

(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2014-519329

(P2014-519329A)

(43) 公表日 平成26年8月14日 (2014. 8. 14)

| (51) Int. Cl.                       | F I                   | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------|
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006. 01)</b>     | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B O 2 4   |
| <b>C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)</b>      | C 1 2 Q 1/02          | 4 B O 6 3   |
| <b>C 1 2 Q 1/25 (2006. 01)</b>      | C 1 2 Q 1/25          | 4 B O 6 4   |
| <b>C 1 2 N 1/15 (2006. 01)</b>      | C 1 2 N 1/15          | 4 B O 6 5   |
| <b>C 1 2 N 1/19 (2006. 01)</b>      | 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 61 頁) 最終頁に続く |                       |             |

(21) 出願番号 特願2014-514061 (P2014-514061)  
 (86) (22) 出願日 平成24年6月6日 (2012. 6. 6)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年12月9日 (2013. 12. 9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/060776  
 (87) 国際公開番号 W02012/168344  
 (87) 国際公開日 平成24年12月13日 (2012. 12. 13)  
 (31) 優先権主張番号 11169621.7  
 (32) 優先日 平成23年6月10日 (2011. 6. 10)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

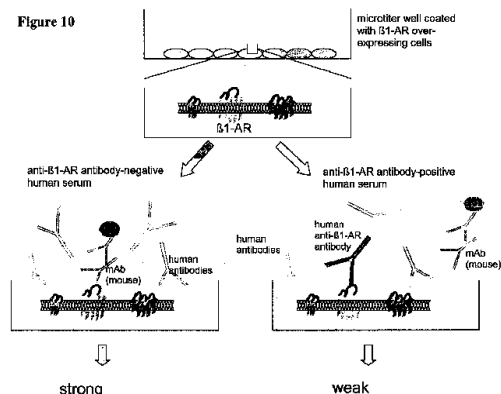
(71) 出願人 513310737  
 コリムン ゲーエムベーハー  
 ドイツ連邦共和国 ノイス 4 1 4 7 0  
 ジョンソン アンド ジョンソン－ブラッ  
 ツ 1  
 (74) 代理人 100095832  
 弁理士 細田 芳徳  
 (72) 発明者 ホルトホフ, ハンス－ペーター  
 ドイツ連邦共和国 ペンツベルク 8 2 3  
 7 7 イム ディッテンリート 2 7 アー  
 ウンゲラー, マルティン  
 (72) 発明者 ドイツ連邦共和国 マルティンスリート  
 8 2 1 5 2 フラウンホファーシュトラ  
 セ 1 7, コリムン ゲーエムベーハー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプター ( $\beta 1$ -AR) に対する結合化合物および自己-抗  $\beta 1$ -AR 抗体の測定におけるその使用

## (57) 【要約】

本開示は、DSM ACC3121、DSM ACC3174、DSM ACC3175、DSM ACC3176およびDSM ACC3177からなる群より選択される寄託番号を有する宿主細胞/ハイブリドーマにより産生される/それらから得られるヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ ( $\beta 1$ -AR-ECII) に結合する結合化合物/抗体に関する。該結合化合物/抗体は特に、生物学的試料中の  $\beta 1$ -AR-ECII に対する自己抗体を特徴づけるおよび同定するための、インビトロ細胞系アッセイシステムにおける自己-抗  $\beta 1$ -AR 抗体の測定に有用である。本開示のさらなる局面は、前記結合化合物/抗体をコードする核酸分子、ベクター、宿主細胞、本開示の結合化合物/抗体を作製するための方法、ならびに本開示の結合化合物/抗体を含むキットである。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合する抗体。

**【請求項 2】**

前記ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループが配列番号:17に示されるアミノ酸配列であるかまたは該アミノ酸配列を含む、請求項 1 記載の抗体。

**【請求項 3】**

DSM ACC3121、DSM ACC3174、DSM ACC3175、DSM ACC3176およびDSM ACC3177からなる群より選択される寄託番号を有する宿主細胞から得られる、請求項 1 または 2 記載の抗体。

**【請求項 4】**

- (i) 寄託番号DSM ACC3121を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、配列番号:10~12それぞれのCDR配列CDRL1~CDRL3を有する少なくとも1つの抗体軽鎖可変領域および配列番号:7~9それぞれのCDR配列CDRH1~CDRH3を有する少なくとも1つの抗体重鎖可変領域を含む；
- (ii) 寄託番号DSM ACC3174を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、配列番号:34~36それぞれのCDR配列CDRL1~CDRL3を有する少なくとも1つの抗体軽鎖可変領域および配列番号:37~39それぞれのCDR配列CDRH1~CDRH3を有する少なくとも1つの抗体重鎖可変領域を含む；
- (iii) 寄託番号DSM ACC3175を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、配列番号:44~46それぞれのCDR配列CDRL1~CDRL3を有する少なくとも1つの抗体軽鎖可変領域および配列番号:47~49それぞれのCDR配列CDRH1~CDRH3を有する少なくとも1つの抗体重鎖可変領域を含む；
- (iv) 寄託番号DSM ACC3176を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、配列番号:54~56それぞれのCDR配列CDRL1~CDRL3を有する少なくとも1つの抗体軽鎖可変領域および配列番号:57~59それぞれのCDR配列CDRH1~CDRH3を有する少なくとも1つの抗体重鎖可変領域を含む；または
- (v) 寄託番号DSM ACC3177を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、配列番号:64~66それぞれのCDR配列CDRL1~CDRL3を有する少なくとも1つの抗体軽鎖可変領域および配列番号:67~69それぞれのCDR配列CDRH1~CDRH3を有する少なくとも1つの抗体重鎖可変領域を含む、から得られる、請求項 1 ~ 3 いずれか記載の抗体。

**【請求項 5】**

- (i) 寄託番号DSM ACC3121を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:6の配列を含む軽鎖可変領域および10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:4の配列を含む重鎖可変領域を含む；
- (ii) 寄託番号DSM ACC3174を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:31の配列を含む軽鎖可変領域および10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:33の配列を含む重鎖可変領域を含む；
- (iii) 寄託番号DSM ACC3175を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:41の配列を含む軽鎖可変領域および10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:43の配列を含む重鎖可変領域を含む；
- (iv) 寄託番号DSM ACC3176を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:51の配列を含む軽鎖可変領域および10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:53の配列を含む重鎖可変領域を含む；または
- (v) 寄託番号DSM ACC3177を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:61の配列を含む軽鎖可変領域および10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:63の配列を含む重鎖可変領域を含む、から得られる、請求項 1 ~ 4 いずれか記載の抗体。

**【請求項 6】**

- (i) 寄託番号DSM ACC3121を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、配列番号:6を含む軽鎖可変領域および配列番号:4を含む重鎖可変領域を含む；
- (ii) 寄託番号DSM ACC3174を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、配列番号:31を含む軽

鎖可変領域および配列番号:33を含む重鎖可変領域を含む；

(iii) 寄託番号DSM ACC3175を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、配列番号:41を含む軽鎖可変領域および配列番号:43を含む重鎖可変領域を含む；

(iv) 寄託番号DSM ACC3176を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、配列番号:51を含む軽鎖可変領域および配列番号:53を含む重鎖可変領域を含む；または

(v) 寄託番号DSM ACC3177を有する宿主細胞、ここで前記抗体は、配列番号:61を含む軽鎖可変領域および配列番号:63を含む重鎖可変領域を含む、  
から得られる、請求項 1 ~ 5 いずれか記載の抗体。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 いずれか記載の抗体と同じエピトープに結合する抗体。

10

【請求項 8】

キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体または完全ヒト抗体である、請求項 1 ~ 7 いずれか記載の抗体。

【請求項 9】

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項 1 ~ 8 いずれか記載の抗体。

【請求項 10】

ヒト、マウスまたはラットのモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 9 いずれか記載の抗体。

【請求項 11】

抗体が、DSM ACC3121、DSM ACC3175、DSM ACC3176およびDSM ACC3177からなる群より選択される寄託番号を有する宿主細胞から得られ、前記抗体が、マウスモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 10 いずれか記載の抗体。

20

【請求項 12】

抗体が、寄託番号DSM ACC3174を有する宿主細胞から得られ、前記抗体が、ラットモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 10 いずれか記載の抗体。

【請求項 13】

抗体が、寄託番号DSM ACC3121を有する宿主細胞から得られ、前記抗体が、重鎖定常領域をさらに含み、重鎖定常領域が、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ または $\gamma 3$ のマウス重鎖定常領域またはそのバリエーションを含む、請求項 1 ~ 11 いずれか記載の抗体。

30

【請求項 14】

抗体が、寄託番号DSM ACC3121を有する宿主細胞から得られ、前記抗体が、軽鎖定常領域をさらに含み、軽鎖定常領域が、 $\kappa$ または $\lambda$ の軽鎖定常領域を含む、請求項 1 ~ 11 または 13 のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 15】

Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')<sub>2</sub>および二特異性抗体からなる群より選択される抗体断片である、請求項 1 ~ 14 いずれか記載の抗体。

【請求項 16】

抗体が、寄託番号DSM ACC3121を有する宿主細胞から得られ、前記抗体が、以下の特性：

40

(a) 抗体が、1000pM以下の平衡解離定数( $K_d$ )でヒト $\beta_1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合する；

(b) ヒト $\beta_1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループに対する結合親和性が、ペプチドシクロ(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln)の存在下、2000pM以下のIC50値で競合的に阻害される；および/または

(c) ラットモノクローナル抗体、好ましくは寄託番号DSM ACC3174を有する宿主細胞から得られるラットモノクローナル抗体、もしくはヒト $\beta_1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合するヤギポリクローナル抗体と比較して少なくとも10倍低い親和性( $K_d$ )を有する、ヒト $\beta_1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループに対する結合の少なくとも1つを有する、請求項 1 ~ 15 いずれか記載の抗体。

50

## 【請求項 17】

前記抗体が、寄託番号DSM ACC3121を有する宿主細胞から得られ、前記抗体が、510pM以下の平衡解離定数( $K_d$ )でヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合する、請求項 16 記載の抗体。

## 【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 いずれか記載の抗体をコードする核酸分子。

## 【請求項 19】

請求項 18 記載の核酸を含むベクター。

## 【請求項 20】

請求項 18 記載の核酸分子または請求項 19 記載のベクターを含む宿主細胞。

10

## 【請求項 21】

ハイブリドーマである、請求項 20 記載の宿主細胞。

## 【請求項 22】

ハイブリドーマが、DSM ACC3121、DSM ACC3174、DSM ACC3175、DSM ACC3176およびDSM ACC3177からなる群より選択される、請求項 21 記載の宿主細胞。

## 【請求項 23】

請求項 20 ~ 22 いずれか記載の宿主細胞の培養および前記培養由来の前記分子を回収することを含む、請求項 1 ~ 17 いずれか記載の抗体を作製するための方法。

## 【請求項 24】

ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ、好ましくは配列番号:17に示されるヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターの細胞外ループに結合する抗体であって、請求項 23 記載の方法から得られる抗体。

20

## 【請求項 25】

ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクがある患者を同定するための方法であって：

(a) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと前記患者の生物学的試料を接触させ、それにより前記生物学的試料に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)を、ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(b) (a)のヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと請求項 1 ~ 17 いずれか記載の抗体を接触させ、それにより前記抗体を、(a)の前記生物学的試料に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)が結合しないヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

30

(c) (a)の前記生物学的試料と接触されなかったヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと請求項 1 ~ 17 いずれか記載の抗体を接触させ、それにより前記抗体を、(a)の前記生物学的試料と接触されなかった前記ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(d) (i) 工程(b)のヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと抗体の間の結合シグナル、および

(ii) 工程(c)のヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと抗体の間の結合シグナル、

を測定する工程；ならびに

(e) (d)(i)で測定した結合シグナルと(d)(ii)の結合シグナルを比較する工程

を含み、(d)(ii)において測定した結合シグナルよりも少なくとも40%低い(d)(i)において測定した結合シグナルが、前記患者が前記疾患を有するかまたは発症するリスクがあることを示す、方法。

40

## 【請求項 26】

前記抗体が、DSM ACC3121、DSM ACC3174、DSM ACC3175、DSM ACC3176およびDSM ACC3177からなる群より選択される寄託番号を有する宿主細胞から得られる抗体である、請求項 25 記載の方法。

## 【請求項 27】

前記抗体が、寄託番号DSM ACC3121を有する宿主細胞から得られる抗体である、請求項 25 または 26 記載の方法。

## 【請求項 28】

ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターが、生物学的試料または抗体と接触する前に、固相に固定

50

化される、請求項 25 ~ 27 いずれか記載の方法。

【請求項 29】

固相の材料が、ポリ-L-リジン、あらかじめコートされたポリ-D-リジン、セファロース、ラテックス、ガラス、ポリスチレン、ポリビニル、ニトロセルロースおよびケイ素からなる群より選択される、請求項 25 ~ 28 いずれか記載の方法。

【請求項 30】

疾患が、特発性拡張型心筋症(DCM)、虚血性心筋症(ICM)、シャーガス病、感染性心臓疾患および非感染性心臓疾患、虚血性心臓疾患および非虚血性心臓疾患、炎症性心臓疾患および心筋炎、心拡張、特発性心筋症、免疫性心筋症、心不全、ならびに心室性および上室性期外捕捉収縮などの任意の心臓不整脈を含む心臓疾患からなる群より選択される、請求項 25 ~ 29 いずれか記載の方法。

10

【請求項 31】

疾患が特発性拡張型心筋症(DCM)である、請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

疾患が虚血性心筋症(ICM)である、請求項 30 記載の方法。

【請求項 33】

測定された結合シグナルが請求項 1 ~ 17 いずれか記載の抗体の標識を含む、請求項 25 ~ 32 いずれか記載の方法。

【請求項 34】

結合化合物の標識が、シグナルを放出する系、またはシグナルを放出する系を含むさらなる第2の分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)により特異的に認識されるシグナルを放出する系を含む、請求項 33 記載の方法。

20

【請求項 35】

シグナルを放出する系が、このシグナルを放出する酵素を含む、請求項 34 記載の方法。

【請求項 36】

第2の分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)が、ペプチド、ポリペプチド、低分子物質、抗体、またはそれらの断片もしくは誘導体からなる群より選択される、請求項 34 または 35 記載の方法。

【請求項 37】

ELISA、EIAまたはRIAである、請求項 25 ~ 36 いずれか記載の方法。

30

【請求項 38】

生物学的試料中の分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)の検出のための、請求項 1 ~ 17 いずれか記載の抗体を含む診断剤。

【請求項 39】

前記抗体が、寄託番号DSM ACC3121を有する宿主細胞から得られる、請求項 38 記載の診断剤。

【請求項 40】

生物学的試料が血液、血漿または血清を含む、請求項 25 ~ 37 いずれか記載の方法または請求項 38 もしくは 39 記載の診断剤。

40

【請求項 41】

前記生物学的試料が、抗体、タンパク質、タンパク質断片、ペプチド、アミノ酸および/またはそれらの誘導体からなる群より選択される分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)を含む、請求項 40 記載の方法または診断剤。

【請求項 42】

前記分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)が抗体(1つまたは複数)である、請求項 41 記載の方法または診断剤。

【請求項 43】

前記抗体が、自己抗 $\beta$ 1-アドレナリン作動性抗体(1つまたは複数)である、請求項 42 記載の方法または診断剤。

50

## 【請求項 4 4】

請求項 1 ~ 1 7 いずれか記載の抗体、請求項 2 0 ~ 2 2 いずれか記載の宿主細胞または請求項 3 8 ~ 4 3 いずれか記載の診断剤を含む、自己抗  $\beta$  1 - アドレナリン作動性レセプター抗体の検出のための診断キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、ヒト  $\beta$  1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ ( $\beta$  1-AR-ECII) に結合する結合化合物に関し、本発明は特に、寄託番号 DSM ACC3121 の宿主細胞/ハイブリドーマにより産生されるおよび/またはそれらから得られる結合化合物/抗体に関する。本発明はまた、DSM ACC3174、DSM ACC3175、DSM ACC3176 および DSM ACC3177 からなる群より選択される寄託番号の宿主細胞 ハイブリドーマにより産生される/それらから得られるヒト  $\beta$  1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合する抗体に関する。本発明の結合化合物/抗体は特に、パキウロウイルスによる SF9 細胞中のヒト  $\beta$  1-アドレノレセプター ( $\beta$  1-AR) の過剰発現に基づく細胞性 ELISA アッセイにおける生物学的試料中の  $\beta$  1-AR-ECII に対する自己抗体を特徴付けおよび同定するための、インビトロアッセイにおける自己-抗  $\beta$  1-AR 抗体の測定に有用である。さらに、前記結合化合物/抗体をコードする核酸分子、ならびに該核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞が本発明中に記載される。本発明はまた、本発明の結合化合物/抗体を産生するための方法を提供する。また、ヒト  $\beta$  1-アドレノレセプター ( $\beta$  1-AR) に関連する疾患、例えば特発性拡張型心筋症 (DCM) または虚血性心筋症 (ICM) を有するかまたは該疾患を発症するリスクを有する患者を同定するための方法が記載される。本発明はまた、自己-抗  $\beta$  1 AR ( $\beta$  1-アドレノレセプター/ $\beta$  1-アドレナリン作動性レセプター) 抗体などの生物学的試料中の分子/化合物を検出するための本発明の結合化合物/抗体を利用する診断の手段、方法および使用に関する。最後に、本発明の化合物を含むキットが記載される。

10

20

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

病因が未知の進行性の心拡張およびポンプ不全は、「特発性」拡張型心筋症 (DCM) と呼ばれている (Richardson, Circulation 93 (1996), 841-842)。DCM は、1 年間に 100 人までの患者の発病および百万人当たり 300 ~ 400 人の患者の有病率を有する重度の心不全の主な原因の一つである (AHA report 2007)。現在では DCM の大部分は、免疫系の活性化時に、心拡張および重度のうっ血性心不全を生じる (慢性) 自己免疫性心筋炎へと進行し得る急性心筋炎を生じる、初期の (ほとんどがウイルス性) 感染から生じると考えられる。重度のうっ血性心不全は特に、(a) 心臓機能に不可欠な異なる筋細胞膜性 (myocyte sarcolemmal) または膜タンパク質に対する自己抗体の発生を伴う (Freedman, J. Clin. Invest. 113 (2004), 1379-1382; Jahns, Trends Cardiovasc Med 16 (2006), 20-24) か、または (b) 心筋層およびウイルス持続 (viral persistence) の慢性炎症を伴う (Kuehl, Circulation 112 (2005), 1965-1970) 場合に生じる。これらの所見は、DCM に苦しむ患者がしばしば細胞性免疫および体液性免疫の両方の変化を有するという事実によりさらに強固にされる (Jahns, Trends Cardiovasc Med 16 (2006), 20-24, Limas Circulation 95 (1997), 1979-1980, Lupp i, Circulation 98 (1998), 777-785, Mahrholdt, Circulation 114 (2006), 1581-1590)。それらの体液性応答に関連して、かなりの数の DCM 患者が、種々の心臓抗原に対する自己抗体を生じていることが見いだされている。これらのうち、(ヒト)  $\beta$  1-アドレノレセプター/ $\beta$  1-アドレナリン作動性レセプター ( $\beta$  1-AR) の第2の細胞外ループに対する自己抗体のサブグループのみが、心拡張および機能不全を発症するヒト  $\beta$  アドレノレセプターに対してアゴニスト様の作用を発揮することが示されている。

30

40

## 【0 0 0 3】

したがって、(ヒト)  $\beta$  1-アドレノレセプター ( $\beta$  1-AR) を標的化する機能的に活性な自己抗体が、進行性の心拡張および心不全の発症および臨床経過に重要な役割を果たすという動物試験および患者に基づいた試験からの証拠が蓄積されている (Wallukat, Eur. Heart

50

J. 12 (1991), 178-181 ; Magnusson, Circulation 89 (1994), 2760-2767 ; Jahns, Circulation 99 (1999), 649-654およびIwata, J. Am. Coll. Cardiol. 37 (2001), 418-424)。 $\beta$ 1-アドレノレセプター( $\beta$ 1-AR)は、アデニル酸シクラーゼ、環状アデノシンリン酸(cAMP)およびPKAを介したシグナル伝達を誘発するGタンパク質共役レセプターである。このシグナル伝達経路は、筋形質カルシウム濃度を調節し、心筋細胞収縮性を増加させる。

【0004】

ここ数年の間、いくつかの異なるグループにより、関連のある自己抗体のクラスが $\beta$ 1-ARの第2のループに結合し、天然のレセプターコンホメーションを認識することが独立して示されている(Jahns Circulation 99 (1999), 649-654 ; Iwata J Am Coll Cardiol 37 (2001), 418-424 ; Nikolaev J Am Coll Cardiol 50 (2007), 423-443およびElies J Immunol. 157 (1996), 4203-4211)。このようなコンホメーションの抗 $\beta$ 1AR-(ECII)抗体は、機能的に活性であり、細胞内のcAMP産生を刺激し得るように思われることが示されている(Jahns, Circulation 99 (1999), 649-654およびNikolaev, Am Coll Cardiol 50 (2007), 423-443)。さらに、第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR ECII)を標的化するこれらの抗 $\beta$ 1AR自己抗体のみが機能的に活性であると思われる。対照的に、レセプタータンパク質のアミノ末端またはカルボキシ末端に対する抗体は生物学的効果を発揮しない(Wallukat, Eur Heart J 12 (1991), 178-181 ; Elies, J Immunol. 157 (1996), 4203-4211およびBorda, Clin Exp Immunol. 57 (1984), 679-686)。

【0005】

ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプター( $\beta$ 1-AR)の第2の細胞外ループに対する機能的に活性な自己抗体に関して、それらの有病率は、天然コンホメーションの標的(すなわち(ヒト) $\beta$ 1-AR)を提示する細胞系に基づいたスクリーニング手法を用いたとすれば、健常個体においてほとんど取るに足らないものである(<1%)ということが示されている(Jahns, Circulation 99 (1999), 649-654)。このスクリーニング法を用いることにより、自己-抗 $\beta$ 1-AR抗体の発生は、慢性の弁または高血圧心臓疾患を有する患者においても除外され得る(Jahns, J. Am. Coll. Cardiol 34 (1999), 1545-1551)。対照的に、 $\beta$ 1-ARの第2の細胞外ループに対する自己抗体は、周知であり、それぞれの試験またはスクリーニング方法に依存して、DCMを有する患者のおよそ30%~50%に見られる。虚血性心筋症を有する患者の少ない割合、およそ10%~20%は、抗 $\beta$ 1-AR抗体陽性であると判断された(Stoerk, Am. Heart J. 152 (2006), 697-704)。これは、 $\beta$ 1-AR自己抗体がDCMにおいて原因的な役割を果たし、単に相関するだけでなく、心筋組織損傷の結果であるという直接的な証拠を示すJahnsらの以前のデータ(Jahns, J. Clin. Invest. 113 (2004), 1419-1429)によっても確認される。

【0006】

結果として、ヒト $\beta$ 1-ARの第2の細胞外ループに対する自己抗体の除去は、DCM患者において改善した臨床状態をもたらすと予想される。DCMに苦しむ患者での初期の臨床試験により、心臓の自己抗体の力価が低減されただけでなく、IgG免疫吸着(IA)を用いた処理後に左心室の機能も改善されたことが示された(Felix., Am Coll Cardiol 35 (2000), 1590-1598 ; Wallukat, N. Engl. J. Med. 347 (2002), 180 ; Mueller, N Engl J Med 347 (2002), 1806およびMueller, Circulation 101 (2000), 385-391)。心臓自己抗体を低減する別のアプローチは、抗原特異的耐性を達成し、過剰活性の免疫系の応答を低減するためのペプチド系ワクチンの使用である。 $\beta$ 1-ARの第2の細胞外ループに相同ないくつかの(シクロ-)ペプチドが、例えばWO 01/21660に開示され、これらのペプチドを拡張型心筋症(DCM)の医療介入に適用することが提唱される。そして、例えばWO 01/21660には、これらのペプチドを血清プロテアーゼから保護するために、例えば環状化によりこれらのペプチドを修飾し得ることが記載される。

【0007】

両方の治療戦略は、自己-抗 $\beta$ 1-AR抗体をスクリーニングするための信頼性の高い診断アッセイの必要性を有し、そのため陽性心不全患者、好ましくはDCMに苦しむ患者が確実に同定される。過去には、このようなアッセイを開発するために大きな努力がな

された。これらのアプローチは二つのクラス：

-抗体がヒト  $\beta 1$  アドレノレセプター ( $\beta 1$ -AR) を活性化する機能的な能力を調べるアッセイ  
-ヒト  $\beta 1$  アドレノレセプターの第2の細胞外ループ(ヒト  $\beta 1$ -ARのECIIループ)に対する自己抗体の結合特性を分析するアッセイ  
に分けることができる。

#### 【0008】

機能的アッセイ、すなわち新生児ラット心筋細胞またはニワトリ胚に対する収縮性効果およびレセプター媒介性シグナル伝達cAMPレベルが確立され、機能的抗  $\beta 1$ -AR抗体を検出するために適合される(Nikolaev, Am. Coll. Cardiol. 50 (2007), 423-443; Wallukat, Mol Cell Cardiol. 27 (1995), 397-406; Erratum in: J Mol Cell Cardiol 27 (1995), 2529; Baba, Ther Apher Dial. 12 (2008), 109-116; Tutor, Cardiovasc Res 76 (2007), 51-60)。全てのこれらの機能的アッセイは、時間と費用がかかり、より大きな患者集団 ( $n>1000$ ) を迅速にスクリーニングするには適切に使用できない手順を特徴とする。

10

#### 【0009】

ヒト自己-抗  $\beta 1$ -AR抗体の結合は、ペプチド系ELISAを使用しても調べられた。このために、ヒト  $\beta 1$ -ARの第2の細胞外ループ(アミノ酸位置197~222)に対応する26マーのペプチド(His-Trp-Trp-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg(配列番号:17))をマイクロタイタープレートに固定化した(Magnusson, J Clin Invest 86 (1990), 1658-1663およびLabovsky, Clin Exp Immunol 148 (2007), 440-449。この種類のアッセイは、完全にHTS(ハイスループットスクリーニング)適合されるが、診断妥当性を有するスクリーニングアッセイとしてのその使用はまだ、より大きな患者集団および健常対照において同時に調べられていない。

