

(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2010-527920
(P2010-527920A)

(43) 公表日 平成22年8月19日(2010.8.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/26 (2006.01)	C07K 16/26 ZNA	4B024
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B064
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 1O2	4B065
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4C085
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 B	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-507637 (P2010-507637)
 (86) (22) 出願日 平成20年5月8日 (2008.5.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年12月22日 (2009.12.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/062973
 (87) 国際公開番号 WO2008/141049
 (87) 国際公開日 平成20年11月20日 (2008.11.20)
 (31) 優先権主張番号 11/745,963
 (32) 優先日 平成19年5月8日 (2007.5.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

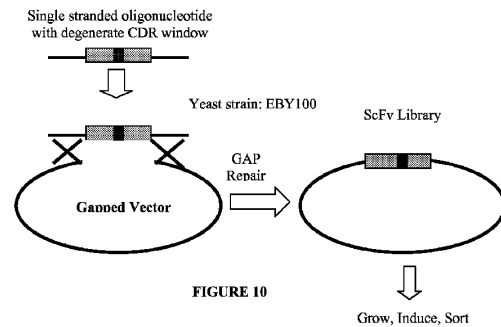
(71) 出願人 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
 パーク アボット パーク ロード 100
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100140523
 弁理士 渡邊 千尋
 (74) 代理人 100103920
 弁理士 大崎 勝真
 (74) 代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトBNP免疫特異的抗体

(57) 【要約】

本発明は、ヒト脳ナトリウム利尿ペプチド又はヒト脳ナトリウム利尿ペプチド断片に高い結合親和性で免疫特異的に結合する抗体、該抗体を産生し選択するための方法、該抗体を用いる、ヒト脳ナトリウム利尿ペプチド又はヒト脳ナトリウム利尿ペプチド断片に対する免疫アッセイ及び該抗体を含有する治療組成物に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) ハイブリドーマ細胞株 106.3 (該細胞株は A.T.C.C. 受託番号 HB-12044 を有する。) により産生される抗体及び (2) A.T.C.C. 受託番号 PTA-6476 を有するハイブリドーマ細胞株 3-631-436 によって産生される抗体の少なくとも 1 つと比較した場合、少なくとも約 2 倍改善しているその平衡解離定数 (K_D) で、ヒト脳ナトリウム利尿ペプチド (「hBNP」) のアミノ酸残基 5 から 18 の少なくとも 3 つのアミノ酸を含有するエピトープに免疫特異的に結合する単離抗体。

【請求項 2】

前記単離抗体が、ハイブリドーマ細胞株 106.3 により産生される抗体と比較した場合、その K_D において少なくとも約 2 倍の改善を示す、請求項 1 の抗体。 10

【請求項 3】

前記単離抗体が、ハイブリドーマ細胞株 3-631-436 により産生される抗体と比較した場合、その K_D において少なくとも約 2 倍の改善を示す、請求項 1 の抗体。

【請求項 4】

前記単離抗体が、ハイブリドーマ細胞株 106.3 により産生される抗体及びハイブリドーマ細胞株 3-631-436 により産生される抗体と比較した場合、その K_D において少なくとも約 2 倍の改善を示す、請求項 1 の抗体。

【請求項 5】

前記単離抗体が、ハイブリドーマ細胞株 106.3 により産生される抗体と比較した場合、その K_D において少なくとも約 5 倍の改善を示す、請求項 1 の抗体。 20

【請求項 6】

前記単離抗体が、ハイブリドーマ細胞株 3-631-436 により産生される抗体と比較した場合、その K_D において少なくとも約 5 倍の改善を示す、請求項 1 の抗体。

【請求項 7】

前記単離抗体が、ハイブリドーマ細胞株 106.3 により産生される抗体及びハイブリドーマ細胞株 3-631-436 により産生される抗体と比較した場合、その K_D において少なくとも約 5 倍の改善を示す、請求項 1 の抗体。

【請求項 8】

前記抗体が hBNP のアミノ酸残基 5 から 13 を含有するエピトープに免疫特異的に結合する、請求項 1 の抗体。 30

【請求項 9】

前記抗体が hBNP のアミノ酸残基 13 から 18 を含有するエピトープに免疫特異的に結合する、請求項 1 の抗体。

【請求項 10】

前記単離抗体がモノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖 Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab 断片、F(ab')₂ 断片、ジスルフィド結合 Fv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片である、請求項 1 から請求項 9 の何れかの抗体。 40

【請求項 11】

A.T.C.C. 受託番号 PTA-6476 を有するハイブリドーマ細胞株 3-631-436 によって産生される抗体と比較した場合、少なくとも約 2 倍改善しているその平衡解離定数 (K_D) で、ヒト脳ナトリウム利尿ペプチド (「hBNP」) のアミノ酸残基 13 から 18 の少なくとも 3 つのアミノ酸を含有するエピトープに免疫特異的に結合する単離抗体。

【請求項 12】

前記単離抗体が、ハイブリドーマ細胞株 3-631-436 により産生される抗体と比較した場合、その K_D において少なくとも約 5 倍の改善を示す、請求項 11 の抗体。

【請求項 13】

前記単離抗体が、ハイブリドーマ細胞株 3 - 6 3 1 - 4 3 6 により産生される抗体と比較した場合、その K_D において少なくとも約 10 倍の改善を示す、請求項 11 の抗体。

【請求項 14】

前記単離抗体が、ハイブリドーマ細胞株 3 - 6 3 1 - 4 3 6 により産生される抗体と比較した場合、その K_D において少なくとも約 15 倍の改善を示す、請求項 11 の抗体。

【請求項 15】

前記単離抗体が、ハイブリドーマ細胞株 3 - 6 3 1 - 4 3 6 により産生される抗体と比較した場合、その K_D において少なくとも約 20 倍の改善を示す、請求項 11 の抗体。

【請求項 16】

前記単離抗体が、ハイブリドーマ細胞株 3 - 6 3 1 - 4 3 6 により産生される抗体と比較した場合、その K_D において少なくとも約 25 倍の改善を示す、請求項 11 の抗体。

10

【請求項 17】

前記単離抗体がモノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖 Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片である、請求項 11 から請求項 16 の何れかの抗体。

【請求項 18】

約 $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間の会合速度 (k_a) を有する (但し、 k_a が $1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_d は $5.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 又は $6.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_a が $6.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_d は $2.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_a が $8.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_d は $2.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_a が $8.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_d は $2.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_a が $5.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_d は $1.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、又は k_a が $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_d は $4.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ではない。) 、hBNP に免疫特異的に結合する単離抗体。

20

【請求項 19】

前記単離抗体がモノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片である、請求項 18 の抗体。

30

【請求項 20】

前記抗体が、hBNP のアミノ酸残基 13 から 18 を含有するエピトープに免疫特異的に結合する、請求項 18 又は 19 の抗体。

【請求項 21】

hBNP に免疫特異的に結合する単離抗体であつて、約 $2.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ の間の解離速度 (k_d) を有する、前記抗体。

【請求項 22】

前記抗体がモノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片である、請求項 21 の抗体。

40

【請求項 23】

前記抗体が、hBNP のアミノ酸残基 13 から 18 を含有するエピトープに免疫特異的に結合する、請求項 21 又は請求項 22 の抗体。

【請求項 24】

hBNP に免疫特異的に結合する単離抗体であつて、約 $3.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ の間の平衡解離定数 (K_D) を有する、前記抗体。

【請求項 25】

50

前記抗体がモノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片である、請求項24の抗体。

【請求項26】

hBNPのアミノ酸残基13から18を含有するエピトープに免疫特異的に結合する、請求項24又は請求項25の抗体。

【請求項27】

A.T.C.C.受託番号PTA-8369を有する、チャイニーズハムスター卵巣(「CHO」)細胞株3-631-436AM5。

10

【請求項28】

A.T.C.C.受託番号PTA-8369を有するCHO細胞株3-631-436AM5から抽出されたDNAから作製された抗体。

【請求項29】

CHO細胞株3-631-436AM5により産生される、キメラ抗体又はそのhBNP-エピトープ結合断片(該細胞株はA.T.C.C.受託番号PTA-8369を有する。)

【請求項30】

A.T.C.C.受託番号PTA-8368を有する、チャイニーズハムスター卵巣(「CHO」)細胞株3-631-436AM8。

20

【請求項31】

A.T.C.C.受託番号PTA-8368を有するCHO細胞株3-631-436AM8から抽出されたDNAから作製された抗体。

【請求項32】

CHO細胞株3-631-436AM8により産生される、キメラ抗体又はそのhBNP-エピトープ結合断片(該細胞株はA.T.C.C.受託番号PTA-8368を有する。)

【請求項33】

hBNPに免疫特異的に結合する単離抗体であって、前記抗体は、可変重鎖ドメイン及び可変軽鎖ドメインを有し、可変重鎖ドメインは、重鎖相補性決定領域(「CDR」)1、重鎖CDR2及び重鎖CDR3を含有し、可変軽鎖ドメインは、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖CDR3を含有し、

30

(a)重鎖CDR1は、

Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Ser-Tyr-Trp-Met-Asn
(配列番号84)

のアミノ酸配列を有し；

(b)重鎖CDR2は、

Arg-Ile-Asp-Pro-Tyr-Asp-Ser-Glu-Thr-His
-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Lys(配列番号85)

のアミノ酸配列を有し、

40

(c)重鎖CDR3は、

Asp-Gly-Tyr(配列番号86)

のアミノ酸配列を有し；

(d)軽鎖CDR1は、

Lys-Ser-Ser-Gln-Ser-Leu-Leu-Asp-Ser-Asp
-Gly-Lys-Thr-Tyr-Leu-Asn(配列番号87)

のアミノ酸配列を有し、

(e)軽鎖CDR2は、

Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Leu-Glu-Ser(配列番号83)

50

の式を有するアミノ酸配列を有し、

(X a a ₉ は、バリン、グルタミン、ヒスチジン、トリプトファン及びアルギニンからなる群から選択され；

X a a ₁₀ は、バリン、アスパラギン、スレオニン及びメチオニンからなる群から選択され；

X a a ₁₁ は、セリン、スレオニン、アスパラギン及びアスパラギン酸からなる群から選択され；

X a a ₁₂ は、リジン及びイソロイシンからなる群から選択され；

但し、X a a ₁₀ がバリンであり、X a a ₁₁ がセリンであり、及びX a a ₁₂ がリジンである場合には、X a a ₉ はバリン以外である。)、並びに

(f) 軽鎖 C D R 3 は、

L e u - G l n - A l a - T h r - H i s - P h e - P r o (配列番号 8 9) のアミノ酸配列を有する、抗体。

【請求項 3 4】

X a a ₉ が、グルタミンであり、

X a a ₁₀ が、アスパラギンであり、

X a a ₁₁ が、スレオニンであり、及び

X a a ₁₂ が、リジンである、請求項 3 3 の抗体。

【請求項 3 5】

X a a ₉ が、ヒスチジンであり、

X a a ₁₀ が、スレオニンであり、

X a a ₁₁ が、スレオニンであり、及び

X a a ₁₂ が、リジンである、請求項 3 3 の抗体。

【請求項 3 6】

X a a ₉ が、トリプトファンであり、

X a a ₁₀ が、メチオニンであり、

X a a ₁₁ が、スレオニンであり、及び

X a a ₁₂ が、リジンである、請求項 3 3 の抗体。

【請求項 3 7】

X a a ₉ が、トリプトファンであり、

X a a ₁₀ が、メチオニンであり、

X a a ₁₁ が、アスパラギンであり、及び

X a a ₁₂ が、リジンである、請求項 3 3 の抗体。

【請求項 3 8】

X a a ₉ が、バリンであり、

X a a ₁₀ が、スレオニンであり、

X a a ₁₁ が、アスパラギン酸であり、及び

X a a ₁₂ が、リジンである、請求項 3 3 の抗体。

【請求項 3 9】

X a a ₉ が、アルギニンであり、

X a a ₁₀ が、スレオニンであり、

X a a ₁₁ が、アスパラギンであり、及び

X a a ₁₂ が、リジンである、請求項 3 3 の抗体。

【請求項 4 0】

X a a ₉ が、トリプトファンであり、

X a a ₁₀ が、メチオニンであり、

X a a ₁₁ が、アスパラギン酸であり、及び

X a a ₁₂ が、リジンである、請求項 3 3 の抗体。

【請求項 4 1】

X a a ₉ が、トリプトファンであり、

10

20

30

40

50

X a a₁₀ が、スレオニンであり、
 X a a₁₁ が、スレオニンであり、及び
 X a a₁₂ が、リジンである、請求項 33 の抗体。

【請求項 42】

X a a₉ が、トリプトファンであり、
 X a a₁₀ が、メチオニンであり、
 X a a₁₁ が、アスパラギンであり、及び
 X a a₁₂ が、リジンである、請求項 33 の抗体。

【請求項 43】

X a a₉ が、バリンであり、
 X a a₁₀ が、スレオニンであり、
 X a a₁₁ が、アスパラギン酸であり、及び
 X a a₁₂ が、イソロイシンである、請求項 33 の抗体。

10

【請求項 44】

前期抗体がモノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片である、請求項 33 から請求項 43 の何れかの抗体。

【請求項 45】

hBNPのアミノ酸残基13から18を含有するエピトープに免疫特異的に結合する、請求項 44 の抗体。

20

【請求項 46】

請求項 1、11、18、21、24、28、29及び31から43の何れかの抗体を含む、hBNP又はhBNP断片に対する免疫アッセイ。

【請求項 47】

hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する単一の抗体を含む、請求項 46 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 48】

hBNP又はhBNP断片に対するさらなる特異的結合パートナーをさらに含む、請求項 46 に記載の免疫アッセイ。

30

【請求項 49】

請求項 1、11、18、21、24、28、29及び請求項 31 から請求項 43 の何れかの抗体の治療的有効量を含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト脳ナトリウム利尿ペプチド又はヒト脳ナトリウム利尿ペプチド断片に高い結合親和性で免疫特異的に結合する抗体、該抗体を産生し選択するための方法、該抗体を用いる、ヒト脳ナトリウム利尿ペプチド又はヒト脳ナトリウム利尿ペプチド断片に対する免疫アッセイ及び該抗体を含有する治療組成物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

心房性ナトリウム利尿ペプチド(本明細書中で以後、「ANP」と呼ぶ。)、脳ナトリウム利尿ペプチド(本明細書中で以後、「BNP」と呼ぶ。)、C型ナトリウム利尿ペプチド(本明細書中で以後、「CNP」と呼ぶ。)及びデンドロアスピス(Dendroaspis、マンバヘビ)ナトリウム利尿ペプチド(本明細書中で以後、「DNP」と呼ぶ。)は、それぞれ、「ナトリウム利尿ペプチド」として知られているホルモンのファミリーのメンバーである。ANP及びBNPは、幅広い生物学的特性が共通しており、心臓ナトリウム利尿系に属する。ANP及びBNPの両者は心筋細胞由来であるが、一方、CN

50

Pは内皮細胞由来である。DNPは、ミドリマンバヘビの毒液から単離されたもので、ANP、BNP及びCNPと構造的に類似性がある。

【0003】

BNPの名称の由来は、それが最初にブタ脳から単離されたからであり、したがって「BNP」は「脳ナトリウム利尿ペプチド」を表した。しかし、BNPは心臓ナトリウム利尿系に属するので、「脳」は、「B型」に変更された。したがって、「BNP」は現在、「B型ナトリウム利尿ペプチド」と呼ばれる。

【0004】

ANPは、心房において心臓により分泌される。BNPは、冠状静脈洞を通じて心臓により、主に心室から分泌される。BNPは、108アミノ酸ポリペプチド前駆体として分泌される(Vallinら、J. Lab. Clin. Med., 134(5): 437-444(1999年11月)を参照)。BNPの成熟型は、2個のシステイン残基間のジスルフィド結合により閉じられた17アミノ酸環、9アミノ酸のアミノ末端テール及び6アミノ酸のカルボキシ末端テールを有する32アミノ酸(108アミノ酸ポリペプチド前駆体のアミノ酸77-108に相当する。)からなる。ANP及びCNPもまた、2個のシステイン残基間のジスルフィド結合により閉じられた17アミノ酸の環を有する。この環の17個のアミノ酸のうち11個は、この3種類の分子間で保存されている。7アミノ酸環構造に加えて、ANPは、6アミノ酸のアミノ末端テール及び5アミノ酸のカルボキシ末端テールを有する。ANPは、ANPの主要な貯蔵型である126アミノ酸Pro-ANP型として産生される。アミノ酸98と99との間のタンパク質分解性の切断後、成熟28アミノ酸ペプチドANPが冠状静脈洞血漿において見られる(Yandel、J. Internal Med., 235: 561-576(1994)参照)。

10

20

【0005】

CNPは、脳及び脳脊髄液において見られ、中枢神経系において3種類のペプチドの中で最も主要なものである。CNPが心臓に存在するとしてもわずかである。Pro-CNPは、活性ペプチドである、CNP-53(アミノ酸51から103)又はCNP-22(アミノ酸82から103)の何れかにプロセッシングされる103アミノ酸ペプチドである。さらに、17アミノ酸環構造、CNP-22は、5アミノ酸のアミノ末端テールを有し、カルボキシ末端テールがない。CNP-53は、アミノ末端部の31アミノ酸の延長部分を除き、CNP-22と同一である。

30

【0006】

既に述べたように、DNPはミドリマンバヘビの毒液から単離された。DNPの成熟型は38アミノ酸からなる。DNP様免疫反応性(DNP-LI)がヒト血漿において報告されており、DNP-LIの血漿濃度は、うっ血性心不全の患者において上昇していることが分かっている(Cataliottiら、Mayo Clin. Proc., 76: 111-1119(2001)参照)。さらに、合成DNPの点滴により、血漿及び尿の環状グアノシンーリン酸の上昇に付随して、顕著なナトリウム利尿及び利尿が起こることも知られている(同上)。

【0007】

天然ヒトナトリウム利尿ペプチドに伴う問題の1つは、これらが血漿及び血清中で不安定なことである。具体的に、プロテアーゼなどの酵素はこれらのペプチドを切断する。例えば、プロテアーゼはアミノ酸鎖の様々な場所でBNP(天然及び合成)を切断する。例えば、プロテアーゼ切断は、アミノ酸2から3の間のBNPのアミノ末端(Shimizuら、Clinica Chimica Acta, 316: 129-135(2002))及びアミノ酸30から32の間のそのカルボキシ末端で起こることが知られている。さらに、BNPのエンドペプチダーゼ切断も本分野で知られている(Davidson及びStruthers、J. Hypertension, 12: 329-336(1994))。

40

【0008】

一般集団において、ヒトでの成熟型BNP(即ち、32アミノ酸分子(BNPの前駆体

50

ポリペプチドのアミノ酸77-108)) (本明細書中で以後、「hBNP」と呼ぶ。)の測定は、うっ血性心不全、虚血性心疾患、心房細動及び腎機能障害などの心臓疾患を反映することが分かっている。実際に、心疾患において、急性心筋梗塞後及び無症候性又亜臨床心室機能障害の間、ヒト血漿中のBNPレベルが上昇することが報告されている(Mukoyamaら、J. Clin. Invest.、87:11402-11412(1991)、Motwaniら、Lancet、341:1109-1113(1993)、Yoshibayashiら、New Eng. J. Med.、327:434(1992)参照)。うっ血性心不全、慢性腎機能不全及び重度の高血圧においてANPの循環レベルの上昇が見られる。ヒト血漿中でのCNPの存在は、CNP-22としてのその有無の報告と未だ意見の分かれるところである。(Yandel、J. Internal Med.、235:561-576(1994)参照)。

10

【0009】

リガンド結合アッセイは、特異的結合タンパク質と選択的に反応する、一般にリガンドと呼ばれる物質の濃度を測定するための分析技術である。特異的抗体と選択的に反応する抗原濃度を測定する免疫アッセイは、リガンド結合アッセイの類の例である。

【0010】

血漿中のヒトナトリウム利尿ペプチド、特にhBNP、を測定するための、免疫アッセイなどのリガンド結合アッセイは、当技術分野で周知であり、市販されている。これらの免疫アッセイでは、少なくとも1又は2種類の特異的抗体ならびに少なくとも1つのキャリアプレート及び、理想的には、少なくとも1つの対照を使用する必要がある。キャリアプレート及び対照に加えて、免疫アッセイの場合、少なくとも1つの試験試料を使用する必要がある。試験試料は、通常、血清、血漿、全血又はその他の体液由来の生物試料である(普通は、ヒト患者から)。試験試料中の少なくとも1種類のヒトナトリウム利尿ペプチドのレベルを免疫アッセイにおいて定量する。

20

【0011】

例えば、米国特許第6,162,902号(本明細書中で以後、「902特許」と呼ぶ。)は、hBNPのエピトープ1-10、5-13及び15-25に対して単一特異的に反応性がある単離抗体を開示する。より具体的には、この「902特許」は、2種類の単離モノクローナル抗体を記載している。第一のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株106.3(ATCC受託番号HB-12044)により産生され、hBNPのエピトープ5-13と単一特異的に反応性がある。第二のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株201.3(ATCC受託番号HB12045)により産生され、hBNPのエピトープ1-10と単一特異的に反応性がある。この「902特許」はまた、生物試料中のhBNPの量を定量することを目的とする免疫アッセイにおける上記の抗体の使用も記載している。米国特許第6,677,124号(本明細書中で以後、「124特許」と呼ぶ。)は、hBNPのC末端領域で見られるLYS-VAL-LEU-ARG-ARG-HISのアミノ酸配列を有するエピトープ(すなわちエピトープ27-32)に結合するモノクローナル抗体を開示する。より具体的には、この「124特許」は、ハイブリドーマ細胞株BC203(FERM BP-3515)により産生されるモノクローナル抗体を記載している。この「124特許」はまた、このモノクローナル抗体を用いたhBNPに対する免疫アッセイも記載している。

30

40

【0012】

hBNP免疫アッセイなどの免疫アッセイで使用される抗体の特異性及び感度が非常に重要であることが当技術分野で一般に知られている。1以上の抗体の特異性及び感度の両方を向上させる一つの方法は、抗体の、その目的とする標的(すなわち抗原)に対する結合親和性を向上させることである。目的とする標的に対する結合親和性が向上している抗体は、特異性及び感度が高くなっているはずである。それゆえ、高い結合親和性でヒトBNPと特異的に結合し、したがってhBNP免疫アッセイで使用される場合に高い特異性及び感度を示す新しい抗体が当技術分野で必要とされている。

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】米国特許第6,162,902号明細書

【特許文献2】米国特許第6,677,124号明細書

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】Vallières, J. Lab. Clin. Med., 134(5), 1999年11月, pp. 437-444

【非特許文献2】Yandel, J. Internal Med., 235, 1994年, pp. 561-576

【非特許文献3】Cataliotti, Mayo Clin. Proc., 76, 2001年, pp. 111-119

【非特許文献4】Shimizu, Clinica Chimica Acta, 316, 2002年, pp. 129-135

【非特許文献5】Davidson及びStruthers, J. Hypertension, 12, 1994年, pp. 329-336

【非特許文献6】Mukoyama, J. Clin. Invest., 87, 1991年, pp. 11402-11412

【非特許文献7】Motwani, Lancet, 341, 1993年, pp. 1109-1113

【非特許文献8】Yoshibayashi, New Eng. J. Med., 327, 1992年, pp. 434

【発明の概要】

【0015】

ある態様において、本発明は、ハイブリドーマ細胞株106.3(この細胞株はA.T.C.C.受託番号HB-12044を有する。)により産生される抗体と比較した場合、少なくとも約2倍高い平衡解離定数(K_D)で、ヒト脳ナトリウム利尿ペプチド(「hBNP」)のアミノ酸残基5から13を含有するエピトープに免疫特異的に結合する単離抗体に関する。より具体的には、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞株106.3により産生される抗体と比較した場合、その K_D が、少なくとも約3倍改善、少なくとも約5倍改善、少なくとも約10倍改善、少なくとも約15倍改善、少なくとも約20倍改善又は少なくとも約25倍改善している。本発明の単離抗体は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、 $F(ab')_2$ 断片、ジスルフィド結合Fv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片であり得る。

【0016】

別の態様において、本発明は、約 5.0×10^4 から約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ の間の会合速度(k_a)を有する、hBNPに免疫特異的に結合する単離抗体に関する。より具体的には、本発明の抗体は、約 3.3×10^4 から約 $1.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ の間、約 2.5×10^4 から約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ の間又は約 2.4×10^4 から約 $1.35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の間の会合速度を有する。本発明の単離抗体は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、 $F(ab')_2$ 断片、ジスルフィド結合Fv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片であり得る。さらに、この単離抗体は、hBNPのアミノ酸残基5から13を含有するエピトープに免疫特異的に結合する。

【0017】

別の態様において、本発明は、約 1.0×10^{-3} から約 $1.0 \times 10^{-6} \cdot s^{-1}$ の間の解離速度(k_d)を有する、hBNPに免疫特異的に結合する単離抗体に関する。よ

10

20

30

40

50

り具体的には、本発明の抗体は、約 1.0×10^{-3} から約 $1.0 \times 10^{-5} \cdot s^{-1}$ の間又は約 1.0×10^{-3} から約 $1.0 \times 10^{-4} \cdot s^{-1}$ の間の解離速度を有する。本発明の単離抗体は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv、抗イデオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片であり得る。さらに、この単離抗体は、hBNPのアミノ酸残基5から13を含有するエピトープに免疫特異的に結合する。

【0018】

別の態様において、本発明は、約 4.2×10^{-11} M から約 1×10^{-15} M の間の平衡解離定数 (K_D) を有する、hBNPに免疫特異的に結合する単離抗体に関する。より具体的には、本発明の抗体は、約 4.0×10^{-11} M から約 1.0×10^{-14} M の間、約 3.0×10^{-11} M から約 1.0×10^{-13} M の間、約 2.0×10^{-11} M から約 8.0×10^{-13} M の間又は約 1.0×10^{-12} M から約 7.4×10^{-13} M の間の平衡解離定数を有する。本発明の単離抗体は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv、抗イデオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片であり得る。さらに、この単離抗体は、hBNPのアミノ酸残基5から13を含有するエピトープに免疫特異的に結合する。

10

20

【0019】

さらに別の態様において、本発明は、A.T.C.C. 受託番号PTA-6987を有するチャニーズハムスター卵巣(「CHO」)細胞株106.3AM1に関する。

【0020】

またさらに別の態様において、本発明は、A.T.C.C. 受託番号PTA-6987を有するCHO細胞株106.3AM1から抽出されたDNAから作製された抗体に関する。

【0021】

さらに別の態様において、本発明は、CHO細胞株106.3AM1により産生される、キメラ抗体又はそのhBNP-エピトープ結合断片に関する(この細胞株はA.T.C.C. 受託番号PTA-6987を有する)。

30

【0022】

またさらなる態様において、本発明は、hBNPに免疫特異的に結合する単離抗体に関するが、この抗体は可変重鎖ドメイン及び可変軽鎖ドメインを有し、この可変重鎖ドメインは、重鎖相補性決定領域(「CDR」)1、重鎖CDR2及び重鎖CDR3を含有し、この可変軽鎖ドメインは、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖CDR3を含有し、

(a) 重鎖CDR1は、Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-His-Tyr-Gly-Ile-Asn(配列番号6)のアミノ酸配列を有し;

(b) 重鎖CDR2は、Trp-Ile-Asn-Thr-His-Thr-Gly-Glu-Xaa₁-Xaa₂-Tyr-Ala-Asp-Asp-Phe-Lys-Gly(配列番号12)の式を有するアミノ酸配列を有し、

40

式中、Xaa₁は、プロリン及びアラニンからなる群から選択され;

式中、Xaa₂は、イソロイシン及びチロシンからなる群から選択され;

(c) 重鎖CDR3は、Ser-His-Arg-Phe-Gly-Leu-Asp-Tyr(配列番号8)のアミノ酸配列を有し;

(d) 軽鎖CDR1は、Lys-Ala-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Val-Asp-Tyr-Asn-Gly-Asp-Ser-Tyr-Leu-Asn(配列番号13)の式を有するアミノ酸配列を有し、

式中、Xaa₃は、セリン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、チロシン、スレオニン及びアルギニンからなる群から選択され;

50

式中、Xaa₄は、グルタミン、チロシン、トリプトファン、アラニン及びフェニルアラニンからなる群から選択され；

式中、Xaa₅は、セリン、グリシン、プロリン、アラニン及びアスパラギン酸からなる群から選択され；

(e)軽鎖CDR2は、Ala-Ala-Ser-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Ser(配列番号14)の式を有するアミノ酸配列を有し、

式中、Xaa₆は、アスパラギン及びシステインからなる群から選択され；

式中、Xaa₇は、ロイシン、グリシン及びアラニンからなる群から選択され；

式中、Xaa₈は、グルタミン酸、トリプトファン及びプロリンからなる群から選択され；

10

(f)軽鎖CDR3は、Gln-Gln-Ser-Asn-Glu-Asp-Pro-Phe-Thr(配列番号11)のアミノ酸配列を有し、

軽鎖CDR1がLys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Asp-Tyr-Asn-Gly-Asp-Ser-Tyr-Leu-Asn(配列番号9)のアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR2がAla-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser(配列番号10)のアミノ酸配列を有する場合、重鎖CDR2は、Trp-Ile-Asn-Thr-His-Thr-Gly-Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala-Asp-Asp-Phe-Lys-Gly(配列番号7)以外のアミノ酸配列を有し、重鎖CDR2がアミノ酸配列Trp-Ile-Asn-Thr-His-Thr-Gly-Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala-Asp-Asp-Phe-Lys-Gly(配列番号7)を有し、軽鎖CDR2がアミノ酸配列Ala-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser(配列番号19)を有する場合、軽鎖CDR1は、Lys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Asp-Tyr-Asn-Gly-Asp-Ser-Tyr-Leu-Asn(配列番号9)以外のアミノ酸配列を有し、又は、重鎖CDR2がTrp-Ile-Asn-Thr-His-Thr-Gly-Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala-Asp-Asp-Phe-Lys-Gly(配列番号7)のアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR1が、Lys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Asp-Tyr-Asn-Gly-Asp-Ser-Tyr-Leu-Asn(配列番号9)のアミノ酸配列を有する場合、軽鎖CDR2は、Ala-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser(配列番号10)以外のアミノ酸配列を有する。

20

30

【0023】

より具体的には、上述の単離抗体において：

Xaa₁はアラニンであり得；

Xaa₂はチロシンであり得；

Xaa₃はセリンであり得；

Xaa₄はグルタミンであり得；

Xaa₅はセリンであり得；

Xaa₆はアスパラギンであり得；

Xaa₇はロイシンであり得；

Xaa₈はグルタミン酸であり得るか；又は

40

上述の単離抗体において：

Xaa₁はプロリンであり得；

Xaa₂はイソロイシンであり得；

Xaa₃はグルタミンであり得；

Xaa₄はフェニルアラニンであり得；

Xaa₅はアラニンであり得；

Xaa₆はアスパラギンであり得；

Xaa₇はロイシンであり得；

Xaa₈はグルタミン酸であり得るか；又は

上述の単離抗体において：

50

- X a a₁ はプロリンであり得 ;
- X a a₂ はイソロイシンであり得 ;
- X a a₃ はチロシンであり得 ;
- X a a₄ はアラニンであり得 ;
- X a a₅ はセリンであり得 ;
- X a a₆ はアスパラギンであり得 ;
- X a a₇ はロイシンであり得 ;
- X a a₈ はグルタミン酸であり得るか ; 又は
 上述の単離抗体において :
- X a a₁ はプロリンであり得 ; 10
- X a a₂ はイソロイシンであり得 ;
- X a a₃ はグルタミンであり得 ;
- X a a₄ はトリプトファンであり得 ;
- X a a₅ はグリシンであり得 ;
- X a a₆ はアスパラギンであり得 ;
- X a a₇ はロイシンであり得 ;
- X a a₈ はグルタミン酸であり得るか ; 又は
 上述の単離抗体において :
- X a a₁ はプロリンであり得 ; 20
- X a a₂ はイソロイシンであり得 ;
- X a a₃ はスレオニンであり得 ;
- X a a₄ はトリプトファンであり得 ;
- X a a₅ はアスパラギン酸であり得 ;
- X a a₆ はアスパラギンであり得 ;
- X a a₇ はロイシンであり得 ;
- X a a₈ はグルタミン酸であり得るか ; 又は
 上述の単離抗体において :
- X a a₁ はプロリンであり得 ;
- X a a₂ はイソロイシンであり得 ;
- X a a₃ はアルギニンであり得 ; 30
- X a a₄ はトリプトファンであり得 ;
- X a a₅ はプロリンであり得 ;
- X a a₆ はアスパラギンであり得 ;
- X a a₇ はロイシンであり得 ;
- X a a₈ はグルタミン酸であり得るか ; 又は
 上述の単離抗体において :
- X a a₁ はプロリンであり得 ;
- X a a₂ はイソロイシンであり得 ;
- X a a₃ はアラニンであり得 ;
- X a a₄ はチロシンであり得 ; 40
- X a a₅ はグリシンであり得 ;
- X a a₆ はアスパラギンであり得 ;
- X a a₇ はロイシンであり得 ;
- X a a₈ はグルタミン酸であり得るか ; 又は
 上述の単離抗体において :
- X a a₁ はプロリンであり得 ;
- X a a₂ はイソロイシンであり得 ;
- X a a₃ はアスパラギンであり得 ;
- X a a₄ はトリプトファンであり得 ;
- X a a₅ はプロリンであり得 ; 50

X a a₆ はアスパラギンであり得；
 X a a₇ はロイシンであり得；
 X a a₈ はグルタミン酸であり得るか；又は
 上述の単離抗体において：
 X a a₁ はプロリンであり得；
 X a a₂ はイソロイシンであり得；
 X a a₃ はセリンであり得；
 X a a₄ はグルタミンであり得；
 X a a₅ はセリンであり得；
 X a a₆ はシステインであり得；
 X a a₇ はグリシンであり得；
 X a a₈ はトリプトファンであり得るか；又は
 上述の単離抗体において：
 X a a₁ はプロリンであり得；
 X a a₂ はイソロイシンであり得；
 X a a₃ はセリンであり得；
 X a a₄ はグルタミンであり得；
 X a a₅ はセリンであり得；
 X a a₆ はシステインであり得；
 X a a₇ はアラニンであり得；
 X a a₈ はプロリンであり得る。

10

20

【0024】

上述の抗体は、約 4.2×10^{-11} M から約 1.0×10^{-15} M の間、約 4.0×10^{-11} M から約 1.0×10^{-14} M の間、約 3.0×10^{-11} M から約 1.0×10^{-13} M の間、約 2.0×10^{-11} M から約 8.0×10^{-13} M の間又は約 1.0×10^{-12} M から約 7.4×10^{-13} M の間の平衡解離定数 (K_D) を有し得る。さらに、上述の抗体は、約 5.0×10^4 から約 1.0×10^8 $M^{-1} s^{-1}$ M の間の会合速度 (k_a) を有し得る。さらに、上述の抗体は、約 1.0×10^{-3} から 1.0×10^{-6} s^{-1} の間の解離速度 (k_d) を有し得る。さらに、本発明の上述の抗体は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv、抗イデオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片であり得る。最後に、上述の抗体は、hBNPのアミノ酸残基5から13を含有するエピトープに免疫特異的に結合し得る。

30

【0025】

別の態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片のための免疫アッセイに関し、この免疫アッセイは、本明細書で前に述べた本発明の抗体の何れか1種類を含む。より具体的には、この免疫アッセイは、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体を1種類のみ含み得る。さらに、この免疫アッセイは、hBNP又はhBNP断片に対するさらなる特異的結合パートナーをさらに含み得る。

40

【0026】

別の態様において、本発明は、本明細書中で前に述べた本発明の抗体の何れかの治療的有効量と、医薬的に許容可能な担体又は賦形剤と、を含有する医薬組成物に関する。

【0027】

さらに別の態様において、本発明は、(1)ハイブリドーマ細胞株106.3(この細胞株はA.T.C.C.受託番号HB-12044を有する。)により産生される抗体及び(2)A.T.C.C.受託番号PTA-6476を有するハイブリドーマ細胞株3-631-436により産生される抗体の少なくとも1つと比較した場合、少なくとも約2倍改善した平衡解離定数 (K_D) で、ヒト脳ナトリウム利尿ペプチド(「hBNP」)のアミノ酸残基5から18の少なくとも3つのアミノ酸を含有するエピトープに免疫特異的

50

に結合する単離抗体に関する。より具体的には、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞株 106.3 により産生される抗体と比較した場合、その K_D が少なくとも約 2 倍の改善を示し、ハイブリドーマ細胞株 3-631-436 によって産生される抗体と比較した場合、その K_D が少なくとも約 2 倍の改善を示し、ハイブリドーマ細胞株 106.3 により産生される抗体及びハイブリドーマ細胞株 3-631-436 により産生される抗体と比較した場合、その K_D が少なくとも約 2 倍の改善を示し、ハイブリドーマ細胞株 106.3 により産生される抗体と比較した場合、その K_D が少なくとも約 5 倍の改善を示し、ハイブリドーマ細胞株 3-631-436 によって産生される抗体と比較した場合、その K_D が少なくとも約 5 倍の改善を示し、又はハイブリドーマ細胞株 106.3 により産生される抗体及びハイブリドーマ細胞株 3-631-436 により産生される抗体と比較した場合、その K_D が少なくとも約 5 倍の改善を示す。さらに、本発明の抗体は、hBNP のアミノ酸残基 5 から 13 を含むエピトープへ免疫特異的に結合する。あるいは、本発明の抗体は、hBNP のアミノ酸残基 13 から 18 を含むエピトープへ免疫特異的に結合する。本発明の単離抗体は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖 Fv、1本鎖抗体、単一ドメイン抗体、Fab 断片、F(ab')₂ 断片、ジスルフィド結合 Fv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片であり得る。

10

【0028】

さらなる態様において、本発明は、A.T.C.C. 受託番号 PTA-6476 を有するハイブリドーマ細胞株 3-631-436 により産生される抗体と比較した場合、少なくとも約 2 倍改善した平衡解離定数 (K_D) で、ヒト脳ナトリウム利尿ペプチド (「hBNP」) のアミノ酸残基 13 から 18 の少なくとも 3 つのアミノ酸を含有するエピトープに免疫特異的に結合する単離抗体に関する。より具体的には、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞株 3-631-436 により産生される抗体と比較した場合、その K_D が少なくとも約 5 倍の改善を示し、ハイブリドーマ細胞株 3-631-436 によって産生される抗体と比較した場合、その K_D が少なくとも約 10 倍の改善を示し、ハイブリドーマ細胞株 3-631-436 により産生される抗体と比較した場合、その K_D が少なくとも約 15 倍の改善を示し、ハイブリドーマ細胞株 3-631-436 により産生される抗体と比較した場合、その K_D が少なくとも約 20 倍の改善を示し、又はハイブリドーマ細胞株 3-631-436 により産生される抗体と比較した場合、その K_D が少なくとも約 25 倍の改善を示す。本発明の単離抗体は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖 Fv、1本鎖抗体、単一ドメイン抗体、Fab 断片、F(ab')₂ 断片、ジスルフィド結合 Fv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片であり得る。

20

30

【0029】

さらなる態様において、本発明は、約 $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間の会合速度 (k_a) を有する (但し、 k_a が $1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_d は $5.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 又は $6.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_a が $6.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_d は $2.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_a が $8.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_d は $2.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_a が $8.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_d は $2.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_a が $5.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_d は $1.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、又は k_a が $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_d は $4.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ではない。)、hBNP に免疫特異的に結合する単離抗体に関する。本発明の単離抗体は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖 Fv、1本鎖抗体、単一ドメイン抗体、Fab 断片、F(ab')₂ 断片、ジスルフィド結合 Fv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片であり得る。本発明の単離抗体は、hBNP のアミノ酸残基 13 から 18 を含有するエピトープに免疫特異的に結合する。

40

50

【0030】

さらに別の態様において、本発明は、約 $2.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ の間の解離速度 (k_d) を有する、hBNPに免疫特異的に結合する単離抗体に関する。本発明の単離抗体は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片であり得る。本発明の単離抗体は、hBNPのアミノ酸残基13から18を含有するエピトープに免疫特異的に結合する。

【0031】

さらに別の態様において、本発明は、約 $3.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ の間の平衡解離定数 (K_D) を有する、hBNPに免疫特異的に結合する単離抗体に関する。本発明の単離抗体は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片であり得る。本発明の単離抗体は、hBNPのアミノ酸残基13から18を含有するエピトープに免疫特異的に結合する。

【0032】

さらに別の態様において、本発明は、A.T.C.C.受託番号PTA-8369を有するチャイニーズハムスター卵巢(「CHO」)細胞株3-631-436AM5に関する。

【0033】

さらに別の態様において、本発明は、A.T.C.C.受託番号PTA-8369を有するCHO細胞株3-631-436AM5から抽出されたDNAから作製された抗体に関する。

【0034】

さらに別の態様において、本発明は、CHO細胞株3-631-436AM5(該細胞株は、A.T.C.C.受託番号PTA-8369を有する。)によって産生されたキメラ抗体又はそのhBNPエピトープ結合断片に関する。

【0035】

さらに別の態様において、本発明は、A.T.C.C.受託番号PTA-8368を有するチャイニーズハムスター卵巢(「CHO」)細胞株3-631-436AM8に関する。

【0036】

さらに別の態様において、本発明は、A.T.C.C.受託番号PTA-8368を有するCHO細胞株3-631-436AM8から抽出されたDNAから作製された抗体に関する。

【0037】

さらに別の態様において、本発明は、CHO細胞株3-631-436AM8(該細胞株は、A.T.C.C.受託番号PTA-8368を有する。)によって産生されたキメラ抗体又はそのhBNPエピトープ結合断片に関する。

【0038】

さらに別の態様において、本発明は、hBNPに免疫特異的に結合する単離抗体に関するが、この抗体は可変重鎖ドメイン及び可変軽鎖ドメインを有し、この可変重鎖ドメインは、重鎖相補性決定領域(「CDR」)1、重鎖CDR2及び重鎖CDR3を含有し、この可変軽鎖ドメインは、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖CDR3を含有し、

(a) 重鎖CDR1は、Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Ser-Tyr-Trp-Met-Asn(配列番号84)のアミノ酸配列を有し；

(b) 重鎖CDR2は、Arg-Ile-Asp-Pro-Tyr-Asp-Ser-

10

20

30

40

50

G l u - T h r - H i s - T y r - A s n - G l n - L y s - P h e - L y s (配列番号 85) のアミノ酸配列を有し、

(c) 重鎖 C D R 3 は、A s p - G l y - T y r (配列番号 86) のアミノ酸配列を有し、

(d) 軽鎖 C D R 1 は、L y s - S e r - S e r - G l n - S e r - L e u - L e u - A s p - S e r - A s p - G l y - L y s - T h r - T y r - L e u - A s n (配列番号 87) のアミノ酸配列を有し、

(e) 軽鎖 C D R 2 は、X a a ₉ - X a a ₁₀ - X a a ₁₁ - X a a ₁₂ - L e u - G l u - S e r (配列番号 83) の式を有するアミノ酸配列を有し、

式中、X a a ₉ は、バリン、グルタミン、ヒスチジン、トリプトファン及びアルギニンからなる群から選択され；

式中、X a a ₁₀ は、バリン、アスパラギン、スレオニン及びメチオニンからなる群から選択され；

式中、X a a ₁₁ は、セリン、スレオニン、アスパラギン及びアスパラギン酸からなる群から選択され；

式中、X a a ₁₂ は、リジン及びイソロイシンからなる群から選択され；

但し、X a a ₁₀ がバリンであり、X a a ₁₁ がセリンであり、及び X a a ₁₂ がリジンである場合には、X a a ₉ はバリン以外であり；並びに

(f) 軽鎖 C D R 3 は、L e u - G l n - A l a - T h r - H i s - P h e - P r o (配列番号 89) のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 3 9 】

より具体的には、上記単離抗体において、

X a a ₉ は、グルタミンであり、

X a a ₁₀ は、アスパラギンであり、

X a a ₁₁ は、スレオニンであり、及び

X a a ₁₂ は、リジンである。

【 0 0 4 0 】

より具体的には、上記単離抗体において、

X a a ₉ は、ヒスチジンであり、

X a a ₁₀ は、スレオニンであり、

X a a ₁₁ は、スレオニンであり、及び

X a a ₁₂ は、リジンである。

【 0 0 4 1 】

より具体的には、上記単離抗体において、

X a a ₉ は、トリプトファンであり、

X a a ₁₀ は、メチオニンであり、

X a a ₁₁ は、スレオニンであり、及び

X a a ₁₂ は、リジンである。

【 0 0 4 2 】

より具体的には、上記単離抗体において、

X a a ₉ は、トリプトファンであり、

X a a ₁₀ は、メチオニンであり、

X a a ₁₁ は、アスパラギンであり、及び

X a a ₁₂ は、リジンである。

【 0 0 4 3 】

より具体的には、上記単離抗体において、

X a a ₉ は、バリンであり、

X a a ₁₀ は、スレオニンであり、

X a a ₁₁ は、アスパラギン酸であり、及び

X a a ₁₂ は、リジンである。

10

20

30

40

50

【0044】

より具体的には、上記単離抗体において、
 X a a₉ は、アルギニンであり、
 X a a₁₀ は、スレオニンであり、
 X a a₁₁ は、アスパラギンであり、及び
 X a a₁₂ は、リジンである。

