

(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2011-501753

(P2011-501753A)

(43) 公表日 平成23年1月13日(2011.1.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B064
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4B065
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47	4H045
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 102	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-530148 (P2010-530148)
 (86) (22) 出願日 平成20年10月17日 (2008.10.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年6月11日 (2010.6.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/080340
 (87) 国際公開番号 W02009/052400
 (87) 国際公開日 平成21年4月23日 (2009.4.23)
 (31) 優先権主張番号 60/981,470
 (32) 優先日 平成19年10月19日 (2007.10.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/981,471
 (32) 優先日 平成19年10月19日 (2007.10.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/981,473
 (32) 優先日 平成19年10月19日 (2007.10.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
 パーク アボット パーク ロード 100
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 バーケンメイヤー, ラリー・ジ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60025、
 グレンビュー、ハンター・ロード・500
 (72) 発明者 デサイ, スーレツシュ・エム
 アメリカ合衆国、イリノイ・60048、
 リバティビル、エイミー・レイン・14
 08

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳動物のNGALに結合する抗体及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、グリコシル化された哺乳動物NGALに対して特異的な抗体並びにこのような抗体を製造及び使用する方法に関する。

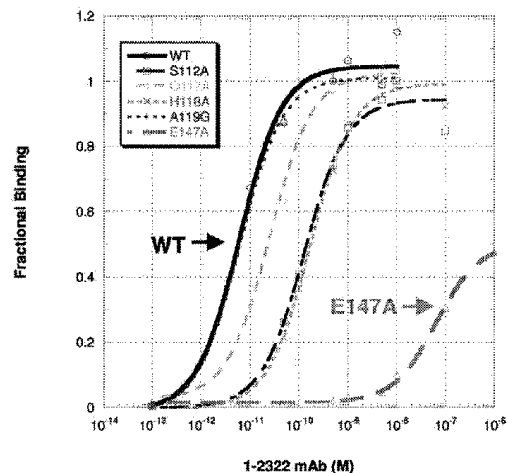


Figure 11

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 又は 3 3 に記載されているヒト N G A L タンパク質のアミノ酸残基 1 1 2、1 1 8 及び 1 4 7 を含む立体構造的エピトープに特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 2】

前記抗体が、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、完全にヒト化された抗体、部分的にヒト化された抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、一本鎖 F v、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片、ジスルフィド結合された F v、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性なそのエピトープ結合断片である、請求項 1 に記載の抗体

10

【請求項 3】

前記抗体がヒト N G A L タンパク質の少なくとも 1 つのさらなるアミノ酸にさらに結合し、前記アミノ酸が、

(a) 配列番号 1 又は 3 3 に記載されているヒト N G A L タンパク質のアミノ酸残基 1 1 7 ;

(b) 配列番号 1 又は 3 3 に記載されているヒト N G A L タンパク質のアミノ酸残基 1 1 9 ;

(c) 配列番号 1 又は 3 3 に記載されているヒト N G A L タンパク質のアミノ酸残基 1 1 7 及び 1 1 9 ;

からなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗体。

20

【請求項 4】

前記抗体が配列番号 7 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有する、ヒト N G A L に特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 5】

前記抗体が配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する、ヒト N G A L に特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 6】

前記抗体が配列番号 7 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する、ヒト N G A L に特異的に結合する単離された抗体。

30

【請求項 7】

A T C C 受託番号 P T A - 8 0 2 4 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5。

【請求項 8】

A T C C 受託番号 P T A - 8 0 2 4 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 によって産生される抗体。

【請求項 9】

前記抗体が配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有する、ヒト N G A L に特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 1 0】

前記抗体が配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する、ヒト N G A L に特異的に結合する単離された抗体。

40

【請求項 1 1】

前記抗体が配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する、ヒト N G A L に特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 1 2】

A T C C 受託番号 P T A - 8 0 2 6 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 9 0 3 - 4 3 0。

【請求項 1 3】

50

A T C C 受託番号 P T A - 8 0 2 6 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 9 0 3 - 4 3 0 によって産生される抗体。

【請求項 1 4】

(a) 配列番号 1、2、3 0 又は 3 3 に記載されているヒト N G A L タンパク質のアミノ酸残基 1 1 2、1 1 8 及び 1 4 7 を含む立体構造的エピトープに特異的に結合する抗体；

(b) ヒト N G A L に特異的に結合し、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有する単離された抗体；

(c) ヒト N G A L に特異的に結合し、配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体；

10

(d) ヒト N G A L に特異的に結合し、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体；

(e) A T C C 受託番号 P T A - 8 0 2 4 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 によって産生される抗体；

(f) ヒト N G A L に特異的に結合し、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有する単離された抗体；

(g) ヒト N G A L に特異的に結合し、配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体；

20

(h) ヒト N G A L に特異的に結合し、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体；及び

(i) A T C C 受託番号 P T A - 8 0 2 6 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 9 0 3 - 4 3 0 によって産生される抗体；

からなる群から選択される 1 つ又はそれ以上の抗体を含む免疫診断試薬。

【請求項 1 5】

配列番号 1、2、3 0 又は 3 3 に記載されているヒト N G A L タンパク質に特異的に結合する単離された抗体、

(a) 残基 N 1 1 6 に関して、約 $^1\text{H} = 9.47$ 又は約 $^1\text{N} = 118.30$ に位置する共鳴位置；

30

(b) 残基 Q 1 1 7 に関して、約 $^1\text{H} = 7.79$ 又は約 $^1\text{N} = 117.67$ に位置する共鳴位置；

(c) 残基 H 1 1 8 に関して、約 $^1\text{H} = 8.75$ 又は約 $^1\text{N} = 116.43$ に位置する共鳴位置；

(d) 残基 T 1 4 1 に関して、約 $^1\text{H} = 7.99$ 又は約 $^1\text{N} = 109.06$ に位置する共鳴位置；

(e) 残基 K 1 4 2 に関して、約 $^1\text{H} = 7.82$ 又は約 $^1\text{N} = 114.25$ に位置する共鳴位置；

(f) 残基 E 1 4 3 に関して、約 $^1\text{H} = 7.40$ 又は約 $^1\text{N} = 114.00$ に位置する共鳴位置；及び

40

(g) 残基 E 1 5 0 に関して、約 $^1\text{H} = 8.70$ 又は約 $^1\text{N} = 118.80$ に位置する共鳴位置；

からなる群から選択される配列番号 1、2、3 0 又は 3 3 の残基に対応するアミノ酸に対するアミド共鳴位置の少なくとも 4 つの T R O S Y プロトン - 窒素相関 N M R スペクトルにおいて、

前記抗体を前記ヒト N G A L タンパク質に添加した結果として、前記抗体が添加されていない場合と比べて、前記抗体は、

(1) ^1H 共鳴位置における約 0.05 ppm から約 1.0 ppm までの擾乱、

(2) ^1N 共鳴位置における約 0.3 ppm から約 3.0 ppm までの擾乱、又は

(3) 共鳴強度の約 2.5 倍から約 20 倍の減少、

50

を引き起こす。)。

【請求項 16】

配列番号 1、2、30 又は 33 に記載されているヒト NGAL タンパク質に特異的に結合する単離された抗体、

(a) 残基 Y 6 4 に関して、約 $^1\text{H} = 9.15$ 又は約 $^1\text{N} = 113.30$ に位置する共鳴位置；

(b) 残基 V 8 4 に関して、約 $^1\text{H} = 9.34$ 又は約 $^1\text{N} = 121.50$ に位置する共鳴位置；

(c) 残基 G 8 6 に関して、約 $^1\text{H} = 8.32$ 又は約 $^1\text{N} = 111.60$ に位置する共鳴位置；

(d) 残基 T 9 3 に関して、約 $^1\text{H} = 9.32$ 又は約 $^1\text{N} = 112.80$ に位置する共鳴位置；

(e) 残基 L 9 4 に関して、約 $^1\text{H} = 7.71$ 又は約 $^1\text{N} = 122.72$ に位置する共鳴位置；

(f) 残基 G 9 5 に関して、約 $^1\text{H} = 9.35$ 又は約 $^1\text{N} = 113.70$ に位置する共鳴位置；及び

(g) 残基 S 9 9 に関して、約 $^1\text{H} = 8.18$ 又は約 $^1\text{N} = 114.50$ に位置する共鳴位置；

からなる群から選択される配列番号 1、2、30 又は 33 の残基に対応するアミノ酸に対するアミド共鳴位置の少なくとも 4 つの TROSY プロトン - 窒素相関 NMR スペクトルにおいて、

前記抗体をヒト NGAL タンパク質に添加した結果として、前記抗体が添加されていない場合と比べて、前記抗体は、

(1) ^1H 共鳴位置における約 0.05 ppm から約 1.0 ppm までの擾乱、

(2) ^1N 共鳴位置における約 0.3 ppm から約 3.0 ppm までの擾乱、又は

(3) 共鳴強度の約 2.5 倍から約 20 倍の減少、

を引き起こす。)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の情報)

本願は、全て 2007 年 10 月 19 日に出願された米国仮特許出願 60/981,470 号、60/981,471 号及び 60/981,473 号並びに全て 2008 年 4 月 16 日に提出された米国非仮特許出願 12/104,408 号、12/104,410 号及び 12/104,413 号の優先権を主張し、これらの各々は、その全体が参照により組み込まれる。

【0002】

(技術分野)

本発明は、哺乳動物の NGAL に結合する抗体及び抗体を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

リポカリンは、細菌からヒトまで様々な生物中に見出される細胞外リガンド結合タンパク質のファミリーである。リポカリンは、小さな疎水性分子の結合及び輸送、栄養素の輸送、細胞増殖の制御並びに免疫応答の調節、炎症及びプロスタグランジン合成など、多くの異なる機能を有している。さらに、幾つかのリポカリンは、細胞制御プロセスにも関与しており、様々な病状における診断及び予後のマーカーとしての役割を果たす。例えば、

糖タンパク質の血漿レベルは、妊娠中に、並びに癌化学療法、腎機能不全、心筋梗塞、関節炎及び多発性硬化症などの症状の診断及び予後においてモニターされる。

【0004】

1993 年に、ヒト好中球由来の新規リポカリン好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (

10

20

30

40

50

又はNGAL、リポカリン-2若しくはLCN2としても知られる。)が同定された。NGALは、単量体並びにホモ及びヘテロ二量体形態で存在する25kDaのリポカリンであり、後者は、ヒト好中球ゼラチナーゼとの46kDa二量体として存在する。NGALの三量体形態も同定されている。NGALは、活性化されたヒト好中球の特異的顆粒から分泌される。相同的なタンパク質が、マウス(24p3/ウテロカリン)及びラット((2)-ミクログロブリン関連タンパク質/関連リポカリン)中に同定されている。構造的データは、8本鎖のバレルを有するNGALの典型的なリポカリン折り畳みを確認したが、リポカリン中に通常見られるより極性が高く、正に帯電したアミノ酸残基とともに整列された異常に大きな空洞を有している。25kDa NGALタンパク質は、細菌由来のリポ多糖及びホルミルペプチドなどの小さな親油性物質を結合すると考えられており、炎症の調節物質として機能し得る。