20

#### 【0010】

現在の試験において、心不全、特にDCMに苦しむ患者を、結合アッセイ、特に完全に天然のヒト  $\beta 1$ -ARまたはヒト  $\beta 1$ -AR ECII対応ペプチド(上述の26マーペプチドHis-Trp-Trp-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg(配列番号:17)のことをいう)のいずれかをそれぞれの結合標的として使用した細胞系競合ELISAアッセイを使用して、ヒト  $\beta 1$ -ARに対する自己抗体の存在について試験した。

#### 【発明の概要】

30

#### 【0011】

現在の技術を考慮して、本発明の技術的な課題は、ヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプター ( $\beta 1$ -AR)に関連する疾患の診断および予想のための改善された手段および方法を提供することである。

#### 【0012】

特許請求の範囲において特徴づけられる態様を提供することにより、該技術的課題は解決される。

#### 【0013】

本発明は、ヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプター ( $\beta 1$ -AR)の第2の細胞外ループに結合する抗体/結合化合物に関する。本発明の抗体は、配列番号:17に示されるアミノ酸配列であるかまたはそれを含むヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合する。抗体/結合化合物は、宿主細胞、例えばDSM ACC3121、DSM ACC3174、DSM ACC3175、DSM ACC3176およびDSM ACC3177からなる群より選択される寄託番号を有するハイブリドーマから入手可能である。これらは、本発明の特に好ましい結合化合物/抗体である。これらの結合化合物/抗体は、本明細書に提供される診断方法などの手段および方法に使用される。

40

#### 【0014】

本発明はまた、上述のような機能的に活性なヒト抗  $\beta 1$ -AR自己抗体の検出のための細胞系競合ELISAの確立に関する。このアッセイは、完全に天然の  $\beta 1$ -ARタンパク質を標的抗原として使用して、エピトープ特異的自己抗体を同定するために必要な基本である細胞外ドメインの正確な折りたたみを提供する。アッセイの特異性を最適化するために、ヒト  $\beta$

50

1-ARの第2の細胞外ループに結合し、レセプター活性を刺激し得る抗体/結合化合物を使用して、競合アプローチを開発した。

【0015】

患者の血清由来の機能的に関連のあるヒト抗 $\beta$ 1-AR自己抗体を、それらの同じまたは重複したエピトープに結合する能力により特徴づけ、試験結合分子/抗体を置き換えて、ELISAシグナルなどの免疫学的または生物学的シグナルを低減する。アラニン並べ替えスキニング(alanine permutation scanning)によるエピトープ検索により、 $\beta$ 1-ARのECIIループ内のアミノ酸配列NDPK(Asn-Asp-Pro-Lys)が、関連のあるエピトープの一部であるはずであるというヒントを得た。

【0016】

したがって、本発明は、高い結合親和性などの1つ以上の所望の特性を有するヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合する抗体に関する。本明細書に記載されるおよび診断方法における抗体は、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合し、前記ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)は、配列番号:17に示されるアミノ酸配列であるか、または該アミノ酸配列を含む。本明細書に記載される抗 $\beta$ 1-AR-ECII抗体は、宿主細胞、例えばDSM ACC3121、DSM ACC3174、DSM ACC3176およびDSM ACC3177からなる群より選択される寄託番号のハイブリドーマにより産生される/それらから得られる。本発明はまた、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクがある患者を同定するための方法における本発明の抗体の使用に関する。本発明において驚くべきことに見いだされたように、DSM ACC3121の寄託番号を有するハイブリドーマ細胞株23-6-7(識別参照番号「b1ECII E3, 23-6-7(anti-beta1-AR)」で2011年3月15日にCorimmun GmbHにより寄託された)により産生される/それから得られる結合化合物/抗体または前記結合化合物/抗体の誘導体は、ポリクローナル(対照)抗体と比較して、 $\beta$ 1-アドレノレセプターに対して高い親和性を発揮する。さらに、本発明は、(i)ハイブリドーマ細胞株28-2-7(識別参照番号「b1ECII, 28-2-7」および寄託番号DSM ACC3175で、2012年5月16日にCorimmun GmbHにより寄託された)、47-12-9(識別参照番号「b1ECII, 47-12-9」および寄託番号DSM ACC3176で、2012年5月16日にCorimmun GmbHにより寄託された)、50-1-5(識別参照番号「b1ECII, 50-1-5」および寄託番号DSM ACC3177で、2012年5月16日にCorimmun GmbHにより寄託された)および55-4-10により産生される/それらから得られるマウスモノクローナル抗体または該抗体の誘導体、ならびに(ii)ラットモノクローナル抗体13F6(識別参照番号「13/F6」および寄託番号DSM ACC3174で、2012年5月16日にCorimmun GmbHにより寄託された)または(iii)ヤギポリクローナル抗体に関する(添付の実施例の図3~5を参照)。添付の実施例において、ラットモノクローナル抗体13F6はまた、ヤギポリクローナル(対照)抗体と比較して、 $\beta$ 1-アドレノレセプター( $\beta$ 1-AR)に対して有意に高い親和性を特徴とすることも示され、例示される(図5)。 $\beta$ 1-ARに対するこの高い親和性を考慮すると、モノクローナルラット13F6抗体(宿主細胞、例えばDSM ACC3174で寄託されたハイブリドーマから得られる)および13F6の誘導体も、例えば、本明細書の以下に記載されるヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための診断方法における陽性対照(PC)として使用し得る。

【0017】

本明細書で使用される場合、用語「 $\beta$ 1-アドレノレセプター( $\beta$ 1-AR)」は、好ましくは、当業者に一般的に知られているヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターのことをいう。例えば、ヒト $\beta$ 1-アドレナリン作動性レセプターのコーディング配列は、当業者に公知のデータベースから得られ得る。例えば、本明細書で使用する場合、ヒト $\beta$ 1-ARの配列(配列番号:1および2)(ヒト $\beta$ 1アドレノレセプター(ADRB1)としても公知)は、データベースエントリーNM\_000684(バージョンNM\_000684.2; GI:110349783)および/またはNP\_000675(バージョン番号NP\_000675.1; GI:4557265)から得られ得る。

【0018】

本発明の状況において、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの核酸配列は、以下の(cDNA)配列

10

20

30

40

50

(配列番号:1を参照)を含む:

【化 1】

atggggcgcg ggggtgctcgt cctggggcgcc tccgagcccg gtaacctgtc gtcgggcccga  
ccgctccccg acggcgcggc caccgcggcg cggctgctgg tgcccgcgtc gccgcccgc  
tcgttgctgc ctcccgccag cgaaagcccc gagccgctgt ctacgcagtg gacagcgggc  
atgggtctgc tgatggcgct catcgtgctg ctcatcgtgg cgggcaatgt gctggtgatc  
gtggccatcg ccaagacgcc gcggtgcag acgctcacca acctcttcat catgtccctg  
gccagcgccg acctggatcat ggggctgctg gtggtgccgt tcggggccac catcgtggtg  
tggggccgct gggagtacgg ctccctcttc tgogagctgt ggacctcagt ggacgtgctg  
tgctgacgg ccagcatcga gacctgtgt gtcatgccc tggaccgcta cctcgccatc  
acctcgccct tccgctacca gagctgctg acgcgcgcgc gggcgcgggg cctcgtgtgc  
accgtgtggg ccatctcggc cctggtgtcc ttccgtgcca tctcatgca ctggtggcg  
gcggagagcg acgaggcgcg ccgctgctac aacgaccca agtgctgcga cttcgtcacc  
aaccgggcct acgcatcgc ctgctcgtg gtctccttct acgtgcccct gtgcatcatg

10

【化 2】

gccttcgtgt acctgcgggt gttccgcgag gccagaagc aggtgaagaa gatcgacagc  
tgcgagcgcc gtttccctcg cgcccagcg cggccgcctt cgccctcgcc ctgcccgtc  
cccgcgccc cgccgcgcgc cggacccccg cgccccgcgc ccgcccgcgc caccgccccg  
ctggccaacg ggctgcggg taagcgcgcg ccctcgcgcc tcgtggccct gcgcgagcag  
aaggcgctca agacgctggg catcatcatg ggctcttca cgctctgctg gctgcccttc  
ttcctggcca acgtggtgaa ggccttccac cgcgagctgg tgcccgaccg cctcttcgtc  
ttcttcaact ggctgggcta cgccaactcg gccttcaacc ccatcatcta ctgccgcagc  
ccgacttcc gcaaggcctt ccagggactg ctctgctgcg cgcgcagggc tgcccgcggg  
cgccacgcga ccacggaga ccggccgcgc gcctcgggct gtctggcccg gcccggaacc  
ccgcatcgc ccggggccgc ctcgacgac gacgacgac atgtcgtcgg ggccacgcgc  
ccgcgcgcgc tgctggagcc ctgggcccgc tgcaacggcg gggcgggcg gcacagcgac  
tcgagcctgg acgagccgtg ccgccccggc ttgcctcgg aatccaaggt gtag

20

30

【 0 0 1 9】

ヒト  $\beta$ 1-アドレノレセプターのアミノ酸配列(配列番号:2を参照)を以下に示す:

## 【化3】

Met Gly Ala Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Ser Glu Pro Gly Asn Leu  
 Ser Ser Ala Ala Pro Leu Pro Asp Gly Ala Ala Thr Ala Ala Arg Leu  
 Leu Val Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser Leu Leu Pro Pro Ala Ser Glu  
 Ser Pro Glu Pro Leu Ser Gln Gln Trp Thr Ala Gly Met Gly Leu Leu  
 Met Ala Leu Ile Val Leu Leu Ile Val Ala Gly Asn Val Leu Val Ile  
 Val Ala Ile Ala Lys Thr Pro Arg Leu Gln Thr Leu Thr Asn Leu Phe  
 Ile Met Ser Leu Ala Ser Ala Asp Leu Val Met Gly Leu Leu Val Val  
 Pro Phe Gly Ala Thr Ile Val Val Trp Gly Arg Trp Glu Tyr Gly Ser  
 Phe Phe Cys Glu Leu Trp Thr Ser Val Asp Val Leu Cys Val Thr Ala  
 Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile  
 Thr Ser Pro Phe Arg Tyr Gln Ser Leu Leu Thr Arg Ala Arg Ala Arg  
 Gly Leu Val Cys Thr Val Trp Ala Ile Ser Ala Leu Val Ser Phe Leu  
 Pro Ile Leu Met His Trp Trp Arg Ala Glu Ser Asp Glu Ala Arg Arg  
 Cys Tyr Asn Asp Pro Lys Cys Cys Asp Phe Val Thr Asn Arg Ala Tyr  
 Ala Ile Ala Ser Ser Val Val Ser Phe Tyr Val Pro Leu Cys Ile Met  
 Ala Phe Val Tyr Leu Arg Val Phe Arg Glu Ala Gln Lys Gln Val Lys  
 Lys Ile Asp Ser Cys Glu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Pro Ala Arg Pro  
 Pro Ser Pro Ser Pro Ser Pro Val Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Gly  
 Pro Pro Arg Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Pro Leu Ala Asn Gly  
 Arg Ala Gly Lys Arg Arg Pro Ser Arg Leu Val Ala Leu Arg Glu Gln  
 Lys Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly Val Phe Thr Leu Cys  
 Trp Leu Pro Phe Phe Leu Ala Asn Val Val Lys Ala Phe His Arg Glu  
 Leu Val Pro Asp Arg Leu Phe Val Phe Phe Asn Trp Leu Gly Tyr Ala

10

20

## 【化4】

Asn Ser Ala Phe Asn Pro Ile Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg  
 Lys Ala Phe Gln Gly Leu Leu Cys Cys Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg  
 Arg His Ala Thr His Gly Asp Arg Pro Arg Ala Ser Gly Cys Leu Ala  
 Arg Pro Gly Pro Pro Pro Ser Pro Gly Ala Ala Ser Asp Asp Asp Asp  
 Asp Asp Val Val Gly Ala Thr Pro Pro Ala Arg Leu Leu Glu Pro Trp  
 Ala Gly Cys Asn Gly Gly Ala Ala Ala Asp Ser Asp Ser Ser Leu Asp  
 Glu Pro Cys Arg Pro Gly Phe Ala Ser Glu Ser Lys Val

30

## 【0020】

ヒトβ1-アドレノレセプターは、配列番号:2に示されるアミノ酸配列のアミノ酸位置59～83、96～120、133～152、177～196、223～243、327～346および359～378中に7個の膜貫通領域を有するレセプターのことをいう。ヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ領域は、配列番号:2に示されるアミノ酸配列のアミノ酸位置197～222中にある(アミノ酸配列His-Trp-Trp-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg; 配列番号:17を参照)。

40

## 【0021】

さらに、添付の実施例に詳述および例示されるように、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマ(宿主細胞、例えば識別参照番号「b1ECII E3, 23-6-7(anti-beta1-AR)」のハイブリドーマを参照)により産生される/それから得られる本発明の抗体またはその誘導体は、ヒトβ1-アドレノレセプター(β1-AR-ECII)に対する自己抗体の同定により検出され得るように、特発性拡張型心筋症(DCM)を有するかまたは発症するリスクを

50

有する患者を同定するための方法に使用され得る。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマ(識別参照番号「b1ECII E3, 23-6-7(anti-beta1-AR)」のハイブリドーマ細胞株を参照)により産生される/それから得られる抗体またはその誘導体、およびヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法におけるその使用に関する。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマ(識別参照番号「b1ECII, 28-2-7」のハイブリドーマ細胞株28-2-7を参照)により産生される/それから得られる抗体またはその誘導体、およびヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法におけるその使用に関する。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマ(識別参照番号「b1ECII, 47-12-9」のハイブリドーマ細胞株47-12-9を参照)により産生される/それから得られる抗体またはその誘導体、およびヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法におけるその使用に関する。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマ(識別参照番号「b1ECII, 50-1-5」のハイブリドーマ細胞株50-1-5を参照)により産生される/それから得られる抗体またはその誘導体、およびヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法におけるその使用に関する。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマ(識別参照番号「13/F6」のハイブリドーマ細胞株を参照)により産生される/それから得られる抗体またはその誘導体、およびヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法におけるその使用に関する。

10

20

#### 【0022】

開示された用語および記載の用語に関して、用語「により産生される」および「から得られる」は、特定のモノクローナル抗体には関連しないが、前記寄託された抗体の誘導体およびバリエーションにも関することが理解される。かかる誘導体およびバリエーションは、寄託されたモノクローナル抗体のCDR配列の少なくとも一部を有する。誘導体およびバリエーションは、限定されないが、CDR移植、ヒト化抗体、Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')<sub>2</sub>、および二特異性抗体(diabody)を含む。

#### 【0023】

本明細書で使用する場合、抗体/結合分子(親抗体/結合分子)の用語「抗体断片」または「結合断片」は、典型的には親抗体の抗原結合領域または可変領域の少なくとも一部(例えば1つ以上のCDR)を含み、親抗体の結合特異性の少なくとも一部を保持する抗体/結合分子の断片または誘導体を包含する。特に、本明細書において、親抗体/結合分子は、宿主細胞、例えばDSM ACC3121、DSM ACC3174、DSM ACC3176およびDSM ACC3177からなる群より選択される寄託番号を有するハイブリドーマにより産生される/それらから得られるヒト $\beta$ 1-アドレノレセプター( $\beta$ 1-AR)の第2の細胞外ループに結合する抗体のことをいう。抗体結合断片の例としては、限定されないが、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>およびFv断片；二特異性抗体；直鎖抗体；一本鎖抗体分子、例えばsc-Fv；ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。典型的に、結合断片または誘導体は、活性をモラーベースで表した場合、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプター( $\beta$ 1-AR)の第2の細胞外に対する結合活性の少なくとも10%を保持する。好ましくは、結合断片または誘導体は、親抗体、特に寄託されたモノクローナル抗体として、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプター( $\beta$ 1-AR)の第2の細胞外に対して、結合親和性結合活性の少なくとも20%、50%、70%、80%、90%、95%または100%以上を保持する。ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプター( $\beta$ 1-AR)の第2の細胞外に結合する結合断片が、その生物学的活性を実質的に改変しない保存的アミノ酸置換(抗体の「保存的バリエーション」という)を含み得ることも意図される。

30

40

#### 【0024】

一般的に、本発明の結合化合物は、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合する抗体である。特に、本発明の結合化合物は、配列番号:4および6(または重鎖可変領域および軽鎖可変領域の対応する核酸配列についての参照がなされる場

50

合は配列番号:3および5)の配列と、少なくとも95%、90%、85%、75%、70%、65%、60%、55%または50%の配列相同性を有するVHドメイン(重鎖可変領域)およびVLドメイン(軽鎖可変領域)を含むかまたはそれからなるヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ(β1-AR-ECII)に結合する抗体である。さらに、本発明の結合化合物は、配列番号:4および6の配列に関して0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上までの保存的アミノ酸置換を有するVHドメインおよびVLドメインを含む抗体である。そして、本発明の結合化合物は、抗体またはその結合断片、例えばFab、Fab'、Fab'-SH、FV、scFV、F(ab')<sub>2</sub>および二特異性抗体からなる群より選択される抗体断片である。

【0025】

本発明はまた、ヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ(β1-AR-ECII)に結合し、配列番号:33および31(または重鎖可変領域および軽鎖可変領域の対応する核酸配列についての参照がなされる場合は配列番号:32および30)の配列と、少なくとも95%、90%、85%、75%、70%、65%、60%、55%または50%の配列相同性を有するVHドメイン(重鎖可変領域)およびVLドメイン(軽鎖可変領域)を含むかまたはそれからなる抗体に関する。さらに、本発明の結合化合物は、配列番号:33および31の配列を参照して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上までの保存的アミノ酸置換を有するVHドメインおよびVLドメインを含む抗体である。さらに、本発明の結合化合物は、抗体またはその結合断片、例えばFab、Fab'、Fab'-SH、FV、scFV、F(ab')<sub>2</sub>および二特異性抗体からなる群より選択される抗体断片である。

【0026】

本発明はまた、ヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ(β1-AR-ECII)に結合し、配列番号:43および41(または重鎖可変領域および軽鎖可変領域の対応する核酸配列についての参照がなされる場合は配列番号:42および40)の配列と、少なくとも95%、90%、85%、75%、70%、65%、60%、55%または50%の配列相同性を有するVHドメイン(重鎖可変領域)およびVLドメイン(軽鎖可変領域)を含むかまたはそれからなる抗体に関する。さらに、本発明の結合化合物は、配列番号:43および41の配列を参照して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上までの保存的アミノ酸置換を有するVHドメインおよびVLドメインを含む抗体である。さらに、本発明の結合化合物は、抗体またはその結合断片、例えばFab、Fab'、Fab'-SH、FV、scFV、F(ab')<sub>2</sub>および二特異性抗体からなる群より選択される抗体断片である。

【0027】

本発明はまた、ヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ(β1-AR-ECII)に結合し、配列番号:53および51(または重鎖可変領域および軽鎖可変領域の対応する核酸配列についての参照がなされる場合は配列番号:52および50)の配列と、少なくとも95%、90%、85%、75%、70%、65%、60%、55%または50%の配列相同性を有するVHドメイン(重鎖可変領域)およびVLドメイン(軽鎖可変領域)を含むかまたはそれからなる抗体に関する。さらに、本発明の結合化合物は、配列番号:53および51の配列を参照して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上までの保存的アミノ酸置換を有するVHドメインおよびVLドメインを含む抗体である。さらに、本発明の結合化合物は、抗体またはその抗原結合断片、例えばFab、Fab'、Fab'-SH、FV、scFV、F(ab')<sub>2</sub>および二特異性抗体からなる群より選択される抗体断片である。

【0028】

本発明はまた、ヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ(β1-AR-ECII)に結合し、配列番号:63および61(または重鎖可変領域および軽鎖可変領域の対応する核酸配列についての参照がなされる場合には配列番号:62および60)の配列と、少なくとも95%、90%、85%、75%、70%、65%、60%、55%または50%の配列相同性を有するVHドメイン(重鎖可変領域)およびVLドメイン(軽鎖可変領域)を含むかまたはそれからなる抗体に関する。さらに、本発明の結合化合物は、配列番号:63および61の配列を参照して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上までの保存的アミノ酸置換を有するVHドメインおよびVLドメインを含む抗体である。さらに、本発明の結合化合物は、抗体またはその結合断片、例えばFab、F

10

20

30

40

50

ab'-、Fab'-SH、FV、scFV、F(ab')<sub>2</sub>および二特異性抗体からなる群より選択される抗体断片である。

【0029】

本発明の状況において、本明細書に記載される抗体は、完全な抗体(免疫グロブリン、例えばIgG1、IgG2、IgG2b、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgDまたはIgE)、F(ab)-、Fab'-、F(ab')<sub>2</sub>-断片、単鎖抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、二価の抗体構築物、抗体融合タンパク質または合成抗体である。

【0030】

さらに、本発明の範囲は、1つ以上の相補性決定領域(CDR)(3本の軽鎖CDRおよび/または3本の重鎖CDR)、および/またはChothia, J. Mol. Biol. 186 (1985), 651-663; Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 4592-4596もしくはKabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987))において同定される方法により同定されるような軽鎖免疫グロブリンもしくは重鎖免疫グロブリンのいずれかの枠組み領域を含む任意の結合化合物を含む。

【0031】

本発明は、以下に示されるような、1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む、ヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合する抗体に関する。該抗体は、寄託番号(受託番号)DSM ACC3121で寄託されたハイブリドーマにより産生され/それから得られ、軽鎖可変領域(VLドメイン)または重鎖可変領域(VHドメイン)それぞれの以下のCDRを含むマウスモノクローナル結合化合物/抗体またはその誘導体のことをいう。したがって、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られる本発明の抗体は、(Kabatの分類系に従って)：

【化5】

CDRH1: Asp-Tyr-Tyr-Met-His (配列番号:7)

CDRH2: Arg-Ile-Asn-Pro-Tyr-Ser-Gly-Ala-Pro-Ser-Tyr-Thr-Gln-Asn-Phe-Lys-Ala (配列番号:8)

CDRH3: Ala-Asn-Trp-Asp-Gly-Tyr-Phe-Asp-Tyr (配列番号:9)

CDRL1: Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Val-Ser-Tyr-Met-Tyr (配列番号:10)

CDRL2: Asp-Thr-Ser-Lys-Leu-Ala-Ser (配列番号:11)

CDRL3: Gln-Gln-Trp-Ser-Ser-Asn-Pro-Trp-Thr (配列番号:12)

からなる群より選択される1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む。

【0032】

本発明はまた、寄託番号DSM ACC3174から得られ、ヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合し、以下に示される1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む抗体またはその誘導体に関する。該抗体は、軽鎖可変領域(VLドメイン)または重鎖可変領域(VHドメイン)のそれぞれの以下のCDRを含むラットモノクローナル結合化合物/その結合または誘導体のことをいう。したがって、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマから得られる本発明の抗体またはその誘導体は(Kabatの分類系に従って)、配列番号:34に示されるCDRL1; 配列番号:35に示されるCDRL2; 配列番号:36に示されるCDRL3; 配列番号:37に示されるCDRH1; 配列番号:38に示されるCDRH2および配列番号:39に示されるCDRH3からなる群より選択される1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む。

【0033】

本発明はまた、寄託番号DSM ACC3175から得られ、ヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合し、以下に示される1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む抗体またはその誘導体に関する。該抗体は、軽鎖可変領域(VLドメイン)または重鎖可変領域(VHドメイン)のそれぞれの以下のCDRを含むマウスモノクローナル結合化合物/抗体のことをいう

。したがって、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマから得られる本発明の抗体またはその誘導体は(Kabatの分類系に従って)、配列番号:44に示されるCDRL1；配列番号:45に示されるCDRL2；配列番号:46に示されるCDRL3；配列番号:47に示されるCDRH1；配列番号:48に示されるCDRH2および配列番号:49に示されるCDRH3からなる群より選択される1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む。

【0034】

本発明はまた、寄託番号DSM ACC3176から得られ、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合し、以下に示される1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む抗体またはその誘導体に関する。該抗体は、軽鎖可変領域(VLドメイン)または重鎖可変領域(VHドメイン)のそれぞれの以下のCDRを含むマウスモノクローナル結合化合物(抗体)のことをいう。したがって、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマから得られる本発明の抗体またはその誘導体は(Kabatの分類系に従って)、配列番号:54に示されるCDRL1；配列番号:55に示されるCDRL2；配列番号:56に示されるCDRL3；配列番号:57に示されるCDRH1；配列番号:58に示されるCDRH2および配列番号:59に示されるCDRH3からなる群より選択される1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む。

【0035】

本発明はまた、寄託番号DSM ACC3177から得られ、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合し、以下に示される1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む抗体またはその誘導体に関する。該抗体は、軽鎖可変領域(VLドメイン)または重鎖可変領域(VHドメイン)のそれぞれの以下のCDRを含むマウスモノクローナル結合化合物(抗体)のことをいう。したがって、寄託番号DSM ACC3177の宿主細胞(ハイブリドーマ)から得られる本発明の抗体またはその誘導体は(Kabatの分類系に従って)、配列番号:64に示されるCDRL1；配列番号:65に示されるCDRL2；配列番号:66に示されるCDRL3；配列番号:67に示されるCDRH1；配列番号:68に示されるCDRH2および配列番号:69に示されるCDRH3からなる群より選択される1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む。

【0036】

さらに、本発明の結合化合物は、寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマ(宿主細胞)により産生され(から得られ)、以下に示される重鎖可変領域(VHドメイン)および/または軽鎖可変領域(VLドメイン)を含むかまたはそれからなるマウスモノクローナル結合化合物(抗体)のことをいう。

【0037】

したがって、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマにより産生される/それから得られる結合化合物/抗体は、cDNA配列または推定アミノ酸配列を含む(CDRに下線を付す)：

【0038】

重鎖の可変領域のcDNA配列(配列番号:3)

【化6】

CTGGTGAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGATA TCCTGCAAGG CTTCTGGTTA CTCATTCACT  
GACTACTACA TGCACTGGGT GAAGCAAAGC CATGTAAAGA GCCTTGAGTG GATTGGACGT  
ATTAATCCTT ACAGTGGTGC TCCTAGCTAC ACCCAGAATT TCAAGGCCAA GGCCAGCTTG  
ACTGTAGATA AGTCCTCCAG CACAGCCTAC ATGGAGCTCC ACAGCCTGAC ATCTGAGGAC  
TCTGCAGTCT ATTACTGCGC AAGAGCTAAC TGGGACGGGT ACTTTGACTA CTGGGGCCAA  
GGCACCCTC TCACA

【0039】

重鎖の可変領域のアミノ酸配列(配列番号:4)

