胞表面ディスプレイの概略図である。図 1 C は、フローサイトメトリーアッセイによって測定された、野生型 (「WT」) 1 - 6 0 - 4 6 s c F v 酵母による s c F v 発現と抗原結合を示す二変量プロットである。図 1 D は、タクロリムス W T 1 - 6 0 - 4 6 s c F v フローサイトメトリーの解離速度アッセイプロットである。

【 図 1 C 】 図 1 A はタクロリムスの構造である。図 1 B は、s c F v 抗体の酵母細胞表面ディスプレイの概略図である。図 1 C は、フローサイトメトリーアッセイによって測定さ

れた、野生型(「WT」)1-60-46 scFv酵母によるscFv発現と抗原結合を示す二変量プロットである。図1Dは、タクロリムスWT 1-60-46 scFvフローサイトメトリーの解離速度アッセイプロットである。

【図1D】図1Aはタクロリムスの構造である。図1Bは、scFv抗体の酵母細胞表面ディスプレイの概略図である。図1Cは、フローサイトメトリーアッセイによって測定された、野生型(「WT」)1-60-46 scFv酵母によるscFv発現と抗原結合を示す二変量プロットである。図1Dは、タクロリムスWT 1-60-46 scFvフローサイトメトリーの解離速度アッセイプロットである。

【図2】図2A及び2Bは、タクロリムス1-60-46 WT重鎖可変(「VH」)配列(配列番号43)(図2A)及び軽鎖可変(「VL」)配列(配列番号45)(図2B)の核酸配列である。これらの核酸配列によってコードされるアミノ酸を表す3文字表記を上を示す。

【図3】タクロリムス1-60-46 VH相補性決定領域(「CDR」)変異原ライブラリーの略図である。無作為化された3アミノ酸配列の各々の左側にライブラリー名を示す。タクロリムス1-60-46 VH CDRのアミノ酸配列を各CDRの下に示す。

【図4】タクロリムス1-60-46 VL CDR変異原ライブラリーの略図である。無作為化された3アミノ酸配列の各々の左側にライブラリー名を示す。タクロリムス1-60-46 VL CDRのアミノ酸配列を各CDRの下に示す。

【図5】図5A-5Cは、3ラウンドの選択中の代表的なタクロリムス1-60-46変異原性CDRライブラリーの二変量プロットである。scFv発現をX軸上に示す。Y軸上に示す抗原結合性に対してscFv発現をプロットする。代表的なソートゲートは、抗原結合性クローンの最も鮮明な(brightest)0.1%-1.0%を分離した。これらを各プロット中に示す。

【図6】タクロリムスWT 1-60-46 VH領域のアミノ酸配列(配列番号1-7)を、変異原性VH CDRライブラリーから単離された変異クローンと比較した表である。クローン名を左側に示す。VH配列を含む種々の領域を上段に示す。WT 1-60-46配列とは異なるアミノ酸を下線を引いた太字で示す。種々の変異クローンのCDR H2領域を配列番号15-18で示す。

【図7A】図7A-7Bは、タクロリムスWT 1-60-46 VL領域のアミノ酸配列(配列番号8-14)を、変異原性VL CDRライブラリーから単離された変異クローンと比較した表である。クローン名を左側に示す。VH配列を含む種々の領域を上段に示す。WT 1-60-46配列とは異なるアミノ酸を下線を引いた太字で示す(図7A)。変異クローンのCDR L1領域を配列番号19-22で示す(図7B)。変異クローンのCDR L3領域を配列番号23-32で示す。

【図7B】図7A-7Bは、タクロリムスWT 1-60-46 VL領域のアミノ酸配列(配列番号8-14)を、変異原性VL CDRライブラリーから単離された変異クローンと比較した表である。クローン名を左側に示す。VH配列を含む種々の領域を上段に示す。WT 1-60-46配列とは異なるアミノ酸を下線を引いた太字で示す(図7A)。変異クローンのCDR L1領域を配列番号19-22で示す(図7B)。変異クローンのCDR L3領域を配列番号23-32で示す。

【図8】タクロリムスWT 1-60-46 scFvクローンの親和性パラメータを独特の変異体と比較した表である。クローン名を左側に示す。種々の変異の組合せを含むクローンは、個々の変異を含むクローンの配列リストによって命名される。試験した親和性パラメータ(10%メタノールあり又はなし)を上段に示す。WT 1-60-46 scFv値と変異scFv値の比を用いて、上記パラメータに対する改善値を求めた。

