

(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2009-514975

(P2009-514975A)

(43) 公表日 平成21年4月9日(2009.4.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18 ZNA	4B024
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B064
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4B065
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4C085
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-540182 (P2008-540182)
 (86) (22) 出願日 平成18年11月9日 (2006.11.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年7月1日 (2008.7.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/043608
 (87) 国際公開番号 W02007/056507
 (87) 国際公開日 平成19年5月18日 (2007.5.18)
 (31) 優先権主張番号 60/734,964
 (32) 優先日 平成17年11月9日 (2005.11.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

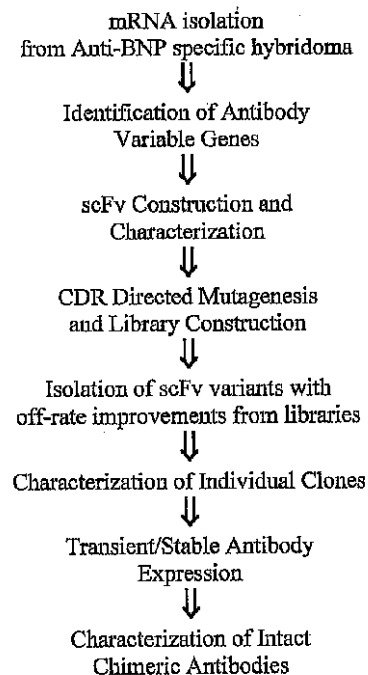
(71) 出願人 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国、イリノイ州 60064
 、アボット・パーク、アボット・パーク・
 ロード 100、エービー6エー1 0
 377
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100140523
 弁理士 渡邊 千尋
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教

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】

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 倍改善している、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。

【請求項 2】

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 に記載の抗体。

【請求項 3】

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 10 倍の改善を示す、請求項 1 又は請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

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 15 倍の改善を示す、請求項 1 から請求項 3 の何れかに記載の抗体。

【請求項 5】

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 20 倍の改善を示す、請求項 1 から請求項 4 の何れかに記載の抗体。

【請求項 6】

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 25 倍の改善を示す、請求項 1 から請求項 5 の何れかに記載の抗体。

【請求項 7】

モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組み換え抗体、キメラ抗体、1本鎖 Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab 断片、 $F(a b')$ 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 6 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

hBNP に免疫特異的に結合する単離抗体 (該抗体は、約 5.0×10^4 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。)。

【請求項 9】

約 3.3×10^4 から約 $1.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間の会合速度を有する、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

約 2.5×10^4 から約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間の会合速度を有する、請求項 8 又は請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

約 2.4×10^4 から約 $1.35 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間の会合速度を有する、請求項 8 から請求項 10 の何れかに記載の抗体。

【請求項 12】

モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組み換え抗体、キメラ抗体、1本鎖 Fv、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab 断片、 $F(a b')$ 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 8 から請求項 11 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

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8から請求項12の何れか一項に記載の抗体。

【請求項14】

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、免疫特異的にhBNPに結合する単離抗体。

【請求項15】

約 1.0×10^{-3} から約 $1.0 \times 10^{-5} \cdot s^{-1}$ の間の解離速度を有する、請求項14に記載の抗体。

【請求項16】

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、請求項14又は請求項15に記載の抗体。

【請求項17】

モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組み換え抗体、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14から請求項16の何れか一項に記載の抗体。

【請求項18】

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14から請求項17の何れか一項に記載の抗体。

【請求項19】

約 $2 \times 10^{-11} M$ から約 $1 \times 10^{-15} M$ 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。

【請求項20】

約 $3.0 \times 10^{-11} M$ から約 $1.0 \times 10^{-14} M$ の間の平衡解離定数を有する、請求項19に記載の抗体。

【請求項21】

約 $4.0 \times 10^{-11} M$ から約 $8.0 \times 10^{-13} M$ の間の平衡解離定数を有する、請求項19又は請求項20に記載の抗体。

【請求項22】

約 $4.2 \times 10^{-11} M$ から約 $7.4 \times 10^{-13} M$ の間の平衡解離定数を有する、請求項19から請求項21の何れか一項に記載の抗体。

【請求項23】

モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組み換え抗体、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19から請求項22の何れか一項に記載の抗体。

【請求項24】

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19から請求項23の何れか一項に記載の抗体。

【請求項25】

A.T.C.C.受託番号PTA-6987を有する、チャイニーズハムスター卵巣(「CHO」)細胞株AM1。

【請求項26】

A.T.C.C.受託番号PTA-6987を有するCHO細胞株AM1から抽出されたDNAから作製された抗体。

【請求項27】

CHO細胞株AM1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-6987を有する。)

10

20

30

40

50

【請求項28】

hBNPに免疫特異的に結合する単離抗体（該抗体は、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、

（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；

10

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；

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；

20

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；

（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；

30

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するか、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するか、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

【請求項29】

50

X a a₁ がアラニンであり、
 X a a₂ がチロシンであり、
 X a a₃ がセリンであり、
 X a a₄ がグルタミンであり、
 X a a₅ がセリンであり、
 X a a₆ がアスパラギンであり、
 X a a₇ がロイシンであり、
 X a a₈ がグルタミン酸である、請求項 2 8 に記載の抗体。

【請求項 3 0】

X a a₁ がプロリンであり、
 X a a₂ がイソロイシンであり、
 X a a₃ がグルタミンであり、
 X a a₄ がフェニルアラニンであり、
 X a a₅ がアラニンであり、
 X a a₆ がアスパラギンであり、
 X a a₇ がロイシンであり、
 X a a₈ がグルタミン酸である、請求項 2 8 に記載の抗体。

10

【請求項 3 1】

X a a₁ がプロリンであり、
 X a a₂ がイソロイシンであり、
 X a a₃ がチロシンであり、
 X a a₄ がアラニンであり、
 X a a₅ がセリンであり、
 X a a₆ がアスパラギンであり、
 X a a₇ がロイシンであり、
 X a a₈ がグルタミン酸である、請求項 2 8 に記載の抗体。

20

【請求項 3 2】

X a a₁ がプロリンであり、
 X a a₂ がイソロイシンであり、
 X a a₃ がグルタミンであり、
 X a a₄ がトリプトファンであり、
 X a a₅ がグリシンであり、
 X a a₆ がアスパラギンであり、
 X a a₇ がロイシンであり、
 X a a₈ がグルタミン酸である、請求項 2 8 に記載の抗体。

30

【請求項 3 3】

X a a₁ がプロリンであり、
 X a a₂ がイソロイシンであり、
 X a a₃ がスレオニンであり、
 X a a₄ がトリプトファンであり、
 X a a₅ がアスパラギン酸であり、
 X a a₆ がアスパラギンであり、
 X a a₇ がロイシンであり、
 X a a₈ がグルタミン酸である、請求項 2 8 に記載の抗体。

40

【請求項 3 4】

X a a₁ がプロリンであり、
 X a a₂ がイソロイシンであり、
 X a a₃ がアルギニンであり、
 X a a₄ がトリプトファンであり、
 X a a₅ がプロリンであり、

50

X a a₆ がアスパラギンであり、
 X a a₇ がロイシンであり、
 X a a₈ がグルタミン酸である、請求項 2 8 に記載の抗体。

【請求項 3 5】

X a a₁ がプロリンであり、
 X a a₂ がイソロイシンであり、
 X a a₃ がアラニンであり、
 X a a₄ がチロシンであり、
 X a a₅ がグリシンであり、
 X a a₆ がアスパラギンであり、
 X a a₇ がロイシンであり、
 X a a₈ がグルタミン酸である、請求項 2 8 に記載の抗体。

10

【請求項 3 6】

X a a₁ がプロリンであり、
 X a a₂ がイソロイシンであり、
 X a a₃ がアスパラギンであり、
 X a a₄ がトリプトファンであり、
 X a a₅ がプロリンであり、
 X a a₆ がアスパラギンであり、
 X a a₇ がロイシンであり、
 X a a₈ がグルタミン酸である、請求項 2 8 に記載の抗体。

20

【請求項 3 7】

X a a₁ がプロリンであり、
 X a a₂ がイソロイシンであり、
 X a a₃ がセリンであり、
 X a a₄ がグルタミンであり、
 X a a₅ がセリンであり、
 X a a₆ がシステインであり、
 X a a₇ がグリシンであり、
 X a a₈ がトリプトファンである、請求項 2 8 に記載の抗体。

30

【請求項 3 8】

X a a₁ がプロリンであり、
 X a a₂ がイソロイシンであり、
 X a a₃ がセリンであり、
 X a a₄ がグルタミンであり、
 X a a₅ がセリンであり、
 X a a₆ がシステインであり、
 X a a₇ がアラニンであり、
 X a a₈ がプロリンである、請求項 2 8 に記載の抗体。

【請求項 3 9】

約 2.0×10^{-11} M から約 1.0×10^{-15} M の間の平衡解離定数を有する、請求項 2 6 から請求項 3 8 の何れか一項に記載の抗体。

40

【請求項 4 0】

約 3.0×10^{-11} M から約 1.0×10^{-14} M の間の平衡解離定数を有する、請求項 2 6 から請求項 3 9 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 4 1】

約 4.0×10^{-11} M から約 8.0×10^{-13} M の間の平衡解離定数を有する、請求項 2 6 から請求項 4 0 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 4 2】

約 4.2×10^{-11} M から約 7.4×10^{-13} M の間の平衡解離定数を有する、請

50

求項 26 から請求項 41 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 43】

約 5.0×10^4 から約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間の会合速度 (k_a) をさらに含む、請求項 26 から請求項 42 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 44】

約 1.0×10^{-3} から約 $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ の間の解離速度 (k_d) をさらに含む、請求項 26 から請求項 43 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 45】

モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組み換え抗体、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 26 から請求項 44 の何れか一項に記載の抗体。

10

【請求項 46】

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 26 から請求項 45 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 47】

請求項 1 から請求項 24 及び請求項 25 から請求項 46 の何れか一項に記載の抗体を含む、hBNP又はhBNP断片に対する免疫アッセイ。

【請求項 48】

hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合する1種類の抗体を含む、請求項 47 に記載の免疫アッセイ。

20

【請求項 49】

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 47 又は請求項 48 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 50】

請求項 1 から請求項 24 及び請求項 25 から請求項 50 の何れか一項に記載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】

30

【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。

【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、CNP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。

40

【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、

50

「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(Valli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

