

(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2012-518418

(P2012-518418A)

(43) 公表日 **平成24年8月16日(2012.8.16)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 4
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-551284 (P2011-551284)
 (86) (22) 出願日 平成22年2月23日 (2010. 2. 23)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年10月20日 (2011. 10. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/024979
 (87) 国際公開番号 WO2010/099079
 (87) 国際公開日 平成22年9月2日 (2010. 9. 2)
 (31) 優先権主張番号 12/391, 937
 (32) 優先日 平成21年2月24日 (2009. 2. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
 パーク アボット パーク ロード 10
 0
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 ブロフィー, スーザン・イー
 アメリカ合衆国、イリノイ・60046、
 リンデンハースト、マラード・ドライブ・
 2477

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トロポニン I に対する抗体およびこれらの使用法

(57) 【要約】

本発明は、トロポニン I に対する抗体およびこれらの使用法に関する。特に、このような抗体を使用して患者中のトロポニン I を検出することができ、例えば心筋梗塞または急性冠症候群の診断において使用することもできる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) 受託番号 PTA - 9816 によって指定される、TnI19C7AM1hG1CHO204 と呼ばれるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞系。

【請求項 2】

請求項 1 の前記 CHO 細胞系によって産生される組換え抗体。

【請求項 3】

G Y T F T D Y N L H (配列番号 52)、Y I Y P Y N G I T G Y N Q K F K S (配列番号 53)、D A Y D Y D Y L T D (配列番号 54)、R T S K N V G T N I H (配列番号 55)、Y A S E R L P (配列番号 56) および Q Q S N N W P Y T (配列番号 57) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 個の相補性決定領域 (CDR) を含み、トロポニン I と結合する抗原結合ドメインを含む単離結合タンパク質。

10

【請求項 4】

前記結合タンパク質が少なくとも 3 個の CDR を含む、請求項 3 の結合タンパク質。

【請求項 5】

前記結合タンパク質が少なくとも 6 個の CDR を含む、請求項 4 に記載の結合タンパク質。

【請求項 6】

ヒトアクセプターフレームワークをさらに含む、請求項 3 に記載の結合タンパク質。

20

【請求項 7】

前記結合タンパク質の可変重鎖のアミノ酸配列が配列番号 25 と少なくとも 70% の同一性を有する結合タンパク質をコードする単離核酸分子。

【請求項 8】

前記結合タンパク質の可変軽鎖のアミノ酸配列が配列番号 28 と少なくとも 70% の同一性を有する、請求項 7 の単離核酸分子。

【請求項 9】

前記結合タンパク質の可変重鎖のアミノ酸配列が配列番号 25 である結合タンパク質をコードする単離核酸分子。

【請求項 10】

前記結合タンパク質の可変軽鎖のアミノ酸配列が配列番号 28 である結合タンパク質をコードする単離核酸分子。

30

【請求項 11】

前記結合タンパク質が配列番号 25 のアミノ酸配列を含む可変重鎖をさらに含む、請求項 10 の単離核酸分子。

【請求項 12】

配列番号 25 のアミノ酸配列を含む、単離結合タンパク質。

【請求項 13】

配列番号 28 のアミノ酸配列を含む、単離結合タンパク質。

【請求項 14】

請求項 9 または請求項 10 の前記単離核酸分子を含むベクター。

40

【請求項 15】

請求項 14 の前記ベクターを含む単離宿主細胞。

【請求項 16】

前記結合タンパク質を産生するのに十分な時間および条件下で請求項 15 の前記宿主細胞を培養することを含む、トロポニン I と結合することができる結合タンパク質を産生する方法。

【請求項 17】

請求項 16 の方法によって産生される単離タンパク質。

【請求項 18】

50

請求項 3 の結合タンパク質および薬剤として許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 19】

- a) トロポニン I と結合し配列番号 25 のアミノ酸配列を含む抗体と試験サンプルを、抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件下で、接触させるステップ、および
b) 前記複合体の存在が前記試験サンプル中のトロポニン I 抗原の存在を示す、前記複合体の存在を検出するステップ
を含む、前記試験サンプル中のトロポニン I 抗原を検出する方法。

【請求項 20】

前記抗体が配列番号 28 のアミノ酸配列をさらに含む、請求項 19 の方法。

【請求項 21】

前記抗体が ATCC 受託番号 PTA - 9816 を有する CHO 細胞系 TnI19C7AM1hG1CHO204 によって産生される、請求項 20 の方法。

【請求項 22】

- a) トロポニン I と結合し配列番号 25 を含む第一の抗体と試験サンプルを、第一の抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間および条件下で、接触させるステップ、
b) 検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物と結合した第二の抗体を含むコンジュゲートを、第一の抗体 / 抗原 / 第二の抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下で、前記第一の抗体 / 抗原複合体に加えるステップ、および
c) 前記試験サンプル中のトロポニン I 抗原の存在を示す、前記シグナル生成化合物によって生成するシグナルの存在を検出するステップ
を含む、前記試験サンプル中のトロポニン I 抗原を検出する方法。

【請求項 23】

前記第一の抗体が配列番号 28 をさらに含む、請求項 22 の方法。

【請求項 24】

前記第一の抗体が ATCC 受託番号 PTA - 9816 を有する CHO 細胞系 TnI19C7AM1hG1CHO204 によって産生される、請求項 23 の方法。

【請求項 25】

- a) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含み、検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物で標識される、トロポニン I と結合する抗体とトロポニン I 抗原を、トロポニン I 抗原 / 抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下で、接触させるステップ、
b) トロポニン I 抗原 / 抗体 / トロポニン I 試験サンプル抗原複合体を形成するのに十分な時間および条件下で、前記トロポニン I 抗原 / 抗体複合体に試験サンプルを加えるステップ、および
c) 前記試験サンプル中のトロポニン I 抗原の存在を示す、前記シグナル生成化合物によって生成するシグナルの存在を検出するステップ
を含む、前記試験サンプル中のトロポニン I 抗原を検出する方法。

【請求項 26】

前記抗体が配列番号 28 のアミノ酸配列をさらに含む、請求項 25 の方法。

【請求項 27】

前記抗体が ATCC 受託番号 PTA - 9816 を有する CHO 細胞系 TnI19C7AM1hG1CHO204 細胞系によって産生される、請求項 24 の方法。

【請求項 28】

- a) 検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物と結合した 1) トロポニン I 参照抗原、および配列番号 25 のアミノ酸配列を含む 2) トロポニン I 抗原に対する抗体と試験サンプルを、トロポニン I 参照抗原 / 抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下で、接触させるステップ、および
b) 前記シグナル生成化合物によって生成するシグナルを検出するステップ
を含み、前記試験サンプル中で検出されるトロポニン I 抗原の量が前記抗体と結合したトロポニン I 参照抗原の量と反比例する、前記試験サンプル中のトロポニン I 抗原を検出

10

20

30

40

50

する方法。

【請求項 29】

前記抗体が配列番号 28 のアミノ酸配列をさらに含む、請求項 28 の方法。

【請求項 30】

前記抗体が ATCC 受託番号 PTA - 9816 を有する CHO 細胞系 TnI19C7A M1hG1CHO204 によって産生される、請求項 29 の方法。

【請求項 31】

a) 患者から生物サンプルを単離するステップ、

b) トロポニン I と結合し配列番号 25 のアミノ酸配列を含む抗体と前記生物サンプルを、トロポニン I 抗原 / 抗体複合体の形成に十分な時間および条件下で、接触させるステップ、および

c) 前記トロポニン I 抗原 / 抗体複合体の存在を検出するステップ、

d) 前記複合体中に存在する前記トロポニン I 抗原を、前記複合体中に存在する前記抗体から分離するステップ、および

e) 分離したトロポニン I 抗原の量を測定するステップ

を含み、正常集団の第 99 百分位数のトロポニン I 値の約 1 - 5 倍を超えるトロポニン I 抗原の量が前記患者中の急性冠症候群または心筋梗塞の診断を示す、急性冠症候群および心筋梗塞の 1 つを有する疑いがある患者の急性冠症候群または心筋梗塞を診断する方法。

【請求項 32】

a) 患者から生物サンプルを単離するステップ、

b) トロポニン I と結合し配列番号 25 のアミノ酸配列を含む第一の抗体と前記生物サンプルを、トロポニン I 抗原 / 抗体複合体の形成に十分な時間および条件下で、接触させるステップ、

c) 検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物と結合した第二の抗体を含む、生成したトロポニン I 抗原 / 抗原複合体にコンジュゲートを、前記コンジュゲートが結合トロポニン I 抗原と結合するのに十分な時間および条件下で加えるステップ、

d) 前記シグナル生成化合物によって生成するシグナルを検出することによって、前記生物サンプル中に存在する可能性があるトロポニン I 抗原の存在を検出するステップ、および

e) 前記シグナルの強度を測定することによって前記試験サンプル中に存在するトロポニン I 抗原の量を測定するステップ

を含み、正常集団の第 99 百分位数の値の約 1 - 5 倍を超えるトロポニン I 抗原の量が前記患者中の急性冠症候群または心筋梗塞の診断を示す、急性冠症候群および心筋梗塞の 1 つを有する疑いがある患者の急性冠症候群または心筋梗塞を診断する方法。

【請求項 33】

請求項 2 の前記組換え抗体または請求項 3 の前記結合タンパク質を含有する容器を含むキット。

【請求項 35】

X₁ が G であり、

X₂ が Y であり、

X₃ が T または S であり、

X₄ が F であり、

X₅ が T であり、

X₆ が D であり、

X₇ が Y であり、

X₈ が N であり、

X₉ が I または L であり、および

X₁₀ が H である、

C D R - V H 1 . X ₁ - X ₂ - X ₃ - X ₄ - X ₅ - X ₆ - X ₇ - X ₈ - X ₉ - X ₁₀ (配列番号 6 3)、

X ₁ が Y であり、

X ₂ が I であり、

X ₃ が Y であり、

X ₄ が P であり、

X ₅ が Y であり、

X ₆ が N であり、

X ₇ が G であり、

X ₈ が I であり、

X ₉ が T であり、

X ₁₀ が G であり、

X ₁₁ が Y であり、

X ₁₂ が N であり、

X ₁₃ が Q であり、

X ₁₄ が K であり、

X ₁₅ が F であり、

X ₁₆ が K であり、および

X ₁₇ が S である、

10

C D R - V H 2 . X ₁ - X ₂ - X ₃ - X ₄ - X ₅ - X ₆ - X ₇ - X ₈ - X ₉ - X ₁₀ - X ₁₁ - X ₁₂ - X ₁₃ - X ₁₄ - X ₁₅ - X ₁₆ - X ₁₇ (配列番号 6 4)、

X ₁ が D であり、

X ₂ が A または F であり、

X ₃ が Y であり、

X ₄ が D であり、

X ₅ が Y または S であり、

X ₆ が D であり、

X ₇ が W、Y または A であり、

X ₈ が L であり、

X ₉ が A または T であり、および

X ₁₀ が Y または D である、

20

30

C D R - V H 3 . X ₁ - X ₂ - X ₃ - X ₄ - X ₅ - X ₆ - X ₇ - X ₈ - X ₉ - X ₁₀ - X ₁₁ (配列番号 6 6)、

X ₁ が R であり、

X ₂ が A または T であり、

X ₃ が S であり、

X ₄ が Q または K であり、

X ₅ が S または N であり、

X ₆ が I または V であり、

X ₇ が G であり、

X ₈ が T であり、

X ₉ が N であり、

X ₁₀ が I であり、および

X ₁₁ が Y または H である、

40

C D R - V L 1 . X ₁ - X ₂ - X ₃ - X ₄ - X ₅ - X ₆ - X ₇ (配列番号 6 6)、

X ₁ が Y であり、

X ₂ が A または G であり、

X ₃ が S または T であり、

X ₄ が E であり、

X ₅ が S または R であり、

50

X_6 が I、L または V であり、および
 X_7 が S、P または F である、
 CDR-VL2・ X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} (配列番号 67)、

および

X_1 が Q であり、

X_2 が Q であり、

X_3 が S であり、

X_4 が N であり、

X_5 が N であり、

X_6 が W であり、

X_7 が P であり、

X_8 が Y であり、および

X_9 が T である、

CDR-VL3・ X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (配列番号 68)

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 個の CDR を含む抗原結合ドメインを含む単離結合タンパク質。

【請求項 36】

前記結合タンパク質が免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDR 移植抗体、ヒト化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド結合 Fv、scFv、単ドメイン抗体、ダイアボディ、多重特異性抗体、二機能性抗体、抗イディオタイプ抗体、二重特異性抗体、およびこれらの機能活性エピトープ結合断片からなる群から選択される、請求項 3 の結合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、トロポニン I に対する抗体およびこれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

トロポニン I は、例えば心筋梗塞後、またはその最中の心筋損傷を判定する際に使用することができる筋タンパク質である。特に、トロポニン I は、筋収縮装置の細フィラメント上に位置するトロポニン複合体の 3 サブユニットの 1 つである。この複合体は、筋収縮のプロセスを制御する際に主な役割を有する。他の 2 つのサブユニット (すなわち T および C) も、心筋組織および骨格筋組織中にトロポニン I と共に細筋フィラメント上に固定されている。

【0003】

ヒト血清中の心筋トロポニン I を測定する、いくつかのアッセイが記載されている。例えば、ラジオアッセイはこの目的で使用されている (Cummins ら、Am Heart Journal 113: 1333-1344 頁 (1987))。しかしながら、このアッセイは、骨格系トロポニン I に対する有意な交差反応性を有するポリクローナル抗体を利用した。さらに、2 つの異なるモノクローナル抗体を使用する、サンドイッチアッセイが利用されている (Bodar ら、Clinical Chemistry 38: 2203-2214 頁 (1992)) ; 米国特許第 7,285,418 号明細書も参照)。残念ながら、このようなアッセイには非常に高い不正確性がある。したがって、トロポニン I に対して非常に特異的で感度が高い免疫学的検定に関する必要性が確かに存在する。これらの免疫学的検定は、骨格組織中で見られるトロポニン I に対する交差反応性を有していない抗体も利用するはずである。特に、このような免疫学的検定が必要とされ、したがって適切な療法は治療する医師によって利用され、これによって罹患患者に考えられる最高の予後を与えることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

本明細書で言及する全ての特許および刊行物には、参照によりこれらの全容を本明細書に組み込まれている。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 7 , 2 8 5 , 4 1 8 号明細書

【 非特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 非特許文献 1 】 Cummins ら、Am Heart Journal 113:1333-1344頁(1987) 10

【 非特許文献 2 】 Bodar ら、Clinical Chemistry 38:2203-2214頁(1992)

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

(発明の要旨)

本発明は、心臓トロポニン I と結合することができる結合タンパク質、特に抗体に関する。特に、これらの抗体は、トロポニン I の 1 つまたは複数のエピトープと結合する。さらに本発明は、例えば診断アッセイにおける、これらの結合タンパク質またはこれらの一部分を産生および使用する方法も提供する。特に本発明は、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) 受託番号 PTA - 9816 によって指定される、TnI19C7AM1hG1CHO204 と呼ばれるチャニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞系、およびこの細胞系によって産生される組換え抗体を包含する。 20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

加えて、本発明は、GYTF TDY NLH (配列番号 52)、YIYPYNGITGY NQKFKS (配列番号 53)、DAYDYDY LTD (配列番号 54)、RTSKNV GTNIH (配列番号 55)、YASERLP (配列番号 56) および QQSNNWPYT (配列番号 57) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 個の相補性決定領域 (CDR) を含み、トロポニン I と結合する抗原結合ドメインを含む単離結合タンパク質を含む。本発明の結合タンパク質は、例えば少なくとも 3 個のこれらの CDR を含むことができる。さらに、この結合タンパク質は、ヒトアクセプターフレームワークまたは足場も含むことができる。この結合タンパク質は、例えば免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDR 移植抗体、ヒト化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド結合 Fv、scFv、単一ドメイン抗体、ダイアボディ、多重特異性抗体、二機能性抗体、抗イディオタイプ抗体、二重特異性抗体、またはこれらの物質のいずれか 1 つの機能活性エピトープ結合断片からなる群から選択することができる。 30

【 0 0 0 9 】

本発明は、その可変重鎖のアミノ酸配列が配列番号 25 と少なくとも 70% の同一性を有する (図 12 参照) 結合タンパク質をコードする単離核酸分子も包含する。この分子は、配列番号 28 と少なくとも 70% の同一性を有する可変軽鎖 (図 12 参照) も含むことができる。 40

【 0 0 1 0 】

さらに本発明は、その可変重鎖のアミノ酸配列が配列番号 25 である結合タンパク質をコードする単離核酸分子を含む。

【 0 0 1 1 】

加えて、本発明は、その可変軽鎖のアミノ酸配列が配列番号 28 である結合タンパク質をコードする単離核酸分子を含む。この分子は、その重鎖のアミノ酸配列が配列番号 25 50

である可変重鎖をコードする単離核酸分子をさらに含むことができる。

【0012】

本発明は、制御エレメント（例えばプロモーター）と結合した、前に記載した1つまたは複数の核酸分子を含むベクター、およびこのベクターを含む宿主細胞も含む。

【0013】

さらに本発明は、対象の結合タンパク質を産生するのに十分な時間および条件下で前に記載した宿主細胞を培養することを含む、トロポニンIと結合することができる前に記載した任意の結合タンパク質を産生する方法を含む。本発明は、この方法によって産生される結合タンパク質も含む。

【0014】

さらに本発明は、前に記載した任意の1つまたは複数の結合タンパク質および薬剤として許容される担体を含む医薬組成物を包含する。

【0015】

本発明は、試験サンプル中のトロポニンI抗原を検出する方法も含む。この方法は、トロポニンIと結合し配列番号25を含む抗体と試験サンプルを、抗体/抗原複合体の形成に十分な時間および条件下で、接触させるステップ、および複合体の存在が前記試験サンプル中のトロポニンI抗原の存在を示す、複合体の存在を検出するステップを含む。この抗体は配列番号28をさらに含むことができる。この抗体はATCC受託番号PTA-9816を有するチャイニーズハムスター卵巣細胞系によって産生され得る。

【0016】

本発明は、トロポニンIと結合し配列番号25を含む第一の抗体と試験サンプルを、第一の抗体/抗原複合体の形成に十分な時間および条件下で、接触させるステップ、検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物と結合した第二の抗体を含むコンジュゲートを、第一の抗体/抗原/第二の抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下で、第一の抗体/抗原複合体に加えるステップ、およびシグナルの存在が前記試験サンプル中のトロポニンI抗原の存在を示す、シグナル生成化合物によって生成するシグナルの存在を検出するステップを含む、試験サンプル中のトロポニンI抗原を検出する方法も含む。第一の抗体は配列番号28をさらに含むことができ、ATCC受託番号PTA-9816を有するチャイニーズハムスター卵巣細胞系によって産生され得る。

【0017】

本発明は、抗体が配列番号25を含み、検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物で標識される、トロポニンIと結合する抗体とトロポニンI抗原を、トロポニンI抗原/抗原複合体を形成するのに十分な時間および条件下で、接触させるステップ、トロポニンI抗原/抗体/トロポニンI試験サンプル抗原複合体を形成するのに十分な時間および条件下で、前記トロポニンI抗原/抗体複合体に試験サンプルを加えるステップ、および試験サンプル中のトロポニンI抗原の存在を示す、シグナル生成化合物によって生成するシグナルの存在を検出するステップを含む、試験サンプル中のトロポニンI抗原を検出する方法も含む。ここでも、抗体は配列番号28をさらに含むことができ、ATCC受託番号PTA-9816を有するチャイニーズハムスター卵巣細胞系によって産生され得る。

【0018】

本発明は、試験サンプル中のトロポニンI抗原を検出する別の方法も包含する。この方法は、検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物と結合した1)トロポニンI参照抗原、および配列番号25を含む2)トロポニンI抗原に対する抗体と試験サンプルを、トロポニンI参照抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下で、接触させるステップ、およびシグナル生成化合物によって生成するシグナルを検出するステップを含み、試験サンプル中で検出されるトロポニンI抗原の量が抗体と結合したトロポニンI参照抗原の量と反比例する。ここでも、抗体は配列番号28をさらに含むことができ、ATCC受託番号PTA-9816を有するチャイニーズハムスター卵巣細胞系によって産生され得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

加えて、本発明は、前に記載した任意の1つまたは複数の結合タンパク質および薬剤として許容される担体を含む医薬組成物を含む。

【 0 0 2 0 】

本発明は、急性冠症候群および心筋梗塞の1つを有する疑いがある患者中の急性冠症候群または心筋梗塞を診断する方法も包含する。この方法は、患者から生物サンプルを単離するステップ、トロポニンIと結合し配列番号25を含む抗体と生物サンプルを、トロポニンI抗原/抗体複合体の形成に十分な時間および条件下で、接触させるステップ、トロポニンI抗原/抗体複合体の存在を検出するステップ、前記複合体中に存在するトロポニンI抗原を、前記複合体中に存在する前記抗体から分離するステップ、および分離したトロポニンI抗原の量を測定するステップを含み、正常集団の第99百分位数のトロポニンI値の約1 - 5倍を超えるトロポニンI抗原の量が患者中の急性冠症候群または心筋梗塞の診断を示す。

