

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5766286号  
(P5766286)

(45) 発行日 平成27年8月19日(2015.8.19)

(24) 登録日 平成27年6月26日(2015.6.26)

(51) Int.Cl.			F I		
<b>CO7K</b>	<b>16/42</b>	<b>(2006.01)</b>	CO7K	16/42	ZNA
<b>C12N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C12N	5/00	IO2
<b>GO1N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO1N	33/53	N
<b>GO1N</b>	<b>33/577</b>	<b>(2006.01)</b>	GO1N	33/577	B
<b>GO1N</b>	<b>33/532</b>	<b>(2006.01)</b>	GO1N	33/532	A

請求項の数 20 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-522270 (P2013-522270)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成23年8月12日(2011.8.12)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2013-535482 (P2013-535482A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成25年9月12日(2013.9.12)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/063906		T
(87) 国際公開番号	W02012/022682		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成24年2月23日(2012.2.23)		グレンツァーヘルストラツセ124
審査請求日	平成25年2月5日(2013.2.5)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	10173090.1		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成22年8月17日(2010.8.17)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒトIgG1抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトIgG1クラスの抗体に特異的に結合し、かつアカゲザル、キヌザル、ヒヒザルおよびカニクイザルの免疫グロブリンに特異的に結合せず、ヒトIgG2クラスの抗体に結合しないことを特徴とする、モノクローナル抗体。

【請求項2】

カッパ軽鎖を有するヒトIgG1クラスの抗体に結合することを特徴とする、請求項1記載の抗体。

【請求項3】

ラムダ軽鎖を有するヒトIgG1クラスの抗体に結合することを特徴とする、請求項1および2のいずれか一項記載の抗体。

【請求項4】

ヒトIgG4クラスの抗体に結合しないことを特徴とする、請求項1~3のいずれか一項記載の抗体。

【請求項5】

ラムダ軽鎖を有するヒトIgG1クラスの抗体のFabに結合することを特徴とする、請求項1~4のいずれか一項記載の抗体。

【請求項6】

カッパ軽鎖を有するヒトIgG1クラスの抗体のFabに結合することを特徴とする、請求項1~5のいずれか一項記載の抗体。

10

20

## 【請求項 7】

ヒトIgG3クラスの抗体に結合しないことを特徴とする、請求項1～6のいずれか一項記載の抗体。

## 【請求項 8】

非ヒト動物由来の抗体であることを特徴とする、請求項1～7のいずれか一項記載の抗体。

## 【請求項 9】

ヒトIgG1クラスの抗体の重鎖定常領域1に特異的に結合することを特徴とする、請求項1～8のいずれか一項記載の抗体。

## 【請求項 10】

細胞株DSM ACC3076から得られるモノクローナル抗体。

## 【請求項 11】

細胞株DSM ACC3076。

## 【請求項 12】

免疫アッセイにおける請求項1～10のいずれか一項記載の抗体の使用。

## 【請求項 13】

(a) 捕捉試薬としての、細胞株DSM ACC3006またはDSM ACC3007またはDSM ACC3008またはDSM ACC3076から得られる抗体、および、

(b) 検出試薬としての、細胞株DSM ACC3006またはDSM ACC3007またはDSM ACC3008またはDSM ACC3076から得られる抗体、

を含み、(a)(b)の少なくとも一方はDSM ACC3076から得られる抗体を含む、キット。

## 【請求項 14】

実験動物から得られた試料中のヒトIgG1クラスの治療抗体を検出する方法であって、

(a) 分析する試料を、請求項1～10のいずれか一項記載のモノクローナル抗体と共にインキュベートする工程、

(b) 任意で、前記試料を、全治療抗体、活性治療抗体、ADA結合治療抗体または抗原結合治療抗体の選択的検出のための試薬と共にインキュベートする工程、ならびに

(c) (a)または(b)で形成された複合体を治療抗体の存在と相関付け、それによって治療抗体を検出する工程、

を含む、前記方法。

## 【請求項 15】

捕捉抗体(capture antibody)およびトレーサー抗体(tracer antibody)を含む免疫アッセイを用いて実験動物から得られた試料中のヒトIgG1クラスの治療抗体を決定する方法であって、捕捉抗体および/またはトレーサー抗体の両方が、独立して、請求項1～10のいずれか一項記載の抗体から選択されることを特徴とする、前記方法。

## 【請求項 16】

治療抗体がFabであることを特徴とする、請求項14～15のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 17】

実験動物が、マーモセットおよびタマリン、旧世界ザル、コビトキツネザルおよびネズミキツネザル、テナガザルおよび小型類人猿、真正キツネザル(true lemur)の科のメンバー、ならびにそれらの交雑種を含む群から選択されることを特徴とする、請求項14～16のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 18】

実験動物から得られた試料中の全治療抗体、活性治療抗体、ADA結合治療抗体または抗原結合治療抗体の濃度を決定するための、ヒトIgG1クラスの治療抗体に特異的に結合しかつ実験動物の免疫グロブリンに特異的に結合しない抗体の使用であって、該抗体が、請求項1～10のいずれか一項記載の抗体である、前記使用。

## 【請求項 19】

細胞株DSM ACC3006および/または細胞株DSM ACC3007および/または細胞株DSM ACC3008および/または細胞株DSM ACC3076および/または細胞株DSM ACC2708によって産生され

10

20

30

40

50

る抗体の混合物を含み、かつ、少なくとも、細胞株DSM ACC3076によって産生される抗体を含むことを特徴とする、抗体組成物。

【請求項20】

請求項14～16のいずれか一項記載の方法における、請求項19記載の抗体組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書では、ヒトIgG1クラスの抗体に特異的に結合する抗体およびその使用を報告する。

【背景技術】

10

【0002】

発明の背景

1974年のKoehlerおよびMilsteinによる最初のモノクローナル抗体の開発以降、ヒトの治療に適した抗体の開発に大きな労力が注がれている。最初に利用可能となったモノクローナル抗体は、マウスおよびラットにおいて開発されたものである。この10年間、市場に届けられるヒトモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体の数は増加の一途をたどっている。周知の例には、例えば、F. Hoffmann-La Roche AG, Basel製のHerceptin（登録商標）およびMabThera（登録商標）が含まれる。

【0003】

膨大な数のヒトまたはヒト化モノクローナル抗体が開発段階にあり、これらは、ヒトへの最初の臨床試験目的での投与を検討する前に、実験動物において調査される必要がある。重要な基準、その中の2つを挙げるとバイオアベイラビリティおよび抗体クリアランスを、調査する必要がある。これらの調査の多くは、実験動物自体の抗体が存在する背景の下での治療抗体の定量を必要とする。ほとんどの場合、哺乳動物が実験動物として使用される。毒性は、通常、最初にマウスまたはラット等のげっ歯類において評価される。それより進んだ薬物開発段階では、特にヒトへの薬物投与の前に、サルなどもそのような前臨床研究に参加させる必要がある。

20

【0004】

哺乳動物は通常、循環中に1mlあたり約10から約30ミリグラムの抗体を有している。治療用モノクローナル抗体は、典型的には、1mlあたり約1ナノグラムから1mlあたり約100マイクログラムの範囲の血清レベルで試験する必要がある。したがって治療抗体は、約100倍から1000万倍上回る実験動物の抗体の背景に抗して検出される必要がある。

30

【0005】

実験動物の抗体の背景の下でのヒトまたはヒト化治療抗体の検出は、薬理学者にとって非常に重要な仕事となっている。ヒトまたはヒト化抗体の検出は、試験動物がホモサピエンスに近くなるほど困難性が増す。

【0006】

US 2004/214761（特許文献1）には、多発性骨髄腫の処置方法が報告されている。クラスIgGヒト抗体の定性的および定量的決定法は、EP-A-1 098 198（特許文献2）に報告されている。WO 2006/066912（特許文献3）では、実験動物における治療抗体の検出が報告されている。抗薬物抗体アッセイは、WO 2008/031532（特許文献4）に報告されている。US 5,332,665（特許文献5）には、種特異的・高親和性モノクローナル抗体が報告されている。

40

【0007】

Jefferis, R., et al., (Immunol. Lett. 31 (1992) 143-168（非特許文献1）およびImmunol. Lett. 10 (1985) 223-252（非特許文献2））は、ヒトIgGサブクラスに対する特異性を有するモノクローナル抗体の評価を報告している。マウスモノクローナル抗体によって認識されるヒトIgGサブクラス特異的なエピトープは、Jefferis, R. (Monographs in Allergy, Karger, Basel (CH), 20 (1986) 26-33（非特許文献3））によって報告されている。Lewis, A.P., et al., は、カッパおよびガンマ・カニクイザル免疫グロブリンcDNAの

50

クローニングおよび配列分析を報告している (Dev. Compar. Immunol. 17 (1993) 549-560 (非特許文献4))。カニクイザルIgGサブクラスの分子的特徴および機能的特徴付けは、Jacobsen, F.W., et al.によって報告されている (J. Immunol. 186 (2011) 341-349 (非特許文献5))。Calvas, P., et al., (Scand. J. Immunol. 49 (1999) 595-610 (非特許文献6))は、マカクザルの3つの免疫グロブリンGサブクラスの特徴付けを報告している。非ヒト霊長類由来の血清試料中の治療抗体のヒト特異的定量的ための免疫アッセイの評価は、Stubenrauch, K-G., et al.によって報告されている (J. Pharm. Biomed. Analysis 49 (2009) 1003-1008 (非特許文献7))。Liang, T., et al. (Vet. Immunol. Immunopat. 80 (2001) 259-270 (非特許文献8))は、4つの異なるイヌ免疫グロブリンガンマ鎖をコードするcDNAのクローニングおよび特徴付けを報告している。

10

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

【0008】

【特許文献1】US 2004/214761

【特許文献2】EP-A-1 098 198

【特許文献3】WO 2006/066912

【特許文献4】WO 2008/031532

【特許文献5】US 5,332,665

## 【非特許文献】

【0009】

20

【非特許文献1】Immunol. Lett. 31 (1992) 143-168

【非特許文献2】Immunol. Lett. 10 (1985) 223-252

【非特許文献3】Monographs in Allergy, Karger, Basel (CH), 20 (1986) 26-33

【非特許文献4】Dev. Compar. Immunol. 17 (1993) 549-560

【非特許文献5】J. Immunol. 186 (2011) 341-349

【非特許文献6】Scand. J. Immunol. 49 (1999) 595-610

【非特許文献7】J. Pharm. Biomed. Analysis 49 (2009) 1003-1008

【非特許文献8】Vet. Immunol. Immunopat. 80 (2001) 259-270

## 【発明の概要】

【0010】

30

本明細書では、1つの局面として、免疫グロブリンクラスIgG1のヒト抗体に存在し、クラスIgG2、IgG3およびIgG4のヒト抗体には存在しないエピトープを報告する。さらに、このエピトープは、カニクイザルの抗体にも存在しない。

