

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5235892号
(P5235892)

(45) 発行日 平成25年7月10日(2013.7.10)

(24) 登録日 平成25年4月5日(2013.4.5)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 O 1 D	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	N	
		GO 1 N 33/543	5 4 1 Z	

請求項の数 7 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2009-537520 (P2009-537520)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成19年11月19日(2007.11.19)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2010-510504 (P2010-510504A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成22年4月2日(2010.4.2)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/009980		T
(87) 国際公開番号	W02008/061684		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成20年5月29日(2008.5.29)		グレンツァーヘルストラツセ124
審査請求日	平成21年6月25日(2009.6.25)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	06024133.8		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成18年11月21日(2006.11.21)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫測定法における標準としての抗イディオタイプ結合体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 治療用モノクローナル抗体のCDR領域に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体と

(ii) 単一免疫グロブリンクラスの参照免疫グロブリンと

を含む結合体であって、該参照免疫グロブリンがヒト免疫グロブリンまたはヒト免疫グロブリンFc領域である、前記結合体。

【請求項2】

前記参照免疫グロブリンが前記抗イディオタイプ抗体に特異的に結合しておらずかつ前記治療用抗体にも特異的に結合していないことを特徴とする、請求項1記載の結合体。

【請求項3】

試料中の抗親抗体抗体を定量するための免疫測定法における標準または陽性対照としての、請求項1記載の結合体の使用。

【請求項4】

前記免疫測定法が捕捉抗体およびトレーサー抗体を含むサンドイッチ免疫測定法であり、該捕捉抗体または該トレーサー抗体が前記親抗体であることを特徴とする、請求項3記載の使用。

【請求項5】

前記抗親抗体抗体が、前記親抗体に対する抗イディオタイプ抗体であることを特徴とする、請求項3または4記載の使用。

【請求項6】

10

20

前記捕捉抗体が、前記親抗体の軽鎖、重鎖可変領域、Fab断片、Fab'断片、F(ab)₂断片、またはF(ab')₂断片を含む群より選択されることを特徴とする、請求項3~5のいずれか一項記載の使用。

【請求項7】

以下の工程を含む、捕捉抗体、トレーサー抗体、および本発明による結合体を含むサンドイッチ免疫測定法を用いて、試料中の親抗体のCDR領域に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体の免疫グロブリンクラスを決定するための方法であって、請求項1記載の結合体を陽性対照として用いる方法：

(a) 捕捉抗体/抗イディオタイプ抗体-複合体の形成に適した条件下で、該試料を捕捉抗体と接触させる工程；

10

(b) トレーサー抗体として

- (i) 抗ヒト免疫グロブリンA抗体、
- (ii) 抗ヒト免疫グロブリンE抗体、
- (iii) 抗ヒト免疫グロブリンM抗体、および
- (iv) 抗ヒト免疫グロブリンG抗体

を該捕捉抗体/抗イディオタイプ抗体-複合体と別々に接触させる工程；

(c) 該トレーサー抗体と該複合体との結合を定量し、それによって該抗イディオタイプ抗体の免疫グロブリンクラスを決定する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、抗薬物抗体の定量のための免疫測定法における標準または陽性対照としての結合体およびその使用を含む。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

モノクローナル抗体を用いる標準的な固相免疫測定法は、固体支持体上に吸着された抗体（捕捉抗体）と、抗原と、検出可能な標識に結合した抗原の別のエピトープに対する抗体（トレーサー抗体）との間での複合体の形成を伴う。したがって、固体支持体-捕捉抗体-抗原-トレーサー抗体のサンドイッチが形成される。このサンドイッチにおいて、抗体と結合した検出可能な標識の強度はインキュベーション媒質中の抗原濃度に比例する。捕捉抗体とトレーサー抗体が抗原の別々のエピトープに結合するので、標準的なサンドイッチ法は二重抗原架橋（double antigen bridging）免疫測定法とも呼ばれる。Hoesel, W.らはJ. Immunol. Methods 294 (2004) 101-110（非特許文献1）において抗EPO二重抗原架橋分析を報告しており、これによって、アミノ基にカップリングした固定化rhEPOと糖鎖基にカップリングした固定化rhEPOとの混合物が使用された。

30

【0003】

二重抗原架橋ELISAなどの免疫測定法は、抗体薬（治療用または診断用の抗体）に対する患者の免疫原性応答の調査における一般的な分析タイプである。Mire-Sluis, A.R.らはJ. Immunol. Methods 289 (2004) 1-16（非特許文献2）において、バイオテクノロジー製品に対する宿主抗体の検出を用いた免疫測定法の設計および最適化の推奨について手短に述べている。Mire-Sluisらによると、周知の抗薬物抗体の分析形式は多数の短所を示している。抗薬物抗体の分析については、例えば国際公開公報第2005/045058号（特許文献1）および国際公開公報第90/006515号（特許文献2）で言及されている。抗イディオタイプ抗体の分析については、例えば米国特許第5,219,730号（特許文献3）、国際公開公報第87/002778号（特許文献4）、欧州特許第0 139 389号（特許文献5）、および欧州特許第0 170 302号（特許文献6）で言及されている。Wadhwa, M.らはJ. Immunol. Methods 278 (2003) 1-17（非特許文献3）において、治療用生物製剤により誘導される望ましくない抗体の検出、測定、および特徴決定のための戦略を報告している。

40

【0004】

50

ヒト抗ヒト抗体の血清学的分析は、Ritter, G., Cancer Res. 61 (2001) 6851-6859 (非特許文献4)および国際公開公報第2003/016909号(特許文献7)に記載されている。IgGクラスのヒト抗ヒト抗体の同定には、分析の前にさらなるプロテインG沈降段階が必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開公報第2005/045058号

【特許文献2】国際公開公報第90/006515号

【特許文献3】米国特許第5,219,730号

10

【特許文献4】国際公開公報第87/002778号

【特許文献5】欧州特許第0 139 389号

【特許文献6】欧州特許第0 170 302号

【特許文献7】国際公開公報第2003/016909号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Hoesel, W.ら, J. Immunol. Methods 294 (2004) 101-110

【非特許文献2】Mire-Sluis, A.R.ら, J. Immunol. Methods 289 (2004) 1-16

【非特許文献3】Wadhwa, M.ら, J. Immunol. Methods 278 (2003) 1-17

【非特許文献4】Ritter, G., Cancer Res. 61 (2001) 6851-6859

20

【発明の概要】

【0007】

本発明は、親抗体のCDR領域に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体と単一の免疫グロブリンクラスの参照免疫グロブリンとを含む結合体を含む。

【0008】

好ましくは、上記の参照免疫グロブリンは、上記抗イディオタイプ抗体および上記親抗体には特異的に結合していない。

【0009】

本発明はさらに、ヒト試料中の抗親抗体抗体を定量するための免疫測定法における標準としての、本発明による結合体の使用を含む。

30

【0010】

好ましくは、上記結合体は、捕捉抗体およびトレーサー抗体を含むサンドイッチ免疫測定法を用いる試料中の抗親抗体抗体の免疫学的定量において、標準または陽性対照として使用される。

【0011】

好ましくは、上記捕捉抗体またはトレーサー抗体は、上記親抗体である。

【0012】

好ましくは、上記抗親抗体抗体は、上記親抗体に対する抗イディオタイプ抗体である。

【0013】

好ましくは、上記親抗体は治療用抗体または診断用抗体である。

40

【0014】

好ましくは、捕捉抗体は、上記親抗体の軽鎖、重鎖可変領域、Fab断片、Fab'断片、F(ab)₂断片、またはF(ab')₂断片を含む群より選択される。

【0015】

好ましくは、固体支持体への捕捉抗体の結合は、受動吸収によって実施される。

【0016】

好ましくは、捕捉抗体は特異的結合対を介して固定化される。

【0017】

好ましくは、捕捉抗体がビオチンに結合し、固定化されたアビジンまたはストレプトアビジンを介して固定化が実施される。

50

【 0 0 1 8 】

好ましくは、トレーサー抗体は特異的結合対を介して、検出可能な標識に結合する。

【 0 0 1 9 】

好ましくは、トレーサー抗体がジゴキシゲニンに結合し、ジゴキシゲニンに対する抗体を介して、検出可能な標識への連結が実施される。

【 0 0 2 0 】

好ましくは、免疫学的定量は、表面プラズモン共鳴によって実施される。

【 0 0 2 1 】

好ましくは、捕捉抗体および/またはトレーサー抗体とその結合パートナーとの結合は、抗体のアミノ酸骨格のN末端アミノ基および/もしくは -アミノ基(リシン)、異なるリシンの -アミノ基、カルボキシ官能基、スルフヒドリル官能基、ヒドロキシル官能基、および/もしくはフェノール官能基、ならびに/または、抗体の糖鎖構造の糖アルコール基を介してこれを化学的に結合させることによって実施される。

10

【 0 0 2 2 】

好ましくは、捕捉抗体は受動吸収によって固体支持体に結合し、かつしたがって固体支持体に結合した捕捉抗体は、異なる抗体部位を介して固体支持体に結合した少なくとも2つの捕捉抗体の混合物を含む。受動吸収は、例えばButler, J.E., Solid Phases in Immunoassay, In: Immunoassays, Diamandis, E.P.およびChristopoulos, T.K. (eds.), Academic Press San Diego (1996), pp. 205-225により記載されている。