10

【0005】

急性腎不全又は慢性腎不全などの腎臓の傷害又は病気は、(病気、傷害などの)様々な異なる原因に由来し得る。腎臓の傷害及び病気の早期同定及び治療は、疾病の進行を妨げる上で有用である。現在、腎機能のバイオマーカーとして、血清クレアチニンがしばしば使用されている。しかしながら、血清クレアチニンの測定は、筋肉質量、性別、人種及び服薬によって影響を受ける。残念なことに、これらの制約のために、しばしば、著しい損傷が既に生じた後でなければ、腎臓病の診断が得られない。

【0006】

NGALは、急性腎臓傷害又は腎臓病に対する初期マーカーである。活性化されたヒト好中球の特異的な顆粒によって産生される他に、NGALは、尿細管上皮の損傷にตอบสนองして、ネフロンによっても産生され、尿細管間質性(TI)傷害のマーカーである。NGALレベルは、正常な血清クレアチニンレベルと比べて、穏やかな「無症候性」腎虚血の後でさえ、虚血又は腎毒性由来の急性尿細管壊死(ATN)において上昇する。さらに、NGALは、慢性腎臓病(CKD)の場合に、腎臓によって発現されることが知られている。上昇した尿のNGALレベルは、進行性の腎不全として示唆されている。NGALは動物及びヒトの両モデルにおいて、虚血性又は腎毒性傷害後の極めて早期に、腎臓尿細管によって顕著に発現されることが以前に示されている。NGALは、尿中に素早く分泌され(NGALは、尿中において、容易に検出及び測定できる。)、虚血性傷害の他のあらゆる公知の尿又は血清マーカーの出現に先行する。このタンパク質はプロテアーゼ耐性であり、NGALの尿細管発現の忠実なマーカーとして尿中に回収できることを示唆する。さらに、例えば、血液からろ過される腎臓の外側に由来するNGALは、尿中に出現せず、むしろ、近位尿細管によって定量的に吸収される。

20

30

【0007】

NGALを検出するための様々なイムノアッセイが本分野において公知である。本明細書に前述されているように、NGALは、単量体として、二量体(ホモ二量体又はヘテロ二量体)として、及び三量体としてさえ見出される。従って、検査試料中のNGAL単量体、二量体又は三量体の特異的に検出及び識別することができる新規抗体及びイムノアッセイに対する要望が本分野において存在する。さらに、検査試料中に含有される二量体に対する単量体の相対的割合を定量することができるイムノアッセイに対する要望も本分野において存在する。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

このような新規抗体及びイムノアッセイは、とりわけ、患者中のあらゆる腎臓傷害又は腎臓病の程度を評価し、腎臓傷害又は腎臓病に罹患している患者の腎臓の状態をモニターし、又は患者中の何れかの腎臓傷害の程度を評価し、その後、患者の腎臓の状態をモニターするために使用することができる。本発明のさらなる目的及び利点が、本明細書に提供されている記載から明らかとなる。

【課題を解決するための手段】

50

【0009】

一実施形態において、本発明は、配列番号1又は33に記載されているヒトNGALタンパク質のアミノ酸残基112、118及び147を含む立体構造的エピトープに特異的に結合する単離された抗体に関する。単離された抗体は、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、完全にヒト化された抗体、部分的にヒト化された抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、一本鎖Fv、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合されたFv、抗イディオタイプ抗体又は機能的に活性なそのエピトープ結合断片であり得る。

【0010】

さらに、上記抗体は、ヒトNGALタンパク質の少なくとも1つのさらなるアミノ酸に結合するヒトNGALタンパク質の少なくとも1つのさらなるアミノ酸に結合し、前記アミノ酸は配列番号1又は33に記載されているヒトNGALタンパク質のアミノ酸残基117又は119からなる群から選択される。より具体的には、抗体は、配列番号1又は33に記載されているヒトNGALタンパク質のアミノ酸残基117にさらに結合する。あるいは、抗体は、配列番号1又は33に記載されているヒトNGALタンパク質のアミノ酸残基119にさらに結合する。あるいは、抗体は、配列番号1又は33に記載されているヒトNGALタンパク質のアミノ酸残基117及び119にさらに結合する。

10

【0011】

別の実施形態において、本発明は、ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号7のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有する単離された抗体に関する。

20

【0012】

別の実施形態において、本発明は、ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号11のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体に関する。

【0013】

さらに別の実施形態において、本発明は、ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号7のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号11のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体に関する。

【0014】

さらに別の実施形態において、本発明は、ATCC受託番号PTA-8024を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-2322-455に関する。

30

【0015】

さらに別の実施形態において、本発明は、ATCC受託番号PTA-8024を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-2322-455によって産生される抗体に関する。

【0016】

さらに別の実施形態において、本発明は、ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号17のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有する単離された抗体に関する。

【0017】

さらに別の実施形態において、本発明は、ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号21のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体に関する。

40

【0018】

別の実施形態において、本発明は、ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号17のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号21のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体に関する。

【0019】

別の実施形態において、本発明は、ATCC受託番号PTA-8026を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-903-430に関する。

【0020】

さらに別の実施形態において、本発明は、ATCC受託番号PTA-8026を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-903-430によって産生される抗体に関する。

【0021】

50

さらに別の実施形態において、本発明は、

(a) 配列番号 1、2、30 又は 33 に記載されているヒト NGAL タンパク質のアミノ酸残基 112、118 及び 147 を含む立体構造的エピトープに特異的に結合する抗体；

(b) ヒト NGAL に特異的に結合し、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有する単離された抗体；

(c) ヒト NGAL に特異的に結合し、配列番号 11 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体；

(d) ヒト NGAL に特異的に結合し、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号 11 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体；

(e) ATCC 受託番号 PTA - 8024 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2322 - 455 によって産生される抗体；

(f) ヒト NGAL に特異的に結合し、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有する単離された抗体；

(g) ヒト NGAL に特異的に結合し、配列番号 21 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体；

(h) ヒト NGAL に特異的に結合し、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号 21 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体；及び

(i) ATCC 受託番号 PTA - 8026 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 903 - 430 によって産生される抗体；

からなる群から選択される 1 つ又はそれ以上の抗体を含む免疫診断試薬に関する。

【0022】

さらに別の実施形態において、本発明は、配列番号 1、2、30 又は 33 に記載されている（特に、配列番号 30 又は 33 に記載されている）ヒト NGAL タンパク質に特異的に結合する単離された抗体に関し、

(a) 残基 N116 に関して、約 $^1\text{H} = 9.47$ 又は約 $^1\text{N} = 118.30$ に位置する共鳴位置；

(b) 残基 Q117 に関して、約 $^1\text{H} = 7.79$ 又は約 $^1\text{N} = 117.67$ に位置する共鳴位置；

(c) 残基 H118 に関して、約 $^1\text{H} = 8.75$ 又は約 $^1\text{N} = 116.43$ に位置する共鳴位置；

(d) 残基 T141 に関して、約 $^1\text{H} = 7.99$ 又は約 $^1\text{N} = 109.06$ に位置する共鳴位置；

(e) 残基 K142 に関して、約 $^1\text{H} = 7.82$ 又は約 $^1\text{N} = 114.25$ に位置する共鳴位置；

(f) 残基 E143 に関して、約 $^1\text{H} = 7.40$ 又は約 $^1\text{N} = 114.00$ に位置する共鳴位置；及び

(g) 残基 E150 に関して、約 $^1\text{H} = 8.70$ 又は約 $^1\text{N} = 118.80$ に位置する共鳴位置；

からなる群から選択される配列番号 1、2、30 又は 33 の（特に、配列番号 30 又は 33 の）残基に対応するアミノ酸に対するアミド共鳴位置の少なくとも 4 つの TROSY プロトン - 窒素相関 NMR スペクトルにおいて、

前記抗体をヒト NGAL タンパク質に添加した結果として、前記抗体が添加されていない場合と比べて、前記抗体は、

(1) ^1H 共鳴位置における約 0.05 ppm から約 1.0 ppm までの擾乱、

(2) ^1N 共鳴位置における約 0.3 ppm から約 3.0 ppm までの擾乱、又は

(3) 共鳴強度の約 2.5 倍から約 20 倍の減少、

を引き起こす。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 3 】

さらに別の実施形態において、本発明は、配列番号 1、2、30 又は 33 に記載されている（特に、配列番号 30 又は 33 に記載されている）ヒト N G A L タンパク質に特異的に結合する単離された抗体に関し、

(a) 残基 Y 6 4 に関して、約 $^1\text{H} = 9.15$ 又は約 $^1\text{N} = 113.30$ に位置する共鳴位置；

(b) 残基 V 8 4 に関して、約 $^1\text{H} = 9.34$ 又は約 $^1\text{N} = 121.50$ に位置する共鳴位置；

(c) 残基 G 8 7 に関して、約 $^1\text{H} = 8.32$ 又は約 $^1\text{N} = 111.60$ に位置する共鳴位置；

(d) 残基 T 9 3 に関して、約 $^1\text{H} = 9.32$ 又は約 $^1\text{N} = 112.20$ に位置する共鳴位置；

(e) 残基 L 9 4 に関して、約 $^1\text{H} = 7.71$ 又は約 $^1\text{N} = 122.34$ に位置する共鳴位置；

(f) 残基 G 9 5 に関して、約 $^1\text{H} = 9.35$ 又は約 $^1\text{N} = 114.13$ に位置する共鳴位置；及び

(g) 残基 S 9 9 に関して、約 $^1\text{H} = 8.18$ 又は約 $^1\text{N} = 114.40$ に位置する共鳴位置；

からなる群から選択される配列番号 1、2、30 又は 33 の（特に、配列番号 30 又は 33 の）残基に対応するアミノ酸に対するアミド共鳴位置の少なくとも 4 つの T R O S Y プロトン - 窒素相関 N M R スペクトルにおいて、

前記抗体をヒト N G A L タンパク質に添加した結果として、前記抗体が添加されていない場合と比べて、前記抗体は、

(1) ^1H 共鳴位置における約 0.05 ppm から約 1.0 ppm までの擾乱、

(2) ^1N 共鳴位置における約 0.3 ppm から約 3.0 ppm までの擾乱、又は

(3) 共鳴強度の約 2.5 倍から約 20 倍の減少、
を引き起こす。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 4 】

【 図 1 】 ヒト N G A L 野生型抗原配列（配列番号 1）を示す。原型のヒト N G A L シグナルペプチド残基は、斜字体及び下線で記載されている。p J V - N G A L - A 3 プラスミド中の野生型ヒト N G A L 配列は、太字で記載されている。C 末端中の 6 X H i s タグは、下線で記載されている。

【 図 2 】 実施例 1 において論述されている野生型ヒト N G A L 配列を含有するプラスミド p J V - N G A L - A 3（p J V - N G A L - h i s A としても知られる。）を示す。

【 図 3 】 ヒト N G A L C 8 7 S 変異体抗原配列（配列番号 2）を示している。原型のヒト N G A L シグナルペプチドは、斜字体及び下線で記載されている。p J V - N G A L（S e r 8 7）- H i s - A 3 プラスミド中の野生型 N G A L 配列は、太字で記載されており、N G A L C 8 7 S 変異体コドン配列は太字及び下線で記載されている。C 末端中の 6 X H i s タグにも、下線が付されている。