【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。

20

【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。前述。

30

【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))

50

、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今だ意見の分かれるところである。(Yandel、J. Internal Med.、235:561-576(1994)参照)。

【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つのキャリブレーター及び、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。キャリブレーター及び対照に加えて、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。

【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。

【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ある方法は、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。

【発明の開示】

【0013】

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

10

20

30

40

50

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、組み換え抗体、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。

【0014】

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、組み換え抗体、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。

10

【0015】

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、組み換え抗体、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。

20

【0016】

別の態様において、本発明は、約 $2 \times 10^{-11} M$ から約 $1 \times 10^{-15} M$ 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 $3.0 \times 10^{-11} M$ から約 $1.0 \times 10^{-14} M$ の間、約 $4.0 \times 10^{-11} M$ から約 $8.0 \times 10^{-13} M$ の間、又は約 $4.2 \times 10^{-11} M$ から約 $7.4 \times 10^{-13} M$ 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、組み換え抗体、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。

30

40

【0017】

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AM1に関する。

【0018】

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AM1から抽出されたDNAから作製された抗体に関する。

【0019】

さらに別の態様において、本発明は、CHO細胞株AM1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。)

50

【0020】

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；

10

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；

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；

20

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；

(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；

30

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するか、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するか、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

【0021】

50

より具体的には、上述の単離抗体において：

X a a₁ はアラニンであり得；
 X a a₂ はチロシンであり得；
 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：

10

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 はグルタミンであり得；
 X a a₄ はフェニルアラニンであり得；
 X a a₅ はアラニンであり得；
 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：

20

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：

30

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：

40

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；
 X a a₄ はトリプトファンであり得；

50

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；
 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

10

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；
 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：

20

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：

30

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。

40

【0022】

上述の抗体は、約 2.0×10^{-11} M から約 1.0×10^{-15} M の間、約 3.0×10^{-11} M から約 1.0×10^{-14} M の間、約 4.0×10^{-11} M から約 8.0×10^{-13} M の間又は約 4.2×10^{-11} 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、組み換え抗体、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

50

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。

【0023】

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。

【0024】

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。

【0025】

図面の簡単な説明

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。

【0026】

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。

【0027】

図3A-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。

【0028】

図4は、106.3 1本鎖可変断片(「scFv」)の略図である。

【0029】

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。

【0030】

図6A-6Bは、106.3 scFvのヌクレオチド配列を示す。

【0031】

図7A-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とインキュベートし、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7A)及びヤギ抗マウス-フィコエリスリン(GAM:PE)(図7B)とインキュベートしたことを示す。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。PEA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(図7A);0、25、50、75、100、125(図7B)。

【0032】

図8は、106.3 scFvオフ速度測定を示す。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)の飽和濃度とインキュベートした。次に、細胞を洗浄し、非標識BNP 1-32c(配列番号5)の飽和濃度とインキュベートした。各時点で、細胞を氷上に移し、洗浄し、SA:PEとインキュベートした。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、時間 x である M_0 (x は、測定されている

10

20

30

40

50

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変異誘発ライブラリを分類するために使用された時間であった。

【0033】

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ごとに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。

【0034】

図10は、酵母相同組み換えを用いてどのように106.3 scFvライブラリを構築するかを示す図表である。より具体的には、ライブラリにおいて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。

10

【0035】

図11は、CDR変異誘発ライブラリから単離された106.3 scFv変異体のオフ速度が改善したこと(すなわち前記変異体の k_{off} が遅くなった。)を示す概略である。

【0036】

図12A-Cは、scFv 106.3変異体の配列特性を示す。より具体的には、106.3変異体からプラスミドDNAを単離し、scFv遺伝子の配列決定を行った。

20

【0037】

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。

【0038】

図14A-H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。

【0039】

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BNP1-32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BNP1-32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)。

30

【0040】

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: 菱形、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

40

【0041】

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: 菱形、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

【0042】

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。

50

【0043】

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。

【0044】

図20は、BIACoreを用いた抗体AMIのアラニンペプチドマッピングを示す。様々なBNPペプチドを含有するBNP複合体の k_{off} の上昇(倍)を示す。

【0045】

I. 導入：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hBNP又はhBNP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。

10

【0046】

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)、組み換え抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv(scFv)、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(sdFv)及び抗イデオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗Id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、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂)又はサブクラスのものであり得る。

20

【0047】

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。

30

抗体(Ab) + 抗原(Ag) Ab - Ag

【0048】

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、BIACore(登録商標)(Sweden)アッセイを使用することができる。さらに、Sapidyne Instruments(Boise, Idaho)から入手可能なKinExA(登録商標)(Kinetic Exclusion Assay)アッセイを使用することもできる。

【0049】

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。

40

抗体(Ab) + 抗原(Ag) Ab - Ag

【0050】

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、BIACore(登録商標)(Sweden)アッセイを使用することができる。さらに、Sapidyne Instruments(Boise, Idaho)から入手可能なKinExA(登録商標)(Kinetic Exclusion Assay)アッセイを使用することもできる。

50

【0051】

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。

【0052】

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。

10

【0053】

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」又は「hBNPポリペプチド」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。

【0054】

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；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、8-12、8-11、8-10、8-9、8-8、8-7、8-6、8-5、8-4、8-3、8-2、8-1

20

30

40

50

8、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。

【0055】

本明細書中で使用する場合、「ヒト化」抗体という用語は、免疫グロブリン変異体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。

【0056】

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断片に対する平衡解離定数(K_D)が少なくとも2.0×10⁻¹¹M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。

【0057】

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、組み換え技術により産生された場合、実質的

10

20

30

40

50

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。

【0058】

本明細書中で使用する場合、「ストリンジェントな条件」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に対するハイブリダイゼーションとそれに続く約50-65の0.2xSSC/0.1%SDS中での1回以上の洗浄を指す。「非常にストリンジェントな条件下」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ダイゼーションとそれに続く約68の0.1xSSC/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ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下を指す(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)。

10

【0059】

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。

20

【0060】

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。

【0061】

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得る。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。通常、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。

30

【0062】

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。具体的に、ある態様において、本発明は、hBNP又は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免疫特異的に結合し、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(本明細書中で「野生型」とも呼ぶ。)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倍改善している抗体に関する。より具体的には、本発明の抗体は、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免疫特異的に結合し、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、その平衡解離定数(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、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

40

50

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倍改善している。

【0063】

別の態様において、本発明は、免疫特異的にhBNP又はhBNP断片に結合し、 k_{on} (又は k_a)が、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 $1.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ であるか又は k_{on} (又は k_a)が、約 $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 、約 $3.3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ 、約 $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.25 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、約 $2.4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の範囲である抗体に関する。

10

【0064】

別の態様において、本発明の抗体は、少なくとも約 $2.4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、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)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するか、又は約 $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 、約 $3.3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ 、約 $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.25 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、約 $2.4 \times 10^{-11} M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の範囲の k_{on} (又は k_a)を有する。

20

【0065】

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AM1 (106.3 L1 B24/H2288としても知られる。)により産生される抗体を提供する。この細胞株により産生される抗体は、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)でhBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基5から13に結合するか又は約 $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 、約 $3.3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ 、約 $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.25 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、約 $2.4 \times 10^{-11} M^{-1} s^{-1}$ から約 $1.35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の範囲の k_{on} (又は k_a)を有する。

30

【0066】

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、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合し、 k_{off} (又は k_d)が少なくとも $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-6} s^{-1}$ であるか又は k_{off} (又は k_d)が $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-6} s^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 又は $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ の範囲である抗体を提供する。

40

【0067】

別の態様において、本発明の抗体は、少なくとも $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-6} s^{-1}$ の k_{off} (又は k_{off})でヒトBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基5

50

から13に免疫特異的に結合するか又は $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 又は $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の範囲の k_{off} (又は k_d)を有する。

【0068】

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AM1により産生される抗体を提供する。この細胞株により産生される抗体は、少なくとも $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ の k_{off} (又は k_d)でhBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基5から13に結合するか又は $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 又は $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の範囲の k_{off} (又は k_d)を有する。

10

【0069】

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、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合し、少なくとも $2.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、少なくとも $3.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、少なくとも $4.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、少なくとも $4.2 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、少なくとも $7.4 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、少なくとも $8.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-15} \text{ M}$ の K_D を有するか又は $2.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-15} \text{ M}$ 、 $3.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $1 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、 $4.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $8.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ 又は $4.2 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $7.4 \times 10^{-13} \text{ M}$ の範囲の K_D を有する抗体に関する。

20

【0070】

別の態様において、本発明の抗体は、少なくとも $2.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、少なくとも $3.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、少なくとも $4.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、少なくとも $4.2 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、少なくとも $7.4 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、少なくとも $8.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-15} \text{ M}$ の K_D でヒトBNPのアミノ酸残基5から13に免疫特異的に結合するか又は $2.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-15} \text{ M}$ 、 $3.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $1 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、 $4.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $8.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ 又は $4.2 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $7.4 \times 10^{-13} \text{ M}$ の範囲である K_D を有する。

30

【0071】

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AM1により産生される抗体を提供する。この細胞株により産生される抗体は、 $4.2 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $7.4 \times 10^{-13} \text{ M}$ の K_D でhBNP又はhBNP断片のアミノ酸残基5から13に結合する。

【0072】

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(ATCC受託番号HB-12044)により産生される抗体の誘導体又は変異体である。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106.3により産生される抗体の誘導体又は変異体である抗体が、hBNP又はhBNP断片に対して高い結合親和性を示し得ることを発見した。より具体的には、本発明の抗体は、少なくとも約 $2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $1.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $1.35 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の k_{on} (又は k_a)を示すか又は約 $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約 $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約 $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約 $2.4 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $1.35 \times$

40

50

$1.0 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の範囲の k_{on} (又は k_a) を有し、少なくとも $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ の k_{off} (又は k_d) を有するか又は $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 又は $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の範囲の k_{off} (又は k_d) を有し、少なくとも $2.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、少なくとも $3.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、少なくとも $4.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、少なくとも $4.2 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、少なくとも $7.4 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、少なくとも $8.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、少なくとも $1.0 \times 10^{-15} \text{ M}$ の K_D を有するか又は $2.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-15} \text{ M}$ 、 $3.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、 $4.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $8.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ 又は $4.2 \times 10^{-11} \text{ M}$ から $7.4 \times 10^{-13} \text{ M}$ の範囲の K_D を有する。本発明の誘導化又は変異抗体は、ハイブリドーマ細胞株 106.3 (本明細書中で「野生型」とも呼ぶ。) 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 及び / 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 CDR 1、軽鎖 CDR 2 及び / 又は軽鎖 CDR 3) において少なくとも 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一部分において (以下に限定されないが、抗体のフレームワーク領域など) 1 以上のその他の変異 (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当技術分野で周知であり、これには、部位特異的変異誘発及び PCR による変異誘発の使用が含まれる (以下で詳細に考察する。)。