【 0 0 2 3 】

本発明の好ましい態様において、捕捉抗体は特異的結合対を介して固定化される。そのような結合対(第一の成分/第二の成分)とは、例えばストレプトアビジンまたはアビジン/ビオチン、抗体/抗原(例えばHermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996を参照されたい)、レクチン/多糖、ステロイド/ステロイド結合タンパク質、ホルモン/ホルモン受容体、酵素/基質、IgG/プロテインAおよび/またはプロテインGなどである。好ましくは、捕捉親抗体がビオチンに結合し、固定化されたアビジンまたはストレプトアビジンを介して固定化が実施される。

20

【 0 0 2 4 】

本発明の好ましい態様において、トレーサー抗体は、好ましくは特異的結合対を介して結合した、検出可能な標識に結合する。そのような結合対(第一の成分/第二の成分)とは、例えばストレプトアビジンまたはアビジン/ビオチン、抗体/抗原(例えばHermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996を参照されたい)、レクチン/多糖、ステロイド/ステロイド結合タンパク質、ホルモン/ホルモン受容体、酵素/基質、IgG/プロテインAおよび/またはプロテインGなどである。好ましくは、トレーサー親抗体は、ジゴキシゲニンおよびジゴキシゲニンに対する抗体を介して、検出可能な標識に結合する。

30

【 0 0 2 5 】

あるいは、トレーサー親抗体は、ルテニウムビスピリジル(ruthenium bispyridyl)複合体のような電気化学発光標識に結合する。

【 図面の簡単な説明 】

40

【 0 0 2 6 】

【 図 1 】 試料中の抗親抗体抗体を検出し、任意でその後にサブクラス決定を行うためのスキーム。

【 図 2 】 本発明による抗イディオタイプ抗体のサブクラス決定に関するBIAcore SPRダイアグラム。(1) 試料の注入、(2) + (3) 抗ヒト免疫グロブリンE抗体の注入、(4) 抗ヒト免疫グロブリンG抗体の注入。

【 図 3 】 任意でクラス特異的抗体と共に、標準として本発明による複合体を使用するためのスキーム。

【 図 4 】 任意でその後の抗標準免疫グロブリンサブクラス抗体(第二の反応)の使用を伴う、標準として本発明による複合物(第一の反応)の使用に関する、BIAcore SPRダイ

50

アグラム。

【図5】抗イディオタイプ抗体のELISA測定のスキーム。

【図6】抗イディオタイプ抗体の定量のためのELISAの検量線。

【図7】その後免疫グロブリンクラス決定を行う、抗親抗体抗体の結合領域の複数チャンネル検出のスキーム。

【発明を実施するための形態】

【0027】

発明の詳細な説明

本発明は、親抗体のCDR領域に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体と単一免疫グロブリンクラスの参照免疫グロブリンとを含む結合体を含む。好ましくは、上記親抗体は治療用抗体である。好ましくは、上記親抗体は診断用抗体である。

10

【0028】

本発明による「親抗体のCDR領域に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体」という用語は、非ヒト動物中で親抗体に対して産生された抗体、すなわち非ヒト抗体を意味する。好ましくは、親抗体に対して産生される上記抗体は、齧歯類またはマカク (macaque) 内で、特に好ましくはマウス、ウサギ、またはカニクイザル内で産生されるか、あるいは、ディスプレイ技術によって、好ましくはファージディスプレイまたはリボソームディスプレイによって得られる。抗イディオタイプ抗体はポリクローナル抗体であることが好ましい。同じく、抗イディオタイプ抗体はモノクローナル抗体であることも好ましい。好ましくは親抗体またはその断片によって、動物の免疫化を実施する。さらなる段階においては、親抗体のあるCDR領域/上記CDR領域に対するアフィニティー吸収を用いて、上記動物に由来する免疫グロブリンを単離および精製する。「親抗体のCDR領域」という用語は、親抗体の軽鎖および重鎖のCDR領域を意味し、すなわち親抗体の軽鎖CDR1、CDR2、CDR3、親抗体の重鎖CDR1、CDR2、CDR3を含む。

20

【0029】

本発明による「親抗体」という用語は、投与後に個体の試料が親抗体を含むことが疑われるように、薬物（薬物抗体または治療用抗体）としてまたは診断用手段（診断用抗体）として個体に投与することのできる抗体を意味する。本発明により実施されるある分析において、親抗体、捕捉（親）抗体、および/またはトレーサー（親）抗体には、例えば同じ発現ベクターを用いて組換え的に作製されかつ同じアミノ酸配列を含む、「同じ」抗体分子が含まれる。薬物抗体（治療用モノクローナル抗体）は、腫瘍の疾患（例えば、非ホジキンリンパ腫、乳癌、および結腸直腸癌を含む、血液悪性腫瘍および固形悪性腫瘍）などの多様な疾患の治療のために広く使用されている。そのような抗体は、例えばLevene, A.P., et al., Journal of the Royal Society of Medicine 98 (2005) 146-152により記載されている。そのような抗体とは、例えば、CCR4、CD19、CD20、CD22、CD28、HLA-DR、CD33、CD40、CD52、CD80、CSF-1R、CTLA-4、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)、EGFR、G250、GD3、HER2/neu、HER3、HER4、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、CD56、VEGF、VEGF2、TLSP-R、TIE-1、TIE-2、TNF- α 、TNF様アポトーシス弱誘導因子 (TNF like weak inducer of apoptosis; TWEAK)、CEA、Ep-CAM、TRAIL、TRAIL-受容体1、TRAIL-受容体2、リンホトキシン- α 受容体、Levis Y抗原、ヘプシン、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (MCSP)、IL-1受容体、IL-6受容体、VEGF-受容体1、VEGF-受容体2、またはIGF-1受容体に対する抗体である。治療用抗体はまた、Groner, B., et al., Curr. Mol. Med. 4 (2004) 539-547、およびHarris, M., Lancet Oncol. 5 (2004) 292-302によっても記載されている。

30

40

【0030】

本明細書で用いる「参照免疫グロブリン」という用語は、完全免疫グロブリン、すなわちFab領域およびFc領域を含む免疫グロブリン、ならびに、Fc領域、 C_H2 ドメイン、または C_H3 ドメインなどの完全免疫グロブリンの断片を意味する。参照免疫グロブリンは好ましくはヒト免疫グロブリンである。好ましくは「参照免疫グロブリン」とは、ヒト免疫グロブリンまたはヒト免疫グロブリンのFc領域である。「参照免疫グロブリン」は抗イディオ

50

タイプ抗体には特異的に結合せず、本発明による結合体の親抗体にも特異的に結合しない。免疫グロブリンのFc領域は、完全免疫グロブリンのペプシン切断またはパパイン切断によって得られる。参照免疫グロブリンは「単一免疫グロブリンクラス」のものである。「単一免疫グロブリンクラス」という用語は、参照免疫グロブリンが、免疫グロブリンクラスA、E、M、およびGから選択される、一つの免疫グロブリンクラス特異的定常領域のアミノ酸配列を含むことを意味する。免疫グロブリンクラス特異的定常領域のアミノ酸配列については、例えばPink, J.R., et al., Biochem. J. 117 (1970) 33-47を参照されたい。

【0031】

「抗親抗体抗体」とは、親抗体に特異的に結合する抗体、すなわち親抗体に対する抗体である。同様に抗IL-6R抗体抗体とは、抗IL-6R抗体に特異的に結合する抗体である。「抗親抗体抗体」とは、親抗体の可変領域、定常領域、または糖鎖構造(glycostructure)のような親抗体の任意の領域に対する抗体である。そのような抗親抗体抗体は、抗体療法の際に患者の免疫原性反応として生じうる(Pan, Y., et al., FASEB J. 9 (1995) 43-49を参照されたい)。「抗イディオタイプ抗体」とは、親抗体のCDR領域に特異的に結合する抗体である。抗イディオタイプ抗体は、親抗体の軽鎖CDR1領域、軽鎖CDR2領域、軽鎖CDR3領域、重鎖CDR1領域、重鎖CDR2領域、または重鎖CDR3領域に特異的に結合する。

10

【0032】

例示的な(好ましくはモノクローナル)親抗体は、IL-6受容体に対する抗体(抗IL-6R抗体)である。そのような抗体は、例えばMihara, M., et al., Clin. Immunol. 98 (2001) 319-326, Nishimoto, N., et al., Blood 106 (2005) 2627-2632によって、治験NCT00046774に、または国際公開公報第2004/096274号に記載されている。

20

【0033】

例示的な(好ましくはモノクローナル)親抗体は、IGF-1受容体に対する抗体(抗IGF-1R抗体)である。そのような抗体は、例えば国際公開公報第2004/087756号または国際公開公報第2005/005635号に記載されている。

【0034】

本発明による「結合する」または「特異的に結合する」という用語は、BIAcoreアッセイ法において 10^{-6} M未満($M = \text{mol/l}$) (例えば 10^{-12} M)の K_D 値で、より好ましくは 10^{-9} M ~ 10^{-15} Mの範囲内の K_D 値によって、抗原、免疫グロブリンの定常領域、親抗体、または親抗体のCDR領域に結合することを指す。「非特異的結合」とは、 K_D 値が 10^{-5} Mを上回る(例えば 10^{-4} Mである)場合に認められる。

