(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2024-546028
(P2024-546028A)
(43)公表日　令和6年12月17日(2024.12.17)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）	
C07K	*16/26*	*(2006.01)*	C07K	16/26	ZNA	4B064	
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13		4B065	
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4H045	
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15			
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19			

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全92頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-527527(P2024-527527)
(86)(22)出願日　令和4年11月7日(2022.11.7)
(85)翻訳文提出日　令和6年7月10日(2024.7.10)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/080897
(87)国際公開番号　WO2023/083723
(87)国際公開日　令和5年5月19日(2023.5.19)
(31)優先権主張番号　21207858.8
(32)優先日　令和3年11月11日(2021.11.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　591003013
エフ．ホフマン－ラ ロシュ アーゲー
Ｆ．ＨＯＦＦＭＡＮＮ－ＬＡ ＲＯＣＨＥ ＡＫＴＩＥＮＧＥＳＥＬＬＳＣＨＡＦＴ
スイス・シーエイチ－４０７０バーゼル・グレンツアーヘルストラツセ１２４
(74)代理人　100118902
弁理士　山本 修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前 徹
(74)代理人　100196508
弁理士　松尾 淳一
(72)発明者　ゲルク，ミヒャエル
ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク，ノ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　Ｌ－チロキシンに対する新規なモノクローナル抗体およびその診断的使用

(57)【要約】
本発明は、Ｌ－チロキシン（Ｔ４）に特異的に結合する新規なモノクローナル抗体、ならびにそのような抗体を含む組成物およびキットを提供する。さらに、そのようなモノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチド、前記抗体を発現する宿主細胞、そのような抗体を産生する方法、およびそのようなモノクローナル抗体を使用する診断方法が提供される。本発明のモノクローナル抗体は、３３位にＶまたはＡ；５０位にＹ；５２位にＷ；９８位にＩ、９９位にＧ、ＡまたはＶ；１００位にＹ；および１００ｂ位にＩを含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、２８位にアミノ酸ＨまたはＹ；２９位にＮまたはＫ；３２位にＷ；９１位にＧまたはＡ；９２位にＹ、ＷまたはＦ；９３位にＳまたはＴ；９５ｂ位にＹまたはＦ；９５ｃ位にＮ、Ｓ、ＴまたはＱ；および９６位にＨを含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含み、ＶＨおよびＶＬにおけるアミノ酸の位置は、それぞれＫａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｌ－チロキシン（Ｔ４）に特異的に結合するモノクローナル抗体であって、前記モノクローナル抗体が、
ｉ）３３位にＶまたはＡ；５０位にＹ；５２位にＷ；９８位にＩ、９９位にＧ、ＡまたはＶ；１００位にＹ；および１００ｂ位にＩを含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）２８位にアミノ酸ＨまたはＹ；２９位にＮまたはＫ；３２位にＷ；９１位にＧまたはＡ；９２位にＹ、ＷまたはＦ；９３位にＳまたはＴ；９５ｂ位にＹまたはＦ；９５ｃ位にＮ、Ｓ、ＴまたはＱ；および９６位にＨを含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と
を含み、
前記ＶＨおよび前記ＶＬ中の前記アミノ酸の位置は、それぞれＫａｂａｔナンバリングスキームに従って示される、モノクローナル抗体。
【請求項２】
前記ＶＨが、３４位にＭ、Ｌ、ＩもしくはＶ；３５位にＮ、Ｓ、ＴもしくはＱ；５１位にＩ、Ａ、ＬもしくはＶ；５２ａ位にＴもしくはＳ；５３位にＲ、Ｇ、ＤもしくはＫ；９７位にＨ、Ａ、ＲもしくはＫ；および／または１００ａ位にＮ、ＡもしくはＱを含み、前記アミノ酸の位置が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示され、ならびに／または前記ＶＬが、３０位にＮ、Ｑ、ＳもしくはＴ；３１位にＡ、ＮもしくはＶ；９４位にＧ、ＡもしくはＳ；９５位にＳ、Ｇ、Ｎ、Ｑ；９５ａ位にＴ、ＳもしくはＧ；および／または９７位にＶ、Ａ、ＩもしくはＬを含み、前記アミノ酸の位置が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される、請求項１に記載のモノクローナル抗体。
【請求項３】
Ｌ－チロキシン（Ｔ４）に特異的に結合するモノクローナル抗体であって、前記モノクローナル抗体が、
ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位、２位、４位および５位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体；（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号８の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１０の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と
を含む、モノクローナル抗体。
【請求項４】
前記軽鎖可変ドメインが、配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２、または配列番号１１の４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、請求項３に記載のモノクローナル抗体。
【請求項５】
３７℃の温度において、Ｔ４との前記モノクローナル抗体の会合速度定数（k_a）が、$1.9 \times 10^{7} M^{-1} sec^{-1}$以上である、請求項１～４のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【請求項６】
Ｔ４への結合についての前記会合速度定数（k_a）が、配列番号４８の重鎖および配列番号４９の軽鎖を含むかまたはそれらからなる抗体のＴ４への前記結合についての会合速度定数（k_a）の少なくとも１０％に対応し、会合速度定数が同一の実験条件下で測定される、請求項１～５のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項７】
前記モノクローナル抗体が、Ｔ４を、３－ヨード－Ｌ－チロシン（Ｌ－Ｔ３）、ｒ甲状腺ホルモン（ｒＴ３）、３，３’，５－トリ－ヨード－サイロ酢酸、３，３’，５，５’－テトラ－ヨードサイロ酢酸、３，５－ジ－ヨード－Ｌ－チロシンおよび／または３－ｉ－Ｌ－チロシンと識別する、請求項１～６のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【請求項８】
前記モノクローナル抗体が、Ｔ４を定量するための競合的イムノアッセイにおいて使用される場合、他の点では同一のイムノアッセイ設定において、配列番号４８の重鎖配列および配列番号４９の軽鎖配列を有するＦａｂフラグメントを用いて達成されるシグナル対ノイズ比の少なくとも２９％、実施形態において６５％および実施形態において少なくとも９５％であるシグナル対ノイズ比を示す、請求項１～７のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【請求項９】
ポリヌクレオチドであって、
（ｉ）請求項１～８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体の前記重鎖もしくは重鎖可変ドメイン、および／または
（ｉｉ）請求項１～８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体の前記軽鎖もしくは軽鎖可変ドメイン
をコードする、ポリヌクレオチド。
【請求項１０】
請求項９に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。
【請求項１１】
請求項９に記載のポリヌクレオチドまたは請求項１０に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項１２】
請求項１～８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を産生する方法であって、前記方法が、請求項１１に記載の宿主細胞を培養することと、前記抗体を単離することとを含む、方法。
【請求項１３】
請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体、請求項９に記載のポリヌクレオチド、請求項１０に記載のベクター、および／または請求項１１に記載の宿主細胞を含む、組成物。
【請求項１４】
試料中のＴ４、特に遊離Ｔ４のインビトロ検出または定量のための、請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体または請求項１３に記載の組成物の使用。
【請求項１５】
請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体を使用して、試料中のＴ４、特に遊離Ｔ４を定量するためのインビトロイムノアッセイ方法。
【請求項１６】
請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体または請求項１３に記載の組成物を含む、キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、Ｌ－チロキシン（Ｔ４）に対する新規なモノクローナル抗体、ならびにそのような抗体を含む組成物およびキットを提供する。さらに、そのようなモノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチド、前記抗体を発現する宿主細胞、そのような抗体を産生する方法、およびそのようなモノクローナル抗体を使用する診断方法が提供される。
【背景技術】
【０００２】
Ｌ－チロキシンホルモン（本明細書では、後にＬ－Ｔ４またはＴ４と呼ばれる；ＣＡＳ

番号：５１－４８－９）は、甲状腺によって血流中に分泌される主要な甲状腺ホルモンである。トリヨードチロニン（Ｔ３）と共に、それは身体の代謝速度を調節するのに重要な役割を果たし、心血管系、成長および骨代謝に影響を及ぼし、性腺機能および神経系の正常な発達に重要である（Ｋｒｏｎｅｎｂｅｒｇ ＨＭ ｅｔ ａｌ．Ｗｉｌｌｉａｍｓ Ｔｅｘｔｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，１２ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，２０１１，ｃｈａｐｔｅｒ １０，ｐ．３０１－３１１）。Ｔ４は、遊離および血清結合ホルモンの平衡混合物として血流中を循環する。遊離Ｔ４（ｆＴ４）は、未結合の生物学的に活性な形態であり、総Ｔ４のわずか０．０３％に相当する。残りのＴ４は不活性であり、チロキシン結合グロブリン（ＴＢＧ）（７５％）、プレアルブミン（１５％）、およびアルブミン（１０％）等の血清タンパク質に結合する（Ｒｏｂｂｉｎｓ Ｊ，Ｒａｌｌ ＪＥ．Ｒｅｃｅｎｔ Ｐｒｏｇ Ｈｏｒｍ Ｒｅｓ １９５７；１３：１６１－２０８；Ｏｐｐｅｎｈｅｉｍｅｒ ＪＨ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ １９６８；２７８（２１）：１１５３－１１６２；ＤｅＧｒｏｏｔ ＬＪ，Ｌａｒｓｅｎ ＰＲ，Ｈｅｎｎｅｍａｎｎ Ｇ．Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８４：６２－６５；Ｅｋｉｎｓ ＲＰ．Ｅｎｄｏｃｒ Ｒｅｖ １９９０；１１（１）：５－４６）。遊離Ｔ４の測定は、これらの結合タンパク質の濃度および結合特性の変化とは無関係であるという利点を有し、したがって、結合パラメーター（Ｔ取り込み、ＴＢＧ）の追加の決定は不要である。したがって、遊離Ｔ４は、甲状腺状態の評価のための臨床ルーチン診断における有用なツールである。甲状腺障害が疑われ、甲状腺抑制療法をモニタリングするのにも適している場合、それはＴＳＨと一緒に測定されるべきである（Ｋｒｏｎｅｎｂｅｒｇ ＨＭ，Ｍｅｌｍｅｄ Ｓ，Ｐｏｌｏｎｓｋｙ ＫＳ，ｅｔ ａｌ．Ｗｉｌｌｉａｍｓ Ｔｅｘｔｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，１２ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，２０１１，ｃｈａｐｔｅｒ １０，ｐ．３０１－３１１；Ｗｕ ＡＨＢ．Ｔｉｅｔｚ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｓｔｓ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，４ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，２００６，ｓｅｃｔｉｏｎ ＩＩ，ｐ．１０７６－１０７７；Ｂｒｅｎｔ ＧＡ．Ｔｈｙｒｏｉｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ Ｔｅｓｔｉｎｇ．Ｓｐｒｉｎｇｅｒ，Ｂｅｒｌｉｎ，１ｓｔ ｅｄｉｔｉｏｎ，２０１０，ｃｈａｐｔｅｒ ５，ｐ．８６－８８）。

【０００３】

遊離甲状腺ホルモンレベルを推定するための様々な方法が利用可能である。平衡透析または限外濾過によるｆＴ４およびｆＴ３の直接測定は、通例の診断目的に一般的に使用される免疫学的手順を標準化するための参照方法として主に使用される（Ｗｕ ＡＨＢ．Ｔｉｅｔｚ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｓｔｓ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，４ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，２００６，ｓｅｃｔｉｏｎ ＩＩ，ｐ．１０７６－１０７７；Ｂｒｅｎｔ ＧＡ．Ｔｈｙｒｏｉｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ Ｔｅｓｔｉｎｇ．Ｓｐｒｉｎｇｅｒ，Ｂｅｒｌｉｎ，１ｓｔ ｅｄｉｔｉｏｎ，２０１０，ｃｈａｐｔｅｒ ５，ｐ．８６－８８）。

【０００４】

いくつかの市販の完全自動化ｆＴ４および総Ｔ４イムノアッセイは、例えばヒツジまたはウサギで産生されたポリクローナル抗体を使用する。しかしながら、日常的なインビトロ診断製品のためのポリクローナル抗体の使用からいくつかの欠点が生じる：１）動物血清からの起源のために、抗体調製物の大部分は最初に非特異的ＩｇＧで存在することから、通常、標的特異的抗体は、例えば、溶出工程中に抗体を好ましくない条件、例えば低ｐＨまたは他の変性条件に曝露するアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製しなければならず、部分的なアンフォールディングに起因する精製抗体の疎水性の増強をもたらし得る。高親和性抗体の喪失さえも、それらが抗体の完全な変性なしに標的から全く溶出され得ない場合に起こり得る。２）哺乳動物免疫系の性質のために、産生された抗体の品質は、親和性および特異性の分布に関して異なる動物間で非常に可変であり得、また、

経時的に連続して採取された単一の動物からの出血は、必然的に、標的特異的抗体の親和性、特異性、また濃度の分布に関して変化する。明らかに、これは抗体調製物自体のロット間変動の問題を引き起こすが、結果として、異なるロットの精製ポリクローナル抗体を用いて生成されたイムノアッセイの挙動が変化するリスクももたらす。

【０００５】

ポリクローナル抗体の欠点にもかかわらず、それに基づく市販のイムノアッセイ、例えば特にＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ＦＴ４　ＩＩＩ（材料番号０７９７６８３６１９０）は、交差反応物に関して良好な分析感度および低い交差反応性を示す。

【０００６】

モノクローナル抗体を作製するための強力な方法でさえも、先行技術において利用可能であり（例えば、ＫＯＨＬＥＲ，Ｇ．，ＭＩＬＳＴＥＩＮ，Ｃ．Ｃｏｎｔｉｎｕｏｕｓ ｃｕｌｔｕｒｅｓ ｏｆ ｆｕｓｅｄ ｃｅｌｌｓ ｓｅｃｒｅｔｉｎｇ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｏｆ ｐｒｅｄｅｆｉｎｅｄ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ．Ｎａｔｕｒｅ ２５６，４９５－４９７（１９７５）．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／２５６４９５ａ０）、シグナル動力学および分析物特異性を失うことなく、イムノアッセイにおいてポリクローナル抗体を置き換えることは自明ではない。特に、Ｌ－Ｔ４等のハプテン分析物に関しては、構造的に密接に関連する構造との望ましくない交差反応を示すことなく優れた速度論的特徴を提供するモノクローナル抗体を同定することは困難である。

【０００７】

したがって、Ｌ－Ｔ４（例えば、ｆＴ４）を構造的に関連する物質／誘導体と十分に識別することができる優れた速度論的特徴を有する新しいモノクローナルＬ－Ｔ４抗体を提供する必要性が高い。さらに、モノクローナル抗体に基づくＬ－Ｔ４（例えば、ｆＴ４）イムノアッセイを提供する必要があり、これは、ポリクローナル抗体に基づく以前に利用可能でよく受け入れられているアッセイよりも、交差反応物に関する分析性能および／または特異性が類似しているか、更には改善されていることを示す。

【発明の概要】

【０００８】

上記の必要性は、本明細書に記載の本発明によって対処される。

【０００９】

第１の態様において、本発明は、Ｌ－チロキシン（Ｔ４）に特異的に結合するモノクローナル抗体に関する。Ｔ４に結合する８４０のモノクローナル抗体のセットの中で、本発明者らは、驚くべきことに、Ｔ４への結合について並外れて高い会合速度定数（k_a）を共有するＣＤＲ配列において非常に高い配列同一性を有する３つの密接に関連する抗体のファミリーを同定した。このような高い会合速度定数は、Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ベースのイムノアッセイ等のハイスループットイムノアッセイにおいて重要であり、この場合、利用可能な抗体－抗原複合体の形成には典型的には非常に短い時間しかない。さらに、本発明の抗体は、ｆＴ４に対するK_Dとの結合親和性がサブナノモル濃度の範囲であることを特徴とする。本明細書で提供される抗体のファミリーは、ｆＴ４に対する高い特異性を更に特徴とし、特にｆＴ４を密接に関連する化合物と識別することができる（下記を参照）。

【００１０】

合わせて、これらの特徴は、特に試料中のｆＴ４のレベルを検出するための競合的イムノアッセイにおいて使用される場合、本発明の第１の態様による抗体を優れたモノクローナル抗体のセットにする。それらの速度論的特徴により、本発明の第１の態様によるモノクローナル抗体は、以前に使用されたポリクローナル抗体を効率的に置き換えることができ、それにより、ポリクローナル抗体に関連する全ての欠点を克服することができる。異なる抗体の混合物を含むポリクローナル抗体の性能が、単一のモノクローナル抗体によって非常によく模倣され得ることは、驚くべき発見である。

【００１１】

Ｔ４との複合体における抗体３８Ｆ８（実施例４のイムノアッセイ実験において最良の

性能を有する同定された抗体ファミリーのメンバー）の結晶構造は、Ｔ４と直接相互作用する全てのアミノ酸残基を明らかにした。驚くべきことに、これらのアミノ酸は、同定された抗体ファミリーの他の２つの抗体７Ｄ４および７Ｅ１０において大部分が同一である。この高い同一性は、３つ全ての同定された抗体が少なくとも大部分同一の相互作用パターンを共有することを確認する。いくつかの相違点は、特にＴ４に対する特異性ならびにＴ４への結合に対する会合速度およびK_Dに関する限り、それぞれのアミノ酸位置において、特定の配列バリエーションが抗体機能に劇的な影響を及ぼさないことを実証している。

【００１２】

共結晶構造によって同定された抗体３８Ｆ８のパラトープを図５に示す。実施例７は、抗体ファミリー３８Ｆ８、７Ｅ１０および７Ｄ４内の配列バリエーションに基づく可能なアミノ酸置換を定義したインシリコアプローチおよびモデリングアプローチを記載する。

【００１３】

これらの分析によって実証されるように、本発明のモノクローナル抗体は、

ｉ）３３位にＶまたはＡ；５０位にＹ；５２位にＷ；９８位にＩ、９９位にＧ、ＡまたはＶ；１００位にＹ；および１００ｂ位にＩを含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）２８位にアミノ酸ＨまたはＹ；２９位にＮまたはＫ；３２位にＷ；９１位にＧまたはＡ；９２位にＹ、ＷまたはＦ；９３位にＳまたはＴ；９５ｂ位にＹまたはＦ；９５ｃ位にＮ、Ｓ、ＴまたはＱ；および９６位にＨを含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含み得る。

【００１４】

上に定義された残基は、Ｌ－Ｔ４との３８Ｆ８の共結晶構造においてＴ４と直接相互作用すると同定された。アミノ酸の上記の全ての位置は、それぞれＶＨおよびＶＬのＫａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。

【００１５】

実施形態において、Ｔ４に結合するためのモノクローナル抗体のパラトープは、３３位、５０位、５２位、９８位、９９位、１００位および１００ｂ位のＶＨのアミノ酸ならびに２８位、２９位、３２位、９１位、９２位、９３位、９５ｂ位、９５ｃ位および９６位のＶＬのアミノ酸を含む。ここでも、全ての位置がＫａｂａｔナンバリングスキームに従って示されている。

【００１６】

パラトープに属するアミノ酸残基を決定する方法は当技術分野で公知である。好ましい方法は、Ｌ－Ｔ４と複合体化した抗体の結晶化である。そのような結晶化のための例示的な実施形態は、添付の実施例に提供される。添付の実施例において使用および記載される設定は、他のＴ４抗体にも適用することができる。そのような説明に基づいて、当業者によって軽微な適合を容易に行うことができる。

【００１７】

したがって、本明細書では、パラトープを含むＬ－チロキシン（Ｔ４）に特異的に結合するモノクローナル抗体が提供され、当該パラトープは、

ｉ）３３位にＶまたはＡ；５０位にＹ；５２位にＷ；９８位にＩ、９９位にＧ、ＡまたはＶ；１００位にＹ；および１００ｂ位にＩを含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）２８位にアミノ酸ＨまたはＹ；２９位にＮまたはＫ；３２位にＷ；９１位にＧまたはＡ；９２位にＹ、ＷまたはＦ；９３位にＳまたはＴ；９５ｂ位にＹまたはＦ；９５ｃ位にＮ、Ｓ、ＴまたはＱ；および９６位にＨを含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含むか、またはこれからなり、

式中、全ての位置は、Ｋａｂａｔ命名法に従って命名されている。

【００１８】

特定の実施形態において、モノクローナル抗体は、

ｉ）３３位にＶまたはＡ；５０位にＹ；５２位にＷ；９８位にＩ、９９位にＧ、ＡまたはＶ；１００位にＹ；および１００ｂ位にＩを含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）２８位にアミノ酸ＨまたはＹ；２９位にＮまたはＫ；３２位にＷ；９１位にＧまたはＡ；９２位にＹ、Ｗまたは Ｆ；９３位にＳまたはＴ；９５ｂ位にＹまたはＦ；９５ｃ位にＮ、Ｓ、またはＴ；および９６位にＨを含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と
を含み、
全ての位置は、Ｋａｂａｔ命名法に従って注釈が付けられている。
他の実施形態において、第１の態様のモノクローナル抗体は、
ｉ）３３位にＶ；５０位にＹ；５２位にＷ；９８位にＩ、９９位にＧ；１００位にＹ；および１００ｂ位にＩを含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）２８位にアミノ酸ＨまたはＹ；２９位にＮまたはＫ；３２位にＷ；９１位にＧ；９２位にＹまたはＷ；９３位にＳ；９５ｂ位にＹ；９５ｃ位にＮまたはＳ；および９６位にＨを含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と
を含み、
全ての位置は、Ｋａｂａｔ命名法に従って注釈が付けられている。

【００１９】

好ましい実施形態において、第１の態様のモノクローナル抗体は、抗体クローン３８Ｆ８においてＴ４と直接相互作用することが見出された残基を含む。

【００２０】

したがって、モノクローナル抗体は、
ｉ）３３位にＶ；５０位にＹ；５２位にＷ；９８位にＩ、９９位にＧ；１００位にＹ；および１００ｂ位にＩを含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）２８位にアミノ酸Ｈ；２９位にＮ；３２位にＷ；９１位にＧ；９２位にＹ；９３位にＳ；９５ｂ位にＹ；９５ｃ位にＮ；および９６位にＨを含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と
を含み得、
全ての位置は、Ｋａｂａｔ命名法に従って注釈が付けられている。

【００２１】

別の好ましい実施形態において、第１の態様のモノクローナル抗体は、３８Ｆ８のパラトープ残基に対応する抗体７Ｄ４に見られる残基を含む。したがって、実施形態において、第１のモノクローナル抗体は、
ｉ）３３位にＶ；５０位にＹ；５２位にＷ；９８位にＩ、９９位にＧ；１００位にＹ；および１００ｂ位にＩを含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）２８位にアミノ酸Ｙ；２９位にＫ；３２位にＷ；９１位にＧ；９２位にＷ；９３位にＳ；９５ｂ位にＹ；９５ｃ位にＳ；および９６位にＨを含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と
を含み得、
全ての位置は、Ｋａｂａｔ命名法に従って注釈が付けられている。

【００２２】

別の好ましい実施形態において、第１の態様のモノクローナル抗体は、３８Ｆ８のパラトープ残基に対応する抗体７Ｅ１０に見られる残基を含む。したがって、モノクローナル抗体は、
ｉ）３３位にＶ；５０位にＹ；５２位にＷ；９８位にＩ、９９位にＧ；１００位にＹ；および１００ｂ位にＩを含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）２８位にアミノ酸Ｙ；２９位にＫ；３２位にＷ；９１位にＧ；９２位にＷ；９３位にＳ；９５ｂ位にＹ；９５ｃ位にＮ；および９６位にＨを含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と
を含み得、
全ての位置は、Ｋａｂａｔ命名法に従って注釈が付けられている。

【００２３】

添付の実施例で詳述するように、ＫａｂａｔナンバリングスキームによるＶＨの３４、３５、５１、５２ａ、５３、９７および／または１００ａの位置のアミノ酸ならびにＫａ

ｂａｔナンバリングスキームによるＶＬの３０、３１、９４、９５、９５ａおよび／または９７の位置のアミノ酸は、Ｔ４と直接相互作用するアミノ酸の位置決めに何らかの関連性があるというインシリコの証拠がある。しかし、密接に関連する抗体３８Ｆ８、７Ｅ１０および７Ｄ４に見られるようなこれらのアミノ酸位置のバリエーションによって、または添付の実施例においてインシリコで評価されるように、他のアミノ酸への少なくとも特定のアミノ酸交換は、これらの位置で許容される（表ＸＸも参照）。

【００２４】

本発明のモノクローナル抗体のＶＨは、３４位にＭ、Ｌ、ＩもしくはＶ；３５位にＮ、Ｓ、ＴもしくはＱ；５１位にＩ、Ａ、ＬもしくはＶ、５２ａ位にＴもしくはＳ；５３位にＲ、Ｇ、ＤもしくはＫ；９７位にＨ、Ａ、ＲもしくはＫ；および／または１００ａ位にＮ、ＡもしくはＱを含み得、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。

【００２５】

一実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨは、３４位にＭ、Ｌ、もしくはＩ；３５位にＮ、Ｓ、もしくはＴ；５１位にＩ、Ａ、もしくはＬ、５２ａ位にＴもしくはＳ；５３位にＲ、Ｇ、ＤもしくはＫ；９７位にＨ、Ａ、ＲもしくはＫ；および／または１００ａ位にＮ、ＡもしくはＱを含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。

【００２６】

特定の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨは、３４位にＭもしくはＬ；３５位にＮ；５１位にＩ、５２ａ位にＴ；５３位にＲ、ＧもしくはＤ；９７位にＨもしくはＡ；および／または１００ａ位にＮもしくはＡを含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。

【００２７】

更により具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨは、３４位にＭ；３５位にＮ；５１位にＩ、５２ａ位にＴ；５３位にＲ；９７位にＨ；および／または１００ａ位にＮを含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。

【００２８】

更により具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨは、３４位にＭ；３５位にＮ；５１位にＩ、５２ａ位にＴ；５３位にＲ；９７位にＨ；および１００ａ位にＮを含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。これらのアミノ酸は、例えば、抗体３８Ｆ８のＶＨ中に見出すことができる。

【００２９】

別の具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨは、３４位にＬ；３５位にＮ；５１位にＩ、５２ａ位にＴ；５３位にＧ；９７位にＡ；および１００ａ位にＡを含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。これらのアミノ酸は、例えば、抗体７Ｄ４のＶＨ中に見出すことができる。

【００３０】

別の具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨは、３４位にＭ；３５位にＮ；５１位にＩ、５２ａ位にＴ；５３位にＤ；９７位にＡ；および１００ａ位にＡを含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。これらのアミノ酸は、例えば、抗体７Ｅ１０のＶＨ中に見出すことができる。

【００３１】

本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、３０位にＮ、Ｑ、ＳもしくはＴ；３１位にＡ、ＮもしくはＶ；９４位にＧ、ＡもしくはＳ；９５位にＳ、Ｇ、ＮもしくはＱ；９５ａ位にＴ、ＳもしくはＧ；および／または９７位にＶ、Ａ、ＩもしくはＬを含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。

【００３２】

一実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、３０位にＮ；３１位にＡ

もしくはＮ；９４位にＧ、ＡもしくはＳ；９５位にＳ、Ｇ、もしくはＮ；９５ａ位にＴ、ＳもしくはＧ；および／または９７位にＶもしくはＡを含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。

【００３３】

更により具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、３０位にＮ；３１位にＡ；９４位にＧ；９５位にＳ；９５ａ位にＴ；および／または９７位にＶを含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。これらのアミノ酸は、例えば、抗体３８Ｆ８のＶＬ中に見出すことができる。

【００３４】

別の具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、３０位にＮ；３１位にＮ；９４位にＡ；９５位にＧ；９５ａ位にＧ；および／または９７位にＡを含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。これらのアミノ酸は、例えば、抗体７Ｄ４のＶＬ中に見出すことができる。

【００３５】

別の具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、３０位にＮ；３１位にＮ；９４位にＳ；９５位にＮ；９５ａ位にＳ；および／または９７位にＡを含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。これらのアミノ酸は、例えば、抗体７Ｅ１０のＶＬ中に見出すことができる。

【００３６】

添付の実施例で論じるように、（ｉ）結晶構造に従ってＴ４と相互作用せず、（ｉｉ）相互作用残基を配置するのに関連すると同定されなかった、Ｔ４に対する新規抗体のＣＤＲ中のアミノ酸は、他のアミノ酸で置換することができる。これらのアミノ酸位置は、ＣＤＲ（好ましくはＫａｂａｔナンバリングスキームによって定義される）中の、Ｋａｂａｔナンバリングスキームによる ＶＨの３３位、５０位、５２位、９８位、９９位、１００位、１００ｂ位、３４位、３５位、５１位、５２ａ位、５３位、９７位および１００ａ位ならびにＶＬの２８位、２９位、３２位、９１位、９２位、９３位、９５ｂ位、９５ｃ位、９６位、３０位、３１位、９４位、９５位、９５ａ位および９７位におけるアミノ酸残基以外の全てのアミノ酸を含む。実施形態において、Ｋａｂａｔナンバリングスキームによる以下のアミノ酸位置を他のアミノ酸で置換することができる：

ｉ）ＶＨの３１位、３２位、５４位～６５位、９５位、９６位、１００ｃ位、１０１位および１０２位；ならびに

ｉｉ）ＶＬの２４位、２５位、２６位、２７位、２７ａ位、２７ｂ位、３３位、３４位、５０位～５６位、８９位および９０位。

【００３７】

本発明の抗体のＶＨは、プロリン以外の任意のアミノ酸（例えば、プロリン以外の任意の天然に存在するアミノ酸）、実施形態において、プロリンまたはシステイン以外の任意のアミノ酸（例えば、ＰまたはＣ以外の任意の天然に存在するアミノ酸）から独立して選択される３１位および３２位（Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従う）のアミノ酸を含み得る。実施形態において、ＶＨは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、３１位にＳ、Ｒもしくはその保存的置換、および／またはＫａｂａｔナンバリングスキームに従って、３２位にＮもしくはその保存的置換を含む。例えば、Ｋａｂａｔナンバリングによる ＶＨの位置３１のアミノ酸は、ＳまたはＲから選択され得る。３２位のアミノ酸はＮであってもよい。具体的な実施形態において、ＶＨは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、３１位にＳまたはＲを含み、および／またはＫａｂａｔナンバリングスキームに従って、３２位にＮを含む。

【００３８】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨのＣＤＲ－Ｈ１は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、３１位～３５位を含む。更により好ましい実施形態において、ＶＨのＣＤＲ－Ｈ１は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、３１位～３５位からなる。

【００３９】
本発明のモノクローナル抗体のＶＨは、好ましくは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５４位～６５位にアミノ酸を含む。５４位～６５位のこれらのアミノ酸は、プロリン以外の任意のアミノ酸（例えば、プロリン以外の任意の天然に存在するアミノ酸であり得る）からそれぞれ個別に選択されてもよく、実施形態において、プロリンまたはシステイン以外の任意のアミノ酸（例えば、ＰまたはＣ以外の任意の天然に存在するアミノ酸であり得る）から選択されてもよい。実施形態において、Ｋａｂａｔナンバリングスキームによる５４位～６５位のアミノ酸は、アミノ酸配列ＳＧＮＴＹＹＡＳＷＡＫＧ（配列番号２）、または１２以下、１１以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下もしくは１以下のアミノ酸交換を有するその変異体を有し得る。好ましくは、５４位～６５位のいずれもプロリンではなく、または実施形態においてプロリンおよびシステインではない。好ましい実施形態において、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５４位～６５位のアミノ酸は、アミノ酸配列ＳＧＮＴＹＹＡＳＷＡＫＧ（配列番号２）または２以下のアミノ酸交換を有するその変異体を有し得、５４位～６５位のいずれもプロリンではなく、または実施形態においてプロリンおよびシステインでもない。実施形態において、配列番号２における全てのアミノ酸交換がそれぞれ個別に保存的アミノ酸交換であり得る。具体的な実施形態において、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５４位～６５位のアミノ酸配列は、以下からなる群から選択され得る：ＳＧＮＴＹＹＡＳＷＡＫＧ（配列番号１）、ＳＧＮＴＹＹＡＴＷＡＫＧ（配列番号２）またはＳＧＳＴＹＹＡＴＷＡＫＧ（配列番号３）。これらは、抗体３８Ｆ８、７Ｄ４および７Ｅ１０に見られる対応する配列である。

【００４０】
実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨのＣＤＲ－Ｈ２は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５０位、５１位、５２位、５２ａ位および５３位～６５（すなわち、５３位、５４位、５５位、５６位、５７位、５８位、５９位、６０位、６１位、６２位、６３位、６３位および６５位）を含む。好ましい実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨのＣＤＲ－Ｈ２は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５０位、５１位、５２位、５２ａ位および５３位～６５（すなわち、５３位、５４位、５５位、５６位、５７位、５８位、５９位、６０位、６１位、６２位、６３位、６３位および６５位）からなる。

【００４１】
実施形態において、ＶＨは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、９５位、９６位、１００ｃ位、１０１位および１０２位のアミノ酸を含む。９５位、９６位、１００ｃ位、１０１位および１０２位のアミノ酸は好ましくは個々に、プロリン以外の、または好ましくはプロリンおよびシステイン以外の任意のアミノ酸（例えば、任意の天然に存在するアミノ酸）から選択される。実施形態において、ＶＨの９５位、９６位、１００ｃ位、１０１位および１０２位のアミノ酸は以下のとおりに選択される：９５位におけるＧまたはその保存的置換；９６位におけるＬまたはその保存的置換；１００ｃ位におけるＦまたはその保存的置換；１０１位におけるＮまたはその保存的置換；および１０２位におけるＦまたはその保存的置換（アミノ酸の位置はＫａｂａｔナンバリングスキームに従って示される）。具体的な実施形態において、ＶＨの９５位、９６位、１００ｃ位、１０１位および１０２位のアミノ酸は以下のとおりに選択される：９５位におけるＧ；９６におけるＬ；１００ｃ位におけるＦ；１０１位におけるＮ；および１０２位におけるＦ。

【００４２】
実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨのＣＤＲ－Ｈ３は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、９５位～１００位（すなわち、９５位、９６位、９７位、９８位、９９位および１００位）、１００ａ位、１００ｂ位、１００ｃ位、１０１位および１０２位を含む。好ましい実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨのＣＤＲ－Ｈ３は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、９５位～１００位（すなわち、９５位、９６位、９７位、９８位、９９位および１００位）、１００ａ位、１００ｂ