【 図 4 】 野生型ヒト N G A L ポリヌクレオチド配列（配列番号 3）を示す。

【 図 5 】 変異体ヒト N G A L ポリヌクレオチド配列（配列番号 4）を示す。

【 図 6 】 サブクローン 1 - 9 0 3 - 4 3 0 から得た精製された抗体が、親 m A b 1 - 9 0 3 - 1 0 2 と比較したときに、ビオチン標識されたヒト N G A L 抗原（N G A L - B t）と類似の用量応答曲線を示すことを示すグラフであり、これにより、サブクローニングの工程がサブクローンの機能的な性能を変化させなかったことを示している。記号：（ - 黒菱形 - ） N A G L - B t と m A b 1 - 9 0 3 - 1 0 2；（ - 黒丸 - ） N G A L - B t と m A b 1 - 9 0 3 - 4 3 0；（ - 黒四角 - ） 無関係のビオチン化された抗原（N C A g - B t）と m A b 1 - 9 0 3 - 1 0 2；（ - x - ） N C A g - B t と m A b 1 - 9 0 3 - 4 3 0。

10

20

30

40

50

【図7】非特異的結合の不存在を示すために、陰性対照 m A b を陰性対照のマッチするピオチン標識された抗原 (N C m A b) と一緒に含めたことを除き、図7は、1 - 2 3 2 2 細胞株に対する親及びサブクローン材料を比較する図6と同じ用量応答曲線を示す。記号：(- 黒菱形 -) N A G L - B t と N C m A b ; (- 黒丸 -) N C A g - B t と m A b 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 ; (- 黒四角 -) N C A g - B t と N C m A b ; (- 黒三角 -) N G A L - B t と m A b 1 - 2 3 2 2 - 1 0 1 ; (- x -) N C A g - B t と m A b 1 - 2 3 2 2 - 1 0 1 ; (- * -) N G A L - B t と m A b 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 。

【図8】N G A L m A b C I A サンドイッチ形成に対する抗原滴定曲線のグラフであり、縦軸が N G A L 濃度 (n g / m L) であり、横軸が発光カウント / 秒 (L C P S) 。記号：(- 黒菱形 -) アクリジン化された 2 1 1 - 0 1 m A b ; (- 黒四角 -) アクリジン化された 1 - 1 8 1 - 1 2 8 m A b ; (- 黒三角 -) アクリジン化された 1 - 4 1 9 - 1 8 2 m A b ; (- x -) アクリジン化された 1 - 9 0 3 - 1 0 2 m A b ; (- * -) アクリジン化された 2 1 1 - 0 2 m A b 。

【図9A】モノクローナル抗体 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 の様々な配列を示している。図9Aは、可変重鎖 (配列番号5及び7) のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列並びに C D R 重鎖1 (配列番号8) 、 C D R 重鎖2 (配列番号9) 及び C D R 重鎖3 (配列番号10) に対するアミノ酸配列を示している。

【図9B】モノクローナル抗体 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 の様々な配列を示している。図9Bは、可変軽鎖 (配列番号6及び11) のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列並びに C D R 軽鎖1 (配列番号12) 、 C D R 軽鎖2 (配列番号13) 及び C D R 軽鎖3 (配列番号14) に対するアミノ酸配列を示している。

【図10A】モノクローナル抗体 1 - 9 0 3 - 4 3 0 の様々な配列を示している。図10Aは、可変重鎖 (配列番号15及び17) に対するポリヌクレオチド及びアミノ酸配列並びに C D R 重鎖1 (配列番号18) 、 C D R 重鎖2 (配列番号19) 及び C D R 重鎖3 (配列番号20) に対するアミノ酸配列を示している。

【図10B】モノクローナル抗体 1 - 9 0 3 - 4 3 0 の様々な配列を示している。図10Bは、可変軽鎖 (配列番号16及び21) に対するポリヌクレオチド及びアミノ酸配列並びに C D R 軽鎖1 (配列番号22) 、 C D R 軽鎖2 (配列番号23) 及び C D R 軽鎖3 (配列番号24) に対するアミノ酸配列を示している。

【図11】実施例7に記載されている異なる機能的エピトープに結合するモノクローナル 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 に対する等温結合データのグラフである。記号：(- 白丸 - 、実線) 野生型 N G A L エピトープ ; (- 白四角 - 、実線) S 1 1 2 A 変異を含む N G A L エピトープ ; (- 白菱形 - 、長い破線) Q 1 1 7 A 変異を含む N G A L エピトープ ; (- x - 、短い破線) H 1 1 8 A 変異を含む N G A L エピトープ ; (- + - 、点線) A 1 1 8 G 変異を含む N G A L エピトープ ; (- 白三角 - 、極めて長い破線) E 1 4 7 A 変異を含む N G A L エピトープ。

【図12】実施例7に記載されている異なる機能的エピトープに結合するモノクローナル 1 - 9 0 3 - 4 3 0 に対する等温結合データのグラフである。記号：(- 白丸 - 、実線) 野生型 N G A L エピトープ ; (- 白四角 - 、実線) S 1 4 A 変異を含む N G A L エピトープ ; (- 白菱形 - 、長い破線) K 1 5 A 変異を含む N G A L エピトープ ; (- x - 、短い破線) R 1 0 9 A 変異を含む N G A L エピトープ ; (- + - 、点線) S 1 5 8 A 変異を含む N G A L エピトープ ; (- 白三角 - 、極めて長い破線) L 1 5 9 A 変異を含む N G A L エピトープ ; (- 黒丸 -) G 1 6 0 A 変異を含む N G A L エピトープ。

【図13】ヒト N G A L の X 線結晶構造上の N G A L エピトープ残基の分子モデル化を示している。図13Aは、抗 N G A L モノクローナル抗体 1 - 9 0 3 - 4 3 0 相互作用のために不可欠な残基 (A r g 1 0 9 及び L y s 1 5) を示している。

【図14】NMRを用いて N G A L のエピトープを同定するために実施例8において使用した変異された N G A L (成熟 N G A L 配列から全てのシグナルペプチドを除去) のポリヌクレオチド配列 (配列番号29) 及びアミノ酸配列 (配列番号30) を示している。アミノ酸残基 8 7 及びヌクレオチド 2 6 3 の太字の配列は、修飾されたコドン中の変化を受

10

20

30

40

50

けたヌクレオチド及び予想されるCysからSerへの変化を示している。残基76及び175の斜字体で記載されたCysは、鎖内S-S結合(野生型NGAL中の残基76、87及び175に、3つのCys残基が存在する。)を示す。最初のMet残基は、原核生物中のみで産生され、真核生物中では産生されず、従って、本明細書において、存在する場合には残基-1としてカウントされ、原核生物中に存在するときに、真核生物に比べて、ポリヌクレオチド配列に対する類似の調整を行わなかった。TGA終始コドンは、アミノ酸配列上のアスタリスクによって特定される。

【図15】実施例8に記載されているNGAL(+)mut8タンパク質の誘導及び精製から得られた試料のSDS-PAGE分析を示している。レーン:(1)サイズマーカー; (2)可溶化液上清; (3)可溶化液沈降物; (4)His-Bind^(R)非結合画分及び(5)His-Bind^(R)精製画分。

【図16】mAb2322の過剰を添加した後のヒトNGALの¹H-¹⁵N TROSY HSQCスペクトルの一部を示す。アサインメントは、公開データベースBiological Magnetic Resonance Data Bank(データベースエントリー4267)に登録されたものに基づいており、観察された擾乱カテゴリーの例が示されている。(灰色の太い線によって示された)抗体結合によるシフトが、遊離のタンパク質の対応するスペクトル(細い黒線によって示されている。)上に重ね合わされている。

【図17A】ヒトNGALの¹H-¹⁵N TROSY HSQCスペクトルの一部を示しており、抗体結合によるシフト(灰色の太い線で描かれたスペクトル)が遊離のタンパク質の対応するスペクトル(細い黒線として示されている。)上に重ね合わされている。図17Aは、mAb903の過剰の添加後のスペクトルの一部を示している。図17Bは、mAb2322の過剰の添加後におけるヒトNGALのスペクトルの対応する一部を示している。これらの図の差によって、これらの抗体がNGAL上の異なる表面上で相互作用することが確認される。アサインメントは、公開データベースBiological Magnetic Resonance Data Bank(データベースエントリー4267)に登録されたものに基づいている。

【図17B】ヒトNGALの¹H-¹⁵N TROSY HSQCスペクトルの一部を示しており、抗体結合によるシフト(灰色の太い線で描かれたスペクトル)が遊離のタンパク質の対応するスペクトル(細い黒線として示されている。)上に重ね合わされている。図17Aは、mAb903の過剰の添加後のスペクトルの一部を示している。図17Bは、mAb2322の過剰の添加後におけるヒトNGALのスペクトルの対応する一部を示している。これらの図の差によって、これらの抗体がNGAL上の異なる表面上で相互作用することが確認される。アサインメントは、公開データベースBiological Magnetic Resonance Data Bank(データベースエントリー4267)に登録されたものに基づいている。

【図18A】アミノ酸の位置(横軸)対相対的擾乱(縦軸)に関して本明細書中に記載されている様々なモノクローナル抗体(mAb)の結合によって引き起こされたNGAL骨格¹H-¹⁵N共鳴擾乱を示すグラフである。図18Aは、mAb2322に対して観察された共鳴変化を示している。

【図18B】アミノ酸の位置(横軸)対相対的擾乱(縦軸)に関して本明細書中に記載されている様々なモノクローナル抗体(mAb)の結合によって引き起こされたNGAL骨格¹H-¹⁵N共鳴擾乱を示すグラフである。図18Bは、mAb809に対して観察された共鳴変化を示している。

【図18C】アミノ酸の位置(横軸)対相対的擾乱(縦軸)に関して本明細書中に記載されている様々なモノクローナル抗体(mAb)の結合によって引き起こされたNGAL骨格¹H-¹⁵N共鳴擾乱を示すグラフである。図18Cは、mAb269に対して観察された共鳴変化を示している。

【図18D】アミノ酸の位置(横軸)対相対的擾乱(縦軸)に関して本明細書中に記載されている様々なモノクローナル抗体(mAb)の結合によって引き起こされたNGAL骨

10

20

30

40

50

格¹H - ¹⁵N共鳴擾乱を示すグラフである。図18Dは、mAb181に対して観察された共鳴変化を示している。

【図18E】アミノ酸の位置(横軸)対相対的擾乱(縦軸)に関して本明細書中に記載されている様々なモノクローナル抗体(mAb)の結合によって引き起こされたNGAL骨格¹H - ¹⁵N共鳴擾乱を示すグラフである。図18Eは、mAb903に対して観察された共鳴変化を示している。

【図18F】アミノ酸の位置(横軸)対相対的擾乱(縦軸)に関して本明細書中に記載されている様々なモノクローナル抗体(mAb)の結合によって引き起こされたNGAL骨格¹H - ¹⁵N共鳴擾乱を示すグラフである。図18Fは、mAb419に対して観察された共鳴変化を示している。