30

【0035】

別の免疫測定法の原理は、例えばHage, D. S.により、Anal. Chem. 71 (1999) 294R-304Rにおいて記載されている。Lu, B.らはAnalyst 121 (1996) 29R-32Rにおいて、免疫測定法で用いるための抗体の配向固定化を報告している。例えばWilchek, M.およびBayer, E. A.により、Methods Enzymol. 184 (1990) 467-469において、アビジン-ビオチン媒介性の免疫測定法が報告されている。

【0036】

抗体、特にその定常ドメインには、表面、タンパク質、ポリマー(PEG、セルロース、またはポリスチロールなど)、酵素、または結合対メンバーのような結合パートナーにカップリングするためのアミノ酸側鎖官能性、すなわち化学反応基が含まれる。抗体の化学反応基とは、例えばアミノ基(リシンのアミノ基、 α -アミノ基)、チオール基(システイン、およびメチオニン)、カルボン酸基(アスパラギン酸、グルタミン酸)、および糖-アルコール基である。そのような方法は、例えばAslam, M. and Dent, A., Bioconjugation, MacMillan Ref. Ltd. (1999) 50-100に記載されている。

40

【0037】

例えば固体支持体に対してポリペプチドが結合するためには、適切な化学保護剤が必要である。これらは、例えば保護されていない側鎖アミンにおいて結合を形成し、N末端におけるそれらの結合よりも安定性が低く、かつ該結合とは異なる。多くのそのような化学保護剤が既知である(たとえば欧州特許第0 651 761号を参照されたい)。好ましい化学

50

保護剤には、無水マレイン酸または無水シトラコン酸 (citraconylic anhydride) などの環状ジカルボン酸無水物が含まれる。

【0038】

「試料」という用語には、ヒト由来の任意の量の物質が非限定的に含まれる。そのような物質には個人由来の全血、血清、または血漿が非限定的に含まれ、これらは臨床ルーチンにおいて最も広く用いられる試料供給源である。

【0039】

本発明による免疫測定法のための固体支持体は、当技術分野において広く記載されている (例えばButler, J.E., Methods 22 (2000) 4-23を参照されたい)。

【0040】

「固体支持体」という用語は非液体の物質を意味し、かつ以下を含む：ポリマー、金属 (常磁性粒子、強磁性粒子)、ガラス、およびセラミックなどの材料から作製された、チップ、容器、および粒子 (微粒子およびビーズを含む)；シリカ、アルミナ、およびポリマーゲルなどのゲル物質；ポリマー、金属、ガラス、および/またはセラミックで作製されうるキャピラリー；ゼオライトおよびその他の多孔性物質；電極；マイクロタイタープレート；固体ストリップ；ならびに、キュベット、チューブ、またはその他の分光計試料容器。分析物の固体支持体成分は、「固体支持体」がその表面上に少なくとも一部分を含み、これが捕捉抗体と直接的または間接的に相互作用することが意図されているという点で、分析物が接触しうる不活性固体表面とは区別される。固体支持体は、チューブ、ストリップ、キュベット、またはマイクロタイタープレートなどの固定成分であってもよく、
20
ビーズおよび微粒子などの非固定成分であってもよい。均一アッセイ形式のための固体支持体として、微粒子を用いることもできる。タンパク質とその他の物質との共有結合的または非共有結合的な付着の両方を可能にする多様な微粒子が使用されうる。そのような粒子には、ポリスチレンおよびポリ(メチルメタクリレート)などのポリマー粒子；金ナノ粒子および金コロイドなどの金粒子；ならびにシリカ、ガラス、および金属酸化物粒子などのセラミック粒子が含まれる。例えば、参照により本明細書に組み入れられているMartin, C.R., et al., Analytical Chemistry-News & Features 70 (1998) 322A-327Aを参照されたい。

【0041】

「チップ」とは、金属、ガラス、またはプラスチックなどの非多孔性の固体物質である。
30
この物質を任意で、全体的にまたは特定領域においてコーティングしてもよい。物質の表面上には、可視的にまたは座標内に (in coordinate)、任意の整列スポットが存在する。物質の表面に対するリンカーまたはスパーサーを用いてまたは用いずに、各スポット上に所定のポリペプチドを固定化することができる。

【0042】

上述および後述の本明細書において言及される全ての文献は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0043】

色原体 (蛍光性または発光性の基および色素)、酵素、NMR活性な基または金属粒子、ハプテン (例えばジゴキシゲニン) は、検出可能な標識の例である。検出可能な標識は、
40
光活性化可能な (photoactivatable) 架橋基、例えばアジド基またはアジリン基であってもよい。同じく、電気化学発光により検出可能な金属キレートも、検出可能な標識として使用される好ましいシグナル放出基であり、例えばルテニウム (ビスピリジル)₃²⁺キレートなどのルテニウムキレートが特に好まれる。適切なルテニウム標識基は、例えば欧州特許第0 580 979号、国際公開公報第90/05301号、国際公開公報第90/11511号、および国際公開公報第92/14138号に記載されている。

【0044】

本発明は、親抗体のCDR領域に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体と単一免疫グロブリンクラスの参照免疫グロブリンとを含む結合体を含む。

【0045】

10

20

30

40

50

本発明は、親抗体のCDR領域に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体と、ヒト免疫グロブリンE、ヒト免疫グロブリンG、ヒト免疫グロブリンM、またはヒト免疫グロブリンAを含む群より選択される単一免疫グロブリンクラスの参照免疫グロブリンとを含む、結合体を含む。すなわち、参照免疫グロブリンはヒトIgEクラス、ヒトIgGクラス、ヒトIgMクラス、またはヒトIgAクラスのいずれかである。

【0046】

好ましくは本発明は、親抗体のCDR領域に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体と、該抗イディオタイプ抗体に特異的に結合せず該親抗体にも特異的に結合しない単一免疫グロブリンクラスの参照免疫グロブリンとを含む、結合体を含む。

【0047】

好ましくは、上記親抗体は治療用抗体または診断用抗体である。好ましくは、上記参照免疫グロブリンは、単一免疫グロブリンクラスの非機能的(not functionable)免疫グロブリンであるか、または単一免疫グロブリンクラスの免疫グロブリンのFc領域である。

【0048】

「診断用抗体」という用語は、天然抗体または組換え的に作製された抗体のいずれかであり、かつその標的抗原の検出および可視化のために用いられる抗体を意味する。例えばアッセイ系(例えばELISA)においてまたはインビトロ画像化のために、診断用抗体を使用する。診断用抗体は、例えば標識された治療用抗体であってもよい。

【0049】

好ましくは、上記参照免疫グロブリンは、ヒト免疫グロブリンまたはヒト免疫グロブリンFc領域である。

【0050】

参照免疫グロブリンにより免疫グロブリンクラス特異的な定常領域が提供され、これは、抗ヒト免疫グロブリンG抗体などの抗免疫グロブリンクラス抗体に特異的に結合される。したがって参照免疫グロブリンは、タグ特異的な抗体によって特異的に同定可能である免疫グロブリンクラス特異的なタグを有する、本発明による結合体を提供する。例えば、タグが免疫グロブリンG定常領域である場合、タグ特異的な抗体とは抗免疫グロブリンG抗体である。

【0051】

上記抗イディオタイプ抗体がポリクローナル抗体でありかつ上記参照免疫グロブリンがポリクローナル免疫グロブリンであることが好ましい。同じく、上記抗イディオタイプ抗体がポリクローナル抗体でありかつ上記参照免疫グロブリンがモノクローナル免疫グロブリンであることも好ましい。さらに、上記抗イディオタイプ抗体がモノクローナル抗体でありかつ上記参照免疫グロブリンがモノクローナル免疫グロブリンであることも好ましい。

【0052】

本発明による結合体は、抗イディオタイプ抗体と参照免疫グロブリンとの化学的結合によって得られる。

【0053】

本発明による結合体において、抗イディオタイプ抗体は機能的免疫グロブリンであり、参照免疫グロブリンは非機能的免疫グロブリンである。これは、抗イディオタイプ抗体がその標的抗体に特異的に結合している一方で参照抗体はいずれのヒト抗原にも特異的に結合していないことを意味するものである。参照抗体は、天然免疫グロブリンとできる限り類似したFc領域を提示するためおよび抗原に結合しないために、提供される。同じく、抗イディオタイプ抗体と参照抗体が同じ抗体ではないこと、すなわちこれらは少なくとも20%のアミノ酸残基が異なること、すなわちこれらがアミノ酸配列ベースで80%以下の同一性を有することも、本発明の範囲に含まれる。参照抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。本出願において用いる「モノクローナル」という用語は、単一の細胞および/またはその子孫によって産生された抗体の集団を意味する。この用語は、抗体が同じアミノ酸配列を有すること、すなわち、抗体を産生する細胞の増殖の間に起こる

