

(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2019-528676

(P2019-528676A)

(43) 公表日 令和1年10月17日(2019.10.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	Z N A 4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/26 (2006.01)	C 0 7 K 16/26	4 H 0 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
C 1 2 N 15/16 (2006.01)	C 1 2 N 15/16	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁)

(21) 出願番号 特願2018-565664 (P2018-565664)	(71) 出願人 304043936 ビオメリュー B I O M E R I E U X フランス国 F-69280 マーシー レトワール
(86) (22) 出願日 平成29年6月16日 (2017.6.16)	(74) 代理人 110002077 園田・小林特許業務法人
(85) 翻訳文提出日 平成31年2月5日 (2019.2.5)	(72) 発明者 アタマン-オナル, ヤスマン フランス国 01600 レリュー, シ ユマン デュ コトー 91
(86) 国際出願番号 PCT/EP2017/064759	(72) 発明者 シュッシュ, シルヴィ フランス国 69890 ラ トゥール ドゥ サルヴァニー, リュ デュ ジャ ックメ 32
(87) 国際公開番号 W02017/216334	
(87) 国際公開日 平成29年12月21日 (2017.12.21)	
(31) 優先権主張番号 16175041.9	
(32) 優先日 平成28年6月17日 (2016.6.17)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗AMH抗体を調製するための方法及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、抗哺乳動物AMH抗体を調製するための方法に関し、この方法は：
 (i) AMHポリペプチド又はこのAMHポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで動物を免疫化する工程であって、前記AMHポリペプチドが、配列番号1の配列又は配列番号1の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも99個のアミノ酸、及び配列番号2の配列又は配列番号2の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で560個のアミノ酸を含む、工程、
 (i i) 免疫原を受けた動物のリンパ器官の細胞からハイブリドーマを調製する工程、
 (i i i) 配列番号1の配列又は配列番号1の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも99個のアミノ酸、及び配列番号8の配列又は配列番号8の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で255個のアミノ酸を含むAMHポリペプチドを認識するが、(a) 配列番号13の配列又は配列番号13の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも131個のアミノ酸、及び配列番号11の配列又は配列番号11の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で156個のアミノ酸を含むAMHポリペプチドも、(b) 配列番号1の配列又は配列番号1の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列中に位置するいずれの線状エピトープも認識しない抗体を分泌するハイブリドーマを選択する工程、並びに
 (i v) 前記抗体を生成する工程を含む。

本発明は、抗体及び抗体断片と、特に受胎能において、AMHをアッセイするうえでのそ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗哺乳動物 AMH (哺乳動物抗ミュラー管ホルモン) 抗体を調製するための方法であって：

(i) AMH ポリペプチド又はこの AMH ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで動物を免疫化する工程であって、前記 AMH ポリペプチドが、配列番号 1 の配列又は配列番号 1 の配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の少なくとも 99 個のアミノ酸、及び配列番号 2 の配列又は配列番号 2 の配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の最大で 560 個のアミノ酸を含む、工程、

(i i) 免疫原を受けた動物のリンパ器官の細胞からハイブリドーマを調製する工程、

(i i i) 配列番号 1 の配列又は配列番号 1 の配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の少なくとも 99 個のアミノ酸、及び配列番号 8 の配列又は配列番号 8 の配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の最大で 255 個のアミノ酸を含む AMH ポリペプチドを認識するが、(a) 配列番号 13 の配列又は配列番号 13 の配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の少なくとも 131 個のアミノ酸、及び配列番号 11 の配列又は配列番号 11 の配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の最大で 156 個のアミノ酸を含む AMH ポリペプチドも、(b) 配列番号 1 の配列又は配列番号 1 の配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列中に位置するいずれの線状エピトープも認識しない抗体を分泌するハイブリドーマを選択する工程、並びに

(i v) 前記抗体を生成する工程

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

使用される免疫原が、配列番号 10 の配列又は配列番号 10 の配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の少なくとも 230 個のアミノ酸、及び配列番号 8 の配列又は配列番号 8 の配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の最大で 255 個のアミノ酸を含み、好ましくは配列番号 8、配列番号 9 及び配列番号 10 の配列又はこれら配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の AMH ポリペプチドから選択される、AMH ポリペプチド、又は前記 AMH ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである、請求項 1 に記載の抗 AMH 抗体を調製するための方法。

【請求項 3】

使用される免疫原が、配列番号 4 の配列又は配列番号 4 と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の少なくとも 535 個のアミノ酸を含み、好ましくは配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4 の配列又はこれら配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の AMH ポリペプチドから選択される、AMH ポリペプチド、又は前記 AMH ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである、請求項 1 に記載の抗 AMH 抗体を調製するための方法。

【請求項 4】

抗体によって認識されない AMH ポリペプチド (a) が、配列番号 11、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される配列及びこれら配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列のポリペプチドである、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗 AMH 抗体を調製するための方法。

【請求項 5】

配列番号 11、配列番号 12 及び配列番号 13 の配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列が、配列：配列番号 21、配列番号 22、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 42、配列番号 43 及び配列番号 44 から選択される、請求項 4 に記載の抗 AMH 抗体を調製するための方法。

【請求項 6】

抗体によって認識されない線状エピトープ (b) が配列番号 45 から配列番号 56 の配列である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗 AMH 抗体を調製するための方法。

【請求項 7】

- 哺乳動物はヒトであり、免疫原は、配列番号 1 の配列の少なくとも 99 個のアミノ酸

10

20

30

40

50

と、配列番号 2 の配列の最大で 560 個のアミノ酸とを含む、AMH ポリペプチド又はこの AMH ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識される AMH ポリペプチドは、配列番号 1 の配列の少なくとも 99 個のアミノ酸と配列番号 8 の配列の最大で 255 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されない AMH ポリペプチド (a) は、配列番号 13 の配列の少なくとも 131 個のアミノ酸と配列番号 11 の配列の最大で 156 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであるか、

- 哺乳動物はウマであり、免疫原は、配列番号 14 の配列の少なくとも 99 個のアミノ酸と、配列番号 15 の配列の最大で 573 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチド、又はこの AMH ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識される AMH ポリペプチドは、配列番号 14 の配列の少なくとも 99 個のアミノ酸と配列番号 19 の配列の最大で 265 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されない AMH ポリペプチド (a) は、配列番号 22 の配列の少なくとも 144 個のアミノ酸と配列番号 21 の配列の最大で 166 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであるか、

- 哺乳動物はイヌであり、免疫原は、配列番号 23 の配列の少なくとも 99 個のアミノ酸と、配列番号 24 の配列の最大で 572 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチド、又はこの AMH ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識される AMH ポリペプチドは、配列番号 23 の配列の少なくとも 99 個のアミノ酸と配列番号 28 の配列の最大で 264 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されない AMH ポリペプチド (a) は、配列番号 31 の配列の少なくとも 144 個のアミノ酸と配列番号 30 の配列の最大で 165 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであるか、或いは

- 哺乳動物はウシであり、免疫原は、配列番号 32 の配列の少なくとも 100 個のアミノ酸と、配列番号 33 の配列の最大で 575 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチド、又はこの AMH ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識される AMH ポリペプチドは、配列番号 32 の配列の少なくとも 100 個のアミノ酸と配列番号 39 の配列の最大で 270 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されない AMH ポリペプチド (a) は、配列番号 44 の配列の少なくとも 146 個のアミノ酸と配列番号 42 の配列の最大で 270 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドである、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗 AMH 抗体を調製するための方法。

【請求項 8】

配列番号 1 の配列又は配列番号 1 の配列と少なくとも 75% の同一性を有する配列の少なくとも 99 個のアミノ酸、及び配列番号 8 の配列又は配列番号 8 の配列と少なくとも 75% の同一性を有する配列の最大で 255 個のアミノ酸を含む AMH ポリペプチドを認識するが、(a) 配列番号 13 の配列又は配列番号 13 の配列と少なくとも 75% の同一性を有する配列の少なくとも 131 個のアミノ酸、及び配列番号 11 の配列又は配列番号 11 の配列と少なくとも 75% の同一性を有する配列の最大で 156 個のアミノ酸を含む AMH ポリペプチドも、配列番号 1 の配列又は配列番号 1 の配列と少なくとも 75% の同一性を有する配列中に位置するいずれの線状エピトープも認識しない、抗哺乳動物 AMH モノクローナル抗体又はモノクローナル抗体断片。

【請求項 9】

認識されない AMH ポリペプチド (a) が、配列番号 11、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される配列又はこれら配列と少なくとも 75% の同一性を有する配列のポリペプチドである、請求項 8 に記載の抗哺乳動物 AMH モノクローナル抗体又はモノクローナル抗体断片。

【請求項 10】

配列番号 11、配列番号 12 及び配列番号 13 の配列と少なくとも 75% の同一性を有

10

20

30

40

50

する配列が、配列：配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3 及び配列番号 4 4 から選択される、請求項 9 に記載の抗哺乳動物 AMH モノクローナル抗体又はモノクローナル抗体断片。

【請求項 1 1】

抗体によって認識されない線状エピトープ (b) が配列番号 4 5 から配列番号 5 6 の配列を有する、請求項 8 から 1 0 のいずれか一項に記載の抗哺乳動物 AMH モノクローナル抗体又はモノクローナル抗体断片。

【請求項 1 2】

- 哺乳動物はヒトであり、認識される AMH ポリペプチドは、配列番号 1 の配列の少なくとも 9 9 個のアミノ酸と配列番号 8 の配列の最大で 2 5 5 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであり、認識されない AMH ポリペプチド (a) は、配列番号 1 3 の配列の少なくとも 1 3 1 個のアミノ酸と配列番号 1 1 の配列の最大で 1 5 6 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであるか、

- 哺乳動物はウマであり、認識される AMH ポリペプチドは、配列番号 1 4 の配列の少なくとも 9 9 個のアミノ酸と配列番号 1 9 の配列の最大で 2 6 5 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであり、認識されない AMH ポリペプチド (a) は、配列番号 2 2 の配列の少なくとも 1 4 4 個のアミノ酸と配列番号 2 1 の配列の最大で 1 6 6 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであるか、

- 哺乳動物はイヌであり、認識される AMH ポリペプチドは、配列番号 2 3 の配列の少なくとも 9 9 個のアミノ酸と配列番号 2 8 の配列の最大で 2 6 4 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであり、認識されない AMH ポリペプチド (a) は、配列番号 3 1 の配列の少なくとも 1 4 4 個のアミノ酸と配列番号 3 0 の配列の最大で 1 6 5 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであるか、或いは

- 哺乳動物はウシであり、認識される AMH ポリペプチドは、配列番号 3 2 の配列の少なくとも 1 0 0 個のアミノ酸と配列番号 3 9 の配列の最大で 2 7 0 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドであり、認識されない AMH ポリペプチド (a) は、配列番号 4 4 の配列の少なくとも 1 4 6 個のアミノ酸と配列番号 4 2 の配列の最大で 2 7 0 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチドである、

請求項 9 から 1 1 のいずれか一項に記載の抗哺乳動物 AMH モノクローナル抗体又はモノクローナル抗体断片。

【請求項 1 3】

(i) 請求項 8 から 1 2 のいずれか一項に記載の抗 AMH モノクローナル抗体又はモノクローナル抗体断片、又は請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法により調製される抗 AMH モノクローナル抗体又はモノクローナル抗体断片、及び (i i) 検出可能なシグナルの放出を生成することのできる標識を含むコンジュゲートであって、前記シグナルが、このコンジュゲートと生物学的試料の AMH との間の免疫反応を可視化するためのものである、コンジュゲート。

【請求項 1 4】

AMH を含むうる生物学的試料において、サンドイッチイムノアッセイ法により哺乳動物 AMH を定量化するための方法であって：

- 前記生物学的試料を二つの AMH 結合パートナーと接触させる工程であって、前記パートナーの少なくとも一方が、請求項 8 から 1 2 のいずれか一項に記載の抗体又は抗体断片であるか、又は請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法に従って調製された抗体又は抗体断片であるか、さもなければ請求項 1 3 に記載のコンジュゲートである、工程、
- 前記結合パートナーと AMH との間の結合により放出されるシグナルが存在する場合には、検出可能なシグナルの放出を生成できる標識を用いてそのシグナルを検出する工程、及び

- 検出されたシグナルを AMH 濃度へと変換する工程を含む方法。

【請求項 1 5】

10

20

30

40

50

生物学的試料が、血液、血清又は血漿の試料である、請求項 14 に記載の、AMH を定量化するための方法。

【請求項 16】

第 2 の AMH 結合パートナーが、配列番号 57 の配列又は配列番号 57 と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の少なくとも 196 個のアミノ酸を含む AMH ポリペプチドを認識するが、(a) 配列番号 10 の配列又は配列番号 10 の配列と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の少なくとも 230 個のアミノ酸、及び配列番号 8 の配列又は配列番号 8 と少なくとも 75 % の同一性を有する配列の最大で 255 個のアミノ酸を含む AMH ポリペプチドも、(b) 配列番号 57 の配列又は配列番号 57 と少なくとも 75 % の同一性を有する配列中に位置する線状エピトープも認識しない抗体である、請求項 14 又は 15 に記載の、AMH を定量化するための方法。

10

【請求項 17】

妊娠可能年齢の女性における卵巢機能不全に関連付けられる障害の診断の補助としての、請求項 14 から 16 のいずれか一項に記載の AMH を定量化するための方法の使用。

【請求項 18】

12 歳以上の若年女子及び女性における卵胞貯蔵を評価するうえでの補助としての、請求項 14 から 16 のいずれか一項に記載の AMH を定量化するための方法の使用。

【請求項 19】

性熟期前の男子における性的分化に関連付けられる障害を評価するうえでの補助としての、請求項 14 から 16 のいずれか一項に記載の AMH を定量化するための方法の使用。

20

【請求項 20】

請求項 8 から 12 のいずれか一項に記載の抗体若しくは抗体断片、又は請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法に従って調製された抗体若しくは抗体断片、及び / 又は請求項 13 に記載のコンジュゲートを含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、AMH としても知られる抗ミュラー管ホルモンの *in vitro* 検出の分野に関する。特に、本発明は、特に出産可能年齢の女性又は雌動物の受胎能に関する試験の文脈における、抗 AMH 抗体の調製、抗 AMH 抗体及び AMH 濃度を決定するためのその使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

抗ミュラー管ホルモン (AMH としても知られる) は、トランスフォーミング増殖因子 (TGF-) ファミリーの 144 kDa の二量体型糖タンパク質であり、このファミリーは、増殖及び分化に作用する多数の因子を含んでいる。AMH は二量体型プロホルモンであり、ジスルフィド架橋によって結合された二つの同一のサブユニットからなる。このプロホルモンは、生物活性を獲得し、成熟したホルモンへと変換されるために、C 末端の近くでタンパク質分解的切断を受ける。切断後、分子複合体は結合したままであり、出生から閉経までの卵巢予備能の変化を監視するために適した感度性能レベルを可能にするイムノアッセイにより血中でアッセイすることができる (Kelsey TW, et al., 2011)。このタンパク質は MIF (ミュラー管抑制因子)、MIH (ミュラー管抑制ホルモン) 及び MIS (ミュラー管抑制物質) としても知られている。

40

【0003】

AMH はすべての動物中に存在する。そのアミノ酸の長さ及び配列は種に依存する。即ち、ヒト AMH は 560 個のアミノ酸を有し、短いシグナルペプチド (アミノ酸 1 - 18)、前駆体部分 (アミノ酸 19 - 25)、N 末端部分 (アミノ酸 26 - 451) 及び C 末端部分 (アミノ酸 452 - 560) から作られている。ウマ AMH は 573 個のアミノ酸を有し、短いシグナルペプチド (アミノ酸 1 - 22)、N 末端部分 (アミノ酸 23 - 451) 及び C 末端部分 (アミノ酸 465 - 573) から作られており、前駆体部分は含まな

50

い。イヌAMHは572個のアミノ酸を有し、短いシグナルペプチド(アミノ酸1-21)、N末端部分(アミノ酸22-463)及びC末端部分(アミノ酸464-572)から作られており、前駆体部分は含まない。ウシAMHは、その一部に575個のアミノ酸を有し、短いシグナルペプチド(アミノ酸1-17)、前駆体部分(アミノ酸18-24)、N末端部分(アミノ酸25-466)及びC末端部分(アミノ酸467-575)から作られている。種に関係なく、AMHのN末端部分は「プロ領域」と呼ばれ、C末端部分は「成熟領域」と呼ばれる。

【0004】

AMHは、シグナルペプチドとそれに続くプレプロホルモン(ヒト及びウシの場合)又はプロホルモン(ウマ又はイヌの場合)とを含むポリペプチド前駆体の形態に合成される。小胞体へのトラフィッキングを可能にするシグナルペプチドは、転座に続いて切断される。小胞体中で、ポリペプチド前駆体は翻訳後修飾、即ちその天然立体配座に到達するための(i)ホモ二量体化及び(ii)グリコシル化を受ける。ヒトにおいて、これはアミノ酸26-560に対応する144kDaの二量体型糖タンパク質である。ヒトの72kDaの各単量体は、プロ領域(ヒトの場合58kDa)とそれに続く成熟領域(ヒトの場合12kDa)とを含む。細胞外の媒質及び血流に分泌される前に、AMH糖タンパク質には切断により最終的な翻訳後成熟が起こる。即ち、ヒト及びウシにおいては、プレプロホルモンが前駆体部分の切断によりプロホルモンに変換される。プロホルモンも、成熟ホルモン(生物活性を有する)を取得するためにN末端部分とC末端部分との間で切断される。しかしながら、これら二つの部分は非共有結合的に結合したままである(Zec I., et al., 2011)。ヒトにおいては、研究によってさまざまな度合いの切断が報告されており、Zec et al.により5%から20%が、Pankhurst et al. (2016)により、男子の場合67%及び女性の場合81%が、それぞれ報告されている。そのため、切断AMHと非切断AMHが血流中に見られる。

【0005】

AMHは、セルトリ細胞により男性に生成され、その生命の開始期において男性生殖管の分化に参与する。女性においては、AMHは、増殖する小卵胞の顆粒膜細胞によって生成されるため、男性とは異なり性熟期から始まる。したがって、女性の場合、AMHは特に受胎能に参与する様々な分野において、それ自体が有用であることが分かっている(Dewailly D, et al. 2014)。例えば、循環するAMHのアッセイにより、周期とは無関係に卵巢中に存在する胞状及び前胞状卵胞の数を推定することができる(Dewailly D, et al., 2014)。さらに、卵巢予備能の自然な低下、したがって不妊の固有リスクの指標として、女性が自身の妊娠計画を管理する上で助けとするためにAMHをアッセイすることの必要性が示されている。生殖補助医療の面で、AMHのアッセイは、特に卵巢を制御下で刺激する工程を最適化すると同時に過刺激を回避することにより、患者にとって最良の戦略を選択することに寄与する(Arce JC, et al., 2014)。AMHのアッセイは、例えばがんの場合に性腺刺激治療を受けた若年女子又は女性における卵巢予備能の変化を監視することも可能にする(Chai J and Howie AF., 2014)。排卵障害を有する女性の場合、血清AMHレベルを決定することにより、卵巢の機能不全の種類、特に多嚢胞性卵巢症候群といった卵巢不全に関連付けられる性腺刺激ホルモン過剰無排卵をよりよく特徴付けることが可能になる(Fong SL, et al., 2015)。若年男子において、AMHは、新生の胎児の睾丸により極めて大量に生成され、即ち男性生殖管の分化に早くから関与している。したがって、AMHをアッセイすることは、性的分化に関連付けられる障害に関して、性熟期前の男子に有用であることが分かっている。