【0045】

より具体的には、上記単離抗体において、
 X a a₉ は、トリプトファンであり、
 X a a₁₀ は、メチオニンであり、
 X a a₁₁ は、アスパラギン酸であり、及び
 X a a₁₂ は、リジンである。

10

【0046】

より具体的には、上記単離抗体において、
 X a a₉ は、トリプトファンであり、
 X a a₁₀ は、スレオニンであり、
 X a a₁₁ は、スレオニンであり、及び
 X a a₁₂ は、リジンである。

【0047】

より具体的には、上記単離抗体において、
 X a a₉ は、トリプトファンであり、
 X a a₁₀ は、メチオニンであり、
 X a a₁₁ は、アスパラギンであり、及び
 X a a₁₂ は、リジンである。

20

【0048】

より具体的には、上記単離抗体において、
 X a a₉ は、バリンであり、
 X a a₁₀ は、スレオニンであり、
 X a a₁₁ は、アスパラギン酸であり、及び
 X a a₁₂ は、イソロイシンである。

30

【0049】

本発明の単離抗体は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv、抗イデオタイプ抗体又は機能的に活性のあるそのエピトープ結合断片であり得る。本発明の単離抗体は、hBNPのアミノ酸残基13から18を含むエピトープへ免疫特異的に結合する。

【0050】

さらに別の態様において、hBNP又はhBNP断片に対するイムノアッセイに関し、前記イムノアッセイは、本発明の前記抗体の何れか1つを含む。より具体的には、前記イムノアッセイは、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合する単一の抗体のみを含み得る。さらに、前記イムノアッセイは、hBNP又はhBNP断片に対するさらなる特異的結合対をさらに含み得る。

40

【0051】

別の態様において、本発明は、本発明の前記抗体の何れかの治療的有効量と及び医薬として許容される担体又は賦形剤とを含む医薬組成物に関する。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】図1は、高い結合親和性でヒトBNPに免疫特異的に結合する抗体を同定し作製するために使用される段階を示すフローチャートである。

50

【図2】図2は、図4で示される106.3 1本鎖可変断片を含有するベクターpYD41-40に対するプラスミドマップである。

【図3A】図3Aは、図2で示されるベクターのヌクレオチド配列である。

【図3B】図3Bは、図2で示されるベクターのヌクレオチド配列である。

【図3C】図3Cは、図2で示されるベクターのヌクレオチド配列である。

【図3D】図3Dは、図2で示されるベクターのヌクレオチド配列である。

【図3E】図3Eは、図2で示されるベクターのヌクレオチド配列である。

【図4】図4は、106.3 1本鎖可変断片(「scFv」)の略図である。

【図5】図5は、106.3 1本鎖可変断片(「scFv」)のアミノ酸配列を示す。実線を引いた配列は、可変重鎖配列(「VH」)を表し、二重線を引いた配列はリンカーを表し、点線を引いた配列は可変軽鎖配列(「VL」)を表す。斜字体及び太字は、相補性決定領域(CDR)を示す。

10

【図6A】図6Aは、106.3 scFvのヌクレオチド配列を示す。

【図6B】図6Bは、106.3 scFvのヌクレオチド配列を示す。

【図7A】図7Aは、酵母発現全長106.3 1本鎖可変断片(scFv)が環状BNP(配列番号5)に結合することを示す。より具体的には、この図は、106.3 scFv発現酵母を環状BNP(1-32c)(配列番号5)又は抗-V5と温置し、次いで二次試薬ストレプトアビジンフィコエリスリン(SA:PE)と温置したことを示す。このフローサイトメリーのヒストグラムは、抗-V5により検出した場合の106.3 scFvの全長発現及び106.3 scFvの環状BNPペプチド(1-32)(配列番号5)への結合能を示す。PE単位(横座標): 10^2 、 10^3 、 10^4 及び 10^5 。カウント単位(縦座標):0、50、100、150。

20

【図7B】図7Bは、酵母発現全長106.3 1本鎖可変断片(scFv)が環状BNP(配列番号5)に結合することを示す。より具体的には、この図は、106.3 scFv発現酵母を環状BNP(1-32c)(配列番号5)又は抗-V5と温置し、次いでヤギ抗マウス-フィコエリスリン(GAM:PE)と温置したことを示す。このフローサイトメリーのヒストグラムは、抗-V5により検出した場合の106.3 scFvの全長発現及び106.3 scFvの環状BNPペプチド(1-32)(配列番号5)への結合能を示す。PE単位(横座標): 10^2 、 10^3 、 10^4 及び 10^5 。カウント単位(縦座標):0、25、50、75、100、125。

30

【図8】図8は、106.3 scFvオフ速度(off-rate)測定を示す。より具体的には、酵母発現106.3 scFvをビオチン化環状BNP(1-32c)(配列番号5)の飽和濃度と温置した。次に、細胞を洗浄し、非標識BNP(1-32c)(配列番号5)の飽和濃度と温置した。各時点で、細胞を氷上に移し、洗浄し、SA:PEと温置した。30分後、細胞を再び洗浄し、フローサイトメーターで分析した。個々の時間点をフィットさせるために一次減衰式を使用した(m_1 は、時間0での理論的最大平均蛍光単位(「MFU」)であり、 m_2 はオフ速度(「 k_{off} 」)であり、 m_3 は、自己蛍光によるバックグラウンドMFUであり、 M_0 (x は、測定されている時間である。)は、測定が行われる時間 x であった。 $t_{1/2} = \ln 2 / k_{off}$ を用いて環状BNP(1-32c)に結合する106.3 scFvの半減期($t_{1/2}$)を計算した。半減期の1.5倍は、106.3 CDR突然変異誘発ライブラリーを分類するために使用された時間であった。

40

【図9】図9は、相補性決定領域の3アミノ酸位置(9ヌクレオチド)が無作為にライブラリーごとに突然変異化されるように、どのように縮重オリゴヌクレオチドを設計するかを示す図表である。

【図10】図10は、酵母相同組換えを用いてどのように106.3 scFvライブラリーを構築するかを示す図表である。より具体的には、ライブラリーにおいて突然変異誘発されているヌクレオチドを除外するために、ギャップのあるベクターをPCRで作製した。縮重1本鎖オリゴヌクレオチドを合成した。ギャップのあるベクター及び1本鎖縮重オリゴヌクレオチドを*S. cerevisiae*(酵母)株EBY100へと形質転換し

50

た。トリプトファン欠乏グルコース培地中で形質転換クローンを選択した。

【図11】図11は、CDR突然変異誘発ライブラリーから単離された106.3 scFvバリエーションのオフ速度が改善したこと(すなわち前記バリエーションの k_{off} が遅くなった。)を示す概略である。

【図12A】図12Aは、scFv 106.3バリエーションの配列特性を示す。より具体的には、106.3バリエーションからプラスミドDNAを単離し、scFv遺伝子の配列決定を行った。

【図12B】図12Bは、scFv 106.3バリエーションの配列特性を示す。より具体的には、106.3バリエーションからプラスミドDNAを単離し、scFv遺伝子の配列決定を行った。

【図12C】図12Cは、scFv 106.3バリエーションの配列特性を示す。より具体的には、106.3バリエーションからプラスミドDNAを単離し、scFv遺伝子の配列決定を行った。

【図13】図13は、BIAcoreを用いた、表面プラズモン共鳴による、選択した106.3改変ヒト-マウスキメラ抗体及びマウス106.3 mAbの親和性測定を示す。

【図14A】図14Aは、実施例1で述べたギャップのあるpYD41ベクターを作製するために使用した(54)オリゴヌクレオチドを示す。

【図14B】図14Bは、実施例1で述べたギャップのあるpYD41ベクターを作製するために使用した(54)オリゴヌクレオチドを示す。

【図14C】図14Cは、実施例1で述べたギャップのあるpYD41ベクターを作製するために使用した(54)オリゴヌクレオチドを示す。

【図14D】図14Dは、実施例1で述べたギャップのあるpYD41ベクターを作製するために使用した(54)オリゴヌクレオチドを示す。

【図14E】図14Eは、実施例1で述べたギャップのあるpYD41ベクターを作製するために使用した(54)オリゴヌクレオチドを示す。

【図14F】図14Fは、実施例1で述べたギャップのあるpYD41ベクターを作製するために使用した(54)オリゴヌクレオチドを示す。

【図14G】図14Gは、実施例1で述べたギャップのあるpYD41ベクターを作製するために使用した(54)オリゴヌクレオチドを示す。

【図14H】図14Hは、実施例1で述べたギャップのあるpYD41ベクターを作製するために使用した(54)オリゴヌクレオチドを示す。

【図15】図15は、実施例3で述べたような単一抗体アッセイ方式での抗体AM1のヒト環状BNP1-32への結合能を調べるための試験の結果を示す(X = 非標識ヒト環状BNP 1-32のある一定濃度により生じたシグナル; A = 非標識ヒト環状BNP 1-32なしで生じたシグナル; X/A = これらの2つのシグナルの比)。

【図16】図16は、実施例4で述べたように、抗体AM1及び融合物3を用いたストレプトアビジン微小粒子を使用した、抗hBNP抗体ペア評価を示す。基本的に、次のものを使用した: 0.05%固形のM280 ストレプトアビジン粒子、65 ng/mL 共役物、100 μ L 試料体積及び2段階(18/4)サンドイッチ方式。記号及び略語: 菱型、抗BNP(106.3 AM1) SA μ P / 抗BNP(融合物3) CPSP; 四角、抗BNP(融合物3) SA μ P / 抗BNP(106.3 AM1) CPSP; RLU、相対光単位。

【図17】図17は、実施例4で述べたように、抗体AM1及び融合物3を用いた常磁性体微小粒子(Polymer Labsより。)を使用した、抗hBNP抗体ペア評価を示す。記号及び略語: 菱型、抗BNP(106.3 AM1) SA μ P / 抗BNP(融合物3) CPSP; 四角、抗BNP(融合物3) SA μ P / 抗BNP(106.3 AM1) CPSP; RLU、相対光単位。

【図18】図18は、様々なhBNPペプチド(約181 nMで使用)での抗体AM1(約0.01 μ g/mLで使用)の置換を示す。

【図19】図19は、EIAを用いた抗体AM1のアラニンペプチドマッピングを示す。

10

20

30

40

50

【図20】図20は、B I A c o r eを用いた抗体A M Iのアラニンペプチドマッピングを示す。様々なB N Pペプチドを含有するB N P複合体の k_{off} の上昇(倍)を示す。

【図21】図21は、図23で示される3-631-436一本鎖可変断片を含有するベクターpYD41-40-3631に対するプラスミドマップである。

【図22A】図22Aは、図21で示されるベクターのヌクレオチド配列(配列番号90)である。

【図22B】図22Bは、図21で示されるベクターのヌクレオチド配列(配列番号90)である。

【図22C】図22Cは、図21で示されるベクターのヌクレオチド配列(配列番号90)である。

【図22D】図22Dは、図21で示されるベクターのヌクレオチド配列(配列番号90)である。

【図23】図23は、3-631-436 s c F vの略図である。

【図24】図24は、3-631-436 s c F vのアミノ酸配列(配列番号91)を示す。実線を引いた配列は、可変重鎖配列(「VH」)を表し、二重線を引いた配列はリンカーを表し、点線を引いた配列は可変軽鎖配列(「VL」)を表す。斜字体及び太字は、相補性決定領域(CDR)を示す。

【図25A】図25Aは、3-631-436 s c F vのヌクレオチド配列(配列番号92)を示す。二本鎖配列が図示されている。

【図25B】図25Bは、3-631-436 s c F vのヌクレオチド配列(配列番号92)を示す。二本鎖配列が図示されている。

【図26】図26A-26Bは、酵母発現全長3-631-436 s c F vが環状B N P(配列番号5)に結合することを示す。より具体的には、この図は、3-631-436 s c F v発現酵母を環状B N P(1-32c)(配列番号5)又は抗-V5とともに温置し、次いで二次試薬ストレプトアビジンフィコエリスリン(SA:PE)(図26A)及びヤギ抗マウス-FITC(GAM:FITC)(図26B)と温置したことを示す。このフローサイトメトリーのヒストグラムは、抗-V5により検出した場合の3-631-436 s c F vの全長発現及び3-631-436 s c F vの環状B N Pペプチド(1-32)(配列番号5)への結合能を示す。抗原(Ag)結合又はPE-A単位(横座標): 10^0 、 10^1 、 10^2 及び 10^3 及び 10^4 。カウント単位(縦座標): 0、10、20、30、40、50、60、70、80(図26A); 抗体(Ab)発現又はFITC-A単位(横座標) 10^0 、 10^1 、 10^2 及び 10^3 及び 10^4 。: 0、10、20、30、40、50、60、70、80(図26B)。

【図27】図27は、3-631-436 s c F vオフ速度測定を示す。より具体的には、3-631-436 s c F v発現酵母をビオチン化環状B N P(1-32c)(配列番号5)の飽和濃度と温置した。次に、細胞を洗浄し、非標識B N P 1-32c(配列番号5)の飽和濃度と温置した。各時点で、細胞を氷上に移し、洗浄し、SA:PEと温置した。30分後、細胞を再び洗浄し、フローサイトメーターで分析した。個々の時間点をフィットさせるために一次減衰式を使用した(m_1 は、時間0での理論的最大平均蛍光単位(「MFU」)であり、 m_2 はオフ速度(「 k_{off} 」)であり、 m_3 は、自己蛍光によるバックグラウンドMFUであり、 M_0 (x は、測定されている時間である。)は、測定が行われる時間 x であった。 $t_{1/2} = \ln 2 / k_{off}$ を用いて環状B N P(1-32c)に結合する3-631-436 s c F vの半減期($t_{1/2}$)を計算した。半減期の3から5倍は、3-631-436 CDR突然変異誘発ライブラリーを分類するために使用された時間であった。

【図28】図28は、CDR突然変異誘発ライブラリーから単離された3-631-436 s c F vパリアントのオフ速度が改善したこと(すなわち前記パリアントの k_{off} が遅くなった。)を示す概略である。

【図29】図29は、s c F v 3-631-436パリアントの配列特性を示す。より具体的には、3-631-436パリアントからプラスミドDNAを単離し、s c F v 遺伝

10

20

30

40

50

子の配列決定を行った（配列番号 143 - 151）。

【図 30】図 30 は、表面プラズモン共鳴 B I A c o r e を使用し、K i n E x A を使用して、選択した 3 - 631 - 436 改変マウス - マウスキメラ抗体及び野生型マウス 3 - 631 - 436 m A b (I g G 2 a) の親和性測定を示す。

【図 31 A】図 31 A は、実施例 5 で述べた p Y D 41 - 41 - 40 - 3 - 631 - 436 ベクターを作製するために使用した 50 のオリゴヌクレオチド（配列番号 93 - 142）を示す。

【図 31 B】図 31 B は、実施例 5 で述べた p Y D 41 - 41 - 40 - 3 - 631 - 436 ベクターを作製するために使用した 50 のオリゴヌクレオチド（配列番号 93 - 142）を示す。

【図 31 C】図 31 C は、実施例 5 で述べた p Y D 41 - 41 - 40 - 3 - 631 - 436 ベクターを作製するために使用した 50 のオリゴヌクレオチド（配列番号 93 - 142）を示す。

【図 31 D】図 31 D は、実施例 5 で述べた p Y D 41 - 41 - 40 - 3 - 631 - 436 ベクターを作製するために使用した 50 のオリゴヌクレオチド（配列番号 93 - 142）を示す。

【図 31 E】図 31 E は、実施例 5 で述べた p Y D 41 - 41 - 40 - 3 - 631 - 436 ベクターを作製するために使用した 50 のオリゴヌクレオチド（配列番号 93 - 142）を示す。

【図 31 F】図 31 F は、実施例 5 で述べた p Y D 41 - 41 - 40 - 3 - 631 - 436 ベクターを作製するために使用した 50 のオリゴヌクレオチド（配列番号 93 - 142）を示す。

【図 32】図 32 は、実施例 7 で述べたように、抗体 3 - 631 - 436 A M 8、抗体 106 . 3 A M 1、抗体 106 . 3 A M 1 F a b ' 2、抗体 106 . 3 A M 2 及び 3 - 631 - 436 を用いた常磁性体微小粒子（P o l y m e r L a b s より。）を使用した、抗 h B N P 抗体ペア評価を示す。記号及び略語：丸、抗 B N P (3 - 631 - 436 A M 8) μ P / 抗 B N P (106 . 3 A M 1 - アクリジニウム) ; 四角、抗 B N P (3 - 631 - 436 A M 8) μ P / 抗 B N P (106 . 3 A M 1 F a b ' 2 - アクリジニウム) ; 菱形、抗 B N P (m s) μ P / 抗 B N P (106 . 3 A M 2 - アクリジニウム) ; 「 X」、抗 B N P (3 - 631 - 436 A M 8) μ P / 抗 B N P (106 . 3 A M 2 - アクリジニウム) ; R L U、相対光単位。

【発明を実施するための形態】

【0053】

I . 序文：本発明は、高い結合親和性でヒト脳ナトリウム利尿ペプチドに免疫特異的に結合する新規抗体に関する。本発明の抗体は、非常に感度の高い試薬であり、試験試料中の h B N P 又は h B N P 断片の定性的及び / 又は定量的検出に有用である。別の実施形態において、本発明は、本発明の抗体を用いた免疫アッセイに関する。またさらなる実施形態において、本発明は、本発明の抗体を含有する治療組成物に関する。

【0054】

定義

本明細書中で使用する場合、「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体（完全又は部分的ヒト化）、動物抗体（ある態様において、鳥類（例えばアヒル又はガチョウ）、別の態様において、サメ又はクジラ、さらに別の態様において、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウスなど）及び非ヒト霊長類（例えば、カニクイザルなどのサル、チンパンジーなど）を含む哺乳動物）、組換え抗体、キメラ抗体、1本鎖 F v (s c F v)、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片、ジスルフィド結合 F v (s d F v) 及び抗イディオタイプ（抗 I d）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗 I d 抗体を含む。）及び上記の何れかの機能的に活性のあるエピトープ結合断片を指す。特に、抗体には、免疫グロブリン分子及び免疫グロ

10

20

30

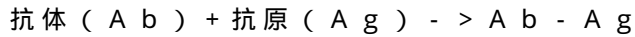
40

50

ブリン分子の免疫学的に活性のある断片、すなわち抗原結合部位を含有する分子が含まれる。免疫グロブリン分子は、何れかのタイプ（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A 及び I g Y）、クラス（例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁ 及び I g A₂）又はサブクラスのものであり得る。

【0055】

本明細書中で使用する場合、「会合速度」、「 k_{on} 」又は「 k_a 」という用語は、本明細書中で交換可能に使用する場合、その標的抗原に対する抗体の結合強度（程度）又は下記により示されるような mAb と抗原との間の複合体形成速度を示す値を指す：

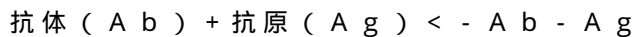


会合定数 (K_A) を決定するための方法は、当技術分野で周知である。例えば、B I A core^(R) (Sweden) アッセイを使用することができる。さらに、Sapid yne Instruments (Boise, Idaho) から入手可能な KinEx A^(R) (Kinetic Exclusion Assay) アッセイを使用することもできる。

10

【0056】

本明細書中で使用する場合、「解離速度」、「 k_{off} 」又は「 k_d 」という用語は、本明細書中で交換可能に使用する場合、その標的抗原からの抗体の解離又は下記で示されるような遊離 mAb 及び抗原への時間による Ab - Ag 複合体の分離の強度（程度）を示す値を指す：



解離定数 (K_D) を決定するための方法は、当技術分野で周知である。例えば、B I A core^(R) (Sweden) アッセイを使用することができる。さらに、Sapid yne Instruments (Boise, Idaho) から入手可能な KinEx A^(R) (Kinetic Exclusion Assay) アッセイを使用することもできる。

20

【0057】

本明細書中で使用する場合、「エピトープ」という用語は、対象において抗原性又は免疫原性活性を有する、ポリペプチド又はタンパク質の部位又は断片を指す。免疫原性活性を有するエピトープは、動物において抗体反応を誘発する、ポリペプチド又はタンパク質の部位又は断片である。抗原活性を有するエピトープは、当業者にとって周知の何らかの方法により（例えば免疫アッセイにより）決定されるような、抗体が免疫特異的に結合する、ポリペプチド又はタンパク質の部位又は断片である。

30

【0058】

本明細書中で使用する場合、「平衡解離定数」又は「 K_D 」という用語は、本明細書中で交換可能に使用する場合、解離速度 (k_{off}) を会合速度 (k_{on}) で割ることにより得られる値を指す。抗原への抗体の結合親和性を表すために、会合速度、解離速度及び平衡解離定数が使用される。

【0059】

本明細書中で使用する場合、「ヒト脳ナトリウム利尿ペプチド」、「ヒトBNP」、「hBNP」、「hBNPペプチド」、「B型ナトリウム利尿ペプチド」、「hBNPポリペプチド」hBNP 1 - 32 という用語は、ヒト脳ナトリウム利尿ペプチドの108アミノ酸前駆体分子のアミノ酸77 - 108に相当する、32アミノ酸分子を指す。ヒト脳ナトリウム利尿ペプチドの配列は、配列番号155に示されている。

40

【0060】

本明細書中で使用する場合、「hBNP断片」又は「hBNPペプチド断片」という用語は、本明細書中で使用する場合、108アミノ酸BNP前駆体分子のアミノ酸77 - 108（配列番号155参照）の少なくとも約5連続アミノ酸を含有するポリペプチドを指す。ある態様において、hBNP断片又はhBNPペプチド断片とは、108アミノ酸BNP前駆体分子のアミノ酸77 - 108の少なくとも約10連続アミノ酸残基；108アミノ酸BNP前駆体分子のアミノ酸77 - 108の少なくとも約15連続アミノ酸残基；

50

108アミノ酸BNP前駆体分子のアミノ酸77-108の少なくとも約20連続アミノ酸残基；108アミノ酸BNP前駆体分子のアミノ酸77-108の少なくとも約25連続アミノ酸残基；又は108アミノ酸BNP前駆体分子のアミノ酸77-108の少なくとも約30連続アミノ酸残基を含有するポリペプチドを指す。hBNP断片又はhBNPペプチド断片の例には、以下に限定されないが、hBNPの、アミノ酸残基1-31、1-30、1-29、1-28、1-27、1-26、1-25、1-24、1-23、1-22、1-21、1-20、1-19、1-18、1-17、1-16、1-15、2-32、2-31、2-30、2-29、2-28、2-27、2-26、2-25、2-24、2-23、2-22、2-21、2-20、2-19、2-18、2-17、2-16、2-15、2-14、2-13、2-12、2-11、2-10、2-9、2-8、2-7、3-32、3-31、3-30、3-29、3-28、3-27、3-26、3-25、3-24、3-23、3-32、3-21、3-20、3-19、3-18、3-17、3-16、3-15、3-14、3-13、3-12、3-11、3-10、3-9、3-8、4-32、4-31、4-30、4-29、4-28、4-27、4-26、4-25、4-24、4-23、4-22、4-21、4-20、4-19、4-18、4-17、4-16、4-15、4-14、4-13、4-12、4-11、4-10、4-9、5-32、5-31、5-30、5-29、5-28、5-27、5-26、5-25、5-24、5-23、5-22、5-21、5-20、5-19、5-18、5-17、5-16、5-15、5-14、5-13、5-12、5-11、5-10、6-32、6-31、6-30、6-29、6-28、6-27、6-26、6-25、6-24、6-23、6-22、6-21、6-20、6-19、6-18、6-17、6-16、6-15、6-14、6-13、6-12、6-11、7-32、7-31、7-30、7-29、7-28、7-27、7-26、7-25、7-24、7-23、7-22、7-21、7-20、7-19、7-18、7-17、7-16、7-15、7-14、7-13、7-12、8-32、8-31、8-30、8-29、8-28、8-27、8-26、8-25、8-24、8-23、8-22、8-21、8-20、8-19、8-18、8-17、8-16、8-15、8-14、8-13、9-32、9-31、9-30、9-29、9-28、9-27、9-26、9-25、9-24、9-23、9-22、9-21、9-20、9-19、9-18、9-17、9-16、9-15、9-14、10-32、10-31、10-30、10-29、10-28、10-27、10-26、10-25、10-24、10-23、10-22、10-21、10-20、10-19、10-18、10-17、10-16、10-15、11-32、11-31、11-30、11-29、11-28、11-27、11-26、11-25、11-24、11-23、11-22、11-21、11-20、11-19、11-18、11-17又は11-16を含有するアミノ酸配列が含まれる。

【0061】

本明細書中で使用する場合、「ヒト化」抗体という用語は、免疫グロブリンバリエント又はその断片を指し、この断片は、所定の抗原と結合することができ、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域及び非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するCDRを含む。通常は、ヒト化抗体は、ヒトではない源からそれに導入された1以上のアミノ酸残基を有する。一般に、ヒト化抗体は、CDR領域の全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、FR領域の全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1、通常は2個の可変ドメイン(Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、Fv)の実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、好ましくは免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部(通常はヒト免疫グロブリンのもの)を含む。一般に、この抗体は、軽鎖ならびに、重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有する。IgM、IgG、IgD、IgA及びIgEを含む免疫グロブリンの何れかのクラス及びIgG₁、IgG₂、IgG₃及びIgG₄を含む何れかのアイソタイプからヒト化抗体を選択することができる。ヒト化抗体は、複数のクラス又はアイソタイプからの配列を含み得、所望のエフェクター機能を最適化する

ために特定の定常ドメインを選択することは、当業者の範囲内である。

【0062】

本明細書中で使用する場合、「ヒト脳ナトリウム利尿ペプチドに免疫特異的に結合する」、「hBNPに免疫特異的に結合する」、「ヒト脳ナトリウム利尿ペプチド断片に免疫特異的に結合する」又は「hBNP断片に免疫特異的に結合する」という語句及びこれらの語句に類似のものは、hBNP又はhBNP断片に特異的に結合し、その他のペプチドに特異的に結合しない、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質及び抗体を指す。hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質又は抗体は、その他のペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に結合し得るが、例えば免疫アッセイ、BIACore又は当技術分野で公知のその他のアッセイにより調べた場合に結合親和性がより低い。hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体又は抗体断片を、例えば、免疫アッセイ、BIACore又は当業者にとって公知のその他の技術により同定することができる。抗体は、以下に限定されないが、放射免疫アッセイ(RIA)及び酵素免疫測定法(ELISA)などの実験技術を用いて調べたときに何らかの交差反応抗原に対する場合よりも高い結合親和性でhBNP又はhBNP断片に結合する場合、hBNPペプチド又はhBNP断片に免疫特異的に結合する(抗体特異性に関する考察に対して、例えば、Paul編、Fundamental Immunology、第2版、Raven Press、New York、332-336頁(1989)を参照)。本発明のある態様において、標準的アッセイ条件下でBIACoreアッセイにより、特に実施例1に記載のBIACoreアッセイにより測定したときに、hBNP又はhBNP断片(アミノ酸5-13など)に対する平衡解離定数(K_D)が少なくとも約 2.0×10^{-11} Mである場合、抗体は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する。本発明の別の態様において、標準的アッセイ条件下でBIACoreアッセイにより、特に実施例1に記載のBIACoreアッセイにより測定したときに、hBNP又はhBNP断片に対する平衡解離定数(K_D)が少なくとも約 3.5×10^{-10} Mである場合、抗体は、hBNP又はhBNP断片(アミノ酸13-18など)に免疫特異的に結合する。

10

20

30

40

50

【0063】

本明細書中で使用する場合、核酸分子に関して「単離された」という用語は、その核酸分子の天然源に存在するその他の核酸分子から分離された核酸分子を指す。さらに、cDNA分子などの「単離された」核酸分子は、組換え技術により産生された場合、実質的にその他の細胞性物質又は培地不含であり得るか、又は、化学合成された場合、実質的に化学的前駆体又はその他の化学物質不含であり得る。ある態様において、核酸分子は単離されている。別の態様において、本発明の抗体をコードする核酸分子は単離されている。

【0064】

本明細書中で使用する場合、「厳格な条件」という用語は、約45の6x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中でのフィルター結合DNAに対するハイブリッド形成とそれに続く約50-65の $0.2 \times SSC / 0.1\%$ SDS中での1回以上の洗浄を指す。「非常に厳格な条件下」という用語は、約45の6xSSC中でのフィルター結合核酸に対するハイブリッド形成とそれに続く約68の $0.1 \times SSC / 0.2\%$ SDS中での1回以上の洗浄又は当業者にとって公知のその他の厳格なハイブリッド形成条件下を指す(例えば、Ausbel, F.M.ら編、1989、Current Protocols in Molecular Biology、Vol. I、Green Publishing Associates, Inc.及びJohn Wiley & Sons, Inc.、New York、6.3.1-6.3.6及び2.10.3頁参照)。

【0065】

本明細書中で使用する場合、「対象」及び「患者」という用語は交換可能に使用する。本明細書中で使用する場合、「対象」という用語は、動物、ある態様において、鳥類(例えばアヒル又はガチョウ)、別の態様において、サメ又はクジラ、又はさらなる態様にお

いて、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット及びマウスなど）及び霊長類（例えば、カニクイザルなどのサル、チンパンジー及びヒト）を含む哺乳動物を指す。

【0066】

本明細書中で使用する場合、「試験試料」という用語は、対象の、血清、血漿、全血、リンパ液、CNS液、尿又はその他の体液由来の生物学的試料を指す。当業者にとって公知の通常の技術を用いて、試験試料を調製することができる。

【0067】

本明細書中で使用する場合、「治療的有効量」又は「医薬的有効量」という用語は、必要な投与量及び期間で、所望の治療結果を達成するのに有効な抗体又は抗体部分の量を意味する。正確な用量は、当業者により確かめられ得る。当技術分野で知られているように、年齢、体重、性別、人種、食事、投与時間、薬物相互作用及び状態の重症度に基づく調整が必要であり得、当業者により通常の実験で確かめられる。治療的有効量はまた、治療上の有益な効果が抗体又は抗体断片の何らかの毒性又は有害な影響を上回るものである。「予防的有効量」とは、必要な投与量及び期間で、所望の予防結果を達成するのに有効な量を指す。通例、疾患の前又は初期段階では、対象において予防的用量を使用するので、予防的有効量は治療的有効量より少ない。

【0068】

II. 本発明の抗体

本発明は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体を提供する。特に、本発明は、hBNP又はhBNP断片に対して高い結合親和性を有する抗体を提供する。より具体的には、ある態様において、本発明は、ヒト脳ナトリウム利尿ペプチド（「hBNP」）のアミノ酸残基5から18の少なくとも3つのアミノ酸を含むエピトープ（hBNPのアミノ酸5から13又はアミノ酸13から18を含むエピトープなど、但し、これらに限定されない。）へ免疫特異的に結合し、及び（1）ハイブリドーマ細胞株106.3（この細胞株はA.T.C.C.受託番号HB-12044を有する。）により産生される抗体及び（2）A.T.C.C.受託番号PTA-6476を有するハイブリドーマ細胞株3-631-436により産生される抗体の少なくとも1つと比較した場合に、その平衡解離定数（ K_D ）の少なくとも約2倍の改善を示す単離抗体に関する。より具体的には、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞株106.3（野生型）により産生される抗体、A.T.C.C.受託番号PTA-6476を有するハイブリドーマ細胞株3-631-436（野生型）により産生される抗体又はハイブリドーマ細胞株106.3（野生型）により産生される抗体、A.T.C.C.受託番号PTA-6476を有するハイブリドーマ細胞株3-631-436（野生型）により産生される抗体の両方と比較した場合に、平衡解離定数（ K_D ）における少なくとも約3倍の改善、少なくとも約5倍の改善、少なくとも約10倍の改善、少なくとも約15倍の改善、少なくとも約20倍の改善、少なくとも約25倍の改善、少なくとも約30倍の改善、少なくとも約35倍の改善、少なくとも約40倍の改善、少なくとも約45倍の改善、少なくとも約50倍の改善、少なくとも約55倍の改善、少なくとも約60倍の改善、少なくとも約70倍の改善又は少なくとも約75倍の改善で、hBNP又はそのhBNP断片のアミノ酸残基5から18の少なくとも3つのアミノ酸残基を含むエピトープ（hBNPのアミノ酸5から13又はアミノ酸13から18を含むエピトープなど、但し、これらに限定されない。）へ免疫特異的に結合する。

【0069】

106.3AM1抗体

具体的には、別の態様において、本発明は、ハイブリドーマ細胞株106.3（該細胞株は、A.T.C.C.受託番号HB-12044を有する。）（本明細書において、「野生型」又は「106.3野生型」とも称される。）により産生される抗体と比べた場合に、その平衡解離定数（ K_D ）における少なくとも約2倍の改善で、hBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基5から13の少なくとも3つのアミノ酸を含むエピトープへ免疫特

10

20

30

40

50

異的に結合する抗体に関する。より具体的には、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞株 106.3 (野生型) により産生される抗体と比較した場合に、その平衡解離定数 (K_D) における少なくとも約 3 倍の改善、少なくとも約 5 倍の改善、少なくとも約 10 倍の改善、少なくとも約 15 倍の改善、少なくとも約 20 倍の改善、少なくとも約 25 倍の改善、少なくとも約 30 倍の改善、少なくとも約 35 倍の改善、少なくとも約 40 倍の改善、少なくとも約 45 倍の改善、少なくとも約 50 倍の改善、少なくとも約 55 倍の改善、少なくとも約 60 倍の改善、少なくとも約 70 倍の改善又は少なくとも約 75 倍の改善で、hBNP 又はその hBNP 断片のアミノ酸残基 5 から 13 を含むエピトープへ免疫特異的に結合する。

【0070】

別の態様において、本発明は、hBNP 又は hBNP 断片へ免疫特異的に結合し、及び少なくとも約 $2.4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $3.3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.25 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ の k_{on} (又は k_a) を有し、又は約 $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $3.3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.25 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $2.4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ までの範囲の k_{on} (又は K_a) を有する抗体に関する。

【0071】

別の態様において、本発明の抗体は、少なくとも約 $2.4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $3.3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.25 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ の k_{on} (又は k_a) でヒト BNP 又は hBNP 断片のアミノ酸残基 5 から 13 へ免疫特異的に結合し、又は約 $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $3.3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.25 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $2.4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ までの範囲の k_{on} (又は k_a) を有する。

【0072】

別の態様において、本発明は、チャイニーズハムスター卵巣細胞株 106.3 AM1 (106.3 L1B24/H2288) としても知られる。) によって産生される抗体を提供する。この細胞株によって産生される抗体は、少なくとも約 $2.4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $3.3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.25 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ の k_{on} (又は k_a) で hBNP または hBNP 断片のアミノ酸残基 5 から 13 に結合し、又は約 $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $3.3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.25 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $2.4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ までの範囲の k_{on} (又は k_a) を有する。

【0073】

本発明は、hBNP 又は hBNP 断片へ免疫特異的に結合する抗体を提供する。特に、本発明は、hBNP 又は hBNP 断片に対して高い結合親和性を有する抗体を提供する。より具体的には、一態様において、hBNP 又は hBNP 断片へ免疫特異的に結合する抗体は、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-6} s^{-1}$ の k_{off}

10

20

30

40

50

k_{off} (又は k_d) を有し、又は約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-6} s^{-1}$ まで、約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ まで、又は約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ までの範囲の k_{off} (又は k_d) を有する。

【0074】

別の態様において、本発明の抗体は、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-6} s^{-1}$ の k_{off} (又は k_{off}) で、ヒトBNP若しくはBNP断片のアミノ酸残基5から13へ免疫特異的に結合し、又は約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-6} s^{-1}$ まで、約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ まで、又は約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ までの範囲の k_{off} (又は k_d) を有する。

10

【0075】

別の態様において、本発明は、チャイニーズハムスター卵巢細胞株106.3AM1によって産生される抗体を提供する。この細胞株によって産生される抗体は、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-6} s^{-1}$ の k_{off} (又は k_d) で、ヒトBNP若しくはBNP断片のアミノ酸残基5から13に結合し、又は約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-6} s^{-1}$ まで、約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ まで、又は約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ までの範囲の k_{off} (又は k_d) を有する。

20

【0076】

本発明は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合する抗体を提供する。特に、本発明は、hBNP又はhBNP断片に対して高い結合親和性を有する抗体を提供する。より具体的には、一態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、少なくとも約 $4.2 \times 10^{-11} M$ の、少なくとも約 $4.0 \times 10^{-11} M$ の、少なくとも約 $3.0 \times 10^{-11} M$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^{-11} M$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-12} M$ の、少なくとも約 $8.0 \times 10^{-13} M$ の、少なくとも約 $7.4 \times 10^{-13} M$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-13} M$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-14} M$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-15} M$ の K_D を有し、又は $4.2 \times 10^{-11} M$ から $1.0 \times 10^{-15} M$ まで、 $4.0 \times 10^{-11} M$ から $1.0 \times 10^{-14} M$ まで、 $3.0 \times 10^{-11} M$ から $1.0 \times 10^{-13} M$ まで、 $2.0 \times 10^{-11} M$ から $8.0 \times 10^{-13} M$ まで若しくは $1.0 \times 10^{-12} M$ から $7.4 \times 10^{-13} M$ までの範囲の K_D を有する抗体をに関する。

30

【0077】

別の態様において、本発明の抗体は、少なくとも約 $4.2 \times 10^{-11} M$ の、少なくとも約 $4.0 \times 10^{-11} M$ の、少なくとも約 $3.0 \times 10^{-11} M$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^{-11} M$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-12} M$ の、少なくとも約 $8.0 \times 10^{-13} M$ の、少なくとも約 $7.4 \times 10^{-13} M$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-13} M$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-14} M$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-15} M$ の K_D で、ヒトBNPのアミノ酸残基5から13へ免疫特異的に結合し、又は $4.2 \times 10^{-11} M$ から $1.0 \times 10^{-15} M$ まで、 $4.0 \times 10^{-11} M$ から $1.0 \times 10^{-14} M$ まで、 $3.0 \times 10^{-11} M$ から $1.0 \times 10^{-13} M$ まで、 $2.0 \times 10^{-11} M$ から $8.0 \times 10^{-13} M$ まで若しくは $1.0 \times 10^{-12} M$ から $7.4 \times 10^{-13} M$ までの範囲の K_D を有する。

40

【0078】

別の態様において、本発明は、チャイニーズハムスター卵巢(CHO)細胞株106.3AM1によって産生される抗体を提供する。この細胞株によって産生される抗体は、 $4.2 \times 10^{-11} M$ から $7.4 \times 10^{-13} M$ までの K_D でhBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基5から13へ結合する。

50

【0079】

別の態様において、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞株106.3 (A.T.C. C. 受託番号HB-12044) によって産生される抗体の誘導体又はバリエーションである。より具体的には、本発明の発明者は、ハイブリドーマ細胞株106.3によって産生される抗体の誘導体又はバリエーションであり、hBNP又はhBNP断片への高い結合親和性を示す抗体を作製できることを見出した。より具体的には、本発明の抗体は、少なくとも約 $2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.35 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の k_{on} (又は k_a)を示し、又は約 $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ まで、約 $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ まで、約 $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ まで、約 $2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.35 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ までの範囲の k_{on} (又は k_a)、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ の k_{off} (又は k_d)を有し、又は約 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ まで、約 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ まで、若しくは約 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ までの範囲の k_{off} (又は k_d)、及び少なくとも約 $4.2 \times 10^{-11} \text{ M}$ の、少なくとも約 $4.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ の、少なくとも約 $3.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ の、少なくとも約 $8.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ の、少なくとも約 $7.4 \times 10^{-13} \text{ M}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-14} \text{ M}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-15} \text{ M}$ の K_D を有し、又は $4.2 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-15} \text{ M}$ まで、 $4.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-14} \text{ M}$ まで、 $3.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ まで、 $2.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $8.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ まで若しくは $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ から $7.4 \times 10^{-13} \text{ M}$ までの範囲の K_D を有する。本発明の誘導された又はバリエーション抗体は、ハイブリドーマ細胞株106.3 (本明細書において、「野生型」とも称される。) によって産生される抗体のアミノ酸配列と比べて、重鎖相補性決定 (「CDR」) 領域 (例えば、重鎖CDR1、重鎖CDR2及び/又は重鎖CDR3) の少なくとも1つに少なくとも1つの変異 (欠失、付加及び/又は置換など)、及び/又は軽鎖CDR領域 (例えば、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び/又は軽鎖CDR3) 中に少なくとも1つの変異 (欠失、付加及び/又は置換など) を含む。さらに、本発明の抗体は、CDR以外の抗体の一部又は部分 (抗体のフレームワーク領域など (但し、これに限定されない。)) の中に1つ又はそれ以上の他の変異 (欠失、付加及び/又は置換など) も含有する。このような誘導体を作製するための方法は、本分野において周知であり、以下でさらに詳しく論述されている位置指定突然変異誘発及びPCR媒介突然変異誘発の使用が含まれる。

【0080】

より具体的には、別の態様において、本発明の抗体は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、式：

Trp - Ile - Asn - Thr - His - Thr - Gly - Glu - Xaa₁ - Xaa₂ - Tyr - Ala - Asp - Asp - Phe - Lys - Gly (配列番号12)

(Xaa₁は、プロリン及びアラニンからなる群から選択され；並びにXaa₂は、イソロイシン及びチロシンからなる群から選択される (但し、Xaa₁がプロリンである場合には、Xaa₂はイソロイシンではない。))

のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2を含む。

【0081】

さらなる態様において、本発明の抗体は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、配列番号15に示されているアミノ酸配列を有する重鎖CDR2を含む。別の態様

において、本発明は、hBNP又は配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも35%、好ましくは少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含むhBNP断片へ免疫特異的に結合する抗体に関する。

【0082】

さらに別の態様において、本発明の抗体は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、式：

Lys - Ala - Xaa₃ - Xaa₄ - Xaa₅ - Val - Asp - Tyr - Asn - Gly - Asp - Ser - Tyr - Leu - Asn (配列番号13)

(Xaa₃は、セリン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、チロシン、スレオニン及びアルギニンからなる群から選択され；Xaa₄は、グルタミン、チロシン、トリプトファン、アラニン及びフェニルアラニンからなる群から選択され；並びに、Xaa₅は、セリン、グリシン、プロリン、アラニン及びアスパラギン酸からなる群から選択される(但し、Xaa₄がグルタミンであり、及びXaa₅がセリンである場合には、Xaa₃はセリンでない。))のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1を含む。

【0083】

さらなる態様において、抗体は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1を有する。別の態様において、本発明は、hBNP又は配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22のアミノ酸配列と少なくとも35%、好ましくは少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含むhBNP断片へ免疫特異的に結合する抗体に関する。

【0084】

さらに別の態様において、本発明の抗体は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、式：

Ala - Ala - Ser - Xaa₆ - Xaa₇ - Xaa₈ - Ser (配列番号14)

(Xaa₆は、アスパラギン及びシステインからなる群から選択され；Xaa₇は、ロイシン、グリシン及びアラニンからなる群から選択され；Xaa₈は、グルタミン酸、トリプトファン及びプロリンからなる群から選択される(但し、Xaa₇がロイシンであり、及びXaa₈がグルタミン酸である場合には、Xaa₆はアスパラギンでない。))のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2を含む。

【0085】

さらなる態様において、本抗体は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、配列番号23又は配列番号24のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2を有する。別の態様において、本発明は、hBNP又は配列番号23若しくは配列番号24のアミノ酸配列と少なくとも35%、好ましくは少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含むhBNP断片へ免疫特異的に結合する抗体に関する。

【0086】

さらなる態様において、本発明の抗体は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、以下のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、重鎖CDR2、重鎖CDR3、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖可変CDR3を有する。

【0087】

(a) Gly - Tyr - Thr - Phe - Thr - His - Tyr - Gly - Ile -

Asn (配列番号6) のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1 ;

(b) Trp - Ile - Asn - Thr - His - Thr - Gly - Glu - Xaa₁ - Xaa₂ - Tyr - Ala - Asp - Asp - Phe - Lys - Gly (配列番号12) の式を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR2 ;

(Xaa₁ は、プロリン及びアラニンからなる群から選択され ;

Xaa₂ は、イソロイシン及びチロシンからなる群から選択される。)

(c) Ser - His - Arg - Phe - Gly - Leu - Asp - Tyr (配列番号8) のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3 ;

