

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-517911

(P2014-517911A)

(43) 公表日 平成26年7月24日(2014.7.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	4 B O 2 4
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	4 B O 6 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 B	4 C O 8 5
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-505136 (P2014-505136)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月22日 (2012. 2. 22)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年12月10日 (2013. 12. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/026141
 (87) 国際公開番号 W02012/141792
 (87) 国際公開日 平成24年10月18日 (2012. 10. 18)
 (31) 優先権主張番号 61/445, 103
 (32) 優先日 平成23年4月11日 (2011. 4. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507269175
 シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノステ
 イックス・インコーポレーテッド
 S I E M E N S H E A L T H C A R E
 D I A G N O S T I C S I N C .
 アメリカ合衆国、ニューヨーク 1 0 5 9
 1、タリータウン、ベネディクト・アベニ
 ュー 5 1 1
 (74) 代理人 110001508
 特許業務法人 津国
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100131808
 弁理士 柳橋 泰雄

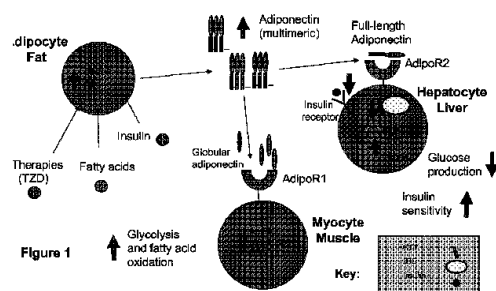
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アディポネクチン受容体C末端フラグメント (CTF) 免疫グロブリン

(57) 【要約】

生物学的サンプル中の第1種のIg-CTFを検出する方法であって、生物学的サンプルを、第1種のIg-CTF又は抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露すること、混合物を形成すること、混合物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること、及び生物学的サンプル中のIg-CTFを検出することを含む。

Normal response to obesity



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生物学的サンプル中の I g - C T F を検出するための方法であって、前記方法は以下：
a . 第 1 種の被験者に由来する生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝露させ、混合物を形成すること；

b . 前記混合物を、第 1 種の I g に優先的に結合する第 3 種の第 2 抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること；及び

c . 前記サンプル中に存在する I g - C T F を検出すること

を含む、方法。

10

【請求項 2】

第 1 種の被験者において I g - C T F のレベルをモニターする方法であって、以下：

a . 前記被験者から得られた生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝露し、混合物を形成すること；

b . 前記混合物を、第 1 種の I g に優先的に結合する第 3 種の第 2 抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること；

c . 前記サンプル中に存在する I g - C T F の量を定量化すること；

d . サンプル中に存在する I g - C T F の量を、

i . 公知の標準又は

i i . より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプル中に存在する I g - C T F の量のいずれかと比較すること

を含む、方法。

20

【請求項 3】

第 1 種の被験者においてインスリン抵抗性を診断するための方法であって、以下：

a . 前記被験者に由来する生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又は前記抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝露し、混合物を形成すること；

b . 前記混合物を、第 1 種の I g に優先的に結合する第 3 種の第 2 抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること；

c . 前記サンプル中に存在する I g - C T F の量を定量化すること；

d . サンプル中に存在する I g - C T F の量を、公知の標準と比較すること；及び

e . サンプル中の I g - C T F の量が、インスリン抵抗性と関連する I g - C T F のレベル内に入るか否かを決定すること

を含む、方法。

30

【請求項 4】

第 1 種の被験者においてインスリン抵抗性を処置する方法であって、以下：

a . 前記被験者に由来する生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝露し、混合物を形成すること；

b . 前記混合物を、第 1 種の I g に優先的に結合する第 3 種の第 2 抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること；

c . 前記サンプル中に存在する I g - C T F の量を定量化すること；

d . サンプル中に存在する I g - C T F の量を、公知の標準と比較すること；

e . サンプル中の I g - C T F の量が、インスリン抵抗性と関連する I g - C T F のレベル内に入るか否かを決定すること；及び

f . 被験者に、インスリン抵抗性のための処置を施す、又は処方すること

を含む、方法。

40

【請求項 5】

第 1 種の被験者においてインスリン抵抗性をモニタリングする方法であって、以下：

a . 前記被験者から得られた生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝露し、混合物を形成すること；

50

- b . 前記混合物を、第 1 種の I g に優先的に結合する第 3 種の第 2 抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること；
 - c . 前記サンプル中に存在する I g - C T F の量を定量化すること；
 - d . サンプル中に存在する I g - C T F の量を、
 - i . 公知の標準又は
 - i i . より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプル中に存在する I g - C T F の量のいずれかと比較すること；及び
 - e . 被験者の I g - C T F のレベルが、インスリン抵抗性の進行、退行、又は安定化を示しているか否かを決定すること
- を含む、方法。

10

【請求項 6】

第 1 種の被験者において癌を診断するための方法であって、以下：

- a . 前記被験者に由来する生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝露し、混合物を形成すること；
 - b . 前記混合物を、第 1 種の I g に優先的に結合する第 3 種の第 2 抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること；
 - c . 前記サンプル中に存在する I g - C T F の量を定量化すること；
 - d . サンプル中に存在する I g - C T F の量を、公知の標準と比較すること；及び
 - e . サンプル中の I g - C T F の量が、癌と関連する I g - C T F のレベル内に入るか否かを決定すること
- を含む、方法。

20

【請求項 7】

第 1 種の被験者において癌を処置する方法であって、以下：

- a . 前記被験者に由来する生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝露し、混合物を形成すること；
 - b . 前記混合物を、第 1 種の I g に優先的に結合する第 3 種の第 2 抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること；
 - c . 前記サンプル中に存在する I g - C T F の量を定量化すること；
 - d . サンプル中に存在する I g - C T F の量を、公知の標準と比較すること；
 - e . サンプル中の I g - C T F の量が、癌と関連する I g - C T F のレベル内に入るか否かを決定すること；及び
 - f . 被験者に、癌のための処置を施す、又は処方すること
- を含む、方法。

30

【請求項 8】

第 1 種の被験者において癌をモニターする方法であって、以下：

- a . 前記被験者から得られた生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝露し、混合物を形成すること；
 - b . 前記混合物を、第 1 種の I g に優先的に結合する第 3 種の第 2 抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること；
 - c . 前記サンプル中に存在する I g - C T F の量を定量化すること；
 - d . サンプル中に存在する I g - C T F の量を、
 - i . 公知の標準又は
 - i i . より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプル中に存在する I g - C T F の量のいずれかと比較すること；及び
 - e . 被験者の I g - C T F のレベルが、癌の進行、退行、又は安定化を示しているか否かを決定すること
- を含む、方法。

40

【請求項 9】

第 1 種の被験者において肝臓疾患を診断するための方法であって、以下：

- a . 前記被験者に由来する生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又はその抗原結合

50

フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝露し、混合物を形成すること；
 b．前記混合物を、第 1 種の I g に優先的に結合する第 3 種の第 2 抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること；
 c．前記サンプル中に存在する I g - C T F の量を定量化すること；
 d．サンプル中に存在する I g - C T F の量を、公知の標準と比較すること；及び
 e．サンプル中の I g - C T F の量が、肝臓疾患と関連する I g - C T F のレベル内に入るか否かを決定すること
 を含む、方法。

【請求項 1 0】

第 1 種の被験者において肝臓疾患を処置する方法であって、以下：

10

a．前記被験者に由来する生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝露し、混合物を形成すること；
 b．前記混合物を、第 1 種の I g に優先的に結合する第 3 種の第 2 抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること；
 c．前記サンプル中に存在する I g - C T F の量を定量化すること；
 d．サンプル中に存在する I g - C T F の量を、公知の標準と比較すること；
 e．サンプル中の I g - C T F の量が、肝臓疾患と関連する I g - C T F のレベル内に入るか否かを決定すること；及び
 f．被験者に、肝臓疾患のための処置を施す、又は処方すること
 を含む、方法。

20

【請求項 1 1】

第 1 種の被験者において肝臓疾患をモニターする方法であって、以下：

a．前記被験者から得られた生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝露し、混合物を形成すること；
 b．前記混合物を、第 1 種の I g に優先的に結合する第 3 種の第 2 抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること；
 c．前記サンプル中に存在する I g - C T F の量を定量化すること；
 d．サンプル中に存在する I g - C T F の量を、
 i．公知の標準又は
 i i．より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプル中に存在する I g - C T F の量のいずれかと比較すること；及び
 e．被験者の I g - C T F のレベルが、前記被験者における肝臓疾患の進行、退行、又は安定化を示しているか否かを決定すること
 を含む、方法。

30

【請求項 1 2】

第 1 種、第 2 種、及び第 3 種が同じ種ではない、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 3】

I g - C T F が、I g に共有結合的に付着した A d i p o R 1 の C 末端フラグメントを含む、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 1 4】

A d i p o R 1 の C 末端フラグメントが、配列番号 1 ~ 2 2 のアミノ酸配列の 1 つ又は複数を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 5】

I g - C T F が、I g に共有結合的に付着した A d i p o R 2 の C 末端フラグメントを含む、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 6】

A d i p o R 2 の C 末端フラグメントが、配列番号 2 3 ~ 4 4 のアミノ酸配列の 1 つ又は複数を含む、請求項 1 ~ 1 2 及び 1 5 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 7】

50

生物学的サンプルが、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に関連しない細胞、組織、外科的に切除された腫瘍組織、生検、細針吸引サンプル、脳脊髄液、白血球、間質液、又は組織学的調製物に由来する、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

生物学的サンプルが、血液又は血漿に由来する、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 19】

フッ化物、ヘパリン、又は EDTA を、生物学的サンプルに加える、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 20】

組織が、肝臓、膵臓、リンパ節、脂肪、筋肉、又は脳である、請求項 17 記載の方法。

【請求項 21】

生物学的サンプルが哺乳動物に由来する、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 22】

哺乳動物がヒトである、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

哺乳動物が非ヒト霊長類である、請求項 21 記載の方法。

【請求項 24】

哺乳動物が、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ラバ、又はブタである、請求項 21 記載の方法。

20

【請求項 25】

第 1 抗体又は抗原結合フラグメントが、固体支持体に結合されている、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 26】

固体支持体が EIA / RIA プレートである、請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

第 2 抗体又は抗原結合フラグメントが、検出可能に標識される、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 28】

検出可能な標識が、放射性標識、化学発光標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、電気化学発光 (ECL) 標識、又は酵素である、請求項 27 記載の方法。

30

【請求項 29】

酵素がアルカリホスファターゼである、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

請求項 1 ~ 29 のいずれか一項記載の方法であって、ここで、第 1 抗体が以下：

a . 受託番号 _____ を有し、ATCC に寄託された細胞株により産生された Ig C T F に優先的に結合する単離抗体 (m A b 4 4 4 - 1 D 1 2) ；

b . 受託番号 _____ を有し、ATCC に寄託された細胞株により産生された C T F に優先的に結合する単離抗体 (m A b - 5 1 0 - 6 B 6) ；又は

c . 受託番号 _____ を有し、ATCC に寄託された細胞株により産生された C T F に優先的に結合する単離抗体 (m A b - 5 1 5 - 4 D 6)

40

を含む、方法。

【請求項 31】

I g が I g G、I g A、I g M、I g D、又は I g E である、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 32】

I g が I g G である、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 33】

I g が、I g G、I g M、又は I g A のカップ軽鎖である、請求項 1 ~ 32 のいずれか

50

一項記載の方法。

【請求項 34】

I g が、I g G のガンマ重鎖である、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 35】

I g が抗原結合領域 (F a b) である、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 36】

遊離 C T F が検出されない、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 37】

インスリン抵抗性が、耐糖能障害、前糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、3型糖尿病、若年性糖尿病、妊娠糖尿病、又は非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) と関連する、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 38】

癌が、乳癌、転移性癌、膵臓癌、又は肝細胞癌である、請求項 6、7、又は 8 記載の方法。

【請求項 39】

肝臓疾患が、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H)、又はアルコール性肝炎である、請求項 9、10、又は 11 記載の方法。

【請求項 40】

公知の標準が、正常なインスリン感受性を有するとして同定されている被験者の I g - C T F レベルを含む、請求項 3、4、又は 5 記載の方法。

20

【請求項 41】

公知の標準が、インスリン抵抗性として同定されている被験者の I g - C T F レベルを含む、請求項 3、4、又は 5 記載の方法。

【請求項 42】

公知の標準が、糖尿病として同定されている被験者の I g - C T F レベルを含む、請求項 3、4、又は 5 記載の方法。

【請求項 43】

工程 a に記載する生物学的サンプルが、インスリン抵抗性又は糖尿病のための処置に続いて、被験者から得られる、請求項 3、4、又は 5 記載の方法。

【請求項 44】

より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプルが、インスリン抵抗性又は糖尿病のための処置に続いて、被験者から得られる、請求項 43 記載の方法。

30

【請求項 45】

公知の標準が、癌がないとして同定されている被験者の I g - C T F レベルを含む、請求項 6、7、又は 8 記載の方法。

【請求項 46】

公知の標準が、癌を有するとして同定されている被験者の I g - C T F レベルを含む、請求項 6、7、又は 8 記載の方法。

【請求項 47】

工程 a に記載する生物学的サンプルが、癌のための処置に続いて、被験者から得られる、請求項 6、7、又は 8 記載の方法。

40

【請求項 48】

より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプルが、癌のための処置に続いて、該被験者から得られる、請求項 47 記載の方法。

【請求項 49】

公知の標準が、正常として同定されている被験者の I g - C T F レベルを含む、請求項 9、10、又は 11 記載の方法。

【請求項 50】

公知の標準が、肝臓疾患を有するとして同定されている被験者の I g - C T F レベルを含む、請求項 9、10、又は 11 記載の方法。

50

【請求項 5 1】

工程 a に記載する生物学的サンプルが、肝臓疾患のための処置に続いて、被験者から得られる、請求項 9、10、又は 11 記載の方法。

【請求項 5 2】

より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプルが、肝臓疾患のための処置に続いて、該被験者から得られる、請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 3】

被験者の I g - C T F のレベルが、経時的に、増加、減少、又は安定化しているか否かを決定することをさらに含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 5 4】

生物学的サンプル中の I g - C T F の存在を検出するためのキットであって、以下：
 a . 受託番号_____を有し、A T C C に寄託された細胞株により産生された I g C T F に優先的に結合する第 1 の単離抗体 (m A b 4 4 4 - 1 D 1 2) ；
 受託番号_____を有し、A T C C に寄託された細胞株により産生された C T F に優先的に結合する第 1 の単離抗体 (m A b - 5 1 0 - 6 B 6) ；及び / 又は
 受託番号_____を有し、A T C C に寄託された細胞株により産生された C T F に優先的に結合する第 1 の単離抗体 (m A b - 5 1 5 - 4 D 6) ；
 b . ヒト I g に優先的に結合する第 2 抗体又は抗原結合フラグメント
 c . 同一のためのパッケージングと一緒での、第 1 抗体又は抗原結合フラグメント及び第 2 抗体又は抗原結合フラグメントの使用のための指示
 を含む、キット。

10

20

【請求項 5 5】

I g が I g G である、請求項 5 4 記載のキット。

【請求項 5 6】

第 2 抗体又は抗原結合フラグメントが、検出可能に標識される、請求項 5 4 又は 5 5 記載のキット。

【請求項 5 7】

検出可能な標識が、放射性標識、蛍光標識、化学発光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、電気化学発光 (E C L) 標識、又は酵素である、請求項 5 6 記載のキット。

30

【請求項 5 8】

酵素がアルカリホスファターゼである、請求項 5 7 記載のキット。

【請求項 5 9】

第 1 抗体又は抗原結合フラグメントを含むための容器をさらに含む、請求項 5 4、5 5、5 6、5 7、又は 5 8 記載のキット。

【請求項 6 0】

第 1 抗体又は抗原結合フラグメントが固体支持体に結合されている、請求項 5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、又は 5 9 記載のキット。

【請求項 6 1】

固体支持体が E I A / R I A プレートである、請求項 6 0 記載のキット。

40

【請求項 6 2】

使用されない場合、第 2 抗体又は抗原結合フラグメントを含むための容器をさらに含む、請求項 5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、又は 6 1 記載のキット。

【請求項 6 3】

配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項 6 4】

配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項 6 5】

配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項 6 6】

50

配列番号 52 のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項 67】

配列番号 45 又は配列番号 46 のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号 1 ~ 44 のアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む単離ポリペプチド複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2011年2月11日に出願された米国仮出願第 61 / 445 , 103 号の利益を主張し、それは、本明細書において、参照により、その全体において組み入れられる。以下の出願及び公開も、本明細書において、参照により、それらの全体において組み入れられる：

米国出願第 10 / 572 , 882 号 (米国公開第 2007 / 0053913 号)、それは国際出願第 PCT / EP 2004 / 10383 号の国内段階である；

米国出願第 10 / 572 , 883 号 (米国公開第 2007 / 0037226 号)、それは国際出願第 PCT / EP 2004 / 10384 号の国内段階である；

米国出願第 60 / 748 , 305 号；国際公開第 WO 2007 / 120311 号；

米国出願第 60 / 991328 号；

米国公開第 2011 / 0301089 号；

米国出願第 12 / 169983 号 (米国特許第 8 , 017 , 573 号)；及び

米国出願第 13 / 265 , 968 号 (国際公開第 WO 2010 / 123720 号)。

【0002】

技術分野

本明細書において提供する主題は、一般的に、I g - C T F の検出のための、ならびに糖尿病、癌、及び肝臓疾患の診断、処置、及びモニタリングのための方法、キット、及び薬剤に関する。

【0003】

背景

慢性炎症を伴う肥満は、大きく、増大する集団に影響を与える。この集団は、心臓血管疾患及び糖尿病を発生する高いリスクを有し、高頻度に、インスリン抵抗性に関連するメタボリックシンドロームを発生する。近年、アディポネクチン及び他のアディポカインが、グルコース代謝を制御する脂肪細胞ホルモンとして発見されている。脂肪細胞の型及び位置の両方が重要である。肥満は、血液中にアディポネクチンを分泌する追加の脂肪細胞を産生し、脂肪及びグルコースの筋肉細胞代謝を助ける。一部の過体重患者は、インスリン抵抗性になる。この場合において、脂肪細胞はアディポネクチン産生を停止する。血液中のアディポネクチンレベルは、肥満、インスリン抵抗性、及び2型糖尿病の条件下で減少する。方法が、これら及び他の疾患状態の予後について被験者においてアディポネクチンレベルを測定するために存在する。アディポネクチンレベルの測定は、しかし、疾患の弱い指標であることが証明されている。必要性が、異常な脂肪細胞活性に関連する疾患状態をモニターするより良い方法について存在する。本発明は、この及び他のニーズを提供する。

【0004】

アディポネクチン受容体 1 (A D I P O R 1) は、7 回膜貫通 G タンパク質共役受容体 (G P C R) である。例えば、WO 01 / 012662 及び WO 01 / 090304 を参照のこと。多くの医学的に有意な生物学的プロセスが、G タンパク質を含むシグナル伝達経路により媒介される [Lefkowitz, Nature 351, 353-354 (1991)]。特定の細胞外メッセンジャー (E C M) は、A D I P O R 1 の C 末端からのペプチドフラグメントであり、ヒト血液において診断的価値を有する。それらの有用性は、ポリクローナル抗体を使用し、質量測定 S E L D I - T O F 免疫親和性方法を用いて確認した。それらの発明は、関連出願 WO 2007 / 120 , 311 の対象であって、それは、本明細書において、参照に

より組み入れられる。

【0005】

概要

予想外に、ADIPOR1及びADIPOR2(配列番号1~44)のC末端フラグメント(CTF)が、タンパク質構造の一部として免疫グロブリンガンマ鎖及びカッパ鎖中に共有結合的に組み込まれていることが発見された。加えて、CTF-免疫グロブリンは、患者の血漿、細胞、及び組織中にあり、CTF-免疫グロブリンにおける変化が、患者におけるインスリン抵抗性及び癌と相関することが見出された。したがって、CTF-免疫グロブリンのCTF部分は、細胞インスリン応答を低下させることが見出され、このように、細胞成長の予想される阻害及び血液グルコースレベルを下げるための低下した能力を起す。

10

【0006】

CTF-免疫グロブリンの免疫グロブリン部分は、細胞、組織、及び血液中の抗原に結合することが見出された。抗原の結合は、Ig-CTFに導き、血漿を離れ、細胞及び組織に入り、細胞成長を阻害し、インスリン応答を低下させる。したがって、CTF-免疫グロブリンの免疫グロブリン部分及びその抗原は、CTFが細胞及び組織に入るか否かを方向付けるための方法において有用である。さらに、CTF-免疫グロブリンの免疫グロブリン部分及び結合した抗原を測定し、使用し、CTFの診断的測定を改善することができる。

【0007】

20

本明細書において提供するものは、それを必要とする患者においてインスリン抵抗性を処置する及び/又は細胞成長を阻害する方法であって、以下の工程を含む：前記患者に、タンパク質構造の一部として免疫グロブリンに共有結合的に組み込まれたCTFペプチド又はその医薬的に許容可能な塩の効果的な量を投与すること；それにおいて、ペプチドは、配列番号1~44と少なくとも75%の同一性を有し、それにおいて、配列番号45及び46と少なくとも75%の同一性のガンマ及びカッパ免疫グロブリン鎖に共有結合的に付着されている。

【0008】

また、提供するものは、それを必要とする患者においてインスリン抵抗性を処置する及び細胞成長の阻害の方法であって、以下の工程を含む：前記患者に、CTFに結合する免疫グロブリンの効果的な量を投与すること、それにおいて、免疫グロブリンは、配列番号1~44と少なくとも75%の同一性を有するペプチドに結合する。

30

【0009】

また、提供するものは、それを必要とする患者においてインスリン抵抗性を処置する方法及び細胞成長を阻害する方法であって、以下の工程を含む：前記患者に、CTF免疫グロブリン中のガンマ鎖又はカッパ鎖と少なくとも75%の同一性を有する免疫グロブリンの効果的な量を投与すること。

【0010】

本明細書においてさらに開示されるのは、それを必要とする患者においてインスリン抵抗性を処置する方法及び細胞成長を阻害する方法であって、以下の工程を含む：前記患者に、CTF免疫グロブリンの免疫グロブリン部分に結合することが示されている、ペプチド抗原又はその医薬的に許容可能な塩の効果的な量を投与すること。

40

【0011】

それを必要とする患者においてインスリン抵抗性及び/又は異常な細胞成長を、患者の生物学的サンプル中のCTFペプチド及び免疫グロブリン部分を測定することにより診断する方法(それにおいて、前記CTFペプチドが、配列番号1~44のアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有し、それにおいて、免疫グロブリン部分が、配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列を含むガンマ又はカッパ免疫グロブリン鎖と少なくとも75%の同一性を有する)をさらに提供する。

【0012】

50

さらに提供するものは、それを必要とする患者においてインスリン抵抗性及び／又は異常な細胞成長を、患者の生物学的サンプル中のCTF免疫グロブリンの免疫グロブリン部分を測定することにより、診断する方法（それにおいて、免疫グロブリン部分が、配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列を含むガンマ又はカッパ免疫グロブリン鎖と少なくともとも75%の同一性を有する）である。

【0013】

また、提供するものは、それを必要とする患者においてインスリン抵抗性及び／又は異常な細胞成長を、患者の生物学的サンプル中のCTF免疫グロブリンの免疫グロブリン部分に結合することが示されているペプチド抗原を測定することにより、診断する方法（それにおいて、免疫グロブリン部分が、配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列を含むガンマ重鎖又はカッパ軽鎖と少なくともとも75%の同一性を有する）である。

10

【0014】

一部の実施態様において、提供するものは、生物学的サンプル中の第1種のIg-CTFを検出する方法であって、生物学的サンプルを、第1種のIg-CTF又は抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露し、それにより、混合物を形成すること、混合物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること、及び前記生物学的サンプル中のIg-CTFを検出することを含む。

【0015】

また、提供するものは、第1種の被験者においてインスリン抵抗性を診断するための方法であって、この方法が、被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種のIg-CTF又は抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露し、それにより、混合物を形成すること、混合物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること、前記サンプル中に存在するIg-CTFの量を定量化すること、サンプル中に存在するIg-CTFの量を、公知の標準と比較すること、及び、サンプル中のIg-CTFの量が、インスリン抵抗性と関連するIg-CTFのレベル内に入るか否かを決定することを含む。

20

【0016】

また、提供するものは、第1種の被験者において癌を診断するための方法であって、前記方法が、被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種のIg-CTF又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露し、混合物を形成すること、混合物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること、前記サンプル中に存在するIg-CTFの量を定量化すること、サンプル中に存在するIg-CTFの量を、公知の標準と比較すること、及び、サンプル中のIg-CTFの量が、癌と関連するIg-CTFのレベル内に入るか否かを決定することを含む。

30

【0017】

第1種の被験者においてインスリン抵抗性を処置するための方法を提供し、この方法は、被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種のIg-CTF又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露し、それにより、混合物を形成すること、混合物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること、サンプル中に存在するIg-CTFの量を定量化すること、サンプル中に存在するIg-CTFの量を、公知の標準と比較すること、サンプル中のIg-CTFの量が、インスリン抵抗性と関連するIg-CTFのレベル内に入るか否かを決定すること、及び、被験者に、インスリン抵抗性のための処置を施す、又は処方することを含む。

40

【0018】

また、提供するものは、第1種の被験者において癌を処置する方法であって、前記方法が、被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種のIg-CTF又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露し、それにより、混合物を形成するこ

50

と、前記混合物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること、前記サンプル中に存在するIg - CTFの量を定量化すること、サンプル中に存在するIg - CTFの量を、公知の標準と比較すること、サンプル中のIg - CTFの量が、癌に関連するIg - CTFのレベル内に入るか否かを決定すること、及び、被験者に、癌のための処置を施す、又は処方することを含む。

【0019】

さらに、本明細書において提供するものは、生物学的サンプル中のIg - CTFの存在を検出するためのキットであって、このキットは、受託番号_____を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたIg CTFに優先的に結合する第1の単離抗体(mAb 444 - 1D12、受託番号_____を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する第1の単離抗体(mAb - 510 - 6B6)、及び/又は受託番号_____を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する第1の単離抗体(mAb - 515 - 4D6)、ヒトIgに優先的に結合する第2抗体又は抗原結合フラグメント、及び、同のためのパッケージングと一緒に、第1抗体又は抗原結合フラグメント及び第2抗体又は抗原結合フラグメントの使用のための指示を含む。

10

【0020】

また、開示されるのは、第1種の被験者においてインスリン抵抗性をモニタリングする方法であって、前記方法は、前記被験者から得られた生物学的サンプルを、第1種のIg - CTF又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露し、それにより、混合物を形成すること、前記混合物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露させること、前記サンプル中に存在するIg - CTFの量を定量化すること、サンプル中に存在するIg - CTFの量を、i . 公知の標準又はi i . より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプル中に存在するIg - CTFの量のいずれかと比較すること、及び、被験者のIg - CTFのレベルが、インスリン抵抗性の進行、退行、又は安定化を示しているか否かを決定することを含む。

20

【0021】

一部の実施態様において、提供するものは、第1種の被験者において癌をモニターする方法であって、前記方法は、前記被験者から得られた生物学的サンプルを、第1種のIg - CTF又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露させ、それにより、混合物を形成すること、前記混合物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること、前記サンプル中に存在するIg - CTFの量を定量化すること、サンプル中に存在するIg - CTFの量を、i . 公知の標準又はi i . より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプル中に存在するIg - CTFの量のいずれかと比較すること、及び、被験者のIg - CTFのレベルが、インスリン抵抗性の進行、退行、又は安定化を示しているか否かを決定することを含む。

30

【0022】

さらに、本明細書において提供するものは、第1種の被験者においてIg - CTFのレベルをモニターする方法であって、前記方法は、被験者から得られた生物学的サンプルを、第1種のIg - CTF又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露すること、混合物を形成すること、前記混合物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること、サンプル中に存在するIg - CTFの量を定量化すること、サンプル中に存在するIg - CTFの量を、i . 公知の標準又はi i . より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプル中に存在するIg - CTFの量のいずれかと比較することを含む。

40

【0023】

第1種の被験者において肝臓疾患を診断するための方法も開示し、前記方法は、被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種のIg - CTF又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露し、それにより、混合物を形成すること、混合

50

物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること、サンプル中に存在するIg - CTFの量を定量化すること、サンプル中に存在するIg - CTFの量を、公知の標準と比較すること、及び、サンプル中のIg - CTFの量が、肝臓疾患と関連するIg - CTFのレベル内に入るか否かを決定することを含む。

【0024】

一部の実施態様において、第1種の被験者において肝臓疾患を処置する方法を提供し、前記方法は、被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種のIg - CTF又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露し、それにより、混合物を形成すること、混合物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること、サンプル中に存在するIg - CTFの量を定量化すること、サンプル中に存在するIg - CTFの量を、公知の標準と比較すること、サンプル中のIg - CTFの量が、肝臓疾患と関連するIg - CTFのレベル内に入るか否かを決定すること、及び、被験者に、肝臓疾患のための処置を施す、又は処方することを含む。

10

【0025】

また、第1種の被験者において肝臓疾患をモニターする方法を提供し、前記方法は、被験者から得られた生物学的サンプルを、第1種のIg - CTF又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露し、混合物を形成すること、前記混合物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露すること、前記サンプル中に存在するIg - CTFの量を定量化すること、サンプル中に存在するIg - CTFの量を、i . 公知の標準又はi i . より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプル中に存在するIg - CTFの量のいずれかと比較すること、及び、被験者のIg - CTFのレベルが、被験者における肝臓疾患の進行、退行、又は安定化を示しているか否かを決定することを含む。

20

【0026】

別の局面において、提供するものは、配列番号49（受託番号_____を有する、2012年2月21日にATCCに寄託された抗体mAb 461 - 4H11を作る細胞株を作るために使用された抗原）、配列番号50（受託番号_____を有する、2012年2月21日にATCCに寄託された抗体mAb 444 - 1D12を作る細胞株を作るために使用された抗原）、配列番号51（受託番号_____を有する、2012年2月21日にATCCに寄託された抗体mAb 515 - 4D6を作る細胞株を作るために使用された抗原）、及び配列番号52（受託番号_____を有する、2012年2月21日にATCCに寄託された抗体mAb 510 - 6B6を作る細胞株を作るために使用された抗原）のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドである。また、提供するものは、配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列にあるいはそれらのフラグメントに共有結合的に付着した、配列番号1 ~ 44のアミノ酸配列のいずれか1つを含む単離ポリペプチド複合体である。

30

【0027】

さらに、生物学的サンプル中のIg - CTFを検出するための方法を提供し、前記方法は、第1種の被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種のIg - CTF又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露させること、混合物を形成すること、混合物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露させること、及び、サンプル中に存在するIg - CTFを検出することを含む。

40

【0028】

一部の実施態様において、第1種、第2種、及び第3種は同じ種ではない。一部の実施態様において、Ig - CTFは、Igに共有結合的に付着したAdipoR1のC末端フラグメントを含む。一部の実施態様において、AdipoR1のC末端フラグメントは、配列番号1 ~ 22のアミノ酸配列のいずれか1つを含む。一部の実施態様において、Ig - CTFは、Igに共有結合的に付着したAdipoR2のC末端フラグメントを含む。他の適した実施態様において、AdipoR2のC末端フラグメントは、配列番号23 ~

50

44のアミノ酸配列のいずれか1つを含む。一部の実施態様において、Ig-CTFは、Igに共有結合的に付着したAdipoR1のC末端フラグメント及びIgに共有結合的に付着したAdipoR2のC末端フラグメントを含む。一部の実施態様において、被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種のIg-CTF又はその抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露する工程は、生物学的サンプルを、第1種のIg-CTF又は抗原結合フラグメントに優先的に結合する1を上回るそのような第2種の第1抗体に曝露することを包含する。

【0029】

一部の実施態様において、生物学的サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に関連しない細胞、組織、外科的に切除された腫瘍組織、生検、細針吸引サンプル、脳脊髄液、白血球、間質液、又は組織学的調製物に由来する又はそれらから得られる。好ましい実施態様において、生物学的サンプルは、血液又は血漿に由来する。フッ化物、ヘパリン、又はEDTAを、生物学的サンプルに加えることができる。組織は、肝臓、膵臓、リンパ節、脂肪、筋肉、又は脳でありうる。

10

【0030】

生物学的サンプルは、哺乳動物に由来しうる。その哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類でありうる。あるいは、哺乳動物は、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ラバ、又はブタでありうる。

【0031】

一部の実施態様において、第1抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に結合している。その固体支持体は、酵素免疫アッセイ(EIA)又はラジオ免疫アッセイ(RIA)プレートでありうる。

20

【0032】

一部の実施態様において、第2抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能に標識される。例えば、検出可能な標識は、放射性標識、化学発光標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、電気化学発光(ECL)標識、又は酵素(例、アルカリホスファターゼ)を含む。

【0033】

適した実施態様において、第1抗体は以下を含む：受託番号_____を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたIgCTFに優先的に結合する単離抗体(mAb 444-1D12)、受託番号_____を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体(mAb-510-6B6)、又は、受託番号_____を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体(mAb-515-4D6)。一部の実施態様において、第1抗体はこれらの抗体の2つ又はそれ以上を含む。

30

【0034】

一部の実施態様において、免疫グロブリン(「Ig」)は、IgG、IgA、IgM、IgD、又はIgEである。好ましい実施態様において、IgはIgGである。他の実施態様において、Igは、IgG、IgM、又はIgAのカッパ軽鎖であり、あるいは、IgはIgGのガンマ重鎖である。別の実施態様において、Igは抗原結合領域(Fab)である。一部の実施態様において、混合物を、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露する工程は、混合物を、第1種のIgに優先的に結合する、1を上回るそのような第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露することを包含する。他の実施態様において、第1種のIgに優先的に結合する、1を上回るそのような第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントは、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE、IgG、IgM、又はIgAのカッパ軽鎖、IgGのガンマ重鎖、抗原結合領域(Fab)、又はそれらの任意の組み合わせに結合することができる。

40

【0035】

一部の好ましい実施態様において、遊離CTFは検出されない。

【0036】

50

一部の実施態様において、インスリン抵抗性は、耐糖能障害、前糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、3型糖尿病、若年性糖尿病、妊娠糖尿病、又は非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）と関連する。

【0037】

一部の実施態様において、癌は、乳癌、転移性癌、膵臓癌、又は肝細胞癌である。

【0038】

一部の実施態様において、肝臓疾患は、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、又はアルコール性肝炎である。

【0039】

添付の図面は、非限定的であり、本明細書に記載する実施態様のさらなる理解を提供するために含まれ、本明細書において組み込まれ、その一部を構成する。

10

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】図1は、アディポネクチン受容体応答に対するアディポネクチンの提案された機構を例示する。正常な患者において、アディポネクチンは、AMPK MAPK p38及びPPARのアディポネクチン受容体シグナル伝達経路を活性化し、筋肉において解糖及び脂肪酸酸化を起こし、肝臓においてグルコース産生を遅らせる。アディポネクチンは、アディポネクチンのC末端フラグメントに直接的に結合しない、又は、CTFの放出を活性化しない。代わりに、アディポネクチンは、C末端フラグメントの放出を遮断する。これは、細胞をインスリンに感作させる。なぜなら、CTFは、肝臓においてインスリン分解酵素（IDE）を阻害するために放出されないからである。これは、IDEが細胞間インスリンを分解することを許し、それは、より強いインスリン受容体応答を維持する。

20

【図2】図2は、Ig-CTF自己免疫の提案された病理を例示する。異常な患者において、腫瘍壊死因子変換酵素（TACE）は、アディポネクチンが遮断するアディポネクチン受容体からCTFを切断する。この切断は、アディポネクチン受容体を囲む領域に引き付けられた免疫グロブリンへのCTFの共有結合的な連結を可能にする。免疫グロブリンは、細胞上にある又は自由に循環するのいずれかである。一度、共有結合的に連結されると、Ig-CTFは組織中に吸収される。この吸収は、CTFの細胞間濃度を増加させる。これは、細胞をインスリンに脱感作させる。なぜなら、CTFは、肝臓においてインスリン分解酵素（IDE）を阻害するからである。これは、IDEが細胞間インスリンを分解することを防止し、それは、より弱いインスリン受容体応答を起こす。

30

【図3a】図3に、CTFが免疫グロブリンに結合していることを示す。図3aは、3人の正常なヒト患者、3人の糖尿病患者、及び3人の耐糖能障害患者からの血漿についての変性ウエスタンプロットの結果を示す。CTF抗体は、共有結合的に結合した免疫グロブリンを表す種々の分子量のバンドを検出する。塩基条件を用いて処理した同じサンプルについてのウエスタンプロットを、図3bに示す。CTFバンドは、もはや明らかでない、恐らくは、なぜなら、結合が破壊されていたからである。これらの同じサンプルを、図3cにおいて、抗IgG抗体を用いてテストし、免疫グロブリンが残っていることを示す。

【図3b】図3に、CTFが免疫グロブリンに結合していることを示す。図3aは、3人の正常なヒト患者、3人の糖尿病患者、及び3人の耐糖能障害患者からの血漿についての変性ウエスタンプロットの結果を示す。CTF抗体は、共有結合的に結合した免疫グロブリンを表す種々の分子量のバンドを検出する。塩基条件を用いて処理した同じサンプルについてのウエスタンプロットを、図3bに示す。CTFバンドは、もはや明らかでない、恐らくは、なぜなら、結合が破壊されていたからである。これらの同じサンプルを、図3cにおいて、抗IgG抗体を用いてテストし、免疫グロブリンが残っていることを示す。

40

【図3c】図3に、CTFが免疫グロブリンに結合していることを示す。図3aは、3人の正常なヒト患者、3人の糖尿病患者、及び3人の耐糖能障害患者からの血漿についての変性ウエスタンプロットの結果を示す。CTF抗体は、共有結合的に結合した免疫グロブリンを表す種々の分子量のバンドを検出する。塩基条件を用いて処理した同じサンプルに

50

ついでウエスタンブロットを、図3bに示す。CTFバンドは、もはや明らかでない、恐らくは、なぜなら、結合が破壊されていたからである。これらの同じサンプルを、図3cにおいて、抗IgG抗体を用いてテストし、免疫グロブリンが残っていることを示す。【図4】図4は、CTFへの抗体を産生するウサギにおける肝臓、脳、及び脾臓中へのIgG-CTF及びCTFの増加吸収の例画像を示す。

【0041】

例示的な実施態様の詳細な説明

本明細書に引用する特許、特許出願、刊行物、及び参考文献の各々が、参照により、その全体において組み入れられる。

【0042】

上記及び本開示を通して用いる通り、以下の用語は、他に示さない限り、以下の意味を有すると理解するものとする。

【0043】

本明細書において使用する通り、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明らかに他を示さない限り、複数の参照を含む。

【0044】

本明細書において使用する通り、用語「約」は、測定可能な値（例えば量、時間的な持続期間など）を指す場合、特定の値からの±20%、好ましくは±10%、より好ましくは±5%、さらにより好ましくは±1%、及び、さらにより好ましくは±0.1%の変動を包含することを意味する。なぜなら、そのような変動は、開示する方法及び組成物を実施するために適切であるからである。

【0045】

本明細書において使用する通り、CTFは、表1に示すアミノ酸配列ならびにそれと少なくとも75%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、及び、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。

【0046】

10

20

【表 1】

表 1.