【0011】

1つの局面として、本明細書では、ヒトIgG1クラスの抗体およびチンパンジーIgGクラスの抗体に特異的に結合しかつ実験動物、例えばカニクイザルの抗体に特異的に結合しない抗体を報告する。

【0012】

また、本明細書で報告する1つの局面は、アッセイにおける本明細書で報告する抗体の使用である。

40

【0013】

本明細書で報告する抗体は、例えば、カニクイザルおよびアカゲザルの血清中のヒトIgG1クラスの治療抗体の決定に使用することができる。

【0014】

1つの局面として、本明細書で報告するエピトープは、SEQ ID NO: 04 (ヒトIgG1 CH1ドメイン) のアミノ酸位置16、82および97を含むことを特徴とする。

【0015】

本明細書で報告する別の局面は、細胞株DSM ACC3076から得ることのできる抗体 (M-1.1 9.31) である。この抗体は、例えば細胞株DSM ACC2708によって産生される抗体M-R10Z8E9と比較して、種内交差反応性 (intra-species cross-reactivity) が低い。この抗体は、

50

Fab領域内の異なるエピトープに結合し、隣接するグリコシル化部位の影響を受けず、かつ、ヒトIgG1クラスの全長抗体およびヒトIgG1 CH1ドメインを含むFab抗体の決定のための免疫アッセイにおいて、細胞株DSM ACC3006によって産生される抗体M-1.3.2、細胞株DSM ACC3007によって産生される抗体M-1.5.8、細胞株DSM ACC3008によって産生される抗体M-1.7.10および細胞株DSM ACC2708によって産生される抗体M-R10Z8E9から選択される抗体と共に使用することができ、その理由は、前記治療抗体中に、各抗体の結合部位が1箇所しか存在しないからである。

【 0 0 1 6 】

本明細書で報告する1つの局面は、ヒトIgG1クラスの抗体およびチンパンジーIgGクラスの抗体またはそれらのFabフラグメントに特異的に結合するモノクローナル抗体である。1つの態様において、この抗体は、非ヒト動物由来の抗体である。1つの態様において、この抗体は、ヒトIgG1クラスの抗体の重鎖定常領域に特異的に結合する。1つの態様において、この抗体は、ヒトIgG1クラスの抗体のFab領域に特異的に結合する。1つの態様において、この抗体は、ヒトIgG1クラスの抗体のCH1ドメインに特異的に結合する。1つの態様において、この抗体は、チンパンジーIgGクラスの抗体に特異的に結合する。1つの態様において、この抗体は、実験動物の抗体に特異的に結合しない。1つの態様において、この抗体は、カニクイザル抗体およびアカゲザル抗体に特異的に結合しない。

10

【 0 0 1 7 】

本明細書で報告する別の局面は、細胞株DSM ACC3076から得られるモノクローナル抗体である。

20

【 0 0 1 8 】

また、本明細書で報告する1つの局面は、細胞株DSM ACC3076によって産生される抗体と同じかまたは重複するエピトープに特異的に結合する抗体である。

【 0 0 1 9 】

本明細書で報告する1つの局面は、細胞株DSM ACC3076である。

【 0 0 2 0 】

また、本明細書で報告する1つの局面は、免疫アッセイにおける本明細書で報告する抗体の使用である。

【 0 0 2 1 】

本明細書で報告するさらなる局面は、  
 (a) 細胞株DSM ACC3076から得られる抗体、  
 (b) 細胞株DSM ACC2708またはDSM ACC3006またはDSM ACC3007またはDSM ACC3008から得られる抗体、  
 を含むキットである。

30

【 0 0 2 2 】

また、本明細書で報告する1つの局面は、実験動物から得られた試料中のヒトIgG1クラスの治療抗体を検出する方法であって、  
 (a) 分析する試料を用意する工程、  
 (b) 本明細書で報告する抗体と共に試料をインキュベートする工程、  
 (c) 任意で、全治療抗体、活性治療抗体、抗薬物抗体(ADA)結合治療抗体または抗原結合治療抗体の選択的検出のための試薬と共に試料をインキュベートする工程、および  
 (d) (b)または(c)で形成され複合体を治療抗体の存在と関連付け、それによって治療抗体を検出する工程、  
 を含む、前記方法である。

40

【 0 0 2 3 】

本明細書で報告する1つの局面は、捕捉抗体(capture antibody)およびトレーサー抗体(tracer antibody)を含む抗原架橋免疫アッセイを用いて実験動物から得られた試料中のヒトIgG1クラスの治療抗体を検出する方法であって、捕捉抗体およびトレーサー抗体が共に、独立して、細胞株DSM ACC3006またはDSM ACC3007またはDSM ACC3008またはDSM ACC3076によって産生される抗体と同じエピトープに結合する抗体から選択されることを特

50

徴とする、前記方法である。

【0024】

1つの態様において、治療抗体は、ヒトIgG1 CH1ドメインを含むFabフラグメントである。1つの態様において、実験動物は、マーモセットおよびタマリン、旧世界ザル、コビトキツネザルおよびネズミキツネザル、テナガザルおよび小型類人猿、真正キツネザル (true lemur) の科 (family) のメンバー、ならびにそれらの交雑種を含む群から選択される。1つの態様において、実験動物は、アカゲザルまたはキヌザルまたはヒヒザルまたはカニクイザルである。1つの態様において、実験動物は、マカク属またはマカクザルである。1つの態様において、実験動物は、カニクイザルまたはアカゲザルである。

【0025】

本明細書で報告する1つの局面は、実験動物から得られた試料中の全治療抗体、活性治療抗体、ADA結合治療抗体または抗原結合治療抗体を決定するための、ヒトIgG1クラスの治療抗体に特異的に結合する抗体の使用であって、抗体が細胞株DSM ACC3006またはDSM ACC3007またはDSM ACC3008またはDSM ACC3076によって産生される抗体と同じエピトープに結合する、前記使用である。

【0026】

本明細書で報告する1つの局面は、細胞株DSM ACC3006および/または細胞株DSM ACC2708および/または細胞株DSM ACC3007および/または細胞株DSM ACC3008および/または細胞株DSM ACC3076によって産生される抗体の混合物を含む抗体組成物である。

【0027】

本明細書で報告する1つの局面は、本明細書で報告する方法における本明細書で報告する抗体組成物の使用である。

【0028】

1つの態様において、免疫アッセイは、サンドイッチ免疫アッセイである。別の態様において、抗体とそのコンジュゲートパートナーとの結合は、抗体のアミノ酸骨格のN末端および/もしくはアミノ基(リジン)、異なるリジンのアミノ基、カルボキシ、スルフヒドリル、ヒドロキシルおよび/もしくはフェノール官能基、ならびに/または抗体の炭水化物構造の糖アルコール基を通じた化学的結合により行われる。1つの態様において、捕捉抗体は、特異的結合対を通じて固定される。1つの態様において、捕捉抗体はビオチンに結合され、固定は固定されたアビジンまたはストレプトアビジンを通じて行われる。1つの態様において、トレーサー抗体は、特異的結合対を通じて検出可能な標識に結合される。1つの態様において、トレーサー抗体はジゴキシゲニンに結合され、検出可能な標識との連結はジゴキシゲニンに対する抗体を通じて行われる。1つの態様において、治療抗体は、ヒトまたはヒト化抗体である。1つの態様において、ヒトまたはヒト化抗体は、モノクローナル抗体である。1つの態様においては、全治療抗体が検出され、別の態様においては、活性治療抗体が検出され、そしてさらなる態様においては、その抗原に結合した治療抗体が検出される。

【発明を実施するための形態】

【0029】

発明の詳細な説明

(細胞株DSM ACC2708から得られる) M-R10Z8E9という名の抗ヒトIgG抗体は、クラスGのヒト免疫グロブリンのCH2ドメイン中のグリコシル化部位Asn297付近にあるエピトープに結合する。本明細書で報告する(細胞株DSM ACC3076から得られる)抗体M-1.19.31は、抗体M-R10Z8E9と比較して低い交差反応性を示し、細胞株DSM-ACC2708によって産生される抗体M-R10Z8E9、細胞株DSM ACC3006によって産生されるM-1.3.2、細胞株DSM ACC3007によって産生されるM-1.5.8および細胞株DSM ACC3008によって産生されるM-1.7.10とは異なるFab領域中のエピトープに結合し、隣接するグリコシル化部位の影響を受けず、かつ、特にFab治療抗体である治療抗体の決定のための免疫アッセイにおいて、細胞株DSM-ACC2708によって産生される抗体M-R10Z8E9、細胞株DSM ACC3006によって産生される抗体M-1.3.2、細胞株DSM ACC3007によって産生される抗体M-1.5.8および/または細胞株DSM ACC3008に

10

20

30

40

50

よって産生される抗体M-1.7.10と混合することができ、その理由は、前記ヒトまたはヒト化抗体のFabフラグメントに、各抗体の結合部位が1箇所しか存在しないからである。

【0030】

「治療抗体」という用語は、ヒト治療用の承認のために臨床研究において試験され、かつ疾患の処置のために個体に投与することができる抗体を意味する。1つの態様において、治療抗体は、モノクローナル抗体である。さらなる態様において、治療抗体は、ヒト抗体遺伝子座で形質転換された類人猿もしくは動物から得られるものであるか、またはヒトモノクローナル抗体であるか、またはヒト化モノクローナル抗体である。1つの態様において、治療抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。1つの態様において、治療抗体は、ヒト化モノクローナル抗体である。治療抗体は、様々な疾患、例えば腫瘍学的疾患（例えば、非ホジキンリンパ腫、乳癌および結腸直腸癌を含む血液および固形の悪性腫瘍）、免疫疾患、中枢神経疾患、血管疾患または感染疾患の処置に広く利用されているものである。そのような抗体は、例えば、CD19、CD20、CD22、HLA-DR、CD33、CD52、EGFR、G250、GD3、HER2、PSMA、CD56、VEGF、VEGF2、CEA、Levis Y抗原、IL-6受容体（IL6R）またはIGF-1受容体（IGF1R）に対する抗体である。