10

【 0 0 2 1 】

本発明は、急性冠症候群および心筋梗塞の1つを有する疑いがある患者中の急性冠症候群または心筋梗塞を診断する他の方法を含む。この方法は、患者から生物サンプルを単離するステップ、トロポニンIと結合し配列番号25を含む第一の抗体と生物サンプルを、トロポニンI抗原/抗体複合体の形成に十分な時間および条件下で、接触させるステップ、検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物と結合した第二の抗体を含む、生成したトロポニンI抗原/抗原複体にコンジュゲートを、コンジュゲートが結合トロポニンI抗原と結合するのに十分な時間および条件下で加えるステップ、シグナル生成化合物によって生成するシグナルを検出することによって、前記生物サンプル中に存在する可能性があるトロポニンI抗原の存在を検出するステップ、およびシグナルの強度を測定することによって試験サンプル中に存在するトロポニンI抗原の量を測定するステップを含み、正常集団の第99百分位数の値の約1 - 5倍を超えるトロポニンI抗原の量が患者中の急性冠症候群または心筋梗塞の診断を示す。

20

【 0 0 2 2 】

本発明は、前に記載した任意の1つまたは複数のモノクローナル抗体または結合タンパク質、および必要な場合、このキットを使用するための方法を記載する説明書を含むキットも含む。

30

【 0 0 2 3 】

加えて、本発明は、

X_1 が G であり、

X_2 が Y であり、

X_3 が T または S であり、

X_4 が F であり、

X_5 が T であり、

X_6 が D であり、

X_7 が Y であり、

X_8 が N であり、

X_9 が I または L であり、および

X_{10} が H である、

配列番号63)、

X_1 が Y であり、

X_2 が I であり、

X_3 が Y であり、

X_4 が P であり、

X_5 が Y であり、

X_6 が N であり、

40

50

- X_7 が G であり、
 X_8 が I であり、
 X_9 が T であり、
 X_{10} が G であり、
 X_{11} が Y であり、
 X_{12} が N であり、
 X_{13} が Q であり、
 X_{14} が K であり、
 X_{15} が F であり、
 X_{16} が K であり、 および
 X_{17} が S である、
 C D R - V H 2 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} -$
 $X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17}$ (配列番号 6 4)、
 X_1 が D であり、
 X_2 が A または F であり、
 X_3 が Y であり、
 X_4 が D であり、
 X_5 が Y または S であり、
 X_6 が D であり、
 X_7 が W、Y または A であり、
 X_8 が L であり、
 X_9 が A または T であり、 および
 X_{10} が Y または D である、
 C D R - V H 3 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10}$ (配列番号 6 5)、
 X_1 が R であり、
 X_2 が A または T であり、
 X_3 が S であり、
 X_4 が Q または K であり、
 X_5 が S または N であり、
 X_6 が I または V であり、
 X_7 が G であり、
 X_8 が T であり、
 X_9 が N であり、
 X_{10} が I であり、 および
 X_{11} が Y または H である、
 C D R - V L 1 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10}$ (配列番号 6 6)、
 X_1 が Y であり、
 X_2 が A または G であり、
 X_3 が S または T であり、
 X_4 が E であり、
 X_5 が S または R であり、
 X_6 が I、L または V であり、 および
 X_7 が S、P または F である、
 C D R - V L 2 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7$ (配列番号 6 7)、
 および
 X_1 が Q であり、
 X_2 が Q であり、
 X_3 が S であり、

10

20

30

40

50

X_4 が N であり、
 X_5 が N であり、
 X_6 が W であり、
 X_7 が P であり、
 X_8 が Y であり、および
 X_9 が T である、

CDR - VL3 - X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} (配列番号 68)

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 個の CDR を含む抗原結合ドメインを含む単離結合タンパク質を含む。

10

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図 1】トロポニン I に対する改善された親和性を有する抗体を同定および作製するために使用したステップを示すフローチャートである。

【図 2 A】野生型 TnI 19C7 単鎖可変断片 (「scFv」) のヌクレオチドの記載 (配列番号 109 および配列番号 110) を示す図である。

【図 2 B】野生型 TnI 19C7 単鎖可変断片 (「scFv」) のヌクレオチドの記載 (配列番号 109 および配列番号 110) を示す図である。

【図 3 A】完全長 TnI 19C7 単鎖可変断片 (scFv) を発現する酵母が、scTnI - C - 2 として知られる単鎖トロポニン I (28 - 110 アミノ酸) リンカートロポニン C (Spectral Diagnostics, RP - 3700) と結合することを示す図である。より詳細には、この図は、TnI 19C7 scFv 発現酵母を、scTnI - C - 2 または抗 V5、次にそれぞれ抗トロポニン mAb およびヤギ抗マウス - フィコエリスリン (GAM: PE) (図 3 B) または GAM: PE (図 3 A) のいずれかとインキュベートしたことを示す。フローサイトメリーのヒストグラムは、抗 V5 によって検出した TnI 19C7 scFv の完全長発現、および scTnI - C - 2 と結合する TnI 19C7 scFv の能力を示す。PE - A 単位 (横座標) : 10^2 、 10^3 、 10^4 、および 10^5 。計数単位 (縦座標) : 10^2 、 10^3 、 10^4 、および 10^5 。

20

【図 3 B】完全長 TnI 19C7 単鎖可変断片 (scFv) を発現する酵母が、scTnI - C - 2 として知られる単鎖トロポニン I (28 - 110 アミノ酸) リンカートロポニン C (Spectral Diagnostics, RP - 3700) と結合することを示す図である。より詳細には、この図は、TnI 19C7 scFv 発現酵母を、scTnI - C - 2 または抗 V5、次にそれぞれ抗トロポニン mAb およびヤギ抗マウス - フィコエリスリン (GAM: PE) (図 3 B) または GAM: PE (図 3 A) のいずれかとインキュベートしたことを示す。フローサイトメリーのヒストグラムは、抗 V5 によって検出した TnI 19C7 scFv の完全長発現、および scTnI - C - 2 と結合する TnI 19C7 scFv の能力を示す。PE - A 単位 (横座標) : 10^2 、 10^3 、 10^4 、および 10^5 。計数単位 (縦座標) : 10^2 、 10^3 、 10^4 、および 10^5 。

30

【図 4】TnI 19C7 scFv のオフレート測定を示す図である。より詳細には、TnI 19C7 scFv 発現酵母を飽和濃度の scTnI - C - 2 とインキュベートした。細胞は二回洗浄し、それぞれの時間地点で細胞を氷に移し、洗浄し抗 TnI mAb とインキュベートした。30 分後、細胞を再度洗浄し、ヤギ抗マウスフィコエリスリンとインキュベートした。再度 30 分後、細胞を洗浄し、フローサイトメーターで分析した。一次崩壊反応式を使用して個々の時間地点を適合させ、この場合 m1 は時間 0 での理論上の最大平均蛍光単位 (「MFU」) であり、m2 はオフレート (「koff」) であり、m3 は自己蛍光によるバックグラウンド MFU であり、M0 は時間 x であり (x は測定中の時間である)、時間 x は測定を行う時間である。TnI - C - 2 と結合した TnI 19C7 scFv の半減期 ($t_{1/2}$) は、 $t_{1/2} = \ln 2 / k_{off}$ を使用して計算した。半減期の 5 倍が、TnI 19C7 scFv の CDR 突然変異ライブラリーを選別するために使用した時間であった。

40

50

【図5】TnI19C7scFvの平衡解離定数(KD)測定を示す図である。より詳細には、TnI19C7scFv発現酵母を様々な濃度のscTnI-C-2とインキュベートした。細胞はPBS pH6.8/2%BSA/0.02%Standapol ES-1で二回洗浄し、30分間抗TnImAbとインキュベートした。細胞を再度洗浄し、30分間ヤギ抗マウスフィコエリスリンとインキュベートした。最後に、細胞を洗浄し、フローサイトメーターで分析した。

【図6】どのようにして縮重オリゴヌクレオチドを設計し、したがってそれぞれのCDRヌクレオチド残基の70%が野生型残基であり30%が他の3残基の混合物であるプライマーを作製するかを示す概略図である。それぞれのライブラリーに関して2個のPCR産物、スパイク(sp)PCR産物および非スパイクPCR産物を作製する。スパイクPCR産物と非スパイクPCR産物を組合せて、完全CDR突然変異scFvライブラリーを作製する。

【図7】酵母の相同組換えを使用し、どのようにしてTnI19C7scFvライブラリーを構築したかを示す概略図である。より詳細には、スパイクCDRPCR産物および切除した酵母ディスプレイベクターをS.セレビスイエ(S.cerevisiae)菌株EBY100に形質転換した。形質転換クローンをトリプトファン欠損グルコース培地中で選択した。

【図8A】scFv構築物を作製するために使用したPCRプライマー(tpVHforからtpVLrev)、CDRスパイクライブラリーを作製するために使用したPCRプライマー(19H1spforからpYD41rev2)、およびコンビネーションライブラリーを作製するために使用したPCRプライマー(19FRH2forから19FRL3)を示す概要である(配列番号1-22参照)。プライマーの太字および拡大領域は、プライマーを作製しながら「70%野生型、30%他のヌクレオチド混合物」が取り込まれた領域を表す。このような「スパイク」プライマーはライブラリー内に多様性をもたらした。

【図8B】scFv構築物を作製するために使用したPCRプライマー(tpVHforからtpVLrev)、CDRスパイクライブラリーを作製するために使用したPCRプライマー(19H1spforからpYD41rev2)、およびコンビネーションライブラリーを作製するために使用したPCRプライマー(19FRH2forから19FRL3)を示す概要である(配列番号1-22参照)。プライマーの太字および拡大領域は、プライマーを作製しながら「70%野生型、30%他のヌクレオチド混合物」が取り込まれた領域を表す。このような「スパイク」プライマーはライブラリー内に多様性をもたらした。

【図9】図5において前に記載したように決定した選択TnI19C7scFvの平衡解離定数(KD)測定を示す図である。

【図10】抗原50%(Ag50)として測定した相対的抗体親和性の結果を示す図である。可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメインにクローニングすることによって、4個のTnI19C7クローンをマウスIgG2ak抗体に変換した。抗体は一過性HEK294細胞系中で発現させた。Ag50は最高シグナルの50%であるscTnI-Cの濃度であり、選択したTnI19C7AM候補の相対的親和性ランキングを表す。TnI19C7AM1はTnI19C7野生型抗体と比較して確かな相対的親和性を示す。

【図11】ARCHITECT(登録商標)アッセイ形式(Abbott Laboratories、Abbott Park、IL)でscTnI-Cと結合するTnI19C7AM1の能力を示す図である。TnI19C7はアクリジニウムで標識し、抗TnI捕捉ビーズを使用してscTnI-Cとの結合に関してアッセイした(X=scTnI-Cの所与のキャリブレーター濃度で生成したシグナル; X/A=キャリブレーターXシグナルとキャリブレーターAシグナルの比; RLU=相対光単位)。TnI19C7AM1は、野生型TnI19C7抗体と比較して、このアッセイ形式においてキャリブレーターの範囲でより良い結合を示した。

【図12A】モノクローナル抗体TnI19C7AM1、特に相補性決定領域(CDR)

10

20

30

40

50

の重鎖（配列番号 25）および軽鎖（配列番号 28）の、ヌクレオチド（配列番号 23、配列番号 24（相補配列）、配列番号 26 および配列番号 27（相補配列））およびコードアミノ酸配列を示す図である。

【図 12B】モノクローナル抗体 T n I 19 C 7 A M 1、特に相補性決定領域（CDR）の重鎖（配列番号 25）および軽鎖（配列番号 28）の、ヌクレオチド（配列番号 23、配列番号 24（相補配列）、配列番号 26 および配列番号 27（相補配列））およびコードアミノ酸配列を示す図である。

【図 13】図 12 中に示したアミノ酸以外のアミノ酸（配列番号 24 - 49）で置換することができる T n I 19 C 7 C D R の重鎖および軽鎖内の位置を示す図である。

【発明を実施するための形態】

10

【0025】

本明細書で他に定義しない限り、本発明に関して使用する科学および技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。用語の意味および範囲は明らかでなければならないが、しかしながら、何らかの潜在的な曖昧さが存在する場合、本明細書で与える定義は如何なる辞書または外部定義より優先される。さらに、文脈によって他に必要とされない限り、単数形用語は複数形を含むものとし、複数形用語は単数形を含むものとする。本出願中、「または」の使用は他に言及しない限り「および/または」を意味する。さらに、用語「including」、ならびに「includes」および「included」などの他の形の使用は非制限的である。さらに、「エレメント」または「構成要素」などの用語は、他に具体的に言及しない限り、1 単位を含むエレメントおよび構成要素と、2 つ以上のサブユニットを含むエレメントおよび構成要素の両方を包含する。

20

【0026】

一般に、本明細書に記載する細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、およびタンパク質および核酸化学、およびハイブリダイゼーション、およびこれらの技法に関して使用する命名は、当技術分野でよく知られており一般に使用される命名である。本発明の方法および技法は、他に示さない限り、当技術分野でよく知られており本明細書を通じて引用および論説する様々な一般およびより具体的な参照中に記載される従来の方法に従って一般的に実施する。酵素反応および精製技法は、当技術分野または本明細書に記載されるのと同様に一般に実施されるように、製造者の仕様書に従って実施する。本明細書に記載する分析化学、合成有機化学、および医学および薬化学、ならびにこれらの実験手順および技法に関して使用する命名は、当技術分野でよく知られており一般に使用される命名である。標準的な技法を、化学合成、化学分析、薬剤調製、製剤、および送達、および患者の治療に使用する。

30

【0027】

本発明をさらに容易に理解することができるように、選択用語を以下に定義する。

【0028】

本明細書で使用する用語「ポリペプチド」は、アミノ酸の任意のポリマー鎖を指す。用語「ペプチド」および「タンパク質」は用語ポリペプチドと相互に使用し、アミノ酸のポリマー鎖も指す。用語「ポリペプチド」は、天然または人工タンパク質、タンパク質断片、およびタンパク質配列のポリペプチドアナログを包含する。ポリペプチドはモノマーまたはポリマーであってよい。

40

【0029】

用語「単離タンパク質」または「単離ポリペプチド」は、その派生起源または供給源によって、その天然状態で付随した本来結合した構成要素と結合していない、同種由来の他のタンパク質を実質的に含まない、異種由来の細胞によって発現される、または天然に存在しない、タンパク質またはポリペプチドである。したがって、化学的に合成されたまたはそれが本来由来する細胞と異なる細胞系中で合成されたポリペプチドは、その本来結合した構成要素から「単離」されている。当技術分野でよく知られているタンパク質精製技法を使用した単離によって、タンパク質を本来結合した構成要素を実質的に含まない状態

50

にすることもできる。

【0030】

本明細書で使用する用語「回収」は、例えば当技術分野でよく知られているタンパク質精製技法を使用した単離によって、ポリペプチドなどの化学種を本来結合した構成要素を実質的に含まない状態にするプロセスを指す。

【0031】

本発明は、本明細書に記載する抗体の可変軽鎖および重鎖をコードする単離ヌクレオチド配列（またはこれらの断片）、およびこれらのコードヌクレオチド配列と少なくとも約70%（例えば70%71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%または79%）、好ましくは少なくとも約80%（例えば80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%または89%）、およびより好ましくは少なくとも約90%（例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一である配列を含む、これらと対応する、同一である、ハイブリダイズ可能である、または相補的である配列を有するヌクレオチド配列（またはこれらの断片）も含む。（70%から100%までの全ての整数（およびこれらの一部分）はパーセント同一性に関して本発明の範囲内にあると考えられる）。このような配列は（例えば天然供給源から単離したか、半合成経路、またはデノボ合成により生成したいずれかの）任意の供給源から誘導することができる。特にこのような配列は、実施例中に記載した供給源（例えば細菌、真菌、藻類、マウスまたはヒト）以外の供給源から単離または誘導することができる。

10

20

【0032】

前に記載したヌクレオチド配列以外に、本発明は、本明細書に記載する抗体の可変軽鎖および重鎖のアミノ酸配列（またはこれらのアミノ酸配列の断片）も含む。さらに本発明は、本発明のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約70%（例えば70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%または79%）、好ましくは少なくとも約80%（例えば80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%または89%）、およびより好ましくは少なくとも約90%（例えば90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であるアミノ酸配列（またはこれらの断片）を含む、これらと対応する、同一である、または相補的であるアミノ酸配列（またはこれらの断片）も含む。（再度、（前述のヌクレオチド配列パーセント同一性に関して列挙したように）70%から100%までの全ての整数（およびこれらの一部分）もパーセント同一性に関して本発明の範囲内にあると考えられる）。

30

【0033】

本発明の目的で、ヌクレオチド配列の「断片」は、指定ヌクレオチド配列の領域に対応する少なくとも約6個、好ましくは少なくとも約8個、より好ましくは少なくとも約10個のヌクレオチド、およびさらにより好ましくは少なくとも約15個のヌクレオチドの隣接配列として定義する。

【0034】

用語「同一性」は、特定の比較ウィンドウまたはセグメントにわたるヌクレオチド - ヌクレオチドベースでの2配列の関連性を指す。したがって、2つのDNAセグメント（または2つのアミノ酸配列）の同じ鎖（センスまたはアンチセンスのいずれか）の間の同一性、対応性または均一性の程度として同一性を定義する。「配列同一性のパーセンテージ」は、特定領域にわたる2つの最適アラインメント配列を比較すること、両配列中の同一塩基または同一アミノ酸が存在する位置の数を決定して適合位置の数を得ること、比較するセグメント中の全位置数でこのような位置の数を割ること、およびこの結果に100を掛けることによって計算する。配列の最適アラインメントは、Smith & Waterman、Appl. Math. 2: 482 (1981)のアルゴリズムによって、Needleman & Wunsch、J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)のアルゴリズムによって、Pearson & Lipman、Proc. Natl. A

40

50

cad. Sci. (USA) 85: 2444 (1988) の方法によって、および関連アルゴリズムを実行するコンピュータプログラム (例えば、Clustal Macaw Pileup (<http://cmgm.stanford.edu/biochem218/11Multiple.pdf>; Higginsら、CABIOS. 5L151-153 (1989))、FASTDB (Intelligentics)、BLAST (National Center for Biomedical Information; Altschulら、Nucleic Acids Research 25: 3389-3402頁 (1997))、PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) または GAP、BESTFIT、FASTA および TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI) (米国特許第 5,912,120号参照) によって実施することができる。

10

20

30

40

50

【0035】

本発明の目的で、「相補性」は、2つのDNAセグメント間の関連性の程度として定義する。相補性は、二重らせんを形成するのに適した条件下で、他のDNAセグメントのアンチセンス鎖とハイブリダイズするあるDNAセグメントのセンス鎖の能力を測定することによって決定する。「相補配列」は、正統的な塩基対形成法則に基づいて所与の配列と対形成する配列として定義する。例えば、あるヌクレオチド鎖中の配列 A - G - T は他の鎖中の T - C - A と「相補的」である。

【0036】

二重らせん中、アデニンが一方の鎖中に見られ、チミンが他方の鎖中に見られる。同様に、グアニンが一方の鎖中に見られるところでは、シトシンが他方の鎖中に見られる。2つのDNAセグメントのヌクレオチド配列間の関連性が高くなるほど、2つのDNAセグメントの鎖間でハイブリッド二本鎖を形成する能力が高くなる。

【0037】

2つのアミノ酸配列間の「類似性」は、両配列中の一連の同一および保存アミノ酸残基の存在として定義する。2つのアミノ酸配列間の類似性の程度が高くなるほど、2つの配列の対応性、同一性または均一性が高くなる。(2つのアミノ酸配列間の同一性は、両配列中の一連の正確に同様または不変アミノ酸残基の存在として定義する。)「相補性」、「同一性」および「類似性」の定義は当業者によく知られている。

【0038】

「によってコードされる」はポリペプチド配列をコードする核酸配列を指し、この場合ポリペプチド配列またはこれらの一部分は、核酸配列によってコードされるポリペプチド由来の、少なくとも3アミノ酸、より好ましくは少なくとも8アミノ酸、およびさらにより好ましくは少なくとも15アミノ酸のアミノ酸配列を含有する。

【0039】

本明細書で使用する「生物活性」は、トロポニンIに対する抗体またはトロポニンIの全ての固有の生物学的性質を指す。このような性質には、例えば、トロポニンIおよび本明細書で記載する機能上関連がある抗体と結合する抗体の能力がある。

【0040】

抗体、タンパク質、またはペプチドと第二の化学種の相互作用に関して本明細書で使用する用語「特異的結合」または「特異的に結合」は、相互作用が化学種上の特定構造 (例えば、抗原決定基またはエピトープ) の存在に依存すること、例えば、抗体が一般に複数のタンパク質ではなく1つの特異的タンパク質構造を認識し結合することを意味する。抗体がエピトープ「A」に特異的である場合、標識「A」および抗体を含有する反応物中のエピトープA (または遊離、非標識A) を含有する分子の存在によって、抗体と結合する標識Aの量は低減する。

【0041】

本明細書で使用する用語「抗体」は、4本のポリペプチド鎖、2本の重鎖(H)および

2本の軽鎖(L)で構成される任意の免疫グロブリン(Ig)分子、またはIg分子の必須エピトープ結合特性を保持する、これらの任意の機能断片、突然変異体、変異体、または誘導体を広く指す。このような突然変異体、変異体、または誘導体抗体物質、以下で論じる非制限的实施形態は当技術分野で知られている。