【図19】ヒトNGALタンパク質の三次元(3D)構造上への擾乱された共鳴のマッピングを示している。具体的には、この図は、ヒトNGAL(pdbid:1x89)の骨格リボン表記を示しており、擾乱された残基のアミドが球体と描かれ、シグナルペプチドを除去した成熟ヒトNGAL配列に従って付番した。図19Aは、K142とE150の間の残基を含む、mAb2322結合によって擾乱された残基の幾つかの位置を示している。図19Bは、L18及びQ88を含むmAb903によって擾乱された残基の幾つかの表面位置を示している。両方のリボンは、同じ配向である。

【図20】抗NGALmAb及びNGALの結合曲線(横軸に遊離のNGAL濃度及び縦軸に結合された割合)及び表9に列記されているそれらの計算された解離定数(K_d)を示している。記号:(-黒丸-)mAb903;(-黒四角-)mAb809;(-白丸-)mAb2322;(-黒三角-)mAb181;(-白三角-)mAb269。

【図21】NGALの添加前(点線)及び添加後(実線)の様々な抗体対に対する二重チャンネル交差相関蛍光曲線を示している(横軸は時間(秒、対数目盛り)及び縦軸は標準化された蛍光交差相関関数 $G_x(\quad)$)。図21Aは、mAb2322とmAb903対に対する結果を示している。図21Bは、mAb2322及びmAb809対に対する結果を示している。図21Cは、mAb809及びmAb181対に対する結果を示している。

【発明を実施するための形態】

【0025】

ある種の哺乳動物のNGALタンパク質に結合する抗体が発見された。これらの単独で又は組み合わされた抗NGAL抗体(本明細書において、「NGAL抗体」と広い意味で表記される。)は、例えば、診断アッセイの成分として様々な用途を有し、又はイムノアッセイキット中に存在する。

【0026】

全てのNGALポリヌクレオチド及びポリペプチド配列並びに野生型NGAL組換え抗原(rAg)及び変異体C87SNGALNGALrAgクローン、サブクローン、ハイブリッド及びハイブリドーマ(名称及び付番を含む。)は、2007年10月19日に出版された米国仮特許出願60/981,470号(参照により、これらに関するその教示に関して組み込まれる。)に記載されているとおりである。

【0027】

A. 定義

本明細書に使用されているように、内容から明白である場合を除き、単数形「a」、「an」及び「the」には、複数表記が含まれる。本明細書で数値範囲を記載する場合には、同一精度でその範囲内の各数値を明確に想定する。例えば、6から9の範囲では、6及び9に加えて、数値7及び8が想定され、6.0から7.0の範囲では、数値6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9及び7.0が明確に想定される。

【0028】

a) 抗体

本明細書において使用される、「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、多重特異

10

20

30

40

50

的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体（完全又は部分的にヒト化）、動物抗体（一態様において、トリ（例えば、アヒル又はガチョウ）、別の態様において、サメ又はクジラ、さらに別の態様において、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウスなど）及びヒト以外の霊長類（例えば、カニクイザル、チンパンジーなどのサル）を含む哺乳動物）、組換え抗体、キメラ抗体、一本鎖Fv（scFv）、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合されたFv（sdFv）及び抗イデオタイプ（抗Id）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体など）及び上記の何れかの機能的に活性なエピトープ結合断片を表す。特に、抗体には、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片、すなわち、抗原結合部位を含有する分子が含まれる。免疫グロブリン分子は、あらゆる種類（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、クラス（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂）又はサブクラスであり得る。単純化のために、分析物に対する抗体は、「抗分析物抗体」又は単に「分析物抗体」（例えば、NGAL抗体）の何れかとしばしば称される。

10

【0029】

b) 尿細管細胞傷害

本明細書において使用される「尿細管細胞傷害」という表現は、多数の疾病又は疾患のプロセスによって引き起こされ得る、突然の（急性）又は時間をかけてゆっくり低下する（慢性）腎若しくは腎臓不全又は機能障害を意味する。尿細管細胞傷害の急性及び慢性形態は何れも、生命を脅かす代謝異常をもたらし得る。

20

【0030】

c) 急性腎臓病

「急性尿細管細胞傷害」は、急性虚血性腎傷害（IRI）又は急性腎毒性腎傷害（NRI）を意味する。IRIには、虚血傷害及び慢性虚血傷害、急性腎不全、急性糸球体腎炎及び急性尿細管間質性腎障害が含まれるが、これらに限定されない。NRI毒性には、敗血症（感染）、ショック、外傷、腎臓結石、腎感染症、薬物毒性、毒（poison）又は毒物（toxin）又は放射線造影色の注射後が含まれるが、これらに限定されない。

【0031】

d) 慢性腎臓病

本明細書において互換的に使用される「慢性尿細管細胞傷害」、「進行性腎臓病」、「慢性腎臓病（CRD）」、「慢性腎臓病（CKD）」という用語には、突然の現象ではなく、ある期間にわたって発生して、尿細管細胞機能の漸進的低下又は尿細管細胞傷害の悪化を引き起こすあらゆる腎臓症状又は機能障害が含まれる。慢性腎臓病が継続した場合の1つの終末点は、「慢性腎不全（CRF）」である。例えば、本明細書において互換的に使用される慢性腎臓病又は慢性腎傷害には、慢性的な感染によって引き起こされる症状又は機能障害、慢性的炎症、糸球体腎炎、血管疾患、間質性腎炎、薬物、毒物、外傷、腎臓結石、長期の高血圧、糖尿病、うっ血性心不全、鎌形赤血球貧血症及び他の造血機能障害に由来する腎障害、肝炎、HIV、パルボウイルス及びBKウイルス（ヒトポリオマウイルス）に関連する腎障害、嚢胞性腎臓病、先天性奇形、閉塞、悪性腫瘍、原因不明の腎臓病、ループス腎炎、膜性糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎、局所的糸球体硬化症、微小変化型疾患、クリオグロブリン血症、抗好中球細胞質抗体（ANCA）陽性血管炎、ANCA陰性血管炎、アミロイドーシス、多発性骨髄腫、軽鎖沈着症、腎臓移植の合併症、腎臓移植の慢性的拒絶、慢性同種移植腎障害及び免疫抑制剤の慢性効果が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、慢性腎臓病又は慢性腎傷害は、慢性腎不全又は慢性糸球体腎炎を表す。

30

40

【0032】

e) 免疫診断試薬

本発明における「免疫診断試薬」は、NGALタンパク質の領域に特異的に結合する1つ又はそれ以上の抗体を含む。例えば、イムノアッセイにおける及び/又は検量用試料、

50

対照及び免疫診断剤としての本発明のこのような抗体の使用が、本明細書に記載されている。しかしながら、本発明の抗体は、例えば、2007年10月19日に出願された米国仮特許出願60/981,473号(改良されたNGALアッセイに関するその教示に関して、参照により、本明細書に組み込まれる。)に記載されているような改良されたNGALアッセイにおいても、場合によって使用することができる。

【0033】

f) NGALポリヌクレオチド及びポリペプチド配列

NGALポリヌクレオチド及びポリペプチド配列は、2007年10月19日に出願された米国仮特許出願60/981,470号(NGALポリヌクレオチド及びポリペプチド配列に関するその教示に関して、参照により、本明細書に組み込まれる。)に記載されているとおりである。このようなポリヌクレオチド及びポリペプチド配列は、本発明において、場合によって使用することができる。

【0034】

一般に、本明細書において使用されるNGALは、例えば、Genbank受付番号GenpeptCAA58127(配列番号1)、AAB26529、XP__862322、XP__548441、P80108、P11672、X83006.1、X99133.1、CAA67574.1、BC033089.1、AAH33089.1、S75256.1、AD14168.1、JC2339、1DFVA、1DFVB、1L6MA、1L6MB、1L6MC、1NGLA、1QQSA、1X71A、1X71B、1X71C、1X89A、1X89B、1X89C、1X8UA、1X8UB及び1X8UCとして記載されているものなど、あらゆるNGAL配列であり得る。NGALポリヌクレオチド及びポリペプチド(例えば、ポリアミノ酸)配列は、天然に見出される配列に基づいて、天然に見出されるとおりであり、単離され、合成的、半合成的、組換え又はその他である。一実施形態において、NGALは、ヒトNGAL(「hNGAL」としても知られる。)である。別段の記載がなければ、NGALポリペプチド配列は、天然に典型的に見出される20残基のアミノ酸シグナルペプチドを差し引いた(及び他のあらゆるシグナルペプチド配列を差し引いた)成熟ヒトNGAL配列に従って付番される。シグナルペプチドが存在する場合、例えば、残基-1から-20のように負の数字が付番され、コードポリヌクレオチド配列に対しては同じ付番が適用される。

【0035】

同様に、NGALのN末端の開始Met残基は、原核生物(例えば、イー・コリ(E. coli))中で産生されたNGAL又は合成(半合成を含む。)若しくは誘導された配列中のみに存在し、真核生物(例えば、ヒトを含む哺乳動物細胞及び酵母細胞)中で産生されるNGAL中には存在しない。従って、存在する場合には、開始Met残基は本明細書において負の数として(例えば、残基-1として)カウントされ、原核及び真核両バックグラウンド中でポリヌクレオチド配列が同じように複製及び転写され、差異は翻訳のレベルで存在するので、真核生物と比較して原核生物のバックグラウンド又は発現系中のポリヌクレオチド配列に対して類似の調整を行わなかった。

【0036】

従って、本明細書の開示は、原核生物及び/又は真核生物バックグラウンド中に存在し及び/又は産生される(例えば、その結果、コドン認識に対する最適化を有する)異なる多数のNGALポリヌクレオチド及びポリペプチド配列を(例えば、免疫原として、及び/又は抗体結合研究において)使用することを包含する。要するに、配列は、(a)シグナルペプチド、(b)成熟NGAL配列中のN末端に存在する開始Met残基、(c)成熟NGALタンパク質に先行するシグナルペプチドの先頭に存在する開始Met残基及び(d)当業者に自明なものなどの他の変動を保有若しくはコードしてもよく、又は保有若しくはコードしなくてもよい。