【図9】図9A-9Bは、(PBS、1%BSA及び10%メタノールで構成された)選択希釈剤中のタクロリムス1-60-46 WT scFv及びコンビナトリアル変異クローン(H2 1A/L1-1B/L3-2B、H2-1A/L1-1B/L3-A、H2-1A/L3-1B及びH2-1B/L1-1B/L3-1B)の親和性分析結果を示すグラフである。図9Aは、解離速度分析結果を示すグラフである。各クローンについて

10

20

30

40

50

非解離 (no dissociation) 対照 rx に対して抗原結合性シグナルを正規化し、秒単位で測定した時間に対してプロットした。図 9 B は、平衡解離定数 (K_D) 分析結果を示すグラフである。各クローンについて飽和抗原条件における最大平均蛍光強度値に対して抗原結合性シグナルを正規化し、「bt-tacro」と称する) 抗原の濃度に対してプロットした。

【図 10】図 10 A は、WT 1-60-46 (WT) 配列を有する Ig G に転化されたタクロリムス 1-60-46 変異クローン由来の VH 及び VL CDR 領域のすべてにおけるアミノ酸残基を比較した表である。任意の所与の配列中に存在する種々の変異の組合せを、個々の変異を含むクローンの配列リストによって左側に示す。生成した各 1-60-46 変異 Ig G の名称を右側に示す (すなわち、AM1、AM2、AM3、AM4 又は AM5)。WT 1-60-46 配列とは異なるアミノ酸を下線を引いた太字で示す。図 10 B は、アッセイ抽出緩衝剤を用いて WT 1-60-46 Ig G を種々の 1-60-46 変異 Ig G (AM1、AM2 又は AM3) と比較した免疫測定結果を示すグラフである (アッセイ抽出緩衝剤は、90%メタノール、10%エチレングリコール及び 100 mM 硫酸亜鉛を含んだ)。示した Ig G で被覆された微粒子を、非標識タクロリムス抗原の種々の濃度 (0 ng/ml - 30 ng/ml) において、(トレーサーとして用いた) 標識タクロリムス抗原と一緒にインキュベートした。(X 軸上に示した) トレーサーシグナルの比を、(Y 軸上に示した) 非標識タクロリムスの濃度に対してプロットした。

【図 11】タクロリムス 1-60-46 AM2 ネズミ重鎖 Ig G の核酸配列 (配列番号 39) である。この核酸配列によってコードされる対応するアミノ酸配列 (配列番号 40) を上に示す。

【図 12】タクロリムス 1-60-46 AM2 ネズミ軽鎖の核酸配列 (配列番号 41) である。この核酸配列によってコードされる対応するアミノ酸配列 (配列番号 42) を上に示す。

【図 13】図 13 A 及び 13 B は、シクロスポリンハイブリドーマ 29-56-14 WT 重鎖可変 (VH) 配列 (配列番号 55) 及び軽鎖可変 (VL) 配列 (配列番号 57) の核酸配列である。これらの核酸配列によってコードされるアミノ酸 (それぞれ、配列番号 56 及び 58) を表す 3 文字表記を上に示す。

【図 14】29-56-14 WT 及びコンビナトリアル変異体 R2-9 CDR 配列である。CDR-H2、H3、L2 及び L3 中の交差反応性の改善に寄与するアミノ酸変異を変異体 R2-9 について特定した。CsA 29-56-14 WT とは異なる変異配列を下線を引いた太字で示す。

【図 15】図 15 A 及び 15 B は、(a) (PBS、pH 7.4 及び 1% BSA で構成された) 生理希釈剤又は (b) (PBS、1% BSA 及び 10% メタノールで構成された) 選択希釈剤中で分析された M17 代謝産物の濃度を増加させて測定した、bt-CsA 結合に対する 29-56-14 WT 及び変異体 R2-9 酵母クローンの IC50 データを示すグラフである。

【図 16】シクロスポリン A (左)、及び本明細書では「AM1 又は M17」と称するシクロスポリン A の代謝産物 (右) の構造である。シクロスポリン A 及び代謝産物 M17 (AM1) の分子式及び分子量を、対応する構造の下に記載する。

