

(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2010-537625  
(P2010-537625A)

(43) 公表日 平成22年12月9日(2010.12.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 ZNAA	4B024
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	4B064
<b>GO1N 33/543 (2006.01)</b>	GO1N 33/543 545A	4B065
<b>CO7K 16/18 (2006.01)</b>	CO7K 16/18	4C085
<b>C12N 1/15 (2006.01)</b>	C12N 1/15	4H045

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-520397 (P2010-520397)  
 (86) (22) 出願日 平成19年8月15日 (2007. 8. 15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年4月8日 (2010. 4. 8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2007/002467  
 (87) 国際公開番号 WO2009/021360  
 (87) 国際公開日 平成21年2月19日 (2009. 2. 19)

(71) 出願人 510037064  
 マウントゲイト グループ リミテッド  
 英領バージン諸島 トートラ ロード タ  
 ウン オフショア インコーポレイション  
 ズ センター ピーオーボックス 957  
 (74) 代理人 100092093  
 弁理士 辻居 幸一  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 禎男  
 (74) 代理人 100084009  
 弁理士 小川 信夫  
 (74) 代理人 100084663  
 弁理士 箱田 篤  
 (74) 代理人 100093300  
 弁理士 浅井 賢治

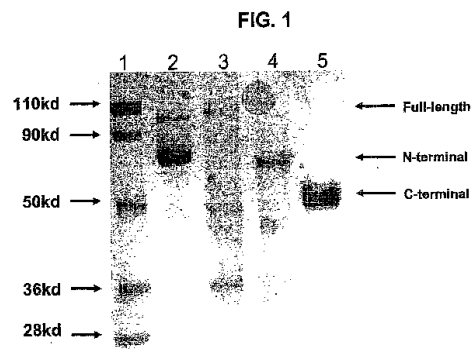
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ゲルゾリン結合剤組成物およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、ゲルゾリンポリペプチドに結合することができるゲルゾリン結合剤（例えば抗体）に一般的に関する。本発明のゲルゾリン結合剤は、ネイティブゲルゾリンタンパク質の精製に加えて、試験サンプル中のゲルゾリンポリペプチド（別名標的ポリペプチド）の検出に単独でまたは組合せで有用である。ゲルゾリン結合剤は、その必要性のある被験体におけるゲルゾリン関連の医学的状態の診断にも有用である。生物学的サンプル中のゲルゾリンを検出するキットが本発明によって提供される。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

C G M C C アクセション番号 2 1 1 4、2 1 1 5 および 2 1 1 6 からなる群から選択される寄託細胞株によって産生される抗体と同じ抗原結合特異性を有する抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 2】

F A Q G A L K S E D (配列番号：2)、S E P D G F W E A L (配列番号：3) および A C S N K I G R F V (配列番号：4) または 1 つもしくは複数の保存的アミノ酸置換を有するその変異型からなる群から選択される少なくとも重鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含み、特異的にゲルゾリンを結合する、抗体またはその抗原結合断片。

10

## 【請求項 3】

モノクローナル抗体を産生する連続的な細胞株であって、前記モノクローナル抗体が、C G M C C アクセション番号 2 1 1 4、2 1 1 5 および 2 1 1 6 からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株によって産生される抗体と同じ抗原決定基に結合し、前記細胞株が癌細胞またはその免疫原性決定基により免疫されたマウスに由来したリンパ球とマウスミエローマ細胞を融合させるプロセスによって産生される、連続的な細胞株。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする、単離された核酸。

## 【請求項 5】

請求項 4 に記載の核酸を含むベクター。

20

## 【請求項 6】

核酸分子に作動可能に結合されたプロモーターをさらに含む、請求項 5 に記載のベクター。

## 【請求項 7】

請求項 5 に記載のベクターを含む宿主細胞。

## 【請求項 8】

配列番号：1 のポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体またはその断片を調製する方法であって、

( a ) 前記抗体またはその断片の発現を提供する条件下で、請求項 4 に記載の核酸を含む細胞を培養する工程；及び

30

( b ) 発現された抗体またはその断片を回収する工程を含む方法。

## 【請求項 9】

F A Q G A L K S E D (配列番号：2)、S E P D G F W E A L (配列番号：3) および A C S N K I G R F V (配列番号：4) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、全長ヒトゲルゾリンを結合可能な抗体によって認識される、ゲルゾリンの単離されたエピトープ。

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載のエピトープを含む免疫原の調製物によって生成された抗体またはその抗原結合断片。

40

## 【請求項 11】

生物学的サンプル中のゲルゾリンの存在または量を決定する方法であって、

( a ) 抗体またはその断片がゲルゾリンに特異的に結合する条件下で、生物学的サンプルを、C G M C C アクセション番号 2 1 1 4、2 1 1 5 および 2 1 1 6 からなる群から選択される寄託細胞株によって産生されるものと同じ抗原結合特異性を有する 1 つもしくは複数の抗体またはその抗原結合断片と接触させる工程；及び

( b ) ゲルゾリンに結合した抗体またはその断片の存在または量を検出し、それによって前記サンプル中のゲルゾリンの存在または量を決定する工程

を含む方法。

50

**【請求項 1 2】**

E L I S Aにおいて、前記サンプルを前記抗体または抗原結合断片と接触させる、請求項 1 1 に記載の方法。

**【請求項 1 3】**

前記接触させる工程が、第 1 の抗体を基質に結合させ、サンプルを接触させ、第 2 の抗体を前記基質に結合させることを含み、前記第 2 の抗体が検出可能な標識を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

**【請求項 1 4】**

前記第 1 の抗体が、ハイブリドーマ細胞株 C G M C C アクセション番号 2 1 1 5 により産生される抗体と同じ抗原決定基に結合し、前記第 2 の抗体が、C G M C C アクセション番号 2 1 1 4 および 2 1 1 6 からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株によって産生される抗体と同じ抗原決定基に結合する、請求項 1 3 に記載の方法。

10

**【請求項 1 5】**

第 1 の哺乳類被験体においてゲルゾリンポリペプチドのレベルの変化に関連する疾患または状態の存在またはそれらに対する素因を決定する方法であって、

( a ) 前記第 1 の哺乳類被験体からの試験サンプルを提供する工程；

( b ) 前記第 1 の哺乳類被験体からの試験サンプルを、ゲルゾリンポリペプチドを結合する 1 つまたは複数の化合物と接触させて化合物 / ゲルゾリンポリペプチド複合体を形成する工程であって、前記化合物が、C G M C C アクセション番号 2 1 1 4、2 1 1 5 および 2 1 1 6 からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株によって産生されるものと同じ抗原結合特異性を有する抗体またはその抗原結合断片である工程；

20

( c ) 前記化合物 / ゲルゾリンポリペプチド複合体のレベルを検出する工程；

( d ) 前記第 1 の哺乳類被験体からのサンプル中のゲルゾリンポリペプチドの発現のレベルを定量する工程；及び

( e ) 工程 ( a ) のサンプル中のゲルゾリンポリペプチドの量を、前記疾患または状態を有していないかまたはそれらに対する素因のないことが既知である第 2 の哺乳類被験体からの対照サンプル中に存在するポリペプチドの量と比較する工程を含み、前記対照サンプルと比較して前記第 1 の被験体中のゲルゾリンポリペプチドの発現レベルの変化が、前記疾患または状態の存在またはそれらに対する素因を示す方法。

30

**【請求項 1 6】**

E L I S Aにおいて、前記サンプルを前記化合物と接触させる、請求項 1 5 に記載の方法。

**【請求項 1 7】**

前記接触させる工程が、第 1 の抗体を基質に結合させ、前記サンプルおよび第 2 の抗体を前記基質に接触させることを含み、前記第 2 の抗体が検出可能な標識を含む、請求項 1 6 に記載の方法。

**【請求項 1 8】**

前記第 1 の抗体が、ハイブリドーマ細胞株 C G M C C アクセション番号 2 1 1 5 により産生される抗体と同じ抗原決定基に結合し、前記第 2 の抗体が、C G M C C アクセション番号 2 1 1 4 および 2 1 1 6 からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株により産生される抗体と同じ抗原決定基に結合する、請求項 1 7 に記載の方法。

40

**【請求項 1 9】**

前記ゲルゾリンのレベルの変化に関連する疾患または状態が、敗血症性ショック、多臓器機能障害症候群関節リウマチ、脳卒中、心筋梗塞、癌、全身性自己免疫性疾患、慢性肝炎、化学療法副作用および放射線療法の副作用からなる群から選択される、請求項 1 5 に記載の方法。

**【請求項 2 0】**

哺乳類被験体における敗血症性ショックをモニタリングする方法であって、

( a ) 請求項 1 1 の方法に記載の哺乳類被験体におけるゲルゾリンのレベルを測定する工程と；

50

(b) 第1の被験体におけるゲルゾリンのレベルを参照スタンダードと比較する工程とを含み、前記参照スタンダードが、敗血症性ショックを有していない対照被験体を含み、前記参照スタンダードと比較した前記第1の被験体のゲルゾリンのレベルの減少が、前記哺乳類被験体が敗血症性ショックを有することを示す方法。

【請求項21】

医学的状态を防止または治療するために化合物の有効性を決定するための臨床試験への組入れのために哺乳類被験体を選択する方法であって、

(a) 請求項11の方法に記載の哺乳類被験体におけるゲルゾリンのレベルを測定する工程；

(b) 第1の被験体におけるゲルゾリンのレベルを参照スタンダードと比較する工程であって、前記参照スタンダードが、ゲルゾリンレベルに影響を与える疾患または状態を有していない対照哺乳類被験体を含む工程、及び

(c) 臨床試験において前記哺乳類被験体を組入れるように選択する工程を含み、前記哺乳類被験体のゲルゾリンレベルの類似性が参照スタンダードのゲルゾリンレベルに類似する方法。

【請求項22】

被験体のための予防的または療法的な治療を選択する方法であって、

(a) 請求項11の方法に記載の哺乳類被験体におけるゲルゾリンのレベルを測定する工程；

(b) 前記被験体のゲルゾリンのレベルに基づいた被験体クラスへ前記被験体を割り当てる工程；及び

(c) 前記被験体クラスに基づいて予防的または療法的な治療を選択する工程を含む方法。

【請求項23】

ゲルゾリンを精製する方法であって、

(a) 抗体またはその断片がゲルゾリンに特異的に結合する条件下で、ゲルゾリンを含む生物学的サンプルを、少なくとも1つの固定化された抗体またはその抗原結合断片と接触させて、固定化されたゲルゾリン抗体複合体を形成する工程であって、前記抗体またはその抗原結合断片が、CGMCCアクセッション番号2114、2115および2116からなる群から選択される寄託細胞株によって産生されるものと同じ抗原結合特異性を有する工程；及び

(b) 前記固定化されたゲルゾリン抗体複合体からゲルゾリンを回収する工程を含む方法。

【請求項24】

前記生物学的サンプルがヒト血清を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

1つまたは複数の容器、CGMCCアクセッション番号2114、2115および2116からなる群から選択される寄託細胞株によって産生されるものと同じ抗原結合特異性を有する1つもしくは複数の抗体またはその抗原結合断片、およびその中の内容物の使用のための説明書を含むキット。

【請求項26】

(a) 第1の抗体によりコートされたELISAプレート；及び

(b) 容器中の第2の抗体を含み、前記第1の抗体および第2の抗体が、CGMCCアクセッション番号2114、2115および2116からなる群から選択される寄託細胞株によって産生された抗体である、キット。

【請求項27】

1つまたは複数のコンポーネントをさらに含み、前記1つまたは複数のコンポーネントが、ヒト血漿ゲルゾリンスタンダード、ヒト血漿希釈緩衝液、洗浄緩衝液および基質緩衝液である、請求項26に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ゲルゾリン結合剤の調製およびその使用に一般的に関する。特に、本発明は、ヒト血漿ゲルゾリンの抗原決定基（すなわちエピトープ）を認識する、抗ゲルゾリン抗体の調製およびゲルゾリン検出のためのそれらの使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

以下の記述は読者の理解を助けるために提供される。提供される情報または引用された参照のどれも本発明に対する先行技術であると認められない。

## 【0003】

アクチンは動物細胞中の最も豊富なタンパク質であり、多くの有核細胞のタンパク質の10~20%、および筋細胞のタンパク質の30%を構成する。各アクチン分子はATP分子を結合して長いフィラメントへと自己集合し、その間にATPはADPに加水分解される。

## 【0004】

動物組織の負傷は、血流を含む細胞外空間へのアクチンの放出をもたらす。非筋肉細胞アクチンのおよそ半分はF-アクチン（G-アクチンモノマーから集合したアクチンの二重螺旋のロッド状のフィラメント形態）であるが、細胞外液のイオン状態はアクチン重合を支援し、その結果、実質的には、死細胞から血液へと放出されたすべてのアクチンがフィラメントへと重合すると予想されるだろう（Lind, S. E. et al., Am. Rev. Respir. Dis. 138: 429-434 (1988)）。精製溶液中で、フィラメント短縮タンパク質の非存在下において、アクチンフィラメントは、容易に数ミクロンの長さ達成しうる。しかしながら、不可逆的に変性させられるか、または他の場合には以下に検討される細胞内アクチン結合タンパク質の1つに結合される、損傷細胞から放出されるアクチンのいくらかの画分では、このアクチンは単量体のままだろう。

## 【0005】

アクチンと天然に結合する多くのタンパク質がある（アクチン結合タンパク質の総説については、Stossel et al., Ann. Rev. Cell Biol. 1: 353-402 (1985); Pollard et al., Ann. Rev. Biochem. 55: 987-1035 (1986)を参照）。しかしながら、主として2つのタンパク質のゲルゾリンおよびDBP（ビタミンD結合タンパク質）が、細胞外アクチンの結合に関与すると考えられる（Janmey et al., Blood 70: 529-530 (1987)）。ゲルゾリンは、アクチンフィラメントの集合および脱集合の鍵となるレギュレーターのアクチン結合タンパク質である。ゲルゾリンは、S1~S6と呼ばれる6つの相同サブドメインを備えた82kDaタンパク質である。各サブドメインは5鎖の $\alpha$ -シートからなり、2つの $\alpha$ -ヘリックスが隣接し、1つは鎖に関して垂直に配置し、1つは平行に配置する。N末端（S1~S3）は延長した $\alpha$ -シートを形成し、C末端（S4-S6）は同様に形成する（Kissel et al., PNAS 100: 3942-3947 (2003)）。タンパク質は高度に保存され、種間での相溶性は高い。ゲルゾリンは、細胞内（サイトゾルおよびミトコンドリア中）、ならびに細胞外血漿中に存在する（Koya et al., J Biol Chem 275 (20): 15343-15349 (2000)）。

## 【0006】

ゲルゾリンはアクチン重合の調節に複数の機能を有する。第一に、ゲルゾリンは単量体アクチン結合に関与する。Ca<sup>2+</sup>の存在下において、ゲルゾリンは2つのアクチン単量体を結合する。ゲルゾリンは、他のアクチン結合部位によってアクチンフィラメントもまた結合することができる。第二に、ゲルゾリンは2つのアクチン単量体を結合してアクチン重合のための核を形成し、アクチンフィラメントの反矢じり端をキャップする。したがって、ゲルゾリンはアクチン重合のための核として働き、新生マイクロフィラメントの末端をキャップすることができる。最後に、ゲルゾリンはアクチン切断活性を有する。

10

20

30

40

50

## 【0007】

細胞中の多量のアクチンのために、死細胞からアクチンの放出は、血漿の細胞外液の粘度を増加させることによって、および/または細胞のトラップによって、または他のもの(まだ未同定の毒性効果)によってのいずれかで、微小環境に有意な影響を有する十分なアクチンを提供する。細胞外への遊離アクチンの注入は、動物組織、ならびに特に腎臓系および心肺系に毒性がある(Harper et al., Clin. Res. 36: 625A (1988); Haddad et al., PNAS 87: 1381-1385 (1990))。急性腎不全は筋損傷の合併症であり、ラットにおけるアクチン注入は血中尿素窒素(BUN)およびクレアチニンレベルの一過性上昇を引き起こすので、腎不全と一致する。血漿中の遊離アクチンは、多臓器機能障害症候群を導くフィラメントを形成しうる(Dahl et al., Shock 12(2): 102-4 (1999))。さらに、フィラメント中の細胞外アクチン分子の各々は、それと結合するADP分子を有するので、血液中の細胞外アクチンの存在は、宿主に有利でない方式で血小板凝集を誘導または増大する傾向がありうる(Lind et al., Am. Rev. Respir. Dis. 138: 429-434 (1988); Scarborough et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 100: 1314-1319 (1981))。従って、血漿ゲルゾリンは、死んだ細胞および死んでいる細胞から放出されたアクチンをスカベンジする生体機能を有し、血漿ゲルゾリンレベルは、外傷のある患者における初期予後マーカーであると思われる(Mounzer et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160: 1673-81 (1999))。

10

20

## 【発明の概要】

## 【0008】

本発明は、ゲルゾリン結合剤の調製およびその使用に一般的に関する。特に、本発明は、ヒト血漿ゲルゾリンの抗原決定基(すなわちエピトープ)を認識する、抗ゲルゾリン抗体の調製およびゲルゾリン検出のためのそれらの使用に関する。1つの態様において、本発明は、CGMCCアクセッション番号2114、2115および2116からなる群から選択される寄託細胞株によって産生される抗体と同じ抗原結合特異性を有する抗体またはその抗原結合断片を提供する。1つの実施形態において、本発明は、FAQGALKSEED(配列番号: 2)、SEPDGFWEAL(配列番号: 3)およびACSNKIGRFV(配列番号: 4)または1つもしくは複数の保存的アミノ酸置換を有するその変異型からなる群から選択される少なくとも重鎖CDR3アミノ酸配列を含み、ゲルゾリンを特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片を提供する。1つの実施形態において、本発明は、本発明の抗体または抗原結合断片をコードする核酸組成物を提供する。1つの実施形態において、本発明は、本発明の抗体または抗原結合断片をコードする核酸組成物を含むベクターを提供する。ベクターは、核酸分子に作動可能に結合したプロモーターをさらに含むことができる。1つの実施形態において、本発明は、本発明の抗体または抗原結合断片をコードする核酸組成物を含むベクターを含む宿主細胞を提供する。1つの実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体がCGMCCアクセッション番号2114、2115および2116からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株によって産生される抗体と同じ抗原決定基に結合し、細胞株が癌細胞またはその免疫原性決定基により免疫されたマウスに由来するリンパ球とマウスミエローマ細胞を融合させるプロセスによって産生される、モノクローナル抗体を産生する連続的な細胞株を提供する。

30

40

## 【0009】

別の態様において、本発明は、配列番号: 1のポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体またはその断片を調製する方法であって、(a)抗体またはその断片の発現を提供する状態下で、請求項4に記載の核酸を含む細胞を培養する工程と; (b)発現された抗体またはその断片を回収する工程とを含む方法を提供する。

## 【0010】

別の態様において、本発明は、FAQGALKSEED(配列番号: 2)、SEPDGF

50

WEAL (配列番号: 3) および ACSNKIGRFV (配列番号: 4) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、全長ヒトゲルゾリンを結合可能な抗体によって認識される、ゲルゾリンの単離されたエピトープを提供する。1つの実施形態において、発明は、FAQGALKSED (配列番号: 2)、SEPDGFWEAL (配列番号: 3) および ACSNKIGRFV (配列番号: 4) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むゲルゾリンのエピトープを含む免疫原の調製により生成される、抗体またはその抗原結合断片を提供する。

#### 【0011】

1つの態様において、本発明は、(a) 抗体またはその断片がゲルゾリンに特異的に結合する条件下で、CGMCCアクセッション番号2114、2115および2116からなる群から選択される寄託細胞株によって産生されるものと同じ抗原結合特異性を有する1つまたは複数の抗体またはその抗原結合断片と、生物学的サンプルを接触させる工程と; (b) ゲルゾリンと結合した抗体またはその断片の存在または量を検出し、それによってサンプル中のゲルゾリンの存在または量を決定する工程とを含む、生物学的サンプル中のゲルゾリンの存在または量を決定する方法を提供する。方法の1つの実施形態において、サンプルは、ELISAにおいて前記抗体または抗原結合断片と接触させられる。方法の1つの実施形態において、接触させる工程は、第1の抗体を基質に結合させ、サンプルを接触させ、第2の抗体(第2の抗体は検出可能な標識を含む)を基質に結合することを含む。方法の1つの実施形態において、第1の抗体はハイブリドーマ細胞株CGMCCアクセッション番号2115により産生される抗体と同じ抗原決定基に結合し、第2の抗体はCGMCCアクセッション番号2114および2116からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株により産生される抗体と同じ抗原決定基に結合する。

10

20

#### 【0012】

1つの態様において、本発明は、哺乳類被験体における敗血症性ショックをモニタリングする方法であって、(a) 生物学的サンプル中のゲルゾリンの存在または量を決定するための本発明の方法に記載の哺乳類被験体におけるゲルゾリンのレベルを測定する工程と; (b) 第1の被験体におけるゲルゾリンのレベルを参照スタンダード(参照スタンダードは敗血症性ショックを有していない対照被験体を含む)と比較し、参照スタンダードと比較した第1の被験体のゲルゾリンのレベルの減少は哺乳類被験体が敗血症性ショックを有することを示す工程とを含む方法を提供する。

30

#### 【0013】

別の態様において、本発明は、医学的状态を防止または治療する化合物の有効性を決定するための臨床試験への組入れのために哺乳類被験体を選択する方法であって、(a) 生物学的サンプル中のゲルゾリンの存在または量を決定するための本発明の方法に記載の哺乳類被験体におけるゲルゾリンのレベルを測定する工程と; (b) 第1の被験体におけるゲルゾリンのレベルを参照スタンダード(参照スタンダードはゲルゾリンレベルに影響を与える疾患または状態を有していない対照哺乳類被験体を含む)と比較する工程と、(c) 臨床試験において哺乳類被験体(哺乳類被験体のゲルゾリンレベルの類似性は参照スタンダードのゲルゾリンレベルに類似する)を組入れるように選択する工程とを含む方法を提供する。

40

#### 【0014】

別の態様において、本発明は、第1の哺乳類被験体においてゲルゾリンポリペプチドのレベルの変化に関連する疾患または状態の存在またはそれらに対する素因を決定する方法であって、(a) 第1の哺乳類被験体からの試験サンプルを提供する工程と; (b) 化合物がCGMCCアクセッション番号2114、2115および2116からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株によって産生されるものと同じ抗原結合特異性を有する抗体またはその抗原結合断片であって、ゲルゾリンポリペプチドを結合する1つまたは複数の化合物と第1の哺乳類被験体からの試験サンプルを接触させて、化合物/ゲルゾリンポリペプチド複合体を形成する工程と、(c) 化合物/ゲルゾリンポリペプチド複合体のレベルを検出する工程と; (d) 第1の哺乳類被験体からのサンプル中のゲルゾリンポリペ

50

プチドの発現のレベルを定量する工程と；(e)工程(a)のサンプル中のゲルゾリンポリペプチドの量を、疾患または状態を有していないかまたは素因のないことが既知である第2の哺乳類被験体からの対照サンプル中に存在するポリペプチドの量と比較し、対照サンプルと比較して第1の被験体のゲルゾリンポリペプチドの発現レベルの変化は疾患または状態の存在またはそれらに対する素因を示す工程とを含む方法を提供する。方法の1つの実施形態において、サンプルはELISAにおいて化合物と接触させられる。方法の1つの実施形態において、接触させる工程は、第1の抗体を基質に結合させ、サンプルおよび第2の抗体(第2の抗体は検出可能な標識を含む)を基質に接触させることを含む。方法の1つの実施形態において、第1の抗体はハイブリドーマ細胞株CGMCCアクセッション番号2115により産生される抗体と同じ抗原決定基に結合し、第2の抗体はCGMCCアクセッション番号2114および2116からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株により産生される抗体と同じ抗原決定基に結合する。方法の1つの実施形態において、ゲルゾリンのレベルの変化に関連する疾患または状態は、敗血症性ショック、多臓器機能障害症候群、関節リウマチ、脳卒中、心筋梗塞、癌、全身性自己免疫性疾患、慢性肝炎、化学療法副作用および放射線療法の副作用からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

**【0015】**

1つの態様において、本発明は、被験体のための予防的または療法的な治療を選択する方法であって、(a)生物学的サンプル中のゲルゾリンの存在または量を決定する本発明の方法に記載の哺乳類被験体においてゲルゾリンのレベルを測定する工程と；(b)被験体のゲルゾリンのレベルに基づいた被験体クラスへ被験体を割り当てる工程と；(c)被験体クラスに基づいて予防的または療法的な治療を選択する工程とを含む方法を提供する。

**【0016】**

1つの態様において、本発明は、ゲルゾリンを精製する方法であって、(a)抗体またはその抗原結合断片はCGMCCアクセッション番号2114、2115および2116からなる群から選択される寄託細胞株によって産生されるものと同じ抗原結合特異性を有し、抗体またはその断片がゲルゾリンに特異的に結合する条件下で、少なくとも1つの固定化された抗体またはその抗原結合断片とゲルゾリンを含む生物学的サンプルを接触させて、固定化されたゲルゾリン抗体複合体を形成する工程と；(b)固定化されたゲルゾリン抗体複合体からゲルゾリンを回収する工程とを含む方法を提供する。方法の1つの実施形態において、生物学的サンプルはヒト血清を含む。

**【0017】**

1つの態様において、本発明は、1つまたは複数の容器、CGMCCアクセッション番号2114、2115および2116からなる群から選択される寄託細胞株によって産生されるものと同じ抗原結合特異性を有する1つまたは複数の抗体またはその抗原結合断片、およびその中の内容物の使用のための説明書を含むキットを提供する。

**【0018】**

1つの態様において、本発明は、(a)第1の抗体によりコートされたELISAプレートと；(b)容器中の第2の抗体とを含み、第1の抗体および第2の抗体がCGMCCアクセッション番号2114、2115および2116からなる群から選択される寄託細胞株によって産生された抗体である、キットを提供する。1つの実施形態において、キットは、ヒト血漿ゲルゾリンスタンダード、ヒト血漿希釈緩衝液、洗浄緩衝液および基質緩衝液のコンポーネントのうち1つまたは複数を含む。

**【図面の簡単な説明】****【0019】**

【図1】マウス抗ヒトゲルゾリンモノクローナル抗体の生成のために免疫原として使用したヒト血漿ゲルゾリンタンパク質(ネイティブヒト血漿ゲルゾリン(レーン2)、および組換え全長ゲルゾリン(レーン3)、組換えN末端ゲルゾリン断片(レーン4)および組換えC末端ゲルゾリン断片(レーン5))のSDS-PAGE解析を示した図である。分子量マーカーをレーン1に示す。

【図2】ヒトゲルゾリンの異なる形態（NG：ネイティブゲルゾリン；GF：全長組換えゲルゾリン；GN：組換えN末端ゲルゾリン断片；GC：組換えC末端ゲルゾリン断片）およびBSA対照への抗ゲルゾリンモノクローナル抗体の結合特質のELISA解析を示した図である。各パネルは、異なる抗体からのデータを提示し、パネルAはGN3E9（図2A）、パネルBはGF2D6（図2B）、パネルCはGC1C10（図2C）、パネルDはGS2C4（図2D）である。

【図3】抗ゲルゾリンモノクローナル抗体によりブローピングした、2つのヒト血漿サンプルのSDS-PAGEのウエスタンブロット解析を示した図である。

【図4】抗ゲルゾリン抗体により免疫沈降させたヒト血漿ゲルゾリンのSDS-PAGE解析を示した図である。各レーンにおけるサンプルは以下のとおりである。レーン1：ブランク対照（血漿なし）；レーン2：GC1C10；レーン3：GF2D6；レーン4：GN3E9；およびレーン5：GS2C4。

【図5A】異なる7種の中での免疫沈降（上部パネル）およびウエスタンブロット解析（下部パネル）による、抗ゲルゾリン抗体GC1C10の交差反応性の解析を示した図であり、レーン1：マウス；レーン2：サル；レーン3：ウサギ；レーン4：ラット；レーン5：ウシ；レーン6：ウマ；レーン7：ヒトである。

【図5B】異なる7種の中での免疫沈降（上部パネル）およびウエスタンブロット解析（下部パネル）による、抗ゲルゾリン抗体GF2D6の交差反応性の解析を示した図であり、レーン1：マウス；レーン2：サル；レーン3：ウサギ；レーン4：ラット；レーン5：ウシ；レーン6：ウマ；レーン7：ヒトである。

【図5C】異なる7種の中での免疫沈降（上部パネル）およびウエスタンブロット解析（下部パネル）による、抗ゲルゾリン抗体GN3E9の交差反応性の解析を示した図であり、レーン1：マウス；レーン2：サル；レーン3：ウサギ；レーン4：ラット；レーン5：ウシ；レーン6：ウマ；レーン7：ヒトである。

【図6】ゲルゾリンのC末端断片の3D構造および抗ゲルゾリン抗体のエピトープ位置である。

【図7】精製したヒト血漿ゲルゾリンへの抗ゲルゾリン抗体の結合のF-アクチン阻害ELISA解析を示した図である。F-アクチンによるゲルゾリンへの抗体結合の阻害は、F-アクチンなしの結合に対するパーセントとして提示される。

【図8A】ペアの抗体（GN3E9/GC1C10）を使用する化学発光ELISAによって生成されたヒト血漿ゲルゾリンの標準曲線であり、検出シグナル（相対的光単位、RLU）の関数として血漿ゲルゾリン濃度（ng/mL）を示した図である。

【図8B】ペアの抗体（GN3E9/GF2D6）を使用する化学発光ELISAによって生成されたヒト血漿ゲルゾリンの標準曲線であり、検出シグナル（相対的光単位、RLU）の関数として血漿ゲルゾリン濃度（ng/mL）を示した図である。

【図9】血漿ゲルゾリンレベルに基づいた、サンプル取り扱い条件（すなわちサンプルへのクエン酸ナトリウム（シトレート）、ヘパリン、またはEDTAの追加）の定量化の比較である。

【図10】抗体ペアのGN3E9/GC1C10を使用するELISA分析における光学的密度vsゲルゾリンポリペプチド濃度のグラフを示した図であり、ゲルゾリンポリペプチドはNG：ネイティブゲルゾリン；GF：全長組換えゲルゾリン；GN：組換えN末端ゲルゾリン断片；またはGC：組換えC末端ゲルゾリン断片である。

【図11A】GN3E9/GC1C10抗体ペアを使用するELISA分析における光学的密度vs血漿ゲルゾリンのグラフを示し、アクチン不含有ゲルゾリン（対照）またはアクチンとの複合体のゲルゾリン（+アクチン）を測定した図である。

【図11B】GN3E9/GF2D6抗体ペアを使用するELISA分析における光学的密度vs血漿ゲルゾリンのグラフを示し、アクチン不含有ゲルゾリン（対照）またはアクチンとの複合体のゲルゾリン（+アクチン）を測定した図である。

【図12】本発明のゲルゾリンELISA分析を使用して、健康的な対照（n=291）およびICU（救急）患者（n=22）において測定された血清ゲルゾリン濃度のグラフ

10

20

30

40

50

である。

【図13】本発明のゲルゾリンELISA分析を使用して決定されるような、正常な患者ならびに全身性エリテマトーデス(SLE)の非活動型および活動型を示す患者における血清ゲルゾリン濃度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )のグラフである。

【図14】本発明のゲルゾリンELISA分析を使用して決定されるような、正常な患者および慢性肝炎に罹患した患者における血清ゲルゾリン濃度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )のグラフである。

【図15A】化学療法の血漿ゲルゾリンレベルに対する効果のウエスタンブロット解析を示した図である。ウエスタンブロットの写真である。

【図15B】化学療法の血漿ゲルゾリンレベルに対する効果のウエスタンブロット解析を示した図である。デンシトメトリーによるウエスタンブロットの定量分析である。

【図16A】化学療法後の血漿ゲルゾリンの時間依存的枯渇のウエスタンブロット解析を示した図である。アドリアマイシンが投与された後の様々なタイムポイントのマウスの血清サンプルのウエスタンブロットの写真である。

【図16B】化学療法後の血漿ゲルゾリンの時間依存的枯渇のウエスタンブロット解析を示した図である。デンシトメトリーによる図16Aのウエスタンブロットの定量分析である。

【図16C】化学療法後の血漿ゲルゾリンの時間依存的枯渇のウエスタンブロット解析を示した図である。タキソールが投与された後の様々なタイムポイントのマウスの血清サンプルのウエスタンブロットの写真である。

【図16D】化学療法後の血漿ゲルゾリンの時間依存的枯渇のウエスタンブロット解析を示した図である。デンシトメトリーによる16C図のウエスタンブロットの定量分析である。

【図17】化学療法の5人の患者の血漿ゲルゾリンレベルを示すグラフである。本発明のゲルゾリンELISA分析を使用して決定されるような、シスプラチン化学療法後の卵巣癌患者の群における時間依存的減少である。

【図18A】インビボのマウスモデルにおける化学療法誘導性体重損失の減少における全長組換えゲルゾリンの治療有効性を示すグラフである。

【図18B】インビボのマウスモデルにおける死亡率の減少における全長組換えゲルゾリンの治療有効性を示すグラフである。

【図19】本発明のGC1C10、GN3E9およびGC2D6抗体によって親和性精製したヒト血漿ゲルゾリンのSDS-PAGEを示した図である。

【図20】3つの代表的な抗ゲルゾリン抗体によるヒト血漿ゲルゾリンの異なる形態のウエスタンブロット解析を示した図である。パネルAは、ヒト血漿ゲルゾリンの90kDa形態のみと反応する抗体群の代表的なものである(図20A)。パネルBは、50kDaゲルゾリン様ポリペプチドのみと反応する抗体群の代表的なものである(図20B)。パネルCは、90kDaおよび50kDaの免疫反応形態の両方と反応する抗体群の代表的なものである(図20C)。

【図21】アポトーシスありまたはアポトーシスなしのヒト膀胱癌細胞株の細胞内ゲルゾリンの抗ゲルゾリン抗体によるウエスタンブロット解析を示した図である。ヒト膀胱癌細胞(MIACAPA)を、対照培地(レーン1)、または4時間1000ng/mlの抗DR5抗体(CTB006)の存在下(レーン2)において培養した。全細胞溶解物のウエスタンブロットを、ゲルゾリンC末端断片特異的抗体GC1C10(図21A)又はゲルゾリンN末端断片特異的抗体GN3E9(図21B)によりプロービングした。

【図22】第1の研究の4人の健康な対照患者(N1~N4)および4人の癌患者(C1~C4)(図22A)、及び第2の研究の4人の健康な対照患者(N5~N8)および4人の癌患者(C5~C8)(図22B)における全血漿ゲルゾリンを免疫沈降させた血漿ゲルゾリンのSDS-PAGE解析(上部パネル)およびウエスタンブロット解析(下部パネル)を示した図である。

【図23】本発明のゲルゾリンELISA分析を使用して決定した、関節リウマチの患者

10

20

30

40

50

と比較した正常な患者における血清ゲルゾリン濃度 (  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ) のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0020】

一般事項。本発明の特定の態様、様式、実施形態、変形物および特色が、本発明の実質的な理解を提供するために様々なレベルで詳細に以下に記述されることが認識されるべきである。

【0021】

本発明は、一般的にゲルゾリンポリペプチドに結合することができるゲルゾリン結合剤 (例えば抗体) を提供する。したがって、本発明の様々な態様は、ゲルゾリン結合剤の調製、発現および特性評価に関する。本発明のゲルゾリン結合剤は、生物学的サンプルからのネイティブゲルゾリンポリペプチドを含む、ネイティブゲルゾリタンパク質を精製する方法に加えて、試験サンプル中のゲルゾリンポリペプチド (別名、標的ポリペプチド) を検出するのに、単独でまたは組合せで、有用である。ゲルゾリン結合剤は、その必要性のある被験体におけるゲルゾリンに関連する医学的状態を診断するのに有用である。ヒトゲルゾリンポリペプチド (配列番号: 1) のアミノ酸配列を、表1中に示す。

10

20

30

【表1】

表1. ヒトゲルゾリンポリペプチド配列

MAPHRPAPALLCALSLALCALSLPVRAATASRGASQAGAPQGRVPEARPNMVEHPEFLKAGKEPGLQI
WRVEKFDLVFPVPTNLYGDFFTGDAYVILKTVQLRNGNLQYDLHYWLGNECSQDESGAAAIFTVQLDDYLN
GRAVQHREVVQGFESATFLGYFKSGLKYKKGGVASGFKHVVPNEVVVQRLFQVKGRRVVRATEVPVSWESF
NNGDCFILDLDGNNIHQWCGSNSNRYERLKATQVSKGIRDNERSGRARVHVSEEGTEPEAMLQVLGPKPAL
PAGTEDTAKEDAANRKLAKLYKVSNGAGTMSVSLVADENPFAQGALKSEDCFILDHKGDKGKIFVWKGKQA
NTEERKAALKTASDFITKMDYPKQTQVSVLPEGGETPLFKQFKNWRDPDQTDGLGLSYLSSHIANVERV
PFDAATLHTSTAMAAQHGMDDDG TGQKQIWRIEGSNKVPVDPATYQGQFYGGDSYIILYNYRHGGRQGQII
YNWQGAQSTQDEVAASAILTAQLDEELGGTPVQSRVVQKPEAHLMSLFGGKPMIYKGGTSREGGQTAP
ASTRLFQVRANSAGATRAVEVLKAGALNSNDAFVLKTPSAAYLWVGTGASEAEKGTGAQELLRVLRAQPV
QVAEGSEPDGFWEALGGKAAARTSPRLKDKKMDAHPRLFACSNKIGRFVIEEVPGELMQEDLATDDVML
LDTWDQVFVWVGKDSQEEETALTSAKRYIETDPANRRRTPITVVKQGFEPSPFVWFLGWDDDYWSV
DPLDRAMAELAA (配列番号: 1)

40

【0022】

いくつかの実施形態において、本発明のゲルゾリン結合剤 (例えば抗ゲルゾリン抗体または抗ゲルゾリン様抗体) は、ゲルゾリンの活性形態または未結合形態を検出する。理論によって限定されることは意図しないが、遊離ゲルゾリン分子と複合体を形成した (アクチンに対して) ゲルゾリン分子の機能特性は異なる。遊離ゲルゾリンはアクチンフィラメントを切断することができるが、複合体のアクチンゲルゾリンは切断できない。ゲルゾリンの切断活性はマイクロモルの  $\text{Ca}^{2+}$  により活性化され、ホスファチジルイノシトールリン酸 (PIP<sub>2</sub>) およびホスファチジルイノシトールリン酸 (PIP) により阻害されることが示されている。細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度がミリモルレベルであり、細胞外液が、通常はゲルゾリンを阻害する形態の PIP または PIP<sub>2</sub> を含んでいないので、血漿ゲルゾリンは細胞外液中で構成的に活性がある。

40

【0023】

本発明の様々な態様は、医学的状態に起こしやすい個体の同定、または薬物応答性、副作用もしくは至適薬物用量に関する個体の分類に、本発明のゲルゾリン結合剤を使用する診断方法およびキットにさらに関する。他の態様において、本発明は、例えば、血漿からのネイティブのヒトゲルゾリンを含む、生物学的サンプルからのゲルゾリンまたはゲルゾリン様ポリペプチドを精製する方法を提供する。したがって、これらの態様を例示する様々な特定の実施形態を以下に示す。

【0024】

50

本発明の1つまたは複数の実施形態の詳細は、付随の記述中で以下に説明される。本発明の実施または検査において本明細書中で記述するものに類似または等価である任意の方法および材料を使用することができるが、好ましい方法および材料をここで記述する。本発明の他の特色、目的および利点は、記述および請求項から明らかになるだろう。一般的に、酵素反応および精製工程は製造者の仕様書に従って実行される。

#### 【0025】

本発明の実行には、分子生物学、タンパク質生化学、細胞生物学、免疫学、微生物学および組換えDNAにおける多くの従来技術が使用される。これらの技術は周知であり、例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*、I-IIII巻、Ausubel編(1997); Sambrook et al.、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、第2版(コールドスプリングハーバーラボラトリー出版(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、1989); DNAクローニング: *DNA Cloning: A Practical Approach*、IおよびII巻、Glover編(1985); *Oligonucleotide Synthesis*、Gait編(1984); *Nucleic Acid Hybridization*、HamesおよびHiggins編(1985); *Transcription and Translation*、HamesおよびHiggins、編(1984); *Animal Cell Culture*、Freshey編(1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRLプレス(IRL Press)、1986年); Perbal、*A Practical Guide to Molecular Cloning; Meth. Enzymol.* シリーズ、(アカデミックプレス社(Academic Press, Inc.)、1984年); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*、MillerおよびCalos編(コールドスプリングハーバーラボラトリー、ニューヨーク、1987); ならびに *Meth. Enzymol.*、154巻および155巻、それぞれWuおよびGrossman編、およびWu編中で説明される。ポリペプチド遺伝子発現産物(すなわち遺伝子翻訳レベル)のレベルを検出および測定する方法は、当技術分野において周知であり、抗体検出および定量化技術などの、ポリペプチド検出方法の使用を含む(StrachanおよびRead、*ヒト分子遺伝学(Human Molecular Genetics)*、第2版(ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社(John Wiley and Sons, Inc.)、ニューヨーク、1999)もまた参照)。

#### 【0026】

特別に定義されない限り、本明細書において使用したすべての技術的用語および科学的用語は、一般的に当業者により一般に理解されるような同じ意味を有している。この明細書および添付された請求項において使用されるように、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、特別に内容が明確に指示しない限り、複数の指示物を含む。例えば、「1つの細胞(a cell)」への参照は、2つまたは複数の細胞の組合せおよび同種のものを含む。一般的に、本明細書、ならびに以下で記述される細胞培養、分子遺伝学、有機化学、分析化学および核酸化学ならびにハイブリダイゼーションにおける実験手順において使用される呼称は周知であり、一般に当技術分野において使用されるものである。本明細書において引用されるすべての参照は、各個々の出版物、特許または特許出願がすべての目的のために具体的および個別にその全体を参照することにより組み入れられるのと同じ程度で、すべての目的のためにそれらの全体を参照することにより本明細書に組み入れられる。

#### 【0027】

定義。この明細書において使用されるような特定の用語の定義は以下に提供される。他の用語の定義は、*Illustrated Dictionary of Immunology*、第2版(Cruse, J. M. および Lewis, R. E.、Boca Ra

ton, FL 編: CRC プレス (CRC Press)、1995) 中に見出すことができる。特別の指示のない限り、本明細書において使用される場合の用語「ゲルゾリン」は、ヒトのタンパク質および遺伝子を指す。

【0028】

本明細書において使用される時、被験体または被験体への薬剤または薬物の「投与」は、その意図された機能を実行するように、被験体に化合物を導入または送達する任意の経路を含む。投与は、経口的、鼻腔内、非経口的（静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下）、経直腸的、または局所的なものを含む、任意の適切な経路により行なうことができる。投与は、自己投与および他の人による投与を含む。記述されるような医学的状態の治療または防止の様々な様式は、ある程度の生物学的または医学的に適切な結果が達成される完全なまたは完全未満の治療または防止を含む、「実質的」を意味するように意図されることもまた認識されるべきである。

10

【0029】

本明細書において使用される時、用語「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸に類似する方式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物に加えて、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸を含む。天然に存在するアミノ酸は、後に修飾されるアミノ酸（例えば、ヒドロキシプロリン、 $\alpha$ -カルボキシグルタミン酸およびO-フォスホセリン）に加えて、遺伝暗号によりコードされるものである。アミノ酸類似体は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造（すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基に結合される $\alpha$ -炭素）を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルフォキシド、メチオンンメチルスルホニウムを指す。かかる類似体は、修飾されたR基（例えば、ノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造を保有する。アミノ酸模倣物は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なるが、天然に存在するアミノ酸に類似する方式で機能する構造を有する化学化合物を指す。アミノ酸は、一般に公知の3文字記号またはIUPAC-IUB生化学命名法委員会によって推奨される1文字記号のいずれかによって、本明細書において指されうる。同様に、一般的に受け入れられている1文字コードによってヌクレオチドを指すことができる。

20

【0030】

本明細書において使用される時、用語「抗体」は抗原（例えばゲルゾリンポリペプチド）を特異的に結合および認識する免疫グロブリン遺伝子またはその断片からのフレームワーク領域を含むポリペプチドを意味する。用語、抗体の使用は、一本鎖全抗体を含む全抗体、およびその抗原結合断片を含むように意味される。それらが所望される生物学的活性を示すかまたは機能する限り、用語「抗体」は二重特異性抗体および多重特異性抗体を含む。

