

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5730200号
(P5730200)

(45) 発行日 平成27年6月3日(2015.6.3)

(24) 登録日 平成27年4月17日(2015.4.17)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)C07K 16/18
G01N 33/53
C12N 15/00Z N A
D
A

請求項の数 5 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2011-522119 (P2011-522119)
 (86) (22) 出願日 平成21年7月29日 (2009.7.29)
 (65) 公表番号 特表2011-530514 (P2011-530514A)
 (43) 公表日 平成23年12月22日 (2011.12.22)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2009/052044
 (87) 國際公開番号 WO2010/017070
 (87) 國際公開日 平成22年2月11日 (2010.2.11)
 審査請求日 平成24年3月29日 (2012.3.29)
 (31) 優先権主張番号 61/086,557
 (32) 優先日 平成20年8月6日 (2008.8.6)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 594197872
 イーライ リリー アンド カンパニー
 アメリカ合衆国 インディアナ州 462
 85 インディアナポリス リリー コー
 ポレイト センター (番地なし)
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100156111
 弁理士 山中 伸一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗ヘプシジン-25選択的抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1に示すアミノ酸配列からなるヒトヘプシジン-25に選択的に結合する、軽鎖可変領域(LCVR)ポリペプチドおよび重鎖可変領域(HCVR)ポリペプチドを含むモノクローナル抗体であって、

(i) 前記LCVRおよび前記HCVRポリペプチドが、それぞれ配列番号59および58に示すアミノ酸配列を有するか；または

(ii) 前記LCVRおよび前記HCVRポリペプチドが、それぞれ配列番号62および58に示すアミノ酸配列を有する、抗体。

【請求項2】

(i) 配列番号76および77にそれぞれ示すアミノ酸配列；または(ii)配列番号76および80にそれぞれ示すアミノ酸配列、を有する重鎖および軽鎖を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

組織または生体液のサンプル中のヘプシジン-25タンパク質の量を定量化するための方法であって、

(i) 固体支持体を、(a)請求項1または2に記載の一次抗体、または(b)配列番号1で示されるアミノ酸配列のアミノ酸5～25(5および25を含む)内に含まれるエピトープに結合する一次抗体でコーティングする工程と、

(ii) 前記サンプルを、前記抗体でコーティングされた固体支持体に付与する工程と

- 、
- (i i i) 未結合のサンプルを除去する工程と、
- (i v) 工程 (i) における前記一次抗体が (a) である場合、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸 5 ~ 25 内に含まれるエピトープに結合する二次抗体を前記固体支持体に付与する工程、または工程 (i) における前記一次抗体が (b) である場合、請求項 1 または 2 に記載の二次抗体を前記固体支持体に付与する工程と、
- (v) 未結合の二次抗体を除去する工程と、
- (v i) 定量的に、前記サンプル中の前記二次抗体に結合されたヘプシジン - 25 の量を検出する工程と、
- を含み、前記一次抗体または前記二次抗体が、配列番号 82 および 83 に示すアミノ酸配列を有する軽鎖および重鎖を含む、方法。 10
- 【請求項 4】**
- 前記サンプルが、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液 (CSF) 、羊水、唾液、汗、腹水、リンパ液、囊胞液、母乳、創傷液、またはそれらに由来し、前記サンプルは、酵素免疫測定法 (EIA) 、ELISA、サンドイッチELISA アッセイ、ラジオイムノアッセイ、沈澱反応または蛍光免疫測定法において、前記抗体と接触する、請求項 3 に記載の方法。 20
- 【請求項 5】**
- 請求項 1 または 2 に記載の抗体を含む、ヘプシジン - 25 を検出または定量化するためのキット。
- 【発明の詳細な説明】**
- 【技術分野】**
- 【0001】**
- 本発明は医薬分野、特にヒトヘプシジン - 25 に対する抗体の分野である。より具体的には、本発明は、抗ヘプシジン - 25 選択的抗体を、それを必要とする患者に投与することによる、貧血などの特定の疾患の治療に関する。本発明はさらに、ヘプシジン - 25 を検出および / または高レベルのヘプシジン - 25 によって特徴付けられる疾患状態を診断するための方法ならびにキットに関する。 30
- 【背景技術】**
- 【0002】**
- 肝細胞によって主に発現されるポリペプチドである、ヒトヘプシジンは、腸からの鉄吸収、マクロファージによって再利用する鉄、および肝臓の鉄貯蔵からの鉄動員を負に調節する重要な鉄調節タンパク質であると考えられている。ヘプシジンの過剰生産は、貧血の病態生理および / または慢性疾患の貧血において重要な役割を果たすように見える。 40
- 【0003】**
- 現在、貧血および / または慢性疾患の貧血のための適かつ効果的な治療は限定されている。特に、エリスロポエチン投与が、全ての患者の約 50 % のみに効果的であり、望ましくない副作用に関連する。さらに、輸血は、汚染、感染および鉄過剰負荷のために望ましくない。
- 【0004】**
- ヒトヘプシジンは、典型的な N 末端の 24 アミノ酸の小胞体標的シグナル配列、およびコンセンサスのフリン切断部位を有する 35 アミノ酸のプロ領域、直後に C 末端の 25 アミノ酸の生物活性鉄調節ホルモンを含む 84 アミノ酸プレプロペプチド (ヘプシジン - 25 、配列番号 1) としてコードされる。ヘプシジン - 20 (例えばヒトに関して、配列番号 1 のアミノ酸 6 ~ 25) およびヘプシジン - 22 (例えばヒトに関して、配列番号 1 のアミノ酸 4 ~ 25) などのヘプシジンの様々な N 末端切断型もまた、インビボにおいて形成することが知られている。しかしながら、ヘプシジン - 25 は、(これのみではないが) ヒトにおけるヘプシジンの大部分の生理学的に関連した形態であると考えられる。前駆体または切断型とは対照的に、ヘプシジン - 25 の濃度を選択的に調節する治療が特に望まれる。特に、前駆体または切断型とは対照的にヘプシジン - 25 に選択的に結合する抗 50

体は、高レベルのヘプシジン - 25 に関する障害の治療または診断において多くの利点を与える。例えば、非選択的ヘプシジン抗体と比較して、高親和性のヘプシジン - 25 選択的抗体は、ヘプシジンの生理学的に関連しない形態に治療抗体が結合しないため、副作用の危険性を減少させ、有効な治療に必要とされる臨床用量は、より低くなる。ヘプシジンに対する非ヒトポリクローナルおよびモノクローナル抗体は以前に報告されている（例えば、特許文献1、特許文献2および特許文献3を参照のこと）が、ヘプシジン - 25 に選択的に結合するモノクローナル抗体についての重要な必要性が当該技術分野において依然として存在する。従って、本発明の一態様は、ヘプシジン - 25 を含むアミノ酸1～7内のヒトヘプシジン - 25 に選択的に結合する抗体の提供である。そのような抗体は、貧血などの疾患、状態または障害を治療するために、ヒトにおける血清鉄レベル、網状赤血球数、赤血球数、ヘモグロビン、および/またはヘマトクリットを増加させるのに有用である。

【0005】

さらに、ヘプシジンについての既存の免疫学的検定は、活性な生理学的に関連するヘプシジン - 25 と不活性な生理学的に関連しないヘプシジン種とを区別しない（例えば非特許文献1、非特許文献2および非特許文献3を参照のこと）。現在、ヘプシジン - 25 についての選択的アッセイに一般に利用可能な唯一の方法は、LC/MS（液体クロマトグラフィー/質量分析）または種々のヘプシジンの形態の分離を必要とする同様の煩雑な方法を含む（例えば非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6を参照のこと）。それらのアッセイは正確かつ精密であり得るが、必要とされるそれらの複雑性、費用、および高いレベルの操作者の専門知識により、それらの慣用の実施が妨げられる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許出願公開第2006/0019339号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2007/0224186号明細書

【特許文献3】米国特許出願公開第2008/0213277号明細書

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Kemna, E. H.ら, Haematologica, 2008年, 93(1), p. 90-7

【非特許文献2】Roe M. A.ら, Br J Nutr., 2007年, 97, p. 544-9

【非特許文献3】Luukkonen S.およびPunnonen K., Clin Chem Lab Med., 2006年, 44, 1361-2

【非特許文献4】Gutierrez, J. A.ら, Biotechniques, 2005年, 38, S13-S17

【非特許文献5】Murphyら, Blood, 2007年, 110, p1048-54

【非特許文献6】Kemna, E. H.ら, Clin. Chem., 2007年, 53, p620-8

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従って、ヘプシジン - 25 の検出または測定のための免疫学的検定におけるそれらの適用のための高親和性でヒトヘプシジン - 25 に選択的に結合する抗体についての重要な必要性も存在する。従って、本発明の別の態様は、哺乳動物組織および生体液中のヘプシジン - 25 の検出および測定のための比較的簡単で、さらに高度に感受性があり、強力で、選択的な免疫学的検定においてヘプシジン - 25 選択的抗体を用いる方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

10

20

40

50

本発明は、ヘプシジン - 25 を含むアミノ酸 1 ~ 7 内のヒトヘプシジン - 25 に選択的に結合する抗体を提供する。一実施形態において、本発明の抗体は、関連する前駆体および切断ポリペプチドとは対照的に、配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドに選択的に結合し、(i) 配列番号 9、10、11、32、33 および 34 にそれぞれ示すアミノ酸配列を有する L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3；(i i) 配列番号 12、13、14、35、36 および 37 にそれぞれ示すアミノ酸配列を有する L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3；(i i i) 配列番号 45、13、14、35、36 および 37 にそれぞれ示すアミノ酸配列を有する L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3；(i v) 配列番号 12、13、14、38、36 および 37 にそれぞれ示すアミノ酸配列を有する L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3；(v) 配列番号 15、10、16、39、40 および 41 にそれぞれ示すアミノ酸配列を有する L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3；(v i) 配列番号 20、21、22、42、43 および 44 にそれぞれ示すアミノ酸配列を有する L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3；(v i i) 配列番号 20、21、23、42、43 および 44 にそれぞれ示すアミノ酸配列を有する L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3；(v i i i) 配列番号 24、25、23、42、43 および 44 にそれぞれ示すアミノ酸配列を有する L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3；(i x) 配列番号 26、25、27、42、43 および 44 にそれぞれ示すアミノ酸配列を有する L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3；ならびに(x) 配列番号 26、25、28、42、43 および 44 にそれぞれ示すアミノ酸配列を有する L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 からなる群より選択される 6 つの C D R を含む。
10

【0010】

別の実施形態において、本発明の抗体は、ヒトヘプシジン - 25、すなわち配列番号 1 の D T H F P I C または齧歯動物ヘプシジン - 25 (配列番号 2 もしくは 3) の D T N F P I C を含むアミノ酸 1 ~ 7 内に含まれるエピトープに結合する。好ましくは、本発明の抗体は、軽鎖可変領域 (「L C V R」) ポリペプチドおよび重鎖可変領域 (「H C V R」) ポリペプチドを含み、ここで、(i) L C V R および H C V R ポリペプチドは、それぞれ配列番号 48 および 49 に示すアミノ酸配列を有するか；(i i) L C V R および H C V R ポリペプチドは、それぞれ配列番号 50 および 51 に示すアミノ酸配列を有するか；(i i i) L C V R および H C V R ポリペプチドは、それぞれ配列番号 52 および 51 に示すアミノ酸配列を有するか；(i v) L C V R および H C V R は、それぞれ配列番号 53 および 54 に示すアミノ酸配列を有するか；(v) L C V R および H C V R は、それぞれ配列番号 55 および 56 に示すアミノ酸配列を有するか；(v i) L C V R および H C V R は、それぞれ配列番号 59 および 58 に示すアミノ酸配列を有するか；(v i i) L C V R および H C V R は、それぞれ配列番号 60 および 58 に示すアミノ酸配列を有するか；(v i i i) L C V R および H C V R は、それぞれ配列番号 61 および 58 に示すアミノ酸配列を有するか；(i x) L C V R および H C V R は、それぞれ配列番号 62 および 58 に示すアミノ酸配列を有するか；または(x) L C V R および H C V R は、それぞれ配列番号 63 および 58 に示すアミノ酸配列を有する。
20

【0011】

他の実施形態において、本発明は、本発明の抗体をコードする単離された核酸分子；必要に応じて、ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識される制御配列に作動可能に連結された、本発明の抗体をコードする核酸分子を含むベクター；本発明の抗体をコードする核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞；本発明の抗体をコードする核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、それによって、核酸が発現する工程、および必要に応じて、宿主細胞培地から抗体を回収する工程を含む本発明の抗体を産生するためのプロ
40

セスを提供する。

【0012】

別の実施形態において、本発明は、本発明の抗体および薬理学的に許容可能な担体または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。好ましくは、医薬組成物は、本発明のモノクローナル抗体の均一または実質的に均一な集団および薬理学的に許容可能な担体または希釈剤を含む。

【0013】

別の実施形態において、本発明は、治療に使用するための成熟ヒトヘプシジンに選択的に結合するヒト遺伝子操作モノクローナル抗体を提供する。

【0014】

別の実施形態において、本発明は、ヒト対象における貧血を治療または予防する際に使用するための成熟ヒトヘプシジンに選択的に結合するヒト遺伝子操作モノクローナル抗体を提供する。

【0015】

本発明はまた、医薬の調製のための成熟ヒトヘプシジンに選択的に結合するヒト遺伝子操作モノクローナル抗体の使用を具現化する。本発明はさらに、動物、好ましくは哺乳動物種、より好ましくはヒト対象における血清鉄レベル、網状赤血球数、赤血球数、ヘモグロビン、および／またはヘマトクリットを増加させるための方法において成熟ヒトヘプシジンに選択的に結合するヒト遺伝子操作モノクローナル抗体の使用を具現化する。

【0016】

本発明はさらに、血清鉄レベル、網状赤血球数、赤血球数、ヘモグロビン、および／またはヘマトクリットを増加させる方法を提供し、その方法は、それを必要とするヒト対象に、成熟ヒトヘプシジンに結合する有効量のヒト遺伝子操作モノクローナル抗体を投与する工程を含む。

【0017】

本発明の別の実施形態は、限定されないが、貧血、例えば感染、炎症、慢性疾患および／または癌に起因する貧血を含む、血清鉄レベル、網状赤血球数、赤血球数、ヘモグロビン、および／またはヘマトクリットの増加から利益を受ける、ヒト対象における疾患、状態または障害を治療するための方法を提供する。