10

20

30

40

## 【化 7】

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Cys Lys Ala Ser Gly Tyr  
Ser Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys  
Ser Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Ala Pro Ser  
Tyr Thr Gln Asn Phe Lys Ala Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser  
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser  
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Trp Asp Gly Tyr Phe Asp Tyr  
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

【0040】

10

軽鎖の可変領域のcDNA配列(配列番号:5)

## 【化 8】

ATGTCTGCAT CTCCAGGGGA GAAGGTCACC ATGACCTGCA GTGCCAGCTC AAGTGTAAGT  
TACATGTACT GGTACCAGCA GAAGTCAGGC ACCTCCCCCA AAAGATGGAT TTATGACACA  
TCCAAATTGG CTTCTGGAGT CCCTGTTTCG CTTAGTGGCA GTGGGTCTGG GACCTCTTAC  
TCTCTACAA TCAGCAGCAT GGAGGCTGAA GATGCTGCCA CTTATTACTG CCAGCAGTGG  
AGTAGTAACC CATGGACGTT CGGTGGAGGC ACCAAATTGG AAATCAAACG G

【0041】

20

軽鎖の可変領域のアミノ酸配列(配列番号:6)

## 【化 9】

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro  
Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
Ser Ser Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
Arg

30

【0042】

本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマにより產生され/それから得られ、配列番号:33(VHドメイン)および/または配列番号:31(VLドメイン)に示される重鎖可変領域(VHドメイン)および/または軽鎖可変領域(VLドメイン)を含むかまたはそれからなるラットモノクローナル結合化合物/抗体に関する。

【0043】

したがって、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマにより產生される/それから得られる抗体は、配列番号:30(軽鎖の可変領域のcDNA配列);配列番号:31(軽鎖の可変領域の(推定)アミノ酸配列);配列番号:32(重鎖の可変領域のcDNA配列)および配列番号:33(重鎖の可変領域の(推定)アミノ酸配列)に示されるcDNA配列または推定アミノ酸配列を含む。

40

【0044】

本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマにより產生され/それから得られ、配列番号:43(VHドメイン)および/または配列番号:41(VLドメイン)に示される重鎖可変領域(VHドメイン)および/または軽鎖可変領域(VLドメイン)を含むかまたはそれからなるラットモノクローナル結合化合物/抗体に関する。

【0045】

したがって、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマにより產生される/それから得られる抗体は、配列番号:40(軽鎖の可変領域のcDNA配列);配列番号:41(軽鎖の可変領域の(推定)アミノ酸配列);配列番号:42(重鎖の可変領域のcDNA配列)および配

50

列番号:43(重鎖の可変領域の(推定)アミノ酸配列)に示されるcDNA配列または推定アミノ酸配列を含む。

【0046】

本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマにより產生され/それから得られ、配列番号:53(VHドメイン)および/または配列番号:51(VLドメイン)に示される重鎖可変領域(VHドメイン)および/または軽鎖可変領域(VLドメイン)を含むかそれからなるラットモノクローナル結合化合物/抗体に関する。

【0047】

したがって、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマにより產生される/それから得られる抗体は、配列番号:50(軽鎖の可変領域のcDNA配列)；配列番号:51(軽鎖の可変領域の(推定)アミノ酸配列)；配列番号:52(重鎖の可変領域のcDNA配列)および配列番号:53(重鎖の可変領域の(推定)アミノ酸配列)に示されるcDNA配列または推定アミノ酸配列を含む。

10

【0048】

本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマにより產生され/それから得られ、配列番号:63(VHドメイン)および/または配列番号:61(VLドメイン)に示される重鎖可変領域(VHドメイン)および/または軽鎖可変領域(VLドメイン)を含むかまたはそれからなるラットモノクローナル結合化合物/抗体に関する。

【0049】

したがって、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマにより產生される/それから得られる抗体は、配列番号:60(軽鎖の可変領域のcDNA配列)；配列番号:61(軽鎖の可変領域の(推定)アミノ酸配列)；配列番号:62(重鎖の可変領域のcDNA配列)および配列番号:63(重鎖の可変領域の(推定)アミノ酸配列)に示されるcDNA配列または推定アミノ酸配列を含む。

20

【0050】

用語「結合化合物」は、抗体およびその結合断片の両方のことをいう。したがって、本発明の状況において、抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特性抗体または完全ヒト抗体である。

【0051】

したがって、本発明において、結合化合物は、(a)モノクローナルまたはポリクローナル抗体(1つまたは複数)、好ましくは(a)(マウス(1匹または複数))モノクローナル抗体(1つまたは複数)のことをいう。宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られる抗体は、(マウス(1匹または複数))モノクローナル抗体である。宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマから得られる抗体は、(マウス(1匹または複数))モノクローナル抗体である。宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマから得られる抗体は、(マウス(1匹または複数))モノクローナル抗体である。宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマから得られる抗体は、(マウス(1匹または複数))モノクローナル抗体である。

30

【0052】

本発明はまた、寄託番号DSM ACC3174の宿主細胞(ハイブリドーマ)から得られる抗体に関するものであり、前記抗体は、(ラット)モノクローナル抗体である。

40

【0053】

本明細書で使用する場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体のことをいい、すなわち該集団を含む個々の抗体が、少数で存在し得る可能性のある天然に存在す変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、単一の抗原部位に対して高度に特異的である。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養により、本質的に汚染されずに他の免疫グロブリンにより合成され得るという点で有利である。改変された「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団中に存在する場合の抗体の特性を示し、何らかの特定の方法により抗体を產生する必要があることを企図しない。上述のように、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler, Nature 256 (1975

50

), 495に記載されるハイブリドーマ方法により作製され得る。

【0054】

本明細書で使用する場合、用語「ポリクローナル抗体」は、1つ以上の他の同一でない抗体中またはその存在下で産生された抗体のことをいう。一般的に、ポリクローナル抗体は、同一でない抗体を産生したいいくつかの他のBリンパ球の存在下で、Bリンパ球から産生される。通常、ポリクローナル抗体は、免疫した動物から直接得られる。

【0055】

本明細書で使用する場合、用語「二重特異性」または「二機能性抗体」は、二つの異なる重鎖/軽鎖対および二つの異なる結合部位を有する人工のハイブリッド抗体のことをいう。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の結合を含む種々の方法により産生され得る。例えば、Songsivilai, Clin. Exp. Immunol. 79 (1990), 315-321およびKostelny, J Immunol. 148 (1992), 1547-1553参照。また、二重特異性抗体は、「二特異性抗体」(Holliger, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90 (1993), 6444-6448)または「Janusins」(Traunecker, EMBO J. 10 (1991), 3655-3659およびTraunecker, Int. J. Cancer Suppl. 7 (1992), 51-52)として形成され得る。

10

【0056】

本明細書で使用する場合、用語「完全ヒト抗体」は、ヒト免疫グロブリンタンパク質のみを含む抗体のことをいう。完全ヒト抗体は、マウス中、マウス細胞中またはマウス細胞由来のハイブリドーマ中で産生された場合は、マウス糖鎖を含み得る。同様に、「マウス抗体(mouse antibody)」または「マウス抗体(murine antibody)」は、マウス(mouse/murine)免疫グロブリンタンパク質配列のみを含む抗体のことをいう。代替的に、「完全ヒト抗体」は、ラット中、ラット細胞中、ラット細胞由来のハイブリドーマ中で産生された場合はラット糖鎖を含み得る。同様に、用語「ラット抗体」は、ラット免疫グロブリン配列のみを含む抗体のことをいう。完全ヒト抗体はまた、例えば、完全ヒト抗体の産生およびスクリーニングを可能にする広く使用されるスクリーニング技術であるファージディスプレイにより産生され得る。また、本発明の状況においてファージ抗体も使用され得る。ファージディスプレイ法は、例えばUS 5,403,484、US 5,969,108およびUS 5,885,793に記載される。完全ヒト抗体の開発を可能にする別の技術は、マウスハイブリドーマ技術の改変を含む。マウスは、自身のマウス遺伝子の代わりにヒト免疫グロブリン座を含むようにトランスジェニックにより作製される(例えばUS 5,877,397参照)。

20

30

【0057】

本発明の一態様において、用語「キメラ抗体」は、別のヒトまたは非ヒト種(例えば、マウス、ウマ、ウサギ、イヌ、ウシ、ニワトリ)由来の抗体領域(例えば定常領域)と融合すなわちキメラ化された本発明の可変領域を含む抗体のことをいう。

【0058】

用語抗体はまた、組み換えヒト抗体、異種抗体およびヘテロハイブリッド抗体に関する。用語「組み換えヒト抗体」としては、組み換え手段により調製、発現、作製または単離された全ヒト配列抗体、例えばヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物(例えばマウス)から単離された抗体；宿主細胞にトランスフェクトされた組み換え発現ベクターを使用して発現された抗体；組み換え、無作為配列ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体；またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列にスプライシングする工程を含む任意の他の手段により調製、発現、作製または単離された抗体が挙げられる。かかる組み換えヒト抗体は、(あるとすれば)ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来の可変領域および定常領域を有する。しかしながら、かかる抗体は、インビトロ突然変異誘発(またはヒトIg配列についてのトランスジェニック動物を使用する場合はインビボ細胞突然変異誘発)に供され得、そのため組み換え抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列はヒト生殖細胞VHおよびVL配列由来でありそれに関連するが、インビボにおいてヒト抗体生殖細胞レパートリー中には、該配列は天然には存在し得ない配列である。

40

【0059】

「異種抗体」は、かかる抗体を産生するトランスジェニック非ヒト生物に関連して定義

50

される。この用語は、アミノ酸配列、またはトランスジェニック非ヒト動物を構成しない生物中に見られる核酸配列に対応するコーディング核酸配列、一般的にはトランスジェニック非ヒト動物と異なる種由来の核酸配列を有する抗体に関する。

【0060】

用語「ヘテロハイブリッド抗体」は、異なる生物起源の軽鎖および重鎖を有する抗体のことをいう。例えば、マウス軽鎖と結合したヒト重鎖を有する抗体はヘテロハイブリッド抗体である。ヘテロハイブリッド抗体の例としては、キメラ抗体およびヒト化抗体が挙げられる。

【0061】

用語抗体はまた、ヒト化抗体に関する。非ヒト(例えばマウスまたはウサギ)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最少配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>または抗体の他の抗原結合下流配列(subsequence))である。しばしば、ヒト化抗体は、レシピエントの相同性決定領域(CDR)由来の残基を、所望の特異性、親和性および受容力を有するマウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種(ドナー抗体)のCDR由来の残基と置き換えたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンのFv枠組み残基は、対応する非ヒト残基と置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも持ち込まれたCDRまたは枠組み配列にも見られない残基を含み得る。これらの改変は、抗体の性能をさらに精密にし、かつ最適化するためになされる。一般的に、ヒト化抗体は、全てまたは実質的に全てのCDR領域が非ヒト動物免疫グロブリンのCDR領域に対応し、  
全てまたは実質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。該ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含み得る。さらなる詳細については、Jones Nature 321 (1986), 522-525; Reichmann Nature 332 (1998), 323-327およびPresta Curr Op Struct Biol 2 (1992), 593-596を参照。

【0062】

抗体のヒト化の一般的な方法は、CDR移植を含み、ここで非ヒト「ドナー」抗体由来の機能的な抗原結合部位は、ヒト「アクセプター」抗体に移植される。CDR移植法は当該技術分野で公知であり、例えばUS 5,225,539、US 5,693,761およびUS 6,407,213に記載される。別の関連する方法は、遺伝子再配列および遺伝子変換を起こし得る、1つ以上のヒト化免疫グロブリン座を含むように遺伝的に作り替えられたトランスジェニック動物からのヒト化抗体の産生である(例えば、US 7,129,084参照)。

【0063】

したがって、本発明の状況において、用語「抗体」または「結合化合物」は、完全免疫グロブリン分子およびかかる免疫グロブリン分子の一部に関する。さらに、該用語は、上述のように改変および/または変化された抗体分子に関する。該用語はまた、組み換えのまたは合成的に産生/合成された抗体に関する。該用語はまた、完全な抗体およびその抗体断片、例えば別々の軽鎖および重鎖、Fab、Fv、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>に関する。用語抗体はまた、限定されないが、完全ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、CDR移植抗体および抗体構築物、例えば一本鎖Fv(scFv)または抗体融合タンパク質を含む。

【0064】

「一本鎖Fv」抗体断片または「scFv」抗体断片は、本発明の状況において、抗体のVHドメインおよびVLドメインを有し、ここでこれらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般的に、scFvポリペプチドはさらに、scFvが抗原結合のための所望の構築物を形成することを利用する、V<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインの間にポリペプチドリinkerを含む。単鎖抗体の作製について説明された技術は、例えばPlueckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, N.Y. (1994), 269-315に記載される。

【0065】

10

20

30

40

50

本明細書で使用する場合、「Fab断片」は、一本の単鎖およびC<sub>H</sub>1および一本の重鎖の可変領域で構成される。Fab分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成し得ない。

【0066】

「Fc」領域は、抗体のC<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3ドメインを含む2本の重鎖断片を含む。該2本の重鎖断片は、2つ以上のジスルフィド結合およびC<sub>H</sub>3ドメインの疎水性相互作用により一緒に維持される。

【0067】

「Fab'断片」は、一本の軽鎖ならびにV<sub>H</sub>ドメインおよびC<sub>H</sub>1ドメインを含む一本の重鎖の一部、また鎖の間のジスルフィド結合が2つのFab'断片の2本の重鎖の間に形成されて、F(ab')<sub>2</sub>分子を形成し得るような、C<sub>H</sub>1とC<sub>H</sub>2の間の領域を含む。

10

【0068】

「F(ab')<sub>2</sub>断片」は、2本の軽鎖、および2本の重鎖の間に鎖の間のジスルフィドが形成されるようなC<sub>H</sub>1とC<sub>H</sub>2ドメインの間の定常領域の一部を含む2本の重鎖を含む。そのためF(ab')<sub>2</sub>断片は、2本の重鎖の間のジスルフィド結合により一緒に保持される2つのFab'断片で構成される。

【0069】

「Fv領域」は、重鎖および軽鎖の両方由来の可変領域を含むが、定常領域を欠く。

【0070】

本発明の状況において、結合化合物は、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマにより産生される/それから得られる抗体でもあり得る。さらに、本発明の結合分子/抗体は、重鎖定常領域、例えばγ1、γ2a、γ2bまたはγ3マウス重鎖定常領域などのマウス定常領域またはそのバリエーションを含む。本発明の結合分子/抗体はまた、軽鎖定常領域、例えばλまたはκマウス軽鎖領域などのマウス軽鎖定常領域またはそのバリエーションを含み得る。したがって、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られる抗体は、重鎖定常領域、例えばγ1、γ2a、γ2bまたはγ3マウス重鎖定常領域などのマウス定常領域またはそのバリエーションを含む。宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られる抗体はまた、軽鎖定常領域、例えばλまたはκマウス軽鎖領域などのマウス軽鎖定常領域またはそのバリエーションを含み得る。

20

【0071】

本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマから得られる抗体に関し、前記抗体は、重鎖定常領域、例えばγ1、γ2a、γ2bまたはγ3マウス重鎖定常領域などのマウス定常領域またはそのバリエーションを含む。宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマから得られる抗体はまた、軽鎖定常領域、例えばλまたはκマウス軽鎖領域などのマウス軽鎖定常領域またはそのバリエーションを含み得る。

30

【0072】

本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマから得られる抗体に関し、前記抗体は、重鎖定常領域、例えばγ1、γ2a、γ2bまたはγ3マウス重鎖定常領域などのマウス定常領域またはそのバリエーションを含む。宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマから得られる抗体はまた、軽鎖定常領域、例えばλまたはκマウス軽鎖領域などのマウス軽鎖定常領域またはそのバリエーションを含み得る。

40

【0073】

本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマから得られる抗体に関し、前記抗体は、重鎖定常領域、例えばγ1、γ2a、γ2bまたはγ3マウス重鎖定常領域などのマウス定常領域またはそのバリエーションを含む。宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマから得られる抗体はまた、軽鎖定常領域、例えばλまたはκマウス軽鎖領域などのマウス軽鎖定常領域またはそのバリエーションを含み得る。

【0074】

本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマから得られる抗体に関し、前記抗体は、重鎖定常領域、例えばγ1、γ2a、γ2bまたはγ2cラット重鎖

50

定常領域などのラット定常領域またはそのバリエーションを含む。宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマから得られる抗体はまた、軽鎖定常領域、例えばλまたはκラット軽鎖領域などのラット軽鎖定常領域またはそのバリエーションを含み得る。

【0075】

用語「保存的置換」は、同様の特性(例えば、電荷、側鎖サイズ、疎水性/親水性、主鎖コンホメーションおよび剛性等)を有する他のアミノ酸でのタンパク質中のアミノ酸の置換のことをいい、該変化は、タンパク質の生物学的活性を変えことなく頻繁になされ得る。一般的に、ポリペプチドの非必須領域中の単一のアミノ酸置換では、実質的に生物学的活性は変わらないことを当業者は理解する(例えば、Watson Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co. 4th Ed. (1987), 224参照)。また、構造的または機能的に類似のアミノ酸の置換は、生物学的活性を損ないにくい。本発明の状況において、本発明の結合化合物/抗体は、本明細書に開示される具体的なアミノ酸配列、例えば配列番号:4、33、43、53、63(抗体の抗体重鎖の可変領域をいう)および6、31、41、51、61(抗体の軽鎖の可変領域をいう)と比較した場合、0(変化なし)、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20個以上までの保存的アミノ酸置換を含む配列を有するポリペプチド鎖を含む。本明細書で使用する場合、句「Xまで」の保存的アミノ酸置換は、0個の置換および10までの任意の数の置換、例えば0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個の置換を含む。

10

【0076】

したがって、本発明は、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られる/それにより産生される抗体に関し、前記抗体は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:6の配列を含む軽鎖可変領域および0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:4の配列を含む重鎖可変領域を含む。

20

【0077】

本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマから得られる/それにより産生される抗体に関し、前記抗体は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:31の配列を含む軽鎖可変領域および0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:33の配列を含む重鎖可変領域を含む。

30

【0078】

本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマにより産生される/それから得られる抗体に関し、前記抗体は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:41の配列を含む軽鎖可変領域および0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:43の配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0079】

本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマから得られる/それにより産生される抗体に関し、前記抗体は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:51の配列を含む軽鎖可変領域および0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:53の配列を含む重鎖可変領域を含む。

40

【0080】

本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマから得られる/それにより産生される抗体に関し、前記抗体は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:61の配列を含む軽鎖可変領域および0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個までの保存的アミノ酸置換を有する配列番号:63の配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0081】

かかる例示的置換は、好ましくは以下の表1に示されるもの従ってなされる：

50

【表 1】

表1  
例示的な保存的アミノ酸置換

| 元の残基    | 保存的置換         |
|---------|---------------|
| Ala (A) | Gly; Ser      |
| Arg (R) | Lys; His      |
| Asn (N) | Gln; His      |
| Asp (D) | Glu; Asn      |
| Cys (C) | Ser; Ala      |
| Gln (Q) | Asn           |
| Glu (E) | Asp; Gln      |
| Gly (G) | Ala           |
| His (H) | Asn; Gln      |
| Ile (I) | Leu; Val      |
| Leu (L) | Ile; Val      |
| Lys (K) | Arg; His      |
| Met (M) | Leu; Ile; Tyr |
| Phe (F) | Tyr; Met; Leu |
| Pro (P) | Ala           |
| Ser (S) | Thr           |
| Thr (T) | Ser           |
| Trp (W) | Tyr; Phe      |
| Tyr (Y) | Trp; Phe      |
| Val (V) | Ile; Leu      |

## 【0082】

本発明はまた、本発明の抗体、例えばβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ(β1-AR-ECII)に結合する抗体をコードする核酸、例えばDNAに関する。該核酸は、少なくとも1つの抗体軽鎖可変領域(VL)および少なくとも1つの抗体重鎖可変領域(VH)またはこれらのドメインの結合断片を含む抗体をコードし、ここで該VLは配列番号:10、11および/または12の配列CDRL1、CDRL2、CDRL3を有する相補性決定領域(CDR)を含み; および/または該VHは、配列番号:7、8および/または9のCDRH1、CDRH2、CDRH3の配列を有するCDRを含む。

## 【0083】

該核酸分子はまた、配列番号:4および/または6を含むかまたはそれらからなる重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域の一方または両方をコードし得る。本発明の核酸分子はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマにより産生される/それから得られる抗体をコードし得る。

## 【0084】

本発明はまた、本発明の抗体、例えばヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ルー

プ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合する抗体をコードする核酸、例えばDNAに関する。該核酸は、少なくとも1つの抗体軽鎖可変領域(VL)および少なくとも1つの抗体重鎖可変領域(VH)またはこれらのドメインの結合断片を含む抗体をコードし、ここで該VLは、配列番号:34、35および/または36の配列CDRL1、CDRL2、CDRL3を有する相補性決定領域(CDR)を含み；および/または該VHは、配列番号:37、38および/または39のCDRH1、CDRH2、CDRH3の配列を有するCDRを含む。

【0085】

該核酸分子はまた、配列番号:33および/または31を含むかまたはそれらからなる重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域の一方または両方をコードし得る。本発明の核酸分子はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマにより産生される/それから得られる抗体をコードし得る。

10

【0086】

本発明はまた、本発明の抗体、例えばヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合する抗体をコードする核酸、例えばDNAに関する。該核酸分子は、少なくとも1つの抗体軽鎖可変領域(VL)および少なくとも1つの抗体重鎖可変領域(VH)またはこれらのドメインの結合断片を含む抗体をコードし、ここで該VLは、配列番号:44、45および/または46の配列CDRL1、CDRL2、CDRL3を有する相補性決定領域(CDR)を含み；および/または該VHは、配列番号:47、48および/または49のCDRH1、CDRH2、CDRH3の配列を有するCDRを含む。

20

【0087】

該核酸分子はまた、配列番号:43および/または41を含むかまたはそれらからなる重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域の一方または両方をコードし得る。本発明の核酸分子はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマにより産生される/それから得られる抗体をコードし得る。

【0088】

本発明はまた、本発明の抗体、例えばヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合する抗体をコードする核酸、例えばDNAに関する。該核酸は、少なくとも1つの抗体軽鎖可変領域(VL)および少なくとも1つの抗体重鎖可変領域(VH)またはこれらのドメインの結合断片を含む抗体をコードし、ここで該VLは、配列番号:54、55および/または56の配列CDRL1、CDRL2、CDRL3を有する相補性決定領域(CDR)を含み；および/または該VHは、配列番号:57、58および/または59のCDRH1、CDRH2、CDRH3の配列を有するCDRを含む。

30

【0089】

該核酸分子はまた、配列番号:53および/または51を含むかまたはそれらからなる重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域の一方または両方をコードし得る。本発明の核酸分子はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマにより産生される/それから得られる抗体をコードし得る。

【0090】

本発明はまた、本発明の抗体、例えばヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合する抗体をコードする核酸、例えばDNAに関する。該核酸は、少なくとも1つの抗体軽鎖可変領域(VL)および少なくとも1つの抗体重鎖可変領域(VH)またはこれらのドメインの結合断片を含む抗体をコードし、ここで該VLは、配列番号:64、65および/または66の配列CDRL1、CDRL2、CDRL3を有する相補性決定領域(CDR)を含み；および/または該VHは、配列番号:67、68および/または69のCDRH1、CDRH2、CDRH3の配列を有するCDRを含む。

40

【0091】

該核酸分子はまた、配列番号:63および/または61を含むかまたはそれらからなる重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域の一方または両方をコードし得る。本発明の核酸分子はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマにより産生される/それから得られる抗体をコードし得る。

50

## 【0092】

前記核酸分子は、天然の核酸分子および組み換え核酸分子であり得る。そのため、本発明の核酸分子は、天然起源、合成または半合成のものであり得る。核酸分子はDNA、RNAおよびPNAを含み得、かつそれらのハイブリッドであり得る。

## 【0093】

本発明の核酸分子に制御配列が付加されてもよいことが当業者に明らかである。例えば、プロモーター、転写エンハンサー、および/または本発明のポリヌクレオチドの発現の誘導を可能にする配列が使用され得る。適切な誘導系は、例えばGossen and Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992), 5547-5551)およびGossen, *Trends Biotech.* 12 (1994), 58-62に記載されるテトラサイクリン-制御遺伝子発現、または例えばCrook, *EMBO J.* 8 (1989), 513-519に記載されるデキサメタゾン-誘導遺伝子発現系である。

10

## 【0094】

さらに、前記核酸分子は、例えばチオエステル結合および/またはヌクレオチドアナログを含み得る。前記修飾は、細胞内のエンド-および/またはエクソヌクレアーゼに対する核酸分子の安定化に有用であり得る。前記核酸分子は、細胞中の前記核酸分子の転写を可能にするキメラ遺伝子を含む適切なベクターにより転写され得る。これに関して、本発明の結合化合物/抗体をコードする核酸分子は、「遺伝子ターゲティング」に使用し得ることも理解される。本発明の状況において、前記核酸分子は標識される。核酸の検出のための方法、例えばサザンブロッティングおよびノザンブロッティング、PCRまたはプライマー伸長は、当該技術分野で周知である。

20

## 【0095】

本発明の核酸分子(1つまたは複数)は、前述の核酸分子のいずれかを単独または組み合わせて含む組み換えにより作製されたキメラ核酸分子であり得る。好ましくは、本発明の核酸分子はベクターの一部である。

## 【0096】

そのため、本発明はまた、本発明の核酸分子を含むベクターに関する。したがって、本発明は、ベクター、好ましくは本発明の核酸を含む発現ベクターに関する。

## 【0097】

本発明のベクターは、例えば遺伝的作り替えにおいて例えば従来から使用されている例えばプラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージまたは別のベクターであり得、適切な宿主細胞中および適切な条件下で前記ベクターの選択を可能にするマーカー遺伝子などのさらなる遺伝子を含み得る。

30

## 【0098】

さらに、本発明のベクターは、本発明の核酸配列に加えて、適切な宿主におけるコーディング領域の適切な発現を可能にする発現調節エレメントを含み得る。かかる調節エレメントは当業者に公知であり、プロモーター、スプライシングカセット、翻訳開始コドン、ベクターに挿入物を導入するための翻訳および挿入部位を含み得る。好ましくは、本発明の核酸分子は、真核生物細胞または原核生物細胞における発現を可能にする前記発現調節配列に作動可能に連結される。したがって、本発明は、本発明の核酸を含むベクターに関し、ここで該核酸は、真核生物および/または原核生物(宿主)細胞を該ベクターでトランスフェクトした場合に宿主細胞により認識される調節配列に作動可能に連結される。