配列 番号	命名	アミノ酸配列
1	AdipoR1 の フラグメント 1	VLVVAAAFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
2	AdipoR1 の フラグメント 2	LVVAAAFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
3	AdipoR1 の フラグメント 3	SNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
4	AdipoR1 の フラグメント 4	VVAAAFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
5	AdipoR1 の フラグメント 5	VAAAFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
6	AdipoR1 の フラグメント 6	AAAFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
7	AdipoR1 の フラグメント 7	AAFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
8	AdipoR1 の フラグメント 8	AFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
9	AdipoR1 の フラグメント 9	FVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
10	AdipoR1 の フラグメント 10	VHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
11	AdipoR1 の フラグメント 11	HFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
12	AdipoR1 の フラグメント 12	FYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
13	AdipoR1 の フラグメント 13	YGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
14	AdipoR1 の フラグメント 14	GVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL

10

20

30

40

15	AdipoR1 の フラグメント 15	VSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
16	AdipoR1 の フラグメント 16	NLQEFRYGLEGGCTDDTLL
17	AdipoR1 の フラグメント 17	LQEFRYGLEGGCTDDTLL
18	AdipoR1 の フラグメント 18	QEFRYGLEGGCTDDTLL
19	AdipoR1 の フラグメント 19	EFRYGLEGGCTDDTLL
20	AdipoR1 の フラグメント 20	FRYGLEGGCTDDTLL
21	AdipoR1 の フラグメント 21	RYGLEGGCTDDTLL
22	AdipoR1 の フラグメント 22	YGLEGGCTDDTLL
23	AdipoR2 の フラグメント 1	IFVVAGAFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
24	AdipoR2 の フラグメント 2	VAGAFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
25	AdipoR2 の フラグメント 3	SNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
26	AdipoR2 の フラグメント 4	FVVAGAFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
27	AdipoR2 の フラグメント 5	VVAGAFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
28	AdipoR2 の フラグメント 6	AGAFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
29	AdipoR2 の フラグメント 7	GAFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
30	AdipoR2 の フラグメント 8	AFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL

10

20

30

40

31	AdipoR2 の フラグメント 9	FVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL	
32	AdipoR2 の フラグメント 10	VHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL	
33	AdipoR2 の フラグメント 11	HFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL	
34	AdipoR2 の フラグメント 12	FHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL	10
35	AdipoR2 の フラグメント 13	HGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL	
36	AdipoR2 の フラグメント 14	GVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL	
37	AdipoR2 の フラグメント 15	VSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL	20
38	AdipoR2 の フラグメント 16	NLQEFRFMIGGGCSEEDAL	
39	AdipoR2 の フラグメント 17	LQEFRFMIGGGCSEEDAL	
40	AdipoR2 の フラグメント 18	QEFRFMIGGGCSEEDAL	30
41	AdipoR2 の フラグメント 19	EFRFMIGGGCSEEDAL	
42	AdipoR2 の フラグメント 20	FRFMIGGGCSEEDAL	
43	AdipoR2 の フラグメント 21	RFMIGGGCSEEDAL	
44	AdipoR2 の フラグメント 22	FMIGGGCSEEDAL	40

【 0 0 4 7 】

本明細書において使用する通り、「免疫グロブリンガンマ重鎖」又は「免疫グロブリンガンマ軽鎖」は、表 2 に示すそれぞれのアミノ酸配列ならびにそれと少なくとも 75%、好ましくは少なくとも 85%、より好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95%の同一性、及び、さらにより好ましくは少なくとも 98%又は 99%の同一性を有する配列を含む。

【 0 0 4 8 】

【表 2】

表 2.

配列 番号	免疫グロブリン鎖	
45	ガンマ重	MEFGLSWVFL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CVASGFTFSS YPMTWVRQAP GKGLEWVASI SYDGSYKYKV DSMKGRLTIS RDNSKNTLYL EMNSLTAEDT AVYYCARTAF FNAYDFWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS VGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
46	カッパ軽	MRLPAQLLGL LMLWVPGSSG DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSDGNTYLNW FQQRPGQSPR RLIYRVSNRD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGL YYCMQHTHWS PITFGQGTRL EIKR

10

20

30

【 0 0 4 9 】

本明細書において使用する通り、用語「免疫グロブリン」又は「I g」は、I g G、I g A、I g M、I g D、及びI g Eクラスならびに抗原結合領域（F a b）を含むそれらのフラグメント、免疫グロブリンカッパ軽鎖、又は免疫グロブリンガンマ重鎖（例えば、配列番号 4 5 又は 4 6 を含む免疫グロブリン鎖など）を含む、抗原に向けられた抗体を指す。さらに、用語「免疫グロブリン」は、それが天然又は改変免疫グロブリン（例えばヒト化抗体、キメラ抗体、二官能性抗体、又は相同配列に基づき調製された組換え抗体など）を問わず、アディポネクチン受容体を発現する全ての種からの免疫グロブリンを含む。

40

【 0 0 5 0 】

本明細書において使用する通り、「付着した」は、化学結合による共有結合的な付着を意味する。I g - C T F の参照において使用される場合、「付着した」は、配列番号 1 ~ 4 4 のアミノ酸配列を含む C T F 及び免疫グロブリンの間の共有結合的な化学結合を指す。

50

【 0 0 5 1 】

例えば、I g - C T Fの参照において使用される場合、「付着した」は、エステル又はアミドを形成するC T Fと、配列番号45又は46中の残基との付着を含む。機構に拘束されないが、共有結合的な付着が、活性化した内部チオエステルが、C T Fにおいて、ペプチド配列（配列番号1～44）中のシステイン及びグルタミンの間で形成された後、生じると考えられる。この活性化チオエステルは、免疫グロブリンがチオエステルの近くにもたらされる場合、免疫グロブリンとの結合を形成することができる。この提案された付着の機構は、抗原への補体C3bの付着プロセスと同様であると考えられ、それは、以下に示す通り、内部チオエステルを通じて生じる：Sim R. B. and Twose TM, R. C. The covalent-binding reaction of complement component C3 Biochem J 193; 115-27 (1981) ; Lutz H. U. and Stammler P. Preferential formation of C3b-IgG Complexes in vitro and in vivo from nascent C3b and naturally occurring anti-band 3 antibodies J Bio Chem 268, 17418-426, 1993 ; 及びSuhn A and Pangburn MK. Covalent Attachment of Human Complement C3 to IgG J Bio Chem 269, 28997-29002, 1994.

10

【 0 0 5 2 】

介してさらに「付着した」は、機構を介してを意味し、それにより、C T Fは、ペプチドR1 C T F配列（配列番号47）G l u - G l y - G l y - C y s - T h r - A s p - A s p - T h r - L e u - L e u中のシステイン及びグルタミン酸の間の内部チオエステルとして活性化される。配列番号47のアミノ酸配列が、C T F A d i p o R 1配列の多く（例えば配列番号1～22中など）において生じる。R2 C T F配列（配列番号48）において、アミノ酸配列はG l y - G l y - G l y - C y s - S e r - G l u - G l u - A s p - A l a - L e uである。配列番号48のアミノ酸配列が、C T F A d i p o R 2配列の多く（例えば配列番号23～44中など）において生じる。

20

【 0 0 5 3 】

さらに「付着した」は、I g - C T Fの参照において使用される場合、エステル結合を通じたC T Fと免疫グロブリン中（例えば、配列番号45又は46中）のチロシンとの付着を含む。

【 0 0 5 4 】

さらに「付着した」は、I g - C T Fの参照において使用される場合、エステル結合を通じたC T Fと免疫グロブリン中のC3b補体結合位置中（例えば、配列番号45又は46、例えば配列番号45の位置144など）のチロシンとの付着を含む。

30

【 0 0 5 5 】

さらに「付着した」は、I g - C T Fの参照において使用される場合、エステル結合を通じたC T Fと抗原結合領域（F a b）中の免疫グロブリン（例えば、配列番号45又は46）との付着を含む。

【 0 0 5 6 】

さらに「付着した」は、I g - C T Fの参照において使用される場合、エステル結合を通じたC T Fと抗原結合領域（F a b）中の免疫グロブリン（例えば、配列番号45又は46）との付着を含む。

【 0 0 5 7 】

さらに「付着した」は、2つのペプチド又はタンパク質を結合する他の手段を意味する。一部の一般に使用される架橋試薬は、以下を含む：ペプチド分子を別のペプチドのN末端に連結するグルタルアルデヒド；ペプチドを別のペプチドのC末端に付着するカルボジイミド（E D C）；遊離アミノ基及びC y s残基を結合するスクシンイミドエステル（例、M B S、S M C C）；T y r残基に連結するベンジジン（B D B）；炭水化物基をペプチド及びイソチオシアネート、トリアゾールに付着する過ヨウ素酸、ならびに、他の適した方法が、一般的に、例えば、以下：

40

L. A. Carpino "1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive," J. Am. Chem. Soc. 115 (10): 4397-4398 (1993) ;

C. Niemeyer, Bio conjugation Protocols: Strategies and Methods Humana Press, 2

50

004, 344 pp., hard cover ;

O'Sullivan, M. J., and Marks, V., *Meth. Enzymol.*, 73, 147-166 (1981).

Harlow, E., and Lane, D.,

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY: 1988) Chapter 9, p.349

に記載されている。

【 0 0 5 8 】

さらに「付着した」は、リンカーアーム、例えば6炭素直鎖など、例えばホモ二官能性リンカーであるBS-3又はヘテロ二官能性リンカーであるMSHなどの手段によるを含む。それらの両方が、ヘキサメチレン、-CH₆-、ペプチドと担体タンパク質の間に7.5オングストロームのスペースを形成する基を含む。それらのリンカーの利点は、7.5オングストロームスペーサーの距離が、任意のスペーサーを有さないグルタルアルデヒドを使用した従来の方法と比較し、共役ペプチドが、担体タンパク質の表面から突き出すことを可能にするということである。ペプチドは、従って、よりアクセス可能であり、抗原性である。ペプチドと担体タンパク質の間の共有結合的な結合は、非常に安定であり、通常の免疫化手順の間での剥離の可能性を低くする。

【 0 0 5 9 】

さらに「付着した」は、配列のNもしくはC末端又は中央にありうる共役部位の手段によるを含む。共役の点は、スルフヒドリル(SH)基又はアミノ基(NH₂)でありうる。ホモ二官能性リンカーは、両側上のLysを通じてペプチド及びタンパク質を連結することである。ヘテロ二官能性リンカーは、Cysを通じてペプチドを及びLys又はN末端を通じてタンパク質を連結することである。

【 0 0 6 0 】

他の手段による、さらに「付着した」は、配列番号1~44のいずれか1つのCTFと天然CTF免疫グロブリンタンパク質と似たCTF配列番号45~46における残基の間に「コンジュゲート」を産生するカップリング反応、このように、因子(例えばタンパク質内の残基配列の位置など)は、担体が連結されるはずの場所を決定しうる。また、免疫原の組成を考えなければならない。なぜなら、異なる技術は、特定の化学を要求するからである。一般のカップリング方法では、遊離アミノ酸、カルボン酸、又はスルフヒドリル基を介して、担体を抗原に連結する。

【 0 0 6 1 】

本明細書において使用する通り、「パーセント同一性」は、参照ポリペプチド配列とマッチし、比較ウィンドウにわたり、2つの最適に整列させた配列を比較することにより決定することができるポリペプチド配列の割合を指し、それにおいて、比較ウィンドウ中のポリペプチド配列は、2つの配列の最適なアラインメントについて参照配列(それは、付加又は欠失を含まない)と比較される通り、付加、欠失(即ち、ギャップ)、誘導体化、及び/又は保存的アミノ酸置換を含むことができる。パーセンテージは、同一のアミノ酸残基が両方の配列において生じる位置の数を決定し、マッチする位置の数をもたらし、マッチする位置の数を、比較のウィンドウ中の位置の総数により割り、結果を100により乗じ、配列同一性のパーセンテージをもたらしことにより算出する。同一性を、当技術分野において公知の種々の配列比較アルゴリズム及びプログラムのいずれかを使用して評価する。そのようなアルゴリズム及びプログラムは、TBFASTN、BLASTP、FASTA、TFASTA、CLUSTALW、FASTDBを含むが、しかし、それらに決して限定されず、それらの全開示が、本明細書において参照により組み入れられる。また、Pearson, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 2444-2448, 1988; Atlschul, et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403410, 1990; Thompson, et al., *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680, 1994; Higgins, et al., *Meth. Enzymol.*, 266: 383402, 1996; Altschul, et al., *Nature Genetics*, 3: 266-272, 1993; Brutlag, et al., *Comp. App. Biosci.*, 6: 237-44, 1990を参照のこと。

【 0 0 6 2 】

10

20

30

40

50

本明細書において使用する通り、「誘導体化」は、技術、例えばユビキチン化、標識、ペグ化（即ち、ポリエチレングリコールを用いた誘導体化）、及び化学的挿入又はアミノ酸（例えばオルニチンなど）の置換（それらは、ヒトタンパク質において通常は生じない）などにより化学的に修飾するプロセスを指す。

【0063】

本明細書において使用する通り、「保存的アミノ酸置換」は、1つのアミノ酸の、同様の構造を有する及び/又は化学的特性を有する別のアミノ酸との置換（例えばロイシンとイソロイシン又はバリン、アスパラギン酸とグルタミン酸、又はトレオニンとセリンの置換など）を指す。

【0064】

本明細書において使用する通り、「ポリペプチド」、「ペプチド」、「鎖」、及び「タンパク質フラグメント」は、本明細書において互換的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。用語は、1つ又は複数のアミノ酸残基が、対応する自然発生のアミノ酸の化学的模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに自然発生のアミノ酸ポリマー及び非自然発生のアミノ酸ポリマーを含む。

【0065】

本明細書において使用する通り、「CTF免疫グロブリン」又は「Ig-CTF」は、免疫グロブリン（例、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE）、免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖、又は免疫グロブリンフラグメント（例、Fab）に付着したCTFペプチドを指す。例えば、CTFは、免疫グロブリンに、配列番号45と少なくとも75%の同一性を伴うガンマ重鎖又は配列番号46と少なくとも75%の同一性を伴うカッパ軽鎖上で付着しうる。CTFは、配列番号1～44のいずれか1つと少なくとも75%の同一性を有する。特定の例において、方法、組成物、及びキットにおいて有用なCTF及び免疫グロブリンは、本明細書において記載する通りの正確な配列を有さないが、しかし、保存的アミノ酸置換及び/又は誘導体化を伴う変異体形態として存在する。例えば、一部の実施態様において、CTFは、機能の喪失を有することなく、そのアミノ酸の少なくとも5%、少なくとも10%、又はさらに少なくとも25%において置換することができる。したがって、配列番号1から配列番号46のペプチド中のアミノ酸の少なくとも一部を、他のアミノ酸を用いて置換することができる。特定の実施態様において、Ig-CTFは以下を指す：配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号1のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド複合体；配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号2のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド複合体；配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号3のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド複合体；配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号4のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド複合体；配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号5のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド複合体；配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号6のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド複合体；配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号7のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド複合体；配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号8のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド複合体；配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号9のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド複合体；配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号10のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド複合体；配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号11のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド複合体；配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号12のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド複合体；配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号13のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド複合体；配列番号45又は配列番号46のアミノ酸配列に共有結合的に付着された配列番号14のアミノ酸配列を含む単離ポ

10

20

30

40

50

学的に単離されうる。例えば、抗体産生細胞を、培養中で継続的に成長させ、ハイブリドーマを形成する細胞と融合させる。単一のハイブリドーマが、1つの抗体だけを産生する。単一のハイブリドーマは分裂し、「クローン」の大集団を産生し、全てが同じ「モノクローナル」抗体を作る。生きたハイブリドーマを、液体窒素中に、無期限に凍結することができる。遊離CTFとして又はIg-CTFのCTF部分としてCTFに優先的に結合する好ましい抗体を提供する。特定の実施態様において、提供するのは、配列番号49(461-4H11を作るために使用される抗原)のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド；配列番号50(444-1D12を作るために使用される抗原)のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド；配列番号51(515-4D6を作るために使用される抗原)のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド；又は配列番号52(510-6B6を作るために使用される抗原)のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドに優先的に結合する抗体である。

10

【0067】

本明細書において使用する通り、「CTF免疫グロブリンの抗原」は、CTF免疫グロブリンにより認識される又はそれに結合している分子、物質、タンパク質、又はペプチドとして定義され、CTF免疫グロブリンを産生する細胞、動物、及びヒトから生物学的に単離される。さらに、この「CTF免疫グロブリンの抗原」は、CTF免疫グロブリンを産生する全ての種により作られうるが、細胞上、組織中、又は液体(例えば尿、血液、脳脊髄液(CSF)、又は間質液など)中に浮遊する抗原でありうる。

【0068】

「CTF」及び「CTF免疫グロブリンへの抗原」を生物学的材料から単離してもよく、又は組換え的に、もしくは、好ましくは、ペプチドとして、液相もしくは固相中での合成の合成的な従来方法により、マニュアル技術又は自動化技術を使用して、調製してもよい。適した方法が、一般的に、例えば、以下において記載されている：Atherton, E. and Sheppard, R.C., *Solid Phase peptide synthesis: a practical approach*. Oxford, England: IRL Press (1989)；Stewart, J. M. and Young, J. D., *Solid phase peptide synthesis*, 2nd edition, Rockford: Pierce Chemical Company, 91 (1984)；R. B. Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide," *J. Am. Chem. Soc.* 85 (14): 2149-2154 (1963)；及びL. A. Carpino "1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. 効率的なペプチドカップリング添加剤," *J. Am. Chem. Soc.* 115 (10): 4397-4398 (1993)。それは、本明細書において参照により組み入れられる。加えて、ペプチドのアミノ酸配列の任意の部分を、直接合成の間に変える及び/又は配列を用いた、もしくは他のタンパク質を用いた化学的方法を使用して組み合わせ、変異体ペプチドを産生することができる。

20

30

【0069】

本明細書において使用する通り、「優先的に結合する」は、抗体が標的に結合するが、しかし、また、限定された数の他の分子に結合しうることを意味する。「優先的な結合」は、抗体、又は抗体フラグメントの文脈において使用される場合、免疫グロブリン遺伝子又は免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによりコードされるドメインを介した、目的のタンパク質の1つ又は複数のエピトープへの結合を表し、分子の混合集団を含むサンプル中の他の分子への結合を支持することを伴わない。

40

【0070】

好ましくは、ペプチドは、従来固相ペプチド合成方法論により調製される。Fmoc化学に基づく標準的な合成プロトコールを使用してもよい。合成後、粗ペプチドを固体支持体から切断し、側鎖保護基を除去する。粗ペプチドを、例えば、調製用の高速液体クロマトグラフィー(例えばC18逆相HPLCなど)により精製することができる。精製ペプチドを、さらに、HPLCにより脱塩し、乾燥形態に凍結乾燥することができる。好ましくは、ペプチドを、密封容器中で、窒素下で保存する。

【0071】

配列番号1~46のペプチドの全ての形態(遊離酸、遊離塩基、双性イオン形態、同形の結晶形態、全てのキラル形態、エナンチオマー形態、ラセミ形態、水和物、溶媒和物、

50

塩、及び酸塩水和物を含む)が、本明細書において記載する対象物の範囲内であると熟慮される。遊離酸ならびにナトリウム塩、カリウム塩、及びカルシウム塩が好ましい形態である。

【0072】

本明細書において記載する対象物に従い、配列番号1~46のペプチドは、1つ又は複数の非対称的に置換された炭素原子を含みうるが、光学的に活性な形態又はラセミ形態で単離されうる。このように、構造の全てのキラル形態、ジアステレオマー形態、ラセミ形態、及び全ての幾何異性体形態が、特定の立体化学又は異性体形態が具体的に示されない限り、意図される。そのような光学的に活性な形態をどのように調製及び単離するかは、当技術分野において周知である。例えば、立体異性体の混合物は、標準的な技術(しかし

10

【0073】

容易に理解されるであろう通り、存在する官能基は、合成の経過の間に、保護基を含みうる。保護基は、それ自体が、官能性に選択的に付加する及びそれから除去することができる化学的な官能基として公知である(例えばヒドロキシル基及びカルボキシル基など)。これらの基は、化学的化合物中に存在し、化合物が曝露される化学反応条件に対して不活性なそのような官能性を与える。種々の保護基のいずれかを、本発明と用いてもよい。好ましい保護基は、ベンジルオキシカルボニル基及びtert-ブチルオキシカルボ

20

【0074】

本明細書において使用する通り、「処置する」は、状態の予防的、治療的、及び緩和的処置を指し、最小限に緩和的効果を要求する。用語「処置する」又は「処置」は、傷害、病理、又は状態の減弱又は寛解における任意の成功又は成功の兆候を指し、任意の客観的又は主観的パラメーター(例えば症状の軽減、緩解、縮小など)を含み、又は、状態を患者により容認できるようにし、変性又は減退の速度を遅くし、変性の最終点をそれほど衰弱させず、被験者の身体的又は精神的な幸福を改善し、又は生存の長さを延長する。処置

30

【0075】

用語「サンプル」は、本明細書において使用する通り、被験者から単離された同様の液体、細胞、又は組織(例、外科的に切除された腫瘍組織、生検、穿刺吸引を含む)、ならびに被験者内に存在する液体、細胞、又は組織の回収を指す。一部の実施態様において、サンプルは生物学的液体である。生物学的液体は、典型的には、生理学的温度で液体であり、被験者又は生物学的供給源において存在する、それから取り除いた、それから発現した又は、そうでなければ、抽出した自然発生する液体を含みうる。特定の組織、器官、又は局所領域に由来する特定の生物学的液体及び特定の他の生物学的液体は、被験者又は生物学的供給源においてより全体的又は全身的に位置付けられうる。生物学的液体の例は、血液、血清及び漿膜液、血漿、リンパ液、尿、唾液、囊胞液、涙滴、糞便、喀痰、分泌組織及び器官の粘膜分泌物、腔分泌物、腹水(例えば非固形腫瘍に関連するものなど)、胸膜腔、心膜腔、腹膜腔、腹腔、及び他の体腔の液体、気管支洗浄により回収された液体などを含む。生物学的液体は、また、被験者又は生物学的供給源と接触する液体溶液、例えば、細胞及び器官培養培地(細胞又は器官条件培地を含む)、洗浄液体などを含みうる。用語「サンプル」は、本明細書において使用する通り、被験者から除去される材料又は被験者において存在する材料を包含する。

40

【0076】

用語「進行」は、状態の進行の文脈において使用される通り、あまり重度ではない容態

50

からより重度の又は進行した容態への状態の変化を含む。

【0077】

用語「退行」は、状態の退行の文脈において使用される通り、より重度の容態からあまり重度ではない又は進行した容態への状態の変化を含む。

【0078】

用語「安定した」は、安定状態の文脈において使用される通り、臨床的に関連する期間にわたり有意に十分に変化しない、又はしていない、進行状態又は退行状態と考えられる疾患状態を記載することが意図される。

【0079】

本明細書において使用する通り、用語「被験者」及び「患者」は、互換的に使用され、動物（哺乳動物を含む）、好ましくはヒトを指す。

10

【0080】

本明細書において使用する通り、「健常な」は、現在、状態又は疾患に苦しんでいない患者を指し、状態に苦しむ素因のある患者を含む。

【0081】

本明細書において使用する通り、「診断」又は「診断する」は、状態（例えばインスリン抵抗性、異常な細胞成長、又は肝臓疾患など）を伴う患者の同定を指す。「診断」又は「診断する」は、また、処置を必要とする患者の同定を指す。一部の実施態様において、インスリン抵抗性は、耐糖能障害、前糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、3型糖尿病、若年性糖尿病、又は妊娠糖尿病と関連する。一部の実施態様において、異常な細胞成長は、癌、例えば、乳癌、転移性癌、膵臓癌、又は肝細胞癌などである。一部の実施態様において、肝臓疾患は、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎（NAFLD）、又はアルコール性肝炎である。

20

【0082】

本明細書において使用する通り、「糖尿病」は、糖尿病、欠損したインスリン分泌及び/又は作用に起因する慢性の高血糖症を指す。世界保健機関は、糖尿病の3つの主要な形態を認識する：I型、II型、3型糖尿病、若年性糖尿病、及び妊娠糖尿病。全ての形態が、高血糖症を防止するために十分なインスリンを産生することができない膵臓のベータ細胞に起因しており、原因が異なる。I型糖尿病は、通常、膵臓ベータ細胞の自己免疫破壊に起因している。II型糖尿病は、標的組織におけるインスリン抵抗性により特徴付けられ、それは、異常に高い量のインスリンについての必要性を作り、糖尿病は、ベータ細胞がこの需要を満たすことができない場合に発生する。妊娠糖尿病は、それがインスリン抵抗性を含む点で、II型糖尿病と同様である；妊娠のホルモンは、この状態を発生する遺伝的な素因がある女性においてインスリン抵抗性を起こしうる。妊娠糖尿病は、典型的には、子供の分娩に伴い消散するが、しかし、I及びII型糖尿病は慢性的な状態である。全ての型が、インスリンを用いて処置可能である。I型糖尿病は、それにおいて、インスリンが膵臓により分泌されず、注射又は吸入されたインスリンだけで直接的に処置可能であるが、食事及び他のライフスタイルの調整は管理の一部である。II型は、食事処置、錠剤、及び注射ならびに、高頻度に、インスリン補充の組み合わせを用いて管理してもよい。

30

40

【0083】

本明細書において使用する通り、「心臓血管疾患」は、心臓発作及び特定の型の脳卒中を起こしうるアテローム性動脈硬化症（動脈疾患）に関連する疾患を含む、心臓及び血管に影響を与える任意の疾患を指す。

【0084】

本明細書において使用する通り、「インスリン抵抗性」は、血流からの（例、インスリン感受性組織、例えば筋肉、脂肪、及び肝臓などの中への）グルコースの廃棄の速度により評価される通りの、インピボでのインスリンの生物学的作用における個人における減少を指す。インスリン抵抗性は、糖尿病、心臓血管疾患、異常な脂肪細胞活性、及びメタボリックシンドロームを伴う患者において生じる。特定の実施態様において、「インスリン

50

抵抗性」は、インスリン分解酵素（IDE）のCTF阻害を指し、細胞間インスリンを上げ、インスリン受容体応答を低下させる（図1）。「インスリン抵抗性」は、また、アルツハイマー病に関連する沈着物に導くアミロイドベータの分解を防止するインスリン分解酵素の阻害を指す。さらなる実施態様において、「インスリン抵抗性」は、CTF免疫グロブリンにより標的化されている正常細胞上の抗原による抵抗性を指し、IDEの阻害剤としてのCTFの利用のための、血漿から細胞中へのCTF免疫グロブリンの能動輸送に導く（図2）。

【0085】

本明細書において使用する通り、「異常な細胞成長」は、細胞増殖及び異常な細胞成長により評価される通り、癌又は炎症性疾患を伴う個人における増加した細胞成長を指す。一部の実施態様において、「異常な細胞成長」は、低下したインスリン受容体応答に起因する「インスリン抵抗性」により減少し、「異常な細胞成長」を伴う患者は、CTF免疫グロブリンのレベルを有する。他の実施態様について、「異常な細胞成長」が、CTFがADAM-17酵素を阻害する場合に生じ、患者における増加したTNF-アルファ及びHER2neuに関連する。他の実施態様について、CTF免疫グロブリンは、異常細胞（例えば、成長がインスリン抵抗性により遅くなる前癌性細胞又は老齢細胞及び異常細胞を正常細胞から区別する抗原により標的化される異常細胞など）において細胞成長を阻害するための機構である。

10

【0086】

本明細書において使用する通り、「医薬的に許容可能な」は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、又は合理的な利益/リスク比と釣り合った他の問題の合併症を伴わず、ヒト及び動物の組織との接触のために適しているそれらの化合物、材料、組成物、及び/又は投与形態を指す。

20

【0087】

本明細書において使用する通り、「医薬的に許容可能な塩」は、開示する化合物の誘導体を指し、それにおいて、親化合物は、酸塩又はその塩基塩（酸付加塩及び塩基付加塩を含む）を作ることにより修飾される。医薬的に許容可能な塩の例は、しかし、限定しないが、塩基残基（例えばアミンなど）の鉱酸塩又は有機酸塩；酸性残基（例えばカルボン酸など）のアルカリ塩又は有機塩；などを含む。用語「酸付加塩」は、酸の付加により調製されている親化合物の対応する塩誘導体を指す。

30

【0088】

本明細書において使用する通り、「医薬的に許容可能な担体」は、任意の及び全ての溶媒、分散媒質、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などを含み、医薬的な投与に適合する。医薬的に活性な物質のためのそのような媒質及び薬剤の使用は、当技術分野において周知である。任意の従来の媒質又は薬剤が活性化合物と不適合である限りを除き、組成物中でのその使用が熟慮される。補充の活性化合物は、また、組成物中に組み入れることができる。

【0089】

本明細書において使用する通り、「投与単位」は、処置される特定の患者のための単位投与量として適した物理的に別個の単位を指す。各々の単位が、要求される医薬的担体との関連において、所望の治療的効果を産生するように算出された、活性化合物の所定の量を含みうる。本発明の投与単位形態についての仕様は、(a)活性化合物の固有の特徴及び達成すべき特定の治療的効果、ならびに(b)そのような活性化合物を配合する当技術分野において固有の限度により定められうる。

40

【0090】

本明細書において使用する通り、「効果的な量」は、症状又は状態を防止、低下、又は除去するために効果的でありうる、本明細書において記載する通りの活性成分の量を指し、本発明に関して、インスリン抵抗性及び異常な細胞成長を処置することを含む。

【0091】

一般的に、本発明のCTFフラグメントの効果的な量は、約0.25mg/kg患者体重～

50

約 200 mg/kg 患者体重、好ましくは約 25 mg/kg 患者体重～約 175 mg/kg 患者体重、及び、より好ましくは約 30 mg/kg 患者体重～約 150 mg/kg 患者体重（ならびにそれらの全ての組み合わせ及び部分組み合わせ）である。

【0092】

CTF 免疫グロブリンの有用な組成物、投与形態、及びキットも発見されている。このように、本明細書において提供するものは、Ig-CTF の医薬的組成物である。一部の実施態様において、Ig-CTF は、医薬的に許容可能な塩の形態である。一部の実施態様において、Ig-CTF の医薬的組成物は、Ig-CTF 及び少なくとも一つの医薬的に許容可能な担体を含む。好ましい実施態様において、Ig-CTF の医薬的組成物は、注射可能な、非経口の、注入可能な、又は吸入可能な投与形態である。一部の実施態様において、Ig-CTF 又はその医薬的組成物及び同を投与するための指示を含むキットを提供する。

10

【0093】

本発明の特定の実施態様において、ペプチド又はその医薬的に許容可能な塩を、非経口経路を介して投与する。特定の好ましい実施態様において、ペプチド又はその医薬的に許容可能な塩を、注射を介して投与する。他の好ましい実施態様において、ペプチド又はその医薬的に許容可能な塩を、注入を介して投与する。さらに他の好ましい実施態様において、ペプチド又はその医薬的に許容可能な塩を、吸入を介して投与する。

【0094】

例えば、インスリン抵抗性、肝臓疾患、又は異常な細胞成長の処置において有用な医薬的キットは、配列番号 1～46 のペプチド又はその医薬的に許容可能な塩のいずれかの効果的な量を、一つ又は複数の滅菌容器中に含み、また、本発明の範囲内である。容器の滅菌は、当業者に周知の従来の滅菌方法論を使用して行ないうる。材料の滅菌容器は、別々の容器、あるいは一つ又は複数のマルチパート容器を、UNIVIAL（商標）ツーパート容器（Abbott Labs, Chicago, Illinois から利用可能）により例示される通り、望ましい通りに含みうる。そのようなキットは、さらに、望ましい場合、一つ又は複数の種々の従来の医薬的キット成分、例えば、成分を混合するための追加バイアルなどを、当業者に明かな通りに含みうる。投与される成分の量を示す指示（インサートとして又はラベルとしてのいずれか）、投与のためのガイドライン、及び/又は成分を混合するためのガイドラインも、キット中に含まれうる。