位、１００ｃ位、１０１位および１０２位からなる。

【００４３】

本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、２４位、２５位、２６位、２７位、２７ａ位、２７ｂ位、３３位および３４位のアミノ酸を含み得る。実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、２４位、２５位、２６位、２７位、２７ａ位、２７ｂ位、３３位および３４位にプロリン以外の任意のアミノ酸（例えば、任意の天然に存在するアミノ酸）を含み得る。実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、２４位、２５位、２６位、２７位、２７ａ位、２７ｂ位、３３位および３４位にプロリンおよびシステイン以外の任意のアミノ酸（例えば、任意の天然に存在するアミノ酸）を含み得る。

【００４４】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、２４位にＱまたはその保存的置換；２５位にＳもしくはその保存的置換；２６位にＳもしくはその保存的置換；２７位にＱもしくはその保存的置換；２７ａ位にＳもしくはその保存的置換；２７ｂ位にＶもしくはその保存的置換；３３位にＣ、Ｌもしくはその保存的置換；および／または３４位にＳもしくはその保存的置換を含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、２４位にＱまたはその保存的置換；２５位にＳまたはその保存的置換；２６位にＳまたはその保存的置換；２７位にＱまたはその保存的置換；２７ａ位にＳまたはその保存的置換；２７ｂ位にＶまたはその保存的置換；３３位にＣ、Ｌまたはその保存的置換；および３４位にＳまたはその保存的置換を含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、２４位にＱ；２５位にＳ；２６位にＳ；２７位にＱ；２７ａ位にＳ；２７ｂ位にＶ；３３位にＣもしくはＬ；および／または３４位にＳを含み、全ての位置がＫａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。他の具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、２４位にＱ；２５位にＳ；２６位にＳ；２７位にＱ；２７ａ位にＳ；２７ｂ位にＶ；３３位にＣまたはＬ；および３４位にＳを含み、全ての位置がＫａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。

【００４５】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬのＣＤＲ－Ｌ１は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、２４位、２５位、２６位、２７位、２７ａ位、２７ｂ位、２８位、２９位、３０位、３１位、３２位、３３位および３４位を含む。好ましい実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬのＣＤＲ－Ｌ１は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、２４位、２５位、２６位、２７位、２７ａ位、２７ｂ位、２８位、２９位、３０位、３１位、３２位、３３位および３４位からなる。

【００４６】

本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５０位、５１位、５２位、５３位、５４位、５５位および５６位にアミノ酸を含み得る。実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５０位、５１位、５２位、５３位、５４位、５５位および５６位にプロリン以外の任意のアミノ酸（例えば、任意の天然に存在するアミノ酸）を含み得る。実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５０位、５１位、５２位、５３位、５４位、５５位および５６位にプロリンおよびシステイン以外の任意のアミノ酸（例えば、任意の天然に存在するアミノ酸）を含み得る。

【００４７】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、５０位にＧもしくはその保存的置換；５１位にＡもしくはその保存的置換；５２位にＳもしくはその保存的置換；５３位にＴもしくはその保存的置換；５４位にＬもしくはその保存的置換；５５位にＴ、Ａ

もしくはその保存的置換；および／または５６位にＣ、Ｓもしくはその保存的置換を含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、５０位にＧまたはその保存的置換；５１位にＡまたはその保存的置換；５２位にＳまたはその保存的置換；５３位にＴまたはその保存的置換；５４位にＬまたはその保存的置換；５５位にＴ、Ａまたはその保存的置換；および５６位にＣ、Ｓまたはその保存的置換を含み、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５０位～５６位にＧＡＳＴＬＴＳ（配列番号４）またはＧＡＳＴＬＡＳ（配列番号５）を含む。

【００４８】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬのＣＤＲ－Ｌ２は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５０位、５１位、５２位、５３位、５４位、５５位および５６位を含む。好ましい実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬのＣＤＲ－Ｌ２は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５０位、５１位、５２位、５３位、５４位、５５位および５６位からなる。

【００４９】

本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、８９位および９０位にアミノ酸を含み得る。実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って８９位および９０位にプロリン以外の任意のアミノ酸（例えば、任意の天然に存在するアミノ酸）を含み得る。実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、８９位および９０位にプロリンおよびシステイン以外の任意のアミノ酸（例えば、任意の天然に存在するアミノ酸）を含み得る。

【００５０】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、８９位にＡもしくはその保存的置換、および／または９０位にＧもしくはその保存的置換を含み、アミノ酸の位置はＫａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、８９位にＡまたはその保存的置換、および９０位にＧまたはその保存的置換を含み、アミノ酸の位置はＫａｂａｔナンバリングスキームに従って示される。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、８９位にＡ、および／または９０位にＧを含む。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、８９位にＡおよび９０位にＧを含む。

【００５１】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬのＣＤＲ－Ｌ３は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、８９位、９０位、９１位、９２位、９３位、９４位、９５位、９５ａ位、９５ｂ位、９５ｃ位、９６位および９７位を含む。好ましい実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬのＣＤＲ－Ｌ３は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、８９位、９０位、９１位、９２位、９３位、９４位、９５位、９５ａ位、９５ｂ位、９５ｃ位、９６位および９７位からなる。

【００５２】

一態様において、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位、２位、４位および５位から選択される４以下、３以下、２以下、または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、１５以下、１４以下、１３以下、１２以下、１１以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下、１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有す

るその変異体、ならびに（ｃ）配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号８の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される１１以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下、または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１０の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される６以下、５以下、４以下、３以下、２以下、または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００５３】

一態様において、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位、２位、４位および５位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号８の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１０の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００５４】

一態様において、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位、２位、４位および５位から選択される１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号８の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１０の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ド

メイン（ＶＬ）とを含む。
【００５５】
具体的な実施形態において、モノクローナル抗体は、
ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位、２位、４位および５位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号８の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１０の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。
【００５６】
更により具体的な実施形態において、モノクローナル抗体は、
ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位および４位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の５位、８位および１３位から選択される、３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号８の３位および７位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の８位および１０位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１０の４位、５位および６位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。
【００５７】
実施形態において、配列番号６の変異体は、４位にＭ、Ｌ、ＩもしくはＶかつ５位にＮ、Ｓ、ＴもしくはＱを有し、配列番号７の変異体は、２位にＩ、Ａ、ＬもしくはＶ、４位にＴもしくはＳ、かつ５位にＲ、Ｇ、ＤもしくはＫを有し、配列番号８の変異体は、３位にＨ、Ａ、ＲもしくはＫかつ７位にＮ、ＡもしくはＱを有し、配列番号９の変異体は、９位にＮ、Ｑ、ＳもしくはＴかつ１０位にＡ、ＮもしくはＶを有し、および／または配列番号１０の変異体は、６位にＧ、ＡもしくはＳ、７位にＳ、Ｇ、ＮもしくはＱ、８位にＴ、ＳまたはＧかつ１２位にＶ、Ａ、ＩもしくはＬを有する。
【００５８】
具体的な実施形態において、配列番号６の変異体は、４位にＭ、ＬもしくはＩかつ５位にＮ、ＳもしくはＴを有し、配列番号７の変異体は、２位にＩ、ＡもしくはＬ、４位にＴもしくはＳかつ５位にＲ、Ｇ、ＤもしくはＫを有し、配列番号８の変異体は、３位にＨ、Ａ、ＲもしくはＫかつ７位にＮ、ＡもしくはＱを有し、配列番号９の変異体は、９位にＮ、Ｑ、ＳもしくはＴかつ１０位にＡ、ＮもしくはＶを有し、および／または配列番号１０

の変異体は、６位にＧ、ＡもしくはＳ、７位にＳ、ＧもしくはＮ、８位にＴ、ＳもしくはＧかつ１２にＶもしくはＡを有する。

【００５９】

更により具体的な実施形態において、配列番号６の変異体は、４位にＭもしくはＬかつ５位にＮを有し、配列番号７の変異体は、２位にＩ、４位にＴかつ５位にＲ、ＧもしくはＤを有し、配列番号８の変異体は、３位にＨもしくはＡかつ７位にＮもしくはＡを有し、配列番号９の変異体は、９位にＮかつ１０位にＡもしくはＮを有し、および／または配列番号１０の変異体は、６位にＧ、ＡもしくはＳ、７位にＳ、ＧもしくはＮ、８位にＴ、ＳもしくはＧかつ／または１２位にＶもしくはＡを有する。

【００６０】

好ましい実施形態において、配列番号６～１０の変異体は、配列番号６～１０と比較して、１２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有する。

【００６１】

また、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位、２位、４位および５位から選択される４以下、３以下、２以下、または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、１５以下、１４以下、１３以下、１２以下、１１以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下、１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１３の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される１１以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下、または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１６の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される６以下、５以下、４以下、３以下、２以下、または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００６２】

一態様において、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位、２位、４位および５位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１３の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される４以下の位置にアミノ酸置

換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１６の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００６３】

一態様において、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位、２位、４位および５位から選択される１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１３の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１６の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００６４】

具体的な実施形態において、モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位、２位、４位および５位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１３の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１６の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００６５】

更により具体的な実施形態において、モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位および４位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の５位、８位および１３位から選択される、３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列

番号１３の３位および７位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の８位および１０位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１６の４位、５位および６位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００６６】

実施形態において、配列番号６の変異体は、４位にＭ、Ｌ、ＩもしくはＶかつ５位にＮ、Ｓ、ＴもしくはＱを有し、配列番号７の変異体は、２位にＩ、Ａ、ＬもしくはＶ、４位にＴもしくはＳ、かつ５位にＲ、Ｇ、ＤもしくはＫを有し、配列番号１３の変異体は、３位にＨ、Ａ、ＲもしくはＫかつ７位にＮ、ＡもしくはＱを有し、配列番号９の変異体は、９位にＮ、Ｑ、ＳもしくはＴかつ１０位にＡ、ＮもしくはＶを有し、および／または配列番号１６の変異体は、６位にＧ、ＡもしくはＳ、７位にＳ、Ｇ、ＮもしくはＱ、８位にＴ、ＳまたはＧかつ１２位にＶ、Ａ、ＩもしくはＬを有する。

【００６７】

具体的な実施形態において、配列番号６の変異体は、４位にＭ、ＬもしくはＩかつ５位にＮ、ＳもしくはＴを有し、配列番号７の変異体は、２位にＩ、ＡもしくはＬ、４位にＴもしくはＳかつ５位にＲ、Ｇ、ＤもしくはＫを有し、配列番号１３の変異体は、３位にＨ、Ａ、ＲもしくはＫかつ７位にＮ、ＡもしくはＱを有し、配列番号９の変異体は、９位にＮ、Ｑ、ＳもしくはＴかつ１０位にＡ、ＮもしくはＶを有し、および／または配列番号１６の変異体は、６位にＧ、ＡもしくはＳ、７位にＳ、ＧもしくはＮ、８位にＴ、ＳもしくはＧかつ１２にＶもしくはＡを有する。

【００６８】

更により具体的な実施形態において、配列番号６の変異体は、４位にＭもしくはＬかつ５位にＮを有し、配列番号７の変異体は、２位にＩ、４位にＴかつ５位にＲ、ＧもしくはＤを有し、配列番号１３の変異体は、３位にＨもしくはＡかつ７位にＮもしくはＡを有し、配列番号９の変異体は、９位にＮかつ１０位にＡもしくはＮを有し、および／または配列番号１６の変異体は、６位にＧ、ＡもしくはＳ、７位にＳ、ＧもしくはＮ、８位にＴ、ＳもしくはＧかつ／または１２位にＶもしくはＡを有する。

【００６９】

好ましい実施形態において、配列番号６、７、１３、９および１６の変異体は、それぞれ配列番号６、７、１３、９および１６と比較して、１２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有する。

【００７０】

また、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の１位、２位、４位および５位から選択される４以下、３以下、２以下、または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、１５以下、１４以下、１３以下、１２以下、１１以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下、１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される１１以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下、または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有

するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１７の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される６以下、５以下、４以下、３以下、２以下、または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００７１】

一態様において、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、
ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の１位、２位、４位および５位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１７の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００７２】

一態様において、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、
ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の１位、２位、４位および５位から選択される１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１７の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００７３】

具体的な実施形態において、モノクローナル抗体は、
ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の

１位、２位、４位および５位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１７の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００７４】

更により具体的な実施形態において、モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の１位および４位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の５位、８位および１３位から選択される、３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の３位および７位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の８位および１０位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１７の４位、５位および６位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００７５】

実施形態において、配列番号１２の変異体は、４位にＭ、Ｌ、ＩもしくはＶかつ５位にＮ、Ｓ、ＴもしくはＱを有し、配列番号７の変異体は、２位にＩ、Ａ、ＬもしくはＶ、４位にＴもしくはＳ、かつ５位にＲ、Ｇ、ＤもしくはＫを有し、配列番号１４の変異体は、３位にＨ、Ａ、ＲもしくはＫかつ７位にＮ、ＡもしくはＱを有し、配列番号９の変異体は、９位にＮ、Ｑ、ＳもしくはＴかつ１０位にＡ、ＮもしくはＶを有し、および／または配列番号１７の変異体は、６位にＧ、ＡもしくはＳ、７位にＳ、Ｇ、ＮもしくはＱ、８位にＴ、ＳまたはＧかつ１２位にＶ、Ａ、ＩもしくはＬを有する。

【００７６】

具体的な実施形態において、配列番号１２の変異体は、４位にＭ、ＬもしくはＩかつ５位にＮ、ＳもしくはＴを有し、配列番号７の変異体は、２位にＩ、ＡもしくはＬ、４位にＴもしくはＳかつ５位にＲ、Ｇ、ＤもしくはＫを有し、配列番号１４の変異体は、３位にＨ、Ａ、ＲもしくはＫかつ７位にＮ、ＡもしくはＱを有し、配列番号９の変異体は、９位にＮ、Ｑ、ＳもしくはＴかつ１０位にＡ、ＮもしくはＶを有し、および／または配列番号１７の変異体は、６位にＧ、ＡもしくはＳ、７位にＳ、ＧもしくはＮ、８位にＴ、ＳもしくはＧかつ１２にＶもしくはＡを有する。

【００７７】

更により具体的な実施形態において、配列番号１２の変異体は、４位にＭもしくはＬか

つ５位にＮを有し、配列番号７の変異体は、２位にＩ、４位にＴかつ５位にＲ、ＧもしくはＤを有し、配列番号１４の変異体は、３位にＨもしくはＡかつ７位にＮもしくはＡを有し、配列番号９の変異体は、９位にＮかつ１０位にＡもしくはＮを有し、および／または配列番号１７の変異体は、６位にＧ、ＡもしくはＳ、７位にＳ、ＧもしくはＮ、８位にＴ、ＳもしくはＧかつ／または１２位にＶもしくはＡを有する。

【００７８】

好ましい実施形態において、配列番号１２、７、１４、９および１７の変異体は、それぞれ配列番号１２、７、１４、９および１７と比較して、１２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有する。

【００７９】

また、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の１位、２位、４位および５位から選択される４以下、３以下、２以下、または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、１５以下、１４以下、１３以下、１２以下、１１以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下、１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される１１以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下、または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号１５の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１８の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される６以下、５以下、４以下、３以下、２以下、または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００８０】

一態様において、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の１位、２位、４位および５位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号１５の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１８の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可

変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００８１】

一態様において、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の１位、２位、４位および５位から選択される１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号１５の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１８の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００８２】

具体的な実施形態において、モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の１位、２位、４位および５位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される、３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号１５の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１８の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００８３】

更により具体的な実施形態において、モノクローナル抗体は、

ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の１位および４位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の５位、８位および１３位から選択される、３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の３位および７位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号１５

の８位および１０位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１８の４位、５位および６位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００８４】

実施形態において、配列番号１２の変異体は、４位にＭ、Ｌ、ＩもしくはＶかつ５位にＮ、Ｓ、ＴもしくはＱを有し、配列番号７の変異体は、２位にＩ、Ａ、ＬもしくはＶ、４位にＴもしくはＳ、かつ５位にＲ、Ｇ、ＤもしくはＫを有し、配列番号１４の変異体は、３位にＨ、Ａ、ＲもしくはＫかつ７位にＮ、ＡもしくはＱを有し、配列番号１５の変異体は、９位にＮ、Ｑ、ＳもしくはＴかつ１０位にＡ、ＮもしくはＶを有し、および／または配列番号１８の変異体は、６位にＧ、ＡもしくはＳ、７位にＳ、Ｇ、ＮもしくはＱ、８位にＴ、ＳまたはＧかつ１２位にＶ、Ａ、ＩもしくはＬを有する。

【００８５】

具体的な実施形態において、配列番号１２の変異体は、４位にＭ、ＬもしくはＩかつ５位にＮ、ＳもしくはＴを有し、配列番号７の変異体は、２位にＩ、ＡもしくはＬ、４位にＴもしくはＳかつ５位にＲ、Ｇ、ＤもしくはＫを有し、配列番号１４の変異体は、３位にＨ、Ａ、ＲもしくはＫかつ７位にＮ、ＡもしくはＱを有し、配列番号１５の変異体は、９位にＮ、Ｑ、ＳもしくはＴかつ１０位にＡ、ＮもしくはＶを有し、および／または配列番号１８の変異体は、６位にＧ、ＡもしくはＳ、７位にＳ、ＧもしくはＮ、８位にＴ、ＳもしくはＧかつ１２にＶもしくはＡを有する。

【００８６】

更により具体的な実施形態において、配列番号１２の変異体は、４位にＭもしくはＬかつ５位にＮを有し、配列番号７の変異体は、２位にＩ、４位にＴかつ５位にＲ、ＧもしくはＤを有し、配列番号１４の変異体は、３位にＨもしくはＡかつ７位にＮもしくはＡを有し、配列番号１５の変異体は、９位にＮかつ１０位にＡもしくはＮを有し、および／または配列番号１８の変異体は、６位にＧ、ＡもしくはＳ、７位にＳ、ＧもしくはＮ、８位にＴ、ＳもしくはＧかつ／または１２位にＶもしくはＡを有する。

【００８７】

好ましい実施形態において、配列番号１２、７、１４、９および１７の変異体は、それぞれ配列番号１２、７、１４、１５および１８と比較して、１２以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的または高度に保存的なアミノ酸置換）を有する。

【００８８】

添付の実施例において明らかにされるように、ＣＤＲ－Ｌ２領域は、本発明のＴ４特異的抗体のものであり、Ｔ４との相互作用に寄与しない。したがって、ＣＤＲ－Ｌ２は、原則として、任意の配列を有することができる。好ましい実施形態において、軽鎖可変ドメインは、（ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２、または配列番号１１の５以下、４以下、３以下、２以下または１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む。一実施形態において、変異体は、配列番号１１の１位および２位にアミノ酸置換を有さない。特定の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体の軽鎖可変ドメインは、（ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２、または配列番号１１の１以下の位置にアミノ酸置換（好ましくは保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換）を有するその変異体を含む。例えば、本発明のモノクローナル抗体の軽鎖可変ドメインは、ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２、または配列番号１１の６位に１以下のアミノ酸置換を有するその変異体を含み得る。

【００８９】

実施形態において、本明細書で言及されるアミノ酸置換のいずれかは、配列のそれぞれの位置で定義されるそれぞれのアミノ酸の保存的なアミノ酸置換であり得る。

【００９０】

本発明との関連で使用される場合、「保存的アミノ酸置換」は、同じ物理化学的群から選択される別のアミノ酸によるアミノ酸の置換を意味し、アミノ酸の物理化学的群は、以下のとおりである。

ａ）Ｇｌｙ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、ＴｒｐおよびＭｅｔからなる非極性疎水性アミノ酸；

ｂ）Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、ＡｓｎおよびＧｌｎからなる極性中性アミノ酸；

ｃ）Ａｒｇ、ＬｙｓおよびＨｉｓからなる、正電荷を有する塩基性アミノ酸、ならびに

ｄ）ＡｓｐおよびＧｌｕからなる、負電荷を有する酸性アミノ酸、であり、

Ｃｙｓが保存的に置換される場合、それはＳｅｒまたはＡｌａで置換され、Ｐｒｏが保存的に置換される場合、それはＡｌａで置換される。

【００９１】

実施形態において、本明細書で言及されるアミノ酸置換のいずれかは、配列のそれぞれの位置で定義されるそれぞれのアミノ酸の高度に保存的なアミノ酸置換であり得る。

【００９２】

本発明との関連で使用される場合、「高度に保存的なアミノ酸置換」は、以下のアミノ酸置換を意味する：

ａ）Ｖａｌ、Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＧｌｙによるＡｌａの置換；

ｂ）ＬｙｓによるＡｒｇの置換；

ｃ）ＧｌｎによるＡｓｎの置換；

ｄ）ＧｌｕによるＡｓｐの置換；

ｅ）ＳｅｒによるＣｙｓの置換；

ｆ）ＡｓｎによるＧｌｎの置換；

ｇ）ＡｓｐによるＧｌｕの置換；

ｈ）ＡｌａによるＧｌｙの置換；

ｉ）ＡｒｇによるＨｉｓの置換；

ｊ）Ｌｅｕ、ＶａｌまたはＡｌａによるＩｌｅの置換；

ｋ）Ｉｌｅ、ＶａｌまたはＡｌａによるＬｅｕの置換；

ｌ）ＡｒｇによるＬｙｓの置換；

ｍ）Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＶａｌによるＭｅｔの置換；

ｎ）ＴｙｒまたはＴｒｐによるＰｈｅの置換；

ｏ）ＡｌａによるＰｒｏの置換；

ｐ）ＴｈｒによるＳｅｒの置換；

ｑ）ＳｅｒによるＴｈｒの置換；

ｒ）ＰｈｅまたはＴｙｒによるＴｒｐの置換；

ｓ）ＰｈｅまたはＴｒｐによるＴｙｒの置換；および

ｔ）Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＡｌａによるＶａｌの置換。

【００９３】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体の重鎖可変ドメイン（ＶＨ）は、（ａ）Ｘ１ＮＶＸ２Ｎ（（式中、Ｘ１はＳまたはＲであり、Ｘ２はＭまたはＬである）；本明細書では配列番号１９または配列番号１９とも呼ばれる）のアミノ酸配列を含むまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ３を含み、本発明の抗体の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は、（ｄ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｌ１、および（ｆ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むかまたはからなるＣＤＲ－Ｌ３を含む。

【００９４】

したがって、一態様において、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が提供され、当該モノクローナル抗体は、

ｉ）本発明のモノクローナル抗体の重鎖可変ドメイン（ＶＨ）は、（ａ）Ｘ１ＮＶＸ２Ｎ（式中、Ｘ１はＳまたはＲであり、Ｘ２はＭまたはＬである）のアミノ酸配列を含むか

またはそれからなるＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ３を含み、

ｉｉ）本発明の抗体の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は、（ｄ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｌ１、および（ｆ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むかまたはからなるＣＤＲ－Ｌ３を含む。

【００９５】

本発明のモノクローナル抗体は、配列番号２４のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｌ２をそのＶＬ中に更に含み得る。

【００９６】

したがって、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、

ｉ）本発明のモノクローナル抗体の重鎖可変ドメイン（ＶＨ）は、（ａ）Ｘ１ＮＶＸ２Ｎ（式中、Ｘ１はＳまたはＲであり、Ｘ２はＭまたはＬである）のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ３を含み、

ｉｉ）本発明の抗体の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は、（ｄ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなるＣＤＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号２４のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなるＣＤＲ－Ｌ２、（ｆ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなるＣＤＲ－Ｌ３を含む。

【００９７】

実施形態において、本発明の抗体の重鎖可変ドメイン（ＶＨ）は、（ａ）配列番号１２、２５および２６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号７、２７および２８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ２、ならびに（ｃ）配列番号１４および２９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ３を含み、本発明の抗体の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は、（ｄ）配列番号１５および３０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｌ１、ならびに（ｆ）配列番号１８、３１および３２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｌ３を含む。

【００９８】

したがって、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、

（ｉ）（ａ）配列番号１２、２５および２６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号７、２７および２８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ２、ならびに（ｃ）配列番号１４および２９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）（ｄ）配列番号１５および３０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｌ１、ならびに（ｆ）配列番号１８、３１および３２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはからなるＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【００９９】

軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は、配列番号１１または３３のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｌ２を更に含み得る。

【０１００】

したがって、実施形態において、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、

（ａ）配列番号１２、２５および２６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか

またはそれからなるＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号７、２７および２８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ２、ならびに（ｃ）配列番号１４および２９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ３とを含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｄ）配列番号１５および３０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１１または３３のアミノ酸配列を含むまたはそれからなるＣＤＲ－Ｌ２、ならびに（ｆ）配列番号１８、３１および３２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｌ３とを含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【０１０１】

本発明の抗体は、ＶＨドメインおよびＶＬドメインにおいてＣＤＲに隣接する異なるフレームワーク領域を有し得る。

【０１０２】

重鎖可変ドメイン（ＶＨ）は、式Ｉ：

ＦＷ－Ｈ１－ＣＤＲ－Ｈ１－ＦＷ－Ｈ２－ＣＤＲ－Ｈ２－ＦＷ－Ｈ３－ＣＤＲ－Ｈ３－ＦＷ－Ｈ４

（式Ｉ）

に表されるＶＨのＣＤＲに隣接するフレームワーク領域（ＦＷ）を含み得る。

【０１０３】

ＦＷ－Ｈ１は、配列番号３４のアミノ酸配列、または配列番号３４と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有し得る。

【０１０４】

ＦＷ－Ｈ２は、配列番号３５のアミノ酸配列、または配列番号３５と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有し得る。

【０１０５】

ＦＷ－Ｈ３は、配列番号３６のアミノ酸配列、または配列番号３６と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有し得る。

【０１０６】

ＦＷ－Ｈ４は、配列番号３７のアミノ酸配列、または配列番号３７と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有し得る。

【０１０７】

軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は、式Ｉ：

ＦＷ－Ｌ１－ＣＤＲ－Ｌ１－ＦＷ－Ｌ２－ＣＤＲ－Ｌ２－ＦＷ－Ｌ３－ＣＤＲ－Ｌ３－ＦＷ－Ｌ４（式Ｉ）

に表されるＶＬのＣＤＲに隣接するフレームワーク領域（ＦＷ）を含み得る。

【０１０８】

ＦＷ－Ｌ１は、配列番号３８のアミノ酸配列、または配列番号３８と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好まし

くは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有し得る。

【０１０９】

ＦＷ－Ｌ２は、配列番号３９のアミノ酸配列、または配列番号３９と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有し得る。

【０１１０】

ＦＷ－Ｌ３は、配列番号４０のアミノ酸配列、または配列番号４０と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有し得る。

【０１１１】

ＦＷ－Ｌ４は、配列番号４１のアミノ酸配列、または配列番号４１と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有し得る。

【０１１２】

実施形態において、ＦＷ－Ｈ１は、配列番号３４のアミノ酸配列または少なくとも６０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ２は、配列番号３５のアミノ酸配列または少なくとも６０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ３は、配列番号３６のアミノ酸配列または少なくとも６０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ４は、配列番号３７のアミノ酸配列または少なくとも６０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、および／またはＦＷ－Ｌ１は、配列番号３８のアミノ酸配列またはそれと少なくとも６０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ２は、配列番号３９のアミノ酸配列またはそれと少なくとも６０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ３は、配列番号４０のアミノ酸配列またはそれと少なくとも６０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ４は、配列番号４１のアミノ酸配列またはそれと少なくとも６０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよい。

【０１１３】

実施形態において、ＦＷ－Ｈ１は、配列番号３４のアミノ酸配列または少なくとも７０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ２は、配列番号３５のアミノ酸配列または少なくとも７０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ３は、配列番号３６のアミノ酸配列または少なくとも７０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ４は、配列番号３７のアミノ酸配列または少なくとも７０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、および／またはＦＷ－Ｌ１は、配列番号３８のアミノ酸配列またはそれと少なくとも７０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ２は、配列番号３９のアミノ酸配列またはそれと少なくとも７０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ３は、配列番号４０のアミノ酸配列またはそれと少なくとも７０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ４は、配列番号４１のアミノ酸配列またはそれと少なくとも７０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよい。

【０１１４】

実施形態において、ＦＷ－Ｈ１は、配列番号３４のアミノ酸配列または少なくとも８０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ２は、配列番号３５のアミ

ノ酸配列または少なくとも８０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ３は、配列番号３６のアミノ酸配列または少なくとも８０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ４は、配列番号３７のアミノ酸配列または少なくとも８０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、および／またはＦＷ－Ｌ１は、配列番号３８のアミノ酸配列またはそれと少なくとも８０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ２は、配列番号３９のアミノ酸配列またはそれと少なくとも８０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ３は、配列番号４０のアミノ酸配列またはそれと少なくとも８０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ４は、配列番号４１のアミノ酸配列またはそれと少なくとも８０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよい。

【０１１５】

実施形態において、ＦＷ－Ｈ１は、配列番号３４のアミノ酸配列または少なくとも８５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ２は、配列番号３５のアミノ酸配列または少なくとも８５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ３は、配列番号３６のアミノ酸配列または少なくとも８５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ４は、配列番号３７のアミノ酸配列または少なくとも８５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、および／またはＦＷ－Ｌ１は、配列番号３８のアミノ酸配列またはそれと少なくとも８５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ２は、配列番号３９のアミノ酸配列またはそれと少なくとも８５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ３は、配列番号４０のアミノ酸配列またはそれと少なくとも８５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ４は、配列番号４１のアミノ酸配列またはそれと少なくとも８５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよい。

【０１１６】

実施形態において、ＦＷ－Ｈ１は、配列番号３４のアミノ酸配列または少なくとも９０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ２は、配列番号３５のアミノ酸配列または少なくとも９０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ３は、配列番号３６のアミノ酸配列または少なくとも９０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ４は、配列番号３７のアミノ酸配列または少なくとも９０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、および／またはＦＷ－Ｌ１は、配列番号３８のアミノ酸配列またはそれと少なくとも９０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ２は、配列番号３９のアミノ酸配列またはそれと少なくとも９０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ３は、配列番号４０のアミノ酸配列またはそれと少なくとも９０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ４は、配列番号４１のアミノ酸配列またはそれと少なくとも９０％の配列同一性を有するその変異体を有してもよい。

【０１１７】

実施形態において、ＦＷ－Ｈ１は、配列番号３４のアミノ酸配列または少なくとも９５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ２は、配列番号３５のアミノ酸配列または少なくとも９５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ３は、配列番号３６のアミノ酸配列または少なくとも９５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ４は、配列番号３７のアミノ酸配列または少なくとも９５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、および／またはＦＷ－Ｌ１は、配列番号３８のアミノ酸配列またはそれと少なくとも９５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ２は、配列番号３９のアミノ酸配列またはそれと少なくとも９５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ３は、配列番号４０のアミノ酸配列またはそれと少なくとも９５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ４は、配列番号４１のアミノ酸配列またはそれと少なくとも９５％の配列同一性を有するその変異体を有してもよい。

【０１１８】

実施形態において、ＦＷ－Ｈ１は、配列番号３４のアミノ酸配列または少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ２は、配列番号３５のアミノ酸配列または少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ３は、配列番号３６のアミノ酸配列または少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｈ４は、配列番号３７のアミノ酸配列または少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、および／またはＦＷ－Ｌ１は、配列番号３８のアミノ酸配列またはそれと少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ２は、配列番号３９のアミノ酸配列またはそれと少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ３は、配列番号４０のアミノ酸配列またはそれと少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有してもよく、ＦＷ－Ｌ４は、配列番号４１のアミノ酸配列またはそれと少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有してもよい。

【０１１９】

実施形態において、ＦＷ－Ｈ１は、配列番号３４のアミノ酸配列を有してもよく、ＦＷ－Ｈ２は、配列番号３５のアミノ酸配列を有してもよく、ＦＷ－Ｈ３は、配列番号３６のアミノ酸配列を有してもよく、ＦＷ－Ｈ４は、配列番号３７のアミノ酸配列を有してもよい。

【０１２０】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨは、配列番号４２のアミノ酸配列、または配列番号４２と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を含むかまたはそれからなる。

【０１２１】

他の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨは、配列番号４３のアミノ酸配列、または配列番号４３と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を含むかまたはそれからなる。

【０１２２】

更に別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＨは、配列番号４４のアミノ酸配列、または配列番号４４と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を含むかまたはそれからなる。

【０１２３】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、配列番号４５のアミノ酸配列、または配列番号４５と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を含むかまたはそれからなる。

【０１２４】

他の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、配列番号４６のアミノ酸配列、または配列番号４６と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を含むかまたはそれからなる。

【０１２５】

更に別の他の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体のＶＬは、配列番号４７のアミノ酸配列、または配列番号４７と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％

、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を含むかまたはそれからなる。

【０１２６】

例えば、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、配列番号４２のアミノ酸配列、または配列番号４２と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を含むかまたはそれからなるＶＨと、配列番号４５のアミノ酸配列、または配列番号４５と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を含むかまたはそれからなるＶＬとを含む。

【０１２７】

さらに、例えば、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、配列番号４３のアミノ酸配列、または配列番号４３と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を含むかまたはそれからなるＶＨと、配列番号４６のアミノ酸配列、または配列番号４６と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を含むかまたはそれからなるＶＬとを含む。

【０１２８】

また更に、例えば、Ｔ４に特異的に結合するモノクローナル抗体本明細書において提供され、当該モノクローナル抗体は、配列番号４４のアミノ酸配列、または配列番号４４と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を含むかまたはそれからなるＶＨと、配列番号４７のアミノ酸配列、または配列番号４７と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を含むかまたはそれからなるＶＬとを含む。

【０１２９】

添付の実施例によって実証されるように、本発明のモノクローナル抗体は、遊離Ｌ－Ｔ４への結合について特に高い会合速度定数（k_a）を特徴とする。この速い会合速度により、本発明の抗体は、ハイスループットイムノアッセイおよび競合アッセイ形式に特に適したものとなる。

【０１３０】

したがって、実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、３７℃で測定したＴ４への結合の会合速度定数（k_a）が少なくとも$1.9\times10^{7}M^{-1}s^{-1}$であることを更に特徴とする。実施形態において、３７℃で測定したＴ４への結合の会合速度は、少なくとも$2\times10^{7}M^{-1}s^{-1}$である。実施形態において、３７℃で測定したＴ４への結合の会合速度定数（k_a）は、少なくとも$1\times10^{8}M^{-1}s^{-1}$である。実施形態において、３７℃で測定したＴ４への結合の会合速度は、少なくとも$1\times10^{9}M^{-1}s^{-1}$である。

【０１３１】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、Ｔ４への結合の会合速度定数（k_a）が、配列番号４８の重鎖および配列番号４９の軽鎖を含むかまたはそれらからなる抗体のＴ４への結合の会合速度定数（k_a）の少なくとも１０％、好ましくは少なくとも２０％、更により好ましくは少なくとも３０％、更により好ましくは少なくとも５０％、更により好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも９０％に相当し、会合速度は同一の実験条件下で測定されることを更に特徴とする。実験条件は、好ましくは、本明細書中下記および／または実施例３に記載されるとおりである。