【0006】

AMHのアッセイは、サンドイッチ免疫アッセイ法によって実施され、同時に感受性で、特異的で、且つ再現可能である試験の使用を必要とする。しかしながら、文献に提案される種々の方法(Hudson, 1990; Long, 2000)や、それ以外の市販の様々なキットがあるとはいえ、これら特性のすべてを結合するアッセイは依然として存在しない。解決すべき主な困難性の一つは、1996年に既に同定されており、それは生物学的試料中にお

10

20

30

40

50

けるAMHの見掛け上の安定性の欠如である。即ち、貯蔵条件（時間、継続時間、冷凍周期など）により、測定される濃度に変動が生じうる（Lee, 1996）。このような変動は、言うまでもなく人工産物であり、生物学的結果の不正確な解釈を招きうる。

【0007】

様々なキットが市販されている。これらキットに使用される抗体は、AMHの異なる領域を認識する。AMHアッセイの第1世代はEIA/MIS/AMH (Immunotech)及びActive MIS/AMH ELISAキット(DSL)に相当する。これらキットに使用される抗体は、同じものではないが、各々がAMHのプロ領域を認識する第1の抗体を使用し、他方の抗体は成熟領域を認識する。2010年に、それらキットを販売するBeckman Coulter社は、それらを、同社によれば性能レベルが向上した第2世代のキット(AMH Gen II Assay)で置き換えた。実際、作製者によれば、このキットは高度に特異的であり、使用される二つのモノクローナル抗体はそれぞれ成熟領域を認識するため、測定されるAMHはタンパク質分解による影響を受けないと思われる(Kumar, 2015; 米国特許第7897350号)。作製者の考えでは、複数のシステイン残基を含む成熟領域は、タンパク質分解が起こる際にはプロ領域より安定しているであろうとのことであった。常套的臨床用途において現場で用いてみると、AMH Gen IIキットは約束されたようなものではないことがすぐに判明した。過去にさかのぼって広く調べたところ、試料管を貯蔵するための条件の観点からAMHアッセイの安定性の欠如が確認され(Rustamov O, 2012)、AMH Gen IIキットがそれら変動に極めて感受性であることが示された。観察される変動を説明するために複数の仮説が提案された。可能な解釈の一つは、血液試料が採取された後でAMH分子が個体によって異なりうる配座変化を経るという事実に関連している。

【0008】

このような結果は、独立のチームにより迅速に反復されて確認された(Xan et al., 2014)。さらに、このチームは、試料の貯蔵期間におけるAMHの安定性を助長するための解決法について記載した。即ち、彼らは、Gen IIによるAMHアッセイの全般的再現性を向上させることができる、アッセイ前の前希釈を実施した。しかしながら、この解決法は、実施が容易であると認められるものの、いくつかの欠点を有している。即ち：

(i) 前希釈の後で測定されるAMH濃度が上昇する。この上昇は、個体によって異なる(利用可能なデータによれば1.35倍から3.06倍)。したがって、広いコホートにわたって実験により参照値を再定義し、さらには臨床的解釈のルールを再定義することが必要である。

(ii) 実施される希釈は無視できるものでない(1/5、即ち300µlのバッファ中60µlの試料)。この解決法は確かに観察される干渉をなくすることができるが、その結果多くの臨床使用にとって重要なアッセイの感度の低下を招く。

(iii) AMH不安定性の理由が依然として特定されていない。結果として、希釈がすべての試料について安定性の欠如という問題を解決すると確信することはできない。

【0009】

さらに、Lukaszuk et al. (2014)は、AMH Gen II Assayキットによって測定される平均AMH濃度の低下及び感度の低下について記載している。彼らの結論は、「Gen IIキットの結果に基づいて刺激プロトコルを実施することは極めて危険である」ということである。

【0010】

したがって、試料の採取からアッセイの実施までの時間に関係なく、且つ貯蔵条件に関係なく(分析前条件とは無関係の用量)測定されるAMH濃度が正確且つ再現可能な頑強なキットを提供することが必須である。

【0011】

親出願である国際公開第2014/074835号は、特定のアイソフォーム又はアイソフォームによる変化が臨床的に意味を持ちうるかどうかを決定するために、様々なAMHアイソフォーム(二量体型AMHのみ、非切断AMH、切断後再会合されたAMHなど)

をアッセイするための様々な方法を提案している。即ち、この出願は、AMHのプロ領域又は成熟領域内に位置する多数の線状エピトープに対して向けられた抗体について記載している。開示される組成物及び方法が、正確且つ再現可能で標準化されたアッセイの要件に対応するとの主張がなされている。この出願は、18のエピトープ、即ちこれらエピトープを認識する抗体を組み合わせることによりサンドイッチイムノアッセイ法を構築するための即ち合計で324(18×18)の方法を開示する。様々なAMHアッセイに生じる多数の分析前の問題を考慮すると、実験による実証なしに、これらエピトープの組み合わせ、即ち抗体の組み合わせの各々が頑強な試験を取得することを可能にすると信じることは難しい。さらに、この親出願のデータはいずれも、記載される抗体の使用が、頑強、正確、再現可能で標準化された、特にその結果が分析前の条件とは無関係な、一般の医療行為に使用できるアッセイを可能にすることを示すものではない。この出願に含まれる唯一のデータは、「単一のエピトープサンドイッチ又はSES」型のアッセイ、即ち捕捉及び検出のために同じモノクローナル抗体を使用するアッセイに基づく安定性データに関するものである。さらに、これら試験はAMHのダイマー形態のみを検出し、その臨床的利益は現在のところ未知である(測定される濃度が、一般の医療行為に用いられるものである総AMHアッセイで得られる濃度とは極めて異なるため)。

10

【発明の概要】

【0012】

本出願人は、予期せずに、非線状エピトープのみを、特にAMHのプロ領域のメジアン部分(ヒトのアミノ酸157~255)に位置するAMHの特定のゾーン内において認識する新規の抗体を調製することにより、先行技術の欠点を克服できることを発見した。この抗体は、一般の医療行為に使用することが可能で、試料の分析前条件又は貯蔵条件に関係なく頑強且つ正確で再現可能な、安定で信頼できるAMHアッセイの実施を可能にする。切断ゾーンを有すると記載されている(国際公開第2014/074835号)AMHのこの特定のゾーンを選択するうえで、驚くべきことに且つあらゆる予想に反して、規定されたゾーンから非線状エピトープを認識するこれら抗体を用いたAMHのアッセイは、生物学的試料中に存在する生物学的利益を有するすべてのAMHを検出する。

20

【0013】

したがって、本発明の第1の課題は、抗哺乳動物AMH(抗ミューラー管ホルモン)抗体を調製するための方法に関し、この方法は、

30

(i) AMHポリペプチド又はこのAMHポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで動物を免疫化する工程であって、前記AMHポリペプチドが、配列番号1の配列又は配列番号1の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも99個のアミノ酸、及び配列番号2の配列又は配列番号2の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で560個のアミノ酸を含む、工程、

(ii) 免疫原を受けた動物のリンパ器官の細胞からハイブリドーマを調製する工程、

(iii) 配列番号1の配列又は配列番号1の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも99個のアミノ酸、及び配列番号8の配列又は配列番号8の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で255個のアミノ酸を含むAMHポリペプチドを認識するが、(a) 配列番号13の配列又は配列番号13の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも131個のアミノ酸、及び配列番号11の配列又は配列番号1の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で156個のアミノ酸を含むAMHポリペプチドも、(b) 配列番号1の配列又は配列番号1の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列中に位置するいずれの線状エピトープも認識しない抗体を分泌するハイブリドーマを選択する工程、並びに

40

(iv) 前記抗体を生成する工程

を含むことを特徴とする。

【0014】

本発明の第2の課題は、配列番号1の配列又は配列番号1の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも99個のアミノ酸、及び配列番号8の配列又は配列番号

50

8の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で255個のアミノ酸を含むAMHポリペプチドを認識するが、(a)配列番号13の配列又は配列番号13の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも131個のアミノ酸、及び配列番号11の配列又は配列番号11の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で156個のアミノ酸を含むAMHポリペプチドも、配列番号1の配列又は配列番号1の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列中に位置するいずれの線状エピトープも認識しない抗哺乳動物AMHモノクローナル抗体又はモノクローナル抗体断片に関する。

【0015】

本発明の第3の課題は、(i)上記に規定される又は上記に規定される方法に従って調製された抗AMHモノクローナル抗体又はモノクローナル抗体断片、及び(ii)検出可能なシグナルの放出を生じさせることができる標識を含むコンジュゲートに関し、前記検出可能なシグナルは、このコンジュゲートと生物学的試料のAMHとの間の免疫反応を可視化する。

10

【0016】

本発明の第4の課題は、AMHを含みうる生物学的試料において、サンドイッチイムノアッセイ法により哺乳動物AMHを定量化するための方法に関し、この方法は、

- 前記生物学的試料を二つのAMH結合パートナーと接触させる工程であって、前記パートナーの少なくとも一方が、上記に規定される又は上記に規定される方法に従って調製された抗体又は抗体断片であるか、さもなければ上記に規定されるコンジュゲートである、工程、

20

- 前記結合パートナーとAMHとの間の結合により放出されるシグナルが存在する場合には、検出可能なシグナルを放出することのできる標識を用いてそのシグナルを検出する工程、並びに

- 検出されたシグナルをAMH濃度へと変換する工程を含む。

【0017】

本発明の第5の課題は、妊娠可能年齢の女性における卵巢機能不全に関連付けられる障害の診断の補助としての、又は12歳以上の若年女子及び女性における卵胞貯蔵の評価の補助としての、さもなければ性熟期前の男子における性的分化に関連付けられる障害の評価の補助としての、上記に規定されるAMHを定量化するための方法の使用に関する。

30

【0018】

終わりに、本発明の最後の課題は、上記に規定される又は上記に規定される方法に従って調製された抗体又は抗体断片、さもなければ上記に規定されるコンジュゲートを含むキットに関する。

【0019】

本発明者は、予期せずに、その調製過程で抗AMHモノクローナル抗体を選択するためにAMHのプロ領域のメジアン部分を使用すると同時に、この部分の線状エピトープを認識する抗体を廃棄することにより、このように選択されたこれら抗体がAMHのアッセイに使用されるときには、信頼性及び再現性のあるアッセイを可能にすることを発見した。

【0020】

抗原決定基としても知られるエピトープは、パラトープによって認識されうる抗原の最小部分であり、抗体の可変部分である。エピトープの構造は抗体のパラトープと相補性である。含まれる構造は、連続エピトープ(sequential epitope又はcontinuous epitope)としても知られる線状エピトープの場合、重要な(consecutive)アミノ酸を含むため一次構造であるか、又は非線状エピトープとしても知られる不連続エピトープである場合には三次構造でありうる。本件の場合のように抗原がタンパク質の性質を有するとき、線状エピトープは可変長のペプチド配列に相当する。

40

【0021】

線状エピトープの配列は、特異性の観点からエピトープと抗体との間の結合を有意に変

50

更することのない「保存的」修飾を含むことができる。

【0022】

したがって、本発明の方法に従って調製された抗体は、AMHのプロ領域のメジアン部分の線状エピトープを認識しないが、このメジアン部分は認識する。

【0023】

「AMHのプロ領域のメジアン部分を認識するモノクローナル抗体」という表現は、抗体が、この部分が存在するときにはAMHに、例えばAMH全体に結合できるが、この部分が存在しないときはAMHポリペプチドに結合できないことを意味する。

【0024】

理論に拘束されることを望むものではないが、帰納的な一の仮説として、抗体が向けられるAMHのプロ領域のメジアン部分は、アッセイされる生物学的試料、例えば血漿中において、AMHがタンパク質分解を受けるゾーンに対応し、このゾーンはその元の立体配座に明らかに存在したままであるか、さもなければその立体配座が分子の周囲のゾーンに影響を与える修飾によって影響されないと考えることができる。

10

【0025】

そのAMHのプロ領域のそれらのメジアン部分に対する抗体を生成することが望ましい哺乳動物は、AMHのアッセイが補助となるあらゆる哺乳動物である。例として、ヒト（男子を含む女性及び男性）、ウマ（特に雌）、イヌ（特に雌）、ウシ、ヒツジ種のメンバー、及びネコのファミリーを挙げることができる。

【0026】

哺乳動物によって分泌されるAMHは、同一ではないが、近い。少なくとも75%の配列同一性が、ヒトAMHと、AMHのアッセイが補助となる他の哺乳動物のAMHとの間に観察される。本発明において標準とするAMHはヒトAMHである。

20

【0027】

二つ以上のポリペプチド配列の文脈における用語「同一性」又は「パーセント同一性」は、比較される二つの配列が、最大に対応するように整列されたとき、整列されうる最大長において同一である特定のパーセンテージのアミノ酸残基を有することを意味する。このような整列及びパーセント同一性の計算は、配列比較アルゴリズム及び/又はソフトウェア（Emboss Needle、LAlign、Blast、Clustalなど）を用いて、又は単純には目視検査により、行うことができる。

30

【0028】

先述のように、AMHはプロ領域及び成熟領域からなる。ヒトにおいて、プロ領域は451位で終わり、成熟領域は452位で始まる。本発明により調製された抗体によって認識されるAMHのプロ領域のメジアン部分は、ヒトにおいて、157位で始まり255位で終わる。これは配列番号1の配列の99個のアミノ酸からなる。ウマの場合、本発明により調製された抗体によって認識されるAMHのプロ領域のメジアン部分は、167位で始まり、265位で終わり、配列番号14の配列の99個のアミノ酸に対応する。本発明により調製された抗体によって認識されるイヌAMHのプロ領域のメジアン部分は、部分的に、166位で始まり、264位で終わり、配列番号23の配列の99個のアミノ酸に対応する。ウシに関しては、本発明により調製された抗体によって認識されるAMHのプロ領域のメジアン部分は、171位で始まり、270位で終わり、配列番号32の配列の100個のアミノ酸に対応する。

40

【0029】

これら特定の有利な抗AMH抗体を生成するために、本発明の方法は、第1の工程として、動物を免疫原で免疫化することを含む。この免疫原は、AMHポリペプチド又はこのAMHポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、少なくとも抗体が間違いなく認識するゾーン、即ち少なくともAMHのプロ領域のメジアン部分を含んでいなければならない。したがって、使用される免疫原は、配列番号1の配列又は配列番号1の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも99個のアミノ酸を含む。

【0030】

50

免疫原はまた、最大で、問題の種のAMH全体又は問題の種のAMH全体をコードするポリヌクレオチド、即ち、ヒトAMHの場合、配列番号2(Uniprot受入番号KB F2YMM5)の配列の560個のアミノ酸を含み、他のAMHは配列番号2の配列と少なくとも75%の同一性を有する。例えば、ウマのAMH全体ポリペプチドは、配列番号15(Uniprot受入番号KB F2YMM5)の配列の573個のアミノ酸を含み、イヌのAMH全体ポリペプチドは、配列番号24(Uniprot受入番号KB A0A0E3N0I3)の配列の572個のアミノ酸を含み、ウシのAMH全体ポリペプチド(Uniprot受入番号KB P03972)は配列番号33の配列の575個のアミノ酸を含む。

【0031】

特定の一実装態様によれば、使用される免疫原は、AMH全体配列に対し、AMHのプロ領域のメジアン部分の後に位置するすべてのアミノ酸を欠くAMHポリペプチド、又はこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、即ち、少なくとも配列番号10の配列又は配列番号10の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の230個のアミノ酸と、配列番号8の配列又は配列番号8の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で255個のアミノ酸とを含み、好ましくは配列番号8、配列番号9及び配列番号10の配列又はこれら配列と少なくとも75%の同一性を有する配列のAMHポリペプチドから選択されるAMHポリペプチド又は前記AMHポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。配列番号8の配列は、ヒトAMHのアミノ酸1-255に対応し(AMH-2と呼ばれる)、配列番号9の配列は、ヒトAMHのアミノ酸19-255、即ち、シグナルペプチドを含まない配列番号8の配列に対応し(シグナルペプチドを含まないAMH-2と呼ばれる)、配列番号10の配列はヒトAMHのアミノ酸26-255、即ちシグナルペプチドを含まない配列番号8の配列又は前駆体部分に対応する(シグナルペプチド又は前駆体部分を含まないAMH-2と呼ばれる)。

【0032】

別の実施態様によれば、使用される免疫原は、シグナルペプチドの全部又は一部と、任意選択的に前駆体部分の全部又は一部とを含むAMH全体に対応する、AMHポリペプチド、又はこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。したがって、AMHポリペプチドは、配列番号4の配列又は配列番号4と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも535個のアミノ酸を含み、好ましくは配列番号2、配列番号3及び配列番号4の配列又はこれら配列と少なくとも75%の同一性を有する配列のAMHポリペプチドから選択される。配列番号2の配列はヒトAMHのアミノ酸1-560に対応し、配列番号3の配列はヒトAMHのアミノ酸19-560、即ちシグナルペプチドを含まない配列番号2の配列に対応し、配列番号3の配列はヒトAMHのアミノ酸26-560、即ちシグナルペプチド又は前駆体部分を含まない配列番号2の配列に対応する。

【0033】

別の実施態様によれば、使用される免疫原は、シグナルペプチドの全部又は一部と、任意選択的に前駆体部分の全部又は一部とを含むが成熟領域は含まないAMH全体に対応する、AMHポリペプチド、又はこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。したがって、AMHポリペプチドは、配列番号7の配列又は配列番号7と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも426個のアミノ酸と、配列番号5の配列又は配列番号5と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で451個のアミノ酸とを含み、好ましくは、配列番号5、配列番号6及び配列番号7の配列又はこれら配列と少なくとも75%の同一性を有する配列のAMHポリペプチドから選択される。配列番号5の配列は、ヒトAMHのアミノ酸1-451に対応し(AMH-3と呼ばれる)、配列番号6の配列は、ヒトAMHのアミノ酸19-451、即ちシグナルペプチドを含まない配列番号5の配列に対応し(シグナルペプチドを含まないAMH-3と呼ばれる)、配列番号7の配列は、ヒトAMHのアミノ酸26-451、即ちシグナルペプチド又は前駆体部分を含まない配列番号5の配列に対応する(シグナルペプチド又は前駆体部分を含まないAMH-3と呼ばれる)。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

以下の表（表 1）は、本発明の状況において、特に一部の免疫源として有用な様々な A M H ポリペプチドを挙げて、哺乳動物の種によりアミノ酸の位置と対応する配列番号（括弧内）を示している。

【 0 0 3 5 】

表 1

	ヒト	ウマ	イヌ	ウシ	
AMHのプロ領域のシグナル部分	157-255 (配列番号1)	167-265 (配列番号14)	166-264 (配列番号23)	171-270 (配列番号32)	10
AMH全体	1-560 (配列番号2)	1-573 (配列番号15)	1-572 (配列番号24)	1-575 (配列番号33)	
シグナル部分を含まないAMH全体	19-560 (配列番号3)	23-573 (配列番号16)	22-572 (配列番号25)	18-575 (配列番号34)	20
シグナル部分又は前駆体部分を含まないAMH全体	26-560 (配列番号4)	NA	NA	25-575 (配列番号35)	
AMH全体-3	1-451 (配列番号5)	1-464 (配列番号17)	1-463 (配列番号26)	1-466 (配列番号36)	30
シグナル部分を含まないAMH全体-3	19-451 (配列番号6)	23-464 (配列番号18)	22-463 (配列番号27)	18-466 (配列番号37)	
シグナル部分又は前駆体部分を含まないAMH全体-3	26-451 (配列番号7)	NA	NA	25-466 (配列番号38)	40
AMH全体-2	1-255 (配列番号8)	1-265 (配列番号19)	1-264 (配列番号28)	1-270 (配列番号39)	

