

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6165713号
(P6165713)

(45) 発行日 平成29年7月19日(2017.7.19)

(24) 登録日 平成29年6月30日(2017.6.30)

(51) Int.Cl.	F I
CO7K 16/22 (2006.01)	CO7K 16/22 ZNA
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D
GO1N 33/577 (2006.01)	GO1N 33/577 B
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 515A
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08

請求項の数 5 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-508815 (P2014-508815)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成24年5月4日(2012.5.4)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2014-515761 (P2014-515761A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成26年7月3日(2014.7.3)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/058208		T
(87) 国際公開番号	W02012/150321		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成24年11月8日(2012.11.8)		グレンツアーヘルストラツセ124
審査請求日	平成26年11月12日(2014.11.12)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	11164957.0		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成23年5月5日(2011.5.5)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	12155742.5	(74) 代理人	100101373
(32) 優先日	平成24年2月16日(2012.2.16)		弁理士 竹内 茂雄
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン様増殖因子1に特異的に結合する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

インスリン様増殖因子1前駆体(配列番号1)のアミノ酸76~84(配列番号3)からなるエピトープに結合する、インスリン様増殖因子1(IGF-1)に特異的な単離されたモノクローナル抗体。

【請求項2】

重鎖可変ドメインが、配列番号15のCDR3H領域、配列番号16のCDR2H領域、および配列番号17のCDR1H領域を含み、そして軽鎖可変ドメインが、配列番号18のCDR3L領域、配列番号19のCDR2L領域、および配列番号20のCDR1L領域を含むことにおいて、前記抗体が特徴付けられる、請求項1の抗体。

【請求項3】

前記抗体が、インスリン様増殖因子1前駆体(配列番号1)のアミノ酸77~84(配列番号4)からなるエピトープに結合する、請求項1の抗体。

【請求項4】

重鎖可変ドメインが、配列番号23のCDR3H領域、配列番号24のCDR2H領域、および配列番号25のCDR1H領域を含み、そして軽鎖可変ドメインが、配列番号26のCDR3L領域、配列番号27のCDR2L領域、および配列番号28のCDR1L領域を含むことにおいて、前記抗体が特徴付けられる、請求項3の抗体。

【請求項5】

サンドイッチ・イムノアッセイを通じて、体液試料においてIGF-1を検出するため

の方法であって：

- a) 請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体と試料をインキュベーションし、それによって、前記試料中に含まれるIGF-1に対する前記抗体の結合が起こり、
 b) IGF-1前駆体のアミノ酸76～84を含まないエピトープに結合する、IGF-1に対する第二の抗体と、試料をインキュベーションし、それによって、第二の抗体の結合が起こり、そして
 c) 工程(a)および(b)において形成された免疫学的サンドイッチ複合体を測定し、それによって試料中のIGF-1を検出する

工程を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の概要】

【0001】

ヒト・インスリン様増殖因子1(UniProtKBエントリーP05019、IGF1__ヒト(配列番号))は、ソマトメジンCおよびソマトメジンAとしてもまた知られ、成熟型では70aaポリペプチド(配列番号2)であり、該ポリペプチドはIGF-2およびインスリンと長いストレッチの配列同一性および高い構造的相同性を共有する(Rinderknecht, E.およびHumbel, R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73(1976) 2365-2369; Rinderknecht, E.およびHumbel, R.E., J. Biological Chemistry 253(1978) 2769-2776)。ヒトIGF-2は、IGF-1より500倍モル濃度過剰にヒト血清中に存在する(Jones, J.I.およびClemmons, D.R., Endocr. Rev. 16(1995) 3-34)。IGF-2の血清濃度がより高く、そしてIGF-2がIGF-1と配列相同性を持つことが、IGF-1の特異的な免疫学的検出の大きな障害となっている。その結果、IGF-1およびIGF-2の間を明らかに区別するIGF-1特異的抗体、すなわちIGF-2と交差反応性を持たない抗体の生成は困難であり、そしてこうした抗体の生成は、体液試料におけるIGF-1の特異的検出の礎石となるであろう。

【0002】

インスリン同様、IGF-1ポリペプチド鎖をドメインに分けることも可能である。IGF-1は、それぞれ、4つのドメイン、B(アミノ酸残基1～29)、C(30～41)、A(42～62)およびD(63～70)を含む。ドメインAおよびBは、それぞれ、インスリンB鎖およびA鎖の構造的相同体であり、ドメインCはプロインスリンの連続ペプチドに類似であり、一方、Dドメインはインスリン中に対応物を持たない。

【0003】

Manes S.ら, J. Endocrinol. 154(1997) 293-302に要約されるように、IGF-1は、成長ホルモン(GH)の増殖促進活性を仲介すると考えられる(Sara, V.R.およびHall, K., Physiol Rev. 70(1990) 591-614)。IGF-1はまた、パラ分泌経路または自己分泌経路を通じて、多様な細胞タイプにおいて、細胞増殖、分化および生存を局所調節する際にも重要であると見なされる(Jones J.I.およびClemmons, D.R., Endocrin. Rev. 16(1995) 3-34)。IGF-1の推定上の受容体である、1型IGF受容体(IGF-1R)(Ullrich, A.ら, EMBO J., 5(1986) 2503-2512)は、腫瘍形成において重要な役割を果たすと提唱されてきている(Sell, C.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(1993) 11217-11221)。多くの腫瘍がIGF-1Rを発現し、そしてIGF-1またはIGF-2を産生し、そして細胞外環境に分泌し(Baserga, R., Cell 79(1994) 927-930; Werner, H.ら, Int. J. Biochem. Cell Biol. 27(1995) 987-994)、それによって自己分泌方式で連続細胞増殖を促進することを示す、多くの証拠がある。

10

20

30

40

50

【0004】

I G F - 1 および I G F - 2 は、どちらも、多くの組織および細胞タイプにおいて発現され、そして自己分泌、パラ分泌および内分泌機能を有する。成熟 I G F - 1 および I G F - 2 は、ヒト、ウシおよびブタ・タンパク質の間で非常に保存されており（100% 同一性）、そしてまた、交差種活性を示す。I G F L（インスリン様増殖因子様）ファミリーには、ヒトにおける4つの小さい（ $\sim 11 \text{ kDa}$ ）、おそらく分泌されるファミリーメンバー、およびマウスにおける1つのメンバーが含まれる。

【0005】

I G F - 1 の重要な役割を考慮すると、I G F - 1 特異的抗体、すなわち I G F - 2 に対する交差活性を持たない抗体の生成は、困難であるとともに、I G F - 1 の特異的検出のために、非常に重要である。インスリン様増殖因子が30年以上知られているにもかかわらず、これまでに、そして現在でもなお、体液試料中で I G F - 1 を特異的に検出すること、または組織試料中でタンパク質インスリン様増殖因子1を位置決定することは困難なままである。これは、例えば、当該技術分野に知られる抗体による、不十分な結合アフィニティおよび/または関連する分子に対する異なるレベルの交差反応性のためでありうる。

10

【0006】

I G F - 1 の血清検出において、大部分の装置は、ストリンジェントな洗浄工程を用いて、用いる特異的結合剤、例えば抗体の非特異的結合を減少させ、そして克服する。一般的に、天然 I G F - 1 での免疫によって発生する抗体は、より低いアフィニティおよび抗原複合体安定性で交差反応する I G F - 2 を認識するよりも、より高いアフィニティおよび抗原複合体安定性で、その本来の免疫原を認識する。例えば、天然組換えヒト I G F - 1 でのマウスの免疫キャンペーンから得られたネズミ・モノクローナル抗体 < I G F - 1 > - M 2 . 2 8 . 4 4 は、 $K_D = 0.03 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ アフィニティおよび $t_{1/2 \text{ 解離}} = 92$ 分で、I G F - 1 に対する結合動力学シグネチャーを示す（図8を参照されたい）一方、I G F - 2 には、 $K_D = 5 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ アフィニティおよび $t_{1/2 \text{ 解離}} = 5$ 分で結合する。基本的な相違は、抗原複合体安定性にある。I G F - 1 特異的アッセイのためのこうした抗体の使用の成功は、その装置の洗浄セットアップに強く依存し、これは、< I G F - 1 > - M 2 . 2 8 . 4 4 交差反応抗体から I G F - 2 を枯渇させる必要があるためである。簡潔には、I G F - 2 への交差反応性を示す I G F - 1 結合抗体の技術的境界は、洗練された洗浄工程によってのみ乗り越えることが可能である。

20

30

【0007】

I G F - 1 特異性必要条件は、平衡条件下で適用される抗体に関して、特に、抗体 - 抗原免疫複合体の洗浄または精製法をいずれも行わない診断系において、はるかに高いことが自明である。他の態様の中で、やはり *in vivo* 状況もまた、主に熱力学平衡によって特徴付けられる。したがって、平衡条件下で、特に、いかなる I G F - 2 相互作用も欠如していることが証明されることが非常に重要である。

【0008】

当該技術分野に知られるこれらの問題を克服する抗体を開発することが、本発明の目的であった。平衡条件下での適用に適した I G F - 1 特異的抗体に対する重要な要求は、I G F - 1 が高アフィニティで認識されそして結合されるだけでなく、I G F - 2 血清濃度が高い場合であっても、検出可能な I G F - 2 会合 k_a ($1/\text{Ms}$) がないことである。

40

【0009】

原則として、I G F - 1 および I G F - 2 の間の免疫学的区別は、それぞれの抗体が I G F - 2 対応物とはアミノ酸配列またはコンホメーションが明らかに異なる I G F - 1 エピトープをターゲットとする場合にのみ実現可能であるはずである。実際、I G F - 1 および I G F - 2 の間には顕著な配列逸脱は1つしかなく、特に、シグナルおよびプロペプチドで番号付けを開始する、I G F - 1 アミノ酸74～90位の I G F - 1 のターン-ループモチーフにおけるものである（UniProtKB エントリー P05019、I G F 1__ヒト）。これまでは、実験動物において、免疫原として天然 I G F - 1 を用いた慣用

50

的免疫戦略によって、この I G F - 1 モチーフをエピトープとしてターゲティングする抗体を得ることは不可能であった。

【 0 0 1 0 】

本発明は、ヒト・インスリン様増殖因子 1 前駆体 (配列番号 1) のアミノ酸 7 6 ~ アミノ酸 8 4 の範囲のアミノ酸ストレッチ内のこの本来の I G F - 1 エピトープに特異的に結合する単離抗体に関する。

【 0 0 1 1 】

新規抗体は、緊密に関連する I G F - 2 が非常に過剰に存在する場合であっても、インスリン様増殖因子 1 の高感度でそして非常に特異的な検出を可能にするため、非常に有用である。

10

【 0 0 1 2 】

驚くべきことに、ヒト・インスリン様増殖因子 1 前駆体 (配列番号 1) のアミノ酸 7 6 ~ アミノ酸 9 0 のアミノ酸ストレッチ (配列番号 5) を利用し、そして代理免疫原内に操作し、それによって天然 I G F - 1 の C ドメインに特異的に結合する抗体を生成する地ならしをすることが可能であることが見出されてきている。本発明者らはまた、ヒト・インスリン様増殖因子 1 前駆体 (配列番号 1) のアミノ酸 7 6 ~ アミノ酸 8 4 内に含まれるエピトープに結合する単離抗体を用いると、I G F - 1 の免疫学的検出に非常に好適でありうることも見出した。

【 0 0 1 3 】

驚くべきことに、インスリン様増殖因子 1 (I G F - 1) のかなり短い部分配列、すなわち配列番号 1 に示す I G F - 1 前駆体のアミノ酸 7 6 ~ 8 4 (配列番号 3) が、非常に好適な特性を有し、そして当該技術分野に知られる問題の少なくともいくつかを克服することも可能であることが見出されてきている。

20

【 0 0 1 4 】

1 つの態様において、本発明は、インスリン様増殖因子 1 前駆体のアミノ酸 7 6 ~ 8 4 (配列番号 3) 内に含まれるエピトープに結合する、単離抗体に関する。

本発明の 1 つの態様において、配列番号 3 に含まれるエピトープ、またはアミノ酸のこのストレッチ内の部分配列 (配列番号 4)、例えば I G F - 1 前駆体 (配列番号 1) のアミノ酸 7 7 ~ 8 4 の範囲の部分配列に結合するモノクローナル抗体を開示する。

【 0 0 1 5 】

本発明はまた、I G F - 1 に特異的に結合する抗体の部分配列、およびイムノアッセイ法であって、液体試料を本発明記載の抗体とインキュベーションし、それによって前記試料中のインスリン様増殖因子 1 に対する前記抗体の結合が起こり、そして前記試料において抗インスリン様増殖因子 1 抗体に結合した I G F - 1 を検出する工程を含む、前記方法にも関する。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 6 】

