

(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2015-509586

(P2015-509586A)

(43) 公表日 平成27年3月30日(2015.3.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 L	2 G 0 4 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	2 G 0 5 4
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B	4 B 0 2 4
GO 1 N 33/554 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	4 B 0 2 9
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 33/554	4 B 0 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-557111 (P2014-557111)
 (86) (22) 出願日 平成25年2月15日 (2013. 2. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年10月9日 (2014. 10. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2013/050315
 (87) 国際公開番号 W02013/121157
 (87) 国際公開日 平成25年8月22日 (2013. 8. 22)
 (31) 優先権主張番号 1200450
 (32) 優先日 平成24年2月16日 (2012. 2. 16)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 510139564
 ユニヴェルシテ ポール サバティエ ト
 ウールーズ トロワ
 フランス共和国 エフー 3 1 0 6 2 トウ
 ールーズ セデックス 9, ルート ド
 ウ ナルボンヌ 1 1 8
 (71) 出願人 514207382
 サントル オスピタリエ ユニヴェルシテ
 ール ドウ トウールーズ
 フランス国 エフー 3 1 0 5 9 トウール
 ーズ セデックス 9, リュ ヴィグリ
 2 テエスア 8 0 0 3 5, オテル
 デューーボンヌフ, オテル デュー
 サン ジャック

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗HLAキメラ型モノクローナル免疫グロブリン、該キメラ型モノクローナル免疫グロブリンを使用する方法及びキット

(57) 【要約】

本発明は、抗体を含有する液体媒体の抗HLA抗体量の決定方法に関する。

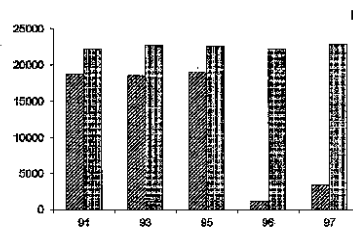
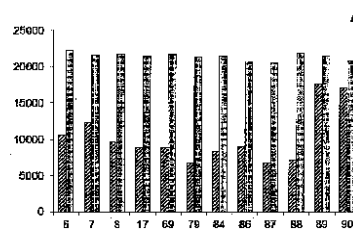


Fig 4

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- 複数のキメラ型モノクローナル免疫グロブリン溶液 (S_n) であって、それぞれが該キメラ型モノクローナル免疫グロブリンの決定された濃度値 (C_n) を示す溶液 (S_n) を作製し、ついで、

- 各溶液 (S_n) を、同じ決定量の少なくとも 1 つの固定化 H L A 抗原と接触させ、
- パラメーターからの測定値 (V_n) であって、決定量の各固定化 H L A 抗原に結合したキメラ型モノクローナル免疫グロブリン量 (Q_n) を表す測定値 (V_n) に、各決定濃度値 (C_n) を関連づける較正曲線を作成し、

- 決定濃度 (C_n) と測定値 (V_n) の対 (C_n 、 V_n) から、各キメラ型モノクローナル免疫グロブリン溶液 (S_n) のキメラ型モノクローナル免疫グロブリン決定濃度 (C_n) に応じて、測定値 (V_n) の較正曲線及びバラツキを作成し、

- キメラ型モノクローナル免疫グロブリン濃度が有意に 0 より大きい値を超えるパラメーターの、閾値と呼ばれる値を計算する、

抗体を含む液体媒体中の抗 H L A 抗体量の決定方法であって、キメラ型モノクローナル免疫グロブリンが、

- 40 k D a ~ 60 k D a の分子量の、重 (H) 鎖と呼ばれる 2 つのポリペプチド鎖、及び、

- 20 k D a ~ 30 k D a の分子量の、軽 (L) 鎖と呼ばれる 2 つのポリペプチド鎖から形成される方法において、

- 各重 (H) 鎖が、

・ H L A クラス I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体及び H L A クラス I I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の重鎖の可変領域 (V_H)、及び、

・ I g A、I g G、及び I g M から成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの重鎖の定常領域 (C_H)

を含むことと、

- 各軽 (L) 鎖が、

・ H L A クラス I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体及び H L A クラス I I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域 (V_L)、及び、

・ 鎖及び 鎖から成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの軽鎖の定常領域 (C_L)

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

H L A クラス I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的な各モノクローナル抗体及び H L A クラス I I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的な各モノクローナル抗体を脊椎生物モノクローナル抗体から成る群から選択することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

パラメーターが、蛍光パラメーター、発光パラメーター、及び比色定量パラメーターから成る群から選択されることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

蛍光パラメーターが蛍光強度であることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

a) 各固定化 H L A 抗原が、粒子から形成される分割された状態の固体担体の粒子の表面に固定化された H L A 抗原であり、

b) 固定化 H L A 抗原と固体担体の H L A 抗原に対する各キメラ型モノクローナル免疫グロブリン溶液とを、固体担体の H L A 抗原と各キメラ型モノクローナル免疫グロブリン溶液のキメラ型モノクローナル免疫グロブリンとの間に安定した結合を形成するのに適合

10

20

30

40

50

した条件下で接触させ、ついで、

c) 固体担体のHLA抗原に結合していないキメラ型モノクローナル免疫グロブリンを洗淨によって除去し、ついで、

d) 固体担体のHLA抗原に結合したキメラ型モノクローナル免疫グロブリンと、蛍光二次抗体、発光二次抗体、及び光吸収二次抗体から成る群から選択された、キメラ型モノクローナル免疫グロブリンに対する二次抗体の溶液とを、キメラ型モノクローナル免疫グロブリンと二次抗体との間に安定した結合を形成するのに適合した条件下で接触させ、ついで、

e) キメラ型モノクローナル免疫グロブリンに結合していない二次抗体を洗淨によって除去し、ついで、

f) 固体担体の各粒子に結合した二次抗体の少なくとも1つのパラメーターを測定し、この測定値に蛍光パラメーター、発光パラメーター、及び比色定量パラメーターから成る群から選択される前記パラメーターからの測定値(V_n)を付与し、ついで、

g) 校正曲線を作成し、ついで、

h) この校正曲線から、分析溶液中の抗HLA抗体の存在の有意な蛍光強度閾値を推定することを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

各固定化HLA抗原が少なくとも1つの細胞の表面に提示されたHLA抗原であることを特徴とする、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体が抗体W6/32であることを特徴とする、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

HLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体が抗体F3.3であることを特徴とする、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

多重定量的免疫蛍光法による方法、フローサイトメトリーによる方法、固体担体上の免疫酵素定量による方法、及び補体依存性小リンパ球傷害による方法から成る群から選択される抗HLA抗体のスクリーニング又は定量方法における標準化及び陽性対照及び感受性の試薬としてのキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの使用であって、キメラ型モノクローナル免疫グロブリンが、

- 40kDa~60kDaの分子量の、重(H)鎖と呼ばれる2つのポリペプチド鎖、及び、

- 20kDa~30kDaの分子量の、軽(L)鎖と呼ばれる2つのポリペプチド鎖、から形成されることを特徴とし、

- 各重(H)鎖が、

・ HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体及びHLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の重鎖の可変領域(V_H)、及び、

・ IgA、IgG、及びIgMから成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの重鎖の定常領域(C_H)

を含むことと、

- 各軽(L)鎖が、

・ HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体及びHLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域(V_L)、及び、

・ 鎖及び鎖から成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの軽鎖の定常領域(C_L)

を含むことを特徴とする使用。

【請求項10】

10

20

30

40

50

- 40 kDa ~ 60 kDa の分子量の、重 (H) 鎖と呼ばれる 2 つのポリペプチド鎖、及び、

- 20 kDa ~ 30 kDa の分子量の、軽 (L) 鎖と呼ばれる 2 つのポリペプチド鎖、
から形成される H L A クラス I 抗原に特異的なキメラ型モノクローナル免疫グロブリンであって、

- 各重 (H) 鎖が、

・ H L A クラス I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の重鎖の可変領域 (V_H)、及び、

・ I g A、I g G、及び I g M から成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの重鎖の定常領域 (C_H)

を含むことと、

- 各軽 (L) 鎖が、

・ H L A クラス I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域 (V_L)、及び、

・ 鎖及び 鎖から成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの軽鎖の定常領域 (C_L)

を含むことを特徴とする、キメラ型モノクローナル免疫グロブリン。

【請求項 11】

- 配列番号 1 の配列の少なくとも 1 つの軽鎖を含むキメラ型モノクローナル免疫グロブリン、及び、

- 配列番号 2 の配列の重鎖、配列番号 3 の配列の重鎖、及び配列番号 4 の配列の重鎖から成る群から選択される少なくとも 1 つの重鎖を含むキメラ型モノクローナル免疫グロブリン

から成る群から選択されることを特徴とする、請求項 10 に記載の H L A クラス I 抗原に特異的なキメラ型モノクローナル免疫グロブリン。

【請求項 12】

- 40 kDa ~ 60 kDa の分子量の、重 (H) 鎖と呼ばれる 2 つのポリペプチド鎖、及び、

- 20 kDa ~ 30 kDa の分子量の、軽 (L) 鎖と呼ばれる 2 つのポリペプチド鎖、

から形成される H L A クラス I I 抗原に特異的なキメラ型モノクローナル免疫グロブリンであって、

- 配列番号 5 の配列の少なくとも 1 つの軽鎖を含むキメラ型モノクローナル免疫グロブリン、及び、

- 配列番号 6 の配列の重鎖、配列番号 7 の配列の重鎖、及び配列番号 8 の配列の重鎖から成る群から選択される少なくとも 1 つの重鎖を含むキメラ型モノクローナル免疫グロブリン

から成る群から選択されることを特徴とするキメラ型モノクローナル免疫グロブリン。

【請求項 13】

H L A クラス I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的な各モノクローナル抗体が脊椎生物モノクローナル抗体から成る群から選択されることを特徴とする、請求項 10 又は 11 に記載の H L A クラス I 抗原に特異的なキメラ型モノクローナル免疫グロブリン。

【請求項 14】

H L A クラス I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体が抗体 W 6 / 3 2 であることを特徴とする、請求項 10、11、又は 13 のいずれか一項に記載のキメラ型モノクローナル免疫グロブリン。

【請求項 15】

H L A クラス I I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体が抗体 F 3 . 3 であることを特徴とする、請求項 12 に記載のキメラ型モノクローナル免疫グ

10

20

30

40

50

ロブリン。

【請求項 16】

液体媒体の抗HLA抗体定量キットであって、請求項10から15のいずれか一項に記載の少なくとも1つのキメラ型モノクローナル免疫グロブリンのあらかじめ決定された量及び請求項1から8のいずれか一項に記載の方法の実施のための説明書を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体を含有する液体媒体の抗HLA抗体量の決定方法に関する。本発明は、かかる方法を実施するための抗HLAクラスI又は抗HLAクラスIIキメラ型モノクローナル免疫グロブリンにも関する。本発明は特に、とりわけ液体媒体、とりわけ生物液体媒体の抗HLA抗体のスクリーニング及び定量のための標準化の試薬として用いることができるように適合した、かかるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンに関する。本発明は、特に一方ではモノクローナル抗体の機能、他方ではキメラ構造を示す、かかるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンに関する。本発明は、かかるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンを用いる、液体媒体の抗HLA抗体の標準化されたスクリーニング方法及び液体媒体の抗HLA抗体の定量方法も目的とする。特に、本発明は、患者、とりわけ移植患者又は移植待機患者の血清の抗HLA抗体のかかる定量方法に関する。

10

【0002】

本発明はさらに、かかる方法の実施のための診断キットに関する。特に、本発明は、正確で、信頼性が高く、迅速である、液体媒体、とりわけ患者から採取した体液の抗HLA抗体の定量が可能であるように適合した、かかる方法及びかかる診断キットに関する。

20

【背景技術】

【0003】

臓器移植の分野では、1930年代から、HLA (Human Leucocytes Antigen、ヒト白血球抗原) 抗原に定義されるようなドナーの組織群と、レシピエントの免疫システム、とりわけ抗体との間の適合性が、臓器移植の成功のために不可欠であることが知られている。

【0004】

HLA抗原は、非常に免疫原性の高い2つのタイプの膜蛋白質、すなわち、クラスIのHLA分子及びクラスIIのHLA分子が有している。したがって、個体のHLAアロ抗原、すなわち自身とは異質で別の抗原への曝露は、これらの抗原に対する免疫応答の発現を引き起こすことがある。この免疫応答は、細胞介在性 (アロ反応性Tリンパ球) 又は液性 (抗HLA抗体の合成) であり得る。

30

【0005】

HLAクラスI抗原は、多形性が3つのそれぞれHLA-A、HLA-B、及びHLA-C対立遺伝子系の原因である、3つのHLA-A、HLA-B、及びHLA-C遺伝子によってコードされる。HLAクラスII抗原は、HLA-DP、HLA-DQ、及びHLA-DR遺伝子によってコードされる。

【0006】

臓器移植では、移植片待機患者に、その患者がすでに免疫化されたHLA抗原を発現する移植片を提案するリスクを最小限にすること、さらにはなくすることが非常に重要である。実際、この状況で超急性、すなわち移植後24時間以内の液性拒絶反応が生じるリスクは大きい。さらに、移植の追跡調査では、移植片レシピエント患者での移植片抗原に対する抗体の出現の早期スクリーニングは、前記移植片レシピエント患者を可能な限り早期に処置し、移植片の破壊を引き起こす可能性のある液性応答の発現の抑制を試みることができる。

40

【0007】

したがって、移植患者と同様に移植待機患者でもアロ免疫の追跡調査が、移植片及び移植患者の生存を確実にするために最も重要である。

50

【0008】

このような背景から、移植待機患者及び移植患者での抗HLA抗体を調査、同定、及び定量できることは必要不可欠である。多くのこれら抗HLA抗体調査技術がすでに開発されている。