シグナルペプチド を含まない AMH全体-2	19-255 (配列番号9)	23-265 (配列番号20)	22-264 (配列番号29)	18-270 (配列番号40)
シグナルペプチド 又は前駆体部 分を含まない AMH全体-2	26-255 (配列番号10)	NA	NA	25-270 (配列番号41)

10

NA = 問題のAMH中に前駆体部分が存在しないため該当しない

【0036】

言うまでもなく、これら配列に記載されたアミノ酸に加えて、ポリペプチド形態であるときには、免疫原は他のポリペプチドの生成とその精製のために使用される他のアミノ酸、例えばポリヒスチジンテールも含むことができる。

20

【0037】

ポリペプチドを生成するための方法は、当業者に広く知られている。例えば、AMHポリペプチドは、当業者に慣習的に知られている、以下の工程を用いる遺伝子工学により得ることができる：

- AMHポリペプチドをコードするDNAを利用可能にする工程であって、前記DNAは一般的な方法により得られる工程、

- このDNAを、クローニングにより、プラスミド、コスミド、ファージ又はウイルスベクター（パキウロウイルス（オートグラフィカリフォルニカ核多角体病ウイルス）、ワクシニアウイルス、セムリキ森林ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルスなど）といった発現ベクターに挿入する工程であって、このベクターが、宿主細胞中でのその増幅

30

- 発現させる対象の遺伝子を含むベクターを宿主細胞中に導入する工程であって、例えば、原核細胞（例えば細菌、例えば大腸菌、バシラスサチリス）中に形質転換又は感染により、又は真核細胞（例えば酵母（サッカロマイセス・セレビシエ、ピキア・パストリス）、昆虫細胞（Sf9、Sf21、High5細胞）、哺乳動物細胞（CHO、293、Per.C6、BHK-21、Veroなど））中に一過性又は持続性のトランスフェクション、さもなければウイルス感染により、導入する工程、

- 発現ベクターを含む宿主細胞を、培養し、任意選択的に宿主細胞中のベクターの増幅により、任意選択的に増殖する工程、

40

- 必要に応じて、組み換えAMHポリペプチドの生成のための転写及びタンパク質合成を誘導すること、並びに

- 例えばポリヒスチジンテールを用いて、前記ポリペプチドを抽出するために、精製する工程。ポリペプチドはその後組み換えと呼ばれる。

【0038】

免疫原がポリヌクレオチドであるとき、遺伝子工学によりAMHポリペプチドを調製するために使用されるものと同じDNAが、例えば使用されるであろう。

【0039】

免疫化のために使用される動物は、モノクローナル抗体を得るために通常使用されるいずれかの動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、ヤギ又はヒツジなどである。

50

【 0 0 4 0 】

免疫化のための条件及びパラメータ、例えば免疫原濃度、免疫化モードなどは、既に 1975年にKohler and Milsteinによって記載された手順、特にマニュアルCurrent protocols in Cell Biology (Yokoyama WM, 2001)を参照できる当業者に広く既知である。

【 0 0 4 1 】

本発明の方法の第2の工程は、一般的な工程であり、免疫原を受けた動物のリンパ器官、例えばスプライン (s p l i n e)、リンパ節及び扁桃腺などの細胞からハイブリドーマを調製することからなる。このような工程は、いずれかのモノクローナル抗体生成マニュアルに記載されている。しかしながら、それぞれの種に適した融合パートナーを使用することが必要である。したがって、例えばマウスにはc G P S C H O - S a株を使用することができ、ウサギには240E - W株を使用することができ(米国特許第7429487号)、ヒツジにはS F P 1株を使用することができる(国際公開第92/15699号)。

10

【 0 0 4 2 】

本方法の第3の工程は、得られたハイブリドーマの特定の選択からなる。これを行うために、まず、ハイブリドーマを、特にそれを増殖させるための栄養分と増殖因子とを含む、当業者に周知の適切な培地で培養する。次いで、対象の抗体を分泌するクローンを、標識を用いない直接的検出(抗原抗体反応後の自然沈殿)、間接的検出(例えばE L I S A又は他の種類のイムノアッセイ)、表面プラズモン共鳴(B I A c o r e (登録商標))及び干渉法(オクテット)といった当業者に既知の技術により、抗体によって認識される抗原を用いて選択する。この工程の独創性は、特定のポリペプチド及びペプチドを用いる、順序を問わない2つの連続的スクリーニングにおいて実施することのできるハイブリドーマの特定の選択にある。

20

【 0 0 4 3 】

スクリーニング1と呼ばれる第1のスクリーニングは、先述のように、プロ領域のメジアン部分を認識する抗体を生成するハイブリドーマのみを保持することにある。しかしながら前記ゾーンは切断部位を有することが知られており、これは排除されなければならない。これを行うために、以下二つの方法が可能である：

方法1：

- まず、A M H - 2、即ち、ヒトA M H - 2の場合、アミノ酸1 - 255(配列番号8)(適切である場合はシグナルペプチドの全部又は一部と前駆体部分の全部又は一部を含まない)、又はこの配列と少なくとも75%の同一性を有する任意の配列を認識する抗体を分泌するハイブリドーマを選択する。一実施態様によれば、抗体によって認識されるA M H - 2ポリペプチドは、配列番号8、配列番号9及び配列番号10から選択される配列及びこれら配列と少なくとも75%の同一性を有する配列のポリペプチドである。

30

- 次いで、A M Hのプロ領域のメジアン部分の前に位置するA M Hの部分、即ち、ヒトA M Hの場合、アミノ酸1 - 156(配列番号11)(適切である場合はシグナルペプチドの全部又は一部と前駆体部分の全部又は一部を含まない)、及びこの配列と少なくとも75%の同一性を有する任意の配列を認識する抗体を生成するハイブリドーマを廃棄する。このA M Hポリペプチドは、本発明により調製された抗体により認識されないA M Hポリペプチド(a)と呼ばれる。一実施態様によれば、抗体によって認識されないA M Hポリペプチド(a)は、配列番号11、配列番号12及び配列番号13から選択される配列及びこれら配列と少なくとも75%の同一性を有する配列のポリペプチドである。配列番号11の配列は、ヒトA M Hのアミノ酸1 - 156に対応し(A M H - 1と呼ばれる)、配列番号12の配列は、ヒトA M Hのアミノ酸19 - 156、即ちシグナルペプチドを含まない配列番号11の配列(シグナルペプチドを含まないA M H - 1と呼ばれる)に対応し、配列番号13の配列はヒトA M Hのアミノ酸26 - 156、即ちシグナルペプチド又は前駆体部分を含まない配列番号11に対応する(シグナルペプチド又は前駆体部分を含まないA M H - 1と呼ばれる)。

40

方法2：

50

- AMHのプロ領域のメジアン部分、即ち、ヒトAMHの場合、アミノ酸157-255（配列番号1）及びこの配列と少なくとも75%の同一性を有する任意の配列を認識する抗体を分泌するハイブリドーマを選択する。

【0044】

以下の表（表2）は、本発明の状況において有用な、認識されない様々なAMHポリペプチド（a）を挙げて、動物の種によりアミノ酸の位置と対応する配列番号（括弧内）とを示している。

【0045】

表2

	ヒト	ウマ	イヌ	ウシ
AMH全体-1	1-156 (配列番号11)	1-166 (配列番号21)	1-165 (配列番号30)	1-170 (配列番号42)
シグナルペプチド を含まない AMH全体-1	19-156 (配列番号12)	23-166 (配列番号22)	22-165 (配列番号31)	18-170 (配列番号43)
シグナルペプチド 又は前駆体部 分を含まない AMH全体-1	26-156 (配列番号13)	NA	NA	25-170 (配列番号44)

10

20

30

NA = 問題のAMH中に前駆体部分が存在しないため該当しない

【0046】

このように、特定の一実施態様によれば、配列番号11、配列番号12、及び配列番号13の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列が、配列番号21、配列番号22、配列番号30、配列番号31、配列番号42、配列番号43及び配列番号44の配列から選択される。

【0047】

AMHポリペプチド（a）は、前述のように調製することができ、AMHに属さない他のアミノ酸を含むことができる。

【0048】

スクリーニング2と呼ばれる第2のスクリーニングは、AMHのプロ領域のメジアン部分、即ち配列番号1の配列又は配列番号1と75%の同一性を有する任意の配列中の線状エピトープを認識する抗体を生成するハイブリドーマを廃棄することからなる。これらエピトープは線状エピトープ（b）と呼ばれる。

【0049】

アミノ酸配列上の線状エピトープの決定は当業者に周知である。これは、対象の配列を、所与の長さ、例えば10、12又は15アミノ酸の重複ペプチドへと切断し、次いでこれらペプチドの中から、モノクローナル又はポリクローナル抗体によって認識されるものを同定することからなる。言うまでもなく、その定義のために、線状エピトープは対象の配列の連続するアミノ酸を有する。

40

50

【 0 0 5 0 】

以下の表（表 3）は、本発明の状況において有用な、AMHのプロ領域のメジアン部分に決定された様々な線状エピトープ（b）を挙げて、哺乳動物の種による配列番号を示している。

【 0 0 5 1 】

表 3

	ヒト	ウマ	豚	ウシ
プロ領域のメジアン部分上の線状	配列番号45	配列番号48	配列番号51	配列番号54
エピトープ	配列番号46	配列番号49	配列番号52	配列番号55
	配列番号47	配列番号50	配列番号53	配列番号56

10

【 0 0 5 2 】

このように、一実施態様によれば、抗体によって認識されない線状エピトープ（b）は、配列番号 4 5 から配列番号 5 6 の配列を有する。

20

【 0 0 5 3 】

先述のように、エピトープは一般的な方法により生成される。それらはペプチド合成によっても生成することができ、時にこれが好まれる。

【 0 0 5 4 】

特定の一実施態様は、選択工程（i i i）のために少なくとも以下の特性を有する：

- スクリーニング 1 は方法 1 を使用する；
- スクリーニング 1 はスクリーニング 2 の前に実施される。

【 0 0 5 5 】

二つのスクリーニング工程の間に、必要に応じて、ハイブリドーマの上清に含まれる抗体を、一般的な技法、例えばプロテイン A に対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製する。選択の実施後及び/又は必要に応じて、二つのスクリーニング工程の間に、安定且つ均一の株を保証するためにハイブリドーマをクローニングする。これは当業者に広く知られている。

30

【 0 0 5 6 】

本発明の方法の最後の工程は、当業者に周知であり、すべてのモノクローナル抗体生成マニュアル、例えばCurrent Protocols in Cell Biologyに記載されている工程である、対象の抗体の生成からなる。

【 0 0 5 7 】

その一般的手順が広く記載されている上記工程に加えて、本発明の方法は、洗浄、貯蔵及び抗体の断片への変換のための工程といった他の工程も含むことができる。

40

【 0 0 5 8 】

本発明の抗 AMH 抗体調製方法では、免疫原（配列番号 1 の配列又は配列番号 1 の配列と少なくとも 7 5 % の同一性を有する配列の少なくとも 9 9 個のアミノ酸と、配列番号 2 の配列又は配列番号 2 の配列と少なくとも 7 5 % の同一性を有する配列の最大で 5 6 0 個のアミノ酸とを含む、AMH ポリペプチド又はこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド）、AMH のプロ領域のメジアン部分（配列番号 1 の配列、又は配列番号 1 の配列と少なくとも 7 5 % の同一性を有する配列の、少なくとも 9 9 個のアミノ酸と、配列番号 8 の配列又は配列番号 8 の配列と少なくとも 7 5 % の同一性を有する配列の最大で 2 5 5 個のアミノ酸とを含む AMH ポリペプチド）、対象の抗体によって認識されないポリペプチド（a）（配列番号 1 3 の配列又は配列番号 1 3 の配列と少なくとも 7 5 % の同一性を

50

有する配列の少なくとも131個のアミノ酸と、配列番号11の配列又は配列番号11の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で156個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチド)、及び線状エピトープ(配列番号1の配列又は配列番号1の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列中に位置する)は、好ましくは同じ種に属する。

【0059】

一実施態様によれば：

- 哺乳動物はヒトであり、免疫原は、配列番号1の配列の少なくとも99個のアミノ酸と、配列番号2の配列の最大で560個のアミノ酸とを含む、AMHペプチド、又はこのAMHポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されるAMHポリペプチドは、配列番号1の配列の少なくとも99個のアミノ酸と配列番号8の配列の最大で255個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されないAMHポリペプチド(a)は、配列番号13の配列の少なくとも131個のアミノ酸と配列番号11の配列の最大で156個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであるか、

10

- 哺乳動物はウマであり、免疫原は、配列番号14の配列の少なくとも99個のアミノ酸と、配列番号15の配列の最大で573個のアミノ酸とを含む、AMHポリペプチド、又はこのAMHポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されるAMHポリペプチドは、配列番号14の配列の少なくとも99個のアミノ酸と配列番号19の配列の最大で265個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されないAMHポリペプチド(a)は、配列番号22の配列の少なくとも144個のアミノ酸と配列番号21の配列の最大で166個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであるか、

20

- 哺乳動物はイヌであり、免疫原は、配列番号23の配列の少なくとも99個のアミノ酸と、配列番号24の配列の最大で572個のアミノ酸とを含む、AMHポリペプチド、又はこのAMHポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されるAMHポリペプチドは、配列番号23の配列の少なくとも99個のアミノ酸と配列番号28の配列の最大で264個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されないAMHポリペプチド(a)は、配列番号31の配列の少なくとも144個のアミノ酸と配列番号30の配列の最大で165個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであるか、或いは

30

- 哺乳動物はウシであり、免疫原は、配列番号32の配列の少なくとも100個のアミノ酸と、配列番号33の配列の最大で575個のアミノ酸とを含む、AMHポリペプチド、又はこのAMHポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されるAMHポリペプチドは、配列番号32の配列の少なくとも100個のアミノ酸と配列番号39の配列の最大で270個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されないAMHポリペプチド(a)は、配列番号44の配列の少なくとも146個のアミノ酸と配列番号42の配列の最大で270個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドである。

40

【0060】

特に：

- 哺乳動物はヒトであり、免疫原は、配列番号2から10の配列のポリペプチドから選択されるAMHポリペプチド、又はこのAMHポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されるAMHポリペプチドは、配列番号1及び配列番号8から10の配列のポリペプチドから選択されるAMHポリペプチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されないAMHポリペプチド(a)は、配列番号11から13の配列のポリペプチドから選択されるAMHポリペプチドであるか、

- 哺乳動物はウマであり、免疫原は、配列番号15から20の配列のポリペプチドから選択されるAMHポリペプチド、又はこのAMHポリペプチドをコードするポリヌクレオ

50

チドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されるA M Hポリペプチドは、配列番号14、19及び20の配列のポリペプチドから選択されるA M Hポリペプチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されないA M Hポリペプチド(a)は、配列番号21及び22の配列のポリペプチドから選択されるA M Hポリペプチドであるか、

- 哺乳動物はイヌであり、免疫原は、配列番号24から29の配列のポリペプチドから選択されるA M Hポリペプチド、又はこのA M Hポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されるA M Hポリペプチドは、配列番号23、28及び29のポリペプチドから選択されるA M Hポリペプチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されないA M Hポリペプチド(a)は、配列番号30及び31の配列のポリペプチドから選択されるA M Hポリペプチドであるか、或いは

- 哺乳動物はウシであり、免疫原は、配列番号33から41の配列のポリペプチドから選択されるA M Hポリペプチド、又はこのA M Hポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されるA M Hポリペプチドは、配列番号32及び配列番号39から41の配列のポリペプチドから選択されるA M Hポリペプチドであり、ハイブリドーマによって分泌される抗体によって認識されないA M Hポリペプチド(a)は、配列番号42から44の配列のポリペプチドから選択されるA M Hポリペプチドである。

【0061】

本発明の方法を用いて生成される抗体は、新規であり、同じ特性を維持する限り、別の方法によって生成されてもよい。したがって、本発明の別の課題は、配列番号1の配列又は配列番号1の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも99個のアミノ酸、及び配列番号8の配列又は配列番号8の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で255個のアミノ酸を含むA M Hポリペプチドを認識するが、(a)配列番号13の配列又は配列番号13の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも131個のアミノ酸、及び配列番号11の配列又は配列番号11の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で156個のアミノ酸を含むA M Hポリペプチドも、配列番号1の配列又は配列番号1の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列中に位置するいずれの線状エピトープも認識しない抗哺乳動物A M Hモノクローナル抗体又は抗体断片に関する。

【0062】

用語「モノクローナル抗体断片」は、それが得られた抗体と同じ免疫学的認識特性を有する抗体のいずれかの部分を意味するものであり、本件の場合、A M Hのプロ領域のメジアン部分と、さらにはA M H全体とを認識することができる。断片の例として、F a b、F a b'及びF(a b')₂断片、さらにはs c F v(単鎖可変断片)及びd s F v(二本鎖可変断片)断片を挙げることができる。これら機能的断片は、特に、遺伝子工学により、さもなければ特異的タンパク質分解性消化とそれに次ぐ精製により得ることができる。

【0063】

本発明の方法について上述した特徴及び定義は、本発明の抗体にも当てはまる。

【0064】

したがって、本発明の抗体は、以下の条件のうちの一又は複数を満たすことができる：

- 認識されないA M Hポリペプチド(a)は、配列番号11、配列番号12及び配列番号13から選択される配列又はこれら配列と少なくとも75%の同一性を有する配列のポリペプチドである、

- 配列番号11、配列番号12及び配列番号13の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列は、配列番号21、配列番号22、配列番号30、配列番号31、配列番号42、配列番号43及び配列番号44の配列から選択される、

- 抗体によって認識されない線状エピトープ(b)は、配列番号45から配列番号56

10

20

30

40

50

の配列を有する。

【0065】

特に、

- 哺乳動物はヒトであり、認識されるAMHポリペプチドは、配列番号1の配列の少なくとも99個のアミノ酸と配列番号8の配列の最大で255個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであり、認識されないAMHポリペプチド(a)は、配列番号13の配列の少なくとも131個のアミノ酸と配列番号11の配列の最大で156個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであるか、

- 哺乳動物はウマであり、認識されるAMHポリペプチドは、配列番号14の配列の少なくとも99個のアミノ酸と配列番号19の配列の最大で265個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであり、認識されないAMHポリペプチド(a)は、配列番号22の配列の少なくとも144個のアミノ酸と配列番号21の配列の最大で166個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであるか、

- 哺乳動物はイヌであり、認識されるAMHポリペプチドは、配列番号23の配列の少なくとも99個のアミノ酸と配列番号28の配列の最大で264個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであり、認識されないAMHポリペプチド(a)は、配列番号31の配列の少なくとも144個のアミノ酸と配列番号30の配列の最大で165個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであるか、或いは

- 哺乳動物はウシであり、認識されるAMHポリペプチドは、配列番号32の配列の少なくとも100個のアミノ酸と配列番号39の配列の最大で270個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドであり、認識されないAMHポリペプチド(a)は、配列番号44の配列の少なくとも146個のアミノ酸と配列番号42の配列の最大で270個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドである。

【0066】

本発明の抗AMH抗体は、AMHを含みうる生物学的試料中でのAMHのアッセイに特に有用である。それらは、完全体又は断片の形態で、及び/又は試料とAMHとの結合後の免疫反応の可視化のための検出可能なシグナルの放出を生成することのできる標識とコンジュゲートさせた形態で、そのまま使用することができ、それにより本発明の別の課題を構成する。