(d) Lys - Ala - Xaa₃ - Xaa₄ - Xaa₅ - Val - Asp - Tyr - Asn - Gly - Asp - Ser - Tyr - Leu - Asn (配列番号13) の式を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1 ;

10

(Xaa₃ は、セリン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、チロシン、スレオニン及びアルギニンからなる群から選択され ;

Xaa₄ は、グルタミン、チロシン、トリプトファン、アラニン及びフェニルアラニンからなる群から選択され ;

Xaa₅ は、セリン、グリシン、プロリン、アラニン及びアスパラギン酸からなる群から選択される。)

(e) 軽鎖CDR2 は、Ala - Ala - Ser - Xaa₆ - Xaa₇ - Xaa₈ - Ser (配列番号14) の式を有するアミノ酸配列を有し ;

(Xaa₆ は、アスパラギン及びシステインからなる群から選択され ;

20

Xaa₇ は、ロイシン、グリシン及びアラニンからなる群から選択され ;

Xaa₈ は、グルタミン酸、トリプトファン及びプロリンからなる群から選択される。)

並びに、

(f) 軽鎖CDR3 は、Gln - Gln - Ser - Asn - Glu - Asp - Pro - Phe - Thr (配列番号11) のアミノ酸配列を有し、

軽鎖CDR1 が Lys - Ala - Ser - Gln - Ser - Val - Asp - Tyr - Asn - Gly - Asp - Ser - Tyr - Leu - Asn (配列番号9) のアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR2 が Ala - Ala - Ser - Asn - Leu - Glu - Ser (配列番号10) のアミノ酸配列を有する場合、重鎖CDR2 は、Trp - Ile - Asn - Thr - His - Thr - Gly - Glu - Pro - Ile - Tyr - Ala - Asp

30

- Asp - Phe - Lys - Gly (配列番号7) 以外のアミノ酸配列を有し、重鎖CDR2 がアミノ酸配列 Trp - Ile - Asn - Thr - His - Thr - Gly - Glu - Pro - Ile - Tyr - Ala - Asp - Asp - Phe - Lys - Gly (配列番号7) を有し、軽鎖CDR2 がアミノ酸配列 Ala - Ala - Ser - Asn - Leu - Glu - Ser (配列番号19) を有する場合、軽鎖CDR1 は、Lys - Ala - Ser - Gln - Ser - Val - Asp - Tyr - Asn - Gly - Asp - Ser - Tyr - Leu - Asn (配列番号9) 以外のアミノ酸配列を有し、又は重鎖CDR2 が Trp - Ile - Asn - Thr - His - Thr - Gly - Glu - Pro - Ile - Tyr - Ala - Asp - Asp - Phe - Lys - Gly (配列番号7) のアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR1 が、Lys - Ala - Ser - Gln - Ser - Val - Asp - Tyr - Asn - Gly - Asp - Ser - Tyr - Leu - Asn (配列番号9) のアミノ酸配列を有する場合、軽鎖CDR2 は、Ala - Ala - Ser - Asn - Leu - Glu - Ser (配列番号10) 以外のアミノ酸配列を有する。

40

【0088】

好ましくは、上記式を有する抗体は、上記式中のXaa₁ からXaa₈ が表1中、以下に示されているアミノ酸残基を有する、重鎖CDR1、重鎖CDR2、重鎖CDR3、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖CDR3を含む。

【0089】

【表 1】

表 1

Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Xaa ₅	Xaa ₆	Xaa ₇	Xaa ₈
アラニン	チロシン	セリン	グルタミン	セリン	アスパラギン	ロイシン	グルタミン酸
プロリン	イソロイシン	グルタミン	フェニルアラニン	アラニン	アスパラギン	ロイシン	グルタミン酸
プロリン	イソロイシン	チロシン	アラニン	セリン	アスパラギン	ロイシン	グルタミン酸
プロリン	イソロイシン	グルタミン	トリプトファン	グリシン	アスパラギン	ロイシン	グルタミン酸
プロリン	イソロイシン	スレオニン	トリプトファン	アスパラギン酸	アスパラギン	ロイシン	グルタミン酸
プロリン	イソロイシン	アルギニン	トリプトファン	プロリン	アスパラギン	ロイシン	グルタミン酸
プロリン	イソロイシン	アラニン	チロシン	グリシン	アスパラギン	ロイシン	グルタミン酸
プロリン	イソロイシン	アスパラギン	トリプトファン	プロリン	アスパラギン	ロイシン	グルタミン酸
プロリン	イソロイシン	セリン	グルタミン	セリン	システイン	グリシン	トリプトファン
プロリン	イソロイシン	セリン	グルタミン	セリン	システイン	アラニン	プロリン

10

20

【 0 0 9 0 】

3 - 6 3 1 - 4 3 6 A M 5 及び 3 - 6 3 1 - 4 3 6 A M 8 抗体

別の態様において、本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(A . T . C . C .)に2004年12月21日に寄託され、A . T . C . C . 受託番号 P T A - 6 4 7 6 が割り当てられ、2006年8月17日に公開された米国特許公開2006 / 0 1 8 3 1 5 4 に記載されている3 - 6 3 1 - 4 3 6 (本明細書において、「野生型」及び「3 - 6 3 1 - 4 3 6」とも称される。)によって産生される抗体と比べた場合に、その平衡解離定数(K_D)が少なくとも約2倍改善して、hBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18の少なくとも3つのアミノ酸を含むエピトープへ免疫特異的に結合する抗体に関する。より具体的には、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞株3 - 6 3 1 - 4 3 6により産生される抗体と比較した場合に、その平衡解離定数(K_D)における少なくとも約3倍の改善、少なくとも約5倍の改善、少なくとも約10倍の改善、少なくとも約15倍の改善、少なくとも約20倍の改善、少なくとも約25倍の改善、少なくとも約30倍の改善、少なくとも約35倍の改善、少なくとも約40倍の改善、少なくとも約45倍の改善、少なくとも約50倍の改善、少なくとも約55倍の改善、少なくとも約60倍の改善、少なくとも約70倍の改善又は少なくとも約75倍の改善で、hBNP又はそのhBNP断片のアミノ酸残基13から18を含むエピトープへ免疫特異的に結合する。

30

【 0 0 9 1 】

別の態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、及び少なくとも約 $1.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $3.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $7.8 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $8.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $7.5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ の k_{on} (又は k_a)を有し、又は約 $1.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $1.95 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $2.70 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $9.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ まで、又は約 $7.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $9.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ までの範囲の k_{on} (又は K_a)を有する抗体に関する

40

50

る(但し、 k_{on} が $1.6 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $5.4 \times 10^{-4} s^{-1}$ 又は $6.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $6.7 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $8.4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.9 \times 10^{-3} s^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $8.4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.9 \times 10^{-3} s^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $5.8 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $1.6 \times 10^{-3} s^{-1}$ ではなく、又は k_{on} が $1.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $4.1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ではない。)

【0092】

別の態様において、本発明の抗体は、少なくとも約 $1.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $3.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $7.8 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $8.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $7.5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ の k_{on} (又は K_a)で、ヒトBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18の少なくとも3つのアミノ酸残基へ免疫特異的に結合し、又は約 $1.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $1.95 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $2.70 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $9.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ まで、又は約 $7.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $9.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ までの範囲の k_{on} (又は K_a)を有する(但し、 k_{on} が $1.6 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $5.4 \times 10^{-4} s^{-1}$ 又は $6.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $6.7 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $8.4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.9 \times 10^{-3} s^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $8.4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.9 \times 10^{-3} s^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $5.8 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $1.6 \times 10^{-3} s^{-1}$ ではなく、又は k_{on} が $1.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $4.1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ではない。)を有する。

【0093】

別の態様において、本発明は、チャイニーズハムスター卵巣細胞株3-631-436AM5(BNP3-631-436AM5CHO893-214としても知られる。)、チャイニーズハムスター卵巣細胞株3-631-436AM8(BNP3-631-436AM8CHO974-211)によって産生される抗体又はチャイニーズハムスター卵巣細胞株3-631-436AM5及びチャイニーズハムスター卵巣細胞株3-631-436AM8によって産生される抗体の組み合わせを提供する。CHO細胞株3-631-436AM5によって産生される抗体は、hBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18へ結合し、少なくとも約 $7.6 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $7.7 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $7.8 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $7.9 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の k_{on} (又は k_a)を有し、又は約 $7.6 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $7.9 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の範囲の k_{on} (又は k_a)を有する。CHO細胞株3-631-436AM8によって産生される抗体は、hBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18へ結合し、少なくとも約 $8.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $8.1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $8.2 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $8.3 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $8.4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の k_{on} (又は k_a)を有し、又は約 $8.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $8.4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の範囲の k_{on} (又は k_a)を有する。

【0094】

本発明は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合する抗体を提供する。特に、本発明は、hBNP又はhBNP断片に対して高い結合親和性を有する抗体を提供する。より具体的には、一態様において、抗体は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合し、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ の、少なくとも約 $6.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ の、少なくとも約 $4.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ の、少

なくとも約 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $7.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $5.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ の k_{off} (又は k_d) を有し、又は $2.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 又は $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $8.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の範囲の k_{off} (又は k_d) を有する。

【0095】

別の態様において、本発明の抗体は、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $6.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $7.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $5.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ の k_{off} (又は k_{off}) k_{off} (又は k_d) で、ヒトBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18の少なくとも3つのアミノ酸残基へ免疫特異的に結合し、又は $2.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 又は $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $8.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の範囲の k_{off} (又は k_d) を有する。

10

【0096】

別の態様において、本発明は、チャイニーズハムスター卵巣細胞株3-631-436AM5によって産生される抗体を提供する。この細胞株によって産生される抗体は、少なくとも約 $1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の、若しくは少なくとも約 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の k_{off} (又は k_d) で、ヒトBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18の少なくとも3つのアミノ酸残基へ結合し、又は約 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 若しくは約 $1.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の範囲の k_{off} (又は k_d) を有する。

20

【0097】

別の態様において、本発明は、チャイニーズハムスター卵巣細胞株3-631-436AM8によって産生される抗体を提供する。この細胞株によって産生される抗体は、少なくとも約 $8.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $8.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $8.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、若しくは少なくとも約 $8.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の k_{off} (又は k_d) で、ヒトBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18のアミノ酸残基へ結合し、又は $8.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ から約 $8.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 若しくは約 $8.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ から約 $8.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の範囲の k_{off} (又は k_d) を有する。

30

【0098】

本発明は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合する抗体を提供する。特に、本発明は、hBNP又はhBNP断片に対して高い結合親和性を有する抗体を提供する。より具体的には、一態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、約 $3.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ まで、約 $2.8 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ まで、約 $2.15 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ まで、若しくは約 $1.6 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-10} \text{ M}$ までの範囲の K_D を有する抗体に関する。

40

【0099】

別の態様において、本発明の抗体は、約 $3.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ まで、約 $2.8 \times 10^{-10} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ まで、約 $2.15 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ まで、若しくは約 $1.6 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-10} \text{ M}$ までの範囲の K_D で、ヒトBNPのアミノ酸残基13から18の少なくとも3つのアミノ酸残基へ免疫特異的に結合する。

【0100】

50

別の態様において、本発明は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株3-631-436AM5によって産生される抗体を提供する。この細胞株によって産生される抗体は、 1.6×10^{-10} Mから 1.2×10^{-10} Mの K_D でhBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18の少なくとも3つのアミノ酸残基に結合する。

【0101】

別の態様において、本発明は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株3-631-436AM8によって産生される抗体を提供する。この細胞株によって産生される抗体は、 1.2×10^{-10} Mから 1.0×10^{-10} Mの K_D でhBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18の少なくとも3つのアミノ酸残基に結合する。

【0102】

別の態様において、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞株3-631-436（A.T.C.C.受託番号PTA-6476）によって産生される抗体の誘導体又はバリエーションである。より具体的には、本発明の発明者らは、ハイブリドーマ細胞株3-631-436によって産生される抗体の誘導体又はバリエーションであり、hBNP又はhBNP断片への高い結合親和性を示す抗体を作製できることを見出した。より具体的には、本発明の抗体は、少なくとも約 $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $3.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $7.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $8.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $7.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の k_{on} （又は k_a ）を示し、又は約 $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ まで、約 $1.95 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ まで、約 $2.70 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $9.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ まで、又は約 $7.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $9.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ までの範囲の k_{on} （又は K_a ）を有し（但し、 k_{on} が $1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_{off} は $5.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 又は $6.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $6.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $8.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $8.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $5.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_{off} は $1.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、又は k_{on} が $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_{off} は $4.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ではない。）、又は少なくとも約 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $6.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $7.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ の k_{off} （又は k_d ）を有し、又は $2.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ まで、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 若しくは $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $8.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ までの範囲の k_{off} （又は k_d ）を有し、又は約 $3.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ まで、約 $2.8 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ まで、約 $2.15 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ まで、又は約 $1.6 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-10} \text{ M}$ までの範囲の K_D を有する。

【0103】

本発明の誘導された又はバリエーション抗体は、ハイブリドーマ細胞株3-631-436（本明細書において、「野生型」及び「3-631-436」とも称される。）によって産生される抗体のアミノ酸配列と比べて、重鎖相補性決定（「CDR」）領域（例えば、重鎖CDR1、重鎖CDR2及び/又は重鎖CDR3）の少なくとも1つに少なくとも1つの変異（欠失、付加及び/又は置換など）、及び/又は軽鎖CDR領域（例えば、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び/又は軽鎖CDR3）中に少なくとも1つの変異（欠失、付加及び/又は置換など）を含む。さらに、本発明の抗体は、CDR以外の抗体の一部又は

10

20

30

40

50

部分（抗体のフレームワーク領域など（但し、これに限定されない。））の中に1つ又はそれ以上の他の変異（欠失、付加及び/又は置換など）も含有し得る。このような誘導体を作製するための方法は、本分野において周知であり、以下でさらに詳しく論述されている位置指定突然変異誘発及びPCR媒介突然変異誘発の使用が含まれる。

【0104】

より具体的には、別の態様において、本発明の抗体は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、式：

$X a a_9 - X a a_{10} - X a a_{11} - X a a_{12} - L e u - G l u - S e r$ （配列番号83）

（ $X a a_9$ は、バリン、グルタミン、ヒスチジン、トリプトファン及びアルギニンからなる群から選択され；式中、 $X a a_{10}$ は、バリン、アスパラギン、スレオニン及びメチオニンからなる群から選択され； $X a a_{11}$ は、セリン、スレオニン、アスパラギン及びアスパラギン酸からなる群から選択され； $X a a_{12}$ は、リジン及びイソロイシンからなる群から選択され；但し、 $X a a_{10}$ がバリンであり、 $X a a_{11}$ がセリンであり、及び $X a a_{12}$ がリジンである場合には、 $X a a_9$ はバリン以外である。）

のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2を含む。

【0105】

さらなる態様において、本発明の抗体は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、配列番号83に示されているアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2を含む。別の態様において、本発明は、hBNP又は配列番号83のアミノ酸配列と少なくとも35%、好ましくは少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含むhBNP断片へ免疫特異的に結合する抗体に関する。

【0106】

さらなる態様において、本発明の抗体は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、配列番号143、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号147、配列番号148、配列番号149、配列番号150又は配列番号151のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2を有する。別の態様において、本発明は、hBNP又は配列番号143、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号147、配列番号148、配列番号149、配列番号150若しくは配列番号151と少なくとも35%、好ましくは少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含むhBNP断片へ免疫特異的に結合する抗体に関する。

【0107】

さらに別の態様において、本発明の抗体は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、以下のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、重鎖CDR2、重鎖CDR3、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖可変CDR3を有する。

【0108】

(a) $G l y - T y r - T h r - P h e - T h r - S e r - T y r - T r p - M e t - A s n$ （配列番号84）のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；

(b) $A r g - I l e - A s p - P r o - T y r - A s p - S e r - G l u - T h r - H i s - T y r - A s n - G l n - L y s - P h e - L y s$ （配列番号85）の式を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；

(c) $A s p - G l y - T y r$ （配列番号86）のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3；

(d) $L y s - S e r - S e r - G l n - S e r - L e u - L e u - A s p - S e r - A s p - G l y - L y s - T h r - T y r - L e u - A s n$ （配列番号87）のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列を有するアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ;

(e) 軽鎖 C D R 2 は、X a a ₉ - X a a ₁₀ - X a a ₁₁ - X a a ₁₂ - L e u - G l u - S e r (配列番号 8 3) の式を有するアミノ酸配列を有し ;

(X a a ₉ は、バリン、グルタミン、ヒスチジン、トリプトファン及びアルギニンからなる群から選択され ;

X a a ₁₀ は、バリン、アスパラギン、スレオニン及びメチオニンからなる群から選択され ;

X a a ₁₁ は、セリン、スレオニン、アスパラギン及びアスパラギン酸からなる群から選択され ;

X a a ₁₂ は、リジン及びイソロイシンからなる群から選択され ;

但し、X a a ₁₀ がバリンであり、X a a ₁₁ がセリンであり、及び X a a ₁₂ がリジンである場合には、X a a ₉ はバリン以外である。)

(f) 軽鎖 C D R 3 は、L e u - G l n - A l a - T h r - H i s - P h e - P r o (配列番号 8 9) のアミノ酸配列を有する。

【 0 1 0 9 】

好ましくは、上記式を有する抗体は、上記式中の X a a ₉ から X a a ₁₂ が表 2 中、以下に示されているアミノ酸残基を有する、重鎖 C D R 1、重鎖 C D R 2、重鎖 C D R 3、軽鎖 C D R 1、軽鎖 C D R 2 及び軽鎖 C D R 3 を含む。

【 0 1 1 0 】

【 表 2 】

表 2

Xaa ₉	Xaa ₁₀	Xaa ₁₁	Xaa ₁₂
グルタミン	アスパラギン	スレオニン	リジン
ヒスチジン	スレオニン	スレオニン	リジン
トリプトファン	メチオニン	スレオニン	リジン
トリプトファン	メチオニン	アスパラギン	リジン
バリン	スレオニン	アスパラギン酸	リジン
アルギニン	スレオニン	アスパラギン	リジン
トリプトファン	メチオニン	アスパラギン酸	リジン
トリプトファン	スレオニン	スレオニン	リジン
トリプトファン	メチオニン	アスパラギン	リジン
バリン	スレオニン	アスパラギン酸	イソロイシン

【 0 1 1 1 】

I I I . 核酸分子

本発明は、h B N P 又は h B N P 断片に免疫特異的に結合する本発明の抗体をコードする、通常は単離された、核酸分子を提供する。

【 0 1 1 2 】

1 0 6 . 3 A M 1 核酸分子

ある態様において、本発明は、ハイブリドーマ細胞株 1 0 6 . 3 (該細胞株は A . T . C . C . 受託番号 H B - 1 2 0 4 4 を有する。) により産生される抗体と比較した場合、その平衡解離定数 (K _D) が、少なくとも約 2 倍改善、少なくとも約 3 倍改善、少なくとも約 5 倍改善、少なくとも約 1 0 倍改善、少なくとも約 1 5 倍改善、少なくとも約 2 0 倍改善、少なくとも約 2 5 倍改善、少なくとも約 3 0 倍改善、少なくとも約 3 5 倍改善、少なくとも約 4 0 倍改善、少なくとも約 4 5 倍改善、少なくとも約 5 0 倍改善、少なくとも約 5 5 倍改善、少なくとも約 6 0 倍改善、少なくとも約 7 0 倍改善又は少なくとも約 7 5 倍改善して、h B N P 又はその h B N P 断片のアミノ酸残基 5 から 1 3 を含有するエピートに結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。本発明はまた、ハイブリドーマ細胞株 1 0 6 . 3 (該細胞は A . T . C . C . 受託番号 H B - 1 2 0 4 4 を有する。) により産生される抗体と比較した場合、その平衡解離定数 (K _D) が、少なくとも約 2 倍改善、少なくとも約 3 倍改善、少なくとも約 5 倍改善、少なくとも約 1 0 倍改善、少なく

とも約15倍改善、少なくとも約20倍改善、少なくとも約25倍改善、少なくとも約30倍改善、少なくとも約35倍改善、少なくとも約40倍改善、少なくとも約45倍改善、少なくとも約50倍改善、少なくとも約55倍改善、少なくとも約60倍改善、少なくとも約70倍改善又は少なくとも約75倍改善して、hBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基5から13を含むエピトープに結合する抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子を提供する。

【0113】

別の態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合し、少なくとも約 4.2×10^{-11} Mの、少なくとも約 4.0×10^{-11} Mの、少なくとも約 3.0×10^{-11} Mの、少なくとも約 2.0×10^{-11} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-12} Mの、少なくとも約 8.0×10^{-13} Mの、少なくとも約 7.4×10^{-13} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-13} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-14} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-15} Mの K_D を有し、又は 4.2×10^{-11} Mから 1.0×10^{-15} Mまで、 4.0×10^{-11} Mから 1.0×10^{-14} Mまで、 3×10^{-11} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、 2×10^{-11} Mから 8.0×10^{-13} Mまで若しくは 1.0×10^{-12} Mから 7.4×10^{-13} Mまでの範囲の K_D を有する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。本発明はまた、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合し、少なくとも約 4.2×10^{-11} Mの、少なくとも約 4.0×10^{-11} Mの、少なくとも約 3.0×10^{-11} Mの、少なくとも約 2.0×10^{-11} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-12} Mの、少なくとも約 8.0×10^{-13} Mの、少なくとも約 7.4×10^{-13} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-13} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-14} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-15} Mの K_D を有し、又は 4.2×10^{-11} Mから 1.0×10^{-15} Mまで、 4.0×10^{-11} Mから 1.0×10^{-14} Mまで、 3×10^{-11} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、 2×10^{-11} Mから 8.0×10^{-13} Mまで若しくは 1.0×10^{-12} Mから 7.4×10^{-13} Mの範囲の K_D を有する抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0114】

別の態様において、本単離核酸分子は、少なくとも約 4.2×10^{-11} Mの、少なくとも約 4.0×10^{-11} Mの、少なくとも約 3.0×10^{-11} Mの、少なくとも約 2.0×10^{-11} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-12} Mの、少なくとも約 8.0×10^{-13} Mの、少なくとも約 7.4×10^{-13} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-13} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-14} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-15} Mの K_D でヒトBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基5から13に免疫特異的に結合し、又は 4.2×10^{-11} Mから 1.0×10^{-15} Mまで、 4.0×10^{-11} Mから 1.0×10^{-14} Mまで、 3×10^{-11} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、 2×10^{-11} Mから 8.0×10^{-13} Mまで若しくは 1.0×10^{-12} Mから 7.4×10^{-13} Mの範囲の K_D を有する抗体をコードする。本発明はまた、少なくとも約 4.2×10^{-11} Mの、少なくとも約 4.0×10^{-11} Mの、少なくとも約 3.0×10^{-11} Mの、少なくとも約 2.0×10^{-11} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-12} Mの、少なくとも約 8.0×10^{-13} Mの、少なくとも約 7.4×10^{-13} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-13} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-14} Mの、少なくとも約 1.0×10^{-15} Mの K_D でhBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基5から13に免疫特異的に結合し、又は 4.2×10^{-11} Mから 1.0×10^{-15} Mまで、 4.0×10^{-11} Mから 1.0×10^{-14} Mまで、 3×10^{-11} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、 2×10^{-11} Mから 8.0×10^{-13} Mまで若しくは 1.0×10^{-12} Mから 7.4×10^{-13} Mの範囲の K_D を有する抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0115】

10

20

30

40

50

さらに別の態様において、本発明は、 4.2×10^{-11} M から 7.4×10^{-13} M の K_D で hBNP 又は hBNP 断片のアミノ酸残基 5 から 13 に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する（該核酸分子は、CHO 細胞株 106.3AM1 により産生される抗体のヌクレオチド配列を含む。）。本発明はまた、 4.2×10^{-11} M から 7.4×10^{-13} M の K_D で hBNP 又は hBNP 断片のアミノ酸残基 5 から 13 に免疫特異的に結合する抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子（該核酸分子は、CHO 細胞株 106.3AM1 により産生される抗体のヌクレオチド配列を含む。）に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0116】

別の態様において、本発明は、hBNP 又は hBNP 断片に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する（該抗体は、ハイブリドーマ細胞株 106.3 (ATCC 受託番号 HB-12044) により産生される抗体の誘導体又はバリエーションを含む。）。本明細書中で既に考察したように、本発明の発明者らは、高い結合親和性で、特異的に少なくとも約 $2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.35 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の k_{on} (又は k_a) を示し、又は約 $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ まで、約 $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ まで、約 $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ まで、約 $2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.35 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の範囲の k_{on} (又は k_a) を有し、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ の k_{off} (又は k_d) を有し、又は $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 若しくは $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の範囲の k_{off} (又は k_d) を有し、及び少なくとも約 4.2×10^{-11} M、少なくとも約 4.0×10^{-11} M、少なくとも約 3.0×10^{-11} M、少なくとも約 2.0×10^{-11} M、少なくとも約 1.0×10^{-12} M、少なくとも約 8.0×10^{-13} M、少なくとも約 7.4×10^{-13} M、少なくとも約 1.0×10^{-13} M、少なくとも約 1.0×10^{-14} M、少なくとも約 1.0×10^{-15} M、の K_D を有し、又は 4.2×10^{-11} M から 1.0×10^{-15} M まで、 4.0×10^{-11} M から 1.0×10^{-14} M まで、 3×10^{-11} M から 1.0×10^{-13} M まで、 2×10^{-11} M から 8.0×10^{-13} M まで若しくは 1.0×10^{-12} M から 7.4×10^{-13} M の範囲の K_D を有する、ハイブリドーマ細胞株 106.3 により産生される抗体の誘導体又はバリエーションである抗体が産生され得ることを見出した。本発明の誘導体又は変異抗体は、ハイブリドーマ細胞株 106.3 により産生される抗体のアミノ酸配列と比較した場合、重鎖相補性決定（「CDR」）領域（例えば、重鎖 CDR 1、重鎖 CDR 2 又は重鎖 CDR 3）の少なくとも 1 つにおいて少なくとも 1 つの突然変異（欠失、付加及び / 又は置換など）、軽鎖 CDR 領域（例えば、軽鎖 CDR 1、軽鎖 CDR 2 又は軽鎖 CDR 3）において少なくとも 1 つの突然変異（欠失、付加及び / 又は置換など）を含む。本発明の抗体をコードする核酸分子において突然変異（欠失、付加及び / 又は置換など）を導入するために、結果としてアミノ酸置換を生じさせる、部位特異的突然変異誘発及び PCR による突然変異誘発を含む、当業者にとって公知の標準的技術を使用することができる。ある態様において、本誘導体は、ハイブリドーマ細胞株 106.3 により産生される元の抗体と比較して、10 アミノ酸未満の置換、5 アミノ酸未満の置換、4 アミノ酸未満の置換、3 アミノ酸未満の置換又は 2 アミノ酸未満の置換を含む。ある態様において、本誘導体は、1 以上の予想される不可欠ではないアミノ酸残基（即ち、抗体が hBNP 又は hBNP 断片に免疫特異的に結合するために重大ではないアミノ酸残基）においてなされる保存的アミノ酸置換を有する。「保存的アミノ酸

10

20

30

40

50

置換」は、アミノ酸残基が、同様の電荷の側鎖を有するアミノ酸で置換されるものである。同様の電荷の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で明らかにされている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。あるいは、飽和突然変異誘発などによって、コード配列の全て又は一部に、突然変異を無作為に導入することができ、hBNP又はhBNP断片に対する結合親和性が向上した突然変異体を同定するために、得られた突然変異体を生物学的活性についてスクリーニングすることができる。突然変異誘発後、コードされる抗体を発現させ、抗体の活性を調べることができる。

10

【0117】

別の態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供するが、該抗体は、次の式のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2を有する：

Trp - Ile - Asn - Thr - His - Thr - Gly - Glu - Xaa₁ - Xaa₂ - Tyr - Ala - Asp - Asp - Phe - Lys - Gly (配列番号12)

20

(式中、Xaa₁は、プロリン及びアラニンからなる群から選択され、Xaa₂は、イソロイシン及びチロシンからなる群から選択され、ただし、Xaa₁がプロリンである場合、Xaa₂はイソロイシンではない。)。本発明はまた、上述の式のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2を有する抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0118】

別の態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供するが、該抗体は、配列番号15のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2を含む(あるいは、からなる)。本発明はまた、配列番号15のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2を含む抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

30

【0119】

別の態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供するが、該抗体は、次の式を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1を有する：

Lys - Ala - Xaa₃ - Xaa₄ - Xaa₅ - Val - Asp - Tyr - Asn - Gly - Asp - Ser - Tyr - Leu - Asn (配列番号13)

(式中、Xaa₃は、セリン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、チロシン、スレオニン及びアルギニンからなる群から選択され、Xaa₄は、グルタミン、チロシン、トリプトファン、アラニン及びフェニルアラニンからなる群から選択され、Xaa₅は、セリン、グリシン、プロリン、アラニン及びアスパラギン酸からなる群から選択され、ただし、Xaa₄がグルタミンであり、Xaa₅がセリンである場合、Xaa₃はセリンではない。)。本発明はまた、上述の式のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1を有する抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

40

【0120】

別の態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供するが、該抗体は、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1を含む(あるいは、からなる)。本発明はまた、配列番号16、配

50

列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21 又は配列番号 22 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR1 を含む抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0121】

別の態様において、本発明は、hBNP 又は hBNP 断片に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供するが、該抗体は、次の式を有するアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2 を有する：

A l a - A l a - S e r - X a a ₆ - X a a ₇ - X a a ₈ - S e r (配列番号 14)

(式中、X a a ₆ は、アスパラギン及びシステインからなる群から選択され、X a a ₇ は、ロイシン、グリシン及びアラニンからなる群から選択され、X a a ₈ は、グルタミン酸、トリプトファン及びプロリンからなる群から選択され、ただし、X a a ₇ がロイシンであり、X a a ₈ がグルタミン酸である場合、X a a ₆ はアスパラギンではない。) 。本発明はまた、上述の式のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2 を有する抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

10

【0122】

別の態様において、本発明は、hBNP 又は hBNP 断片に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供するが、該抗体は、配列番号 23 又は配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2 を含む(あるいは、からなる)。本発明はまた、配列番号 23 又は配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2 を含む抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

20

【0123】

別の態様において、本発明は、hBNP 又は hBNP 断片に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供するが、該抗体は、配列番号 15 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR2、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21 又は配列番号 22 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR1、配列番号 23 又は配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2 又はこれらのアミノ酸配列の何れかの組み合わせを含む(あるいは、これらからなる)。本発明は、配列番号 15 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR2、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21 又は配列番号 22 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR1、配列番号 23 又は配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2 又はこれらのアミノ酸配列の何れかの組み合わせを含む抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

30

【0124】

別の態様において、本発明は、hBNP 又は hBNP 断片に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供するが、該抗体は、次のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR1、重鎖 CDR2、重鎖 CDR3、軽鎖 CDR1、軽鎖 CDR2 及び軽鎖可変 CDR3 を有する：

40

(a) 重鎖 CDR1 は、G l y - T y r - T h r - P h e - T h r - H i s - T y r - G l y - I l e - A s n (配列番号 6) のアミノ酸配列を有し；

(b) 重鎖 CDR2 は、T r p - I l e - A s n - T h r - H i s - T h r - G l y - G l u - X a a ₁ - X a a ₂ - T y r - A l a - A s p - A s p - P h e - L y s - G l y (配列番号 12) の式を有するアミノ酸配列を有し、

式中、X a a ₁ は、プロリン及びアラニンからなる群から選択され；

式中、X a a ₂ は、イソロイシン及びチロシンからなる群から選択され；

(c) 重鎖 CDR3 は、S e r - H i s - A r g - P h e - G l y - L e u - A s p - T y r (配列番号 8) のアミノ酸配列を有し；

(d) 軽鎖 CDR1 は、L y s - A l a - X a a ₃ - X a a ₄ - X a a ₅ - V a l - A

50

s p - T y r - A s n - G l y - A s p - S e r - T y r - L e u - A s n (配列番号 1 3) の式を有するアミノ酸配列を有し、

式中、X a a ₃ は、セリン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、チロシン、スレオニン及びアルギニンからなる群から選択され；

式中、X a a ₄ は、グルタミン、チロシン、トリプトファン、アラニン及びフェニルアラニンからなる群から選択され；

式中、X a a ₅ は、セリン、グリシン、プロリン、アラニン及びアスパラギン酸からなる群から選択され；

(e) 軽鎖 C D R 2 は、A l a - A l a - S e r - X a a ₆ - X a a ₇ - X a a ₈ - S e r (配列番号 1 4) の式を有するアミノ酸配列を有し、

式中、X a a ₆ は、アスパラギン及びシステインからなる群から選択され；

式中、X a a ₇ は、ロイシン、グリシン及びアラニンからなる群から選択され；

式中、X a a ₈ は、グルタミン酸、トリプトファン及びプロリンからなる群から選択され；

(f) 軽鎖 C D R 3 は、G l n - G l n - S e r - A s n - G l u - A s p - P r o - P h e - T h r (配列番号 1 1) のアミノ酸配列を有し、

軽鎖 C D R 1 が L y s - A l a - S e r - G l n - S e r - V a l - A s p - T y r - A s n - G l y - A s p - S e r - T y r - L e u - A s n (配列番号 9) のアミノ酸配列を有し、軽鎖 C D R 2 が A l a - A l a - S e r - A s n - L e u - G l u - S e r (配列番号 1 0) のアミノ酸配列を有する場合、重鎖 C D R 2 は、T r p - I l e - A s n - T h r - H i s - T h r - G l y - G l u - P r o - I l e - T y r - A l a - A s p - A s p - P h e - L y s - G l y (配列番号 7) 以外のアミノ酸配列を有するか、重鎖 C D R 2 がアミノ酸配列 T r p - I l e - A s n - T h r - H i s - T h r - G l y - G l u - P r o - I l e - T y r - A l a - A s p - A s p - P h e - L y s - G l y (配列番号 7) を有し、軽鎖 C D R 2 がアミノ酸配列 A l a - A l a - S e r - A s n - L e u - G l u - S e r (配列番号 1 9) を有する場合、軽鎖 C D R 1 は、L y s - A l a - S e r - G l n - S e r - V a l - A s p - T y r - A s n - G l y - A s p - S e r - T y r - L e u - A s n (配列番号 9) 以外のアミノ酸配列を有するか、又は、重鎖 C D R 2 が T r p - I l e - A s n - T h r - H i s - T h r - G l y - G l u - P r o - I l e - T y r - A l a - A s p - A s p - P h e - L y s - G l y (配列番号 7) のアミノ酸配列を有し、軽鎖 C D R 1 が、L y s - A l a - S e r - G l n - S e r - V a l - A s p - T y r - A s n - G l y - A s p - S e r - T y r - L e u - A s n (配列番号 9) のアミノ酸配列を有する場合、軽鎖 C D R 2 は、A l a - A l a - S e r - A s n - L e u - G l u - S e r (配列番号 1 0) 以外のアミノ酸配列を有する。本発明はまた、上述の式に従うアミノ酸配列を有する、重鎖 C D R 1 領域、重鎖 C D R 2 領域、重鎖 C D R 3 領域、軽鎖 C D R 1 領域、軽鎖 C D R 2 領域及び軽鎖 C D R 3 領域を有する抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【 0 1 2 5 】

さらに別の態様において、本発明は、h B N P 又は h B N P 断片に免疫特異的に結合する抗体 (該抗体は C H O 細胞株 1 0 6 . 3 A M 1 により産生される。) をコードする単離核酸分子を提供する。本発明はまた、h B N P 又は h B N P 断片に免疫特異的に結合する抗体 (該抗体は C H O 細胞株 1 0 6 . 3 A M 1 により産生される。) をコードする核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【 0 1 2 6 】

3 - 6 3 1 - 4 3 6 A M 5 及び 3 - 6 3 1 - 4 3 6 A M 8 核酸分子

別の態様において、本発明は、2 0 0 4 年 1 2 月 2 1 日に寄託され、A . T . C . C . 受託番号 P T A - 6 4 7 6 が割り当てられ、2 0 0 6 年 8 月 1 7 日に公開された米国特許公開 2 0 0 6 / 0 1 8 3 1 5 4 に記載されている 3 - 6 3 1 - 4 3 6 (本明細書において

10

20

30

40

50

、「野生型」及び「3-631-436」とも称される。)によって産生される抗体と比べた場合に、その平衡解離定数(K_D)が、少なくとも約2倍改善、少なくとも約3倍改善、少なくとも約5倍改善、少なくとも約10倍改善、少なくとも約15倍改善、少なくとも約20倍改善、少なくとも約25倍改善、少なくとも約30倍改善、少なくとも約35倍改善、少なくとも約40倍改善、少なくとも約45倍改善、少なくとも約50倍改善、少なくとも約55倍改善、少なくとも約60倍改善、少なくとも約70倍改善又は少なくとも約75倍改善して、hBNP又はそのhBNP断片のアミノ酸残基13から18に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する。本発明はまた、2004年12月21日に寄託され、A.T.C.C.受託番号PTA-6476が割り当てられ、2006年8月17日に公開された米国特許公開2006/0183154に記載されている3-631-436(本明細書において、「3-631-436」とも称される。)により産生される抗体と比較した場合、その平衡解離定数(K_D)が少なくとも約2倍改善、少なくとも約3倍改善、少なくとも約5倍改善、少なくとも約10倍改善、少なくとも約15倍改善、少なくとも約20倍改善、少なくとも約25倍改善、少なくとも約30倍改善、少なくとも約35倍改善、少なくとも約40倍改善、少なくとも約45倍改善、少なくとも約50倍改善、少なくとも約55倍改善、少なくとも約60倍改善、少なくとも約70倍改善又は少なくとも約75倍改善して、hBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18を含むエピトープに結合する抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子を提供する。

10

【0127】

20

別の態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、及び少なくとも約 3.5×10^{-10} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、約 2.8×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mまで、約 2.15×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-11} Mまで、若しくは約 1.60×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-10} Mまでの範囲の K_D を有する単離核酸分子を提供する。

【0128】

本発明は、hBNP又はhBNP断片へ免疫特異的に結合し、及び少なくとも約 3.5×10^{-10} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、約 2.8×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mまで、約 2.15×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-11} Mまで、若しくは約 1.6×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-10} Mまでの範囲の K_D を有する抗体をコードする本明細書中に記載されている核酸分子へ、厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

30

【0129】

別の態様において、単離核酸分子は、約 3.5×10^{-10} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、約 2.8×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mまで、約 2.15×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-11} Mまで、若しくは約 1.60×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-10} Mの K_D でヒトBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18へ免疫特異的に結合する。本発明は、約 3.5×10^{-10} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、約 2.8×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mまで、約 2.15×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-11} Mまで、若しくは約 1.60×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-10} Mの範囲の K_D で、hBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18へ免疫特異的に結合する抗体をコードする本明細書中に記載されている核酸分子へ、厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子も提供する。

40

【0130】

さらに別の態様において、本発明は、約 1.2×10^{-10} Mから約 1.6×10^{-11} Mの K_D でhBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する(該核酸分子は、CHO細胞株3-631-436AM5により産生される抗体のヌクレオチド配列を含む)。本発明はまた、 1.2×10^{-10} Mから 1.6×10^{-13} Mの K_D でhBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18に免疫特異的に結合する抗体をコードする本明細書中に記載の核酸

50

分子（該核酸分子は、CHO細胞株3-631-436AM5により産生される抗体のヌクレオチド配列を含む。）に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0131】

さらに別の態様において、本発明は、約 1.0×10^{-10} Mから約 1.2×10^{-10} Mの K_D でhBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する（該核酸分子は、CHO細胞株3-631-436AM8により産生される抗体のヌクレオチド配列を含む。）。本発明はまた、 1.0×10^{-10} Mから 1.2×10^{-10} Mの K_D でhBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基13から18に免疫特異的に結合する抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子（該核酸分子は、CHO細胞株3-631-436AM8により産生される抗体のヌクレオチド配列を含む。）に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

10

【0132】

別の態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供する（該抗体は、ハイブリドーマ細胞株3-631-436AM5（ATCC受託番号8369）により産生される抗体の誘導体又はバリエーションを含む。）。本明細書中で既に考察したように、本発明の発明者らは、高い結合親和性を示し、具体的には少なくとも約 $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $3.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $7.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $8.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $7.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の k_{on} （又は K_a ）を示し、又は約 $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ まで、約 $1.95 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ まで、約 $2.70 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $9.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ まで、若しくは約 $7.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $9.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ までの範囲の k_{on} （又は K_a ）（但し、 k_{on} が $1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_{off} は $5.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 又は $6.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $6.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $8.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $8.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $5.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_{off} は $1.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ではなく、又は k_{on} が $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であれば、 k_{off} は $4.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ではない。）を有し、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $6.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $7.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $5.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ の k_{off} （又は k_d ）を有し、又は $2.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 又は $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $8.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の範囲の k_{off} （又は k_d ）を有し、又は約 $3.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ まで、約 $2.8 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ まで、約 $2.15 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ まで若しくは約 $1.6 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1.0 \times 10^{-10} \text{ M}$ までの範囲の K_D を有する、ハイブリドーマ細胞株3-631-436AM5又は3-631-436AM8により産生される抗体の誘導体又はバリエーションである抗体が産生され得ることを見出ししている。

20

30

40

【0133】

本発明の誘導体又は変異抗体は、ハイブリドーマ細胞株3-631-436（A.T.C.C.受託番号PTA-6476を有する。）により産生される抗体のアミノ酸配列と

50

比較した場合、軽鎖相補性決定（「CDR」）領域（例えば、軽鎖CDR2）の少なくとも1つの中に少なくとも1つの突然変異（欠失、付加及び/又は置換など）を含む。本発明の抗体をコードする核酸分子において突然変異（欠失、付加及び/又は置換など）を導入するために、結果としてアミノ酸置換を生じさせる、部位特異的突然変異誘発及びPCRによる突然変異誘発を含む、当業者にとって公知の標準的技術を使用することができる。ある態様において、本誘導体は、ハイブリドーマ細胞株3-631-436（A.T.C.C.受託番号PTA-6476を有する。）により産生される元の抗体と比較して、10アミノ酸未満の置換、5アミノ酸未満の置換、4アミノ酸未満の置換、3アミノ酸未満の置換又は2アミノ酸未満の置換を含む。ある態様において、本誘導体は、1以上の予想される不可欠ではないアミノ酸残基（即ち、抗体がhBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合するために重大ではないアミノ酸残基）においてなされる保存的アミノ酸置換を有する。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、同様の電荷の側鎖を有するアミノ酸で置換されるものである。同様の電荷の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で明らかにされている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。あるいは、飽和突然変異誘発などによって、コード配列の全て又は一部に、突然変異を無作為に導入することができ、hBNP又はhBNP断片に対する結合親和性が向上した突然変異体を同定するために、得られた突然変異体を生物学的活性についてスクリーニングすることができる。突然変異誘発後、コードされる抗体を発現させ、抗体の活性を調べることができる。

【0134】

別の態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供するが、該抗体は、次の式のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2を有する。

$X a a_9 - X a a_{10} - X a a_{11} - X a a_{12} - L e u - G l u - S e r$ （配列番号83）の式を有するアミノ酸配列を有し；

（ $X a a_9$ は、バリン、グルタミン、ヒスチジン、トリプトファン及びアルギニンからなる群から選択され；

$X a a_{10}$ は、バリン、アスパラギン、スレオニン及びメチオニンからなる群から選択され；

$X a a_{11}$ は、セリン、スレオニン、アスパラギン及びアスパラギン酸からなる群から選択され；

$X a a_{12}$ は、リジン及びイソロイシンからなる群から選択され；

但し、 $X a a_{10}$ がバリンであり、 $X a a_{11}$ がセリンであり、及び $X a a_{12}$ がリジンである場合には、 $X a a_9$ はバリン以外である。）

【0135】

本発明はまた、上述の式のアミノ酸配列を有する軽い鎖CDR2を有する抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0136】

別の態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供するが、該抗体は、配列番号143、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号147、配列番号148、配列番号149、配列番号150又は配列番号151のアミノ酸配列を有する軽い鎖CDR2を含む（ある

いは、からなる)。本発明はまた、配列番号143、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号147、配列番号148、配列番号149、配列番号150又は配列番号151のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2を含む抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0137】

別の態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子を提供するが、該抗体は、次のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR1、重鎖CDR2、重鎖CDR3、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖可変CDR3を有する。

【0138】

(a) Gly - Tyr - Thr - Phe - Thr - Ser - Tyr - Trp - Met - Asn (配列番号84)のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1;

(b) Arg - Ile - Asp - Pro - Tyr - Asp - Ser - Glu - Thr - His - Tyr - Asn - Gln - Lys - Phe - Lys (配列番号85)の式を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR2;

(c) Asp - Gly - Tyr (配列番号86)のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3;