【0009】

特に、「補体依存性小リンパ球傷害」と呼ばれる技術が知られている。この技術は、患者、とりわけ移植レシピエントの血清を、HLA分類法がウサギ補体存在下で既知である細胞系に提示することに存する。これらの細胞が持つHLA抗原に特異な抗体(Ac)が検査された血清中に存在し、これらの抗体が補体を活性化できる場合(クラスIgMならびにサブクラスIgG-1及びIgG-3の抗体)、補体依存性細胞溶解(CDC、Complement Dependent Cytotoxicity)は抗体の存在を明らかにする。様々なHLA抗原を発現する細胞パネルによって、このように抗体をスクリーニングし、ついでその1つ又は複数の特異性を同定することができる。この照合技術によって、移植片にとって最も危険な細胞溶解性抗HLA抗体を検出することができる。しかし、この技術は最新の技術と比較すると、低い感受性を示す。したがって、HLA表現型が既知であるドナーを由来とする多種多様のリンパ球を用意する、あるいは大量のHLA分類された細胞系統をインビトロで培養する必要のあるこの技術は、その実施において複雑で負担が大きい。

10

【0010】

固体担体上での免疫酵素定量(「ELISA」、「Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay、酵素結合免疫吸着アッセイ」を指す)などより感受性の高い技術も知られている。さらに、近年、フローサイトメーターの原理から考案されたフロー検出と対をなす免疫蛍光法の技術が現れた。フロー免疫蛍光法の原理は、精製したHLAクラスI又はHLAクラスII抗原をポリスチレンビーズの表面に固定することから成る。HLAクラスI又はHLAクラスII抗原を識別する抗HLA抗体は、ビーズの表面と結合した抗原に結合し、ポリスチレンビーズ洗浄後、蛍光基にカップリングした抗IgG二次抗体によって明らかになる。二次抗体はフローフルオリメトリーによって検出される。さらに、その蛍光強度が定量される。

20

【0011】

スクリーニング検査には、混合物として複数のタイプのビーズを用い、ビーズの各タイプはクラスIあるいはクラスIIの複数のHLA抗原を表面に持つ。かかるアプローチによって、抗HLA抗原の存在を検出できるが、その1つ又は複数の特異性の同定はできない。

30

【0012】

反面、抗体の特異性の同定及び特性化には、混合物として複数のタイプのビーズを用い、ビーズの各タイプは表面にHLA抗原を1つのみ持つ。

【0013】

抗HLA抗体の検出及び同定キットは既知である。これはHLAクラスI抗原又はHLAクラスII抗原で覆われたポリスチレンビーズ及びヒトIgGで覆われたポリスチレンビーズを含む。フィコエリトリンにカップリングしたヒト抗IgG二次抗体及び陰性対照として抗HLA抗体を欠いた血清も商品化されている。かかる陰性対照は、ポリスチレンビーズ上の二次抗体の非特異的な固定を定量するのに適合している。かかるキットは、陽性対照も感受性対照も測定した蛍光強度から分析した媒体中の抗HLA抗体濃度(例えばモル/L又はg/Lで表す)を正確に推定することができる基準も全く含まない。

40

【0014】

さらに、校正及び/又は感受性の証拠を欠いたかかるキットは、分析方法の感受性の閾値、すなわち観察されたシグナルが測定底部のノイズより有意に大きいと断定できるシグナルの最小値を決定できない。

【0015】

抗HLA抗体のスクリーニング及び/又は定量の方法における陽性対照のこの欠陥を緩

50

和するため、免疫学及び組織適合性学の研究所は、陽性対照として、複数のHLA抗原に対して免疫化された複数の個体の複数の血清混合物を用いている。

【0016】

かかる陽性対照では、免疫化された個体の血清の各抗体のそれぞれの濃度が未知である。かかる血清混合物では、蛍光測定値の強度と血清混合物の特異的な抗体の濃度(mol/L又はg/L)の相関させることができない。したがって、移植患者又は移植待機患者の血清中に存在する抗体を定量することができない。したがって、超急性液性応答の発生の真のリスクを評価することもできない。

【0017】

かかる血清混合物の反応性は抗原によって異なり、その使用によって検討した各HLA抗原について検出閾値を固定することはできない。さらに、患者の血清を由来とする、かかるポリクローナル抗体混合物は、限定された量しか入手できず、すぐに尽きる。したがって、それ自体も一定でない量の入手となる他の混合物であって、結果の標準化という観点から、研究所間で前記混合物の交換ができないような混合物に代替しなければならない。ロット間での血清混合物の可変性によって、ロット間で比較することも再現することもできないこれらのロットの頻繁な確認が必要となる。

10

【0018】

かかる血清混合物を用いて、本発明者らは、各タイプのポリスチレンビーズに関連づけた蛍光強度の値は、各タイプのポリスチレンビーズの持つクラスI又はクラスIIのHLA抗原の性質に依存することを明らかにした(図2、3、及び4)。さらに、各タイプのポリスチレンビーズに結合したこの蛍光強度の値は、時間、とりわけ約5カ月の期間で、大きく変動する。この値は平均1000~20000蛍光単位で変動する(図4、ハッチのヒストグラム)。

20

【0019】

ポリスチレンビーズ全体で測定された蛍光強度の平均値は、大きな分散度(その標準偏差から計算)を示し、液体媒体中の抗HLA抗体を定量することができないという結果となった。かかる分散度は、従来技術の基準の説明として与えられる本特許出願の図4(ハッチのヒストグラム)に示されている。

【0020】

かかる蛍光強度の測定値の分散度は、特に蛍光強度の値が低い場合、低い蛍光強度の値を判別することができないが、低い濃度の抗HLA抗体の存在を、測定底部のノイズから判別できない低い蛍光強度の値から示す。

30

【0021】

前述と同様の理由で、先行技術で陽性対照として用いられたかかる調製法では、液体媒体、とりわけ移植患者又は移植待機患者から採取した血清中に存在する抗体の濃度を正確に決定することはできない。

【発明の開示】

【0022】

本発明は、抗HLAクラスI抗体又は抗HLAクラスII抗体の血清学的分析における標準化及び陽性対照及び感受性の試薬として、とりわけ臓器移植の状況において、キメラ型モノクローナル免疫グロブリンを提案し、これらの欠点を解決することを目的とする。

40

【0023】

本発明は、患者の血清中の抗HLA抗体の信頼性の高い定量ができるように適合したキメラ型モノクローナル免疫グロブリンを提案し、前述に挙げた欠点を緩和することを目的とする。かかるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンは、特に移植片の抗原に対する抗体の、患者での発生の検出ができるように、この抗体の濃度が非常に低い場合も適合する。

【0024】

本発明は、抗HLA抗体の検出方法の標準化に適合したキメラ型モノクローナル免疫グロブリンを提案することを目的とする。特に、正確に検出閾値を定義できるため、本発明

50

によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンは、生物学者が抗体調査方法を有効化することを可能にする。

【0025】

本発明は、移植片のHLA抗原に対する抗HLA抗体の発生を可能な限り早期に検出できるように適合したキメラ型モノクローナル免疫グロブリンを提案することを目的とする。かかる早期検出によって、特に液性拒絶反応を可能な限り速やかに発見し、したがって移植した臓器の拒絶反応の治療処置を速やかに処方することができる。

【0026】

本発明は、体液中の抗HLA抗体の調査方法を標準化し校正できる、かかるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンを提案することを目的とする。

10

【0027】

本発明は、医学分析の研究所の認証の新しい法的規格による抗HLA抗体のスクリーニング、定量、及び特性化の標準化された方法の認証を可能とし得る、かかるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンを提案することも目的とする。フランスでは、医学の分析研究所、とりわけ免疫学の研究所は、COFRAC（フランス認証委員会）の規格第15189号を満たさなければならない。

【0028】

本発明は、とりわけ免疫蛍光法による抗HLA抗体スクリーニング検査において、定量校正の試薬として、少なくとも1つのキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの組成物を提案することも目的とする。

20

【0029】

本発明は、特に「Luminex（登録商標）」テクノロジーによる抗HLA抗体スクリーニング検査において、定量基準として、少なくとも1つのキメラ型モノクローナル免疫グロブリンのかかる組成物を提案することを目的とする。

【0030】

本発明は、フローサイトメトリーによる、ELISA技術又は補体依存性小リンパ球傷害による抗HLA抗体スクリーニング検査において、定量基準として、少なくとも1つのキメラ型免疫グロブリンのかかる組成物を提案することも目的とする。

【0031】

したがって、本発明は、1つ又は複数の患者の血清混合物を由来とする抗体の複合混合物の代わりに定量基準として用いる、かかるキメラ型モノクローナル免疫グロブリン及び少なくとも1つのキメラ型モノクローナル免疫グロブリンのかかる組成物を提案することを目的とする。

30

【0032】

本発明は、多量に入手可能であり、生産が抗HLA抗体濃度の点及び組成の点から完全に標準化された、かかるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンを提案することも目的とする。

【0033】

さらに、本発明は、キメラ型モノクローナル免疫グロブリン濃度が、液体媒体の抗HLA抗体のスクリーニング及び/又は定量及び/又は特性化方法の標準化のため、完全に既知である、かかるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの安定した水溶液を提案することを目的とする。

40

【0034】

このために、本発明は、抗体を含有する液体媒体の抗HLA抗体量の決定方法であって、

- 複数のキメラ型モノクローナル免疫グロブリン溶液 (S_n)、とりわけ水溶液を作成し、各溶液 (S_n) は前記キメラ型モノクローナル免疫グロブリンの決定濃度値 (C_n) を示し、ついで、
- 各溶液 (S_n) を、同じ決定量の少なくとも1つの固定化HLA抗原と接触させ、
- パラメーターからの測定値 (V_n) に各決定濃度値 (C_n) を関連づける較正曲線

50

を作成し、前記測定値 (V_n) は、決定量の各固定化 H L A 抗原に結合したキメラ型モノクローナル免疫グロブリン量 (Q_n) を表し、

- 決定濃度 (C_n) と測定値 (V_n) の対 (C_n 、 V_n) から、各キメラ型モノクローナル免疫グロブリン溶液 (S_n) のキメラ型モノクローナル免疫グロブリン決定濃度 (C_n) に応じて、測定値 (V_n) の較正曲線及びバラツキを作成し、

- キメラ型モノクローナル免疫グロブリン濃度が有意に 0 より大きい値を超えるパラメーターの、閾値と呼ばれる値を計算する方法において、

キメラ型モノクローナル免疫グロブリンが、以下：

- 40 k D a ~ 60 k D a の分子量の、重 (H) 鎖と呼ばれる 2 つのポリペプチド鎖、及び、

- 20 k D a ~ 30 k D a の分子量の、軽 (L) 鎖と呼ばれる 2 つのポリペプチド鎖、から形成され、

- 各重 (H) 鎖が、以下：

- ・ H L A クラス I 抗原モノモルフィック (単型 , 単形) エピトープに特異的なモノクローナル抗体及び H L A クラス I I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の重鎖の可変領域 (V_H)、及び、

- ・ I g A、I g G、及び I g M から成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの重鎖の定常領域 (C_H)

を含むことと、

- 各軽 (L) 鎖が、以下：

- ・ H L A クラス I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体及び H L A クラス I I 抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の軽鎖可変領域 (V_L)、及び、

- ・ 鎖及び 鎖から成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの軽鎖定常領域 (C_L)

を含むこととを特徴とする方法に関する。

【0035】

本明細書全体において、「H L A クラス I 抗原」及び「H L A クラス I I 抗原」(H L A は「H u m a n L e u c o c y t e A n t i g e n」を指す) の表現は、本質的にヒトのものである抗原を意味する。

【0036】

したがって、本発明は、本発明による少なくとも 1 つのキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの溶液から較正曲線を作成し、前記キメラ型モノクローナル免疫グロブリンが前記溶液中で既知の濃度を示す、抗 H L A 抗体のインビトロ定量方法を提案することにも存する。

【0037】

実際、本発明者らは、液体媒体中のクラス I 及びクラス I I の抗 H L A 抗体濃度の信頼性が高く再現性のある定量評価が可能となる先行技術で既知の溶液が存在しないことに気づいた。

【0038】

本発明により、有利には、パラメーターは、蛍光パラメーター、発光パラメーター、及び比色定量パラメーターから成る群から選択される。

【0039】

本発明により、有利には、キメラ型モノクローナル免疫グロブリン決定濃度 (C_x) は、多くても 10^{-4} g / m L、とりわけ 10^{-10} g / m L ~ 10^{-4} g / m L である。 10^{-4} g / m L 未満のあらゆる、特に約 10^{-4} g / m L の濃度は、高濃度溶液の希釈によって得ることができる。

【0040】

有利には、本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの漸増段階希釈を実施

10

20

30

40

50

する。蛍光パラメーター、とりわけ定量的免疫蛍光法（HLA抗原に覆われたビーズでのLuminox（登録商標）技術）によって、又はフローサイトメトリー技術（リンパ球で実施する）によって測定された蛍光パラメーター、発光パラメーター、とりわけ化学発光パラメーター、及び比色定量パラメーターから成る群から選択されるパラメーターからの測定値（ V_n ）と各キメラ型モノクローナル免疫グロブリン溶液（ S_n ）濃度（ C_n ）を関連づけるため、既知の濃度の本発明によるこれらのキメラ型モノクローナル免疫グロブリン溶液（ S_n ）を用いる。

【0041】

本発明により、有利には、本発明による方法において、HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的な各モノクローナル抗体及びHLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的な各モノクローナル抗体を、脊椎生物モノクローナル抗体、特に哺乳類、とりわけマウス、ラット、ウサギ、ハムスター、及びヒトのモノクローナル抗体、ならびに哺乳類以外の脊椎生物、とりわけ両生類、鳥類、特にキジ目のモノクローナル抗体から成る群から選択する。

10

【0042】

本発明により、有利には、パラメーターは、蛍光パラメーター、発光パラメーター、及び比色定量パラメーターから成る群から選択される。

【0043】

本発明により、有利には、蛍光パラメーターは蛍光強度である。したがって、蛍光パラメーターの各値（ V_n ）は蛍光強度である。

20

【0044】

本発明により、有利には、多重定量的免疫蛍光法、フローサイトメトリー、固体担体上の免疫酵素定量による方法（ELISA）、競合結合による方法、及び補体依存性小リンパ球傷害による方法から成る群から選択される技術によってパラメーターからの各測定値（ V_n ）を測定する。