10

【0031】

「抗体」という用語は、抗体全体および抗体フラグメントを含む様々な形態の抗体構造物を包含する。本明細書で報告する抗体は、1つの態様において、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体またはT細胞抗原除去抗体（T cell antigen depleted antibody）である。抗体の遺伝子操作は、例えば、Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238およびUS 5,204,244; Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270; Lonberg, N., Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1117-1125に記載されている。抗体は、重鎖の定常領域のアミノ酸配列により、クラス：IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMに分類される。これらのクラスのいくつかは、さらにサブクラス（アイソタイプ）に、すなわち、IgGはIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4に、またはIgAはIgA1およびIgA2に分類される。抗体が属する免疫グロブリンのクラスに応じて、その免疫グロブリンの重鎖定常領域は、それぞれ、（IgA）、（IgD）、（IgE）、（IgG）およびμ（IgM）と呼ばれる。「ヒトIgG1クラスの抗体」という用語は、定常ドメインのアミノ酸配列がSEQ ID NO:01、SEQ ID NO:02、SEQ ID NO:03またはSEQ ID NO:04で表されるヒトIgG1のアミノ酸配列から導かれる抗体を意味する。そのような抗体には、少なくともCH1ドメインが存在しなければならない。この用語は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体および抗体コンジュゲートを含む。

20

30

【0032】

非ヒト（例えばげっ歯類）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト抗体由来の部分配列およびヒト抗体由来の部分配列を含むキメラ抗体である。その大部分において、ヒト化抗体は、ヒト抗体（レシピエント抗体）由来であり、その中の超可変領域の残基が、所望の特異性および親和性を有する非ヒト種（ドナー抗体）、例えばマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類の超可変領域由来の残基で置換されているものである。いくつかの例においては、ヒト抗体のフレームワーク領域（FR）の残基が、対応する非ヒト残基で置換される。さらに、ヒト化抗体は、さらなる修飾、例えばレシピエント抗体にもドナー抗体にも見られないアミノ酸残基を含み得る。そのような修飾により、対応する親配列に対して相同性があるが同一ではないそのようなレシピエントまたはドナー抗体のバリエーションが得られる。これらの修飾は、抗体の性能をさらに向上させるために為される。

40

【0033】

一般に、ヒト化抗体は、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒトドナー抗体のそれに対応しておりかつFRのすべてまたは実質的にすべてがヒトレシピエント抗体のそれに対応している少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含むものであろう。ヒト化抗体はまた、任意で、抗体定常領域、典型的にはヒト抗体の抗体定常領域の少なくとも一部分を含むであろう。

【0034】

50

非ヒト抗体をヒト化する方法は、当技術分野で報告されている。1つの態様において、ヒト化抗体は、非ヒト供給源から導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「インポート」残基と称され、典型的には「インポート」可変ドメインから取り出されたものである。ヒト化は、本質的には、超可変領域を非ヒト抗体の対応する配列と置換することによるWinterらの方法にしたがい実施することができる。したがって、そのような「ヒト化」抗体は、実質的にインタクトなヒト可変ドメイン未満が非ヒト種由来の対応する配列で置換されているキメラ抗体である。実際には、ヒト化抗体は、典型的に、いくつかの超可変領域の残基および場合によってはいくつかのフレームワーク領域の残基がげっ歯類または非ヒト霊長類抗体の類似部位由来の残基で置換されているヒト抗体である。

10

## 【0035】

本明細書において使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を表す、すなわち、その集団を構成する個々の抗体が、わずかに存在し得る自然発生する可能性のある変異を除いて同一であることを表す。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原性部位に指向するものである。さらに、異なる抗原性部位（抗原決定基またはエピトープ）に指向する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは異なり、各モノクローナル抗体は、その抗原の単一の抗原性部位に指向する。モノクローナル抗体は、それらの特異性に加えて、それらが他の抗体の混入なく合成され得る点でも有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均質な抗体集団から得られるという抗体の特徴を示すものであり、任意の特定の

20

## 【0036】

「キメラ抗体」という用語は、第1の種由来の可変ドメイン、すなわち結合領域、およびそれと異なる第2の供給源または種由来の定常領域の少なくとも一部分を含む抗体を意味し、通常は組換えDNA技術によって調製される。

## 【0037】

本明細書において使用される場合、「実験動物」という用語は、マーモセットおよびタマリン（マーモセット（Callitrichidae）科）、新世界ザル（オマキザル（Cebidae）科）、旧世界ザル（オナガザル科（Cercopithecidae）科）、コビトキツネザルおよびネズミキツネザル（コビトキツネザル（Cheirogaleidae）科）、アイアイ（アイアイ（Daubentoniidae）科）、ブッシュベイビーおよびガラゴ（ガラゴ（Galagonidae）科）、テナガザルおよび小型類人猿（テナガザル（Hylobatidae）科）、インドリ、シファカおよびその類縁体（インドリ（Indridae）科）、真正キツネザル（キツネザル（Lemuridae）科）、ロリス（ロリス（Loridae）科）、イタチキツネザル（イタチキツネザル（Megaladapidae）科）、メガネザル（メガネザル（Tarsiidae）科）ならびにそれらの交雑種を含む霊長類の目（order）の科のメンバーを意味する。

30

## 【0038】

1つの態様において、実験動物は、マーモセットおよびタマリン、旧世界ザル、コビトキツネザルおよびネズミキツネザル、テナガザルおよび小型類人猿、真正キツネザルの科のメンバー、ならびにそれらの交雑種を含む群から選択される。この態様において、人間に最も近い類縁種である類人猿、特にチンパンジー、ボノボ、ゴリラおよびオラウータンの群は除外される。1つの態様において、実験動物は、マカク属のメンバーである。1つの態様において、実験動物は、*Macaca fascicularis*（カニクイザル）および*Macaca mulatta*（アカゲザル）から選択される。

40

## 【0039】

「試料」は、実験動物から得られる任意の組織または液体試料を意味する。1つの態様において、試料は、唾液、尿、全血、血漿または血清等の液体試料であろう。さらなる態様において、試料は、全血、血漿または血清であろう。

## 【0040】

「ヒトIgG1クラスの治療抗体に特異的に結合しかつ実験動物の抗体に特異的に結合しな

50

い抗体」は、ヒトIgG1クラスの治療抗体に対して少なくとも $10^{-8}$  mol/lの解離定数(=  $K_{D_{i_{ss}}}$ )で結合する。したがって、「特異的に結合する」という用語は、 $10^{-8}$  mol/lまたはそれより小さい解離定数(=  $K_{D_{i_{ss}}}$ )の下での抗体またはFabフラグメントの結合を意味する。「特異的に結合しない」という用語は、高く $10^{-7}$  mol/lまたはそれより大きい、すなわち $10^{-5}$  mol/lの解離定数(=  $K_{D_{i_{ss}}}$ )での抗体またはFabフラグメントの結合を意味する。同時に、「実験動物の抗体に特異的に結合しない」という特性は、 $10^{-7}$  mol/lまたはそれよりも劣る $K_{D_{i_{ss}}}$ によって担保される。1つの態様において、治療抗体に特異的に結合しかつ実験動物の抗体に特異的に結合しない抗体は、そのヒトIgG1クラスの抗体に対する反応性と実験動物の抗体に対する反応性の間に少なくとも100倍の $K_{D_{i_{ss}}}$ ギャップを有するであろう。

10

## 【0041】

抗体の結合特性、特に $K_{D_{i_{ss}}}$ は、1つの態様において、BIAcore(登録商標)機器によって評価される。この方法において、結合特性は、表面プラズモン共鳴(SPR)の変化により査定される。調査対象の抗体を固相(チップと呼ばれる)に結合し、そしてこの被覆チップに対するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体あるいはIgG含有血清の結合を評価する事が都合がよい。

## 【0042】

「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合することができるタンパク質決定基を意味する。エピトープは通常、化学的に活性な表面分子団、例えばアミノ酸または糖側鎖からなり、そして通常エピトープは、固有の3次元構造的特徴および固有の電荷的特徴を有する。高次構造および非高次構造エピトープは、変性溶媒の存在下で前者への結合は失われるが後者への結合は失われない点で区別できる。1つの態様において、本明細書で報告する抗体は、ネイティブのヒトIgG1に結合するが、変性したヒトIgG1には結合しない。

20

## 【0043】

本明細書において使用される場合、「細胞株DSM ACC3076によって産生される抗体と同じエピトープに結合する」という用語は、(細胞株DSM ACC3076によって産生される)抗体M-1.19.31が結合するのと同じヒトIgG1上のエピトープに結合する抗体を表す。本明細書で報告するヒトIgG1クラスの抗体に結合する抗体のエピトープ結合特性は、当技術分野で公知の技術を用いて決定され得る。ヒトIgG1に対する結合は、ヒトIgG1に対する抗体M-1.19.31の結合を阻害する試験抗体の能力を決定するインビトロ競合的結合阻害アッセイにおいて、25°での表面プラズモン共鳴(SPR)により決定することができる。これは、例えば実施例12で報告されているように、BIAcoreアッセイ(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden)によって調査することができる。実施例12において、本明細書で報告するヒトIgG1クラスの抗体に結合する抗体の、結合した抗体M-1.19.31と競合する予想結合応答の百分率(%)は、BIAcoreアッセイエピトープマッピングの説明書に記載されているように、下記式Iによって計算され、

30

相対的応答(全体\_安定期\_前期)

$$100 * \frac{r_{MAX}}{r_{MAX}} \quad \text{(式I)}$$

40

式中、 $r_{MAX}$ は、下記式IIによって計算される。

相対的応答(全体\_安定期\_後期) \* 抗体分子量

$$\frac{\text{相対的応答(全体_安定期_後期) * 抗体分子量}}{\text{抗原分子量}} \quad \text{(式II)}$$

抗原分子量

最小結合応答も、同一の抗体1および2の対から計算される(実施例12参照)。得られる最大値 + 50%が、有意な競合、したがって同じエピトープに対する有意な結合の閾値として設定される。

## 【0044】

本明細書で報告する1つの局面において、抗体は、ヒトIgG1クラスの抗体に対する結合に関して抗体M-1.19.31と競合する。そのような結合の競合は、当技術分野で公知の技術