10

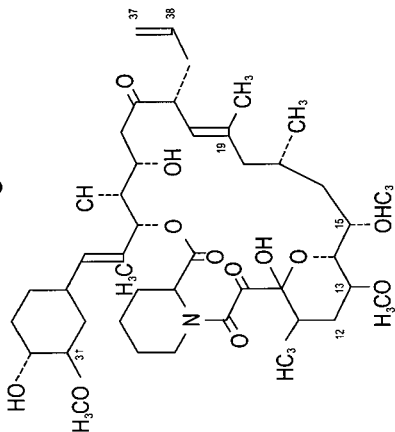
20

30

40

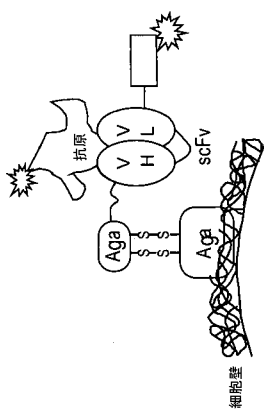
【 図 1 A 】

Fig. 1A



【 図 1 B 】

Fig. 1B



【 図 2 】

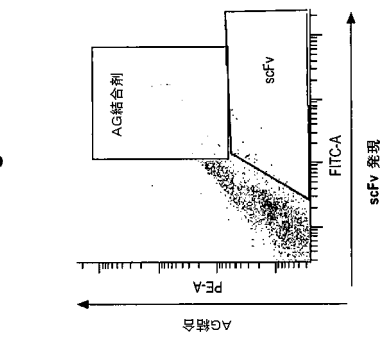
Fig. 2

2A.
 GluValGlu LeuValGlu SerClyGly AspIleVal LysProGly GlySerLeu LysLeuSer CysAlaAla SerClyPhe ThrPheSer
 GAGCGGA TTCGGAG TCGGGGA GACTTGG AGCGTGA AGCTCCG TGTGAGC TGTGAGC TGTGAGC TGTGAGC TGTGAGC
 CTCACCT ACCAGCC AGACCCCT CTGATCC TCGGACCT CCGAGGAC TTGAGAGG ACAGCTCG AGAGCTAG AGAGCTAG AGAGCTAG
 SerTyrGly MetSerTTP ValArgGln ThrProAsp LysArgLeu GluTyrVal AlaThrIle SerSerGly GlyThrTyr ThrPheTyr
 AGTATTGG ATGCTTTGG GTTCGGAG ACCGACAG AGAGCTG GAGTGGTC GCACACCT AGTACTGT GGTACTTAC ACCTCTAT
 TCAATACG TACAGAAC CAGGGGTC TGGGGTTC TTCTCCGAC CTCACCCAG CGTTGTTAA TCATCCCA CCGTGAATG TGGAGATA
 ProAspSer ValIleGly ArgPheThr IleSerArg AspAsnAla LysAsnThr LeuSerLeu LysIleSer SerIleuIys SerAlaAsp
 CCAGACAT GCGAGGG CCGTTCAC ATCTCCAG CACATGCC AGAGACC CTGCTCC CAGATGAC AGTCTGAG TCTCCAG
 SerGlnVal CACTCCC CGAAGTG TCGAGTC CTGATCG CAGAGAG CAGAGAG CAGAGAG CAGAGAG CAGAGAG CAGAGAG
 SerGlnVal CACTCCC CGAAGTG TCGAGTC CTGATCG CAGAGAG CAGAGAG CAGAGAG CAGAGAG CAGAGAG CAGAGAG
 AGCGCAT TATTACTC TCAAGCAG ACCGATGT TACTCTGG TTCTGTTA TGGGGCAG GGGACTGT GTCACGTC TGTGCA
 TGTCCGAC ATAATGCA AGTCTGTC TGGCTACG ATGAGGACC AAGGATA ACCCCGGT CCGCTGAG CAGTGACG AGACGT