20

30

【0095】

「レポーター分子」により、本明細書において使用する通り、その化学的性質により、抗原結合抗体の検出を可能にする分析的に同定可能なシグナルを産生する分子を意味する。検出は定性的又は定量的のいずれかでありうる。アッセイのこの型において最も一般に使用されるレポーター分子は、着色ラテックス粒子、金属粒子、酵素、フルオロフォア、又は放射性核種を含む分子（即ち、ラジオアイソトープ）のいずれかである。

【0096】

本明細書において記載する実施態様は、特定の方法、試薬、化合物、組成物、又は生物学的システム（それらは、もちろん、変動しうる）に限定されない。

【0097】

Ig-CTF の検出及びモニタリング

本発明は、Ig-CTF を検出する方法を提供する。一実施態様において、第1種の被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種の Ig-CTF 又はその第1抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露させ、これによって混合物を形成する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。この混合物を、次に、第1種の Ig に優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。次に、サンプル中に存在する Ig-CTF を検出する。Ig-CTF を検出するために使用されうる多くの異なるアッセイプラットフォームがある。

40

【0098】

50

特定の実施態様において、発現のレベル（少なくとも1つの可溶性Ig - CTFの存在又は非存在を含む）を、免疫アッセイによりアッセイする。当業者は、その最も広い文脈において、「免疫アッセイ」が、テストサンプルを、標的について特異的な1つ又は複数の免疫相互作用分子と、それに結合し、前記結合を検出するために十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートすることを含むことを知っている。本明細書において使用する通り、用語「標的」は、プローブが結合するようにデザインされた分析物を指す。例えば、本明細書において、寄託された抗体の特異的なCTF標的を提供する：配列番号49、HVLVVA AAFVHF CYS、配列番号50、HFYGVSNLQEF RYGL EGGCTDDSL L、配列番号51、GGCTDDDTLL、及び配列番号52、GGCSEEDAL。特定の好ましい実施態様において、免疫相互作用分子は抗体である。例えば、これらの配列は、寄託された抗体により認識される：それぞれクローン461 - 4H11、クローン444 - 1D12、クローン515 - 4D65、及びクローン510 - 6B6。抗体をテストサンプルとインキュベートするための条件は、アッセイにおいて用いられるフォーマット、用いられる検出方法、ならびにアッセイにおいて使用される抗体分子の型及び性質に依存し、変動する。当業者は、一般に利用可能な免疫学的アッセイフォーマットのいずれか1つ、例えば、酵素免疫アッセイ、ラジオ免疫アッセイ、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）、免疫比濁、免疫比濁分析（immunonephrometric）、磁気免疫粒子分離、免疫クロマトグラフィー、免疫マイクロ流体、免疫遠心、拡散ベースのオクタロニー、ロケットゲル免疫電気泳動、又はインサイチュウムアッセイを、本目的に容易に適応することができることを認識するであろう。

10

20

【0099】

免疫アッセイは、テストサンプル中のアディポネクチン受容体の少なくとも1つのIg - CTFの定量化において、特に、少なくとも1つのIg - CTFのレベルが、非罹患者において検出可能な正常レベルと比較し、変わっているか否かを決定するために有用である。結果として、そのような免疫アッセイは、患者が疾患又は疾患への素因を有しているか否かを決定する際に特に有用である。免疫アッセイは、他の使用、例えば、疾患進行のモニタリング又は治療的介入への応答のモニタリングにおける使用なども有している。本明細書において記載する本発明は、それらの性能のために前記免疫アッセイを要求する、免疫相互作用分子及び診断アッセイの全てのそのような使用にまで及ぶ。

【0100】

例としてだけ、特定の実施態様において、フラグメントに対して産生された抗体を固体基質上に固定化し、第1複合体を形成し、患者からの生物学的テストサンプルを結合分子と接触させる。インキュベーションの適した期間後、抗体 - 二次複合体の形成を可能にするために十分な期間にわたり、検出可能なシグナルを産生することが可能な受容体分子を用いて標識した第2抗体を、次に、加え、インキュベートし、三次複合体の形成のための十分な時間を可能にする。任意の未反応材料を洗い流し、三次複合体の存在を、レポーター分子により産生されたシグナルの観察により決定する。結果は、目に見えるシグナルの簡単な観察により定性的でありうる、又は、公知の量のハプテンを含むコントロールサンプルとの比較により定量化されうる。このアッセイのバリエーションは、同時アッセイ（それにおいて、サンプル及び標識抗体の両方を、同時に、結合抗体に加える）又はリバーサアッセイ（それにおいて、標識抗体及びテストされるサンプルを最初に組み合わせ、インキュベートし、次に、同時に、結合抗体に加える）を含む。これらの技術は当業者に周知であり、バリエーションの可能性は容易に明らかであろう。

30

40

【0101】

Ig - CTFを検出する他の例は、定量的ウエスタンブロットティング、免疫組織化学、タンパク質バイオチップ、マススペクトロメトリー及び他を含む。

【0102】

Ig - CTFは、任意の適した方法により検出することができる。用いることができる検出パラダイムは、例えば、光学的方法、電気化学的方法（ボルタンメトリー及びアンペロメトリー技術）、原子間力顕微鏡法、及び無線周波数方法（例、多極共鳴スペクトロス

50

コピー)を含む。光学的方法は、例えば、比色アッセイ、電子インピーダンススペクトロスコピー、顕微鏡法(共焦点及び非共焦点の両方)、蛍光の検出、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、及び複屈折又は屈折率(例、表面プラズモン共鳴、エリブソメトリー、共振ミラー方法、格子結合器導波管方法又はインターフェロメトリー)を含む。

【0103】

Ig-C TF自体は、免疫グロブリンに共有結合的に付着されたアディポレセプターのC末端フラグメントを含むことができる。用語「アディポレセプター」は、アディポレセプター1(「AdipoR1」)及びアディポレセプター2(「AdipoR2」)を含む。AdipoR1のアミノ酸配列の例は、配列番号1~22のアミノ酸配列を含む。AdipoR2のアミノ酸配列の例は、配列番号23~44のアミノ酸配列のアミノ酸配列を含む。本発明の方法において、Ig-C TFの1つ又は複数(即ち、少なくとも1つ)を検出することができる。例えば、Ig-C TFの任意の1つ又は組み合わせ(それにおいて、C TFは、配列番号1~配列番号44のアミノ酸配列により表されるフラグメントの1つである)を検出することができる。

10

【0104】

本発明の方法において、生物学的サンプルは、多数の供給源から来うる。例えば、生物学的サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に関連しない細胞、組織、外科的に切除された腫瘍組織、生検、細針吸引サンプル、脳脊髄液、白血球、間質液、又は組織学的調製物に由来しうる。入手及び取り扱いのそれらの簡単さのため、血液及び血漿は、生物学的サンプルの特に有用な供給源でありうる。

20

【0105】

一部の場合において、保存剤は、冷蔵又は冷凍しながら、保存のために生物学的サンプルを安定化させるのに役立つ。適した保存剤の例は、フッ化物、ヘパリン、又はEDTAを含む。

【0106】

他の実施態様において、組織は、肝臓、膵臓、リンパ節、脂肪、筋肉、又は脳である。これらの組織においてIg-C TFを検出するための方法の例は、免疫組織化学(組織染色)である。

【0107】

生物学的サンプルは、任意の哺乳動物に由来しうる。好ましい実施態様は、哺乳動物がヒトである場合でありうる。しかし、他の哺乳動物(動物園、研究、及び飼育動物(ペット)、例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ラバ、又はブタなどを含む)は、生物学的サンプルの潜在的な供給源でありうる。

30

【0108】

本発明の他の実施態様において、抗体が提供され、それらは、方法のための第1抗体として使用できうる。例えば、受託番号_____ (クローン444-1D12)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたIg-C TFに優先的に結合する単離抗体、受託番号_____ (クローン-510-6B6)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたC TFに優先的に結合する単離抗体;又は受託番号_____ (クローン-515-4D6)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたC TFに優先的に結合する単離抗体。これらの抗体を調製するために使用される抗原及び方法論を、実施例12において完全に説明する。

40

【0109】

一部の場合において、第1抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に結合されている。固体支持体は、典型的には、ガラス又はポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンである。固体支持体は、ストリップ、カセット、チューブ、ビーズ、ディスク、プレート、もしくはマイクロプレート、又はイムノアッセイを行うために適した任意の他の表面の形態でありうる。結合プロセスは、当技術分野

50

において周知であり、一般的に、分子を不溶性担体に共有結合させる又は物理的に吸着させる架橋からなる。一実施態様において、固体支持体はE I A / R I Aプレートである。

【0110】

I g - C T Fにおいて、I gは、免疫グロブリンアイソタイプI g G、I g A、I g M、I g D、又はI g Eでありうる。I g - C T FにおけるI gの好ましい例は、I g Gである。免疫グロブリンは、いくつかのサブユニットから作られる。例えば、I g Gは、ガンマ()重鎖、及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g Aは、アルファ()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g Mは、ミュー(μ)重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g Dは、デルタ()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g Eは、エプシロン()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g - C T FのI gは、また、免疫グロブリンのアイソタイプの1つのサブユニットでありうる。例えば、I gは、I g G、I g M、又はI g Aのカッパ軽鎖でありうる。又は、I gは、I g Gのガンマ重鎖でありうる。あるいは、I gは、抗原結合領域(F a b)でありうる。

10

【0111】

一部の実施態様において、二次抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能に標識される。検出可能な標識の例は、放射性標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、化学発光標識、電気化学発光(E C L)標識、又は酵素を含む。放射性標識は^{1 2 5} Iを含み、それは、抗体に付着することができる(Harlow and Lane, supra, 1988)。有用な蛍光標識は、例えば、D A P I、フルオレセイン、ランタニド金属、Hoechst 33258、Rフィコシアニン、Bフィコエリトリン、Rフィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、及びリサミンを含む。フルオレセイン又はローダミン標識 2 - M G、H A、T I M P - 1、又はY K L - 4 0 特異的結合薬剤(例えば抗 2 - M G、抗H A、抗T I M P - 1、もしくは抗Y K L - 4 0 抗体、又はフルオレセインもしくはローダミン標識二次抗体など)が、本発明において有用でありうる。有用な蛍光抗体は、商業的に、例えば、Tago Immunologicals (Burlingame, Calif) から得ることができる。蛍光化合物は、それらの結合能力を変えずに、抗体に化学的に共役することができる。特定の波長の光を用いた照射により活性化される場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子中に興奮状態を誘導し、顕微鏡を用いて視覚的に検出可能な特徴的な色の光の放出が続く。酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ(H R P)、アルカリホスファターゼ(A P)、ガラクトシダーゼ、又はウレアーゼなどを、本発明の方法における使用のために、例えば、抗アディポネクチンレセプターC末端フラグメントに又は二次抗体に連結することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン(T M B) と使用することができ、それは、4 5 0 nmで検出可能である過酸化水素の存在において可溶性産物をもたらす。

20

30

【0112】

他の実施態様において、遊離C T Fは、アッセイのデザインのため、検出されない。

【0113】

別の実施態様において、第1種、第2種、及び第3種は同じ種ではない。

【0114】

一部の実施態様において、I g - C T Fのレベルをモニターし、それを検出するだけではないことが望ましい。また、I g - C T Fのレベルをモニターする方法を提供する。一実施態様において、第1種の被験者から得られた生物学的サンプルを、第1種のI g - C T F又はその第1抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露させ、これによって混合物を形成する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。この混合物を、次に、第1種のI gに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。次に、サンプル中に存在するI g - C T Fを定量化し、次に、サンプル中に存在するI g - C T Fの量を、公知の標準と、又はより早期の時間点で被験者から得られる生物学的サンプル中に存在するI g - C T Fの量と比較する。別の実施態様において、この比較は、

40

50

Ig - CTF が、経時的に増加、減少、又は安定化しているか否かを示しうる。Ig - CTF のレベルをモニターするために使用されうる多くの異なるアッセイプラットフォームがある。

【0115】

特定の実施態様において、発現のレベル（少なくとも1つの可溶性Ig - CTFの存在又は非存在を含む）を、免疫アッセイによりアッセイする。当業者は、その最も広い文脈において、「免疫アッセイ」が、テストサンプルを、標的について特異的な1つ又は複数の免疫相互作用分子と、それに結合し、前記結合を検出するために十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートすることを含むことを知っている。本明細書において使用する通り、用語「標的」は、プローブが結合するようにデザインされた分析物を指す。例えば、本明細書において、寄託された抗体の特異的なCTF標的を提供する：配列番号49、HVLVVA AAFVHFCYS、配列番号50、HFYGVSNLQEF RYGL EGGCTDDSL L、配列番号51、GGCTDDDTLL、及び配列番号52、GGCS EEDAL。特定の好ましい実施態様において、免疫相互作用分子は抗体である。例えば、これらの配列は、寄託された抗体により認識される：それぞれ461 - 4H11、クローン444 - 1D12、クローン515 - 4D65、及びクローン510 - 6B6。抗体をテストサンプルとインキュベートするための条件は、アッセイに用いられるフォーマット、用いられる検出方法、ならびにアッセイにおいて使用される抗体分子の型及び性質に依存し、変動する。当業者は、一般に利用可能な免疫学的アッセイフォーマットのいずれか1つ、例えば、酵素免疫アッセイ、ラジオ免疫アッセイ、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）、免疫比濁、免疫比濁分析、磁気免疫粒子分離、免疫クロマトグラフィー、免疫マイクロ流体、免疫遠心、拡散ベースのオクタロニー、ロケットゲル免疫電気泳動、又はインサイチュ免疫アッセイを、本目的に容易に適応することができることを認識するであろう。

10

20

【0116】

免疫アッセイは、テストサンプル中のアディポネクチン受容体の少なくとも1つのIg - CTFの定量化において、特に、少なくとも1つのIg - CTFのレベルが、非罹患個体において検出可能な正常レベルと比較し、変わっているか否かを決定するために有用である。結果として、そのような免疫アッセイは、患者が疾患又は疾患への素因を有しているか否かを決定する際に特に有用である。免疫アッセイは、他の使用、例えば、疾患進行のモニタリング又は治療的介入への応答のモニタリングにおける使用なども有しうる。本明細書において記載する本発明は、それらの性能のために前記免疫アッセイを要求する、免疫相互作用分子及び診断アッセイの全てのそのような使用にまで及ぶ。

30

【0117】

例としてだけ、特定の実施態様において、フラグメントに対して産生された抗体を固体基質上に固定化し、第1複合体を形成し、患者からの生物学的テストサンプルを結合分子と接触させる。インキュベーションの適した期間後、抗体 - 二次複合体の形成を可能にするために十分な期間にわたり、検出可能なシグナルを産生することが可能な受容体分子を用いて標識した第2抗体を、次に、加え、インキュベートし、三次複合体の形成のための十分な時間を可能にする。任意の未反応材料を洗い流し、三次複合体の存在を、レポーター分子により産生されたシグナルの観察により決定する。結果は、目に見えるシグナルの簡単な観察により定性的でありうる、又は、公知の量のハプテンを含むコントロールサンプルとの比較により定量化されうる。このアッセイのバリエーションは、同時アッセイ（それにおいて、サンプル及び標識抗体の両方が、同時に、結合抗体に加えられる）又はリバースアッセイ（それにおいて、標識抗体及びテストされるサンプルを最初に組み合わせ、インキュベートし、次に、同時に、結合抗体に加える）を含む。これらの技術は当業者に周知であり、バリエーションの可能性は容易に明らかであろう。

40

【0118】

Ig - CTFを検出する他の例は、定量的ウエスタンブロッティング、免疫組織化学、タンパク質バイオチップ、マススペクトロメトリー及び他を含む。

50

【0119】

CTF免疫グロブリンは、任意の適した方法によりモニターすることができる。用いることができる検出パラダイムは、例えば、光学的方法、電気化学的方法（ボルタンメトリー及びアンペロメトリー技術）、原子間力顕微鏡法、及び無線周波数方法（例、多極共鳴スペクトロスコピー）を含む。光学的方法は、例えば、比色アッセイ、電子インピーダンススペクトロスコピー、顕微鏡法（共焦点及び非共焦点の両方）、蛍光の検出、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、及び複屈折又は屈折率（例、表面プラズモン共鳴、エリプソメトリー、共振ミラー方法、格子結合器導波管方法又はインターフェロメトリー）を含む。

【0120】

Ig-CTF自体は、免疫グロブリンに共有結合的に付着されたアディポレセプターのC末端フラグメントを含むことができる。用語「アディポレセプター」は、アディポレセプター1（「AdipoR1」）及びアディポレセプター2（「AdipoR2」）を含む。AdipoR1のアミノ酸配列の例は、配列番号1～22のアミノ酸配列を含む。AdipoR2のアミノ酸配列の例は、配列番号23～44のアミノ酸配列のアミノ酸配列を含む。本発明の方法において、Ig-CTFの1つ又は複数（即ち、少なくとも1つ）を検出することができる。例えば、Ig-CTFの任意の1つ又は組み合わせ（それにおいて、CTFは、配列番号1～配列番号44のアミノ酸配列により表されるフラグメントの1つである）を検出することができる。

【0121】

本発明の方法において、生物学的サンプルは、多数の供給源から来うる。例えば、生物学的サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に関連しない細胞、組織、外科的に切除された腫瘍組織、生検、細針吸引サンプル、脳脊髄液、白血球、間質液、又は組織学的調製物に由来しうる。入手及び取り扱いのそれらの簡単さのため、血液及び血漿は、生物学的サンプルの特に有用な供給源でありうる。

【0122】

一部の場合において、保存剤は、冷蔵又は冷凍しながら、保存のために生物学的サンプルを安定化させるのに役立つ。適した保存剤の例は、フッ化物、ヘパリン、又はEDTAを含む。

【0123】

他の実施態様において、組織は、肝臓、膵臓、リンパ節、脂肪、筋肉、又は脳である。これらの組織においてIg-CTFを検出するための方法の例は、免疫組織化学（組織染色）である。

【0124】

生物学的サンプルは、任意の哺乳動物に由来しうる。好ましい実施態様において、サンプルはヒトから得られる。しかし、他の哺乳動物（動物園、研究、及び飼育動物（ペット））、例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ラバ、又はブタなどを含む）も、生物学的サンプルの潜在的な供給源でありうる。

【0125】

本発明の他の実施態様において、抗体が提供され、それらは、方法のための第1抗体として使用できうる。例えば、受託番号_____（クローン444-1D12）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたIg-CTFに優先的に結合する単離抗体、受託番号_____（クローン-510-6B6）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体；又は受託番号_____（クローン-515-4D6）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体。これらの抗体を調製するために使用される抗原及び方法論を、実施例12において完全に説明する。

【0126】

一部の場合において、第1抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に結合されて

10

20

30

40

50

いる。固体支持体は、典型的には、ガラス又はポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンである。固体支持体は、ストリップ、カセット、チューブ、ビーズ、ディスク、プレート、もしくはマイクロプレート、又はイムノアッセイを行うために適した任意の他の表面の形態でありうる。結合プロセスは、当技術分野において周知であり、一般的に、分子を不溶性担体に共有結合させる又は物理的に吸着させる架橋からなる。一実施態様において、固体支持体はE I A / R I Aプレートである。

【0127】

I g - C T Fにおいて、I gは、免疫グロブリンアイソタイプI g G、I g A、I g M、I g D、又はI g Eでありうる。I g - C T FにおけるI gの好ましい例は、I g Gである。免疫グロブリンは、いくつかのサブユニットから作られる。例えば、I g Gは、ガンマ()重鎖、及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g Aは、アルファ()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g Mは、ミュー(μ)重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g Dは、デルタ()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g Eは、エプシロン()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g - C T FのI gは、また、免疫グロブリンのアイソタイプの1つのサブユニットでありうる。例えば、I gは、I g G、I g M、又はI g Aのカッパ軽鎖でありうる。又は、I gは、I g Gのガンマ重鎖でありうる。あるいは、I gは、抗原結合領域(F a b)でありうる。

10

【0128】

一実施態様において、第2抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能に標識される。検出可能な標識の例は、放射性標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、化学発光標識、電気化学発光(E C L)標識、又は酵素を含む。放射性標識は¹²⁵Iを含み、それは、抗体に付着することができる(Harlow and Lane, supra, 1988)。有用な蛍光標識は、例えば、D A P I、フルオレセイン、ランタニド金属、Hoechst 33258、Rフィコシアニン、Bフィコエリトリン、Rフィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、及びリサミンを含む。フルオレセイン又はローダミン標識 2 - M G、H A、T I M P - 1、又はY K L - 40特異的結合薬剤(例えば抗 2 - M G、抗H A、抗T I M P - 1、もしくは抗Y K L - 40抗体、又はフルオレセインもしくはローダミン標識二次抗体など)が、本発明において有用でありうる。有用な蛍光抗体は、商業的に、例えば、Tago Immunologicals (Burlingame, Calif)から得ることができる。蛍光化合物は、それらの結合能力を変えないことなく、抗体に化学的に共役することができる。特定の波長の光を用いた照射により活性化される場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子中に興奮状態を誘導し、光顕微鏡を用いて視覚的に検出可能な特徴的な色での光の放出が続く。酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ(H R P)、アルカリホスファターゼ(A P)、ガラクトシダーゼ、又はウレアーゼなどを、本発明の方法における使用のために、例えば、抗アディポネクチンレセプターC末端フラグメントに又は二次抗体に連結することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン(T M B)と使用することができ、それは、450nmで検出可能である過酸化水素の存在において可溶性産物をもたらす。

20

30

40

【0129】

他の実施態様において、遊離C T Fは、アッセイのデザインのため、検出されない。

【0130】

別の実施態様において、第1種、第2種、及び第3種は同じ種ではない。

【0131】

本発明は、また、生物学的サンプル中のI g - C T Fの存在を検出するためのキットを提供し、受託番号_____ (m A b 444 - 1 D 1 2)を有し、A T C Cに寄託された細胞株により産生されたI g C T Fに優先的に結合する第1の単離抗体、受託番号_____ (m A b - 5 1 0 - 6 B 6)を有し、A T C Cに寄託された細胞株により産生されたC T Fに優先的に結合する第1の単離抗体；及び/又は受託番号_____ (m A b - 5 1

50

5 - 4 D 6) を有し、A T C C に寄託された細胞株により産生された C T F に優先的に結合する第 1 の単離抗体、ヒト I g に優先的に結合する第 2 抗体又は抗原結合フラグメント、及び、同のためのパッケージングと一緒に、第 1 抗体又は抗原結合フラグメント及び第 2 抗体又は抗原結合フラグメントの使用のための指示を含む。

【 0 1 3 2 】

好ましい実施態様において、I g - C T F における I g は I g G である。別の好ましい実施態様において、第 2 抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能に標識される。検出可能な標識の例は、放射性標識、蛍光標識、エピトプタグ、ビオチン、発色団標識、化学発光標識、電気化学発光 (E C L) 標識、又は酵素を含む。放射性標識は ^{125}I を含み、それは、抗体に付着することができる (Harlow and Lane, supra, 1988)。有用な蛍光標識は、例えば、D A P I、フルオレセイン、ランタニド金属、Hoechst 33258、R フィコシアニン、B フィコエリトリン、R フィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、及びリサミンを含む。フルオレセイン又はローダミン標識 2 - M G、H A、T I M P - 1、又は Y K L - 4 0 特異的結合薬剤 (例えば抗 2 - M G、抗 H A、抗 T I M P - 1、もしくは抗 Y K L - 4 0 抗体、又はフルオレセインもしくはローダミン標識二次抗体など) が、本発明において有用でありうる。有用な蛍光抗体は、商業的に、例えば、Tago Immunologicals (Burlingame, Calif) から得ることができる。蛍光化合物は、それらの結合能力を変えなく、抗体に化学的に共役することができる。特定の波長の光を用いた照射により活性化される場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子中に興奮状態を誘導し、顕微鏡を用いて視覚的に検出可能な特徴的な色での光の放出が続く。酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P)、アルカリホスファターゼ (A P)、ガラクトシダーゼ、又はウレアーゼなどを、本発明の方法における使用のために、例えば、抗アディポネクチンレセプター C 末端フラグメントに又は二次抗体に連結することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン (T M B) と使用することができ、それは、450 nm で検出可能である過酸化水素の存在において可溶性産物をもたらす。

10

20

【 0 1 3 3 】

本発明の実施態様において、キットは、また、第 1 抗体又は抗原結合フラグメントを含むための容器を含む。例えば、容器は、1.5 mL チューブ、5 mL チューブ、15 mL チューブ、25 mL チューブ、又は 50 mL チューブでありうる。これらのチューブは、材料 (例えばポリカーボネート、プラスチック (plastics)、又はガラスなど) から作ることができる。本発明の別の実施態様において、キットは、また、使用されない場合、第 2 抗体又は抗原結合フラグメントを含むための容器を含む。例えば、容器は、1.5 mL チューブ、5 mL チューブ、15 mL チューブ、25 mL チューブ、又は 50 mL チューブでありうる。これらのチューブは、材料 (例えばポリカーボネート、プラスチック、又はガラスなど) から作ることができる。

30

【 0 1 3 4 】

一部の場合において、第 1 抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に結合されている。固体支持体は、典型的には、ガラス又はポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンである。固体支持体は、ストリップ、カセット、チューブ、ビーズ、ディスク、プレート、もしくはマイクロプレート、又はイムノアッセイを行うために適した任意の他の表面の形態でありうる。結合プロセスは、当技術分野において周知であり、一般的に、分子を不溶性担体に共有結合させる又は物理的に吸着させる架橋からなる。一実施態様において、固体支持体は E I A / R I A プレートである。

40

【 0 1 3 5 】

インスリン抵抗性の診断、処置、及びモニタリングにおける I g - C T F の使用

提供する本発明の実施態様は、被験者においてインスリン抵抗性を診断するための方法である。一実施態様において、被験者に由来する生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又はその第 1 抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝

50

露させ、これによって混合物を形成する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。この混合物を、次に、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。次に、サンプル中に存在するIg - CTFを定量化する。最後に、サンプル中に存在するIg - CTFの量を、公知の標準と比較し、サンプル中のIg - CTFの量が、インスリン抵抗性と関連するIg - CTFのレベル内に入るか否かを決定する。

【0136】

例として、インスリン抵抗性は、耐糖能障害、前糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、3型糖尿病、若年性糖尿病、妊娠糖尿病、又は非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)と関連しうる。

【0137】

特定の実施態様において、発現のレベル(少なくとも1つの可溶性Ig - CTFの存在又は非存在を含む)を、免疫アッセイによりアッセイする。当業者は、その最も広い文脈において、「免疫アッセイ」が、テストサンプルを、標的について特異的な1つ又は複数の免疫相互作用分子と、それに結合し、前記結合を検出するために十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートすることを含むことを知っている。本明細書において使用する通り、用語「標的」は、プローブが結合するようにデザインされた分析物を指す。例えば、本明細書において、寄託された抗体の特異的なCTF標的を提供する：配列番号49、HVLVVA AAFVHFCYS、配列番号50、HFYGVSNLQEF RYGL EGGCTDDSL L、配列番号51、GGCTDDDTLL、及び配列番号52、GGCSEEDAL。特定の好ましい実施態様において、免疫相互作用分子は抗体である。例えば、これらの配列は、寄託された抗体により認識される：それぞれクローン461 - 4H11、クローン444 - 1D12、クローン515 - 4D65、及びクローン510 - 6B6。抗体をテストサンプルとインキュベートするための条件は、アッセイに用いられるフォーマット、用いられる検出方法、ならびにアッセイにおいて使用される抗体分子の型及び性質に依存し、変動する。当業者は、一般に利用可能な免疫学的アッセイフォーマットのいずれか1つ、例えば、酵素免疫アッセイ、ラジオ免疫アッセイ、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫比濁、免疫比濁分析、磁気免疫粒子分離、免疫クロマトグラフィー、免疫マイクロ流体、免疫遠心、拡散ベースのオクタロニー、ロケットゲル免疫電気泳動、又はインサイチュ免疫アッセイを、本目的に容易に適応することができることを認識するであろう。

【0138】

免疫アッセイは、テストサンプル中のアディポネクチン受容体の少なくとも1つのIg - CTFの定量化において、特に、少なくとも1つのIg - CTFのレベルが、非罹患個体において検出可能な正常レベルと比較し、変わっているか否かを決定するために有用である。結果として、そのような免疫アッセイは、患者が疾患又は疾患への素因を有しうるか否かを決定する際に特に有用である。免疫アッセイは、他の使用、例えば、疾患進行のモニタリング又は治療的介入への応答のモニタリングにおける使用なども有しうる。本明細書において記載する本発明は、それらの性能のために前記免疫アッセイを要求する、免疫相互作用分子及び診断アッセイの全てのそのような使用にまで及ぶ。

【0139】

例としてだけ、特定の実施態様において、フラグメントに対して産生された抗体を固体基質上に固定化し、第1複合体を形成し、患者からの生物学的テストサンプルを結合分子と接触させる。インキュベーションの適した期間後、抗体 - 二次複合体の形成を可能にするために十分な期間にわたり、検出可能なシグナルを産生することが可能な受容体分子を用いて標識した第2抗体を、次に、加え、インキュベートし、三次複合体の形成のための十分な時間を可能にする。任意の未反応材料を洗い流し、三次複合体の存在を、レポーター分子により産生されたシグナルの観察により決定する。結果は、目に見えるシグナルの簡単な観察により定性的でありうる、又は、公知の量のハプテンを含むコントロールサンプルとの比較により定量化されうる。このアッセイのバリエーションは、同時アッセイ(

10

20

30

40

50

それにおいて、サンプル及び標識抗体の両方が、同時に、結合抗体に加えられる)又はリパーアッセイ(それにおいて、標識抗体及びテストされるサンプルを最初に組み合わせ、インキュベートし、次に、同時に、結合抗体に加える)を含む。これらの技術は当業者に周知であり、パリエーションの可能性は容易に明らかであろう。

【0140】

Ig - CTFを検出する他の例は、定量的ウエスタンブロッティング、免疫組織化学、タンパク質バイオチップ、マスペクトロメトリー及び他を含む。

【0141】

CTF免疫グロブリンは、任意の適した方法により検出することができる。用いることができる検出パラダイムは、例えば、光学的方法、電気化学的方法(ボルタンメトリー及びアンペロメトリー技術)、原子間力顕微鏡法、及び無線周波数方法(例、多極共鳴スペクトロスコピー)を含む。光学的方法は、例えば、比色アッセイ、電子インピーダンススペクトロスコピー、顕微鏡法(共焦点及び非共焦点の両方)、蛍光の検出、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、及び複屈折又は屈折率(例、表面プラズモン共鳴、エリブソメトリー、共振ミラー方法、格子結合器導波管方法又はインターフェロメトリー)を含む。

10

【0142】

Ig - CTF自体は、免疫グロブリンに共有結合的に付着されたアディポレセプターのC末端フラグメントを含むことができる。用語「アディポレセプター」は、アディポネクチンレセプター1(アディポレセプター1;「AdipoR1」)及びアディポネクチンレセプター2(アディポレセプター2;「AdipoR2」)を含む。AdipoR1のアミノ酸配列の例は、配列番号1~22のアミノ酸配列を含む。AdipoR2のアミノ酸配列の例は、配列番号23~44のアミノ酸配列を含む。本発明の方法において、Ig - CTFの1つ又は複数(即ち、少なくとも1つ)を検出することができる。例えば、Ig - CTFの任意の1つ又は組み合わせ(それにおいて、CTFは、配列番号1~配列番号44のアミノ酸配列により表されるフラグメントの1つである)を検出することができる。

20

【0143】

本明細書に記載する方法において、生物学的サンプルは、多数の供給源から来うる。例えば、生物学的サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に関連しない細胞、組織、外科的に切除された腫瘍組織、生検、細針吸引サンプル、脳脊髄液、白血球、間質液、又は組織学的調製物に由来しうる。入手及び取り扱いのそれらの簡単さのため、血液及び血漿は、生物学的サンプルの特に有用な供給源でありうる。

30

【0144】

一部の場合において、保存剤は、冷蔵又は冷凍しながら、保存のために生物学的サンプルを安定化させるのに役立つ。適した保存剤の例は、フッ化物、ヘパリン、又はEDTAを含む。

【0145】

他の実施態様において、組織は、肝臓、膵臓、リンパ節、脂肪、筋肉、又は脳である。これらの組織においてIg - CTFを検出するための方法の例は、免疫組織化学(組織染色)である。

40

【0146】

生物学的サンプルは、任意の哺乳動物に由来しうる。好ましい実施態様は、哺乳動物がヒトである場合でありうる。しかし、他の哺乳動物(動物園、研究、及び飼育動物(ペット)、例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ラバ、又はブタなどを含む)も、生物学的サンプルの潜在的な供給源でありうる。

【0147】

本発明の他の実施態様において、抗体が提供され、それらは、方法のための第1抗体と

50

して使用できうる。例えば、受託番号_____（クローン444-1D12）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたIg-CTFに優先的に結合する単離抗体、受託番号_____（クローン-510-6B6）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体；又は受託番号_____（クローン-515-4D6）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体。これらの抗体を調製するために使用される抗原及び方法論を、実施例12において完全に説明する。

【0148】

一部の場合において、第1抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に結合されている。固体支持体は、典型的には、ガラス又はポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンである。固体支持体は、ストリップ、カセット、チューブ、ビーズ、ディスク、プレート、もしくはマイクロプレート、又はイムノアッセイを行うために適した任意の他の表面の形態でありうる。結合プロセスは、当技術分野において周知であり、一般的に、分子を不溶性担体に共有結合させる又は物理的に吸着させる架橋からなる。一実施態様において、固体支持体はEIA/RIAプレートである。

10

【0149】

Ig-CTFにおいて、Igは、免疫グロブリンアイソタイプIgG、IgA、IgM、IgD、又はIgEでありうる。Ig-CTFにおけるIgの好ましい例は、IgGである。免疫グロブリンは、いくつかのサブユニットから作られる。例えば、IgGは、ガンマ（ γ ）重鎖、及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。IgAは、アルファ（ α ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。IgMは、ミュー（ μ ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。IgDは、デルタ（ δ ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。IgEは、エプシロン（ ϵ ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。Ig-CTFのIgは、また、免疫グロブリンのアイソタイプの1つのサブユニットでありうる。例えば、Igは、IgG、IgM、又はIgAのカッパ軽鎖でありうる。又は、Igは、IgGのガンマ重鎖でありうる。あるいは、Igは、抗原結合領域（Fab）でありうる。

20

【0150】

一実施態様において、第2抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能に標識される。検出可能な標識の例は、放射性標識、蛍光標識、エピトプタグ、ビオチン、発色団標識、化学発光標識、電気化学発光（ECL）標識、又は酵素を含む。放射性標識は¹²⁵Iを含み、それは、抗体に付着することができる（Harlow and Lane, supra, 1988）。有用な蛍光標識は、例えば、DAPI、フルオレセイン、ランタニド金属、Hoechst 33258、Rフィコシアニン、Bフィコエリトリン、Rフィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、及びリサミンを含む。フルオレセイン又はローダミン標識 2-MG、HA、TIMP-1、又はYKL-40特異的結合薬剤（例えば抗 2-MG、抗HA、抗TIMP-1、もしくは抗YKL-40抗体、又はフルオレセインもしくはローダミン標識二次抗体など）が、本発明において有用でありうる。有用な蛍光抗体は、商業的に、例えば、Tago Immunologicals（Burlingame, Calif）から得ることができる。蛍光化合物は、それらの結合能力を変えずに、抗体に化学的に共役することができる。特定の波長の光を用いた照射により活性化される場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子中に興奮状態を誘導し、顕微鏡を用いて視覚的に検出可能な特徴的な色の光の放出が続く。酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（AP）、ガラクトシダーゼ、又はウレアーゼなどを、本発明の方法における使用のために、例えば、抗アディポネクチンレセプターC末端フラグメントに又は二次抗体に連結することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン（TMB）と使用することができ、それは、450nmで検出可能である過酸化水素の存在において可溶性産物をもたらす。