【0042】

完全長抗体では、それぞれの重鎖は重鎖可変領域(本明細書ではHCVRまたはVHと略す)および重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、3ドメイン、CH1、CH2およびCH3で構成される。それぞれの軽鎖は軽鎖可変領域(本明細書ではLCVRまたはVLと略す)および軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は1ドメイン、CLで構成される。VHおよびVL領域は、より保存的なフレームワーク領域(FR)と呼ばれる領域間に散在する、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変領域にさらに細分することができる。それぞれのVHおよびVLは、以下の順:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端に配列する、3個のCDRおよび4個のFRで構成される。免疫グロブリン分子は、任意の型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)またはサブクラスであってよく、任意の種(例えば、マウス、ヒト、ニワトリ、ラット、ウサギ、ヒツジ、サメおよびラクダ)に由来してよい。

10

【0043】

本発明の抗体のCDRを以下の表1および表2中に示す:

20

【0044】

【表1】

表1: TnI 19C7 AM1 に関する重鎖のCDR

配列番号	タンパク質領域	配列
52	CDR H1	GYTFTDYNLH
53	CDR H2	YIYPYNGITGYNQKFKS
54	CDR H3	DAYDYDYLT

30

【0045】

40

【表 2】

表 2 : TnI 19C7 AM1 に関する軽鎖の CDR

配列番号	タンパク質領域	配列
55	CDR L1	RTSKNVGTNIH
56	CDR L2	YASERLP
57	CDR L3	QQSNNWPYT

10

【0046】

本明細書で使用する用語、抗体の「抗原結合部分」（または単に「抗原部分」）は、抗原と特異的に結合する能力を保持する1つまたは複数の抗体の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の1つまたは複数の断片によって実施され得ることは示されている。このような抗体の実施形態は、2個以上の異なる抗原と特異的に結合する、二重特異性、二機能性、または多重特異性であってもよい。用語、抗体の「抗原結合部分」内に含まれる結合断片の例には、(i) Fab断片、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片、(ii) F(ab')₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結した2個のFab断片を含む二価断片、(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、(v) 1個の変域ドメインを含む、dAb断片（参照により本明細書に組み込む、Wardら、(1989) *Nature* 341: 544 - 546頁、Winterら、*Intern. Appln. Public. No. WO90/05144A1*）、および(vi) 単離相補性決定領域(CDR)がある。さらに、Fv断片の2個のドメイン、VLおよびVHは別々の遺伝子によってコードされているが、組換え法を使用して、VLとVH領域が対になり一価分子を形成する単鎖タンパク質としてそれらを作製することができる合成リンカーによって(単鎖Fv(scFv))として知られる、例えばBirdら、(1988) *Science* 242: 423 - 426頁；およびHoustonら、(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879 - 5883頁を参照)、それらを接合することができる。このような単鎖抗体も、本明細書において用語、抗体の「抗原結合部分」の範囲内に含まれる。ダイアボディなどの、他の型の単鎖抗体も含まれる。ダイアボディは、VHおよびVLドメインが一本のポリペプチド鎖上で発現される二価の二重特異性抗体であるが、同じ鎖上の2ドメイン間の対形成を可能にするのに短すぎるリンカーを使用し、それによって別の鎖の相補的ドメインとこれらのドメインを対形成させ、2個の抗原結合部位を作製する(例えば、Holliger、P.ら、(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444 - 6448頁；Poljak、R.J.ら、(1994) *Structure* 2: 1121 - 1123頁を参照)。このような抗体結合部分は当技術分野で知られている(Kontermann and Dubel eds、*Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag, New York, 790頁 (ISBN 3-540-41354-5))。

20

30

40

【0047】

本明細書で使用する用語「抗体構築物」は、リンカーポリペプチドまたは免疫グロブリン定常ドメインと結合した1つまたは複数の本発明の抗原結合部分を含むポリペプチドを

50

指す。リンカーポリペプチドは、ペプチド結合によって連結した2個以上のアミノ酸残基を含み、これらを使用して1つまたは複数の抗原結合部分を結合させる。このようなリンカーポリペプチドは当技術分野でよく知られている(例えば、Holliger、P.ら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448頁; Poljak、R. J.ら、(1994) Structure 2: 1121 - 1123頁を参照)。免疫グロブリン定常ドメインは、重鎖または軽鎖定常ドメインを指す。ヒトIgG重鎖および軽鎖定常ドメインのアミノ酸配列は当技術分野で知られており、例は表3中に表す。

【0048】

【表 3】

表 3 : ヒト IgG 重鎖定常ドメインおよび軽鎖定常ドメインの配列

タンパク質	配列識別子	配列
		12345678901234567890123456789012
タンパク質	配列識別子	配列
		12345678901234567890123456789012
Igガンマ-1定常領域	配列番号 :50	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
Igガンマ-1定常領域 突然変異体	配列番号 :51	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

タンパク質	配列識別子	配列
		12345678901234567890123456789012
Ig Kappa 定常領域	配列番号: 61	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
Igラムダ定常領域	配列番号: 62	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATL VCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKS <hr/> SYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS

10

20

【0049】

他にさらに、抗体またはこれらの抗原結合部分は、1つまたは複数の他のタンパク質またはペプチドと抗体または抗体部分の共有または非共有結合によって形成される、より大きな免疫接着分子の一部である可能性がある。このような免疫接着分子の例は、ストレプトアビジンコア領域を使用してテトラマー-scFv分子を作製すること(Kipriyanov、S.M.ら、(1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101頁)、およびシステイン残基、マーカーペプチドおよびC末端ポリヒスチジンタグを使用して二価およびビオチニル化scFv分子を作製することを含む(Kipriyanov、S.M.ら、(1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058頁)。FabおよびF(ab')₂断片などの抗体部分は、完全抗体のそれぞれパインまたはペプシン消化などの従来技法を使用して、完全抗体から調製することができる。さらに、抗体、抗体部分および免疫接着分子は、本明細書に記載するような標準的な組換えDNA技法を使用して得ることができる。

30

【0050】

本明細書で使用する「単離抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すものとする(例えば、トロポニンIと特異的に結合する単離抗体は、トロポニンI以外の抗原と特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。トロポニンIと特異的に結合する単離抗体は、しかしながら、他種由来のトロポニンI分子などの、他の抗原と交差反応性を有する可能性がある。さらに、単離抗体は他の細胞物質および/または化学物質を実質的に含まない可能性がある。

40

【0051】

本明細書で使用する用語「ヒト抗体」は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来の変および定常領域を有する抗体を含むものとする。本発明のヒト抗体は、例えばCDR中、特にCDR3中に、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含むことができる(例えば、インビトロでのランダムまたは部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボでの体細胞突然変異によって導入された突然変異)。しかしながら、本明細書で使用する用語「ヒト抗体」は、マウスなどの他の哺乳動物種の生殖細胞系由来のCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を含まないものとする。

50

【0052】

本明細書で使用する用語「組換えヒト抗体」は、(以下に記載する)宿主細胞にトランスフェクトした組換え発現ベクターを使用して発現された抗体、組換え、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離した抗体(Hoogenboom H. R.、(1997) TIB Tech. 15: 62-70頁; Azzazy H.、および Highsmith W. E.、(2002) Clin. Biochem. 35: 425-445頁; Gavi londo J. V.、および Larrick J. W. (2002) Bio Techniques 29: 128-145頁; Hoogenboom H.、および Chames P. (2000) Immunology Today 21: 371-378頁)、ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックである動物(例えば、マウス)から単離した抗体(例えば、Taylor、L. D.ら、(1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295頁; Keller mann、S - A. および Green、L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 593-597頁; Little M.ら(2000) Immunology Today 21: 364-370頁を参照)、または他のDNA配列とヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製または単離された抗体などの、組換え手段によって調製、発現、作製または単離された全てのヒト抗体を含むものとする。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来の変域および定常領域を有する。しかしながら、特定の実施形態では、このような組換えヒト抗体にインビトロでの突然変異誘発(または、ヒトIg配列に関してトランスジェニックである動物を使用するとき、インビボでの体細胞突然変異)を施し、したがって組換え抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系VHおよびVL配列に由来し関連がある一方で、インビボでヒト抗体生殖細胞系レパートリー内に本来存在し得ない配列である。

10

20

【0053】

用語「キメラ抗体」は、一種由来の重鎖および軽鎖可変領域配列と別種由来の定常領域配列を含む抗体を指す。本発明は、例えばヒト定常領域と結合したマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する、キメラ抗体を包含する。

【0054】

用語「CDR移植抗体」は、一種由来の重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、VHおよび/またはVLの1つまたは複数のCDR領域の配列が別種のCDR配列で置換された抗体、1つまたは複数のマウスCDR(例えば、CDR3)がヒトCDR配列で置換されたマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体などを指す。

30

【0055】

用語「ヒト化抗体」は、非ヒト種(例えば、マウス)由来の重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、VHおよび/またはVL配列の少なくとも一部分がより「ヒト様」に改変されている、すなわちヒト生殖細胞系可変配列により類似している抗体を指す。ヒト化抗体の1つの型は、ヒトCDR配列が非ヒトVHおよびVL配列中に導入され対応する非ヒトCDR配列に置換された、CDR移植抗体である。

【0056】

用語「カバットのナンバリング」、「カバットの定義」および「カバットの標識」は、本明細書において相互に使用する。当技術分野で理解されるこれらの用語は、抗体、またはこれらの抗原結合部分の重鎖および軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基より可変性(すなわち超可変性)であるアミノ酸残基のナンバリングのシステムを指す(Kabatら、(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391頁および Kabat、E. A.ら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242)。重鎖可変領域に関して、超可変領域はCDR1に関してアミノ酸位置31から35、CDR2に関してアミノ酸位置50から65、およ

40

50

びCDR3に関してアミノ酸位置95から102の範囲である。軽鎖可変領域に関して、超可変領域はCDR1に関してアミノ酸位置24から34、CDR2に関してアミノ酸位置50から56、およびCDR3に関してアミノ酸位置89から97の範囲である。(さらに、本発明の目的で、Oxford MolecularのABM抗体モデリングソフトウェアによって定義されたAbMの定義を使用して、重鎖に関してアミノ酸26から35のCDR-H1領域を定義した。)

本明細書で使用する用語「アクセプター」および「アクセプター抗体」は、1つまたは複数のフレームワーク領域の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または100%のアミノ酸配列を提供またはコードする抗体または核酸配列を指す。いくつかの実施形態では、用語「アクセプター」は、(1つまたは複数の)定常領域を提供またはコードする抗体アミノ酸または核酸配列を指す。さらに別の実施形態では、用語「アクセプター」は、1つまたは複数のフレームワーク領域および(1つまたは複数の)定常領域を提供またはコードする抗体アミノ酸または核酸配列を指す。特定の実施形態では、用語「アクセプター」は、1つまたは複数のフレームワーク領域の少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または100%のアミノ酸配列を提供またはコードするヒト抗体アミノ酸または核酸配列を指す。この実施形態によれば、アクセプターは、ヒト抗体の1つまたは複数の特定位置に存在しない、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、または少なくとも10個のアミノ酸残基を含有することができる。アクセプターフレームワーク領域および/または(1つまたは複数の)アクセプター定常領域は、例えば、生殖細胞系抗体遺伝子、成熟抗体遺伝子、機能抗体(例えば、当技術分野でよく知られている抗体、開発中の抗体、または市販の抗体)から誘導または入手することができる。

【0057】

本明細書で使用する用語「CDR」は、抗体可変配列内の相補性決定領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれの中に3個のCDRが存在し、それらはそれぞれの可変領域に関してCDR1、CDR2およびCDR3で表す。本明細書で使用する用語「CDRセット」は、抗原と結合することができる1個の可変領域中に存在する3個のCDRの一群を指す。これらのCDRの正確な境界は、異なるシステムに従い異なる定義がされている。Kabataiによって記載されたシステム(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)および(1991))は抗体の任意の可変領域に適用可能な明確な残基ナンバリングシステムを与えるだけでなく、3個のCDRを画定する正確な残基境界も与える。これらのCDRはKabataiのCDRと呼ぶことができる。Chothiaおよび同僚(Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917頁(1987)およびChothiaら、Nature 342: 877-883頁(1989))は、KabataiのCDR内の特定微小部分は、アミノ酸配列のレベルで多大な多様性を有するにもかかわらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体配座をとることを発見した。これらの微小部分は、L1、L2およびL3またはH1、H2およびH3として表し、この場合「L」および「H」は、それぞれ軽鎖および重鎖領域を表す。これらの領域は、KabataiのCDRと重複する境界を有するChothiaのCDRと呼ぶことができる。KabataiのCDRと重複するCDRを画定する他の境界は、Padlan (FASEB J. 9: 133-139頁(1995)およびMacCallum (J. Mol. Biol. 262(5): 732-45頁(1996))によって記載されている。さらに他のCDR境界の定義は、AbMの定義などの前述のシステムの1つに厳密には従わない可能性があるが、それにもかかわらずKabataiのCDRと重複し、ただし、特定残基または残基群またはさらにCDR全体が抗原結合に有意に影響を与えないという予想または実験の発見に照らして、それらを短縮または延長することができる。本明細書で使用する方法はこれらのシステムのいずれかに従い定義したCDRを利用することができるが、好ましい実施形態

10

20

30

40

50

は Kabat、AbM または Chothia 定義の CDR を利用する。

【0058】

本明細書で使用する用語「標準」残基は、Chothiaら（いずれも参照により本明細書に組み込む、J. Mol. Biol. 196: 901-907頁（1987）；Chothiaら、J. Mol. Biol. 227: 799（1992））によって定義された個々の標準CDR構造を画定するCDRまたはフレームワーク中の残基を指す。Chothiaらによれば、多くの抗体のCDRの重要部分は、アミノ酸配列のレベルでの多大な多様性にもかかわらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体配座を有する。それぞれの標準構造は、ループを形成するアミノ酸残基の隣接セグメントに関する一組のペプチド骨格のねじれ角を主に指定する。

10

【0059】

本明細書で使用する用語「ドナー」および「ドナー抗体」は、1つまたは複数のCDRを与える抗体を指す。好ましい実施形態では、ドナー抗体は、フレームワーク領域が入手または誘導される抗体と異なる種由来の抗体である。ヒト化抗体の文脈で、用語「ドナー抗体」は、1つまたは複数のCDRを与える非ヒト抗体を指す。

【0060】

本明細書で使用する用語「フレームワーク」および「フレームワーク配列」は、CDRを引いた可変領域の残りの配列を指す。CDR配列の正確な定義は異なるシステムによって決定することができるので、フレームワーク配列の意味には相応して異なる解釈が施される。6個のCDR（軽鎖のCDR-L1、-L2、および-L3および重鎖のCDR-H1、-H2、および-H3）はさらに軽鎖および重鎖上のフレームワーク領域を各鎖上の4個の微小領域（FR1、FR2、FR3およびFR4）に分かれ、この中でCDR1はFR1とFR2の間、CDR2はFR2とFR3の間、およびCDR3はFR3とFR4の間に位置する。FR1、FR2、FR3またはFR4として個々の微小領域を特定せずに、フレームワーク領域は、他に言及されるように、一本の本来存在する免疫グロブリン鎖の可変領域内の組合せFRを表す。本明細書で使用する1つのFRは4個の微小領域の1つを表し、複数のFRはフレームワーク領域を構成する4個の微小領域の2つ以上を表す。

20

【0061】

本発明の一実施形態では、マウス重鎖および軽鎖ドナー配列は以下に記載する配列から選択される：

30

【0062】

【表 4】

表 4 : TnI 19C7 AM1 に関する重鎖ドナー配列

配列番号	配列	
	1234567890123456789012345678901 2	10
69	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTF SGFSLS	
70	WIRQPPGKALEWLA	
71	RLTISKDTSKNQVVLTMNMDPV DTATYYCAR	
72	WGQGTTVTVSS	20
73	EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTV SGFSLS	
74	WIRQPPGKALEWLA	
75	RLTISKDTSKSNQVVLTMNMDPV DTATYYCAR	
76	WGQGTTVTVSS	
77	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFS	30
78	WVRQAPGKGLEWVG	
79	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTED TAVYYCAR	
80	WGQGTTVTVSS	
81	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFS	40
82	WVRQAPGKGLEWVS	
83	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCAR	
84	WGQGTTVTVSS	

配列 番号	配列
	1234567890123456789012345678901 2
85	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFS
86	WVRQAPGQGLEWMG
87	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR
88	WGQGTTVTVSS
89	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFT
90	WVRQAPGQGLEWMG
91	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCAR
92	WGQGTTVTVSS

10

20

【 0 0 6 3 】

【表5】

表5：TnI 19C7 AM1 に関する軽鎖ドナー配列

配列番号	配列
	12345678901234567890123456789012
93	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
94	WYQQKPGQPPKLLIY
95	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYC
96	FGGGTKVEIKR
97	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
98	WYQQKPGQAPRLLIY

10

20

配列番号	配列
	12345678901234567890123456789012
99	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDF AVYYC
100	FGGGTKVEIKR
101	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
102	WYQQKPEKAPKSLIY
103	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYC
104	FGGGTKVEIKR
105	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC
106	WYQQKPGKAPKLLIY
107	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYC
108	FGGGTKVEIKR

30

40

【0064】

本明細書で使用する用語「生殖細胞系抗体遺伝子」または「遺伝子断片」は、遺伝子再編成および個々の免疫グロブリンの発現のための成熟をもたらす成熟プロセスを経ていない、非リンパ系細胞によってコードされる免疫グロブリン配列を指す（例えば、Shapiroら、Crit. Rev. Immunol. 22 (3) : 183 - 200頁 (200

50

2) ; Marchalonisら、Adv Exp Med Biol. 484:13-30頁(2001)を参照)。本発明の様々な実施形態によって与えられる利点の1つは、生殖細胞系抗体遺伝子は種において個々の必須アミノ酸配列構造特性を保存する可能性が成熟抗体遺伝子より高く、したがってその種で治療上使用すると外来供給源からであると認識される可能性が低いという認識に由来する。

【0065】

本明細書で使用する用語「重要」残基は、抗体、特にヒト化抗体の結合特異性および/または親和性に対してより影響がある可変領域内の特定残基を指す。重要残基は、以下の：CDRと隣接する残基、潜在的グリコシル化部位(N-またはO-グリコシル化部位のいずれかであってよい)、希少残基、抗原と相互作用することができる残基、CDRと相互作用することができる残基、標準残基、重鎖可変領域と軽鎖可変領域の間の接触残基、ベルニアーゾーン内の残基、およびChothia定義の可変重鎖CDR1とKabata定義の第一重鎖フレームワークの間の重複する領域中の残基の1つまたは複数だけには限られないが、これらを含む。

10

【0066】

本明細書で使用する用語「ヒト化抗体」は、対象の抗原と免疫特異的に結合し、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク(FR)領域および非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域(CDR)を含む、抗体または変異体、誘導体、アナログまたはこれらの断片である。CDRの文脈において本明細書で使用する用語「実質的に」は、非ヒト抗体CDRのアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%、および最も好ましくは少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するCDRを指す。ヒト化抗体は、少なくとも1つ、および典型的には2つの可変ドメイン(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv)の全てを実質的に含み、その中で全てまたは実質的に全てのCDR領域は非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し(すなわちドナー抗体)、全てまたは実質的に全てのフレームワーク領域はヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のフレームワーク領域である。好ましくは、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれも含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、軽鎖と重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有する。抗体は、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3およびCH4領域も含むことができる。他の実施形態では、ヒト化抗体はヒト化軽鎖のみ含有する。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体はヒト化重鎖のみ含有する。特定の実施形態では、ヒト化抗体は軽鎖および/またはヒト化重鎖のヒト化可変ドメインのみ含有する。

20

30

【0067】

ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgE、およびIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を非制限的に含む任意のアイソタイプを含めた、任意のクラスの免疫グロブリンから選択することができる。ヒト化抗体は2クラスまたはアイソタイプ由来の配列を含むことができ、当技術分野でよく知られている技法を使用して、特定の定常ドメインを選択し望ましいエフェクター機能を最適化することができる。

【0068】

ヒト化抗体のフレームワークおよびCDR領域は親配列に正確に対応する必要はない。例えば、ドナー抗体CDRまたはコンセンサスフレームワークは、その部位のCDRまたはフレームワーク残基がドナー抗体またはコンセンサスフレームワークのいずれかに対応しないように、少なくとも1つのアミノ酸残基の置換、挿入および/または欠失によって突然変異誘発することができる。しかしながら、好ましい実施形態では、このような突然変異は広範囲ではない。通常、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも95%のヒト化抗体残基が、親FRおよびCDR配列の残基に対応する。本明細書で使用する用語「コンセンサスフレームワーク」は、コンセンサス免疫グロブリン配列中のフレームワーク領域を指す。本明細書で使用する用語「コンセンサス免疫グロブリン配列」は、関連免疫グロブリン配列

40

50

のファミリー中で最も頻繁に出現するアミノ酸（またはヌクレオチド）から形成される配列を指す（例えば、Winnaker、From Genes to Clones（Verlagsgesellschaft、Weinheim、ドイツ 1987）を参照）。免疫グロブリンのファミリーにおいて、コンセンサス配列中のそれぞれの位置は、ファミリー中のその位置に最も頻繁に出現するアミノ酸によって占められる。2つのアミノ酸が同程度頻繁に出現する場合、いずれかがコンセンサス配列中に含まれ得る。

【0069】

本明細書で使用する用語「ベルニアー」ゾーンは、FooteおよびWinter（参照により本明細書に組み込む、1992、J. Mol. Biol. 224: 487-499頁）によって記載されたように、CDR構造を調節し抗原との適合を微調整することができるフレームワーク残基の部分集合を指す。ベルニアーゾーン残基はCDRの下に層を形成し、抗体のCDRの構造および親和性に影響を与えることができる。