【0067】

免疫反応の可視化のための検出可能なシグナルの放出を生成することのできる発現標識は、化学修飾なしで直接的に、又はそのような群を含めるための化学修飾後に、一群の抗体又は抗体断片と反応する一群を含むいずれかの分子を意味し、この分子は、求められる量を示すために使用される検出可能なシグナルを直接的又は間接的に生成することができる。

【0068】

標識と本発明の抗体又は抗体断片との間の結合は、当業者に既知の任意の方法により、特にカップリングにより行うことができる。

【0069】

標識の例には特に以下が含まれる：

例えば比色定量、蛍光光度又はホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、
- ガラクトシダーゼ又はグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼなどの発光により検出することのできるシグナルを生成する酵素、

- ・ 蛍光性、発光性又は色素化合物といった発色団、
- ・ P32、S35又はI125などの放射性分子、
- ・ Alexa5又はフィコシアニンなどの蛍光性分子、及び
- ・ アクリジニウムベース又はルテニウムベースの有機金属系誘導体といった電気化学発光塩。

【0070】

間接的検出系の例には、例えばアンチリガンドと反応できるリガンドが含まれる。この

場合リガンドは標識に相当し、抗体又は抗体断片と共にコンジュゲートを構成する。

【0071】

リガンド/アンチリガンドの対は、当業者には周知であり、例えば以下の対を含む：ビオチン/ストレプトアビジン、ハプテン/抗体、抗原/抗体、ペプチド/抗体、糖/レクチン、ポリヌクレオチド/ポリヌクレオチドに相補的な配列。

【0072】

この場合、アンチリガンドは、先述の直接的な検出標識によって直接検出可能でありうるか、又はそれ自体が別のリガンド/アンチリガンド対によって検出可能でありうるなどである。

【0073】

AMHのアッセイは、当業者に広く知られるアッセイである、サンドイッチイムノアッセイ法によって行われる。簡単に説明すると、このアッセイは、被分析物、本件の場合には哺乳動物AMHを、二つの被分析物-結合パートナー、本件の場合には少なくとも一つの本発明の抗体又は抗体断片を用いて決定することからなる。

【0074】

言うまでもなく、例えば用語「イムノアッセイ」中の接頭語「イムノ」は、本出願においては、本発明の抗体又は抗体断片以外の結合パートナーが、必然的に抗体又は抗体断片といった免疫学的起源のパートナーであることを厳密に示していると解釈されるべきではない。実際、当業者に周知であるように、この用語はもっと広く使用されており、結合パートナーが免疫学的起源/性質のパートナーではなく、例えば、検出及び/又は定量化が望まれる被分析物の受容体からなる試験及び方法を意味するためにも使用される。必須条件は、問題の結合パートナーが求められる被分析物、本件の場合にはAMHに、好ましくは特異的に結合できることである。したがって、用語「イムノ」は、詳細には頭字語ELISAに対応する名称に含まれるものであるが、もっと広く「リガンド結合アッセイ」と呼ばれる、厳密な意味で免疫学的ではない結合パートナーを使用するアッセイのために、ELISAアッセイという用語を使用することは既知の慣行である。明瞭さと均一性のために、本出願において、用語「イムノ」は、本発明の抗体又は抗体断片以外の結合パートナーが性質又は起源の観点から厳密な意味で免疫学的ではない場合も、求められる被分析物への結合及びその定量化に適した少なくとも一つの結合パートナーを好ましくは特異的に使用する任意の生物学的分析を意味するために用いられる。

【0075】

したがって、本発明の別の課題は、AMHを含みうる生物学的試料において、サンドイッチイムノアッセイ法により哺乳動物AMHを定量化するための方法に関し、この方法は、

- 前記生物学的試料を二つのAMH結合パートナーと接触させる工程であって、前記パートナーのうちの少なくとも一方が、本発明の抗体、抗体断片又はコンジュゲートである、工程、
 - 前記結合パートナーとAMHとの間の結合により放出されるシグナルが存在する場合には、検出可能なシグナルの放出を生成できる標識を用いてそのシグナルを検出する工程、並びに
 - 検出されたシグナルをAMH濃度へと変換する工程
- を含むかこれら工程からなる。

【0076】

この定量化方法の第1の工程は、生物学的試料を二つのAMH結合パートナーと接触させる工程であって、前記パートナーのうちの少なくとも一方が本発明の抗体、抗体断片又はコンジュゲートである工程を含むか又は同工程からなる。

【0077】

哺乳動物AMHを含みうる生物学的試料は、血液、血清、血漿、濾胞性の流体及び精子の試料である。一実施態様によれば、生物学的試料は、血液、血清又は血漿の試料である。

。

10

20

30

40

50

【0078】

任意選択的にコンジュゲートの形態の、本発明の抗体又は抗体断片以外の結合パートナーは、AMHに結合することのできるいずれかの分子を含む。このような結合パートナーの例として、抗AMHポリクローナル抗体、抗AMHモノクローナル抗体、抗AMHモノクローナル抗体断片、抗体アナログ（抗体を模倣できる分子）、例えばNanofitins、アプタマー、さもなければ「DARpins」、又はAMHとの相互作用を有することが知られているいずれかの他の分子を挙げるができる。

【0079】

Nanofitin抗体アナログは、抗体と同様に、生物学的標的に結合することができ、したがって生物体内部において、それを検出、捕捉又は極めて単純に標的化することを可能にする小タンパク質である。

10

【0080】

アプタマー抗体アナログは、“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment”（Ellington AD and Szostak JW., 1990）のSELEXとして知られるin vitro選択の組み合わせ方式により、最大1015の異なる配列を含むライブラリにおいて同定されるオリゴヌクレオチド、通常はRNA又はDNAである。多くのアプタマーは、変化した複雑な構造に適合し、それによりその構造に変化する寸法の空洞を形成することを可能にし、様々なリガンドに結合することを可能にするRNAの能力により、RNAから構成される。それらは、生物工学的、診断的又は治療的用途に使用することのできる、対象の生化学的ツールである。その選択性及びリガンド結合特性は、抗体に匹敵する。

20

【0081】

「DARpins」抗体アナログは、Designed Ankyrin Repeat ProteINS（Boersma YL and Plutckthun A, 2011）を指すDARpinsであり、抗体を模倣し、高い親和性及び高い選択性で標的タンパク質に結合することを可能にする別のクラスのタンパク質である。それらは、複合膜タンパク質を細胞原形質膜の「脊柱」を構成するスペクトリン/アクチン網に結合することを可能にするアダプタータンパク質である、アンキリンタンパク質のファミリーに由来する。アンキリンの構造は、約33個のアミノ酸のモチーフの反復に基づいており、DARpinsについてもそれがいえる。各モチーフは、ヘリックス-ターン-ヘリックス型の二次構造を有する。DARpinsは、少なくとも三つ、好ましくは四つから五つの反復単位を含み、スクリーニングコンビナトリアルライブラリによって得られる。

30

【0082】

抗AMHポリクローナル抗体、モノクローナル抗体及び抗体断片は、当業者に広く知られる一般的な方式で調製することができる。いくつかの抗体が、例えばAnsh Labs（US）社から、市販されている。

【0083】

本発明者は、抗体認識ゾーンが、AMHのプロ領域のC末端部分、即ち、ヒトAMHの場合、アミノ酸256から451（196個のアミノ酸配列番号57）；ウマAMHの場合、アミノ酸266から464（199個のアミノ酸配列番号58）、イヌAMHの場合、アミノ酸265から463（199個のアミノ酸配列番号59）、及びウシAMHの場合、アミノ酸271から466（199個のアミノ酸配列番号60）であること以外、本発明について先述したものと同一モノクローナル抗体調製方法を用いて、AMHのアッセイにおいて特に有用である他のモノクローナル抗体も調製した。したがって、対象のプロ領域のC末端部分は、配列番号57の配列又は配列番号57と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも196個のアミノ酸を含むAMHポリペプチドである。予期されなかったことに、AMHのプロ領域のC末端部分を認識する抗体は、先行技術の抗体とは異なり、それらが用いられるアッセイにおいて大量に使用される必要がない。

40

【0084】

AMHのC末端部分を認識するこれら抗体を調製するために、使用される免疫原は、A

50

MHポリペプチド、又はこのAMHポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、これは、少なくとも抗体が間違いなく認識する部分、即ち少なくともAMHのプロ領域のC末端部分、即ち配列番号57の配列又は配列番号57と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも196個のアミノ酸を含まなければならない。免疫原は、最大で問題の種のAMH全体又は問題の種のAMH全体をコードするポリヌクレオチド、即ち、ヒトAMHの場合、配列番号2の配列の560個のアミノ酸も含み、他のAMHは配列番号2の配列と少なくとも75%の同一性を含む。特定の免疫原は、以下から選択することができる：

- AMHの配列全体に対し、AMHのプロ領域のC末端部分の後ろに位置するすべてのアミノ酸を欠くAMHポリペプチド、又はこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、即ち、配列番号7の配列又は配列番号7と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも426個のアミノ酸と、配列番号5の配列又は配列番号5と少なくとも75%の同一性を有する配列の最大で451個のアミノ酸とを含み、好ましくは配列番号5、配列番号6及び配列番号7の配列又はこれら配列と少なくとも75%の同一性を有する配列、例えば配列番号17、18、26、27、36、37又は38の配列のAMHポリペプチドから選択される、AMHポリペプチド、又は前記AMHポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（これは、適切である場合はシグナルペプチドを含まず、任意選択的に前駆体部分を含まないAMH-3に相当する）；

- シグナルペプチドの全部又は一部及び任意選択的に前駆体部分の全部又は一部を含むAMH全体に相当する、即ち配列番号4の配列又は配列番号4と少なくとも75%の同一性を有する配列の少なくとも535個のアミノ酸を含み、好ましくは配列番号2、配列番号3及び配列番号4の配列又はこれら配列と少なくとも75%の同一性を有する配列、例えば配列番号15、16、24、25、33、34又は35の配列のAMHポリペプチドから選択される、AMHポリペプチド、又はこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【0085】

また、ハイブリドーマの選択は、特定のポリペプチド及びペプチドを用いる順序を問わない2つのスクリーニング工程を用いて実施される。

【0086】

スクリーニング1と呼ばれる第1のスクリーニングは、前述のように、プロ領域のC末端部分を認識する抗体を生成するハイブリドーマのみを保持することからなる。これを行うために、以下二つの方法が可能である：

方法1：まず、AMH-3、即ち、ヒトAMH-3の場合、アミノ酸1-451（配列番号5）（適切である場合はシグナルペプチドの全部又は一部と前駆体部分の全部又は一部を含まない）、又はこの配列と少なくとも75%の同一性を有する任意の配列を認識する抗体を分泌するハイブリドーマを選択する。一実施態様によれば、抗体によって認識されるAMH-3ポリペプチドは、配列番号5、配列番号6及び配列番号7の配列及びこれら配列と少なくとも75%の同一性を有する配列から選択される配列のポリペプチドである。次いで、AMHのプロ領域のC末端部分の前に位置するAMHの部分、即ち、ヒトAMHの場合、アミノ酸1-255（配列番号8-AMH-2）（適切である場合はシグナルペプチドの全部又は一部と前駆体部分の全部又は一部を含まない）、及びこの配列と少なくとも75%の同一性を有する任意の配列を認識する抗体を生成するハイブリドーマを廃棄する。このAMHポリペプチドは、本発明により調製された抗体によって認識されないAMHポリペプチド（a）と呼ばれる。一実施態様によれば、抗体によって認識されないAMHポリペプチド（a）は、配列番号8、配列番号9及び配列番号10から選択される配列及びこれら配列と少なくとも75%の同一性を有する配列のポリペプチドである。

【0087】

方法2：AMHのプロ領域のC末端部分、即ち、ヒトAMHの場合、アミノ酸256-451（配列番号57）、又はこの配列と少なくとも75%の同一性を有する任意の配列を認識する抗体を分泌するハイブリドーマを選択する。

【 0 0 8 8 】

スクリーニング 2 と呼ばれる第 2 のスクリーニングは、A M H のプロ領域の C 末端部分、即ち配列番号 5 7 の配列又は配列番号 5 7 について 7 5 % を有する任意の配列中の線状エピトープ (b) を認識する抗体を生成するハイブリドーマを廃棄することからなる。

【 0 0 8 9 】

以下の表 (表 4) は、これら抗体の調製に有用な、A M H のプロ領域の C 末端部分に決定された様々な線状エピトープ (b) を挙げて、哺乳動物の種による配列番号を示している。

【 0 0 9 0 】

表 4

	ヒト	ウマ	豚	ウシ
プロ領域の C末端部分の 線状エピトープ	配列番号 61から68	配列番号 69から74 配列番号 62及び63	配列番号 75から81 配列番号73	配列番号 82から85 配列番号62、 63、70及び73

10

20

【 0 0 9 1 】

このようにして調製された抗 A M H 抗体は、以下の特性を有する：配列番号 5 7 の配列又は配列番号 5 7 と少なくとも 7 5 % の同一性を有する配列の少なくとも 1 9 6 個のアミノ酸を含む A M H ポリペプチドを認識し、(a) 配列番号 1 0 の配列、又は配列番号 1 0 の配列と少なくとも 7 5 % の同一性を有する配列の、少なくとも 2 3 0 個のアミノ酸と、配列番号 8 の配列、又は配列番号 8 の配列と少なくとも 7 5 % の同一性を有する配列の、最大で 2 5 5 個のアミノ酸とを含む A M H ポリペプチドも、(b) 配列番号 5 7 の配列又は配列番号 5 7 と少なくとも 7 5 % の同一性を有する配列、例えば配列番号 6 1 から 8 5 の配列中に位置する線状エピトープも認識しない。

30

【 0 0 9 2 】

本発明の抗体調製方法及び本発明の抗体について前述したすべての特徴及び定義はここでも当てはまる。

【 0 0 9 3 】

二つの結合パートナーのうち的一方は、コンジュゲート又はトレーサーを形成するように標識に結合してもよい。他方の結合パートナーは、直接的又は間接的に、固体支持体に捕捉させてもよい。次に、後者について捕捉パートナーに、前者について検出パートナーに言及する。

40

【 0 0 9 4 】

本発明の A M H 定量化方法に使用される A M H 結合パートナーの対は、特に本発明の抗体と共に、プロ領域の C 末端部分を認識する抗 A M H 抗体を使用するとき、A M H のプロ領域及び成熟領域、又はプロ領域のみを認識することができる。したがって、特定の実施態様によれば、本定量化方法に使用される第 2 の A M H 結合パートナーは、配列番号 5 7 の配列又は配列番号 5 7 と少なくとも 7 5 % の同一性を有する配列の、少なくとも 1 9 6 個のアミノ酸を含む A M H ポリペプチドを認識するが、(a) 配列番号 1 0 の配列又は配列番号 1 0 の配列と少なくとも 7 5 % の同一性を有する配列の、少なくとも 2 3 0 個のアミノ酸と、配列番号 8 の配列又は配列番号 8 と少なくとも 7 5 % の同一性を有する配列

50

の、最大で255個のアミノ酸とを含むAMHポリペプチドも、(b)配列番号57の配列又は配列番号57と少なくとも75%の同一性を有する配列中に位置する線状エピトープも認識しない抗体であり、後者は、このコンジュゲートと生物学的試料のAMHとの間の免疫反応の可視化のための検出可能なシグナルの放出を生成することのできる標識を有する断片及び/又はコンジュゲートの形態でもよい。

【0095】

生物学的試料を二つのAMH結合パートナーと接触させることは、当業者に広く知られているように、一工程又は二工程で行うことができる。簡単に説明すると、一工程のイムノアッセイは、本発明の抗体、抗体断片又はコンジュゲートを含む被検試料を、同時に二つの結合パートナーと接触させることを含むが、二工程のイムノアッセイは、被検試料をまず第1の結合パートナーと、次いで被分析物と接触させることを含み、このように形成された第1の結合パートナー複合体を第2の結合パートナーと接触させる。二つの結合パートナーのうちの一つは言うまでもなく上記に規定された本発明の抗体、抗体断片又はコンジュゲートである。

10

【0096】

本方法は、洗浄工程及びインキュベーション工程といった当業者に既知の他の工程も含むことができる。

【0097】

本発明の定量化方法の第2の工程は、前記結合パートナーとAMHとの間の結合により放出されるシグナルが存在する場合には、上記に規定された検出可能なシグナルの放出を生成できる標識を用いてそのシグナルを検出する工程を含むか又は同工程からなる。この標識は、前記AMH結合パートナーのうちの一つにコンジュゲートさせることができる。

20

【0098】

使用される標識の種類に応じて、当業者は、いずれかの種類の適切な測定装置、例えば分光光度計、分光蛍光光度計、濃度計、ルミノメーター、さもなければ高解像度カメラを用いて、標識の可視化又は検出可能なシグナルの放出を可能にする試薬を加える。

【0099】

AMHの定量化方法の最終工程は、検出されたシグナルをAMH濃度へと変換することを含むか又は変換することからなる。AMHのレベル又は量にも言及する。一般原理は、イムノアッセイの間に放出されたシグナルの測定値が生物学的試料のAMHの量に比例するということである。

30

【0100】

検出されたシグナルをAMH濃度へと変換するこの工程は、当業者に広く知られている。これは、標準レンジに基づいて予め設定した数学モデルを用いることである。この標準レンジは、既知の方式で事前に取得される。簡単に説明すると、標準レンジを取得することは、標的の被分析物(AMH)の量又は濃度を増加させることにより生成されたシグナルを測定すること、AMHのレベルの関数としてシグナルを示す曲線を描画すること、及びこのような関係をできる限り忠実に表す数学モデルを発見することからなる。数学モデルは、試験される生物学的試料に含まれるAMHの不明な量、力価又は濃度を決定するために使用される。

40

【0101】

AMH濃度の決定は、複数の点で、特に女性の受胎能に関して、女性の卵巢予備能を推定するために、例えば卵胞を破壊する危険のある高度な治療を受けなければならない女性において使用することができ、さらには性熟期前の男子において、例えば性的分化に関連付けられる障害の場合に使用することができる。

【0102】

したがって、本発明の別の課題は、本発明の方法、或いは補助としての本発明の定量化方法を使用して調製されたかどうかに関係なく：

- 妊娠可能年齢の女性における卵巢機能不全に関連付けられる障害の診断のための、又は
- 12歳以上の若年女子及び女性における卵胞貯蔵の評価における、又は

50

- 性熟期前の男子における性的分化に関連付けられる障害の評価における、
本発明の抗体、抗体断片又はコンジュゲートの使用に関する。

【0103】

特に上述の使用に従って使用される本発明の方法を実施するために、本発明の抗体、断片又はコンジュゲートはキットに収容することができる。

【0104】

したがって、本発明の別の課題は、上記に規定又は調製される抗体又は抗体断片及び/
又は上記に規定されるコンジュゲートを含むキットに関する。

【0105】

ここでも、本発明の抗体及び方法に関して上記に記載された特徴及び定義は、本発明の
キットに当てはまる。

10

【0106】

特定の一実施態様によれば、キットは少なくとも一つのポジティブコントロールも含有
又は収容する。このポジティブコントロールは、キットの使用の間に用いられる結合パー
トナーに結合することのできる化合物を含み、この化合物は所定の量で存在する。

【0107】

このような化合物の非限定的な例として、適切である場合はシグナルペプチドの全部又
は一部及び任意選択的に前駆体部分の全部又は一部を含む、配列番号2の配列又は配列番
号2の配列と少なくとも75%の同一性を有する配列のAMH全体を挙げるこ
とができる。