【 図 1 】サーマス・サーモフィラス (*Thermus thermophilus*) S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) 融合ポリペプチドの SDS PAGE (クーマシー染色) および抗 h i s タグウェスタンブロット (1 0 秒曝露) 。 M - N o v e x S h a r p 標準 ; 1 - 2 . 5 μ g のサーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) 融合ポリペプチド ; 2 - 5 . 0 μ g のサーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) 融合ポリペプチド ; 3 - 1 0 μ g のサーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) 融合ポリペプチド ; M * - M a g i c M a r k 。

40

【 図 2 】サーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) 融合ポリペプチドの分析用 H P L C クロマトグラム (上部の線 : 分子量標準。下部の線 : 融合ポリペプチド) 。

【 図 3 】それぞれ、捕捉抗原として、サーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) およびヒト I G F - 1 (= I G F - 1) を用いた E L I S A によって測定した、免疫 1 2 週後のマウスにおける血清力価 (m E = ミリ吸光度) 。

50

【図4】IGF-1、サーマス・サーモフィラスSlyD-IGF-1(74~90)融合ポリペプチドおよびサーマス・サーモフィラス野生型SlyDポリペプチドに対する結合シグナルを示す、一次培養のELISAスクリーン(mE = ミリ吸光度、IGF-1 = ヒトIGF-1)。

【図5】IGF-1、IGF-2、サーマス・サーモフィラスSlyD-IGF-1(74~90)融合ポリペプチドおよびサーマス・サーモフィラス野生型SlyDポリペプチドに対する一次培養<IGF-1>M-11.0.15の例示的なBIACore動力学スクリーニング。(一次培養は11.0.15と称され、一方、最終クローニング後の名称は11.10.15である)。

【図6】IGF-1、サーマス・サーモフィラスSlyD-IGF-1(74~90)融合ポリペプチドおよびサーマス・サーモフィラス野生型SlyDポリペプチドに対するクローニング培養上清のELISAスクリーン。結合アフィニティの改善を示す吸収シグナルの増加が、IGF-1およびサーマス・サーモフィラスSlyD-IGF-1(74~90)融合ポリペプチドで検出された。

【図7】IGF-1、IGF-2、サーマス・サーモフィラスSlyD-IGF-1(74~90)融合ポリペプチド、サーマス・サーモフィラス野生型SlyDポリペプチド、サーモコッカス・ガンマトランス(Thermococcus gammatolerans)野生型SlyDポリペプチド、サーマス・サーモフィラスSlyD-IF融合ポリペプチド、およびサーモコッカス・ガンマトランスSlyD-IGF-2(53~65)融合ポリペプチドに対する、<IGF-1>M-11.11.17-IgGのBIACore測定。

【図8】新規に発生させた抗IGF-1抗体の結合動力学を示す表。mAb:モノクローナル抗体;RU:センサー上に捕捉されたモノクローナル抗体の相対反応単位;抗原:溶液中の抗原;kDa:溶液中の分析物として注入される抗原の分子量; k_a :会合速度定数; k_d :解離速度定数; $t_{1/2}$ 解離:式、 $t_{1/2}$ 解離 = $\ln(2) / 60 * k_d$ にしたがって計算される抗体-抗原複合体半減期; K_D :解離定数; R_{MAX} :90nM分析物注入の会合期の終わりの結合シグナル;MR:モル濃度比; Chi^2 :測定のカイ二乗検定;n.d.:検出不能。

【発明を実施するための形態】

【0017】

成熟ヒト・インスリン様増殖因子1(IGF-1)は、約8kDaの分子量を有し、そして70アミノ酸からなる。IGF-1は、4つのよく定義された領域である、それぞれ、配列番号2のB(アミノ酸残基1~29)、C(30~41)、A(42~62)およびD(63~70)を含む。

【0018】

本発明は、インスリン様増殖因子1のループ領域(配列番号5)内に含まれるエピトープに結合する単離抗体に関する。

1つの態様において、本発明は、インスリン様増殖因子1前駆体(配列番号1)のアミノ酸残基76~84(配列番号3)内の単離抗体結合に関する。言い換えると、本発明記載の単離抗体は、配列番号3に含まれるエピトープに結合する。

【0019】

別に説明しない限り、本明細書で用いるすべての技術的用語および科学的用語は、本明細書に開示する本発明が属する技術分野において、一般の当業者に共通に理解されるのと同じ意味を有する。

【0020】

冠詞「a」および「an」は、本明細書において、冠詞の文法的対象(grammatical object)の1または1より多く(すなわち少なくとも1つ)を指す。例えば、「抗体(an antibody)」は、1つの抗体または1より多い抗体を意味する。

【0021】

10

20

30

40

50

「エピトープ」は、抗原結合分子（例えば抗体、抗体断片、抗体結合領域を含有する足場タンパク質、またはアプタマー）が結合するターゲット分子（例えば抗原、例えばタンパク質または核酸分子）上の部位である。エピトープは、ターゲット分子の連続残基または隣接する非連続残基（例えばアミノ酸残基）の両方から形成可能である。連続残基（例えばアミノ酸残基）から形成されるエピトープは、典型的にはまた、直鎖エピトープとも称される。エピトープには、典型的には、少なくとも5残基、そして最大約12残基、大部分、6～10残基の間（例えばアミノ酸残基）が含まれる。「単離」抗体は、天然環境の構成要素から同定され、そして分離され、そして/または回収されているものである。天然環境の混入構成要素は、抗体に関して、研究、診断または療法使用と干渉するであろう物質であり、そしてこれには酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質が含まれる。いくつかの態様において、抗体を、例えばローリー法によって測定した際に、抗体重量の70%より高く精製し、そしていくつかの態様において、重量80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%より高く精製する。1つの好ましい態様において、タンパク質検出のためのクーマシーブルー染色を用いて、還元条件下のSDS-PAGEによって決定した際に、90%純度より高く、本発明記載の単離抗体を精製する。

10

【0022】

1つの態様において、本発明記載の抗体は、ポリクローナル抗体である。配列番号3に含まれる配列に結合するポリクローナル抗体は、例えば、免疫吸着物質としてこの配列を含有するアフィニティカラムを用いた免疫吸着によって、得ることも可能である。1つの態様において、本発明記載の抗体はモノクローナル抗体である。

20

【0023】

先行技術の方法によって、IGF-1のCドメインに対する抗体を生成することはまったく不可能であったようである。実際、天然組換えIGF-1での免疫、ならびにIGF-1由来ペプチドでの免疫（Manes S.R., J. Endocrinol. 154 (1997) 293-302）は、前記エピトープ領域に対するモノクローナル抗体を産生することができなかった。最も顕著には、インスリン様増殖因子1前駆体のアミノ酸76～84を含む直鎖ポリペプチド配列での実験動物の免疫は、天然コンホメーションIGF-1に対する、またはその直鎖ペプチドモチーフに対する結合活性を示す抗体をいずれも生成することができなかった。

30

【0024】

実験動物を免疫する目的のため、インスリン様増殖因子1前駆体のアミノ酸配列76～84を含む拘束されたIGF-1ペプチドの十分な量を合成しようとする先の試みは、成功しなかった。

【0025】

本明細書に開示する新規方法に基づいて、こうしたほとんどアクセス不能な抗体が、現在、再現可能な方式で生成可能となっている。簡潔には、本明細書に示す方法は、操作されたサーマス・サーモフィラスSlyDの使用を含む。SlyD IF（フラップ中の挿入物（Insert-In-Flap））基質結合ドメインを、インスリン様増殖因子1前駆体のアミノ酸配列76～84によって置き換え、こうして移植したペプチド免疫原を含む、熱安定性足場モジュールを構成する。

40

【0026】

アミノ酸移植片は、IGF-1挿入モチーフの天然様二次構造を保持する、サーマス・サーモフィラスSlyD FKBPドメインによって、拘束されたエンタルピー的に好ましい方式で提示される。このキメラ・ポリペプチドは、実験動物の免疫のための免疫原として用いられる。完全ポリペプチドに対する体液性免疫反応もまた、挿入モチーフに対してターゲティングされる。例えば野生型シャペロンに対する、または天然成熟IGF-1に対する、比較スクリーニングによって、IGF-1挿入モチーフを特異的に認識する抗体を選択可能である。こうしてキメラポリペプチドは、天然IGF-1の代理ポリペプチドとして働き、そして驚くべきことに、初めて、高アフィニティ抗体を生成するために、

50

あらかじめ選択されたエピトープに対する免疫反応を指向することが可能になった。

【0027】

提供する方法および該方法を用いて生成される抗体は、それぞれ、例えば療法適用および診断適用のため、研究およびルーチンにおいて重要な価値がある。

本明細書において、用語「ヒトIGF-1に対する結合」、または「抗IGF-1抗体」は、交換可能である。本発明記載のヒトIGF-1抗原に対する抗体結合は、好ましくは、 25°C で、 $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ またはそれ未満の K_D 値を有し、1つの態様において、 25°C で、 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$ またはそれ未満の K_D 値を有する。標準結合アッセイ、例えば表面プラズモン共鳴技術(BIACORE(登録商標)、GE-Healthcare、スウェーデン・ウプサラ)で結合アフィニティを測定する。結合アフィニティの K_D 値を測定するための方法を、実施例セクションに記載する。したがって、本明細書において、「ヒトIGF-1に結合する抗体」は、 25°C で、少なくとも $K_D = 1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ またはそれ未満の K_D で、好ましくは $K_D = 1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/l} \sim K_D = 1.0 \times 10^{-12} \text{ mol/l}$ で、ヒトIGF-1抗原に結合する抗体を指す。

10

【0028】

本明細書記載の抗体は、IGF-2に対して、 25°C で、いかなる測定可能な会合速度定数 k_a ($1/\text{Ms}$)も示さない。抗体は、IGF-1に対して、少なくとも $k_a = 9 \times 10^5$ ($1/\text{Ms}$)またはそれより速い、拡散限界に近い会合速度定数 k_a ($1/\text{Ms}$)を示す。したがって、1つの態様において、本発明記載の抗体は、IGF-2に対して、 25°C で測定可能な会合速度定数を示さない。

20

【0029】

1つの態様において、本発明記載の抗体は、 25°C で、少なくとも $k_d = 2 \times 10^{-3}$ ($1/\text{s}$) $\sim k_d = 3 \times 10^{-5}$ ($1/\text{s}$)またはそれより遅い抗原複合体安定性を示す。

【0030】

当業者が認識するであろうように、用語「特異的」は、試料中に存在する他の生体分子が、例えばインスリン様増殖因子1に特異的に結合する抗体に、有意に結合しないことを示すよう用いられる。好ましくは、インスリン様増殖因子1以外の生体分子への結合レベルは、無視できる結合アフィニティを生じ、すなわちELISAまたは例えばBIACORE 4000装置を用いたアフィニティ測定によって、測定可能な結合アフィニティを生じない。

30

【0031】

「インスリン様増殖因子1に特異的に結合する」抗体は、インスリン様増殖因子2に結合しないであろう。より正確には、非常に高感度のBIACORE T200装置を用いた動力学測定は、分析物が高濃度であったとしても、IGF-2に対するこうした抗体のいかなる測定可能な会合速度定数 k_a ($1/\text{Ms}$)も示さない(例えば図7を参照されたい)。さらに、「インスリン様増殖因子1に特異的に結合する」抗体は、 25°C で、IGF-1の完全に機能的な化学量論結合によって特徴付けられ、 $MR = 1.7 \sim MR = 2.0$ のモル濃度比(MR)値によって示されるように、2つのIGF-1ポリペプチドに、1つの抗体が同時に結合可能である方式で、結合する(図8を参照されたい)。

40

【0032】

結合アフィニティ K_D は、T200装置(GE Healthcare, Biacore)を用いて測定される。

BIACORE T200装置(GE Healthcare)を用いて、IGF-1ペプチドへの結合特異性に関して、ハイブリドーマ培養上清を動力的に評価する。製造者の指示にしたがって、CM5シリーズSセンサーを系内に搭載し、そしてHBSN緩衝液($10 \text{ mM HEPES pH } 7.4$ 、 150 mM NaCl)中で標準化した。系の緩衝液をHBS-ET($10 \text{ mM HEPES pH } 7.4$ 、 150 mM NaCl 、 $0.05\% \text{ TWEEN } 20$)に交換する。試料緩衝液は、 1 mg/ml CMD (

