

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5642702号
(P5642702)

(45) 発行日 平成26年12月17日(2014.12.17)

(24) 登録日 平成26年11月7日(2014.11.7)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N 15/02	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A C	
C O 7 K 16/42	(2006.01)	C O 7 K 16/42		
G O 1 N 33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53	N	

請求項の数 8 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2011-542710 (P2011-542710)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成21年12月18日(2009.12.18)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2012-513426 (P2012-513426A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成24年6月14日(2012.6.14)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/009160		T
(87) 国際公開番号	W02010/072384		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成22年7月1日(2010.7.1)		グレンツァーヘルストラツセ124
審査請求日	平成23年8月19日(2011.8.19)	(74) 代理人	100078662
(31) 優先権主張番号	08022235.9		弁理士 津国 肇
(32) 優先日	平成20年12月22日(2008.12.22)	(74) 代理人	100116919
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 齋藤 房幸
微生物の受託番号	DSMZ DSM ACC2939	(72) 発明者	エッスイヒ, ウルリヒ
			ドイツ国、82152 プラネック、ヨセ
			フーフォン-ヒルシューシュトラセ 5
			1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロイドβペプチドに対する抗体に対する抗イディオタイプ抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞系 DSM ACC 2939 から得られる抗体。

【請求項2】

細胞系 DSM ACC 2939 から得られた抗体を採用する、免疫アッセイを用いた試料中のアミロイド ペプチドに対する抗体の免疫学的測定のための方法。

【請求項3】

細胞系 DSM ACC 2939 から得られた抗体を採用する、免疫アッセイを用いた試料中のアミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗イディオタイプ抗体の免疫学的測定のための方法。

【請求項4】

免疫アッセイが、捕捉抗体、トレーサー抗体および検出抗体を含み、該捕捉抗体が、ストレプトアビジンを介して固相にコンジュゲーションした、細胞系 DSM ACC 2939 から得られた、アミロイド ペプチドに対する抗体に対するビオチン化抗イディオタイプ抗体であり、該トレーサー抗体が、検出可能なラベルとしてのジゴキシゲニンにコンジュゲーションした、細胞系 DSM ACC 2939 から得られた、アミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗イディオタイプ抗体であり、該検出抗体が、ペルオキシダーゼにコンジュゲーションしたジゴキシゲニンに対する抗体であることを特徴とする、請求項2記載の方法。

【請求項5】

イムノアッセイが、固相にコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドと、検出可能なラベルとしてのジゴキシゲニンにコンジュゲーションした、細胞系 D S M A C C 2 9 3 9 から得られた、アミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗イディオタイプ抗体と、ペルオキシダーゼにコンジュゲーションしたジゴキシゲニンに対する検出抗体とを含むことを特徴とする、請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】

イムノアッセイが、捕捉抗体およびトレーサー抗体を含み、該捕捉抗体が、結合対の第 1 部分にコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドに対する抗体であり、該トレーサー抗体が、検出可能なラベルにコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドに対する抗体であることを特徴とする、請求項 3 記載の方法。

10

【請求項 7】

イムノアッセイが、固相にコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドと、検出可能なラベルとしてのジゴキシゲニンにコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドに対する抗体と、ペルオキシダーゼにコンジュゲーションしたジゴキシゲニンに対する検出抗体とを含むことを特徴とする、請求項 3 記載の方法。

【請求項 8】

イムノアッセイが、捕捉抗体およびトレーサー抗体を含み、該捕捉抗体が、固相にコンジュゲーションされる抗体部位で異なる少なくとも二つの該抗体を含む混合物であり、該トレーサー抗体が、検出可能なラベルとコンジュゲーションされる抗体部位で異なる少なくとも二つの該抗体を含む該抗体の混合物であることを特徴とする、請求項 2 ~ 7 のいずれか一項記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗 A 抗体に結合する抗イディオタイプ抗体、および抗 A 抗体上の同じまたはオーバーラップするエピトープに結合する抗体を検出するためのアッセイに関する。

【0002】

発明の背景

認知症の全症例の約 70% は、認知に重要な脳領域および神経回路の選択的損傷に関連するアルツハイマー病が原因である。アルツハイマー病は、特に海馬錐体ニューロンにおける神経原線維タンゲルならびに主にアミロイド沈着の高密度核および拡散したハローを有する多数のアミロイド斑を特徴とする。

30

【0003】

細胞外の老人斑 (neuritic plaque) は、「アミロイド」、「A -」、「A 4」、「- A 4」または「A」と呼ばれる多量の主に原線維性のペプチドを含有する (例えば Selkoe, D.J., Ann. Rev. Cell Biol. 10 (1994) 373-403; Koo, E.H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 9989-9990; 米国特許第 4, 666, 829 号; または Glenn er, G.G., Biochem. Biophysic. Res. Commun. 122 (1984) 1131-1135 参照)。このアミロイド ペプチドは、「アルツハイマー前駆タンパク質 / - アミロイド前駆タンパク質」(APP) から得られる。APP は、内在性膜糖タンパク質であり (例えば Sisodia, S.S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 6075-6079 参照)、形質膜プロテアーゼである - セクレターゼによって A 配列内でタンパク質内分解的に切断される (例えば Sisodia (1992)、上記引用参照)。その上、さらなるセクレターゼ活性、特に - セクレターゼおよび - セクレターゼ活性は、39 個のアミノ酸 (A 39)、40 個のアミノ酸 (A 40)、42 個のアミノ酸 (A 42) または 43 個のアミノ酸 (A 43) のいずれかを含むアミロイド - (A) の細胞外放出を導く (例えば Sinha, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 11049-11053; Price, D.L., Science 282 (1998) 1079-1083; 国際公開公報第 00/72880 号; または Hardy, J., Trends in Neuroscience (1997) 154-159 参照)。

40

【0004】

50

A にいくつかの天然型があることに注目すべきであり、ヒト型は、上記の A 39、A 40、A 41、A 42 および A 43 と呼ばれる。最も顕著な型である A 42 は、アミノ酸配列 (N - 末端から始まる) : D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A (配列番号: 13) を有する。A 41、A 40、A 39 では、それぞれ C - 末端の A、I A および V I A が欠如している。A 43 型では、上記配列の C - 末端に追加的にトレオニン残基が含まれる。