20

【0108】

キットは、結合パートナーとAMHとの間の反応を実証するために必要とされるすべての
の化合物、例えば洗浄バッファ又は標識の可視化又は検出可能なシグナルの放出を可能
にする試薬も収容することができる。

【0109】

本発明は、非限定的な例示として提供される以下の実施例と、図1から4とにより、さら
に明瞭に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1】ヒトAMHタンパク質と、それに由来するヒトAMH-1、AMH-2及びAMH-3
タンパク質コンストラクトの構造を表す模式図である。

30

【図2】ピス-Tris 4-12%ゲル上での電気泳動により分離された後の、HEK293T細胞中でのAMH-1、AMH-2、AMH-3及びAMH全体遺伝子コンストラクトのトランスフェクションにより得られた細胞溶解物のウェスタンブロット分析である。ウェル1、2：ネガティブコントロールの溶解物（空のプラスミドでトランスフェクトされた細胞）；ウェル3、4：AMH-1溶解物；ウェル5、12：分子量標準；ウェル6、7：AMH-2溶解物；ウェル8、9：AMH-3溶解物；ウェル10、11：AMH全体溶解物。ウェル1、3、6、8及び10は条件Aに対応する：ローディングされた試料は加熱及び還元した。ウェル2、4、7、9及び11は条件Bに対応する：ローディングされた試料は加熱したが還元しなかった。Aは、抗アクチン抗体で試験した膜の写真であり、当量の総タンパク質が各ウェルにローディングされたことを確認するものである。Bは、抗ヒスチジン抗体（Qiagen）で試験した膜の写真である。AMHで構築された発現生成物に対応するバンドが四角で囲まれている。

40

【図3】ピス-Tris 4-12%ゲル上での電気泳動により分離された後の、HEK293T細胞中での遺伝子コンストラクトのトランスフェクションの上清から精製されたAMH-2及びAMH-3タンパク質のウェスタンブロット分析である。ウェル1：ネガティブコントロール（空のプラスミドでトランスフェクトされた細胞）；ウェル2：AMH-2；ウェル3：AMH-3；ウェル5：分子量標準。ローディングされた試料は加熱したが還元しなかった。五つの同じ膜（図3Aから3E）を調製し、各々を、抗AMH抗体又は抗ヒスチジン抗体（Qiagen）で試験した。

50

【図4】アフィニティークロマトグラフィーによって精製された組み換えAMHタンパク質CHO-AMH5-3F1のSDS-PAGE分析である。総タンパク質を可視化するため、SDS-PAGEゲルを硝酸銀で染色した。ウェル1：分子量標準；ウェル2：加熱したが還元していない組み換えAMH；ウェル3：加熱及び還元した組み換えAMH。

【実施例】

【0111】

実施例1：ヒトAMHの全配列又は切断配列に対応するDNA断片のクローニング、及びHEK293T細胞中での一過性のトランスフェクション

1.1. 遺伝子コンストラクト

発現されるAMH全体配列は、560個のアミノ酸(UniprotKBデータベースの受入番号P03971に対応する配列番号2)を含むヒトAMHのものである；このコンストラクトをAMH-560と呼ぶ。これは、タンパク質の翻訳後成熟の間に切断された前駆体部分(アミノ酸19-25)とシグナルペプチド(アミノ酸1-18)とを含んでいる。

【0112】

AMH-1、AMH-2及びAMH-3と呼ばれ、それぞれAMHのアミノ酸1-156(配列番号11)、1-255(配列番号8)及び1-451(配列番号5)の配列に対応する他の三つのタンパク質コンストラクトを調製した。精製を容易にするために、ポリヒスチジン(8-His)タグをこれら4つのコンストラクトのC末端側に付加した(配列表にはタグは付加されていない)。

【0113】

以下の表5にその配列を示すAMH-1、AMH-2、AMH-3及びAMH全体のコンストラクトに対応するDNA断片は、GeneArt(登録商標)(Life Technologies)から合成遺伝子の形態で得られた。各DNA断片(AMH-1、AMH-2、AMH-3及びAMH全体)を、CMVプロモーターの制御下においてpCMV6-XL5ベクターのEcoRI部位とNotI部位との間でクローニングした。エラーを含んでいないことを確認するために、得られたプラスミドをインサートのレベルで配列決定することにより検証した。

【0114】

表5

名称	AMH ポリヌクレオチド	対応する DNA 断片 配列番号 X-8HIS-停止コドン
AMH-1	配列番号 86	配列番号 86-CACCACCATCATCACCATCACCAC-TGA
AMH-2	配列番号 87	配列番号 87-CACCACCATCATCACCATCACCAC-TGA
AMH-3	配列番号 88	配列番号 88-CACCACCATCATCACCATCACCAC-TGA
AMH 全体	配列番号 89	配列番号 89-CACCACCATCATCACCATCACCAC-TGA

【0115】

1.2. HEK293T細胞中での一過性のトランスフェクション

培養：HEK-293T/17SF細胞(ATCC ACS-4500™)を、製造者の指示に従って、グルタミン(Gibco # 250030.24)を用いて濃縮したHEK Plus SFM培地(ATCC # 8006386597)において無

血清で培養した。トランスフェクションの前に、細胞をF75培養フラスコ内で培養し、インキュベーター内で37℃及び5% CO₂に維持した。

【0116】

トランスフェクション：HEK293T SF細胞(10⁶個の細胞)を、Ammaxヌクレオフェクター装置(Lonza)を用いたヌクレオフェクションにより、Ammax細胞株ヌクレオフェクターキットV(#VCA-1003)を供給し、1回のトランスフェクション当たり100万個の細胞に5μgのDNAを用いるプロトコルを適用することにより、トランスフェクトした。簡単に説明すると、100万個の細胞を、それらを収集するために200gで10分間遠心分離する。次いで細胞ペレットを、100μlの溶液V(キットで供給される)に再懸濁する。5μgのプラスミドを細胞懸濁液に加える。混合物全体を、穏やかに混合し、Ammaxキュベット(これもキットで供給される)に移す。キュベットを、Ammax Q-001プログラムに設定したヌクレオフェクター装置に挿入し、次いでヌクレオフェクションを活性化する。次いで試料を、直ちに6ウェル細胞培養プレート内の温かい培地に移し、それを37℃、5% CO₂でインキュベートする。HEK293T SF細胞を48時間培養する。

10

【0117】

溶解及び収集：トランスフェクションの48時間後、上清を収集し、次いでプロテアーゼ阻害剤(cOmpleteTM、EDTAフリープロテアーゼ阻害剤カクテルタブレット/Roche)を加えた後で-80℃で凍結する。トランスフェクトされた細胞ペレット(6×10⁶個の細胞/ペレット)を、130mMのNaCl、0.5% Triton X-100、5 U/mlのベンゾナーゼヌクレアーゼ(Novagen)、0.48 g/LのMgCl₂及びプロテアーゼ阻害剤(cOmpleteTM、EDTAフリープロテアーゼ阻害剤カクテルタブレット、Roche Cat.No.045-6642、1タブレット/50ml、pH7.4)を含む1.8mlの5.5mMホスフェート溶解バッファーを用いて採取する。次いで細胞溶解物を氷上に30分間置き、次いで15分間13000g、4℃で遠心分離する。得られた上清は、AMH-1、AMH-2、AMH-3及びAMH全体タンパク質を含んでおり、-80℃で貯蔵される。

20

【0118】

1.3. タンパク質発現のウェスタンブロット分析

工程1.2.の間に得られた発現産物の第1の特徴づけを、NuPAGE(登録商標)MES SDSバッファー(Life Technologies)中のNuPAGE(登録商標)ビス-Tris4-12%ゲルでのSDS-PAGE分析により実施した。ゲル(14μl/ウェル)上にローディングする前に、トランスフェクションの上清及び溶解物を、NuPAGE(登録商標)LDS 4X試料バッファー4X(Life Technologies)(3/1、体積/体積)に希釈し、様々な処理を行った。最終濃度5.5mMのジチオスレイトール(DTT)の付加によって還元を実施した。加熱は5分間75℃で行った。

30

条件A：加熱済及び還元済(DTTにより)

条件B：加熱済及び非還元(DTTを用いない)。

【0119】

ゲルの泳動後、電気泳動によって分離したタンパク質を、20%のメタノールを含む1X Tris-グリシンバッファー中において350mAの一定電流で50分間0.45μl/mのニトロセルロース膜上に移す。膜のパッシベーションを、130mMのNaClを含む5.5mMのリン酸バッファー中、3% BSA(ウシ血清アルブミン)の存在下において、+2/8℃で一晩実施する。パッシベーション後、マウス抗ヒスチジンモノクローナル抗体(Qiagen、Cat.No.34660)を、130mMのNaCl及び0.05%のTween 20を含む5.5mMのリン酸バッファー中において1/2000に希釈し、次いでこの希釈液10mlを、膜と共に1時間+18/25℃でインキュベートする。まったく同じように調製した第2の膜を、同じ時間及び同じ条件下で、抗ヒスチジン抗体の代わりにマウス抗アクチンモノクローナル抗体(クローンAC-15

40

50

、Life Technologies、Cat. No. AM4302)と共にインキュベートする。この膜は、各ウェル内で、同等の量の総タンパク質が分析に供されることを検証するために役立つ(等価モード制御)。

【0120】

未結合の抗体を除去するために膜をすすいだ後(130mMのNaCl及び0.05%のTween 20を含む5.5mMのリン酸バッファー中において5分間に5回の洗浄)、それらを、0.2% Tween 20を含む1X PBS中において1/2000に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート抗マウス二次抗体(Jacskon Immunoresearch、Cat. No. 115-036-003)と共に1時間インキュベートする。0.2%のTween 20を含む1X PBS中での5分間で5回の洗浄後、Clarity Western-blot Substrate溶液(Biorad、Cat. No. 170-5061)中において、攪拌しながら5分間膜をインキュベートすることにより、化学発光(Chemidoc XRS、Biorad)による獲得前に可視化を実施する。

10

【0121】

結果を図2に示す。抗アクチン抗体(図2A)を用いて可視化した膜では、ウェル当たり一つのバンドを観察している。これらバンドの強度は、やや強度が小さいAMH-1のウェル(3及び4)を除いて同等である。このように、このコントロールは検証される。抗ヒスチジン抗体(図2B)を用いて可視化した膜では、バンドは、ネガティブコントロールのウェルに上昇を示す。しかしながら、前記ウェルは、プラスミドを含まないブランクでトランスフェクトされた細胞の溶解物を含む。これは、すべてのウェル内にある溶解物中の特定のタンパク質に対する抗ヒスチジン抗体の非特異的な反応性に当てはまる。このような非特異的バンドに加えて、AMH-1、AMH-2、AMH-3及びAMH全体のウェルは、特異的なバンド、即ちネガティブコントロールのウェルには存在しないバンドを含む。これら特異的バンドは、図2Bで四角に囲まれている。これらの見かけの分子量は、加熱済及び還元済の条件の場合、AMH-1、AMH-2、AMH-3及びAMH全体コンストラクト(ウェル3、6、8、10)についてそれぞれ約20、30、55及び65kDaである。加熱済且つ非還元済の条件の場合の見かけの分子量は、AMH-1、AMH-2、AMH-3及びAMH全体コンストラクト(ウェル4、7、9、11)についてそれぞれ約36、50、100及び120kDaである。これら分子量の推定値は、非還元条件におけるAMHコンストラクトの二量体化と矛盾しない。重要であるのは、成熟領域の非存在下において、AMH-1及びAMH-2コンストラクトにおいて大量のランダムなC末端トランケーションが生じるにも関わらず、二量体化が起こることである。

20

30

【0122】

結論として、このウェスタンブロット分析は、ヌクレオチド配列により、AMH-1、AMH-2、AMH-3及びAMH全体プラスミドコンストラクトが明らかにヒスチジンタグを含むタンパク質の発現を可能にし、その見かけの分子量が予想された分子量に相当することを示すものである。

【0123】

実施例2: CHO細胞におけるAMHタンパク質の安定な発現及び精製

AMH全体を発現する組み換えCHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞の安定なクローンを、Celllectis社のcGPS CHO-Sa CEMAXキット(Cat. No. CHOSa-0011-05及びCHOSa-0011-10)を使用し、関連するプロトコルに従って得た。このキットは、標的とされる、CHO細胞における外来性遺伝子の染色体内組み込みを可能にする。キットは、cGPS CHO-Sa細胞株(接着細胞)、対象の遺伝子がある中にクローニングされる組み込み型ベクター、メガヌクレアーゼI-Sce Iを恒常的に発現するベクター、及びTransMessengerTM Transfection Reagentキット(Qiagen Cat. No. 301525)から構成される。遺伝的に修飾されたcGPS CHO-Sa細胞株

40

50

は、そのゲノム中に、エンドヌクレアーゼ活性を有するメガヌクレアーゼ I - S c e I によって認識される大きな独特の特定部位を含むという特異性を有している。

【 0 1 2 4 】

2 . 1 . クローニング

C 末端 8 - ヒスチジンタグに結合した全ヒト AMH タンパク質 (a a 1 - 5 6 0) をコードする合成遺伝子を Gene art 社に発注した。この遺伝子を、CHO 宿主での発現のために最適化した。この AMH 遺伝子を、Cell e c t i s 社によって販売される p I M . L P 2 . Z e o 組み込み型ベクターの E c o R I 部位と N o t I 部位の間に、CMV プロモーターの制御下でクローニングした。p I M . L P 2 . Z e o 組み込み型ベクターは、CHO ゲノム内でメガヌクレアーゼ I - S c e I によって認識される独特の部位のそれぞれ上流及び下流の領域と相同の 2 つの領域を含むという特異性を有している。これら 2 つの特定の領域は、AMH をコードする遺伝子が挿入されたマルチクローニングサイトを画定する。さらに、この組み込みプラスミドは、トランスフェクトされた CHO 細胞に 2 つの選択的利点を提供する。1 つ目は、CMV プロモーターによって制御されるゼオシン耐性遺伝子である。2 つ目は、SV 4 0 プロモーターによって制御されるネオマイシン耐性遺伝子である。この遺伝子は、ネオマイシンに近い抗生物質として、ジェネテシン (G 4 1 8) 耐性も可能にする。

10

【 0 1 2 5 】

2 . 2 . トランスフェクション

トランスフェクションの前日 (D - 1)、1 0 c m のペトリ皿一つにつき、 $2 \times 1 0 ^ 5$ 個の c G P S CHO - S a C E M A X 接着細胞を、2 m M の L - グルタミン、ペニシリン (1 0 0 U I / m l)、ストレプトマイシン (1 0 0 μ g / m l)、アンホテリシン B (F o n g i z o n e) (0 . 2 5 μ g / m l) 及び 1 0 % のウシ胎児血清を補った F - 1 2 K 培地中に播種する。

20

【 0 1 2 6 】

トランスフェクション (D) 当日、AMH 遺伝子を含む 1 μ g の組み込み型ベクター (p I M . L P 2 . Z e o) と 1 μ g のメガヌクレアーゼ mRNA とを、E C - R バッファー (T r a n s M e s s e n g e r ^{T M} トランスフェクション試薬キットに含まれる) 中に希釈する。次いで 4 μ l のエンハンサー試薬を加える [核酸 (m g) / エンハンサー (m l) 比 = 1 / 2]。総反応体積は 1 0 0 μ l でなければならない。次いで溶液を 5 分間常温でインキュベートする。次に 1 6 μ l の T r a n s M e s s e n g e r ^{T M} 試薬を加え、次いで混合物全体を 1 0 分間 + 1 8 / 2 5 でインキュベートし、その後 $2 \times 1 0 ^ 5$ 個の細胞上に堆積させる。その培地は事前に 9 0 0 μ l の血清と抗生物質とを含まない F - 1 2 k 培地で置き換えておく。

30

【 0 1 2 7 】

2 . 3 . クローン選択及びクローンの特徴づけ

AMH 組み換えクローンを、ゼオシン及びジェネテシン (G 4 1 8) に対するそれらの耐性に従って選択した。

【 0 1 2 8 】

トランスフェクションの 2 4 時間後 (D + 1)、0 . 6 m g / m l の G 4 1 8 を補った 1 0 m l の完全培地で培地を置き換え、次いで、6 日目 (D + 6) から始めて、0 . 6 m g / m l の G 4 1 8 及び 0 . 4 m g / m l のゼオシンを補った新鮮な培地で定期的に培地を置き換える。トランスフェクションの 1 5 日後 (D + 1 5)、細胞を、9 6 ウェルプレート内で限界希釈する。この細胞クローニングの後、クローンを培養により増幅し、次いで：

40

- AMH 遺伝子の 5 ' 及び 3 ' 末端に特異的なプライマーを用いた、CHO 細胞から抽出したゲノム DNA 上での PCR により、

- AMH タンパク質の発現を検証するためのウェスタンブロット法により試験した。

【 0 1 2 9 】

50

PCR及びウェスタンブロット法の両方でポジティブであったクローンの中から、AMH5 3F1クローンを選択した。このクローンについて、AMH遺伝子の増幅により得られたPCR産物を、遺伝子の一体性を検証するため、及び選択の間に変異が導入されなかったことを確認するために、その全体について配列決定した。

【0130】

2.4. 安定なCHO-AMH5 3F1クローンを用いる組み換えAMHの発現

AMH5 3F1クローンを、225cm²の培養皿で、1% v/vの抗生物質及び抗真菌薬(Gibco Cat. No. 15240)、12mMのL-グルタミン(Gibco Cat. No. 25030)、6g/lのグルコース(Sigma Cat. No. G8769)、0.4mMのクエン酸鉄(Sigma Cat. No. F6129)、2%のヒポキサンチン-チミジン(Gibco Cat. No. 41065)、1%のグリセロール及び1mg/lのペプスタチンA(Sigma Cat. No. P4265)を補った60mlのEx細胞302培地(Sigma Cat. No. 4324C)中、 9×10^6 個の細胞という割合で培養する。培養皿を、インキュベーター内で、7.5% CO₂の雰囲気下において37℃でインキュベートする。4日間の培養(増幅)後、得られた細胞懸濁液(約 6.6×10^6 個の細胞)を、同じプロトコールに従って、7F225培養皿に再度播種する。これら培養物の上清を収集し、次いで5000gで遠心分離し、精製まで-25℃で凍結する。

10

【0131】

2.5. 組み換えAMHタンパク質CHO-AMH5 3F1の精製

以前に収集した培養上清を、解凍し、プールする。次いで5リットルの容積の上清を、0.8µmの膜(Nalgene, VWR Cat. No. 7345084)で、次いで0.22µmの膜(Nalgene aPES Rapid Flow)で濾過する。次いで試料を、30kDaのカットオフ閾値を有する中空ファイバ(GE Cat. No. 564110-18)上で20倍に濃縮する。次いで、約100mlの残余分を、その体積の5倍に対し、100mMのNaCl、1mMのEDTA、0.9g/lのアジドを含む、50mMのカリウムナトリウムホスフェートバッファー(pH7.8)を用いて透析濾過する。2つのComplete EDTAを含まないプロテアーゼ阻害剤のタブレット(Roche Cat. No. 11873580001)を加える。この残余分を、供給者のプロトコール(GE Cat. No. 17-0716-01)に従ってゲル1ml当たり10mgの抗体の割合で、抗AMH(ポリクローナル又はモノクローナル)抗体に連結されたHi-trap NHS Sepharoseカラム上でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。アフィニティークラムをダイアフィルトレーションバッファーで平衡化し、次いで50mlの残余分を0.5ml/分の速度でカラムに注入する。次いで、100mMのNaCl、1mMのEDTAを含む50mMのTris HClバッファー(pH7.9)中において洗浄を行う。次いでAMHタンパク質の溶出を、0.1Mのグリシン-HClバッファー(pH2.9)を用いて、0.5ml/分の速度で実施する。収集された溶出画分は、直ちにpH7-8に中和し、プロテアーゼ阻害剤をそれに加え、画分をプールし、0.5MのNaCl(pH7.5)及び20%のエタノールを含む0.2MのNaHCO₃貯蔵バッファー中に-80℃で貯蔵する。図4は、実施例1.3.のプロトコールによる組み換えAMHタンパク質CHO-AMH5 3F1のSDS-PAGE分析後の膜の写真である。ウェスタンブロットの代わりに、総タンパク質を硝酸銀で染色した。精製されたタンパク質は極めて純粋である。