50

カルボキシメチルデキストラン、Sigma # 86524) を補った系の緩衝液である。系を 25 で操作する。

【0033】

10000 RU RAMIGFC (それぞれのマウス免疫グロブリンGサブクラスのウサギ抗マウスF(c)ガンマ断片の相対単位/Jackson Laboratories) を、フローセルFC1 (サブクラス1の抗マウスF(c)ガンマ)、FC2、FC3およびFC4上、EDC/NHS化学反応を用いて、製造者の指示にしたがって固定する。1Mエタノールアミンを用いて、センサーを脱活性化する。

【0034】

例えば配列番号3 (IGF-1 76~84) のペプチドに対する抗体の結合活性を動力学的に試験する。試料緩衝液中、1:3に希釈した未精製ハイブリドーマ上清を10μl/分で1分間注入することによって、抗体を捕捉する。

10

【0035】

流速を100μl/分に設定する。例えば配列番号 (IGF-1前駆体タンパク質76~84) のペプチドを、それぞれ0nM、1.1nM、3nM、10nM、30nMおよび90nMの異なる濃度段階で、3分間注入する。Kinjectコマンドを用いて、解離を600秒間監視する。30μl/分で30秒間、10mMグリシンpH1.5を3回連続注入して、センサー表面の酸性再生を達成する。

【0036】

1つの態様において、本発明記載の抗体は、配列番号3のアミノ酸配列内に含まれるエピトープに、すなわちインスリン様増殖因子1前駆体 (配列番号1) のアミノ酸76~84内に含まれるエピトープに、25 で、 1.0×10^{-8} mol/lまたはそれ未満の K_D 値で特異的に結合する。上述のように、本発明記載の、すなわち配列番号3に含まれるエピトープに結合するポリクローナル抗体は、例えば、免疫吸収のため、配列番号3のペプチドを用いた免疫吸着によって、免疫動物の血清から単離可能である。

20

【0037】

モノクローナル抗体は、一定の品質で、そしてほぼ無制限の量で産生可能である。好ましい態様において、配列番号3に含まれるエピトープに結合する抗体は、モノクローナル抗体である。

【0038】

1つの態様において、配列番号3に結合する抗体は、ハイブリドーマ細胞株10.07.09 (Mab <h-IGF-1>M-10.07.09を産生する) によって産生されるモノクローナル抗体である。

30

【0039】

新規に生成される2つの<IGF-1>モノクローナル抗体 (それぞれ、Mab <h-IGF-1>M-11.11.17を産生する11.11.17、およびMab <h-IGF-1>M-11.09.15を産生する11.09.15) は、配列番号3に含まれる、さらにより小さいエピトープに結合し、すなわち、これらは配列番号4によって示されるエピトープに結合する。

【0040】

1つの態様において、本発明の抗体は、インスリン様増殖因子1前駆体のアミノ酸76~84を含むエピトープに、すなわち成熟IGF-1のアミノ酸28~36 (配列番号4) に結合する。1つの態様において、本発明の抗体は、配列番号43~配列番号49の合成15量体ペプチドに、すなわちインスリン様増殖因子1前駆体のアミノ酸76~84 (配列番号3) からなるエピトープを含むペプチドに結合する。

40

【0041】

1つの態様において、本発明の抗体は、インスリン様増殖因子1前駆体のアミノ酸77~84 (配列番号4) を含むエピトープに結合する。1つの態様において、本発明の抗体は、配列番号43~配列番号50の合成15量体ペプチドに、すなわちインスリン様増殖因子1のアミノ酸77~84 (配列番号4) からなるエピトープを含むペプチドに結合す

50

る。

【0042】

抗体が配列番号3または配列番号4のそれぞれに提供するアミノ酸配列のエピトープのいずれに結合するとしても、好ましくは、実施例セクションに記載するような、PeptideScan分析によって評価する。例えば、配列番号3の配列を含む多様なPeptideScanペプチドが、こうした分析において検査中の抗体で陽性の結果を示したならば、配列番号3のエピトープへの結合が承認される。

【0043】

本発明はまた、重鎖可変ドメインCDR3領域として、配列番号15のCDR3領域を含むことで特徴付けられる、IGF-1に特異的に結合する抗体にも関する。

10

好ましくは、IGF-1に特異的に結合する抗体は、重鎖可変ドメインが、配列番号15のCDR3領域および配列番号16のCDR2領域を含むことで特徴付けられる。

【0044】

好ましくは、IGF-1に特異的に結合する抗体は、重鎖可変ドメインが、配列番号15のCDR3領域、配列番号16のCDR2領域、および配列番号17のCDR1領域を含むことで特徴付けられる。

【0045】

本発明はまた、重鎖可変ドメインが、配列番号15のCDR3H領域、配列番号16のCDR2H領域、および配列番号17のCDR1H領域を含み、そして軽鎖可変ドメインが、配列番号18のCDR3L領域、配列番号19のCDR2L領域、および配列番号20のCDR1L領域を含むことで特徴付けられる、ヒトIGF-1に結合する抗体にも関する。

20

【0046】

本発明はさらに、それぞれ、重鎖可変ドメインVHが配列番号21であり；そして軽鎖可変ドメインVLが配列番号22であることで特徴付けられる抗体、またはそのヒト化型に関する。

【0047】

本発明はまた、重鎖可変ドメインCD3領域として、配列番号23のCDR3領域を含むことで特徴付けられる、IGF-1に特異的に結合する抗体にも関する。

好ましくは、IGF-1に特異的に結合する抗体は、重鎖可変ドメインが配列番号23のCDR3領域および配列番号24のCDR2領域を含むことで特徴付けられる。

30

【0048】

好ましくは、IGF-1に特異的に結合する抗体は、重鎖可変ドメインが、配列番号23のCDR3領域、配列番号24のCDR2領域および配列番号25のCDR1領域を含むことで特徴付けられる。

【0049】

本発明はまた、重鎖可変ドメインが、配列番号23のCDR3H領域、配列番号24のCDR2H領域、および配列番号25のCDR1H領域を含み、そして軽鎖可変ドメインが、配列番号26のCDR3L領域、配列番号27のCDR2L領域、および配列番号28のCDR1L領域を含むことで特徴付けられる、ヒトIGF-1に結合する抗体にも関する。

40

【0050】

本発明はさらに、それぞれ、重鎖可変ドメインVHが配列番号29であり；そして軽鎖可変ドメインVLが配列番号30であることで特徴付けられる抗体、またはそのヒト化型に関する。

【0051】

本発明はさらに、それぞれ、重鎖可変ドメインVHが配列番号31であり；そして軽鎖可変ドメインVLが配列番号32であることで特徴付けられる抗体、またはそのヒト化型に関する。

【0052】

50

1つの態様において、本発明記載の抗体はモノクローナルである。1つの態様において、本発明記載の抗体はヒト化抗体またはヒト抗体である。1つの態様において、本発明記載の抗体はIgG1またはIgG4サブクラスである。1つの態様において、本発明記載の抗体は、IgG1サブクラスのモノクローナルヒト化抗体である。

【0053】

本発明はまた、それぞれ、配列番号15または配列番号23のHCDR3を含むキメラまたはヒト化抗体にも関する。

用語「抗体」は、限定されるわけではないが、全抗体および抗体断片を含む、多様な型の抗体構造を含む。本発明記載の抗体は、好ましくは、本発明記載の特徴的な特性が保持される限り、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはさらに遺伝子操作された抗体である。

10

【0054】

「抗体断片」は、全長抗体の一部、好ましくはその可変ドメイン、または少なくともその抗原結合部位を含む。抗体断片の例には、ディアボディ、一本鎖抗体分子、および抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。scFv抗体は、例えば、Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88に記載される。さらに、抗体断片は、V_Hドメインの特性、すなわちV_Lドメインとともに組立可能であるV_Hドメインの特性、またはIGF-1に結合するV_Lドメインの特性、すなわちV_Hドメインとともに機能的な抗原結合部位に組立可能であるV_Lドメインの特性を有し、そしてそれによって本発明記載の抗体の特性を提供する、一本鎖ポリペプチドを含む。

20

【0055】

用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、本明細書において、単一アミノ酸組成物の抗体分子の調製物を指す。

用語「キメラ抗体」は、マウス由来の可変領域、すなわち結合領域、および異なる供給源または種由来の定常領域の少なくとも一部を含み、通常、組換えDNA技術によって調製されるモノクローナル抗体を指す。マウス可変領域およびヒト定常領域を含むキメラ抗体が特に好ましい。こうしたマウス/ヒトキメラ抗体は、マウス免疫グロブリン可変領域をコードするDNAセグメントおよびヒト免疫グロブリン定常領域をコードするDNAセグメントを含む、発現された免疫グロブリン遺伝子の産物である。本発明によって含まれる「キメラ抗体」の他の型は、クラスまたはサブクラスが元来の抗体のものから修飾されているかまたは変化しているものである。こうした「キメラ」抗体はまた、「クラススイッチ抗体」と称される。キメラ抗体を産生するための方法は、現在当該技術分野において周知である慣用的な組換えDNAおよび遺伝子トランスフェクション技術を伴う。例えば、Morrisson, S.L.ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238およびUS 5,204,244を参照されたい。

30

【0056】

用語「ヒト化抗体」または「抗体のヒト化型」は、フレームワークまたは「相補性決定領域」(CDR)が、親免疫グロブリンのものと比較した際に、異なる特異性の免疫グロブリンのCDRを含むように修飾されている抗体を指す。好ましい態様において、「ヒト化抗体」を調製するため、V_HおよびV_LのCDRが、ヒト抗体のフレームワーク内に移植される。例えば、Riechmann, L.ら, *Nature* 332 (1988) 323-327; およびNeuberger, M.S.ら, *Nature* 314 (1985) 268-270を参照されたい。重鎖および軽鎖可変フレームワーク領域は、同じまたは異なるヒト抗体配列に由来してもよい。ヒト抗体配列は、天然存在ヒト抗体の配列であってもよい。ヒト重鎖および軽鎖可変フレームワーク領域は、例えば、Lefranc, M.-P., *Current Protocols in Immunology* (2000) - Appendix 1P.A.1P.1-A.1P.37に記載され、そしてIMGTを通じて、国際ImMunoGeneTics情報系(登録

40

50

商標) (<http://imgt.cines.fr>) または <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk> を通じてアクセス可能である。場合によって、さらなる突然変異によって、フレームワーク領域を修飾してもよい。特に好ましい CDR は、キメラ抗体に関して上述の抗原を認識する配列に相当するものに対応する。好ましくは、こうしたヒト化型は、ヒト定常領域とキメラ化される。用語「ヒト化抗体」は、本明細書において、また、本発明記載の特性、特に C1q 結合および/または FcR 結合に関する特性を生成するように、例えば「クラススイッチング」、すなわち Fc 部分の変化または突然変異 (例えば IgG1 から IgG4 および/または IgG1 / IgG4 突然変異) によって、定常領域において修飾されている。

【0057】

用語「ヒト抗体」は、本明細書において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来の可変領域および定常領域を有する抗体を含むと意図される。ヒト抗体は、当該技術分野に周知である (van Dijk, M.A. および van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374)。ヒト抗体はまた、内因性免疫グロブリン産生の非存在下で、免疫に際してヒト抗体の全レパートリーまたはセレクションを産生することが可能なトランスジェニック動物 (例えばマウス) においても産生可能である。こうした生殖系列突然変異体マウスにおける、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイのトランスファーは、抗原曝露に際して、ヒト抗体の産生を生じるであろう (例えば、Jakobovits, A.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A.ら, Nature 362 (1993) 255-258; Brueggemann, M.D.ら, Year Immunol. 7 (1993) 33-40 を参照されたい)。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーにおいても産生可能である (Hoogenboom, H.R. および Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D.ら, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597)。Cole, A.ら および Boerner, P.らの技術もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である (Cole, A.ら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A.R. (1985) p. 77; および Boerner, P.ら, J. Immunol. 147 (1991) 86-95)。本発明記載のヒト化抗体に関してすでに言及したように、用語「ヒト抗体」は、本明細書においてまた、本発明記載の特性、特に C1q 結合および/または FcR 結合に関する特性を生成するように、例えば「クラススイッチング」、すなわち Fc 部分の変化または突然変異 (例えば IgG1 から IgG4 および/または IgG1 / IgG4 突然変異) によって、定常領域において修飾されている抗体も含む。