30

【0031】

本明細書において使用される時、用語「抗体関連ポリペプチド」は、以下のポリペプチドエレメントのすべてまたは一部と共に、単独または組合せで可変領域を含むことができる一本鎖抗体を含む、抗原結合抗体断片を意味する。抗体分子のヒンジ領域、 $CH_1$ 、 $CH_2$ 、および $CH_3$ ドメイン。可変領域およびヒンジ領域、 $CH_1$ 、 $CH_2$ ならびに $CH_3$ ドメインの任意の組合せもまた本発明中に含まれる。本発明の結合剤として有用な抗体関連分子は、例えば、Fab、Fab' および  $F(ab')_2$ 、Fd、一本鎖Fvs (scFv)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fv (sdFv)、 $V_L$ または $V_H$ のドメインを含む断片を含むが、これらに限定されない。实例は、(i) Fab断片 ( $V_L$ ドメイン、 $V_H$ ドメイン、 $C_L$ ドメインおよび $CH_1$ ドメインからなる一価断片)；(ii)  $F(ab')_2$ 断片 (ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合される2つのFab断片を含む二価断片)；(iii)  $V_H$ ドメインおよび $CH_1$ ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単腕の $V_L$ ドメインおよび $V_H$ ドメインからなるFv断片、(v)  $V_H$ ドメインからなるdAb断片 (Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989)；および(vi) 単離された相補性決定領域 (CDR) を含む。それゆえ、「抗体断片」は

40

50

、全長抗体の一部（一般的にその抗原結合領域または可変領域）を含むことができる。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびFv断片；ダイアボディ；直線状抗体；一本鎖抗体分子；ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体を含む。一本鎖抗体分子は、多数の個々の分子による多量体（例えば二量体、三量体または他の多量体）を含むことができる。

【0032】

本明細書において使用される時、用語「生物学的サンプル」は、生細胞に由来するかまたは接触されたサンプル物質を意味する。用語「生物学的サンプル」は、被験体内に存在する組織、細胞および液体に加えて、被験体から単離された組織、細胞および生物学的液体を含むように意図される。本発明の生物学的サンプルは、例えば、全血、血漿、精液、唾液、涙、尿、糞便物質、汗、パッカル、皮膚、脳脊髄液、および毛髪を含むが、これらに限定されない。生物学的サンプルは、内部臓器の生検または癌から得ることもできる。生物学的サンプルは、診断または研究のために被験体から得ることができるか、または疾患ではない個体から対照としてまたは基礎研究のために得ることができる。

10

【0033】

本明細書において使用される時、用語「CDRがグラフトされた抗体」は、望ましい抗原特異性を保持する「ドナー」抗体からのCDR「グラフト」によって「アクセプター」抗体の少なくとも1つのCDRが置換される抗体を意味する。

【0034】

本明細書において使用される時、用語「キメラ抗体」は、1つの種からのモノクローナル抗体のFc定常領域（例えば、マウスFc定常領域）が、組換えDNA技術を使用して、他の種の抗体からのFc定常領域（例えば、ヒトFc定常領域）で、置換される抗体を意味する。一般的には、Robinson et al.、PCT/US86/02269；Akira et al.、ヨーロッパ特許出願第184,187号；Taniguchi、ヨーロッパ特許出願第171,496号；Morrison et al.、ヨーロッパ特許出願第173,494号；Neuberger et al.、WO86/01533；Cabilly et al. 米国特許第4,816,567号；Cabilly et al.、ヨーロッパ特許出願第125,023号；Better et al.、Science 240:1041-1043,1988；Liu et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443,1987；Liu et al.、J. Immunol 139:3521-3526,1987；Sun et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218,1987；Nishimura et al.、Cancer Res 47:999-1005,1987；Wood et al.、Nature 314:446-449,1985；およびShaw et al.、J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559,1988を参照。

20

30

【0035】

本明細書において使用される時、用語「臨床応答」は、応答、無応答、および有害応答（すなわち副作用）の定量的測定のいずれかまたはすべてを意味する

【0036】

本明細書において使用される時、用語「臨床試験」は、特定の治療に対する応答に基づく臨床データを収集するようにデザインされた任意の研究試験を意味し、第I相、第II相および第III相の臨床試験を含むが、これらに限定されない。標準的方法を使用して、患者集団を定義し被験体を組入れる。

40

【0037】

本明細書において使用される時、用語「コンセンサスFR」は、コンセンサス免疫グロブリン配列中のフレームワーク（FR）抗体領域を意味する。抗体のFR領域は抗原に接触しない。

【0038】

本明細書において使用される時、用語「ダイアボディ」は2つの抗原結合部位を備えた

50

小さな抗体断片を指し、その断片は、同じポリペプチド鎖 ( $V_H V_L$ ) 中に軽鎖可変ドメイン ( $V_L$ ) に接続された重鎖可変ドメイン ( $V_H$ ) を含む。同じ鎖上の2つのドメインとの間での対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインは、もう一つの鎖の相補的なドメインと対合し、2つの抗原結合部位を生じることを強いられる。ダイアボディは、例えば、EP 404,097; WO 93/11161; および Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) 中でより完全に記述される。

#### 【0039】

本明細書において使用される時、用語「エフェクター細胞」は、免疫応答の認識相および活性化相に対立する、免疫応答のエフェクター相に關与する免疫細胞を意味する。例示的な免疫細胞は、骨髄性またはリンパ性起源の細胞、例えば、リンパ球（例えば、B細胞および細胞傷害T細胞 (CTL) を含むT細胞）、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、好酸球、好中球、多核白血球、顆粒球、マスト細胞および好塩基球を含む。エフェクター細胞は特異的Fc受容体を発現し、特異的免疫機能を実行する。エフェクター細胞は抗体依存性細胞性細胞傷害 (ADCC) を誘導することができ、例えば、好中球はADCCを誘導することができる。例えば、FcRを発現する単球、マクロファージ、好中球、好酸球、およびリンパ球は、標的細胞の特異的の死滅および免疫系の他の成分への抗原の提示、または抗原を提示する細胞への結合に關与する。エフェクター細胞は、標的抗原、標的細胞、転移癌細胞、または微生物をファゴサイトーシスすることもできる。

#### 【0040】

本明細書において使用される時、用語「エピトープ」は、抗体への特異的結合が可能なタンパク質決定基を意味する。エピトープは、通常アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性のある表面配置からなり、比電荷特質に加えて、特異的3次元構造特性を通常有する。立体配座的エピトープおよび非立体配座的エピトープは、変性溶媒の存在下で前者への結合は失われるが、後者への結合は失われないという点で区別される。1つの実施形態において、ゲルゾリンの「エピトープ」は、本発明のゲルゾリン結合剤が結合するゲルゾリタンパク質中の領域である。本発明の選択した実施形態において、このエピトープは、配列番号：1の約321~約330、約636~約645、または約661~670のアミノ酸残基にわたるドメインである。

#### 【0041】

エピトープに結合するゲルゾリン結合剤についてスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, コールドスプリングハーバークラボラトリー、Ed Harlow and David Lane (1988) 中で記述されていたものなどのルーチンの交差ブロッキング分析を実行することができる。この分析を使用して、ゲルゾリン結合剤が本発明のゲルゾリン抗体と同じ部位またはエピトープを結合するかどうか決定することができる。あるいはまたはさらに、エピトープマッピングを当技術分野において公知の方法により実行することができる。例えば、抗体配列をアラニンスキャニングによってなどで変異させて、接触残基を同定することができる。異なる方法では、ゲルゾリンの異なる領域に対応するペプチドは、検査抗体による競合分析、または検査抗体および特性が評価されたエピトープもしくは公知のエピトープを備えた抗体による競合分析において使用することができる。

#### 【0042】

本明細書において使用される時、用語、組成物の「効果的な量」または「薬学的に効果的な量」または「療法的に効果的な量」は、所望される療法的および/または予防的効果を達成するのに十分な量、例えば治療されている疾患に關連する症状（例えば標的ポリペプチド（例えばゲルゾリンまたはゲルゾリン様ポリペプチド）に關連する疾患または医学的状态）の防止または減少をもたらす量である。被験体に投与される本発明の組成物の量は、疾患のタイプおよび重症度、ならびに公衆衛生、年齢、性別、体重および薬物への耐性などの個体の特質に依存するだろう。疾患の程度、重症度およびタイプにも依存するだ

10

20

30

40

50

ろう。当業者は、これらおよび他の因子に依存して適切な投薬量を決定することができるだろう。本発明の組成物は、1つまたは複数の追加の療法的化合物と組み合わせてもまた投与することができる。本発明の方法において、ゲルゾリンは、疾患または外傷状態により引き起こされたゲルゾリンレベルが減少した被験体に投与され、それによって被験体中の血漿ゲルゾリンのレベルを増加させる。例えば、ゲルゾリンの「療法的に効果的な量」は、遊離細胞外アクチンの毒性効果が最小で寛解されるレベルが意味される。

#### 【0043】

本明細書において使用される時、「発現」は、1つまたは複数の以下のものを含むが、これらに限定されない。前駆mRNAへの遺伝子の転写；前駆mRNAのスプライシングおよび他のプロセッシングによる成熟mRNAの産生；mRNAの安定；タンパク質への成熟mRNAの翻訳（コドン使用頻度およびtRNA利用度を含む）；ならびに適切な発現および機能のために必要とされるならば、翻訳産物の糖鎖付加および/または他の修飾。

10

#### 【0044】

本明細書において使用される時、用語「ゲルゾリン」は、多機能のアクチン結合タンパク質を指す。哺乳類において、ゲルゾリンは、細胞質変異型および細胞外変異型の2つのアイソフォームを含む。ヒト血漿ゲルゾリンは分子のN末端への約25アミノ酸の追加によってだけ細胞ゲルゾリンとは異なり、両方のゲルゾリンは単一遺伝子産物である。血漿ゲルゾリンは3つのアクチン結合部位を有しており、G-アクチンまたはF-アクチンのいずれかへ高い親和性で結合する。「ゲルゾリン」は、哺乳類ポリペプチドの組換え形態もまた指す。

20

#### 【0045】

本明細書において使用される時、用語「遺伝子」は発現を制御するプロモーター、エクソン、イントロンおよび他の非翻訳領域を含む、RNA産物の調節された生合成のための情報をすべて含むDNAのセグメントを意味する。

#### 【0046】

本明細書において使用される時、用語「ヒト配列抗体」は、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域（存在するならば）を有する抗体を含む。本発明のヒト配列抗体は、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロのランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘発、またはインビボの体細胞変異によって導入された変異）を含むことができる。かかる抗体は、例えばPCT公報番号WO01/14424およびWO00/37504中で記述されているように、非ヒトトランスジェニック動物において生成することができる。しかしながら、用語「ヒト配列抗体」は、本明細書において使用される時、別の哺乳類種の生殖細胞系列に由来するCDR配列（マウスなどの）がヒトフレームワーク配列（例えばヒト化抗体）上にグラフトされた抗体を含むようには意図されない。

30

#### 【0047】

本明細書において使用される時、用語、非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。ヒト化抗体は大部分についてはヒト免疫グロブリンであり、レシピエントの超可変領域残基は、所望される特異性、親和性および容量を有するマウス、ラット、ウサギまたはヒト以外の霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）からの超可変領域残基により置換される。いくつかの実例において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基により置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体において見出さない残基を含むことができる。これらの修飾を行って、結合親和性などの抗体パフォーマンスをさらに改良する。一般的に、ヒト化抗体は、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、FR領域は結合親和性を改善する1つまたは複数のアミノ酸置換を含みうるが、FR領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のFR領域である、少なくとも1つ典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含むだろう。FR中のこれらのアミノ酸置換の数は、典型的には、重鎖において最高6、および軽鎖において最高3である。ヒト化抗体は、任

40

50

意で免疫グロブリン定常領域 (Fc) (典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域) の少なくとも一部もまた含むだろう。さらに詳細のためには、Jones et al., Nature 321: 522 - 525 (1986); Reichmann et al., Nature 332: 323 - 329 (1988); および Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 593 - 596 (1992) を参照。

#### 【0048】

本明細書において記述されるゲルゾリン抗体の「1つまたは複数のアミノ酸配列の修飾」が検討される。例えば、抗体の結合親和性および/または他の生物学的特性を改善することが望ましいだろう。ゲルゾリン抗体のアミノ酸配列変異型は、抗体核酸の中へ適切なヌクレオチド変化を導入することによって、またはペプチド合成によって調製される。かかる修飾は、例えば、ゲルゾリン抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失および/またはその中への挿入および/またはその置換を含む。得られた抗体が所望される特性を保持する限り、欠失、挿入および置換の任意の組合せは、対象となる抗体を得るために行なわれる。修飾はタンパク質の糖鎖付加パターンの変化もまた含む。変異誘発のための好ましい位置の同定のための有用な方法は、Cunningham and Wells in Science, 244: 1081 - 1085 (1989) により記述されるような「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれるものである。次に、変異抗体は所望される活性についてスクリーニングされる。もし抗体の変異型が所望される特性を保持するならば、本発明は、CGMCCアクセッション番号2114、2115、2116をそれぞれ有する、ハイブリドーマGC1C10、CN3E9、またはGF2D6によって定義されるアミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸の追加、欠失および/または置換を備えた抗体変異型を含む。

10

20

#### 【0049】

本明細書において使用される時、用語「超可変領域」は、抗原結合に關与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、一般的に「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基 (例えば、 $V_L$  中のおよそ残基24~34 (L1)、50~56 (L2) および89~97 (L3)、ならびに $V_H$  中のおよそ31~35B (H1)、50~65 (H2) および95~102 (H3)) (Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版、公衆衛生局、国立衛生研究所、ベセズダ、メリーランド (1991)) および/または「超可変ループ」からのアミノ酸残基 (例えば、 $V_L$  中の残基26~32 (L1) および50~52 (L2) および91~96 (L3) ならびに $V_H$  中の26~32 (H1)、52A~55 (H2) および96~101 (H3)) (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (1987)) を含む。

30

#### 【0050】

本明細書において使用される時、用語「同一の」またはパーセント「同一性」は、2つまたは複数の核酸配列またはポリペプチド配列のコンテキストにおいて使用された場合、同じであるか、または以下で記述されるデフォルトパラメーターによるBLASTもしくはBLAST2.0の配列比較アルゴリズムを使用してまたは手動のアライメントおよび目視点検によって測定して (例えば、NCBIウェブサイトを参照)、同じであるアミノ酸残基またはヌクレオチドの指定のパーセンテージ (すなわち、比較ウィンドウまたは指定の領域にわたり最大で一致するように比較およびアライメントさせた場合、指定の領域 (例えば、本明細書において記述される抗体をコードするヌクレオチド配列または本明細書において記述される抗体のアミノ酸配列) にわたり約60%の同一性、好ましくは65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の同一性) を有する、2つまたは複数の配列またはサブ配列を指す。かかる配列は「実質的に同一である」とされる。この用語は、検査配列の相補物も指すか、または相補物にも適用することができる。用語は、置換を有する配列に加えて、欠失および/または追加を有する配列もまた含む。以下に記載されるように、好ましいアルゴリズムはギャップおよび同種のものを説明することがで

40

50

きる。好ましくは、同一性は、少なくとも約 25 のアミノ酸もしくはヌクレオチド長である領域、またはより好ましくは 50 ~ 100 のアミノ酸もしくはヌクレオチド長である領域にわたり存在する。

#### 【0051】

「単離された」または「精製された」ポリペプチドまたはその生物学的に活性のある部分は、ゲルゾリン結合剤が由来する細胞または組織源からの細胞物質または他の混入ポリペプチドが実質的にないか、または化学的に合成された場合、化学的前駆体または他の化学物質が実質的にない。例えば、抗ゲルゾリンまたは抗ゲルゾリン様抗体である単離されたゲルゾリン結合剤は、薬剤の診断的使用または療法的使用を妨害する物質がないだろう。かかる妨害物質は酵素、ホルモンならびに他のタンパク性および非タンパク性溶質を含みうる。あるいは、本発明のゲルゾリン結合剤と免疫反応性である、単離されたゲルゾリンまたはゲルゾリン様ポリペプチドは、ポリペプチドの診断的使用または療法的使用を妨害する物質が実質的にないだろう。

10

#### 【0052】

本明細書において使用される時、用語「インタクトな抗体」は、ジスルフィド結合によって相互に連結された少なくとも2つの重(H)鎖ポリペプチドおよび2つの軽(L)鎖ポリペプチドを有する抗体を意味する。各重鎖は、重鎖可変領域(HCVRまたはV<sub>H</sub>として本明細書において短縮される)および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は3つのドメイン(CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>およびCH<sub>3</sub>)を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域(LCVRまたはV<sub>L</sub>として本明細書において短縮される)および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は1つのドメイン(C<sub>L</sub>)を含む。V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>の領域は、相補性決定領域(CDR)と名付けられた超可変性領域へとさらに細分することができ、フレームワーク領域(FR)と名付けられたより保存された領域が散在する。各々のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>は、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序でアミノ末端からカルボキシル末端へ並んだ3つのCDRおよび4つのFRからなる。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合するドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えばエフェクター細胞)および古典的補体系の第1成分(C1q)を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を仲介することができる。

20

#### 【0053】

本明細書において使用される時、用語「免疫応答」は、リンパ球、抗原提示細胞、食細胞、顆粒球、および上記の細胞または肝臓によって産生される可溶性巨大分子(抗体、サイトカインおよび相補物を含む)の共同行為を指し、それは、癌細胞、転移性腫瘍細胞、悪性メラノーマ、侵入病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、または自己免疫もしくは病的な炎症の症例における正常なヒト細胞もしくは組織の選択的な損傷、それらの選択的な破壊、またはヒト身体からのそれらの選択的な除去をもたらす。

30

#### 【0054】

本明細書において使用される時、用語、「免疫学的に交差反応性のある」および「免疫学的に反応性のある」は、同じ抗原(「免疫学的に反応性のある」)または異なる抗原(「免疫学的に交差反応性のある」)を使用して生成された抗体と特異的に反応性のある抗原を意味するように交換可能に使用される。一般的に、抗原は、ゲルゾリン、その変異型またはサブ配列である。

40

#### 【0055】

本明細書において使用される時、用語「免疫学的に反応性のある条件」は、抗体が他の実質的にすべてのエピトープに結合するよりも検出可能に高い程度で、一般的にバックグラウンド結合の少なくとも2倍を越えて、好ましくはバックグラウンドの少なくとも5倍を越えて、抗原の特定のエピトープに対して生成された抗体がそのエピトープに結合することを可能にする条件を意味する。免疫学的に反応性のある条件は抗体結合反応の形式に依存的で、典型的には免疫分析プロトコールにおいて利用されるものである。免疫分析形式および条件の記述については、HarlowおよびLane、Antibodies, A Laboratory Manual (コールドスプリングハーバー出版、ニューヨ

50

ーク、1988)を参照。

【0056】

本明細書において使用される時、用語「リンパ球」は、血液、リンパ、およびリンパ組織中に見出される、任意の単核の非ファゴサイトーシスの白血球(例えば、Bリンパ球およびTリンパ球)を意味する。

【0057】

本明細書において使用される時、用語「医学的状态」は、治療および/または防止が望ましい1つまたは複数の身体的および/または心理的な症状として現われる任意の状態または疾患を含むが、これらに限定されず、以前および新しく同定された疾患および他の障害を含む。例えば、医学的状态は、肝炎、SLE、癌、敗血症性ショック、脳卒中、心筋梗塞、ならびに化学療法および放射線療法の副作用でありえる。

【0058】

本明細書において使用される用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質の抗体(すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在しうる天然に存在する可能性のある変異を除いて同一である)の集団から得られる抗体を指す。例えば、モノクローナル抗体は、任意の真核生物クローン、原核生物クローン、またはファージクローンを含む単クローンに由来する抗体でありえ、それが産生される方法に由来する抗体ではない。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープについて単一の結合特異性および親和性を示す。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一抗原部位に対して向けられている。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対して向けられた異なる抗体を典型的には含む従来の(ポリクローナル)抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体は各抗原上の単一決定基に対して向けられる。修飾語句「モノクローナル」は、実質的に抗体の均質集団から得られているような抗体の性質を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈することができない。モノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ技術、組換え技術、およびファージディスプレイ技術を含むが、これらに限定されない当技術分野において公知の様々な技術を使用して調製することができる。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature 256: 495 (1975)により最初に記述されたハイブリドーマ方法により作製することができるか、または組換えDNA方法(例えば、米国特許第4,816,567号参照)により作製することができる。例えば、「モノクローナル抗体」は、Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)中で記述されている技術を使用して、ファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

【0059】

本明細書において使用される時、用語「薬学的に許容される担体」は、薬学的投与と適合性のある、任意の溶媒およびすべての溶媒、分散物溶媒、コーティング、抗菌化合物および抗真菌化合物、等張化合物および吸収遅延化合物、ならび同種のものを含むように意図される。

【0060】

本明細書において使用される時、用語「ポリクローナル抗体」は、抗体の調製物が、少なくとも2つの異なる抗体産生細胞株に由来することを意味する。この用語の使用は、抗原の異なるエピトープまたは領域に対して特異的に結合する抗体を含む少なくとも2つの抗体の調製物を含む。

【0061】

本明細書において使用される時、用語、「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、任意のRNAまたはDNAを意味し、それは未修飾または修飾されたRNAまたはDNAでありえる。ポリヌクレオチドは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNA、一本鎖領域および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖RNAおよび二本鎖RNA、一本鎖領域および二本鎖領域の混合物であるRNA、ならびに一本鎖、より典型的には二本鎖でありえるDNAおよびRNAまたは一本鎖領域および二本鎖領域の混合物を含むハイブリッド分子を、限

10

20

30

40

50

定されずに含む。さらに、ポリヌクレオチドは、RNAもしくはDNA、またはRNAおよびDNAの両方を含む三本鎖領域を指す。用語、ポリヌクレオチドは、安定性または他の理由のために修飾された骨格を備えた、1つまたは複数の修飾塩基およびDNAまたはRNAを含んでいるDNAまたはRNAもまた含む。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ゲルゾリン遺伝子からのポリヌクレオチド配列を含んでいる。

【0062】

本明細書において使用される時、用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに対して連結された2つまたは複数のアミノ酸を含む多量体（すなわち、ペプチドイソスター）を意味するように交換可能に本明細書において使用される。ポリペプチドは、短鎖（通常はペプチド、糖ペプチドまたはオリゴマーと呼ばれる）およびより長鎖（一般的にタンパク質と呼ばれる）の両方を指す。ポリペプチドは、遺伝子にコードされる20のアミノ酸以外のアミノ酸を含みうる。ポリペプチドは、翻訳後プロセッシングなどの天然プロセス、または当技術分野において周知の化学的修飾技術により修飾されたアミノ酸配列を含む。かかる修飾は、多数の研究文献に加えて、基礎的な教科書およびより詳細なモノグラフ中で十分に記述されている。特定の実施形態において、ポリペプチドは、ゲルゾリンタンパク質からのポリペプチド配列を含む。

10

【0063】

本明細書において使用される時、用語「集団」は少なくとも2人の個体の任意の群でありえる。集団は、例えば、参照集団、集団群、家族集団、臨床的集団、および同性集団を含むが、これらに限定されない。

20

【0064】

本明細書において使用される時、用語「組換え」は、例えば、細胞、または核酸、タンパク質もしくはベクターへの参照と共に使用された場合、異種の核酸もしくはタンパク質の導入または天然の核酸もしくはタンパク質の変化によって、細胞、核酸、タンパク質もしくはベクターが修飾されるか、または物質がそのように修飾された細胞に由来することを指す。したがって、例えば、組換え細胞は、細胞の天然（非組換え）形態の中では見出されない遺伝子を発現するか、またはそうでなければ、異常発現、低発現、もしくは無発現で天然の遺伝子を発現する。

30

【0065】

本明細書において使用される時、用語「参照スタンダード」は、化合物の投与前の参照スタンダード集団または単一被験体のいずれかにおいて観察される、1つまたは複数の遺伝子またはタンパク質の発現のパターンである。

【0066】

本明細書において使用される時、語句「サルベージ受容体結合エピトープ」は、IgG分子のインビボの血清半減期の増加に関与するIgG分子（例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、またはIgG<sub>4</sub>）のFc領域のエピトープを指す。例えば、抗体の血清半減期を増加させるために、米国特許第5,739,277号中で記述されるように、抗体（特に抗体断片）の中へサルベージ受容体結合エピトープを組み入れることができる。

40

【0067】

本明細書において使用される時、用語「一本鎖抗体」または「一本鎖Fv (scFv)」は、Fv断片の2つのドメイン（V<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>）の抗体融合分子を指す。Fv断片の2つのドメイン（V<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>）は別の遺伝子によりコードされるが、それらは一価分子（一本鎖Fv (scFv)）として公知）を形成するようにV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>の領域が対合する単一タンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって、組換え方法を使用して結合することができる。例えば、Bird et al., Science 242: 423-426, 1988; およびHuston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883, 1988を参照。かかる一本鎖抗体は、用語「抗体」断片への参照により含まれており、組換え技術またはインタクトな抗体の酵素分解または化学分解により調製することができる。

50

## 【0068】

本明細書において使用される時、用語「低分子」は、約5 kDa未満、およびより好ましくは約2 kDa未満の分子量を有する組成物を意味する。低分子は、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、糖ペプチド、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質、リポポリサッカライド、これらの組合せ、または他の有機分子もしくは無機分子でありえる。

## 【0069】

本明細書において使用される時、用語「特異的結合」は、少なくとも $10^{-6}$ Mでの結合親和性でゲルゾリン結合剤と抗原との間の接触を意味する。好ましい結合剤は、少なくとも約 $10^{-7}$ M、および好ましくは $10^{-8}$ M ~  $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M、または $10^{-12}$ Mの親和性で結合する。

10

## 【0070】

本明細書において使用される時、用語「被験体」は、被験体が、好ましくは、ヒトなどの哺乳類であるが、動物、例えば、家庭動物（例えば、イヌ、ネコおよび同種のもの）、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマおよび同種のもの）および実験動物（例えば、サル、ラット、マウス、ウサギ、モルモットおよび同種のもの）でもありえることを意味する。

## 【0071】

本明細書において使用される時、用語「置換」は当技術分野において一般的に使用される変異の1つである。それらの置換変異型は、異なる残基により置換されたゲルゾリン結合抗体分子中の少なくとも1つのアミノ酸残基を有する。置換変異誘発のために最も興味のある部位は超可変領域を含むが、FRの変更もまた検討される。「保存的置換」は、「好ましい置換」の見出しの下で以下の表において示される。かかる置換が生物学的活性の変化を結果的にもたらすならば、次により実質的な変化（表2中で表示された「例示的な置換」、または、アミノ酸クラスに関してさらに以下で記載されるように）を導入することができ、産物はスクリーニングされる。

20

## 【0072】

本明細書において使用される時、用語「参照スタンダード集団」は、1つまたは複数の生物学的特質（例えば、薬物応答性、遺伝子型、ハプロタイプ、表現型など）によって特徴づけられる集団を意味する。

## 【0073】

本明細書において使用される時、「試験サンプル」は、対象となる被験体から得られた生物学的サンプルを意味する。例えば、試験サンプルは、生物学的液体（例えば血清）、細胞もしくは組織サンプル、培養培地もしくは増殖培地からのサンプル、またはそれに由来する単離された核酸もしくはポリペプチドでありえる。

30

【表 2】

表 2 : アミノ酸置換		
もとの残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	val ; leu ; ile	val
Arg (R)	lys ; gln ; asn	lys
Asn (N)	gln ; his ; asp , lys ; arg	gln
Asp (D)	glu ; asn	glu
Cys (C)	ser ; ala	ser
Gln (Q)	asn ; glu	asn
Glu (E)	asp ; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn ; gln ; lys ; arg	arg
Ile (I)	leu ; val ; met ; ala ; phe ; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン ; ile ; val ; met ; a la ; phe	ile
Lys (K)	arg ; gln ; asn	arg
Met (M)	leu ; phe ; ile	leu
Phe (F)	leu ; val ; ile ; ala ; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr ; phe	tyr
Tyr (Y)	trp ; phe ; thr ; ser	phe
Val (V)	ile ; leu ; met ; phe ; ala ; ノルロイシン	leu

10

20

30

50

## 【0074】

特に好ましいタイプの置換変異型は、親抗体の1つまたは複数の超可変領域残基の置換を含む。かかる置換変異型の作製のための便利な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性成熟を含む。具体的には、いくつかの超可変領域部位（例えば6～7の部位）を変異させて、各部位で可能なすべてのアミノ酸置換を作製する。このように生成された抗体変異型は、各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子III産物への融合物として線状ファージ粒子から一価様式でディスプレイされる。次にファージにディスプレイされた変異型は、本明細書において開示されるように、生物学的活性（例えば結合親和性）についてスクリーニングされる。修飾用の候補の超可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング変異誘発を実行して抗原結合ゲルゾリンに有意に寄与する超可変領域残基を同定することができる。あるいはまたはさらに、抗原抗体複合体の結晶構造を解析して抗体とゲルゾリンとの間の接触点を同定することは有益でありえる。かかる接触残基および隣接残基は、本明細書において詳述された技術に記載の置換のための候補である。一

且かかる変異型が生成されれば、変異型のパネルは本明細書において記述されるようにスクリーニングされ、1つまたは複数の適切な分析において類似する特性または優れた特性を備えた抗体は、さらなる開発のために選択されうる。抗体変異型が所望される特性を保持するならば、本発明は、CGMCCアクセッション番号2114、2115、および2116をそれぞれ有するハイブリドーマGC1C10、GN3E9、GF2D6によって定義される、免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の超可変領域に1つまたは複数のアミノ酸置換（特に保存的置換）を備えた抗体変異型を含む。

**【0075】**

本明細書において使用される時、用語「療法剤」は、効果的な量で存在する場合に、その必要性のある被験体に対する所望される療法効果を生ずる化合物を意味するように意図される。

10

**【0076】**

本明細書において使用される時、用語「治療すること」もしくは「治療」または「緩和」は、標的とする病理学的な状態または障害を防止または減速（減少）させることが目的である、療法的な治療および予防的または防止的な手段の両方を指す。本発明の方法に記載のネイティブゲルゾリンまたは組換えゲルゾリンの療法的な量を投与された後に、被験体が特定の疾患または状態の1つまたは複数の徴候および症状において、観察可能および/または測定可能な低減または非存在を示すならば、ゲルゾリンレベルの低下により特徴づけられた障害についての「治療」が被験体で成功する。例えば、癌については、癌細胞の数の低減または癌細胞の非存在；腫瘍サイズの低減；腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度までの減速および好ましくは停止）；ある程度までの腫瘍増殖の阻害；特異的癌と関連する1つまたは複数の症状の寛解の長さの増加、および/またはある程度までの軽減；罹患率および死亡率の低減、ならびに生活の質問題の改善である。

20

**【0077】**

本明細書において使用される時、用語「可変」は、抗体の中の可変ドメインの特定のセグメントの配列が広く異なるという事実を指す。Vドメインは抗原結合を仲介し、特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定義する。しかしながら、可変性は可変ドメインのアミノ酸スパンにわたって均一に分布していない。代わりに、V領域は、各9～12のアミノ酸長の「超可変領域」と呼ばれる非常に可変性であるより短い領域により分離された15～30のアミノ酸のフレームワーク領域（FR）と呼ばれる比較的変性のないストレッチからなる。ネイティブの重鎖および軽鎖の可変ドメインは各々、3つの超可変領域（-シート構造を接続するループを形成し、いくつかの場合では-シート構造の一部を形成する）によって連結された、4つのFR（主として-シート立体配置を採用する）を含む。各鎖における超可変領域はFRによって非常に近接して一緒に保持され、他の鎖からの超可変領域と共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版、公衆衛生局、国立衛生研究所、ベセズダ、メリーランド（1991）を参照）。定常ドメインは抗体を抗原に結合することに直接関与しないが、抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）への抗体の関与などの様々なエフェクター機能を示す。

30

40

本発明の組成物

**【0078】**

ゲルゾリン結合剤。1つの態様において、本発明はゲルゾリン結合剤組成物（別名、結合剤）を提供する。1つの実施形態において、本発明の結合剤は、ゲルゾリンポリペプチド、ホモログ、断片、またはその誘導体に向けられたインタクトな抗体である。対象となる結合剤は、遊離した全長の活性のあるゲルゾリンに特異的に結合するものでありえるが、アクチンに結合されるゲルゾリンを「事実上」（または「実質的に」）結合しない。かかる実施形態において、蛍光励起細胞分取（FACS）解析、ELISA、ウエスタンブロット、または放射免疫分析によって決定されるように、これらのタンパク質への本発明の結合剤の結合の程度は、約10%未満、好ましくは、または約5%未満、または約1%

50

未満になるだろう。

【0079】

定義されたエピトープ（特に機能的ゲルゾリンに関連するエピトープ）を備えたモノクローナル抗体を生成する以前の取り組みは、大部分は不成功だった。ゲルゾリンは高度に保存されたタンパク質で、種の中で高度に相同である。また、ゲルゾリンは血漿中で多量にあり、そのことは免疫系による寛容性が良好であることを必要とする。さらに、ゲルゾリンが主要なアクチン結合タンパク質であるという事実のために、エピトープの露出は、アクチンおよび他の血漿タンパク質とのゲルゾリンの複合体形成により限定される。ゲルゾリンに対するいくつかのモノクローナル抗体は産生された（Hiyoshi et al., Biochem Mol Biol Int. 32: 755-62 (1994)を参照）が、血漿ゲルゾリンの定量的測度のための免疫分析はない。

10

【0080】

本発明者は、免疫およびスクリーニングの両方のためのヒトゲルゾリンタンパク質の様々な形態（ネイティブゲルゾリン、組換え全長ゲルゾリン、ならびにN末端およびC末端のゲルゾリン断片を含む）を使用して、ゲルゾリン結合剤をデザインする戦略を見出した。さらに、本発明者の戦略は、免疫応答の修飾物質を使用して、ヒトゲルゾリンの共通のエピトープに対する免疫寛容性を破壊するようにデザインされる。この戦略の結果は、臨床設定において使用できる、血漿ゲルゾリンのための迅速な、正確なおよび定量的な分析を可能にする、定義されたエピトープを備えたゲルゾリン結合剤である。

20

【0081】

本発明の結合剤は、結合剤によって認識または特異的に結合される本発明のポリペプチドのエピトープ（複数可）または部分（複数可）、例えばゲルゾリンポリペプチドの表面上に位置するポリペプチドの領域（例えば親水性領域）に関して記述または指定することができる。1つの実施形態において、本発明は、ゲルゾリン結合剤、例えば、FAQGALKSED（配列番号：2）、SEPDGFWEAL（配列番号：3）、ACSNKIGRFV（配列番号：4）からなる群から選択される1つまたは複数のアミノ酸配列を含む、ゲルゾリンポリペプチド（別名標的ポリペプチド）に向けられた抗体または抗体関連ポリペプチドを提供する

【0082】

選択された実施形態において、本発明は、表3中で要約されたゲルゾリン結合剤を提供する。

30

【表3】

表3：選択したゲルゾリン受容体結合剤		
結合剤	タイプ	記述
GN3E9	マウスモノクローナル抗体	FAQGALKSED（配列番号：2）のポリペプチド配列を含むエピトープに向けられたマウスモノクローナル抗体。
GC1C10	マウスモノクローナル抗体	SEPDGFWEAL（配列番号：3）のポリペプチド配列を含むエピトープに向けられたマウスモノクローナル抗体。
GF2D6	マウスモノクローナル抗体	ACSNKIGRFV（配列番号：4）のポリペプチド配列を備えたエピトープに向けられたマウスモノクローナル抗体。

40

【0083】

表5（上記）中で要約されたゲルゾリン結合剤に関連する生物学的物質の寄託は、表4

50

中で以下に詳述されるように、China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC)、China Committee for Culture Collection of Microorganisms、私書箱2714、北京100080、中華人民共和国、により行なわれた。

【表4】

表4：生物の寄託			
寄託の名称	材料	日付	アクセッション番号
GN3E9	マウス-マウスハイブリドーマ	2007年7月20日	2115
GC1C10	マウス-マウスハイブリドーマ	2007年7月20日	2114
GF2D6	マウス-マウスハイブリドーマ	2007年7月20日	2116

10

【0084】

別の実施形態において、本発明は、アクチンに結合したゲルゾリンではなく、活性のあるゲルゾリンに結合する所望される特質を有する抗体の生成のために使用することができる、ゲルゾリンの他のエピトープを解明する方法を提供する。エピトープに対して向けられた結合剤は異なる可変領域またはCDR領域を有してもよいが、本発明の抗体の結合特性および機能特性を有するべきである。標的化抗体産生のための手段として、親水性および疎水性の領域を示す疎水性プロットは、例えば、フリー変換と共にまたはフリー変換なしのいずれかで、Kyte Doolittle法またはHopp Woods法を含む当技術分野において周知の任意の方法により生成することができる（例えば、Hopp and Woods, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828 (1981); Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol. 157: 105-142 (1982)を参照）。例えば、N末端およびC末端の位置によって、近接するアミノ酸残基のサイズによって、本明細書において記述されるように、エピトープ（複数可）またはポリペプチドの部分（複数可）は指定することができる。本発明は、本発明のポリペプチドを特異的に結合する結合剤を含んでおり、その除外を可能にする。本発明は、立体配座的エピトープまたは非立体配座的エピトープであるエピトープを特異的に結合する結合剤を含む。上述されるように、立体配座的エピトープまたは非立体配座的エピトープは、変性溶媒の存在下で前者への結合が失われるが、後者への結合は失われないという点で区別される。

20

30

【0085】

本発明の結合剤は、それらの交差反応性に関して記述または指定することもできる。本発明の標的ポリペプチドの任意の他の類似体、オルソログ、ホモログを結合しない結合剤が含まれる。95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、および50%未満の同一性（当技術分野において公知のおよび本明細書において記載の方法を使用して計算されるように）でポリペプチドを本発明のポリペプチドに結合しない結合剤もまた、本発明中に含まれる。ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で（本明細書において記述されるような）、本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチドのみを結合する結合剤が、本発明中にさらに含まれる。

40

【0086】

本発明の結合剤は、それらの結合親和性に関してまた記述または指定することができる。好ましい結合親和性は、 $5 \times 10^{-6} M$ 、 $10^{-6} M$ 、 $5 \times 10^{-7} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $5 \times 10^{-8} M$ 、 $10^{-8} M$ 、 $5 \times 10^{-9} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $5 \times 10^{-10} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $5 \times 10^{-11}$

50

M、 $10^{-11}$ M、 $5 \times 10^{-12}$ M、 $10^{-12}$ M、 $5 \times 10^{-13}$ M、 $10^{-13}$ M、 $5 \times 10^{-14}$ M、 $10^{-14}$ M、 $5 \times 10^{-15}$ M、および $10^{-15}$ M未満の解離定数または $K_d$ のものを含む。1つの実施形態において、本発明は、ヒトゲルゾリンに高くとも $1 \times 10^{-8}$ の $K_d$ 値、好ましくは高くとも約 $1 \times 10^{-9}$ の $K_d$ 値で、少なくとも結合するゲルゾリン結合剤を提供する。

#### 【0087】

本発明の範囲内のゲルゾリン結合剤は、例えば、標的ポリペプチド、ホモログ、誘導体またはその断片を特異的に結合する、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ダイアボディ、ならびにヒトモノクローナル抗体およびヒトポリクローナル抗体を含むが、これらに限定されない。本明細書において使用される時、「ゲルゾリン様ポリペプチド」は、ゲルゾリンポリペプチドとは異なるが、本発明のゲルゾリン結合剤と免疫学的に反応性であるポリペプチドを意味する。ゲルゾリン様ポリペプチドは、ゲルゾリンポリペプチドと同じ生物または異なる生物に由来することができる。ゲルゾリン様ポリペプチドは、ゲルゾリンポリペプチドと同じ遺伝子または異なる遺伝子によりコードされうる。本発明の結合剤として有用な抗体は、例えば、IgG (IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、およびIgG<sub>4</sub>を含む)、IgA (IgA<sub>1</sub>およびIgA<sub>2</sub>を含む)、IgD、IgE、またはIgM、およびIgYを含むが、これらに限定されない。

10

#### 【0088】

別の実施形態において、本発明の結合剤は、ゲルゾリンポリペプチド、ホモログまたはその誘導体に向けられた抗体関連ポリペプチドである。典型的には、結合剤の抗原結合領域 (例えば、抗ゲルゾリンの結合領域) は、本発明の結合剤の結合の特異性および親和性において最も重大である。いくつかの実施形態において、ゲルゾリン結合剤は、例えば、抗体の部分の欠失、追加、または置換によって修飾された、抗ゲルゾリンポリペプチドモノクローナル抗体、抗ゲルゾリンポリペプチドキメラ抗体、および抗ゲルゾリンポリペプチドヒト化抗体などの、抗ゲルゾリンポリペプチド抗体である。例えば、抗ゲルゾリンポリペプチド抗体は、抗体の半減期 (例えば血清半減期)、安定性または親和性の増加が意図される。

20

#### 【0089】

1つの実施形態において、ゲルゾリンポリペプチドの特定のドメインに特異的な抗体の選択は、かかるドメインを保持するゲルゾリンポリペプチドの断片に結合するハイブリドーマの生成によって促進される。したがって、ゲルゾリンポリペプチド、またはその誘導体、断片、類似体もしくはホモログ内の所望されるドメインに特異的な抗体であるゲルゾリン結合剤もまた、本明細書において提供される。

30

#### 【0090】

本発明は、本発明の結合剤に対する抗イディオタイプの抗体をさらに含む。本発明の結合剤は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、またはそれ以上の多重特異性でありえる。多重特異性結合剤は、本発明のゲルゾリンポリペプチドの異なるエピトープに特異的でありえるか、または異種のポリペプチドもしくは固体支持体材などの異種の組成物とともに、本発明のゲルゾリンポリペプチドの両方に特異的でありえる。例えば、WO 93 / 17715 ; WO 92 / 08802 ; WO 91 / 00360 ; WO 92 / 05793 ; Tuttle et al. , J . Immunol . 147 : 60 - 69 ( 1991 ) ; 米国特許第5,573,920号、第4,474,893号、第5,601,819号、第4,714,681号、第4,925,648号；第6,106,835号；Kostelny et al. , J . Immunol . 148 : 1547 - 1553 ( 1992 ) を参照。本発明の結合剤は、鳥類および哺乳類を含む任意の動物起源からでありえる。好ましくは、結合剤は、ヒト、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリである。

40

#### 【0091】

本発明の結合剤は、単独でまたは他の組成物と組み合わせてのいずれかを使用することができる。例えば、本発明のゲルゾリン結合剤は当技術分野において公知の1つまたは複数

50

の抗ゲルゾリン抗体（例えば、限定されないが、抗体GS-2C4）と組み合わせて使用することができる（シグマ-アルドリッチ（Sigma-Aldrich）社、カタログ番号G4896；Afiy and Werness. Appl. Immunohistochem. 6:30, (1998)）。

【0092】

本発明のゲルゾリン結合剤は、N末端またはC末端で異種のポリペプチドへ組換えによりさらに融合されるか、またはポリペプチドまたは他の組成物に化学的にコンジュゲートすることができる（共有結合コンジュゲーションおよび非共有結合コンジュゲーションを含む）。例えば、本発明のゲルゾリン結合剤は、異種ポリペプチドまたは薬物または毒素など、検出分析における標識およびエフェクター分子として有用な分子に組換えにより融合またはコンジュゲートすることができる。例えば、WO92/08495；WO91/14438；WO89/12624；米国特許第5,314,995号；およびEP0396387を参照。

10

【0093】

特定の実施形態において、本発明のゲルゾリン結合剤は、本発明のゲルゾリン結合剤コンジュゲータタンパク質をもたらす、1つまたは複数の療法的部分または細胞毒性部分にカップリングされるかまたはコンジュゲートされる抗ゲルゾリン抗体または抗ゲルゾリン抗体関連のポリペプチドである。本発明のゲルゾリン結合剤コンジュゲータタンパク質を使用して、既定の生物学的応答を修飾するか、または生物学的応答を生じる（例えば、エフェクター細胞の動員）ことができる。療法的部分は、古典的な化学的療法剤に限定されると解釈するべきできない。例えば、療法的部分は所望される生物学的活性を保持するタンパク質またはポリペプチドでありえる。かかるタンパク質は、例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌外毒素、またはジフテリア毒素などの酵素的活性のある毒素、またはその活性断片；腫瘍壊死因子またはインターフェロン-などのタンパク質；または例えば、リンホカイン、インターロイキン1（「IL-1」）、インターロイキン2（「IL-2」）、インターロイキン6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、または他の増殖因子などの生物学的応答修飾因子を含むことができる。

20

本発明のゲルゾリン結合剤を調製する方法

【0094】

全体的な概説。最初に、本発明の結合剤（例えば抗ゲルゾリン受容体抗体）を作製することができる標的ポリペプチドが選択される。標的ポリペプチドに向けられた結合剤を生成するための技術は当業者に周知である。かかる技術の例は、例えば、ディスプレイライブラリー、ゼノマウスまたはヒューマブマウス、ハイブリドーマ、および同種のものを含む技術を含むが、これらに限定されない。本発明の範囲内の標的ポリペプチドは、抗原性を示すことが可能な任意のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を含む。実施例は、ゲルゾリン、ペプチド、ポリペプチド、およびその断片を含むが、これらに限定されない。

30

【0095】

本開示に従う使用のための結合剤として、ゲルゾリンポリペプチドおよびその断片に向けられた、天然に存在する抗体が適切であるだけでなく、組換えにより操作された抗体および抗体断片（例えば抗体関連ポリペプチド）もまた適切であることを理解するべきである。

