

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4964957号
(P4964957)

(45) 発行日 平成24年7月4日(2012.7.4)

(24) 登録日 平成24年4月6日(2012.4.6)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53		N
CO 7 K 16/42	(2006.01)	CO 7 K 16/42		

請求項の数 11 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2009-524143 (P2009-524143)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成19年9月7日(2007.9.7)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2010-500388 (P2010-500388A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成22年1月7日(2010.1.7)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/007803		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開番号	W02008/031532		グレンツァーヘルストラツセ124
(87) 国際公開日	平成20年3月20日(2008.3.20)	(74) 代理人	100078662
審査請求日	平成21年2月16日(2009.2.16)		弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	06019016.2	(74) 代理人	100113653
(32) 優先日	平成18年9月12日(2006.9.12)		弁理士 東田 幸四郎
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100116919
(31) 優先権主張番号	06020797.4		弁理士 齋藤 房幸
(32) 優先日	平成18年10月4日(2006.10.4)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
微生物の受託番号	DSMZ DSM ACC2708		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗薬物抗体アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

捕獲抗体およびトレーサー抗体を含む二重抗原架橋イムノアッセイを使用するサル種の試料中のヒトまたはヒト化薬物抗体(DA)および前記薬物抗体に対する抗体(抗薬物抗体、ADA)の免疫複合体(DA/ADA複合体)の免疫学的測定のための方法であって、前記抗体の一方がカニクイザルIgGの定常ドメインに特異的に結合しかつヒトIgGの定常ドメインに結合しない抗体であり、そして他方の抗体がヒト免疫グロブリンの定常ドメインに特異的に結合しかつカニクイザルIgGの定常ドメインに結合しない抗体であることを特徴とする、方法。

【請求項2】

捕獲抗体がヒトIgGに特異的に結合する抗体であり、そしてトレーサー抗体がカニクイザルIgGに特異的に結合しかつヒト免疫グロブリンに結合しない抗体であることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項3】

捕獲抗体がカニクイザルIgGに特異的に結合しかつヒト免疫グロブリンに結合しない抗体であり、そしてトレーサー抗体がヒトIgGに特異的に結合する抗体であることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項4】

カニクイザルIgGに特異的に結合する抗体および/またはヒト免疫グロブリンに特異的に結合する抗体がモノクローナルであることを特徴とする、請求項1~3のいずれか1項

10

20

記載の方法。

【請求項 5】

形成された複合体の量が D A / A D A 複合体、D A、および/または A D A の濃度に相関することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

試料が予め決定された量の前記薬物抗体とプレインキュベートされることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

捕獲抗体が特異的結合対を介して固定化されることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

捕獲抗体がビオチンにコンジュゲートされ、そして固定化が固定化されたアビジンまたはストレプトアビジンを介して行われることを特徴とする、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

トレーサー抗体が特異的結合対を介して検出可能な標識にコンジュゲートされることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

トレーサー抗体がジゴキシゲニンにコンジュゲートされ、そして検出可能な標識への結合がジゴキシゲニンに対する抗体を介して行われることを特徴とする、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項記載の方法において使用するための抗体組成物であって、細胞株 D S M A C C 2 7 9 9、細胞株 D S M A C C 2 8 0 0、細胞株 D S M A C C 2 8 0 1、細胞株 D S M A C C 2 8 0 2、および/または細胞株 D S M A C C 2 8 0 3 によって産生される抗体の混合物を含むことを特徴とする、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗薬物抗体の測定のための方法およびそのようなアッセイの使用のためのキットを含む。

【0002】

発明の背景

モノクローナル抗体を用いる標準的な固相イムノアッセイは、固相上に吸着された抗体（捕獲抗体）、抗原、および酵素または検出可能な標識とコンジュゲートされた抗原の別のエピトープに対する抗体（トレーサー抗体）の間の複合体の形成を含む。従って、以下のサンドイッチが形成される：固相 - 捕獲抗体 - 抗原 - トレーサー抗体。このサンドイッチにおいて、抗体コンジュゲート酵素の活性（または検出可能な標識の量）は、インキュベーション媒質中の抗原濃度に比例する。1つのサンドイッチアッセイは、捕獲抗体およびトレーサー抗体が抗原の異なるエピトープに結合する、二重抗原架橋イムノアッセイである。Hoesel, W., et al., J. Immunol. Methods 294 (2004) 101-110は、アミノ基および炭水化物基に結合した固定化 r h E P O の混合物が使用される、抗 E P O 二重抗原架橋アッセイを報告している。二重抗原架橋 E L I S A のようなイムノアッセイは、抗体薬物に対する患者の免疫原性の答えの検討において一般的なアッセイの型である。Mire-Sluis, A.R., et al., J. Immunol. Methods 289 (2004) 1-16は、生物工学製品に対する宿主抗体の検出を使用するイムノアッセイの設計および最適化のための推奨をまとめている。Mire-Sluis et al.によれば、周知の抗薬物抗体アッセイフォーマットはかなりの不利益を示す。抗薬物抗体アッセイは、例えば W O 2 0 0 5 / 0 4 5 0 5 8 および W O 9 0 / 0 0 6 5 1 5 において言及されている。抗イディオタイプ抗体アッセイは、例えば U S 5 , 2 1 9 , 7 3 0、W O 8 7 / 0 0 2 7 7 8、E P 0 1 3 9 3 8 9、および E P 0 1 7 0 3 0 2 において言及されている。Wadhwa, M., et al., J. Immunol. Methods 278 (2003) 1

10

20

30

40

50

-17は、治療生物学物質によって誘導される所望されない抗体の検出、測定および特徴付けのためのストラテジーを報告している。二重抗原架橋イムノアッセイを使用する試料中の薬物抗体に対する抗体の免疫学的測定のための免疫学的アッセイはPCT/EP2007/001935に記載されている。サルにおけるヒト抗体の測定のための免疫学的アッセイはWO2006/066912に記載されている。当該分野において（例えばUS2003/0068664）、活性治療抗体の検出を可能にするアッセイシステムも知られている。そのようなシステムは、固相への抗原の結合、この結合した抗原への治療抗体の結合、および固相へ抗原を介して結合した治療抗体の検出を必要とする。

【0003】

発明の概要

10

本発明は、カニクイザルIgGに特異的に結合しかつヒトIgGに結合しない抗体を提供する。好ましくは、抗体はモノクローナル抗体である。

【0004】

好ましい実施態様において、本発明による抗体は、細胞株3.25.12(DSM ACC2799)、3.29.15(DSM ACC2800)、4.38.30(DSM ACC2801)、7.57.41(DSM ACC2802)、または7.72.32(DSM ACC2803)によって産生される。

【0005】

本発明は、サンドイッチアッセイ、すなわち二重抗原架橋イムノアッセイを使用するサル種の試料中の薬物抗体(DA)および前記薬物抗体に対する抗体(抗薬物抗体、ADA)の免疫複合体の免疫学的測定のための方法を提供する。

20

【0006】

免疫複合体はさらにDA/ADA複合体と略される。

【0007】

本発明は、捕獲抗体およびトレーサー抗体を含むサンドイッチ型または二重抗原架橋イムノアッセイを使用する試料中のDA/ADA複合体の免疫学的測定のための方法であって、前記抗体の一方(すなわちトレーサー抗体または捕獲抗体)がカニクイザルIgGに特異的に結合する抗体であり、そして他方の抗体がヒト免疫グロブリンに特異的に結合する抗体であることを特徴とする、方法を提供する。

【0008】

30

本発明の好ましい実施態様において、捕獲抗体はヒト免疫グロブリンに特異的に結合する抗ヒトIg抗体であり、そしてトレーサー抗体はカニクイザルIgGに特異的に結合する抗カニクイザルIgG抗体である。本発明の好ましい実施態様において、捕獲抗体はカニクイザルIgGに特異的に結合する抗カニクイザルIgG抗体であり、そしてトレーサー抗体はヒトIgに特異的に結合する抗ヒトIg抗体である。

【0009】

好ましくは、抗ヒトIg抗体はヒトIgGに特異的に結合する。好ましくは、抗カニクイザルIgG抗体および/または抗ヒトIg抗体はモノクローナルである。好ましくは、ヒト免疫グロブリンに特異的に結合する前記抗体は、カニクイザルIgGに結合しない。好ましくは、ヒト免疫グロブリンに結合する前記抗体は、細胞株DSM ACC2708

40

によって産生される。

【0010】

好ましくは、カニクイザルIgGに結合する前記抗体は、ヒトIgGに結合しない。好ましくは、カニクイザルIgGに結合する前記抗体は、細胞株3.25.12(DSM ACC2799)、3.29.15(DSM ACC2800)、4.38.30(DSM ACC2801)、7.57.41(DSM ACC2802)、または7.72.32(DSM ACC2803)によって産生される。

【0011】

前記測定のプロセスで、抗カニクイザルIgG抗体、DA/ADA複合体、および抗ヒトIg抗体の間で複合体が形成され、そして形成された複合体の量はDA/ADA複合体、D