【0045】

有利には、本発明による方法の第1の変形形態において、

a) 各固定化HLA抗原は、粒子から形成される分割された状態の固体担体の粒子の表面に固定化されたHLA抗原であり、

b) 固定化HLA抗原と固体担体のHLA抗原に対する各キメラ型モノクローナル免疫グロブリン溶液とを、固体担体のHLA抗原と各キメラ型モノクローナル免疫グロブリン溶液のキメラ型モノクローナル免疫グロブリンとの間に安定した結合を形成するのに適合した条件下で接触させ、ついで、

30

c) 固体担体のHLA抗原に結合していないキメラ型モノクローナル免疫グロブリンを洗浄によって除去し、ついで、

d) 固体担体のHLA抗原に結合したキメラ型モノクローナル免疫グロブリンと、蛍光二次抗体、発光二次抗体、及び光吸収二次抗体から成る群から選択され、キメラ型モノクローナル免疫グロブリンに対する二次抗体溶液とを、キメラ型モノクローナル免疫グロブリンと二次抗体との間に安定した結合を形成するのに適合した条件下で接触させ、ついで、

40

e) キメラ型モノクローナル免疫グロブリンに結合していない二次抗体を洗浄によって除去し、ついで、

f) 固体担体の各粒子に結合した二次抗体の少なくとも1つのパラメーターを測定し、この測定値に蛍光パラメーター、とりわけ定量的免疫蛍光法（HLA抗原に覆われたビーズでのLuminox（登録商標）技術）によって、又はフローサイトメトリー技術（リンパ球で実施する）によって測定された蛍光パラメーター、発光パラメーター、とりわけ化学発光パラメーター、及び比色定量パラメーターから成る群から選択される前記パラメーターからの測定値（ V_n ）を付与し、ついで、

g) 校正曲線を作成し、ついで、

h) この校正曲線から、分析溶液中の抗HLA抗体の存在の有意な蛍光強度閾値を推定

50

する。

【0046】

有利には、第2の変形形態において、及び本発明により、各固定化HLA抗原は、少なくとも1つの細胞、とりわけインビトロ培養細胞の表面に提示されたHLA抗原である。

【0047】

有利には、本発明による方法のこの第2の変形形態において、

i) 各固定化HLA抗原は少なくとも1つの細胞の表面に提示されたHLA抗原であり

j) 少なくとも1つの細胞の表面に提示されたHLA抗原と各キメラ型モノクローナル免疫グロブリン溶液とを、1つ又は複数の細胞のHLA抗原と各キメラ型モノクローナル免疫グロブリン溶液のキメラ型モノクローナル免疫グロブリンとの間に安定した結合を形成するのに適合した条件下で接触させ、ついで、

k) 1つ又は複数の細胞のHLA抗原に結合していないキメラ型モノクローナル免疫グロブリンを洗浄によって除去し、ついで、

l) 1つ又は複数の細胞のHLA抗原に結合したキメラ型モノクローナル免疫グロブリンと、キメラ型モノクローナル免疫グロブリンに対する二次抗体溶液とを、キメラ型モノクローナル免疫グロブリンと二次抗体との間に安定した結合を形成するのに適合した条件下で接触させ、ついで、

m) キメラ型モノクローナル免疫グロブリンに結合していない二次抗体を洗浄によって除去し、ついで、

n) 各細胞に結合した二次抗体の少なくとも1つのパラメーターを測定し、この測定値に蛍光パラメーター、とりわけ定量的免疫蛍光法(HLA抗原に覆われたビーズでのLuminescence(登録商標)技術)によって、又はフローサイトメトリー技術(リンパ球で実施する)によって測定された蛍光パラメーター、発光パラメーター、とりわけ化学発光パラメーター、及び比色定量パラメーターから成る群から選択される前記パラメーターからの測定値(V_n)を付与し、ついで、

o) 校正曲線を作成し、ついで、

p) この校正曲線から、分析溶液中の抗HLA抗体の存在の有意な蛍光強度閾値を推定する。

【0048】

本発明により、有利には、分割された状態の固体担体は、ほぼ球形の粒子の形で、フローオリメトリーによってその分析ができるように適合した大きさである。

【0049】

本発明により、有利には、蛍光強度測定値から非線形回帰によって校正曲線を決定する。

【0050】

本発明により、有利には、液体媒体は、体液、とりわけ個体から採取した血清から成る群から選択される。

【0051】

本発明により、有利には、個体は、移植待機患者及び移植患者から成る群から選択される患者である。

【0052】

本発明により、有利には、HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体は、抗体W6/32である。

【0053】

本発明により、有利には、HLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体は、抗体F3.3である。

【0054】

本発明は、多重定量的免疫蛍光法による方法、フローサイトメトリーによる方法、固体担体上の免疫酵素定量による方法(ELISA)、及び補体依存性小リンパ球傷害による

10

20

30

40

50

方法から成る群から選択される抗HLA抗体のスクリーニング方法、とりわけ調査方法もしくは同定方法、又は定量方法におけるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの使用も目的とする。

【0055】

本発明は、特に多重定量的免疫蛍光法による方法、フローサイトメトリーによる方法、固体担体上の免疫酵素定量による方法、及び補体依存性小リンパ球傷害による方法から成る群から選択される抗HLA抗体のスクリーニング又は定量方法における標準化及び陽性対照及び感受性の試薬としてのキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの使用であって、キメラ型モノクローナル免疫グロブリンが、以下：

- 40kDa～60kDaの分子量の、重(H)鎖と呼ばれる2つのポリペプチド鎖、及び、

- 20kDa～30kDaの分子量の、軽(L)鎖と呼ばれる2つのポリペプチド鎖、から形成されることを特徴とし、

- 各重(H)鎖が、以下：

- ・HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体及びHLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の重鎖の可変領域(V_H)、及び、

- ・IgA、IgG、及びIgMから成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの重鎖の定常領域(C_H)

を含むことと、

- 各軽(L)鎖が、以下：

- ・HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体及びHLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域(V_L)、及び、

- ・鎖及び鎖から成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの軽鎖の定常領域(C_L)

を含むこととを特徴とする使用を目的とする。

【0056】

したがって、重鎖の定常部分(C_H)及び軽鎖の定常部分(C_L)が、競合試験においてヒトIgAの定常部分から構成される、本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンを用いる。本発明によるかかるクラスIgAキメラ型モノクローナル免疫グロブリンは、病人血清中に存在する抗HLAクラスIgG(又はIgM)ポリクローナル抗体の固定を、少なくとも部分的に阻害するのに適合している。本発明によるクラスIgAキメラ型モノクローナル免疫グロブリンによる血清IgG固定阻害によって、「Luminox(登録商標)」装置へのフロー記録での多重定量的免疫蛍光法による、フローサイトメトリーによる、ELISA技術による、及び補体依存性小リンパ球傷害による抗HLA抗体スクリーニング検査において用いられる、免疫吸着担体上のIgG固定の特異性が証明できる。

【0057】

特に、クラスIgAキメラ型モノクローナル免疫グロブリンは、HLA抗原の提示担体上のIgG吸着に対応する非特異的信号と比べて、血清中の抗HLA IgGの真の存在に対応する特異的信号を区別できる。抗HLA IgG調査のための本発明によるこのクラスIgAキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの競合は、Luminox(登録商標)での定量的免疫蛍光法によって証明された。

【0058】

本発明によるクラスIgG及びクラスIgMキメラ型モノクローナル免疫グロブリンは、適合したあらゆる技術(補体依存性小リンパ球傷害又はフローサイトメトリー)によって、及び免疫吸収担体上のクラスIgG又はIgM抗体検出のあらゆる技術(ELISA又はポリスチレンビーズでの定量的免疫蛍光法)において、臓器移植の直前に実施される、臓器のレシピエントとドナーとの間の直接的な適合試験(クロスマッチ)の陽性対照及

10

20

30

40

50

び感受性対照として利用することができる。

【0059】

本発明は、以下：

- 40 kDa ~ 60 kDa の分子量の、重（H）鎖と呼ばれる2つのポリペプチド鎖、及び、
- 20 kDa ~ 30 kDa の分子量の、軽（L）鎖と呼ばれる2つのポリペプチド鎖、から形成されるHLAクラスI抗原に特異的なキメラ型モノクローナル免疫グロブリンであって、

- 各重（H）鎖が以下：

- ・ HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の重鎖の可変領域（ V_H ）、及び、
- ・ IgA、IgG、及びIgMから成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの重鎖の定常領域（ C_H ）

を含むことと、

- 各軽（L）鎖が以下：

- ・ HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域（ V_L ）、及び、

- ・ 鎖及び 鎖から成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの軽鎖の定常領域（ C_L ）

を含むこととを特徴とするキメラ型モノクローナル免疫グロブリンにも関する。

【0060】

有利には、HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体は、すべてのHLAクラスI抗原に共通のエピトープを識別できるように適合させる。

【0061】

本発明により、有利には、HLAクラスI抗原に特異的なキメラ型モノクローナル免疫グロブリンは以下：

- 配列番号1の配列の少なくとも1つの軽鎖を含むキメラ型モノクローナル免疫グロブリン、及び、

- 配列番号2の配列の重鎖、配列番号3の配列の重鎖、及び配列番号4の配列の重鎖から成る群から選択される少なくとも1つの重鎖を含むキメラ型モノクローナル免疫グロブリン

から成る群から選択される。

【0062】

本発明は、以下：

- 40 kDa ~ 60 kDa の分子量の、重（H）鎖と呼ばれる2つのポリペプチド鎖、及び、

- 20 kDa ~ 30 kDa の分子量の、軽（L）鎖と呼ばれる2つのポリペプチド鎖、から形成されるHLAクラスII抗原に特異的なキメラ型モノクローナル免疫グロブリンであって、

- 配列番号5の配列の少なくとも1つの軽鎖を含むキメラ型モノクローナル免疫グロブリン、及び、

- 配列番号6の配列の重鎖、配列番号7の配列の重鎖、及び配列番号8の配列の重鎖から成る群から選択される少なくとも1つの重鎖を含むキメラ型モノクローナル免疫グロブリン

から成る群から選択されることを特徴とするキメラ型モノクローナル免疫グロブリンにも関する。

【0063】

有利には、抗HLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体は、ほぼすべてのHLAクラスII抗原に共通のエピトープを識別できるように

10

20

30

40

50

適合させる。

【0064】

有利には、本発明によるHLAクラスI又はクラスII抗原に特異的なキメラ型モノクローナル免疫グロブリンは、以下のような免疫グロブリンを意味する。

・重鎖及び軽鎖がその定常部分において本質的にヒトのものである。特に、重鎖の定常部分は、IgAの重鎖の定常部分、IgGの重鎖の定常部分、及びIgMの重鎖の定常部分から成る群から選択され、軽鎖の定常部分は鎖及び鎖から成る群から選択され、

・軽鎖及び重鎖の可変部分がHLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体及びHLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択される。かかるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンにおいて、ヒト抗体重鎖の定常部分(C_H)及びヒト抗体軽鎖の定常部分(C_L)は、合計でキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの約60質量%に相当する。さらに、かかるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンは、モノクローナル抗体、すなわち単一のモノモルフィックエピトープに特異的である。

【0065】

有利には、各モノクローナル抗体は、HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的な、脊椎生物、とりわけヒト以外の脊椎生物のモノクローナル抗体、及びHLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的な、脊椎生物、とりわけヒト以外の脊椎生物のモノクローナル抗体から成る群から選択される。

【0066】

本明細書全体において、「ヒト以外の脊椎生物」は、ヒトを除く高等生物を意味する。かかる脊椎生物は特に免疫システムを持っている。かかる脊椎生物は特にヒト以外の哺乳類、とりわけマウス、ラット、ウサギ、及びハムスター、両生類、ならびに鳥類、とりわけキジ目から成る群から選択される。かかるヒト以外の脊椎生物は、特に実験用動物である。しかし、かかるモノクローナル抗体は、ヒトモノクローナル抗体から成る群から選択することができる。

【0067】

本発明により、有利には、HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的な各モノクローナル抗体及びHLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的な各モノクローナル抗体は、脊椎生物モノクローナル抗体、特に哺乳類、とりわけマウス、ラット、ウサギ、ハムスター、及びヒトのモノクローナル抗体、ならびに哺乳類以外の脊椎生物、とりわけ両生類、鳥類、特にキジ目のモノクローナル抗体から成る群から選択される。

【0068】

本発明により、有利には、HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体は、抗体W6/32である。

【0069】

本発明により、有利には、HLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体は、抗体F3.3である。

【0070】

さらに、本発明は、水性組成物中の本発明による少なくとも1つのキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの安定した溶液を目的とする。

【0071】

本発明は、本発明による少なくとも1つのキメラ型モノクローナル免疫グロブリンのかかる水溶液も目的とし、前記水溶液は前記キメラ型モノクローナル免疫グロブリンのあらかじめ決定された濃度を示す。

【0072】

本発明は、抗体を含有する液体媒体の抗HLA抗体量の決定を可能にし得るように適合したかかるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンも目的とする。

【0073】

本発明は、そのうえ、液体媒体の抗HLA抗体のインビトロ定量キットであって、本発明による少なくとも1つのキメラ型モノクローナル免疫グロブリンのあらかじめ決定された量及び本発明による方法の実施のための説明書を含むキットに及ぶ。

【0074】

したがって、本発明は、以下：

- 40kDa ~ 60kDaの分子量の、重(H)鎖と呼ばれる2つのポリペプチド鎖、及び、

- 20kDa ~ 30kDaの分子量の、軽(L)鎖と呼ばれる2つのポリペプチド鎖、を含む少なくとも1つのキメラ型モノクローナル免疫グロブリンのあらかじめ決定された量を含む液体媒体の抗HLA抗体のインビトロ定量キットであって、

- 各重(H)鎖が、以下：

・HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体及びHLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の重鎖の可変領域(V_H)、及び、

・IgA、IgG、及びIgMから成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの重鎖の定常領域(C_H)