40

## 【0099】

真核生物および原核生物(宿主)細胞における発現を確実にする調節エレメントは、当業者に周知である。本明細書において上述されるように、調節エレメントは通常、転写の開始を確実にする制御配列、ならびに任意に転写の終結および転写物の安定化を確実にするポリAシグナルを含む。さらなる制御エレメントは、転写および翻訳のエンハンサー、および/または天然結合するかまたは異種のプロモーター領域を含み得る。例えば哺乳動物宿主細胞における発現を可能にする潜在的な制御エレメントは、CMV-HSVチミジンキナーゼプロモーター、SV40、RSVプロモーター(ラウス肉腫ウイルス)、ヒト伸長因子1 $\alpha$ -プロモーター、グルココルチコイド誘導MMTVプロモーター(モロニーマウス腫瘍ウイルス)、メ

50

タロチオネイン-またはテトラサイクリン-誘導プロモーター、またはエンハンサー、例えばCMVエンハンサーもしくはSV40エンハンサーを含む。神経細胞における発現のために、神経線維-、PGDF-、NSE-、PrP-またはthy-1-プロモーターが使用され得ることが構想される。前記プロモーターは当該技術分野で公知であり、とりわけCharron J. Biol. Chem. 270 (1995), 25739-25745に記載される。原核生物細胞における発現のために、例えばtac-lac-プロモーターまたはtrpプロモーターなどの多くのプロモーターが記載されている。転写の開始のためのエレメントに加えて、かかる制御エレメントはまた、SV40-ポリ-A部位またはtk-ポリ-A部位などのポリヌクレオチドの下流にある転写終結シグナルを含み得る。この状況において、Okayama-Berg cDNA発現ベクターpcDV1(Pharmacia)、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3(In-vitro gene)、pSPORT1(GIBCO BRL)、pX(Pagano, Science 255 (1992), 1144-1147)、酵母ツーハイブリッドベクター、例えばpEG202およびdpJG4-5(Gyuris, Cell 75 (1995), 791-803)、または原核生物発現ベクター、例えばλgt11もしくはpGEX(Amersham-Pharmacia)などの適切な発現ベクターが当該技術分野で公知である。本発明の核酸分子に加えて、該ベクターはさらに、分泌シグナルをコードする核酸配列を含み得る。かかる配列は当業者に周知である。さらに、使用される発現系に応じて、本発明のペプチドを細胞区画に誘導し得るリーダー配列が本発明の核酸分子のコーディング配列に付加され得、これも当該技術分野で周知である。該リーダー配列(1つまたは複数)、好ましくは翻訳されたタンパク質またはそのタンパク質を細胞質周囲空間または細胞外媒体に誘導し得るリーダー配列は、翻訳、開始および終結配列を有する適切な段階で集合される。任意に、異種配列は、所望の特性、例えば発現された組み換え生成物の安定化または簡易な精製を付与するC-またはN-末端識別ペプチドなどの融合タンパク質をコードし得る。ベクターが適切な宿主に組み込まれると、宿主は、ヌクレオチド配列の高レベル発現に適した条件下で維持され、所望の場合は、本発明の抗体分子またはその断片の回収および精製がそれに続き得る。

#### 【0100】

さらに、本発明のベクターはまた、発現ベクターであり得る。本発明の核酸分子およびベクターは、直接導入、またはリポソーム、ウイルスベクター(例えばアデノウイルス、レトロウイルス)、エレクトロポレーション、弾道(例えば遺伝子銃)もしくは細胞への他の送達系を介した導入のために設計され得る。さらに、本発明の核酸分子のための真核生物発現系としてバキュロウイルス系が使用され得る。

#### 【0101】

本発明はまた、本発明のベクターをトランスフェクトもしくは形質導入された宿主細胞、または本発明のベクターを保有する非ヒト宿主、すなわち本発明の核酸分子もしくはかかる核酸分子を含むベクターで遺伝的に改変された宿主細胞または宿主に関する。用語「遺伝的に改変された」は、宿主細胞または宿主が、その天然のゲノムに加えて、細胞または宿主またはその前駆物/パートナーの1つに導入された本発明の核酸分子またはベクターを含むことを意味する。核酸分子またはベクターは、ゲノムの外側に独立した分子として、好ましくは複製可能な分子として遺伝的に改変された宿主細胞もしくは宿主のいずれか中に存在し得るか、または宿主細胞もしくは宿主のゲノム中に安定に組み込まれ得る。

#### 【0102】

本発明の宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。大腸菌または枯草菌などの適切な原核生物細胞は一般的に、クローニングのために使用される。さらに、真核生物細胞は、例えば真菌細胞または動物細胞を含む。適切な真菌細胞の例は、酵母細胞、好ましくはサッカロミセス属のもの、最も好ましくはサッカロミセス・セレビシ工種のものである。適切な動物細胞は、例えば昆虫細胞、脊椎動物細胞、好ましくは哺乳動物細胞、例えばHEK293、NSO、CHO、MDCK、U2-OSHeLa、NIH3T3、MOLT-4、Jurkat、PC-12、PC-3、IMR、NT2N、Sk-n-sh、CaSki、C33Aである。これらの宿主細胞、例えばCHO細胞は、本発明の抗体分子に、リーダーペプチド除去、折り畳みならびにHおよびC鎖の集合、正確な部位での糖付加、ならびに機能的分子の分泌などの翻訳後(二次)修飾を提供し得る。当該技術分野で公知のさらなる適切な細胞株は、例えばDeutsche Sammlung von Mikroorg

anismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)またはthe American Type Culture Collection (ATCC)などの細胞株寄託所から入手可能である。本発明に従って、一次細胞/細胞培養物が宿主細胞として機能し得ることがさらに構想される。前記細胞は、特に昆虫(例えばショウジョウバエまたはゴキブリ種の昆虫)または哺乳動物(例えばヒト、ブタ、マウスまたはラット)由来である。前記宿主細胞はまた、神経芽細胞株からの細胞および/またはそれ由来の細胞を含み得る。上述の一次細胞は当該技術分野で周知であり、とりわけ一次星状細胞、(混合)脊髄培養物または海馬培養物を含む。

#### 【0103】

本発明の状況において、本発明の宿主細胞は、受託番号DSM ACC3121を有するハイブリドーマであり得る。したがって、本発明は、本発明の結合分子を産生する宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121を有するハイブリドーマに関する。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174を有するハイブリドーマに関する。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175を有するハイブリドーマに関する。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176を有するハイブリドーマに関する。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177を有するハイブリドーマに関する。

10

#### 【0104】

ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合する(モノクローナル)抗体を産生する宿主細胞、例えばハイブリドーマは、Corimmun GmbH, Fraunhoferstr. 17, 82152 MartinsriedによりDSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに寄託されている。

20

#### 【0105】

ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合する(マウスモノクローナル)抗体を産生するハイブリドーマ(23-6-7)は、Corimmun GmbH, Fraunhoferstr. 17, 82152 MartinsriedによりDSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに、2011年3月15日に寄託されている。該ハイブリドーマについての寄託名およびDSM受託番号は「b1ECII E3, 23-6-7 (anti-beta1-AR)」および「DSM ACC3121 (DSMZ ACC3121)」である。

#### 【0106】

ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合する(マウスモノクローナル)抗体を産生するハイブリドーマ(28-2-7)は、Corimmun GmbH, Fraunhoferstr. 17, D-82152 Martinsriedにより、DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに、2012年5月16日に寄託されている。該ハイブリドーマ(23-6-7)についての寄託名およびDSM受託番号は、「b1ECII, 28-2-7」および「DSM ACC3175 (DSMZ ACC3175)」である。

30

#### 【0107】

ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合する(マウスモノクローナル)抗体を産生するハイブリドーマ(47-12-9)は、Corimmun GmbH, Fraunhoferstr. 17, D-82152 Martinsriedにより、DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに、2012年5月16日に寄託されている。該ハイブリドーマ(47-12-9)についての寄託名およびDSM受託番号は、「b1ECII, 47-12-9」および「DSM ACC3176 (DSMZ ACC3176)」である。

40

#### 【0108】

ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合する(マウスモノクローナル)抗体を産生するハイブリドーマ(50-1-5)は、Corimmun GmbH, Fraunhoferstr. 17, D-82152 Martinsriedにより、DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに、2012年5月16日に寄託されている。該ハイブリドーマ(50-1-5)についての寄託名およびDSM受託番号は、「b1ECII, 50-1-5」および「DSM ACC3177 (DSMZ ACC3177)」である。

#### 【0109】

50

ヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta 1$ -AR-ECII)に結合する(ラットモノクローナル)抗体を産生するハイブリドーマ(13/F6)は、Corimmun GmbH, Fraunhoferstr. 17, D-82152 Martinsriedにより、DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに、2012年5月16日に寄託されている。該ラットモノクローナル抗体(クローン)13F6を発現するハイブリドーマ(宿主細胞)についての寄託名およびDSM受託番号は、「13/F6」および「DSM ACC3174 (DSMZ ACC3174)」である。

【0110】

本発明は、培養培地中で結合化合物をコードする発現ベクターを有する宿主細胞を培養し、宿主細胞または培養培地から結合化合物/抗体を回収する、本発明の結合化合物/抗体を作製する方法に関する。本発明はまた、本発明の宿主細胞の培養および培養からの結合化合物の回収を含む、本発明の抗体を作製するための方法に関し得る。したがって、本発明は、本発明の抗体を作製するための方法に関し、ここで前記方法は、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマの培養、および該宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られる抗体を培地から回収することを含む。本発明はまた、本発明の抗体を作製するための方法に関し、ここで前記方法は、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマの培養、および宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマから得られる抗体を培地から回収することを含む。本発明はまた、本発明の抗体を作製するための方法に関し、ここで前記方法は、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマの培養、および宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマから得られる抗体を培地から回収することを含む。本発明はまた、本発明の抗体を作製するための方法に関し、ここで前記方法は、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマの培養、および宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマから得られる抗体を培地から回収することを含む。本発明はまた、本発明の抗体を作製するための方法に関し、ここで前記方法は、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマの培養、および宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマから得られる抗体を培地から回収することを含む。

【0111】

宿主細胞、例えばCHO細胞は、発現された本発明の結合化合物に翻訳後(二次)修飾を提供し得る。これらの修飾は、とりわけ糖化およびリン酸化を含む。したがって、本発明はまた、本発明の宿主細胞により産生されたヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合する抗体に関する。したがって、本発明の状況において、結合化合物/抗体は、DSM ACC3121で寄託されたハイブリドーマにより産生される。

【0112】

本発明は、上述の宿主細胞から得られる/それにより産生されるおよび/または寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られる/それにより産生される結合化合物としての、ヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta 1$ -AR-ECII)上の同じエピトープに結合する抗体またはその断片などの結合化合物に関する。本発明は、上述の宿主細胞から得られる/それにより産生されるおよび/または寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマから得られる/それにより産生される結合化合物としての、ヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta 1$ -AR-ECII)上の同じエピトープに結合する抗体またはその結合断片などの結合化合物に関する。本発明は、上述の宿主細胞から得られる/それにより産生されるおよび/または寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマから得られる/それにより産生される結合化合物としての、ヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta 1$ -AR-ECII)上の同じエピトープに結合する抗体またはその結合断片などの結合化合物に関する。本発明は、上述の宿主細胞から得られる/それにより産生されるおよび/または寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマから得られる/それにより産生される結合化合物としての、ヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta 1$ -AR-ECII)上の同じエピトープに結合する抗体またはその結合断片などの結合化合物に関する。本発明は、上述の宿主細胞から得られる/それにより産生されるおよび/または寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマから

得られる/それにより産生される結合化合物としての、ヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ ( $\beta 1$ -AR-ECII) 上の同じエピトープに結合する抗体またはその結合断片などの結合化合物に関する。

【0113】

本発明は、1000、900、800、700、600、550、540、530、520、510、500、490、480、470、460、450、440、430、420、410、400、390、380、370、360、350pM以下の平衡解離定数( $K_d$ )で結合する抗体などの、ヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ ( $\beta 1$ -AR-ECII) に結合する抗体またはその断片に関する。本発明はまた、寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞から得られ、ヒト  $\beta 1$ -AR-ECIIの第2の細胞外ループに結合する抗体またはその断片、またはその結合断片に関し、ここで寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞から得られる抗体またはその断片は、1000、900、800、700、600、550、540、530、520、510、500、490、480、470、460、450、440、430、420、410、400、390、380、370、360、350pM以下の平衡解離定数( $K_d$ )を有することを特徴とする。本発明はまた、寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞から得られる抗体またはその断片に関し、ここで前記抗体は510pM以下の平衡解離定数( $K_d$ )でヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合する。

10

【0114】

本発明の結合化合物はまた、寄託番号DSM ACC3174の宿主細胞(ハイブリドーマ)から得られるラットモノクローナル抗体13F6またはヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ ( $\beta 1$ -AR-ECII) に結合するヤギポリクローナル抗体と比較して、少なくとも1000、100、50、40、30、20、10、5倍低い親和性( $K_d$ )でヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ ( $\beta 1$ -AR-ECII) に結合する抗体またはその断片であり得る。本発明はまた、寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞(ハイブリドーマ)から得られ、寄託番号DSM ACC3174の宿主細胞(ハイブリドーマ)から得られるラットモノクローナル抗体13F6またはヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ ( $\beta 1$ -AR-ECII) に結合するヤギポリクローナル抗体と比較して、30、20、10、5倍低く第2の細胞外ループに結合する抗体またはその断片またはその断片に関する。

20

【0115】

本発明の結合化合物はまた、ヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ ( $\beta 1$ -AR-ECII) に対する結合親和性を(ヒト)  $\beta 1$ -アドレノレセプターのレセプター相同物の存在下で測定する生物学的アッセイ系において測定した場合に、2000、1900、1800、1700、1600、1500、1400、1300、1200、1100、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、10pM以下のIC50値を有する抗体またはその断片であり得る。本発明はまた、ヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループ ( $\beta 1$ -AR-ECII) に対する結合親和性を(ヒト)  $\beta 1$ -アドレノレセプターのレセプター相同物の存在下で測定する生物学的アッセイ系において測定した場合に、2000、1900、1800、1700、1600、1500、1400、1300、1200、1100、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、10pM以下のIC50値を有する、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られる抗体またはその断片に関する。

30

【0116】

したがって、本発明は、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られる抗体またはその断片に関し、前記抗体は以下の特性：

40

(a) 該抗体は、1000pM以下の平衡解離定数( $K_d$ )でヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合する；

(b) ヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループに対する結合親和性は、(ヒト)  $\beta 1$ -アドレノレセプターのレセプター相同物の存在下で2000pM以下のIC50値で競合的に阻害される；および/または

(c) ラットモノクローナル抗体、好ましくは寄託番号DSM ACC3174の宿主細胞から得られるラットモノクローナル抗体、またはヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合するヤギポリクローナル抗体と比較して、少なくとも10倍低い親和性( $K_d$ )を有するヒト  $\beta 1$ -アドレノレセプターの第2の細胞外ループに対する結合

50

の少なくとも1つを有する。

【0117】

本明細書で同定された特徴を有する、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られる抗体またはその断片は、例えば結合親和性を測定することによりスクリーニングされ得る。宿主細胞、例えばDSM ACC3121、DSM ACC3174、DSM ACC3175、DSM ACC3176およびDSM ACC3177からなる群より選択される寄託番号のハイブリドーマから得られる抗体により結合されたヒトβ1-アドレノレセプター(β1-AR)の第2の細胞外ループ上の同じエピトープに結合する抗体についてスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されるものなどの通常の交差ブロッキングアッセイ(cross-blocking assay)を実施し得る。代替的に、アラニン並べ替えスクリーニングまたは例えばChampe, J. Biol. Chem. 270 (1995), 1388-1394に記載される方法により、エピトープマッピングを実施し得る。例えばヒトβ1-ARの第2の細胞外ループについての抗体親和性は、添付の実施例に記載されるものなどの標準的な方法を使用して決定し得る。好ましい抗体またはその断片は、100pM以下の平衡解離定数( $K_d$ )でβ1-ARの第2の細胞外ループに結合するものである。約510pM以下の $K_d$ 値を有する抗体またはその断片がさらに好ましい。

10

【0118】

本発明において使用されるβ1-レセプター相同物としては、とりわけ天然に見られるかまたは合成、組み換えおよび/または化学的に作製された、化学的もしくは生物学的の起源、分子、物質または化合物の分子、物質もしくは化合物が挙げられ得る。具体的に、β1-レセプター相同物は、ヒトβ1-アドレノレセプターに相同なレセプターである。具体的に、β1-レセプター相同物は、β1-アドレノレセプター、好ましくはヒトβ1-アドレノレセプターの第1(β1-ECI)、第2(β1-ECII)または第3の細胞外ループ(β1-ECIII)に対して配列類似性を有するペプチドまたはシクロペプチドである。β1-アドレノレセプターの第3の細胞外ドメイン(β1-ECIII)は、アミノ酸配列Lys-Ala-Phe-His-Arg-Glu-Leu-Val-Pro-Asp-Argを含むかまたはそれからなる。(ヒト)β1-アドレノレセプターの第2(β1-ECII)細胞外ループに対して配列類似性を有するペプチドまたはシクロペプチドは、一般式( $x-x_h$ -Cys- $x-x^a-x^b-x^c-x$ -Cys- $y-x_i-x$ )またはシクロ( $x-x_h$ -Cys- $x-x^a-x^b-x^c-x$ -Cys- $y-x_i-x$ )を含むかまたはそれからなる。この式中、語「 $y$ 」は、Cys以外の任意のアミノ酸であり得、好ましくは「 $y$ 」は、Cysおよび/またはPro以外の任意のアミノ酸であり得る。一般的に、「 $y$ 」は、このアミノ酸が本明細書に記載されるシクロペプチドのアミノ酸(例えば、本明細書に記載されるシクロペプチドの別のCys)と分子内結合(例えば、ジスルフィド結合)を有さない限りは任意のアミノ酸であり得る。好ましくは、「 $y$ 」は、本明細書に記載されるシクロペプチドの別のアミノ酸(例えば、本明細書に記載されるシクロペプチドの別のCys)との分子内結合(例えば、ジスルフィド結合)またはCys残基を含む外因性細胞タンパク質との分子間結合がない場合を除き、Cysと類似の任意のアミノ酸(すなわち、Cysと同様の化学構造および/または同様の生物学的挙動を有するアミノ酸)であり得る。好ましくは、「 $y$ 」は、CysまたはThr以外の任意の極性アミノ酸であり得る。具体的に、本明細書に記載されるシクロペプチドにおいて、「 $y$ 」は、Serであり得る。本発明の状況において、「 $y$ 」は、セレノシステインまたはそのアナログであり得る。さらに、本発明の状況において、「 $y$ 」は、α酪酸(Abu)またはAbuアナログであり得る。適切な(シクロ-)ペプチドの例は：(シクロ)(Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Abu-Asp-Phe-Val-Thr-Gly)配列番号:13を参照、(シクロ)(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Abu-Asp-Phe-Val-Gln)配列番号:14を参照、および(シクロ)(Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Abu-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-Gln)配列番号:15を参照、である。本明細書に記載される状況において、(シクロ-)ペプチド(上述の式を参照)中、「 $h$ 」は、1~15、好ましくは5~9の数であり得、および/または「 $i$ 」は、0~14、好ましくは1~14の数であり得る。したがって、本明細書に記載される状況において、「 $i$ 」は、0~6、好ましくは1~6の数であり得る。したがって、「 $h$ 」は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14もしくは15であり得、およ

20

30

40

50

び/または「 $i$ 」は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13および14であり得る。好ましくは、「 $h$ 」は、5もしくは9であるか、または「 $i$ 」は、3もしくは6である。さらに、本発明の状況において、「 $x_h$ 」は、アミノ酸配列Asp-Glu-Ala-Arg-ArgもしくはArg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Argであり得るか、および/または「 $x_i$ 」は、アミノ酸配列Asp-Phe-Val、Asp-Phe-Val-ThrもしくはAsp-Phe-Val-Thr-Asn-Thrである。本発明の状況において、「 $x_h$ 」は、アミノ酸配列Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Argであるか、および/または「 $x_i$ 」は、アミノ酸配列DFVTである。さらに、本発明に記載される場合、(シクロ-)ペプチド(またはその環状部分)は、1つのProのみを含む。したがって、「 $y$ 」も「 $x$ 」も、正確に $x^a$ 、 $x^b$ および $x^c$ の1つとは異なり、Proではないことが好ましい。本発明の状況において、「 $x^c$ 」はProであり、「 $x^b$ 」は、上述の式のいずれかに記載されるように、AspまたはGluなどの酸性アミノ酸である。例えば、「 $x^c$ 」がProである場合、「 $x^a$ 」は酸性アミノ酸であり得、「 $x_a$ 」がProである場合、本明細書において上述の式のいずれかに記載されるように「 $x$ 」は、「 $x_a$ 」と最初のCysの間に位置し、酸性アミノ酸であり得る。

10

#### 【0119】

(シクロ-)ペプチド(またはその環状部分)は、本発明において記載されるように、18~25個のアミノ酸を含む。したがって、本発明の(シクロ-)ペプチドは、18、19、20、21、23、24または25個のアミノ酸を含み、ここで(シクロ-)ペプチドは、好ましくは18、22または25個のアミノ酸を含み、より好ましくは18または22個のアミノ酸を含む。本発明の状況において、(シクロ-)ペプチド(またはその環状部分)は、より少ないアミノ酸、例えば16または17個のアミノ酸を含む。本発明の状況において、本明細書に記載される $\beta$ 1-レセプター相同物は、必要な変更を加えて直鎖ペプチドであり得る。本明細書に記載される $\beta$ 1-レセプター相同物はまた、(シクロ-)ペプチドであり得、(ヒト) $\beta$ 1-アドレノレセプターの第3の細胞外ループ(上記参照)と配列類似性を有する。 $\beta$ 1-レセプター相同物は、当該技術分野で周知であり、とりわけWO2006/103101およびWO 2009/027063に記載される。WO 2006/103101およびWO 2009/027063に開示される $\beta$ 1レセプター相同物は本発明の状況内にある。特に、WO 2009/027063に記載される(シクロ-)ペプチドが好ましい。本発明の状況において、 $\beta$ 1-レセプター相同物は、好ましくは、シクロ(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln)を参照して配列番号:16に記載されるアミノ酸配列(ペプチド)のことをいう。

20

#### 【0120】

本発明の状況において、提供される環状(シクロ)ペプチド内の分子内S-S結合は、本明細書に記載される前記環状(シクロ)ペプチドのアミノ酸主鎖/主要アミノ酸配列中の2つのCys残基の間に形成され得る。本発明の状況において、 $\beta$ 1-レセプター相同物は、2つのCys残基の間に分子内S-S結合を有するシクロ(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln)を参照する配列番号:16に示されるアミノ酸配列(ペプチド)のことをいう。ヒト $\beta$ 1-ARのECIIエピトープに対する相同物のことをいうこの環状(シクロ)ペプチド(すなわち、配列番号:16)において、Ala<sub>1</sub>とGln<sub>18</sub>の間に環状化が起こり得る。

30

#### 【0121】

したがって、添付の本発明の実施例に示されるように、本明細書に記載される抗体はまた、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に対する結合親和性をペプチドシクロ(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln)(配列番号:16に示される)の存在下で測定する生物学的アッセイ系において測定した場合、2000、1900、1800、1700、1600、1500、1400、1300、1200、1100、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、10pM以下のIC50値を有する抗体またはその断片であり得る。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られ、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に対する結合親和性をペプチドシクロ(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln)(配列番号:16に示される)の存在下で測定する生物学的アッセイ系において測定した場合、2000、1900、1800、1700、1600、1500、1400、1300、1200、11

40

50

00、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、10pM以下のIC50値を有する抗体またはその断片に関する。

【0122】

したがって、本発明は、寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞(ハイブリドーマ)から得られる抗体またはその断片に関し、ここで前記抗体は、以下の特性：

(a) 該抗体は、1000pM以下の平衡解離定数( $K_d$ )でヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合する；

(b) ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループに対する結合親和性は、ペプチドシクロ(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln)(配列番号:16に示される)の存在下で2000pM以下のIC50値で競合的に阻害される；および/または

(c) ラットモノクローナル抗体、好ましくは寄託番号DSM ACC3174の宿主細胞から得られるラットモノクローナル抗体、またはヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合するヤギポリクローナル抗体と比較して、少なくとも10倍低い親和性( $K_d$ )を有するヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループに対する結合の少なくとも1つを有する。

【0123】

本発明はまた、寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞(ハイブリドーマ)から得られ、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に対する結合親和性をペプチドシクロ(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln)(配列番号:16に示す)の存在下で測定する生物学的アッセイ系において測定した場合、1200、1100、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、10pM以下のIC50値を有する抗体またはその断片に関する。

【0124】

さらに、添付の実施例に示すように、本発明の抗体は、生物学的試料中の分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)の検出における診断剤/診断試薬として有用である。したがって、本発明は、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマにより産生され/それから得られ、生物学的試料中の分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)の検出における診断剤/診断試薬として有用な抗体またはその断片に関する。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマから得られ、生物学的試料中の分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)の検出における診断剤/診断試薬として有用な抗体またはその断片に関する。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマから得られ、生物学的試料中の分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)の検出における診断剤/診断試薬として有用な抗体またはその断片に関する。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマから得られ、生物学的試料中の分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)の検出における診断剤/診断試薬として有用な抗体またはその断片に関する。本発明はまた、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマから得られ、生物学的試料中の分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)の検出における診断剤/診断試薬として有用な抗体またはその断片に関する。

【0125】

本明細書で定義される生物学的試料は、例えば細胞、細胞溶解物、細胞の粗製抽出物、膜組織調製物または生体液(biofluid)であり得る。分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)が検出される本発明の試料中で使用する場合、生体液は、好ましくは精液、リンパ液、血清、血漿、尿、滑液または脊髄液のことをいう。本発明はまた、分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)が検出される生物学的試料が血液、血清または血漿のことをいう態様に関する。

【0126】

本発明の状況において、本発明の生物学的試料は、抗体、タンパク質、タンパク質断片、ペプチド、アミノ酸および/またはそれらの誘導体から選択される分子(1つまたは複数)

または化合物(1つまたは複数)を含む。

【0127】

本明細書で使用する場合、該分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)は、本明細書において生物学的試料中、好ましくは血液、血清または血漿中の抗体(1つまたは複数)のことをいう。