【0018】

本発明はまた、哺乳動物から得られる組織または生体液のサンプル中のヘプシジン-25の量を測定するための方法を提供し、その方法は、以下の工程：(i)前記動物から組織または生体液のサンプルを得る工程；(ii)前記サンプルを、ヘプシジン-25選択的抗体またはそのフラグメントと接触させる工程；および(iii)定量的、半定量的または定性的手段によって、直接的または間接的に前記サンプル中のヘプシジン-25の量を検出する工程を含む。

【0019】

別の実施形態において、本発明の抗体は、哺乳動物から得た組織または生体液のサンプル中のヘプシジン-25タンパク質の量を定量化するのに有用であり、(i)固体支持体を、配列番号1、配列番号3(マウス5～25)または配列番号2(ラット5～25)を含むアミノ酸5～25内に含まれるエピトープに結合する一次抗体でコーティングする工程；(ii)前記哺乳動物から組織または生体液の試験サンプルを得る工程；(iii)試験サンプルを、抗体でコーティングされた固体支持体に付与する工程；(iv)任意のヘプシジンの存在により、ヘプシジン-一次抗体が結合するための適切な条件下でヘプシジン-一次抗体複合体を形成させる工程；(v)未結合のサンプルを除去する工程；(vi)ヒトまたは齧歯動物ヘプシジン-25、すなわちそれぞれDTHFPI CまたはDTNFPI Cを含むアミノ酸1～7内に含まれるエピトープに結合する二次抗体を、固体支持体に付与する工程；(vii)任意のヘプシジン-25の存在により、任意のヘプシジン-25-一次抗体複合体に結合する二次抗体のための適切な条件下で二次抗体-ヘプシジン-25-一次抗体複合体を形成させる工程；(viii)未結合の二次抗体を除去する工程

10

20

30

40

50

; ならびに (v i) 二次抗体の存在または非存在を検出する工程を含む。二次抗体の存在または非存在は、直接的または間接的のいずれかで検出されてもよく、定量的、半定量的、または定性的に測定されてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、抗ヘプシジン-25選択的Mab 3.23を用いてヒト血清から免疫沈降したヒトヘプシジンの形態のMALDI-TOFマススペクトルを示す。シグナル1は、インタクトなヒトヘプシジン-25の予想される質量と一致する質量(およそ2790ダルトン(Da)の分子量(MW))を有する。シグナル2は、インタクトなヒトヘプシジン-20の予想される質量と一致する質量(2192DaのMW)を有する。クロマトグラムが示すように、抗ヘプシジン-25 Mab 3.23は、検出可能な量のヘプシジン-25および非常に少ない量のヘプシジン-20に結合した。Mab 3.23は、検出可能なレベルのヘプシジン-22(MW 2436Da)、ヘプシジン-24(MW 2674Da)またはプロヘプシジン(MW 6929Da)に結合するように見えなかった。マススペクトルは、以下の実施例6に本質的に記載されるサンプルマトリクスとしてa-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸(ペプチドマトリクス)を用いる、陽イオン、線形モード法を利用するMALDI-TOF質量分析計で生成された。

【図2】図2は、関連領域(MW 2000~3000Da)における図1に示すマススペクトルの拡大図を示す。クロマトグラムが示すように、Mab 3.23は、ヘプシジン-25(シグナル1)に結合し、非常に少ない程度でヘプシジン-20(シグナル2)に結合した。抗ヘプシジン選択的Mab 3.23は、検出可能なレベルのヘプシジン-22(MW 2436Da)またはヘプシジン-24(MW 2674Da)に結合するように見えなかった。

【図3】図3は、抗ヘプシジン-25選択的Mab 5E8を用いてヒト血清から免疫沈降されたヒトヘプシジンの形態のMALDI-TOFマススペクトルを示す。シグナル1は、インタクトなヒトヘプシジン-25(2790Da)の予想される質量と一致する質量を有する。クロマトグラムが示すように、抗ヘプシジン-25 Mab 5E8は、検出可能な量のヘプシジン-25のみに結合した。マススペクトルは、以下の実施例6に本質的に記載されるサンプルマトリクスとしてa-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸(ペプチドマトリクス)を用いる、陽イオン、線形モード法を利用するMALDI-TOF質量分析計で生成された。

【図4】図4は、関連領域(MW 2000~3000Da)における図1に示すマススペクトルの拡大図を示す。クロマトグラムが示すように、Mab 5E8は、検出可能な量のヘプシジン-25(シグナル1)に結合した。Mab 5E8は、検出可能なレベルのヘプシジン-20(2192DaのMW)、ヘプシジン-22(2436DaのMW)、ヘプシジン-24(2674DaのMW)、またはプロヘプシジン(6929DaのMW)に結合しなかった。

【図5】図5は、10μg/L(10ng/mL)の濃度で開始する合成されたヘプシジン-25(黒丸)を連続希釈し、実施例8に記載されるMSD免疫学的検定を実施することによって生成されたヘプシジン-25についての検量線のグラフを示す。MSD免疫学的検定はヘプシジン-25に特異的であり、ヘプシジン-20(黒三角)またはヘプシジン-22(白丸)を認識しなかった。

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下の略語が本明細書中で使用される：ACN：アセトニトリル、BSA：ウシ血清アルブミン、DTT：ジチオスレイトール、EDTA：エチレンジアミン四酢酸、ELISA：酵素免疫測定法、IMAC：固定化金属アフィニティークロマトグラフィー、IPTG：イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド、Mab：モノクローナル抗体、Mabs：複数のモノクローナル抗体、MALDI-TOF：マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間、PBS：リン酸緩衝生理食塩水、SPR：表面プラズモン共鳴、T

10

20

30

40

50

F A : トリフルオロ酢酸。この文献に使用される全てのアミノ酸の略語は、37 C . F . R . § 1 . 8 2 2 (B) (2) に記載されるように米国特許商標局によって受容されているものである。

【 0 0 2 2 】

本発明は、ヘプシジン - 25 を含むアミノ酸 1 ~ 7 内に含まれるエピトープを標的化することによってヘプシジン - 25 に選択的に結合する抗体を提供する。そのような抗体は、貧血などの疾患、状態または障害の治療のために、ヒトにおける血清鉄レベル、網状赤血球数、赤血球数、ヘモグロビン、および / またはヘマトクリットを増加させるのに有用である。さらに、本発明は、哺乳動物の組織および生体液におけるヘプシジン - 25 の検出および / または測定のために、比較的簡単で、さらに高度に感受性があり、選択的な免疫学的検定において、そのような抗体を使用する方法を提供する。

【 0 0 2 3 】

本明細書に使用される場合、用語「ヘプシジン」とは、哺乳動物において存在することが知られているヘプシジンタンパク質の任意の形態を指す。本明細書に使用される場合、用語「成熟ヘプシジン」とは、哺乳動物において発現されるヘプシジンタンパク質の任意の成熟な生物学的形態を指す。本明細書に使用される場合、用語「ヒトヘプシジン」とは、ヒトに存在するヘプシジンタンパク質の任意の形態を指す。本明細書に使用される場合、用語「ヒトヘプシジン - 25 」とは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するヒトヘプシジンの成熟形態を指す。

【 0 0 2 4 】

抗体の一般構造は当該技術分野において非常に周知である。IgG タイプの抗体に関して、鎖内および鎖間ジスルフィド結合によって架橋される 4 つのアミノ酸鎖（2 つの「重」鎖および 2 つの「軽」鎖）が存在する。特定の生物学的系において発現される場合、未修飾のヒト Fc 配列を有する抗体は、Fc 領域においてグリコシル化される。抗体は同様に他の位置においてグリコシル化され得る。抗体のサブユニット構造および三次元配置は当該技術分野において周知である。各々の重鎖は、N 末端の重鎖可変領域（「H C V R 」）および重鎖定常領域（「H C C R 」）から構成される。重鎖定常領域は、IgG、IgD および IgA に関して 3 つのドメイン（C H 1、C H 2 および C H 3 ）；ならびに IgM および IgE に関して 4 つのドメイン（C H 1、C H 2、C H 3 および C H 4 ）から構成される。各々の軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書中で「L C V R 」）および軽鎖定常領域（「L C C R 」）から構成される。

【 0 0 2 5 】

各々の軽 / 重鎖対の可変領域は抗体結合部位を形成する。H C V R および L C V R 領域はさらに、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変性の領域、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる、より保存される散在した領域に細分され得る。各々の H C V R および L C V R は、以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 でアミノ末端からカルボキシ末端に並ぶ 3 つの CDR および 4 つの FR から構成される。本明細書中で、重鎖の 3 つの CDR は、「CDRH1、CDRH2 および CDRH3」と呼ばれ、軽鎖の 3 つの CDR は、「CDRL1、CDRL2 および CDRL3」と呼ばれる。CDR は抗原と特異的相互作用を形成する大部分の残基を含む。各ドメインに対するアミノ酸の指定は、周知の慣用法に従う（例えば、Kabat, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。

【 0 0 2 6 】

本発明の抗体は、免疫グロブリンクラス（IgA、IgD、IgG、IgM および IgE）のいずれかから選択される重鎖定常領域を有し得る。好ましくは、本発明の抗体は、ヒトまたはマウス IgG Fc 領域に由来する定常領域を含む。

【 0 0 2 7 】

用語「モノクローナル抗体」とは、例えば任意の真核生物、原核生物またはファージク

10

20

30

40

50

ローンを含む、単一のコピーまたはクローンに由来する抗体を指し、それが産生される方法ではない。好ましくは、本発明のモノクローナル抗体は、均一または実質的に均一の集団中に存在する。

【0028】

本発明の抗体はインタクトであり得る。すなわち、任意の短縮形態が抗原結合部分を含み、抗原結合能力を保有する場合、そのような抗体のFc領域、または一部もしくはフラグメントを含む、完全または十分な長さの定常領域を含む。そのような短縮形態としては、例えば、開示される抗ヘブシジン-25選択的抗体のCDRまたは可変領域を含むFabフラグメント、Fab'フラグメントまたはF(ab')2フラグメントが挙げられる。さらに、そのような短縮形態の抗体は、LCVRおよびHCVRをコードするDNAとリンカー配列とを結合することによって産生され得る一本鎖Fvフラグメントであり得る(Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp 269-315, 1994を参照のこと)。フラグメントまたは部分が指定されているか否かに関わらず、本明細書に使用される用語「抗体」は、他に示されない限り、そのようなフラグメントまたは部分および一本鎖形態を含む。タンパク質部分またはタンパク質フラグメントが、ヘブシジン-25に選択的に結合し、インビポまたはインピトロにおける哺乳動物のヘブシジン-25の1つ以上の生物活性特性を中和する能力を保有する限り、それは用語「抗体」に含まれる。

10

20

【0029】

本発明の抗体は、当該技術分野において周知の技術、例えば組み換え技術、ファージディスプレイ技術、合成技術またはそのような技術の組み合わせあるいは当該技術分野において容易に知られる他の技術を用いて産生され得る(例えば、Jayasena, S. D. et al., Clin. Chem., 45:1628-50 (1999) およびFellouse, F. A. et al., J. Mol. Biol., 373(4):924-40 (2007)を参照のこと)。

【0030】

以下の表1および表2は本発明の抗体についての好適なCDRを示す。

【0031】

30

【表1】

表1

Fab	LCDR1	LCDR2	LCDR3	
コンセンサス1	SASSSX ₁ SX ₂ MY (配列番号: 6)	LTSX ₃ LAS (配列番号: 7)	QQWSSX ₄ PPT (配列番号: 8)	
4C11	SASSSVSYMY (配列番号: 9)	LTSNLAS (配列番号: 10)	QQWSSNPPT (配列番号: 11)	
1G8	SASSSASYMY (配列番号: 12)	LTSHLAS (配列番号: 13)	QQWSSGPPT (配列番号: 14)	10
1B4	SASPSVSYMY (配列番号: 45)	LTSHLAS (配列番号: 13)	QQWSSGPPT (配列番号: 14)	
1E3	SASSSASYMY (配列番号: 12)	LTSHLAS (配列番号: 13)	QQWSSGPPT (配列番号: 14)	
3A9	SASSSVSSMY (配列番号: 15)	LTSNLAS (配列番号: 10)	QQWSSYPPT (配列番号: 16)	
コンセンサス 2	KSSQSLLYX ₅ NGKTYLT (配列番号: 17)	LVSKLDX ₆ (配列番号: 18)	X ₇ QGSHFPWX ₈ (配列番号: 19)	20
5E8	KSSQSLLYSNGKTYLT (配列番号: 20)	LVSKLD ₉ (配列番号: 21)	VQGSHFPWT (配列番号: 22)	
OB3	KSSQSLLYSNGKTYLT (配列番号: 20)	LVSKLD ₉ (配列番号: 21)	HQGSHFPWT (配列番号: 23)	
OB1	KSSQSLLYRNGKTYLT (配列番号: 24)	LVSKLDP (配列番号: 25)	HQGSHFPWT (配列番号: 23)	
OH4	KSSQSLLYPNGKTYLT (配列番号: 26)	LVSKLDP (配列番号: 25)	IQGSHFPWT (配列番号: 27)	30
OE1	KSSQSLLYPNGKTYLT (配列番号: 26)	LVSKLDP (配列番号: 25)	FQGSHFPWV (配列番号: 28)	

* X₁ は V または A であり、 X₂ は Y または S であり、 X₃ は N または H であり、 X₄ は N 、 G または Y であり、 X₅ は S 、 R または P であり、 X₆ は S または P であり、 X₇ は V 、 H 、 I または F であり、 X₈ は T または V である。

【0032】

【表2】

表2

Fab	HCDR1	HCDR2	HCDR3
コンセン サス	G ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ G ₁₃ G ₁₄ (配列番号:29)	HWWWN ₁₅ X ₁₆ KX ₁₇ YNTX ₁₈ LKS (配列番号:30)	I ₁₉ YYG ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ GFAY (配列番号:31)
4C11	GFSLSTYGIGVVG (配列番号:32)	HWWNDNKSNTALKS (配列番号:33)	IGYYGSTSGFAY (配列番号:34)
1G8	GYSLSTPGIGVVG (配列番号:35)	HWWNDAKSYNTALKS (配列番号:36)	IGYYGSTAGFAY (配列番号:37)
1B4	GYSLSTPGIGVVG (配列番号:35)	HWWNDAKSYNTALKS (配列番号:36)	IGYYGSTAGFAY (配列番号:37)
1E3	GLSLSTPGIGVVG (配列番号:38)	HWWNDAKSYNTALKS (配列番号:36)	IGYYGSTAGFAY (配列番号:37)
3A9	GFSLNSYCFGIG (配列番号:39)	HWWNGNKYYNTILKS (配列番号:40)	IHYYGNSYGFAY (配列番号:41)
コンセン サス2	GFAFSSYDMS (配列番号:42)	TIISGGTYTYYPDSDKG (配列番号:43)	DGYIH (配列番号:44)
5E8	GFAFSSYDMS (配列番号:42)	TIISGGTYTYYPDSDKG (配列番号:43)	DGYIH (配列番号:44)
OB3	GFAFSSYDMS (配列番号:42)	TIISGGTYTYYPDSDKG (配列番号:43)	DGYIH (配列番号:44)
OB1	GFAFSSYDMS (配列番号:42)	TIISGGTYTYYPDSDKG (配列番号:43)	DGYIH (配列番号:44)
OH4	GFAFSSYDMS (配列番号:42)	TIISGGTYTYYPDSDKG (配列番号:43)	DGYIH (配列番号:44)
OE1	GFAFSSYDMS (配列番号:42)	TIISGGTYTYYPDSDKG (配列番号:43)	DGYIH (配列番号:44)