を含むことと、

- 各軽(L)鎖が、以下：

・HLAクラスI抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体及びHLAクラスII抗原モノモルフィックエピトープに特異的なモノクローナル抗体から成る群から選択されるモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域(V_L)、及び、

・鎖及び鎖から成る群から選択されるヒト免疫グロブリンの軽鎖の定常領域(C_L)

を含むこととを特徴とするキットを目的とし、前記キットは本発明による方法の実施のための説明書も含む。

【0075】

本発明は、また、上記又は下記に記載の特徴のすべて又は一部を組み合わせて特徴とする、抗体を含有する液体媒体の抗HLA抗体量の決定方法、キメラ型モノクローナル免疫グロブリン、その使用、及びこの決定のためのキットに関する。

【0076】

本発明の他の目的、特徴、及び利点は、限定的ではない例としてのみ挙げられた本発明の好ましい実施形態を表す添付図面を参照する以下の説明を読むことにより明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】陰性対照により処理された17種のタイプのビーズの蛍光強度の時間的変動を示すグラフである。

【図2】時間に応じた先行技術による陽性対照の12種のタイプのHLAクラスI抗原を持つビーズの蛍光強度の変動を示すグラフである。

【図3】時間に応じた先行技術による陽性対照の5種のタイプのHLAクラスIIビーズの蛍光強度の変動を示すグラフである。

【図4A】先行技術による陽性対照及び本発明による陽性対照の蛍光強度の比較を示すヒストグラムであって、先行技術による陽性対照(ハッチのヒストグラム)で、及び本発明による陽性対照(純色のヒストグラム)で処理された12種のタイプのHLAクラスIビーズ上で測定された蛍光強度を示すヒストグラムである。

【図4B】先行技術による陽性対照及び本発明による陽性対照の蛍光強度の比較を示すヒストグラムであって、先行技術による陽性対照(ハッチのヒストグラム)で、及び本発明による陽性対照(純色のヒストグラム)で処理された5種のタイプのHLAクラスIIビーズ上で測定された蛍光強度を示すヒストグラムである。

【図5】Tリンパ球及びBリンパ球上の本発明によるクラスI及びクラスIIのキメラ型

10

20

30

40

50

モノクローナル免疫グロブリンの固定のフローサイトメトリー分析である。

【図 6 A】本発明による陽性対照で処理された 12 種のタイプの H L A クラス I ビーズに対応する重ね合わせた 12 本の用量応答曲線を示すグラフである。本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリン濃度は、 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で表す。

【図 6 B】図 6 A に対応する本発明による陽性対照で処理された 12 種のタイプの H L A クラス I ビーズの平均用量応答曲線を示すグラフである。本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリン濃度は、 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で表す。

【図 7 A】本発明による陽性対照で処理された 5 種のタイプの H L A クラス I I ビーズに対応する重ね合わせた 5 本の用量応答曲線を示すグラフである。本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリン濃度は、 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で表す。

【図 7 B】図 7 A に対応する本発明による陽性対照で処理された 5 種のタイプの H L A クラス I I ビーズの平均用量応答曲線を示すグラフである。本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリン濃度は、 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で表す。

【図 8 A】緩衝生理食塩水で保存した（白色の正方形）、及び $60\text{g}/\text{L}$ のヒトアルブミン溶液で保存した（黒色の菱形）本発明による抗 H L A クラス I キメラ型モノクローナル免疫グロブリンの用量応答曲線の比較を示すグラフである。

【図 8 B】緩衝生理食塩水で保存した（白色の正方形）、及び $60\text{g}/\text{L}$ のヒトアルブミン溶液で保存した（黒色の菱形）本発明による抗 H L A クラス I I キメラ型モノクローナル免疫グロブリンの用量応答曲線の比較を示すグラフである。

【図 9】抗 H L A クラス I キメラ型モノクローナル免疫グロブリン（H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2]）の軽鎖のペプチド配列を示す図であり、配列番号 1 の配列に対応する。

【図 10】キメラ型モノクローナル免疫グロブリン H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2] の重鎖のペプチド配列を示す図であり、配列番号 2 の配列に対応する。

【図 11】キメラ型モノクローナル免疫グロブリン H u - I g A 2 K [W 6 / 3 2] の重鎖のペプチド配列を示す図であり、配列番号 3 の配列に対応する。

【図 12】キメラ型モノクローナル免疫グロブリン H u - I g M K [W 6 / 3 2] の重鎖のペプチド配列を示す図であり、配列番号 4 の配列に対応する。

【図 13】キメラ型モノクローナル免疫グロブリン H u - I g G 1 K [F 3 . 3] の軽鎖のペプチド配列を示す図であり、配列番号 5 の配列に対応する。

【図 14】キメラ型モノクローナル免疫グロブリン H u - I g A 2 K [F 3 . 3] の重鎖のペプチド配列を示す図であり、配列番号 6 の配列に対応する。

【図 15】キメラ型モノクローナル免疫グロブリン H u - I g G 1 K [F 3 . 3] の重鎖のペプチド配列を示す図であり、配列番号 7 の配列に対応する。

【図 16】キメラ型モノクローナル免疫グロブリン H u - I g M K [F 3 . 3] の重鎖のペプチド配列を示す図であり、配列番号 8 の配列に対応する。

【実施例】

【0078】

実施例 1 本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリン I g G / 抗 H L A クラス I (H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2]) の獲得

抗体 W 6 / 3 2 は、1978 年、B a r n s t a b l e らの刊行物に初めて記載された (B a r n s t a b l e C J、B o d m e r W F、B r o w n G、G a l f r e G、M i l s t e i n C、W i l l i a m s A F、Z i e g l e r A .、1978、C e l l e、14 (1)、9 ~ 20 . P r o d u c t i o n o f m o n o c l o n a l a n t i b o d i e s t o g r o u p A e r y t h r o c y t e s , H L A a n d o t h e r h u m a n c e l l s u r f a c e a n t i g e n s - n e w t o o l s f o r g e n e t i c a n a l y s i s)。この抗体は、マウス骨髄腫系統（マウス免疫グロブリンで分泌されない P 3 - N S I / 1 A g 4 - 1 系統）の細胞と、ヒト細胞に対して免疫化されたマウスリンパ球との融合を由来とするマウスハイブリドーマから分泌された。この抗体は H L A クラス I 分子（H L A - A、H L A - B、H L A - C）上に認められた大衆エピトープと反応することが証明された。識別された

10

20

30

40

50

エピトープは、クラスIの重鎖と2マイクログロブリンとの会合に依存するコンホメーションエピトープである。エピトープは、2マイクログロブリン3位のアルギニン及び鎖121位のリジンの存在を必要とする(Ladasky J J、Shum B P、Canauez F、Seuanez H N、Parham P.、(1999)、Immunogenetics、49(4)、312~320. Residue 3 of beta 2-microglobulin affects binding of class I MHC molecules by the W6/32 antibody)。

【0079】

第1段階では、抗体W6/32の重鎖及び軽鎖をコードする転写産物がクローニングされ、配列決定された。

10

【0080】

重鎖のmRNAのDNAコピー(cDNA)は、2つのプライマー、一方はプライマーペプチド(「leader peptide、リーダーペプチド」)をコードする領域に特異的であり、他方は定常部分のCH1ドメインをコードする部分5'を標的とするプライマーによってPCR増幅された。

【0081】

軽鎖のcDNA増幅には、リーダーペプチドのエクソンを標的とするプライマー及びCドメインの部分5'を標的とするプライマーが用いられた。2つの鎖のcDNAフラグメントは、大腸菌(E coli)中でクローニングされた。クローニングされたフラグメントは配列決定された。配列アラインメントによって、重鎖及び軽鎖のcDNAのコンセンサスを98%の相同性閾値で確立することができた。可変部分をコードする領域は、IMGT(登録商標)(「International Immunogenetics Information System、国際免疫遺伝学情報システム」)のデータベースにある配列と比較して決定した。

20

【0082】

場合に依りて軽鎖又は重鎖のプライマーペプチドをコードする配列は5'に加えられ、3'の配列は軽鎖DNAのためのBsiWI制限酵素部位、及び重鎖のためのNheI制限酵素部位を作る形で変更された。これらの制限酵素部位は、クローニングベクターpFUSE-CLIG及びpFUSE-CHIG(InvivoGen、Toulouse、フランス)中にこれらの核酸配列の挿入ができるように適合している。このように決められた配列は合成され、ついで、ヒト鎖の定常ドメインをコードする部分(アロタイプKm 01、Genbank受託番号: J00241)、あるいはヒトIgG1の定常部分を含む発現ベクターの中でクローニングされた。発現ベクターの制限酵素部位によって、免疫グロブリン鎖の定常部分をコードする領域に沿って可変部分のcDNAを挿入することができる。

30

【0083】

2つの発現ベクター、一方は抗体W6/32軽鎖の可変部分とヒトCドメインを会合させるキメラ軽鎖(VL[W6/32]-ヒトC鎖)をコードし、他方は抗体W6/32重鎖の可変部分とヒトC1ドメインを会合させる(VL[W6/32]-ヒトC1)ベクターがこのようにして得られた。

40

【0084】

これら2つのベクターは、CHO細胞(Chinese Hamster Ovary cells、チャイニーズハムスター卵巣細胞)内にトランスフェクションによって導入された。このために、細胞はまず軽鎖をコードするベクターによって、ついで重鎖をコードするベクターによってトランスフェクトされた。発現ベクターは、二重トランスフェクト細胞を効果的に選別できる細胞毒性薬耐性因子を含む。選別期間後、二重トランスフェクト細胞は、限界希釈法によってクローニングされ、ELISAサンドイッチ法によってヒトIgG1がクローン上清中にあることが明らかになった。このようにして明らかになった産生クローンに、下記でHu-IgG1K[W6/32]と名づけられるキメ

50

ラ I g G 1 分泌において最も有効なクローンを集められるように複数回限界希釈法によるクローニングサイクルを施した。

【 0 0 8 5 】

トランスフェクト C H O 細胞培養物の上清中に分泌された H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2] は、S e p h a r o s e (登録商標) ビーズに結合したブドウ球菌 (s t a p h y l o c o q u e) プロテイン A 上の捕獲 - 溶出によって精製された。I g G 1 は p H 2 のグリシン緩衝液中で酸性 p H で溶出された。溶出液は濃度 7 5 0 m M のリン酸二ナトリウム水溶液で即時に緩衝化された。H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2] 溶液は、4 又は - 8 0 で保存された。

【 0 0 8 6 】

キメラ型モノクローナル免疫グロブリン (I g G 1 - 抗 H L A クラス I) H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2] の軽鎖のペプチド配列は図 9 に示され、配列番号 1 の配列に対応する。キメラ型モノクローナル免疫グロブリン (I g G 1 - 抗 H L A クラス I) H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2] の重鎖のペプチド配列は図 1 0 に示され、配列番号 2 の配列に対応する。

【 0 0 8 7 】

本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリン H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2] 結合の特異性の検証は、E D T A チューブで採取したヒト血液から密度勾配上で分離された T リンパ球又は B リンパ球上で実施された。細胞は、抗 C D 3、抗 C D 1 9、及び抗 C D 4 5 抗体によって標識された。T (C D 3 +) 及び B (C D 1 9 +) リンパ球は、リンパ球 C D 4 5 + 集団の中から決められた。

【 0 0 8 8 】

末梢血のヒト単核細胞 (T リンパ球又は B リンパ球) 存在下で、キメラ型モノクローナル免疫グロブリン H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2] をインキュベートし、ついで前記ヒト単核細胞を連続して 3 回の洗浄、続いてリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で 3 回の洗浄を実施する。ヒト抗 F c ヤギ抗体によってヒト単核細胞に固定されたキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの固定が明らかにされる。結果は図 5 に示され、抗体 H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2] は B リンパ球上に固定して (図 5 A)、T リンパ球上にも固定し (図 5 C)、これに対して抗体 H u - I g G 1 K [F 3 . 3] は B リンパ球上に固定するが (図 5 B)、T リンパ球上には固定しない (図 5 D) ことを示す。

【 0 0 8 9 】

実施例 2 キメラ型モノクローナル免疫グロブリン H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2] の特異性

次に、キメラ型モノクローナル免疫グロブリン H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2] の特異性が、O n e L a m b d a (登録商標) 社販売の市販キットを用いて多重定量的蛍光法によって決定された。この決定は、間接免疫蛍光反応に基づき、様々な群の H L A 抗原に覆われたラテックスビーズを用いる。ラテックスビーズに存在する H L A 抗原を識別できる抗体は、フィコエリトリンにカップリングしたヒト抗 I g G 抗体によって明らかになる。蛍光は、L u m i n e x (登録商標) 装置でフローサイトメトリーによって各ビーズ上で定量される。各ビーズは特定の H L A 抗原混合物に覆われているが、ビーズの各タイプの特異的な蛍光標識によって、様々なビーズ (その蛍光から識別できる) を利用することができる。これによって、すべてのクラス I ビーズがほぼ同じ強度で識別されることが証明される (図 4 A、クラス I ビーズ)。これによって、キメラ型モノクローナル免疫グロブリン H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2] がすべての H L A クラス I 分子上に存在する大衆エピトープを識別すると結論づけられる。

【 0 0 9 0 】

競合実験によって、マウスハイブリドーマから分泌されたマウスモノクローナル抗体 W 6 / 3 2 は、キメラ型モノクローナル免疫グロブリン H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2] の固定を阻害することが証明された。

【 0 0 9 1 】

10

20

30

40

50

実施例3 本発明によるアイソタイプIgA2及びIgMの抗HLAクラスIキメラ型モノクローナル抗体(Hu-IgA2 K[W6/32]及びHu-IgM K[W6/32])の獲得