10

【0070】

用語「活性」は、抗原に対する抗体、例えばトロポニンIと結合する抗トロポニンI抗体の結合特異性/親和性などの活性を含む。

【0071】

用語「エピトープ」は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体と特異的に結合することができる任意のポリペプチド抗原決定基を含む。特定の実施形態では、エピトープ抗原決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、またはスルホニルなどの化学的活性がある表面分子群を含み、また特定の実施形態では、特異的三次元構造特性、および/または特異的電荷特性を有する可能性がある。エピトープは、抗体によって結合される抗原の領域である。特定の実施形態では、抗体は、それがタンパク質および/またはマクロ分子の複合混合物中のその標的抗原を優先的に認識するとき、抗原と特異的に結合すると言える。

20

【0072】

本明細書で使用する用語「表面プラズモン共鳴」は、例えばBIACOREシステム（Pharmacia Biosensor AB、Uppsala、Sweden and Piscataway、NJ）を使用した、バイオセンサーマトリクス内のタンパク質濃度の変化の検出によって、リアルタイムの生体特異的相互作用の分析を可能にする光学現象を指す。さらなる記載に関しては、Jonsson、U.ら、（1993）Ann. Biol. Clin. 51: 19-26頁；Jonsson、U.ら、（1991）Biotechniques 11: 620-627頁；Johnsson、B.ら、（1995）J. Mol. Recognit. 8: 125-131頁；およびJohnsson、B.ら、（1991）Anal. Biochem. 198: 268-277頁を参照。

30

【0073】

本明細書で使用する用語「 K_{on} 」は、当技術分野で知られているように、抗体/抗原複合体を形成するための抗原と抗体の結合に関する速度定数を指すものとする。

【0074】

本明細書で使用する用語「 K_{off} 」は、当技術分野で知られているように、抗体/抗原複合体を形成するための抗体の解離に関するオフレート定数を指すものとする。

40

【0075】

本明細書で使用する用語「 K_d 」または「 K_D 」は、当技術分野で知られているように、特定の抗体-抗原相互作用の解離定数を指すものとする。

【0076】

本明細書で使用する用語「標識結合タンパク質」は、結合タンパク質の同定をもたらす取り込み標識を有するタンパク質を指す。好ましくは、標識は検出可能なマーカ、例えば放射標識アミノ酸の取り込み、または標識アビジンによって検出することができるピオチニル部分のポリペプチドとの結合である（例えば、光学または比色定量法によって検出することができる蛍光マーカまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン）。ポリペプチド用の標識の例には、以下の：放射性同位体または放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 166

50

H_o、または¹⁵³Sm)、蛍光標識(例えば、FITC、ローダミン、ランタニドリン光体)、酵素標識(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、化学発光マーカー、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)、およびガドリニウムキレートなどの磁性物質があるが、これらだけには限られない。

【0077】

用語「抗体コンジュゲート」は、治療剤または細胞毒性薬などの第二の化学成分と化学結合した抗体などの、結合タンパク質を指す。用語「作用物質」は、化学化合物、化学化合物の混合物、生物学的マクロ分子、または生物材料から作製した抽出物を示すために本明細書で使用する。好ましくは、治療剤または細胞毒性薬には、百日咳毒素、タクソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンラスチン、コルヒシン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにこれらのアナログまたはホモログがあるが、これらだけには限られない。本明細書で使用する用語「結晶」および「結晶化」は、結晶の形で存在する抗体、またはこの抗原結合部分を指す。結晶は、非晶質固体状態または液状結晶状態などの他の形と異なる、固形状物質の1つの形である。結晶は、原子、イオン、分子(例えば、抗体などのタンパク質)、または分子構築体(例えば、抗原/抗体複合体)の規則的な反復三次元配列で構成される。これらの三次元配列は、当技術分野で十分理解されている特異的数学的關係に従い配列する。結晶内で反復される基本単位、または構成単位は非対称単位と呼ばれる。所与の、明確に定義された結晶対称性に従う配列中の非対称単位の反復は、結晶の「単位格子」を与える。全ての三次元中の規則正しい配置による単位格子の反復が結晶を与える。Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 第2版、201-16頁、Oxford University Press, New York, New York, (1999)を参照。

10

20

30

【0078】

本明細書で言及する用語「ポリヌクレオチド」は、ポリマー型の2個以上のヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドのいずれか、またはいずれかの型のヌクレオチドの修飾型を意味する。この用語は一本鎖および二本鎖型のDNAを含むが、二本鎖DNAであることが好ましい。

【0079】

本明細書で使用する用語「単離ポリヌクレオチド」は、その起源によって、「単離ポリヌクレオチド」が本来見られるポリヌクレオチドの全部または一部と関係がない、本来連結していないポリヌクレオチドに作動可能に連結した、または大きな配列の一部として本来存在しない、(例えば、ゲノム、cDNA、または合成起源、またはこれらのいくつかの組合せ)ポリヌクレオチドを意味するものとする。

40

【0080】

本明細書で使用する用語「ベクター」は、それが連結している別の核酸を運ぶことができる核酸分子を指すものとする。1つの型のベクターは「プラスミド」であり、これは追加的DNAセグメントを連結することができる環状二本鎖DNAループを指す。別の型のベクターはウイルスベクターであり、この場合追加的DNAセグメントをウイルスゲノム中に連結することができる。特定のベクターは、それらを導入する宿主細胞中で自律複製することができる(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)を、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、したがって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作動可能に連結した遺伝子の発現を誘導す

50

ることができる。このようなベクターは、本明細書では「組換え発現ベクター」（または単に「発現ベクター」）と呼ぶ。一般に、組換えDNA技法において有用である発現ベクターはプラスミドの型であることが多い。本明細書中、「プラスミド」と「ベクター」は相互に使用することができる。プラスミドは、最も一般に使用される型のベクターであるからである。しかしながら本発明は、同等の機能を果たすウイルスベクター（例えば、複製欠陥レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルス）などの、このような他の型の発現ベクターを含むものとする。

【0081】

本明細書で使用する用語「作動可能に連結した」は、本明細書に記載する構成要素が、それらの意図する形式でそれらが働くのを可能にする関係にある並置を指す。コード配列と「作動可能に連結した」制御配列は、コード配列の発現が制御配列と適合性がある条件下で実施される様な形式で連結する。「作動可能に連結した」配列は、対象の遺伝子と隣接した発現制御配列と、トランスまたは対象の遺伝子を制御する距離で作用する発現制御配列の両方を含む。本明細書で使用する用語「発現制御配列」は、それらが連結するコード配列の発現およびプロセッシングを実行するのに必要であるポリヌクレオチド配列を指す。発現制御配列には、適切な転写開始、終了、プロモーターおよびエンハンサー配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナルなどの有効なRNAプロセッシングシグナル、細胞質mRNAを安定化する配列、翻訳効率を高める配列（すなわち、コザックのコンセンサス配列）、タンパク質の安定性を高める配列、および望ましいとき、タンパク質の分泌を高める配列がある。このような制御配列の性質は宿主生物に応じて異なり、原核生物では、このような制御配列は一般にプロモーター、リボソーム結合部位、および転写終了配列を含み、真核生物では、一般にこのような制御配列はプロモーターおよび転写終了配列を含む。用語「制御配列」は、その存在が発現およびプロセッシングに必要な不可欠である構成要素を含むものとし、その存在が有益である追加的構成要素、例えば、リーダー配列および融合パートナー配列も含むことができる。

【0082】

本明細書で定義する「形質転換」は、それによって外来DNAが宿主細胞に入る任意のプロセスを指す。当技術分野でよく知られている様々な方法を使用して、形質転換を天然または人為的条件下で行うことができる。形質転換は、原核または真核宿主細胞に外来核酸配列を挿入するための、任意の知られている方法に頼ることができる。方法は形質転換する宿主細胞に基づいて選択し、ウイルス感染、エレクトロポレーション、リポフェクション、および粒子衝突だけには限られないが、これらを含むことができる。このような「形質転換」細胞は、挿入DNAが自律的複製プラスミドまたは宿主染色体の一部のいずれかとして複製することができる、安定的に形質転換された細胞を含む。これらは、限られた時間の間挿入DNAまたはRNAを一過的に発現する細胞も含む。

【0083】

本明細書で使用する用語「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）は、その中に外来DNAが導入されている細胞を指すものとする。このような用語は、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の子孫も指すことを意図することは理解されるはずである。突然変異または環境的影響のいずれかのため、世代を継承する際に特定の修飾が起こる可能性があるので、このような子孫は実際、親細胞と同一でない可能性があるが、本明細書で使用する用語「宿主細胞」の範囲内に依然として含まれる。宿主細胞は、区系界のいずれかから選択される原核細胞および真核細胞を含むことが好ましい。好ましい真核細胞には、原生生物、真菌、植物および動物細胞がある。最も好ましくは、宿主細胞は、原核細胞系*E. coli*、哺乳動物細胞系CHO、HEK293およびCOS、昆虫細胞系Sf9、および真菌細胞系*Saccharomyces cerevisiae*または*Picchia pastoris*を含むが、これらだけには限られない。

【0084】

標準的技法を、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織培養および形質

10

20

30

40

50

転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）に使用することができる。酵素反応および精製技法は、製造者の仕様書に従い、または当技術分野で一般に実施されるように、または本明細書に記載するように実施することができる。前述の技法および手順は、当技術分野でよく知られている従来の方法に従い、本明細書を通じて引用および論説する様々な一般のおよびより具体的な参照文献中に記載されるように、一般的に実施することができる。例えば、あらゆる目的で参照により本明細書に組み込む、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.（1989））を参照。

【0085】

本明細書で使用し当技術分野で知られている「トランスジェニック生物」はトランス遺伝子を含む細胞を有する生物を指し、生物（またはその祖先）に導入されるトランス遺伝子はその生物中で本来発現されないポリペプチドを発現する。「トランス遺伝子」は、トランスジェニック生物が発生する細胞のゲノムに安定的および作動可能に組み込まれ、トランスジェニック生物の1つまたは複数の細胞型または組織においてコードされる遺伝子産物の発現を誘導する、DNA構築物である。

【0086】

用語「制御する」と「調節する」は相互に使用し、また本明細書で使用するように、対象の分子の活性（例えば、トロポニンIの生物活性）の変化または改変を指す。調節は、対象の分子の特定活性または機能の程度の増大または低下であってよい。分子の例示的な活性および機能には、結合特性、酵素活性、細胞受容体活性化、およびシグナル伝達があるが、これらだけには限られない。

【0087】

相応して、本明細書で使用する用語「モジュレーター」は、対象の分子の活性または機能（例えば、トロポニンIの生物活性）を変えるまたは改変することができる化合物である。例えば、モジュレーターは、モジュレーターの不在下で観察される活性または機能の程度と比較して、分子の特定活性または機能の程度の増大または低下を引き起こすことができる。特定の実施形態では、モジュレーターは、分子の少なくとも1つの活性または機能の程度を低下させる阻害剤である。例示的な阻害剤には、タンパク質、ペプチド、抗体、ペプチボディ、炭水化物または有機低分子があるが、これらだけには限られない。ペプチボディは例えば国際出願公開第WO 01/83525号中に記載されている。

【0088】

本明細書で使用する用語「アゴニスト」は、アゴニストの不在下で観察される活性または機能の程度と比較して、対象の分子との接触時に、分子の特定活性または機能の程度の増大を引き起こすモジュレーターを指す。対象の個々のアゴニストは、トロポニンIポリペプチド、核酸、炭水化物、またはトロポニンIと結合する任意の他の分子だけには限られないが、これらを含むことができる。

【0089】

本明細書で使用する用語「アンタゴニスト」または「阻害剤」は、アンタゴニストの不在下で観察される活性または機能の程度と比較して、対象の分子との接触時に、分子の特定活性または機能の程度の低下を引き起こすモジュレーターを指す。

【0090】

本明細書で使用する用語「有効量」は、障害またはその1つまたは複数の症状の重度および/または期間を低減または改善する、障害の進行を予防する、障害の退行を引き起こす、障害に伴う1つまたは複数の症状の再発、発達、発症または進行を予防する、障害を検出する、または別の治療（例えば、予防または治療剤）の（1つまたは複数の）予防もしくは治療効果を増大もしくは改善するのに十分な療法の量を指す。

【0091】

本明細書で使用する用語「サンプル」は、その最も広い意味で使用する。本明細書で使用する「生物サンプル」には、生物または以前生存していた物体由来の任意の量の物質だ

10

20

30

40

50

けには限られないが、これらがある。このような生物には、ヒト、マウス、ラット、サル、イヌ、ウサギおよび他の哺乳動物もしくは非哺乳動物だけには限られないが、これらがある。このような物質には、血液、血漿、尿、滑液、細胞、臓器、組織（例えば、脳）、骨髄、リンパ節、脳脊髄液、および脾臓だけには限られないが、これらがある。

【0092】

抗体を作製する方法

本発明の抗体は、当技術分野で知られている任意のいくつかの技法によって作製することができる。例えば、組換えもしくはファージディスプレイ技術の使用、またはこれらの組合せを含めた、広く様々な技法を使用して抗体を調製することができる。用語「モノクローナル抗体」は、任意の真核生物、原核生物、またはファージクローンを含めた単一クローンから誘導される抗体を指し、それを産生する方法は指さない。

10

【0093】

一実施形態では、本発明は、本発明の抗体を分泌するチャイニーズハムスター卵巣細胞系を培養することを含む、組換え抗体を作製する方法（およびこの方法によって産生される抗体）を提供する。

【0094】

さらに、特異的エピトープを認識する本発明の抗体の断片は、知られている技法によって作製することができる。例えば、本発明の Fab および F(ab')₂ 断片は、(Fab 断片を産生するために) パパインまたは (F(ab')₂ 断片を産生するために) ペプシンなどの酵素を使用して、免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断によって産生することができる。F(ab')₂ 断片は、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖の CH1 ドメインを含有する。

20

【0095】

組換え抗体ライブラリーを使用した抗トロポニン I 抗体の産生

インビトロ法を使用して本発明の抗体を作製することもでき、この場合抗体ライブラリーをスクリーニングして、望ましい結合特異性を有する抗体を同定する。組換え抗体ライブラリーのこのようなスクリーニング法は当技術分野でよく知られており、例えば、そのそれぞれの内容を参照により本明細書に組み込む、Ladner ら、米国特許第 5,223,409 号、Kang ら、国際出願公開第 WO92/18619 号、Dower ら、国際出願公開第 WO91/17271 号、Winter ら、国際出願公開第 WO92/20791 号、Markland ら、国際出願公開第 WO92/15679 号、Breitling ら、国際出願公開第 WO93/01288 号、McCafferty ら、PCT 公開第 WO92/01047 号、Garrard ら、国際出願公開第 WO92/09690 号、Fuchs ら、(1991)、Bio/Technology 9: 1370-1372 頁、Hay ら、(1992) Hum Antibod Hybridomas 3: 81-85 頁、Huse ら、(1989)、Science 246: 1275-1281 頁、McCafferty ら、Nature (1990) 348: 552-554 頁、Griffiths ら、(1993) EMBO J 12: 725-734 頁、Hawkins ら、(1992) J Mol Biol 226: 889-896 頁、Clackson ら、(1991) Nature 352: 624-628 頁、Gram ら、(1992) PNAS 89: 3576-3580 頁、Garrard ら、(1991) Bio/Technology 9: 1373-1377 頁、Hoogenboom ら、(1991)、Nuc Acid Res 19: 4133-4137 頁、および Barbasa ら、(1991)、PNAS 88: 7978-7982 頁、米国特許出願公開第 20030186374 号、および国際出願公開第 WO97/29131 号中に記載された方法を含む。

30

40

【0096】

組換え抗体ライブラリーは、トロポニン I、またはその一部分で免疫処置した対象に由来してよい。あるいは、組換え抗体ライブラリーは、ナイーブ対象、すなわちトロポニン I で免疫処置していない対象に由来してよく、ヒトトロポニン I で免疫処置していないヒト対象由来のヒト抗体ライブラリーなどであってよい。ヒトトロポニン I を含むペプチド

50

で組換え抗体ライブラリーをスクリーニングして、それによってトロポニン I を認識する抗体を選択することによって、本発明の抗体を選択する。前段落中の参照文献中に記載された方法など、このようなスクリーニングおよび選択を実施するための方法は、当技術分野でよく知られている。トロポニン I に対する特定の結合親和性を有する本発明の抗体、特定 k_{off} 速度定数でヒトトロポニン I から解離する抗体などを選択するために、当技術分野で知られている表面プラズモン共鳴の方法を使用して、望ましい k_{off} 速度定数を有する抗体を選択することができる。

【0097】

一態様では、本発明は、ヒトトロポニン I と結合する、単離抗体、またはその抗原結合部分に関する。様々な実施形態において、抗体は組換え抗体である。

10

【0098】

別の手法では、本発明の抗体を、当技術分野で知られている酵母ディスプレイ法を使用して作製することもできる。酵母ディスプレイ法では、遺伝的方法を使用して抗体ドメインを酵母細胞壁に係留させ、それらを酵母の表面上に提示する。特に、このような酵母を利用して、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から発現される抗原結合ドメインを提示することができる。本発明の抗体を作製するために使用することができる酵母ディスプレイ法の例には、参照により本明細書に組み込む、Witttrupら、米国特許第 6,699,658 号で開示された方法がある。

【0099】

組換え抗体の産生

前述のように、当技術分野で知られている任意の数の技法によって、本発明の抗体を産生することができる。例えば、重鎖および軽鎖をコードする（1つまたは複数の）発現ベクターを標準技法によって宿主細胞にトランスフェクトする、宿主細胞からの発現は、本発明の抗体を産生するのに好ましい方法である。（様々な型の用語「トランスフェクション」は、原核生物または真核生物宿主細胞に外来 DNA を導入するのに一般に使用される広く様々な技法、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含するものとする。）原核生物または真核生物宿主細胞のいずれかにおいて本発明の抗体を発現させることは可能であるが、真核生物細胞中での抗体の発現が好ましく、哺乳動物宿主細胞中が最も好ましい。このような真核生物細胞（特に哺乳動物細胞）は、正確にフォールディングされ免疫活性がある抗体を構築および分泌する可能性が原核生物細胞より高いからである。

20

30

【0100】

本発明の組換え抗体を発現するのに好ましい哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）（例えば R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621 頁中に記載された DHFR 選択可能マーカーを使用した、Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220 頁中に記載された dhfr-CHO 細胞を含む）、NS0 ミエローマ細胞、COS 細胞および SP2 細胞がある。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞中に導入するとき、宿主細胞中での抗体の発現、またはより好ましくは宿主細胞を増殖させる培養培地中への抗体の分泌を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することによって抗体を産生する。抗体は標準的タンパク質精製法を使用して培養培地から回収することができる。

40

【0101】

宿主細胞を使用して、Fab 断片または scFv 分子などの、機能性抗体断片を産生することもできる。前述の手順の変形は、本発明の範囲内にあることは理解される。例えば、本発明の抗体の軽鎖および/または重鎖の機能断片をコードする DNA で宿主細胞をトランスフェクトすることは望ましい可能性がある。組換え DNA 技術を使用して、対象の抗原との結合に必ずしも必要ではない軽鎖および重鎖の片方または両方をコードする DNA の一部、または全部を除去することもできる。このような切断型 DNA 分子から発現される分子も、本発明の抗体によって包含される。さらに、標準的な化学架橋法によって第

50

二の抗体と本発明の抗体を架橋させることによって、1本の重鎖と1本の軽鎖が本発明の抗体であり他の重鎖と軽鎖が対象の抗原以外の抗原に特異的である、二重機能性抗体を産生することができる。

【0102】

本発明の抗体、またはその抗原結合部分の組換え発現に好ましい系では、抗体重鎖と抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターを、リン酸カルシウム仲介トランスフェクションによってd h f r - C H O細胞中に導入する。組換え発現ベクター内では、抗体重鎖および抗体軽鎖遺伝子が、C M Vエンハンサー / A d M L Pプロモーター制御エレメントとそれぞれ作動可能に連結して、遺伝子の高レベルの転写を誘導する。組換え発現ベクターは、メトトレキセート選択 / 増幅を使用してベクターでトランスフェクトしたC H O細胞の選択を可能にするD H F R遺伝子も保有する。選択した形質転換体宿主細胞を培養して抗体重鎖および抗体軽鎖を発現させ、完全抗体を培養培地から回収する。標準的な分子生物学の技法を使用して、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、培養培地から抗体を回収する。さらに他に本発明は、本発明の組換え抗体が合成されるまで適切な培養培地中で本発明の宿主細胞を培養することによって、本発明の組換え抗体を合成する方法を提供する。この方法は、培養培地から組換え抗体を単離することをさらに含むことができる。

10

【0103】

抗トロポニン抗体

本明細書に記載する(表1および2参照)単離抗トロポニンI抗体のC D R配列は、本発明に従い単離し、前の表1および2中に挙げたC D R配列を含むポリペプチドを含む、トロポニンI結合タンパク質の新規なファミリーを確定する。好ましいトロポニンI結合活性を有する本発明のC D Rを作製および選択するために、本明細書に具体的に記載する方法だけには限られないがこれらを含めた、本発明の結合タンパク質を作製するため、およびそれらの結合特性を評価するための、当技術分野で知られている標準的な方法を使用することができる。

20

【0104】

抗トロポニンIキメラ抗体

キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子、マウスモノクローナル抗体由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体などである。本発明の方法などのキメラ抗体を産生するための方法は当技術分野でよく知られている。例えば、それらの全容を参照により本明細書に組み込む、Morrisson、Science 229:1202(1985); Oira、BioTechniques 4:214(1986); Gilliesら、(1989) J. Immunol. Methods 125:191-202頁、米国特許第5,807,715号、同第4,816,567号、および同第4,816,397号を参照。さらに、適切な生物活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と一緒に適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子のスプライシングによる、「キメラ抗体」の産生のために開発された技法(それらの全容を参照により本明細書に組み込む、Morrissonら、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855頁、Neubergerら、1984、Nature 312:604-608頁、Takedaら、1985、Nature 314:452-454頁)を使用することができる。