40

【0096】

本明細書において示される技術に使うことができる結合剤（例えば、抗ゲルゾリン抗体）は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびにFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、scFv、ダイアボディ、抗体軽鎖、抗体重鎖および/または抗体断片などの抗体断片を含む。抗体Fv含有ポリペプチド（例えばab'およびF(ab')<sub>2</sub>抗体断片）の高収率産生のために有用な方法が記述されている。米国特許第5,648,237号を参照。

【0097】

50

一般的に、結合剤は起源の種から得られる。より詳細には、標的ポリペプチド抗原についての特異性を有する起源の種の抗体の軽鎖、重鎖または両方の可変部分の核酸またはアミノ酸配列が得られる。起源の種は、本発明の結合剤または結合剤のライブラリーを生成するのに有用な任意の種（例えばラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、サル、ヒトおよび同種のもの）である。

#### 【0098】

好ましい実施形態において、ゲルゾリン結合剤は抗ゲルゾリン抗体である。ファージまたはファージミドのディスプレイ技術は本発明の結合剤を得るのに有用な技術である。本発明において有用な抗ゲルゾリン抗体は、「ヒト抗体」（例えばヒトから単離された抗体）、または「ヒト配列抗体」である。ヒト抗体は、ファージディスプレイ方法を含む当技術分野において公知の様々な方法により作製することができる。米国特許第4,444,887号、第4,716,111号、第5,545,806号、および第5,814,318号；ならびにWO98/46645、WO98/50433、WO98/24893、WO98/16654、WO96/34096、WO96/33735、およびWO91/10741もまた参照。ポリファージ粒子のスクリーニングによる、多量体ポリペプチド複合体のメンバーをコードする核酸配列の同定のために有用な方法が記述されている。Rudert et al.、米国特許第6,667,150号。また、組換え免疫グロブリンは産生することができる。Cabilly、米国特許第4,816,567号；Cabilly et al.、U.S.6,331,415およびQueen et al.、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A86:10029-10033,1989。モノクローナル抗体の生成およびクローニングのための技術は当業者に周知である。本発明のゲルゾリン結合剤は、高い免疫反応性（すなわち、特異的に標的抗原を結合することができるように、正しく折り置まれる抗体分子のパーセンテージ）を好ましくは有する。結合剤（例えば本発明の抗体）をコードする配列の発現は、大腸菌（E.coli）において、かかる発現が、少なくとも80%、90%、95%または99%の免疫反応性を通常もたらすように実行することができる。

#### 【0099】

これらのタンパク質または遺伝子の特定の短縮は、完全な配列タンパク質または遺伝子の調節機能または酵素機能を実行する。したがって、例えば、核酸配列コーディングは、機能的に等価なタンパク質または遺伝子を提供する、置換、追加、欠失または多量体発現によって変化させることができる。核酸コーディング配列の縮重に起因する、天然に存在するタンパク質のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を実質的にコードする他の配列は、本発明の実施において使用することができる。これらは、配列内で機能的に等価なアミノ酸残基をコードする異なるコドンの置換によって変更され、したがってサイレント変化を産生する、上述のポリペプチドをコードする核酸配列のすべてまたは部分を含む核酸配列を含むが、これらに限定されない。標準的方法（「Current Methods in Sequence Comparison and Analysis」Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications、アランR.リス社（Alan R.Liss, Inc.）、pp.127-149、1998）により計算されるように、かかる変異形態がゲルゾリンまたはゲルゾリン様ポリペプチドを認識する作動可能な抗体を形成する限り、本発明に記載の免疫グロブリンのヌクレオチド配列が、最大25%までの配列相同変異を許容することが認識される。例えば、ポリペプチド配列内の1つまたは複数のアミノ酸残基は、機能的等価物として働く類似した極性の別のアミノ酸により置換することができ、サイレント変化を結果として生じる。配列内のアミノ酸についての置換物はアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択することができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンを含む。極性の中性アミノ酸は、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンを含む。正に荷電した（塩基性）アミノ酸は、アルギニン、リジンおよびヒスチジンを含む。

負に荷電した（酸性）アミノ酸はアスパラギン酸およびグルタミン酸を含む。翻訳の間にまたはその後、例えば、グリコソレーション（glycosylation）、タンパク質分解を生ずる切断、抗体分子または他の細胞リガンドへの結合などによって、差別的に修飾されたタンパク質またはその断片もしくは誘導体もまた、本発明の範囲内に含まれる。さらに、核酸配列をコードする阻害剤は、インビトロまたはインビボで、翻訳配列、開始配列および/もしくは終止配列を生じる、および/もしくは破壊するように、またはコーディング領域中の変異を生じる、および/もしくは新しい制限酵素部位を形成する、もしくは先に存在するものを破壊するように変異させて、インビトロの修飾をさらに促進することができる。インビトロの部位特異的変異誘発、J. Biol. Chem. 253 : 6551、Tabリンカー（ファルマシア（Pharmacia）社）の使用、および同種のものを含むが、これらに限定されない、当技術分野において公知の変異誘発のための任意の技術を使用することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0100】

ポリクローナル抗血清および免疫原の調製。本発明の抗体または抗体断片を生成する方法は、典型的には、精製されたゲルゾリンもしくはゲルゾリン様ポリペプチドまたはそのホモログもしくは断片、またはゲルゾリンもしくはゲルゾリン様ポリペプチドまたはそのホモログもしくは断片を発現する細胞により、被験体（一般的にマウスまたはウサギなどの非ヒト被験体）を免疫することを含む。ゲルゾリンポリペプチドの任意の免疫原性部分を免疫原として使用することができる。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換えにより発現されたゲルゾリンポリペプチドまたは化学的に合成されたゲルゾリンポリペプチドを含むことができる。単離されたゲルゾリンポリペプチドまたはその部分もしくは断片は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体調製のための標準的技術を使用して、ゲルゾリンポリペプチドまたは部分もしくは断片に結合するゲルゾリン結合剤を生成する免疫原として使用することができる。免疫原として全長ゲルゾリンポリペプチドを使用することができるか、またはあるいは、本発明は、ゲルゾリンポリペプチド断片の使用を提供する。ゲルゾリンポリペプチドは、配列番号：1において示されるアミノ酸配列の少なくとも4アミノ酸残基を含み、ペプチドに対する抗体がゲルゾリンポリペプチドと特異的免疫複合体を形成するようなゲルゾリンポリペプチドのエピトープを包含する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも5、8、10、15、20、または30アミノ酸残基を含む。より長い抗原性ペプチドは、用途に依存して、当業者に周知の方法に従って、より短い抗原性ペプチド以上に時には好ましい。典型的には、免疫原は、少なくとも長さで約8アミノアシル残基、および好ましくは少なくとも長さで約10アシル残基であるだろう。既定のエピトープの多量体は、モノマーよりも時には効果的である。

#### 【0101】

必要とあれば、ゲルゾリンポリペプチド（またはその断片）の免疫原性は、キーホールリンペットヘモシニアン（KLH）またはオボアルブミン（OVA）などのハプテンへの融合またはコンジュゲーションによって増加することができる。多くのかかるハプテンが当技術分野において公知である。フロインド完全アジュバントまたは不完全アジュバントなどの従来のアジュバントとゲルゾリンポリペプチドを組み合わせ、被験体のポリペプチドに対する免疫反応を増加させることもできる。免疫学的応答の増加に使用する様々なアジュバントは、フロインド（完全および不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、ジニトロフェノールなど）、カルメット・ゲラン桿菌およびコリネバクテリウム・パルブム（Corynebacterium parvum）などのヒトアジュバント、または類似する免疫刺激化合物を含むが、これらに限定されない。これらの技術は当技術分野において標準的である。

#### 【0102】

便宜上、免疫応答は、「一次」免疫応答または「二次」免疫応答のいずれかとして本発明においてしばしば記述される。一次免疫応答（「防御」免疫応答とも記載される）は、特定の抗原（例えばゲルゾリンポリペプチド）に対するある程度の初回曝露（例えば初回

「免疫」)の結果として、個体において産生される免疫応答を指す。かかる免疫は、例えば、抗原へのある程度の自然曝露(例えば抗原を示すかまたは提示するいくつかの病原体による初回感染からの)の結果として、または個体中のいくつかの腫瘍の癌細胞(例えば悪性メラノーマ)によって提示された抗原から、起こりうる。あるいは、免疫は、抗原を含むワクチンによる個体のワクチン接種の結果として起こりうる。例えば、ワクチンは、ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドからの1つまたは複数の抗原を含むゲルゾリンワクチンでありえる。

【0103】

一次免疫応答は、経時的に弱くもしくは減ずるようになりえ、消滅するか、または少なくとも検出不可能なほど減ずるようになる。したがって、本発明は、「二次」免疫応答(本明細書において「記憶免疫応答」としてもまた記述される)にもまた関する。用語、二次免疫応答は、一次免疫応答が既に産生された後に個体において誘発される免疫応答を指す。

10

【0104】

したがって、二次応答または免疫応答は、例えば、弱くまたは減ずるようになった既存の免疫応答を促進するように、または消滅するかまたはもはや検出することができないかのいずれかである以前の免疫応答を再び生じるように引き出すことができる。二次免疫応答または記憶免疫応答は、液性(抗体)応答または細胞性応答のいずれかでありえる。二次液性応答または記憶液性応答は、抗原の第1の提示で生成された記憶B細胞の刺激に応じて起こる。遅延型過敏症(DTH)反応は、CD4<sup>+</sup>細胞によって仲介されるタイプの細胞性の二次免疫応答または記憶免疫応答である。抗原への最初の曝露は免疫系をプライミングし、追加の曝露はDTHをもたらす。

20

【0105】

適切な免疫に後続して、ゲルゾリン結合剤、例えば、抗ゲルゾリンポリクローナル抗体を、被験体の血清から調製することができる。所望されるならば、ゲルゾリンポリペプチドに対して向けられた抗体分子は、哺乳類から(例えば血液から)単離することができ、IgG画分を得るポリペプチドAクロマトグラフィーなどの周知の技術によってさらに精製することができる。

【0106】

モノクローナル抗体。本発明の1つの実施形態において、結合剤は抗ゲルゾリンモノクローナル抗体である。例えば、いくつかの実施形態において、抗ゲルゾリンモノクローナル抗体は、ヒトまたはマウスの抗ゲルゾリンモノクローナル抗体でありえる。特定のゲルゾリンポリペプチド、またはその誘導体、断片、類似体もしくはホモログへ向けられたモノクローナル抗体の調製のために、連続的な細胞株培養による抗体分子の産生を提供する任意の技術を利用することができる。かかる技術は、ハイブリドーマ技術(例えば、Kohler & Milstein, 1975. Nature 256: 495-497を参照); トリオーマ技術; ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(例えば、Kozbor, et al., 1983. Immunol. Today 4: 72を参照)およびヒトモノクローナル抗体を産生するEBVハイブリドーマ技術(例えば、Cole, et al., 1985. In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、アランR.リス社、pp. 77-96を参照)を含むが、これらに限定されない。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実施において利用することができ、ヒトハイブリドーマの使用(例えば、Cote, et al., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030を参照)によって、またはエプスタインバーウイルスによるヒトB細胞のインビトロの形質転換(例えば、Cole, et al., 1985. In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、アランR.リス社、pp. 77-96を参照)によって、産生することができる。例えば、抗体の領域をコードする核酸の集団は単離することができる。抗体の保存領域をコードする配列に由来するプライマーを利用するPCRを使用して、集団から抗体の部分をコードする配列を増幅し、次に増幅配列から、可変ドメインな

30

40

50

どの抗体またはその断片をコードするDNAを再構築する。かかる増幅配列は、ファージまたは細菌の上での融合ポリペプチドの発現およびディスプレイのために、他のタンパク質（例えばバクテリオファージコートまたは細菌細胞表面タンパク質）をコードするDNAに融合することもできる。次に増幅配列を発現させ、ゲルゾリンポリペプチド上に存在する抗原またはエピトープについて、発現させた抗体またはその断片の、例えば、親和性に基いてさらに選択または単離することができる。あるいは、抗ゲルゾリンモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマは、被験体の免疫によって調製することができ、次にルーチンの方法を使用して、被験体の脾臓からハイブリドーマを単離する。例えば、Milstein et al.、(Galfrè and Milstein, Methods Enzymol (1981) 73: 3-46)を参照。標準的方法を使用するハイブリドーマのスクリーニングは、変化した特異性（すなわち、異なるエピトープについて）および親和性のモノクローナル抗体を産生するだろう。所望される特性（例えば、ゲルゾリン結合）を備えた選択されたモノクローナル抗体は、ハイブリドーマによって発現されたままで使用することができ、ポリエチレングリコール（PEG）などの分子に結合して特性を変更することができるか、またはそれをコードするcDNAは、様々な方法で単離、配列決定、および操作することができる。合成デンドロマーの（dendromeric）ツリーを反応性アミノ酸側鎖（例えば、リジン）に追加して、ゲルゾリンポリペプチドの免疫原特性を促進することができる。また、CPGジヌクレオチド技術を使用してゲルゾリンポリペプチドの免疫原特性を促進することができる。他の操作は、保存の間にまたは被験体への投与の後に抗体の不安定性に寄与する特定のアミノアシル残基の置換または欠失、およびゲルゾリンポリペプチドの抗体の親和性を改善する親和性成熟技術を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0107】

ハイブリドーマ技術。1つの実施形態において、本発明の結合剤は、不死化細胞に融合した、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する遺伝子導入非ヒト動物（例えばトランスジェニックマウス）から得られたB細胞を含む、ハイブリドーマによって産生された抗ゲルゾリンモノクローナル抗体である。ハイブリドーマ技術は、当技術分野において公知であり、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual、コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク349（1988）；Hammerling et al., Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas, 563-681（1981）中で教示されたものを含む。ハイブリドーマおよびモノクローナル抗体を産生する他の方法は、当業者に周知である。

#### 【0108】

ファージディスプレイ技術。上述されるように、本発明の結合剤は、組換えDNA技術およびファージディスプレイ技術の適用を介して産生することができる。例えば、本発明の結合剤（例えば、抗ゲルゾリン抗体）は、当技術分野において公知の様々なファージディスプレイ方法を使用して調製することができる。ファージディスプレイ方法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面上にディスプレイされる。所望される結合特性を備えたファージは、抗原（典型的には、固体表面またはビーズに結合または捕捉された抗原）により直接選択することによって、レパートリー抗体ライブラリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えばヒトまたはマウス）から選択される。これらの方法において使用されるファージは、典型的にはfdおよびM13を含む線状ファージであり、Fab抗体ドメイン、Fv抗体ドメインまたはジスルフィドで安定化したFv抗体ドメインは、ファージの遺伝子IIITタンパク質または遺伝子VIIITタンパク質のいずれかに組換えにより融合される。さらに、方法をFab発現ライブラリー（例えば、Huse, et al., Science 246: 1275-1281, 1989を参照）の構築に適合して、ゲルゾリンポリペプチド（例えばポリペプチド、またはその誘導体、断片、類似体もしくはホモログ）について所望される特異性を備えたモノクローナルFab断片の迅速で効果的な同定を可能にす

ることができる。本発明の結合剤を作製するために使用することができるファージディスプレイ方法の他の例は、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-5883, 1988; Chaudhary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 1066-1070, 1990; Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182: 41-50, 1995; Ames et al., J. Immunol. Methods 184: 177-186, 1995; Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24: 952-958, 1994; Persic et al., Gene 187: 9-18, 1997; Burton et al., Advances in Immunology 57: 191-280 (1994); PCT/GB91/01134; WO90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; WO93/11236; WO95/15982; WO95/20401; WO96/06213; WO92/01047 (国立医学研究所ら); WO97/08320 (モルフォシス (Morphosys) 社); WO92/01047 (CAT/MRC); WO91/17271 (アフィマックス (Affymax) 社); ならびに米国特許第5,698,426号、第5,223,409号、第5,403,484号、第5,580,717号、第5,427,908号、第5,750,753号、第5,821,047号、第5,571,698号、第5,427,908号、第5,516,637号、第5,780,225号、第5,658,727および第5,733,743号中で開示されたものを含む。ジスルフィド結合を介するポリペプチドの結合によるバクテリオファージ粒子の表面上でのポリペプチドのディスプレイに有用な方法は、Lohning、米国特許第6,753,136号によって記述された。上述の参照において記述されるように、ファージ選択後に、ファージからの抗体コーディング領域は単離され、ヒト抗体を含む全抗体、または他の所望される抗原結合断片の生成に使用することができる。哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含む任意の所望される宿主において発現することができる。例えば、組換えによりFab、Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>断片を産生する技術は、WO92/22324; Mullinax et al., BioTechniques 12: 864-869, 1992; および Sawai et al., AJRI 34: 26-34, 1995; および Better et al., Science 240: 1041-1043, 1988中で開示されたものなどの当技術分野において公知の方法を使用して利用することもできる。

#### 【0109】

一般的に、ディスプレイベクターの中へクローニングされるハイブリッド抗体またはハイブリッド抗体断片は、抗体または抗体断片がファージまたはファージミド粒子の表面上に存在するので、十分な結合活性を維持した変異型を同定するために、適切な抗原に対して選択することができる。例えば、Barbas III et al., Phage Display, A Laboratory Manual (コールドスプリングハーバークラボラトリープレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、2001)を参照。しかしながら、他のベクター形式をこのプロセスのために使用すること(例えば、選択および/またはスクリーニングのための溶菌ファージベクター(修飾T7システムまたはラムダザップシステム)の中への抗体断片ライブラリーのクローニング)ができるかもしれない。

#### 【0110】

組換えゲルゾリン結合剤の発現。上述されるように、本発明の結合剤は、組換えDNA技術の適用を介して産生することができる。本発明のゲルゾリン結合剤をコードする組換えポリヌクレオチドコンストラクトは、典型的には、天然に結合されるプロモーター領域または異種のプロモーター領域を含む抗ゲルゾリン抗体鎖のコーディング配列に作動可能に結合した発現制御配列を含む。それゆえ、本発明の別の態様は、本発明のゲルゾリン結合剤をコードする1つまたは複数の核酸配列を含むベクターを含んでいる。本発明の1つまたは複数のポリペプチドの組換え発現のために、ゲルゾリン結合剤をコードするヌクレ

オチド配列のすべてまたは一部を含む核酸は、当技術分野において周知のおよび以下で詳述されるような組換えDNA技術によって、適切なクローニングベクターまたは発現ベクター（すなわち挿入されたポリペプチドコーディング配列の転写および翻訳のための必要なエレメントを含むベクター）の中へ挿入される。多様な集団のベクターを産生する方法は、Lerner et al.、米国特許第6,291,160号；第6,680,192号によって記述されている。

#### 【0111】

一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書において、プラスミドがベクターの最も通常は使用される形態であるので、「プラスミド」および「ベクター」は交換可能に使用することができる。しかしながら、本発明は、等価な機能を果たす、技術的にプラスミドでないウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）などの発現ベクターの他のかかる形態を含むように意図される。かかるウイルスベクターは、被験体の感染およびその被験体における化合物の発現を可能にする。好ましくは、発現制御配列は、真核生物宿主細胞を、形質転換またはトランスフェクションすることが可能なベクターにおける真核生物プロモーターシステムである。一旦ベクターが適切な宿主の中へ組み入れられたならば、宿主は、ゲルゾリン結合剤をコードするヌクレオチド配列の高レベル発現、ならびにゲルゾリン結合剤（例えば交差反応する抗ゲルゾリン抗体）の回収および精製のために適切な条件下で維持される。一般に、米国特許出願第20020199213号を参照。これらの発現ベクターは、典型的には、エピソームとして、または宿主染色体DNAの組み込み部分として宿主生物中で複製可能である。通常は、発現ベクターは、所望されるDNA配列により形質転換された細胞の検出を可能にする、選択マーカー（例えばアンピシリン耐性、ハイグロマイシン耐性）を含む。ベクターは、細胞外への抗体断片の分泌の指令に有用なシグナルペプチド（例えば、ペクチン酸リアーゼ）もまたコードすることができる。米国特許第5,576,195号を参照。

#### 【0112】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現のために適切な形態でゲルゾリン結合特性を備えた化合物をコードする核酸を含み、それは組換え発現ベクターが1つまたは複数の調節配列（発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択される）を含み、発現される核酸配列に作動可能に結合されることを意味する。組換え発現ベクター内で、「作動可能に結合された」は、ヌクレオチド配列の発現を可能にする方式で（例えば、インビトロの転写/翻訳システムにおいて、またはベクターが宿主細胞の中への導入されるときに宿主細胞において）、対象となるヌクレオチド配列が調節配列（複数可）に結合されることを意味するように意図される。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えばポリアデニル化シグナル）を含むように意図される。かかる調節配列は、例えば、Goeddel、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、アカデミックプレス、サンディエゴ、カリフォルニア（1990）中で記述される。調節配列は、多くのタイプの宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指令するもの、および特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指令するもの（例えば、組織特異的調節配列）を含む。発現ベクターのデザインが形質転換される宿主細胞の選択、所望されるポリペプチドの発現のレベルなどのような因子に依存できることは、当業者によって認識されるだろう。組換えポリペプチド発現（例えば、ゲルゾリン結合剤）のプロモーターとして有用な典型的な調節配列は、例えば、3-ホスホグリセレートキナーゼおよび他の解糖酵素を含むが、これらに限定されない。誘導可能な酵母プロモーターは、数ある中で、アルコール脱水素酵素、イソチトクロムC、およびマルトースおよびガラクトース利用に關与する酵素からのプロモーターを含む。1つの実施形態において、本発明のゲルゾリン結合剤をコードするポリヌクレオチドは、araBプロモーターに作動可能に結合され、宿主細胞において発現可能である。米国特許第5,028,530号を参照。本発明の発現ベクターを宿主細胞の中へ導入して、それによって本明細書において記述さ

10

20

30

40

50

れるような核酸によってコードされる融合ポリペプチドを含む、ポリペプチドまたはペプチド（例えばゲルゾリン結合剤など）を産生することができる。

【0113】

本発明の別の態様は、1つまたは複数のゲルゾリン結合剤をコードする核酸を含む、ゲルゾリン結合剤発現宿主細胞に関する。本発明の組換え発現ベクターは、原核細胞または真核細胞におけるゲルゾリン結合剤の発現のためにデザインすることができる。例えば、ゲルゾリン結合剤は、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用して）、真菌細胞（例えば酵母）、酵母細胞または哺乳類細胞において発現させることができる。適切な宿主細胞は、Goeddel、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、アカデミックプレス、サンディエゴ、カリフォルニア（1990）中でさらに論じられる。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを使用して、転写シンプトコで翻訳することができる。確率論的に生成されたポリヌクレオチド配列の発現を介して、所定の特性（例えばゲルゾリン結合剤）を有するポリペプチドの調製スクリーニングのために有用な方法が記述されている。米国特許第5,763,192号；第5,723,323号；第5,814,476号；第5,817,483号；第5,824,514号；第5,976,862号；第6,492,107号；第6,569,641号を参照。

10

【0114】

原核生物におけるポリペプチドの発現は、融合ポリペプチドまたは非融合ポリペプチドのいずれかの発現を指令する構成的プロモーターまたは誘導可能プロモーターを含むベクターを有する大腸菌においてほとんどの場合実行される。融合ベクターは、その中にコードされたポリペプチドに（通常は組換えポリペプチドのアミノ末端に）多数のアミノ酸を追加する。かかる融合ベクターは、典型的には、(i)組換えポリペプチドの発現を増加させること；(ii)組換えポリペプチドの溶解度を増加させること；および(iii)親和性精製におけるリガンドとして働くことによって組換えポリペプチドの精製を支援すること、の3つの目的を果たす。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解を生ずる切断部位を融合部分および組換えポリペプチドの接合点で導入して、融合ポリペプチドの精製に続く融合部分からの組換えポリペプチドの分離を可能にする。かかる酵素、およびそれらの同族の認識配列は、第Xa因子およびトロンピンおよびエンテロキナーゼを含んでいる。典型的な融合発現ベクターは、pGEX（ファルマシア・バイオテック社（Pharmacia Biotech Inc）；Smith and Johnson, Gene 67:31-40, 1988）pMAL（ニューイングランド・バイオラボ（New England Biolabs）社、ベヴァリー、マサチューセッツ）およびpRIT5（ファルマシア社、ピスカタウェイ、ニュージャージー）を含み、それぞれ標的組換えポリペプチドに、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合ポリペプチド、またはポリペプチドAを融合させる。

20

30

【0115】

適切な誘導可能な非融合大腸菌発現ベクターの例は、pTrc（Amrann et al., Gene 69:301-315, (1988)）、およびpET11d（Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、アカデミックプレス、サンディエゴ、カリフォルニア（1990）60-89）を含む。ポリペプチド融合を介して多機能のポリペプチドをもたらす異なる活性のペプチドドメインまたはタンパク質ドメインの標的化集合のための方法は、Pack et al., 米国特許第6,294,353号；第6,692,935号によって記述されている。組換えポリペプチドの発現（例えばゲルゾリン結合剤）を最大化する大腸菌における1つの戦略は、組換えポリペプチドをタンパク質分解的に切断する能力が減少した宿主菌中でポリペプチドを発現することである。例えば、Gottesman、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、アカデミックプレス、サンディエ

40

50

ゴ、カリフォルニア(1990)119-128を参照。別の戦略は、各アミノ酸についての個々のコドンが発現宿主(例えば大腸菌)中で優先的に利用されるものであるように、発現ベクターの中へ挿入される核酸の核酸配列を変更することである(例えば、Wada, et al., 1992. *Nucl. Acids Res.* 20: 2111-2118を参照)。本発明の核酸配列のかかる変化は、標準的DNA合成技術によって実行することができる。

【0116】

別の実施形態において、ゲルゾリン結合剤の発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母サッカロミセス・セレビジエ(*Saccharomyces cerevisiae*)における発現のためのベクターの例は、pYepSec1(Baldari, et al., 1987. *EMBO J.* 6: 229-234)、pMFa(Kurjan and Herskowitz, *Cell* 30: 933-943, 1982)、pJRY88(Schultz et al., *Gene* 54: 113-123, 1987)、pYES2(インビトロゲン社(Invitrogen Corporation)、サンディエゴ、カリフォルニア)、およびpicZ(インビトロゲン社、サンディエゴ、カリフォルニア)を含む。あるいは、ゲルゾリン結合剤は、パキウウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞において発現させることができる。ポリペプチド(例えばゲルゾリン結合剤)の発現のために利用可能なパキウウイルスベクターは、培養昆虫細胞(例えばSF9細胞)における、pAcシリーズ(Smith, et al., *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165, 1983)およびpVLシリーズ(Lucklow and Summers, 1989. *Virology* 170: 31-39)を含む。

10

20

【0117】

さらに別の実施形態において、本発明のゲルゾリン結合剤をコードする核酸は、哺乳類発現ベクターを使用して、哺乳類細胞において発現される。哺乳類発現ベクターの例は、例えば、pCDM8(Seed, . *Nature* 329: 840, 1987)、およびpMT2PC(Kaufman, et al., *EMBO J.* 6: 187-195, 1987)を含むが、これらに限定されない。哺乳類細胞において使用された場合、発現ベクターの制御機能はウイルス性調節エレメントによってしばしば提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマウイルス、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。他の本発明のゲルゾリン結合剤の発現に有用な原核細胞および真核細胞の両方のために適切な発現システムについては、例えば、Sambrook, et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*の16章および17章。第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、1989を参照。

30

【0118】

別の実施形態において、組換え哺乳類発現ベクターは、特定の細胞タイプにおける核酸の発現を優先的に指令することができる(例えば、組織特異的調節エレメントを核酸の発現に使用する)。組織特異的調節エレメントは当技術分野において公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定例は、アルブミンプロモーター(肝臓特異的; Pinkert, et al., *Genes Dev.* 1: 268-277, 1987)、リンパ系特異的プロモーター(Calame and Eaton, *Adv. Immunol.* 43: 235-275, 1988)、特にT細胞受容体のプロモーター(Winoto and Baltimore, *EMBO J.* 8: 729-733, 1989)、および免疫グロブリン(Banerji, et al., 1983. *Cell* 33: 729-740; Queen and Baltimore, *Cell* 33: 741-748, 1983.)、ニューロン特異的プロモーター(例えば、ニューロフィラメントプロモーター; Byrne and Ruddie, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6: 5473-5477, 1989)、膵臓特異的プロモーター(Edlund, et al., 1985. *Science* 230: 912-916)、ならびに乳腺特異的プロ

40

50

モーター（例えば、乳漿プロモーター；米国特許第4,873,316号およびヨーロッパ出願公報第264,166号）を含む。発生で調節されるプロモーターは、例えば、マウス *hox* プロモーター（Kessel and Gruss, *Science* 249: 374-379, 1990）、および *β*-フェトプロテインプロモーター（Campes and Tilghman, *Genes Dev.* 3: 537-546, 1989）もまた包含する。

【0119】

本発明の別の態様は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。「宿主細胞」、「組換え宿主細胞」という用語は、交換可能に本明細書において使用される。かかる用語が特定の被験体細胞だけでなく、かかる細胞の子孫または潜在的な子孫も指すことが理解される。特定の修飾が変異または環境の影響のいずれかのために次世代で起こりうるので、実際は、かかる子孫は親細胞と同一でないかもしれないが、本明細書において使用される時、なお用語の範囲内に含まれる。

10

【0120】

宿主細胞は任意の原核生物または真核細胞でありえる。例えば、ゲルゾリン結合剤は、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞、酵母または哺乳類細胞において発現することができる。哺乳類細胞は、免疫グロブリンまたはその断片をコードするヌクレオチドセグメントの発現のための好ましい宿主である。Winnacker, *From Genes To Clones*, (VCH出版社 (VCH Publishers), ニューヨーク, 1987) を参照。インタクトな異種タンパク質を分泌することができる多数の適切な宿主細胞株は、当技術分野において開発されており、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株、様々なCOS細胞株、HeLa細胞、L細胞およびミエロマ細胞株を含む。好ましくは、細胞はヒト以外である。これらの細胞のための発現ベクターは、複製起点、プロモーター、エンハンサーなどの発現制御配列、ならびにリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写ターミネーター配列などの必要なプロセッシング情報部位を含むことができる。Queen et al., *Immunol. Rev.* 89: 49, 1986。好ましい発現制御配列は、内在性遺伝子、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、ウシパピロマウイルス、および同種のものに由来するプロモーターである。Co et al., *J. Immunol.* 148: 1149, 1992。他の適切な宿主細胞は当業者に公知である。

20

30

【0121】

ベクターDNAは従来の形質転換技術またはトランスフェクション技術を介して原核細胞または真核細胞の中へ導入することができる。本明細書において使用される時、用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウムの共沈殿、DEAE-デキストラン仲介性トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを含む、宿主細胞の中への外来の核酸（例えばDNA）の導入のための様々な当技術分野で認められている技術を指すように意図され、微粒子銃またはウイルスベースのトランスフェクションは他の細胞性宿主のために使用することができる。哺乳類細胞を形質転換するために使用する他の方法は、ポリプレックス融合、リボソーム、エレクトロポレーション、および顕微注射の使用を含む (Sambrook et al., *Molecular Cloning* を一般的に参照)。宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションのために適切な方法は、Sambrook, et al. (*MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 第2版、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー、コールドスプリングハーバー・ラボラトリープレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク, 1989)、および他の実験手引き書中に見出すことができる。対象となるDNAセグメントを含むベクターは、細胞性宿主のタイプに依存して、周知の方法によって宿主細胞の中へ導入することができる。

40

【0122】

哺乳類細胞の安定性トランスフェクションについては、細胞のごく一部分のみが、使用

50

する発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、ゲノムの中へ外来性DNAを組み込むことが公知である。これらの組込んだものを同定および選択するために、一般的に選択可能なマーカー（例えば抗生物質耐性）をコードする遺伝子を対象となる遺伝子と共に宿主細胞の中へ導入する。様々な選択マーカーは、G418、ハイグロマイシンおよびメトトレキサートなどの薬物への耐性を与えるものを含む。選択可能なマーカーをコードする核酸は、ゲルゾリン結合剤をコードするものと同じベクター上で宿主細胞の中へ導入することができるか、または別のベクター上で導入することができる。導入した核酸により安定的にトランスフェクションされた細胞は、薬物選択によって同定することができる（例えば、他の細胞は死滅するが、選択可能なマーカー遺伝子を組み入れた細胞は生き残るだろう）。

10

## 【0123】

本発明のゲルゾリン結合剤を含む、原核宿主細胞または真核宿主細胞などの培養宿主細胞を使用して、組換えゲルゾリン結合剤を産生（すなわち発現）することができる。1つの実施形態において、方法は、ゲルゾリン結合剤が産生されるように、発明の宿主細胞（ゲルゾリン結合剤をコードする組換え発現ベクターが導入された）を適切な培地中で培養することを含む。別の実施形態において、方法は、溶媒または宿主細胞からゲルゾリン結合剤を単離する工程をさらに含む。一旦発現されたならば、ゲルゾリン結合剤（例えば、抗ゲルゾリン抗体または抗ゲルゾリン抗体関連ポリペプチド）の回収物は、培養培地および宿主細胞から精製される。ゲルゾリン結合剤は、HPLC精製、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動および同種のものを含む、当技術分野の標準的手順に従って精製することができる。1つの実施形態において、ゲルゾリン結合剤は、Boss et al.、米国特許第4,816,397号の方法によって宿主生物において産生される。通常、抗ゲルゾリン抗体鎖はシグナル配列と共に発現され、したがって培養培地へ放出される。しかしながら、抗ゲルゾリン抗体鎖が宿主細胞によって自然に分泌されないならば、抗ゲルゾリン抗体鎖は、穏やかな界面活性剤による処理によって放出させることができる。組換えポリペプチドの精製は当技術分野において周知であり、硫酸沈澱、親和性クロマトグラフィー精製技術、カラムクロマトグラフィー、イオン交換精製技術、ゲル電気泳動および同種のものを含む（Scopes、Protein Purification（シュプリンガー・フェアラーク（Springer-Verlag）、ニューヨーク、1982）を一般的に参照）。

20

30

## 【0124】

ゲルゾリン結合剤をコードするポリヌクレオチド（例えば抗ゲルゾリン抗体コーディング配列）を、トランスジェニック動物のゲノムの中への導入および続いてトランスジェニック動物の乳汁中での発現のためにトランスジーン中に組み入れることができる。例えば、米国特許第5,741,957号、第5,304,489号、および第5,849,992号を参照。適切なトランスジーンは、カゼインまたは $\alpha$ -ラクトグロブリンなどの乳腺特異的遺伝子からのプロモーターおよびエンハンサーとの作動可能な結合で、軽鎖および/または重鎖のコーディング配列を含む。トランスジェニック動物の産生のために、トランスジーンを受精卵母細胞の中へ顕微注射できるか、またはトランスジーンを胚性幹細胞のゲノムの中へ組み入れ、かかる細胞の核を除核卵母細胞の中へ導入することができる。

40

## 【0125】

一本鎖抗体。1つの実施形態において、本発明の結合剤は一本鎖抗ゲルゾリン抗体である。本発明に従って、技術は、ゲルゾリンポリペプチドに特異的な一本鎖抗体の産生に適合させることができる（例えば、米国特許第4,946,778号を参照）。本発明の一本鎖Fvsおよび抗体の産生に使用することができる技術の例は、米国特許第4,946,778号および第5,258,498号；Houston et al., Method in Enzymology, 203:46-88, 1991；Shu, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7995-7999, 1993；およびSkerra et al., Science 240:1038-10

50

40, 1988中に記述されるものを含む。

【0126】

キメラ抗体およびヒト化抗体。1つの実施形態において、本発明の結合剤はキメラ抗ゲルゾリン抗体である。1つの実施形態において、本発明の結合剤はヒト化抗ゲルゾリン抗体である。本発明の1つの実施形態において、ドナー抗体およびアクセプター抗体は、異なる種からのモノクローナル抗体である。例えば、アクセプター抗体はヒト抗体（ヒトにおけるその抗原性を最小限にする）であり、その場合には結果として生じるCDRがグラフトされた抗体は、「ヒト化」抗体と称される。

【0127】

キメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体などの、ヒト部分および非ヒト部分の両方を含む組換え抗ゲルゾリン抗体は、標準的組換えDNA技術を使用して作製することができ、本発明の範囲内である。ヒトにおける本発明の結合剤のインビボの使用に加えて、これらの薬剤のインビトロの検出分析の使用を含むいくつかの使用のために、キメラ抗ゲルゾリン抗体、ヒト化抗ゲルゾリン抗体、またはヒト抗ゲルゾリン抗体を使用することが好ましい。かかるキメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、当技術分野において公知の組換えDNA技術によって産生することができる。かかる有用な方法は、例えば、国際出願番号PCT/US86/02269；米国特許第5,225,539号；ヨーロッパ特許第184187号、ヨーロッパ特許第171496号；ヨーロッパ特許第173494号；PCT国際公開第WO86/01533号；米国特許第4,816,567号；第5,225,539号；ヨーロッパ特許第125023号；Better, et al., 1988. Science 240:1041-1043；Liu, et al., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443；Liu, et al., 1987. J. Immunol. 139:3521-3526；Sun, et al., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218；Nishimura, et al., 1987. Cancer Res. 47:999-1005；Wood, et al., 1985. Nature 314:446-449；Shaw, et al., 1988. J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559；Morrison (1985) Science 229:1202-1207；Oi, et al. (1986) BioTechniques 4:214；Jones, et al., 1986. Nature 321:552-525；Verhoeyan, et al., 1988. Science 239:1534；Morrison, Science 229:1202, 1985；Oi et al., BioTechniques 4:214, 1986；Gillies et al., J. Immunol. Methods, 125:191-202, 1989；米国特許第5,807,715号；およびBeidler, et al., 1988. J. Immunol. 141:4053-4060中で記述される方法を含むが、これらに限定されない。例えば、CDRグラフト（EP0239400；WO91/09967；米国特許第5号,第530,101号；第5,585,089号；第5,859,205号；第6,248,516号；EP460167）、ペニアリングまたは表面置換（EP0592106；EP0519596；Padlan E. A., Molecular Immunology, 28:489-498, 1991；Studnicka et al., Protein Engineering 7:805-814, 1994；Roguska et al., PNAS 91:969-973, 1994）、および鎖シャッフリング（米国特許第5,565,332号）を含む様々な技術を使用して、抗体はヒト化できる。1つの実施形態において、マウス抗ゲルゾリンモノクローナル抗体をコードするcDNAは、Fc定常領域をコードする配列を除去するように特異的に選択された制限酵素により消化され、ヒトFc定常領域をコードするcDNAの等価部分が置換される（Robinson et al., PCT/US86/02269；Akira et al., ヨーロッパ特許出願184,187；Taniguchi, ヨーロッパ特許出願第171,496号；Morrison et al., ヨーロッパ

10

20

30

40

50

特許出願第173,494号; Neuberger et al., WO86/01533; Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号; Cabilly et al., ヨーロッパ特許出願第125,023号; Better et al. (1988) Science 240:1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al. (1987) J. Immunol 139:3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al. (1987) Cancer Res 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; および Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559); 米国特許第6,180,370号; 米国特許第6,300,064号; 第6,696,248号; 第6,706,484号; 第6,828,422号を参照)。

10

## 【0128】

1つの実施形態において、本発明は、ヒト抗マウス抗体(以下、「HAMA」と呼ぶ)応答を恐らく誘導しないが、なお効果的な抗体エフェクター機能を有するヒト化抗ゲルゾリン抗体の構築を可能にする。本明細書において使用される時、用語「ヒト」および「ヒト化」は、抗体に関して、ヒト被験体において療法上耐容される弱い免疫原性応答を誘発すると予想される任意の抗体に関する。1つの実施形態において、本発明はヒト化ゲルゾリン抗体(重鎖および軽鎖の免疫グロブリン)を提供する。

20

## 【0129】

CDR抗体。1つの実施形態において、本発明の結合剤は抗ゲルゾリンCDR抗体である。一般的に、抗ゲルゾリンのCDR抗体の生成に使用されるドナー抗体およびアクセプター抗体は、異なる種からのモノクローナル抗体である。典型的には、アクセプター抗体はヒト抗体(ヒトにおける抗原性を最小限にする)であり、その場合には結果として生じるCDRがグラフトされた抗体は「ヒト化」抗体と称される。グラフトは、アクセプター抗体の単一の $V_H$ もしくは $V_L$ 内の単一CDR(または単一CDRの一部でさえ)でありえるか、または $V_H$ および $V_L$ の1つもしくは両方の内の複数のCDR(またはその一部)でありえる。結果として生じるCDRがグラフトされた抗体のMetAp3への適切な結合を可能にすることに必要な置換のみが必要とされるが、しばしばアクセプター抗体のすべての可変ドメイン中のすべての3つのCDRは対応するドナーCDRと置換されるだろう。CDRがグラフトされたヒト化抗体を生成する方法は、Queen et al., 米国特許第5,585,089号、米国特許第5,693,761号; 米国特許第5,693,762号; およびWinter, U.S. 5,225,539; ならびにEP0682040によって教示される。 $V_H$ ポリペプチドおよび $V_L$ ポリペプチドを調製するのに有用な方法は、Winter et al., 米国特許第4,816,397号; 第6,291,158号; 第6,291,159号; 第6,291,161号; 第6,545,142号; EP0368684; EP0451216; EP0120694によって教示される。

30

## 【0130】

同じファミリーおよび/または同じファミリーメンバーから適切なフレームワーク領域候補の選択の後に、重鎖可変領域および軽鎖可変領域のどちらかまたは両方は、ハイブリッドフレームワーク領域の中への起源の種からのCDRのグラフトによって産生される。上述の態様のいずれかに関するハイブリッド可変鎖領域を有するハイブリッド抗体またはハイブリッド抗体断片の集合は、当業者に公知の従来の方法を使用して、遂行することができる。例えば、本明細書において記述されるハイブリッド可変ドメインをコードするDNA配列(すなわち、標的種に基づいたフレームワーク、および起源の種からのCDR)は、オリゴヌクレオチド合成および/またはPCRによって産生することができる。CDR領域をコードする核酸は、適切な制限酵素を使用して、起源の種抗体から単離することができ、適切なライゲーション酵素でライゲーションすることによって、標的種フレーム

40

50

ワークの中へライゲーションすることができる。あるいは、起源の種の抗体の可変鎖のフレームワーク領域は、部位特異的変異誘発によって変化させることができる。

【0131】

ハイブリッドが各フレームワーク領域に対応する複数の候補の中の選択から構築されるので、本明細書において記載した原理に従う構築に適用可能な配列の多くの組合せが存在する。したがって、ハイブリッドのライブラリーは個々のフレームワーク領域の異なる組合せを備えたメンバーを集合させることができる。かかるライブラリーは、配列の電子データベース的収集またはハイブリッドの物理的収集でありえる。

【0132】

このプロセスは、典型的にはグラフトCDRに隣接するアクセプター抗体のFRを変更しない。しかしながら、当業者は、既定のFRの特定の残基を置換してFRをドナー抗体の対応するFRにさらに類似するようにすることによって、結果として生じる抗ゲルゾリンCDRグラフト抗体の抗原結合親和性を、時には改善することができる。置換の好ましい位置は、CDRに隣接するアミノ酸残基、またはCDRと相互作用することができるアミノ酸残基を含む（例えば、US5,585,089、特にカラム12-16を参照）。または当業者は、ドナーFRでスタートし、アクセプターFRまたはヒトコンセンサスFRにさらに類似するように修飾することができる。これらの修飾を生じさせるための技術は当技術分野において公知である。特に、結果として生じるFRの位置にヒトコンセンサスFRがあてはめられるならば、またはかかるコンセンサスFRに少なくとも90%またはそれ以上で同一であるならば、そうすることは、完全なヒトFRを備えた同じ抗体と比較して、結果として生じる修飾された抗ゲルゾリンCDR抗体の抗原性を有意に増加させないだろう。

【0133】

融合タンパク質。1つの実施形態において、本発明の結合剤は融合タンパク質である。本発明のゲルゾリン結合剤は、第2のタンパク質に融合した場合、抗原タグとして使用することができる。ポリペプチドに融合することができるドメインの例は、異種のシグナル配列だけでなく他の異種の機能的領域も含んでいる。融合は必ずしも直接的である必要がないが、リンカー配列を介して起こりうる。さらに、本発明の融合タンパク質はゲルゾリン結合剤の特質を改善するためにも操作することができる。例えば、追加のアミノ酸（特に荷電アミノ酸）の領域を、ゲルゾリン結合剤のN末端に追加して、宿主細胞からの精製または後の取り扱いおよび保存の間の安定性および持続性を改善することができる。また、ペプチド部分をゲルゾリン結合剤に追加して精製を促進することができる。かかる領域は、ゲルゾリン結合剤の最終的な調製の前に除去することができる。ポリペプチドの取り扱いを促進するペプチド部分の追加は、当技術分野においてなじみ深いルーチンな技術である。本発明のゲルゾリン結合剤は、融合したポリペプチドの精製を促進するペプチドなどのマーカー配列に融合することができる。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、数ある中で、pQEベクター（キアゲン社（QIAGEN, Inc.）、9259イートンアベニュー、チャッツワース、カリフォルニア、91311）中で提供されるタグなどのヘキサ-ヒスチジンペプチドであり、それらの多くは市販で入手可能である。Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824, 1989中で記述されるように、例えば、ヘキサ-ヒスチジンは融合タンパク質の都合のよい精製を提供する。精製に有用な別のペプチドタグ、「HA」タグは、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに対応する。Wilson et al., Cell 37: 767, 1984。