重鎖W6/32の可変部分(VH[W6/32])は、他の2つの発現ベクター、第1のベクターはキメラ μ 鎖(W6/32の可変部分及びヒト μ 重鎖(Genbankアクセス番号:AY510104.1)の定常部分)、他方はキメラ λ 鎖(W6/32の可変部分及びヒト λ 重鎖、アロタイプA2m(1)(Genbankアクセス番号:J00221)の定常部分)を産生できるベクターの中にクローニングされた。これら2つのベクターは、キメラ軽鎖VL[W6/32]-ヒトKの発現を可能にする、ベクターによってあらかじめトランスフェクトされたCHO系統細胞をトランスフェクトするために用いられた。このように、多量のキメラ型モノクローナル免疫グロブリンHu-IgA2 K[W6/32]を分泌するCHO細胞クローン、及びキメラ型モノクローナル免疫グロブリンHu-IgM K[W6/32]を分泌する他のクローンを単離した。納入業者の勧めに従い、キメラ型IgAはペプチドMにカップリングしたアガロースの担体(InvivoGen、Toulouse、フランス)上で精製し、キメラ型IgMはプロテインLにカップリングしたアガロースの担体(InvivoGen、Toulouse、フランス)上で精製した。

【0092】

キメラ型モノクローナル免疫グロブリン(IgA2-抗HLAクラスI)Hu-IgA2 K[W6/32]の重鎖のペプチド配列は図11に示され、配列番号3の配列に対応する。

【0093】

キメラ型モノクローナル免疫グロブリン(IgM-抗HLAクラスI)の重鎖のペプチド配列は図12に示され、配列番号4の配列に対応する。

【0094】

キメラ型モノクローナル免疫グロブリンHu-IgA2 K[W6/32]及びHu-IgM K[W6/32]の反応性は、Lab screen mixed(登録商標)キット(One Lambda(登録商標))でのLuminex(登録商標)技術で、蛍光二次抗体としてフィコエリトリンにカップリングしたヒト抗IgA又はヒト抗IgMヤギ抗体で検証した。

【0095】

実施例4 本発明による抗HLAクラスIIモノクローナル抗体(Hu-IgG1 K[F3.3])の獲得

その原理において、抗HLAクラスIIモノクローナル抗体の獲得方法は、抗HLAクラスIIモノクローナル抗体(W6/32)の獲得方法と似通っている。

【0096】

抗体F3.3(Elsasser, D., Valerius, T., Repp, R., Weiner, G. J., Deo, Y., Kalden, J. R., van de Winkel, J. G., Stevenson, G. T., Glennie, M. J. 及び Gramatzki, M., (1996), Blood, 87(9), 3803~3812 . HLA class II as potential target antigen on malignant B cells for therapy with bispecific antibodies in combination with granulocyte colony-stimulating factor)は、マウスハイブリドーマの単クローンの製品である。抗体F3.3は、HLAクラスII分子を発現するすべてのヒト細胞の表面に存在する少なくとも1つの大衆エピトープを識別する。特に、抗体F3.3は、すべてのDR抗原、すべてのDP抗原、及びすべてのDQ2群の抗原を識別する。抗体F3.3の可変部分の完全なコード配列は、Genbank(登録商標)でアクセス可能である(アクセス番号:軽鎖についてはAY058910[VL]及び重鎖についてはAY058911[VH])。

10

20

30

40

50

【0097】

可変部分の配列は、重鎖についてはpFUSE - CH Ig (InvivoGen、Toulouse、フランス)及び軽鎖についてはpFUSE - CL Ig (InvivoGen、Toulouse、フランス)のクローニングベクター中で、適正に合成されクローニングされた。ベクター(pFUSE - CH Ig)は、キメラ重鎖VH[F3.3]-ヒトC₁の産生を可能にし、ベクター(pFUSE - CL Ig)は、軽鎖VL[F3.3]-ヒトC₂の産生を可能にする。これら2つの発現ベクターは、実施例1に記載のようにCHO系統細胞をトランスフェクトするために用いられる。

【0098】

さらに、可変部分VH[F3.3]は、キメラ重鎖VH[F3.3]-ヒトC_μ及びVH[F3.3]-ヒトC₂の産生を可能とする発現ベクター中でクローニングされた。

10

【0099】

抗HLAクラスIIキメラ型モノクローナル免疫グロブリン(Hu-IgG1 K[F3.3])の軽鎖のペプチド配列は図13に示され、配列番号5の配列に対応する。

【0100】

抗HLAクラスIIキメラ型モノクローナル免疫グロブリン(Hu-IgA2 K[F3.3])の重鎖のペプチド配列は図14に示され、配列番号6の配列に対応する。

【0101】

抗HLAクラスIIキメラ型モノクローナル免疫グロブリン(Hu-IgG1 K[F3.3])の重鎖のペプチド配列は図15に示され、配列番号7の配列に対応する。

20

【0102】

抗HLAクラスIIキメラ型モノクローナル免疫グロブリン(Hu-IgM K[F3.3])の重鎖のペプチド配列は図16に示され、配列番号8の配列に対応する。

【0103】

HLAクラスII抗原に対するキメラ型モノクローナル免疫グロブリンHu-IgG1 K[F3.3]、Hu-IgA2 K[F3.3]、及びHu-IgM K[F3.3]は、適切なベクターによってトランスフェクトCHO細胞によって産生された。キメラIgG1はプロテインA Sepharose上で精製された。キメラIgAはペプチドMアガロース(InvivoGen、Toulouse、フランス)上で精製された。キメラIgMはプロテインLアガロース(InvivoGen、Toulouse、フランス)上で精製された。

30

【0104】

本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンHu-IgG1 K[F3.3]の結合の特異性は、実施例1に記載のように、ヒト単核細胞上でフローサイトメトリーによる間接免疫蛍光法によって検証する。結果は図5に示され、本発明による抗体Hu-IgG1 K[F3.3]がヒト細胞に対して、とりわけBリンパ球(図5B)及びTリンパ球(図5D)に、強く反応することを示す。

【0105】

さらに、本発明による抗HLAクラスIIキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの特異性をLuminox(登録商標)での多重定量的免疫蛍光法によって、Labscreen mixed(登録商標)及びLabscreen single antigen(登録商標)(One Lambda(登録商標))キットを用いて検討する。

40

【0106】

抗体Hu-IgG1 K[F3.3]は、Labscreen mixed(登録商標)キットのHLAクラスII抗原を持つすべてのビーズ、ならびにLabscreen single antigen class II(登録商標)キットのHLA-DR、HLA-DP、及びHLA-DQ2抗原を持つすべてのビーズ上に固定した。

【0107】

競合実験によって、キメラ型モノクローナル免疫グロブリンHu-IgG1 K[F3.3]及びHu-IgA2 K[F3.3]は、同じエピトープを識別することが証明さ

50

れた。キメラ型モノクローナル免疫グロブリンHu-IgA2 K[F3.3]の反応性は、キメラ型モノクローナル免疫グロブリンHu-IgA2 K[F3.3]の固定を明らかにするために、フィコエリトリンにカップリングしたヒト抗IgAヤギ抗体を用いて、Lab screen mixed (登録商標)キット(One-Lambda (登録商標))を用いたLuminex (登録商標)技術によって検討された。キメラ型モノクローナル免疫グロブリンHu-IgA2 K[F3.3]の反応性は、キメラ型モノクローナル免疫グロブリンHu-IgG1 K[F3.3]の反応性と同一であることが明らかになった。

【0108】

実施例5 抗HLA抗体のインビトロ定量方法

本発明による免疫蛍光法による抗体を含有する液体媒体の抗HLA抗体のインビトロ定量方法において、限定的でない例として、以下を含む研究用キット「Lab screen mixed (登録商標)」(LSM12、One Lambda (登録商標) Inc.、USA)を用いる。

- 精製された及び混合物状態のHLAクラスI抗原(HLA-A、HLA-B、及びHLA-C)に共有的に結合したポリスチレンビーズ、
- 精製されたHLAクラスII抗原(HLA-DR、HLA-DQ、及びHLA-DP)に共有的に結合したポリスチレンビーズ、
- IgGに結合した、陽性対照ビーズと呼ばれるポリスチレンビーズ、
- 表面抗原の欠けている陰性対照ビーズと呼ばれるポリスチレンビーズ。かかる研究用キット(Lab screen mixed (登録商標))は、抗HLAクラスI抗体及び抗HLAクラスII抗体のスクリーニングのポリスチレンビーズの水性懸濁液を含む。この懸濁液のポリスチレンビーズは、複数のタイプのポリスチレンビーズを含み、各タイプのポリスチレンビーズは、蛍光標識によって他のタイプのポリスチレンビーズと区別され、別のHLAクラスI抗原及びHLAクラスII抗原を持つポリスチレンビーズを含む。実際には、各タイプのポリスチレンビーズは、6つのHLA-A(クラスI)抗原、6つのHLA-B(クラスI)抗原、6つのHLA-C(クラスI)抗原、又は6つのHLA-DQ(クラスII)抗原、6つのHLA-DR(クラスII)抗原、6つのHLA-DP(クラスII)抗原までポリスチレンビーズの表面に提示する。

【0109】

研究用キット(Lab screen mixed (登録商標))は、17種の各タイプのポリスチレンビーズの蛍光強度が同時に測定可能な、12種のタイプのクラスIポリスチレンビーズ及び5種のタイプのクラスIIビーズを含む。したがって、同じ集合のHLA抗原に結合した各タイプのポリスチレンビーズの平均蛍光強度を計算する。このポリスチレンビーズの混合物の中には、HLAクラスI抗原及びHLAクラスII抗原が欠けているものがあり、陰性対照に利用される。

【0110】

研究用キット(Lab screen mixed (登録商標))の使用には、さらに抗HLA抗体スクリーニング反応のときに陰性対照血清(Lab screen Negative Control (LSNC)血清)を必要とする。この血清は、製造者によって、抗HLAクラスI抗体及び抗HLAクラスII抗体が欠けていることを特徴とされている。

【0111】

かかる陰性対照で処理されるクラスI抗原を持つ12種の各タイプのビーズ及びクラスII抗原を持つ5種の各タイプのビーズに関連づけた、5カ月間観察された蛍光強度の平均値は下記の表1に示されている。

10

20

30

40

識別された HLA抗原の クラス	ビーズ番号	平均蛍光	標準偏差
クラス I	6	79.82	30.26
	7	110.87	39.45
	88	118.09	30.31
	17	94.16	38.98
	69	136.93	54.01
	79	136.67	49.73
	84	109.79	35.61
	86	102.07	27.77
	87	119.96	32.50
	88	100.67	30.04
	89	90.89	25.85
クラス II	90	157.12	73.60
	91	112.79	35.91
	93	143.52	39.21
	95	104.89	34.79
	96	153.14	55.02
	97	117.61	46.14

表1

【0112】

表1に示された値は小さく、生成された蛍光はポリスチレンビーズ上のIgGの非特異的な結合及びこれらのビーズ上の二次抗体の非特異的な結合によって示される。

【0113】

陽性対照

研究用キット(Lab screen mixed(登録商標))は、陽性対照として、表面に精製されたヒトIgGを移植したポリスチレンビーズを含む。かかる陽性対照は、二次抗体の機能性の検証でのその使用において限定的である。かかる陽性対照では、蛍光強度値を液体媒体中の抗HLA抗体濃度値に変換することができない。

【0114】

ポリクロール陽性対照

キット(Lab screen mixed(登録商標))使用者、とりわけ免疫学研究所は、先行技術によるインビトロ抗HLA抗体スクリーニングのときの陽性対照として、HLA抗原に対して多重免疫化した個体を由来とする血清混合物を用いるように推奨している。例として、このポリクロール対照の各タイプのHLAクラスI及びクラスIIビーズに関連づけた、5カ月間測定された平均蛍光強度値を下記の表2に示す。

識別された HLA抗原の クラス	ビーズ番号	平均蛍光	標準偏差
クラス I	6	3821.21	1980.68
	7	5313.44	2261.91
	88	4103.80	1812.89
	17	3808.23	1726.83
	69	2699.31	1759.92
	79	2316.98	1341.26
	84	2437.50	1672.73
	86	3163.40	1765.90
	87	1836.57	1379.55
	88	2082.32	1364.82
	89	15691.55	1791.89
クラス II	90	15158.40	2072.65
	91	14433.92	2197.01
	93	13343.17	2492.20
	95	14550.62	2162.28
	96	207.17	232.44
	97	589.34	670.31

表2

【0115】

先行技術による定性的対照で処理されたHLAクラスIビーズ上で測定された平均蛍光の計算された値は、約5200蛍光単位であり、標準偏差は約4900蛍光単位である。

【0116】

先行技術による定性的対照で処理されたHLAクラスIIビーズ上で測定された平均蛍光の計算された値は、約8600蛍光単位であり、標準偏差は約7500蛍光単位である。

【0117】

定性的対照の各タイプのポリスチレンビーズの蛍光強度は、1000～20000で変動する。各タイプのポリスチレンビーズ（HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DQ、HLA-DR、及びHLA-DP）の応答のかかる可変性では、1つの参照抗HLA抗体濃度に対して測定した蛍光強度の単一の変換曲線を決めることはできない。さらに、各タイプのHLA抗原に特異的なHLA抗体濃度が先行技術の定性的対照において決定できないという事実を考慮すると、測定した蛍光強度のかかる変換曲線は得られない。

【0118】

先行技術の定性的対照の例として、キット「Lab screen mixed（登録商標）」の各タイプのポリスチレンビーズの蛍光分析は、クラスI抗原を持つ各タイプのビーズ（図4Aのビーズ番号6、7、8、17、69、79、84、86、87、88、8

10

20

30

40

50

9、及び90のタイプ)に関連づけた蛍光は、平均約7000蛍光単位から平均12000蛍光単位の値で変動することを示す。各タイプのHLAクラスIビーズ上で測定された平均蛍光強度値は、約9600蛍光単位である。これらの値の標準偏差値は、約3100蛍光単位である。

【0119】

さらに、キット「Lab screen mixed (登録商標)」の各タイプのポリスチレンビーズのこの蛍光分析は、クラスII抗原を持つ各タイプのビーズ(図4Bのビーズ番号91、93、95、96、及び97のタイプ)に関連づけた蛍光は、平均約1000蛍光単位から平均19000蛍光単位の値で変動することを示す。各タイプのHLAクラスIIビーズ上で測定された平均蛍光強度値は、約13000蛍光単位である。これらの値の標準偏差値は、約8300蛍光単位である。

