

(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2018-532376

(P2018-532376A)

(43) 公表日 平成30年11月8日 (2018.11.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 92 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-510804 (P2018-510804)
 (86) (22) 出願日 平成28年8月26日 (2016. 8. 26)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年3月26日 (2018. 3. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/049127
 (87) 国際公開番号 W02017/040342
 (87) 国際公開日 平成29年3月9日 (2017. 3. 9)
 (31) 優先権主張番号 62/211, 642
 (32) 優先日 平成27年8月28日 (2015. 8. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 チャイ, チエンティン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, デ
 ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー
 ジェネンテック, インコーポレイテッ
 ド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒプシン抗体及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、抗ヒプシン抗体、ならびにヒプシン及び/またはデオキシヒプシンを含有するポリペプチドの検出及び単離における抗ヒプシン抗体の使用と、抗ヒプシン抗体を含む組成物及びキットと、を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ポリペプチド中のヒブシンに特異的に結合する単離された抗体であって、ヒブシンに隣接する、異なるアミノ酸配列を有するヒブシン含有ポリペプチドに結合する、前記抗体。

【請求項 2】

前記抗体は、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合しない、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体は、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記抗体は、前記ヒブシンを含有するポリペプチドに対して 900 nM 以下の結合親和性 (K_D) を呈する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

前記抗体は、(i) 前記ヒブシンを含有するポリペプチドに対して 300 nM 以下の結合親和性 (K_D)、及び (ii) 前記デオキシヒブシンを含有するポリペプチドに対して 200 nM 以下の結合親和性 (K_D) を呈する、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記抗体は、モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

前記抗体は、抗原結合断片である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、(i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(ii) 配列番号 13 もしくは 14 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (iii) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含み、かつ/または前記軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 1 もしくは 2 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(ii) 配列番号 4 もしくは 5 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (iii) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む、請求項 1、2、及び 4 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 9】

前記重鎖可変領域は、配列番号 24 もしくは 25 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含み、かつ/または前記軽鎖可変領域は、配列番号 20 もしくは 21 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、(i) 配列番号 11 もしくは 12 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(ii) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (iii) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含み、かつ/または前記軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(ii) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (iii) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む、請求項 1 及び 3 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 11】

前記重鎖可変領域は、配列番号 27 もしくは 28 のアミノ酸配列と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列を含み、かつ/または前記軽鎖可変領域は、配列番号 23 のアミノ酸配列と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 12】

前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、(i) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(ii) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (iii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含み

10

20

30

40

50

、かつ／または前記軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(i i i) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、請求項 1 及び 3 ～ 7 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 3】

前記重鎖可変領域は、配列番号 2 6 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含み、かつ／または前記軽鎖可変領域は、配列番号 2 2 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 1 4】

ポリペプチド中のヒブシンに結合する単離された抗体であって、前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、(i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 1 3 もしくは 1 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び(i i i) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ／または前記軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 1 もしくは 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 4 もしくは 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(i i i) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、単離された抗体。

10

【請求項 1 5】

前記重鎖可変領域は、配列番号 2 4 もしくは 2 5 のアミノ酸配列を含み、かつ／または前記軽鎖可変領域は、配列番号 2 0 もしくは 2 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 に記載の単離された抗体。

20

【請求項 1 6】

前記重鎖は、配列番号 3 3 もしくは 3 4 のアミノ酸配列を含み、かつ／または前記軽鎖は、配列番号 2 9 もしくは 3 0 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 に記載の単離された抗体。

【請求項 1 7】

ポリペプチド中のヒブシンと特異的に結合する単離された抗体であって、前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、(i) 配列番号 1 1 もしくは 1 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び(i i i) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ／または前記軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(i i i) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、単離された抗体。

30

【請求項 1 8】

前記重鎖可変領域は、配列番号 2 7 もしくは 2 8 のアミノ酸配列を含み、かつ／または前記軽鎖可変領域は、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 7 に記載の単離された抗体。

【請求項 1 9】

前記重鎖は、配列番号 3 6 もしくは 3 7 のアミノ酸配列を含み、かつ／または前記軽鎖は、配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 7 に記載の単離された抗体。

【請求項 2 0】

ポリペプチド中のヒブシンと特異的に結合する単離された抗体であって、前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、(i) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び(i i i) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ／または前記軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(i i i) 配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、単離された抗体。

40

【請求項 2 1】

前記重鎖可変領域は、配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含み、かつ／または前記軽鎖可変領域は、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 0 に記載の単離された抗体。

50

【請求項 22】

前記重鎖は、配列番号 35 のアミノ酸配列を含み、かつ/または前記軽鎖は、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む、請求項 20 に記載の単離された抗体。

【請求項 23】

前記抗体は、検出剤に結合している、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 24】

請求項 1～22 のいずれか一項に記載の抗体をコードする配列を含む、単離された核酸。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 26】

発現ベクターである、請求項 25 に記載のベクター。

【請求項 27】

請求項 24 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項 28】

抗体を産生するための方法であって、請求項 27 に記載の宿主細胞を、前記抗体を産生する条件下で培養することを含む、前記方法。

【請求項 29】

前記宿主細胞によって産生された前記抗体を回収することをさらに含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

試料中のヒプシン含有ポリペプチドを検出するための方法であって、(a) 前記試料を請求項 1～22 のいずれか一項に記載の抗体と接触させるステップと、(b) 前記試料中の前記ポリペプチドに結合した前記抗体を検出するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 31】

前記抗体は、検出剤に結合している、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記ポリペプチドに結合した前記抗体は、二次薬剤を使用することによって検出される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

前記検出剤は、化学発光標識、発色団、発蛍光団、磁性粒子、染料、放射標識、または酵素である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

前記検出は、酵素結合免疫吸着測定法、放射免疫測定法、免疫沈殿法、クロマトグラフィー、免疫組織化学法、免疫蛍光検査法、表面プラズモン共鳴法、蛍光標識細胞分取法、及び質量分析法からなる群から選択される 1 つ以上のアッセイによる、請求項 30～33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記試料は、生体試料である、請求項 30～34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記生体試料は、細胞または組織を含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記生体試料は流体である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

試料中のヒプシン含有ポリペプチドを単離するための方法であって、(a) 前記試料を請求項 1～22 のいずれか一項に記載の抗体と接触させるステップと、(b) 前記抗体に結合した前記ポリペプチドを単離するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 39】

前記抗体は、固体表面に固定化される、請求項 38 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 40】

前記試料は生体試料である、請求項 38 または 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記生体試料は、細胞または組織を含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記生体試料は流体である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 43】

請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、組成物。

【請求項 44】

請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 43 に記載の組成物を含む、
キット。 10

【請求項 45】

試料中のヒブシン含有ポリペプチドを検出するための方法で前記抗体を使用するための
1 つ以上の薬剤をさらに含む、請求項 44 に記載のキット。

【請求項 46】

試料中のヒブシン含有ポリペプチドを単離するための方法で前記抗体を使用するための
1 つ以上の薬剤をさらに含む、請求項 44 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

関連出願の相互参照

本出願は、2015 年 8 月 28 日出願の米国仮特許出願第 62 / 211, 642 号の優先権の利益を主張するものであり、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

ASCII テキストファイルでの配列表の提出

ASCII テキストファイルでの以下の提出の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：コンピュータ可読形式 (CRF) の配列表 (ファイル名：146392034440 SEQLIST. txt、記録日：2016 年 8 月 25 日、サイズ：42 KB)。

30

【0003】

発明の概要

本発明は、ヒブシン及び / またはデオキシヒブシンを含有するポリペプチドを検出及び単離するための方法及び試薬に関する。

【背景技術】

【0004】

異常アミノ酸であるヒブシン (Nε - (4 - アミノ - 2 - ヒドロキシブチル) - リジン) は、翻訳後修飾リジンである。真核細胞翻訳開始因子 5A (eIF5A) は、今のところ、ヒブシンを含有することが報告されている唯一の天然型タンパク質である (Cooper et al. Cell. 29: 791 - 797, 1982; Park et al. PNAS, 78: 2869 - 2873, 1981)。ヒブシンを有する eIF5A の修飾は、2 つの酵素反応を伴う。まず第 1 に、デオキシヒブシンシンターゼ (DHS) が、スベルミジンのブチルアミン部分を eIF5A の 1 つの特異的リジン残基 (ヒト eIF5A 上の残基 K50) の ε - アミノ基に輸送し、デオキシヒブシンを生じる。第 2 に、ヒブシン生合成は、デオキシヒブシンヒドロキシラーゼ (DOHH) によって触媒されるヒドロキシル化によって完了する (Park et al. PNAS, 103: 51 - 56, 2006)。翻訳伸長、RNA 結合、及びリボソームの会合等の eIF5A の最もよく知られている機能はヒブシン化に依存するため、ヒブシン化 eIF5A は、その活性形態のようである (Jao, et al. J. Cell. Biochem. 97: 583 - 598, 2006; Saini et al. Nature, 459: 118 - 121, 200 40 50

09)。eIF5A、ならびにDHS及びDOHHのアミノ酸配列は、真核生物全体に高度に保存され、デオキシヒブシン/ヒブシンは、古細菌及び真核生物における細胞増殖のために絶対に必要である(Jansson et al. J. Bacteriol. 182: 1158 - 1161, 2000、Park et al. Biol. Signals. 6: 115 - 123)。eIF5Aにおけるヒブシンに変換されるリジン残基(K50)及びこの修飾部位を取り囲む一次配列は高度に保存され、真核生物の進化を通じてこの異常タンパク質修飾の重要性を強調する。しかしながら、eIF5A以外の他のヒブシン化タンパク質は、これらを同定する膨大な努力にもかかわらず報告されていない(Cooper et al. Cell. 29: 791 - 797, 1982、Sievert et al. Mol. Cell Proteomics, 11: 1289 - 1305, 2012)。

10

【0005】

抗体に基づく親和性精製は、同定のために少量のタンパク質を濃縮するのに広く使用されている。この手法は、タンパク質リジンアセチル化(Kim et al. Mol. Cell. 23: 607 - 618, 2006、Zhang et al. Mol. Cell Proteomics, 8: 215 - 225, 2009)、アルギニンメチル化(Ong et al. Nat. Methods. : 119 - 126, 2004)、及びチロシンリン酸化(Pandey et al. PNAS, 97: 179 - 184, 2000、Rikova et al. Cell, 131: 1190 - 1203, 2007)の網羅的解析のために良好に使用されている。しかしながら、高親和性翻訳後修飾(PTM)特異的かつ配列非依存性抗体は、PTMが小さいため、目的とするPTMのために得るのが容易ではない。さらに、PTM特異的状況非依存性抗体の複合体構造はこれまで報告されていない。ポリクローナルを含むいくつかの抗ヒブシンまたは抗デオキシヒブシン抗体(Clement et al. Eur. J. Biochem. 270: 4254 - 4263, 2003、Cracchiolo et al.ynecol. Oncol. 94: 217 - 222, 2004)及びモノクローナル抗体(Bergeron et al. Med. Chem. 41(20): 3888 - 3900, 1998)が報告されている。しかしながら、これらの抗体は、eIF5Aペプチドに対して産生され、eIF5Aに結合することに対して特徴づけられている。したがって、これらの抗体はヒブシンに隣接する異なる配列を有する新規のヒブシン化タンパク質の同定にあまり適していない可能性がある。さらに、ポリクローナル抗体は、入手が困難であり、モノクローナル抗体の配列はまだ報告されていない。結果として、放射標識されたスペルミジン及びGC7(DHS阻害剤)は、依然としてeIF5Aの機能性の研究のために最も頻繁に使用されているツールである。ヒブシンと隣接するアミノ酸配列に非依存性の、ポリペプチド上のヒブシンに結合する高親和性抗ヒブシン抗体を開発する必要性が依然として存在する。そのような抗ヒブシン抗体の発見は、新規のヒブシン化ポリペプチドの同定及び単離を可能にし得る。

20

30

【0006】

特許出願、特許公報、及び科学文献を含む、本明細書に引用される全ての参考文献は、各個々の参考文献が参照により組み込まれるように具体的かつ個別に示されているかのように、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

40

【発明の概要】

【0007】

抗ヒブシン抗体、それを含む組成物、及びそれを使用する方法を本明細書に提供する。

【0008】

隣接するアミノ酸配列に最低限依存して翻訳後修飾(PTM)ヒブシンに結合する汎抗ヒブシン抗体を本明細書に提供する。この抗体は、ヒブシン及びデオキシヒブシンに結合し得るか、またはヒブシンには選択的に結合するが、デオキシヒブシンには結合し得ない。

【0009】

一態様において、ポリペプチド中のヒブシンに特異的に結合する単離された抗体が本明

50

細書に提供され、該抗体は、ヒブシンに隣接する、異なるアミノ酸配列を有するヒブシン含有ポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態において、該抗体は、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合しない。いくつかの実施形態において、該抗体は、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する。本明細書の実施形態のいずれかにおいて、該抗体は、ヒブシンを含有するポリペプチドに対して900 nM以下の結合親和性(K_D)を呈し得る。さらなる実施形態において、該抗体は、(i)ヒブシンを含有するポリペプチドに対して300 nM以下の結合親和性(K_D)、及び(ii)デオキシヒブシンを含有するポリペプチドに対して200 nM以下の結合親和性(K_D)を呈する。本明細書の実施形態のいずれかにおいて、本明細書に記載される抗体は、モノクローナル抗体であってもよい。本明細書の実施形態のいずれかにおいて、本明細書に記載される抗体は、抗原結合断片であってもよい。本明細書の実施形態のうちのいくつかにおいて、該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、該重鎖可変領域は、(i)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号13もしくは14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、(i)配列番号1もしくは2のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号4もしくは5のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。さらなる実施形態において、該重鎖可変領域は、配列番号24もしくは25のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、配列番号20もしくは21のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。本明細書の実施形態のうちのいくつかにおいて、該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、該重鎖可変領域は、(i)配列番号11もしくは12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。さらなる実施形態において、該重鎖可変領域は、配列番号27もしくは28のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、配列番号23のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む。本明細書の実施形態のうちのいくつかにおいて、該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、該重鎖可変領域は、(i)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。さらなる実施形態において、該重鎖可変領域は、配列番号26のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、配列番号22のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、該抗体は、検出剤に結合している。

【0010】

一態様において、ポリペプチド中のヒブシンに結合する単離された抗体が本明細書に提供され、該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、該重鎖可変領域は、(i)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号13もしくは14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、(i)配列番号1もしくは2のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号4もしくは5のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。さらなる実施形態において、該重鎖可変領域は、配列番号24もしくは25のアミノ酸配列を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、配列番号20もしくは21のアミノ酸配列を含む。さらなる実施形態において、該重鎖は、配列番号33もしくは34のアミノ酸配列を含み、か

つ／または該軽鎖は、配列番号 29 もしくは 30 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、該抗体は、検出剤に結合している。

【0011】

別の態様において、ポリペプチド中のヒブシンに特異的に結合する単離された抗体が本明細書に提供され、該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、該重鎖可変領域は、(i) 配列番号 11 もしくは 12 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(ii) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (iii) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含み、かつ／または該軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(ii) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (iii) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む。さらなる実施形態において、該重鎖可変領域は、配列番号 27 もしくは 28 のアミノ酸配列を含み、かつ／または該軽鎖可変領域は、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む。さらなる実施形態において、該重鎖は、配列番号 36 もしくは 37 のアミノ酸配列を含み、かつ／または該軽鎖は、配列番号 32 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、該抗体は、検出剤に結合している。

10

【0012】

さらに別の態様において、ポリペプチド中のヒブシンに特異的に結合する単離された抗体が本明細書に提供され、該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、該重鎖可変領域は、(i) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(ii) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (iii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含み、かつ／または該軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(ii) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (iii) 配列番号 72 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む。さらなる実施形態において、該重鎖可変領域は、配列番号 26 のアミノ酸配列を含み、かつ／または該軽鎖可変領域は、配列番号 22 のアミノ酸配列を含む。さらなる実施形態において、該重鎖は、配列番号 35 のアミノ酸配列を含み、かつ／または該軽鎖は、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、該抗体は、検出剤に結合している。

20

【0013】

別の態様において、上記及び本明細書に記載される任意の抗体をコードする配列を含む単離された核酸が本明細書に提供される。さらに別の態様において、本明細書に記載される核酸を含むベクターが本明細書に提供される。一実施形態において、該ベクターは、発現ベクターである。さらに別の態様において、本明細書に記載される核酸を含む宿主細胞が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、該宿主細胞は、抗体を発現し、産生する。

30

【0014】

別の態様において、抗体を産生する方法が本明細書に提供され、本方法は、抗体を産生する条件下で、本明細書に記載され、かつ本明細書に記載される核酸を含む任意の宿主細胞を培養することを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、宿主細胞によって産生された抗体を回収することをさらに含む。

【0015】

一態様において、試料中のヒブシン含有ポリペプチドを検出するための方法が本明細書に提供され、本方法は、(a) 試料を上記及び本明細書に記載される抗体と接触させるステップと、(b) 試料中のポリペプチドに結合した抗体を検出するステップと、を含む。一実施形態において、該抗体は、検出剤に結合している。一実施形態において、該ポリペプチドに結合した抗体は、二次薬剤を使用することによって検出される。さらなる実施形態において、検出剤は、化学発光標識、発色団、発蛍光団、磁性粒子、染料、放射標識、または酵素である。本明細書の方法の実施形態のうちのいくつかにおいて、検出は、酵素結合免疫吸着測定法、放射免疫測定法、免疫沈殿法、クロマトグラフィー、免疫組織化学法、免疫蛍光検査法、表面プラズモン共鳴法、蛍光標識細胞分取法、及び質量分析法からなる群から選択される 1 つ以上のアッセイによる。本明細書の実施形態のいずれかにおい

40

50

て、該試料は、生体試料であってもよい。さらなる実施形態において、該生体試料は、細胞または組織を含む。別のさらなる実施形態において、該生体試料は流体である。

【0016】

さらに別の態様において、試料中のヒブシン含有ポリペプチドを単離するための方法が本明細書に提供され、本方法は、(a) 試料を上記及び本明細書に記載される抗体と接触させるステップと、(b) 抗体に結合したポリペプチドを単離するステップと、を含む。さらなる実施形態において、該抗体は、固体表面に固定化される。本明細書の実施形態のいずれかにおいて、該試料は、生体試料であってもよい。さらなる実施形態において、該生体試料は、細胞または組織を含む。別のさらなる実施形態において、該生体試料は流体である。

10

【0017】

別の態様において、上記及び本明細書に記載される抗体を含む組成物が本明細書に提供される。

【0018】

一態様において、上記及び本明細書に記載される抗体またはその組成物を含むキットが本明細書に提供される。ある実施形態において、該キットは、試料中のヒブシン含有ポリペプチドを検出するための方法で該抗体を使用するための1つ以上の薬剤をさらに含む。別の実施形態において、該キットは、試料中のヒブシン含有ポリペプチドを検出するための方法で該抗体を使用するための1つ以上の薬剤をさらに含む。

20

【0019】

本明細書に記載される様々な実施形態の特性うちの1つ、いくつか、または全てを組み合わせ、本発明の他の実施形態を形成し得ることが理解される。本発明のこれら及び他の態様は、当業者には明らかとなるであろう。本発明のこれら及び他の実施形態は、以下の詳細な説明によってさらに説明される。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1A】図1A～Dは、汎抗ヒブシン抗体の重鎖及び軽鎖可変ドメインを示す図である。図1A) mAbHpu24 (配列番号20) 及びmAbHpu24.B (配列番号21) の軽鎖可変領域、図1B) mAbHpu24 (配列番号24) 及びmAbHpu24.B (配列番号25) の重鎖可変領域、図1C) mAbHpu98 (配列番号23)、mAbHpu98.61 (配列番号23) 及びmAbHpu91 (配列番号22) の軽鎖可変領域、及び図1D) mAbHpu98 (配列番号27)、mAbHpu98.61 (配列番号28) 及びmAbHpu91 (配列番号26) の重鎖可変領域。親抗体(mAbHpu24またはmAbHpu98)と親和性成熟変異体(mAbHpu24.BまたはmAbHpu98.61)との間の配列の違いが強調されている。mAbHpu91と近縁mAbHpu98とmAbHpu98.61抗体との間の配列の違いも強調されている。

30

【図1B】図1A～Dは、汎抗ヒブシン抗体の重鎖及び軽鎖可変ドメインを示す図である。図1A) mAbHpu24 (配列番号20) 及びmAbHpu24.B (配列番号21) の軽鎖可変領域、図1B) mAbHpu24 (配列番号24) 及びmAbHpu24.B (配列番号25) の重鎖可変領域、図1C) mAbHpu98 (配列番号23)、mAbHpu98.61 (配列番号23) 及びmAbHpu91 (配列番号22) の軽鎖可変領域、及び図1D) mAbHpu98 (配列番号27)、mAbHpu98.61 (配列番号28) 及びmAbHpu91 (配列番号26) の重鎖可変領域。親抗体(mAbHpu24またはmAbHpu98)と親和性成熟変異体(mAbHpu24.BまたはmAbHpu98.61)との間の配列の違いが強調されている。mAbHpu91と近縁mAbHpu98とmAbHpu98.61抗体との間の配列の違いも強調されている。

40

【図1C】図1A～Dは、汎抗ヒブシン抗体の重鎖及び軽鎖可変ドメインを示す図である。図1A) mAbHpu24 (配列番号20) 及びmAbHpu24.B (配列番号21) の軽鎖可変領域、図1B) mAbHpu24 (配列番号24) 及びmAbHpu24.B (配列番号25) の重鎖可変領域、図1C) mAbHpu98 (配列番号23)、mAbHpu98.61 (配列番号23) 及びmAbHpu91 (配列番号22) の軽鎖可変領域、及び図1D) mAbHpu98 (配列番号27)、mAbHpu98.61 (配列番号28) 及びmAbHpu91 (配列番号26) の重鎖可変領域。親抗体(mAbHpu24またはmAbHpu98)と親和性成熟変異体(mAbHpu24.BまたはmAbHpu98.61)との間の配列の違いが強調されている。mAbHpu91と近縁mAbHpu98とmAbHpu98.61抗体との間の配列の違いも強調されている。

50

b H p u 9 8 . 6 1 (配列番号 2 3) 及び m A b H p u 9 1 (配列番号 2 2) の軽鎖可変領域、及び図 1 D) m A b H p u 9 8 (配列番号 2 7)、m A b H p u 9 8 . 6 1 (配列番号 2 8) 及び m A b H p u 9 1 (配列番号 2 6) の重鎖可変領域。親抗体 (m A b H p u 2 4 または m A b H p u 9 8) と親和性成熟変異体 (m A b H p u 2 4 . B または m A b H p u 9 8 . 6 1) との間の配列の違いが強調されている。m A b H p u 9 1 と近縁 m A b H p u 9 8 と m A b H p u 9 8 . 6 1 抗体との間の配列の違いも強調されている。

【図 1 D】図 1 A ~ D は、汎抗ヒブシン抗体の重鎖及び軽鎖可変ドメインを示す図である。図 1 A) m A b H p u 2 4 (配列番号 2 0) 及び m A b H p u 2 4 . B (配列番号 2 1) の軽鎖可変領域、図 1 B) m A b H p u 2 4 (配列番号 2 4) 及び m A b H p u 2 4 . B (配列番号 2 5) の重鎖可変領域、図 1 C) m A b H p u 9 8 (配列番号 2 3)、m A b H p u 9 8 . 6 1 (配列番号 2 3) 及び m A b H p u 9 1 (配列番号 2 2) の軽鎖可変領域、及び図 1 D) m A b H p u 9 8 (配列番号 2 7)、m A b H p u 9 8 . 6 1 (配列番号 2 8) 及び m A b H p u 9 1 (配列番号 2 6) の重鎖可変領域。親抗体 (m A b H p u 2 4 または m A b H p u 9 8) と親和性成熟変異体 (m A b H p u 2 4 . B または m A b H p u 9 8 . 6 1) との間の配列の違いが強調されている。m A b H p u 9 1 と近縁 m A b H p u 9 8 と m A b H p u 9 8 . 6 1 抗体との間の配列の違いも強調されている。

【図 2 A】図 2 A ~ C は、m A b H p u 2 4、m A b H p u 9 1 及び m A b H p u 9 8 がヒブシンを特異的に認識することを示す一連のパネルである。図 2 A) 未精製のハイブリドーマ上清の E L I S A によって示される、隣接する配列に非依存性のヒブシン化ペプチドに結合した抗ヒブシン抗体。ペプチド (P 1 ~ P 6) の配列は、表 1 に提供する。塗りつぶされた棒は、ヒブシン化ペプチドに結合した抗ヒブシン抗体のデータを示す。星印 (*) を有する塗りつぶされた棒は、非ヒブシン化ペプチドに結合した抗ヒブシン抗体のデータを示す。図 2 B) ヒブシン化に必要な酵素 D H S 及び D O H H の融合タンパク質を使用した、293 個の細胞中の成熟 e I F 5 A の過剰発現の構成デザイン。図 2 C) ウエスタンブロット法分析によって示された天然無傷タンパク質 e I F 5 A 中のヒブシンに特異的に結合した抗ヒブシン抗体。

【図 2 B】図 2 A ~ C は、m A b H p u 2 4、m A b H p u 9 1 及び m A b H p u 9 8 がヒブシンを特異的に認識することを示す一連のパネルである。図 2 A) 未精製のハイブリドーマ上清の E L I S A によって示される、隣接する配列に非依存性のヒブシン化ペプチドに結合した抗ヒブシン抗体。ペプチド (P 1 ~ P 6) の配列は、表 1 に提供する。塗りつぶされた棒は、ヒブシン化ペプチドに結合した抗ヒブシン抗体のデータを示す。星印 (*) を有する塗りつぶされた棒は、非ヒブシン化ペプチドに結合した抗ヒブシン抗体のデータを示す。図 2 B) ヒブシン化に必要な酵素 D H S 及び D O H H の融合タンパク質を使用した、293 個の細胞中の成熟 e I F 5 A の過剰発現の構成デザイン。図 2 C) ウエスタンブロット法分析によって示された天然無傷タンパク質 e I F 5 A 中のヒブシンに特異的に結合した抗ヒブシン抗体。

【図 2 C】図 2 A ~ C は、m A b H p u 2 4、m A b H p u 9 1 及び m A b H p u 9 8 がヒブシンを特異的に認識することを示す一連のパネルである。図 2 A) 未精製のハイブリドーマ上清の E L I S A によって示される、隣接する配列に非依存性のヒブシン化ペプチドに結合した抗ヒブシン抗体。ペプチド (P 1 ~ P 6) の配列は、表 1 に提供する。塗りつぶされた棒は、ヒブシン化ペプチドに結合した抗ヒブシン抗体のデータを示す。星印 (*) を有する塗りつぶされた棒は、非ヒブシン化ペプチドに結合した抗ヒブシン抗体のデータを示す。図 2 B) ヒブシン化に必要な酵素 D H S 及び D O H H の融合タンパク質を使用した、293 個の細胞中の成熟 e I F 5 A の過剰発現の構成デザイン。図 2 C) ウエスタンブロット法分析によって示された天然無傷タンパク質 e I F 5 A 中のヒブシンに特異的に結合した抗ヒブシン抗体。

【図 3 A】図 3 A ~ C は、汎抗ヒブシン抗体の特異性特性評価を示す一連のパネルである。図 3 A) ヒブシン及びデオキシヒブシンの構造。図 3 B) m A b H p u 9 8 はヒブシン及びデオキシヒブシンの両方に結合することができた一方で、F a b H p u 2 4 及び F a b H p u 9 1 はヒブシンと排他的に相互作用した。結合分析を、O c t e t R E D 器具

10

20

30

40

50

を使用して、ビオチン標識した P 1 ヒブシン含有ペプチド (1 またはマゼンタによって示す)、P 1 - デオキシヒブシン化ペプチド (2 または橙色によって示す) または非ヒブシン化ペプチド (3 または青色によって示す) をストレプトアビジンバイオセンサ上に固定化し、次いで 2 0 0 n M の抗 H p u F a b s に浸漬することにより、行った。図 3 C) F a b H p u 9 8 残基 V_H Y 5 2 は、デオキシヒブシン及びヒブシンへの二重結合に必要不可欠であった。P 1 - H p u は、P 1 ヒブシン含有ペプチド (1 またはマゼンタによって示す) を示し、P 1 - デオキシは、P 1 - デオキシヒブシン化ペプチド (2 または橙色) を示し、P 1 は、非ヒブシン化ペプチド (3 または青色によって示す) を示す。

【図 3 B】図 3 A ~ C は、汎抗ヒブシン抗体の特異性特性評価を示す一連のパネルである。図 3 A) ヒブシン及びデオキシヒブシンの構造。図 3 B) m A b H p u 9 8 はヒブシン及びデオキシヒブシンの両方に結合することができた一方で、F a b H p u 2 4 及び F a b H p u 9 1 はヒブシンと排他的に相互作用した。結合分析を、O c t e t R E D 器具を使用して、ビオチン標識した P 1 ヒブシン含有ペプチド (1 またはマゼンタによって示す)、P 1 - デオキシヒブシン化ペプチド (2 または橙色によって示す) または非ヒブシン化ペプチド (3 または青色によって示す) をストレプトアビジンバイオセンサ上に固定化し、次いで 2 0 0 n M の抗 H p u F a b s に浸漬することにより、行った。図 3 C) F a b H p u 9 8 残基 V_H Y 5 2 は、デオキシヒブシン及びヒブシンへの二重結合に必要不可欠であった。P 1 - H p u は、P 1 ヒブシン含有ペプチド (1 またはマゼンタによって示す) を示し、P 1 - デオキシは、P 1 - デオキシヒブシン化ペプチド (2 または橙色) を示し、P 1 は、非ヒブシン化ペプチド (3 または青色によって示す) を示す。

【図 3 C】図 3 A ~ C は、汎抗ヒブシン抗体の特異性特性評価を示す一連のパネルである。図 3 A) ヒブシン及びデオキシヒブシンの構造。図 3 B) m A b H p u 9 8 はヒブシン及びデオキシヒブシンの両方に結合することができた一方で、F a b H p u 2 4 及び F a b H p u 9 1 はヒブシンと排他的に相互作用した。結合分析を、O c t e t R E D 器具を使用して、ビオチン標識した P 1 ヒブシン含有ペプチド (1 またはマゼンタによって示す)、P 1 - デオキシヒブシン化ペプチド (2 または橙色によって示す) または非ヒブシン化ペプチド (3 または青色によって示す) をストレプトアビジンバイオセンサ上に固定化し、次いで 2 0 0 n M の抗 H p u F a b s に浸漬することにより、行った。図 3 C) F a b H p u 9 8 残基 V_H Y 5 2 は、デオキシヒブシン及びヒブシンへの二重結合に必要不可欠であった。P 1 - H p u は、P 1 ヒブシン含有ペプチド (1 またはマゼンタによって示す) を示し、P 1 - デオキシは、P 1 - デオキシヒブシン化ペプチド (2 または橙色) を示し、P 1 は、非ヒブシン化ペプチド (3 または青色によって示す) を示す。

【図 4 A】図 4 A ~ B は、親和性成熟抗ヒブシン抗体によって増加した抗原結合を示す一連のグラフである。図 4 A) 固定化された P 1 - H p u ペプチドまたは P 1 - デオキシ H p u ペプチドに結合する F a b H p u 2 4 または F a b H p u 2 4 . B の典型的なバイオセンサのセンサグラム。図 4 B) 固定化された P 1 - H p u ペプチドまたは P 1 - デオキシ H p u ペプチドに結合する F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラム。F a b を以下の範囲の濃度 : 2 0 0 n M (赤色)、6 6 . 7 n M (橙色)、2 2 n M (緑色)、7 . 4 n M (青色)、2 . 4 n M (紫色) で注入し、近似曲線を示す (黒色)。

【図 4 B】図 4 A ~ B は、親和性成熟抗ヒブシン抗体によって増加した抗原結合を示す一連のグラフである。図 4 A) 固定化された P 1 - H p u ペプチドまたは P 1 - デオキシ H p u ペプチドに結合する F a b H p u 2 4 または F a b H p u 2 4 . B の典型的なバイオセンサのセンサグラム。図 4 B) 固定化された P 1 - H p u ペプチドまたは P 1 - デオキシ H p u ペプチドに結合する F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラム。F a b を以下の範囲の濃度 : 2 0 0 n M (赤色)、6 6 . 7 n M (橙色)、2 2 n M (緑色)、7 . 4 n M (青色)、2 . 4 n M (紫色) で注入し、近似曲線を示す (黒色)。

【図 5 A】図 5 A ~ E は、様々なヒブシン含有ペプチドに結合する F a b H p u 2 4 または F a b H p u 2 4 . B の典型的なバイオセンサのセンサグラムを示す一連のグラフであ

10

20

30

40

50

る。固定化された図 5 A) P 2 - H p u、図 5 B) P 3 - H p u、図 5 C) P 4 - H p u、図 5 D) P 5 - H p u 及び図 5 E) P 6 - H p u に結合する F a b H p u 2 4 または F a b H p u 2 4 . B の典型的なバイオセンサのセンサグラム。F a b を以下の範囲の濃度：2 0 0 n M (赤色)、6 6 . 7 n M (橙色)、2 2 n M (緑色)、7 . 4 n M (青色)、2 . 4 n M (紫色) で注入し、近似曲線を示す (黒色)。

【図 5 B】図 5 A ~ E は、様々なヒブシン含有ペプチドに結合する F a b H p u 2 4 または F a b H p u 2 4 . B の典型的なバイオセンサのセンサグラムを示す一連のグラフである。固定化された図 5 A) P 2 - H p u、図 5 B) P 3 - H p u、図 5 C) P 4 - H p u、図 5 D) P 5 - H p u 及び図 5 E) P 6 - H p u に結合する F a b H p u 2 4 または F a b H p u 2 4 . B の典型的なバイオセンサのセンサグラム。F a b を以下の範囲の濃度：2 0 0 n M (赤色)、6 6 . 7 n M (橙色)、2 2 n M (緑色)、7 . 4 n M (青色)、2 . 4 n M (紫色) で注入し、近似曲線を示す (黒色)。