50

を用いて決定され得る。抗体の結合は、ヒトIgG1クラスの抗体に対する抗体M-1.19.31の結合を阻害する試験抗体の能力を決定するインビトロ競合的結合阻害アッセイにおいて、25 °Cでの表面プラズモン共鳴（SPR）により決定される。これは、例えば実施例12のように、BIAcoreアッセイ（Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden）によって調査することができる。

【0045】

ヒトIgG1クラスの（治療）抗体に特異的に結合しかつ実験動物の抗体に特異的に結合しない抗体は、1つの態様において、モノクローナル抗体、またはそのような抗体のフラグメント、またはそのような抗体の結合ドメインを含む遺伝子コンストラクトである。ヒトIgG1クラスの抗体に特異的に結合しかつ実験動物の抗体に特異的に結合しないという上記の基準を満たす任意の抗体フラグメントを使用することができる。

10

【0046】

実験動物におけるヒトIgG1クラスの治療抗体の適用に関連する様々な局面が、前臨床研究の間に評価されなければならない。特定の状況において、それは、存在するヒトIgG1クラスの治療抗体の総量を分析することに関連するものであり得、または、ヒトIgG1クラスの治療抗体の特定のフラグメント、もしくはヒトIgG1クラスの治療抗体の特定の修飾、もしくは抗原に結合したヒトIgG1クラスの治療抗体の濃度、もしくは依然として抗原に特異的に結合することができるヒトIgG1クラスの治療抗体の画分を分析することが重要であり得る。1つの態様において、本明細書で報告する抗体および方法は、ヒトIgG1クラスの治療抗体の全治療抗体、活性治療抗体、ADA結合治療抗体または抗原結合治療抗体のそれぞれを検出するのに使用することができる。「全治療抗体」という用語は、その抗体が活性であるか（すなわち、依然としてその抗原に対して反応性であるか）、不活性であるかおよび/または抗原に結合しているかに関係なく検出される任意の抗体を意味する。

20

【0047】

全治療抗体は、活性治療抗体および不活性治療抗体に分割することができる。

【0048】

「活性治療抗体」という用語は、実験動物中に存在する治療抗体であって、依然としてその抗原に結合することができるものを意味する。そのような抗体は、例えば、その抗原結合部位にその抗原または任意のその他の分子が結合していないものである。

【0049】

「不活性治療抗体」は、抗原結合治療抗体、抗治療抗体、抗体結合治療抗体（抗薬物抗体結合治療抗体；ADA結合治療抗体）および変性抗体に分割することができる。

30

【0050】

「抗原結合治療抗体」という用語は、実験動物の循環中に存在する治療抗体であって、その抗原に結合しているものを意味する。

【0051】

上記の全治療抗体、活性治療抗体、ADA結合治療抗体または抗原結合治療抗体は、本明細書で報告する抗体および方法を用いて直接的に検出することができる。さらに、他の形態の不活性治療抗体、例えば、抗薬物抗体または抗イディオタイプ抗体または特に中和性の抗薬物抗体に結合した治療抗体を検出することが可能である。

40

【0052】

さらに、任意の「不活性治療抗体」を間接的に評価することも可能である。そのような不活性治療抗体は、例えば、自身の抗原に結合した治療抗体であるか、または交差反応性抗原に結合した治療抗体であるか、または治療抗体に対する自己もしくは抗イディオタイプ抗体によりブロックされた治療抗体であり得る。全抗体量が活性抗体と抗原結合抗体との和よりも多い場合、自身の対応する抗原に結合していない不活性抗体を含むさらなる抗体の画分が存在するということであろう。

【0053】

全治療抗体は、例えば、いわゆる競合的免疫アッセイ系またはいわゆるサンドイッチ型アッセイ系において検出することができる。そのようなアッセイは、1つの態様において

50

は洗浄工程なしで実施され得（均質免疫アッセイ）、または別の態様においては洗浄工程ありで実施され得る（不均質免疫アッセイ）。

【0054】

1つの態様において、全治療抗体は、治療抗体に特異的に結合しかつ実験動物の抗体に特異的に結合しない抗体をサンドイッチの両側で使用する、サンドイッチ型免疫アッセイにおいて検出される。そのようなサンドイッチの一方の側で使用される抗体は、固相に結合されているまたは結合することができ（多くの場合、捕捉抗体と呼ばれる）、そのようなサンドイッチのもう一方の側の抗体は、直接的または間接的な検出を容易にするよう標識されている（いわゆる検出抗体）。そのようなサンドイッチアッセイ手順において結合した検出抗体の量は、調査されている試料中の治療抗体の量に直接的に相関するものである。

10

【0055】

試料中の活性治療抗体の検出は、適当な最先端の手順によって達成され得る。しかし、全治療抗体または自身の抗原に結合した治療抗体の画分の検出はそれよりも困難であり、全く異なるアッセイ設計を必要とし、特に異なるアッセイの各々に専用の試薬を必要とする。本明細書で報告する、治療抗体に特異的に結合しかつ実験動物の抗体に特異的に結合しない抗体により、互いに類似する試験系における活性治療抗体、全治療抗体、ADA結合治療抗体または抗原結合治療抗体の画分の評価が可能となる。この種の全治療抗体、活性治療抗体、ADA結合治療抗体または抗原結合治療抗体の比較評価は、定量比較をこれらの様々な治療抗体の画分間で行う場合に有益である。

20

【0056】

1つの態様においては、サンドイッチ型のアッセイ形式が、活性治療抗体を検出するために設計される。1つの態様においては、治療抗体に特異的に結合しかつ実験動物の抗体に特異的に結合しない抗体が、捕捉抗体として使用され、そのようなサンドイッチアッセイの検出側は、標識された形態の抗原を利用するか、または抗原の結合後に、治療抗体により認識されるエピトープに結合しないもしくはそれと競合しない第2の抗体を利用するかのおいずれかであり、その場合の第2の抗体は、直接的または間接的な検出を容易にするよう特異的に検出可能であるおよび/またはそのように標識されているものである。

【0057】

抗原結合治療抗体は、1つの態様において、治療抗体に特異的に結合しかつ実験動物の抗体に特異的に結合しない抗体を捕捉抗体として用いるサンドイッチ型のアッセイ形式で検出される。その検出において、1つの態様では、治療抗体のエピトープと競合しないエピトープで抗原と結合する第2の抗体が使用される。第2の抗体は、1つの態様において、直接的または間接的な検出を容易にするよう標識される。

30

【0058】

直接的検出のための標識基は、任意の公知の検出可能なマーカー基、例えば、色素、発光標識基、例えば化学発光基、例えばアクリジニウムエステルもしくはジオキセタン、または蛍光色素、例えばフルオレセイン、クマリン、ローダミン、オキサジン、レソルフィン、シアニンおよびそれらの誘導体から選択することができる。他の標識基の例は、発光金属錯体、例えばルテニウムまたはユーロピウム錯体、酵素、例えばELISAまたはCEDIA（クローン化酵素ドナー免疫アッセイ）に使用されるもの、および放射性同位体である。電氣的化学発光により検出することができる金属キレートもまた、1つの態様においては、検出可能な標識として使用されるシグナル発生基であり、ルテニウムキレートが特に望ましい。1つの態様において、標識基は、ルテニウム（ビスピリジル）<sub>3</sub><sup>2+</sup>キレートである。

40

【0059】

間接的検出系では、例えば、検出試薬、例えば検出抗体が、結合対の第1のパートナーで標識される。適当な結合対の例は、ハプテンまたは抗原/抗体、例えばアミノピオチン、イミノピオチンまたはデスチオピオチンなどのピオチンまたはピオチンアナログ/アビジンまたはストレプトアビジン、糖/レクチン、核酸または核酸アナログ/相補的核酸、および受容体/リガンド、例えばステロイドホルモン受容体/ステロイドホルモンである

50

。1つの態様において、第1の結合対メンバーは、ハプテン、抗原およびホルモンから選択される。1つの態様において、ハプテンは、ジゴキシンならびにビオチンおよびそのアナログから選択される。そのような結合対の第2のパートナー、例えば抗体、ストレプトアビジン等は通常、直接的検出が可能ないように、例えば上記のような標識により、標識される。

#### 【0060】

上記の免疫学的検出法のすべてにおいて、試薬の条件は、使用される試薬の結合を実現する、例えば抗体とその対応する抗原との結合を実現するよう選択される。当業者は、そのような結合事象の結果を、複合体という用語を使用することによって表現する。本明細書で報告する方法において形成される複合体は、最先端の手順によって、対応する治療抗体の濃度に相関付けられる。使用される検出試薬に依存して、この相関付け工程は、全治療抗体、活性治療抗体、ADA結合治療抗体または抗原結合治療抗体の濃度を導き出すであろう。

10

#### 【0061】

当業者は、本明細書で報告する方法が、全治療抗体、抗原結合治療抗体、活性治療抗体さらには不活性治療抗体の濃度を明らかにすることを理解するであろう。異なるアッセイにおいて単一および同一の試薬、すなわち治療抗体に特異的に結合しかつ実験動物の抗体に特異的に結合しない抗体が使用されるため、得られる値を容易に相互比較することができ、その比率さえも評価することができる。さらなる態様において、この方法は、全治療抗体に対する活性治療抗体の比率に関する。この比率は、治療抗体の効能の指標として十分機能し得る。

20

#### 【0062】

ヒトIgG1クラスの抗体に存在し、他のヒトIgGクラス、例えばIgG2、IgG3およびIgG4の抗体には存在せず、実験動物の抗体、特にカニクイザルまたはアカゲザルの免疫グロブリンにも存在しないエピトープが1つ存在することが見出された。このエピトープは、寄託細胞株DSM ACC3076によって産生される抗体M-1.19.31に対する結合によって特徴付けられる。したがって、本明細書で報告する1つの局面は、細胞株DSM ACC3076によって産生される抗体である。

#### 【0063】

この寄託細胞株によって産生される抗体により認識されるエピトープはヒトIgG1クラスの抗体のFab領域に固有のものであるため、本明細書で報告する別の局面は、寄託細胞株DSM ACC3076から得られる抗体に結合するエピトープである。この抗体は抗体Fabフラグメントに対する結合によって同定されるため、該エピトープは、ヒトIgG1クラスの抗体のFabフラグメントに存在することをさらに特徴とする。1つの態様において、このエピトープは、ヒトIgG1のCH1ドメインに存在することを特徴とする。本明細書で報告する1つの局面において、この抗体は、ヒトIgG1クラスの治療抗体に特異的に結合しかつ実験動物の抗体に特異的に結合せず、かつこの抗体が細胞株DSM ACC3076によって産生される抗体と同じエピトープに結合する抗体であることを特徴とする。