10

20

30

40

50

【0073】

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 断片に免疫特異的に結合し、次の式のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2 を含む：

$\text{Trp} - \text{Ile} - \text{Asn} - \text{Thr} - \text{His} - \text{Thr} - \text{Gly} - \text{Glu} - \text{Xaa}_1 - \text{Xaa}_2 - \text{Tyr} - \text{Ala} - \text{Asp} - \text{Asp} - \text{Phe} - \text{Lys} - \text{Gly}$ (配列番号 12)

(式中、 Xaa_1 は、プロリン及びアラニンからなる群から選択され、 Xaa_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、ただし、 Xaa_1 がプロリンである場合、 Xaa_2 はイソロイシンではない。)。

【0074】

またさらなる態様において、本発明の抗体は、hBNP 又は hBNP 断片に免疫特異的に結合し、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2 を含む。別の態様において、本発明は、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 又は hBNP 断片に免疫特異的に結合する抗体に関する。

【0075】

さらに別の態様において、本発明の抗体は、hBNP 又は hBNP 断片に免疫特異的に結合し、次の式を有するアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1 を含む：

$\text{Lys} - \text{Ala} - \text{Xaa}_3 - \text{Xaa}_4 - \text{Xaa}_5 - \text{Val} - \text{Asp} - \text{Tyr} - \text{Asn} - \text{Gly} - \text{Asp} - \text{Ser} - \text{Tyr} - \text{Leu} - \text{Asn}$ (配列番号 13)

(式中、 Xaa_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、 Xaa_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、 Xaa_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、ただし、 Xaa_4 がグルタミンであり、 Xaa_5 がセリンである場合、 Xaa_3 はセリンではない。)。

【0076】

またさらなる態様において、本抗体は、hBNP又はhBNP断片に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、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又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体に関する。

【0077】

さらに別の態様において、本発明の抗体は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合し、次の式を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2を含む：

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

(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、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、ただし、Xaa₇がロイシンであり、Xaa₈がグルタミン酸である場合、Xaa₆はアスパラギンではない。)

【0078】

またさらなる態様において、本抗体は、hBNP又はhBNP断片に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、配列番号23又は配列番号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又はhBNP断片に免疫特異的に結合する抗体に関する。

【0079】

またさらなる態様において、本発明の抗体は、hBNP又はhBNP断片に免疫特異的に結合し、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：

(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；

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；

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；

10

20

30

40

50

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；

(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するか、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するか、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。

10

20

【0080】

好ましくは、上述の式を有する抗体は、上述の式において、Xaa₁ - Xaa₈ は下記表2で示され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。

【0081】

【表1】

30

表2

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

40

【0082】

III. 核酸分子

50

本発明は、hBNP又はhBNP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。ある態様において、本発明は、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、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倍改善した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断片のアミノ酸残基5から13を含むエピトープに結合し、ハイブリドーマ細胞株106.3(該細胞は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、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倍改善した抗体をコードする本明細書中に記載の核酸分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズ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

20

【0083】

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 2.0×10^{-11} M、少なくとも 3.0×10^{-11} M、少なくとも 4.0×10^{-11} M、少なくとも 4.2×10^{-11} M、少なくとも 1.0×10^{-12} M、少なくとも 1.0×10^{-13} M、少なくとも 7.4×10^{-13} M、少なくとも 8.0×10^{-13} M、少なくとも 1.0×10^{-14} M、少なくとも 1.0×10^{-15} Mの K_D を有するか又は、 2.0×10^{-11} Mから 1.0×10^{-15} M、 3.0×10^{-11} Mから 1×10^{-14} M、 4.0×10^{-11} Mから 8.0×10^{-13} M又は 4.2×10^{-11} 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 2.0×10^{-11} M、少なくとも 3.0×10^{-11} M、少なくとも 4.0×10^{-11} M、少なくとも 4.2×10^{-11} M、少なくとも 1.0×10^{-12} M、少なくとも 1.0×10^{-13} M、少なくとも 7.4×10^{-13} M、少なくとも 8.0×10^{-13} M、少なくとも 1.0×10^{-14} M、少なくとも 1.0×10^{-15} Mの K_D を有するか又は 2.0×10^{-11} Mから 1.0×10^{-15} M、 3.0×10^{-11} Mから 1×10^{-14} M、 4.0×10^{-11} Mから 8.0×10^{-13} M又は 4.2×10^{-11} 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ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ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

40

【0084】

別の態様において、本単離核酸分子は、少なくとも 2.0×10^{-11} M、少なくとも 3.0×10^{-11} M、少なくとも 4.0×10^{-11} M、少なくとも 4.2×10^{-11} M、少なくとも 1.0×10^{-12} M、少なくとも 1.0×10^{-13} M、少なくとも 7.4×10^{-13} M、少なくとも 8.0×10^{-13} M、少なくとも 1.0×10^{-14} M、少なくとも 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するか又は 2.0×10^{-11} Mから 1.0×10^{-15} M、 3.0×10^{-11} Mから 1×10^{-14} M、 4.0×10^{-11} Mから 8.0×10^{-13} M又は 4.2×10^{-11} 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 2.0×10^{-11} M、少なくとも 3.0×10^{-11} M、少なくとも 4.0×10^{-11} M、少なくとも 4.2×10^{-11} M

50

、少なくとも 1.0×10^{-12} M、少なくとも 1.0×10^{-13} M、少なくとも 7.4×10^{-13} M、少なくとも 8.0×10^{-13} M、少なくとも 1.0×10^{-14} M、少なくとも 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するか又は 2.0×10^{-11} M から 1.0×10^{-15} M、 3.0×10^{-11} M から 1×10^{-14} M、 4.0×10^{-11} M から 8.0×10^{-13} M 又は 4.2×10^{-11} 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ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0085】

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 AM1 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 AM1 により産生される抗体のヌクレオチド配列を含む。）にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0086】

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変異体を含む。）。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 $2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $1.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $1.35 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の k_{on} (又は k_a) を示すか又は $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $1.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $1.35 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 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) を有するか又は $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 又は $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の範囲の k_{off} (又は k_d) を有し、少なくとも約 2.0×10^{-11} M、少なくとも約 3.0×10^{-11} M、少なくとも約 4.0×10^{-11} M、少なくとも約 4.2×10^{-11} M、少なくとも約 1.0×10^{-12} M、少なくとも約 1.0×10^{-13} M、少なくとも約 7.4×10^{-13} M、少なくとも約 8.0×10^{-13} M、少なくとも約 1.0×10^{-14} M、少なくとも約 1.0×10^{-15} M、少なくとも約 1.0×10^{-16} M の K_D を有するか又は 2.0×10^{-11} M から 1.0×10^{-16} M、 2.0×10^{-11} M から 1.0×10^{-15} M、 3.0×10^{-11} M から 1×10^{-14} M、 4.0×10^{-11} M から 8.0×10^{-13} M 又は 4.2×10^{-11} 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変異体である抗体が産生され得ることを発見した。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 CDR1、重鎖 CDR2 又は重鎖 CDR3）の少なくとも 1 つにおいて少なくとも 1 つの変異（欠失、付加及び / 又は置換など）、軽鎖 CDR 領域（例えば、軽鎖 CDR1、軽鎖 CDR2 又は軽鎖 CDR3）において少なくとも 1 つの変異（欠失、付加及び / 又は置換など）を含む。本発明の抗体をコードする核酸分子において変異（欠失、付加及び / 又は置換など）を導入するために、

10

20

30

40

50

結果としてアミノ酸置換を生じさせる、部位特異的変異誘発及びPCRによる変異誘発を含む、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アミノ酸未滿の置換、5アミノ酸未滿の置換、4アミノ酸未滿の置換、3アミノ酸未滿の置換又は2アミノ酸未滿の置換を含む。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、飽和変異誘発などによって、コード配列の全て又は一部に、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変異体を同定するために、得られた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。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

20

【0087】

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、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)

(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ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ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

【0088】

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、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ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0089】

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、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

40

50

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ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0090】

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、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ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ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

【0091】

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、次の式を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2を有する：

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

(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、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、ただし、Xaa₇がロイシンであり、Xaa₈がグルタミン酸である場合、Xaa₆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ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ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

【0092】

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、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ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ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

【0093】

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、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ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ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

【0094】

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、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：

(a) 重鎖CDR1は、Gly - Tyr - Thr - Phe - Thr - His - Tyr -

50

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 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 - 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 1 2) 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 C D R 3 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 C D R 1 は、L y s - A l a - X a a ₃ - X a a ₄ - X a a ₅ - 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 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ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ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 0 9 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 A M 1 により産生される。) をコードする単離核酸分子を

【 0 0 9 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 A M 1 により産生される。) をコードする単離核酸分子を

【 0 0 9 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 A M 1 により産生される。) をコードする単離核酸分子を

【 0 0 9 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 A M 1 により産生される。) をコードする単離核酸分子を

【 0 0 9 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 A M 1 により産生される。) をコードする単離核酸分子を

【 0 0 9 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 A M 1 により産生される。) をコードする単離核酸分子を

【 0 0 9 5 】

10

20

30

40

50

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AM1により産生される。）をコードする核酸分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子も提供する。

【0096】

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。

【0097】

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み換え発現により、本発明の抗体を調製することができる。抗体を組み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以上の組み換え発現ベクターを宿主細胞にトランスフェクトする。Sambrook、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み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、標準的組み換え核酸（DNA）法を使用する。

10

20

【0098】

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AM1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、登録番号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。

30

【0099】

例えば、106.3可変重鎖（VH）及び可変（VL）核酸断片を得たら、本明細書中で開示するAM1又はAM1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、変異誘発を行うことができる。異なるAM1又はAM1関連配列におけるアミノ酸残基を同定するために、106.3VH及びVL DNA配列によりコードされるアミノ酸配列をAM1又はAM1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であるかを調べるために、遺伝子コードを用いて、変異配列がAM1又はAM1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の適切なヌクレオチドに対して変異誘導を行う。PCRによる変異誘発（この方法では、PCR産物が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。）又は部位特異的変異誘発などの標準的方法により、抗体106.3配列の変異誘発を行うことができる。