(d) Lys - Ser - Ser - Gln - Ser - Leu - Leu - Asp - Ser - Asp - Gly - Lys - Thr - Tyr - Leu - Asn (配列番号87)のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1;

(e) 軽鎖CDR2は、Xaa₉ - Xaa₁₀ - Xaa₁₁ - Xaa₁₂ - Leu - Glu - Ser (配列番号83)の式を有するアミノ酸配列を有し;

(Xaa₉は、バリン、グルタミン、ヒスチジン、トリプトファン及びアルギニンからなる群から選択され;

Xaa₁₀は、バリン、アスパラギン、スレオニン及びメチオニンからなる群から選択され;

Xaa₁₁は、セリン、スレオニン、アスパラギン及びアスパラギン酸からなる群から選択され;

Xaa₁₂は、リジン及びイソロイシンからなる群から選択され;

但し、Xaa₁₀がバリンであり、Xaa₁₁がセリンであり、及びXaa₁₂がリジンである場合には、Xaa₉はバリン以外である。)

(f) 軽鎖CDR3は、Leu - Gln - Ala - Thr - His - Phe - Pro (配列番号89)のアミノ酸配列を有する。

【0139】

さらに別の態様において、本発明は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体(該抗体はCHO細胞株3-631-436AM5又は3-631-436AM8により産生される。)をコードする単離核酸分子を提供する。本発明はまた、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体(該抗体はCHO細胞株3-631-436AM5又は3-631-436AM8により産生される。)をコードする核酸分子に厳格な条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0140】

IV. 本発明の抗体を調製するための方法

当業者にとって公知の通常の技術を用いて本発明の抗体を調製することができる。

【0141】

ある態様において、宿主細胞における免疫グロブリン軽及び重鎖遺伝子の組換え発現により、本発明の抗体を調製することができる。抗体を組換え発現させるために、軽及び重鎖が宿主細胞で発現され、好ましくは宿主細胞が培養されている培地中に分泌され、その培地から本抗体を回収できるように、本抗体の免疫グロブリン軽及び重鎖をコードする核酸分子を担う1以上の組換え発現ベクターを宿主細胞に形質移入する。Sambrook

10

20

30

40

50

、Fritsch及びManiatis(編)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor, New York(1989)、Ausbel、F.M.ら(編)Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates(1989)及び米国特許第4,816,397号(Bossら)などに記載のように、抗体重及び軽鎖遺伝子を得て、これらの遺伝子を組換え発現ベクターに組み込み、このベクターを宿主細胞に導入するために、標準的組換え核酸(DNA)法を使用する。

【0142】

本発明の抗体を発現させるために、軽及び重鎖領域をコードする核酸分子を最初に得る。例えばCHO細胞株106.3AM1、CHO細胞株3-631-436AM5、CHO細胞株3-631-436AM8又はこれらのあらゆる組み合わせにより産生される抗体を含む、本発明の抗体を生成させるために、モノクローナル抗体106.3を発現するハイブリドーマ細胞株又はモノクローナル抗体3-631-436を発現するハイブリドーマ細胞株からこれらの核酸分子を得て、当技術分野で周知である手段(部位特異的突然変異誘発など)により改変することができる。モノクローナル抗体106.3を発現するハイブリドーマ細胞株は、American Type Culture Collection(「ATCC」)10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110に寄託し、受託番号HB-12044が与えられた。モノクローナル抗体106.3の核酸配列は、図3A-3E及び配列番号1で示す。2004年12月21日に寄託され、A.T.C.C.受託番号PTA-6476が割り当てられ、2006年8月17日に公開された米国特許公開2006/0183154に記載されているモノクローナル抗体3-631-436を発現するハイブリドーマ細胞株。モノクローナル抗体3-631-436の核酸配列は、図25Aから25B及び配列番号92に示されている。

【0143】

例えば、106.3又は3-631-436可変重鎖(VH)及び可変(VL)核酸断片を得たら、本明細書中に開示されている106.3AM1、3-631-436AM5、3-631-436AM8又は106.3AM1、3-631-436AM5若しくは3-631-436AM8関連アミノ酸配列をコードするように、これらの配列又は、相補性決定(「CDR」)領域などのこれらの配列内の特定の領域に対して、突然変異誘発を行うことができる。異なる106.3AM1、3-631-436AM5、3-631-436AM8又は106.3AM1、3-631-436AM5若しくは3-631-436AM8関連配列中のアミノ酸残基を同定するために、106.3又は3-631-436VH及びVLDNA配列によりコードされるアミノ酸配列を、106.3AM1、3-631-436AM5、3-631-436AM8又は106.3AM1、3-631-436AM5若しくは3-631-436AM8関連VH及びVLアミノ酸配列と比較する。どのヌクレオチドの変更を行うべきかを決定するために、遺伝子コードを用いて、突然変異配列が106.3AM1、3-631-436AM5、3-631-436AM8又は106.3AM1、3-631-436AM5若しくは3-631-436AM8関連アミノ酸配列をコードするように、モノクローナル抗体106.3又は3-631-436の適切なヌクレオチドに対して突然変異誘導を行う。PCRによる突然変異誘発(この方法では、PCR産物が突然変異を含有するように、変異ヌクレオチドをPCRプライマー組み込む。)又は部位特異的突然変異誘発などの標準的方法により、抗体106.3又は3-631-426配列の突然変異誘発を行うことができる。

【0144】

あるいは、別の態様において、当業者にとって公知の通常の技術を用いて、化学合成装置においてVH及びVL鎖をコードする核酸分子を合成することができる。例えば、当技術分野で公知の通常の技術を用いて、セクションIIIに記載の核酸分子からのVH及びVL鎖を化学合成することができる。支持体に付着させた3'末端塩基から開始して、段

階的にヌクレオチドをカップリングさせる。最も5'側のヌクレオチドを付加した後、そのヌクレオチドを固体支持体から切断し、脱塩により精製して、その後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により精製する(Midland Certified Reagents、Midland、TX、www.oligos.com)。

【0145】

(上述のような、VH及びVL遺伝子の、増幅及び突然変異誘発により)106.3AM1、3-631-436AM5、3-631-436AM8又は106.3AM1、3-631-436AM5若しくは3-631-436AM8関連VH及びVLセグメントをコードする核酸断片を得たら、例えば、可変領域遺伝子を抗体に変換するために(以下に限定されないが、全長抗体鎖遺伝子、Fab断片遺伝子へ、又はscFv遺伝子へ、など)、これらの核酸断片をさらに標準的組換えDNA技術により操作することができる。これらの操作において、別のタンパク質(抗体定常領域又はフレキシブルなリンカーなど)をコードする別の核酸断片に、VL-又はVHコード核酸断片を操作可能に連結する。「操作可能に連結」という用語は、この関連で使用する場合、2個の核酸断片によりコードされるアミノ酸配列の読み枠がずれないようにこの2個の核酸断片がつながれることを意味するものとする。

10

【0146】

代替的な方法において、野生型CDR領域(モノクローナル抗体106.3又は3-631-426のものなど)を用いてscFv遺伝子を構築し、次いで当技術分野で公知の技術を用いて突然変異誘発を行い得る。

20

【0147】

重鎖定常領域(CH1、CH2及びCH3)をコードする別の核酸分子へVHコード核酸分子を操作可能に連結することにより、VH領域をコードする単離核酸分子を全長重鎖遺伝子へと変換することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野で公知である(例えば、Kabata、E.A.ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242(1991)参照)。別の態様において、本発明は、以下に限定されないがヒト重鎖定常領域の全ての既知のアロタイプを含む全ての既知のヒト重鎖定常領域をさらに包含する。標準的PCR増幅により、これらの領域を包含する核酸断片を得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM又はIgD定常領域であり得る。

30

【0148】

軽鎖定常領域、CLをコードする別の核酸分子にVLコード核酸分子を操作可能に連結することにより、全長軽鎖遺伝子(ならびにFab軽鎖遺伝子)へと、VL領域をコードする単離核酸分子を変換することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野で公知である(例えば、Kabata、E.A.ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242(1991)参照)。本発明は、以下に限定されないがヒト軽鎖定常領域の全ての既知のアロタイプを含む全ての既知のヒト軽鎖定常領域を包含する。標準的PCR増幅により、これらの領域を包含する核酸断片を得ることができる。軽鎖定常領域は、カッパ又はラムダ定常領域であり得るが、最も好ましくはカッパ定常領域である。

40

【0149】

特定の重又は軽鎖領域内のフレームワーク(FR)及びCDR領域の具体的な表示は、このような領域を区別するために使用する、慣習又は付番システムにより変化し得ることを理解されたい(例えばChothia、Kabata、Oxford Molecular's AbM modeling software、これらは全て、当業者にとって公知である)。本発明の目的のために、Kabata付番システムを使用する。

50

【0150】

s c F v 遺伝子を作製するために、フレキシブルリンカー（アミノ酸配列 G P A K E L T P L K E A K V S（配列番号4）によりコードされるリンカーなど）をコードする別の断片に V H 及び V L コード核酸断片を操作可能に連結する（米国特許公開 2004-0175379A1 参照）。本発明で利用できるその他のリンカー配列の例は、Birdら、Science 242:423-426(1988)、Houstonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988) 及び McCaffertyら、Nature、348:552-554(1990)で見出すことができる。

【0151】

本発明の抗体又は抗体部分を発現させるために、遺伝子が転写及び翻訳調節配列に操作可能に連結されるように、上述のように得られた部分又は全長軽及び重鎖をコードする核酸分子を発現ベクターに挿入する。この関連において、「操作可能に連結」という用語は、ベクター内の転写及び翻訳調節配列が、抗体遺伝子の転写及び翻訳を制御するというそれらの意図する機能を果たすように、抗体遺伝子がベクターに連結されることを意味するものとする。使用する発現宿主細胞と適合するように、発現ベクター及び発現調節配列を選択する。抗体軽鎖遺伝子及び抗体重鎖遺伝子を別個のベクターに挿入でき、又は、より一般的には、両遺伝子を同じ発現ベクターに挿入する。標準的方法（例えば、抗体遺伝子断片及びベクターの相補的制限部位のライゲーション又は制限部位がない場合は平滑末端ライゲーション）により、発現ベクターに抗体遺伝子を挿入する。軽又は重鎖配列の挿入前に、発現ベクターが既に抗体定常領域配列を有し得る。例えば、V H 及び V L 配列を全長抗体遺伝子に変換するためのあるアプローチは、ベクター内で V H セグメントが C H 「セグメント」に操作可能に連結され、ベクター内で V L セグメントが C L セグメントに操作可能に連結されるように、重鎖定常及び軽鎖定常領域をそれぞれ既にコードする発現ベクターにそれらを挿入することである。さらに又はあるいは、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードし得る。シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端に読み枠どおりに連結されるように、抗体鎖遺伝子をベクターにクロニングすることができる。シングルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチド又は異種シグナルペプチド（即ち、免疫グロブリンではないタンパク質からのシグナルペプチド）であり得る。

【0152】

抗体鎖遺伝子に加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞において抗体鎖遺伝子の発現を調節する制御配列を担い得る。「制御配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー及び、抗体鎖遺伝子の転写又は翻訳を調節するその他の発現調節エレメント（例えばポリアデニル化シグナル）を含むものとする。このような制御配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されている。当業者にとって当然のことながら、制御配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換する宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの因子に依存し得る。哺乳動物宿主細胞発現に対する好ましい制御配列には、サイトメガロウイルス（「CMV」）由来（CMVプロモーター/エンハンサーなど）、シミアンウイルス40（「SV40」）由来（SV40プロモーター/エンハンサーなど）、アデノウイルス由来（アデノウイルス主要後期プロモーター（「AdMLP」など）及びポリオーマ由来のプロモーター及び/又はエンハンサーなど、哺乳動物細胞での高レベルのタンパク質発現を導くウイルスエレメントが含まれる。ウイルス制御エレメントの詳細及びその配列に関して、例えば、Stinskiによる米国特許第5,168,062号、Bellらによる米国特許第4,510,245号及びSchaffnerらによる米国特許第4,968,615号を参照のこと。

【0153】

抗体鎖遺伝子及び制御配列に加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞でのベクターの

10

20

30

40

50

複製を制御する配列（例えば複製起点）及び選択可能マーカー遺伝子など、さらなる配列を担い得る。選択可能マーカー遺伝子により、ベクターが導入されている宿主細胞の選択が容易になる（例えば、全て Axel らによる、米国特許第 4,399,216 号、同第 4,634,665 号及び同第 5,179,017 号を参照）。例えば、通常、選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞において、例えば、G418、ハイグロマイシン又はメトトレキセートなどの薬物に対する耐性を与える。好ましい選択可能マーカー遺伝子には、メトトレキセート選択/増幅を用いて dhfr - 宿主細胞において使用するためのジヒドロ葉酸還元酵素（「DHFR」）遺伝子及び G418 選択のためのネオマイシン（「neo」）遺伝子が含まれる。

【0154】

軽及び重鎖の発現の場合、標準的技術により、重及び軽鎖をコードする発現ベクターを宿主細胞に形質移入する。「形質移入」という用語の様々な形態は、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿法、DEAE-デキストラン形質移入など、原核又は真核宿主細胞への外来 DNA の導入のために一般的に使用される多岐にわたる技術を含むするものとする。本発明の抗体を原核又は真核宿主細胞の何れかで発現させることは理論的に可能ではあるが、真核細胞、特に哺乳動物細胞は、原核細胞よりも、正しく折りたたまれ、免疫学的に活性のある無傷の抗体をアSEMBLし分泌させるのによりふさわしいので、真核細胞で、最も好ましくは哺乳動物宿主細胞で、抗体を発現させることが最も好ましい。抗体遺伝子の原核発現は、活性抗体の高収率の産生には無効であることが報告されている（Boss、M. A. 及び Wood、C. R.、*Immunology Today* 6:12-13 (1985) 参照）。

【0155】

本発明の組換え抗体を発現させるのに好ましい哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣（「CHO」）細胞（例えば R. J. Kaufman 及び P. A. Sharp、*Mol. Biol.* 159:601-621 (1982) に記載のものなどの、DHFR 選択可能マーカーとともに使用される、Urlaub 及び Chasin、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 (1980) に記載の、dhfr-CHO 細胞を含む。）、NSO 骨髄腫細胞、COS 細胞、及び SP2/0 細胞が含まれる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、宿主細胞で抗体を発現させるのに十分な時間、より好ましくは宿主細胞を増殖させている培地に抗体が分泌されるのに十分な時間、宿主細胞を培養することにより抗体が産生される。標準的タンパク質精製法を用いて、培地から抗体を回収することができる。

【0156】

Fab 断片、F(ab')₂ 断片又は scFv 分子などの無傷の抗体の一部を産生させるために宿主細胞を使用することもできる。上述の手順における変法が本発明の範囲内であることは理解されよう。例えば、本発明の抗体の軽鎖又は重鎖の何れか（両方ではない。）をコードする核酸分子を宿主細胞に形質移入することが望まれ得る。hBNP 又は hBNP 断片への結合に不必要な軽及び重鎖の何れか又は両方をコードする核酸分子のいくつか又は全てを除去するために、組換え DNA 技術を使用することもできる。このような短縮核酸分子から発現される分子も本発明の抗体に包含される。

【0157】

本発明の抗体又はその抗原結合部分の組換え発現のための好ましい系において、リン酸カルシウム介在形質移入により、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターを dhfr-CHO 細胞に導入する。組換え発現ベクター内で、遺伝子の高レベル転写を導くために、抗体重及び軽鎖遺伝子を CMV エンハンサー/A d M L P プロモーター制御エレメントにそれぞれ操作可能に連結する。組換え発現ベクターは DHFR 遺伝子も担い、これにより、このベクターにより形質移入された CHO 細胞の選択が可能になる。形質移入ベクターから DHFR 遺伝子を得た CHO 細胞を得るために、ヒポキサンチン及びチミジン不含の培地中で細胞を培養した。最大量の抗体を発現したクローンを同定するために、抗原特異的スクリーニング法を使用した。これらの個々のクローンを増殖させ

10

20

30

40

50

、通常的に再スクリーニングした。106.3AM1、3-631-436AM5及び3-631-436AM8形質移入から細胞株を選択した。抗体重及び軽鎖を発現させるために、選択した形質転換宿主細胞を培養し、培地から無傷の抗体を回収する。組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞を形質移入し、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、培地から抗体を回収するために、標準的な分子生物学的技術を使用する。

【0158】

前述のことを考慮して、本発明の別の態様は、本発明の抗体及び抗体部分の組換え発現に使用できる、核酸、ベクター及び宿主細胞組成物に関する。106.3AM1及びそのバリエーションの重鎖CDR2領域をコードするアミノ酸配列を配列番号15で示す。106.3AM1軽鎖CDR1領域をコードするアミノ酸配列を配列番号22で示す。106.3AM1の重鎖CDR2領域をコードする核酸分子を配列番号81で示す。106.3AM1の軽鎖CDR1領域をコードする核酸分子を配列番号82で示す。別の態様において、3-631-436AM5及び3-631-436AM8並びにこれらのバリエーションの軽鎖CDR2領域をコードするアミノ酸配列は、配列番号83中に示されている。3-631-436AM5及び3-631-436AM8の軽鎖CDRL2領域をコードする核酸分子は、配列番号154中に示されている。

10

【0159】

V. 組換え抗体の選択

本明細書中に開示されている、106.3AM1、3-631-436AM5、3-631-436AM8又は106.3AM1、3-631-436AM5若しくは3-631-436AM8関連抗体を含む本発明の抗体は、コンビナトリアル抗体ライブラリーのスクリーニングにより単離することができる。好ましくは、コンビナトリアル抗体ライブラリーは、組換えコンビナトリアルライブラリー、好ましくは、キメラの、ヒト化又はヒトVL及びVH cDNAを用いて作製された、scFv酵母ディスプレイライブラリーである。このようなライブラリーの作製及びスクリーニングのための方法は当技術分野で公知である。酵母ディスプレイライブラリーを作製するための市販のベクターに加えて(pYD1ベクター、Invitrogen Carlsbad, Californiaなど)、抗体ディスプレイライブラリーの作製及びスクリーニングに特に受け入れやすい方法及び試薬の例は、例えば、Border E.T.及びWitttrup K.D.、Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, Methods Enzymol., 328:430-44(2000)及びBorder E.T.及びWitttrup K.D.、Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, Nat Biotechnol., 15(6):553-7(1997年6月)で見出すことができる。

20

30

【0160】

好ましい実施形態において、本明細書中のセクションIIに記載の抗体の何れかなどの、高い結合親和性の抗体を単離するために、酵母(好ましくはSaccharomyces cerevisiae)表面でscFvとして発現されるヒト重及び軽鎖配列を生成させるため、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合することが知られている抗体(例えばモノクローナル抗体106.3又はモノクローナル抗体3-631-436など)を最初に使用する。これらの抗体の解離速度(すなわち、 k_{off} 又は k_d)を調べるために、これらの抗体(モノクローナル抗体106.3又はモノクローナル抗体3-631-436など)scFvを分析する。次に、好ましくはビオチン化環状hBNP(1-32c)を用いて、このようなコンストラクトをスクリーニングする。次いで、平均蛍光単位(「MFU」として、時間(秒)に対して解離速度データをプロットすることができる。データをフィットさせるために、一次減衰式を使用することができる。使用できるこのような式の例は以下の式である:

40

$$y = m1 * \exp(-m2 * M0) + m3$$

50

(式中、 m_1 は時間 0 での最大蛍光 ($*$ = 乗算及び $e \times p$ = 指数) ; m_2 はオフ速度 (オフ速度を決定するための式は当業者にとって周知である。) ; M_0 は時間 x (x は測定している時間) であり ; m_3 は系から生じているバックグラウンド蛍光である。

【0161】

突然変異誘発ライブラリーからオフ速度が改善した本発明の抗体を同定するために、解離速度データを使用することができる。

【0162】

CDR 変異誘発ライブラリーを作製するために、続く重及び軽鎖可変領域の突然変異誘発に対して、解離速度が改善したこれらの scFv コンストラクトを選択する。

【0163】

106.3AM1 及び 106.3AM1 関連抗体に関して、結合親和性をさらに向上させるために、天然の免疫反応中の抗体の親和性成熟に關与するインビボ体細胞変異プロセスと同様のプロセスにおいて、好ましい VH/VL ペアの VH 及び VL セグメントに対して、好ましくは、VH の CDR 2 領域内、VL の CDR 1 領域内及び / 又は CDR 2 領域内で、無作為に突然変異誘発を行うことができる。標的とされる CDR 内で 3 個のアミノ酸をコードする縮重一本鎖オリゴヌクレオチドで各 CDR の一部を置換することにより、このインビボ親和性突然変異を行うことができる。酵母中での相同組換えにより、新しい無作為配列による各 CDR の一部の置換 (最大 8000 の可能性) を行うことができる (例えば実施例 1 参照)。scFv に關連して hBNP 又は hBNP 断片への結合についてこれらの無作為突然変異 VH 及び VL セグメントを分析することができ ; 改善された蛍光を示し、(a) A.T.C.C. 受託番号 HB-12044 を有するハイブリドーマ細胞株 106.3 により産生される抗体と比較した場合、その平衡解離定数 (K_D) が、少なくとも約 2 倍改善、少なくとも約 3 倍改善、少なくとも約 5 倍改善、少なくとも約 10 倍改善、少なくとも約 15 倍改善、少なくとも約 20 倍改善、少なくとも約 25 倍改善、少なくとも約 30 倍改善、少なくとも約 35 倍改善、少なくとも約 40 倍改善、少なくとも約 45 倍改善、少なくとも約 50 倍改善、少なくとも約 55 倍改善、少なくとも約 60 倍改善、少なくとも約 70 倍改善又は少なくとも約 75 倍改善で、hBNP 又はその hBNP 断片のアミノ酸残基 5 から 13 を含有するエピトープに結合し、(b) 少なくとも約 $2.4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも約 $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも約 $3.3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも約 $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも約 $1.25 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも約 $1.35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ の k_{on} (又は k_a) を示し、若しくは $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3.3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から $1.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から $1.25 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2.4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から $1.35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の範囲の k_{on} (又は k_a) を有し、(c) 少なくとも約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-6} s^{-1}$ の k_{off} (又は k_d) を示すか又は $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-6} s^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 若しくは $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ の範囲の k_{off} (又は k_d) を有し、又は (d) 少なくとも約 $4.2 \times 10^{-11} M$ の、少なくとも約 $4.0 \times 10^{-11} M$ の、少なくとも約 $3.0 \times 10^{-11} M$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^{-11} M$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-12} M$ の、少なくとも約 $8.0 \times 10^{-13} M$ の、少なくとも約 $7.4 \times 10^{-13} M$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-13} M$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-14} M$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-15} M$ の K_D を示し、若しくは $4.2 \times 10^{-11} M$ から $1.0 \times 10^{-15} M$ まで、 $4.0 \times 10^{-11} M$ から $1.0 \times 10^{-14} M$ まで、 $3 \times 10^{-11} M$ から $1.0 \times 10^{-13} M$ まで、 $2 \times 10^{-11} M$ から $8.0 \times 10^{-13} M$ まで若しくは $1.0 \times 10^{-12} M$ から $7.4 \times 10^{-13} M$ までの範囲の K_D を有する、scFv を単離し、配列決定により CDR 突然変異を同定することができる。

10

20

30

40

50

【0164】

組換え s c F v ディスプレイライブラリーのスクリーニング後、所望の特性を有するクローンを変換のために選択する。選択した抗体をコードする核酸分子をディスプレイパッケージから（例えば酵母発現ベクターから）回収し、標準的な組換え DNA 技術により、その他の発現ベクターにサブクローニングすることができる。必要に応じて、本発明のその他の抗体形態を作製するために、核酸をさらに操作することができる（例えば、さらなる定常領域などのさらなる免疫グロブリンドメインをコードする核酸に連結する。）。上記セクション I V で詳述したように、コンビナトリアルライブラリーのスクリーニングにより単離された組換えヒト抗体を発現させるために、抗体をコードする DNA を組換え発現ベクターにクローニングし、哺乳動物宿主細胞に導入する。

10

【0165】

3 - 6 3 1 - 4 3 6 A M 5、3 - 6 3 1 - 4 3 6 A M 8 並びに 3 - 6 3 1 - 4 3 6 A M 5 及び 3 - 6 3 1 - 4 3 6 A M 8 関連抗体に関して、結合親和性をさらに増加させるために、天然の免疫反応中の抗体の親和性成熟に關与するインビボ体細胞変異プロセスと同様のプロセスにおいて、好ましい V H / V L ペアの V H 及び V L セグメントに対して、好ましくは、V L の C D R 2 領域内で、無作為に突然変異誘発を行うことができる。標的とされる V L C D R 内で 3 個のアミノ酸をコードする縮重一本鎖オリゴヌクレオチドで V L C D R の一部を置換することにより、このインビボ親和性突然変異を行うことができる。酵母中での相同組換えにより、新しい無作為配列による C D R の一部の置換（最大 8 0 0 0 の可能性）を行うことができる（例えば実施例 5 参照）。s c F v に関連して h B N P 又は h B N P 断片への結合についてこれらの無作為突然変異 V L セグメントを分析することができ；改善された蛍光を示し、(a) 2 0 0 4 年 1 2 月 2 1 日に A . T . C . C . に寄託され、A . T . C . C . 受託番号 P T A - 6 4 7 6 が割り当てられ、2 0 0 6 年 8 月 1 7 日に公開された米国特許公開 2 0 0 6 / 0 1 8 3 1 5 4 に記載されている 3 - 6 3 1 - 4 3 6 により産生される抗体と比較した場合、その平衡解離定数 (K_D) が、少なくとも約 2 倍改善、少なくとも約 3 倍改善、少なくとも約 5 倍改善、少なくとも約 1 0 倍改善、少なくとも約 1 5 倍改善、少なくとも約 2 0 倍改善、少なくとも約 2 5 倍改善、少なくとも約 3 0 倍改善、少なくとも約 3 5 倍改善、少なくとも約 4 0 倍改善、少なくとも約 4 5 倍改善、少なくとも約 5 0 倍改善、少なくとも約 5 5 倍改善、少なくとも約 6 0 倍改善、少なくとも約 7 0 倍改善又は少なくとも約 7 5 倍改善で、h B N P 又はその h B N P 断片のアミノ酸残基 5 から 1 3 を含有するエピトープに結合し、(b) 少なくとも約 $1.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $3.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $7.8 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $8.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ の k_{on} (又は K_a) を有し、又は約 $1.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $1.95 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ まで、約 $2.70 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $9.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ まで、又は約 $7.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から約 $9.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ までの範囲の k_{on} (又は K_a) を有し (但し、 k_{on} が $1.6 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $5.4 \times 10^{-4} s^{-1}$ 又は $6.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $6.7 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $8.4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.9 \times 10^{-3} s^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $8.4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $2.9 \times 10^{-3} s^{-1}$ ではなく、 k_{on} が $5.8 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $1.6 \times 10^{-3} s^{-1}$ ではなく、又は k_{on} が $1.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であれば、 k_{off} は $4.1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ではない。) を有し、又は少なくとも約 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ の、少なくとも約 $6.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ の、少なくとも約 $5.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ の、少なくとも約 $4.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ の、少なくとも約 $7.5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $5.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ の、少なくとも約 $2.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ の、少なくとも約 $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ の、少なくとも約 1.0×1

20

30

40

50

$0 \cdot 6 \text{ s}^{-1}$ の k_{off} (又は k_d) を有し、若しくは $2 \cdot 0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1 \cdot 0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、 $1 \cdot 0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1 \cdot 0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 若しくは $1 \cdot 0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $8 \cdot 5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の範囲の k_{off} (又は k_d) を有し、又は少なくとも約 $3 \cdot 5 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1 \cdot 0 \times 10^{-13} \text{ M}$ まで、約 $2 \cdot 8 \times 10^{-10} \text{ M}$ から約 $1 \cdot 0 \times 10^{-12} \text{ M}$ まで、 $2 \cdot 15 \times 10^{-10} \text{ M}$ から $1 \cdot 0 \times 10^{-11} \text{ M}$ まで若しくは $1 \cdot 6 \times 10^{-10} \text{ M}$ から $1 \cdot 0 \times 10^{-10} \text{ M}$ までの範囲の K_D を有する、 $scFv$ を単離し、配列決定により CDR 突然変異を同定することができる。

【0166】

組換え $scFv$ ディスプレイライブラリーのスクリーニング後、所望の特性を有するクローンを変換のために選択する。選択した抗体をコードする核酸分子をディスプレイパッケージから (例えば酵母発現ベクターから) 回収し、標準的な組換え DNA 技術により、その他の発現ベクターにサブクローニングすることができる。必要に応じて、本発明のその他の抗体形態を作製するために、核酸をさらに操作することができる (例えば、さらなる定常領域などのさらなる免疫グロブリンドメインをコードする核酸に連結する。)。上記セクション IV で詳述したように、コンビナトリアルライブラリーのスクリーニングにより単離された組換えヒト抗体を発現させるために、抗体をコードする DNA を組換え発現ベクターにクローニングし、哺乳動物宿主細胞に導入する。

10

【0167】

VI . 免疫アッセイ

別の態様において、本発明は、試験試料中の $hBNP$ 又は $hBNP$ 断片の定性及び / 又は定量的検出のために使用することができる免疫アッセイに関する。当技術分野で公知である何らかの方式を用いて (以下に限定されないが、サンドイッチ方式、競合阻害方式 (フォワード又はリバース競合阻害アッセイの両方を含む。)) 又は蛍光偏向方式など、本発明の免疫アッセイを行うことができる。

20

【0168】

試験試料中の $hBNP$ 又は $hBNP$ 断片の定性検出のための免疫アッセイにおいて、抗体 - $hBNP$ 免疫複合体を形成させるために、 $hBNP$ 又は $hBNP$ 断片を含有する疑いがあるか又は含有することが知られている少なくとも1つの試験試料に、 $hBNP$ 又はその $hBNP$ 断片のある一定のエピトープに結合する少なくとも1つの抗体を接触させる。少なくとも1つの試験試料中でこのような抗体 - $hBNP$ 免疫複合体を形成させるためのこのような免疫アッセイにおいて、本明細書中のセクション II に記載の抗体を使用することができる。次に、当業者にとって公知の通常の技術を用いて、これらの免疫複合体を検出することができる。例えば、抗体 - $hBNP$ 複合体の有無を検出するための検出可能な標識を用いて本発明の抗体を標識することができる。あるいは、検出可能な標識で試験試料中の $hBNP$ 又は $hBNP$ 断片を標識し、当業者にとって公知の通常の技術を用いて、得られた抗体 - $hBNP$ 免疫複合体を検出することができる。検出可能な標識及び抗体へのそれらの結合を以下で詳細に述べる。

30

【0169】

あるいは、 $hBNP$ 又は $hBNP$ 断片に結合し、検出可能な標識を含有する二次抗体を試験試料に添加し、抗体 - $hBNP$ 複合体の存在を検出するために使用することができる。当技術分野で公知である何れかの検出可能な標識を使用することができる。検出可能な標識及び抗体へのそれらの結合を以下で詳細に述べる。

40

【0170】

サンドイッチ型の方式などの BNP の定量検出のための免疫アッセイにおいて、試験試料中で $hBNP$ 又は $hBNP$ 断片を分離し、定量するために、少なくとも2種類の抗体を利用する。より具体的には、これら少なくとも2つの抗体を有する免疫アッセイは、免疫複合体を形成する $hBNP$ 又は $hBNP$ 断片のある一定のエピトープに結合する (これは「サンドイッチ」と呼ばれる。)。一般に、試験試料中で $hBNP$ 又は $hBNP$ 断片を捕捉するために、1以上の抗体を使用することができ (これらの抗体は「捕捉」抗体と呼ばれることが多い。)、検出可能な (すなわち定量可能な) 標識をサンドイッチに結合させ

50

るために、1以上の抗体を使用する（これらの抗体は「検出」抗体と呼ばれることが多い）。サンドイッチアッセイでは、その個々のエピトープに対するアッセイにおいて、何らかのその他の抗体の結合によってそれらのエピトープに結合する両抗体を減少させないことが好ましい。言い換えると、hBNP又はhBNP断片を含有する疑いのある試験試料と接触させる1以上の第一の抗体が、第二又は次の抗体により認識されるエピトープの全て又は一部と結合せず、それにより1以上の第二の検出抗体がhBNP又はhBNP断片に結合する能力を妨害しないよう、抗体を選択すべきである。

【0171】

本発明者らは、本発明の抗体を用いて優れたサンドイッチ免疫アッセイを行うことができることを見出した。より具体的には、該免疫アッセイにおいて、第一の抗体として本発明の抗体を使用することができる。好ましくは、本発明の抗体は、(a)約 4.2×10^{-11} Mから約 7.4×10^{-13} Mの間の K_D で、hBNP又はhBNP断片の5-13の少なくとも3個のアミノ酸を含有するエピトープに免疫特異的に結合し、(b)少なくとも約 3.5×10^{-10} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、約 2.8×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mまで、約 2.15×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-11} Mまで、若しくは約 1.6×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-10} Mまでの範囲の K_D でhBNP又はhBNP断片の13から18の少なくとも3個のアミノ酸を含有するエピトープに免疫特異的に結合する。場合により、本発明の抗体に加えて、該免疫アッセイは、hBNPのアミノ酸27-32の少なくとも3個のアミノ酸を含有するアミノ酸配列を有するエピトープに免疫特異的に結合する、二次、三次、四次又はより高次の抗体、好ましくは1つ又はそれ以上のモノクローナル抗体、を含むことができる。hBNPのアミノ酸27-32を含有するアミノ酸配列を有するエピトープに免疫特異的に結合するモノクローナル抗体の例は、ハイブリドーマ細胞株BC203により産生されるモノクローナル抗体である。

【0172】

好ましい実施形態において、少なくとも1種類の第一の捕捉抗体及び少なくとも1種類の第二の検出抗体と、同時に又は連続して、hBNP又はhBNP断片を含有する疑いのある試験試料を接触させることができる。サンドイッチアッセイ方式において、第一の抗体-hBNP複合体の形成が可能な条件下で、hBNP又はhBNP断片を含有する疑いのある試験試料を、特定のエピトープに特異的に結合する少なくとも1種類の第一の捕捉抗体と最初に接触させる。複数の捕捉抗体を使用する場合、第一の多重捕捉抗体-hBNP複合体が形成される。サンドイッチアッセイにおいて、抗体、好ましくは、少なくとも1種類の捕捉抗体、を試験試料中で予想されるhBNP又はhBNP断片の最大量のモル濃度過剰量で使用する。例えば、微小粒子被覆緩衝液1 mLにつき、抗体 約 $5 \mu\text{g/mL}$ から約 1mg/mL を使用することができる。

【0173】

場合によっては、少なくとも1種類の第一の捕捉抗体と試験試料を接触させる前に、試験試料から第一の抗体-hBNP複合体の分離を容易にする固体支持体に少なくとも1種類の第一の捕捉抗体を結合させることができる。以下に限定されないが、ウェル、試験管又はビーズの形態のポリマー性物質から作られた固体支持体を含む、当技術分野で公知である何れかの固体支持体を使用することができる。吸着により、化学カップリング剤を用いた共有結合により、又は当技術分野で公知であるその他の手段により、抗体（又は複数の抗体）を固体支持体に結合させることができるが、ただし、このような結合は、抗体のhBNP又はhBNP断片への結合能を妨害しない。さらに、必要に応じて、抗体の様々な官能基との反応性を与えるために、固体支持体を誘導体化することができる。このような誘導体化には、以下に限定されないが、無水マレイン酸、N-ヒドロキシスクシンイミド及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどの、ある種のカップリング剤の使用が必要である。

【0174】

hBNP又はhBNP断片を含有する疑いのある試験試料を少なくとも1種類の第一の

捕捉抗体と接触させた後、第一の捕捉抗体（又は多重抗体）- hBNP複合体の形成を可能にするために、試験試料を温置する。約2 から約45 の温度で、約4.5 から約10.0のpHで、少なくとも約1分から約18時間、好ましくは約2から6分間、最も好ましくは約3から4分間、温置を行うことができる。

【0175】

第一/多重捕捉抗体-hBNP複合体の形成後、次に、少なくとも1種類の第二の検出抗体とこの複合体を接触させる（第一/多重抗体-hBNP-第二抗体複合体の形成が可能な条件下）。第一の抗体-hBNP複合体を複数の検出抗体と接触させる場合、第一/多重捕捉抗体-hBNP-多重抗体検出複合体が形成される。第一の抗体と同様に、少なくとも第二の（及び続く）抗体を第一の抗体-hBNP複合体と接触させる場合、第一/多重抗体-hBNP-第二/多重抗体複合体の形成のために、上述のものと同様の条件下での温置時間が必要である。好ましくは、少なくとも1つの第二の抗体は、検出可能な標識を含有する。第一/多重抗体-hBNP-第二/多重抗体複合体の形成前、これと同時に又はこの後に、少なくとも1種類の第二の抗体に検出可能な標識を結合させることができる。当技術分野で公知である何らかの検出可能な標識を使用することができる。例えば、検出可能な標識は、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²P、³³Pなどの放射性標識、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリペルオキシダーゼ、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼなどの酵素標識、アクリジニウムエステル、ルミナル、イソルミノール、チオエステル、スルホンアミド、フェナントリジニウムエステルなどの化学発光標識、フルオレセイン（5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロフルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネートなど）、ローダミン、フィコピリタンパク質、R-フィコエリスリン、量子ドット（硫化亜鉛キャップ付きカドミウムセレニド）などの蛍光標識、温度による標識又は免疫ポリメラーゼ連鎖反応標識であり得る。標識、標識手段及び標識の検出に対する導入は、Polak及びVan Noorden、Introduction to Immunocytochemistry、第2版、Springer Verlag、N.Y.（1997）及びHaugland、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals（1996）（これは、Molecular Probes, Inc.、Eugene、Oregonにより出版されているハンドブック兼カタログである。）において見出される。

【0176】

直接又はカップリング剤を介しての何れかで、検出可能な標識を抗体に結合させることができる。使用できるカップリング剤の例は、Sigma-Aldrich、St. Louis、MOから市販されているEDAC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド、塩酸塩）である。使用できるその他のカップリング剤は当技術分野で公知である。検出可能な標識を抗体に結合させるための方法は当技術分野で公知である。さらに、検出可能な標識を抗体にカップリングさせるのを容易にする末端基を既に含有する多くの検出可能な標識を購入又は合成することができる（例えば、N10-（3-スルホプロピル）-N-（3-カルボキシプロピル）-アクリジニウム-9-カルボキサミドなど、あるいはCPSP-アクリジニウムエステル又はN10-（3-スルホプロピル）-N-（3-スルホプロピル）-アクリジニウム-9-カルボキサミドとして知られているか、あるいはSPSP-アクリジニウムエステルとして知られている。）。

【0177】

標識の定量前に、第一の抗体/多重-hBNP-第二/多重抗体複合体を試験試料の残りの部分から分離することができる（分離しなければならないということではない。）。例えば、少なくとも第一の捕捉抗体がウェル又はビーズなどの固体支持体に結合している場合、固体支持体と（試験試料からの）液体を引き離すことにより分離を行うことができる。あるいは、少なくとも第一の捕捉抗体が固体支持体に結合している場合、第一（多重）抗体-hBNP-第二（多重）抗体複合体を形成させるために、第一の捕捉抗体をhB

NP含有試料及び少なくとも1種類の第二の検出抗体と同時に接触させ、次いで固体支持体と液体(試験試料)を引き離し得る。少なくとも一次捕捉抗体が固体支持体に結合していない場合、標識量の定量のために、第一の抗体/多重-hBNP-第二/多重抗体複合体を試験試料から除去する必要はない。

【0178】

標識された第一の抗体-hBNP-第二の抗体複合体の形成後、当技術分野で公知の技術を用いて複合体中の標識の量を定量する。例えば、酵素標識を使用する場合、発色などの定量可能な反応を起こす標識に対する基質と標識化複合体を反応させる。標識が放射性標識である場合、シンチレーションカウンターを用いて標識を定量する。標識が蛍光標識である場合、ある色の光(「励起波長」として知られている。)で標識を刺激し、刺激に対して反応して標識により発光される別の色(「発光波長」として知られている。)で検出することにより標識を定量する。標識が化学発光標識である場合、視覚的に、又は照度計、x線フィルム、高速写真フィルム、CCDカメラなどを用いて、発光される光を検出して標識を定量する。複合体中の標識の量を定量したら、既知の濃度のhBNP又はhBNP断片の連続希釈液を用いて作成された標準曲線を使用して、試験試料中のhBNP又はhBNP断片の濃度を調べる。hBNP又はhBNP断片の連続希釈液を用いること以外に、重量測定法、マススペクトロメトリー及び当技術分野で公知のその他の技術により、標準曲線を作成することができる。

10

【0179】

フォワード競合方式において、hBNP抗体(本発明の抗体など)への結合に対して試験試料中でhBNP又はhBNP断片と競合させるために、既知の濃度の、標識したhBNP、hBNP断片又はそのhBNP類似体の一定分量を使用する。hBNP、hBNP断片及びそのhBNP類似体のペプチド及び、hBNP、hBNP断片及びそのhBNP類似体のペプチドを作製する方法は、当技術分野で公知である(例えば米国特許第6,162,902号参照)。さらに、本明細書中の実施例に記載のように、前記競合方式において、環状hBNP(1-32)を使用することもできる。

20

【0180】

フォワード競合アッセイにおいて、固定化抗体(本発明の抗体など)を連続的又は同時の何れかで、試験試料及び標識化hBNP、hBNP断片又はそのhBNP類似体と接触させることができる。サンドイッチアッセイ方式に関連して、上記で述べた検出可能な標識を含む、当業者にとって公知の何れかの検出可能な標識で、hBNPペプチド、hBNP断片又はそのhBNP類似体を標識することができる。このアッセイにおいて、本明細書中で既に述べた技術を用いて固体支持体に本発明の抗体を固定化することができる。あるいは、微小粒子などの固体支持体に固定化されている抗種(antisppecies)抗体などの抗体に本発明の抗体をカップリングさせることができる(実施例3及び7参照)。

30

【0181】

サンドイッチアッセイ方式に関連して上述したものと同様の条件下で、標識化hBNPペプチド、hBNP断片又はhBNP類似体、試験試料及び抗体を温置する。次に、抗体-hBNP複合体の2種類の異なる種を生成させる。具体的に、生成した抗体-hBNP複合体の1つは検出可能な標識を含有し、一方、他方の抗体-hBNP複合体は検出可能な標識を含有しない。検出可能な標識の定量前に、抗体-hBNP複合体を試験試料の残りの部分から分離することができる(分離しなければならないということではない)。抗体-hBNP複合体が試料の残りの部分から分離されているか否かにかかわらず、次に抗体-hBNP複合体中の検出可能な標識の量を定量する。次いで、抗体-hBNP複合体中の検出可能な標識の量を標準曲線に対して比較することにより、試験試料中のhBNP又はhBNP断片の濃度を調べる。既知の濃度のhBNP又はhBNP断片の連続希釈液を用いて、マススペクトロメトリー、重量測定法、及び当技術分野で公知のその他の技術により、標準曲線を作成することができる。

40

【0182】

50

サンドイッチアッセイ方式に関連して上記で述べた固体支持体などの固体支持体に抗体を結合させることにより、試験試料から抗体-hBNP複合体を分離し、次いで、固体支持体と試験試料の残りを引き離すことができる。

