

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-531762

(P2015-531762A)

(43) 公表日 **平成27年11月5日(2015.11.5)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/44 (2006.01)	CO7K 16/44	4H045
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 N	
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
	GO1N 33/543 545A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2015-526940 (P2015-526940)
 (86) (22) 出願日 平成25年8月8日 (2013.8.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月13日 (2015.2.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/066625
 (87) 国際公開番号 W02014/026905
 (87) 国際公開日 平成26年2月20日 (2014.2.20)
 (31) 優先権主張番号 12180835.6
 (32) 優先日 平成24年8月17日 (2012.8.17)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/684,836
 (32) 優先日 平成24年8月20日 (2012.8.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502247787
 モルフォシス・アー・ゲー
 ドイツ連邦共和国 82152・マルティン
 スリッド/プラネッグ, レナークリストー
 シュトラーセ 48
 (71) 出願人 515040999
 ヘルトル, シュテファン
 HARTLE, Stefan
 ドイツ連邦共和国 82287 イェゼン
 ヴァング, アーデルスホーフエナーシュト
 ラーセ 10

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複合体特異的抗体及び抗体断片並びにその使用

(57) 【要約】

本発明は、特定の同族抗原結合部分、特に抗体と、その抗原との複合体を特異的に検出する抗体及びその断片を提供する。本開示の抗体は、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合しないため、例えば抗原 - 結合抗原結合部分を直接検出するのに使用することができる。更に、前記抗体及び抗体断片の使用のための方法を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

特定の同族抗体とその抗原との複合体に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその断片において、前記特定の同族抗体とその抗原との複合体に特異的に結合し、前記特定の同族抗体又は前記抗原の何れか単独には結合しないことを特徴とする、単離されたモノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその断片において、前記単離されたモノクローナル抗体又はその断片のエピトープが、前記特定の同族抗体の可変領域の 1 つ以上のアミノ酸を含むことを特徴とする、単離されたモノクローナル抗体又はその断片。

10

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 の何れか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその断片において、前記単離されたモノクローナル抗体又はその断片が、ヒト化又はヒトモノクローナル抗体又は断片であることを特徴とする、単離されたモノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 の何れか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその断片において、前記特定の同族抗体が、ハツカネズミ、キメラ、ヒトのヒト化モノクローナル抗体又はその断片であることを特徴とする、単離されたモノクローナル抗体又はその断片。

20

【請求項 6】

請求項 5 に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその断片において、前記特定の同族抗体又はその断片が、非限定的にアダリムマブ、MOR 103、リツキシマブ、トラストズマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、ゲムツズマブ、インフリキシマブ、ラニビズマブ、ウステキヌマブ、ゴリムマブ、ナタリズマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ、パニツムマブからなるリストから選択されることを特徴とする、単離されたモノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 6 の何れか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその断片において、前記抗原がサイトカイン又は受容体であることを特徴とする、単離されたモノクローナル抗体又はその断片。

30

【請求項 8】

サンプル中の特定の同族抗体とその抗原との複合体の検出のための、請求項 1 乃至 7 の何れか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその断片の使用。

【請求項 9】

サンプル中の特定の同族抗体とその抗原との複合体の検出方法において、
a) 前記サンプルを、請求項 1 乃至 7 の何れか 1 項に記載の単離された抗体又は断片と接触させるステップと、
b) 前記複合体に結合された前記単離された抗体又は断片を検出するステップと、を含む方法。

40

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法において、前記複合体が、EIA、ELISA、RIA、間接競合免疫アッセイ、直接競合免疫アッセイ、非競合免疫アッセイ、サンドウィッチ免疫アッセイ、凝集アッセイ又は MSD を用いて検出されることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 9 乃至 10 の何れか 1 項に記載の方法において、前記特定の同族抗体とその抗原との複合体が、非限定的にアダリムマブ/TNF-、MOR 103/GM-CSF、トラストズマブ/Her2/c-neu、アレムツズマブ/CD52、ベバシズマブ/VEGF-A、セツキシマブ/EGF-R、ゲムツズマブ/CD33、インフリキシマブ/T

50

N F - 、ラニビズマブ / V E G F - A、ウステキヌマブ / I L - 1 2、ウステキヌマブ / I L - 2 3、ゴリムマブ / T N F - 、ナタリズマブ / 4 - インテグリン、オフアツムマブ / C D 2 0、リツキシマブ / C D 2 0、オマリズマブ / I g E (F c 領域)、パニツムマブ / E G F R からなる群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその断片の同定方法において、
 (a) 抗体又は抗体断片のライブラリーを、非結合抗原と、特定の同族抗体と同一のアイソタイプを有する抗体との存在下で、前記特定の同族抗体とその抗原との複合体に対してスクリーニングするステップと、
 (b) 前記特定の同族抗体とその抗原との複合体、及び前記結合した抗体又は抗体断片を単離するステップと、
 (c) 前記抗体又は抗体断片を同定及び単離するステップと、を含む方法。

10

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の方法によって獲得可能な、その断片の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 1 4】

請求項 1 乃至 7 の何れか 1 項に記載の 1 つ以上の抗体又はその断片と、特定の同族抗体とその抗原との複合体の検出に必要な少なくとも 1 つの試薬又は装置と、を含むキット。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載のキットにおいて、前記 1 つ以上の抗体が、非限定的にアダリムマブ / T N F - 、M O R 1 0 3 / G M - C S F、トラスツズマブ / H e r 2 / c - n e u、アレムツズマブ / C D 5 2、ベバシズマブ / V E G F - A、セツキシマブ / E G F - R、ゲムツズマブ / C D 3 3、インフリキシマブ / T N F - 、ラニビズマブ / V E G F - A、ウステキヌマブ / I L - 1 2、ウステキヌマブ / I L - 2 3、ゴリムマブ / T N F - 、ナタリズマブ / 4 - インテグリン、オフアツムマブ / C D 2 0、リツキシマブ / C D 2 0、オマリズマブ / I g E (F c 領域)、パニツムマブ / E G F R からなる群から選択される複合体の 1 つに結合する抗体又はその断片の群から選択されることを特徴とするキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、その全体が参照により組み込まれる、2 0 1 2 年 8 月 2 0 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 6 8 4 , 8 3 6 号明細書による利益を主張する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

抗体等の免疫グロブリンは、医薬産業において継続的に、また益々興味を持たれている。2 0 0 0 年以来、モノクローナル抗体の治療的市場は急激に増大し、2 0 0 7 年には、米国内で最もよく売れた 2 0 種のバイオ医薬品のうち 8 種は、治療的モノクローナル抗体であり、各々、5 0 億米国ドルを超える世界的年間売上高を有する。

40

【0 0 0 3】

現在、有意な数の抗体、並びに免疫グロブリンの誘導体及び断片が、前臨床及び臨床開発中である。開発中の薬物は、ヒトに導入される前に、広範な発見及び前臨床試験にて分析及び特徴付けられている。安全かつ強力な薬物プロファイルを確立するために、中毒学的、薬物動態学的及び薬力学的特徴のような重要な基準を探索する必要がある。治療的抗体レベルを定量化及び監視するために、これらの試験の多数は、例えば患者又は実験動物からの血清又は任意の体液のようなサンプルマトリクス中の治療的抗体の特定の検出のための薬物特異的薬剤を使用する必要がある。

【0 0 0 4】

薬物特異的薬剤は、例えば、ヒト又はヒト化免疫グロブリンのみを検出し、従って非ヒ

50

ト実験宿主由来のサンプル中のヒト又はヒト化治療的抗体の定量化に使用することができる抗体を含む（例えば、その全体が参照により組み込まれる国際公開第2006066912号パンフレット；米国特許出願第11/792,910号明細書）。更に一步進めたものは、治療的抗体内の独特の構造に特異的な抗イディオタイプ抗体又は抗体断片の使用である。従って、抗イディオタイプ抗体は、宿主サンプルが単離されているか否かに係わらずサンプルマトリクス中の特定の治療的抗体又は抗体断片の検出に使用することができる（例えば、国際公開第2009032128号パンフレット参照）。しかしながら、抗イディオタイプ抗体の大多数は治療的抗体の独特のCDRsの1つ以上に結合し、CDRsは治療的抗体の抗原と特異的に相互作用するパラトープを規定するため、遊離の、抗原に結合していない治療的抗体の検出及び監視のみが可能である。

10

【0005】

米国特許第2012/0157663号明細書は、抗体が対応する抗原に結合した場合にのみ、該抗体に結合する能力を有する所謂「ドミノ抗体」を記載している。米国特許第2012/0157663号明細書の抗体は、特定のハイブリドーマベースのスクリーニング技術を介して生成される。全てのドミノ抗体に共通することは、標的抗体上のドミノ抗体のエピトープが、標的抗体がその対応する抗原に結合した後の立体構造の変化を介して形成されることである。エピトープは、標的抗体の定常領域、例えば、軽鎖の定常領域）内に位置し、抗原又は標的抗体のCDR領域のいずれの部分も含まない。対照的に、本発明の複合体特異的抗体及び抗体断片は、標的抗体のCDR領域の少なくとも所定の部分に結合する。従って、ドミノ抗体は、標的抗体がそれらの対応する抗原に結合した際のみ

20

【0006】

患者に適用された治療的抗体は、常に、宿主の身体の末梢内で異なる状態間でバランスしているため、これらの異なる状態の監視及び割合は、治療的抗体の安全性のための必須情報を提供する。これらの異なる状態は、質量作用の法則に従ってバランスされ、全ての抗体、非結合抗体及び結合抗体を含み、前記バランスは、例えば治療的抗体の親和性に依存し、また身体内の抗原の濃度にも依存する。更に、身体からの治療的抗体のクリアランスが比較的遅いため、その抗原に結合した治療的抗体は、多くの場合、より長期間のその投与後に抗原レベルの増大をもたらす（Charles P. (1999) Journal of Immunology 163; 1521 - 1528）。治療的抗体の存在下、結合抗原は中和され、殆どは生理活性を有さない。しかしながら、この現象は監視される必要があり、例えば急激な退薬の危険性を評価することが重要である。

30

【0007】

総じて、全ての抗体、非結合抗体及び結合抗体の特定の検出は、特に興味深く、治療的抗体のプロファイリング及び後の認可に重要である（Kuang B. (2010) Bioanalysis, 2(6): 1125 - 40）。結合していない治療的抗体に結合することができ、また複合体（その抗原に結合した治療的抗体）にも結合することができ、従って総抗体負荷の検出に有用な、僅かな抗イディオタイプ抗体が例示されている。そのような非パラトープ抗イディオタイプ抗体は、国際公開第2009032128号パンフレットに開示されている。

40

【0008】

対照的に、殆ど全ての抗イディオタイプ抗体は標的抗体のDCRsに指向され、従って非結合抗体のみを検出する（例えば、Tornetta M. (2007) Journal of Immunological Methods 328, 34 - 44参照）。

【0009】

しかしながら、CDR特異的抗イディオタイプ抗体の使用、又は非パラトープ抗イディオタイプ抗体の使用のいずれも、薬物 - 抗原複合体のみの直接検出及び定量化が可能では

50

ない。結合抗体を定量化するために、様々なE L I S Aベースのアッセイが確立されているが、常に間接検出のための二次的な、例えば抗ヒトF c抗体を必要とする。F c特異的検出抗体の使用は、血清免疫グロブリンから複合体を捕捉及び単離する追加のステップ及び大量の洗浄を必要とし、従ってこれらのアッセイは背景ノイズ及び信号変化の影響を受けやすい。

【0010】

従って、抗体-抗原複合体を検出及び定量化するために、より高感度かつ頑強な代替的手法が必要とされている。

【発明の概要】

【0011】

本発明は、同族抗体とその抗原との複合体を特異的に検出し及び該複合体に特異的に結合する抗体及び抗体断片を開示する。本開示の抗体は、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合せず、従って二次的なF c特異的抗体を使用することなく、結合した治療的抗体を直接検出するのに使用することができる。

【0012】

本発明はまた、特定の同族抗体とその抗原との複合体を特異的に検出し及び該複合体に特異的に結合する抗体及び抗体断片を開示する。詳細には、本発明の抗体及び抗体断片は、同一の抗原特異性を有する他の同族抗体の複合体には結合しない。