40

【0100】

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

50

Reagents, Midland, TX, www. oligos.com)。

【0101】

(上述のような、VH及びVL遺伝子の、増幅及び変異誘発により)AM1又はAM1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み換え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

【0102】

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変異誘発を行い得る。

【0103】

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、Kabat、E.A.ら、Sequences of Protein
s 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。

20

【0104】

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、Kabat、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。

30

【0105】

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、Kabat、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、Kabat付番システムを使用する。

40

【0106】

scFv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GPAKELTPLKEAKVS(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VH及びVLコード核酸断片を操作可能に連結する。本発明で使用できるその他のリンカー配列の例は、Birdら、Science 242:423-426(1988

50

)、Huston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。

【0107】

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ライゲーション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るか、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。

10

【0108】

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、VH及びVL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VHセグメントがCH「セグメント」に機能可能に連結され、ベクター内でVLセグメントがCLセグメントに機能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、組み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ー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。

20

【0109】

抗体鎖遺伝子に加えて、組み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、Goedel; 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。

30

40

【0110】

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

50

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。

【0111】

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トランスフェクトする。「トランスフェクション」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-デキストラントトランスフェクションなど、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包含するものとする。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抗体をアSEMBル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)。

10

【0112】

本発明の組み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、HEK-293細胞及びSP2細胞が含まれる。抗体遺伝子をコードする組み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。

20

【0113】

Fab断片、F(ab')₂断片s又はscFv分子などのインタクトな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トランスフェクト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、組み換え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。

30

【0114】

本発明の抗体又はその抗原結合部分の組み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トランスフェクションにより、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードする組み換え発現ベクターをdhfr - CHO細胞に導入する。組み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。組み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トランスフェクトされたCHO細胞の選択が可能になる。トランスフェクトベクターから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。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、通常的に再スクリーニングした。最大量を産生するクローンはAM1であった。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、培地からインタクトな抗体を回収する。組み換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、培地から

40

50

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。

【0115】

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み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。AM1及びその変異体の重鎖CDR2領域をコードするアミノ酸配列を配列番号15で示す。AM1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。AM1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。AM1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。

【0116】

V. 組み換え抗体の選択

本明細書中で開示される、AM1又はAM1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は、組み換えコンビナトリアルライブラリ、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である。このようなライブラリ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Wittrup 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Wittrup 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。

【0117】

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:

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

(式中、m1は時間0での最大蛍光(* = 時間及びexp = 指数); m2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。); M0は時間x(xは測定している時間)であり; m3は系から生じているバックグラウンドである。)

【0118】

変異誘発ライブラリ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。

【0119】

CDR変異誘発ライブラリを作製するために、続く重及び軽鎖可変領域の変異誘発に対して、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。

【0120】

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

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CDR2領域内、VLのCDR1領域内及び/又はCDR2領域内で、無作為に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変異を行うことができる。酵母での相同組み換えにより、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に関連してhBNP又はhBNP断片への結合についてこれらの無作為変異VH及びVLセグメントを分析することができ; 次に、蛍光が強まっており、(a)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、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倍改善しているか、(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)を示すか又は $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 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 $1.25 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2.4 \times 10^{-11} M^{-1} s^{-1}$ から $1.35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の範囲の k_{on} (又は k_a)を有するか、(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 $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 又は $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ から $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ の範囲の k_{off} (又は k_d)を有するか、又は(d)少なくとも約 $2.0 \times 10^{-11} M$ 、少なくとも約 $3.0 \times 10^{-11} M$ 、少なくとも約 $4.0 \times 10^{-11} M$ 、少なくとも約 $4.2 \times 10^{-11} M$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-12} M$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-13} M$ 、少なくとも約 $7.4 \times 10^{-13} M$ 、少なくとも約 $8.0 \times 10^{-13} M$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-14} M$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-15} M$ の K_D を示すか又は $2.0 \times 10^{-11} M$ から $1.0 \times 10^{-15} M$ 、 $3.0 \times 10^{-11} M$ から $1 \times 10^{-14} M$ 、 $4.0 \times 10^{-11} M$ から $8.0 \times 10^{-13} M$ 又は $4.2 \times 10^{-11} M$ から $7.4 \times 10^{-13} M$ の範囲の K_D を有する、scFvを単離し、配列決定によりCDR変異を同定することができる。

【0121】

組み換えscFvディスプレイライブラリ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、標準的な組み換え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のスクリーニングにより単離された組み換えヒト抗体を発現させるために、抗体をコードするDNAを組み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。

【0122】

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ズ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。

【0123】

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。

10

【0124】

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。

【0125】

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。

20

【0126】

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種類の抗体は、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る（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。

30

【0127】

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発見した。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、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(3)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。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(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免疫特異的に結合する、二次抗体、好ましくはモノクローナル抗体、を含む。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。

40

【0128】

50

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1mLにつき、抗体 約5 μ g/mLから約1mg/mLを使用することができる。

10

【0129】

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。

20

【0130】

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、試験試料をインキュベートする。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2-6分間、最も好ましくは約3-4分間、インキュベートを行うことができる。

【0131】

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インキュベート時間が必要である。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、ルミナール、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マ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

30

40

50

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。

【0132】

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CSPS-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。)

10

【0133】

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hBNP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。

20

【0134】

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。

30

40

【0135】

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

50

いて、環状hBNP(1-32)を使用することもできる。

【0136】

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(antispieces)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3参照)。

10

【0137】

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インキュベートする。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、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。

20

【0138】

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。

【0139】

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、インタクトなhBNP1-32、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、hBNPのアミノ酸5-13の少なくとも3個(3)のアミノ酸を含むエピトープに特異的に結合する(本発明の抗体、具体的にはCHO細胞株AM1により産生される抗体など)か又は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する。標識し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

30

40

50

、 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 - 1
 6、 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

20

30

40

【0140】

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hB
 NP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、この抗体は、hBNPのアミノ酸5 - 13の少なく
 とも3個の(3)アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープ又は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AM1により産生される抗体である。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
 可能な標識によりこの抗体を標識することができる。

【0141】

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 - 1
 3を含有するアミノ酸配列を有する。

【0142】

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 h B N P ペプチド、h B N P ペプチド断片又はその h B N P 類似体、試験試料及び少なくとも 1 つの標識化抗体をインキュベートする。次に、2 種類の異なる種の h B N P - 抗体複合体を生成させる。具体的に、生成させた h B N P - 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 h B N P - 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 h B N P - 抗体複合体及び試験試料の残りの部分を固定化 h B N P - 抗体複合体から除去する。非固定化 h B N P 抗体複合体を除去したら、次に、固定化 h B N P - 抗体複合体中の検出可能な標識の量を定量する。次に、h B N P - 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 h B N P 又は h B N P 断片の濃度を調べることができる。既知の濃度の h B N P 又は h B N P 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

20

30

40

50

【0143】

蛍光偏光アッセイにおいて、ある実施形態で、非標識化 h B N P - 抗体複合体を形成させるために、h B N P 又はその h B N P 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 h B N P - 抗体複合体を蛍光標識した h B N P、h B N P 断片又はその h B N P 類似体に接触させる。標識化 h B N P、h B N P 断片又は h B N P 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 h B N P 又は h B N P 断片と競合する。形成された標識化 h B N P - 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 h B N P の量を調べる。

【0144】

好ましくは、蛍光偏光アッセイで使用する抗体は、h B N P のアミノ酸 5 - 13 の少なくとも 3 個の (3) アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープ又は B N P 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する。h B N P 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 C H O 細胞株 A M 1 により産生されるモノクローナル抗体である。

【0145】

好ましくは、h B N P ペプチド断片は、h B N P 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。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 h B N P ペプチド、h B N P ペプチド断片又はその h B N P 類似体及び試験試料及び少なくとも 1 つの標識化抗体をインキュベートする。

【0146】

あるいは、別の実施形態において、標識化 h B N P - 抗体複合体及び非標識化 h B N P - 抗体複合体の両方を形成させるために、蛍光標識化 h B N P、h B N P 断片又はその h B N P 類似体と、h B N P 又はその h B N P 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 h B N P - 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 h B N P の量を調べる。この免疫アッセイで使用する抗体は、h B N P のアミノ酸 5 - 13 の少なくとも 3 個の (3) アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープ又は h B N P 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AM1により産生されるモノクローナル抗体である。さらに、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

10

【0147】

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AM1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BNP-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、試験試料中の何らかの非標識化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、hBNPのアミノ酸5-13の少なくとも3個の(3)アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープ又はhBNPのアミノ酸13-20、13-19、13-18、13-17、13-16、14-20、14-19、14-18、14-17、14-16、15-20、15-19、15-18、16-20、16-19、17-24、17-23、17-22、17-21、17-20、17-19、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-24、19-23、19-22又は19-21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AM1により産生されるモノクローナル抗体である。さらに、hBNPペ

20

30

【0148】

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。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

40

50

、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。

【0149】

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。

10

【0150】

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。

20

【0151】

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。このような処方物の調製のための多くの方法が特許取得されているか、又は当業者に一般に知られている。（例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 編、Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 参照）。

30

【0152】

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。

40

【0153】

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。

50

【0154】

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む。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。

10

【0155】

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。

20

【0156】

ここで、実施例により、限定的ではなく、本発明の例を与える。

【実施例1】

【0157】

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)。

30

【0158】

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Wittrup, 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)。

40

【0159】

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)。

50

【0160】

PCR単一オーバーラップ伸長 (single overlap extension、SOE) を使用して、106.3scFv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、106.3scFvDNAをクローニングした。pYD41-106.3scFv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、106.3scFv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。

【0161】

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-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。

【0162】

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、pYD41-106.3scFv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時間インキュベートした。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0.5OD600 (1e7個の細胞/0.5OD/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106.3scFvを発現する酵母細胞をインキュベートし、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。)) とインキュベートした。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。

【0163】

酵母における、106.3scFv及び106.3変異体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 (~0.3µM) (配列番号5) 100倍モル過剰濃度及び抗-V5抗体 (2.5µg/mL) と0.05OD酵母 (1x10⁶個の細胞) をインキュベートすることにより、酵母における106.3scFv及び106.3変異体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) とともに室温にてインキュベートした (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

10

20

30

40

50

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、細胞をインキュベートし、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（「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8で示されるこの式中のオフ速度 m_2 は $8.4 \cdot 10^{-5}$ 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。