10

20

30

40

50

偶発的な突然変異にもかかわらず、該抗体が同一アミノ酸配列を有することを意味する。

【0054】

本出願中で用いる「非機能的免疫グロブリン」という用語は、 10^{-5} mol/l以上（例えば 10^{-3} mol/l）の K_D 値（結合親和性）で、好ましくは 10^{-6} mol/l以上の K_D 値でヒト抗原に結合する免疫グロブリンを意味する。結合親和性は、表面プラズモン共鳴技術（BIAcore（登録商標））などの標準的な結合アッセイ法により定量される。この結合親和性の値は厳密な値と見なされるべきではなく、これは単なる基準点である。これは、ヒト抗原に対して免疫グロブリン典型的な特異的結合を全く示さずしたがってヒトにおいて治療活性を全く有さない免疫グロブリンを決定および/または選択するために使用される。これは、免疫グロブリンが非ヒト抗原に対して特異的結合を示すことを除外するものではない。非ヒト抗原のこの特異的結合は、 10^{-7} mol/l以下（例えば 10^{-10} mol/l）の K_D 値、好ましくは 10^{-8} mol/l以下の K_D 値と対応付けられている。

10

【0055】

トランスフェクトマ（transfectoma）に基づいて、すなわち、免疫化マウスより得られたトランスフェクト免疫グロブリン遺伝子を含むリンパ系細胞に基づいて、本発明による結合体を核酸レベルでの結合によって得ることができる。

【0056】

受容臓器の外側から起こる、哺乳動物への薬物の投与、例えば外因性治療用ポリペプチドの投与によって、受容哺乳動物の免疫応答がもたらされる。この免疫応答は、抗薬物抗体の産生によって明らかになる。そのような免疫応答の評価のためには、薬物に対する抗体の検出のための方法が必要となる。

20

【0057】

本発明による結合体を、免疫測定法における標準として使用することができる。したがって本発明は、ヒト試料中の抗親抗体抗体の定量のための免疫測定法における標準としての、親抗体のCDR領域に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体と単一免疫グロブリンクラスの参照免疫グロブリンとを含む結合体の使用を含む。

【0058】

また、本発明による結合体を、免疫測定法における陽性対照として使用することもできる。例えばこれにより、検出限界の確定が可能になる。したがって本発明は、ヒト試料中の抗親抗体抗体の定量のための免疫測定法における陽性対照としての、親抗体のCDR領域に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体と単一免疫グロブリンクラスの参照免疫グロブリンとを含む結合体の使用を含む。本態様において、上記結合体を免疫測定法の前にヒト試料に添加することが好ましい。

30

【0059】

好ましくは、親抗体は治療用抗体である。同じく好ましくは、親抗体はマウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。好ましくは、親抗体はキメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。特に好ましくは、上記親抗体は、治療用のキメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。親抗体に対する抗体の検出のために、放射免疫測定法（RIA）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、免疫放射線測定法（IRMA）、または表面プラズモン共鳴（SPR）などの様々な方法を使用することができる。

40

【0060】

本出願で用いる「治療用抗体」という用語およびその文法上の同等表現は、疾患の治療、療法、または診断における使用のために哺乳動物、好ましくはヒトに投与することが意図された抗体、好ましくはモノクローナル抗体を意味する。治療用抗体は一般に、組換え的手段によって、例えば該治療用抗体をコードする核酸でトランスフェクトした真核細胞の培養によって、作製される。好ましくは、治療用抗体はキメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。治療用抗体は、例えば標的細胞の枯渇、ADCC（抗体依存性細胞媒介性細胞障害）の仲介、またはCDC（補体依存性細胞障害）の仲介などの所望の効果を達成するために投与される。標的細胞とは例えば、癌細胞またはウイルス感染細胞であり得る。ADCCまたはCDCを仲介するために、治療用抗体は標的細胞に結合しなければならず、かつ

50

これはしたがって例えば腫瘍抗原に対して特異的である、すなわち特異的に結合する。

【0061】

本明細書で用いる「腫瘍抗原」とは当技術分野で公知の意味を含み、これには、腫瘍細胞の腫瘍形成特性に寄与することが知られているか寄与すると考えられている、該腫瘍細胞上で発現する（または該腫瘍細胞の発生に關与する）任意の分子が含まれる。数多くの腫瘍抗原が当技術分野で公知である。ある分子が腫瘍抗原であるかどうかは、例えばクローン原性アッセイ法、形質転換アッセイ法、インビトロまたはインビボにおける腫瘍形成アッセイ法、ゲル移動アッセイ法、遺伝子ノックアウト解析などの、当業者に周知の技術およびアッセイ法により判定することもできる。好ましくは、本明細書で用いる場合の「腫瘍抗原」という用語は、ヒト膜貫通タンパク質、すなわち、細胞の脂質二重層内に固定された細胞膜タンパク質を指す。一般にヒト膜貫通タンパク質は本明細書で用いる「細胞外ドメイン」を含むと考えられ、これは、リガンド、親油性膜貫通ドメイン、保存された細胞内ドメイン、例えばチロシンキナーゼドメイン、および、リン酸化可能な複数のチロシン残基を包含するカルボキシ末端シグナル伝達ドメインと結合しうる。腫瘍抗原には、EGFR、HER2/neu、HER3、HER4、EpCAM、CEA、TRAIL、TRAIL-受容体1、TRAIL-受容体2、リンホトキシン-受容体、CCR4、CD19、CD20、CD22、CD28、CD33、CD40、CD80、CSF-1R、CTLA-4、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）、ヘプシン、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（MCSP）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、VEGF受容体1、VEGF受容体2、IGF1-R、TSLP-R、TIE-1、TIE-2、TNF-、TNF様アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、またはIL-1Rなどの分子が含まれる。

10

20

【0062】

好ましくは、本発明による結合体は、捕捉抗体およびトレーサー抗体を含むサンドイッチ免疫測定法を用いた、試料中の抗親抗体抗体の免疫学的定量における標準として使用される。特に好ましくは、上記捕捉抗体または上記トレーサー抗体は上記親抗体である。

【0063】

例えば、抗薬物抗体アッセイ法は国際公開公報第2005/045058号および国際公開公報第90/006515号において言及されており、抗イディオタイプ抗体アッセイ法は米国特許第5,219,730号、国際公開公報第87/002778号、欧州特許第0 139 389号、および欧州特許第0 170 302号において言及されている。

【0064】

上記抗イディオタイプ抗体がモノクローナル抗体でありかつ上記参照免疫グロブリンがポリクローナルヒト免疫グロブリンであることが好ましい。同じく、上記抗イディオタイプ抗体がモノクローナル抗体でありかつ上記参照免疫グロブリンがモノクローナルヒト免疫グロブリンであることも好ましい。

30

【0065】

好ましくは、本発明による結合体は、試料中の親抗体に対する抗イディオタイプ抗体の免疫学的定量における標準として使用される。免疫学的定量のために、捕捉抗体およびトレーサー抗体が使用される。一態様において、捕捉抗体は親抗体である。好ましくは、捕捉抗体として使用される親抗体は完全抗体であり、すなわち軽鎖および重鎖を含み、該軽鎖は可変ドメインおよび定常ドメインを含みかつ該重鎖は可変ドメイン、 C_H1 ドメイン、 C_H2 ドメイン、 C_H3 ドメイン、および任意で C_H4 ドメイン、ならびにヒンジ領域を含む。好ましくは、捕捉抗体は上記親抗体の軽鎖、重鎖可変領域、Fab断片、Fab'断片、 $F(ab)_2$ 断片、または $F(ab')_2$ 断片を含む群より選択される、すなわちこれは、上記親抗体の軽鎖、重鎖可変領域、Fab断片、Fab'断片、 $F(ab)_2$ 断片、または $F(ab')_2$ 断片のいずれかである。その他の態様において、トレーサー抗体は親抗体である。この態様において、例えば、本発明による結合体は、結合体の参照免疫グロブリンに特異的に結合する免疫グロブリンを介して、固体支持体に結合する。

40

【0066】

トレーサー抗体および/または捕捉抗体とその結合パートナーとの結合は、受動吸収、化学結合、または特異的結合対を介した結合などの様々な方法により実施することができ

50

る。本明細書で用いる「結合パートナー」という用語は、例えば固体支持体、ポリペプチド、検出可能な標識、特異的結合対のメンバーを意味する。一態様において、捕捉抗体および/またはトレーサー抗体とその結合パートナーとの結合は、抗体のアミノ酸骨格のN末端アミノ基および/もしくは -アミノ基(リシン)、異なるリシンの -アミノ基、カルボキシ官能基、スルフヒドリル官能基、ヒドロキシル官能基、および/もしくはフェノール官能基、ならびに/または、抗体の糖鎖構造の糖アルコール基を介してこれを化学的に結合させることによって実施される。一態様において、捕捉抗体および/またはトレーサー抗体は、特異的結合対を介してその結合パートナーに結合する。好ましくは、捕捉親抗体がビオチンに結合し、固体支持体に固定化されたアビジンまたはストレプトアビジンを介して固体支持体への固定化が実施される。好ましくは、トレーサー抗体がジゴキシゲニンに結合し、検出可能な標識への連結がジゴキシゲニンに対する抗体を介して実施される。別の態様において、捕捉抗体は受動吸収によって固体支持体に結合する。受動吸収によって固体支持体に結合した抗体は、異なる抗体部位を介して固体支持体に結合した抗体の混合物を含む。したがって、受動吸収によって固体支持体に結合した捕捉抗体は2つ以上の異なる結合体の混合物であり、ここで該結合体は、固体支持体への結合に用いられる抗体部位すなわち抗体残基が異なる。受動吸収は、例えばButler, J.E., in "Solid Phases in Immunoassay", page 205-225 ; Diamandis, E.P. and Christopoulos, T.K. (Editors) : Immunoassays (1996), Academic Press, San Diegoにより記載されている。