30

40

【0105】

一実施形態では、本発明のキメラ抗体を、ヒトI g G 1定常領域で前に記載した抗体の重鎖定常領域を置換することによって産生する。特定の実施形態では、本発明のキメラ抗体は、配列番号25のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H)、および配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L)を含む。

【0106】

抗トロポニンI C D R移植抗体

本発明のC D R移植抗体は、 V_H および / または V_L の1つまたは複数のC D R領域が

50

本発明のマウス抗体のCDR配列で置換されたヒト抗体由来の、重鎖および軽鎖可変領域配列を含む。任意のヒト抗体由来のフレームワーク配列が、CDR移植の鑄型として働くことができる。しかしながら、このようなフレームワークへの直鎖置換は、抗原に対する結合親和性のある程度の消失をもたらすことが多い。ヒト抗体が元のマウス抗体と相同的であるほど、マウスCDRとヒトフレームワークの組合せが親和性を低減し得るCDRの歪みをもたらす可能性は低い。したがって、CDRとは別のマウス可変フレームワークを置換するために選択したヒト可変フレームワークは、マウス抗体可変領域フレームワークと少なくとも65%の配列同一性を有することが好ましい。CDRとは別のヒト可変領域とマウス可変領域は、少なくとも70%の配列同一性を有することがより好ましい。CDRとは別のヒト可変領域とマウス可変領域は、少なくとも75%の配列同一性を有することがさらにより好ましい。CDRとは別のヒト可変領域とマウス可変領域は、少なくとも80%の配列同一性を有することが最も好ましい。キメラ抗体の産生(EP239,400、国際出願公開第WO91/09967号、米国特許第5,225,539号、同第5,530,101号、および同第5,585,089号も参照)、ベニアリングまたは表面再処理(EP592,106、EP519,596、Padlan、Molecular Immunology 28(4/5):489-498頁(1991)、Studnickaら、Protein Engineering 7(6):805-814頁(1994)、Roguskaら、PNAS 91:969-973頁(1994))、および鎖シャッフリング(米国特許第5,565,352号)に関する方法は当技術分野で知られており、実施例2.2中で詳細に論じる。

10

20

【0107】

ヒト化抗体

ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する所望の抗原と結合する、非ヒト種抗体由来の抗体分子である。知られているヒトIg配列は、例えばwww.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi;www.atcc.org/phage/hdb.html;www.sciquest.com/;www.abcam.com/;www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html;www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html;www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm;www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/;www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html;www.antibodyresource.com/mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html;www.immunologylink.com/;pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html;www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/;www.pebio.com/pa/340913/340913.html-;www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;www.mehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html;www.biodesign.com/table.asp;www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html;www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html;www.isac-net.org/sites_geo.html;aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html;baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html;www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;www.mrc-cpe

30

40

50

.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;www.ibbt.unam.mx/vir/V_mice.html;imgt.cnusc.fr:8104/;www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html;antibody.bath.ac.uk/;abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html;www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/;www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/h-humanisation/TAHHP.html;www.ibbt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;www.jerini.de/frroducts.htm;www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、U.S. Dept. Health (1983)中に開示されており、それぞれ完全に参照により本明細書に組み込む。このようなインポート配列を使用して免疫原性を低減することができ、または結合、親和性、オンレート、オフレート、親和力、特異性、半減期、または当技術分野で知られている任意の他の適切な特徴を低減、増大もしくは改変することができる。

【0108】

ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基をCDRドナー抗体由来の対応する残基で置換して、抗原結合を改変する、好ましくは改善することができる。これらのフレームワーク置換は、当技術分野でよく知られている方法、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRとフレームワーク残基の相互作用のモデリング、および特定位置での異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較によって同定する。(例えば、参照によりそれらの全容を本明細書に組み込む、Queenら、米国特許第5,585,089号、Riechmannら、Nature 332:323(1988)を参照。)三次元免疫グロブリンモデルが一般に利用可能であり、当業者には熟知されている。選択した候補免疫グロブリン配列の考えられる三次元立体配座構造を例示し示す、コンピュータプログラムが利用可能である。これらのディスプレイの調査は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の考えられる役割の分析、すなわちその抗原と結合する候補免疫グロブリンの能力に影響を与える残基の分析を可能にする。このようにして、(1つまたは複数の)標的抗原に対する高い親和性などの望ましい抗体特性が得られるように、コンセンサスおよびインポート配列からFR残基を選択し組合せることができる。一般にCDR残基は、抗原結合に影響を与える際に直接および最も実質的に関与する。それぞれ完全に参照により本明細書に組み込む、その中に引用される参照文献を含めた、Jonesら、Nature 321:522(1986);Verhoeyenら、Science 239:1534(1988)、Simsら、J. Immunol. 151:2296(1993);Chothia and Lesk、J. Mol. Biol. 196:901(1987)、Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285(1992);Prestaら、J. Immunol. 151:2623(1993)、Padlan、Molecular Immunology 28(4/5):489-498頁(1991);Studnickaら、Protein Engineering 7(6):805-814頁(1994);Roguskaら、PNAS 91:969-973頁(1994);国際出願公開第WO91/09967号、PCT/:US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755、WO90/14443、WO90/14424、WO

90/14430、EP229246、EP592,106;EP519,596、EP239,400、米国特許第5,565,332号、同第5,723,323号、同第5,976,862号、同第5,824,514号、同第5,817,483号、同第5814476号、同第5763192号、同第5723323号、同第5,766,886号、同第5,714,352号、同第6,204,023号、同第6,180,370号、同第5,693,762号、同第5,530,101号、同第5,585,089号、同第5,225,539号、同第4,816,567号中に記載された技法だけには限られないが、これらの方法などの当技術分野で知られている様々な技法を使用して、抗体をヒト化することができる。

【0109】

抗体および抗体産生細胞系の産生

前述のように、本発明の抗体は、例えば当技術分野で知られているいくつかのインビトロおよびインビボアッセイのいずれか1つにより評価して(例えば、以下の実施例参照)、トロポニンIと特異的に結合する高い能力を示すことが好ましい。

【0110】

特定の実施形態では、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgMまたはIgD定常領域などの重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、IgG1重鎖定常領域またはIgG4重鎖定常領域であることが好ましい。さらに抗体は、軽鎖定常領域、kappa軽鎖定常領域またはラムダ軽鎖定常領域のいずれかを含むことができる。抗体はkappa軽鎖定常領域を含むことが好ましい。あるいは、抗体の一部は、例えばFab断片または単鎖Fv断片であってよい。

【0111】

抗体エフェクター機能を改変するための、Fc部分中のアミノ酸残基の置換は当技術分野で知られている(Winterら、米国特許第5,648,260号および同第5,624,821号)。抗体のFc部分は、いくつかの重要なエフェクター機能、例えばサイトカイン誘導、ADCC、ファゴサイトーシス、補体依存性細胞障害作用(CDC)ならびに抗体および抗原-抗体複合体の半減期/クリアランス率を仲介する。いくつかの例では、これらのエフェクター機能は治療用抗体に望ましいが、しかしながら他の例では、治療目的に応じて不要またはさらに有害である可能性がある。特定ヒトIgGアイソタイプ、特にIgG1およびIgG3は、それぞれFcRおよび補体C1qとの結合を介して、ADCCおよびCDCを仲介する。新生児型Fc受容体(FcRn)は、抗体の循環半減期を決定する重要な構成要素である。さらに別の実施形態では、抗体のエフェクター機能が改変するように、抗体の定常領域、例えば抗体のFc領域中の少なくとも1つのアミノ酸残基が置換される。

【0112】

一実施形態は、本発明の抗体または抗体部分が別の機能分子(例えば、別のペプチドまたはタンパク質)と誘導体化または連結した、標識結合タンパク質を提供する。例えば、本発明の標識結合タンパク質は、(化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合またはその他によって)本発明の抗体または抗体部分と、(ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグなどの)別の分子と抗体または抗体部分の結合を仲介することができる、別の抗体(例えば、二重特異性抗体またはダイアボディ)、検出剤、細胞毒性薬、薬剤、および/またはタンパク質またはペプチドなどの、1つまたは複数の他の分子体を機能的に連結させることによって誘導化することができる。

【0113】

本発明の抗体または抗体部分を誘導体化することができる有用な検出剤には、蛍光化合物がある。例示的な蛍光検出剤には、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリスリンなどがある。抗体は、例えばアルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどの検出可能な酵素で誘導体化することもできる。抗体を検出可能な酵素で誘導体化するとき、その酵素が検出可能な反応産物を生成する

10

20

30

40

50

のに用いる追加試薬を加えることによってそれを検出する。例えば、検出剤ホースラディッシュペルオキシダーゼが存在するとき、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加によって、検出可能である着色反応産物が生成する。抗体をビオチンで検出し、アビジンまたはストレプトアビジン結合の間接的測定によって検出することもできる。

【0114】

本発明の別の実施形態は、結晶化結合タンパク質を提供する。本発明は、本明細書で開示する完全抗トロポニンI抗体およびその断片の結晶、ならびにこのような結晶を含む製剤および組成物に関することが好ましい。一実施形態では、結晶化結合タンパク質は、結合タンパク質の可溶性対照物より長いインビボ半減期を有する。別の実施形態では、結合タンパク質は結晶化後に生物活性を保持する。

10

【0115】

本発明の結晶化結合タンパク質は、当技術分野で知られており、参照により本明細書に組み込む国際出願公開第W002/072636号中に開示される方法に従い産生することができる。

【0116】

本発明の別の実施形態は、抗体またはその抗原結合部分が1つまたは複数の炭水化物残基を含む、グリコシル化結合タンパク質を提供する。発生期インビボタンパク質産生は、翻訳後修飾として知られるさらなるプロセッシングを経る可能性がある。特に、糖（グリコシル）残基を酵素によって加えることができる、グリコシル化として知られるプロセス。共有結合したオリゴ糖側鎖を有する生成したタンパク質は、グリコシル化タンパク質または糖タンパク質として知られる。抗体はFcドメイン、および可変ドメイン中に1つまたは複数の炭水化物残基を有する糖タンパク質である。Fcドメイン中の炭水化物残基は、Fcドメインのエフェクター機能に対して重要な影響、および抗体の抗原結合または半減期に対して最小の影響がある（R. Jefferins, *Biotecnol. Prog.* 21 (2005), 11-16頁）。対照的に、可変ドメインのグリコシル化は、抗体の抗原結合活性に対して影響がある可能性がある。可変ドメインのグリコシル化は、おそらく立体障害が原因で抗体結合親和性に対して悪影響があり（Co, M. S.ら, *Mol. Immunol.* (1993) 30: 1361-1367頁）、または抗原に対する高い親和性をもたらす可能性がある（Wallick, S. C.ら, *Exp. Med.* (1988) 168: 1099-1109, Wright, A.ら, *EMBO J.* (1991) 10: 2717-2723）。

20

30

【0117】

本発明の一態様は、その中で結合タンパク質のO-またはN-結合グリコシル化部位が突然変異している、グリコシル化部位突然変異体の作製を対象とする。当業者は、標準的なよく知られている技法を使用して、このような突然変異体を作製することができる。生物活性を保持するが高いまたは低い結合活性を有するグリコシル化部位突然変異体の作製は、本発明の別の目的である。

【0118】

さらに別の実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合部分のグリコシル化を修飾する。例えば、非グリコシル化抗体（すなわち、グリコシル化がない抗体）を作製することができる。グリコシル化を改変して、例えば抗原に対する抗体の親和性を増大することができる。このような炭水化物の修飾は、例えば抗体配列内の1つまたは複数のグリコシル化部位を改変することによって実施することができる。例えば、1つまたは複数の可変領域グリコシル化部位の排除をもたらして、それによってその部位のグリコシル化を排除する、1つまたは複数のアミノ酸置換を作製することができる。このような非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増大する可能性がある。このような手法は、その各々を参照によりその全容を本明細書に組み込む、国際出願公開第W003/016466A2、および米国特許第5,714,350号および同第6,350,861号中にさらに詳細に記載される。

40

【0119】

50

追加的または代替的に、少量のフコシル残基を有する低フコシル化抗体、または多量の二等分 G1cNAc 構造を有する抗体などの、改変型のグリコシル化を有する本発明の修飾抗体を作製することができる。このような改変型グリコシル化パターンは、抗体の ADC 能力を増大することが実証されている。このような炭水化物の修飾は、例えば改変型グリコシル化機構で宿主細胞中の抗体を発現させることによって実施することができる。改変型グリコシル化機構を有する細胞は当技術分野で記載されており、本発明の組換え抗体を発現させそれによって改変型グリコシル化がある抗体を産生する、宿主細胞として使用することができる。例えば、その各々を参照によりその全容を本明細書に組み込む、Shields、R.L.ら、(2002) J. Biol. Chem. 277: 26733 - 26740 頁、Umamara、(1999) Nat. Biotech. 17: 176 - 1、および欧州特許第 EP 1,176,195 号、国際出願公開第 WO 03/035835 号および同第 WO 99/5434280 号を参照。

10

20

30

40

50

【0120】

タンパク質のグリコシル化は、対象のタンパク質のアミノ酸配列、およびその中でタンパク質が発現される宿主細胞に依存する。異なる生物は異なるグリコシル化酵素（例えば、グリコシルトランスフェラーゼおよびグリコシダーゼ）を生成し、利用可能な異なる基質（ヌクレオチド糖）を有する可能性がある。このような要因のため、タンパク質のグリコシル化パターン、およびグリコシル残基の組成は、その中で個々のタンパク質が発現される宿主系に応じて異なる可能性がある。本発明において有用であるグリコシル残基は、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、n-アセチルグルコースアミンおよびシアル酸だけには限られないが、これらを含むことができる。グリコシル化結合タンパク質は、グリコシル化パターンがヒトであるようなグリコシル残基を含むことが好ましい。

【0121】

異なるタンパク質のグリコシル化は異なるタンパク質特性をもたらす可能性があることは、当業者には知られている。例えば、酵母などの微生物宿主中で産生される治療用タンパク質、および酵母内因性経路を利用するグリコシル化の有効性は、CHO 細胞系などの哺乳動物細胞中で発現される同じタンパク質のそれと比較して低減する可能性がある。このような糖タンパク質はヒトにおいて免疫原性があり、投与後に低減したインビボ半減期を示す可能性もある。ヒトおよび他の動物において特異的受容体が、特異的グリコシル残基を認識し、血流からのタンパク質の迅速な除去を促進することができる。他の悪影響は、タンパク質のフォールディング、可溶性、プロテアーゼに対する感受性、運搬、輸送、区画化、分泌、他のタンパク質または因子による認識、抗原性、またはアレルギー性の変化を含み得る。したがって当業者は、特異的グリコシル化組成およびパターン、例えば、ヒト細胞中または目的対象動物の種特異的細胞中で生じるそれと同一、または少なくとも類似したグリコシル化組成およびパターンを有する治療用タンパク質を好み得る。

【0122】

宿主細胞の発現と異なるグリコシル化タンパク質の発現は、宿主細胞を遺伝的に改変して異種グリコシル化酵素を発現させることによって実施することができる。当技術分野で知られている技法を使用して、当業者は、ヒトタンパク質のグリコシル化を示す抗体またはそれらの抗原結合部分を作製することができる。例えば、酵母菌株を遺伝的に改変して非天然グリコシル化酵素を発現させており、したがって、これらの酵母菌株中で産生されるグリコシル化タンパク質（糖タンパク質）は、動物細胞、特にヒト細胞のグリコシル化と同一のタンパク質のグリコシル化を示す（米国特許出願公開第 20040018590 および同第 20020137134 号および国際出願公開第 WO 05/100584 A 2 号）。

【0123】

用語「多価結合タンパク質」は、2つ以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質を示すために本明細書中で使用する。多価結合タンパク質は3つ以上の抗原結合部位を有するように操作することが好ましく、一般に天然に存在する抗体ではない。用語「多重特異性結

合タンパク質」は、2つ以上の関連または無関連標的と結合することができる結合タンパク質を指す。本明細書で使用する二重可変ドメイン(DVD)結合タンパク質は、2つ以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質であり、四価または多価結合タンパク質である。このようなDVDは単一特異性である可能性があり、すなわち1つの抗原と結合することができる、または多重特異性である可能性があり、すなわち2つ以上の抗原と結合することができる。2つの重鎖DVDポリペプチドおよび2つの軽鎖DVDポリペプチドを含むDVD結合タンパク質は、DVDIgと呼ばれる。DVDIgのそれぞれ半分は、重鎖DVDポリペプチド、および軽鎖DVDポリペプチド、および2つの抗原結合部位を含む。それぞれの結合部位は、抗原結合部位当たり抗原結合に關与する合計6個のCDRを有する、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む。DVD結合タンパク質およびDVD結合タンパク質を作製する方法は、米国特許出願第11/507,050号中に開示されており、参照により本明細書に組み込む。

【0124】

本発明の一態様は、トロポニンIと結合することができる結合タンパク質を含むDVD結合タンパク質に関する。DVD結合タンパク質は、トロポニンIおよび第二の標的と結合することができるのが好ましい。本発明は、その中で抗体がトロポニンIおよび2つの他の標的(すなわち、第二および第三の標的)と結合することができる、三重可変ドメイン(TVD)結合タンパク質も包含する。

【0125】

結合タンパク質以外に、本発明は、本発明のこのような結合タンパク質に特異的な抗イディオタイプ(抗Id)抗体も対象とする。抗Id抗体は、別の抗体の抗原結合領域と一般に結合した特有の抗原決定基を認識する抗体である。結合タンパク質(例えば、対象の抗体)またはそのCDR含有領域で動物を免疫処置することによって、抗Idを調製することができる。免疫処置した動物は、免疫処置抗体のイディオタイプ抗原決定基を認識し、これらに应答し、抗Id抗体を産生する。抗Id抗体を「免疫原」として使用して、いわゆる抗抗Id抗体を産生するさらに別の動物中で免疫应答を誘導することもできる。

【0126】

さらに、ライブラリーのメンバーである宿主細胞が変形グリコシル化パターンを有する対象のタンパク質を産生するように、様々なグリコシル化酵素を発現するように遺伝的に操作した宿主細胞のライブラリーを使用して、対象のタンパク質を発現させることが可能であることは当業者によって理解される。したがって当業者は、個々の新規なグリコシル化パターンを有する対象のタンパク質を選択および単離することができる。特に選択した新規なグリコシル化パターンを有するタンパク質は、改善または改変された生物学的性質を示すことが好ましい。

【0127】

抗トロポニンI抗体の診断用途

トロポニンIと結合するそれらの能力を前提として、従来の免疫学的検定、競合または非競合アッセイ、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオ免疫学的検定(RIA)、免疫測定アッセイまたは組織免疫組織化学法などを使用し、本発明の抗トロポニンI抗体、またはその一部分を使用して、(例えば、血清、全血、CSF、脳組織または血漿などの生物サンプル中の)トロポニンIを検出することができる。したがって本発明は、生物サンプルと本発明の抗体、または抗体部分を接触させること、およびトロポニンIと結合した抗体(抗体部分)または非結合抗体(抗体部分)のいずれかを検出して、それによって生物サンプル中のトロポニンIを検出することを含む、生物サンプル中のトロポニンIを検出するための方法を提供する。結合または非結合抗体の検出を容易にするための検出可能な物質を用いて、抗体を直接または間接的に標識する。適切な検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質および放射性物質がある。適切な酵素の例には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼがあり、適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンがあり、適切な蛍

光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリスリンがあり、発光物質の一例にはルミノールがあり、また適切な放射性物質の例には、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{77}Lu 、 ^{166}Ho 、または ^{153}Sm がある。

【0128】

抗体標識に対する代替として、検出可能な物質で標識した組換えトロポニンI標準、および非標識抗トロポニンI抗体を利用する競合免疫学的検定によって、生体液中のトロポニンIをアッセイすることができる。このアッセイ中、生物サンプル、標識した組換えトロポニンI標準、および抗トロポニンI抗体を組合せ、非標識抗体と結合した標識した組換えトロポニンI標準の量を測定する。生物サンプル中のトロポニンIの量は、抗トロポニンI抗体と結合した標識した組換えトロポニンI標準の量に反比例する。

10

【0129】

特に、本発明の一実施形態では、1つまたは複数の本発明の抗体を固相にコーティングする（または液相中に存在する）。試験または生物サンプル（例えば、血清、血漿、尿など）を次いで固相と接触させる。トロポニンI抗原がサンプル中に存在する場合、このような抗原は固相上の抗体と結合し、次いで直接法または間接法のいずれかによって検出される。直接法は、複合体自体の存在、したがって抗原の存在を単に検出することを含む。固相にコーティングした抗体と共に完全抗体またはその断片を使用することが可能であることに留意しなければならない。（本発明の目的で、抗体の「断片」または「一部分」は、結合性に関して完全抗体と機能上同じ形式で反応する抗体のサブユニットとして定義する。）

20

前述のように、間接法では、コンジュゲートを結合抗原に加える。このコンジュゲートは、結合抗原と結合し、シグナル生成化合物または標識と結合した第二の抗体を含む。第二の抗体が結合抗原と結合する場合、シグナル生成化合物は測定可能なシグナルを生成する。したがって、このようなシグナルは、試験サンプル中の抗原（すなわちトロポニンI）の存在を示す。