【0164】

変異誘発ライブラリからオフ速度が改善した106.3変異体を同定するために、オフ速度選別ストラテジーを用いた。したがって、変異誘発ライブラリ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変異誘発ライブラリを選別した。

10

【0165】

106.3 CDR特異的ライブラリ（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）に対して変異誘発を行った（例えば、図3-6及び配列番号6-11参照）。Kabat命名法を用いて、CDRループ長及び付番を定めた。個々のライブラリは、1つのライブラリ中、CDRの3ヶ所のアミノ酸位置が無作為に変異誘発され、変異誘発枠は1ライブラリにつき1アミノ酸シフトしていた（図9参照）。個々のライブラリに対するライブラリ多様性は、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個の変異体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（29個の可変重鎖及び25個の可変軽鎖ライブラリ）を作製した。

20

【0166】

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（ 3×10^8 個の細胞）と組み合わせ、Gietz及びSchiestlライブラリ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み換えのために、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を増殖させ、ライブラリ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。

30

40

【0167】

106.3変異誘発CDRライブラリ

オフ速度分類ストラテジーに基づき106.3ライブラリを分類した。106.3 CDR変異誘発ライブラリ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変異誘発ライブラリを洗浄し、ビオチン化環状BNP（1-32c）（配列番号5）及び抗-V5抗体とともにインキュベートし、2回洗浄し、非標識環状BNP（1-32c）（配列番号5）とともにインキュベートした。3

50

時間後、変異誘発ライブラリを2回洗浄し、SA-PE (1:200希釈)及びGAM-633 (1:200希釈)とともに30分間氷上でインキュベートした。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。

【0168】

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ティングし、30に72時間置いた。3種類のライブラリがwt106.3 scFvと比較して改善を示した：重鎖ライブラリH28、軽鎖ライブラリL1 (1-5プール)及びL2 (1-5プール)。これらのライブラリ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。

【0169】

選択した106.3変異体の分析

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変異体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。

【0170】

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変異体の配列を調べた。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リバース-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変異体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 Pos 8はCDR H2の8番目のアミノ酸である。)。

【0171】

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変異は両者とも、位置4にシステインを含有する。

【0172】

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変異体をキメラマウス-ヒトIgG₁/ヒトカップバ抗体に変換した。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, 18:53

10

20

30

40

50

22、(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ライゲーションし、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細胞にトランスフェクトした。次の106.3変異体: 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。

【0173】

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, 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ライゲーションした。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。

10

【0174】

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、ライゲーションして、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ールを用いて、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AM1に対して安定なCHO細胞株を開発し(「BNP106.3sc128am1CHO1162-236」及び「106.3 L1 B24/H2 288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。

20

【0175】

改変キメラ106.3変異体の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、Nordlin, 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。20 µL/分で0.4 M 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。10 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) 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、1 M エタノールアミン pH 8.5 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、100 µL/分の流速での100 mM 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中にてバイオセンサーにカップリングさせる。

30

40

【0176】

12 mg/mL BSA及び12 mg/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10 µg/mL濃度に希釈する。dH₂O中の100 µMのBNPの凍結 (-80

50

)一定分量をSPRランニング緩衝液に入れて100 pMの濃度に希釈する。

【0177】

25にて、10 μL/分で各抗BNP cAb 30 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100 μL/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、100 pM BNPの試料溶液に置き換える(シリンジ充填の間で)。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、100 μL/分の流速での100 mM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ブランク稼動を行う。

10

【0178】

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נס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、1:1 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。

【0179】

BIAcore SPRを用いて、野生型106.3 cAb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。106.3 AM1 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106.3 AM1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。

20

【0180】

改変キメラ106.3変異体の特異性

抗BNP106.3 AM1 BNP短縮型BNPペプチド置換EIA

30

置換マイクロタイターCIAにおいて、106.3 AM1 mAb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時間インキュベートし、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インキュベートし、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トリガー/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BNP106.3 AM1 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。

40

【0181】

改変キメラ106.3変異体の精密エピトープマッピング

抗BNP106.3 sc128 L1 B24 H2 288 AM1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変異誘発スクリ

50

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hBNP 1-32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をインキュベートし、次いで、非結合試料を洗い流す。結合した抗体を2900nMの非標識ペプチドと反応させる。インキュベート後、洗浄して非結合遊離ペプチドを除去する。次に、2.9nMのビオチン化hBNP 1-32環状ペプチド(Abbott GPRD、Abbott Park、IL)を抗BNP 106.3AM1 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

10

【0182】

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

20

【0183】

【化1】

NH2-SPKMVQSGCFGRKMDRISSSSGLGCKVLRH-COOH (配列番号5)

【0184】

BIAcoreでの抗BNP 106.sc128 L1 B24 H2 288AM1アラニンペプチドマッピング

30

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。

【0185】

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。

40

【0186】

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

50

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)。

【実施例2】

【0187】

ATCC寄託情報

BNP106.3sc128am1CHO1162-236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。

10

【実施例3】

【0188】

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AM1により産生される抗体(「抗体AM1」)を精製し、試験して、ARCHITECT(登録商標)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。

【0189】

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。)。インキュベート後、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AM1と反応させ、インキュベートし、洗浄した。

20

30

【0190】

次に、ARCHITECT(登録商標)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、この反応混合物をインキュベートした。インキュベート後、ARCHITECT(登録商標)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(登録商標)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(登録商標)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(登録商標)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AM1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。

40

【実施例4】

50

【0191】

CHO細胞株AM1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（登録商標）-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「融合物3」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）のインキュベーション中、本アッセイにおいてBNPペプチドを捕捉した。

10

20

【0192】

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（DynaL Biotech LLC、Brown Deer、WI）上で捕捉した。検体との最初（第1回目）のインキュベーション中、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。

30

【0193】

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.）に連させ、粒子結合hBNPペプチドを検出するために第二（2回目）のインキュベーション中、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、連合が起こった。

【0194】

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AM1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AM1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）のインキュベーション中、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連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連させ、粒子結合hBNPペプチドを検出するための2回目のインキュベーション中、このアッセイにおいて使用した。

40

【0195】

ARCHITECT（登録商標）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。

50

【0196】

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）、この反応混合物をインキュベートした。インキュベート後、ARCHITECT（登録商標）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（登録商標）Line DiluentはAbbott Laboratories、Abbott Park、Illinoisから市販されている。

10

【0197】

約50-100ng/mLのmAb-アクリジニウム-連合体を反応容器に分注し、約37℃の温度でおよそ4分間インキュベートした。インキュベート後、反応容器をARCHITECT（登録商標）Line Diluentで洗浄し、未結合物質を除去した。

【0198】

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（登録商標）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。

【0199】

ARCHITECT（登録商標）システムは、通常は相対光単位（本明細書中で以後、「rlu'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1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。

20

【0200】

【表2】

表 1

uP mAb クロ-		106.3AM1	3-631-436		106.3AM1	3-631-436
Conj mAb クロ-		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	2388		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					
	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

30

40

【0201】

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。

【0202】

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。

50

【0203】

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。

【0204】

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)」、「基本的にかつなる (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く、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。

【図面の簡単な説明】

【0205】

【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を示す。

【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を示す。

【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を示す。

【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を示す。

【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を示す。

【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を示す。

【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を示す。

【図4】図4は、106.3 1本鎖可変断片(「scFv」)の略図を示す。

【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。

【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。

【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。

【図8】図8は、106.3 scFvオフ速度測定を示す。

【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ごとに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10】図10は、酵母相同組み換えを用いてどのように106.3 scFvライブラリを構築するかを示す。

【図11】図11は、CDR変異誘発ライブラリから単離された106.3 scFv変異体のオフ速度が改善したこと(すなわち前記変異体の k_{off} が遅くなった。)を示す。

【図12A】図12Aは、scFv 106.3変異体の配列特性を示す。

【図12B】図12Bは、scFv 106.3変異体の配列特性を示す。

【図12C】図12Cは、scFv 106.3変異体の配列特性を示す。

【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。

【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。

【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。

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

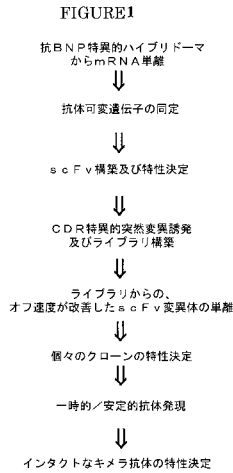
【図19】図19は、EIAを用いた抗体AM1のアラニンペプチドマッピングを示す。

【図20】図20は、BIACoreを用いた抗体AMIのアラニンペプチドマッピングを示す。様々なBNPペプチドを含有するBNP複合体の k_{off} の上昇(倍)を示す。

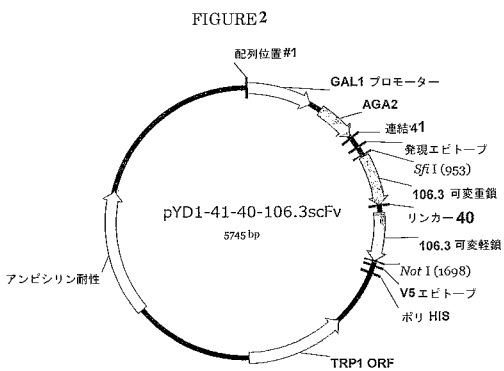
10

20

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 B 】

FIGURE 3B

```

1045 ACC TTCACACAC TATGGATAAAC TGGGTGAAGCAG
1081 ACTCCAAGAAAG GATTTAAGTGG ATGGCCTGGATA
1117 AACACCCATACT GGAGAGCCAATA TATGCTGATGAC
1153 TTCAGGGACGG TTTGCCCTCTCT TTGGAACCTCT
1189 GCCAACACTGCC TATTTGCCAAATC AACAACTCAAC
1225 AATGGAGACATG GGTACATATTTT TGTACARGAAGT
1261 CACCGGTTTGGT TTGGACTACTGG GGTCAAGGTACC
1297 TCAGTCACCATC TCGTCAGGTCCC GCCAAGGAGTTG
1333 ACGCCCTGAAAG GAGGCGAAGGTC TCTGACAAATGT
1369 CTGACCCAAATCT CCACCTTCTTTG GCTGTGTCCTA
1405 GGGCAGAGGGCC ACCATCTCCTGC AAGGCCAGCCAA
1441 AGTGTGATATAT AATGGTGATAGT TATCTGAACCTGG
1477 TACCAACAGAAG CCAGGACAGCCA CCCAAATTCCTC
1513 ATCTATGCTGCA TCCAAATAGAAA TCTGGGATCCCA
1549 GCCAGGTTTAGT GGCAGTGGGCT GGGACAGACTTC
1585 AACCTCAACATC CATCCTGTGGAG GAGGAGGATGCT
1621 GCAACCTATTAC TGTACGAAAGT AATGAGGATCCA
1657 TTCACGTTCCGG TCGGGGACAAA TTGGAATAAAA
1693 CGGGCGGGCCCT CTCGAGTCTAGA GGGCCCTTCGAA
1729 GCTAAGCCCTATC CCTAACCCCTCT CTCGGTCTCGAT
1765 TCTACCGGTACC GGTCTCATCAC CATCACCATTTGA
1801 GTTAAACCCCGC TGATCTGATAAC AACAGTGTAGAT
1837 GTAACAAAATCG ACTTTGTCCCA CTGACTTTTAG
  