30

40

【0151】

50

他の実施態様において、遊離 C T F は、アッセイのデザインのため、検出されない。

【 0 1 5 2 】

提供する本発明の別の実施態様は、被験者においてインスリン抵抗性を処置するための方法である。一実施態様において、被験者に由来する生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又はその第 1 抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝露させ、これによって混合物を形成する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。この混合物を、次に、第 1 種の I g に優先的に結合する第 3 種の第 2 抗体又は抗原結合フラグメントに曝露する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。次に、サンプル中に存在する I g - C T F を定量化する。最後に、サンプル中に存在する I g - C T F の量を、公知の標準と比較し、サンプル中の I g - C T F の量が、インスリン抵抗性と関連する I g - C T F のレベル内に入るか否かを決定する、及び、被験者に、インスリン抵抗性のための処置を施す、又は処方すること。

10

【 0 1 5 3 】

例として、インスリン抵抗性は、耐糖能障害、前糖尿病、1 型糖尿病、2 型糖尿病、3 型糖尿病、若年性糖尿病、妊娠糖尿病、又は非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) と関連しうる。

【 0 1 5 4 】

特定の実施態様において、発現のレベル (少なくとも 1 つの可溶性 I g - C T F の存在又は非存在を含む) を、イムノアッセイによりアッセイする。当業者は、その最も広い文脈において、「イムノアッセイ」が、テストサンプルを、標的について特異的な 1 つ又は複数の免疫相互作用分子と、それに結合し、前記結合を検出するために十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートすることを含むことを知っている。本明細書において使用する通り、用語「標的」は、プローブが結合するようにデザインされた分析物を指す。例えば、本明細書において、寄託された抗体の特異的な C T F 標的を提供する：配列番号 4 9、H V L V V A A A F V H F C Y S、配列番号 5 0、H F Y G V S N L Q E F R Y G L E G G C T D D S L L、配列番号 5 1、G G C T D D T L L、及び配列番号 5 2、G G C S E E D A L。特定の好ましい実施態様において、免疫相互作用分子は抗体である。例えば、これらの配列は、寄託された抗体により認識される：それぞれクローン 4 6 1 - 4 H 1 1、クローン 4 4 4 - 1 D 1 2、クローン 5 1 5 - 4 D 6 5、及びクローン 5 1 0 - 6 B 6。抗体をテストサンプルとインキュベートするための条件は、アッセイに用いられるフォーマット、用いられる検出方法、ならびにアッセイにおいて使用される抗体分子の型及び性質に依存し、変動する。当業者は、一般に利用可能な免疫学的アッセイフォーマットのいずれか 1 つ、例えば、酵素イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、酵素連結免疫吸着アッセイ (E L I S A)、免疫比濁、免疫比濁分析、磁気免疫粒子分離、イムノクロマトグラフィー、免疫マイクロ流体、免疫遠心、拡散ベースのオクタロニー、ロケットゲル免疫電気泳動、又はインサイチュイムノアッセイを、本目的に容易に適応することができることを認識するであろう。

20

30

【 0 1 5 5 】

イムノアッセイは、テストサンプル中のアディポネクチン受容体の少なくとも 1 つの I g - C T F の定量化において、特に、少なくとも 1 つの I g - C T F のレベルが、非罹患個体において検出可能な正常レベルと比較し、変わっているか否かを決定するために有用である。結果として、そのようなイムノアッセイは、患者が疾患又は疾患への素因を有しているか否かを決定する際に特に有用である。イムノアッセイは、他の使用、例えば、疾患進行のモニタリング又は治療的介入への応答のモニタリングにおける使用なども有しうる。本明細書において記載する本発明は、それらの性能のために前記イムノアッセイを要求する、免疫相互作用分子及び診断アッセイの全てのそのような使用にまで及ぶ。

40

【 0 1 5 6 】

例としてだけ、特定の実施態様において、フラグメントに対して産生された抗体を固体基質上に固定化し、第 1 複合体を形成し、患者からの生物学的テストサンプルを結合分子と接触させる。インキュベーションの適した期間後、抗体 - 二次複合体の形成を可能にす

50

るために十分な期間にわたり、検出可能なシグナルを産生することが可能な受容体分子を用いて標識した第2抗体を、次に、加え、インキュベートし、三次複合体の形成のための十分な時間を可能にする。任意の未反応材料を洗い流し、三次複合体の存在を、レポーター分子により産生されたシグナルの観察により決定する。結果は、目に見えるシグナルの簡単な観察により定性的でありうる、又は、公知の量のハプテンを含むコントロールサンプルとの比較により定量化されうる。このアッセイのバリエーションは、同時アッセイ（それにおいて、サンプル及び標識抗体の両方が、同時に、結合抗体に加えられる）又はリバースアッセイ（それにおいて、標識抗体及びテストされるサンプルを最初に組み合わせ、インキュベートし、次に、同時に、結合抗体に加える）を含む。これらの技術は当業者に周知であり、バリエーションの可能性は容易に明らかであろう。

10

【0157】

Ig - CTFを検出する他の例は、定量的ウエスタンブロッティング、免疫組織化学、タンパク質バイオチップ、マスペクトロメトリー及び他を含む。

【0158】

CTF免疫グロブリンは、任意の適した方法により検出することができる。用いることができる検出パラダイムは、例えば、光学的方法、電気化学的方法（ボルタンメトリー及びアンペロメトリー技術）、原子間力顕微鏡法、及び無線周波数方法（例、多極共鳴スペクトロスコピー）を含む。光学的方法は、例えば、比色アッセイ、電子インピーダンススペクトロスコピー、顕微鏡法（共焦点及び非共焦点の両方）、蛍光の検出、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、及び複屈折又は屈折率（例、表面プラズモン共鳴、エリブソメトリー、共振ミラー方法、格子結合器導波管方法又はインターフェロメトリー）を含む。

20

【0159】

Ig - CTF自体は、免疫グロブリンに共有結合的に付着されたアディポレセプターのC末端フラグメントを含むことができる。用語「アディポレセプター」は、アディポレセプター1（「AdipoR1」）及びアディポレセプター2（「AdipoR2」）を含む。AdipoR1のアミノ酸配列の例は、配列番号1～22のアミノ酸配列を含む。AdipoR2のアミノ酸配列の例は、配列番号23～44のアミノ酸配列を含む。本発明の方法において、Ig - CTFの1つ又は複数（即ち、少なくとも1つ）を検出することができる。例えば、Ig - CTFの任意の1つ又は組み合わせ（それにおいて、CTFは、配列番号1～配列番号44のアミノ酸配列により表されるフラグメントの1つである）を検出することができる。

30

【0160】

本発明の方法において、生物学的サンプルは、多数の供給源から来うる。例えば、生物学的サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に関連しない細胞、組織、外科的に切除された腫瘍組織、生検、細針吸引サンプル、脳脊髄液、白血球、間質液、又は組織学的調製物に由来しうる。入手及び取り扱いのそれらの簡単さのため、血液及び血漿は、生物学的サンプルの特に有用な供給源でありうる。

【0161】

一部の場合において、保存剤は、冷蔵又は冷凍しながら、保存のために生物学的サンプルを安定化させるのに役立つ。適した保存剤の例は、フッ化物、ヘパリン、又はEDTAを含む。

40

【0162】

他の実施態様において、組織は、肝臓、膵臓、リンパ節、脂肪、筋肉、又は脳である。これらの組織においてIg - CTFを検出するための方法の例は、免疫組織化学（組織染色）である。

【0163】

生物学的サンプルは、任意の哺乳動物に由来しうる。好ましい実施態様は、哺乳動物がヒトである場合でありうる。しかし、他の哺乳動物（動物園、研究、及び飼育動物（ペット）、例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウ

50

マ、ロバ、ラバ、又はブタなどを含む)も、生物学的サンプルの潜在的な供給源でありうる。

【0164】

本発明の他の実施態様において、抗体が提供され、それらは、方法のための第1抗体として使用できうる。例えば、受託番号_____ (クローン444-1D12)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたIg-CTFに優先的に結合する単離抗体、受託番号_____ (クローン-510-6B6)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体;又は受託番号_____ (クローン-515-4D6)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体。これらの抗体を調製するために使用される抗原及び方法論を、実施例12において完全に説明する。

10

【0165】

一部の場合において、第1抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に結合されている。固体支持体は、典型的には、ガラス又はポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンである。固体支持体は、ストリップ、カセット、チューブ、ビーズ、ディスク、プレート、もしくはマイクロプレート、又はイムノアッセイを行うために適した任意の他の表面の形態でありうる。結合プロセスは、当技術分野において周知であり、一般的に、分子を不溶性担体に共有結合させる又は物理的に吸着させる架橋からなる。一実施態様において、固体支持体はEIA/RIAプレートである。

20

【0166】

Ig-CTFにおいて、Igは、免疫グロブリンアイソタイプIgG、IgA、IgM、IgD、又はIgEでありうる。Ig-CTFにおけるIgの好ましい例は、IgGである。免疫グロブリンは、いくつかのサブユニットから作られる。例えば、IgGは、ガンマ()重鎖、及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。IgAは、アルファ()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。IgMは、ミュー(μ)重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。IgDは、デルタ()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。IgEは、エプシロン()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。Ig-CTFのIgは、また、免疫グロブリンのアイソタイプの1つのサブユニットでありうる。例えば、Igは、IgG、IgM、又はIgAのカッパ軽鎖でありうる。又は、Igは、IgGのガンマ重鎖でありうる。あるいは、Igは、抗原結合領域(Fab)でありうる。

30

【0167】

一部の実施態様において、第2抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能に標識される。検出可能な標識の例は、放射性標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、電気化学発光(EL)標識、又は酵素を含む。放射性標識は¹²⁵Iを含み、それは、抗体に付着することができる(Harlow and Lane, supra, 1988)。有用な蛍光標識は、例えば、DAPI、フルオレセイン、ランタニド金属、Hoechst 33258、Rフィコシアニン、Bフィコエリトリン、Rフィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、及びリサミンを含む。フルオレセイン又はローダミン標識 2-MG、HA、TIMP-1、又はYKL-40特異的結合薬剤(例えば抗 2-MG、抗HA、抗TIMP-1、もしくは抗YKL-40抗体、又はフルオレセインもしくはローダミン標識二次抗体など)が、本発明において有用でありうる。有用な蛍光抗体は、商業的に、例えば、Tago Immunologicals(Burlingame, Calif)から得ることができる。蛍光化合物は、それらの結合能力を変えなく、抗体に化学的に共役することができる。特定の波長の光を用いた照射により活性化される場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子中に興奮状態を誘導し、顕微鏡を用いて視覚的に検出可能な特徴的な色での光の放出が続く。酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)、ガラクトシダーゼ、又はウレアーゼなどを、本発明の方法における使用のために、例えば、抗アディポネクチンレセプターC末端フラグメントに又は二次抗体に

40

50

連結することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン (T M B) と使用することができ、それは、450 nm で検出可能である過酸化水素の存在において可溶性産物をもたらす。

【0168】

他の実施態様において、遊離 C T F は、アッセイのデザインのため、検出されない。

【0169】

インスリン抵抗性のための処置の例は、インスリンの必要性を低下させること、インスリン又は補充インスリンの作用への細胞の感受性を増加させることを含む。インスリンについての必要性を低下させることは、例えば、食事における変化を通じて生じうる。インスリンの作用への細胞の感受性を増加させることは、例えば、医薬 (例えばグルコファージ、ピオグリタゾン、及びロシグリタゾンなど) を取ることにより生じうる。補充インスリンは、例えば、インスリンを被験者中に導入することにより生じうる。

10

【0170】

提供する本発明の別の実施態様は、被験者においてインスリン抵抗性をモニターするための方法である。一実施態様において、被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種の I g - C T F 又はその第1抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露させ、これによって混合物を形成する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。この混合物を、次に、第1種の I g に優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。次に、サンプル中に存在する I g - C T F を定量化する。サンプル中の I g - C T F の分量を、次に、公知の標準又はより早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプル中に存在する I g - C T F の量のいずれかと比較する。次に、被験者の I g - C T F のレベルが、インスリン抵抗性の進行、退行、又は安定化を示しているか否かを決定することができる。

20

【0171】

例として、インスリン抵抗性は、耐糖能障害、前糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、3型糖尿病、若年性糖尿病、妊娠糖尿病、又は非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) と関連しうる。

【0172】

特定の実施態様において、発現のレベル (少なくとも1つの可溶性 I g - C T F の存在又は非存在を含む) を、イムノアッセイによりアッセイする。当業者は、その最も広い文脈において、「イムノアッセイ」が、テストサンプルを、標的について特異的な1つ又は複数の免疫相互作用分子と、それに結合し、前記結合を検出するために十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートすることを含むことを知っている。本明細書において使用する通り、用語「標的」は、プローブが結合するようにデザインされた分析物を指す。例えば、本明細書において、寄託された抗体の特異的な C T F 標的を提供する：配列番号 49、H V L V V A A A F V H F C Y S、配列番号 50、H F Y G V S N L Q E F R Y G L E G G C T D D S L L、配列番号 51、G G C T D D T L L、及び配列番号 52、G G C S E E D A L。特定の好ましい実施態様において、免疫相互作用分子は抗体である。例えば、これらの配列は、寄託された抗体により認識される：それぞれクローン 461 - 4H11、クローン 444 - 1D12、クローン 515 - 4D65、及びクローン 510 - 6B6。抗体をテストサンプルとインキュベートするための条件は、アッセイに用いられるフォーマット、用いられる検出方法、ならびにアッセイにおいて使用される抗体分子の型及び性質に依存し、変動する。当業者は、一般に利用可能な免疫学的アッセイフォーマットのいずれか1つ、例えば、酵素イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、酵素連結免疫吸着アッセイ (E L I S A)、免疫比濁、免疫比濁分析、磁気免疫粒子分離、イムノクロマトグラフィー、免疫マイクロ流体、免疫遠心、拡散ベースのオクタロニー、ロケットゲル免疫電気泳動、又はインサイチュイムノアッセイを、本目的に容易に適応することができることを認識するであろう。

30

40

【0173】

50

イムノアッセイは、テストサンプル中のアディポネクチン受容体の少なくとも1つのIg - CTFの定量化において、特に、少なくとも1つのIg - CTFのレベルが、非罹患個体において検出可能な正常レベルと比較し、変わっているか否かを決定するために有用である。結果として、そのようなイムノアッセイは、患者が疾患又は疾患への素因を有しうるか否かを決定する際に特に有用である。イムノアッセイは、他の使用、例えば、疾患進行のモニタリング又は治療的介入への応答のモニタリングにおける使用なども有しうる。本明細書において記載する本発明は、それらの性能のために前記イムノアッセイを要求する、免疫相互作用分子及び診断アッセイの全てのそのような使用にまで及ぶ。

【0174】

例としてだけ、特定の実施態様において、フラグメントに対して産生された抗体を固体基質上に固定化し、第1複合体を形成し、患者からの生物学的テストサンプルを結合分子と接触させる。インキュベーションの適した期間後、抗体 - 二次複合体の形成を可能にするために十分な期間にわたり、検出可能なシグナルを産生することが可能な受容体分子を用いて標識した第2抗体を、次に、加え、インキュベートし、三次複合体の形成のための十分な時間を可能にする。任意の未反応材料を洗い流し、三次複合体の存在を、レポーター分子により産生されたシグナルの観察により決定する。結果は、目に見えるシグナルの簡単な観察により定性的でありうる、又は、公知の量のハプテンを含むコントロールサンプルとの比較により定量化されうる。このアッセイのバリエーションは、同時アッセイ（それにおいて、サンプル及び標識抗体の両方が、同時に、結合抗体に加えらる）又はリバースアッセイ（それにおいて、標識抗体及びテストされるサンプルを最初に組み合わせ、インキュベートし、次に、同時に、結合抗体に加える）を含む。これらの技術は当業者に周知であり、バリエーションの可能性は容易に明らかであろう。

【0175】

Ig - CTFを検出する他の例は、定量的ウエスタンブロッティング、免疫組織化学、タンパク質バイオチップ、マススペクトロメトリー及び他を含む。

【0176】

CTF免疫グロブリンは、任意の適した方法により検出することができる。用いることができる検出パラダイムは、例えば、光学的方法、電気化学的方法（ボルタンメトリー及びアンペロメトリー技術）、原子間力顕微鏡法、及び無線周波数方法（例、多極共鳴スペクトロスコピー）を含む。光学的方法は、例えば、比色アッセイ、電子インピーダンススペクトロスコピー、顕微鏡法（共焦点及び非共焦点の両方）、蛍光の検出、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、及び複屈折又は屈折率（例、表面プラズモン共鳴、エリブソメトリー、共振ミラー方法、格子結合器導波管方法又はインターフェロメトリー）を含む。

【0177】

Ig - CTF自体は、免疫グロブリンに共有結合的に付着されたアディポレセプターのC末端フラグメントを含むことができる。用語「アディポレセプター」は、アディポレセプター1（「AdipoR1」）及びアディポレセプター2（「AdipoR2」）を含む。AdipoR1のアミノ酸配列の例は、配列番号1～22のアミノ酸配列を含む。AdipoR2のアミノ酸配列の例は、配列番号23～44のアミノ酸配列を含む。本発明の方法において、Ig - CTFの1つ又は複数（即ち、少なくとも1つ）を検出することができる。例えば、Ig - CTFの任意の1つ又は組み合わせ（それにおいて、CTFは、配列番号1～配列番号44のアミノ酸配列により表されるフラグメントの1つである）を検出することができる。

【0178】

本明細書に記載する方法において、生物学的サンプルは、多数の供給源から来うる。例えば、生物学的サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に関連しない細胞、組織、外科的に切除された腫瘍組織、生検、細針吸引サンプル、脳脊髄液、白血球、間質液、又は組織学的調製物に由来しうる。入手及び取り扱いのそれらの簡単さのため、血液及び血漿は、生物学的サンプルの特に有用な供給源でありう

10

20

30

40

50

る。

【0179】

一部の場合において、保存剤は、冷蔵又は冷凍しながら、保存のために生物学的サンプルを安定化させるのに役立つ。適した保存剤の例は、フッ化物、ヘパリン、又はEDTAを含む。

【0180】

他の実施態様において、組織は、肝臓、膵臓、リンパ節、脂肪、筋肉、又は脳である。これらの組織においてIg-CTFを検出するための方法の例は、免疫組織化学（組織染色）である。

【0181】

生物学的サンプルは、任意の哺乳動物に由来しうる。好ましい実施態様は、哺乳動物がヒトである場合でありうる。しかし、他の哺乳動物（動物園、研究、及び飼育動物（ペット）、例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ラバ、又はブタなどを含む）も、生物学的サンプルの潜在的な供給源でありうる。

【0182】

本発明の他の実施態様において、抗体が提供され、それらは、方法のための第1抗体として使用できうる。例えば、受託番号_____（クローン444-1D12）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたIg-CTFに優先的に結合する単離抗体、受託番号_____（クローン-510-6B6）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体；又は受託番号_____（クローン-515-4D6）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体。これらの抗体を調製するために使用される抗原及び方法論を、実施例12において完全に説明する。

【0183】

一部の場合において、第1抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に結合されている。固体支持体は、典型的には、ガラス又はポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンである。固体支持体は、ストリップ、カセット、チューブ、ビーズ、ディスク、プレート、もしくはマイクロプレート、又はイムノアッセイを行うために適した任意の他の表面の形態でありうる。結合プロセスは、当技術分野において周知であり、一般的に、分子を不溶性担体に共有結合させる又は物理的に吸着させる架橋からなる。一実施態様において、固体支持体はEIA/RIAプレートである。

【0184】

Ig-CTFにおいて、Igは、免疫グロブリンアイソタイプIgG、IgA、IgM、IgD、又はIgEでありうる。Ig-CTFにおけるIgの好ましい例は、IgGである。免疫グロブリンは、いくつかのサブユニットから作られる。例えば、IgGは、ガンマ（ γ ）重鎖、及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。IgAは、アルファ（ α ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。IgMは、ミュー（ μ ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。IgDは、デルタ（ δ ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。IgEは、エプシロン（ ϵ ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。Ig-CTFのIgは、また、免疫グロブリンのアイソタイプの1つのサブユニットでありうる。例えば、Igは、IgG、IgM、又はIgAのカッパ軽鎖でありうる。又は、Igは、IgGのガンマ重鎖でありうる。あるいは、Igは、抗原結合領域（Fab）でありうる。

【0185】

一部の実施態様において、第2抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能に標識される。検出可能な標識の例は、放射性標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、化学発光標識、電気化学発光（ECL）標識、又は酵素を含む。放射性標識は ^{125}I を含み、それは、抗体に付着することができる（Harlow and Lane, supra, 1988）。有

10

20

30

40

50

用な蛍光標識は、例えば、D A P I、フルオレセイン、ランタニド金属、Hoechst 33258、Rフィコシアニン、Bフィコエリトリン、Rフィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、及びリサミンを含む。フルオレセイン又はローダミン標識 2 - M G、H A、T I M P - 1、又はY K L - 4 0 特異的結合薬剤（例えば抗 2 - M G、抗 H A、抗 T I M P - 1、もしくは抗 Y K L - 4 0 抗体、又はフルオレセインもしくはローダミン標識二次抗体など）が、本発明において有用でありうる。有用な蛍光抗体は、商業的に、例えば、Tago Immunologicals (Burlingame, Calif) から得ることができる。蛍光化合物は、それらの結合能力を変えないことなく、抗体に化学的に共役することができる。特定の波長の光を用いた照射により活性化される場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子中に興奮状態を誘導し、顕微鏡を用いて視覚的に検出可能な特徴的な色での光の放出が続く。酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P)、アルカリホスファターゼ (A P)、ガラクトシダーゼ、又はウレアーゼなどを、本発明の方法における使用のために、例えば、抗アディポネクチンレセプター C 末端フラグメントに又は二次抗体に連結することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン (T M B) と使用することができ、それは、450 nm で検出可能である過酸化水素の存在において可溶性産物をもたらす。

10

【0186】

他の実施態様において、遊離 C T F は、アッセイのデザインのため、検出されない。

【0187】

本発明の別の実施態様において、公知の標準は、正常なインスリン感受性を有するとして同定されている被験者の I g - C T F レベルでありうる。本発明の別の実施態様において、公知の標準は、インスリン抵抗性として同定されている被験者の I g - C T F レベルでありうる。本発明の別の実施態様において、公知の標準は、糖尿病として同定されている被験者の I g - C T F レベルでありうる。本発明の別の実施態様において、工程に記載する生物学的サンプルが、インスリン抵抗性又は糖尿病のための処置に続いて、前記被験者から得られる、あるいは、より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプルが、インスリン抵抗性又は糖尿病のための処置に続いて、被験者から得られる。

20

【0188】

癌の診断、処置、及びモニタリングにおける I g - C T F の使用

本明細書において提供する別の実施態様は、被験者において癌を診断するための方法である。一実施態様において、被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種の I g - C T F 又はその第1抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露させ、これによって混合物を形成する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。この混合物を、次に、第1種の I g に優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。次に、サンプル中に存在する I g - C T F を定量化する。最後に、サンプル中に存在する I g - C T F の量を、公知の標準と比較し、サンプル中の I g - C T F の量が、癌と関連する I g - C T F のレベル内に入るか否かを決定する。

30

【0189】

例として、癌は、乳癌、転移性癌、肝細胞癌、又は膵臓癌でありうる。

40

【0190】

特定の実施態様において、発現のレベル（少なくとも1つの可溶性 I g - C T F の存在又は非存在を含む）を、イムノアッセイによりアッセイする。当業者は、その最も広い文脈において、「イムノアッセイ」が、テストサンプルを、標的について特異的な1つ又は複数の免疫相互作用分子と、それに結合し、前記結合を検出するために十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートすることを含むことを知っている。本明細書において使用する通り、用語「標的」は、プローブが結合するようにデザインされた分析物を指す。例えば、本明細書において、寄託された抗体の特異的な C T F 標的を提供する：配列番号 49、H V L V V A A A F V H F C Y S、配列番号 50、H F Y G V S N L Q E F R Y G L E G G C T D D S L L、配列番号 51、G G C T D D T L L、及び配列番号 52、G G C

50

SEEDAL。特定の好ましい実施態様において、免疫相互作用分子は抗体である。例えば、これらの配列は、寄託された抗体により認識される：それぞれクローン461-4H11、クローン444-1D12、クローン515-4D65、及びクローン510-6B6。抗体をテストサンプルとインキュベートするための条件は、アッセイに用いられるフォーマット、用いられる検出方法、ならびにアッセイにおいて使用される抗体分子の型及び性質に依存し、変動する。当業者は、一般に利用可能な免疫学的アッセイフォーマットのいずれか1つ、例えば、酵素イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫比濁、免疫比濁分析、磁気免疫粒子分離、イムノクロマトグラフィー、免疫マイクロ流体、免疫遠心、拡散ベースのオクタロニー、ロケットゲル免疫電気泳動、又はインサイチュイムノアッセイを、本目的に容易に適応することができることを認識するであろう。

10

【0191】

イムノアッセイは、テストサンプル中のアディポネクチン受容体の少なくとも1つのIg-CTFの定量化において、特に、少なくとも1つのIg-CTFのレベルが、非罹患個体において検出可能な正常レベルと比較し、変わっているか否かを決定するために有用である。結果として、そのようなイムノアッセイは、患者が疾患又は疾患への素因を有しうるか否かを決定する際に特に有用である。イムノアッセイは、他の使用、例えば、疾患進行のモニタリング又は治療的介入への応答のモニタリングにおける使用なども有しうる。本明細書において記載する本発明は、それらの性能のために前記イムノアッセイを要求する、免疫相互作用分子及び診断アッセイの全てのそのような使用にまで及ぶ。

20

【0192】

例としてだけ、特定の実施態様において、フラグメントに対して産生された抗体を固体基質上に固定化し、第1複合体を形成し、患者からの生物学的テストサンプルを結合分子と接触させる。インキュベーションの適した期間後、抗体-二次複合体の形成を可能にするために十分な期間にわたり、検出可能なシグナルを産生することが可能な受容体分子を用いて標識した第2抗体を、次に、加え、インキュベートし、三次複合体の形成のための十分な時間を可能にする。任意の未反応材料を洗い流し、三次複合体の存在を、レポーター分子により産生されたシグナルの観察により決定する。結果は、目に見えるシグナルの簡単な観察により定性的でありうる、又は、公知の量のハプテンを含むコントロールサンプルとの比較により定量化されうる。このアッセイのパリエーションは、同時アッセイ(それにおいて、サンプル及び標識抗体の両方が、同時に、結合抗体に加えられる)又はリバースアッセイ(それにおいて、標識抗体及びテストされるサンプルを最初に組み合わせ、インキュベートし、次に、同時に、結合抗体に加える)を含む。これらの技術は当業者に周知であり、パリエーションの可能性は容易に明らかであろう。

30

【0193】

Ig-CTFを検出する他の例は、定量的ウエスタンブロッティング、免疫組織化学、タンパク質バイオチップ、マススペクトロメトリー及び他を含む。

【0194】

CTF免疫グロブリンは、任意の適した方法により検出することができる。用いることができる検出パラダイムは、例えば、光学的方法、電気化学的方法(ボルタンメトリー及びアンペロメトリー技術)、原子間力顕微鏡法、及び無線周波数方法(例、多極共鳴スペクトロスコピー)を含む。光学的方法は、例えば、比色アッセイ、電子インピーダンススペクトロスコピー、顕微鏡法(共焦点及び非共焦点の両方)、蛍光の検出、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、及び複屈折又は屈折率(例、表面プラズモン共鳴、エリブソメトリー、共振ミラー方法、格子結合器導波管方法又はインターフェロメトリー)を含む。

40

【0195】

Ig-CTF自体は、免疫グロブリンに共有結合的に付着されたアディポレセプターのC末端フラグメントを含むことができる。用語「アディポレセプター」は、アディポレセプター1(「AdipoR1」)及びアディポレセプター2(「AdipoR2」)を含

50

む。A d i p o R 1のアミノ酸配列の例は、配列番号1～22のアミノ酸配列を含む。A d i p o R 2のアミノ酸配列の例は、配列番号23～44のアミノ酸配列を含む。本発明の方法において、I g - C T Fの1つ又は複数（即ち、少なくとも1つ）を検出することができる。例えば、I g - C T Fの任意の1つ又は組み合わせ（それにおいて、C T Fは、配列番号1～配列番号44のアミノ酸配列により表されるフラグメントの1つである）を検出することができる。

【0196】

本明細書に記載する方法において、生物学的サンプルは、多数の供給源から来うる。例えば、生物学的サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に関連しない細胞、組織、外科的に切除された腫瘍組織、生検、細針吸引サンプル、脳脊髄液、白血球、間質液、又は組織学的調製物に由来しうる。入手及び取り扱いのそれらの簡単さのため、血液及び血漿は、生物学的サンプルの特に有用な供給源でありうる。

10

【0197】

一部の場合において、保存剤は、冷蔵又は冷凍しながら、保存のために生物学的サンプルを安定化させるのに役立つ。適した保存剤の例は、フッ化物、ヘパリン、又はE D T Aを含む。

【0198】

他の実施態様において、組織は、肝臓、膵臓、リンパ節、脂肪、筋肉、又は脳である。これらの組織においてI g - C T Fを検出するための方法の例は、免疫組織化学（組織染色）である。

20

【0199】

生物学的サンプルは、任意の哺乳動物に由来しうる。好ましい実施態様は、哺乳動物がヒトである場合でありうる。しかし、他の哺乳動物（動物園、研究、及び飼育動物（ペット）、例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ラバ、又はブタなどを含む）も、生物学的サンプルの潜在的な供給源でありうる。

【0200】

本発明の他の実施態様において、抗体が提供され、それらは、方法のための第1抗体として使用できうる。例えば、受託番号_____（クローン444-1D12）を有し、A T C Cに寄託された細胞株により産生されたI g - C T Fに優先的に結合する単離抗体、受託番号_____（クローン-510-6B6）を有し、A T C Cに寄託された細胞株により産生されたC T Fに優先的に結合する単離抗体；又は受託番号_____（クローン-515-4D6）を有し、A T C Cに寄託された細胞株により産生されたC T Fに優先的に結合する単離抗体。これらの抗体を調製するために使用される抗原及び方法論を、実施例12において完全に説明する。

30

【0201】

一部の場合において、第1抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に結合されている。固体支持体は、典型的には、ガラス又はポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンである。固体支持体は、ストリップ、カセット、チューブ、ビーズ、ディスク、プレート、もしくはマイクロプレート、又はイムノアッセイを行うために適した任意の他の表面の形態でありうる。結合プロセスは、当技術分野において周知であり、一般的に、分子を不溶性担体に共有結合させる又は物理的に吸着させる架橋からなる。一実施態様において、固体支持体はE I A / R I Aプレートである。

40

【0202】

I g - C T Fにおいて、I gは、免疫グロブリンアイソタイプI g G、I g A、I g M、I g D、又はI g Eでありうる。I g - C T FにおけるI gの好ましい例は、I g Gである。免疫グロブリンは、いくつかのサブユニットから作られる。例えば、I g Gは、ガンマ（ γ ）重鎖、及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。I g Aは、アルファ

50

α () 重鎖及びカッパ () 又はラムダ () 軽鎖で作られる。Ig Mは、ミュー (μ) 重鎖及びカッパ () 又はラムダ () 軽鎖で作られる。Ig Dは、デルタ () 重鎖及びカッパ () 又はラムダ () 軽鎖で作られる。Ig Eは、エプシロン () 重鎖及びカッパ () 又はラムダ () 軽鎖で作られる。Ig - C T FのIgは、また、免疫グロブリンのアイソタイプの1つのサブユニットでありうる。例えば、Igは、Ig G、Ig M、又はIg Aのカッパ軽鎖でありうる。又は、Igは、Ig Gのガンマ重鎖でありうる。あるいは、Igは、抗原結合領域 (F a b) でありうる。

【0203】

一部の実施態様において、第2抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能に標識される。検出可能な標識の例は、放射性標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、化学発光標識、電気化学発光 (E C L) 標識、又は酵素を含む。放射性標識は 125 I を含み、それは、抗体に付着することができる (Harlow and Lane, supra, 1988)。有用な蛍光標識は、例えば、D A P I、フルオレセイン、ランタニド金属、Hoechst 33258、Rフィコシアニン、Bフィコエリトリン、Rフィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、及びリサミンを含む。フルオレセイン又はローダミン標識 2 - M G、H A、T I M P - 1、又はY K L - 40特異的結合薬剤 (例えば抗 2 - M G、抗H A、抗T I M P - 1、もしくは抗Y K L - 40抗体、又はフルオレセインもしくはローダミン標識二次抗体など) が、本発明において有用でありうる。有用な蛍光抗体は、商業的に、例えば、Tago Immunologicals (Burlingame, Calif) から得ることができる。蛍光化合物は、それらの結合能力を変えないことなく、抗体に化学的に共役することができる。特定の波長の光を用いた照射により活性化される場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子中に興奮状態を誘導し、顕微鏡を用いて視覚的に検出可能な特徴的な色の光の放出が続く。酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P)、アルカリホスファターゼ (A P)、ガラクトシダーゼ、又はウレアーゼなどを、本発明の方法における使用のために、例えば、抗アディポネクチンレセプターC末端フラグメントに又は二次抗体に連結することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン (T M B) と使用することができ、それは、450 nmで検出可能である過酸化水素の存在において可溶性産物をもたらす。

【0204】

他の実施態様において、遊離C T Fは、アッセイのデザインのため、検出されない。

【0205】

提供する本発明の別の実施態様は、被験者において癌を処置するための方法である。一実施態様において、被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種のIg - C T F又はその第1抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露させ、これによって混合物を形成する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。この混合物を、次に、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。次に、サンプル中に存在するIg - C T Fを定量化する。最後に、サンプル中に存在するIg - C T Fの量を、公知の標準と比較し、サンプル中のIg - C T Fの量が、癌と関連するIg - C T Fのレベル内に入るか否かを決定し、及び、被験者に、癌のための処置を施す、又は処方すること。

【0206】

例として、癌は、乳癌、転移性癌、肝細胞癌、又は膵臓癌でありうる。

【0207】

特定の実施態様において、発現のレベル (少なくとも1つの可溶性Ig - C T Fの存在又は非存在を含む) を、イムノアッセイによりアッセイする。当業者は、その最も広い文脈において、「イムノアッセイ」が、テストサンプルを、標的について特異的な1つ又は複数の免疫相互作用分子と、それに結合し、前記結合を検出するために十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートすることを含むことを知っている。本明細書において使用する通り、用語「標的」は、プローブが結合するようにデザインされた分析物を指す。例

えば、本明細書において、寄託された抗体の特異的なCTF標的を提供する：配列番号49、HVLVVA AAFVHFCYS、配列番号50、HFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDSL L、配列番号51、GGCTDDTLL、及び配列番号52、GGCS EEDAL。特定の好ましい実施態様において、免疫相互作用分子は抗体である。例えば、これらの配列は、寄託された抗体により認識される：それぞれクローン461-4H11、クローン444-1D12、クローン515-4D65、及びクローン510-6B6。抗体をテストサンプルとインキュベートするための条件は、アッセイに用いられるフォーマット、用いられる検出方法、ならびにアッセイにおいて使用される抗体分子の型及び性質に依存し、変動する。当業者は、一般に利用可能な免疫学的アッセイフォーマットのいずれか1つ、例えば、酵素イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫比濁、免疫比濁分析、磁気免疫粒子分離、イムノクロマトグラフィー、免疫マイクロ流体、免疫遠心、拡散ベースのオクタロニー、ロケットゲル免疫電気泳動、又はインサイチュイムノアッセイを、本目的に容易に適応することができることを認識するであろう。