【0013】

これらの複合体特異的抗体は、ヒト患者又は実験動物から単離されたサンプル中の、抗体-抗原複合体のみでなく、遊離又は非結合薬物を定量化する卓越した方法を可能にする。より高感度かつ頑強なアッセイ、例えばE L I S A構成等が本明細書に開示され、薬物動態試験のための代替的な及び改善されたアッセイを提供する。更に、本明細書に開示した定量化アッセイを使用して、例えばラテラルフロー技術を用いて薬物レベルを監視する簡易試験を開発することができる。

【0014】

本開示は更に、前記複合体の検出のためのアッセイにおける前記抗体の使用を開示する。更に、本開示は、特定の同族抗体とその抗原との複合体を特異的に検出する抗体を同定する方法を開示する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、E L I S Aにて、一連の無関連及び関連抗原並びにアダリムマブ/TNF - 複合体に対する特異的結合に関して試験した7つの抗体の結果を示す。5 g / m Lの各抗原をマイクロタイプレート上に一晚被覆した。5 % B S Aで洗浄及びブロッキングした後、F a b - F Hフォーマットの抗アダリムマブ/TNF - 抗体(2 μ g / m L溶液から20 μ L)を加えた。検出は、H R P標識抗H i s抗体及びQ u a n t a B l u蛍光ペルオキシダーゼ基質を使用して行った。

【図2】図2は、E L I S Aでの、異なる固定化抗原上のA d a T N F # 5の滴定の結果を示す。試験した濃度範囲(0 . 0 3 ~ 2 0 0 0 n g / m L)に亘って、A d a T N F # 5は、アダリムマブ/TNF - 複合体のみに結合し、その単一の構成成分及び他の抗原には結合しなかった。

【図3】図3は、E L I S Aにて、様々な抗原に対して試験した、完全長ヒトI g G 1に変換された精製A d a T N F # 5の結果を示す。H R Pに結合された精製A d a T N F # 5 - h I g G 1は、アダリムマブとTNF - との複合体に特異的に結合する。

【図4】図4は、薬物動態E L I S Aアッセイの結果を示す。ヒトTNF - をマイクロタイプレート上に被覆し、増大する濃度のアダリムマブを10 %ヒト血清中に添加し、予備被覆プレートに適用した。洗浄後、抗アダリムマブ/TNF - h I g G 1抗体A d a T N F # 5 (H R Pに結合した)を2 μ g / m Lで加えた。検出は、Q u a n t a B l u (登録商標)蛍光ペルオキシダーゼ基質を加えることにより行った。A d a T N F # 5は、ヒト血清の存在下、アダリムマブ/TNF - 複合体に用量依存的に結合した。

10

20

30

40

50

【図5】図5は、ELISAにて、様々な抗原に関して試験したIFX-TNF#1、IFX-TNF#2及びIFX-TNF#3の結果を示す。従って、5µg/mLの各抗原をマイクロタイタープレート上に被覆し、Fab-FHフォーマットの抗インフリキシマブ/TNF-抗体(2µg/mL溶液から20µL)を加えた。IFX-TNF#1は、インフリキシマブ/TNF-複合体を特異的に検出することが証明された(図5)。

【図6】図6は、抗MOR103/GM-CSF複合体抗体を検出するスクリーニングELISAの結果を示す。5µg/mLの各抗原(BSA、GST、MOR03207及びMOR103)をマイクロタイタープレート上に被覆した。更にMOR103/GM-CSF複合体もプレート上に固定化した。M103GmCSF#1、M103GmCSF#2及びM103GmCSF#3は、MOR103/GM-CSF複合体を特異的に検出したが、GM-CSF又はMOR103単独は検出しなかった。

【図7】図7は、M103GmCSF#1の標的選択性を試験したELISAの結果を示す。MOR103単独、ビオチン化GM-CSF、又はMOR103に結合したビオチン化GM-CSFの何れかをアビジン被覆プレート上に被覆した。HisタグM103GmCSF#1Fabを濃度を増大させて加え、検出した。M103GmCSF#1は、薬物-標的複合体に対する結合に高い選択性を示し、個々のタンパク質(薬物及び標的)には示さなかった。

【図8】図8は、ヒト血清中のMOR103/GM-CSF複合体を定量化するMSD(登録商標)(Meso Scale Discovery)ベースのリガンド結合アッセイの結果を示す。MOR103/GM-CSF複合体をヒト血清で補充し、Multi-array(登録商標)96ウェルプレートの標準プレート上に滴定した。ECL標識M103GmCSF#1IgGを使用して、MOR103/GM-CSF複合体を検出した。滴定曲線全体において、MOR103/GM-CSF複合体は、50%ヒト血清の存在下、用量依存的に特異的に検出された。

【発明を実施するための形態】

【0016】

従って、一態様において、本開示は、特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関する。一実施形態において、単離されたモノクローナル抗体又はその断片は、特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合し、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合しない。

【0017】

単離されたモノクローナル抗体又はその断片

別の態様では、本開示は、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関し、該単離されたモノクローナル抗体又はその断片は、100nM、90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM又は1nM未満のEC₅₀濃度で、特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合する。

【0018】

別の態様では、本開示は、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関し、該単離されたモノクローナル抗体又はその断片は、 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、 $10^{12} M^{-1}$ 又は $10^{13} M^{-1}$ 未満の解離定数(KD)で、特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合する。

【0019】

一態様において、本開示は、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関し、該単離されたモノクローナル抗体又はその断片は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である。一実施形態では、前記単離された抗体又はその断片は、ヒト又はヒト化抗体である。一実施形態では、前記単離された抗体又はその断片は、キメラ抗体である。一実施形態では、前記単離された抗体又はその断片は、ヒト重鎖定常領域及びヒト軽鎖定常領域を含む。一実施形態では、前記単離された抗体は、IgGアイソタイプである。別の実施

10

20

30

40

50

形態では、抗体は、任意のアイソタイプ（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D及びI g A）、クラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1及びI g A 2）又はその誘導体（例えば、I g G 1 f L A L A）であってもよい。一実施形態では、抗体は、I g G 1 f L A L Aアイソタイプのものである。一実施形態では、前記単離された抗体又はその断片は、F a b、F (a b 2) '、F (a b) 2 '及びs c F Vからなる群から選択される。一実施形態では、単離された抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、及び合成抗体からなる群から選択される。一実施形態では、抗体又はその断片は、ヒト又はヒト化抗体である。

【0020】

同族抗原結合部分

一態様において、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関する。別の態様では、本開示は、特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関する。一実施形態では、前記同族抗原結合部分、又は前記特定の同族抗原結合部分は、同族抗体又はその断片である。一実施形態では、前記同族抗体若しくはその断片、又は前記特定の同族抗体若しくはその断片は、治療的抗体又は治療的抗体断片である。別の実施形態では、前記同族抗体若しくはその断片、又は前記特定の同族抗体若しくはその断片は、診断的抗体又は診断的抗体断片である。

【0021】

好ましい実施形態では、同族抗体又はその断片は、特定の同族モノクローナル抗体又はその断片である。「特定の同族モノクローナル抗体」とは、その抗原に特異的に結合する1つの、また唯一のモノクローナル抗体を指す。所謂「ドミノ抗体」（米国特許第2012/0157663号明細書参照）の標的抗体は、ドミノ抗体が、該ドミノ抗体の標的抗体の定常領域に結合し、従って1つの単一の抗体に特異的ではなく、所定の標的特異性を有する全部の、又は少なくとも多数の抗体に特異的であるため、この定義の下では特定の同族抗体ではない。

【0022】

好ましい実施形態では、同族抗体又はその断片は、同族モノクローナル抗体又はその断片である。

【0023】

一実施形態では、前記同族モノクローナル抗体又はその断片は、ヒト又はヒト化抗体である。一実施形態では、前記同族モノクローナル抗体又はその断片は、キメラ抗体である。一実施形態では、前記同族モノクローナル抗体又はその断片は、ヒト重鎖定常領域及びヒト軽鎖定常領域を含む。一実施形態では、前記同族モノクローナル抗体は、I g Gアイソタイプである。別の実施形態では、同族抗体は、任意のアイソタイプ（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D及びI g A）、クラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1及びI g A 2）又はその誘導体（例えば、I g G 1 f L A L A）であってもよい。一実施形態では、同族抗体は、I g G 1 f L A L Aアイソタイプのものである。

【0024】

一実施形態では、前記同族モノクローナル抗体又はその断片は、F a b、F (a b 2) '、F (a b) 2 '及びs c F Vからなる群から選択される。一実施形態では、前記同族モノクローナル抗体又はその断片は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、及び合成抗体からなる群から選択される。一実施形態では、同族抗体又はその断片は、ヒト又はヒト化抗体である。

【0025】

一態様では、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体、又は特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関し、ここで同族抗原結合部分は、抗体由来の足場である。一実施形態では、抗体由来の足場は、s c F v、四価抗体、架橋F a b又はI g Gからなる群から選択され

10

20

30

40

50

る。一実施形態では、同族抗体又はその断片は、単鎖抗体である。

【0026】

一態様では、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体、又は特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関し、ここで同族抗原結合部分は、単ドメイン抗体、マキシ抗体 (maxi body)、ミニ抗体 (mini body)、細胞内抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、v-NAR、ラクダ科動物抗体、アンキリン、ドメイン抗体、リポカリン、小モジュラー免疫薬、マキシボディ (maxy body)、タンパク質 A 及びアフイリン (affilin) からなる群から選択される。

【0027】

一態様では、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体、又は同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関し、ここで同族抗原結合部分は、非限定的にアダリムマブ、MOR103、リツキシマブ、トラスツズマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、ゲムツズマブ、インフリキシマブ、ラニビズマブ、ウステキヌマブ、ゴリムマブ、ナタリズマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ、パニツムマブからなるリストから選択される。

【0028】

抗原

一態様において、本開示は、特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関し、ここで抗原はタンパク質である。好ましい実施形態では、タンパク質は、ヒトタンパク質である。

【0029】

本発明の単離されたモノクローナル抗体又は断片のエピトープは、特定の同族抗体の可変領域の1つ以上のアミノ酸を含む。従って、所定の態様において、本開示は、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関し、ここで前記単離されたモノクローナル抗体又はその断片のエピトープは、特定の同族抗体の可変領域の1つ以上のアミノ酸を含む。別の態様では、本開示は、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関し、ここで前記単離されたモノクローナル抗体又はその断片のエピトープは、特定の同族抗体の可変領域の1つ以上のアミノ酸と、前記特定の同族抗体の抗原の1つ以上のアミノ酸とを含む。

【0030】

別の態様では、本開示は、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関し、ここで前記単離されたモノクローナル抗体又はその断片のエピトープは、特定の同族抗体と前記特定の同族抗体の抗原との両方からのストレッチを含む。

【0031】

一実施形態では、タンパク質は、特定の疾患に関連している。一実施形態では、タンパク質は、特定の疾患における特定の生物学的療法のための有用な標的である。一実施形態では、タンパク質は、特定の薬物の有用な標的である。一実施形態では、タンパク質は、治療的抗体又はその断片の有用な標的である。一実施形態では、タンパク質は、診断的抗体又はその断片の有用な標的である。一実施形態では、タンパク質は、サイトカインである。一実施形態では、タンパク質は、受容体である。

【0032】

一実施形態では、タンパク質は、炎症性疾病、自己免疫性疾病、ウイルス、細菌及び寄生虫感染症、悪性腫瘍、神経変性疾病又は任意の腫瘍関連疾病に関連している。一実施形態では、タンパク質は、癌に関連している。

【0033】

一実施形態では、一実施形態では、タンパク質は、非限定的に TNF- α 、TNF- β 、VEGF-A、 α 4-インテグリン、CD20、IgE (Fc 領域)、EGFR、GM-CSF、CD19、M-CSF、CD38、MIF、DDT、IL-17A、IL-17C、IL-1 β 、IL1- α 、IL-6、IL-12、IL-23、Her2/c-neu、CD52、CD33 からなるリストから選択される。