【0058】

用語「組換えヒト抗体」は、本明細書において、NS0 または CHO 細胞などの宿主細胞から、あるいは宿主細胞内にトランスフェクションされた組換え発現ベクターを用いて発現されるヒト免疫グロブリン遺伝子または抗体に関してトランスジェニックである動物 (例えばマウス) から単離された抗体など、組換え手段によって調製されるか、発現されるか、生成されるかまたは単離されるすべてのヒト抗体を含むよう意図される。こうした組換えヒト抗体は、再編成された型の可変領域および定常領域を有する。本発明記載の組換えヒト抗体は、*in vivo* 体細胞高頻度変異に供されている。したがって、組換え抗体の VH 領域および VL 領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列 VH 配列および VL 配列に由来し、そしてこうした配列に関連しているが、ヒト抗体生殖系列レパートリー内に、*in vivo* で天然には存在しない可能性もある。

【0059】

本発明記載の抗体は、イムノアッセイの補助によって、液体試料からのインスリン様増殖因子 1 の検出に非常に有用であることが立証されてきている。

10

20

30

40

50

イムノアッセイは、当業者に周知である。こうしたアッセイを実施するための方法、ならびに実際上の適用および方法は、関連する教科書に要約される。関連する教科書の例は、Tijssen, P., Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays 中, pp. 221-278, Burdon, R.H. および v. Knippenberg, P.H. (監修), Elsevier, アムステルダム (1990)、ならびに Methods in Enzymology, Colowick, S.P. および Caplan, N.O. (監修), Academic Press) の、免疫学的検出法を扱う多くの巻、特に第70巻、第73巻、第74巻、第84巻、第92巻および第121巻である。

10

【0060】

本発明記載の方法における1つの態様において、IGF-1タンパク質を、イムノアッセイ法で測定する。

特定の態様において、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)において、または電気化学発光に基づくイムノアッセイ(ECLIA)において、IGF-1を検出する。

【0061】

1つの態様において、サンドイッチアッセイ(サンドイッチ型アッセイ形式)において、IGF-1を検出する。1つの態様において、サンドイッチ・イムノアッセイにおいては、少なくとも2つの非重複エピトープと反応性である少なくとも2つの抗体を使用して、IGF-1の測定を行う。

20

【0062】

1つの態様において、本発明は、サンドイッチ・イムノアッセイを通じて、体液試料においてIGF-1を検出するための方法であって、本発明記載の抗体と試料をインキュベーションし、それによって、前記試料中に含まれるインスリン様増殖因子1に対する前記抗体の結合が起こり、IGF-1のアミノ酸76~84を含まないエピトープに結合する、IGF-1に対する第二の抗体と、試料をインキュベーションし、それによって、第二の抗体の結合が起こり、そして工程(a)および(b)において形成された免疫学的サンドイッチ複合体を測定し、それによって試料中のIGF-1を検出する工程を含む、前記方法に関する。

30

【0063】

サンドイッチアッセイは、最も有用で、そして最も一般的に用いられるアッセイの1つである。サンドイッチアッセイ技術の多くのバリエーションが存在し、そしてすべて、本発明によって含まれると意図される。簡潔には、典型的な順方向アッセイにおいて、非標識抗体を固体支持体(または固相)上に固定し、そして試験しようとする試料を、結合した分子と接触させる。この捕捉抗体の固定は、固相への直接吸着によってであってもよいし、または例えば特異的結合対を通じて、例えばストレプトアビジン-ビオチン結合対を通じて、間接的であってもよい。適切なインキュベーション期間後、抗体-抗原複合体の形成を可能にするのに十分な時間の後、次いで、検出可能シグナルを産生可能なレポーター分子で標識された、抗原に結合する第二の抗体を添加し、そしてインキュベーションし、抗体-抗原標識抗体のサンドイッチ複合体の形成に十分な時間置く。いかなる非反応物質も洗浄し、そしてレポーター分子によって産生されるシグナルの観察によって、IGF-1の存在を決定する。結果は、視覚的シグナルの単純な観察によって、定性的であってもよいし、または既知の量のバイオマーカーを含有する対照試料と比較することによって、定量的であってもよい。

40

【0064】

典型的なサンドイッチアッセイにおいて、第一の抗体は、固体表面に共有的にまたは非共有的に結合している。固体表面は、典型的には、ガラスまたはポリマーであり、最も一般的に用いられるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、塩化ポリビニル、またはポリプロピレンである。固体支持体は、チューブ、ビーズ、

50

マイクロプレートのディスク、またはイムノアッセイを実行するのに適した任意の他の表面の形であってもよい。結合プロセスは当該技術分野に周知であり、そして一般的に、架橋、共有結合、または物理的吸着からなる。通常、抗体でコーティングした固体表面（「固相複合体」）を処理して、非特異的結合をブロッキングし、そして試験試料調製において洗浄する。次いで、試験しようとする試料のアリコットを固相複合体に添加し、そして十分な時間（例えば、2～40分間、またはより好適であるならば一晩）、そして適切な条件下（例えば室温から40℃、例えば両端を含めて25℃～32℃）でインキュベーションして、第一の抗体または捕捉抗体および対応する抗原の間の結合を可能にする。インキュベーション期間後、第一の抗体または捕捉抗体および該抗体に結合した抗原を含む固相を洗浄し、そして抗原上の別のエピトープに結合する第二の抗体または標識抗体とインキュベーションする。第二の抗体は、第一の抗体および関心対象の抗原の複合体への第二の抗体の結合を示すために用いるレポーター分子に連結されている。

10

【0065】

アッセイのバリエーションには、試料および標識抗体の両方を、固相に結合した抗体または結合可能な抗体に、同時に添加する、同時アッセイが含まれる。これらの技術は、容易に明らかであろうように、重要でない任意のバリエーションを含めて、当業者に周知である。

【0066】

別の競合法は、固相上にIGF-1を固定し、そして次いで、固定されたターゲットを試料とともに、IGF-1に対する特異的抗体に曝露することを含み、この抗体は、レポーター分子で標識されていてもまたはされていなくてもよい。ターゲットの量およびレポーター分子シグナルの強度に応じて、ターゲット分子による競合は、こうした標識抗体を通じて、直接検出可能でありうる。あるいは、IGF-1に特異的に結合する抗体は固定されていてもよく、そしてIGF-1は、標識IGF-1と、試料中のIGF-1の競合を通じて測定可能である。

20

【0067】

好ましい態様において、試料物質として体液を用いて、本発明記載の方法（単数または複数）を実施する。さらなる態様において、体液試料を、全血、血清または血漿から選択する。さらなる態様において、試料物質は血清または血漿である。1つの態様において、IGF-1の測定のためのイムノアッセイは、試料物質として血清を用いる。1つの態様において、IGF-1の測定のためのイムノアッセイは、試料物質として尿を用いる。

30

【0068】

IGF-1の検出において使用するため、キットまたは製品もまた、本発明によって提供される。これらのキットは、1またはそれより多い容器手段、例えばバイアル、チューブ等を緊密に封じ込めて受け入れる区画化されたキャリアー手段を含んでもよく、容器手段は各々、方法に用いようとする別個の要素の1つを含む。例えば、容器手段の1つは、本発明記載の抗体を含んでもよい。キットはまた、酵素標識、蛍光標識、または放射性同位体標識などのレポーター分子に結合した、IGF-1に結合する第二の抗体などの、レポーター手段を含む容器も有してもよい。こうしたキットは、典型的には、上述の容器、ならびに商業的観点および使用者の観点から望ましい物質を含む、1またはそれより多い他の容器を含み、こうした物質には、緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および使用説明書を含む添付文書が含まれる。組成物が特定の適用に用いられることを示すラベルが、容器上に存在してもよいし、そしてまた使用説明書も示してもよい。

40

【0069】

1つのさらなる特異的態様において、抗体に基づくキットのため、キットは例えば：（1）IGF-1に特異的に結合する第一の抗体（例えば固体支持体に付着するか、または固体支持体に結合可能である）および（2）IGF-1に結合する第二の異なる抗体を含んでもよい。好ましくは、後者の抗体をレポーター分子で標識する。もちろん、こうしたアッセイを設計する際に、第一の抗体を第二の抗体と交換し、そして逆を行うことも可能である。

50

【0070】

以下の実施例、配列表および図は、本発明の理解を補助するために提供され、本発明の真の範囲は付随する請求項に示される。本発明の精神から逸脱することなく、示す方法において、修飾を作製してもよいことが理解される。

【0071】

配列表の説明

配列番号1	ヒト・インスリン様増殖因子1前駆体の配列	
配列番号2	成熟ヒト・インスリン様増殖因子1の配列	
配列番号3	ヒト・インスリン様増殖因子1前駆体の部分配列(76~84位)	
配列番号4	ヒト・インスリン様増殖因子1前駆体の部分配列(77~84位)	10
配列番号5	ヒト・インスリン様増殖因子1前駆体の部分配列(74~90位)	
配列番号6	人工配列:(gly-gly-gly-ser)	
配列番号7	人工配列:(Hisタグ)	
配列番号8	人工配列:FkBP-IGF-1(74~90)融合タンパク質	
配列番号9	人工配列:SllyD-FkBP-IGF-1(74~90)融合タンパク質	
配列番号10	人工配列:サーマス・サーモフィラス-SllyD-IGF-1(74~90)融合タンパク質	
配列番号11	人工配列:サーマス・サーモフィラス野生型SllyDタンパク質	
配列番号12	人工配列:IFドメインを欠くサーマス・サーモフィラスSllyD	20
配列番号13	人工配列:サーモコッカス・ガンマトレランスSllyD-IGF-1(74~90)融合タンパク質	
配列番号14	人工配列:サーモコッカス・ガンマトレランスSllyD-IGF-2(53~65)融合タンパク質	
配列番号15	MAb 10.07.09の重鎖CDR3H	
配列番号16	MAb 10.07.09の重鎖CDR2H	
配列番号17	MAb 10.07.09の重鎖CDR1H	
配列番号18	MAb 10.07.09の軽鎖CDR3H	
配列番号19	MAb 10.07.09の軽鎖CDR2H	
配列番号20	MAb 10.07.09の軽鎖CDR1H	30
配列番号21	MAb 10.07.09の重鎖可変ドメインVH	
配列番号22	MAb 10.07.09の軽鎖可変ドメインVL	
配列番号23	MAb 11.11.17の重鎖CDR3H	
配列番号24	MAb 11.11.17の重鎖CDR2H	
配列番号25	MAb 11.11.17の重鎖CDR1H	
配列番号26	MAb 11.11.17の軽鎖CDR3H	
配列番号27	MAb 11.11.17の軽鎖CDR2H	
配列番号28	MAb 11.11.17の軽鎖CDR1H	
配列番号29	MAb 11.11.17の重鎖可変ドメインVH	
配列番号30	MAb 11.11.17の軽鎖可変ドメインVL	40
配列番号31	MAb 11.09.15の重鎖可変ドメインVH	
配列番号32	MAb 11.09.15の軽鎖可変ドメインVL	
配列番号33~62	エピトープ分析で用いるような、ヒト・インスリン様増殖因子1前駆体の部分配列	

【実施例】

【0072】

実施例1

モノクローナル抗体の生成のための一般的方法

あらかじめ配合した融合ポリペプチド免疫原を、実験動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、またはハムスターに、異なる投薬量で腹腔内投与する。B細胞収集前に、

ブースト免疫を行う。KoehlerおよびMilsteinの方法(Koehler, G.およびMilstein, C., Nature 256(1975) 495-497)にしたがって、B細胞ハイブリドーマを得ることも可能である。得たハイブリドーマを、マルチウェルプレートのウェル中に単一のクローンまたは細胞として入れる。分泌される抗体によって、抗体の結合に関して陽性の試験結果を生じた初代ハイブリドーマ培養を、動力学的スクリーニング法でさらにスクリーニングする。

【0073】

実施例2

SlyD/FKBP12-IGF-1(74~90)融合ポリペプチドを用いた、インスリン様増殖因子1に対する抗体の生成

10

IGF-1に対するモノクローナル抗体の生成において、アミノ酸配列NKPTGYGSSSRRAPQTG(配列番号5)を含む融合ポリペプチドを、実験動物の免疫に用いてもよい。

【0074】

免疫原性ポリペプチドの提示を改善するため、配列番号5のIGF-1ターン-ループモチーフに、アミノ酸配列のN末端およびC末端でGGGSリンカー(配列番号6)を隣接させるか、またはIGF-1アミノ酸配列のN末端でHGジペプチドを、そしてIGF-1アミノ酸配列のC末端でGAジペプチドを隣接させるか、いずれかを行ってもよい。

【0075】

NKPTGYGSSSRRAPQTG(配列番号5)からなるIGF-1アミノ酸配列に特異的に結合する抗IGF-1抗体の発生のため、SlyD/FKBP12-IGF-1(74~90)融合ポリペプチドを免疫原として、そしてまたスクリーニング試薬として、用いた。

20

【0076】

配列番号7のアミノ酸配列タグもまた含むFKBP12-IGF-1(74~90)融合ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列を有する：

【0077】

【化1】

MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTAVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLG
KQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGGGGSNKPTGYGSSSRRAPQTG
GGSTLVFDVELLKLEGGGSRKHHHHHHHH(配列番号8).