【0128】

さらに、本発明の状況において、生物学的試料中の1つまたは複数の抗体は、自己-抗 $\beta$ 1-アドレナリン作動性抗体(1つまたは複数)/自己-抗 $\beta_1$ -AR抗体(1つまたは複数)のことをいう。

【0129】

したがって、本発明は、血液、血清または血漿中の自己抗 $\beta$ 1-アドレナリン作動性抗体(1つまたは複数)/自己-抗 $\beta$ 1-AR抗体(1つまたは複数)の検出における本発明の抗体を含む診断剤/診断試薬のことをいう。本発明の状況において、診断剤/診断試薬として使用され得る前記抗体が、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマにより産生される/それから得られる抗体またはその断片のことをいうことが好ましい。本発明の状況において、診断剤/診断試薬として使用され得る抗体は、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマにより産生される/それから得られる抗体またはその断片のことをいう。本発明の状況において、診断剤/診断試薬として使用され得る抗体は、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマにより産生される/それから得られる抗体またはその断片のことをいう。本発明の状況において、診断剤/診断試薬として使用され得る抗体は、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマにより産生される/それから得られる抗体またはその断片のことをいう。本発明の状況において、診断剤/診断試薬として使用され得る抗体は、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマにより産生される/それから得られる抗体またはその断片のことをいう。

【0130】

本発明において、宿主細胞、例えばDSM ACC3121、DSM ACC3174、DSM ACC3175、DSM ACC3176およびDSM ACC3177からなる群より選択される寄託番号のハイブリドーマから得られ、診断剤/診断試薬として使用される本発明の前記抗体が、検出可能に標識されることが好ましい。種々の技術は、生体分子(結合化合物)を標識するために利用可能であり、当業者に周知であり、本発明の範囲内にあると考えられる。かかる技術は、例えばTijssen, "Practice and theory of enzyme immuno assays", Burden, RH and von Knippenburg (Eds), 15 (1985), "Basic methods in molecular biology"; Davis LG, Dimer MD; Battey Elsevier (1990), Mayer et al., (Eds) "Immunochemical methods in cell and molecular biology" Academic Press, London (1987)またはAcademic Press, Inc.の"Methods in Enzymology"のシリーズに記載される。

【0131】

当業者に公知の多くの異なる標識および標識法がある。本発明に使用され得る標識の種類の例としては、酵素、放射性同位体、コロイド状金属、蛍光化合物、化学発光化合物および生体発光化合物が挙げられる。

【0132】

一般的に使用される標識は、とりわけ蛍光色素(例えば、フルオロセイン、ローダミン、テキサスレッド等)、酵素(例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ)、放射性同位体(例えば、 $^{32}\text{P}$ または $^{125}\text{I}$ )、ビオチン、ジゴキシゲニン、コロイド状金属、化学-または生体発光化合物(例えば、ジオキセタン、ルミノールまたはアクリジニウム)を含む。標識手順、例えば酵素またはビオチニル基の共有結合、ヨウ素化、リン酸化、ビオチン化等が当該技術分野で周知である。

【0133】

検出方法は、限定されないが、オートラジオグラフィー、蛍光顕微鏡検査、直接および間接酵素反応等を含む。一般的に使用される検出アッセイは、放射性同位体法または非放射性同位体法を含む。これらはとりわけウェスタンブロット、オーバーレイアッセイ、RI

10

20

30

40

50

A(ラジオイムノアッセイ)およびIRMA(免疫放射性免疫測定アッセイ)、EIA(酵素免疫アッセイ)、ELISA(酵素標識イムノソルベント検定法)、FIA(蛍光免疫アッセイ)およびCLIA(化学発光免疫アッセイ)を含む。

【0134】

さらに、本発明の抗体の別の発明的使用は、ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法における使用である。したがって、寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞から得られる抗体は、ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプター(adrenoceptor)に関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法に使用され得る。寄託番号DSM ACC3174の宿主細胞から得られる抗体はまた、ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法に使用され得る。寄託番号DSM ACC3175の宿主細胞から得られる抗体はまた、ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法に使用され得る。寄託番号DSM ACC3176の宿主細胞から得られる抗体はまた、ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法に使用され得る。寄託番号DSM ACC3177の宿主細胞から得られる抗体はまた、ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法に使用され得る。

10

【0135】

ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプター(adrenoceptor)に関連する上記の疾患は、限定されないが、特発性拡張型心筋症(DCM)、虚血性心筋症(ICM)、感染性および非感染性心臓疾患、虚血性および非虚血性心臓疾患、炎症性心臓疾患および心筋症、心拡張、特発性心筋症、免疫性心筋症、心不全ならびに心室、シャーガス病および上室性期外捕捉収縮(supraventricular premature capture beats)などの任意の心臓不整脈を含む心臓疾患を含む。

20

【0136】

本発明の状況において、ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターに関連する疾患は、特発性拡張型心筋症(DCM)のことをいう。さらに、本発明の状況において、ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターに関連する疾患は、虚血性心筋症(ICM)のことをいう。

【0137】

したがって、本発明は、ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法を提供し、該方法は：

30

(a) ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターと前記患者の生物学的試料を接触させ、それにより前記生物学的試料に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)をヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターに結合させる工程；

(b) (a)のヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターと本発明の抗体/結合化合物を接触させ、それにより前記抗体/結合化合物を、(a)の前記生物学的試料に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)が結合しないヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターに結合させる工程；

(c) (a)の前記生物学的試料と接触されていないヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターを、本発明の抗体/結合化合物と接触させ、それにより前記抗体/結合化合物を、(a)の前記生物学的試料と接触されていない前記ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターに結合させる工程；

40

(d) (i) ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターと工程(b)の抗体/結合分子の間の結合シグナル、および

(ii) ヒト $\beta$ <sub>1</sub>-アドレノレセプターと工程(c)の抗体/結合分子の間の結合シグナルを測定する工程；ならびに

(e) (d)(i)において測定された結合シグナルと(d)(ii)の結合シグナルを比較する工程を含み、ここでd(ii)において測定された結合シグナルよりも少なくとも40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%低いd(i)において測定された結合シ

50

グナルは、前記患者が、前記疾患を有するかまたは発症するリスクを有することを示す。

【0138】

本発明は、ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法を提供し、該方法は：

(a) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと前記患者の生物学的試料を接触させ、それにより前記生物学的試料に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)をヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(b) (a)のヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターを、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られる抗体またはその誘導体と接触させ、それにより前記抗体またはその誘導体を、(a)の前記生物学的試料中に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)が結合していないヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(c) (a)の前記生物学的試料と接触されなかったヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターを、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られる抗体またはその誘導体と接触させ、それにより前記抗体またはその誘導体を、(a)の前記生物学的試料と接触されなかったヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(d) (i) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと工程(b)の抗体またはその誘導体の間の結合シグナル、および

(ii) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと工程(c)の抗体またはその誘導体の間の結合シグナルを測定する工程；ならびに

(e) d(i)において測定された結合シグナルとd(ii)の結合シグナルを比較する工程を含み、ここでd(ii)において測定された結合シグナルよりも少なくとも40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%低いd(i)において測定された結合シグナルは、前記患者が前記疾患を有するかまたは発症するリスクを有することを示す。

【0139】

さらに、本発明は、ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法を提供し、該方法は：

(a) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと前記患者の生物学的試料を接触させ、それにより前記生物学的試料に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)をヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(b) (a)のヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターを、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマから得られる抗体またはその誘導体と接触させ、それにより前記抗体またはその誘導体を、(a)の前記生物学的試料に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)が接触しないヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(c) (a)の前記生物学的試料と接触されなかったヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターを、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマから得られる抗体またはその誘導体と接触させ、それにより前記抗体またはその誘導体を、(a)の前記生物学的試料と接触されなかったヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(d) (i) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと工程(b)の抗体またはその誘導体の間の結合シグナル、および

(ii) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと工程(c)の抗体またはその誘導体の間の結合シグナルを測定する工程；ならびに

(e) d(i)において測定された結合シグナルとd(ii)の結合シグナルを比較する工程を含み、ここでd(ii)において測定された結合シグナルよりも少なくとも40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%低いd(i)において測定された結合シ

グナルは、前記患者が前記疾患を有するかまたは発症するリスクを有することを示す。

【0140】

本発明はまた、ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法に関し、該方法は：

(a) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと前記患者の生物学的試料を接触させ、それにより前記生物学的試料に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)をヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(b) (a)のヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターを、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマから得られる抗体またはその誘導体と接触させ、それにより前記結合化合物を、(a)の前記生物学的試料に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)が結合しないヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(c) (a)の前記生物学的試料と接触されなかったヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターを、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマから得られる抗体またはその誘導体と接触させ、それにより前記結合化合物を、(a)の前記生物学的試料と接触されなかった前記ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(d) (i) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと工程(b)の抗体またはその誘導体の間の結合シグナル、および

(ii) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと工程(c)の抗体またはその誘導体の間の結合シグナルを測定する工程；ならびに

(e) d(i)において測定された結合シグナルとd(ii)の結合シグナルを比較する工程を含み、ここでd(ii)において測定された結合シグナルよりも少なくとも40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%低いd(i)において測定された結合シグナルは、前記患者が前記疾患を有するかまたは発症するリスクを有することを示す。

【0141】

本発明はまた、ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法に関し、該方法は：

(a) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと前記患者の生物学的試料を接触させ、それにより前記生物学的試料に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)をヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(b) (a)のヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターを、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマから得られる抗体またはその誘導体と接触させ、それにより前記結合化合物を、(a)の前記生物学的試料に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)が結合しないヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(c) (a)の前記生物学的試料と接触されなかったヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターを、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマから得られる抗体またはその誘導体と接触させ、それにより前記抗体またはその誘導体を、(a)の前記生物学的試料と接触されなかったヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(d) (i) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと工程(b)の抗体またはその誘導体の間の結合シグナル、および

(ii) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと工程(c)の抗体またはその誘導体の間の結合シグナルを測定する工程；ならびに

(e) d(i)において測定された結合シグナルとd(ii)の結合シグナルを比較する工程を含み、ここでd(ii)において測定された結合シグナルよりも少なくとも40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%低いd(i)において測定された結合シ

グナルは、前記患者が前記疾患を有するかまたは発症するリスクを有することを示す。

【0142】

本発明は、ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと関連のある疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法を提供し、該方法は：

(a) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと前記患者の生物学的試料を接触させ、それにより前記生物学的試料に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)をヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(b) (a)のヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターを、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマから得られる抗体またはその誘導体と接触させ、それにより前記抗体またはその誘導体を、(a)の前記生物学的試料に含まれる分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)が結合しないヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(c) (a)の前記生物学的試料と接触されなかったヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターを、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマから得られる抗体またはその誘導体と接触させ、それにより前記抗体またはその誘導体を、(a)の前記生物学的試料と接触されなかったヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに結合させる工程；

(d) (i) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと工程(b)の抗体またはその誘導体の間の結合シグナル、および

(ii) ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターと工程(c)の抗体またはその誘導体の間の結合シグナルを測定する工程；ならびに

(e) (d)(i)において測定された結合シグナルと(d)(ii)の結合シグナルを比較する工程を含み、ここで(d)(ii)において測定された結合シグナルよりも少なくとも40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%低い(d)(i)において測定された結合シグナルは、前記患者が前記疾患を有するかまたは発症するリスクを有することを示す。

【0143】

本発明の状況において、(d)(ii)において測定された結合シグナルよりも少なくとも40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%低い(d)(i)において測定された結合シグナルは、前記患者が前記疾患を有するかまたは発症するリスクを有することを示す。特に、(d)(ii)において測定された結合シグナルよりも少なくとも65%低い(d)(i)において測定された結合シグナルは、試験された患者を、ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有すると同定する。

【0144】

ヒト  $\beta_1$ -アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための1つのさらなるアッセイにおいて、因子(K)およびアッセイカットオフ値の検証は、セクション5.1.1~5.1.3の添付の実施例に示されるように決定され得る。このアッセイにおいて、試料の競合的効力NC(例えば健常ボランティア由来の血清(対照試料))およびPC(例えば、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマから得られる抗  $\beta_1$ -ARラット13F6抗体でスパイクした(spiked)健常ボランティア由来の血清)はそれぞれ、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマから得られる抗体23-6-7の結合の障害パーセントとして計算された。このために、それぞれの測定された結合シグナル(光学密度(OD)値)を、例えば抗体23-6-7により測定された値で割って、100をかけ、得られた値を100から引いた。

【0145】

例えば23-6-7マウス抗体のOD値における低減なしは0%障害を生じたが、完全なOD値の低

減は、100%阻害に相当する。したがって、本発明の状況において、因子Kは、ヒト $\beta_1$ -アドレノレセプターに関連する疾患に苦しんでいない対照試料としての健常被験体由来の血清(NC)の分析で、以下の等式(1)、(2)および(3)：

(1) 阻害%スクリーニングカットオフ=平均阻害%列データ(対照試料)+2x標準偏差(SD)

(2)  $K_i = (\text{阻害\%スクリーニングカットオフ}_i - \text{平均阻害\%}_{NC_i}) / \text{平均阻害\%}_{PC_i}$

(3)  $K = (K_1 + K_2 + K_3) / 3$

を使用することにより決定し得る。

【0146】

さらなるアッセイにおいて等式(1)、(2)および(3)を使用することにより、因子(K)=0.143を得ることができる。

【0147】

$K_i$  ( $i=1 \sim 3$ )は、例えば20のブランク個別試料を有する3つのプレート上で決定し得る。全てのさらなるプレート「i」について、以下のカットオフ式(4)が適用され得る：

(4) 阻害%カットオフ $_i = \text{平均阻害\%}_{NC_i} + K(0.143) \times \text{平均阻害\%}$

【0148】

阻害%カットオフ計算のこの方法は、それぞれのプレートについて多くの個別ブランク試料を解析する必要性を回避し得る。異なるプレート由来の阻害%列データ(試料)を調整するために、それぞれの阻害%カットオフを考慮する必要がある。

(5) 阻害%=平均阻害%列データ(試料)-阻害%カットオフ

【0149】

図11に図示されるように、ヒト $\beta_1$ -アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法において、競合アッセイアプローチが開発された：ヒト抗 $\beta_1$ -AR(自己-)抗体は、細胞性 $\beta_1$ -ARへの結合について、例えば寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞から得られる抗体23-6-7などのマウスモノクローナル抗体と競合する。そのため、ヒト $\beta_1$ -ARと本発明の抗体の間の結合シグナルは、例えば $\beta_1$ -ARの第2の細胞外ループに結合する自己抗 $\beta_1$ -AR抗体を含む生物学的試料の存在下で一回測定された。対照試料として、ヒト $\beta_1$ -ARと本発明の抗体の間の結合シグナルは、例えば $\beta_1$ -ARの第2の細胞外ループに結合する自己抗 $\beta_1$ -AR抗体を含む生物学的試料の非存在下で測定された。上述で説明したように、本発明の抗体の測定された結合シグナルにおける低減なしは、0%阻害を表すが、完全な低減(測定可能なシグナルがない)は、100%阻害を表す。本発明の状況において、上述の等式において示される阻害カットオフ値は、40%~75%の間にある。したがって、本発明の状況において、阻害カットオフ値は、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%および75%の間にある。

【0150】

本発明の方法において試験されるヒト $\beta_1$ -アドレノレセプターに関連する疾患は、限定されないが、特発性拡張型心筋症(DCM)、虚血性心筋症(ICM)、感染性および非感染性心臓疾患、虚血性および非虚血性心臓疾患、炎症性心臓疾患および心筋炎、心拡張、特発性心筋症、免疫性心筋症、心不全、ならびに心室性、シャーガス病および上室性期外捕捉収縮などの任意の心臓不整脈を含む心臓疾患を含む。

【0151】

本発明の方法の状況において、ヒト $\beta_1$ -アドレノレセプター( $\beta_1$ -AR)は、生物学的試料または本発明の結合化合物との接触前に固相に固定化される。

【0152】

本発明の方法の状況において、ヒト $\beta_1$ -アドレノレセプター( $\beta_1$ -AR)は、生物学的試料または本発明の結合化合物/抗体との接触後に表面上の固相に固定化される。

【0153】

本明細書で使用する場合、レセプター、好ましくはヒト $\beta_1$ -アドレノレセプター( $\beta_1$ -AR)は、種々の方法で固相に固定化され得る。適切な方法は、例えばレセプターの種類また

10

20

30

40

50

は固相の材料などの種々の要因に依存する。固定化は共有結合または吸着により起こり得る。(添付の実施例に示されるように)本発明の方法の好ましい態様に従って、レセプターは、SF9細胞に発現され、固相(好ましくはポリ-L-リジンコート培養プレート)上に固定されるヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターである。タンパク質であるレセプターの固定の固定化について、受動的な吸着によりレセプターが固相に直接的に固定化される方法が記載される。通常、ポリマー可塑性材料(例えば、ポリスチレン、ポリビニル、ラテックス)からなり、かつ例えばマイクロタイタープレートまたはマルチウェルプレート、膜または球状「ビーズ」(粒子形態の架橋ポリマー)の形態である適切な固相が、この目的に使用される(Lowman, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26 (1997), 401-24)。

【0154】

10

さらに、本発明の方法の状況において、固相の材料は、ポリ-L-リジン、あらかじめコートされたポリ-L-リジン、セファロース、ラテックス、ガラス、ポリスチレン、ポリビニル、ニトロセルロースおよびケイ素からなる群より選択される。

【0155】

さらに好ましくは、本発明の方法の固相は、膜、ビーズ、チップまたは(培養)プレートである。上述のプレートの例は、マイクロタイタープレートまたはマルチウェルプレートである。好ましくは、これらは、6、12、24、48、96、128、356、1024個以上のウェルを有する。本発明の実施例4において、96ウェルプレートを使用する方法が記載される。さらに、上述のようなヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターに関連する疾患を有するかまたは発症するリスクを有する患者を同定するための方法の状況において、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターまたはこのレセプターの断片と工程(a)の第1の結合分子の間の結合シグナルの検出において、生物学的試料を、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループに結合する本明細書に記載の結合化合物と接触させ、これは第1の結合分子とヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの結合後にアクセス可能である。この好ましい態様は、例えばELISAの機械作用的原理を利用する方法に関する。この原理は一般的に当業者に公知であり、とりわけStryer, Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, 1996に記載される。さらに、対応する方法が添付の実施例5に記載される。さらに、本明細書に記載される方法の状況において、本明細書に記載される抗体は標識される。さらに、本明細書に記載される結合分子の標識は、シグナルを放出する系を含むことが好ましい。かかるシグナルを放出する系の例は、放射性同位体を用いた上述の標識である。同様に、本明細書に記載される結合化合物の蛍光標識は、本発明のシグナルを放出する系を用いた標識を生じ、ここでシグナルは、色素の適切な刺激後の蛍光シグナルの放出である。本明細書に記載される発明に従って、シグナルを放出する系は、シグナルを放出する酵素を含むことがさらに好ましい。かかる酵素の例は、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼおよびウレアーゼを含む。酵素反応による検出のために必要な基質の例および使用は、当業者に公知であり、特に市販の検出キットの梱包リーフレットにから公知である。かかる市販のキットはしばしば、特定の種、例えば抗マウスの結合化合物(1つまたは複数)(抗体(1つまたは複数))を認識し、シグナルを放出する酵素が結合した第2の分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)を含む。したがって、対応する抗体は、本明細書に記載される結合化合物(1つまたは複数)(抗体(1つまたは複数))の特定の標識を認識する第2の分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)、すなわちFc部分の一例である。

20

30

40

【0156】

本明細書に記載される方法の状況において、第2の分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)は、ペプチド、ポリペプチド、低分子物質、抗体またはその断片もしくは誘導体からなる群より選択される。

【0157】

用語「ペプチド(1つまたは複数)」は、通常、30アミノ酸までのアミノ酸鎖のことをいう。用語「ポリペプチド(1つまたは複数)」は、通常30より多くのアミノ酸を含むペプチドのことをいい、タンパク質を含む。用語「低分子物質」または小分子(1つまたは複数)は、50~3000g/mol、しかしながらより頻繁に75~2000g/mol、大部分は100~1000g/molの

50

範囲の分子質量を有する低分子複合体である分子のことをいう。低分子物質は、有機的または無機的な性質を有し得る。

【0158】

本発明はまた、少なくとも本発明の結合化合物(1つまたは複数)、少なくとも本発明の宿主細胞または少なくとも本発明の診断剤/診断分子を含む分子(1つまたは複数)または化合物(1つまたは複数)の検出のための診断キットに関する。有利なことに、本発明のキットはさらに、任意にバッファ(1つまたは複数)、保存液および/または医学的、科学的もしくは診断的アッセイおよび目的の実施のために必要な保持試薬もしくは物質を含む。さらに、本発明のキットの一部は、バイアルもしくはボトルに個々に封入され得るか、または容器もしくは多容器単位中に組み合わせて封入され得る。

10

【0159】

したがって、本発明の状況において、(診断)キットは、自己抗 $\beta$ 1-アドレナリン作動性抗体(1つまたは複数)の検出のためのキットのことをいい、ここで該キットは、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3121のハイブリドーマにより産生される/それから得られる少なくとも抗体を含む。本発明はまた、自己抗 $\beta$ 1-アドレナリン作動性抗体(1つまたは複数)の検出のためのキットに関し、ここで該キットは、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマにより産生される/それから得られる少なくとも抗体を含む。本発明はまた、自己抗 $\beta$ 1-アドレナリン作動性抗体(1つまたは複数)の検出のためのキットに関し、ここで該キットは、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3175のハイブリドーマにより産生される/それから得られる少なくとも抗体を含む。本発明はまた、自己抗 $\beta$ 1-アドレナリン作動性抗体(1つまたは複数)の検出のためのキットに関し、ここで該キットは、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3176のハイブリドーマにより産生される/それから得られる少なくとも抗体を含む。本発明はまた、自己抗 $\beta$ 1-アドレナリン作動性抗体(1つまたは複数)の検出のためのキットに関し、ここで該キットは、宿主細胞、例えば寄託番号DSM ACC3177のハイブリドーマにより産生される/それから得られる少なくとも抗体を含む。

20

【0160】

本発明のキットは、特に本発明の方法を実施するために有利に使用され得、例えば診断キット、検索ツールまたは医療ツールとして本明細書に言及される種々の用途に使用され得る。さらに、本発明のキットは、科学的、医学的および/または診断的目的に適した検出のための手段を含み得る。キットの製造は、好ましくは当業者に公知の標準的な手順に従う。

30

【図面の簡単な説明】

【0161】

図面は以下のことを示す：

【図1】26マーペプチド(His-Trp-Trp-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg(配列番号:17))を使用したELISA結合アッセイ。マイクロタイタープレートのプラスチック表面にコートされた26マーペプチド(His-Trp-Trp-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg(配列番号:17))を用いるELISA結合アッセイを使用した場合の、抗 $\beta$ 1-AR陽性を考慮した特発性拡張型心筋症に苦しむ患者(DCM患者)および健常ボランティア(対照患者)のパーセント。

40

【図2】ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-ECII AR)に対する異なるモノクローナルマウス抗体のクローンの親和性のELISA系測定。種々のモノクローナル抗体クローンの増加濃度(0.00017~133nMの範囲)を、バキュロウイルス感染後にヒト $\beta$ 1-アドレノレセプター( $\beta$ 1-AR)を過剰発現したSF9細胞上でインキュベートした。それぞれのモノクローナル抗体を、プロテインGクロマトグラフィーによりハイブリドーマ上清から精製した。BCAタンパク質含有量分析により濃度を測定し、クマシー染色により純度を分析した。1回の代表的な実験からのOD値の2回の測定のSD偏差を有する平均を示す。

【図3】ヒト $\beta$ 1-ARに結合する、ハイブリドーマクローン23-6-7、47-12-9、50-1-5、55-3-10および28-2-7により産生された5つのマウスモノクローナル抗体の最大半量効力応答(

50

half maximal efficacy response)(EC50)-値の濃度の概観。最大半量効力応答(EC50)値を有する平均濃度を4回の独立した実験から決定した。post-hoc LSDに従った分散分析(ANOVA)によりそれぞれのpEC50値( $\log_{10}(\text{EC50})$ )を比較して決定した場合、ハイブリドーマクローン23-6-7の平均EC50値は、ハイブリドーマクローン47-12-9、50-1-5、55-3-10および28-2-7の平均EC50値よりも有意に低かった( $p < 0.05$ )。

【図4】マウス、ラットおよびヤギのそれぞれから得られた種々の抗体の、SF9細胞中(0.1% Tween 20の存在下または非存在下)で過剰発現したヒト $\beta$ 1-ARに対する結合特性。種々の抗体の増加濃度(0.001~100nMの範囲)を、バキュロウイルスの感染後にヒト $\beta$ 1-ARを過剰発現したSF9細胞上でインキュベートした。標準偏差を有するOD比の2回の測定の平均を抗体濃度に対してプロットする(対数目盛)。

10

【図5】Tween 20の存在下または非存在下の抗 $\beta$ 1-AR ECIIに対する種々の抗体の親和性のELISA系測定の比較。種々の抗体の増加濃度(0.001~100nMの範囲)を、バキュロウイルス感染後にヒト $\beta$ 1-ARを過剰発現したSF9細胞上で、Tween 20あり/なしでインキュベートした。標準偏差を有するOD比の2回の測定の平均を、抗体濃度に対してプロットする(対数目盛)。

【図6】配列番号16を参照したシクロ(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln)による第2 $\beta$ 1-ARに対するモノクローナルマウス(23-6-7)抗体結合の競合。0.0001 $\mu$ M~10 $\mu$ Mの範囲の種々の濃度のシクロ(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln)(配列番号16に示す)を、受託番号DSM ACC3121(23-6-7)で寄託されたハイブリドーマにより産生されたマウスモノクローナル抗 $\beta$ 1-AR-ECII抗体と、バキュロウイルス感染によりヒト $\beta$ 1-ARを過剰発現するSF9細胞上で共インキュベートした。4回の独立した測定のS.E.M.を有する平均をプロットする。

20

【図7】個々の特発性拡張型心筋症(DCM)患者から得られた血清のカットオフを超えた阻害値。ヒト $\beta$ 1-AR発現細胞 対 対照細胞(ヒト $\beta$ 1-ARを発現していない)において、モノクローナルマウス抗 $\beta$ 1-AR-ECII抗体(23-6-7)により誘発されたシグナルの比に対する血清試料の阻害として値を計算する。95%信頼区間より低く、65%カットオフ値を超える阻害%を示す。それぞれ2重に行った独立した3回の実験の結果を示す。バーは、S.E.M.を有する平均を示す。