10

20

30

40

50

【0208】

イムノアッセイは、テストサンプル中のアディポネクチン受容体の少なくとも1つのIg-CTFの定量化において、特に、少なくとも1つのIg-CTFのレベルが、非罹患個体において検出可能な正常レベルと比較し、変わっているか否かを決定するために有用である。結果として、そのようなイムノアッセイは、患者が疾患又は疾患への素因を有しているか否かを決定する際に特に有用である。イムノアッセイは、他の使用、例えば、疾患進行のモニタリング又は治療的介入への応答のモニタリングにおける使用なども有しうる。本明細書において記載する本発明は、それらの性能のために前記イムノアッセイを要求する、免疫相互作用分子及び診断アッセイの全てのそのような使用にまで及ぶ。

【0209】

例としてだけ、特定の実施態様において、フラグメントに対して産生された抗体を固体基質上に固定化し、第1複合体を形成し、患者からの生物学的テストサンプルを結合分子と接触させる。インキュベーションの適した期間後、抗体-二次複合体の形成を可能にするために十分な期間にわたり、検出可能なシグナルを産生することが可能な受容体分子を用いて標識した第2抗体を、次に、加え、インキュベートし、三次複合体の形成のための十分な時間を可能にする。任意の未反応材料を洗い流し、三次複合体の存在を、レポーター分子により産生されたシグナルの観察により決定する。結果は、目に見えるシグナルの簡単な観察により定性的でありうる、又は、公知の量のハプテンを含むコントロールサンプルとの比較により定量化されうる。このアッセイのバリエーションは、同時アッセイ(それにおいて、サンプル及び標識抗体の両方が、同時に、結合抗体に加えらる)又はリパスアッセイ(それにおいて、標識抗体及びテストされるサンプルを最初に組み合わせ、インキュベートし、次に、同時に、結合抗体に加える)を含む。これらの技術は当業者に周知であり、バリエーションの可能性は容易に明らかであろう。

【0210】

Ig-CTFを検出する他の例は、定量的ウエスタンブロッティング、免疫組織化学、タンパク質バイオチップ、マススペクトロメトリー及び他を含む。

【0211】

CTF免疫グロブリンは、任意の適した方法により検出することができる。用いることができる検出パラダイムは、例えば、光学的方法、電気化学的方法(ボルタンメトリー及びアンペロメトリー技術)、原子間力顕微鏡法、及び無線周波数方法(例、多極共鳴スペクトロスコーピー)を含む。光学的方法は、例えば、比色アッセイ、電子インピーダンススペクトロスコーピー、顕微鏡法(共焦点及び非共焦点の両方)、蛍光の検出、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、及び複屈折又は屈折率(例、表面プラズモン共鳴、エリブソメトリー、共振ミラー方法、格子結合器導波管方法又はインターフェロメトリー)を含む。

【0212】

Ig - CTF自体は、免疫グロブリンに共有結合的に付着されたアディポレセプターのC末端フラグメントを含むことができる。用語「アディポレセプター」は、アディポレセプター1(「AdipoR1」)及びアディポレセプター2(「AdipoR2」)を含む。AdipoR1のアミノ酸配列の例は、配列番号1~22のアミノ酸配列を含む。AdipoR2のアミノ酸配列の例は、配列番号23~44のアミノ酸配列を含む。本発明の方法において、Ig - CTFの1つ又は複数(即ち、少なくとも1つ)を検出することができる。例えば、Ig - CTFの任意の1つ又は組み合わせ(それにおいて、CTFは、配列番号1~配列番号44のアミノ酸配列により表されるフラグメントの1つである)を検出することができる。

【0213】

本発明の方法において、生物学的サンプルは、多数の供給源から来うる。例えば、生物学的サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に関連しない細胞、組織、外科的に切除された腫瘍組織、生検、細針吸引サンプル、脳脊髄液、白血球、間質液、又は組織学的調製物に由来しうる。入手及び取り扱いのそれらの簡単さのため、血液及び血漿は、生物学的サンプルの特に有用な供給源でありうる。

【0214】

一部の場合において、保存剤は、冷蔵又は冷凍しながら、保存のために生物学的サンプルを安定化させるのに役立つ。適した保存剤の例は、フッ化物、ヘパリン、又はEDTAを含む。

【0215】

他の実施態様において、組織は、肝臓、膵臓、リンパ節、脂肪、筋肉、又は脳である。これらの組織においてIg - CTFを検出するための方法の例は、免疫組織化学(組織染色)である。

【0216】

生物学的サンプルは、任意の哺乳動物に由来しうる。好ましい実施態様は、哺乳動物がヒトである場合でありうる。しかし、他の哺乳動物(動物園、研究、及び飼育動物(ペット)、例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ラバ、又はブタなどを含む)も、生物学的サンプルの潜在的な供給源でありうる。

【0217】

本発明の他の実施態様において、抗体が提供され、それらは、方法のための第1抗体として使用できうる。例えば、受託番号_____ (クローン444-1D12)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたIg - CTFに優先的に結合する単離抗体、受託番号_____ (クローン-510-6B6)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体;又は受託番号_____ (クローン-515-4D6)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体。これらの抗体を調製するために使用される抗原及び方法論を、実施例12において完全に説明する。

【0218】

一部の場合において、第1抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に結合されている。固体支持体は、典型的には、ガラス又はポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンである。固体支持体は、ストリップ、カセット、チューブ、ビーズ、ディスク、プレート、もしくはマイクロプレート、又はイムノアッセイを行うために適した任意の他の表面の形態でありうる。結合プロセスは、当技術分野において周知であり、一般的に、分子を不溶性担体に共有結合させる又は物理的に吸着させる架橋からなる。一実施態様において、固体支持体はEIA/RIAプレートである。

【0219】

Ig - CTFにおいて、Igは、免疫グロブリンアイソタイプIgG、IgA、IgM、IgD、又はIgEでありうる。Ig - CTFにおけるIgの好ましい例は、IgGで

10

20

30

40

50

ある。免疫グロブリンは、いくつかのサブユニットから作られる。例えば、I g Gは、ガンマ()重鎖、及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g Aは、アルファ()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g Mは、ミュー(μ)重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g Dは、デルタ()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g Eは、エプシロン()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。I g - C T FのI gは、また、免疫グロブリンのアイソタイプの1つのサブユニットでありうる。例えば、I gは、I g G、I g M、又はI g Aのカッパ軽鎖でありうる。又は、I gは、I g Gのガンマ重鎖でありうる。あるいは、I gは、抗原結合領域(F a b)でありうる。

【0220】

一部の実施態様において、第2抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能に標識される。検出可能な標識の例は、放射性標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、化学発光標識、電気化学発光(E C L)標識、又は酵素を含む。放射性標識は^{1 2 5} Iを含み、それは、抗体に付着することができる(Harlow and Lane, supra, 1988)。有用な蛍光標識は、例えば、D A P I、フルオレセイン、ランタニド金属、Hoechst 33258、Rフィコシアニン、Bフィコエリトリン、Rフィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、及びリサミンを含む。フルオレセイン又はローダミン標識 2 - M G、H A、T I M P - 1、又はY K L - 4 0 特異的結合薬剤(例えば抗 2 - M G、抗H A、抗T I M P - 1、もしくは抗Y K L - 4 0 抗体、又はフルオレセインもしくはローダミン標識二次抗体など)が、本発明において有用でありうる。有用な蛍光抗体は、商業的に、例えば、Tago Immunologicals (Burlingame, Calif) から得ることができる。蛍光化合物は、それらの結合能力を変えなく、抗体に化学的に共役することができる。特定の波長の光を用いた照射により活性化される場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子中に興奮状態を誘導し、顕微鏡を用いて視覚的に検出可能な特徴的な色での光の放出が続く。酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ(H R P)、アルカリホスファターゼ(A P)、ガラクトシダーゼ、又はウレアーゼなどを、本発明の方法における使用のために、例えば、抗アディポネクチンレセプターC末端フラグメントに又は二次抗体に連結することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン(T M B)と使用することができ、それは、450 nmで検出可能である過酸化水素の存在において可溶性産物をもたらす。

【0221】

他の実施態様において、遊離C T Fは、アッセイのデザインのため、検出されない。

【0222】

癌処置の例は、外科手術、ホルモン治療、放射線、化学療法、免疫療法、標的治療、及びそれらの組み合わせを含む。ホルモン治療薬物の例は、アロマターゼ阻害剤ならびに黄体形成ホルモン放出ホルモン類似体及び阻害剤を含む。放射線処置の例は、原体陽子ビーム放射線治療、定位放射線手術、定位放射線治療、術中放射線治療、化学修飾剤、及び放射線増感剤の関連技術を含む。化学療法薬物の例は、アミノプテリン、シスプラチン、メトトレキサート、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ならびに、その他の単独及び組み合わせを含む。癌処置の例は、また、生物学的応答修飾因子(B R M)治療、生物学的治療、生物療法、及び免疫療法を含む。B R Mの例は、インターフェロン、インターロイキン、ならびに他のサイトカイン及び抗体(例えばリツキシマブ及びトラスツズマブなど)及びさらに癌ワクチン(例えばSipuleucel-Tなど)を含む。癌治療の他の例は、成長シグナル阻害剤(例えばトラスツズマブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、セツキシマブ(c e n t u x i m a b)、ダサチニブ、及びニロチニブなど)などの標的治療を含む。標的治療の別の型は、血管新生阻害剤(例えば、周囲の血管構造及び血液供給の増加から癌を阻害するベパシズマブなど)を含む。標的治療の最終的な型は、直接的な癌細胞死を誘導することができるアポトーシス誘導薬物を含む。

【0223】

提供する本発明の別の実施態様は、被験者において癌をモニターするための方法である

10

20

30

40

50

。一実施態様において、被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種のIg - CTF又はその第1抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露させ、これによって混合物を形成する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。この混合物を、次に、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。次に、サンプル中に存在するIg - CTFを定量化する。サンプル中のIg - CTFの分量を、次に、公知の標準又はより早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプル中に存在するIg - CTFの量のいずれかと比較する。次に、被験者のIg - CTFのレベルが、癌の進行、退行、又は安定化を示しているか否かを決定することができる。

【0224】

例として、癌は、乳癌、転移性癌、肝細胞癌、又は膵臓癌でありうる。

【0225】

特定の実施態様において、発現のレベル（少なくとも1つの可溶性Ig - CTFの存在又は非存在を含む）を、免疫アッセイによりアッセイする。当業者は、その最も広い文脈において、「免疫アッセイ」が、テストサンプルを、標的について特異的な1つ又は複数の免疫相互作用分子と、それに結合し、前記結合を検出するために十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートすることを含むことを知っている。本明細書において使用する通り、用語「標的」は、プローブが結合するようにデザインされた分析物を指す。例えば、本明細書において、寄託された抗体の特異的なCTF標的を提供する：配列番号49、HVLVVA AAFVHFCYS、配列番号50、HFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDSL L、配列番号51、GGCTDDTL L、及び配列番号52、GGCSEEDAL。特定の好ましい実施態様において、免疫相互作用分子は抗体である。例えば、これらの配列は、寄託された抗体により認識される：それぞれクローン461 - 4H11、クローン444 - 1D12、クローン515 - 4D65、及びクローン510 - 6B6。抗体をテストサンプルとインキュベートするための条件は、アッセイに用いられるフォーマット、用いられる検出方法、ならびにアッセイにおいて使用される抗体分子の型及び性質に依存し、変動する。当業者は、一般に利用可能な免疫学的アッセイフォーマットのいずれか1つ、例えば、酵素免疫アッセイ、ラジオ免疫アッセイ、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）、免疫比濁、免疫比濁分析、磁気免疫粒子分離、免疫クロマトグラフィー、免疫マイクロ流体、免疫遠心、拡散ベースのオクタロニー、ロケットゲル免疫電気泳動、又はインサイチュ免疫アッセイを、本目的に容易に適応することができることを認識するであろう。

【0226】

免疫アッセイは、テストサンプル中のアディポネクチン受容体の少なくとも1つのIg - CTFの定量化において、特に、少なくとも1つのIg - CTFのレベルが、非罹患個体において検出可能な正常レベルと比較し、変わっているか否かを決定するために有用である。結果として、そのような免疫アッセイは、患者が疾患又は疾患への素因を有しているか否かを決定する際に特に有用である。免疫アッセイは、他の使用、例えば、疾患進行のモニタリング又は治療的介入への応答のモニタリングにおける使用なども有しうる。本明細書において記載する本発明は、それらの性能のために前記免疫アッセイを要求する、免疫相互作用分子及び診断アッセイの全てのそのような使用にまで及ぶ。

【0227】

例としてだけ、特定の実施態様において、フラグメントに対して産生された抗体を固体基質上に固定化し、第1複合体を形成し、患者からの生物学的テストサンプルを結合分子と接触させる。インキュベーションの適した期間後、抗体 - 二次複合体の形成を可能にするために十分な期間にわたり、検出可能なシグナルを産生することが可能な受容体分子を用いて標識した第2抗体を、次に、加え、インキュベートし、三次複合体の形成のための十分な時間を可能にする。任意の未反応材料を洗い流し、三次複合体の存在を、レポーター分子により産生されたシグナルの観察により決定する。結果は、目に見えるシグナルの簡単な観察により定性的でありうる、又は、公知の量のハプテンを含むコントロールサン

10

20

30

40

50

ブルとの比較により定量化されうる。このアッセイのバリエーションは、同時アッセイ（それにおいて、サンプル及び標識抗体の両方が、同時に、結合抗体に加えられる）又はリバースアッセイ（それにおいて、標識抗体及びテストされるサンプルを最初に組み合わせ、インキュベートし、次に、同時に、結合抗体に加える）を含む。これらの技術は当業者に周知であり、バリエーションの可能性は容易に明らかであろう。

【0228】

Ig - CTFを検出する他の例は、定量的ウエスタンブロッティング、免疫組織化学、タンパク質バイオチップ、マスペクトロメトリー及び他を含む。

【0229】

CTF免疫グロブリンは、任意の適した方法により検出することができる。用いることができる検出パラダイムは、例えば、光学的方法、電気化学的方法（ボルタンメトリー及びアンペロメトリー技術）、原子間力顕微鏡法、及び無線周波数方法（例、多極共鳴スペクトロスコピー）を含む。光学的方法は、例えば、比色アッセイ、電子インピーダンススペクトロスコピー、顕微鏡法（共焦点及び非共焦点の両方）、蛍光の検出、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、及び複屈折又は屈折率（例、表面プラズモン共鳴、エリブソメトリー、共振ミラー方法、格子結合器導波管方法又はインターフェロメトリー）を含む。

10

【0230】

Ig - CTF自体は、免疫グロブリンに共有結合的に付着されたアディポレセプターのC末端フラグメントを含むことができる。用語「アディポレセプター」は、アディポレセプター1（「AdipoR1」）及びアディポレセプター2（「AdipoR2」）を含む。AdipoR1のアミノ酸配列の例は、配列番号1～22のアミノ酸配列を含む。AdipoR2のアミノ酸配列の例は、配列番号23～44のアミノ酸配列を含む。本発明の方法において、Ig - CTFの1つ又は複数（即ち、少なくとも1つ）を検出することができる。例えば、Ig - CTFの任意の1つ又は組み合わせ（それにおいて、CTFは、配列番号1～配列番号44のアミノ酸配列により表されるフラグメントの1つである）を検出することができる。

20

【0231】

本発明の方法において、生物学的サンプルは、多数の供給源から来うる。例えば、生物学的サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に関連しない細胞、組織、外科的に切除された腫瘍組織、生検、細針吸引サンプル、脳脊髄液、白血球、間質液、又は組織学的調製物に由来しうる。入手及び取り扱いのそれらの簡単さのため、血液及び血漿は、生物学的サンプルの特に有用な供給源でありうる。

30

【0232】

一部の場合において、保存剤は、冷蔵又は冷凍しながら、保存のために生物学的サンプルを安定化させるのに役立つ。適した保存剤の例は、フッ化物、ヘパリン、又はEDTAを含む。

【0233】

他の実施態様において、組織は、肝臓、膵臓、リンパ節、脂肪、筋肉、又は脳である。これらの組織においてIg - CTFを検出するための方法の例は、免疫組織化学（組織染色）である。

40

【0234】

生物学的サンプルは、任意の哺乳動物に由来しうる。好ましい実施態様は、哺乳動物がヒトである場合でありうる。しかし、他の哺乳動物（動物園、研究、及び飼育動物（ペット）、例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ラバ、又はブタなどを含む）も、生物学的サンプルの潜在的な供給源でありうる。

【0235】

本発明の他の実施態様において、抗体が提供され、それらは、方法のための第1抗体として使用できうる。例えば、受託番号_____（クローン444 - 1D12）を有し、A

50

TCCに寄託された細胞株により産生されたIg-CTFに優先的に結合する単離抗体、受託番号_____ (クローン-510-6B6)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体；又は受託番号_____ (クローン-515-4D6)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体。これらの抗体を調製するために使用される抗原及び方法論を、実施例12において完全に説明する。

【0236】

一部の場合において、第1抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に結合されている。固体支持体は、典型的には、ガラス又はポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンである。固体支持体は、ストリップ、カセット、チューブ、ビーズ、ディスク、プレート、もしくはマイクロプレート、又はイムノアッセイを行うために適した任意の他の表面の形態でありうる。結合プロセスは、当技術分野において周知であり、一般的に、分子を不溶性担体に共有結合させる又は物理的に吸着させる架橋からなる。一実施態様において、固体支持体はEIA/RIAプレートである。

10

【0237】

Ig-CTFにおいて、Igは、免疫グロブリンアイソタイプIgG、IgA、IgM、IgD、又はIgEでありうる。Ig-CTFにおけるIgの好ましい例は、IgGである。免疫グロブリンは、いくつかのサブユニットから作られる。例えば、IgGは、ガンマ()重鎖、及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。IgAは、アルファ()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。IgMは、ミュー(μ)重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。IgDは、デルタ()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。IgEは、エプシロン()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。Ig-CTFのIgは、また、免疫グロブリンのアイソタイプの1つのサブユニットでありうる。例えば、Igは、IgG、IgM、又はIgAのカッパ軽鎖でありうる。又は、Igは、IgGのガンマ重鎖でありうる。あるいは、Igは、抗原結合領域(Fab)でありうる。

20

【0238】

一部の実施態様において、第2抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能に標識される。検出可能な標識の例は、放射性標識、蛍光標識、エピトプタグ、ビオチン、発色団標識、化学発光標識、電気化学発光(ECL)標識、又は酵素を含む。放射性標識は¹²⁵Iを含み、それは、抗体に付着することができる(Harlow and Lane, supra, 1988)。有用な蛍光標識は、例えば、DAPI、フルオレセイン、ランタニド金属、Hoechst 33258、Rフィコシアニン、Bフィコエリトリン、Rフィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、及びリサミンを含む。フルオレセイン又はローダミン標識2-MG、HA、TIMP-1、又はYKL-40特異的結合薬剤(例えば抗2-MG、抗HA、抗TIMP-1、もしくは抗YKL-40抗体、又はフルオレセインもしくはローダミン標識二次抗体など)が、本発明において有用でありうる。有用な蛍光抗体は、商業的に、例えば、Tago Immunologicals (Burlingame, Calif)から得ることができる。蛍光化合物は、それらの結合能力を変えないことなく、抗体に化学的に共役することができる。特定の波長の光を用いた照射により活性化される場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子中に興奮状態を誘導し、顕微鏡を用いて視覚的に検出可能な特徴的な色の光の放出が続く。酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)、ガラクトシダーゼ、又はウレアーゼなどを、本発明の方法における使用のために、例えば、抗アディポネクチンレセプターC末端フラグメントに又は二次抗体に連結することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン(TMB)と使用することができ、それは、450nmで検出可能である過酸化水素の存在において可溶性産物をもたらす。

30

40

【0239】

他の実施態様において、遊離CTFは、アッセイのデザインのため、検出されない。

50

【 0 2 4 0 】

本発明の別の実施態様において、公知の標準は、癌がないとして同定されている被験者の I g - C T F レベルでありうる。本発明の別の実施態様において、公知の標準は、癌を有するとして同定されている被験者の I g - C T F レベルでありうる。本発明の別の実施態様において、工程 a に記載する生物学的サンプルが、癌のための処置に続いて、被験者から得られる、あるいは、より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプルが、癌のための処置に続いて、被験者から得られる。

【 0 2 4 1 】

肝臓疾患の診断、処置、及びモニタリングにおける I g - C T F の使用

提供する本発明の実施態様は、被験者において肝臓疾患を診断するための方法である。一実施態様において、被験者に由来する生物学的サンプルを、第 1 種の I g - C T F 又はその第 1 抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第 2 種の第 1 抗体に曝露させ、これによって混合物を形成する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。この混合物を、次に、第 1 種の I g に優先的に結合する第 3 種の第 2 抗体又は抗原結合フラグメントに曝露する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。次に、サンプル中に存在する I g - C T F を定量化する。最後に、サンプル中に存在する I g - C T F の量を、公知の標準と比較し、サンプル中の I g - C T F の量が、肝臓疾患と関連する I g - C T F のレベル内に入るか否かを決定する。

10

【 0 2 4 2 】

肝臓疾患の例は、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H)、又はアルコール性肝炎を含む。

20

【 0 2 4 3 】

特定の実施態様において、発現のレベル (少なくとも 1 つの可溶性 I g - C T F の存在又は非存在を含む) を、イムノアッセイによりアッセイする。当業者は、その最も広い文脈において、「イムノアッセイ」が、テストサンプルを、標的について特異的な 1 つ又は複数の免疫相互作用分子と、それに結合し、前記結合を検出するために十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートすることを含むことを知っている。本明細書において使用する通り、用語「標的」は、プローブが結合するようにデザインされた分析物を指す。例えば、本明細書において、寄託された抗体の特異的な C T F 標的を提供する：配列番号 4 9、H V L V V A A A F V H F C Y S、配列番号 5 0、H F Y G V S N L Q E F R Y G L E G G C T D D S L L、配列番号 5 1、G G C T D D T L L、及び配列番号 5 2、G G C S E E D A L。特定の好ましい実施態様において、免疫相互作用分子は抗体である。例えば、これらの配列は、寄託された抗体により認識される：それぞれクローン 4 6 1 - 4 H 1 1、クローン 4 4 4 - 1 D 1 2、クローン 5 1 5 - 4 D 6 5、及びクローン 5 1 0 - 6 B 6。抗体をテストサンプルとインキュベートするための条件は、アッセイに用いられるフォーマット、用いられる検出方法、ならびにアッセイにおいて使用される抗体分子の型及び性質に依存し、変動する。当業者は、一般に利用可能な免疫学的アッセイフォーマットのいずれか 1 つ、例えば、酵素イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、酵素連結免疫吸着アッセイ (E L I S A)、免疫比濁、免疫比濁分析、磁気免疫粒子分離、イムノクロマトグラフィー、免疫マイクロ流体、免疫遠心、拡散ベースのオクタロニー、ロケットゲル免疫電気泳動、又はインサイチュイムノアッセイを、本目的に容易に適応することができることを認識するであろう。

30

40

【 0 2 4 4 】

イムノアッセイは、テストサンプル中のアディポネクチン受容体の少なくとも 1 つの I g - C T F の定量化において、特に、少なくとも 1 つの I g - C T F のレベルが、非罹患個体において検出可能な正常レベルと比較し、変わっているか否かを決定するために有用である。結果として、そのようなイムノアッセイは、患者が疾患又は疾患への素因を有しているか否かを決定する際に特に有用である。イムノアッセイは、他の使用、例えば、疾患進行のモニタリング又は治療的介入への応答のモニタリングにおける使用なども有しうる。本明細書において記載する本発明は、それらの性能のために前記イムノアッセイを要求

50

する、免疫相互作用分子及び診断アッセイの全てのそのような使用にまで及ぶ。

【0245】

例としてだけ、特定の実施態様において、フラグメントに対して産生された抗体を固体基質上に固定化し、第1複合体を形成し、患者からの生物学的テストサンプルを結合分子と接触させる。インキュベーションの適した期間後、抗体-二次複合体の形成を可能にするために十分な期間にわたり、検出可能なシグナルを産生することが可能な受容体分子を用いて標識した第2抗体を、次に、加え、インキュベートし、三次複合体の形成のための十分な時間を可能にする。任意の未反応材料を洗い流し、三次複合体の存在を、レポーター分子により産生されたシグナルの観察により決定する。結果は、目に見えるシグナルの簡単な観察により定性的でありうる、又は、公知の量のハプテンを含むコントロールサンプルとの比較により定量化されうる。このアッセイのパリエーションは、同時アッセイ（それにおいて、サンプル及び標識抗体の両方が、同時に、結合抗体に加えられる）又はリバースアッセイ（それにおいて、標識抗体及びテストされるサンプルを最初に組み合わせ、インキュベートし、次に、同時に、結合抗体に加える）を含む。これらの技術は当業者に周知であり、パリエーションの可能性は容易に明らかであろう。

10

【0246】

Ig-CtFを検出する他の例は、定量的ウエスタンブロッティング、免疫組織化学、タンパク質バイオチップ、マススペクトロメトリー及び他を含む。

【0247】

CtF免疫グロブリンは、任意の適した方法により検出することができる。用いることができる検出パラダイムは、例えば、光学的方法、電気化学的方法（ボルタンメトリー及びアンペロメトリー技術）、原子間力顕微鏡法、及び無線周波数方法（例、多極共鳴スペクトロスコピー）を含む。光学的方法は、例えば、比色アッセイ、電子インピーダンススペクトロスコピー、顕微鏡法（共焦点及び非共焦点の両方）、蛍光の検出、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、及び複屈折又は屈折率（例、表面プラズモン共鳴、エリブソメトリー、共振ミラー方法、格子結合器導波管方法又はインターフェロメトリー）を含む。

20

【0248】

Ig-CtF自体は、免疫グロブリンに共有結合的に付着されたアディポレセプターのC末端フラグメントを含むことができる。用語「アディポレセプター」は、アディポレセプター1（「AdipoR1」）及びアディポレセプター2（「AdipoR2」）を含む。AdipoR1のアミノ酸配列の例は、配列番号1～22のアミノ酸配列を含む。AdipoR2のアミノ酸配列の例は、配列番号23～44のアミノ酸配列を含む。本発明の方法において、Ig-CtFの1つ又は複数（即ち、少なくとも1つ）を検出することができる。例えば、Ig-CtFの任意の1つ又は組み合わせ（それにおいて、CtFは、配列番号1～配列番号44のアミノ酸配列により表されるフラグメントの1つである）を検出することができる。

30

【0249】

本発明の方法において、生物学的サンプルは、多数の供給源から来うる。例えば、生物学的サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に関連しない細胞、組織、外科的に切除された腫瘍組織、生検、細針吸引サンプル、脳脊髄液、白血球、間質液、又は組織学的調製物に由来しうる。入手及び取り扱いのそれらの簡単さのため、血液及び血漿は、生物学的サンプルの特に有用な供給源でありうる。

40

【0250】

一部の場合において、保存剤は、冷蔵又は冷凍しながら、保存のために生物学的サンプルを安定化させるのに役立つ。適した保存剤の例は、フッ化物、ヘパリン、又はEDTAを含む。

【0251】

他の実施態様において、組織は、肝臓、膵臓、リンパ節、脂肪、筋肉、又は脳である。これらの組織においてIg-CtFを検出するための方法の例は、免疫組織化学（組織染

50

色)である。

【0252】

生物学的サンプルは、任意の哺乳動物に由来しうる。好ましい実施態様は、哺乳動物がヒトである場合でありうる。しかし、他の哺乳動物(動物園、研究、及び飼育動物(ペット)、例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ラバ、又はブタなどを含む)も、生物学的サンプルの潜在的な供給源でありうる。

【0253】

本発明の他の実施態様において、抗体が提供され、それらは、方法のための第1抗体として使用できうる。例えば、受託番号_____ (クローン444-1D12)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたIg-CTFに優先的に結合する単離抗体、受託番号_____ (クローン-510-6B6)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体;又は受託番号_____ (クローン-515-4D6)を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生されたCTFに優先的に結合する単離抗体。これらの抗体を調製するために使用される抗原及び方法論を、実施例12において完全に説明する。

10

【0254】

一部の場合において、第1抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に結合されている。固体支持体は、典型的には、ガラス又はポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンである。固体支持体は、ストリップ、カセット、チューブ、ビーズ、ディスク、プレート、もしくはマイクロプレート、又はイムノアッセイを行うために適した任意の他の表面の形態でありうる。結合プロセスは、当技術分野において周知であり、一般的に、分子を不溶性担体に共有結合させる又は物理的に吸着させる架橋からなる。一実施態様において、固体支持体はEIA/RIAプレートである。

20

【0255】

Ig-CTFにおいて、Igは、免疫グロブリンアイソタイプIgG、IgA、IgM、IgD、又はIgEでありうる。Ig-CTFにおけるIgの好ましい例は、IgGである。免疫グロブリンは、いくつかのサブユニットから作られる。例えば、IgGは、ガンマ()重鎖、及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。IgAは、アルファ()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。IgMは、ミュー(μ)重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。IgDは、デルタ()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。IgEは、エプシロン()重鎖及びカッパ()又はラムダ()軽鎖で作られる。Ig-CTFのIgは、また、免疫グロブリンのアイソタイプの1つのサブユニットでありうる。例えば、Igは、IgG、IgM、又はIgAのカッパ軽鎖でありうる。又は、Igは、IgGのガンマ重鎖でありうる。あるいは、Igは、抗原結合領域(Fab)でありうる。

30

【0256】

一部の実施態様において、第2抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能に標識される。検出可能な標識の例は、放射性標識、蛍光標識、エピトプタグ、ビオチン、発色団標識、化学発光標識、電気化学発光(ECL)標識、又は酵素を含む。放射性標識は¹²⁵Iを含み、それは、抗体に付着することができる(Harlow and Lane, supra, 1988)。有用な蛍光標識は、例えば、DAPI、フルオレセイン、ランタニド金属、Hoechst 33258、Rフィコシアニン、Bフィコエリトリン、Rフィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、及びリサミンを含む。フルオレセイン又はローダミン標識 2-MG、HA、TIMP-1、又はYKL-40特異的結合薬剤(例えば抗 2-MG、抗HA、抗TIMP-1、もしくは抗YKL-40抗体、又はフルオレセインもしくはローダミン標識二次抗体など)が、本発明において有用でありうる。有用な蛍光抗体は、商業的に、例えば、Tago Immunologicals(Burlingame, Calif)から得ることができる。蛍光化合物は、それらの結合能力を変えずに、抗体に化学的に共役することができる。特定の波長の

40

50

光を用いた照射により活性化される場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子中に興奮状態を誘導し、顕微鏡を用いて視覚的に検出可能な特徴的な色の光の放出が続く。酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（AP）、ガラクトシダーゼ、又はウレアーゼなどを、本発明の方法における使用のために、例えば、抗アディポネクチンレセプターC末端フラグメントに又は二次抗体に連結することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン（TMB）と使用することができ、それは、450nmで検出可能である過酸化水素の存在において可溶性産物をもたらす。

【0257】

他の実施態様において、遊離CTFは、アッセイのデザインのため、検出されない。

10

【0258】

提供する本発明の別の実施態様は、被験者において肝臓疾患を処置するための方法である。一実施態様において、被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種のIg-CTF又はその第1抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露させ、これによって混合物を形成する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。この混合物を、次に、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。次に、サンプル中に存在するIg-CTFを定量化する。最後に、サンプル中に存在するIg-CTFの量を、公知の標準と比較し、サンプル中のIg-CTFの量が、癌と関連するIg-CTFのレベル内に入るか否かを決定し、及び、被験者に、肝臓疾患のための処置を施す、又は処方すること。

20

【0259】

肝臓疾患の例は、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、又はアルコール性肝炎を含む。

【0260】

特定の実施態様において、発現のレベル（少なくとも1つの可溶性Ig-CTFの存在又は非存在を含む）を、イムノアッセイによりアッセイする。当業者は、その最も広い文脈において、「イムノアッセイ」が、テストサンプルを、標的について特異的な1つ又は複数の免疫相互作用分子と、それに結合し、前記結合を検出するために十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートすることを含むことを知っている。本明細書において使用する通り、用語「標的」は、プローブが結合するようにデザインされた分析物を指す。例えば、本明細書において、寄託された抗体の特異的なCTF標的を提供する：配列番号49、HVLVVA AAFVHFCYS、配列番号50、HFYGVSNLQEF RYGL EGGCTDDSL L、配列番号51、GGCTDDTL L、及び配列番号52、GGCSEEDAL。特定の好ましい実施態様において、免疫相互作用分子は抗体である。例えば、これらの配列は、寄託された抗体により認識される：それぞれクローン461-4H11、クローン444-1D12、クローン515-4D65、及びクローン510-6B6。抗体をテストサンプルとインキュベートするための条件は、アッセイに用いられるフォーマット、用いられる検出方法、ならびにアッセイにおいて使用される抗体分子の型及び性質に依存し、変動する。当業者は、一般に利用可能な免疫学的アッセイフォーマットのいずれか1つ、例えば、酵素イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）、免疫比濁、免疫比濁分析、磁気免疫粒子分離、イムノクロマトグラフィー、免疫マイクロ流体、免疫遠心、拡散ベースのオクタロニー、ロケットゲル免疫電気泳動、又はインサイチュイムノアッセイを、本目的に容易に適応することができることを認識するであろう。

30

40

【0261】

イムノアッセイは、テストサンプル中のアディポネクチン受容体の少なくとも1つのIg-CTFの定量化において、特に、少なくとも1つのIg-CTFのレベルが、非罹患者において検出可能な正常レベルと比較し、変わっているか否かを決定するために有用である。結果として、そのようなイムノアッセイは、患者が疾患又は疾患への素因を有し

50

うるか否かを決定する際に特に有用である。免疫アッセイは、他の使用、例えば、疾患進行のモニタリング又は治療的介入への応答のモニタリングにおける使用なども有しうる。本明細書において記載する本発明は、それらの性能のために前記免疫アッセイを要求する、免疫相互作用分子及び診断アッセイの全てのそのような使用にまで及び。

【0262】

例としてだけ、特定の実施態様において、フラグメントに対して産生された抗体を固体基質上に固定化し、第1複合体を形成し、患者からの生物学的テストサンプルを結合分子と接触させる。インキュベーションの適した期間後、抗体-二次複合体の形成を可能にするために十分な期間にわたり、検出可能なシグナルを産生することが可能な受容体分子を用いて標識した第2抗体を、次に、加え、インキュベートし、三次複合体の形成のための十分な時間を可能にする。任意の未反応材料を洗い流し、三次複合体の存在を、レポーター分子により産生されたシグナルの観察により決定する。結果は、目に見えるシグナルの簡単な観察により定性的でありうる、又は、公知の量のハプテンを含むコントロールサンプルとの比較により定量化されうる。このアッセイのバリエーションは、同時アッセイ（それにおいて、サンプル及び標識抗体の両方が、同時に、結合抗体に加えらる）又はリパスアッセイ（それにおいて、標識抗体及びテストされるサンプルを最初に組み合わせ、インキュベートし、次に、同時に、結合抗体に加える）を含む。これらの技術は当業者に周知であり、バリエーションの可能性は容易に明らかであろう。