30

【0078】

配列番号7のアミノ酸配列タグを含むSlyD/FKBP12-IGF-1(74~90)融合ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列を有する：

【0079】

【化2】

MKVAKDLVVSLAYQVRTEDGVLVDESPVSAPLDYLGHGSLISGLETALEGHE
VGDKFDVAVGANDAYGQYDENLVQRVPKDVFMGVDELQVGMRFLEAETDQG
PVPVEITAVEDDHVVVDGNHMLAGQNLKFNVEVVAIREATEEELAHGHVHGA
HDHHHDHDHGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGGVQVETISPGDGRTFPKRG
QTAVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQ
RAKLTISPDYAYGGGGSNKPTGYGSSSRRAPQTGGGGSTLVFDVELLKLEGGGS
RKHHHHHHHHHH(配列番号9).

40

【0080】

SlyD/FKBP12-IGF-1(74~90)融合ポリペプチドで免疫したNMRIマウスから得た細胞を、ELISAを用いて分析した。1mlあたり0.41μgポリペプチドを含む溶液を適用することによって、Nunc Maxisorb Fマルチ

50

ウェルプレートにSlyD/FKBP12-IGF-1(74~90)またはSlyD/FKBP12-対照(配列番号5のペプチドを欠く)でコーティングした。その後、PBS中に1%RPLAを含む溶液を、室温で1時間適用することによって、未結合の結合部位をブロッキングした。0.9%(w/v)塩化ナトリウムおよび0.05%(w/v)Tweenを含む溶液でウェルを3回洗浄した。90ng/mlのビオチン化IGF-1または500ng/mlのビオチン化IGF-1-ペプチドループをそれぞれ含む溶液を適用することによって、化学的にビオチン化したIGF-1(Peprotech、ヒトIGF-1、カタログ番号100-11)および配列番号5のアミノ酸3~15を含むビオチン化IGF-1ペプチドループを、それぞれ、StreptaWell High Bind SAマルチウェルプレートのウェル中に固定した。ループペプチドは、配列番号5の2位に対応するシステインで始まり、そしてそれに加えて、配列番号5の16位に対応するシステインを含有する。これらの2つのシステインを用いて、ペプチドを環状化し、それによって、ペプチドループが形成されている。N末端システインは、さらに、ビオチン化に用いられてきている。

【0081】

試料として、PBSで1:50に希釈したマウス血清を用いた。場合によって、1:819,200の最終希釈まで、さらなる希釈を1:4段階で行った。インキュベーション時間は、室温で1時間であった。0.9%(w/v)塩化ナトリウムおよび0.05%(w/v)Tweenを含む溶液でウェルを3回洗浄した。検出抗体として、ペルオキシダーゼにコンジュゲート化した、ターゲット抗体の定常ドメインに対するポリクローナル抗体を用いた(PAK<M-Fc>S-F(ab')₂-POD)。1%(w/v)RSAを含むPBS中、80ng/mlの濃度で検出抗体を適用した。インキュベーション時間は、室温で1時間であった。0.9%(w/v)塩化ナトリウムおよび0.05%(w/v)Tweenを含む溶液でウェルを3回洗浄した。その後、ウェルをABTS溶液で、室温で15分間インキュベーションした。発色強度を測光法で測定した。例示的な結果を以下の表に提示する。

【0082】

表

【0083】

【表1】

固定 → マウス ↓	IGF-1	IGF-1 ペプチド ループ	SlyD/FKBP12- IGF-1(74-90)	SlyD/FKBP12- 対照
K1575M1	189	194	2911	8379
K1575M2	395	678	1470	2546
K1575M3	465	272	4126	10091
K1575M4	564	-	2426	6337
K1576M1	2143	2058	8302	9934
K1576M2	-	-	2960	8816
K1576M3	-	-	2978	7756
K1576M4	-	-	6957	11095
K1576M5	-	-	11221	16588

【0084】

- : ELISAにおいて結合がまったく検出不能

免疫10週後、ELISAによって抗体力価を測定した。SlyD/FKBP12-IGF-1(74~90)(配列番号9)融合ポリペプチドで免疫したマウスは、IGF-1に対して、配列番号5のペプチドに対して、SlyD/FKBP12-IGF-1(7

4～90)融合ポリペプチドに対して、そしてS l y D / F K B P 1 2 対照ポリペプチド(配列番号5の配列を含まない配列番号9)に対して、低い力価を示した。1匹のマウスのみ(上記表のK 1 5 7 6 M 1)が十分に高い抗I G F - 1力価を提供し、そしてこれをハイブリドーマの生成に用いた。これらの実験において、天然I G F - 1を特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマはまったく同定不能であった。S l y D / F K B P 1 2 - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) は、I G F - 1 特異的抗体の発生のための免疫試薬としては不適切であるようである。その後、ポリペプチドS l y D / F K B P 1 2 - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) が熱力学的に安定でないことが実験的に確認された(データ未提示)。S l y D ドメインのみが正しくフォールディングし、F K B P 1 2 - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) ドメインは正しくフォールディングしない。したがって、F K B P 1 2 足場の熱力学的安定性が境界線上であるため、融合ポリペプチドは、I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) 移植配列を効率的に提示しない。

【0085】

実施例3

サーマス・サーモフィラスS l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) 融合ポリペプチドを用いた、インスリン様増殖因子1に対する抗体の生成

キメラであるサーマス・サーモフィラス - S l y D - 抗原融合ポリペプチドを用いてマウスを免疫することによって、抗原特異的抗体を最終的に生成した。この足場表面上で、すなわちF K B P ドメインおよびI F ドメイン間の連結領域において、複数のエピトープをターゲティング可能である。陰性対照としての野生型サーマス・サーモフィラスS l y D に対する、または陽性対照としての天然組換え抗原(I G F - 1)に対する、示差スクリーニングによって、移植されたターゲット抗原に結合する抗体を同定可能である。この例は、以前記載するように、準安定性ヒトF K B P 1 2 に比較して、熱安定性S l y D 足場の好適な特性を立証する。サーマス・サーモフィラスS l y D は、エンタルピー的に強固でそして安定な構造の提示が可能であり、そしてしたがって、そうでなければ例えば実験動物の免疫系にアクセス可能でないであろう、代理天然タンパク質構造に対するモノクローナル抗体の発生のための、抗原提示足場として使用するのに適している。

【0086】

3.1 サーマス・サーモフィラスS l y D 融合ポリペプチドの産生

N I G U (ドイツ・ヴァルトクライブルク) からグアニジニウム塩酸 (G d m C l) (A 等級) を購入した。C o m p l e t e (登録商標) E D T A 不含プロテアーゼ阻害剤錠剤、イミダゾールおよびE D T A を、R o c h e D i a g n o s t i c s G m b H (ドイツ・マンハイム) より購入し、すべての他の化学薬品は、M e r c k (ドイツ・ダルムシュタット) の分析等級であった。限外ろ過膜 (Y M 1 0 、 Y M 3 0) を A m i c o n (米国マサチューセッツ州ダンバース) より購入し、微小透析膜 (V S / 0 . 0 2 5 μ m) および限外ろ過装置 (B i o m a x ウルトラフリーフィルターデバイス) を M i l l i p o r e (米国マサチューセッツ州ベッドフォード) より購入した。未精製溶解物のろ過のための硝酸セルロースおよび酢酸セルロース膜 (1 . 2 μ m 、 0 . 4 5 μ m および 0 . 2 μ m 孔サイズ) を、S a r t o r i u s (ドイツ・ゲッティンゲン) より購入した。

【0087】

発現カセットのクローニング

サーマス・サーモフィラス由来のS l y D ポリペプチドの配列をS w i s s P r o t データベース(寄託番号Q 7 2 H 5 8)より回収した。サーモコッカス・ガンマトレランス由来のS l y D ポリペプチドの配列をP r o s i t e データベース(寄託番号C 5 A 7 3 8)より回収した。サーマス・サーモフィラスS l y D をコードする合成遺伝子、サーマス・サーモフィラスS l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0)、およびサーマス・サーモフィラスS l y D - I F を、S l o n i n g B i o t e c h n o l o g y G m b H (ドイツ) より購入し、そしてp Q E 8 0 L 発現ベクター内にクローニングした。大腸菌(E . c o l i) 宿主細胞における発現のため、コドン使用を最適化した。したがって、サーモコッカス・ガンマトレランスS l y D、サーモコッカス・ガンマトレランスS l y D

- IGF - 2 (53 ~ 65)、サーマス・サーモフィラス S l y D - IGF - 1 (74 ~ 90) 抗原およびサーモコッカス・ガンマトレランス S l y - D - IGF - 1 (74 ~ 90) 抗原をコードする類似の合成遺伝子を Gene art (ドイツ) より購入し、そして p E T 2 4 発現ベクター (Novagen、米国ウイスコンシン州マディソン) 内にクローニングした。

【 0088 】

さらに、G S リンカー (G G G S、配列番号 6) を含め、そして H i s タグ (配列番号 7) をカルボキシ末端に融合させて、固定金属イオン・アフィニティークロマトグラフィ (I M A C) による融合ポリペプチドのアフィニティ精製を可能にした。

【 0089 】

IGF - 1 断片 74 ~ 90 (アミノ酸配列 N K P T G Y G S S S R R A P Q T G、配列番号 5 を参照されたい) に特異的に結合するモノクローナル抗体を生成するため、親サーマス・サーモフィラス S l y D タンパク質のアミノ酸 71 ~ 122 (すなわち I F ドメイン) の分子置換によって、このアミノ酸配列を、サーマス・サーモフィラス由来の分子シヤペロン S l y D 上に移植した。IGF - 1 挿入配列の角度を最適化するため、組換えポリペプチドの 70 位のアスパラギン酸残基および 88 位のロイシン残基を、各々、グリシンによって置換した (D 70 G および L 88 G)。したがって、生じる融合ポリペプチドは以下のアミノ酸配列を有する：

【 0090 】

【 化 3 】

MRGSKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEG
EAFQAHVPAEKAYGPHGNKPTGYGSSSRRAPQTGGAGKDLDFQVEVVKVREA
TPELLHGHAHGGGSRKHHHHHHHH (配列番号 10).

【 0091 】

このサーマス・サーモフィラス S l y D - IGF - 1 (74 ~ 90) 融合ポリペプチド (S D S Page およびウエスタンブロットに関しては、図 1 を参照されたい) を、IGF - 1 アミノ酸配列 N K P T G Y G S S S R R A P Q T G (配列番号 5) をターゲティングする抗 IGF - 1 抗体の発生のための免疫原として、そしてまたスクリーニング試薬

として用いた。

【 0092 】

1 つの陰性対照として、サーマス・サーモフィラス由来の組換え「野生型」S l y D (配列番号 11) をスクリーニング目的のために用いた。

【 0093 】

【 化 4 】

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEGEAF
QAHVPAEKAYGPHDPEGVQVVPLSAFPEDA EVVPGAQFYAQDMEGNPMPPLTV
VAVEGEEVTVDNFHPLAGKDLDFQVEVVKVREATPELLHGHAHGGGSRKHH
HHHH (配列番号 11).

【 0094 】

さらに、スクリーニングおよび特異性試験のため、サーマス・サーモフィラス S l y D - I F 融合ポリペプチド (配列番号 12) を産生した。このサーマス・サーモフィラス S l y D - I F 融合ポリペプチドは、I F ドメインを欠き、アミノ酸配列モチーフ A G S G S S で置換され、そして配列番号 7 の C 末端アミノ酸配列タグを含む。

【 0095 】

【化5】

MRGSKVGGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEG
EAFQAHVPAEKAYGPHGAGSGSSGAGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAH
GGGSRKHHHHHHHH (配列番号 12).

【0096】

さらなる対照として、配列番号7のC末端アミノ酸配列タグを含むサーモコッカス・ガンマトレランス由来の天然 S l y D を用いた：

【0097】

【化6】

MKVERGDFVLFNYVGRYENGEVFDTSYESVAREQGIFVEEREYSPIGVTVGAG
EIIPGIEEALLGMELGEKKEVVPPEKGYGMPREDLIVPVPIEQFTSAGLEPVEG
MYVMTDAGIAKILKVEEKTVRLDFNHPLAGKTAIFEIEVVEIKKAGEAGGGSRK
HHHHHH (配列番号 13).