【０１３２】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、Ｆａｂフラグメントを含む抗体であり、３７℃で測定したＴ４への結合に関する当該Ｆａｂフラグメントの会合速度定数（k_a）が少なくとも$1.9\times10^{7}M^{-1}s^{-1}$であることを更に特徴とする。実施形態において、３７℃で測定した、Ｔ４への結合に関するＦａｂ抗体フラグメントの会合速度定数（k_a）は、少なくとも$2\times10^{7}M^{-1}s^{-1}$ある。実施形態において、３７℃で測定した、Ｔ４への結合に関するＦａｂフラグメントの会合速度定数（k_a）は、少なくとも$1\times10^{8}M^{-1}s^{-1}$ある。実施形態において、３７℃で測定した、Ｔ４への結合に関するＦａｂフラグメントの会合速度定数（k_a）は、少なくとも$1\times10^{9}M^{-1}s^{-1}$ある。

【０１３３】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、Ｆａｂ抗体フラグメントであり、３７℃で測定したＴ４への結合の会合速度定数（k_a）が少なくとも$1.9\times10^{7}\ M^{-1}s^{-1}$であることを更に特徴とする。実施形態において、３７℃で測定した、Ｔ４への結合に関するＦａｂ抗体フラグメントの会合速度定数（k_a）は、少なくとも$2\times10^{7}M^{-1}s^{-1}$ある。実施形態において、３７℃で測定した、Ｔ４への結合に関するＦａｂフラグメントの会合速度定数（k_a）は、少なくとも$1\times10^{8}M^{-1}s^{-1}$ある。実施形態において、３７℃で測定した、Ｔ４への結合に関するＦａｂフラグメントの会合速度定数（k_a）は、少なくとも$1\times10^{9}M^{-1}s^{-1}$ある。

【０１３４】

Ｔ４への結合に対する抗体の会合速度定数（k_a）を決定する方法は、当技術分野で公知である。例示的な実施例は、添付の実施例（特に実施例３）に記載されている。

【０１３５】

実施形態において、Ｔ４への結合に関する抗体の会合速度定数（k_a）を決定するための方法の設定を、配列番号４８の重鎖と配列番号４９の軽鎖とからなるＦａｂ抗体フラグメントについて、３７℃で測定したＴ４への結合に関する会合速度定数が$1\times10^{9}\ M^{-1}s^{-1}$であるように較正し得る。

【０１３６】

好ましい実施形態において、Ｔ４への結合に関する本発明の抗体の会合速度定数（k_a）は、表面プラズモン共鳴分光法（例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標））によって測定される。

【０１３７】

添付の実施例に記載されるように、抗体３８Ｆ８、７Ｅ１０および７Ｄ４は、ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）実験において有意な質量輸送制限（ＭＴＬ）を示した。したがって、会合速度定数を決定するために使用される表面プラズモン共鳴分光測定は、ＭＴＬ補正を使用しなければならない。ＭＴＬ補正は、好ましくは、２コンパートメントモデル（Ｍｙｓｚｋａ ｅｔ．ａｌ．，Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ，Ｖｏｌ７５，Ａｕｇｕｓｔ １９９８，５８３－５９４；Ｂｉａｃｏｒｅ Ｉｎｓｉｇｈｔ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｕｓｅｒ Ｍａｎｕａｌ ２９２８７２４８ ＡＢ、２１４～２１５頁）に基づく。好ましい実施形態において、分析は、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）８Ｋ機器を用いて行われてもよく、分析は、Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｉｎｓｉｇｈｔ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｖ３．０１１．１５４２３を用いて自動

的に行われてもよい。

【０１３８】

k_aを決定するための表面プラズモン共鳴測定は、３７℃の温度で行われ得る。測定は、一連の漸増Ｌ－Ｔ４濃度、例えばｃ＝０．１２～１０ｎＭ、希釈係数３を用いたマルチサイクル速度論を用いて実施され得る。システム緩衝液は、１１ｍＭ　PO_4、１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、２．７ｍＭ　ＫＣｌ、ｐＨ７．４＋０．０５％（ｗ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ２０および５％（ｖ／ｖ）ＤＭＳＯを含有するＰＢＳ、ｐＨ７．４であり得る。試料緩衝液として、１ｍｇ／ｍＬカルボキシメチルデキストラン（ＣＭＤ）を補充した後者の系緩衝液を使用し得る。

【０１３９】

会合速度定数k_a［１／Ｍｓ］、解離速度定数k_d［s^{-1}］、および解離平衡定数K_D［Ｍ］は、ラングミュアモデルに従って、例えば機器（例えば、上に明記したように）に対応する評価ソフトウェアを使用することによって計算され得る。

【０１４０】

添付の実施例において明らかにされるように、本発明の抗体はまた、Ｌ－Ｔ４に対する高い親和性を有することを特徴とする。したがって、本発明のモノクローナル抗体は、１０ｎＭ以下、好ましくは５ｎＭ以下、好ましくは１ｎＭ以下、更により好ましくは０．５ｎＭ以下、更により好ましくは０．３ｎＭ以下、最も好ましくは０．２８ｎＭ以下の遊離Ｌ－Ｔ４への結合の平衡解離定数K_Dを有することを特徴とし得る。これらの値は、好ましくは、Ｂｉａｃｏｒｅ表面プラズモン共鳴分光法および溶液設定における親和性を用いて決定される。実験条件は、好ましくは、本明細書中下記および／または実施例３に記載されるとおりである。

【０１４１】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、Ｔ４への結合のK_Dが、配列番号４８の重鎖および配列番号４９の軽鎖を含むかまたはそれらからなる抗体のＴ４への結合のK_Dの少なくとも１０％、好ましくは少なくとも２０％、更により好ましくは少なくとも３０％、更により好ましくは少なくとも５０％、更により好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも９０％に相当し、K_Dは同一の実験条件下で測定されることを更に特徴とする。実験条件は、好ましくは、本明細書中下記および／または実施例３に記載されるとおりである。K_Dを決定するための好ましい温度は、３７℃である。

【０１４２】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、Ｆａｂフラグメントを含む抗体であり、遊離Ｌ－Ｔ４への結合の平衡解離定数K_Dが１０ｎＭ以下、好ましくは５ｎＭ以下、好ましくは１ｎＭ以下、更により好ましくは０．５ｎＭ以下、最も好ましくは０．３ｎＭ以下であることを更に特徴とする。これらの値は、好ましくは、Ｂｉａｃｏｒｅ表面プラズモン共鳴分光法および溶液設定における親和性を用いて決定される。実験条件は、好ましくは、本明細書中下記および／または実施例３に記載されるとおりである。K_Dを決定するための好ましい温度は、３７℃である。

【０１４３】

実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、Ｆａｂ抗体フラグメントであり、遊離Ｌ－Ｔ４への結合の平衡解離定数K_Dが１０ｎＭ以下、好ましくは５ｎＭ以下、好ましくは１ｎＭ以下、更により好ましくは０．５ｎＭ以下、最も好ましくは０．３ｎＭ以下であることを更に特徴とする。これらの値は、好ましくは、Ｂｉａｃｏｒｅ表面プラズモン共鳴分光法および溶液設定における親和性を用いて決定される。実験条件は、好ましくは、本明細書中下記および／または実施例３に記載されるとおりである。K_Dを決定するための好ましい温度は、３７℃である。

【０１４４】

平衡解離定数K_Dを決定する方法は、当技術分野で公知である。

【０１４５】

好ましい実施形態において、K_Dは、表面プラズモン共鳴分光法（例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標））によって決定され得る。

【０１４６】

K_Dを決定するための好ましい温度は、３７℃である。

【０１４７】

好ましい実施形態において、K_Dを決定するための方法は、配列番号４８の重鎖および配列番号４９の軽鎖からなるＦａｂ抗体フラグメントについて、Ｔ４への結合のK_Dが３７℃で０．２８ｎＭであるようにK_Dが較正される。

【０１４８】

実施形態において、K_Dは、会合および解離速度を決定する速度論的測定値を使用して決定され得る。したがって、方法は、実施形態において、上記のk_aの決定について説明したのと同じ表面プラズモン共鳴方法であり得る。当該方法は、好ましくは、質量輸送制限のための補正を含む。

【０１４９】

好ましい実施形態において、K_Dは、表面プラズモン共鳴分光法（例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標））を使用し、溶液測定原理で親和性を使用して決定され得る。溶液分析における親和性の利点は、それが質量輸送制限の根底になく、平衡状態での測定を可能にすることである。

【０１５０】

K_Dの溶液測定における親和性のために、捕捉標識（例えばビオチン）にコンジュゲートされた遊離Ｌ－Ｔ４－をセンサー表面（例えば、捕捉標識がビオチンである場合、ストレプトアビジン上（ＳＡ）－ビオチン相互作用を介してＣＡＰチップ上）に事前に捕捉（例えば可逆的に）し得る。抗Ｔ４抗体またはその抗原結合フラグメント（例えばＦａｂ）と非標識Ｌ－Ｔ４との混合物を、平衡に達するために数時間プレインキュベートしてもよい。次いで、（すなわち、Ｌ－Ｔ４結合ではない）Ｌ－Ｔ４抗体またはそのフラグメントの濃度を、定量化のための先行する較正を使用して、表面に表示されたＬ－Ｔ４への結合を介して決定してもよい。抗体またはその抗原結合フラグメントの濃度は、好ましくは混合物中で一定に保持されるが、Ｌ－Ｔ４濃度は変動する。Ｌ－Ｔ４が増加すると、溶液中の「遊離」Ｆａｂフラグメントが減少し、K_Dを決定することができる。

【０１５１】

遊離Ｌ－Ｔ４への本発明の抗体の結合についてのK_Dの溶液中での親和性のための例示的な設定は、以下のとおりであり得る。ＣＡＰ－Ｋｉｔ（Ｃｙｔｉｖａ）の販売業者の指示に従って、ＣＡＰ－試薬に続いて、ビオチン化Ｔ４が高密度でセンサー表面に可逆的に捕捉され得る。再生は、各サイクルの後にグアニジニウム／ＮａＯＨ溶液を用いて行ってもよい。溶液中の両方の相互作用パートナーのプレインキュベーションを以下のように行ってもよい：抗体または抗原結合フラグメント（例えばＦａｂ）濃度が３ｎＭで一定に保たれ得る。Ｌ－Ｔ４甲状腺ホルモン濃度は、各Ｔ４相互作用に対して最適化され得る。例えば、０．０２１ｎＭ～９０ｎＭの非標識Ｌ－Ｔ４をプレインキュベーションのために使用してもよい。

【０１５２】

Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェア（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　ＳＷ　Ｖ３．２）からの溶液中の親和性モデルを使用して、データを評価し、K_Dを決定し得る。

【０１５３】

本明細書で使用される場合、Ｔ４と反応する抗体または抗体抗原結合フラグメントに関連して「特異的に結合する」という語句は、Ｔ４が抗原－抗体反応を介して抗体または抗体抗原結合フラグメントに結合することを示す。

【０１５４】

実施形態において、本発明の抗体は、遊離Ｌ－Ｔ４を、３－ヨード－Ｌ－チロシン（Ｌ－Ｔ３）、ｒ甲状腺ホルモン（ｒＴ３）、３，３’，５－トリ－ヨード－サイロ酢酸、３

，３’，５，５’－テトラ－ヨードサイロ酢酸、３，５－ジ－ヨード－Ｌ－チロシンおよび／または３－ｉ－Ｌ－チロシン等の構造的に関連する化合物から識別する。本明細書で使用される場合、「識別する」または「識別すること」は、Ｌ－Ｔ４に対する結合親和性が関連化合物よりもかなり高いこと、すなわちK_Dがかなり低いことを意味する。好ましい実施形態において、「識別する」は、本発明の抗体が関連化合物に対して検出可能な結合を示さないこと、または３７℃で測定した関連化合物のK_D（K_D－ＸＲ）とＬ－Ｔ４のK_Dとの比が４以上、好ましくは５以上の値を有することを意味する。言い換えれば、関連化合物に対する親和性と比較したＬ－Ｔ４に対する親和性は、少なくとも４倍、好ましくは少なくとも５倍高い。

【０１５５】

実施形態において、本発明の抗体は、Ｌ－Ｔ４を３－ヨード－Ｌ－チロシン（Ｌ－Ｔ３）と識別する。好ましくは、２５℃で測定したＬ－Ｔ３のK_DとＬ－Ｔ４のK_Dとの比は、４以上、好ましくは２０以上、更により好ましくは３０以上、更により好ましくは４０以上、最も好ましくは４７以上の値を有し得る。代替的または追加的に、３７℃で測定したＬ－Ｔ３のK_DとＬ－Ｔ４のK_Dとの比は、４以上、好ましくは２０以上、更により好ましくは３０以上、更により好ましくは４０以上、更により好ましくは５０以上、最も好ましくは５８以上の値を有し得る。

【０１５６】

代替的または追加的に、本発明の抗体は、Ｌ－Ｔ４をｒＴ３と識別する。好ましくは、２５℃で測定したｒＴ３のK_DとＬ－Ｔ４のK_Dとの比は、４以上、好ましくは６以上、更により好ましくは８以上、最も好ましくは１０以上の値を有し得る。代替的または追加的に、３７℃で測定したｒＴ３のK_DとＬ－Ｔ４のK_Dとの比は、４以上、好ましくは８以上、更により好ましくは１０以上、更により好ましくは１２以上、更により好ましくは１４以上、最も好ましくは１８以上の値を有し得る。

【０１５７】

代替的または追加的に、本発明の抗体は、Ｌ－Ｔ４を３，３’，５－トリ－ヨード－サイロ酢酸と識別する。好ましくは、３７℃で測定した３，３’，５－トリ－ヨード－サイロ酢酸のK_DとＬ－Ｔ４のK_Dとの比は、４以上、好ましくは１０以上、更により好ましくは３０以上、更により好ましくは５０以上、更により好ましくは８０以上、最も好ましくは９２以上の値を有する。

【０１５８】

代替的または追加的に、本発明の抗体は、Ｌ－Ｔ４を３，３’，５，５’－テトラ－ヨードサイロ酢酸と識別する。好ましくは、３７℃で測定した３，３’，５，５’－テトラ－ヨードサイロ酢酸のK_DとＬ－Ｔ４のK_Dとの比は、３以上、好ましくは４以上、最も好ましくは５以上の値を有する。

【０１５９】

代替的または追加的に、本発明の抗体は、Ｌ－Ｔ４を３，５－ジヨード－チロシンと識別する。好ましくは、３７℃で測定した３，５－ジ－ヨード－Ｌ－チロシンのK_DとＬ－Ｔ４のK_Dとの比は、４以上、好ましくは１０以上、更により好ましくは３０以上、更により好ましくは５０以上、更により好ましくは８０、更に好ましくは１００以上、更により好ましくは１５０以上、最も好ましくは１６６以上の値を有する。

【０１６０】

代替的または追加的に、本発明の抗体は、Ｌ－Ｔ４を３－ｉ－Ｌ－チロシンと識別する。好ましくは、３７℃で測定した３，５－ジ－ヨード－Ｌ－チロシンのK_DとＬ－Ｔ４のK_Dとの比は４以上の値を有する。更により好ましくは、本発明の抗体は、表面プラズモン共鳴分光法（例えば、本明細書に記載の設定、例えば実施例３を使用して、）によって測定可能な３－ｉ－Ｌ－チロシンに対する相互作用を示さない。

【０１６１】

Ｌ－Ｔ４および関連化合物のいずれかに対する本発明の抗体の結合についてK_Dを決定するための方法は、最新技術である。Ｌ－Ｔ４への結合についてK_Dを決定するための例

示的な方法は、本明細書中上記および添付の実施例に記載される。これらの方法は、K_D値の比を計算することができるように、必要な変更を加えて関連化合物に適用することができる。「関連化合物に対するK_DとＬ－Ｔ４に対するK_Dとの比」とは、関連化合物に対する抗体のK_DをＬ－Ｔ４に対する抗体のK_Dで除することを意味する。

【０１６２】

好ましい実施形態において、比を計算するためのK_D値は、表面プラズモン共鳴分光法（例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標））で決定される。好ましい実施形態において、０．１ｎＭ～９００ｎＭの潜在的交差反応物濃度を使用したマルチサイクル速度論的測定を使用し得る。Ｌ－Ｔ４に構造的に関連する化合物は、３０μＬ／分～６０μＬ／分の流量を使用して注入され得る。会合相を３分～５分の間、解離相を５分～１５分の間監視し得る。Ｌ－Ｔ４相互作用は、３０分の解離時間を有する追加の分析物注入を使用することによって特性評価され得る。K_D値を決定するための表面プラズモン共鳴測定は、３７℃の温度で行われ得る。システム緩衝液は、１１ｍＭ　PO_4、１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、２．７ｍＭ　ＫＣｌ、ｐＨ７．４＋０．０５％（ｗ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ２０および５％（ｖ／ｖ）ＤＭＳＯを含有するＰＢＳ、ｐＨ７．４であり得る。試料緩衝液として、１ｍｇ／ｍＬカルボキシメチルデキストラン（ＣＭＤ）を補充した後者の系緩衝液を使用し得る。解離平衡定数K_D［Ｍ］は、ラングミュアモデルに従って、例えば機器（例えば、上に明記したように）に対応する評価ソフトウェアを使用することによって計算され得る。

【０１６３】

添付の実施例において明らかにされるように、構造的に関連する抗体３８Ｆ８　７Ｅ１０および７Ｄ４は、競合的イムノアッセイにおいて良好なシグナル対ノイズ比を示した。性能はポリクローナル抗Ｌ－Ｔ４抗体に匹敵した。

【０１６４】

したがって、好ましい実施形態において、本発明のＴ４特異的抗体は、Ｔ４（例えば、ｆＴ４）を定量するための競合的イムノアッセイにおいて使用される場合、配列番号４８の重鎖配列および配列番号４９の軽鎖配列を含むかまたはそれらからなるＦａｂフラグメントを用いて達成されるシグナル対ノイズ比の少なくとも２９％、少なくとも３０％、少なくとも６５％、少なくとも６６％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％であるシグナル対ノイズ比を示す。これらの実施形態において、抗体が交換されることを除いて、イムノアッセイ設定は同一である。

【０１６５】

好ましい実施形態において、シグナル対ノイズ比は、０～１２２．１ｐｍｏｌ／ＬのｆＴ４濃度範囲で分析され得る。

【０１６６】

本明細書で使用される場合、「シグナル対ノイズ比」は、「シグナル動態比」または「相対総シグナルスパン」とも呼ばれ得る。試料中のＴ４（例えば、ｆＴ４）の存在が増加するにつれて測定シグナルが減少するイムノアッセイ形式の場合、シグナル対ノイズ比またはシグナル動態比は、（ｉ）Ｔ４を含まない試料と最も高い測定Ｔ４（例えば、ｆＴ４）濃度（例えば１２２．１ｐｍｏｌ／Ｌ）を有する試料との間のシグナル（例えば、ＥＣＬ数）の変化を、（ｉｉ）最も高い測定Ｔ４濃度（例えば１２２．１ｐｍｏｌ／Ｌ）を有する試料のシグナル（例えば、ＥＣＬ数）で除することによって計算される比に関する。測定されたシグナルが試料中のＴ４（例えば、ｆＴ４）の存在の増加と共に増加するイムノアッセイ形式の場合、シグナル対ノイズ比またはシグナル動態比は、（ｉ）Ｔ４を含まない試料（例えば、ｆＴ４）と最も高い測定されたＴ４（例えば、ｆＴ４）濃度（例えば１２２．１ｐｍｏｌ／Ｌ）を有する試料との間のシグナルの正の変化（例えば、ＥＣＬ数）－または医学的に関連する濃度範囲の定義された分析物濃度を、（ｉｉ）Ｔ４を含まない試料（例えば、ｆＴ４）のシグナル（例えば、ＥＣＬ数）で除することによって計算される比に関する。

【０１６７】

抗体のシグナル対ノイズ比を評価するための競合的イムノアッセイは、以下の基本的な

アッセイ原理を有し得る：
（ｉ）Ｔ４（例えば、ｆＴ４）を含む試料を抗体とインキュベートすることであって、抗体を検出標識（例えば、ルテニウム標識）で規定時間（例えば９分）標識する、Ｔ４（例えば、ｆＴ４）を含む試料を抗体とインキュベートすること、
（ｉｉ）（ｉ）捕捉標識にカップリングしたＴ４（例えば、ビオチン化Ｔ４またはＴ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチン－ハプテン）および捕捉標識に結合することができる粒子の混合物に添加し、得られた混合物を規定の時間（例えば９分）インキュベートすること；あるいは、捕捉標識に結合することができる粒子を、得られた混合物を規定の時間（例えば９分）インキュベートしながら後続の工程で添加し得る。
（ｉｉｉ）混合物から粒子を分離し、検出標識シグナルを測定することによって、混合物に結合した標識抗体を検出すること、ならびに
（ｉｖ）測定された検出標識シグナルに基づいて試料中のＴ４の量（例えば、ＦＴ４）を決定すること。

【０１６８】
この競合アッセイ原理では、Ｔ４（例えば、ＦＴ４）の量が多いほど、検出標識の測定シグナルは低くなる。

【０１６９】
シグナル対ノイズ比を評価するための競合的イムノアッセイの具体的かつ特に好ましい例を添付の実施例４に提供する。したがって、具体的な実施形態において、シグナル対ノイズ比は、自動Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）Ｉｍｍｕｎｏ－Ａｎａｌｙｚｅｒ（例えば、Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ｃｏｂａｓ（登録商標）ｅ４１１）を使用する競合免疫学的アッセイによって評価され得る。１８分の総インキュベーション時間を含むアッセイは、以下の設定を有し得る：第１のインキュベーション（９分）：１５μＬのＴ４（例えば、ｆＴ４）含有試料、７５μＬのルテニウム化Ｌ－Ｔ４特異的抗体をインキュベートする；第２のインキュベーション（９分）：７５μＬのＴ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチン－ハプテン－コンジュゲートの溶液および３５μＬのストレプトアビジン被覆微粒子を第１のインキュベーション工程の混合物に添加する。続いて、磁気ビーズに付着したルテニウム標識シグナルを測定することによって、試料中のＴ４（例えば、ｆＴ４）の量を決定し得る。具体的には、反応混合物を測定セル内に吸引し、そこで微粒子は電極の表面上に磁気的に捕捉され得る。次いで、未結合物質をＰｒｏＣｅｌｌ＃１１６６２９８８１２２（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　ＧｍｂＨ　ドイツ）で除去し得る。次いで、電極への電圧の印加を使用して、光電子増倍管によって測定される電気化学発光ベースの発光を誘導し得る。

【０１７０】
実施形態において、上記または以下の実施例４に記載のＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）Ｉｍｍｕｎｏ－Ａｎａｌｙｚｅｒベースの競合アッセイを使用してもよい。これらの実施形態において、本発明の抗体について、第１の試料が１２２．１０ｐｍｏｌ／ＬのＴ４（例えば、ｆＴ４）濃度を有し、第２の試料が０ｐｍｏｌ／ＬのＴ４（例えば、ｆＴ４）濃度を有すると仮定すると、第１の試料および第２の試料（すなわち、第１の試料をカウント数で割ったものをカウントし、第２の試料をカウントする）について検出されたカウントの比は、１１％以下、５％以下または４％以下であり得る。

【０１７１】
本発明の抗体および抗原結合フラグメントは、当技術分野で日常的に使用される様々な技術によって調製され得る。例えば、抗原反応性抗体産生Ｂ細胞を単離し、続いて単離するＬ－Ｔ４で非ヒト動物（例えば、ウサギ）を免疫することにより、抗体を調製することができる。免疫原性を増強するために、免疫化のためのＬ－Ｔ４を担体タンパク質（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ））にカップリングさせてもよい。好ましくは、Ｔ４－ＮＨ－ＰＥＧ（３）－ＣＯ－ＫＬＨが免疫化のために使用される。Ｌ－Ｔ４に結合する抗体のスクリーニングは、Ｌ－Ｔ４を分析物として使用して達成され得る。好ましくは、Ｔ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチンを表面にカップリングさせ、

それに対する抗体の結合を試験し得る。Ｌ－Ｔ４に特異的に結合する抗体を同定するために、３－ヨード－Ｌ－チロシン（Ｌ－Ｔ３）、甲状腺ホルモン（ｒＴ３）、３，３’，５－トリ－ヨード－サイロ酢酸、３，３’，５，５’－テトラ－ヨードサイロ酢酸、３，５－ジ－ヨード－Ｌ－チロシンおよび／または３－ｉ－Ｌ－チロシン等の構造的に関連する化合物への結合についてのカウンタースクリーニングを行ってもよい。非ヒト動物の免疫化を使用して本発明による抗体を製造するための好ましい例示的な方法は、添付の実施例に提供される（特に実施例１を参照）。抗体を産生するための選択されたクローンを、その後の組換え処理のための日常的な方法に従って処理することができる。

【０１７２】

本発明の抗体および抗体抗原結合フラグメントを生成または単離するための別の適切な方法としては、限定されないが、目的の結合活性を使用してペプチドまたはタンパク質ライブラリー（例えば、限定されないが、バクテリオファージ、リボソーム、オリゴヌクレオチド、ＲＮＡ、ｃＤＮＡまたは酵母ディスプレイライブラリー）から組換え抗体を選択する方法が挙げられる。例えば、Ｌ－Ｔ４への特異的結合について陽性選択することによって、例えば、Ｌ－Ｔ４カップリングビオチン（例えば、Ｔ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチン）を使用することによって、そのようなライブラリーから抗体または抗原結合フラグメントを選択することができる。任意に、Ｌ－Ｔ４に特異的に結合する抗体を同定するために、３－ヨード－Ｌ－チロシン（Ｌ－Ｔ３）、甲状腺ホルモン（ｒＴ３）、３，３’，５－トリ－ヨード－サイロ酢酸、３，３’，５，５’－テトラ－ヨードサイロ酢酸、３，５－ジ－ヨード－Ｌ－チロシンおよび／または３－ｉ－Ｌ－チロシン等の構造的に関連する化合物への結合についての陰性選択も行われ得る。ディスプレイライブラリーは、当技術分野で周知であり、例えば、限定されないが、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅｓｈｉｒｅ、ＵＫ）、ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ（Ｍａｒｔｉｎｓｒｉｅｄ／Ｐｌａｎｅｇｇ，Ｄｅｌ．）、Ｂｉｏｖａｔｉｏｎ（Ａｂｅｒｄｅｅｎ，Ｓｃｏｔｌａｎｄ，ＵＫ）およびＢｉｏｉｎｖｅｎｔ（Ｌｕｎｄ、Ｓｗｅｄｅｎ）を含む様々な市販業者から入手可能である。ここでも、選択されたクローンは、その後の組換え処理のための慣例的な方法に従って処理することができる。

【０１７３】

本発明の抗体は、組換え発現され得る。したがって、特定の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は組換え抗体であり得る。組換え抗体を産生する方法は、当技術分野で公知である。本発明による抗体の組換え発現およびその後の精製のための例示的な実施形態は、添付の実施例４に提供される。

【０１７４】

第２の態様において、本発明はまた、本明細書中上記で定義されるような本発明のモノクローナル抗体またはその任意の抗原結合フラグメントをコードする核酸分子を提供する。特に、本明細書中上記で定義されるようなＴ４に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖可変ドメインおよび／または軽鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、本発明の重鎖および／または軽鎖可変ドメインを含む全長ＩｇＧ抗体が発現されるように、重鎖および軽鎖可変ドメインだけでなく、残りの重鎖および／または軽鎖定常領域も確実に発現させるための、更なる配列を含み得る。したがって、本明細書に記載のＴ４に特異的に結合するモノクローナル抗体または抗原結合フラグメントに関する態様および実施形態のそれぞれについて、それぞれの抗体または抗原結合フラグメントをコードする対応するポリヌクレオチドが本明細書において提供される。

【０１７５】

第３の態様において、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターが本明細書において提供される。特に、本発明の抗体または抗体抗原結合フラグメントをコードする核酸分子を含むベクターが提供される。本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、導入された宿主細胞において自己複製することができる環状または線状の核酸分子に関する。本発明での使用に適したベクターの非限定的な例としては、コスミド、プラスミド（例

えば、ネイキッド、またはリポソームに包含）、ウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）およびバクテリオファージが挙げられる。しかしながら、当技術分野は多くの適切なベクターを提供し、その選択は所望の機能に依存する。適切なベクターの開発および使用は、当技術分野において十分に文書化されており、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌ “Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎ．Ｙ．（２００１）ａｎｄ Ａｕｓｕｂｅｌ，“Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ”，Ｇｒｅｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎ．Ｙ．（１９８９），（１９９４）に記載される技術を参照されたい。本発明に関連して使用されるベクターは、本明細書に開示される、完全長抗－Ｌ－Ｔ４／遊離Ｌ－Ｔ４抗体抗原結合フラグメントをコードする核酸配列を含む。したがって、本明細書に記載のＴ４に特異的に結合するモノクローナル抗体または抗原結合フラグメントに関する態様および実施形態のそれぞれについて、それぞれの抗体または抗原結合フラグメントをコードする対応するポリヌクレオチドを含むベクターが本明細書において提供される。

【０１７６】

本明細書で使用される場合、「～を含むベクター」という用語に関して、宿主細胞における所望のベクター活性に必要および／または十分である、例えばベクターの複製を駆動する（したがって、コードする核酸配列）および／または本発明の抗体もしくは抗原結合フラグメントを発現するように宿主細胞に指示する更なる核酸配列がベクター中に存在することが当技術分野で理解される。そのような更なる核酸配列には、ベクター複製および／または特定の細胞系における所望の配列の発現を制御する配列が含まれるが、これらに限定されない。例えば、ベクターは、作動可能に連結されている、かつ／または調節配列の制御下の、本発明の抗体または抗体抗原結合フラグメントをコードする核酸分子を含み得る。「調節配列」という用語は、それらが作動可能に連結されているコード配列の発現をもたらすのに必要なＤＮＡ配列を指す。「制御配列」という用語は、少なくとも、存在が発現にも必要でもあり得る全ての構成要素を含むことを意図しており、例えば複製を可能にするための追加の有利な構成要素を更に含み得る。当技術分野で理解されるように、そのような調節配列および制御配列の性質は、宿主生物に応じて異なる。例えば、原核生物において、制御配列は概して、プロモーター、リボソーム結合部位、およびターミネーターを含む。真核生物において、制御配列は、概してプロモーター、ターミネーター、およびいくつかの場合においてはエンハンサー、転写活性化因子または転写因子を含む。

【０１７７】

本発明で使用されるベクターは、好ましくは発現ベクターである。発現ベクターは、宿主細胞における本発明の核酸分子の複製および発現を指示することができ、したがって、例えば、本明細書に開示されるＴ４に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖可変ドメインおよび／または軽鎖可変ドメインの発現を提供する。いくつかの実施形態において、ベクターは、本発明の重鎖および軽鎖可変ドメインを含む全長ＩｇＧ抗体が発現されるように、重鎖および軽鎖可変ドメインだけでなく、残りの重鎖および軽鎖定常領域も確実に発現させるための、更なる配列を含み得る。適切な発現ベクターは文献に広く記載されており、特定の細胞系のための適切な発現ベクターの決定は、慣例的な方法を使用して当業者によって容易に行うことができる。好ましくは、本明細書に開示されるベクターは、組換えポリヌクレオチド（すなわち、本発明のモノクローナル抗体をコードする核酸配列）ならびに発現可能に連結された制御配列を含む。本明細書において提供されるベクターは、好ましくはプロモーターを更に含む。本明細書に記載されるベクターはまた、選択マーカー遺伝子および宿主における複製を確保する複製起点を含み得る。さらに、本明細書において提供されるベクターはまた、転写のための終結シグナルを含み得る。当技術分野で公知の発現ベクターは、宿主細胞における一過性または構成的発現を駆動し得る。

【０１７８】

本発明の核酸分子および／またはベクターは、当技術分野で公知であるかまたは本明細書に記載される任意の手段によって、原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞へのトランスフェクションのために設計することができる。適切な方法の非限定的な例として、化学ベースの方法（ポリエチレンイミン、リン酸カルシウム、リポソーム、ＤＥＡＥ－デキストラン、ヌクレオフェクション）、非化学的方法（エレクトロポレーション、ソノポレーション、光トランスフェクション、遺伝子電気泳動、流体力学的送達、または細胞を本発明の核酸分子と接触させた際の天然形質転換）、粒子ベースの方法（遺伝子銃、マグネトフェクション、インパルフェクション）ファージベクターベースの方法およびウイルス法が挙げられる。例えば、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、セムリキ森林ウイルスまたはウシパピローマウイルス等のウイルスに由来する発現ベクターを、標的細胞集団への核酸分子のトランスフェクションに使用してもよい。さらに、バキュロウイルス系を、本発明の核酸分子の真核生物発現系におけるベクターとして使用することもできる。

【０１７９】

「原核生物」という用語は、本発明のタンパク質の発現のためにＤＮＡまたはＤＮＡもしくはＲＮＡ分子で形質転換、形質導入またはトランスフェクトすることができる全ての細菌を含むことを意味する。原核生物宿主としては、グラム陰性細菌ならびにグラム陽性細菌、例えば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、Ｓ・ティフィムリウム（Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、セラチア・マルセッセンス（Ｓｅｒｒａｔｉａ　ｍａｒｃｅｓｃｅｎｓ）、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）（グルタミクム）、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）（フルオレッセンス）、ラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、ストレプトミセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）および枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）が挙げられる。「真核生物」という用語は、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞を含むことを意味する。当技術分野で典型的に使用される宿主細胞の非限定的な例としては、Ｈｅｌａ、ＨＥＫ２９３、Ｈ９、Ｐｅｒ．Ｃ６およびＪｕｒｋａｔ細胞、マウスＮＩＨ３Ｔ３、ＮＳ／０、ＳＰ２／０およびＣ１２７細胞、ＣＯＳ細胞、例えばＣＯＳ１またはＣＯＳ７、ＣＶ１、ウズラＱＣ１－３細胞、マウスＬ細胞、マウス肉腫細胞、ボーズメラノーマ細胞およびチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞が挙げられる。

【０１８０】

したがって、第４の態様において、本発明は、本発明によるポリヌクレオチドまたは本発明によるベクターを含む宿主細胞に関する。宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得る。好ましい実施形態において、宿主細胞は、真核細胞である。特定の実施形態において、細胞はＨＥＫ細胞である。別の特定の実施形態において、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞である。