```

【 図 3 A 】

FIGURE 3A

```

1 ACGGATTAGAAG CCGCCGAGCGGG TGACAGCCCTCC
37 GAAGGAAGACTC TCCCTCCGTGCGT CCTCGTCTCACC
73 CGGTCCGCTTCC TGAACCGCAGAT GTGCCCTCGCGCC
109 GCCTGCTCCGA ACAATAAGATT CTACAATACTAG
145 CTTTATGSGTTA TGAAGAGGAAAA ATTGGCAGTAAC
181 CTGGCCCCACAA ACCTTCAAATGA ACGAATCAAATT
217 AACACCCATAGG ATGATAATGCGA TTAGTTTTTTAG
253 CCTTATTTCTGG GGTAAATTAATCA GCGAAGCGATGA
289 TTTTGTATCTAT TAACAGATATAT AAATGCAAAAAC
325 TGCATTAACCCAC TTTAACTAATAC TTTCAACATTTT
361 CGGTTGTATTA CTTCTTATTCAA ATGTAATAAAAG
397 TATCAACAAAAA ATTCTTAATATA CCTTATACTTT
433 AACGTCAAGGAG AAAAAACCCCGG ATCGGACTACTA
469 GCAGCTGTAATA CGACTCACTATA GGGAAATATTAG
          AGA2
505 CTAATTTACTT CATACTTTTCA ATTAAGATGCAG
          AGA2
541 TTACTTCGCTGT TTTTCAATATTT TCTGTTATTGCT
          AGA2
577 TCAGTTTTAGCA CAGGAAGTACA ACTATATGCGAG
          AGA2
613 CAAATCCCCTCA CCAACTTTAGAA TCGACGCCGTAC
          AGA2
649 TCTTTGTCAACG ACTACTATTTTG GCCAACGGGAAG
          AGA2
685 GCAATGCAAGGA GTTTTGAATAT TACAATCAGTA
          AGA2
721 ACGTTTGTCACT AATTGCGGTTCT CACCCCTCAACA
          AGA2
757 ACTAGCAAAGGC AGCCCCATAAAC ACACAGTATGTT
          連結 41
793 TTTAAGCTCTG CAGGCTAGTGGT GAGAACAAGGTG
          連結 41
829 GAGTACCGCGCG CGGTTGATGGCC TTGTCTGCTAGC
865 ATGACTGGTGA CAGCAAATGGGT CGGATCTGTAC
901 GACGATGACGAT AAGTACCAGGA TCCAGTGTGGTG
          106.3
937 GAATTCGCGGCC CAGCCGGCCATG GCCCAGATCCAG
          可変重鎖
973 TTGGTGCACTCT GGACCTGAGCTG AGGAAGCCTGGA
1009 GAGACAGTCAAG ATCTCCTGCAAG GGTCTGGATAT
  
```

【 図 3 C 】

FIGURE 3C

```

1873 CTCTACAAAAA ACAATATACCTT TCATTTCTCCGT
1909 AAACAACATGTT TTCCCATGTAAAT ATCCTTTTCTAT
1945 TTTTCGTFCCGT TACCAACTTTAC ACAACTTTATA
1981 TAGCTATFCACT TCTATACACTAA AAAAACTAAGACA
2017 ATTTAATTTTG CTGCCCTGCCATA TTTCAATTTGTT
2053 ATAAATTCCTAT AATTTATCCTAT TAGTAGTAAAAA
2089 AAAGATGAATGT GAATCGAATCCT AAGAGATTTGGG
2125 CAAGTGCACAAA CAATACTTAAAT AAATACTACTCA
          末端 TRP1 ORF
2161 GTAATAACCTAT TTCTTAGCATT TTGACGAAAT
2197 GCTATTTTGTTA GAGTCTTTTACA CCATTTGCTTCC
2233 ACACCTCCGCTT ACATCAACACCA ATAACGCCAATTT
2269 AATCTAAGGCCA TCACCACACTTT TCTGGCCTCAGT
2305 CCACCAGCTAAC ATAAATGTIAG CTCTCCGGGCTC
2341 TCTTGCCTTCCA ACCCAGTCAGAA ATCGASTTCCAA
2377 TCCAAAAGTTCA CCGTCCCACTCT GCTTCTGAATCA
2413 AACAAAGGGAATA AACGAATGAGGT TTTCTGAAAGCT
2449 GCCTGAGTACTG ATGTTGAGCTCT TTTGGAATACG
2485 AGTCTTTTATAA CTGGGCAACCG AGGAACCTTTGG
2521 TATTTCTGCCAC GACTCATCTCCG TCGAGTTGGAGC
2557 ATATCAATGCCG TAATCATTTGACC AGAGCCAAAACA
2593 TCTTCTTAGTGT TGAATACGAAAC ACGCCAACCAAG
2629 TATTTCCGAGTG CTTGAACATATT TTATATGCTTTT
2665 ACAAGACTTGAA ATTTTCTTTGCA ATAACGGGTCA
2701 ATTTGTTCTTTT CTATTTGGGCACA CATATAATACCC
2737 AGCAAGTCAGCA TCGGAATCTAGA GCACATCTGGG
2773 GCCTCTGTGCTC TCGAAGCCGCAA ACTTTCACCAAT
2809 GGACCAGAACTA CTTGTGAAATTA ATACAGACATA
          TRP1 ORF
2845 CTCCAAGCTGCC TTTGTGTGCTTA ATCAGGTATACT
2881 CAGTGTCTCAAT AGTCACCAATGC CCTCCCTTTGG
2917 CCTCTCTCTTTT CTTTTTTCGACC GAATTTCTTGAA
2953 GACGAAAGGGCC TCGGTATACCC TATTTTATAGG
2989 TTAATGTATGA TAATAATGGTTT CTTAGGACGGAT
3025 CGCTTCCCTGTA ACTTACAGCGCG CTCGTATCTTT
3061 AATCATGGAATA ATTGGGAATTT ACTCTGTGTTTA
3097 TTTATTTTATG TTTGTATTTGG ATTTTAGAAGAT
3133 AAATAAAGAAGG TAGAAGAGTAC GGAATGAAGAAA
3169 AAAAAATAAACA AAGGTTTAAAAA ATTTCAACAAAA
3205 AGCGTACTTTAC ATATATATTTAT TAGACAAGAAAA
3241 GCAGATTAATAA GATATACATTCG ATTAACAGATAAG
3277 TAAATGTAAAAA TCACAGGATTTT CGTGTGGTCT
3313 TCTACACAGACA AGATGAACAAAT TCGGCATTAATA
3349 CCTGAGAGCAGG AAGAGCAAGATA AAGSTAGTATT
3385 TGTGGCGATCC CCTAGAGTCTT TTACATCTTCGG
3421 AAAACAAAACCT ATTTTCTTTTATA ATTTCTTTT
3457 ACTTCTATTTT TAATTTATATAT TTATATTAATAA
3493 ATTTAAATATAA ATTTATTTTATA GCACGTGATGAA
  
```

【 図 3 D 】

FIGURE 3D

```

3529 AAGGACCCAGGT GGCACCTTTTCGG GGAATGTGCGC
3565 GGAAACCCATATT TGTTTTATTTTTC TAAATACATTCA
3601 AATATATGATCCG CTCATGAGACAA TAACCCGTGATAA
      アンピシリン耐性 ---
3637 ATGCTTCAATAA TATTGAAAAAGG AAGAGTATGAGT
3673 ATPCAACATTTC CGTGPCGCCCTT ATCCCTTTTTTT
3709 GCGGCATTTTGC CTTCCTGTTTTT GTCACCCAGAA
3745 ACCTPGTGAATA GFAAAAGATGCT GAAGATCAGTTG
3781 GPGCACGAGTG GGTACATCGAA CTGGATCTCAAC
3817 AGCGGTAAGATC CTTGAGAGTTTT CGCCCCGAAGAA
3853 CTTTTTCCAATG ATGAGCAGTTTT AAAGTTCTGCTA
3889 TGTGGCCCGGTA TTATCCCGTGT TACGCCGGGCAA
3925 GAGCAACFCGGT CGCCGCATACAC TATTCTCAGAA
3961 GACTTGGTTCAG TACTCACCAGTC ACAGAAAAGCAT
3997 CTTACGGATGGC ATGACAGTAAGA GAATATGTCAGT
4033 GCTGCCATAAAC ATGAGTGAATAA ACTGCGGCCAAC
4069 TTACTTCTGACA ACGATCGGAGGA CCGAAGGAGCTA
4105 ACCGCTTTTTTTC CACAACATGGGG GATCATGTAAC
4141 CGCCTTGATCGT TGGGAACCGGAG CTGAATGAAGCC
4177 ATACCAACGAC GAGCGTGACACC ACGATGCCTGTA
4213 GCAATGGCAACA ACGTTGCGCAAA CTATTAAGTGGC
4249 GAATACTTACT CTAGCTTCCCGG CAACAATTAATA
4285 GACTGGATGGAG GCGGATAAAGTT GCAGGACCACTT
4321 CTCCGCTCGGCC CTTCGCGCTGGC TGGTTTTATGCTT
4357 GATAAATCTGGA GCCCGTGGCGGT GGGTCTCGCGGT
4393 ATCATGCGAGCA CTGGGGCCAGAT GGTAAAGCCCTCC
4429 CCFATCCGTATT ATCTACACGACG GGCAGTCAGGCA
4465 ACTATGGATGAA CGAAATAGACAG ATCCGTGAGATA
      アンピシリン耐性 末端
4501 GGTGCCCTCACTG ATTAAGCATTGG TAACTGTGAGC
4537 CAAGTTTACTCA TATATACTTTAG ATTGATTTAAAA
4573 CTFCATTTTTAA TTTAAAAGGATC TAGGTGAAGATC
4609 CTTTTGATAAAT CTCATGACCAAA ATCCCTTAACGT
4645 GAGTTTTCGTTT CACTGAGCGTCA GACCCCGTAGAA
4681 AAGATCAAAGGA TCTTCTTGAGAT CCTTTTTTCTGT
4717 CGCCTAATCTGC TGCTTGCACAACA AAAAAACCCCG
4753 CTACCAGCGGTG GTTTGTTTGCCG GATCAAGAGCTA
4789 CCAACTCTTTTT CCGAAGGTAAC TGGTTCAGCAGA
4825 GCGCAGATACCA AATACTGTCTTT CTAGTGTAGCCG
4861 TAGTTAGGCCAC CACTTCAAGAAC TCTGTAGCACC
4897 CCTACATACCTC GCTCTGTCTAATC CTGTACCAAGT
4933 GCTGCTGCCAGT GCGGATAAGTCG TGTCTTACCAGG
4969 TTGACTCAAGA CGATAGTTACCG GATAAGGCCGAG
5005 CGGTCCGGCTGA ACGGGGGGTTCC TGCACACAGCCC
5041 AGTTGGAGCGA ACGACCTACACC GAATGAGATAC
5077 CTACAGCGTGAG CATTGAGAAAGC GCCACGCTTCCC
5113 GARGGGAGAAAG GCGGACAGGTAT CCGTAAAGCGCC