2B.
 AspValLeu MethCln ThrProIleu SerLeuPro ValSerIleu GlyAspGln AlaSerIle SerCysIys SerSerCln SerIleVal
 CAGAGAG TACTGCTT TCGAGTGG AGGACCGA CAGTCAAG CCGTGGT CCGAGGAG AGAGCTAG AGAGCTAG AGAGCTAG
 H1SerThr GlyAspThr PheLeuGlu ThrPheLeu GluLysPhe GlyIleSer ProLysLeu LeuIleTyr LysIleSer AsnArgPhe
 CAGACTACT GGAACACC TTTTITGAA TGGTITTC GAGAGCCA GCGCAGCT CCAAGCTC CTGACTAC AAAATTCC AACCGATT
 GATCATCA CTTTIGCG AAAATCIT ACCAAMAC GTTTCGGT CCGCTCAG GGTTCGAG GACTAGAG TTTTAAAG TTGCGTAA
 SerGlyVal ProAspArg PheSerGly SerGlySer GlyThrAsp PheThrLeu LysIleSer ArgValGlu SerGluArg LeuGlyVal
 TCTGGGTC CCAAGCAG TCACTGGC AGTGCAGT GGGACAGT TTCACACT AGACTAG AGAGGAG AGAGGAG TCTGAGAT CTGGAGTT
 AGACCCAG GGTCTGTC AGTACCG TCACTTAP CCGTCTTA AGTGTGAG TCTGATCG TCTGATCG TCTGATCG TCTGATCG TCTGATCG
 TyrTyrCys PheGlnGly SerHisVal ProLeuThr PheGlyAla GlyThrIys LeuGluLeu LysAla
 TCTGAGT TCTGAGT TCTGAGT TCTGAGT TCTGAGT TCTGAGT TCTGAGT TCTGAGT TCTGAGT TCTGAGT
 ATAATGAG AAATTTCCA AGTGTAGC GGGAGTGG AAGGCAGA CCGTGGTTC GACCTGAC TTGCGCGG

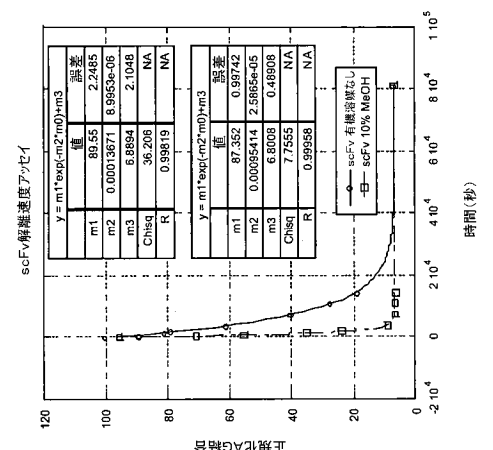
【 図 1 C 】

Fig. 1C



【 図 1 D 】

Fig. 1D



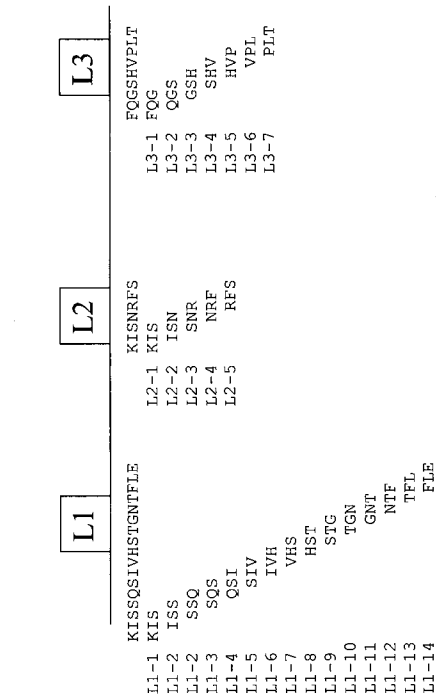
【 図 3 】

Fig. 3

H1	H2	H3
GTFSSYGMS	TISSGGTYF	QTIDGYSWFFY
H1-1 GFT	H2-1 TIS	H3-1 QTD
H1-2 FTF	H2-2 ISS	H3-2 TDG
H1-3 TFS	H2-3 SSG	H3-3 DGY
H1-4 FSS	H2-4 SGG	H3-4 GYS
H1-5 SSY	H2-5 GGT	H3-5 YSW
H1-6 SYG	H2-6 GTY	H3-6 SWF
H1-7 YGM	H2-7 TYT	H3-7 WFF
H1-8 GMS	H2-8 YTF	H3-8 FFF