10

【0120】

したがって、かかる対照は、血清混合物中の各抗体濃度が既知でない以上、もっぱら定性的である分析での使用において、限定的である。

【0121】

本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリン

研究用キット(Lab screen mixed (登録商標))の定量的対照として、本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンを用いる。既知の濃度 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ で、実施例1から4に記載のように、抗HLAクラスI(Hu-IgG1 K[W6/32])及び/又は抗HLAクラスII(Hu-IgG1 K[F3.3])キメラ型モノクローナル免疫グロブリン溶液を調製する。HLAクラスI又はクラスII抗原を持つ各タイプのポリスチレンビーズに関連づけた平均蛍光強度分析を実施する。得られた結果は、図4に示されている(白色のヒストグラム)。

20

【0122】

キット「Lab screen mixed (登録商標)」の各タイプのポリスチレンビーズについて、平均約22000蛍光単位の蛍光強度が観察される。

【0123】

特に、この分析は以下を示す。

- クラスI抗原を持つ各タイプのビーズ(図4Aのビーズ番号6、7、8、17、69、79、84、86、87、88、89、及び90のタイプ、純色のヒストグラム)に関連づけた蛍光はほぼ定常であり、平均約22000蛍光単位である。各タイプのHLAクラスIビーズ上で測定された平均蛍光強度値は、約21500蛍光単位である。これらの値の標準偏差値は、約450蛍光単位である。

30

- クラスII抗原を持つ各タイプのビーズ(図4Bのビーズ番号91、93、95、96、及び97のタイプ、純色のヒストグラム)に関連づけた蛍光はほぼ定常であり、平均約22000蛍光単位である。これらの値の標準偏差値は、約700蛍光単位である。

【0124】

この蛍光強度値は、ポリスチレンビーズのタイプにかかわらず(ポリスチレンビーズのタイプが持つHLA抗原にかかわらず)ほぼ定常であり、 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体濃度に対応する。本発明によるかかるキメラ型モノクローナル抗体は、本発明によるキメラ型モノクローナル抗体濃度に応じて、蛍光応答の定量的較正ができるように適合している。

40

【0125】

本発明(図4A及び4Bの純色のヒストグラム)と先行技術(図4A及び4Bのハッチのヒストグラム)との比較として、HLAクラスI抗原を持つビーズ上及びHLAクラスII抗原を持つビーズ上で明らかになった平均蛍光値(及び標準偏差)は図4に表している。

【0126】

実施例6 抗HLA抗体のインビトロ定量方法 - 「用量応答」曲線

「用量応答」曲線を作成するため、マイクロフィルターマルチウェルプレート(Multiscreen (登録商標))の各ウェルに洗浄緩衝液(PBS)300 μL を分配す

50

る。10分後、洗浄緩衝液を吸引除去し、「Lab screen mixed (登録商標)」ビーズの均質化した懸濁液5 μ Lを加える。一連の漸減キメラ型モノクローナル抗体濃度の本発明によるキメラ型モノクローナル抗体溶液が連続段階希釈によって得られる。陰性及び陽性対照は平行して同じ形で処理される。これらの各連続希釈液20 μ Lを分配し、マルチウェルプレートのウェルにあらかじめ置かれたポリスチレンビーズと接触させる。ポリスチレンビーズとキメラ型モノクローナル抗体との混合物は、遮光下常温で30分間インキュベートされる。その後、洗浄緩衝液250 μ Lで各ウェルの洗浄を連続して5回実施する。次に、1/100に希釈した二次抗体溶液100 μ Lを加える。ポリスチレンビーズに結合した抗HLA抗体の蛍光標識として用いられる二次抗体は、例えばフィコエリトリンにカップリングしたヤギ抗IgA抗体 (anti-IgA-PE、AbSerotec、USA) 又はフィコエリトリンにカップリングしたヤギ抗IgG抗体 (anti-IgG-PE、InGen、USA) である。もちろん、本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリン定常鎖に結合可能で識別可能な抗体にカップリングした他のあらゆる蛍光基を用いることができる。マルチウェルプレートは、Luminex (登録商標) 免疫蛍光リーダーでの分析前に、遮光下常温に30分間置く。

10

【0127】

本発明による方法によって得た「用量応答」タイプの較正曲線は、図6 (抗HLAクラスI) 及び図7 (抗HLAクラスII) に表している。蛍光強度値は、 μ g/mLで表される本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリン濃度に応じて示される。

20

【0128】

各タイプのHLAクラスI (図6B) 及びHLAクラスII (図7B) ビーズ上で測定された蛍光強度の測定値の平均値及び標準偏差は、下記の表3にまとめている。

抗体、 μ g/mL	HLA クラス I		HLA クラス II	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差
$5 \cdot 10^{-4}$	589.25	31.15	316.30	29.6
$2 \cdot 10^{-3}$	1433.18	103.03	1086.38	72.15
$7.8 \cdot 10^{-3}$	3028.43	143.22	3518.68	145.09
$3.13 \cdot 10^{-2}$	7781.63	342.02	9129.82	273.56
$1.25 \cdot 10^{-1}$	15190.29	685.49	17955.55	298.79
$5 \cdot 10^{-1}$	20548.53	441.7	22755.75	160.45
$2 \cdot 10^0$	22621.17	255.88	23578.19	167

30

表3

【0129】

上に記載した滴定曲線に関するデータについてボルツマン型シグモイド非線形回帰による統計的分析を実施する。観察された最小蛍光値 (MIN)、すなわちキメラ型モノクローナル免疫グロブリン濃度が0の値に近づくときの曲線での漸近線の値、観察された最大蛍光値 (MAX)、すなわちキメラ型モノクローナル免疫グロブリン濃度が無限値に近づくときの曲線での漸近線の値、及び特異的シグナルの50%に対応するキメラ型モノクローナル免疫グロブリン濃度値 (MAX - MIN) を決定する。これらの値は下記の表4に示されている。

40

キメラ型モノクローナル免疫グロブリン	MIN	MAX	(MAX-MIN)*50%、 μg/mL
抗クラス I	65	22400	0.06
抗クラス II	88	24600	0.05

表4

【 0 1 3 0 】

10

実施例 7 アルブミン緩衝液媒体中の本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリン Hu - I g G 1 K [W 6 / 3 2] 及び Hu - I g G 1 K [F 3 . 3] の安定性の分析

60 g / L の濃度でのヒトアルブミンを含有する水性緩衝液媒体中に 2 カ月間保存した本発明によるキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの連続希釈液を調製する。L u m i n e x (登録商標) 技術によって、実施例 6 に記載のように「用量応答」曲線を作成する。H L A クラス I 抗原に対するキメラ型モノクローナル免疫グロブリン (H u - I g G 1 K [W 6 / 3 2]) で得た結果は図 8 A に示され、H L A クラス II 抗原に対するキメラ型モノクローナル免疫グロブリン (H u - I g G 1 K [F 3 . 3]) で得た結果は図 8 B に示されている。緩衝生理食塩水中で保存したキメラ型モノクローナル免疫グロブリンで得た結果は白色の正方形 () で示され、蛋白質緩衝液中で保存したキメラ型モノクローナル免疫グロブリンで得た結果は黒色の菱形 () で示されている。緩衝生理食塩水中で保存されたキメラ型モノクローナル免疫グロブリンと蛋白質緩衝液中で保存されたキメラ型モノクローナル免疫グロブリンの間にはいかなる有意な差も観察されなかった。

20

【 図 1 】

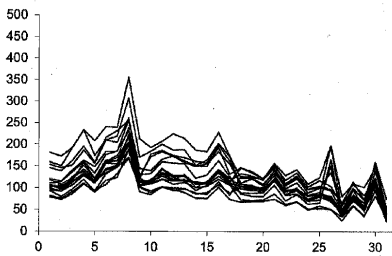


Fig 1

【 図 2 】

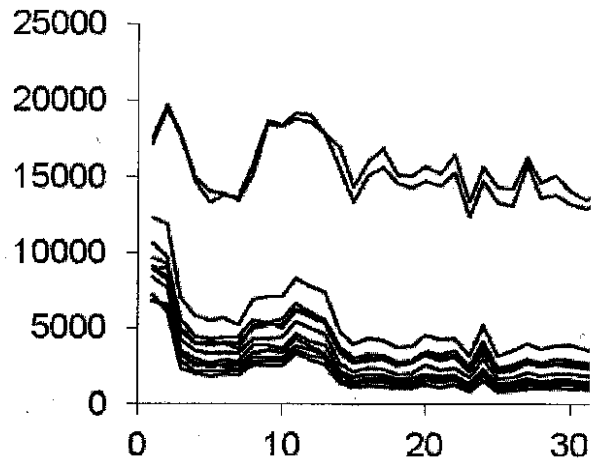


Fig 2

【 図 3 】

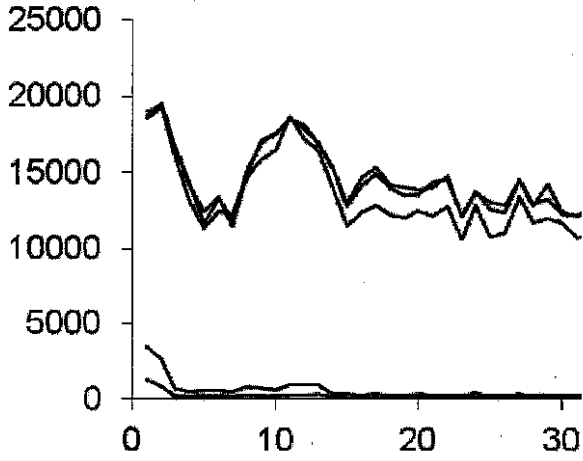
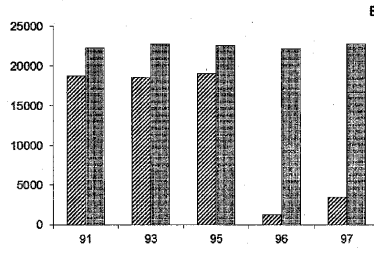
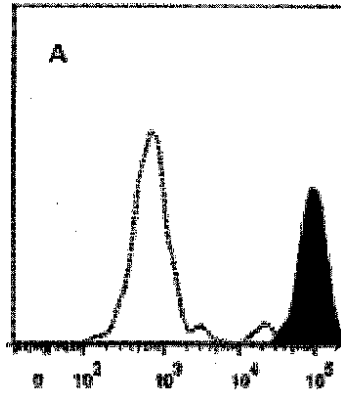