【0183】

抗体との結合に対して試験試料中のhBNP又はhBNP断片との競合のために使用される標識化hBNP(又はhBNP断片又はそのhBNP類似体)は、無傷のhBNP 1-32、その何らかのhBNP断片(ただし、該hBNP断片は、hBNPのアミノ酸5-13、5-12、5-11、5-10、5-9、5-8、5-7、6-13、6-12、6-11、6-10、6-9、6-8、7-13、7-13、7-11、7-10、7-9、8-13、8-12、8-11、8-10、9-13、9-12、9-11、10-13、10-12又は11-13を含有(含む、及びその間を意味する。)する少なくとも1つのアミノ酸配列を含む。)又は何らかのhBNP類似体であり得る(ただし、該hBNPペプチド、hBNP断片又はhBNP類似体は、抗体により認識されるエピトープに対応するアミノ酸配列を含有する。)。好ましくは、使用される抗体は、(a)hBNPのアミノ酸5-13の少なくとも3個(3)のアミノ酸残基を含むエピトープに特異的に結合し(本発明の抗体、具体的にはCHO細胞株106.3AM1により産生される抗体など)、すなわち、hBNPのアミノ酸5-13、5-12、5-11、5-10、5-9、5-8、5-7、6-13、6-12、6-11、6-10、6-9、6-8、7-13、7-13、7-11、7-10、7-9、8-13、8-12、8-11、8-10、9-13、9-12、9-11、10-13、10-12又は11-13を含有する(含む及びその間を意味する。)アミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し、(b)hBNPの13-18のアミノ酸残基の少なくとも3個(3)のアミノ酸残基を含むエピトープに特異的に結合し(本発明の抗体、具体的にはCHO細胞株3-631-436AM5又は3-631-436AM8により産生される抗体など)、約 3.5×10^{-10} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、約 2.8×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mまで、約 2.15×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-11} Mまで、若しくは約 1.6×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-10} Mまでの範囲の K_D で、アミノ酸13-18、13-17、13-16、13-15、14-18、14-17、14-16、15-18、15-17若しくは16-18を含有する(含む及びその間を意味する。)アミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し、又は(c)(a)及び(b)のあらゆる組み合わせに特異的に結合する。標識して、本発明で使用することができるhBNP断片の例には、以下に限定されないが、hBNPのアミノ酸1-31、1-30、1-29、1-28、1-27、1-26、1-25、1-24、1-23、1-22、1-21、1-20、1-19、1-18、1-17、1-16、1-15、2-32、2-31、2-30、2-29、2-28、2-27、2-26、2-25、2-24、2-23、2-22、2-21、2-20、2-19、2-18、2-17、2-16、2-15、2-14、2-13、2-12、2-11、2-10、2-9、2-8、2-7、3-32、3-31、3-30、3-29、3-28、3-27、3-26、3-25、3-24、3-23、3-32、3-21、3-20、3-19、3-18、3-17、3-16、3-15、3-14、3-13、3-12、3-11、3-10、3-9、3-8、4-32、4-31、4-30、4-29、4-28、4-27、4-26、4-25、4-24、4-23、4-22、4-21、4-20、4-19、4-18、4-17、4-16、4-15、4-14、4-13、4-12、4-11、4-10、4-9、5-32、5-31、5-30、5-29、5-28、5-27、5-26、5-25、5-24、5-23、5-22、5-21、5-20、5-19、5-18、5-17、5-16、5-15、5-14、5-13、5-12、5-11、5-10、6-32、6-31、6-30、6-29、6-28、6-27、6-26、6-25、6-24、6-23、6-22、6-21、6-20、6-19、6-18、6-17、6-16、6-15、6-14、6-13、6-12、6-11、7-32、7-31、7-30、7-29、7-28、7-27、7-26、7-25、7-24、7-23、7-22、7

10

20

30

40

50

- 21、7 - 20、7 - 19、7 - 18、7 - 17、7 - 16、7 - 15、7 - 14、7 - 13、7 - 12、8 - 32、8 - 31、8 - 30、8 - 29、8 - 28、8 - 27、8 - 26、8 - 25、8 - 24、8 - 23、8 - 22、8 - 21、8 - 20、8 - 19、8 - 18、8 - 17、8 - 16、8 - 15、8 - 14、8 - 13、9 - 32、9 - 31、9 - 30、9 - 29、9 - 28、9 - 27、9 - 26、9 - 25、9 - 24、9 - 23、9 - 22、9 - 21、9 - 20、9 - 19、9 - 18、9 - 17、9 - 16、9 - 15、9 - 14、10 - 32、10 - 31、10 - 30、10 - 29、10 - 28、10 - 27、10 - 26、10 - 25、10 - 24、10 - 23、10 - 22、10 - 21、10 - 20、10 - 19、10 - 18、10 - 17、10 - 16、10 - 15、11 - 32、11 - 31、11 - 30、11 - 29、11 - 28、11 - 27、11 - 26、11 - 25、11 - 24、11 - 23、11 - 22、11 - 21、11 - 20、11 - 19、11 - 18、11 - 17又は11 - 16を含有するアミノ酸配列を有するペプチド断片が含まれる。

10

【0184】

リバー競争アッセイにおいて、固定化hBNPペプチド、hBNP断片又はそのhBNP類似体を連続的又は同時の何れかで、試験試料及び少なくとも1つの標識化抗体と接触させることができる。好ましくは、抗体は、(a) hBNPの5 - 13のアミノ酸残基の少なくとも3個(3)のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し(本発明の抗体、具体的にはCHO細胞株106.3AM1により産生される抗体など)、又はhBNPのアミノ酸5 - 13、5 - 12、5 - 11、5 - 10、5 - 9、5 - 8、5 - 7、6 - 13、6 - 12、6 - 11、6 - 10、6 - 9、6 - 8、7 - 13、7 - 13、7 - 11、7 - 10、7 - 9、8 - 13、8 - 12、8 - 11、8 - 10、9 - 13、9 - 12、9 - 11、10 - 13、10 - 12若しくは11 - 13を含有する(含む及びその間を意味する。)アミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し、(b) hBNPの13 - 18のアミノ酸残基の少なくとも3個(3)のアミノ酸残基を含むエピトープに特異的に結合し(本発明の抗体、具体的にはCHO細胞株3 - 631 - 436AM5又は3 - 631 - 436AM8により産生される抗体など)、約 3.5×10^{-10} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、約 2.8×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mまで、約 2.15×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-11} Mまで、若しくは約 1.6×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-10} Mまでの範囲の K_D で、アミノ酸13 - 18、13 - 17、13 - 16、13 - 15、14 - 18、14 - 17、14 - 16、15 - 18、15 - 17若しくは16 - 18を含有する(含む及びその間を意味する。)アミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し、又は(a)及び(b)のあらゆる組み合わせに特異的に結合する。hBNPのアミノ酸残基5 - 13の少なくとも3個の(3)アミノ酸残基を含有するエピトープに特異的に結合する抗体の例は、CHO細胞株106.3AM1により産生される抗体である。hBNPのアミノ酸残基13 - 18の少なくとも3個の(3)アミノ酸残基を含有するエピトープに特異的に結合する抗体の例は、CHO細胞株3 - 631 - 436AM5又は3 - 631 - 436AM8により産生される抗体である。これらの抗体の何れもが(106.3AM1、3 - 631 - 436AM5又は3 - 631 - 436AM8)、当業者に公知のあらゆる検出可能な標識(サンドイッチアッセイ方式に関連して上で論述されている検出可能な標識を含む。)で標識され得る。

20

30

40

【0185】

hBNPペプチド、hBNP断片又はhBNP類似体をサンドイッチアッセイ方式に関連して上記で述べた固体支持体などの固体支持体に結合させることができる。好ましくは、このhBNPペプチド断片は、hBNPのアミノ酸5 - 13、5 - 12、5 - 11、5 - 10、5 - 9、5 - 8、5 - 7、6 - 13、6 - 12、6 - 11、6 - 10、6 - 9、6 - 8、7 - 13、7 - 13、7 - 11、7 - 10、7 - 9、8 - 13、8 - 12、8 - 11、8 - 10、9 - 13、9 - 12、9 - 11、10 - 13、10 - 12又は11 - 13を含有するアミノ酸配列を有する。

【0186】

50

サンドイッチアッセイ方式に関連して上記で述べたものと同様の条件下で、固定化hBNPペプチド、hBNPペプチド断片又はそのhBNP類似体、試験試料及び少なくとも1つの標識化抗体を温置する。次に、2種類の異なる種のhBNP-抗体複合体を生成させる。具体的に、生成させたhBNP-抗体複合体の1つは固定化され、検出可能な標識を含有し、一方、他方のhBNP-抗体複合体は固定化されておらず、検出可能な標識を含有する。洗浄など、当技術分野で公知の技術により、非固定化hBNP-抗体複合体及び試験試料の残りの部分を固定化hBNP-抗体複合体から除去する。非固定化hBNP抗体複合体を除去したら、次に、固定化hBNP-抗体複合体中の検出可能な標識の量を定量する。次に、hBNP-複合体中の検出可能な標識の量を標準曲線と比較することにより、試験試料中のhBNP又はhBNP断片の濃度を調べることができる。既知の濃度のhBNP又はhBNP断片の連続希釈液を用いて、マススペクトロメトリー、重量測定法によって、及び当技術分野で公知のその他の技術によって、標準曲線を作成することができる。

10

【0187】

蛍光偏光アッセイにおいて、ある実施形態で、非標識化hBNP-抗体複合体を形成させるために、hBNP又はそのhBNP断片を含有する疑いのある非標識化試験試料と抗体又は機能的に活性のあるその断片を最初に接触させる。次に、非標識化hBNP-抗体複合体を蛍光標識したhBNP、hBNP断片又はそのhBNP類似体に接触させる。標識化hBNP、hBNP断片又はhBNP類似体は、抗体又は機能的に活性のあるその断片への結合に対して、試験試料の何れかの非標識化hBNP又はhBNP断片と競合する。形成された標識化hBNP-抗体複合体の量を調べ、標準曲線を使用して、試験試料中のhBNPの量を調べる。

20

【0188】

好ましくは、蛍光偏光アッセイで使用する抗体は、(a) hBNPの5-13のアミノ酸残基の少なくとも3個(3)のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し(本発明の抗体、具体的にはCHO細胞株106.3AM1により産生される抗体など)、すなわち、hBNPのアミノ酸5-13、5-12、5-11、5-10、5-9、5-8、5-7、6-13、6-12、6-11、6-10、6-9、6-8、7-13、7-13、7-11、7-10、7-9、8-13、8-12、8-11、8-10、9-13、9-12、9-11、10-13、10-12若しくは11-13を含有する(含む及びその間を意味する。)アミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し、(b) 約 3.5×10^{-10} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、好ましくは約 2.8×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mまで、より好ましくは約 2.15×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-11} Mまで、さらに好ましくは約 1.6×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-10} Mまでの範囲の K_D で、hBNPの13-18のアミノ酸残基の少なくとも3個(3)のアミノ酸残基を含むエピトープに特異的に結合し(本発明の抗体、具体的にはCHO細胞株3-631-436AM5又は3-631-436AM8により産生される抗体など)、すなわち、アミノ酸13-18、13-17、13-16、13-15、14-18、14-17、14-16、15-18、15-17又は16-18を含有する(含む及びその間を意味する。)アミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し、又は(c) (a)及び(b)のあらゆる組み合わせを有するエピトープに特異的に結合する。hBNPのアミノ酸残基5-13の少なくとも3個の(3)アミノ酸残基を含有するエピトープに特異的に結合する抗体の例は、CHO細胞株106.3AM1により産生されるモノクローナル抗体である。hBNPのアミノ酸残基13-18の少なくとも3個の(3)アミノ酸残基を含有するエピトープに特異的に結合する抗体の例は、CHO細胞株3-631-436AM5又は3-631-436AM8により産生されるモノクローナル抗体である。

30

40

【0189】

好ましくは、hBNPペプチド断片は、hBNPのアミノ酸5-13、5-12、5-11、5-10、5-9、5-8、5-7、6-13、6-12、6-11、6-10、

50

6 - 9、6 - 8、7 - 13、7 - 13、7 - 11、7 - 10、7 - 9、8 - 13、8 - 12、8 - 11、8 - 10、9 - 13、9 - 12、9 - 11、10 - 13、10 - 12又は11 - 13を含有するアミノ酸配列を有する。サンドイッチアッセイ方式に関連して上記で述べたものと同様の条件下で、抗体、標識化hBNPペプチド、hBNPペプチド断片又はそのhBNP類似体及び試験試料及び少なくとも1つの標識化抗体を温置する。

【0190】

あるいは、別の実施形態において、標識化hBNP - 抗体複合体及び非標識化hBNP - 抗体複合体の両方を形成させるために、蛍光標識化hBNP、hBNP断片又はそのhBNP類似体と、hBNP又はそのhBNP断片を含有する疑いのある非標識化試験試料と、抗体又は機能的に活性のあるその断片と、を同時に接触させる。形成された標識化hBNP - 抗体複合体の量を調べ、標準曲線を使用して試験試料中のhBNPの量を調べる。この免疫アッセイで使用する抗体は、(a) hBNPの5 - 13のアミノ酸残基の少なくとも3個(3)のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し(本発明の抗体、具体的にはCHO細胞株106.3AM1により産生される抗体など)、すなわち、hBNPのアミノ酸5 - 13、5 - 12、5 - 11、5 - 10、5 - 9、5 - 8、5 - 7、6 - 13、6 - 12、6 - 11、6 - 10、6 - 9、6 - 8、7 - 13、7 - 13、7 - 11、7 - 10、7 - 9、8 - 13、8 - 12、8 - 11、8 - 10、9 - 13、9 - 12、9 - 11、10 - 13、10 - 12若しくは11 - 13を含有する(含む及びその間を意味する。)アミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し、(b) 約 3.5×10^{-10} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、好ましくは約 2.8×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mまで、より好ましくは約 2.15×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-11} Mまで、さらに好ましくは約 1.6×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-10} Mまでの範囲の K_D で、hBNPの13 - 18のアミノ酸残基の少なくとも3個(3)のアミノ酸残基を含むエピトープに特異的に結合し(本発明の抗体、具体的にはCHO細胞株3 - 631 - 436AM5又は3 - 631 - 436AM8により産生される抗体など)、すなわち、アミノ酸13 - 18、13 - 17、13 - 16、13 - 15、14 - 18、14 - 17、14 - 16、15 - 18、15 - 17又は16 - 18を含有する(含む及びその間を意味する。)アミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し、又は(c) (a) 及び(b)のあらゆる組み合わせを有するエピトープに特異的に結合する。hBNPのアミノ酸5 - 13の少なくとも3個の(3)アミノ酸を含有するアミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合する抗体の例は、CHO細胞株106.3AM1により産生されるモノクローナル抗体である。hBNPのアミノ酸13 - 18の少なくとも3個の(3)アミノ酸を含有するアミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合する抗体の例は、CHO細胞株3 - 631 - 436AM5または3 - 631 - 436AM8により産生されるモノクローナル抗体である。

【0191】

あるいは、さらに別の実施形態において、標識化hBNP - 抗体複合体を形成させるために、抗体(CHO細胞株106.3AM1、CHO細胞株3 - 631 - 436AM5、CHO細胞株3 - 631 - 436AM8によって産生される抗体又はこれらのあらゆる組み合わせなどの、本発明の抗体など)により産生される抗体などの本発明の抗体など)又は機能的に活性のあるその断片を蛍光標識化hBNP、hBNP断片又はそのhBNP類似体と最初に接触させる。次に、hBNP又はそのhBNP断片を含有する疑いのある非標識化試験試料と標識化hBNP - 抗体複合体を接触させる。抗体又は機能的に活性のあるその断片への結合に対して、試験試料中のあらゆる非標識化hBNP又はhBNP断片が標識化hBNP、hBNP断片又はhBNP類似体と競合する。形成された標識化hBNP - 抗体複合体の量を調べ、標準曲線を使用して試験試料中のhBNPの量を調べる。この免疫アッセイで使用する抗体は、(a) hBNPの5 - 13のアミノ酸残基の少なくとも3個(3)のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し(本発明の抗体、具体的にはCHO細胞株106.3AM1により産生される抗体など)、すなわち、hBNPのアミノ酸5 - 13、5 - 12、5 - 11、5 - 10、5 - 9、5 -

8、5-7、6-13、6-12、6-11、6-10、6-9、6-8、7-13、7-13、7-11、7-10、7-9、8-13、8-12、8-11、8-10、9-13、9-12、9-11、10-13、10-12若しくは11-13を含有する(含む及びその間を意味する。)アミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し、(b)約 3.5×10^{-10} Mから 1.0×10^{-13} Mまで、好ましくは約 2.8×10^{-10} Mから 1.0×10^{-12} Mまで、より好ましくは約 2.15×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-11} Mまで、さらに好ましくは約 1.6×10^{-10} Mから約 1.0×10^{-10} Mまでの範囲の K_D で、hBNPの13-18のアミノ酸残基の少なくとも3個(3)のアミノ酸残基を含むエピトープに特異的に結合し(本発明の抗体、具体的にはCHO細胞株3-631-436AM5又は3-631-436AM8により産生される抗体など)、すなわち、アミノ酸13-18、13-17、13-16、13-15、14-18、14-17、14-16、15-18、15-17又は16-18を含有する(含む及びその間を意味する。)アミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合し、又は(c)(a)及び(b)のあらゆる組み合わせを有するエピトープに特異的に結合する。hBNPのアミノ酸5-13の少なくとも3個の(3)アミノ酸を含有するアミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合する抗体の例は、CHO細胞株106.3AM1により産生されるモノクローナル抗体である。hBNPのアミノ酸残基13-18の少なくとも3個の(3)アミノ酸残基を含有するエピトープに特異的に結合する抗体の例は、CHO細胞株3-631-436AM5又は3-631-436AM8により産生されるモノクローナル抗体である。

10

20

【0192】

VII. 医薬組成物及び医薬投与

本発明の抗体は、対象への投与に適切な医薬組成物中に配合することができる。通常、医薬組成物は、本発明の抗体の治療的又は予防的有効量を、医薬的に許容可能な担体又は賦形剤と共に含む。本明細書で使用する場合、「医薬的に許容可能な担体」又は「医薬的に許容可能な賦形剤」は、生理学的に適合する何らか又は全ての、溶媒、分散媒体、被覆剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などを含む。医薬的に許容可能な担体又は賦形剤の例には、水、生理食塩水、リン酸塩緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、ならびにこれらの組合せの1以上が含まれる。

30

【0193】

多くの場合、等張剤、例えば、糖、マンニトールなどのポリアルコール、ソルビトール、又は塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましい。抗体又は抗体部分の貯蔵期間又は有効性を高める、湿潤化剤又は乳化剤、保存料又は緩衝剤などの湿潤化物質又は少量の補助物質などの医薬的に許容可能な物質も含まれ得る。場合によっては、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸又はこれらの塩(アルギン酸ナトリウムなど)などの崩壊剤を含み得る。賦形剤に加えて、本医薬組成物は、血清アルブミンなどの担体タンパク質、緩衝剤、結合剤、甘味料及び他の香味料、着色料及びポリエチレングリコールの1以上を含み得る。

40

【0194】

本発明の組成物は、様々な形態であり得る。これらには、例えば、液体、半固体及び固体の剤形、例えば溶液(例えば、注射用及び点滴用溶液)、分散液又は懸濁液、錠剤、丸剤、粉末、リポソーム及び座薬などが含まれ得る。好ましい剤形は、意図する投与方法及び治療用途に依存する。通常的好ましい組成物は、注射用又は点滴用溶液、例えば他の抗体によるヒトの受動免疫法のために使用されるものと類似の組成物などである。好ましい投与方法は、非経口(例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内)である。好ましい実施形態において、抗体は静脈内点滴又は注射によって投与される。別の好ましい実施形態において、抗体又は抗体断片は、筋肉内又は皮下注射によって投与される。

40

【0195】

治療用組成物は、通常、製造及び貯蔵の条件下で無菌かつ安定でなければならない。本組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散剤、リポソーム又はその他の高い薬剤濃度

50

に適した秩序構造として処方することができる。滅菌注射用溶液は、活性化合物（すなわち抗体又は抗体断片）を、必要な量で、適切な溶媒中に、必要に応じて上記で列挙した成分の1つ又は組合せと共に配合し、続いて過滅菌することにより調製することができる。一般に、分散剤は、基本的な分散媒及び上記で列挙したのものからの必要なその他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に活性化合物を配合することにより調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分に何らかのさらなる所望の成分を加えた粉末を、予め過滅菌したこれらの溶液から得る、真空乾燥及び凍結乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することにより、分散剤の場合は必要な粒子サイズを維持することにより、及び、界面活性剤を使用することにより、維持することができる。組成物中に吸収を遅らせる物質、例えば、モノステアリン酸塩及びゼラチンを含むことにより、注射用組成物を持続的に吸収させるようにすることができる。

10

【0196】

本発明の抗体は、当技術分野で公知の様々な方法により投与することができるが、多くの治療用途に対して、好ましい投与の経路/方法は、静脈内注射又は点滴である。当業者にとって当然のことながら、投与の経路及び/又は方法は、所望の結果に依存して変化する。ある実施形態において、インプラント、経皮パッチ及びマイクロカプセル型送達系を含む制御放出製剤など、化合物を急速な放出から保護する担体を用いて活性化合物を調製し得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。この

20

【0197】

ある実施形態において、例えば不活性希釈剤又は同化可能な可食担体と共に、本発明の抗体を経口投与し得る。硬殻又は軟殻のゼラチンカプセル、圧縮錠剤、口腔錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハースなどに、この化合物（及び必要に応じてその他の成分）を封入し得る。本発明の抗体又は抗体断片を非経口投与以外によって投与するために、この化合物をその不活性化を防止する物質で被覆するか、又はこれらと一緒に投与することが必要であり得る。

30

【0198】

補助的な有効物質を組成物中に配合することもできる。ある実施形態において、抗体又は抗体部分を、1以上のさらなる治療剤と一緒に処方、及び/又は一緒に投与する。このような併用治療は、有利に、投与される治療剤のより少ない投与量を使用して、それ故に単剤療法に伴う毒性又は合併症の恐れを避け得るか、あるいは相乗的に又は相加的に治療効果を高め得る。

【0199】

投与レジメンは、最適の所望の反応が得られるように調節することができる（例えば、治療反応又は予防反応）。例えば、1回のボラス投与を行うか、数回に分けて時間をかけて投与するか又は投与量を治療状況の緊急性によって指示される通りに比例的に減量又は増量させ得る。投与の容易さ及び投与量の均一性のためには非経口の組成物を投与単位形態で処方することが特に有利である。本明細書で使用する場合、投与単位形態は、試験する哺乳動物対象に対する単位投与として適切な物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要な医薬担体とともに所望の治療効果を生じるように計算された活性化合物の予め定められた量を含有する。本発明の投与単位形態の仕様は、(a)活性化合物の特有の特徴及び達成しようとする特定の治療又は予防効果及び(b)個体における感受性の治療のためにこのような活性化合物を化合する技術に固有の制約により決定され、これらに直接依存する。

40

【0200】

50

本発明の抗体又は抗体部分の治療的又は予防的有効量に対する例となる限定的ではない範囲は、0.1 - 20 mg / kg、より好ましくは0.5 - 10 mg / kgである。投与量の値は、軽減しようとする症状のタイプ及び重症度によって変化し得ることに注意されたい。さらに、いかなる特定の対象に対しても、個体の必要性及び組成物を投与し投与を監督する者の専門的な判断に従って、投与期間にわたって、具体的な投与レジメンを調整すべきこと、及び本明細書で示した投与量範囲は単なる例であり、特許請求する組成物の範囲又は実施を制限するものではないことを理解されたい。

【0201】

ここで、例示により、限定的ではない、本発明の実施例を与える。

【実施例1】

【0202】

免疫グロブリン遺伝子の同定

サブクローニングされた抗BNP106.3ハイブリドーマ細胞（ハイブリドーマ細胞株106.3（A.T.C.C.受託番号HB-12044）は米国特許第6,162,902号に記載されている。）からメッセンジャーRNAを単離した。キットに含まれる免疫グロブリン遺伝子特異的プライマーとともにNovagen（Novagen（Merck KGAAの関連会社、Darmstadt, Germany）、カタログ番号69831-3）から購入したマウスIgプライマーセットキットを用いた逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応で106.3 mRNAを利用した。得られたPCR産物の配列決定を行い、このように、免疫グロブリン可変重及び可変軽鎖遺伝子を同定した（図3A-3E及び配列番号1参照）。

【0203】

pYD41ベクターへの106.3可変領域遺伝子のクローニング

酵母ディスプレイ系を使用して、酵母タンパク質AGA2への融合物として、酵母表面上で、非変異抗BNPタンパク質（本明細書中で後述）及び抗BNPタンパク質のライブラリーを発現させた。pYDと呼ばれる酵母ディスプレイベクター（Invitrogen Carlsbad, California）は、酵母接合因子であるAGA2遺伝子のC末端での抗BNP遺伝子のクローニングを可能にするので、これを使用した（Boder及びWitttrup, Nature Biotechnology, 15:553-557（1997年6月）参照）。pYDベクターのその他の重要な特性には、挿入された抗BNP遺伝子のC末端における、ガラクトース誘導性プロモーター及びエピトープタグ、V5が含まれる（図2及び図6A-6B参照）。

【0204】

酵母ディスプレイプラットフォームは、1本鎖可変断片として知られる抗体方式を利用する。scFv方式において、フレキシブルリンカーを介して可変重鎖ドメインを可変軽鎖ドメインに連結する（可変重鎖ドメイン-リンカーGPAKELTPLKEAKVS（配列番号4）-可変軽鎖ドメイン）（米国特許公開2004-0175379A1参照）。

【0205】

PCR単一オーバーラップ伸長（single overlap extension、SOE）を使用して、106.3 scFvコンストラクトに対して可変重鎖遺伝子（VH）及び可変軽鎖遺伝子（VL）を連結した（例えば、図4、6A-6B及び配列番号2参照）。ベクター制限部位SfiI及びNotIを用いて、酵母ディスプレイベクターpYD41に、106.3 scFv DNAをクローニングした。pYD41-106.3 scFvベクターをDH5 E.コリに形質転換した。次に、このE.コリからプラスミドDNAを単離し、106.3 scFvインサートの配列決定を行い、scFvが読み枠どおりにAGA2タンパク質とともにクローニングされていることを確認した。

【0206】

酵母ディスプレイベクターpYD41へのscFvに対するクローニング部位は、次の遺伝子を含むORFにある：AGA2-連結リンカー41-Xpressエピトープタグ

10

20

30

40

50

- 106 . 3 可変重鎖 - リンカー 40 - 106 . 3 可変軽鎖 - V5 エピトープタグ - 6 個の His。さらに、酵母株 EBY100 はトリプトファン栄養要求性株であり、pYD41 ベクターは、系の選択可能マーカーとしてトリプトファンをコードする。

【0207】

サッカロミセスセレビスエ (酵母、*Saccharomyces cerevisiae*) 株 EBY100 への形質転換

Gietz 及び Schiestl 法 (Schiestl 及び Gietz, *Current Genetics*, 16 (5-6) : 339-46 (1989年12月) 参照) を用いて、酵母ディスプレイプラスミド、pYD41-106.3scFv を *S.セレビスエ* EBY100 へと形質転換した。形質転換反応液の希釈液を選択用グルコースプレート (2% グルコース (0.67% 酵母窒素塩基、0.105% HSM-trp-ura、1.8% 細菌用寒天、18.2% ソルビトール、0.86% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、1.02% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)) にプレティングし、30℃ にて 48-72 時間温置した。選択用グルコース培地に個々のコロニーを播種し、30℃ にて 16-20 時間、振盪しながら増殖させた。細胞 / mL の 0.5 OD600 (1×10^7 個の細胞 / 0.5 OD / mL) を選択用ガラクトース培地に移すことにより、コロニーにおいてタンパク質発現を誘導した。20℃ にて 16-24 時間コロニーを振盪し、次いで、環状 BNP (「1-32c」と呼ぶ。) (配列番号 5) 及び抗-V5 への結合について、FACS Aria フローサイトメーターにより分析した。フローサイトメトリーアッセイのために、ピオチン化：環状 BNP (1-32c) (配列番号 5) 又は抗-V5 抗体とともに 106.3scFv を発現する酵母細胞を温置し、次いで、ストレプトアビジン：フィコエリスリン (SA:PE、BD Pharmingen) 又はヤギ抗マウス免疫グロブリン-Alexa Fluora 633 (GAM:633、Molecular Probes (これは Invitrogen Carlsbad, California の関連会社である。)) と温置した。図 7A-7B で示すフローサイトメトリーのヒストグラムは、106.3scFv (抗-V5 結合) の全長表面発現及び 106.3scFv の環状 BNP (1-32c) (配列番号 5) への結合を示す。

【0208】

酵母における、106.3scFv 及び 106.3 バリエントに対するオフ速度分析

室温にて 30-60 分間、ピオチン化環状 BNP 1-32c ($\sim 0.3 \mu\text{M}$) (配列番号 5) 100 倍モル過剰濃度及び抗-V5 抗体 ($2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) と 0.05 OD 酵母 (1×10^6 個の細胞) を温置することにより、酵母における 106.3scFv 及び 106.3 バリエントのオフ速度測定を行った。次に、1% ウシ血清アルブミンとともにリン酸緩衝生理食塩水を含むブロッキング緩衝液 (PBS/BSA) で細胞を 2 回洗浄し、様々な時間 (0、0.25 時間、0.5 時間、1 時間、2 時間、4.25 時間、25.5 時間、50 時間、75 時間及び 144 時間)、100 倍モル過剰濃度の非標識環状 BNP 1-32c (配列番号 5) とともに室温にて温置した (図 8 参照)。各時点で、酵母細胞を氷に移し、反応を停止させた。次に、PBS/BSA で細胞を 2 回洗浄し、二次染色試薬中で懸濁した (具体的に言うと、SA:PE 及び GAM:633。)。氷上で 30 分間、細胞を温置し、2 回洗浄し、次に FACS Aria フローサイトメーターで分析した。図 8 は、時間 (秒) に対して平均蛍光単位 (「MFI」) としてプロットしたオフ速度データを示す。データをフィットさせるために一次減衰式を使用した。図 8 で示されるこの式中のオフ速度 m_2 は $8.4 \cdot 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ にフィットし、R 値は 0.9993 であった。106.3 scFv 半減期 ($t_{1/2}$) は 137 分 ($t_{1/2} = \ln 2 / k_{off}$) であった。

【0209】

突然変異誘発ライブラリーからオフ速度が改善した 106.3 バリエントを同定するために、オフ速度選別ストラテジーを用いた。したがって、突然変異誘発ライブラリーを選別するのに適切な時間を定めるために、106.3 scFv、非変異又は野生型 (「wt」)、半減期を使用した。非標識環状 BNP (1-32c) (配列番号 5) の添加から

およそ3時間後、wt 106.3 scFvに対して述べた同じアッセイ条件を用いて、106.3突然変異誘発ライブラリーを選別した。

【0210】

106.3 CDR特異的ライブラリー(directed library)の作製
抗体106.3の3種類の重鎖及び3種類の軽鎖相補性決定領域(CDR)のループは主要な抗原接触部位なので、抗体106.3の3種類の重鎖及び3種類の軽鎖相補性決定領域(CDR)に対して突然変異誘発を行った(例えば、図3-6及び配列番号6-11参照)。Kabata命名法を用いて、CDRループ長及び付番を定めた。個々のライブラリーは、1つのライブラリー中、CDRの3ヶ所のアミノ酸位置が無作為に突然変異誘発され、突然変異誘発枠は1ライブラリーにつき1アミノ酸シフトしていた(図9参照)。個々のライブラリーに対するライブラリー多様性は、CDR位置ごとにサンプリングしたアミノ酸ごとに全部で 20^3 又は8,000個のバリエーションとなると予想される。106.3 scFvに対して、全部で54個のライブラリー(29個の可変重鎖及び25個の可変軽鎖ライブラリー)を作製した。

10

【0211】

ギャップのある線状化pYD41-106.3ベクター及び1本鎖オリゴヌクレオチドを化学的にコンピテントなEBY100酵母と組み合わせることにより、ライブラリーを作製した(図10参照)。ギャップのあるpYD41ベクターは、ライブラリー構築において1本鎖縮重オリゴヌクレオチドで置換されている各CDRの特異的な領域を欠失させるPCRにより作製されたベクターである。縮重1本鎖オリゴヌクレオチドは、90-105ヌクレオチド長であり、9個の縮重ヌクレオチド枠のそれぞれにおいてpYD41-106.3 scFvベクターに対して39-43ヌクレオチドのホモロジーを有する。全部で54個の各ライブラリーに対するオリゴヌクレオチドを合成した(図14A-H及び配列番号25-78参照)。ギャップのあるベクター(1 μ g)及び縮重オリゴヌクレオチド(16 μ g)をEBY100酵母(3e8個の細胞)と組み合わせ、Gietz及びSchiestlライブラリー形質転換プロトコール(Schiestl及びGietz、Current genetics、16(5-6):339-46(1989年12月))を用いて形質転換を行った。ヌクレオチド重複及び酵母の内在ギャップ修復の機構により促進される相同組換えのために、形質転換中に縮重オリゴヌクレオチド及びpYD41-106.3 scFvギャップベクターが環状になる。30にて48-72時間、選択用グルコース培地中でライブラリーを増殖させ、ライブラリー分類のためのタンパク質発現誘導前に再び選択用グルコース培地に入れた。

20

30

【0212】

106.3突然変異誘発CDRライブラリー

オフ速度分類ストラテジーに基づき106.3ライブラリーを分類した。106.3 CDR突然変異誘発ライブラリーをガラクトース発現培地中で20にて18-24時間誘導した。室温にて、PBS/BSAで106.3突然変異誘発ライブラリーを洗浄し、ピオチン化環状BNP(1-32c)(配列番号5)及び抗-V5抗体とともに温置し、2回洗浄し、非標識環状BNP(1-32c)(配列番号5)とともに温置した。3時間後、突然変異誘発ライブラリーを2回洗浄し、SA-PE(1:200希釈)及びGAM-633(1:200希釈)とともに30分間氷上で温置した。最後に、細胞を洗浄し、分析し、FACS Ariaで分類した。全長BNP結合クローンを分類するために、ゲートセットを用いて、3時間において、非変異106.3結合に基づきソートゲートを設定した。各ソートが、BNP結合集団の上位0.1-0.5%を回収した。分類した細胞を選択用グルコース培地中で増殖させ、30にて18-24時間増殖させた。ソート1細胞を誘導し、さらに1又は2回、分類を繰り返した。

40

【0213】

最後の分類後、分類した細胞を選択用グルコースプレートにプレーティングし、30にて72時間置いた。3種類のライブラリーがwt 106.3 scFvと比較して改善を示した:重鎖ライブラリーH28、軽鎖ライブラリーL1(1-5プール)及びL2(1

50

- 5 プール)。これらのライブラリーからの個々の酵母コロニーを選択用グルコース培地に接種し、凍結保存し、選択用ガラクトース培地中で誘導した。次に、個々のコロニーの特徴を調べ、オフ速度アッセイで順位付けした。

【0214】

選択した106.3バリエーションの分析

wt106.3 scFvに対して上記で述べたオフ速度アッセイにおいて、選択したクローンの特徴を最初に調べた。図11は、評価を行った各改善106.3 scFvバリエーションに対する一次減衰曲線から決定したオフ速度値を示す。全体的に、クローンのオフ速度は106.3 scFv wtクローンの2倍を超えて改善した。所望の最も遅いオフ速度を有するクローンは106.3 L1 B24 scFvであり、そのオフ速度は 6.7×10^{-6} 秒⁻¹であった。

10

【0215】

アミノ酸変異が発現されていることを調べるために、選択した106.3 scFvバリエーションの配列を調べた。最初に、酵母ミニプレップキット(カタログ番号D2001、Zymo Research Orange, CA)を用いてプラスミドDNAを酵母懸濁培養液から単離した。配列決定グレードのプラスミドDNAを得るために、酵母ミニプレップキットからのプラスミドをDH5 E.コリに形質転換し、次いでE.コリミニプレップキット(Qiagen)を用いて培養液から精製した。次いで、pYD41ベクター特異的プライマー(pYD41フォワード-TAGCATGACTGGTGGACAGC(配列番号79)及びpYD41リバーシ-CGTAGAATCGAGACCGAG(配列番号80))を用いて、純粋なプラスミドDNAの配列決定を行った。106.3 scFvバリエーションに対するヌクレオチド及びアミノ酸配列データを図12A-Cで示す。位置番号は、個々のCDRにおけるアミノ酸位置を指す(H2 Pos8はCDR H2の8番目のアミノ酸である。)

20

【0216】

CDR L1に対する配列データから、トリプトファン又は、チロシンもしくはフェニルアラニンなどのその他の大きな疎水性アミノ酸に対して位置4において強い優先傾向が示される。位置4の大きなアミノ酸残基は、106.3 scFvに対するオフ速度の実質的な改善に重要であり得る。環状BNP(1-32c)ペプチド(配列番号5)は、この大きなアミノ酸により捕捉されるようになり得、したがって、オフ速度が遅くなる。L2突然変異は両者とも、位置4にシステインを含有する。

30

【0217】

一時的又は安定発現系における106.3キメラ抗体のクローニング及び可溶性発現 pBOS(Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)と呼ばれる一時的発現ベクター系への106.3可変ドメインのクローニングを通じて、選択した106.3バリエーションをキメラマウス-ヒトIgG₁/ヒトカッパ抗体に変換した。より具体的には、PCRを用いて、別個のpBOSベクターへのクローニングのための制限部位のある可変重鎖遺伝子及び可変軽鎖遺伝子を増幅した(Mizushima及びNagata, Nucleic Acids Research, 18:5322, (1990))。消化済み/脱リン酸化ベクターに可変重鎖遺伝子及び可変軽鎖遺伝子を連結し、DH5 E.コリに形質転換した。E.コリからプラスミドDNAを精製し、リポフェクタミン(Invitrogen Carlsbad, California)又はエレクトロポレーションを用いてCOS-7細胞及び293H細胞に形質移入した。次の106.3バリエーション: wtキメラ、L1 B24キメラ、L1 16キメラ、L1 B24/H2 288キメラ及びL116/H2 288キメラに対して一時的抗体を発現させた。

40

【0218】

pBOS-106.3重鎖及び軽鎖ベクターを用いて、2段階のクローニング手順で安定なCHO細胞株プラスミドを作製した。最初に、制限酵素SrfI/NotIを用いて、pBV及びpJVプラスミド(Abbott Bioresearch Center

50

、Worcester, MA)において、ヒト定常遺伝子に対する読み枠どおりに、可変重鎖遺伝子及び可変軽鎖遺伝子をそれぞれ連結した。ライゲーション反応物をDH5 E・コリに形質転換し、続いて、プラスミドDNAを個々のコロニーから単離した。クローニング部位で、pBV-106.3 マウス可変重鎖-ヒトIgG1及びpJV-106.3 マウス可変軽鎖-ヒトカッパの配列決定を行った。

【0219】

第二のクローニング段階には、重鎖IgG₁遺伝子及び軽鎖カッパ遺伝子を1つの安定な細胞株ベクターに連結することが含まれた。pBV-106.3及びpJV-106.3ベクターをAscI/PacIで消化した。VL-ヒトカッパ定常及びVH-ヒトIgG1定常DNA断片をゲルで精製し、連結して、pBJ-106.3と呼ばれる安定な細胞株ベクターを作製した。リン酸カルシウムプロトコルを用いて、pBJ-106.3重鎖/軽鎖キメラプラスミドをCHO細胞に形質転換した。最初の形質転換から安定な細胞株をサブクローニングした。クローン106.3AM1に対して安定なCHO細胞株を開発し(「BNP106.3sc128am1CHO1162-236」及び「106.3L1B24/H2288キメラ」とも呼ばれる。)、本明細書中の実施例2で述べるようにA.T.C.C.に寄託した。

10

【0220】

改変キメラ106.3パリアントのBIAcoreによる特性の決定

アミンカップリング(アミノカップリングは当技術分野で周知である。例えば、Nordin、Hら、Analytical Biochemistry、340:359-368(2005J)を参照)によってヤギ抗ヒトFc(GAHFc)(Jackson Immunoresearch Laboratories、West Grove、PA)(抗種抗体)を前もって調整したBIAcore CM5チップ(Uppsala、Sweden)に固定化することにより、高密度ヤギ抗ヒトFc(GAHFc)抗体表面プラズマ共鳴(SPR)バイオセンサーを準備した。20µL/分で0.4M EDCと0.1 NHSとの1:1混合液を8分間注入して、カルボキシメチル-デキストランバイオセンサーを活性化する。10mM酢酸ナトリウム(pH5.0)中のGAHFcを10分間の注入により活性化表面にカップリングさせる。次に、1MエタノールアミンpH8.5で8分間この表面を不活性化し、次いでGAHFcをさらに10分間注入する。この後、100µL/分の流速での100mM H₃PO₄の20秒間の注入を10回行ってバイオセンサーの調整を行う。GAHFcの、~10.5 ICRU、共鳴単位を各フローセルでバイオセンサーにカップリングする。

20

30

【0221】

12mg/mL BSA及び12mg/mLカルボキシメチルデキストランナトリウム塩)を添加したSPRランニング緩衝液(BIAcore、Uppsala、Sweden)(脱気/真空ろ過HBS-EP(BIAcore、Sweden))で、精製した抗BNPキメラ抗体(「cAb」): (1)CHO細胞からの安定な106.3AM1(上記及び実施例2に記載)及び(2)COS細胞からの一時的抗BNP WT/WTを精製抗体の10µg/mL濃度に希釈する。dH₂O中の100µMのBNPの凍結(-80)一定分量をSPRランニング緩衝液に入れて100pMの濃度に希釈する。

40

【0222】

25にて、10µL/分で各抗BNP cAb 30µLを個々のSPRフローセル上に注入し、1個のフローセルを参照対照として空白にしておく。各cAbをバイオセンサー上に添加後、45分間、SPRランニング緩衝液で100µL/分の流速で全フローセルを平衡化し、その後、ランニング緩衝液のボトルを~16時間、100pM BNPの試料溶液に置き換える(シリンジ充填の間)。次に、試料溶液をさらに~7時間、SPRランニング緩衝液に戻し換える。次いで、100µL/分の流速での100mMリン酸の33秒パルス3回で表面を再生する。~23時間、抗BNP cAbを添加したセンサー全体にSPRランニング緩衝液を流すことにより空白稼動を行う。

【0223】

50

データを二重参照補正し(参照データを差し引き、次いでブランク緩衝液データを差し引くことにより、100 pM BNP試料データを補正した。)、マストランSPORT及びBIA Evaluation Software(バージョン3.2)でのリニアドリフトを考慮して、1:1 Langmuir Bindingモデル(BIA Evaluation 3 Software Handbook、編集1999年11月(バージョンAD) Copyright 1997-1999、BIAcore AB)にフィットさせた。

【0224】

BIAcore SPRを用いて、野生型106.3cAbの平衡解離定数(K_D)を求めたところ、 1.9×10^{-11} Mとなり、結合速度は 7.8×10^6 M^{-1} 秒 $^{-1}$ 、オフ速度は 1.5×10^{-4} 秒 $^{-1}$ であった。106.3AM1 cAbの平衡解離定数(K_D)を求めたところ、 1.9×10^{-12} Mとなり、結合速度は 1.3×10^7 M^{-1} 秒 $^{-1}$ 、オフ速度は 2.4×10^{-5} 秒 $^{-1}$ であった。溶液相測定において K_D 値を求めるSapidyneのKinExA装置を用いて(Sapidyne、Boise、ID)、106.3及び106.3AM1の両者に対して、それぞれ 1.7×10^{-12} M及び 9.3×10^{-12} Mという同様の K_D 値が得られた。

10

【0225】

改変キメラ106.3パリアントの特異性

抗BNP106.3AM1 BNP短縮型BNPペプチド置換EIA

置換マイクロタイターCIAにおいて、106.3AM1mAbの、hBNP短縮型、すなわちhBNP1-26及びhBNP5-13への結合能を求めた(図18参照)。ブロッキングした抗種被覆プレートをmAbとともに1時間温置し、洗浄した。連続希釈した遊離、非共役hBNP1-26(Abbott、Abbott Park、IL)、hBNP5-13(AnaSpec、San Jose、CA)、hBNP1-32(Peptide Institute、大阪、日本)ペプチド又は0ペプチド対照を1時間、AM1 mAbと反応させた。プレートを洗浄し、アクリジニル化hBNP(1-32環状)共役物(Abbott ADD、Abbott Park、IL)を添加した。プレートをもう一度温置し、洗浄した。Microbeta Jet(Perkin-Elmer、Turku、Finland)において、連続的に積層されたプレートリガーノトリガーコンビネーション(Abbott、Abbott Park、IL)として生じた化学発光シグナルから、相対発光単位(RLU)を得た。マイクロタイターアッセイにおいて、>85%シグナル置換により示されるように、抗BNP106.3AM1 mAbが、遊離hBNP断片アミノ酸1-26及びアミノ酸5-13に対して反応性があることが分かった。

20

30

【0226】

改変キメラ106.3パリアントの精密エピトープマッピング

抗BNP106.3AM1アラニンペプチドマッピングEIA

環状hBNP1-32 アラニン置換ペプチドパネルによるアラニン突然変異誘発スクリーニング手順を用いて、106.3AM1 mAbの結合部位を同定した。hBNPペプチドの単一アミノ酸をアラニンアミノ酸と置換した(位置10及び26を除く。)。標識化hBNP1-32ペプチドに対して、非標識アラニン置換ペプチドとの結合能について、106.3AM1 mAbを評価した。抗種抗体で被覆した固相において一定濃度のmAbを温置し、次いで、非結合試料を洗い流す。結合した抗体を2900 nMの非標識ペプチドと反応させる。温置後、洗浄して非結合遊離ペプチドを除去する。次に、2.9 nMのビオチン化hBNP1-32環状ペプチド(Abbott GPRD、Abbott Park、IL)を抗BNP106.3AM1 mAbの何れかの非結合部位と反応させる。非結合ペプチドを洗い流し、その後、ストレプトアビジン-HRPO(Invitrogen、Carlsbad、CA)を添加する。OPD基質システム(Abbott、Abbott Park、IL)を発色に使用し、Titertek MAP EIAワークステーション(Titertek Instruments、Hunt