【０１８１】

本明細書に開示される本発明の抗体の重鎖および／または軽鎖をコードする組換え発現ベクターを宿主細胞に導入する場合、抗体または抗体抗原結合フラグメントは、宿主細胞において抗体または抗原結合フラグメントを発現させるか、または好ましくは、宿主細胞が成長している培地中に抗体または抗原結合フラグメントを分泌させるのに十分な期間にわたって宿主細胞を培養することによって産生される。抗体および／または抗原結合フラグメントは、標準的なタンパク質精製方法を使用して培地から回収することができる。抗体の精製方法は、当技術分野で周知である。例示的な精製方法は、添付の実施例に記載されている。

【０１８２】

したがって、本発明はまた、本明細書に開示されるＴ４に特異的に結合するモノクローナル抗体の産生のための方法を提供する。この方法は、本発明の宿主細胞を適切な条件下で培養することと、産生された抗体を単離することとを含む。例えば添付の実施例に記載されるような精製工程によって、本発明の単離されたモノクローナル抗体を得ることができる。本発明は更に、本明細書中に開示される方法のいずれかによって得ることができる

抗体または抗原結合フラグメントを提供する。

【０１８３】

形質転換された宿主細胞は、バイオリアクター内で成長させ、最適な細胞成長を達成するために当技術分野で公知の技術によって培養することができる。本発明の抗体および／または抗体抗原結合フラグメントは、次いで任意の従来の手段、例えば限定されないが、アフィニティークロマトグラフィー（例えば、Ｓｔｒｅｐ－ｔａｇ ＩＩまたはＨｉｓ$_6$タグ等の融合タグを使用する）、ゲル濾過（サイズ排除クロマトグラフィー）、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、逆相ＨＰＬＣまたは免疫沈降によって細胞画分または成長培地から単離され得る。

【０１８４】

上記の手順のバリエーションは、本発明の範囲内であることが理解されよう。例えば、組換えＤＮＡ技術を使用して、本明細書に開示される抗体および／または抗体抗原結合フラグメントをコードする、例えば本明細書で上に定義される重鎖および／または軽鎖可変ドメインをコードするＤＮＡ配列を取り出しまたは修飾し得る。例えば、組換えＤＮＡ技術を使用して、目的の抗原への特異的かつ選択的な結合を維持するために必要ではないコード配列の部分を除去し得る。そのような切断ＤＮＡ分子から発現される分子も、本発明の抗体に包含される。さらに、少なくとも２回（好ましくは４、５、６、７、８回）の本発明の重鎖可変ドメインおよび／または軽鎖可変ドメイン（例えば、Ｔ４に特異的かつ選択的に結合する抗体Ｆｖドメインの形成）を含む多価抗体も提供される。

【０１８５】

抗体誘導体は、例えば、外因性配列を付加して、免疫原性を改変し、または結合、親和性、オン速度、オフ速度、結合活性、特異性、半減期もしくは任意の他の適切な特徴を低減、増強もしくは改変することによって製造され得る。

【０１８６】

本明細書中に開示される抗体のヒト化バージョン、すなわち、本明細書中上記で開示されるような重鎖および／または軽鎖のＣＤＲを含むものも提供される。当技術分野で周知のように、「ヒト化」（親抗体のヒト化バージョンを作製するための）は、ヒト由来フレームワークおよび定常ドメインの場面において非ヒトドナー免疫グロブリンに由来するＣＤＲを使用して抗体を組換え操作することを指す。操作中、フレームワークおよび／またはＣＤＲ残基は、結合親和性および活性、例えばＴ４に対する特異性を保存するように変更され得る。抗体をヒト化する方法は、当技術分野で公知であり、例えばＱｕｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８６（１９８９），１００２９－１００３２；Ｈｏｄｇｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９（１９９１）４２１に記載されている。

【０１８７】

第５の態様において、本発明は、本発明の抗体、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクターまたは本発明の宿主細胞を含む組成物を提供した。好ましい実施形態において、組成物は診断用組成物、すなわち診断用途に使用するための組成物である。好ましい実施形態において、組成物は、Ｌ－Ｔ４、好ましくは遊離Ｌ－Ｔ４を検出するためのインビトロ診断試験で使用するためのものである。好ましい実施形態において、診断用組成物は、Ｌ－Ｔ４、好ましくは遊離Ｌ－Ｔ４を検出するためのイムノアッセイのための試薬であり得る。診断用組成物は、好ましくは、対象から得られた試料中のＬ－Ｔ４、好ましくは遊離Ｌ－Ｔ４の検出を可能にするように構成される。試料は、好ましくは血液試料（例えば、全血、血清または血漿）である。

【０１８８】

実施形態において、本発明の組成物は、好ましくはイムノアッセイを使用して、試料中のＴ４（好ましくはｆＴ４）のインビトロ検出（好ましくは定量）のための組成物である。実施形態において、イムノアッセイは、異種イムノアッセイである。実施形態において、イムノアッセイは、競合的イムノアッセイである。

【０１８９】
第６の態様において、本発明は、試料中のＴ４（例えば、遊離Ｔ４）のインビトロ検出（好ましくは定量）のための本発明による抗体の使用を提供する。Ｔ４（例えば、遊離Ｔ４）の検出および／または定量は、好ましくはイムノアッセイを使用することによって達成される。したがって、Ｔ４（例えば、遊離Ｔ４）を検出するためのイムノアッセイ（例えば、不均一イムノアッセイ）に使用するための本発明の抗体も提供される。
【０１９０】
試料は、限定されないが、血液試料、脳脊髄液、精液、唾液または尿等の体液であり得る。実施形態において、試料は、全血、血清または血漿等の血液試料である。実施形態において、試料は、血清または血漿である。
【０１９１】
Ｔ４は非常に小さな分析物であるため、イムノアッセイは競合的であることが好ましい。実施形態において、アッセイ設定は、例えば、本明細書中下記または添付の実施例に記載されるような、逆滴定タイプの競合アッセイである。簡潔には、このアッセイは、以下のように構成され得る：
（ｉ）Ｔ４（例えば、遊離Ｔ４）を含む試料を抗体とインキュベートすることであって、抗体を検出標識（例えば、ルテニウム標識）で規定時間（例えば９分）標識する、Ｔ４（例えば、遊離Ｔ４）を含む試料を抗体とインキュベートすること、
（ｉｉ）（ｉ）捕捉標識にカップリングしたＴ４（例えば、Ｔ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチン－ハプテン）および捕捉標識に結合することができる粒子の混合物に添加し、得られた混合物を規定の時間（例えば９分）インキュベートすること、
（ｉｉｉ）混合物から粒子を分離し、検出標識シグナルを測定することによって、混合物に結合した標識抗体を検出すること、ならびに
（ｉｖ）測定された検出標識シグナルに基づいてＴ４の量（例えば、遊離Ｔ４）を決定すること。
【０１９２】
任意に、Ｔ４が結合タンパク質によって部分的に結合されている試料中で総Ｔ４が決定される場合、工程（ｉ）は、本発明の第７の態様との関連において以下に詳細に記載されるように、その結合タンパク質からＴ４を放出することを含み得る。
【０１９３】
第７の態様において、本発明は、本発明の抗体を使用して試料中のＴ４（例えば、遊離Ｔ４）を定量するためのインビトロイムノアッセイ法を提供する。抗体は、組成物、特に本発明の診断用組成物の一部であり得る。
【０１９４】
試料は、血液試料、脳脊髄液、精液、唾液または尿等の体液であり得る。実施形態において、試料は、全血、血清または血漿等の血液試料である。実施形態において、試料は、血清または血漿である。
【０１９５】
Ｌ－Ｔ４を定量するための方法は、（ｉ）Ｌ－Ｔ４を含む試料を、抗体がＬ－Ｔ４に結合することを可能にする条件下で本発明の抗体とインキュベートすることと、（ｉｉ）本発明の抗体に結合したＬ－Ｔ４の量を直接的または間接的に検出することによって試料中のＬ－Ｔ４の量を定量することとを含み得る。
【０１９６】
直接的に検出するとは、抗体－Ｌ－Ｔ４複合体の量が検出標識を介して直接検出され、Ｌ－Ｔ４－抗体複合体の量が試料中のＬ－Ｔ４の量に比例して対応することを意味する。間接的に検出するとは、Ｌ－Ｔ４の量が検出可能な標識（例えば、競合アッセイ形式で達成される場合）の測定シグナルと間接的に相関することを意味する。例えば、間接的な検出のために、本発明の抗体を検出標識で標識してもよく、表面に（直接またはビオチン等の捕捉標識を介して）連結されたＬ－Ｔ４（すなわち、本発明のＴ４抗体への結合についてＴ４と競合する）またはＬ－Ｔ４の類似体（ａｎａｌｏｇｏｎ）に対する標識抗体の結

合量が検出される。したがって、実施形態において、試料中のＬ－Ｔ４（例えば、ｆＴ４）に結合しない抗体の量を定量し、それによって試料中のＬ－Ｔ４の量を間接的に決定する。

【０１９７】

実施形態において、本発明の方法は、試料中の総Ｔ４（すなわち、結合タンパク質に結合した遊離Ｔ４およびＴ４）を検出する方法であり得る。これらの実施形態において、方法は、放出剤を添加することによって結合タンパク質からＴ４を放出することを更に含み得る。そのような放出剤は、例えば、抗体とのインキュベーションの前またはインキュベーションの間に添加され得る。実施形態において、放出剤は、抗体とのインキュベーションの前に添加されてもよく、更なる方法工程中に依然として存在してもよい。Ｔ４を結合タンパク質から放出するための適切な試薬は、当技術分野で公知である（例えば、Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）Ｔ４のＭｅｔｈｏｄ　Ｓｈｅｅｔ；Ｒｅｆ．０９００７７８４１９０を参照）。いくつかの実施形態において、放出剤は、８－アニリノ－１－ナフタレンスルホン酸（ＡＮＳ）であってもよい。実施形態において、ＡＮＳは、０．３ｍｇ／ｍｌ～０．９ｍｇ／ｍｌ、実施形態において０．３７５ｍｇ／ｍｌ～０．８３ｍｇ／ｍｌの試料中の最終濃度で添加され得る。実施形態において、ＡＮＳは、本発明の抗体とのインキュベーション中に０．８３ｍｇ／ｍｌであり得、捕捉剤（例えば、本発明の抗体と競合する）が添加される後続の工程では０．３７５ｍｇ／ｍｌであり得る。

【０１９８】

本発明の抗体に連結された検出標識は、当技術分野で公知の任意の検出標識であり得る。例えば、検出標識は、酵素または発光する標識（例えば、蛍光、発光、化学発光、電気化学発光または放射能）から選択され得る。

【０１９９】

第８の態様において、本発明の抗体またはそれを含む組成物を含むキットが本明細書において提供される。実施形態において、キットは、インビトロでＴ４（例えば、ｆＴ４）を検出および／または定量するためのキットである。実施形態において、キットは、イムノアッセイキットである。実施形態において、キットは、異種イムノアッセイのためのキットである。実施形態において、キットは、競合的イムノアッセイのためのキットである。実施形態において、キットは、インビトロで総Ｔ４を検出するためのキットであってもよく、試料中のそれに結合した結合タンパク質（例えば、血清／血漿結合タンパク質）からＴ４を放出するためのｒｅａｌｅａｓｅ剤を更に含んでもよい。

【０２００】

本発明はまた、本発明の少なくとも１つの試薬、すなわち（ｉ）本発明の抗体または抗体抗原結合フラグメント、（ｉｉ）本発明の核酸分子、（ｉｉｉ）本発明のベクター、（ｉｖ）本発明の宿主細胞、および／または（ｖ）本発明の方法によって産生される、または得られる抗体または抗体抗原結合フラグメントの１つ以上を含む任意の製造品（例えば、パッケージまたは容器または添付書類）を含むキットを提供する。キットは、本発明の方法を実行するためのユニットとして、奨励、流通、または販売され得る。

【０２０１】

実施形態において、本発明のキットは、検出標識（例えば、本明細書の他の箇所に明記されているように）が付着された本発明の抗体を含み得る。キットは、Ｌ－Ｔ４を更に含み得る。Ｌ－Ｔ４は、捕捉標識を含み得る。キットは、磁性粒子（例えば、磁性粒子）等の固相を含み得る。固相は、捕捉標識が結合できるように官能化されていてもよく、例えばストレプトアビジンで官能化されていてもよい。あるいは、固相をＬ－Ｔ４でプレコートしてもよい。

【０２０２】

特定の検出標識は、検出可能なシグナルを生成するための基質または試薬を必要とするため、本発明のキットは、実施形態において、検出標識の検出を可能にする基質および／または試薬を更に含有し得る。

【０２０３】

具体的な実施形態において、キットは、第１の容器に、本発明によるＴ４（例えば、遊離Ｔ４）に特異的に結合するモノクローナル抗体を含んでもよく、別の第２の容器に、固相とＬ－Ｔ４（例えばビオチン化Ｌ－Ｔ４）の捕捉類似体との混合物を含んでもよく、捕捉類似体は固相に結合することができる。例えば、固相をストレプトアビジンでコーティングし、捕捉類似体をビオチン化してもよい。あるいは、第２の容器は、Ｌ－Ｔ４で固定化された固相を含み得る。両方の実施形態において、Ｌ－Ｔ４の固相へのカップリングは、Ｌ－Ｔ４が依然として本発明の抗体によって認識され得るようなものである。

【０２０４】

本発明は、特に以下の項目にも関する。

【０２０５】

１．Ｌ－チロキシン（Ｔ４）に特異的に結合するモノクローナル抗体であって、前記モノクローナル抗体が、

ｉ）３３位にＶまたはＡ；５０位にＹ；５２位にＷ；９８位にＩ、９９位にＧ、ＡまたはＶ；１００位にＹ；および１００ｂ位にＩを含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）２８位にアミノ酸ＨまたはＹ；２９位にＮまたはＫ；３２位にＷ；９１位にＧまたはＡ；９２位にＹ、ＷまたはＦ；９３位にＳまたはＴ；９５ｂ位にＹまたはＦ；９５ｃ位にＮ、Ｓ、ＴまたはＱ；および９６位にＨを含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含み、

前記ＶＨおよび前記ＶＬ中の前記アミノ酸の位置は、それぞれＫａｂａｔナンバリングスキームに従って示される、モノクローナル抗体。

【０２０６】

２．前記ＶＬが、位置９５ｃにＮ、ＳまたはＴを含む、項目１に記載のモノクローナル抗体。

【０２０７】

３．

ｉ）前記ＶＨが、３３位にＶおよび９９位にＧを含み、

ｉｉ）前記ＶＬが、９１位にＧ；９２位にＹまたはＷ；９３位にＳ；９５ｂ位にＹおよび９５ｃ位にＮまたはＳを含む、項目１に記載のモノクローナル抗体。

【０２０８】

４．

ｉ）前記ＶＨが、３３位にＶおよび９９位にＧを含み、

ｉｉ）前記ＶＬが、２８位にＨ；２９位にＮ；９１位にＧ；９２位にＹ；９３位にＳ；９５ｂ位にＹおよび９５ｃ位にＮを含む、項目１に記載のモノクローナル抗体。

【０２０９】

５．Ｔ４に結合するための前記モノクローナル抗体の前記パラトープが、３３位、５０位、５２位、９８位、９９位、１００位および１００ｂ位の前記ＶＨのアミノ酸ならびに２８位、２９位、３２位、９１位、９２位、９３位、９５ｂ位、９５ｃ位および９６位の前記ＶＬのアミノ酸を含み、前記ＶＨおよび前記ＶＬにおける前記アミノ酸の位置は、それぞれＫａｂａｔナンバリングスキームに従って示される、項目１～５のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２１０】

６．前記ＶＨが、３４位にＭ、Ｌ、ＩもしくはＶ；３５位にＮ、Ｓ、ＴもしくはＱ；５１位にＩ、Ａ、ＬもしくはＶ、５２ａ位にＴもしくはＳ；５３位にＲ、Ｇ、ＤもしくはＫ；９７位にＨ、Ａ、ＲもしくはＫ；および／または１００ａ位にＮ、ＡもしくはＱを含み、前記アミノ酸の位置が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される、項目１～５のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２１１】

７．前記ＶＨが、３４位にＭ、ＬもしくはＩ；３５位にＮ、ＳもしくはＴ；および／または５１位にＩ、ＡもしくはＬを含む、項目６に記載のモノクローナル抗体。

【０２１２】

８．前記ＶＨが、３４位にＭもしくはＬ；３５位にＮ；５１位にＩ；５２ａ位にＴ；５

３位にＲ、ＧもしくはＤ；９７位にＨもしくはＡ；および／または１００ａ位にＮもしくはＡを含む、項目６に記載のモノクローナル抗体。

【０２１３】

９．前記ＶＨが、３４位にＭ；３５位にＮ；５１位にＩ；５２ａ位にＴ；５３位にＲ；９７位にＨ；および／または１００ａ位にＮを含む、項目６に記載のモノクローナル抗体。

【０２１４】

１０．前記ＶＬが、３０位にＮ、Ｑ、ＳもしくはＴ；３１位にＡ、ＮもしくはＶ；９４位にＧ、ＡもしくはＳ；９５位にＳ、Ｇ、Ｎ、Ｑ；９５ａ位にＴ、ＳもしくはＧ；および／または９７位にＶ、Ａ、ＩもしくはＬを含み、前記アミノ酸の位置が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される、項目１～９のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２１５】

１１．前記ＶＬが、３０位にＮ；３１位にＡもしくはＮ；９５位にＳ、ＧもしくはＮ；および／または９７位にＶもしくはＡを含む、項目１０に記載のモノクローナル抗体。

【０２１６】

１２．前記ＶＬが、３０位にＮ；３１位にＡ；９４位にＧ；９５位にＳ；９５ａ位にＴおよび／または９７位にＶを含む、項目１０に記載のモノクローナル抗体。

【０２１７】

１３．前記ＶＨが、それぞれＫａｂａｔナンバリングスキームに従って、３１位および３２位にプロリン以外のアミノ酸を含む、項目１～１２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２１８】

１４．前記ＶＨが、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、３１位にＳ、Ｒもしくはその保存的置換、および／またはＫａｂａｔナンバリングスキームに従って３２位にＮもしくはその保存的置換を含む、項目１～１２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２１９】

１５．前記ＶＨが、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、３１位にＳもしくはＲ、および／またはＫａｂａｔナンバリングスキームに従って３２位にＮを含む、項目１～１２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２２０】

１６．前記ＶＨのＣＤＲ－Ｈ１が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、３１位～３５位を含むかまたはそれからなる、項目１～１５のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２２１】

１７．前記ＶＨが、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５４位～６５位にプロリン以外のアミノ酸を含む、項目１～１６のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２２２】

１８．前記ＶＨが、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５４位～６５位にアミノ酸配列ＳＧＮＴＹＹＡＳＷＡＫＧ（配列番号１）、または１２以下、１１以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下もしくは１以下のアミノ酸置換を有し、５４位～６５位のいずれもプロリンではないその変異体を含む、項目１～１７のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２２３】

１９．１２以下、１１以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下または１以下のアミノ酸置換が、それぞれ個別に保存的なアミノ酸置換である、項目１８に記載のモノクローナル抗体。

【０２２４】

２０．前記ＶＨが、以下からなる群から選択される、Ｋａｂａｔナンバリングスキーム

に従って、５４位～６５位のアミノ酸配列を含む、項目１～１９のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体：ＳＧＮＴＹＹＡＳＷＡＫＧ（配列番号１）、ＳＧＮＴＹＹＡＴＷＡＫＧ（配列番号２）またはＳＧＳＴＹＹＡＴＷＡＫＧ（配列番号３）。

【０２２５】

２１．前記ＶＨのＣＤＲ－Ｈ２が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５０位、５１位、５２位、５２ａ位および５３位～６５位を含むかまたはそれからなる、項目１～２０のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２２６】

２２．前記ＶＨが、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、９５位、９６位、１００ｃ位、１０１位および１０２位にプロリン以外のアミノ酸を含む、項目１～２１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２２７】

２３．前記ＶＨは、９５位におけるＧまたはその保存的置換；９６位におけるＬまたはその保存的置換；１００ｃ位におけるＦまたはその保存的置換；１０１位におけるＮまたはその保存的置換；および１０２位におけるＦまたはその保存的置換を含み、前記アミノ酸の位置が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される、項目１～２２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２２８】

２４．前記ＶＨが、９５位にＧ；９６位にＬ；１００ｃ位にＦ；１０１位にＮ；および１０２位にＦを含み、前記アミノ酸の位置が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される、項目１～２３のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２２９】

２５．前記ＶＨのＣＤＲ－Ｈ３が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、９５位～１００位、１００ａ位、１００ｂ位、１００ｃ位、１０１位および１０２位を含むかまたはこれからなる、項目１～２４のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２３０】

２６．前記ＶＬが、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、２４位、２５位、２６位、２７位、２７ａ位、２７ｂ位、３３位および３４位にプロリン以外のアミノ酸を含む、項目１～２５のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２３１】

２７．前記ＶＬが、２４位にＱまたはその保存的置換；２５位にＳもしくはその保存的置換；２６位にＳもしくはその保存的置換；２７位にＱもしくはその保存的置換；２７ａ位にＳもしくはその保存的置換；２７ｂ位にＶもしくはその保存的置換；３３位にＣ、Ｌもしくはその保存的置換；および／または３４位にＳもしくはその保存的置換を含み、前記アミノ酸の位置が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される、項目１～２６のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２３２】

２８．前記ＶＬが、２４位にＱ；２５位にＳ；２６位にＳ；２７位にＱ；２７ａ位にＳ；２７ｂ位にＶ；３３位にＣもしくはＬ；および／または３４位にＳを含み、前記アミノ酸の位置が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される、項目１～２７のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２３３】

２９．ＶＬの前記ＣＤＲ－Ｌ１が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、２４位、２５位、２６位、２７位、２７ａ位、２７ｂ位、２８位、２９位、３０位、２８位、３２位、３３位および３４位を含むかまたはこれからなる、項目１～３１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２３４】

３０．前記ＶＬが、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５０位、５１位、５２位、５３位、５４位、５５位および５６位にプロリン以外のアミノ酸を含む、項目１～２９のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２３５】
３１．前記ＶＬが、５０位にＧもしくはその保存的置換；５１位にＡもしくはその保存的置換；５２位にＳもしくはその保存的置換；５３位にＴもしくはその保存的置換；５４位にＬもしくはその保存的置換；５５位にＴ、Ａもしくはその保存的置換；および／または５６位にＣ、Ｓもしくはその保存的置換を含み、前記アミノ酸の位置が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って示される、項目１～３０のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２３６】
３２．前記ＶＬが、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５０位～５６位にＧＡＳＴＬＴＳ（配列番号４）またはＧＡＳＴＬＡＳ（配列番号５）を含む、項目１～３１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２３７】
３３．前記ＶＬのＣＤＲ－Ｌ２が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、５０位、５１位、５２位、５３位、５４位、５５位および５６位を含むかまたはこれからなる、項目１～３２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２３８】
３４．前記ＶＬが、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、８９位および９０位にプロリン以外のアミノ酸を含む、項目１～３３のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２３９】
３５．前記ＶＬが、８９位にＡもしくはその保存的置換、および／または９０位にＧもしくはその保存的置換を含み、前記アミノ酸の位置がＫａｂａｔナンバリングスキームに従って示される、項目１～３４のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２４０】
３６．前記ＶＬが、８９位にＡ、および／または９０位にＧを含み、前記アミノ酸の位置がＫａｂａｔナンバリングスキームに従って示される、項目１～３５のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２４１】
３７．ＶＬの前記ＣＤＲ－Ｌ３が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って、８９位、９０位、９１位、９２位、９３位、９４位、９５位、９５ａ位、９５ｂ位、９５ｃ位、９６位および９７位を含むかまたはそれからなる、項目１～３６のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２４２】
３８．Ｌ－チロキシン（Ｔ４）に特異的に結合するモノクローナル抗体であって、前記モノクローナル抗体が、
ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位、２位、４位および５位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体；（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号８の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１０の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と
を含む、モノクローナル抗体。
【０２４３】
３９．Ｌ－チロキシン（Ｔ４）に特異的に結合するモノクローナル抗体であって、前記

モノクローナル抗体が、
ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位、２位、４位および５位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体；（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１３の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１６の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と
を含む、モノクローナル抗体。
【０２４４】
４０．Ｌ－チロキシン（Ｔ４）に特異的に結合するモノクローナル抗体であって、前記モノクローナル抗体が、
ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の１位、２位、４位および５位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体；（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１７の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と
を含む、モノクローナル抗体。
【０２４５】
４１．Ｌ－チロキシン（Ｔ４）に特異的に結合するモノクローナル抗体であって、前記モノクローナル抗体が、
ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の１位、２位、４位および５位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体；（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
ｉｉ）（ｄ）配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号１５の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１８の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と
を含む、モノクローナル抗体。
【０２４６】
４２．
（ａ）配列番号６の前記変異体が、４位にＭ、Ｌ、ＩまたはＶかつ５位にＮ、Ｓ、ＴまたはＱを有し、

（ｂ）配列番号７の前記変異体が、２位にＩ、Ａ、ＬまたはＶ、４位にＴまたはＳ、５位にＲ、Ｇ、ＤまたはＫを有し、
（ｃ）配列番号８の前記変異体が、３位にＨ、Ａ、ＲまたはＫかつ７位にＮ、ＡまたはＱを有し、
（ｄ）配列番号９の前記変異体が、９位にＮ、Ｑ、ＳまたはＴかつ１０位にＡ、ＮまたはＶを有し、
（ｅ）配列番号１０の前記変異体が、６位にＧ、ＡまたはＳ、７位にＳ、Ｇ、ＮまたはＱ、８位にＴ、ＳまたはＧかつ１２位にＶ、Ａ、ＩまたはＬを有する、項目３８～４１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２４７】

４３．
（ａ）配列番号６の前記変異体が、４位にＭ、Ｌ、またはＩかつ５位にＮ、Ｓ、またはＴを有し、
（ｂ）配列番号７の前記変異体が、２位にＩ、Ａ、またはＬ、４位にＴまたはＳ、５位にＲ、Ｇ、ＤまたはＫを有し、
（ｃ）配列番号１３の前記変異体が、３位にＨ、Ａ、ＲまたはＫかつ７位にＮ、ＡまたはＱを有し、
（ｄ）配列番号９の前記変異体が、９位にＮ、Ｑ、ＳまたはＴかつ１０位にＡ、ＮまたはＶを有し、
（ｅ）配列番号１６の前記変異体が、６位にＧ、ＡまたはＳ、７位にＳ、Ｇ、またはＮ、８位にＴ、ＳまたはＧかつ１２位にＶ、またはＡを有する、項目３８～４１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２４８】

４４．
（ａ）配列番号１２の前記変異体が、４位にＭ、またはＬかつ５位にＮを有し、
（ｂ）配列番号７の前記変異体が、２位にＩ、４位にＴ、５位にＲ、Ｇ、またはＤを有し、
（ｃ）配列番号１４の前記変異体が、３位にＨ、またはＡかつ７位にＮ、ＡまたはＱを有し、
（ｄ）配列番号９の前記変異体が、９位にＮかつ１０位にＮ、またはＡを有し、
（ｅ）配列番号１７の前記変異体が、６位にＧ、ＡまたはＳ、７位にＳ、Ｇ、またはＮ、８位にＴ、ＳまたはＧかつ１２位にＶ、またはＡを有する、項目３８～４１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２４９】

４５．
（ａ）配列番号１２の前記変異体が、４位にＭかつ５位にＮを有し、
（ｂ）配列番号７の前記変異体が、２位にＩ、４位にＴ、５位にＲを有し、
（ｃ）配列番号１４の前記変異体が、３位にＨかつ７位にＮを有し、
（ｄ）配列番号９の前記変異体が、９位にＮかつ１０位にＡを有し、
（ｅ）配列番号１７の前記変異体が、６位にＧ、７位にＳ、８位にＴかつ１２位にＶを有する、項目３８～４１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２５０】

４６．前記軽鎖可変ドメインが、（ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２、または配列番号１１の４以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、項目３８～４５のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２５１】

４７．ＣＤＲ　Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１およびＬ３の前記変異体における前記アミノ酸置換の和が、１２以下である、項目３８～４６のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２５２】

４８．ＣＤＲ　Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２およびＬ３の前記変異体における前記アミノ酸置換の合計が、１３以下である、項目４６に記載のモノクローナル抗体。

【０２５３】

４９．前記モノクローナル抗体が、

ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位、２位、４位および５位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体；（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号８の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１０の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と

を含む、項目３８～４８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２５４】

５０．前記モノクローナル抗体が、

ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位、２位、４位および５位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体；（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１３の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１６の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と

を含む、項目３８～４８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２５５】

５１．前記モノクローナル抗体が、

ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の１位、２位、４位および５位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体；（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１７の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と

を含む、項目３８～４８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２５６】

５２．前記モノクローナル抗体が、

ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号１２の

１位、２位、４位および５位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体；（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の２位および４位～１７位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の１位～３位、７位および９位～１１位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号１５の１位～６位、９位、１０位、１２位および１３位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１８の１位、２位、６位～８位および１２位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と

を含む、項目３８～４８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２５７】

５３．前記軽鎖可変ドメインが、（ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２、または配列番号１１の１以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、項目３８～５２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２５８】

５４．前記モノクローナル抗体が、

ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位および４位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体；（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の５位、８位および１３位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号８の３位および７位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の８位および１０位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１０の４位、５位および６位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と

を含む、項目３８～５３のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２５９】

５５．前記モノクローナル抗体が、

ｉ）（ａ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位および４位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体；（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の５位、８位および１３位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１３の３位および７位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の８位および１０位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１６の４位、５位および６位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と

を含む、項目３８～５３のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２６０】

５６．前記モノクローナル抗体が、

ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位および４位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体；（ｂ）配

列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の５位、８位および１３位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の３位および７位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号９の８位および１０位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１７の４位、５位および６位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と

を含む、項目３８～５３のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２６１】

５７．前記モノクローナル抗体が、

ｉ）（ａ）配列番号１２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１、または配列番号６の１位および４位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体；（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または配列番号７の５位、８位および１３位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｃ）配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３、または配列番号１４の３位および７位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

ｉｉ）（ｄ）配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または配列番号１５の８位および１０位から選択される２以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体、ならびに（ｆ）配列番号１８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３、または配列番号１８の４位、５位および６位から選択される３以下の位置にアミノ酸置換を有するその変異体を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と

を含む、項目３８～５３のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２６２】

５８．前記軽鎖可変ドメインが、（ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２、または配列番号１１の６位に１以下のアミノ酸置換を有するその変異体を含む、項目３８～５７のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２６３】

５９．前記各アミノ酸置換が、保存的アミノ酸置換、好ましくは高度に保存的なアミノ酸置換である、項目３８～５８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２６４】

６０．前記重鎖可変ドメイン（ＶＨ）が、（ａ）Ｘ１ＮＶＸ２Ｎ（式中、Ｘ１はＳまたはＲであり、Ｘ２はＭまたはＬである）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含み、前記軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）が、（ｄ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、および（ｆ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む、項目１～５９のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２６５】

６１．前記軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）が、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２を含む、項目１～６０のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２６６】

６２．前記重鎖可変ドメイン（ＶＨ）が、（ａ）配列番号１２、２５および２６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号７、２７および２８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ２、ならびに（ｃ）配列番号１４および２９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなるＣＤＲ－Ｈ３を含み、前記軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）が、（ｄ）配列番号１５および３０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたは

それからなるＣＤＲ－Ｌ１、ならびに（ｆ）配列番号１８、３１および３２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ－Ｌ３を含む、項目１～６１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２６７】

６３．前記軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）が、配列番号１１または３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２を含む、項目１～６２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２６８】

６４．前記重鎖可変ドメイン（ＶＨ）が、式Ｉ：

ＦＷ－Ｈ１－ＣＤＲ－Ｈ１－ＦＷ－Ｈ２－ＣＤＲ－Ｈ２－ＦＷ－Ｈ３－ＣＤＲ－Ｈ３－ＦＷ－Ｈ４（式Ｉ）

に表される前記ＶＨの前記ＣＤＲに隣接するフレームワーク領域（ＦＷ）を含み、

ＦＷ－Ｈ１が、配列番号３４のアミノ酸配列、または配列番号３４と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有し、

ＦＷ－Ｈ２が、配列番号３５のアミノ酸配列、または配列番号３５と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有し、

ＦＷ－Ｈ３が、配列番号３６のアミノ酸配列、または配列番号３６と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有し、

ＦＷ－Ｈ４が、配列番号３７のアミノ酸配列、または配列番号３７と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有する、項目１～６３のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２６９】

６５．前記軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）が、式Ｉ：

ＦＷ－Ｌ１－ＣＤＲ－Ｌ１－ＦＷ－Ｌ２－ＣＤＲ－Ｌ２－ＦＷ－Ｌ３－ＣＤＲ－Ｌ３－ＦＷ－Ｌ４（式Ｉ）

に表される前記ＶＬの前記ＣＤＲに隣接するフレームワーク領域（ＦＷ）を含み、

ＦＷ－Ｌ１が、配列番号３８のアミノ酸配列、または配列番号３８と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有し、

ＦＷ－Ｌ２が、配列番号３９のアミノ酸配列、または配列番号３９と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有し、

ＦＷ－Ｌ３が、配列番号４０のアミノ酸配列、または配列番号４０と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を

有し、
ＦＷ－Ｌ４が、配列番号４１のアミノ酸配列、または配列番号４１と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその変異体を有する、項目１～６４のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２７０】
６６．前記ＶＨが、配列番号４２のアミノ酸配列、または配列番号４２と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有する変異体を有する、項目１～６５のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２７１】
６７．前記ＶＨが、配列番号４３のアミノ酸配列、または配列番号４３と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有する変異体を有する、項目１～６６のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２７２】
６８．前記ＶＨが、配列番号４４のアミノ酸配列、または配列番号４４と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有する変異体を有する、項目１～６７のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２７３】
６９．前記ＶＬが、配列番号４５のアミノ酸配列、または配列番号４５と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有する変異体を有する、項目１～６８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２７４】
７０．前記ＶＬが、配列番号４６のアミノ酸配列、または配列番号４６と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有する変異体を有する、項目１～６９のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２７５】
７１．前記ＶＬが、配列番号４７のアミノ酸配列、または配列番号４７と少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９９％の配列同一性を有する変異体を有する、項目１～７０のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２７６】
７２．３７℃の温度において、Ｔ４との前記モノクローナル抗体の会合速度定数（k_a）が、$1.9\times10^{7}M^{-1}sec^{-1}$以上、実施形態において$2\times10^{7}M^{-1}sec^{-1}$以上、実施形態において$1\times10^{8}M^{-1}sec^{-1}$以上、実施形態において$3\times10^{8}M^{-1}sec^{-1}$以上、および実施形態において$1\times10^{9}M^{-1}sec^{-1}$以上である、項目１～７１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。
【０２７７】
７３．Ｔ４への結合の前記会合速度定数（k_a）が、配列番号４８の重鎖および配列番