10

20

30

40

50

【0034】

一態様において、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関し、ここで複合体は、非限定的にアダリムマブ/TNF-、MOR103/GM-CSF、トラスツズマブ/Her2/c-neu、アレムツズマブ/CD52、ベバシズマブ/VEGF-A、セツキシマブ/EGF-R、ゲムツズマブ/CD33、インフリキシマブ/TNF-、ラニビズマブ/VEGF-A、ウステキヌマブ/IL-12、ウステキヌマブ/IL-23、ゴリムマブ/TNF-、ナタリズマブ/4-インテグリン、オファツムマブ/CD20、リツキシマブ/CD20、オマリズマブ/IgE(Fc領域)、パニツムマブ/EGFRからなる群から選択される。

10

【0035】

単離されたモノクローナル抗体又はその断片の使用

一態様において、本開示は、サンプル中の同族抗原結合部分とその抗原との複合体、又は特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体の検出のための、単離された抗体又はその断片の使用に関し、ここで前記単離された抗体又はその断片は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体、又は特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合し、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合しない。

【0036】

別の態様では、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体、又は同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合し、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合しない、単離された抗体又はその断片を使用する、サンプル中の同族抗原結合部分及びその抗原の複合体、又は特定の同族抗原結合部分及びその抗原の複合体の検出方法に関する。

20

【0037】

一態様において、本開示は、サンプル中の同族抗原結合部分とその抗原との複合体、又は特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体の検出方法に関し、該方法は、

a) 前記サンプルを、単離された抗体又はその断片と接触させるステップと、ここで前記単離された抗体又はその断片は、前記複合体に特異的に結合し、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合せず、

b) 前記複合体に結合した前記単離された抗体又は断片を検出するステップと、を含む。

30

【0038】

別の態様では、本開示は、サンプル中の同族抗原結合部分とその抗原との複合体、又は特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体の検出方法に関し、該方法は、

a) 前記サンプルを、単離された抗体又はその断片と接触させるステップと、ここで前記単離された抗体又はその断片は、前記複合体に特異的に結合し、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合せず、

b) 前記複合体に結合した前記単離された抗体又は断片を検出するステップと、

c) 前記複合体に結合した前記単離された抗体又は断片を、抗原結合同族抗原結合部分の濃度と関連させるステップと、を含む。

40

【0039】

別の態様では、本開示は、サンプル中の同族抗体及びその抗原、又は特定の同族抗体とその抗原との複合体検出方法に関し、該方法は、

a) 分析するべきサンプルを提供するステップと、

b) 前記サンプルを、単離された抗体又はその断片と接触させるステップと、ここで前記単離された抗体又はその断片は、前記複合体に特異的に結合し、前記同族抗体又は前記抗原の何れか単独には結合せず、

c) 前記複合体に結合した前記単離された抗体又は断片を検出するステップと、

d) 前記複合体に結合した前記単離された抗体又は断片を、抗原結合同族抗体の濃度と関連させるステップと、を含む。

50

【0040】

一実施形態では、前記同族抗原結合部分は、同族抗体又はその断片である。好ましい実施形態では、同族抗体又はその断片は、同族モノクローナル抗体又はその断片である。一実施形態では、前記同族モノクローナル抗体その断片は、ヒト又はヒト化抗体である。一実施形態では、前記同族モノクローナル抗体その断片は、キメラ抗体である。一実施形態では、前記同族モノクローナル抗体その断片は、ヒト重鎖定常領域及びヒト軽鎖定常領域を含む。一実施形態では、前記同族モノクローナル抗体は、I g Gアイソタイプである。別の実施形態では、同族抗体は、任意のアイソタイプ（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D及びI g A）、クラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1及びI g A 2）又はその誘導體（例えば、I g G 1 f L A L A）であってもよい。一実施形態では、同族抗体は、I g G 1 f L A L Aアイソタイプのものである。

10

【0041】

一実施形態では、前記同族モノクローナル抗体その断片は、F a b、F (a b 2) '、F (a b) 2 ' 及びs c F Vからなる群から選択される。一実施形態では、前記同族モノクローナル抗体その断片は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体及び合成抗体からなる群から選択される。一実施形態では、同族抗体その断片は、ヒト又はヒト化抗体である。

【0042】

一実施形態では、前記特定の同族抗体とその抗原との複合体は、非限定的にアダリムマブ/TNF-、MOR 103/GM-CSF、トラスツズマブ/Her 2/c-neu、アレムツズマブ/CD 52、ベバシズマブ/VEGF-A、セツキシマブ/EGF-R、ゲムツズマブ/CD 33、インフリキシマブ/TNF-、ラニビズマブ/VEGF-A、ウステキヌマブ/IL-12、ウステキヌマブ/IL-23、ゴリムマブ/TNF-、ナタリズマブ/4-インテグリン、オフアツムマブ/CD 20、リツキシマブ/CD 20、オマリズマブ/IgE (Fc領域)、パニツムマブ/EGFRからなる群から選択される。

20

【0043】

一態様において、本開示は、サンプル中の抗原結合部分の検出方法に関し、該方法は、
a) 同族抗原結合部分の抗原を固定化するステップと、
b) 前記固定化された抗原と前記サンプルとの接触をもたらすステップと、
c) 前記同族抗原結合部分とその抗原との間で形成された複合体を、前記複合体に特異的に結合し、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合しない、単離された抗体又はその断片を用いて検出するステップと、を含む。

30

【0044】

別の態様では、本開示は、サンプル中の非結合同族抗原結合部分の検出方法に関し、該方法は、

a) 同族抗原結合部分の抗原を固定化するステップと、
b) 前記固定化された抗原と前記サンプルとの接触をもたらすステップと、
c) 前記同族抗原結合部分とその抗原との間で形成された複合体を、前記複合体に特異的に結合し、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合しない、単離された抗体又はその断片を用いて検出するステップと、を含む。

40

【0045】

別の態様では、本開示は、サンプル中の非結合同族抗原結合部分の検出方法に関し、該方法は、

a) 同族抗原結合部分の抗原を固定化するステップと、
b) 前記固定化された抗原と前記サンプルとの接触をもたらすステップと、
c) 前記同族抗原結合部分とその抗原との間で形成された複合体を、前記複合体に特異的に結合し、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合しない、単離された抗体又はその断片を用いて検出するステップと、
d) b) で形成された複合体を、サンプル中の非結合同族抗原結合部分の濃度と関連さ

50

せるステップと、を含む。

【0046】

一実施形態では、方法、前記検出は、E I A、E L I S A、R I A、間接競合免疫アッセイ、直接競合免疫アッセイ、非競合免疫アッセイ、サンドウィッチ免疫アッセイ、凝集アッセイ及びM S D (M e s o S c a l e D i s c o v e r y) からなる群から選択される手段により達成される。好ましい実施形態では、前記検出は、サンドウィッチE L I S Aにより達成される。別の好ましい実施形態では、前記検出は、M S D (M e s o S c a l e D i s c o v e r y) アッセイにより達成される。

【0047】

一実施形態では、サンプルは、組織又は液体サンプルである。更なる実施形態では、液体サンプルは、唾液、尿、全血、血漿又は血清である。好ましい実施形態では、サンプルは、実験動物又はヒトから得られる。より好ましい実施形態では、サンプルは、ヒトから得られた全血、血漿又は血清である。

10

【0048】

一態様において、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合し、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合しない、単離されたモノクローナル抗体、又はその断片を同定する方法に関し、該方法は、

(a) 抗体又は抗体断片のライブラリーを、非結合抗原と、同族抗体と同一のアイソタイプを有する抗体との存在下で、同族抗体とその抗原との複合体、又は特定の同族抗体とその抗原との複合体に対してスクリーニングするステップと、

20

(b) 前記同族抗体とその抗原との複合体、又は前記特定の同族抗体とその抗原との複合体、及び結合した抗原結合部分を単離するステップと、

(c) 前記抗原結合部分を同定及び単離するステップと、を含む。

【0049】

別の態様では、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合し、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合しない、単離されたモノクローナル抗体、又はその断片を同定する方法に関し、該方法は、

(a) 抗体又は抗体断片のライブラリーを、非結合抗原と、同族抗体と同一のアイソタイプ及び同一のフレームワークを有する抗体との存在下で、同族抗体とその抗原との複合体、又は前記特定の同族抗体とその抗原との複合体に対してスクリーニングするステップと、

30

(b) 前記同族抗体とその抗原との複合体、又は前記特定の同族抗体とその抗原との複合体、及び結合した抗原結合部分を単離するステップと、

(c) 前記抗原結合部分を同定及び単離するステップと、を含む。

【0050】

一態様において、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体、又は特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合し、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合しない、1つ以上の抗体、又はその断片と、そのような複合体の検出に必要な少なくとも1つの試薬又は装置と、を含むキットに関する。

【0051】

別の態様では、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体、又は特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合する1つ以上の抗体、又はその断片と、特定の同族抗原結合部分及びその抗原の、1つ以上の異なる同族抗原結合部分とその抗原との複合体の検出に必要な少なくとも1つの試薬又は装置と、を含むキットに関する。別の態様では、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体、又は特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合する抗体又はその断片と、前記複合体の検出に必要な少なくとも1つの試薬又は装置と、を含むキットに関する。一実施形態では、前記装置は、ラテラルフロー装置である。

40

【0052】

別の態様では、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体、又は特定の同族抗

50

原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合する1つ以上の抗体、又はその断片を含むラテラルフロー装置に関する。一実施形態では、前記1つ以上の抗体又はその断片は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体、又は特定の同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合し、前記同族抗原結合部分又は前記抗原の何れか単独には結合しない。更なる実施形態では、前記1つ以上の抗体は、非限定的にアダリムマブ/TNF-、MOR103/GM-CSF、トラスツズマブ/Her2/c-neu、アレムツズマブ/CD52、ベバシズマブ/VEGF-A、セツキシマブ/EGF-R、ゲムツズマブ/CD33、インフリキシマブ/TNF-、ラニビズマブ/VEGF-A、ウステキヌマブ/IL-12、ウステキヌマブ/IL-23、ゴリムマブ/TNF-、ナタリズマブ/4-インテグリン、オフアツムマブ/CD20、リツキシマブ/CD20、オマリズマブ/IgE(Fc領域)、パニツムマブ/EGFRからなる群から選択される複合体の1つに結合する抗体又はその断片の群から選択される。

10

【0053】

別の態様では、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合するモノクローナル抗体又はその断片をコードする、単離された核酸に関する。

【0054】

別の態様では、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合するモノクローナル抗体又はその断片をコードする単離された核酸を含むベクターに関する。

【0055】

別の態様では、本開示は、同族抗原結合部分とその抗原との複合体に特異的に結合するモノクローナル抗体又はその断片をコードする、単離された核酸を含むベクターを含む宿主細胞に関する。一実施形態では、宿主細胞は、原核生物又は真核生物宿主細胞である。好ましい実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物宿主細胞である。

20

【0056】

別の態様では、本開示は、表1に記載した抗体と交差競合する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関する。所定の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその断片は、表1に記載した抗体と交差競合し、ELISAベースの交差競合において、表1に記載した抗体の1つの特異的な結合を少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%低下させる。

【0057】

別の態様では、本開示は、表1に記載した抗体と同一のエピトープと相互作用する(例えば、結合、安定化、空間分布により)、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関する。

30

【0058】

一態様では、本開示は、表1の抗体の何れかのKababにより定義された6つのCDRsを含む、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関する。別の態様では、本開示は、表1の抗体の各々のKababにより定義された6つのCDRsを含む、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関する。

【0059】

一態様では、本開示は、表1の抗体の何れかのVH及びVLを含む、単離されたモノクローナル抗体又はその断片に関する。

40

【0060】

別の態様では、本開示は、単離されたモノクローナル抗体又はその断片をコードする核酸に関し、ここで核酸は、表1の抗体の何れかのVH及びVLを含む。

【0061】

別の態様では、本開示は、表1に記載した核酸に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%の配列同一性を有する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片をコードする核酸に関する。