10

【0263】

Ig - CTFを検出する他の例は、定量的ウエスタンブロッティング、免疫組織化学、タンパク質バイオチップ、マスペクトロメトリー及び他を含む。

20

【0264】

CTF免疫グロブリンは、任意の適した方法により検出することができる。用いることができる検出パラダイムは、例えば、光学的方法、電気化学的方法（ボルタンメトリー及びアンペロメトリー技術）、原子間力顕微鏡法、及び無線周波数方法（例、多極共鳴スペクトロスコピー）を含む。光学的方法は、例えば、比色アッセイ、電子インピーダンススペクトロスコピー、顕微鏡法（共焦点及び非共焦点の両方）、蛍光の検出、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、及び複屈折又は屈折率（例、表面プラズモン共鳴、エリブソメトリー、共振ミラー方法、格子結合器導波管方法又はインターフェロメトリー）を含む。

30

【0265】

Ig - CTF自体は、免疫グロブリンに共有結合的に付着されたアディポレセプターのC末端フラグメントを含むことができる。用語「アディポレセプター」は、アディポレセプター1（「AdipoR1」）及びアディポレセプター2（「AdipoR2」）を含む。AdipoR1のアミノ酸配列の例は、配列番号1～22のアミノ酸配列を含む。AdipoR2のアミノ酸配列の例は、配列番号23～44のアミノ酸配列を含む。本発明の方法において、Ig - CTFの1つ又は複数（即ち、少なくとも1つ）を検出することができる。例えば、Ig - CTFの任意の1つ又は組み合わせ（それにおいて、CTFは、配列番号1～配列番号44のアミノ酸配列により表されるフラグメントの1つである）を検出することができる。

40

【0266】

本発明の方法において、生物学的サンプルは、多数の供給源から来うる。例えば、生物学的サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に関連しない細胞、組織、外科的に切除された腫瘍組織、生検、細針吸引サンプル、脳脊髄液、白血球、間質液、又は組織学的調製物に由来しうる。入手及び取り扱いのそれらの簡単さのため、血液及び血漿は、生物学的サンプルの特に有用な供給源でありうる。

【0267】

一部の場合において、保存剤は、冷蔵又は冷凍しながら、保存のために生物学的サンプルを安定化させるのに役立つ。適した保存剤の例は、フッ化物、ヘパリン、又はEDTAを含む。

50

【0268】

他の実施態様において、組織は、肝臓、膵臓、リンパ節、脂肪、筋肉、又は脳である。これらの組織において I g - C T F を検出するための方法の例は、免疫組織化学（組織染色）である。

【0269】

生物学的サンプルは、任意の哺乳動物に由来しうる。好ましい実施態様は、哺乳動物がヒトである場合でありうる。しかし、他の哺乳動物（動物園、研究、及び飼育動物（ペット）、例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ラバ、又はブタなどを含む）も、生物学的サンプルの潜在的な供給源でありうる。

10

【0270】

本発明の他の実施態様において、抗体が提供され、それらは、方法のための第1抗体として使用できうる。例えば、受託番号 _____（クローン444-1D12）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生された I g - C T F に優先的に結合する単離抗体、受託番号 _____（クローン-510-6B6）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生された C T F に優先的に結合する単離抗体；又は受託番号 _____（クローン-515-4D6）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生された C T F に優先的に結合する単離抗体。これらの抗体を調製するために使用される抗原及び方法論を、実施例12において完全に説明する。

【0271】

一部の場合において、第1抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に結合されている。固体支持体は、典型的には、ガラス又はポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンである。固体支持体は、ストリップ、カセット、チューブ、ビーズ、ディスク、プレート、もしくはマイクロプレート、又はイムノアッセイを行うために適した任意の他の表面の形態でありうる。結合プロセスは、当技術分野において周知であり、一般的に、分子を不溶性担体に共有結合させる又は物理的に吸着させる架橋からなる。一実施態様において、固体支持体は E I A / R I A プレートである。

20

【0272】

I g - C T F において、I g は、免疫グロブリンアイソタイプ I g G、I g A、I g M、I g D、又は I g E でありうる。I g - C T F における I g の好ましい例は、I g G である。免疫グロブリンは、いくつかのサブユニットから作られる。例えば、I g G は、ガンマ（ γ ）重鎖、及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。I g A は、アルファ（ α ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。I g M は、ミュー（ μ ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。I g D は、デルタ（ δ ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。I g E は、エプシロン（ ϵ ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。I g - C T F の I g は、また、免疫グロブリンのアイソタイプの1つのサブユニットでありうる。例えば、I g は、I g G、I g M、又は I g A のカッパ軽鎖でありうる。又は、I g は、I g G のガンマ重鎖でありうる。あるいは、I g は、抗原結合領域（F a b）でありうる。

30

【0273】

一部の実施態様において、第2抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能に標識される。検出可能な標識の例は、放射性標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、化学発光標識、電気化学発光（E C L）標識、又は酵素を含む。放射性標識は 125 I を含み、それは、抗体に付着することができる（Harlow and Lane, supra, 1988）。有用な蛍光標識は、例えば、D A P I、フルオレセイン、ランタニド金属、Hoechst 33258、Rフィコシアニン、Bフィコエリトリン、Rフィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、及びリサミンを含む。フルオレセイン又はローダミン標識 2 - M G、H A、T I M P - 1、又は Y K L - 40 特異的結合薬剤（例えば抗 2 - M G、抗 H A、抗 T I M P - 1、もしくは抗 Y K L - 40 抗体、又はフルオレセインもしくはローダミン標識二

40

50

次抗体など)が、本発明において有用でありうる。有用な蛍光抗体は、商業的に、例えば、Tago Immunologicals (Burlingame, Calif) から得ることができる。蛍光化合物は、それらの結合能力を変えないことなく、抗体に化学的に共役することができる。特定の波長の光を用いた照射により活性化される場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子中に興奮状態を誘導し、顕微鏡を用いて視覚的に検出可能な特徴的な色の光の放出が続く。酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ (AP)、ガラクトシダーゼ、又はウレアーゼなどを、本発明の方法における使用のために、例えば、抗アディポネクチンレセプターC末端フラグメントに又は二次抗体に連結することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン (TMB) と使用することができ、それは、450 nmで検出可能である過酸化水素の存在において可溶性産物をもたらす。

10

【0274】

他の実施態様において、遊離CTFは、アッセイのデザインのため、検出されない。

【0275】

肝臓疾患の処置の例は、医薬、外来処置、外科手術、及び肝臓移植を含む。

【0276】

提供する本発明の別の実施態様は、被験者において肝臓疾患をモニターするための方法である。一実施態様において、被験者に由来する生物学的サンプルを、第1種のIg-CTF又はその第1抗体の抗原結合フラグメントに優先的に結合する第2種の第1抗体に曝露させ、これによって混合物を形成する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。この混合物を、次に、第1種のIgに優先的に結合する第3種の第2抗体又は抗原結合フラグメントに曝露する。この工程後、任意の洗浄工程を実施することができる。次に、サンプル中に存在するIg-CTFを定量化する。サンプル中のIg-CTFの量を、次に、公知の標準又はより早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプル中に存在するIg-CTFの量のいずれかと比較する。次に、被験者のIg-CTFのレベルが、肝臓疾患の進行、退行、又は安定化を示しているか否かを決定することができる。

20

【0277】

特定の実施態様において、発現のレベル(少なくとも1つの可溶性Ig-CTFの存在又は非存在を含む)を、免疫アッセイによりアッセイする。当業者は、その最も広い文脈において、「免疫アッセイ」が、テストサンプルを、標的について特異的な1つ又は複数の免疫相互作用分子と、それに結合し、前記結合を検出するために十分な時間にわたり及び条件下でインキュベートすることを含むことを知っている。本明細書において使用する通り、用語「標的」は、プローブが結合するようにデザインされた分析物を指す。例えば、本明細書において、寄託された抗体の特異的なCTF標的を提供する：配列番号49、HVLVVA AAFVHF CYS、配列番号50、HFYGVSNLQEF RYGL EGGCTDDSL L、配列番号51、GGCTDDTL L、及び配列番号52、GGCSEEDAL。特定の好ましい実施態様において、免疫相互作用分子は抗体である。例えば、これらの配列は、寄託された抗体により認識される：それぞれクローン461-4H11、クローン444-1D12、クローン515-4D65、及びクローン510-6B6。抗体をテストサンプルとインキュベートするための条件は、アッセイに用いられるフォーマット、用いられる検出方法、ならびにアッセイにおいて使用される抗体分子の型及び性質に依存し、変動する。当業者は、一般に利用可能な免疫学的アッセイフォーマットのいずれか1つ、例えば、酵素免疫アッセイ、ラジオ免疫アッセイ、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫比濁、免疫比濁分析、磁気免疫粒子分離、免疫クロマトグラフィー、免疫マイクロ流体、免疫遠心、拡散ベースのオクタロー、ロケットゲル免疫電気泳動、又はインサイチュ免疫アッセイを、本目的に容易に適応することができることを認識するであろう。

30

40

【0278】

免疫アッセイは、テストサンプル中のアディポネクチン受容体の少なくとも1つのIg-CTFの定量化において、特に、少なくとも1つのIg-CTFのレベルが、非罹患

50

個体において検出可能な正常レベルと比較し、変わっているか否かを決定するために有用である。結果として、そのようなイムノアッセイは、患者が疾患又は疾患への素因を有しうるか否かを決定する際に特に有用である。イムノアッセイは、他の使用、例えば、疾患進行のモニタリング又は治療的介入への応答のモニタリングにおける使用なども有しうる。本明細書において記載する本発明は、それらの性能のために前記イムノアッセイを要求する、免疫相互作用分子及び診断アッセイの全てのそのような使用にまで及ぶ。

【0279】

例としてだけ、特定の実施態様において、フラグメントに対して産生された抗体を固体基質上に固定化し、第1複合体を形成し、患者からの生物学的テストサンプルを結合分子と接触させる。インキュベーションの適した期間後、抗体-二次複合体の形成を可能にするために十分な期間にわたり、検出可能なシグナルを産生することが可能な受容体分子を用いて標識した第2抗体を、次に、加え、インキュベートし、三次複合体の形成のための十分な時間を可能にする。任意の未反応材料を洗い流し、三次複合体の存在を、レポーター分子により産生されたシグナルの観察により決定する。結果は、目に見えるシグナルの簡単な観察により定性的でありうる、又は、公知の量のハプテンを含むコントロールサンプルとの比較により定量化されうる。このアッセイのパリエーションは、同時アッセイ（それにおいて、サンプル及び標識抗体の両方が、同時に、結合抗体に加えられる）又はリバースアッセイ（それにおいて、標識抗体及びテストされるサンプルを最初に組み合わせ、インキュベートし、次に、同時に、結合抗体に加える）を含む。これらの技術は当業者に周知であり、パリエーションの可能性は容易に明らかであろう。

10

20

【0280】

Ig-CTFを検出する他の例は、定量的ウエスタンブロッティング、免疫組織化学、タンパク質バイオチップ、マススペクトロメトリー及び他を含む。

【0281】

CTF免疫グロブリンは、任意の適した方法により検出することができる。用いることができる検出パラダイムは、例えば、光学的方法、電気化学的方法（ボルタンメトリー及びアンペロメトリー技術）、原子間力顕微鏡法、及び無線周波数方法（例、多極共鳴スペクトロスコピー）を含む。光学的方法は、例えば、比色アッセイ、電子インピーダンススペクトロスコピー、顕微鏡法（共焦点及び非共焦点の両方）、蛍光の検出、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、及び複屈折又は屈折率（例、表面プラズモン共鳴、エリブソメトリー、共振ミラー方法、格子結合器導波管方法又はインターフェロメトリー）を含む。

30

【0282】

Ig-CTF自体は、免疫グロブリンに共有結合的に付着されたアディポレセプターのC末端フラグメントを含むことができる。用語「アディポレセプター」は、アディポレセプター1（「AdipoR1」）及びアディポレセプター2（「AdipoR2」）を含む。AdipoR1のアミノ酸配列の例は、配列番号1~22のアミノ酸配列を含む。AdipoR2のアミノ酸配列の例は、配列番号23~44のアミノ酸配列を含む。本発明の方法において、Ig-CTFの1つ又は複数（即ち、少なくとも1つ）を検出することができる。例えば、Ig-CTFの任意の1つ又は組み合わせ（それにおいて、CTFは、配列番号1~配列番号44のアミノ酸配列により表されるフラグメントの1つである）を検出することができる。

40

【0283】

本発明の方法において、生物学的サンプルは、多数の供給源から来うる。例えば、生物学的サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に関連しない細胞、組織、外科的に切除された腫瘍組織、生検、細針吸引サンプル、脳脊髄液、白血球、間質液、又は組織学的調製物に由来しうる。入手及び取り扱いのそれらの簡単さのため、血液及び血漿は、生物学的サンプルの特に有用な供給源でありうる。

【0284】

一部の場合において、保存剤は、冷蔵又は冷凍しながら、保存のために生物学的サン

50

ルを安定化させるのに役立つ。適した保存剤の例は、フッ化物、ヘパリン、又は EDTA を含む。

【0285】

他の実施態様において、組織は、肝臓、膵臓、リンパ節、脂肪、筋肉、又は脳である。これらの組織において Ig - CTF を検出するための方法の例は、免疫組織化学（組織染色）である。

【0286】

生物学的サンプルは、任意の哺乳動物に由来しうる。好ましい実施態様は、哺乳動物がヒトである場合でありうる。しかし、他の哺乳動物（動物園、研究、及び飼育動物（ペット）、例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ラバ、又はブタなどを含む）も、生物学的サンプルの潜在的な供給源でありうる。

10

【0287】

本発明の他の実施態様において、抗体が提供され、それらは、方法のための第1抗体として使用できうる。例えば、受託番号_____（クローン444 - 1D12）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生された Ig - CTF に優先的に結合する単離抗体、受託番号_____（クローン - 510 - 6B6）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生された CTF に優先的に結合する単離抗体；又は受託番号_____（クローン - 515 - 4D6）を有し、ATCCに寄託された細胞株により産生された CTF に優先的に結合する単離抗体。これらの抗体を調製するために使用される抗原及び方法論を、実施例12において完全に説明する。

20

【0288】

一部の場合において、第1抗体又は抗原結合フラグメントは、固体支持体に結合されている。固体支持体は、典型的には、ガラス又はポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンである。固体支持体は、ストリップ、カセット、チューブ、ビーズ、ディスク、プレート、もしくはマイクロプレート、又はイムノアッセイを行うために適した任意の他の表面の形態でありうる。結合プロセスは、当技術分野において周知であり、一般的に、分子を不溶性担体に共有結合させる又は物理的に吸着させる架橋からなる。一実施態様において、固体支持体は EIA / RIA プレートである。

30

【0289】

Ig - CTF において、Ig は、免疫グロブリンアイソタイプ IgG、IgA、IgM、IgD、又は IgE でありうる。Ig - CTF における Ig の好ましい例は、IgG である。免疫グロブリンは、いくつかのサブユニットから作られる。例えば、IgG は、ガンマ（ γ ）重鎖、及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。IgA は、アルファ（ α ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。IgM は、ミュー（ μ ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。IgD は、デルタ（ δ ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。IgE は、エプシロン（ ϵ ）重鎖及びカッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）軽鎖で作られる。Ig - CTF の Ig は、また、免疫グロブリンのアイソタイプの1つのサブユニットでありうる。例えば、Ig は、IgG、IgM、又は IgA のカッパ軽鎖でありうる。又は、Ig は、IgG のガンマ重鎖でありうる。あるいは、Ig は、抗原結合領域（Fab）でありうる。

40

【0290】

一部の実施態様において、第2抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能に標識される。検出可能な標識の例は、放射性標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、電気化学発光（ECL）標識、又は酵素を含む。放射性標識は ^{125}I を含み、それは、抗体に付着することができる（Harlow and Lane, supra, 1988）。有用な蛍光標識は、例えば、DAPI、フルオレセイン、ランタニド金属、Hoechst 33258、Rフィコシアニン、Bフィコエリトリン、Rフィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、及びリサミンを含む。フルオレセイン又はローダミン標識 2 - MG、HA、TIMP - 1、

50

又は Y K L - 4 0 特異的結合薬剤（例えば抗 2 - M G、抗 H A、抗 T I M P - 1、もしくは抗 Y K L - 4 0 抗体、又はフルオレセインもしくはローダミン標識二次抗体など）が、本発明において有用でありうる。有用な蛍光抗体は、商業的に、例えば、Tago Immunologicals (Burlingame, Calif) から得ることができる。蛍光化合物は、それらの結合能力を変えなく、抗体に化学的に共役することができる。特定の波長の光を用いた照射により活性化される場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子中に興奮状態を誘導し、顕微鏡を用いて視覚的に検出可能な特徴的な色での光の放出が続く。酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P)、アルカリホスファターゼ (A P)、ガラクトシダーゼ、又はウレアーゼなどを、本発明の方法における使用のために、例えば、抗アディポネクチンレセプター C 末端フラグメントに又は二次抗体に連結することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン (T M B) と使用することができ、それは、450 nm で検出可能である過酸化水素の存在において可溶性産物をもたらす。

10

20

30

40

50

【0291】

他の実施態様において、遊離 C T F は、アッセイのデザインのため、検出されない。

【0292】

本発明の別の実施態様において、公知の標準は、正常として同定されている被験者の I g - C T F レベルでありうる。本発明の別の実施態様において、公知の標準は、肝臓疾患を有するとして同定されている被験者の I g - C T F レベルでありうる。本発明の別の実施態様において、工程 a に記載する生物学的サンプルが、肝臓疾患のための処置に続いて、被験者から得られる、あるいは、より早期の時間点で被験者から得られた生物学的サンプルが、肝臓疾患のための処置に続いて、被験者から得られる。

【0293】

本発明は、さらに、以下の実施例において定義され、それにおいて、全ての部分及びパーセンテージが、特に明記しない限り、重量による。これらの実施例は、本発明の好ましい実施態様を示しており、例示だけにより与えられることを理解すべきである。上の考察及びこれらの実施例から、当業者は、本発明の本質的な特徴を、その精神及び範囲から逸脱することを伴わず、確認することができ、本発明の種々の変化及び改変を作り、それを、種々の使用及び条件に適応することができる。

【0294】

実施例

実施例 1 血液、組織、及び細胞中での C T F 免疫グロブリンの検出

ウエスタンブロット分析を、ヒト血漿、脾臓、脂肪、肝臓、及び筋肉組織、ならびに筋細胞及び上皮細胞の培養ホモジネートで、以下の方法及びそれらのバリエーションに従って実行した。

【0295】

タンパク質濃度約 20 µg/ml を伴うサンプル及びホモジネートを、水中で 5 分間にわたり、S D S を伴う緩衝液中で煮沸し、氷上で冷却し、タンパク質を変性させた。サンプルを、次に、遠心し、沈殿を除去し、サンプルを、5% ベータ - メルカプトエタノールを伴う Biorad Laemmli 緩衝液と 1 : 1 で煮沸し、ジスルフィド結合を破壊した。処理したサンプルを、12% 又は 10% の Ready Gel (Biorad) 上に添加し、S D S - P A G E ゲルを、T r i s、グリシン、S D S 緩衝液 (Biorad) 中で、110 V (Biorad PROTEAN Tetra Cell) で、1 ~ 1.5 時間にわたり、プロモフェノールブルーがゲルの底に達するまで、泳動した。ゲルプレートを解体し、トランスファー緩衝液中に浸した。ゲルを、0.2 µm ニトロセルロースペーパーに、30 V で、4 チェンバー中で一晩トランスファーした。

【0296】

タンパク質のトランスファー後、ニトロセルロースを、T T B S 緩衝液 (20 mM T r i s、500 mM N a C l、p H 7.4、0.1% Tween-20) を用いてリンス及び洗浄した。膜を、次に、T T B S 中の 5% B S A を用いて、室温で、穏やかな攪拌を伴い、ブロッキングした。ブロッキング緩衝液を、次に、除去し、膜を、アルカリホスファター

ゼ又はホースラディッシュペルオキシダーゼに共役した抗体を用いてインキュベートした。AdipoR1 CTFについて、アルカリホスファターゼに共役したmAb 444-1D12を使用した(2.5mg/mlを1:1000に希釈、Siemens Healthcare Diagnostics)。抗体コンジュゲートを伴う膜を、室温で3時間にわたり又は4で一晩、穏やかな攪拌を伴いインキュベートした。抗体を、次に、捨て、ゲルを、TTBSを用いて、各々5分間にわたり3回洗浄した。膜を、アルカリホスファターゼ又はホースラディッシュペルオキシダーゼを用いてインキュベートし、色を発生させ、記録した。一部の場において、膜を、所望の時間(3秒から10分)でのX線フィルム(Fisher)への曝露により撮像し、次に、Kodak GBX現像剤/固定剤を使用して現像した。

【0297】

CTFへのモノクローナル抗体を用いてヒト血漿で得られたウエスタンブロットの結果を、図3に示す。結果は、CTF R1及びR2への全てのモノクローナル抗体について典型的である。図3aは、3人の非糖尿病(N)患者、3人のインスリン抵抗性(IR)患者、及び3人の糖尿病(D)患者の血漿についての結果を示す。全てが、CTFが160kDaの免疫グロブリン、55kDaの免疫グロブリン重鎖、及び26kDaの免疫グロブリン軽鎖ならびのそれらのフラグメント中に存在した。サンプルは、メルカプトエタノールを用いて処理し、メルカプトエタノールはジスルフィド連結を破壊するため、従って、CTFは、ジスルフィド連結により、免疫グロブリンに付着されていない。図3bは、アルカリ条件(250mM Tris buffer, pH 11.5、及び37、2時間にわたる)を用いた処理後での同じ患者サンプルを示す。処置は、ヒト免疫グロブリンへのCTF連結を破壊し、CTFが検出された。図3cにおいて、アルカリ処理されたサンプルについてのゲルを、抗ヒトIgG-ALPを用いて測定し、結果は、ヒト免疫グロブリンが、依然として、CTFの放出後に存在していることを実証した。これらのアルカリ条件、及びC3b及び免疫グロブリン鎖の間のエステル結合を破壊することが示されている他のものが、また、免疫グロブリンからCTFを解放した(Lutz H. U. and Stammler P. Preferential formation of C3b-IgG Complexes in vitro and in vivo from nascent C3b and naturally occurring anti-band 3 antibodies J Bio Chem 268, 17418-426, 1993)。

【0298】

正常ラット、糖尿病ラット、及びAdipoR1 CTF25(配列番号11)を用いて処置された糖尿病ラットの肝臓、膵臓、筋肉、及び腸間膜組織で得られたウエスタンブロットの結果を、表3中に示す。結果は、CTF AdipoR1及びAdipoR2への全てのモノクローナル抗体及びテストされた処置について典型的である。組織の全てが、CTF免疫グロブリンの存在を示す。肝臓サンプルは、26kDaの免疫グロブリン軽鎖ならびに100及び160kDaの一部の完全IgG及びフラグメント(しかし、50kDaの免疫グロブリン重鎖ではない)を示した。膵臓サンプルは、重鎖及び一部の軽鎖(しかし、完全IgGではない)を示した。筋肉及び脂肪サンプルは、重鎖及び一部の軽鎖(しかし、完全IgGではない)を示した。CTFを用いた処置は、バンドを増加させなかった。なぜなら、遊離CTFは、共有結合的な結合を形成するためのペプチドの活性化を伴わず、免疫グロブリンに付着しないからである。CTFを伴う免疫グロブリン鎖の量における差が、個々のラットの間及び正常ラット及び糖尿病ラットの間で観察された。全ての組織がIDE及びTACEを含んだ。

【0299】

10

20

30

40

【表 3】

表 3. 組織中の CTF 免疫グロブリン

	CTF を伴い、主に観察された免疫グロブリン鎖		
組織型	正常ラット	糖尿病ラット	処置された糖尿病ラット
肝臓	軽鎖	軽鎖	軽鎖
膵臓	重鎖	重鎖	重鎖
筋肉	重鎖及び軽鎖	重鎖及び軽鎖	重鎖及び軽鎖
腸間膜組織	重鎖及び軽鎖	重鎖及び軽鎖	重鎖及び軽鎖

10

【0300】

さらに、標的器官試験を実施した。2群のウサギ（抗ポリクローナルCTF産生者及び非産生者）を、クライオスライススライドのために、肝臓、筋肉、脂肪、脳、及び膵臓について収集した。組織を、遊離CTF（mAb 461-4H11）、CTF-IgG（mAb 444-1D12）、腫瘍壊死因子変換酵素（TACE aka ADAM-17）、インスリン分解酵素（IDE）、及びIgGについて染色した。結合を、Fc受容体遮断ペプチドを用いて、及び、走査顕微鏡を用いた蛍光標識抗体を使用して行った。結果は、肝臓が、CTF吸収についての主な標的器官であることを示した。罹患肝臓、脳、及び膵臓は、増加した吸収を示す。肝臓、脳、及び膵臓は、IDEが存在する場所である（CTFはIDEに作用する）。筋肉及び一部の褐色脂肪は、CTFを放出するためにTACEを有した。CTFへの免疫応答は、脳、膵臓、及び肝臓中へのCTF-IgGの吸収を大きく増加させる。結果を表4に示す。脳及び膵臓は、時折、特に、病変又は白血球浸潤（WBC）を示す内皮及び間質部分の周りの一部の組織部分の内部でのCTFについて弱く陽性であった。筋肉は、インタクトな受容体のため、細胞の外膜上でだけ陽性であった。白色脂肪はCTFを示さなかったが、しかし、褐色脂肪中に増大した一部の微量CTFがあった。

20

【0301】

【表 4】

表 4.

	肝臓	小脳	大脳 右及び左	膵臓	脂肪 (脂肪)	筋肉
CTF	陽性 5+	陽性 1+	陽性 1+	陽性 1+	陰性	陽性 1+
TACE (CTF 形成プロテアーゼ)	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陽性
IDE (CTF により阻害されたプロテアーゼ)	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性
IgG 対比染色	CTF が見 出された場 合に陽性	CTF が見 出された場 合に陽性	CTF が見 出された場 合に陽性	陰性	陰性	陰性

10

20

【 0 3 0 2 】

CTF への抗体は、脳、膵臓、及び肝臓中への CTF - IgG 及び CTF の大きく増加した吸収を例示した。これは、抗 CTF 抗体を伴うウサギにおいてであった。ウサギは、BSA 及び LBH に付着した AdipoR1CTF 33mer (配列番号 1) を用いて接種していた。結果を表 5 中及び図 4 中に示す。

【 0 3 0 3 】

【表 5】

表 5.

ポリクローナル抗体を 産生するウサギの能力	肝臓中の CTF	脳中の CTF	膵臓中の CTF
陰性 N=3 抗 CTF を産生し なかった	陽性 5+ 陽性 6+ 陽性 5+	陽性 1+ 陰性 陰性	陽性 1+ 陽性 1+ 陽性 1+
陽性 N=3 抗産生者	強く陽性 陽性 35+ 陽性 40+ 陽性 30+	陽性 陽性 10+ 陽性 11+ 陽性 8+	陽性 陽性 8+ 陽性 12+ 陽性 8+

30

40

50

【0304】

さらに、標的器官試験を実施した。3群のラットを屠殺し、クライオスライススライドのために、肝臓、筋肉、脂肪、脳、リンパ節、及び膵臓について収集した。これらの3群は、糖尿病を伴わないラットを表す（早期糖尿病及び後期糖尿病中への2～4週間）。全てが、糖尿病状態について、経口耐糖能テスト（OGTT）及びh b A 1 cテストにより特徴付けられた。組織を、遊離CTF（mAb 461-4h11）、IgG-CTF（mAb 444-1D12）、TACE、IDE、及びIgGについて染色した。結合を、Fc受容体遮断ペプチドの存在において、及び、走査顕微鏡を用いた蛍光標識抗体を使用して行った。結果は、リンパ節がCTF吸収のための別の主な標的であることを示した。糖尿病は進行するにつれて、肝臓及びリンパ節において観察されるCTFの量は増加した。脳及び膵臓が、また、増加した吸収を示した。これらの結果を表6にまとめる。

10

【0305】

【表6】

表6.

CTF	正常ラット N=3	短期間の糖尿病ラット N=3	長期間の糖尿病ラット N=3
肝臓	陰性 陽性 2+ 陰性 陰性	陽性 陽性 5+ 陽性 4+ 陽性 3+	陽性 陽性 6+ 陽性 7+ 陽性 5+
リンパ節	陰性 陽性 5+ 陰性 陰性	陽性 陽性 10+ 陽性 11+ 陽性 8+	陽性 陽性 5+ 陽性 11+ 陽性 5+

20

30

【0306】

細胞培養マウス筋細胞（C2C12）及びミドリザル上皮細胞（VERO）（American Type Cell Culture, ATCC, Manassa VA）を、RPMI-1640培地を使用した培養中で維持し、正常細胞を、改変イーグル培地（MEM）を用いて維持した。両方の培地が、2 mMグルタミン、ペニシリン（50単位/ml）、ストレプトマイシン（50 µg/ml）、及び10%ウシ胎児血清を含んだ。培地はサイトカインを含まなかった。細胞を、37で、95%空気及び5%CO₂の雰囲気中で成長させ、細胞成長のコンフルエンスでPBS/EDTAを使用した1～4希釈物を用いて分割することにより増殖させた。細胞株を同期化し、R1-CTF25配列番号11又は球状アディポネクチンを用いて誘導した。結果を表7に示す。

40

【0307】

【表7】

表7. 細胞中のCTF免疫グロブリン

細胞型	CTFを伴う、主に観察された免疫グロブリン鎖		
	未処置	CTFを用いて処置	アディポネクチンを用いて処置
筋細胞	重鎖及び完全IgG	重鎖及び完全IgG	重鎖及び完全IgG
上皮細胞	重鎖及び完全IgG	重鎖及び完全IgG	重鎖及び完全IgG

50

【0308】

両方の細胞株が、アディポネクチン受容体1を発現した。両方の細胞株からのライセートが、CTF免疫グロブリンを含み、変性ウエスタンブロット上で、重鎖及び完全IgGを含んだが、しかし、軽鎖形態を伴わなかった。これらは、ウシIgGを含むウシ胎児血清中で成長させた細胞培養物であるため、細胞は、CTFをIgGに付着する。従って、アディポネクチン受容体を発現する任意の細胞は、抗原提示細胞として機能し、免疫グロブリンへの付着のために、CTFの活性化を起こす(図2)。アディポネクチン受容体1及び2を発現する細胞及び組織の一覧については、Golzを参照のこと。

【0309】

CTF R1 CT F 2 5 配列番号11を用いた細胞培養物の処理は、CTF免疫グロブリンを増加させなかった。なぜなら、このCTFは、活性化を伴わず、免疫グロブリンにしないからである。加えて、アディポネクチン処理は、CTF免疫グロブリンのバンドを増加させなかった。恐らくは、血清が、既に、受容体に結合するためのアディポネクチンを含んでいたからである。

【0310】

血液分画も試験し、CTF-IgGが血液中にあるか否か及び免疫細胞がCTFを運ぶか否かを見た。細胞を、ろ過により単離し、遊離CTF-IgG(mAb 444-1D12)及び蛍光標識を伴うIgGについての抗体を用いて染色した。細胞を、次に、DAPI及び二次蛍光標識を伴う抗白血球抗体(CD45、CD3、及びCD19)を用いて対比染色した。結合は、Fc受容体遮断ペプチドの存在において行った。結果は、走査型顕微鏡で決定した。結果は、IgG-CTFが、白血球(多形核B及びT細胞)上で運ばれることを示した。これらの多形核B及びT細胞は、好中球及び好塩基球であるように見える。赤血球はCTFを運ばない。CTF及びCTF-IgGを、免疫組織化学(IHC)により、別々に、完全な受容体から検出する。これらの結果を表8に示す。

【0311】

【表8】

表8.