【 図 4 】

Fig. 4



【 図 6 】

Fig. 6

変種	FRI	CDR-H1	FR2	CDR-H2
1-60-46 WT	EVELVESGGDLVKGSSLSKLSCAAS (配列番号 : 1)	GFTFSYSGMS (配列番号 : 2)	WRQCFDPRKLERWAT (配列番号 : 3)	TLSSGGTYTF (配列番号 : 4)
H2-1	EVELVESGGDLVKGSSLSKLSCAAS (配列番号 : 1)	GFTFSYSGMS (配列番号 : 2)	WRQCFDPRKLERWAT (配列番号 : 3)	TLSSGGTYTF (配列番号 : 15)
H2-1A	EVELVESGGDLVKGSSLSKLSCAAS (配列番号 : 1)	GFTFSYSGMS (配列番号 : 2)	WRQCFDPRKLERWAT (配列番号 : 3)	TLSSGGWTF (配列番号 : 16)
H2-1B	EVELVESGGDLVKGSSLSKLSCAAS (配列番号 : 1)	GFTFSYSGMS (配列番号 : 2)	WRQCFDPRKLERWAT (配列番号 : 3)	TLSSGGKVF (配列番号 : 17)
H2-3B	EVELVESGGDLVKGSSLSKLSCAAS (配列番号 : 1)	GFTFSYSGMS (配列番号 : 2)	WRQCFDPRKLERWAT (配列番号 : 3)	TLSSGGWTF (配列番号 : 18)

変種	FR3	CDR-H3	FR4
1-60-46 WT	YPSVYKGRFTISRDNKNTLSQMSLSKSDATAMYCSR (配列番号 : 5)	QTDGYSWFPY (配列番号 : 6)	WGQGLVTVSA (配列番号 : 7)
H2-1	YPSVYKGRFTISRDNKNTLSQMSLSKSDATAMYCSR (配列番号 : 5)	QTDGYSWFPY (配列番号 : 6)	WGQGLVTVSA (配列番号 : 7)
H2-1A	YPSVYKGRFTISRDNKNTLSQMSLSKSDATAMYCSR (配列番号 : 5)	QTDGYSWFPY (配列番号 : 6)	WGQGLVTVSA (配列番号 : 7)
H2-1B	YPSVYKGRFTISRDNKNTLSQMSLSKSDATAMYCSR (配列番号 : 5)	QTDGYSWFPY (配列番号 : 6)	WGQGLVTVSA (配列番号 : 7)
H2-3B	YPSVYKGRFTISRDNKNTLSQMSLSKSDATAMYCSR (配列番号 : 5)	QTDGYSWFPY (配列番号 : 6)	WGQGLVTVSA (配列番号 : 7)
H2-1	YPSVYKGRFTISRDNKNTLSQMSLSKSDATAMYCSR (配列番号 : 5)	QTDGYSWFPY (配列番号 : 6)	WGQGLVTVSA (配列番号 : 7)

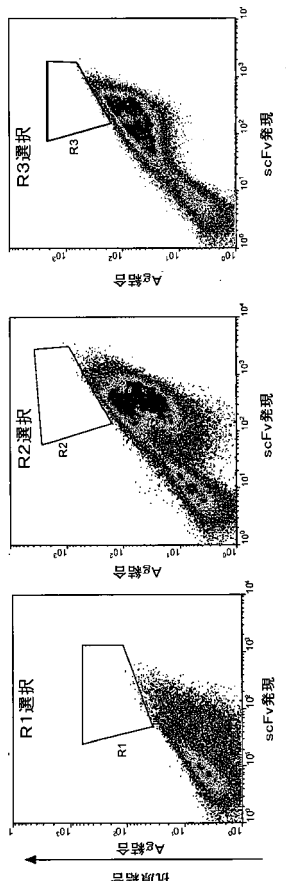
【 図 5 】

【 図 7 A 】

Fig. 5C

Fig. 5B

Fig. 5A



AB発現

Fig. 7A

変種	FRI	CDR-L1	FR2	CDR-L2
1-60-46 WT	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 9)	IFQGSFKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L1-1	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 19)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L1-2A	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 20)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L1-4B	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 21)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L1-1B	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 22)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L3-A	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 9)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L3-B	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 9)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L3-C	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 9)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L3-D	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 9)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L3-1B	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 9)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L3-1A	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 9)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L3-2A	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 9)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L3-3A	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 9)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L3-4A	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 9)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)
L3-2B	DVLMQTPPLSLPVSIGDQASISIC (配列番号 : 8)	KSSQSIWHSTGNTFLE (配列番号 : 9)	WFLQKPGQSPKLLIY (配列番号 : 10)	KISNRFS (配列番号 : 11)