10

【図 5 C】図 5 A ~ E は、様々なヒブシン含有ペプチドに結合する F a b H p u 2 4 または F a b H p u 2 4 . B の典型的なバイオセンサのセンサグラムを示す一連のグラフである。固定化された図 5 A) P 2 - H p u、図 5 B) P 3 - H p u、図 5 C) P 4 - H p u、図 5 D) P 5 - H p u 及び図 5 E) P 6 - H p u に結合する F a b H p u 2 4 または F a b H p u 2 4 . B の典型的なバイオセンサのセンサグラム。F a b を以下の範囲の濃度：2 0 0 n M (赤色)、6 6 . 7 n M (橙色)、2 2 n M (緑色)、7 . 4 n M (青色)、2 . 4 n M (紫色) で注入し、近似曲線を示す (黒色)。

20

【図 5 D】図 5 A ~ E は、様々なヒブシン含有ペプチドに結合する F a b H p u 2 4 または F a b H p u 2 4 . B の典型的なバイオセンサのセンサグラムを示す一連のグラフである。固定化された図 5 A) P 2 - H p u、図 5 B) P 3 - H p u、図 5 C) P 4 - H p u、図 5 D) P 5 - H p u 及び図 5 E) P 6 - H p u に結合する F a b H p u 2 4 または F a b H p u 2 4 . B の典型的なバイオセンサのセンサグラム。F a b を以下の範囲の濃度：2 0 0 n M (赤色)、6 6 . 7 n M (橙色)、2 2 n M (緑色)、7 . 4 n M (青色)、2 . 4 n M (紫色) で注入し、近似曲線を示す (黒色)。

30

【図 5 E】図 5 A ~ E は、様々なヒブシン含有ペプチドに結合する F a b H p u 2 4 または F a b H p u 2 4 . B の典型的なバイオセンサのセンサグラムを示す一連のグラフである。固定化された図 5 A) P 2 - H p u、図 5 B) P 3 - H p u、図 5 C) P 4 - H p u、図 5 D) P 5 - H p u 及び図 5 E) P 6 - H p u に結合する F a b H p u 2 4 または F a b H p u 2 4 . B の典型的なバイオセンサのセンサグラム。F a b を以下の範囲の濃度：2 0 0 n M (赤色)、6 6 . 7 n M (橙色)、2 2 n M (緑色)、7 . 4 n M (青色)、2 . 4 n M (紫色) で注入し、近似曲線を示す (黒色)。

40

【図 6 A】図 6 A ~ F は、様々なヒブシンまたはデオキシヒブシン含有ペプチドに結合した F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラムを示す一連のグラフである。固定化された図 6 A) P 2 - H p u、図 6 B) P 2 - デオキシ H p u、図 6 C) P 3 - H p u、図 6 D) P 4 - H p u、図 6 E) P 5 - H p u 及び図 6 F) P 6 - H p u に結合した F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラム。F a b を以下の範囲の濃度：2 0 0 n M (赤色)、6 6 . 7 n M (橙色)、2 2 n M (緑色)、7 . 4 n M (青色)、2 . 4 n M (紫色) で注入し、近似曲線を示す (黒色)。

【図 6 B】図 6 A ~ F は、様々なヒブシンまたはデオキシヒブシン含有ペプチドに結合した F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラムを示す一連のグラフである。固定化された図 6 A) P 2 - H p u、図 6 B) P 2 - デオキシ H p u、図 6 C) P 3 - H p u、図 6 D) P 4 - H p u、図 6 E) P 5 - H p u 及び図 6 F) P 6 - H p u に結合した F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラム。F a b を以下の範囲の濃度：2 0 0 n M (赤色)、6 6 . 7 n M (橙色)、2 2 n M (緑色)、7 . 4 n M (青色)、2 . 4 n M (紫色) で注入し、近似曲線を示す (黒色)。

50

【図 6 C】図 6 A ~ F は、様々なヒブシンまたはデオキシヒブシン含有ペプチドに結合し

た F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラムを示す一連のグラフである。固定化された図 6 A) P 2 - H p u、図 6 B) P 2 - デオキシ H p u、図 6 C) P 3 - H p u、図 6 D) P 4 - H p u、図 6 E) P 5 - H p u 及び図 6 F) P 6 - H p u に結合した F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラム。F a b を以下の範囲の濃度：2 0 0 n M (赤色)、6 6 . 7 n M (橙色)、2 2 n M (緑色)、7 . 4 n M (青色)、2 . 4 n M (紫色) で注入し、近似曲線を示す (黒色)。

【図 6 D】図 6 A ~ F は、様々なヒブシンまたはデオキシヒブシン含有ペプチドに結合した F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラムを示す一連のグラフである。固定化された図 6 A) P 2 - H p u、図 6 B) P 2 - デオキシ H p u、図 6 C) P 3 - H p u、図 6 D) P 4 - H p u、図 6 E) P 5 - H p u 及び図 6 F) P 6 - H p u に結合した F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラム。F a b を以下の範囲の濃度：2 0 0 n M (赤色)、6 6 . 7 n M (橙色)、2 2 n M (緑色)、7 . 4 n M (青色)、2 . 4 n M (紫色) で注入し、近似曲線を示す (黒色)。

【図 6 E】図 6 A ~ F は、様々なヒブシンまたはデオキシヒブシン含有ペプチドに結合した F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラムを示す一連のグラフである。固定化された図 6 A) P 2 - H p u、図 6 B) P 2 - デオキシ H p u、図 6 C) P 3 - H p u、図 6 D) P 4 - H p u、図 6 E) P 5 - H p u 及び図 6 F) P 6 - H p u に結合した F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラム。F a b を以下の範囲の濃度：2 0 0 n M (赤色)、6 6 . 7 n M (橙色)、2 2 n M (緑色)、7 . 4 n M (青色)、2 . 4 n M (紫色) で注入し、近似曲線を示す (黒色)。

【図 6 F】図 6 A ~ F は、様々なヒブシンまたはデオキシヒブシン含有ペプチドに結合した F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラムを示す一連のグラフである。固定化された図 6 A) P 2 - H p u、図 6 B) P 2 - デオキシ H p u、図 6 C) P 3 - H p u、図 6 D) P 4 - H p u、図 6 E) P 5 - H p u 及び図 6 F) P 6 - H p u に結合した F a b H p u 9 8 または F a b H p u 9 8 . 6 1 の典型的なバイオセンサのセンサグラム。F a b を以下の範囲の濃度：2 0 0 n M (赤色)、6 6 . 7 n M (橙色)、2 2 n M (緑色)、7 . 4 n M (青色)、2 . 4 n M (紫色) で注入し、近似曲線を示す (黒色)。

【図 7 A】図 7 A ~ B は、親和性成熟抗ヒブシン抗体がヒブシン化タンパク質 e I F 5 A のより良好な回収をもたらすことを示すクーマシーブルーで染色したゲルである。図 7 A) より多くの内因性 e I F 5 A が m A b H p u 2 4 よりも m A b H p u 2 4 . B によって免疫沈殿されたことを示すクーマシーブルー染色。図 7 B) より多くの内因性 e I F 5 A が m A b H p u 9 8 よりも m A b H p u 9 8 . 6 1 によって引き下ろされたことを示すクーマシーブルー染色。

【図 7 B】図 7 A ~ B は、親和性成熟抗ヒブシン抗体がヒブシン化タンパク質 e I F 5 A のより良好な回収をもたらすことを示すクーマシーブルーで染色したゲルである。図 7 A) より多くの内因性 e I F 5 A が m A b H p u 2 4 よりも m A b H p u 2 4 . B によって免疫沈殿されたことを示すクーマシーブルー染色。図 7 B) より多くの内因性 e I F 5 A が m A b H p u 9 8 よりも m A b H p u 9 8 . 6 1 によって引き下ろされたことを示すクーマシーブルー染色。

【図 8 A】図 8 A ~ B は、F a b 断片に結合したヒブシン含有ペプチドの電子密度マップである。図 8 A) F a b H p u 2 4 と複合したヒブシンの電子密度を示す (3 . 0 倍 R M S D で示した) 模擬アニーリング m F o - d F c オミットマップ。図 8 B) F a b H p u 9 8 と複合したヒブシンの電子密度を示す (3 . 0 倍 R M S D で示した) 模擬アニーリング m F o - d F c オミットマップ。矢印は、ペプチドを含有するヒブシンを示す。

【図 8 B】図 8 A ~ B は、F a b 断片に結合したヒブシン含有ペプチドの電子密度マップである。図 8 A) F a b H p u 2 4 と複合したヒブシンの電子密度を示す (3 . 0 倍 R M

10

20

30

40

50

S Dで示した) 模擬アニーリングm F o - d F c オミットマップ。図 8 B) F a b H p u 9 8 と複合したヒブシンの電子密度を示す (3 . 0 倍 R M S Dで示した) 模擬アニーリングm F o - d F c オミットマップ。矢印は、ペプチドを含有するヒブシンを示す。

【図 9 A】図 9 A ~ B は、ヒブシンとの F a b H p u 2 4 及び F a b H p u 9 8 の代替の結合様式を示す一連の図である。図 9 A) ヒブシン含有 C 1 ペプチド (黄色、真っ直ぐな矢印で示す) と複合した F a b H p u 2 4 F a b V_L (サーモン色、右葉) 及び V_H (青色、左葉) ドメイン。図 9 B) ヒブシン含有 C 1 ペプチド (黄色、真っ直ぐな矢印で示す) と複合した F a b H p u 9 8 F a b の V_L (スミレ色、左葉) 及び V_H (暗い青緑色、右葉)。

【図 9 B】図 9 A ~ B は、ヒブシンとの F a b H p u 2 4 及び F a b H p u 9 8 の代替の結合様式を示す一連の図である。図 9 A) ヒブシン含有 C 1 ペプチド (黄色、真っ直ぐな矢印で示す) と複合した F a b H p u 2 4 F a b V_L (サーモン色、右葉) 及び V_H (青色、左葉) ドメイン。図 9 B) ヒブシン含有 C 1 ペプチド (黄色、真っ直ぐな矢印で示す) と複合した F a b H p u 9 8 F a b の V_L (スミレ色、左葉) 及び V_H (暗い青緑色、右葉)。

【図 10 A】図 10 A ~ B は、ヒブシン相互作用の水素結合ネットワークを示す一連の図である。図 10 A) ヒブシン含有 C 1 ペプチドとの F a b H p u 2 4 の広範囲な水素結合ネットワーク。示されるようにオングストロームでの長さで、推定上の水素結合を破線 (橙色) で示した、V_H (青色、左葉)、V_L (サーモン色、右葉)、及び C 1 ペプチド (黄色、矢印で示す) を示す立体像図。図 10 B) V_H (マゼンタ、左葉)、V_L (暗い青緑色、右葉) 及び C 1 ペプチド (黄色、矢印で示す) を有するペプチド C 1 を有する F a b H p u 9 8 の広範囲な水素結合ネットワーク。

【図 10 B】図 10 A ~ B は、ヒブシン相互作用の水素結合ネットワークを示す一連の図である。図 10 A) ヒブシン含有 C 1 ペプチドとの F a b H p u 2 4 の広範囲な水素結合ネットワーク。示されるようにオングストロームでの長さで、推定上の水素結合を破線 (橙色) で示した、V_H (青色、左葉)、V_L (サーモン色、右葉)、及び C 1 ペプチド (黄色、矢印で示す) を示す立体像図。図 10 B) V_H (マゼンタ、左葉)、V_L (暗い青緑色、右葉) 及び C 1 ペプチド (黄色、矢印で示す) を有するペプチド C 1 を有する F a b H p u 9 8 の広範囲な水素結合ネットワーク。

【図 11 A】図 11 A ~ C は、F a b H p u 9 8 に結合するヒブシンとデオキシヒブシンとの比較を示す一連の図である。図 11 A) 5 . 0 倍 r m s d で示した、ヒブシンのヒドロキシル基の位置及び V_H Y 5 2 側鎖のシフトを示す、同形の F o - F o 差マップ。図 11 B) F a b H p u 9 8 において、ヒブシン複合体、ヒブシンのヒドロキシル基が、V_L S 9 4 及び V_H Y 5 2 の両方と水素結合を形成する。図 11 C) F a b H p u 9 8 において、デオキシヒブシン複合体、V_L S 9 4 及び V_H Y 5 2 が水素結合を形成する。矢印は、ペプチドを含有するヒブシンを示す。

【図 11 B】図 11 A ~ C は、F a b H p u 9 8 に結合するヒブシンとデオキシヒブシンとの比較を示す一連の図である。図 11 A) 5 . 0 倍 r m s d で示した、ヒブシンのヒドロキシル基の位置及び V_H Y 5 2 側鎖のシフトを示す、同形の F o - F o 差マップ。図 11 B) F a b H p u 9 8 において、ヒブシン複合体、ヒブシンのヒドロキシル基が、V_L S 9 4 及び V_H Y 5 2 の両方と水素結合を形成する。図 11 C) F a b H p u 9 8 において、デオキシヒブシン複合体、V_L S 9 4 及び V_H Y 5 2 が水素結合を形成する。矢印は、ペプチドを含有するヒブシンを示す。

【図 11 C】図 11 A ~ C は、F a b H p u 9 8 に結合するヒブシンとデオキシヒブシンとの比較を示す一連の図である。図 11 A) 5 . 0 倍 r m s d で示した、ヒブシンのヒドロキシル基の位置及び V_H Y 5 2 側鎖のシフトを示す、同形の F o - F o 差マップ。図 11 B) F a b H p u 9 8 において、ヒブシン複合体、ヒブシンのヒドロキシル基が、V_L S 9 4 及び V_H Y 5 2 の両方と水素結合を形成する。図 11 C) F a b H p u 9 8 において、デオキシヒブシン複合体、V_L S 9 4 及び V_H Y 5 2 が水素結合を形成する。矢印は、ペプチドを含有するヒブシンを示す。

10

20

30

40

50

【図 1 2 A】図 1 2 A ~ D は、ヒブシンに結合する親和性成熟 F a b s の構造を示す一連の図である。図 1 2 A) C 1 ペプチド (G S G - H p u - G S G 、黄色、矢印で示す) に結合する、F a b H p u 2 4 V_L (サーモン色、右葉) 及び V_H (青色、左葉) と、F a b H p u 2 4 . B V_L (サーモン色、右葉) 及び V_H (緑色、左葉) との比較。C D R H 2 及び H 3 の立体構造の変化が、ヒブシン相互作用のための接触領域を増加させた。図 1 2 B) ヒブシン含有ペプチド C 1 との F a b H p u 2 4 . B の広範囲な水素結合ネットワーク。図 1 2 C) C 1 ペプチド (G S G - H p u - G S G 、矢印で示す) に結合する、F a b H p u 9 8 V_L (スミレ色、左部分) 及び V_H (シアン、右部分) と、F a b H p u 9 8 . 6 1 V_L (スミレ色、左部分) 及び V_H (緑色、右部分) の比較。図 1 2 D) F a b H p u 2 4 . B の T 3 3 が、ヒブシンとの付加的な水素結合を作っている。矢印は、ペプチドを含有するヒブシンを示す。

10

【図 1 2 B】図 1 2 A ~ D は、ヒブシンに結合する親和性成熟 F a b s の構造を示す一連の図である。図 1 2 A) C 1 ペプチド (G S G - H p u - G S G 、黄色、矢印で示す) に結合する、F a b H p u 2 4 V_L (サーモン色、右葉) 及び V_H (青色、左葉) と、F a b H p u 2 4 . B V_L (サーモン色、右葉) 及び V_H (緑色、左葉) との比較。C D R H 2 及び H 3 の立体構造の変化が、ヒブシン相互作用のための接触領域を増加させた。図 1 2 B) ヒブシン含有ペプチド C 1 との F a b H p u 2 4 . B の広範囲な水素結合ネットワーク。図 1 2 C) C 1 ペプチド (G S G - H p u - G S G 、矢印で示す) に結合する、F a b H p u 9 8 V_L (スミレ色、左部分) 及び V_H (シアン、右部分) と、F a b H p u 9 8 . 6 1 V_L (スミレ色、左部分) 及び V_H (緑色、右部分) の比較。図 1 2 D) F a b H p u 2 4 . B の T 3 3 が、ヒブシンとの付加的な水素結合を作っている。矢印は、ペプチドを含有するヒブシンを示す。

20

【図 1 2 C】図 1 2 A ~ D は、ヒブシンに結合する親和性成熟 F a b s の構造を示す一連の図である。図 1 2 A) C 1 ペプチド (G S G - H p u - G S G 、黄色、矢印で示す) に結合する、F a b H p u 2 4 V_L (サーモン色、右葉) 及び V_H (青色、左葉) と、F a b H p u 2 4 . B V_L (サーモン色、右葉) 及び V_H (緑色、左葉) との比較。C D R H 2 及び H 3 の立体構造の変化が、ヒブシン相互作用のための接触領域を増加させた。図 1 2 B) ヒブシン含有ペプチド C 1 との F a b H p u 2 4 . B の広範囲な水素結合ネットワーク。図 1 2 C) C 1 ペプチド (G S G - H p u - G S G 、矢印で示す) に結合する、F a b H p u 9 8 V_L (スミレ色、左部分) 及び V_H (シアン、右部分) と、F a b H p u 9 8 . 6 1 V_L (スミレ色、左部分) 及び V_H (緑色、右部分) の比較。図 1 2 D) F a b H p u 2 4 . B の T 3 3 が、ヒブシンとの付加的な水素結合を作っている。矢印は、ペプチドを含有するヒブシンを示す。

30

【図 1 2 D】図 1 2 A ~ D は、ヒブシンに結合する親和性成熟 F a b s の構造を示す一連の図である。図 1 2 A) C 1 ペプチド (G S G - H p u - G S G 、黄色、矢印で示す) に結合する、F a b H p u 2 4 V_L (サーモン色、右葉) 及び V_H (青色、左葉) と、F a b H p u 2 4 . B V_L (サーモン色、右葉) 及び V_H (緑色、左葉) との比較。C D R H 2 及び H 3 の立体構造の変化が、ヒブシン相互作用のための接触領域を増加させた。図 1 2 B) ヒブシン含有ペプチド C 1 との F a b H p u 2 4 . B の広範囲な水素結合ネットワーク。図 1 2 C) C 1 ペプチド (G S G - H p u - G S G 、矢印で示す) に結合する、F a b H p u 9 8 V_L (スミレ色、左部分) 及び V_H (シアン、右部分) と、F a b H p u 9 8 . 6 1 V_L (スミレ色、左部分) 及び V_H (緑色、右部分) の比較。図 1 2 D) F a b H p u 2 4 . B の T 3 3 が、ヒブシンとの付加的な水素結合を作っている。矢印は、ペプチドを含有するヒブシンを示す。

40

【図 1 3】ヒブシンを取り囲むアミノ酸配列に最低限依存して推定上のヒブシン含有ポリペプチド上のヒブシンに結合する、本明細書に記載される任意の抗ヒブシン抗体の模擬モデルを示す図である。矢印は、ヒブシン含有タンパク質を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

I . 定義

50

本発明を詳細に記載する前に、本発明が特定の組成物または生物学的系に限定されず、当然変化し得ることを理解されたい。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定することを意図されていないことも理解されたい。

【0022】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、その内容が明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「1つの分子(a molecule)」への言及は、2つ以上のかかる分子の組み合わせを任意に含むといった具合である。

【0023】

本明細書で使用される「約」という用語は、当業者であれば容易に理解するそれぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態を含む(かつ説明する)。例えば、「約X」について言及する記述は、「X」の記述を含む。

【0024】

本明細書に記載される本発明の態様及び実施形態が、態様及び実施形態「を含む」、「からなる」、及び「から本質的になる」を含むことが理解される。

【0025】

本明細書の「抗体」という用語は、最も広義に使用され、それらが所望の抗原結合活性を呈する限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、ヒト化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体及び抗体断片を含むが、これらに限定されない、様々な抗体構造を包含する。

【0026】

「親和性」とは、分子(例えば、抗体)とその結合パートナー(例えば、抗原)との単一結合部位の間の非共有結合相互作用の合計の強度を指す。別途示されない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」とは、結合対のメンバー(例えば、抗体及び抗原)間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は一般に、解離定数(K_D)によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例証的かつ例示的な実施形態が、以下に記載される。

【0027】

「親和性成熟」抗体とは、改変を有しない親抗体と比較して、1つ以上の超可変領域(HVR)に1つ以上の改変を有し、かかる改変により抗体の抗原に対する親和性が改善される抗体を指す。

【0028】

「抗ヒブシン抗体」及び「ポリペプチド中のヒブシンに結合する抗体」という用語は、抗体がヒブシン含有ポリペプチドに対する検出、診断または単離試薬として有用であるような十分な親和性でヒブシン含有ポリペプチド中のヒブシンに結合することができる抗体を指すのに、同義に使用される。一実施形態において、非ヒブシン化ポリペプチドへの抗ヒブシン抗体の結合の程度は、例えば、放射免疫測定法(RIA)で測定して、ヒブシン化タンパク質への抗ヒブシン抗体の結合の約10%未満である。ある特定の実施形態において、ヒブシン含有ポリペプチド中のヒブシンに結合する抗体は、 $1\mu\text{M}$ 以下、 100nM 以下、 10nM 以下、 1nM 以下、 0.1nM 以下、 0.01nM 以下、または 0.001nM 以下(例えば 10^{-8}M 以下、例えば $10^{-8}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$ 、例えば、 $10^{-9}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$)の解離定数(K_D)を有する。いくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、ポリペプチド中のデオキシヒブシンにも結合する。

【0029】

「抗デオキシヒブシン抗体」及び「ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する抗体」という用語は、抗体がデオキシヒブシン含有ポリペプチドに対する検出、診断または単

10

20

30

40

50

離試薬として有用であるような十分な親和性でデオキシヒブシン含有ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合することができる抗体を指すのに同義に使用される。いくつかの実施形態において、デオキシヒブシンに結合する抗体は、ポリペプチド中のヒブシンとも結合する。一実施形態において、非デオキシヒブシン化ポリペプチドへの抗デオキシヒブシン抗体の結合の程度は、例えば、放射免疫測定法（RIA）で測定して、デオキシヒブシン化ポリペプチドへの抗体の結合の約10%未満である。ある特定の実施形態において、デオキシヒブシン含有ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する抗体は、 $1\mu\text{M}$ 以下、 100nM 以下、 10nM 以下、 1nM 以下、 0.1nM 以下、 0.01nM 以下、または 0.001nM 以下（例えば 10^{-8}M 以下、例えば $10^{-8}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$ 、例えば、 $10^{-9}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$ ）の解離定数（ K_D ）を有する。

10

【0030】

いくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、同じポリペプチド（例えば、ヒブシン及びデオキシヒブシンを含有するポリペプチド）上のヒブシン及びデオキシヒブシンに結合する。いくつかの実施形態において、該抗体は、異なるポリペプチド上のヒブシン及びデオキシヒブシンに結合する（例えば、ヒブシンを含有し、デオキシヒブシンを含有しないポリペプチド、及びデオキシヒブシンを含有し、ヒブシンを含有しないポリペプチド）。いくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合しない。

【0031】

「結合」または「特異的結合」は、概して（抗体と1つ以上の標的との間、抗ヒブシン抗体とヒブシンとの間、または抗ヒブシン抗体とデオキシヒブシンとの間等の）2つの分子間の、十分な親和性での結合を指す。好ましくは、抗体が無関係の標的に結合する程度は例えば、放射免疫測定法（RIA）によって測定して、標的への抗体の結合の約10%未満である。いくつかの実施形態において、標的に結合する抗体は、 $1\mu\text{M}$ 以下、 100nM 以下、 10nM 以下、 1nM 以下、または 0.1nM 以下の解離定数（ K_D ）を有する。

20

【0032】

「抗体がヒブシンと隣接する異なるアミノ酸配列を有するヒブシン含有ポリペプチドまたはデオキシヒブシン含有ポリペプチドに結合する」という用語は、ペプチドを取り囲む可変、またはタンパク質配列の文脈において、ヒブシン及び/またはデオキシヒブシンを特異的に認識する抗体を指す。そのような抗体は、ヒブシンまたはデオキシヒブシンに隣接する異なるアミノ酸配列を有する少なくとも2つのポリペプチド中のヒブシン及び/またはデオキシヒブシンに結合する。ある特定の実施形態において、そのような抗体は、ヒブシン及び/またはデオキシヒブシンを取り囲むアミノ酸配列に最低限依存してポリペプチド中のヒブシン及び/またはデオキシヒブシンに結合し、例えば、該抗体は、25%未満、20%、15%、10%、7%、5%、2%または1%の親和性の変化でヒブシン及び/またはデオキシヒブシンを取り囲む異なるアミノ酸配列を有する2つ以上のポリペプチドに結合する。

30

【0033】

「完全長抗体」、「無傷抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書で、天然抗体構造と実質的に同様の構造を有するか、または本明細書に定義されるFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指すように同義に使用される。

40

【0034】

「抗体断片」または「抗原結合断片」は、無傷抗体が結合する抗原に結合する、無傷抗体の一部を含む無傷抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；二重特異性抗体；線状抗体（linear antibodies）；1本鎖抗体分子（例えば、scFv）；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0035】

「Fab」断片は、軽鎖の可変及び定常ドメイン、ならびに重鎖の可変ドメイン及び第

50

1の定常ドメイン(CH1)を含有する。 $F(ab)'_2$ 抗体断片は、一般にヒンジステインによってカルボキシ末端の近くに共有結合した一対のFab断片を含む。抗体断片の他の化学的結合もまた知られている。

【0036】

「Fv」は、完全な抗原認識部位及び抗原結合部位を含有する最小の抗体断片である。この断片は1つの重鎖可変領域ドメインと1つの軽鎖可変領域ドメインが、非共有結合で緊密に結合した二量体からなる。これらの2つのドメインの折り畳みにより、抗原結合のためのアミノ酸残基を提供し、抗原結合特異性を抗体に与える、6つの超可変ループ(H鎖及びL鎖からそれぞれ3つのループ)が生じる。しかしながら、全結合部位よりも低い親和性であるが、単一の可変ドメイン(または抗原に特異的なCDRを3つしか含まないFvの半分)でさえも、抗原を認識し、それに結合する能力を有する。

10

【0037】

抗体の「クラス」は、その重鎖によって保有される定常ドメインまたは定常領域の型を指す。5つの主要なクラスの抗体IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが存在し、これらのうちのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂にさらに分類され得る。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ と呼ばれる。

【0038】

本明細書における「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するように使用される。この用語は、天然配列Fc領域及び変異型Fc領域を含む。一実施形態では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端に及ぶ。しかしながら、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は、存在する場合もあれば、しない場合もある。本明細書で別途指定されない限り、Fc領域または定常領域内のアミノ酸残基の付番は、Kabata et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載される、EUインデックスとも呼ばれるEU付番システムに従う。

20

30

【0039】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般に、4つのFRドメイン:FR1、FR2、FR3、及びFR4からなる。したがって、HVR及びFR配列は、一般に、VH(またはVL)において次の順序で現れる:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0040】

本明細書で使用される場合、「超可変領域」、「HVR」、または「HV」という用語は、配列が超可変性であり、かつ/または構造的に定義されたループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は、6つのHVRを含み、3つがVH(H1、H2、H3)にあり、3つがVL(L1、L2、L3)にある。天然抗体において、H3及びL3が6つのHVRのうち最も高い多様性を呈し、特にH3が、抗体に優れた特異性を与える上で特有の役割を果たすと考えられている。例えば、Xu et al. Immunity 13:37-45(2000)、Johnson and Wu, Methods in Molecular Biology 248:1-25(Lo, ed. Human Press, Totowa, NJ, 2003)を参照されたい。実際に、重鎖のみからなる天然に存在するラクダ抗体は、軽鎖の不在下でのみ機能的であり、安定している。例えば、Hamers-Casterman et al. Nature 363:446-448(1993)、Sheriff et al. Nature Struct. Biol. 3:733-736(1996)を参照されたい。

40

50

【 0 0 4 1 】

いくつかのHVR描写が本明細書で使用され、本明細書に包含される。Kabat相補性決定領域(CDR)は、配列可変性に基づくものであり、最も一般的に使用されている(Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、その代わりに、構造的ループの位置に言及する(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM HVRは、KabatのHVRとChothiaの構造ループとの折衷物であり、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアで用いられている。「接触」HVRは、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。これらHVRの各々の残基を、以下に記載する。

10

ループ	K a b a t	C h o t h i a	接 触
L 1	L 2 4 ~ L 3 4	L 2 6 ~ L 3 4	L 3 0 ~ L 3 6
L 2	L 5 0 ~ L 5 6	L 5 0 ~ L 5 6	L 4 6 ~ L 5 5
L 3	L 8 9 ~ L 9 7	L 9 1 ~ L 9 6	L 8 9 ~ L 9 6
H 1	H 3 1 ~ H 3 5 B	H 2 6 ~ H 3 2	H 3 0 ~ H 3 5 B (K a b a t 番号付け)
H 1	H 3 1 ~ H 3 5	H 2 6 ~ H 3 2	H 3 0 ~ H 3 5 (C h o t h i a 番号付け)
H 2	H 5 0 ~ H 6 5	H 5 3 ~ H 5 6	H 4 7 ~ H 5 8
H 3	H 9 5 ~ H 1 0 2	H 9 5 ~ H 1 0 2	H 9 3 ~ H 1 0 1

20

【 0 0 4 2 】

HVRは、以下の「伸長HVR」を含み得る：VLにおいて、24~36または24~34(L1)、46~56または50~56(L2)、及び89~97または89~96(L3)、ならびにVHにおいて、26~35(H1)、50~65または49~65(H2)、及び93~102、94~102、または95~102(H3)。

30

【 0 0 4 3 】

別途指定されない限り、可変ドメイン残基(HVR残基及びフレームワーク領域残基)は、Kabat et al. (上記参照)に従って本明細書で番号付けされる。

【 0 0 4 4 】

「Kabatにあるような可変ドメイン残基番号付け」または「Kabatにあるようなアミノ酸位置番号付け」という用語、及びそれらの変形は、Kabat et al. (上記参照)における抗体の編集物の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに使用される番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを使用して、実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのFRもしくはHVRの短縮、またはそれへの挿入に対応するより少ないアミノ酸または追加のアミノ酸を含有し得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後に単一のアミノ酸挿入(Kabatに従う残基52a)を含み、重鎖FR残基82の後に挿入された残基(例えば、Kabatに従う残基82a、82b、及び82c等)を含み得る。残基のKabat番号付けは、所与の抗体に対して、「標準の」Kabatによって番号付けされた配列との抗体の配列の相同領域での整列によって決定され得る。

40

【 0 0 4 5 】

Kabat番号付けシステムは、一般に、可変ドメイン内の残基(およそ軽鎖の残基1~107及び重鎖の残基1~113)を指すときに用いられる(例えば、Kabat et al. Sequences of Immunological Interest

50

. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991))。 「EU番号付けシステム」または「EU指標」は、一般に、免疫グロブリン重鎖定常領域における残基について言及する際に使用される(例えば、Kabatt et al. (上記参照)で報告されるEU指標)。「KabattにあるようなEU指標」は、ヒトIgG1 EU抗体の残基番号付けを指す。本明細書に別途示されない限り、抗体の可変ドメイン内の残基番号の参照は、Kabatt番号付けシステムによる残基番号付けを意味する。本明細書に別途示されない限り、抗体の定常ドメイン内の残基番号の参照は、EU番号付けシステムによる残基番号付けを意味する(例えば、米国仮出願第60/640,323号、EU番号付けに関する図を参照されたい)。

10

【0046】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に關与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン(それぞれ、VH及びVL)は、一般に類似の構造を有し、各ドメインが4つの保存フレームワーク領域(FR)及び3つの超可変領域(HVR)を含む。(例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed. W. H. Freeman and Co. page 91 (2007)を参照されたい)。単一のVHドメインまたはVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、VHドメインまたはVLドメインを使用して抗原に結合する抗体から単離されて、それぞれ、相補的VLドメインまたはVHドメインのライブラリーをスクリーニングすることができる。例えば、Portolano et al. J. Immunol. 150: 880-887 (1993)、Clarkson et al. Nature 352: 624-628 (1991)を参照されたい。

20

【0047】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一であり、かつ/または同じエピトープに結合するが、例えば、自然発生突然変異を含有するか、またはモノクローナル抗体調製物の産生中に生じる、起こり得る変異抗体は例外であり、かかる変異型は一般的に少量で存在する。異なる決定基(エピトープ)に対して指向される異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体の集団から得られるものとして抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含むがこれらに限定されない、多様な技法によって作製されてもよく、モノクローナル抗体を作製するためのかかる方法及び他の例示的な方法が、本明細書に記載されている。

30

【0048】

「裸の抗体」は、異種性部分(例えば、細胞傷害性部分)または放射標識に複合されていない抗体を指す。裸の抗体は、製剤中に存在してもよい。

40

【0049】

「天然抗体」は、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合されている2つの同一の軽鎖及び2つの同一の重鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端まで、各重鎖は、可変重ドメイン(variable heavy domain)または重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VH)と、その後3つの定常ドメイン(CH1、CH2、及びCH3)とを有する。同様に、N末端からC末端まで、各軽鎖は、可変軽ドメイン(variable light domain)または軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VL)と、その後定常軽(CL)ドメインとを

50

有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カップパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる2つの型うちの1つに割り当てられ得る。

【0050】

「単離された」抗体とは、その天然環境の構成成分から分離された抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動法（IEF）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフ法（例えば、イオン交換もしくは逆相HPLC）によって決定される、95%超または99%超の純度まで精製される。抗体純度の評価のための方法の概説に関して、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照されたい。

10

【0051】

「単離された」核酸とは、その天然環境の構成成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、通常は核酸分子を含有する細胞内に含有される核酸分子を含むが、その核酸分子が染色体外に、またはその天然染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0052】

「抗ヒプシン抗体をコードする単離された核酸」とは、抗体重鎖及び軽鎖（またはそれらの断片）をコードする1つ以上の核酸分子を指し、単一のベクターまたは別個のベクター内のかかる核酸分子（複数可）を含み、かかる核酸分子（複数可）は、宿主細胞内の1つ以上の場所に存在する。

【0053】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」という用語は、同義で使用され、その中に外因性核酸が導入された細胞を指し、かかる細胞の子孫を含む。宿主細胞には、初代形質転換細胞及び継代の数にかかわらずそれに由来する子孫を含む、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれる。子孫は、核酸含有量が親細胞と完全に同一ではない場合があるが、変異を含み得る。最初に形質転換された細胞についてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物活性を有する変異子孫が、本明細書に含まれる。いくつかの実施形態において、宿主細胞は単離される（すなわち、その構成成分天然環境の構成成分から単離される）。