【0130】

診断免疫学的検定中で使用する固相の例は、多孔性および非多孔性材料、ラテックス粒子、磁気粒子、マイクロ粒子（米国特許第5,705,330号参照）、ビーズ、膜、マイクロタイターウエルおよびプラスチックチューブである。固相材料およびコンジュゲート中に存在する抗原または抗体を標識する方法の選択は、望む場合、望ましいアッセイ形式の性能特性に基づいて決定する。

30

【0131】

前述のように、コンジュゲート（または指標試薬）は、シグナル生成化合物または標識と結合した抗体（アッセイに応じて、またはおそらく抗抗体）を含む。このシグナル生成化合物または「標識」自体は検出可能であり、または1つもしくは複数の他の化合物と反応させて検出可能な産物を生成することができる。シグナル生成化合物の例には、色原体、放射性同位体（例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S および ^{14}C ）、化学発光化合物（例えば、アクリジニウム）、粒子（可視または蛍光）、核酸、錯化剤、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよびリボヌクレアーゼ）などの触媒がある。酵素（例えば、アルカリホスファターゼまたはホースラディッシュペルオキシダーゼ）を使用する場合、クロモ -、フルロ -、またはルモジェニック基質の添加は、検出可能なシグナルの生成をもたらす。時間分解蛍光、内部反射蛍光、増幅（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応）およびラマン分光法などの他の検出システムも有用である。

40

【0132】

前述のように、前述の免疫学的検定によって試験することができる生体液の例には、血漿、尿、全血、乾燥全血、血清、脳脊髄液、唾液、涙、鼻腔洗浄液または組織および細胞の水性抽出物がある。

50

【0133】

加えて、免疫学的検定中で使用する（トロポニンI抗原を検出するための）一次捕捉抗体は、固相と共有または（例えば、イオン性、疎水性など）非共有結合させることが可能であることにも留意しなければならない。共有結合の結合剤は当技術分野で知られており、固相の一部であってよく、またはコーティング前にそれを誘導体化することができる。

【0134】

さらに、本発明のアッセイおよびキットは、AbbottのPoint of Care (i-STAT (商標))電気化学免疫学的検定システムを含めた、ポイントオブケアアッセイシステム用に適合または最適化することが場合によって可能である。免疫センサーおよび一回使用試験デバイス中でこれらを製造および操作する方法は、例えば（それらに関する教示を参照により本明細書に組み込む）米国特許第5,063,081号、および公開済み米国特許出願第20030170881号、同第20040018577号、同第20050054078号、および同第20060160164号中に記載されている。

10

【0135】

当然ながら、本明細書の任意の例示的な形式および本発明による任意のアッセイまたはキットは、例えば米国特許第5,089,424号および同第5,006,309号中に記載され、例えばAbbottのARCHITECT (登録商標)、AxSYM、IMX、PRISM、およびQuantumIIプラットフォーム、および他のプラットフォームだけには限られないがこれらを含めてAbbott Laboratories (Abbott Park, IL)によって市販されているように、（マイクロ粒子を含む固相が存在するシステムを含めた）自動および半自動システムにおける使用に適合または最適化することが可能である。

20

【0136】

本発明の目的に使用することができる他のアッセイ形式には、例えば、迅速な試験法、ウエスタンブロット、および例えばARCHITECT (登録商標)アッセイ中での常磁性粒子の使用がある（それらの全容を参照により本明細書に組み込む、David Wildによって編集されたFrank Quinn, The Immunoassay Handbook、第二版、363-367頁、2001を参照）。このような形式は当業者には知られている。

30

【0137】

前に記載したアッセイの要素は、キットの形で使用するのに特に適していることにも留意しなければならない。キットはバイアル、ボトルまたはストリップなどの1個の容器を含むこともできる。これらのキットは、洗浄、処理などのアッセイを実施するのに必要な他の試薬、および指標試薬のバイアルまたは容器も含有することができる。

【0138】

医薬組成物

本発明は、本発明の抗体、またはその抗原結合部分および薬剤として許容される担体を含む医薬組成物も提供する。本発明の抗体を含む医薬組成物は、障害の診断、検出、またはモニタリング、障害またはその1つまたは複数の症状の予防、治療、管理、または改善、および/または研究だけには限られないが、これらに使用する。特定の実施形態では、組成物は本発明の1つまたは複数の抗体を含む。別の実施形態では、医薬組成物は、トロポニンI活性が有害である障害を治療するために、本発明の1つまたは複数の抗体、および本発明の抗体以外の1つまたは複数の予防剤または治療剤を含む。好ましくは、障害またはその1つまたは複数の症状の予防、治療、管理、または改善に有用であることが知られている、使用されていた、または現在使用されている予防剤または治療剤。これらの実施形態によれば、組成物は担体、希釈剤または賦形剤をさらに含むことができる。

40

【0139】

本発明の抗体および抗体部分は、対象への投与に適した医薬組成物中に取り込むことができる。典型的には、医薬組成物は、本発明の抗体または抗体部分、および薬剤として許

50

容される担体を含む。本明細書で使用する「薬剤として許容される担体」は、生理的に適合性がある、任意および全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。薬剤として許容される担体の例には、1つまたは複数の水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびこれらの組合せがある。多くの場合、等張剤、例えば、糖、マンニトールなどのポリアルコール、ソルビトール、または塩化ナトリウムなどを組成物中に含むことが好ましい。薬剤として許容される担体は、抗体または抗体部分の貯蔵寿命または有効性を高める、湿潤剤または乳化剤、防腐剤またはバッファーなどの、微量の補助物質をさらに含むことができる。

【0140】

様々な送達系が知られており、これらを使用して、障害またはその1つまたは複数の症状の予防、管理、治療、または改善するのに有用な、本発明の1つまたは複数の抗体、または本発明の1つまたは複数の抗体と予防剤もしくは治療剤の組合せ、例えば、リポソーム封入体、マイクロ粒子、マイクロカプセル、抗体または抗体断片の発現、受容体仲介エンドサイトーシスが可能である組換え細胞（例えば、Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432頁(1987)を参照）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部として核酸の構築物などを投与することができる。本発明の予防剤または治療剤を投与する方法は、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外投与、腫瘍内投与、および粘膜投与（例えば、鼻腔内および経口経路）だけには限られないが、これらを含む。さらに、例えば吸入器または噴霧器、およびエアゾル剤を含む製剤の使用によって、肺投与を利用することができる。例えば、そのそれぞれを参照によりそれらの全容を本明細書に組み込む、米国特許第6,019,968号、同第5,985,320号、同第5,985,309号、同第5,934,272号、同第5,874,064号、同第5,855,913号、同第5,290,540号、および同第4,880,078号、および国際出願公開第WO92/19244号、同第WO97/32572号、同第WO97/44013号、同第WO98/31346号、および同第WO99/66903号を参照。一実施形態では、本発明の抗体、併用療法剤、または本発明の組成物を、Alkermes AIR（登録商標）肺送達系技術（Alkermes, Inc. Cambridge, MA）を使用して投与する。特定の形態では、本発明の予防剤または治療剤を、筋肉内、静脈内、腫瘍内、経口、鼻腔内、肺、または皮下投与する。予防剤または治療剤は、任意の好都合な経路によって、例えば注入またはポラス注射によって、上皮または皮膚粘膜内層（例えば、経口粘膜、直腸および腸粘膜など）を介した吸収によって投与することができ、他の生物活性剤と一緒に投与することができる。投与は全身性または局所性であってよい。

【0141】

特定の形態では、治療の必要がある領域に本発明の予防剤または治療剤を局所投与することは望ましい可能性がある。これは、例えば、非制限的に、局所注入、注射によって、またはインプラントによって実施することができ、前記インプラントは、シリコン膜、ポリマー、繊維状マトリクス（例えば、Tissue1（登録商標））、またはコーゲンマトリクスなどの膜およびマトリクスを含めた、多孔性または非多孔性材料である。一実施形態では、有効量の本発明の1つまたは複数の抗体アンタゴニストを対象の患部に局所投与して、障害またはその症状の予防、治療、管理、および/または改善する。別の形態では、有効量の本発明の1つまたは複数の抗体を、本発明の対象抗体以外の、有効量の1つまたは複数の療法剤（例えば、1つまたは複数の予防剤または治療剤）と併用して患部に局所投与して、障害またはその1つまたは複数の症状の予防、治療、管理、および/または改善する。

【0142】

別の形態では、予防剤または治療剤は制御放出系または徐放系に送達することができる。一実施形態では、ポンプを使用して制御放出または徐放を実施することができる（Langer、上記、Sefton、1987、CRC Crit. Ref. Biome

10

20

30

40

50

d. Eng. 14:20、Buchwaldら、1980、Surgery 88:507、Saudekら、1989、N. Engl. J. Med. 321:574を参照)。別の実施形態では、ポリマー材料を使用して、本発明の療法剤の制御放出または徐放を実施することができる(例えば、Medical Applications of Controlled Release、Langer and Wise(eds.)、CRC Press、Boca Raton、FL(1974)、Controlled Drug Bioavailability、Drug Product Design and Performance、Smolen and Ball(eds.)、Wiley、New York(1984)、Ranger and Peppas、1983、J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照。Levyら、1985、Science 228:190、Duringら、1989、Ann. Neurol. 25:351、Howardら、1989、J. Neurosurg. 71:105)、米国特許第5,679,377号、米国特許第5,916,597号、米国特許第5,912,015号、米国特許第5,989,463号、米国特許第5,128,326号、国際出願公開第WO99/15154号、および国際出願公開第WO99/20253号も参照)。徐放製剤において使用されるポリマーの例には、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)、およびポリオルトエステルがあるが、これらだけには限られない。好ましい実施形態では、徐放製剤において使用されるポリマーは不活性であり、浸出不純物を含まず、保存時に安定性があり、滅菌状態であり、生分解性である。さらに別の実施形態では、制御放出系または徐放系を予防または治療標的の近くに置くことができ、したがって微量の全身用量を必要とし得る(例えば、Goodson、Medical Applications of Controlled Release、上記、vol. 2、115-138頁(1984)中を参照)。

【0143】

制御放出系はLanger(1990、Science 249:1527-1533頁)による総説中で論じられている。当業者に知られている任意の技法を使用して、本発明の1つまたは複数の治療剤を含む徐放製剤を生成することができる。例えば、そのそれぞれを参照によりそれらの全容を本明細書に組み込む、米国特許第4,526,938号、国際出願公開第WO91/05548号、国際出願公開第WO96/20698号、Ningら、1996、「Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel」、Radiotherapy & Oncology 39:179-189頁、Songら、1995、「Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions」、PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397頁、Cleekら、1997、「Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application」、Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854頁、およびLamら、1997、「Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery」、Pro. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760頁を参照。

【0144】

本発明の抗体またはその抗原結合部分を単独、または1つまたは複数の他の作用物質、

10

20

30

40

50

例えば治療剤（例えば、低分子または生物分子）と併用して使用することができ、前記他の作用物質はその意図する目的で当業者によって選択されることは理解されるはずである。他の作用物質は、治療用組成物に有利な属性を与える作用物質、例えば組成物の粘性に影響を与える作用物質であってもよい。

【0145】

本発明内に含まれる組合せは、それらの意図する目的で有用である組合せであることはさらに理解されるはずである。以下で述べる作用物質は、例示目的であり制限することは目的としない。本発明の一部である組合せは、本発明の抗体と以下の表から選択される少なくとも1つの他の作用物質であってよい。組合せが、形成組成物はその目的とする機能を果たすことができるような組合せである場合、組合せは2つ以上の他の作用物質、例えば2つまたは3つの他の作用物質を含むこともできる。

10

【0146】

本発明の医薬組成物は、「治療有効量」または「予防有効量」の本発明の抗体または抗体部分を含むことができる。「治療有効量」は、望ましい治療結果を得るのに必要な用量および期間で有効な量を指す。抗体または抗体部分の治療有効量は当業者によって決定することができ、個体の疾患状態、年齢、性別、および重量、および個体中で望ましい応答を誘導する抗体または抗体部分の能力などの要因によって変わる可能性がある。治療有効量は、抗体または抗体部分のいかなる毒性または有害影響よりも、治療有効効果が上回る量でもある。「予防有効量」は、望ましい予防結果を得るのに必要な用量および期間で有効な量を指す。典型的には、疾患の前または初期段階で対象において予防用量を使用するので、予防有効量は治療有効量未満である。

20

【0147】

ここまで本発明を詳細に記載してきたが、例示目的のみで含め本発明の範囲を制限することは目的としない以下の実施例を参照することによって、本発明はさらに明らかに理解される。

【実施例1】

【0148】

19C7の作製および単離

免疫グロブリン遺伝子の同定

メッセンジャーRNAをサブクローニング抗TnI 19C7 - 144ハイブリドーマ細胞から単離した。（ハイブリドーマ細胞系TnI 19C7は米国特許出願第US 2006 / 0018879号中に記載される。）TnI 19C7のmRNAは、Novagen（Novagen（Merck KGaA, Darmstadt、ドイツの系列会社である）、カタログ番号69831-3）から購入したマウスIgプライマーセットキット、およびキット中に含まれる免疫グロブリン遺伝子特異的プライマーを使用して、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応中で利用した。生成したPCR産物は配列決定し、したがって免疫グロブリン可変重鎖および可変軽鎖遺伝子を同定した（図2参照）。

30

【0149】

pYD41ベクターへのTnI 19C7可変領域遺伝子のクローニング

酵母ディスプレイ系を使用して、（本明細書で前に記載した）非突然変異または野生型抗TnIタンパク質、および酵母タンパク質AGA2との融合体としての酵母表面上の抗TnIタンパク質のライブラリーを発現させた。pYDと呼ばれる酵母ディスプレイベクター（Invitrogen、Carlsbad、California）を使用した。それがAGA2遺伝子のC末端での抗TnI遺伝子のクローニングを可能にするからである、酵母接合因子（Boder and Witttrup、Nature Biotechnology、15：553 - 557頁（1997年6月）参照）。pYDベクターの他の重要な特徴には、挿入抗TnI遺伝子のC末端上のガラクトース誘導性プロモーターおよびエピトープタグ、V5がある（図12参照）。

40

【0150】

酵母ディスプレイプラットフォームは、単鎖可変断片として知られる抗体形式を利用する

50

。s c F v形式では、柔軟性のあるリンカーによって、可変重鎖ドメインと可変軽鎖ドメインを連結させる（可変重鎖ドメイン - リンカー - G P A K E L T P L K E A K V S（配列番号58） - 可変軽鎖ドメイン）。

【0151】

PCRシングルオーバーラップエクステンション（SOE）を使用して、T n I 1 9 C 7 s c F v用に可変重鎖遺伝子（VH）と可変軽鎖遺伝子（VL）を組合せた（図2、および配列番号54および55）。T n I 1 9 C 7 s c F vのDNAを、ベクター制限部位S f i IおよびX h o Iを使用して酵母ディスプレイベクターp Y D 4 1にクローニングした。p Y D 4 1 - T n I 1 9 C 7 s c F vベクターはDH5 イーコリに形質転換した。次いでプラスミドDNAをイーコリから単離し、T n I 1 9 C 7 s c F v挿入体を配列決定して、A G A 2タンパク質とインフレームでs c F vがクローニングされたことを確実にした。

10

【0152】

酵母ディスプレイベクターp Y D 4 1へのs c F vに関するクローニング部位は、以下の遺伝子：A G A 2結合リンカー - 41 - Xプレスエピトプタグ - T n I 1 9 C 7可変重鎖リンカー - 40 - T n I 1 9 C 7可変軽鎖 - V5エピトプタグ - （配列番号29）タグを含むORF中である。さらに、酵母菌株E B Y 1 0 0はトリプトファン栄養要求性変異株であり、p Y D 4 1ベクターは系の選択可能マーカーとしてトリプトファンをコードする。

20

【0153】

サッカロマイセス・セレピシエ菌株E B Y 1 0 0への形質転換

酵母ディスプレイプラスミド、p Y D 4 1 - T n I 1 9 C 7 s c F vを、G i e t zおよびS c h i e s t lの方法（S c h i e s t lおよびG i e t z、C u r r e n t G e n e t i c s、16（5 - 6）：339 - 46頁（1989年12月）参照）を使用してサッカロマイセス・セレピシエE B Y 1 0 0に形質転換した。形質転換反応の希釈液を選択グルコースプレート（2%グルコース（0.67%酵母窒素源基礎培地、0.105% H S M - t r p - u r a、1.8%細菌寒天培地、18.2%ソルビトール、0.86% N a H ₂ P O ₄ H ₂ O、1.02% N a ₂ H P O ₄ 7 H ₂ O）に平板培養し、48 - 72時間30 でインキュベートした。選択グルコース培地に個々のコロニーを接種し、16 - 20時間30 で攪拌しながら増殖させた。0.5 O D 6 0 0の細胞/ml（1 e 7細胞/0.5 O D / m l）を選択ガラクトース培地に移すことによって、タンパク質の発現をコロニーにおいて誘導した。コロニーは16 - 24時間20 で攪拌し、次いでs c T n I - C - 2および抗V5との結合に関してF A C S A r i aフローサイトメーターによって分析した。（s c T n I - C - 2は、S p e c t r a l D i a g n o s t i c s、T o r o n t o、カナダからの、結合した、単鎖T n I（28 - 110アミノ酸） - リンカーT n C（1 - 160アミノ酸）であることに留意しなければならない。s c T n I - C - 2は本発明の考察の目的で「s c T n I - C」として略す。）フローサイトメトリーアッセイ用に、T n I 1 9 C 7 s c F vを発現する酵母細胞を、s c T n I - C - 2または抗V5、次にそれぞれ抗トロポニンm A bおよびヤギ抗マウス - フィコエリスリン（G A M : P E）（図3B）またはG A M : P E（図3A）のいずれかとインキュベートした。フローサイトメトリーのヒストグラムは、抗V5によって検出したT n I 1 9 C 7 s c F vの完全長発現、およびs c T n I - C - 2と結合するT n I 1 9 C 7 s c F vの能力を示す。

30

40

【0154】

酵母におけるT n I 1 9 C 7 s c F vおよびT n I 1 9 C 7変異体に関するオフレート分析

酵母におけるT n I 1 9 C 7 s c F vおよびT n I 1 9 C 7変異体のオフレートの測定値を、30 - 60分間室温で0.05 O D酵母（1 × 10⁶個の細胞）と50 n Mのs c T n I - C - 2をインキュベートすることによって測定した。次いで細胞を、リン酸緩衝生理食塩水p H 6 . 8および2%ウシ血清アルブミンおよび0.2% S t a n d a p o l

50

ES-1 (PBS / BSA / Standapol) を含有するブロッキングバッファーで二回洗浄し、様々な時間量 (0、0.25 時間、0.5 時間、1 時間、2 時間、4.25 時間、25.5 時間、50 時間、75 時間および 144 時間) で室温においてインキュベートした (図 4 参照)。それぞれの時間地点で酵母細胞を氷に移し、反応を停止させた。次いで細胞をブロッキングバッファーで二回洗浄し、次の染色試薬、具体的には抗 TnI mAb 8E10、100 nM で懸濁した。細胞は氷上で 30 分間インキュベートし、二回洗浄し、次いでヤギ抗マウス - フィコエリスリン (GAM : PE) とインキュベートした。最後に、細胞を洗浄し、FACS Aria フローサイトメーターによって分析した。図 4 は、平均蛍光単位 (「M F U」) 対時間 (秒単位) としてプロットしたオフレートデータを示す。一次崩壊反応式を使用してデータを適合させた。オフレート、図 4 中に示す式中の m_2 は 0.007 sec^{-1} に適合させた。TnI 19C7 scFv の半減期 ($t_{1/2}$) は、約 8.5 分であった ($t_{1/2} = \ln 2 / k_{off}$)。

【0155】

オフレート選別戦略を使用して、突然変異ライブラリーからオフレート改善 TnI 19C7 変異体を同定した。したがって、TnI 19C7 scFv、非突然変異または野生型 (「wt」) の半減期を使用して突然変異ライブラリーを選別するのに適した時間を決定した。TnI 19C7 突然変異ライブラリーを、野生型 TnI 19C7 scFv に関して記載したのと同じアッセイ条件で、scTnI - C - 2 を含まない細胞の洗浄後約 9 分で選別した。

【0156】

TnI 19C7 scFv および TnI に関する平衡解離 (KD) の分析

酵母における TnI 19C7 scFv および TnI 19C7 変異体の KD 測定値を、45 - 60 分間室温で 0.05 OD 酵母 (1×10^6 個の細胞) と様々な濃度の scTnI - C - 2 をインキュベートすることによって測定した。リン酸緩衝生理食塩水 pH 6.8 および 2% ウシ血清アルブミンおよび 0.2% Standapol ES-1 (PBS / BSA / Standapol) を含有するブロッキングバッファーを洗浄および試薬希釈に使用した。次いで細胞を二回洗浄し、抗 TnI mAb、8E10 と 30 分間インキュベートした。細胞を再度洗浄し、ヤギ抗マウス - フィコエリスリンと 30 分間インキュベートした。最後に、細胞を洗浄し、FACS Aria フローサイトメーターによって分析した (図 5 参照)。図 5 は、標準化平均蛍光単位 (「M F U」) 対 scTnI - C - 2 濃度 (モル濃度単位) としてプロットした KD データを示す。抗体標準化、抗原結合平均蛍光強度を抗原濃度に対してプロットし、非線形最小二乗法の適合 ($y = m_1 + m_2 * m_0 / (m_3 + m_0)$) を使用して K_D を決定した。