【図8】健常ボランティアから得られた血清のカットオフを超える阻害値。ヒト $\beta$ 1-ARを発現する細胞 対 対照細胞(ヒト $\beta$ 1-ARを発現しない)において、モノクローナルマウス抗 $\beta$ 1-AR-ECII抗体(23-6-7)により誘発されたシグナルの比に対する血清試料の阻害として値を計算する。95%信頼区間より低く、65%カットオフ値を超える阻害%を示す。それぞれ2重に行った3回の独立した試験の結果を示す。バーはS.E.M.を有する平均を示す。

30

【図9】DCM患者または健常対照におけるヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合する陽性自己-抗 $\beta$ 1-AR抗体のパーセントの測定。反復測定の95%信頼区間がこの値を超える場合にも、65%阻害のカットオフ測定により、陽性として誘導(derivatation)を行った。この値を使用して、試験した健常対照群(43人)のうち1人だけで、自己-抗 $\beta$ 1-AR抗体が測定され得たが、DCMに苦しむ82人の患者のうち22人で自己-抗 $\beta$ 1-AR抗体が測定され得た。

【図10】モノクローナルマウス抗 $\beta$ 1-AR-ECII抗体23-6-7の競合によるヒト抗 $\beta$ 1-AR(ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプター)抗体のELISA測定の原理。ELISAは、ミクロ状態(microstate)プレート形式を使用した $\beta$ 1-ARに対するインビボの自己抗体結合特性を模倣する。他のヒト抗体の種々の細胞膜タンパク質への交差結合を回避するために、競合アプローチを開発した：ヒト抗 $\beta$ 1-AR(自己-)抗体は、例えば寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞から得られる抗体23-6-7などのマウスモノクローナル抗体と、細胞性 $\beta$ 1-ARへの結合について競合する。

40

【図11】寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞/ハイブリドーマから得られるマウスモノクローナル抗体の結合親和性。バキュロウイルス感染後にSF9細胞上で過剰発現される完全な組み換えヒト $\beta$ 1-ARに対する、寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞/ハイブリドーマから得られるマウスモノクローナル抗 $\beta$ 1-AR-ECII抗体23-6-7の結合親和性。少なくとも4回の独立

50

した測定のス.E.M.を有する平均をプロットする。患者血清由来の機能的に関連のあるヒト抗 $\beta$ 1-AR自己-抗体を、同じまたは重複するエピトープに結合する能力で特徴づけ、試験結合分子/抗体を置き換え、例えばペルオキシダーゼ(POD)に基づく放出系を使用して測定され得るELISAシグナルなどの免疫学的または生物学的シグナルを低減する。

【図12】ヒト $\beta$ 1-ARを安定に発現するヒト胚性腎臓HEK293細胞におけるEpac-FRETによるcAMPレベルの測定。ヒト $\beta$ 1-ARを安定して発現するヒト胚性腎臓HEK293細胞(DE 10 201 0 018 878 A1に記載)を使用して、独立した実験の例示的なFRET比の痕跡を示す(%はYFP/CFP強度比の相対的な変化に対応する)。FRETの低下は細胞内cAMPの増加を反映する。(A)生細胞において、不活性な対照抗体は有意なcAMP応答を誘導しなかった。実験の終わりに、完全なcAMP応答を誘発する2.5mol/Lの濃度のイソプロテレノール(Iso)によるさらなる刺激により、細胞の生存力が明らかにされる。(B)対照的に、この実験の終わりにイソプロテレノール(Iso)のさらなる投与により誘導されたように、マウスモノクローナル抗 $\beta$ -1AR-ECII抗体23-6-7(寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞/ハイブリドーマから得られる)の添加により、38.2%の最大可能シグナルに対応する関連のあるシグナルが誘発された。(C)シグナル強度および反応速度は、抗 $\beta$ -1-AR抗体陽性で前もって判断したDCM患者血清由来のものと同等であった。

10

【図13】ポリクローナルヤギ抗 $\beta$ 1-AR抗体による、寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞/ハイブリドーマから得られるマウスモノクローナル抗体23-6-7の結合の競合。種々の濃度(0.0~1.400nmol/L(nM)の範囲)のポリクローナルヤギ抗体と、寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞(ハイブリドーマ)から得られるマウスモノクローナル抗 $\beta$ -1AR-ECII抗体23-6-7を、0.26nMの終濃度で共インキュベートした。健常ボランティア由来の10%血清プールの添加をバッファ対照と比較すると、同様の用量依存的効果が生じた。少なくとも10nMのヤギ抗体で阻害は発揮された。少なくとも4回の独立した測定のス.E.M.を有する平均をプロットする。

20

【図14A】DCM患者または健常対照(図(A)および(B))およびICM(図(C))患者におけるヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合する自己-抗 $\beta$ 1-AR抗体の決定。(A) $\beta$ 1-ARを過剰発現するSF9細胞 対 対照SF9細胞( $\beta$ 1-ARについて陰性)でのELISAを用いた、DCM患者(n=167)および公知の心臓疾患が報告されていない対照被験体(n=110)の $\beta$ 1-AR結合活性の概観。モノクローナル抗 $\beta$ 1-AR抗体23-6-7との競合を測定することにより結合活性を決定した。3回の独立した測定のス.E.M.を有する平均をプロットする。

30

【図14B】(B) DCM患者(n=167)および公知の心臓疾患がなにも報告されていない対照被験体(n=110)の同一の血清試料を、26マーベプチドHis-Trp-Trp-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg; 配列番号:17)に対して分析した。結合活性は、比(26マーに対する試料光学密度(OD)/対照ウェルに対する試料OD)として計算した。抗 $\beta$ 1-AR抗体陽性スコアは、>1.5の比と規定した。2回の独立した測定のス.E.M.を有する平均をプロットする。

【図14C】(C) $\beta$ 1-ARを過剰発現するSF9細胞 対 対照SF9細胞( $\beta$ 1-ARについて陰性)でのELISAを用いた、ICM患者(n=156)および公知の心臓疾患がなにも報告されていない対照被験体(n=110)の $\beta$ 1-AR結合活性の概観。寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞/ハイブリドーマから得られるモノクローナル抗 $\beta$ 1-AR抗体23-6-7との競合を測定して、結合活性を決定した。3回の独立した測定のス.E.M.を有する平均をプロットする。

40

【図15】非変性血清およびそれぞれの抗体を枯渇させた血清画分の阻害効果の比較。非変性血清およびそれぞれの抗体を枯渇させた血清画分の阻害効果の比較。20個の血清試料は、13.1%の平均阻害値を有して試験陽性であった。対照的に、全てのプロテインG処理試料は、カットオフ値未満の平均阻害値を有して試験陰性であった。

#### 【実施例】

#### 【0162】

実施例により本発明を例示する：

実施例1：ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に対する抗体

50

## の作製

1.1 融合タンパク質GST- $\beta$ 1-ECII構築物の産生および精製

ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループおよび隣り合う膜貫通アミノ酸(アミノ酸195~225; ECII)をコードするDNA断片。より正確に、ヒト $\beta$ 1アドレノレセプター( $\beta$ 1-AR)の第2の細胞外ループのアミノ酸197~222(His-Trp-Trp-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg; 配列番号:17)ならびに隣接する膜貫通領域のアミノ酸195(Lys)、196(Met)、223(Ala)、224(Tyr)および225(Ala)をコードするDNA断片を、サブクローニングのための上流BamHIおよび下流EcoRI制限部位を有するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増幅した。PCR断片を制限酵素処理し、細菌グルタチオン-S-トランスフェラーゼのコーディング配列の3'末端と共にインフレイム

10

## 【0163】

GST- $\beta$ 1-AR-ECII融合タンパク質の発現を、1mMイソプロピル-1-チオ-b-D-ガラクト-ピラノシド(IPTG)を用いて30℃で3時間誘導した。続いて、細胞を氷上で回収し、ペレット化し(4000xg、4℃、10分)、1/10容量の氷冷PBS(リン酸緩衝化食塩水:140mM NaCl、2.7mM KCl、10.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.3)に再懸濁し、20 $\mu$ g/mlのDNase I(Sigma)および2mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の存在下、12000psiで、French Press (SLM Instruments, Rochester, NY, USA)により溶解した。0.2mMフェニルメチルスルホニルフルオライド(PMSF)、5mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)および1% Triton X-100の添加後、溶解物を遠心分離して(10000xg、4℃、15分)、可溶性タンパク質画分をグルタチオン-セファロース4Bカラム(Pharmacia, Uppsala, Sweden)に吸着させた。PBSで洗浄後、結合したタンパク質を、50mM Tris-HCl、pH8.0中の10mM還元グルタチオンで溶出した。溶出物の純度を、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)で調整して、クマシーブルー染色を行った。全ての得られた生成物は、本質的に純粋であり(80~90%); 細菌グルタチオン-S-トランスフェラーゼに対応する29kDaの分離した生成物(split-product)の汚染のみが検出可能であった。精製された融合タンパク質の収率は、誘導細菌培養液1リットル当たり2.5mg~15mgで変化した(Jahns, Eur J Pharmacol 316 (1996), 111-121)。

20

## 【0164】

1.2 ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に対するモノクローナルマウス抗体の作製

## 1.2.1 免疫化

8週齢のBALB/c雌マウスを、39日間かけて、項目1.1に上述される31マーのペプチド(GST- $\beta$ 1-AR-ECII)と連結したGST融合タンパク質で皮下免疫した。2週間ごとに50 $\mu$ g/ラットのGST- $\beta$ 1-AR-ECII融合タンパク質をフロイント完全および不完全アジュバントと一緒に用いてマウスを3回免疫した。

## 【0165】

最初の免疫は、250 $\mu$ l PBS、200 $\mu$ lフロイント不完全アジュバント(Sigma-Aldrich(登録商標))および50 $\mu$ lフロイント完全アジュバント(Sigma-Aldrich(登録商標))に溶解したGST- $\beta$ 1-AR-ECII(50 $\mu$ g)を用いて行った。2回目および3回目の免疫は、250 $\mu$ l PBSおよび250 $\mu$ lフロイント不完全アジュバント(Sigma-Aldrich(登録商標))に溶解したGST- $\beta$ 1-AR-ECII(50 $\mu$ g)を用いて行った。全量500 $\mu$ lを皮下注射のために種々の部位に分配した。39日後、3回目の免疫の11日後、脾臓から脾臓細胞を単離して、ポリエチレングリコールを用いて不死化骨髓腫細胞SP2/0と4:1の比で融合させた。融合細胞をHAT培地(ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン培地)中で10日間インキュベートした。2つの単一細胞クローニング手順と並行して、ハイブリドーマ培養上清をスクリーニングし、GST融合タンパク質、直鎖25マーペプチド(Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-Gln; 配列番号:18)または18マーシクロペプチド(すなわち、シクロ(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-

40

50

Phe-Val-Gln、Cys-Cysを有する)；配列番号:16)を固定化抗原として使用して、ELISAにより選択した。5個の異なるハイブリドーマ細胞クローン、すなわちハイブリドーマ細胞クローン23-6-7、28-2-7、47-12-9、50-1-5および55-4-10が、このハイブリドーマ融合アプローチにより生じた。

#### 【0166】

##### 1.2.2 ハイブリドーマ細胞培養上清からの抗体の精製

ハイブリドーマ細胞を、DMEM(4.5g/Lグルコース、ピルビン酸Na、 $2 \times 10^{-3}$ M L-グルタミン、 $2 \times 10^{-3}$ M非必須アミノ酸、 $5 \times 10^{-5}$ M 2-メルカプトエタノール、15% FCS、100mg/Lストレプトマイシン、250  $\mu$ g/Lアンホテリシンを有する)中、37℃で5% CO<sub>2</sub>とともに培養した。続いて、ハイブリドーマ細胞培養クローンの上清をプロテインGアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。細胞培養クローン由来の抗体含有上清を、プロテインGセファロース4 Fast Flow(Thermo Fisher, カタログ番号17-0618-05)により精製した。試料をカラムに流す前に、上清を、14000g、4℃で、15分間遠心分離し、等量の20mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>および1/20量のプロテインGセファロース4 Fast Flowと混合した。1時間、20℃でのインキュベーション後、混合物を遠心分離カラムに移した(Thermo Scientific, カタログ番号89897)。カラムを、30xカラム容量の20mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>で洗浄した。抗体を100mMグリシン、pH2.7で溶出した。溶出の直後に、1M Tris/HCl、pH9.0~pH7.5でpHを元に戻した。PBSに対して試料を一晩4℃で透析した。クマシーブルー染色で純度を調整し、280nmでの光学密度の測定により濃度を決定した。

10

#### 【0167】

20

##### 1.2.3 マウスモノクローナル抗体23-6-7の寄託

ヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ(β1-AR-ECII)に結合するマウスモノクローナル抗体23-6-7を発現するハイブリドーマクローン23-6-7は、Corimmun GmbH, Fraunhoferstr. 17, D-82152 Martinsriedにより、DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに2011年3月15日に寄託された。ハイブリドーマ(23-6-7)についての寄託名およびDSM受託番号は、「b1ECII E3, 23-6-7 (anti-beta1-AR)」および「DSM ACC3121 (DSMZ ACC3121)」である。

#### 【0168】

##### 1.2.4 マウスモノクローナル抗体28-2-7の寄託

30

ヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ(β1-AR-ECII)に結合するマウスモノクローナル抗体28-2-7を発現するハイブリドーマクローン28-2-7は、Corimmun GmbH, Fraunhoferstr. 17, D-82152 Martinsriedにより、DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに2012年5月16日に寄託された。ハイブリドーマ(23-6-7)についての寄託名およびDSM受託番号は、「b1ECII, 28-2-7」および「DSM ACC3175 (DSMZ ACC3175)」である。

#### 【0169】

##### 1.2.5 マウスモノクローナル抗体47-12-9の寄託

ヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ(β1-AR-ECII)に結合するマウスモノクローナル抗体47-12-9を発現するハイブリドーマクローン47-12-9は、Corimmun GmbH, Fraunhoferstr. 17, D-82152 Martinsriedにより、DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに、2012年5月16日に寄託された。ハイブリドーマ(47-12-9)についての寄託名およびDSM受託番号は、「b1ECII, 47-12-9」および「DSM ACC3176 (DSMZ ACC3176)」である。

40

#### 【0170】

##### 1.2.6 マウスモノクローナル抗体50-1-5の寄託

ヒトβ1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ(β1-AR-ECII)に結合するマウスモノクローナル抗体50-1-5を発現するハイブリドーマクローン50-1-5は、Corimmun GmbH, Fraunhoferstr. 17, D-82152 Martinsriedにより、DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに、2

50

012年5月16日に寄託された。ハイブリドーマ(50-1-5)についての寄託名およびDSM受託番号は、「b1ECII, 50-1-5」および「DSM ACC3177 (DSMZ ACC3177)」である。

【0171】

1.3. ヒト  $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に対するモノクローナルラット抗体およびヤギポリクローナル抗体の作製

ラットモノクローナル抗体クローン13F6は、マウスモノクローナル抗体について上述されたものと同じプロトコルに従って作製した(上述の項目1.2.1および1.2.2参照)。より正確に、ラットモノクローナルクローン13F6は、GST- $\beta$ 1-ECII融合タンパク質(上述の項目1.1参照)を使用して、マウスモノクローナル抗体について使用されたように(上述の項目1.2.1および1.2.2参照)、In Vivo Biotech Services GmbHにより作製された。続いて、ラット抗体は、製造業者の指示書に従いプロテインGアフィニティークロマトグラフィーにより精製して、PBSに溶解した。

【0172】

ヒト  $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-AR-ECII)に結合するラットモノクローナル抗体13F6を発現するハイブリドーマ(宿主細胞)は、Corimmun GmbH, Fraunhoferstr. 17, D-82152 Martinsriedにより、DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに、2012年5月16日に寄託された。ラットモノクローナル抗体(クローン)13F6を発現するハイブリドーマ細胞(宿主細胞)についての寄託名およびDSM受託番号は、「13/F6」および「DSM ACC3174 (DSMZ ACC3174)」である。

【0173】

ヤギポリクローナル抗体(Lot: 28498)は、Biogenes GmbH, Berlinにより生成された。ヤギの免疫は、7、14、28、70、105、133日目に、ヒト  $\beta$ 1-ARの第2の細胞外ループのアミノ酸197-222ならびにヒト  $\beta$ 1アドレノレセプター( $\beta$ 1-AR)の隣接する膜貫通領域のアミノ酸195(L)、196(M)、223(A)、224(Y)および225(A)に対応するGST融合タンパク質(GST  $\beta$ 1-AR-ECII)(上述の項目1.1参照)を使用して、6回のブーストにより行った。161日目に、抗体含有血清を得て、製造業者の指示書に従いアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。そのため、25マーペプチド(ヒト  $\beta$ 1-ARの第2の細胞外ループのアミノ酸200~222(Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg(配列番号:19))ならびに配列番号:1の1位のアミノ酸Alaおよび配列番号:18の25位のアミノ酸Glnに対応するAla-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-Gln(配列番号:18))は、CNBr活性化セファロース4B(GE Healthcare, カタログ番号17-0430-01)に連結された。抗体をグリシンバッファ、pH7.5、250mM NaCl、0.02%チメロサルに溶解した。

【0174】

実施例2: ヒト  $\beta$ 1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$ 1-ECII)に対するモノクローナル抗体の可変領域のコーディング配列の決定

2.1 寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞(ハイブリドーマ)から得られるマウスモノクローナル抗体23-6-7の可変領域のコーディング配列の決定

ハイブリドーマ細胞(クローン)「b1ECII E3, 23-6-7 (anti-beta 1-AR)」(DSM ACC3121で寄託)のmRNAを、Oligotex Direct mRNA kit (QIAGEN, Germany)を使用して、 $5 \times 10^6$ 個の細胞から単離した。Superscript(登録商標)III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA)を用いてcDNA合成を行った。Duebel, J Immunol Methods. 175 (1994), 89-95のプロトコルに従って、PCRにより可変領域配列の増幅を行った。簡潔に、PCRは、 $2 \mu$ l cDNA、 $200 \mu$ M dNTP、5% DMSO、10pmol各プライマーおよび $0.5 \mu$ l Herculase II Fusion (Agilent Technologies, USA)および1x Herculase反応バッファを用いて行った。軽鎖可変領域の可変領域配列はプライマー組み合わせBi8/Bi5を用いて増幅し、重鎖配列は増幅プライマーとしてBi3/Bi4およびBi3d/Bi4を用いた; プライマー配列については以下の表2を参照。陽性対照として、 $\beta$ アクチンの増幅のためのcDNA定性プライマー(フォワードプライマー: 5'-GGCATCCTCACCTGAAGTA-3'(配列番号:20)、リバースプライマー: 5'-GTCAGGCA

10

20

30

40

50

GCTCGTAGCTCT-3' (配列番号:21))を使用した。陰性対照はcDNAの代わりに水を使用した。95 で2分の最初の变性、次いで94 で1分、52 で2分、72 で1分の35サイクルおよび72 で5分の最後の伸長により増幅を開始した。PCR断片を1.6%アガロースゲル(高分解アガロースゲル)から単離し、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK)を製造業者のプロトコルに従って使用して精製した。精製したPCR断片は、名称Bi5seq(5'-GGGAAGATGGATCCAGTTG-3' (軽鎖 ; 配列番号:27))およびBi4seq(5'-CAGGGGCCAGTGGATAG A-3' (重鎖 ; 配列番号:28))のプライマーを用いて配列決定し、NCBI IgBlastプログラム(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)で解析した。

#### 【0175】

2.2 寄託番号DSM ACC3175、DSM ACC 3176およびDSM ACC3177の宿主細胞(ハイブリドーマ)から得られるマウスモノクローナル抗体28-2-7、47-12-9および50-1-5の可変領域のコーディング配列の決定 10

ハイブリドーマ細胞(クローン)(i)DSM ACC3175で寄託された「b1ECII, 28-2-7」、(ii)DSM ACC3176で寄託された「b1ECII, 47-12-9」および(iii)DSM ACC3176で寄託された「b1ECII, 50-1-5」のmRNAを、Oligotex Direct mRNA kit (QIAGEN, Germany)を使用して、 $5 \times 10^6$ 個の細胞から単離した。Superscript(登録商標) III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA)を使用してcDNA合成を行った。PCRにより可変領域配列の増幅を、Duebel, J Immunol Methods. 175(1994), 89-95のプロトコルに従って行った。簡潔に、PCRは、0.5~1.0  $\mu$ l cDNA、200  $\mu$ M dNTP、2.5% DMSO、10pmol各プライマーおよび0.5  $\mu$ l Herculase II Fusion (Agilent Technologies, USA)および1x Herculase反応バッファを用いて行った。軽鎖の可変領域配列はプライマー組み合わせBi8/Bi5で増幅し、重鎖配列は、増幅プライマーとしてBi3/Bi4およびBi3d/Bi4を使用した；プライマー配列については以下の表2を参照。陽性対照として、 $\beta$ アクチンの増幅のためにcDNA定性プライマー(フォワードプライマー：5'-GGCATCCTCACCCTGAAGTA-3' (配列番号:20)、リバースプライマー：5'-GTCAGGCAGCTCGTAGCTCT-3' (配列番号:21))を使用した。陰性対照は、cDNAの代わりに水を使用した。増幅は、95 で2分の最初の变性、次いで94 で1分、52 で2分、72 で1分の35サイクルおよび72 で5分の最後の伸長で開始した。PCR断片を1.6%アガロースゲル(高分解アガロースゲル)から単離して、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK)を製造業者のプロトコルに従って使用して精製した。精製したPCR断片は、名称Bi5seq(5'-GGGAAGATGGATCCAGTTG-3' (軽鎖 ; 配列番号:27))およびBi4seq(5'-CAGGGGCCAGTGGATAG A-3' (重鎖 ; 配列番号:28))で配列決定し、NCBI IgBlastプログラム(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)で解析した。 20 30

#### 【0176】

2.3 寄託番号DSM ACC3174のハイブリドーマ(宿主細胞)から得られるラットモノクローナル抗体13F6の可変領域のコーディング配列の決定

ハイブリドーマ細胞(クローン)(i)DSM ACC3174で寄託された「13F6」のmRNAを、Oligotex Direct mRNA kit (QIAGEN, Germany)を用いて $5 \times 10^6$ 個の細胞から単離した。Superscript(登録商標) III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA)を使用してcDNA合成を行った。PCRによる可変領域配列の増幅は、Duebel, J Immunol Methods. 175 (1994), 89-95のプロトコルに従って行った。簡潔に、PCRは、0.5~1.0  $\mu$ l cDNA、200  $\mu$ M dNTP、2.5% DMSO、10pmol各プライマーおよび0.5  $\mu$ l Herculase II Fusion (Agilent Technologies, USA)および1x Herculase反応バッファを用いて行った。軽鎖可変領域の可変領域配列は、プライマー組み合わせBi7/Bi5を用いて増幅し、重鎖配列は、増幅プライマーとしてBi3d/Bi4を使用した；プライマー配列については以下の表2を参照。陽性対照として、 $\beta$ アクチンの増幅のためのcDNA定性プライマー(フォワードプライマー：5'-GGCATCCTCACCCTGAAGTA-3' (配列番号:20)、リバースプライマー：5'-GTCAGGCAGCTCGTAGCTCT-3' (配列番号:21))を使用した。陰性対照は、cDNAの代わりに水を使用した。増幅は、95 で2分の最初の变性、次いで94 で1分、52 で2分、72 で1分の35サイクルおよび72 で5分の最後の伸長で開始した。PCR断片を1.6%アガロースゲル(高分解アガロースゲル)から単離して、製造業者のプロトコルに従ってGFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Heal 40 50

thcare, UK)を使用して精製した。精製したPCR断片は、名称Bi5seq(5'-GGGAAGATGGATCCAGTTG-3'(軽鎖;配列番号:27))およびBi4seq(5'-CAGGGGCCAGTGGATAGA-3'(重鎖;配列番号:28))のプライマーで配列決定し、NCBI IgBlastプログラム(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)で解析した。

【表2-1】

表2:

| プライマー | ドメイン     | 5'→3'配列                                                   |
|-------|----------|-----------------------------------------------------------|
| Bi7   |          | GGTGATATC(A/T)TG(A/C)TGACCCAA(A/T)CTCCACTCTC<br>(配列番号:29) |
| Bi8   | κ鎖<br>可変 | GGTGATATCGT(G/T)CTCAC(C/T)CA(A/G)TCTCCAGCAAT<br>(配列番号:22) |

10

【表2-2】

|      |          |                                                     |
|------|----------|-----------------------------------------------------|
| Bi5  | κ鎖<br>定常 | GGGAAGATGGATCCAGTTGGTGCAGCATCAGC<br>(配列番号:23)       |
| Bi3  | 重鎖<br>可変 | GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTAGCCTGGTG<br>(配列番号:24)   |
| Bi3d | 重鎖<br>可変 | AGGT(C/G)CAGCTGCAG(C/G)AGTC(A/T)GG<br>(配列番号:25)     |
| Bi4  | γ鎖<br>定常 | CCAGGGGCCAGTGGATAGACAAGCTTGGGTGTCGTTTT<br>(配列番号:26) |

20

【0177】

30

#### 実施例4: Sf9昆虫細胞中のヒトβ1-アドレノレセプターの異種発現

昆虫細胞Sf9細胞(ヨトウガ、ATCC受託番号CRL 1711)を、10%ウシ胎仔培地、100U/mlペニシリンおよび100g/mlストレプトマイシンを補充したGrace's昆虫培地(Invitrogen)中の接着培地中、27℃で増殖させた。細胞が約70~100%コンフルエントに達した場合に、増殖の3~4日後に細胞を培養フラスコから解離させた。その後、細胞を20℃で遠心分離し(400xg、5分)、細胞培養培地(10%ウシ胎仔培地、100U/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシンを補充したGrace's昆虫培地)中に再懸濁した。懸濁した細胞に、ヒトβ1-アドレノレセプター(β1-AR)についての遺伝子を保有するバキュロウイルス(MOI 6)を20℃で感染させた。対照として、トランスジーン非含有バキュロウイルスを使用した。細胞懸濁物を、ポリ-L-リジンコート96ウェル培養プレート(Biocoat, # 356516)上に、1ウェル当たり30,000細胞の密度で、全量200μlの培養培地(10%ウシ胎仔培地、100U/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシンを補充したGrace's昆虫培地(Invitrogen))に直接播種した。27℃で72時間のインキュベーション後、100μlの細胞非含有培養上清を除去し、100μlの2xPFA(パラホルムアルデヒド)固定液(PBSの最終溶液中2% PFA)を添加した。細胞を、一定の振盪(Heidolph Titramax 1000、450rpm)で、室温で15分間インキュベートした。上清を除去し、次いで固定した細胞をPBS-T(PBS Dulbecco (カタログ番号L1820, Biochrom AG)+0.1% Tween 20 (PBS-T))で3回洗浄した。