40

50

s v i l l e、A l a b a m a) においてシグナルを読み取った。

【0227】

106.3AM1 mAbの精密エピトープマッピングプロファイルを調べるためのツールとして、このシグナル置換EIAアッセイを使用した。遊離ペプチド濃度は、阻害を確実に生じさせるために、標識ペプチドの濃度を2-log上回るものであった。図19の棒グラフは、標識ペプチドに対する遊離ペプチドのAM1抗体結合シグナルの、結合/非結合(B/B0)比を示す。アミノ酸残基がhBNPへのAM1 mAb結合に重要である場合、シグナル置換がない方向への偏向が検出される。この例において、B/B0比が>0.4となる場合、特定のアミノ酸がMAB結合に重要であると考えられる。106.3AM1 mAb機能的エピトープが、下記配列において太字で示される、V5、Q6、G7、G9、F11及びR13として同定される。

10

【0228】

【化1】

NH2-SPKMVQSGCFGRKMDRISSSSGLGCKVLRH-COOH (配列番号5)

【0229】

BIAcoreでの抗BNP106.sc128 L1 B24 H2 288AM1アラニンペプチドマッピング

上述のようなアミンカップリングによって、前もって調整したBIAcore CM5チップ(Uppsala, Sweden)にヤギ抗ヒトFc(GAHFc)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)(抗種抗体)を固定化することにより、高密度ヤギ抗ヒトFc(GAHFc)抗体表面プラズマ共鳴(SPR)バイオセンサーを準備した。

20

【0230】

個々のSPRフローセル上に(1つのフローセルを参照対照としてブランクのままにしておく。)、25にて、抗BNP AM1 cAb 60μLを10μL/分で注入する。各cAbをバイオセンサー上に添加した後、10分間、SPRランニング緩衝液で100μL/分の流速で全フローセルを平衡化する。10nMの、BNPペプチド又はBNP単アラニン置換ペプチド(10及び26を除く各位置でアラニンを置換)200μLを100μL/分でAM1表面上に流した。解離を引き起こし、1800秒間監視した。次にこの表面を本明細書中で既に述べたように再生する。

30

【0231】

データを二重参照補正し(参照データを差し引き、次いでブランク緩衝液データを差し引くことにより、試料データを補正した。)、センソグラム(sensogram)の解離相からオフ速度を求めた。この結果から、アミノ酸V5、Q6、G7、G9、F11及びR13が抗BNP AM1/WT BNP複合体の安定性に重要であることが示される。これらの残基を個々にアラニンに変異させた場合、オフ速度が少なくとも1桁向上する。このことから、上述のEIAの知見と一致して、BNPに対するエピトープに結合する抗BNP AM1 cAbが次のBNP残基、V5、Q6、G7、G9、F11及びR13を含有することが示唆される(図20参照)。

40

【実施例2】

【0232】

A T C C 寄託情報

BNP106.3sc128am1CHO1162-236(本明細書中において、「106.3AM1」とも称される。)に対するチャイニーズハムスター卵巣細胞株をAmerican Type Culture Collection(本明細書中で以後、「A.T.C.C.」と呼ぶ。)、10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209に2005年9月20日に寄託し、A.T.C.C.受託番号PTA-6987が割り当てられた。

【実施例3】

50

【0233】

単一抗体方式を用いた競合的免疫アッセイ

上記実施例1及び2に記載のCHO細胞株106.3AM1により産生される抗体(「抗体106.3AM1」)を精製し、試験して、ARCHITECT^(R)装置(Abbott Laboratories、Abbott Park、IL、この装置は、米国特許第5,468,646号に記載されている。)において単一抗体方式で、この抗体の、ヒト環状BNP1-32との結合能を調べた。この単一抗体方式は、試験反応で検体特異的抗体を1種類のみ使用することを包含する。

【0234】

常磁性体微小粒子(本明細書中で、以後、「微小粒子」と呼ぶ。Polymer Labs、Amherst、MA)を洗浄し、次いで連続希釈したヤギ抗ヒト抗体(Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA)と反応させた。米国特許第6,162,902号に記載の技術を用いてヤギ抗ヒト抗体で常磁性体微小粒子を被覆した。具体的には、EDACカップリングを使用した(EDACは、通常、一級アミンとのアミド結合に対してカルボキシル活性化剤として使用される。さらに、これはリン酸基と反応する。これは、ペプチド合成、核酸へのタンパク質の架橋及び免疫複合体の調製において使用される。EDACに対する化学式は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、塩酸塩である。EDACは、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO.から市販されている。)。温置後、微小粒子を洗浄し、BSAで被覆した。次に、これらのヤギ抗ヒト被覆微小粒子を連続希釈抗体106.3AM1と反応させ、温置し、洗浄した。

【0235】

次に、ARCHITECT^(R)装置(Abbott Laboratories、Abbott Park、Illinois)で、ヒト環状BNP1-32への反応性について、これらの被覆微小粒子を試験した。ヒト環状BNP1-32を含有する一定分量を反応容器の中の微小粒子と同じウェルに入れ、反応混合物を形成させた。およそ18分間、この反応混合物を温置した。温置後、ARCHITECT^(R) Line Diluentで微小粒子を洗浄し、捕捉されなかったヒト環状BNP1-32を除去した。ARCHITECT^(R) Line DiluentはAbbott Laboratories、Abbott Park、Illinoisから市販されている。次に、アクリジニウムと連結されたヒト環状BNP1-32(本明細書中で以後「トレーサー」と呼ぶ。)を反応容器に分注し、約4分間、微小粒子と反応させ、その後、ARCHITECT^(R) Line Diluentでこの微小粒子を洗浄し、未結合物質を除去した。トレーサーを約5-25ng/mLに希釈した。この反応容器に過酸化水素溶液、次いで水酸化ナトリウムを添加し、ARCHITECT^(R)装置の化学発光微小粒子免疫アッセイ(CMIA)光学アセンブリーにより、化学発光シグナルを測定した。図15で示されるように、このアッセイ方式において、抗体106.3AM1は、濃度依存的に、非標識ヒト環状BNP1-32への反応性を示した。

【実施例4】

【0236】

CHO細胞株106.3AM1により産生される抗体を用いたサンドイッチアッセイ
改変ARCHITECT^(R)-hBNPアッセイ(本明細書中で以後、「Arch-BNP」と呼ぶ。)のために、モノクローナル抗体(「mAb」)3-631-436で常磁性体粒子を被覆した。このmAbは、hBNPペプチドのアミノ酸13-18を含有するアミノ酸配列と結合する。(ハイブリドーマ細胞株3-631-436により産生されるモノクローナル抗体は、米国特許出願第11/135,050号、2005年5月25日出願、に記載されている。その内容を参照により本明細書中に組み込む。ハイブリドーマ細胞株3-631-436により産生されるモノクローナル抗体はまた、交換可能に、本明細書中で、「モノクローナル抗体3-631-436」及び「3-631-436」とも呼ばれる。さらに、マウスハイブリドーマ細胞株3-631-436を200

10

20

30

40

50

4年12月21日にA.T.C.C.に寄託し、A.T.C.C.受託番号PTA-6476が割り当てられた。)。米国特許第6,162,902号に記載の技術を用いて、モノクローナル抗体3-631-436で常磁性体粒子(Polymer Laboratories、Amherst、MA)を被覆した。具体的には、EDACカップリングを使用した(EDACは、通常、一級アミンとのアミド結合に対してカルボキシル活性化剤として使用される。さらに、これはリン酸基と反応する。これは、ペプチド合成、核酸へのタンパク質の架橋及び免疫複合体の調製において使用される。EDACに対する化学式は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、塩酸塩である。EDACは、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO.から市販されている。)。粒子を洗浄し、BSAで被覆した。これらの粒子を使用して、検体との最初(第1回目)の温置中、本アッセイにおいてBNPペプチドを捕捉した。

10

【0237】

あるいは、NHS-PEO₄-ビオチン(Pierce Biotechnology、Inc.、Rockford、IL)を用いてモノクローナル抗体3-631-436をビオチン化し、ストレプトアビジン-被覆スーパー常磁性体 Dynabeads (Dyna1 Biotech LLC、Brown Deer、WI)上で捕捉した。検体との最初(第1回目)の温置中、このアッセイにおいてBNPペプチド捕捉するためにも、これらの粒子を使用した。

【0238】

抗体106.3AM1(実施例1及び2参照)をアクリジニウム(Abbott Laboratories、Abbott Park、IL.)に共役させ、粒子結合hBNPペプチドを検出するために第二(2回目)の温置中、このアッセイにおいて使用した。活性化アクリジニウム-カルボキサミドエステルとの抗体AM1の反応により、共役が起こった。

20

【0239】

上述のものに対するコンプリメンタルな(complementary)改変Arc-BNPアッセイにおいて、EDAC化学を利用して抗体106.3AM1で常磁性体粒子(Polymer Laboratories、Amherst、MA)を被覆することにより、又は抗体106.3AM1をビオチン化し、ストレプトアビジン被覆スーパー常磁性体 Dynabeads (Invitrogen Carlsbad、California)上で捕捉することにより、捕捉粒子を調製した。この手順は、モノクローナル抗体3-631-436粒子の調製に対する上述のものと同であった。これらの粒子を使用して、検体との最初(第1回目)の温置中、このアッセイにおいてBNPペプチドの捕捉も行った。抗体AMIをアクリジニウムに共役させた場合と同じ方法でモノクローナル抗体3-631-436をアクリジニウムに共役させ、粒子結合hBNPペプチドを検出するための2回目の温置中、このアッセイにおいて使用した。

30

【0240】

ARCHITECT^(R)装置(この装置は米国特許第5,468,646号に記載されている。)においてBNP免疫アッセイを行った。

【0241】

キャリブレーター溶液を含有する一定分量を反応容器の微小粒子と同じウェルに入れ、反応混合物を形成させた。キャリブレーター溶液はhBNP全長ペプチドを含有した。サンプリングプローブにより、Tris/BSA希釈液中の捕捉抗体で被覆された微小粒子をサンプリングセンターの反応容器の適切なウェルにピペットで取った。約37の温度でおよそ4分間(ストレプトアビジンに基づく粒子の場合18分間)、この反応混合物を温置した。温置後、ARCHITECT^(R) Line Diluentで反応混合物を洗浄し、捕捉されなかったキャリブレーターを除去した。ARCHITECT^(R) Line DiluentはAbbott Laboratories、Abbott Park、Illinoisから市販されている。

40

【0242】

50

約 50 - 100 ng / mL の mAb - アクリジニウム - 複合体を反応容器に分注し、約 37 の温度でおよそ 4 分間温置した。温置後、反応容器を ARCHITECT^(R) Line Diluent で洗浄し、未結合物質を除去した。

【0243】

過酸化水素溶液、次いで水酸化ナトリウム溶液を反応容器に添加し、ARCHITECT^(R) 装置の化学発光微小粒子免疫アッセイ (CMIA) 光学アセンブリーにより、化学発光シグナルを測定した。

【0244】

ARCHITECT^(R) システムは、通常は相対光単位 (本明細書中で以後、「r l u ' s」) で測定されるアクリジニウムシグナルを測定する。測定は 3 回行った。下記表 3 及び図 16 及び 17 で示される結果は、3 回の値の平均を示す。具体的に、表 B 及び図 16 及び 17 の結果は、pg / mL BNP キャリブレーターで示す。

【0245】

【表 3】

表 3

uP mAb 加→		106.3AM1	3-631-436	106.3AM1	3-631-436
Conj mAb 加→		3-631-436	106.3AM1	3-631-436	106.3AM1
BNP (pg/mL)	試料				
0	Cal A	1132	1275	706	528
30	Cal B	1784	2386	671	1291
300	Cal C	19819	35445	3907	12618
1000	Cal D	142648	250363	28612	76400
2000	Cal E	446152	600661	93326	216220
5000	Cal F	1502213	1780437	451856	893368
	比率				
	A/A	1.0	1.0	1.0	1.0
	B/A	1.6	1.9	1.0	2.4
	C/A	17.5	27.8	5.5	23.9
	D/A	126.0	196.4	40.5	144.6
	E/A	394.0	471.1	132.2	409.2

【0246】

さらに、hBNP 又は hBNP 断片及び抗 hBNP 治療薬の治療用量の投与を受けている患者を監視するためにこの免疫アッセイを使用することができる。

【実施例 5】

【0247】

免疫グロブリン遺伝子の同定

サブクローニングされた抗 BNP 3 - 631 - 436 ハイブリドーマ細胞 (2006 年 8 月 17 日に公開された米国特許公開 2006 / 0183154 号に記載されているハイブリドーマ細胞株 3 - 631 - 436 (A . T . C . C . 受託番号 PTA - 6476)) からメッセンジャー RNA を単離した。キットに含まれる免疫グロブリン遺伝子特異的プライマーとともに Novagen (Novagen (Merck KGAA の関連会社、Darmstadt、Germany)、カタログ番号 69831 - 3) から購入したマウス Ig プライマーセットキットを用いた逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応で 3 - 631 - 436 mRNA を利用した。得られた PCR 産物の配列決定を行い、このように、免疫グロブリン可変重鎖遺伝子を同定した (図 23、24、並びに 25A 及び 25B 参照)。

【0248】

あるいは、その後、軽鎖遺伝子を単離するために使用された LC - MS - MS 技術を用いて、3 - 631 - 436 軽鎖の N 末端アミノ酸配列を決定した。SDS - PAGE 上で抗体の重鎖及び軽鎖を分離し、トリプシン消化し、LC - MS - MS によって分析した。データベース検索を用いて、N 末端アミノ酸配列が DVVMTQTPLT LSVTTGQ

P A S I S C (配列番号 152) であることが決定された。mRNA から 3 - 631 - 436 軽鎖を増幅するために、縮重 5'ヌクレオチドプライマー (5' G A Y G T N G T N A T G A C N C A R A C N C C N 3' (N = A、G、C、T; Y = C、T; R = A、G) (配列番号 153) 及び Novagen キット (上記) とともに供給されたリバーシブルプライマーを使用した。完全な軽鎖可変遺伝子を同定するために、得られた PCR 産物を配列決定した (図 25A 及び 25B 参照)。

【0249】

pYD41 ベクターへの 3 - 631 - 436 可変領域遺伝子のクローニング

酵母ディスプレイ系を使用して、酵母タンパク質 AGA2 への融合物として、酵母表面上で、非変異抗 BNP タンパク質 (本明細書中で後述) 及び抗 BNP タンパク質のライブラリーを発現させた。pYD と呼ばれる酵母ディスプレイベクター (Invitrogen Carlsbad, California) は、酵母接合因子である AGA2 遺伝子の C 末端での抗 BNP 遺伝子のクローニングを可能にするので、これを使用した (Boder 及び Wittrop, Nature Biotechnology, 15:553-557 (1997年6月) 参照)。pYD ベクターのその他の重要な特性には、挿入された抗 BNP 遺伝子の C 末端における、ガラクトース誘導性プロモーター及びエピトープタグ、V5 が含まれる (図 21 及び図 25A - 25B 参照)。

10

【0250】

酵母ディスプレイプラットフォームは、1本鎖可変断片として知られる抗体方式を利用する。scFv 方式において、フレキシブルリンカーを介して可変重鎖ドメインを可変軽鎖ドメインに連結する (可変重鎖ドメイン - リンカー - G P A K E L T P L K E A K V S (配列番号 4) - 可変軽鎖ドメイン)。

20

【0251】

PCR 単一オーバーラップ伸長 (single overlap extension, SOE) を使用して、3 - 631 - 436 scFv コンストラクトに対して可変重鎖遺伝子 (VH) 及び可変軽鎖遺伝子 (VL) を連結した (例えば、図 23、並びに 25A 及び 25B 参照)。ベクター制限部位 SfiI 及び NotI を用いて、酵母ディスプレイベクター pYD41 に、3 - 631 - 436 scFv DNA をクローニングした。pYD41 - 3 - 631 - 436 scFv ベクターを DH5 E コリに形質転換した。次に、この E コリからプラスミド DNA を単離し、3 - 631 - 436 scFv インサートの配列決定を行い、scFv が読み枠どおりに AGA2 タンパク質とともにクローニングされていることを確認した。

30

【0252】

酵母ディスプレイベクター pYD41 への scFv に対するクローニング部位は、次の遺伝子を含む ORF にある: AGA2 - 連結リンカー - 41 - Xpress エピトープタグ - 3 - 631 - 436 可変重鎖 - リンカー - 40 - 3 - 631 - 436 可変軽鎖 - V5 エピトープタグ - 6 個の His。さらに、酵母株 EBY100 はトリプトファン栄養要求性株であり、pYD41 ベクターは、系の選択可能マーカーとしてトリプトファンをコードする。

【0253】

サッカロミセスセレビシエ (酵母、Saccharomyces cerevisiae) 株 EBY100 への形質転換

Gietz 及び Schiestl 法 (Schiestl 及び Gietz, Current genetics, 16 (5-6): 339-46 (1989年12月) 参照) を用いて、酵母ディスプレイプラスミド、pYD41 - 3 - 631 - 436 scFv を S. セレビシエ EBY100 へと形質転換した。形質転換反応液の希釈液を選択用グルコースプレート (2% グルコース (0.67% 酵母窒素塩基、0.105% HSM - trp - ura、1.8% 細菌用寒天、18.2% ソルビトール、0.86% NaH₂PO₄ H₂O、1.02% Na₂HPO₄ 7H₂O)) にプレーティングし、30 にて 48 - 72 時間温置した。選択用グルコース培地に個々のコロニーを播種し、30 にて 16 - 2

40

50

0時間、振盪しながら増殖させた。細胞/mLの0.5 OD 600 (1e7個の細胞/0.5 OD/mL)を選択用ガラクトース培地に移すことにより、コロニーにおいてタンパク質発現を誘導した。20にて16-24時間コロニーを振盪し、次いで、環状BNP(「1-32c」と呼ぶ。)(配列番号5)及び抗-V5への結合について、FACS Ariaフローサイトメーターにより分析した。フローサイトメトリーアッセイのために、ビオチン化：環状BNP(1-32c)(配列番号5)又は抗-V5抗体とともに3-631-436 scFvを発現する酵母細胞を温置し、次いで、ストレプトアビジン：フィコエリスリン(SA:PE、BD Pharmingen)又はFITC標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン(GAM:FITC、Molecular Probes(これはInvitrogen Carlsbad、Californiaの関連会社である。))とともに温置した。図26A及び26B中に示されているフローサイトメトリーのヒストグラムは、3-631-436 scFvの完全長表面発現(Ab発現結合)及び3-631-436 scFvの環状BNP(1-32c)(配列番号5)への結合(Ag結合)を示す。

10

【0254】

酵母における、3-631-436 scFv及び3-631-436バリエーションに対するオフ速度分析

室温にて30-60分間、ビオチン化環状BNP 1-32c (~0.3 μM)(配列番号5)100倍モル過剰濃度及び抗-V5抗体(2.5 μg/mL)と0.05 OD酵母(1×10⁶個の細胞)を温置することにより、酵母における3-631-436 scFv及び3-631-436バリエーションのオフ速度測定を行った。次に、1%ウシ血清アルブミンとともにリン酸緩衝生理食塩水を含むブロッキング緩衝液(PBS/BSA)で細胞を2回洗浄し、様々な時間(0、5分、15分、30分、60分、120分、180分、240分(図27参照))、100倍モル過剰濃度の非標識環状BNP 1-32c(配列番号5)とともに室温にて温置した。各時点で、酵母細胞を氷に移し、反応を停止させた。次に、PBS/BSAで細胞を2回洗浄し、二次染色試薬中で懸濁した(具体的に言うと、SA:PE及びGAM:633。)。氷上で30分間、細胞を温置し、2回洗浄し、次にFACS Ariaフローサイトメーターで分析した。図27は、時間(秒)に対して平均蛍光単位(「MFU」としてプロットしたオフ速度データを示す。データをフィットさせるために一次減衰式を使用した。図27中に示されているこの式中のオフ速度m2は4.7×10⁻³秒⁻¹にフィットし、R値は0.98912であった。3-631-436 scFv半減期(t_{1/2})は2.4分(t_{1/2}=ln2/k_{off})であった。

20

30

【0255】

突然変異誘発ライブラリーからオフ速度が改善した3-631-436バリエーションを同定するために、オフ速度選別ストラテジーを用いた。したがって、突然変異誘発ライブラリーを選別するのに適切な時間を定めるために、3-631-436 scFv、非変異又は野生型(「wt」)、半減期を使用した。非標識環状BNP(1-32c)(配列番号5)の添加からおよそ10から12分後、wt 3-631-436 scFvに対して述べた同じアッセイ条件を用いて、3-631-436突然変異誘発ライブラリーを選別した。

40

【0256】

3-631-436 CDR特異的ライブラリー(directed library)の作製

抗体3-631-436の3種類の重鎖及び3種類の軽鎖相補性決定領域(CDR)のループは主要な抗原接触部位なので、抗体106.3の3種類の重鎖及び3種類の軽鎖相補性決定領域(CDR)に対して突然変異誘発を行った(例えば、図22A-22D並びに25A及び25B並びに配列番号90-92参照)。Kabat命名法を用いて、CDRループ長及び付番を定めた。個々のライブラリーは、1つのライブラリー中、CDRの3ヶ所のアミノ酸位置が無作為に突然変異誘発され、突然変異誘発枠は1ライブラリーに

50

つき1アミノ酸シフトしていた(図9参照)。個々のライブラリーに対するライブラリー多様性は、CDR位置ごとにサンプリングしたアミノ酸ごとに全部で 20^3 又は8,000個のバリエーションとなると予想される。3-631-436scFvに対して、全部で50個のライブラリー(24個の可変重鎖及び26個の可変軽鎖ライブラリー)を作製した。【0257】

ギャップのある線状化pYD41-3-631-436ベクター及び1本鎖オリゴヌクレオチドを化学的にコンピテントなEY100酵母と組み合わせることにより、ライブラリーを作製した(図10参照)。ギャップのあるpYD41ベクターは、ライブラリー構築において1本鎖縮重オリゴヌクレオチドで置換されている各CDRの特異的な領域を欠失させるPCRにより作製されたベクターである。縮重1本鎖オリゴヌクレオチドは、90-105ヌクレオチド長であり、9個の縮重ヌクレオチド枠のそれぞれにおいてpYD41-3-631-436scFvベクターに対して39-43ヌクレオチドのホモロジーを有する。全部で50個の各ライブラリーに対するオリゴヌクレオチドを合成した(図31A-31F及び配列番号93-142参照)。ギャップのあるベクター(1 μ g)及び縮重オリゴヌクレオチド(16 μ g)をEY100酵母(3e8個の細胞)と組み合わせ、Gietz及びSchiestlライブラリー形質転換プロトコル(Schiestl及びGietz、Current genetics、16(5-6):339-46(1989年12月))を用いて形質転換を行った。ヌクレオチド重複及び酵母の内在ギャップ修復の機構により促進される相同組換えのために、形質転換中に縮重オリゴヌクレオチド及びpYD41-3-631-436scFvギャップベクターが環状になる。30にて48から72時間、選択用グルコース培地中でライブラリーを増殖させ、再び選択用グルコース培地に入れた。ライブラリー分類のためのタンパク質発現の誘導前に、個別のライブラリーを、以下のようなそれらのCDRに従ってプールした。H1(1-8)、H2(1-8)、H2(9-15)、L1(1-8)、L1(9-14)、L2(1-5)、L3(1-7)。

【0258】

3-631-436突然変異誘発CDRライブラリー

オフ速度分類ストラテジー、平衡分類ストラテジーおよびオン速度(on-rate)/オフ速度分類ストラテジーに基づき3-631-436ライブラリーを分類した。3-631-436CDR突然変異誘発ライブラリーをガラクトース発現培地中で20にて18から24時間誘導した。オフ速度分類のために、室温にて、PBS/BSAで3-631-436突然変異誘発ライブラリーを洗浄し、ビオチン化環状BNP(1-32c)(配列番号5)の飽和濃度及び抗-V5抗体とともに温置し、2回洗浄し、非標識環状BNP(1-32c)(配列番号5)とともに温置した。10から12分後、突然変異誘発ライブラリーを2回洗浄し、SA-PE(1:200希釈)及びGAM-IgG2aAlexaFluor488(1:150希釈)とともに20から30分間氷上で温置した。最後に、細胞を洗浄し、分析し、FACS Ariaで分類した。全長BNP結合クローンを分類するために、ゲートセットを用いて、同じアッセイ条件下で、非変異3-631-436結合に基づきソートゲートを設定した。各ソートが、BNP結合集団の上位0.1-0.2%を回収した。分類した細胞を選択用グルコース培地中で増殖させ、30にて18-24時間増殖させた。ソート1細胞を誘導し、さらに2回、分類を繰り返した。

【0259】

平衡分類のために、室温にて、PBS/BSAで3-631-436突然変異誘発ライブラリーを洗浄し、26pMビオチン化環状BNP(1-32c)(配列番号5)及び抗-V5抗体とともに温置した。ビオチン化BNPの濃度は、3-631-436wtscFvのKD(約260pM)より10倍低かった。1から2時間後、ライブラリーを氷に移し、2回洗浄し、抗V5抗体とともに30分間温置した後、2回洗浄し、SA:PE及びGAM-IgG2aAlexaFluor488とともに30分間温置した。細胞を洗浄し、アッセイ条件下での3-631-436wt結合に基づいて確立されたソートゲートを用いて、FACS Aria上で細胞を分析した。各ソートは、BNP結合集団の上位

0.1 - 0.2%を回収した。分類した細胞を増殖させ、さらに2回、分類を繰り返した。

【0260】

オン速度/オフ速度分類のために、それぞれ、V Lライブラリー又はV Hライブラリー中に、軽鎖ライブラリープール及び重鎖ライブラリープールを合わせた。競合物質である非標識BNPとともに12.5分間温置することを除き、分類の第一巡はオフ速度アプローチを使用した。第二及び第三巡では、50 pMビオチン化BNPとともにライブラリーを温置し、上記オフ速度アッセイ方式を実施する約14分前に、90% s c F v飽和に到達させた。第四巡及び最終の分類に関しては、50 pMビオチン化BNPとともにライブラリーを温置し、オフ速度アッセイ方式を実施する約10分前に、80% s c F v飽和に到達させた。

10

【0261】

最後の分類後、分類した細胞を選択用グルコースプレートにプレーティングし、30に72時間置いた。1つのライブラリー：軽鎖ライブラリーL2(1-7プール)がwt 3-631-436 s c F vと比較して改善を示した。これらのライブラリーからの個々の酵母コロニーを選択用グルコース培地に接種し、凍結保存し、選択用ガラクトース培地中で誘導した。次に、個々のコロニーの特徴を調べ、オフ速度アッセイで順位付けした。

【0262】

選択した3-631-436バリエーションの分析

wt 3-631-436 s c F vに対して上記で述べたオフ速度アッセイにおいて、選択したクローンの特徴を最初に調べた。図28は、評価を行った各改善3-631-436 s c F vバリエーションに対する一次減衰曲線から決定したオフ速度値を示す。全体的に、クローンのオフ速度は3-631-436 s c F v wtクローンの2倍を超えて改善した。

20

【0263】

アミノ酸変異が発現されていることを調べるために、選択した3-631-436 s c F vバリエーションの配列を調べた。最初に、酵母ミニプレップキット(カタログ番号D2001、Zymo Research Orange, CA)を用いてプラスミドDNAを酵母懸濁培養液から単離した。配列決定グレードのプラスミドDNAを得るために、酵母ミニプレップキットからのプラスミドをDH5 E.コリに形質転換し、次いでE.コリミニプレップキット(Qiagen)を用いて培養液から精製した。次いで、pYD41ベクター特異的プライマー(pYD41フォワード-TAGCATGACTGGTGGACAGC(配列番号79)及びpYD41リバーズ-CGTAGAAATCGAGACCAG(配列番号80))を用いて、純粋なプラスミドDNAの配列決定を行った。3-631-436 s c F vバリエーションに対するヌクレオチド及びアミノ酸配列データを図29に示す。位置番号は、Kabata付番システムを用いた付番によって与えられたアミノ酸位置を指す。

30

【0264】

50から52位のVal/Val/Serからトリプトファン/スレオニン-メチオニン-/アスパラギン酸-アスパラギン-スレオニンへの突然変異の収束がCDRL2中に同定された。

40

【0265】

一時的又は安定発現系における3-631-436キメラ抗体のクローニング及び可溶性発現

pBOS(Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)と呼ばれる一時的発現ベクター系への3-631-436可変ドメインのクローニングを通じて、選択した3-631-436バリエーションをキメラマウスIgG_{2b}/カッパ抗体に変換した。より具体的には、PCRを用いて、別個のpBOSベクターへのクローニングのための制限部位のある可変重鎖遺伝子及び可変軽鎖遺伝子を増幅した(Mizushima及びNagata, Nucleic Acids Research

50

、18:5322、(1990))。消化済み/脱リン酸化ベクターに可変重鎖遺伝子及び可変軽鎖遺伝子を連結し、DH5 E.コリに形質転換した。E.コリからプラスミドDNAを精製し、リポフェクタミン(Invitrogen Carlsbad, California)又はエレクトロポレーションを用いて293H細胞に形質移入した。以下の名称の3-631-436バリエーション: wtキメラ、3-631-436AM1及びAM2、AM3、AM43-631-436AM5、AM6及び3-631-436AM8キメラに対して一時的抗体を発現させた。クローニングの前に、図30におけるように、AM又は「親和性成熟」名称表記をクローンに割り当てた。

【0266】

pBOS-3-631-436AM1重鎖及び軽鎖ベクターを用いて、2段階のクローニング手順で安定なCHO細胞株プラスミドを作製した。最初に、制限酵素SrfI/NotIを用いて、pBV及びpJVプラスミド(Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)において、マウス定常遺伝子に対する読み枠どおりに、可変重鎖遺伝子及び可変軽鎖遺伝子をそれぞれ連結した。ライゲーション反応物をDH5 E.コリに形質転換し、続いて、プラスミドDNAを個々のコロニーから単離した。クローニング部位で、pBV-3-631-436AM1マウス可変重鎖-ヒトIgG2bIgG_{2b}及びpJV-3-631-436AM1マウス可変軽鎖-カッパの配列決定を行った。

10

【0267】

第二のクローニング段階には、重鎖IgG_{2b}遺伝子及び軽鎖カッパ遺伝子を1つの安定な細胞株ベクターに連結することが含まれた。pBV-3-631-436及びpJV-3-631-436ベクターをAscI/PacIで消化した。VL-マウスカッパ定常及びVH-マウスIgG2b定常DNA断片をゲルで精製し、連結して、pBJ-3-631-436と呼ばれる安定な細胞株ベクターを作製した。リン酸カルシウムプロトコールを用いて、pBJ-3-631-436重鎖/軽鎖キメラプラスミドをCHO細胞に形質転換した。最初の形質転換から安定な細胞株をサブクローニングした。クローン3-631-436AM5に対して安定なCHO細胞株を開発し(「BNP3-631-436AM5CHO893-214」及び「BNP3-631-436AM8CHO974-211」とも呼ばれる。)、本明細書中の実施例6で述べるようにA.T.C.C.に寄託した。

20

30

【0268】

改変キメラ3-631-436バリエーションのBIAcoreによる特性の決定

アミンカップリング(アミノカップリングは当技術分野で周知である。例えば、Nordin、Hら、Analytical Biochemistry、340:359-368(2005J)を参照)によって、ヤギ抗マウスFc(GAMFc)(Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA)(抗種抗体)を前もって調整したBIAcore CM5チップ(Uppsala, Sweden)に固定化することにより、ヤギ抗マウスFc(GAMFc)抗体表面プラズマ共鳴(SPR)バイオセンサーを準備した。20µL/分で0.4MEDCと0.1NHSとの1:1混合液を用いて、カルボキシメチル-デキストランバイオセンサーを活性化する。10mM酢酸ナトリウム(pH5.0)中のGAHFcを10分間の注入により活性化表面にカップリングさせる。次に、1MエタノールアミンpH8.5で8分間この表面を不活性化し、次いでGAHFcをさらに10分間注入する。その後、30µL/分の流速での150mMH₃PO₄の60秒間の注入を10回行ってバイオセンサーの調整を行う。GAHFcの、約14kRU、共鳴単位を各フローセルでバイオセンサーにカップリングする。

40

【0269】

補充されたSPRランニング緩衝液(BIAcore, Uppsala, Sweden)(脱気/真空ろ過HBS-EP(BIAcore, Sweden))を用いて、精製された抗BNPキメラ抗体:3-631-436wt、3-631-436AM1、3-6

50

31-436AM2、3-631-436A3、3-631-436AM4、3-631-436AM5、3-631-436AM6及び3-631-436AM8(上記)を、精製抗体の0から25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度になるように希釈する。dH₂O中の100 μM のBNPの凍結された(-80)一定分量をSPRランニング緩衝液に入れて、1 μM 、50nMの濃度及び/又は100nMからの3倍系列希釈に希釈する。

【0270】

25にて、5 $\mu\text{L}/\text{分}$ で各抗BNPAb55から60 μL を個々のSPRフローセル上に注入し、1個のフローセルを参照対照としてブランクにしておく。各Abをバイオセンサー上に添加後、BNP又はランニング緩衝液の150 μL 注入に続く、解離時間360秒の前に、5から6分間、SPRランニング緩衝液で75 $\mu\text{L}/\text{分}$ の流速で全フローセルを平衡化する。続いて、流速を30から100 $\mu\text{L}/\text{分}$ に変更し、次いで、30から100 $\mu\text{L}/\text{分}$ の流速での100から150mMリン酸の3つの33から60秒パルスを用いて表面を再生する。

10

【0271】

データを二重参照補正し(参照データを差し引き、次いでブランク緩衝液データを差し引くことにより、BNP試料データを補正した。)、マストランスポート及びBIA Evaluation Software(バージョン3.2)でのリニアドリフトを考慮して、1:1Langmuir Bindingモデル(BIA Evaluation Software Handbook、編集1999年11月(バージョンAD) Copyright 1997-1999、BIAcore AB)にフィットさせた。

20

【0272】

BIAcore SPRを用いて、野生型3-631-436mAbの平衡解離定数(K_D)を求めたところ、 $3.8 \times 10^{-10} \text{ M}$ となり、オン速度は $6.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、オフ速度は $2.5 \times 10^{-3} \text{ 秒}^{-1}$ であった。3-631-436mAM2cAbの平衡解離定数(K_D)を求めたところ、 $1.6 \times 10^{-10} \text{ M}$ となり、オン速度は $3.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、オフ速度は $5.6 \times 10^{-4} \text{ 秒}^{-1}$ であった。3-631-436mAM3cAbの平衡解離定数(K_D)を求めたところ、 $2.1 \times 10^{-10} \text{ M}$ となり、オン速度は $5.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、オフ速度は $1.6 \times 10^{-3} \text{ 秒}^{-1}$ であった。3-631-436mAM4cAbの平衡解離定数(K_D)を求めたところ、 $3.7 \times 10^{-10} \text{ M}$ となり、オン速度は $1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、オフ速度は $6 \times 10^{-4} \text{ 秒}^{-1}$ であった。3-631-436mAM5cAbの平衡解離定数(K_D)を求めたところ、 $1.4 \times 10^{-10} \text{ M}$ となり、オン速度は $7.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、オフ速度は $1.1 \times 10^{-3} \text{ 秒}^{-1}$ であった。3-631-436mAM6cAbの平衡解離定数(K_D)を求めたところ、 $2.8 \times 10^{-10} \text{ M}$ となり、オン速度は $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、オフ速度は $4.1 \times 10^{-3} \text{ 秒}^{-1}$ であった。3-631-436mAM8cAbの平衡解離定数(K_D)を求めたところ、 $1.0 \times 10^{-10} \text{ M}$ となり、オン速度は $8.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、オフ速度は $8.2 \times 10^{-4} \text{ 秒}^{-1}$ であった。図30に記されているように、溶液相測定において K_D 値を求めるために、SapidyneのKinExA装置も使用した(Sapidyne, Boise, ID)。

30

【実施例6】

40

【0273】

ATCC 寄託情報

BNP3-631-436AM5CHO893-214(本明細書中において、「3-631-436AM5」とも称される。)に対するチャイニーズハムスター卵巣細胞株をAmerican Type Culture Collection(本明細書中で以後、「A.T.C.C.」と呼ぶ。)、10801 University Blvd.、Manassas、VA 20110-2209に2007年4月26日に寄託し、A.T.C.C.受託番号PTA-8369が割り当てられた。

【0274】

BNP3-631-436AM8CHO974-211(本明細書中において、「3-

50

631-436AM8」とも称される。)に対するチャイニーズハムスター卵巣細胞株を American Type Culture Collection (本明細書中で以後、「A.T.C.C.」と呼ぶ。)、10801 University Blvd.、Manassas、VA 20110-2209に2007年4月26日に寄託し、A.T.C.C.受託番号PTA-8368が割り当てられた。

【実施例7】

【0275】

3-631-436AM抗体を用いたサンドイッチアッセイ

改変ARCHITECT^(R)-hBNPアッセイ(本明細書中で以後、「Arc-BNP」と呼ぶ。)のために、モノクローナル抗体(「mAb」)3-631-436又は3-631-436親和性成熟した「AM」突然変異体で常磁性体粒子を被覆した。3-631-436Abは、hBNPペプチドのアミノ酸13-18を含有するアミノ酸配列と結合する。(ハイブリドーマ細胞株3-631-436により産生されるモノクローナル抗体は、米国特許出願第11/135,050号、2005年5月25日出願、に記載されている。その内容を参照により本明細書中に組み込む。ハイブリドーマ細胞株3-631-436により産生されるモノクローナル抗体はまた、交換可能に、本明細書中で、「モノクローナル抗体3-631-436」及び「3-631-436」とも呼ばれる。さらに、マウスハイブリドーマ細胞株3-631-436を2004年12月21日にA.T.C.C.に寄託し、A.T.C.C.受託番号PTA-6476が割り当てられた。)。米国特許第6,162,902号に記載の技術を用いて、モノクローナル抗体3-631-436又は組換え3-631-436AMx抗体(xは、親和性成熟されたバリエーションを表す数である。)を常磁性体粒子(Polymer Laboratories、Amherst、MA)上に被覆した。具体的には、EDACカップリングを使用した(EDACは、通常、一級アミンとのアミド結合に対してカルボキシル活性化剤として使用される。さらに、これはリン酸基と反応する。これは、ペプチド合成、核酸へのタンパク質の架橋及び免疫複合体の調製において使用される。EDACに対する化学式は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、塩酸塩である。EDACは、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO.から市販されている。)。粒子を洗浄し、BSAで被覆した。これらの粒子を使用して、検体との最初(第1回目)の温置中、本アッセイにおいてBNPペプチドを捕捉した。

【0276】

抗体AM1(実施例1及び2参照)をアクリジニウム(Abbott Laboratories、Abbott Park、IL.)に共役させ、粒子結合hBNPペプチドを検出するために第二(2回目)の温置中、このアッセイにおいて使用した。活性化アクリジニウム-カルボキサミドエステルとの抗体106.3AM1の反応により、共役が起こった。

【0277】

ARCHITECT^(R)装置(この装置は米国特許第5,468,646号に記載されている。)においてBNP免疫アッセイを行った。

【0278】

キャリブレーター溶液を含有する一定分量を反応容器の微小粒子と同じウェルに入れ、反応混合物を形成させた。キャリブレーター溶液はhBNP全長ペプチドを含有した。サンプリングプローブにより、Tris/BSA希釈液中の捕捉抗体で被覆された微小粒子をサンプリングセンターの反応容器の適切なウェルにピペットで取った。約37の温度でおよそ184分間、この反応混合物を温置した。温置後、ARCHITECT^(R)Line Diluentで反応混合物を洗浄し、捕捉されなかったキャリブレーターを除去した。ARCHITECT^(R)Line DiluentはAbbott Laboratories、Abbott Park、Illinoisから市販されている。

【0279】

約100ng/mLのmAb-アクリジニウム-複合体を反応容器に分注し、約37

10

20

30

40

50

の温度でおよそ4分間温置した。温置後、反応容器をARCHITECT^(R) Line Diluentで洗浄し、未結合物質を除去した。

【0280】

過酸化水素溶液、次いで水酸化ナトリウム溶液を反応容器に添加し、ARCHITECT^(R)装置の化学発光微小粒子免疫アッセイ(CMIA)光学アセンブリーにより、化学発光シグナルを測定した。

【0281】

ARCHITECT^(R)システムは、通常は相対光単位(本明細書中で以後、「r l u ' s」)で測定されるアクリジニウムシグナルを測定する。測定は3回行った。下記表4及び5並びに図32に示されている結果は、3回の値の平均を示す。具体的には、表4及び図32の結果は、pg/mL BNPキャリブレーターで示されている。

【0282】

【表4】

表4

微粒子	3631436AM8	3631436 ms	3631436AM8	3631436AM8
連結物	106.3 AM2	106.3AM2	106.3AM1	106.3 AM1 Fab'2
Cal A (0 pg/mL)	2176	1096	527	634
Cal B (30 pg/mL)	9321	3004	7455	10305
Cal C (300 pg/mL)	131587	15681	47327	65486
Cal D (1000 pg/mL)	631930	35461	108478	159603
Cal E (2000 pg/mL)	1405322	217211	500753	688275
Cal F (5000 pg/mL)	3023686	652218	1152358	1502446
比率 A/A	1.0	1.0	1.0	1.0
比率 B/A	4.3	2.7	14.1	16.3
比率 C/A	60.5	14.3	89.8	103.3
比率 D/A	290.4	32.4	205.8	251.7
比率 E/A	645.8	198.2	950.2	1085.6
比率 F/A	1389.6	595.1	2186.6	2369.8

【0283】

さらに、hBNP又はhBNP断片及び抗hBNP治療薬の治療用量の投与を受けている患者を監視するためにこの免疫アッセイを使用することができる。

【0284】

当業者にとって当然のことながら、本発明は、目的を達成し、言及した結果及び長所ならびに本発明において固有の結果及び長所を得るためによく適応する。本明細書中に記載の、分子複合体及び方法、手順、治療、分子、具体的な化合物は、現在、好ましい実施形態の代表であり、典型であり、本発明の範囲を限定するものではない。当業者にとって当然のことながら、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、本明細書中で開示する本発明に対して様々な置換及び変更がなされ得る。

【0285】

本明細書で言及する全特許及び刊行物は、本発明が属する分野において当業者のレベルを示すものである。全特許及び刊行物は、各個々の刊行物が具体的かつ個別に参照により組み込まれることが示されるように、同じ程度に参照により本明細書に組込まれる。

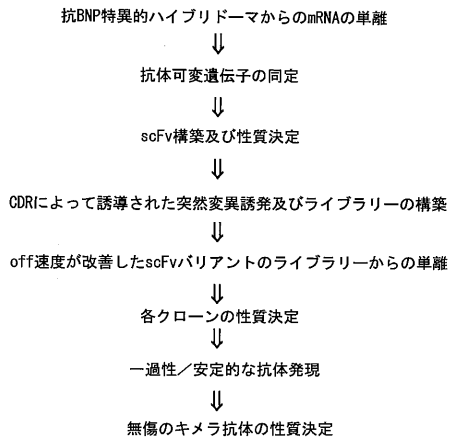
【0286】

本明細書中で具体的に開示されない何らかの要素、制限なく、本明細書中に具体的に記載の本発明を適切に実施し得る。したがって、例えば、本明細書中のいかなる場合も、「含む(comprising)」、「基本的からなる(consisting essentially of)」及び「からなる(consisting of)」という用

語は何れも、他の2つの用語の何れかで置き換え得る。使用されている用語及び表現は、説明の用語として使用され、限定の用語として使用されず、かかる用語及び表現の使用は示され記載されている特性又はその一部の何らかの同等物を排除するものではないが、特許請求される本発明の範囲内で様々な変更が可能であることを認識されたい。このように、好ましい実施形態及び任意の特性により本発明を具体的に開示してきたが、本明細書中で開示する概念の、変更及び変化が当業者にとってなされ得、かかる変更及び変化が、添付の特許請求の範囲により定められる本発明の範囲内にあるとみなされることを理解されたい。