【 図 7 B 】

クローン	FR3	CDR-L3	FR4
1-60-46 WT	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :13)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L1-1	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :13)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L1-2A	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :13)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L1-4B	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :13)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L1-1B	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :13)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L3-A	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :23)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L3-B	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :24)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L3-C	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :25)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L3-D	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :26)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L3-1B	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :27)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L3-1A	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :28)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L3-2A	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :29)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L3-3A	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :30)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L3-4A	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :31)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)
L3-2B	GVDFRFGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (配列番号 :12)	FGSHVPLT (配列番号 :32)	FGAGTKLEIKRA (配列番号 :14)

Fig. 7B

【 図 8 】

クローン	koff (1/sec)		koff改善		KD (M)		KD改善	
	有糖液にL 10% MeOH	有糖液にL 10% MeOH	有糖液にL 10% MeOH	有糖液にL 10% MeOH	有糖液にL 10% MeOH	有糖液にL 10% MeOH	有糖液にL 10% MeOH	有糖液にL 10% MeOH
WT	1.30E-04	9.38E-04	1.0	1.0	4.18E-10	5.80E-10	1.0	1.0
H2-1	5.2E-05	4.7E-04	2.5	2.0				
H2-1A	2.9E-05	1.8E-04	4.5	5.9	5.3E-11	1.3E-10	7.9	4.5
H2-1B	3.4E-05	2.5E-04	3.8	3.8				
H2-3B	3.7E-05	1.9E-04	3.5	4.9				
L1-2A	2.6E-05	2.2E-04	5.0	4.3				
L1-4A	3.3E-05	2.8E-04	3.9	4.1				
L1-1B	2.8E-05	1.9E-04	4.6	4.9	1.4E-10	2.7E-10	3.0	2.1
L3-A	6.0E-05	4.7E-04	2.2	2.0				
L3-1A	3.5E-05	1.2E-04	3.7	7.8				
L3-2A	4.3E-05	1.5E-04	3.0	6.3				
L3-3A	5.0E-05	1.7E-04	2.6	5.5				
L3-4A	5.0E-05	1.9E-04	2.6	4.9				
L3-1B	4.7E-05	3.5E-04	2.8	2.7				
L3-2B	4.2E-05	3.0E-04	3.1	3.2				
H2-1A/L1-1B/L3-1A	4.4E-05	1.3E-04	3.0	7.2	2.2E-10	3.6E-10	1.9	1.6
H2-1A/L1-1B/L3-2B	3.9E-05	8.8E-05	3.3	11.1	4.1E-10	4.1E-10	1.4	1.4
H2-1A/L1-1B/L3-A	2.40E-05	7.50E-05	5.4	12.5	6.1E-11	6.1E-11	9.5	9.5
H2-1B/L1-1B/L3-1B	5.90E-05	5.90E-05	9.4	15.9	3.80E-11	3.80E-11	15.3	10.9
H2-3B/L1-4A/L3-1B	1.00E-04	1.00E-04	9.4	9.4				
H2-1A/L1-1B/L3-1B	6.60E-05	6.60E-05	14.2	6.3	4.90E-11	4.90E-11	11.8	11.8
H2-1A/L3-1A	5.8E-05	5.8E-05	2.8	17.1	7.4E-11	7.4E-11	7.8	7.8
H2-1A/L3-2B	3.90E-05	1.20E-04	3.3	7.8	6.30E-11	6.30E-11	9.2	9.2
L1-1B/L3-1A	4.40E-05	2.50E-04	3.0	3.8	1.00E-09	1.00E-09	0.6	0.6
L1-1B/L3-2B	4.50E-05	2.30E-04	2.9	4.1	1.60E-10	1.60E-10	3.6	3.6
H2-3B/L3-2A	6.90E-05	6.90E-05	13.6	13.6				