50

Aおよび/またはADAの濃度に相関する。

【0012】

本発明によれば、形成されたDA/ADA複合体の検出のための直接的試料分析を行うことができる。そのようなアッセイにおいて、試料が薬物抗体と抗薬物抗体の両方を含有する場合にのみ陽性シグナルが見出される。

【0013】

あるいは、本発明によれば、予め決定された量の薬物抗体とのプレブレインキュベーションの後に試料分析を行う(ことができる)。そのようなアッセイにおいて、試料中の薬物抗体の存在/非存在とは無関係に、試料が抗薬物抗体を含有する場合に陽性シグナルが見出される。

10

【0014】

好ましくは、捕獲抗体は受動的吸着によって固相にコンジュゲートされ、それゆえ少なくとも2つの異なる抗体部位で固相にコンジュゲートされる。受動的吸着は、例えば、Butler, J.E., *Solid Phases in Immunoassay*, In: *Immunoassays*, Diamandis, E.P. and Christopoulos, T.K. (eds.) Academic Press San Diego (1996), pp. 205-225に記載されている。

【0015】

本発明の好ましい実施態様において、捕獲抗体は特異的結合対を介して固定化される。そのような結合対(第1成分/第2成分)は、例えば、ストレプトアビジンまたはアビジン/ビオチン、抗体/抗原(例えばHermanson, G.T., et al., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 1996参照)、レクチン/多糖、ステロイド/ステロイド結合タンパク質、ホルモン/ホルモン受容体、酵素/基質、IgG/プロテインAおよび/またはGなどである。好ましくは、捕獲抗体はビオチンにコンジュゲートされ、そして固定化は固定化されたアビジンまたはストレプトアビジンを介して行われる。

20

【0016】

好ましくは、抗体のそのコンジュグーションパートナーへのコンジュグーションは、抗体のアミノ酸骨格のN末端および/または -アミノ基(リジン)、異なるリジンの -アミノ基、カルボキシ官能基、スルフヒドリル官能基、ヒドロキシル官能基および/またはフェノール官能基、および/または抗体の炭水化物構造の糖アルコール基を介する化学的結合によって行われる。

30

【0017】

本発明の好ましい実施態様において、トレーサー抗体は検出可能な標識にコンジュゲートされ、好ましくは特異的結合対を介してコンジュゲートされる。そのような結合対(第1成分/第2成分)は、例えば、ストレプトアビジンまたはアビジン/ビオチン、抗体/抗原、レクチン/多糖、ステロイド/ステロイド結合タンパク質、ホルモン/ホルモン受容体、酵素/基質、IgG/プロテインAおよび/またはGなどである。好ましくは、トレーサー抗体は、ジゴキシゲニンおよびジゴキシゲニンに対する抗体を介して、検出可能な標識にコンジュゲートされる。あるいは、トレーサー抗体は、ルテニウムビスピリジル錯体のような電気化学発光標識にコンジュゲートされる。

【0018】

さらなる実施態様において、本発明は、サンドイッチ型または二重抗原架橋イムノアッセイを使用するサル種の試料中の薬物抗体に対する抗体(抗薬物抗体、ADA)の免疫学的測定のための方法を提供する。

40

【0019】

本発明は、捕獲抗体およびトレーサー抗体を含むサンドイッチ型または二重抗原架橋イムノアッセイを使用する試料中のADAの免疫学的測定のための方法であって、前記抗体の一方がカニクイザルIgGに特異的に結合しかつヒトIgGに結合しない抗体であり、そして他方の抗体が薬物抗体であることを特徴とする、方法を提供する。

【0020】

ADAの免疫学的測定の好ましい実施態様において、捕獲抗体は薬物抗体であり、そし

50

てトレーサー抗体はカニクイザル I g G に特異的に結合しかつヒト I g G に結合しない抗カニクイザル I g G 抗体である。A D A の免疫学的測定のためには好ましい実施態様において、捕獲抗体はカニクイザル I g G に特異的に結合しかつヒト I g G に結合しない抗カニクイザル I g G 抗体であり、そしてトレーサー抗体は薬物抗体である。前記測定の過程で、薬物抗体、A D A、および抗カニクイザル I g G 抗体の間で複合体が形成され、そして形成された前記複合体の量は A D A の濃度に相関する。A D A の免疫学的測定のためには好ましい実施態様において、抗カニクイザル I g G 抗体は、モノクローナル抗体（抗カニクイザル m A b）である。

【0021】

本発明の別の実施態様は、ハイブリドーマ細胞株 3.25.12 (DSM ACC 2799)、3.29.15 (DSM ACC 2800)、4.38.30 (DSM ACC 2801)、7.57.41 (DSM ACC 2802)、7.72.32 (DSM ACC 2803) である。

【0022】

本発明の別の態様は、細胞株 DSM ACC 2799、細胞株 DSM ACC 2800、細胞株 DSM ACC 2801、細胞株 DSM ACC 2802、および/または細胞株 DSM ACC 2803 によって産生される抗体の混合物を含む、本発明による方法において使用するための抗体組成物である。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】DA/A DA 複合体の検出のためのアッセイ - DA 添加なし。ビオチン化抗ヒト I g 抗体をストレプトアビジンコートマイクロタイタープレート (SA-MTP) に固定化する。薬物抗体/抗薬物抗体 (DA/A DA) 複合体を固定化抗ヒト I g 抗体によって捕獲する (Bi; ビオチン化)。結合した DA/A DA 複合体をジゴキシゲニン標識 (Dig; ジゴキシゲニン化) 抗カニクイザル I g G 抗体および抗ジゴキシゲニン抗体西洋ワサビペルオキシダーゼ (POD) コンジュゲート (POD にコンジュゲートされたポリクローナル抗 D I G 抗体、p A b < D i g > P O D) によって検出する。カニクイザル I g G に化学的にコンジュゲートされたヒト I g G を標準として使用する。

【図2】DA/A DA 複合体の検出のためのアッセイ - DA 添加あり。試料分析の前に、サル血清試料を P B S ベースの緩衝液で希釈し、そして薬物抗体をスパイクした。15 分間のプレインキュベーションの後、試料を上記の E L I S A を用いて分析した (図1の説明参照)。

【図3】抗カニクイザル抗体を使用する A D A の検出のためのアッセイ。ビオチン化薬物抗体をストレプトアビジンコートマイクロタイタープレート (SA-MTP) に結合させる (Bi; ビオチン化)。抗薬物抗体 (A D A) は固定化薬物抗体に結合する。結合した A D A をジゴキシゲニン標識 (D i g ; ジゴキシゲニン化) 抗カニクイザル I g G 抗体および抗ジゴキシゲニン抗体西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート (p A b < D i g > P O D) によって検出する。カニクイザル I g G に化学的にコンジュゲートされた抗ヒト I g G 抗体を標準として使用する。

【図4】DA/A DA 複合体アッセイの標準曲線。1% (v/v) カニクイザル血清を含む P B S ベースの緩衝液で希釈したカニクイザル I g G に化学的にコンジュゲートされたヒト I g G の種々の濃度について光学密度 (O D) を与える。

【図5】Hu M a b < I G F - 1 R > (3 mg/kg; i v) のカニクイザル単回用量 P K 研究の試料中の DA/A DA 複合体の検出。薬物投与後 0 時間と 1176 時間との間の 8 つの時点で血清試料を採集し、そして薬物抗体の添加なしで E L I S A (図1に示す) を用いて分析した。DA/A DA 複合体の量 (405 nm の O D シグナル) を投与後の時間に対してプロットする。

【図6】Hu M a b < I G F - 1 R > (3 mg/kg; i v) のカニクイザル単回用量 P K 研究の試料中の DA/A DA 複合体の検出。薬物投与後 0 時間と 1176 時間との間の 8 つの時点で血清試料を採集し、そして薬物抗体の添加ありで E L I S A (図2に示す) を用

10

20

30

40

50

いて分析した。D A / A D A 複合体の量 (4 0 5 nm の O D シグナル) を投与後の時間に対してプロットする。

【図7】モノクローナル抗カニクイザル I g G およびポリクローナルカニクイザル I g G によるカニクイザル I g G の検出の比較。1 % (v / v) カニクイザル血清を含む P B S ベースの緩衝液で希釈したカニクイザル I g G に化学的にコンジュゲートされたヒト I g G の種々の濃度について光学密度 (シグナル (メジアン)) を与える。

【 0 0 2 4 】

発明の詳細な説明

本発明は、カニクイザル I g G に特異的に結合しかつヒト I g G に結合しない抗体を提供する。

10

【 0 0 2 5 】

本発明による用語「薬物抗体」は、疾患の処置のために個体に投与されることができる抗体を示す。本発明に従って行われる1つのアッセイ内で、薬物抗体および捕獲抗体、または薬物抗体およびトレーサー抗体は、それぞれ「同じ」抗体分子 (例えば、同じ発現ベクターを用いて組換え産生され、そして同じアミノ酸配列を含む) を含む。薬物抗体 (治療モノクローナル抗体) は、腫瘍学的疾患 (例えば、非ホジキンリンパ腫、乳癌および結腸直腸癌を含む血液および固形の悪性腫瘍)、免疫学的疾患、中枢神経疾患、血管疾患、または感染症のような種々の疾患の処置のために広く使用されている。そのような抗体は、例えば Levene, A.P., et al., *Journal of the Royal Society of Medicine* 98 (2005) 145-152 に記載されている。そのような抗体は、例えば C D 2 0、C D 2 2、H L A - D R、C D 3 3、C D 5 2、E G F R、G 2 5 0、G D 3、H E R 2、P S M A、C D 5 6、V E G F、V E G F 2、C E A、ルイス Y 抗原、I L - 6 受容体、または I G F - 1 受容体に対する抗体である。治療抗体は、Groner, B., et al., *Curr. Mol. Meth.* 4 (2004) 539-547; Harris, M., *Lancet Oncol.* 5 (2004) 292-302 にも記載されている。