```

【 図 3 E 】

FIGURE 3E

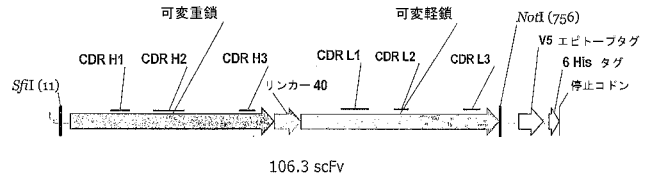
```

5149 AGGGTCGGAACA GGAGAGCGCAG AGGGAGCTTCCA
5185 GGGGGAAACGCC TGGTATCTTTAT AGTCTGTGCGGG
5221 TTTCGCCACCTC TGACTTGAGCGT CGATTTTTGTGA
5257 TGCTCGTCAGGG GGGCCGAGCCTA TGGAAAAACGCC
5293 AGCAACCGCGCC TTTTACGGTTC CTGGCCTTTTGC
5329 TGGCCTTTTGTG CACATGTTCTTT CTTGCTTTATCC
5365 CCTGATTTCTGTG GATAACCGTATT ACGGCTTTGAG
5401 TGAGCTGATACC GCTCCGCCGAGC CGAAGCAGCCG
5437 CGCAGCGAGTCA GTGAGCGAGGAA GCGGAAGAGCCG
5473 CCAATACGCAAA CGCCTCTCCCC CGCGTTGGCCG
5509 ATTCATTAATGC AGCTGGCAGGAC AGGTTCCCGGAC
5545 TGGAAAGCGGGC AGTGAGCGCAAC GCAATTAATGTG
5581 AGTTACCTACT CATTAGGCAACC CAGGTTTACAC
5617 TTTATGCTTCCG GCTCCTATGTTG TGTGGATTTGTG
5653 AGCGGATACAA TTTACACGAGAA AACAGCTATGAC
5689 CATGATACGCC ARGCTCGGATT ARCCCTCACTAA
5725 AGGGAACAAAAA CTGGCTAGT

```

【 図 4 】

FIGURE 4



【 図 5 】

FIGURE 5

```

QLVQSGPELR KPGETVKISC KGSYTFTHY GINWVKQTER KDLKWMGWIN
THTCEPIYAD DFKGRFAFSL ETSANTAYLQ INNLNNGDMG TYFCTRSHRF
GLDYWGQGT S VTVSSGPAKE LTPLEKAVK DNVLTQSPFS LAVSLGQRAT
ISCKASQSDV YNGDSLAWY QOKPGQPKF LIYAASNLES GIPARFSGSG
SCTDFNLNIH PVREEDAATY YCQSNEDPF TFGSGTKLEI KRAAALESRG
PFEKPIPMP LGLDSTRTG HHHHHH*

```

【 図 6 A 】

FIGURE 6A

```

946 106.3 可変重鎖
      CAGATCCAG TGTGTGACG TCTGGACCT
      GTCTAGTTC AACCACGTC AGACCTGGA

991 106.3 可変重鎖
      GAGCTGAGG AAGCCTGGA GAGACAGTC MAGATCTCC TGCAAGGSI
      CTCGACTCC TCCGACCT CTCTGTGCG TCTGAGGG ACGTTCCEA

1036 CDR H1----- (10)
      TCTGGATAAT ACCTTCACA CACTATGCA ATAAACTGS GTGAGCAG
      AGACCTATA TGGAGTGT GTGATACTT TATTGACC CACTTCGTC

1081 106.3 可変重鎖
      ACTCCAGA AAGGATTA AGTGGATG GCGTGATA AACACCCAT
      TGAGGTTCT TTCTAAT TCACTAC CCGACCTAT TGTGGGTA

1126 H2----- (17)
      106.3 可変重鎖
      ACTGGAGAG CCAATATAT GCTGATGAC TCAAGGGA CGGTTTGC
      TGACCTCTC GGTATATA CGACTACTG AAGTTCCT CCBAACGG

1171 106.3 可変重鎖
      TTCTCTTG GAAACCTCT GCACACT GCTTAFTTS CAATCAAC
      AAGGAAR CTTTGGGA CGSTTGTGA CCGATAAC GTTAGTTG

1216 CDR H3
      AACCTCAAC AATGGAGAC ATGGGTACA TATTTCTGT ACAAGAGT
      TTGGAGTGT TTAACCTG TACCACTGT ATAAAGCA GTTCTTCA

1261 H3----- (8)
      106.3 可変重鎖
      CACCGGTTT GGTITGGAC TACTGGGGT CAAGTACC TCAGTCACC
      GTGGCCAAA CCAARCTG ATGACCCCA GTTCCATGG AGTCAGTGG

1306 106.3 Vh
      リンカー 40-----
      GTCTGTCA GTTCCGCC AAGGAGTTG ACGCCCTG AAGGAGCG
      CAGACAGT CAAGGCGG TTCTCAAC TGCGGGAC TTCTCCCG

1351 106.3 可変重鎖
      Linker 40
      AAGTCTCT GCAATGTTG CTGACCCA TCTCCACT TCTTTGCT
      TTCCAGCA CTGTTACG GACTGGTT AGAGGTGA AGAAACGA

1396 106.3 可変重鎖
      GTCTCTTA GGGCAGAG GCCACATC TCTTCAAG GCCAGCCAA
      CACAGAGT CCGGTCTC CGTGGTAG AGGAGGTT CGTCCGTT

1441 CDR L1----- (15)
      106.3 可変重鎖
      AGTGTGAT TATAATGGT GATAGTAT CTAAGCTGS TACCAAC
      TCACACTA ATATACCA CTATCATG GACTTGAC ATGTTGTC

```

【 図 6 B 】

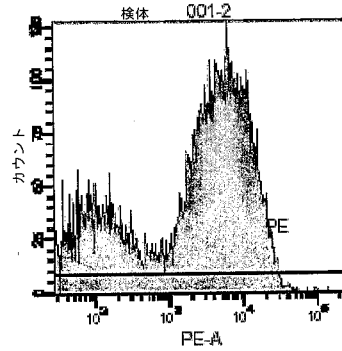
FIGURE 6B

```

                                CDR L2-----
106.3 可変軽鎖
1486  AAGCCAGGA CAGCCACCC AATTCCTC ATCTATGCF GCATCCAAT
      TTCGGTCTT GTCGGTGGG TTTAAGGAG TAGATAGCA CTTAGGTTA
----- (7)
106.3 可変軽鎖
1531  CFAGAATCT GGGATCCCA GCCAGGTTT AGTGGCACT GGGTCTGGG
      GATCTTAGA CCTAGGCTT CGGTCCARA TCACCTCA  CCCAGACCC
106.3 可変軽鎖
1576  ACAGACTTC AACCTCAAC ATCCATCCT GTGGAGGAG GAGGATGCT
      TGTGTGAAG TTGGAGTTG TAGGTAGGA CACCTCCTC CTCCTAGGA
                                CDR L3-----
106.3 可変軽鎖
1621  GCAACCTAT TACTGTGAG CAAAGTAAT GAGGATCCA TTCAGTTTC
      CGTTGGATA ATGACAGTC GTTTCATTA CTCCTAGGT AAGTGAAG
106.3 可変軽鎖
1666  GGCTCGGGG ACAAAGTTG GAATAAARA CGGGCGGCG CCCTCGAG
      CCGAGCCCC TGTTCACAC CTTATTATT GCCCGCCGG CGGAGCTC
                                V5 エピトープ
1711  TCTAGAGGG CCCTTOGAA GSTAAGCCT ATCCCTAAC CCTCTCCTC
      AGATCTCCC GGGAGGCTT CCATTGGGA TAGGGATTG GAGAGAGGAG
                                V5 エピトープ
1756  GCTCTCGAT TCTACGGGT ACCGGTCAAT CATCACCAT CACCAATGA
      CCRAGGCTA AGATGCGCA TGGCCAGTA GTAGTGSTA GTGGTAACT
    
```