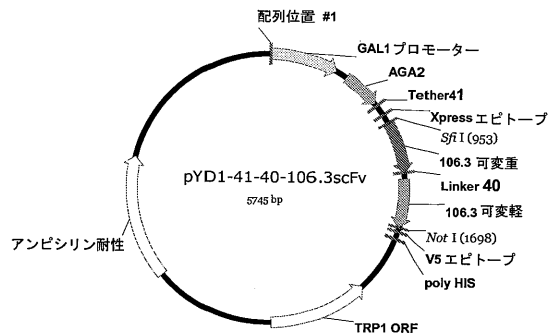
【 図 1 】

FIGURE 1



【 図 2 】

FIGURE 2



【 図 3 A 】

FIGURE 3A

1 ACGGATTAGAAG CCGCCGAGCGGG TGACAGCCCTCC
 37 GAAGGAGAGACTC TCCTCCGTGGCT CCTCGTCTCAC
 73 CGGTCCGCTTCC TGAACCGCAGAT GTGCCTCGGCC
 109 GCACTGCCTCGA ACAATAAAGATT CTACAATACTAG
 145 CTTTATGGTTA TGAAGAGGAAA ATTGGCAGTAAC
 181 CTGGCCCCACAA ACCCTCAATGA ACGAATCAAATT
 217 AACACCATAGG ATGATAATGCGA TTAGTTTTTATG
 253 CCTTATTCTGG GGTAAATTAATCA GCGAAGCGATGA
 289 TTTTGTATCTAT TAACAGATATAT AAATGCCAAAAC
 325 TGCATTAACACC TTTAACTAATAC TTTCACATTTT
 361 CGGTTTGATTA CTCTTATTCAA ATGTAATAAAG
 397 TATCAACAAAA ATGTGTAATATA CCTCTATACCTT
 433 AACGTCAAGGAG AAAAAACCCCGG ATCGGACTACTA
 469 GCAGCTGTAATA CGACTCACTATA GGGAAATATTAAG
 AGA2
 505 CTAATCTACTT CATACATTTTCA ATTAAGATCGAG
 -----AGA2-----
 541 TTAATTCGCTGT TTTTCAATATTT TCTGTATTGGCT
 -----AGA2-----
 577 TCAGTTTATGCA CAGGAACCTGACA ACTATATGCGAG
 -----AGA2-----
 613 CAAATCCCTCA CCAACTTTAGAA TCGACGCCGTAC
 -----AGA2-----
 649 TCTTTGTCACAG ACTACTATTTTG GCCAACGGGAG
 -----AGA2-----
 685 GCAATGCAAGGA GTTTTGAATAT TACAATCAGTA
 -----AGA2-----
 721 ACGTTTGTCACT AATPGCGGTTCT CACCCCTCAACA
 -----AGA2-----
 757 ACTAGCAAGGC AGCCCATATAAC ACACAGTATGTT
 --- 聚留 41 ---
 793 TTTAAGCTTCTG CAGGCTAGTGGT GAGAAACAAGGTG
 -----聚留 41-----
 829 GAGTACGCCCG GCGTTGATGGCC TTGCTCTGCTAGC
 865 ATGACTGGTGA CAGCAAAATGGGT CGGGATCTGTAC
 901 GACGATGACGAT AAGGTACCAGGA TCCAGTGTGGTG
 106.3
 937 GAATTCGCGGCC CAGCCGCCCATG GCCCAGATCCAG
 可変重
 973 TTGGTGCAGTCT GGACCTGAGCTG AGGAAGCCCTGGA
 1009 GAGACAGTCAAG ATCTCTGCAAG GGTTCGGATAT

【 図 3 B 】

FIGURE 3B

1045 ACCTTCACACAC TATGGAATAAAC TGGGTGAAGCAG

 1081 ACTCCAAGAAAG GATTTAAAGTGG ATGGGCTGGATA

 1117 AACACCCATACT GGAGAGCCAATA TATGCTGATGAC

 1153 TTCAAGGGACGG TTTGCCTTCTCT TTGGAACCTTCT

 1189 GCCAACACTGCG TATTGTGCAAACT AACACCTCAAC

 1225 AATGGAGACATG GGTACATATTTT TGTACAAGAAGT

 1261 CACCGGTTTGGT TTGGACTACTGG GGTCAAGGTACC

 1297 TCAGTCACCCGTC TCGTCAGGTCCC GCCAAGGAGTTG

 1333 ACGCCCTGTAAG GAGGGCAAGGTC TCTGACATGTG

 1369 CTGACCCAATCT CCACCTTCTTTG GCTGTGTCTCTA

 1405 GGGCAGAGGGCC ACCATCTCTCTG AAGGCCAGCCAA

 1441 AGTGTGATTAT AATGGTATAGT TATCTGAACTGG

 1477 TACCAACAGAAAG CAGGACAGCCA CCCAAATTCCTC

 1513 ATCTATGCTGCA TCCAACTAGAA TCTGGATCCCA

 1549 GCCAGGTTTAGT GGCAGTGGGCT GGGACAGACTTC

 1585 AACCTCAACATC CATCTCTGTGGG GAGGAGGATGCT

 1621 GCACCTATTAC TGTACAGAAAGT AATGAGGATCCA

 1657 TTCACGTTCCGC TCGGGACAAGG TTGGAATAAAA
 末端
 1693 CGGGCGGCCGCC CTCGAGTCTAGA GGGCCCTTCGAA
 V5 エピトープ
 1729 GGTAAAGCCTATC CCTAACCTCTC CTCGGTCTCGAT

 6 HIS タグ ----- 停止
 1765 TCTACGCTTACC GGTCACTATCAC CATCACCATTGA
 1801 GTTTAAACCCGC TGATCTGATAC AACAGTGTAGAT
 1837 GTAACAAAATCG ACTTTGTTCCTCA CTGTACTTTTAT

【 図 3 C 】

FIGURE 3C

1873 CTCGTACAAAAT ACAATATACTTT TCATTTTCCCGT
 1909 AAACAACATGTT TTCCCACTGTAAT ATCCTTTCTTAT
 1945 TTTTCGTTCCGT TACCAACTTTAC ACATACTTTTATA
 1981 TAGCTATTCACT TCTATACACTAA AAAACTAAGACA
 2017 ATTTAATTTTGG CTGCCTGCCATA TTTCAATTTGTT
 2053 ATAAATTCCTAT AATTTATCTTAT TAGTAGCTAATA
 2089 AAAGATGAATGT GAATCGAATCCT AAGAGAAATGGG
 2125 CAAGTGACAAA CAATACTTAAAT AAATACTACTCA
 末端 TRP1 ORF
 2161 GTAATAACCTAT TTCTTACGATTT TTGACGAAATT
 2197 GCTATTTTGTGA GAGCTTTTACA CCATTTGTCTCC
 2233 ACACCTCCGCTT ACATCAACACCA ATAACGCCATTT
 2269 AATCTAAGCGCA TCACCAACATTT TCTGGCGTCAGT
 2305 CCACCACTAAC ATAAAATGTAAG CTCTCGGGGCTC
 2341 TCTTGCTTTCCA ACCCACTCAGAA ATCGAGTTCCAA
 2377 TCCAAAAGTTCA CCTGTCCACCT GCTTCTGAATCA
 2413 AACAAAGGAATA AACGAATGAGGT TTCTGTGAAGCT
 2449 GCACGTGAGTAGT ATGTTGCACTCT TTTGGAAATAGC
 2485 AGCTTTTAAATA ACTGGCAACCG AGGAACCTTTGG
 2521 TATCTTGGCCAC GACTCATCTCCG TGCAGTTGGAGC
 2557 ATATCAATGCCG TAATCATTTGACC AGAGCCAAAACG
 2593 TCCTCCTTAGGT TGATTAAGCAAC ACGCCAACCAAG
 2629 TATTTGGAGTGG CCTGAACTATTT TTATATGCTTTT
 2665 ACAAGACTTGAA ATTTTCTTTGCA ATAACCGGGTCA
 2701 ATTTGTTCTCTT CTATTTGGGACA CATATAATACC
 2737 AGCAAGTFCAGCA TCGAAATCTAGA GCACATCTCGG
 2773 GCCTCTGTGCTC TCGAAGCCGCAA ACTTTCACCAAT
 2809 GGACCAAGACTA CCTGTGAATTA ATACAGACATA
 TRP1 ORF
 2845 CTCCAAGCTGCC TTTGTGTGCTTA ATCAGTATACT
 2881 CACGTGCTCAAT AGTCACCAATGC CCTCCCTTTGG
 2917 CCTCTCCTTTT CTTTTCGACC GAATTTCTTGAA
 2953 GACGAAGGGCC TCGTATGCGCT TATTTTATAGG
 2989 TTAATCTCATGA TAATAATGCTTT CTAGGACGAT
 3025 CGCTTCCCTGTA ACTTACAGCGGC CTGTAATCTTT
 3061 AATGATGGAATA ATTTGGGAATTT ACTCTGTGTTTA
 3097 TTTATTTTATG TTTGTATTTGG ATTTTGAAGAAG
 3133 AAATAAAGAAAG TAGAAGACTTAC GGAATCAAGAAA
 3169 AAAAAATAAACA AAGGTTTAAAA ATTTCAACAAA
 3205 AGCTACTTTTAC ATATATATTTAT TAGACAAGAAA
 3241 GCAGATTAATA GATATACATTCG ATTAACGATAAG
 3277 TAAAATGTAAA TCACAGGATTTT CGTGTGTGGTCT
 3313 TCTACACAGACA AGATGAACAAT TCGGCAATTAAT
 3349 CCTGAGAGCAGC AAGAGCAAGATA AAAGTATGATTT
 3385 TGTGCGCATCC CCCTAAGCTTT TTACATCTCTGG
 3421 AAAACAAAACCT ATTTTTCCTTTA ATTTCTTTTTTT
 3457 ACTTTCTATTTT TAATTTATATAT TTATATAAAAA
 3493 ATTTAATTTATA ATTTTCTTTATA GCACGTGATGAA

【 図 3 D 】

FIGURE 3D

3529 AAGGACCCAGT GGCACCTTTCCG GGAATGTGCGC
 3565 GGAACCCCTATT TGTPTTATTTTC TAAATACATCCA
 3601 AATATGTATCCG CTCATGAGACAA TAACCCGTGATA
 Amp Res ---
 3637 ATGCTTCAATA TATTGAAAAAGG AAGATATGAGT
 3673 ATTCACATTTT CCGTGTCCGCCCTT ATTCCTTTT
 3709 CGCGCATTTTGC CTTCCTGTTTTT GTCACCCAGAA
 3745 ACGCTGGTGAAA GTAAAAGATGCT GAAGATCAGTGT
 3781 GGTGCACGAGTG GGTACATCGAA CTGATCTCAAC
 3817 ACGGGTAAGATC CTTGAGAGTTTT CGCCCGAAGAA
 3853 CGTTTTCCAATG ATGAGCACTTTT AAAGTCTGCTA
 3889 TGTGGCGCGGTA TTATCCCGTGTG GACGCCGGCAA
 3925 GAGCAACTCGGT CGCCGCAATAC TATTTCTCAGAT
 3961 ACGGGTGGTGG TACTACCACTG ACAGAAAAGCAT
 3997 CTTACGGATGGC ATGACAGTAAAG GAATTTATGCA
 4033 GCTCCCAATACC ATGATGATTAAC ACTGCGCCCAAC
 4069 TTACTTCTGACA ACGATCCGAGGA CCCAAGAGCTA
 4105 ACCCTTTTGTG CACAACATGGGG GATCATGTAAC
 4141 CGCCTTGTATCT TGGGAACCGGAG CTGAATGAAGCC
 4177 ATACCAAACGAC GAGCGTGACACC ACGATGCGGTGA
 4213 GCAATGGCAACA ACGTTGCGCAAA CTATTAACCTGGC
 4249 GAATCACTTACT CTAGCTTTCCGG CACAATTAATA
 4285 GACTGGATGGAG GGGGATAAAGTT CAGGACCACTT
 4321 CTGCGCTCGGCC CTTCGGCTGCG TGGTTATTTGCT
 4357 GATAAATCTGGA GCGGGGTGCGGT GGTCTCGCGGT
 4393 ATCATTGCAACA CTGGGCCAGAT GGTAAAGCCCTCC
 4429 CGTATCGTAGTT ATCTACACGACG GGCAGTCAGGCA
 4465 ACTATGGATGAA CGAAATAGACAG ATCGCTGAGATA
 Amp Res end
 4501 GGTGCCTCACTG ATTAAGCAATGG TAACGTGTCAGC
 4537 CAAGTTTACTCA TATATACTTAG ATTGATTTAAAA
 4573 CTTCAATTTTAA TTTAAAGGATC TAGGTGAAGATC
 4609 CTTTTFGATAAT CTCATGACCAAAA ATCCCTTACGFT
 4645 GAGTTTCTGTT CACTGAGCGTCA GACCCGTGAGAA
 4681 AAGATCAAAAGG TCTCTTTGAGAT CCTTTTCTGT
 4717 CGGTAATCTGCT TGCTTGCACAAA AAAAAACCCAGC
 4753 CTACAGCGGTG GTTTGTTTCGG GATCAAGAGCTA
 4789 CCAACTCTTTTT CCGAAGTAACT GGCTTCAGCAGA
 4825 GCGCAGATACCA AATACTGTCCTT CTAGTGTAGCGC
 4861 TAGTTAGGCCAC CACTTCAAGAAC TCTGTAGCACCG
 4897 CCTACATACCTC GCTCTGCTAATC CTGTTACCCAGG
 4933 GCTGTCGCCAGT GGGGATAAGTCG TGCTTACCGGT
 4969 TTGACTCAAGA CGATAGTTACCG GATAAGGCGCAG
 5005 CGTGGGGCTGA ACGGGGGTTCG TGACACAGCCCC
 5041 AGCTTGGAGCGA ACGACCTACACC GAACGTAGATAC
 5077 CTACAGCGTGAG CATTGGAAGAGC GCCACGCTTCCC
 5113 GAAGGGAGAAAG GCGGACAGGTAT CCGGTAAGCGGC

【 図 3 E 】

FIGURE 3E

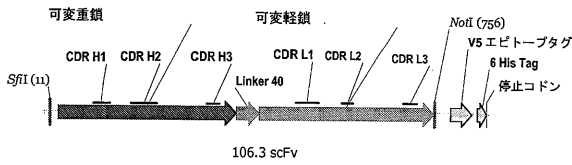
```

5149 AGGGTCGGAACA GGAGAGCGCAG AGGGAGCTTCCA
5185 GGGGGGAACGCC TGGTATCTTTAT AGTCCTGTCGGG
5221 TTTCGCCACCTC TGACTTGGAGCGT CGATTTTTGTGA
5257 TGCTCGTCAGGG GGGCCGAGCCTA TGGAAAAACGCC
5293 AGCAACGCGGCC TTTTACCGTTC CTGCGCTTTTGC
5329 TGGCCTTTTGTCT CACATGTTCTTT CTGCGTTATCC
5365 CCTGATCTGTG GATAACCGTATT ACCGCTTTGAG
5401 TGAGCTGATACC GCTCGCCGAGC CGAACGACCGAG
5437 CGCAGCGAGTCA GTGAGCGAGGAA CGGGAAGAGCGC
5473 CCAATACGCAAA CCGCCTCTCCC GCGCGTTGGCG
5509 ATTCAATTAATGC AGCTGGCACGAC AGGTTTCCCGAC
5545 TGGAAAGCGGGC AGTGAGCGCAC GCAATTAATGTG
5581 AGTTACCTCACT CATTAGGCACCC CAGGCTTACAC
5617 TTTATGCTTCCG GCTCCTATGTTG TGTGAAATGTG
5653 AGCGGATAACAA TTTACACAGGA AACAGCTATGAC
5689 CATGATACGCC AAGCTCGGAAT AACCTCACTAA
5725 AGGGAACAAAAG CTGGCTAGT

```

【 図 4 】

FIGURE 4



【 図 5 】

FIGURE 5

```

QLVQSGPELR KPGETVKISC KSGYTFTHY GINWVKQTFR KDLKMWGIN
THTGEPYAD DFKGRFAFSL ETSANTAYLQ INNLNNGDMG TYFCTRSHRF
GLDYWGQGTLS VTVSSGPAKE LPLKEAKVLS DNVLQSPPS LAVSLGQRAT
ISCKASQSVY YNGDSYLNWY QOKPGQPKF LIYAASNLES GIPARFSGSG
SGTDFNLNIH PVEERDAATY YCQSNEDPF TFGSGTKLEI KRAAALESRG
PFEGKPIPNP LGLDSTRTG HHHHHH*

```

【 図 6 A 】

FIGURE 6A

```

946 106.3 可変重
CAGATCCAG TTGGTGACG TGTGCACCT
GTCTAGGTC AACCACTC AGACTGGGA

106.3 可変重
991 GAGCTGAG AGCCGGA GAGACAGTC AAGATCTCC TGCAGGGT
CTGACTCC TTGCGACT CTCTGTG TCTAGAGG ACGTCCCA

CDR H1----- (10)
1036 106.3 可変重
TCTGGATAT ACCTTCACA CACTATGGA ATAAACTGG GTGAAGCAG
AGACCTATA TGGAGTGT GTGATACCT TATTTGACC CACTTCGTC

CDR H2-----
1081 106.3 可変重
ACTCCAAGA AAGGATTA AAGTGGAT GCGTGGATA AACACCCAT
TGAGSTTCT TTCTAAT TACACCTAC CCGACCTAT TTGTGGTA

H2----- (17)
1126 106.3 可変重
ACTGGAGG CCAATATAT GCTGATAC TCAAGGGA CGGTTGGC
TGACCTCTC GGTATATA CGACTACTG ARGTTCCCT GCCAACGG

106.3 可変重
1171 TTCTCTTG GAAACCTCT GCCAACCCT GCCTATTTG CAATCAAC
AAGAGAAC CTTTGAGA CGGTTGTA CGGATAAAC GTTAGTTC

CDR H3
1216 106.3 可変重
AACTCAAC AATGGAGAC ATGGGTACA TATTTCTGT ACAAGAACT
TTGGAGTTG TTACTCTG TACCCATGT ATAAAGACA TGTTCTCA

H3----- (8)
1261 106.3 可変重
CACCGGTT GGTGGAC TACTGGGT CAAGTACC TGATCACC
GTGGCCAA CCAAACTG ATGACCCA GTTCCATGG AGTCAGTG

106.3 Vh
リンカー 40-----
1306 GTCTCTGA GTCCCGCG AAGGATGT ACGCCCTG AAGGAGCG
CAGAGCAGT CCAGSGCG TTCTCAAC TCGSGGAC TTCTCCCG

106.3 可変軽
Linker 40
1351 AAGSTCTCT GACAAETG CTGACCCAA TCTCCACTT TCTTTGGCT
TTCCAGAGA CTGTTACAC GACTGGGT AGAGTGA AGAAACCA

CDR L1-----
1396 106.3 可変軽
GTGTCCTA GGGCAGAG GCCACCAT TCTGCAAG GCCAGCCAA
CACAGAGAT CCCGTCTC CGGTGTAG AGGACGTC CGGTGGTT

CDR L1----- (15)
1441 106.3 可変軽
AGTGTGAT TATAAAGT GATAGTAT CTGAAGTGG TACCAACAG
TCACARCTA ATATTACCA CTATCAATA GACTTGACC ATGGTTCT

```

【 図 6 B 】

FIGURE 6B

```

1486 106.3 可変軽 CDR L2-----
AAGCCAGGA CAGCCACC AARTTCTC ATCTATGCT GCATCCAA
TTGCTCTCT GTCGTTGG TTTAAGGAG TAGATACGA CGTAGGTA

----- (7)
1531 106.3 可変軽
CTAGATCT GGGATCCA GCCAGGTT AGTGCACT GGGCTGGG
GATCTTGA CCTAGGTT CGGTCCAA TCACCTCA CCCGAGCC

106.3 可変軽
1576 ACAGACTTC AACCTCAC ATCCATCT GTGAGGAG GAGGATGCT
TGCTGAG TTGGATTT TAGGTAGA CACTCTCT CTCTIACGA

CDR L3----- (9)
1621 106.3 可変軽
GCACCTAT TACTGTG CAAAGTAA GAGGATCCA TTCAGTTC
CGTTGATA ATGACAGTC GTTTCATTA CTCTAGGT ARGTCAG

106.3 可変軽
1666 GGCCTGGG ACAAGTTC GAAATAAA CCGGCGGC CCCTCGAG
CCGAGCCC TGTTTCAC CTTTATTT GCCCGCGC CGGAGCTC

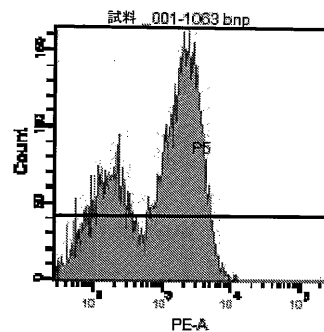
106.3 可変軽
1711 TCTAGAGG CCCTGAA GGTAAAGCT ATCCCTAAC CCTCTCTC
AGATCTCC GGAAGCTT CCATTCGA TAGGGATT GGAGAGGAG

106.3 可変軽
1756 GGTGTGAT TCTACGCT ACCGRCAT CATCAAC CACCAATGA
CCAGACTA AGATGCCA TGCCAGTA STAGTSTA GTGSTRAT

```

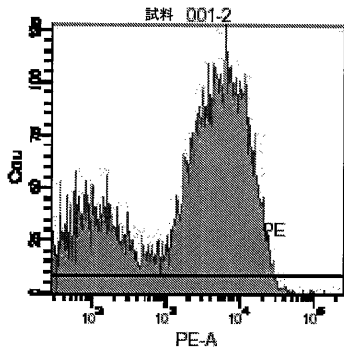
【 図 7 A 】

FIGURE 7A



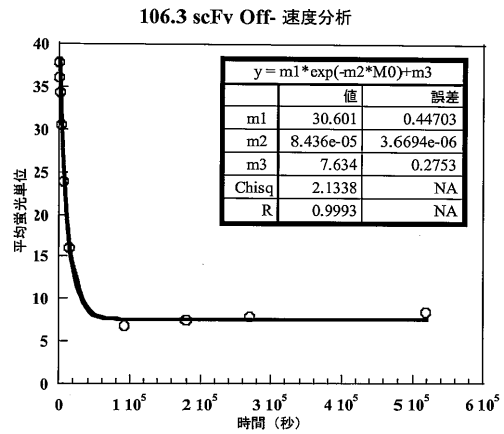
【 図 7 B 】

FIGURE 7B



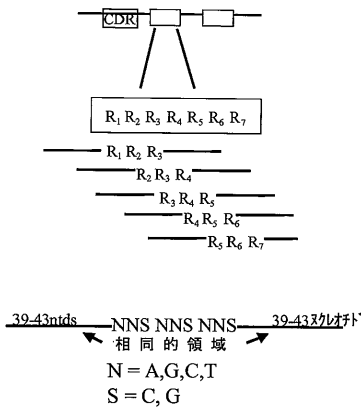
【 図 8 】

FIGURE 8



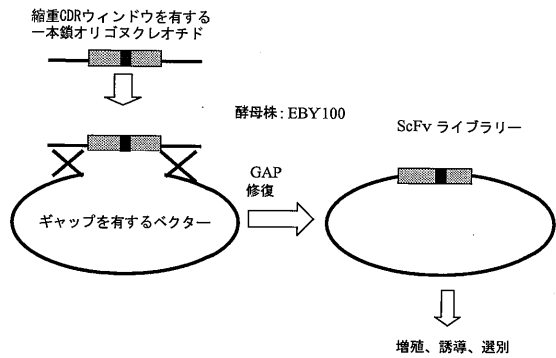
【 図 9 】

FIGURE 9



【 図 10 】

FIGURE 10



【 図 11 】

FIGURE 11

名称	k_{off} (秒 ⁻¹)	改善倍数
106.3 wt	8.4E-05	----
H2 288	3.7E-05	2.3
L1 B4	7.3E-06	11.5
L1 B9	3.1E-05	2.7
L1 9b	1.3E-05	6.4
L1 B12	7.6E-06	11.0
L1 B15	8.6E-06	9.7
L1 16	8.7E-06	9.6
L1 B24	6.7E-06	12.5
L2 6	3.2E-05	2.7
L2 21	4.0E-05	2.1

【 図 1 2 A 】

FIGURE 12A

名称	CDR H2 Pos 56	CDR H2 Pos 57	CDR H2 Pos 58
106.3 wt	Glu (GAG)	Pro (CCA)	Ile (ATA)
H2 288	Glu (GAG)	Ala (GCG)	Tyr (TAC)

【 図 1 2 B 】

FIGURE 12B

名称	CDR L1 Pos 26	CDR L1 Pos 27	CDR L1 Pos 27A	他の変異
106.3 wt	Ser (AGC)	Gln (CAA)	Ser (AGT)	
L1 B4	Gln (CAG)	Phe (TTC)	Ala (GCG)	
L1 B9	Tyr (TAC)	Ala (GCG)	Ser (AGT)	
L1 9b	Gln (CAG)	Trp (TGG)	Gly (GGC)	R42S
L1 B12	Thr (ACC)	Trp (TGG)	Asp (GAC)	
L1 B15	Arg (AGG)	Trp (TGG)	Pro (CCG)	
L1 16	Ala (GCG)	Tyr (TAC)	Gly (GGC)	
L1 B24	Asn (AAC)	Trp (TGG)	Pro (CCC)	R42S

【 図 1 2 C 】

FIGURE 12C

名称	CDR L2 Pos 53	CDR L2 Pos 54	CDR L2 Pos 55
106.3 wt	Asn (AAT)	Leu (CTA)	Glu (GAA)
L2 6	Cys (TGC)	Gly (GGG)	Trp (TGG)
L2 21	Cys (TGC)	Ala (GCG)	Pro (CCG)

【 図 1 3 】

FIGURE 13

クローン名	抗体の種類	$k_{on} (M^{-1}秒^{-1})$	$k_{off} (秒^{-1})$	$K_D (pM)$
106.3 wt	Mouse IgG1	1.2E+07	2.2E-04	18
106.3 wt	マウス-ヒト IgG1	7.8E+06	1.5E-04	19
106.3 AM1	マウス-ヒト IgG1	1.3E+07	2.4E-05	1.9

【 図 1 4 B 】

FIGURE 14B

H2 縮重オリゴヌクレオチド

系	コード	CDR	ライゲラー名	長さ(ヌクレオチド)
106.3	オリゴ7	H2	H2-1	105
106.3	オリゴ8	H2	H2-2	105
106.3	オリゴ9	H2	H2-3	105
106.3	オリゴ10	H2	H2-4	105
106.3	オリゴ11	H2	H2-5	105
106.3	オリゴ12	H2	H2-6	105
106.3	オリゴ13	H2	H2-7	105
106.3	オリゴ14	H2	H2-8	105
106.3	オリゴ15	H2	H2-9	105
106.3	オリゴ16	H2	H2-10	105
106.3	オリゴ17	H2	H2-11	105
106.3	オリゴ18	H2	H2-12	105
106.3	オリゴ19	H2	H2-13	105
106.3	オリゴ20	H2	H2-14	105
106.3	オリゴ21	H2	H2-15	105

オリゴ7
TGG GTG AAG CAG ACT CCA AGA AAG GAT TTA AAG TGG ATG GGC NNS
NNS NNS ACC CAT ACT GGA GAG CCA ATA TAT GCT GAT GAC TTC AAG
GGA CGG TTT GCC TTC

オリゴ8
TGG GTG AAG CAG ACT CCA AGA AAG GAT TTA AAG TGG ATG GGC TGG
NNS NNS NNS CAT ACT GGA GAG CCA ATA TAT GCT GAT GAC TTC AAG
GGA CGG TTT GCC TTC

オリゴ9
TGG GTG AAG CAG ACT CCA AGA AAG GAT TTA AAG TGG ATG GGC TGG
ATA NNS NNS NNS ACT GGA GAG CCA ATA TAT GCT GAT GAC TTC AAG
GGA CGG TTT GCC TTC

オリゴ10
TGG GTG AAG CAG ACT CCA AGA AAG GAT TTA AAG TGG ATG GGC TGG
ATA AAC NNS NNS NNS GGA GAG CCA ATA TAT GCT GAT GAC TTC AAG
GGA CGG TTT GCC TTC

オリゴ11
TGG GTG AAG CAG ACT CCA AGA AAG GAT TTA AAG TGG ATG GGC TGG
ATA AAC ACC NNS NNS NNS GAG CCA ATA TAT GCT GAT GAC TTC AAG
GGA CGG TTT GCC TTC

オリゴ12
CCA AGA AAG GAT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC CAT NNS
NNS NNS CCA ATA TAT GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC
TCT TTG GAA ACC TCT

【 図 1 4 A 】

FIGURE 14A

縮重オリゴヌクレオチド:
N=A, G, C, T; S=G, C

CDR H3 縮重オリゴヌクレオチド

系	コード	CDR	ライゲラー名	長さ(ヌクレオチド)
106.3	オリゴ1	H3	H3-1	105
106.3	オリゴ2	H3	H3-2	105
106.3	オリゴ3	H3	H3-3	105
106.3	オリゴ4	H3	H3-4	105
106.3	オリゴ5	H3	H3-5	105
106.3	オリゴ6	H3	H3-6	99

オリゴ1
AAC CTC AAC AAT GGA GAC ATG GGT ACA TAT TTC TGT ACA AGA NNS
NNS NNS TTT GGT TTG GAC TAC TGG GGT CAA GGT ACC TCA GTC ACC
GTC TCG TCA GGT CCC

オリゴ2
AAC CTC AAC AAT GGA GAC ATG GGT ACA TAT TTC TGT ACA AGA AGT
NNS NNS NNS GGT TTG GAC TAC TGG GGT CAA GGT ACC TCA GTC ACC
GTC TCG TCA GGT CCC

オリゴ3
AAC CTC AAC AAT GGA GAC ATG GGT ACA TAT TTC TGT ACA AGA AGT
CAC NNS NNS NNS TTG GAC TAC TGG GGT CAA GGT ACC TCA GTC ACC
GTC TCG TCA GGT CCC

オリゴ4
AAC CTC AAC AAT GGA GAC ATG GGT ACA TAT TTC TGT ACA AGA AGT
CAC CGG NNS NNS NNS GAC TAC TGG GGT CAA GGT ACC TCA GTC ACC
GTC TCG TCA GGT CCC

オリゴ5
AAC CTC AAC AAT GGA GAC ATG GGT ACA TAT TTC TGT ACA AGA AGT
CAC CGG TTT NNS NNS NNS TAC TGG GGT CAA GGT ACC TCA GTC ACC
GTC TCG TCA GGT CCC

オリゴ6
GAC ATG GGT ACA TAT TTC TGT ACA AGA AGT CAC CGG TTT GGT NNS
NNS NNS TGG GGT CAA GGT ACC TCA GTC ACC GTC TCG TCA GGT CCC
GCC GCC AAG

【 図 1 4 C 】

FIGURE 14C

オリゴ13
CCA AGA AAG GAT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC CAT ACT
NNS NNS NNS ATA TAT GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC
TCT TTG GAA ACC TCT

オリゴ14
CCA AGA AAG GAT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC CAT ACT
GGA NNS NNS NNS TAT GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC
TCT TTG GAA ACC TCT

オリゴ15
CCA AGA AAG GAT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC CAT ACT
GGA GAG NNS NNS NNS GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC
TCT TTG GAA ACC TCT

オリゴ16
CCA AGA AAG GAT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC CAT ACT
GGA GAG CCA NNS NNS NNS GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC
TCT TTG GAA ACC TCT

オリゴ17
AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC CAT ACT GGA GAG CCA ATA NNS
NNS NNS GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT
GCC AAC ACT GCC TAT

オリゴ18
AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC CAT ACT GGA GAG CCA ATA TAT
NNS NNS NNS TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT
GCC AAC ACT GCC TAT

オリゴ19
AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC CAT ACT GGA GAG CCA ATA TAT
GCT NNS NNS NNS AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT
GCC AAC ACT GCC TAT

オリゴ20
AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC CAT ACT GGA GAG CCA ATA TAT
GCT GAT NNS NNS NNS GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT
GCC AAC ACT GCC TAT

オリゴ21
AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC CAT ACT GGA GAG CCA ATA TAT
GCT GAT GAC NNS NNS NNS CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT
GCC AAC ACT GCC TAT

【 図 1 4 D 】

FIGURE 14D

CDR H1 縮重オリゴヌクレオチド

系	コード	CDR	ライブ列-名	長さ(ヌクレオチド)
106.3	オリゴ22	H1	H1-1	105
106.3	オリゴ23	H1	H1-2	105
106.3	オリゴ24	H1	H1-3	105
106.3	オリゴ25	H1	H1-4	105
106.3	オリゴ26	H1	H1-5	105
106.3	オリゴ27	H1	H1-6	99
106.3	オリゴ28	H1	H1-7	99
106.3	オリゴ29	H1	H1-8	99

オリゴ22
AGG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GGT TCT NNS
NNS NNS TTC ACA CAC TAT GGA ATA AAC TGG GTG AAG CAG ACT CCA
AGA AAG GAT TTA AAG

オリゴ23
AGG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GGT TCT GGA
NNS NNS NNS ACA CAC TAT GGA ATA AAC TGG GTG AAG CAG ACT CCA
AGA AAG GAT TTA AAG

オリゴ24
AGG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GGT TCT GGA
TAT NNS NNS NNS CAC TAT GGA ATA AAC TGG GTG AAG CAG ACT CCA
AGA AAG GAT TTA AAG

オリゴ25
AGG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GGT TCT GGA
TAT ACC NNS NNS NNS TAT GGA ATA AAC TGG GTG AAG CAG ACT CCA
AGA AAG GAT TTA AAG

オリゴ26
AGG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GGT TCT GGA
TAT ACC TTC NNS NNS NNS GGA ATA AAC TGG GTG AAG CAG ACT CCA
AGA AAG GAT TTA AAG

オリゴ27
ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GGT TCT GGA TAT ACC TTC ACA NNS
NNS NNS ATA AAC TGG GTG AAG CAG ACT CCA AGA AAG GAT TTA AAG
TGG ATG GGC

オリゴ28
ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GGT TCT GGA TAT ACC TTC ACA CAC
NNS NNS NNS AAC TGG GTG AAG CAG ACT CCA AGA AAG GAT TTA AAG
TGG ATG GGC

オリゴ29
ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GGT TCT GGA TAT ACC TTC ACA CAC
TAT NNS NNS NNS TGG GTG AAG CAG ACT CCA AGA AAG GAT TTA AAG
TGG ATG GGC

【 図 1 4 E 】

FIGURE 14E

CDR L1 縮重オリゴヌクレオチド(13)

系	コード	CDR	ライブ列-名	長さ(ヌクレオチド)
106.3	オリゴ30	L1	L1-1	99
106.3	オリゴ31	L1	L1-2	99
106.3	オリゴ32	L1	L1-3	99
106.3	オリゴ33	L1	L1-4	99
106.3	オリゴ34	L1	L1-5	99
106.3	オリゴ35	L1	L1-6	99
106.3	オリゴ36	L1	L1-7	99
106.3	オリゴ37	L1	L1-8	99
106.3	オリゴ38	L1	L1-9	99
106.3	オリゴ39	L1	L1-10	99
106.3	オリゴ40	L1	L1-11	99
106.3	オリゴ41	L1	L1-12	93
106.3	オリゴ42	L1	L1-13	93

オリゴ30
TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC NNS NNS NNS
CAA AGT GTT GAT TAT AAT GGT GAT AGT TAT CTG AAC TGG TAC CAA
CAG AAG

オリゴ31
TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG NNS NNS
NNS AGT GTT GAT TAT AAT GGT GAT AGT TAT CTG AAC TGG TAC CAA
CAG AAG

オリゴ32
TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC
NNS NNS NNS GTT GAT TAT AAT GGT GAT AGT TAT CTG AAC TGG TAC
CAA CAG AAG

オリゴ33
TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC
AGC NNS NNS NNS GAT TAT AAT GGT GAT AGT TAT CTG AAC TGG TAC
CAA CAG AAG

オリゴ34
TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC
AGC CAA NNS NNS NNS TAT AAT GGT GAT AGT TAT CTG AAC TGG TAC
CAA CAG AAG

オリゴ35
GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT NNS NNS
NNS AAT GGT GAT AGT TAT CTG AAC TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGA
CAG CCA CCC

【 図 1 4 F 】

FIGURE 14F

オリゴ36
GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT NNS
NNS NNS GGT GAT AGT TAT CTG AAC TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGA
CAG CCA CCC

オリゴ37
GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT
NNS NNS NNS GAT AGT TAT CTG AAC TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGA
CAG CCA CCC

オリゴ38
GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT
TAT NNS NNS NNS AGT TAT CTG AAC TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGA
CAG CCA CCC

オリゴ39
GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT
TAT AAT NNS NNS NNS TAT CTG AAC TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGA
CAG CCA CCC

オリゴ40
ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT AAT GGT NNS NNS
NNS CTG AAC TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGA CAG CCA CCC AAA TTC
CTC

オリゴ41
ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT AAT GGT GAT NNS
NNS NNS AAC TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGA CAG CCA CCC AAA TTC
CTC

オリゴ42
ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT AAT GGT GAT AGT
NNS NNS NNS TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGA CAG CCA CCC AAA TTC
CTC

CDR L2 縮重オリゴヌクレオチド (5)

系	コード	CDR	ライブ列-名	長さ(ヌクレオチド)
106.3	オリゴ43	L2	L2-1	99
106.3	オリゴ44	L2	L2-2	99
106.3	オリゴ45	L2	L2-3	99
106.3	オリゴ46	L2	L2-4	99
106.3	オリゴ47	L2	L2-5	99

オリゴ43
CAA CAG AAG CCA GGA CAG CCA CCC AAA TTC CTC ATC TAT NNS NNS
NNS AAT CTA GAA TCT GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG
TCT GGG ACA

オリゴ44
CAA CAG AAG CCA GGA CAG CCA CCC AAA TTC CTC ATC TAT GCT NNS
NNS NNS CTA GAA TCT GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG
TCT GGG ACA

【 図 1 4 G 】

FIGURE 14G

CDR L3 縮重オリゴヌクレオチド (7)

系	コード	CDR	ライブ列-名	長さ(ヌクレオチド)
106.3	オリゴ48	L3	L3-1	99
106.3	オリゴ49	L3	L3-2	99
106.3	オリゴ50	L3	L3-3	99
106.3	オリゴ51	L3	L3-4	99
106.3	オリゴ52	L3	L3-5	99
106.3	オリゴ53	L3	L3-6	93
106.3	オリゴ54	L3	L3-7	93

オリゴ45
CAA CAG AAG CCA GGA CAG CCA CCC AAA TTC CTC ATC TAT GCT GCA
NNS NNS NNS GAA TCT GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG
TCT GGG ACA

オリゴ46
CAA CAG AAG CCA GGA CAG CCA CCC AAA TTC CTC ATC TAT GCT GCA
TCC NNS NNS NNS TCT GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG
TCT GGG ACA

オリゴ47
CAA CAG AAG CCA GGA CAG CCA CCC AAA TTC CTC ATC TAT GCT GCA
TCC AAT NNS NNS NNS GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG
TCT GGG ACA

オリゴ48
CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT NNS NNS NNS
AAT GAG GAT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA
AAA CCG

オリゴ49
CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG NNS
NNS NNS GAG GAT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA
ATA AAA CCG

オリゴ50
CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA
NNS NNS NNS GAT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA
ATA AAA CCG

オリゴ51
CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA
AGT NNS NNS NNS CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA
ATA AAA CCG

オリゴ52
CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA
AGT AAT NNS NNS NNS TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA
ATA AAA CCG

【 図 1 4 H 】

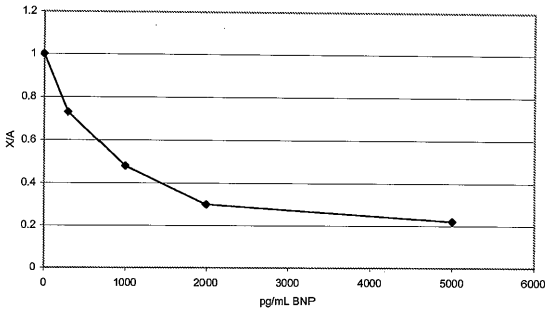
FIGURE 14H

オリゴ53
 GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG NNS NNS
 NNS ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC
 GCC
 オリゴ54
 GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG GAT NNS
 NNS NNS TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC
 GCC

【 図 1 5 】

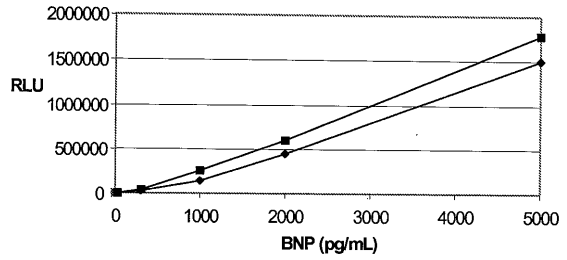
FIGURE 15

BNP 106.3 AM1Ab 構築検査
 (10 ug/mL 捕捉抗体 Ab, 25 ng/mL BNP Ab, 10 ng/mL BNP 1-32 ACR 遊離物質)



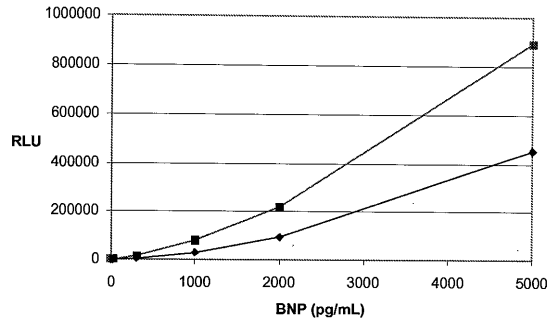
【 図 1 6 】

FIGURE 16



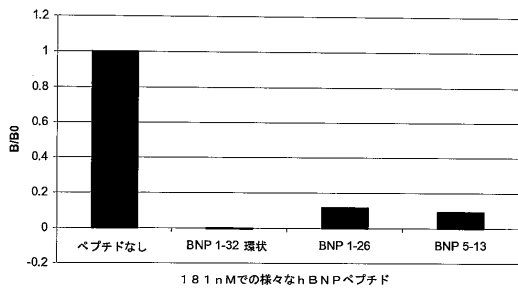
【 図 1 7 】

FIGURE 17



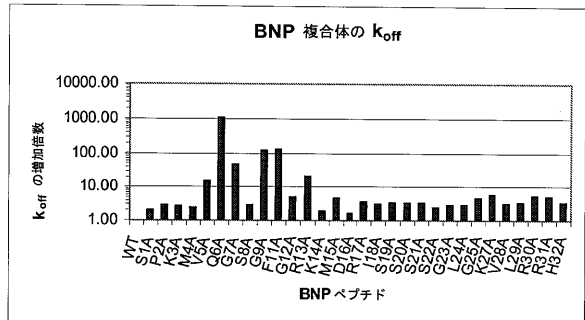
【 図 1 8 】

FIGURE 18



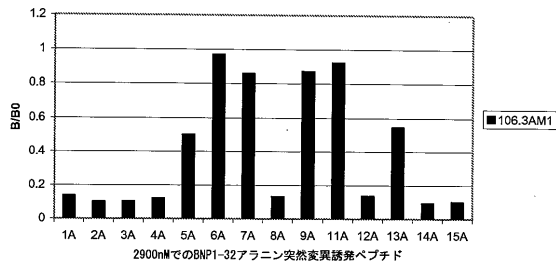
【 図 2 0 】

FIGURE 20



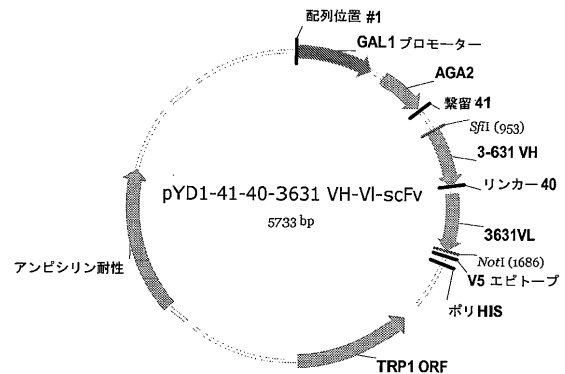
【 図 1 9 】

FIGURE 19



【 図 2 1 】

FIGURE 21



【 図 2 2 A 】

FIGURE 22A

GAL1 プロモーター

1 ACGGATTAGAAGCCG CGAGCGGGTGACAG CCCTCCGAAGGAGA CTCTCCCTCCGCGT
 61 CCTCCCTCCACCGG TCGGCTCCCTGAAC GCAGATGTGCGCTCCG CGCCGACTGTCCCGA
 121 ACAATAAAGATCTCA CAATACACTAGCTTTA TGGTTATGAGAGGA AAAATTTGGCAGTAA
 181 CTGGCCCAACAACC TTCAAAATGACGAAT CAAATTAACAACCAT AGGATGATATGCGA
 241 TTAGTTTTTATAGCT TATTTCTGGGGTAAAT TAATCAGCGAAGCGA TGATTTTTGATCTAT
 301 TAACAGATATATAAA TGCAAAAACGCATT AACCACTTAACTAA TACTTTCAACATTTT
 361 CGGTTGTATTACTT CTTATTCAAAATGAA TAAAAGTATCAACAA AAAATTTGTAATATA
 421 CCTCTATACTTTAAC GTCAAGGAGAAAAA CCCCAGATCGGACTA CTAGCAGCTGTAATA