20

【 0 0 2 6 】

例示の (好ましくはモノクローナルの) 治療 / 薬物抗体は、I L - 6 受容体に対する抗体 (m A b I L - 6 R) である。そのような抗体は、例えば Mihara, M., et al., *Clin. Immunol.* 98 (2001) 319-326; Nishimoto, N., et al., *Blood* 106 (2005) 2627-2632; 臨床試験 N C T 0 0 4 6 7 7 4; W O 2 0 0 4 / 0 9 6 2 7 4 に記載されている。

30

【 0 0 2 7 】

例示の (好ましくはモノクローナルの) 治療 / 薬物抗体は、I G F - 1 受容体に対する抗体 (m A b I G F - 1 R) である。そのような抗体は、例えば W O 2 0 0 4 / 0 8 7 7 5 6、W O 2 0 0 5 / 0 0 5 6 3 5 に記載されている。

【 0 0 2 8 】

「抗薬物抗体」は、例えば薬物抗体の可変ドメイン、定常ドメインまたは糖構造のような、薬物抗体の任意の領域に対するものでありうる抗体である。そのような抗薬物抗体は、抗体療法の間患者の免疫原性反応として生じうる (Pan, Y., et al., *FASEB J.* 9 (1995) 43-49 参照)。「抗薬物抗体」の大部分は薬物抗体の相補性決定領域の1つ以上に結合する。抗薬物抗体のその薬物抗体の抗原に対する親和性は、薬物抗体のその標的抗原に対する親和性と比較して一般に低い。

40

【 0 0 2 9 】

「抗カニクイザル I g G 抗体」は、カニクイザル I g G (カニクイザル免疫グロブリン G) に特異的に結合する抗体 (好ましくはモノクローナル (すなわちモノクローナル抗カニクイザル抗体、m A b < C y n o I g G >)) である。そのような抗体は、カニクイザル I g G に、少なくとも 10^{-9} mol / L の解離定数 (= K D i s s .) で、より好ましくは少なくとも 10^{-10} mol / L の K D i s s . で結合する。同時に、ヒト I g G に結合しない特性は、 10^{-8} mol / L またはそれより悪い、例えば 10^{-5} mol / L の K D i s s . によって保証される。また好ましくは、カニクイザル I g G に結合しかつヒト I g G に結合しない抗体は、それぞれカニクイザル I g G およびヒト I g G に対するその反応性の間に少なくとも 1 0 0 倍の K D i s s . のギャップを有する。

50

【0030】

好ましくは、抗カニクイザルIgG抗体は、マーモセットIgG、アカゲザルIgGおよびヒビIgGにも、少なくとも 10^{-8} mol/l、好ましくは 10^{-9} mol/Lの解離定数(=K D i s s .)で、より好ましくは少なくとも 10^{-10} mol/LのK D i s s .で結合する。

【0031】

1つの実施態様において、本発明による抗体はモノクローナル抗体である。本出願内で使用する用語「モノクローナル」は、単一の細胞またはその子孫によって産生され、そしてまたその標的抗原の単一の抗原決定基に結合する抗体の集団を示す。本出願内で使用する用語「ヒトIgGに結合しない」またはその文法的相当語句は、ヒトIgGに対する特異的結合を示さない、すなわち 10^{-7} mol/Lまたはそれより悪い、例えば 10^{-5} mol/LのK D i s s .を有する抗体を示す。これは、ヒトIgGに結合するカニクイザルIgGを除去するためにヒト免疫グロブリンに対して交差吸着させられたカニクイザル抗体のポリクローナル集団を含まない。交差吸着は、このプロセスにおいて形成される結合平衡に起因して、ヒトIgGに結合しないポリクローナル抗体(モノクローナル抗体どころか)の集団を与えない。この平衡に起因して、ヒトIgGに結合するいくつかの抗体は交差吸着されず、そして溶液中に、従って得られた抗体調製物中に残存する。従って、一旦ヒトIgGに交差吸着された免疫グロブリンは、全ての抗ヒトIgG結合を完全には枯渇しておらず、そしてヒトIgG結合をなお示す。

【0032】

本発明のさらなる態様は、細胞株DSM ACC 2799、細胞株DSM ACC 2800、細胞株DSM ACC 2801、細胞株DSM ACC 2802、細胞株DSM ACC 2803、ならびに細胞株DSM ACC 2799、または細胞株DSM ACC 2800、または細胞株DSM ACC 2801、または細胞株DSM ACC 2802、または細胞株DSM ACC 2803によって産生されるモノクローナル抗体である。本発明の別の態様は、細胞株DSM ACC 2799、細胞株DSM ACC 2800、細胞株DSM ACC 2801、細胞株DSM ACC 2802、および/または細胞株DSM ACC 2803によって産生される抗体の混合物を含む抗体組成物である。本発明はさらに、細胞株DSM ACC 2799、または細胞株DSM ACC 2800、または細胞株DSM ACC 2801、または細胞株DSM ACC 2802、または細胞株DSM ACC 2803によって産生される抗体を含む組成物を含む。

【0033】

本発明による抗体を用いて、個々のヒト血清のバックグラウンド変動を最小化することができるか、または排除することさえできる。

【0034】

本発明による用語「サル」は、カニクイザル、マーモセット、アカゲザルおよびヒビを意味する。好ましくは「サル」はカニクイザル、アカゲザル(Rhesus Macaque)およびヒビを示す。

【0035】

好ましくは、抗ヒトIg抗体(Igは免疫グロブリンを示す)は、WO 2006/066912に記載されるようなカニクイザルの免疫グロブリン上に存在しないエピトープに特異的に結合する抗体である。このエピトープはMAB < H - F c p a n > M - R 1 0 Z 8 E 9 (MAB < h - F c g a m m a > M - R 1 0 Z 8 E 9 または簡潔にMAB M - R 1 0 Z 8 E 9 とも示される)へのその結合によって特徴付けられる。本発明による好ましい実施態様において、抗ヒトIg抗体は、MAB M - R 1 0 Z 8 E 9 と同じエピトープへの結合によってさらに特徴付けられる。MAB M - R 1 0 Z 8 E 9 は、DSMZ に 2004年12月22日にDSM ACC 2708として寄託された細胞株によって産生される。好ましくは、抗ヒトIg抗体は、MAB M - R 1 0 Z 8 E 9 の可変重鎖ドメインおよび可変軽鎖ドメインを含む。より好ましくは、抗ヒトIg抗体は、MAB M - R 1 0 Z 8 E 9 の可変重鎖ドメインおよび可変軽鎖ドメインのCDR領域ならびに非ヒトフ

10

20

30

40

50

レーンワークを含む。好ましくは、抗ヒトIg抗体はモノクローナル抗体（抗ヒトIgA m b）である。

【0036】

抗体の結合特性、特にK D i s s . は、好ましくはB I A c o r e（登録商標）機器によって評価される。この方法において、結合特性は、表面プラズモン共鳴（S P R）の変化によって評価される。検討中の抗体を固相（チップと呼ばれる）に結合させ、そしてこのコートされたチップへのモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、またはIg Gを含む血清さえ、の結合を評価するのが簡便である。

【0037】

本発明によるイムノアッセイのための固体支持体は当該分野の技術水準で広く記載されている（例えばButler, J.E., Methods 22 (2000) 4-23参照）。

10

【0038】

様々なイムノアッセイの原理は、例えばHage, D.S., Anal. Chem. 71 (1999) 294R-304 Rに記載されている。Lu, B., et al., Analyst. 121 (1996) 29R-32Rは、イムノアッセイにおいて使用するための抗体の方向付けられた固定化を報告している。アビジン - ビオチン媒介イムノアッセイは、例えばWilchek, M. and Bayer, E.A., Methods Enzymol. 184 (1990) 467-469に報告されている。

【0039】

本出願内で使用する用語「二重抗原架橋イムノアッセイ」は、異なる、重複しないかまたは干渉しない抗原のエピトープに各々が結合する2つの異なる抗体によって抗原が結合される、サンドイッチ型イムノアッセイを示す。このアッセイにおいて、捕獲抗体、抗原、およびトレーサー抗体を含むサンドイッチが形成され、従って抗原がそれに結合する2つの抗体を架橋する。