【0037】

典型的な配列には、本明細書中に記載されているもの、すなわち、配列番号1(シグナルペプチドを含むNGAL野生型ポリペプチド)、配列番号2(シグナルペプチドを含む

10

20

30

40

50

NGAL変異体ポリペプチド)、配列番号30(シグナルペプチドを一切含まず、並びに原核生物中で産生され及びMet開始コドンが存在するときには、Met開始残基が先行し得るが、Met開始コドンが存在するか否かに関わらず、真核生物中で産生されたときにはMet開始残基が存在しないNGAL変異体ポリペプチド)、配列番号33(シグナルペプチドを一切含まず、並びに原核生物中で産生され及びMet開始コドンが存在するときには、Met開始残基が先行し得るが、Met開始コドンが存在するか否かに関わらず、真核生物中で産生されたときにはMet開始残基が存在しないNGAL野生型ポリペプチド);配列番号3(シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むNGAL野生型ポリヌクレオチド配列);配列番号4(シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むNGAL変異体ポリヌクレオチド);配列番号32(何れかのシグナルペプチドをコードするポリヌクレオチドを含まないが、Met開始コドン、例えば、ATGあり又はなしに、場合によってN末端にさらに先行することができる、合成又は真核生物発現用のNGAL変異体ポリヌクレオチド)、配列番号29(何れかのシグナルペプチドをコードするポリヌクレオチドを含まないが、Met開始コドン、例えば、ATGあり又はなしに、場合によってN末端にさらに先行することができる、合成又は真核生物発現用のNGAL変異体ポリヌクレオチド)が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0038】

g)グリコシル化された哺乳動物NGAL

グリコシル化された哺乳動物NGAL(例えば、免疫原として、及び/又は様々な抗体の結合を評価するために使用される)は、2007年10月19日に出願された米国仮特許出願60/981,470号(参照により、この点に関するその教示に関して組み込まれる。)に記載されているとおりである。

【0039】

一般に、本明細書において使用される場合、本明細書において互換的に使用される「オリゴ糖部分」又は「オリゴ糖分子」という用語は、インビボ又はインビトロでのグリコシル化によって、(例えば、哺乳動物のNGALなどのグリコシル化されたポリペプチドを産生するために)ポリペプチドに付着させることができる1つ又はそれ以上の単糖残基を含む炭水化物含有分子を表す。ポリペプチドに付着されたオリゴ糖部分の数が明示的に表示されている場合を除き、本明細書において引用される「オリゴ糖部分」という表記は全て、ポリペプチドに付着された1つ又はそれ以上のこのような部分を表すものとする。好ましくは、前記炭水化物含有分子を付着させることができるポリペプチドは、すなわち、本明細書中にさらに記載されている「グリコシル化された哺乳動物NGAL」を提供するために野生型又は変異体哺乳動物NGALである。

【0040】

「インビボグリコシル化」という用語は、インビボで、例えば、例えばN結合型及びO結合型グリコシル化によって、ポリペプチドの発現のために使用されるグリコシル化細胞中での翻訳後プロセッシングの間にかかるオリゴ糖部分のあらゆる付着を意味するものとする。通常、N-グリコシル化されたオリゴ糖部分は、5つの単糖残基(すなわち、2つのN-アセチルグルコサミン残基及び3つのマンノース残基)から構成される共通の基本的コア構造を有する。正確なオリゴ糖構造は、グリコシル化を行う問題の生物及び具体的なポリペプチドに大きく依存する。

【0041】

「インビトログリコシル化」という用語は、場合によって架橋剤を用いて、オリゴ糖部分をポリペプチドの付着基へ共有結合させることを通常含む、インビトロで行われる合成的グリコシル化を表す。インビトログリコシル化は、様々な異なる化学を用いて、化学的に合成されたオリゴ糖構造をポリペプチド(例えば、哺乳動物NGALなど)に付着させることによって達成することができる。例えば、使用され得る化学は、ポリエチレングリコール(PEG)をタンパク質に付着させるために使用される化学であり、場合によって短いスペーサーを介して、オリゴ糖が官能基に連結される。インビトログリコシル化は、約0.02から約2.0mLの容量で、約0.5から約2.0mg/mLのタンパク質濃

度で、約4.0から約7.0のpHの適切な緩衝液中で実施することができる。他のインビトログリコシル化法は、例えば、Apelin他によるWO87/05330、Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc., Boca Raton, Fla中のLundblad他によるCRCCrit. Rev. Biochem. 259-306(1981)、Yan et al., Biochemistry, 23:3759-3765(1982)及びDoebber et al., J. Biol. Chem. 257:2193-2199(1982)に記載されている。

【0042】

h) ヒトNGAL断片

ヒトNGAL断片(例えば、免疫原として、様々な抗体の結合を評価するために使用される)は、2007年10月19日に出願された米国仮特許出願60/981,470号(参照により、この点に関するその教示に関して組み込まれる。)に記載されているとおりである。

【0043】

一般に、本明細書において使用される「ヒトNGAL断片」は、本明細書において、成熟ヒトNGAL又はシグナルペプチドを含むNGALの全体より少ない部分を含むポリペプチドを表す。特に、ヒトNGAL断片は、配列番号1、2、30又は33の約5から約178まで又は約179の連続するアミノ酸を含む。特に、ヒトNGAL断片は、配列番号1、2、30又は33の約5から約170の連続するアミノ酸を含む。特に、ヒトNGAL断片は、配列番号1、2、30又は33の少なくとも約5個の連続するアミノ酸、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約10個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33のアミノ酸の少なくとも約15個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約20個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約25個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33のアミノ酸の少なくとも約30個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約35個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約40個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約45個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約50個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約55個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約60個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約65個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約70個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約75個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約80個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約85個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約90個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約95個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約100個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約105個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約110個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約115個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約120個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約125個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約130個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約135個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約140個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約145個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約150個の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、30若しくは33の少なくとも約160個の連続するアミノ酸残基

10

20

30

40

50

、配列番号 1、2、30 若しくは 33 の少なくとも約 165 個の連続するアミノ酸残基、配列番号 1、2、30 若しくは 33 の少なくとも約 170 個の連続するアミノ酸残基又は配列番号 1、2、30 若しくは 33 の少なくとも約 175 個の連続するアミノ酸残基を含む。

【0044】

(例えば、免疫原として、及び/又は様々な抗体の結合を評価するために使用される) 本発明において使用することが想定されるヒトNGAL断片の例には、以下のものが含まれるが、これらに限定されない。

【0045】

(a) 配列番号 1、2、30 又は 33 のアミノ酸残基 112、113、114、115、116、117 及び 118 を含む少なくとも約 7 個の連続するアミノ酸のヒトNGAL断片(配列番号 1 及び 2 の付番は、シグナルペプチド及び何れかのMet開始残基直後の成熟配列のGln残基から始まり、シグナルペプチド及び何れかのMet開始残基は、本明細書に前述されているように、負の付番が為される。);

(b) 配列番号 1、2、30 又は 33 のアミノ酸残基 112、113、114、115、116、117、118 及び 119 を含む少なくとも約 8 個の連続するアミノ酸のヒトNGAL断片(配列番号 1 及び 2 の付番は、シグナルペプチド及び何れかのMet開始残基直後の成熟配列のGln残基から始まる。);

(c) 配列番号 1、2、30 又は 33 のアミノ酸残基 112、118 及び 147 を含む少なくとも約 36 個の連続するアミノ酸のヒトNGAL断片(配列番号 1 及び 2 の付番は、シグナルペプチド及び何れかのMet開始残基直後の成熟配列のGln残基から始まる。);

(d) 配列番号 1、2、30 又は 33 のアミノ酸残基 15 及び 109 を含む少なくとも約 95 個の連続するアミノ酸のヒトNGAL断片(配列番号 1 及び 2 の付番は、シグナルペプチド及び何れかのMet開始残基直後の成熟配列のGln残基から始まる。);

(e) 配列番号 1、2、30 又は 33 のアミノ酸残基 15、109 及び 158 を含む少なくとも約 144 個の連続するアミノ酸のヒトNGAL断片(配列番号 1 及び 2 の付番は、シグナルペプチド及び何れかのMet開始残基直後の成熟配列のGln残基から始まる。);

(f) 配列番号 1、2、30 又は 33 のアミノ酸残基 15、109、158 及び 159 を含む少なくとも約 145 個の連続するアミノ酸のヒトNGAL断片(配列番号 1 及び 2 の付番は、シグナルペプチド及び何れかのMet開始残基直後の成熟配列のGln残基から始まる。); 又は

(g) 配列番号 1、2、30 又は 33 のアミノ酸残基 15、109、158、159 及び 160 を含む少なくとも約 146 個の連続するアミノ酸のヒトNGAL断片(配列番号 1 及び 2 の付番は、シグナルペプチド及び何れかのMet開始残基直後の成熟配列のGln残基から始まる。);

【0046】

場合によって、本明細書に記載されているように使用されるこのようなヒトNGAL断片は、配列番号 3、4 又は 32 の対応する配列によって部分的に又は完全にコードされる。これらの線に沿って、一実施形態において、本発明は、配列番号 4 若しくは 32 の配列を含む又は配列番号 4 若しくは 32 の配列からなる単離され、精製され、又は単離及び精製されたヒトNGALポリヌクレオチドの使用を想定する。

【0047】

i) NGALハイブリッド

本明細書において使用される「NGALハイブリッド」又は「NGALハイブリドーマ」という用語は、目的の抗NGAL抗体を産生するハイブリドーマクローン又はサブクローン(明記されているとおりの)を表す。一般に、同じ種類のサブクローンから得られたものと比較すると、ハイブリドーマクローンによって産生された抗体の親和性には、幾らか小さな変動が存在し得る(例えば、クローンの純度を反映する)。比較により、同じ

10

20

30

40

50

クローンを起源とし、さらに、目的の抗NGAL抗体を産生する全てのハイブリドーマサブクローンは、同じ配列及び/又は同じ構造の抗体を産生することが十分に確立されている。

【0048】

j) 特異的結合

本明細書において、「特異的結合」という用語は、特定の部位において、別の結合パートナーよりある結合パートナー（例えば、2つのポリペプチド、ポリペプチドと核酸分子又は2つの核酸分子）に優先的に結合することと定義される。「特異的に結合する」という用語は、非特異的な標的分子（例えば、特異的に認識される部位を欠如する無作為な分子）に比べて、標的分子/配列に対する結合の優先性（例えば、親和性）は、少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも5倍及び最も好ましくは少なくとも10倍又は20倍であることを示す。

10

【0049】

k) 結合パートナー

本明細書において使用される「結合パートナー」とは、結合ペアの一員、すなわち、分子の1つが第二の分子に結合する分子のペアである。特異的に結合する結合パートナーは、「特異的結合パートナー」と称される。イムノアッセイにおいて一般的に使用される抗原及び抗体結合パートナーの他に、他の特異的な結合パートナーは、ビオチン及びアビジン、炭水化物及びレクチン、相補的ヌクレオチド配列、エフェクター及び受容体分子、補因子及び酵素、酵素阻害剤及び酵素などが含まれ得る。さらに、特異的な結合パートナーは、元の特異的結合パートナーの類縁体である対（例えば、分析物-類縁体）を含み得る。免疫反応性の特異的結合パートナーには、抗原、抗原断片、抗体及び抗体断片（モノクローナル及びポリクローナルの両方）並びにこれらの複合体が含まれる（組換えDNA法によって形成されるものを含む。）。

20

【0050】

l) エピトープ

本明細書において使用される「エピトープ」又は「目的のエピトープ」という用語は、認識され、その特異的結合パートナー上の相補的部位に結合することができる何れかの分子上の部位を表す。分子と特異的結合パートナーは、特異的結合ペアの一部である。例えば、エピトープは、ポリペプチド、タンパク質、ハプテン、炭水化物抗原（糖脂質、糖タンパク質又はリポ多糖など（但し、これらに限定されない。））又は多糖であり得、その特異的結合パートナーは抗体であり得る（但し、これに限定されない。）。