Fig. 8

【 図 9 】

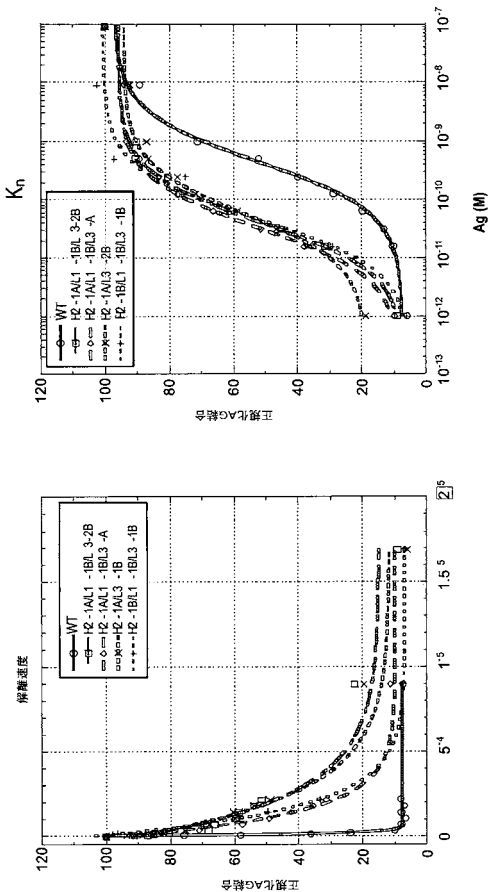


Fig. 9A

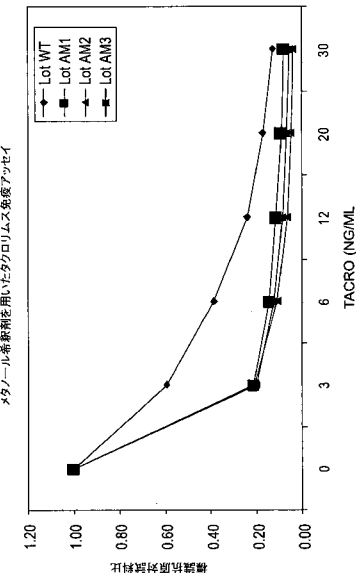
Fig. 9B

【 図 10 】

変異体	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	名株
1-60-46 WT	GFTFSSYGM	TISSGGYTF	QTDGYSWFF	KSSQIVHSTGNFTLE	KISNRES	FGSHVPLT	WT
H2-1A/L1-1B/L3-2B	GFTFSSYGM	TISSGGAMTF	QTDGYSWFF	KSSQGLVHSTGNFTLE	KISNRES	FGSSSPILT	AM1
H2-1A/L1-1B/L3-A	GFTFSSYGM	TISSGGAMTF	QTDGYSWFF	KSSQGLVHSTGNFTLE	KISNRES	FGSSSPILT	AM2
H2-1A/L1-1B/L3-B	GFTFSSYGM	TISSGGAMTF	QTDGYSWFF	KSSQGLVHSTGNFTLE	KISNRES	FGSSSPILT	AM3
H2-1B/L1-1B/L3-1A	GFTFSSYGM	TISSGGAMTF	QTDGYSWFF	KSSQGLVHSTGNFTLE	KISNRES	FGSSSPILT	AM4
H2-1B/L1-1B/L3-1B	GFTFSSYGM	TISSGGAMTF	QTDGYSWFF	KSSQGLVHSTGNFTLE	KISNRES	FGSSSPILT	AM5

Fig. 10A

Fig. 10B



【 図 1 5 】

Fig. 15B

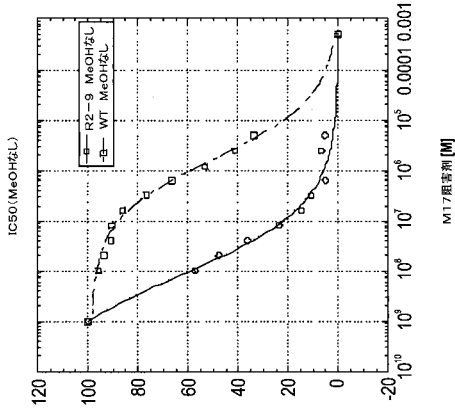
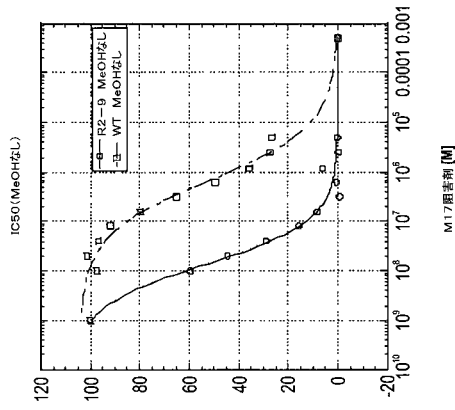
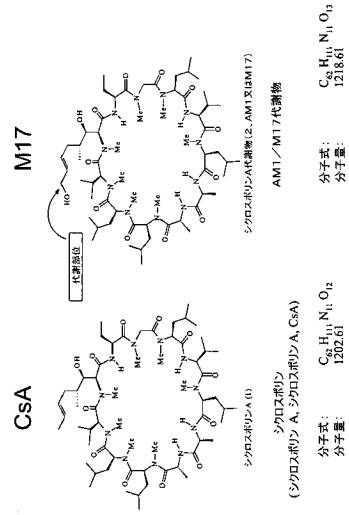