【0005】

抗体を用いた標準的な固相イムノアッセイは、固相に吸着/固定化された抗体(捕捉抗体)と、抗原と、酵素または検出可能なラベルにコンジュゲーションした、抗原の別のエピトープに対する抗体(トレーサー抗体)との間の複合体の形成を伴う。そのアッセイでは、サンドイッチ、すなわち固相/捕捉抗体/抗原/トレーサー抗体が形成する。とりわけサンドイッチにより触媒される反応では、抗体とコンジュゲーションした酵素の活性は、インキュベーション培地中の抗原濃度に比例する。捕捉抗体とトレーサー抗体とが同じ抗原の異なるエピトープに結合することから、標準的なサンドイッチ法は、また、二重抗原架橋イムノアッセイと呼ばれる。Hoesel, W.ら(J. Immunol. Methods 294 (2004) 101-110)は、アミノ基に結合した固定化 r h E P O と、糖質基に結合した r h E P O との混合物を使用した抗 E P O 二重抗原架橋アッセイを報告している。二重抗原架橋 E L I S A などのイムノアッセイは、薬物抗体に対する患者の免疫原性応答の研究によくみられる種類のアッセイである。Mire-Sluis, A.R.ら(J. Immunol. Methods 289 (2004) 1-16)は、バイオテクノロジー産物に対する宿主抗体の検出を用いたイムノアッセイの設計および最適化のための提案を要約している。抗薬物抗体アッセイは、例えば国際公開公報第 2005/045058 号および国際公開公報第 90/006515 号に言及されている。抗イディオタイプ抗体アッセイは、例えば米国特許第 5,219,730 号;国際公開公報第 87/002778 号;EP 0139389;およびEP 0170302に言及されている。Wadhwa, M.ら(J. Immunol. Methods 278 (2003) 1-17)は、治療用生物学的製剤によって誘導される、望まれない抗体の検出、測定およびキャラクタリゼーションのための戦略を報告している。US 2007/0093415に、アミロイド特異的ペプチドおよびその使用が報告されている。抗イディオタイプ抗体の製造方法は、EP 1917854に報告されている。

【0006】

発明の概要

本発明の第1の局面は、アミロイド ペプチドに対する抗体に結合する抗イディオタイプ抗体に加えて、本発明によるアッセイにおけるその使用である。一態様では、該抗体は、寄託細胞系DSM ACC2939から得られる抗体と同じまたはオーバーラップするエピトープに結合することを特徴とする。別の態様は、該抗体が、寄託細胞系DSM ACC2939から得られる抗体であることである。

【0007】

本発明の他の局面は、イムノアッセイを用いた試料中のアミロイド ペプチドに対する抗体の免疫学的測定のための方法、およびイムノアッセイを用いた試料中の、アミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗イディオタイプ抗体の免疫学的測定のための方法である。

【0008】

試料中のアミロイド ペプチドに対する抗体の免疫学的測定のための方法の態様では、イムノアッセイは、捕捉抗体、トレーサー抗体および検出抗体を含み、ここで、捕捉抗体は、ストレプトアビジンを介して固相にコンジュゲーションした、アミロイド ペプチドに対する抗体に対するビオチン化抗イディオタイプ抗体であり、トレーサー抗体は、検出可能なラベルとしてのジゴキシゲニンにコンジュゲーションした、アミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗イディオタイプ抗体であり、検出抗体は、ホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲーションしたジゴキシゲニンに対する抗体である。

【0009】

試料中のアミロイド ペプチドに対する抗体の免疫学的測定のための方法のさらなる態

10

20

30

40

50

様では、イムノアッセイは、固相にコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドと、検出可能なラベルとしてのジゴキシゲニンにコンジュゲーションした、アミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗イディオタイプ抗体と、ホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲーションしたジゴキシゲニンに対する検出抗体とを含む。

【 0 0 1 0 】

一態様では、アミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗イディオタイプ抗体は、寄託細胞系DSM ACC2939から得られた抗体と同じまたはオーバーラップするエピトープに結合する。別の態様では、アミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗イディオタイプ抗体は、寄託細胞系DSM ACC2939から得られる抗体である。

【 0 0 1 1 】

試料中の、アミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗イディオタイプ抗体の免疫学的測定のための方法の一態様では、イムノアッセイは、捕捉抗体およびトレーサー抗体を含み、ここで、捕捉抗体は、結合ペアの第1部分にコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドに対する抗体であり、トレーサー抗体は、検出可能なラベルにコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドに対する抗体である。一態様では、イムノアッセイは、ホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲーションしたジゴキシゲニンに対する検出抗体を含む。

【 0 0 1 2 】

試料中の、アミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗イディオタイプ抗体の免疫学的測定のための方法のさらなる態様では、イムノアッセイは、固相にコンジュゲーションしたアミロイド ペプチド、検出可能なラベルとしてのジゴキシゲニンにコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドに対する抗体、およびホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲーションしたジゴキシゲニンに対する検出抗体を含む。

【 0 0 1 3 】

本発明による方法の一態様では、イムノアッセイは、捕捉抗体およびトレーサー抗体を含み、ここで、捕捉抗体は、固相にコンジュゲーションされる抗体部位で異なる少なくとも二つの抗体を含む混合物であり、トレーサー抗体は、検出可能なラベルにコンジュゲーションされる抗体部位で異なる少なくとも二つの抗体を含む混合物である。

【 0 0 1 4 】

一態様では、抗体と、そのコンジュゲーションパートナーとのコンジュゲーションは、薬物抗体のアミノ酸主鎖のN-末端および/もしくは - アミノ基 (リシン)、別のリシンの - 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/または薬物抗体の糖質構造の糖アルコール基を介して化学結合することによって行われる。別の態様では、捕捉抗体混合物は、アミノ基を介して、および糖質構造を介してそのコンジュゲーションパートナーにコンジュゲーションした抗体を含む。

【 0 0 1 5 】

一態様では、アミロイド ペプチドに対する抗体は、国際公開公報第03/070760号に報告されたような抗体である。別の態様では、アミロイド ペプチドに対する抗体は、配列番号：1、2および3より選択される重鎖CDR3、ならびに配列番号：4、5および6より選択される軽鎖CDR3を含む。さらなる態様では、アミロイド ペプチドに対する抗体は、配列番号：7、8および9より選択される重鎖可変ドメインならびに/または配列番号：10、11および12より選択される軽鎖可変ドメインを含む。

【 0 0 1 6 】

さらなる態様では、捕捉抗体混合物および/またはトレーサー抗体混合物は、少なくとも二つの異なるアミノ基を介してそのコンジュゲーションパートナーにコンジュゲーションした抗体を含む。異なるアミノ基を介したそのような結合は、第1段階で - アミノ基の部分を化学保護剤でアシル化することにより、例えばシトラコニル化することにより、行うことができる。第2段階では、コンジュゲーションは、残りのアミノ基を介して行う。続いてシトラコニル化を除去し、抗体は、残りの遊離アミノ基を介してコンジュゲーション

10

20

30

40

50

オンパートナーにコンジュゲーションする、すなわち得られた抗体は、シトラコニル化によって保護されなかったアミノ基を介してコンジュゲーションパートナーにコンジュゲーションする。適切な化学保護剤は、保護されていない側鎖アミンで結合を形成し、N-末端でのそれらの結合よりも安定性が低く、それらの結合と異なる。多数のそのような化学保護剤が公知である（例えばEP 0651761参照）。一態様では、化学保護剤には、無水マレイン酸または無水シトラコニル酸のような無水環状ジカルボン酸が含まれる。

【0017】

一態様では、捕捉抗体は、受動吸着により固相にコンジュゲーションする結果として、少なくとも二つの異なる抗体部位で固相にコンジュゲーションされる。受動吸着は、例えばButler, J.E., "Solid Phases in Immunoassay" (1996) 205-225およびDiamandis, E.P., and Christopoulos, T.K. (Editors), "Immunoassays" (1996) Academic Press (San Diego)に記載されている。