【0134】

したがって、これらの上述の融合のいずれかは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを使用して操作することができる。また、融合タンパク質はインビボで半減期の増加を示しうる。

【0135】

ジスルフィド結合二量体構造を有する融合タンパク質（IgGに起因する）は、単量体

10

20

30

40

50

の分泌タンパク質またはタンパク質断片単独よりも、他の分子の結合および中和において効率的でありえる。Fountoulakis et al., J. Biochem. 270:3958-3964, 1995。

【0136】

同様に、EP-A-0464533 (カナダ対応特許2045869)は、別のヒトタンパク質またはその一部と共に免疫グロブリン分子の定常領域の様々な部分を含む融合タンパク質を開示する。多くの場合において、融合タンパク質中のFc部分は、治療および診断において有益であり、したがって、例えば、薬物動態学的特性の改善をもたらすことができる。EP-A0232262を参照。あるいは、融合タンパク質が発現、検出、および精製された後に、Fc部分を欠失させることが所望されるだろう。例えば、融合タンパク質が抗原として免疫に使用されるならば、Fc部分は治療および診断を妨げうる。薬物開発において、例えば、hIL-5などのヒトタンパク質をハイスループットスクリーニング分析の目的のためにFc部分と融合して、hIL-5のアンタゴニストが同定されている。Bennett et al., J. Molecular Recognition 8:52-58, 1995; Johanson et al., J. Biol. Chem., 270:9459-9471, 1995。

10

【0137】

標識されたゲルゾリン結合剤。1つの実施形態において、本発明のゲルゾリン結合剤は標識部分(すなわち、検出可能基)とカップリングされる。ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドへの本発明のゲルゾリン結合剤の特異的結合を有意に妨害しない限り、本発明のゲルゾリン結合剤へコンジュゲートする特定の標識または検出可能基は、本発明の重大な態様ではない。検出可能基は、検出可能な物理的特性または化学的性質を有する任意の物質でありえる。かかる検出可能標識は免疫分析および画像診断の分野において良く発達しており、一般に、かかる方法に有用な大部分の任意の標識は本発明へ適用することができる。したがって、標識は、分光的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、光学的手段または化学的手段によって、検出可能な任意の組成物である。本発明における有用な標識は、磁気ビーズ(例えば、ダイナビーズ(Dynabeads)(商標))、蛍光色素(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミン、および同種のもの)、放射標識(例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、マイクロバブルなどの他の造影剤(超音波画像診断のための)、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{15}\text{O}$ (ポジトロン放出断層撮影のための)、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ (単一光子放出断層撮影のための)、酵素(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼおよび一般にELISAの中で使用される他のもの)、およびコロイド金もしくは色ガラスなどの呈色標識またはプラスチック(例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス、および同種のもの)のビーズを含む。かかる標識の使用について記述する特許は、米国特許第3,817,837号;第3,850,752号;第3,939,350号;第3,996,345号;第4,277,437号;第4,275,149号;および第4,366,241号を含み、各々は全体を参照することによりおよびすべての目的のために本明細書に組み入れられる。Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals(第6版、モレキュラープローブ社(Molecular Probes, Inc.))、ユージーン、オレゴン)もまた参照。

20

30

40

【0138】

標識は、当技術分野において周知の方法に従って分析の所望される成分へ直接または間接的にカップリングすることができる。上で示されるように、様々な標識は、必要とされる感度、化合物とのコンジュゲーションの容易性、必要とされる安定性、利用可能な機器類、および処分規定に依存する標識の選択により使用することができる。

【0139】

非放射性標識は、しばしば間接手段によって結合される。一般的に、リガンド分子(例えば、ビオチン)は、分子へ共有結合される。次にリガンドは、検出可能な酵素、蛍光化

50

合物、または化学発光化合物などの、先天的に検出可能であるかまたはシグナルシステムに共有結合されるかのいずれかである抗リガンド（例えばストレプトアビジン）分子と結合する。多数のリガンドおよび抗リガンドは使用することができる。リガンドが天然の抗リガンド（例えば、ビオチン、チロキシン、およびコルチゾール）を有する場合、標識された天然に存在する抗リガンドと併用して使用することができる。あるいは、任意のハプテン化合物または抗原化合物は、抗体（例えば抗ゲルゾリン抗体）と組み合わせて使用することができる。

#### 【0140】

分子は、例えば酵素または蛍光団とのコンジュゲーションによって、シグナル生成化合物へ直接コンジュゲートすることもできる。標識として対象となる酵素は、主として加水分解酵素（特にホスファターゼ、エステラーゼおよびグリコシダーゼ）または酸化還元酵素（特にペルオキシダーゼ）であるだろう。標識部分として有用な蛍光化合物は、例えば、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ならびに同種のものを含むが、これらに限定されない。標識部分として有用な化学発光化合物は、例えば、ルシフェリンおよび2,3-ジヒドロフタラジンジオン（例えば、ルミノール）を含むが、これらに限定されない。使用することができる様々な標識システムまたはシグナル発生システムの総説については、米国特許第4,391,904号を参照。

10

#### 【0141】

標識を検出する手段は、当業者に周知である。したがって、例えば、標識が放射性標識である場合、検出のための手段は、オートラジオグラフィーのようなシンチレーションカウンターまたは感光性フィルムを含む。標識が蛍光標識である場合、それは適切な波長の光による蛍光色素の励起および結果として生じる蛍光の検出によって検出することができる。蛍光は、感光性フィルムによって、電荷結合素子（CCD）または光電子増倍管および同種のものなどの電子検出器の使用によって、視覚的に検出することができる。同様に、酵素による標識は、酵素についての適切な基質の提供および結果として生じる反応生成物の検出によって、検出することができる。最終的に単純な呈色標識は、標識と結合させた色の観察によって単純に検出することができる。したがって、様々なディップスティック分析において、コンジュゲートされた金はしばしばピンク色に見えるが、コンジュゲートされた様々なビーズはビーズの色に見える。

20

30

#### 【0142】

いくつかの分析形式は、標識成分の使用を必要としない。例えば、凝集分析を使用して標的抗体（例えば抗ゲルゾリン抗体）の存在を検出することができる。この場合、抗原でコートした粒子は、標的抗体を含むサンプルによって凝集される。この形式において、成分のどれも標識される必要はなく、標的抗体の存在は単純な目視検査によって検出される。

本発明のゲルゾリン結合剤の同定および特性評価

#### 【0143】

本発明の結合剤の同定および/またはスクリーニングのための方法。ゲルゾリンポリペプチドに対する所望される特異性を有する結合剤（例えば、抗ゲルゾリン抗体および抗ゲルゾリン抗体関連ポリペプチド）の同定およびスクリーニングに有用な方法は、当技術分野内で公知の任意の免疫学仲介性技術を含む。免疫応答の成分は、当業者に周知の様々な方法によってインピットロで検出することができる。例えば、（1）細胞傷害性Tリンパ球を放射性標識された標的細胞と共にインキュベートし、これらの標的細胞の溶解物は放射能の放出によって検出することができる；（2）ヘルパーTリンパ球を抗原および抗原提示細胞と共にインキュベートし、サイトカインの合成および分泌は標準的方法によって測定することができる（Windhagen A; et al., Immunity, 2: 373-80, 1995）；（3）抗原提示細胞をタンパク質全体の抗原と共にインキュベートし、MHC上でのその抗原の提示はTリンパ球活性化分析または生物物理的方法のいずれかによって検出することができる（Harding et al., Proc. N

40

50

atl. Acad. Sci., 86:4230-4, 1989); (4) マスト細胞をこれらのFc 受容体を架橋する試薬と共にインキュベートし、ヒスタミン放出は酵素免疫分析によって測定することができる(Siraganian et al., TIPS, 4:432-437, 1983); および(5) 酵素結合免疫吸着分析(ELISA)。  
【0144】

同様に、モデル生物(例えばマウス)またはヒト被験体のいずれかにおける免疫応答の産物もまた、当業者に周知の様々な方法によって検出することができる。例えば、(1) ワクチン接種に応答した抗体の産生は、臨床検査室において現在使用される標準的方法(例えば、ELISA)によって容易に検出することができる;(2) 炎症の部位に対する免疫細胞の移動は、皮膚の表面を引っ掻き、滅菌済み容器を配置して掻傷部位の上の移動細胞を捕捉することによって検出することができる(Peters et al., Blood, 72:1310-5, 1988); (3) マイトジェンまたは混合リンパ球反応に応答した末梢血単核細胞の増殖は、<sup>3</sup>H-チミジンを使用して測定することができる;(4) PBMCにおける、顆粒球、マクロファージおよび他の食細胞の貪食能は、標識された粒子と共にウェル中にPBMCを配置することによって測定することができる(Peters et al., Blood, 72:1310-5, 1988); および(5) 免疫系細胞の分化は、CD4およびCD8などのCD分子への抗体によるPBMCの標識およびこれらのマーカーを発現するPBMCの画分の測定によって測定することができる。

10

【0145】

1つの実施形態において、本発明のゲルゾリン結合剤は、複製可能な遺伝子パッケージの表面上の候補結合剤のディスプレイを使用して選択される。例えば、米国特許第5,514,548号;第5,837,500号;第5,871,907号;第5,885,793号;第5,969,108号;第6,225,447号;第6,291,650号;第6,492,160号;EP585287;EP605522;EP616640;EP1024191;EP589877;EP774511;EP844306を参照。所望される特異性を備えた結合分子をコードするファージミドゲノムを含む系状バクテリオファージ粒子の産生/選択に有用な方法が記述されている。例えば、EP774511;US5871907;US5969108;US6225447;US6291650;US6492160を参照。

20

30

【0146】

1つの実施形態において、本発明のゲルゾリン結合剤は、酵母宿主細胞の表面上での候補結合剤のディスプレイを使用して選択される。酵母表面のディスプレイによるscFvポリペプチドの単離に有用な方法は、Kieck et al., Protein Eng. 1997 Nov; 10(11):1303-10によって記述されている。

【0147】

1つの実施形態において、本発明のゲルゾリン結合剤はリボソームディスプレイを使用して選択される。リボソームディスプレイを使用してペプチドライブラリー中のリガンドを同定するのに有用な方法は、Mattheakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022-26, 1994; およびHanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937-42, 1997によって記述された。

40

【0148】

1つの実施形態において、本発明のゲルゾリン結合剤は、候補結合剤のtRNAディスプレイを使用して選択される。tRNAディスプレイを使用するリガンドのインビトロの選択に有用な方法は、Merryman et al., Chem. Biol. 9:741-46, 2002によって記述されている。

【0149】

1つの実施形態において、本発明のゲルゾリン結合剤は、RNAディスプレイを使用して選択される。RNAディスプレイライブラリーを使用するペプチドおよびタンパク質の

50

選択ために有用な方法は、Roberts et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12297-302, 1997; および Nemoto et al., FEBS Lett., 414: 405-8, 1997 によって記述されている。天然に存在しない RNA ディスプレイライブラリーを使用するペプチドおよびタンパク質の選択のために有用な方法は、Frankel et al., Curr. Opin. Struct. Biol., 13: 506-12, 2003 によって記述されている。

#### 【0150】

1つの実施形態において、本発明のゲルゾリン結合剤はグラム陰性菌のペリプラスムにおいて発現され、標識されたゲルゾリンポリペプチドと混合される。WO 02/34886 を参照。ゲルゾリンポリペプチドへの親和性を備えた組換えポリペプチドを発現するクローンにおいて、Harvey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 22: 9193-98 2004 および米国特許第 2004/0058403 号中に記述されているように、結合剤に結合された標識ゲルゾリンポリペプチドの濃度は増加し、細胞がライブラリーの残りから単離されることを可能にする。

#### 【0151】

所望されるゲルゾリン結合剤の選択の後に、当業者に公知の任意の技術（例えば、原核細胞または真核細胞の発現および同種のもの）によって大量に産生させることができるかが検討される。例えば、抗ゲルゾリンのハイブリッド抗体または断片であるが、これらに限定されないゲルゾリン結合剤は、従来技術を使用して、起源種の抗体結合特異性の保有に必要とされる CDR および必要であるならば可変領域フレームワークの最小の部分（本明細書において記述される技術に従って操作されるように）が起源の種の抗体に由来し、抗体の残りの部分が本明細書において記述されるように操作できる標的種の免疫グロブリンに由来し、それによってハイブリッド抗体重鎖の発現のためのベクターを産生する、抗体重鎖をコードする発現ベクターを構築することによって産生される。

#### 【0152】

ゲルゾリン結合の測定。1つの実施形態において、ゲルゾリン結合分析は、ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドとゲルゾリン結合剤との間の結合、およびゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドとゲルゾリン結合剤との間の結合量の査定のために適切な条件下で、ゲルゾリンポリペプチドおよびゲルゾリン結合剤が混合される、分析形式を指す。結合の量は、適切な対照（ゲルゾリンポリペプチドの非存在下において結合する量、非特異的免疫グロブリン組成物の存在下における結合の量または両方でありえる）と比較される。結合の量は任意の適切な方法によって査定することができる。結合分析方法は、例えば、ELISA、放射免疫分析、シンチレーション近接分析、蛍光エネルギー移動分析、液体クロマトグラフィー、膜濾過分析、および同種のものを含む。ゲルゾリン結合剤に対するゲルゾリンポリペプチド結合の直接測定のための生物物理的分析は、例えば、核磁気共鳴、蛍光、蛍光偏光、表面プラズモン共鳴（BIACOR チップ）、および同種のものである。特異的結合は、当技術分野において公知の標準的分析（例えば、放射性リガンド結合分析、ELISA、FRET、免疫沈降、SPR、NMR（2D-NMR）、質量分析、および同種のもの）によって決定される。候補ゲルゾリン結合剤の特異的結合が候補ゲルゾリン結合剤の非存在下において観察された結合よりも少なくとも 1 パーセント高いならば、候補ゲルゾリン結合剤は本発明のゲルゾリン結合剤として有用である。

#### 【0153】

ゲルゾリンポリペプチドおよびゲルゾリン結合剤の共結晶も、分子間相互作用を決定する方法として本発明によって提供される。ゲルゾリン結合剤とゲルゾリンポリペプチドとの間の結合に適切な条件は、化合物およびそのリガンドに依存し、当業者によって容易に決定することができる。

本発明のゲルゾリン結合剤の使用

#### 【0154】

一般事項。本発明の結合剤は、ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチ

ドの局在および/または定量化に関する当技術分野において公知の方法で有用である（例えば、適切な生理学的なサンプル内のゲルゾリンポリペプチドレベルの測定における使用のための、診断法における使用のための、ポリペプチドの造影における使用のための、および同種のもの）。本発明の結合剤は、親和性クロマトグラフィーまたは免疫沈降などの標準的技術によってゲルゾリンポリペプチドを単離するのに有用である。本発明のゲルゾリン結合剤は、ホストシステムにおいて発現された組換え産生の免疫反応性のゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドに加えて、生物学的サンプル（例えば哺乳類の血清、または細胞）からの天然の免疫反応性のゲルゾリンポリペプチドの精製を促進することができる。さらに、ゲルゾリン結合剤を使用して、免疫反応性のポリペプチドの発現の存在量およびパターンを評価するために、免疫反応性のゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチド（例えば、血漿、細胞溶解物または細胞上清中の）を検出することができる。本発明のゲルゾリン結合剤を診断的に使用して、例えば、既定の治療レジメンの有効性を決定する臨床試験手順の一部として、組織中の免疫反応性のゲルゾリンおよび/またはゲルゾリン様ポリペプチドレベルをモニタリングすることができる。上述されるように、検出は、検出可能な物質に本発明のゲルゾリン結合剤をカップリングする（すなわち物理的に結合する）ことによって促進することができる。

10

20

30

40

50

**【0155】**

ゲルゾリンポリペプチドの検出。生物学的サンプル中のゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの存在または非存在を検出する例示的な方法は、被験者から生物学的サンプルを得ること、およびゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの存在が生物学的サンプル中に検出されるように、ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドを検出できる本発明のゲルゾリン結合剤と生物学的サンプルを接触させることを含む。ゲルゾリン結合剤の例は、配列番号：1またはそのホモログもしくは断片に対する抗体であり、ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドへの結合が可能であり、好ましくは検出可能な標識を備えた抗体である。結合剤に関して、用語「標識された」は、直接標識された別の化合物との反応による結合剤の間接標識に加えて、結合剤へ検出可能な物質をカップリングする（すなわち物理的に結合する）ことによる結合剤の直接標識を包含するように意図される。間接標識の例は、蛍光標識された二次抗体を使用して一次抗体を検出すること、および蛍光標識されたストレプトアビジンにより検出できるようにビオチンによりDNAプローブを末端標識することを含む。

**【0156】**

本発明の検出方法を使用して、インビボに加えてインビトロの生物学的サンプル中のゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドを検出することができる。ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの検出のためのインビトロの技術は、酵素結合免疫吸着分析（ELISA）、ウエスタンブロット、免疫沈降、放射免疫分析および免疫蛍光法を含む。さらに、ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの検出のためのインビボの技術は、被験体の中へ標識されたゲルゾリン結合剤（例えば抗ゲルゾリン抗体）を導入することを含む。例えば、抗体は、被験体中での存在および位置が標準的画像診断技術によって検出できる放射性のマーカールにより標識することができる。1つの実施形態において、生物学的サンプルは、被験者からのポリペプチド分子を含む。

**【0157】**

免疫分析および画像診断。本発明のゲルゾリン結合剤は、抗体ベースの技術を使用する生物学的サンプル（例えばヒト血漿）中のゲルゾリンポリペプチドレベルまたはゲルゾリン様ポリペプチドレベルの分析に使用することができる。例えば、組織中のタンパク質発現は、古典的な免疫組織学的方法により研究することができる。Jalkanen, M. et al., J. Cell. Biol. 101: 976 - 985, 1985; Jalkanen, M. et al., J. Cell. Biol. 105: 3087 - 3096, 1987。タンパク質遺伝子発現の検出に有用な他の抗体ベースの方法は、酵素結合免疫吸着分析（ELISA）および放射免疫分析（RIA）などの免疫分析を含む。適切な抗

体分析標識は当技術分野において公知であり、グルコースオキシダーゼなどの酵素標識、ならびにヨウ素 ( $^{125}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ )、炭素 ( $^{14}\text{C}$ )、硫黄 ( $^{35}\text{S}$ )、トリチウム ( $^3\text{H}$ )、インジウム ( $^{112}\text{In}$ ) およびテクネチウム ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) などの放射性同位元素または他の放射性薬剤、ならびにフルオレセインおよびローダミンなどの蛍光標識、ならびにビオチンを含む。

【0158】

生物学的サンプル中の分泌されたゲルゾリンポリペプチドレベルまたはゲルゾリン様ポリペプチドレベルの分析に加えて、分泌されたゲルゾリンポリペプチドレベルまたはゲルゾリン様ポリペプチドレベルを画像診断によってインビボでも検出することができる。ゲルゾリンポリペプチドレベルまたはゲルゾリン様ポリペプチドのインビボの画像診断のためのゲルゾリン結合剤（例えば抗ゲルゾリン抗体）標識またはマーカーは、X線検査、NMRまたはESRによって検出可能なものを含む。X線検査のために適切な標識は、バリウムまたはセシウムなどの放射性同位元素を含み、検出可能な放射線を放射するが、被験体にとって明らかに有害ではない。NMRおよびESRに適切なマーカーは、検出可能な特有のスピン（重水素などの）によるものを含み、それは適切なscFvクローンに対する栄養素の標識によってゲルゾリン結合剤の中へ取り込むことができる。

10

【0159】

放射性同位元素（例えば、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、放射線不透過性物質、または核磁気共鳴により検出可能な物質などの適切な検出可能な造影部分により標識されたゲルゾリン結合剤は、被験体の中へ導入される（例えば、非経口的、皮下、または腹腔内）。被験体のサイズおよび使用される画像診断システムが、診断的画像の産生に必要とされる造影部分の量を決定するであろうことは当技術分野において理解されるだろう。放射性同位元素部分の場合において、ヒト被験体については、注射される放射線の量は通常は約5~20ミリキュリーにわたる $^{99\text{m}}\text{Tc}$ であろう。次に標識ゲルゾリン結合剤は、特異的標識ポリペプチドを含む細胞の位置に優先的に蓄積するだろう。例えば、インビボの腫瘍画像診断は、S. W. Burchiel et al., Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer 13 (1982) 中に記述される。

20

【0160】

したがって、本発明は、(a) 個体の細胞または体液中の本発明のゲルゾリン結合剤の結合を測定することによってポリペプチドの発現を分析することと；(b) 標準的レベルと比較した分析ポリペプチドの増加または減少が医学的状态を表す場合に、タンパク質の量を標準と比較することを含む医学的状态の診断法を提供する。

30

【0161】

親和性精製。本発明のゲルゾリン結合剤を使用して、サンプルからの免疫反応性のゲルゾリン（例えば、ネイティブ血漿ゲルゾリン）を精製することができる。いくつかの実施形態において、抗体（例えばGN3E9、GC1C10、および/またはGF2D6）は固体支持体上に固定化することができる。かかる固体支持体の例は、ポリカーボネートなどのプラスチック、アガロースおよびセファロースなどの複合炭水化物、ポリアクリルアミドなどのアクリル樹脂、ならびにラテックスビーズを含む。かかる固体支持体に抗体をカップリングするための技術は当技術分野において周知である(Weir et al., 「Handbook of Experimental Immunology」第4版、ブラックウェル・サイエンティフィック・パブリケーション(Blackwell Scientific Publications)、オックスフォード、イギリス、10章(1986)；Jacoby et al., Meth. Enzym. 34、アカデミックプレス、ニューヨーク(1974))。

40

【0162】

抗原を抗体支持マトリックスに結合させる最も単純な方法は、カラム中にビーズを回収して、抗原溶液をカラムを通して通過させることである。この方法の効率は、固定化抗体と抗原との間の接触時間に依存し、それは低流速の使用によって延長することができる。

50

抗原が通りすぎて流れるとき、固定化抗体は抗原を捕捉する。あるいは、抗原は、抗原溶液を支持体（例えばビーズ）と混合し、スラリーを回転または振動させることによって、抗体支持マトリックスと接触させることができ、抗原と固定化抗体との間の最大の接触が可能になる。結合反応が完了した後に、スラリーはビーズの回収のためのカラムの中へ通過される。ビーズは適切な洗浄緩衝液を使用して洗浄され、次に純粋または実質的に純粋な抗原が溶出される。

**【0163】**

対象となる抗体またはポリペプチドは、ビーズなどの固体支持体にコンジュゲートすることができる。さらに、ビーズなどの第1の固体支持体は、所望されるならば、ポリペプチドの支持体へのコンジュゲーションのために本明細書において開示されたものを含む、任意の適切な手段によって、第2のビーズまたは他の支持体でありえる第2の固体支持体にコンジュゲートすることもできる。したがって、固体支持体へのポリペプチドのコンジュゲーションを参照して本明細書において開示された任意のコンジュゲーションの方法および手段は、第1の支持体のコンジュゲーションを第2の支持体に適用することができ、第1の固体支持体および第2の固体支持体は同じまたは異なることがありえる。

10

**【0164】**

固体支持体へのポリペプチドのコンジュゲートのための使用に適切なリンカー（それは架橋剤でありえる）は、支持体の表面上に存在する官能基と、またはポリペプチドと、または両方と反応することができる様々な薬剤を含む。架橋剤として有用な試薬は、ホモ二官能性試薬および特にヘテロ二官能性試薬を含む。有用な二官能性架橋剤は、N-SIAB、ジマレイミド、DTNB、N-SATA、N-SPDP、SMCCおよび6-HYNICを含むが、これらに限定されない。架橋剤を選択して、ポリペプチドと固体支持体との間に選択的に切断可能な結合を提供することができる。例えば、3-アミノ-(2-ニトロフェニル)プロピオン酸などの感光性架橋剤は、固体支持体からのポリペプチドの切断のための手段として利用することができる(Brown et al., Mol. Divers, pp, 4-12 (1995); Rothschild et al., Nuc l. Acids Res. 24:351-66 (1996); および米国特許第5,643,722号)。他の架橋試薬は当技術分野において周知である(例えば、Wong (1991)、前出; および Hermanson (1996)、前出を参照)。

20

**【0165】**

抗体またはポリペプチドは、カルボキシル基官能化ビーズとポリペプチドのアミノ末端との間に形成された共有結合性アミド結合、または反対にアミノ基官能化ビーズとポリペプチドのカルボキシル末端との間に形成された共有結合性アミド結合を介して、ビーズなどの固体支持体上に固定化することができる。さらに、二官能性トリチルリンカーは、アミノ樹脂による樹脂上のアミノ基またはカルボキシル基を介して、支持体に(例えば、ワング樹脂などの樹脂上の4-ニトロフェニル活性エステルに)結合することができる。二官能性トリチルアプローチを使用して、固体支持体は、ポリペプチドの切断および除去を保証するために、ギ酸またはトリフルオロ酢酸などの揮発性酸による処理を必要とする。かかる場合において、ポリペプチドは、固体支持体のウェルの底で、または固体支持体の平坦表面上で、ビーズがないパッチとして沈着することができる。マトリックス溶液の追加後に、ポリペプチドはMSの中へ脱着される。

30

40

**【0166】**

揮発性酸または適切なマトリックス溶液(例えば、3-HPAを含むマトリックス溶液)の使用によって、疎水性トリチルリンカーを酸不安定リンカーとして利用して、ポリペプチドからアミノ結合トリチル基を切断することもできる。酸不安定性は変化させることもできる。例えば、トリチル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチルまたはトリメトキシトリチルは、ポリペプチドの適切なパラ置換のまたはより酸不安定なトリチルアミン誘導体に変化させることができ、すなわち、トリチルエーテル結合およびトリチルアミン結合はポリペプチドに作製することができる。したがって、ポリペプチドは、例えば、疎水性引力の破壊によって、または酸性条件下(所望されるならば、3-HPAなどのマ

50

トリックスが酸として働く典型的なMSの条件下を含む)で、トリチルエーテル結合またはトリチルアミン結合の切断によって、疎水性リンカーから除去することができる。

【0167】

直交切断可能リンカーは、また第1の固体支持体(例えばビーズ)を第2の固体支持体に結合することに、または固体支持体に対象となるポリペプチドを結合することに有用になりえる。かかるリンカーを使用すると、第1の固体支持体(例えばビーズ)は支持体からポリペプチドを切断せずに、第2の固体支持体から選択的に切断することができ、次にポリペプチドは後にビーズから切断することができる。例えば、ジスルフィドリンカー(DTTなどの還元剤を使用して切断することができる)を利用してビーズを第2の固体支持体に結合することができ、酸切断可能二官能性トリチル基を使用して支持体にポリペプチドを固定化することができる。所望されるように、固体支持体へのポリペプチドの結合は、例えば、第1の支持体と第2の支持体との間の結合はインタクトなままで、最初に切断することができる。トリチルリンカーは共有結合性コンジュゲーションまたは疎水性コンジュゲーションを提供することができ、コンジュゲーションの性質に関係なく、トリチル基は酸性条件で容易に切断される。

10

【0168】

例えば、ビーズは、固体支持体へのビーズの高密度結合、またはビーズへのポリペプチドの高密度結合が促進されるような長さおよび化学的性質を有するように選択できる結合基を介して、第2の支持体に結合することができる。かかる結合基は、例えば「樹状の」構造を有することができ、それによって、固体支持体上で1つの結合部位あたり多重性の官能基を提供する。かかる結合基の例は、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ペンタ-エリスロールおよびトリス-ヒドロキシ-アミノメタンを含む。

20

【0169】

非共有結合的会合。非共有相互作用を介して、抗体またはポリペプチドは固体支持体にコンジュゲートすることができるか、または第1の固体支持体もまた第2の固体支持体にコンジュゲートすることができる。例えば、強磁性材で作製された磁性ビーズ(磁化することができる)は、磁性固体支持体に引きつけることができ、磁場の除去によって支持体から遊離することができる。あるいは、固体支持体は、イオン部分または疎水性部分(それぞれ、イオン部分または疎水性部分の相互作用を可能にできる)と共に、ポリペプチド(例えば、結合されたトリチル基を含むポリペプチド)と共に、または疎水性性質を有する第2の固体支持体と共に提供することができる。

30

【0170】

固体支持体は特異的結合ペアのメンバーで提供することができ、したがって相補的な結合部分を含むポリペプチドまたは第2の固体支持体にコンジュゲートすることができる。例えば、アビジンもしくはストレプトアビジンによりコートされたビーズは、ビオチン部分を組み入れたポリペプチドに、またはビオチンもしくはイミノ-ビオチンなどのビオチンの誘導體によりコートされた第2の固体支持体に結合することができる。

【0171】

本明細書において開示された、またはそうでなければ当技術分野において公知の任意の結合メンバーは、反対にできることが認識されるべきである。したがって、例えば、ビオチンはポリペプチドまたは固体支持体のいずれかの中へ組み入れることができ、反対に、アビジンまたは他のビオチン結合部分はそれぞれ支持体またはポリペプチドの中へ組み入れられるだろう。使用のために本明細書において検討される他の特異的結合ペアは、ホルモンおよびそれらの受容体、酵素およびそれらの基質、ヌクレオチド配列およびその相補的な配列、抗体、およびそれが特異的に相互作用する抗原、ならびに当業者に公知の他のかかるペアを含むが、これらに限定されない。

40

ゲルゾリン結合剤の診断用使用

【0172】

一般事項。本発明のゲルゾリン結合組成物は診断法に有用である。それゆえ、本発明は、被験体におけるゲルゾリン関連の医学的状態の診断において有用な本発明の結合剤を使

50

用する方法を提供する。本発明の結合剤がゲルゾリンポリペプチドに対して任意のレベルのエピトープ結合特異性および非常に高い結合親和性を有するように、本発明の結合剤を選択することができる。一般に、結合剤の結合親和性が高ければ高いほど、よりストリンジентな洗浄条件を免疫分析において実行して、標的ポリペプチドを除去せずに、非特異的に結合した物質を除去することができる。したがって、診断アッセイにおいて有用な本発明のゲルゾリン結合剤は、通常、少なくとも $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ または $10^{12} M^{-1}$ の結合親和性を有する。さらに、少なくとも12時間、好ましくは少なくとも5時間、およびより好ましくは少なくとも1時間で、標準条件下で平衡を達成するように、診断試薬として使用されるゲルゾリン結合剤が十分な反応速度結合率を有することは望ましい。

10

**【0173】**

本発明のいくつかの方法は、診断試薬として本発明の抗ゲルゾリン抗体および抗ゲルゾリン抗体組成物のポリクローナル調製物を利用し、他の方法はモノクローナル単離物を利用する。ポリクローナル混合物の使用は、1つのモノクローナル抗ゲルゾリン抗体で作製した組成物と比較して、多数の長所を有する。ゲルゾリンポリペプチド上の複数の部位にポリクローナル抗ゲルゾリン抗体または他のポリペプチドが結合することによって、ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチド上の単一部位に結合するモノクローナルよりも強いシグナル（診断のための）を生成することができる。さらに、ポリクローナル調製物は、原型の標的配列の多数の変異型（例えば対立遺伝子変異型、種変異型、系統変異型、薬物に誘導されたエスケープ変異型）に結合することができるが、モノクローナル抗体は、原型の配列またはそれに対する変異型のより狭い範囲にのみ結合することができる。しかしながら、モノクローナル抗ゲルゾリン抗体は、密接に関連する抗原の存在下または可能性のある存在下における単一抗原の検出に有利である。

20

**【0174】**

上述された方法に従って調製されたポリクローナルヒト抗ゲルゾリン抗体を利用する方法において、調製物は、典型的には標的ポリペプチドに対する異なるエピトープ特異性を備えたゲルゾリン結合剤（例えば抗体）の組合せを含む。モノクローナル抗体を利用するいくつかの方法において、異なるエピトープ結合特異性の2つの抗体を有することが望ましい。エピトープ結合特異性の差は競合結合分析によって決定することができる。

30

**【0175】**

ヒト抗体のゲルゾリン結合剤を診断試薬として任意の種類のサンプルに使用することができるが、それらはヒトの生物学的サンプルのための診断試薬として最も有用である。ゲルゾリン結合剤を使用して、様々な標準的分析形式における既定のゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドを検出することができる。かかる形式は、免疫沈降、ウェスタンブロッティング、ELISA、放射免疫分析、および免疫測定分析を含む。Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (コールドスプリングハーバー・パブリケーション、ニューヨーク、1988)；米国特許第3,791,932号；第3,839,153号；第3,850,752号；第3,879,262号；第4,034,074号、第3,791,932号；第3,817,837号；第3,839,153号；第3,850,752号；第3,850,578号；第3,853,987号；第3,867,517号；第3,879,262号；第3,901,654号；第3,935,074号；第3,984,533号；第3,996,345号；第4,034,074号；および第4,098,876号を参照。生物学的サンプルは、被験体の任意の組織または体液から得ることができる。

40

**【0176】**

免疫測定分析またはサンドイッチ分析は、本発明の診断法のための好ましい形式である。米国特許第4,376,110号、第4,486,530号、第5,914,241号および第5,965,375号を参照。かかる分析は、固相へ固定化された1つのゲルゾリン結合剤（例えば、抗ゲルゾリン抗体または抗ゲルゾリン抗体の集団）、および溶液中の別の抗ゲルゾリン抗体または抗ゲルゾリン抗体の集団を使用する。典型的には、溶液の

50

抗ゲルゾリン抗体または抗ゲルゾリン抗体の集団は標識されている。抗体集団が使用されるならば、集団は標的ポリペプチド内の異なるエピトープ特異性への抗体結合を含むことができる。したがって、同じ集団は固相抗体および溶液抗体の両方に使用することができる。抗ゲルゾリンモノクローナル抗体が使用されるならば、異なる結合特異性を有する第1のゲルゾリンモノクローナル抗体および第2のゲルゾリンモノクローナル抗体は、固相および溶液相に使用される。固相（「捕捉」とも呼ばれる）抗体および溶液（「検出」とも呼ばれる）抗体は、順番にまたは同時にのどちらかで、標的抗原と接触させることができる。固相抗体が最初に接触されるならば、分析は前進分析であると呼ばれる。反対に、溶液抗体が最初に接触させられるならば、分析は後退分析であると呼ばれる。標的が両方の抗体と同時に接触されるならば、分析は同時分析と呼ばれる。抗ゲルゾリン抗体とゲルゾリンポリペプチドを接触させた後に、サンプルを、期間（通常約10分～約24時間で変化し、通常約1時間である）の間インキュベートする。次に洗浄工程を実行して診断試薬として使用される抗ゲルゾリン抗体に特異的に結合されないサンプルの成分を除去する。固相抗体および溶液抗体が分離した工程で結合される場合、洗浄はいずれかの結合工程または両方の結合工程の後に実行することができる。洗浄後に、結合は、典型的には、標識溶液抗体の結合を介して固相に結合された標識の検出によって定量される。通常、既定の1対の抗体または抗体の集団および既定の反応条件について、検量曲線が標的抗原の既知の濃度を含むサンプルから調製される。次に検査されるサンプル中のゲルゾリンポリペプチドの濃度は、補間によって検量曲線から読み取られる。被検体は、平衡時に結合された標識溶液抗体の量から、または平衡が達成される前に一連のタイムポイントで結合された標識溶液抗体の反応速度測定によってのいずれかで、測定することができる。かかる曲線の勾配は、サンプル中のゲルゾリンポリペプチドの濃度の測定値である。

10

20

30

40

50

**【0177】**

上記の方法で使用される適切な支持体は、例えばニトロセルロース膜、ナイロン膜および誘導体化ナイロン膜、またアガロースなどの粒子、デキストランベースのゲル、ディップスティック、微粒子、ミクロスフェア、磁性粒子、試験管、マイクロタイターウェル、セファデックス（商標）（アマシャム・ファルマシア・バイオテク（Amersham Pharmacia Biotech）社、ピスカタウェイ、ニュージャージー）、ならびに同種のものを含む。固定化は、吸収によるかまたは共有結合によることができる。任意で、抗ゲルゾリン抗体は、表面に結合されたアビジンなどのリンカーへの結合のために、ビオチンなどのリンカー分子に連結することができる。

**【0178】**

本発明は、個体がゲルゾリンポリペプチドの発現または活性に関連する障害を発症するリスクがあるかどうかの決定のための予後の（または予測の）分析もまた提供する。かかる分析を予後または予測の目的に使用し、それによってゲルゾリンポリペプチドによって特徴づけられる障害またはゲルゾリンポリペプチドに関連する障害の発病の前に個体を予防的に治療することができる。さらに、本発明の方法を使用して、本発明のゲルゾリン結合剤が多型形態のゲルゾリンポリペプチドに対するより高い親和性を有する（または逆の）例において、個体がゲルゾリンポリペプチドまたは多型形態のゲルゾリンポリペプチドを発現するかどうかを査定することもまたできる。

**【0179】**

被験体に投与された場合、被験体の特定の組織中の（または血液中の）特定のポリペプチドのレベルは、毒性、有効性、クリアランス率または規定の薬物の代謝率を表わすことができる。本明細書において記述された方法を、被験体におけるかかるポリペプチド（例えばゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチド）のレベルの決定に使用して、これらの薬物に対するかかる被験体の応答の予測を支援することもできる。本発明の別の態様は、個体におけるゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの発現を決定し、それによってその個体に適切な療法的化合物または予防的化合物を選択するための方法を提供する。

**【0180】**

ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドへの本発明のゲルゾリン結合剤の結合を利用して、例えば、ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの発現または活性に関連する障害を有するかまたは発症のリスクがある被験体を同定することができる。あるいは、予後の分析は疾患または障害を有するかまたは発症のリスクがある被験体を同定に利用することができる。したがって、本発明は、被験体から試験サンプルを得てゲルゾリンペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドを検出し、ゲルゾリンペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの変化の存在が、異常なゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの発現または活性に関連する疾患または状態を有するかまたは発症のリスクがある被験体のための診断である、異常なゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの発現または活性に関連する疾患または状態を同定する方法を提供する。 10

【0181】

さらに、本明細書において記述される予後の分析を使用して、被験体が化合物（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、ポリペプチド、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補）を投与できるかどうかを決定し、異常なゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの発現または活性に関連する疾患または障害を治療することができる。例えば、かかる方法を使用して、ゲルゾリンポリペプチドレベルに影響を与える化合物（例えば、化学療法剤）により被験体が効果的に治療できるかどうかを決定することができる。したがって、本発明は、異常なゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの発現または活性に関連する障害または状態について化合物により被験体が効果的に治療できるかどうかを決定し、ゲルゾリン結合剤を使用して試験サンプルを得てゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドを検出する方法を提供する。（例えば、ここで、ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの存在または非存在は、異常なゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの発現または活性に関連する障害を治療する化合物を投与できる被験体についての診断である） 20

【0182】

被験体から得られた血液または組織のサンプル中のゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドのレベルは決定され、疾患のない個体から得られた血液サンプルまたは同じ組織タイプからのサンプルにおいて見出されるレベルと比較される。健康な被験者から得られたサンプルと比較して、ゲルゾリンレベルに影響を与える疾患または状態を有する疑いのある被験体から得られたサンプル中のゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの不十分な量（または過剰量）は、検査されている被験体におけるゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドに関連する疾患または状態を表す。さらなる検査は確定診断を行なうために必要とされうる。 30

【0183】

特定のゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチド分子の不十分な量（または過剰量）の程度が、疾患に罹患する被験体が特定のタイプの療法または治療に応答しどうかどうかを表すことが公知である、多数の疾患がある。したがって、サンプル中のゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドを検出する方法を、予後予測の方法として使用し、例えば、被験体が療法または治療に応答する可能性を評価することができる。被験体からの適切な組織または血液のサンプル中の関係のある予後のポリペプチドのレベルは決定され、適切な対照（例えば、同じ疾患に罹患するが治療に順調に反応する被験体におけるレベル）と比較される。対照と比較して、予後のポリペプチドがサンプルにおいて低発現される程度は、被験体が治療または療法に順調に反応しない（例えば、化学療法による治療に耐容性がある）可能性の予測でありえる。対照に比べて過剰発現（または低発現）が大きいほど、被験体は治療に反応しない可能性が高い。血漿ゲルゾリンレベルが対照被験体と比較して低下した状態の例は、敗血症性ショック、多臓器機能障害症候群、関節リウマチ、外傷、脳卒中、心筋梗塞、癌、化学療法および放射線療法、全身性自己免疫性疾患、ならびに慢性肝炎を含むが、これらに限定されない。 40

## 【0184】

本明細書において記述される方法は、例えば、臨床設定において便利に使用することができる、例えば、少なくとも1つのプローブ試薬（例えば、本明細書において記述されるゲルゾリン結合剤）を含む、プレパッケージされた診断キットの利用によって実行して、ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドに關与する疾患または疾病の症状または家族歴を示す被験体を診断することができる。さらに、ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドが発現される任意の細胞タイプまたは組織は、本明細書において記述される予後の分析において利用することができる。

## 【0185】

標準対照集団への被験体の相関関係。治療への臨床応答と特定のレベルの血漿ゲルゾリンとの間の相関関係を推定するために、治療を受けた個体の集団（すなわち臨床的集団）によって示された臨床応答に関するデータを得ることが必要である。この臨床データは、1つまたは複数の臨床試験の結果の後ろ向き解析によって得ることができる。あるいは、臨床データは1つまたは複数の新しい臨床試験のデザインおよび実行によって得ることができる。臨床的集団データの解析は標準対照集団を定義するのに有用であり、今度は、それは臨床試験登録のため、または療法的な治療の選択のために被験体を分類するのに有用である。好ましい実施形態において、臨床的集団中に含まれる被験体は、対象となる医学的状态の存在について類別される。可能性のある被験体の類別は、例えば、標準的健康診断または1つもしくは複数の臨床検査を含むことができる。あるいは、被験体の類別は、遺伝子発現パターンの使用を含むことができる。例えば、発現パターンと疾患または状態に対する罹病性または重症度との間で強い相関関係がある場合、血漿ゲルゾリンレベルは類別基準として有用である。1つの実施形態において、被験体は、被験体における1つまたは複数のバイオマーカーの測定レベルと標準対照集団において観察される1つまたは複数のバイオマーカーのレベルとの間の類似性に基づいて、特定の群またはクラスに分類または割り当てられる。

## 【0186】

本発明の1つの実施形態において、対象となる療法的な治療は試験集団中の各被験体に投与され、各被験体の治療への応答は1つまたは複数の所定の基準を使用して測定される。多くの事例において、試験集団は広範囲にわたる応答を示し、研究者は、様々な応答によって構成された多数の応答者群（例えば、低、中、高）を選択するだろうことが予測される。さらに、バイオマーカー（例えば血漿ゲルゾリン）の発現レベルは定量され、それは治療の投与前および/または治療の後に行うことができる。次にこれらの結果を解析して、群間の臨床応答における任意の観察された変異が統計的に有意かどうかを決定する。使用することができる統計分析方法は、L. D. Fisher & G. van Belle、*Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences*（ワイリー・インターサイエンス（Wiley-Interscience）社、ニューヨーク、1993）中で記述される。

## 【0187】

当業者は、上述された分析から発現レベルの関数として臨床応答を予測する数理モデルを構築することができる。臨床応答とバイオマーカーの発現レベルとの間の関連性の同定は、治療に応答するもしくはしない個体、またはあるいは、より低レベルで応答し、したがってより多くの治療（すなわちより多量の薬物）を必要としうる個体を決定する診断方法をデザインする根拠でありえる。診断方法は、いくつかの形態（例えば、ELISAもしくは抗体ベースの検査、血清検査、または健康診断測定）のうちの1つを採用することができる。唯一の必要条件は、診断検査結果と根底にある状態との間に十分な相関関係があるということである。好ましい実施形態において、この診断法は、上述される血清ゲルゾリンについて抗体分析を使用する。

## 【0188】

予測医学。本発明は、診断分析、予後分析および臨床試験モニタリングが被験体を予防的に治療する予後（予測）目的に使用される、予測医学の分野にもまた關する。したがっ

10

20

30

40

50

て、本発明の1つの態様は、生物学的サンプル（例えば血液、血清、細胞、組織）のコンテキスト中の血漿ゲルゾリンレベルを決定して、それによって個体が異常な血漿ゲルゾリンレベルに関連する疾患または障害に罹患するかどうか、または障害を発症するリスクがあるかどうかを決定するための診断分析に関する。

【0189】

予後分析。バイオマーカー分子（例えばバイオマーカーポリペプチドまたはバイオマーカーポリペプチドをコードする核酸）への予後化合物の結合を利用して、バイオマーカーポリペプチド発現または活性に関連する障害（上述される）を有するかまたはそれらが発症するリスクがある被験体を同定することができる。予後化合物は、例えば、抗バイオマーカーポリペプチド抗体、低分子、核酸、ポリペプチド、オリゴ糖、脂質、またはその組合せを含むが、これらに限定されない、バイオマーカー分子と結合または会合する任意の化合物である。あるいは、予後分析を利用して、疾患または障害を有するかまたはそれらが発症のリスクがある被験体を同定することができる。したがって、本発明は、バイオマーカー発現または活性に関連する疾患または障害を同定する方法であって、試験サンプルを被験体から得て予後化合物の結合または活性を検出して、予後化合物の結合または活性の変化の存在が、バイオマーカーの発現または活性に関連する疾患または障害を有するかまたはそれらが発症するリスクがある被験体についての診断である方法を提供する。本明細書において使用される時、「試験サンプル」は、対象となる被験体から得られた生物学的サンプルを指す。例えば、試験サンプルは、生物学的液体（例えば血清）、細胞サンプルもしくは組織、またはそれらに由来する単離された核酸もしくはポリペプチドでありえる。