号４９の軽鎖を含むかまたはそれらからなる抗体のＴ４への結合の会合速度定数（ｋａ）の少なくとも１０％、好ましくは少なくとも２０％、更により好ましくは少なくとも３０％、更により好ましくは少なくとも５０％、更により好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも９０％に相当し、前記会合速度定数が同一の実験条件下で測定される、項目１～７２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２７８】

７４．前記ｋａが、表面プラズモン共鳴分光法によって決定される、項目７２または７３に記載のモノクローナル抗体。

【０２７９】

７５．前記表面プラズモン共鳴分光法が、質量輸送制限のための補正を使用して分析される、項目７４に記載のモノクローナル抗体。

【０２８０】

７６．前記モノクローナル抗体が、２０ｎｍ以下、実施形態において１０ｎＭ以下、実施形態において５ｎＭ以下、実施形態において１ｎＭ以下、実施形態において０．５ｎＭ以下、実施形態において０．３ｎＭ以下、および実施形態において０．２８ｎＭ以下のK_DでＴ４に結合する、項目１～７３のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２８１】

７７．前記K_Dが、任意に、溶液測定における親和性を使用して、表面プラズモン共鳴分光法によって決定される、項目７６に記載のモノクローナル抗体。

【０２８２】

７８．前記モノクローナル抗体が、Ｔ４を、３－ヨード－Ｌ－チロシン（Ｌ－Ｔ３）、ｒ甲状腺ホルモン（ｒＴ３）、３，３’，５－トリ－ヨード－サイロ酢酸、３，３’，５，５’－テトラ－ヨードサイロ酢酸、３，５－ジ－ヨード－Ｌ－チロシンおよび／または３－ｉ－Ｌ－チロシンと識別する、項目１～７７のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２８３】

７９．前記モノクローナルが、Ｔ４をＬ－Ｔ３および／またはｒＴ３と識別する、項目１～７８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２８４】

８０．Ｔ４をそれぞれの物質（複数可）と識別することが、Ｔ４に結合するためのK_Dがそれぞれ他の物質（複数可）のK_Dよりも少なくとも４倍低い、実施形態において少なくとも５倍低いことを意味する、項目７８または７９に記載のモノクローナル抗体。

【０２８５】

８１．前記モノクローナル抗体が、Ｔ４（例えば、ｆＴ４）を定量するための競合的イムノアッセイにおいて使用される場合、他の点では同一のイムノアッセイ設定において、配列番号４８の重鎖配列および配列番号４９の軽鎖配列を有するＦａｂフラグメントを用いて達成されるシグナル対ノイズ比の少なくとも２９％、実施形態において６５％および実施形態において少なくとも９５％であるシグナル対ノイズ比を示す、項目１～８０のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２８６】

８２．前記モノクローナル抗体が、Ｆａｂフラグメントである、項目１～８１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【０２８７】

８３．ポリヌクレオチドであって、

（ｉ）項目１～８２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体の前記重鎖もしくは重鎖可変ドメイン、および／または

（ｉｉ）項目１～８２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体の前記軽鎖もしくは軽鎖可変ドメイン

をコードする、ポリヌクレオチド。

【０２８８】
８４．項目８３に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【０２８９】
８５．項目８３に記載のポリヌクレオチド、または項目８４に記載のベクターを含む宿主細胞。
【０２９０】
８６．原核生物細胞または真核生物細胞である、項目８５に記載の宿主細胞。
【０２９１】
８７．真核生物細胞であり、前記細胞がＨＥＫ細胞またはＣＨＯ細胞である、項目８５に記載の宿主細胞。
【０２９２】
８８．項目１～８２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を産生する方法であって、項目８５～８７のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養することと、前記抗体を単離することとを含む、方法。
【０２９３】
８９．項目８８に記載の方法によって得ることができる、項目１～８２のいずれか一項に記載の抗体。
【０２９４】
９０．項目１～８２のいずれか１つに記載の抗体、項目８３に記載のポリヌクレオチド、項目８４に記載のベクター、または項目８５～８７のいずれか一項に記載の宿主細胞を含む組成物。
【０２９５】
９１．診断用組成物である、項目１～８２のいずれか一項に記載の抗体を含む組成物。
【０２９６】
９２．試料中のＴ４（例えば、ｆＴ４）のインビトロ検出、好ましくはインビトロ定量のための、好ましくはイムノアッセイを用いる、項目１～８２のいずれか一項に記載の抗体または項目９０もしくは９１に記載の組成物の使用。
【０２９７】
９３．前記イムノアッセイが、異種イムノアッセイである、項目９２に記載の使用。
【０２９８】
９４．前記試料が、血液、好ましくは血漿または血清である、項目９２または９３に記載の使用。
【０２９９】
９５．前記イムノアッセイが、競合的イムノアッセイである、項目９２～９４のいずれか一項に記載の使用。
【０３００】
９６．項目１～８２のいずれか一項に記載の抗体を用いて、試料中のＴ４（例えば、ｆＴ４）を定量するためのインビトロイムノアッセイ法。
【０３０１】
９７．前記試料が、体液である、項目９６に記載の方法。
【０３０２】
９８．前記体液が、血液試料、脳脊髄液、精液、唾液または尿である、項目９７に記載の方法。
【０３０３】
９９．前記体液が、全血、血清または血漿である血液試料である、項目９６または９７に記載の方法。
【０３０４】
１００．前記方法が、（ｉ）Ｔ４（例えば、ｆＴ４）を含む試料を、項目１～８２のいずれか一項に記載の抗体または項目９０もしくは９１に記載の組成物と共にインキュベートすることと、（ｉｉ）それぞれ、前記組成物に含まれる抗体または前記抗体に結合した

Ｔ４（例えば、ｆＴ４）を直接的または間接的に検出することによって、前記試料中のＴ４（例えば、ｆＴ４）の量を定量することとを含む、項目９６～９９のいずれか一項に記載の方法。

【０３０５】

１０１．前記方法が、（ｉ）Ｔ４（例えば、ｆＴ４）を含む試料を、項目１～８２のいずれか一項に記載の抗体または項目９０もしくは９１に記載の組成物とインキュベートすることであって、前記抗体が、それに付着した検出標識を有する、項目１～８２のいずれか一項に記載の抗体または項目９０もしくは９１に記載の組成物とインキュベートすることと、（ｉｉ）前記検出標識を介して前記試料中のＴ４（例えば、ｆＴ４）に結合しなかった前記抗体の量を定量することによって、前記試料中のＴ４（例えば、ｆＴ４）の量を定量することとを含む、項目９６～１００のいずれか一項に記載の方法。

【０３０６】

１０２．前記検出標識が、酵素、発光、一実施形態において蛍光、発光、化学発光、電気化学発光または放射能を放出する標識から選択される、項目１０１に記載の方法。

【０３０７】

１０３．前記方法が、試料中の総Ｔ４を検出する方法であり、前記方法が、結合タンパク質（例えば血清タンパク質）からＴ４を放出するための試薬で前記試料を処理することを含み、実施形態において、その結合タンパク質からＴ４を放出するための前記試薬が、８－アニリノナフタレン－１－スルホン酸（ＡＮＳ）である、項目９６～１０２のいずれか一項に記載の方法。

【０３０８】

１０４．項目１～８２のいずれか一項に記載の抗体、または項目９０もしくは９１に記載の組成物を含む、キット。

【０３０９】

１０５．前記キットが、インビトロでＴ４（例えば、ｆＴ４）を検出および／または定量するためのキットである、項目１０３に記載のキット。

【０３１０】

１０６．イムノアッセイキットである、項目１０３または１０４に記載のキット。

【０３１１】

本発明は、Ｌ－チロキシンに特異的に結合する抗体を提供する。（本明細書ではＬ－Ｔ４またはＴ４と呼ぶ）。当技術分野で使用されるＬ－チロキシンの代替名は、３，３’，５，５”－テトラヨード－Ｌ－チロニンおよび３－［４－（４－ヒドロキシ－３，５－ジヨードフェノキシ）－３，５－ジヨードフェニル］－Ｌ－アラニンである。Ｔ４はＣＡＳ番号５１－４８－９を有する。Ｔ４は、遊離および血清結合ホルモンの平衡混合物として血流中を循環する。遊離Ｔ４（ｆＴ４）は、未結合の生物学的に活性な形態であり、総Ｔ４のわずか０．０３％に相当する。残りのＴ４は不活性であり、チロキシン結合グロブリン（ＴＢＧ）（７５％）、プレアルブミン（１５％）、およびアルブミン（１０％）等の血清タンパク質に結合する（Ｒｏｂｂｉｎｓ Ｊ，Ｒａｌｌ ＪＥ．Ｒｅｃｅｎｔ Ｐｒｏｇ Ｈｏｒｍ Ｒｅｓ １９５７；１３：１６１－２０８；Ｏｐｐｅｎｈｅｉｍｅｒ ＪＨ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ １９６８；２７８（２１）：１１５３－１１６２；ＤｅＧｒｏｏｔ ＬＪ，Ｌａｒｓｅｎ ＰＲ，Ｈｅｎｎｅｍａｎｎ Ｇ．Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８４：６２－６５；Ｅｋｉｎｓ ＲＰ．Ｅｎｄｏｃｒ Ｒｅｖ １９９０；１１（１）：５－４６）。血清タンパク質に結合したＴ４は抗体結合にほとんどアクセスできないため、本発明の抗体は、Ｔ４／Ｌ－Ｔ４に特異的に結合する抗体がその遊離形態で（すなわち、結合タンパク質結合形態ではない）Ｔ４／Ｌ－Ｔ４に結合することは明らかである。したがって、実施形態において、本発明の抗体はまた、ｆＴ４に特異的に結合し得る。実施形態において、ｆＴ４に特異的に結合することは、ｆＴ４が血清タンパク質結合Ｔ４と識別できることを意味するものではなく、Ｌ－Ｔ３等の関連物質／誘導体および本明細書の他の箇所に開示される他のものからのＴ４の識別に関する。本発明の抗体は、実施形態において、ｆＴ４の検出用であり得る。他の実施形

態において、抗体は、試料中の総Ｔ４の検出に使用することができる。後者の実施形態において、抗体の使用は、典型的には、タンパク質（例えば血清タンパク質）に結合したＴ４を放出するための試料の前処理を含む。

【０３１２】

本明細書で使用される場合、「抗体」、「抗体（複数）」という用語、および類似の用語は、完全な免疫グロブリン分子に関し、天然に存在する形態の抗体（ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥを含むが、これらに限定されない）、ならびに、限定されないが、単鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、抗体融合タンパク質、および多重特異性抗体を含む組換え抗体構築物；ならびに上記の全ての抗原結合フラグメントおよび誘導体を包含する。本明細書で使用される場合、「抗体」、「抗体（複数）」という用語、および類似の用語はまた、その抗原結合フラグメントを指し、それは、本明細書で抗体抗原結合フラグメント、および／または単に抗原結合フラグメントと呼ばれ得る。これらの用語は、当技術分野で公知のように、標的抗原、すなわちＬ－Ｔ４に特異的に結合する能力を保持する抗体の１つ以上のフラグメントを指し、限定されないが、Ｆｖドメイン、すなわちＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦｖフラグメント等、対になった重鎖および軽鎖可変ドメインを含む抗原結合フラグメント、ならびに組換え構築物、例えばｓｃＦｖとして当技術分野で公知の単鎖Ｆｖドメインを含む。この用語はまた、本明細書で定義される抗原に特異的かつ選択的に結合する能力を保持する、当技術分野で公知の単一の非対重鎖または軽鎖可変ドメインを含む抗体抗原結合フラグメントを含み、それには、限定されないが、ラクダの重鎖に基づく単一ドメイン抗体（当該技術分野ではｓｄＡｂ、ｄＡｂ、および／またはナノボディとも呼ばれる）およびV_HHドメインが含まれる。

【０３１３】

特定の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、完全免疫グロブリン、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ＦｖまたはｓｃＦｖであり得る。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体はＦａｂフラグメントであり得る。

【０３１４】

抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得る。本発明の抗体は、モノクローナルである。抗体またはその抗原結合フラグメントに関して本明細書で使用される場合、「モノクローナル」という用語は、単一のＢ細胞クローンから産生される抗体ポリペプチドまたはそのフラグメントの集団を指し、その集団は、抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位の１つの種のみを含む。これは、複数の種の抗原結合部位を含む抗体ポリペプチドまたは抗原結合フラグメントの集団を指す用語である「ポリクローナル」抗体および組成物とは対照的である。本発明のモノクローナル抗体の修飾形態、例えばそのヒト化バージョンまたはキメラバージョン、ならびに組換え抗体構築物、例えば抗体（または抗原結合フラグメント）融合タンパク質も含まれ、ここで、抗体または抗原結合フラグメントは、例えば組換えて作られた抗体／フラグメント／構築物の単離および／または調製のための追加のドメインを含む。

【０３１５】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に関与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれＶＨおよびＶＬ）は、類似の構造を一般に有し、各ドメインは、４つの保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）と３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）とを含む。（例えば、Ｋｉｎｄｔ ｅｔ ａｌ．Ｋｕｂｙ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６ｔｈ ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ．，ｐａｇｅ ９１（２００７）を参照）。抗原結合特異性を付与するためには、単一のＶＨドメインまたはＶＬドメインで十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体を、その抗原に結合する抗体のＶＨドメインまたはＶＬドメインを用いて単離し、相補的なＶＬドメインまたはＶＨドメインそれぞれのライブラリーをスクリーニングし得る。例えば、Ｐｏｒｔｏｌａｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：８８０－８８７（１９９３）；Ｃｌａｒｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－６２８（１９９１）を参照されたい。

【０３１６】
抗体に関連して本明細書で使用される場合、「パラトープ」という用語は、抗原（例えば、Ｌ－Ｔ４）と直接相互作用するＶＨおよびＶＬのアミノ酸に関する。パラトープアミノ酸は、異なる相互作用モードを介して抗原と相互作用し得る。例示的な相互作用モードは、疎水性相互作用、Ｈ結合、H_2O配位とのＨ結合およびH_2O配位である。各パラトープ残基と抗原との相互作用は、アミノ酸側鎖またはアミノ酸骨格を介して個々に媒介され得る。
【０３１７】
本明細書で使用される場合、「超可変領域」または「ＨＶＲ」という用語は、配列内で超可変可能であり、抗原結合特異性を決定する、抗体可変ドメインの領域、例えば「相補性決定領域」（ＣＤＲ）のそれぞれを意味する。
【０３１８】
一般に、抗体は６つのＣＤＲを含み、３つがＶＨにあり（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３）、３つがＶＬにある（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３）。本明細書における例示的なＣＤＲとしては、以下が挙げられる：
（ａ）アミノ酸残基２６－３２（Ｌ１）、５０－５２（Ｌ２）、９１－９６（Ｌ３）、２６－３２（Ｈ１）、５３－５５（Ｈ２）および９６－１０１（Ｈ３）で生じる超可変ループ（Ｃｈｏｔｈｉａ　ａｎｄ　Ｌｅｓｋ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７））；
（ｂ）アミノ酸残基２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）、８９～９７（Ｌ３）、３１～３５ｂ（Ｈ１）、５０～６５（Ｈ２）、および９５～１０２（Ｈ３）に存在するＣＤＲ（Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ　Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１））、ならびに
（ｃ）アミノ酸残基２７ｃ～３６（Ｌ１）、４６～５５（Ｌ２）、８９～９６（Ｌ３）、３０～３５ｂ（Ｈ１）、４７～５８（Ｈ２）、および９３～１０１（Ｈ３）に存在する抗原接触（ＭａｃＣａｌｌｕｍ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２～７４５（１９９６））。
【０３１９】
別途指示がない限り、ＣＤＲは、上記Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．に従い決定される。当業者であれば、ＣＤＲの呼称はまた、上掲のＣｈｏｔｈｉａ、上掲のＭｃＣａｌｌｕｍ、または任意の他の科学的に認められた命名法に従って決定され得ることを理解するであろう。
【０３２０】
本発明の抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸残基のナンバリングは、特に明記しない限り、Ｋａｂａｔ命名法に従って行われる。当業者は、Ｋａｂａｔに従うナンバリングを、Ｃｌｏｔｈｉａ、ＭｃＣａｌｌｕｍ等の他の命名法に変換することができる。
【０３２１】
「フレームワーク」または「ＦＲ」は、相補性決定領域（ＣＤＲ）以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのＦＲは、一般的に４つのＦＲドメイン：ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４からなる。したがって、ＣＤＲおよびＦＲ配列は、一般的に、ＶＨ（またはＶＬ）において次の配列で出現する：ＦＲ１－ＣＤＲ－Ｈ１（ＣＤＲ－Ｌ１）－ＦＲ２－ＣＤＲ－Ｈ２（ＣＤＲ－Ｌ２）－ＦＲ３－ＣＤＲ－Ｈ３（ＣＤＲ－Ｌ３）－ＦＲ４。
【０３２２】
アミノ酸と関連して本明細書で使用される場合、「置換」、「交換」または「変異する」という用語は、アミノ酸を別のアミノ酸で置き換えることを指す。特定の位置でのアミノ酸の欠失および異なる位置での１つ（または複数）のアミノ酸の導入は、「置換」という用語に明示的に包含されるものではない。述べられたように、本発明は、本明細書中上記で定義されたような保存的または高度に保存的なアミノ酸置換を包含する。

【０３２３】
場合によっては、本明細書では、ある特定のアミノ酸が、２つ以上のアミノ酸のサブセットまたはその保存的（または高度に保存的）置換から選択されると定義される。これらの例では、それぞれのアミノ酸位置は、列挙されたアミノ酸のいずれか、または明示的に列挙されたアミノ酸のいずれかの保存的（または高度に保存的）アミノ酸置換であり得る。本明細書で使用される保存的および高度に保存的な置換が意味するものは、本明細書の他の箇所で定義される。例示的な例を挙げると、ある特定のアミノ酸が「ＡもしくはＴまたはその保存的アミノ置換」と定義される場合、そのアミノ酸は、Ａまたはその任意の保存的アミノ酸交換、またはＴまたはその保存的アミノ置換であり得る。
【０３２４】
アミノ酸は、本明細書では、１文字コードまたは３文字コードを使用して綴られるか、または略記される。
【０３２５】
本発明との関連では、それは、配列（特にＣＤＲ）の変異体を指す。これらの変異体は、典型的には、１つ以上のアミノ酸置換を含む。変異体ＣＤＲが、機能的変異体であること、すなわち参照アミノ酸配列とは異なり得るが、異なる配列が、記載された重鎖および／または軽鎖可変ドメインの状況における参照配列と同じ機能活性を示すかまたは維持するアミノ酸配列を有することは明らかである。具体的には、本明細書で使用される場合、同じ機能活性という用語は、１つ以上の変異体ＣＤＲを含む本発明の抗体または抗体結合フラグメントが、並外れて高い会合速度定数ｋａおよび／またはＬ－Ｔ４への結合に対する親和性、特異性（特に、構造的に関連する化合物からのＬ－Ｔ４の識別に関する）および／またはイムノアッセイにおける高いシグナル対ノイズ比を維持することを意味する。
【０３２６】
本発明との関連で使用される場合、「保存的アミノ酸置換」は、同じ物理化学的群から選択される別のアミノ酸によるアミノ酸の置換を意味し、アミノ酸の物理化学的群は、以下のとおりである。
ａ）Ｇｌｙ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、ＴｒｐおよびＭｅｔからなる非極性疎水性アミノ酸；
ｂ）Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、ＡｓｎおよびＧｌｎからなる極性中性アミノ酸；
ｃ）Ａｒｇ、ＬｙｓおよびＨｉｓからなる、正電荷を有する塩基性アミノ酸、ならびに
ｄ）ＡｓｐおよびＧｌｕからなる、負電荷を有する酸性アミノ酸、であり、
Ｃｙｓが保存的に置換される場合、それはＳｅｒまたはＡｌａで置換され、Ｐｒｏが保存的に置換される場合、それはＡｌａで置換される。
【０３２７】
本発明との関連で使用される場合、「高度に保存的なアミノ酸置換」は、以下のアミノ酸置換を意味する：
ａ）Ｖａｌ、Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＧｌｙによるＡｌａの置換；
ｂ）ＬｙｓによるＡｒｇの置換；
ｃ）ＧｌｎによるＡｓｎの置換；
ｄ）ＧｌｕによるＡｓｐの置換；
ｅ）ＳｅｒによるＣｙｓの置換；
ｆ）ＡｓｎによるＧｌｎの置換；
ｇ）ＡｓｐによるＧｌｕの置換；
ｈ）ＡｌａによるＧｌｙの置換；
ｉ）ＡｒｇによるＨｉｓの置換；
ｊ）Ｌｅｕ、ＶａｌまたはＡｌａによるＩｌｅの置換；
ｋ）Ｉｌｅ、ＶａｌまたはＡｌａによるＬｅｕの置換；
ｌ）ＡｒｇによるＬｙｓの置換；
ｍ）Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＶａｌによるＭｅｔの置換；
ｎ）ＴｙｒまたはＴｒｐによるＰｈｅの置換；

ｏ）ＡｌａによるＰｒｏの置換；
ｐ）ＴｈｒによるＳｅｒの置換；
ｑ）ＳｅｒによるＴｈｒの置換；
ｒ）ＰｈｅまたはＴｙｒによるＴｒｐの置換；
ｓ）ＰｈｅまたはＴｒｐによるＴｙｒの置換；および
ｔ）Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＡｌａによるＶａｌの置換。

【０３２８】

本明細書で使用される場合、ポリペプチド／ペプチドのアミノ酸配列および／または核酸配列または核酸分子に関連する「配列同一性％」という用語は、アラインメントされた２つ以上の配列の、比較される配列（またはその全体的に比較される部分）の全長を構成する残基の数と比較した、同一のアミノ酸または核酸残基のマッチ数を表す。２つ以上の配列または部分配列のアラインメントを使用して、同一である残基のパーセンテージは、比較ウィンドウ上で、もしくは当技術分野で公知の配列比較アルゴリズムを使用して測定される指定された領域上で（部分）配列を比較し、最大一致についてアラインメントする場合、または手作業でアラインメントし、目視検査にする場合に決定され得る。配列同一性の決定に使用するためのアルゴリズムの非限定的な例としては、例えば、ＮＣＢＩ ＢＬＡＳＴアルゴリズム（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２５（１９９７）、３３８９－３４０２）、ＣＬＵＳＴＡＬＷコンピュータプログラム（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２（１９９４）、４６７３－４６８０）またはＦＡＳＴＡ（Ｐｅａｒｓｏｎ ａｎｄ Ｌｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，８５（１９８８），２４４４）に基づくものが挙げられる。ＦＡＳＴＡアルゴリズムは、典型的には、その計算において、配列における内部の一致しない欠失または付加、すなわちギャップを考慮しないが、これは、％配列同一性の過大評価を回避するために手動で訂正され得る。しかしながら、ＣＬＵＳＴＡＬＷは、その同一性計算において配列ギャップを考慮する。ＢＬＡＳＴおよびＢＬＡＳＴ ２．０アルゴリズム（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２５（１９７７）、３３８９）も利用可能である。

【０３２９】

本明細書で使用される場合、「核酸分子」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」および類似の用語は、ゲノムＤＮＡとｃＤＮＡの両方、ならびに本発明の抗体または抗原結合フラグメントの発現を駆動することができるＲＮＡを含む。本明細書で使用される場合、「ＲＮＡ」という用語は、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡおよびｒＲＮＡを含むが、ＲＮＡウイルスのＲＮＡの場合等、ゲノムＲＮＡも含む全ての形態のＲＮＡを含むことが理解される。好ましくは、「ＲＮＡ」と記載する実施形態はｍＲＮＡに関する。本発明の核酸分子／核酸配列は、天然ならびに合成または半合成起源のものであり得る。実施形態において、本発明の核酸／核酸配列は単離され得る。したがって、核酸分子は、例えば、有機化学の従来のプロトコルに従って、組換え方法に従って合成された、または半合成的に、例えば化学合成と組換え方法とを組み合わせることによって製造された核酸分子であり得る。当業者は、そのような核酸分子の調製および使用に精通している。

【０３３０】

本明細書で使用される場合、「イムノアッセイ」は、分析物の検出または定量が分析物と少なくとも１つの分析物特異的結合剤との反応に依存し、したがって分析物：結合剤複合体を形成する、十分に確立された生物分析方法である。本発明との関連において、少なくとも１つの分析物特異的結合剤のうちの少なくとも１つは、本発明の抗体である。「サンドイッチ」イムノアッセイの具体的な実施形態は、複数の認識エピトープを有する分析物に使用することができる。したがって、サンドイッチアッセイには、分析物上の重複しないエピトープに付着する少なくとも２つの結合剤が必要である。「異種サンドイッチイムノアッセイ」では、結合剤の１つが分析物特異的捕捉結合剤の機能的役割を有し、この結合剤は固相上に固定化されているか、または（アッセイの過程で）固相上に固定化される。第２の分析物特異的結合剤は、液相に溶解形態で供給される。それぞれの分析物が第

１および第２の結合剤によって結合されると、サンドイッチ状の複合体（結合剤－１：分析物：結合剤－２）が形成される。サンドイッチ状の複合体は、「検出複合体」とも呼ばれる。検出複合体内では、分析物は結合剤の間に挟まれており、すなわちそのような複合体では、分析物は第１の結合剤と第２の結合剤との間の接続要素を表す。

【０３３１】

（「均一」に対するものとして）「不均一」という用語は、アッセイ手順における２つの必須で別個の工程を示す。第１の工程では、標識を含む検出複合体が形成され、固定化されるが、未結合の標識がまだ複合体を囲んでいる。標識依存シグナルを判定する前に、未結合標識は固定化された検出複合体から除去されるため、第２の工程に相当する。対照的に、均一アッセイは、シングルステップインキュベーションによって分析物依存の検出可能なシグナルを生成し、洗浄工程を必要としない。

【０３３２】

不均一イムノアッセイでは、固相は、分析物と接触させる前に、その表面に機能性捕捉結合剤（第１の結合剤）が結合し得るように官能化されるか、または、固相の表面は、分析物と反応した後に、第１の結合剤を係留することができるように官能化されている。後者の場合、係留プロセスは、分析物を特異的に捕捉して結合する結合剤の能力を妨げてはならない。液相中に存在する第２の結合剤は、結合した分析物の検出に使用される。したがって、不均一イムノアッセイでは、分析物を第１の結合剤（捕捉）および第２の結合剤（検出器）に結合させる。これにより、分析物が捕捉結合剤と検出器結合剤との間に挟まれた「検出複合体」が形成される。典型的な実施形態において、検出器結合剤は、分析物と接触させる前に標識されるか、あるいは、分析物結合後に標識が検出器結合剤に特異的に付着される。検出複合体が固相に固定化されている場合、固相で検出可能な標識の量は、挟まれた分析物の量に相当する。未結合の標識を除去した後、分析物の存在と量を示す固定化された標識を検出できる。

【０３３３】

本明細書で使用される場合、「競合的イムノアッセイ」は、好ましくは、分析物と直接相互作用する単一の結合剤（すなわちＴ４／ｆＴ４）を使用する。「競合不均一イムノアッセイ」は、典型的には、試料中の分析物の量に逆に対応する検出標識のシグナルを検出する。本明細書の好ましい実施形態において、競合的イムノアッセイは不均一競合的イムノアッセイであり得る。実施形態において、分析物を含む試料は、分析物特異的結合剤（例えば、本発明の抗体）と反応することができる分析物の人工的に生成された標識類似体と混合される。アッセイでは、分析物および類似体は、固定化されているかまたは固定化される捕捉結合剤（例えば、本発明の抗体）への結合について競合する。結合剤の量は、この設定において限定的であるように選択される。この結合工程に続いて、固定化された標識の量が多いほど、捕捉結合剤をめぐって競合することができた非標識分析物の量が少なくなる。固定化された標識は、洗浄工程の後に定量される。この設定では、固相で検出可能な標識の量は、試料に最初に存在した分析物の量に反対に相応する。他の実施形態において、競合的イムノアッセイは、不均一逆滴定アッセイであり得る。そのようなアッセイでは、分析物を含む試料は、最初に、分析物：結合剤複合体を形成するのに十分な時間、検出標識が付着した結合剤（例えば、本発明の抗体）と共にインキュベートされる。結合剤は、測定される最高分析物濃度に対して過剰に提供されてもよい。続いて、検出標識（例えば、本発明の抗体について試料中のＴ４（例えば、ｆＴ４）と競合する）を有する結合剤との結合について競合する捕捉類似体（例えばビオチン化Ｌ－Ｔ４）を混合物に添加する。捕捉類似体は、混合物とのインキュベーション中に表面（例えば磁気ビーズ）に固定化されているか、または（例えば、ビオチン－ストレプトアビジン相互作用を介して）固定化される。次いで、非表面結合試薬を除去し、検出標識のシグナルを検出することによって、分析物の量を検出することができる。表面に（結合剤に付着した）検出標識が多いほど、試料中に存在する分析物は少なかった。したがって、この第２の設定ではまた、固相で検出可能な標識の量は、試料に最初に存在した分析物の量に反対に相応する。

【０３３４】

本明細書で使用される場合、「検出可能な標識」は、検出を可能にする標識に関する。本発明の一実施形態によれば、検出可能な標識は、酵素、または一実施形態において蛍光、発光、化学発光、電気化学発光もしくは放射能を放出する標識である。好ましい実施形態において、標識は電気化学発光標識、一実施形態においてトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（ＩＩ）錯体（Ｒｕ（ｂｐｙ））である。干渉は、自己抗体および類似の干渉分子を引き付ける標識分子の三次元構造によって引き起こされ、例えば光または放射能等の当該標識のシグナル放出機構によっては引き起こされないため、上記の標識は全て本発明で使用することができる。

【０３３５】

本明細書で使用される場合、「捕捉標識」は、捕捉剤（例えば、捕捉標識が付着したＴ４）を表面（例えば、マイクロビーズ等の磁性粒子上）に固定化することができる標識に関する。非限定的な例は、結合対のメンバーである。捕捉標識の非限定的な例はビオチンまたはその誘導体であり、これはストレプトアビジンまたはその誘導体と相互作用することができる。様々な捕捉標識が当技術分野で周知である。

【０３３６】

本開示との関連で使用される場合、「試料」は、Ｌ＿Ｔ４を含む、または含むと予想される液体試料であり得る。試料は、特に、限定されないが、血液試料、脳脊髄液、精液、唾液または尿等の体液であり得る。実施形態において、試料は、全血、血清または血漿等の血液試料である。実施形態において、試料は、血清または血漿である。

【０３３７】

単語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、ならびに「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」および「含むこと（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」のような変形は、記載された整数もしくは工程または整数もしくは工程のグループの包含を意味するが、いかなる他の整数もしくは工程または整数もしくは工程のグループの除外を意味しないことが理解される。

【０３３８】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、別途内容が明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。

【０３３９】

濃度、量、および他の数値データは、本明細書では「範囲」の形式で表現または提示され得る。このような範囲の形式は、便宜上および簡潔にするために単に使用されているに過ぎないことが理解され、したがって、その範囲の境界として明示的に列挙されている数値を含むだけではなく、各数値および部分範囲があたかも明示的に列挙されているかのごとく、その範囲内に包含される個々の数値または部分範囲の全てを含むことを柔軟に解釈するべきである。例示として、「１５０ｍｇ～６００ｍｇ」の数値範囲は、１５０ｍｇ～６００ｍｇの明示的に列挙された値を含むだけでなく、示された範囲内の個々の値および部分範囲も含むと解釈されるべきである。したがって、この数値範囲には、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、・・・５８０、５９０、６００ｍｇ等の個々の値、および１５０から２００、１５０から２５０、２５０から３００、３５０から６００等の部分範囲が含まれる。この同じ原理は、１つの数値のみを列挙する範囲にも適用される。さらに、このような解釈は、その範囲の幅または記載されている特性にかかわらず、適用すべきである。

【０３４０】

「約」という用語は、数値に関連して使用される場合、示された数値よりも５％小さい下限値を有し、かつ示された数値よりも５％大きい上限値を有する範囲内の数値を包含することを意味する。

【０３４１】

本発明の前述の詳細な説明では、いくつかの個々の要素、特徴、技法、および／または工程が開示されている。これらの各々は、単独で考慮または使用される場合に個々にだけでなく、互いに組み合わせて考慮および使用される場合にも利益を有することが容易に認

識される。したがって、過度に繰り返される冗長な節を避けるために、この説明は、可能な全ての組み合わせおよび置き換えを繰り返すことを避けた。それにもかかわらず、明示的に列挙されているか否かにかかわらず、そのような組み合わせは完全に本開示の主題の範囲内にあることが理解される。

【０３４２】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解されている意味と同じ意味を有することが意図される。本明細書で使用される技術への言及は、当業者には明らかであろうそれらの技術のバリエーションまたは同等の技術の置換を含む、当技術分野で一般的に理解されている技術を指すことが意図される。

【０３４３】

本明細書で提供される全てのアミノ酸配列は、当技術分野で慣習的に行われるように、最もＮ末端の残基で始まり、最もＣ末端の残基で終わり、本発明のいたるところでアミノ酸を同定するために使用される１文字または３文字のコード略語は、アミノ酸について一般的に使用されるものに対応する。

【０３４４】

本明細書では、特許出願および製造者のマニュアルを含む多くの文書が引用されている。これらの文献の開示は、本発明の特許性に関連するとは考えられないが、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。より具体的には、参照された全ての文書は、個々の文書が参照により組み込まれることが具体的かつ個々に示されている場合と同程度まで、参照により組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【０３４５】

以下の図は、本発明の理解を助けるために提供されており、その真の範囲は、特許請求の範囲に明記されている。本発明の趣旨から逸脱することなく、記載されている手順に修飾が加えられ得ることが理解される。

【０３４６】

【図１】図１は、生成された抗体の初期速度論的スクリーニングのために得られたデータを示す。解離速度定数k_dを会合速度定数k_aに対してプロットし、対角線は得られた親和性範囲を示す。８４０個の分析された上清（Ａ）および５０個の抗体の選択されたＡｂ選択（Ｂ）が示されている。重要なことに、たとえそのような補正が必要であったとしても、この図に示されているk_a値およびk_d値の決定のために、質量輸送制限の補正は適用されなかった。