20

【0054】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、それが連結している別の核酸を増殖させることができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、及びそれが導入される宿主細胞のゲノム内に組み込まれたベクターを含む。ある特定のベクターは、それらが作動可能に結合している核酸の発現を誘導することができる。かかるベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称される。

30

【0055】

参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント（%）」は、配列を整列し、配列同一性最大パーセントを実現するために必要に応じてギャップを導入した後に、かついかなる保存的置換も配列同一性の部分として考慮せずに、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基の割合（%）として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するための整列は、当該技術分野の技術範囲内の様々な方法で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegalign（DNASTAR）ソフトウェア等の公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成され得る。当業者であれば、比較される配列の全長にわたる最大整列を達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含む、配列の整列に適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書における目的のために、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. が作成したものであり、ソースコードは、米国著作権局（Washington D.C. 20559）においてユーザ文書とともに申請されており、これは、米国著作権登録番号TXU510087で登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, In

40

50

c. (South San Francisco, California) から公的に入手可能であり、またはソースコードからコンパイルされ得る。ALIGN - 2 プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステムでの使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN - 2 プログラムによって設定されており、変動しない。

【0056】

ALIGN - 2 がアミノ酸配列比較に用いられる状況下で、所与のアミノ酸配列 B への、それとの、またはそれに対する所与のアミノ酸配列 A のアミノ酸配列同一性% (代替的に、所与のアミノ酸配列 B への、それとの、またはそれに対するある特定のアミノ酸配列同一性%を有するか、または含む所与のアミノ酸配列 A と表現され得る) は、以下のように計算される：

$$100 \times \text{分数 } X / Y$$

式中、X は、配列整列プログラム ALIGN - 2 によってそのプログラムの A と B との整列において完全な一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Y は、B におけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは等しくない場合、A の B に対するアミノ酸配列同一性%は、B の A に対するアミノ酸配列同一性%とは等しくないことが理解される。別途具体的に示されない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性%値は、直前の段落に記載されるように ALIGN - 2 コンピュータプログラムを使用して得られる。

【0057】

「添付文書」という用語は、かかる試薬製品の用法についての情報を含む試薬製品の商用パッケージに通例含まれる説明書を指すように使用される。

【0058】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物には、家畜 (例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ)、霊長類 (例えば、ヒト、及びサル等の非ヒト霊長類)、ウサギ、ならびに齧歯類 (例えば、マウス及びラット) が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、個体または対象は、ヒトである。

【0059】

本明細書に使用されるとき、「試料」または「生体試料」という用語は、目的とする対象、細胞、または組織から得られたかまたはそれ由来の組成物を指す。試料としては、ある個体からの組織、全血、血清、または血漿が挙げられるがこれらに限定されない。試料には、組織、細胞、または組織もしくは細胞から得られた流体も含むが、これらに限定されない。

【0060】

本明細書に使用されるとき、「評価を補助する」ための方法は、臨床的判断 (例えば、アナフィラキシーのリスク) を下す際に補助する方法を指し、最終的な評価に関して結論的であってもよいが、または結論的でなくてもよい。

【0061】

本明細書に使用されるとき、「基準値」は、絶対値、相対値、上限及び/もしくは下限がある値、値の範囲、平均値 (average value)、中央値、平均値 (mean value)、または特定の対照もしくは基礎値と比較した値であってもよい。

【0062】

「検出する」または「検出」という用語は、特定の分子の質的測定及び量的測定の両方、本明細書ではヒブシン含有ポリペプチド中のヒブシンまたはデオキシヒブシン含有ポリペプチド中のデオキシヒブシン等の特定の分析物分子の測定を含むために最も広義に使用される。一態様において、本明細書に記載される検出方法は、試料中の目的とする分析物分子の存在のみを確認するために使用される。別の態様において、検出方法は、試料中の分析物分子の量を定量化するために使用されてもよい。さらに別の態様において、該方法は、標的分子の目的とする分析物分子の相対的結合親和性を判定するために使用されてもよい。

10

20

30

40

50

【0063】

「検出剤 (detecting agent)」、「検出剤 (detection agent)」、「検出試薬 (detecting reagent)」、及び「検出試薬 (detection reagent)」という用語は、抗ヒブシン抗体に結合することができる磁気標識、発色団標識、染料標識、蛍光標識、酵素標識、放射性標識、もしくは化学発光標識等の標識を介して直接、または抗ヒブシン抗体と特異的と結合する抗体もしくは受容体等の標識化二次薬剤を介して間接的に、のいずれかで、抗ヒブシン抗体を検出する薬剤を指すように同義に使用される。二次薬剤の例としては、抗体、抗体フラグメント、可溶性受容体、受容体フラグメント等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0064】

10

「アッセイ表面」または「表面」という用語は、免疫測定で使用するために捕捉剤が固定化され得る基質を意味する。好適なアッセイ表面としては、ポリマーアッセイプレート、チップ、流動性カード (fluidity card)、磁気ビーズ、樹脂、セルロースポリマースポンジ等が挙げられる。

【0065】

「捕捉剤」または「捕捉試薬」という用語は、試料中の標的分子または分析物分子 (例えば、ヒブシン及び / もしくはデオキシヒブシンを含有するポリペプチド) に結合し、捕捉することができる薬剤 (例えば、抗ヒブシン抗体) を指す。捕捉剤または試薬は、例えば、微粒子またはビーズ、マイクロタイタープレート、カラム樹脂、チップ、流動性カード (fluidity card)、磁気ビーズ、セルロースポリマースポンジ等の固体基質上に固定化されてもよい。

20

【0066】

本明細書において使用する場合、「標識」という用語は、核酸プローブ、ポリペプチドまたは抗体等の試薬に直接または間接的に複合または融合し、複合または融合した試薬の検出または捕捉を容易にする化合物または組成物を指す。この標識はそれ自体が検出可能 (例えば、放射性同位標識、蛍光標識、光ルミネセンス標識、化学発光標識、もしくは電気化学発光標識) であり得るか、別の分子に結合した後に検出可能であり得るか、または酵素標識の場合、検出可能である基質化合物もしくは組成物の化学改変を触媒し得る。

【0067】

30

「標的分子」という用語は、本明細書に記載される抗体の特異的結合標的を指す。一実施形態において、標的分子は、ヒブシン含有ポリペプチド中のヒブシンまたはヒブシン含有ポリペプチドである。一実施形態において、標的分子は、デオキシヒブシン含有ポリペプチド中のデオキシヒブシンまたはデオキシヒブシン含有ポリペプチドである。

【0068】

本明細書に使用されるとき、「分析物」及び「分析物分子」は、本発明の方法によって分析され、かつ限定されないがヒブシン及び / またはデオキシヒブシンを含有するポリペプチドを含む分子を指す。

【0069】

40

「タンパク質」、「ペプチド」、及び「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸ポリマー、または1組の2つ以上の相互作用しているかもしくは結合したアミノ酸ポリマーを意味するように同義に使用される。

【0070】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合によって結合した2つ以上のアミノ酸を含有するペプチドまたはタンパク質を指し、ペプチド、オリゴマー、タンパク質等を含む。ポリペプチドは、天然、修飾、または合成アミノ酸を含有し得る。ポリペプチドは、例えば翻訳後プロセッシングによって天然に、または例えばアミド化アシル化、架橋等、化学的に修飾もされ得る。

【0071】

II. 抗ヒブシン抗体

一態様において、本発明は、ポリペプチド中のヒブシンに結合する単離された抗体を提

50

供する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗ヒブシン抗体は、以下の特質のうちの1つ以上を有する。(1)ポリペプチド中のヒブシンに結合する、(2)ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合しない、(3)ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する、(4)ヒブシンに隣接する異なるアミノ酸を有するヒブシン含有ポリペプチド中のヒブシンに結合する、(5)デオキシヒブシンに隣接する異なるアミノ酸を有するデオキシヒブシン含有ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する、(6)900 nM以下の結合親和度でヒブシン含有ポリペプチド中のヒブシンに結合する、(7)300 nM以下の結合親和度でヒブシン含有ポリペプチド中のヒブシンに結合し、200 nM以下の結合親和度でデオキシヒブシン含有ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する。

10

【0072】

一態様において、本発明は、ポリペプチド中のヒブシンに結合する単離された抗体を提供し、該抗体は、ヒブシンに隣接する異なるアミノ酸配列を有するヒブシン含有ポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態において、該抗体は、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合しない。いくつかの実施形態において、該抗体は、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する。いくつかの実施形態において、該抗体は、表1に示すペプチドに結合する(例えば、配列番号56~69の群から選択される1つ以上)。

【0073】

一態様において、本明細書に記載される抗ヒブシン抗体は、モノクローナル抗体である。一態様において、本明細書に記載される抗ヒブシン抗体は、抗体フラグメント(抗原結合フラグメントを含む)、例えば、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv、または(Fab')₂フラグメントである。一態様において、本明細書に記載される抗ヒブシン抗体のうちのいずれも、精製される。

20

【0074】

一態様において、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供され、該重鎖可変領域は、(i)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号13もしくは14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、(i)配列番号1もしくは2のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号4もしくは5のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

【0075】

一態様において、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供され、該重鎖可変領域は、(i)配列番号11もしくは12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

40

【0076】

一態様において、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供され、該重鎖可変領域は、(i)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0077】

一態様において、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供され、該重鎖可変領域は、(i)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号17のア

50

ミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、(i)配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0078】

一態様において、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供され、該重鎖可変領域は、(i)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、(i)配列番号2のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

10

【0079】

一態様において、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供され、該重鎖可変領域は、(i)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0080】

一態様において、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供され、該重鎖可変領域は、(i)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または該軽鎖可変領域は、(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

20

【0081】

本明細書に記載される抗ヒブシン抗体は、任意の好適なフレームワーク可変ドメイン配列を含んでもよいが、ただし、該抗体がポリペプチド中のヒブシンに結合する能力を保持していることを条件とする。いくつかの実施形態において、該抗体は、ポリペプチド中のヒブシン及びデオキシヒブシンに結合する能力を保持する。本明細書に使用されるとき、重鎖フレームワーク領域は、「HC-FR1-FR4」と示され、軽鎖フレームワーク領域は、「LC-FR1-FR4」と示される。いくつかの実施形態において、該抗ヒブシン抗体は、配列番号46、50、51、及び53の重鎖可変ドメインフレームワーク配列を含む(それぞれHC-FR1、HC-FR2、HC-FR3、及びHC-FR4)。いくつかの実施形態において、該抗ヒブシン抗体は、配列番号47、50、52、及び53の重鎖可変ドメインフレームワーク配列を含む(それぞれHC-FR1、HC-FR2、HC-FR3、及びHC-FR4)。いくつかの実施形態において、該抗ヒブシン抗体は、配列番号48、50、52、及び53の重鎖可変ドメインフレームワーク配列を含む(それぞれHC-FR1、HC-FR2、HC-FR3、及びHC-FR4)。いくつかの実施形態において、該抗ヒブシン抗体は、配列番号49、50、52、及び53の重鎖可変ドメインフレームワーク配列を含む(それぞれHC-FR1、HC-FR2、HC-FR3、及びHC-FR4)。いくつかの実施形態において、該抗ヒブシン抗体は、配列番号38、40、42、及び45の軽鎖可変ドメインフレームワーク配列を含む(それぞれLC-FR1、LC-FR2、LC-FR3、及びLC-FR4)。いくつかの実施形態において、該抗ヒブシン抗体は、配列番号39、41、43、及び45の軽鎖可変ドメインフレームワーク配列を含む(それぞれLC-FR1、LC-FR2、LC-FR3、及びLC-FR4)。

30

40

【0082】

一実施形態において、該抗ヒブシン抗体は、フレームワーク配列及び超可変領域を含む

50

重鎖可変ドメインを含み、フレームワーク配列は、それぞれ配列番号 46 ~ 49 (HC - FR1)、配列番号 50 (HC - FR2)、配列番号 51 または 52 (HC - FR3)、及び配列番号 53 (HC - FR4) の HC - FR1 ~ HC - FR4 配列を含み、HVR - H1 は、配列番号 9 のアミノ酸配列を含み、HVR - H2 は、配列番号 13 または 14 のアミノ酸配列を含み、HVR - H3 は、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、該抗ヒブシン抗体は、フレームワーク配列及び超可変領域を含む重鎖可変ドメインを含み、該フレームワーク配列は、それぞれ配列番号 46 ~ 49 (HC - FR1)、配列番号 50 (HC - FR2)、配列番号 51 または 52 (HC - FR3)、及び配列番号 53 (HC - FR4) の HC - FR1 ~ HC - FR4 配列を含み、HVR - H1 は、配列番号 10 のアミノ酸配列を含み、HVR - H2 は、配列番号 15 のアミノ酸配列を含み、HVR - H3 は、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、該抗ヒブシン抗体は、フレームワーク配列及び超可変領域を含む重鎖可変ドメインを含み、該フレームワーク配列は、それぞれ配列番号 46 ~ 49 (HC - FR1)、配列番号 50 (HC - FR2)、配列番号 51 または 52 (HC - FR3)、及び配列番号 53 (HC - FR4) の HC - FR1 ~ HC - FR4 配列を含み、HVR - H1 は、配列番号 11 または 12 のアミノ酸配列を含み、HVR - H2 は、配列番号 16 のアミノ酸配列を含み、HVR - H3 は、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、抗ヒブシン抗体は、フレームワーク配列及び超可変領域を含む軽鎖可変ドメインを含み、該フレームワーク配列は、それぞれ配列番号 38 または 39 (LC - FR1)、配列番号 40 または 41 (LC - FR2)、配列番号 42 ~ 44 (LC - FR3)、及び配列番号 45 (LC - FR4) の LC - FR1 ~ LC - FR4 配列を含み、HVR - L1 は、配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を含み、HVR - L2 は、配列番号 4 または 5 のアミノ酸配列を含み、HVR - L3 は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、抗ヒブシン抗体は、フレームワーク配列及び超可変領域を含む軽鎖可変ドメインを含み、該フレームワーク配列は、それぞれ配列番号 38 または 39 (LC - FR1)、配列番号 40 または 41 (LC - FR2)、配列番号 42 ~ 44 (LC - FR3)、及び配列番号 45 (LC - FR4) の LC - FR1 ~ LC - FR4 配列を含み、HVR - L1 は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含み、HVR - L2 は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、HVR - L3 は、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、抗ヒブシン抗体は、フレームワーク配列及び超可変領域を含む軽鎖可変ドメインを含み、フレームワーク配列は、それぞれ配列番号 38 または 39 (LC - FR1)、配列番号 40 または 41 (LC - FR2)、配列番号 42 ~ 44 (LC - FR3)、及び配列番号 45 (LC - FR4) の LC - FR1 ~ LC - FR4 配列を含み、HVR - L1 は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含み、HVR - L2 は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、HVR - L3 は、配列番号 72 のアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号 24 または 25 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号 20 または 21 のアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号 27 または 28 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号 26 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号 22 のアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号 24 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号 25 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号 21 のアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号 27 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号 28 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む。

【0083】

いくつかの実施形態において、重鎖 HVR 配列は、以下を含む。

a) HVR - H1 (DYAMI (配列番号 9))、

b) HVR - H2 (I I Y G G S N K L A Y A K W A (配列番号 13) または I I Y G V I N D L A Y A K W A (配列番号 14))、及び

c) HVR - H3 (G Y G S M D G Y D R L N L (配列番号 17))。

【0084】

いくつかの実施形態において、重鎖HVR配列は、以下を含む。

a) HVR - H1 (T Y T I N (配列番号 10))、

b) HVR - H2 (D I W S D G N T Y Y A N W A (配列番号 15))、及び

c) HVR - H3 (D S W D T S I Y Y G L D L (配列番号 18))。

【0085】

いくつかの実施形態において、重鎖HVR配列は、以下を含む。

10

a) HVR - H1 (T Y T M N (配列番号 11))、または H C T M N (配列番号 12)

、

b) HVR - H2 (D I Y T D G N T Y Y A N W A (配列番号 16))、及び

c) HVR - H3 (D S W D A S S Y Y G L D L (配列番号 19))。

【0086】

いくつかの実施形態において、重鎖FR配列は、以下を含む。

a) HC - FR1 (Q E Q L K E S G G R L V A P G T P L T L T C T V S G F D I S (配列番号 46)、

Q S V E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S A F S L S (配列番号 47)、

Q S V E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S G F S L S (配列番号 48)、ま

20

たは

Q S V E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S A C S L Y (配列番号 49))、

b) HC - FR2 (W V R Q A P G K G L E W I G (配列番号 50)、

c) HC - FR3 (K G R F T I S R T S T T V D L K I T S P T T E D T A T Y F C A R (配列番号 51)、または

K G R F T I S K T S T T V D L K I T S P T T E D T A T Y F C A R (配列番号 52))、及び

d) HC - FR4 (W G Q G T L V T V S S (配列番号 53))。

【0087】

いくつかの実施形態において、軽鎖HVR配列は、以下を含む。

30

a) HVR - L1 (Q S S E T V Y R G D W L S (配列番号 1)、または R S R Q R V Y L G D W L S (配列番号 2))、

b) HVR - L2 (D A S Y L A S (配列番号 4)、または D A S F R G D (配列番号 5))、及び

c) HVR - L3 (L G G Y Y D D A D D T (配列番号 7))。

【0088】

いくつかの実施形態において、軽鎖HVR配列は、以下を含む。

a) HVR - L1 (Q A S E D I K R Y L A (配列番号 3))、

b) HVR - L2 (A A S K L A S (配列番号 6))、及び

c) HVR - L3 (Q Q G Y T S S N V N N A (配列番号 8)、または Q Q G Y T S T N V N N A (配列番号 72))。

40

【0089】

いくつかの実施形態において、軽鎖FR配列は、以下を含む。

a) LC - FR1 (A A V L T Q T P S P V S A A V G G T V T I S C (配列番号 38)、または A I K M T Q T P S S V S A A V G G T V T I N C (配列番号 39))、

b) LC - FR2 (W F Q K K P G Q P P K L L I Y (配列番号 40)、または W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y (配列番号 41))、

c) LC - FR3 (G V S S R F S G S G S G T H F T L T I S G V Q C D D A A T Y Y C (配列番号 42)、

G V S S R F T G S G S G T E Y T L T I S G V Q C D D A A T Y Y C (配列番号 43

50

)、または

G V S S R F K G S G S G T E Y T L T I S G V Q C D D A A T Y Y C (配列番号 4 4

)、及び

d) L C - F R 4 (F G G G T E V V V K (配列番号 4 5))。

【 0 0 9 0 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド中のヒブシンに結合する抗ヒブシン抗体が本明細書に提供され、該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、該抗体は、以下を含む。

(a) 重鎖可変ドメインであって、

(1) 配列番号 4 6 ~ 4 9 から選択されるアミノ酸配列を含む H C - F R 1、

10

(2) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、

(3) 配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む H C - F R 2、

(4) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、

(5) 配列番号 5 1 もしくは 5 2 のアミノ酸配列を含む H C - F R 3、

(6) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、及び

(7) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H C - F R 4 を含む、重鎖可変ドメイン、

ならびに / または

(b) 軽鎖可変ドメインであって、

(1) 配列番号 3 8 もしくは 3 9 のアミノ酸配列を含む L C - F R 1、

(2) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、

20

(3) 配列番号 4 0 もしくは 4 1 のアミノ酸配列を含む L C - F R 2、

(4) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、

(5) 配列番号 4 2 ~ 4 4 から選択されるアミノ酸配列を含む L C - F R 3、

(6) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、ならびに

(7) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む L C - F R 4 を含む、軽鎖可変ドメイン。

【 0 0 9 1 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド中のヒブシンに結合する抗ヒブシン抗体が本明細書に提供され、該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、該抗体は、以下を含む。

(a) 重鎖可変ドメインであって、

30

(1) 配列番号 4 6 ~ 4 9 から選択されるアミノ酸配列を含む H C - F R 1、

(2) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、

(3) 配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む H C - F R 2、

(4) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、

(5) 配列番号 5 1 もしくは 5 2 のアミノ酸配列を含む H C - F R 3、

(6) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、及び

(7) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H C - F R 4 を含む、重鎖可変ドメイン、

ならびに / または

(b) 軽鎖可変ドメインであって、

(1) 配列番号 3 8 もしくは 3 9 のアミノ酸配列を含む L C - F R 1、

40

(2) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、

(3) 配列番号 4 0 もしくは 4 1 のアミノ酸配列を含む L C - F R 2、

(4) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、

(5) 配列番号 4 2 ~ 4 4 から選択されるアミノ酸配列を含む L C - F R 3、

(6) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、ならびに

(7) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む L C - F R 4 を含む、軽鎖可変ドメイン。

【 0 0 9 2 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド中のヒブシンに結合する抗ヒブシン抗体が本明細書に提供され、該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、該抗体は、以下を含む。

50

- (a) 重鎖可変ドメインであって、
 - (1) 配列番号 46 ~ 49 から選択されるアミノ酸配列を含む H C - F R 1、
 - (2) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、
 - (3) 配列番号 50 のアミノ酸配列を含む H C - F R 2、
 - (4) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、
 - (5) 配列番号 51 もしくは 52 のアミノ酸配列を含む H C - F R 3、
 - (6) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、及び
 - (7) 配列番号 53 のアミノ酸配列を含む H C - F R 4 を含む、重鎖可変ドメイン、
- ならびに / または

10

- (b) 軽鎖可変ドメインであって、
 - (1) 配列番号 38 もしくは 39 のアミノ酸配列を含む L C - F R 1、
 - (2) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、
 - (3) 配列番号 40 もしくは 41 のアミノ酸配列を含む L C - F R 2、
 - (4) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、
 - (5) 配列番号 42 ~ 44 から選択されるアミノ酸配列を含む L C - F R 3、
 - (6) 配列番号 72 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、及び
 - (7) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む L C - F R 4 を含む、軽鎖可変ドメイン。

【0093】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド中のヒブシンに結合する抗ヒブシン抗体が本明細書に提供され、該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、該抗体は、以下を含む。

20

- (a) 重鎖可変ドメインであって、
 - (1) 配列番号 46 ~ 49 から選択されるアミノ酸配列を含む H C - F R 1、
 - (2) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、
 - (3) 配列番号 50 のアミノ酸配列を含む H C - F R 2、
 - (4) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、
 - (5) 配列番号 51 もしくは 52 のアミノ酸配列を含む H C - F R 3、
 - (6) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、及び
 - (7) 配列番号 53 のアミノ酸配列を含む H C - F R 4 を含む、重鎖可変ドメイン、
- ならびに / または

30

- (b) 軽鎖可変ドメインであって、
 - (1) 配列番号 38 もしくは 39 のアミノ酸配列を含む L C - F R 1、
 - (2) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、
 - (3) 配列番号 40 もしくは 41 のアミノ酸配列を含む L C - F R 2、
 - (4) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、
 - (5) 配列番号 42 ~ 44 から選択されるアミノ酸配列を含む L C - F R 3、
 - (6) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、及び
 - (7) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む L C - F R 4 を含む、軽鎖可変ドメイン。

【0094】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド中のヒブシンに結合する抗ヒブシン抗体が本明細書に提供され、該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、該抗体は、以下を含む。

40

- (a) 重鎖可変ドメインであって、
 - (1) 配列番号 46 ~ 49 から選択されるアミノ酸配列を含む H C - F R 1、
 - (2) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、
 - (3) 配列番号 50 のアミノ酸配列を含む H C - F R 2、
 - (4) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、
 - (5) 配列番号 51 もしくは 52 のアミノ酸配列を含む H C - F R 3、
 - (6) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、及び
 - (7) 配列番号 53 のアミノ酸配列を含む H C - F R 4 を含む、重鎖可変ドメイン、

50

ならびに / または

(b) 軽鎖可変ドメインであって、

(1) 配列番号 38 もしくは 39 のアミノ酸配列を含む LC - FR 1、

(2) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む HVR - L 1、

(3) 配列番号 40 もしくは 41 のアミノ酸配列を含む LC - FR 2、

(4) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む HVR - L 2、

(5) 配列番号 42 ~ 44 から選択されるアミノ酸配列を含む LC - FR 3、

(6) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む HVR - L 3、及び

(7) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む LC - FR 4 を含む、軽鎖可変ドメイン。

【0095】

10

一態様において、配列番号 24 もしくは 25 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含み、かつ / または配列番号 20 もしくは 21 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを、これらの配列の翻訳後修飾を含めて含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。一態様において、配列番号 27 もしくは 28 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含み、かつ / または配列番号 23 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを、これらの配列の翻訳後修飾を含めて含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。一態様において、配列番号 26 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含み、かつ / または配列番号 22 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを、これらの配列の翻訳後修飾を含めて含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。

【0096】

20

一態様において、配列番号 24 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含み、かつ / または配列番号 20 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを、これらの配列の翻訳後修飾を含めて含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。一態様において、配列番号 25 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含み、かつ / または配列番号 21 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを、これらの配列の翻訳後修飾を含めて含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。一態様において、配列番号 27 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含み、かつ / または配列番号 23 のアミノ酸配列を、これらの配列の翻訳後修飾を含めて含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。一態様において、配列番号 28 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含み、かつ / または配列番号 23 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを、これらの配列の翻訳後修飾を含めて含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。一態様において、配列番号 26 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含み、かつ / または配列番号 22 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを、これらの配列の翻訳後修飾を含めて含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。

30

【0097】

いくつかの実施形態において、配列番号 24 または 25 のアミノ酸配列と少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、配列番号 26 のアミノ酸配列と少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、配列番号 27 または 28 のアミノ酸配列と少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列は、基準配列と比較して置換、挿入、または欠失を含むが、そのアミノ酸配列を含む抗体は、ポリペプチド中のヒブシンに結合する能力を保持する。いくつかの実施形態において、少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有するアミ

40

50

ノ酸配列は、基準配列と比較して置換、挿入、または欠失を含むが、そのアミノ酸配列を含む抗体は、ポリペプチド中のヒブシン及びデオキシヒブシンに結合する能力を保持する。いくつかの実施形態において、置換、挿入、または欠失（例えば、1、2、3、4、または5つのアミノ酸）は、HVRの外側の領域（すなわち、FR内）で生じる。

【0098】

いくつかの実施形態において、配列番号20または21のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、配列番号22のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、配列番号23のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列は、基準配列と比較して置換、挿入、または欠失を含むが、そのアミノ酸配列を含む抗体は、ポリペプチド中のヒブシンに結合する能力を保持する。いくつかの実施形態において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列は、基準配列と比較して置換、挿入、または欠失を含むが、そのアミノ酸配列を含む抗体は、ポリペプチド中のヒブシン及びデオキシヒブシンに結合する能力を保持する。いくつかの実施形態において、置換、挿入、または欠失（例えば、1、2、3、4、または5つのアミノ酸）は、HVRの外側の領域（すなわち、FR内）で生じる。

【0099】

いくつかの実施形態において、図1Bまたは図1Dに示される重鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。例えば、図1Bに示される抗体Hpu24の重鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、図1Bに示される抗体Hpu24・Bの重鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、図1Dに示される抗体Hpu98の重鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、図1Dに示される抗体Hpu98・61の重鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、図1Dに示される抗体Hpu91の重鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。

【0100】

いくつかの実施形態において、図1Aまたは図1Cに示される軽鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。例えば、図1Aに示される抗体Hpu24の軽鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、図1Aに示される抗体Hpu24・Bの軽鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、図1Cに示される抗体Hpu98の軽鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、図1Cに示される抗体Hpu98・61の軽鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、図1Cに示される抗体Hpu91の軽鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。

【0101】

一態様において、本発明は、図1Bまたは図1Dに示されるものから選択される重鎖可変ドメイン及び図1Aまたは図1Cに示されるものから選択される軽鎖可変ドメインを含む抗ヒブシン抗体を提供する。例えば、図1Bに示される抗体Hpu24、図1Bに示される抗体Hpu24・B、図1Dに示される抗体Hpu91、図1Dに示される抗体Hpu98、または図1Dに示される抗体Hpu98・61の重鎖可変ドメインと、図1Aに

示される抗体 H p u 2 4、図 1 A に示される抗体 H p u 2 4 . B、図 1 C に示される抗体 H p u 9 1、図 1 C に示される抗体 H p u 9 8、図 1 C に示される抗体 H p u 9 8 . 6 1 の軽鎖可変ドメインと、を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。

【 0 1 0 2 】

一態様において、本発明は、(a) 図 1 B または図 1 D に示されるものから選択される 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの V H H V R、及び / または (b) 図 1 A または図 1 C に示されるものから選択される 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの V L H V R を含む抗ヒブシン抗体を提供する。例えば、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 B に示される H p u 2 4 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの C h o t h i a V H H V R、及び / または (b) 図 1 A に示される H p u 2 4 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの C h o t h i a V L H V R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 B に示される H p u 2 4 . B からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの C h o t h i a V H H V R、及び / または (b) 図 1 A に示される H p u 2 4 . B からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの C h o t h i a V L H V R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 D に示される H p u 9 1 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの C h o t h i a V H H V R、及び / または (b) 図 1 C に示される H p u 9 1 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの C h o t h i a V L H V R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 D に示される H p u 9 8 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの C h o t h i a V H H V R、及び / または (b) 図 1 C に示される H p u 9 8 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの C h o t h i a V L H V R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 B に示される H p u 2 4 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの K a b a t V H H V R、及び / または (b) 図 1 A に示される H p u 2 4 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの K a b a t V L H V R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 B に示される H p u 2 4 . B からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの K a b a t V H H V R、及び / または (b) 図 1 A に示される H p u 2 4 . B からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの K a b a t V L H V R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 D に示される H p u 9 1 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの K a b a t V H H V R、及び / または (b) 図 1 C に示される H p u 9 1 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの K a b a t V L H V R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 D に示される H p u 9 8 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの K a b a t V H H V R、及び / または (b) 図 1 C に示される H p u 9 8 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの K a b a t V L H V R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 D に示される H p u 9 8 . 6 1 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの K a b a t V H H V R、及び / または (b) 図 1 C に示される H p u 9 8 . 6 1 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの K a b a t V L H V R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 B に示される H p u 2 4 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの接触 V H H V R、及び / または (b) 図 1 A に示される H p u 2 4 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの接触 V L H V R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 B に示される H p u 2 4 . B からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの接触 V H H V R、及び / または (b) 図 1 A に示される H p u 2 4 . B からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの接触 V L H V R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 D に示される H p u 9 1 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの接触 V H H V R、及び / または (b) 図 1 C に示される H p u 9 1 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つ

10

20

30

40

50

の接触 V L H V R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 D に示される H p u 9 8 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの接触 V H H V R、及び / または (b) 図 1 C に示される H p u 9 8 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの接触 V L H V R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、(a) 図 1 D に示される H p u 9 8 . 6 1 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの接触 V H H V R、及び / または (b) 図 1 C に示される H p u 9 8 . 6 1 からの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの接触 V L H V R を含む。

【 0 1 0 3 】

いくつかの実施形態において、配列番号 3 3 もしくは 3 4 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び / または配列番号 2 9 もしくは 3 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び / または配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、配列番号 3 6 もしくは 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び / または配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、ポリペプチド中のヒブシンに結合する。

10

【 0 1 0 4 】

いくつかの実施形態において、配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び / または配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び / または配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び / または配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び / または配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び / または配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗ヒブシン抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、ポリペプチド中のヒブシンに結合する。

20

【 0 1 0 5 】

本明細書のいくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、ポリペプチド中のヒブシン及びデオキシヒブシンに結合する。本明細書のいくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合しない。

30

【 0 1 0 6 】

本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、それらの物理的 / 化学的特性及び / または生物学的活性について、当該技術分野で既知の様々なアッセイによって、特定され得るか、スクリーニングされ得るか、または特徴付けられ得、本明細書の実施例において記載され得るか、かかる特性 (例えば、物理的特性) または活性 (例えば、生物学的活性) をインビボ及び / またはインビトロで有する抗体が提供される。ある特定の実施形態において、本発明の抗体は、かかる特性 (例えば、物理的特性) または活性 (例えば、生物学的活性) について試験される。

40

【 0 1 0 7 】

1 . 抗体親和性

ある特定の実施形態において、ポリペプチド中のヒブシンに結合する本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、 $1 \mu M$ 以下、 $100 nM$ 以下、 $10 nM$ 以下、 $1 nM$ 以下、 $0.1 nM$ 以下、 $0.01 nM$ 以下、または $0.001 nM$ 以下 (例えば $10^{-8} M$ 以下、例えば $10^{-8} M \sim 10^{-13} M$ 、例えば、 $10^{-9} M \sim 10^{-13} M$) の解離定数 (K_D) を有する。いくつかの実施形態において、ポリペプチド中のヒブシンに結合する本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、 $1 nM$ 以下、 $10 nM$ 以下、 $20 nM$ 以下、 $40 nM$ 以下、 $60 nM$ 以下、 $80 nM$ 以下、 $100 nM$ 以下、 $150 nM$ 以下、 $200 nM$ 以下、 $250 nM$ 以下、 $300 nM$ 以下、 $350 nM$ 以下、 $400 nM$ 以下、 $450 nM$ 以

50

下、500 nM以下、550 nM以下、600 nM以下、650 nM以下、700 nM以下、750 nM以下、800 nM以下、または900 nM以下の解離定数 (K_D) を有する。いくつかの実施形態において、ポリペプチド中のヒブシンに結合する本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、1 mM以下、5 mM以下、10 mM以下、15 mM以下、20 mM以下、25 mM以下、30 mM以下、35 mM以下、40 mM以下、45 mM以下、50 mM以下、55 mM以下、60 mM以下、65 mM以下、70 mM以下、75 mM以下、80 mM以下、85 mM以下、90 mM以下、95 mM以下、または100 mM以下の解離定数 (K_D) を有する。ある特定の実施形態において、ポリペプチド中のヒブシンに結合する本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、本明細書の表2に示される、 K_D を有する。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される抗ヒブシン抗体は、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合しない。さらなる実施形態において、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合しない抗ヒブシン抗体は、ヒブシンを含有するポリペプチドに対して少なくとも900 nM以下の結合親和性 (K_D) を呈する。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される抗ヒブシン抗体は、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する。さらなる実施形態において、デオキシヒブシンに結合する抗ヒブシン抗体は、