20

【0040】

モノクローナル抗体およびその定常ドメインは、タンパク質として、表面、タンパク質、ポリマー（例えばP E G）、セルロース、またはポリスチレン、酵素、または結合対のメンバーのような結合パートナーへの結合のためのいくつかの反応性側鎖を含む。抗体の化学的反応性基は、例えば、アミノ基（リジンの - アミノ基、 - アミノ基）、チオール基（シスチン、システイン、メチオニン）、カルボン酸基（アスパラギン酸、グルタミン酸）、および糖アルコール基である。そのような方法は、例えばAslam, M. and Dent, A., Bioconjugation, MacMillan Ref. Ltd. (1999), pp. 50-100に記載されている。

30

【0041】

用語「試料」は、サル由来の任意の量の物質を含む。そのような物質としては、限定するものではないが、そのような固体由来の全血、血清または血漿が挙げられ、これらは前臨床ルーチンにおいて最も広く使用される試料の供給源である。

【0042】

用語「固相」は、非液体物質を意味し、そしてポリマー、金属（常磁性、強磁性粒子）、ガラス、およびセラミックスのような材料から作製される粒子（微粒子およびビーズを含む）；シリカ、アルミナ、およびポリマーゲルのようなゲル物質；ポリマー、金属、ガラスおよび/またはセラミックスから作製されるキャピラリー；ゼオライトおよびその他の多孔性物質；電極；マイクロタイタープレート；固体ストリップ；キュベット、チューブまたはその他の分光計試料容器を含む。アッセイの固相成分は、アッセイが接触する不活性固体表面とは、「固相」が、捕獲抗体と相互作用することが意図される少なくとも1つの部分をその表面上に含むという点で区別される。固相は、チューブ、ストリップ、キュベットまたはマイクロタイタープレートのような定常性成分であってもよく、またはビーズおよび微粒子のような非定常性成分であってもよい。微粒子は均一アッセイフォーマットのための固相としても使用することができる。タンパク質およびその他の物質の非共有または共有いずれかの結合を可能にする種々の微粒子を使用しうる。そのような粒子は、ポリスチレンおよびポリ（メチルメタクリレート）のようなポリマー粒子；金ナノ粒子および金コロイドのような金粒子；およびシリカ、ガラスおよび金属酸化物粒子のよ

40

50

うなセラミック粒子を含む。例えばMartin, C.R., et al., Analytical Chemistry-News & Features 70 (1998) 322A-327A (本明細書に参照により組み入れる) 参照。

【 0 0 4 3 】

色素原(蛍光性または発光性の基および色素)、酵素、NMR活性基または金属粒子、ハプテン、例えばジゴキシゲニンが、検出可能な標識の例である。検出可能な標識は、光活性化可能な架橋基、例えばアジドまたはアジリン基であることもできる。電気化学発光によって検出できる金属キレートも好ましいシグナル発生基であり、特に好ましくはルテニウムキレート、例えばルテニウム(ビスピリジル)₃²⁺キレートである。適切なルテニウム標識基は、例えばE P 0 5 8 0 9 7 9、W O 9 0 / 0 5 3 0 1、W O 9 0 / 1 1 5 1 1、およびW O 9 2 / 1 4 1 3 8に記載されている。

10

【 0 0 4 4 】

イムノアッセイは当業者に周知である。そのようなアッセイを実施するための方法ならびに実際の適用および手順は関連するテキストにまとめられている。関連するテキストの例は、Tijssen, P., Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates, In: Practice and theory of enzyme immunoassays, Burdon, R.H. and v. Knippenberg, P.H. (eds.), Elsevier, Amsterdam (1990) pp. 221-278および免疫学的検出方法を取り扱うColowick, S.P. and Caplan, N.O. (eds.), "Methods in Enzymology", Academic Pressの種々の巻、特に第70、73、74、84、92および121巻である。

【 0 0 4 5 】

本発明による抗体は、ハイブリドーマ細胞株3.25.12(DSM ACC 2799)、3.29.15(DSM ACC 2800)、4.38.30(DSM ACC 2801)、7.57.41(DSM ACC 2802)、7.72.32(DSM ACC 2803)(これら自体もまた本発明の態様である)によって産生されることができる。本発明による(すなわちカニクイザルIgGに特異的に結合しかつヒトIgGに結合しない)さらなる抗体を、例えば実施例3に概要を記載する方法を使用して見出すことができる。

20

【 0 0 4 6 】

あるいは、例えば、第1工程において、同じ標的抗原に結合する2つの抗体のエピトープ重複を、競合試験系の助けで決定する方法を使用することができる。この目的のために、例えば酵素イムノアッセイの助けで、固定化標的抗原への結合について既知の抗体(例えば、本発明による細胞株によって産生された抗体)と問題の抗体が競合する程度を試験する。この目的のために、適切に固定化された標的抗原を、標識形態の既知の抗体および過剰量の問題の抗体とともにインキュベートする。問題の抗体の存在下および非存在下で結合した標識形態の抗体の量を測定することによって、問題の抗体が既知の抗体の結合を置換できる程度を評価することができる。既知の抗体を参照して、同じ濃度で20%より多い、好ましくは30%より多い置換、またはより高い濃度で(好ましくは問題の抗体が10³~10⁵倍過剰の場合に)70%より多い、好ましくは80%より多い置換が存在する場合、エピトープ重複が生じており、そして両方の抗体が同じエピトープの同じかまたは重複する部分に結合する。そのような同定された抗体を方法の第2工程において使用する。ここで、ヒトIgGへの第1工程で同定された抗体の結合を決定する。そのような決定を、例えばELISA、イムノアッセイまたは表面プラズモン共鳴を用いて行うことができる。ヒトIgGへの結合のないことを決定することができる場合、そのような抗体はカニクイザルIgGに特異的に結合しかつヒトIgGに結合しない抗体として定義される。あるいは、本発明による抗体を、カニクイザルIgGおよびヒトIgGに対するK D i s s . を別々に測定し、そしてそれらの値を比較することによって同定することができる。

30

40

【 0 0 4 7 】

本発明は、薬物抗体および抗薬物抗体の複合体(これを以下でDA/ADA複合体として示す)の測定のための免疫学的測定方法を報告する。より詳細には、本発明は、捕獲抗

50

体およびトレーサー抗体を含むサンドイッチ型イムノアッセイを使用するサル種の試料中の薬物抗体(DA)および前記薬物抗体に対する抗体(抗薬物抗体、ADA)の免疫複合体(DA/ADA複合体)の免疫学的測定のための方法であって、前記抗体の一方がカニクイザルIgGに特異的に結合しそして好ましくはヒトIgGに結合しない抗体であり、そして前記抗体の他方がヒトIgGに特異的に結合しそして好ましくはカニクイザルIgGに結合しない抗体であることを特徴とする、方法を含む。1つの実施態様において、捕獲抗体はヒトIgGに特異的に結合しかつカニクイザルIgGに結合しない抗体であり、そしてトレーサー抗体はカニクイザルIgGに特異的に結合しかつヒトIgGに結合しない抗体である。異なる実施態様において、捕獲抗体はカニクイザルIgGに特異的に結合しかつヒトIgGに結合しない抗体であり、そしてトレーサー抗体はヒトIgGに特異的に結合しかつカニクイザルIgGに結合しない抗体である。本発明の別の実施態様は、カニクイザルIgGに特異的に結合する抗体および/またはヒトIgGに特異的に結合する抗体がモノクローナルであるということである。

10

【0048】

本発明の方法の好ましい実施態様において、試料は予め決定された量の薬物抗体とプレインキュベートされる。本発明の方法はDA/ADA複合体の検出のためのものであるので、これにより、試料中の薬物抗体の存在とは無関係に抗薬物抗体の検出が可能になる(例えば図5および6参照)。

【0049】

ヒトまたはヒト化薬物抗体とカニクイザルIgGとの間の高い同一性により、薬物抗体の主な抗原決定基はその相補性決定領域である。これらの抗原決定基は好適に抗薬物抗体によって認識される。従って、抗薬物抗体の大部分は対応する薬物抗体の相補性決定領域を認識し、それゆえそれに結合する。抗薬物抗体-薬物抗体複合体の形成は、抗原性エピトープを遮蔽し、従ってサンドイッチアッセイにおける前記複合体の測定と競合する。

20

【0050】

抗ヒトIgG抗体は、例えばWO2006/066912に記載されるような、カニクイザルから得られた免疫グロブリン上に存在しないエピトープに特異的に結合する抗体である。好ましい実施態様において、抗ヒトIgG抗体は、細胞株DSM ACC2708によって産生される抗体と同じエピトープへの結合によってさらに特徴付けられ、これは、クラスGのヒト免疫グロブリンの全てのサブクラス上に存在し、そしてチンパンジーのIgG以外の大部分の実験動物の免疫グロブリン上には存在しないようであるエピトープへの結合である。さらなる好ましい実施態様において、抗ヒトIgG抗体は細胞株DSM ACC2708によって産生される抗体である。