* X₉ は F、Y または L であり、X₁₀ は S または N であり、X₁₁ は T または S であり、X₁₂ は Y または P であり、X₁₃ は I または F であり、X₁₄ は V、または I であり、X₁₅ は D または G であり、X₁₆ は A または N であり、X₁₇ は S または Y であり、X₁₈ は A または T であり、X₁₉ は G または H であり、X₂₀ は S または N であり、X₂₁ は T または S であり、X₂₂ は S、A または Y である。

【0033】

本発明は、限定されないが、

a) 以下を含む軽鎖可変領域；

i) 配列番号 6、9、12、45、15、17、20、24 および 26 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する L C D R 1；

ii) 配列番号 7、10、13、18、21 および 25 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する L C D R 2；および

iii) 配列番号 8、11、14、16、19、22、23、17 および 28 からな

10

20

30

40

50

る群より選択されるアミノ酸配列を有するLCDR3；ならびに

b) 以下を含む重鎖可変領域；

i) 配列番号29、32、35、38、39および42からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCDR1；

ii) 配列番号30、33、36、40および43からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCDR2；および

iii) 配列番号31、24、27、41および44からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCDR3、

を含む抗体を含む。

【0034】

10

あるいは、本発明の好適な抗体は、

a) 以下を含むLCVR；

i) 配列番号9、12、20および26からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCDR1；

ii) 配列番号10、13、21および25からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCDR2；および

iii) 配列番号11、14、23および27からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCDR3；ならびに

b) 以下を含むHCVR；

i) 配列番号32、35および42からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCDR1；

ii) 配列番号33、36および43からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCDR2；および

iii) 配列番号34、37および44に示すアミノ酸配列を有するHCDR3、を含む。

【0035】

本発明の別の好適な抗体は、配列番号20、21、22、42、43および44にそれぞれ示すアミノ酸配列を有するLCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含む。

【0036】

30

本発明の別の好適な抗体は、配列番号26、25、28、42、43および44にそれぞれ示すアミノ酸配列を有するLCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含む。

【0037】

本発明の別の好適な抗体は、配列番号24、25、23、42、43および44にそれぞれ示すアミノ酸配列を有するLCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含む。

【0038】

本発明のより好適な抗体は、配列番号26、25、27、42、43および44にそれぞれ示すアミノ酸配列を有するLCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含む。

【0039】

本発明のさらにより好適な抗体は、配列番号9、10、11、32、33および34にそれぞれ示すアミノ酸配列を有するLCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含む。

【0040】

本発明のさらにより好適な抗体は、配列番号12、13、14、35、36および37にそれぞれ示すアミノ酸配列を有するLCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含む。

【0041】

50

本発明のさらにより好適な抗体は、配列番号45、13、14、35、36および37にそれぞれ示すアミノ酸配列を有するLCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含む。

【0042】

本発明の最も好適な抗体は、配列番号20、21、23、42、43および44にそれぞれ示すアミノ酸配列を有するLCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含む。

【0043】

本発明の最も好適な抗体は、配列番号12、13、14、38、36および37にそれぞれ示すアミノ酸配列を有するLCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含む。 10

【0044】

本発明の最も好適な抗体は、配列番号15、10、16、39、40および41にそれぞれ示すアミノ酸配列を有するLCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含む。

【0045】

本発明の好適な抗体は、配列番号46、48、50、52、53、55、57、59、60、61、62および63からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCVRを含む。本発明の別の好適な抗体は、配列番号47、49、51、54、56および58からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCVRを含む。本発明の別の好適な抗体は、配列番号59のLCVRおよび配列番号58のHCVRを含む。本発明の別の好適な抗体は、配列番号60のLCVRおよび配列番号58のHCVRを含む。本発明の別の好適な抗体は、配列番号61のLCVRおよび配列番号58のHCVRを含む。本発明の別の好適な抗体は、配列番号62のLCVRおよび配列番号58のHCVRを含む。本発明の別の好適な抗体は、配列番号63のLCVRおよび配列番号58のHCVRを含む。本発明の最も好適な抗体は、配列番号48のLCVRおよび配列番号49のHCVRを含む。本発明の別の最も好適な抗体は、配列番号55のLCVRおよび配列番号56のHCVRを含む。このようLCVRは、好ましくは、軽鎖または重鎖定常領域に連結される。 20

【0046】

本発明の好適なモノクローナル抗体は、本明細書中で4C11、1G8、1B4、1E3、3A9、2、5E8、OB3、OB1、OH4およびOE1と称される。Mabs 4C11、1G8、1B4、1E3、3A9、5E8、OB3、OB1、OH4、OE1、3.12、3.23および/またはその種々のフラグメントをコードするアミノ酸配列の配列番号を、以下の表3に提供する。 30

【0047】

【表3】

表3

Mab	LC	HC	LC VR	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HC VR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
コンセン サス1	64	65	46	6	7	8	47	29	30	31
4C11	66	67	48	9	10	11	49	32	33	34
1G8	68	69	50	12	13	14	51	35	36	37
1B4	70	69	52	45	13	14	51	35	36	37
1E3	71	72	53	12	13	14	54	38	36	37
3A9	73	74	55	15	10	16	56	39	40	41
コンセン サス2	75	76	57	17	18	19	58	42	43	44
5E8	77	76	59	20	21	22	58	42	43	44
OB3	78	76	60	20	21	23	58	42	43	44
OB1	79	76	61	24	25	23	58	42	43	44
OH4	80	76	62	26	25	27	58	42	43	44
OE1	81	76	63	26	25	28	58	42	43	44
3.23	82	83								
3.12	84	85								

【0048】

用語「エピトープ」とは、抗体の抗原結合領域の1つ以上において抗体によって認識され、結合され得る分子の部分を指す。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基からなり、通常、特定の三次元構造特性および特定の電荷特性を有する。好ましくは、本発明の抗体は、成熟ヘプシジンのN末端でエピトープに結合する。より好ましくは、本発明の抗体は、ヘプシジン-25を含むアミノ酸1~7内に含まれるエピトープに結合する。より好ましくは、本発明の抗体は、ヒトヘプシジン-25のN末端に結合する。さらにより好ましくは、本発明の抗体は、ヒトヘプシジン-25を含むアミノ酸1~7内に含まれるエピトープに結合する。最も好ましくは、本発明の抗体は、配列番号1のアミノ酸DTHFPI内に含まれるエピトープに結合する。

【0049】

本明細書に使用される場合、用語「結合親和性(K_D)」は、特定の抗原-抗体相互作用の解離速度を指すことが意図される。 K_D は、解離速度、いわゆる「オフレート(k_{off})」と、会合速度、すなわち「オンレート(k_{on})」との比である。従って、 K_D は k_{off}/k_{on} と等しく、モル濃度(M)として表される。 K_D が小さくなれば、結合親和性は強くなるということになる。従って、1μMの K_D は、1nMの K_D と比べて弱い結合親和性を示す。 K_D 値は、当該技術分野において公知の方法によって得られ得る。

【0050】

本明細書に使用される場合、本発明の抗ヘプシジン-25抗体に対して言及される用語「選択的」とは、抗体が、25にてSPRによって測定される場合、同じ哺乳動物種に存在するヘプシジン-25の少なくとも1つの前駆体型および/またはヘプシジン-25の少なくとも1つのN末端切断型に結合するより、約1000倍、500倍、200倍、100倍、50倍、10倍または約5倍低い K_D でヘプシジン-25に結合する抗体を指

10

20

30

40

50

す。さらに、または代替的に、本明細書の以下の実施例 4 ~ 8 に記載される免疫学的検定および / または M A L D I - T O F 質量分析法によってアッセイされる場合、本発明のヘプシジン - 2 5 選択的抗体はヘプシジン - 2 5 に結合するが、哺乳動物種に存在するヘプシジン - 2 5 の少なくとも 1 つの前駆体型および / またはヘプシジン - 2 5 の少なくとも 1 つの N 末端切断型に結合しないか、またはごくわずかしか結合しない。好ましくは、ヘプシジン - 2 5 の前駆体型はプロヘプシジンであり、より好ましくはヒトプロヘプシジンであり、最も好ましくは配列番号 9 0 に示すアミノ酸配列からなるヒトプロヘプシジンである。好ましくは、ヘプシジン - 2 5 の N 末端切断型は、ヒトヘプシジン - 2 0 (すなわち配列番号 1 のアミノ酸 6 ~ 2 5) またはヒトヘプシジン - 2 2 (配列番号 1 のアミノ酸 4 ~ 2 5) である。

10

【 0 0 5 1 】

用語「検出する」または「検出」は、標的分子の定量的、半定量的または定性的測定を含むように広範囲の意味で使用される。一態様において、本明細書に記載される方法は、生物学的サンプル中の特定のヘプシジンポリペプチドの存在または非存在を決定するだけであってもよく、これによって、ヘプシジンポリペプチドは、上記の方法によってアッセイされる場合、サンプル中で検出可能であるか、または検出不能である。

【 0 0 5 2 】

本発明の抗体に言及される用語「生物活性」は、限定されないが、エピトープまたは抗原結合親和性、インビボおよび / またはインビトロでの抗体の安定性、例えばヒト対象に投与される場合、抗体の免疫特性、ならびに / あるいは限定されないが炎症の動物モデル、例えば I L - 6 により誘発される炎症チャレンジアッセイにおける血清鉄レベル異常調節の阻害を含む、インビボもしくはインビトロにおけるヘプシジン - 2 5 の生物学的活性を中和または拮抗する能力を含む。上述の性質または特性は、限定されないが、シンチレーション近接アッセイ、 E L I S A 、 O R I G E N 免疫学的検定 (I G E N) 、蛍光消光、蛍光 E L I S A 、競合的 E L I S A 、限定されないが B I A c o r e バイオセンサーを用いる S P R 解析を含む S P R 解析、制限のないインビトロおよびインビボでの中和アッセイを含む、当該技術分野で認識されている技術を用いて観察または測定され得る (例えば、 P C T 国際特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 6 2 6 8 5 号を参照のこと) 。

20

【 0 0 5 3 】

ヘプシジンに言及される用語「生物活性」は、限定されないが、その受容体のフェロポーチンを含む、限定されないが、別のタンパク質に対するヘプシジンの特異的結合、ヘプシジンにより誘発されるフェロポーチンの内在化および / または分解などのヘプシジンの 1 つ以上のフェロポーチンにより媒介される機能 (例えば、 Nemeth , E. ら , H e p c i d i n R e g u l a t e s I r o n E f f l u x b y B i n d i n g t o F e r r o p o r t i n a n d I n d u c i n g I t s I n t e r n a l i z a t i o n , S c i e n c e 3 0 6 , 2 0 9 0 - 2 0 9 3 (2 0 0 4) を参照のこと) 、フェロポーチンにより媒介される鉄排出のヘプシジン調節、ヒトにおける血清鉄レベル、網状赤血球数、赤血球数、ヘモグロビン、および / またはヘマトクリットのヘプシジンにより誘発される減少、タンパク質安定性、すなわちヘプシジンにより影響を受けるインビボまたはインビボでの別のタンパク質のレベルまたは活性、ならびにヘプシジンの発現レベルおよび / または組織分布を含む。

30

【 0 0 5 4 】

本明細書に使用される場合、本発明の抗体の生物活性に対して言及される用語「阻害する」または「中和する」とは、限定されないが、ヒト、ラットまたはマウスのヘプシジン - 2 5 の生物活性を含む、ヘプシジンの生物活性を実質的に拮抗し、妨げ、防ぎ、抑制し、遅延し、分解し、除去し、停止し、減少し、または反転する抗体の能力を意味する。

40

【 0 0 5 5 】

用語「対象」および「患者」は、本明細書で交換可能に使用され、哺乳動物、好ましくはヒトを指す。特定の実施形態において、患者は、ヘプシジンの減少されたレベル、ヘプシジン生物活性の減少、および / または血清鉄レベル、網状赤血球数、赤血球数、ヘモグ

50

ロビンおよび／またはヘマトクリットの増加から利益を受ける疾患、障害、または状態を有する。

【0056】

本明細書に使用される場合、抗体とヘプシジンポリペプチドとの間の結合に対して言及される用語「特異的に結合する」とは、抗体が、25にてSPRによって測定される場合、約500nM未満のK_Dでヘプシジンポリペプチドに結合することを意味する。

【0057】

一実施形態において、本発明の抗体は、25にてSPRによって測定される場合、約100nM未満、約50nM未満、約25nM未満、約10nM未満、約5nM未満、約1nM未満、または約800pM未満の、ヒトヘプシジン-25（配列番号1）に対するK_Dを有する。好ましくは、本発明の抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、非ヒト哺乳動物種の少なくとも1つの成熟ヘプシジンポリペプチドに特異的に結合する。より好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、マウス、ラットおよびカニクイザルのヘプシジン-25（それぞれ配列番号3、2および4）からなる群より選択される少なくとも1つのヘプシジン-25ポリペプチドに特異的に結合する。さらにより好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、カニクイザルのヘプシジン-25（配列番号4）に特異的に結合する。さらにより好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、マウスおよび／またはラットのヘプシジン-25（それぞれ配列番号3および2）に特異的に結合する。