10

【0018】

一態様では、トレーサー抗体混合物は、アミノ基および糖質構造を介してそのコンジュゲーションパートナーにコンジュゲーションした抗体を含む。

【0019】

別の態様では、捕捉抗体のトレーサー抗体に対する比は、1:10~50:1（比は、抗体分子のモル比を意味し、異なりうるコンジュゲートの分子量とは無関係）である。なおさらなる態様では、そのような混合物におけるアミノにコンジュゲーションした抗体（トレーサー抗体または捕捉抗体のいずれか）の、糖質にコンジュゲーションした抗体（トレーサー抗体または捕捉抗体のいずれか）に対する比は、1:10~10:1（比は、抗体分子のモル比を意味し、異なりうるコンジュゲートの分子量に無関係）である。

20

【0020】

本発明の一態様では、捕捉抗体は、特異的結合ペアを介してコンジュゲーション（固定化）されている。そのような結合ペア（第1構成要素/第2構成要素）は、一態様では、ストレプトアビジンまたはアビジン/ビオチン、抗体/抗原（例えば、Hermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996参照）、レクチン/多糖、ステロイド/ステロイド結合タンパク質、ホルモン/ホルモンレセプター、酵素/基質、IgG/プロテインAおよび/またはGなどより選択される。一態様では、捕捉抗体は、ビオチンにコンジュゲーションされ、固定化は、固定化されたアビジンまたはストレプトアビジンを介して行う。

30

【0021】

別の態様では、トレーサー抗体は、検出可能なラベルとコンジュゲーションさせる。一態様では、トレーサー抗体は、ジゴキシゲニンおよびジゴキシゲニンに対する抗体を介して検出可能なラベルにコンジュゲーションされる。または、トレーサー抗体は、ルテニウムビスピリジル錯体のような電気化学発光ラベルにコンジュゲーションされる。

【0022】

発明の詳細な説明

本発明による「アミロイド ペプチドに対する抗体」という用語は、個体に投与することができる抗体であって、結果として投与後に該個体の試料が該抗体を含むと推測される抗体を意味する。本発明による一つのアッセイ内で、捕捉抗体およびトレーサー抗体は、「同じ」抗体分子、例えば、同じ発現ベクターを用いてリコンビナント産生された、同じアミノ酸配列を含む抗体分子を含む。アミロイド ペプチドに対する抗体は、例えば、米国特許第7,256,273号、米国特許第7,189,819号、米国特許第7,179,892号、米国特許第7,195,761号、US 2008/0281082、US 2008/0221306、US 2008/0131422、US 2008/0050367、US 2007/0238154、US 2007/0154480、US 2007/0110750、US 2006/0280743、US 2006/0292152、US 2006/0165682、US 2006/0057701、US 2006/0057702、US 2006/0039906、US 2005/0249725、US 2005/0169925、US 2005/0118651、US 2005/0009150、US 2004/0171816、US 2004/0171815、およびUS 2004/0192898に記載されている。

40

50

【 0 0 2 3 】

「抗イディオタイプ抗体」は、治療用抗体の相補性決定領域のような抗原結合部位に対する、すなわち可変領域に対して向けられている。そのような抗イディオタイプ抗体は、患者の免疫原性反応物として抗体治療の間に生成することがある（例えばPan, Y., et al., FASEB J. 9 (1995) 43-49参照）。一態様では、アミロイド ペプチドに対する抗体に対する該抗イディオタイプ抗体は、アミロイド ペプチドに対する抗体の一つまたは複数のCDRに結合する。

【 0 0 2 4 】

本発明の第1の局面は、アミロイド ペプチドに対する抗体に結合する抗イディオタイプ抗体である。本発明のこの局面に関する例示的な抗体は、寄託細胞系DSM ACC2939から得られる抗体である。本発明によるアッセイにおけるこの抗体およびその使用もまた、本発明の局面である。一態様では、該抗イディオタイプ抗体は、寄託細胞系DSM ACC2939から得られる抗体と同じまたはオーバーラップするエピトープに結合することを特徴とする。固定化抗体および可溶性抗原（またはその逆）を、20～50 nMの濃度の問題となるエピトープ及び、エピトープのオーバーラップを検出しなければならない濃度100 nMの抗体と共に使用した表面プラスモン共鳴（SPR）アッセイにより、50%以上、一態様では75%以上のシグナル減少が検出される場合に、二つのエピトープはオーバーラップする。または、競合試験系の助けを借りて、同じ抗原に結合する二つの抗体のエピトープのオーバーラップを測定する方法を使用することができる。このために、エピトープのオーバーラップを検出しなければならない抗体が固定化抗原との結合を他の抗体と競合するかどうかは、例えばリコンビナント抗原エピトープを発現している細胞を採用した細胞ベースの酵素イムノアッセイ（ELISA）の助けを借りて試験する。このために、ラベル化形態の抗体およびエピトープのオーバーラップを測定しなければならない過剰の抗体と共に、固定化抗原をインキュベーションする。エピトープのオーバーラップは、結合したラベルの検出によって容易に確認することができる。公知の抗体を基準にして、エピトープのオーバーラップを測定しなければならない抗体が、同濃度で70%を超える、一態様では80%を超えるシグナル減少が測定された場合、またはより高濃度で、場合によると10⁵倍過剰で、80%を超える、一態様では90%を超える置換が測定された場合に、エピトープの同一性またはオーバーラップが存在し、両抗体は、同じ抗原の同じまたはオーバーラップするエピトープに結合する。本発明による抗イディオタイプ抗体は、アミロイド ペプチドのアミノ酸配列、例えば一態様では配列番号：13のアミノ酸残基に特異的に結合する抗体に対して向けられている。

【 0 0 2 5 】

異なるイムノアッセイの原理は、例えばHage, D.S. (Anal. Chem. 71 (1999) 294R-304R)により記載されている。Lu, B.ら (Analyst 121 (1996) 29R-32R)は、イムノアッセイに使用するための抗体の配向された固定化を報告している。アビジン - ビオチン - 介在性イムノアッセイは、例えばWilchek, M.およびBayer, E.A.によりMethods Enzymol. 184 (1990) 467-469に報告されている。

【 0 0 2 6 】

モノクローナル抗体およびそれらの定常ドメインは、表面、タンパク質、ポリマー（例えばPEG、セルロースまたはポリスチロール）、酵素または結合ペアのメンバーなどの結合パートナーと結合するための多数の反応性側鎖をタンパク質として有する。抗体の化学反応基は、例えばアミノ基（リシン、 - アミノ基）、チオール基（シスチン、システイン、およびメチオニン）、カルボン酸基（アスパラギン酸、グルタミン酸）、および糖 - アルコール基である。そのような方法は、例えばAslam M.およびDent, A.によって、"Bioconjugation", MacMillan Ref. Ltd. 1999, pp. 50-100に記載されている。

【 0 0 2 7 】

タンパク質の最も一般的な反応基の一つは、アミノ酸リシンの脂肪族 - アミンである。一般に、ほぼ全ての抗体は、豊富なリシンを有する。リシン性アミンは、pH 8.0超で適度に良好な求核剤である（ $pK_a = 9.18$ ）ことから、多様な試薬と容易かつ正確