40

【0178】

細胞系(細胞性)ELISAアッセイ(実施例5.1参照)において、自己抗β1-アドレナリン作動性抗体についての結合エピトープとして天然の機能的に活性なヒトβ1-アドレノレセプター

50

ーを提供するために、SF9細胞に、ヒト  $\beta$  1-ARの遺伝子を保有するバキュロウイルスを感染させた。患者の自己抗  $\beta$  1-AR抗体(自己抗  $\beta$  1-AR抗体力価)の直接測定は、高度に多様化されたヒト抗体プールによる細胞表面エピトープに対する強力なバックグラウンド結合シグナルのために可能ではなかった。この問題を回避するために、競合アッセイを行い、それによりヒト  $\beta$  1-ARに対する高親和性抗体を使用して、ヒト血清由来の特異的な抗  $\beta$  1-AR自己抗体により競合され得るヒト  $\beta$  1-AR産生SF9細胞に対して特異的な結合シグナルを生成した(図11)。

【0179】

4.1  $\beta$  1-アドレノレセプター( $\beta$  1-AR)の第2の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の同定および特徴づけ

10

しかしながらかかる競合アプローチについての先行必要条件は、ヒト  $\beta$  1-ARに対して高い特異性および親和性を有する抗体の作製であった。ヒト  $\beta$  1-アドレナリン作動性レセプター( $\beta$  1-アドレノレセプター)の第2の細胞外ループ( $\beta$  1-AR ECII)に結合する異なるモノクローナルマウス抗体は、ハイブリドーマ細胞株アプローチ(実施例1.2参照)を使用して作製した。5つのハイブリドーマ細胞クローン23-6-7、28-2-7、47-12-9、50-1-5および55-3-10の(天然の)ヒト  $\beta$  1-ARに対する結合特性を分析した。

【0180】

図2および3は、他の同様に産生された抗体(すなわち、ハイブリドーマ細胞クローン28-2-7、47-12-9、50-1-5および55-3-10)と比較した、ハイブリドーマ細胞クローン23-6-7の有意に良好な結合親和性を示す。ハイブリドーマ細胞クローン23-6-7は、低いバックグラウンドレベルと合わせて最も高い結合親和性、 $K_d=0.43\text{nM}$ (EC50と同等)を示した。これらの性質は、 $\beta$  1-AR ECIIに対するヒト自己抗体との競合的置き換えを有意に高めた。

20

【0181】

(寄託されたハイブリドーマ細胞(クローン)DSM ACC3121から得られる)抗体23-6-7のさらなる特性について、ヒト  $\beta$  1-アドレノレセプターの第2の細胞外ドメインに対する結合特異性を試験した。そのため、組み換え  $\beta$  1-AR-過剰発現SF9細胞に対して、任意の競合剤の非存在下での種々の濃度の(寄託されたハイブリドーマ細胞(クローン)DSM ACC3121から得られる)抗体23-6-7の結合特性を最初に測定した。上記の実験を確認し、(寄託されたハイブリドーマ細胞(クローン)DSM ACC3121から得られる)抗体23-6-7について0.43nMの結合親和性を例示する図12に結果を示す。

30

【0182】

23-6-7抗  $\beta$  1-AR抗体クローンの機能性を決定するために、本発明者らは、 $G_s$  プロテインおよびアデニルシクラーゼ(AC)の連続的な活性化を介したレセプターに媒介される細胞内環状アデノシンリン酸(cAMP)の蓄積を活性化する能力を調べた。細胞内cAMPのこの増加を検出するための1つの方法は、Epac1のcAMP結合ドメインに融合したシアン蛍光タンパク質(CFP)および黄色蛍光タンパク質(YFP)の間の蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を使用することである(Nikolaev, J Am Coll Cardiol 50 (2007), 423-43)。蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を使用した、細胞内cAMPの増加の決定のための手段および方法は、DE 10 2010 018 878 A1に記載される。クローン23-6-7の添加は、FRETアッセイ(図12(B))を使用して決定した場合、DCM患者由来の抗  $\beta$  1-AR自己抗体により典型的に発揮されるように遅い反応速度を伴って(図12(C))、ヒト  $\beta$  1-ARを安定に発現するHEK 293細胞を明らかに活性化した。対照的に、陰性対照抗体は効果的でなかった(図12(A))。

40

【0183】

したがって、寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞(ハイブリドーマ)から得られる抗体は、その高い結合親和性を考慮して、競合アッセイを容易に実施できる  $\beta$  1-アドレノレセプター抗体クローンである。

【0184】

さらに、ラットおよびヤギもGST-  $\beta$  1-ECII融合構築物(実施例1.1参照)で免疫して、ヒト  $\beta$  1-アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta$  1-AR-ECII)に結合する抗体の産生をもたらした。ラットの場合、モノクローナル抗体13F6は、ハイブリドーマ細胞株アプローチ

50

(実施例1.3参照)によっても作製された。ポリクローナルヤギ抗体は、 $\beta_1$ -AR-EC<sub>II</sub> ペプチドを用いた親和性クロマトグラフィー(実施例1.4参照)により精製した。マウス23-6-7、ラットモノクローナル抗体およびヤギポリクローナル抗体を用いて得られた結果の比較を図3および4に示す。

【0185】

要するに、本発明の図3および4から明らかなように、ハイブリドーマ細胞クローン23-6-7(受託番号DSM ACC3121で寄託される)により産生されたマウスモノクローナル抗体は、(SF9細胞において発現された)ヒト $\beta_1$ -ARに対し最も高い親和性で結合し、ラットモノクローナル抗体13F6およびヤギポリクローナル抗体がそれに続く。マウスモノクローナル抗体23-6-7の0.41nMのEC50値は、ラットモノクローナル抗体13F6およびヤギポリクローナル抗体と比較して、10倍より低い。さらに、0.1% Tweenのアッセイインキュベーションへの添加および洗浄バッファの添加後、シグナル強度であるそれぞれのOD値の増加が測定された。しかしながら、界面活性剤Tween 20の除去は、非常に低いシグナル対ノイズ比のために、ヒト自己抗体の競合測定には十分ではなかった。

10

【0186】

SF9細胞中で過剰発現された組み換え $\beta_1$ -ARに対して抗体23-6-7の結合特異性を提供するために、本発明者らは、ヒト $\beta_1$ アドレノレセプターの第2の細胞外ループ( $\beta_1$ -AR ECII-ループ)のコア領域に対応する18マーペプチド(シクロ(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln); 配列番号:16)を付加して、抗体結合に競合させた。結果を、低いナノモル範囲のIC50濃度を示す図6に示す。

20

【0187】

実施例5：酵素標識イムノソルベント検定法(ELISA)

5.1 細胞Elisaアッセイ

PFA固定した細胞を、3%粉ミルクを補充した200 $\mu$ l PBS-T(PBS Dulbecco (カタログ番号L1820, Biochrom AG)+0.1% Tween 20)で、室温で1時間ブロックした。その後、プレートをPBS-Tで3回洗浄した。ハイブリドーマ融合アプローチ、すなわちハイブリドーマ細胞クローン23-6-7(上述の実施例1参照)から得られたマウスモノクローナル抗 $\beta_1$ -AR抗体を、0.1% Tween 20および3% BSA(ウシ血清アルブミン)の存在下、血清0.26nMの固定濃度で添加して、0.1% Tween 20の存在下、健常ボランティアまたはDCM患者それぞれ由来のヒト血清(1:10希釈)の添加により結合を競合させた。実験の第1のシリーズにおいて、82人のDCM患者由来の血清および健常ボランティアから得られた43の血清(実施例5.3参照)を図7~9に例示するように調べた。

30

【0188】

DSM ACC3174で寄託されたハイブリドーマ細胞(クローン)(上述の実施例1参照)から得られる産生された所定の濃度(760nM)のモノクローナルラット抗体13F6により陽性対照試料が提供さ、これは競合にも使用した。一定の振盪で、室温で2時間のインキュベーション後、細胞をPBS-Tで3回洗浄し、二次抗体(Dianova, カタログ番号715-035-151)溶液(PBS-T+3%粉乳に1:5000希釈)を添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。PBS-Tでさらに4回の洗浄工程後、100 $\mu$ l TMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)基質溶液により、複合体中に結合したペルオキシダーゼを20 で可視化する。100 $\mu$ lの1M硫酸による酵素反応停止後、生じた色強度を450nmおよび595nmの参照波長で測定した。色強度は、試料中のヒト抗 $\beta_1$ レセプター抗体の量に反比例した。

40

【0189】

それぞれのODバックグラウンドシグナル(対照細胞)を差し引いた、マウスモノクローナル抗体23-6-7(受託番号DSM ACC3121で寄託)により発揮された光学強度(OD)シグナル(ヒト $\beta_1$ -AR発現SF9細胞)は、100%のスコアであって、それぞれの血清の阻害能力は二重に決定した。少なくとも3回の独立した実験のSEMを有するそれぞれの血清の平均値を計算した。

【0190】

群の間の差は非常に有意であった(DCM 対 健常対照について $p<0.00005$ )。特発性拡張型心筋症に苦しむ患者(DCM患者)を心エコー検査により調べ、45%未満の駆出率を有すること

50

を特徴とする。さらに、冠状心臓疾患は、侵襲性のカテーテル調査により除外した。公知の心臓疾患を有さない被験体を対照とした(健常ボランティア)。試験した特発性拡張型心筋症に苦しむ患者(DCM患者)の総数は82であり、健常ボランティア(任意の公知の心臓疾患に苦しんでいない)の総数は43であった。自己- $\beta$ 1-アドレナリン作動性抗体陽性(AR自己-抗体陽性)と自己- $\beta$ 1-アドレナリン作動性抗体陰性(AR自己-抗体陰性)を分類するために、アッセイカットオフ値を決定した。反復測定95%信頼区間がこの値を超えた場合も、65%より大きな阻害を陽性とみなした。

#### 【0191】

この値を使用すると、2.33%と同等の健常対照群のうちわずか一人の個体(1/43)が陽性とみなされた。対照的に、DCM患者の40.24%(33/82)が、抗 $\beta$ 1-AR自己-抗体陽性とみなされた。各DCM患者または健常対照のそれぞれの阻害能力(%)の概観を実施するために、結果をヒストグラムにプロットする(図9)。

#### 【0192】

##### 5.1.1 細胞系 $\beta$ 1-AR競合アッセイ

Sf9(ヨトウガ、ATCC受託番号CRL 1711)細胞を、標準的な細胞培養プロトコルに従って、接着培養中で増殖させた(培養詳細について、上述の項目実施例4参照)。細胞が約70~100%コンフルエントに達した場合、増殖の3~4日後に細胞を培養フラスコから解離した。その後、細胞を遠心分離して(400 $\times$ g、5分)、細胞培養培地に再懸濁した。懸濁した細胞に、ヒト $\beta$ 1-ARの遺伝子を保有するバキュロウイルス(MOI 6)を感染させた。トランスジェン含有バキュロウイルスを対照とした。細胞懸濁物を、1ウェル当たり30,000細胞の密度で、ポリ-L-リジンコート96ウェル細胞培養プレート(Biocoat, # 356516)に直接播種した。インキュベーションの72時間後、細胞培養液上清の半分(200 $\mu$ l/ウェル)を除去して、100 $\mu$ l 2 $\times$  PFA固定液(最終溶液中2% PFA)を添加した。一定の振盪で、細胞を室温で15分間インキュベートした。次いで上清を除去して、固定細胞をPBSで3回洗浄した(PBS Dulbecco (カタログ番号L1820, Biochrom AG)+0.1% Tween 20(PBS-T)。任意に、マイクロタイタープレートを-80 $^{\circ}$ Cで6ヶ月まで凍結した。

#### 【0193】

PFA固定細胞を、200 $\mu$ l PBS-T+3%粉乳で、室温、1時間ブロッキングした。その後、プレートをPBS-Tで3回洗浄した。寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞から得られたマウスモノクローナル抗 $\beta$ 1-AR抗体23-6-7を添加して、次いで健常ボランティアまたはDCM患者のそれぞれ由来のヒト血清を添加して、23-6-7結合を競合した。所定の濃度のモノクローナルラット抗 $\beta$ 1-AR抗体13F6(寄託番号DSM ACC3174の宿主細胞から得られる)により陽性対照試料が提供され、これを競合にも使用した。一定の振盪で室温2時間のインキュベーション後、細胞をPBS-Tで3回洗浄し、二次抗体液(PBS-T+3%粉乳中1:5000)を添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。PBS-Tでさらに3回の洗浄工程後、TMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)基質液により複合体中に結合したペルオキシダーゼを可視化した。硫酸を用いた酵素反応の停止後、得られた色の強度を450nmおよび595nmの参照波長で測定した。

#### 【0194】

ヒト試料、NC(健常ボランティア由来の血清)およびPC(抗 $\beta$ 1-ARラット13F6抗体でスパイクした健常ボランティア由来の血清)のそれぞれの競合効力を、結合するマウス抗体(23-6-7)の阻害パーセントとして計算した。このために、それぞれのOD値をマウス抗体(23-6-7)値で割って、100をかけ、得られた値を100から引いた。

#### 【0195】

(23-6-7)マウス抗体のOD値の低減なしは0%阻害を生じたが、完全OD値低減は、100%阻害に相当した。

#### 【0196】

因子(K)およびアッセイカットオフ値の決定のためにアッセイ検証を行った。20名の健常ボランティア由来の血清の分析に基づいた3回の独立した実験において、因子(K)=0.143は、等式(1、2、3)を使用して得られた。

阻害%スクリーニングカットオフ=平均阻害%列データ(対照試料)+2xSD (1)

$K_i = (\text{阻害\%スクリーニングカットオフ}_i - \text{平均阻害\%}_{NC_i}) / \text{平均阻害\%}_{PC_i}$  (2)

$K = (K_1 + K_2 + K_3) / 3$  (3)

$K_i$  ( $i=1 \sim 3$ )は、20個のブランクの個々の試料を用いて3つのプレートで決定した。

全てのさらなるプレート「i」について、以下のカットオフ式(4)を適用した：

阻害%カットオフ $_i$ =平均阻害% $_{NC_i}$ + $K(0.143) \times$  平均阻害% $_{PC_i}$  (4)

阻害%カットオフ計算のこの方法により、それぞれのプレートに対する多くの個々のブランク試料の分析の必要性が回避された。

異なるプレート由来の阻害%列データ(試料)を調整するために、それぞれの阻害%カットオフを考慮する必要がある。

阻害%=平均阻害%列データ(試料)-阻害%カットオフ (5)

【0197】

仮説は、モノクローナル抗 $\beta$ 1-AR抗体23-6-7(DSM ACC3121で寄託されたハイブリドーマ細胞(クローン)から得られる)の $\beta$ 1-AR-過剰発現SF9細胞への結合は、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターに関連する疾患に苦しむ患者(例えば、DCMに苦しむ患者；図11の模式的概観参照)由来の血清との共インキュベーションにより改変されるはずであるというものであった。寄託番号DSM ACC3121の宿主細胞から得られる23-6-7抗体の結合の競合的低減は、それぞれの試料において、抗 $\beta$ 1-AR抗体の存在に依存して生じるはずである。アッセイへのこのヒト血清プールの添加の影響を明らかにするために、同一のアッセイアプローチにおいて、ポリクローナルヤギ抗 $\beta$ 1-AR抗体も対照バッファに添加した。図13は、用量依存性および最大シグナルの両方に関して、両方の条件についての競合曲線の高い類似性を示す。アッセイを検証するために、健常ボランティア由来の血清プールからなる陰性対照が必要であると思われる。競合のためにポリクローナルヤギ抗 $\beta$ 1-AR抗体を使用した場合、アッセイ感度を10nMで決定した。

【0198】

#### 5.1.2 $\beta$ 1-AR ELISAの検証

アッセイ間の同等性を保証するために、健常ボランティア由来のプールされたヒト血清試料からなる陰性対照試料(NC)およびラット抗 $\beta$ 1-AR抗体13F6(DSM ACC3174で寄託されたハイブリドーマ細胞(クローン)から得られる)でスパイクしたヒト血清プールからなる陽性対照(PC)を、それぞれのマイクロタイタープレート上で測定した。本発明者らは、再現可能な利用可能性のために、ポリクローナルヤギ抗 $\beta$ 1-AR抗体よりもむしろ、モノクローナルラット13F6抗体(DSM ACC3174で寄託されたハイブリドーマ細胞(クローン)から得られる)を使用した。

【0199】

ヒト血清試料の阻害(%)を分類するために、プレート特異的な阻害%カットオフを考慮した。応答は個々のアッセイ間で変化したので、それに応じてカットオフ値を変更した。それぞれのアッセイにおいてカットオフ値を評価するための陰性対照および所定の因子(K)の使用により、経時的な非特異的結合(NSB)の変化の補正が可能になった。陽性対照のOD値のみがアッセイ感度の評価を可能にするので、カットオフ式における陽性対照のさらなる使用により、さらに良好な標準化が可能になった。

【0200】

アッセイカットオフポイント値：陽性試料が検出されるよりも高い、アッセイの非特異的バックグラウンドのレベルおよびこれらのマトリックス試料の応答に基づいて、カットオフ値を統計学的に決定した。3つの独立した実験において、20名の健常ボランティア由来の血清試料を試験した。平均+2.0xSDを計算してカットオフを決定した。個々のアッセイ間のいくつかの小さな変化について説明するために、予備試験検証データから決定した特定の標準化因子をかけて、調整したカットオフ値を計算した。

【0201】

感度：抗体調製物がカットオフ値と同等のアッセイ読み出しを生じた濃度として、アッセイ感度を決定した。患者血清からヒト抗 $\beta$ 1-AR抗体を完全に精製することはこれまでは可

10

20

30

40

50

能でなかったので、項目5.1.1に記載されるように、ポリクローナルヤギ抗 $\beta$ 1-AR抗体を使用してアッセイ感度を決定した。カットオフ値はおよそ10nMで決定した。

【0202】

回復(Recovery)：回復を決定するために、健常ボランティア由来の20の血漿試料を、760nMのアッセイ濃度において、(DSM ACC3174で寄託されるハイブリドーマ細胞(クローン)から得られる)ラット13F6抗 $\beta$ 1-AR抗体でスパイクした。20個全ての試料は、2.54%の平均変動係数(CV)を有するカットオフポイント値を超える阻害値を示したので、回復のための基準は完全に満たされた。

【0203】

精度：共にラット13F6抗体を253nMおよび760nMそれぞれのアッセイ濃度でスパイクした検証試料(VS)および陽性対照(PC)を使用して、アッセイ内(再現性)およびアッセイ間(中間精度)検証を評価した。それぞれのプレートに対して、異なる3日に実施された4回の繰り返しを使用した。本発明者らは、VSについて、4.8%の平均アッセイ内CVおよび16.2%の平均アッセイ間CV、ならびにPCについて、3.6%の平均アッセイ内CVおよび15.4%の平均アッセイ間CVをそれぞれ見出した。

10

【0204】

3回の独立した測定において、167のヒトDCM血清試料および110の年齢を適合したボランティアの測定により、患者群について14.4%の平均アッセイ間CVおよび対照群について16.9%の平均アッセイ間CVが得られた。

【0205】

安定性：VSについて、保存条件および血清試料安定性を調べた。22℃で3時間または4℃で16時間のいずれかの保存は、ラット13F6抗 $\beta$ 1-AR抗体の測定に負の影響を有さず、ストレスを与えない(unstressed)VSと比較して95.1%および92.3%の回復を生じた。また、3回の繰り返し凍結/融解サイクルは、VSの結果に影響を及ぼさなかった。

20

【0206】

また、抗 $\beta$ 1-AR抗体の安定性測定は、全血試料においても分析した。抗 $\beta$ 1-AR抗体について試験した陽性の10個のDCM試料は、20℃で20時間保存して再度分析した。94.7%(SD $\pm$ 10.4)の回復が測定され、血清中の安定性と比較して、全血中の高い抗体安定性が示された。

【0207】

5.1.3 DCMに苦しむ患者 対 ボランティアのスクリーニング結果

30

<45%の左心室末期拡張体積(end-diastolic volume)(LV-EF)を示す167名のDCM患者および血液サンプリング時に公知の心臓疾患が報告されていない110名の年齢を適合したボランティアにおける抗 $\beta$ 1-AR抗体の存在を分析した。

【0208】

図14(A)および14(B)に参照されるDCMに苦しむ167名の患者を、心エコー検査により調べると、45%未満の駆出率を有することを特徴とする。地方の血液ドナーバンクの厳密に年齢を合わせた被験体(n=110)由来の血清を対照とした。全てのこれらの対照被験体(n=110)は、血液サンプリング時に心臓血管疾患が報告されていなかった。ボランティア群の平均患者年齢は60.9 $\pm$ 11.2歳であり、有意に異なっていた(両側t検定)。

40

【0209】

DCM群において上述の項目5.1.2で同定された標準的なパラメーターを適用することにより、これらの試料の62.2%が関連のある抗 $\beta$ 1-AR抗体について陽性であると確認され、年齢適合対照群では8.2%のみであった(図14A)。

【0210】

図8および9と図14(A)の比較から明らかな(偽)陽性対照被験体の異なる有病率は、図7～9に示される結果の試験において調べられた健常被験体の対照群が、図14(A)に示される結果の疾患DCM群と比較して年齢が適合されいなかったという事実に関連する。図7～9に示されるこれらの対照被験体は、疾患個体群よりもかなり若かった。

【0211】

50

図14(A)に示されるデータは、健常被験体の対照群を年齢適合基準で統計的に比較するというアプローチに関連する。多くの研究者(例えば、Effors B. Stress, immunity and aging. Marcel Dekker, New York, NY, 1984)は、健常被験体の対照群における偽陽性バイオマーカーの数が、調べられた対照個体群の年齢が上がるにつれて増加することを見出した。

#### 【0212】

##### 5.1.4 ICMに苦しむ患者 対 ボランティアのスクリーニング結果

重度の冠動脈疾患により起こる「虚血性心筋症」に苦しむ患者(n=156)(ICM患者)および血液サンプリング時に公知の心臓疾患が報告されていない110名の年齢適合ボランティアにおいて、抗 $\beta$ 1-AR抗体の存在を分析した。

10

#### 【0213】

図14(C)の試験に使用した重度の冠動脈疾患により起こる「虚血性心筋症」に苦しむ患者(ICM患者)を心エコー検査で調べると、45%未満の左心室駆出率(LV-EF)を有することが特徴づけられる。さらに、侵襲性カテーテル調査により冠状心臓疾患を確認した。公知の心臓疾患を有さない被験体を対照とした(健常ボランティア)。

#### 【0214】

ICM群において、上述の項目5.1.1および5.1.2で同定された標準的パラメーターを適用することで、年齢適合対照群と比較して、ICM群の有意に多くの数の試料が、関連する抗 $\beta$ 1-AR抗体について陽性であることが同定された(図14(C))。

20

#### 【0215】

##### 5.1.5 非変性血清およびそれぞれの抗体を枯渇させた血清画分の阻害効果の比較

細胞系(細胞性)ELISAにおいて決定された阻害値が、実際にはIgG抗体のためであったことを示すために、20の抗 $\beta$ 1-AR抗体陽性DCM血清を、プロテインGセファロースにより枯渇させてIgG免疫グロブリンを排除した。それぞれの血清由来のフロースルーを回収して、細胞性ELISAにより負荷(未処理血清)との比較において分析した。ELISAで決定された抗 $\beta$ 1AR力価が、全ての調査された抗体枯渇試料において完全に消えたことが観察された(公称平均阻害%は、13.1%から-31.1%に減少した; 図15)。

#### 【0216】

##### 5.2 ペプチド系ELISAアッセイ

ヒト血清において、自己-抗 $\beta$ 1-アドレナリン作動性抗体の決定に広く使用される方法は、ペプチド系ELISAアッセイである。このペプチド系ELISAアッセイ系において、マイクロタイタープレート(Nunc microtiter maxisorp plates)を、0.1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 中、10 $\mu\text{g/ml}$ のヒト $\beta$ 1レセプターの第2の細胞外ループのアミノ酸配列(残基197~222)に対応する26マーペプチド(His-Trp-Trp-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg; 配列番号:17)の溶液で、室温で1時間コートした。ウェルを、3%粉乳を補充したPBS-T(PBS Dulbecco (カタログ番号L1820, Biochrom AG)+0.1% Tween 20)で飽和した後、健常ボランティアまたはDCMを有する患者由来のヒト血清をそれぞれ、同じバッファ(PBS-T+3%ミルク)中に1:20希釈し、ウェルに添加した。4で16時間のインキュベーション後、結合した抗体をペルオキシダーゼで標識した二次抗ヒトIgG抗体(Dianova, カタログ番号109-035-088)(PBS-T+3%ミルク中1:5000希釈)で検出した。それぞれの工程の間に3xPBS-T洗浄手順を行った。その後100 $\mu\text{l}$ のTMB基質(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)溶液を全てのウェルに分配した。プレートを被覆して、20で10~30分インキュベートした。100 $\mu\text{L}$ の停止液(1M硫酸)を全てのウェルに添加して酵素反応を停止した。450nm(参照フィルター650nm)で吸光度を読んだ。色密度の減少は、試料中のヒト $\beta$ 1-レセプター抗体の量に直接関連した。

30

40

#### 【0217】

このELISAアッセイについて診断ツールとしての能力を明らかにするためにペプチド系ELISA法を行った。DCM患者に対する健常ボランティアの相対的な性能に、平均焦点(mean focus)を集中させた。

#### 【0218】

50

特発性拡張型心筋症に苦しむ患者(DCM患者; n=82)を心エコー検査で調査したところ、45%未満の駆出率を有することが特徴づけられる。さらに、侵襲性カテーテル調査により冠状心臓疾患を除外した。公知の心臓疾患を有さない被験体を対照とした(健常ボランティア; n=43)。DCM患者および健常ボランティア(対照群)の両方において図1から明らかなように、同じパーセントの自己抗 $\beta$ 1-アドレナリン作動性レセプター抗体(1つまたは複数)が観察された。