30

【0051】

驚くべきことに、本発明による方法を用いて、抗薬物抗体の不完全な検出が防止されることが見出された。例えば捕獲分子が抗薬物抗体と同じ抗原決定基(すなわち、薬物抗体のCDR)に結合する場合、捕獲分子への薬物抗体の結合はこれらのエピトープをブロックし、すなわちそれらを抗薬物抗体について遮蔽し、従って抗薬物抗体が結合しそして検出されることを妨げる。この結果、試料中の抗薬物抗体の不完全な検出がもたらされる。抗薬物抗体は通常薬物抗体に対して低い結合親和性を有し、それゆえ薬物抗体の結合のために抗薬物抗体の両方の抗原結合領域の協同を必要とする。従って、捕獲分子への結合がない可能性があり、これもまた抗薬物抗体の低い検出を導く。それゆえ、抗薬物抗体のCDRを介する捕獲はアッセイに適切ではない。

40

【0052】

従って、本発明の1つの態様は、捕獲抗体およびトレーサー抗体を含むサンドイッチイムノアッセイを使用するサル種の試料中の薬物抗体(DA)および前記薬物抗体に対する抗体(抗薬物抗体、ADA)の免疫複合体(DA/ADA複合体)の免疫学的測定のための方法であって、前記抗体の一方がカニクイザルIgGに特異的に結合しかつヒトIgGに結合しない抗体であり、そして他方の抗体がヒトIgGに特異的に結合しかつカニクイザルIgGに結合しない抗体であることを特徴とする、方法である。この態様の1つの実

50

施態様において、カニクイザル I g G に特異的に結合しかつヒト I g G に結合しない抗体は、細胞株 D S M A C C 2 7 9 9 または D S M A C C 2 8 0 0 または D S M A C C 2 8 0 1 または D S M A C C 2 8 0 2 または D S M A C C 2 8 0 3 によって産生される。この態様の別の実施態様において、ヒト I g G に特異的に結合しかつカニクイザル I g G に結合しない抗体は、細胞株 D S M A C C 2 7 0 8 によって産生される。

【 0 0 5 3 】

本発明の方法の 1 つの実施態様において、形成された複合体の量は D A / A D A 複合体、D A、および / または A D A の濃度に相関する。

【 0 0 5 4 】

別の実施態様において、抗薬物抗体または D A / A D A 複合体に結合する捕獲抗体は、抗薬物抗体の C D R または C D R に連続的または幾何的に近接したフレームワーク領域に結合しない。

【 0 0 5 5 】

本発明の別の態様は、捕獲抗体およびトレーサー抗体を含むサンドイッチイムノアッセイを使用するサル種の試料中の薬物抗体に対する抗体（抗薬物抗体、A D A）の免疫学的測定のための方法であって、捕獲抗体がカニクイザル I g G に特異的に結合しかつヒト I g G に結合しない抗体であり、そしてトレーサー抗体が薬物抗体であることを特徴とする、方法である。捕獲抗体およびトレーサー抗体を含むサンドイッチイムノアッセイを使用するサル種の試料中の薬物抗体に対する抗体（抗薬物抗体、A D A）の免疫学的測定のための方法であって、トレーサー抗体がカニクイザル I g G に特異的に結合しかつヒト I g G に結合しない抗体であり、そして捕獲抗体が薬物抗体であることを特徴とする、方法または態様である。

【 0 0 5 6 】

本発明による好ましいハイブリドーマ細胞株 3 . 2 5 . 1 2、3 . 2 9 . 1 5、4 . 3 8 . 3 0、7 . 5 7 . 4 1 および 7 . 7 2 . 3 2 は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の下、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Germany に寄託された。

【 0 0 5 7 】

【表 1】

クローン	寄託番号	寄託日
3.25.12	DSM ACC2799	24.08.2006
3.29.15	DSM ACC2800	24.08.2006
4.38.30	DSM ACC2801	24.08.2006
7.57.41	DSM ACC2802	24.08.2006
7.72.32	DSM ACC2803	24.08.2006
MAB M-R10Z8E9	DSM ACC2708	22.12.2004

【 0 0 5 8 】

前記細胞株から得られうる抗体は本発明の実施態様である。

【 0 0 5 9 】

以下の実施例および図面は、本発明の理解を助けるために与えられ、その真の範囲は添付の特許請求の範囲に記載されている。本発明の精神を逸脱することなく記載の手順に改変がなされうるということが理解される。

【 0 0 6 0 】

実施例

実施例 1

カニクイザル I g G およびカニクイザル F c フラグメントの調製

a) カニクイザル I g G の調製

カニクイザル血清を A e r o s i l (登録商標) 3 8 0 を用いて脱脂し、そして硫酸ア

10

20

30

40

50

ンモニウムを用いて沈殿させた(2.0Mまで)。ペレットをリン酸緩衝液中でホモジナイズし、そしてリン酸緩衝液(pH 7.0)に対して透析した。混合物をpH 7.0のDEAEイオン交換クロマトグラフィーによって分離し、そして素通り中のIgGをゲルろ過によって濃縮および精製した。

【0061】

b) カニクイザルFcの調製

a)の精製IgGを15mMシステインの存在下37°C、pH 7.0でパパイン(4mU/μg IgG)を用いてフラグメント化した。80分後、混合物を25%ヨードアセトアミド(30mMまで)とともにインキュベートし、そしてその後30mM NaClを含む10mM HEPES緩衝液(pH 7.5)に対して透析した。混合物をQ-Sepharoseイオン交換クロマトグラフィーによって分離した。Fab画分は素通り中に存在し、そしてFc画分を1Mまでの塩化ナトリウムの塩勾配を使用することによって溶出した。最後に、Fc画分をリン酸緩衝液に対して透析し、そしてゲルろ過によって精製した。

【0062】

実施例2

モノクローナル抗カニクイザルIgG抗体の生成

a) マウスの免疫

雌性Balb/cまたはNMRIマウス(それぞれ8~12週齢)をCFA(フロイント完全アジュバント)と混合した100μgのカニクイザルIgG(カニクイザル免疫グロブリンG)またはカニクイザルFcを用いて腹腔内に一次免疫した。3回のさらなる腹腔内免疫工程を、4、7および10週後に、IFA(フロイント不完全アジュバント)と混合したマウス当たり100μgのカニクイザルIgGを適用して続けた。次に、融合の3日前に、PBS(リン酸緩衝食塩水;抗ヒスタミン剤およびアドレナリン添加)中の100μgのカニクイザルIgGを各々用いて静脈内追加免疫を行った。

【0063】

b) 融合およびクローニング

a)に従って免疫したマウスの脾臓細胞のミエローマ細胞との融合をGalfré, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. 73 (1981) 3-46に従って行った。約 1×10^8 個の脾細胞を約 2×10^7 個のミエローマ細胞(P3x63-Ag8.653、ATCC CRL 1580)と混合し、そして遠心分離した(10分間、 $300 \times g$ および4°C)。その後細胞をFCS(ウシ胎仔血清)を含まないRPMI 1640培地で1回洗浄し、そして尖った50mLバイアル中 $400 \times g$ で再度遠心分離した。その後、1mLのPEG(ポリエチレングリコール、分子量4,000g/mol)を添加し、混合をピペティングによって実施した。37°Cの水浴中での1分間の後に、FCSを含まないRPMI 1640 5mLを滴下し、懸濁液を混合し、10%(v/v)FCSを含むRPMI 1640で50mLにフィルアップし、次いで遠心分離した。沈降した細胞を10%FCSを含むRPMI 1640に再懸濁し、そして増殖因子インターロイキン6(IL-6、100U/mL)を含有するヒポキサンチン-アザセリン選択培地(10%FCSを含むRPMI 1640中100mmol/Lヒポキサンチン、1μg/mLアザセリン)中でプレATINGした。約10日後、初代培養物を特異的抗体合成についてアッセイした(実施例3参照)。カニクイザルIgGへの結合を示し、かつヒト正常IgGとの交差反応を示さない初代培養物をフローサイトメーター(FACS Aria、BD Biosciences)を使用する96ウェル細胞培養プレート中への単一細胞沈着によって個別化し、培地は増殖因子インターロイキン6を含んでいた(100U/mL)。このプロトコルに従うことによって、寄託したクローン(表1)が生成された。本発明に有用な細胞株をDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Germanyに寄託した(表1)。

【0064】

【表 2】

表 1:
抗カニクイザル mAb クローン

クローン	IgG クラス およびサブクラス	免疫原	寄託番号	寄託日
3.25.12	IgG1, kappa	IgG	DSM ACC2799	24.08.2006
3.29.15	IgG1, kappa	IgG	DSM ACC2800	24.08.2006
4.38.30	IgG1, kappa	IgG	DSM ACC2801	24.08.2006
7.57.41	IgG2a, kappa	Fc	DSM ACC2802	24.08.2006
7.72.32	IgG1, kappa	Fc	DSM ACC2803	24.08.2006

10

【 0 0 6 5 】

c) 細胞培養上清からの免疫グロブリンの産生

生成されたハイブリドーマ細胞株を、10% FCS を補充した RPMI 1640 培地中に $1.0 \times 10^5 \sim 2.2 \times 10^5$ 細胞/mL (個々の細胞株によって) の開始細胞密度 (生細胞) で接種し、そして 9 ~ 16 日の期間 (個々の細胞株によって) スピナー技術で拡大した。回収された培養上清において、36 ~ 61 μg モノクローナル抗体/mL の濃度が達成された。培養上清からの抗体の精製を標準的なタンパク質化学方法に従って、例えば Bruck, C., et al., Methods Enzymol. 121 (1986) 587- 596 に従って行った。