【図２】図２は、Ｂｉａｃｏｒｅによって測定した３７℃でのＬ－Ｔ４に結合するＦａｂフラグメント３８Ｆ８、７Ｄ４、７Ｅ１０、３Ｂ７、１８Ｂ３および４Ｈ８の速度論的プロファイルを示す。漸増Ｌ－Ｔ４濃度ｃ＝０．０４～１０ｎＭのＡ）３８Ｆ８、Ｂ）７Ｄ４、Ｃ）７Ｅ１０、Ｄ）３Ｂ７、Ｅ）１８Ｂ３およびＦ）の４Ｈ８結合系列、希釈係数３；３．３ｎＭの複製。質量輸送制限（８Ｋ－ｉｎｓｉｇｈｔ　ＳＷ）を補正したＬａｎｇｍｕｉｒ　１：１結合モデルでオーバーレイした測定センサーグラム（黒色で示されている）を用いた多サイクル速度論。

【図３】図３は、Ｆａｂフラグメントの溶液中親和性（ＡｉＳ）曲線を示す。左から右に、３８Ｆ８、７Ｄ４、７Ｅ１０（上）、３Ｂ７、１８Ｂ３および４Ｈ８（下）、濃度はそれぞれ３ｎＭ（３８Ｆ８、７Ｄ４および７Ｅ１０）、５ｎＭ（３Ｂ７）または１０ｎＭ（１８Ｂ３および４Ｈ８）で一定に保持され、Ｌ－Ｔ４濃度は変動する。存在するＬ－Ｔ４が増加すると、溶液中の「遊離」Ｆａｂフラグメントが減少する。競合実験について決定されたＦａｂ濃度を、Ｌ－Ｔ４競合剤濃度に対してプロットした。

【図４】図４は、３７℃でＬ－Ｔ３に結合するＦａｂフラグメント３８Ｆ８、７Ｄ４、７Ｅ１０、３Ｂ７、１８Ｂ３および４Ｈ８の速度論的プロファイルを示す：漸増Ｌ－Ｔ３濃度ｃ＝１．２～３００ｎＭのＡ）３８Ｆ８、Ｂ）７Ｄ４、Ｃ）７Ｅ１０、Ｄ）３Ｂ７、Ｅ）１８Ｂ３およびＦ）４Ｈ８結合系列、希釈係数３；１００ｎＭの複製。測定されたセン

サーグラム（左）およびプロットされた応答がＸＲ濃度に対する共振単位（ＲＵ）において平衡に達する定常状態の速度論を、フィッティングされた結合モデル（右）でオーバーレイした。
【図５】図５は、Ｆａｂ　３８Ｆ８の受容体結合ポケットにおけるＬ－Ｔ４リガンドの二次元表示を示す。リガンドは棒表示で示され、結合に関与する受容体アミノ酸は球に単純化されている。ここで、ＡおよびＢの文字の接頭辞は、それぞれ重鎖および軽鎖を表す。リガンドを包み込む曲線状の点線はリガンドとの主な相互作用領域を表し、一方、直線状の点線は水素結合を表す。いくつかのリガンド原子の背後にある影付きの球状領域は、溶媒の接近可能性を示し、影付きの球が大きいほど、相対的な溶媒の接近可能性が高くなる。
【図６】図６は、それぞれ３８Ｆ８、７Ｄ４、７Ｅ１０、３Ｂ７、１８Ｂ３および４Ｈ８のＶＨドメインおよびＶＬドメインの配列アラインメントを示す。ＣＤＲは太字で強調されている。Ｌ－Ｔ４と複合体を形成している３８Ｆ８の結晶構造に従ってＬ－Ｔ４と直接相互作用するパラトープの一部として同定されたアミノ酸残基に下線を付している。
【図７】３８Ｆ８、７Ｄ４、４Ｈ８、および７Ｅ１０の平衡化３Ｄ構造。４つ全てのクローンの重鎖および軽鎖のＣＤＲの配列を下に示す。３８Ｆ８の結合ポケットを形成し、他のクローンで同一のアミノ酸を太字で示す。結合ポケットが異なるアミノ酸を斜体で示す。
【０３４７】
配列の説明
配列番号１：Ｋａｂａｔナンバリングに従う３８Ｆ８のＶＨのアミノ酸（ＡＳ）５４～６５
ＳＧＮＴＹＹＡＳＷＡＫＧ
配列番号２　Ｋａｂａｔナンバリングに従う７Ｄ４のＶＨのＡＳ５４～６５
ＳＧＮＴＹＹＡＴＷＡＫＧ
配列番号３　Ｋａｂａｔナンバリングに従う７Ｅ１０のＶＨのＡＳ５４～６５
ＳＧＳＴＹＹＡＴＷＡＫＧ
配列番号４　Ｋａｂａｔナンバリングに従う３８Ｆ８のＶＬのＡＳ５０～５６
ＧＡＳＴＬＴＳ
配列番号５　Ｋａｂａｔナンバリングに従う７Ｅ１０および７Ｄ４のＶＬのＡＳ５０～５６
ＧＡＳＴＬＡＳ
配列番号６　パラトープ残基にバリエーションを有する３８Ｆ８のＣＤＲ－Ｈ１配列
ＳＮＸＭＮ（式中、ＸはＶまたはＡである）
配列番号７　３８Ｆ８のＣＤＲ－Ｈ２配列
ＹＩＷＴＲＳＧＮＴＹＹＡＳＷＡＫＧ
配列番号８　パラトープ残基にバリエーションを有する３８Ｆ８のＣＤＲ－Ｈ３配列
ＧＬＨＩＸＹＮＩＦＮＦ（式中、ＸはＧ、ＡまたはＶである）
配列番号９　パラトープ残基にバリエーションを有する３８Ｆ８のＣＤＲ－Ｌ１配列
ＱＳＳＱＳＶＸ１Ｘ２ＮＡＷＣＳ（式中、Ｘ１はＨまたはＹであり、Ｘ２はＮまたはＫである）
配列番号１０　パラトープ残基にバリエーションを有する３８Ｆ８のＣＤＲ－Ｌ３配列
ＡＧＸ１Ｘ２Ｘ３ＧＳＴＸ４Ｘ５ＨＶ（式中、Ｘ１はＧまたはＡであり、Ｘ２はＹ、ＷまたはＦであり、Ｘ３はＳまたはＴであり、Ｘ４はＹまたはＦであり、Ｘ５はＮ、Ｓ、Ｔ、Ｑ、Ｎである）
配列番号１１　３８Ｆ８のＣＤＲ－Ｌ２配列
ＧＡＳＴＬＴＳ
配列番号１２　３８Ｆ８のＣＤＲ－Ｈ１配列
ＳＮＶＭＮ
配列番号１３　パラトープ残基にバリエーションを有する３８Ｆ８のＣＤＲ－Ｈ３配列

ＧＬＨＩＸＹＮＩＦＮＦ（式中、ＸはＧまたはＡである）
配列番号１４　３８Ｆ８のＣＤＲ－Ｈ３配列
ＧＬＨＩＧＹＮＩＦＮＦ
配列番号１５　３８Ｆ８のＣＤＲ－Ｌ１配列
ＱＳＳＱＳＶＨＮＮＡＷＣＳ
配列番号１６　パラトープ残基にバリエーションを有する３８Ｆ８のＣＤＲ－Ｌ３配列
ＡＧＸ１Ｘ２Ｘ３ＧＳＴＸ４Ｘ５ＨＶ（式中、Ｘ１はＧまたはＡであり、Ｘ２はＹ、ＷまたはＦであり、Ｘ３はＳまたはＴであり、Ｘ４はＹまたはＦであり、Ｘ５はＮ、Ｓ、Ｔである）
配列番号１７　パラトープ残基にバリエーションを有する３８Ｆ８のＣＤＲ－Ｌ３配列
ＡＧＧＸ１ＳＧＳＴＹＸ２ＨＶ（式中、Ｘ１はＹ、Ｗであり、Ｘ２はＮ、Ｓである）
配列番号１８　３８Ｆ８のＣＤＲ－Ｌ３配列
ＡＧＧＹＳＧＳＴＹＮＨＶ
配列番号１９　３８Ｆ８、７Ｅ１０および７Ｄ４のＣＤＲ－Ｈ１コンセンサス配列
Ｘ１ＮＶＸ２Ｎ（式中、Ｘ１はＳまたはＲであり、Ｘ２はＭ、Ｌである）
配列番号２０　３８Ｆ８、７Ｅ１０および７Ｄ４のＣＤＲ－Ｈ２コンセンサス配列
ＹＩＷＴＸ１ＳＧＸ２ＴＹＹＡＸ３ＷＡＫＧ（式中、Ｘ１はＲ、ＧまたはＤであり、Ｘ２はＮまたはＳであり、Ｘ３はＳまたはＴである）
配列番号２１　３８Ｆ８、７Ｅ１０および７Ｄ４のＣＤＲ－Ｈ３コンセンサス配列
ＧＬＸ１ＩＧＹＸ２ＩＦＮＦ（式中、Ｘ１はＨまたはＡであり、Ｘ２はＮまたはＡである）
配列番号２２　３８Ｆ８、７Ｅ１０および７Ｄ４のＣＤＲ－Ｌ１コンセンサス配列
ＱＳＳＱＳＶＸ１Ｘ２ＮＸ３ＷＸ４Ｓ（式中、Ｘ１はＨまたはＹであり、Ｘ２はＮまたはＫであり、Ｘ３はＡまたはＮであり、Ｘ４はＣまたはＬである）
配列番号２３　３８Ｆ８、７Ｅ１０および７Ｄ４のＣＤＲ－Ｌ３コンセンサス配列
ＡＧＧＸ１ＳＸ２Ｘ３Ｘ４ＹＸ５ＨＸ６（式中、Ｘ１はＹまたはＷであり、Ｘ２はＧ、ＡまたはＳであり、Ｘ３はＳ、ＧまたはＮであり、Ｘ４はＴであり、ＧまたはＳであり、Ｘ５はＮまたはＳであり、Ｘ６はＶまたはＡである）
配列番号２４　３８Ｆ８、７Ｅ１０および７Ｄ４のＣＤＲ－Ｌ２コンセンサス配列
ＧＡＳＴＬＸ１Ｓ（式中、Ｘ１はＴまたはＡである）
配列番号２５　７Ｅ１０のＣＤＲ－Ｈ１
ＲＮＶＭＮ
配列番号２６　７Ｄ４のＣＤＲ－Ｈ１
ＲＮＶＬＮ
配列番号２７　７Ｅ１０のＣＤＲ－Ｈ２
ＹＩＷＴＤＳＧＳＴＹＹＡＴＷＡＫＧ
配列番号２８　７Ｄ４のＣＤＲ－Ｈ２
ＹＩＷＴＧＳＧＮＴＹＹＡＴＷＡＫＱ
配列番号２９　７Ｄ４および７Ｅ１０のＣＤＲ－Ｈ３
ＧＬＡＩＧＹＡＩＦＮＦ
配列番号３０　７Ｄ４および７Ｅ１０のＣＤＲ－Ｌ１
ＱＳＳＱＳＶＹＫＮＮＷＬＳ
配列番号３１　７Ｅ１０のＣＤＲ－Ｌ３
ＡＧＧＷＳＳＮＳＹＮＨＡ
配列番号３２　７Ｄ４のＣＤＲ－Ｌ３
ＡＧＧＷＳＡＧＧＹＳＨＡ
配列番号３３　７Ｄ４および７Ｅ１０のＣＤＲ－Ｌ２
ＧＡＳＴＬＡＳ
配列番号３４　Ｋａｂａｔに従う３８Ｆ８のＦＷ－Ｈ１
ＬＳＬＥＥＳＧＧＲＬＶＴＰＧＴＰＬＴＬＴＣＴＶＳＧＩＤＬＳ

配列番号３５　Ｋａｂａｔに従う３８Ｆ８のＦＷ－Ｈ２
ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＩＧ
配列番号３６　Ｋａｂａｔに従う３８Ｆ８のＦＷ－Ｈ３
ＲＦＴＩＳＫＴＳＳＴＴＶＤＬＫＭＴＳＬＴＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＧ
配列番号３７　Ｋａｂａｔに従う３８Ｆ８のＦＷ－Ｈ４
ＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ
配列番号３８　Ｋａｂａｔに従う３８Ｆ８のＦＷ－Ｌ１
ＡＶＬＴＱＴＰＳＰＶＳＡＡＶＧＧＴＶＴＩＮＣ
配列番号３９　Ｋａｂａｔに従う３８Ｆ８のＦＷ－Ｌ２
ＷＦＱＫＫＰＧＱＰＰＫＱＬＩＹ
配列番号４０　Ｋａｂａｔに従う３８Ｆ８のＦＷ－Ｌ３
ＧＶＰＳＲＦＫＧＳＧＳＧＴＱＦＴＬＴＩＳＤＶＱＣＤＤＡＡＴＹＹＣ
配列番号４１　Ｋａｂａｔに従う３８Ｆ８のＦＷ－Ｌ４
ＦＧＧＧＴＥＶＶＶＫ
配列番号４２　３８Ｆ８のＶＨドメイン
ＬＳＬＥＥＳＧＧＲＬＶＴＰＧＴＰＬＴＬＴＣＴＶＳＧＩＤＬＳＳＮＶＭＮＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＩＧＹＩＷＴＲＳＧＮＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＦＴＩＳＫＴＳＳＴＴＶＤＬ
ＫＭＴＳＬＴＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＧＧＬＨＩＧＹＮＩＦＮＦＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ
配列番号４３　７Ｅ１０のＶＨドメイン
ＱＳＶＥＥＳＧＧＲＬＶＴＰＧＴＰＬＴＬＴＣＴＶＳＧＩＤＬＳＲＮＶＭＮＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＩＧＹＩＷＴＤＳＧＳＴＹＹＡＴＷＡＫＧＲＦＴＩＳＫＴＳＳＴＴＶＥＬ
ＫＭＴＳＰＴＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＧＧＬＡＩＧＹＡＩＦＮＦＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ
配列番号４４　７Ｄ４のＶＨドメイン
ＱＳＶＥＥＳＧＧＲＬＶＴＰＧＴＰＬＴＬＴＣＴＶＳＧＩＤＬＳＲＮＶＬＮＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＩＧＹＩＷＴＧＳＧＮＴＹＹＡＴＷＡＫＧＲＦＴＩＳＫＴＳＳＴＴＶＤＬ
ＫＭＴＳＰＴＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＧＧＬＡＩＧＹＡＩＦＮＦＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ
配列番号４５　３８Ｆ８のＶＬドメイン
ＡＶＬＴＱＴＰＳＰＶＳＡＡＶＧＧＴＶＴＩＮＣＱＳＳＱＳＶＨＮＮＡＷＣＳＷＦＱＫ
ＫＰＧＱＰＰＫＱＬＩＹＧＡＳＴＬＴＳＧＶＰＳＲＦＫＧＳＧＳＧＴＱＦＴＬＴＩＳＤＶ
ＱＣＤＤＡＡＴＹＹＣＡＧＧＹＳＧＳＴＹＮＨＶＦＧＧＧＴＥＶＶＶＫ
配列番号４６　７Ｅ１０のＶＬドメイン
ＡＶＬＴＱＴＰＳＰＶＳＡＡＶＧＧＴＶＴＩＳＣＱＳＳＱＳＶＹＫＮＮＷＬＳＷＦＱＱ
ＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＹＧＡＳＴＬＡＳＧＶＰＳＲＦＥＧＳＧＳＧＴＱＦＴＬＴＩＳＤＶ
ＱＣＤＤＡＡＴＹＹＣＡＧＧＷＳＳＮＳＹＮＨＡＦＧＧＧＴＧＶＶＶＴ
配列番号４７　７Ｄ４のＶＬドメイン
ＡＡＶＬＴＱＴＰＳＰＶＳＡＡＶＧＧＴＶＴＩＳＣＱＳＳＱＳＶＹＫＮＮＷＬＳＷＦＱ
ＱＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＹＧＡＳＴＬＡＳＧＶＰＳＲＦＥＧＳＧＳＧＴＱＦＴＬＴＩＳＤ
ＶＱＣＤＤＡＡＴＹＹＣＡＧＧＷＳＡＧＧＹＳＨＡＦＧＧＧＴＧＶＶＶＡ
配列番号４８　Ｆａｂ　３８Ｆ８の重鎖
ＬＳＬＥＥＳＧＧＲＬＶＴＰＧＴＰＬＴＬＴＣＴＶＳＧＩＤＬＳＳＮＶＭＮＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＩＧＹＩＷＴＲＳＧＮＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＦＴＩＳＫＴＳＳＴＴＶＤＬ
ＫＭＴＳＬＴＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＧＧＬＨＩＧＹＮＩＦＮＦＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＧ
ＱＰＫＡＰＳＶＦＰＬＡＰＣＣＧＤＴＰＳＳＴＶＴＬＧＣＬＶＫＧＹＬＰＥＰＶＴＶＴＷ
ＮＳＧＴＬＴＮＧＶＲＴＦＰＳＶＲＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＳＶＴＳＳＳＱＰＶＴＣＮ
ＶＡＨＰＡＴＮＴＫＶＤＫＴＶＡＰＳＴＣＳ
配列番号４９　Ｆａｂ　３８Ｆ８の軽鎖
ＡＶＬＴＱＴＰＳＰＶＳＡＡＶＧＧＴＶＴＩＮＣＱＳＳＱＳＶＨＮＮＡＷＣＳＷＦＱＫ
ＫＰＧＱＰＰＫＱＬＩＹＧＡＳＴＬＴＳＧＶＰＳＲＦＫＧＳＧＳＧＴＱＦＴＬＴＩＳＤＶ
ＱＣＤＤＡＡＴＹＹＣＡＧＧＹＳＧＳＴＹＮＨＶＦＧＧＧＴＥＶＶＶＫＧＤＰＶＡＰＴＶ
ＬＩＦＰＰＡＡＤＱＶＡＴＧＴＶＴＩＶＣＶＡＮＫＹＦＰＤＶＴＶＴＷＥＶＤＧＴＴＱＴ

ＴＧＩＥＮＳＫＴＰＱＮＳＡＤＣＴＹＮＬＳＳＴＬＴＬＴＳＴＱＹＮＳＨＫＥＹＴＣＫＶＴＱＧＴＴＳＶＶＱＳＦＮＲＧＤＣ

配列番号５０　１８Ｂ３のＶＨドメイン

ＱＳＶＥＥＳＧＧＲＬＶＴＰＧＴＰＬＴＬＴＣＴＬＳＧＦＳＬＫＧＹＡＬＳＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＩＧＬＩＧＮＴＧＭＴＹＹＡＴＷＡＴＧＲＦＴＩＳＫＴＳＴＴＶＤＬＫＭＴＳＰＴＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＤＷＦＲＹＤＴＦＧＧＴＴＶＩＹＹＹＧＭＤＬＷＧＰＧＴＬＶＴＶＳＳ

配列番号５１　４Ｈ８のＶＨドメイン

ＱＳＶＥＥＳＧＧＲＬＶＴＰＧＴＰＬＴＬＴＣＴＡＳＧＦＳＬＳＡＹＹＭＩＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＩＧＹＩＧＧＧＶＳＡＳＹＡＳＷＡＮＧＲＦＴＩＳＳＴＳＴＴＶＤＬＫＩＰＳＰＴＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＧＳＷＮＳＧＩＤＬＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ

配列番号５２　３Ｂ７のＶＨドメイン

ＱＳＬＥＥＳＧＧＤＬＶＫＰＧＡＳＬＴＬＴＣＫＡＳＧＩＤＦＳＧＳＡＬＣＷＶＲＱＡＰＧＫＧＰＥＷＩＶＣＩＹＶＧＳＦＱＮＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＦＴＩＳＫＴＳＳＴＴＶＴＬＱＭＴＳＬＴＶＡＤＴＡＴＹＦＣＡＳＤＡＳＧＩＳＨＹＲＹＹＦＮＬＷＧＰＧＴＬＶＴＶＳＳ

配列番号５３　１８Ｂ３のＶＬドメイン

ＡＬＶＭＴＱＴＰＳＰＶＳＡＡＶＧＧＴＶＴＩＮＣＱＡＳＥＥＩＧＮＮＬＡＷＦＱＱＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＱＲＡＳＴＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＹＳＬＴＩＳＧＬＱＣＤＤＡＡＴＹＹＣＬＧＶＬＰＹＩＧＡＤＧＨＡＦＧＧＧＴＥＶＶＶＫＧＤＰＶ

配列番号５４　４Ｈ８のＶＬドメイン

ＡＡＶＬＴＱＴＡＳＰＶＳＡＡＶＧＧＴＶＴＩＮＣＱＳＳＱＳＶＶＮＮＮＲＬＳＷＦＱＱＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＹＫＡＳＴＬＡＳＧＶＰＳＲＦＫＧＳＧＳＧＴＱＦＴＬＴＩＳＤＶＱＣＤＤＡＡＴＹＹＣＬＧＧＹＩＳＴＳＤＮＡＦＧＧＧＴＥＶＶＶＫＧＤＰＶ

配列番号５５　３Ｂ７のＶＬドメイン

ＡＩＥＭＴＱＴＰＦＳＶＳＡＡＶＧＧＴＶＴＩＳＣＱＡＳＥＳＶＹＡＫＬＧＷＹＱＱＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＹＤＡＳＳＬＡＳＧＶＰＳＲＦＫＧＳＧＳＧＴＥＹＳＬＴＩＳＤＬＥＣＤＤＡＡＴＹＹＣＱＳＡＹＹＴＲＧＡＤＴＷＧＡＦＧＧＧＴＥＶＶＶＫＧＤＰＶ

配列番号５６　４Ｈ８のＣＤＲ－Ｈ１

ＡＹＹＭＩ

配列番号５７　４Ｈ８のＣＤＲ－Ｈ２

ＹＩＧＧＧＶＳＡＳＹＡＳＷＡＮＧ

配列番号５８　４Ｈ８のＣＤＲ－Ｈ３

ＧＳＷＮＳＧＩＤＬ

配列番号５９　４Ｈ８のＣＤＲ－Ｌ１

ＱＳＳＱＳＶＶＮＮＮＲＬＳ

配列番号６０　４Ｈ８のＣＤＲ－Ｌ２

ＫＡＳＴＬＡＳ

配列番号６１　４Ｈ８のＣＤＲ－Ｌ３

ＬＧＧＹＩＳＴＳＤＮＡ

【実施例】

【０３４８】

以下の実施例は、本発明の理解を助けるために提供されており、その真の範囲は、特許請求の範囲に明記されている。本発明の思想から逸脱することなく、定められた手順に変更を加えることができると理解される。

【０３４９】

実施例１：Ｔ４に特異的な抗体の生成

ハプテン免疫原およびスクリーニング試薬の合成

ハプテンＴ４－ＮＨ－ＰＥＧ（３）－（ＯＳｕ）の合成

１００ｍｇのＬ－チロキシンを８ｍＬの乾燥ＤＭＦに溶解し、３８μＬのトリメチルア

ミンおよび１１７ｍｇのＮＨＳ－ＰＥＧ３－ＮＨＳを添加した。反応物を４時間撹拌した。溶媒を蒸発させ、生成物を分取ＨＰＬＣ逆相によって精製した。

【０３５０】

ＨＰＬＣ－ＥＳＩ－ＭＳ：Ｍ＋＝１１０７．２　Ｄａ．収量は１０５ｍｇであった。

【０３５１】

抗原コンジュゲートＴ４－ＮＨ－ＰＥＧ（３）－ＣＯ－ＫＬＨの合成

上記のように合成した７．９ｍｇのＴ４－ＮＨ－ＰＥＧ（３）－（ＯＳｕ）、ＮＨＳエステルを１５００μＬのＤＭＳＯに溶解し、１００ｍｇのＫＬＨ（キーホールリンペットヘモシアニン、Ｓｉｇｍａ　Ｈ　８２８３）の溶液に添加した。ｐＨをｐＨ＝８．３に調整し、溶液を一晩撹拌した。混合物をＡｍｉｃｏｎ撹拌セルで精製した。

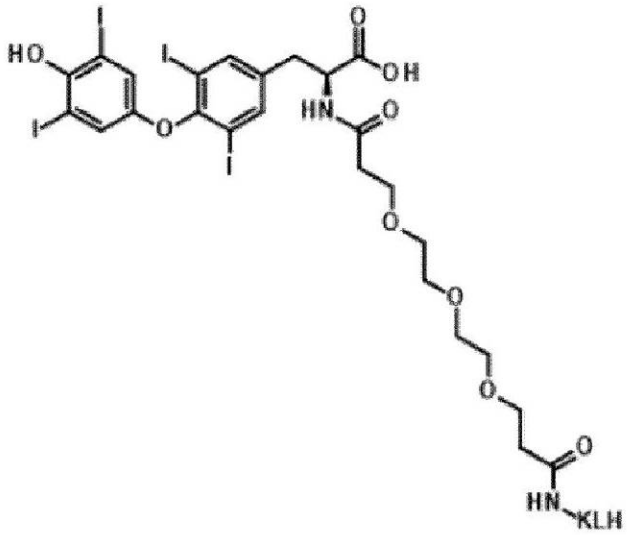
【０３５２】

アミノ基の分析：抗原－ＫＬＨ比－約２００：１

【０３５３】

Ｔ４－ＮＨ－ＰＥＧ（３）－ＣＯ－ＫＬＨの化学構造は以下のとおりである：

【化１】



【０３５４】

Ｔ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチンの合成

ビオチン－ＤＡＤＯＯ－ＨＳ－ＤＡＤＯＯ（１２１ｍｇ、欧州特許第４５１８１０Ａ１号を参照）をトリエチルアミン（３６．１μＬ）を含むＤＭＦ（２０ｍＬ）に溶解し、Ｔ４－（Ｂｏｃ）－ＯＳｕ（２４９ｍｇ）を添加した。反応物を２時間撹拌した。溶媒をロータリーエバポレーターで除去した。粗生成物をＴＦＡ（６．０ｍＬ）に溶解し、室温で３０～６０分間撹拌した。溶媒を蒸発させ、生成物を分取ＨＰＬＣ逆相によって精製し、１４７ｍｇを得た。

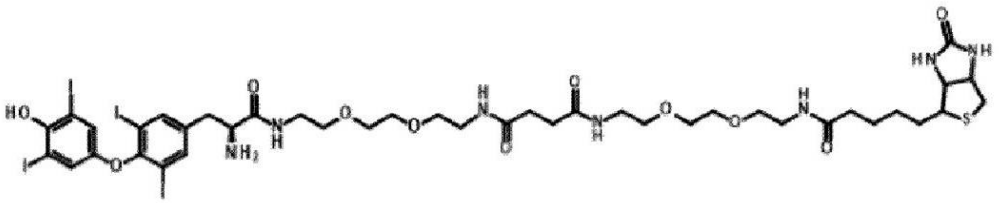
【０３５５】

ＨＰＬＣ－ＥＳＩ－ＭＳ：［Ｍ＋２Ｈ$^{+}$］／２＝６８２．９　Ｄａ．収量は１４７ｍｇであった。

【０３５６】

Ｔ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチンの化学構造は以下のとおりである：

【化２】



【０３５７】

免疫化

１２～１６週齢のニュージーランドホワイト（ＮＺＷ）ウサギをＴ４－ＮＨ－ＰＥＧ（３）－ＣＯ－ＫＬＨで免疫した。ハプテンの免疫原性を増強するために、担体タンパク質としてキーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）にカップリングさせた。最初の月に、動物を毎週免疫した。２ヶ月目から、免疫化スケジュールを１ヶ月に１回に減らした。最初の免疫化のために、５００μｇのＴ４－ＮＨ－ＰＥＧ（３）－ＣＯ－ＫＬＨを０、９％のＮａＣｌに溶解し、２ｍｌの完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）に乳化した。その後の全ての免疫化のために、ＣＦＡを１ｍＬの不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）エマルジョンに置き換えた。

【０３５８】

力価分析

ＥＬＩＳＡプロトコルを用いて力価分析を行った。陽性対照としてＴ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチンを使用して血清滴定を行った。

【０３５９】

ビオチン化スクリーニング試薬を、１６ｎｇ／ｍｌ溶液１００μｌ／ウェルを室温で６０分間インキュベートすることによって、９６ウェルストレプトアビジン被覆マイクロタイタープレートの表面に固定化した。その後の洗浄は、製造業者の指示に従って自動機器（Ｂｉｏｔｅｋ）を使用して行った。各ウサギからの少量の血清（動物あたり２～３ｍｌ）を、免疫化キャンペーンの開始後４５日目および１０５日目に収集した。各ウサギ由来の血清を、１％ＢＳＡを含有するＰＢＳで１：３００、１：９００、１：２７００、１：８１００、１：２４３００、１：７２９００、１：２１８７００および１：６５６１００に希釈した。各希釈液１００μｌを、スクリーニングペプチドを用いて予め調製したプレートに添加し、室温で６０分間インキュベートした。結合した抗体を、ＨＲＰ標識Ｆ（ａｂ’）２ヤギ抗ウサギＦｃγ（Ｄｉａｎｏｖａ）およびＡＢＴＳ基質溶液（Ｒｏｃｈｅ）で検出した。分析した動物の力価を希釈曲線の５０％シグナル減少に設定した。

【表１】

動物	力価４５日目	力価１０５日目
１#Ｋ６２１２	３４０．１０２	１６１．１２６
２#Ｋ６２１３	１８６．３７０	２６０．５７５
３#Ｋ６２１４	１５７．９９３	２３４．１０７
４#Ｋ６２１６	３６０．６２１	３２１．３４１

表１：Ｔ４－ＮＨ－ＰＥＧ（３）－ＣＯ－ＫＬＨＴ４－ＣＯ－ＰＥＧ（３）－ＣＯ－ＫＬＨによる免疫化後の例示的な力価

【０３６０】

表１の結果によって実証されるように、免疫化動物由来のポリクローナル血清は、Ｔ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチンスクリーニングペプチドに結合した。

【０３６１】

Ｂ細胞クローニング

抗原反応性Ｂ細胞を濃縮するために、１００ｎｇ／ｍｌのＴ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチンを、免疫化動物由来の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）プールと共に４℃で１５分間プレインキュベートした。洗浄工程の後、Ｔ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチンに結合した抗原反応性Ｂ細胞を、ストレプトアビジン被覆ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）と共に４℃で１５分間インキュベートした。ＭＡＣＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を使用した陽性Ｂ細胞の選別およびその後のインキュベーションを、Ｓｅｅｂｅｒ ｅｔａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ９（２０１４），ｉｓｓｕｅ ２，ｅ８６１８４に記載されているように行ったが、陽性Ｂ細胞の選別はプレート結合の代わりにＭＡＣＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を伴った点が唯一の例外であった。

【０３６２】

続いて、Ｈｉｔ－ＥＬＩＳＡ（すなわち、スクリーニング剤への結合を試験するＥＬＩＳＡ）を使用して、所望の結合特性を有する、すなわちＴ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチンに結合する抗体を発現するＢ細胞を同定した。Ｔ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチンを、それぞれ室温で６０分間、１００ｎｇ／ｍｌ溶液の１００μｌ／ウェルのインキュベーションによって、ストレプトアビジン被覆９６ウェルプレート（Ｎｕｎｃ）の表面に固定化した。プレートを洗浄し、３０μｌのウサギＢ細胞培養上清を各ウェルに移し、室温で１時間インキュベートした。スクリーニング剤に結合した抗体の検出には、ＨＲＰ標識Ｆ（ａｂ’）２ヤギ抗ウサギＦｃγ（Ｄｉａｎｏｖａ）およびＡＢＴＳ基質溶液（Ｒｏｃｈｅ）を製造者の指示に従って使用した。Ｔ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチンに結合した５８６８個のクローンを同定した。Ｔ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチンに結合した５８６８個のクローンを同定した（合計５匹の免疫化ウサギを用いた１０回のＢ細胞選別実験のうち）。第１のＢ細胞選別からの３３３個のクローンおよび第２のＢ細胞選別からの４２１個のクローンのＶ領域を哺乳動物発現ベクターにクローニングし、続いて２ｍｌのＨＥＫ２９３細胞で発現させた（Ｓｅｅｂｅｒ ｅｔａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ９（２０１４），ｉｓｓｕｅ ２，ｅ８６１８４に記載される）。発現の１週間後、次いで、ウサギＩｇＧを含有するトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞の上清を、詳細な速度論的分析（実施例２および実施例３を参照）およびＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）プラットフォームベースのｆＴ４アッセイ（実施例４を参照）での評価のための性能基準を満たす抗体のサブセットの最初のＳＰＲ Ｂｉａｃｏｒｅベースの選択に使用した。

【０３６３】

実施例２：抗体を選択するためのＳＰＲ Ｂｉａｃｏｒｅ速度論的クリーニング

実施例１においてＥＬＩＳＡによってＴ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチンに結合することが同定された８４０個の組換え生産モノクローナル抗体を、ＳＰＲ Ｂｉａｃｏｒｅを使用して更なるスクリーニング工程に供した。具体的には、５０個の抗体を速度論的特徴に従って予め選択し、最後に一組の６個の抗体を選択した。６個の選択された抗体の選択および以下の詳細な評価の過程で、抗体の以下の特徴を評価した：Ｌ－Ｔ４との結合およびＬ－Ｔ３、Ｄ－Ｔ３、ｒＴ３、３，３’，５－トリヨードサイロ酢酸、３，３’，５，５’－テトラヨードサイロ酢酸、３，５－ジヨード－Ｌ－チロシンおよび３－ヨード－Ｌ－チロシンとの潜在的交差反応性についての速度論パラメーター（K_D、k_a、k_d、速度係数）。

【０３６４】

速度論的スクリーニグを、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）Ｔ２００装置で３７℃で実施した。Ｂｉａｃｏｒｅ ＣＭ５シリーズＳセンサーを機器に取り付け、製造者の指示に従ってプレコンディショニングした。

【０３６５】

システム緩衝液は、１１ｍＭ ＰＯ４、１３７ｍＭ ＮａＣｌ、２．７ｍＭ ＫＣｌ、ｐＨ７．４＋０．０５％（ｗ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ２０および５％（ｖ／ｖ）ＤＭＳＯを含有するＰＢＳ、ｐＨ７．４であった。