10

20

30

40

50

に反応して安定な結合を形成する。アミン反応性試薬は、主にタンパク質のリシンおよび
- アミノ基と反応する。反応性エステル、特に N - ヒドロキシ - スクリンイミド (NH
S) エステルは、アミノ基の改変のために最も一般的に採用される試薬に含まれる。水性
環境における反応の至適 pH は、pH 8.0 ~ 9.0 である。イソチオシアネートは、ア
ミン改変試薬であり、タンパク質とチオ尿素結合を形成する。イソチオシアネートは、水
溶液 (最適には pH 9.0 ~ 9.5) 中でタンパク質性アミンと反応する。アルデヒドは
、温和な水性条件で脂肪族および芳香族アミン、ヒドラジン、ならびにヒドラジドと反応
してイミン中間体 (シッフ塩基) を形成する。シッフ塩基を中または強還元剤 (水素化ホ
ウ素ナトリウムまたはシアノ水素化ホウ素ナトリウム) で選択的に還元して、安定なアル
キルアミン結合を得ることができる。アミンを改変するために使用されている他の試薬は
、酸無水物である。例えば、ジエチレントリアミン五酢酸無水物 (DTPA) は、二つの
アミン反応性無水基を有する二官能性キレート剤である。それは、タンパク質の N - 末端
および - アミノ基と反応して、アミド結合を形成することができる。無水環が開環する
と、配位複合体中の金属と堅固に結合できる多価の金属キレートアームが生じる。

【0028】

抗体における別の一般的な反応基は、含硫アミノ酸シスチンおよびその還元生成物シス
테인 (または半シスチン) からのチオール残基である。システインは、アミンよりもよ
り求核性で、かつ一般にタンパク質の中で最も反応性の高い官能基である遊離チオール基
を有する。チオールは、一般に中性 pH で反応性であることから、アミンの存在下で他の
分子に選択的に結合することができる。遊離のスルフィド基は、比較的反応性である
ので、これらの基を有するタンパク質は、多くの場合に、ジスルフィド基またはジスル
フィド結合としてその酸化型でスルフィド基と共存する。そのようなタンパク質で反応
性遊離チオールを産生させるには、ジチオスレイトール (DTT) などの試薬によるジス
ルフィド結合の還元が必要である。チオール反応性試薬は、タンパク質上のチオール基と
結合してチオエーテル結合生成物を形成する試薬である。これらの試薬は、微酸性 ~ 中性
pH で迅速に反応することから、アミノ基の存在下で選択的に反応させることができる。
文献には、反応性アミノ基を介して複数のスルフィド基を導入する効率的な方法を提
供する、Traut 試薬 (2 - イミノチオラン)、スクシンイミジル (アセチルチオ) アセテ
ート (SATA)、およびスルホスクシンイミジル 6 - [3 - (2 - ピリジルジチオ) プ
ロピオンアミド] ヘキサノエート (スルホ - LC - SPDP) などのいくつかのチオール
架橋試薬の使用が報告されている。ハロアセチル誘導体、例えばヨードアセトアミドは
、チオエーテル結合を形成することから、チオール改変用の試薬でもある。さらに有用な
試薬は、マレイミドである。マレイミドとチオール反応性試薬との反応は、本質的にヨ
ードアセトアミドと同じである。マレイミドは、微酸性から中性 pH で迅速に反応する。

【0029】

抗体における別の一般的な反応基は、カルボン酸である。タンパク質は、C - 末端位に
、ならびにアスパラギン酸およびグルタミン酸の側鎖内にカルボン酸基を有する。カルボ
ン酸が水中で相対的に低い反応性であることから、通常、タンパク質および他の生体分子
を選択的に改変するためにこれらの基を使用することが困難になる。これを行う場合、通
常は水溶性カルボジイミドの使用によりカルボン酸基を反応性エステルに変換し、アミン
、ヒドラジド、またはヒドラジンなどの求核性試薬と反応させる。さらにより高塩基性
のリシンの - アミンの存在下で活性化カルボン酸と選択的に反応させて安定なアミド結合
を形成させるために、アミン含有試薬は弱塩基性であるべきである。pH を 8.0 よりも
上げると、タンパク質の架橋形成が起こるおそれがある。

【0030】

過ヨウ素酸ナトリウムは、抗体に結合した糖鎖内の糖のアルコール部分を酸化してアル
デヒドにするために使用することができる。各アルデヒド基は、カルボン酸について記載
したのと同様にアミン、ヒドラジド、またはヒドラジンと反応させることができる。糖鎖
は主に抗体の結晶性フラグメント (Fc) 領域に見られることから、コンジュゲーション
は、抗原結合部位から離れた糖質の部位特異的改変により達成することができる。シッフ

10

20

30

40

50

塩基中間体が形成され、シアノ水素化ホウ素ナトリウム（穏やかで選択的）または水素化ホウ素ナトリウム（強い）水溶性還元剤を用いたその中間体の還元によって、それをアルキルアミンに還元することができる。

【0031】

「試料」という用語には、非限定的に、生物またはかつての生物に由来する任意の量の物質が含まれる。そのような生物には、非限定的に、ヒト、マウス、サル、ラット、ウサギ、および他の動物が含まれる。そのような物質には、非限定的に、個体からの全血、血清、または血漿が含まれ、これらは、臨床日常業務に最も広く使用される試料源である。

【0032】

「固相」という用語は、非液状物質を意味し、この用語には、ポリマー、金属（常磁性、強磁性粒子）、ガラス、およびセラミックなどの材料から作られた粒子（マイクロパーティクルおよびビーズを含む）；シリカ、アルミナ、およびポリマーゲルなどのゲル状物質；ポリマー、金属、ガラス、および/またはセラミック製でありうるキャピラリー；ゼオライトおよび他の多孔質物質；電極；マイクロタイタープレート；固体ストリップ；ならびにキュベット、チューブまたは他の分光計用試料容器が含まれる。「固相」が、捕捉薬物抗体と相互作用させることを意図する少なくとも一つの部分をその表面に有する点で、アッセイの固相構成要素は、そのアッセイが接触しうる不活性固体表面と区別される。固相は、チューブ、ストリップ、キュベットもしくはマイクロタイタープレートなどの静止構成要素でありうるか、またはビーズもしくはマイクロパーティクルなどの非静止構成要素でありうる。タンパク質および他の物質を非共有または共有結合させる多様なマイクロパーティクルを使用することができる。そのような粒子には、ポリスチレンおよびポリ（メチルメタクリレート）などのポリマー粒子；金ナノパーティクルおよび金コロイドなどの金粒子；ならびにシリカ、ガラス、および酸化金属粒子などのセラミック粒子が含まれる。例えばMartin, C.R., et al., Analytical Chemistry-News & Features, 70 (1998) 322A-327A、またはButler, J.E., Methods 22 (2000) 4-23を参照されたい。