【0098】

I G F - 2 に対する交差反応性に関して評価するため、ヒト I G F - 2 (アミノ酸 53 ~ 65) 由来の構造的に相同な配列を、サーモコッカス・ガンマトレランス S l y D 内に挿入し、これをC末端でG S スペースーおよびヘキサヒスチジンタグ(精製および再フォールディングのため)と融合させた：

【0099】

【化7】

MKVERGDFVLFNYVGRYENGEVFDTSYESVAREQGIFVEEREYSPIGVTVGAG
EIIPGIEEALLGMELGEKKEVVPPEKGYGMP-G-SRVSRRSRG-G-AGKTAIFEIE
VVEIKKAGEAGGGSRKHHHHHH (配列番号 14).

【0100】

融合ポリペプチドの発現、精製および再フォールディング

ほぼ同一のプロトコルを用いることによって、すべての S l y D ポリペプチドを精製し、そして再フォールディングさせることも可能である。特定の発現プラスミドを宿する大腸菌 B L 2 1 (D E 3) 細胞を、選択的増殖のためそれぞれの抗生物質(カナマイシン 30 μ g / m l 、またはアンピシリン(1 0 0 μ g / m l)) を含有する L B 培地中、37 ° C で、1 . 5 の O D 6 0 0 まで増殖させ、そして 1 m M イソプロピル - β - D - チオガラクトシド(I P T G) を添加することによって、細胞質ゾル過剰発現を誘導した。誘導 3 時間後、遠心分離(5 , 0 0 0 g で 2 0 分間) によって細胞を採取し、凍結し、そして - 2 0 ° C で保存した。細胞溶解のため、7 M G d m C l および 5 m M イミダゾールを補った冷却 5 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液(p H 8 . 0) 中に、凍結ペレットを再懸濁した。その後、懸濁物を氷上で 2 ~ 1 0 時間攪拌して、細胞溶解を完了させた。遠心分離(2 5 , 0 0 0 g 、 1 時間) およびろ過(硝酸セルロース膜、 8 . 0 μ m 、 1 . 2 μ m 、 0 . 2 μ m) 後、溶解物を、溶解緩衝液で平衡化した N i - N T A カラム上に適用した。続く洗浄工程において、イミダゾール濃度を 1 0 m M に上昇させ(7 M G d m C l を含む 5 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液(p H 8 . 0) 中)、そして 5 m M T C E P を添加して、チオール部分を還元型に維持し、そして未成熟なジスルフィド架橋を防止した。少なくとも 1 5 ~ 2 0 体積の還元性洗浄緩衝液を適用した。その後、G d m C l 溶液を、1 0 0 m M N a C l 、 1 0 m M イミダゾール、および 5 m M T C E P を含む 5 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液(p H 8 . 0) に置換して、マトリックス結合した S l y D 融合ポリペプチドのコンホメーション的な再フォールディングを誘導した。同時精製するプロテアーゼの再活性化を回避するため、プロテアーゼ阻害剤カクテル(C o m p l e t e (登録商標) E D T A 不含、R o c h e) を再フォールディング緩衝液に添加した。全部で 1 5 ~

10

20

30

40

50

20カラム体積の再フォールディング緩衝液を一晩処置で適用した。その後、100mM NaClおよび10mMイミダゾールを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)10カラム体積で洗浄することによって、TCEPおよびComplete(登録商標)EDTA不含阻害剤カクテルを除去した。最後の洗浄工程において、イミダゾール濃度を30mM(10カラム体積)に上昇させて、頑強な混入物質を除去した。次いで、同じ緩衝液中の250mMイミダゾールを適用することによって、再フォールディングポリペプチドを溶出させた。Tricine-SDS-PAGEによって、純度に関してタンパク質含有分画を評価し(Schaegger, H.およびvon Jagow, G., Anal. Biochem. 166(1987) 368-379)、そしてプールした。続いて、緩衝系としてリン酸カリウム(50mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)、100mM KCl、0.5mM EDTA)を用いて、タンパク質をサイズ排除クロマトグラフィ(Superdex™ HiLoad, Amersham Pharmacia)に供した。最後に、タンパク質含有分画をプールし、そしてAmiconセル(YM10)中で、~5mg/mlの濃度まで濃縮した。

【0101】

サーマス・サーモフィラスSlyD-IGF-1(74~90)融合ポリペプチド(配列番号10)を、単量体型の可溶性で、そして安定したポリペプチドとして、成功裡に精製可能であった(図2を参照されたい)。

【0102】

UV分光測定

UVIKON XL二光線分光光度計で、タンパク質濃度測定を行った。SlyD変異体に関するモル吸光係数(280)を、Pace(Pace, C.N.ら, Protein Sci. 4(1995) 2411-2423)にしたがって、計算した。

【0103】

CD分光測定

本発明記載のキメラ融合タンパク質が、フォールディングされたコンホメーションを採用するかどうかを調べるため、近UV領域におけるCDスペクトルを測定した。製造者の推奨にしたがって、JASCO J-720装置およびJASCOソフトウェアを用いて、CDスペクトルを記録し、そして評価した。0.2cm経路長を持つ水晶キュベットを用いた。装置パラメータを1解像度、1nmバンド幅および5mdegの感度に設定した。試料緩衝液は50mMリン酸カリウムpH7.5、100mM NaCl、1mM EDTAであった。各分析のためのタンパク質濃度は、36μM(サーマス・サーモフィラス野生型SlyDの場合)、23μM(サーマス・サーモフィラスSlyD-IFの場合)、16μM(サーマス・サーモフィラスSlyD抗原の場合)、19μM(サーモコッカス・ガンマデュランス野生型SlyDの場合)、および16μM(サーモコッカス・ガンマデュランスSlyD抗原の場合)であった。CDシグナルを20で250nm~330nmの間、0.5nm解像度、そして1分あたり20nmのスキャン速度で記録した。シグナル対ノイズ比を改善するため、スペクトルを集積させた(9回)。続く実験態様において、CDシグナルを固定波長で温度の関数として記録した。融解および再フォールディング曲線(20~100//100~20)をサーモコッカス・ガンマトランスSlyD誘導体に関して、ならびにサーマス・サーモフィラスSlyD誘導体に関して(20~85//85~20)、277nmで記録した。加熱および冷却速度は1分あたり1であった。

【0104】

融合ポリペプチド、サーマス・サーモフィラス野生型SlyD、サーマス・サーモフィラスSlyD-IF、および移植された抗原挿入物を含むサーマス・サーモフィラスSlyDのCDスペクトルを記録してきている。近UV CDシグネチャーは、明らかに、IFドメインが欠けているかまたは異種アミノ酸(抗原)移植体によって置換されている場合であっても、20ですべての融合ポリペプチドが、緻密な、おそらく天然様のコンホメーションにフォールディングすることを示した。

10

20

30

40

50

【0105】

加熱/冷却周期後、すなわちタンパク質試料の熱誘導されたアンフォールディングおよびそれに続く冷却後、移植された抗原を含むサーマス・サーモフィラス S l y D の近 UV C D スペクトルは本質的に回復する。すなわち、融解および再フォールディング後のサーマス・サーモフィラス S l y D の近 UV C D スペクトルは、天然分子のスペクトルと実質的に同一である。これは、抗原挿入物を含むサーマス・サーモフィラス S l y D の熱誘導されたアンフォールディングが完全に可逆性であることを強く示す。アンフォールディングの可逆性と組み合わせて、高い内因性熱力学的安定性は、免疫原の非常に望ましい特徴である。

【0106】

サーモコッカス・ガンマトレランス S l y D - 抗原ポリペプチドに関しては、熱誘導されたアンフォールディングは、100%でも不完全であった。言い換えると、本発明者らの実験セットアップにおいては、アクセス可能な温度限界を構成する水の沸点であっても、足場/移植分子のかなりの部分はその天然様フォールディングを保持する。したがって、好熱性生物由来の F K B P ドメインが非常に安定であるため、それぞれの I F ドメインの置換によってポリペプチドの移植が可能になる一方、同時に、新規に生成されたキメラ足場タンパク質の全体のフォールディングは大部分保持される。簡潔には、熱安定性 F K B P ドメインは、分子クランプとして働き、その中に免疫原ペプチドがよく定義されたコンホメーションで固定されることが可能である。

【0107】

3.2 サーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) でのマウスの免疫および I G F - 1 に対するモノクローナル抗体の発生

8 ~ 12 週齢の B a l b / c および N M R I マウスをそれぞれ、100 μ g のサーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) での反復腹腔内免疫に供した。マウスを3回免疫し、すなわち最初の免疫の6週間および10週間後の時点でもまた免疫した。完全フロイント・アジュバントを用いて第一の免疫を実行し、不完全フロイント・アジュバントを用いて第二および第三の免疫を行ってもよい。天然組換え I G F - 1 およびサーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) に対するマウス血清力価を、以下に記載するように、E L I S A 法によって12週後に試験した。F i r m w a r e : V 3 . 1 5 1 9 / 0 3 / 0 1 ; X R E A D P L U S バージョン: V 4 . 2 0 の元で実行する T e c a n S u n r i s e 上で、E L I S A を行った。1 m l あたり 0 . 5 μ g ポリペプチドを含む溶液を適用することによって、N u n c M a x i s o r b F マルチウェルプレートにサーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) でコーティングした。90 n g / m l ビオチン化 I G F - 1 を含む溶液を適用することによって、単離およびビオチン化 I G F - 1 を S t r e p t a W e l l H i g h B i n d S A マルチウェルプレートのウェル中に固定した。その後、P B S 中に 1 % R P L A を含む溶液を、室温で1時間適用することによって、未結合の結合部位をブロッキングした。0 . 9 % (w / v) 塩化ナトリウムおよび 0 . 0 5 % (w / v) T w e e n を含む溶液でウェルを3回洗浄した。マウス血清を P B S で 1 : 5 0 に希釈し、そして試料として用いた。場合によって、1 : 8 1 9 , 2 0 0 の最終希釈まで、さらなる希釈を 1 : 4 段階で行った。インキュベーション時間は、室温で1時間であった。0 . 9 % (w / v) 塩化ナトリウムおよび 0 . 0 5 % (w / v) T w e e n を含む溶液でウェルを3回洗浄した。検出抗体として、ペルオキシダーゼにコンジュゲート化した、ターゲット抗体の定常ドメインに対するポリクローナル抗体を用いた (P A K < M - F c > S - F (a b ') ₂ - P O D) 。 1 % (w / v) R S A を含む P B S 中、80 n g / m l の濃度で検出抗体を適用した。インキュベーション時間は、室温で1時間であった。0 . 9 % (w / v) 塩化ナトリウムおよび 0 . 0 5 % (w / v) T w e e n を含む溶液でウェルを3回洗浄した。その後、ウェルを A B T S 溶液と、室温で15分間インキュベーションした。発色強度を測光法で測定した。図3は、得られたマウス血清力価を示す。

【0108】

脾臓細胞調製および骨髄腫細胞株との融合の3日前、100 µgのサーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) 融合ポリペプチドの i . v . 注射によって最終ブースター免疫を行った。

【 0 1 0 9 】

E L I S A スクリーニング

免疫原、サーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0)、ビオチン化天然 I G F - 1 および野生型サーマス・サーモフィラス S l y D およびブランクプレートそれぞれに対する反応性に関する E L I S A によって、一次培養上清を試験した。T e c a n S u n r i s e、F i r m w a r e : V 3 . 1 5 1 9 / 0 3 / 0 1 ; X R E A D P L U S バージョン : V 4 . 2 0 で、E L I S A を駆動した。N u n c M a x i s o r b F マルチウェルプレートを 5 µ g / m l S l y D 融合ポリペプチドでコーティングした。1 2 5 n g / m l 組換えビオチン化 I G F - 1 抗体で S t r e p t a W e l l H i g h B i n d S A マルチウェルプレートをコーティングした。その後、P B S 中の 1 % R P L A によって、室温で 1 時間、未結合の結合部位をブロックした。0 . 9 % (w / v) 塩化ナトリウムおよび 0 . 0 5 % (w / v) T w e e n を含む溶液でウェルを 3 回洗浄した。R P M I 1 6 4 0 培地中の未希釈ハイブリドーマ上清を試料として用いた。インキュベーション時間は、室温で 1 時間であった。0 . 9 % (w / v) 塩化ナトリウムおよび 0 . 0 5 % (w / v) T w e e n を含む溶液でウェルを 3 回洗浄した。検出抗体として、ペルオキシダーゼにコンジュゲート化した、ターゲット抗体の定常ドメインに対するポリクローナル抗体を用いた (P A K < M - F c > S - F (a b ') ₂ - P O D)。1 % (w / v) R S A を含む P B S 中、8 0 n g / m l の濃度で検出抗体を適用した。インキュベーション時間は、室温で 1 時間であった。0 . 9 % (w / v) 塩化ナトリウムおよび 0 . 0 5 % (w / v) T w e e n を含む溶液でウェルを 3 回洗浄した。その後、ウェルを A B T S 溶液で、室温で 1 5 分間インキュベーションした。4 0 5 n m で、発色強度を測光法で測定した。参照波長は 4 9 2 n m であった (図 4 を参照されたい)。組換え I G F - 1、サーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) への結合に際して、E L I S A において迅速でそして強い色形成を示し、そしてサーマス・サーモフィラス S l y D に対してより少ない結合を示す、一次ハイブリドーマ上清を、以下に記載するような動力学スクリーニングプロセスに移した。