10

20

【0190】

さらに、本明細書において記述される予後の分析を使用して、被験体に化合物（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、ポリペプチド、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補）を投与できるかどうかを決定し、バイオマーカーに関連する疾患または障害を治療することができる。本明細書において使用される時、被験体または患者への化合物の投与は自己投与および他の人による投与を含む。1つの実施形態において、本明細書において記述された予後分析を使用して、被験体が化合物に応答性かどうかを決定する。例えば、かかる方法を使用して、バイオマーカーに関連する障害（すなわちバイオマーカーに関連する医学的状態）のための療法的化合物により被験体を効果的に治療することができるかどうかを決定できる。したがって、本発明は、試験サンプルを得て、予後化合物を使用してバイオマーカー分子を検出し、バイオマーカーの発現または活性に関連する障害のための化合物により被験体が効果的に治療することができるかどうかを決定する方法を提供する（例えば、参照におけるバイオマーカーの発現のレベルと比較したバイオマーカー分子の存在または発現のレベルの変化が、バイオマーカーに関連する障害を治療する化合物を投与できる被験体についての診断である）。

30

【0191】

1つの実施形態において、第1の被験体から得られた血液サンプルまたは組織サンプルにおけるバイオマーカー分子のレベルは決定され、バイオマーカーに関連する疾患のない第2の被験体から得られた血液サンプルまたは同じ組織タイプからのサンプルにおいて見出されたレベルと比較される。健康な（第2の）被験体から得られたサンプルと比較して、バイオマーカーに関連する疾患を有する疑いのある第1の被験体から得られたサンプルにおけるバイオマーカー分子の過剰量（または不十分な量）は、検査されている被験体におけるバイオマーカーに関連する疾患を表す。さらなる検査は確定診断を行なうために必要とされうる。

40

【0192】

1つの実施形態において、第1のタイムポイントで被験体から得られた血液または組織のサンプルにおけるバイオマーカー分子（例えば、血清ゲルゾリン）のレベルは決定され、後のタイムポイントで被験体から得られた血液サンプルまたは同じ組織タイプからのサンプルにおいて見出されたレベルと比較される。第1のタイムポイントで被験体から得ら

50

れたサンプルにおけるバイオマーカー分子の過剰量（または不十分な量）は、第2のタイムポイントで被験体から得られたサンプルと比較することができ、第2のタイムポイントでのバイオマーカーレベルと比較して第1のタイムポイントとの間のバイオマーカーレベルの減少（不十分な量）は、ゲルゾリン補充療法を必要とする被験体を表す。さらなる検査は確定診断を行なうために必要とされうる。

#### 【0193】

特定のバイオマーカー分子の過剰発現（または低発現）の程度が、疾患に罹患する被験体が特定のタイプの療法または治療に応答しそうかどうかを表すことが公知である、多数の疾患がある。したがって、サンプル中のバイオマーカー分子を検出する方法を、予後予測の方法として使用し、例えば、被験体が療法または治療に応答する可能性を評価することができる。したがって別の実施形態において、第1の被験体から得られた血液サンプルまたは組織サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカー分子のレベルが決定され、化合物（例えば対象となる療法的化合物）に応答性の第2の被験体または標準対照集団から得られた血液サンプルまたは同じ組織タイプからのサンプルにおいて見出される少なくとも1つのバイオマーカー分子のレベルと比較される。第2の被験体または標準対照集団から得られた血液サンプルまたは同じ組織タイプからのサンプルにおいて見出された少なくとも1つのバイオマーカー分子のレベルと比較して、第1の被験体から得られた血液サンプルまたは組織サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカー分子の発現のレベルまたはパターンにおける類似性は、第1の被験体が化合物（例えば対象となる療法的化合物）に応答性であることを示す。すなわち、被験体からの適切な組織または生物学的サンプルにおける適切なバイオマーカーのレベルは決定され、適切な対照（例えば、同じ疾患に罹患するが治療に順調に応答する被験体のレベル）と比較される。対照と比較して、バイオマーカーがサンプルにおいて過剰発現される（または低発現される）程度は、被験体が治療または療法に順調に応答しない（例えば、化学療法に耐容性がある）可能性の予測でありえる。対照に比べて過剰発現（または低発現）が大きいほど、被験体は治療に応答しない可能性が高い。

10

20

#### 【0194】

特定のバイオマーカー分子の過剰発現（または低発現）の程度（すなわち、バイオマーカーに関連する疾患または医学的状态）が、被験体が疾患を発症するかどうかを表すことが公知である、多数の疾患がある。したがって、サンプルにおけるバイオマーカーを検出する方法は、被験体が疾患を発症するかどうかを予測する方法として使用することができる。疾患を発症するリスクがある被験体からの適切な組織サンプルまたは血液サンプルにおける1つまたは複数のバイオマーカーのレベルは決定され、適切な対照（例えば、その疾患を発症するリスクがない被験体におけるレベル）と比較される。対照と比較した、1つのまたは複数のバイオマーカーがサンプルにおいて過剰発現される（または低発現される）程度は、被験体はその疾患を発症する可能性の予測でありえる。対照に比べて過剰発現（または低発現）が大きいほど、被験体は疾患を発症する可能性が高い。

30

#### 【0195】

本明細書において記述される方法は、少なくとも1つのプローブ試薬（例えば本明細書において記述される抗ゲルゾリンのポリペプチド抗体）を含む、プレパッケージされた診断キットの利用によって、例えば実行することができ、例えば、それを臨床設定において都合よく使用して本発明のバイオマーカーに関連する疾患または疾病の症状または家族歴を示す患者を診断することができる。さらに、本発明のバイオマーカーが発現される任意の細胞タイプまたは組織を、本明細書において記述される予後予測の分析において利用することができる。

40

#### 【0196】

臨床的有効性のモニタリング。1つの実施形態において、本発明はゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの発現に対する薬剤（例えば薬物、化合物、または低分子）の影響のモニタリングを提供する。かかる分析は、基本的な薬物スクリーニングおよび臨床試験において適用することができる。例えば、ゲルゾリンポリペプチドレベル

50

またはゲルゾリン様ポリペプチドレベルを増加（または減少）させる薬剤の有効度は、ゲルゾリンの発現の低下を示す被験体の臨床試験においてモニタリングすることができる。ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの発現に影響を与える薬剤は、薬剤の投与および応答の観察によって同定することができる。このように、ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの発現パターンは、マーカー（薬剤への被験体の生理反応を表す）として働くことができる。したがって、この応答状態は、薬剤による個体の治療の前に、およびその間の様々なポイントで決定することができる。

**【0197】**

被験体分類。ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの標準対照レベルは異なる対照群におけるレベルを測定することによって決定される。次に対照レベルは、既定の被験体におけるゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの測定されたレベルと比較される。被験体はどの程度同様に基づいて特定の群に分類または割り当てることができる、測定されたレベルは既定の群についての対照レベルと比較された。

10

**【0198】**

当業者に理解されるように、この決定に關与する特定の不確実性があるだろう。したがって、対照群レベルの標準偏差は確率的決定を行なうために使用することができ、本発明の方法は、広範囲の確率ベースの遺伝子型群決定にわたり適用可能である。したがって、例えばおよび限定するのではなく、1つの実施形態において、ゲルゾリンポリペプチドの測定されたレベルが対照群のいずれかの平均の2.5標準偏差以内にあるならば、その個体はその群に割り当てることができる。別の実施形態において、ゲルゾリンポリペプチドの測定されたレベルが対照群のいずれかの平均の2.0標準偏差以内にあるならば、その個体はその群に割り当てることができる。なお別の実施形態において、遺伝子発現産物の測定されたレベルが対照群のいずれかの平均の1.5標準偏差以内にあるならば、その個体はその群に割り当てることができる。さらに別の実施形態において、遺伝子発現産物の測定されたレベルが対照群レベルのいずれかの平均の1.0以下の標準偏差であるならば、その個体はその群に割り当てることができる。

20

**【0199】**

したがってこのプロセスは、確率の様々な程度で、特異的被験体が配置されるべき群の決定を可能にし、次にかかる割り当ては個体が配置されるべきリスクカテゴリーを決定するだろう。

30

キット

**【0200】**

本発明のゲルゾリン結合剤組成物（例えば、モノクローナル抗体）および使用説明書を含むキットもまた、本発明の範囲内にある。キットは、例えば任意の体液、例えば血清、血漿、リンパ、囊胞液、尿、便、脳脊髄液、腹水または血液を含み、体組織の生検標本を含むが、これらに限定されない、生物学的サンプル中のゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの存在の検出に有用である。例えば、キットは、生物学的サンプル中のゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドを結合することができる1つまたは複数のゲルゾリン結合剤（例えば、CGMCCアクセッション番号2114、2115、および2116からなる群から選択される寄託細胞株によって産生された抗体と同じ抗原結合特異性を有する抗体またはその抗原結合断片）と；サンプル中のゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの量の決定のための手段と；サンプル中のゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドの量を標準と比較するための手段とを含むことができる。1つまたは複数のゲルゾリン結合剤は標識することができる。キット成分（例えば試薬）は、適切な容器中にパッケージングすることができる。キットは、ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチドを検出するキットを使用するための説明書をさらに含むことができる。

40

**【0201】**

抗体ベースのキットについては、キットは、例えば、1) マーカーまたは本発明に対応するポリペプチドに結合する、第1の抗体（例えば、固体支持体に結合された）と；任意

50

で；2)ポリペプチドまたは第1の抗体のいずれかに結合し、検出可能な標識にコンジュゲートされた、第2の異なる抗体とを含むことができる。

#### 【0202】

キットは、例えば、緩衝剤、防腐剤またはタンパク質安定化剤もまた含むことができる。キットは、検出可能な標識を検出するために必要な成分（例えば、酵素または基質）をさらに含むことができる。キットは対照サンプルまたは一連の対照サンプルもまた含むことができ、それは分析されて試験サンプルと比較することができる。キットの成分は各個別容器内に封入でき、すべての様々な容器は、キットを使用して実行された分析の結果の解釈のための説明書と共に、単一パッケージ内にありえる。本発明のキットは、キット容器上にまたはその中に製品の書面情報を含むことができる。製品の書面情報は、キットに含まれる試薬を使用する方法、例えば、被験体における医学的状態の防止または治療のための戦略の決定に本発明のバイオマーカーを使用する方法について記述する。いくつかの実施形態において、試薬の使用は本発明の方法に記載のものになりえる。

10

ゲルゾリン置換療法の予防的および療法的な使用

#### 【0203】

一般事項。本発明のゲルゾリン結合剤および方法はゲルゾリン補充療法と共に使用することができる。具体的には、本発明は、異常なゲルゾリンの発現もしくは活性に関連する障害のリスクがあるかもしくはそれに対する感受性のある被験体、または異常なゲルゾリンの発現もしくは活性に関連する障害を有する被験体を治療する、予防的方法および療法的方法の両方を提供する。ゲルゾリン結合剤および方法を使用して、例えば、ゲルゾリン補充療法の被験体の適性の確認、またはかかる療法を受ける被験体におけるゲルゾリン補充療法の有効性のモニタリングを行なう。1つの実施形態において、療法的に効果的な量の組換えゲルゾリン化合物またはネイティブの精製されたゲルゾリン化合物は、過剰な細胞外アクチンの二次的な毒性効果に対する療法的利益が提供されるように、投与される。

20

「過剰な」細胞外アクチンによって、血漿タンパク質が二次的な組織損傷または毒性効果なしで細胞外液からアクチンを結合し取り除く能力を越える細胞外アクチンの量が意味される。「二次的な」組織損傷または毒性効果によって、血漿中の過剰な細胞外アクチンの存在（通常、身体の他の部分での「一次」組織損傷の結果として）に起因し、それがなければ健康である組織、器官、および細胞の中に起こる組織損傷または毒性効果が意味される。理論によって限定されることは意図しないが、ゲルゾリンの注入は、a)アクチン単量体のアクチンフィラメントへの凝縮を防止するようにそれらに結合すること、および/またはb)アクチンフィラメントを単量体状態へ切断すること、および/またはc)アクチン結合タンパク質またはその断片と複合体形成したかかるアクチンの血中循環または細胞外組織環境からのクリアランスを促進することをもたらす。

30

#### 【0204】

任意で、投与は、放射線、化学療法の治療、または他の細胞保護剤もしくは免疫修飾剤の投与の組み合わせサイクルなどの補助療法コースの間になされる。それゆえ、本発明の結合剤および補助療法に有用な化合物は、その投与を必要とする被験体に同時におよび連続して投与することができる。

#### 【0205】

1つの態様において、本発明は、被験体にゲルゾリンを投与することによって、異常なゲルゾリン発現または活性に関連する疾患または状態を被験体において予防する方法を提供する。疾患または障害が防止されるかまたはあるいは進行が遅延されるようにする、予防的ゲルゾリン結合剤の投与は、変調に特徴的な症状が現われる前に行なわれうる。療法的適用において、ゲルゾリンは、血清ゲルゾリンレベルの減少を疑われるか、既に患っている被験体に投与される。療法的または予防的な治療を遂行するのに適切な量は、療法的または予防的に効果的な用量として定義される。

40

#### 【0206】

ゲルゾリン結合剤ベース療法の生物学的効果の決定。本発明の様々な実施形態において、適切なインビトロまたはインビボの分析を実行して、ゲルゾリン補充療法の効果および

50

被験体における影響を受けた組織の治療に投与が適応されるかを決定する。

【0207】

典型的には、療法的または予防的効果の達成に十分な効果的な量の本発明の組成物は、1日あたり1キログラム体重あたり約0.000001mg~1日あたり1キログラム体重あたり約10,000mgにわたる。好ましくは、投薬量範囲は、1日あたり1キログラム体重あたり約0.0001mg~1日あたり1キログラム体重あたり約100mgである。ゲルゾリンの投与については、投薬量は、1週ごとに、2週間ごとに、または3週間ごとに、宿主体重について約0.0001~100mg/kg、およびより通常は0.01~5mg/kgにわたる。例えば、投薬量は、1週ごとに、2週間ごとに、もしくは3週間ごとに、1mg/kg体重もしくは10mg/kg体重、または1週ごとに、2週間ごとに、もしくは3週間ごとに、1~10mg/kgの範囲内でありえる。1つの実施形態において、抗体の単一投薬量は1kg体重あたり0.1~10,000マイクログラムにわたる。1つの実施形態において、担体中の抗体濃度は、送達された1ミリリットルあたり0.2~2000マイクログラムにわたる。例示的な治療レジームは、2週間ごとに1回または1月に1回または3~6か月ごとに1回の投与を課す。ゲルゾリンは、複数の機会でも通常投与される。単一投薬の間隔は、毎日、毎週、毎月、または毎年でありえる。被験体における抗体の血中濃度を測定することによって示されるように、間隔は不規則でもありえる。いくつかの方法において、投薬量は、被験体における血清ゲルゾリン濃度を、約75µg/mL~約125µg/mL、100µg/mL~約150µg/mL、約125µg/mL~約175µg/mL、または約150µg/mL~約200µg/mLにするように調整される。あるいは、ゲルゾリンは持続放出製剤として投与することができ、この事例においては頻繁な投与はそれほど必要とされない。投薬量および頻度は、被験体におけるゲルゾリン結合剤の半減期に依存して変化する。投与の投薬量および頻度は治療が予防的かまたは療法的かどうかによって依存して変化する。予防的適用において、長期間にわたって比較的希な間隔で、比較的低い投薬量を投与する。幾人かの被験体は、残りの人生の間治療を受け続ける。療法的適用において、疾患の進行が低減されるかまたは終了するまで、および好ましくは被験体の疾患の症状の部分的または完全な改善が示されるまで、時には比較的短い間隔での比較的高い投薬量が必要とされる。その後、本特許は予防的レジームを投与することができる。

10

20

30

【0208】

毒性。好ましくは、効果的な量(例えば用量)の本明細書において記述されたゲルゾリンは、被験体に実質的な毒性を引き起こさずに、療法的利益を提供するだろう。本明細書において記述されたゲルゾリンの毒性は、例えば、LD<sub>50</sub>(集団の50%までの致死用量)またはLD<sub>100</sub>(集団の100%までの致死用量)の決定によって、細胞培養または実験動物における標準薬学的手順によって決定することができる。毒性と療法効果との間の用量比率が治療指数である。これらの細胞培養分析および動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための非毒性投薬量範囲の処方を使用することができる。本明細書において記述されたゲルゾリンの投薬量は、好ましくは毒性がほとんどまたは全くない効果的な用量を含む、血中循環濃度の範囲内に存在する。投薬量は、利用された投薬形態および利用される投与経路に依存して、この範囲内で変化することができる。個々の医師は、被験体の状態を考慮して、正確な処方、投与経路および投薬を選択することができる。例えば、Finglet al., In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1 (1975)を参照。

40

【0209】

医薬組成物の製剤。本発明の方法に従って、ゲルゾリンを投与に適切な医薬組成物の中へ組み入れることができる。医薬組成物は、一般的に、組換えゲルゾリン、または実質的に精製されたネイティブゲルゾリン、および被験体への投与に適切な形態の薬学的に許容される担体を含む。薬学的に許容される担体は、組成物の投与に使用される特定の方法に加えて、投与されている特定の組成物によっても部分的に決定される。したがって、抗体組成物の投与のための様々な適切な医薬組成物の製剤がある(例えば、Remingto

50

n's Pharmaceutical Sciences、マック・パブリッシング社 (Mack Publishing Co.)、イーストン、ペンシルバニア、第18版、1990を参照)。医薬組成物は、一般的に、滅菌済みで実質的に等張なものとして、アメリカ食品薬品局の医薬品最適製造基準 (GMP) 条令を全面遵守して製剤化される。  
【0210】

用語「薬学的に許容される」、「生理的に耐容される」およびその文法的な変形は、それらが組成物、担体、希釈剤および試薬を指すように交換可能に使用され、物質が、組成物の投与を妨げる程の所望されない生理的効果を産生することなしに被験体へまたは被験体上に投与可能であることを示す。例えば、「薬学的に許容される賦形剤」は、一般的に、安全で非毒性で望ましい医薬組成物の調製に有用な賦形剤を意味し、ヒト薬学的使用に加えて獣医学の使用にも許容される賦形剤を含む。かかる賦形剤は、固体、液体、半固体、または、エアゾール組成物の事例では、ガスでありえる。「薬学的に許容される塩およびエステル」は、薬学的に許容され、所望される薬理学的特性を有する塩およびエステルを意味する。かかる塩は、ゲルゾリン結合剤中に存在する酸性プロトンが無機塩基または有機塩基と反応できる場合、形成されうる塩を含む。適切な無機塩は、アルカリ金属 (例えば、ナトリウムおよびカリウム、マグネシウム、カルシウム、ならびにアルミニウム) により形成されるものを含む。適切な有機塩は、アミン塩基 (例えば、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、N-メチルグルカミン、および同種のもの) などの有機塩基により形成されるものを含む。かかる塩は、無機酸 (例えば、塩酸および臭化水素酸) および有機酸 (例えば酢酸、クエン酸、マレイン酸、ならびにメタンスルホン酸およびベンゼンスルホン酸などのアルカン-スルホン酸およびアレ-スルホン酸) により形成される酸付加塩もまた含む。薬学的に許容されるエステルは、ゲルゾリン結合剤中に存在するカルボキシ基、スルホニルオキシ基およびホスホキシ (phosphonoxy) 基から形成されるエステル (例えばC<sub>1-6</sub>アルキルエステル) を含む。2つの酸性基が存在する場合、薬学的に許容される塩またはエステルは、モノ酸モノ塩もしくはエステル、またはジ塩もしくはエステルになりえ; 同様に2つ以上の酸性基が存在する場合、かかる基のいくつがまたはすべては塩化またはエステル化することができる。本発明において命名されたゲルゾリン結合剤は、非塩化形態もしくは非エステル化形態、または塩化形態および/もしくはエステル化形態でありえ、かかるゲルゾリン結合剤の名称は、もとの (非塩化および非エステル化) 化合物ならびにその薬学的に許容される塩およびエステルの両方を含むように意図される。また、本発明において命名された特定のゲルゾリン結合剤は、1つ以上の立体異性形態で存在することができ、かかるゲルゾリン結合剤の名称は、すべての単一立体異性体およびかかる立体異性体のすべての混合物 (ラセミ化合物またはそうでないものでも) を含むように意図される。当業者は、本発明の特定の薬物および組成物の投与の適切なタイミング、連続順序および投薬量をたやすく決定する。

【0211】

かかる担体または希釈剤の好ましい例は、水、食塩水、リンガー液、ブドウ糖溶液、および5%ヒト血清アルブミンを含むが、これらに限定されない。リボソームおよび固定油などの非水性媒質も使用することができる。薬学的に活性のある物質のためのかかる溶媒および化合物の使用は、当技術分野において周知である。任意の従来の溶媒または化合物がゲルゾリン結合剤と非適合性である場合以外は、組成物におけるその使用が検討される。追加の活性化合物もまた組成物の中へ組み入れることができる。

【0212】

本発明の医薬組成物は、その意図された投与経路と適合性のあるように製剤化される。本発明のゲルゾリン組成物は、非経口経路、局所用経路、静脈経路、経口経路、皮下経路、動脈内経路、皮内経路、経皮経路、直腸経路、頭蓋内経路、腹腔内経路、鼻腔内経路; 筋肉内経路によって、または吸入薬として投与することができる。ゲルゾリンは、様々なアクチン関連疾患またはマイクロフィラメント関連疾患を含む様々な疾患を治療するのに、少なくとも部分的に効果的な他の薬剤と組み合わせて任意で投与することができる。

## 【0213】

非経口適用、皮内適用、または皮下適用に使用される溶液または懸濁物は、以下の成分を含むことができる。注射用水、食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒などの滅菌済み希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌化合物；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などのキレート化合物；酢酸塩、シトレートまたはリン酸塩などの緩衝剤、および塩化ナトリウムまたはブドウ糖などの等張性調整のための化合物。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基により調整することができる。非経口調製は、ガラスまたはプラスチックで作製されたアンプル、使い捨てシリンジまたは複数用量バイアル中に封入することができる。

10

## 【0214】

注射可能使用に適切な医薬組成物は、滅菌済みの水性溶液（水溶性の場合）または分散物、および滅菌済みの注射可能な溶液または分散物の即時調整のための滅菌済み粉末を含む。静脈内投与については、適切な担体は、生理食塩水、静菌水、クレモフォルE L T M（B A S F、パーシッパニー、ニュージャージー）またはリン酸緩衝食塩水（PBS）を含む。すべての事例において、組成物は滅菌済みで、容易な注射針通過性が存在する程度に液体であるべきである。それは製造および保存の条件下で安定し、細菌および真菌などの微生物の混入活動に対して保護されるべきである。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール、および同種のもの）、およびその適切な混合物を含む、溶媒または分散媒でありえる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散物の事例においては必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。微生物活動の防止は、様々な抗菌化合物および抗真菌化合物（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル、および同種のもの）によって達成することができる。多くの事例において、組成物中に等張化合物（例えば、糖、マンニトールおよびソルビトールなどの多価アルコール、塩化ナトリウム）を含むことは好ましいだろう。注射可能な組成物の長期吸収は、組成物中に吸収を遅延させる化合物（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を含むことによって成し遂げることができる。

20

## 【0215】

滅菌済みの注射可能溶液は、上記で列挙された成分の1つまたは組合せと共に、適切な溶媒中に必要な量でゲルゾリン結合剤を組み入れ、必要に応じて、続いて濾過滅菌を行うことによって調製することができる。一般的に、分散物は、基本的な分散媒および上記で列挙されたものからの必要な他の成分を含む滅菌済みの媒質の中へ結合剤を組み入れることによって調製される。滅菌済みの注射可能溶液の調製のための滅菌済み粉末の事例において、調製の方法は、事前に滅菌済みのその濾過溶液からの、任意の追加の所望される成分を加えた活性成分の粉末をもたらず、真空乾燥および凍結乾燥である。本発明の薬剤は、活性成分の持続放出またはパルス放出を可能にするような方式で製剤化することができるデポー注射またはインプラント調製の形態で投与することができる。

30

## 【0216】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または食用担体を含む。それらはゼラチンカプセル中に封入されか、またはタブレットへと圧縮することができる。経口の療法的投与目的のために、結合剤は賦形剤と共に組み入れられて、タブレット、トローチまたはカプセルの形態で使用することができる。経口組成物は、マウスウォッシュとしての使用のために液体担体を使用して調製することもでき、液体担体中の化合物は、経口的に、吸い込んで吐くか、または飲み込んで適用される。薬学的に適合性のある結合化合物および/またはアジュバント物質は、組成物の一部として含むことができる。タブレット、ピル、カプセル、トローチおよび同種のものは、以下の成分のいずれか、または類似する性質の化合物を含むことができる。微結晶性セルロース、トラガカントゴムもしくはゼラチンなどの結合剤；デンプンもしくはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、プリモゲル（Prim

40

50

o g e l ) もしくはトウモロコシデンブンの崩壊化合物 ; ステアリン酸マグネシウム  
もしくはステロテス ( S t e r o t e s ) などの潤滑剤 ; コロイド状二酸化ケイ素などの  
流動促進剤 ; ショ糖もしくはサッカリンなどの甘味化合物 ; またはペパーミント、サリチ  
ル酸メチルもしくはオレンジ香味などの香味化合物。

【 0 2 1 7 】

吸入による投与については、ゲルゾリン結合剤は、適切な噴射剤 ( 例えば二酸化炭素な  
どのガス ) を含む加圧容器もしくはディスペンサー、または噴霧器からエアゾールスプレ  
ーの形態で送達される。

【 0 2 1 8 】

全身投与は、経粘膜手段または経皮手段によることもできる。経粘膜投与または経皮投  
与については、バリアの浸透に適切な浸透剤は製剤中に使用される。かかる浸透剤は、当  
技術分野において一般的に公知であり、例えば、経粘膜投与のためには、界面活性剤、胆  
汁酸塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻内スプレーまたは坐剤の使用  
を介して遂行することができる。経皮投与については、ゲルゾリン結合剤は、当技術分野  
において一般的に公知であるような軟膏、膏薬、ゲルまたはクリームへと製剤化される。

10

【 0 2 1 9 】

ゲルゾリンは、直腸送達のために、坐剤 ( 例えば、カカオバターおよび他のグリセリド  
などの従来の坐剤基剤と共に ) または停留浣腸の形態で医薬組成物として調製することも  
できる。

【 0 2 2 0 】

1 つの実施形態において、ゲルゾリンは、インプラントおよびマイクロカプセル化され  
た送達システムを含む、身体からの迅速除去に対してゲルゾリンを保護する担体 ( 制御放  
出製剤などの ) により調製される。生体分解性生体適合ポリマーは、エチレン酢酸ビニル  
、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸な  
どを使用することができる。かかる製剤の調製のための方法は、当業者に明らかであろう  
。物質は、アルザ社 ( A l z a C o r p o r a t i o n ) およびノバ・ファーマシュー  
ティカルズ社 ( N o v a P h a r m a c e u t i c a l s , I n c ) から商業的に得る  
ことができる。リポソーム懸濁物 ( ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体により感染  
細胞へ標的化されたりポソームを含む ) もまた、薬学的に許容される担体として使用する  
ことができる。これらは、例えば、米国特許第 4 , 5 2 2 , 8 1 1 号中に記述されている  
ように、当業者に公知の方法に従って調製することができる。

20

30

【 0 2 2 1 】

組換えゲルゾリンの調製。下記の大部分の考察は、ゲルゾリン核酸を含むベクターによ  
り形質転換された細胞を培養すること、および細胞培養からポリペプチドを回収すること  
による、ゲルゾリンの産生に関する。本発明のゲルゾリンは、血漿から親和性精製 ( 上述  
された ) を使用して、ネイティブゲルゾリンを精製することによって産生されることが  
さらに想定される。タンパク質、およびタンパク質をコードする D N A 配列は標準的方法  
を使用して産生することができる。精製は、クロマトグラフィーを使用すること、ポリペ  
プチドに対して向けられた抗体を使用すること、または精製を支援して次に切断可能部分  
 ( またはタグ ) に融合される形態のポリペプチドを産生することによって、タンパク質の  
単離などの標準的手順を使用して遂行することもできる。

40

【 0 2 2 2 】

ゲルゾリンポリペプチドまたはゲルゾリン様ポリペプチド ( 例えば配列番号 : 1 のポリ  
ペプチド ) をコードするポリヌクレオチドは、当技術分野において周知の試薬および技術  
を使用して、多くの市販で入手可能な発現ベクターのいずれかの中へ挿入することができ  
る。組換え発現コンストラクトの調製において、本発明の様々なポリヌクレオチドは細菌  
性プラスミドベクターの中へ挿入または置換することができる。細菌性複製システム、細  
菌における選択を可能にするマーカー、および一般的に 1 つまたは複数の特有の便利に位  
置するクローニング部位を有することによって特徴づけられる任意の都合のよいプラスミ  
ドを利用できる。ベクターと呼ばれる多数のプラスミドが、形質転換のために利用可能で

50

ある。適切なベクターは以下のものを含むが、これらに限定されない：ベクターシステム g t 1 1、シャロン 4 などのウイルスベクター、ならびに p B R 3 2 2、p B R 3 2 5、p A C Y C 1 7 7、p A C Y C 1 0 8 4、p U C 8、p U C 9、p U C 1 8、p U C 1 9、p L G 3 3 9、p R 2 9 0、p K C 3 7、p K C 1 0 1、S V 4 0、p ブルースクリプト I I S K + / - または K S + / - (ストラタジーン ( S t r a t a g e n e ) 社、ラ・ホーヤ、カリフォルニア)、およびその任意の派生物などのプラスミドベクター。また、適切なものはクローニングおよび発現のために高度に有用でありえる酵母発現ベクターである。例示的な酵母プラスミドは、p P I C Z および p F L D (インビトロゲン社、カールズバッド、カリフォルニア) を含むが、これらに限定されない。ベクターの選択は好ましい形質転換技術および標的宿主細胞に依存するだろう。

10

**【 0 2 2 3 】**

ゲルゾリンをコードする核酸分子は、選択されたプロモーターの制御下でコードされたタンパク質の発現のためにオープンリーディングフレームが適切に方向付けされるように、5' ~ 3' 方向でベクターの中へ挿入される。このように、ゲルゾリン構造遺伝子はプロモーターに「作動可能に結合される」と表現される。単一核酸または複数の核酸は、各々が適切なプロモーターの制御下で、適切なベクターの中へこのように挿入されて、本発明の核酸コンストラクトを調製することができる。

**【 0 2 2 4 】**

特定の調節配列も本発明の発現コンストラクトの中へ組み入れることができる。これらは、転写および翻訳を実行するように宿主細胞タンパク質と相互作用するベクターの非転写領域を含む。かかるエレメントの強度および特異性は変化しうる。利用されたベクターシステムおよび宿主に依存して、最小限の 5' プロモーターエレメントに加えて、構成的プロモーター、誘導可能プロモーターおよび抑制可能プロモーターを含む、任意の数の適切な転写エレメントおよび / または翻訳エレメントを使用することができる。

20

**【 0 2 2 5 】**

構成的プロモーターは、細胞における遺伝子の持続的な発現を指令するプロモーターである。異種ポリヌクレオチドの発現の誘導のために広く使用されるいくつかの構成的プロモーターの例は、酵母における発現のための A D H 1 プロモーター、大部分の真核細胞タイプにおいて発現することが公知である任意のいくつかのアクチン遺伝子に由来するプロモーター、および多くの細胞タイプで蓄積することが公知である遺伝子産物のプロモーターであるユビキチンプロモーターを含む。哺乳類細胞で使用される構成的プロモーターの例は、ラウス肉腫ウイルスに由来する R S V プロモーター、サイトメガロウイルスに由来する C M V プロモーター、 $\gamma$ -アクチンおよび他のアクチンプロモーター、ならびに E F 1 プロモーターを含む。

30

**【 0 2 2 6 】**

また、本発明のプラスミドにおけるプロモーターとして適切なものは、遺伝子発現調節に対する外部制御を可能にするプロモーターである。遺伝子発現の量およびタイミングを調節する 1 つの方法は、誘導可能プロモーターを使用することである。構成的プロモーターとは異なり、誘導可能プロモーターは常に至適な活性があるわけでない。誘導可能プロモーターは、誘導剤 ( または誘導因子 ) に応答する 1 つまたは複数の D N A 配列または遺伝子の転写を直接または間接的に活性化することができる。いくつかの誘導可能プロモーターは、特定の温度で活性化される熱ショックプロモーター ( H S P ) などの物理的手段によって活性化される。他のプロモーターは化学的手段 ( 例えば I P T G ) によって活性化される。誘導可能プロモーターの他の例は、重金属イオンによって活性化されるメタロチオネインプロモーター、および特定のホルモンの処理によって活性化されるホルモン応答性プロモーターを含む。誘導因子の非存在下において、誘導可能プロモーター制御下で、核酸配列または遺伝子は転写されないか、または最小限転写されるのみだろう。本発明の核酸コンストラクトのプロモーターは、同種 ( 宿主細胞と同じ種に由来 )、または異種 ( 宿主細胞とは異なる種に由来 ) でありえる。

40

**【 0 2 2 7 】**

50

一旦本発明の核酸コンストラクトが調製されたならば、宿主細胞の中へ取り込まれうる。これは、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版、コールドスプリングハーバー：コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・プレス、ニューヨーク(2001)によって記述されるような、当技術分野において公知の標準的手順を使用して、本発明のプラスミドコンストラクトによる宿主または細胞の形質転換またはトランスフェクションによって実行される。本発明のために適切な宿主および細胞は、細菌細胞、ウイルス、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞、およびヒト細胞を含む哺乳類細胞に加えて、組換えタンパク質の産生に適切な他の細胞システムを含むが、これらに限定されない。例示的な細菌細胞は、大腸菌およびマイコバクテリウム種 (*Mycobacterium* sp.) を含むが、これらに限定されない。例示的な酵母宿主は、ピスキア・パストリス (*Pischia pastoris*)、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) およびシゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) を含むが、これらに限定されない。形質転換またはトランスフェクションの方法は、プラスミド中に含まれる対象となる遺伝子の一過性発現または安定性発現をもたらす。形質転換後に、形質転換された宿主細胞は、適切な培養中で選択し増やすことができる。形質転換細胞は、本発明の核酸コンストラクトと共に宿主細胞の中へ同時に導入した選択マーカーを使用して、最初に同定される。適切なマーカーは、カナマイシン、ゲンタマイシン、アンピシリン、ハイグロマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、および同種のものに対する耐性などの抗生物質耐性をコードするマーカーを含む。任意の公知の抗生物質耐性マーカーは、本発明に従って、形質転換および形質転換された宿主細胞の選択に使用することができる。細胞または組織を抗生物質を含む選択培地で増殖させ、それによって、一般的に抗生物質耐性マーカーを発現する形質転換体のみが増殖し続ける。さらに、または別の方法では、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP) または強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を含むが、これらに限定されないレポーター遺伝子は、形質転換細胞の選択のために使用することができる。利用される選択マーカーは標的種に依存するだろう。

#### 【0228】

組換えゲルゾリンは、標準的陰イオン交換クロマトグラフィーを使用して精製することができる。Oberley, R. E. et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L296-306 (2004)。

#### 【0229】

ゲルゾリンタンパク質を得るために、コーディング配列が誘導可能プロモーターの制御下にあるならば、発現が誘導される。タンパク質を単離するために、発現ベクターを保有する宿主細胞を増殖させ、ホモジナイズし、ホモジネートを遠心分離して細菌残屑を除去する。次に上清に連続する硫酸沈澱を行なう。本発明のタンパク質を含む画分は、適切なサイズのデキストランカラムまたはポリアクリルアミドカラムでゲル濾過し、タンパク質を分離する。必要であるならば、タンパク質画分はHPLCによってさらに精製することができる。適切なものとして、タンパク質精製の代替方法を使用することができる。J. E. Coligan et al., 編、*Current Protocols in Protein Science* (ジョン・ワイリー・アンド・サンズ、2003) を参照。実質的に精製された組換えタンパク質を得ると同時に、タンパク質は本明細書において記述されるような被験体に投与されうる。

#### 【0230】

投与の容易性および投薬量の均一性のために、経口組成物または非経口組成物を投薬単位形態で製剤化することは特に有利である。投薬単位形態は(本明細書において使用される時)、治療されるべき被験体のための単一投薬量として適した物理的に分離した単位を指し、各単位は、必要な薬学的担体中に所望される療法効果を産生することが意図される結合剤の所定の量を含む。本発明の投薬単位形態のための明細は、結合剤の特有の特質お

よび達成される特定の療法効果、ならびに被験体の治療のためのかかるゲルゾリン結合剤を調合する当技術分野に固有の限定によって決定され、直接依存する。

【0231】

以下の実施例はより完全に本発明の好ましい実施形態を示すために示される。これらの実施例は、添付された請求項によって定義されるので、本発明の範囲の限定として一切解釈されるべきでない。

【実施例】

【0232】

本発明は、以下の実施例によってさらに示され、それは多少なりとも限定するようには解釈されるべきでない。

【0233】

実施例1．ゲルゾリン抗原の調製物

1．ゲルゾリンおよびゲルゾリンの断片のクローニング

【0234】

ヒトゲルゾリンの全長、N末端断片およびC末端断片をコードするcDNAは、以下のものを使用する以下のRT-PCR法によってクローニングした。

【0235】

a．鋳型

【0236】

全RNAはHELAヒト癌細胞株から単離した。cDNAは、製造者の使用説明書に従って、逆転写キット(プロメガ(Promega)社、マディソン、ウイスコンシン、カタログ番号A3500)を使用して合成した。cDNAをPCRのための鋳型として使用した。

【0237】

b．PCRプライマー

【0238】

全長ヒトゲルゾリンならびにN末端断片およびC末端断片のクローニングのための以下のペアになったPCRプライマーを、表5中に示す。

表5．ゲルゾリン断片クローニングのためのPCRプライマー。

【表5】

ゲルゾリンタンパク質	プライマー	配列番号	アミノ酸範囲
全長 (GF)	5' CACCGGATCCCTGCTTTGCGCGCTGTCCCTG 3' CTCGAGTCAGGCAGCCAGCTCAGCCAT	配列番号: 5 配列番号: 6	13~ 782
N末端 (GN)	5' CACCGGATCCCTGCTTTGCGCGCTGTCCCTG 3' TTA CTCTCGAGTCCATATGTGGCAGGGTCCAC	配列番号: 7 配列番号: 8	13~ 440
C末端 (GC)	5' CACCGGATCCGCCACATATGGACAGTTCT 3' CTCGAGTCAGGCAGCCAGCTCAGCCAT	配列番号: 9 配列番号: 10	440~ 782

【0239】

c．PCR反応

【0240】

以下の試薬を、PCR反応(100 $\mu$ lの最終体積)中で組み合わせた。鋳型cDNA、合計33 $\mu$ lの反応のうちの5 $\mu$ l;各々10pmolの5'プライマーおよび3'プライマー;10 $\times$ PCR緩衝液、10 $\mu$ l;dNTPs(各2.5mM)、4 $\mu$ l;およびTaqポリメラーゼ(プロメガ社)、5単位。

【0241】

PCR反応は以下のように行なった。溶液は、最初に94 $^{\circ}$ Cで2分間加熱し、続いて94 $^{\circ}$ C 30秒間、52 $^{\circ}$ C 1分間、および72 $^{\circ}$ C 3分間の40サイクルを行なった。次に、反応は最終伸長のために72 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした。このように得られた増幅D

10

20

30

40

50

NA断片を、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルで分離した。PCR産物は紫外線を使用して可視化し、増幅産物の予想されるサイズに対応するバンドをジーンクリーンキット(バイオ101(BIO101)社、アーバイン、カリフォルニア)を使用して回収した。

#### 【0242】

d. PCR産物のクローニング

#### 【0243】

TOPO100発現クローニングキット(インビトロゲン社、カールズバッド、カリフォルニア)を使用して、DNA断片をクローン化した。これは以下のように実行した。PCR反応溶液から回収されたDNA断片は、クローニングキットにより提供された50ngのTOPOベクターと共に、 $1 \mu\text{l}$ の10×リガーゼ反応緩衝液(6mMトリスHCl(pH7.5)、6mM塩化マグネシウム、5mM塩化ナトリウム、7mMβ-メルカプトエタノール、0.1mMATP、2mMDTT、1mMスペルミジン、および $0.1 \text{mg}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミン)と混合し、そこに4単位のT4DNAリガーゼ( $1 \mu\text{l}$ )を追加した。混合物の全体積を滅菌脱イオン水により $10 \mu\text{l}$ に調整し、結果として生じるリガーゼ溶液を14で15時間インキュベートした。この後に、 $2 \mu\text{l}$ のリガーゼ反応溶液を $50 \mu\text{l}$ のコンピテントな大腸菌系統TOP10F(TAクローニングキットにより提供され、取扱説明書に従ってコンピテントにした)に追加し、結果として生じる混合物を30分間氷上で保持し、次に42で30秒間加熱し、再び5分間氷上で冷却した。次に、2%(w/v)トリプトン、0.5%(w/v)酵母抽出物、0.05%(w/v)塩化ナトリウム、2.5mM塩化カリウム、1mM塩化マグネシウムおよび20mMグルコースを含む、 $500 \mu\text{l}$ の培地(以下、「SOC」培地と呼ぶ)を、培養に追加し、混合物は振盪しながら1時間37でインキュベートした。この後に、培養を、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むL-プロス寒天プレート(1%(w/v)トリプトン、0.5%(w/v)酵母抽出物、0.5%(w/v)塩化ナトリウム、0.1%(w/v)グルコースおよび0.6%(w/v)バクトアガー(ディフコ(Difco)社、デトロイト、ミシガン))上に広げた。プレート上に現われたアンピシリン耐性コロニーを選択し、白金のトランスファーチップにより掻きとり、200毎分回転数で振盪しながら37で一晩 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL-プロス培地中で培養した。インキュベーション後に、細胞を遠心分離によって採取し、これからSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版(コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、1989)に記述されているようなアルカリ方法によってプラスミドDNAを調製した。

#### 【0244】

2. ゲルゾリタンパク質の発現および精製

#### 【0245】

ヒトゲルゾリンの全長、N末端断片またはC末端断片をコードするcDNAを、TOPO100ベクター(インビトロゲン社、カールズバッド、カリフォルニア)へと挿入した。結果として生じるプラスミドを大腸菌系統BL21(DE3)中に形質転換し、指数増殖期までLB溶媒中で増殖させ、 $0.4 \text{mM}$ イソプロピル-β-D-ガラクトピラノシドにより3時間誘導した。細胞を遠心分離によってペレットにし、上清は除去した。ペレットにした細胞を溶解緩衝液(8M尿素、20mMトリスHCl)中で再懸濁し、さらに超音波処理によって破壊した。混合物を遠心分離(15分間 $14,000 \times g$ )によって清澄化し、上清を回収した。清澄化した上清から、製造者の使用説明書に従ってNi-NTAスーパーフローカラム(キアゲン社、バレンシア、カリフォルニア)を使用して、発現した組換えヒトゲルゾリンポリペプチドを精製した。精製したゲルゾリタンパク質調製物は、PBSに対して4で一晩透析した。タンパク質濃度をBCA分析(ピアース(Pierce)社、ウォーバーン、マサチューセッツ)によって決定し、分割物を免疫のための使用まで-80で保存した。

10

20

30

40

50

## 【0246】

精製したゲルゾリンタンパク質調製物(1 µg)は、10% SDS-PAGE上の分離およびクマシーブルーによる染色によって特性を評価した。脱染色の後に、ゲルはHPの写真スキャナーを使用してスキャンした。結果を図1中に示す。(レーン1:分子量マーカー;レーン2:サイトスケルトン(Cytoskeleton)社(デンバー、コロラド)から購入した精製ヒト血漿ゲルゾリン;レーン3:組換え全長(「FL」)ゲルゾリン;レーン4:組換えN末端ゲルゾリン断片;レーン5:組換えC末端ゲルゾリン断片)。