20

30

40

【0132】

実施例3: マウスの免疫化による本発明の抗AMH抗体の調製

3.1. 免疫原

実施例1で得られたAMH全体及びAMH-3プラスミドを、大腸菌での培養により増幅し、次いでQiagen社のEndoFree Plasmid Mega Kit(Cat. No. 12381)又は同等のキットを用いて精製した。Gene Gunカートリッジ(Bio-Rad)の調製のために、2µgのプラスミドDNAを、CaCl

50

2 及びスペルミジンの存在下で、供給者の指示に従い、0.22 mgの直径1 μmの金ビーズ上に沈殿させた。このように調製されたビーズは、吸湿剤（乾燥サシェ剤）の存在下で暗所で+2/8で貯蔵することができる。

【0133】

実施例2で得られた組み換えAMHタンパク質CHO-AMH53F1を、油中水エマルションの形態で調製された、良好なアジュバント能を有することが知られているフロイントアジュバント（Sigma）と容量を合わせて混合した。このような調製は、各注入の前にその場で実施された。

【0134】

3.2. 免疫化

免疫化実験を、最初の免疫化の時点で週齢六から八の雌BALB/c（H-2^d）マウスにおいて実施した。種々のプロトコールを実施する：

- ・0、2、4及び6週の4回でAMH DNA全体の注入1回当たり4 μgを投与
- ・0、2、4及び6週の4回でAMH-2 DNAの注入1回当たり4 μgを投与
- ・0、2、4及び6週の4回でAMH-3 DNAの注入1回当たり4 μgを投与
- ・0、2、及び4週の3回でAMHタンパク質の注入1回当たり10 μgを投与

【0135】

DNA免疫化の場合、マウスの腹部の毛を刈り込んだ。Helios Gene Gun Delivery System（Bio-Rad）を2750 kPaの圧力で使用し、DNAでコーティングした金ビーズをマウスの皮膚に注入した。タンパク質免疫化のために、注入は皮下に行われた。

【0136】

抗体の外観を監視するために、マウスから周期的に血液試料を採取する。これら血清中の抗AMH抗体の存在を、96ウェルマイクロプレートでELISAを実施することにより試験する。組み換えAMHタンパク質CHO-AMH53F1が捕捉モードで使用される（1 μg/ウェル）；飽和後、この抗原を、試験する血清の様々な希釈液と反応させる（37で1時間のインキュベーション）。血清中に存在する抗AMH抗体を、求める抗体（0.1 μg/ウェル）に結合するアルカリホスフェートにコンジュゲートしたAffiniPureヤギ抗マウスIgG抗体（H+L、Jackson ImmunoResearch、Cat No. 115-055-146）を使用して明らかした。免疫化したマウスの中で、抗AMH抗体を生じたマウスはこのように同定される。

【0137】

1回目の注入後50から70日の間に、抗AMH体液性反応を生じたマウスを、100 μgのAMHタンパク質の静脈内注入により再度刺激した。

【0138】

3.3. ハイブリドーマの調製

この最後の注入の三日後、反応したマウスを屠殺した：血液及びスプライン（spleen）を除去した。スプライン（spleen）から得られた脾細胞を、それらが融合して不死化するよう、Kohler and Milsteinによって記載されたプロトコール（Kohler and Milstein 1975, Kohler et al., 1976）に従って、Sp2/0-Ag14骨髄腫細胞で培養した。12-14日の培養期間の後、得られたハイブリドーマの上清をスクリーニングして、上記セクションに記載したELISAアッセイを用いて抗AMH抗体の存在を決定した。

【0139】

3.4. ヒトAMHタンパク質の157-255領域又は256-451領域を認識するハイブリドーマの上清の選択

ウサギ抗6ヒスチジン抗体（Sigma Aldrich、Cat. No. SAB4301134又は等価物）を、1X PBSに希釈し、+18/25で一晩インキュベートすることにより、96ウェルマイクロタイトレーションプレートに1 μg/ウェルの割合で吸着させた。次いでプレートを、PBS-0.05%のTween 20バッファー（

10

20

30

40

50

PBS-T) 中で3回洗浄し、次いで、10g/lのBSAを含むPBS-Tバッファー中でのインキュベーションによりパッシベートし、再びPBS-Tバッファー中で3回洗浄した。

【0140】

実施例1で得られ、-80℃で貯蔵した溶解物を、解凍し、1X PBSバッファー中において1/2と1/10の間に希釈する。100μlの各溶解物(ネガティブコントロール、AMH-1、AMH-2、AMH-3及びAMH全体)を、プレートの複数のウェルに分配し、2時間37℃でインキュベートする。次いでプレートを空にし、300mMのNaClを含むPBS-Tバッファー中で4回洗浄する。次いで、試験するハイブリドーム上清(100μl)を5つの異なる溶解物の各々に加え、1時間37℃でインキュベートする。300mMのNaClを含むPBS-T中で4回の洗浄を行うさらなる工程の後、ヤギにおいて生成され、ペルオキシダーゼにコンジュゲートさせたAffiniPure抗マウスIgGである二次抗体(H+L、Jackson ImmunoResearch、Cat No. 115-035-166)を加える。300mMのNaClを含むPBS-T中で3回の洗浄を行うさらなる工程の後、SureBlueTM TMB Microwell Peroxidase基質(KLP、Cat. No. 52-00-01)の存在下で10分間+18/25℃でプレートをインキュベートすることにより反応を可視化する。プレートは、450及び630nmでODを測定することにより読み取る。

10

【0141】

157-255領域を認識するハイブリドームの上清の選択：ELISAの結果から選択されたハイブリドームは、その上清が、AMH-2溶解物を認識するがAMH-1溶解物を認識しない抗体を含むものである。言うまでもなく、AMH-3及びAMH全体溶解物も、選択されたハイブリドームの上清によって認識される。このようにして5G5-1B11ハイブリドームが選択された。

20

【0142】

256-451領域を認識するハイブリドームの上清の選択：ELISAの結果から選択されたハイブリドームは、その上清が、AMH-3溶解物を認識するがAMH-2溶解物又はAMH-1溶解物を認識しない抗体を含むものである。言うまでもなく、AMH全体溶解物も、選択されたドームの上清によって認識される。このようにして3H8、4C7及び4G10ハイブリドームが選択された。

30

【0143】

選択後、クローナリティを確認するために、選択されたハイブリドームを、当業者に周知の限界希釈技術に従ってクローニングした。このようにして、以下の抗AMH抗体を分泌するモノクローナルハイブリドームを取得することができた：

- ヒトAMHの157-255領域を認識する5G5A10及び1B11B1、
- ヒトAMHの256-451領域を認識する3H8E2、4C7E12及び4G10E12。

【0144】

Falkenberg(1998)による出版物から得られるプロトコルに従ってminiPERMTM バイオリアクター中でハイブリドームを培養することにより、モノクローナル抗体の大規模生産を実施した。次いで、モノクローナル抗体を、プロテインA上でのアフィニティークロマトグラフィーにより培養上清から精製した。

40

【0145】

実施例4：非線状エピトープを認識する抗AMHモノクローナル抗体の選択

実施例3で得られたモノクローナル抗体の中から、非線状エピトープを認識するものを選択するために、線状エピトープ対して向けられたものを決定した。これを行うために、ヒトAMHのアミノ酸配列の全体をカバーする80個の合成ペプチドを合成した。抗体の、これらペプチドの各々に対する結合を、ELISAにより試験した。

【0146】

50

4.1. ペプチド合成

16個のアミノ酸の80個のペプチドを合成した。16個のアミノ酸のうち12個がAMH配列に対応し且つアミノ酸と5個だけ重複していることにより、ヒトAMH配列（アミノ酸1-560）の全体がカバーされる。ビオチン、次いでSGSG配列（スペーサーアーム）を、ELISAによるこれらペプチドの分析を容易にするために、N末端に加えた。これらペプチドは、精製せず、溶液中におく（水/アセトニトリル）。これらをLC/MS質量分析により検証した。合成された配列を表6に示す。

【0147】

表6. ヒトAMHペプチドの配列

ペプチド No.	AMHペプチド (配列番号)	位置	全配列
1	MRDLPLTSLALV (配列番号 90)	1-12	Bio-SGSG-MRDLPLTSLALV-アミノ
2	SLALVLSALGAL (配列番号 91)	8-19	Bio-SGSG-SLALVLSALGAL-アミノ
3	ALGALLGTEALR (配列番号 92)	15-26	Bio-SGSG-ALGALLGTEALR-アミノ
4	TEALRAEPAVG (配列番号 93)	22-33	Bio-SGSG-TEALRAEPAVG-アミノ
5	EPAVGTSGLIFR (配列番号 94)	29-40	Bio-SGSG-EPAVGTSGLIFR-アミノ
6	GLIFREDLDWPP (配列番号 95)	36-47	Bio-SGSG-GLIFREDLDWPP-アミノ
7	LDWPPGSPQEPL (配列番号 96)	43-54	Bio-SGSG-LDWPPGSPQEPL-アミノ
8	PQEPLCLVALGG (配列番号 97)	50-61	Bio-SGSG-PQEPLCLVALGG-アミノ
9	VALGGDSNGSSS (配列番号 98)	57-68	Bio-SGSG-VALGGDSNGSSS-アミノ
10	NGSSSPLRVVGA (配列番号 99)	64-75	Bio-SGSG-NGSSSPLRVVGA-アミノ
11	RVVGALSAYEQA (配列番号 100)	71-82	Bio-SGSG-RVVGALSAYEQA-アミノ

10

20

30

40

12	AYEQAF LGAVQR (配列番号 101)	78-89	Bio-SGSG-AYEQAF LGAVQR-アミノ酸
13	GAVQRARWGPRD (配列番号 102)	85-96	Bio-SGSG-GAVQRARWGPRD-アミノ酸
14	WGPRDLATFGVC (配列番号 103)	92-103	Bio-SGSG-WGPRDLATFGVC-アミノ酸
15	TFGVCNTGDRQA (配列番号 104)	99-110	Bio-SGSG-TFGVCNTGDRQA-アミノ酸
16	GDRQAALPSLRR (配列番号 105)	106-117	Bio-SGSG-GDRQAALPSLRR-アミノ酸
17	PSLRRLGAWLRD (配列番号 106)	113-124	Bio-SGSG-PSLRRLGAWLRD-アミノ酸
18	AWLRDPGGQRLV (配列番号 107)	120-131	Bio-SGSG-AWLRDPGGQRLV-アミノ酸
19	GQRLVVLHLEEV (配列番号 108)	127-138	Bio-SGSG-GQRLVVLHLEEV-アミノ酸
20	HLEEV TWEPTPS (配列番号 109)	134-145	Bio-SGSG-HLEEV TWEPTPS-アミノ酸
21	EPTPSLR FQEPP (配列番号 110)	141-152	Bio-SGSG-EPTPSLR FQEPP-アミノ酸
22	FQEPPPGGAGPP (配列番号 111)	148-159	Bio-SGSG-FQEPPPGGAGPP-アミノ酸
23	GAGPPELALLVL (配列番号 112)	155-166	Bio-SGSG-GAGPPELALLVL-アミノ酸
24	ALLVLYPGGPGE (配列番号 113)	162-173	Bio-SGSG-ALLVLYPGGPGE-アミノ酸

10

20

30

40

25	GPGPEVTVTRAG (配列番号 114)	169-180	Bio-SGSG-GPGPEVTVTRAG-アミノ
26	VTRAGLPGAQSL (配列番号 115)	176-187	Bio-SGSG-VTRAGLPGAQSL-アミノ
27	GAQSLCPSRDTR (配列番号 116)	183-194	Bio-SGSG-GAQSLCPSRDTR-アミノ
28	SRDTRYLVLAVD (配列番号 117)	190-201	Bio-SGSG-SRDTRYLVLAVD-アミノ
29	VLAVDRPAGAWR (配列番号 45)	197-208	Bio-SGSG-VLAVDRPAGAWR-アミノ
30	AGAWRGSLALT (配列番号 118)	204-215	Bio-SGSG-AGAWRGSLALT-アミノ
31	GLALTLQPRGED (配列番号 119)	211-222	Bio-SGSG-GLALTLQPRGED-アミノ
32	PRGEDSRLSTAR (配列番号 46)	218-229	Bio-SGSG-PRGEDSRLSTAR-アミノ
33	LSTARLQALLFG (配列番号 120)	225-236	Bio-SGSG-LSTARLQALLFG-アミノ
34	ALLFGDDHRCFT (配列番号 121)	232-243	Bio-SGSG-ALLFGDDHRCFT-アミノ
35	HRCFTRMTPALL (配列番号 47)	239-250	Bio-SGSG-HRCFTRMTPALL-アミノ
36	TPALLLLPRSEP (配列番号 122)	246-257	Bio-SGSG-TPALLLLPRSEP-アミノ
37	PRSEPAPLPAHG (配列番号 123)	253-264	Bio-SGSG-PRSEPAPLPAHG-アミノ

10

20

30

40

38	LPAHGQLDTPVF (配列番号 61)	260-271	Bio-SGSG-LPAHGQLDTPVF-アミノ
39	DTPVFPPRPSA (配列番号 124)	267-278	Bio-SGSG-DTPVFPPRPSA-アミノ
40	PRPSAELEESPP (配列番号 125)	274-285	Bio-SGSG-PRPSAELEESPP-アミノ
41	EESPPSADPFLE (配列番号 126)	281-292	Bio-SGSG-EESPPSADPFLE-アミノ
42	DPFLETLTRLVR (配列番号 127)	288-299	Bio-SGSG-DPFLETLTRLVR-アミノ
43	TRLVRALRVPPA (配列番号 128)	295-306	Bio-SGSG-TRLVRALRVPPA-アミノ
44	RVPPARASAPRL (配列番号 129)	302-313	Bio-SGSG-RVPPARASAPRL-アミノ
45	SAPRLALDPDAL (配列番号 130)	309-320	Bio-SGSG-SAPRLALDPDAL-アミノ
46	DPDALAGFPQGL (配列番号 131)	316-327	Bio-SGSG-DPDALAGFPQGL-アミノ
47	FPQGLVNLSDPA (配列番号 132)	323-334	Bio-SGSG-FPQGLVNLSDPA-アミノ
48	LSDPAALERLLD (配列番号 62)	330-341	Bio-SGSG-LSDPAALERLLD-アミノ
49	ERLLDGEEPLLL (配列番号 63)	337-348	Bio-SGSG-ERLLDGEEPLLL-アミノ
50	EPLLLLLRPTAA (配列番号 64)	344-355	Bio-SGSG-EPLLLLLRPTAA-アミノ

10

20

30

40

51	RPTAATTGDPAP (配列番号 133)	351-362	Bio-SGSG-RPTAATTGDPAP-アミド
52	GDPAPLHDPTSA (配列番号 65)	358-369	Bio-SGSG-GDPAPLHDPTSA-アミド
53	DPTSAPWATALA (配列番号 66)	365-376	Bio-SGSG-DPTSAPWATALA-アミド
54	ATALARRVAAEL (配列番号 134)	372-383	Bio-SGSG-ATALARRVAAEL-アミド
55	VAAELQAAAAEL (配列番号 135)	379-390	Bio-SGSG-VAAELQAAAAEL-アミド
56	AAAELRSLPGLP (配列番号 136)	386-397	Bio-SGSG-AAAELRSLPGLP-アミド
57	LPGLPPATAPLL (配列番号 137)	393-404	Bio-SGSG-LPGLPPATAPLL-アミド
58	TAPLLARLLALC (配列番号 138)	400-411	Bio-SGSG-TAPLLARLLALC-アミド
59	LLALCPGGPGGL (配列番号 139)	407-418	Bio-SGSG-LLALCPGGPGGL-アミド
60	GPGGLGDPLRAL (配列番号 140)	414-425	Bio-SGSG-GPGGLGDPLRAL-アミド
61	PLRALLLKKALQ (配列番号 141)	421-432	Bio-SGSG-PLRALLLKKALQ-アミド
62	LKALQGLRVEWR (配列番号 67)	428-439	Bio-SGSG-LKALQGLRVEWR-アミド
63	RVEWRGRDPRGP (配列番号 68)	435-446	Bio-SGSG-RVEWRGRDPRGP-アミド

10

20

30

40

64	DPRGPGRAQRSA (配列番号 142)	442-453	Bio-SGSG-DPRGPGRAQRSA-アミノ
65	AQRSAGATAADG (配列番号 143)	449-460	Bio-SGSG-AQRSAGATAADG-アミノ
66	TAADGPCALREL (配列番号 144)	456-467	Bio-SGSG-TAADGPCALREL-アミノ
67	ALRELSVDLRAE (配列番号 145)	463-474	Bio-SGSG-ALRELSVDLRAE-アミノ
68	DLRAERSVLIPE (配列番号 146)	470-481	Bio-SGSG-DLRAERSVLIPE-アミノ
69	VLIPETYQANNC (配列番号 147)	477-488	Bio-SGSG-VLIPETYQANNC-アミノ
70	QANNCQVCGWP (配列番号 148)	484-495	Bio-SGSG-QANNCQVCGWP-アミノ
71	VCGWPQSDRNPR (配列番号 149)	491-502	Bio-SGSG-VCGWPQSDRNPR-アミノ
72	DRNPRYGNHVVL (配列番号 150)	498-509	Bio-SGSG-DRNPRYGNHVVL-アミノ
73	NHVVLLLKMQVR (配列番号 151)	505-516	Bio-SGSG-NHVVLLLKMQVR-アミノ
74	KMQVRGAALARP (配列番号 152)	512-523	Bio-SGSG-KMQVRGAALARP-アミノ
75	ALARPPCCVPTA (配列番号 153)	519-530	Bio-SGSG-ALARPPCCVPTA-アミノ
76	CVPTAYAGKLLI (配列番号 154)	526-537	Bio-SGSG-CVPTAYAGKLLI-アミノ

10

20

30

40

77	GKLLISLSEERI (配列番号 155)	533-544	Bio-SGSG-GKLLISLSEERI-アミド
78	SEERISAHHVPN (配列番号 156)	540-551	Bio-SGSG-SEERISAHHVPN-アミド
79	HHVPMVATECG (配列番号 157)	547-558	Bio-SGSG-HHVPMVATECG-アミド
80	VPNMVATECGCR (配列番号 158)	549-560	Bio-SGSG-VPNMVATECGCR-アミド