30

【0051】

特に、エピトープは、抗原（すなわち、抗体が結合するタンパク質）の特定領域（1つ又はそれ以上のアミノ酸から構成される。）を表す。より具体的には、抗原性エピトープは、抗体結合ドメインの表面上の相補的領域（パラトープ）と相互作用するタンパク質表面上の領域である。従って、エピトープは、抗体との静電的相互作用、疎水的相互作用及び水素結合に関与し、表面の正しい形状、その柔軟性及び構造的動力学に必要とされる残基も含有する。抗原性エピトープに対して強固な支持の役割を有する、埋め込まれた「第二球体」残基も存在する。

40

【0052】

m) 結合定数（例えば、 K_D 、 k_a 及び k_d ）

本明細書において互換的に使用される「平衡解離定数」又は「 K_D 」という用語は、平衡状態での滴定測定において得られた値又は会合速度定数（ k_{on} ）によって解離速度定数（ k_{off} ）を除することによって得られた値を表す。会合速度定数、解離速度定数及び平衡解離定数は、抗原への抗体の結合親和性を表すために使用される。

【0053】

「相対親和性」又は「相対的 K_R 」という用語は、抗血清検査試料又はクローニングされていないハイブリッド検査試料を含む検査集団内で抗体/抗原 K_D を測定するために同じ検査方法を用いて明らかにされた抗原への抗体の結合力として定義することができ、従

50

って、「絶対的な」特異性データではなく、相対的な親和性値を与える。(例えば、Immunology, 32:49 (1977)及びEssential Immunology, Blackwell Scientific Publications, 7th edition, page 74 (1991)参照)。

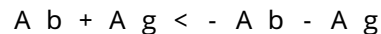
【0054】

本明細書において互換的に使用される「会合速度定数」、「 k_{on} 」又は「 k_a 」という用語は、以下の式によって示されているように、標的抗原への抗体の結合速度又は抗体と抗原の間での複合体形成の速度を示す値を表す。



【0055】

本明細書において互換的に使用される「解離速度定数」、「 k_{off} 」又は「 k_d 」という用語は、以下の式によって示されているように、標的抗原から抗体が解離する速度又はAb-Ag複合体が経時的に遊離の抗体及び抗原へ分離することを示す値を表す。



【0056】

会合及び解離速度定数を測定するための方法は、本分野において周知である。蛍光を基礎とする技術を用いることによって、平衡状態にある生理的緩衝液中で試料を調べるための高い感度及び能力が得られる。BIAcore^(R)(生物分子相互作用分析)アッセイなどの他の実験的アプローチ及び装置(例えば、BIAcore International ABから入手可能な装置、GE Healthcare company、Uppsala, Sweden)を使用することが可能である。さらに、Sapidyne Instruments(Boise, Idaho)から入手可能なKinExA^(R)(Kinetic Exclusion Assay)も使用することが可能である。

【0057】

n) 対象

本明細書において使用される「対象」及び「患者」という用語は、当該対象が治療の何れかの形態を有し、又は現在行っているかどうかに関わらず、互換的に使用される。本明細書において使用される「対象」という用語は、非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット及びマウスなど)、ヒト以外の霊長類(例えば、カニクイザル、チンパンジーなどのサル)及びヒトを含む哺乳動物を表す。好ましくは、対象は、ヒトである。

【0058】

o) 検査試料

本明細書において使用される「検査試料」という用語は、血清、血漿、血液(全血を含むが、これに限定されない。)、リンパ、尿又は対象の他の体液に由来する生物学的試料を表す。検査試料は、当業者に公知の定型的な技術を用いて調製することが可能である。好ましくは、検査試料は、尿又は血液である。

【0059】

p) 前処理試薬(例えば、溶解、沈殿及び/又は可溶化試薬)

本明細書に記載されている診断アッセイにおいて使用される前処理試薬とは、何れかの細胞を溶解し、及び/又は検査試料中に存在する何らかの分析物を可溶化する試薬である。本明細書中にさらに記載されているように、前処理は、全ての試料に対して必要とは限らない。とりわけ、分析物(すなわち、NGAL)の可溶化には、試料に存在する何れかの内在性結合タンパク質からの分析物の放出を引き起こす。前処理試薬は、同種(分離工程を必要としない)又は異種(分離工程を必要とする)であり得る。異種の前処理試薬を使用すると、アッセイの次の工程に進む前に、検査試料からのあらゆる沈殿した分析物結合タンパク質の除去が存在する。前処理試薬は、(a)1つ若しくはそれ以上の溶媒及び塩、(b)1つ若しくはそれ以上の溶媒、塩及び界面活性剤、(c)界面活性剤、(d)界面活性剤及び塩又は(e)細胞溶解及び/若しくは分析物の可溶化に適したあらゆる試薬若しくは試薬の組み合わせを場合によって含むことができる。また、単独の又は他の何

10

20

30

40

50

れかの前処理剤（例えば、溶媒、界面活性剤、塩など）と組み合わせたプロテアーゼを使用することができる。

【0060】

q) 固相

本明細書において使用される「固相」は、不溶性であり、又はその後の反応によって不溶性となり得るあらゆる物質を表す。固相は、捕捉剤を誘引及び固定化するその固有の能力のために選択され得る。あるいは、捕捉剤を誘引及び固定化する能力を有する連結剤を固相に付着することができる。連結剤には、例えば、捕捉剤そのものに、又は捕捉剤に連結された帯電物質に関して反対の電荷を帯びた帯電物質が含まれ得る。一般に、連結剤は、固相上に固定化され（又は固相に付着され）、及び結合反応を通じて捕捉剤を固定化する能力を有するあらゆる結合パートナー（好ましくは、特異的な）であり得る。連結剤によって、アッセイの実施前又はアッセイの実施中に、捕捉剤が固相物質に間接的に結合することが可能となる。固相は、例えば、プラスチック、誘導化されたプラスチック、磁気又は非磁気金属、ガラス又はケイ素であり得、例えば、試験管、マイクロタイターウェル、シート、ビーズ、微粒子、チップ及び当業者に公知の他の構成などであり得る。

10

【0061】

本明細書において使用される用語は、特定の実施形態のみを記載することを目的とするものであって、その他、限定を意図するものではない。

【0062】

B. グリコシル化された哺乳動物NGAL

本発明において使用されるグリコシル化された哺乳動物NGALは、2007年10月19日に出願された米国仮特許出願60/981,470号（参照により、この点に関するその教示に関して組み込まれる。）に記載されているとおりである。一般に、本発明は、あらゆる種類の哺乳動物NGAL（例えば、単離された、組換え、変異体、野生型、合成、半合成など）、特に、場合によってグリコシル化されている哺乳動物NGAL、特に本明細書に記載されているようなヒトNGALの使用を想定する。このような哺乳動物NGALは、例えば、抗体を作製するための免疫原として、及び/又はこのような抗体の結合を評価する際に使用される。

20

【0063】

一実施形態において、本発明は、単離されたグリコシル化された哺乳動物NGALの使用に関する。より具体的には、本発明は、少なくとも1つのオリゴ糖分子又は部分及び最大10のオリゴ糖分子又は部分を含有するグリコシル化された哺乳動物NGALに関する。本発明において使用されるグリコシル化された哺乳動物NGALには、グリコシル化されたイヌNGAL、グリコシル化されたネコNGAL、グリコシル化されたラットNGAL、グリコシル化されたマウスNGAL、グリコシル化されたウマNGAL、グリコシル化された非ヒト霊長類NGAL及びグリコシル化されたヒトNGALが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、グリコシル化された哺乳動物NGALは、ヒトNGALである。さらに、グリコシル化された哺乳動物NGALは、野生型NGAL（すなわち、野生型イヌNGAL、野生型ネコNGAL、野生型ラットNGAL、野生型マウスNGAL、野生型ウマNGAL、野生型非ヒト霊長類NGAL又は野生型ヒトNGALなどの（但し、これらに限定されない。）あらゆる野生型哺乳動物NGAL）であり得る。好ましくは、野生型哺乳動物NGALは、配列番号1（シグナルペプチドを含み、配列番号1の付番はシグナルペプチド及び何れかのMet開始残基の直後の成熟配列のGln残基から始まる。）又は配列番号33（シグナルペプチドを含まない。）に示されているアミノ酸配列を有する野生型ヒトNGALである。あるいは、グリコシル化された哺乳動物NGALは、野生型哺乳動物NGALの対応するアミノ酸配列と比べたときに、1つ又はそれ以上のアミノ酸置換、欠失又は付加を含むアミノ酸配列を含むグリコシル化された変異体哺乳動物NGALであり得る。例えば、グリコシル化された哺乳動物NGALは、野生型ヒトNGAL（例えば、配列番号1又は33参照）のアミノ酸配列は少なくとも1つのアミノ酸置換を含有するヒトNGALであり得る。具体的には、少なくとも1つのアミノ酸置

30

40

50

換を、配列番号 1 又は 33 のアミノ酸残基 87 に施すことができる。具体的には、配列番号 1 又は 33 に示されているアミノ酸 87 のシステインをセリンと置換することができる（例えば、配列番号 2 及び 30 参照）。セリン又はシステイン以外のアミノ酸（例えば、グリシン又はアラニン）に対する他の置換を施すこともできる。さらに、定型的な実験操作を用いて、当業者により、配列番号 1 又は 33 のアミノ酸残基 87 における単一のアミノ酸置換以外の他のアミノ酸置換、欠失又は付加を施すことができる。

【0064】

本明細書において使用される哺乳動物 N G A L（例えば、場合によってグリコシル化された）は、組換え DNA 技術を用いて、化学合成によって、又は化学合成と組換え DNA 技術の組み合わせによって作製することができる。具体的には、哺乳動物 N G A L をコードするポリヌクレオチド配列は、目的の哺乳動物 N G A L をコードするポリヌクレオチド配列を単離又は合成することによって構築され得る。上述のように、哺乳動物 N G A L（例えば、場合によってグリコシル化された）は、野生型哺乳動物 N G A L であり得、又は 1 つ以上のアミノ酸置換、欠失又は付加を含有する変異体哺乳動物 N G A L であり得る。このようなアミノ酸置換、欠失又は付加は、突然変異導入によるなど（例えば、Nelson and Long, Analytical Biochemistry 180: 147 - 151 (1989) に記載されているような、周知の方法に従う部位指定突然変異導入、無作為突然変異導入又はシャッフリングを用いて）、本分野において公知の定型的技術を用いて施すことができる。

10

【0065】

目的の哺乳動物 N G A L をコードするポリヌクレオチド配列は、オリゴヌクレオチド合成装置を使用することによるなど、オリゴヌクレオチドが所望の哺乳動物 N G A L（野生型又は変異体）のアミノ酸配列に基づいて設計される化学合成によって、好ましくは、組換え哺乳動物 N G A L がその中で産生される宿主細胞中で好まれるコドンを選択することによって調製され得る。例えば、所望の哺乳動物 N G A L の一部をコードする幾つかの小さなオリゴヌクレオチドがポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、連結又は連結連鎖反応（LCR）によって合成及び組み立てられ得る。各オリゴヌクレオチドは、典型的には、相補的組み立てのために 5' 又は 3' 突出を含有する。