(i) ヒブシンを含有するポリペプチドに対して300 nM以下の結合親和性 (K_D)、及び(ii) デオキシヒブシンを含有するポリペプチドに対して200 nM以下の結合親和性 (K_D) を呈する。ある特定の実施形態において、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、1 μ M以下、100 nM以下、10 nM以下、1 nM以下、0.1 nM以下、0.01 nM以下、または0.001 nM以下 (例えば 10^{-8} M以下、例えば 10^{-8} M ~ 10^{-13} M、例えば、 10^{-9} M ~ 10^{-13} M) の解離定数 (K_D) を有する。いくつかの実施形態において、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、1 nM以下、5 nM以下、10 nM以下、15 nM以下、20 nM以下、30 nM以下、40 nM以下、50 nM以下、60 nM以下、70 nM以下、80 nM以下、90 nM以下、100 nM以下、110 nM以下、120 nM以下、130 nM以下、140 nM以下、150 nM以下、160 nM以下、170 nM以下、180 nM以下、190 nM以下、または200 nM以下の解離定数 (K_D) を有する。いくつかの実施形態において、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、1 mM以下、5 mM以下、10 mM以下、15 mM以下、20 mM以下、25 mM以下、30 mM以下、35 mM以下、40 mM以下、45 mM以下、50 mM以下、55 mM以下、60 mM以下、65 mM以下、70 mM以下、75 mM以下、80 mM以下、85 mM以下、90 mM以下、95 mM以下、または100 mM以下の解離定数 (K_D) を有する。ある特定の実施形態において、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する本明細書に提供される抗ヒブシン抗体は、本明細書の表2に示される、 K_D を有する。本明細書のいくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、配列番号24もしくは25のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む重鎖可変領域、及び/または配列番号20もしくは21のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書のいくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、配列番号26のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む重鎖可変領域、及び/または配列番号22のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書のいくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、配列番号27もしくは28のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む重鎖可変領域、及び/または配列番号23のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、抗原結合断片である。

【0108】

一実施形態において、 K_D は、B I A C O R E (登録商標) 表面プラズモン共鳴アッセイを用いて測定される。例えば、B I A C O R E (登録商標) T200 (B i a c o r e

10

20

30

40

50

、Uppsala、Sweden)を用いたアッセイは、約300反応単位(RU)のNeutrAvidinでコーティングされ、10RU未満のビオチン化抗原(例えば、ヒプシンを含有するポリペプチド)を捕捉するCM5チップで行われる。一実施形態において、本明細書に記載される抗ヒプシン抗体(例えば、抗ヒプシンFab断片)は、固定化されたペプチド(例えば、ヒプシンを含有するペプチド)を流れるように注入前に、10mM HEPES、pH7.4、0.15M NaCl、及び0.005% Surfactant P20中で段階希釈する。会合速度(k_{on})及び解離速度(k_{off})は、単純な1対1のラングミュア結合モデル(BIACORE(登録商標)Evaluation Softwareバージョン3.2)を使用して、会合センサグラムと解離センサグラムとを同時に当てはめることによって計算される。平衡解離定数(K_D)を、比率 k_{off}/k_{on} として計算する。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999)を参照のこと。上記表面プラズモン共鳴アッセイによるオンレートが $10^6 M^{-1} s^{-1}$ を超える場合、オンレートは、ストップフローを備えた分光光度計(Aviv Instruments)、または攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-AMINCO(商標)分光光度計(Thermo Spectronic)等の分光計で測定される場合に、漸増する抗原(例えば、ヒプシンを含有するポリペプチド)濃度の存在下で、25℃で、PBS中20nMの抗ヒプシン抗体(Fab型)(pH7.2)の蛍光発光強度(励起=295nm、発光=340nm、16nm帯域通過)の増加または減少を測定する蛍光消光技法を使用して決定することができる。

10

20

【0109】

2. 結合アッセイ及び他のアッセイ

一態様において、本発明の抗ヒプシン抗体は、例えば酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ウエスタンブロット、放射免疫測定、表面プラズモン共鳴法、クロマトグラフィー、免疫沈殿法、免疫蛍光検査法、蛍光標識細胞分取法等の既知の方法によりその抗原結合活性に関して試験される。

【0110】

別の態様において、競合アッセイを使用して、ポリペプチド中のヒプシン及び/またはデオキシヒプシンに結合するために、本明細書に記載される抗体(例えばHpu98)と競合する抗体を特定することができる。ある特定の実施形態において、かかる競合抗体は、本明細書に記載される抗ヒプシン抗体(例えばHpu98)によって結合される、同じエピトープ(例えば、線状または立体構造エピトープ)に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的な方法は、Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)内のMorris (1996)「Epitope Mapping Protocols」に提供される。

30

【0111】

一例示的な競合アッセイにおいて、ヒプシンを含有する固定化されたポリペプチドは、ポリペプチド中のヒプシンに結合する第1の標識された抗体(例えばHpu24)Hpu24)と、第1の抗体とポリペプチド中のヒプシンへの結合について競合するその能力について試験される第2の非標識抗体とを含む溶液中で、インキュベートされる。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在してもよい。対照として、ヒスプシン(hyspusine)を含有する固定化されたポリペプチドを、第1の標識抗体を含むが第2の非標識抗体を含まない溶液中でインキュベートする。第1の抗体のヒプシンを含有するポリペプチドへの結合を許容する条件下でのインキュベーションの後、過剰な非結合抗体を除去し、ヒプシンを含有する固定化されたポリペプチドに関連する標識の量を測定する。ヒプシンを含有する固定化されたポリペプチドに関連する標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に低減される場合、それは、第2の抗体がポリペプチド中のヒプシンへの結合について第1の抗体と競合していることを示す。Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.

40

50

14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照のこと。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、デオキシヒブシンを含有する。いくつかの実施形態において、第1の抗体は、ポリペプチド中のデオキシヒブシンに結合する。いくつかの実施形態において、第2の抗体は、ポリペプチド中のヒブシンに結合する。

【0112】

別の態様において、アッセイを使用して、実施例1に記載される結合アッセイ等の本明細書に記載される抗ヒブシン抗体を特定することができる。いくつかの実施形態において、候補抗ヒブシン抗体を含有する試料は、ELISAによるような、本明細書に記載される方法を用いてスクリーニングされる。いくつかの実施形態において、候補抗ヒブシン抗体を含有する試料は、ヒブシン化ペプチドと接触して置かれ、候補抗ヒブシン抗体のヒブシン化ペプチドへの結合が、当該技術分野で標準の技法（例えばELISA）を用いて検出される。いくつかの実施形態において、候補抗ヒブシン抗体を含有する試料は、デオキシヒブシン化ペプチドと接触して置かれ、候補抗ヒブシン抗体のデオキシヒブシン化ペプチドへの結合が、当該技術分野で標準の技法（例えばELISA）を用いて検出される。いくつかの実施形態において、候補抗ヒブシン抗体のヒブシン化ペプチド及び/またはデオキシヒブシン化ペプチドへの結合が、候補抗ヒブシン抗体の非ヒブシン化ペプチドへの結合と比較される。いくつかの実施形態において、ヒブシン化ペプチドは、表1に示される、ヒブシン化ペプチドである。いくつかの実施形態において、ヒブシン化ペプチドは、P1 - Hpu（配列番号56）、P2 - Hpu（配列番号59）、P3 - Hpu（配列番号62）、P4 - Hpu（配列番号64）、P5 - Hpu（配列番号66）、及びP6 - Hpu（配列番号68）からなる群から選択される1つ以上である。いくつかの実施形態において、デオキシヒブシン化ペプチドは、表1に示される、デオキシヒブシン化ペプチドである。いくつかの実施形態において、デオキシヒブシン化ペプチドは、P1 - デオキシ（配列番号57）及びP2 - デオキシ（配列番号60）からなる群から選択される1つ以上である。いくつかの実施形態において、非ヒブシン化ペプチドは、表1に示される、ヒブシン化ペプチドである。いくつかの実施形態において、非ヒブシン化ペプチドは、P1（配列番号58）、P2（配列番号61）、P3（配列番号63）、P4（配列番号65）、P5（配列番号67）、及びP6（配列番号69）からなる群から選択される1つ以上である。

【0113】

別の態様において、2つ以上のヒブシン化ペプチド及び/またはデオキシヒブシン化ペプチドに結合する汎抗ヒブシン抗体を選択するためのアッセイ及び方法が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、2つ以上のヒブシン化ペプチドに結合する汎抗ヒブシン抗体を選択するための方法は、a) 候補抗体を、P1 - Hpu（配列番号56）、P2 - Hpu（配列番号59）、P3 - Hpu（配列番号62）、P4 - Hpu（配列番号64）、P5 - Hpu（配列番号66）及びP6 - Hpu（配列番号68）からなる群から選択される2つ以上のヒブシン化ペプチドと接触させるステップと、b) 候補抗体が2つ以上のヒブシン化ペプチドに結合するかどうかを決定するステップであって、2つ以上のヒブシン化ペプチドへの結合は、候補抗体が汎抗ヒブシン抗体であることを示す、ステップと、c) 汎抗ヒブシン抗体を選択するステップと、を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、選択された汎抗ヒブシン抗体を、P1 - デオキシ（配列番号57）及びP2 - デオキシ（配列番号60）からなる群から選択される1つ以上のデオキシヒブシン化ペプチドと接触させるステップと、汎抗ヒブシン抗体が1つ以上のデオキシヒブシン化ペプチドに結合するかどうかを決定するステップと、を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、選択された汎抗ヒブシン抗体を、P1（配列番号58）、P2（配列番号61）、P3（配列番号63）、P4（配列番号65）、P5（配列番号67）、及びP6（配列番号69）からなる群から選択される1つ以上の非ヒブシン化ペプチドと接触させるステップと、汎抗ヒブシン抗体が1つ以上の非ヒブシン化ペプチドに結合するかどうかを決定するステップと、を含む。いくつかの実施形態において、2つ以上のデオキシ

ヒブシン化ペプチドに結合する汎抗ヒブシン抗体を選択するための方法は、a) 候補抗体を、P 1 - デオキシ (配列番号 5 7) 及び P 2 - デオキシ (配列番号 6 0) からなる群から選択される 2 つ以上のデオキシヒブシン化ペプチドと接触させるステップと、b) 候補抗体が 2 つ以上のデオキシヒブシン化ペプチドに結合するかどうかを決定するステップであって、2 つ以上のデオキシヒブシン化ペプチドへの結合は、候補抗体が汎抗ヒブシン抗体であることを示す、ステップと、c) 汎抗ヒブシン抗体を選択するステップと、を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、選択された汎抗ヒブシン抗体を、P 1 - H p u (配列番号 5 6)、P 2 - H p u (配列番号 5 9)、P 3 - H p u (配列番号 6 2)、P 4 - H p u (配列番号 6 4)、P 5 - H p u (配列番号 6 6)、及び P 6 - H p u (配列番号 6 8) からなる群から選択される 1 つ以上のヒブシン化ペプチドと接触させるステップと、汎抗ヒブシン抗体が 1 つ以上のヒブシン化ペプチドに結合するかどうかを決定するステップと、をさらに含む。いくつかの実施形態において、本方法は、選択された汎抗ヒブシン抗体を、P 1 (配列番号 5 8)、P 2 (配列番号 6 1)、P 3 (配列番号 6 3)、P 4 (配列番号 6 5)、P 5 (配列番号 6 7)、及び P 6 (配列番号 6 9) からなる群から選択される 1 つ以上の非ヒブシン化ペプチドと接触させるステップと、汎抗ヒブシン抗体が 1 つ以上の非ヒブシン化ペプチドに結合するかどうかを決定するステップと、をさらに含む。いくつかの実施形態において、1 つ以上のデオキシヒブシン化ペプチド及び 1 つ以上のヒブシン化ペプチドに結合する汎抗ヒブシン抗体を選択するための方法は、a) 候補抗体を、P 1 - デオキシ (配列番号 5 7) 及び P 2 - デオキシ (配列番号 6 0) からなる群から選択される 1 つ以上のデオキシヒブシン化ペプチド、ならびに P 1 - H p u (配列番号 5 6)、P 2 - H p u (配列番号 5 9)、P 3 - H p u (配列番号 6 2)、P 4 - H p u (配列番号 6 4)、P 5 - H p u (配列番号 6 6)、及び P 6 - H p u (配列番号 6 8) からなる群から選択される 1 つ以上のヒブシン化ペプチドと接触させるステップと、b) 候補抗体が 1 つ以上のデオキシヒブシン化ペプチド及び 1 つ以上のヒブシン化ペプチドに結合するかどうかを決定するステップであって、1 つ以上のデオキシヒブシン化ペプチド及び 1 つ以上のヒブシン化ペプチドへの結合は、候補抗体が汎抗ヒブシン抗体であることを示す、ステップと、c) 汎抗ヒブシン抗体を選択するステップと、を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、汎抗ヒブシン抗体を、P 1 (配列番号 5 8)、P 2 (配列番号 6 1)、P 3 (配列番号 6 3)、P 4 (配列番号 6 5)、P 5 (配列番号 6 7) 及び P 6 (配列番号 6 9) からなる群から選択される 1 つ以上の非ヒブシン化ペプチドと接触させるステップと、汎抗ヒブシン抗体が 1 つ以上の非ヒブシン化ペプチドに結合するかどうかを決定するステップと、をさらに含む。いくつかの実施形態において、選択された汎抗ヒブシン抗体は、ヒブシン及びデオキシヒブシンに結合する。いくつかの実施形態において、選択された汎抗ヒブシン抗体は、ヒブシンに結合するが、デオキシヒブシンに結合しない。

【0 1 1 4】

汎抗ヒブシン抗体を選択するための方法のいくつかの実施形態において、ステップ a) は、ヒブシン化ペプチド及び / またはデオキシヒブシン化ペプチドへの結合について単一候補抗体を試験することを含む。汎抗ヒブシン抗体の選択のための方法のいくつかの実施形態において、ステップ a) は、ヒブシン化ペプチド及び / またはデオキシヒブシン化ペプチドへの結合について複数の候補抗体を試験することを含む。汎抗ヒブシン抗体の選択のための方法のいくつかの実施形態において、ステップ c) は、試験した複数の候補抗体から 1 つ以上の汎抗ヒブシン抗体を選択することを含む。例えば、ヒブシン化ペプチド及び / またはデオキシヒブシン化ペプチドに結合する 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または 100 であるが、500 以下の汎抗ヒブシン抗体を選択すること。本明細書に提供される汎抗ヒブシン抗体を選択する方法において試験される複数の抗体は、ハイブリドーマライブラリー、ファージディスプレイライブラリー、例えば、哺乳動物細胞 (例えば、ヒト細胞、マウス細胞、ラット細胞、ウサギ細胞等) 由来の m R N A から調製された軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメイン c D N A を用いて調

10

20

30

40

50

製された s c F v ファージディスプレイライブラリー、溶液相ライブラリー、固相ライブラリー、及び親和性クロマトグラフィー選択を用いたもの等の合成ライブラリー法が含まれるが、これらに限定されない、当該技術分野で周知の組み合わせ抗体ライブラリー法の多くの手法のうちのいずれかを用いて得られ得る。かかるライブラリーの調製及びスクリーニング方法は、当該技術分野において周知である。ハイブリドーマライブラリー及びファージディスプレイライブラリー（例えば、Pharmacia 組換えファージ抗体システム、カタログ番号 27-9400-01、及び Stratagene SurfZAP（商標）ファージディスプレイキット、カタログ番号 240612）を作製するための市販のキットに加えて、240612）、抗体ライブラリーを作製及びスクリーニングするために特に使用可能な方法及び試薬の例は、例えば、Ladner らの米国特許第 5, 223, 409 号、PCT 公開第 WO 92/18619 号、PCT 公開第 WO 91/17271 号、PCT 公開第 WO 92/20791 号、PCT 公開第 WO 92/15679 号、PCT 公開第 WO 93/01288 号、PCT 公開第 WO 92/01047 号、及び PCT 公開第 WO 92/09690 号に見出され得る。

10

【0115】

別の態様において、抗ヒブシン抗体がヒブシン化ペプチドに結合する抗ヒブシン抗体（例えば、汎抗ヒブシン抗体）を産生する方法が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、ヒブシン化ペプチドに結合する抗ヒブシン抗体を産生する方法は、抗ヒブシン抗体を産生する条件下で、本明細書に記載される核酸を含む宿主細胞（例えば、本明細書に記載される宿主細胞）を培養することを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、宿主細胞によって産生される抗ヒブシン抗体を回収することをさらに含む。別の態様において、抗ヒブシン抗体がデオキシヒブシン化ペプチドに結合する抗ヒブシン抗体（例えば、汎抗ヒブシン抗体）を産生する方法が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、デオキシヒブシン化ペプチドに結合する抗ヒブシン抗体を産生する方法は、抗ヒブシン抗体を産生する条件下で、本明細書に記載される核酸を含む宿主細胞（例えば、本明細書に記載される宿主細胞）を培養することを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、宿主細胞によって産生される抗ヒブシン抗体を回収することをさらに含む。別の態様において、ヒブシン化ペプチドに結合するが、デオキシヒブシン化ペプチドに結合しない汎抗ヒブシン抗体を産生する方法が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、ヒブシン化ペプチドに結合するが、デオキシヒブシン化ペプチドに結合しない汎抗ヒブシン抗体を産生する方法は、汎抗ヒブシン抗体を産生する条件下で、本明細書に記載される核酸を含む宿主細胞（例えば、本明細書に記載される宿主細胞）を培養することを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、宿主細胞によって産生される汎抗ヒブシン抗体を回収することをさらに含む。

20

30

【0116】

III. 抗体の調製

本明細書に記載される抗体は、抗体を生成するための当該技術分野で利用可能な技法を使用して調製され、その例示的な方法は、以下の節により詳細に記載される。

【0117】

1. 抗体断片

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片には、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、及び scFv 断片、ならびに以下に記載される他の断片が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の抗体断片の概説については、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003) を参照のこと。scFv 断片の概説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994) を参照のこと、また、WO 93/16185、ならびに米国特許第 5, 571, 894 号及び同第 5, 587, 458 号も参照のこと。エピトープ残基を結合し、

40

50

増加したインビボ半減期を有するサルベージ受容体を含むFab及びF(ab')₂断片の考察に関しては、米国特許第5,869,046号を参照のこと。

【0118】

ダイアボディは、二価または二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、EP 404,097、WO 1993/01161、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)、及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)を参照のこと。トリアボディ及びテトラボディもまた、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載されている。

10

【0119】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部、または軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部を含む、抗体断片である。ある特定の実施形態において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA、例えば、米国特許第6,248,516 B1を参照のこと)。

【0120】

抗体断片は、本明細書に記載されるように、無傷抗体のタンパク質消化、ならびに組換え宿主細胞(例えば、E.coliまたはファージ)による産生を含むがこれらに限定されない、様々な技法によって作製することができる。

【0121】

20

2. ライブラリー由来抗体

本発明の抗体は、所望の活性(複数可)を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって単離され得る。例えば、ファージディスプレイライブラリーを生成し、所望の結合特性を保有する抗体についてかかるライブラリーをスクリーニングするための多様な方法が、当該技術分野で既知である。かかる方法は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)に概説され、例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-554、Clackson et al., Nature 352:624-628(1991)、Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597(1992)、Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)、Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2):299-310(2004)、Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093(2004)、Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472(2004)、及びLee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132(2004)にさらに記載されている。

30

【0122】

40

ある特定のファージディスプレイ法では、VH及びVL遺伝子のレパートリーがポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別個にクローニングされ、ファージライブラリー内でランダムに組換えられ、その後、これは、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12:433-455(1994)に記載される抗原結合ファージについてスクリーニングされ得る。ファージは、典型的には、一本鎖Fv(scFv)断片またはFab断片のいずれかとして抗体断片をディスプレイする。免疫化源からのライブラリーは、ハイブリドーマの構築を必要とすることなく、免疫原に高親和性抗体を提供する。あるいは、Griffiths et al., EMBO J, 12:725-734(1993)に記載されるように、ナイーブレパートリーを(例えば、ヒトから)クローン化して、いかなる免疫化も伴わずに幅広い非自己抗原及び自己抗原に抗体の単一源

50

を提供することができる。最後に、ナイーブレパートリーは、H o o g e n b o o m a n d W i n t e r , J . M o l . B i o l . , 2 2 7 : 3 8 1 - 3 8 8 (1 9 9 2) に記載されるように、幹細胞からの再編成されていないV遺伝子セグメントをクローン化し、ランダム配列を含有するPCRプライマーを使用して高度に可変性のCDR3領域をコードし、インビトロでの再編成を達成することによって、合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリーについて記載する特許公報としては、例えば、米国特許第5,750,373号、ならびに米国特許公開第2005/0079574号、同第2005/0119455号、同第2005/0266000号、同第2007/0117126号、同第2007/0160598号、同第2007/0237764号、同第2007/0292936号、及び同第2009/0002360号が含まれる。

10

【0123】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体または抗体断片は、本明細書においてヒト抗体またはヒト抗体断片と見なされる。

【0124】

3. 抗体変異型

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体のアミノ酸配列変異型が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び/または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異型は、抗体をコードするヌクレオチド配列中に適切な修飾を導入することによって、またはペプチド合成によって調製され得る。かかる修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列の残基からの欠失、及び/またはそこへの挿入、及び/またはその置換が含まれる。最終構築物に到達するために欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせを行うことができるが、但し、その最終構築物が所望の特性、例えば、抗原結合を保有することを条件とする。

20

【0125】

a) 置換、挿入、及び欠失変異型

ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異型が提供される。置換型変異誘発の目的とする部位には、HVR及びFRが含まれる。保存的置換は、表Aに「好ましい置換」の見出しの下に示される。より実質的な変化は、表Aに「例示的な置換」の見出しの下に示され、アミノ酸側鎖クラスを参照して以下にさらに記載される。アミノ酸置換は、目的とする抗体に導入され得、生成物が所望の活性、例えば、保持された/改善された抗原結合について、スクリーニングされる。

30

表 A

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
A l a (A)	V a l、L e u、I l e	V a l
A r g (R)	L y s、G l n、A s n	L y s
A s n (N)	G l n、H i s、A s p、L y s、 A r g	G l n
A s p (D)	G l u、A s n	G l u
C y s (C)	S e r、A l a	S e r
G l n (Q)	A s n、G l u	A s n
G l u (E)	A s p、G l n	A s p
G l y (G)	A l a	A l a
H i s (H)	A s n、G l n、L y s、A r g	A r g
I l e (I)	L e u、V a l、M e t、A l a、 P h e、ノルロイシン	L e u
L e u (L)	ノルロイシン、I l e、V a l、 M e t、A l a、P h e	I l e
L y s (K)	A r g、G l n、A s n	A r g
M e t (M)	L e u、P h e、I l e	L e u
P h e (F)	T r p、L e u、V a l、I l e、 A l a、T y r	T y r
P r o (P)	A l a	A l a
S e r (S)	T h r	T h r
T h r (T)	V a l、S e r	S e r
T r p (W)	T y r、P h e	T y r
T y r (Y)	T r p、P h e、T h r、S e r	P h e
V a l (V)	I l e、L e u、M e t、P h e、 A l a、ノルロイシン	L e u

アミノ酸は、一般的な側鎖特性に従って分類され得る：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；
- (2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n；
- (3) 酸性：A s p、G l u；
- (4) 塩基性：H i s、L y s、A r g；
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：G l y、P r o；
- (6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【0126】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを必要とするであろう。

【0127】

置換変異体の一種は、親抗体の1つ以上の超可変領域残基を置換することを含む。一般に、さらなる研究のために選択される、得られた変異型（複数可）は、親抗体と比べて、ある特定の生物学的特性（例えば、親和性の増加）における改変（例えば、改善）を有し、かつ/または実質的に保持された親抗体のある特定の生物学的特性を有するであろう。例示的な置換変異型は、例えば、本明細書に記載される技法等のファージディスプレイに

基づく親和性成熟技法を使用して好都合に生成され得る親和性成熟抗体である。簡潔には、1つ以上のHVR残基が変異され、変異型抗体がファージ上にディスプレイされ、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【0128】

改変（例えば、置換）は、HVRにおいて、例えば抗体親和性を改善するために行われ得る。かかる改変は、HVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で変異を受けるコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207: 179-196 (2008)を参照のこと）、及び/または抗原に接触する残基において行われ得、得られた変異型VHまたはVLは、結合親和性について試験される。二次ライブラリーの構築及びそれからの再選択による親和性成熟については、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))に記載されている。親和成熟のいくつかの実施形態において、多様な方法（例えば、エラープロードPCR、鎖シャッフリング、またはオリゴヌクレオチド指向性変異誘発）のいずれかによって、成熟のために選択された可変遺伝子中に多様性が導入される。次いで、二次ライブラリーが作製される。次いで、ライブラリーがスクリーニングされ、所望の親和性を有する任意の抗体変異型を特定する。多様性を導入するための別の方法は、いくつかのHVR残基（例えば、一度に4～6個の残基）がランダム化されるHVR指向性アプローチを含む。抗原結合に關与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング変異誘発またはモデリングを使用して、具体的に特定され得る。特に、CDR-H3及びCDR-L3が、しばしば標的とされる。

10

20

【0129】

ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、かかる改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低減させない限り、1つ以上のHVR間で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的改変（例えば、本明細書に提供される保存的置換）がHVR内で行われ得る。かかる改変は、例えば、HVR内の抗原接触残基の外側であってもよい。上に提供された変異型VH配列及びVL配列のある特定の実施形態において、各HVRは、改変されないか、または1つ、2つ、もしくは3つ以下のアミノ酸置換を含む。

30

【0130】

変異誘発のための標的とされ得る抗体の残基または領域の特定のための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085に記載されるように、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、残基または標的残基群（例えば、arg、asp、his、lys、及びglu等の荷電残基）が特定され、中性または負荷電アミノ酸（例えば、アラニンまたはボリアラニン）によって置き換えられて、抗体と抗原との相互作用に影響が及ぼされたかどうかを決定する。さらなる置換が最初の置換に対する機能感受性を示すアミノ酸位置に導入され得る。あるいは、またはさらに、抗体と抗原との間の接触点を同定するための抗原-抗体複合体の結晶構造。かかる接触残基及び隣接する残基が置換の候補として標的とされ得るか、または排除され得る。変異型がスクリーニングされて、それらが所望の特性を有するかを決定することができる。

40

【0131】

アミノ酸配列挿入には、長さが1残基から100以上の残基を含むポリペプチドの範囲であるアミノ末端及び/またはカルボキシル末端の融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異型には、酵素（例えば、ADEPTのための）またはポリペプチドへの抗体のN末端もしくはC末端の融合が挙げられ、これは抗体の血清半減期を増加させる。

【0132】

50

b) グリコシル化変異型

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させるように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作製または除去されるようにアミノ酸配列を改変することによって好都合に達成され得る。

【0133】

抗体がFc領域を含む場合、それに結合した炭水化物が改変され得る。哺乳動物細胞によって産生された天然抗体は、典型的には、N結合によってFc領域のCH2ドメインのAsn297に一般に結合される分岐状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wright et al., TIBTECH 15:26-32 (1997)を参照のこと。オリゴ糖には、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、及びシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに結合したフコースが含まれ得る。いくつかの実施形態において、本発明の抗体中におけるオリゴ糖の修飾は、ある特定の改善された特性の改善を有する抗体変異型を作製するために行われ得る。

10

【0134】

一実施形態において、Fc領域に(直接的または間接的に)結合したフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体変異型が提供される。例えば、かかる抗体中のフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%、または20%~40%であり得る。フコースの量は、例えば、WO2008/077546に記載されるMALDI-TOF質量分析法によって測定される、Asn297に結合した全ての糖構造(例えば、複合体、ハイブリッド、及び高マンノース構造)の合計に対する、Asn297での糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域の約297位(Fc領域残基のEu付番)に位置するアスパラギン残基を指すが、Asn297はまた、抗体内のわずかな配列変異に起因して、297位から約±3アミノ酸上流または下流、すなわち294~300位の間に位置してもよい。かかるフコシル化変異型は、改善されたADCC機能を有し得る。例えば、米国特許公開第US 2003/0157108号(Presta, L.)、同第US 2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)を参照のこと。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変異型に関する刊行物の例としては、US 2003/0157108、WO 2000/61739、WO 2001/29246、US 2003/0115614、US 2002/0164328、US 2004/0093621、US 2004/0132140、US 2004/0110704、US 2004/0110282、US 2004/0109865、WO 2003/085119、WO 2003/084570、WO 2005/035586、WO 2005/035778、WO 2005/053742、WO 2002/031140、Okazaki et al., J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)、Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生することができる細胞株の例としては、タンパク質フコシル化が欠損したLec13 CHO細胞(Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986))、米国特許出願第US 2003/0157108 A1号、Presta, L.、及びWO 2004/056312 A1、Adams et al.、特に実施例11)、及びノックアウト細胞株、例えばアルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8ノックアウトCHO細胞(例えば、Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)、Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)、及びWO 2003/085107)が挙げられる。

20

30

40

【0135】

例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分される

50

、二分されたオリゴ糖を有する抗体変異型がさらに提供される。かかる抗体変異型は、低減されたフコシル化を有し得る。かかる抗体変異型の例は、例えば、WO 2003/011878 (Jean-Mairetら)、米国特許第6,602,684号 (Umanaら)、及びUS 2005/0123546 (Umanaら)に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変異型も提供される。かかる抗体変異型は、例えば、WO 1997/30087 (Patelら)、WO 1998/58964 (Raju, S.)、及びWO 1999/22764 (Raju, S.)に記載されている。

【0136】

c) Fc領域変異型

ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸修飾が、本明細書に提供される抗体のFc領域に導入され、それによりFc領域変異型が生成され得る。Fc領域変異型は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾 (例えば、置換) を含むヒトFc領域配列 (例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fc領域) を含み得る。

【0137】

ある特定の実施形態において、本発明は、いくつかであるが全てではなくエフェクター機能を保有し、それにより、インビボでの抗体の半減期が重要であるが、さらにある特定のエフェクター機能 (補体及びADCC等) が不必要であるか、または有害である用途に対して望ましい候補となる、抗体変異型を企図する。インビトロ及び/またはインビボ細胞傷害性アッセイを行って、CDC及び/またはADCC活性の低減/枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体 (FcR) 結合アッセイを行って、抗体がFcγR結合を欠く (故にADCC活性を欠く可能性が高い) が、FcRn結合能力を保持していることを確実にすることができる。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞が、Fc (RIIIのみを発現する一方で、単球は、Fc (RI、Fc (RII、及びFc (RIIIを発現する。造血細胞でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991) の464頁の表3に要約されている。目的とする分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号 (例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 7059-7063 (1986) を参照のこと)、及びHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 1499-1502 (1985)、5,821,337 (Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166: 1351-1361 (1987) を参照のこと)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を用いてもよい (例えば、フローサイトメトリーのためのACTI (商標) 非放射性細胞傷害性アッセイ (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA、及びCytotox 96 (登録商標) 非放射性細胞傷害性アッセイ (Promega, Madison, WI) を参照のこと。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞 (PBMC) 及びナチュラルキラー (NK) 細胞が挙げられる。あるいは、またはさらに、目的とする分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652-656 (1998) に開示されるような動物モデルにおいて評価され得る。C1q結合アッセイを実行して、抗体がC1qに結合することができず、それ故にCDC活性を欠くことを確認することもできる。例えば、WO 2006/029879及びWO 2005/100402のC1q及びC3c結合ELISAを参照のこと。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってもよい (例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)、Cragg, M. S. et al., Blood 101: 1045-1052 (2003)、及びCragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103: 2738-2743 (2004) を参照のこと)。FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期の決定は、当該技術分野で既知の方法を

10

20

30

40

50

使用して行うこともできる（例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18 (12) : 1759 - 1769 (2006) を参照のこと）。

【0138】

低減したエフェクター機能を有する抗体としては、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、及び329のうちの1つ以上の置換を有する抗体が挙げられる（米国特許第6,737,056号）。かかるFc変異体には、アミノ酸位置265、269、270、297、及び327のうちの2つ以上の置換を有するFc変異体、例えば、残基265及び297のアラニンへの置換を有するいわゆる「DANA」Fc変異体が挙げられる（米国特許第7,332,581号）。

10

【0139】

FcRへの結合が改善または低減されたある特定の抗体変異型が記載されている（例えば、米国特許第6,737,056号、WO 2004/056312、及びShields et al., J. Biol. Chem. 9 (2) : 6591 - 6604 (2001) を参照のこと）。

【0140】

ある特定の実施形態において、抗体変異型は、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298、333、及び/または334位（残基のEU付番）での置換を有するFc領域を含む。

20

【0141】

いくつかの実施形態において、例えば、米国特許第6,194,551号、WO 99/51642、及びIdusogie et al., J. Immunol. 164 : 4178 - 4184 (2000) に記載されるように、改変はFc領域内で行われ、C1q結合及び/または補体依存性細胞傷害性(CDC)の改変（すなわち、改善または低減）をもたらす。

【0142】

増加した半減期、及び胎児への母体IgGの移動を担う新生児Fc受容体(FcRn)への改善された結合を有する抗体(Guyer et al., J. Immunol. 117 : 587 (1976) 及びKim et al., J. Immunol. 24 : 249 (1994))は、US2005/0014934A1(Hintonら)に記載されている。それらの抗体は、Fc領域のFcRnへの結合を改善する1つ以上の置換を有するFc領域を含む。かかるFc変異型には、Fc領域残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、または434のうちの1つ以上での置換、例えば、Fc領域残基434の置換を有するものを含む（米国特許第7,371,826号）。

30

【0143】

Fc領域変異型の他の例に関しては、Duncan & Winter, Nature 322 : 738 - 40 (1988)、米国特許第5,648,260号、米国特許第5,624,821号、及びWO 94/29351も参照のこと。

40

【0144】

d) システイン操作された抗体変異型

ある特定の実施形態において、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン操作された抗体、例えば、「チオMAb」を作製することが望ましい場合がある。特定の実施形態において、置換された残基は、抗体の利用しやすい部位で生じる。これらの残基をシステインで置換することによって、反応性のチオール基がそれにより抗体の利用しやすい部位に位置付けられ、それを使用して、検出剤等の他の部分に抗体を複合体化して、本明細書にさらに記載されるように、免疫複合体を作製することができる。ある特定の実施形態において、以下の残基、軽鎖のV205(Kabat付番)、重鎖のA118(EU付番)、及び重鎖Fc領域のS400(EU付番)のうちの任意の1つ