## 【0247】

実施例2. ヒトゲルゾリンに対するモノクローナル抗体の生成

10

## 1. 免疫

## 【0248】

メスの6~8週間齢のBalb/cマウス(ジャクソン研究所(Jackson Laboratory)、バー・ハーバー、メイン)を、以下のうちの1つにより免疫した。(1)ネイティブ血漿ゲルゾリン(NG、サイトスケルトン社から入手可能);(2)組換え全長ゲルゾリン(GF、配列番号:1のアミノ酸23~782)、(3)組換えN末端ゲルゾリン(GN、配列番号:1のアミノ酸23~440)、または(4)組換えC末端ゲルゾリン(GC、配列番号:1のアミノ酸440~782)。初回の脚パッド免疫のために、1mg/mLの各免疫原を等容量のフロインド完全アジュバント(ディフコ社、デトロイト、ミシガン)により乳化した。混合物(100 µL)をマウスの脚パッドへと注射した。7日後に、マウスの脚パッドに、等容量のアジュバントにより乳化した100 µLの各免疫原を注射した。0.5 mLのPBS中の100 µgのマウス組換えBリンパ球刺激因子ポリペプチド(BLYS)の腹腔内注入と組み合わせて、100 µLのPBS中の250 µgの免疫原の脚パッド注入により、マウスを週に1回(3週間)さらにブーストした。最後の注射の3日後に、免疫したマウスの局所リンパ節からリンパ球を回収した。

20

## 【0249】

## 2. 細胞融合

## 【0250】

単一細胞の懸濁をリンパ節から調製し、2:1の比率でNS1ミエローマ細胞と混合した。結果として生じる混合物を、PRMI-1640により3回洗浄した。次に、ピペットのチップを使用してペレットを撈拌しながら、37°Cにあらかじめ暖めた1ミリリットルの50%(v/v)ポリエチレングリコール1500(ベーリンガー・マンハイム(Boehringer Mannheim)社、バーゼル、スイス)を、チューブへゆっくり追加した。続いて、37°Cにあらかじめ暖めた50 mLの無血清RPMI培地をゆっくり追加した。次に結果として生じる混合物を遠心分離し、上清を廃棄し、50 mLの12%(v/v)FCS含有HAT培地をピペットのチップにより穏やかに撈拌しながら追加した。懸濁物を100 µL/ウェルで96ウェル細胞培養マイクロプレートへと分注した。次にプレートを5%(v/v)CO<sub>2</sub>の雰囲気中で37°Cで7~10日間インキュベートした。

30

40

## 【0251】

## 3. モノクローナル抗体のスクリーニング

## 【0252】

スクリーニングは表6に従って行なった。ELISAプレートを1 µg/mLのゲルゾリン免疫原タンパク質により4°Cで一晩コートした。未結合のゲルゾリン免疫原はPBSによる3回の洗浄によってウェルから洗い落とされた。ウェル中の非特異的結合部位は、3%(w/v)BSA含有PBSによりウェルを室温で1時間インキュベートすることによってブロックした。ブロック緩衝液は、洗浄せずにハイブリドーマ上清の追加前に除去した。次に100マイクロリットルのハイブリドーマ培養上清(100 µL)を適切なウェルに追加し、プレートを37°Cで1時間インキュベートして抗ゲルゾリン抗体の

50

結合を可能にした。未結合の物質は、PBSによりウェルを3回洗い落とすことによって除去した(各5分)。結合した抗ゲルゾリン抗体は、HRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体(1:10,000)によりウェルをインキュベートすること(30分;37℃)によって検出した。未結合のHRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体は、PBSによりウェルを3回洗い落とすことによって除去した(各5分)。抗ゲルゾリン抗体-HRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体の複合体は、シヨアブルー(SureBlue)TMB 1-コンポーネントマイクロウェルペルオキシダーゼ基質(KPL社、ゲーサーズバーグ、メリーランド)を使用して測定した。具体的には、シヨアブルー-TMB 1-コンポーネントマイクロウェルペルオキシダーゼ基質(KPL社、ゲーサーズバーグ、メリーランド)をウェルに追加し、プレートを10分間インキュベートして基質のHRP仲介性転換を可能にした。酵素反応は100 $\mu$ lの2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の追加により停止した。次に、ELISAプレート読取り装置を使用して、サンプルウェルの光学的密度を450nm/650nmで測定した。

【表6】

群	免疫原	一次スクリーニング	二次スクリーニング
1	ネイティブゲルゾリン (NG)	NG	GF GN GC
2	全長組換えゲルゾリン (FL)	GF	NG GN GC
3	N末端組換えゲルゾリン (GN)	GN	NG GF GC
4	C末端組換えゲルゾリン (GC)	GC	NG GF GN

【0253】

二次確認のスクリーニング手順を使用して、陽性クローンの結合特異性をさらに確定する。すべての陽性クローンは、表6中で確定された「二次スクリーニング」ポリペプチドを使用して、二次確認ELISAスクリーニング(上で詳述したように)を行なった。スクリーニングの結果を表7中に示す。各々のスクリーニングについて検査した総クローンと比較した、陽性クローンの数を表7中に示す。一次スクリーニングは、各ゲルゾリン免疫原への結合について480クローンを検査した。ゲルゾリン免疫原への結合について陽性のクローンを、本研究の他のゲルゾリン免疫原への結合について検査した。

【表7】

免疫原	タンパク質のスクリーニング			
	NG	GF	GN	GC
NG	34/480	2/34	1/34	1/34
GF	31/85	85/480	31/85	25/85
GN	4/37	19/37	37/480	0/37
GC	30/76	30/76	6/76	76/480

【0254】

3つのクローン(GN3E9、GC1C10およびGF2D6)は、N末端断片またはC末端断片(GNまたはGC)のいずれかに加えて、ネイティブゲルゾリン(NG)および/または組換え型ゲルゾリン(GF)へ高い結合親和性で特異的に結合することが明らか

にされた。したがって、これらのクローンは、本発明のゲルゾリン検出方法において有用な例示的な抗体として選択された（以下に記載される）。

【0255】

4．限界希釈によるクローニング

【0256】

もとのGN3E9、GC1C10およびGF2D6ハイブリドーマ細胞は、フィーダー細胞としての $10^5$ のBalb/cマウスの胸腺細胞の存在下において、RPMI-1640含有12% (v/v) FCSにより1mLあたり0.3細胞まで希釈し、2つの96ウェルプレート中で培養した。7～10日後に、培養上清(100 $\mu$ L)を7～10日後に回収し、抗体産生を上述するようなELISAによって決定した。陽性クローンは続いて限界希釈によって3回サブクローン化した。

10

【0257】

5．抗ゲルゾリン抗体のアイソタイプの解析

【0258】

選択した抗ゲルゾリン抗体のアイソタイプは、ヤギ抗マウスアイソタイプ特異的抗体(サザン・バイオテック(Southern Biotech)社、バーミングハム、アラバマ)によって決定した。GN3E9のアイソタイプはマウスIgG2bとして決定され、GC1C10およびGF2D6のアイソタイプはマウスIgG1として決定された。

6．GN3E9、GC1C10およびGF2D6モノクローナル抗体の精製

【0259】

GN3E9は、セファロースGL-4B親和性精製媒質(ファルマシア社、ウプサラ、スウェーデン)を使用して、親和性クロマトグラフィーによって精製した。GC1C10およびGF2D6の抗体は、プロテインGセファロースCL-4B親和性精製培地(ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン)を使用して、親和性クロマトグラフィーによって精製した。培養上清は、1分あたり2mLの流速でカラムへ適用した。培養上清をカラムを介して通過させた後、カラムを50mLのPBSにより洗浄した。タンパク質は溶出緩衝液(0.1Mグリシン(pH2.4)、0.15M NaCl)により溶出した。各々の溶出した画分(1mL)の光学的密度はOD280nmで測定した。OD280が0.1単位以上の画分を回収した。100 $\mu$ Lの中和緩衝液(1MトリスHCl(H8.5))を画分へ追加した後に、透析チューブ中に溶出液を個別に置き、溶出液は1LのPBS(pH7.5)に対して4で透析した。透析緩衝液を2回変えた。親和性精製した各抗体を1mg/mLに濃縮し、滅菌し、使用まで4で保存した。

20

30

【0260】

実施例3．本発明の選択したゲルゾリン結合剤の特性評価

市販の抗ヒトゲルゾリン抗体GS2C4(シグマ・ケミカル社、セントルイス、ミズーリ)に加えて、選択した3抗体(例えばGN3E9、GF2D6およびGC1C10)は、ELISA、ウエスタンブロットおよび免疫沈降法を使用して特性を評価した。以下で記述する方法を使用して、これらの実施例において示される抗体に追加して、ゲルゾリン結合剤を生成することおよび/または比較することもまた当業者にとって可能だろう。

【0261】

1．ゲルゾリン結合剤の結合特質のELISAによる決定

【0262】

研究を実行して、以下に詳述されるように選択したゲルゾリン結合剤の結合特質を決定する。PBS中で1 $\mu$ g/mLのヒト血漿から精製したネイティブヒト血漿ゲルゾリン(サイトスケルトン社、デンバー、コロラドから購入した)、組換え全長ゲルゾリン(GF)、組換えN末端断片(GN)、組換えC末端断片(GC)、またはバックグラウンド対照としてのBSAにより、ELISAプレートを4で一晩コートした。未結合のゲルゾリンポリペプチドは、PBSによりプレートを3回洗浄してウェルから洗い落とした(各5分)。ウェル中の非特異的結合部位は、3%(w/v)のBSA含有PBSによりウェルを室温で1時間インキュベートすることによってブロッキングした。可変量の抗体(0

40

50

. 001  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ~ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を 37 で 30 分間追加した。未結合の抗体は、PBS により 3 回洗い落とすことによってウェルから除去した (各 5 分)。結合した抗ゲルゾリン抗体は、HRP conjugate 抗マウス IgG 抗体 (1 : 10, 000, 100  $\mu\text{l}$ ) によりウェルをインキュベートすること (30 分; 37 ) によって検出した。未結合の HRP conjugate 抗マウス IgG 抗体は、PBS によりウェルを 3 回洗い落とすことによって除去した (各 5 分)。抗ゲルゾリン抗体 - HRP conjugate 抗マウス IgG 抗体の複合体は、シヨアブルー TMB 1 - コンポーネントマイクロウェルペルオキシダーゼ基質 (KPL 社、ゲーサーズバーグ、メリーランド) を使用して測定した。具体的には、シヨアブルー TMB 1 - コンポーネントマイクロウェルペルオキシダーゼ基質 (KPL 社、ゲーサーズバーグ、メリーランド) をウェルに追加し、プレートを 10 分間インキュベートして基質の HRP 仲介性転換を可能にした。酵素反応は 100  $\mu\text{l}$  の 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  の追加により停止した。次に、ELISA プレート読取り装置を使用して、サンプルウェルの光学的密度を 450 nm / 650 nm で測定した。

### 【0263】

以下で詳述されるように選択したゲルゾリン結合剤の結合特質を決定するために実行した研究結果の要約を、図 2 中に示す。パネル A において、GN3E9 は、ネイティブゲルゾリン、組換え全長ゲルゾリン、および組換え N 末端ゲルゾリン断片に対する用量依存的反応を示したが、C 末端断片または BSA に対しては示さず、GN3E9 がゲルゾリンの N 末端部分に対して向けられた抗体であることが指摘された。パネル B および C において、GF2D6 および GC1C10 は、それぞれ、ネイティブゲルゾリン、組換え全長ゲルゾリン、および組換え C 末端ゲルゾリン断片に対する用量依存的応答を示したが、N 末端断片または BSA に対しては示さず、GF2D6 および GC1C10 の両方がゲルゾリンの C 末端部分に対して向けられた抗体であることが指摘された。市販の抗ゲルゾリン抗体 (GS2C4 (パネル D)) は GF2D6 および GC1C10 に類似する結合特異性を示したが、GF2D6 および GC1C10 と比較して、結合反応性ははるかに弱い。GF2D6 抗体は、同じ濃度 (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) での GN3E9 (パネル A)、GF2D6 (パネル B) および GC1C10 (パネル D) について観察されたシグナルと比較して、GS2C4 (パネル D) では 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度でシグナルが欠落していることによって判断されるように、免疫反応性ゲルゾリンの検出には有意に感受性がないと思われた。それゆえ、本発明のゲルゾリン結合剤は、市販の抗ゲルゾリン抗体 GS2C4 と比較した場合に、ゲルゾリンおよびゲルゾリン関連ポリペプチドの検出により高い感度があるという長所を有する。本発明のゲルゾリン結合剤のより高い感度は、本発明の方法におけるこれらの結合剤の使用のために有利である。

### 【0264】

#### 2. ウエスタンブロット解析

### 【0265】

ウエスタンブロット解析技術を使用して生物学的サンプルにおける本発明のゲルゾリン結合剤の結合特性を評価した。すなわち、抗ゲルゾリン抗体の結合特異性をさらに決定するために、抗ゲルゾリン抗体によるヒト血清サンプルのウエスタンブロット解析を実行した。2 つの正常なヒト被験体の血清サンプル (20  $\mu\text{l}$  の PBS 中で血清の 1 : 20 希釈) を、標準的技術を使用して、10% SDS - PAGE によって分画し、ニトロセルロース膜上にウエスタンブロットした。エレクトロブロットしたニトロセルロース膜 (ブロット) を 5% (w/v) 脱脂乳を使用して室温で 1 時間ブロッキングした後、4 つの重複したブロットの各々は、精製した抗ゲルゾリン抗体 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (すなわち、GN3E9 ; GC1C10 ; GF2D5 ; または GS2C4) により室温で 2 時間ブローピングした。未結合の抗ゲルゾリン抗体は、0.02% のツイーン 20 を含む PBS により振盪しながら室温で 10 分間洗浄することによって、ブロットから洗い落とされた。結合した抗ゲルゾリン抗体は、HRP conjugate ヤギ抗マウス IgG により各ブロットを室温で 1 時間ブローピングすることによって検出した。未結合の HRP conjugate ヤギ抗マウス IgG は、0.02% ツイーン 20 を含む PBS により振盪しながら室温で 10 分間洗

浄することによって、プロットから洗い落とした。抗ゲルゾリン - HRPコンジュゲートヤギ抗マウスIgG複合体は、HRP仲介性化学発光を使用して可視化した。具体的には、プロットは、ルミグロー (LumiGLO) (登録商標) ペルオキシダーゼ化学発光基質 (KPL、ゲーズバーグ、メリーランド) により3分間インキュベートし、X線フィルムに露光した。結果を図3中に示す。図3中に示されるように、GN3E9、GF2D6およびGS2C4、GC1C10はすべて、全長血漿ゲルゾリンに対応する90のkDaタンパク質を結合した。GC1C10抗体は50kDaタンパク質を含むヒト血清中に存在する他のゲルゾリン関連ポリペプチドもまた結合した。50kDaゲルゾリン様ポリペプチドは、全長ゲルゾリンポリペプチドのC末端中のエピトープに向けられたいくつかの抗体によって認識される。

10

【0266】

3. 免疫沈降

【0267】

ネイティブ形態の血漿ゲルゾリンを免疫沈降させる本発明のゲルゾリン結合剤の能力を決定するために、GN3E9抗体、GF2D6抗体、GC1C10抗体およびGS2C4抗体を、2mg/mlのビーズ濃度で、CNBr活性化セファロース4B (アマシャム・ファルマシア・バイオテック社 (ピスカタウェイ、ニュージャージー)) にコンジュゲートした。コンジュゲーション手順は製造者の使用説明書に従って実行した。簡潔には、前活性化したビーズ (660mg; およそ2mLの最終ビーズ容積に等しい) を15容の1mM HCl中に懸濁し、30分間膨潤させた。次にビーズを、ゲルの15容の1mMの冷 (4) HClにより洗浄し、続いて15容のカップリング緩衝液 (0.5M NaClを含む0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.3)) により洗浄して、「洗浄したゲル」と呼ばれるビーズがもたらされた。各々の抗ゲルゾリン抗体 (GC1C10; GF2D6; GN3E9; およびGS2C4) は、0.5~1.0mg/mlでカップリング緩衝液中に希釈し、pHをpH 8.3に調整した。洗浄したゲルを各々の抗ゲルゾリン抗体溶液に追加し、混合物は4で一晚インキュベートして、「カップリングしたゲル」がもたらされた。カップリングしたゲルを、15容の1Mエタノールアミン中で室温で2~4時間再懸濁して、活性化されたビーズ上の使用されない活性化された化学的コンジュゲーション部位をブロックした。次にブロックしたゲルは、15容の50mMトリス、1M NaCl (pH 8.0) 緩衝液、および50mMグリシン、1M NaCl (pH 3.5) 緩衝液により交互に8回洗浄し、続いてゲルの10容のPBSにより最終洗浄して、未結合物質を除去した。

20

30

【0268】

ヒト血清からヒトゲルゾリンを免疫沈降させるゲルゾリン結合剤の能力を測定するために、正常な被験体からの1ミリリットル (1mL) のヒト血清サンプルは、10μLの抗ゲルゾリン抗体コンジュゲートビーズ (すなわち、GC1C10; GF2D6; GN3E9; またはGS2C4のコンジュゲートビーズ)、または対照としてのブランクビーズ (すなわち、抗ゲルゾリン抗体をコンジュゲートしていないビーズ) により2時間室温でインキュベートした。遠心分離 (14,000rpm、3分) によりビーズをペレットにすること、上清を除去すること、および次にPBS中の再懸濁によりペレットにしたビーズを洗浄することによって、抗ゲルゾリン抗体コンジュゲートビーズまたはブランクビーズから、未結合物質を洗い落とした。5回の洗浄サイクルに続いて、抗ゲルゾリン抗体コンジュゲートビーズまたはブランクビーズに結合された物質は、ペレットにしたビーズに40μLのSDS-PAGEローディング緩衝液 (3xストックの混合によって調製されたSDS-PAGEローディング緩衝液: 1Mトリス-C1 (pH 6.8)、2.4mL; 20% SDS 3mL; グリセロール (100%) 3mL; B-メルカプトエタノール 1.6mLプロモフェノールブルー 0.006g、10mL) を追加すること、および5分間サンプルを煮沸することによって、変性状態下で取り出された。免疫沈降したタンパク質を10% SDS-PAGE上で分画し、標準的技術を使用するクマシーブルー染色により染色して可視化した。結果を図4中に示す。図4中に示されるSDS-PAGEのレーンは、

40

50

以下のとおりである。レーン 1、ブランクビーズ（抗体なし）；レーン 2（GC1C10）；レーン 3（GF2D6）；レーン 4（GN3E9）；およびレーン 5（GS2C4）。レーン 2～4 に示される本発明の抗ゲルゾリン抗体（すなわち、GC1C10、GF2D6 および GN3E9）は、それぞれ、ヒト血清からの全長血漿ゲルゾリンの予想される移動と一致する～90 kDa ポリペプチドを免疫沈降させることができた。これとは対照的に、市販の抗ゲルゾリン抗体の GS2C4（レーン 5）、およびブランク（抗体がない対照；レーン 1）のどちらも、ヒト血清サンプルから検出可能な～90 kDa ポリペプチドを沈降させる能力を示さなかった。それゆえ、本研究において検査した本発明のゲルゾリン結合剤は、ヒト血清サンプルからの全長ゲルゾリンポリペプチドの予想される移動と一致する免疫反応性の～90 kDa ポリペプチドを沈降させることができるので、市販の抗ゲルゾリン抗体 GS2C4 とは異なる。この～90 kDa ポリペプチドの同一性は質量分析解析によって全長ゲルゾリンポリペプチドであると確定された（実施例 4 を参照）。

10

#### 【0269】

免疫沈降させることが検査された本発明の選択したゲルゾリン結合剤の能力は、本発明の方法におけるこれらの結合剤の使用に有利である。具体的には、免疫反応性の～90 kDa ポリペプチド（すなわちネイティブゲルゾリン）を沈降させることができる本発明のゲルゾリン結合剤は、恐らく生物学的サンプル中のネイティブゲルゾリンの結合に優れており、それゆえ本研究において利用されるような条件下で、ヒト血清サンプルからの免疫反応性の～90 kDa ポリペプチドを沈降させることができない他の抗ゲルゾリン抗体（例えば GS2C4）と比較する場合、本発明の方法においてより有用であることが証明される。

20

#### 【0270】

実施例 4 . ゲルゾリン結合剤によって結合される免疫反応性ポリペプチドの特性評価

抗ゲルゾリン抗体によって免疫沈降させた 90 kDa タンパク質がヒトゲルゾリンであることを確認するために、タンパク質バンドを SDS - PAGE から切断し、内容物は標準的技術を使用して、生物医学解析ナショナルセンター（National Center of Biomedical Analysis）（北京、中国）で質量分析によって解析した（Lewis et al.、Identification of Viral Mutants by Mass Spectrometry、Proc Nat Acad Sci USA 95：8596 - 8601（1998）を参照）。データを表 8 中に示す。プロテオミクスデータベース（Swiss - Prot / TrEMBL）検索から、90 kDa タンパク質はヒトゲルゾリンであることが示された。すなわち、本発明の抗ゲルゾリン抗体によって免疫沈降された 90 kDa ポリペプチドについて観察された質量分析パターンは、ヒト血漿ゲルゾリンについて報告された断片化パターン（Swiss - Prot / TrEMBL）に対応した。したがって、本発明の抗ゲルゾリン抗体によって免疫沈降された 90 kDa ポリペプチドは、ヒト血漿ゲルゾリンとして確定された。

30

表 8 . 免疫沈降された 90 kDa タンパク質の質量分析解析。

【表 8】

	m/z	強度		m/z	強度
1	998.57	50843.46	41	1911.03	2400.38
2	1033.56	2703.13	42	1936.98	6510.56
3	1044.55	1646.67	43	1955.05	1325.40
4	1074.56	2661.98	44	1998.12	2783.94
5	1078.56	13005.95	45	2039.65	4259.79
6	1118.55	3156.02	46	2079.14	62184.58
7	1126.65	3472.77	47	2085.15	1201.01
8	1179.65	1752.49	48	2095.13	9613.80
9	1208.74	2901.21	49	2150.15	2518.35
10	1210.76	9589.77	50	2163.13	3361.57
11	1231.78	2089.52	51	2272.16	13436.04
12	1234.68	6770.12	52	2294.14	897.53
13	1254.76	130596.74	53	2326.30	1187.02
14	1260.75	2464.65	54	2345.18	1417.40
15	1275.78	178815.66	55	2387.22	1715.26
16	1279.76	1859.19	56	2464.28	2647.65
17	1293.70	3749.91	57	2562.43	546.82
18	1308.71	1859.32	58	2669.34	1409.68
19	1315.74	5299.92	59	2687.35	1054.55
20	1320.64	3175.49	60	2706.46	3530.63
21	1349.70	6692.36	61	2764.51	682.48
22	1434.84	1473.61	62	2771.42	832.80
23	1475.82	4269.13	63	2843.46	1059.69
24	1493.80	2938.58	64	2873.38	3997.29
25	1526.84	13178.06	65	2889.36	558.77
26	1538.84	3921.98	66	3029.49	648.16
27	1542.83	3212.21	67	3570.92	306.74
28	1554.85	2676.44	68	3958.23	362.16
29	1573.80	2077.29	69	4087.37	124.00
30	1599.87	2777.20	70	4273.48	78.00
31	1639.78	1360.55			
32	1700.92	2838.91			
33	1722.91	17508.64			
34	1736.86	1608.93			
35	1753.97	1432.72			
36	1813.00	1890.69			
37	1826.96	2585.75			
38	1830.03	7243.12			
39	1837.97	10582.00			
40	1849.95	17521.04			

10

20

30

40

## 【0271】

実施例 5 . 本発明の選択したゲルゾリン結合剤のエピトープの特性評価

本発明の抗ゲルゾリン抗体によって認識されるエピトープは、ヒトゲルゾリンポリペプチドの異なるアミノ酸配列であるが重複するアミノ酸配列の短縮型ゲルゾリンポリペプチ

50

ドを使用して、ヒトゲルゾリンの50残基領域にマップされた。

【0272】

1. 短縮型ゲルゾリンポリペプチドの発現

【0273】

市販で入手可能な抗ゲルゾリンGS2C4抗体（シグマ・ケミカル社、セントルイス、ミズーリ、アメリカ）に加えて、GN3E9、GC1C10およびGF2D6抗体によって認識されるエピトープは、短縮型組換えヒトゲルゾリンタンパク質のパネルを使用して決定された。

【0274】

a. 短縮型ヒトゲルゾリンタンパク質のデザイン

【0275】

全RNAはHELAヒト癌細胞株から単離した。cDNAは、製造者の使用説明書に従って、逆転写キット（プロメガ社、マディソン、ウイスコンシン、カタログ番号A3500）を使用して合成した。cDNAはPCRのための鋳型として使用した。短縮型ゲルゾリンタンパク質をコードするcDNAクローンを得るために使用したプライマー、および短縮型タンパク質の対応するアミノ酸配列は、表9中に要約される。

【表 9】

表9：エピトープマッピングのための短縮型ヒトゲルゾリンのクローニング				
ペプチド	プライマー	配列番号：	タンパク質配列	エピトープ
GN 1	5' CACCGGATCCCTGCTTTGCGC GCTGTCCCTG 3' GGATCCCTATCCATATGTGGCA GGGTC	配列番号： 1 1 配列番号： 1 2	アミノ酸 1 3～ア ミノ酸 4 6 6	アミノ酸 4 1 6～アミ ノ酸 4 6 6
GN 2	5' CACCGGATCCCTGCTTTGCGC GCTGTCCCTG 3' GGATCCCTAGTTGGCGATATG GCTGGA	配列番号： 1 3 配列番号： 1 4	アミノ酸 1 3～ア ミノ酸 4 1 6	アミノ酸 3 6 6～アミ ノ酸 4 1 6
GN 3	5' CACCGGATCCCTGCTTTGCGC GCTGTCCCTG 3' GGATCCCTAGATGAAGTCAGA GGCTGT	配列番号： 1 5 配列番号： 1 6	アミノ酸 1 3～ア ミノ酸 3 6 6	アミノ酸 3 1 6～アミ ノ酸 3 6 6
GN 4	5' CACCGGATCCCTGCTTTGCGC GCTGTCCCTG 3' GGATCCCTAAGCCACGAGGGA GACGG	配列番号： 1 7 配列番号： 1 8	アミノ酸 1 3～ア ミノ酸 3 1 6	アミノ酸 2 6 6～アミ ノ酸 3 1 6
GN 5	5' CACCGGATCCCTGCTTTGCGC GCTGTCCCTG 3' GGATCCCTACTCAGTGCCCTC CTCAGA	配列番号： 1 9 配列番号： 2 0	アミノ酸 1 3～ア ミノ酸 2 6 6	アミノ酸 2 1 6～アミ ノ酸 2 6 6
GN 6	5' CACCGGATCCCTGCTTTGCGC GCTGTCCCTG 3' GGATCCCTAGAAGCAGTCGCC ATTGTT	配列番号： 2 1 配列番号： 2 2	アミノ酸 1 3～ア ミノ酸 2 1 6	アミノ酸 1 6 6～アミ ノ酸 2 1 6
GN 7	5' CACCGGATCCCTGCTTTGCGC GCTGTCCCTG 3' GGATCCCTACTTCAGGCCAGA CTTGAA	配列番号： 2 3 配列番号： 2 4	アミノ酸 1 3～ア ミノ酸 1 6 6	アミノ酸 1 1 6～アミ ノ酸 1 6 6
GN 8	5' CACCGGATCCCTGCTTTGCGC GCTGTCCCTG 3' GGATCCCTACAGCCAGTAGTG GAGGTC	配列番号： 2 5 配列番号： 2 6	アミノ酸 1 3～ア ミノ酸 1 1 6	アミノ酸 6 6～アミノ 酸 1 1 6
GC 1	5' CACCGGATCCGCCACATATGG ACAGTTCT 3' GGATCCCTATCAGGCAGCCAG CTCAGC	配列番号： 2 7 配列番号： 2 8	アミノ酸 4 6 7～ アミノ酸 7 8 2	アミノ酸 7 3 2～アミ ノ酸 7 8 2
GC 2	5' CACCGGATCCGCCACATATGG ACAGTTCT 3' GGATCCCTACGTCTCGATGTA CCGCTT	配列番号： 2 9 配列番号： 3 0	アミノ酸 4 6 7～ アミノ酸 7 3 2	アミノ酸 6 8 2～アミ ノ酸 7 3 2

10

20

30

40

GC3	5' CACCGGATCCGCCACATATGG ACAGTTCT 3' GGATCCCTACTCTTCGATCACA AAACG	配列番号： 31 配列番号： 32	アミノ酸 467～ アミノ酸 682	アミノ酸6 32～アミ ノ酸682
GC4	5' CACCGGATCCGCCACATATGG ACAGTTCT 3' GGATCCCTATGCCACCTGCAC AGGTTG	配列番号： 33 配列番号： 34	アミノ酸 467～ アミノ酸 632	アミノ酸5 82～アミ ノ酸632
GC5	5' CACCGGATCCGCCACATATGG ACAGTTCT 3' GGATCCCTAAGGCAATACCTC AACAGC	配列番号： 35 配列番号： 36	アミノ酸 467～ アミノ酸 582	アミノ酸5 32～アミ ノ酸582

10

## 【0276】

b. PCR反応

## 【0277】

表5、表6または表9中に要約した各々のヒトゲルゾリンペプチドをコードするDNAは、鋳型としてヒト核酸を含む組成物から増幅された。簡潔には、以下の試薬を、PCR反応(100 μlの最終体積)中で組み合わせた。鋳型cDNA、合計33 μl反応のうち5 μl; 10 pmolの適切な5'プライマーおよび3'プライマーのペア(表5または表9を参照); 10×PCR緩衝液、10 μl; dNTPs(各2.5 mM)、4 μl; およびTaqポリメラーゼ(プロメガ者)、5単位。

20

## 【0278】

PCR反応は以下のように行なった。溶液は、最初に94 で2分間加熱し、続いて94 30秒間、52 1分間、および72 3分間の40サイクルを行なった。次に、反応は最終伸長のために72 で10分間インキュベートした。増幅DNA断片を0.25 μg/mlエチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルで分離し、紫外線を使用して可視化した。増幅産物の予想されるサイズに対応するバンドをジーンクリーンキット(バイオ101社、アーバイン、カリフォルニア)を使用して回収した。すべてのPCR産物の同一性は配列解析によって確定された(以下を参照)。

30

## 【0279】

c. 短縮型ヒトゲルゾリンポリペプチドをコードするPCR産物のクローニング

## 【0280】

TOPO発現クローニングキット(インビトロゲン社、カリフォルニア)を使用して、短縮型ヒトゲルゾリンポリペプチド(表5、表6および表9)をコードする各DNA断片をクローン化した。簡潔には、PCR反応溶液から回収されたDNA断片は、50 ngのTOPO発現ベクター(TOPO発現クローニングキット)と共に、1 μlの10×リガーゼ反応緩衝液(6 mM トリスHCl (pH 7.5)、6 mM 塩化マグネシウム、5 mM 塩化ナトリウム、7 mM β-メルカプトエタノール、0.1 mM ATP、2 mM DTT、1 mM スペルミジンおよび0.1 mg/mlのBSA)と混合し、そこに4単位のT4 DNAリガーゼ(1 μl)が追加した。混合物の全体積を滅菌脱イオン水により10 μlに調整し、結果として生じるリガーゼ溶液を14 で15時間インキュベートした。インキュベーション後に、2 μlのリガーゼ反応溶液を50 μlのコンピテントな大腸菌系統TOP10F(TOPO発現クローニングキット)に追加し、製造者の使用説明書に従ってコンピテントにした。結果として生じる混合物を30分間氷上で保持し、次に42 で30秒間処理し、再び5分間氷上で冷却した。次に、2%(v/v)トリプトン、0.5%(w/v)酵母抽出物、0.05%(w/v)塩化ナトリウム、2.5 mM 塩化カリウム、1 mM 塩化マグネシウムおよび20 mM グルコースを含む、500 μlの培地(以下、「SOC」培地と呼ぶ)を、培養に追加し、混合物を振盪しながら1時間37 でイ

40

50

ンキュベートした。この後に、培養を、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むL-ブロス寒天プレート(1%(v/v)トリプトン、0.5%(w/v)酵母抽出物、0.5%(w/v)塩化ナトリウム、0.1%(w/v)グルコースおよび0.6%(w/v)バクタアガー(ディフコ社、デトロイト、ミシガン)上)に広げた。プレート上に現われたアンピシリン耐性コロニーを選択し、白金のトランスファーチップにより掻きとり、200毎分回転数で振盪しながら37で一晚 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL-ブロス培地中で培養した。インキュベーション後に、細胞を遠心分離によって採取し、これからアルカリ方法(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版(コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、1989))によってプラスミドDNAを調製した。各々の短縮型クローンからの5つのクローンを配列決定して、各々の短縮型ゲルゾリンポリペプチドの予測されたポリペプチド配列をコードするクローンを同定した。次に各々の短縮型ゲルゾリンポリペプチドの予測されたポリペプチド配列をコードすることが確認された単一クローンを、大腸菌発現宿主中での発現のために選択した。

【0281】

d. ゲルゾリンタンパク質の発現および精製

【0282】

ヒトゲルゾリンの全長、N末端断片またはC末端断片をコードするcDNA(表5または表6)または表9中に示されるゲルゾリンポリペプチド短縮型を、各々、個別のTOP0100ベクター(インビトロゲン社)の中へ挿入した。結果として生じるプラスミドを大腸菌系統BL21(DE3)中に形質転換し、指数増殖期までLB溶媒中で大腸菌を増殖させ、0.4mMイソプロピル-1-チオ-D-ガラクトピラノシドにより3時間誘導した。細胞は遠心分離によってペレットにし、上清を除去した。ペレットにした細胞を溶解緩衝液(8M尿素、20mMトリスHCl)中で再懸濁し、超音波処理によってさらに破壊した。この混合物を遠心分離(15分間14,000xg)によって清澄化し、上清を回収した。製造者の使用説明書に従ってNi-NTAスーパーフローカラム(キアゲン社、バレンシア、カリフォルニア)を使用して、発現した組換えヒトゲルゾリンポリペプチドを清澄にした上清から精製した。タンパク質濃度をBCA分析(ピアース(Pierce)社、ウォーバーン、マサチューセッツ)によって決定し、分割物を免疫のための使用まで-80で保存した。精製したゲルゾリンタンパク質調製物は、PBSに対して4で一晚透析した。タンパク質濃度はBCA分析(ピアース社、ウォーバーン、マサチューセッツ)によって決定し、分割物を使用まで-80で保存した。

【0283】

2. 短縮型ヒトゲルゾリンタンパク質のELISAによるエピトープマッピング。

【0284】

ELISAプレート(96ウェル;BDバイオサイエンス(BD Biosciences)社、カリフォルニア)を、表10および11中にリストされるような各々の短縮型ゲルゾリンタンパク質を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ でコートした(4一晚)。未結合の短縮型ゲルゾリンポリペプチドは、PBSによりウェルを3回洗浄することによってプレートから洗い落とした。次にプレートは3%(w/v)BSA含有PBSにより室温で1時間ブロッキングした。検査抗体( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 最終濃度で)を適切なウェルに追加し、37で1時間インキュベートした。未結合の抗体はPBSによりプレートを3回洗浄することによってウェルから除去した。結合した抗ゲルゾリン抗体は、HRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体(1:10,000希釈;サザン・バイオテック社、バーミングハム、アラバマ)によりウェルをインキュベート(30分;37)することによって検出した。未結合のHRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体は、PBSによりウェルを3回洗い落とすことによって除去した(各5分)。抗ゲルゾリン抗体-HRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体の複合体は、シヨアブルー-TMB 1-コンポーネントマイクロウェルペルオキシダーゼ基質(KPL社、ゲーサーズバーグ、メリーランド)を使用して測定した。具体的には

、シヨアブルー-TMB 1-コンポーネントマイクロウェルペルオキシダーゼ基質（KPL社、ゲーサーズバーグ、メリーランド）をウェルに追加し、プレートを10分間インキュベートして基質のHRP仲介性転換を可能にした。酵素反応は100 $\mu$ lの2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の追加により停止した。次に、ELISAプレート読取り装置を使用して、サンプルウェルの光学的密度を450nm/650nmで測定した。

【0285】

ヒトゲルゾリンのN末端断片に対して向けられたモノクローナル抗体を産生する合計9つの抗ゲルゾリン抗体クローンは、N末端ヒトゲルゾリン短縮型ポリペプチド（GN1～GN8）のパネルにより調べた。同様に、ヒトゲルゾリンのC末端断片に対して向けられたモノクローナル抗体を産生する16の抗ゲルゾリン抗体クローンは、C末端ヒトゲルゾリン短縮型ポリペプチド（GC1～GC6）のパネルにより調べた。N末端およびC末端に特異的な抗体のエピトープ頻度は、表10および11中にそれぞれ示される。

10

【表10】

表10. N末端特異的抗ゲルゾリン抗体のエピトープ頻度。				
ペプチド	配列	エピトープ	頻度	代表的なもの
GN1	アミノ酸13～アミノ酸466	アミノ酸416～アミノ酸466	0/9	
GN2	アミノ酸13～アミノ酸416	アミノ酸366～アミノ酸416	0/9	
GN3	アミノ酸13～アミノ酸366	アミノ酸316～アミノ酸366	4/9	GN3E9
GN4	アミノ酸13～アミノ酸316	アミノ酸266～アミノ酸316	0/9	
GN5	アミノ酸13～アミノ酸266	アミノ酸216～アミノ酸266	0/9	
GN6	アミノ酸13～アミノ酸216	アミノ酸166～アミノ酸216	0/9	
GN7	アミノ酸13～アミノ酸166	アミノ酸116～アミノ酸166	0/9	
GN8	アミノ酸13～アミノ酸116	アミノ酸66～アミノ酸116	5/9	GF5A3

20

30

【0286】

表10中に示されるように、ヒトゲルゾリンのN末端断片に対して向けられたモノクローナル抗体を産生する検査した抗ゲルゾリン抗体クローンの9のうちの4つは、領域GN3に向けられていた。1つのかかる抗ヒトゲルゾリン抗体はGN3E9である。ヒトゲルゾリンのN末端断片に対して向けられたモノクローナル抗体を産生する検査した抗ゲルゾリン抗体クローンの9のうちの残りの5つは、領域GN8に向けられていた。1つのかかる抗ヒトゲルゾリン抗体はGN5A3である。

40

【表 1 1】

表 1 1 : C末端特異的抗ゲルゾリン抗体のエピトープ頻度。				
ペプチド	配列	エピトープ	頻度	代表的なもの
GC1	アミノ酸467～ア ミノ酸782	アミノ酸732～ア ミノ酸782	0/16	
GC2	アミノ酸467～ア ミノ酸732	アミノ酸682～ア ミノ酸732	0/16	
GC3	アミノ酸467～ア ミノ酸682	アミノ酸632～ア ミノ酸682	11/16	GC1C10、GF2D 6 シグマ社GS2C4
GC4	アミノ酸467～ア ミノ酸632	アミノ酸582～ア ミノ酸632	0/16	
GC5	アミノ酸467～ア ミノ酸582	アミノ酸532～ア ミノ酸582	0/16	
GC6	アミノ酸467～ア ミノ酸532	アミノ酸482～ア ミノ酸532	5/16	GC5C1

10

## 【0287】

表 1 1 中に示されるように、ヒトゲルゾリンの C 末端断片に対して向けられたモノクローナル抗体を産生する検査した抗ゲルゾリン抗体クローンの 16 のうちの 11 は、領域 GC3 に向けられていた。3 つのかかる抗ヒトゲルゾリン抗体は GC1C10、GF2D6 および市販で入手可能な GS2C4 抗体である。ヒトゲルゾリンの C 末端断片に対して向けられたモノクローナル抗体を産生する検査した抗ゲルゾリン抗体クローンの 16 のうちの残りの 5 は、領域 GC68 に向けられた。1 つのかかる抗ヒトゲルゾリン抗体は GC5C1 である。

20

## 【0288】

3 . 種の中での交差反応性および相同性の解析によるエピトープの微細なマッピング

## 【0289】

異なる種の中でのゲルゾリンポリペプチドの相同性レベルが高いことから、異なる種で発現されるゲルゾリン免疫反応性ポリペプチドとこれらの結合剤の交差反応性を調べることによって、本発明のゲルゾリン結合剤により結合されるゲルゾリンエピトープをさらにマッピングすることが可能である。

30

## 【0290】

a . 免疫沈降

## 【0291】

様々な種からのネイティブ形態の血漿ゲルゾリンを免疫沈降させる本発明の抗ゲルゾリン抗体の能力を決定するために、GN3E9、GF2D6 および GC1C10 を、上記の実施例 3 中で記述されるように、2 mg / ml のビーズの濃度でセファロース 4 B にコンジュゲートした。選択した哺乳類種からの 1 mL 血清サンプル ( 1 mL ) は、10 μ l の抗体コンジュゲートビーズまたはブランクビーズ ( 対照 ) と共に 2 時間室温でインキュベートした。遠心分離 ( 14 , 000 rpm、3 分 ) によりビーズをペレットにすること、上清を除去すること、および次に PBS 中の再懸濁によりペレットにしたビーズを洗浄することによって、抗ゲルゾリン抗体コンジュゲートビーズまたはブランクビーズから、未結合物質を洗い落とした。5 回の洗浄サイクルに続いて、抗ゲルゾリン抗体コンジュゲートビーズまたはブランクビーズに結合された物質は、ペレットにしたビーズに、40 μ l の SDS - PAGE ローディング緩衝液 ( 3 × ストックの混合によって調製された SDS - PAGE ローディング緩衝液 : 1 M トリス - Cl ( pH 6 . 8 ) 2 . 4 ml ; 20 % SDS 3 ml ; グリセロール ( 100 % ) 3 ml ; B - メルカプトエタノール 1 . 6 ml ; プロモフェノールブルー 0 . 006 g、10 ml ) を追加すること、およびサンプルを 5

40

50

分間煮沸することによって、変性条件下で取り出された。免疫沈降したタンパク質を 10 % SDS - PAGE 上で分画し、標準的技術を使用するクマシーブルー染色により染色して可視化した。結果を図 5 A ~ 5 C 中で示す。

【 0 2 9 2 】

b . ウエスタンブロット解析

【 0 2 9 3 】

抗ゲルゾリン抗体の異なる種の中での結合特異性を決定するために、抗ゲルゾリン抗体による血清サンプルのウエスタンブロット解析を実行した。選択した哺乳類種 ( 20  $\mu$  l の PBS 中で血清の 1 : 20 希釈 ) の血清サンプルを、標準的技術を使用して、10 % SDS - PAGE によって分画し、ニトロセルロース膜上にウエスタンブロットした。エレクトロトランスファー後に、エレクトロブロットしたニトロセルロース膜 ( ブロット ) を室温で 5 % ( w / v ) の脱脂乳を使用して 1 時間ブロッキングした。ブロットは、精製抗ゲルゾリン抗体 ( 1  $\mu$  g / ml ; プロテイン A または プロテイン G により精製された )、すなわち GN 3 E 9 ; GC 1 C 1 0 ; GF 2 D 6 ; または GS 2 C 4 により室温で 2 時間ブローピングした。未結合の抗ゲルゾリン抗体は、0 . 0 2 % ( v / v ) ツイーン 2 0 を含む PBS により振盪しながら室温で 10 分間 5 回洗浄することによって、ブロットから洗い落とした。結合した抗ゲルゾリン抗体は、HRP コンジュゲートヤギ抗マウス Ig G ( ブロッキング緩衝液中で 1 : 1 0 , 0 0 0 ) により各ブロットを室温で 1 時間ブローピングすることによって検出した。未結合の HRP コンジュゲートヤギ抗マウス Ig G は、0 . 0 2 % ( v / v ) ツイーン 2 0 を含む PBS により振盪しながら室温で 10 分間 5 回洗浄することによって、ブロットから洗い落とした。抗ゲルゾリン - HRP コンジュゲートヤギ抗マウス Ig G 複合体は、HRP 仲介性化学発光を使用して可視化した。具体的には、ブロットは、ルミグロ- ( 登録商標 ) ペルオキシダーゼ化学発光基質 ( KPL 社、ゲ-サーズバーグ、メリーランド ) により 3 分間インキュベートし、X 線フィルムに露光した。ウエスタンブロット解析の結果は、図 5 A ( GC 1 C 1 0 )、図 5 B ( GF 2 D 6 ) および図 5 C ( GN 3 E 9 ) 中で示される。レーンは以下のとおりである。M : 分子量マーカー ; B : ブランク ; レーン 1 : マウス血清、レーン 2 : サル血清、レーン 3 : ウサギ血清、レーン 4 : ラット血清、レーン 5 : ウシ血清、レーン 6 : ウマ血清、レーン 7 : ヒト血清。

10

20

30

【 0 2 9 4 】

抗ゲルゾリン抗体の交差反応性を検討する研究の結果は、表 1 2 中に要約され、ここで「 n d 」は決定されないことを示す。

【 表 1 2 】

クローン	p G S N							
	ヒト	サル	ウシ	ウマ	ブタ	ウサギ	ラット	マウス
GN 3 E 9	+	+	-	-	n d	-	-	-
GC 1 C 1 0	+	+	+	+	n d	-	+	-
GF 2 D 6	+	+	+	+	n d	-	-	-
GS 2 C 4	+	n d	+	n d	+	+	-	-

40

【 0 2 9 5 】

表 1 2 中に示されるように、検査した抗ゲルゾリン抗体は、各免疫反応性のゲルゾリンについて別個のパターンの交差反応性を有していた。例えば、抗体 GN 3 E 9 は、他の検査した哺乳類の血清ゲルゾリンポリペプチドではなく霊長類の血清ゲルゾリン ( ヒトおよびサル ) を選択的に結合した。これとは対照的に、市販の抗ゲルゾリン抗体 GS 2 C 4 は、ラットおよびマウスを除く、検査された大部分の哺乳類血清ゲルゾリンに結合することが観察された。