AGA2

481 CGACTCACTATAGG AATAATTAAGCTAAT CTACTTCATACATTT TCAATTAAGATGCAG
 AGA2

541 TTACTTCGCTGTTTT TCAAAATTTTCTGTT ATTGCTTCAGTTTTA GCACAGAACTGACA
 AGA2

601 ACTATATGCGAGCA ATCCCTCCACCAACT TTAGAATCGACGCC TACTCTTTGTCACAG
 AGA2

661 ACTACTATTTTGGCC AACGGGAGGCGAATG CAGAGAGTTTTGAA TATTACAAATCAGTA
 AGA2

721 ACGTTTGTCAATAT TCGGGTTCACACCC TCACAACTAGCAAA GGCAGCCCATAAAC
 AGA2 Tether41

781 ACACAGTATGTTTT AAGCTTCAGAGCT AGTGGTGAGAACAAG GTGGAGTACGCCCG

~~~~~

接着 41

841 GCCTGATGGCTTG TCTGCTAGATGACT GGTGGACAGCAATG GGTCCGGATCTGTAC  
 SfiI

901 GAGATGACGATAG GTACAGGATCCAGT GTGGTGAATTCGGC GCCACGCCGCCATG  
 3-631-436 VH

961 GCCCAGTCCAACTG CAGCAGCTCGGGCT GAGCTGGTGGAGCCT GGGCTTCAGTGAAG  
 3-631-436 VH

1021 CTGCTCGCAAGGCT TCTGGCTACAGTTC ACCAATTACTGGATG AACTGGGTTAAACAG  
 3-631-436 VH

1081 AGGCCGTGACAGGC CTTGAGTGGATGGA AGGATGATCTTAC GATAGTAAACTCAC  
 3-631-436 VH

1141 TACAACTAAAGTTC AAGGACAAGGCCAT TTGACTGTGACAAA TCCTCAGCACAGCC  
 3-631-436 VH

1201 TTGTCGCACTACC AGCCTGACACTGAG GACTCTGGCTGAT TATTGGGCTCAGTAT  
 3-631-436 VH Linker 40

1261 GGTACTGSGGGCGA GGGACACAGCTCAC GTCTCCTCAGGTCC GCCAAGAGTTGAGC  
 リンカー 40 3-631-436 VL

1321 CCCTGAAAGAGGCG AAGGTCTCTGATGTT GTTATGACTCAGCA CCACTCACTTTGTCG

【 図 2 2 B 】

**FIGURE 22B**

3-631-436 VL

1381 GTTACCACITGACAA CCAGTTCATCTCT TGAAGTCAAGTCAG AGCCCTTAGATAGT  
 3-631-436 VL

1441 GATGGAAAAACCAT TTAATTTGGTATTCT CAGAGGCGAGCGAG TCTCAAAGCTCCTA

~~~~~

3-631-436 VL

1501 ATCTATGTGGTGTCT AAATGGAGTCTGGA GTCCTGACAGGTTCT ACTGGCAGTGGATCA
 3-631-436 VL

1561 GGGACAGATTTACA CTGAAATCAGCAGA GTGGAGGTGAGGAT TTGGAGTTTATTAC

~~~~~

3-631-436 VL

1621 TGCTTGAAGTACA CATTTCCGTGGAGC TTGGTGGAGGACC AAGCTGAAATCAAA  
 NotI V5 エピトープ

1681 CGGGCGCCCGCCCT GAGTCTAGAGGGCC TTGGAAGTAAGCCT ATCCCTAACCCCTCT  
 V5 エピトープ poly His

1741 CTGGCTCTGATCT ACGGTAACCGGTCAT CACCACTCACCAT TGAGTTAAACCCGC  
 1801 TGATCTGATAACAAC AGTGTAGATGTAACA AAATCGACTTTGTC CCACGTACTTTTAT  
 1861 CTGCTGAAAAATACA ATATACTTTTCACTT CCGCTAAACAACA GTTTCCCATATGAT  
 1921 ATCTTTTCTATTTT TCGTTCCGTAAACA CTTTACACATATTT ATATAGCTATTCAT  
 1981 TCTATACACTAAAA ACTAAGACAATTTTA ATTTTGGCTGCTGCC ATATTTCAATTTGTT  
 2041 ATAAATTCCTATAT TTATCCTATTAGTAG CTAAAAAAGATGAA TGTGAATCGAATCCT  
 2101 AAGGAAATGGGCAA GTGCACAAACAATCT TTAATAAATACTAC TCAGTATACCACTAT

~~~~~

2161 TTCTTAGCAATTTTG ACGAAATTTGCTATT TTGTAGAGCTCTTT ACACCTTTGCTCC
 TRP1 ORF

2221 ACACCTCGCTTACA TCAACACCAATAAC CCAATTAATCAAGC GCATCACCAGCAATT
 TRP1 ORF

2281 TCTGGCTCAGTCCA CCAGCTAACATAAAA TGAAGCTCTCGGG CTCTCTTGCTTCCA
 TRP1 ORF

2341 ACCCAGTCAGAAAT GAGTTCCAATCCAAA AGTTCACCTGTCCA CTGCTTCTGAATCA
 TRP1 ORF

2401 AACAGGGAATAAAC GAATGAGGTTTCTGT GAAGCTGCACAGT AGTATGTTGACGCT
 TRP1 ORF

2461 TTTGAAATACGAGT CTTTTAATACTGGC AAACGAGGAGACTCT TGTATTCTTGGCAC
 TRP1 ORF

2521 GACTCATCTCCGTGC AGTTGGACGATAICA ATCCGTAATCATG ACCAGAGCCAAACA
 TRP1 ORF

2581 TCCTCCTTAGTGA TTAGCAAAACAGCCA ACCAAGTATTTCCGA GTGCCTGAACATTT

【 図 2 2 C 】

FIGURE 22C

TRP1 ORF

2641 TTATATGCTTTTACA AGACTTGAATTTTC CTGCAATAACCGGG CAATTTGTTCTCTTT

TRP1 ORF

2701 CTATTGGGCACACAT ATAATACCAGCAGC TCAGCATCGGAATCT AGAGCACATCTCGG

TRP1 ORF

2761 GCCTCTGTGCTCTGC AAGCCGCAAACTTTC ACCAATGGACCAGAA CTACCTGTGAATTA

TRP1 ORF

2821 ATACAGCAGTACTC CAGCTGACCTTTGGT TGCTTAATCAGGTAT ACTCAGCTGTCTAAT

TRP1 ORF

2881 AGTCACCAATGCCCT CCCTTGGGCCCTCT CCTTTCTTTTTTTC ACCGAAATTTCTGAA
 GACGAAGGGCCCTCG TGATACGCTATATTT TATAGTTAATGTC A TGAATAATATGTTTT
 3001 CTTAGGACGGATCCG TTGCTGTAACTTAC ACGGCCCTCGTATCT TTTAATGATGGAATA
 3061 ATTTGGGAATTTACT CTGCTTATTTTATT TTATGTTTGTGATT TGGATTTAGAAAAT
 3121 AAATAAAGAGGTTAG AAGATTACGGAATG AAGAAAAAATAA ACAAAGGTTTAAAAA
 3181 ATTTCAACAAAAGC GTACTTACATATAT ATTTATTAGACAAGA AAACAGATTAATAA
 3241 GATATACATTTGATT AACGATAAGTAAAT GTAAATCACAGGAT TTTCTGTGTGGTCT
 3301 TCTACACAGCAAGA TGAACAATTCGGCA TTAATACCTGAGGC AGSAGGCAAGATA
 3361 AAGGTGATTTTGT TGGCGATCCCGTAG AGCTTTTACATCT CCGAAACAAARACT
 3421 ATTTTCTTTTATF TCTTTTCTTACTTTC TATTTTAAATTA TAATTTTAAATAA
 3481 ATTTAAATATAATT ATTTTATAGCAGST GATGAARAGGACCA GGTGGCTTTTGGC
 3541 GGAATATGSCCGGA ACCCTATTTTGTTA TTTTCTAAATACAT TCAAAATGATATCCG

~~~~~

3601 CTCATGAGACAATA CCGTGATAAGTCTT CAATAATTTGAAAA AGGAAGATGATGAGT  
 アンピシリン耐性

3661 ATTCACATTTCCGT GTCCGCTTATTCCT TTTTTGGCGCATTT TGCTTCTCTTTTT  
 アンピシリン耐性

3721 GCTCACCAGAAACG CTGGTGAAGTAAA GATGCTGAAGTCAG TTGGTGCACGAGTG  
 アンピシリン耐性

3781 GGTACATCGAAGT GATCTACAGCGGCT AAGATCCITGAGAGT TTTGCCCCGAAGAA  
 アンピシリン耐性

3841 CGTTTCCAATGATG AGCACTTTAAGTCT CTGCTATGTGGCGG GTATTATCCCGTGT  
 アンピシリン耐性

3901 GAOGCCGGCAAGAG CACTCGGTCCGCCG ATACACTATTCTCAG AATGACTTGGTTGAG  
 アンピシリン耐性

3961 TACTCACCAGTCACA GAAAGCAATCTTACG GATGGCATGACAGTA AGGAATTTATGAGT  
 アンピシリン耐性

4021 GCTGCCATPAACATG AGTATAGACTGCG GCCAATTTACTTCTG ACAAGATCGGAGGA  
 アンピシリン耐性

4081 CCGAAGGAGCTAAC GCTTTTTTGCACAC AGGGGGATCATGTA ACTCGCCTGATGCT  
 アンピシリン耐性

4141 TGGGAACCGAGCTC AATGAAGCAATACCA AACGACGAGCGTGC ACCACGATGCCGTGA

【 図 2 2 D 】

**FIGURE 22D**

アンピシリン耐性

4201 GCATGGCAACAAC TTGGCAACTATTA ACTGGCAACTACTT ACTCTAGTTCCCGG  
 アンピシリン耐性

4261 CAACAATTAATAGC TGGATGGAGCGGAT AAGTTGACAGGACA CTCTCGCCTCGGCC  
 アンピシリン耐性

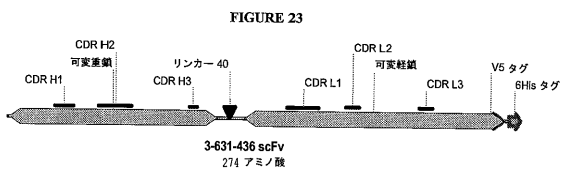
4321 CTTCGGCTGGCTGG TTTATGCTGATAAA TCTGGAGCCGGTGG CTTGGTCTCGCGGT  
 アンピシリン耐性

4381 ATCATTCAGCACTG GGGCCAGATGTAAG CCGTCCGATCGTA GTTATCTACAGAGG  
 アンピシリン耐性

4441 GGCAGTCAGCAACT ATGGATGAACGAAAT AGACAGATCCGCTGAG ATAGGTGCCCTACTG  
 アンピシリン耐性

4501 APTAAGCATTTGTTAA CTGTGACCAAGTT TACTCATATATACT TAGATTGATTTAAA  
 4561 CTCCTTTAATTAATTT AAAAGGATCTAGGT AAGATCCTTTTGAT AATCCTATGACAAA  
 4621 ATCCCTTACGGTGG TTTCTGTCCCTGTA GCGTCAAGCCCGTA GAAAGATCAAAAGGA  
 4681 TCTCTTGGAGTCTCT TTTTTCGCGCTGA ATCTGCTCTCCAA ACBAAAACCAACCG  
 4741 CTAACAGCGGTGGT TGTTCGCGGACAA GAGTACCAACTCT TTTCCGAGTAACT  
 4801 GCCTCAGCAGAGCG CAGATACCAATACT GTCCTCAGGTFAG CCGTGTATGGCCAC  
 4861 CACTTCAAGACTCT GTAGCACCGCTACA TACCCTGCTCCTA ATCCCTTACCAAGT  
 4921 GCTGCTCCAGTGGC GATAAGTGTGTCTT ACCGGTGTGACTCA AGACGATATGACCG  
 4981 GATAAGGCGCAGCGG TCGGGCTGACGGGG GGTCTGTGACACAG CCGACTTGGAGCGA  
 5041 ACACCTACACCGAA CTGAGATACCTACAG CGTGACATTTGAGA AGCCCAAGCTTCCC  
 5101 GAAGGGAGAAAGCGG GACAGGATCCGGTA ACGGGCAGGTCGGA ACAGGAGAGCGCACG  
 5161 AGGGAGCTCCAGGG GGGACCGCTGGTAT CTTTATAGTCTGTC GGGTTGCCACCTTC  
 5221 TGACTTGAAGCTGGA TTTTGTGATGCTCG TCAGGGGGCCGAGC CTAATGAAAAACGCC  
 5281 AGCAAGCGGCGCTT TTACGTTCTCGGCC TTTTGTGCTGCTTT GCTCAGATGTTCTTT  
 5341 CCTCCGTTATCCCTT GATTCTGGGATAAC CGTATTACCGCTTT GAGTGAAGTATACC  
 5401 GCTCGCGCAGCGGA ACGACGAGCGCGAG GAGTCAATGAGGAG GAGCGGAAGAGCGC  
 5461 CCAATACGCAAAACCG CUCCTCCCGCGCTGT TGGCCGATTCATTA TGCAGCTGGCAGAC  
 5521 AAGTTCCCGCAGCG AAGCGGCGCAGTGG CCAACGCGCAATTAAT GTGAGTACTCTCCT  
 5581 CATTTAGCCACCCAG GCTTTACACTTATG CTCCCGGCTCTATG TTTTGTGATTTGG  
 5641 ACGGATACAAATTT CACACAGGAACACG TATGCCATGATTAAC GCCAAGCTCGGAAT  
 5701 AACCTCACTAATAAG GAAACAAAGCTGGCT AGT

【 図 2 3 】



【 図 2 4 】

FIGURE 24

```

1  QVQLQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTF SYMMWVKQR PEQGLEWIGR
51  IDPVSEETHY NQKFKDKALL TVDKSSSTAF VQLTSLTSED SAVVYCVSDG
101 YNGAGITTVV SSGPAKELAP LKEAKVSDVV MTQTEFLLSV TIOQPASISC
151 KSSQSLDSD GKTYYLNLFQ RFGESPKLLI YVVSKLESQV PDRFTGSGSG
201 TDFTLKISRNV EADDLGVVYC LQATHFPTTF GGGTKLEIKR AAALERSGPF
251 EGKPIPNELL GLDSTRTGHG HHHH (配列番号:91)

```

【 図 2 5 A 】

FIGURE 25A

```

3-631-436 VH
-----
1  GSCCCAGCCG GCCATGGGCC AGTCCACT GCAGAGCCT GGGCTGAGC
   CGGGTCGGC CGGTACCGGG TCCAGTTGA GTCGTCGGA CCCGACTCG
-----
3-631-436 VH
-----
51  TGGTGAGGCC TGGGGCTTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGC TTCTGGTAC
   ACCACTCCGG ACCCCGAGT CACTTCGACA GGACGTCCG AAGACCGATG
-----
(10)
-----
101 ACGTTACCA GTTACTGGAT GAATGGGTT AACAGAGGC CTGAGCAAGG
   TGCAGTGGT CAATGACCTA CTGACCCAA TTGTCTCCG GACTGGTTC
-----
3-631-436 VH
-----
CDR H2-----
151 CCTTGAGTGG ATTGGAAGGA TTGATCCTTA CGATAGTAA ACTCACTACA
   GGAATCACC TAACCTTCTT AACTAGGAAT GCTATCACT TGAGTGATG
-----
(17)
-----
201 ATCAAAAGTT CAAGGACAAG GCCATTTTGA CTGTAGACAA ATCCTCCAGC
   TAGTTTCAA GTTCTGTGTC CGGTAAAAC GACATCTGT TAGGAGGTCG
-----
3-631-436 VH
-----
251 ACAGCCTTG TGCACCTCAC CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGGGCTTA
   TGTGGGAGC ACGTTGAGTG GTCGGACTGT AGACTCCTGA GACCCAGAT
-----
3-631-436 VH
-----
CDR H3-(3)
301 TTATTGCGTC TCTGATGGTT ACTGGGGCGC AGGGACCAG GTCACCGTCT
   AATAACGCAG AGACTACCA TGAACCCCGC TCCCTGTGC CAGTGGCAGA
   Linker 40
-----
VH
-----
351 CCTCAGTCC CGCCAGGAG TTGACGCCCC TGAAGAGGC GAAGTCTCT
   GGAGTCCAG GCGGTCTCC ACTGCGGGG ACTTCTCTCG CTCCAGAGA
-----
3-631-436 VL
-----
401 GATGTTGTTA TGAATCAGC ACCACTCACT TTGTCGGTTA CCAGTGGACA
   CTACAACAT ACTGAGTCTG TGGTGAAGTA AACAGCCAAT GGTGACCTGT
-----
3-631-436 VL
-----
CDR L1-----
451 ACCAGCTTC ATCTCTGCA AGTCAAGTCA GAGCCTCTTA GATAGTGATG
   TGGTCAAGG TAGAGACGT TCAGTTCAGT CTCGGAGAA CTATCACTAC
-----
3-631-436 VL
-----
(16)

```

【 図 2 5 B 】

FIGURE 25B

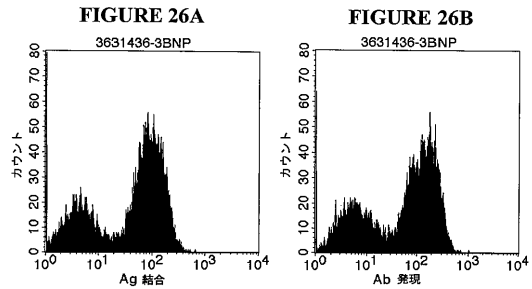
```

501  GAAAAACCTA TTTAAATGG TTATTCCAGA GCCAGGCGA GTCTCCAAAG
   CTTTTGGAT AAATTAACC AATAAGTCT CCGTCCGCT CAGAGTTTC
-----
3-631-436 VL
-----
CDR L2----- (7)
551 CTCTAATCT ATGAGTGTCT TAACTGGAG TCTGGAGTCC CTGACAGTT
   GAGGATPAG TACCCACAG ATTTGACCTC AGACTCAGG GACTGTCCAA
-----
3-631-436 VL
-----
601 CACTGGCAGT GGATCAGGA CAGATTAC ACTGAAAATC AGCAGATGG
   GTGACCGTCA CCTAGTCCCT GTCTAAGTG TGAATTTAG TGTCTCACC
-----
3-631-436 VL
-----
CDR L3----- (7)
651 AGGCTGAGGA TTTGGGAGTT TATTACTGCT TGCAAGTAC ACATTTCCG
   TCCGACTCCT AAACCTCAA ATAATGACGA ACGTTCGATG TGTAAAAGGC
   3631VL
-----
701 TGGACCTTCG GTGAGGCMC CAGCTGGAA ATCAAGCGG CGSCCGCCCT
   ACCTGCAAGC CACCTCCGTG GTTCGACTT TAGTTTGGCC GCGGCGGGA
-----
V5 Epitope
-----
751 CGAGTCTAGA GGGCCCTTCG AAGGTAAGCC TATCCCTAAC CCTCTCCTCG
   GCTCAGATCT CCCGGAAGC TTCCATTCCG ATAGGGATTG GAGAGGAGC
-----
V5 エピトープ : ポリ HIS
-----
801 GTCTGATTC TACGCGTACC GGTCAATC ACCATCACCA T
   CAGAGCTAAG ATGCGCATGG CCAGTAGTAG TGGTAGTGGT A

```

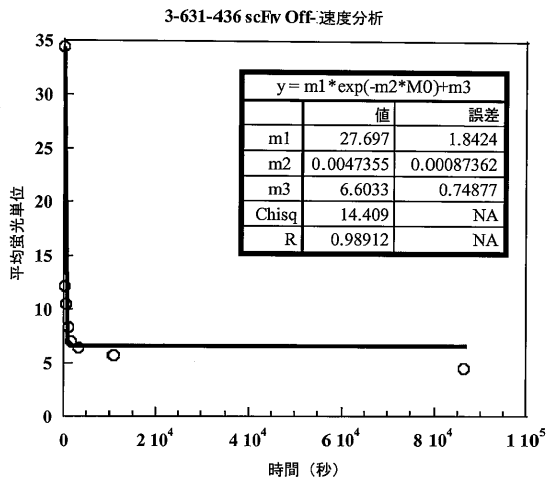
【 図 2 6 】

FIGURE 26



【 図 2 7 】

FIGURE 27



【 図 2 8 】

FIGURE 28

| 選択戦略      | クローン名     | koff (秒 <sup>-1</sup> ) | 改善倍数  |
|-----------|-----------|-------------------------|-------|
| N/A       | 3-631-436 | 4.8E-03                 | ----- |
| 平衡        | L2 1      | 2.5E-04                 | 19    |
| 平衡        | L2 4      | 1.4E-03                 | 4     |
| 平衡        | L2 7      | 1.5E-04                 | 32    |
| 平衡        | L2 8      | 1.7E-04                 | 28    |
| Off-速度    | L2 9      | 5.0E-04                 | 10    |
| Off-速度    | L2 10     | 1.9E-03                 | 3     |
| On/Off-速度 | 500-1     | 5.3E-04                 | 9     |
| On/Off-速度 | 500-2     | 3.2E-04                 | 15    |
| On/Off-速度 | 500-5     | 1.7E-04                 | 28    |
| On/Off-速度 | 500-10    | 4.9E-04                 | 10    |

【 図 2 9 】

FIGURE 29

| クローン名     | 位置50      | 位置51      | 位置52      | 位置53      |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 3-631-436 | Val (GTG) | Val (GTG) | Ser (TCT) | Lys (AAA) |
| L2 1      | Gln (CAG) | Asn (AAC) | Thr (ACG) | Lys (AAA) |
| L2 4      | His (CAC) | Thr (ACG) | Thr (ACG) | Lys (AAA) |
| L2 7      | Trp (TGG) | Met (ATG) | Thr (ACC) | Lys (AAA) |
| L2 8      | Trp (TGG) | Met (ATG) | Asn (AAC) | Lys (AAA) |
| L2 9      | Val (GTG) | Thr (ACC) | Asp (GAC) | Lys (AAG) |
| L2 10     | Arg (CGC) | Thr (ACG) | Asn (AAC) | Lys (AAA) |
| 500-1     | Trp (TGG) | Met (ATG) | Asp (GAC) | Lys (AAA) |
| 500-2     | Trp (TGG) | Thr (ACG) | Thr (ACG) | Lys (AAA) |
| 500-10    | Val (GTG) | Thr (ACG) | Asp (GAC) | Ile (ATC) |

【 図 3 0 】

FIGURE 30

| クローン名     | イソタイプ   | IgG名 | KinExA (pM) | Biacore (pM) | Biacore kon (M <sup>-1</sup> 秒 <sup>-1</sup> ) | Biacore koff (秒 <sup>-1</sup> ) |
|-----------|---------|------|-------------|--------------|------------------------------------------------|---------------------------------|
| 3-631-436 | mIgG2ak |      | 286         | 375          | 6.7E+06                                        | 2.5E-03                         |
| 3-631-436 | mIgG2bc | AM1  | ND          | 363          | 8.4E+06                                        | 2.9E-03                         |
| L2 1      | mIgG2bc | AM2  | 94          | 155          | 3.6E+06                                        | 5.6E-04                         |
| L2 7      | mIgG2bc | AM3  | 156         | 213          | 5.8E+06                                        | 1.6E-03                         |
| L2 8      | mIgG2bc | AM4  | 101         | 371          | 1.6E+06                                        | 6.0E-04                         |
| L2 9      | mIgG2bc | AM5  | 218         | 144          | 7.9E+06                                        | 1.1E-03                         |
| 500-2     | mIgG2bc | AM6  | 203         | 280          | 1.5E+06                                        | 4.1E-04                         |
| 500-10    | mIgG2bc | AM8  | 41          | 101          | 8.1E+06                                        | 8.2E-04                         |

【 図 3 1 A 】

FIGURE 31A

縮重オリゴヌクレオチド : N=A, G, C, T, S=G, C

CDR H1 縮重オリゴヌクレオチド (8)

| 系         | コード  | CDR | ライプ列名 | 長さ (ヌクレオチド) |
|-----------|------|-----|-------|-------------|
| 3-631-436 | 1-1h | H1  | H1-1  | 102         |
| 3-631-436 | 1-2h | H1  | H1-2  | 102         |
| 3-631-436 | 1-3h | H1  | H1-3  | 102         |
| 3-631-436 | 1-4h | H1  | H1-4  | 102         |
| 3-631-436 | 1-5h | H1  | H1-5  | 102         |
| 3-631-436 | 1-6h | H1  | H1-6  | 102         |
| 3-631-436 | 1-7h | H1  | H1-7  | 102         |
| 3-631-436 | 1-8h | H1  | H1-8  | 102         |

オリゴ1-1h

CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT NNS NNS NNS TTC ACC AGT TAC TGG ATG  
AAC TGG GTT AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ( 配列番号 : 93 )

オリゴ1-2h

CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC NNS NNS NNS ACC AGT TAC TGG ATG  
AAC TGG GTT AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ( 配列番号 : 94 )

オリゴ1-3h

CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC NNS NNS NNS AGT TAC TGG ATG  
AAC TGG GTT AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ( 配列番号 : 95 )

オリゴ1-4h

CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACG NNS NNS NNS TAC TGG ATG  
AAC TGG GTT AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ( 配列番号 : 96 )

オリゴ1-5h

CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACG TTC NNS NNS NNS TGG ATG  
AAC TGG GTT AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ( 配列番号 : 97 )

オリゴ1-6h

CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACG TTC ACC NNS NNS NNS ATG  
AAC TGG GTT AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ( 配列番号 : 98 )

オリゴ1-7h

CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACG TTC ACC AGT NNS NNS NNS  
AAC TGG GTT AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ( 配列番号 : 99 )

オリゴ1-8h

CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACG TTC ACC AGT TAC NNS NNS  
NNS TGG GTT AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ( 配列番号 : 100 )

【 図 3 1 B 】

FIGURE 31B

CDR H2 縮重オリゴヌクレオチド(15)

| 系         | コード    | CDR | ライプラー名 | 長さ(ntd) |
|-----------|--------|-----|--------|---------|
| 3-631-436 | 2-1-1h | H2  | H2-1-1 | 102     |
| 3-631-436 | 2-1-2h | H2  | H2-1-2 | 102     |
| 3-631-436 | 2-1-3h | H2  | H2-1-3 | 102     |
| 3-631-436 | 2-1-4h | H2  | H2-1-4 | 102     |
| 3-631-436 | 2-1-5h | H2  | H2-1-5 | 102     |
| 3-631-436 | 2-1-6h | H2  | H2-1-6 | 102     |
| 3-631-436 | 2-1-7h | H2  | H2-1-7 | 102     |
| 3-631-436 | 2-1-8h | H2  | H2-1-8 | 102     |
| 3-631-436 | 2-2-1h | H2  | H2-2-1 | 99      |
| 3-631-436 | 2-2-2h | H2  | H2-2-2 | 99      |
| 3-631-436 | 2-2-3h | H2  | H2-2-3 | 99      |
| 3-631-436 | 2-2-4h | H2  | H2-2-4 | 99      |
| 3-631-436 | 2-2-5h | H2  | H2-2-5 | 99      |
| 3-631-436 | 2-2-6h | H2  | H2-2-6 | 99      |
| 3-631-436 | 2-2-7h | H2  | H2-2-7 | 99      |

オリゴ2-1-1h  
 AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ATT GGA NNS NNS NNS CCT TAC GAT AGT GAA ACT  
 CAC TAC AAT CAA AAG TTC AAG GAC AAG GCC ATT TTG ACT ( 配列番号:101)

オリゴ2-1-2h  
 AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ATT GGA AGG NNS NNS NNS TAC GAT AGT GAA ACT  
 CAC TAC AAT CAA AAG TTC AAG GAC AAG GCC ATT TTG ACT ( 配列番号:102)

オリゴ2-1-3h  
 AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ATT GGA AGG NNS NNS NNS GAT AGT GAA ACT  
 CAC TAC AAT CAA AAG TTC AAG GAC AAG GCC ATT TTG ACT ( 配列番号:103)

オリゴ2-1-4h  
 AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT NNS NNS NNS AGT GAA ACT  
 CAC TAC AAT CAA AAG TTC AAG GAC AAG GCC ATT TTG ACT ( 配列番号:104)

オリゴ2-1-5h  
 AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT NNS NNS NNS GAA ACT  
 CAC TAC AAT CAA AAG TTC AAG GAC AAG GCC ATT TTG ACT ( 配列番号:105)

オリゴ2-1-6h  
 AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT TAC NNS NNS NNS ACT  
 CAC TAC AAT CAA AAG TTC AAG GAC AAG GCC ATT TTG ACT ( 配列番号:106)

オリゴ2-1-7h  
 AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT TAC GAT NNS NNS NNS  
 CAC TAC AAT CAA AAG TTC AAG GAC AAG GCC ATT TTG ACT ( 配列番号:107)

オリゴ2-1-8h  
 AAA CAG AGG CCT GAG CAA GGC CTT GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT TAC GAT AGT NNS NNS  
 NNS TAC AAT CAA AAG TTC AAG GAC AAG GCC ATT TTG ACT ( 配列番号:108)

【 図 3 1 D 】

FIGURE 31D

CDR L1 縮重オリゴヌクレオチド(14)

| 系         | コード    | CDR | ライプラー名 | 長さ(ntd) |
|-----------|--------|-----|--------|---------|
| 3-631-436 | 1-1-1L | L1  | L1-1   | 102     |
| 3-631-436 | 1-1-2L | L1  | L1-2   | 102     |
| 3-631-436 | 1-1-3L | L1  | L1-3   | 102     |
| 3-631-436 | 1-1-4L | L1  | L1-4   | 102     |
| 3-631-436 | 1-1-5L | L1  | L1-5   | 102     |
| 3-631-436 | 1-1-6L | L1  | L1-6   | 102     |
| 3-631-436 | 1-1-7L | L1  | L1-7   | 102     |
| 3-631-436 | 1-1-8L | L1  | L1-8   | 102     |
| 3-631-436 | 1-2-1L | L1  | L1-2-1 | 96      |
| 3-631-436 | 1-2-2L | L1  | L1-2-2 | 96      |
| 3-631-436 | 1-2-3L | L1  | L1-2-3 | 96      |
| 3-631-436 | 1-2-4L | L1  | L1-2-4 | 96      |
| 3-631-436 | 1-2-5L | L1  | L1-2-5 | 96      |
| 3-631-436 | 1-2-6L | L1  | L1-2-6 | 96      |

オリゴ1-1-1L  
 TCG GTT ACC ACT GGA CAA CCA GCT TCC ATC TCT TGC AAG NNS NNS NNS CAG AGC CTC TTA GAT AGT  
 GAT GGA AAA ACC TAT TTA AAT TGG TTA TTC CAG AGG CCA ( 配列番号:117)

オリゴ1-1-2L  
 TCG GTT ACC ACT GGA CAA CCA GCT TCC ATC TCT TGC AAG NNS NNS NNS AGC CTC TTA GAT AGT  
 GAT GGA AAA ACC TAT TTA AAT TGG TTA TTC CAG AGG CCA ( 配列番号:118)

オリゴ1-1-3L  
 TCG GTT ACC ACT GGA CAA CCA GCT TCC ATC TCT TGC AAG TCA NNS NNS NNS CTC TTA GAT AGT  
 GAT GGA AAA ACC TAT TTA AAT TGG TTA TTC CAG AGG CCA ( 配列番号:119)

オリゴ1-1-4L  
 TCG GTT ACC ACT GGA CAA CCA GCT TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT NNS NNS NNS TTA GAT AGT  
 GAT GGA AAA ACC TAT TTA AAT TGG TTA TTC CAG AGG CCA ( 配列番号:120)

オリゴ1-1-5L  
 TCG GTT ACC ACT GGA CAA CCA GCT TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG NNS NNS NNS GAT AGT  
 GAT GGA AAA ACC TAT TTA AAT TGG TTA TTC CAG AGG CCA ( 配列番号:121)

オリゴ1-1-6L  
 TCG GTT ACC ACT GGA CAA CCA GCT TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC NNS NNS NNS AGT  
 GAT GGA AAA ACC TAT TTA AAT TGG TTA TTC CAG AGG CCA ( 配列番号:122)

オリゴ1-1-7L  
 TCG GTT ACC ACT GGA CAA CCA GCT TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC NNS NNS NNS  
 GAT GGA AAA ACC TAT TTA AAT TGG TTA TTC CAG AGG CCA ( 配列番号:123)

オリゴ1-1-8L  
 TCG GTT ACC ACT GGA CAA CCA GCT TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC TTA NNS NNS  
 NNS GGA AAA ACC TAT TTA AAT TGG TTA TTC CAG AGG CCA ( 配列番号:124)

【 図 3 1 C 】

FIGURE 31C

オリゴ2-2-1h  
 GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT TAC GAT AGT GAA NNS NNS NNS AAT CAA AAG TTC AAG GAC  
 AAG GCC ATT TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA ( 配列番号:109)

オリゴ2-2-2h  
 GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT TAC GAT AGT GAA ACT NNS NNS NNS CAA AAG TTC AAG GAC  
 AAG GCC ATT TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA ( 配列番号:110)

オリゴ2-2-3h  
 GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT TAC GAT AGT GAA ACT CAC NNS NNS NNS AAG TTC AAG GAC  
 AAG GCC ATT TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA ( 配列番号:111)

オリゴ2-2-4h  
 GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT TAC GAT AGT GAA ACT CAC TAC NNS NNS NNS TTC AAG GAC  
 AAG GCC ATT TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA ( 配列番号:112)

オリゴ2-2-5h  
 GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT TAC GAT AGT GAA ACT CAC TAC AAT NNS NNS NNS AAG GAC  
 AAG GCC ATT TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA ( 配列番号:113)

オリゴ2-2-6h  
 GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT TAC GAT AGT GAA ACT CAC TAC AAT CAA NNS NNS NNS GAC  
 AAG GCC ATT TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA ( 配列番号:114)

オリゴ2-2-7h  
 GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT TAC GAT AGT GAA ACT CAC TAC AAT CAA AAG NNS NNS NNS  
 AAG GCC ATT TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA ( 配列番号:115)

CDR H3 縮重オリゴヌクレオチド(1)

| 系         | コード  | CDR | ライプラー名 | 長さ(ntd) |
|-----------|------|-----|--------|---------|
| 3-631-436 | 3-1h | H3  | H3-1   | 93      |

オリゴ3-1h  
 ACC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAT TGC GTC TCT NNS NNS NNS TGG GGC GCA GGG  
 ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT CCC GCC ( 配列番号:116)

【 図 3 1 E 】

FIGURE 31E

オリゴ1-2-1L  
 TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC TTA GAT NNS NNS NNS AAA ACC TAT TTA AAT TGG  
 TTA TTC CAG AGG CCA GGC GAG TCT CCA AAG CTC ( 配列番号:125)

オリゴ1-2-2L  
 TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC TTA GAT AGT NNS NNS NNS ACC TAT TTA AAT TGG  
 TTA TTC CAG AGG CCA GGC GAG TCT CCA AAG CTC ( 配列番号:126)

オリゴ1-2-3L  
 TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC TTA GAT AGT GAT NNS NNS NNS TAT TTA AAT TGG  
 TTA TTC CAG AGG CCA GGC GAG TCT CCA AAG CTC ( 配列番号:127)

オリゴ1-2-4L  
 TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC TTA GAT AGT GAT GGA NNS NNS NNS TTA AAT TGG  
 TTA TTC CAG AGG CCA GGC GAG TCT CCA AAG CTC ( 配列番号:128)

オリゴ1-2-5L  
 TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC TTA GAT AGT GAT GGA AAA NNS NNS NNS AAT TGG  
 TTA TTC CAG AGG CCA GGC GAG TCT CCA AAG CTC ( 配列番号:129)

オリゴ1-2-6L  
 TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC TTA GAT AGT GAT GGA AAA ACC NNS NNS NNS TGG  
 TTA TTC CAG AGG CCA GGC GAG TCT CCA AAG CTC ( 配列番号:130)

CDR L2 縮重オリゴヌクレオチド(5)

| 系         | コード  | CDR | ライプラー名 | 長さ(ntd) |
|-----------|------|-----|--------|---------|
| 3-631-436 | 2-1L | L2  | L2-1   | 93      |
| 3-631-436 | 2-2L | L2  | L2-2   | 93      |
| 3-631-436 | 2-3L | L2  | L2-3   | 93      |
| 3-631-436 | 2-4L | L2  | L2-4   | 93      |
| 3-631-436 | 2-5L | L2  | L2-5   | 93      |

オリゴ2-1L  
 CAG AGG CCA GGC GAG TCT CCA AAG CTC CTA ATC TAT NNS NNS NNS AAA CTG GAG TCT GGA GTC  
 CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGG ( 配列番号:131)

オリゴ2-2L  
 CAG AGG CCA GGC GAG TCT CCA AAG CTC CTA ATC TAT GTG NNS NNS NNS CTG GAG TCT GGA GTC  
 CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGG ( 配列番号:132)

オリゴ2-3L  
 CAG AGG CCA GGC GAG TCT CCA AAG CTC CTA ATC TAT GTG GAG NNS NNS NNS GAG TCT GGA GTC  
 CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGG ( 配列番号:133)

オリゴ2-4L  
 CAG AGG CCA GGC GAG TCT CCA AAG CTC CTA ATC TAT GTG GAG NNS NNS NNS TCT GGA GTC  
 CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGG ( 配列番号:134)

【 図 3 1 F 】

FIGURE 31F

オリゴ2-5L  
 CAG AGG CCA GGC GAG TCT CCA AAG CTC CTA ATC TAT TGC GTG TCT AAA NNS NNS NNS GGA CTC  
 CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGG ( 配列番号 :135)

CDR L3 縮重オリゴヌクレオチド (7)

| 系         | コード  | CDR | ラジカ-名 | 長さ(ntd) |
|-----------|------|-----|-------|---------|
| 3-631-436 | 3-1L | L3  | L3-1  | 99      |
| 3-631-436 | 3-2L | L3  | L3-2  | 99      |
| 3-631-436 | 3-3L | L3  | L3-3  | 99      |
| 3-631-436 | 3-4L | L3  | L3-4  | 99      |
| 3-631-436 | 3-5L | L3  | L3-5  | 99      |
| 3-631-436 | 3-6L | L3  | L3-6  | 99      |
| 3-631-436 | 3-7L | L3  | L3-7  | 99      |

オリゴ3-1L  
 AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAC TGC TTG NNS NNS NNS ACA CAT TTT CCG TGG ACG  
 TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCG ( 配列番号 :136)

オリゴ3-2L  
 AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAC TGC TTG NNS NNS NNS CAT TTT CCG TGG ACG  
 TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCG ( 配列番号 :137)

オリゴ3-3L  
 AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAC TGC TTG CAA NNS NNS NNS TTT CCG TGG  
 ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCG ( 配列番号 :138)

オリゴ3-4L  
 AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAC TGC TTG CAA GCT NNS NNS NNS CCG TGG ACG  
 TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCG ( 配列番号 :139)

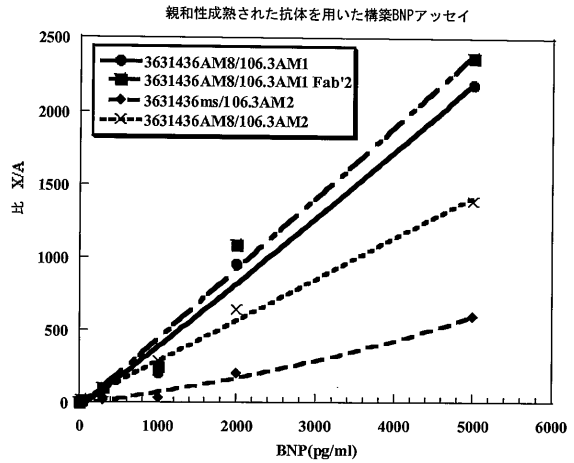
オリゴ3-5L  
 AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAC TGC TTG CAA GCT ACA NNS NNS NNS TGG ACG  
 TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCG ( 配列番号 :140)

オリゴ3-6L  
 AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAC TGC TTG CAA GCT ACA NNS NNS NNS ACG  
 TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCG ( 配列番号 :141)

オリゴ3-7L  
 AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAC TGC TTG CAA GCT ACA CAT TTT NNS NNS NNS  
 TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCG ( 配列番号 :142)

【 図 3 2 】

FIGURE 32



【 配列表 】

2010527920000001 .app

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               | International application No.<br>PCT/US 08/62973                                                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - C12P 21/08 (2008.04)<br>USPC - 530/388.1; 530/388.24<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                   |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>USPC - 530/388.1, 388.24<br><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>USPC - 530/387.1, 387.9, 388.25; 435/7.1, 326, 336 (text search-see search terms below)<br><br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>PubWEST(PGPB,USPT,EPAB,JPAB); Google/Scholar; PubMed (text search, see terms below)<br>Search Terms: anti-BNP, anti-hBNP, BNP, hBNP, antibody, CDR1, CDR2, CDR3, mutate, mutation, dissociation rate, k.sub.off, k.sub.d, association rate, k.sub.on, k.sub.a, equilibrium dissociation, K.sub.D, affinity maturation, 106.3, 3-631-436.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                   |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                            | Relevant to claim No.                                                                                                                             |
| X<br>-----<br>Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | US 2006/0183154 A1 (SHIH et al.) 17 August 2006 (17.08.2006) Figures 5a and 5b; Table 2; para [0012], [0014], [0017]-[0019], [0022], [0132]   | 18-28, 33-48<br><br>1-17, 27-32, 49                                                                                                               |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2006/0121242 A1 (DALL'ACQUA et al.) 8 June 2006 (08.06.2006) Abstract, Figure 15B, para [0093], [0164], [0249], [0385], [0410]             | 1-17, 27-32, 49                                                                                                                                   |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Boder et al. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. PNAS, 2000, Vol 97, pp 10701-10705 | 1-49                                                                                                                                              |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                   |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                   |
| Date of the actual completion of the international search<br>23 August 2008 (23.08.2008)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                               | Date of mailing of the international search report<br><br><div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">02 SEP 2008</div> |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-3201                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                               | Authorized officer:<br>Lee W. Young<br><br><small>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br/>PCT OSP: 571-272-7774</small>                                    |

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.             | F I     |        | テーマコード(参考) |
|--------------------------|---------|--------|------------|
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 | N          |
| A 6 1 P 5/00 (2006.01)   | A 6 1 P | 5/00   |            |
| A 6 1 P 7/12 (2006.01)   | A 6 1 P | 7/12   |            |
| A 6 1 P 7/10 (2006.01)   | A 6 1 P | 7/10   |            |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01)  | C 1 2 P | 21/08  |            |

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 プロフィー, スーザン・イー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60046、リンデンハースト、マラード・ドライブ・2477

(72) 発明者 テイーマン, ブライアン・シー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60126、エルムハースト、サウス・レックス・ブルバード・140

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA55 CA02 CA07 DA12 EA04  
4B064 AG27 CA06 CA19 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA91X AA91Y AB05 AC14 BA08 CA25 CA44 CA46  
4C085 AA14 BB07 CC21 DD62 EE01 GG01 GG08  
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 EA27 FA74

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | ヒトBNP免疫特异的抗体                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2010527920A</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 公开(公告)日 | 2010-08-19 |
| 申请号            | JP2010507637                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 申请日     | 2008-05-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 雅培公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 雅培制药                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |         |            |
| [标]发明人         | プロフィースーザンイー<br>テーマンブライアンシー                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |            |
| 发明人            | プロフィー,スーザン・イー<br>テーマン,ブライアン・シー                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| IPC分类号         | C07K16/26 C07K16/46 C12N5/10 C12N15/09 G01N33/53 A61K39/395 A61P5/00 A61P7/12 A61P7/10 C12P21/08                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| CPC分类号         | A61P5/00 A61P7/10 A61P7/12 C07K16/26 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2317/92 G01N33/74 G01N2333/58 G01N2800/325 Y10S435/975                                                                                                                                                                                                                                                               |         |            |
| FI分类号          | C07K16/26.ZNA C07K16/46 C12N5/00.102 C12N15/00.A G01N33/53.B A61K39/395.N A61P5/00 A61P7/12 A61P7/10 C12P21/08                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA55 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA12 4B024/EA04 4B064/AG27 4B064/CA06 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB07 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA27 4H045/FA74 |         |            |
| 代理人(译)         | Masarushin大崎                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |            |
| 优先权            | 11/745963 2007-05-08 US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |

摘要(译)

本发明涉及免疫特异性结合具有高结合亲和力的人脑利尿钠肽或人脑利尿钠肽片段的抗体，产生和选择所述抗体的方法，人脑利尿钠肽或人脑利尿钠肽片段的免疫测定法。所述抗体和含有所述抗体的治疗组合物。