10

【0067】

本発明の好ましい態様において、捕捉抗体は特異的結合対を介して固定化される。例えばそのような結合対(第一の成分/第二の成分)は、ストレプトアビジンまたはアビジン/ビオチン、抗体/抗原(例えばHermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996を参照されたい)、レクチン/多糖、ステロイド/ステロイド結合タンパク質、ホルモン/ホルモン受容体、酵素/基質、IgG/プロテインAおよび/またはプロテインGおよび/またはプロテインLなどである。好ましくは、捕捉親抗体はビオチンに結合し、固定化されたアビジンまたはストレプトアビジンを介して固定化が実施される。本発明のその他の好ましい態様において、トレーサー抗体は、検出可能な標識に結合する、好ましくは特異的結合対を介して結合する。例えばそのような結合対(第一の成分/第二の成分)は、ストレプトアビジンまたはアビジン/ビオチン、抗体/抗原、レクチン/多糖、ステロイド/ステロイド結合タンパク質、ホルモン/ホルモン受容体、酵素/基質、IgG/プロテインAおよび/またはプロテインGおよび/またはプロテインLなどである。好ましくは、トレーサー親抗体は、ジゴキシゲニンおよびジゴキシゲニンに対する抗体を介して、検出可能な標識に結合する。あるいは、トレーサー親抗体は、ルテニウムビスピリジル複合体のような電気化学発光標識に結合する。

20

30

【0068】

本発明による結合体を、ヒト試料中の親抗体に対する抗イディオタイプ抗体の定量的ための免疫測定法における標準として用いる場合、2つ以上の異なる濃度でこれを用いることが好ましい。異なる濃度の標準に対する応答を定量することによって、検量線を算出することができる。

【0069】

本発明による結合体を、ヒト試料中の親抗体に対する抗イディオタイプ抗体の定量的ための免疫測定法における標準として用いる場合、該結合体の上記参照免疫グロブリンに特異的に結合する(任意の)追加の抗体を用いることができる。本発明による結合体を、単独の標準としてまたは任意の追加の抗ヒト免疫グロブリン抗体と組み合わせた標準として使用することができる(図3および4)。

40

【0070】

本出願において互換的に使用可能な「標準」または「標準物質」という用語は解析法のための基準点を意味し、かつこれは、同じ解析法の結果と比較される値を設定するために使用される。本明細書で用いる「陽性対照」という用語は、解析法において使用された場合に所定のカットオフ値または閾値を上回る応答を達成する標準物質を意味する。カ

50

ットオフ値とは一般に、抗薬物抗体を含まない試料の解析において得られた平均値 + 得られた値の標準偏差 × 2 (好ましくは × 3) である。

【 0 0 7 1 】

本発明は、以下の工程を含む、免疫測定法における標準として本発明による結合体を使用するための方法をさらに含む：(a)本発明による結合体を捕捉抗体と接触させる工程、(b)該結合体と該捕捉抗体との結合を検出する工程。工程(a)における結合の検出は、例えばSPR角の変化を介して直接的に、または例えばトレーサー抗体および/もしくは検出可能な標識を介して間接的に、実施することができる。

【 0 0 7 2 】

本発明はさらに、抗薬物抗体が親抗体のFc領域に結合しているのかFab領域に結合しているのかを判定するためおよび該抗薬物抗体がどの免疫グロブリンクラスを有するのかを決定するための方法を含む(例えば図7を参照されたい)。この方法において、試料の結合は、固定化親抗体、該親抗体の固定化Fc領域、および/または該親抗体の固定化Fab領域を用いて判定される。これは例えば、4つのチャンネルのうち1つが固定化親抗体を含み、1つが親抗体の固定化Fc領域を含み、1つが親抗体の固定化Fab領域を含み、1つが固定化親抗体を全く含まない、BIAcoreチップ上で実施することができる。どのチャンネルが、およびしたがって親抗体のどの部分が試料由来の抗薬物抗体との結合を示すかによって、抗薬物抗体の結合領域を決定することができる。免疫グロブリンクラスは、抗ヒト免疫グロブリンE抗体、抗ヒト免疫グロブリンM抗体、抗ヒト免疫グロブリンG抗体、または抗ヒト免疫グロブリンA抗体の結合によって決定される。抗ヒト免疫グロブリン抗体は連続的または同時に使用され、好ましくは連続的に使用される。本発明による結合体を、本方法における標準として使用することができる。

【 0 0 7 3 】

本発明はさらに、以下の工程を含む、捕捉抗体、トレーサー抗体、および本発明による結合体を含むサンドイッチ免疫測定法を用いて、試料中の親抗体のCDR領域に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体の免疫グロブリンクラスを決定するための方法であって、本発明による結合体を陽性対照として用いる方法を含む：

(a) 捕捉抗体/抗イディオタイプ抗体-複合体の形成に適した条件下で、該試料を捕捉抗体と接触させる工程；

(b) トレーサー抗体として

- (i) 抗ヒト免疫グロブリンA抗体、
- (ii) 抗ヒト免疫グロブリンE抗体、
- (iii) 抗ヒト免疫グロブリンM抗体、および
- (iv) 抗ヒト免疫グロブリンG抗体

を該捕捉抗体/抗イディオタイプ抗体-複合体と別々に接触させる工程；

(c) 該トレーサー抗体のそれぞれと該複合体との結合を判定し、それによって該抗イディオタイプ抗体の免疫グロブリンクラスを決定する工程。

【 0 0 7 4 】

本方法のスキームおよび例示的な反応ダイアグラムを、図1および図2に示す。

【 0 0 7 5 】

好ましくは、上記トレーサー抗体を (i) 抗ヒト免疫グロブリンA抗体、(ii) 抗ヒト免疫グロブリンE抗体、(iii) 抗ヒト免疫グロブリンM抗体、および (iv) 抗ヒト免疫グロブリンG抗体の順で、上記捕捉抗体/抗イディオタイプ抗体-複合体と接触させる、すなわちトレーサー抗体を連続的に接触させる。

【 0 0 7 6 】

好ましくは上記捕捉抗体を、上記親抗体の軽鎖、重鎖可変領域、Fab断片、Fab'断片、F(ab)₂断片、またはF(ab')₂断片を含む群より選択する。

【 0 0 7 7 】

本発明はさらに、抗IL-6R抗体のCDR領域に特異的に結合するポリクローナル抗体を含む。本発明によるポリクローナル抗体の調製のための方法は、実施例1a)に記載されている

10

20

30

40

50

。

【0078】

好ましくは、本発明による抗イディオタイプ抗体の免疫グロブリンクラスを決定するための方法は、以下の工程を含む：

- (a) 捕捉抗体/抗イディオタイプ抗体-複合体の形成に適した条件下で、試料を捕捉抗体と接触させる工程；
- (b) 抗ヒト免疫グロブリンG抗体、抗ヒト免疫グロブリンE抗体、抗ヒト免疫グロブリンM抗体、抗ヒト免疫グロブリンA抗体を含むトレーサー抗体の群より選択されるトレーサー抗体を、該捕捉抗体/抗イディオタイプ抗体-複合体と接触させる工程；
- (c) 該トレーサー抗体と該複合体との結合を判定する工程；
- (d) 該捕捉抗体/抗イディオタイプ抗体-複合体を分解する工程；
- (e) 以前には選択されていないトレーサー抗体を用いて工程 (a) ~ (d) を繰り返す工程；
- (f) 該捕捉抗体/抗イディオタイプ抗体-複合体に特異的に結合する該トレーサー抗体の免疫グロブリンであるとして該抗イディオタイプ抗体の免疫グロブリンクラスを決定する工程。

10

【0079】

好ましくはトレーサー抗体は、抗ヒト免疫グロブリンG抗体、または抗ヒト免疫グロブリンE抗体、または抗ヒト免疫グロブリンM抗体、または抗ヒト免疫グロブリンA抗体より選択される。

【0080】

本出願において使用する「[...] 複合体の形成に適した条件下」という用語およびその文法上の同等表現は、関心対象の抗体/免疫グロブリン、例えば抗イディオタイプ抗体が第二の抗体と接触した場合にそれと結合する条件を意味する。これは、第二の抗体に対して関心対象の抗体の100%が結合することを必ずしも意味するものではなく、関心対象の抗体の本質的に100%が結合すること、すなわち、関心対象の抗体の少なくとも85%が結合すること、好ましくは関心対象の抗体の少なくとも90%が結合すること、好ましくは関心対象の抗体の少なくとも95%が結合すること、より好ましくは関心対象の抗体の95%よりも多くが結合することを意味する。

20

【0081】

以下の実施例および添付の図面は、本発明の理解を助けるために提供されるものであって、本発明の真の範囲は、添付の特許請求の範囲により規定される。本発明の趣旨から逸脱しない限り、記載された手法に変更を加えてもよいことが理解される。