	赤血球	白血球 (CD45+) 多形核	T細胞 CD 3	B細胞 CD 19
細胞上に存在するCTF	陰性	IgGブロッキングを伴っても、多くの細胞上で陽性	陽性 10 mL 血液中 観察された細胞	陽性 10 mL 血液中 観察された細胞
IgG結合	陽性	陽性	陽性	陽性
供給源	ヒト全血	ヒト全血	ヒト全血	ヒト全血

【0312】

受容体発現が検出されていないことが確認された(IgG-CTF及びCTFだけ)。

【0313】

実施例2 アルカリ条件は、IgからCTFを解放する；インスリン抵抗性への相関

血漿サンプルを、アルカリを用いて処理し、免疫グロブリンからCTFを遊離させ、全血漿中CTFを測定することを可能にした。血漿サンプルを、耐糖能テスト及び糖尿病の診断を伴う患者から回収した(表9を参照のこと)。サンプルを、CTFについての2つの抗体に基づくイムノアッセイによりアッセイし、解放されたCTFとインスリン抵抗性との相関を決定した。

【0314】

【表9】

表9. インスリン抵抗性患者コホート

回収	コントロール	インスリン抵抗性	糖尿病
血漿サンプルの耐糖能テストの相関	N=50 陰性の経口耐糖能テスト(OGTT)及びhbA1C <6.5%を伴う非糖尿病	N=50 陽性のOGTT及びhbA1C <6.5%を伴う非糖尿病	N=50 陽性のOGTT及びhbA1C ≥6.5%を伴う糖尿病

10

【0315】

典型的なサンプルELISAプレートを、プレートを、最初に、抗CTF抗体(例えばMab 444-1D12など)を用いて、トリス緩衝生理食塩水(TBS)中の濃度12 µg/mlでコーティングすることにより調製した。プレートを、次に、TBSを用いて、自動プレートウォッシャーを使用して洗浄した(300 µLで5回)。プレートを、次に、TBS中の1%ウシ血清アルブミンを用いてブロッキングした。プレートを、再び、TBSを用いて洗浄した。CTFキャリブレーターを、pH 6.5のTBS中で、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312、及び0 ng/mlで、CTFR 125、アミノ酸配列(配列番号11) HFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTL Lを使用して調製した。処理された患者サンプルを、50 µLのサンプルを、40 µLのTris 50 mM (pH 10.5)と、1時間にわたり、37 で混合することにより調製し、120 µLのTris 0.5 M (pH 5.2)を用いたpH中和が続いた。キャリブレーター及びサンプルを100 µLで添加した。プレートを密封し、シェーカースピード1000 rpmで、35 で60分間にわたりインキュベートした(プレート当たり)。

20

30

【0316】

典型的なアッセイELISAプレートを、再びTTBSを用いて洗浄後に測定し、非結合CTFを除去した。TTBS中の濃度4.0 µg/mlでのアルカリホスファターゼ(ALP)に共役した二次抗CTF抗体、例えばmAb 444-1D12 (Siemens Healthcare Diagnostic)などを、100 µLで、各々のウェルに適用した。プレートを密封し、シェーカー中で、スピード1000 rpmで、35 で60分間にわたりインキュベートし、再び、TTBSを用いた洗浄が続いた。各々のウェル中のALPの量を、1-Step(商標)PNPP基質(Fisher Thermo Scientific)を使用し、プレートリーダーにおいて測定し、37 までインキュベートし、プレートを、正時に、405 nmでの吸光度を使用し、12時間にわたり読んだ。

40

【0317】

【表 10】

表 10. 遊離 CTF へのインスリン抵抗性の相関

R1 合計	平均	標準偏差	最小	最大
正常	671.3	1211.3	5.0	6951.3
糖尿病	1030.2	1662.0	19.6	7758.9
インスリン抵抗性	1241.5	2079.3	38.0	11137.0

【0318】

10

得られた相関の結果を表 10 に示す。全ての患者が、低いバックグラウンドを伴い、ならびにプレート範囲 < 10%CV 及びアッセイ範囲 100 ~ 10,000 pg/mL 内で測定可能であった。全結合値が、インスリン抵抗性を伴う患者において 1.8 倍に増加した。

【0319】

pH 7.0 以上での遊離 CTF (配列番号 1 ~ 44) の不安定性を確認した。結果として、pH 処理を慎重に制御し、遊離 CTF の再現可能な測定値を得なければならなかった。そのようなコントロールを用いてさえ、プレート間の値の変動は、しばしば、臨床適用について望ましいよりも ~ 20% 及びそれより高かった。遊離 CTF は、pH 7、好ましくは pH 6.5 以下でより安定である。なぜなら、それは、典型的には、細胞内部の酸性環境中に存在するからである。ここで、以前に開示した通り、遊離 CTF は二量体を形成する。免疫グロブリン CTF は、pH < 8 未満において安定であり、細胞外部で見出される CTF の原理的な形態であるため、免疫グロブリン CTF の測定が、臨床適用のために望ましかった。

20

【0320】

実施例 3 CTF を含む免疫グロブリン鎖の同定

商業的グレードのヒト血清タンパク質を、mAb 444-1D12 ALP を用いて、実施例 1 の方法に従い、ウエスタンブロットした。テストした商業的グレードは、IgG (I4506 Sigma Aldrich Chemical Co, St Louis Mo)、カップ軽鎖 (AG744 Millipore Billerica, MA formerly Chemicon)、ラムダ (P164-1 Scipac Ltd, Kent UK)、Fc フラグメント (AG744 Chemicon)、IgA (I-0633 Sigma)、及び IgM (I-8260, Sigma) を含んだ。免疫グロブリン CTF は、約 26 kDa のカップ軽鎖及びラムダ軽鎖ならびに 2 つのガンマ重鎖から成る。IgA、IgM、IgD、及び IgE はガンマ重鎖を含まず、代わりに、それぞれアルファ、ミュー、デルタ、及びイプシロン重鎖に基づく。全ての免疫グロブリン、IgG、IgA、IgM、IgD、及び IgE が、カップ軽鎖を含む。結果を表 11 にまとめる。

30

【0321】

【表 11】

表 11. CTF を含む免疫グロブリン鎖

商業的グレードのヒト血清タンパク質	R1 CTF モノクローナル抗体へのウエスタンブロットを用いて観察されたバンド	
	ガンマ鎖バンド	カップ鎖バンド
IgG	50 kDa	26 kDa
IgM	バンドなし	26 kDa
IgA	バンドなし	26 kDa
カップ	バンドなし	26, 15, 13 及び 12kDa
ラムダ	バンドなし	バンドなし
Fc	バンドなし	バンドなし

40

50

【0322】

データは、CTFがIgGのガンマ鎖及びカッパ鎖に付着していることを示した。単量体又は二量体としての遊離CTFは、IgG中で観察されなかった。データは、また、CTFがIgA及びIgMのカッパ鎖に付着していることを示した。25kDaより小さいカッパ鎖フラグメントが観察された。IgD及びIgEは、また、カッパ鎖を含み、従って、また、付着CTFを含むことが予想される。ガンマ重鎖のFc領域は、また、エフェクター機能ドメインとして公知であり、50又は25kDaの重鎖フラグメントに結合したCTFを含まなかった。これは、CTFがIgGのFab領域においてガンマ鎖及びカッパ鎖に付着していることを示す。

【0323】

CTFは、カッパ鎖においてIgG、IgA、IgM、IgD、及びIgEアイソタイプ中に組み込まれるため、抗カッパ及び抗CTFモノクローナルサンドイッチアッセイを使用することで、全ての免疫グロブリンにおいて結合したCTFが測定される。対照的に、抗ガンマ及び抗CTFモノクローナルサンドイッチアッセイを用いたアッセイでは、IgGアイソタイプにおいてだけ結合したCTFが測定される。同様に、IgG、IgA、IgM、IgD、又はIgEについて特異的な他の抗体は、その形態において結合したCTFを測定するモノクローナルサンドイッチアッセイを可能にする。

【0324】

実施例4 免疫グロブリンCTFの相関

血漿サンプルを、CTF免疫グロブリンについて、CTFR1及びCTFR2についてのモノクローナル抗体ならびに免疫グロブリンについての抗体を用いたELISA方法を使用し、ALPに共役されたカッパ又はガンマ免疫グロブリン鎖についてのモノクローナル抗体を使用し、測定した。使用したELISA方法論は、以前に記載されたものと同じであったが、サンプルのアルカリ処理を伴わず、CTF免疫グロブリンを伴う患者サンプルを、標準として割り当て、アッセイのためにより短い読み取り時間を使用した。

【0325】

結合CTF免疫グロブリンアッセイを使用し、インスリン抵抗性患者コホートをテストした(表12を参照のこと)。全ての患者が、低いバックグラウンドを伴い、ならびにプレート範囲<10%CV及びアッセイ範囲100~10,000pg/mL内で測定可能であった。極めて上昇した遊離CTFが、依然として検出されたが、しかし、正常サンプルにおいてより多かった。加えて、プレート間のCVが<10%まで低下し、患者群内の標準偏差が低下した。

【0326】

10

20

30

【表 1 2】

表12. CTF免疫グロブリンへのインスリン抵抗性の相関

CTF R1 ガンマ	平均	標準偏差	最小	最大
正常	1114.3	1431.6	218.2	7476.1
糖尿病	814.0	594.1	202.2	2630.9
インスリン抵抗性	558.5	384.7	147.2	2263.1

CTF R1 カップ	平均	標準偏差	最小	最大
正常	1011.0	1303.7	78.9	6422.3
糖尿病	897.4	718.0	289.2	4465.4
インスリン抵抗性	645.3	302.2	269.6	1480.4

CTF R2 ガンマ	平均	標準偏差	最小	最大
正常	2118.2	1581.2	415.7	9394.9
糖尿病	1674.9	829.1	222.9	4099.6
インスリン抵抗性	1412.5	704.0	441.6	4218.2

CTF R2 カップ	平均	標準偏差	最小	最大
正常	1205.1	772.7	320.4	4598.6
糖尿病	1043.1	428.6	246.6	2026.0
インスリン抵抗性	981.4	458.1	202.8	2292.8

【0327】

相関の結果を表12に示す。血漿中のCTF免疫グロブリンにおける2.0倍の減少が、インスリン抵抗性を伴う患者において観察された。CTF免疫グロブリンが組織及び細胞中に蓄積し、インスリン抵抗性を起こす。測定値は、CTF R1免疫グロブリン対CTF R2免疫グロブリンを測定した際、同様であった。測定値は、カップ鎖免疫グロブリン対ガンマ鎖免疫グロブリンを測定した際、同様であった。組み合わせの内、CTF R1ガンマ鎖免疫グロブリンが、インスリン抵抗性において最も大きな減少を有した。ここで、CTF免疫グロブリンの閾値 < 300 pg/mLをインスリン抵抗性の指標として使用し、診断感度が70%、特異性が70%であった。

【0328】

これらの結果は、実施例13のプロトコールを使用して確認された。試験をデザインし、非糖尿病と早期糖尿病及び後期糖尿病を比較した。IgG-CTFアッセイを、空腹時グルコーススクリーニングを受けた患者から得られた全血サンプルを用いて使用した。患者は、彼らが正常な空腹時全血グルコース < 100 mg/dL及び正常な全血HbA1c < 6.5%の両方を有した場合、正常として定義した。異常な全血空腹時グルコース (> 135 mg/dL)を伴う患者は、経口耐糖能テスト(OGTT)を受けた。異常なOGTT結果[血漿中グルコース値 > 126 mg/dL(0時間目)又は > 200 mg/dL(2時間目)]又は異常な全血HbA1c < 6.5%を伴う患者は、前糖尿病として又は耐糖能障害に分類した。

【0329】

このプロセスを通じて、101人の患者を非糖尿病として分類し、127人の患者を糖尿病として分類した。ELISAアッセイによるIgG-CTFを、全ての糖尿病患者及び非糖尿病患者で実施した。IgG-CTF結果を表13及び14にまとめる。

【0330】

【表 13】

表 13.

	IgG-CTF 正常	IgG-CTF 異常
インスリン抵抗性ではない	85 人の被験者	16 人の被験者
インスリン抵抗性	22 人の被験者	105 人の被験者

【0331】

陽性は、140 mg/dL より大きい 120 分値又は長期間の糖尿病を伴う耐糖能障害として定義した。使用した閾値は、5.5 ng/ml の IgG-CTF であった。感度は 83.2% であった。特異性は 84% であった。陽性予測値 (PPV) は 87% であった。陰性予測値 (NPV) は 80% であった。PPV は真陽性として算出した (TP) / (TP + 偽陽性 (FP))。NPV は真陰性として算出した (TN) / (TN + 偽陰性 (FN))。

10

【0332】

【表 14】

表 14.

	IgG-CTF 正常	IgG-CTF 異常
インスリン抵抗性ではない	90 人の被験者	19 人の被験者
インスリン抵抗性	17 人の被験者	102 人の被験者

20

【0333】

使用した閾値は、5.5 ng/ml の IgG-CTF であった。PPV は 84% であった。NPV は 84% であった。

【0334】

これらの実験から引き出された結論は、良い相関が得られたことである。0 及び 120 分は、同じ IgG-CTF 値を与えた。そのため、それは、0 時間の測定値だけを要求する慢性マーカーである。

30

【0335】

また、CTF 免疫グロブリンについてのテストを、異常な細胞成長を伴う患者からの血清サンプルのコホートにおいて行った (表 15 を参照のこと)。転移性癌及び限局性癌を伴う患者を、インスリン抵抗性及びアルコール性肝炎により特徴付けられる非アルコール性脂肪性肝炎 (NAFLD) ならびに肝臓における炎症性細胞の存在によって特徴付けられる自己免疫性肝炎から分けた。

【0336】

【表 15】

表15. 癌及び肝臓疾患患者コホート

回収	正常 N=30	乳癌 N=9	膵臓癌 N=5	肝臓疾患 N=23
異常な細胞成長 集団 (血清)	癌、肝臓疾患、糖 尿病、又はメタボ リックシンドローム の病歴なし	N=8 の限局性癌及 び N=1 の転移性 癌から成る	N=4 の限局性癌及 び N=1 の転移性癌 から成る	N=12 の非アルコ ール性脂肪性肝炎 (NASH); N=3 の アルコール性肝炎 のアルコール性肝 炎; N=6 の自己免 疫性肝炎; N=2 の 肝細胞癌から成る

10

【 0 3 3 7 】

関連の結果を表 1 6 に示す C T F 免疫グロブリンにおける 2 . 5 倍の増加が、乳癌及び
 肝臓癌を伴う患者において観察された。1 . 7 倍の増加が、転移性癌を伴う患者において
 観察された。膵臓癌を伴う患者は、C T F 免疫グロブリンにおける減少を有した。増殖性
 肝臓疾患 (例えば非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H)、アルコール性肝炎、及び自己
 免疫性肝炎など) を伴う患者は、C T F 免疫グロブリンにおけるさらにより有意な増加 (

20

【 0 3 3 8 】

【表 1 6】

表16. 癌及び肝臓疾患患者コホート

	AdipoR1 カ ツパ pg/mL	標準偏差	CTF における 変化
正常	594.9	724.9	1
乳癌	1486.1	1692.9	2.5
転移性癌	1028.8	11.8	1.7
膵臓癌	327.5	194.9	0.6
肝細胞癌	1512.3	483.6	2.5
自己免疫性肝炎	2028.7	1145.6	3.4
非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)	2457.3	1570.4	4.1
アルコール性肝炎	3279.2	2569.0	5.5

30

【 0 3 3 9 】

実施例 5 天然 C T F 免疫グロブリンの単離

天然 C T F 免疫グロブリンを、ウエスタンブロット方法により単離した。あるいは、天
 然 C T F 免疫グロブリンを、それを、モノクローナル抗体 m A b 4 4 4 - 1 D 1 2 と共
 役させたポリマー樹脂ビーズ上に捕捉することにより単離した。PolyLink Protein Coupl
 ing Kit (Bangs Laboratories Inc.) を、この共役のために使用した。一般に使用される
 他の捕捉ビーズ及び粒子も機能した。天然 C T F 免疫グロブリンが、p H 調整により、捕
 捉ビーズから放出された。それは、また、プロテイン A カラム精製による I g G 中への分
 画により精製することができた。精製及び同定は、抗ヒトカツパ鎖、抗ヒトガンマ鎖、及
 び抗 C T F 抗体へのウエスタンブロットにより確立することができた。マスペクトロメ
 トリーもピーク同定のために使用した。同定された免疫グロブリンの主要な形態は、 I
 g M、I g G、F a b 2、I g、ガンマ鎖、及び軽鎖を含む。結果を表 1 7 に示す。

40

50

【 0 3 4 0 】

【 表 1 7 】

表 17.

バンド Id	ウエスタンブロットにおける観察された kDa					
	血漿	脂肪組織	肝臓組織	筋肉組織	脾臓組織	筋細胞 細胞培養
IgM	250			200		200
IgG	160					
Fab2	100		100	110		100-110
unk			70	80		60
ガンマ重	55			55	50	
AdipoR1		37-45	43	37-45		47
軽鎖 CTF	25	25	25	25	25	
軽鎖	22	22	22	22	22	
CTF 二量体	8					

10

20

【 0 3 4 1 】

表 1 7 は、A d i p o R 1 受容体についての質量が、完全長の形態について 4 3 kDa であることを示す。完全な受容体は、膜を含む組織サンプル中で現れているが、血漿中では現れていない。組織は、一般的には、検出可能な二量体を含まなかったが、しかし、これは、ウエスタンの検出限界を下回りうる。

【 0 3 4 2 】

I g G - C T F を I g G と比較する E L I S A による分析では、患者血漿中での I g G C T F のパーセンテージが、大半の患者における全ての血漿 I g G の < 0 . 2 % であることが見出された。このパーセンテージは、I g G C T F R 1 及び R 2 について同様であった。I g M C T F のパーセンテージは、典型的には、より低かったが、しかし、患者血漿中では、大半の患者における全ての血漿 I g M の約 < 0 . 0 3 % であることが見出された。このパーセンテージは、R 1 及び R 2 付着について同様であった。C T F と I g G の比率は、典型的には、大半の患者において、1 ~ 2 であったが、1 ~ 5 の範囲を伴った。

30

【 0 3 4 3 】

I g M、I g G、ガンマ、カップ、及び F a b 抗体の交差反応性を伴う E L I S A 試験を、血漿中で、C T F 結合フラグメントについてテストし、I g M、I g G、ガンマ、カップ、及び F a b が存在することが確認された。加えて、2 つの C T F が、典型的には、I g G 上であることが確認された。

40

【 0 3 4 4 】

実施例 6 天然 C T F 免疫グロブリンへの抗原の単離

天然 C T F 免疫グロブリンを結合する細胞を、生物学的材料（例えば組織、液体、及び細胞培養物など）から、本明細書において開示する C T F - I g G アッセイ（I H C 又は E L I S A）を使用して単離することができる。細胞の単離方法では、しばしば、磁気粒子、蛍光粒子、捕捉ビーズ、及び細胞を単離及び選別するために（例えばフロー細胞診、顕微鏡イメージング、ろ過、及びその他などにおいて）有用な他の材料に付着した抗体を使用する。天然 C T F 免疫グロブリンは、捕捉相において又は細胞検出による選別のために、抗体として役立つことができる。

【 0 3 4 5 】

50

天然CTF免疫グロブリンを、シグナル生成化合物としてのフルオレセインイソチオシアネート(FITC)に付着した。癌細胞をろ過方法により単離し、血液中で、循環腫瘍細胞を他の細胞から単離した。患者の血液を、塩化アンモニウムにより溶解し、赤血球(しかし、白血球又は癌細胞ではない)を除去した。白血球又は癌細胞を、赤血球が通過することを可能にする8 μ m細孔膜上に捕捉した。膜を、走査型蛍光顕微鏡を用いて撮像し、天然CTF免疫グロブリンに結合する癌細胞及び白血球を見出す。白血球を、Cy5色素を伴うCD3、CD45、及びCD19抗体を用いて対比染色し、好中球、ベータ細胞、及びT細胞としてのCTF免疫グロブリン結合細胞の同定を確認した。癌細胞を、Texas Red色素を伴うEpCAM抗体を用いて対比染色し、癌細胞としてのCTF免疫グロブリン結合細胞の同定を確認した。

10

【0346】

天然CTF免疫グロブリンに結合し、膜から除去される個々の細胞を、細胞培養により増幅させてもよい。この細胞単離及び増幅は、細胞応答によって、CTFがIgGに結合するのを防止するための生化学的な方法を同定し、CTF-IgGが組織中に吸収されるのを遮断し、免疫細胞に対するCTF-IgGの影響を変えるために有用である。このように、この測定値を使用し、潜在的な薬物を同定することができる。これらの細胞を、また、CTF免疫グロブリンに結合する分子の単離のために使用し、潜在的な新たな薬物を同定することができる。

【0347】

例えば、抗原は、細胞ライセートから、それらを、捕捉相としての天然CTF免疫グロブリンを伴うポリマー樹脂ビーズコンジュゲート上に捕捉することにより単離することができる。親和性精製抗原がビーズから放出される。

20

【0348】

実施例7 CTF免疫グロブリン及び抗原に結合する特定の免疫グロブリンの単離

免疫グロブリン及び他のタンパク質に結合したCTFを使用し、モノクローナル抗体を作ることができる。また、天然CTF免疫グロブリンへの親和性精製抗原を使用し、モノクローナル抗体(免疫グロブリン)を作ることができる。

【0349】

これらの抗原へのモノクローナル抗体は、ミエローマ細胞を、標準的な担体タンパク質[例えばキーホールリンペットヘモヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)、オボアルブミン(OA)、又は同様のものなど]上の抗原を用いて免疫化されているマウスからの脾臓細胞と融合させることにより作った。抗体産生細胞を、培養中で継続的に成長させ、選択培養HAT培地中でハイブリドーマを形成する細胞と融合する。選択培養培地は、HAT培地と呼ばれる。なぜなら、それは、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含むからである。この培地は、融合(ハイブリドーマ)細胞について選択的である。1つの抗原への1つの抗体だけを産生する単一抗体を単離した。単一のハイブリドーマは分裂し、「クローン」の大集団を産生し、全てが同じ「モノクローナル」抗体を作る。生きたハイブリドーマを、液体窒素中に、無期限に凍結する。

30

【0350】

実施例8 CTF免疫グロブリンへの特定抗原の単離

40

モノクローナル抗体を使用し、CTF免疫グロブリンへの特定抗原を、実施例6からの特異的なモノクローナル抗体を伴うポリマー樹脂コンジュゲート上に捕捉することによる細胞抗原の精製により単離することができる。PolyLink Protein Coupling Kit(Bangs Laboratories Inc.)を、この共役のために使用した。一般に使用される他の捕捉ビーズ及び粒子も用いることができる。モノクローナル抗体に特異的に結合する抗原を、pH調整により、捕捉ビーズから放出することができる。精製及び同定は、天然CTF免疫グロブリン及び実施例6からのモノクローナル抗体へのウエスタンブロットにより最初に確立することができる。反応性ビーズを単離し、同一性を、N末端テールのペプチド配列により又はマスペクトロメトリーにより決定することができる。

【0351】

50

実施例 9 免疫グロブリンの C T F 共役

C T F 免疫グロブリンは、免疫グロブリン F i t g e r a l d 産物コード 3 0 - A I 1 7) への C T F R 1 C T F 2 5 配列番号 1 1 の付着により産生されたが、それは、ペプチドを、別のペプチドの C 末端に、遊離アミノ基及びピスチン (v y s t e i n) 残基を結合するスクシンイミドエステル (例、M B S、S M C C) を通じて付着させる。これらの材料を、E L I S A 方法のための標準として使用した。この同じ C T F 付着プロセスを、多くの他の免疫グロブリンを用いて行うことができる。例えば、実施例 6 から単離されたもの又は他の免疫グロブリン。例えば、C T F は、また、トラスツズマブ、フルベストラント、トシツモマブ (t o s i t u n o m a b)、イブリツモマブ、イマチニブ、レナリドミド、セツキシマブ、ダサチニブ、パニツムマブ (p a n t u m u m a b)、ラパチニブ、及びニロチニブに付着することができた。実際には、マレイミド活性化 I g G を、C T F のシステイン残基上のスルフヒドリル (- S H) 部分を用いて処理し、合成 C T F - グロブリンを産生した。

【 0 3 5 2 】

実施例 1 0 インスリン応答及び細胞成長の C T F 免疫グロブリン影響

C T F は、以前に、動物モデルにおいてインスリン応答に影響を与えることが見出された。インスリン応答を、以前に開示された通り (国際公開第 W O 2 0 0 7 / 1 2 0 , 3 1 1 号)、動物モデルにおける耐糖能テストにより測定した。C T F を用いて処置された動物モデルを、未処置群と比較し、応答及び有効性を決定した。同様に、動物モデルを、天然サンプルから単離された又は合成 C T F 免疫グロブリンコンジュゲートとして産生された C T F 免疫グロブリンを用いて処置することができる。動物モデルを、また、C T F 免疫グロブリンへの抗原又は前記抗原への特定の免疫グロブリンを用いて処置することができる。

【 0 3 5 3 】

インスリン抵抗性及び異常な細胞成長は、また、細胞モデルを使用して測定することができる。一般的に、細胞培養、例えば癌細胞 (例、M C F、M D A S K B R)、筋細胞 (C 2 C 1 2)、及びミドリザル上皮細胞 (V E R O) (American Type Cell Culture, ATCC, Manassa VA) を、R P M I - 1 6 4 0 培地を使用した培養中で維持し、筋細胞及び癌細胞を、改変イーグル培地 (M E M) を用いて維持する。両方の培地が、2 mM グルタミン、ペニシリン (5 0 単位 / ml)、ストレプトマイシン (5 0 μ g / ml)、及び 1 0 % ウシ胎児血清 (インスリン及びアディポネクチンを含む) を含んだ。細胞を、3 7 $^{\circ}$ C で、9 5 % 空気及び 5 % C O ₂ の雰囲気中で成長させ、細胞成長のコンフルエンスで、P B S / E D T A を使用した 1 ~ 4 希釈物を用いて分割することにより増殖させた。細胞株を同期化することができる。天然 C T F 免疫グロブリン ; C T F - I g G を伴う血漿、合成 C T F 免疫グロブリンコンジュゲートを用いて、又は C T F 免疫グロブリンへの抗原もしくは前記抗原への免疫グロブリンを用いて誘導 (処置) することができる。

【 0 3 5 4 】

処理された細胞培養物におけるインスリン応答を、インスリンをインスリン受容体に結合させることにより又は細胞間インスリンの喪失を測定することにより直接的に測定することができる。より少ないインスリン結合は、より低いインスリン受容体レベル及びインスリン応答を示す。受容体への結合は、全細胞を E L I S A プレートに、1 2 時間にわたるインキュベーションを伴い測定する。プレートの洗浄には T B S を用い、ブロッキングには 2 0 0 μ L の P B S 中 Blocker Casein (Thermo Fisher 37528) を用い、T T B S を用いた洗浄が続く。各々のウェルを、2 5 mM T r i s、2 5 mM H E P E S、0 . 1 M N a C l、及び 1 0 % トレハロース (p H 7 . 5 に調整) 中のインスリン - ビオチン (5 n g / ml 又は 1 . 4 μ M) を用いてインキュベートした。3 7 $^{\circ}$ C での 1 時間のインキュベーション後、プレートを、T T B S を用いて洗浄し、ストレプトアビジン - A L P (0 . 3 mg / ml 又は 0 . 0 7 4 μ M) を用いてさらに 1 時間にわたりインキュベートし、洗浄した。結合 A L P を、パラ - ニトロフェノールホスフェートを加えることにより測定した。

【 0 3 5 5 】

10

20

30

40

50

処置した細胞培養におけるインスリン抵抗性又は異常な細胞成長を、インスリンにより起こる細胞シグナルを使用して測定することができる。インスリンは、グルコース輸送、グリコーゲン合成、タンパク質合成、細胞増殖、細胞遊走接着、生存、タンパク質合成、ニトロオキシド (nitroxide) 合成、及び神経保護 (neuroprotection) を、PI3キナーゼ/Akt及びMAPK/Erkシグナル伝達を通じて、ならびに、結果としてのチューブリン重合、カテニン (catenin) 分解、サイクリンD1分解、及びmTOR阻害シグナル伝達を活性化する。一般的に、インスリンは、身体の細胞増殖を制御し、肝臓及び筋肉中へのグルコースの入りを加速し、インスリン分泌は、血糖のレベルにより決定される。対照的に、アディポネクチンシグナル (レプチン及びアルファ-アドレナリン受容体など) は、グルコース取り込み、解糖、脂肪酸酸化、血圧、及び血流を増加させ；グリコーゲン合成、糖新生、脂肪酸合成、ステロール合成、脂肪分解、細胞増殖 (AMPK合成を通じて) を減少させ、一般的に、身体のエネルギーを燃焼し、長いエネルギー保存を停止する。

10

20

30

40

50

【0356】

キナーゼリン酸化アッセイは、一般的に、細胞をマイクロタイタープレートのウェルへ加え、それらを、100 µLのPBS中4%ホルムアルデヒドを用いて固定することにより行うことができる。プレートを、追加の20分間にわたり室温で保ち、次に、パラフィンを用いてカバーし、アッセイするまで4で保存した。Akt及びPI3Kのリン酸化における相対的な増加のELISA測定を、ELISA製造者の指示 (Superarray, Frederick, MD) に従って実施した。MAPK/Erkリン酸化における相対的な増加の測定を、ELISA製造者の指示 (Assay Designs, Ann Arbor MI) に従って実施した。結果を、3つの独立した実験において、新たな培養物を用いて繰り返した。細胞を、マイクロタイタープレートへ固定し、固定緩衝液の除去が続き、細胞クエンチングを、H₂O₂及びNaN₃を用いて実施した。クエンチング緩衝液を除去し、プレートを加熱し、洗浄し、ブロッキングした。これには、Akt、Phos-Akt、PI3K、及びPhos-PI3Kについての一次抗体 (1:100希釈) を用いた1時間のインキュベーションが続いた。各々の抗体及び誘導条件を、別々の3通りのウェル中でテストした。非結合の一次抗体を、洗浄により除去し、プレートを、次に、HRPに共役した二次抗体 (1:16希釈) を用いて1時間にわたりインキュベートした。プレートを2回洗浄し、現像溶液を加えた。インキュベーション後、停止溶液の添加後に形成された、結果としての暗い青色を、450 nmで読み取った。

【0357】

インスリン抵抗性又は異常な細胞成長は、また、細胞アポトーシスシグナル伝達により測定することができる。アポトーシスのシグナル伝達を、活性化B細胞の核因子カッパ軽鎖エンハンサー (NFカッパB) により阻害し、それは腫瘍壊死因子 (TNFアルファ) により制御される。アポトーシスのシグナル伝達は、PI3キナーゼ/Aktキナーゼリン酸化により阻害され、それはインスリンにより制御される。従って、CTFはインスリン抵抗性を誘導し、CTF阻害はTNFアルファ放出を阻害し、両方がアポトーシスシグナル伝達を支持した。

【0358】

アポトーシスシグナル伝達は、核凝縮、細胞萎縮、膜埋め込み、及びDNA断片化により特徴付けられる、調節された細胞自殺機構である。アポトーシスの活性化を、カスパーゼプロテアーゼ、即ち、カスパーゼ3、5、6及び9の活性化により測定することができる。これらのカスパーゼは、アポトーシスの中心レギュレーターであり、実行されたアポトーシスの決定的な測定である。アポトーシスシグナル伝達を、また、ホスファチジルセリン分析により、蛍光分析を使用して測定することができ、アポトーシスプロセスの間での膜変化の測定である (B. D. Smith, Cell Death and Differentiation 2003; 10; 1357-9)。

【0359】

カスパーゼ活性化によるアポトーシスアッセイは、一般的に、種々の細胞抽出物及び上

清を使用することにより行う。ウエスタンブロットを、抗カスパーゼ抗体（3 / 8 / 9）に対して実施した（Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA）。電気泳動を、標準的な条件下で、Tris - グリシン - SDS 緩衝液を使用し、18 ~ 20 mA で、3 μg のBiorad前染色標準を用いて実行した。電気泳動後、タンパク質を、ゲルからニトロセルロース膜上に、80 V で1時間にわたり又は40 V - 晩4 でトランスファーした。トランスファーしたタンパク質を、上に言及する特異的抗体（1 mg/ml）を用いて、カゼインブロッカーを用いた1時間のブロッキング後、反応させた。非結合抗体を洗い流し、Tween20を含むTBSを用いてブロッキングした後、プロットした膜を、ALP共役した対応する二次抗体を用いて、さらに1時間にわたりインキュベートした。最後に、サンプルと抗体との交差反応性を、10 mLのTBS中の66 μlのニトロブルーテトラゾリウム（50 mg/ml 70% DMF）及び35 μlのプロモクロロインドリルホスフェート（50 mg/ml DMF, 100%）の添加によりモニターした。

10

【0360】

ホスファチジルセリン分析を使用したアポトーシスアッセイを、一般的に、生細胞を使用することにより行う。誘導した細胞を、PSS - 380色素を用いて処理し、アポトーシス細胞の外葉上でホスファチジルセリンを認識した（9）。細胞を、Falcon Microslide System（Fisher）上に蒔き、TES 緩衝液（5 mM N - トリス [ヒドロキシメチル] - 2 - アミノエタンスルホン酸：TES、150 mM NaCl、pH 7.4）を用いて2回洗浄し、それには、25 μm PSS - 380を含む200 μLの新しいTES 緩衝液を用いた37 で10分間にわたるインキュベーションが続いた。緩衝液を染色後に除去し、細胞を、TES 緩衝液を用いて1回、蛍光についての観察前に洗浄した。位相差画像を使用し、蛍光シグナルの領域を位置付け、罹患細胞のパーセンテージを算出した。

20

【0361】

天然CTF免疫グロブリン；合成CTF免疫グロブリン、CTF免疫グロブリンへの抗原、及び前記抗原への特異的な免疫グロブリンを用いて誘導された癌細胞培養での予想結果を、表18において下に示す。

【0362】

【表18】

表18.インスリン応答及び細胞成長に対する影響

30

	インスリン応答 ベースライン	細胞成長 ベースライン
正常		
天然CTF免疫グロブリン	減少	減少
合成CTF免疫グロブリン	減少	減少

【0363】

実施例11 CTFの測定に対する免疫グロブリンCTFの影響

血漿サンプルを、CTFについての3つのアッセイにより測定した。これらの3つのアッセイを、表16において比較する。第1アッセイは、CTFについてのモノクローナル抗体及びALPに共役したCTFについてのポリクローナル抗体を用いたELISA方法を使用した、遊離CTFについてのサンドイッチアッセイであった。

40

【0364】

第2アッセイは、CTFについてのモノクローナル抗体及びALPに共役したヒトアルブミンについてのポリクローナル抗体を用いたELISA方法を使用した、アルブミンに非共有結合的に結合した遊離CTFについてのサンドイッチアッセイであった。遊離CTF分子は、「非共有結合的」様式において、アルブミンに会合し、強く結合することが見出された。結果として、血漿中のほぼ全ての遊離CTFが、アルブミンと会合している。アルブミン結合を、血漿を、捕捉ビーズに結合したCTFを用いて処理することにより確認した。CTFに結合したタンパク質を、ウエスタンブロット上で、SDS変性ゲル電気泳動を用いて解離（破壊）し、最後の数個のN末端ペプチドを、配列決定し、結合タンパ

50

ク質をアルブミンとして同定した。この結合は、遊離 C T F イムノアッセイにおいて破壊されなかった。

【 0 3 6 5 】

第 3 アッセイは、C T F についてのモノクローナル抗体及び A L P に共役したヒト免疫グロブリン鎖についてのモノクローナル又はポリクローナル抗体を用いた E L I S A 方法を使用した、免疫グロブリンに共有結合的に結合した C T F についてのサンドイッチアッセイであった。C T F 分子は、共有結合的に付着している「及び会合しているだけではない」ことが見出された。結果として、血漿中の免疫グロブリンに付着したほぼ全ての C T F が、変性を伴う又は伴わないウエスタンブロット上で又はイムノアッセイにおいて、解離（破壊）することができない。そこでは、C T F と会合したアルブミンを、変性を伴うウエスタンブロット上で又はイムノアッセイ洗浄手順において解離（破壊）することができる。洗浄は、アルブミンのこの干渉会合の除去を可能にする。ヒト血液中の I g G C T F の量は、遊離 C T F 又はアルブミンに会合した遊離 C T F の量に対し、はるかに過剰である。従って、遊離 C T F 及びアルブミンの両方の影響が低下し、I g G C T F アッセイへの干渉はしない。

10

【 0 3 6 6 】

これらのアッセイの臨床成績の比較を、表 1 6 において下に示す。3 つのイムノアッセイを使用し、患者からの 1 0 0 の血漿サンプルをテストし、結果を標準と比較した。遊離 C T F 及び C T F アルブミンアッセイでは、合成 C T F ペプチドを、標準として、ならびに、校正及び C T F 免疫グロブリンアッセイのために、ヒト I g G に共役した合成 C T F ペプチドを使用した。臨床サンプルテストのための理想的なイムノアッセイでは、標準への高い相関 ($R^2 > 0.95$) が維持されうるが、バックグラウンドにおける増加は受けられないであろう（臨床サンプル中での干渉により起こされる、検出限界での $< 10\%$ 増加）。

20

【 0 3 6 7 】

【表 1 9】

表 19. 方法比較

アッセイ	検出限界でのバックグラウンドにおける増加 (%)	相関傾き (R2)	CTF- IgG による干渉	CTF による干渉	アルブミンによる干渉
遊離 CTF アッセイ	1762%まで	0.90	はい	いいえ	はい
CTF-免疫グロブリンアッセイ	8%	0.98	いいえ	いいえ	いいえ
CTF-アルブミンアッセイ	256%まで	0.85	はい	はい	いいえ
理想	<10%	0.95	いいえ	いいえ	いいえ

30

40

【 0 3 6 8 】

C T F 免疫グロブリンについてのアッセイは、干渉を受けず、臨床テストのために適していた。

【 0 3 6 9 】

実施例 1 2 モノクローナル抗体の調製

B A L B / c マウスを、1 0 0 μ g/マウスの合成 A d i p o R 1 又は A d i p o R 2 ペプチド免疫原組成物を用いて免疫化した。表 2 0 に示す通りに含まれる、これらの A d i p o R 1 又は A d i p o R 2 ペプチド免疫原組成物：

【 0 3 7 0 】

【表 20】

表 20

配列番号	AdipoR	抗体クローン	アミノ酸配列
49	1	461-4H11	HVLVVAAAFVHFCYS
50	1	444-1D12	HFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDSL
51	1	515-4D6	GGCTDDTLL
52	2	510-6B6	GGCSEEDAL

10

【0371】

1ヶ月後、眼球出血を各々のマウスから取り、免疫原に対するELISAによりタイトルし、免疫応答を評価した。最善の応答を示しているマウスを、免疫原を伴う100 µg/マウスの注射により追加免疫した。4日後、マウスを屠殺し、それらの脾臓を、Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975)の方法に従った融合のために使用した。脾細胞を、SP2-0 Ag14ミエローマ細胞と、PEG (ポリエチレングリコール) 溶液を使用して融合し (脾細胞とミエローマ細胞との比率は5:1)、96ウェルプレート中に、50% PEG/HAT成長培地を使用して蒔いた。37 °C 摂氏での7~10日間のインキュベーション後、融合細胞を、成長について、3~4日毎の供給により、HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) 選択方法を利用してモニターし、HAT成長培地を用いた継代培養が続いた。