30

#### 【0064】

例えば、2つの異なる抗体に結合するエピトープの同一性または重複性を競合試験系を利用して決定する方法を使用することができる。この目的のために、例えば、酵素免疫アッセイを利用して、固定された標的抗原に対する結合に関して対象の抗体が既知の抗体と競合する程度が試験される。この目的のために、適当に固定された標的抗原が、標識された形態の既知の抗体および過剰な対象の抗体と共にインキュベートされる。結合した標識の検出によって、対象の抗体が既知の抗体の結合と置き換わることができる程度を容易に確認することができる。同じ濃度の場合で20%を超える置換、別の態様では30%を超える置換があるとき、または、高濃度の場合、1つの態様では既知抗体を基準として対象抗体が $10^3$ - $10^5$ 倍過剰である場合で70%を超える置換、別の態様では80%を超える置換があるとき、エピトープの重複が存在し、両方の抗体は同じかまたは重複するエピトープに結合する。

40

50

## 【 0 0 6 5 】

寄託細胞株DSM ACC3076から得られる抗体の特異性は、それぞれの抗体のビオチニル化およびジゴキシゲニル化バリエーションならびに異なる種由来の血清の各々を用いるサンドイッチELISAにおいて示すことができる。このアッセイにおいて（概要については図1を参照のこと）、捕捉および検出抗体は、同じ細胞株から得られる同じエピトープに結合するものである。そのようなアッセイは、実験動物の血清中のヒトIgGの検出および定量的のために汎用的に利用できるアッセイであるために、その結合部位が例えばグリコシル化部位または潜在的脱アミド化部位などの任意の2次的抗体修飾に非依存性である抗ヒトIgG抗体を必要とする。そうでなければ、検出および定量したい新規の治療抗体の各々にアッセイを最適化することが必要となる。さらに、本明細書で報告する抗体はまた、分析される治療抗体と異なり、参照標準および陽性対照として利用することができる。

10

## 【 0 0 6 6 】

本明細書で報告する抗体は、ヒトおよびチンパンジーの免疫グロブリンクラスGの免疫グロブリンに対して高い特異性があり、抗体M-R10Z8E9よりも良好な種間特異性（inter-species specificity）を示し、実験動物のクラスGの免疫グロブリンに特異的に結合しないことを見ることができると示すことができる。

## 【 0 0 6 7 】

本明細書で報告する抗体の特異性はまた、BIAcore技術を用いる表面プラズモン共鳴実験において示すことができる。ドットプロット実験を使用することにより、本明細書で報告する抗体に結合されたエピトープが高次構造エピトープであり、その結合は変性したヒト免疫グロブリンでは失われることを示すことができる（図2）。

20

## 【 0 0 6 8 】

本明細書で報告する別の局面は、捕捉抗体として本明細書で報告するビオチニル化抗体およびトレーサー抗体として本明細書で報告するジゴキシゲニル化抗体を含む、実験動物から得られた試料中の、ヒトIgG1クラスのヒト抗体またはその誘導体、例えばヒトIgG1 C H1ドメインを含むFabフラグメントを定量するためのアッセイである。図3には、アッセイ設計の概要が示されている（捕捉抗体、例えばビオチニル化M-1.19.31、分析物：ヒト抗体のFabフラグメント、トレーサー抗体、例えばジゴキシゲニル化M-1.3.2）。このアッセイは、2つの異なるエピトープでヒトIgGのFabフラグメントに結合する捕捉およびトレーサー抗体を必要とする。

30

## 【 0 0 6 9 】

本明細書で報告する別の局面は、ヒトIgGの異なるドメイン上のエピトープに特異的に結合する捕捉抗体およびトレーサー抗体を含むアッセイである。このアッセイでは、インタクトな治療抗体のみが、陽性のアッセイ結果および検出可能なシグナルを生じるであろう。1つの態様において、捕捉抗体およびトレーサー抗体は、独立に、一方は抗体M-1.3.2、M-1.5.8、M-1.7.10およびM-1.19.31から、他方は抗体M-R10Z8E9から選択される。実験動物におけるヒトIgGの構造完全性を検証するための、この局面にしたがう例示的なアッセイでは、捕捉抗体としてビオチニル化M-R10Z8E9、分析物として抗IL13R 1抗体、トレーサー抗体としてジゴキシゲニル化M-1.19.31を使用することができる（図4には、アッセイ設計の概要およびこのアッセイ用の較正曲線が示されている）。

40

## 【 0 0 7 0 】

本明細書で報告するさらなる局面は、抗薬物抗体（ADA）を模倣する参照標準および/または陽性対照として抗ヒトIgG抗体を使用するアッセイである。これは、アッセイ開発段階において、そのアッセイの最適なアッセイ条件および試験の堅牢性を決定する、すなわち、異なる標準試薬/陽性対照を用いた場合のアッセイ性能を検査するのに有用であり得る。ADAはポリクローナルでありおそらくFabフラグメントとFc部分の両方に対して指向しているという事実を鑑みると、この設計は特に有利である。

## 【 0 0 7 1 】

本明細書で報告するさらなる局面において、細胞株DSM ACC3076から得られる抗体は、本明細書で報告する方法において、ヒトIgG1クラスの治療抗体に特異的に結合しかつ実験

50

動物の抗体に特異的に結合しない抗体として使用される。

【 0 0 7 2 】

本明細書で報告する1つの局面は、実験動物から得られた試料中のヒトIgG1クラスの治療抗体の全治療抗体、活性治療抗体、ADA結合治療抗体または抗原結合治療抗体の濃度を決定するための、ヒトIgG1クラスの治療抗体に特異的に結合しかつ実験動物の抗体に特異的に結合しない抗体の使用に関連する。1つの態様において、この方法において使用される抗体は、細胞株DSM ACC3076から得られる抗体により認識されるものと同じかまたは重複するエピトープに結合する抗体から選択される。

【 0 0 7 3 】

本明細書で報告する1つの局面は、実験動物から得られた試料中のヒトIgG1クラスの治療抗体の全治療抗体、活性治療抗体、ADA結合治療抗体または抗原結合治療抗体の濃度を決定するための、どちらもヒトIgG1クラスの治療抗体に特異的に結合しかつ実験動物の抗体に特異的に結合しない2つの抗体の使用であって、一方の抗体が捕捉抗体であり、一方の抗体がトレーサー抗体である使用に関連する。1つの態様において、治療抗体は、Fabフラグメントである。

【 0 0 7 4 】

それぞれ抗体M-1.3.2、M-1.5.8、M-1.7.10およびM-1.19.31を発現する、ハイブリドーマ細胞株であるMAK<H-IgG>M-1.3.2、MAK<H-IgG>M-1.5.8、MAK<H-IgG>M-1.7.10、MAK<H-IgG>M-1.19.31は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約の下で、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Germanyに寄託された。

細胞株	寄託番号	寄託日
MAB<h-Fc $\gamma$ >M-R10Z8E9	DSM ACC2708	22.12.2004
MAK<H-IgG>M-1.3.2	DSM ACC3006	24.09.2009
MAK<H-IgG>M-1.5.8	DSM ACC3007	24.09.2009
MAK<H-IgG>M-1.7.10	DSM ACC3008	24.09.2009
MAK<H-IgG> M-1.19.31	DSM ACC3076	30.06.2010

これらの細胞株、および同細胞株から得ることのできる抗体は、本発明の一局面である。

【 0 0 7 5 】

具体的態様

態様1： ヒトIgG1クラスの抗体に特異的に結合し、かつアカゲザル、キヌザル、ヒヒザルおよびカニクイザルの免疫グロブリンに特異的に結合しないことを特徴とする、モノクローナル抗体。

態様2： カッパ軽鎖を有するヒトIgG1クラスの抗体に結合することを特徴とする、態様1記載の抗体。

態様3： ラムダ軽鎖を有するヒトIgG1クラスの抗体に結合しないことを特徴とする、前記態様のいずれか一つに記載の抗体。

態様4： ラムダ軽鎖を有するヒトIgG1クラスの抗体に結合することを特徴とする、態様1および2のいずれか一つに記載の抗体。

態様5： ヒトIgG2クラスの抗体に結合しないことを特徴とする、態様1、2および4のいずれか一つに記載の抗体。

態様6： ヒトIgG4クラスの抗体に結合しないことを特徴とする、態様1、2および4~5のいずれか一つに記載の抗体。

態様7： ラムダ軽鎖を有するヒトIgG1クラスの抗体のFabに結合することを特徴とする、態様1、2および4~6のいずれか一つに記載の抗体。

態様8： カッパ軽鎖を有するヒトIgG1クラスの抗体のFabに結合することを特徴とする、前記態様のいずれか一つに記載の抗体。

態様9： ヒトIgG3クラスの抗体に結合しないことを特徴とする、前記態様のいずれか一

10

20

30

40

50

つに記載の抗体。

態様10： 非ヒト動物由来の抗体であることを特徴とする、前記態様のいずれか一つに記載の抗体。

態様11： ヒトIgG1クラスの抗体の重鎖定常領域1に特異的に結合することを特徴とする、前記態様のいずれか一つに記載の抗体。

態様12： 細胞株DSM ACC3006から得られるモノクローナル抗体。

態様13： 細胞株DSM ACC3006または細胞株DSM ACC3007によって産生される抗体と同じかまたは重複するエピトープに特異的に結合することを特徴とする、モノクローナル抗体。

態様14： 細胞株DSM ACC3006。

態様15： 細胞株DSM ACC3007から得られるモノクローナル抗体。

態様16： 細胞株DSM ACC3008から得られるモノクローナル抗体。

態様17： 細胞株DSM ACC3008によって産生される抗体と同じかまたは重複するエピトープに特異的に結合することを特徴とする、モノクローナル抗体。

態様18： 細胞株DSM ACC3007。

態様19： 細胞株DSM ACC3008。

態様20： 細胞株DSM ACC3076から得られるモノクローナル抗体。

態様21： 細胞株DSM ACC3076によって産生される抗体と同じかまたは重複するエピトープに特異的に結合することを特徴とする、モノクローナル抗体。

態様22： 細胞株DSM ACC3076。

態様23： 免疫アッセイにおける態様1～13および15～17および20～21のいずれか一つに記載の抗体の使用。

態様24： (a) 捕捉試薬としての、細胞株DSM ACC3006またはDSM ACC3007またはDSM ACC3008またはDSM ACC3076から得られる抗体、