30

【0082】

以下の実施例におけるIL-6受容体に対する抗体の使用は、本発明を例示することのみを目的とし、本発明の範囲を限定することを意味するものではない。

【0083】

実施例1

親抗体のCDR領域に特異的に結合するポリクローナル抗イディオタイプ抗体とクラスE、G、A、およびMのポリクローナルヒト血清免疫グロブリンとの合成物の調製

ポリクローナル抗IL-6R抗体抗体（抗IL-6R-mAb pAb）

40

(i) モノクローナル抗IL-6R抗体に対するポリクローナル抗体の調製

ウサギ血清由来のポリクローナル抗体の精製

ウサギは、標準的な方法によってモノクローナル抗IL-6R抗体で免疫化した。免疫化ウサギ5匹の生血清において、Aerosil (1.5% (w/v)) を用いた脱脂によって脂質成分を除去し、硫酸アンモニウム (1.7 M) を用いて免疫グロブリンを沈殿させた。酸処理 (30分間、pH 5.5) および50 mM NaCl、pH 7.0を添加した15 mMリン酸カリウム緩衝液に対する透析の後、pH 7.0にてDEAEイオン交換クロマトグラフィーによって混合物を分離した。免疫グロブリンG画分はフロースルー (= ウサギ抗IL-6R-mAb pAb) 中に存在し、これを約25 mg/mlまで濃縮した。

【0084】

50

IL-6Rに対する親抗体のCDR領域に特異的に結合するウサギ抗IL-6R-mAb抗体の調製

前記段階の濃縮IgG画分を、150 mM NaCl、pH 7.5を添加した50 mMリン酸カリウムによる緩衝系（PBS）に移した。最先端技術によるNHS-セファロースへの抗IL-6R抗体の結合によって調製した固定化抗IL-6R抗体（親抗体）を含む免疫吸着剤をカラムに詰め、150 mM NaCl、pH 7.5を添加した50 mMリン酸カリウム緩衝液で平衡化した。

【0085】

免疫吸着剤1 mlあたり10 mgの濃縮免疫グロブリンG画分を、PBSで平衡化されたカラムに適用した。PBS、0.05% (w/v) Tween（登録商標）20を添加した0.5 M NaCl、および30 mM NaClを連続して用い、カラムを洗浄した。免疫吸着剤に特異的に結合したIgGを、3 mM HClおよび1 Mプロピオン酸を用いて溶出させた。溶出物をPBSに対して透析した。

10

【0086】

ヒト免疫グロブリンG（IgG）定常領域に対する交差反応性を有する抗体を除去するために、最先端技術によるNHS-セファロースへの非特異的ヒトIgGの結合によって調製した固定化ヒトIgGを有するアフィニティーカラムに、アフィニティー精製抗体を適用した。PBSを用いてカラムを平衡化した。免疫吸着剤1 mlあたり約6 mgのIgGをカラムに適用した。所望の特異的ポリクローナルIgG画分は、フロースルー中に存在する。0.05% (w/v) Tween（登録商標）20を添加した0.5 M NaCl、30 mM NaCl、1 Mプロピオン酸、およびPBSによるカラムの再生後、ヒトIgG定常領域に非特異的に結合している抗体の免疫吸着を2回繰り返し、ヒトIgGに対する交差反応性を有する抗体を完全に除去した。

【0087】

20

ヒトIgG定常領域に対する交差反応性を有さない、得られた精製ポリクローナル抗IL-6R抗体を、約4 mg/mlまで濃縮して、-80 で保存した。

【0088】

(ii) ポリクローナルヒト免疫グロブリンE、ヒト免疫グロブリンG、ヒト免疫グロブリンA、およびヒト免疫グロブリンMに対する、ポリクローナル抗IL-6R抗体の結合
ポリクローナルウサギ抗IL-6R抗体（aa-IL-6R pAb）とヒト免疫グロブリンGとの結合体の調製

段階1：ウサギaa-IL-6R pAb-SATPの調製

150 mM NaCl、pH 7.8を含む100 mMリン酸カリウム緩衝液に対してaa-IL-6R pAbを透析し、タンパク質溶液をタンパク質濃度約15 mg/mlに調製した。N-スクシンイミジル-3-アセチルチオプロピオネート（SATP）をDMSO中に溶解し、モル比1：5（aa-IL-6R pAb：SATP）で抗体溶液に添加した。pHをpH 7.1に調整し、混合物を25 で60分間インキュベートした。L-リシンを最終濃度10 mMで添加することにより反応を停止させ、200 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 6.1を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液に対する透析によって過剰なSATPを除去した。

30

【0089】

段階2：ヒトポリクローナルヒト免疫グロブリンG-MHの調製

30 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 7.4に対してポリクローナルヒト抗体を透析し、その後タンパク質溶液をタンパク質濃度約25 mg/mlに調整した。マレイミドヘキサノイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MHS）をDMSO中に溶解し、モル比1：6（IgG：MHS）で抗体溶液に添加した。pHをpH 7.1に調整し、混合物を25 で60分間インキュベートした。L-リシンを最終濃度10 mMで添加することにより反応を停止させ、pHをpH 6.2に調整し、200 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 6.1を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液に対する透析によって過剰なMHSを除去した。

40

【0090】

段階3：aa-IL-6R pAb-SATPとポリクローナルヒト免疫グロブリンG-MHとの結合

2% (v/v) 1 Mヒドロキシアミン、pH 7.5とのインキュベーションによってaa-IL-6R pAb-SATPを脱アセチル化してaa-IL-6R pAb-SHとし、25 で45分間インキュベートした。脱アセチル化抗体をポリクローナルヒト免疫グロブリンG-MHと混合し（IgG-SH：IgG-MHのモル比 = 1：3）、200 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 6.1を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液で希釈

50

して、最終濃度1.5 mg/mlのaa-IL-6R pAb-SHおよび4.5 mg/mlのポリクローナルヒト免疫グロブリンG-MHとした。pHをpH 7.1に調整し、混合物を25 でインキュベートした。分析用ゲル濾過カラム（例えばTSK 3000）を用いて、結合プロセスを解析した。システインを最終濃度1 mMで添加することによって、概して45分後に結合を停止させた。さらに30分間のインキュベーション時間の後、N-メチルマレイミド（NMM）を最終濃度5 mMで添加し、pHをpH 7.5に調整した。25 で60分間インキュベーションした後、S300ゲル濾過クロマトグラフィーにより結合体を精製し、非結合抗体を除去した。

【0091】

ウサギaa-IL-6R pAbとヒト免疫グロブリンMとの結合体の調製

段階1：ウサギaa-IL-6R pAb-SATPの調製

150 mM NaCl、pH 7.8を含む100 mMリン酸カリウム緩衝液に対してaa-IL-6R pAbを透析し、タンパク質溶液をタンパク質濃度約15 mg/mlに調製した。N-スクシンイミジル-3-アセチルチオプロピオネート（SATP）をDMSO中に溶解し、モル比1：5（aa-IL-6R pAb：SATP）で抗体溶液に添加した。pHをpH 7.1に調整し、混合物を25 で60分間インキュベートした。L-リシンを最終濃度10 mMで添加することにより反応を停止させ、200 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 6.1を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液に対する透析によって過剰なSATPを除去した。

【0092】

段階2：ポリクローナルヒト免疫グロブリンM-MHの調製

30 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 7.4に対してポリクローナルヒト抗体を透析し、その後、得られたタンパク質溶液をタンパク質濃度約20 mg/mlに調整した。マレイミドヘキサノイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MHS）をDMSO中に溶解し、モル比1：50（1 gM：MHS）で抗体溶液に添加した。pHをpH 7.1に調整し、混合物を25 で60分間インキュベートした。L-リシンを最終濃度10 mMで添加することにより、反応を停止させた。pHをpH 6.2に調整し、200 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 6.1を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液に対する透析によって過剰なMHSを除去した。

【0093】

段階3：aa-IL-6R pAb-SATPとポリクローナルヒト免疫グロブリンM-MHとの結合

2%（v/v）1 Mヒドロキシアミン、pH 7.5とのインキュベーションによってaa-IL-6R pAb-SATPを脱アセチル化してaa-IL-6R pAb-SHとし、25 で45分間インキュベートした。脱アセチル化抗体をポリクローナルヒト免疫グロブリンM-MHと混合し（aa-IL-6R pAb-SH：IgM-MHのモル比=1：2）、200 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 6.1を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液で希釈して、最終濃度約0.9 mg/mlのaa-IL-6R pAb-SHおよび9.1 mg/mlのポリクローナルヒト免疫グロブリンM-MHとした。pHをpH 7.1に調整し、混合物を25 でインキュベートした。分析用ゲル濾過カラム（例えばTSK 5000）を用いて、結合プロセスをモニターした。システインを最終濃度1 mMで添加することによって、概して60分後に結合反応を停止させた。さらに30分間のインキュベーション時間の後、N-メチルマレイミド（NMM）を最終濃度5 mMで添加し、pHをpH 7.5に調整した。25 で60分間インキュベーションした後、S400ゲル濾過クロマトグラフィーにより結合体を精製し、非結合抗体を除去した。