50

以上をシステインで置換してもよい。システイン操作された抗体は、例えば、米国特許第 7, 521, 541 号に記載されるように生成され得る。

【0145】

e) 抗体誘導体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、当該技術分野で既知であり、かつ容易に入手可能な追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに修飾され得る。抗体の誘導体化に好適な部分には、水溶性ポリマーが含まれるが、これに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール (PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1, 3-ジオキソラン、ポリ-1, 3, 6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸 (ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、及びデキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレン(propylene)グリコールホモポリマー、プロリプロピレン(prolypropylene)オキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、ならびにこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造において有利であり得る。ポリマーは、任意の分子量であり得、分岐状または非分岐状であり得る。抗体に結合するポリマーの数は異なり得、1つを超えるポリマーが結合する場合、それらは同じ分子であっても異なる分子であってもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/または種類は、改善される抗体の特定の特性または機能を含むがこれらに限定されない検討事項に基づいて決定され得る。

【0146】

別の実施形態において、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る抗体及び非タンパク質性部分の複合体が提供される。一実施形態において、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである(Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005))。放射線は、任意の波長のものであってもよく、通常の細胞を傷つけないが、抗体-非タンパク質性部分に隣接する細胞が死滅させられる温度まで非タンパク質性部分を加熱する波長が含まれるが、これらに限定されない。

【0147】

4. ベクター、宿主細胞、及び組換え方法

本発明の抗体の組換え産生では、それをコードする核酸が単離され、さらなるクローニング(DNAの増幅)のため、または発現のために、複製可能ベクターに挿入される。抗体をコードするDNAは、従来の手技を使用して(例えば、抗体の重鎖軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することのできるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、容易に単離及び配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクターの選択は、使用される宿主細胞に部分的に依存する。一般に、宿主細胞は、原核生物または真核細胞(一般に哺乳動物)起源のいずれかの宿主細胞である。IgG、IgM、IgA、IgD、及び、IgE定常領域を含む任意のアイソタイプの定常領域がこの目的のために使用され得、かかる定常領域が任意のヒトまたは動物種から得られ得ることが理解されるであろう。

【0148】

原核生物宿主細胞を使用した抗体の生成:

a) ベクター構築

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードするポリヌクレオチド配列は、標準の組換え技法を使用して得られ得る。所望のポリヌクレオチド配列は、ハイブリドーマ細胞等の抗体産生細胞から単離及び配列決定され得る。代替的に、ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド合成機またはPCR技法を用いて合成され得る。得られた時点で、ポリペプチドをコードする配列は、原核生物宿主内で異種ポリヌクレオチドを複製及び発現することができる

組換えベクターに挿入される。利用可能であり、かつ当該技術分野で既知の多くのベクターが本発明のために使用され得る。適切なベクターの選択は、主に、ベクターに挿入される核酸の大きさ及びベクターで形質転換される特定の宿主細胞によって異なるであろう。各ベクターは、その機能（異種ポリヌクレオチドの増幅もしくは発現、またはこれらの両方）及びそれが存在する特定の宿主細胞とのその適合性に依りて種々の成分を含有する。ベクター成分には、一般に、複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位（RBS）、シグナル配列、異種核酸挿入、及び転写終結配列が含まれるが、これらに限定されない。

【0149】

一般に、宿主細胞と適合性のある種由来のレプリコン及び制御配列を含有するプラスミドベクターが、これらの宿主に関連して使用される。このベクターは、通常、複製部位、及び形質転換細胞において表現型選択を提供することができるマーキング配列を持つ。例えば、E. coli は、典型的には、E. coli 種由来のプラスミドである pBR322 を使用して形質転換される。pBR322 は、アンピシリン（Amp）及びテトラサイクリン（Tet）耐性をコードする遺伝子を含有し、それ故に形質転換細胞を特定するための容易な手段を提供する。pBR322、その誘導体、または他の微生物プラスミドもしくはバクテリオファージは、内因性タンパク質の発現のための微生物によって使用され得るプロモーターも含有し得るか、またはそれを含有するように修飾され得る。特定の抗体の発現のために使用される pBR322 誘導体の例は、Carter et al., 米国特許第 5,648,237 号に詳述される。

【0150】

加えて、宿主微生物と適合性のあるレプリコン及び制御配列を含有するファージベクターが、これらの宿主に関連して形質転換ベクターとして使用され得る。例えば、λGEM-TM-11 等のバクテリオファージが、E. coli LE392 等の感受性宿主細胞を形質転換するために使用され得る組換えベクターを作製する際に利用されてもよい。

【0151】

本発明の発現ベクターは、ポリペプチド構成成分の各々をコードする 2 つ以上のプロモーター-シストロン対を含み得る。プロモーターは、その発現を調節するシストロンの上流（5'）に位置する非翻訳調節配列である。原核生物プロモーターは、典型的には、2 つのクラス、すなわち誘導プロモーター及び構成プロモーターに分けられる。誘導プロモーターは、培養条件の変化、例えば、栄養素の存在もしくは不在、または温度の変化に依りてその制御下で増加したレベルのシストロンの転写を開始するプロモーターである。

【0152】

様々な潜在的宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが周知である。選択したプロモーターを、制限酵素消化によって供給源 DNA からプロモーターを除去し、かつ単離されたプロモーター配列を本発明のベクターに挿入することによって、軽鎖または重鎖をコードするシストロン DNA に作動可能に結合することができる。天然プロモーター配列と多くの異種プロモーターの双方を、標的遺伝子の増幅及び/または発現を誘導するために使用することができる。いくつかの実施形態において、天然の標的ポリペプチドプロモーターと比較して、一般的に発現する標的遺伝子をより多く転写させ、効率をよくするので、異種プロモーターが有用である。

【0153】

原核生物宿主との使用に好適なプロモーターには、PhoA プロモーター、β-ガラクトナーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン（trp）プロモーター系、及びハイブリッドプロモーター、例えば、tac または trc プロモーターが含まれる。しかしながら、細菌において機能的である他のプロモーター（他の既知の細菌またはファージプロモーター等）も好適である。それらのヌクレオチド配列が公開されており、それにより、当業者が、任意の必要とされる制限部位を提供するためにリンカーまたはアダプターを使用して、それらを標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロンに作動可能に連結することが可能になっている（Siebenlist et al. (1980) Cell

10

20

30

40

50

20:269)。

【0154】

本発明の一態様において、組換えベクター内の各シストロンは、膜にわたる発現ポリペプチドの転位を誘導する分泌シグナル配列構成成分を含む。一般に、シグナル配列は、ベクターの構成成分であり得るか、またはベクターに挿入される標的ポリペプチドDNAの一部であり得る。本発明の目的のために選択されるシグナル配列は、宿主細胞によって認識及びプロセッシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。異種ポリペプチドに天然のシグナル配列を認識及びプロセッシングしない原核宿主細胞の場合、シグナル配列は、例えば、アルカリ性ホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ipp、または熱安定性エンテロトキシンII（STII）リーダー、LamB、PhoE、PelB、OmpA、及びMBPからなる群から選択される原核シグナル配列によって置換される。本発明の一実施形態において、発現系の両シストロンにおいて使用されるシグナル配列は、STIIシグナル配列またはその変異型である。

10

【0155】

別の態様において、本発明に従って免疫グロブリンの産生は、宿主細胞の細胞質で生じ得、したがって、各シストロン内での分泌シグナル配列の存在を必要としない。その点で、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖は、細胞質内で発現され、折り畳まれ、組み立てられて機能的免疫グロブリンを形成する。ある特定の宿主株（例えば、E. coli trxB株）は、ジスルフィド結合形成に有利な細胞質条件を提供し、それによって、発現されたタンパク質サブユニットの適切な折り畳み及び組み立てを可能にする。Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995)。

20

【0156】

本発明の抗体はまた、発現したポリペプチド構成成分の定量的比率が、本発明の分泌及び適切に組み立てられた抗体の収率を最大限にするように調節され得る、発現系を用いることによって産生され得る。かかる調節は、少なくとも部分的には、ポリペプチド構成成分に関する翻訳強度を同時に調節することによって達成される。

【0157】

翻訳強度を調節するための一技法は、Simmonsらの米国特許第5,840,523号に開示されている。それは、シストロン内の翻訳開始領域（TIR）の変異体を利用する。所与のTIRに関して、一連のアミノ酸または核酸配列変異体が、一連の翻訳強度で作製され、それにより、この因子を特定鎖の所望の発現レベルに調整するための便利な手段を提供する。TIR変異体は、アミノ酸配列を変更し得るコドン変化を生じる慣用的突然変異誘発技法により生成され得る。ある特定の実施形態において、ヌクレオチド配列の変化は、サイレントである。TIRにおける変更には、例えば、シグナル配列における変更とともに、シャイン・ダルガーノ（Shine-Dalgarno）配列の数または間隔における変更が含まれ得る。変異体シグナル配列を生成するための一方法は、シグナル配列のアミノ酸配列を変えない（すなわち、変化はサイレントである）コード配列の開始での「コドンバンク」の生成である。これは、各コドンの第三ヌクレオチド位置を変えることにより成し遂げられ得る、さらに、いくつかのアミノ酸、例えばロイシン、セリン、及びアルギニンは、バンクを作製するに際して複雑性を付加し得る多重第一及び第二位置を有する。突然変異誘発のこの方法は、Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 4:151-158に詳細に記載されている。

30

40

【0158】

一実施形態において、一組のベクターが、その中の各シストロンに関して一連のTIR強度で生成される。この限定された組は、種々のTIR強度の組み合わせの下で、各鎖の発現レベルならびに所望の抗体産物の収率の比較を提供する。TIR強度は、Simmonsらの米国特許第5,840,523号に詳細に記載されるようなレポーター遺伝子の発現レベルを定量することにより決定され得る。翻訳強度比較に基づいて、所望の個々のTIRは、本発明の発現ベクター構築物に組み合わせられるよう選択される。

50

【0159】

本発明の抗体の発現に好適な原核生物宿主細胞としては、グラム陰性菌またはグラム陽性菌等の *Archaeobacteria* 及び *Eubacteria* が挙げられる。有用な細菌の例としては、*Escherichia* (例えば、*E. coli*)、*Bacilli* (例えば、*B. subtilis*)、*Enterobacteria*、*Pseudomonas* 種 (例えば、*P. aeruginosa*)、*Salmonella typhimurium*、*Serratia marcescans*、*Klebsiella*、*Proteus*、*Shigella*、*Rhizobia*、*Vitreoscilla*、または *Paracoccus* が挙げられる。一実施形態において、グラム陰性細胞が使用される。一実施形態において、*E. coli* 細胞が、本発明の宿主として使用される。*E. coli* 株の例としては、株 W3110 (*Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219*、ATCC 寄託番号 27,325) 及びその誘導体 (遺伝子型 W3110 $\Delta fhuA(\Delta tonA) ptr3 lac Iq lacL8 \Delta ompT \Delta (nmpc-fepE) degP41 kanR$ を有する株 33D3 (米国特許第 5,639,635 号) が挙げられる。特許第他の株及びそれらの誘導体、例えば、*E. coli* 294 (ATCC 31,446)、*E. coli* B、*E. coli* λ 1776 (ATCC 31,537)、及び *E. coli* RV308 (ATCC 31,608) も好適である。これらの例は、限定するものではなく、例証するものである。定義された遺伝子型を有する上述の細菌のうちのいずれの誘導体の構築方法も、当該技術分野で既知であり、例えば、*Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)* に記載されている。一般に、細菌の細胞におけるレプリコンの複製可能性を考慮して適切な細菌を選択することが必要である。例えば、pBR322、pBR325、pACYC177、または pKN410 等の周知のプラスミドを使用してレプリコンを提供する場合、*E. coli*、*Serratia*、または *Salmonella* 種が宿主として好適に使用され得る。典型的には、宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素しか分泌すべきでなく、さらなるプロテアーゼ阻害剤が細胞培養物に組み込まれることが望ましくあり得る。

10

20

30

【0160】

b) 抗体産生

宿主細胞は、上述の発現ベクターで形質転換され、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅に適切になるように修飾された従来の栄養素培地で培養される。

【0161】

形質転換とは、DNA が染色体外要素として、または染色体組み込み体によってのいずれかで複製可能になるように、DNA を原核生物宿主に導入することを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換がかかる細胞に適切な標準の技法を用いて行われる。一般に、塩化カルシウムを用いるカルシウム処理が、実質的な細胞壁障壁を含有する細菌細胞に使用される。形質転換の別の方法は、ポリエチレングリコール / DMSO を用いる。使用されるなおも別の技法は、電気穿孔である。

40

【0162】

本発明のポリペプチドを産生するために使用される原核生物細胞は、当該技術分野で既知の、かつ選択された宿主細胞の培養に好適な培地で成長させられる。好適な培地の例としては、必要な栄養素補充物を含むルリアブロス (LB) が挙げられる。いくつかの実施形態において、培地は、発現ベクターを含有する原核生物細胞の成長を選択的に可能にするために、発現ベクターの構築に基づいて選択された選択剤も含有する。例えば、アンピシリンが、アンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞を成長させるための培地に添加される。

【0163】

50

炭素、窒素、及び無機リン酸塩源に加えて、任意の必要な補充物も、単独で、または複合窒素源等の別の補充物もしくは培地との混合物として導入される適切な濃度で含まれる。任意に、培養培地は、グルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリトリール、及びジチオスレイトリールからなる群から選択される１つ以上の還元剤を含有し得る。

【０１６４】

原核生物宿主細胞は、好適な温度で培養される。ある特定の実施形態において、*E. coli* 成長の場合、成長温度は、約 20 ~ 約 39 の範囲、約 25 ~ 約 37 の範囲、または約 30 である。培地の pH は、主に宿主生物に応じて、約 5 ~ 約 9 の範囲の任意の pH であり得る。ある特定の実施形態において、*E. coli* の場合、pH は、約 6.8 ~ 約 7.4、または約 7.0 である。

10

【０１６５】

誘導プロモーターが本発明の発現ベクターに使用される場合、タンパク質発現は、プロモーターの活性化に好適な条件下で誘導される。本発明の一態様において、*PhoA* プロモーターが、ポリペプチドの転写を制御するために使用される。したがって、形質転換宿主細胞は、誘導のためにリン酸塩制限培地で培養される。ある特定の実施形態において、リン酸塩制限培地は、*C. R. A. P* 培地である（例えば、*Simmons et al.*, *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147 を参照されたい）。様々な他の誘導因子が、当該技術分野で既知の用いられるベクター構築物に従って使用され得る。

20

【０１６６】

一実施形態において、本発明の発現ポリペプチドは、宿主細胞のペリプラズムに分泌され、それから回収される。タンパク質回収は、典型的には、一般に浸透圧ショック、超音波処理、または溶解等の手段による微生物の破壊を伴う。細胞が破壊されると、細胞残屑または全細胞は、遠心分離または濾過によって除去され得る。タンパク質は、例えば、親和性樹脂クロマトグラフィーによってさらに精製される。あるいは、タンパク質は、培養培地に輸送され、その中で単離され得る。細胞が培養物から除去され得、培養上清が、産生されたタンパク質のさらなる精製のために濾過及び濃縮される。発現ポリペプチドは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 及びウエスタンブロットアッセイ等の一般に既知の方法を使用してさらに単離及び特定され得る。

30

【０１６７】

本発明の一態様において、抗体産生は、発酵プロセスによって大量に行われる。様々な大規模供給バッチ発酵手順が組換えタンパク質の産生に利用可能である。大規模発酵は、少なくとも 1000 リットルの容量、ある特定の実施形態において、約 1,000 ~ 100,000 リットルの容量を有する。これらの発酵槽は、酸素及び栄養素、特にグルコースを分布させるために攪拌インペラーを使用する。小規模発酵とは、一般に、容積がおよそ 100 リットル以下であり、約 1 リットル ~ 約 100 リットルの範囲であり得る発酵槽での発酵を指す。

【０１６８】

発酵プロセスにおいて、タンパク質発現の誘導は、典型的には、細胞が所望の密度、例えば、約 180 ~ 220 の OD₅₅₀ になるまで好適な条件下で成長した後に開始され、その段階で、細胞は、初期静止期にある。当該技術分野で知られており、また上述のように、様々な誘導因子が、用いられるベクター構築物に従って使用され得る。細胞は、誘導前により短い期間成長させられてもよい。細胞は、通常、約 12 ~ 50 時間誘導されるが、より長いまたはより短い誘導時間も使用され得る。

40

【０１６９】

本発明のポリペプチドの産生収率及び品質を改善するために、様々な発酵条件が修正され得る。例えば、分泌抗体ポリペプチドの適切な集合及び折り畳みを改善するために、*Dsb* タンパク質 (*DsbA*、*DsbB*、*DsbC*、*DsbD*、及びまたは *DsbG*) または *FkpA* (シャペロン活性を有するペプチジルプロリルシス、トランス - イソメラーゼ

50

）のシャペロンタンパク質を過剰発現するさらなるベクターを使用して、宿主原核生物細胞を共形質転換することができる。シャペロンタンパク質が細菌宿主細胞において産生される異種タンパク質の適切な折り畳み及び溶解を容易にすることが実証されている。Chen et al. (1999) J. Biol. Chem. 274: 19601 - 19605、Georgiou et al. , 米国特許第6,083,715号、Georgiou et al. , 米国特許第6,027,888号、Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100 - 17105、Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17106 - 17113、Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39: 199 - 210。

10

【0170】

発現異種タンパク質（特にタンパク質分解感受性のもの）のタンパク質分解を最小限に抑えるために、タンパク質分解酵素が欠損したある特定の宿主株が本発明に使用され得る。例えば、宿主細胞株は、既知の細菌プロテアーゼ、例えば、プロテアーゼIII、OmpT、DegP、Tsp、プロテアーゼI、プロテアーゼMi、プロテアーゼV、プロテアーゼVI、及びそれらの組み合わせをコードする遺伝子において遺伝子変異（複数可）をもたらすように修飾され得る。いくつかのE. coliプロテアーゼ欠損株が利用可能であり、例えば、Joly et al. , (1998)（上記参照）、Georgiou et al. , 米国特許第5,264,365号、Georgiou et al. , 米国特許第5,508,192号、Hara et al. , Microbial Drug Resistance, 2: 63 - 72 (1996)に記載されている。

20

【0171】

一実施形態において、タンパク質分解酵素が欠損し、かつ1つ以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換されたE. coli株が、本発明の発現系における宿主細胞として使用される。

【0172】

c) 抗体精製

一実施形態において、本明細書で産生される抗体タンパク質は、さらなるアッセイ及び使用のために、実質的に同種の調製物を得るようにさらに精製される。当該技術分野で既知の標準のタンパク質精製方法が用いられ得る。以下の手順は、好適な精製手順の例示である：免疫親和性またはイオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、DEAE等のシリカまたは陽イオン交換樹脂でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈殿、及び例えばSephadex G-75を使用したゲル濾過。

30

【0173】

一態様において、固相に固定化されたプロテインAが、本発明の抗体産物の免疫親和性精製に使用される。プロテインAは、高親和性で抗体のFc領域に結合するStaphylococcus aureusからの41kDの細胞壁タンパク質である。Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1 - 13。プロテインAが固定化される固相は、ガラスまたはシリカ表面を含むカラム、または、制御孔ガラスカラムもしくはケイ酸カラムであり得る。いくつかの適用では、カラムは、夾雑物の非特異的結合を防ぐ可能性があるためにグリセロール等の試薬でコーティングされている。

40

【0174】

精製の第1のステップとして、上述のように細胞培養から得られた調製物がプロテインA固定化固相に適用されて、目的とする抗体のプロテインAへの特異的結合を可能にし得る。次いで、固相は、固相に非特異的に結合している夾雑物を除去するために洗浄される。最後に、目的とする抗体が、溶出により固相から回収される。

【0175】

真核性宿主細胞を使用した抗体の生成：

50

真核性宿主細胞において使用するためのベクターは、一般に、非限定的構成成分：シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列のうちの1つ以上を含む。

【0176】

a) シグナル配列構成成分

真核宿主細胞において使用するためのベクターもまた、目的とする成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有するシグナル配列または他のポリペプチドを含有してもよい。選択される異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識及びプロセッシング（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであり得る。哺乳類細胞発現においては、哺乳類シグナル配列、ならびにウイルス分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスgDシグナルが利用可能である。かかる前駆体領域のDNAは、リーディングフレームにおいて、抗体をコードするDNAに連結される。

10

【0177】

b) 複製起点

一般に、複製起点成分は、哺乳類発現ベクターに必要とされない。例えば、SV40起点は、ただ初期プロモーターを含有するため、一般的に、使用され得る。

【0178】

c) 選択遺伝子構成成分

発現ベクター及びクローニングベクターは、選択遺伝子、別名、選択可能なマーカーを含有し得る。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質もしくは他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、もしくはテトラサイクリンへの耐性を与えるか、(b) 栄養要求性欠損を補完するか（関連性のある場合）、または(c) 複合培地から入手不可能な必須の栄養素を供給する、タンパク質をコードする。

20

【0179】

選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を停止する薬物を利用する。異種遺伝子での形質転換に成功した細胞は、薬物耐性を与えるタンパク質を産生し、それ故に選択レジメンで生き残る。かかる優性選択の例は、薬物ネオマイシン、ミコフェノール酸、及びハイグロマイシンを使用する。

【0180】

哺乳類細胞に好適な選択可能なマーカーの別の例は、DHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン-I及び-II、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等の、抗体核酸を取り込むための細胞成分の特定を可能にするものである。

30

【0181】

例えば、いくつかの実施形態において、DHFR選択遺伝子で形質転換された細胞はまず、DHFRの競合アンタゴニストであるメトトレキサート(Mtx)を含有する培養培地中で形質転換体の全てを培養することによって、特定される。いくつかの実施形態において、野生型DHFRが用いられるときの適切な宿主細胞は、DHFR活性が欠損したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株（例えば、ATCC CRL-9096）である。

40

【0182】

代替的に、抗体、野生型DHFRタンパク質、及びアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)等の別の選択可能なマーカーをコードするDNA配列で形質転換または共形質転換された宿主細胞（特に、内因性DHFRを含有する野生型宿主）は、アミノグリコシド抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシン、またはG418等の選択可能なマーカー用の選択剤を含有する培地中での細胞成長によって選択され得る。米国特許第4,965,199号を参照されたい。宿主細胞は、グルタミン合成酵素(GS)が欠損した細胞株を含む、NS0、CHOK1、または誘導体を含み得る。哺乳類細胞のために選択可能なマーカーとしてGSを使用するための方法は、米国特許第5,122,464号、及び米国特許第5,891,693号において記載されている。

50

【0183】

d) プロモーター構成成分

発現及びクローニングベクターは、通常、宿主生物により認識され、かつ目的とするポリペプチド（例えば、抗体）をコードする核酸に作動可能に連結するプロモーターを含有する。真核生物のためのプロモーター配列が知られている。例えば、実質的に全ての真核遺伝子が、転写が始まる部位からおよそ25～30塩基上流に位置するATに富んだ領域を有する。多くの遺伝子の転写開始から70～80塩基上流に見られる別の配列は、Nが任意のヌクレオチドであるCNCAAT領域である。大半の真核遺伝子の3'末端は、コード配列の3'末端へのポリA尾部の付加のためのシグナルであり得るAATAA配列である。ある特定の実施形態において、これらの配列のうちのいずれかまたは全てが、真核性発現ベクターに好適に挿入され得る。

10

【0184】

哺乳動物宿主細胞中のベクターからの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（アデノウイルス2等）、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、及びシミアンウイルス40（SV40）等のウイルスのゲノムから、または異種哺乳動物プロモーター、例えば、アクチンプロモーターもしくは免疫グロブリンプロモーターから、熱ショックプロモーターから得られるプロモーターにより制御されるが、但し、かかるプロモーターが宿主細胞系と適合性であることを条件とする。

20

【0185】

SV40ウイルスの初期プロモーター及び後期プロモーターは、SV40ウイルス複製起点も含有するSV40制限断片として好都合に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII-E制限断片として簡便に得られる。ウシ乳頭腫ウイルスをベクターとして使用して哺乳類宿主におけるDNAを発現させる系が、米国特許第4,419,446号に開示されている。この系の修飾については、米国特許第4,601,978号に記載されている。また、単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞でのヒトβ-インターフェロンcDNAの発現を記載する、Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)も参照されたい。代替的に、ラウス肉腫ウイルス長末端反復がプロモーターとして使用され得る。

30

【0186】

e) エンハンサーエレメント構成成分

より高次の真核生物による本発明の抗体をコードするDNAの転写は、多くの場合、エンハンサー配列をベクターに挿入することにより増加する。哺乳動物遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン、及びインスリン）からの多くのエンハンサー配列が現在知られている。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルスからのエンハンサーが使用されるであろう。例としては、複製起点の後半側のSV40エンハンサー（bp100～270）、ヒトサイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、マウスサイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後半側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。真核生物プロモーターの活性化のためのエンハンサー要素を記載している、Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)も参照されたい。エンハンサーは、抗体ポリペプチドコード配列の5'位または3'位でベクターにスプライスされ得るが、通常、プロモーターから5'部位に位置する。

40

【0187】

f) 転写終結構成成分

真核性宿主細胞において使用される発現ベクターはまた、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含有し得る。かかる配列は、一般に、真核またはウイルスDNAまたはcDNAの5'非翻訳領域、時折、3'非翻訳領域から入手可能である。これらの領域は、抗体をコードするmRNAの非翻訳部分内のポリアデニル化断片として転写されたヌ

50

クレオチドセグメントを含有する。1つの有用な転写終結成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO 94 / 1 1 0 2 6 及びそれらで開示される発現ベクターを参照されたい。

【0188】

g) 宿主細胞の選択及び形質転換

本明細書におけるベクター内でのDNAのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞には、脊椎動物宿主細胞を含む、本明細書に記載される高等真核生物の細胞が含まれる。培養（組織培養）における脊椎動物細胞の調製は、日常的な手順となっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV 40 によって形質転換されたサル腎臓 CV 1 株（COS - 7、ATCC CRL 1651）、ヒト胚腎臓株（293細胞または懸濁培養下での増殖のためにサブクローニングされた293細胞、Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK、ATCC CCL 10）、チャニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR（CHO、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)）；マウスセルトリ細胞（TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)）、サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL 70）、アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO - 76、ATCC CRL - 1587）、ヒト子宮頸癌腫細胞（HELA、ATCC CCL 2）、イヌ腎臓細胞（MDCK、ATCC CCL 34）、パッファローラット肝細胞（BRL 3A、ATCC CRL 1442）、ヒト肺細胞（W138、ATCC CCL 75）、ヒト肝細胞（Hep G2、HB 8065）、マウス乳房腫瘍（MMT 060562、ATCC CCL 51）、TRI細胞（Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)）；MRC 5細胞；FS4細胞；CHOK1または誘導体及びヒト肝臓癌株（Hep G2）である。

【0189】

宿主細胞は、抗体産生のために上述の発現またはクローニングベクターで形質転換され、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅に適切なものとして修飾された従来の栄養素培地中で培養される。

【0190】

h) 宿主細胞の培養

本発明の抗体を産生するために使用される宿主細胞は、多様な培地中で培養され得る。Ham's F10 (Sigma)、最小必須培地（MEM）、Sigma）、RPMI - 1640 (Sigma)、及びダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、Sigma）等の市販の培地が、宿主細胞の培養に好適である。加えて、Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)、米国特許第4,767,704号、同第4,657,866号、同第4,927,762号、同第4,560,655号、もしくは同第5,122,469号、WO 90 / 03430、WO 87 / 00195、または米国特許第30,985号に記載の培地のうちのいずれも、宿主細胞のための培地として使用され得る。これらの培地のいずれにも、必要に応じて、ホルモン及び／または他の増殖因子（インスリン、トランスフェリン、または上皮増殖因子等）、塩（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩等）、緩衝液（HEPES等）、ヌクレオチド（アデノシン及びチミジン等）、抗生物質（GENTAMYCIN（商標）薬等）、微量要素（マイクロモルの範囲の最小濃度で通常存在する無機化合物と定義される）、及びグルコースまたは同等のエネルギー源が補充され得る。任意の他の補充物もまた、当業者には既知であろう適切な濃度で含まれ得る。温度、pH等の培養条件は、発現のために選択された宿主細胞にこれまでに使用されているものであり、当業者には明らかであろう。

【0191】

i) 抗体の精製

組換え技法を使用するとき、抗体は、細胞内、または培地に直接分泌され得る。抗体が

細胞内で産生される場合、第1のステップとして、微粒子残屑（宿主細胞または溶解断片のいずれか）が、例えば、遠心分離または限外濾過により除去され得る。抗体が培地に分泌される場合、かかる発現系の上清は、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用して、まず濃縮され得る。タンパク質分解を阻害するためのPMSF等のプロテアーゼ阻害剤が前述のステップのうちのいずれかに含まれてもよく、外来性夾雑物の成長を阻止するための抗生物質が含まれてもよい。

【0192】

細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及び親和性クロマトグラフィーを使用して精製することができ、親和性クロマトグラフィーが典型的な精製技術である。親和性リガンドとしてのプロテインAの好適性は、抗体内に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプに応じて異なる。プロテインAは、ヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、または $\gamma 4$ 重鎖に基づく抗体を精製するために使用され得る（Lindmark et al., J. Immunol. Methods 62: 1-13 (1983)）。プロテインGが全てのマウスアイソタイプ及びヒト $\gamma 3$ に推奨される（Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)）。親和性リガンドが結合するマトリックスは、アガロースであり得るが、他のマトリックスも利用可能である。孔制御ガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼン等の機械的に安定なマトリックスは、アガロースで達成可能なものよりも速い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がCH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX（商標）樹脂（J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.）が精製に有用である。タンパク質精製のための他の技法、例えば、イオン交換カラム上での分別、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上でのクロマトグラフィー、ヘパリン上でのクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂（ポリアスバラギン酸カラム等）上でのSEPHAROSE（商標）クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿も、回収される抗体に応じて利用可能である。

【0193】

任意の予備精製ステップ（複数可）後、目的とする抗体及び夾雑物を含む混合物が、例えば、約2.5～4.5のpHの溶出緩衝液を使用して、低塩濃度（例えば、約0～0.25Mの塩）で行われる、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーによってさらなる精製に供され得る。

【0194】

一般に、研究、試験、及び臨床で使用するための抗体を調製するための様々な方法論が当該技術分野で十分に確立されており、上述の方法論と一致しており、かつ/または当業者により目的とする特定の抗体に適切であると見なされる。

【0195】

IV. 組成物

本明細書に記載される抗ヒブシン抗体の組成物または製剤は、所望の程度の純度を有する抗体を、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、1つ以上の任意の許容される担体と混合することによって調製される（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）。許容される担体は、緩衝液、例えばリン酸、クエン酸、及び他の有機酸；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えば、アクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルもしくはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスバラギ

ン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに/または非イオン性界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）が含まれるが、これらに限定されない。本明細書における例示的な許容される担体は、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（SHASEGP）、例えば、rHuPH20（HYLENE X（登録商標）、Baxter International, Inc.）等のヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質等の分散剤をさらに含む。rHuPH20を含む、ある特定の例示的なSHASEGP及び使用方法が、米国特許公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載されている。

10

【0196】

例示的な凍結乾燥抗体製剤が、米国特許第6,267,958号に記載されている。水性抗体製剤としては、米国特許第6,171,586号及びWO2006/044908に記載されるものが含まれ、後者の製剤にはヒスチジン-酢酸緩衝液が含まれる。

【0197】

本明細書における組成物はまた、必要に応じて、2つ以上の活性成分（例えば、検出剤、二次薬剤等）を含み得る。かかる活性成分は、好適には、意図される目的のために有効な量で組み合わせで存在する。

【0198】

抗ヒブシン抗体は、例えば、コアセルベーション技法もしくは界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセル及びポリ-（メチルメタシレート（methylmethacrylate））マイクロカプセル中、コロイド薬物送達系（例えば、リボソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）中、またはマイクロエマルジョン中に封入され得る。かかる技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.（1980）に開示されている。

20

【0199】

徐放性調製物が調製され得る。徐放性調製物の好適な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、これらのマトリックスは、成形物品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。

30

【0200】

インビボ投与に使用される製剤は、一般に、滅菌のものである。滅菌性は、例えば、滅菌濾過膜を介した濾過によって容易に達成され得る。

【0201】

V. 診断及び検出のための方法及び組成物

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗ヒブシン抗体はいずれも、試料中のヒブシン含有ポリペプチドの存在の検出に有用である。本明細書で使用される場合、「検出すること」という用語は、定量または定性検出を包含する。ある特定の実施形態において、試料は生体試料である。実施形態において、生体試料は、細胞、または臓器からの組織等の組織を含む。いくつかの実施形態において、組織は、乳房組織、皮膚組織、脳組織、肝臓組織、腎臓組織、卵巣組織、子宮組織、頸部組織、心臓組織、肺組織、またはリンパ系組織であるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、細胞は、循環腫瘍細胞、組織から単離された細胞、細胞株であるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、生体試料は、洗浄液、細胞溶解物、血漿、血液、または血清等の流体である。本明細書に記載される試料は、試料中のポリペプチドの検出を可能にするために、当該技術分野で常法を用いてプロセスされる。

40

【0202】

一実施形態において、診断または検出方法において使用するための抗ヒブシン抗体が提

50

供される。さらなる態様では、試料中のヒブシン含有ポリペプチドの存在の検出方法が提供される。ある特定の実施形態において、本方法は、ヒブシン含有ポリペプチドへの抗ヒブシン抗体の結合を許容する条件下で、試料を本明細書に記載される抗ヒブシン抗体と接触させることと、抗ヒブシン抗体とヒブシン含有ポリペプチドとの間で複合体が形成されるかどうかを検出することと、を含む。さらなる態様では、試料中のデオキシヒブシン含有ポリペプチドの存在の検出方法が提供される。ある特定の実施形態において、本方法は、デオキシヒブシン含有ポリペプチドへの抗ヒブシン抗体の結合を許容する条件下で、試料を本明細書に記載される抗ヒブシン抗体と接触させることと、抗ヒブシン抗体とデオキシヒブシン含有ポリペプチドとの間で複合体が形成されるかどうかを検出することと、を含む。かかる方法は、インビトロ方法またはインビボ方法であり得る。一実施形態において、例えば、ポリペプチド中のヒブシン及び/またはデオキシヒブシンが患者の選択のためのバイオマーカーである場合、抗ヒブシン抗体を使用して、治療薬を用いた療法に適切な対象を選択する。