【 0 2 9 6 】

c . エピトープの配列相同性解析。

50

## 【0297】

ヒト抗ゲルゾリン抗体との交差反応性(表12を参照)を調べた様々な哺乳類種の50アミノ酸のゲルゾリンエピトープ領域(上で同定された)の配列アライメントにおける差から、検査された抗ゲルゾリン抗体の各々について、およそ10アミノ酸残基までゲルゾリンエピトープをさらに正確にしていくことが可能になった。ホモロジー検索およびエピトープ決定の結果を、表13(GN3E9)、表14(GF2D6)、表15(GC1C10)および表16(シグマGS2C4)中に要約する。1つまたは2つのゲルゾリンエピトープ領域中のアミノ酸残基変化は、抗ゲルゾリン抗体の結合エピトープに影響を与えることが観察された。

## 【表13】

種	配列相同性	反応性	決定したエピトープ	アミノ酸範囲	配列番号:
ヒト	FAQGAL <u>K</u> SED	++++	FAQGA L <u>K</u> SED	321~330	配列番号: 2
ウシ	FAQGAL RSED	-			配列番号: 37
ウマ	FAQGAL RSED	-			配列番号: 37
マウス	FAQGAL RSED	-			配列番号: 37
ラット	FAQGAL RSED	-			配列番号: 37

10

20

## 【0298】

表13中に要約されるように、抗ゲルゾリン抗体GN3E9は、アミノ酸配列FAQGA L K SED(配列番号: 2)を含むエピトープを結合すると予測される。

## 【表14】

種	配列相同性	反応性	決定したエピトープ	アミノ酸範囲	配列番号:
ヒト	ACSN <u>K</u> IGRFV	++++	ACSN <u>K</u> IGRFV	661~670	配列番号: 4
ウシ	ACSNK IGRFV	++++			配列番号: 4
ウマ	ACSN <u>K</u> IGRFV	++++			配列番号: 4
マウス	ACSNR IGRFV	-			配列番号: 38
ラット	ACSNR IGRFV	-			配列番号: 38
ブタ	ACSN <u>K</u> IGRFV	nd			配列番号: 4

30

40

## 【0299】

表14中に要約されるように、抗ゲルゾリン抗体GF2D6は、アミノ酸配列ACSNK IGRFV(配列番号: 4)を含むエピトープを結合すると予測される。

【表 15】

表 15. ホモロジー検索およびGC1C10のエピトープ決定					
種	配列相同性	反応性	決定したエピトープ	アミノ酸範囲	配列番号:
ヒト	SEP <u>DGF</u> WEAL	++++	SEP <u>DGF</u> WEAL	636~645	配列番号: 3
ウシ	SEP <u>DSF</u> WEAL	++++	SEP <u>DSF</u> WEAL	636~645	配列番号: 39
ウマ	SEP <u>DSF</u> WEAL	++++			配列番号: 39
マウス	SEPDAF WEAL	-			配列番号: 40
ラット	SEP <u>DGF</u> WEAL	++++			配列番号: 3
ブタ	SEP <u>DSF</u> WEAL	nd			配列番号: 39

10

## 【0300】

表 15 中に要約されるように、抗ゲルゾリン抗体 GC1C10 は、Xaa が G または S であるアミノ酸配列 SEPDXFWAL (配列番号: 47) を含むエピトープを結合すると予測される。

20

【表 16】

表 16. ホモロジー検索およびGS2C4のエピトープ決定					
種	配列相同性	反応性	決定したエピトープ	アミノ酸範囲	配列番号:
ヒト	GGK <u>AA</u> RTSP	++++	GGK <u>AA</u> RTSP	646~655	配列番号: 41
ウシ	GGKAA RTSP	++++			配列番号: 41
ウマ	GGKAT RTSP	-			配列番号: 42
マウス	GGKT RTSP	-			配列番号: 43
ラット	GGKT RTSP	-			配列番号: 43
ブタ	GGK <u>AA</u> RTSP	++++			配列番号: 41

30

## 【0301】

表 16 中に要約されるように、市販の抗ゲルゾリン抗体 GS2C4 は、アミノ酸配列 GKAA YRTSP (配列番号: 41) を含むエピトープを結合すると予測される。

40

## 【0302】

上述されるように、抗ゲルゾリン抗体の GN3EP、GC1C10、GF2D6 および GS2C4 は、別個の生化学的性質を提示する。抗ゲルゾリン抗体の GN3EP、GC1C10 および GF2D6 は、互いに異なり、市販の抗ゲルゾリン抗体 GS2C4 について観察された交差反応性のパターンとも異なる、交差反応性のパターンを示す。さらに、抗ゲルゾリン抗体の GN3EP、GC1C10 および GF2D6 は、互いに異なり、市販の抗ゲルゾリン抗体 GS2C4 により結合されるゲルゾリンエピトープとも異なるゲルゾリンエピトープに結合する。これは、ゲルゾリンの C 末端の 3D 構造の解析によってさらに示される (Narayan et al., FEBS Lett. 552: 82-85 (

50

2003))。抗ゲルゾリン抗体のGC1C10、GF2D6およびGS2C4について同定されたゲルゾリンエピトープの位置の位置のマッピングは、図6中に示されるように、ヒトゲルゾリンポリペプチドの表面上の異なる領域にこれらの薬剤が結合することを明らかにする。結果は、検査したすべての抗ゲルゾリン抗体によって認識されるエピトープが正に荷電すると予測される領域中にあることを示す。

#### 【0303】

実施例6．アクチン不含有血漿ゲルゾリンを認識する能力

#### 【0304】

アクチン阻害ELISA分析を使用して、血漿ゲルゾリンの未結合(活性)形態を認識し、血漿ゲルゾリンの結合(不活性)形態を認識しない、本発明のゲルゾリン結合剤の能力を検査した。この分析において、ELISAプレートを、PBS中の $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の精製ネイティブヒト血漿ゲルゾリンにより4で一晚コートした。PBSにより3回洗浄した後に、プレートは1時間室温で3%(w/v)BSA含有PBSによりブロッキングした。F-アクチンは、 $10\text{mM}$ の $\text{CaCl}_2$ の存在下において、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度で適切な検査ウェルに追加した。次にプレートを1時間37でインキュベートし、ウェル上のネイティブ血漿ゲルゾリンコーティングにアクチンが結合することを可能にした。このインキュベーション期間に続いて、未結合のF-アクチンは、PBSにより室温で3回洗浄することによってウェルから洗い落とした(各3分)。抗ゲルゾリンの検査抗体( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 最終濃度)を、適切なウェルに追加し、1時間37でインキュベートした。未結合の抗体はPBSによりプレートを3回洗浄することによってウェルから除去した。結合した抗ゲルゾリン抗体は、HRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体(1:10,000希釈;サザン・バイオテック社、バーミングハム、アラバマ)によりウェルをインキュベート(30分;37)することによって検出した。未結合のHRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体は、PBSによりウェルを3回洗い落とすことによって除去した(各5分)。抗ゲルゾリン抗体-HRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体の複合体は、シヨアブルーTM B1-コンポーネントマイクロウェルペルオキシダーゼ基質(KPL社、ゲーサーズバーグ、メリーランド)を使用して測定した。具体的には、シヨアブルーTM B1-コンポーネントマイクロウェルペルオキシダーゼ基質(KPL社、ゲーサーズバーグ、メリーランド)をウェルに追加し、プレートを10分間インキュベートして基質のHRP仲介性転換を可能にした。酵素反応は $100\mu\text{L}$ の $2\text{N}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ の追加により停止した。次に、ELISAプレート読取り装置を使用して、サンプルウェルの光学的密度を $450\text{nm}/650\text{nm}$ で測定した。

#### 【0305】

F-アクチンにより処理されないサンプルへの抗体の結合(100%の結合)と比べた、F-アクチンにより処理されたサンプルに結合した抗ゲルゾリン抗体の量の比較は、図7中に要約される。F-アクチン処理の存在下または非存在下において結合する抗ゲルゾリン抗体GS2C4について観察される分析シグナルの有意な変化が観察されなかったため、市販の抗ゲルゾリン抗体GS2C4は、遊離ゲルゾリン(すなわち、F-アクチンに結合されない)およびFアクチンに結合したゲルゾリンを区別しなかった。これとは対照的に、抗ゲルゾリン抗体のGN3E9、GC1C10およびGF2D6は、ゲルゾリンのアクチン結合形態よりもヒト血漿ゲルゾリンの活性形態に対する選択性を示す(図7)。理論によって限定されることは意図しないが、遊離ゲルゾリン分子とアクチン複合体を形成したゲルゾリン分子の機能特性は異なる。例えば、遊離ゲルゾリンはアクチンフィラメントを切断することができるが、複合体中のアクチンゲルゾリンは切断できない。したがって、本発明の方法における遊離の活性のあるゲルゾリンを優先的に結合するゲルゾリン結合剤の使用は、アクチンと複合体を形成したゲルゾリンとは異なる機能特性を有する(上述されるように)遊離ゲルゾリンの生物学的サンプル中のレベルをより正確に定量するという長所を有する。

#### 【0306】

実施例7．血漿ゲルゾリンについての免疫分析

10

20

30

40

50

## 1. 方法

## 【0307】

血漿ゲルゾリンの定量的測定のためのサンドイッチゲルゾリンELISAを行なうために、4つの抗ゲルゾリン抗体を選択して捕捉抗体または検出抗体として働く能力を決定した。ゲルゾリンELISAは以下のように実行した。ELISAプレート(96ウェル; BDバイオサイエンス社、カリフォルニア)を、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の捕捉抗体により4で一晩コートした。未結合の捕捉抗体は、PBSによりプレートを3回洗浄することによってウェルから洗い落とした。次に、非特異的結合部位は、PBS中の3%(w/v)BSAによるウェルのインキュベートによってブロッキングした(1時間、室温)。ブロッキング溶液をウェルから除去し、プレートは真空密封前に風乾し、使用前に4で保存した。生物学的サンプル中のゲルゾリンの測定のために、 $50\mu\text{l}$ のヒト血漿サンプルを、室温に平衡化した捕捉抗体により処理したゲルゾリンELISAプレートの適切なウェルに最初に追加した。プレートへのサンプルの追加の直後に、 $50\mu\text{l}$ のHRPコンジュゲート検出抗体(ブロッキング緩衝液中で $\sim 0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ )を適切なウェルに追加し、プレートは20分間37でインキュベートした。未結合の物質は、PBSによりプレートを3回洗浄することによってウェルから洗い落とした。捕捉された血漿ゲルゾリン:HRPコンジュゲート抗体複合体は、追加された $100\mu\text{l}$ のECL基質緩衝液(KPL社、ゲーサーズバーグ、メリーランド)の追加によって測定した。37で3分間のインキュベーションの後に、各ウェルの光学的密度はELISAプレート読取り装置において $450\text{nm}/650\text{nm}$ で測定した。

10

20

## 【0308】

## 2. ELISAにおけるゲルゾリン抗体のペア能力

## 【0309】

表17は、本発明の選択した抗体および市販の抗ゲルゾリンモノクローナル抗体GS2C4のペアの適合性を示す。抗ゲルゾリン抗体GN3E9を捕捉抗体として使用した場合に、検出抗体としてGC1C10抗体またはGF2D6抗体のいずれかにより最も高いOD値が得られ、ゲルゾリンELISAに有用な抗体立体配置は、捕捉抗体としてGN3E9、および検出抗体としてGC1C10抗体またはGF2D6抗体であることを示唆する。本発明のゲルゾリン結合剤(例えば抗ゲルゾリン抗体のGN3E9、GC1C10またはGF2D6)とは対照的に、市販の抗ゲルゾリン抗体GS2C4は、ELISA形式で血漿ゲルゾリンを検出する捕捉抗体または検出抗体としては有用ではなかった。

30

## 【表17】

		捕捉抗体			
		GN3E9	GC1C10	GF2D6	GS2C4
検出抗体	GN3E9	—	2.58	2.96	0.015
	GC1C10	3.65	—	0.35	0.012
	GF2D6	3.85	0.41	—	0.031
	GS2C4	0.025	0.014	0.013	—

40

## 【0310】

## 3. 血漿ゲルゾリンの定量的測定

## 【0311】

ゲルゾリンELISA分析形式(上で詳述されたように)で血漿ゲルゾリンを定量的に測定する本発明のゲルゾリン結合剤の能力を検査するために、親和性精製したヒト血漿ゲルゾリンを含むサンプルの希釈系列を使用して、標準曲線を生成した。結果は図8中に示され、2つの検査された捕捉抗体/検出抗体ペアが血漿ゲルゾリンの幅広い濃度範囲にわたりヒトゲルゾリンの定量的測定を可能することを示す。図8Aおよび図8Bの両方において示されるように、相対的光単位(RLU)として表現される分析シグナルと血漿ゲルゾリン濃度( $\text{ng}/\text{ml}$ )との間で直接的な直線関係があった。例えば、図8A中で示さ

50

れる抗体ペア (GN3E9 (捕捉) / GC1C10 (検出)) は、0.9998 の R 値を有していた。図 8 B 中で示される抗体ペア (GN3E9 (捕捉) / GF2D6 (検出)) は、0.9989 の R 値を有していた。

#### 【0312】

##### 4. 血漿ゲルゾリンの測定に対するサンプル調製物の効果

#### 【0313】

血液採取手順がゲルゾリンの定量化に影響を与えるかどうかを検査するために、8人の健康な個人からの血液サンプルを、クエン酸ナトリウム、ヘパリンまたは EDTA を含む、血清調製チューブ (リウ・ヤン・メディカル・デバイス社 (Liu Yang Medical Device Co Ltd)、フーナン、中国) 中に回収した。GN3E9 / GC1C10 抗体ペアを使用して、上述されるようにゲルゾリン ELISA を行なった。結果を図 9 中に示す。追加しない (血清) サンプルは、 $126 \pm 14 \mu\text{g}/\text{mL}$  のゲルゾリンレベルを示した。ヘパリンまたは EDTA の追加は血清中のゲルゾリンの定量化を有意に妨害せず、それぞれ  $124 \pm 18 \mu\text{g}/\text{mL}$  および  $116 \pm 17 \mu\text{g}/\text{mL}$  のゲルゾリンレベルを示した。しかしながら、クエン酸ナトリウムはヒト血漿ゲルゾリンの ELISA 測定を妨害し、 $77 \pm 12 \mu\text{g}/\text{mL}$  のゲルゾリンを示す ( $p < 0.0001$ )。これらの結果は、血漿サンプルの調製条件が ELISA 技術による免疫反応性ゲルゾリンポリペプチドの検出に影響を与えることを示す。

10

#### 【0314】

##### 5. 全長ゲルゾリンの特異的測定

20

#### 【0315】

ゲルゾリン結合剤を使用する免疫分析が全長ゲルゾリンおよび/または他の免疫反応性断片を測定するかどうかを決定するために、4つの異なるタイプのヒトゲルゾリンスタンダード (例えば、ネイティブゲルゾリン、組換え全長、組換え N 末端断片および組換え C 末端断片) を、GN3E9 / GC1C10 抗体ペアを使用して ELISA によって測定した。結果を図 10 中に示す。検査されたゲルゾリン結合剤は、用量依存的様式で、ネイティブ血漿ゲルゾリンおよび組換え全長ゲルゾリンの両方を定量的に測定する ELISA 形式で有用であった。GN3E9 捕捉抗体および GC1C10 検出抗体の特異性と一致して、この抗体ペアは N 末端または C 末端のどちらの断片も検出しなかった。これらの結果は、この実施例において記述される定量的分析が全長ゲルゾリンに特異的であり、免疫反応性断片を検出しないことを示す。

30

#### 【0316】

##### 6. アクチン不含有ゲルゾリンの特異的測定

#### 【0317】

サンプル中のゲルゾリンの機能的形態 (例えば、アクチン不含有形態) を測定する血漿ゲルゾリンの免疫分析は有利であろう。本発明のゲルゾリン結合剤を使用するゲルゾリン ELISA がアクチン不含有ゲルゾリンのみを測定するかどうかを決定するために、様々な量のネイティブ血漿ゲルゾリンスタンダードを、2つのペアの抗体を使用して、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  の F-アクチンの存在下または非存在下で測定した。図 11 中で示されるように、F-アクチンの存在はペアの抗体のゲルゾリンに対する反応性を有意に低減した (パネル A: GN3F9 / GC1C10; パネル B: GN3E9 / GC2D6)。これらの結果は、選択された抗体ペアが活性のある血漿ゲルゾリンに選択的であるので、ELISA 形式で活性のある血漿ゲルゾリンの定量に選択された抗体ペアが有用であることを示す。

40

#### 【0318】

##### 実施例 8. 臨床的サンプル中の血漿ゲルゾリンの定量化

##### 1. 救急患者における血清ゲルゾリンレベル

#### 【0319】

ゲルゾリン ELISA 分析が臨床設定においてゲルゾリンを定量する能力を検査するために、上述されるように正常な患者および ICU 患者からのサンプルを得て解析した。この解析は捕捉抗体 / 検出抗体ペア GN3E9 / GC1C10 を使用した。結果を図 12 お

50

よび表 18 中に示す。図 12 は、正常な被験体が  $136 \pm 22 \mu\text{g}/\text{mL}$  の血清ゲルゾリンレベルを示し、その一方で ICU 患者が有意に低下したおよそ  $35 \pm 25 \mu\text{g}/\text{mL}$  の血清ゲルゾリンレベルを有することを示す ( $p < 0.0001$ )。表 18 は、各救急患者についての、性別、年齢、診断、および実際のゲルゾリンレベルを示すデータを提示する。したがって、血清ゲルゾリンレベルは、ICU 患者における、敗血症性ショック、感染（例えば肺炎および呼吸窮迫症候群）；心不全；心臓発作および膵炎のバイオマーカーである。

【表 18】

表 18. 救急患者における血清ゲルゾリンレベル					
サンプル番号	性別	年齢	診断	血清ゲルゾリン ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	カットオフ (平均 3SD)
正常な対照 (298)				$136 \pm 22$	70
1	F	70	脳卒中	8.4	****
2	M	80	肺炎	99.5	
3	M	74	敗血症	25.8	***
4	F	70	肺炎、RDS?	4.6	****
5	F	88	心筋梗塞	16.8	***
6	F	76	心不全	6.7	****
7	M	72	肺炎、RDS?	15.2	***
8	M	80	肺炎、RDS?	8.7	****
9	M	80	肺炎	42.2	**
10	F	82	肺炎	53.2	*
11	M	75	急性膵炎	85.4	
12	M	72	?	25.1	***
13				46.1	*
14				43.8	*
15				23.7	****
16				43.3	*
17	F	87	肺炎、RDS?	21.1	***
18	M	75	肺炎	10.3	***
19	M	80	肺炎	62.3	*
20	M	78	敗血症	28.1	***
21	M	72	心不全	55.5	*
22	F	85	心不全	44.9	*

## 【0320】

ICU 群における患者は比較的高齢であったが、他の研究は様々な年齢集団の中で血漿ゲルゾリンレベルは有意に異ならないことを示した。結果を表 19 中に示す。

表 19. 年齢によって分類されたヒト被験体における血清ゲルゾリンの定量化

【表 19】

年齢群	20～30	30～40	40～50	50～60	60～70	70～80
被験体の数	83	36	13	29	72	70
平均	185.8	181.1	190.2	188.4	194.6	203.7
標準偏差	37.75	34.2	37.46	32.93	43.69	40.34
標準誤差	4.144	5.7	10.39	6.114	5.149	4.822

## 【0321】

救急患者の追加の2つの群（大手術を受けた患者および重症の敗血症の症状を示す患者）もまた、ゲルゾリンELISA分析において本発明のゲルゾリン結合剤を使用して、血清ゲルゾリンレベルの低下を示した。大手術は麻酔または呼吸補助を含む任意の外科的手順として定義される。患者組入れのための基準は以前に記述された（Wang et al., Eur J Clin Pharmacol 62: 927-31 (2006)）。重症の敗血症は、新規の臓器機能不全、低血圧あるいは血流低下に関連する敗血症として定義される。患者組入れのための基準は以前に記述された。（Chen et al., Genes Immun 8: 439-43 (2007)）。

10

## 【0322】

血清ゲルゾリンレベルは、対照（ $127.7 \pm 35.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $n = 14$ ）と比較して、手術患者（ $44.75 \pm 25.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $n = 43$ ）および重篤な敗血症患者（ $21.65 \pm 12.04 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $n = 80$ ）の両方において減少した。これらのさらなる結果は、臨床設定において血清ゲルゾリンを定量する本発明のゲルゾリン結合剤の能力を実証する。さらに、研究は、本発明のゲルゾリン結合剤を使用するゲルゾリンELISAが敗血症患者からの生物学的サンプル中の血清ゲルゾリンの測定に有用であることを実証する。ゲルゾリンはヒト敗血症におけるバイオマーカーである。

20

## 【0323】

2. 全身性エリテマトーデス（SLE）における血清ゲルゾリンレベル

## 【0324】

本発明のゲルゾリン結合剤を使用するゲルゾリンELISAを使用して、全身性エリテマトーデス（SLE）などの活動性自己免疫性疾患の検出のために血清ゲルゾリンレベルが適切なバイオマーカーを提供するかどうかを調べた。上述されるようにゲルゾリンELISA解析を実行した。結果は図13中に示され、正常な患者（ $137 \pm 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）と比較して、活動性SLE（ $26 \pm 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $p < 0.0001$ ）または非活動性SLE（ $88 \pm 36 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $p < 0.0001$ ）を有する患者が血清ゲルゾリンレベルの有意な低下を示すことを指摘する。同様に、非活動性SLEを有する患者は正常な患者と比較して、血清ゲルゾリンレベルの有意な低下を示す。さらに、研究は、本発明のゲルゾリン結合剤を使用するゲルゾリンELISAが自己免疫性疾患に罹患した患者からの生体サンプル中の血清ゲルゾリンの測定に有用であることを実証する。血清ゲルゾリンは自己免疫性疾患のためのバイオマーカーでありえ、活動性SLE状態から非活動性SLE状態に移行する個体の同定を支援することができる。

30

40

## 【0325】

3. 慢性肝炎における血清ゲルゾリンレベル

## 【0326】

本発明のゲルゾリン結合剤を使用するゲルゾリンELISAを使用して、血清ゲルゾリンレベルが慢性肝炎の検出のために適切なバイオマーカーを提供するかどうかを調べた。上述されるようにゲルゾリンELISA解析を実行した。図14に示されるように、血清ゲルゾリンは慢性肝炎に罹患した患者において有意に減少する。したがって、ゲルゾリンは肝機能の指標でありえ、慢性肝炎に罹患した患者がゲルゾリン補充療法を必要とするだろうことを示唆する。血清ゲルゾリンは慢性肝炎のためのバイオマーカーでありえる。さらに、研究は、本発明のゲルゾリン結合剤を使用するゲルゾリンELISAが慢性肝炎に

50

罹患した患者からの生体サンプル中の血清ゲルゾリンの測定に有用であることを実証する。

【0327】

4. 関節リウマチにおける血清ゲルゾリンレベル

【0328】

本発明のゲルゾリン結合剤を使用するゲルゾリンELISAを使用して、関節リウマチなどの慢性炎症性疾患の検出のために血清ゲルゾリンレベルが適切なバイオマーカーを提供するかどうかを調べた。上述されるようにゲルゾリンELISA解析を実行した。結果は図23中に示され、正常な患者(231 ± 4.7 μg/mL; n = 32)と比較して、関節リウマチ(140.1 ± 6.3 μg/mL、p < 0.0001; n = 29; 平均 ± S 標準誤差)を有する患者が血清ゲルゾリンレベルの有意な低下を示すことを指摘する。研究は、本発明のゲルゾリン結合剤を使用するゲルゾリンELISAが慢性炎症性疾患(例えば関節リウマチ)に罹患する患者からの生体サンプル中の血清ゲルゾリンの測定に有用であることを実証する。

10

【0329】

5. 癌患者における血清ゲルゾリンレベル

【0330】

本発明のゲルゾリン結合剤を使用するゲルゾリンELISAを使用して、患者の状態を評価するために癌患者における血清ゲルゾリンレベルを測定した。血清サンプルは、任意の重大な治療(手術、化学療法、または放射線療法)前に新しく診断された癌に罹患した患者から回収した。サンプルは、捕捉抗体/検出抗体ペアGN3EP/GC1C10を使用して上述されるようなゲルゾリンELISAによって解析した。結果を表20中に示す。

20

【表20】

表20. 癌患者における血清ゲルゾリンレベル			
	標本組数	カットオフ未満 平均 - 3SD (70 μg/mL)	カットオフ値未満の患 者の%
正常	291	0	0
乳癌	48	7	14.6%
大腸癌	66	17	27.6%
胃癌	98	40	40.8%
肺癌	88	42	47.7%

30

【0331】

結果は、すべての検査されたタイプの癌を有している患者の有意な割合が、健康的な対照と比較して、血清ゲルゾリンレベルが有意により低いことを示すことを指摘する。それゆえ、血清ゲルゾリンレベルは癌または癌患者の状態のためのバイオマーカーでありえる。さらに、研究は、本発明のゲルゾリン結合剤を使用するゲルゾリンELISAが癌に罹患した患者からの生体サンプル中の血清ゲルゾリンの測定に有用であることを実証する。本発明のゲルゾリン結合剤を使用するゲルゾリンELISAは、ゲルゾリン補充療法目的のために癌患者の状態を決定する方法において有用である。例えば、癌患者におけるゲルゾリンレベルを査定して、ゲルゾリンレベルが対照参照スタンダードに対して低下しているかどうかを決定する。患者における血清ゲルゾリンのレベルが対照参照スタンダードよりも低いならば、患者はゲルゾリン補充療法を必要とする個体として分類することができる。さらに、本発明のゲルゾリン結合剤を使用して、血漿ゲルゾリンのレベルに基づいて患者に投薬すべきゲルゾリンのレベルを決定することができる。さらに、本発明のゲルゾリン結合剤を使用して、患者の治療後に血清ゲルゾリンレベルを測定することによって

40

50

、ゲルゾリン補充療法に対する患者の後続応答を測定することができる。

【0332】

実施例9．血漿ゲルゾリンレベルに対する化学療法の効果

1．インビボのマウスモデルにおける血漿ゲルゾリンに対する化学療法の効果

【0333】

血漿ゲルゾリンに対する化学療法の効果は、本発明の結合剤を使用して調べた。化学療法剤のタキソール（タキソール、メイン・ファルマPty社（Mayne Pharma Pty Ltd）、マルグレーブVIC 3170オーストラリア）、またはアドリアマイシン（アドリアマイシン、ベン・ベニュー・ラボラトリーズ社（Ben Venue Laboratories, Inc.）ベッドフォード、オハイオ4414）を、マウス（中国医学科学院動物施設（Animal Facility of Chinese Academy of Medical Sciences）から購入した8週齢のメスBalb/c）へと腹腔内注射（1用量あたり250 $\mu$ g）によって投与した。薬剤は一日おきに2回投与した。最後の注射後3日で、血清をマウスから回収し、抗ゲルゾリン抗体のGC1C10およびGC1G12を使用するウエスタンブロットによって解析した（上述された手順を使用して）。抗体GC1G12はマウスゲルゾリンと交差反応する。結果を図15中に示す（パネルAおよびB）。パネルAにおける各レーン異なる被験体マウスを示す。パネルAのウエスタンブロットデータ（図15A）をデンシトメトリーによって定量的に測定した（図15B）。結果は、タキソールまたはアドリアマイシンのいずれかを使用する化学療法による治療が、かかる療法を投与したマウスにおいて検出可能な血清ゲルゾリンのレベルを有意に減少させることを示す。

10

20

【0334】

化学療法後の血漿ゲルゾリンの時間依存的減少を検討するために、マウス（中国医学科学院動物施設から購入した8週齢のメスBalb/c）に、単一ボラス注射として、タキソール（1用量あたり500 $\mu$ g）またはアドリアマイシン（1用量あたり500 $\mu$ g）の高用量で腹腔内注射した。ゲルゾリンの血中濃度は、抗ゲルゾリン抗体GC1G12によるウエスタンブロット解析を使用して、治療後の示されたタイムポイントで測定した（上述されるように）。図16Aはウエスタンブロットを示し、図16Bはデンシトメトリーを使用するウエスタンブロットの定量化を示す。図16Aおよび16B中に示されるように、血清ゲルゾリンの時間依存的減少はタキソール治療後に観察された。同様に、図16Cおよび16D中に示されるように、ゲルゾリンの血中濃度の時間依存的減少はアドリアマイシン治療後に観察された。したがって、化学療法は、マウスモデルにおいて血漿ゲルゾリンを枯渇させ、血漿ゲルゾリンレベルは化学療法の急性毒性反応のためのバイオマーカーとして働くことができる。それゆえ、本発明のゲルゾリン結合剤は、化学療法に後続する患者条件のモニタリング、またはゲルゾリン補充療法もしくはさらなる化学療法が適切かどうかの確認に有用である。さらに、本発明のゲルゾリン結合剤を使用して、血漿ゲルゾリンのレベルに基づいて患者に投薬するべきゲルゾリンのレベルを決定することができる。さらに、本発明のゲルゾリン結合剤を使用して、患者の治療後に血清ゲルゾリンレベルを測定することによって、ゲルゾリン補充療法に対する患者の後続応答を測定することができる。

30

40

【0335】

2．ヒトにおける血漿ゲルゾリンに対する化学療法の効果

【0336】

卵巣癌に罹患した5人のヒト患者におけるゲルゾリンの血中濃度は、化学療法の前後にGN3E9/GC1C10抗体ペアを使用するELISAによって（上述されるように）測定した。具体的には、第III期/IV期卵巣癌に罹患したヒト被験体は、化学療法として、3時間にわたってパクリタキセル185mg/m<sup>2</sup>の静脈注射、および3週間ごとに用量75mg/m<sup>2</sup>のシスプラチンを受けた。結果は図17中に示す。すべての患者は、化学療法後の3週間でゲルゾリンレベルの有意な低下を示した。マウスモデルにおける結果と一致するように、化学療法は、ヒトにおける血漿ゲルゾリンを枯渇させ、血漿ゲル

50

ゾリンレベルは化学療法に急性毒性反応のためのバイオマーカーとして働きうる。それゆえ、本発明のゲルゾリン結合剤は、化学療法に後続する患者条件のモニタリング、またはゲルゾリン補充療法もしくはさらなる化学療法が適切かどうかの確認に有用である。さらに、本発明のゲルゾリン結合剤を使用して、血漿ゲルゾリンのレベルに基づいて患者に投薬すべきゲルゾリンのレベルを決定することができる。さらに、本発明のゲルゾリン結合剤を使用して、患者の治療後の血清ゲルゾリンレベルを測定することによって、ゲルゾリン補充療法に対する患者の後続応答を測定することができる。

【0337】

#### 実施例10．ゲルゾリン補充療法

化学療法後のマウス（中国医学科学院動物施設から購入した8週齢のメスBalb/c）の体重およびパーセント生存に対するゲルゾリン補充療法の効果を検討した。この実験において、一日おきの腹腔内注射によって、250 $\mu$ g アドリアマイシンの2用量をマウスに投与した。アドリアマイシンの最終用量の1日後に、検査群のマウスに、腹腔内注射によって100 $\mu$ gの組換え全長ゲルゾリンのサプリメントを投与した。ゲルゾリンサプリメントは一日おきに合計で3用量を繰り返した。化学療法およびゲルゾリン補充療法後のマウスの体重およびパーセント生存を図18中に示す。結果は、ゲルゾリンの投与10日後のマウスの100%の生存をもたらすが、ゲルゾリンを投与されないマウスは10日後に100%の死亡率を示すことを指摘する。同様に、ゲルゾリン補充療法を行なったマウスについての体重の減少は、かかる療法を行われないマウスほど重篤ではなかった。したがって、化学療法の間に被験体にゲルゾリンを補うことは、化学療法誘導性急性毒性反応および死亡率を低減する。それゆえ、本発明のゲルゾリン結合剤は、化学療法に後続する患者条件のモニタリング、またはゲルゾリン補充療法もしくはさらなる化学療法が適切かどうかの確認に有用である。さらに、本発明のゲルゾリン結合剤を使用して、血漿ゲルゾリンのレベルに基づいて患者に投薬すべきゲルゾリンのレベルを決定することができる。さらに、本発明のゲルゾリン結合剤を使用して、患者の治療後の血清ゲルゾリンレベルを測定することによって、ゲルゾリン補充療法に対する患者の後続応答を測定することができる。

【0338】

#### 実施例11．血漿からのネイティブゲルゾリンの免疫親和性精製

##### 1．血漿ゲルゾリンの親和性精製

【0339】

血漿中のアクチン不含有ゲルゾリンに結合する本発明の選択した抗体の能力は、これらの抗体がヒト血漿からのゲルゾリンのネイティブ形態および機能的形態の精製に有用であることを示唆する。この可能性を検査するために、高度に精製された抗ゲルゾリン抗体（標準的技術でプロテインAまたはプロテインGにより親和性精製した）の、GN3E9、GF2D6、またはGC1C10を、セファロース4Bに固定化し、ヒト血漿ゲルゾリンの親和性精製のために使用した。実施例3において上述されるように、抗ゲルゾリン抗体のセファロース4Bへの固定化を実行した。血漿ゲルゾリンの親和性精製のために、プールした10mlのヒト血漿（少なくとも20人の被験体）を、毎分2mlの流速で2mlの抗体（例えば抗ゲルゾリン抗体のGN3E9、GF2D6、またはGC1C10）固定化ビーズを含むカラムを介して、通過させた。血漿サンプルを各免疫親和性カラムを介して通過させた後、未結合の物質は50mlのPBSによりカラムから洗浄した。ゲルゾリン親和性カラムの各々に結合したタンパク質は、溶出緩衝液（0.1Mグリシン（pH2.4）、0.15M NaCl）により溶出した。溶出した各画分（1ml）の光学的密度をOD280nmで測定した。OD280が0.1単位以上である画分を回収した。100 $\mu$ lの中和緩衝液（1MトリスHCl（pH8.5））の追加後に、溶出液を透析チューブ中に個別に置き、溶出液を1LのPBS（pH7.5）に対して4で透析した。透析緩衝液を2回変えた。標準的技術によってセントリコン濾過装置を使用して、1mg/mlまで精製タンパク質を濃縮した。濃縮されたサンプルは0.22 $\mu$ mフィルターを介する通過によって滅菌し、次に使用まで4で保存した。タンパク質純度は、上述され

た手順によって、図19中に要約されるような10% SDS-PAGEによって検討した。図19は、10% SDS-PAGEおよびクマシーブルー染色によって、抗ゲルゾリン抗体のGC1C10、GN3EPおよびGN2D6にそれぞれコンジュゲートしたビーズを使用して親和性精製したヒト血漿ゲルゾリンの分画の結果を示す。ゲルはクマシーブルーにより室温で30分間染色し、次に50% (v/v) メタノールおよび10% (v/v) 酢酸により脱染色した。実施例3中で提示された免疫沈降研究と一致して、抗ゲルゾリン抗体のGN3E9、GF2D6またはGC1C10は、SDS-PAGE上で~90 kDaポリペプチドとして移動する免疫反応性ポリペプチドを結合した。~90 kDaの抗ゲルゾリン抗体免疫反応性ポリペプチドの移動は、ヒト血清サンプルからの全長ゲルゾリンポリペプチドの予想される移動と一致している。この~90 kDaポリペプチドの同一性は、質量分析解析によって全長ゲルゾリンポリペプチドであることが確定されている(実施例4を参照)。SDS-PAGEゲルのデンストメトリー解析によって決定されるように、免疫精製された全長ゲルゾリンポリペプチドの純度は90%以上だった。それゆえ、ゲルゾリン結合剤(例えば抗ゲルゾリン抗体のGN3E9、GF2D6またはGC1C10)は、ヒト血清からネイティブヒトゲルゾリンを精製する方法において有用である。同様に、これらのゲルゾリン結合剤は、免疫反応性ゲルゾリン(例えばその断片およびホモログに加えて、ネイティブゲルゾリンおよび組換えゲルゾリン)を生物学的サンプルから精製する方法において有用である。

10

#### 【0340】

2. 本発明のゲルゾリン結合剤を使用する組換えゲルゾリンによるゲルゾリンの親和性精製ネイティブ形態の生物学的活性の比較

20

#### 【0341】

ネイティブ血漿ゲルゾリンヒトゲルゾリンは、本質的に上述されるような手順によって本発明の抗ゲルゾリン抗体を使用して免疫親和性精製された(実施例11、セクション1)。全長組換えヒトゲルゾリンは、製造者の使用説明書に従ってNi-NTAスーパーフローカラム(キアゲン社、バレンシア、カリフォルニア)を使用して精製した(実施例1を参照)。ゲルゾリン検査調製物の生物学的活性は、F-アクチン切断分析においてインビトロで決定された。簡潔には、F-アクチンは室温で免疫親和性ゲルゾリン(ネイティブまたは組換え)と共にインキュベートし、上清(G-アクチン) vs ペレット(F-アクチン)中のアクチンの比率をゲルゾリン不含有対照反応と比較した。ゲルゾリンの生物学的活性は、5分以内にF-アクチンの50%を可溶化するのに必要なゲルゾリンの量または濃度によって決定された。この閾値の到達に必要とされるゲルゾリンの量が増加するにつれて、あまり生物学的活性がないゲルゾリンのサンプルは、5分あたりのアクチン切断の同じレベルを達成するより低い量を必要とする他のゲルゾリンサンプルと比較する。

30

#### 【0342】

具体的には、親和性精製したヒト血漿ゲルゾリン(ネイティブ血漿ゲルゾリン)の生物学的活性は、F-アクチン切断分析(サイトスケルトン社、デンバー、コロラド)によって、組換え全長ヒトゲルゾリンの生物学的活性と比較した。ゲルゾリンは、反応緩衝液(0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、30 mM  $\text{NaCl}$ 、1 mM DTTを含む50 mM トリス(pH 7.5))中で希釈した。F-アクチン基質は、30分間一般的なアクチン緩衝液(0.2 mM  $\text{CaCl}_2$ を含む5 mM トリス(pH 8.0))中で0.5 mg/mlでアクチンを希釈することによって、ウサギ筋肉アクチンから調製され、混合物は氷上でインキュベートした。混合物は遠心分離(14,000 rpm、15分)によって清澄化し、G-アクチンを含む上清を保存した。次に10分の1(1/10)体積のアクチン重合緩衝液(20 mM  $\text{CaCl}_2$ および10 mM ATPを含む50 mM  $\text{KCl}$ )を上清に追加し、この混合物を室温で1時間インキュベートしてF-アクチンを形成させた。このF-アクチン調製物を検査反応における基質として使用して、ゲルゾリンのF-アクチン切断活性を決定した。ゲルゾリン仲介性F-アクチン切断活性は、100  $\mu\text{l}$ の反応緩衝液中の可変濃度のゲルゾリン検査調製物(0~0.1 mg/ml)の存在下において、5  $\mu\text{g}$ のF-アクチン調製物をインキュベートすることによって

40

50

測定した。検査混合物は室温で5分間インキュベートし、次に100,000×gで1時間遠心分離した。F-アクチンを含むペレットを、SDS-PAGEサンプル緩衝液中に溶解した。G-アクチンを含む上清を取り出して20%TCAにより沈降させ、ペレットをSDS-PAGEサンプル緩衝液中に溶解した。F-アクチンおよびG-アクチンの両方を10%SDS-PAGEで分離し、クマシーブルーにより染色した(上で詳述されるように)。F-アクチンvsG-アクチンの比率はデンストメトリーによって決定した。結果は表21中で以下に要約される。

【表21】

表21：親和性精製したゲルゾリンのF-アクチン切断活性				
ゲルゾリン	F-アクチンの%			
	0	0.1mg/ml	0.5mg/ml	1.0mg/ml
免疫親和性精製したヒトネイティブ血漿ゲルゾリン	74	35	21	12
全長ヒト組換えゲルゾリン	75	68	55	19

10

## 【0343】

表21中で示されるように、本発明の抗ゲルゾリン抗体は、本発明の方法を使用して、生物学的活性のあるヒトネイティブ血漿ゲルゾリンの精製に有用である。表21中で要約されたF-アクチン切断活性によって証明されるように、Ni-NTA親和性クロマトグラフィーによって精製された全長ヒト組換えゲルゾリンと比較して、本発明の方法がより高い生物学的活性を備えた精製ヒトネイティブ血漿ゲルゾリン調製物をもたらすので、ヒトネイティブ血漿ゲルゾリンを精製する本発明のゲルゾリン結合剤の使用は有利である。より低い生物学的活性を備えたゲルゾリン調製物の投与と比較した場合、ゲルゾリン補充を必要とする被験体に投与するときにより高い生物学的活性を備えたゲルゾリン調製物がより効果的でありえる。より高い生物学的活性のゲルゾリン調製物を使用してより低い投薬量で投与し、被験体に対して同じ療法的利益を達成することができる。このより低い投薬量は、ゲルゾリン補充療法の有害な副作用(例えば免疫反応または細胞毒性)についての可能性を最小限にすることができる。

20

30

## 【0344】

ゲルゾリンの生物学的活性は、化学療法誘導性急性毒性の防止の有効性の評価によるインビボの分析によっても以下に記載されるように決定することができる。マウスをアドリアマイシンの致死未満用量により治療し、ゲルゾリンを注射する。体重減少および死亡率は、親和性精製したゲルゾリンの治療有効性の評価のために使用する。ゲルゾリンを投与されない被験体に比べて、ゲルゾリンを投与される被験体における体重損失または死亡率の増加は、ゲルゾリン調製物に生物学的活性があることを示す。

## 【0345】

実施例12.50kDaのゲルゾリン様ポリペプチドの特性評価。

1.ゲルゾリンポリペプチドおよびゲルゾリン様ポリペプチドについての結合剤の特異性

40

## 【0346】

様々な免疫原に対する抗ゲルゾリン抗体のパネルは、ウエスタンブロットにおいて1つ以上の免疫反応性ゲルゾリン様ポリペプチドを検出する能力について検査された。上記の実施例3でのように、ウエスタンブロット解析を実行した。結果を表22中に示す。ネイティブ血漿ゲルゾリンにより免疫されたマウスから得た5つの抗体がのみ50kDaゲルゾリン様ポリペプチドを認識する(例えば、図20Bを参照)。全長組換えゲルゾリンに対する抗体のうちの6つは90kDaポリペプチドのみを検出し(例えば、図20Aを参

50

照)、それらのうちの4つは90kDaポリペプチドおよび50kDaポリペプチドの両方を検出する(例えば、図20Cを参照)。ゲルゾリンのN末端断片に対する抗体は90kDaポリペプチドのみと反応し、それらのどれも50kDaポリペプチドを認識しない。C末端断片に対する抗体は変化する反応性プロファイルを示す。12のクローンのうちの4つは90kDaポリペプチドを認識し、12のクローンのうち2つは50kDaポリペプチドを検出し、12のクローンのうちの6つは90kDaポリペプチドおよび50kDaポリペプチドの両方と反応する。図20は、異なる検出プロファイルを備えた3つの異なるカテゴリーの抗体の代表的結果を示すウエスタンブロットである。

【表22】

以下に対する抗体	90kDaのみ	50kDaのみ	90kDa及び50kDa
ネイティブゲルゾリン (NG)	0/5	5/5	0/5
全長組換え (GF)	6/10	0/10	4/10
N末端断片 (NG)	4/4	0/4	0/4
C末端断片 (GC)	4/12	2/12	6/12

10

## 【0347】

本発明のゲルゾリン結合剤は、免疫測定方法(例えばELISA;RIA;ウエスタンブロット)において有用であり、全長ゲルゾリン免疫反応性ポリペプチドおよび/または50kDaゲルゾリン様免疫反応性ポリペプチドを選択的に測定する。

20

## 【0348】

2. 50kDaゲルゾリン様ポリペプチドはアポトーシスの細胞中に存在する。

## 【0349】

カスパーゼ3がアポトーシスの間にゲルゾリンを切断することが報告されている(Sun et al., J Biol Chem. 274:33179-33182(1999))。したがって、50kDaゲルゾリン様免疫反応性ポリペプチドは、カスパーゼ3による全長ゲルゾリンの切断に由来しうる。図21は、対照細胞およびアポトーシス細胞を比較する抗ゲルゾリン抗体による細胞性ゲルゾリンのウエスタンブロット解析である。レーン1は対照MIAcapa細胞(膵癌細胞)を含み、レーン2はCTB006抗体により治療された細胞である。CTB006はTRAIL-R2受容体に向けられたマウスモノクローナル抗体である。この抗体は、TRAIL-R2受容体を発現する腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する。結果は、細胞内ゲルゾリン(全長、90kDa)のレベルの増加がアポトーシスの誘導と関連することを示し、ゲルゾリンがストレス誘導タンパク質であることを示唆する。さらに、50kDaの免疫反応性断片はアポトーシスの細胞に特異的に関連し、血漿中に観察される50kDaタンパク質が全長ゲルゾリンの切断産物でありえることを示唆する。