【0033】

一態様では、色素原（蛍光または発色基および色素）、酵素、NMR - 活性基、金属粒子、またはジゴキシゲニンなどのハプテンから、検出可能なラベルが選択される。検出可能なラベルは、また、光で活性化されうる架橋基、例えばアジドまたはアジリン基でありうる。電気化学発光により検出できる金属キレートは、また、一態様でシグナル発生基であり、特にルテニウムキレート、例えばルテニウム（ピスピリジル）₃²⁺キレートが好ましい。適切なルテニウムラベル基は、例えば、EP 0580979、国際公開公報第90/05301号、国際公開公報第90/11511号、および国際公開公報第92/14138号に記載されている。

【0034】

本発明は、捕捉抗体およびトレーサー抗体を含むイムノアッセイを用いた、試料中のアミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗イデオタイプ抗体の免疫学的測定のための方法を提供する。一態様では、イムノアッセイは、抗原架橋イムノアッセイである。別の態様では、イムノアッセイは、捕捉抗体およびトレーサー抗体を含み、ここで、その捕捉抗体は、固相にコンジュゲーションされる抗体部位で異なる少なくとも二つの抗体を含む、アミロイド ペプチドに対する抗体の混合物であり、トレーサー抗体は、検出可能なラベルにコンジュゲーションされる抗体部位で異なる少なくとも二つの抗体を含む、アミロイド ペプチドに対する抗体の混合物である。

【0035】

通例/一般に採用されるアッセイは、試料中のアミロイド ペプチドに対する抗体の定量および/または測定に関して限界があり、これは、例えばアミロイド ペプチドへのアミロイド ペプチドに対する抗体の結合性の変化に起因する。イムノアッセイに本発明によるアミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗体（抗-抗A 抗体抗体）を使用することによって、これらの限界を克服できることが見出された。

【0036】

10

20

30

40

50

本発明による方法に有用な捕捉抗体は、固相にコンジュゲーションされる。コンジュゲーションは、一態様では、抗体のアミノ酸主鎖のN-末端および/または -アミノ基（リシン）、別のリシンの -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/または抗体の糖質構造の糖アルコール基を介した化学結合により行う。本発明による方法に有用な捕捉抗体は、一態様では、固相にコンジュゲーションした少なくとも二つの抗体の混合物であり、ここで、固相にコンジュゲーションした少なくとも二つの抗体は、固相にコンジュゲーションされる部位で異なる。例えば、固相にコンジュゲーションした少なくとも二つの抗体の混合物は、抗体のアミノ酸主鎖のアミノ酸を介して固相にコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドに対する抗体と、抗体の糖質構造の糖アルコール基を介して固相にコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドに対する抗体とを含みうる。また、例えば、固相にコンジュゲーションした少なくとも二つの抗体の混合物は、それらのアミノ酸主鎖の別のアミノ酸残基を介して固相にコンジュゲーションした抗体を含みうる。「別のアミノ酸残基」という表現は、リシンおよびアスパラギン酸、またはチロシンおよびグルタミン酸などの二つの異なる種類のアミノ酸、または、抗体のアミノ酸配列の位置で異なるアミノ酸主鎖の二つのアミノ酸残基の一方を意味する。後者の場合に、アミノ酸は、同じ種類または異なる種類でありうる。「抗体部位（部位）で異なる」という表現は、例えば抗体が固相にコンジュゲーションされる部位の種類、例えばアミノ酸もしくは糖アルコール基、またはアミノ酸主鎖のアミノ酸の数のいずれかが異なることを示す。逆に、本発明による方法に有用なトレーサー抗体に同じことが当てはまる。

10

20

【0037】

本発明の一態様では、アミロイド ペプチドに対する抗体の重鎖可変ドメインは、配列番号：1、2、または3より選択されるアミノ酸配列を有するCDR3を含む。さらなる態様では、該アミロイド ペプチドに対する抗体の軽鎖可変ドメインは、配列番号：4、5、または6より選択されるアミノ酸配列を有するCDR3を含む。さらなる態様では、アミロイド ペプチドに対する抗体は、配列番号：7、8、または9より選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインを含む。なおさらなる態様では、該アミロイド ペプチドに対する抗体は、配列番号：10、11、または12より選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0038】

本発明による方法の一態様では、イムノアッセイは、捕捉抗体としてビオチン化され、ストレプトアビジンを介して固相にコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドに対するモノクローナル抗体のF(ab')₂フラグメントと、トレーサー抗体としてホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲーションしたヒト免疫グロブリンGに対するポリクローナル抗体とを含む。

30

【0039】

本発明による抗体の別の態様では、イムノアッセイは、二重抗原架橋イムノアッセイである。

【0040】

本発明による方法のさらなる態様では、イムノアッセイは、捕捉抗体、トレーサー抗体および検出抗体を含み、ここで、捕捉抗体は、ストレプトアビジンを介して固相にコンジュゲーションしたビオチン化アミロイド ペプチドに対する抗体であり、トレーサー抗体は、ジゴキシゲニンにコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドに対する抗体であり、検出抗体は、ホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲーションしたジゴキシゲニンに対する抗体である。

40

【0041】

本発明による方法の別の態様では、イムノアッセイは、捕捉抗体、トレーサー抗体および検出抗体を含み、ここで、捕捉抗体は、ストレプトアビジンを介して固相にコンジュゲーションした、アミロイド ペプチドに対する抗体に対するビオチン化抗イディオタイプ抗体であり、トレーサー抗体は、検出可能なラベルとしてのジゴキシゲニンにコンジュゲ

50

ーションした、アミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗イディオタイプ抗体であり、検出抗体は、ホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲーションしたジゴキシゲニンに対する抗体である。

【0042】

本発明による方法の別の態様では、イムノアッセイは、固相にコンジュゲーションしたアミロイド ペプチドと、検出可能なラベルとしてのジゴキシゲニンにコンジュゲーションした、アミロイド ペプチドに対する抗体に対する抗イディオタイプ抗体と、ホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲーションしたジゴキシゲニンに対する検出抗体とを含む。

【0043】

本発明によるマウス-マウスハイブリドーマ細胞系であるハイブリドーマ細胞系MAK<Ma b31>M-1.5.74は、特許手続き上の微生物寄託の国際承認に関するブダペスト条約に基づき Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) (ドイツ) に2008年7月29日に寄託番号DSM ACC2939で寄託された。

【0044】

本発明の理解を助けるために、以下の実施例、配列リストおよび図面を提供するが、その真の範囲は、添付の特許請求の範囲に示す。本発明の精神から逸脱せずに、示された手順に改変を加えることができることが了解されている。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】抗イディオタイプ抗ヒトA 抗体抗体の選択。

【図2】交叉反応性を評価するアッセイ。

【図3】抗ヒトA 抗体の定量。

【図4】抗ヒトA 抗体の定量のための代替アッセイ。

【図5】抗-抗ヒトA 抗体抗体 (ADA) の検出。

【図6】抗-抗ヒトA 抗体中和抗体の検出。

【0046】

実施例

実施例 1

アミロイド ペプチドに対する抗体の F (a b ') ₂ フラグメントの調製

例えば、例示的なアミロイド ペプチドに対する抗体 (抗A 抗体) およびそれに対応する核酸配列は、国際公開公報第2003/070760号またはUS 2005/0169925または配列番号: 1 ~ 12 に報告されている。