10

20

30

40

50

【0203】

ある特定の実施形態において、検出剤を含むまたは検出剤に結合している（本明細書では、「複合される」とも称される）抗ヒブシン抗体が提供される。検出剤（本明細書では、「標識」とも称される）としては、直接的に検出される標識または部分（例えば、蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、及び放射性標識等）、ならびに例えば、酵素反応または分子相互作用を介して間接的に検出される部分、例えば、酵素またはリガンドが含まれるが、これらに限定されない。例示的な標識としては、放射性同位体³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及び¹³¹I、希土類キレートまたはフルオレセイン等のフルオロフォア及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリ性ホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化する酵素（HRP、ラクトペルオキシダーゼ、またはミクロペルオキシダーゼ等）とカップリングした複素環オキシダーゼ、例えば、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定フリーラジカル、ジゴキシゲニン等が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、検出剤は、化学発光基質、発色団、発蛍光団、磁性粒子、染料、放射標識、または酵素である。

【0204】

抗ヒブシン抗体または二次薬剤（例えば、抗体）の検出剤への複合化は、免疫アッセイ技法における標準の操作手技である。例えば、O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in *Methods in Enzymology*, ed. J. J. Langone 及び H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, N.Y., 1981), pp. 147-166 を参照されたい。標識部分をタンパク質またはポリペプチドに共有結合させる従来の方法が利用可能である。例えば、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビス-イミデート、ビス-ジアゾ化ベンジジン等のカップリング剤を使用して、抗体を、上述の蛍光標識、化学発光標識、及び酵素標識で標識化することができる。例えば、米国特許第3,940,475号（蛍光測定法）及び米国特許第3,645,090号（酵素）、Hunter et al., 1962, *Nature*, 144:945、David et al., 1974, *Biochemistry*, 13:1014-1021、Pain et al., 1981, *J. Immunol. Methods*, 40:219-230、及び Nygren J., 1982, *Histochem. and Cytochem.*, 30

: 407 - 412 を参照されたい。

【0205】

いくつかの実施形態において、ヒブシンを含有するポリペプチド及び／またはデオキシヒブシンに結合した抗ヒブシン抗体は、二次薬剤を使用して検出される。二次薬剤は、抗体の検出のために当該技術分野で日常的に使用される任意の薬剤であり得る。いくつかの実施形態において、二次薬剤は、抗体である。いくつかの実施形態において、二次薬剤は、本明細書に記載される検出剤に結合している。

【0206】

一態様において、本発明は、試料中のヒブシン含有ポリペプチドを検出するための方法を提供し、本方法は、(a) 試料を本明細書に記載される抗ヒブシン抗体と接触させるステップと、(b) 試料中のポリペプチドに結合した抗ヒブシン抗体を検出するステップと、を含む。いくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、本明細書に記載される検出剤に結合している。いくつかの実施形態において、ポリペプチドに結合した抗ヒブシン抗体は、本明細書に記載される二次薬剤を使用して検出される。いくつかの実施形態において、検出剤は、化学発光基質、発色団、発蛍光団、磁性粒子、染料、放射標識、または酵素である。いくつかの実施形態において、検出は、酵素結合免疫吸着測定法、放射免疫測定法、免疫沈殿法、クロマトグラフィー、免疫組織化学法、免疫蛍光検査法、表面プラズモン共鳴法、蛍光標識細胞分取法、及び質量分析法からなる群から選択されるであるが、これらに限定されない、本明細書に記載される1つ以上のアッセイによる。いくつかの実施形態において、試料は、本明細書に記載される生体試料である。いくつかの実施形態において、生体試料は、細胞または組織を含む。いくつかの実施形態において、生体試料は、流体である。

【0207】

一態様において、本発明は、試料中のデオキシヒブシン含有ポリペプチドを検出するための方法を提供し、本方法は、(a) 試料を本明細書に記載される抗ヒブシン抗体と接触させるステップと、(b) 試料中のポリペプチドに結合した抗ヒブシン抗体を検出するステップと、を含む。いくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、本明細書に記載される検出剤に結合している。いくつかの実施形態において、ポリペプチドに結合した抗ヒブシン抗体は、本明細書に記載される二次薬剤を使用して検出される。いくつかの実施形態において、検出剤は、化学発光基質、発色団、発蛍光団、磁性粒子、染料、放射標識、または酵素である。いくつかの実施形態において、検出は、酵素結合免疫吸着測定法、放射免疫測定法、免疫沈殿法、クロマトグラフィー、免疫組織化学法、免疫蛍光検査法、表面プラズモン共鳴法、蛍光標識細胞分取法、及び質量分析法からなる群から選択されるであるが、これらに限定されない、本明細書に記載される1つ以上のアッセイによる。いくつかの実施形態において、試料は、本明細書に記載される生体試料である。いくつかの実施形態において、生体試料は、細胞または組織を含む。いくつかの実施形態において、生体試料は、流体である。

【0208】

当該技術分野で既知の方法を使用して、抗ヒブシン抗体とヒブシン及び／またはデオキシヒブシン含有ポリペプチドとの間の結合を検出することができる。ELISA、表面プラズモン共鳴法(例えば、BIAcore(登録商標))、ImmunoCap(登録商標)、RIA(放射免疫測定法)、免疫沈殿法、クロマトグラフィー、免疫組織化学法、免疫蛍光検査法、蛍光標識細胞分取法、及び質量分析法アッセイを使用してもよい。アッセイは、同種、半同種、または非同種であり得る。例えば、ほとんどのELISAは、標的タンパク質の補足及び検出のために抗体及び／またはリガンドを使用する。これらのELISAは、同種、半同種、または非同種のアッセイ形式を使用して、感度を最大にする、またはマトリックス干渉を軽減することができる。

【0209】

同種アッセイは、捕捉剤(例えば、抗ヒブシン抗体)及び検出剤(例えば、検出剤、二次薬剤等)の両方が液相反応で標識タンパク質(例えば、ヒブシン及び／またはデオキシ

10

20

30

40

50

ヒブシン含有ポリペプチド)を含有するマトリックス試料で同時にブレインキュベートする形式を使用する。次いで、捕捉剤 - 標的タンパク質 - 検出剤の複合体は、固相(ストレプトアビジンでコーティングしたELISAプレート)上で捕捉し、洗浄し、表面に捕捉された検出剤の量を検出することによって(例えば、検出剤が酵素である場合、適切な基質溶液の添加によって)定量化する。半同種アッセイは、捕捉剤のみが液相反応でマトリックス試料とともにブレインキュベートされる形式を使用する。次いで、この捕捉剤 - 標的タンパク質の複合体を、固相上に捕捉し、洗浄し、次いで、検出剤とともにインキュベートし、洗浄し、定量化する。非同種アッセイは、いかなる液相のブレインキュベーションステップも使用しないが、その代わりに、連続ステップを使用する。捕捉剤を固相に捕捉し、洗浄し、標的タンパク質を含有するマトリックス試料を添加し、捕捉剤によって結合し、洗浄し、検出試薬によって結合し、洗浄し、最終的に定量化する。

10

【0210】

捕捉試薬(例えば、抗ヒブシン抗体)は、アッセイ手順前の、不水溶性マトリックスまたは表面への吸着(米国特許第3,720,760号)、または米国特許第3,645,852号もしくはRotmans et al., 1983, J. Immunol. Methods, 57:87-98に記載される、例えば、硝酸及び還元剤で支持体の事前活性化を行うもしくはこの事前活性化を行わない、例えば、グルタルアルデヒドもしくはカルボジイミド架橋結合を用いることによる非共有もしくは共有結合のような、あるいはアッセイ手順後の、捕捉試薬を不溶性にすることによって固相に固定化され得る。いくつかの実施形態において、固定化後に捕捉試薬(例えば、抗ヒブシン抗体)は、試料からの標

20

【0211】

本明細書に記載される任意の固相または表面(小シート、Sephadex、塩化ポリビニル、プラスチックビーズ、微小粒子、アッセイプレート、またはポリスチレンから製造される試験管、及びポリスチレン)は、本明細書の方法のいくつかの実施形態において使用され得る。固定化のために使用される固相または表面は、例えば、表面、粒子、多孔質マトリックス、セルロースポリマースポンジ(ImmunoCAP(登録商標)、Phadia)等の形態の支持体を含む、本質的に水不溶性であり、かつ免疫測定アッセイに有用な任意の不活性支持体または担体であり得る。一般に使用されている支持体の例としては、小シート、Sephadex、ポリ塩化ビニル、プラスチックビーズ、微小粒子、アッセイプレート、またはポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン等から製造された試験管が挙げられる。かかる支持体としては、96ウェルマイクロタイタープレート、ならびに濾紙等の粒子材料、アガロース、架橋デキストラン、及び他の多糖が挙げられる。あるいは、米国特許第3,969,287号、同第3,691,016号、同第4,195,128号、同第4,247,642号、同第4,229,537号、及び同第4,330,440号に記載の反応性水不溶性マトリックス、例えば、臭化シアン活性化炭水化合物及び反応性基質が、捕捉試薬固定化に好適に用いられる。ある実施形態において、固定化捕捉試薬は、一度にいくつかの試料を分析するために使用され得るマイクロタイタープレート、好ましくはマルチウェルマイクロタイタープレート上にコーティングされる。

30

40

【0212】

固相は、非共有結合もしくは共有結合相互作用、または所望の場合、物理的結合によって結合し得る、捕捉試薬(例えば、抗ヒブシン抗体)でコーティングされる。結合技法としては、米国特許第4,376,110号及びそこに引用される参考文献に記載のものが挙げられる。プレートに対して捕捉試薬の共有結合が用いられる場合、プレートまたは他の固相は捕捉試薬とともに架橋剤とインキュベートすることができる。固相基質に捕捉試薬を付着するために一般的に用いられる架橋剤には、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシサクシンイミドエステル類、例えば4-アジドサリチル酸を有するエステル類、3,3'-ジチオビス(サクシンイミドイルプロピオネート)等のジサクシンイミドイルエステル類、及びビス-N-

50

マレイミド - 1 , 8 - オクタン等の二官能性マレイミド類を含むホモ二官能性イミドエステルが含まれる。メチル - 3 - [(p - アジドフェニル) ジチオ] プロピオイミデート等の誘導体化剤は、光の存在下で架橋を形成することが可能である、光活性化することができ、中間体を産出する。コーティングされた固相材料は、典型的には、結合部位に非特異的に結合してプレートのウェル上の過剰な結合部位への遊離分析分子の望ましくない結合を阻止するための結合部位を飽和させる遮断剤で処理される。適切な遮断剤の例としては、例えば、ゼラチン、ウシ血清アルブミン、卵アルブミン、カゼイン、及び脱脂乳が含まれる。遮断処理は、典型的には、約 1 ~ 4 時間、好ましくは約 1 . 5 ~ 3 時間、周囲温度の条件下で行われる。

【 0 2 1 3 】

分析される本明細書に記載される試料は、必要に応じて希釈し、固定化プレートに添加され得る。希釈に使用され得る緩衝液としては、例えば、(a) 0 . 5 % B S A、0 . 0 5 % T W E E N 2 0 (商標)、洗剤 (P 2 0)、5 m M E D T A、0 . 2 5 % C h a p s 界面活性剤、0 . 2 % ベータ - ガンマグロブリン、及び 0 . 3 5 M N a C l、p H 7 . 0 を含有するリン酸緩衝生理食塩水 (P B S)、(b) 0 . 5 % B S A 及び 0 . 0 5 % P 2 0 を含有する P B S、(c) 0 . 5 % B S A、0 . 0 5 % P 2 0、5 m M E D T A、及び 0 . 3 5 M N a C l、p H 6 . 3 5 を含有する P B S、(d) 0 . 5 % B S A、0 . 0 5 % P 2 0、5 m M E D T A、0 . 2 % ベータ - ガンマグロブリン、及び 0 . 3 5 M N a C l を含有する P B S、(e) 0 . 5 % B S A、0 . 0 5 % P 2 0、5 m M E D T A、0 . 2 5 % C h a p s、及び 0 . 3 5 M N a C l を含有する P B S、及び (f) 0 . 5 % P 2 0 を含有する P B S が挙げられる。

【 0 2 1 4 】

本明細書に記載される試料及び捕捉試薬 (例えば、ヒブシン抗体) のインキュベーションの条件は、アッセイの感度を最大にし、解離を最小限に抑えるように選択される。インキュベーション時間は、主に温度に応じて異なる。

【 0 2 1 5 】

本明細書に記載される方法で使用されるインキュベーション緩衝液の p H は、捕捉される分析物 (例えば、ヒブシンを含有するポリペプチド) に捕捉試薬 (例えば、抗ヒブシン抗体) が特異的に結合するための有意なレベルを維持するように選択する。いくつかの実施形態において、インキュベーション緩衝液の p H は、約 6 ~ 9 . 5 (約 6 ~ 7 の p H を含む) である。いくつかの実施形態において、インキュベーション緩衝液の p H は、約 7 . 2 である。ホウ酸塩、リン酸塩、炭酸塩、トリス - H C l もしくは T n s - リン酸塩、アセテート、バルビタール等を含む、様々な緩衝液を使用して、このステップの間に所望の p H に達し、維持することができる。通常、用いられる特定の緩衝液は重要でないが、それぞれのアッセイで、2 以上の緩衝液よりも 1 つの緩衝液が好ましい場合がある。

【 0 2 1 6 】

試料は、洗浄溶液を用いて固定化捕捉試薬 (例えば、抗ヒブシン抗体) から分離して、システムから、ヒブシン及び / またはデオキシヒブシンを含有しないポリペプチド等の非特異的分子を除去することができる。洗浄溶液は、通常、緩衝液である。上述のインキュベーション緩衝液は、好適な洗浄溶液である。洗浄溶液の p H は、インキュベーション緩衝液に対して上述のように決定される。ある実施形態において、洗浄溶液の p H は、約 6 ~ 9、より好ましくは約 6 ~ 7 である。洗浄は、1 つ以上行われ得る。洗浄溶液の温度は、約 0 ~ 4 0、より好ましくは約 4 ~ 3 0 であるであり得る。自動プレート洗浄機を利用することができる。

【 0 2 1 7 】

系から、ヒブシン及び / またはデオキシヒブシンを含有しないポリペプチド等の非特異的分子の除去後に、捕捉分析物分子 (例えば、ヒブシン及び / またはデオキシヒブシン含有ポリペプチド) は、検出剤と接触され得る。分析物分子を検出剤と接触させるための温度及び時間は、主に用いられる検出手段に応じて異なる。例えば、ストレプトアビジンに

10

20

30

40

50

コンジュゲートした西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) (SA-HRP) が検出手段として用いられる場合には、検出剤は、約 0.5 ~ 2 時間、より好ましくは約 1 時間、捕捉された分析物とインキュベートするのが好ましい。系から結合しない検出剤を除去するために上記の通りに系を洗浄し、ペルオキシダーゼ基質を加えて反応させ、室温で約 15 分間、または色が十分に可視化されるまでプレートをインキュベートすることによって発色させる。ある実施形態において、結合していない分析物が系から洗浄された後に、過剰モルの検出剤が系に加えられる。

【0218】

捕捉試薬 (例えば、抗ヒブシン抗体) に結合した (例えば、ヒブシン及び / またはデオキシヒブシン含有ポリペプチド) の量は、固定化相から結合していない検出剤を洗浄して、標識に適切である検出法を用いて分析物に結合した検出剤の量を計量することによって決定される。ある実施形態において、標識部分は、酵素である。酵素部分の場合、発色色素の量が、捕捉された分析物の量の直接の測定値である。例えば、HRP が標識部分である場合、色素は、(例えば、450 nm で) の吸光度で光学密度 (O.D.) を定量化することによって検出される。別の実施形態において、捕捉試薬に結合した分析物の量は、間接的に測定される。非標識の検出剤のシグナルは、標識部分に複合化される抗検出剤抗体を用いた検出のために増幅することができる。例えば、標的分子を結合する非標識マウス抗体のシグナルは、HRP で標識したヒツジ抗マウス IgG 抗体を用いて増幅することができる。標識部分は、標識に適切である検出法を用いて検出される。例えば、HRP は、比色基質と HRP とを反応させ、450 nm 吸光度で反応した基質の光学密度を測定することによって検出することができる。

10

20

【0219】

システムの pH 及び / または温度を、標的分子を結合する分子を特定するために変更することができる。

【0220】

陽性対照を、アッセイを構築し、アッセイの感度を評価するために使用してもよく、及び / またはアッセイのための対照を使用してもよい。陽性対照を、本明細書に記載される方法のうちのいずれかで使用してもよい。いくつかの実施形態において、アッセイは、デオキシヒブシンに結合しない陽性対照抗ヒブシン抗体を試験することを含む。いくつかの実施形態において、アッセイは、ヒブシンに結合する陽性対照抗ヒブシン抗体を試験することを含む。いくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体の試料中のヒブシン及び / またはデオキシヒブシン含有ポリペプチドへの結合及び陽性対照抗体のヒブシン及び / またはデオキシヒブシン含有ポリペプチドへの結合が、検出され、比較される。

30

【0221】

陰性対照を、アッセイを構築し、アッセイの感度を評価するために使用してもよく、及び / またはアッセイのための対照を使用してもよい。陰性対照を、本明細書に記載される方法のうちのいずれかで使用してもよい。いくつかの実施形態において、アッセイは、デオキシヒブシンに結合しない陰性対照抗ヒブシン抗体を試験することを含む。いくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体の試料中のヒブシン及び / またはデオキシヒブシン含有ポリペプチドへの結合及び陰性対照抗体のヒブシン及び / またはデオキシヒブシン含有ポリペプチドへの結合が、検出され、比較される。

40

【0222】

一態様において、本発明は、試料中のヒブシン含有ポリペプチドを検出するための方法を提供し、本方法は、(a) 試料を本明細書に記載される抗ヒブシン抗体と接触させるステップと、(b) 抗体に結合したポリペプチドを単離するステップと、を含む。いくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、本明細書に記載される検出剤に結合している。いくつかの実施形態において、ポリペプチドに結合した抗ヒブシン抗体は、本明細書に記載される二次薬剤を使用して検出される。いくつかの実施形態において、検出剤は、化学発光基質、発色団、発蛍光団、磁性粒子、染料、放射標識、または酵素である。いくつかの実施形態において、検出は、酵素結合免疫吸着測定法、放射免疫測定法、免疫沈殿法、

50

クロマトグラフィー、免疫組織化学法、免疫蛍光検査法、表面プラズモン共鳴法、蛍光標識細胞分取法、及び質量分析法からなる群から選択されるのであるが、これらに限定されない、本明細書に記載される1つ以上のアッセイによる。いくつかの実施形態において、該抗体は、本明細書に記載される固体表面に固定化される。いくつかの実施形態において、試料は、本明細書に記載される生体試料である。いくつかの実施形態において、生体試料は、細胞または組織を含む。いくつかの実施形態において、生体試料は、流体である。

【0223】

一態様において、本発明は、試料中のデオキシヒブシン含有ポリペプチドを単離するための方法を提供し、本方法は、(a)試料を本明細書に記載される抗ヒブシン抗体と接触させるステップと、(b)抗体に結合したポリペプチドを単離するステップと、を含む。いくつかの実施形態において、抗ヒブシン抗体は、本明細書に記載される検出剤に結合している。いくつかの実施形態において、ポリペプチドに結合した抗ヒブシン抗体は、本明細書に記載される二次薬剤を使用して検出される。いくつかの実施形態において、検出剤は、化学発光基質、発色団、発蛍光団、磁性粒子、染料、放射標識、または酵素である。いくつかの実施形態において、検出は、酵素結合免疫吸着測定法、放射免疫測定法、免疫沈殿法、クロマトグラフィー、免疫組織化学法、免疫蛍光検査法、表面プラズモン共鳴法、蛍光標識細胞分取法、及び質量分析法からなる群から選択されるのであるが、これらに限定されない、本明細書に記載される1つ以上のアッセイによる。いくつかの実施形態において、該抗体は、本明細書に記載される固体表面に固定化される。いくつかの実施形態において、試料は、本明細書に記載される生体試料である。いくつかの実施形態において、生体試料は、細胞または組織を含む。いくつかの実施形態において、生体試料は、流体である。

10

20

【0224】

ヒブシン含有ポリペプチド及びデオキシヒブシン含有ポリペプチドは、本明細書に記載されるもののような当該技術分野での標準技法を用いて単離することができる。例えば、ヒブシン含有ポリペプチド及びデオキシヒブシン含有ポリペプチドは、免疫親和性またはイオン交換カラム、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカまたは陽イオン交換樹脂でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈殿、及びゲル濾過によって単離することができる。

30

【0225】

単離されたヒブシン含有ポリペプチド及びデオキシヒブシン含有ポリペプチドは、当該技術分野での標準技法を用いて特定することができる。例えば、単離されたポリペプチドのアミノ酸配列が、標準的なシーケンシング法によって得られ得る。別例として、単離されたポリペプチドの物理的特性もまた、質量分析法を用いることによって決定することができる。

【0226】

VI. 製品またはキット

本発明はまた、本明細書に記載される方法で用いるためのキットも提供する。

【0227】

一態様において、本発明は、本明細書に記載される抗ヒブシン抗体またはその組成物を含むキットを提供する。いくつかの実施形態において、キットは、試料中のヒブシン含有ポリペプチドを検出するための方法において、抗ヒブシン抗体の使用のための1つ以上の薬剤をさらに含む。いくつかの実施形態において、キットは、試料中のデオキシヒブシン含有ポリペプチドを検出するための方法において、抗ヒブシン抗体の使用のための1つ以上の薬剤をさらに含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の薬剤は、本明細書に記載される緩衝液、固体表面、検出剤、二次薬剤、陽性対照、または陰性対照である。いくつかの実施形態において、陽性対照は、ヒブシン含有ポリペプチドを含む。本明細書のいくつかの実施形態において、陰性対照は、非ヒブシン含有ポリペプチドを含む。本明細書のいくつかの実施形態において、陽性対照は、デオキシヒブシン含有ポリペプチドである。本明細書のいくつかの実施形態において、陰性対照は、非デオキシヒブシン含有ポリペ

40

50

プチドである。いくつかの実施形態において、試料は、生体試料である。いくつかの実施形態において、生体試料は、細胞または組織を含有する。いくつかの実施形態において、生体試料は、流体である。

【0228】

一態様において、本発明は、本明細書に記載される抗ヒブシン抗体またはその組成物を含むキットを提供する。いくつかの実施形態において、キットは、試料中のヒブシン含有ポリペプチドを単離するための方法において、抗ヒブシン抗体の使用のための1つ以上の薬剤をさらに含む。いくつかの実施形態において、キットは、試料中のデオキシヒブシン含有ポリペプチドを単離するための方法において、抗ヒブシン抗体の使用のための1つ以上の薬剤をさらに含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の薬剤は、本明細書に記載される緩衝液、固体表面、検出剤、二次薬剤、陽性対照、または陰性対照である。いくつかの実施形態において、陽性対照は、ヒブシン含有ポリペプチドを含む。本明細書のいくつかの実施形態において、陰性対照は、非ヒブシン含有ポリペプチドを含む。本明細書のいくつかの実施形態において、陽性対照は、デオキシヒブシン含有ポリペプチドである。本明細書のいくつかの実施形態において、陰性対照は、非デオキシヒブシン含有ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、試料は、生体試料である。いくつかの実施形態において、生体試料は、細胞または組織を含有する。いくつかの実施形態において、生体試料は、流体である。

10

【0229】

本明細書の実施形態のうちのいくつかにおいて、キットは、本明細書に記載される検出剤に結合した抗ヒブシン抗体を含む。いくつかの実施形態において、検出剤は、化学発光基質、発色団、発蛍光団、磁性粒子、染料、放射標識、または酵素である。

20

【0230】

本発明のキットは、本明細書に記載される方法のうちのいずれかに従って用いるための任意の取扱説明書をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態において、取扱説明書は、本明細書に記載される任意の方法に従って、試料中のヒブシン含有ポリペプチドを抗ヒブシン抗体で検出する説明を含む。いくつかの実施形態において、取扱説明書は、本明細書に記載される任意の方法に従って、試料中のヒブシン含有ポリペプチドを抗ヒブシン抗体で単離する説明を含む。いくつかの実施形態において、取扱説明書は、本明細書に記載される任意の方法に従って、試料中のデオキシヒブシン含有ポリペプチドを抗ヒブシン抗体で検出する説明を含む。いくつかの実施形態において、取扱説明書は、本明細書に記載される任意の方法に従って、試料中のデオキシヒブシン含有ポリペプチドを抗ヒブシン抗体で単離する説明を含む。取扱説明書は、ラベルまたは添付文書上に提供され得る。キットは、本明細書に記載される方法を実行するために、緩衝液及び試薬等のさらなる構成成分を任意に含み得る。

30

【0231】

キットの試薬（抗ヒブシン抗体等）は、容器内にあってもよい。本発明のキットは、好適な包装内にある。好適な包装としては、バイアル、瓶、ジャー、可撓性パッケージング（例えば、密封Mylarまたはプラスチックバッグ）等が挙げられるが、これらに限定されない。ELISAアッセイにおいてシグナル検出のためのデバイス等の特定のデバイスと組み合わせて使用する包装も企図される。

40

【0232】

以下は、本発明の方法及び組成物の例である。上述の概要を得ると、様々な他の実施形態が実施されることが理解される。

【実施例】

【0233】

実施例1：抗ヒブシン抗体の特定及び特性評価

周囲のアミノ酸配列に最低限依存してポリペプチド中のヒブシンに結合する抗ヒブシン抗体が生成された。かかる抗ヒブシン抗体はまた、本明細書において、「汎抗ヒブシン抗体」と称される。

50

【 0 2 3 4 】

材料及び方法

F a b 産生及び精製

劇的に改善された収率及び95%超の純度を有するヒブシン化ペプチドの自動化固相合成のために直角に保護されているヒブシン試薬が、これまでに開発されている (Song et al., J. Org. Chem., 80: 3677-3681, 2015)。汎ヒブシン抗体を生成するために、10匹のウサギを、キーホールリンペットヘモシアニンまたはチログロブリンに複合化したI1及びI2ペプチド (YenZym Antibodies, South San Francisco, CA) のカクテルで免疫化した。ブースト間の3週間で3ラウンドの免疫付与後、ウサギを、対応する非ヒブシン化ペプチドを上回るヒブシン含有ペプチドへの結合のそれらの選択性について、ELISAによってスクリーニングした。結合の最高の選択性を有する4匹のウサギを、1つのさらなるラウンドの免疫化に供した。次いで、ウサギモノクローナル抗体を生成した (Abcam, Burlingame, CA) (Chen et al., J. Virol., 87: 10232-10243, 2013)。ハイブリドーマウエルからの上清を、ヒブシン化及び一致した非ヒブシン化ペプチドへの結合のために、ELISAによってスクリーニングした (表1)。隣接する配列を有するヒブシン化ペプチドの全てに結合することができた5つのハイブリドーマクローンである、例えば、ヒブシン化eIF5Aペプチドを、さらなる特性評価のために選択した。

表 1. ヒブシン化ペプチド¹の概要

用途及びペプチド名	ペプチド配列	配列番号
免疫付与		
I 1	Hpu-peg ₆ -C	配列番号 5 4
I 2	GSG-Hpu-GSG-peg ₆ -C	配列番号 5 5
スクリーニング		
P 1 - H p u	ビオチン-peg ₆ -GSG-Hpu-GSG	配列番号 5 6
P 1 - デオキシ	ビオチン-peg ₆ -GSG-デオキシHpu-GSG	配列番号 5 7
P 1	ビオチン-peg ₆ -GSG-K-GSG	配列番号 5 8
P 2 - H p u	ビオチン-peg ₆ -STSKTG-Hpu-HGHAK	配列番号 5 9
P 2 - デオキシ	ビオチン-peg ₆ -STSKTG-デオキシHpu-HGHAK	配列番号 6 0
P 2	ビオチン-peg ₆ -STSKTG-K-HGHAK	配列番号 6 1
P 3 - H p u	ビオチン-GG-DEEAL-Hpu-QLAEWVS	配列番号 6 2
P 3	ビオチン-GG-DEEAL-K-QLAEWVS	配列番号 6 3
P 4 - H p u	ビオチン-GG-AAAA-Hpu-AAAA-Hpu-AA AA-Hpu-A	配列番号 6 4
P 4	ビオチン-GG-AAAA-Hpu-AAAA-K-AAAA -Hpu-A	配列番号 6 5
P 5 - H p u	GW-Hpu-PMSRSSGRVYYFNGG-ビオチン	配列番号 6 6
P 5	GW-K-PMSRSSGRVYYFNGG-ビオチン	配列番号 6 7
P 6 - H p u	ビオチン-GGLLELD-Hpu-WASLW	配列番号 6 8
P 6	ビオチン-GGLLELD-K-WASLW	配列番号 6 9
結晶化		
C 1	GSG-Hpu-GSG	配列番号 7 0
C 2	GSG-デオキシHpu-GSG	配列番号 7 1

10

20

30

40

50

¹ peg₆ は、ポリエチレングリコールを示し、Hpu は、ヒブシンを示し、デオキシHpu は、デオキシヒブシンを示す。ペプチドのアミノ末端は、ビオチンまたはアセチル基によって遮断される。ペプチドのカルボキシ末端は、アセチル基によって覆われる。

【0235】

抗体配列は、RNeasy Miniキットを用いたRNAの抽出、SuperScript II RT-PCRシステムを用いた逆転写、SMARTer RACER 5'キット(Clontech Laboratories)を用いた増幅、及びTAKAクローニングによって得られた。CHO細胞を、プラスミドでトランスフェクトし、2週間培養した。IgGを、プロテインA親和性クロマトグラフィー(5mlのHiTrap MabSelect SuReカラム、GE Healthcare)によって精製した。Fab断片を、パイン消化によって調製した。IgG分子を、20mM リン酸塩 pH 6.5、150mM NaCl、20mM 塩酸システイン、及び4mM EDTA中の20:1のモル比のパインとインキュベートした。37℃で4時間後、30mM ヨードアセトアミドを添加することによって、反応を停止した。Fab断片を、Fc断片

及びMabSelect SuReクロマトグラフィーによって消化されないIgGから分離し、流入物を回収した。Fab断片を、10mM Tris-HCl 8.0及び100mM NaCl中のSuperDex D75カラム(GE Healthcare)上でさらに精製した。

【0236】

抗ヒブシン抗体のeIF5Aへの特異性

Flagタグ化ヒトWTまたはK50A eIF5Aを、Mycタグ化DHS及びHAタグ化DOHHとともに、ヒト胎児腎臓293T細胞内において発現させた。トランスフェクトした293T細胞を、溶解緩衝液(50mM Tris-HCl、150mM NaCl、2mM EDTA、1% Triton-X100、及びプロテアーゼ阻害剤カクテル、pH7.4)中で溶解した。上清を、遠心分離(30分、16,000g、及び4)後に回収した。次いで、試料を、各抗ヒブシンモノクローナル抗体の特異性を決定するために、ウエスタンブロット法によって分析した。

10

【0237】

結果

ヒブシンを、以前に記載のように作成し(Song et al., J. Org. Chem., 80:3677-3681, 2015)、異なるヒブシン化ペプチドのパネルを合成するために使用した(表1)。あるいは、10匹のウサギを、キーホールリンペットヘモシアニンまたはチログロブリンのいずれかに複合化したアセチル-ヒブシン-pep₆-C-アミド及びアセチル-GSG-ヒブシン-GSG-pep₆-C-アミドペプチドで免疫化した。3ラウンドの免疫付与後、10匹のウサギのうちの4匹のウサギがELISAによりそれらの非ヒブシン化対照物よりもヒブシン含有ペプチドに対してわずかに高い反応を示したため、それらをモノクローナル抗体の生成のために追求した。非精製のウサギハイブリドーマ上清を、免疫付与のために使用したヒブシン化ペプチドへの選択的結合のために、ELISAによってスクリーニングし、陽性ウェルは、異なるヒブシン化ペプチドのパネルへの結合のためにさらにスクリーニングした(表1)。7,680のうちの146のハイブリドーマ上清が、免疫付与のために使用したヒブシン化ペプチドに選択的に結合することが見出されたが、対応する非ヒブシン化ペプチドには見出されなかった。これらの146のうちの5つのハイブリドーマ上清は、対応する非ヒブシン化ペプチドに最低限結合してヒブシン化ペプチドの全てに結合した。これらの5つのウサギモノクローナル抗体を、分子クローニングし、組換え発現し、精製し、特性評価した。これらの5つのウサギのうちの3つのウサギモノクローナル抗体(mAbHp24、mAbHp91、及びmAbHp98)は、異なるヒブシン化ペプチドの全てを認識することが確認されたが、対応する非修飾ペプチドは確認されなかった(図1A~D及び図2A)。これらの結果は、これらの抗ヒブシン抗体が多く異なるヒブシン化タンパク質と相互作用する可能性があり、ヒブシン、すなわち、汎抗ヒブシン抗体の一次配列及び二次構造環境から独立していることを示唆している。

20

30

【0238】

抗ヒブシン抗体は、天然無傷eIF5Aタンパク質中のヒブシンに結合するそれらの能力について特徴付けられた。ヒト胎児腎臓293細胞を、flagタグ化野生型(またはK50A変異体)eIF5A、及び自己切断型T2Aペプチドリンカーを介してHAタグ化DOHHに融合したmycタグ化DHSをコードするプラスミドによって同時トランスフェクトした(Ryan et al., J. Gen. Virol., 72:2727-2732, 1991)(図2B)。全細胞溶解物を、抗flagまたは抗ヒブシン抗体を用いて、SDS-PAGE及びウエスタンブロット分析に供した。野生型及びK50A変異体eIF5Aタンパク質を、抗flag抗体をプロットングすることによって示されるように同様の量で発現した(図2C)。3つの抗ヒブシン抗体は、トランスフェクトした野生型eIF5Aを検出したが、ヒブシン化のために必要とされるリジンに欠いているK50A変異体を検出しなかった。抗ヒブシン抗体はまた、内在性eIF5Aを認識し、これらの大部分は、ヒブシン化されている(Park et al., PNAS, 103