【 0 0 6 6 】

20

実施例 3

抗カニクイザル IgG 抗体の検出のためのスクリーニングアッセイ

a) カニクイザル IgG に優先的に結合する抗体についての一次スクリーニング

ハイブリドーマ細胞の培養上清中の抗体の特異性の測定のために、組換えストレプトアビジンで予めコートした MTP (マイクロタイタープレート) (Micro Coat, Bernried, ロット MC 1098) を、1.0% (w/v) BSA II を補充した PBS 中のそれぞれビオチン化カニクイザル IgG 250 ng/mL またはビオチン化ヒト IgG 250 ng/mL でコートし (1 ウェル当たり 100 μL 、60 分間周囲温度で振とうしながらのインキュベーション)、次に 0.9% (w/v) NaCl / 0.05% Tween (登録商標) 20 で 3 回洗浄した。次の工程において、1 ウェル当たり、アッセイしようとする抗体溶液 (培養上清) 100 μL を添加し、そして 60 分間周囲温度で振とうしながらインキュベートした。0.9% (w/v) NaCl / 0.05% Tween (登録商標) 20 での 3 回の洗浄工程の後、1 ウェル当たり、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識したポリクローナルヒツジ抗マウス Fc 抗体の F(ab')₂ フラグメント 100 μL を、結合した試料抗体の検出のために添加し、そして 60 分間周囲温度で振とうしながらインキュベートした。次に、上記のように洗浄を行った。最後に、1 ウェル当たり 100 μL の ABTS (登録商標) (Roche Diagnostics GmbH、カタログ番号 1684302) を添加した。30 分間周囲温度でのインキュベーションの後、吸光度 (OD) を 405 および 492 nm [405 / 492] で市販のマイクロタイタープレート ELISA リーダー中で測定した。このスクリーニングにより、カニクイザル IgG に十分に結合し、かつヒト IgG に対する交差反応性を示さない / 低く示す抗体が選択された。この抗体の選択をさらにアッセイ b) に供した。

30

40

【 0 0 6 7 】

b) ヒト IgG に対する検出可能な交差反応性を有しない抗体の選択

一次スクリーニング a) の抗体の選択から、ヒト IgG に対する検出可能な交差反応性を示さないものを同定するために、下記のアッセイを行った。組換えストレプトアビジンで予めコートした MTP (Micro Coat, Bernried, ロット MC 1098) を、1.0% BSA II を含む PBS (リン酸緩衝食塩水) 中のビオチン化カニクイザル IgG 250 ng/mL でコートし (1 ウェル当たり 100 μL 、60 分間周囲温度で振とうしながらのインキュベーション)、次に 0.9% (w/v) NaCl / 0.05%

50

Tween (登録商標) 20で3回洗浄した。次の工程において、それぞれ1ウェル当たり、アッセイしようとする抗体溶液(培養上清)100 μ L、およびPBS(参照シグナル)50 μ L、またはヒトIgGの溶液(80mg/mL;アッセイ中の最終濃度:27mg/mL;アッセイシグナル)50 μ Lを添加し、そして60分間周囲温度で振とうしながらインキュベートした。0.9%(w/v)NaCl/0.05%Tween(登録商標)20での3回の洗浄工程の後、1ウェル当たり、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識したポリクローナルヒツジ抗マウスFc 抗体のF(ab')₂フラグメント100 μ Lを、結合した試料抗体の検出のために添加し、そして60分間周囲温度で振とうしながらインキュベートした。次に、上記のように洗浄を行った。最後に、1ウェル当たり100 μ LのABTS(登録商標)(Roche Diagnostics GmbH、カタログ番号1684302)を添加した。30分間周囲温度でのインキュベーションの後、吸光度を[405/492]nmで市販のマイクロタイタープレートELISAリーダー中で測定した。関連する参照シグナルと有意に異なるアッセイシグナルを示す抗体をさらなる使用のために選択した。定量的には、これは<0.001%のヒトIgGへの交差反応性の評価に相当する。(「有意に異なる」の定義:アッセイシグナル=参照シグナルの90~110%。)

10

【0068】

実施例4

カニクイザルIgG(Cyno-IgG)のヒトIgG(H-IgG)とのコンジュゲートの調製

20

a) Cyno-IgG-SATPの調製

イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過によってカニクイザル血清から精製したカニクイザルIgGを30mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.1)に対して透析し、そして得られたタンパク質溶液を約10mg/mlのタンパク質濃度に調整した。N-スクシンイミジル-3-アセチルチオプロピオナート(SATP)をDMSO中に溶解し、そして抗体溶液に1:5(IgG:SATP)のモル比で添加した。混合物を60分間25 $^{\circ}$ C、pH7.1でインキュベートした。最終濃度10mMでL-リジンを添加することによって反応を停止し、pHをpH6.1に調整し、そして余剰のSATPを200mM NaClおよび1mM EDTAを含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.1)に対する透析によって除去した。

30

【0069】

b) H-IgG-MHの調製

イオン交換クロマトグラフィーによってヒト血清から精製したヒトIgGを30mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.1)に対して透析し、そして得られたタンパク質溶液を約20mg/mlのタンパク質濃度に調整した。マレイミドヘキサノイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MHS)をDMSO中に溶解し、そして抗体溶液に1:6(IgG:MHS)のモル比で添加した。混合物を60分間25 $^{\circ}$ C、pH7.1でインキュベートした。最終濃度10mMにL-リジンを添加することによって反応を停止し、pHを6.1に調整し、そして余剰のMHSを200mM NaClおよび1mM EDTAを含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.1)に対する透析によって除去した。

40

【0070】

c) Cyno-IgG-SATPのH-IgG-MHとのコンジュゲーション

2.5%(v/v)1Mヒドロキシルアミン溶液(pH7.5)を添加し、そして60分間25 $^{\circ}$ Cでインキュベートすることによって、Cyno-IgG-SATPをCyno-IgG-SHに脱アセチル化した。脱アセチル化した抗体を、H-IgG-MHと、総IgG約7mg/mlの最終濃度に混合した(Cyno-IgG-SH:H-IgG-MHのモル比=1:1)。pHを7.1に調整し、そして混合物を25 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。コンジュゲーションプロセスを分析用ゲルろ過カラム(例えばTSK3000)を用いて分析した。一般に、システインを最終濃度2mMに添加することによって、40分後にコンジュゲーションプロセスを停止した。30分のインキュベーション時間の後、N-メチ

50

ルマレイミド (N M M) を 5 m M の最終濃度に添加し、そして p H を 7 . 5 に調整した。60 分間の 25 °C でのインキュベーションの後、コンジュゲートを S e p h a c r y l S - 3 0 0 を用いるゲルろ過クロマトグラフィーによって分離して、非コンジュゲート抗体を除去した。

【 0 0 7 1 】

実施例 5

ジゴキシゲニン化モノクローナル抗カニクイザル F c 抗体の調製

a) モノクローナル抗カニクイザル F c 抗体の調製

モノクローナル抗カニクイザル F c 抗体の発酵上清を約 10 倍濃縮し、20 m M T R I S、1 M 硫酸アンモニウムを含む緩衝液 (p H 9 . 0) に移し、そして P r o t e i n A - s e p h a r o s e にアプライした。0 . 2 M クエン酸ナトリウム (p H 3 . 0) での溶出物をリン酸緩衝液 (p H 7 . 5) に対して透析した。ウシ I g G の混入物 (発酵プロセス中の F C S に由来する) を、固定化されたウシ I g G に対する抗体を用いる免疫吸着によって分離した。

10

【 0 0 7 2 】

b) モノクローナル抗カニクイザル F c 抗体のジゴキシゲニン化

リン酸緩衝液中のモノクローナル抗カニクイザル F c 抗体の溶液を p H 8 . 1 および約 2 m g / m l の濃度に調整した。ジゴキシゲニン - 3 - O - メチルカルボニル - L - アミノカプロン酸 - N - ヒドロキシスクシンイミドエステルを D M S O に溶解し、そして抗体溶液に 1 : 5 のモル比で添加した。L - リジンを添加することによって反応を 60 分後に停止し、そして余剰の標識試薬を 150 m M N a C l を含む 50 m M リン酸カリウム緩衝液 (p H 7 . 5) に対する透析によって除去した。