【0047】

抗A 抗体を100mMクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.6) 中でペプシン (5 μg ペプシン/mg抗体) と共にインキュベーションした。フラグメンテーションは、分析用ゲル濾過によって分析し、リン酸カリウムでpHを7.0に調整することによって50分後に停止させた。300mM塩化ナトリウムを含有する50mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) でその混合物を透析後に、調製物を約20mg/mlに濃縮し、ゲル濾過カラム (Superdex 200) に適用した。回収した画分を分析用ゲル濾過によって分析し、F (a b ') ₂ フラグメントを含有する画分を、ヒトFc に対するポリクローナル抗体を固定化したアフィニティマトリックスに適用し、微量のFc 含有フラグメントを除去した。通過液をプールし、最終的に約20mg/mlに濃縮した。

【0048】

実施例 2

モノクローナル抗イディオタイプ抗体の産生

a) マウスの免疫処置

それぞれ8 ~ 12週齢の雌性Ba1b/cまたはNMRIマウスに、実施例1に概要したように得られた、配列番号: 7 ~ 9より選択される重鎖可変ドメインおよび配列番号: 10 ~ 12より選択される軽鎖可変ドメインを含む、モノクローナル抗A 抗体のF (a

10

20

30

40

50

b')₂ フラグメント 100 μg を C F A (フロイント完全アジュバント) と混合したものを腹腔内に初回免疫処置した。続いて4、7、および10週間後に、マウス1匹あたり100 μgの上記F (a b ')₂ フラグメントをI F A (フロイント不完全アジュバント) と混合したものを適用する3回の腹腔内免疫処置段階をさらに行った。続いてP B S (リン酸緩衝食塩水) 中にそれぞれ25 ~ 100 μgのF (a b ')₂ フラグメントを用いて、それぞれ静脈内または腹腔内追加免疫を行い。3日後に融合させた。

【0049】

b) 融合およびクローニング

a) により免疫処置されたマウスの脾臓細胞由来細胞、骨髓腫細胞との融合を、Galfre, G.およびMilstein, C. (Galfre, G., and Milstein, C., Methods Enzymol. 73 (1981) 3-46) により行った。約1 × 10⁸ 個の脾臓細胞を2 × 10⁷ 個の骨髓腫細胞 (P3x63-Ag8.653, ATCC CRL1580) と混合し、遠心分離 (10分間、300 × g、4) した。その後、F C S (ウシ胎児血清) 不含培地R P M I 1 6 4 0 で細胞を1回洗浄し、50ml尖形バイアルに入れて400 × gで再度遠心分離した。その後、1mlのP E G (ポリエチレングリコール、分子量4000g/mol) を添加した。ピペティングにより混合を行った。37 の水浴中で1分後に、5mlのF C S 不含R P M I 1 6 4 0 を滴加した。この懸濁液を混合し、F C S を10% (v/v) 含有するR P M I 1 6 4 0 で50mlに調整し、その後遠心分離した。F C S を10%含有するR P M I 1 6 4 0 に沈降細胞を再懸濁し、成長因子インターロイキン6 (I L - 6、100U/ml) を含有するヒポキサンチン - アザセリン選択培地 (F C S を10%含有するR P M I 1 6 4 0 中の100mmol/lのヒポキサンチン、1 μg/mlのアザセリン) に蒔いた。約10日後に、特異的抗体合成について初代培養物をアッセイした (実施例3参照)。上記F (a b ')₂ フラグメントに結合性を示すが、ヒトI g Gと交叉反応を示さず、抗イディオタイプであることが示された初代培養物は、成長因子インターロイキン6 (100U/ml) を含有する培地と共にフローサイトメーター (FACSAria, BD Biosciences) を使って96ウェル細胞培養プレートに単一細胞堆積により個別化した。このプロトコールに従うことにより、寄託クローン1.5.74を作出した (表1)。本発明に有用な細胞系をDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (D S M Z) (ドイツ) に寄託した。

【0050】

【表1】

表1: 抗イディオタイプモノクローナル抗体を産生するクローン

クローン	IgG のクラスおよびサブクラス	寄託番号	寄託日
1.5.74	IgGX, Iκ	DSM ACC2939	29.07.2008

【0051】

c) 細胞培養上清からの免疫グロブリンの製造

作出されたハイブリドーマ細胞系を、F C S 10% 補充R P M I 1 6 4 0 培地1mlあたり1.0 × 10⁵ 個細胞の最初の細胞密度で接種し、スピナー培養で増殖させた。そこから細胞を、F C S 10% 補充R P M I 1 6 4 0 培地1mlあたり2.4 × 10⁶ 個細胞の最初の細胞密度 (生細胞) でMinipermeユニットに接種し、増殖させた。回収した培養上清に1.2mg/mlのモノクローナル抗体濃度を達成した。培養上清からの抗体の精製は、標準的なタンパク質化学法、例えばBruck, C., et al., Methods Enzymol. 121 (1986) 587-596により行った。

【0052】

実施例3

抗イディオタイプ抗体の検出のためのスクリーニングアッセイ

a) 薬物抗体に結合する抗体についての一次スクリーニング

ハイブリドーマ細胞の培養上清中の抗体の特異性を測定するために、リコンビナントストレプトアビジンを予備コーティングしたMTP（マイクロタイタープレート）（MicroCoat, Bernried, Germany）に、それぞれ1.0% (w/v)のBSAフラクションIIを補充したPBS中に200 ng/mlのビオチン化モノクローナル抗A抗体、または2 µg/mlのビオチン化ヒトIgGをコーティングした（100 µl/ウェル、振盪しながら外界温度で60分間インキュベーション）。続いて0.05% (w/v) Tween（登録商標）20を含有する0.9% (w/v) 塩化ナトリウム溶液でウェルを3回洗浄した。次の段階で、ウェル1個あたり100 µlのアッセイされるべき抗体溶液（培養上清）を添加し、振盪しながら外界温度で60分間インキュベーションした。ウェルあたり0.9% (w/v) NaCl / 0.05% Tween（登録商標）20で3回の洗浄段階を行った後で、ヒツジポリクローナル抗マウスFc抗体のホースラディッシュペルオキシダーゼラベル化Fab'）₂フラグメント（100 µl）を添加し、振盪しながら外界温度で60分間インキュベーションした。続いて、洗浄を上記のように行った。最終的にウェルあたり100 µlのABTS（登録商標）（Roche Diagnostics GmbH, Germany、カタログ番号1684302）を添加した。外界温度で30分間インキュベーション後に、市販のマイクロタイタープレートELISAリーダーで吸光度（光学密度OD）を405および492 nm [405 / 492] で測定した。このスクリーニングは、モノクローナル抗A抗体IgGに良好に結合し、ヒトIgGに低い交叉反応性だけを、または無交叉反応性さえも示す抗体の選択を導いた。この抗体選択物をさらにアッセイb) に供した。