40

50

: 51 - 56, 2006)。

【0239】

汎ヒプシン抗体は、その後、生合成中間体、デオキシヒプシンへの結合に対してスクリーニングした(図3A)。FabHpu91は、可変ドメインにおいて8つのアミノ酸のみがFabHpu98とは異なるが、FabHpu98のみがデオキシヒプシンに結合した(図1C~D及び図3B)。FabHpu91からの単一アミノ酸残基を、デオキシヒプシンの特異性への基盤を理解するためにFabHpu98の等価位置で導入した。FabHpu98 Y52W変異体は、バイオ層干渉分光法(Octet)によって判断されるように、FabHpu91のように、デオキシヒプシンよりヒプシンを好んだ(図3C)。FabHpu91 W52Y対照物が、作製され、デオキシヒプシンに結合する改善された能力及びヒプシンに結合する弱化した能力を有することが見出された(図3C)。それ故に、V_H Y52は、ヒプシン及びデオキシヒプシンに対する結合特異性を決定するスイッチとしての役割を果たし得る。

10

【0240】

実施例2: 抗ヒプシン抗体の親和性成熟

ファージディスプレイ技術を用いて、汎抗ヒプシン抗体の親和性をさらに増強した。

【0241】

材料及び方法

親和性成熟のためのファージディスプレイ

E. coliにおけるウサギFabHpu24及びFabHpu98のファージディスプレイを改善するために、細菌コドン最適化されたウサギFabHpu24及びFabHpu98配列を合成し(Genewiz)、ファージディスプレイベクターにクローン化した。ファージディスプレイライブラリーを、Kunkel変異誘発によって作成した(Kunkel et al., PNAS, 82: 488 - 492, 1985)。各ライブラリーにおいて、ヌクレオチド塩基と過剰量の野生型ヌクレオチドの70 - 10 - 10 - 10の混合物で合成された縮重オリゴヌクレオチドを用いて、変異を、同じCDRループ上にすべての位置に導入した。その結果として、得られたライブラリーは、約50%の頻度で野生型残基を好む。標準プロトコルに従って、すべてのファージ調製を行った(Bostrom et al., Methods Mol. Biol., 525: 353 - 376, 2009)。簡潔には、96ウェルMaxisorpプレートを、5 µg/mlのNeutrAvidinで、4で一晚コーティングし、続いて、Superblock(商標)T20(PBS)ブロッキング緩衝液で、20で1時間ブロックした。第1ラウンドでは、P1-Hpuペプチドを、500 nMの濃度で10分間振とうした後に、プレート上に捕捉した。過剰なペプチドを除去した後、100 µlのライブラリーファージ(ブロッキング緩衝液中 3×10^{12} 粒子/ml)を各ウェルに添加し、プレートを、室温で1時間インキュベートした。次いで、プレートを、PBS中の0.05%(v/v) Tween 20で10回洗浄した。結合ファージを、0.1 M HCl及び0.5 M KClで20分間プレートから溶出し、等体積の1 M Tris-HCl(pH 7.5)で中和させ、その後のラウンドのために増幅した。第2ラウンド以降は、Fab提示ファージを、まず、低下している濃度のビオチン化ペプチドと混合し、NeutrAvidinコーティングしたウェル上で15分間捕捉した。数ラウンド後に、選択されたクローンを、IgGとして再フォーマットし、Exp293細胞に一過性にトランスフェクトした(Life Technologies, Grand Island, NY)。

20

30

40

【0242】

バイオ層干渉分光法

ペプチドとFabとの間の相互作用の検出を、Octet RED 96システム(ForteBio, Menlo Park, CA)を用いて、バイオ層干渉分光法によって行った。ペプチドを、ストレプトアビジンでコーティングしたセンサチップ(ForteBio)上に固定化した。使用前に、センサチップを、1×動態緩衝液に1分間浸漬した。Fabを、200 nMの濃度に調節した。Octetに使用されるマイクロプレートを

50

、1ウェル当たり200 μ lの緩衝液または試料で充填した。データは、Octet Data Acquisition 7.0ソフトウェアによって自動作成された。

【0243】

表面プラズモン共鳴分析

表面プラズモン共鳴法データは、BiacoreモデルT200 (Biacore, Uppsala, Sweden)において測定した。Biacore CM5チップを、約300RUのNeutrAvidinでコーティングし、ビオチン化抗原を、10RU未満捕捉した。10mM HEPES pH7.4、0.15M NaCl、及び0.005% Surfactant P20中の段階希釈のFab断片を、固定化ペプチドに流し、1:1のLangmuir結合モデルを使用して、各Fab:抗原対の k_{on} 、 k_{off} 、及び K_D を計算した。

10

【0244】

eIF5Aの免疫沈殿

4つのプレート(150mm)のサブコンフルエント状態の293T細胞を回収し、5mlの氷冷溶解緩衝液(50mM Tris-HCl、150mM NaCl、2mM EDTA、1% Triton-X100、及びプロテアーゼ阻害剤カクテル、pH7.4)中で溶解した。上清を、遠心分離(30分、 5×10^4 g、4 $^{\circ}$ C)後に収集し、1、2、4、または8倍に希釈した。各希釈物からの試料(500 μ l)を、5 μ gの精製されたmAbHpu24、mAbHpu24.B、mAbHpu98、またはmAbHpu98.61が予め充填された50 μ lのプロテインAダイナビーズ(Invitrogen)に添加し、4 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートした。次いで、ビーズを、溶解緩衝液で3回洗浄し、50 μ lの1 $\times$ NuPAGE LDS試料緩衝液とともに、70 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした。電気泳動後に、タンパク質を、クマシーブルー染色によって可視化した。

20

【0245】

結果

P1ヒブシン化ペプチドに対するFabHpu98及びFabHpu24の結合親和性(K_D) (表2)は、それぞれ、約113nM及び約192nMであった。これまでの研究は、eIF5Aが多くの異なる細胞型において豊富なヒブシン化タンパク質であることを示している(Cooper et al., Cell, 29:791-797, 1982)。ヒブシンに対する抗体の高い親和性は、少量のヒブシン化タンパク質を特定する可能性を高めるために望ましい。

30

【0246】

ヒブシンを固定させるためのコア水素結合ネットワークを潜在的により良好に支持するために、工学は、末梢CDR残基に焦点を合わせた。複合体の構造に基づいて(実施例3を参照)、FabHpu24のCDRL1、L2、H2及びFabHpu98のCDRH1、H2、L3を多様化した。ビオチン-pep₆-GSG-ヒブシン-GSG(P1)ペプチド及び配列分析を用いてファージライブラリー選択の数ラウンド後に、目的とするクローンを、Fab断片としてExp293細胞中に発現し、精製し、ヒブシンへの結合についてSPRによって試験した。改善されたV_L及びV_H配列(L1、L2、H2)の組み合わせは、FabHpu24.B変異体をもたらし、これは、ヒブシン化ペプチド、P1におけるその親クローンよりも32倍高い結合親和性を有した(図1A~B)。FabHpu24.Bは、6nMの K_D でヒブシンへの特異性を維持し、デオキシヒブシンへの非常に弱い結合を有した(表2)。対照的に、FabHpu98.61を生み出すためのFabHpu98の親和性成熟により、ヒブシン(18nM K_D)及びデオキシヒブシン(20nM K_D)の両方に対して高い親和性結合をもたらした(図1C~D及び表2)。

40

表 2. 汎抗ヒブシン F a b 断片の結合定数¹

ペプチド	FabHpu24 K _D (nM)	FabHpu24. B. K _D (nM)	倍率	FabHpu98 K _D (nM)	FabHpu98. 61 K _D (nM)	倍率
P1-Hpu	192 ± 35	6 ± 2	32	119 ± 60	15 ± 3	7.9
P 1 - デ オ キシ Hpu	>1000	>1000	1	118 ± 6	17 ± 4	6.9
P1	>1000	>1000		>1000	>1000	
P2-Hpu	157 ± 12	13 ± 5	12	204 ± 40	78 ± 14	2.6
P 2 - デ オ キシ Hpu	>1000	>1000		158 ± 13	86 ± 22	1.8
P2	>1000	>1000		>1000	>1000	
P3-Hpu	>1000	186 ± 60	>5	>1000	>1000	
P3	>1000	>1000		>1000	>1000	
P4-Hpu	541 ± 331	32 ± 15	17	228 ± 43	91 ± 16	2.5
P4	>1000	>1000		>1000	>1000	
P5-Hpu	96 ± 19	7 ± 3	13	176 ± 33	70 ± 21	2.5
P5	>1000	>1000		>1000	>1000	
P6-Hpu	176 ± 55	61 ± 11	2.9	>1000	229 ± 40	> 4. 4
P6	>1000	>1000		>1000	>1000	

10

20

30

40

50

¹ H p u は、ヒブシンを示し、デオキシ H p u は、デオキシヒブシンを示す。親和性測定（平均 ± 標準偏差）は、表面プラズモン共鳴法によって行われた。結合親和性における改善倍率（「倍率」として示される）は、親及び対応する親和性成熟抗体の K_D 値の比率として計算した

【 0 2 4 7 】

構造に基づいて、変異は、末梢 C D R ループに位置し、ペプチド中の他の残基と接触することは期待されない。増加した親和性がヒブシンまたは隣接する配列との改善された相互作用によるものかどうかを評価するために、選択した F a b を、6 対のヒブシン化または非ヒブシン化ペプチドに対して評価した（図 4 A ~ B、図 5 A ~ E、及び図 6 A ~ F）。親和性成熟 I g G は、それらの親クローンよりも高い最大結合（R m a x）ですべてのヒブシン化ペプチドに結合することができるが、匹敵する非ヒブシン化ペプチドには結合することができない（表 2）。抗ヒブシン抗体は、わずかに配列選択性を有し、例えば、F a b H p u 9 8 . 6 1 は、P 3 ヒブシン含有ペプチドに弱く結合するが、一方、それは、他のペプチドに対してはるかに良好な反応を有する（図 6 A ~ F）。第三に、F a b H p u 2 4 . B は、ヒブシン化ペプチドに最良の結合を有するが、一方、F a b H p u 9 8 . 6 1 は、デオキシヒブシン含有ペプチドに結合する能力を保持する。それ故に、F a b H p u 2 4 . B と F a b H p u 9 8 . 6 1 の組み合わせは、異なる、可能性のあるヒブシン修飾タンパク質及びデオキシヒブシン修飾タンパク質の発見に好ましいと思われる。

【 0 2 4 8 】

親和性成熟抗体が、可能性のあるヒブシン化タンパク質を引き出す際に効率性の高まりをもたらすかどうかを研究するために、mAbHp u 2 4、mAbHp u 2 4 . B、mAbHp u 9 8、及びmAbHp u 9 8 . 6 1を用いて、一連の293T細胞溶解物希釈液から内在性eIF5Aタンパク質を免疫沈降した。親mAbHp u 2 4は、すべての溶解物希釈液中でeIF5Aを免疫沈降したが、一方、12倍の親和性改善を有するmAbHp u 2 4 . Bは、eIF5Aの回収を劇的に増加させた(図7A~B)。さらに、mAbHp u 9 8 . 6 1のみが、P2-Hpuペプチドへの結合において2倍の親和性改善を有したにもかかわらず、mAbHp u 9 8 . 6 1はまた、eIF5Aを回収する際に、mAbHp u 9 8よりもはるかに効率が悪かった(図7A~B、表2)。したがって、親和性成熟した汎ヒブシン抗体は、潜在的な新規の少量のヒブシン化タンパク質の質を高めるのに十分であり得る。

10

【0249】

実施例3：ヒブシン化ペプチドまたはデオキシヒブシン化ペプチドと複合した抗体の構造分析

ヒブシン化またはデオキシヒブシン化ペプチドと複合した汎抗ヒブシン抗体を、構造分析によって特徴付けた。

【0250】

材料及び方法

X線結晶学的構造分析

精製したFabHp u 2 4を、10mg/mlに濃縮し、シットティングドロップ法によって結晶化する前に、アセチル-GSG-ヒブシン-GSG-アミドペプチドと1:2のモル比で混合した。FabHp u 2 4の複合体の最適化結晶条件は、4で、20%ポリエチレングリコール(peg) 3350、0.1Mビス-トリスプロパンpH7.0、及び0.2Mカリウム/リン酸ナトリウムである。データ収集のために、液体窒素中で瞬間冷凍する前に、結晶を、抗凍結剤溶液(25%グリセロール、20%peg 3350、0.1Mビス-トリスプロパンpH7.0、及び0.2Mカリウム/リン酸ナトリウム)中に短時間浸漬し、データセットを、ビームラインALS 5.0.2で収集した。

20

【0251】

精製したFabHp u 2 4 . Bを、10mg/mlに濃縮し、シットティングドロップ法によって結晶化する前に、アセチル-GSG-ヒブシン-GSG-アミドペプチド(C1)と1:4のモル比で混合した。FabHp u 2 4 . Bの複合体の最適化結晶条件は、19で、14%peg 6000、0.5M NaClである。データ収集のために、液体窒素中で瞬間冷凍する前に、結晶を、抗凍結剤溶液(35%エチレングリコール、14%peg 6000、0.5M NaCl、及び1mM C1ペプチド)中に短時間浸漬し、データセットを、ビームラインALS 5.0.2で収集した。

30

【0252】

精製したFabHp u 9 8を、15mg/mlに濃縮し、シットティングドロップ法によって結晶化する前に、アセチル-GSG-ヒブシン-GSG-アミドペプチド(C1)またはアセチル-GSG-デオキシヒブシン-GSGペプチド(C2)と1:4のモル比で混合した。FabHp u 9 8の複合体の最適化結晶条件は、4で、20%peg 8000及び0.5M Li₂SO₄である。データ収集のために、液体窒素中で瞬間冷凍する前に、結晶を、抗凍結剤溶液(30%エチレングリコール、5%peg 8000、0.4M Li₂SO₄、30%エチレングリコール、及び1mMの対応するペプチド)中に短時間浸漬し、データセットを、先端放射光施設(APS)のビームライン22-IDGで収集した。

40

【0253】

すべてのX線回析データセットは、HKL2000ソフトウェアパッケージで処理された(Otwinowski et al., Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillatio

50

n Mode. In Macromolecular Crystallography, Academic Press, pp. 307 - 326, 1997)。構造を、同種 Fab に構築された開始モデル (タンパク質データバンク [PDB] 4HBC) を用いて、Phenix ソフトウェアパッケージの Phaser による分子置換によって決定した (Adams et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 66: 213 - 221, 2010、及び McCoy et al., J. Appl. Crystallogr. 40: 658 - 674, 2007)。

【0254】

結果

FabHpu24 - ヒプシン化ペプチド複合体

10

FabHpu24 - ヒプシン化 C1 ペプチド複合体の X 線結晶学的構造を、ヒプシンへの抗体結合に対する分子的洞察を得るために 2.0 Å の解像度で決定した (表 3)。複合体は、非対称単位 (0.15 Å の rmsd) で、2 つのすべて類似の FabHpu24 - ヒプシン複合体とともに P2₁ 空間群で結晶化した。ヒプシンの 4 - アミノ - 2 - ヒドロキシブチル基は、模擬アニーリング mFo - dFc オミット電子密度マップにおいて明確に視認できたが (図 8A)、ヒプシンの残りは、視認できなかった。これらの観察は、FabHpu24 が、ヒプシンのみに結合し、隣接アミノ酸残基には結合しなかったことを示唆した。実際に、ヒプシンは、FabHpu24 の重鎖及び軽鎖可変ドメインによって形成された深いポケットに挿入された (図 9A)。ヒプシン結合ポケットは、V_H 鎖及び V_L 鎖によって、それぞれ与えられた、112 Å² 及び 189 Å² の、全体で約 301 Å² の溶媒曝露された表面積に埋め込まれた。

20

表 3 . 構造データの概要及び精密化の統計¹

	ヒプシン- FabHpu24	ヒプシン-F abHpu24.B	ヒプシン- FabHpu98	デオキシ ヒプシン- FabHpu98	ヒプシン -FabHpu9 8.61	
データ収集						
空間群	P21	P21	C222	C222	C2	
細胞寸法						
a , b , c (Å)	42.4, 167. 3, 68.3	69.1, 168. 0, 84.9	106.0, 29 4.1, 68.7	105.6, 29 4.0, 68.8	130.1, 7 5.8, 120. 6	10
α , β , γ (°)	90, 98.9, 9 0	90, 99.7, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 120. 7, 90	
分解能 (Å)	50-1.85 (1.92-1.8 5)	50-2.40 (2.49-2.4 0)	50.0-1.95 (2.0-1.9 5)	50.0-2.0 (2.07-2.0 0)	40.0-1.9 (2.0-1. 9)	
R s y m (%)	6.6 (54.5)	7.4 (52.9)	7.5 (78.5)	7.5 (88.4)	9.0 (55. 2)	20
最高シェル内 の C C _{1/2}	0.719	0.776	0.615	0.605	0.808	
< I > / < σ (I) >	30.7 (2.0)	15.4 (2.3)	22.0 (2.2)	16.0 (2.2)	9.9 (2.1)	
完全性 (%)	99.9 (99. 9)	100 (99.9)	99.8 (99. 0)	99.9 (99. 8)	97.7 (95. 3)	
冗長性	3.8 (3.6)	1.9 (1.9)	7.4 (6.5)	7.1 (5.6)	3.4 (3.3)	30
精密化						
分解能 (Å)	43.0-2.0	49.0-2.4	41.2-1.95	42.9-1.98	37.2-1.9	
固有の反射数	79689	74274	78403	74438	77821	
F a b なし	2	4	2	2	2	
結合ペプチド 数	2	4	1	1	2	
R w o r k / R f r e e (%)	19.2/22.5	20.1/24.8	17.7/21.8	17.9/22.3	21.2/24. 9	40
原子数						
タンパク質	6392	12730	6423	6429	6289	
溶媒	266	277	262	155	254	
平均二乗偏差						
結合の長さ (Å)	0.006	0.004	0.013	0.013	0.005	
結合角度 (°)	1.02	0.882	1.48	1.48	1.083	

ラマチャンド
ラン

好適 (%)	96.2	96.3	97.5	96.7	97.2
認容された (%)	3.8	3.5	2.4	3.0	2.54
異常値 (%)	0.0	0.2	0.1	0.4	0.24

¹ 括弧内の値は、最高分解能シェルのものである。

【0255】

ヒブシン結合ポケットは、主に、相補性決定領域 (CDR) の L1、L3、及び H3 内の残基からなった。極性相互作用に使用可能であるヒブシンの側鎖上にわずか3つのヘテロ原子があった (図3A)。ヒブシン - FabHpu24 界面の検査は、水素結合及び塩橋相互作用を含む、ヒブシン - 4 - アミノ - 2 - ヒドロキシブチル基の遠位末端で相互作用のネットワークを示した (図10A)。具体的には、ヒブシンの末端アミノ基の第1のヘテロ原子 (11 - N) は、その予測された pKa は、分析連続静電気 (ACE) によって 9.8 であったため、結晶条件下で正電荷を持つと思われた (Schaefer et al., The Journal of Physical Chemistry, 100:1578:1599, 1996)。ヘテロ原子 (11 - N) は、ポケットの底部で V_LD96、ならびに V_LD95 の側鎖及び V_HY92 の主鎖カルボニル基への2つのさらなる水素結合を有する塩橋によって固定された。さらに、V_LD96 は、水素結合によって、V_HY100b 及び V_LY92 によって安定化する。第2のヘテロ原子、ヒブシンの9 - ヒドロキシル基は、V_LD95、V_HY100b、及び水分子への水素結合を形成した。さらに、V_HD100 によって配位された、水分子もまた、第3のヘテロ原子 (7 - N) と相互作用し、その予測された pKa は、10.2 であり、V_LY93 のカルボニル基への水素結合も形成した。対照的に、ヒブシンの遠位末端は、少量の電子密度によって示唆されるように、より可撓性であり得る。このことは、脂肪族鎖のみが、疎水性相互作用によって制限され得るため、驚くべきことではない。それでもなお、ヒブシンの遠位部分は、遠位末端が結合ポケットの底部に達することができるスペーサとしての役割を果たす。

【0256】

FabHpu98 ヒブシン及びデオキシヒブシン複合体

FabHpu98 は、ヒブシン及びデオキシヒブシンの両方に結合したという点で二重特異性を有した。FabHpu98 - ヒブシン及び FabHpu98 - デオキシヒブシン複合体の結晶を、同じ条件下で成長させ、それらの X 線結晶学的構造を、2.0 の解像度で決定した。複合体は、非対称単位 (0.764 の rmsd) で、2つのすべて類似の FabHpu98 とともに C222 空間群で結晶化した。1つの FabHpu98 分子は、ヒブシンまたはデオキシヒブシンとの複合体を形成したが、一方、他方の FabHpu98 分子は、そのパラトープが分子間の接触によってブロックされたため、複合されていない形態であった。

【0257】

FabHpu98 複合体において、ヒブシンまたはデオキシヒブシンはまた、V_H 及び V_L 界面によって構成された深いポケットにおいて結合し、V_H 鎖及び V_L 鎖は、それぞれ、148² 及び 156² の埋め込まれた表面積を有した (図9B)。ヒブシンは、FabHpu98 の結合ポケットに押し込むように傾斜していたが、FabHpu24 の可変ドメイン間に突出するようにほぼ垂直であった。2つのヒブシン部分は、互いに対して 46° の角度で突出した。

【0258】

FabHpu98 - ヒブシン複合体では、4 - アミノ - 2 - ヒドロキシブチル基はまた、完全に埋め込まれ、静電相互作用及び水素結合によって配位したが、一方、ヒブシンの

残りは、部分的に埋め込まれた。ポケットの底部で、ヒブシンの末端アミノ基（11 - N）は、V_H フレームワーク残基 N35、D95、及び秩序付けられた水分子で水素結合を形成した。末端アミノ基はまた、静電相互作用によって、V_H D50と相互作用した。これらの接触残基のすべては、隣接残基を有する水素結合ネットワークを通してさらに位置付けられた（図10B）。ヘテロ原子（7 - N）は、V_L Y92のカルボニル基及び硫酸イオンと水素結合を形成した。H E P E S及びT r i s緩衝液を用いた表面プラズモン共鳴法（S P R）実験は、F a b H p u 98が類似の親和性でヒブシンまたはデオキシヒブシンに結合したことを示したため、後者は、特異性及び親和性に欠かせなかった。

【0259】

芳香族残基は、ヒブシンまたはデオキシヒブシンの脂肪族部分のために有利な疎水性環境を明らかに提供した。F a b H p u 24ヒブシン複合体とは異なり、近隣残基もまた、模擬アニーリングm F o - d F cオミット電子密度マップに示された（図8B）。モデルは、ペプチド主鎖原子のみが、F a b H p u 98と接触したことを示した。

【0260】

デオキシヒブシン及びヒブシンの相互作用の比較

ヒブシン及びデオキシヒブシンは、F a b H p u 98によって構成された深いポケットに挿入するために同様の立体構造に採用した。しかしながら、デオキシヒブシン及びヒブシンの相互作用の差があった。第一に、ヒブシンのヒドロキシル基は、F o（ヒブシン） - F o（デオキシヒブシン）差マップに明確に示され、これを、F a b H p u 98：ヒブシンモデルからの相を用いることによって計算した（図11A）。ヒブシンのヒドロキシル基は、V_L S94、V_H Y52、及び硫酸イオンとともに水素ネットワークを形成した（図11B）。

【0261】

上述のように、V_H Y52の機能は、デオキシヒブシンの相互作用には欠かせなかった。ヒブシンのヒドロキシル基は、V_L S94（3.0）及びV_H Y52側鎖（3.0）と2つの比較的長い水素結合を形成した（図11B）。F a b H p u 98 - デオキシヒブシン複合体にある間、ヒドロキシル基への2つの水素結合は、もはや存在しなかった。その代わりに、V_H Y52は、側鎖の運動を示し、V_L S94に対して突出し、明らかに（2.8）水素結合を形成した（図11C）。これらの観察は、変異誘発及びS P R研究と一致した。V_H Y52 F変異体は、恐らく水素結合の減少のため、野生型F a b H p u 98と比較して、ヒブシン含有ペプチドに対してより弱い結合親和性を示した（図3C）。さらに、V_H Y52 F変異は、恐らくV_L S94で水素結合を形成することができないため、デオキシヒブシンと検出可能な相互作用を停止した。それ故に、V_H 残基Y52は、デオキシヒブシンとの相互作用で中心的役割を果たした。

【0262】

F a b H p u 24 . Bヒブシン化ペプチド複合体

F a b H p u 24 . Bヒブシン化C1ペプチド複合体の結晶構造を、F a b H p u 24 . Bの30倍の親和性改善のための分子基盤をより理解するために、2.4の解像度で決定した。単位格子は、F a b H p u 24の2倍の大きさであるが、F a b H p u 24 . Bの結晶は、F a b H p u 24に同形であった。F a b H p u 24 . Bの一次配列は、C D R L1、L2、及びH2においてその親F a b H p u 24とは異なったが、主鎖立体構造変化は、C D R H2においてのみ観察され、ヒブシン部分に対してC D R H3をさらに押し込んだ（図12A）。結果として、F a b H p u 24 . B V_H D100とV_L Y28との間の水素結合は、ヒブシンを包含するために、より大きな接触領域を形成した。ヒブシンは、配位水の代わりに、第3のヘテロ原子（7 - N）がF a b H p u 24 . BにおいてV_H G100aのカルボニル基で水素結合を直接形成したことを除いては、同じ水素ネットワークを有する深いポケットに明らかに固定した（図12B）。さらに、ヒブシンに隣接する隣接残基もまた、F a b H p u 24 . Bとの相互作用に参与した。V_H M99及びV_H D56側鎖のカルボニル基は、C1ペプチドの主鎖と水素結合を形成した。さらに、V_H 残基D56はまた、ペプチドS6中の隣接残基の側鎖と相互作用

10

20

30

40

50

した。これらの結果は、6 nMから186 nMの間で異なる、FabHpu24・Bと異なる隣接配列を有するヒプシンとの間の結合親和性の差の説明となり得る。ヒプシンのみが、FabHpu24・ヒプシン複合体において観察されたが、隣接配列もまた、FabHpu24とヒプシンとの間の相互作用に影響を及ぼした。それにもかかわらず、FabHpu24・Bは、すべての6つの合成されたヒプシン化ペプチドに結合することができた。

【0263】

FabHpu98・61ヒプシン化ペプチド複合体

FabHpu98・61・ヒプシン化C1ペプチド複合体のX線結晶学的構造を、ヒプシンへの抗体結合に対する分子的洞察を得るために2.2 Åの解像度で決定した。複合体は、非対称単位(0.14 Åのrmsd)で、2つのすべて類似のFabHpu98・61・ヒプシン複合体とともにC2空間群で結晶化した。FabHpu98・61及びFabHpu98は、CDRH1ループを除いては、非常に類似の様式でヒプシン化C1ペプチドに結合し、その中で、C27及びC32は、ジスルフィドを形成した(図12C)。結果として、FabHpu98・61 CDRH1は、V_H W9の方向に傾き、ヒプシンに対してその充填を改善し得る。加えて、VH T33は、より接近し、ヒプシンの11-NでさらなるH結合を形成し、他の相互作用は、同じ相互作用を維持した。

配列

Hpu24軽鎖CDR1のアミノ酸配列(Kabat)

QSSETVYRGDWLS(配列番号1)

Hpu24・B軽鎖CDR1のアミノ酸配列(Kabat)

RSRQRVYLGDWLS(配列番号2)

Hpu91、Hpu98及びHpu98・61軽鎖CDR1のアミノ酸配列(Kabat)

QASEDIKRYLA(配列番号3)

Hpu24軽鎖CDR2のアミノ酸配列(Kabat)

DASYLAS(配列番号4)

Hpu24・B軽鎖CDR2のアミノ酸配列(Kabat)

DASFRGD(配列番号5)

Hpu91、Hpu98、及びHpu98・61軽鎖CDR2のアミノ酸配列(Kabat)

AASKLAS(配列番号6)

Hpu24及びHpu24・B軽鎖CDR3のアミノ酸配列(Kabat)

LGGYYDDADDT(配列番号7)

Hpu98及びHpu98・61軽鎖CDR3のアミノ酸配列(Kabat)

QQGYTSSNVNNA(配列番号8)

Hpu24及びHpu24・B重鎖CDR1のアミノ酸配列(Kabat)

DYAMI(配列番号9)

Hpu91重鎖CDR1のアミノ酸配列(Kabat)

TYTIN(配列番号10)

Hpu98重鎖CDR1のアミノ酸配列(Kabat)

TYTMN(配列番号11)

Hpu98・61重鎖CDR1のアミノ酸配列(Kabat)

HCTMN(配列番号12)

Hpu24重鎖CDR2のアミノ酸配列(Kabat)

IIFYGGSNKLAYAKWA(配列番号13)

Hpu24・B重鎖CDR2のアミノ酸配列(Kabat)

IIFYGVINDLAYAKWA(配列番号14)

Hpu91重鎖CDR2のアミノ酸配列(Kabat)

DIWSDGNTYYANWA(配列番号15)

H p u 9 8 及び H p u 9 8 . 6 1 重鎖 C D R 2 のアミノ酸配列 (K a b a t)
D I Y T D G N T Y Y A N W A (配列番号 1 6)
H p u 2 4 及び H p u 2 4 . B 重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列 (K a b a t)
G Y G S M D G Y D R L N L (配列番号 1 7)
H p u 9 1 重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列 (K a b a t)
D S W D T S I Y Y G L D L (配列番号 1 8)
H p u 9 8 及び H p u 9 8 . 6 1 重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列 (K a b a t)
D S W D A S S Y Y G L D L (配列番号 1 9)
H p u 2 4 軽鎖可変領域のアミノ酸配列
A A V L T Q T P S P V S A A V G G T V T I S C Q S S E T V Y R G D W L S W F Q K 10
K P G Q P P K L L I Y D A S Y L A S G V S S R F S G S G S G T H F T L T I S G V
Q C D D A A T Y Y C L G G Y Y D D A D D T F G G G T E V V V K (配列番号 2 0)
H p u 2 4 . B 軽鎖可変領域のアミノ酸配列
A A V L T Q T P S P V S A A V G G T V T I S C R S R Q R V Y L G D W L S W F Q K
K P G Q P P K L L I Y D A S F R G D G V S S R F S G S G S G T H F T L T I S G V
Q C D D A A T Y Y C L G G Y Y D D A D D T F G G G T E V V V K (配列番号 2 1)
H p u 9 1 軽鎖可変領域のアミノ酸配列
A I K M T Q T P S S V S A A V G G T V T I N C Q A S E D I K R Y L A W Y Q Q K P
G Q P P K L L I Y A A S K L A S G V S S R F T G S G S G T E Y T L T I S G V Q C
D D A A T Y Y C Q Q G Y T S T N V N N A F G G G T E V V V K (配列番号 2 2) 20
H p u 9 8 及び H p u 9 8 . 6 1 軽鎖可変領域のアミノ酸配列
A I K M T Q T P S S V S A A V G G T V T I N C Q A S E D I K R Y L A W Y Q Q K P
G Q P P K L L I Y A A S K L A S G V S S R F K G S G S G T E Y T L T I S G V Q C
D D A A T Y Y C Q Q G Y T S S N V N N A F G G G T E V V V K (配列番号 2 3)
H p u 2 4 重鎖可変領域のアミノ酸配列
Q E Q L K E S G G R L V A P G T P L T L T C T V S G F D I S D Y A M I W V R Q A
P G K G L E W I G I I Y G G S N K L A Y A K W A K G R F T I S R T S T T V D L K
I T S P T T E D T A T Y F C A R G Y G S M D G Y D R L N L W G Q G T L V T V S S
(配列番号 2 4)
H p u 2 4 . B 重鎖可変領域のアミノ酸配列 30
Q E Q L K E S G G R L V A P G T P L T L T C T V S G F D I S D Y A M I W V R Q A
P G K G L E W I G I I Y G V I N D L A Y A K W A K G R F T I S R T S T T V D L K
I T S P T T E D T A T Y F C A R G Y G S M D G Y D R L N L W G Q G T L V T V S S
(配列番号 2 5)
H p u 9 1 重鎖可変領域のアミノ酸配列
Q S V E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S A F S L S T Y T I N W V R Q A P
G K G L E W I G D I W S D G N T Y Y A N W A K G R F T I S K T S T T V D L K I T
S P T T E D T A T Y F C A R D S W D T S I Y Y G L D L W G Q G T L V T V S S (配
列番号 2 6)
H p u 9 8 重鎖可変領域のアミノ酸配列 40
Q S V E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S G F S L S T Y T M N W V R Q A P
G K G L E W I G D I Y T D G N T Y Y A N W A K G R F T I S K T S T T V D L K I T
S P T T E D T A T Y F C A R D S W D A S S Y Y G L D L W G Q G T L V T V S S (配
列番号 2 7)
H p u 9 8 . 6 1 重鎖可変領域のアミノ酸配列
Q S V E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S A C S L Y H C T M N W V R Q A P
G K G L E W I G D I Y T D G N T Y Y A N W A K G R F T I S K T S T T V D L K I T
S P T T E D T A T Y F C A R D S W D A S S Y Y G L D L W G Q G T L V T V S S (配
列番号 2 8)
H p u 2 4 軽鎖のアミノ酸配列 50

AAVL TQT P S P V S A A V G G T V T I S C Q S S E T V Y R G D W L S W F Q K
K P G Q P P K L L I Y D A S Y L A S G V S S R F S G S G S G T H F T L T I S G V
Q C D D A A T Y Y C L G G Y Y D D A D D T F G G G T E V V V K G D P V A P T V L
I F P P A A D Q V A T G T V T I V C V A N K Y F P D V T V T W E V D G T T Q T T
G I E N S K T P Q N S A D C T Y N L S S T L T L T S T Q Y N S H K E Y T C K V T
Q G T T S V V Q S F N R G D C (配列番号 29)

H p u 2 4 . B 軽鎖のアミノ酸配列

AAVL TQT P S P V S A A V G G T V T I S C R S R Q R V Y L G D W L S W F Q K
K P G Q P P K L L I Y D A S F R G D G V S S R F S G S G S G T H F T L T I S G V
Q C D D A A T Y Y C L G G Y Y D D A D D T F G G G T E V V V K G D P V A P T V L
I F P P A A D Q V A T G T V T I V C V A N K Y F P D V T V T W E V D G T T Q T T
G I E N S K T P Q N S A D C T Y N L S S T L T L T S T Q Y N S H K E Y T C K V T
Q G T T S V V Q S F N R G D C (配列番号 30)