【0058】

一実施形態において、本発明の抗体は、25にてSPRによって測定される場合、約100nM未満、約50nM未満、約25nM未満、約10nM未満、約5nM未満、約1nM未満、または約800pM未満の、ヒトヘプシジン-25（配列番号1）に対するK_Dを有し、i)抗体は、25にてSPRによって測定される場合、少なくとも約200倍、約100倍、約50倍、約10倍、または約5倍高い、ヒトプロヘプシジン、ヒトヘプシジン-20（配列番号88）またはヒトヘプシジン-22（配列番号89）に対するK_Dを有するか、あるいはii)ヒトプロヘプシジン、ヒトヘプシジン-20（配列番号88）またはヒトヘプシジン-22（配列番号89）に対する抗体の結合は、実施例4～7に記載される免疫学的検定および／またはMALDI-TOF質量分析法によって検出可能でないか、またはごくわずかしか検出できない。好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、非ヒト哺乳動物種の少なくとも1つの成熟ヘプシジンポリペプチドに特異的に結合する。より好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、マウス、ラットおよびカニクイザルのヘプシジン-25（それぞれ配列番号3、2および4）からなる群より選択される少なくとも1つのヘプシジン-25ポリペプチドに特異的に結合する。さらにより好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、カニクイザルのヘプシジン-25（配列番号4）に特異的に結合する。さらにより好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、マウスおよび／またはラットのヘプシジン-25（それぞれ配列番号2および3）に特異的に結合する。

【0059】

別の実施形態において、本発明の抗体は、25にてSPRによって測定される場合、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のヒトヘプシジン-25（配列番号1）に対するK_Dを有し、i)抗体は、25にてSPRによって測定される場合、少なくとも約200倍、約100倍、約50倍、約10倍、または約5倍高い、ヒトプロヘプシジン、ヒトヘプシジン-20（配列番号88）またはヒトヘプシジン-22（配列番号89）に対するK_Dを有するか、あるいはii)ヒトプロヘプシジン、ヒトヘプシジン-20（配列番号88）またはヒトヘプシジン-22（配列番号89）に対する抗体の結合は、実施例4～7に記載される免疫学的検定および／またはMALDI-TOF質量分析法によって検出可能でないか、またはごくわずかしか検出できない。好ましくは、抗体はまた、25

10

20

30

40

50

にてSPRによって測定される場合、非ヒト哺乳動物種の少なくとも1つの成熟ヘプシジンポリペプチドに特異的に結合する。より好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、マウス、ラットおよびカニクイザルのヘプシジン-25(それぞれ配列番号3、2および4)からなる群より選択される少なくとも1つのヘプシジン-25ポリペプチドに特異的に結合する。さらにより好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、カニクイザルのヘプシジン-25(配列番号4)に特異的に結合する。さらにより好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、マウスおよび/またはラットのヘプシジン-25(それぞれ配列番号3および2)に特異的に結合する。

【0060】

10

一実施形態において、本発明の抗体は、25にてSPRによって測定される場合、約100nM未満、約50nM未満、約25nM未満、約10nM未満、約5nM未満、約1nM未満または約800pM未満の、ヒトヘプシジン-25(配列番号1)に対するKDを有する。好ましくは、本発明の抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、非ヒト哺乳動物種の少なくとも1つの成熟ヘプシジンポリペプチドに対して約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のKDを有する。より好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、マウス、ラットおよびカニクイザルのヘプシジン-25(それぞれ配列番号3、2および4)からなる群より選択される少なくとも1つのヘプシジン-25ポリペプチドに対して約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のKDを有する。さらにより好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、カニクイザルのヘプシジン-25(配列番号4)に対して約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のKDを有する。さらにより好ましくは、抗体はまた、マウスおよび/またはラットのヘプシジン-25(それぞれ配列番号3および2)に対して約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のKDを有する。

【0061】

30

別の実施形態において、本発明の抗体は、25にてSPRによって測定される場合、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のヒトヘプシジン-25(配列番号1)に対するKDを有する。好ましくは、本発明の抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、非ヒト哺乳動物種の少なくとも1つの成熟ヘプシジンに対して、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のKDを有する。より好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、マウス、ラットおよびカニクイザルのヘプシジン-25(それぞれ配列番号3、2および4)からなる群より選択される少なくとも1つのヘプシジン-25ポリペプチドに対して、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のKDを有する。さらにより好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、カニクイザルのヘプシジン-25(配列番号4)に対して、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のKDを有する。さらにより好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、マウスおよび/またはラットのヘプシジン-25(それぞれ配列番号3および2)に対して、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のKDを有する。

【0062】

一実施形態において、本発明の抗体は、25にてSPRによって測定される場合、約100nM未満、約50nM未満、約25nM未満、約10nM未満、約5nM未満、約

50

1 nM未満、または約800pM未満の、ヒトヘプシジン-25（配列番号1）に対するK_Dを有し、i)抗体は、25にてSPRによって測定される場合、少なくとも約200倍、約100倍、約50倍、約10倍または約5倍高い、ヒトプロヘプシジン、ヒトヘプシジン-20（配列番号88）またはヒトヘプシジン-22（配列番号89）に対するK_Dを有するか、あるいはii)ヒトプロヘプシジン、ヒトヘプシジン-20（配列番号88）またはヒトヘプシジン-22（配列番号89）に対する抗体の結合は、実施例4～7に記載される免疫学的検定および/またはMALDI-TOF質量分析法によって検出可能でないか、またはごくわずかしか検出できない。好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、非ヒト哺乳動物種の少なくとも1つの成熟ヘプシジンポリペプチドに対して、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のK_Dを有する。より好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、マウス、ラットおよびカニクイザルのヘプシジン-25（それぞれ配列番号3、2および4）からなる群より選択される少なくとも1つのヘプシジン-25ポリペプチドに対して、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のK_Dを有する。さらにより好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、カニクイザルのヘプシジン-25（配列番号4）に対して、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のK_Dを有する。さらにより好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、マウスおよび/またはラットのヘプシジン-25（それぞれ配列番号3および2）に対して、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のK_Dを有する。

【0063】

別の実施形態において、本発明の抗体は、25にてSPRによって測定される場合、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のヒトヘプシジン-25（配列番号1）に対するK_Dを有し、i)抗体は、25にてSPRによって測定される場合、少なくとも約200倍、約100倍、約50倍、約10倍または約5倍高い、ヒトプロヘプシジン、ヒトヘプシジン-20（配列番号88）またはヒトヘプシジン-22（配列番号89）に対するK_Dを有するか、あるいはii)ヒトプロヘプシジン、ヒトヘプシジン-20（配列番号88）またはヒトヘプシジン-22（配列番号89）に対する抗体の結合は、実施例4～7に記載される免疫学的検定および/またはMALDI-TOF質量分析法によって検出可能でないか、またはごくわずかしか検出できない。好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、非ヒト哺乳動物種の少なくとも1つの成熟ヘプシジンポリペプチドに対して、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のK_Dを有する。より好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、マウス、ラットおよびカニクイザルのヘプシジン-25（それぞれ配列番号3、2および4）からなる群より選択される少なくとも1つのヘプシジン-25ポリペプチドに対して、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のK_Dを有する。さらにより好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、カニクイザルのヘプシジン-25（配列番号4）に対して、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のK_Dを有する。さらにより好ましくは、抗体はまた、25にてSPRによって測定される場合、マウスおよび/またはラットのヘプシジン-25（それぞれ配列番号3および2）に対して、約100nM～約800pMの間、約50nM～約800pMの間、約50nM～約1nMの間、または約35nM～1nMの間のK_Dを有する。

【0064】

10

20

30

40

50

(抗体発現)

標準的な分子生物学技術が、組み換え発現ベクターを調製するため、宿主細胞をトランスフェクトするため、形質転換体を選択するため、本発明の抗体を產生する宿主細胞株を単離するため、それらの宿主細胞を培養し、培地から抗体を回収するために使用される。

【0065】

本発明はまた、本発明の抗ヘプシジン抗体を発現する宿主細胞に関する。当該技術分野において公知の多種多様の宿主発現系は、原核生物（細菌）および真核生物発現系（酵母、バキュロウイルス、植物、哺乳動物および他の動物細胞、トランスジェニック動物、およびハイブリドーマ細胞など）、ならびにファージディスプレイ発現系を含む、本発明の抗体を発現させるために使用され得る。

10

【0066】

本発明の抗体は、宿主細胞における免疫グロブリン軽鎖および重鎖遺伝子の組み換え発現によって調製され得る。抗体を組み換えて発現するために、宿主細胞は、抗体の免疫グロブリン軽鎖および／または重鎖をコードするDNAフラグメントを保有する1つ以上の組み換え発現ベクターで形質転換、形質導入、感染などをされ、それによって、軽鎖および／または重鎖が宿主細胞中に発現される。重鎖および軽鎖は、それらが1つのベクター内で作動可能に連結される異なるプロモーターから独立して発現され得るか、または重鎖および軽鎖は、それらが2つのベクター（1つが重鎖を発現し、もう1つが軽鎖を発現する）内で作動可能に連結される異なるプロモーターから独立して発現され得る。必要に応じて、重鎖および軽鎖は異なる宿主細胞で発現されてもよい。

20

【0067】

宿主細胞はまた、従来の技術によって、インタクトな抗体の部分またはフラグメント、例えばFabフラグメントまたはscFv分子を產生するために使用され得る。例えば、本発明の抗体の軽鎖または重鎖のいずれかをコードするDNAで宿主細胞をトランスフェクトすることが望まれてもよい。組み換えDNA技術はまた、ヒトヘプシジン-25に対する結合に必要でない軽鎖および重鎖のいずれかまたは両方をコードする一部または全てのDNAを取り除くために使用されてもよい。このような切断DNA分子から発現される分子もまた、本発明の抗体に含まれる。

【0068】

本発明は、本発明の核酸分子を含む宿主細胞を提供する。好ましくは、本発明の宿主細胞は、本発明の核酸分子を含む1つ以上のベクターまたは構築物を含む。例えば、本発明の宿主細胞は、本発明のベクターが導入される細胞であり、そのベクターは、本発明の抗体のLCVRをコードするポリヌクレオチドおよび／または本発明のHCVRをコードするポリヌクレオチドを含む。本発明はまた、本発明の2つのベクターが導入される宿主細胞を提供し、1つは本発明の抗体のLCVRをコードするポリヌクレオチドを含み、もう1つは本発明の抗体に存在するHCVRをコードするポリヌクレオチドを含み、各々は、エンハンサー／プロモーター調節エレメント（例えば、SV40、CMV、アデノウイルスなど由来（例えばCMVエンハンサー／AdMLPプロモーター調節エレメントまたはSV40エンハンサー／AdMLPプロモーター調節エレメント））に作動可能に連結されて、遺伝子の高レベルの転写を駆動する。

30

【0069】

一旦発現されると、本発明のインタクトな抗体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態は、硫酸沈殿法、イオン交換、アフィニティ（例えばプロテインA）、逆相、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む、当該技術分野の標準的な方法によって精製され得る。薬理学的使用のために、少なくとも約90%、約92%、約94%または約96%均一性の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、約98%～約99%またはそれ以上の均一性が最も好ましい。一旦、部分的または所望の場合、均一的に精製されると、次いで、本明細書に指示されるように、滅菌抗体が治療的に使用され得る。

40

【0070】

50

(ヒト遺伝子操作抗体)

好ましくは、治療目的のために使用される本発明の抗体は、抗体が免疫反応を引き起こす可能性を減少させるために、(抗体に存在する範囲で)ヒト由来のフレームワークおよび定常領域の配列を有する。ヒト遺伝子操作抗体は、それらが治療適用に有益であり、ヒト対象に投与される場合、マウス起源の抗体またはマウス起源の部分を含む抗体で頻繁に観察されるヒト抗マウス抗体反応の可能性を減少させるので、特に興味深い。好ましくは、注入されるヒト遺伝子操作抗体は、例えばマウス抗体より、むしろ天然のヒト抗体に近い半減期を有し得るので、より少ない用量かつ少ない頻度で対象に投与できる。

【0071】

本明細書に使用される場合、用語「ヒト遺伝子操作抗体」とは、少なくとも一部がヒト起源である抗体を指す。例えば、ヒト遺伝子操作抗体は、マウスなどの非ヒト起源の抗体由来の部分、および例えば従来の技術(例えば合成)によって化学的に一緒に結合されるか、または遺伝子操作技術を用いて隣接ポリペプチドとして調製されるヒト起源の抗体由来の部分を含んでもよい。

【0072】

好ましくは、「ヒト遺伝子操作抗体」は、親抗体、すなわち非ヒト抗体、好ましくはマウスFab 4C11などのマウスMabもしくはそのフラグメントが起源であるか、またはそれらに由来するCDRを有し、一方、存在する範囲でフレームワークおよび定常領域(または有意もしくは実質的なその部分、すなわち少なくとも約90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%)は、前記抗体がヒト細胞で産生するか否かに関わらず、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン領域(例えば、International Immunogenetics Databaseを参照のこと)またはその組み換え体もしくは変異型で生じる核酸配列情報によってコードされる。好ましくは、ヒト遺伝子操作抗体の少なくとも2つ、3つ、4つ、5つまたは6つのCDRは、ヒト遺伝子操作抗体が誘導される非ヒト親抗体のCDRから最適化されて、スクリーニングアッセイ、例えばELISAアッセイによって確認され得る、所望の特性、例えば向上した特異性、親和性または中和を生じる。好ましくは、本発明の抗体における最適なCDRは、親マウスFab 4C11、3A9、または5E8に存在するものと比較した場合、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。親マウスFab 4C11、3A9または5E8のものと比較した場合、本発明のヒト遺伝子操作抗体のCDRにおける特定のアミノ酸置換は、抗体の不安定性の可能性を減少させる(例えば、1つ以上のCDR Asn残基の除去)か、または(例えばIMMUNOFILTER(商標)技術(Xencor, Inc., Monrovia, CA)によって予測されるように)ヒト対象に投与される場合、抗体の免疫原性の可能性を減少させる。

【0073】

ヒト遺伝子操作抗体は、好ましくは、非ヒト抗体由来の最小配列を含む。ヒト遺伝子操作抗体は、受容抗体にも、あるいは親抗体から導入されるCDRまたはフレームワーク配列のいずれにも見出されない残基を含んでもよい。ヒト遺伝子操作抗体は、当該技術分野における慣例の使用方法を用いてインピトロでの突然変異に供されてもよく、それによって、ヒト遺伝子操作組み換え抗体のHCVRおよびLCVR領域のフレームワーク領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列HCVRおよびLCVR配列に関連するものに由来するが、インピボにおいてヒト抗体生殖細胞系列レパートリー内の天然に存在し得ない配列となる。ヒト遺伝子操作組み換え抗体のHCVRおよびLCVRフレームワーク領域のそのようなアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列配列と少なくとも約85%、約90%、約92%、約94%、約95%、約96%、約98%、またはより好ましくは少なくとも99%、または最も好ましくは100%同一であると意図される。

【0074】

好ましい実施形態において、本発明のヒト遺伝子操作抗体は、ヒト生殖細胞系列軽鎖フレームワーク配列およびヒト生殖細胞系列重鎖フレームワーク配列を含む(例えば、国際公開第2005/005604号を参照のこと)。