#### 【0219】

より低いまたはより高いカットオフ比への変化は、結果を有意に変えなかった(データは示さず)。抗体陽性健常被験体のこの高いパーセントは、予測されず、自己抗 $\beta$ 1-アドレナリン作動性レセプター抗体(1つまたは複数)の部分偽陽性決定により説明され得る。これらの所見から、本発明者らは、マイクロタイタープレートへの固定化後のペプチドコンホメーションは、ヒト $\beta$ 1-アドレノレセプターEC IIループの天然の構造を、おそらくは反映しないと結論付ける。ペプチドの人工折りたたみにより、非特異的抗体結合の原因となり得る新たなエピトープが生じ得る。同様のアプローチにおいて、親和性カラムによりヒト血漿試料を精製した。このために、同じ26マーペプチド(His-Trp-Trp-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg(配列番号:17))を、CNBr-活性化セファロース4B(GE Healthcare, カタログ番号17-0430-01)に連結させた。製造業者の指示書に従い精製を行った。次いで、前もって精製した抗体画分を、ペプチド系ELISAアッセイにおいて分析したところ、DCM患者 対 健常ボランティアの間に有意な差は観察されなかった(データは示さず)。

#### 【0220】

##### 5.2.1 ペプチド系ELISAアッセイ

細胞(細胞性)系SF9 $\beta$ 1-AR ELISAアッセイ(上述の項目5.1.3に記載)で使用したように、<45%の左心室末端拡張体積(LV-EF)を示す167名のDCM患者および血液サンプリング時に公知の心臓疾患が報告されていない110名の年齢適合ボランティアおよび年齢適合対照群由来の同じ血清試料を使用した。

#### 【0221】

Nuncマイクロタイター-maxisorpプレートを、0.1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 中の0.5 $\mu\text{g/ml}$ ペプチド、26マーペプチド(His-Trp-Trp-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg; 配列番号:17)またはパッファ単独で、4で16時間かけてコートした。ウェルを、3%粉乳および0.1% Tween 20を補充したPBSで飽和した後、健常ボランティアまたはDCMを有する患者由来のヒト血清のそれぞれを、PBS-T+3% BSA+10% FCSに1:20希釈し、ウェルに添加した。室温で2時間のインキュベーション後、結合した抗体を、PBS-T+3%ミルクに1:20000希釈した、ペルオキシダーゼで標識した二次抗ヒトIgG抗体で検出した。各工程の間に、プレートをPBS-Tで3回洗浄した。その後、100 $\mu\text{l}$ のTMB基質(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)基質溶液を全てのウェルに分配した。プレートを被覆して、室温で10~30分間インキュベートした。100 $\mu\text{L}$ の停止液(1M硫酸)を全てのウェルに添加して酵素反応を停止した。450nm(参照フィルター650nm)で吸光度を読んだ。色強度の減少は、試料中のヒト抗 $\beta$ 1レセプター抗体の量に直接関連した。バックグラウンド強度の1.5倍を強い陽性と規定した。

#### 【0222】

図14Bに示すように、29.9%抗 $\beta$ 1-AR抗体陽性DCM患者 対 対照群において35.5%陽性所見が観察された。

#### 【0223】

上記の項目5.1.3で説明されたように、細胞系ELISAアッセイでは、167名のDCM患者および健常対照群(n=110)由来の同じ血清試料を使用して、同じカットオフ値を使用すると(図14Aおよび14B参照)、抗 $\beta$ 1-AR抗体は、DCM患者の約60%および健常ボランティア(対照群)の約8%で検出された。抗 $\beta$ 1-AR抗体力価( $\beta$ 1MAB結合の阻害として規定される)は、プロテインG吸着により血清からIgG抗体を枯渇させた後はもはや検出されなかった(図15参照)。結果的に、細胞系ELISAアッセイから得られた結果は、DCM患者の任意の特異的同定を除外

した多くの偽陽性結果を生じた第2の細胞外  $\beta$  1-ARループ由来の直鎖26マーペプチドを用いて行ったペプチド系ELISAアッセイとははっきりと異なる。

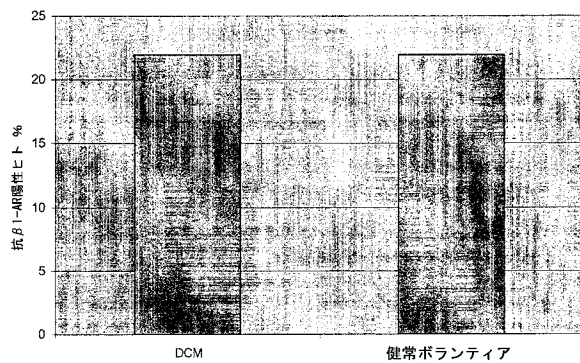
【 0 2 2 4 】

#### 5.4 データ解析

Sigmaプロットソフトウェア、バージョン11から、標準曲線解析(「4パラメーターロジスティック」)を使用して $IC_{50}$ 値を計算した。全ての他の計算は、EXCELソフトウェア、バージョン2003/2007を用いて行った。

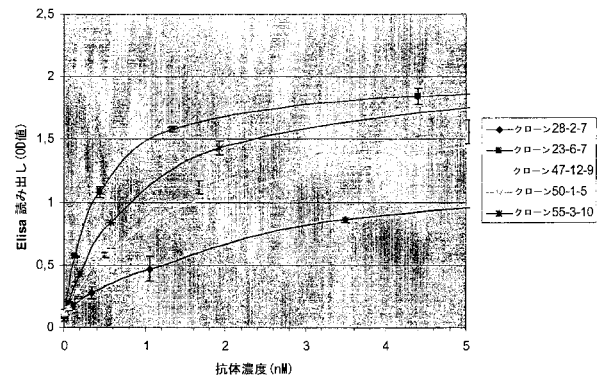
【 図 1 】

Figure 1



【 図 2 】

Figure 2



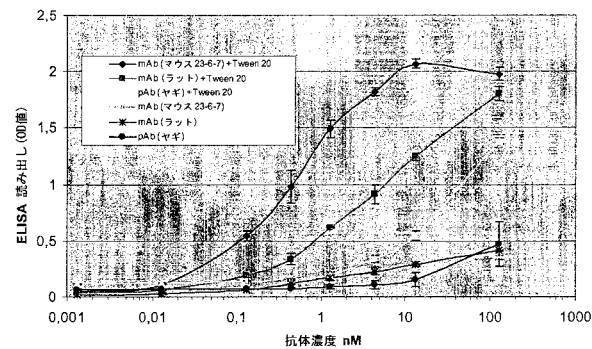
【 図 3 】

Figure 3

| クローンmAb<br>(マウス) | EC50<br>(nM) | EC50<br>(nM) | EC50<br>(nM) | EC50<br>(nM) | 平均<br>IC50 (nM) | SD   | SEM  | ANOVA p<br>値 対<br>23-6-7 < |
|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|------|------|----------------------------|
| 28-2-7           | 4,32         | 2,96         | 4,76         | 4,93         | 4,24            | 0,89 | 0,45 | 0,001                      |
| 47-12-9          | 2,25         | 1,21         | 1,43         | 1,77         | 1,66            | 0,45 | 0,23 | 0,001                      |
| 50-1-5           | 5,58         | 1,06         | 3,86         | 3,88         | 3,60            | 1,87 | 0,94 | 0,001                      |
| 55-3-10          | 2,35         | 0,78         | 1,17         | 1,25         | 1,39            | 0,68 | 0,34 | 0,002                      |
| 23-6-7           | 0,51         | 0,36         | 0,40         | 0,35         | 0,40            | 0,07 | 0,04 | 1                          |

【 図 4 】

Figure 4



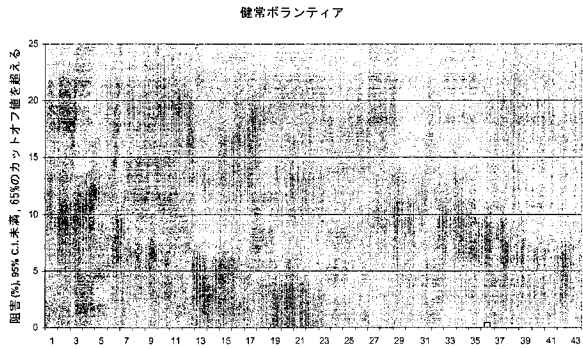
【 図 5 】

Figure 5

| 抗体               | Tween 20 あり  |       | Tween 20 なし  |        |
|------------------|--------------|-------|--------------|--------|
|                  | EC50 平均 (nM) | SEM   | EC50 平均 (nM) | SEM    |
| mAb (マウス 23-6-7) | 0,41         | 0,07  | 0,62         | 0,50   |
| mAb (ラット13F6)    | 6,06         | 4,07  | 7,93         | 5,36   |
| pAb (ヤギ)         | 37,37        | 27,53 | 179,98       | 129,40 |

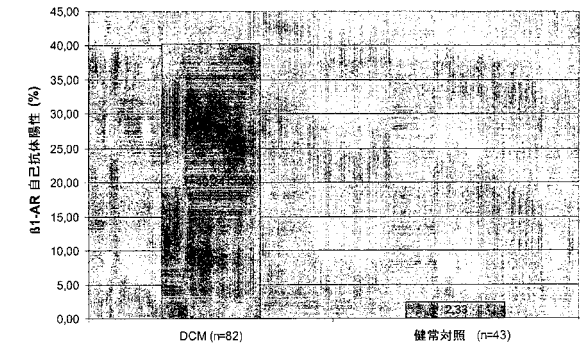
【 図 8 】

Figure 8



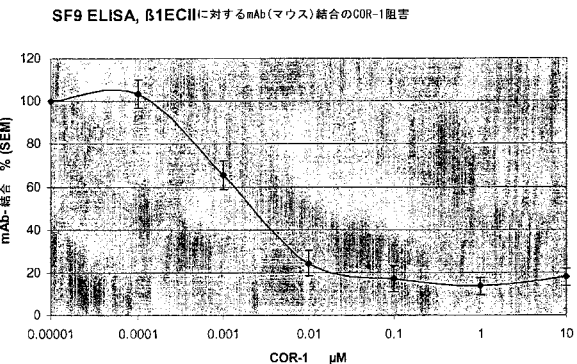
【 図 9 】

Figure 9



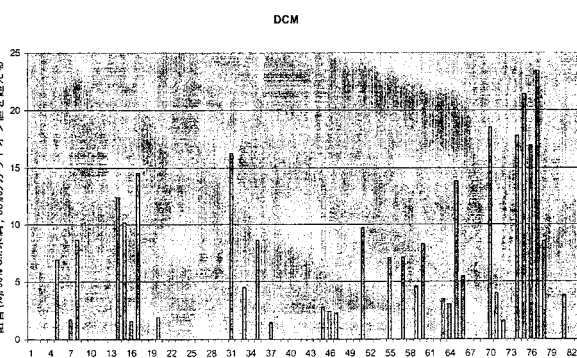
【 図 6 】

Figure 6



【 図 7 】

Figure 7



【 図 1 0 】

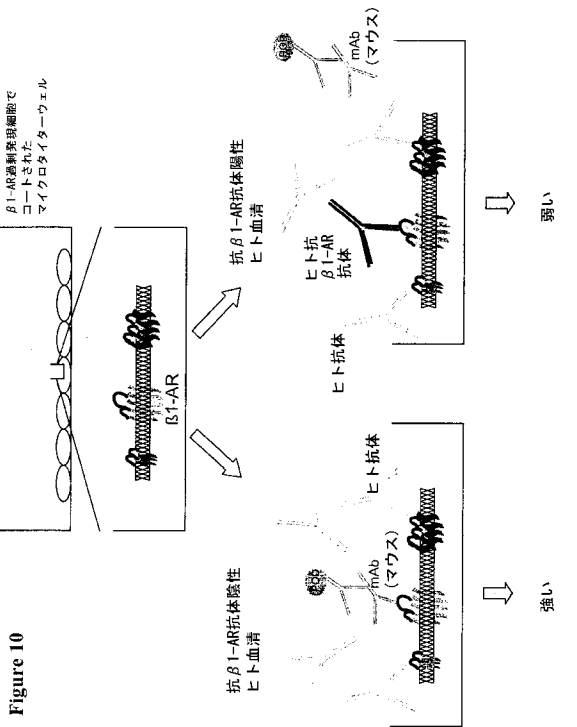


Figure 10

【図 1 1】

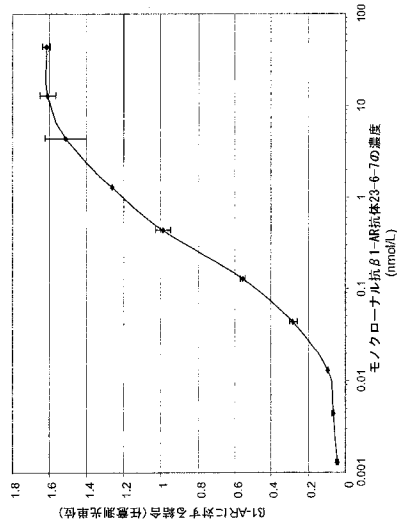


Figure 11

【図 1 3】

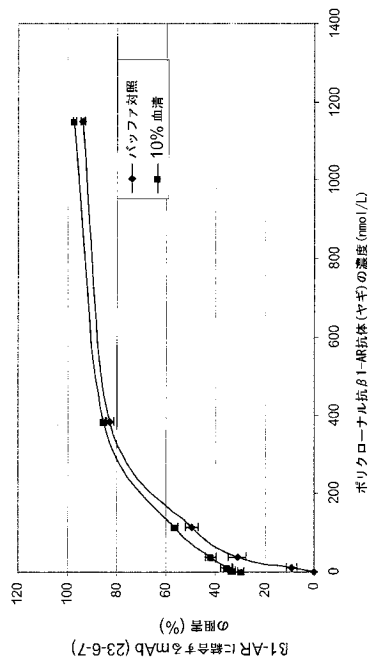


Figure 13

【図 1 2】

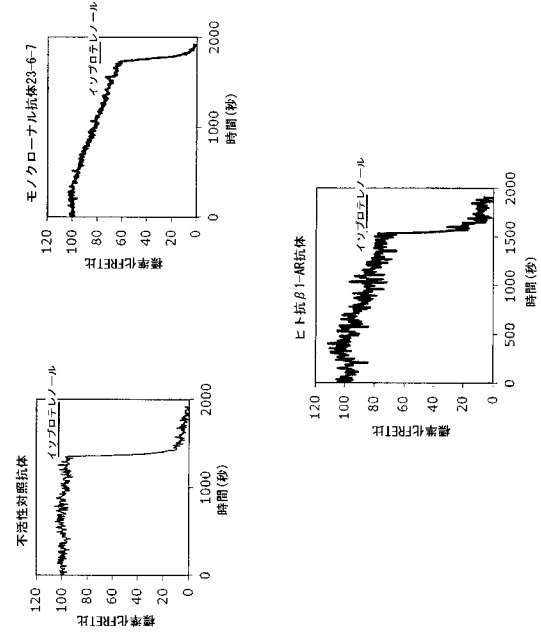


Figure 12

【図 1 4 A】

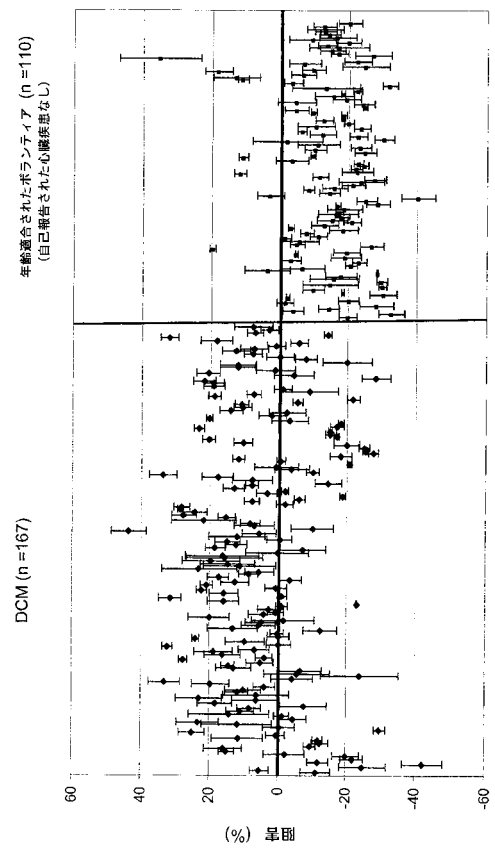
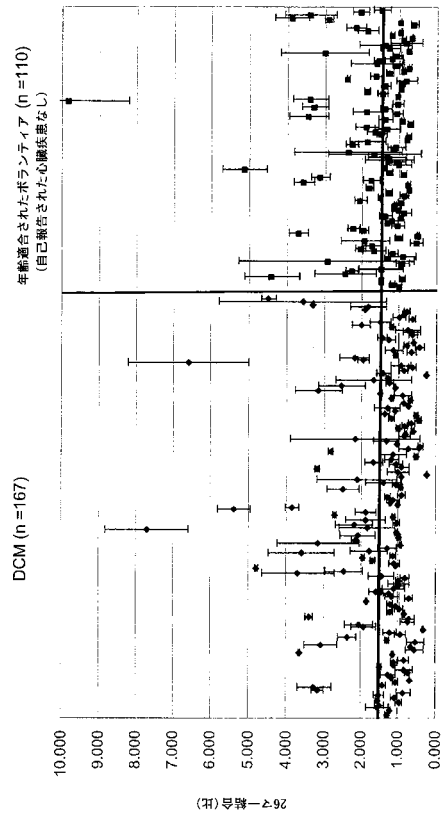


Figure 14 A

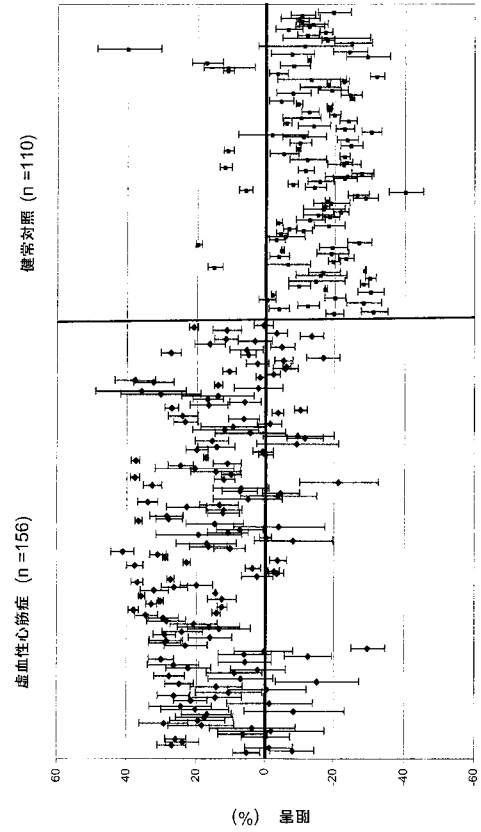
【図 14 B】

Figure 14 B



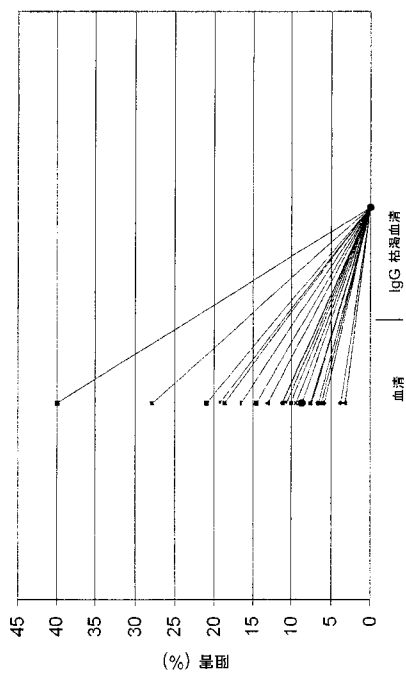
【図 14 C】

Figure 14 C



【図 15】

Figure 15



【配列表】

2014519329000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/060776

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 G01N33/564  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, 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         | JAHNS R ET AL: "MODULATION OF BETA1-ADRENOCEPTOR ACTIVITY BY DOMAIN-SPECIFIC ANTIBODIES AND HEART FAILURE-ASSOCIATED AUTONATIBODIES", JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 36, no. 4, 1 October 2000 (2000-10-01), pages 1280-1287, XP009072151, ISSN: 0735-1097, DOI: 10.1016/S0735-1097(00)00881-0 whole document, especially the Abstract; pages 1280-1281; pages 1281-1282, paragraph "Enzyme-linked immunoassay"<br>-----<br>-/-- | 1-12,<br>15-26,<br>28-38,<br>40-44 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 August 2012

Date of mailing of the international search report

07/09/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Luyten, Kattie

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/060776

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Relevant to claim No.              |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| X         | JAHNS R ET AL: "AUTOANTIBODIES ACTIVATING HUMAN .BETA.1-ADRENERGIC RECEPTORS ARE ASSOCIATED WITH REDUCED CARDIAC FUNCTION IN CHRONIC HEART FAILURE", CIRCULATION, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, US, vol. 99, no. 5, 9 February 1999 (1999-02-09), pages 649-654, XP009072150, ISSN: 0009-7322 cited in the application whole document, especially the Abstract; page 650, first full paragraph; page 651, last full paragraph               | 1-12,<br>15-26,<br>28-38,<br>40-44 |
| X         | MAGNUSSON Y ET AL: "Functional analysis of rabbit anti-peptide antibodies which mimic autoantibodies against the betal-adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy", JOURNAL OF AUTOIMMUNITY, LONDON, GB, vol. 4, no. 6, 1 December 1991 (1991-12-01), pages 893-905, XP022992951, ISSN: 0896-8411, DOI: 10.1016/0896-8411(91)90052-E [retrieved on 1991-12-01] whole document, especially the Abstract; page 894 | 1-12,<br>15-26,<br>28-38,<br>40-44 |
| X         | YVONNE MAGNUSSON ET AL: "Mapping of a Functional Autoimmune Epitope on the betal-Adrenergic Receptor in Patients with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy", J. CLIN. INVEST., vol. 86, 1 November 1990 (1990-11-01), pages 1658-1663, XP55036458, cited in the application whole document, especially the Abstract; page 1659, left-hand column                                                                                                | 1-12,<br>15-26,<br>28-38,<br>40-44 |
| X         | REZA MOBINI ET AL: "A Monoclonal Antibody Directed Against an Autoimmune Epitope on the Human betal-Adrenergic Receptor Recognized in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy", HYBRIDOMA, vol. 19, no. 2, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 135-142, XP55036305, whole document, especially the Abstract; page 136                                                                                                                               | 1-12,<br>15-26,<br>28-38,<br>40-44 |

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.                    | F I                    | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|------------------------|-------------|
| <b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>   | C 1 2 N 1/21           |             |
| <b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>   | C 1 2 N 5/00 1 0 1     |             |
| <b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 5/00 1 0 2     |             |
| <b>C 0 7 K 16/28 (2006.01)</b>  | C 1 2 P 21/08          |             |
| <b>G 0 1 N 33/566 (2006.01)</b> | C 0 7 K 16/28          |             |
| <b>G 0 1 N 33/543 (2006.01)</b> | G 0 1 N 33/566         |             |
| <b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>  | G 0 1 N 33/543 5 1 1 D |             |
|                                 | G 0 1 N 33/53 N        |             |

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(72) 発明者 ツェイピーク, シュテファン  
ドイツ連邦共和国 グレーフェルフィンゲ 8 2 1 6 6 ヘルマン - フンメル - シュトラーセ 1  
0

(72) 発明者 ローゼ, マルティン ヨット.  
ドイツ連邦共和国 ヴュルツブルク 9 7 0 7 4 ジルヒェルシュトラーセ 4 2

(72) 発明者 ヤーンズ, ローラント  
ドイツ連邦共和国 ヴュルツブルク 9 7 0 7 8 モーンシュトラーセ 2 0

(72) 発明者 ヤーンズ, ヴァレリー  
ドイツ連邦共和国 ヴュルツブルク 9 7 0 7 8 モーンシュトラーセ 2 0

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA44 CA01 DA02 GA11 HA01 HA15  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QQ96 QR01 QR48 QR55  
QS26 QS28 QS33 QX02  
4B064 AG27 CA20 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA90X AA93Y AB01 AB07 AC14 BA02 BA08 CA25 CA44 CA46  
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 人β1肾上腺素受体 ( β1-AR ) 的结合化合物及其在测定自身抗β1-AR抗体中的应用                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2014519329A</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 公开(公告)日 | 2014-08-14 |
| 申请号            | JP2014514061                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 申请日     | 2012-06-06 |
| [标]申请(专利权)人(译) | CORIMMUN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | Korimun有限公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| [标]发明人         | ホルトホフハンスペーター<br>ウンゲラーマルティン<br>ツェイビークシュテファン<br>ローゼマルティンヨット<br>ヤーンスローラント<br>ヤーンスヴァレリー                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| 发明人            | ホルトホフ,ハンス-ペーター<br>ウンゲラー,マルティン<br>ツェイビーク,シュテファン<br>ローゼ,マルティン ヨット.<br>ヤーンス,ローラント<br>ヤーンス,ヴァレリー                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/25 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/28 G01N33/566 G01N33/543 G01N33/53                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/74 C07K16/286 C07K16/2869 C07K2317/34 C07K2317/92 G01N33/6893 G01N33/9433 G01N2800/325                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.ZNA.A C12Q1/02 C12Q1/25 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12P21/08 C07K16/28 G01N33/566 G01N33/543.511.D G01N33/53.N                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR01 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS26 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB07 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 |         |            |
| 优先权            | 2011169621 2011-06-10 EP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |            |

#### 摘要(译)

本公开涉及与人β1-肾上腺素受体 ( β1-AR-ECII ) 的第二细胞外环结合的结合化合物/抗体，其由宿主细胞/杂交瘤产生/可从宿主细胞/杂交瘤产生，其中保藏号选自下组：DSM ACC3121，DSM ACC3174，DSM ACC3175，DSM ACC3176和DSM AC-C3177。结合化合物/抗体特别可用于在体外基于细胞的测定系统中测定自身抗-β1-AR抗体，以表征和鉴定生物样品中针对β1-AR-ECII的自身抗体。本公开内容的其他方面是编码所述结合化合物/抗体的核酸分子，载体，宿主细胞，产生本公开的结合化合物/抗体的方法以及包含本公开的结合化合物/抗体的试剂盒。

Figure 10