10

【0053】

20

b) 抗イディオタイプ抗体の選択

一次スクリーニングa) の抗体選択物から、抗イディオタイプである抗体を同定するために、以下に記載したアッセイを行った。リコンビナントストレプトアビジンを予備コーティングされたMTP（MicroCoat, Bernried, Germany）に、PBS中の250 ng/mlのビオチン化Aペプチド（0.5%のBSAフラクションII含有）をコーティングし（100 µl/ウェル、振盪しながら外界温度で60分間インキュベーション）、続いて0.9% (w/v) NaCl / 0.05% Tween（登録商標）20で3回洗浄した。次の段階に、ウェル1個あたりモノクローナル抗A抗体のジゴキシゲニンラベル化Fabフラグメント（50 µl、2.5 ~ 15 ng/ml）、および50 µlのPBS（参照シグナル）または50 µlの候補抗体（培養上清；アッセイシグナル）をそれぞれ添加し、外界温度で60分間振盪しながらインキュベーションした。結合したヒトモノクローナル抗A抗体 - ジゴキシゲニンコンジュゲートを検出するために、ウェルあたり0.9% (w/v) NaCl / 0.05% Tween（登録商標）20で3回の洗浄段階を行った後に、ヒツジポリクローナルジゴキシゲニンに対する抗体のホースラディッシュペルオキシダーゼラベル化Fabフラグメント（100 µl）を添加し、外界温度で振盪しながら60分間インキュベーションした。続いて、上記のように洗浄を行った。最終的に、ウェルあたり100 µlのABTS（登録商標）（Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany、カタログ番号1684302）を添加した。外界温度で30分間インキュベーション後に、市販のマイクロタイタープレートELISAリーダーで吸光度を [405 / 492] nmで測定した。関連する参照シグナルと比較して大きく減少したアッセイシグナルを示す抗体を、さらなる使用のための候補として選択した。

30

40

【0054】

c) ヒトIgGに最低の交叉反応性を有する抗体の選択

スクリーニングb) の候補からヒトIgGに最低の交叉反応性を示すものを同定するために、以下に記載するアッセイを行った。リコンビナントストレプトアビジンで予備コーティングされたMTP（MicroCoat, Bernried, Germany）に緩衝液中のビオチン化モノクローナル抗A抗体IgG（50 ng/ml）をコーティングし（125 µl/ウェル、振盪しながら外界温度で30分間インキュベーション）、続いて、0.9% (w/v) NaCl / 0.05% Tween（登録商標）20で3回洗浄した。次の段階に、100 µlのそれぞれの候補抗体（培養上清）、100 µlのヒトIgG（最大73 mg/mlの濃度）、および200 µl

50

のジゴキシゲニンラベル化モノクローナル抗 A 抗体 - F a b フラグメントの混合物をウェルあたり 100 μ l 添加し、振盪しながら外界温度で 60 分間インキュベーションした。結合したモノクローナル抗 A 抗体 - F a b - ジゴキシゲニンコンジュゲートを検出するために、ウェルあたり 0.9% (w/v) N a C l / 0.05% Tween (登録商標) 20 で 3 回の洗浄段階を行った後で、ヒツジポリクローナルジゴキシゲニンに対する抗体のホースラディッシュペルオキシダーゼラベル化 F a b フラグメント (100 μ l) を添加し、振盪しながら外界温度で 60 分間インキュベーションした。続いて、上記のように洗浄を行った。最終的に、ウェルあたり 100 μ l の ABTS (登録商標) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany、カタログ番号 1684302) を添加した。外界温度で 30 分間インキュベーション後に、市販のマイクロタイタープレート E L I S A リーダーを用いて [405 / 492] nm で吸光度を測定した。ヒト I g G を添加しない場合に比べて、ヒト I g G の添加によるアッセイシグナルの最小の減損を示す抗体をさらなる使用のために選択した。

【0055】

実施例 4

モノクローナル抗 A 抗体に対するマウスモノクローナル抗イディオタイプ抗体の精製
モノクローナル抗 A 抗体 I g G に対する抗体の発酵上清を約 10 倍濃縮し、20 mM T r i s、1 M 硫酸アンモニウムを有する緩衝液 (pH 9.0) に移し、プロテイン A - セファロースに適用した。0.2 M クエン酸ナトリウムおよび 0.2 M 硫酸アンモニウムを有する pH 5.5 の溶出液をリン酸緩衝液 (pH 7.5) で透析した。ウシ I g G の混入物 (発酵プロセス中の F C S から) をウシ I g G に対する固定化抗体で免疫吸着することによって分離した。

【0056】

実施例 5

モノクローナル抗 A 抗体に対するビオチン化抗体の調製

モノクローナル抗 A 抗体 - I g G に対する抗体を、リン酸緩衝液 (pH 8.5) で約 15 mg/ml のタンパク質濃度に調整した。D - ビオチノイル - アミノカプロン酸 - N - ヒドロキシスクシンイミドを D M S O に溶解させ、それをその溶液に 1 : 5 のモル比で添加した。60 分後に L - リシンを添加することにより反応を停止させ、150 mM 塩化ナトリウムを有する 25 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を用いた透析およびゲル濾過により、過剰のラベル化試薬を除去した。

【0057】

実施例 6

モノクローナル抗 A 抗体に対するジゴキシゲニル化抗体の調製

モノクローナル抗 A 抗体 - I g G に対する抗体を、リン酸緩衝液 (pH 8.5) で約 15 mg/ml のタンパク質濃度に調整した。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 D M S O に溶解させ、1 : 5 のモル比で抗体溶液に添加した。60 分後に L - リシンを添加することにより反応を停止させ、150 mM 塩化ナトリウムを有する 25 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を用いた透析およびゲル濾過により、過剰のラベル化試薬を除去した。

【0058】

実施例 7

モノクローナル抗 A 抗体の定量アッセイ

E L I S A は、ストレプトアビジン - マイクロタイタープレート (M T P) を用いてヒト血漿中のモノクローナル抗 A 抗体を定量測定するためのアッセイである。校正用標準および試料を、モノクローナル抗 A 抗体のイディオタイプに対するビオチン化抗イディオタイプ抗体およびジゴキシゲニル化抗イディオタイプ抗体 (- I g G - B i および - I g G - D i g) と共に予備インキュベーションする。30 分間の予備インキュベーション後に、その混合物をマイクロタイタープレートに移す。サンドイッチ - E L I S A は、ABTS (登録商標) 基質の呈色反応を触媒するペルオキシダーゼにコンジュゲーションしたヒツジジゴキシゲニンに対する抗体で検出する。シグナルを E L I S A リーダーにより測定

10

20

30

40

50

する。抗-DIG pAb-Fab-POD (pAb = ポリクローナル抗体) と共にインキュベーションする前後に洗浄段階を行う。全ての較正用標準および試料は、10%のヒト血漿を含む。

【0059】

実施例 8

モノクローナル抗 A 抗体に対する抗薬物抗体を検出するためのアッセイ

第1段階で、ビオチン化モノクローナル抗 A 抗体を、ストレプトアビジンコーティングされたマイクロタイタープレート (SA-MTP) のウェルにコンジュゲーション (結合) させた。ユニバーサル緩衝液で洗浄することによって、コンジュゲーションしていない (未結合の) 抗体を除去した。その後、試料および参照標準 (5%ヒト血清に添加されたモノクローナル抗イディオタイプ抗 A 抗体) をウェル中でインキュベーションした。抗-抗 A 抗体は、固定化モノクローナル抗 A 抗体に結合した。未結合の物質を洗浄除去後に、結合した抗-抗 A 抗体をジゴキシゲニル化モノクローナル抗 A 抗体で検出し、続いてホースラディッシュペルオキシダーゼラベル化ジゴキシゲニンに対する抗体と共にインキュベーションした (図1参照)。抗体-酵素コンジュゲートは、ABTS (登録商標) 基質の呈色反応を触媒した。シグナルは、ELISAリーダーにより 405 nm (参照波長: 490 nm) で測定した。各血清試料の吸光値を3重で繰り返して測定した。