Fig. 15A



【 図 1 6 】


Fig. 16



【 配 列 表 】

2009534466000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/10076									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C07K 16/44(2006.01);C12N 5/16(2006.01);G01N 33/53(2006.01),33/531(2006.01),33/577(2006.01) USPC: 530/387.3,388.9,389.8;435/7.1,325,328,345,358;436/548 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) U.S. : 530/387.3, 388.9, 389.8; 435/7.1,325,328,345,358; 436/548 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category *</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>WO 01/09190 A2 (DADE BEHRING INC.) 08 February 2001, see entire document.</td> <td style="text-align: center;">1-5,13-41</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>BODER et al. Directed Evolution of Antibody Fragments with Monovalent Femtomolar Antigen Binding Affinity. PNAS. Vol 97, No. 20, pages 10701-10705, see entire document.</td> <td style="text-align: center;">1-5,13-41</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	WO 01/09190 A2 (DADE BEHRING INC.) 08 February 2001, see entire document.	1-5,13-41	Y	BODER et al. Directed Evolution of Antibody Fragments with Monovalent Femtomolar Antigen Binding Affinity. PNAS. Vol 97, No. 20, pages 10701-10705, see entire document.	1-5,13-41
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
Y	WO 01/09190 A2 (DADE BEHRING INC.) 08 February 2001, see entire document.	1-5,13-41									
Y	BODER et al. Directed Evolution of Antibody Fragments with Monovalent Femtomolar Antigen Binding Affinity. PNAS. Vol 97, No. 20, pages 10701-10705, see entire document.	1-5,13-41									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.									
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 05 June 2008 (05.06.2008)		Date of mailing of the international search report 01 JUL 2008									
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer  Ron Schwadron, Ph.D. Telephone No. 571 272 1600									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/10076

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, MEDICINE/BIOTECH (DIALOG) search term: inventor names, antibod?, selection diluent, tacrolimus, 1-60-46, immunosuppressive, 1-60-46 AM2, 10-11, 10-10, affinity, phage, equilibrium, cho

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 33/531 (2006.01)		G 0 1 N 33/531		B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08		

(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, MT, 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, BH, 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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 シーゲル, ロバート・ダブリュ

アメリカ合衆国、イリノイ・60099、ビーチ・パーク、ノース・ギルバート・アベニュー・38775

(72)発明者 タイナー, ジョーン・デー

アメリカ合衆国、イリノイ・60087、ビーチ・パーク、ノース・オーチャード・ロード・37835

(72)発明者 ナカガワ, テリー・ワイ

アメリカ合衆国、イリノイ・60203、エバンストン、チャーチ・ストリート・3359

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA53 CA02 CA07 DA02 DA12 EA04 GA11 HA03

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA13

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA46

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	免疫抑制结合抗体及其获得和使用方法		
公开(公告)号	JP2009534466A	公开(公告)日	2009-09-24
申请号	JP2009507787	申请日	2007-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	シーゲルロバートダブリユ タイナージヨンディー ナカガワテリーワイ		
发明人	シーゲル,ロバート・ダブリユ タイナー,ジヨン・ディー ナカガワ,テリー・ワイ		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/09 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/531 C12P21/08		
CPC分类号	C07K14/4702 A61K38/00 A61K2039/505 C07K16/1292 C07K16/18		
FI分类号	C07K16/44.ZNA C12N15/00.A C12N5/00.B G01N33/53.S G01N33/566 G01N33/531.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
优先权	60/794370 2006-04-24 US 60/856614 2006-11-03 US 11/788949 2007-04-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明尤其涉及免疫特异性结合至少一种目的试剂（例如免疫抑制剂）的抗体，产生这种抗体的方法和使用所述抗体的免疫试验。另外，本发明还涉及选择用于诊断免疫测定的抗体的方法和选择用于诊断免疫测定的抗原的方法。本发明还涉及在一种或多种主要代谢物存在下抗体识别活性母体药物的改进。