20

【0066】

（合成、部位指定突然変異導入又は別の方法によるなど）一旦組み立てられたら、目的の哺乳動物 N G A L をコードするポリヌクレオチド配列は、組換えベクター中に挿入され、所望の形質転換された宿主細胞中でのその発現のために必要な何れかの調節配列へ作用可能に連結され得る。

30

【0067】

全てのベクター及び発現調節配列が、目的のポリヌクレオチド配列を発現するために等しく良好に機能し得るわけではなく、全ての宿主が同じ発現系とともに等しく良好に機能するわけではないが、当業者は、過度の実験操作なしに、本発明において使用するためのこれらのベクター、発現調節配列、最適化されたコドン及び宿主から容易に選択を行い得ると考えられる。ベクターは、宿主中で複製可能でなければならず、又は染色体中に組み込まなければならないので、例えば、ベクターを選択する際には、宿主を検討しなければならない。ベクターのコピー数、そのコピー数を調節する能力及びベクターによってコードされる何らかの他のタンパク質の発現（抗生物質マーカーなど）も検討すべきである。発現調節配列を選択する際には、様々な要因も検討され得る。これらには、配列の相対的な強さ、その調節可能性及び特に、潜在的な二次構造に関して、哺乳動物 N G A L をコードするポリヌクレオチド配列とのその適合性が含まれるが、これらに限定されない。宿主は、選択されたベクターとのその適合性、コドン使用、分泌特性、ポリペプチドを正しく折り畳む能力、発酵又は培養の必要性、タンパク質をグリコシル化する能力（又は能力の欠如）及びヌクレオチド配列によってコードされる産物の精製の容易さなどを検討することによって選択すべきである。

40

【0068】

50

組換えベクターは、自律的に複製するベクター、すなわち、染色体外成分として存在し、その複製が染色体の複製から独立しているベクター（プラスミドなど）であり得る。あるいは、ベクターは、宿主細胞中に導入されたときに、宿主細胞ゲノム中に組み込まれ、ベクターがその中に組み込まれている染色体と一緒に複製されるベクターであり得る。

【0069】

ベクターは、好ましくは、哺乳動物NGALをコードするポリヌクレオチド配列はポリヌクレオチド配列の転写のために必要とされる追加セグメントに作用可能に連結されている発現ベクターである。ベクターは、典型的には、プラスミド又はウイルスDNAに由来する。本明細書に挙げられている宿主細胞中での発現に適した多数の発現ベクターが市販されており、又は文献に記載されている。真核生物宿主に対する有用な発現ベクターには、SV40、ウシ乳頭腫ウイルス、アデノウイルス及びサイトメガロウイルスから得られる発現調節配列を含むベクターが含まれるが、これらに限定されない。具体的なベクターには、pCDNA3.1(+)/Hyg(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)及びpCI-neo(Stratagene, La Jolla, CA, USA)が含まれる。酵母細胞中で使用するための発現ベクターの例には、2 μ プラスミド及びその誘導体、POT1ベクター（米国特許第4,931,373号参照）、pJSO37ベクター（Okkels, Ann. New York Acad. Sci., 782:202-207, (1996)に記載されている。）及びpPICZA、B又はC(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)が含まれるが、これらに限定されない。昆虫細胞中で使用するための発現ベクターの例には、pVL941、pBG311(Cate et al., "Isolation of Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance And Expression of the Human Gene In Animal Cells" Cell, 45:685-698 (1986)、pBluebac4.5及びpMelbac(何れも、Invitrogen Corp., Carlsbad, CAから入手可能である。)が含まれるが、これらに限定されない。本発明において使用するための好ましいベクターは、pJV(Abbott Laboratories, Abbott Bioresearch Center, Worcester, MAから入手可能)である。

10

20

30

【0070】

使用可能な他のベクターは、哺乳動物NGALをコードするポリヌクレオチド配列のコピー数を増幅することができる。このような増幅可能なベクターは、本分野において周知である。これらのベクターには、DHFR増幅(例えば、Kaufinan、米国特許第4,470,461号、Kaufinan et al., "Construction Of A Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis Of Signals Utilized For Efficient Expression" Mol. Cell. Biol., 2:1304-1319 (1982))及びグルタミン合成酵素(GS)増幅(例えば、米国特許第5,122,464号及び欧州特許出願0338,841号参照)によって増幅され得るベクターが含まれるが、これに限定されない。

40

【0071】

組換えベクターは、目的の宿主細胞中でのベクターの複製を可能にするDNA配列をさらに含み得る。(宿主細胞が哺乳動物細胞である場合)このような配列の例は、SV40の複製起点である。宿主細胞が酵母細胞である場合、ベクターの複製を可能にする適切な配列は、酵母プラスミド2 μ 複製遺伝子REP1から3及び複製起点である。

【0072】

ベクターは、選択可能なマーカー、すなわち、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)又はシゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)TP1遺伝子をコードする遺伝子など(P. R. Russell, Gene, 40:125-130 (1985)参照)、その産物が宿主細胞中の欠損を相補する遺伝子又はポリ

50

ヌクレオチドをコードする遺伝子もしくはポリヌクレオチド又はアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、ハイグロマイシン又はメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与するものも含まれる。糸状真菌の場合、選択可能なマーカには、amdS、pryG、arcB、niaD及びsCが含まれるが、これらに限定されない。

【0073】

本明細書において使用される「調節配列」という用語は、哺乳動物NGALの発現に必要な又は有利なあらゆる成分を表す。各調節配列は、哺乳動物NGALをコードする核酸配列にとって固有又は外来であり得る。このような調節配列には、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、エンハンサー又は上流活性化配列、シグナルペプチド配列及び転写終結因子が含まれるが、これらに限定されない。最小限、調節配列は、哺乳動物NGALをコードするポリヌクレオチド配列に作用可能に連結された少なくとも1つのプロモーターを含む。

10

【0074】

本明細書において使用される「作用可能に連結された」という用語は、配列の正常な機能が発揮され得るような互いに対する配置での、酵素的連結又はその他の手段による2つ又はそれ以上のポリヌクレオチド配列の共有結合を表す。例えば、プレ配列又は分泌リーダーをコードするポリヌクレオチド配列は、ポリペプチドの分泌に参与するプロタンパク質としてポリペプチドが発現された場合に、ポリペプチドに対するポリヌクレオチド配列に作用可能に連結されている。プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼした場合には、コード配列に作用可能に連結されている。リボソーム結合部位は、翻訳を促進するように配置されている場合に、コード配列に作用可能に連結されている。一般に、「作用可能に連結された」とは、連結されているポリヌクレオチド配列が連続しており、分泌性リーダーの場合には、連続しており及び読み取り相にあることを意味する。連結は、都合のよい制限部位での連結によって達成される。このような部位が存在しない場合には、標準的な組換えDNA法と組み合わせて、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーが使用される。

20

【0075】

本発明において、多様な発現調節配列が使用され得る。このような有用な発現調節配列には、前記発現ベクターの構造遺伝子に付随した発現調節配列及び原核若しくは真核細胞又はこれらのウイルスの遺伝子の発現を調節することが知られているあらゆる配列並びにこれらの様々な組み合わせが含まれる。哺乳動物細胞中での転写を誘導するための適切な調節配列の例には、SV40及びアデノウイルスの初期及び後期プロモーター、例えば、アデノウイルス2主要後期プロモーター、MT-1(メタロチオネイン遺伝子)プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス前初期遺伝子プロモーター(CMV)、ヒト延長因子1(EF-1)プロモーター、ドロソフィラ最小熱ショックプロテイン70プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、ヒトユビキチンC(UbC)プロモーター、ヒト成長ホルモン終結因子、SV40又はアデノウイルスE1b領域ポリアデニル化シグナル及びKozakコンセンサス配列(Kozak, J Mol Biol, 196:947-50(1987))が含まれる。

30

40

【0076】

哺乳動物細胞中での発現を改善するために、合成イントロンが、哺乳動物NGALをコードするポリヌクレオチド配列の5'非翻訳領域中に挿入され得る。合成イントロンの一例は、プラスミドpCI-Neo(Promega Corporation, WI, USAから入手可能)から得られる合成イントロンである。

【0077】

昆虫細胞中での転写を誘導するための適切な調節配列の例には、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーター、バキュロウイルス前初期遺伝子1プロモーター及びバキュロウイルス39K後初期遺伝子プロモーター及びSV40ポリアデニル化配列が含まれるが、これらに限定されない。

50

【0078】

酵母宿主細胞中で使用するための適切な調節配列の例には、酵母 接合系のプロモーター、酵母トリオースリン酸イソメラーゼ (TPI) プロモーター、酵母解糖系遺伝子又はアルコール脱水素酵素遺伝子由来のプロモーター、ADH2-4cプロモーター及び誘導性GALプロモーターが含まれる。

【0079】

糸状真菌宿主細胞中で使用するための適切な調節配列の例には、ADH3プロモーター及びターミネーター、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) TAKAアミラーゼトリオースリン酸イソメラーゼ又はアルカリプロテアーゼをコードする遺伝子に由来するプロモーター、*Aspergillus niger* - アミラーゼ、*Aspergillus nidulans* 又は *Aspergillus nidulans* グルコアミラーゼ、*Rhizomucor miehei* リゾムコール・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) アスパラギン酸プロテイナーゼ又はリパーゼをコードする遺伝子に由来するプロモーター、TPI1ターミネーター及びADH3ターミネーターが含まれる。

10

【0080】

哺乳動物NGALをコードするポリヌクレオチド配列は、シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでもよく、又は含まなくてもよい。哺乳動物NGALがその中で発現される細胞から分泌されるべき場合には、シグナルペプチドが存在する。このようなシグナルペプチドが存在する場合、このようなシグナルペプチドは、ポリペプチドの発現のために選択された細胞によって認識されるものであるべきである。シグナルペプチドは、目的の哺乳動物NGALに対して相同 (例えば、目的の哺乳動物NGALとともに通常付随するシグナルペプチドであり得る。) 若しくは異種 (すなわち、目的の哺乳動物NGALとは別の源を起源とする。) であり得、又は宿主細胞に対して、相同又は異種であり得る (すなわち、宿主細胞から本来発現されるペプチドであり、又は宿主細胞から本来発現されないペプチド)。従って、シグナルペプチドは、原核生物性であり (例えば、細菌に由来する。) 又は真核生物性 (例えば、哺乳動物又は昆虫、糸状真菌又は酵母細胞に由来する。) であり得る。