【0062】

定義

50

本明細書で使用される用語「抗原結合部分」は、所定の抗原に特異的に結合する能力を与えるポリペプチドを含む部分を指す。例えば、抗体、抗体断片、抗体誘導体、抗体様足場及び代替的な足場は、少なくとも1つの抗原結合部分を含む。抗原結合部分はまた、単一ドメイン抗体、マキシ抗体、ミニ抗体、細胞内抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、*v*-NAR及び*scFv*に組み込まれてもよい(例えば、Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136参照)。抗原結合部分を含む分子の更なる例は、本明細書にて下記に提供され、フィブロネクチン(Adnexus, Bristol-Myers Squibb, Waltham, MAが完全に所有)、ラクダ科動物抗体、アンキリン(Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland and)、ドメイン抗体(Domantis, Ltd., Cambridge, MA及びAblynx nv, Zwijnaarde, Belgium)、リボカリン(Pieris Proteolab AG, Freising, Germany)、小モジュラー免疫薬(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、マキシボディ(Avidia, Inc., Mountain View, CA)、タンパク質A(Affibody AG, Sweden)、及びアフイリン(-クリスタリン又はユビキチン)(Scil Proteins GmbH, Halle, Germany)を含む。

10

【0063】

本明細書で使用される用語「抗原結合領域」は、抗原結合部分と抗原との間の特定の結合に関与する抗原結合部分のドメインを指す。例えば、抗体又はその断片の抗原結合領域は、重鎖(本明細書ではと略すVH)及び軽鎖(本明細書ではVLと略す)のN末端可変領域のアミノ酸残基により形成される。VH及びVLの可変領域は、各々、相補性決定領域(CDR)と称される3つの超可変領域を含む。VHの3つのCDRs及びVLの3つのCDRsは、互いに3次的に配置されて、抗原結合表面を形成する。

20

【0064】

本明細書で使用される用語「抗体」は、抗体全体、及び抗体の任意の断片又は単鎖を含む。天然に存在する「抗体」は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖を含むタンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書ではVHと略す)及び重鎖定常領域から構成されている。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2及びCH3から構成されている。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書ではVLと略す)及び軽鎖定常領域から構成されている。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、CLから構成されている。VH及びVL領域は、更に、相補性決定領域(CDR)と称される超可変性領域に細分されてもよく、該領域は、より保存された、フレームワーク領域(FR)と称される領域が組み入れられている。VH及びVLの各々は、以下の順序で、アミノ末端からカルボキシ末端へ配置された3つのCDRs及び4つのFRsから構成されている: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)及び古典的補体系の第1の構成成分(C1q)を含む、宿主組織又は因子に対する免疫グロブリンの結合を仲介し得る。抗体は、任意のアイソタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2)、サブクラス、又はそれらの改変型(例えば、IgG1f LALA)のものであってもよい。

30

40

【0065】

用語、抗体の「断片」は、抗原に特異的に結合する能力を保持する、抗体の1つ以上の断片を指す。用語「断片」に包含される結合断片の例には、Fab断片、VL、VH、CL及びCH1ドメインからなる一価断片; $(Fab)_2$ 断片、ジスルフィド架橋によってヒンジ領域に結合された2つのFab断片を含む二価断片; VH及びCH1ドメインからなるFd断片; 抗体の単一アームのVL及びVHドメインからなるFv断片; VHドメインからなる単一ドメイン抗体(dAb)断片(Ward et al., (1989) N

50

ature 341:544-546);並びに、単離された相補性決定領域(CDR)、並びに、VL及びVH領域が対となって一価分子を形成する単鎖断片(scFv)(単鎖Fv(scFv)として既知;例えばBird et al., (1988) Science 242:423-426;及びHouston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883参照)が挙げられる。2つのドメインVL及びVHは別個の遺伝子によりコードされているが、組み換え方法を用いて、それらが単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする人工ペプチドリンカーによって連結され得る。そのような単鎖抗体は、1つ以上の抗原結合部分を含む。これらの抗体断片は、当業者に既知の従来技術を用いて得られ、断片は無傷抗体と同一の方法で、有用性に関してスクリーニングされる。

10

【0066】

「抗原」は、抗原結合部分により特異的に結合される任意の分子又は任意の分子の複合体として定義される。

【0067】

用語「複合体」は、互いに対して親和性を有する少なくとも2つの部分の間の会合体(例えば、化学的又は生化学的)を指す。「タンパク質複合体」又は「ポリペプチド複合体」は、少なくとも1つ以上のポリペプチドを含む複合体を指す。本明細書で使用されるように、複合体は、同族抗原結合部分及びその抗原を含む。一実施形態では、複合体は、抗体-抗原複合体である。好ましい実施形態では、複合体は、治療的抗体及びその抗原を含む抗体-抗原複合体である。

20

【0068】

用語「同族」は、一緒に機能する構成成分、又は互いに対するある特異性の態様を有する構成成分、例えばオルトゴナルtRNA及びオルトゴナルアミノアシル-tRNAシターゼ、又は抗体及び抗原を指す。構成成分は、相補的であるとも称され得る。本明細書で使用されるように、同族抗原結合部分は、その抗原に特異的に結合する抗原結合部分である。

【0069】

用語「重鎖可変領域CDR1」及び「H-CDR1」は、用語「重鎖可変領域CDR2」及び「H-CDR2」、用語「重鎖可変領域CDR3」及び「H-CDR3」、用語「軽鎖可変領域CDR1」及び「L-CDR1」;用語「軽鎖可変領域CDR2」及び「L-CDR2」並びに用語「軽鎖可変領域CDR3」及び「L-CDR3」のように、交換可能に使用される。

30

【0070】

本明細書で使用される用語「ヒト抗体」は、フレームワーク及びCDR領域の両方がヒト起源の配列に由来する可変領域を有する抗体を含むことが意図される。本明細書で使用されるように、ヒト抗体は、重鎖若しくは軽鎖可変領域又は完全長重鎖若しくは軽鎖を含む。所定の場合に、ヒト抗体は、アミノ酸配列において、生殖細胞免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列と少なくとも60%、70%、80%、90%、又は少なくとも95%、又は更には少なくとも96%、97%、98%、又は99%同一であってもよい。それにより、前記ヒト抗体は、B細胞から単離されたVH/VLレパートリーのPCR増幅により生成され又は合成により生成されたヒト生殖細胞遺伝子に由来する抗体を含む技術プラットフォームから得ることができる。技術プラットフォームには、ファージ、リボソーム又は酵母上に表示されるヒト免疫グロブリン遺伝子を含むライブラリーベースの手法が挙げられる。代表的なディスプレイ技術は、科学コミュニティーにて標準である。更に、ヒト免疫グロブリンレパートリーを保有する遺伝子導入マウスの免疫化は、関心対象の抗原に対するヒト抗体を生成する他の手法である。MorphoSys HuCAL(登録商標)概念(Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86)に基づく抗体ライブラリーから選択された抗体又はその断片は、完全にヒトと考慮される。

40

【0071】

50

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」は、単一分子組成物の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する独特の結合特異性及び親和性を有する独特の結合部位を示す。

【0072】

「ヒト化」抗体は、非ヒト抗体の反応性を保持すると共に、ヒト内で免疫原性がより低い抗体である。これは例えば非ヒトCDR領域を保持し、抗体の残りの部分（即ち、定常領域、及び可変領域のフレームワーク部分）をそれらのヒト対応物で代替することにより達成され得る。例えばMorrisson et al (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 - 6855; Morrison and Oi (1988) Adv. Immunol., 44: 65 - 92; Verhoeyen et al. (1988) Science, 239: 1534 - 1536; Padlan, Molec (1991) Immun., 28: 489 - 498; 及びPadlan, Molec (1994) Immun., 31: 169 - 217を参照されたい。ヒト操作技術の他の例には、非限定的に、米国特許第5,766,886号明細書に開示されているXoma技術が挙げられる。

10

【0073】

用語「キメラ抗体」は、(a)定常領域、又はその一部分が、変更、代替又は交換されているため、抗原結合部位（可変領域）が異なる又は変更されたクラス、エフェクター機能及び/若しくは種の定常領域、又はキメラ抗体に新しい特性を付与する完全に異なる分子、例えば酵素、毒素、ホルモン、増殖因子、薬物等に結合され；又は(b)可変領域、又はその一部分が、異なる又は変更された抗原特異性を有する可変領域で変更、代替又は交換されている、抗体分子である。例えば、マウス抗体は、その定常領域をヒト免疫グロブリンからの定常領域で代替することにより改変され得る。ヒト定常領域による代替に起因して、キメラ抗体は、抗原を認識するその特性を保持すると共に、本来のマウス抗体と比較して、ヒト内で抗原性が低下され得る。

20

【0074】

用語「単離された」は、例えば、異なる抗原特異性を有する他の抗体又は抗原結合部分を実質的に含まない、抗体又は抗原結合部分であり得る化合物を指す。更に、単離された抗体抗原結合部分は、他の細胞物質及び/又は化学物質を実質的に含まない可能性がある。

30

【0075】

用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書で交換可能に使用されて、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する、天然に存在するアミノ酸の人工化学的ミメティック（模倣物）であるアミノ酸ポリマー、並びに、天然に存在するアミノ酸ポリマー及び天然に存在しないアミノ酸ポリマーであるアミノ酸ポリマーに適用される。特に示さない限り、特定のポリペプチド配列は、その保存的に改変された変異体も暗に包含する。

【0076】

用語「サイトカイン」は、細胞内メディエーターとして他の細胞上に作用する、1つの細胞集団により放出されるタンパク質の一般的用語である。そのようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるものは、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン等の成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、及び黄体ホルモン（LH）等の糖タンパク質ホルモン；肝臓増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子a及び；ミユラー管抑制因子；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒピン；アクチピン；血管内皮増殖因子A～F例えば、VEGF-A）；インテグリン例えば、 α 4-インテグリン）；トロンプオエチン（TPO）；NGF等の神経成長因子；血小板増殖因子；TGF- α 及びTGF- β 等のトランスフォーミング増殖因子（TGFs）；インシュリン様の増殖因

40

50

子 - I 及び - II ; エリスロポエチン (E P O) ; 骨誘導因子 ; インターフェロン - 、
 - 、 及び - 等のインターフェロン ; マクロファージ - C S F (M - C S F) 等のコロ
 ニー刺激因子 (C S F s) ; 顆粒球 - マクロファージ - C S F (G M - C S F) ; 及び顆
 粒球 - C S F (G - C S F) ; I L - 1、 I L - 1、 I L - 2、 I L - 3、 I L - 4、
 I L - 5、 I L - 6、 I L - 7、 I L - 8、 I L - 9、 I L - 11、 I L - 12、 I L 1
 7 - ファミリーメンバー (例えば、 I L - 17 C) 等のインターロイキン (I L s) ; T
 N F - 又は T N F - 等の腫瘍壊死因子 ; 並びに L I F、 キットリガンド (K L)、 M
 I F、 D - D T を含む他のポリペプチド因子である。本明細書で使用されるように、用語
 サイトカインは、天然源由来又は組み換え細胞培養物由来のタンパク質、及び天然配列サ
 イトカインの生物学的に活性な等価物を含む。

10

【 0 0 7 7 】

用語「受容体」は、例えば細胞内で、特定のリガンド又は結合パートナーとの相互作用
 の結果として、生物活性に影響を与える能力を有するタンパク質の一般的用語である。細胞
 膜結合受容体は、細胞外リガンド結合ドメイン、1つ以上の膜貫通又は膜貫通型ドメイ
 ン、及び、一般にシグナル伝達に關与する細胞内エフェクタードメインにより特徴付けら
 れる。細胞膜受容体に対するリガンド結合は、細胞膜を横切って連絡する細胞外ドメイ
 ンにおける変化、1つ以上の細胞内タンパク質との直接又は間接的な相互作用を生じ、酵素
 活性、細胞形状、又は遺伝子発現プロファイル等の細胞特性を変更する。受容体はまた、
 細胞表面から解かれてもよく、細胞質、細胞核であってもよく、又は細胞から完全に解放
 されてもよい。一般に、受容体は、膜結合、細胞質又は細胞核 ; 単量体 (例えば、甲状腺
 刺激ホルモン受容体、 - アドレナリン受容体) 又は多量体 (例えば、 P D G F 受容体
 、 成長ホルモン受容体、 I L - 3 受容体、 G M - C S F 受容体、 G - C S F I 受容体、
 エリスロポエチン受容体及び I L - 6 受容体) であり得る。受容体のより詳細な例には、
 非限定的に更に、分化のクラスター (例えば、 C D 2 0、 C D 1 9、 C D 3 8、 C D 5 2
 、 C D 3 3)、免疫グロブリン (例えば、 I g E (F c 領域))、上皮増殖因子受容体 (例
 えば、 E G F R) 又は受容体チロシンキナーゼ (R T K) (例えば、 H e r 2 / c - n
 e u、 H e r 3、 H e r 4) が挙げられる。