【０３６６】
１ｍｇ／ｍＬ（カルボキシメチルデキストラン（ＣＭＤ）を補充したシステム緩衝液を試料緩衝液として使用した。
【０３６７】
ウサギ抗体捕捉系をセンサー表面に固定化した。システム緩衝液は、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、３ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０５％（ｗ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＨＢＳ－ＥＴ＋ｐＨ７．４であった。ポリクローナルヤギ抗ウサギＩｇＧ　Ｆｃ捕捉抗体ＧＡＲｂＦｃγ（コード番号１１１－００５－０４６、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を、製造業者の説明書に従ってＥＤＣ／ＮＨＳ化学を使用して２５℃でアミンカップリングした。
【０３６８】
２５μｇ／ｍＬの捕捉抗体を１０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液ｐＨ５．０中で使用した。捕捉抗体を、フローセルＦｃ１－４上に１３０００～１５０００ＲＵのリガンド密度で固定した。遊離活性化カルボキシル基を１ＭエタノールアミンｐＨ８．５で飽和させた。
【０３６９】
２５ｎＭウサギ正常ＩｇＧ（ＳＩＧＭＡ）をＦＣ１の参照として使用した。ウサギ抗体含有細胞培養上清を試料緩衝液で希釈し、フローセル２、３および４上に捕捉した。捕捉は５μｌ／分で３分間行った。抗体捕捉レベル（ＣＬ）を監視した。
【０３７０】
８４０個の細胞培養上清の速度論的スクリーニングを、３０ｎＭ　Ｌ－Ｔ４（Ｒｏｃｈｅ）分析物の単一濃度注入を用いて行った。分析物の会合を３分間、解離相を６０μｌ／分で５分間監視した。各測定サイクルの後、１０ｍＭグリシン緩衝液ｐＨ２．０およびｐＨ２．２５を２０μＬ／分で３０秒および６０秒間注入することによって捕捉系を再生した。
【０３７１】
２つの報告点、分析物注入の終了直前に記録されたシグナルである分析物結合遅延（ＢＬ）および解離時間の終了直前のシグナルである安定性遅延（ＳＬ）を使用して、抗体／抗原結合安定性を特性評価した。
【０３７２】
会合速度定数k_a［$M^{-1}s^{-1}$］、解離速度定数k_d［s^{-1}］および解離平衡定数K_D［Ｍ］は、評価用ソフトを用いてラングミュアモデルにより算出した。抗体／抗原複合体半減期を、式ｔ／２ｄｉｓｓ＝ｌｎ（２）／（k_d＊６０）に従って分単位で計算した。重要なことに、多数の抗体のこの最初のスクリーニングでは、使用されたＴ２００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ－ＳｏｆｔｗａｒｅではＭＴＬの補正が提供されないため、質量輸送補正は適用されなかった。したがって、抗体とＬ－Ｔ４との間の結合がＢｉａｃｏｒｅ設定で拡散律速である場合、k_a速度は過小評価される可能性がある。なお、実施例３では、ＭＴＬ補正を適用した。
【０３７３】
モル比、結合化学量論を以下の式によって計算した。
ＭＲ＝ＢＬ（抗原）＊ＭＷ（抗体）／（ＭＷ（抗原）＊ＣＬ（抗体））。
【０３７４】
このようにして、８４０個のウサギｍＡｂを速度論的に調べた。抗体プールの速度論的データを統計的に評価した。全解離平衡定数K_Dの平均値は7×10^{-10}Ｍであった。見出された最も高い親和性はK_D 1.94×10^{-12}Ｍであり、抗体プール中の最も低い親和性はK_D 1.44×10^{-9}であった（図１を参照）。８４０個の抗体速度論をそれらの解離速度定数に従って最初にランク付けし、５０個の抗体のセットを、最高、最低および平均Ｔ４複合体安定性付近に集まった異なる複合体安定性経路から経験的に選択した（図１を参照）。次いで、これらの５０個の組換え抗体を、１３℃および３７℃の２つの異なる温度で０．０４ｎＭ～３０ｎＭのＴ４分析物濃度を用いたマルチサイクル速度論によってより詳細に速度論的に調べた。この場合も、測定されたシグネチャがそのような

補正を示したとしても、質量輸送補正は適用されなかった。速度論的スクリーニングからのアッセイ設定を記載のように使用した。目標は、速度係数の原理を使用して適切な抗体を同定することであった（欧州特許第２４７０５６３Ｂ１号）。本明細書で使用される速度係数は、商ｋａ（３７℃）／ｋａ（１３℃）に対応する。低温１３℃で既に速いＬ－Ｔ４会合速度定数ｋａ［Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$］を有し、高温３７℃であまり加速しない会合速度定数ｋａを有する抗体に着目した。１３℃～３７℃の温度勾配においてｋａが劇的に増加した抗体は、望ましくない高い結合エントロピーを有し、選択されなかった。

【０３７５】

例えば、抗体３Ｂ７は、商ｋａ（３７℃）／ｋａ（１３℃）＝１８を示し、選択されたが、抗体１８Ｃ５は、商ｋａ３７℃／ｋａ１３℃＝１５２を示し、選択解除された。

【０３７６】

この会合速度から、６個のｍＡｂを選択し、Ｌ－Ｔ４および潜在的交差反応物３－ヨード－Ｌ－チロシン（Ｌ－Ｔ３）、ｒ甲状腺ホルモン（ｒＴ３）、３，３’，５－トリ－ヨード－サイロ酢酸、３，３’，５，５’－テトラ－ヨードサイロ酢酸、３，５－ジ－ヨード－Ｌ－チロシンおよび３－ｉ－Ｌ－チロシンへの結合についてより詳細に速度論的に特性評価した。

【０３７７】

Ｌ－Ｔ３、Ｄ－Ｔ３、ｒＴ３、３，３’，５－トリヨードサイロ酢酸、３，３’，５，５’－テトラヨードサイロ酢酸、３、５－ジヨード－Ｌ－チロシンおよび３－ヨード－Ｌ－チロシン。

【０３７８】

選択された抗体は、３８Ｆ８、７Ｄ４、７Ｅ１０、３Ｂ７、１８Ｂ３および４Ｈ８であった。これらの選択された抗体は、（ＭＴＬ補正を適用せずに）２～３５の速度係数を有した。

【０３７９】

実施例３：実施例２で選択された６つの抗体の更なるＳＰＲ　Ｂｉａｃｏｒｅ特性評価

実施例２では、更に詳細な評価のために６つの抗体を選択した。この評価のために、元のＩｇＧではなく、その対応するＦａｂフラグメントを使用した。Ｆａｂフラグメントは、以下の実施例４Ａ）に記載されるように組換え発現および精製された。

【０３８０】

６つの選択された抗体の詳細な速度論的特性評価

ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）８Ｋ装置を用いて、３７℃で、６つの表面提示Ｆａｂフラグメントの親和性を決定した。測定は、以下の適応を伴って上記のように行った。

【０３８１】

捕捉系として、ＰＡＫ＜Ｋ－Ｆ（ａｂ）２＞Ｚ－ＩｇＧ（ＩＳ）（コード番号１１１－００５－００６、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を用いた。アミンカップリングは、１０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液ｐＨ５．０中３５μｇ／ｍＬ　ＰＡＫ＜Ｋ－Ｆ（ａｂ）２＞Ｚ－ＩｇＧ（ＩＳ）の濃度を有するＨＢＳ－Ｎ緩衝液ｐＨ７．４を使用して記載のように行った。

【０３８２】

マルチサイクル速度論は、一連の漸増Ｌ－Ｔ４濃度ｃ＝０．１２～１０ｎＭ、希釈係数３を用いて行った。使用した緩衝液は、実施例２に記載されるとおりであった。１０ｍＭグリシン緩衝液ｐＨ２．０およびｐＨ２．２５を２０μＬ／分で６０秒間注入することによって再生を行った。

【０３８３】

３７℃における相互作用を図２に示す。

【０３８４】

Ｆａｂ　３８Ｆ８、７Ｄ４および７Ｅ１０の相互作用は、Ｌ－Ｔ４に結合すると、大きな質量輸送制限（ＭＴＬ）を示したが、Ｆａｂ　３Ｂ７は、より低いＭＴＬを示した。Ｍ

ＴＬ補正は、ベンダーからのＥｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｉｎｓｉｇｈｔ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｖ３．０１１．１５４２３を使用して自動的に適用された。ここで、ＭＴＬ補正は、２コンパートメントモデルを用いて対処される。したがって、速度論的定数は見かけの値を表すが、ＭＴＬに対して補正されている。

【０３８５】

Ｆａｂ　３８Ｆ８、７Ｄ４および７Ｅ１０は、３７℃でＦａｂ　３Ｂ７、１８Ｂ３または４Ｈ８と比較して、有意に加速された複合体形成速度を示した。

【０３８６】

３８Ｆ８、７Ｄ４、および７Ｅ１０の３７℃でのk_a速度定数は＞１．０Ｅ＋０９$M^{-1}s^{-1}$であり、これは機器の仕様に近いかまたはこの仕様の外である。３Ｂ７、４Ｈ８および１８Ｂ３のk_a速度定数は、４．８Ｅ＋０６～１．８Ｅ＋０７$M^{-1}s^{-1}$であった。

【０３８７】

得られた親和性を計算によって決定した：K_D＝２８０ｐＭ（３８Ｆ８）、１２５ｐＭ（７Ｄ４）、２４８ｐＭ（７Ｅ１０）、３７ｐＭ（３Ｂ７）、９６０ｐＭ（１８Ｂ３）および１２１０ｐＭ（４Ｈ８）；以下の表２を参照されたい。

【表２】

Ｆａｂクローン	Ｌ－Ｔ４　K_D［ｎＭ］
３８Ｆ８	０．２８±０．７％
７Ｄ４	０．１３±０．６％
７Ｅ１０	０．２５±０．６％
３Ｂ７	０．３７±１．８％
１８Ｂ３	０．９６±０．４％
４Ｈ８	１．２１±０．７％

表２：表面に対する親和性は、３７℃の溶液中でＬ－Ｔ４に結合するＦａｂフラグメント３８Ｆ８、７Ｄ４、７Ｅ１０、３Ｂ７、１８Ｂ３および４Ｈ８を示した。

【０３８８】

３７℃溶液中での親和性

速度論的速度定数から得られた親和性と相補的に、解離平衡定数K_Dを溶液中の親和性（ＡｉＳ）によって決定した。溶液分析における親和性の利点は、それが質量輸送制限の根底になく、平衡状態での測定を可能にすることである。

【０３８９】

ビオチン化（Ｂｉ－）Ｔ４は、ストレプトアビジン（ＳＡ）－ビオチン相互作用を介してＣＡＰ－チップセンサー表面に予め捕捉された。抗Ｔ４－Ｆａｂフラグメントと非標識Ｔ４との混合物を、平衡に達するために数時間プレインキュベートした。「遊離」Ｆａｂフラグメントの濃度は、定量のための先行するＦａｂ較正を使用して、表面に表示されたビオチン化Ｔ４への結合を介して決定される。

【０３９０】

Ｆａｂフラグメント濃度を混合物中で一定に保持しながら、Ｔ４濃度を変化させた。存在するＴ４が増加すると、溶液中の「遊離」Ｆａｂフラグメントが減少する。

【０３９１】

アッセイ方法は以下のとおりであった：

ＣＡＰ－Ｋｉｔ（Ｃｙｔｉｖａ）の販売業者の指示に従って、ＣＡＰ－試薬に続いて、ビオチン化Ｔ４が高密度でセンサー表面に可逆的に捕捉される。再生は、各サイクル後にグアニジニウム／ＮａＯＨ溶液を用いて行った。

【０３９２】
溶液中での両方の相互作用パートナーのプレインキュベーション：Ｆａｂ濃度は、Ｆａｂ　１８Ｂ３および４Ｈ８については１０ｎＭ、３Ｂ７については５ｎＭ、Ｆａｂ　３８Ｆ８、７Ｅ１０および７Ｄ４については３ｎＭで一定に保った。Ｔ４甲状腺ホルモン濃度を、各Ｔ４相互作用について個別に最適化した、すなわち、ｃ＝０．０７～１５０ｎＭ（１８Ｂ３および４Ｈ８）、０．０７ｎＭ～５０ｎＭ（３Ｂ７）、０．０２１ｎＭ～９０ｎＭ（３８Ｆ８、７Ｅ１０および７Ｄ４）。Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアからの溶液中の親和性モデルを使用してデータを評価した。
【０３９３】
Ｆａｂフラグメント３８Ｆ８、７Ｄ４、７Ｅ１０、３Ｂ７、１８Ｂ３および４Ｈ８の溶液中での親和性曲線を図３に示す。
【０３９４】
溶液中の親和性で決定されたK_D値は以下のとおりである。
【表３】

Ｆａｂ クローン	ＡｉＳベースのK_D ［ｎＭ］	R^2	B_{tot} ［ｎＭ］
３８Ｆ８	０．１６±０．０３	１．００	３．１４±０．０２
７Ｄ４	０．０８±０．０２	１．００	３．０９±０．０２
７Ｅ１０	０．２１±０．０４	０．９９	３．１１±０．０３
３Ｂ７	０．２４±０．０７	０．９８	５．０６±０．０７
１８Ｂ３	０．４４±０．１５	０．９８	９．９±０．１
４Ｈ８	０．７０±０．１０	１．００	１０．５±０．１

表３　Ｆａｂフラグメント３８Ｆ８、７Ｄ４、７Ｅ１０、３Ｂ７、１８Ｂ３および４Ｈ８についての溶液中での親和性

【０３９５】
クローン３８Ｆ８、７Ｄ４、７Ｅ１０および３Ｂ７について測定されたK_D値は、上記の速度論的分析における異なる設定で測定されたものと同様の範囲にあり、これらの結果を確認する。
【０３９６】
Ｆａｂフラグメント４Ｈ８は、速度論的分析によって測定されたものよりも高い第１．７因子親和性を示す。両方のＦａｂフラグメント１８Ｂ３および４Ｈ８は、６つのＦａｂフラグメントの最も弱い親和性を示し、順位付けを確認する。
【０３９７】
交差反応性
マルチサイクル交差反応性測定のために、０．１ｎＭ～９００ｎＭの分析物濃度を使用した。可能性のある交差反応物を３０μＬ／分～６０μＬ／分で注入した。会合相を３分～５分の間、解離相を５分～１５分の間監視した。３０分の解離時間を有する追加の分析物注入を使用して、真のＴ４相互作用を特性評価した。
【０３９８】
交差反応物に結合する６つのＦａｂフラグメントの親和性を、濃度系列を有する多サイクル速度論を使用して３７℃で決定した。交差反応物Ｌ－Ｔ３は、３７℃でＬ－Ｔ４よりも少なくとも４９倍弱い親和性を示し、ｒＴ３は、３７℃でＬ－Ｔ４よりも少なくとも１８倍弱い親和性を示す。
【０３９９】
３７℃での交差反応物Ｌ－Ｔ３の相互作用を図４に示す。全ての交差反応物の結果を表４に要約する。Ｆａｂ　３８Ｆ８については、追加の交差反応物も分析した（表５を参照

）。

【表４】

Ｆａｂ クローン	温度 ℃	比 K_D　Ｌ－Ｔ３／Ｌ－Ｔ４	比 K_D　ｒＴ３／Ｌ－Ｔ４
３８Ｆ８	２５℃	４７	１４
３８Ｆ８	３７℃	６２	２０
７Ｄ４	２５℃	５２	１０
７Ｄ４	３７℃	５８	１８
７Ｅ１０	２５℃	８０	３１
７Ｅ１０	３７℃	９１	３５
３Ｂ７	２５℃	９９	１５２
３Ｂ７	３７℃	１６４	１９０
１８Ｂ３	２５℃	５０	３０
１８Ｂ３	３７℃	４９	３２
４Ｈ８	２５℃	ｎ．ｂ．	４３
４Ｈ８	３７℃	ｎ．ｂ．	２７

表４　交差反応物Ｌ－Ｔ３およびｒ－Ｔ３についての親和性比K_D　Ｌ－Ｔ３／K_D　Ｌ－Ｔ４　ｒｅｓｐ．K_D　ｒＴ３／K_D　Ｌ－Ｔ４；ｎ．ｂ．結合が検出されないことを意味する

【表５】

交差反応物ＸＲ	比K_D　ＸＲ／Ｌ－Ｔ４ ［－］
３－ヨード－Ｌ－チロシン（Ｌ－Ｔ３）	６２
ｒ甲状腺ホルモン（ｒＴ３）	２０
３，３’，５－トリ－ヨード－サイロ酢酸	９２
３，３’，５，５’－テトラ－ヨードサイロ酢酸	５
３，５－ジ－ヨード－Ｌ－チロシン	１６６
３－ｉ－Ｌ－チロシン	検出可能なＸＲ結合なし

表５　Ｆａｂクローン３８Ｆ８についての潜在的交差反応物（ＸＲ）／K_D　Ｌ－Ｔ４についての親和性比K_D

【０４００】

実施例４：Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）競合的イムノアッセイにおける実施例２で選択された抗体の特性評価

Ａ．）抗Ｔ４－Ｆａｂの精製

ＢｉａＣｏｒｅ－Ａｎａｌｙｓｉｓ（実施例２および実施例３参照）による速度論的挙動に従って予め選択された抗体候補を、ＨＥＫ細胞の一過性トランスフェクションを使用してＨｉｓタグ付きＦａｂフラグメントとして発現させた。培養上清を、１０ｋＤａのＭＷカットオフを有するＶｉｖａｆｌｏｗ　２００限外濾過ユニット（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ、ドイツ）を使用して濃縮し、その後、２０ｍＭ　ＫＰＯ４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１

０ｍＭイミダゾール、ｐＨ８．０に対する透析またはダイアフィルトレーションを介した緩衝液交換を行った。続いて、Ｎｉ－ＮＴＡ／ＩＭＡＣアフィニティークロマトグラフィーカラム（ＨｉｓＴｒａｐ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、スウェーデン）を上記の透析緩衝液で平衡化し、馴化上清を６０カラム体積／時間の流量でカラムに適用した。次いで、緩衝液Ａ（２０ｍＭ　ＫＰＯ４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭイミダゾール、ｐＨ８．０）および０～３５％　Ｂを含む緩衝液Ｂ（２０ｍＭ　ＫＰＯ$_4$、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５００ｍＭイミダゾール、ｐＨ８．０）の直線勾配を用いて、１０～２０カラム容量でＦａｂフラグメントを溶出した。溶出Ｆａｂの画分を、分析的サイズ排除クロマトグラフィーを使用して純度に関して評価し、純度≧９５％のＦａｂを有する画分をプールした。最後に、プールしたＦａｂ－調製物を、２０ｍＭ　ＫＰＯ$_4$、１００ｍＭ　ＫＣｌ、２％スクロース、ｐＨ７．９の保存緩衝液に対して透析し、等分し、－８０℃で凍結保存した。

【０４０１】

Ｂ．）抗Ｔ４－Ｆａｂルテニウム標識コンジュゲートの作製

精製された抗Ｔ４　Ｆａｂ抗体を、標準的な実験室手順に従って、スルホビスピリジル－ルテニウムのＮ－ヒドロキシ－スクシンイミド活性化エステルで標識した。簡潔には、Ｆａｂ（４．４ｍｇ、１００ｍＭ　ＫＰＯ$_4$中１．０３ｍＬ、ｐＨ８．４）の溶液に、ＳＵＬＦＯ－ＢＰＲＵ　ＮＨＳ　ＥＳＴＥＲ（ＣＡＳ４８２６１８－４２－８：ルテニウム酸塩（２－）、ビス［［２，２’－ビピリジン］－４，４’－ジメタンスルホネート（２－）－κＮ１，κＮ１’］［１－［４－（４’－メチル［２，２’－ビピリジン］－４－イル－κＮ１，κＮ１’）－１－オキソブトキシ］－２，５－ピロリジンジオン］－、ナトリウム（１：２）、（ＯＣ－６－３１）－（ＡＣＩ）；１２、ＤＭＳＯ中５ｍｇ／ｍｌ）の溶液５２μＬを添加する（すなわち、Ｆａｂモル当たり６．０モルのルテニウム－ＮＨＳ－エステルの化学量論）。室温で１２０分間撹拌した後、リジンを最終濃度１０ｍＭで添加することによって誘導体化を停止した。飽和ＫＨ$_2$ＰＯ$_4$を用いてｐＨをｐＨ７．５に調整し、反応混合物を５０ｍＭ　ＫＰＯ$_4$／０、１５Ｍ　ＫＣｌ／２％サッカロース、ｐＨ７．５に対して一晩透析した。凝集体および残りの加水分解ルテニウムエステルを除去するために、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５　ＨＲ　１０／３０カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）でのサイズ排除クロマトグラフィーから適切な画分を収集した。６．５％（ｗ／ｖ）の最終濃度までスクロースを添加した後、調製物を０．４５μｍのＰＶＤＦシリンジフィルタ（Ａｃｒｏｄｉｓｋ　Ｐａｌｌ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｃｏｒｐ．）でフィルタにかけ、－８０℃で凍結保存した。

【０４０２】

Ｃ．）抗Ｔ４　Ｆａｂ－ルテニウムコンジュゲートの機能評価

自動Ｅｌｅｃｓｙｓ　Ｉｍｍｕｎｏ－Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ｃｏｂａｓ（登録商標）ｅ４１１）を使用する競合免疫学的アッセイのアッセイ原理を以下に要約する。アッセイに必要な総インキュベーション時間は１８分である：第１のインキュベーション（９分間）：１５μＬのｆＴ４含有試料、７５μＬのルテニウム化モノクローナルＴ４特異的Ｆａｂ抗体をインキュベートし、ある割合のルテニウム化抗Ｔ４　Ｆａｂ抗体および遊離Ｔ４を含む複合体を形成する。第２のインキュベーション（９分）：７５μＬのＴ４（ＯＳｕ）－ビス－ＤＡＤＯＯ－ビオチン－ハプテン－コンジュゲートの溶液および３５μＬのストレプトアビジン被覆微粒子を第１のインキュベーション工程の混合物に添加する。この第２のインキュベーションの間、第１のインキュベーション工程後に遊離したままであるルテニウム化抗Ｔ４　Ｆａｂ抗体はビオチン化Ｔ４－ハプテンに結合することができ、Ｔ４－ビオチンコンジュゲートに結合したルテニウム化抗体の複合体は、ビオチンとストレプトアビジンとの相互作用を介してストレプトアビジン被覆磁性ビーズ／固相に結合する。反応混合物を測定セル内に吸引し、そこで微粒子は電極の表面上に磁気的に捕捉される。次いで、未結合物質をＰｒｏＣｅｌｌ　＃　１１６６２９８８１２２（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　ＧｍｂＨ　ドイツ）で除去する。次いで、電極への電圧の印加は、光電子増倍管によって測定される光の電気化学発光に基づく発

光を誘発する。

【０４０３】

カウント対遊離Ｔ４の濃度におけるＥＣＬシグナルのプロットは、Ｔ４濃度の上昇を伴う立下りシグナルを有する典型的な双曲線競合曲線をもたらす。

【表６】

キャリブレータ番号	MK１	MK２	MK３	MK４	MK５	総競合 cts MK５／cts MK１ [%]	シグナル動力学 [(cts MK１－cts MK５)／cts MK５]
遊離Ｔ４の濃度 [pmol／L]	0．00	9．53	25．69	52．71	122．10		
	シグナル [cts]						
pAbロットA	133262	33017	12327	6491	3803	3%	34．0
pAbロットB	195660	65633	31877	18151	11101	6%	16．6
mAb 3B7	130543	67950	26980	14304	8432	6%	14．5
mAb 7D4	52230	30347	16196	9518	5863	11%	7．9
mAb 7E10	73167	27870	12531	6731	3991	5%	17．3
mAb 38F8	145082	40459	17338	9202	5272	4%	26．5
mAb 18B3	8032	7139	4959	3426	2331	29%	2．4
mAb 4H8	23559	22175	18720	14332	10231	43%	1．3

表６：ポリクローナル抗Ｔ４抗体（参照）および様々なモノクローナル抗体ａｃｃのルテニウム－コンジュゲートを使用した上昇する濃度の遊離Ｔ４とのシグナル競合

【０４０４】

上記の表６に示されるように、実施例２および実施例３で行われたＢｉａｃｏｒｅ実験においてＴ４に対して並外れて高いｋａを示した３つのＦａｂフラグメント３８Ｆ８、７Ｅ１０および７Ｄ４は、試験された４つの最良の抗体のうちにあった。これにより、Ｔ４に対する高いｋａが、競合的イムノアッセイを提供するための１つの（とりわけ）重要な因子であることが確認される。さらに、データは、ポリクローナル抗体が、本明細書に提供されるような単一モノクローナル抗体によって首尾よく置き換えられ得ることを実証している。

【０４０５】

実施例５：Ｔ４との複合体におけるＦａｂ抗体３８Ｆ８の結晶構造の決定

Ｌ－Ｔ４ホルモンを含む場合と含まない場合のＦａｂ　３８Ｆ８の結晶化：

３８Ｆ８　Ｆａｂフラグメントを含む溶液を１８ｍｇ／ｍｌに濃縮し、結晶化スクリーニングに供した。蒸気拡散シッティングドロップ実験において、１００ｎｌのタンパク質溶液を１００ｎｌのリザーバー溶液（１：１の比）と混合するか、または１４０ｎｌのタンパク質溶液を６０ｎｌのリザーバー溶液（７：３の比）と混合することによって、結晶化液滴を２１°で設定した。結晶は、沈殿剤としてポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含むいくつかの条件で出現した。構造決定に使用した結晶は２日以内に現れ、以下の沈殿剤溶液を含む条件で４日以内にフルサイズに成長した：１２０ｍＭエチレングリコール混合物（３０ｍＭジエチレングリコール、３０ｍＭトリエチレングリコール、３０ｍＭテト

ラエチレングリコールおよび３０ｍＭペンタエチレングリコール）、１００ｍＭトリス塩基－ＢＩＣＩＮＥ　ｐＨ８．５、２０％ｖ／ｖ　ＰＥＧ　５００　ＭＭＥおよび１０％ｗ／ｖ　ＰＥＧ　２００００。

【０４０６】

アポ結晶を７：３の比の液滴から採取し、１：１の比の液滴からの結晶を、上記沈殿剤溶液に加えて１０％ＤＭＳＯを含有するＬ－チロキシンホルモン（Ｌ－３，５，３’，５’－テトラヨードチロニンまたはＬ－Ｔ４、シグマ）の飽和溶液に２０時間浸漬した。結晶を沈殿剤溶液から直接採取し、液体Ｎ２中でフラッシュ冷却した。回折画像は、Ｓｗｉｓｓ　Ｌｉｇｈｔ　ＳｏｕｒｃｅのビームラインＸ１０ＳＡで１００Ｋの温度でＥＩＧＥＲ２Ｘ　１６Ｍ検出器で収集し、画像はＸＤＳパッケージ［Ｋａｂｓｃｈ　Ｗ．ＸＤＳ．Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔ．Ｄ６６，１２５－１３２（２０１０）］で処理した。アポ結晶については、単結晶からのデータをマージして、非対称単位に２つの分子を有する空間群Ｃ１２１の１．８１Å分解能データセットを得た（表７を参照）。Ｌ－Ｔ４結合結晶についても同様に、単結晶からのデータをマージして、非対称単位に２つの分子を有する空間群Ｃ１２１の１．６６Å分解能データセットを得た。

【０４０７】

構造は、ＰＨＥＮＩＸ［Ｌｉｅｂｓｃｈｎｅｒ　Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ　ｕｓｉｎｇ　Ｘ－ｒａｙｓ，ｎｅｕｔｒｏｎｓ　ａｎｄ　ｅｌｅｃｔｒｏｎｓ：ｒｅｃｅｎｔ　ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ　ｉｎ　Ｐｈｅｎｉｘ．Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔ．Ｄ７５，８６１－８７７（２０１９）］一式の一部としてのプログラムＰＨＡＳＥＲ［ＭｃＣｏｙ　ＡＪ，Ｇｒｏｓｓｅ－Ｋｕｎｓｔｌｅｖｅ　ＲＷ，Ａｄａｍｓ　ＰＤ，Ｗｉｎｎ　ＭＤ，Ｓｔｏｒｏｎｉ　ＬＣ，Ｒｅａｄ　ＲＪ　Ｊ．Ａｐｐｌ．Ｃｒｙｓｔ．４０，６５８－６７４（２００７）］）］での分子置換によって決定した。ＰＤＢ－ＩＤ　６ＬＤＸ由来のＦａｂフラグメントを定常ドメインと可変ドメインに分割し、検索モデルとして使用した。分子置換溶液モデルをＣＯＯＴ［Ｅｍｓｌｅｙ　Ｐ，Ｌｏｈｋａｍｐ　Ｂ，Ｓｃｏｔｔ　ＷＧ，Ｃｏｗｔａｎ　Ｋ．Ｆｅａｔｕｒｅｓ　ａｎｄ　ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｃｏｏｔ．Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔ．Ｄ６６，４８６－５０１（２０１０）］で再構築し、ＰＨＥＮＩＸ　Ｒｅｆｉｎｅで精密化した。

【表７－１】

データ収集	アポ結晶	Ｌ－Ｔ４$_4$結合
波長（Å）	１．０	１．０
解像度[1]（Å）	５３．３－１．８１（１．９３－１．８１）	３８．９８－１．６６（１．６７－１．６６）
空間群	Ｃ　１　２　１	Ｃ　１　２　１
単位セル（Å、°）	１１４．０６，８５．９０，１１０．８２　９０．００，１０５．５１，９０．００	１１４．２７，８５．８２．１１１．５８，９０．００，１０５．８２，９０．００
全回折	２６９，３７７（１３，６４２）	３５５，４４１（１８，１１０）
固有の回折	７７，７３２（３，８８７）	１０３，４２７（５，１７２）
多重性	３．５（３．５）	３．４（３．５）
完成度（%）	８３．２（２４．８）	８．３８（２６．３）
平均Ｉ／σ（Ｉ）	１２．９（１．５）	１２．７（１．４）
ウィルソンＢ因子	３２．６２	２７．８６
Ｒ－ｍｅａｓ	０．０４９（０．６１０）	０．０４６（０．９５０）
ＣＣ１／２	０．９９９（０．５８７）	０．９９９（０．４８６）
精密化		
精密化で用いた回折	７７，７１２（１３７）	１０３，４００（３４７）
Ｒ－ｆｒｅｅに用いた回折	３，８３１（５）	５，２５４（１４）
Ｒ－ｗｏｒｋ	１７．４９	１７．６８
Ｒ－ｆｒｅｅ	２１．９０	２１．４９
非水素原子の数	６，８３９	７，０３５
巨大分子	６，４３２	６，４４５
タンパク質残基	８６６	８６６
ＲＭＳ結合（Å）	０．００５	０．００７
ＲＭＳ角度（°）	０．７２	０．８４
ラマチャンドラン　好ましい（%）	９８．１４	９７．７９
ラマチャンドラン　許容（%）	１．８６	２．２１
ラマチャンドラン　外れ値（%）	０．００	０．００
回転異性体　外れ値（%）	０．９４	１．３４
Ｃｌａｓｈスコア	２．１１	１．９３

【表７－２】

平均Ｂ因子（Å^2）	４１．９６	３６．７５
巨大分子	４１．７３	３６．２０
リガンド	５８．１５	５７．４５
溶媒	４３．８９	３９．０３

表７：結晶学的データおよび精密化統計

[1] 括弧内の値は、最高解像度区画を示す。

[2] $R_{meas}=\Sigma|I-<I>|/\Sigma I$（式中、Ｉは強度である。）

[3] $R_{work}=\Sigma|F_o-<F_c>|/\Sigma F_o$（式中、$F_o$は観測値であり、$F_c$は計算された構造因子振幅である。）

[4] R_{free}は、精密化の間に省略された合計データの５％に基づいて算出した。

【０４０８】

Ｌ－Ｔ４ホルモンを含む場合と含まない場合のＦａｂ　３８Ｆ８の構造

Ｆａｂ　３８Ｆ８のＬ－Ｔ４への結合を原子的詳細で特徴付けるために、アポ形態およびＬ－Ｔ４リガンド結合形態のＦａｂの結晶構造を決定した。Ｆａｂの全体的な立体配座は、アポ形態およびリガンド結合形態の両方において非常に類似しており、ＲＭＳＤは０．１１Å２である。ＣＤＲループの側鎖に有意差は観察されず、リガンド結合のオン速度が速いことが示唆される。これは、実施例３に示されるＢｉａｃｏｒｅデータと一致する。

【０４０９】

Ｆａｂパラトープは軽鎖と重鎖の界面に形成されたポケットである。

【０４１０】

プログラムＰＩＳＡによる分析［Ｋｒｉｓｓｉｎｅｌ　Ｅ　ａｎｄ　Ｈｅｎｒｉｃｋ　Ｋ．Ｉｎｆｅｒｅｎｃｅ　ｏｆ　ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｓｓｅｍｂｌｉｅｓ　ｆｒｏｍ　ｃｒｙｓｔａｌｌｉｎｅ　ｓｔａｔｅ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３７２，７７４－－７９７（２００７）］は、リガンドの４１６Å２の表面積は、リガンド表面積全体の６８％であるＦａｂ　３８Ｆ８によって埋もれていることが明らかにした。合計１６個のアミノ酸がＦａｂパラトープを構成し、７個が重鎖由来であり、９個が軽鎖由来である（図５および表８を参照）。軽鎖ＣＤＲ２を除く全てのＣＤＲループは、ヨウ素原子およびフェノール環との疎水性相互作用によって主に支配されるリガンド結合に関与する。リガンドの親水性アミノ基およびカルボキシル基を溶媒に曝露し、ポケットから出す。Ｆａｂの重鎖および軽鎖ＣＤＲ３ループは、疎水性ポケットの大部分を形成し、これは側鎖および主鎖の両方の相互作用によって形成される。これらを表７に要約する。

【０４１１】

３つの水素結合は、リガンドのＯ４およびＯ４’原子と、Ｆａｂの重鎖のＣＲＤ２上のＴｙｒ５０と、軽鎖のＣＤＲ１上のＨｉｓ２８およびＣＤＲ３上のＨｉｓ９６とによって形成されるリガンドを安定化するのに役立つ。さらに、２つの極性－パイ（アレーン－Ｈ結合）相互作用が存在し、１つの例では、Ｆａｂ軽鎖のＨｉｓ２８およびＡｓｎ２９によって配位された水分子がリガンドフェノール環の１つに対する水素供与体であり、他の例では、Ｃ２’がＦａｂ軽鎖のＨｉｓ３０の複素環式イミダゾール環に対する水素供与体である。全てのアミノ酸ナンバリングは、Ｋａｂａｔ命名法に従う。