10

20

30

40

50

【0075】

ヒト遺伝子操作抗体を生成するために当該技術分野において利用可能な複数の方法が存在する（例えば、PCT国際特許出願公開第2006/06046935；Queenら，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2869 (1991)；Jonesら，Nature, 321: 522 (1986)；Riechmannら，Nature, 332: 323-327 (1988)；およびVerhoevenら，Science, 239: 1534 (1988)を参照のこと）。例えば、ヒト遺伝子操作抗体は、選択的にヘプシジン-25に結合する親抗体（例えば成熟抗体またはハイブリドーマによって作製された抗体）のHCVRおよびLCVRをコードする核酸配列を得て、前記HCVRおよびLCVR（非ヒト）中のCDRを同定し、そのようなCDRコード核酸配列を選択されたヒトフレームワークコード核酸配列に移植することによって生成されてもよい。必要に応じて、CDR領域をフレームワーク領域に移植する前にCDR内の1つ以上のアミノ酸を異なるアミノ酸で置換するために、CDR領域は、ランダムにまたは特定の位置で変異することによって最適化されてもよい。あるいは、CDR領域は、当業者に利用可能な方法を用いてヒトフレームワーク領域への挿入後に最適化されてもよい。10

【0076】

CDRをコードする配列が選択されたヒトフレームワークコード配列に移植された後、次いで、ヒト遺伝子操作可変重鎖および可変軽鎖配列をコードする得られたDNA配列が、ヘプシジン-25を結合するヒト遺伝子操作抗体を生成するために発現される。ヒト遺伝子操作HCVRおよびLCVRは、完全な抗ヘプシジン-25抗体分子の一部として、すなわちヒト定常領域配列との融合タンパク質として発現されてもよい。しかしながら、HCVRおよびLCVR配列はまた、例えば、ヒト遺伝子操作抗ヘプシジン-25FabまたはFabを生成するために定常配列の存在下で発現されてもよい（例えば、Watkins, J.ら, Anal. Biochem. 253: 37-45 (1997)およびWatkins, J.ら, Anal. Biochem. 256: 169-177, (1998)を参照のこと）。20

【0077】

（診断用途）

本発明の抗体は、ヘプシジン-25によって促進される疾患および状態に対する性質の評価、ならびにそれらを患っている患者におけるそのような疾患および状態の検出および診断のために、組織または生体液中のヘプシジン-25の量を正確に検出または測定するための手段を提供する。例えば、本発明のヘプシジン-25選択的抗体は、感受性が高く、信頼できる免疫学的検定（例えば、ELISA、RIA、免疫拡散法、またはSPRアッセイなどの免疫検出アッセイ）に導入され得る。同様に、本発明のヘプシジン-25選択的抗体はまた、組織または生体液サンプルの免疫組織化学的（IHC）および免疫蛍光（IF）アッセイに有用である。そのような分析は、ヘプシジン-25の異常レベルを検出し、それによって、ヘプシジン-25によって促進される疾患および状態を診断するために使用されてもよい。より具体的には、本発明は、患者由来の組織または生体液のサンプル中のヘプシジン-25のレベルを測定し、サンプル中のヘプシジン-25のレベルと、1つ以上のコントロール個体由来の対応するサンプル中のヘプシジン-25のレベルまたは基準物とを比較し、それによって、ヘプシジン-25の異常レベルに関連する疾患状態を検出することによって、患者におけるヘプシジン-25に関連する疾患または状態を診断する方法を提供する。疾患状態は、減少した血清鉄レベル、網状赤血球数、赤血球数、ヘモグロビン、および/またはヘマトクリットに関連する1つ以上の遺伝性疾患または非遺伝性疾患を含んでもよい。好ましくは、疾患状態は、貧血に関連する1つ以上の遺伝性疾患または非遺伝性疾患を含んでもよい。30

【0078】

患者における疾患または状態に関連するヘプシジン-25をモニターする方法もまた、提供される。その方法は、第1の時点においてヘプシジン-25に関連する疾患または状態の危険性を被っている患者由来の組織または生体液のサンプル中のヘプシジン-25の4050

レベルを測定する工程；1つ以上の異なる時点において患者由来の組織または生体液の1つ以上のサンプル中のヘプシジン-25のレベルを測定する工程；異なる時点において測定されるヘプシジン-25のレベルを比較し、それによって、ヘプシジン-25により測定される疾患または状態をモニターする工程を含む。

【0079】

本発明のヘプシジン-25選択的抗体は、ハイスループット方法に適用される場合に特に有用である。そのような方法は、マイクロチップおよびマイクロアレイ法を含み、それによって、多くのサンプルが、マイクロプレートまたはスライド、あるいは当該技術分野において公知の他のアッセイ基板上で試験され得る。

【0080】

生物学的サンプル中のヘプシジン-25の存在またはそのレベルは、抗原-抗体複合体を形成するために適切な条件下で生物学的サンプルと、例えば本発明の抗体とを混合することによって規定され得る。抗体は、結合または未結合の抗体の検出を容易にするために検出可能な部分で直接的またはより好ましくは間接的に標識される。免疫複合体形成の検出の様々な方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、ELISA、RIA、免疫プロット法（例えばドッロプロット、スロットプロット、ウェスタンプロットなど）、間接免疫蛍光法技術および例えばSPRなどの物理的パラメーターの変化の検出に依存する方法などがある。このような適用には、生物学的サンプル、例えばヒトの生体液または細胞もしくは組織抽出物中のヘプシジンを検出するために検出可能な部分に結合される本発明のヘプシジン-25選択的抗体を利用する方法が含まれる。本発明の抗体は、検出可能な部分での修飾を含むか、または含まないそのようなアッセイに使用され得る。検出可能な部分で修飾される場合、本発明の抗体は、検出可能な部分の共有または非共有結合によって修飾され得る。本明細書に使用される場合、用語「検出可能」は、公知の分析技術を用いて、検出器によって物質を同定または追跡することを可能にする物質（複合体、化合物または部分）の特徴を記載する。検出可能な部分の代表的な例としては、限定されないが、発色団、蛍光部分、リン光性部分、発光部分、放射性部分、種々の酵素（例えばアルカリホスファターゼ、または西洋ワサビペルオキシダーゼ）、磁性部分（例えば反磁性、常磁性および強磁性物質）、および重金属群、ならびに任意の他の公知の検出可能な部分が挙げられる。形成される抗体-抗原標準複合体の量は、例えば、光度または比色分析手段などの当該技術分野において公知の種々の方法によって定量されてもよい。好ましくは、本発明の抗体は、修飾せずに使用される。すなわち、当該技術分野において周知の方法に従って間接的に標識される。

【0081】

本発明は、生物学的サンプル中のヘプシジン-25タンパク質を検出するための方法を具現化し、本発明の抗体がヘプシジン-25タンパク質に結合できるのに十分な条件下かつ時間で、前記抗体と生物学的サンプルとをインキュベートする工程、および前記結合を検出する工程を含む。好ましくは、抗体は、5E8、OH4および/またはOB3である。生物学的サンプル中のヘプシジン-25タンパク質を検出するための好ましい方法は、サンドイッチELISAであり、本発明の一次抗体がヘプシジン-25タンパク質に結合できるのに十分な条件下かつ時間で、前記抗体と生物学的サンプルとをインキュベートする工程、未結合サンプルを除去する工程、配列番号1のアミノ酸1~7内に含まれるエピトープに選択的に結合する二次抗体を付与する工程、未結合の二次抗体を除去する工程、および前記二次抗体の結合を検出する工程を含む。好ましくは、一次抗体は3.23または3.12であり、二次抗体はOH4またはOB3である。抗ヘプシジンMab 3.23は、2つの軽鎖ポリペプチドおよび2つの重鎖ポリペプチドを含み、軽鎖ポリペプチドの各々は配列番号82に示すアミノ酸配列を有し、重鎖ポリペプチドの各々は配列番号83に示すアミノ酸配列を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合する。抗ヘプシジンMab 3.12は、2つの軽鎖ポリペプチドおよび2つの重鎖ポリペプチドを含み、軽鎖ポリペプチドの各々は配列番号84に示すアミノ酸配列を有し、重鎖ポリペプチドの各々は配列番号85に示すアミノ酸配列を有し、配列番号1に示すア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を有するポリペプチドに結合する。生物学的サンプル中のヘプシジン - 25 タンパク質を検出するためのより好ましい方法はサンドイッチ E L I S A であり、一次抗体がヘプシジンタンパク質に結合できるのに十分な条件下かつ時間で、ヘプシジンのアミノ酸 5 ~ 25 内に含まれるエピトープに特異的に結合する前記抗体と、生物学的サンプルとをインキュベートする工程、未結合サンプルを除去する工程、ヘプシジン - 25 のアミノ酸 1 ~ 7 内に含まれるエピトープに結合する二次抗体を付与する工程、未結合の二次抗体を除去する工程、および前記二次抗体の結合の存在または非存在を検出する工程を含む。好ましくは、一次抗体は 3.23 または 3.12 であり、二次抗体は O H 4 または O B 3 である。より好ましくは、二次抗体は標識されず、結合は当該技術分野において公知の方法に従って間接的に検出される。

10

【0082】

本発明はまた、ヘプシジン - 25 を含む疑いのあるサンプルをスクリーニングするための組成物、方法およびキットを提供する。そのようなスクリーニングは、そのようなポリペプチドを含むか、または生成する疑いのある患者サンプル、または実験サンプルで実施されてもよい。キットは、本発明のヘプシジン - 25 選択的抗体を含んでもよい。キットは、サンプルと、本発明のヘプシジン - 25 選択的抗体との間の相互作用を検出するための適切なバッファーおよび試薬を含んでもよい。提供される試薬は、抗マウス IgG 抗体などの本発明の抗体と結合または相互作用できる放射性標識、蛍光標識、または酵素標識された薬剤であり得る。

【0083】

20

キットの試薬は、溶液として提供されるか、固体支持体に結合されるか、または乾燥粉末として提供されてもよい。試薬が溶液で提供される場合、好ましくは、溶液は水溶液である。好ましくは、試薬が固体支持体に結合される場合、固体支持体は、クロマトグラフ媒体、複数のウェルを有する試験プレート、または顕微鏡スライドであってもよい。提供される試薬が乾燥粉末である場合、粉末は適切な溶媒の添加によって再構成されてもよく、ウェルとしてキットに提供されてもよい。

【0084】

本発明のキットは一般にバイアルを含む容器で提供され、その中に抗体、抗原または検出試薬が入られてもよく、好ましくは適切に等分されてもよい。本発明のキットはまた、典型的に、商業用販売のための抗体、抗原および試薬容器を含むための手段を含む。そのような容器はプラスチック容器を含んでもよく、その中に所望のバイアルが保持され、さらに 1 つ以上の必要な化学物質、例えば、クロマトグラフィー物質、溶媒および溶離剤、試験管、洗浄剤、抗体および検出反応のための化学物質が保持される。

30

【0085】

(治療的使用)

ヘプシジン - 25 により促進される疾患または状態は、それらを必要とする患者に、(1)ヒトヘプシジン - 25、すなわち DTHFPI C (配列番号 5)、および / または(2)マウスヘプシジン - 25、すなわち DTNFPI C (配列番号 86) を含むアミノ酸 1 ~ 7 内に含まれるエピトープに結合するヘプシジン - 25 選択的抗体の二次抗体を含む医薬組成物を投与することによって予防または治療され得る。

40

【0086】

本発明の抗体を含む医薬組成物は、有効量がそれを必要とするヒト被検体に投与される場合、ヒトにおける血清鉄レベル、網状赤血球数、赤血球数、ヘモグロビン、および / またはヘマトクリットを増加させるために使用され得る。さらに、本発明の抗体は、状態、疾患、または障害の治療に有用であり得、ここで、ヘプシジン - 25 の存在は、望まれない病理学的効果またはヘプシジン - 25 のレベルの減少を引き起こすか、またはそれらの原因となるか、あるいはヘプシジン生物活性はヒト被検体における治療的有用性を有する。そのような状態、疾患または障害は、限定されないが、感染、炎症、慢性疾患および癌に起因する貧血を含む、貧血を含む。被検体は男性であっても女性であってもよい。好ましくは、ヒト被検体は、望ましくない、低い血清鉄レベル、低い網状赤血球数、赤血球数

50

、ヘモグロビン、および／またはヘマトクリットを有するか、またはそれらを有する危険性がある。より好ましくは、ヒト被検体は、限定されないが、感染、炎症、慢性疾患および／または癌に起因する貧血を含む、貧血の危険性があるか、またはそれを患っている。

【0087】

さらに、本発明の抗体の使用は、限定されないが、感染、炎症、慢性疾患、および癌に起因する貧血を含む、貧血の治療または予防のための医薬の製造に使用するためのものである。

【0088】

本発明のヘプシジン-25選択的抗体はまた、ヘプシジン-25により促進される疾患および状態の予防および治療に有用である。本発明の抗ヘプシジン-25選択的Mabsは、ヘプシジン-25に対する受動免疫のための医薬組成物において処方され得る。本発明のMabsの機能的フラグメント、例えばFabフラグメント、F(ab')2フラグメントおよびヘプシジン-25に選択的に結合する能力を保有する任意のフラグメントなどもまた、医薬組成物に組み込まれて、治療に適用されてもよい。

10

【0089】

さらに、本発明のヘプシジン-25選択的Mabsは、ヘプシジン-25により促進される疾患および状態の進行をモニターするために免疫学的検定に適用されてもよく、ここで、ヘプシジン-25のレベルまたは量は、処置または治療の成功、あるいは疾患または状態の進行の指標を提供する。

【0090】

20

さらに、本発明のMabsは、ヘプシジン-25により促進される疾患または状態を患っている患者のヘプシジン-25遮断治療を評価する方法において有用である。その方法は、以下の工程：

a) 治療の初期段階前または治療の初期段階中の患者から生体液の第1のサンプルを得る工程；

b) 免疫学的検定法によって第1のサンプル中のヘプシジン-25のレベルを測定する工程；

c) 治療が効果を有するうちの適切な時間の後に、患者から生体液の第2のサンプルを得る工程；

d) 免疫学的検定法によって第2のサンプル中のヘプシジン-25の量を測定する工程；

30

e) ヘプシジン-25結合または遮断治療の効果を測定するために、第1のサンプル中のヘプシジン-25の測定された量と、第2のサンプル中のヘプシジン-25の量とを比較する工程、を含む。