20

【 0 0 7 8 】

用語「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子により提供される抗体クラス (例えば、
 I g M、 I g E、 I g G 1 又は I g G 4 等の I g G) を指す。アイソタイプは、これらの
 クラスのうちの1つの改変型も含み、改変は F c 機能を変更し、例えば、エフェクター機
 能又は F c 受容体に対する結合を向上又は低下させるように為されている。例えば I g G
 1 f L A L A は、エフェクター機能が有意に低下されている I g G アイソタイプの改変
 型である。アミノ酸の特定の置換は、非改変抗体と比較して、 F c R I 受容体に対する
 結合親和性を低下させた。 I g G 1 f L A L A は、その全体が参照により組み込まれる
 米国特許出願第 0 8 / 4 7 9 , 7 5 2 号明細書 (S C O T G E N B I O P H A R M A C
 E U T I C A L S I N C .) に記載されている。本開示の所定の実施形態では、抗体の
 抗原結合部分は、タイプ I g G、 I g M、 I g A、 I G E 又は I g D のものである。特定
 の実施形態において、抗体は、タイプ I g G のものである。本開示の所定の実施形態にお
 いて、抗体は、サブタイプ I g G 1、 I g G 2、 I g G 3 又は I g G 4 のものである。特
 定の実施形態において、抗体は、サブタイプ I g G 1 又は I g G 4 のものである。別の特
 定の実施形態において、抗体は、サブタイプ I g G 1 又は I g G 1 f L A L A のもので
 ある。

30

40

【 0 0 7 9 】

表現、抗原に「特異的に結合する」は、タンパク質及び他の生物製剤の不均一集団中の
 抗原の存在下で判定できる結合反応を指す。それにより、表現「抗原を認識する」及び「
 抗原に特異的な」は、本明細書で用語「抗原に特異的に結合する」と交換可能に使用され
 る。例えばモノクローナル抗体のような抗原結合部分の、抗原に対する特異的結合は、当
 技術分野にて既知の確立された様々な方法により決定することができ、 E L I S A、 F A
 C S、 ウェスタンブロット、イムノブロット、 M S D、 B I A c o r e 及び S E T を含む

50

。本開示にて、抗原結合部分は、抗原結合部分が背景の少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、特定の抗原に結合可能であると示された場合、抗原に特異的であると見なされる。それにより、背景は、選択抗原に対して非特異的であることが既知の抗原結合部分により、又は非関連抗原に対する結合と比較することにより、決定される。

【0080】

「交差競合」は、標準的な競合結合アッセイにおいて、特定の抗原に対する他の抗体又は抗原結合部分の結合を妨げる、抗体又は他の抗原結合部分の能力を意味する。抗体又は他の抗原結合部分が特定の抗原に対する他の抗体又は抗原結合部分の結合を妨げることができる能力又は程度、及び、従ってそれが本発明による交差競合であり得るか否かは、標準的な競合結合アッセイを用いて決定することができる。1つの好適なアッセイは、Biacore技術(例えば、Biacore 3000機器(Biacore, Uppsala, Sweden)を使用することによる)の使用を含み、該機器は、表面プラズモン共鳴技術を用いて、相互作用の程度を測定することができる。交差競合を測定する他のアッセイは、ELISAベースの手法を用いる。それらの交差競合に基づく「エピトープマッピング」抗体の高スループットプロセスは、国際特許出願国際公開第2003/48731号パンフレットに記載されている。

10

【0081】

用語「エピトープ」は、抗体に特異的に結合し、又は分子と別様に相互作用することが可能な任意のタンパク質を含む。エピトープ決定基は、一般に、アミノ酸又は炭水化物又は糖鎖等の、分子の化学的に活性な表面基からなり、特定の3次元構造特性、及び特定の電荷特性を有し得る。エピトープは、「線状」又は「立体構造的」であり得る。用語「線状エピトープ」は、タンパク質と相互作用分子(抗体等)との間の相互作用の全地点がタンパク質の一次アミノ酸配列に沿って線状に生じる(連続)エピトープを指す。用語「立体構造的エピトープ」は、不連続アミノ酸が3次元立体構造にて一体となっているエピトープを指す。立体構造的エピトープでは、相互作用地点は互いに分離したタンパク質上のアミノ酸残基を渡って生じる。

20

【0082】

「~と同一のエピトープに結合する」は、抗体又は他の抗原結合部分が特定の抗原に結合する能力、及び、例示された抗体と同一のエピトープを有することを意味する。例示された抗体及び他の抗体のエピトープは、エピトープマッピング技術を用いて決定することができる。エピトープマッピング技術は、当技術分野にて周知である。例えば、立体構造的エピトープは、例えば水素/重水素交換、x線結晶学及び2次元核磁気共鳴等によって、アミノ酸の空間立体配座を決定することにより容易に同定される。

30

【0083】

本明細書で使用される用語「親和性」は、例えばモノクローナル抗体のような抗原結合部分と抗原との、単一の抗原部位における相互作用の強度を指す。各抗原部位内で、抗体「アーム」の可変領域は、多数の部位において弱い非共有結合力を介して抗原と相互作用し;相互作用が多くなる程、親和性が高くなる。

40

【0084】

本明細書で使用される用語「KD」は、 K_d と K_a との比(即ち、 K_d/K_a)から得られる解離定数を指し、モル濃度(M)として表される。例えばモノクローナル抗体のような抗原結合部分に関するKD値は、当技術分野にて確立された方法を用いて決定することができる。例えばモノクローナル抗体のような抗原結合部分のKDを決定するための方法は、SET(可溶性平衡滴定(soluble equilibrium titration))、又は、Biacore(登録商標)システム等のバイオセンサシステムを使用した表面プラズモン共鳴である。本開示では、抗原結合部分は、典型的には、 5×10^{-2} M未満、 10^{-2} M未満、 5×10^{-3} M未満、 10^{-3} M未満、 5×10^{-4} M

50

未満、 10^{-4} M未満、 5×10^{-5} M未満、 10^{-5} M未満、 5×10^{-6} M未満、 10^{-6} M未満、 5×10^{-7} M未満、 10^{-7} M未満、 5×10^{-8} M未満、 10^{-8} M未満、 5×10^{-9} M未満、 10^{-9} M未満、 5×10^{-10} M未満、 10^{-10} M未満、 5×10^{-11} M未満、 10^{-11} M未満、 5×10^{-12} M未満、 10^{-12} M未満、 5×10^{-13} M未満、 10^{-13} M未満、 5×10^{-14} M未満、 10^{-14} M未満、 5×10^{-15} M未満、又は 10^{-15} M未満、又はそれより低い解離定数 (KD) (koff/kon) を有する。

【0085】

「疾患」は、例えば治療的抗体又は他の抗原結合部分を使用することによる医療的処置から利益を得るであろう任意の状態である。疾患の非限定的な例には、自己免疫性疾患、炎症、細胞増殖性疾患；B細胞リンパ腫、非白血病及びリンパ系腫瘍；神経細胞、グリア、星状細胞、視床下部及び他の腺、マクロファージ (macrophage)、上皮、間質及び胞腔疾患；並びに炎症性、免疫性、又は感染性疾患が挙げられる。用語「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」は、ある程度の異常な細胞増殖に関連した疾患を指す。一実施形態では、疾患は癌である。

10

【0086】

本明細書で使用されるように、用語「自己免疫性疾患」は、一般に、自己認識の構成成分を有するとして特徴付けられる疾病を指す。自己免疫性疾患の例には、非限定的に、自己免疫性肝炎、多発性硬化症、全身性エリトマトーデス、突発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、I型糖尿病、関節リウマチ、乾癬、橋本甲状腺炎、バセドウ病、強直性脊椎炎 Sjogrens 疾病、CREST 症候群、強皮症、IgA 腎障、類天疱瘡、尋常性天疱瘡 (Pemphigous Vulgaris)、ANCA 関連血管炎、抗リン脂質抗体症候群、及び更に多数が挙げられる。殆どの自己免疫性疾患は、慢性炎症性疾患でもある。これは炎症性細胞 (白血球) の長期間 (> 6ヶ月) の活性化に関連した疾病プロセスとして定義される。慢性炎症は患者器官又は組織の損傷をもたらす。多数の疾患は慢性炎症性疾患であるが、自己免疫性の基礎を有するとして知られていない。例えば、アテローム性動脈硬化症、鬱血性心疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性多発動脈炎、ウィップル病、原発性硬化性胆管炎及び更に多数。

20

【0087】

用語「癌」は、典型的には未制御の細胞成長/増殖により特徴付けられる哺乳動物内の生理学的状態を指す。癌の例には、非限定的に：癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、及び白血病が挙げられる。癌のより詳細な例には、非限定的に：結腸直腸癌、慢性リンパ性白血病 (GLL)、非小細胞 (NSCLC) を含む肺、乳房、卵巣、頸部、子宮内膜、前立腺、結腸直腸、腸カルチノイド、膀胱、胃、膵臓、肝臓 (肝細胞)、肝芽腫、食道、経肺腺癌、中皮腫、滑膜肉腫、骨肉腫、頭部及び頸部扁平上皮細胞癌、若年性鼻咽腔血管線維腫、脂肪肉腫、甲状腺、黒色腫、基底細胞癌 (BCC)、髓芽腫及びデスモイドが挙げられる。主題の方法による処置に特に興味深い癌には、グリア細胞種、髓芽腫、結腸癌、結腸直腸癌、黒色腫、乳癌、肺癌、肝癌及び胃癌が挙げられる。

30

【0088】

用語「治療的抗体」は、ヒトでの使用が意図される任意の抗体製剤に関する。そのような治療的抗体は、モノクローナル抗体が好ましい。更に好ましいそのようなモノクローナル抗体は、大型類人猿から得られ、又はヒトモノクローナル抗体であろう。ヒトモノクローナル抗体が好ましいであろう。また好ましいそのような治療的モノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体であろう。治療的抗体は、腫瘍学的疾病 (例えば、非ホジキンリンパ腫、乳癌及び結腸直腸癌を含む血液系及び固体悪性腫瘍)、免疫疾患、中枢神経疾患、血管疾患、又は感染性疾患等の様々な疾患の処置に広く使用されている。そのような抗体は、一実施形態では、TNF-、TNF-、VEGF-A、4-インテグリン、CD20、IgE (Fc 領域)、EGFR、GM-CSF、CD19、MCSF、CD38、MIF、DDT、IL-17C、IL-12、Her2/c-neu、CD52、CD33 に対する抗体である。そのような抗体は、例えばアダリムマブ、MOR103、

40

50

リッキシマブ、トラスツズマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、ゲムツズマブ、インフリキシマブ、ラニビズマブ、ウステキヌマブ、ゴリムマブ、ナタリズマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ及びパニツムマブである。

【0089】

本願に使用されている用語「サンプル」は、非限定的に、生物又は死んだ生物 (formerly living thing) からの任意の量の物質を示す。そのような生物には、非限定的に、ヒト、マウス、猿、ラット、兎、及び他の動物が挙げられる。そのような物質には、非限定的に、個人からの唾液、尿、全血、血清又は血漿が挙げられる。臨床ルーチンで最も広く使用されているサンプル源は、全血、血漿又は血清である。好ましい実施形態では、サンプルは患者から単離された。より好ましい実施形態では、サンプルはヒトから単離された。

10

【0090】

本明細書で使用される用語「患者」は、哺乳動物を示す。本発明による患者は、好ましくはヒトである。

【0091】

本明細書で使用されるように、用語「結合」は、例えば化学的カップリングによる共有結合、又は、例えばイオン相互作用、疎水性相互作用、水素結合等による非共有結合であり得る結合又は付着を指す。好ましい実施形態では、結合又は付着は、非共有結合相互作用である。一例では、用語、結合は、同族抗原結合部分の、その抗原に対する付着を指す。