20

【0372】

2~3週間後、ハイブリドーマコロニー成長を有するウェルを、ELISAによりテストし、いずれの成長が、ペプチドへの抗体免疫応答を産生したかを決定した。96ウェルプレート培養物を、ウリスタチン (uristatin) ペプチドを用いて、100 µg/mLコーティングプレートでテストした。プレートを一晚2~8 °C でコーティングした後、全てのプレートを洗浄し、ブロッキングした。細胞培養上清を、次に、100 µl/ウェル、1時間にわたり室温で適用した。プレートを洗浄後、ヤギ抗マウスIgGホースラディッシュペルオキシダーゼ (1:2000希釈で) を、100 µl/ウェルで1時間にわたり適用した。プレートを、1回、再び洗浄し、OPD (O-フェニレンジアミン二塩酸塩) 基質が続き、490 nmで、Spectra Maxプレートリーダー上で読み取った。

30

【0373】

陽性応答を与えるコロニーを、さらなる増大及び再テストのために24ウェルプレートに移し、陽性結果を検証した。テストで陽性となったコロニーを、さらに、6ウェルプレート中で、10%ウシ胎児血清 (FBS) を伴うイスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM) 中で増大させた。増大後、コロニーを-70 °C で凍結し、次に、長期保存のために液体窒素に移した。精製ペプチドを使用したELISA結果に基づき、種々のコロニーを、さらに、IMDM、10% FBS中で増大させ、凍結して落とした。

40

【0374】

上のプロトコルを使用して作った抗体産生細胞を、American Type Culture Collection (「ATCC」) (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) に、2012年2月21日に寄託し、mAb 461-4H11を産生する細胞について受託番号PTA-____、mAb 444-1D12を産生する細胞について受託番号PTA-____、及び、510-6B6を産生する細胞について受託番号PTA-____が割り当てられている。

【0375】

実施例 13 結合アッセイプロトコル

これらの方法を使用し、インスリン抵抗性への相関試験においてIgG-CTFを測定

50

することができる。材料は、濃度 2.5 mg/ml の抗 R 1 C T F 抗体 M a b 4 4 4 - 1 D 1 2 - 1 h 7 を含み、150 μ L の抗体を 10 mL の T B S 中に、プレートコーティングのために希釈した。あるいは、濃度 1.25 mg/ml の抗 R 1 C T F 抗体 M a b 4 6 1 - 4 H 1 1 . 2 A 4 を、300 μ L の抗体を 10 mL の T B S 中に、プレートコーティングのために希釈した。あるいは、濃度 0.47 mg/ml の抗 R 2 C T F 抗体 M a b 5 1 0 - 6 B 6 - 1 G 1 1 を、1000 μ L の抗体を 10 mL の T B S 中に、プレートコーティングのために希釈した。A L P に共役した抗ヒト I g G 抗体 (抗 I g G A L P) [Siemens によりマウスにおいて産物 7 6 0 1 M R として産生されたモノクローナル抗ヒト F a b 抗体を、アルカリホスファターゼ (A L P) に共役した (Biozyme ALPI12G ロット 1 6 6 2 A A)]。抗 I g G A L P を、0.3 mg/ml ストックとして精製し、それを、25 μ L で、10 mL の 0.05% T - T B S 中に、アッセイにおける使用のために希釈した。テスト標準を、実施例 9 に記載する通り、C T F R 1 2 5 m e r (配列番号 1 1) に共役したヒト I g G (F i t z g e r a l d 産物コード 3 0 - A I 1 7) から作った。Tween n を伴わない T B S を、B u p H T r i s 緩衝生理食塩水 (Fisher Catalog# PI-28376) から作ったが、25 mM t r i s 及び 0.15 M 塩化ナトリウム (pH 7.2) である。ブロッキング緩衝液は、Super blocker であった。それは、供給 (Pierce) として使用した。T - T B S を、10% Tween-20 (Biorad Catalog# 161-0781) を T B S 中に加えることにより調製し、0.05% Tween-20 を作った。キャリプレート緩衝液は、1% B S A (Sigma P3688) を伴い、1.92 g/L クエン酸 (0.1 M) を伴い、pH が 6.4 に調整された P B E であった。イムノアッセイを読み取るために、96 ウェル E L I S A プレートを使用した (Costar cat # 3590)。平底を伴う E I A プレート及び高結合 Fisher Catalog# 07-200-35。Corning 低温バイアル 1.2 mL C (430658) を保存のために使用した。BD Vacutainer K2EDTA 10.8 mg 滅菌 r e f 3 6 7 8 9 3 プラスチックチューブ及びヘパリンナトリウム、ガラスチューブ r e f 8 0 9 1 4 3 7、及びグレートップグルコースチューブも使用した。

【0376】

第 1 工程は、8 つのプレート (Costar 96-Well EIA/RIA Plates Flat Well; High Binding) を、C T F についての m A b を用いて、T B S 中の濃度 12 μ g/ml でコートすることであった。100 μ l/ウェルのコーティング溶液をプレートに適用した。プレートを密封し、冷蔵庫 (4) 中で一晩 (~ 5 p m ~ ~ 9 a m) 又は 3 時間にわたり室温でインキュベートすることを可能にした。コーティング溶液を、ピペティングにより捨て、徹底的に水を切った。保存するためのプレートは、洗浄しなかった。それらは、プレートシーラー (Fisher Scientific Catalog #NC9479592) を用いて密封し、乾燥剤を伴う密封バッグの中に入れた。それらを、使用の日まで、- 20 で保存した。コーティングしたプレートは 3 ヶ月間持続する。

【0377】

第 2 工程は、40 人の患者について 1 つのプレートのブロッキング調製であった。各々のウェルを、300 μ l の T B S を用いて、自動プレートウォッシャーを使用して 5 回洗浄した。次に、300 μ l の Super Blocker を、各々のウェルに、ブロッキングのために加えた。プレートを、シェーカースピード 1000 rpm (設定 5) を用いて、37.5 で 60 分間にわたりインキュベートした。プレートを、300 μ l の 0.05% T - T B S を用いて、自動プレートウォッシャーを使用して 5 回洗浄した。

【0378】

第 3 工程は、濃縮した合成 C T F 試薬 (20 μ L I g G - C T F、18.8 mg/ μ L、10 mL P B S 中) の以下の希釈を実施することにより、サンプルキャリプレートを調製し、ストックを作ることであった。このストックを、3 ヶ月間にわたり、保存 (例、冷凍) することができる。キャリプレートは、キャリプレート緩衝液 (P B S + クエン酸 + 1% B S A、pH 6.4) 中で作った。キャリプレートは、毎日新たに作らなければならない。キャリプレートは、表 2.1 に従って作り上げた。

【0379】

【表 2 1】

表 21.

Cal	濃度	希釈
5	0.3 µg/ml	700 µl キャリブレーター緩衝液に 300 µl のストック
4	0.15 µg/ml	300 µl キャリブレーター緩衝液に 300 µl の Cal 5
3	0.06 µg/ml	400 µl キャリブレーター緩衝液に 100 µl の Cal 5
2	0.02 µg/ml	450 µl キャリブレーター緩衝液に 50 µl の Cal 5
1	0 µg/ml	キャリブレーター緩衝液

10

【 0 3 8 0】

4 番目の工程は、患者のサンプルを調製することであった。50 µl のサンプル (43 / プレート) を、ポリプロピレンサンプルプレート中の二通りのレーンのウェル中に加えた。600 µl の TBS を加え、十分に混合した (プレートを、この点で、4 で 5 日まで又は - 20 で少なくとも 5 日間にわたり保存することができる)。50 µl の希釈サンプル (1 : 12) 及び 50 µl のキャリブレーターを、ブロッキングした ELISA プレートの個々のウェル中に移した。

【 0 3 8 1】

第 5 工程は、1 度に 1 つのプレートについてのイムノアッセイ結合及び洗浄であった。プレートを密封し、シェーカースピード 1000 rpm で、35 で 60 分間にわたりインキュベートした。プレートを、0.05% T - TBS を用いて、自動プレートウォッシャーを使用して 5 回洗浄した。100 µl の抗 IgG アルカリホスファターゼ mAb を、各々のウェルに、0.05% T - TBS 中で適用した。プレートを密封し、シェーカースピード 1000 rpm で、35 で 60 分間にわたりインキュベートした。プレートを、0.05% T - TBS を用いて、自動プレートウォッシャーを使用して 5 回洗浄した。

20

【 0 3 8 2】

第 6 工程は、1 度に 1 つのプレートについてのイムノアッセイ結合及び洗浄であった。PNPP 基質を、1 シルバー及び 1 パッケージを 10 mL の PNPP 緩衝液中に室温で溶解することにより、新たに調製した (Sigma Catalog # N189)。次に、90 µl の PNPP を、各々のウェルに加えた。プレートをプレートリーダー中に置き、37 でインキュベートし、プレートを、16 分間にわたり、405 nm / 950 nm での吸光度を使用し、2 分毎に読み取った。

30

【 0 3 8 3】

実施例 1 4 組織単離のための癌及び血液細胞染色ならびに組織サンプル染色

以下は、組織テストのために使用することができる抗体材料である。それらを、ラット及びウサギからの組織について使用した。10 µl を 10 mL の PBS 中に希釈した場合、2.58 mg/ml (F から P 4 : 3) の抗 CTFR1 - FITC マウスモノクローナル mAb (クローン 444 - 1D12 Ekhart IN)。抗 CTFR1 マウスモノクローナル mAb (クローン 461 - 4H11 Ekhart IN) を、抗マウス mAb FITC ヤギ pAb の 1.0 mL (2 mg/ml) (クローン UCHL1 PE a b 6785 Abcam Inc.) と使用した。抗 TACE (ADAM17) マウス mAb (R&D systems MAB2129) を、FITC に共役した抗マウス FITC ヤギポリクローナル抗体 (Abcam ab6785) と使用した。抗 IDE (insulin) ヤギ pAb (R&D systems AF2496) を、FITC に共役した抗ヤギ FITC ポリクローナル抗体 (Abcam 97109) と使用した。

40

【 0 3 8 4】

以下は、細胞単離のために使用することができる方法である。細胞材料を、赤血球が通過することを可能にする 8 µm 細孔膜を通じてろ過した。膜を、走査型蛍光顕微鏡を用いて撮像し、以下を使用し、天然 CTF 免疫グロブリンに結合する癌細胞及び白血球を見出

50

す：抗CTFR1-FITCマウスモノクローナルmAbを伴う抗CD 45 TR (Ekhart IN)、抗CTFR1-FITCマウスモノクローナルmAbを伴う抗CD 19 TR (Abcam)、抗CTFR1-FITCマウスモノクローナルmAbを伴う抗CD 3 TR (Abcam)。細胞を、次に、膜から、Eppendorf Transfermanマイクロマニピュレーターを使用して除去した。

【0385】

以下は、ヒト癌細胞（成長する癌細胞については、実施例10を参照のこと）モデルテストのために使用することができる材料である：抗CTFR1-FITCマウスモノクローナルmAb（クローン444-1D12 Ekhart IN）（2.58mg/ml、FからP 4 : 3、2.3mL）を、細胞のために使用し、陰性を示した。TR (Abcam Ab 6716) に共役した、マウスへの抗ウサギTRヤギポリクローナルを混合した抗IDE (insulysin) ウサギpAb (calibiochem ST1120) を、SKBR細胞モデルテストのために使用した。TR (Abcam Ab 6716) に共役した、マウスへの抗ウサギTRヤギポリクローナルを混合した抗TACEウサギpAb (calibiochem PC491) を、SKBR細胞モデルテストのために使用した。マルチプレックス抗IDE 抗IDE (insulysin) ウサギpAb (calibiochem ST1120) を、TR (Abcam) に共役したマウスへの抗ウサギTRヤギポリクローナルを伴う細胞モデルのために使用し、抗IDE TACE (ADAM17) トリpAb (R&D systemsAF930) と混合し、Cy5 (Abcam) を用いて共役したマウスへの抗トリCy5ヤギポリクローナルを伴う細胞モデルのために使用し、SKBR細胞モデルテストのためのマルチプレックスアッセイとして使用した。

10

20

【0386】

以下は、ブロッキングのために使用することができる材料である：ウサギにおいて産生した抗Fc受容体抗体 (Abcam)、ウサギにおいて産生した抗CD32抗体、ウサギにおいて産生した抗Fc - RI I - a抗体、ウサギにおいて産生した抗Fc - RI I a抗体、ウサギにおいて産生した抗FcRII - a抗体、ウサギにおいて産生した抗IgG Fc受容体II - a抗体、ウサギにおいて産生した抗低親和性免疫グロブリン Fc領域受容体II - a前駆体抗体、抗ヒト共役ALP抗体（抗IgG ALP）：以下は、ブロッキングのために典型的に使用された材料であり、IgGガンマグロブリンヒト結腸分画 (G4368 Sigma Aldrich) であった。

30

【0387】

以下は、一般的な材料及び組織である：遠心チューブNalgene 50mL (#3110-9500) (フタを伴う)。

【0388】

膵臓、肝臓、脂肪、及び大腿四頭筋を、ZDFラットから単離し、組織の超音波処理試験 (Sonicato Misonix Inc Sonicaton XL 2010 hornを使用) のために使用した。組織の第2セットを、肝臓及びリンパ節を含むZDFラットから単離した。膵臓、脳、肝臓、脂肪、及び大腿四頭筋を、ポリクローナル発生の間に処置したウサギから単離し、クライオスライス (AML laboratories) のために使用し、別々のスライスを左右の脳半球及び小脳について得た。組織を、PBSを用いて、回収時に灌流した。組織を、(OCT化合物) を伴う凍結組織スライスについて包埋し、氷槽中のディスプレイベース (cat no 22.363.544) 中に置き、次に、-70 で凍結した。ウサギ464、465、及び466は、キーホールリンペットヘモシアニンKLH CTF33 (配列番号1) を用いて接種し、応答者であり、全てが、CTFに対するポリクローナル抗体を作った。それに対して、ウサギ467、468、及び469は、BSA CTF33 (配列番号1) を用いて接種し、非応答者であり、CTFに対するポリクローナル抗体を作らなかった。ウサギを、応答者又は非応答者として、R1 CTF25 (配列番号11) を使用して判断した。細胞透過溶液は、0.2% triton X100 (PBS中) であった。細胞洗浄溶液：1から10にPBS中に希釈し、0.1%のPBS/Tween-20を作る。DAPI：4,6ジアミジノ-2-フェニルインドールジヒドロクロライドMW 350.25 DAPIは、1mgバイアル中で来る。DAPIを1mlのTES中に溶解し

40

50

、1 mg/mlを作る。DAPIストック溶液は数ヶ月にわたり安定であり、光から保護して-20℃で保存した場合、繰り返し使用される。DAPIワーキング溶液を、DAPIストック溶液をTES中で1:10に希釈することにより作る(100 µg/ml DAPI)。癌細胞：乳癌細胞(ATCC)を、実施例10に記載する通りに培養し、そこで、濃度~200,000細胞/mLまで成長させた。細胞を、10 µlを1 mL中に希釈し、~2000細胞/mL、又は2細胞/µL又は0.5/HRP(HRP=0.2 µL)を提供した。顕微鏡法を、Leica DM5000顕微鏡を用いた位相差及び蛍光顕微鏡法により行った。使用したカバースリップはFisher 12-548-6, Permafrostスライドであった。

【0389】

顕微鏡法において使用したフィルターを表22に示す。

10

【0390】

【表22】

表22.

フィルター	励起フィルター	放出フィルター	蛍光シグナル
A4	340-380 BP	450-490 BP	DAPI
TX 2	540-580 BP	610-680 BP	Texas red 592, 614
L5	460-500 BP	512-543 BP	FITC (ex 488, em 525nm)
Y5			

20

【0391】

癌及び血液細胞染色

細胞サンプルを、100 µLの細胞懸濁液を、5% IgG又はBSAを伴う1.0 mLのPBSに、洗浄緩衝液中で、20,000細胞/mL(20細胞/µL又は5/HRP(HRP=0.2 µL))のために加えることにより作った(これは、また、全血を用いて行うことができる)。細胞が均等に分布したことを確保するために、細胞をボルテックスした。100 mLのテスト標準に、20 µLのDAPIを加えた(希釈1:10)。20 µL抗体を加えた。細胞を、15分間にわたり、37℃でインキュベートした。細胞を、10分間@7500 rpmで遠心し、上清をタッピングによりデカントした(~450 µL)。細胞を、1000 µLのPBSを用いて洗浄し、ボルテックスした。細胞を、10分間@7500 rpmで遠心し、上清をタッピングによりデカントした(~450 µL)。100 µLのPBS洗浄緩衝液を、最終的なイメージング溶液について加えた。5 µLを、ガラスの長いカバースリップを伴うスライドに適用した。位相差及び蛍光顕微鏡法を、Leica DM5000を用いて行った。

30

【0392】

細胞単離のためのラット組織サンプル染色

1 mLのPBSへの100 mgの組織の組織サンプルを作り、240ワット(40%)で1時間にわたり、細胞が均等に分布するまで、超音波処理した。細胞は加熱しなかった。むしろ、細胞を冷蔵し、冷やした。5 µLのDAPI(希釈)を、100 µLの組織サンプルに加えた。10 µLの抗体(非希釈)をサンプルに加え、15分間にわたり室温でインキュベートした。サンプルを、5分間@7500 rpmで遠心し、上清をタッピングによりデカントオフした(~450 µL)。100 µLのPBS洗浄緩衝液を、最終的なイメージング溶液について加えた。5 µLのサンプルを、ガラスの長いカバースリップを伴うスライドに適用した。位相差及び蛍光顕微鏡法を、Leica DM5000顕微鏡を用いて行った。

40

【0393】

組織固定のためのラット組織サンプル染色

組織サンプルを、1 mLのPBSへの100 mgの組織を用いて作った。サンプルを、240ワットで15分間~30分間にわたり、組織が薄くなるまで、超音波処理した。組織は加熱しなかった。むしろ、それを冷蔵し、冷やした。プロセス組織を顕微鏡スライドに加

50

えた。組織部分に、疎水性ペンを用いて円を描き、液体を保持するための部分を作った。100 μ Lの5%ホルムアルデヒド(PBS中)を円部分に加えた。スライドを15分間にわたり室温でインキュベートした。スライドを、次に、透過処理緩衝液(PBS/Triton X 100、0.2%)中で、洗浄槽において5~15分間にわたり洗浄した。スライドを除去した。スライドを、ドリップドライすることを可能にした。組織上のFc受容体を、次に、5%の50 μ LのIgG(PBS中)(5mg/ml)を、スライドの円部分に加え、スライドを15分間にわたり室温で放置することによりブロッキングした。スライドを除去し、スライドを洗浄槽中に5分間にわたり浸すことにより、細胞洗浄(PBS/Tween-20、0.1%)中で洗浄した。スライドを除去した(ペンを再適用しなければならないことがある)。50 μ Lの染色を円部分に加えた。染色を、(2.0mLのPBS、100 μ LのDAPI(0.01mg/mlに希釈))から作った。100 μ Lの抗体(0.1mg/mlに希釈)を加えた。スライドを15分間にわたり37 でインキュベートし、次に、除去した。スライドを、次に、スライドを洗浄槽中に5分間にわたり浸すことにより、細胞洗浄緩衝液(PBS/Tween-20、0.1%)中で洗浄した。位相差及び蛍光顕微鏡法を、Leica DM5000顕微鏡を用いて行った。

10

【0394】

組織固定のためのウサギ組織サンプル染色

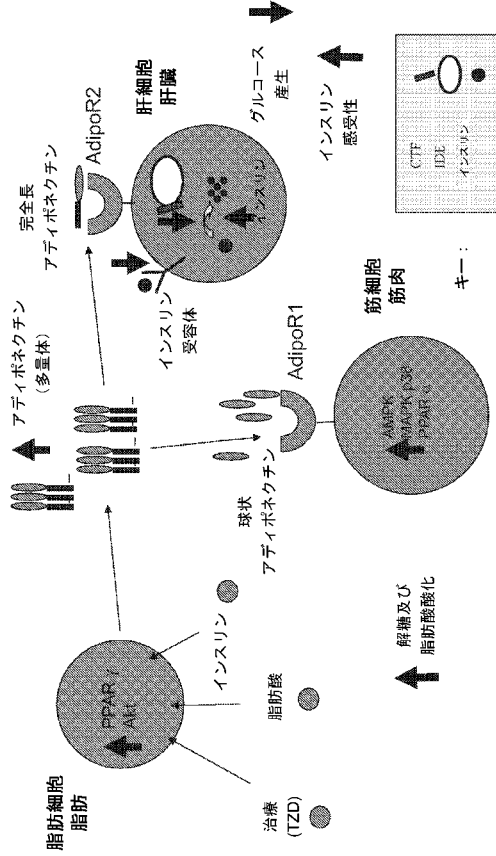
顕微鏡用の組織スライスを、当技術分野に一般的な任意の慣例に従って作ることができる。作ったスライスは、灌流組織上の8 μ mのクライオスライスであった。スライド上の組織を、疎水性ペンを用いて円を描き、液体を保持するための部分を作った。100 μ Lの5%ホルムアルデヒド(PBS中)を円部分に加えた。スライドを15分間にわたり室温でインキュベートした。スライドを、次に、透過処理緩衝液(PBS/Triton X 100、0.2%)中で、洗浄槽において5~15分間にわたり洗浄した。スライドを除去した。スライドを、ドリップドライすることを可能にした。組織上のFc受容体を、次に、5%の50 μ LのIgG(PBS中)(5mg/ml)を、スライドの円部分に加え、スライドを15分間にわたり室温で放置することによりブロッキングした。スライドを除去し、スライドを洗浄槽中に5分間にわたり浸すことにより、細胞洗浄(PBS/Tween-20、0.1%)中で洗浄した。スライドを除去した(ペンを再適用しなければならないことがある)。50 μ Lの染色を円部分に加えた。染色を、(2.0mLのPBS、100 μ LのDAPI(0.01mg/mlに希釈))から作った。100 μ Lの抗体(0.1mg/mlに希釈)を加えた。スライドを15分間にわたり37 でインキュベートし、次に、除去した。スライドを、次に、スライドを洗浄槽中に5分間にわたり浸すことにより、細胞洗浄緩衝液(PBS/Tween-20、0.1%)中で洗浄した。位相差及び蛍光顕微鏡法を、Leica DM5000顕微鏡を用いて行った。

20

30

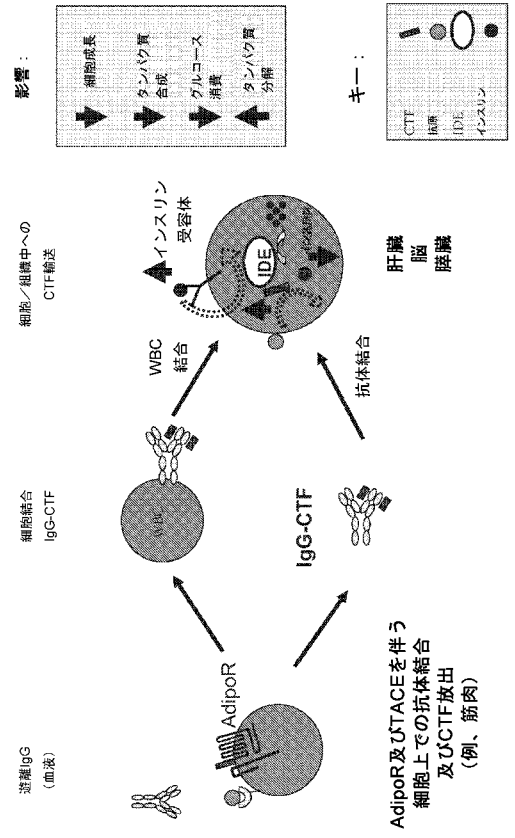
【 図 1 】

肥満への正常な応答

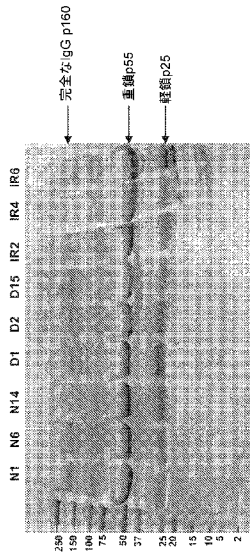


【 図 2 】

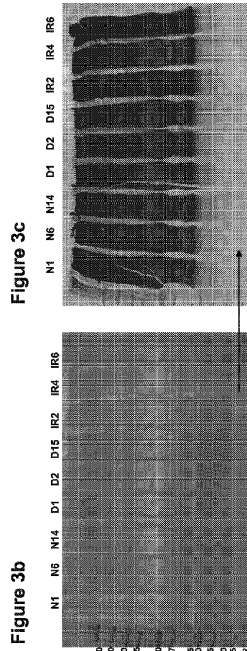
異常なインスリン抵抗性



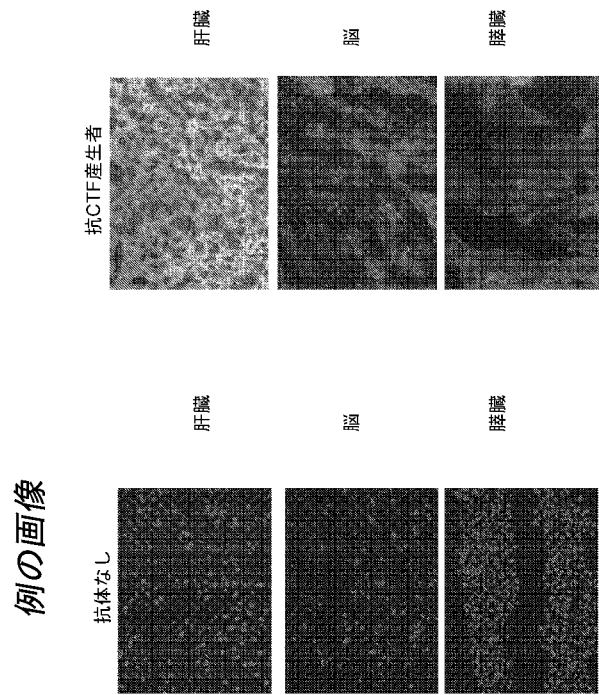
【 図 3 a 】



【 図 3 b - 3 c 】



【 図 4 】



【 配列表 】

2014517911000001.app

【国際調査報告】

61400260616



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 1226141

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/53 (2012.01) USPC - 4357.1 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) USPC - 4357.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 436/501, 436/86, 530/350 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST -- PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; Dialog Classic Files -- 654, 652, 349, 348, 340, 35, 65, 155; USPTO Web Page; Google Scholar; Search terms -- C-terminal fragment (CTF), immunoglobulin, antibody cross-reactivity, multiple species, patient samples, control samples, diagnosis, treatment, prognosis, quantitative analysis, cancer, insulin resistance										
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT										
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 2010/0143958 A1 (PUGIA) 10 June 2010 (10.06.2010) para [0004]-[0008], [0010], [0044], [0047], [0051], [0093], [0098], [0110], [0113]-[0115], [0139], [0141], [0158], [0186], abstract</td> <td>1-12, 37-53</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2008/0221305 A1 (CHEN et al.) (11 September 2008) para [0002], [0064], [0211], [0155], [0331], [0338], [0535], [0538], [0545], [0692], [0743], [0883], [1304], abstract</td> <td>1-12, 37-53</td> </tr> </tbody> </table>	Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 2010/0143958 A1 (PUGIA) 10 June 2010 (10.06.2010) para [0004]-[0008], [0010], [0044], [0047], [0051], [0093], [0098], [0110], [0113]-[0115], [0139], [0141], [0158], [0186], abstract	1-12, 37-53	Y	US 2008/0221305 A1 (CHEN et al.) (11 September 2008) para [0002], [0064], [0211], [0155], [0331], [0338], [0535], [0538], [0545], [0692], [0743], [0883], [1304], abstract	1-12, 37-53	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.								
Y	US 2010/0143958 A1 (PUGIA) 10 June 2010 (10.06.2010) para [0004]-[0008], [0010], [0044], [0047], [0051], [0093], [0098], [0110], [0113]-[0115], [0139], [0141], [0158], [0186], abstract	1-12, 37-53								
Y	US 2008/0221305 A1 (CHEN et al.) (11 September 2008) para [0002], [0064], [0211], [0155], [0331], [0338], [0535], [0538], [0545], [0692], [0743], [0883], [1304], abstract	1-12, 37-53								
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>										
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"g" document member of the same patent family</p>										
Date of the actual completion of the international search 24 July 2012 (24.07.2012)	Date of mailing of the international search report 03 AUG 2012									
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 22.4.2014									

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/26141

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

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

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

2. Claims Nos.: 54-58
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 54-58 are directed towards antibodies designated by ATCC numbers, but the ATCC numbers are left blank. The omissions render the claims unclear to the extent that a reasonable search cannot be performed. Said claims are not in compliance with Article 6 and Rule 6.

3. Claims Nos.: 13-36 and 59-62
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-12 and 37-53, drawn to methods and kits for analyzing IG-CTF in a biological sample.

Group II: Claim 63, drawn to an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 49.

Group III: Claim 64, drawn to an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 50.

Group IV: Claim 65, drawn to an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 51.

Group V: Claim 66, drawn to an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 52.

--please see continuation on extra sheet--

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-12 and 37-53

Remark on Protest

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

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/26141

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group VI+: Claim 67, drawn to an isolated polypeptide complex comprising anyone of the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 1 to 44 covalently attached to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 45 or SEQ ID NO: 46. If Applicant elects to have this group searched, Applicant must specify at least one amino acid sequence of SEQ ID NOs: 1 to 44 to be searched and at least one amino acid sequence of SEQ ID NO:45 or 46 to be searched. Each unique amino acid sequence constitutes an inventive concept.

The inventions listed as Groups I-VI+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The shared technical feature of the inventions listed as Groups II, III, and VI+ is the specific amino acid recited therein. Significant structural similarities cannot readily be ascertained among the polypeptides. Without significant structural similarities, the polypeptides do not have a shared special technical feature. In the absence of a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The shared technical feature of the inventions listed as Groups IV and VI+ is the sequence of SEQ ID NO:51, which represents a fragment of SEQ ID NOs: 4-11, 19-22, and 47. This shared technical feature fails to provide a contribution over the prior art, as evidenced by US 2010/0143956 A1 to Puglia (published 10 June 2010), which discloses a sequence that exhibits 100% identity with SEQ ID NO:51 (Pugia SEQ ID NO:22). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature.

The shared technical feature of the inventions listed as Groups V and VI+ is the sequence of SEQ ID NO:52, which represents a fragment of SEQ ID NO:33. This shared technical feature fails to provide a contribution over the prior art, as evidenced by US 2005/0032166 A1 to Chen et al. (published 10 February 2005), which discloses a sequence that exhibits 100% identity with SEQ ID NO:52 (Chen SEQ ID NO:18). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature.

Further, the special technical feature of the inventions listed as Group I is the detection or quantification of Ig-CTF. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups II-VI+. The special technical feature of the inventions listed as Group II is the amino acid sequence of SEQ ID NO: 49. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I, III-VI+. The special technical feature of the inventions listed as Group III is the amino acid sequence of SEQ ID NO: 50. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I-II, IV-VI+. The special technical feature of the inventions listed as Group IV is the amino acid sequence of SEQ ID NO: 51. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I-III, V. The special technical feature of the inventions listed as Group V is the amino acid sequence of SEQ ID NO: 52. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I-IV.

Groups I-VI+ therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 Q 1/06	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
C 1 2 Q 1/42	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	Z
C 0 7 K 7/06	(2006.01)	C 1 2 Q 1/06	
C 0 7 K 7/08	(2006.01)	C 1 2 Q 1/42	
C 0 7 K 14/72	(2006.01)	C 0 7 K 7/06	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 0 7 K 7/08	
		C 0 7 K 14/72	
		C 1 2 N 15/00	A

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

(74)代理人 100119079
弁理士 伊藤 佐保子

(74)代理人 100135873
弁理士 小澤 圭子

(74)代理人 100116528
弁理士 三宅 俊男

(74)代理人 100122736
弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747
弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540
弁理士 生川 芳徳

(74)代理人 100146031
弁理士 柴田 明夫

(74)代理人 100141357
弁理士 鈴木 音哉

(72)発明者 プジア, マイケル
アメリカ合衆国、インディアナ 4 6 5 3 0、グレンジャー、タディントン・ドライブ 1 4 3 4
2

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA44 BA61 DA02 GA05 HA01 HA15
4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QR02 QR13 QR66 QS03
QS16 QS36 QX02
4C084 AA17 NA05 ZA752 ZB262 ZC352
4C085 AA13 AA19 BB11 BB36 CC22 EE01
4H045 AA11 AA30 BA10 BA15 BA16 BA17 BA18 CA40 DA50 DA75
DA76 EA20 EA50 EA51 FA10 FA74

专利名称(译)	脂联素受体C末端片段 (CTF) 免疫球蛋白		
公开(公告)号	JP2014517911A	公开(公告)日	2014-07-24
申请号	JP2014505136	申请日	2012-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
申请(专利权)人(译)	西门子医疗诊断公司		
[标]发明人	プジアマイケル		
发明人	プジア,マイケル		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 G01N33/543 A61K45/00 A61P3/10 A61P35/00 A61P1/16 A61K39/395 C12Q1/06 C12Q1/42 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/72 C12N15/09		
CPC分类号	A61P1/16 A61P3/10 A61P35/00 G01N33/574 G01N33/6857 G01N33/74 G01N2800/042 G01N2800/085 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/574.A G01N33/543.575 G01N33/543.541.B G01N33/543.545.A A61K45/00 A61P3/10 A61P35/00 A61P1/16 A61K39/395.Z C12Q1/06 C12Q1/42 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/72 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA44 4B024/BA61 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/HA01 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QR02 4B063/QR13 4B063/QR66 4B063/QS03 4B063/QS16 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZA752 4C084/ZB262 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA19 4C085/BB11 4C085/BB36 4C085/CC22 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA10 4H045/FA74		
代理人(译)	津国 肇 柳桥康夫 三宅 俊男 田中洋子 阿基奥·希巴达		
优先权	61/445103 2011-04-11 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种检测生物样品中第一种Ig-CTF的方法，包括使生物样品与第二种Ig-CTF或第二种接触将第一抗体暴露于第一抗体，形成混合物，将混合物暴露于第三类型的第二抗体或优先结合第一类型的Ig的抗原结合片段，Ig-CTF

配列番号	命名	アミノ酸配列
1	AdipoR1 のフラグメント 1	VLVVAFAFVHFYGVSNLQEFYRGLGGCTDDTLL
2	AdipoR1 のフラグメント 2	LVVVAFAFVHFYGVSNLQEFYRGLGGCTDDTLL
3	AdipoR1 のフラグメント 3	SNLQEFYRGLGGCTDDTLL
4	AdipoR1 のフラグメント 4	VVAAAFVHFYGVSNLQEFYRGLGGCTDDTLL
5	AdipoR1 のフラグメント 5	VAAAFVHFYGVSNLQEFYRGLGGCTDDTLL
6	AdipoR1 のフラグメント 6	AAAFVHFYGVSNLQEFYRGLGGCTDDTLL
7	AdipoR1 のフラグメント 7	AAFVHFYGVSNLQEFYRGLGGCTDDTLL
8	AdipoR1 のフラグメント 8	AFVHFYGVSNLQEFYRGLGGCTDDTLL
9	AdipoR1 のフラグメント 9	FVHFYGVSNLQEFYRGLGGCTDDTLL
10	AdipoR1 のフラグメント 10	VHFYGVSNLQEFYRGLGGCTDDTLL
11	AdipoR1 のフラグメント 11	HFYGVSNLQEFYRGLGGCTDDTLL
12	AdipoR1 のフラグメント 12	FYGVSNLQEFYRGLGGCTDDTLL
13	AdipoR1 のフラグメント 13	YGVSNLQEFYRGLGGCTDDTLL
14	AdipoR1 のフラグメント 14	GVSNLQEFYRGLGGCTDDTLL