【0060】

実施例 9

モノクローナル抗 A 抗体を定量するための代替アッセイ

ELISAは、アミノ酸1-40を含むアミロイドタンパク質 (A (1-40)) をコーティングされたマイクロタイタープレート (MTP) を用いてヒト血漿中のモノクローナル抗 A 抗体を定量測定するためのアッセイである。較正用標準および試料は、A (1-40) でコーティングされたマイクロタイタープレートのウェルの中でインキュベーションし、A (1-40) でコーティングされた表面に結合したモノクローナル抗 A 抗体の量は、モノクローナル抗 A 抗体のイディオタイプに対するジゴキシゲニル化抗イディオタイプ抗体 (-IgG-Dig) と ABTS (登録商標) 基質との呈色反応を触媒するペルオキシダーゼにコンジュゲーションしたジゴキシゲニンに対する抗体を用いて検出する。シグナルは、ELISAリーダーにより測定する。

【0061】

全てのインキュベーションサイクルの間に洗浄段階を行う。マイクロタイタープレート (MTP) に A (1-40) をコーティング後に、追加的なブロッキング段階が必要である (インキュベーション緩衝液を用いる)。全ての較正用標準および試料は、10%のヒト血漿を含む。全てのインキュベーション段階は室温で行う。

【0062】

実施例 10

モノクローナル抗 A 抗体に対する抗薬物中和抗体を検出するためのアッセイ

治療用モノクローナル抗 A 抗体の相補性決定領域に対する抗薬物中和抗体を分析するために、競合ELISAを開発した。血漿試料または標準としてモノクローナル抗 A 抗体に対する抗イディオタイプ抗体をモノクローナル抗 A 抗体-DIGコンジュゲートと共に予備インキュベーションする。残りの遊離モノクローナル抗 A 抗体-DIGコンジュゲートは、A でコーティングしたマイクロタイタープレートに捕捉し、ペルオキシダーゼラベル化ジゴキシゲニンに対する抗体、その後 ABTS を用いた呈色反応で検出する。

。

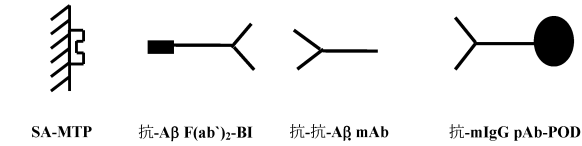
10

20

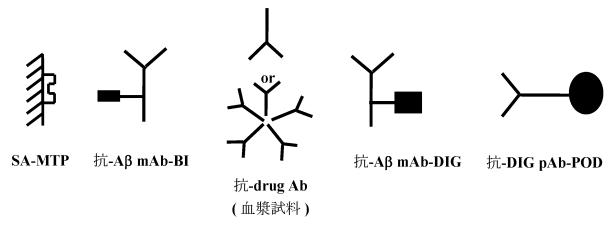
30

40

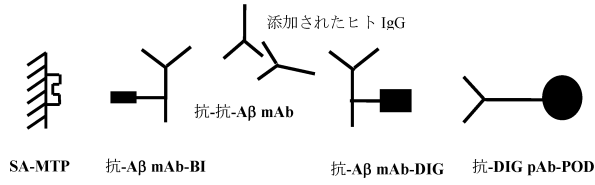
【 図 1 】



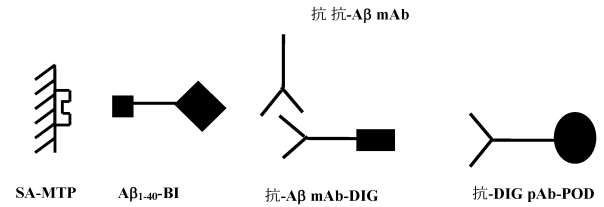
【 図 5 】



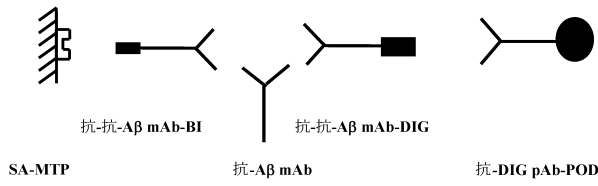
【 図 2 】



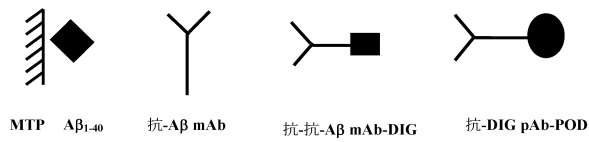
【 図 6 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

0005642702000001 . app

フロントページの続き

- (72)発明者 ヘーゼル, ヴォルフガング
ドイツ国、82327 トゥッツィング、ツェーザル-フォン-フォーファッカー-シュトラッセ
10
- (72)発明者 シュトゥーベンラウホ, カイ-グンナー
ドイツ国、82377 ペンツベルク、アン・デア・フライハイト 105
- (72)発明者 フォーゲル, ルドルフ
ドイツ国、82362 ヴァイルハイム、ラーベルシュトラッセ 5アー

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 特表2005-527199(JP, A)
特開2008-115180(JP, A)
国際公開第2008/061684(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
C07K 16/00 - 16/46
G01N 33/00 - 33/98
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/
WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
PubMed

专利名称(译)	针对淀粉状蛋白β肽抗体的抗独特型抗体		
公开(公告)号	JP5642702B2	公开(公告)日	2014-12-17
申请号	JP2011542710	申请日	2009-12-18
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	エッスイヒウルリヒ ヘーゼルヴォルフガング シュトゥーベンラウホカイグンナー フォーゲルルドルフ		
发明人	エッスイヒ,ウルリヒ ヘーゼル,ヴォルフガング シュトゥーベンラウホ,カイ-グンナー フォーゲル,ルドルフ		
IPC分类号	C12N15/02 C07K16/42 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/4241 C07K2317/56 C07K2317/565 G01N33/686 G01N2333/4709 G01N2469/20 C07K16/42		
FI分类号	C12N15/00.ZNAC C07K16/42 G01N33/53.N		
代理人(译)	津国 肇		
优先权	2008022235 2008-12-22 EP		
其他公开文献	JP2012513426A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及与抗淀粉样蛋白β肽的抗体的互补决定区结合的抗独特型抗体。在一个实施方案中，所述抗体与可从细胞系DSM ACC2939获得的抗体结合相同的表位或重叠表位。还报道了用于测定针对淀粉状蛋白β肽的抗体和用于测定与针对淀粉状蛋白β肽的抗体结合的抗独特型抗体的免疫测定。

クローン	IgGのクラスおよびサブクラス	寄託番号	寄託日
1.5.74	IgG1, κ	DSM ACC2939	29.07.2008