20

【0092】

用語「抗原 - 結合」抗原結合部分は、実験動物又は患者の循環中に存在する、その抗原に結合した抗原結合部分を示すのに使用される。更なる実施形態では、抗原 - 結合抗原結合部分は、抗体である。更なる実施形態では、抗原 - 結合抗原結合部分は、治療的抗体である。

【0093】

用語「非結合」抗原結合部分は、その抗原に結合していない、実験動物又は患者の循環中に存在する抗原結合部分を示すのに使用される。更なる実施形態では、抗原結合部分は、抗体又はその断片である。更なる実施形態では、抗原結合部分は、治療的抗体である。

【0094】

用語「収集物」又は「ライブラリー」は、少なくとも2つのメンバーを意味する。用語「メンバー」は、非限定的に、抗体若しくはその断片をコードする核酸、又は抗体若しくはその断片自体を含む。

30

【0095】

用語「ライブラリー」は、本明細書に記載した多様性を有する、2つ以上の存在物 (entity) を含む存在物のセットを指す。例えば、「抗体又は抗体断片のライブラリー」は、抗体又は抗体断片をコードし、本明細書に記載した多様性を有する、2つ以上のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのセットを指す。例えば、例えば MorphoSys HuCAL PLATINUM (登録商標) ライブラリーのような市販のファージディスプレイライブラリーを使用することができる。

40

【0096】

本明細書で使用されるように、用語「多様性」は、多様さ、即ち顕著な不均一性を指す。

【0097】

用語「フレームワーク」は、可変ドメインの抗原結合ループのための足場としての役割を果たす、該可変ドメインの一部として Kabat et al. (1991) により定義された抗体可変ドメインを意味する。フレームワーク領域の例には、可変重鎖又は可変軽鎖の何れかの FR1、FR2、FR3 及び FR4 が挙げられる。

【0098】

用語「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子により提供される抗体クラス (例えば、

50

IgM、IgE、例えばIgG1又はIgG4等のIgG)を指す。アイソタイプは、これらのクラスのうちの1つの改変型も含み、改変は、Fc機能を変更するために、例えばエフェクター機能又はFc受容体に対する結合を向上又は低下させるために為されている。

【0099】

「抗イデオタイプ抗体」は、他の抗体の抗原結合領域に特異的に結合し、従って他の抗体により特異的に結合される抗体を意味する。抗イデオタイプ抗体は、通常、他の抗体により認識されるエピトープを模倣し得る。イデオタイプは、免疫グロブリンの可変領域内の構造の遺伝的に決定された変種である。イデオタイプ可変性の正確な遺伝学的基礎は、部分的にのみ説明されている。しかしながら、イデオタイプ変種は、特に抗原結合領域の範囲内に、イデオトープとも称される、アミノ酸配列及びタンパク質構造(所謂、決定基)を含む。用語「イデオタイプ」は、抗体分子の可変領域の決定基の完全セットを指定する。

10

【0100】

用語「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸及びまた合成アミノ酸、並びに天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸ミメティック(模倣物)を指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝暗号によりコードされたもの、並びに後に改変されたアミノ酸、例えばヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタメート、及びO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、天然に存在するアミノ酸と同一の基本化学構造、即ち、水素、カルボキシル基、アミノ基、及びR基に結合した炭素を有する化合物、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。それらの類似体は、改変R基(例えば、ノルロイシン)又は改変ペプチドバックボーンを有するが、天然に存在するアミノ酸と同一の基本化学構造を保持する。アミノ酸ミメティック(模倣物)は、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様に機能する化学的化合物を指す。

20

【0101】

用語「核酸」は、本明細書では用語「ポリヌクレオチド」と交換可能に使用され、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド、及び、単鎖又は二本鎖形態の何れかのそれらのポリマーを指す。この用語は、基準の核酸と同様の結合特性を有し、基準のヌクレオチドと同様に代謝される、既知のヌクレオチド類似体、又は改変バックボーン残基若しくは結合を含む、合成、天然に存在する、及び天然に存在しない核酸を包含する。そのような類似体の例には、非限定的に、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNAs)が挙げられる。特に示さない限り、特定の核酸配列は、その保存的に改変された変異体(例えば、縮重コドン置換体)及び相補的な配列、並びに明白に示される配列も暗に包含する。詳細には、下記に詳細に説明するように、縮重コドン置換体は、1つ以上の選択された(又は全部の)コドンの第3の位置が、混合塩基(mixed-base)及び/又はデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することにより達成され得る(Batzer et al. (1991) Nucleic Acid Res. 19: 5081; Ohtsuka et al. (1985) J. Biol. Chem. 260: 2605-2608; 及びRossolini et al. (1994) Mol. Cell. Probes 8: 91-98)。

30

40

【0102】

用語「組み換え宿主細胞」(又は単に「宿主細胞」)は、組み換え発現ベクターが導入されている細胞を指す。それらの用語は、特定の対象細胞のみではなく、それらの細胞の後代も指すことが意図されることを理解するべきである。所定の改変は突然変異又は環境的影響の何れかに起因して、後生に生じ得るため、それらの後代は、実際には、親細胞と同一でない場合があるが、尚、本明細書で使用される用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。

【0103】

50

本明細書で使用される用語「ベクター」は、外来性遺伝子材料を他の細胞内に移動するのに使用される分子ビヒクルを指す。ベクター自体は、一般に挿入断片（関心対象の配列）と、ベクターの「バックボーン」としての役割を果たす、より大きい配列とからなるDNA配列である。ベクターが遺伝子情報を他の細胞に移動する目的は、典型的には、標的細胞内で挿入断片を単離し、増加させ、又は発現することである。

【0104】

本明細書で使用される用語「ラテラルフロー」は、基質又は担体、例えばラテラルフロー膜の面に沿った液体の流れを指す。一般に、ラテラルフロー装置は、毛細管作用、即ちウィッキング又はクロマトグラフ作用により溶液を輸送することが可能な材料の細長片（又は、流体連通する複数の細長片）を含み、細長片（1つ又は複数）内の異なる範囲又はゾーンは、基質に拡散的又は非拡散的に結合したアッセイ試薬を含み、該基質は、溶液がそれらのゾーンへ輸送され又は該ゾーンを通して移動されたときに、検出可能なシグナルを生成する。典型的には、そのようなアッセイは、液体サンプルを受容するように適合された適用ゾーン、適用ゾーンから側方に離間し、適用ゾーンと流体連通する試薬ゾーン、及び試薬ゾーンから側方に離間し、試薬ゾーンと流体連通する検出ゾーンを含む。試薬ゾーンは、液体中で可動であり、かつサンプル中の分析物と相互作用して、例えば分析物 - 試薬複合体を形成することが可能な、及び/又は、検出ゾーン内の結合分子と相互作用することが可能な化合物（例えば、抗体）を含んでもよい。検出ゾーンは、細長片上に固定化され、分析物及び/又は試薬及び/又は分析物 - 試薬複合体と相互作用して、検出可能なシグナルを生成することが可能な結合分子（例えば、抗体）を含んでもよい。そのようなアッセイは、直接（サンドウィッチアッセイ）又は競合結合を介して、サンプル中の分析物を検出するのに使用することができる。ラテラルフロー装置の例は、米国特許第6,194,220号明細書、米国特許第5,998,221号明細書及び米国特許第5,798,273号明細書に提供されている。

10

20

表1:配列

抗体-ID /配列番号	領域	配列
AdaTNF#1		VH1A VL κ 3
配列番号 1 (Kabat)	HCDR1	GGTFSTYAIS
配列番号 2 (Kabat)	HCDR2	WMGGIIPFGTANYAQKFQG
配列番号 3 (Kabat)	HCDR3	DYFSSIGWVVYYGPM DY
配列番号 4 (Kabat)	LCDR1	RASQSVSSPYLA
配列番号 5 (Kabat)	LCDR2	LLIYDVSSRAT
配列番号 6	LCDR3	QQYTSTPP

10

20

(Kabat)			
配列番号 7	VL	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSPYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDVSSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCQYTSSTPPTFGQGTKVEIKRT	
配列番号 8	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYAIWVR QAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARDYFSSIGWVYVYGPMDY WGQGTLVTVSS	10
配列番号 9	DNA VL	gatatcgtgctgaccagagcccggcgaccctgagcctgagcccggggaac gtgccaccctgagctgcagagcgagccagtctgttcttctccgtacctggcttg taccagcagaaaccgggcccaggccccgctctattaatctacgacgttctctc gtgcgaccggcattccggcgcttttagcggcagcggatccggcaccgattca ccctgaccattagcagcctggaaccggaagactttgcggtgattattgccagc agtacacttctactccgcccagccttggccagggcacgaaagtgaattaaac gtacg	
配列番号 10	DNA VH	caggtgcaattggtgcagagcgggtgccgaagtgaaaaaaccgggcagcag cgtgaaagttagctgcaaagcatccggaggacgttttctacttacgctatcttt gggtgcgccaggccccgggcccaggccctcgagtggatgggaggatcatccc gatcttcggcactgcaactacgcccagaaattcagggccgggtgaccattac cgccgatgaaagcaccagcaccgcctatatggaactgagcagcctgcgag cgaagatacggccgtgtattattgcgcgctgactacttctctatcggtgggtt gttactacgggtccgatggattactggggccaaggcaccctgggtgactgttagct ca	20
AdaTNF#5		VH1A VL _{K1}	30
配列番号 11 (Kabat)	HCDR1	GGTFSTNAIS	
配列番号 12 (Kabat)	HCDR2	WMGGINPHLGHADYAQKFQG	
配列番号 13 (Kabat)	HCDR3	GWYYIGSNPSMYPNYFDP	40
配列番号 14 (Kabat)	LCDR1	RASQTISSYLN	
配列番号 15 (Kabat)	LCDR2	LLIYTASNLS	
配列番号 16 (Kabat)	LCDR3	QQVLHLP	

配列番号 17	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQTISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYTASNLSQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQ PEDFATYYCQQLVHLPHTFGQGTKVEIKRT	
配列番号 18	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTNAISWVR QAPGQGLEWMGGINPHLGHADYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARGWYYIGSNPSMYPNYF DPWGQGLVTVSS	
配列番号 19	DNA VL	gatatccagatgaccagagcccagcagcctgagcgccagcggtggcgat cgcgtagaccattacctgcagagccagccagactatttcttctacactgaactgta ccagcagaaaccgggcaaagcgccgaaactattaatctacactgcttcaacc tgcaaagcggcgtgccgagccgcttagcggcagcggatccggcaccgatttc accctgaccattagctctgcaaccggaagactttgcgacctattattgccagc aggtctgcatctgccgataccttggccagggcacgaaagtgaattaac gtacg	10
配列番号 20	DNA VH	Caggtgcaattggtgcagagcggtgccgaagtgaaaaaaccgggcagcag cgtgaaagtagctgcaaagcatccggagggacgttttctactaacgctatctctt gggtgcccaggccccgggcccagggcctcagtggtggggcggtatcaacc cgcatctgggcatgcccactacgcccagaaattcagggccgggtgaccatt accgccgatgaaagcaccagcaccgctatatggaactgagcagcctgcg agcgaagatacggcgtgtattattgcgcggtggtgtaactacatcggttca accgctctatgaccgaaactactcgatccgtggggccaaggcaccctggtga ctgttagctca	20
IFX-TNF#1		VH3-23 VLκ3	
配列番号 21 (Kabat)	HCDR1	GFTFSSYGMH	30
配列番号 22 (Kabat)	HCDR2	WVSYIYYGGSPTYADSVKG	
配列番号 23 (Kabat)	HCDR3	GMYLYDQPAFDY	
配列番号 24 (Kabat)	LCDR1	SGDNIRSDYVH	40
配列番号 25 (Kabat)	LCDR2	LVIYDKSERPS	
配列番号 26 (Kabat)	LCDR3	QAADTWSTIV	
配列番号 27	VL	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLGDYYVHWYQQK	

		PGQAPVLVIYADNNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAEDEADYYCQTYDDRSSPVFGGKLTVLGQ	
配列番号 28	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN SYAMS WVRQAPGKGL EWVSGIGS YTYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAED TAVYYCAR LSQGTGVM DYGQGLV T VSS	
配列番号 29	DNA VL	gatatcgaactgaccagccgccttcagtgagcgtgcaccaggtcagaccgc gcgtatctcgtgtagcggcgattctctggtgattattatgttcattggtaccagcag aaacccgggcaggcgccagttctgtgattatgctgataataatcgccctcag gcatccgggaacgcttagcggatccaacagcggcaacaccgcgaccctga ccattagcggcactcaggcgggaagacgaagcggattattatgccagactatg atgatcgttctctcctgtgttggcggcgccacgaagtaaccgtcctaggctcag	10
配列番号 30	DNA VH	caggtgcaattggtggaaagcggcggcggcctggtgcaaccggggcggcagc ctgcgtctgagctgcgcggcctccggattaccttaattcttatgctatgctctgggt gccaagcccctgggaagggtctcgagtggtgagcggtagctatgctatgctctgggt cctattatgaggatagcgtgaaaggccgtttaccattcacgtgataattcga aaaacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgctgcggaagatacggcctgta ttattgcgcgctcttctcagactggtgttatggattattggggccaaggcaccct ggtgacggttagctca	20

【実施例】

【0105】

抗体 / 抗原複合体に特異的な Fab 断片及び抗体の生成

抗体 / 抗原複合体を特異的に認識する抗体を選択するために、市販のファージディスプレイライブラリー、MorphoSys HuCAL PLATINUM (登録商標) ライブラリーを使用した。前記抗体ライブラリーは、HuCAL (登録商標) 概念 (Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86) に基づき、ファージ表面上に Fab を表示するのに Cys Display (登録商標) 技術を使用する (Lohning に付与された国際公開第 2001/05950 号パンフレット)。しかしながら、利用可能な任意の他の抗体ライブラリーが複合体特異的な抗体の同定に好適であろう。

【0106】

抗体 / 抗原複合体抗体を同定するために、標的抗体 / 抗原複合体を標的とする特定のパニング戦略を開発した。それにより、組み換えられ、精製された抗原及びその対応する組み換え治療的抗体をパニングに使用した。記載した下記の実施例によれば、3つの異なる抗体 / 抗原複合体に関して、特定の複合体のみに結合する抗体を同定した。記載した全てのパニング戦略及び抗原を、抗体選択プロセスに使用した。各パニング戦略は、少なくとも 3 回 (round) の個々のパニングからなり、独特の抗原、抗原濃度及び洗浄の厳格性を含んでいた。

【0107】

実施例 1 : アダリムマブ / TNF - 複合体に特異的な Fab 断片及び抗体の生成及び特徴付け。

アダリムマブ / TNF - 複合体に特異的に結合する抗体を同定するために、溶液パニング手法において、磁気ビーズ及びアダリムマブに結合した組み換え TNF - (BioLegend 570108、Lot B137143) を抗原として使用した。

10

20

30

40

50

【0108】

a) パニング

溶液パニングのために、TNF- α を Epoxy M-450 磁気ビーズ (Dynabeads M-450, Dynal) に共有結合させ、ファージディスプレイ抗体ライブラリーのファージ製剤を洗浄し、Chemiblocker (Chemicon) でブロックする。

【0109】

アダリムマブ/TNF- α 複合体を提供するために、磁気ビーズに結合した組み換え TNF- α を、アダリムマブと共にプレインキュベートした。1回目のパニングのために、Chemiblocker (Chemicon) 及び Tween/PBS の存在下、ファージ-抗体を、精製ヒト IgG1 (50 μ g/ml)、10% ヒト血清、50 g/ml リツキシマブ (IgG1) 及び 1 μ g/ml TNF- α の存在下、アダリムマブ/TNF- α 複合体に加えて、IgG1 及び遊離 TNF- α に特異的な、又はヒト血清の任意の構成成分と交差反応する全ファージ-抗体を吸着させた。ローテータ上にて 2~8 で一晩インキュベートした後、ファージ-抗原混合物をチューブに移動し、磁気分離器を使用して磁気ビーズを捕捉した。ビーズから上清を注意深く除去し、残ったビーズを PBST で洗浄した。

10

【0110】

続く2回目及び3回目のパニングを、遊離 TNF- α の濃度を増大させて (2回目のパニングで 5 μ g/ml ; 3回目のパニングで 25 μ g/ml) 厳格性を増大させ、同様の方法で行い、遊離 TNF- α と交差反応した抗体を廃棄した。

20

【0111】

パニングの各回後、残ったファージを溶出し、溶出したファージを大腸菌 TG1 細菌の感染に直ちに使用した。ヘルパーファージを使用することによるファージの救助後、ポリクローナル増幅ファージ出力を再度タイター (titer) し、連続選択ステップに使用した。3回目のパニング後、溶出した抗原特異的ファージの DNA を、感染細菌から単離し、Fabコード DNA を、PCR を介して特定の Fab 発現ベクター内にサブクローン化した。Fabコードベクターを使用した TG1-F 細菌の形質転換後、HuCAL-Fab 断片を含む周辺質抽出物の単クローン発現、及び調製を行った。Fab 含有周辺質抽出物を、初期スクリーニング及び特徴付けに使用した。

30

【0112】

更なる特徴付けのために、精製 Fab を使用した。TG-1 細胞内での Fab 断片の発現を、1 mM クロラムフェニコール及び 0.1% ブドウ糖で補充した 500 ml の 2xYT 培地を使用して、シェーカーフラスコ内で行った。発現は、0.75 mM IPTG を 30 で 20 時間加えることにより誘導した。リゾチーム、Bugbuster 及び Benzonaase を含む溶解緩衝液を使用して細胞を破壊し、Ni-NTA クロマトグラフィー (Bio-Rad, Germany) により Fab 断片を単離した。UV 分光光度法によりタンパク質濃度を決定した。Fab 断片の純度は、SDS-PAGE を使用して変性、還元状態にて分析し、HPSEC により天然状態にて分析した。

40

【0113】

完全長 IgGs を発現するために、ヒト IgG2、ヒト IgG4、ヒト IgG4__Pro、及びヒト IgG1f LALA に関して、重鎖 (VH) 及び軽鎖 (VL) の可変ドメインを、Fab 発現ベクターから適切な pMORPH (登録商標) __hlg ベクター内にサブクローン化した。

【0114】

b) スクリーニング

一次スクリーニングを ELISA により行った。上述したパニング手順の結果から 368 のクローンを無作為に選定し、384 ウェルの ELISA プレート内で成長させた。抗体発現の誘導 (0.75 mM IPTG、30 で 20 時間) と、リゾチームを使用した細胞溶解の後、抗体を含む細胞溶解物を ELISA にて試験した。

50

【0115】

従って、以下の抗原、アダリムマブ/TNF- 複合体、骨髄腫細胞ラインからの精製ヒトIgG1 / ; リツキシマブ及び遊離組み換えTNF- をELISAプレート上に被覆した。

【0116】

複合体上で正(背景の少なくとも5倍のシグナル)であったが、他の抗原に結合しなかった、全部で12のクローンを同定した。その後、12のクローンを配列決定して独特の抗体を同定した。7つの独特の配列が同定できた。これらの7つのクローンを発現及び精製した後、特徴付けた。

【0117】

c) 特徴付け

最初に、7つの抗体を、ELISAにて、一連の無関連及び関連抗原並びにアダリムマブ/TNF- 複合体に対する特異的結合に関して試験し、ここでアダリムマブをプレート上に被覆して、TNF- を複合体の形成に供し、又はその逆の何れかであった。従って、5µg/mLの各抗原をマイクロタイタープレート上に一晚被覆した。5%BSAで洗浄及びブロッキングした後、Fab-FHフォーマットの抗アダリムマブ/TNF- 抗体(2µg/mL溶液から20µL)を加えた。検出は、HRP標識抗His抗体及びQuantablu蛍光ペルオキシダーゼ基質を使用して行った。AdaTNF#1及びAdaTNF#5は、複合体に対して高い特異性を有することが証明された(図1)。

【0118】

次のステップでは、抗体を異なる固定化抗原上に滴定することにより、AdaTNF#5をより詳細に試験した。試験した濃度範囲(0.03~2000ng/mL)に亘って、抗体は、アダリムマブ/TNF- 複合体のみに結合し、インフリキシマブ/TNF- 複合体、非結合アダリムマブ又は遊離TNF- 、及び他の抗原には結合しなかった(図2)。

【0119】

AdaTNF#5を完全長ヒトIgG1フォーマットに変換し、ヒト細胞ライン中で発現させ、タンパク質Aクロマトグラフィーを介して精製して更に分析した。最初に、(二価)IgG1フォーマットの抗体が尚、同一の特異性を示すか否かを試験した。抗原を5µg/mLでマイクロタイタープレート上に一晚被覆した。5%BSAで洗浄及びブロッキングした後、HRP結合AdaTNF#5-hIgG1(Hispec緩衝液中の2µg/mL溶液から20µL)を加えた。検出は、Quantablu(登録商標)蛍光ペルオキシダーゼ基質を使用して行った。HRPに結合した精製AdaTNF#5-hIgG1は、アダリムマブとTNF- との複合体に特異的に結合した。(図3)

【0120】

更なる特徴付けのために、固定化アダリムマブ-TNF- 複合体に関する、AttanaA200機器を使用したリアルタイム標識遊離分子相互作用分析により、AdaTNF#5の一価固有親和性を $K_D = 67 \text{ nM}$ として測定した。次いで、複合体特異的抗体AdaTNF#5を、ヒト血清中に添加したアダリムマブの決定に使用できるか否かを試験した。ヒトTNF- を5µg/mLでマイクロタイタープレート上に被覆し、一晚インキュベートした。PBST中の5%BSAで洗浄及びブロッキングした後、増大する濃度のアダリムマブを10%ヒト血清中に添加し、予備被覆プレートに適用した。洗浄後、抗アダリムマブ/TNF- hIgG1抗体AdaTNF#5(HRPに結合した)を2µg/mLで加えた。検出は、Quantablu(登録商標)蛍光ペルオキシダーゼ基質を加えることにより行った。AdaTNF#5は、アダリムマブTNF- 複合体に用量依存的に結合した(図4)。従って、この新規な特異性を使用して、最も頻繁に使用されている架橋フォーマットに依存しない非常に高感度の定量化アッセイを開発することができる。

【0121】

実施例2: インフリキシマブ/TNF- 複合体に特異的なFab断片及び抗体の生成及

10

20

30

40

50

び特徴付け。

インフリキシマブTNF - 複合体に特異的に結合する抗体を同定するために、溶液パニング手法において、磁気ビーズ及びインフリキシマブに結合した組み換えTNF - (BioLegend 570108、Lot B137143)を抗原として使用した。
【0122】

パニング及びスクリーニングは、実施例1に記載したように行った。一次スクリーニングの後、3つの独特の抗体がインフリキシマブ/TNF - 複合体に結合することが同定され、これらを発現させ、精製し、更なる特徴付け試験に供した。
【0123】

IFX - TNF # 1、IFX - TNF # 2及びIFX - TNF # 3を、一連の無関連及び関連抗原並びにインフリキシマブ/TNF - 複合体に対する特異的結合に関してELISAにて試験した。従って、5 µg/mLの各抗原をマイクロタイタープレート上に一晚被覆した。A5%BSAで洗浄及びブロッキングした後、Fab - FHフォーマットの抗インフリキシマブ/TNF - 抗体(2 µg/mL溶液から20 µL)を加えた。検出は、HRP標識抗His抗体及びQuantablu蛍光ペルオキシダーゼ基質を使用して行った。IFX - TNF # 1は、複合体に対して高い特異性を有することが証明された(図5)。
【0124】

実施例3: MOR103/GM - CSF複合体に特異的なFab断片及び抗体の生成及び特徴付け。

MOR103/GM - CSF複合体に特異的に結合する抗体を同定するために、固相パニング手法において、組み換えビオチン化ヒトGM - CSF及びMOR103を抗原として使用した。
【0125】

a) パニング

実施例1に記載したパニング手順に従って、ファージ製剤を調製した。
【0126】

MOR103/GM - CSF複合体を提供するために、組み換えGM - CSFをストレプトアビジン被覆プレート上に固定化し、MOR103を加えて複合体を形成した。
【0127】