(b) 検出試薬としての、細胞株DSM ACC3006またはDSM ACC3007またはDSM ACC3008またはDSM ACC3076から得られる抗体、を含む、キット。

態様25： 実験動物から得られた試料中のヒトIgG1クラスの治療抗体を検出する方法であって、

(a) 分析する試料を、態様1～13および15～17および20～21のいずれか一つに記載のモノクローナル抗体と共にインキュベートする工程、

(b) 任意で、前記試料を、全治療抗体、活性治療抗体、ADA結合治療抗体または抗原結合治療抗体の選択的検出のための試薬と共にインキュベートする工程、ならびに

(c) (a) または (b) で形成された複合体を治療抗体の存在と相関付け、それによって治療抗体を検出する工程、

を含む、前記方法。

態様26： 捕捉抗体 (capture antibody) およびトレーサー抗体 (tracer antibody) を含む免疫アッセイを用いて実験動物から得られた試料中のヒトIgG1クラスの治療抗体を決定する方法であって、捕捉抗体および/またはトレーサー抗体の両方が、独立して、態様1～13および15～17および20～21のいずれか一つに記載の抗体から選択されることを特徴とする、前記方法。

態様27： 治療抗体がFabであることを特徴とする、態様25～26のいずれか一つに記載の方法。

態様28： 実験動物が、マーモセットおよびタマリン、旧世界ザル、コビトキツネザルおよびネズミキツネザル、テナガザルおよび小型類人猿、真正キツネザルの科のメンバー、ならびにそれらの交雑種を含む群から選択されることを特徴とする、態様1～13および15～17および20～21に記載の抗体ならびに態様25～27のいずれか一つに記載の方法。

態様29： 実験動物から得られた試料中の全治療抗体、活性治療抗体、ADA結合治療抗体または抗原結合治療抗体の濃度を決定するための、ヒトIgG1クラスの治療抗体に特異的に結合しかつ実験動物の免疫グロブリンに特異的に結合しない抗体の使用であって、該抗体が、態様1～13および15～17および20～21のいずれか一つに記載の抗体である、前記使用

10

20

30

40

50

。 態様30： 細胞株DSM ACC3006および/または細胞株DSM ACC3007および/または細胞株DSM ACC3008および/または細胞株DSM ACC3076および/または細胞株DSM ACC2708によって産生される抗体の混合物を含むことを特徴とする、抗体組成物。

態様31： 態様25～27のいずれか一つに記載の方法における、態様30記載の抗体組成物の使用。

#### 【0076】

以下の実施例および図面は、本発明の理解を助けるために提供されるものであり、その真の範囲は添付の特許請求の範囲に示されている。本発明の精神から逸脱することなく、示されている手順において変更が為され得ることを理解されたい。

10

#### 【0077】

##### 図面の説明

SEQ ID NO: 01 ヒトIgG1 (カフカス人アロタイプ)  
 SEQ ID NO: 02 ヒトIgG1 (アフリカ系アメリカ人アロタイプ)  
 SEQ ID NO: 03 ヒトIgG1バリエーション (カフカス人アロタイプ)  
 SEQ ID NO: 04 ヒトIgG1 CH1ドメイン

##### 【図面の簡単な説明】

#### 【0078】

【図1】実験動物中のヒト抗体 (ヒトIgG) の定量のための完全汎用アッセイのアッセイ形式。

20

【図2】抗ヒトIgG抗体のドットプロット：例示の参照抗体として、Pセレクトリンに対する抗体を選択した；ネイティブ (左カラム) および変性 (右カラム) 形態の参照抗体をニトロセルロース膜上にドット配置し、それぞれのジゴキシゲニル化抗ヒトIgG抗体；(a) M-R10Z8E9、(b) M-1.19.31によって検出している。

【図3】実験動物から得られた試料中のヒト抗体誘導体の定量アッセイ；アッセイ設計の概要。

【図4】実験動物におけるヒトIgGの構造完全性 (structural integrity) の検証アッセイ：(a) アッセイ設計の概要、(b) 較正曲線。

##### 【実施例】

#### 【0079】

30

##### 実施例1

ヒトIgGのF(ab')<sub>2</sub>フラグメント (免疫原) の調製

100 mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH 3.7中の、クラスGの全長ヒト抗体 (ヒトIgG) を、ペプシンと共にインキュベートした (IgG 1mgあたり1μgのペプシン)。その断片化は、分析用ゲルろ過により分析し、pH値をリン酸カリウムの添加により6.5に調整することによって、90分後に停止させた。10 mM塩化ナトリウムを含む10 mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5に対してこの混合物を透析した後、その溶液をSPセファロースクロマトグラフィカラムに投入し、塩勾配下で溶出させた個々の画分を、個別に、分析用ゲルろ過によって分析した。抗体F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを含むプールを、ヒトFc に対するポリクローナル抗体が固定されたアフィニティマトリックスに投入し、微量のFc フラグメントを除去した。その流出液をプールし、約16 mg/mlまで濃縮し、そして最後にゲルろ過カラム (Superdex 200) に投入した。

40

#### 【0080】

##### 実施例2

モノクローナル抗ヒトIgG抗体の作製

##### (a) マウスの免疫

8-12週齢のメスNMRIマウスの各々に対して、実施例1において調製した抗体F(ab')<sub>2</sub>フラグメント100μgとCFA (完全フロイドアジュバント) の混合物を用いて、腹腔内で初期免疫を行った。6および10週間後に、マウス1匹あたり100μgの抗体F(ab')<sub>2</sub>フラグメントのIFA (不完全フロイドアジュバント) との混合物を各々用いる2回のさらなる腹腔内免疫工

50

程を実施した。その後、融合前の3日間に、50  $\mu$ gの抗体F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを含むPBS（リン酸緩衝生理食塩水）を各々用いる静脈内ブースト免疫を行った。

【0081】

(b) 融合およびクローニング

(a) で免疫したマウスの脾臓細胞を、Galfre and Milstein (Galfre, G. and Milstein, C, Methods Enzymol. 73 (1981) 3-46) にしたがって骨髄腫細胞に融合させた。およそ  $2.1 \times 10^8$  の脾細胞を  $4.2 \times 10^7$  の骨髄腫細胞 (P3x63-Ag8.653, ATCC CRL1580) と混合し、遠心分離 (300 x g および 4 分で10分間) した。その後、この細胞を、FCS (ウシ胎仔血清) を含まない培養培地 RPMI 1640 で一度洗浄し、50 ml の尖頭バイアル中、400 x g で再度遠心分離した。その後、1 ml の PEG (ポリ(エチレングリコール)、分子量 4,000 g/mol) を加え、ピペティングにより混合を行った。1分後、37 °C の水浴中で、FCS を含まない RPMI 1640 を 5 ml 滴下し、懸濁物を混合し、10% (v/v) FCS を含む RPMI 1640 を添加して最終量 50 ml とし、その後、遠心分離した。沈殿した細胞を、10% FCS を含む RPMI 1640 中に再懸濁させ、これを、成長因子組換えマウスインターロイキン6 (Peprotech, 0.5 ng/ml) を含むヒポキサンチン・アザセリン選択培地 (10% FCS を含む RPMI 1640 中に 100 mmol/l ヒポキサンチン、1  $\mu$ g/ml アザセリン) にプレティングした。11日後、その初代培養物を、目的の抗体の合成についてアッセイした (実施例3を参照のこと)。ビオチニル化抗体 F(ab')<sub>2</sub> フラグメントおよびビオチニル化ヒト正常 IgG に対する結合を示した初代培養物を、成長因子組換えマウスインターロイキン6 (Peprotech, 0.5 ng/ml) を含む培地中での、フローサイトメーター (FACSAria, BD Biosciences) を用いる、96ウェル細胞培養プレートへの単一細胞堆積 (single cell deposition) により、分離した。このプロトコルにしたがい、細胞株 DSM ACC3076 を得た。

【0082】

(c) 免疫グロブリンの産生

(b) で得られたハイブリドーマ細胞株を、10% FCS および一般的に使用されている補充物質を補充した RPMI 1640 中に、1ml あたり約  $2 \times 10^5$  細胞の初期細胞密度 (生存細胞) となるよう接種し、およそ3週間の期間、T型フラスコ (Cellline, IBS) 中で増殖させた。この培養上清からの抗体の精製は、標準的な、例えば Bruck, C., et al., Methods Enzymol. 121 (1986) 587-596 で報告されているようなタンパク質化学的方法にしたがい行った。

【0083】

### 実施例3

抗ヒトIgG抗体の検出のためのスクリーニングアッセイ

(a) ヒトIgGに結合する抗体の1次スクリーニング

ハイブリドーマ細胞の培養上清中に存在する抗体の特異性の決定のために、組換えストレプトアビジンがプレコートされたMTP (マイクロタイタープレート) (MicroCoat, Bernried, ロットMC 1098) を、1.0% (w/v) BSA II が補充されたPBS中の、免疫プロセスで使用したビオチニル化ヒトIgG、250 ng/ml またはビオチニル化ヒトIgG、250 ng/ml のそれぞれでコートし (ウェルあたり 100  $\mu$ l、振盪しながら周囲温度で60分間のインキュベーション)、その後、0.9% (w/v) NaCl / 0.05% Tween (登録商標) 20 で3回洗浄した。次の工程で、アッセイする抗体溶液 (培養上清) をウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、周囲温度で60分間、振盪しながらインキュベートした。各ウェルに対する 0.9% (w/v) NaCl / 0.05% Tween (登録商標) 20 による3回の洗浄工程の後、ポリクローナルヒツジ抗マウスFc 抗体のセイヨウワサビペルオキシダーゼ標識 F(ab')<sub>2</sub> フラグメント 100  $\mu$ l を、結合した試料抗体の検出のために添加し、周囲温度で60分間、振盪しながらインキュベートした。その後、上記のような洗浄を行った。最後に、ウェルあたり 100  $\mu$ l の ABTS (登録商標) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany; カタログ番号 1684302) を添加した。周囲温度で30分間のインキュベーションの後、市販のマイクロタイタープレート ELISA リーダーにおいて 405 および 492 nm [405/492] の吸光 (OD) を測定した。このスクリーニングにより、ヒトIgG およびヒトIgG に十分結合する抗体を選択した。この選択された抗体をさらに、アッセイ (b) に供した。