Fig 3

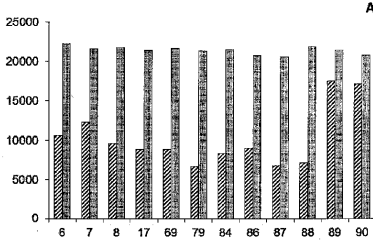
【 図 4 B 】



【 図 5 A 】

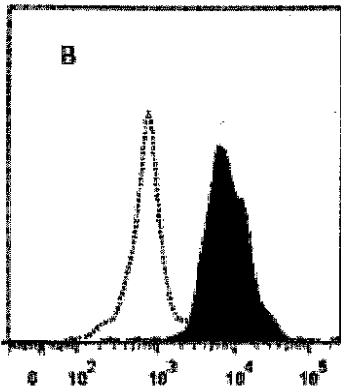


【 図 4 A 】



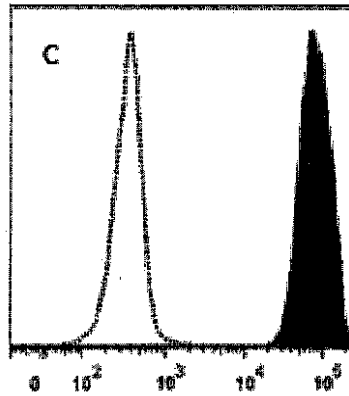
A

【 図 5 B 】



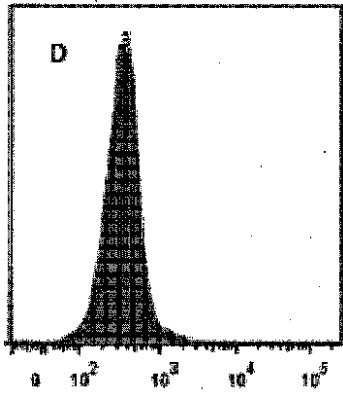
B

【 図 5 C 】

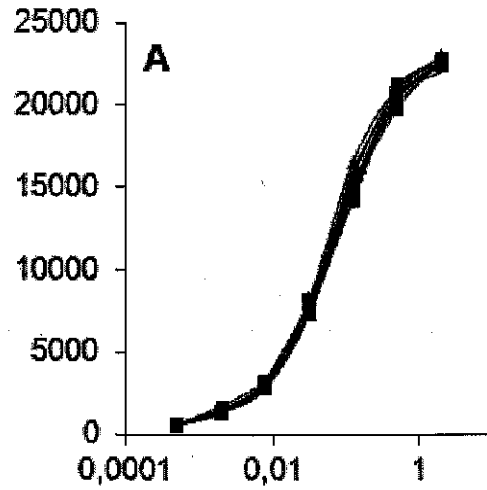


C

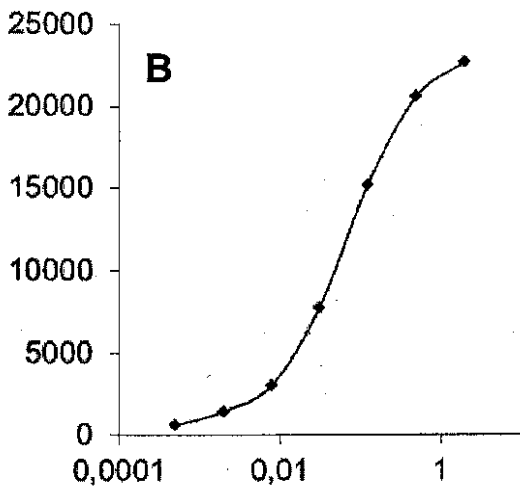
【 図 5 D 】



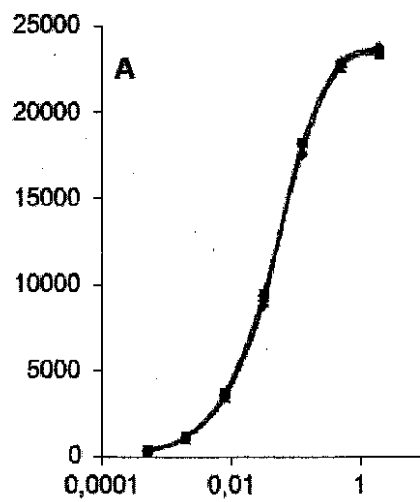
【 図 6 A 】



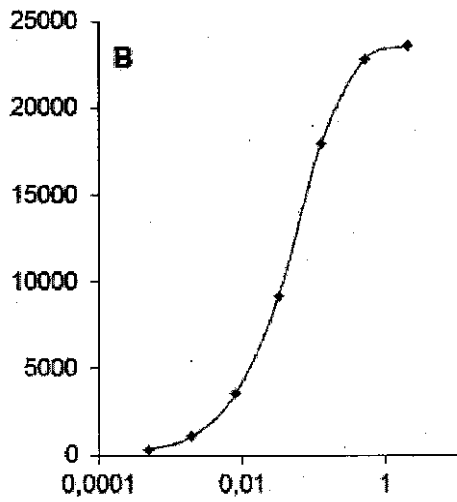
【 図 6 B 】



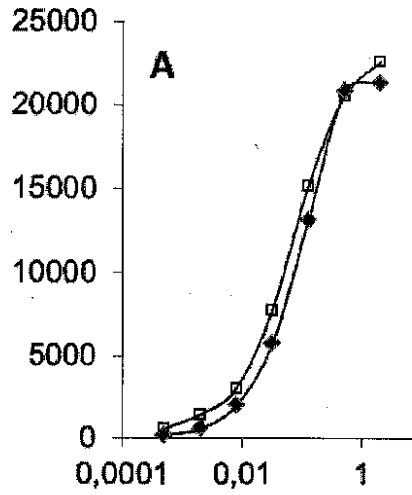
【 図 7 A 】



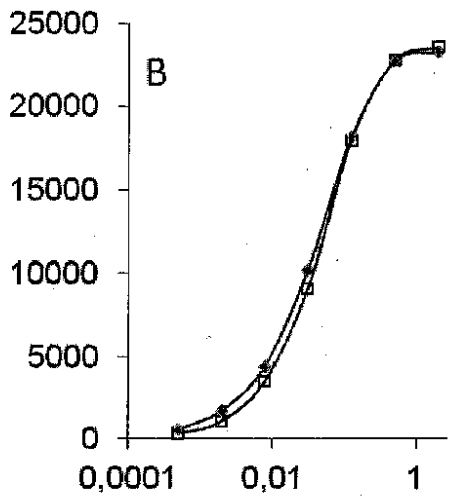
【 図 7 B 】



【 図 8 A 】



【 図 8 B 】



【 図 9 】

Met,ysSer,Gln,Thr,Gln,Val,Phe,Val,Phe	Leu,Leu,Leu,Cys,Val,Ser,Gly,Ala,His,Gly
1	11
Ser,Ile,Val,Met,Thr,Gln,Thr,Pro,lys,Phe	Leu,Leu,Val,Ser,Ala,Gly,Asp,Arg,Val,Thr
21	31
Ile,Thr,Cys,lys,Ala,Ser,Gln,Ser,Val,Ser	Asn,Asp,Val,Ala,Tyr,Tyr,Gln,Gln,lys,Pro
41	51
Gly,Gln,Ser,Pro,lys,Leu,Ile,Tyr,Tyr	Ala,Ser,Asn,Arg,Tyr,Thr,Gly,Val,Pro,Asp
61	71
Arg,Phe,Thr,Gly,Ser,Gly,Tyr,Gly,Thr,Asp	Phe,Thr,Phe,Thr,Ile,Ser,Thr,Val,Gln,Ala
81	91
Gln,Asp,Leu,Ala,Val,Tyr,Phe,Cys,Gln,Gln	Asp,Tyr,Ser,Ser,Pro,Pro,Tyr,Thr,Phe,Gly
101	111
Gly,Gly,Thr,lys,Leu,Gln,Ile,Arg,Arg,Thr	Val,Ala,Ala,Pro,Ser,Val,Phe,Ile,Phe,Pro
121	131
Pro,Ser,Asp,Gln,Gln,Leu,lys,Ser,Gly,Thr	Ala,Ser,Val,Val,Cys,Leu,Leu,Asn,Asn,Phe
141	151
Tyr,Pro,Arg,Gln,Ala,lys,Val,Gln,Tp,lys	Val,Asp,Asn,Ala,Leu,Gln,Ser,Gly,Asn,Ser
161	171
Gln,Gln,Ser,Val,Thr,Gln,Asp,Ser,lys	Asp,Ser,Thr,Tyr,Ser,Leu,Ser,Ser,Thr,Leu
181	191
Thr,Leu,Ser,lys,Ala,Asp,Tyr,Gln,lys,His	lys,Val,Tyr,Ala,Cys,Glu,Val,Thr,Ile,Gln
201	211
Gly,Leu,Ser,Ser,Pro,Val,Thr,lys,Ser,Phe	Asn,Arg,Gly,Glu,Cys
221	231

Fig 9

【 図 1 0 】

```

MetAlaValLeuValLeuLeuPheCysLeu 1
ValGlnLeuLysGlnSerGlyProGlyLeu 21
CysThrValSerGlyPheSerLeuThrSer 41
GlyLysGlyLeuGlnTrpLeuGlyValle 61
AlaPheLeuSerArgLeuSerLeuArgLys 81
MetAsnSerLeuGlnAlaAspAspThrAla 101
SerThrSerAlaTrpPheAlaTyrTrpGly 121
SerThrLysGlyProSerValPheProLeu 141
ThrAlaAlaLeuGlyCysLeuValLysAsp 161
AsnSerGlyAlaLeuThrSerGlyValHis 181
LeuTyrSerLeuSerValValThrVal 201
IleCysAsnValAsnIleLysProSerAsn 221
SerCysAspLysThrHisThrCysProPro 241
SerValPheLeuPheProLysProLys 261
ValThrCysValValValValValSerHis 281
ValAspGlyValGlnValHisAsnAlaLys 301
ThrTyrArgValValSerValLeuThrVal 321
TyrLysCysLysValSerAsnLysAlaLeu 341
AlaLysGlyGlnProArgGlnProGlnVal 361
ThrLysAsnGlnValSerLeuThrCysLeu 381
ValGlnTrpGlnSerAsnGlyGlnProGln 401
AspSerAspGlySerPheLeuTyrSer 421
GlnGlyAsnValPheSerCysSerValMet 441
LysSerLeuSerLeuSerProGlyLys 461

```

Fig 10

【 図 1 1 】

```

MetAlaValLeuValLeuLeuPheCysLeu 1
ValGlnLeuLysGlnSerGlyProGlyLeu 21
CysThrValSerGlyPheSerLeuThrSer 41
GlyLysGlyLeuGlnTrpLeuGlyValle 61
AlaPheLeuSerArgLeuSerLeuArgLys 81
MetAsnSerLeuGlnAlaAspAspThrAla 101
SerThrSerAlaTrpPheAlaTyrTrpGly 121
SerProThrSerProLysValPheProLeu 141
ValValValAlaCysLeuValGlnGlyPhe 161
SerGlnSerGlyGlnAsnValThrAlaArg 181
AspLeuTyrThrThrSerSerGlnLeuThr 201
SerValThrCysHisValLysHisTyrThr 221
ProValProProProProProCysCysHis 241
GlnAspLeuLeuLeuGlySerGlnAlaAsn 261
AlaSerGlyAlaThrPheThrTrpThrPro 281
ProGlnArgAspLeuCysGlyCysTyrSer 301
ProTrpAsnHisGlyGlnThrPheThrCys 321
LeuThrAlaAsnIleThrLysSerGlyAsn 341
ProProSerGlnGlnLeuAlaLeuAsnGln 361
PheSerProLysAspValLeuValArgTrp 381
LysTyrLeuThrTrpAlaSerArgGlnGln 401
ThrSerLeuArgValAlaAlaGlnAsp 421
ValGlyHisGlnAlaLeuProLeuAlaPhe 441
LysPheThrHisValAsnValSerValVal 461

```

Fig 11

【 図 1 2 】

```

MetAlaValLeuValLeuLeuPheCysLeu 1
ValGlnLeuLysGlnSerGlyProGlyLeu 21
CysThrValSerGlyPheSerLeuThrSer 41
GlyLysGlyLeuGlnTrpLeuGlyValle 61
AlaPheLeuSerArgLeuSerLeuArgLys 81
MetAsnSerLeuGlnAlaAspAspThrAla 101
SerThrSerAlaTrpPheAlaTyrTrpGly 121
SerAlaProThrLeuPheProLeuValSer 141
ValAlaValGlyCysLeuAlaGlnAspPhe 161
TyrLysAsnAsnSerAspIleSerSerThr 181
LysTyrAlaAlaThrSerGlnValLeuLeu 201
GlnHisValValCysLysValGlnHisPro 221
ProValHisAlaGlnLeuProLysVal 241
PheGlyAsnProArgLysSerLysLeulle 261
IleGlnValSerTrpLeuArgGlnGlyLys 281
ValGlnAlaGlnAlaLysGlnSerGlyPro 301
IleLysGlnSerAspTrpLeuSerGlnSer 321
LeuThrPheGlnGlnAsnAlaSerSerMet 341
ValPheAlaIleProSerPheAlaSer 361
CysLeuValThrAspLeuThrThrTyrAsp 381
GlyGlnAlaValLysThrHisThrAsnIle 401
AlaValGlyGlnAlaSerLeuCysGlnAsp 421
ThrValThrHisThrAspLeuProSerPro 441
ValAlaLeuHisArgProAspValTyrLeu 461
ArgGlnSerAlaThrIleThrCysLeuVal 481
GlnTrpMetGlnArgGlyGlnProLeuSer 501
ProGlnProGlnAlaProGlyArgTyrPhe 521
GlnTrpAsnThrGlyGlnThrTyrCys 541
ValThrGlnArgThrValAspLysSerThr 561
ValMetSerAspThrAlaGlyThrCysTyr 581

```

Fig 12

【 図 1 3 】

```

MetAspPheGlnValGlnIlePheSerPhe 1
ArgGlyGlnIleValLeuThrGlnSerPro 21
ValThrMetThrCysSerAlaSerSerle 41
ProLysSerSerProArgLeuLeulleTyr 61
ValArgPheSerGlySerGlyGlyThr 81
AlaGlnAspAlaLeuThrTyrPheCysGln 101
GlyGlyThrLysLeuGlnIleLysArgThr 121
ProSerAspGlnGlnLeuLysSerGlyThr 141
TyrProArgGlnAlaLysValGlnTrpLys 161
GlnGlnSerValThrGlnGlnAspSerLys 181
ThrLeuSerLysAlaAspTyrGlnLysHis 201
GlyLeuSerSerProValThrLysPhe 221

```

Fig 13

【 図 1 4 】

```

MetAspLeuArgLeuSerCysAlaPhe11
ValLysLeuGlnGluSerGlyGlyLeu21
CysValAlaSerGlyPheThrPheSerAsn41
GlnLysGlyLeuGluTrpValAlaGln61
TyrAlaGluSerValLysGlyArgPheThr81
TyrLeuGlnMetAsnAsnLeuArgSerGlu101
SerTyrSerPheAspTyrTrpGlyGlnGly121
ThrSerProLysValPheProLeuSerLeu141
ValAlaCysLeuValGlnGlyPhePhePro161
SerGlyGlnAsnValThrAlaArgAsnPhe181
TyrThrThrSerSerGlnLeuThrLeuPro201
TheCysHisValLysHisTyrThrAsnPro221
ProProProProProCysCysHisProArg241
LeuLeuLeuGlySerGlnAlaAsnLeuThr261
GlyAlaThrPheThrTrpThrProSerSer281
ArgAspLeuCysGlyCysTyrSerValSer301
AsnHisGlyGluThrPheThrCysThrAla321
AlaAsnIleThrLysSerGlyAsnThrPhe341
SerGluGlnLeuAlaLeuAsnGlnLeuVal361
ProLysAspValLeuValArgTrpLeuGln381
LeuThrTrpAlaSerArgGlnGluProSer401
IleLeuArgValAlaAlaGluAspTrpLys421
HisGlnAlaLeuProLeuAlaPheThrGln441
ThrHisValAsnValSerValValMetAla461
IleValLeuLeuLysGlyValGlnSerGlu11
ValGlnProGlyGlySerMetLysLeuSer31
SerTrpMetAsnTrpValArgGlnSerPro51
ArgLeuLysSerAsnAsnTyrAlaThrArg71
IleSerArgAspAspSerLysSerSerVal91
AspThrAlaIleTyrTrpCysThrProLeu111
ThrThrValThrValSerThrAlaSerPro131
AspSerThrProGlnAspGlyAsnValVal151
GlnGluProLeuSerValThrTrpSerGlu171
ProProSerGlnAspAlaSerGlyAspLeu191
AlaTheGlnCysProAspGlyLysSerVal211
SerGlnAspValThrValProCysProVal231
LeuSerLeuHisArgProAlaLeuGluAsp251
CysThrLeuThrGlyLeuArgAspAlaSer271
GlyLysSerAlaValGlnGlyProProGlu291
SerValLeuProGlyCysAlaGlnProTrp311
AlaHisProGluLeuLysThrProLeuThr331
ArgProGluValIleLeuLeuProPro351
ThrLeuThrCysLeuAlaArgGlyPheSer371
GlySerGlnGluLeuProArgGluLysTyr391
GlnGlyThrThrPheAlaValThrSer411
LysGlyAspThrPheSerCysMetValGly431
LysThrLeuAspArgLeuAlaGlyLysPro451
GluValAspGlyThrCysTyr471