10

【 0 1 4 8 】

4 . 2 . E L I S A

96 ウェルマイクロプレートを、1 X P B S バッファー中のストレプトアビジン (1 0 μ g / m l 、 1 μ g / ウェル) で 1 時間 3 7 ° でコーティングし、次いで 1 0 g / l の B S A を含む P B S - 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 バッファー (P B S - T) 中において一晩常温でパッシベートする。パッシベーション溶液を除去し、次いでビオチン化ペプチドを分配し (1 X P B S バッファー中 1 0 μ g / m l 、 1 ウェル当たり 1 μ g) 、 1 時間 3 7 ° でインキュベートする。P B S - T 中で 4 回洗浄した後、試験するモノクローナル抗体を 1 μ g / m l の濃度で加える。1 時間 3 0 分にわたる 3 7 ° でのインキュベーション及び 4 回の P B S - T による洗浄後、ペルオキシダーゼコンジュゲート抗マウス I g G 抗体を加える。T M B 基質を用いて可視化を実施し、その際 4 5 0 n m での光学濃度 (O D) が測定される。

20

【 0 1 4 9 】

E L I S A フォーマットを検証するために、市販の抗 A M H 抗体をポジティブコントロールとして使用した。これは、A n s h L a b s 社の A A 0 1 1 クローンである。この抗体は、ペプチド 5 2 (配列番号 1 3 7) を特異的に認識し、得られる O D シグナルは 1 を上回る。実施例 3 で得られた 5 個のモノクローナル抗体の中で、4 C 7 E 1 2 クローンもペプチド 5 2 を認識する。したがって、4 C 7 E 1 2 クローンは A A 0 1 1 クローンと同じエピトープを認識する。これは保持されない。モノクローナル抗体 5 G 5 A 1 0 、 1 B 1 1 B 1 、 3 H 8 E 2 及び 4 G 1 0 E 1 2 は、試験した 8 0 個の A M H ペプチドをいずれも認識しない。したがって、これらのエピトープは線形でない。生物学的試料中の A M H タンパク質の定量化方法を開発するために選択されたのは、これら四つの非線状抗体、即ち 5 G 5 A 1 0 、 1 B 1 1 B 1 、 3 H 8 E 2 及び 4 G 1 0 E 1 2 である。

30

【 0 1 5 0 】

実施例 5 : 抗 A M H 抗体 5 G 5 A 1 0 、 1 B 1 1 B 1 、 3 H 8 E 2 及び 4 G 1 0 E 1 2 の特徴づけ

40

5 . 1 . E L I S A による抗 A M H 抗体 5 G 5 A 1 0 、 1 B 1 1 B 1 、 3 H 8 E 2 及び 4 G 1 0 E 1 2 の捕捉能力の比較

2 0 0 m M の T r i s (p H 6 . 2) 中で 5 μ g / m l に希釈した捕捉抗体 (5 G 5 A 1 0 、 1 B 1 1 B 1 、 3 H 8 E 2 及び 4 G 1 0 E 1 2) を、9 6 ウェルマイクロタイトレーションプレートに 0 . 5 μ g / ウェルの割合で分配し、1 時間 3 0 分にわたり 3 7 ° でインキュベートする。次いでプレートを P B S - 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 バッファー (P B S - T) 中において 3 回洗浄し、次いで 1 0 g / l の B S A を含む P B S - T バッファー中での 2 時間のインキュベーションによりパッシベートし、再度 P B S - T バッ

50

ァー中で3回洗浄する。

【0151】

実施例1で得られ、-80℃で貯蔵した溶解物を、解凍し、1X PBS中において1/20に希釈する。100µlの各溶解物（ネガティブコントロール、AMH-1、AMH-2、AMH-3及びAMH全体）を、分配し、一晚37℃でインキュベートする。次いでプレートを空にし、300mMのNaClを含むPBS-Tバッファー中で4回洗浄する。パッシベーションバッファー中で1/1000に希釈したビオチン化抗ヒスチジン抗体（Qiagen Cat. No. 34440）を、分配し、次いで1時間30分にわたり37℃でインキュベートする。再度プレートを3回洗浄した後、パッシベーションバッファー中で1/2000に希釈したストレプトアビジン-ペルオキシダーゼコンジュゲート（Jackson ImmunoResearch Cat. No. 016-030-034）と共に1時間30分にわたり37℃でインキュベートする。PBS-T中で3回の洗浄を行うさらなる工程の後、SureBlueTM TMB Microwell Peroxidase基質（KLP、Cat. No. 52-00-01）の存在下においてプレートを10分間+18/25℃でインキュベートすることにより、反応を可視化する。プレートを、450及び630nmでのODを測定することにより読み取る。

10

【0152】

得られた結果を表7に示す。PBS及びプラスミドなしでトランスフェクトされた溶解物であるネガティブコントロールについて測定されたOD値は最大で0.28であり、これは非特異的シグナルに相当する。

20

【0153】

表7. 抗AMH抗体の捕捉能力（OD_{450nm}の値）

	Ab 1B11B1		Ab 5G5A10		Ab 3H8E2		Ab 4G10E12	
PBS 初 ^o タイプ ^o コントロール	0.129	0.141	0.196	0.246	0.137	0.132	0.178	0.122
溶解物初 ^o タイプ ^o コントロール	0.199	0.189	0.210	0.223	0.165	0.159	0.168	0.281
AMH-1 溶解物	0.221	0.236	0.257	0.266	0.244	0.198	0.218	0.203
AMH-2 溶解物	4.244	4.246	4.316	4.191	0.176	0.197	0.184	0.168
AMH-3 溶解物	3.683	3.774	3.186	3.365	1.859	1.815	1.801	1.622
AMH 全体溶解物	3.184	3.351	3.296	3.360	1.667	1.711	2.132	1.812

30

40

【0154】

表7の結果は、1B11B1及び5G5A10抗体が、AMH-2、AMH-3及びAMH全体の溶解物を捕捉することを示している（OD>3）。3H8E2及び4G10E12抗体は、AMH-3及びAMH全体溶解物を捕捉する（OD>1.6）。AMH-1溶解物（アミノ酸1-156）は、試験したモノクローナル抗体のうちのいずれによっても捕捉されない。

【0155】

さらに、ヒトAMHタンパク質の157-255領域を認識する1B11B1及び5G5A10抗体は、256-451領域を認識する3H8E2及び4G10E12抗体の捕捉能力を上回る同能力を有している。実際、認識の場合（表7の網掛け部分）、いずれの

50

溶解物についても、1 B 1 1 B 1 及び 5 G 5 A 1 0 抗体に得られた OD 値は、3 H 8 E 2 及び 4 G 1 0 E 1 2 抗体によって得られたものよりも高い。したがって、捕捉モードでは、1 B 1 1 B 1 抗体又は 5 G 5 A 1 0 抗体を優先的に用いることが賢明であろう。

【 0 1 5 6 】

5.2. ウェスタンブロット特徴づけ

抗 AMH モノクローナル抗体の反応性のよりよい特徴づけを行うために、ウェスタンブロット分析を実施した。

【 0 1 5 7 】

タンパク質の精製：AMH - 2 及び AMH - 3 コンストラクトをコードするプラスミドとさらにはネガティブコントロール（プラスミドなし）を用いる実施例 1 のプロトコールに従って、トランスフェクションを実施した。培養上清を収集し、その中で見つかる AMH タンパク質を、それらのポリヒスチジンタグを利用して、バッチ単位の金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。これを行うために、トランスフェクション上清を、260 mM の NaCl を含む 11 mM のリン酸バッファー（pH 7.4）中で平衡化した Ni - NTA 樹脂（Roche, Cat. No. 115-26-70）と共に、一晚 + 2 / 8 で攪拌しながらインキュベートする。次いでこの樹脂を、3000 g での 3 分間の遠心分離により収集し、吸収されない物質を含む上清を除去する。平衡化バッファーで 3 回洗浄した後、タンパク質を、130 mM の NaCl（pH 7.4）を含み、且つ 500 mM のイミダゾール、及びプロテアーゼ阻害剤を含む 5.5 mM のリン酸バッファーで溶出し、その pH を 7.6 に調節する。溶出は、+ 2 / 8 で攪拌しながら一晚インキュベートすることにより実施する。次いで AMH を含む上清を、3000 g . で 3 分間樹脂を遠心分離した後に収集する。この精製工程は、AMH タンパク質を濃縮するため、及び特に、SDS - PAGE ゲルの移動を妨害する上清中に存在する大量の BSA を除去するために必要である。

【 0 1 5 8 】

ウェスタンブロット：この分析は、抗ヒスチジン抗体を使用して又はそれを抗 AMH 抗体に置き換えて（1つの膜につき 1 µg）、実施例 1、セクション 1.3 に記載されたプロトコールに従って実施された。

【 0 1 5 9 】

結果：この分析の結果を図 3 に示す。試料は、加熱後、還元せずに分析した。二つの精製済みタンパク質 AMH - 2 及び AMH - 3 が、抗ヒスチジン抗体（図 3 A）を用いて可視化された膜上に示されている。予想通り、ネガティブコントロールウェルに反応性は観察されない。試験される抗 AMH 抗体はすべて AMH - 3 タンパク質を認識するが、AMH - 2 タンパク質も認識するのは 1 B 1 1 B 1 クローンのみであり、しかもその反応性は AMH - 3 の場合よりずっと低い。4 G 1 0 E 1 2 及び 3 H 8 E 2 のクローンの場合、この結果は、ELISA によって得られる結果と一致する。実際、これら抗体の結合ゾーンは、AMH - 2 コンストラクトには存在しない AMH の 256 - 451 領域内にある。ELISA により、1 B 1 1 B 1 及び 5 C 5 A 1 0 のクローンは同様の反応性を呈し、AMH - 2 及び AMH - 3 を良好に認識する。抗 - His 抗体で可視化された膜上に見ることができるように、ウェスタンブロットにより、1 B 1 1 B 1 0 抗体は、AMH - 3 には強いシグナルを出し、AMH - 2 に得られるシグナルは、タンパク質が同等の量で存在しているにもかかわらず、それよりもずっと弱い。このことから、部分的変性技術であるウェスタンブロット法が、AMH - 2 タンパク質の抗原性の試験に適していないと結論付けることができる。ELISA により極めて良好な反応性を示す 5 G 5 A 1 0 抗体は、ウェスタンブロット法ではシグナルをほとんど又はまったく出さない。この実験条件下における AMH - 3 との結合が弱いことを考慮すると、AMH - 2 との反応性がまったく観察されないことは普通である。全体として、この実験は、5 G 5 A 1 0 又はある程度において 1 B 1 1 B 1 などの熱変性に感受性の非線状抗体の認識の研究に、ウェスタンブロット法が適さないことを示している。したがって、文献において抗 AMH 抗体に対してウェスタンブロット法により実施される分析は、十分に注意して解釈しなければならず、可能であれば、ウェスタ

ンプロット法よりもELISAによる分析が好ましい。

【0160】

実施例6：サンドイッチイムノアッセイ法によるAMHの検出

市販のAMHキットで、試料が採取された後アッセイが実施されるまでの時間の関数として試料について取得される濃度の間には、有意な差が観察された。この種の変動性は、臨床においては受け入れられず、したがって、測定されるAMH濃度が正確で再現性を有し、アッセイの前に試料を+2/8又は-19/-31で貯蔵することができる頑強なキットが利用可能であることが必須である。このようなアッセイが、ヒトAMHのアミノ酸157-255に向けられた抗体を選択することにより実施された。

【0161】

6.1. 自動化イムノアッセイの手順

VIDAS（登録商標）自動免疫分析機器（bioMérieux）を用いる一工程式のサンドイッチイムノアッセイ法により、生物学的試料中におけるAMHの検出を実施した。単回使用チップは、反応の固体相及びそのピペットシステムの両方として作用する。この自動機器のカートリッジは、シール及び標識されたアルミニウム箔で覆われた10個のウェル（X0からX9）から構成される。第1のウェル（X0）は、試料の導入を容易にするために事前にカットされた部分を含む。最後のウェル（X9）は、その中で基質の蛍光光度が測定される光学キュベットである。分析に必要とされる種々の試薬が中間ウェルに収容される。アッセイのすべての工程は、このようにして、機器により自動的に実施される。それらは反応媒体の吸引/放出のサイクルの連続からなる。

【0162】

チップの感受性増加及びパッシベーション：それぞれTrisバッファー（pH6.2）中、7µg/mlで、C1対については5G5A10モノクローナル抗体の又はC2対については8C5B10H5モノクローナル抗体の、270µlの溶液を用いて、チップの感受性を増加させた。感光液と共に+18/25で約20時間インキュベートした後、チップを空にした。次いで、5g/lのウシアルブミンを含むこれと同じ溶液300µlを加え、+18/25で約20時間チップのパッシベーションを行った。次いでチップを空にし、乾燥させ、その後使用まで防湿して+4で貯蔵する。

【0163】

コンジュゲート抗体溶液の調製：C1対の場合、コンジュゲート溶液は、アルカリホスファターゼに結合した、Fab'断片の形態の4G10E12モノクローナル抗体を含む。C2対の場合、コンジュゲート溶液は、アルカリホスファターゼに結合した、Fab'断片の形態の5G5A10モノクローナル抗体を含む。コンジュゲートした抗体は、Tris/NaCl BSAバッファー（pH6.5）中において約0.1µg/mlに希釈された。

【0164】

イムノアッセイ：VIDAS（登録商標）チップが試料と接触するとすぐに、捕捉抗体がこのチップに固定化されているため、免疫反応が開始される。自動機器は試験試料（89.6µl）を226µlのコンジュゲート溶液と混合する。インキュベーションは約10分間37で続き、AMHの、一方でコーンに吸着された抗体に対する特異的結合を、他方でコンジュゲートした抗体（検出抗体）への結合を可能にする。次いで未結合成分を、154mMのNaCl及び0.55%のTween 20を含む54mMのTrisバッファー（pH7.3）での3回の洗浄により除去する。最後の可視化工程の間に、4-メチルウンベリフェリルホスフェート基質を吸引し、次いでチップ中に放出する；コンジュゲート抗体の酵素は、この基質の4-メチルウンベリフェロンへの加水分解のための反応を触媒し、それにより発せられる蛍光光度を450nmで測定する。蛍光光度シグナルの値（RFV = 相対的蛍光光度値）は、試料中に存在する抗原の濃度に比例する。

【0165】

6.2. 種々の貯蔵条件を経た試料のAMHアッセイ

年齢19から52の女性に由来する天然試料の8つのプールを、市販のAMH Gen

10

20

30

40

50

II Assayキット (Beckman Coulter) 及び二対の抗体 (C1 及び C2) を VIDAS (登録商標) 自動機器に用いて並行してアッセイした。各試料プールは、ローヌアルプス地域圏の Etablissement Francais du Sang (EFS) [フランス国血液銀行] から得た女性由来の3つの血清からなる。
【0166】

これら試料を、試料採取後4時間以内に (時間 T0 に対応)、次いで、+2/8 で24時間貯蔵後、+2/8 で7日間貯蔵後、及び-19/-31 で7日間貯蔵後に (これら試料の種々の貯蔵条件に対応) 試験した。
【0167】

マイクロプレート形態のキットの場合、それぞれの用量を、生産者により推奨されるレンジの関数として計算した。次いで、T0において得られた用量に対する各貯蔵条件について得られた用量の比を計算した。VIDAS (登録商標) 自動機器の場合、各貯蔵条件について、2対の抗体の各々に得られた蛍光光度シグナル (RFV = 相対的蛍光光度値) を使用して、T0で得られた蛍光光度シグナルに対する比を計算した。得られた結果を表8に示す。
【0168】

表8: 種々の条件下での貯蔵後とT0におけるAMH容量又はシグナルの比 (T / T0比)

	+2/8°Cで24時間			+2/8°Cで7日間			-19/-31°Cで7日間		
	C1	C2	REF	C1	C2	REF	C1	C2	REF
プール001	0.99	1.00	1.10	0.95	1.06	1.14	0.98	0.99	1.20
プール002	0.98	1.04	1.27	0.96	1.13	1.20	0.99	1.03	1.30
プール003	0.98	1.00	1.14	0.96	1.04	1.05	1.01	1.02	1.07
プール004	1.01	0.99	1.58	0.97	1.08	1.57	0.99	1.02	1.73
プール005	0.96	1.02	1.46	0.95	1.09	1.33	0.97	1.01	1.24
プール006	1.00	1.01	1.35	0.97	1.10	1.40	0.97	0.99	1.35
プール007	0.97	1.03	1.43	0.96	1.11	1.66	0.95	1.01	1.51
プール008	0.99	1.06	1.34	0.95	1.07	1.34	1.00	1.03	1.35
平均	0.99	1.02	1.33	0.96	1.09	1.34	0.98	1.01	1.34
最小	0.96	0.99	1.10	0.95	1.04	1.05	0.95	0.99	1.07
最大	1.01	1.06	1.58	0.97	1.13	1.66	1.01	1.03	1.73

C1: 捕捉抗体としての5G5A10及び検出抗体としての4G10E12を用いたV

I D A S (登録商標) アッセイ ; C 2 : 捕捉抗体としての 8 C 5 B 1 0 H 5 及び検出抗体としての 5 G 5 A 1 0 を用いた V I D A S (登録商標) アッセイ ; R E F : A M H G e n I I マイクロプレートアッセイ

【 0 1 6 9 】

T / T 0 比が 1 に近づく程、経時的に又は貯蔵条件に従って、検出される A M H の量の変動性は小さくなる。C 1 又は C 2 対を用いる A M H アッセイは、先行する試料の貯蔵条件に関係なく常に同じ結果を生じる : 試料を + 2 / 8 で 2 4 時間貯蔵したとき、T / T 0 比は、平均で 0 . 9 9 (C 1) 及び 1 . 0 2 (C 2) である。これら値は極めて 1 に近く、一方参照キットは平均比 1 . 3 3 を呈し、これは、測定される用量が平均して 1 . 3 3 倍となることを示す。同じ種類の観察を、試験される他の貯蔵条件について行う。

10

【 0 1 7 0 】

つまり、5 G 5 A 1 0 抗体はヒト A M H の 1 5 7 - 2 5 5 ゾーンの非線状エピトープを認識し、4 G 1 0 E 1 2 抗体はヒト A M H の 2 5 6 - 4 5 1 ゾーンの非線状エピトープを認識し、8 C 5 B 1 0 H 5 抗体は A M H の成熟領域内の線状エピトープを認識し (ヒト A M H の 5 0 8 - 5 1 9) 、 A M H G e n I I A s s a y キットの抗体は共に成熟領域の線状エピトープに向けられる。

【 0 1 7 1 】

抗体対 C 1 及び C 2 は、頑強で、その結果が先行する試料の貯蔵条件により変動しない A M H イムノアッセイの開発を可能にする。

【 0 1 7 2 】

実施例 7 : V I D A S (登録商標) A M H の分析感度

実施例 6 に記載された V I D A S (登録商標) A M H イムノアッセイ (対 C 1) の分析感度を、先行技術によるアッセイのそれと比較した。同様の条件下でそれら抗体対を比較できるように、実験全体を、V I D A S (登録商標) 自動機器で実施した。チップを、実施例 6 において説明した手順に従って、5 G 5 A 1 0 抗体 (A M H のプロ領域の C 末端部分を認識する抗体) 、又は A A 0 1 2 抗体 (市販の抗体 - A n s h L a b s) でコーティングした。検出工程のために、二つのコンジュゲート、即ち 4 G 1 0 E 1 2 抗体と A A 0 1 1 抗体 (市販の抗体 - A n s h L a b s) とを比較した。両者は、実施例 6 の手順によりアルカリホスファターゼにコンジュゲートした。4 G 1 0 E 1 2 コンジュゲートは 1 8 0 n g / m l で、A A 0 1 1 コンジュゲートは 5 0 0 n g / m l で、それぞれ使用した。このように、A M H のプロ領域の C 末端部分を認識する 4 G 1 0 E 1 2 コンジュゲートは、市販の抗体と比較してずっと少ない量で使用される。このことは完全に予想外である。