## 【 0 0 8 4 】

(b) 他の種のIgGに対する交差反応性が最小限の抗体の選択

ビオチニル化ヒトIgGを、第1工程において、ストレプトアビジンコートされたマイクロタイタープレート (SA-MTP) のウェルに結合させた。余分な非結合抗体を洗浄により除去した。その後、試料および参照標準 (例えば、実施例2で得られた抗ヒトIgG抗体) を緩衝液および10 %カニクイザル血清で希釈した。希釈した試料をプレートに添加し、周囲温度で60分間、振盪しながらインキュベートした。非結合物質を洗い流した後、ジゴキシゲニル化形態の第1工程のヒトIgGをプレートのウェルに添加し、さらに60分間インキュベートした。洗浄後、結合したジゴキシゲニル化抗体を、抗ジゴキシゲニン抗体-HRPコンジュゲートにより検出した。抗体-酵素コンジュゲートのHRP (セイヨウワサビペルオキシダーゼ) は、ABTS基質の発色反応を触媒する。このシグナルを、ELISAリーダーにより、405 nmの波長 (参照波長: 490 nm) で測定する。各血清試料の吸光値は、三連で決定した。

## 【 0 0 8 5 】

カニクイザル血清中および緩衝液中で高いアッセイ応答を示した抗体を選択した。この2次スクリーニングにより、ヒトIgGに十分結合し、他の種のIgGに対する交差反応性が最小限の抗体を選択した。

## 【 0 0 8 6 】

## 実施例4

表面プラズモン共鳴による抗体結合性 / 特異性の評価

すべての測定を、CM5チップを用いるBIAcore (登録商標) T100機器において実施した。このチップに対する抗体のコーティングは、標準的なアミンカップリングにより行った。そうでないことが示されない限り、すべてのインキュベーションは、HBS緩衝液 (HEPES、NaCl、pH 7.4) 中、25 °Cで実施した。飽和量のポリクローナルヤギ抗マウスFcガンマ抗体を、アミンカップリングによりCM5チップの一つのフローセルに固定した。その後、ヒトIgGに対するモノクローナルマウス抗体を、流速30  $\mu$ l/分で60秒間注入し、抗マウスFc抗体に結合させた。すべての動物血清を、HBS緩衝液で希釈した。結合は、流速30  $\mu$ l/分での100分の1希釈血清の注入および60秒間のインキュベーションにより分析した。解離は、チップ表面を180秒間HBS緩衝液で洗浄することによって測定した。BIAcore (登録商標) のBIAevaluationソフトウェアを使用し、解離定数の値 ( $=K_D$ ) を1:1ラングミュアフィッティングモデルから計算した。すべての動物血清において、この計算は、IgGレベルが15 mg/mlであるという仮定に基づき行った。試験抗体の注入開始から80秒後のシグナル値を、結合したIgG量の比較のために選択した (表1を参照のこと)。

## 【 0 0 8 7 】

(表1) 異なるモノクローナル抗ヒトIgG抗体に対する動物血清の結合の結合シグナル [RU] および  $K_D$  値

抗体 (→) 試料 (↓) (血清)	M-R10Z8E9		M-1.19.31	
	結合 RU	$K_D$ mol/l	結合 RU	$K_D$ mol/l
チンパンジー	159	$2.21 \times 10^{-10}$	352	$4.92 \times 10^{-9}$
ヒト	151.3	$1.77 \times 10^{-10}$	356	$1.52 \times 10^{-8}$
イヌ	35.5	$3.17 \times 10^{-8}$	3	結合なし
アカゲザル	-1.9	結合なし	36	$2.15 \times 10^{-6}$
マーモセット	18.9	$2.04 \times 10^{-7}$	0	結合なし
ヒヒ	-1.5	結合なし	41	$4.53 \times 10^{-6}$
カニクイザル	-1.4	結合なし	31	$1.23 \times 10^{-6}$

## 【 0 0 8 8 】

実施例5

## (a) マウスモノクローナル抗ヒトIgG抗体の精製

実施例2で得られた細胞株の発酵上清を約10倍濃縮し、20 mM TRIS、1 M硫酸アンモニウムを含む緩衝液、pH 9.0に移し、プロテインAセファロースクロマトグラフィーカラムに投入した。pH 5.0の0.2 Mクエン酸ナトリウム、0.2 M硫酸アンモニウムにより得られた溶出物を、リン酸緩衝液、pH 7.5に対して透析した。(発酵プロセス中のFCS由来の)ウシIgG混入物は、ウシIgGに対する固定された抗体による免疫吸着によって分離した。

【0089】

## (b) ピオチニル化抗ヒトIgG抗体の調製

リン酸緩衝液、pH 8.5中の(a)で得られた抗ヒトIgG抗体を、約5 mg/mlのタンパク質濃度になるよう調整した。D-ピオチニル-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドをDMSOに溶解させ、これを抗体溶液に1:5のモル比で添加した。この反応を、60分後にL-リジンを添加することによって停止させ、過剰な標識試薬を、150 mM NaClを含む50 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 7.5に対する透析により除去した。

【0090】

## (c) ジゴキシゲニル化抗ヒトIgG抗体の調製

リン酸緩衝液、pH 8.5中の(a)で得られた抗ヒトIgG抗体を、約5 mg/mlのタンパク質濃度になるよう調整した。ジゴキシゲニン 3-O-メチルカルボニル-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドをDMSOに溶解させ、これを抗体溶液に1:4のモル比で添加した。この反応を、60分後にL-リジンを添加することによって停止させ、過剰な標識試薬を、150 mM NaClを含む50 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 7.5に対する透析により除去した。

【0091】

実施例6

実験動物由来の試料中のヒト抗体(ヒトIgG)の定量のための完全汎用アッセイ

ピオチニル化抗体M-1.19.31は、第1工程において、ストレプトアビジンコートされたマイクロタイタープレート(SA-MTP)に結合させることができる。余分な非結合抗体は洗浄により除去することができる。試料/標準、例えば、カニクイザル血清中にスパイクされた抗IL1R抗体、抗IL13R 1抗体、抗Abeta抗体および抗IL6R抗体を、一連の濃度でプレートに添加し、周囲温度で60分間、振盪しながらインキュベートしてもよい。非結合抗体を洗い流した後、100 µlのジゴキシゲニル化抗体M-1.19.31がプレートに添加され得る。洗浄後、結合したジゴキシゲニル化抗体は、抗ジゴキシゲニン抗体-HRPコンジュゲートにより検出することができる。各血清試料の吸光値は、三連で決定した(方法の概要については図1を参照のこと)。

【0092】

実施例7

実験動物由来の試料中のヒト抗体誘導体(例えば、Fabフラグメント)の定量アッセイ

ピオチニル化抗体M-1.19.31は、第1工程において、ストレプトアビジンコートされたマイクロタイタープレート(SA-MTP)に結合させることができる。余分な非結合抗体は洗浄により除去することができる。試料/標準、例えば、カニクイザル血清中に添加された抗IGF1R抗体Fabフラグメントを、ウェルに添加し、周囲温度で60分間、振盪しながらインキュベートしてもよい。非結合抗体を洗い流した後、100 µlのジゴキシゲニル化抗体M-1.3.2がプレートの各ウェルに添加され得る。洗浄後、結合したジゴキシゲニル化抗体は、抗ジゴキシゲニン抗体-HRPコンジュゲートにより検出することができる。各血清試料の吸光値は、三連で決定され得る(方法の概要については図3を参照のこと)。

【0093】

実施例8

実験動物由来の試料中に存在するヒトIgGの構造完全性の検証アッセイ

ピオチニル化抗体M-1.19.31を、第1工程において、ストレプトアビジンコートされたマイクロタイタープレート(SA-MTP)に結合させることができる。余分な非結合抗体は洗浄により除去することができる。試料/標準、例えば、カニクイザル血清中に添加された抗

10

20

30

40

50

IL13R 1抗体を、プレートに添加し、周囲温度で60分間、振盪しながらインキュベートしてもよい。非結合抗体を洗い流した後、100 $\mu$ lのジゴキシゲニル化抗体M-1.3.2がプレートに添加され得る。洗浄後、結合したジゴキシゲニル化抗体は、抗ジゴキシゲニン抗体-HRPコンジュゲートにより検出することができる。各血清試料の吸光値は、三連で決定され得る。

【0094】

#### 実施例9

本発明による抗ヒトIgG抗体と組み合わせてFc融合タンパク質（抗原）を使用する、実験動物由来の試料中のヒト抗体（ヒトIgG）の定量アッセイ

ビオチニル化抗原（Bi-X）を、第1工程において、ストレプトアビジンコートされたマイクロタイプレート（SA-MTP）に結合させた。余分な非結合抗原を洗浄により除去した。その後、カニクイザル血清中に添加された抗X抗体を固定されたヒト受容体Xに結合させた。非結合物質を洗い流した後、結合した抗X抗体を、ヒトFabフラグメントに対するジゴキシゲニル化モノクローナル抗体（抗体M-1.19.31）およびその後のセイヨウワサビペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体とのインキュベーションにより検出した。各血清試料の吸光値は、三連で決定する。

【0095】

（表2）ODデータ

ng/ml	OD405nm
50.00	2.006
25.00	1.203
12.50	0.662
6.25	0.350
3.13	0.188
1.56	0.107
0.78	0.071
0	0.034

【0096】

#### 実施例10

ドットプロット - 高次構造エピトープ 対 線状エピトープ

抗ヒトIgG抗体が高次構造エピトープを検出するのか線状エピトープを検出するのかを決定するため、ドットプロット分析を行った。

【0097】

この試験において、ネイティブおよび変性形態の抗原タンパク質（ヒトIgG）をニトロセルロース膜上にドット配置した。変性形態を得るために、抗原タンパク質を、SDSと共に37 $^{\circ}$ Cで一晩、シェーカー上でインキュベートした。両方の形態とも、一連の濃度で膜上にドット配置した。膜を完全に乾燥させた後、その表面を、周囲温度で60分間、振盪しながら、ブロッキング緩衝液（Roti-Block, Roth, Germany）でブロックした。膜の洗浄後、それを、ジゴキシゲニル化抗体M-1.19.31を含む溶液と共にインキュベートした。洗浄後、結合したジゴキシゲニル化抗体を、抗ジゴキシゲニン抗体-HRPコンジュゲートにより検出した。抗体-酵素コンジュゲートのHRPIは、BM-Blue基質の発色反応を触媒する。このシグナルは、直接視覚的に利用でき、スキャナーで捕捉することができる。