```

Fig 14

【 図 1 5 】

```

MetAspLeuArgLeuSerCysAlaPhe11
ValLysLeuGlnGluSerGlyGlyLeu21
CysValAlaSerGlyPheThrPheSerAsn41
GlnLysGlyLeuGluTrpValAlaGln61
TyrAlaGluSerValLysGlyArgPheThr81
TyrLeuGlnMetAsnAsnLeuArgSerGlu101
SerTyrSerPheAspTyrTrpGlyGlnGly121
LysGlyProSerValPheProLeuAlaPro141
AlaLeuGlyCysLeuValLysAspTyrPhe161
GlyAlaLeuThrSerGlyValHisThrPhe181
SerLeuSerSerValValThrValProSer201
AsnValAsnHisLysProSerAsnThrLys221
AspLysThrHisThrCysProCysPro241
PheLeuPheProProLysProLysAspThr261
CysValValValAspValSerHisGluAsp281
GlyValGluValHisAsnAlaLysThrLys301
ArgValValSerValLeuThrValLeuHis321
CysLysValSerAsnLysAlaLeuProAla341
GlyGlnProArgGlnProGlnValTyrThr361
AsnGlnValSerLeuThrCysLeuValLys381
TrpGluSerAsnGlyGlnProGlnAsnAsn401
AspGlySerPheValAspTyrSerLysLeu421
AsnValPheSerCysSerValMetHisGlu441
LeuSerLeuSerProGlyLys461
IleValLeuLeuLysGlyValGlnSerGlu11
ValGlnProGlyGlySerMetLysLeuSer31
SerTrpMetAsnTrpValArgGlnSerPro51
ArgLeuLysSerAsnAsnTyrAlaThrArg71
IleSerArgAspAspSerLysSerSerVal91
AspThrAlaIleTyrTrpCysThrProLeu111
ThrThrValThrValSerThrAlaSerPro131
AspSerThrProGlnAspGlyAsnValVal151
GlnGluProLeuSerValThrTrpSerGlu171
ProProSerGlnAspAlaSerGlyAspLeu191
AlaTheGlnCysProAspGlyLysSerVal211
SerGlnAspValThrValProCysProVal231
LeuSerLeuHisArgProAlaLeuGluAsp251
CysThrLeuThrGlyLeuArgAspAlaSer271
GlyLysSerAlaValGlnGlyProProGlu291
SerValLeuProGlyCysAlaGlnProTrp311
AlaHisProGluLeuLysThrProLeuThr331
ArgProGluValIleLeuLeuProPro351
ThrLeuThrCysLeuAlaArgGlyPheSer371
GlySerGlnGluLeuProArgGluLysTyr391
GlnGlyThrThrPheAlaValThrSer411
LysGlyAspThrPheSerCysMetValGly431
LysThrLeuAspArgLeuAlaGlyLysPro451
GluValAspGlyThrCysTyr471
MetAspLeuArgLeuSerCysAlaPhe11
ValLysLeuGlnGluSerGlyGlyLeu21
CysValAlaSerGlyPheThrPheSerAsn41
GlnLysGlyLeuGluTrpValAlaGln61
TyrAlaGluSerValLysGlyArgPheThr81
TyrLeuGlnMetAsnAsnLeuArgSerGlu101
SerTyrSerPheAspTyrTrpGlyGlnGly121
ThrSerProLysValPheProLeuSerLeu141
ValAlaCysLeuValGlnGlyPhePhePro161
SerGlyGlnAsnValThrAlaArgAsnPhe181
TyrThrThrSerSerGlnLeuThrLeuPro201
TheCysHisValLysHisTyrThrAsnPro221
ProProProProProCysCysHisProArg241
LeuLeuLeuGlySerGlnAlaAsnLeuThr261
GlyAlaThrPheThrTrpThrProSerSer281
ArgAspLeuCysGlyCysTyrSerValSer301
AsnHisGlyGluThrPheThrCysThrAla321
AlaAsnIleThrLysSerGlyAsnThrPhe341
SerGluGlnLeuAlaLeuAsnGlnLeuVal361
ProLysAspValLeuValArgTrpLeuGln381
LeuThrTrpAlaSerArgGlnGluProSer401
IleLeuArgValAlaAlaGluAspTrpLys421
HisGlnAlaLeuProLeuAlaPheThrGln441
ThrHisValAsnValSerValValMetAla461

```

Fig 15

【 図 1 6 】

```

MetAspLeuArgLeuSerCysAlaPhe11
ValLysLeuGlnGluSerGlyGlyLeu21
CysValAlaSerGlyPheThrPheSerAsn41
GlnLysGlyLeuGluTrpValAlaGln61
TyrAlaGluSerValLysGlyArgPheThr81
TyrLeuGlnMetAsnAsnLeuArgSerGlu101
SerTyrSerPheAspTyrTrpGlyGlnGly121
ProThrLeuPheProLeuValSerCysGlu141
ValGlyCysLeuAlaGlnAspPheLeuPro161
AsnAsnSerAspLysSerThrArgGly181
AlaAlaTheSerGlnValLeuLeuProSer201
ValValCysLysValGlnHisProAsnGly221
TheAlaGlnLeuProProLysValSerVal241
AsnProArgLysSerLysLeuLeuCysGln261
ValSerTrpLeuArgGluGlyLysGlnVal281
AlaGlnAlaLysGlnSerGlyProThrThr301
GluSerAspTrpLeuSerGlnSerMetPhe321
PheGlnGlnAsnAlaSerSerMetCysVal341
AlaIleProProSerPheAlaSerIlePhe361
ValThrAspLeuThrThrTyrAspSerVal381
AlaValLysThrHisThrAsnIleSerGlu401
GlyGlnAlaSerIleCysGluAspAspTrp421
ThrHisThrAspLeuProSerProLeuLys441
LeuIleArgProAspValTyrLeuLeuPro461
SerAlaThrIleThrCysLeuValTheGly481
MetGlnArgGlyGlnProLeuSerProGlu501
ProGlnAlaProGlyArgTyrPheAlaHis521
AsnThrGlyGluThrTyrThrCysValVal541
GlnArgThrValAspLysSerThrGlyLys561
SerAspThrAlaGlyThrCysTyr581
IleValLeuLeuLysGlyValGlnSerGln11
ValGlnProGlyGlySerMetLysLeuSer31
SerTrpMetAsnTrpValArgGlnSerPro51
ArgLeuLysSerAsnAsnTyrAlaThrArg71
IleSerArgAspAspSerLysSerSerVal91
AspThrAlaIleTyrTrpCysThrProLeu111
ThrThrValThrValSerThrAlaSerPro131
AspSerThrProGlnAspGlyAsnValVal151
GlnGluProLeuSerValThrTrpSerGlu171
ProProSerGlnAspAlaSerGlyAspLeu191
AlaTheGlnCysProAspGlyLysSerVal211
SerGlnAspValThrValProCysProVal231
LeuSerLeuHisArgProAlaLeuGluAsp251
CysThrLeuThrGlyLeuArgAspAlaSer271
GlyLysSerAlaValGlnGlyProProGlu291
SerValLeuProGlyCysAlaGlnProTrp311
AlaHisProGluLeuLysThrProLeuThr331
ArgProGluValIleLeuLeuProPro351
ThrLeuThrCysLeuAlaArgGlyPheSer371
GlySerGlnGluLeuProArgGluLysTyr391
GlnGlyThrThrPheAlaValThrSer411
LysGlyAspThrPheSerCysMetValGly431
LysThrLeuAspArgLeuAlaGlyLysPro451
GluValAspGlyThrCysTyr471

```

Fig 16

【配列表】

201509586000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2013/050315

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/28 G01N33/563 G01N33/564		
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. DECHANT: "Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing", BLOOD, vol. 100, no. 13, 15 December 2002 (2002-12-15), pages 4574-4580, XP055030069, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2002-03-0687 figure 3	12,15
X	EP 1 927 367 A1 (UNIV TOKUSHIMA [JP]; CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 4 June 2008 (2008-06-04) figure 3	10,11, 13,14,16
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
E earlier application or patent but published on or after the international filing date		*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
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)		*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
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 May 2013		17/05/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wagner, René

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2013/050315

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>K. MIZUTANI ET AL: "The Importance of Anti-HLA-Specific Antibody Strength in Monitoring Kidney Transplant Patients", AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION, vol. 7, no. 4, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 1027-1031, XP055030268, ISSN: 1600-6135, DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01721.x page 1028</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-9
X	<p>EL-AWAR ET AL: "HLA Class I Epitopes: Recognition of Binding Sites by mAbs or Eluted Alloantibody Confirmed With Single Recombinant Antigens", HUMAN IMMUNOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 68, no. 3, 8 March 2007 (2007-03-08), pages 170-180, XP005917287, ISSN: 0198-8859, DOI: 10.1016/J.HUMIMM.2006.11.006 page 172</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	6-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2013/050315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 1927367	A1	04-06-2008	EP 1927367 A1	04-06-2008
			JP 2012176972 A	13-09-2012
			US 2009022687 A1	22-01-2009
			WO 2006123724 A1	23-11-2006

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2013/050315

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
INV. C07K16/28	G01N33/563 G01N33/564	
ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07K G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
	no. des revendications visées	
X	M. DECHANT: "Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing", BLOOD, vol. 100, no. 13, 15 décembre 2002 (2002-12-15), pages 4574-4580, XP055030069, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2002-03-0687 figure 3	12,15
X	EP 1 927 367 A1 (UNIV TOKUSHIMA [JP]; CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 4 juin 2008 (2008-06-04) figure 3	10,11, 13,14,16
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/>
	Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe	
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention	
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément	
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier	
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets	
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
7 mai 2013	17/05/2013	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Wagner, René	

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2013/050315

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>K. MIZUTANI ET AL: "The Importance of Anti-HLA-Specific Antibody Strength in Monitoring Kidney Transplant Patients", AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION, vol. 7, no. 4, 1 avril 2007 (2007-04-01), pages 1027-1031, XP055030268, ISSN: 1600-6135, DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01721.x page 1028</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-9
X	<p>EL-AWAR ET AL: "HLA Class I Epitopes: Recognition of Binding Sites by mAbs or Eluted Alloantibody Confirmed With Single Recombinant Antigens", HUMAN IMMUNOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 68, no. 3, 8 mars 2007 (2007-03-08), pages 170-180, XP005917287, ISSN: 0198-8859, DOI: 10.1016/J.HUMIMM.2006.11.006 page 172</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	6-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2013/050315

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1927367	A1	04-06-2008	EP 1927367 A1	04-06-2008
			JP 2012176972 A	13-09-2012
			US 2009022687 A1	22-01-2009
			WO 2006123724 A1	23-11-2006

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 21/78 (2006.01)	G 0 1 N 21/64 F	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	G 0 1 N 21/78 C	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 F	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

- (71)出願人 514207496
 インヴィヴォジェン
 フランス国 エフ - 3 1 4 0 0 トゥールーズ, ゼドイ ドゥ モントードラン, リュ ジャ
 ン ロディエ 5
- (74)代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
- (74)代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
- (72)発明者 ブランシェ, アントワヌ
 フランス国 エフ - 3 1 0 0 0 トゥールーズ, ブールヴァード ドゥ ストラスブール 1 6
- (72)発明者 コンニー, ニコラ
 フランス国 エフ - 3 1 1 2 0 ラ クロワ ファルガルド, ルート ドゥ ラ グレーゼット
 1 0 5
- (72)発明者 ティラビ, ジャン - ジェラルド
 フランス国 エフ - 3 1 4 0 0 トゥールーズ, シュマン デ コート ドゥ ペッシュ - ダヴ
 イッド 3 9
- (72)発明者 ドゥウロクール, ダニエル
 フランス国 エフ - 3 1 6 5 0 サン トラン ドゥ ガムヴィル, リュ ドゥ ラ デジラー
 ド 1 0

F ターム(参考) 2G043 AA01 AA03 BA16 CA04 DA05 DA06 EA01 FA07 LA01
 2G054 AA02 AA07 AB02 AB04 CA23 CE02 EA01 EA02 EA03 EA06
 FA08 GB02 JA06
 4B024 AA11 BA44 CA07 DA02 EA04 GA11 HA01 HA15
 4B029 AA07 BB17 CC01 FA12
 4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA13
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	抗HLA嵌合单克隆免疫球蛋白，使用嵌合单克隆免疫球蛋白的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2015509586A	公开(公告)日	2015-03-30
申请号	JP2014557111	申请日	2013-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	男性中心南某处δ统一威赛牛油果尾图卢兹酒店的Vie特尔诺沃仁		
申请(专利权)人(译)	Üniversite电保罗萨巴蒂埃图卢兹特鲁瓦中心Osupitarie统一威赛牛油果尾图卢兹酒店的Vie特尔诺沃仁		
[标]发明人	ブランシェアントワヌ コンニーニコラ ティラビジャンジェラル ドゥウロクールダニエル		
发明人	ブランシェ, アントワヌ コンニー, ニコラ ティラビ, ジャン-ジェラル ドゥウロクール, ダニエル		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/554 G01N21/64 G01N21/78 C07K16/28 C07K16/46 C12N15/09 C12M1/34 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/2833 C07K2317/24 G01N33/577 G01N33/6893 G01N2800/24 G01N33/54306 G01N33/6854 G01N2333/705		
FI分类号	G01N33/543.501.L G01N33/53.N G01N33/577.B G01N33/543.575 G01N33/554 G01N21/64.F G01N21/78.C C07K16/28.ZNA C07K16/46 C12N15/00.A C12M1/34.F C12P21/08		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/DA05 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/FA07 2G043/LA01 2G054/AA02 2G054/AA07 2G054/AB02 2G054/AB04 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA02 2G054/EA03 2G054/EA06 2G054/FA08 2G054/GB02 2G054/JA06 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B029/AA07 4B029/BB17 4B029/CC01 4B029/FA12 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	2012000450 2012-02-16 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种测定含有抗体的液体培养基的抗HLA抗体量的方法。