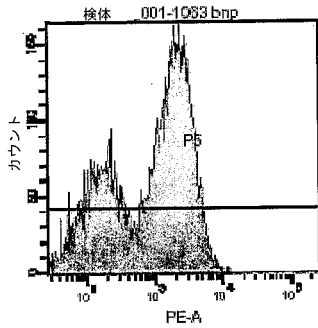
【 図 7 B 】

FIGURE 7B



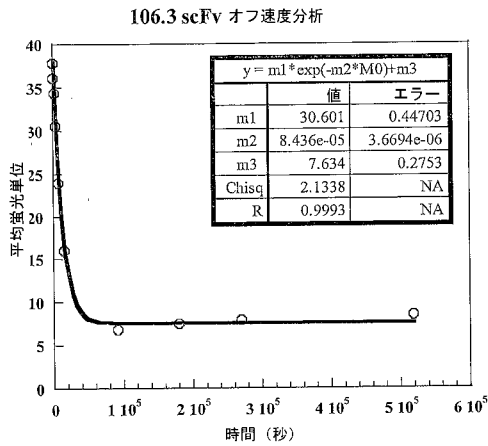
【 図 7 A 】

FIGURE 7A



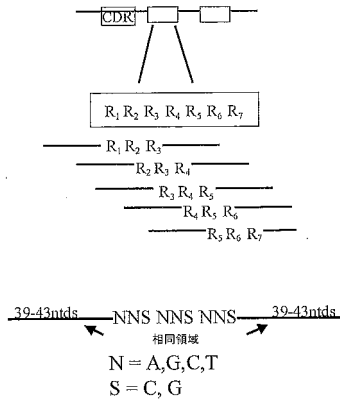
【 図 8 】

FIGURE 8



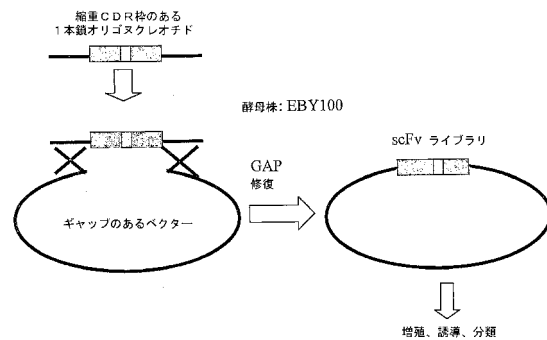
【 図 9 】

FIGURE 9



【 図 10 】

FIGURE 10



【 図 1 1 】

FIGURE 11

名称	k_{off} (秒 ⁻¹)	改善(倍)
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	その他の突然変異
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 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	ライブラリ名	長さ(ntd)
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 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	抗体タイプ	k_{on} (M ⁻¹ 秒 ⁻¹)	k_{off} (秒 ⁻¹)	K_D (pM)
106.3 wt	マウス 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	ライブラリ名	長さ(ntd)
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 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	ライブラリ名	長さ(ntd)
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	ライブラリ名	長さ(ntd)
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	ライブラリ名	長さ(ntd)
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

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** GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG
TCT GGG ACA

系	コード	CDR	ライブラリ名	長さ(ntd)
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 CGG

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 CGG

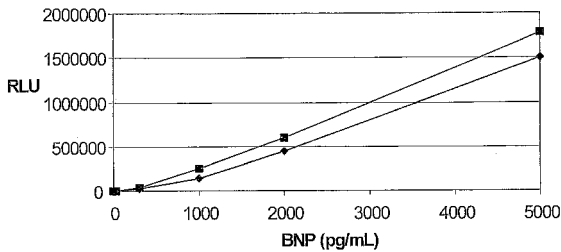
オリゴ50
CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT **CAG CAA**
NNS NNS NNS **GAT CCA TTC ACG** TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA
ATA AAA CGG

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 CGG

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 CGG

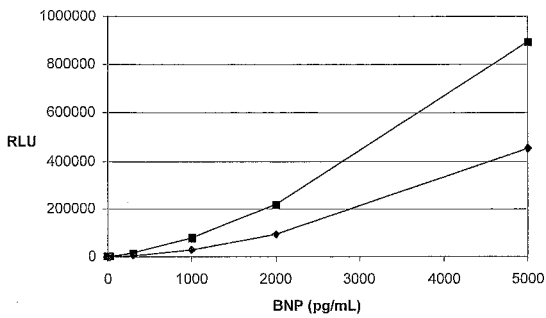
【 図 1 6 】

FIGURE 16



【 図 1 7 】

FIGURE 17



【 図 1 4 H 】

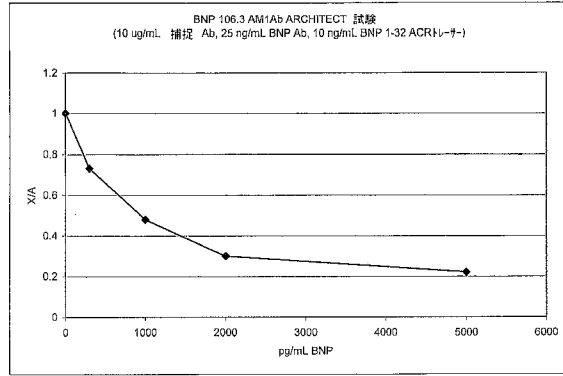
FIGURE 14H

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

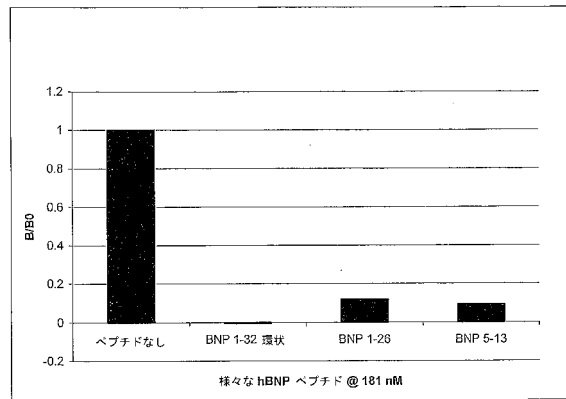
【 図 1 5 】

FIGURE 15



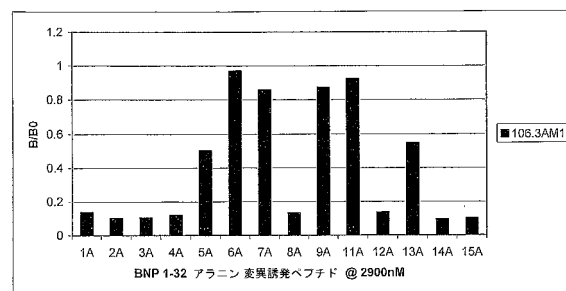
【 図 1 8 】

FIGURE 18



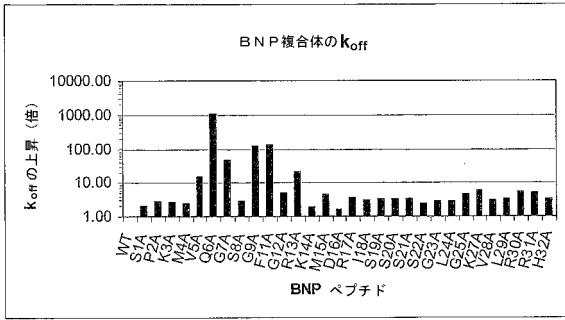
【 図 1 9 】

図 19



【 図 20 】

FIGURE 20



【 配列表 】

2009514975000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2006/043608
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/26 C12N5/10 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 162 902 A1 (MISCHAK RONALD P [US] ET AL) 19 December 2000 (2000-12-19) cited in the application the whole document	1-50
Y	BODER ERIC T ET AL: "Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 97, no. 20, 26 September 2000 (2000-09-26), pages 10701-10705, XP002185398 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-50
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *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 *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 *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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 March 2007		27/03/2007
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-9016		Authorized officer Domingues, Helena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/043608

<i>(Continuation)</i> DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZAHND CHRISTIAN ET AL: "Directed in vitro evolution and crystallographic analysis of a peptide-binding single chain antibody fragment (scFv) with low picomolar affinity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 279, no. 18, 30 April 2004 (2004-04-30), pages 18870-18877, XP002406477 ISSN: 0021-9258 pages 18871-4; table II	1-50
Y	ITOH H ET AL: "PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE AND THEIR APPLICATION TO RADIOIMMUNOASSAY AND PASSIVE IMMUNIZATION" ENDOCRINOLOGY, vol. 127, no. 3, 1990, pages 1292-1300, XP009080182 ISSN: 0013-7227 the whole document	1-50
Y	DATABASE WPI Week 199207 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1992-053618 XP002423680 -& JP 03 297392 A (SHIONOGI & CO LTD) 27 December 1991 (1991-12-27) the whole document	1-50
T	TETIN SERGEY Y ET AL: "Interactions of two monoclonal antibodies with BNP: High resolution epitope mapping using fluorescence correlation spectroscopy" BIOCHEMISTRY, vol. 45, no. 47, 28 November 2006 (2006-11-28), pages 14155-14165, XP002423678 ISSN: 0006-2960	1-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/043608

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6162902	A1	NONE	
JP 3297392	A	27-12-1991 JP 2676114 B2	12-11-1997

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 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, 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

(74) 代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74) 代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72) 発明者 シー, ジエシー・ダブリユ

アメリカ合衆国、イリノイ・60045、レイク・フォレスト、エツジウッド・ロード・1415

(72) 発明者 ピンクス, メアリー・エス

アメリカ合衆国、イリノイ・60646、シカゴ、ノース・ランダーズ・5948

(72) 発明者 タイナー, ジョーン・デー

アメリカ合衆国、イリノイ・60087、ビーチ・パーク、ノース・オーチャード・ロード・37835

(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 トウー, バイリン

アメリカ合衆国、イリノイ・60044、レイク・ブラフ、ヘムステッド・ストリート・135

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA02 CA12 DA02 DA12 EA04

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA91X AA91Y AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C085 AA13 AA14 BB11 DD62 EE01

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 EA23 EA50 FA74

专利名称(译)	ヒトBNP免疫特异的抗体		
公开(公告)号	JP2009514975A	公开(公告)日	2009-04-09
申请号	JP2008540182	申请日	2006-11-09
[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	シーエシーダブリユ ピンクスメアリーエス タイナージヨンディー プロフィースーザンイー トウーバイリン		
发明人	シー,ジエシー・ダブリユ ピンクス,メアリー・エス タイナー,ジヨン・ディー プロフィー,スーザン・イー トウー,バイリン		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/46 C12N5/10 C12N15/09 A61K39/395 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/06 A61P13/12 A61P9/12 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/12 A61P13/12 C07K16/26 C07K2317/24 C07K2317/622 C07K2317/92 G01N33/74 G01N2333/58 G01N2800/325 Y10S435/975		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C07K16/46 C12N5/00.B C12N15/00.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P9/00 A61P9 /04 A61P9/06 A61P13/12 A61P9/12 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA02 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/DA12 4B024 /EA04 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065 /CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA23 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
优先权	60/734964 2005-11-09 US		
其他公开文献	JP5364378B2		
外部链接	Espacenet		

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。

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