【 0 1 1 0 】

S P R に基づく動力学スクリーニング

サーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0)、天然組換え I G F - 1、天然組換え I G F - 2、野生型サーマス・サーモフィラス S l y D、およびサーマス・サーモフィラス S l y D - I G F - 1 (7 4 ~ 9 0) を、S P R に基づく動力学スクリーニング分析に用いた。S P R 分析のため、一般的に、溶液中で単量体および一価分析物を用いて、ラングミュア・モデルにしたがって抗体結合動力学を測定することが認められる。さらに、S P R 測定のため、より高い分子量を持つ分析物を用いて、測定感度を増加させることがむしろ好適であり、これは S P R が質量感受性分析であるためである。

【 0 1 1 1 】

B I A c o r e A 1 0 0 装置上、ソフトウェアバージョン V 1 . 1 の制御下で、動力学スクリーニングを行った。B I A c o r e C M 5 チップを装置内に搭載して、そして製造者の指示にしたがって、流体力学的にアドレス指定し、そしてプレコンディショニングした。泳動緩衝液として、H B S - E P 緩衝液を用いた (1 0 m M H E P E S (p H 7 . 4)、1 5 0 m M N a C l、1 m M E D T A、0 . 0 5 % (w / v) P 2 0)。ポリクローナルウサギ抗マウス I g G F c 捕捉抗体を 1 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 4 . 5) 中、3 0 µ g / m l で、1 0 , 0 0 0 R U で、フローセル 1、2、3 および 4 中、スポット 1、2、4 および 5 に固定する (図 5)。抗体を N H S / E D C 化学反応を通じて共有固定した。その後、1 M エタノールアミン溶液でセンサーを脱活性化した。スポット 1 および 5 を測定に用い、そしてスポット 2 および 4 を参照スポットとして用いた。センサーチップへの適用前に、ハイブリドーマ上清を H B S - E P 緩衝液中で 1 :

2に希釈した。希釈溶液を30 μ l/分の流速で1分間注入した。その直後に、分析物、例えばサーマス・サーモフィラスSlyD-IGF-1(74~90)融合ポリペプチドを、30 μ l/分の流速で2分間注入した。その後、シグナルを5分間の解離時間に関して記録した。10mMグリシン-HCl溶液(pH1.7)を流速30 μ l/分で2分間注入することによって、センサーを再生した。結合後期(BL)と示される、分析物注入の終了の少し前に記録されるシグナル、および安定性後期(SL)と示される、解離時間終了の少し前に記録されるシグナルの2つのレポートポイントを用いて、動力学スクリーニング性能を特徴付けた。

【0112】

さらに、ラングミュア・モデルにしたがって解離速度定数 k_d (1/s)を計算し、そして式、 $\ln(2)/(60 * k_d)$ にしたがって、抗体/抗原複合体半減期を分の単位にして計算した。

10

【0113】

理解可能であるように、抗原、サーマス・サーモフィラスSlyD-IGF-1(74~90)での免疫、ならびにサーマス・サーモフィラスSlyD-IGF-1(74~90)、サーマス・サーモフィラスSlyD「野生型」、天然IGF-1および天然IGF-2でのスクリーニングによって、モノクローナル抗体を得た。足場に基づくスクリーニング・アプローチによって、IGF-1、配列番号5に含まれるエピトープへの抗体結合を特異的に発生させることが可能になる。

【0114】

当該技術分野に知られる方法によって、クローン培養上清に限界希釈することにより、一次培養上清をさらに発生させた。アフィニティおよび特異性に関して、クローン培養上清を機能アッセイにおいて試験した。

20

【0115】

サーマス・サーモフィラスSlyD-IGF-1(74~90)およびサーマス・サーモフィラスSlyDのそれぞれへの結合に比較して、IGF-1への特異的結合に関して、ELISAによって、クローン培養を分析した。

【0116】

3.3 抗体産生クローン培養上清のBIAcore性質決定

BIAcore CM5センサーを系内にマウントしたBIAcore T200装置(GE Healthcare)を用いた。0.1%SDS、50mM NaOH、10mM HClおよび100mM H₃PO₄を100 μ l/分で1分間注入することによって、センサーをプレコンディショニングした。

30

【0117】

系の緩衝液は、PBS-DT(10mM Na₂HPO₄、0.1mM KH₂PO₄、2.7mM KCl、137mM NaCl、0.05% Tween(登録商標)20、5% DMSO)であった。試料緩衝液は系の緩衝液であった。

【0118】

BIAcore T200システムを制御ソフトウェアV1.1.1の元で駆動した。ポリクローナルウサギIgG抗体<IgGFC M>R(Jackson Immuno Research Laboratories Inc.)を、それぞれ、フローセル1、2、3および4上、6500RU、10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)中、30 μ g/mlで、EDC/NHS化学反応を通じて、製造者の指示にしたがって固定した。最後に、1Mエタノールアミン溶液を用いて、センサー表面をブロックした。全実験を25で行った。

40

【0119】

およそ40nMでそれぞれの抗体を含有するクローン培養上清を<IgGFC M>R表面上、5 μ l/分の流速で、2分間捕捉した。溶液中の分析物として、組換え天然IGF-1(Peprotech Inc. カタログ番号100-11)、組換え天然IGF-2(Peprotech Inc. カタログ番号100-12)、サーマス・サー

50

モフィラスSlyD-IGF-1(74~90)、組換え野生型サーマス・サーモフィラスSlyD、組換えサーマス・サーモフィラスSlyD-IF、組換え野生型サーモコッカス・ガンマデュランSlyD、組換えサーモコッカス・ガンマデュランSlyD-IGF-2(53~65)融合ポリペプチドを用いた。サーマス・サーモフィラスSlyD-IFは、IFドメインを欠くサーマス・サーモフィラスSlyDのFKBPドメインのみである。サーモコッカス・ガンマデュランSlyD-IGF-2(53~65)を用いて対比スクリーニングし(counter screen)、そしてIGF-2ヘアピン挿入に比較して、IGF-1ヘアピンに対する特異性を調べた。それぞれの分析物を90nMから、30nM、10nM、3.3nM、1.1nMおよび0nMの異なる濃度段階で注入した。会合期を、100 μ l/分の流速で3分間監視した。100 μ l/分の流速で10分間、解離を監視した。10mMグリシン緩衝液(pH1.7)を用いて系を再生した。BIAcore評価ソフトウェアを用いて動力学を評価した。

10

【0120】

以下の用語を本明細書に用いる：mAb：モノクローナル抗体；RU：センサー上に捕捉されたモノクローナル抗体の相対反応単位；抗原：溶液中の抗原；kDa：溶液中の分析物として注入されるキログルトンの抗原分子量；ka：会合速度定数；kd：解離速度定数；t1/2解離：式、 $t_{1/2} \text{解離} = \ln(2) / 60 * kd$ にしたがって計算される抗体-抗原複合体半減期；KD：解離定数；R_{MAX}：90nM分析物注入の会合期終了時の結合シグナル；MR：モル濃度比；カイ²；測定失敗；n.d.：検出不能。

【0121】

20

図7において、サーマス・サーモフィラスSlyD-IGF-1(74~90)融合ポリペプチド免疫キャンペーンから得た、抗IGF-1モノクローナル抗体mAb<IGF1>M-11.11.17での例示的なBIAcore測定を示す。抗体は、サーマス・サーモフィラスSlyD-IGF-1(74~90)融合ポリペプチドおよびIGF-1に特異的に結合するが、試験したすべての他のポリペプチドには結合しない。

【0122】

モノクローナル抗体mAb<IGF1>M-11.09.15を産生する別のハイブリドーマ細胞株を類似の方式で得た。

図8は、足場由来モノクローナル抗体M-11.11.17が、IGF-1に対してピコモル濃度アフィニティを有することを示す。足場由来モノクローナル抗体M-10.7.9は、IGF-1に対してナノモル濃度アフィニティを有する。IGF-2に対する交差反応性も、または野生型サーマス・サーモフィラスSlyDに対する交差反応性も、または野生型サーモコッカス・ガンマトレランスSlyDに対する交差反応性も、またはサーマス・サーモフィラスSlyD-IF融合ポリペプチドに対する交差反応性も、またはサーモコッカス・ガンマトレランスSlyD-IGF-2(53~65)融合ポリペプチドに対する交差反応性も、検出不能であった。

30

【0123】

M-2.28.44は、組換えヒトIGF-1でマウスを慣用的に免疫することによって得られるモノクローナル抗体である。抗体がIGF-1に対して30pMアフィニティを示すという事実に関わらず、IGF-2に対して500pM交差反応性が見られた(図8も参照されたい)。サーマス・サーモフィラスSlyD-IGF-1(74~90)およびサーモコッカス・ガンマトレランスSlyD-IGF-2(53~65)のどちらもこのモノクローナル抗体によって結合されないため、交差反応性IGF-2エピトープはIGFヘアピン領域ではないことが結論づけ可能である。

40

【0124】

3.3 <IGF-1>モノクローナル抗体に対するエピトープ分析

CelluspotTM合成およびエピトープマッピング

ヒトIGF1の配列に対応する重複固定ペプチド断片(長さ：15アミノ酸)のライブラリーによって、エピトープマッピングを行った。合成する各ペプチドを、1アミノ酸ずつシフトし、すなわち各ペプチドは、前のペプチドおよび後のペプチドと、それぞれ14

50

アミノ酸の重複を有する。ペプチドアレイの調製のため、Intavis CelluSpotsTM技術を使用した。このアプローチでは、修飾セルロースディスク上、自動化合成装置(Intavis MultiPep RS)でペプチドを合成し、合成後にディスクを溶解させる。次いで、巨大分子セルロースに共有結合した個々のペプチドの溶液をコーティングした顕微鏡スライド上にスポットする。384ウェル合成プレート中、アミノ修飾セルロースディスク上で、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)化学反応を利用して、CelluSpotsTM合成を段階的に行った。各カップリング周期で、対応するアミノ酸をDMF中のDIC/HOBtの溶液で活性化した。カップリング工程間で、未反応アミノ基を、無水酢酸、ジイソプロピルエチルアミンおよび1-ヒドロキシベンゾトリアゾールの混合物でキャッピングした。合成完了時、セルロースディスクを96ウェルプレートに移し、そして側鎖脱保護のため、トリフルオロ酢酸(TFA)、ジクロロメタン、トリイソプロピルシラン(TIS)および水の混合物で処理した。切断溶液を除去した後、セルロース結合ペプチドを、TFA、TFMSA、TISおよび水の混合物で溶解し、ジイソプロピルエーテルで沈殿させ、そしてDMSO中に再懸濁した。続いて、Intavisスライドスポットティングロボットを用いて、ペプチド溶液をIntavis CelluSpotsTMスライド上にスポットした。

10

【0125】

エピトープ分析のため、上述のように調製したスライドを、エタノールで洗浄し、そして次いで、Tris緩衝生理食塩水(TBS; 50mM Tris, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH8)で洗浄した後、5mLのTBS、0.1% Tween 20中の10xウェスタンブロッキング試薬(Roche Applied Science)、2.5gスクロースで、4で16時間ブロッキングした。スライドをTBSおよび0.1% Tween 20で洗浄し、そしてその後、TBSおよび0.1% Tween 20中の対応するIGF1抗体1μg/mLと、周囲温度で2時間、インキュベーションし、そして続いて、TBS+0.1% Tween 20で洗浄した。検出のため、スライドを抗ウサギ/抗マウス二次HRP抗体(TBS-T中、1:20000)とインキュベーションした後、化学発光基質ルミノールとインキュベーションし、そしてLumiImager(Roche Applied Science)で視覚化した。ELISA陽性スポットを定量化し、そして対応するペプチド配列の割り当てを通じて、抗体結合エピトープを同定した。