【0094】

ウサギaa-IL-6R pAbとポリクローナルヒト免疫グロブリンEとの結合体の調製

段階1：ウサギaa-IL-6R pAb-SATPの調製

150 mM NaCl、pH 7.8を含む100 mMリン酸カリウム緩衝液に対してaa-IL-6R pAbを透析し、タンパク質溶液をタンパク質濃度約15 mg/mlに調製した。N-スクシンイミジル-3-アセチルチオプロピオネート（SATP）をDMSO中に溶解し、モル比1：5（aa-IL-6R pAb：SATP）で抗体溶液に添加した。pHをpH 7.1に調整し、混合物を25 で60分間インキュベートした。L-リシンを最終濃度10 mMで添加することにより反応を停止させ、200 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 6.1を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液に対する透析によって過剰なSATPを除去した。

【0095】

10

20

30

40

50

段階2：ポリクローナルヒト免疫グロブリンE-MHの調製

30 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 7.4に対してポリクローナルヒト抗体を透析し、得られたタンパク質溶液を最終タンパク質濃度約13 mg/mlに調整した。マレイミドヘキサノイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MHS) をDMSO中に溶解し、モル比1:6 (IgE:MHS) で抗体溶液に添加した。pHをpH 7.1に調整し、混合物を25 ℃で60分間インキュベートした。L-リシンを最終濃度10 mMで添加することにより反応を停止させ、pHをpH 6.2に調整し、200 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 6.1を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液に対する透析によって過剰なMHSを除去した。

【0096】

段階3：ウサギaa-IL-6R pAb-SATPとポリクローナルヒト免疫グロブリンE-MHとの結合

2% (v/v) 1 Mヒドロキシアミン、pH 7.5とのインキュベーションによってaa-IL-6R pAb-SATPを脱アセチル化してaa-IL-6R pAb-SHとし、25 ℃で45分間インキュベートした。脱アセチル化抗体をポリクローナルヒト免疫グロブリンE-MHと混合し (aa-IL-6R pAb-SH:IgE-MHのモル比=1:1.7)、200 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 6.1を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液で希釈して、濃度2.9 mg/mlのaa-IL-6R pAb-SHおよび6.3 mg/mlのポリクローナルヒト免疫グロブリンE-MHとした。pHを7.1に調整し、混合物を25 ℃でインキュベートした。分析用ゲル濾過カラム (例えばTSK 4000) を用いて、結合プロセスをモニターした。システインを最終濃度1 mMで添加することによって、概して90分後に結合プロセスを停止させた。さらに30分間のインキュベーション時間の後、N-メチルマレイミド (NMM) を最終濃度5 mMで添加し、pHをpH 7.5に調整した。25 ℃で60分間インキュベーションした後、S300ゲル濾過クロマトグラフィーにより結合体を精製し、非結合抗体を除去した。

【0097】

ウサギaa-IL-6R pAbとポリクローナルヒト免疫グロブリンAとの結合体の調製

段階1：ウサギaa-IL-6R pAb-SATPの調製

150 mM NaCl、pH 7.8を含む100 mMリン酸カリウム緩衝液に対してaa-IL-6R pAbを透析し、タンパク質溶液をタンパク質濃度約15 mg/mlに調製した。N-スクシンイミジル-3-アセチルチオプロピオネート (SATP) をDMSO中に溶解し、モル比1:5 (aa-IL-6R pAb:SATP) で抗体溶液に添加した。pHをpH 7.1に調整し、混合物を25 ℃で60分間インキュベートした。L-リシンを最終濃度10 mMで添加することにより反応を停止させ、200 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 6.1を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液に対する透析によって過剰なSATPを除去した。

【0098】

段階2：ポリクローナルヒト免疫グロブリンA-MHの調製

30 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 7.4に対してポリクローナルヒト抗体を透析し、得られたタンパク質溶液を最終タンパク質濃度約13 mg/mlに調整する。マレイミドヘキサノイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MHS) をDMSO中に溶解し、モル比1:6 (IgA:MHS) で抗体溶液に添加する。pHをpH 7.1に調整し、混合物を25 ℃で60分間インキュベートする。L-リシンを最終濃度10 mMで添加することにより反応を停止させ、pHをpH 6.2に調整し、200 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 6.1を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液に対する透析によって過剰なMHSを除去する。

【0099】

段階3：ウサギaa-IL-6R pAb-SATPとポリクローナルヒト免疫グロブリンA-MHとの結合

2% (v/v) 1 Mヒドロキシアミン、pH 7.5とのインキュベーションによってaa-IL-6R pAb-SATPを脱アセチル化してaa-IL-6R pAb-SHとし、25 ℃で45分間インキュベートした。脱アセチル化抗体をポリクローナルヒト免疫グロブリンA-MHと混合し (aa-IL-6R pAb-SH:IgA-MHのモル比=1:2)、200 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 6.1を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液で希釈して、濃度2.9 mg/mlのaa-IL-6R pAb-SHおよび6.3 mg/mlのポリクローナルヒト免疫グロブリンA-MHとする。pHを7.1に調整し、混合物を25 ℃でインキュベートする。分析用ゲル濾過カラム (例えばTSK 4000) を用いて、結合プロセスをモニターする。システインを最終濃度1 mMで添加することによって、概して90分後に結合プロセスを停止させる

。さらに30分間のインキュベーション時間の後、N-メチルマレイミド (NMM) を最終濃度5 mMで添加し、pHをpH 7.5に調整する。25 で60分間インキュベーションした後、S300ゲル濾過クロマトグラフィーにより結合体を精製し、非結合抗体を除去する。

【 0 1 0 0 】

実施例2

ストレプトアビジンコートチップへのビオチン化抗IL-6R抗体のカップリング

抗IL-6R抗体を緩衝液 (100 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 8.5) に対して透析した。その後、溶液をタンパク質濃度10 mg/mlに調整した。D-ビオチノイル-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルをDMSO中に溶解し、モル比1:5で抗体溶液に添加した。60分後、L-リシンを添加することによって反応を停止させた。150 mM塩化ナトリウム、pH 7.5を添加した25 mMリン酸カリウム緩衝液に対する透析によって、過剰な標識試薬を除去した。

10

【 0 1 0 1 】

CM5チップのフローセルの表面を、第1段階のNHS-EDC混合物によって活性化させた。表面活性化の後、Neutravidinの100 µg/ml溶液 (pH 4.5の緩衝液中で希釈; Pierce) を注入して、活性化表面エステルに対する共有結合を形成させた。その後、1 Mエタノールアミンの注入によって、残存する未カップリングエステルの不活性化を行った。ビオチン化抗体を流速20 µl/分および濃度20 µg/mlで5分間、単一のフローセルに注入した。これにより、フローセルへの抗体の固定化がもたらされた。

20

【 0 1 0 2 】

実施例3

ヒト血清におけるIgGクラスの抗IL-6R抗体の検出

試料を1:10~1:100の間で希釈し、容量20 µlで、実施例2において調製したチップに流速20 µl/分で注入した。試料注入後、抗IgGクラス抗体mAb抗ヒト免疫グロブリンG抗体を流速20 µl/分および濃度20 µg/mlで注入した。最後に、再生溶液 (100 mM H₃PO₄) 注入を1回実施した。各測定を開始時に標準試料を測定した。陽性標準としてのポリクローナルウサギ抗IL-6R抗体 (aa-IL-6R pAb) とヒトIgGとの結合体20 µlを、流速20 µl/分で、抗IL-6R抗体の完全抗体、F(ab')₂断片、および/またはFc断片を固定化した免疫原性チップ (immunogenicity chip) に注入した。標準の注入の後、任意で、抗IgGクラス抗体mAb抗ヒト免疫グロブリンG抗体を同じ流速で注入した。

30

【 0 1 0 3 】

実施例4

ヒト血清におけるIgEクラスの抗IL-6R抗体の検出

試料を1:10~1:100の間で希釈し、容量20 µlで、実施例2において調製したチップに流速20 µl/分で注入した。試料注入後、抗IgEクラス抗体mAb抗ヒト免疫グロブリンE抗体を流速20 µl/分および濃度20 µg/mlで注入した。最後に、再生溶液 (100 mM H₃PO₄) 注入を1回実施した。各測定を開始時に標準試料を測定した。陽性標準としてのウサギaa-IL-6R pAbとヒトIgEとの結合体20 µlを、流速20 µl/分で、抗IL-6R抗体の完全抗体、F(ab')₂断片、および/またはFc断片を固定化した免疫原性チップに注入した。標準の注入の後、任意で、抗IgEクラス抗体mAb抗ヒト免疫グロブリンE抗体を同じ流速で注入した。

40

【 0 1 0 4 】

実施例5

ヒト血清におけるIgMクラスの抗IL-6R抗体の検出

試料を1:10~1:100の間で希釈し、容量20 µlで、実施例2において調製したチップに流速20 µl/分で注入した。試料注入後、抗IgMクラス抗体mAb抗ヒト免疫グロブリンMを流速20 µl/分および濃度20 µg/mlで注入した。最後に、再生溶液 (100 mM H₃PO₄) 注入を1回実施した。各測定を開始時に標準試料を測定した。陽性標準としてのウサギaa-IL-6R pAbとヒトIgMとの結合体20 µlを、流速20 µl/分で、抗IL-6R抗体の完全抗体、F(ab')₂断片、および/またはFc断片を固定化した免疫原性チップに注入した。標準の注入の後、任意で、抗IgMクラス抗体mAb抗ヒト免疫グロブリンM抗体を同じ流速で注入した。