20

30

【 0 1 7 3 】

0 . 0 5 5 から 1 1 n g / m l にわたる A M H の標準レンジを、A M H 濃度が既知である血清を、閉経期の女性由来の血清中において希釈することにより調製し (無視できる A M H 濃度) 、次いで以下 3 つのアッセイフォーマットを用いて測定した :

対 C 1 : 捕捉 5 G 5 A 1 0 + 検出 4 G 1 0 E 1 2

A n s h L a b s 対 : 捕捉 A A 0 1 2 + 検出 A A 0 1 1

混合対 : 捕捉 5 G 5 A 1 0 + 検出 A A 0 1 1

結果を表 9 に示す。

40

【 0 1 7 4 】

表9. 標準レンジでの、VIDAS（登録商標）による種々の抗体対に得られるRFVシグナルとS/N比の比較

捕捉	VIDAS RFVシグナル				VIDAS RFV/RFV0		
	5G5A10	AA012	5G5A10		5G5A10	AA012	5G5A10
検出 (濃度 ng/ml)	4G10E12 (180)	AA011 (500)	AA011 (500)		4G10E12 (180)	AA011 (500)	AA011 (500)
AMH ng/ml	RFV	RFV	RFV		S/N	S/N	S/N
0	1	45	7				
0.055	51	81	53		51	2	8
0.11	92	113	91		92	3	13
0.275	224	209	221		224	5	32
0.9	916	735	910		916	16	130
2.1	2113	1602	2097		2113	36	300
4	3817	2938	3816		3817	65	545
6.3	4839	3915	4891		4839	87	699
8.7	5672	4810	5764		5672	107	823
11	6335	5392	6404		6335	120	915

10

20

30

S/N = 「シグナル/ノイズ」比。所与のアッセイフォーマットについての、レンジのポイント0（AMHを含まない）のRFVシグナルに対するRFVシグナルの比。

【0175】

対C1（5G5A10 & 4G10E12）は、極めて良好なシグナルダイナミクスと、極めて低いバックグラウンドノイズ（ポイント0において1RFV）を呈する。先行技術による対AA012 & AA011は、それよりも不良のシグナルダイナミクス（11ng/mlで、対C1の場合の6335RFVに対し、5392RFV）と、特に大きなバックグラウンドノイズ45RFVを呈する。混合対（5G5A10 & AA011）は、対C1（同じ捕捉抗体）と同等のシグナルダイナミクスを有する。バックグラウンドノイズ（7RFV）は、対AA012 & AA011の場合よりかなり低い、対C1より高いままである。したがって、シグナル/ノイズ（S/N）比の点で、分析的に最も感度の高いアッセイは、対C1を用いるものであり、次いで混合対を用いるもの、そして最後にAnsh Labs対を用いるものである。

40

【0176】

50

実施例 8 : V I D A S A M H アッセイの分析的特異性

実施例 6 に記載された V I D A S A M H アッセイ (対 C 1) の分析的特異性を、交差反応性を有する化合物を分析することにより確立した。これら化合物を、1 ng/ml 及び 4 ng/ml の AMH を含む血清試料に過負荷量で加えた。この試験の結果を表 10 にまとめる。

【 0 1 7 7 】

表 10. V I D A S (登録商標) AMH アッセイの交差反応性

試験した化合物	試験した濃度	% 交差反応性
アクチビン A	100ng/ml	$\leq 0.10\%$
インビピン A	100ng/ml	$\leq 0.12\%$
LH	500 IU/l	$\leq 0.21\%$
FSH	500 IU/l	$\leq 0.23\%$

10

20

試験した濃度で有意な交差反応性は検出されなかった。V I D A S A M H アッセイは、極めて良好な分析的特異性を呈する。

【 0 1 7 8 】

実施例 9 : V I D A S A M H アッセイの精度

V I D A S A M H アッセイ (対 C 1) の精度の試験を、測定値レンジの 5 つの濃度レベルを代表するヒト試料のパネルを用いて実施した。各濃度レベルについて、再現性 (シリーズ内精度)、バッチ内精度及び実験室内精度 (機器内バッチ内精度) を予測した。この試験の間に得られた値を表 11 に報告する：

【 0 1 7 9 】

表 11. V I D A S A M H アッセイの精度

N(繰り返しの数)	濃度レベル (ng/ml)	% CV 再現性	% CV バッチ内	% CV 実験室内
519	0.22	4.1	6.6	8.3
520	1.08	4.4	8.0	9.9
520	2.99	4.4	7.4	9.8
520	5.45	4.8	7.6	8.9
520	7.37	4.4	8.2	10.6

40

【 0 1 8 0 】

50

この極めて広範な試験が示すように、VIDAS AMHアッセイは、良好な再現性を呈する：異なるバッチ間の変動係数(CV)は、11%を超えない。

【0181】

参考文献

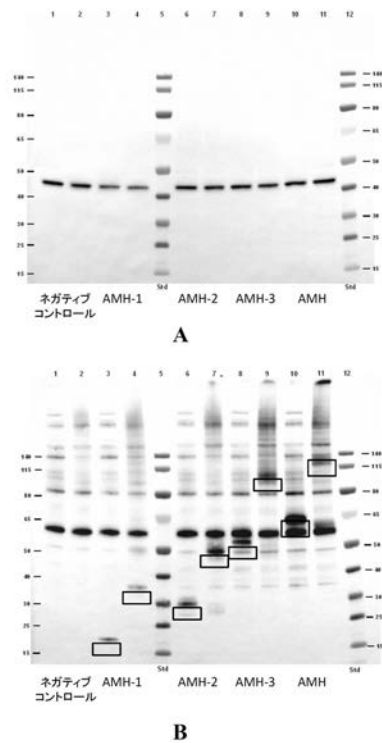
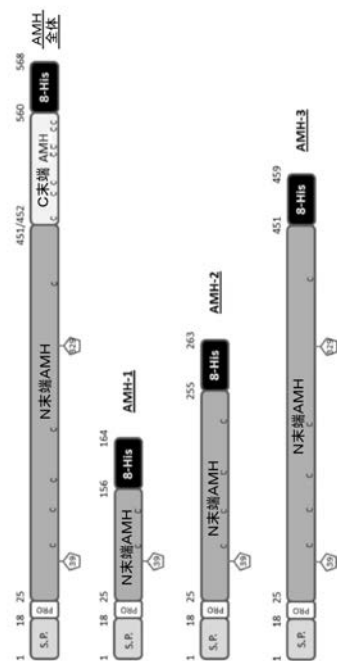
- Arce JC, et al., 2014, Fertility and Sterility, 102(6):1633-40
- Boersma YL, Pluckthun A, 2011, Curr. Opin. Biotechnol, 22:849-857
- Chai J and Howie AF, 2014, European Journal of Cancer, 50(14):2367-74
- Dewailly D, et al., 2014, The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women, Human Reproduction Update, 20(3):370-85
- Ellington AD and Szostak JW., 1990, Nature, 346 :818-822
- Falkenberg FW, 1998, Res Immunol 149(6):560-570.
- Fong SL, et al., 2015, European Journal of Obstetrics&Gynecology and Reproductive Biology, 186:75-9
- Han X et al., 2014, Hum Reprod, 29(5):1042-1048.
- Hudson PL et al., 1990, J Clin Endocrinol Metab, 70:16-22.
- Kelsey TW, et al., 2011, PLoS ONE, 6(7):e22024
- Kohler G and Milstein C, 1975, Nature, 256:495-497.
- Kohler G et al., 1976, Eur J Immunol, 6:292-295.
- Kumar A et al., 2010, J Immunol Methods, 362:51-59.
- Lee M et al., 1996, J Clin Endocrinol Metab, 81:571-576.
- Long WQ et al., 2000, J Clin Endocrinol Metab, 85(2):540-544.
- Lukaszuk K et al., 2014, Hum Reprod, 27(10):3085-3091.
- Panhurst M.W. et al, 2016, Physiological Reports, 4(9):1-10
- Zec I et al., 2011, Biochimica Medica, 21(3):219-30.

10

20

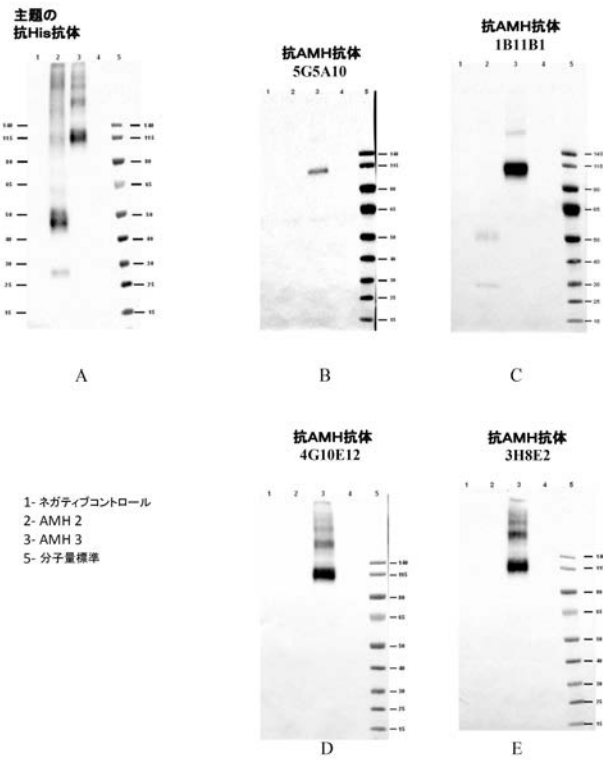
【図1】

【図2】



【 図 3 】

【 図 4 】



【 配 列 表 】

[2019528676000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2017/064759

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/064759

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/26 G01N33/53 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, 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.
A	WO 2008/153433 A1 (STATE RES INST OF HIGHLY PURE [RU]; TROFIMOV ALEXANDER VIKTOROVICH [RU]) 18 December 2008 (2008-12-18) -----	1-20
A	WO 2014/074835 A2 (ANSH LABS LLC [US]) 15 May 2014 (2014-05-15) cited in the application -----	1-20
A	WO 2014/204327 A1 (OTAGO INNOVATION LTD [NZ]) 24 December 2014 (2014-12-24) -----	1-20
A	WO 2006/127850 A1 (BECKMAN COULTER INC [US]) 30 November 2006 (2006-11-30) cited in the application -----	1-20
	-/--	
<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 *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
5 September 2017		13/09/2017
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 Marinoni J-C

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/064759

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HUDSON P L ET AL: "AN IMMUNOASSAY TO DETECT HUMAN MULLERIAN INHIBITING SUBSTANCE IN MALES AND FEMALES DURING NORMAL DEVELOPMENT", JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, THE ENDOCRINE SOCIETY, US, vol. 70, no. 1, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 16-22, XP008073147, ISSN: 0021-972X cited in the application -----</p>	1-20
A	<p>LONG WEN-QING ET AL: "Detection of minimal levels of serum anti-Mullerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay", JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, THE ENDOCRINE SOCIETY, US, vol. 85, no. 2, 1 February 2000 (2000-02-01), pages 540-544, XP002481798, ISSN: 0021-972X, DOI: 10.1210/JC.85.2.540 cited in the application -----</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/064759

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008153433	A1	18-12-2008	NONE
WO 2014074835	A2	15-05-2014	AU 2013342190 A1 02-07-2015 CA 2930036 A1 15-05-2014 EP 2917235 A2 16-09-2015 HK 1215259 A1 19-08-2016 US 2016274130 A1 22-09-2016 WO 2014074835 A2 15-05-2014
WO 2014204327	A1	24-12-2014	AU 2014281270 A1 21-01-2016 EP 3011337 A1 27-04-2016 US 2016370385 A1 22-12-2016 WO 2014204327 A1 24-12-2014
WO 2006127850	A1	30-11-2006	AT 478336 T 15-09-2010 DK 1886140 T3 08-11-2010 EP 1886140 A1 13-02-2008 ES 2349309 T3 29-12-2010 JP 4852712 B2 11-01-2012 JP 2008542723 A 27-11-2008 PT 1886140 E 24-11-2010 US 2006275850 A1 07-12-2006 WO 2006127850 A1 30-11-2006

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/064759

Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.c de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, la recherche internationale a été effectuée sur la base d'un listage des séquences :
- a. faisant partie de la demande internationale telle que déposée :
- sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25.
- sur papier ou sous forme d'un fichier image.
- b. remis avec la demande internationale, exclusivement aux fins de la recherche internationale en vertu de la règle 13ter.1.a), sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25.
- c. remis postérieurement à la date de dépôt international exclusivement aux fins de la recherche internationale :
- sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25 (règle 13ter.1.a)).
- sur papier ou sous forme d'un fichier image (règle 13ter.1.b) et instruction administrative 713).
2. De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences a été déposée ou remise, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles faisant partie de la demande telle que déposée et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, selon le cas, ont été remises.
3. Commentaire complémentaires:

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/064759

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
INV. C07K16/26 G01N33/53 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, 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	
A	WO 2008/153433 A1 (STATE RES INST OF HIGHLY PURE [RU]; TROFIMOV ALEXANDER VIKTOROVICH [RU]) 18 décembre 2008 (2008-12-18) -----	1-20
A	WO 2014/074835 A2 (ANSH LABS LLC [US]) 15 mai 2014 (2014-05-15) cité dans la demande -----	1-20
A	WO 2014/204327 A1 (OTAGO INNOVATION LTD [NZ]) 24 décembre 2014 (2014-12-24) -----	1-20
A	WO 2006/127850 A1 (BECKMAN COULTER INC [US]) 30 novembre 2006 (2006-11-30) cité dans la demande -----	1-20
	-/--	
<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	
5 septembre 2017	13/09/2017	
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	Marinoni J-C	

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/064759

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>HUDSON P L ET AL: "AN IMMUNOASSAY TO DETECT HUMAN MULLERIAN INHIBITING SUBSTANCE IN MALES AND FEMALES DURING NORMAL DEVELOPMENT", JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, THE ENDOCRINE SOCIETY, US, vol. 70, no. 1, 1 janvier 1990 (1990-01-01), pages 16-22, XP008073147, ISSN: 0021-972X cité dans la demande</p> <p>-----</p>	1-20
A	<p>LONG WEN-QING ET AL: "Detection of minimal levels of serum anti-Mullerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay", JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, THE ENDOCRINE SOCIETY, US, vol. 85, no. 2, 1 février 2000 (2000-02-01), pages 540-544, XP002481798, ISSN: 0021-972X, DOI: 10.1210/JC.85.2.540 cité dans la demande</p> <p>-----</p>	1-20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2017/064759

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2008153433	A1	18-12-2008	AUCUN	

WO 2014074835	A2	15-05-2014	AU 2013342190 A1	02-07-2015
			CA 2930036 A1	15-05-2014
			EP 2917235 A2	16-09-2015
			HK 1215259 A1	19-08-2016
			US 2016274130 A1	22-09-2016
			WO 2014074835 A2	15-05-2014

WO 2014204327	A1	24-12-2014	AU 2014281270 A1	21-01-2016
			EP 3011337 A1	27-04-2016
			US 2016370385 A1	22-12-2016
			WO 2014204327 A1	24-12-2014

WO 2006127850	A1	30-11-2006	AT 478336 T	15-09-2010
			DK 1886140 T3	08-11-2010
			EP 1886140 A1	13-02-2008
			ES 2349309 T3	29-12-2010
			JP 4852712 B2	11-01-2012
			JP 2008542723 A	27-11-2008
			PT 1886140 E	24-11-2010
			US 2006275850 A1	07-12-2006
			WO 2006127850 A1	30-11-2006

 フロントページの続き

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON
2. TWEEN

(72) 発明者 コンベ, マクシム

フランス国 69002 リヨン, リュ ヴィクトル ユゴー 8

(72) 発明者 ダニエル, ソワジック

フランス国 01600 トレヴー, アヴェニュー デュ メーヌ 251

(72) 発明者 オットーネ, ソフィ

フランス国 69210 サン - ベル, モンテ デ リュイーヌ 8

Fターム(参考) 4B064 AG26 AG27 CA19 CC24 CE12 DA13

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA30 DA75 DA76 EA50

FA74 GA26

【要約の続き】

の使用にも関する。

【選択図】なし

专利名称(译)	抗AMH抗体的制备方法及其用途		
公开(公告)号	JP2019528676A	公开(公告)日	2019-10-17
申请号	JP2018565664	申请日	2017-06-16
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	生物梅里埃		
[标]发明人	アタマンオナルヤスマン シュッシュシルヴィ		
发明人	アタマン-オナル, ヤスマン シュッシュ, シルヴィ コンペ, マクシム ダニエル, ソワジック オットーネ, ソフィ		
IPC分类号	C12P21/08 C07K16/26 G01N33/53 C12N15/16		
CPC分类号	C07K16/26 C07K2317/34 G01N33/689 G01N33/74 G01N2800/367 C07K2317/10 G01N2333/575		
FI分类号	C12P21/08.ZNA C07K16/26 G01N33/53.D C12N15/16		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA30 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	2016175041 2016-06-17 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及制备抗哺乳动物AMH抗体的方法，该方法包括：(i)用AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸免疫动物的步骤，其中所述AMH多肽与SEQ ID NO：1的序列或SEQ ID NO：1的序列至少75%相同。该序列具有性别的至少99个氨基酸，以及SEQ ID NO：2的序列或与SEQ ID NO：2的序列具有至少75%的同一性的序列的至多560个氨基酸。(ii)从已接受免疫原的动物的淋巴器官细胞制备杂交瘤，(iii)SEQ ID NO：1的序列或与SEQ ID NO：1的序列具有至少75%的同一性，且与SEQ ID NO：8的序列或SEQ ID NO：8的序列具有至少75%的同一性的至少99个氨基酸 识别含有序列中至多255个氨基酸的AMH多肽，该序列具有(a)SEQ ID NO：13的序列的至少131个氨基酸或与SEQ ID NO：13的序列具有至少75%的同一性的序列 以及AMH多肽，其包含SEQ ID NO：11的序列或与SEQ ID NO：11的序列具有至少75%的同一性的序列的至多156个氨基酸，还(b)SEQ ID NO：1或SEQ ID NO：1的序列 选择一种分泌一种抗体的杂交瘤，该抗体不识别位于与序列具有至少75%同一性的序列中的任何线性表位，并且(iv)产生抗体的步骤 包括。本发明还涉及抗体和抗体片段及其在测定AMH中，特别是在育性中的用途。[选择图]无

(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2019-528676 (P2019-528676A) 令和1年10月17日 (2019. 10. 17)
(51) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考)
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B064
C07K 16/26 (2006.01)	C07K 16/26	4H045
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	
C12N 15/16 (2006.01)	C12N 15/16	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁)		
(21) 出願番号	特願2018-565664 (P2018-565664)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成29年6月16日 (2017. 6. 16)	304043936
(85) 翻訳文提出日	平成31年2月5日 (2019. 2. 5)	ビオメリュー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/064759	B I O M E R I E U X
(87) 国際公開番号	W02017/216334	フランス国 F-69280 マーシー
(87) 国際公開日	平成29年12月21日 (2017. 12. 21)	レトワール
(31) 優先権主張番号	16175041.9	110002077
(32) 優先日	平成28年6月17日 (2016. 6. 17)	(74) 代理人
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	園田・小林特許業務法人
		アタマン-オナル, ヤスマン
		フランス国 O1600 レリュール, シ
		ュマン チュ コトー 91
		シュッシュ, シルヴィ
		フランス国 69890 ラ トゥール
		ドゥ サルヴァニー, リュ デュ ジャ
		ックメ 32
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 抗AMH抗体を調製するための方法及びその使用		