全3回のパニングを、100 µg/mLのMOR3207(リゾチーム特異的ヒトIgG1)及び5 µg/mLの遊離GM - CSFの存在下で行った。実施例1に記載したように、単離されたファージのDNAをFab - 発現ベクター内にサブクローン化し、各クローンを一次スクリーニングに供した。
【0128】

b) スクリーニング

一次スクリーニングをELISAにより行った。上述したパニング手順の結果から368のクローンを無作為に選定し、284ウェルのELISAプレート内で成長させた。抗体発現の誘導(0.75 mM IPTG、30 で20時間)と、リゾチームを使用した細胞溶解の後、抗体を含む細胞溶解物をELISAにて試験した。
【0129】

従って以下の抗原、MOR103/GM - CSF複合体、精製ヒトMOR3207(IgG1/) ; MOR103及び遊離組み換えヒトGM - CSFをELISAプレート上に被覆した。
【0130】

複合体上で正(背景の少なくとも5倍のシグナル)であったが、他の抗原に結合しなかった全部で3つの独特のクローンを同定した。その後、選択したクローンを発現及び精製し、一連の無関連及び関連抗原並びにMOR103/GM - CSF複合体に対する特異的結合に関してELISAにて試験した。
【0131】

10

20

30

40

50

5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各抗原 (BSA、GST、MOR03207及びMOR103)をマイクロタイプレート上に一晚被覆した。ビオチン化GM-CSF (GM-CSF-bio)の固定化のために、ニュートラアビジンを5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で一晩被覆し、5%BSAでブロックした後、GM-CSF-bioを加えた。MOR103を5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で加えてGM-CSF-bioを固定化することにより各MOR103/GM-CSF-bio複合体を形成した。5%BSAで洗浄及びブロッキングした後、C末端6-Hisタグを含むFabフォーマットの抗MOR103/GM-CSF抗体 (2 g/mL 溶液から20 μL)を加え、その後、抗His検出抗体を使用して検出し、洗浄後、QuantaBlu蛍光ペルオキシダーゼ基質を使用して定量化した。

【0132】

3つの全抗体 (M103GmCSF#1、M103GmCSF#2、及びM103GmCSF#3)は、MOR103/GM-CSF複合体を特異的に検出するが、GM-CSF又はMOR103単独は検出しないことが分かった (図6)。MOR103に対するM103GmCSF#1の幾分かの結合が観察されたが、続く滴定ELISAで確認できなかった。

【0133】

c) 特徴付け

M103GmCSF#1を更に特徴付けた。MOR103単独、ビオチン化GM-CSF、又はMOR103に結合したビオチン化GM-CSFの何れかをアビジン被覆プレート上に被覆した。HisタグM103GmCSF#1Fabを濃度を増大させて加え、His特異的POD結合二次抗体を使用して検出し、QuantaBlu蛍光ペルオキシダーゼ基質を使用して定量化した。M103GmCSF#1は、薬物-標的複合体に対する結合に高い選択性を示し、個々のタンパク質 (薬物及び標的)には示さなかった (図7)。薬物-標的複合体に対するM103GmCSF#1Fabの一価親和性: $k_D = 4.9 \text{ nM}$ 。

【0134】

実施例4: 同族抗体とその抗原との複合体に特異的な抗体を使用して、ヒト血清中の抗体/抗原複合体を検出するアッセイ。

ヒト血清又は血漿からの特定の抗体/抗原複合体を監視及び定量化するために、MSD (登録商標) (Meso Scale Discovery) 技術に基づいて、頑強な薬物動態学的検出アッセイを確立した。

【0135】

手短には、PBSに溶解した2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のラット抗ヒトGM-CSFを、Multi-array (登録商標) 96ウェルプレートの標準プレート (Meso Scale Discovery; Cat: L11XA-3)の各ウェルに被覆した。

【0136】

翌日、MOR103 (hIgG; DSM: P19292; CMC2; conc.: 2.0 mg/mL)及びGM-CSF (Bayer; NDC50419-002-33 Lot: B16891; conc.: 0.25 mg/mL)をLCB緩衝液 (Low Cross-Buffer, Candor Bioscience GmbH Cat# 100500, Lot# 100C434c)中で希釈した。MOR103/GM-CSF複合体を形成するために、MOR103及びGM-CSFを5:1比で混合し、100%ヒト血清 (プールした、男性; Sigma, Cat: H4522; Lot: 11M0605)で補充した。1時間のインキュベーション後、MOR103及びGM-CSFミックスをLCB緩衝液で2倍に希釈し、最終血清濃度50%をもたらし、プレインキュベーションプレートから予備被覆Multi-array (登録商標) 96ウェルプレートに移動し、更に室温で1時間インキュベートした。アッセイプレートをPBSTを使用して洗浄し、400 ng/mL のECL標識M103GmCSF#1 IgG (Lot: 110801__11STE11*1; ECL-標識: Lot: 110831__5AUN51; conc.: PBS中1.7 mg/mL)を1時間加えてMOR103/GM-CSF複合体を検出

10

20

30

40

50

し、続いてMSD読み取り用緩衝液(read buffer) T (Cat: R92TC-1) を使用して定量化し、MSD Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA) 内で測定した。

【0137】

滴定曲線全体において、MOR103/GM-CSF複合体は、ヒト血清の存在下、用量依存的に特異的に検出され、各濃度に関する逆精度(back accuracy)は、少なくとも96~104%であった(下記参照、図8)。

校正 サンプル	公称 Conc. [pM]	精密さ 二重 分析 [%]	精度 [%]
St01	500	2.3	100.3
St02	250	0.5	99.5
St03	125	0.4	99.5
St04	62.5	3.1	100.2
St05	31.25	3.3	100.4
St06	15.63	2.2	99.7
St07	7.81	2.8	103.7
St08	3.91	2.6	96.5
St09	1.95	4.1	97.3
St10	0.98	0	104.8
St11	0.49	20	99.8

10

20

【0138】

本開示を完全に記載してきたが、例示であり、更なる限定を意味するものではない以下の例及び特許請求の範囲により更に説明される。

【0139】

前述の書面による明細書は、当業者が本開示を実施することを可能にするのに十分であると考慮される。しかしながら、文章中に前述のものが如何に詳細に記載され得るかに係わらず、本開示は多数の方法で実施することができ、添付の特許請求の範囲及びその任意の等価物に従って解釈するべきであることを認識するであろう。

30

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/066625

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. G01N33/564 C07K16/00 G01N33/53 C07K16/24		
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.
X	US 2012/157663 A1 (AZUMA TAKACHIKA [JP] ET AL) 21 June 2012 (2012-06-21)	1,2,8,9, 12,13
Y	paragraphs [0127] - [0132], [0140] - [0154]; example 1	3-7,10, 11,14,15
Y	----- US 2011/236994 A1 (ALBITAR MAHER [US] ET AL) 29 September 2011 (2011-09-29)	3-7,10, 11,14,15
A	----- JP 58 177921 A (FUJI ZOKI SEIYAKU) 18 October 1983 (1983-10-18)	1-15
A	----- JP 2000 055917 A (MITSUBISHI KAGAKU BIO CLINICAL) 25 February 2000 (2000-02-25)	1-15
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier application or patent but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*R* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 26 November 2013		Date of mailing of the international search report 05/12/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fellows, Edward

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/066625

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>AbD serotec: "Human anti Adalimumab (drug/target complex) HCA206 Fab", ³ 1 September 2012 (2012-09-01), XP002687475, Retrieved from the Internet: URL:http://www.abdserotec.com/CodePages/Datasheet.aspx?ProductCode=HCA206 [retrieved on 2012-11-16] -----</p>	
T	<p>AbD serotech: "Human anti Adalimumab (drug/target complex) HAC207 IgG", ³ 1 September 2012 (2012-09-01), XP002687476, Retrieved from the Internet: URL:http://static.abdserotec.com/datasheets/hca20/adalimumab-antibody-18754-higg1-hca207.pdf [retrieved on 2012-11-16] -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/066625

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012157663 A1	21-06-2012	CA 2723618 A1	26-11-2009
		CN 102037018 A	27-04-2011
		EP 2289943 A1	02-03-2011
		EP 2530092 A1	05-12-2012
		KR 20110007621 A	24-01-2011
		US 2010040605 A1	18-02-2010
		US 2012157663 A1	21-06-2012
		WO 2009142221 A1	26-11-2009
		US 2011236994 A1	29-09-2011
AU 2002327037 A1	01-04-2003		
EP 1438583 A2	21-07-2004		
EP 2131198 A2	09-12-2009		
HK 1068411 A1	09-04-2010		
JP 4424987 B2	03-03-2010		
JP 5264522 B2	14-08-2013		
JP 2005533236 A	04-11-2005		
JP 2009075139 A	09-04-2009		
JP 2012198232 A	18-10-2012		
US 2003068664 A1	10-04-2003		
US 2010221761 A1	02-09-2010		
US 2011236994 A1	29-09-2011		
US 2012107846 A1	03-05-2012		
US 2013004977 A1	03-01-2013		
WO 03024993 A2	27-03-2003		
JP 58177921 A	18-10-1983		
JP 2000055917 A	25-02-2000	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

(71)出願人 515041000

フリッシュ, クリстіアン

FRISCH, Christian

ドイツ連邦共和国 82272 ミュンヘン, アグリーコラシュトラッセ 64

(71)出願人 515041011

クナッピック, アヒム

KNAPPIK, Achim

ドイツ連邦共和国 82272 モーレンヴァイス, デュンゼルバッハ 66ペー

(74)代理人 110001302

特許業務法人北青山インターナショナル

(72)発明者 ヘルトル, シュテファン

ドイツ連邦共和国 82287 イェゼンヴァング,アーデルスホーフェナーシュトラッセ 10

(72)発明者 フリッシュ, クリстіアン

ドイツ連邦共和国 80689 ミュンヘン, アグリーコラシュトラッセ 64

(72)発明者 クナッピック, アヒム

ドイツ連邦共和国 82272 モーレンヴァイス, デュンゼルバッハ 66ペー

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 DA76 EA50

专利名称(译)	复合物特异性抗体和抗体片段及其用途		
公开(公告)号	JP2015531762A	公开(公告)日	2015-11-05
申请号	JP2015526940	申请日	2013-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	莫佛塞斯公司 地狱托斯特凡 哈特尔STEFAN 弗里施基督教 FRISCH CHRISTIAN 点击螺母挑阿希姆 KNAPPIK ACHIM		
申请(专利权)人(译)	Morufoshisu ARE游戏 Geltru, 斯特凡 弗里施, 基督教 Kunappikku, 阿希姆		
[标]发明人	ヘルトルシュテファン フリッシュクリスティアン クナピックアヒム		
发明人	ヘルトル,シュテファン フリッシュ,クリスティアン クナピック,アヒム		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	C07K16/44 G01N33/53.N G01N33/53.D G01N33/543.545.A		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50		
优先权	2012180835 2012-08-17 EP 61/684836 2012-08-20 US		
其他公开文献	JP6437913B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了特异性检测特定同源抗原结合部分，特别是抗体及其抗原的复合物的抗体及其片段。本发明的抗体不结合所述同源抗原结合部分或所述抗原，因此可以使用例如抗体。直接检测抗原结合的抗原结合部分。还公开了使用所述抗体和抗体片段的方法。

(21) 出願番号	特願2015-526940 (P2015-526940)	(71) 出願人	502247787
(86) (22) 出願日	平成25年8月8日 (2013.8.8)		モルフオシス・アーゲー
(83) 翻訳文提出日	平成27年2月13日 (2015.2.13)		ドイツ連邦共和国 82152・マルティン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/066625		スリード/ブラネグ, レナークリスト
(87) 国際公開番号	WO2014/026905		シュトラウセ48
(87) 国際公開日	平成26年2月20日 (2014.2.20)	(71) 出願人	515040999
(31) 優先権主張番号	12180835.6		ヘルトル, シュテファン
(32) 優先日	平成24年8月17日 (2012.8.17)		HARTLE, Stefan
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ドイツ連邦共和国 82287 イェゼン
(31) 優先権主張番号	61/684,836		ヴァング, アーザルスホーフエナーシュト
(32) 優先日	平成24年8月20日 (2012.8.20)		ラーセ 10
(33) 優先権主張国	米国 (US)		