50

【 0 1 0 5 】

実施例6

ヒト血清におけるIgE、IgG、およびIgMクラスの抗IL-6R抗体の検出

試料を1:10~1:100の間で希釈し、容量20 μ lで、実施例2において調製したチップに流速20 μ l/分で注入した。試料注入後、抗IgEクラス抗体mAb抗ヒト免疫グロブリンEを流速20 μ l/分および濃度20 μ g/mlで注入した。注入後、応答を記録した。その後、抗IgMクラス抗体mAb抗ヒト免疫グロブリンMを流速20 μ l/分および濃度20 μ g/mlで注入した。注入後、応答を記録した。その後、抗IgGクラス抗体mAb抗ヒト免疫グロブリンGを流速20 μ l/分および濃度20 μ g/mlで注入した。注入後、応答を記録した。最後に、再生溶液(100 mM H_3PO_4)注入を1回実施した。記載した標準試料(結合体)3種類を、各測定の開始時に測定した。標準1:陽性標準としてのウサギaa-IL-6R pAbとヒトIgMとの結合体20 μ lを、免疫原性チップに注入した;標準2:陽性標準としてのウサギaa-IL-6R pAbとヒトIgEとの結合体20 μ lを、免疫原性チップに注入した;標準3:陽性標準としてのウサギaa-IL-6R pAbとヒトIgGとの結合体20 μ lを、免疫原性チップに注入した。

10

【 0 1 0 6 】

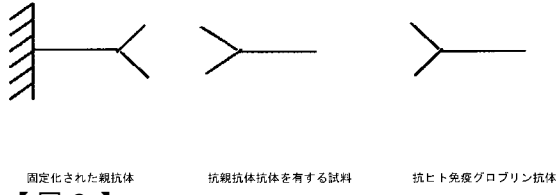
実施例7

標準結合体を用いたIgEクラスの抗親抗体のELISA測定

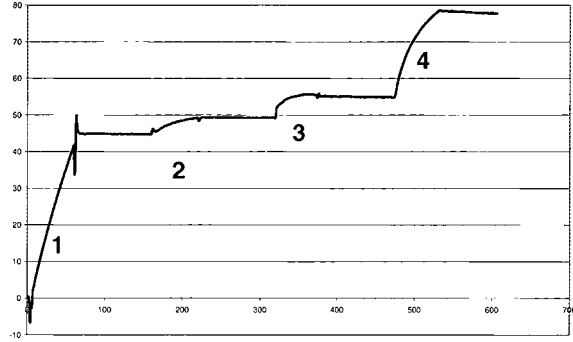
第1段階において、IL-6受容体に対するビオチン化抗体(親抗体)を、ストレプトアビジンコートマイクロタイタープレート(SA-MTP)のウェル内の表面に結合させた。未結合の抗体は、一般的な緩衝液を用いた洗浄によって除去した。その後、試料および参照標準(ポリクローナルヒトIgEに結合した抗IL-6受容体抗体に対するウサギ抗体)を別々のウェルに添加し、インキュベーションした。試料および参照標準それぞれに由来する抗親抗体は、固定化親抗体に結合する。洗浄段階の後、結合した抗親抗体および参照標準をそれぞれ、ヒトIgEに対するジゴキシゲニン化抗体を用いて検出し、続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗ジゴキシゲニン抗体と共にインキュベーションした。抗体-酵素結合体はABTS(登録商標)基質の呈色反応を触媒する。波長405 nm(参照波長490 nm)にて、ELISAリーダーによってシグナルを測定する。各血清試料の吸光度の値は三つ組で測定する。標準について、および抗親抗体がIgEサブクラスである場合の試料についても、陽性シグナルが認められた(図5および図6)。

20

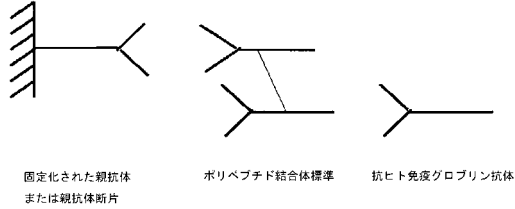
【図1】



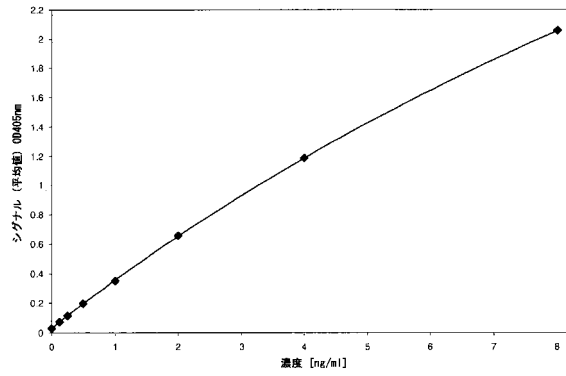
【図2】



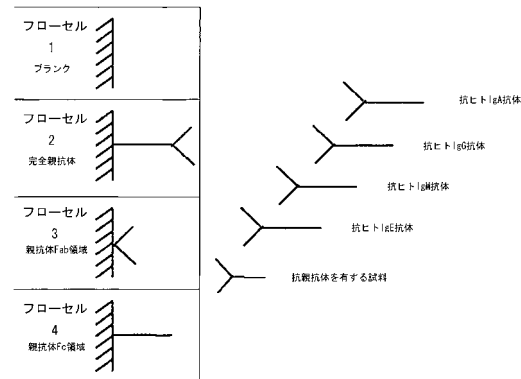
【図3】



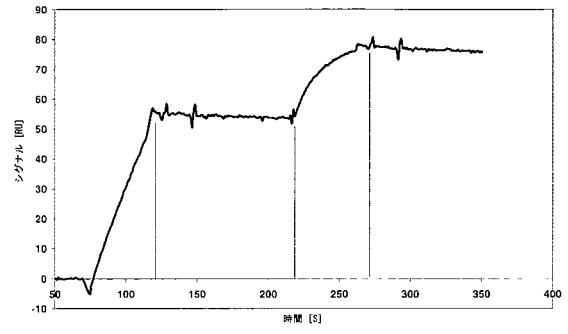
【図6】



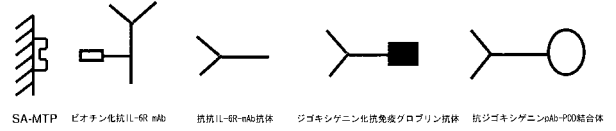
【図7】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 スチュベンラウフ ケイ グナー
ドイツ国 ペンツベルク アン デア フレイハイト 105
- (72)発明者 ボゲル ラドルフ
ドイツ国 ウェイヘイム ラバーストラッセ 5エー
- (72)発明者 ウェセルス ウウエ
ドイツ国 ペンツベルク シンデルスドルファー ストラッセ 8エー

審査官 草川 貴史

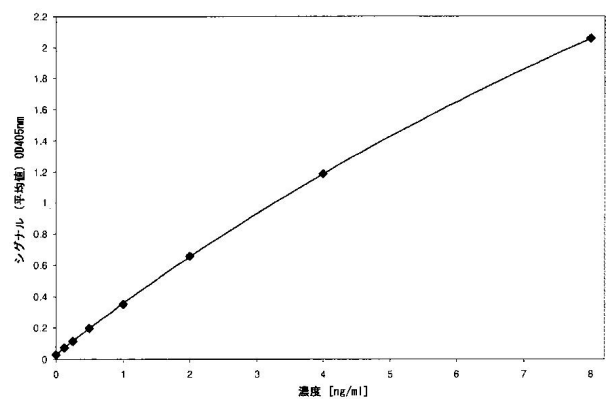
- (56)参考文献 特表2004-528033(JP,A)
特表2005-535571(JP,A)
特表2001-509369(JP,A)
特表2007-528868(JP,A)
特開平04-304897(JP,A)
特表平04-501417(JP,A)
特開平03-206894(JP,A)
特開昭60-248626(JP,A)
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- G01N 33/48-33/98
A61K 39/395
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
Science Direct
MEDLINE(STN)
CAplus(STN)

专利名称(译)	抗独特型结合物作为免疫测定中的标准及其用途		
公开(公告)号	JP5235892B2	公开(公告)日	2013-07-10
申请号	JP2009537520	申请日	2007-11-19
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	スチュベンラウフケイグナー ボゲルラドルフ ウェセルスウエ		
发明人	スチュベンラウフ ケイ-グナー ボゲル ラドルフ ウェセルス ウエ		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/4283 C07K16/4208 C07K16/4258 C07K16/4291 C07K16/461 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/52 C07K2317/54 C07K2319/30 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/6857 G01N33/686 G01N2021/5903 G01N2333/435 G01N2800/24 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/543.501.D G01N33/53.N G01N33/543.541.Z		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关		
优先权	2006024133 2006-11-21 EP		
其他公开文献	JP2010510504A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

包含特异性结合亲本抗体CDR区的抗独特型抗体的缀合物的组合物和使用E, G, M或A类多克隆人血清免疫球蛋白的方法, 以及所述组合物作为标准的用途。提出了一种免疫分析方法。

【 図 6 】



【 図 7 】