20

【 0 0 7 3 】

実施例 6

B I A c o r e (登録商標) システムによる抗体結合 / 特異性の評価

全ての測定を、B I A c o r e (登録商標) 2000 機器を用い C M 5 チップを使用して行った。抗体でのこのチップのコーティングを、標準的なアミンカップリングによって達成した。別段示さない限り、全てのインキュベーションを H B S 緩衝液 (H E P E S、N a C l、p H 7 . 4) 中 25 °C で行った。飽和量の異なるモノクローナル抗カニクイザル I g G 抗体、M A B M - R 1 0 Z 8 E 9、およびポリクローナル抗ヒト F c 抗体 (D i a n o v a、G e r m a n y) をそれぞれ同じ C M 5 チップの異なるチャンネル上にアミンカップリングによって固定化した。全ての動物血清を 1 m g / m l C M - デキストランを含有する H B S 緩衝液中で最終濃度 1 % に希釈した。1 / 100 希釈した血清の注入および 60 秒間のインキュベーションによって結合を分析した。チップ表面を H B S 緩衝液で 180 秒間洗浄することによって解離を測定した。B I A c o r e (登録商標) からの B I A e v a l u a t i o n S o f t w a r e を使用して、解離定数値 (= K D i s s .) を、1 : 1 ラングミュアフィッティングモデル (L a n g m u i r f i t t i n g m o d e l) を用いて算出した。全ての動物血清について、この算出は、I g G レベルが 15 m g / m l であるという仮定に基づいた。試験抗体の注入開始の 80 秒後のシグナル値を、結合した I g G の量の比較のために選択した (表 2 中 R U) 。

30

40

【 0 0 7 4 】

【表 3】

表 2:

モノクローナル抗カニクイザル IgG 抗体およびポリクローナル抗ヒト Fcγ 抗血清への
動物血清の結合シグナル [RU]

試料 (血清)	抗カニクイザル mAb (クローン 3.25.12)		PAb<H-Fcγ>	
	結合 RU	KDiss. (mol/L)	結合 RU	KDiss. (mol/L)
マーモセット	-31.4	結合なし	532	1.41*10 ⁻⁰⁸
ヒヒ	2038.5	9.39*10 ⁻¹³	1404.6	6.37*10 ⁻¹¹
ラット	-20.9	結合なし	48.2	結合なし
チンパンジー	-28.2	結合なし	1918.1	3.72*10 ⁻¹³
カニクイザル	2278.7	2.03*10 ⁻⁰⁹	1344.8	7.17*10 ⁻¹²
アカゲザル	2362.8	5.09*10 ⁻¹⁰	1172.1	9.08*10 ⁻¹¹
NMRI-マウス	-15.7	結合なし	-23.8	結合なし
ヒト	-25.5	結合なし	1571.6	4.56*10 ⁻¹²
イヌ	-35.9	結合なし	564.3	1.15*10 ⁻⁰⁸
CD1-マウス	-40.4	結合なし	-30.7	結合なし

10

20

【 0 0 7 5 】

表 2 は、モノクローナル抗カニクイザル I g G 抗体がヒト血清と交差反応しないことを示す。カニクイザル、アカゲザルおよびヒヒ血清中に含まれる I g G のみが検出される。モノクローナル抗カニクイザル I g G 抗体とは対照的に、ポリクローナル抗ヒト F c 抗体は、ヒト、イヌおよび全ての試験したサル種の血清との高い反応性を示す。

【 0 0 7 6 】

実施例 7

DA / ADA 複合体についてのアッセイ - DA 添加なし

第 1 工程において、ビオチン化 M A B M - R 1 0 Z 8 E 9 を、ストレプトアビジンコートマイクロタイタープレート (S A - M T P) のウェルに結合させた。過剰の非結合抗体を洗浄によって除去した。その後、サル血清試料および参照標準 (1 % カニクイザル血清中にスパイクしたカニクイザル I g G と化学的にコンジュゲートされたヒト I g G) をウェル中でインキュベートした。非結合物質を洗浄した後、結合した DA / ADA 複合体をジゴキシゲニン化抗カニクイザル抗体、および続く西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体とのインキュベーションにより検出した。抗体 - 酵素コンジュゲートは、A B T S (登録商標) 基質の呈色反応を触媒する。シグナルを 4 0 5 nm の波長で E L I S A リーダーによって測定した (参照波長: 4 9 0 nm ([4 0 5 / 4 9 0] nm))。各血清試料の吸光度値を二連で測定した。この試験系の模式図を図 1 に示す。

30

【 0 0 7 7 】

実施例 8

DA / ADA 複合体についてのアッセイ - DA 添加あり

試料分析の前に、サル血清試料を P B S ベースの緩衝液で希釈し、そして薬物抗体をスパイクした。15 分間のプレインキュベーションの後、試料を上記の E L I S A を用いて分析した。この試験系の模式図を図 2 に示す。

40

【 0 0 7 8 】

実施例 9

カニクイザル P K 研究の試料中の DA / ADA 複合体の検出

I G F - 1 R に対するヒト抗体 (W O 2 0 0 5 / 0 0 5 6 3 5 ; 3 mg / kg ; i v) を用いるカニクイザル単回用量 P K 研究 (P K = 薬物動態) の血清試料を上記の E L I S A を

50

用いて分析した：i) 薬物抗体添加なしのDA/ADA複合体の検出(図5)、およびii) 薬物抗体添加ありのDA/ADA複合体の検出(図6)。投与後0時間と1176時間との間の8つの時点で血清試料を採集しそして分析した。図中、DA/ADA複合体の量(405nmのODシグナル)を投与後の時間に対してプロットした。図5に示すように、薬物抗体のインビトロでの添加なしの陽性シグナルは、AD/ADA複合体がインビボで形成された場合、336時間と672時間との間の血清試料においてのみ検出された(ピーク形状)。抗薬物抗体の非存在下では、免疫複合体は形成されず、そして陽性シグナルは検出されなかった(336時間の前の時点)。試料中の薬物の非存在に起因して、投与の672時間以降は、複合体は検出可能でなかった。プレインキュベーション工程として血清試料に薬物抗体を添加すると、インビボ形成およびインビトロ形成両方のDA/ADA複合体が検出されたかまたは検出可能であった。図6において実証されるように陽性シグナルはADAの生成のみに依存する。両方の図(図5および6)は薬物-時間曲線とよく相関する。

【0079】

実施例10

抗カニクイザル抗体を使用するADA検出のためのアッセイ

第1工程において、ビオチン化薬物抗体(IGF-1Rに対するヒト抗体)を、ストレプトアビジンコートマイクロタイタープレート(SA-MTP)のウェルに結合させた。過剰の非結合抗体を洗浄によって除去した。その後、サル血清試料(PBSベースの緩衝液で20倍希釈)および参照標準をインキュベートした。非結合基質を洗浄した後、結合した抗薬物抗体(ADA)をジゴキシゲニン化抗カニクイザル抗体、および続く西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体とのインキュベーションにより検出した。抗体-酵素コンジュゲートは、ABTS(登録商標)基質の呈色反応を触媒する。シグナルを405nmの波長でELISAリーダーによって測定した(参照波長:490nm)。各血清試料の吸光度値を三連で測定した。この試験系の模式図を図3に示す。

【0080】

実施例11

カニクイザルIgGに対するポリクローナル抗体の調製

a) ウサギ血清からのポリクローナル抗体の精製

ウサギを標準的な方法に従ってカニクイザルFcで免疫した。カニクイザルFcで免疫した5羽のウサギの生血清において、脂質成分をAerosil(1.5%(w/v))を用いる脱脂によって除去し、そして免疫グロブリンを硫酸アンモニウム(1.7M)を用いて沈殿させた。酸処理(30分間、pH5.5)および50mM NaClを補充した15mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に対する透析の後、混合物をpH7.0のDEAEイオン交換クロマトグラフィーによって分離し、そして素通り中のIgG画分(=ウサギポリクローナル抗カニクイザルIgG抗体)を約25mg/mlに濃縮した。

【0081】

b) ヒトIgGに対する交差反応性を有しないアフィニティ精製ポリクローナルウサギ抗カニクイザルIgG抗体(pAb<Cyno-IgG>)の調製

工程a)の濃縮IgG画分を150mM NaClを補充した50mMリン酸カリウム(pH7.5)(PBS)を用いる緩衝液系に移した。固定化カニクイザルIgG(当該分野の技術水準によるカニクイザルIgGのNH₂-sepharoseへのコンジュゲーションによって調製)を含む免疫吸着剤をカラムに充填し、そして150mM NaClを補充した50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)で平衡化した。

【0082】

10mg IgG/ml免疫吸着剤を、PBSで平衡化したカラムにアプライした。カラムを、PBS、0.05%(w/v)Tween(登録商標)20を補充した0.5M NaCl、および30mM NaClで連続的に洗浄した。アフィニティマトリックスに特異的に結合したIgGを3mM HClおよび1Mプロピオン酸を用いて溶出し、そしてPBSに対して透析した。

10

20

30

40

50

【0083】

ヒトIgGに対する交差反応性を有する抗体を除去するために、アフィニティ精製した抗体を、固定化ヒトIgG（当該分野の技術水準による非特異的ヒトIgGのNH₂-sepharoseへのコンジュゲーションによって調製）を含むアフィニティカラムにアプライした。カラムをPBSで平衡化した。約6mg IgG/ml免疫吸着剤をカラムにアプライした。特異的ポリクローナルIgG画分は素通り中に存在する。0.05% (w/v) Tween（登録商標）20を補充した0.5M NaClでのカラムの再生の後、30mM NaCl、1Mプロピオン酸、およびPBS。非特異的に結合しているIgGの免疫吸着を2回反復して、ヒトIgGに対する交差反応性を有する抗体を完全に除去した。