【0091】

患者におけるヘプシジン-25結合治療または遮断治療を評価するために適用される上記の方法は、特に臨床診療において有益であり、1つの治療計画または別の治療計画で開始するタイミングの決定は、患者の転帰に重要であり得る。本発明の方法は、それらの重要な決定の基礎となる情報を提供する。その方法は、治療の初期段階前、または治療の初期段階中のヘプシジン-25の量の測定を提供し、そして、特に治療が有効になり始めると予想される場合、治療の開始後、1回以上の期間におけるヘプシジン-25の1つ以上の測定を提供する。

40

【0092】

ヘプシジン-25遮断治療は、抗ヘプシジン-25選択的抗体の患者への受動投与であつてもよい。抗ヘプシジン-25選択的抗体は、キメラヒト／非ヒト抗体、ヒト化または完全なヒトモノクローナル抗ヘプシジン-25選択的抗体、あるいはヘプシジン-25結合に機能的な任意のヘプシジン-25選択的抗体フラグメントであつてもよい。

【0093】

免疫複合体形成を検出する様々な方法は、当該技術分野において周知であり、例えばELISA、RIA、免疫プロット法（例えばドッロプロット、スロットプロット、ウェス

50

タンプロットなど)、間接免疫蛍光法技術および例えばS P Rなどの物理的パラメーターの変化の検出に依存する方法がある。1つの広範に使用される方法において、免疫複合体形成は、放射性標識または酵素タグ(例えばアルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ)などの標識の使用により検出される。さらなる利点は、二次抗体または当該技術分野において周知の方法に従う、ビオチン化リガンドを結合するためのアビシン結合分子などの二次結合リガンドの使用により得ることができる。

【0094】

本明細書に使用される場合、用語「治療」および「治療する」とは、例えば、本明細書に記載される疾患、状態、または障害、その症状、あるいはそれに対する性質を、例えば、治療、軽減、変化、作用、制御、停止、改善、または防止するための治療効果を与える目的で、本明細書に記載される疾患、状態、または障害、そのような疾患、状態、または障害の症状、あるいはそのような疾患、状態、または障害に対する性質を有する患者に物質を投与することを指す。好ましくは、治療される患者は哺乳動物、より好ましくは、ヒトである。投薬計画は、最適な所望の反応(例えば治療反応)を提供するように調節され得る。例えば、単一のボーラスが投与されてもよく、数回に分割した用量が時間にわたって投与されてもよいか、または用量は比例的に減少されるか、もしくは治療状況の緊急性によって示される場合、増加されてもよい。

【0095】

(医薬組成物)

本発明の抗体は、ヒト被検体への投与に適切な医薬組成物に組み込まれ得る。本発明の抗体は、ヒト被検体に単独あるいは単回または複数回投与量で薬理学的に許容可能な担体および/または希釈剤と併せて投与されてもよい。そのような医薬組成物は、選択される投与様式に適切であるように設計され、薬理学的に許容可能な希釈剤、担体、および/または賦形剤、例えば分散剤、バッファー、界面活性剤、防腐剤、可溶化剤、等張剤、安定化剤などが必要に応じて使用される。前記組成物は、当該技術分野において公知の従来技術に従って設計されてもよい。

【0096】

医薬組成物のための適切な担体は、本発明のM a bと混合される場合、分子の活性を保持し、被検体の免疫系と反応しない、任意の物質を含む。

【0097】

本発明の抗ヘプシジン-25M a bを含む医薬組成物は、標準的な投与技術を用いて本明細書に記載される病状、例えば貧血障害の危険性があるか、またはそれらを示す被検体に投与され得る。

【0098】

本明細書に使用される場合、用語「有効量」とは、所望の治療結果を達成するために、(投薬量および期間および投与手段について)必要な量を指す。抗体の有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、体重などの要因、および個体において所望の反応を引き起こすための抗体または抗体部分の能力に従って変化させてもよい。有効量はまた、抗体のあらゆる毒性または有害作用を、治療的に有益な効果が上回るものである。

【0099】

有効量は少なくとも最少量であるが、被検体に対して治療的有益性を与えるのに必要である活性剤の毒性量より少ない。つまり、本発明の抗体の有効量または治療的に有効な量は、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて、(i) 血清鉄レベル、網状赤血球数、赤血球数、ヘモグロビン、および/またはヘマトクリットを増加させるか、あるいは(ii) ヘプシジン-25の存在が望ましくない病理学的作用を引き起こすか、またはその原因となる状態、障害または疾患を治療するか、あるいは(iii) ヘプシジン-25のレベルまたはヘプシジン生物活性の減少が、限定されないが、感染、炎症、慢性疾患、および/または癌に起因する貧血を含む、限定されないが、慢性疾患の貧血を含む、限定されないが、貧血を含む、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて有益な治療効果を生じる、量である。本発明の抗体の有効量は、単回投与または複数回投与で投与されてもよい。さらに、本発明

10

20

30

40

50

の抗体の有効量は、2回以上投与されなくても、有効量より少ない複数回用量で投与されてもよい。

【 0 1 0 0 】

医薬分野において周知のように、任意の1人の被検体のための投薬量は、投与頻度および投与経路、全体的な健康、および同時に投与されている他の薬物を含む、多くの要因に依存する。用量はさらに、疾患の種類および重篤性に非常に依存し得る。典型的な用量は、例えば、約0.1～約100mg；好ましくは約1～約100mg；より好ましくは約5～約50mgの範囲であり得るが、しかし、この例示的範囲の上下の用量も、特に上述の要因を考慮して想定される。日常の非経口投薬計画は、全体重の約10μg/kg～約10mg/kg、好ましくは約100μg/kg～約10mg/kg、より好ましくは約1mg/kg～約10mg/kgである。進行は定期評価によりモニターされてもよく、それに応じて用量が調節される。

10

【 0 1 0 1 】

抗体のこれらの提案される量は多くの治療的決定に従う。適切な用量および計画を選択する際の重要な要因は、得られる結果である。この状況において考慮するための要因は、特に治療される障害、個々の患者の臨床状態、障害の原因、抗体の送達部位、抗体の特定の種類、投与方法、投与計画および投与頻度、ならびに医師に公知の他の要因を含む。

[0 1 0 2]

本発明の抗体の投与経路は、経口、非経口、吸入または局所的であってもよい。好ましくは、本発明の抗体は、非経口投与に適切な医薬組成物に組み込まれてもよい。本明細書に使用される場合、用語、非経口は、静脈内、筋肉内、皮下、直腸、腔内、または腹腔内投与を含む。静脈内または腹腔内または皮下注射による非経口送達が好ましい。皮下注射が最も好ましい。そのような注射のための適切な賦形剤は当該技術分野において周知である。

20

【 0 1 0 3 】

医薬組成物は、典型的に、例えば、密閉されたバイアル、シリンジまたは他の送達装置、例えばペンを含む、与えられる容器中の製造および貯蔵条件下で、無菌かつ安定でなければならない。従って、医薬組成物は、製剤作製後に濾過滅菌され得るか、または微生物学的に受容可能に作製され得る。

30

1004】

以下の実施例は例示の目的のためのみに与えられ、本発明の範囲を限定することを意図しない。

【实施例】

101031

(実施例1) ヒトヘゴシン・23の生成)

商業的供給源（例えば、Peptide International (Louisville, KY)）から取得するかまたは当技術分野で公知の種々の合成または組み換え技術により、ヒトヘプシジン-25を生成することができる。例えば、ヘプシジン-25の25アミノ酸を含み、かつ、配列番号95に示すようなアミノ酸配列を有する融合タンパク質を、大腸菌で発現する。37にて1 mMのIPTGを用いる誘導の3~6時間後にヒトヘプシジン-25融合タンパク質を発現する3リットルの大腸菌から、封入体を単離する。封入体をバッファーA(50 mMのTrisおよび8 Mの尿素(pH 8.0))に溶かす。上清を固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィー(IMAC)カラム(20 mL樹脂)に通す。カラムを吸光度が基準値に戻るまでバッファーAで洗浄し、結合したポリペプチドをバッファーA内の0.5 Mのイミダゾールによりカラムから溶出されたバッチとする。ヒトヘプシジン-25融合タンパク質をプールし、50 mMのDTTで還元する。その後、プールされた物質を、2 Mの尿素、3 mMのシステイン、50 mMのTris(pH 8.0)内で最終タンパク質濃度が50 µg/mL未満になるように希釈することにより、この融合タンパク質をリフォールディングする。この物質を室温にて攪拌し、48時間空气中で酸化させる。酸化ポリペプチドを流速5 mL/分にてIMA

40

50

Cカラム(20mL)に通し、ヒトヘプシジン-25融合タンパク質をバッファーA内の0.5Mイミダゾールによりカラムから溶出されたバッチにする。ヒトヘプシジン-25融合タンパク質を含有するプールされた画分を濃縮し、50mMのTris、4Mの尿素、pH8.0で流速3mL/分にて平衡化されたサイジングカラム(例えば、SUPERDEX(登録商標)75、GE Health care、XK26/60)に通す。溶出された单量体融合タンパク質をプールし、次いで、50mMのTris、2Mの尿素、5mMのCaCl₂、pH8.0に希釈し、その後、エンテロキナーゼで切断して、配列番号1のヒトヘプシジン-25を生成する。未切断のヒトヘプシジン-25融合タンパク質を、受動IMACクロマトグラフィー(上記の概略参照)により除去する。次いで、IMACカラムからの通過物(flow-through)をC-18逆相カラム上に流速4.0mL/分にて負荷する。カラムを吸光度が基準値に戻るまで0.1%のTFA入り水で洗浄し、結合したポリペプチドを、0.5%/分の速度で0.1%のTFAを含む20%~40%のACNの線形勾配によりカラムから溶出する。ヒトヘプシジン-25ポリペプチドを含有する画分をプールし、N末端アミノ酸配列分析およびマトリクス支援レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-MS)により分析する。

【0106】

また、ラット、マウス、および、カニクイザルのヘプシジン-25と種々のN末端切断型のヒトヘプシジン-25(ヘプシジン22およびヘプシジン20を含む)をコードするポリペプチドを、ヒトヘプシジン-25について説明したように基本的に生成した。

【0107】

(実施例2 N末端ヘプシジン-25抗体の生成)

5個のアミノ酸ペプチドリンカー(すなわち、GPGPG)でOVAペプチド(アミノ酸323~336)配列(すなわち、完全長免疫原DTTHFPICGPGPGISQAVHAAHAEINE(配列番号87))に結合させたN末端ヘプシジンペプチド(配列番号1のアミノ酸1~7)を用いてマウスに免疫性を与え、これらのマウスから脾臓を27日目に回収する。Ag⁺およびIgG⁺メモリーと胚中心細胞について1ウェルあたり1細胞においてB細胞をソートし、EL4B細胞と2週間共培養する。その後、得られたIgG含有上清を1.4倍に希釈し、以下の3つのELISAフォーマットに従ってスクリーニングする。(1)96ウェルプレートを、NEUTRAVIDIN(商標)結合タンパク質(すなわち、脱グリコシル化されかつ等電的中性型(isoelectrical ly neutral form)のアビジン(Pierce Biotechnology, Rockville, IL))を用いて、2μg/mLの炭酸バッファー中で一晩コーティングする。非特異的結合部位をカゼインで1時間ブロックする。その後、プレートを0.05%のTween-20を含むPBSで3回洗浄し、100nMのビオチン化ヘプシジンを1時間プレート上でインキュベートする。プレートを再度上述のように洗浄する。その後、培養物からのIgG上清を1時間インキュベートし、プレートを洗浄する。ヘプシジン-25抗体の特異的結合を0.5μg/mLのヤギ抗マウスIgGのFcアルカリホスファターゼにより検出する。アルカリホスファターゼ活性を、適当量のPMP/PAMP基質(6mg/mlのフェノールフタレンインーリン酸(PMP))入り0.5MのTris、pH10.2、2%の2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール(AMP)、0.1%のNaN₃)を加えることにより測定し、560nmにおける吸光度の量を測定する。(2)96ウェルプレートを、ヤギ抗マウスカッパIgGを用いて、2μg/mlにて炭酸バッファー中で一晩コーティングする。その後、非特異的結合部位をカゼインで1時間ブロックする。プレートを0.05%のTween-20を含むPBSで3回洗浄し、培養物からのIgG上清を1時間インキュベートする。その後、ビオチン化ヘプシジン-25(100nM)を1時間プレート上でインキュベートし、プレートを再度上述のように洗浄する。その後、捕捉した抗体に対するヘプシジン-25の特異的結合を、1μg/mlのNEUTRAVIDIN-AP(商標)、NEUTRAVIDIN(商標)-アルカリホスファターゼ結合体(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)を加えることにより検出し、アルカリホスファターゼ活性をPMP

10

20

30

40

50

/AMP基質を加えることにより検出し、560nmにおける吸光度を測定する。(3)96ウェルプレートを100nMのヘプシジン-25入り水を用いて一晩37にてコーティングする。その後、非特異的結合部位をカゼインで1時間ブロックし、プレートを0.05%のTween-20を含むPBSで3回洗浄する。その後、培養物からのIgG上清を1時間インキュベートし、プレートを再度上述のように洗浄する。N末端ヘプシジン-25抗体の特異的結合を0.5μg/mLのヤギ抗マウスIgGのFcアルカリホスファターゼにより検出する。アルカリホスファターゼ活性をPMP/AMP基質で測定し、560nmにおける吸光度の量を測定する。

【0108】

次いで、ヘプシジン-25(例えば、3A9、4C11および5E8)のN末端に特異的なマウス抗体を発現するB細胞を用いてRNAを単離し、可変領域をRT-PCRにより増幅させ、市販のマウスIgG1ベクターまたは重鎖および軽鎖それぞれへ連続的にクローニングする。一時的に発現されたマウス抗体を、SPRを用いてN末端ヘプシジン-25特異的抗体として確認した。