【0098】

#### 実施例11

ELISAによる抗体結合性 / 特異性の評価

どの種のヒトIgGサブクラスが研究対象の抗ヒト抗体に結合するかを決定するため、架橋ELISA分析を行った。

【0099】

第1工程において、ビオチニル化抗体M-R10Z8E9、M-1.3.2、M-1.5.8、M-1.7.10およびM-

1.19.31を、ストレプトアビジンマイクロタイタープレートに結合させた。第2工程において、異なるサブクラスのスヒトIgG抗体をインキュベートした。ヒトIgG1カッパ；ヒトIgG1ラムダ；ヒトIgG4；キメラヒトIgG1；ヒトIgG2（ポリクローナル精製ヒトIgG2）およびヒトIgG3（ポリクローナル精製ヒトIgG3）を、一連の希釈率で調製し、ピオチニル化抗ヒト抗体でコートされたストレプトアビジンマイクロタイタープレート上でインキュベートした。洗浄工程の後、コーティングに使用したのと同じ抗体を、ジゴキシゲニル化形態で、検出抗体として使用した。これは、同じ抗ヒト抗体クローンをコーティングと検出に使用したことを意味する。例えば、あるプレートは、M-1.7.10 Biでコートし、M-1.7.10-Digを検出に使用した。インキュベーションおよび洗浄工程の後に、セイヨウワサビペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体とのインキュベーションを行った。各血清試料の吸光値は、三連で決定した。

10

【 0 1 0 0 】

(表3) 架橋ELISA分析のまとめ

試料	コーティング/検出に使用した抗体				
	mAb M-R10Z8E9	mAb M-1.3.2	mAb M-1.5.8	mAb M-1.7.10	mAb M-1.19.31
IgG1-κ	++	++	++	++	++
IgG1-λ	++	--	--	--	++
IgG4	++	+	+	++	--
キメラ IgG1	++	+	+	++	++
IgG2	+	+-	+-	++	--
IgG3	+-	--	--	--	--
IgG1-κ Fab	--	++	++	++	++
IgG1-λ Fab	--	--	--	--	+

20

++	強い陽性
+	陽性
+-	弱いシグナル
--	陰性

30

【 0 1 0 1 】

## 実施例12

SPRを利用した、交差競合に基づく、ヒトIgG1クラス抗体に対する抗体のエピトープの特徴付け

機器： BIACORE（登録商標）T100

チップ： CM5（BIAcore BR-1006-68）

結合： アミンカップリング

緩衝液： PBS（BIAcore BR-1006-72）、pH 7.4、25

40

【 0 1 0 2 】

交差競合（cross-competition）を通じたエピトープ結合アッセイのために、多量の抗マウスFc 抗体（ヤギ由来、Jackson Immuno Research Cat.No.115-005-071）を、抗ヒトIgG抗体の提示用のセンサーチップ表面に結合させる（およそ8,000~12,000 RU）。10 μg/mlの第1の抗ヒトIgG抗体の注入の後、捕捉用抗マウス抗体の残存するフリーの結合能を、250 μg/mlの Maus免疫グロブリンで飽和させる。フリーの抗マウス結合部位のプロッキングの後、ヒトFabフラグメントを10 μg/mlの濃度で1分間注入し、第1の抗ヒトIgG抗体に結合させる。第2の抗ヒトIgG抗体を10 μg/mlの濃度で1分間注入する。第1と第2の抗体の結合部位が異なる場合、第2の抗体は、固定されたヒトFabフラグメントに結合すること

50

ができるであろう。結合部位が同じであれば、第2の抗ヒトIgG抗体の結合は見られないであろう。第2の結合が陽性であることは、10 RU結合のカットポイントにより定義される。各サイクルの後、100 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を注射して結合免疫複合体を除去することによって、センサーチップを再生する。共有結合した抗マウス抗体のみが、チップに対する結合を維持するであろう。

【0103】

可能性のある抗ヒト抗体の組み合わせをすべて分析することによって、エピトープグループを定義する。

【0104】

(表4) BIAcore結合アッセイの結果(応答性[RU])

第1の抗ヒトIgG	第2の抗ヒトIgG			
	mAb M-1.3.2	mAb M-1.5.8	mAb M-1.7.10	mAb M-1.19.31
mAb M-1.3.2	-3.6	-2.1	32.1	18.4
mAb M-1.5.8	-4.1	-3.1	28.5	15.5
mAb M-1.7.10	93.5	80.8	4.4	23.8
mAb M-1.19.31	183.7	165.9	114.0	-2.3

【0105】

(表5) エピトープグループの結果

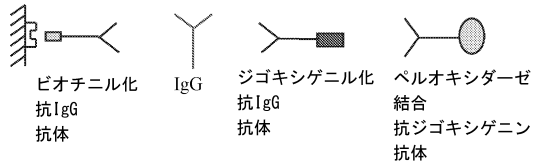
エピトープグループ:	
1	mAb<HuIgG>M-1.7.10
2	mAb<HuIgG>M-1.3.2 /1.5.8
3	mAb<HuIgG>M-1.19.31

10

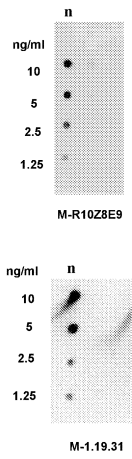
20

30

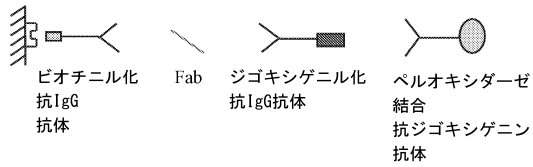
【図1】



【図2】



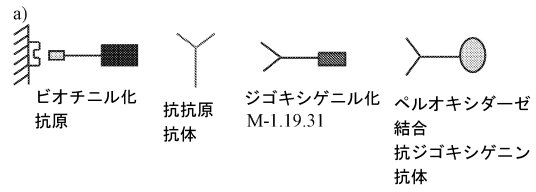
【図3】



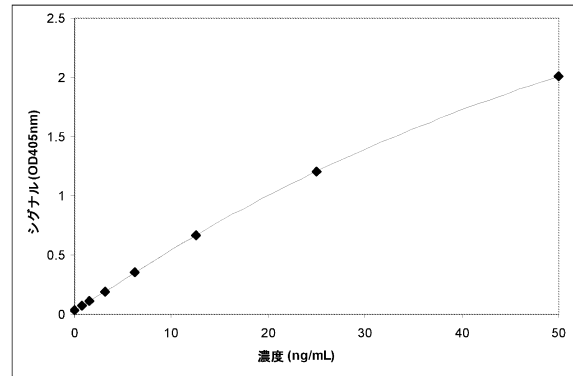
【配列表】

000576628600001.app

【図4】



b)



## フロントページの続き

- (51) Int.Cl. F I  
 C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C
- (74)代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699  
 弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
 弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340  
 弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889  
 弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072  
 弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 エシグ ウルリッヒ  
 ドイツ連邦共和国 プラネック ジョセフ ボン ヒルシュ シュトラーセ 5 1
- (72)発明者 クロスターマン ステファン  
 ドイツ連邦共和国 ノイリート ケーンバウーンシュトラーセ 8
- (72)発明者 コワレウスカイ フランク  
 ドイツ連邦共和国 ミュンヘン アイデンバックシュトラーセ 1 3 5
- (72)発明者 スチューベンラウフ カイ グナー  
 ドイツ連邦共和国 ペンツブルグ アン デー フライハイト 1 0 5
- (72)発明者 ボゲル ルドルフ  
 ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム アイデンバックシュトラーセ 1 3 5
- (72)発明者 ウェッセルス ウヴェ  
 ドイツ連邦共和国 ペンツブルグ シンデルスドーフアー シュトラーセ 6 0 エフ

審査官 吉岡 沙織

- (56)参考文献 特表2008-525766(JP,A)  
 特表2013-508700(JP,A)  
 Immunology Letters, 1992年, Vol.31, P.143-168  
 PRIMATES, 2002年, Vol.43, No.4, P.343-349

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 C 0 7 K 1 6 /  
 G 0 1 N 3 3 /  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )

专利名称(译)	抗人IgG1抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP5766286B2</a>	公开(公告)日	2015-08-19
申请号	JP2013522270	申请日	2011-08-12
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	エシグウルリッチ クロスターマンステファン コワレウスカイフランク スチューベンラウフカイグナー ボゲルルドルフ ウェッセルスウヴェ		
发明人	エシグ ウルリッチ クロスターマン ステファン コワレウスカイ フランク スチューベンラウフ カイ-グナー ボゲル ルドルフ ウェッセルス ウヴェ		
IPC分类号	C07K16/42 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/532 C12P21/02		
CPC分类号	C07K16/4283 C07K2317/30 C07K2317/33 C07K2317/54 C07K2317/92 C07K16/4241 G01N33/6854 G01N33/686 C07K16/18 C07K16/42 C12N5/12 G01N33/68 C12N5/163 C07K2317/14		
FI分类号	C07K16/42.ZNA C12N5/00.102 G01N33/53.N G01N33/577.B G01N33/532.A C12P21/02.C		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	2010173090 2010-08-17 EP		
其他公开文献	JP2013535482A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本文报道了特异性结合人IgG1抗体并且不特异性结合实验动物的免疫球蛋白的单克隆抗体以及该抗体在免疫测定中的用途。

(21) 出願番号	特願2013-522270 (P2013-522270)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成23年8月12日 (2011. 8. 12)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2013-535482 (P2013-535482A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成25年9月12日 (2013. 9. 12)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/063806		T
(87) 国際公開番号	W02012/022682		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成24年2月23日 (2012. 2. 23)		グレンツアーヘルストラッセ124
審査請求日	平成25年2月5日 (2013. 2. 5)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	10173090.1		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成22年8月17日 (2010. 8. 17)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 善名 雅夫
		(74) 代理人	100160823
			弁理士 山口 裕幸
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く