10

H p u 9 1 軽鎖のアミノ酸配列

A I K M T Q T P S S V S A A V G G T V T I N C Q A S E D I K R Y L A W Y Q Q K P
G Q P P K L L I Y A A S K L A S G V S S R F T G S G S G T E Y T L T I S G V Q C
D D A A T Y Y C Q Q G Y T S T N V N N A F G G G T E V V V K G D P V A P T V L I
F P P A A D Q V A T G T V T I V C V A N K Y F P D V T V T W E V D G T T Q T T G
I E N S K T P Q N S A D C T Y N L S S T L T L T S T Q Y N S H K E Y T C K V T Q
G T T S V V Q S F N R G D C (配列番号 31)

20

H p u 9 8 及び H p u 9 8 . 6 1 軽鎖のアミノ酸配列

A I K M T Q T P S S V S A A V G G T V T I N C Q A S E D I K R Y L A W Y Q Q K P
G Q P P K L L I Y A A S K L A S G V S S R F K G S G S G T E Y T L T I S G V Q C
D D A A T Y Y C Q Q G Y T S S N V N N A F G G G T E V V V K G D P V A P T V L I
F P P A A D Q V A T G T V T I V C V A N K Y F P D V T V T W E V D G T T Q T T G
I E N S K T P Q N S A D C T Y N L S S T L T L T S T Q Y N S H K E Y T C K V T Q
G T T S V V Q S F N R G D C (配列番号 32)

H p u 2 4 重鎖のアミノ酸配列

Q E Q L K E S G G R L V A P G T P L T L T C T V S G F D I S D Y A M I W V R Q A
P G K G L E W I G I I Y G G S N K L A Y A K W A K G R F T I S R T S T T V D L K
I T S P T T E D T A T Y F C A R G Y G S M D G Y D R L N L W G Q G T L V T V S S
G Q P K G P S V F P L A P C C G D T P S S T V T L G C L V K G Y L P E P V T V T
W N S G T L T N G V R T F P S V R Q S S G L Y S L S S V V S V T S S S Q P V T C
N V A H P A T N T K V D K T V A P S T C S K P T (配列番号 33)

30

H p u 2 4 . B 重鎖のアミノ酸配列

Q E Q L K E S G G R L V A P G T P L T L T C T V S G F D I S D Y A M I W V R Q A
P G K G L E W I G I I Y G V I N D L A Y A K W A K G R F T I S R T S T T V D L K
I T S P T T E D T A T Y F C A R G Y G S M D G Y D R L N L W G Q G T L V T V S S
G Q P K G P S V F P L A P C C G D T P S S T V T L G C L V K G Y L P E P V T V T
W N S G T L T N G V R T F P S V R Q S S G L Y S L S S V V S V T S S S Q P V T C
N V A H P A T N T K V D K T V A P S T C S K P T (配列番号 34)

40

H p u 9 1 重鎖のアミノ酸配列

Q S V E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S A F S L S T Y T I N W V R Q A P
G K G L E W I G D I W S D G N T Y Y A N W A K G R F T I S K T S T T V D L K I T
S P T T E D T A T Y F C A R D S W D T S I Y Y G L D L W G Q G T L V T V S S G Q
P K G P S V F P L A P C C G D T P S S T V T L G C L V K G Y L P E P V T V T W N
S G T L T N G V R T F P S V R Q S S G L Y S L S S V V S V T S S S Q P V T C N V
A H P A T N T K V D K T V A P S T C S K P T (配列番号 35)

H p u 9 8 重鎖のアミノ酸配列

Q S V E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S G F S L S T Y T M N W V R Q A P

50

G K G L E W I G D I Y T D G N T Y Y A N W A K G R F T I S K T S T T V D L K I T
S P T T E D T A T Y F C A R D S W D A S S Y Y G L D L W G Q G T L V T V S S G Q
P K G P S V F P L A P C C G D T P S S T V T L G C L V K G Y L P E P V T V T W N
S G T L T N G V R T F P S V R Q S S G L Y S L S S V V S V T S S S Q P V T C N V
A H P A T N T K V D K T V A P S T C S K P T (配列番号 36)

H p u 9 8 . 6 1 重鎖のアミノ酸配列

Q S V E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S A C S L Y H C T M N W V R Q A P
G K G L E W I G D I Y T D G N T Y Y A N W A K G R F T I S K T S T T V D L K I T
S P T T E D T A T Y F C A R D S W D A S S Y Y G L D L W G Q G T L V T V S S G Q
P K G P S V F P L A P C C G D T P S S T V T L G C L V K G Y L P E P V T V T W N
S G T L T N G V R T F P S V R Q S S G L Y S L S S V V S V T S S S Q P V T C N V
A H P A T N T K V D K T V A P S T C S K P T (配列番号 37)

H p u 2 4 及び H p u 2 4 . B 軽鎖 F R 1 のアミノ酸配列

A A V L T Q T P S P V S A A V G G T V T I S C (配列番号 38)

H p u 9 1、H p u 9 8、及び H p u 9 8 . 6 1 軽鎖 F R 1 のアミノ酸配列

A I K M T Q T P S S V S A A V G G T V T I N C (配列番号 39)

H p u 2 4 及び H p u 2 4 . B 軽鎖 F R 2 のアミノ酸配列

W F Q K K P G Q P P K L L I Y (配列番号 40)

H p u 9 1、H p u 9 8、及び H p u 9 8 . 6 1 軽鎖 F R 2 のアミノ酸配列

W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y (配列番号 41)

H p u 2 4 及び H p u 2 4 . B 軽鎖 F R 3 のアミノ酸配列

G V S S R F S G S G S G T H F T L T I S G V Q C D D A A T Y Y C (配列番号 42)

H p u 9 1 軽鎖 F R 3 のアミノ酸配列

G V S S R F T G S G S G T E Y T L T I S G V Q C D D A A T Y Y C (配列番号 43)

H p u 9 8 及び H p u 9 8 . 6 1 軽鎖 F R 3 のアミノ酸配列

G V S S R F K G S G S G T E Y T L T I S G V Q C D D A A T Y Y C (配列番号 44)

H p u 2 4、H p u 2 4 . B、H p u 9 1、H p u 9 8、及び H p u 9 8 . 6 1 軽鎖 F R
4 のアミノ酸配列

F G G G T E V V V K (配列番号 45)

H p u 2 4 及び H p u 2 4 . B 重鎖 F R 1 のアミノ酸配列

Q E Q L K E S G G R L V A P G T P L T L T C T V S G F D I S (配列番号 46)

H p u 9 1 重鎖 F R 1 のアミノ酸配列

Q S V E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S A F S L S (配列番号 47)

H p u 9 8 重鎖 F R 1 のアミノ酸配列

Q S V E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S G F S L S (配列番号 48)

H p u 9 8 . 6 1 重鎖 F R 1 のアミノ酸配列

Q S V E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S A C S L Y (配列番号 49)

H p u 2 4、H p u 2 4 . B、H p u 9 1、H p u 9 8、及び H p u 9 8 . 6 1 重鎖 F R
2 のアミノ酸配列

W V R Q A P G K G L E W I G (配列番号 50)

H p u 2 4 及び H p u 2 4 . B 重鎖 F R 3 のアミノ酸配列

K G R F T I S R T S T T V D L K I T S P T T E D T A T Y F C A R (配列番号 51)

H p u 9 1、H p u 9 8、及び H p u 9 8 . 6 1 重鎖 F R 3 のアミノ酸配列

K G R F T I S K T S T T V D L K I T S P T T E D T A T Y F C A R (配列番号 52)

H p u 2 4、H p u 2 4 . B、H p u 9 1、H p u 9 8、及び H p u 9 8 . 6 1 重鎖 F R
4 のアミノ酸配列

W G Q G T L V T V S S (配列番号 53)

H p u 9 1 軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列 (K a b a t)

Q Q G Y T S T N V N N A (配列番号 72)

10

20

30

40

【 図 1 A 】

[illegible]

【 図 1 B 】

Position	Sequence	Position	Sequence
1	Q	1	Q
2	E	2	E
3	Q	3	Q
4	E	4	E
5	L	5	L
6	K	6	K
7	E	7	E
8	S	8	S
9	G	9	G
10	G	10	G
11	R	11	R
12	L	12	L
13	V	13	V
14	A	14	A
15	P	15	P
16	G	16	G
17	L	17	L
18	T	18	T
19	L	19	L
20	T	20	T
21	C	21	C
22	T	22	T
23	V	23	V
24	S	24	S
25	G	25	G
26	F	26	F
27	D	27	D
28	I	28	I
29	S	29	S
30	D	30	D
31	Y	31	Y
32	M	32	M
33	I	33	I
34	W	34	W
35	V	35	V
36	R	36	R
37	Q	37	Q
38	A	38	A
39	P	39	P
40	G	40	G
41	P	41	P
42	S	42	S
43	P	43	P
44	K	44	K
45	G	45	G
46	L	46	L
47	E	47	E
48	W	48	W
49	I	49	I
50	G	50	G
51	I	51	I
52	N	52	N
53	G	53	G
54	G	54	G
55	S	55	S
56	N	56	N
57	K	57	K
58	A	58	A
59	K	59	K
60	R	60	R
61	F	61	F
62	T	62	T
63	I	63	I
64	S	64	S
65	R	65	R
66	T	66	T
67	T	67	T
68	V	68	V
69	D	69	D
70	L	70	L
71	N	71	N
72	L	72	L
73	N	73	N
74	L	74	L
75	N	75	N
76	L	76	L
77	N	77	N
78	L	78	L
79	N	79	N
80	L	80	L
81	N	81	N
82	L	82	L
83	N	83	N
84	L	84	L
85	N	85	N
86	L	86	L
87	N	87	N
88	L	88	L
89	N	89	N
90	L	90	L
91	N	91	N
92	L	92	L
93	N	93	N
94	L	94	L
95	N	95	N
96	L	96	L
97	N	97	N
98	L	98	L
99	N	99	N
100	L	100	L
101	N	101	N
102	L	102	L
103	N	103	N
104	L	104	L
105	N	105	N
106	L	106	L
107	N	107	N
108	L	108	L
109	N	109	N
110	L	110	L
111	N	111	N
112	L	112	L
113	N	113	N

【 図 1 C 】

Label 番号 Hpu98 Hpu98 61 Hpu91	ATGAG
--	---

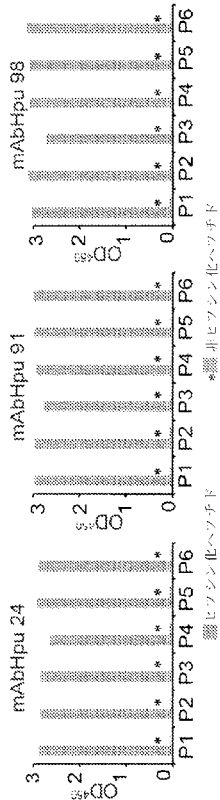
【 図 1 D 】

Kuhn 番号
 Hpu98
 Hpu98.61
 Hpu91

CDR H1 - CDR H1
 CDR H1 - Kabal
 CDR H2 - CDR H2
 CDR H2 - Kabal
 CDR H3 - CDR H3
 CDR H3 - Kabal

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510

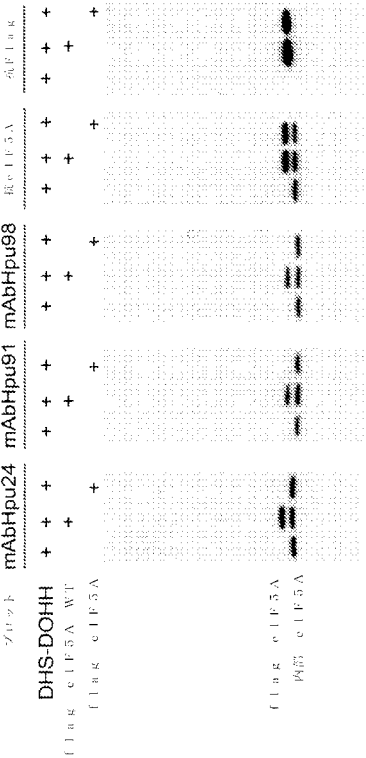
【図 2 A】



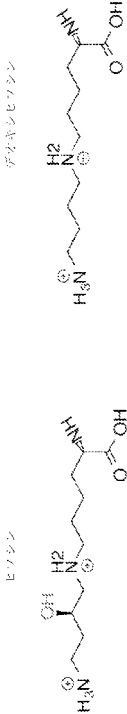
【図 2 B】



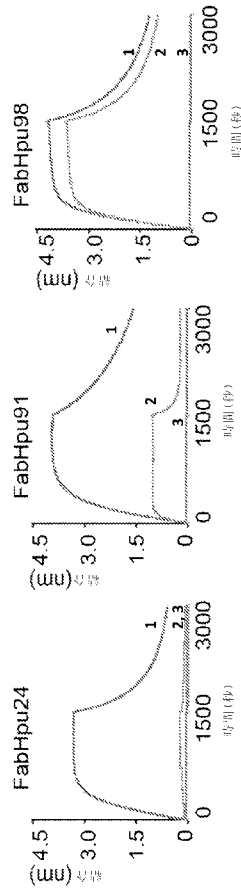
【図 2 C】



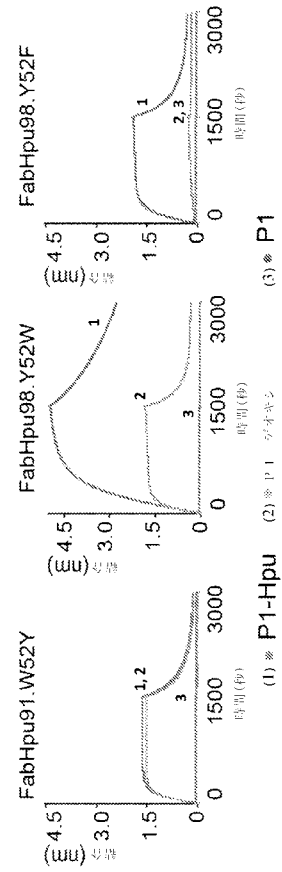
【図 3 A】



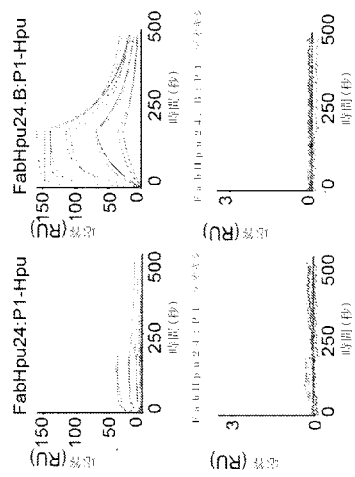
【図 3 B】



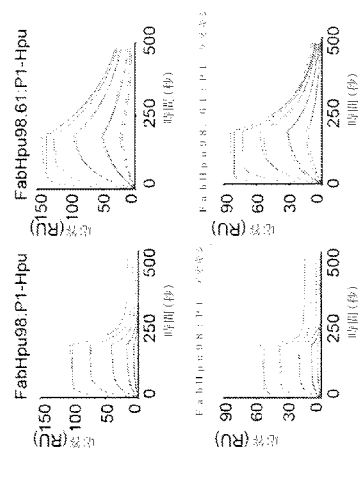
【図 3 C】



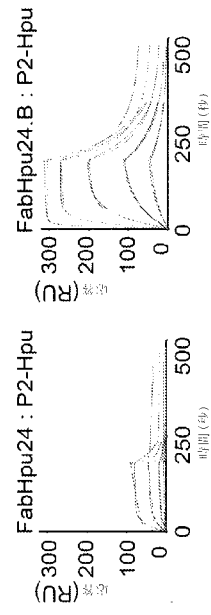
【図 4 A】



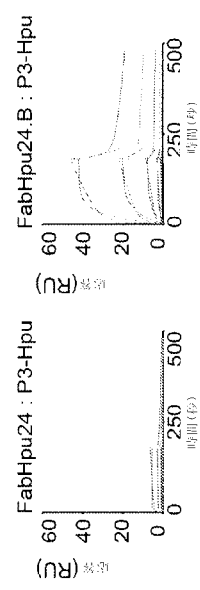
【図 4 B】



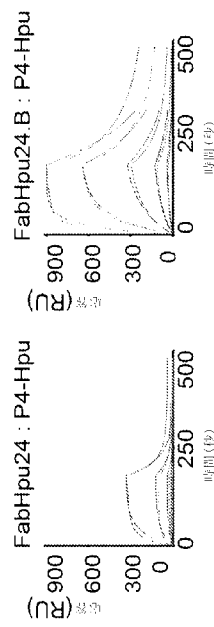
【図 5 A】



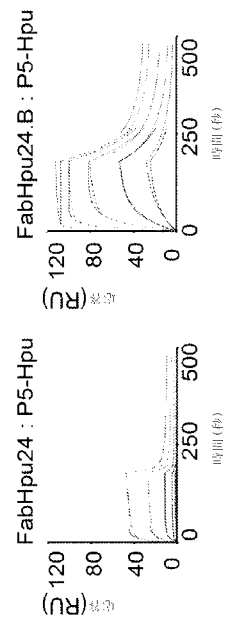
【図 5 B】



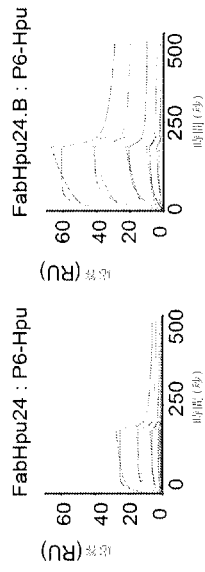
【図 5 C】



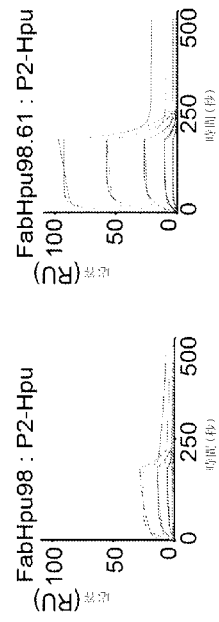
【図 5 D】



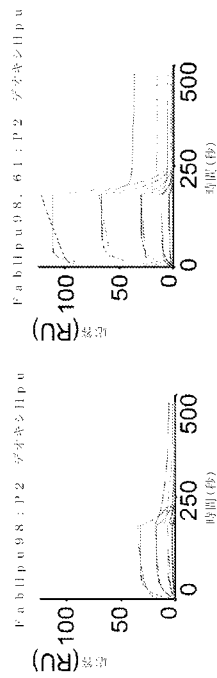
【図 5 E】



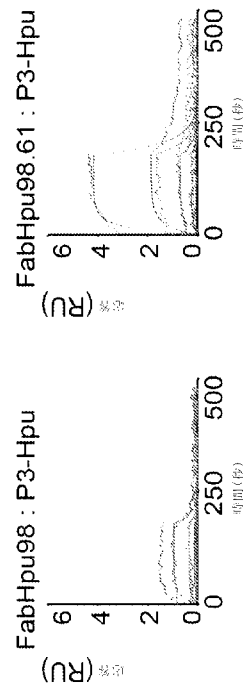
【図 6 A】



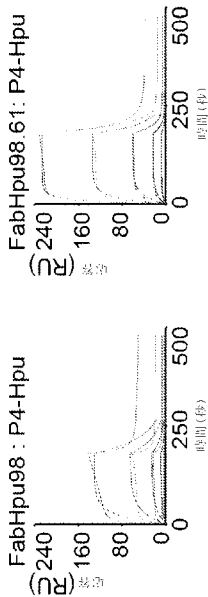
【図 6 B】



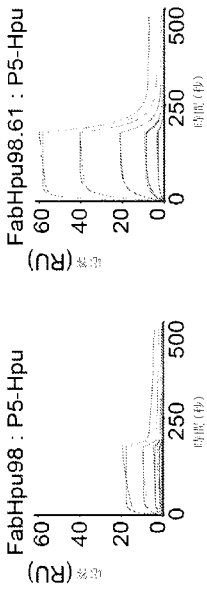
【図 6 C】



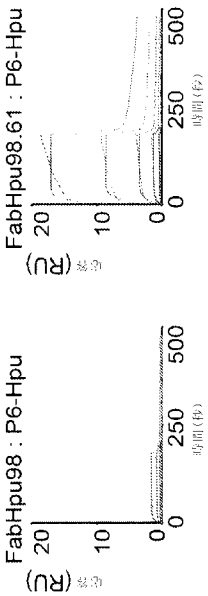
【 図 6 D 】



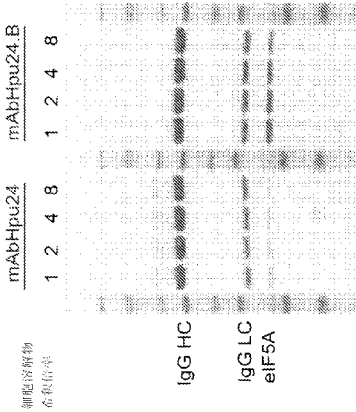
【 図 6 E 】



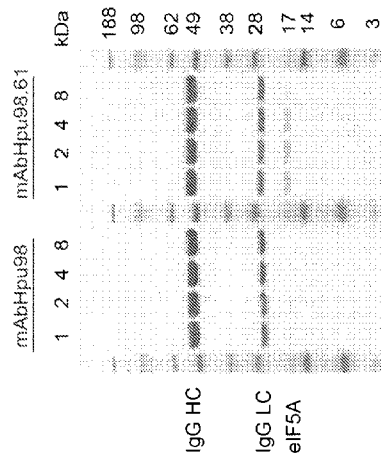
【 図 6 F 】



【 図 7 A 】



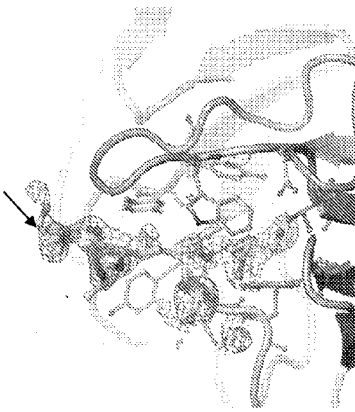
【図 7 B】



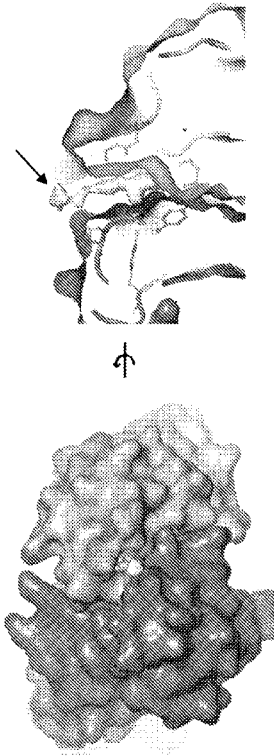
【図 8 A】



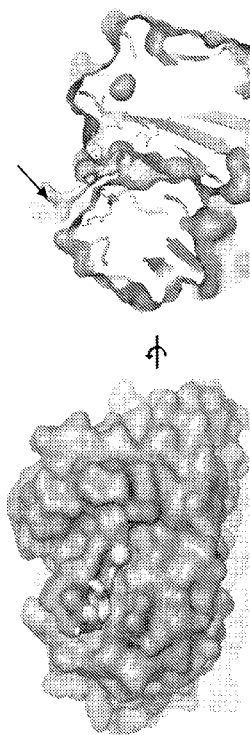
【図 8 B】



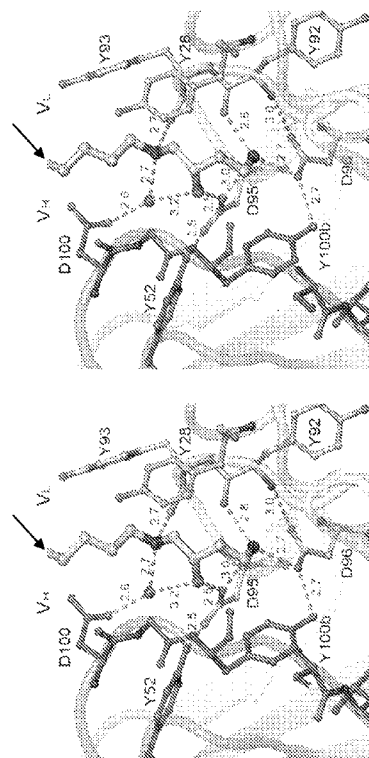
【図 9 A】



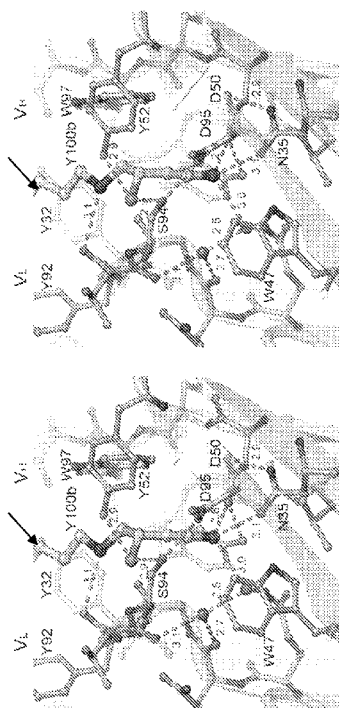
【図 9 B】



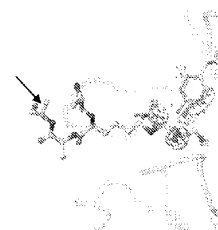
【図 10 A】



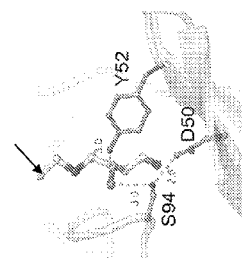
【図 10 B】



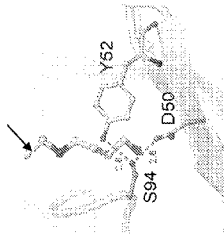
【図 11 A】



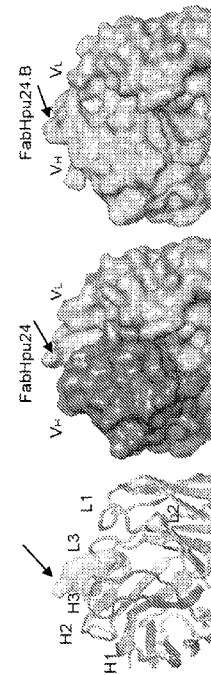
【図 11 B】



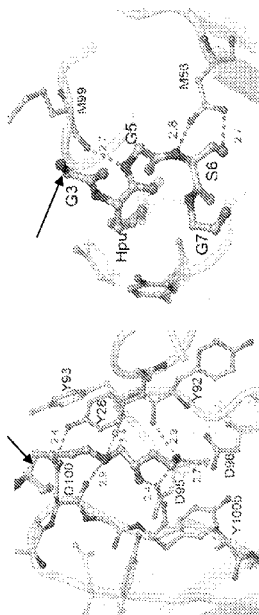
【図 1 1 C】



【図 1 2 A】

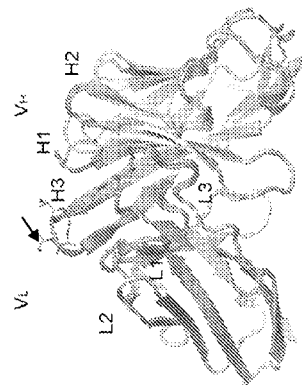


【図 1 2 B】

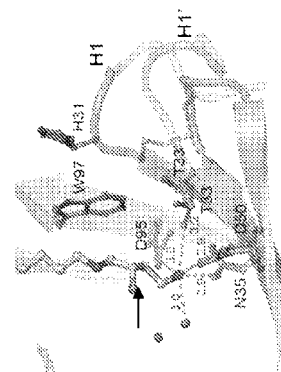


P a b H p u 9 8 8 P a b H p u 9 8 8 . d 1

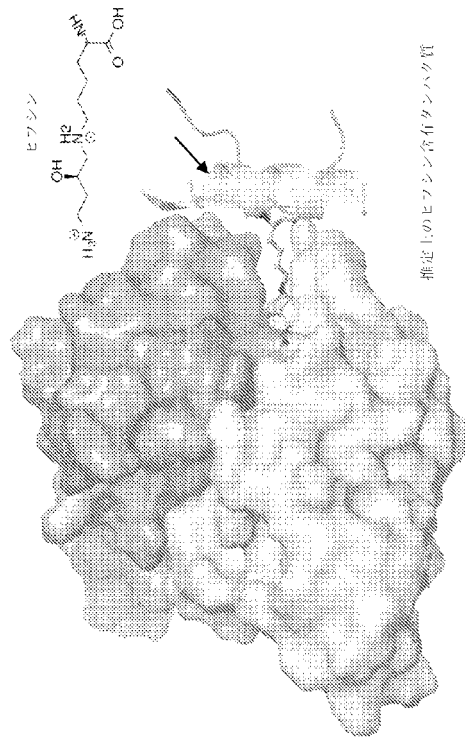
【図 1 2 C】



【図 1 2 D】



【図 13】



【配列表】

2018532376000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/049127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/44 G01N33/53
ADD.

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 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 practicable, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/119476 A1 (MIRMIRA RAGHAVENDRA G [US]) 30 April 2015 (2015-04-30) paragraph [0008] paragraph [0052]	1-46
A	----- CARVAJAL-GAMEZ B ET AL: "Identification of two novel Trichomonas vaginaliseif-5a genes", INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 10, no. 2, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 284-291, XP026919561, ISSN: 1567-1348, DOI: 10.1016/J.MEEGID.2009.12.008 [retrieved on 2010-01-07] figure 1 ----- -/-	1-46

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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 application or patent 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

27 October 2016

Date of mailing of the international search report

11/11/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wagner, René

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/049127

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 2004/024087 A2 (UNIV NEW JERSEY MED [US]; NIH NIDCR [US]; UNIV ROCKEFELLER [US]; HANAU) 25 March 2004 (2004-03-25) example 7	1,4-46
X	----- BERNADETTE M CRACCHIOLO ET AL: "Eukaryotic initiation factor 5A-1 (eIF5A-1) as a diagnostic marker for aberrant proliferation in intraepithelial neoplasia of the vulva", GYNECOLOGIC ONCOLOGY., vol. 94, no. 1, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 217-222, XP055314375, GB ISSN: 0090-8258, DOI: 10.1016/j.ygyno.2004.03.018 page 218	1,4-46
X	----- US 2011/177089 A1 (SEKO YOSHINORI [JP] ET AL) 21 July 2011 (2011-07-21) paragraph [0120]	1,4-46
X	----- YURIKA NISHIKI ET AL: "Characterization of a novel polyclonal anti-hypusine antibody", SPRINGERPLUS, vol. 2, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01), page 421, XP055314227, DE ISSN: 2193-1801, DOI: 10.1074/jbc.M008982200 page 2	1-46
X,P	----- ZHAI QIANTING ET AL: "Structural Analysis and Optimization of Context-Independent Anti-Hypusine Antibodies", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 428, no. 3, 14 January 2016 (2016-01-14), pages 603-617, XP029430862, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2016.01.006 the whole document	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/049127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2015119476 A1	30-04-2015	NONE	
WO 2004024087 A2	25-03-2004	AU 2003270622 A1	30-04-2004
		US 2009253777 A1	08-10-2009
		WO 2004024087 A2	25-03-2004
US 2011177089 A1	21-07-2011	JP 5578522 B2	27-08-2014
		US 2011177089 A1	21-07-2011
		US 2013280268 A1	24-10-2013
		WO 2009144933 A1	03-12-2009

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 0 7 K	16/44	(2006.01)	C 0 7 K	16/44
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	G 0 1 N	33/543
C 0 7 K	1/22	(2006.01)	C 0 7 K	1/22
				D
				5 4 1 A
				5 4 1 B
				5 4 5
				5 7 5

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. UNIX

(72) 発明者 カーター , ポール ジェー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サンフランシスコ , ディーエヌエー
ウェイ 1 , シーノオー ジェネンテック , インコーポレイテッド

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA12 CA19 CC24 CE12 CE13

4B065 AA90X AA90Y AA99Y AB01 AB02 AC14 BA02 CA25 CA46

4H045 AA11 AA30 BA10 BA60 BA70 BA71 BA72 DA76 EA50 FA74

GA26

专利名称(译)	抗抑郁素抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2018532376A	公开(公告)日	2018-11-08
申请号	JP2018510804	申请日	2016-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
发明人	チャイ, チエンティン カーター, ポール ジェー.		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/44 G01N33/53 G01N33/543 C07K1/22		
CPC分类号	G01N33/6812 C07K16/18 C07K16/44 C07K2317/34 G01N33/521 G01N33/5308 G01N33/533 G01N33/ /6872 G01N2800/50		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/44 G01N33/53.D G01N33/543.541.A G01N33/543.541.B G01N33/543.545 G01N33/543.575 C07K1/22		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA12 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/CE13 4B065 /AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065 /CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA60 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
優先権	62/211642 2015-08-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供抗 - hypusin抗体和抗 - hypusin抗体在检测和分离含有 hypusine和/或deoxyhypusin的多肽中的用途，以及包含抗hypusin抗体的组合物和试剂盒。【选择图】无

(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2018-532376 (P2018-532376A)
		(43) 公表日	平成30年11月8日 (2018.11.8)
(51) Int. Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)		C 1 2 N 15/13	Z N A 4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)		C 1 2 N 15/63	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)		C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21	
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 92 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2018-510804 (P2018-510804)	(71) 出願人	509012625
(86) (22) 出願日	平成28年8月26日 (2016. 8. 26)		ジェネンテック、 インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成30年3月26日 (2018. 3. 26)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/049127		サンフランシスコ ディーエヌエー
(87) 国際公開番号	W02017/040342		ウェイ 1
(87) 国際公開日	平成29年3月9日 (2017. 3. 9)	(74) 代理人	110002077
(31) 優先権主張番号	62/211, 642		園田・小林特許業務法人
(32) 優先日	平成27年8月28日 (2015. 8. 28)	(72) 発明者	チャイ、 チエンティン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
			8 0、 サウス サンフランシスコ、 ディーエヌエー
			ウェイ 1、 シー/オー
			ジェネンテック、 インコーポレイテッド
		最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 抗ヒプシン抗体及びその使用			