【表８】

鎖	ＣＤＲ	Ｋａｂａｔナンバリングに従う残基	側鎖／主鎖	相互作用タイプ
重	１	Ｖａｌ３３	側鎖	疎水性
重	２	Ｔｙｒ５０	側鎖	Ｈ結合
重	２	Ｔｒｐ５２	側鎖	疎水性
重	３	Ｉｌｅ９８	側鎖	疎水性
重	３	Ｇｌｙ９９	主鎖	疎水性
重	３	Ｔｙｒ１００	側鎖	疎水性
重	３	Ｉｌｅ１００ｂ	側鎖	疎水性
軽	１	Ｈｉｓ２８	側鎖	Ｈ結合およびH_2O配位
軽	１	Ａｓｎ２９	側鎖	H_2O配位
軽	１	Ｔｒｐ３２	側鎖	疎水性
軽	３	Ｇｌｙ９１	主鎖	疎水性
軽	３	Ｔｙｒ９２	主鎖	疎水性
軽	３	Ｓｅｒ９３	主鎖	疎水性
軽	３	Ｔｙｒ９５ｂ	側鎖	疎水性
軽	３	Ａｓｎ９５ｃ	主鎖	疎水性
軽	３	Ｈｉｓ９６	側鎖	Ｈ結合

表８：４．５Åの距離カットオフで同定されたパラトープのＦａｂ　３８Ｆ８残基構成要素の要約。残基は、Ｋａｂａｔの慣例に従ってナンバリングされる。

【０４１２】

概要：

・Ｆａｂ　３８Ｆ８パラトープは、主に重鎖および軽鎖の両方からのＣＲＤ３ループ残基で構成されるポケットである。

・Ｆａｂのアポ結合状態とリガンド結合状態との間の立体構造類似性は、リガンド結合オン速度が速いことを示唆している。

・Ｌ－Ｔ４リガンドとの相互作用は、ヨウ素原子およびフェノール環を介して大部分が疎水性であるが、３つの水素結合および２つの極性－パイ相互作用も含む。

・リガンドの接近可能な表面積の６８％がＦａｂによって埋められる

【０４１３】

実施例６：スクリーニングされた抗体の配列比較

実施例３は、Ｆａｂ抗体３８Ｆ８、７Ｅ１０および７Ｄ４が顕著に高いｋａを有することを明らかにした。さらに、実施例４は、これらの３つのクローンが、Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）システムで確立された競合的イムノアッセイにおいて最良に試験された４つのクローンの中にあることを示した。これらの３つの抗体および他の６つの選択された抗体のいくつか（実施例２を参照）が配列類似性を共有するかどうかを調べるために、可変領域（ＶＨおよびＶＬ）の配列アラインメントが行われた。配列アラインメント（図６を参照）は、驚くべきことに、抗体３８Ｆ８、７Ｄ４および７Ｅ１０がＶＨ領域およびＶＬ領域において、特にＣＤＲにおいても著しく高い配列類似性を有することを明らかにした。更に驚くべきことに、３８Ｆ８抗体のパラトープを形成するアミノ酸位置の保存性は極めて高い。これは、３８Ｆ８、７Ｄ４および７Ｅ１０が、特にＣＤＲ配列においても高い配列類似性を共有する密接に関連した抗体であることを示唆している。上述のように、これ

らの抗体は、機能的特徴、特に非常に高いｋａを共有する。さらに、これらの３つのＦａｂフラグメントは、シグナル対ノイズによって評価されるようにｆＴ４を定量するためのＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ベースのイムノアッセイにおける４つの最良に試験された抗体の中にあった。

【０４１４】

観察された類似性を定量化するために、カスタマイズされたスコア行列を使用して配列アラインメントから類似性スコアを得た。このマトリックスは、５つの重み付けされた物理的パラメーター：形状指数、ファンデルワールス体積、等電点、疎水性、および分極率に基づいて構築される。これらの５つのパラメーターは、パラトープを形成するアミノ酸の最も重要な特徴を捕捉し、類似の結合モチーフを有する異種クローンを同定することを可能にする。高い類似性スコアを有する抗体は、ＣＤＲ領域において類似の結合様式ならびに類似のアミノ酸配列の両方を有する。類似性スコアが高いほど、抗体はより関連性が高い。クローン７Ｄ４－９８％、７Ｅ１０－９８％、３Ｂ７－８６％、１８Ｂ３－９２％、４Ｈ８－９５％についての３８Ｆ８に関する類似性スコア。この類似性スコア分析により、７Ｅ１０および７Ｄ４が３８Ｆ８と密接に関連していることが確認された。結合を媒介するパラトープ残基は非常に類似している（１６アミノ酸のうち１２および１３は同一である）。

【０４１５】

実施例７：３８Ｆ８ならびに関連抗体７Ｄ４および７Ｅ１０のＴ４への結合を更に特徴付けるためのモデリング分析

Ｆａｂ　３８Ｆ８のＬ－Ｔ４ホルモンへの原子レベルでの結合を、インシリコアプローチを使用して特性評価した。この分析は、ＣＤＲ中のどのアミノ酸が結合に重要であるかを定義し、特定のＣＤＲ位置でのアミノ酸置換が許容される程度の証拠を得ることを目的とした。

【０４１６】

インシリコ分析は、７Ｄ４および７Ｅ１０では、速度論的特性（ｋａおよびＫＤ）が７Ｅ１０と同様であり、Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）性能がわずかに悪い２つのＦａｂが同定されたという事実を利用した。本発明者らはまた、４Ｈ８が３８Ｆ８と有意な配列類似性も共有しながら、その速度論的特性ならびにＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）性能に大きな差を示したという事実を利用した。したがって、既知の機能的特徴および配列バリエーションの組み合わせは、３８Ｆ８の機能的特徴（速度論、特異性およびＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）性能）に対するアミノ酸置換の影響を予測するための基礎として使用することができた。言い換えれば、これにより、本発明者らは、３８Ｆ８　Ｔ４結合特性（速度論、特異性およびＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）性能）を維持するためのＣＤＲ中の重要なアミノ酸残基（すなわち、機能的性能を損なうことなく置換することができない）、潜在的に重要なアミノ酸（すなわち、特定のアミノ酸にのみ交換され得るアミノ酸）および重要でないアミノ酸（保存的アミノ酸と非保存的アミノ酸の両方が可能でなければならない）を同定することができた。

【０４１７】

最初の工程として、３８Ｆ８ならびに２つの高度に類似した抗体、７Ｄ４、７Ｅ１０（類似性スコア９８％超）および４Ｈ８（類似性スコア９５％）の平衡化構造を生成した。７Ｄ４、７Ｅ１０、および４Ｈ８の平衡構造を得るために、最初に、内部Ｒｏｃｈｅ抗体結晶構造データベースで訓練された機械学習アルゴリズムに基づいて、ＭｏＦｖＡＢパッケージを使用して初期３Ｄ形状を予測した。この最初の推測の後、正しいループ形状を得るために、分子動力学シミュレーションを更に使用して３Ｄ構造を最適化した（シミュレーションパラメーターの詳細は以下に提供される）。３８Ｆ８の結晶構造ならびに７Ｄ４、７Ｅ１０および４Ｈ８の平衡構造を図７に示す。第２の工程として、３８Ｆ８の配列に点変異を行い、自由エネルギー最小化を行い、初期構造および３つの他のクローンの構造または構造と比較する。

【０４１８】

Ｌ－Ｔ４ホルモンとの結合に対する３８Ｆ８の点変異の効果を、類似した（７Ｄ４、７Ｅ１０）または異なる（４Ｈ８）機能的特徴を有する非常に類似したクローンの配列および３Ｄ形状を比較することによってモデル化および予測した（図７に示す）。パラトープに直接寄与する全ての残基を上記の実施例５に列挙し、図７のアラインメントに太字で印刷する。他の３つのクローンにおけるパラトープ領域の置換を斜体で示す。少数の例外を除いて、パラトープの全ての残基は、重要なアミノ酸、すなわち機能的特徴を維持するために重要なアミノ酸と見なされる。しかしながら、パラトープにおける相互作用のいくつかは、これらの位置で少なくとも特定のアミノ酸置換が可能でなければならないように、ペプチド骨格のみを介する（下記を参照）。さらに、他のパラトープアミノ酸は、密接に関連するアミノ酸によって模倣され得るそれらの側鎖と疎水性相互作用を形成する（例えば、ＨＣのＶ３３およびＬＣのＹ９５ｂ）。特定のアミノ酸に置換され得るこれらのパラトープアミノ酸は、表９において潜在的に重要であるとしてグループ化されている。表９に列挙されている重要でない領域は、結合ポケットから遠く離れており、この領域における変異時でさえそれらの構造を保存するループフラグメントである。したがって、分析では、この「重要でない」領域でのアミノ酸交換が可能であるべきであることが提案されている。そのような変異は、保存的アミノ酸交換を含み得るが、非保存的アミノ酸交換も含み得る。さらに、ＣＤＲ中の潜在的な重要なアミノ酸位置、すなわちパラトープに寄与しないが、重要なパラトープ残基の構造位置に影響を及ぼさないように特定の他のアミノ酸によってのみ置換され得る残基が見出された。主鎖相互作用のみを介して結合に寄与する、またはクローン７Ｄ４および７Ｅ１０にファミリーバリエーションを有するパラトープ領域のアミノ酸は、潜在的に重要であると特定され、したがって重要領域から除外される。重要な領域には、側鎖を介した相互作用に関与し、交換されるべきではないアミノ酸のみが含まれる。表９は、３８Ｆ８のＣＤＲ領域における重要なアミノ酸、潜在的に重要なアミノ酸および重要でないアミノ酸を要約する。

【表９】

領域	ＣＤＲ－Ｈ１	ＣＤＲ－Ｈ２	ＣＤＲ－Ｈ３	ＣＤＲ－Ｌ１	ＣＤＲ－Ｌ２	ＣＤＲ－Ｌ３
重要ではない	Ｓ３１、Ｎ３２	ＳＧＮＴＹＹＡＳＷＡＫＧ（５４～６５）	Ｇ９５、Ｌ９６、Ｆ１００ｃ、Ｎ１０１、Ｆ１０２	ＱＳＳＱＳ（２４～２７）	ＧＡＳＴＬＴＳ（５０～５６）	Ａ８９、Ｇ９０
潜在的に重要	Ｍ３４、Ｎ３５、Ｖ３３	１５１、Ｔ５２ａ、Ｒ５３	Ｈ９７、Ｇ９９、Ｎ１００ａ	Ｈ２８、Ｎ２９、Ｎ３０、Ａ３１	－	Ｇ９１、Ｙ９２、Ｓ９３、Ｇ９４、Ｓ９５、Ｔ９５ａ、Ｎ９５ｃ、Ｖ９７、Ｙ９５ｂ
重要		Ｙ５０、Ｗ５２	Ｉ９８、Ｙ１００、Ｉ１００ｂ	Ｗ３２	－	Ｈ９６

表９．３８Ｆ８のＣＤＲ領域のアミノ酸は、重要でない（性能を損なうことなく他のアミノ酸で置換することができる）、潜在的に重要（性能を失うことなく少なくとも特定の他のアミノ酸で置換することができる）および重要（置換することができない）の３つの群に分けられる。ＣＤＲループは、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従ってナンバリングされる。

【０４１９】

潜在的に重要であると定義される領域におけるアミノ酸置換の効果を分析するために、本発明者らはエネルギー最小化アプローチを使用した（詳細は以下に提供される）。有効な点変異は、疎水性指数、他のアミノ酸の配向、または排除体積のいずれにも影響しない場合に許容される。潜在的に重要なアミノ酸における可能なアミノ酸置換の最初の推測として、３８Ｆ８に対して７Ｄ４、７Ｅ１０、および４Ｈ８に見られるアミノ酸置換を検討

した。潜在的に重要な領域における可能性のあるアミノ酸置換のモデリングからの結果を表１０に収集し、以下に説明する。可能性のある変異は、３つの群に分けられる：ファミリーバリエーション（すなわち、密接に関連する７Ｄ４および７Ｅ１０に見られる）、インシリコ評価を使用して承認されたアミノ酸置換、およびインシリコ承認置換と類似の物理化学的特徴を有するアミノ酸を有する他の示唆された置換。

【表１０】

鎖	位置（Ｋａｂａｔ）	残基（３８Ｆ８）	ファミリーのバリエーション（７Ｄ４または７Ｅ１０）	インシリコ承認された交換	その他の提案された交換
重	３３	Ｖ		Ａ	
	３４	Ｍ	Ｌ	Ｉ	Ｖ
	３５	Ｎ	－	Ｓ、Ｔ	Ｑ
	５１	Ｉ	－	Ａ、Ｌ	Ｖ
	５２ａ	Ｔ	－	Ｓ	－
	５３	Ｒ	Ｇ、Ｄ	Ｋ	－
	９７	Ｈ	Ａ	Ｒ、Ｋ	－
	９９	Ｇ	－	Ａ	Ｖ
	１００ａ	Ｎ	Ａ	Ｑ	－
軽	２８	Ｈ	Ｙ	－	－
	２９	Ｎ	Ｋ	－	－
	３０	Ｎ	－	Ｑ、Ｓ、Ｔ	－
	３１	Ａ	Ｎ	Ｖ	
	９１	Ｇ	－	Ａ	－
	９２	Ｙ	Ｗ	Ｆ	－
	９３	Ｓ	－	Ｔ	－
	９４	Ｇ	Ａ、Ｓ	－	－
	９５	Ｓ	Ｇ、Ｎ	－	Ｑ
	９５ａ	Ｔ	Ｓ、Ｇ	－	－
	９５ｂ	Ｙ		Ｆ	
	９５ｃ	Ｎ	Ｓ	Ｔ	Ｑ
	９７	Ｖ	Ａ	－	Ｉ、Ｌ

表１０．重要なおよび潜在的に重要な残基についての３８Ｆ８のＣＤＲ領域における可能性のある点変異

【０４２０】

ＣＤＲによるアミノ酸置換分析の要約

ＣＤＲ－Ｈ１：アミノ酸Ｍ３４およびＮ３５は、Ｖ３３（結合様式に関与する）に近接している。突然変異Ｍ３４Ｌ（Ｉ）およびＮ３５Ｓ（Ｔ）はＶ３３の立体配座および配向に影響を及ぼさず、これらの変異がパラトープ結合および抗体特性に影響を及ぼさないことを示唆する。類似の物理化学的特性を有するアミノ酸への変異が可能である（Ｎ３５Ｑ

、Ｍ３４Ｖ）。Ｖ３３は、疎水性側鎖相互作用を介してＬ－Ｔ４との相互作用に寄与する。置換Ｖ３３Ａは、疎水性指数と排除体積との比較に従って、この相互作用に影響を及ぼさないはずである。

【０４２１】

ＣＤＲ－Ｈ２：アミノ酸Ｉ５１、Ｔ５２ａ、Ｒ５３は、重要なＹ５０およびＷ５２に近接している。同じクローンファミリーから、Ｇのサイズが小さいため変異Ｒ５３Ｇが可能であり、異なるクラスのアミノ酸への変異が重要である。変異Ｒ５３Ｄは、その電荷の性質のために重要ではなく、配向は保存されている。変異Ｉ５１Ａ（Ｌ）、Ｒ５３Ｋおよび Ｔ５２ａＳは、重要なＹ５０およびＷ５２の立体配座および配向に影響を及ぼさない。Ｙ５０はＨ結合に関与するため、この位置での交換は重要であり得る。Ｗ５２は疎水性相互作用の一部であり、芳香族部分の適切な配向も結合点にとって重要である。

【０４２２】

ＣＤＲ－Ｈ３：アミノ酸Ｈ９７、Ｇ９９、Ｎ１００ａは、重要なＩ９８、Ｙ１００、Ｉ１００ｂに近接している。変異Ｈ９７ＡおよびＮ１００ａＡは、重要なＩＧＹ（９８～１００）フラグメントの再配向をもたらす。Ａが７Ｅ１０および７Ｄ４の９７位および１００ａ位に見出されるように、配向が変化しても、Ａ９７および／またはＡ１００ａを有する抗体は依然として優れた結合親和性k_aおよびＥｌｅｃｓｙｓアッセイ性能を有することが明らかである。変異Ｈ９７Ｒ（Ｋ）、Ｎ１００ａＱは、ＩＧＹ（９８～１００）フラグメントの適切な配向を維持することが見出されており、したがって好ましい置換であり得る。Ｇ９９は、小さなアミノ酸である変異Ｇ９９Ａ（Ｖ）で変異することを可能にするため、主鎖を介した結合に関与する。

【０４２３】

ＣＤＲ－Ｌ１：アミノ酸Ｎ３０は、パラトープアミノ酸Ｈ２８、Ｎ２９、Ａ３１、Ｗ３２に近接している。Ｎ３０Ｑ（Ｓ、Ｔ）の変異は、フラグメントＨＮＮＡＷ（２８～３２）の配向に影響を及ぼさない。Ｎ３０Ｑ（Ｓ、Ｔ）は、結合フラグメントＨＮＮＡＷ（２８～３２）中にあるが、反対方向を向いており、Ｌ－Ｔ４との結合に影響を及ぼさない。変異Ｈ２８Ｋは重要であり、それは、Ｎ２９の誤った配向および結合モチーフにおける芳香族結合の切断をもたらす。変異Ａ３１は、Ｗ３２の位置をわずかにシフトさせる（およびパイスタッキングに影響を及ぼす）ため、この位置は、好ましくは小さく疎水性であるべきであり、例えばＶ．位置Ｗ３２が重要である。ファミリーバリエーションを表１０に列挙する。

【０４２４】

ＣＤＲ－Ｌ２：ＣＤＲ－Ｌ２は、様々な点変異を有し得る。ＣＤＲ－Ｌ２ループは結合に直接関与しないため、重要でない領域として分類される。

【０４２５】

ＣＤＲ－Ｌ３：Ｙ９５ｂ、Ｈ９６の向きは、結合様式にとって重要である。Ｙ９５ｂは疎水性相互作用に関与しているため、Ｆ中で変異させることができる。変異Ｙ９２Ｗ（Ｆ）およびＳ９３Ｔは、これらのアミノ酸が主鎖相互作用を介して関与しているため重要ではないが、全体的な配向はシフトしている。変異Ｇ９１Ａ、Ｇ９４Ａ（Ｓ）、Ｓ９５Ｇ（Ｎ）、Ｔ９５ａＳ、Ｎ９５ｃＳ（Ｔ）、Ｖ９７Ａは、重要なＹ９５ｂ、Ｈ９６の立体配座および配向に影響を及ぼさない。同様の物理化学的特性を有するアミノ酸への特定の上記位置における更なる変異が可能である。

【０４２６】

コンピュータシミュレーションの詳細：

１）分子動力学シミュレーション。

７Ｅ１０、７Ｄ４および４Ｈ８　Ｆａｂの構造を得るために、ＧＲＯＭＡＣＳシミュレーションパッケージを使用した。抗体および環境水を、ＡＭＢＥＲ９９ＳＢ－ＩＬＤＮ［Ｌｉｎｄｏｒｆｆ－Ｌａｒｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　７８，１９５０－５８，２０１０］力場パラメーターおよび水に対するｔｉｐ３ｐモデル［Ｄ．Ｊ．Ｐｒｉｃｅ，ａｎｄ　Ｃ．Ｌ．Ｂｒｏｏｋｓ　ＩＩＩ，Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｐｈｙｓ．１２１，１

００９６，２００４］を使用して、２ｆｓの時間ステップで、カノニカル（ＮＶＴ）アンサンブル（ボックスサイズ：薬７．０×７．０×７．０ｎｍ３）内の完全原子表現でモデル化した。速度リスケールサーモスタットによって温度を３００Ｋに設定した。各動的軌跡は、ループ配座の試料まで３００ｎｓの長さであった。

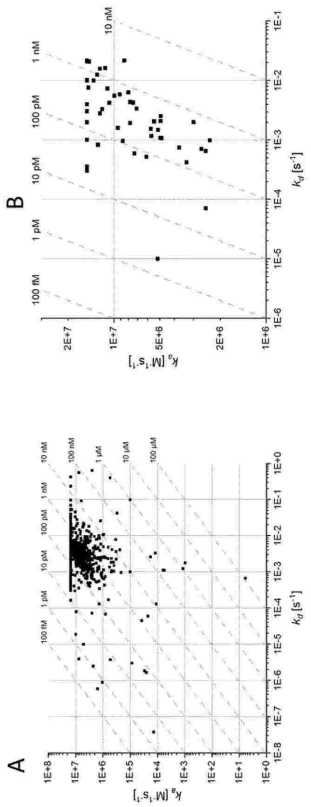
【０４２７】

２）アミノ酸置換時の構造最適化。

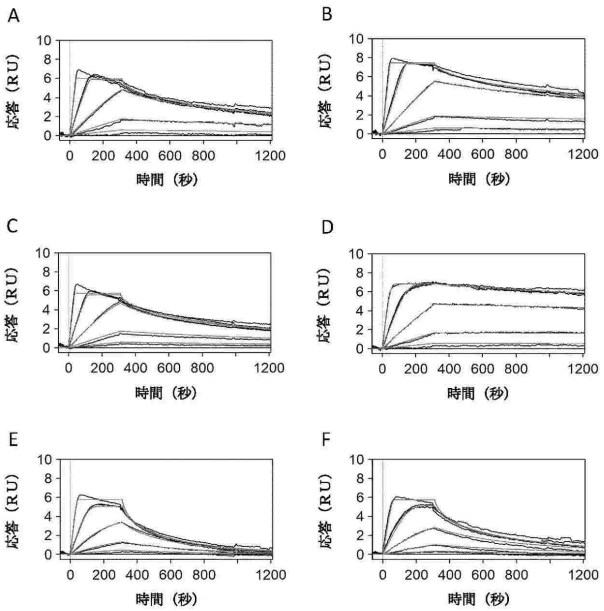
３８Ｆ８の結晶構造におけるアミノ酸置換は、コンピュータソフトウェアプラットフォームであるＳＡＭＳＯＮモデル［ＯｎｅＡｎｇｓｔｒｏｍ，ＳＡＭＳＯＮ，２０２０、ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｓａｍｓｏｎ－ｃｏｎｎｅｃｔ．ｎｅｔ／から入手可能］を使用して行われる。結晶構造中のある点変異の後、新たに得られた構造のエネルギーを最小化して局所自由度を平衡化した。これは、分子構造用のＦＩＲＥ（高速慣性緩和エンジン）オプティマイザによって行われた［Ｂｉｔｚｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈｙｓｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗ Ｌｅｔｔｅｒｓ，９７，１７０２０１，２００６］．Ｐｈｙｓｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗ Ｌｅｔｔｅｒｓ，９７，１７０２０１，２００６］。

【図面】

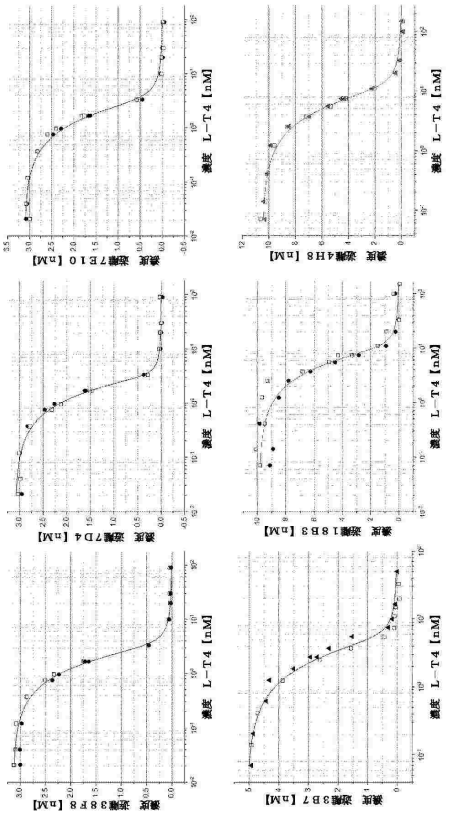
【図１】



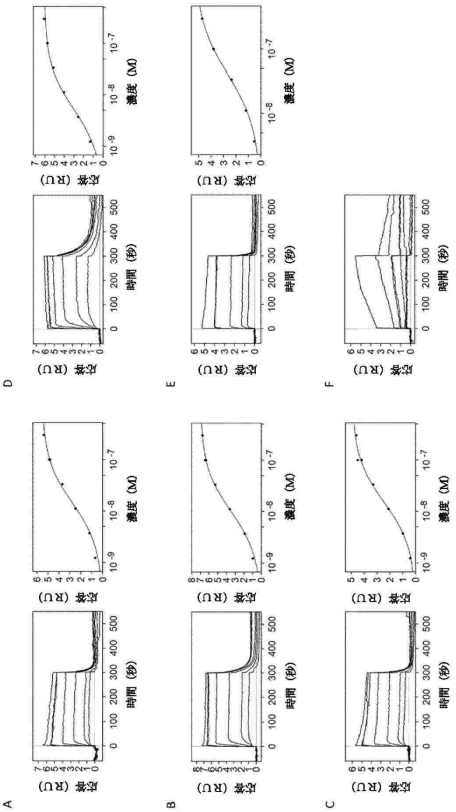
【図２】



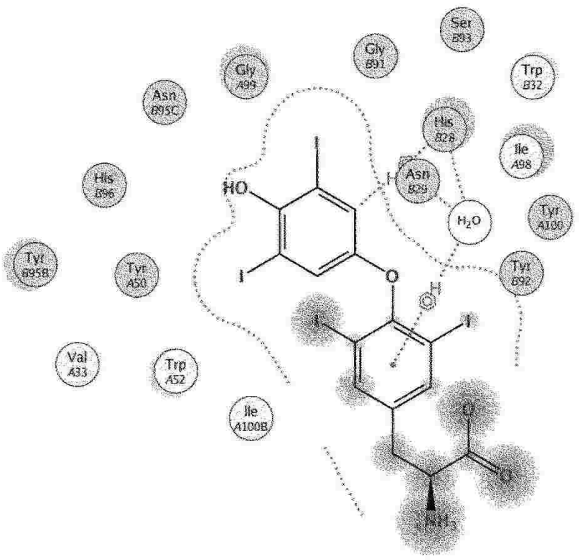
【図３】


濃度 L−T4 [nM]
濃度 凝集3B7 [nM]
濃度 凝集3B8 [nM]
濃度 凝集4H8 [nM]
濃度 凝集7D4 [nM]
濃度 凝集7E10 [nM]

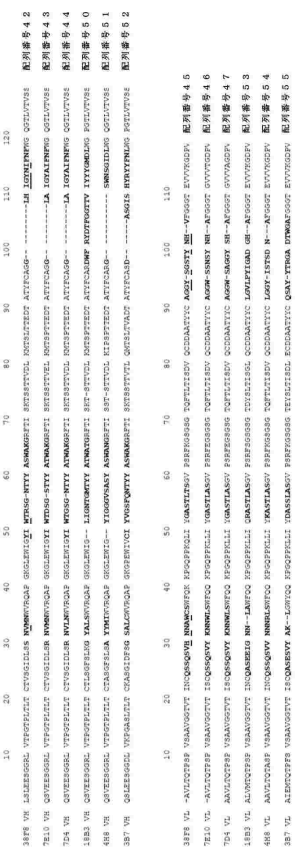
【図４】


A
B
C
D
E
F
応答 (RU)
時間 (秒)
濃度 (M)

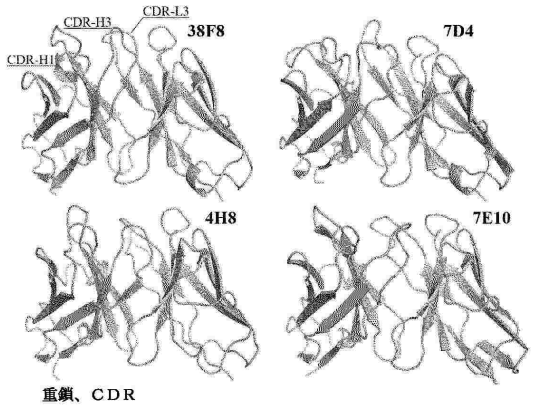
【図５】


Ser B93
Gly B91
Gly A99
Trp B32
Asn B95C
His B28
Ile A98
His B96
Asn B29
Tyr A100
Tyr B95B
Tyr A50
Tyr B92
Val A33
Trp A52
Ile A100B
HO
O
I
H2O

【図６】



【図７】



重鎖、CDR

38F8	SNVMN	YIWTRSGNTYYASWAKG	GLHIGYNIFNF
7D4	RNVLN	YIWTGSGNTYYATWAKG	GLAIGYAIFNF
7E10	RNVMN	YIWTDSGSTYYATWAKG	GLAIGYAIFNF
4H8	AYYMI	YIGGGVSASYASWANG	GSWNSGIDL

	SEQ ID NOs
38F8	SEQ ID NOs: 12, 7 and 14
7D4	SEQ ID NOs: 26, 28 and 29
7E10	SEQ ID NOs: 25, 27 and 29
4H8	SEQ ID NOs: 56, 57 and 58

軽鎖、CDR

38F8	QSSQSVHNNAWCS	GASTLTS	AGGYSGSTYNHV	SEQ ID NOs: 15,11 and 18
7D4	QSSQSVYKNNWLS	GASTLAS	AGGWSAGGYSHA	SEQ ID NOs: 30, 33 and 31
7E10	QSSQSVYKNNWLS	GASTLAS	AGGWSSNSYNHA	SEQ ID NOs: 30, 33 and 32
4H8	QSSQSVYNNRLS	KASTLAS	LGGYISTSDNA	SEQ ID NOs: 59, 60 and 61

【配列表】

2024546028000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/080897

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/080897

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/26 G01N33/53 G01N33/78
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, 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	EP 0 168 907 A2 (BECTON DICKINSON CO [US]) 22 January 1986 (1986-01-22) page 4, line 4 - page 6, line 8 page 6, line 26 - page 7, line 26 page 9, line 7 - page 15, line 14 claims 1,4-9; examples 1,2 -----	1-16
X	EP 0 959 355 A1 (ABBOTT LAB [US]) 24 November 1999 (1999-11-24) paragraphs [0002], [0010], [0012], [0015], [0016], [0018] - [0020], [0024] - [0026] paragraphs [0039], [0040], [0054]; examples 3,4 ----- -/--	1-16

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 January 2023	02/02/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Stein, Annette

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/080897

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Anonymous: "Product Datasheet Thyroxine Antibody (XM212) NB110-7978", , 29 April 2021 (2021-04-29), pages 1-3, XP055908952, Retrieved from the Internet: URL:https://www.novusbio.com/PDFs/NB110-7978.pdf [retrieved on 2022-04-05] page 2 -----	1-16
X	WO 2019/229296 A1 (TEKNOLOGIAN TUTKIMUSKESKUS VTT OY [FI]; MILANO POLITECNICO [IT]) 5 December 2019 (2019-12-05) page 2, line 29 - page 4, line 3 page 9, line 12 - page 15, line 17; figures 1-5,10,11 page 17, line 30 - page 20, line 37 claims 1,2,4-11,13-27,31-33; examples 1-4 -----	1-16
X	KAMRUN NAHAR ISLAM ET AL: "Direct Construction of an Open-Sandwich Enzyme Immunoassay for One-Step Noncompetitive Detection of Thyroid Hormone T4", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 83, no. 3, 1 February 2011 (2011-02-01), pages 1008-1014, XP055608405, US ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac102801r the whole document, in particular abstract, figures 2 and S2 -----	1-16
A	Anonymous: "Radioimmunoassay, Free Thyroxine", , 21 August 2007 (2007-08-21), pages 1-3, XP055909398, Retrieved from the Internet: URL:https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K070708 [retrieved on 2022-04-05] the whole document -& Anonymous: "FDA review: 510(k) SUBSTANTIAL EQUIVALENCE DETERMINATION DECISION SUMMARY ASSAY TEMPLATE", , 21 August 2007 (2007-08-21), pages 1-10, XP055909401, Retrieved from the Internet: URL:https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K070708.pdf [retrieved on 2022-04-05] the whole document, in particular pages 2-4 and 7 -----	1-16

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/080897

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0168907 A2	22-01-1986	DE 3586808 T2	25-03-1993
		EP 0168907 A2	22-01-1986
		MY 103022 A	30-04-1993
		US 4636478 A	13-01-1987
EP 0959355 A1	24-11-1999	CA 2130197 A1	14-10-1993
		EP 0635020 A1	25-01-1995
		EP 0959355 A1	24-11-1999
		JP 3667753 B2	06-07-2005
		JP H07505627 A	22-06-1995
		US 5352803 A	04-10-1994
		US 5359093 A	25-10-1994
		US 5496925 A	05-03-1996
		US 5573904 A	12-11-1996
		US 5616298 A	01-04-1997
		US 5688921 A	18-11-1997
		US 5691456 A	25-11-1997
		WO 9320060 A1	14-10-1993
WO 2019229296 A1	05-12-2019	CN 112204049 A	08-01-2021
		EP 3802597 A1	14-04-2021
		US 2021230270 A1	29-07-2021
		WO 2019229296 A1	05-12-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N	*1/21 (2006.01)*	C12N	1/21	
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10	
C12P	*21/08 (2006.01)*	C12P	21/08	
G01N	*33/53 (2006.01)*	G01N	33/53	E
G01N	*33/531 (2006.01)*	G01N	33/531	A

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

ンネンバルト ２，ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー

(72)発明者 ハルドーソン，シュタイナー

スイス国 ４０７０ バーゼル，グレンツァッハーシュトラーセ １２４，エフ．ホフマン－ラ ロシュ アーゲー

(72)発明者 ヒルツェル，クラウス

ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク，ノンネンバルト ２，ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー

(72)発明者 ホイヤー，カロリーネ・ドロテア

ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク，ノンネンバルト ２，ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー

(72)発明者 ヨーゼル，ハンス－ペーター

ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク，ノンネンバルト ２，ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー

(72)発明者 ユックニシュケ，ウテ

ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク，ノンネンバルト ２，ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー

(72)発明者 レーマン，ホルガー

ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク，ノンネンバルト ２，ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー

(72)発明者 マルキナ，アナスタシア

ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク，ノンネンバルト ２，ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー

(72)発明者 プレンシプ，ジュゼッペ

ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク，ノンネンバルト ２，ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー

(72)発明者 フォン プロフ，レオポルト

ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク，ノンネンバルト ２，ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー

(72)発明者 シュレームル，ミヒャエル

ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク，ノンネンバルト ２，ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー

Ｆターム（参考） 4B064 AG27 CA19 CC24 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA92Y AA94Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA46

4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA50 FA74