【0109】

(実施例3 SPRを用いる抗ヘプシジンFabsおよびMabsの親和結合測定)
SPRバイオセンサー(例えば、BIAcore(登録商標)T100)を、抗体(例えば、本明細書に開示された抗体)の結合反応速度および親和性を測定するために用いることができる。BIAcore(登録商標)システムは、SPRの光学的性質を利用して、デキストランバイオセンサーマトリクス内の相互作用分子のタンパク質濃度における変化を検出する。特に指定のない限り、全ての試薬および物質をBIAcore(登録商標)AB(Upsala, Sweden)から購入する。全ての測定を25にて行う。サンプルをHBS-EPバッファー(150mMの塩化ナトリウム、3mMのEDTA、0.05%(w/v)界面活性剤P-20および10mMのHEPES、pH7.4)に溶解する。ヒトカッパでFabsを捕捉するために、ヤギ抗ヒトカッパを、アミン結合キットを用いて、5000~10000反応単位(Rus)のレベルにてCM5センサーチップの1~4のフローセル上に固定する。マウスIgG1でMabsを捕捉するために、ヤギ抗マウスFcガンマを、アミン結合キットを用いて、5000~10000RusのレベルにてCM5センサーチップの1~4のフローセル上に固定する。ヒトIgG4で抗体を捕捉するために、タンパク質Aを、アミン結合キットを用いて、400~700RusのレベルにてCM4センサーチップの1~4のフローセル上に固定する。大腸菌のペリプラズマから調製されたFabsおよび哺乳動物細胞培養物から調製されたMabsを、複数の分析サイクルを用いて評価する。各サイクルは、以下のステップからなる。200~1000Rusの捕捉を目指してFabまたはMabを約10μL/分にて0.3~2分間注入し、実施例1において上述したように取得された種々の濃度のヒトヘプシジン-25(600nM~0.1nM)を50μL/分にて2分間注入し、次いで、2~10分間解離し、そして、30μLの10mMの塩酸グリシン、pH1.5を用いて再生する。測定は25にて取得され、各サイクルにおける会合速度および解離速度を、BIA評価ソフトウェア内の「1:1の物質移動を伴う」結合モデルを用いて評価する。

【0110】

マウスモノクローナル抗体3A9、4C11、5E8、OB3、OH4、OB1およびOE1は、約36nM~約1nMの親和性(K_D)でヒトヘプシジン-25と結合することを示す。マウスモノクローナル抗体OH4は、約1.2nMの K_D でヒトヘプシジン-25と結合するが、ヒトヘプシジン20またはヒトヘプシジン22とは検出可能に結合しない。マウスモノクローナル抗体5E8は、ヒトヘプシジン-25と結合するが、マウスまたはラットのヘプシジン-25とは検出可能に結合しない。マウスモノクローナル抗体4C11は、ヒト、マウス、およびラットのヘプシジン-25と結合し、より低い程度で、ヒトヘプシジン22(約209nM)と結合するが、ヒトヘプシジン20とは結合しない。

【0111】

10

20

30

40

50

(実施例4 ヒトヘプシジン-25と同時結合するMabsペアの同定)

S P R分析によりヒトヘプシジン-25に対する高親和性結合を示したヒトヘプシジン-25を含むアミノ酸1~7に対して産生されたモノクローナル抗体を、Mab3.23とともにヒトヘプシジン-25に同時結合する能力について試験した。

【0112】

つまり、Bia core(登録商標)T100上で、ヤギ抗マウスIgG1Fcポリクローナル抗体を、5000~15000反応単位(Ru)にてCM5チップのフローセル1~4上に固定した。Mab5E8をフローセル2上で捕捉し、Mab4C11をフローセル3上で捕捉し、Mab3A9をフローセル4上で捕捉した。フローセル1を参考フローセルとして用いた。次いで、全てのフローセルにヒトヘプシジン-25を注入した。フローセル上に固定されたMabs5E8、4C11および3A9を有するフローセルは全て、ヒトヘプシジン-25に対するそれらMabsの結合を示すRusの増加を示した。次に、全てのフローセルにMab3.23を注入した。フローセル2のみ、フローセル上に固定されたMab5E8を有し、Mabs5E8および3.23によりヒトヘプシジン-25と同時結合することを示した。

【0113】

加えて、MabsHu22、3.23、3.12、およびネガティブコントロールヒトIgG4抗体を、1000~4000RusにてセンサーチップCM4チップ(Bia core)の別個のフローセル上で固定した。次いで、フローセルにヒトヘプシジン-25を注入した。次に、フローセルにMab5E8を注入した。フローセル上に固定されたMabsHu22、3.23、および3.12を有するフローセルは、ヒトヘプシジン-25の結合と、その後、Mab5E8の同時結合を示した。フローセル上に固定したネガティブコントロールヒトIgG4を有するフローセルは、ヒトヘプシジン-25またはMab5E8のいずれにも結合を示さなかった。更に、Mab5E8は、ヒトのアミノ酸1~7およびマウスのヘプシジン-25(Alpha Diagnostic International, San Antonio TX; cat. # Hepc13-S)から構成されるKLH複合ペプチドに対して産生されたウサギポリクローナル抗血清、または、それらのIgG精製調製物(Alpha Diagnostic International; cat. # Hepc13-A)のいずれに対しても、ヒトヘプシジン-25と同時結合しなかった。

【0114】

(実施例5 ヒトヘプシジン-25の測定のためのサンドイッチELISAアッセイ)

マルチウェルプレートのウェルを、炭酸-重炭酸コーティングバッファー、pH9.40(Pierce Biotechnology, Rockville, IL)中で2mg/Lの濃度にてMab3.23を用い、室温にて1時間コーティングする。次に、ウェルを吸引し、TBST(10mmol/LのTris、pH7.4、1mLのTween-20/Lを含む150mmol/LのNaClを含有するTRIS緩衝化生理食塩水)で3回洗浄する。次いで、ウェルをTBS-カゼインプロッキングバッファー(カトン(Kathon)抗菌剤を含む150mMのNaCl、25mMのTris、1%のカゼイン、pH7.4(Pierce Biotechnology; cat. # 37532)で1時間ブロックする。次に、100μLのヘプシジン-25標準(50mmol/LのHEPES、pH7.40、150mmol/LのNaCl、10mL/LのTrition(登録商標)X-100非イオン界面活性剤(Union Carbide Corp., Danbury, CT)、5mmol/LのEDTA、および、5mmol/Lのエチレングリコ-四酢酸(EGTA)からなる、アッセイバッファー中の種々の濃度における合成されたヒトヘプシジン-25)をウェルのセットに加えて、較正曲線を生成する。その後、血清サンプルをアッセイバッファー中で1:20に希釈し、その個々のウェルに加え、ELISAプレートを室温にて1時間インキュベートする。吸引後、ウェルをTBSTで3回洗浄し、100μLの1:1000希釈ビオンチン化抗ヘプシジン-25Mab5E8を1mg/mlにてウェルに加え、室温にて1時間インキュベートする。吸

10

20

30

40

50

引後、ウェルをT B S Tで3回洗浄し、100 μLのポリ-ストレプトアビジン-H R P溶液(P i e r c e B i o t e c h n o l o g y , R o c k v i l l e , I L)をウェルに加え、室温にて30分間インキュベートする。その後、ウェルをT B S Tで3回洗浄する。最後のT B S Tの吸引後、100 μLの3', 3', 5', 5' - テトラメチルベンジジン発色基質(development substrate)(P i e r c e B i o t e c h n o l o g y , R o c k v i l l e , I L)をウェルに加え、室温にて30分間インキュベートする。反応を等量の2Nリン酸で停止し、プレートを450 nmにて読み取る。

【0115】

40人の正常患者および癌患者からのヘプシジン-25の血清濃度を、5~656 μg/Lの範囲で上述のサンドイッチELISAによって測定し、測定されたヘプシジン-25の血清濃度を標準LC/MSアッセイ($r = 0.98$, $p < 0.0001$)(M u r p h yら(2007)を参照)を用いて直接相關させた。また、B i o r e c l a m a t i o n , I n c . (E a s t M e a d o w , N J)から得られた健康なドナー(50人の男性および50人の女性、年齢は18歳から66歳であり、平均年齢37歳)からの100個のヒト血清サンプルは、1~79 μg/mlより少ない範囲のヘプシジン-25濃度を有すると決定した。加えて、サンドイッチELISAは、ヒトヘプシジン-25コントロールペプチドが用量依存的に少なくとも1ng/mlまで減ることを検出した。一方、ヒトヘプシジン-25コントロールペプチド(2ng/ml以下)、および、ヒト血清サンプルポジティブコントロール内(すなわち、LC/MSアッセイによりヘプシジン-25を含有することが予め決定される)の内因性ヘプシジン-25のどちらも、M a b 5 E 8を(i)ヒトのアミノ酸1~7およびマウスのヘプシジン-25(Alpha Diagnostic International, San Antonio TX; cat. # Hepc13-S)からなるK L H結合ペプチドに対して産生されたウサギポリクローナル抗血清、または、(ii)そのI g G精製調製物(Alpha Diagnostic International; cat. # Hepc13-A)で置換した場合、同様のアッセイにおいて検出可能ではない。更に、ヘプシジン-25標準、および、ヒト血清サンプルポジティブコントロールのどちらも、H E P C - 13 - S抗血清またはそのI g G精製調製物を(i)アッセイプレート(すなわち、捕捉抗体として)の別個のウェル上でコーティングしたか、(ii)ビオチン結合検出抗体としてアッセイに加えたか、または、(iii)未結合検出抗体としてアッセイに加えた場合(すなわち、抗ウサギI g G二次抗体を用いてそれらの結合を連続的にアッセイした状態)、検出可能ではなかった。

【0116】

ヒトヘプシジン-25コントロールペプチドおよびヒト血清ポジティブコントロールサンプル中の内因性ヘプシジン-25は、サンドイッチELISAがM a b 5 E 8を捕捉抗体として用い、かつ、K L H結合13アミノ酸成熟ヒトヘプシジンC末端ペプチド(Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX; cat. # H E P C 12 - A)に対して産生された市販のウサギポリクローナルI g Gとペアで用いた場合、検出されなかった。

【0117】

(実施例6 MALDI-TOFを用いた抗ヘプシジン抗体の選択性の決定)
バイオマーカーの臨床の慣例の診断は、主に免疫学的定量的技術(例えば、ELISA)に基づく。これらの方法は、小さい抗原または抗原アイソフォームに適用できないことが多い(S p a r b i e r , K . , I n t e r n a t i o n a l M e e t i n g o f t h e A s s o c i a t i o n o f B i o m o l e c u l a r R e s o u r c e F a c i l i t i e s , S a l t L a k e C i t y , U T , P o s t e r V 2 8 - S , (2008); およびG u t i e r r e z , J . A . ら(2005))。M a b sまたはF a b sは、サンプル減少後に実行された、抗体結合ヘプシジンポリペプチドで、MALDI-TOF質量分析によって、ヒト血清から、前駆体またはそれらの切断型よ

10

20

30

40

50

りも内因性ヘプシジン - 25 を選択的に免疫沈降させるそれらの能力について評価され得る。

【0118】

抗ヒトヘプシジン Mabs または Fab's を、炭酸 - 重炭酸 (pH 9.4) バッファー中に 1 時間室温にて 2 mg / L の濃度において、96 - ウエル標準 E L I S A プレートの別個のウェル上にコーティングする。次いで、ウェルを吸引し、T B S T で 3 回洗浄する。既知量のヘプシジン - 25 (アッセイバッファー中に希釈された) を含有するヒト血清サンプルを、100 µl / ウェルで 1 時間室温にて加える。ウェルを吸引し、T B S T で 3 回洗浄する。捕捉されたヘプシジンポリペプチドを、40 µL / ウェルの 0.1% ギ酸を 5 分間室温にて加えることにより溶出する。溶出されたサンプルを収集し、C4 Zi p Tip (商標) (Millipore, Billerica, MA)、すなわち、フェムトモルからピコモルのタンパク質またはペプチドを理想的には 25,000 分子量から 100,000 分子量の範囲で精製しあつ濃縮するためのクロマトグラフィー媒体を敷き詰めた状態の 10 µL ピペットチップ、を用いて濃縮する。1マイクロリットルの 2 分の 1 のサンプルを M A L D I 標的上にスポットし、等量のマトリクス溶液 (50% アセトニトリル、アルファ - シアン - 4 - ヒドロキシ桂皮酸で飽和された 0.1% TFA) をサンプルに加える。サンプルを乾燥し、線形モードで操作される 4700 TOF - TOF 質量分析計 (Applied Biosystems) で分析する。

【0119】

直前に上述した M A L D I - T O F スペクトロメトリーを実質的に用いて行われた実験は、Mab 3.23 がヘプシジン - 25 に結合し、より低い程度でヘプシジン - 20 に結合したことを示した (図 1 および 2)。Mab 3.23 は、検出可能なレベルのヘプシジン - 22 (分子量 2436 Da)、ヘプシジン - 24 (分子量 2674 Da)、またはプロヘプシジン (分子量 6929 Da) と結合することを示さなかった (当然ながら、試験された血清サンプルは期待量のヒトヘプシジンのこれらの形態を含むものと仮定する)。

【0120】

ヒト血清中のどのヘプシジン種が Mab 5E8 により結合されるかを決定するために、類似の実験を、M A L D I - T O F スペクトロメトリーを用いて行った。これらの実験は、Mab 5E8 がヒト血清中のヘプシジン - 25 のみに結合したことを決定した (図 3 および 4)。重要なことに、ヘプシジン - 20、ヘプシジン - 22、プロヘプシジン、または他のヘプシジン種のいずれも、再度 Mab 5E8 に結合しなかった (血清サンプル中に予想通りヒトヘプシジンのこれらの種が存在していたものと仮定する)。

【0121】

したがって、Mab 5E8 またはそれら由来の抗体もしくは限定されないが Mab OH4 を含むそれらに関連する抗体を用いる免疫学的検定は、ヒトヘプシジン - 25 (ヒト血清中のヘプシジンの活性な生理学的に関連した形態) に対して、高度に特異的かつ選択的である。特異性および / または選択性における更なる改善が、Mab 5E8 またはそれら由来の抗体もしくは限定されないが Mab OH4 を含むそれらに関連する抗体ならびに Mab 3.23、Mab 3.12 またはそれら由来の抗体もしくはそれらに関連する抗体の使用を組み合わせた、ヒトヘプシジン - 25 に対する免疫学的検定において期待されている。

【0122】

(実施例 7 (抗体の直接標識を用いずに) ヒトヘプシジン - 25 を測定するためのサンドイッチ E L I S A アッセイ)

サンドイッチ E L I S A を、(i) 標識した結合抗体を非標識の OH4 と置換すること、および (ii) OH4 の結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス抗体を用いて間接的に検出することを除いて、実施例 5 のように行う。

【0123】

上述のようにサンドイッチ E L I S A における Mab 3.23 および非標識の Mab

10

20

30

40

50

OH 4 を用いて、ヒトヘプシジン - 2 5 を、約 0 . 2 n g / m L の感度にてヒト血清において選択的に検出した。

【 0 1 2 4 】

(実施例 8 ヒトヘプシジン - 2 5 を測定するためのメソスケールディスカバリー・サンドイッチ免疫アッセイ)