30

## 【0350】

3. 癌患者における血清ゲルゾリンプロファイル

## 【0351】

ゲルゾリンの血清プロファイルの臨床的有意性をさらに検討するために、ゲルゾリンの2つの免疫反応形態は、上述された手順を使用して、抗ゲルゾリン抗体GC1C10を使用する免疫沈降およびウエスタンブロット解析によって、8人の健康的な対照(N1~N8)および8人の癌患者(C1~C8)において測定された。図4において示されるように、抗ゲルゾリン抗体GC1C10は90kDaタンパク質のみを沈降させることができた。したがって、抗ゲルゾリン抗体C1C10は、ウエスタンブロットにおいて50kDaの免疫反応性ゲルゾリン様タンパク質を認識することができるが、免疫沈降分析においてゲルゾリンのより短い形態(すなわち50kDa免疫反応性ポリペプチド)を免疫沈降させることができない。全血清サンプルのウエスタンブロット解析は、GC1C10が健康的な対照の血清サンプル中のゲルゾリンの2つの形態を検出するが、癌患者においては検

40

50

出しないことを示し(図22)、50kDa形態が癌または癌患者の状態のためのバイオマーカーでありえることを示す。具体的には、50kDaゲルゾリン様血漿ポリペプチドの減少は患者が癌を有することを示すことができる。さらに、本研究は、本発明のゲルゾリン結合剤を使用して、ゲルゾリンは癌患者からの生体サンプル中の血清ゲルゾリンおよびゲルゾリン様ポリペプチドの測定に有用であることを実証する。

#### 【0352】

実施例13．本発明の抗ゲルゾリン結合剤の重鎖および軽鎖のN-末端アミノ酸配列の決定。

GN3E9、GC1C10およびGF2D6の重鎖および軽鎖のcDNAを得るために、GN3E9、GC1C10およびGF2D6の重鎖とおよび軽鎖のN-末端アミノ酸配列を、既知の配列決定技術によって決定することができる。5マイクログラム(5μg)の親和性精製したGN3E9、GC1C10およびGF2D6を、還元条件下の10%SDS-PAGEにおいて分離する。電気泳動後に、ゲル中のタンパク質をポリフッ化ビニリデン膜(「PVDF」)に転写する。転写後に、PVDF膜を洗浄緩衝液25mM NaCl、10mM 硼酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)により洗浄し、次に染色溶液(50%(v/v)メタノール、20%(v/v)酢酸および0.05%(w/v)クーマシーブリリアントブルー)中で5分間染色して、タンパク質バンドの位置決めをする。次にPVDF膜を90%(v/v)水メタノールにより脱染色し、重鎖(より少ない移動度のバンド)および軽鎖(より大きい移動度のバンド)に対応するバンドを切除して脱イオン水により洗浄する。重鎖および軽鎖のN-末端アミノ酸配列は、タンパク質配列解析器を使用するエドマン自動化法によって決定する(PROCI SE 491、ABI社、アメリカ)。

#### 【0353】

上述された技術を使用して、本発明の選択したゲルゾリン結合剤について以下のN末端配列が決定された。

#### 【表23】

表23：抗体のN末端配列			
クローン	鎖	配列	配列番号
GN3E9	軽鎖	DIVMTQSPATLSVTPGDR	配列番号：44
GC1C10	重鎖	EVQLVE SGGGLVKPG	配列番号：45
GC1C10	軽鎖	DVQMTSPSXL T	配列番号：46

#### 【0354】

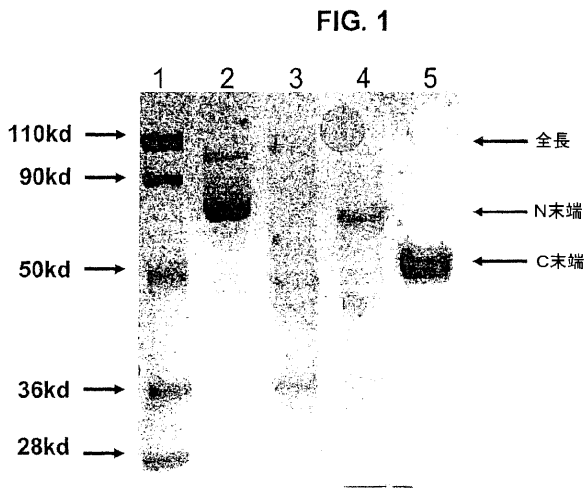
同等物

本発明は、本発明の個々の態様の単一の実例として意図される本出願中に記述される特定の実施形態に関して限定されるのではない。本発明の多くの修飾および変形は、当業者に明らかであるように、その趣旨および範囲から逸脱せずに行うことができる。本発明の範囲内の機能的に等価な方法および装置は、本明細書において列挙されたものに加えて、前述から当業者に明らかになるだろう。かかる修飾および変形は、添付される請求項の範囲以内にあるように意図される。本発明は、かかる請求項が権利化される対応特許の全範囲に加えて、添付された請求項に関してのみ限定されるべきである。当然変化することができる、特定の方法、試薬、化合物組成物または生物学的システムに本発明が限定されないことが理解されるべきである。本明細書において使用される用語が、特定の実施形態のみを記述する目的のためのものであり、限定するようには意図されないこともまた理解されるべきである。

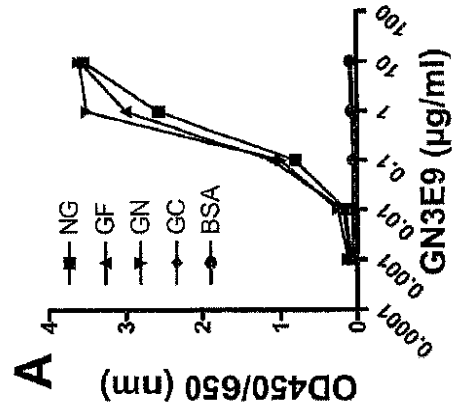
#### 【0355】

他の実施形態は以下の請求項内で説明される。

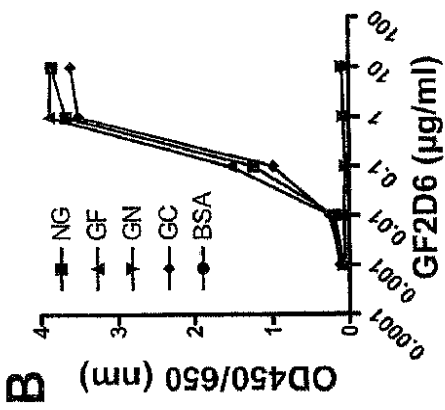
【 図 1 】



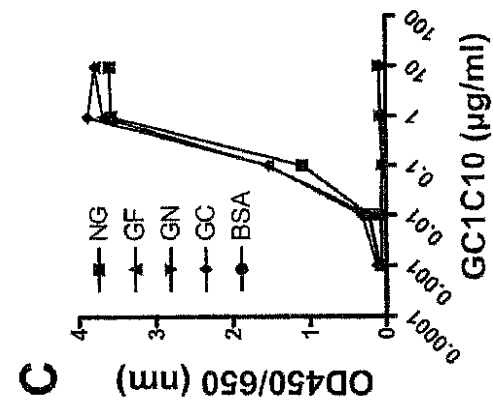
【 図 2 A 】



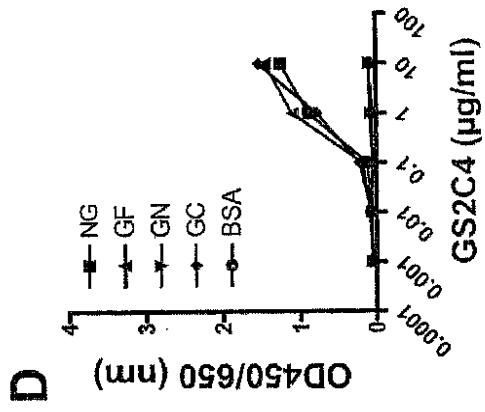
【 図 2 B 】



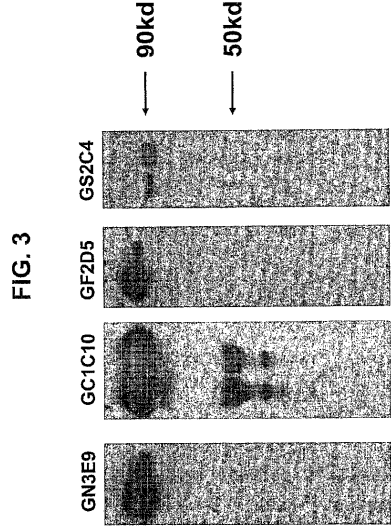
【 図 2 C 】



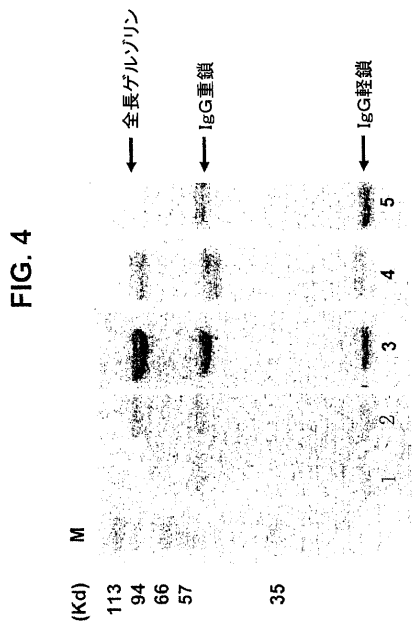
【 図 2 D 】



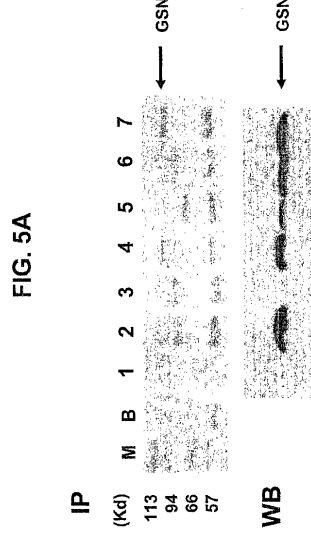
【 図 3 】



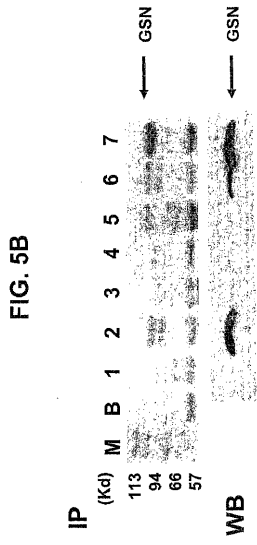
【 図 4 】



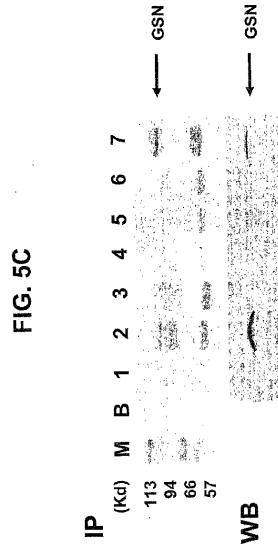
【 図 5 A 】



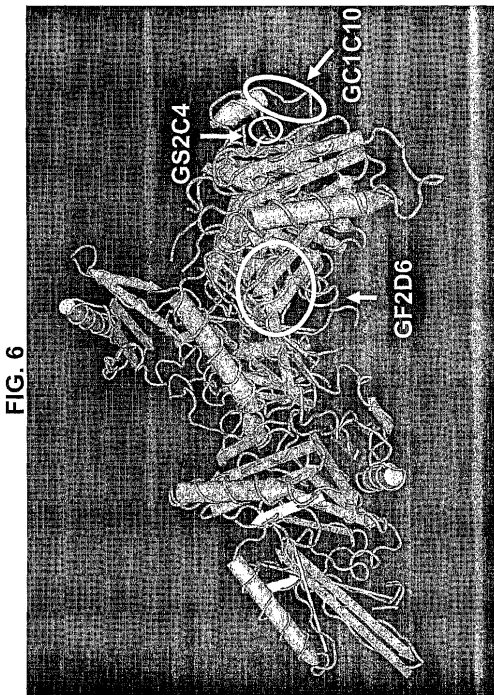
【 図 5 B 】



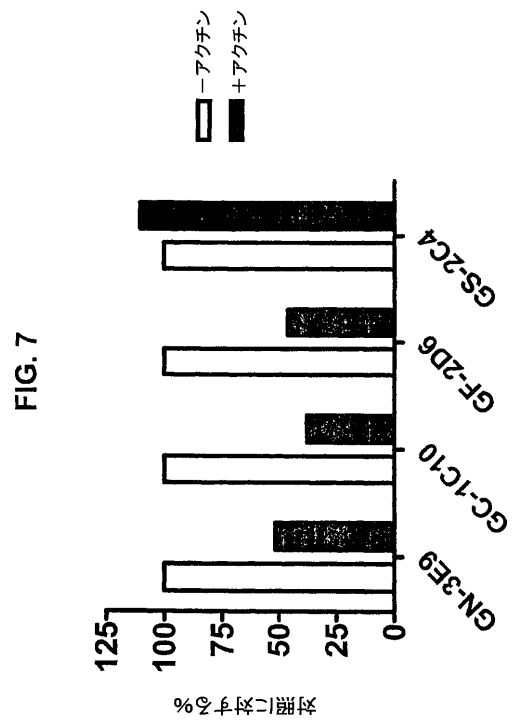
【 図 5 C 】



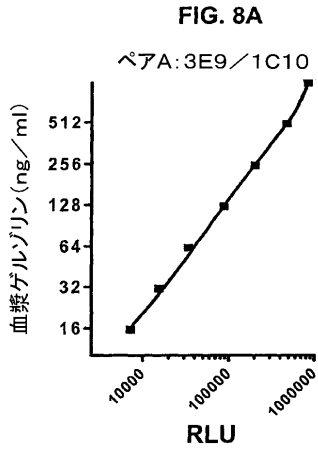
【 図 6 】



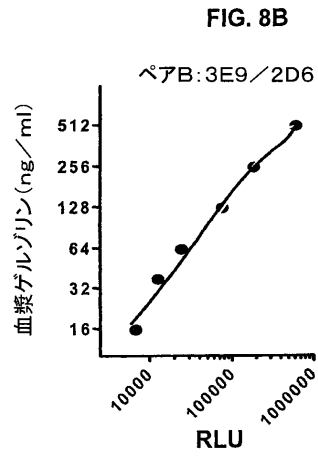
【 図 7 】



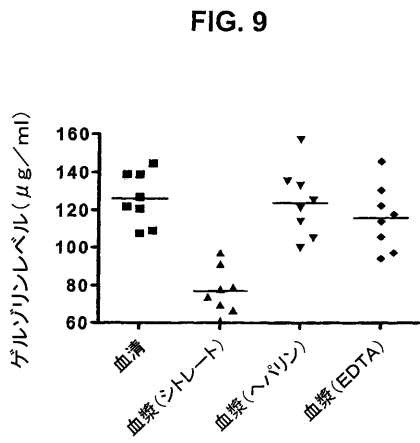
【 図 8 A 】



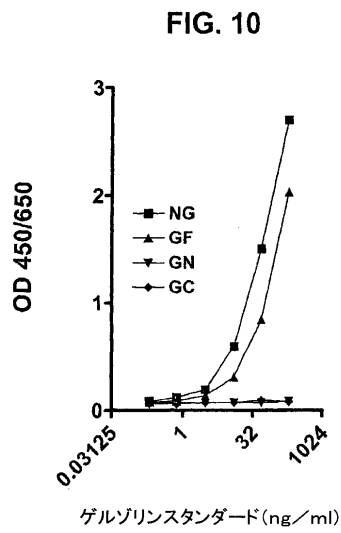
【 図 8 B 】



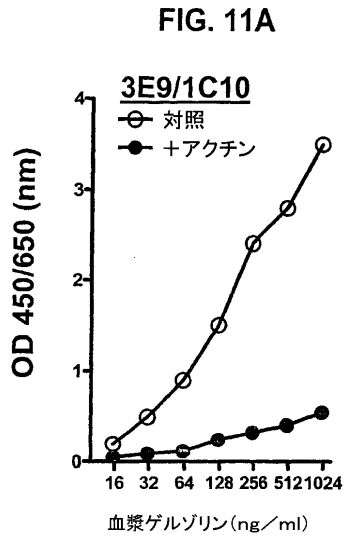
【 図 9 】



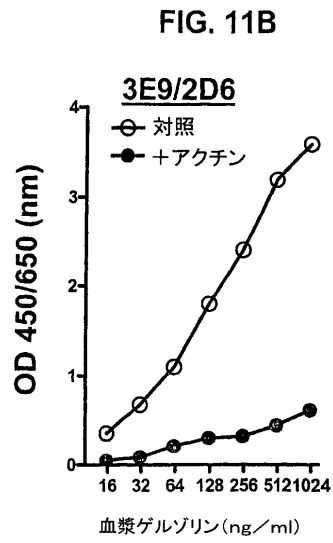
【 図 10 】



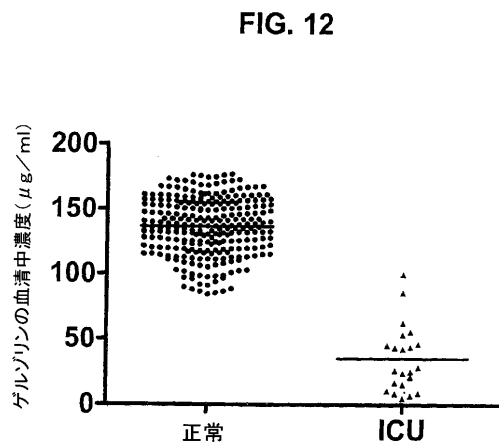
【 図 1 1 A 】



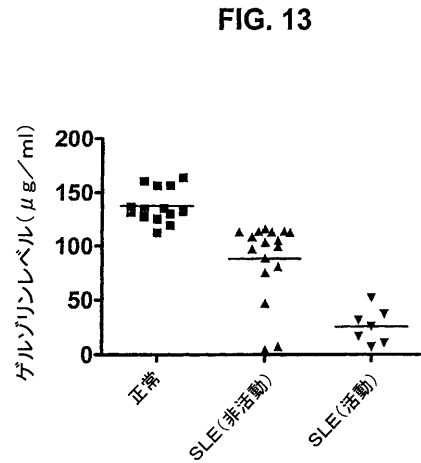
【 図 1 1 B 】



【 図 1 2 】

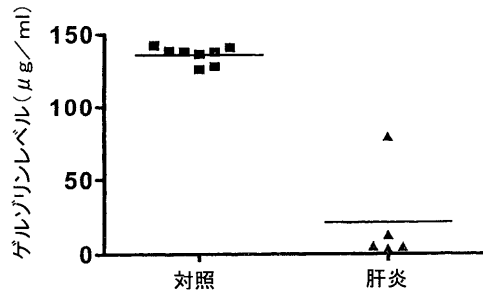


【 図 1 3 】

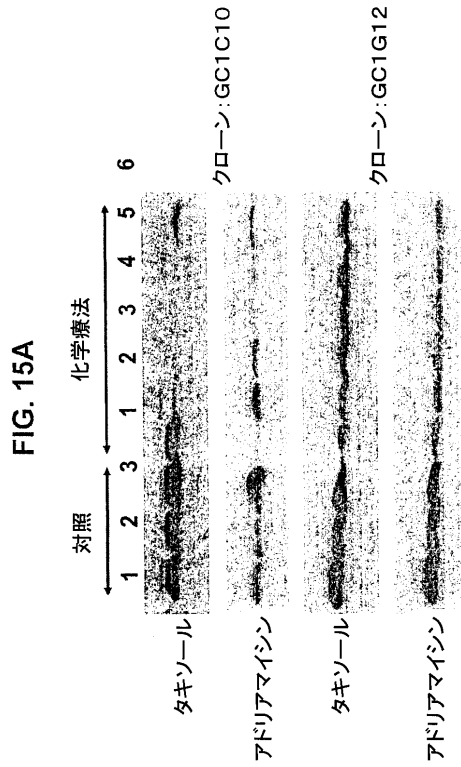


【 図 1 4 】

FIG. 14

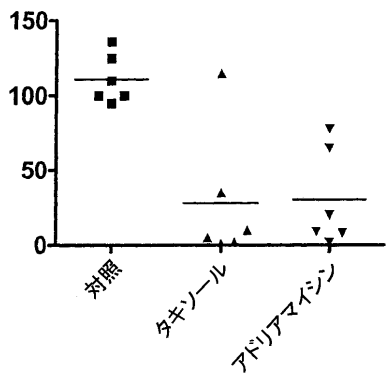


【 図 1 5 A 】



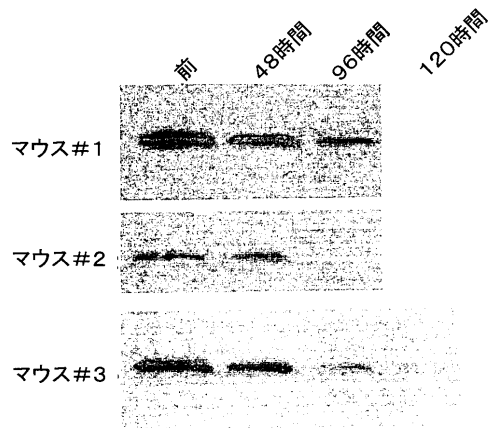
【 図 1 5 B 】

FIG. 15B

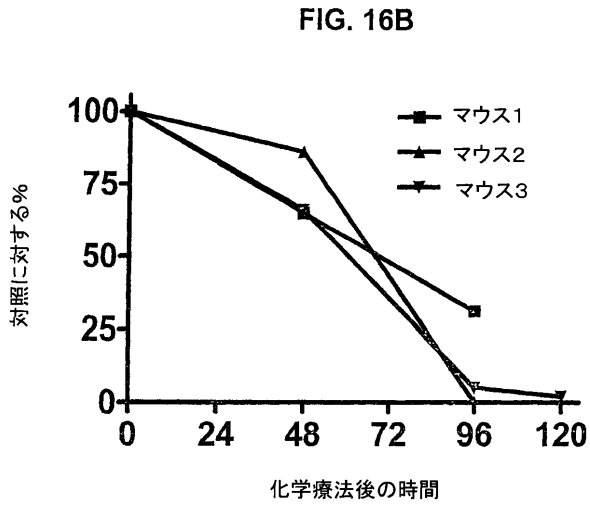


【 図 1 6 A 】

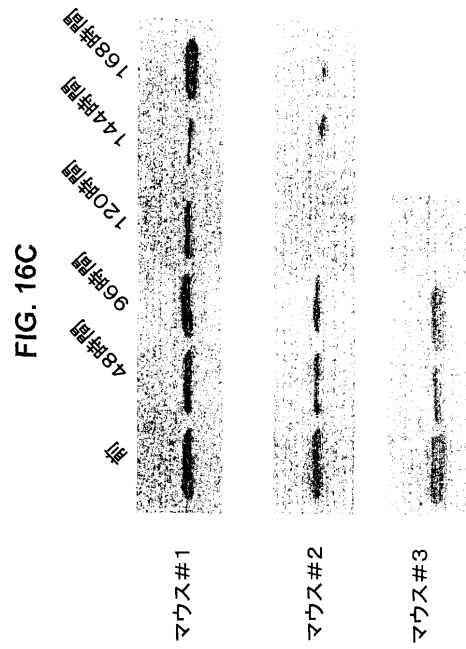
FIG. 16A



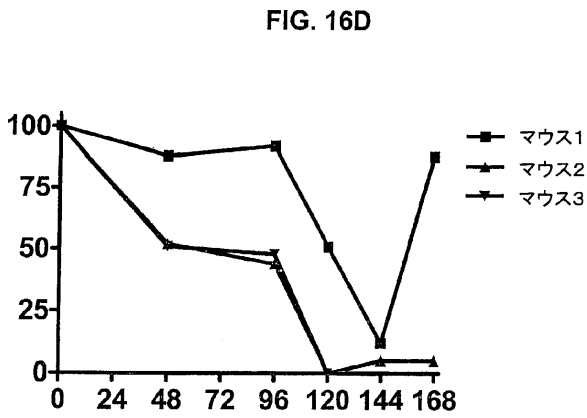
【 図 1 6 B 】



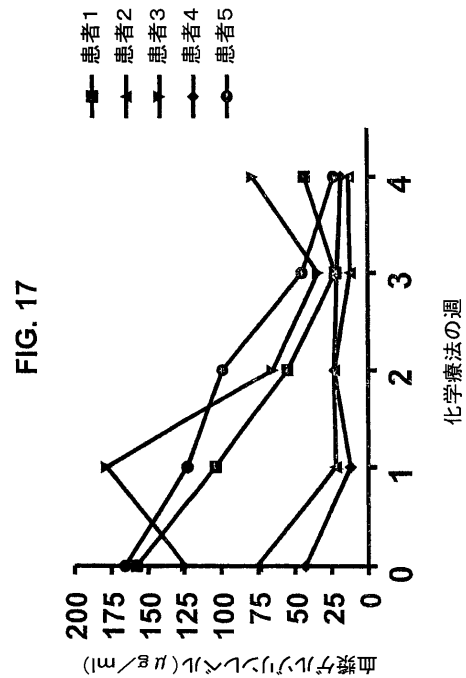
【 図 1 6 C 】



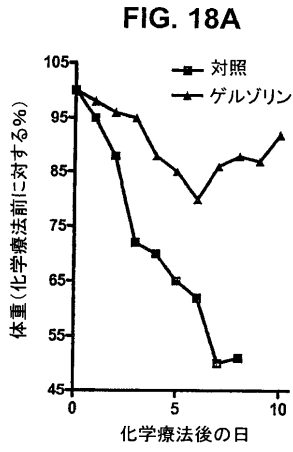
【 図 1 6 D 】



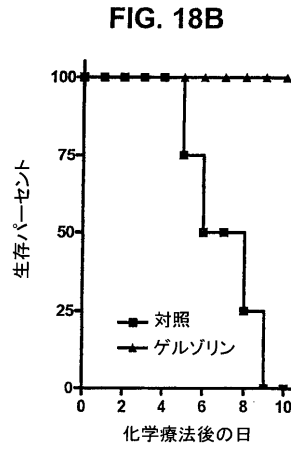
【 図 1 7 】



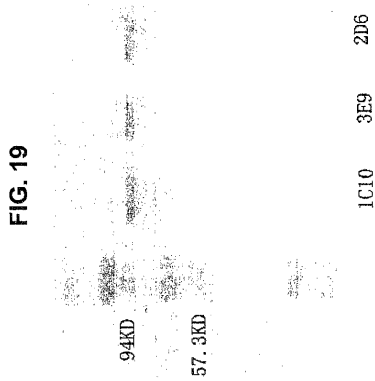
【 図 1 8 A 】



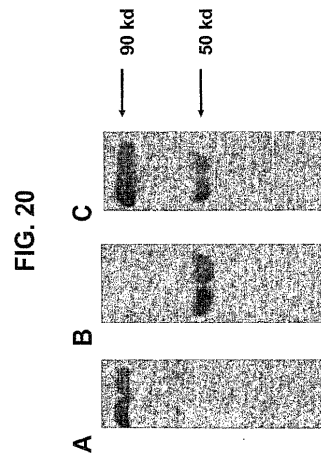
【 図 1 8 B 】



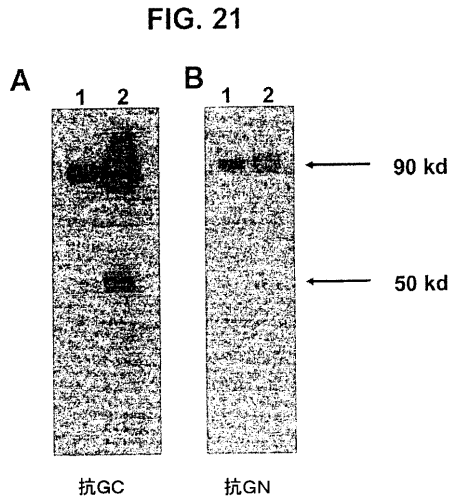
【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



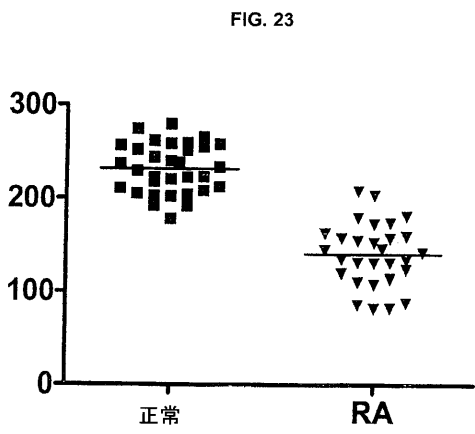
【 图 2 1 】



【 图 2 2 】



【 图 2 3 】



## 【配列表】

2010537625000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成22年8月13日(2010.8.13)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

C G M C C アクセション番号 2 1 1 4、2 1 1 5 および 2 1 1 6 からなる群から選択される寄託細胞株によって産生される抗体と同じ抗原結合特異性を有する抗体またはその抗原結合断片。

【請求項2】

F A Q G A L K S E D (配列番号：2)、S E P D G F W E A L (配列番号：3) および A C S N K I G R F V (配列番号：4) または1つもしくは複数の保存的アミノ酸置換を有するその変異型からなる群から選択される少なくとも重鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含み、特異的にゲルゾリンを結合する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項3】

モノクローナル抗体を産生する連続的な細胞株であって、前記モノクローナル抗体が、C G M C C アクセション番号 2 1 1 4、2 1 1 5 および 2 1 1 6 からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株によって産生される抗体と同じ抗原決定基に結合し、前記細胞株が癌細胞またはその免疫原性決定基により免疫されたマウスに由来したリンパ球とマウスミエローマ細胞を融合させるプロセスによって産生される、連続的な細胞株。

【請求項4】

請求項1～2のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする、単離された核酸。

【請求項5】

請求項4に記載の核酸を含むベクター。

【請求項6】

核酸分子に作動可能に結合されたプロモーターをさらに含む、請求項5に記載のベクター。

【請求項7】

請求項5に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項8】

配列番号：1のポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体またはその断片を調製する方法であって、

(a) 前記抗体またはその断片の発現を提供する条件下で、請求項4に記載の核酸を含む細胞を培養する工程；及び

(b) 発現された抗体またはその断片を回収する工程を含む方法。

【請求項9】

F A Q G A L K S E D (配列番号：2)、S E P D G F W E A L (配列番号：3) および A C S N K I G R F V (配列番号：4) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、全長ヒトゲルゾリンを結合可能な抗体によって認識される、ゲルゾリンの単離されたエピトープ。

【請求項10】

請求項9に記載のエピトープを含む免疫原の調製物によって生成された抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 1 1】

生物学的サンプル中のゲルゾリンの存在または量を決定する方法であって、  
(a) 抗体またはその断片がゲルゾリンに特異的に結合する条件下で、生物学的サンプルを、CGMCCアクセッション番号2114、2115および2116からなる群から選択される寄託細胞株によって産生されるものと同じ抗原結合特異性を有する一つもしくは複数の抗体またはその抗原結合断片と接触させる工程；及び  
(b) ゲルゾリンに結合した抗体またはその断片の存在または量を検出し、それによって前記サンプル中のゲルゾリンの存在または量を決定する工程を含む方法。

## 【請求項 1 2】

E L I S Aにおいて、前記サンプルを前記抗体または抗原結合断片と接触させる、請求項 1 1に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

前記接触させる工程が、第1の抗体を基質に結合させ、サンプルを接触させ、第2の抗体を前記基質に結合させることを含み、前記第2の抗体が検出可能な標識を含む、請求項 1 2に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

前記第1の抗体が、ハイブリドーマ細胞株CGMCCアクセッション番号2115により産生される抗体と同じ抗原決定基に結合し、前記第2の抗体が、CGMCCアクセッション番号2114および2116からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株によって産生される抗体と同じ抗原決定基に結合する、請求項 1 3に記載の方法。

## 【請求項 1 5】

第1の哺乳類被験体においてゲルゾリンポリペプチドのレベルの変化を測定する方法であって、

- (a) 前記第1の哺乳類被験体からの試験サンプルを提供する工程；
- (b) 前記第1の哺乳類被験体からの試験サンプルを、ゲルゾリンポリペプチドを結合する一つまたは複数の化合物と接触させて化合物/ゲルゾリンポリペプチド複合体を形成する工程であって、前記化合物が、CGMCCアクセッション番号2114、2115および2116からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株によって産生されるものと同じ抗原結合特異性を有する抗体またはその抗原結合断片である工程；
- (c) 前記化合物/ゲルゾリンポリペプチド複合体のレベルを検出する工程；
- (d) 前記第1の哺乳類被験体からのサンプル中のゲルゾリンポリペプチドの発現のレベルを定量する工程；及び
- (e) 工程(a)のサンプル中のゲルゾリンポリペプチドの量を、ゲルゾリンポリペプチドのレベルの変化に関連する疾患または状態を有していないかまたはそれらに対する素因のないことが既知である第2の哺乳類被験体からの対照サンプル中に存在するポリペプチドの量と比較して、前記対照サンプルと比較した前記第1の被験体中のゲルゾリンポリペプチドの発現レベルの変化を測定する工程を含む方法。

## 【請求項 1 6】

E L I S Aにおいて、前記サンプルを前記化合物と接触させる、請求項 1 5に記載の方法。

## 【請求項 1 7】

前記接触させる工程が、第1の抗体を基質に結合させ、前記サンプルおよび第2の抗体を前記基質に接触させることを含み、前記第2の抗体が検出可能な標識を含む、請求項 1 6に記載の方法。

## 【請求項 1 8】

前記第1の抗体が、ハイブリドーマ細胞株CGMCCアクセッション番号2115により産生される抗体と同じ抗原決定基に結合し、前記第2の抗体が、CGMCCアクセッション番号2114および2116からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株により産生される抗体と同じ抗原決定基に結合する、請求項 1 7に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記ゲルゾリンのレベルの変化に関連する疾患または状態が、敗血症性ショック、多臓器機能障害症候群、関節リウマチ、脳卒中、心筋梗塞、癌、全身性自己免疫性疾患、慢性肝炎、化学療法の副作用および放射線療法の副作用からなる群から選択される、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 20】

哺乳類被験体におけるゲルゾリンのレベルの減少をモニタリングする方法であって、

(a) 請求項 11 の方法に記載の哺乳類被験体におけるゲルゾリンのレベルを測定する工程と；

(b) 第 1 の被験体におけるゲルゾリンのレベルを参照スタンダードと比較して、前記参照スタンダードと比較した前記第 1 の被験体のゲルゾリンのレベルの減少をモニタリングする工程とを含み、前記参照スタンダードが、敗血症性ショックを有していない対照被験体を含む方法。

## 【請求項 21】

医学的状态を防止または治療するために化合物の有効性を決定するための臨床試験への組入れのために哺乳類被験体を選択する方法であって、

(a) 請求項 11 の方法に記載の哺乳類被験体におけるゲルゾリンのレベルを測定する工程；

(b) 第 1 の被験体におけるゲルゾリンのレベルを参照スタンダードと比較する工程であって、前記参照スタンダードが、ゲルゾリンレベルに影響を与える疾患または状態を有していない対照哺乳類被験体を含む工程、及び

(c) 臨床試験において前記哺乳類被験体を組入れるように選択する工程を含み、前記哺乳類被験体のゲルゾリンレベルの類似性が参照スタンダードのゲルゾリンレベルに類似する方法。

## 【請求項 22】

被験体のゲルゾリンのレベルに基づいた被験体クラスへ前記被験体を割り当てる方法であって、

(a) 請求項 11 の方法に記載の哺乳類被験体におけるゲルゾリンのレベルを測定する工程；及び

(b) 前記被験体のゲルゾリンのレベルに基づいた被験体クラスへ前記被験体を割り当てる工程；  
を含む方法。

## 【請求項 23】

ゲルゾリンを精製する方法であって、

(a) 抗体またはその断片がゲルゾリンに特異的に結合する条件下で、ゲルゾリンを含む生物学的サンプルを、少なくとも 1 つの固定化された抗体またはその抗原結合断片と接触させて、固定化されたゲルゾリン抗体複合体を形成する工程であって、前記抗体またはその抗原結合断片が、CGMCC アクセション番号 2114、2115 および 2116 からなる群から選択される寄託細胞株によって産生されるものと同じ抗原結合特異性を有する工程；及び

(b) 前記固定化されたゲルゾリン抗体複合体からゲルゾリンを回収する工程を含む方法。

## 【請求項 24】

前記生物学的サンプルがヒト血清を含む、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 25】

1 つまたは複数の容器、CGMCC アクセション番号 2114、2115 および 2116 からなる群から選択される寄託細胞株によって産生されるものと同じ抗原結合特異性を有する 1 つもしくは複数の抗体またはその抗原結合断片、およびその中の内容物の使用のための説明書を含むキット。

## 【請求項 26】

( a ) 第 1 の抗体によりコートされた E L I S A プレート ; 及び  
( b ) 容器中の第 2 の抗体を含み、前記第 1 の抗体および第 2 の抗体が、C G M C C アク  
セッション番号 2 1 1 4、2 1 1 5 および 2 1 1 6 からなる群から選択される寄託細胞株  
によって産生された抗体である、キット。

【請求項 2 7】

1 つまたは複数のコンポーネントをさらに含み、前記 1 つまたは複数のコンポーネント  
が、ヒト血漿ゲルゾリンスタンダード、ヒト血漿希釈緩衝液、洗浄緩衝液および基質緩衝  
液である、請求項 2 6 に記載のキット。

## 【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2007/002467
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
See extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C07K, G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT, CNKI, ISI Web of Knowledge, Embase, Medline, GenBank Gelsolin, GSN, Epitope?, antibody, antibodies, antigen?, monoclonal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US6271353B1 (CHUS), 07 Aug. 2001 (07.08.2001), see column 11 lines 16-17, column 4 lines 55-57, columns 41-46.	10 1, 3-9, 11-14, 21-27
A	CN1746676A (TUMO-N), 15 March 2006 (15.03.2006), see whole document.	1, 3-14, 21-27
A	Ulrike FOCK et al: "Topological assignment of the N-terminal extension of plasma gelsolin to the gelsolin surface", Biochem. J., 2005, Vol. 385, pages 659-665.	1, 3-14, 21-27
A	Lorraine E. LAHAM et al: "Identification of two sites in gelsolin with different sensitivities to adenine nucleotides", Eur. J. Biochem., 1995, Vol. 234, pages 1-7.	1, 3-14, 21-27
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<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>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 13 May 2008 (13.05.2008)		Date of mailing of the international search report 29 May 2008 (29.05.2008)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer LU, Chun Telephone No. (86-10)62411048

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2007/002467

**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.: 15-20  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 15-20 relate to methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods.

2.  Claims Nos.: 2  
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:  
Claim 2 claims an antibody or an antigen-binding fragment comprising at least heavy chain CDR3 amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 3 or SEQ ID NO.: 4. According to the present description and claim 9, an epitope of gelsolin comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 3 or SEQ ID NO.: 4. The epitope in antigen can not constitute CDR3 amino acid sequence in antibody. Therefore, claim 2 is so unclear that no meaningful opinion could be formed.
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

See 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 an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2007/002467

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/00 (2006.01) i

G01N 33/531 (2006.01) i

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

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

**Group I: claim 1 (in part), claims 3-14 (in part), claims 21-27 (in part)**

An antibody or antigen-binding fragment having the same antigen-binding specificity of antibodies by CGMCC Accession No: 2114, an antibody predicted to bind an epitope comprising the amino acid sequence SEPDGFWEAL (SEQ ID NO.: 3), a corresponding continuous cell line, an isolated nucleic acid encoding the antibody, a vector comprising the nucleic acid, a host cell comprising the vector, a method for preparing an antibody comprising culturing a cell containing a nucleic acid, an isolated epitope of gelsolin comprising an amino acid sequence SEQ ID NO.: 3, an antibody generated by preparation of an immunogen containing said epitope, methods for determining, selecting or purifying by using CGMCC Accession No: 2114, kits comprising antibodies having the same antigen-binding specificity produced by CGMCC Accession No: 2114.

**Group II: claim 1 (in part), claims 3-14 (in part), claims 21-27 (in part)**

An antibody or antigen-binding fragment having the same antigen-binding specificity of antibodies by CGMCC Accession No: 2115, an antibody predicted to bind an epitope comprising the amino acid sequence FAQGALKSED (SEQ ID NO.: 2), a corresponding continuous cell line, an isolated nucleic acid encoding the antibody, a vector comprising the nucleic acid, a host cell comprising the vector, a method for preparing an antibody comprising culturing a cell containing a nucleic acid, an isolated epitope of gelsolin comprising an amino acid sequence SEQ ID NO.: 2, an antibody generated by preparation of an immunogen containing said epitope, methods for determining, selecting or purifying by using CGMCC Accession No: 2115, kits comprising antibodies having the same antigen-binding specificity produced by CGMCC Accession No: 2115.

**Group III: claim 1 (in part), claims 3-14 (in part), claims 21-27 (in part)**

An antibody or antigen-binding fragment having the same antigen-binding specificity of antibodies by CGMCC Accession No: 2116, an antibody predicted to bind an epitope comprising the amino acid sequence ACSNKIGRFV (SEQ ID NO.: 4), a corresponding continuous cell line, an isolated nucleic acid encoding the antibody, a vector comprising the nucleic acid, host cell comprising the vector, a method for preparing an antibody comprising culturing a cell containing a nucleic acid, an isolated epitope of gelsolin comprising an amino acid sequence SEQ ID NO.: 4, an antibody generated by preparation of an immunogen containing said epitope, methods for determining, selecting or purifying by using CGMCC Accession No: 2116, kits comprising antibodies having the same antigen-binding specificity produced by CGMCC Accession No: 2116.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2007/002467

There is no technical correlation among the three groups which don't involve any same or corresponding special technical features. Thereby, the requirement of unity of invention referred to in Rule 13.1 shall not be fulfilled.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.  
PCT/CN2007/002467

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US6271353B1	07-08-2001	WO9518221A1	06-07-1995
		AU1281495A	17-07-1995
		JP8080195A	26-03-1996
		EP0756005A1	29-01-1997
		US6130060A	10-10-2000
		US6184352B1	06-02-2001
		TW438886A	07-06-2001
		EP1371728A1	17-12-2003
		JP2004344172A	09-12-2004
		CA2180103C	08-02-2005
		EP0756005B1	09-03-2005
		DE69434292E	14-04-2005
		DE69434292T2	12-01-2006
		JP3914272B2	16-05-2007
CN1746676A	15-03-2006	NONE	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
	C 1 2 N 5/00 1 0 2	

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

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100162422

弁理士 志村 将

(72)発明者 シェン エンユン

中華人民共和国 1 0 0 1 7 6 ベイジン ベイジン エコノミック テクノロジカル ディヴェ  
ロップメント エリア ホンダ ノース ロード ナンバー12 タワー ビー ルーム 2 1 0

(72)発明者 ユ ゼン

中華人民共和国 1 0 0 1 7 6 ベイジン ベイジン エコノミック テクノロジカル ディヴェ  
ロップメント エリア ホンダ ノース ロード ナンバー12 タワー ビー ルーム 2 0 1

(72)発明者 ソウ ミン

中華人民共和国 1 0 0 1 7 6 ベイジン ベイジン エコノミック テクノロジカル ディヴェ  
ロップメント エリア ホンダ ノース ロード ナンバー12 タワー ビー ルーム 2 0 1

(72)発明者 グオ フェイ

中華人民共和国 1 0 0 1 7 6 ベイジン ベイジン エコノミック テクノロジカル ディヴェ  
ロップメント エリア ホンダ ノース ロード ナンバー12 タワー ビー ルーム 2 0 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 DA06 EA04 FA02 GA01 GA11 HA03

4B064 AG01 AG26 CA19 CA20 DA13

4B065 AA01X AA57X AA90X AA90Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA24 CA25

CA46

4C085 AA14 BB31 CC23 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	凝溶胶蛋白粘合剂组合物及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010537625A</a>	公开(公告)日	2010-12-09
申请号	JP2010520397	申请日	2007-08-15
[标]申请(专利权)人(译)	英属维尔京群岛英属维尔京群岛		
申请(专利权)人(译)	摩门集团有限公司		
[标]发明人	シエンエンユン ユゼン ゾウミン グオフェイ		
发明人	シエン エンユン ユゼン ゾウミン グオフェイ		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/53 G01N33/543 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61P31/04 A61P29/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P35/00 A61P1/16 A61K39/395		
CPC分类号	A61P1/16 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K16/18 C07K2317/565 C07K2317/73 G01N2800/26 G01N2800/52 G01N2800/56		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A G01N33/53.D G01N33/543.545.A C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 A61P31/04 A61P29/00.101 A61P9/00 A61P9/10 A61P35/00 A61P1/16 A61K39/395.N C12N5/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	小川伸男 山崎 一夫		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明一般涉及可与凝溶胶蛋白多肽结合的凝溶胶蛋白粘合剂（例如抗体）。本发明的凝溶胶蛋白粘合剂可单独或组合用于检测测试样品中的凝溶胶蛋白多肽（也就是靶多肽）以及纯化天然凝溶胶蛋白。凝溶胶蛋白粘合剂也可用于诊断有此需要的受试者中的凝溶胶蛋白相关的医学病症。本发明提供了检测生物样品中凝溶胶蛋白的试剂盒。