【0157】

TnI 19C7 スパイク CDR ライブラリーの作製

突然変異誘発を抗体 TnI 19C7 の 3 個の重鎖および軽鎖相補性決定領域 (CDR) に誘導した。これらのループは主な抗原接触部位であるからである。CDR ループの長さおよびナンバリングは、Kabata および Oxford の Molecular AbM モデリングの命名法を使用して定義した。1 個のライブラリーに関してランダムな突然変異が CDR の各アミノ酸位置に組み込まれるように、個々のライブラリーを構成した。各 CDR 当たり 1 個のライブラリーに相当する合計 6 個のライブラリーを作製した。

【0158】

化学的コンピテント EBY100 酵母を用いて SfiI / XhoI 消化 pYD41 ベクターと PCR 産物を組合せてライブラリーを作製した (図 7 参照)。2 個の PCR 産物を各 CDR ライブラリーに関して作製して、PCR 選別および酵母への相同組換えを可能にした。1 個の PCR 産物は、CDR の全長に関して、70% が野生型と 30% が他のヌクレオチドである比をプライマー合成中に使用するように設計したプライマーを使用した。この産物はスパイク (sp) 産物と呼んだ (図 7 参照)。第二の PCR 産物を、scFv 遺伝子の残り部分を含むように設計した。2 個の PCR 産物を組合せ、これらを使用して単鎖可変断片または scFv 産物を作製した。消化ベクター (1 μg) および scFv P

10

20

30

40

50

CR産物(5ug)をE BY 100酵母(5.2e8 - 6.4e8細胞)と組合せ、エレクトロポレーションを使用して形質転換した。scFv PCR産物およびpYD41消化ベクターは、ヌクレオチド重複および酵母内因性ギャップの修復の機構によって助長される相同組換えのため形質転換中に環化する。ライブラリーは選択グルコース培地中で48 - 72時間30において増殖させ、ライブラリー選別用のタンパク質発現の誘導前に選択グルコース培地中で再度継代した。

【0159】

TnI19C7突然変異CDRライブラリー

TnI19C7ライブラリーをオフレート選別戦略に基づいて選別した。TnI19C7 CDR突然変異ライブラリーを、18 - 24時間20でガラクトース発現培地において誘導した。酵母におけるTnI19C7 scFvおよびTnI19C7ライブラリーを、室温で10 - 15分間25 - 50 nMのscTnI - C - 2とインキュベートした。次いで細胞を、リン酸緩衝生理食塩水pH6.8および2%ウシ血清アルブミンおよび0.2%Standapol ES - 1 (PBS / BSA / Standapol)を含有するブロッキングバッファーで二回洗浄し、8分間室温でインキュベートした。酵母細胞は氷に移し、反応を停止させた。次いで細胞をブロッキングバッファーで二回洗浄し、次の染色試薬、具体的には抗TnImAb8E10、100 nMおよび抗V5、1.5 - 2 ug / mlで懸濁した。細胞は氷上で30分間インキュベートし、二回洗浄し、次いでヤギ抗マウスIgG2a - フィコエリスリン (GAM IgG2a : PE) および1 : 200希釈ヤギ抗マウスIgG1 - Alexa Fluor 488 (GAM IgG1 : 488) とインキュベートした。最後に、細胞を洗浄し、分析し、FACS Ariaフローサイトメーターで選別した。選別ゲートを8 - 9分での非突然変異TnI19C7の結合に基づいて設定し、完全長TnI結合クローンを選別するためにゲートを設定した。それぞれの選別によってTnI結合集合の上部0.1 - 0.5%を回収した。選別した細胞は選択グルコース培地中で増殖させ、30で18 - 24時間増殖させた。選別1の細胞を誘導し、選別はさらに2または3ラウンド繰り返した。

10

20

【0160】

最終選別後、選別した細胞は選択グルコースプレートに平板培養し、72時間30で放置した。これらのライブラリーからの個々の酵母コロニーを選択グルコース培地に接種し、凍結保存し、選択ガラクトース培地において誘導した。次いで個々のコロニーを特徴付けし、オフレートアッセイ中でランク付けした。TnI19C7AM4を単離し、この選別アウトプットから同定した。

30

【0161】

TnI19C7コンビナトリアル突然変異クローンの作製および分析

それぞれのマスターCDRライブラリーまたは全マスターCDRライブラリーのアウトプットからオフレートに関して特徴付けしたコロニーを使用して、異なる個々の突然変異対を含有するscFv遺伝子を構築した。この手法は、個々の突然変異を組合せることによって結合性がさらに増大したかどうかの決定を可能にした。それぞれのCDR領域中に様々な突然変異を含有するコンビナトリアルクローンをPCR増幅によって構築し、当業者に知られている通常の技法を使用して組合せた。コンビナトリアル突然変異ライブラリーは前に記載したように酵母に形質転換し、オフレートおよびKD選択圧を使用して二回選別した。KD選択用に、100 pM (ラウンド1) および50 pM (ラウンド2) scTnI - Cを前に記載したように(図5) KD実験中で使用した。オフレート選別に関しては、選別は抗原の洗浄後3時間40分(ラウンド1) および4時間25分(ラウンド2) のインキュベーション時間で前に記載したように実施した。選別ゲートをそれぞれの条件に関して非突然変異TnI19C7の結合に基づいて設定し、完全長TnI結合クローンを選別するためにゲートを設定した。それぞれの選別によってTnI結合集合の上部0.1%を回収した。選別した細胞は選択グルコース培地中で、30において18 - 24時間増殖させた。選別1の細胞を誘導し、選別はさらに1ラウンド繰り返した。

40

【0162】

50

最終選別後、選別した細胞は選択グルコースプレートに平板培養し、72時間30で放置した。これらのライブラリーからの個々の酵母コロニーを選択グルコース培地に接種し、凍結保存し、選択ガラクトース培地において誘導した。次いで個々のコロニーを特徴付けし、オフプレートアッセイ中でランク付けした。T n I 1 9 C 7 A M 1、A M 2、およびA M 3を単離し、このコンビナトリアルライブラリーから同定した。

【0163】

選択したT n I 1 9 C 7変異体の分析

選択したクローンは、野生型T n I 1 9 C 7 s c F vに関して前に記載したように、K Dの改善に関して最初に特徴付けした。図9は、4つの選択したクローンに関して決定したs c F vのK D値を示す。野生型T n I 1 9 C 7抗体の1.7 n Mと比較して、T n I 1 9 C 7 A M 1クローンは0.36 n Mで最も改善された結合を示した。

10

【0164】

選択したT n I 1 9 C 7 s c F v変異体を配列決定して、発現されたアミノ酸突然変異体を決定した。最初に、プラスミドDNAを、酵母用ミニ-調製キット(カタログ番号D 2 0 0 1、Z y m o R e s e a r c h O r a n g e、C A)を使用して酵母懸濁培養液から単離した。配列決定等級プラスミドDNAを得るために、酵母用ミニ-調製キット由来のプラスミドをD H 5 α イコリに形質転換し、次いでイコリ用ミニ-調製キットを使用して培養液から精製した。p Y D 4 1ベクター特異的プライマー(p Y D 4 1 f o r - T A G C A T G A C T G G T G G A C A G C (配列番号59)およびp Y D 4 1 r e v - C G T A G A A T C G A G A C C G A G (配列番号60)を使用して、次いで純

20

【0165】

全体として、野生型クローン由来の配列多様性の原因はC D R L 2およびC D R H 1中に見られ、一方C D R L 1およびH 3はコンセンサスモチーフ中にフォールディングされた。C D R L 3およびC D R H 2は非突然変異状態のままであった。C D R H 1に関する配列のデータは、コンビナトリアルライブラリーから単離した3クローンにおいて同定したように、位置34においてイソロイシンからロイシンの保存的变化の優先性を示した。C D R H 3のコンセンサス配列は、コンビナトリアルライブラリーから単離した3クローンにおいて同定したように、位置100aにおいてトリプトファンではなくチロシン、位置101においてアラニンではなくトレオニン、および位置102においてチロシンではなくアスパラギン酸の強い優先性を示した。クローン19C7AM4を同定したマスターC D R選別から、C D R H 3は、コンビナトリアルコンセンサス配列組と異なる突然変異を有する唯一のC D Rであった。具体的には、突然変異はA 1 a 9 6 P h e、T y r 9 9 S e r、T r p 1 0 0 a A 1 a、およびT y r 1 0 2 A s pであった。

30

【0166】

C D R L 1に関するコンセンサス配列のデータは、位置25でトレオニン、位置27でリシン、位置28でアスパラギン、位置29でバリン、および位置34でヒスチジンの優先性を示した。C D R L 2に関しては、それぞれのクローンは特有の突然変異を有するか

40

【0167】

一過的または安定的発現系中でのT n I 1 9 C 7キメラ抗体のクローニングおよび可溶性発現

選択したT n I 1 9 C 7変異体を、p B O Sと呼ばれる一過的発現ベクター系(A b b o t t B i o r e s e a r c h C e n t e r、W o r c e s t e r、M A)へのT n I 1 9 C 7可変ドメインのクローニングによって、キメラマウス-マウスI g G_{2a}/マウスkappaおよび/またはマウス-ヒトI g G₁/ヒトkappa抗体に転換した。より詳細には、P C Rを使用して、別のp B O Sベクターへのクローニング用の制限部位

50

を有する可変重鎖および可変軽鎖遺伝子を増幅した (Mizushima and Nagata, *Nucleic Acids Research*, 18:5322 (1990))。可変重鎖遺伝子と可変軽鎖遺伝子を消化および脱リン酸化ベクターで連結させ、DH5 イーコリに形質転換した。プラスミドDNAをイーコリから精製し、PEI (1 mg/ml) を使用して293H細胞にトランスフェクトした。以下のTnI19C7変異体：TnI19C7野生型、AM1、AM2、AM3およびAM4の一過的抗体が発現した。

【0168】

例えば、pBOS-TnI19C7AM1重鎖および軽鎖ベクターを使用して、安定的CHO細胞系プラスミドを2ステップのクローニング手順で作製した。最初に、可変重鎖遺伝子と可変軽鎖遺伝子を、制限酵素SrfI/NotIを使用して、それぞれpBVおよびpJVプラスミド (Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA) 中のヒト定常領域とインフレームで連結させた。連結反応物はDH5 イーコリに形質転換し、プラスミドDNAは個々のコロニーから後に単離した。pBV-TnI19C7マウス可変重鎖-ヒトIgG1およびpJV-TnI19C7マウス可変軽鎖-ヒトkappaを、クローニング部位で配列決定した。

10

【0169】

第二のクローニングステップは、1つの安定細胞系ベクターに重鎖IgG₁遺伝子と軽鎖kappa遺伝子を組合せることを含んでいた。pBV-TnI19C7AM1ヒトIgG1とpJV-TnI19C7AM1ヒトkappaベクターをAscI/PacIで消化した。VL-ヒトkappa定常およびVH-ヒトIgG1定常DNA断片をゲル精製し、連結させてpBJ-TnI19C7AM1と呼ばれる安定細胞系ベクターを生成した。pBJ-TnI19C7AM1ヒト重鎖/軽鎖キメラプラスミドは、リポフェクタミン (Invitrogen) プロトコールを使用してCHO細胞に形質転換した。安定細胞系は初回形質転換からサブクローニングした。(「TnI19C7AM1hG1kCHO204」とも呼ばれる) 安定的CHO細胞系がクローンAM1用に開発され、2009年2月11日にアメリカンタイプカルチャーコレクション、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209に寄託され、受託番号PTA-9816を得た。

20

【実施例2】

30

【0170】

トロポニンIクローン19C7野生型と親和性成熟抗体の相対的親和性

トロポニンIクローン19C7野生型 (マウス完全構築物) および親和性成熟 (ヒト定常領域) 抗体を、マイクロタイター酵素免疫学的検定中で相対的親和性に関して評価した。96ウエルアッセイプレート (NUNC Corporation, Rochester, NY) を、ヒツジ抗マウスIgGFc 特異的抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) またはロバ抗ヒトIgGFc 断片特異的抗体 (Jackson ImmunoResearch) のいずれかの100uL/ウエルの2ug/mL溶液を加えることによってコーティングした。両方の抗体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 中に希釈した。アッセイプレートは15-30 で一晩インキュベートした。翌日コーティング試薬を除去し、200uL/ウエルのBSA溶液 (PBS中に希釈したウシ血清アルブミン [Abbott Laboratories]) を加えた。BSA溶液は15-30 において30分間アッセイウエル中でインキュベートし、除去し、アッセイウエルは300uL/ウエルの蒸留水 (dH2O, Abbott Laboratories) を加えることによって洗浄し、3洗浄サイクルで吸引した。次に、100uL/ウエルの試験サンプルを加えた。試験サンプルは、それぞれの抗体の開始2ug/mL溶液 (BSA溶液中) を作製し、次にBSA溶液中にlog3希釈によって調製した。試験サンプルは15-30 において2-3時間インキュベートし、その後サンプルを吸引除去し、ウエルは前に記載したようにdH2Oで洗浄した。次に、100uL/ウエ

40

50

ルの試験抗原溶液をそれぞれのアッセイウエルに加えた。試験抗原溶液は、BSA溶液中のscTnI-C-2（完全長心筋トロポニンCと結合した心筋トロポニンIのアミノ酸28-100、Spectral Diagnostics）の1000ng/mL溶液を最初に調製し、次にlog2希釈によって作製した。抗原溶液は15-30において10分間アッセイウエル中でインキュベートし、溶液を叩き出すことによって除去した。次いでアッセイプレートの前に記載したようにdH2Oで洗浄した。次に、100uL/ウエルのビオチン標識ヤギ抗トロポニンI抗体（HyTest、BSA溶液中に500ng/mLに希釈）をそれぞれのアッセイウエルに加え、15-30において30分間インキュベートした。次いで抗体を吸引除去し、ウエルは記載したようにdH2Oで洗浄した。次に、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（SA-HRP O、Jackson ImmunoResearch）の100uL/ウエルの200ng/mL溶液（BSA溶液中）を加え、15-30において30分間インキュベートした。次いでSA-HRP O試薬を吸引除去し、プレートを記載したように洗浄した。次に基質溶液を、10mLのOPD希釈液当たり10PD錠剤を溶かすことによって調製した（o-フェニレンジアミン、いずれもAbbott Laboratories）。100uL/ウエルの調製基質溶液をアッセイプレートに加え、約4-5分間インキュベートし、次いで100uL/ウエルの1N硫酸（Abbott Laboratories）を加えることによって反応を停止させた。生成したシグナルは、蛍光光度計を使用して492nmで読み取った。実験からの結果はカレイダグラフソフトウェアを使用してプロットした。Ag₅₀値（最大結合の50%での抗原の濃度）を決定し、これを使用して試験抗原に対する相対的親和性に関して抗体を比較した。

10

20

【実施例3】

【0171】

免疫学的検定中でのモノクローナル抗体19C7の使用

トロポニンIクローン19C7野生型（マウス完全構築物）および親和性成熟（ヒト定常領域）抗体を、ARCHITECT（登録商標）免疫学的検定アナライザー（Abbott Laboratories）で相対的親和性に関して評価した。このアッセイは全自動式であり、アナライザーは全てのステップで機能する。マウス抗トロポニンI抗体（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）でコーティングした磁気マイクロ粒子を、様々なレベルのscTnI-C-2（完全長心筋トロポニンCと結合した心筋トロポニンIのアミノ酸28-100、（Spectral Diagnostics）と混合し、15-30において18分間インキュベートした。この時間中、マイクロ粒子コーティング抗体はscTnI-C-2と結合した。次いでマイクロ粒子を磁石で引き寄せ、残りのアッセイ溶液は吸引し、粒子はアッセイ希釈液（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）で洗浄した。次に、その全てをアクリジニウムで標識した野生型または親和性成熟19C7抗体（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）をマイクロ粒子に加え、15-30において4分間インキュベートした。次に、マイクロ粒子を磁石で引き寄せ、残りのアッセイ溶液は吸引し、粒子はアッセイ希釈液で洗浄した。シグナル（相対光単位）はプレトリガーおよびトリガー溶液（いずれもAbbott Laboratories）を加えることによって生成した。シグナル比を計算し、これらを使用して抗体を比較した。図11中に示す結果に基づいて確定することができるように、AM1抗体は野生型抗体より良いシグナルを与えた。

30

40

【 図 1 】

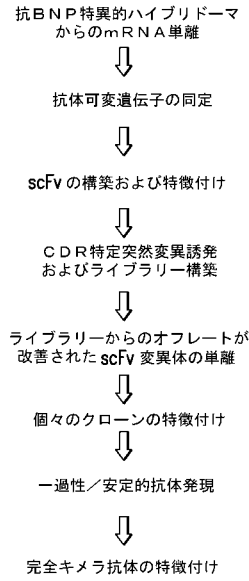


FIG.1

【 図 2 A 】

酵母ディスプレイ操作に使用した scFv 構築物

19C7 可変部重鎖遺伝子

配列番号: 54 1 GAGGTCCAG CTTCAGCAG TCAGGACCT ACCTGGTG AACCTGGG GCCTCAGTG
配列番号: 55 CTCCAGGTC GAAGTGTC AGTCTGGA CTGGACCAC TTTGGACCC CGGAGTCAC

19C7 可変部重鎖遺伝子

55 AGGATATCC TGCAAGCCT TCTGGATC ACATTCACT CACTACAAC ATACACTGG
TCCTATAGG ACGTTCCGA AGACCTATG TGTAGTGA CTGATGTTG TATGTGACC

19C7 可変部重鎖遺伝子

109 GTGAAACAG AGCCATGGA AAGACCTT GAGTGGATT GGATATATT TATCCTTAC
CACTTTGTC TCGGTACCT TTCTCGGAA CTCACCTAA CCTATATAA ATAGGAATG

19C7 可変部重鎖遺伝子

163 AATGTATT ACTGGCTAC AACAGAAA TTCAAGAGC AAGCCACA TTGACTGTA
TTACCATAA TGACCGATG TTGGTCTTT AAGTTCTCG TTCCGGTGT AACTGACAT

19C7 可変部重鎖遺伝子

217 GACAGTTCC TGCAATACA GCCTACATG GACCTCCGC AGCCTGACA TCTGAGGAC
CTGTCAAGG AGTATTATG CGGATGATC CTGGAGGGG TCGGACTGT AGACTCCTG

19C7 可変部重鎖遺伝子

271 TCTGCAGTC TATTTTTGT GCTAGAGAC GCTTATGAT TAGGACTGG TTGGCTTAC
AGACGTCAG ATAAAAACA CGATCTCTG CGAATACTA ATGCTGACC AACCGAATG

19C7 可変部重鎖遺伝子

325 TGGGGCCAA GGGACTCTG GTCAGTGTG TCTGCAGGT CCCGCCAAG GAGTTGAGG
ACCCCGGTT CCTGAGAC CAGTGACAG AGAAGTCCA GGGCGTTC CTCAGCTGC

19C7 可変部軽鎖遺伝子

リンカー

379 CCCCTGAAG GAGGCGAAG GTCTCTGAC ATCTTGCTG ACTCAGTCT CCAGTCATC
GGGGACTTC CTCCGCTTC CAGAGACTG TAGAACCAC TGACTCAGA GGTCACTAG

FIG.2A

【 図 2 B 】

19C7 可変部軽鎖遺伝子

433 CTGTCTGTG AGTCCAGGA GAAAGAGTC AGTTTCTCC TGCAGGGCC AGTCAGAGC
GACAGACAC TCAGGTCTT CTTTCTCAG TCAAAGAGG ACGTCCCGG TCAGTCTCG

19C7 可変部軽鎖遺伝子

487 ATTGGCACA AACATATAT TGGTATCAG CAAAGAACA AATGGTTCT CCAAGCCTT
TAACCGTGT TTGTATATA ACCATAGTC GTTCTGTGT TTACCAAGA GGTTCGGAA

19C7 可変部軽鎖遺伝子

541 CTCATAAAG TATGCTTCT GAGTCTATC TCTGGGATC CCTTCCAGG TTTAGTGGC
GAGTATTTT ATACGAAGA CTCAGATAG AGACCCTAG GGAAGGTCC AAATCACCC

19C7 可変部軽鎖遺伝子

595 AGTGGGTCA GGGACAGAT TTTACTCTT AGCATCAAC AGTGTGGAG TCTGAAGAT
TCACCCAGT CCCTGTCTA AAATGAGAA TCGTAGTTG TCACACCTC AGACTTCTA

19C7 可変部軽鎖遺伝子

649 ATTGCTGAT TATTACTGT CAACAAAGT AATAACTGG CCATACAGC TTCGGAGGG
TAAGGACTA ATAATGACA GTTGTTC A TTATTGACC GGTATGTGC AAGCCTCC