【 0 1 2 5 】

ヒトヘプシジン - 2 5 メソスケールディスカバリー (Meso Scale Disc overy , Gaithersburg , MD) (MSD) 免疫アッセイを上述の試薬を用いて構築した。つまり、 1 mg の Mab OH 4 を、 50 % のグリセロール中に希釈した市販のキット (Pierce Biotechnology , Rockville , IL) を用いてビオチン化し、必要となるまで - 20 °C で保存した。ストレプトアビシンコーティングされかつプロックされた E L I S A プレートのウェルを、 2 mg / L の濃度にてビオチン化 Mab OH 4 とともに 1 時間インキュベートした。その後、ウェルを吸引し、 T B S T (10 mmol / L の Tris 、 pH 7.40 、 1 mL の Tween 20 / L を含む 150 mmol / L の NaCl を含有する Tris 緩衝化生理食塩水) で 3 回洗浄した。次に、 100 μL のヘプシジン標準 (50 mmol / L の HEPES 、 pH 7.40 、 150 mmol / L の NaCl 、 10 mL / L の Triton X - 100 、 5 mmol / L の EDTA 、および 5 mmol / L の EGTA からなるアッセイバッファー中の種々の濃度の合成されたヘプシジン - 2 5 タンパク質) を、較正曲線を生成するためにウェルに加えた。同時に、血清サンプルを、アッセイバッファー中で 1 : 20 に希釈し、それらの個々のウェルに加え、 E L I S A プレートを 1 時間室温にてインキュベートした。吸引後、ウェルを T B S T で 3 回洗浄し、 100 μL の 1 : 1000 希釈のルテニウムで標識した Mab 3 . 23 を 1 mg / mL にてウェルに加えて、 1 時間室温にてインキュベートした。吸引後、ウェルを T B S T で 3 回洗浄し、ウェルにわたって電圧を通し各ウェルからルテニウム電気化学発光を記録する MSD リーダーを用いて E L I S A プレートを発現させた。 MSD ソフトウェアおよびシグマプロット (Sigma Plot) バージョン 8 . 0 を E L I S A の較正曲線におけるフィッティングのために用いた。

【 0 1 2 6 】

MSD サンドイッチ免疫アッセイにおける抗体の最適なペアを、捕捉抗体として Mab OH 4 と、結合抗体として Mab 3 . 23 とがペアになるように決定した。合成ヘプシジン - 2 5 タンパク質を 10 μg / L の濃度にて調製し、標準曲線を生成するために連続的に希釈した。図 5 に示すように、 E L I S A は、許容可能なダイナミックレンジ、バックグラウンド、および感度を有することが見出された。ゼロ較正器からの 3 つの標準偏差評価に基づいて、免疫アッセイが、 L C / M S 型アッセイ (M u r p h y ら (2007)) により測定される場合、ヒト血清ヘプシジン - 2 5 のレベルの予め推定した測定値に基づいて、ヒト血清ヘプシジン - 2 5 のレベルを測定するのに十分な感度以上を有すべきことを示す、 0 . 01 μg / L よりも良くなるように、免疫アッセイの感度を決定した。また、図 2 にグラフ化されたデータは、ヘプシジン - 20 またはヘプシジン - 22 が検出できないため、 MSD サンドイッチ免疫アッセイがヘプシジン - 2 5 に対して選択的であることを示す。加えて、組み換え標準および実際のヒト血清サンプルに関する免疫アッセイ希釈曲線を平行になるように決定し、免疫アッセイは、ヒト血清サンプルについて優れた希釈直線性を示した (データは示さず) 。

【 0 1 2 7 】

MSD サンドイッチ免疫アッセイ法の選択性および感度を、上述した代表的な L C / M S アッセイ (M u r p h y ら (2007)) と比較した。より具体的には、健常者および癌患者の混合物由来の 52 個のヒト血清サンプルを、 MSD サンドイッチ免疫アッセイと、ヘプシジン - 2 5 に対して特異的であることを示した上述した L C / M S アッセイ (M u r p h y ら (2007)) の両方を用いて分析した。この比較からの結果は、 MSD 免疫アッセイを用いて決定されたヘプシジン - 2 5 の値が、 MSD サンドイッチ免疫アッセイがヒト血清サンプル中のヘプシジン - 2 5 を特異的かつ選択的に測定することを裏付け

る（データは示さず）、LC/MSヘプシジン-25アッセイの値（ $r = 0.98$ 、 $p < 0.00001$ ）と、非常に高度に相関したことを示した。

【0128】

MSDサンドイッチ免疫アッセイのいくつかのパラメーターを、ヒト血清サンプルを用いて評価した。より具体的には、凍結融解安定性を、4つの異なる血清サンプルを試験することにより評価した。これらの結果は、MSDサンドイッチ免疫アッセイが、5回の凍結融解サイクル後であっても、一貫して80～120%のヘプシジン-25の回収を有する凍結融解安定性を持つことを示した。凍結融解サイクルの個々の結果は、以下のとおりであった。サンプルAの場合、それぞれ0.16、0.16、0.17、0.17、0.17、および0.17 $\mu\text{g}/\text{L}$ ；サンプルBの場合、それぞれ4.5、4.4、4.6、4.6、4.6、および4.4 $\mu\text{g}/\text{L}$ ；サンプルCの場合、それぞれ8.9、9.6、9.7、9.7、9.9、および9.6 $\mu\text{g}/\text{L}$ ；サンプルDの場合、それぞれ15.1、15.1、15.4、15.7、15.4、および15.4 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。MSDサンドイッチ免疫アッセイの正確性は、0.16、4.5、および15.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ の内因性ヘプシジン-25を含有するヒト血清サンプルを用いて評価した。内部（intra）アッセイ（ $n = 20$ ）の正確性結果（CV）は、それぞれ上述のレベルにおいて、試験されたヘプシジン-25の全濃度において許容可能な正確性を示す、3.4%、4.5%、および3.5%であった。

【0129】

ヒト血清に加えられた合成ヘプシジン-25タンパク質の回収を評価するために、合成ヘプシジン-25タンパク質を4つの異なるヒト血清サンプル（各サンプルは、非常に低い濃度の内因性ヘプシジン-25を含有する）に、それぞれ250、25、2.5、および0.25 $\mu\text{g}/\text{L}$ の濃度にて加えた。これらのサンプルを、MSDサンドイッチ免疫アッセイを用いて分析した。平均（SD）結果は、試験されたヘプシジン-25の全レベルにて80～120%の回収を示す、それぞれ287（6） $\mu\text{g}/\text{L}$ 、24.2（0.2） $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2.0（0.1） $\mu\text{g}/\text{L}$ 、および0.23（0.01） $\mu\text{g}/\text{L}$ であった。

【0130】

MSDサンドイッチ免疫アッセイの標準範囲は、正常な健康の志願者（50人の男性および50人の女性）からの100個の血清サンプルを実施することにより確定した。これらサンプルのヘプシジン-25の値の範囲は、0.02 $\mu\text{g}/\text{L}$ ～25 $\mu\text{g}/\text{L}$ であり、平均値は $3.0 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{L}$ であり、LC/MSアッセイを用いる正常なヒトにおいて予め報告されたヘプシジン-25のレベルと一致した（MurphyらBlood, 110:1048-54 (2007)を参照）。

【0131】

興味深いことに、正常なヒト対象におけるヘプシジン-25のレベルは、男性（ $4.2 \pm 0.8 \mu\text{g}/\text{L}$ ）と比較して女性（ $1.8 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{L}$ ）の方が有意に（ $p < 0.01$ ）低いことが見出された。また、これらの正常な対象におけるヘプシジン-25のレベルは、血清フェリチン濃度と比較したところ、血清フェリチンレベル（ $r = 0.71$ 、 $p < 0.001$ ）（データは示さず）と直接相関していることが見出された。

【0132】

最後に、MSDサンドイッチ免疫アッセイによりそれぞれ決定された、癌患者（ $n = 34$ ）の血清におけるヘプシジン-25のレベルを、正常な健康の志願者（ $n = 100$ ）の血清におけるヘプシジン-25のレベルと比較した。この比較結果は、ヘプシジン-25のレベルが正常なコントロール（ $3.0 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{L}$ ）（データは示さず）と比較して、癌を有する患者において有意に（ $p < 0.001$ ）上昇した（ $70.9 \pm 10.4 \mu\text{g}/\text{L}$ ）ことを示した。興味深いことに、血液学的悪性腫瘍（ $83.3 \pm 11.9 \mu\text{g}/\text{L}$ ）および非血液学的悪性腫瘍（ $58.4 \pm 17 \mu\text{g}/\text{L}$ ）の両方を有する患者コホートは、正常なコントロール（両方について $p < 0.001$ ）と比較して、それぞれ有意にヘプシジン-25のレベルを上昇させたことを示し、これは、上昇したヘプシジン-25のレベルが癌関連貧血において重要な役割を担い得ることを示唆し得る（データは示さず）

。

【0133】

ヘプシジン-25に対して非特異的でありかつプロヘプシジンおよび他の非関連ヘプシジン種と交差反応し得る、既知のELISA法と比較して、本明細書において開示されたMSDサンドイッチ免疫アッセイは、ヒト血清において特異的かつ選択的にヘプシジン-25のレベルを測定し、上述したヘプシジン-25についての代表的な方法であるLC/MSアッセイとよく相関する。ヒト血清ヘプシジンのレベルを測定するためのLC/MS型法を超えるMSDサンドイッチ免疫アッセイの1つの利点とは、MSDサンドイッチ免疫アッセイが、ほとんどの臨床検査室において実施できることである。これは、一般的に複雑な実験や高度に専門化された操作者の専門知識がLC/MS型アッセイを慣例的に行うのに必要とされるが、本MSDサンドイッチ免疫アッセイがどちらも必要としないことによる。加えて、MSDサンドイッチ免疫アッセイは、LC/MSアッセイよりも非常に高度にハイスループットである可能性を有するはずである。したがって、MSDサンドイッチ免疫アッセイは、ヒト対象におけるヘプシジン-25のレベルを選択的に測定するよう慣例的に、臨床的に利用され得る方法を提供する。

10

【図1】

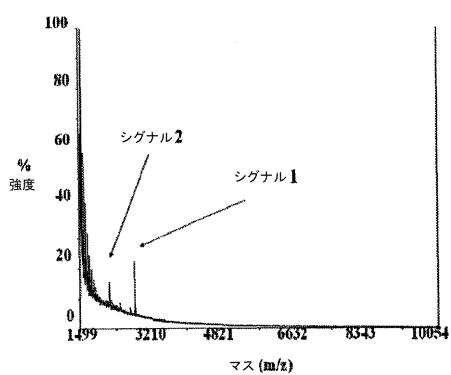


Figure 1

【図2】

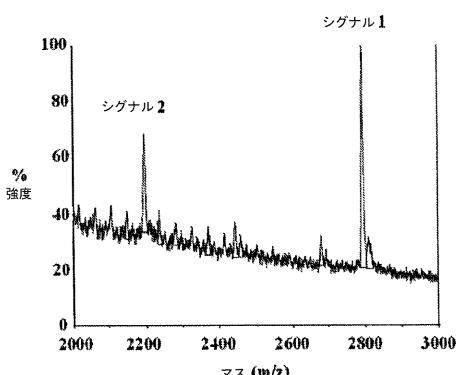


Figure 2

【図3】

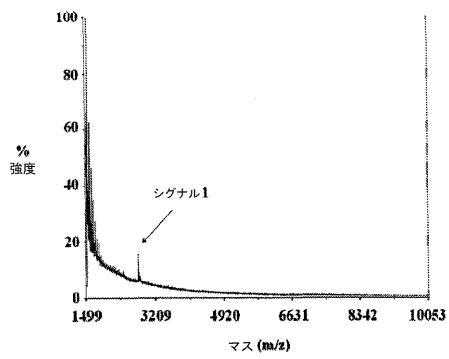


Figure 3

【図4】

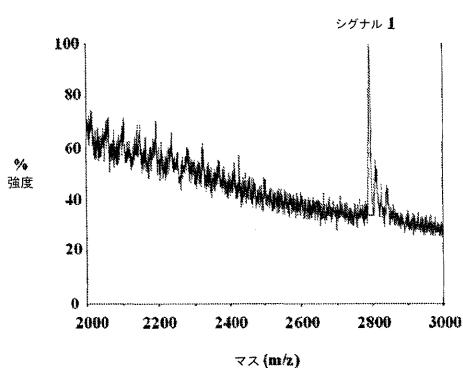


Figure 4

【図5】

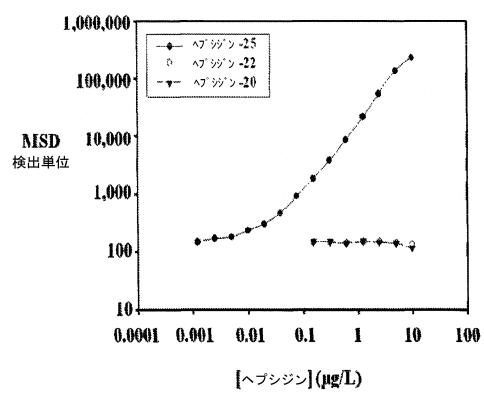


Figure 5

【配列表】

0005730200000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ドンミエン・ドーン・マン・レウン
アメリカ合衆国4 6 2 8 5 インディアナ州インディアナポリス、リリー・コーポレイト・センター
、イーライ・リリー・アンド・カンパニー
- (72)発明者 ルアン・ペン
アメリカ合衆国4 6 2 8 5 インディアナ州インディアナポリス、リリー・コーポレイト・センター
、イーライ・リリー・アンド・カンパニー
- (72)発明者 タン・イン
アメリカ合衆国4 6 2 8 5 インディアナ州インディアナポリス、リリー・コーポレイト・センター
、イーライ・リリー・アンド・カンパニー
- (72)発明者 デリック・ライアン・ウィッチャー
アメリカ合衆国4 6 2 8 5 インディアナ州インディアナポリス、リリー・コーポレイト・センター
、イーライ・リリー・アンド・カンパニー
- (72)発明者 ピア・パウリーナ・ヤキ
アメリカ合衆国4 6 2 8 5 インディアナ州インディアナポリス、リリー・コーポレイト・センター
、イーライ・リリー・アンド・カンパニー

審査官 原 大樹

- (56)参考文献 国際公開第2 0 0 6 / 0 9 9 1 2 6 (WO , A1)
特表2 0 0 4 - 5 3 6 0 7 7 (JP , A)
国際公開第2 0 0 5 / 0 3 5 7 5 6 (WO , A1)
米国特許出願公開第2 0 0 6 / 0 0 1 9 3 3 9 (US , A1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
G 0 1 N 3 3 / 0 0 - 3 3 / 9 8
M E D L I N E / B I O S I S / E M B A S E / W P I D S / W P I X / C A p l u s (S T N
)
J S T p l u s / J M E D p l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
U n i P r o t / G e n e S e q