【0084】

得られた、ヒトIgGに対する交差反応性を有しない精製ポリクローナル抗カニクイザルIgG抗体を、約4mg/mlに濃縮し、そして-80℃で貯蔵した。

【0085】

実施例12

BIAcore（登録商標）システムによるポリクローナルウサギ抗カニクイザルFc抗体（pAb <Cyno-Fc>）の抗体結合/特異性の評価

全ての測定を、BIAcore（登録商標）2000機器を用いCM5チップを使用して行った。抗体でのこのチップのコーティングを、標準的なアミンカップリングによって達成した。別段示さない限り、全てのインキュベーションをHBS緩衝液（HEPES、NaCl、pH7.4）中25℃で行った。飽和量のポリクローナル抗カニクイザルIgG抗体をCM5チップ上にアミンカップリングによって固定化した。全ての動物血清を1mg/ml CM-デキストランを含有するHBS緩衝液中で最終濃度1%に希釈した。1/100希釈した血清の注入および60秒間のインキュベーションによって結合を分析した。チップ表面をHBS緩衝液で180秒間洗浄することによって解離を測定した。BIAcore（登録商標）からのBIAevaluation Softwareを使用して、解離定数値（=KDiss.）を、1:1ラングミュアフィッティングモデルを用いて算出した。全ての動物血清について、この算出は、IgGレベルが15mg/mlであるという仮定に基づいた。試験抗体の注入開始の80秒後のシグナル値を、結合したIgGの量の比較のために選択した（表3中RU）。

【0086】

【表4】

表3:

ポリクローナル抗カニクイザルIgG抗体への動物血清の結合シグナル [RU]

試料 (血清)	抗カニクイザル pAb	
	結合 RU	KDiss. (mol/L)
マーモセット	50.8	1.80*10 ⁻⁰⁷
ヒヒ	1297.4	4.11*10 ⁻¹⁰
ラット	-12.4	結合なし
チンパンジー	3.8	結合なし
カニクイザル	1357.9	1.92*10 ⁻⁰⁹
アカゲザル	1244.6	2.16*10 ⁻⁰⁹
NMRI-マウス	42.1	4.27*10 ⁻⁰⁶
ヒト	-6.7	結合なし
イヌ	-10	結合なし
CD1-マウス	-15.9	結合なし

10

20

30

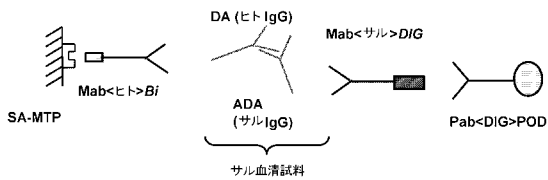
40

50

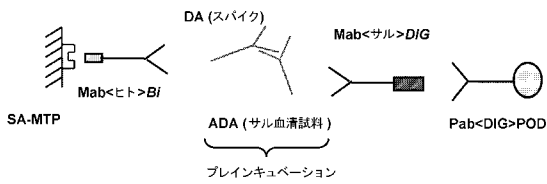
【 0 0 8 7 】

表 3 は、ポリクローナル抗カニクイザル I g G 抗体がヒト血清と交差反応しないことを示す。マーモセット、カニクイザル、アカゲザルおよびヒヒ血清中に含まれるサル I g G のみが検出される。モノクローナル抗カニクイザル I g G 抗体とは対照的に、ポリクローナル抗カニクイザル I g G 抗体は、N M R I - マウスの血清との反応性を示す。また、ポリクローナル抗カニクイザル I g G 抗体は、ヒト I g G に結合せず、そしてサル I g G およびマウス I g G に対する反応性の間に少なくとも 1 0 0 倍の反応性の差異を有する。

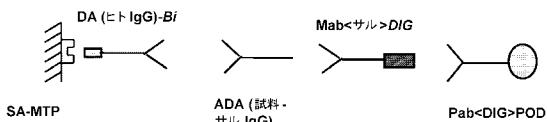
【 図 1 】



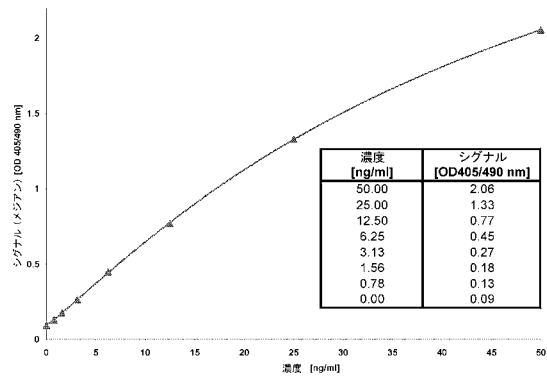
【 図 2 】



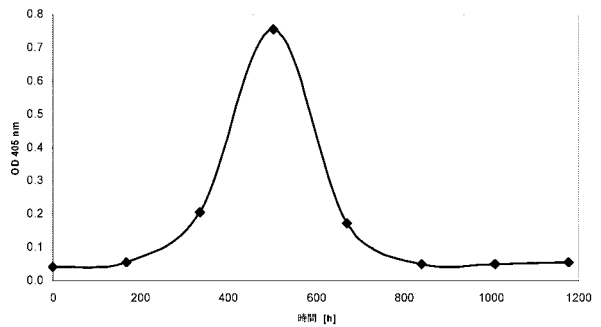
【 図 3 】



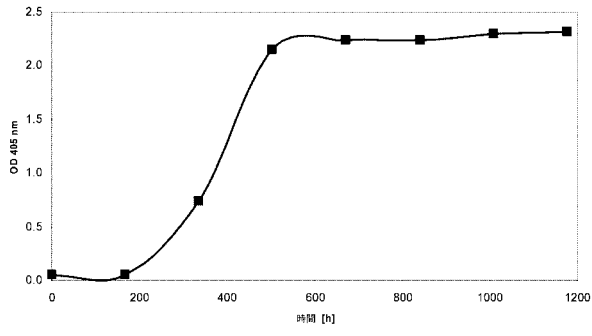
【 図 4 】



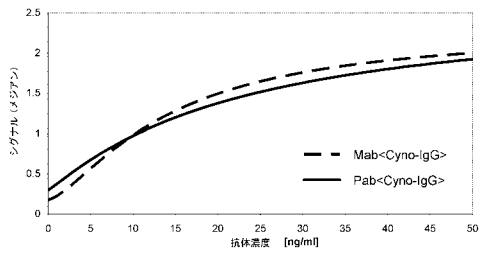
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2799
微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2800
微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2801
微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2802
微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2803

- (72)発明者 エッスイヒ, ウルリヒ
ドイツ国、8 2 1 5 2 プラネック、ヨセフ - フォン - ヒルシュ - シュトラーセ 5 1
- (72)発明者 シュトゥーベンラウホ, カイ - グンナー
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、アン・デア・フライハイム 1 0 5
- (72)発明者 ヴォーゲル, ルドルフ
ドイツ国、8 2 3 6 2 ヴァイルハイム、ラーベルシュトラーセ 5 アー
- (72)発明者 ウェッセルズ, ウーヴェ
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ジンデルスドルファー・シュトラーセ 8 アー

審査官 北村 悠美子

- (56)参考文献 国際公開第2 0 0 6 / 0 6 6 9 1 2 (WO, A 1)
国際公開第2 0 0 5 / 0 1 8 6 6 8 (WO, A 1)
Developmental and Comparative Immunology, 1 9 9 5 年, Vol.19, No.6, p.547-557
[ONLINE], 2 0 0 5 年 2 月 2 日, P1-4, URL, <http://www.researchd.com/rdiabs/2ndabmky.htm>

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07K 16/42
G01N 33/53
WPI
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)

专利名称(译)	抗药物抗体测定		
公开(公告)号	JP4964957B2	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	JP2009524143	申请日	2007-09-07
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	エッスイヒウルリヒ シュトウベンラウホカイグンナー ヴォーゲルルドルフ ウェッセルズウーヴェ		
发明人	エッスイヒ,ウルリヒ シュトウベンラウホ,カイ-グンナー ヴォーゲル,ルドルフ ウェッセルズ,ウーヴェ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/42		
CPC分类号	G01N33/6854 C07K16/065 C07K16/42 C07K16/4283 C07K2317/21 C07K2317/32 C07K2317/33 C07K2317/52		
FI分类号	G01N33/53.N C07K16/42		
代理人(译)	津国 肇 田畑幸四郎		
优先权	2006019016 2006-09-12 EP 2006020797 2006-10-04 EP		
其他公开文献	JP2010500388A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种特异性结合食蟹猴IgG的抗体，其特征在于不与人IgG结合，以及免疫测定药物抗体（DA）的免疫复合物（DA / ADA复合物）和抗所述药物抗体的抗体的方法（使用双抗原桥接免疫测定法在猴物种样品中的抗药物抗体ADA）。

クローン	寄託番号	寄託日
3.25.12	DSM ACC2799	24.08.2006
3.29.15	DSM ACC2800	24.08.2006
4.38.30	DSM ACC2801	24.08.2006
7.57.41	DSM ACC2802	24.08.2006
7.72.32	DSM ACC2803	24.08.2006
MAB M-R10Z8E9	DSM ACC2708	22.12.2004