19C7 可変部軽鎖遺伝子

703 GGGACCAAG CTGGAATA AAACCG
CCCTGGTTC GACCTTTAT TTTGCC

FIG.2B

【 図 3 A 】

酵母における TnI 19C7 scFv の発現

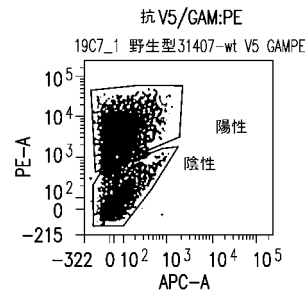


FIG.3A

【 図 3 B 】

酵母における TnI 19C7 scFv の発現

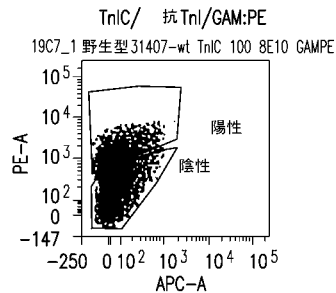
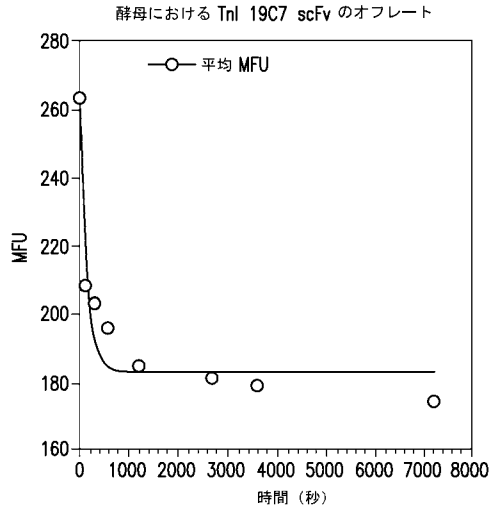


FIG.3B

【 図 4 】



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

	値	誤差
m1	77.011	9.9361
m2	0.0068528	0.0022053
m3	183.38	4.2374
カイニ乗	431.53	NA
R	0.96172	NA

FIG.4

【 図 5 】

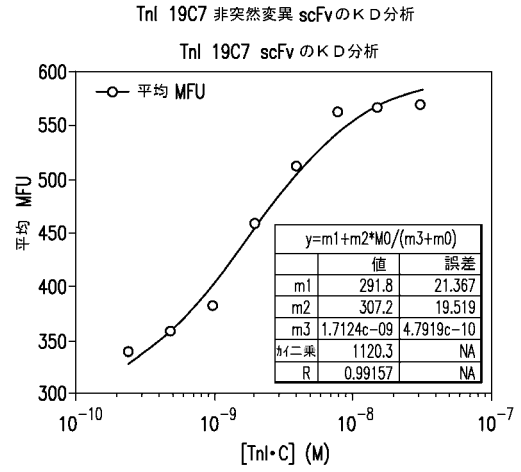


FIG.5

【 図 6 】

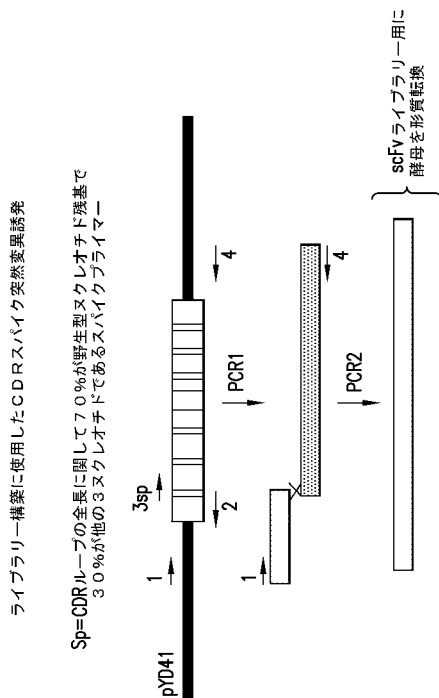


FIG.6

【 図 7 】

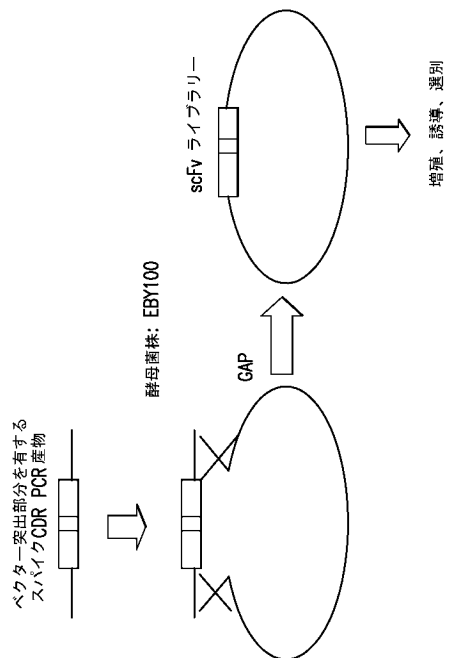


FIG.7

【 図 8 A 】

ライブラリー構築に使用したプライマー

名称	位置	配列
tpVHfor	pYD41 19C7VH5'	gaatttagggccaccggccatggcgggtccagctcca gaagtca
tpVHrev	pYD41 19C7VH3' リンク-40	cttcagggggtcactctctggggaccctgagagacagt gac
tpVLfor	pYD41 19C7VL5' リンク-40	ttgaccccctgaaggagggctctgacactctgtgga ct
tpVLrev	pYD41 19C7VL3'rev	gaaggccctctgacctgagggcgcccgctttatttcc ag
19H1spfor	pYD41 19C7 CDRH1	gaacctgggacctcagtgagatatactgcaagcctctg gatacacttcaactgactacaacatcacacgggt gaacaggccatgga
19HF1rev	pYD41 19C7 VH FR1	agagacctgacggatatactcactgagggc
pYD1AG2for	pYD41 AG2 for	agtcaagttgtctc
		caaggctttccatggct
19H3spfor	pYD41 19C7 CDRH3	catctgagacctcagactctattttgtctgtagagacgctta tgattcacgactgggtgggttacggggccacaggact ctggtcaactgtc

配列番号: 1

配列番号: 2

配列番号: 3

配列番号: 4

配列番号: 5

配列番号: 6

配列番号: 7

配列番号: 8

配列番号: 9

配列番号: 10

FIG.8A

【 図 8 B 】

19HF3rev	pYD41 19C7 VH FR3	tctgcacacaataatagactgcagagctctc
19L1spfor	pYD41 19C7 CDRL1	cigtgggtccaggaggaagtcagttctctcgcagggc cagtcagagcatttggcacaacacatataatggatc agcaagacaacatggtctc
19LF1rev	pYD41 19C7 VL FR1	gaagggaacctgactcttctctctggaact
19L2spfor	pYD41 19C7 CDRL2	aaagacaactggctccaggctctctctcaagctatgctt ctgagctctctctgggtccctccagtttagggcagt
19LF2rev	pYD41 19C7 VL FR2	ctttatgagagccitggagaccatt
19L3spfor	pYD41 19C7 CDRL3	gigtgggtciggaagatattgctgatttactcgcacaaa gtaataactggcctacacagctcgggggggggacc aagctggcaata
19LF3rev	pYD41 19C7 VL FR3	acagctaatcactcagcaatattctcaga
pYD41rev2	pYD41 変異株リ HIS	atagacaagggatatacactgggacaac
19FRH2 for	pYD41 19C7 FR H2	tgggtgacaacagccatggaagagcctt
19FRH3 for	pYD41 19C7 FR H2	aagggcaactgacigtgacagctt
19FRL2 for	pYD41 19C7 FR L2	tggtatcagaagaagaca
19FRL3 for	pYD41 19C7 FR L3	gggtcccttccagtttagggc

配列番号: 11

配列番号: 12

配列番号: 13

配列番号: 14

配列番号: 15

配列番号: 16

配列番号: 17

配列番号: 18

配列番号: 19

配列番号: 20

配列番号: 21

配列番号: 22

FIG.8B

【 図 9 】

scFv 発現酵母において測定した平衡解離定数 (KD)

カドンの名称	scFv KD (nM)
Tn I 19C7 野生型	1.7
Tnl 19C7 AM1	0.36
Tnl 19C7 AM2	0.38
Tnl 19C7 AM3	0.42
Tnl 19C7 AM4	0.36

FIG.9

【 図 1 0 】

EIA アッセイ中でのマウスキメラ抗体の測定ランキング

カドンの名称	Ab50	Ag50
Tn I 19C7 野生型	25ng/mL	0.73
Tnl 19C7 AM1	25ng/mL	0.39
Tnl 19C7 AM2	25ng/mL	1.15
Tnl 19C7 AM3	25ng/mL	0.78
Tnl 19C7 AM4	8ng/mL	1.58

FIG.10

【 図 1 1 】

Tnl 19C7 AM1 と Tnl 19C7 野生型を比較した Architect (登録商標) の結果

Tn I 19C7 野生型	平均 RLU	X/A
CalA	1132	1
CalB	11321	10
CalC	21656	19
CalD	63838	56
CalE	383234	339
CalF	1463399	1293

Tn I 19C7 AM1	Mean RLU	X/A
CalA	1241	1
CalB	16282	14
CalC	29986	26
CalD	90633	80
CalE	540658	478
CalF	1974094	1744

FIG.11

【 図 1 2 A 】

トロポニン I の 19C7 AM1 VH 配列

配列番号 : 25 GluValGln LeuGlnGln SerGlyPro AspLeuVal LysProGly AlaSerVal
 配列番号 : 23 1 GAGGTCCAG CTTCAGCAG TCAGGACCT GACCTGTG AACCTGGG GCCTCAGTG
 配列番号 : 24 CTCCAGGTC GAAGTGTG AGTCTGGA CTGGACCAC TTGGACCC CGGAGTCAC

CDR H1

55 ArgIleSer CysLysAla SerGlyTyr ThrPheThr AspTyrAsn LeuHisTrp
 AGGATATCC TGCAAGGCT TCTGGATAC ACATTCAAG GACTATAAC TTACACTGG
 TCCTATAGG ACGTCCGA AGACCTATG TGTAAGTGC CTGATATTG AATGTGACC

CDR H2

109 ValLysGln SerHisGly LysSerLeu GluTrpIle GlyTyrIle TyrProTyr
 GTGAAACAG AGCCATGGA AAGAGCCTT GAGTGGATT GGATATATT TATCCTTAC
 CACTTTGTC TCGTACTT TTCTCGAA CTCACCTAA CCTATATAA ATAGGAATG

CDR H2

163 AsnGlyIle ThrGlyTyr AsnGlnLys PheLysSer LysAlaThr LeuThrVal
 AATGCTATT ACTGGCTAC AACAGAAA TTCAAGAGC AAGGCCACA TTGACTGTA
 TTACCATAA TGACGATG TTGCTCTT AAGTCTCG TTCCGGTGT AACTGACAT

217 AspSerSer SerAsnThr AlaTyrMet AspLeuArg SerLeuThr SerGluAsp
 GACAGTTCC TCCAATACA GCCTACATG GACCTCCG AGCCTGACA TCTGAGGAC
 CTGTCAAGG AGGTTATGT CGGATGTAC CTGGAGGCG TGGAGCTGT AGACTCCTG

CDR H3

271 SerAlaVal TyrPheCys AlaArgAsp AlaTyrAsp TyrAspTyr LeuThrAsp
 TCTGCAGTC TATTTTGT GCTAGAGAC CCTTATGAT TACGACTAT CTGACGGAC
 AGACCTCAG ATAAAAACA CGATCTCTG CGAATACTA ATGCATGATA GACTGCCTG

325 TrpGlyGln GlyThrLeu ValThrVal SerAla
 TGGGGCCAA GGGACTCTG GTCACTGTC AGGGCT
 ACCCCGGTT CCCTGAGAC CAGTGACAG TCGCGA

FIG.12A

【 図 1 2 B 】

トロポニン I の 19C7 AM1 VL 配列

配列番号 : 28 AspIleLeu LeuThrGln SerProVal IleLeuSer ValSerPro GlyGluArg
 配列番号 : 26 1 GACATCTTG CTGACTCAG TCTCCAGTC ATCCTGTCT GTGAGTCCA GGAGAAAGA
 配列番号 : 27 CTGTAGAAC GACTGAGTC AGAGCTCAG TAGGACAGA CACTCAGGT CCTCTTTCT

CDR L1

55 ValSerPhe SerCysArg ThrSerLys AsnValGly ThrAsnIle HisTrpTrp
 GTCAGTTTC TCCTGCAGG ACCAGTAAG AACGTTGGC ACAAACATT CATTGGTAT
 CAGTCAAAG AGGAGTCC TGGTATTC TTGCAACCC TGTTTGTA AATAACATA

CDR L2

109 GlnGlnArg ThrAsnGly SerProArg LeuLeuIle LysTyrAla SerGluArg
 CAGCAAAGA ACAAATGCT TCTCCAAGG CTCTCATA AAGTATGCT TCAGAGCGT
 GTCGTTTCT TGTTTACA AGAGGTTCC GAAGATAT TTCATACGA AGTCTCCGA

CDR L2

163 LeuProGly IleProSer ArgPheSer GlySerGly SerGlyThr AspPheThr
 TTACCTGGG ATCCTTCC AGGTTTAGT GGCAGTGGG TCAGGGACA GATTTTACT
 AATGACCC TAGGGAAGG TCCAATCA CGTCCACC AGTCCCTGT CTAATAATG

CDR L3

217 LeuSerIle AsnSerVal GluSerGlu AspIleAla AspTyrTyr CysGlnGln
 CTTAGCATC AACAGTGTG GAGTCTGAA GATATTGCT GATTATTAC TGTCACAA
 GAATCGTAG TTGTACAC CTCACACT CTATAACA CTAATAATG ACAGTTGTT

CDR L3

271 SerAsnAsn TrpProTyr ThrPheGly GlyGlyThr LysLeuGlu IleLysArg
 AGTAATAAC TGGCCATAC ACGTTCGGA GGGGGACC AAGTGGAA ATAAAAAGG
 TCATTATTG ACCCGTATG TCGAAGCCT CCCCCTGG TTCGACCTT TATTTTGGC

FIG.12B

【 図 1 3 】

TnI 19C7 AM1-AM4 抗体に関するCDR配列の一覧

	CDR H1	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
配列番号 : 30	19C7 野生型	G	Y	T	F	T	D	Y	N	I	H
配列番号 : 31	19C7 AM1	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-
配列番号 : 32	19C7 AM2	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-
配列番号 : 33	19C7 AM3	-	-	S	-	-	-	-	-	L	-
配列番号 : 34	19C7 AM4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	CDR H1	95	96	97	98	99	100	100?	100?	101	102
配列番号 : 35	19C7 野生型	D	A	Y	D	Y	D	W	L	A	Y
配列番号 : 36	19C7 AM1	-	-	-	-	-	-	Y	-	T	D
配列番号 : 37	19C7 AM2	-	-	-	-	-	-	Y	-	T	D
配列番号 : 38	19C7 AM3	-	-	-	-	-	-	Y	-	T	D
配列番号 : 39	19C7 AM4	-	F	-	-	S	-	A	-	-	D

	CDR L1	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
配列番号 : 40	19C7 野生型	R	A	S	Q	S	I	G	T	N	I	Y
配列番号 : 41	19C7 AM1	-	T	-	K	N	V	-	-	-	-	H
配列番号 : 42	19C7 AM2	-	T	-	K	N	V	-	-	-	-	H
配列番号 : 43	19C7 AM3	-	T	-	K	N	V	-	-	-	-	H
配列番号 : 44	19C7 AM4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	CDR L2	50	51	52	53	54	55	56
配列番号 : 45	19C7 野生型	Y	A	S	E	S	I	S
配列番号 : 46	19C7 AM1	-	-	-	-	R	L	P
配列番号 : 47	19C7 AM2	-	G	T	-	R	V	F
配列番号 : 48	19C7 AM3	-	-	-	-	-	-	-
配列番号 : 49	19C7 AM4	-	-	-	-	-	-	-

FIG.13

【配列表】

2012518418000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/024979

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K14/47 C07K16/18 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		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FILATOV V L ET AL: "EPITOPE MAPPING OF ANTI-TROPONIN I MONOCLONAL ANTIBODIES" BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 45, no. 6, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 1179-1187, XP000941112 ISSN: 1039-9712 page 1181, paragraph 3; table 1 ----- -/-	3-8, 18, 33, 35, 36
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 26 April 2010		Date of mailing of the international search report 06/05/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlean 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Griesinger, Irina

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/US2010/024979

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PERONNET ET AL: "Isoelectric point determination of cardiac troponin I forms present in plasma from patients with myocardial infarction" CLINICA CHIMICA ACTA, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL LNKD- DOI:10.1016/J.CCA.2006.10.006, vol. 377, no. 1-2, 15 December 2006 (2006-12-15), pages 243-247, XP005805375 ISSN: 0009-8981 abstract	3-8,18, 33,35,36
X	FR 2 779 526 A1 (PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS [FR]) 10 December 1999 (1999-12-10) tables II,III	3-8,18, 33,35,36
X	RAMA D ET AL: "EPITOPE LOCALIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES USED IN HUMAN TROPONIN I IMMUNOENZYMOMETRIC ASSAY" HYBRIDOMA, LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 2, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 153-157, XP009033257 ISSN: 0272-457X abstract; table 1	3-8,18, 33,35,36
X	WO 2005/000901 A2 (UNIV DUKE [US]; TEDDER THOMAS F [US]; UCHIDA JUNJI [JP]; HAMAGUCHI YAS) 6 January 2005 (2005-01-06) sequence 25	3-8,18, 33,35,36
X	EP 0 866 131 A2 (SANKYO CO [JP]) 23 September 1998 (1998-09-23) abstract; example 4	7
X	EP 2 014 302 A1 (INST CURIE [FR]; INST NAT SANTE RECH MED [FR]) 14 January 2009 (2009-01-14) sequence 8	8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/024979

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2010 /024979

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-33, 36(completely); 35(partially)

relate to a variant of the known antibody TnI 19C7 called TnI 19C7 AM1 and comprising the sequences according to SEQ ID NOs: 25, 28 and 52-57, the corresponding nucleic acid sequences, vectors, host cells, kits, methods of producing it and its uses.

2. claim: 35(partially)

relate to a variant of the known antibody TnI 19C7 called TnI 19C7 AM2 and comprising the sequences according to SEQ ID NOs: 32,37, 42 and 47 (see Figure 13), the corresponding nucleic acid sequences, vectors, host cells, kits, methods of producing it and its uses.

3. claim: 35(partially)

relate to a variant of the known antibody TnI 19C7 called TnI 19C7 AM3 and comprising the sequences according to SEQ ID NOs: 33, 38, 43 and 48(see Figure 13), the corresponding nucleic acid sequences, vectors, host cells, kits, methods of producing it and its uses.

4. claim: 35(partially)

relate to a variant of the known antibody TnI 19C7 called TnI 19C7 AM4 and comprising the sequences according to SEQ ID NOs: 34, 39, 44 and 49 (see Figure 13), the corresponding nucleic acid sequences, vectors, host cells, kits, methods of producing it and its uses.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2010/024979

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2779526	A1	10-12-1999	WO 9964868 A1 16-12-1999
WO 2005000901	A2	06-01-2005	AU 2004252067 A1 06-01-2005
			CA 2525251 A1 06-01-2005
			CN 1802388 A 12-07-2006
			EP 1626993 A2 22-02-2006
			JP 2007535301 T 06-12-2007
			KR 20060022238 A 09-03-2006
			NZ 543960 A 28-11-2008
			NZ 568403 A 30-10-2009
			US 2009136516 A1 28-05-2009
EP 0866131	A2	23-09-1998	AU 736287 B2 26-07-2001
			AU 5937598 A 15-10-1998
			BR 9800937 A 11-01-2000
			CA 2232828 A1 21-09-1998
			CZ 9800858 A3 14-10-1998
			HU 9800613 A2 01-02-1999
			ID 20065 A 24-09-1998
			NO 981272 A 22-09-1998
			NZ 330004 A 28-10-1998
			PL 325457 A1 28-09-1998
			TR 9800517 A2 21-10-1998
			ZA 9802371 A 28-09-1998
			EP 2014302
EP 2167125 A1 31-03-2010			
WO 2009007222 A1 15-01-2009			

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 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
	G 0 1 N 33/53 D	
	A 6 1 P 9/10	

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

(72) 発明者 トウー , バイリン
アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバティービル、バージニア・アベニュー・1748

(72) 発明者 ホワン , ダーガン
アメリカ合衆国、イリノイ・60060、マンデレイン、オーリンズ・ドライブ・1375

(72) 発明者 ツイーマン , ロバート・エヌ
アメリカ合衆国、イリノイ・60046、リンデンハースト、フォーリング・ウオーターズ・ドライブ・2944

(72) 発明者 タイナー , ジョーン・デー
アメリカ合衆国、イリノイ・60085、ビーチ・パーク、ノース・オーチャード・ロード・37835

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA07 DA02 DA12 EA04
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA72X AA91X AA91Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 DD62 DD88
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA23 EA28 EA50 FA74

专利名称(译)	抗肌钙蛋白I的抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2012518418A	公开(公告)日	2012-08-16
申请号	JP2011551284	申请日	2010-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	ブロフィー・スーザン・イー トウ・バイリン ホワン・ダーガン ツイーマン・ロバート・エヌ タイナー・ジヨン・デー		
发明人	ブロフィー,スーザン・イー トウ,バイリン ホワン,ダーガン ツイーマン,ロバート・エヌ タイナー,ジヨン・デー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395 G01N33/53 A61P9/10		
CPC分类号	C07K16/18 C07K14/4716 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/92		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12P21/08 A61K39/395.D A61K39/395.N G01N33/53.D A61P9/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA12 4B024/EA04 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA72X 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD62 4C085/DD88 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	12/391937 2009-02-24 US		
其他公开文献	JP6055593B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及肌钙蛋白I的抗体及其使用方法。特别地，此类抗体可用于检测患者中的肌钙蛋白I，并且还可用于诊断例如心肌梗塞或急性冠状动脉综合征。

配列番号	タンパク質領域	配列
52	CDR H1	GYTFTDYNLH
53	CDR H2	YIYPYNGITGYNQKFKS
54	CDR H3	DAYDYDYLTD