20

30

【0126】

エピトープマッピングに用いた配列(便宜上、最初の32のみ示すが、全IGF-1分子をスキャンしている)：

【0127】

【表 2】

配列番号	配列	
33	A-L-Q-F-V-C-G-D-R-G-F-Y-F-G-N	
34	L-Q-F-V-C-G-D-R-G-F-Y-F-G-N-K	
35	Q-F-V-C-G-D-R-G-F-Y-F-G-N-K-P	
36	F-V-C-G-D-R-G-F-Y-F-G-N-K-P-T	
37	V-C-G-D-R-G-F-Y-F-G-N-K-P-T-G	10
38	C-G-D-R-G-F-Y-F-G-N-K-P-T-G-Y	
39	G-D-R-G-F-Y-F-G-N-K-P-T-G-Y-G	
40	D-R-G-F-Y-F-G-N-K-P-T-G-Y-G-S	
41	R-G-F-Y-F-G-N-K-P-T-G-Y-G-S-S	
42	G-F-Y-F-G-N-K-P-T-G-Y-G-S-S-S	
43	F-Y-F-G-N-K-P-T-G-Y-G-S-S-S-R	
44	Y-F-G-N-K-P-T-G-Y-G-S-S-S-R-R	
45	F-G-N-K-P-T-G-Y-G-S-S-S-R-R-A	
46	G-N-K-P-T-G-Y-G-S-S-S-R-R-A-P	20
47	N-K-P-T-G-Y-G-S-S-S-R-R-A-P-Q	
48	K-P-T-G-Y-G-S-S-S-R-R-A-P-Q-T	
49	P-T-G-Y-G-S-S-S-R-R-A-P-Q-T-G	
50	T-G-Y-G-S-S-S-R-R-A-P-Q-T-G-G	
51	G-Y-G-S-S-S-R-R-A-P-Q-T-G-G-I	
52	Y-G-S-S-S-R-R-A-P-Q-T-G-G-I-V	
53	G-S-S-S-R-R-A-P-Q-T-G-G-I-V-D	
54	S-S-S-R-R-A-P-Q-T-G-G-I-V-D-E	
55	S-S-R-R-A-P-Q-T-G-G-I-V-D-E-C	30
56	S-R-R-A-P-Q-T-G-G-I-V-D-E-C-C	
57	R-R-A-P-Q-T-G-G-I-V-D-E-C-C-F	
58	R-A-P-Q-T-G-G-I-V-D-E-C-C-F-R	
59	A-P-Q-T-G-G-I-V-D-E-C-C-F-R-S	
60	P-Q-T-G-G-I-V-D-E-C-C-F-R-S-C	
61	Q-T-G-G-I-V-D-E-C-C-F-R-S-C-D	
62	T-G-G-I-V-D-E-C-C-F-R-S-C-D-L	
63	G-G-I-V-D-E-C-C-F-R-S-C-D-L-R	
64	G-I-V-D-E-C-C-F-R-S-C-D-L-R-R	40

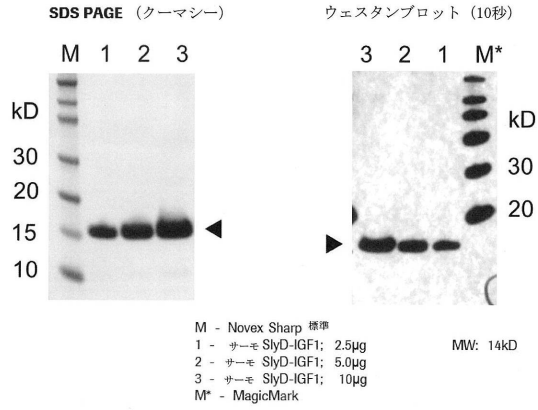
【 0 1 2 8 】

モノクローナル抗体 M A b < I G F - 1 > M - 1 0 . 7 . 9 は、配列番号 4 3 ~ 4 9 のペプチドに結合することが見出された。これは、配列番号 3 に示すエピトープに対応する。

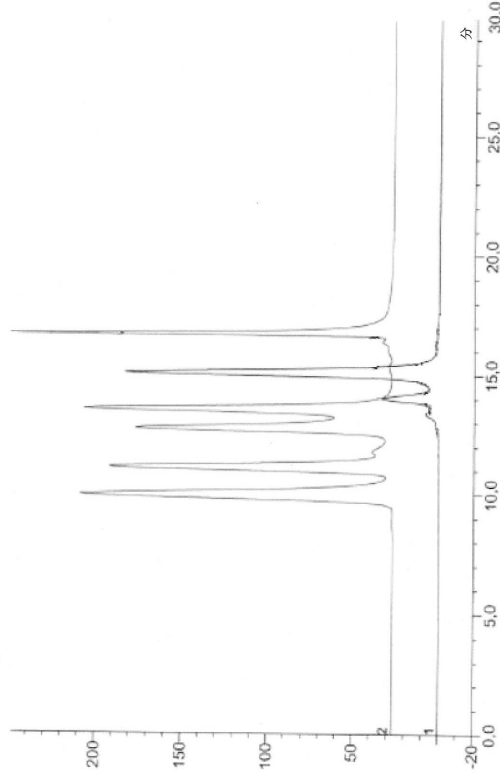
【 0 1 2 9 】

類似の方式で、M A b < I G F - 1 > 1 1 . 1 1 . 1 7 および M A b < I G F - 1 > 1 1 . 0 9 . 1 5 それぞれに対するエピトープを決定している。これらのモノクローナル抗体はどちらも、配列番号 4 3 ~ 5 0 のペプチドに結合することが見出された。これは、配列番号 4 に示すエピトープに対応する。

【 図 1 】



【 図 2 】



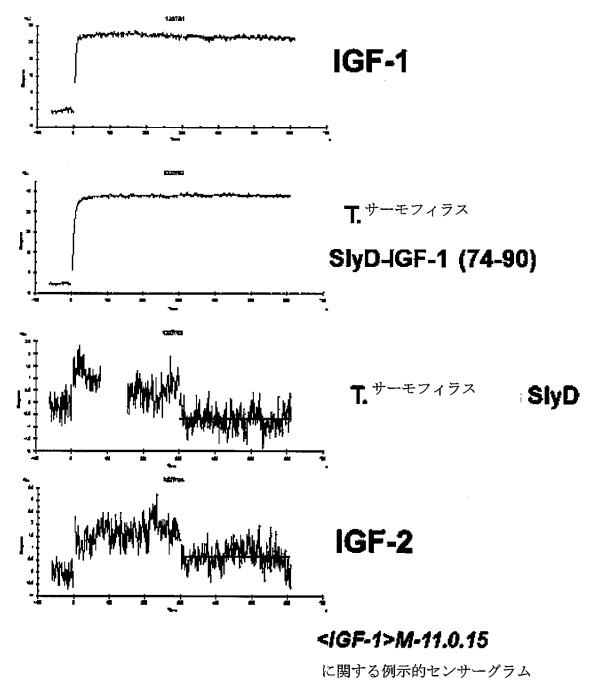
【 図 3 】

マウス番号	マウス IC50 血清力価 IC50 [mE]		
	IGF-1	T. サーマーフィラス	SlyD-IGF-1(74-90)
K1643M1	800		10000
K1643M2	1000		15000
K1643M3	4700		50000
K1643M4	500		7000
K1643M5	2500		26000
K1644M1	2800		32000
K1644M2	280		-
K1644M3	250		300
K1644M4	150		800
K1644M5	150		-

【 図 4 】

一次培養 番号	反応性 [mE]		
	IGF-1	T. サーマーフィラス SlyD-IGF-1(74-90)	T. サーマーフィラス SlyD
10.0.1	1013	957	347
10.0.2	217	127	45
10.0.3	941	1061	50
10.0.4	993	1023	900
10.0.5	998	1084	1023
10.0.6	32	56	55
10.0.7	988	1032	64
10.0.8	973	992	46
10.0.9	818	943	35
10.0.10	819	734	35
10.0.11	809	848	160
10.0.12	729	848	42
10.0.13	140	961	741
11.0.14	30	32	33
11.0.15	1087	1156	30
11.0.16	982	977	33
11.0.17	922	1021	28

【 図 5 】



【配列表】

0006165713000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 15/02 (2006.01) C 1 2 N 15/00 C
- (74)代理人 100157923
 弁理士 鶴喰 寿孝
- (72)発明者 アンドレス, ヘルベルト
 ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, カペレンヴィーゼ 3 9
- (72)発明者 デューフェル, ハルトムート
 ドイツ国 8 2 4 4 4 シュレードルフ, フュルザウムシュトラーセ 1 1 アー
- (72)発明者 ゲルク, ミヒャエル
 ドイツ国 8 1 3 7 7 ミュンヘン, フュルステンリーダー・シュトラーセ 2 7 0
- (72)発明者 コワリュースキー, フランク
 ドイツ国 8 1 4 7 9 ミュンヘン, アイデンバッハシュトラーセ 1 3 5
- (72)発明者 ショルツ, クリスティアン
 ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ジンデルスドルファー・シュトラーセ 3 5 アー
- (72)発明者 シュレムル, ミヒャエル
 ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ホーホフェルトシュトラーセ 4 6

審査官 小林 薫

- (56)参考文献 特表2009-533028(JP,A)
 特開平01-003561(JP,A)
 特表2009-521938(JP,A)
 Clin. Chem. Enzym. Comms., 1996, Vol.7, p.155-165
 J. Clin. Endocrinol. Metab., 1980, Vol.50, No.2, p.405-407
 FEBS LETTERS, 1978, Vol. 89, No. 2. p.283-286

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
 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 / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 P u b M e d
 D W P I (T h o m s o n I n n o v a t i o n)

专利名称(译)	一种特异性结合胰岛素样生长因子1的抗体		
公开(公告)号	JP6165713B2	公开(公告)日	2017-07-19
申请号	JP2014508815	申请日	2012-05-04
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	アンドレスヘルベルト デューフェルハルトムート ゲルクミヒャエル コワリユースキーフランク ショルツクリスティアン シュレムルミヒャエル		
发明人	アンドレス,ヘルベルト デューフェル,ハルトムート ゲルク,ミヒャエル コワリユースキー,フランク ショルツ,クリスティアン シュレムル,ミヒャエル		
IPC分类号	C07K16/22 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/543 C12P21/08 C12N15/02		
CPC分类号	C07K16/1203 C07K2319/00 C12N9/90 A61P37/00 A61P37/04 C07K14/475 C07K14/65 C07K16/22 C07K2317/92 C07K2319/21 C07K2319/22 C07K2319/23 C07K2319/24 C07K2319/35 C07K2319/41 C07K2319/43 C12Y502/01008 A61K39/02 C07K14/195 C07K16/12 C07K19/00 G01N33/53 C07K16/40 C07K2317/34 C07K2317/565 G01N33/573 G01N33/74 G01N2333/99		
FI分类号	C07K16/22.ZNA G01N33/53.D G01N33/577.B G01N33/543.515.A C12P21/08 C12N15/00.C		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修 鹤喰 寿孝		
审查员(译)	小林薰		
优先权	2011164957 2011-05-05 EP 2012155742 2012-02-16 EP		
其他公开文献	JP2014515761A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明中，作为已知的人胰岛素样生长因子1前体 (SEQ ID NO : 1) 涉及特异性结合包含在氨基酸拉伸中的氨基酸76至氨基酸84的表位的分离的抗体。这种新型抗体非常有用，因为它们可以灵敏，特异地检测胰岛素样生长因子1，即使密切相关的胰岛素样生长因子2存在浓度过高这很有用。胰岛素生长因子1的检测是可能的，例如在体液样品中。

(5) Int. Cl.		F I	
C O 7 K	1 6 / 2 2 (2006. 01)	C O 7 K	1 6 / 2 2 Z N A
G O 1 N	3 3 / 5 3 (2006. 01)	G O 1 N	3 3 / 5 3 D
G O 1 N	3 3 / 5 7 7 (2006. 01)	G O 1 N	3 3 / 5 7 7 B
G O 1 N	3 3 / 5 4 3 (2006. 01)	G O 1 N	3 3 / 5 4 3 5 1 5 A
C 1 2 P	2 1 / 0 8 (2006. 01)	C 1 2 P	2 1 / 0 8

請求項の数 5 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-508815 (P2014-508815)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成24年5月4日 (2012. 5. 4)		エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2014-515761 (P2014-515761A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成26年7月3日 (2014. 7. 3)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/058208		T
(87) 国際公開番号	W02012/150321		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成24年11月8日 (2012. 11. 8)		グレンツァーヘルストラッセ124
審査請求日	平成26年11月12日 (2014. 11. 12)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	11164957.0		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成23年5月5日 (2011. 5. 5)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	12155742.5	(74) 代理人	100101373
(32) 優先日	平成24年2月16日 (2012. 2. 16)		弁理士 竹内 茂雄
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン様増殖因子1に特異的に結合する抗体