20

【0081】

シグナルペプチドの存在又は不存在は、例えば、哺乳動物NGALの産生のために使用される発現宿主細胞に依存する。糸状真菌において使用するために、シグナルペプチドは、アスペルギルス種のアミラーゼ又はグルコアミラーゼをコードする遺伝子、リゾムコール・ミエヘイリパーゼ若しくはプロテアーゼ又はフミコラ・ラヌギノサリパーゼをコードする遺伝子に都合よく由来し得る。昆虫細胞中で使用する場合、シグナルペプチドは、鱗翅目のマンジュカ・セクスタ (*Manduca sexta*) 脂質動員ホルモン前駆体 (米国特許第5,023,328号参照)、ミツバチのメリチン (*Invitrogen Corp., Carlsbad, CA*)、エクジステロイドUDPグルコシル転移酵素 (egt) (Murphy et al., *Protein Expression and Purification* 4:349-357 (1993) などの昆虫遺伝子 (WO90/05783参照) 又はヒト膵臓リパーゼ (hpl) (*Methods in Enzymology*, 284:262-272 (1997)) に由来し得る。

30

40

【0082】

哺乳動物細胞中で使用するためのシグナルペプチドの具体例には、マウスIg 軽鎖シグナルペプチドが含まれる (Coloma, M, J. *Imm. Methods*, 152:89-104 (1992))。酵母細胞中で使用する場合、適切なシグナルペプチドには、*S. cerevisiae* 由来の - 因子シグナルペプチド (米国特許第4,870,008号参照)、マウス唾液アミラーゼのシグナルペプチド (O. Hagenbuchle et al., *Nature*, 289:643-646 (1981))、修飾されたカルボキシペプチダーゼシグナルペプチド (L. A. Vails et al., *Cell*, 48:887-897 (1987) 参照)、酵母BAR1シ

50

グナルペプチド (WO 87/02670 参照) 及び酵母アスパラギン酸プロテアーゼ 3 (YAP3) シグナルペプチド (M. Egel-Mitani et al., Yeast, 6:127-137 (1990) 参照) が含まれる。

【0083】

本発明のグリコシル化された哺乳動物 NGAL を産生するために、細菌、真菌 (酵母を含む。)、昆虫、哺乳動物又は他の適切な動物細胞若しくは細胞株及びトランスジェニック動物又は植物を含むあらゆる適切な宿主を使用し得る。イー・コリなどの非グリコシル化生物が使用される場合、本発明のグリコシル化された哺乳動物 NGAL を産生するために、イー・コリ中での発現の後に、好ましくは、適切なインビトログリコシル化が行われる。

10

【0084】

細菌宿主細胞の例には、バシラス、例えば、ビー・ブレビス (B. brevis) 又はビー・サブチリス (B. subtilis)、シュドモナス又はストレプトミセスの系統などのグラム陽性細菌又はイー・コリの系統などのグラム陰性細菌が含まれるが、これらに限定されない。細菌宿主細胞中へのベクターの導入は、形質転換受容細胞 (例えば、Young et al., Journal of Bacteriology, 81:823-829 (1961)) 又は Dubnau et al., Journal of Molecular Biology, 56:209-221 (1971)) を用いた例えば、プロトプラスト形質転換 (例えば、Chang et al., Molecular General Genetics, 168:111-115 (1979) 参照)、電気穿孔 (例えば、Shigekawa et al., Biotechniques, 6:742-751 (1988) 参照) 又は連結 (例えば、Koehler et al., Journal of Bacteriology, 169:5771-5278 (1987) 参照) によって実施され得る。

20

【0085】

適切な糸状真菌宿主細胞の例には、アスペルギルス、例えば、アー・オリザエ (A. oryzae)、アー・ニガー (A. niger) 又は A. ニジュランス (A. nidulans)、フザリウム (Fusarium) 又はトリコデルマ (Trichoderma) の系統が含まれるが、これらに限定されない。真菌細胞は、当業者に公知の技術を用いて、プロトプラスト形成、プロトプラストの形質転換及び細胞壁の再生を含む方法によって形質転換され得る。アスペルギルス宿主細胞の形質転換のための適切な手法は、欧州特許出願 238023 及び米国特許第 5,679,543 号に記載されている。フザリウム種を形質転換するための適切な手法は、「Malaridier et al., Gene, 78:147-156 (1989)」及び WO96/00787 によって記載されている。酵母は、「Becker and Guarente, In Abelson, J. N. and Simon, M. I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., Journal of Bacteriology, 153:163 (1983); 及び Hinnen et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 75:1920 (1978)」によって記載されている手法を用いて形質転換され得る。

30

40

【0086】

好ましくは、本発明の哺乳動物 NGAL は、インビボでグリコシル化される。哺乳動物 NGAL がインビボでグリコシル化される場合、宿主細胞は、哺乳動物 NGAL の所望されるグリコシル化を作製することができる宿主細胞の群から選択される。従って、宿主細胞は、酵母細胞、昆虫細胞又は哺乳動物細胞から選択され得る。

【0087】

適切な宿主細胞の例には、サッカロミセスの系統、例えば、エス・セレピシアエ (S.

50

cerevisiae)、スキゾサッカロミセス(Schizosaccharomyces)、クリベロミセス、ピー・パストリス又はピー・メタノリカ(P. methanolica)などのピキア、エイチ・ポリモルファ又はヤロウィアなどのハンセンユラ(Hansenula)の系統が含まれる。異種のポリヌクレオチドで酵母細胞を形質転換し、酵母細胞から異種のポリペプチドを産生する方法は、Clontech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA, USA (YeastmakerTM Yeast Transformation System Kitの製品プロトコール中)によって、及びReeves et al., FEMS Microbiology Letters, 99:193-198(1992), Manivassakam et al., Nucleic Acids Research, 21:4414-4415(1993)及びGaneva et al., FEMS Microbiology Letters, 121:159-164(1994)によって開示されている。

【0088】

適切な昆虫宿主細胞の例には、スポドブレラ・フルギペルダ(Sf9又はSf21)又はトリコプルシア・ニー細胞(High Five)などの鱗翅目細胞株が含まれるが、これらに限定されない(米国特許第5,077,214号参照)。昆虫細胞の形質転換及び異種のポリペプチドの産生は、当業者に周知である。

【0089】

適切な哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株、ミドリザル細胞株(COS)、マウス細胞(例えば、NS/O)、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞株、ヒト細胞(ヒト胚性腎臓細胞(例えば、HEK293)(ATCC受託番号CRL-1573)など)及び組織培養中の植物細胞が含まれる。好ましくは、哺乳動物細胞は、CHO細胞株及びHEK293細胞株である。別の好ましい宿主細胞は、B3細胞株(例えば、Abbott Laboratories, Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)又は別のジヒドロ葉酸還元酵素欠損(DHFR⁻)CHO細胞株(例えば、Invitrogen Corp., Carlsbad, CAから入手可能)である。一態様において、本発明は、グリコシル化されたヒト野生型NGAL(すなわち、配列番号1又は33のアミノ酸配列を有するもの)を産生し、2006年11月21日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に寄託され、ATCC受託番号PTA-8020が付与されたCHO細胞株に関する。好ましくは、ATCC受託番号PTA-8020を有するCHO細胞株によって産生される野生型ヒトNGALは、約25キロダルトン(kDa)の分子量を有する。別の態様において、本発明は、グリコシル化された変異体ヒトNGALを産生するCHO細胞株に関する。好ましくは、グリコシル化された変異体ヒトNGALは、野生型ヒトNGAL(すなわち、配列番号1又は33)のアミノ酸配列のアミノ酸87に対応するアミノ酸においてアミノ酸置換を含む。より好ましくは、アミノ酸置換は、セリンによるシステインの置換である(配列番号2又は30参照)。最も好ましくは、CHO細胞株は、2007年1月23日にATCCに寄託され、ATCC受託番号PTA-8168が付与されたCHO細胞株である。ATCC受託番号PTA-8168を有するCHO細胞株は、配列番号2又は30のアミノ酸配列を含むグリコシル化された変異体ヒトNGALを産生する。さらに別の態様において、本発明は、配列番号2又は30のアミノ酸配列を含む単離された変異体グリコシル化されたヒトNGALに関する。

【0090】

哺乳動物の宿主細胞中に外来ポリヌクレオチドを導入する方法には、リン酸カルシウムによって媒介される形質移入、電気穿孔、DEAE-デキストランによって媒介される形質移入、リポソームによって媒介される形質移入、LipofectamineTM 2000を用いる、Life Technologies Ltd, Paisley, UKによって記載されているウイルスベクター及び形質移入方法が含まれる。これらの方法は、本分野において周知であり、例えば、Ausbel et al. (eds.) C

urrent Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, New York, USA (1996) によって記載されている。哺乳動物細胞の培養は、例えば、「Jenkins, Ed., Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Human Press Inc. Totowa, N.J., USA (1999)」及び「Harrison and Rae General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press (1997)」に開示されている確立された方法に従って実施される。

【0091】

製造方法において、細胞は、本分野で公知の方法を用いて、哺乳動物NGALの産生に適した栄養素培地中で培養される。例えば、細胞は、振盪フラスコ培養、適切な培地中並びにグリコシル化された哺乳動物NGALを発現及び/又は単離させる条件下で行われる研究室用又は産業用発酵装置中での小規模若しくは大規模発酵(連続、バッチ、フェドバッチ又は固体状態発酵を含む。)によって培養される。培養は、本分野において公知の手法を用いて、炭素及び窒素源並びに無機塩を含む適切な栄養素培地中で行われる。適切な培地は、民間の業者から入手することができ、又は(例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログ中に)公開された組成に従って調製され得る。グリコシル化された哺乳動物NGALが栄養素培地中に分泌される場合、哺乳動物NGALは、培地から直接回収され得る。哺乳動物NGALが分泌されない場合には、細胞可溶化液から回収することができる。

10

20

【0092】

得られた哺乳動物NGALは、本分野において公知の方法によって回収され得る。例えば、哺乳動物NGALは、遠心、ろ過、抽出、スプレー乾燥、蒸発又は沈殿などの(但し、これらに限定されない。)慣用の手法によって、栄養素培地から回収され得る。

【0093】

哺乳動物NGALは、クロマトグラフィー(イオン交換、アフィニティー、疎水性、等電電気泳動及びサイズ排除など(但し、これらに限定されない。))、電気泳動手法(調製用等電点など(但し、これらに限定されない。))、溶解度の差(硫酸アンモニウム沈殿など(但し、これらに限定されない。))、SDS-PAGE又は抽出(例えば、J-C Janson and Lars Ryden, editors, Protein Purification, VCH Publishers, New York (1989)参照)などの(但し、これらに限定されない。)本分野において公知の様々な手法によって精製され得る。

30

【0094】

本明細書に記載されているグリコシル化された哺乳動物NGAL(野生型及び変異体)は、様々な異なる目的及び様々な異なる方法のために使用することができる。具体的には、本明細書に記載されているグリコシル化された哺乳動物NGALは、1つ若しくはそれ以上の検量用試料、1つ若しくはそれ以上の対照又は検査試料中の哺乳動物NGALを検出するためのアッセイ(好ましくは、イムノアッセイ)における1つ若しくはそれ以上の検量用試料の組み合わせとして使用することができる。これは、2007年10月19日に出願された米国仮特許出願60/981,470号(抗原、検量用試料、対照及びキットに関するその教示に関して、参照により組み込まれる。)及び2007年10月19日に出願された米国仮特許出願60/981,473号(改良されたNGALアッセイに関するその教示に関して、参照により組み込まれる。)の主題である。

40

【0095】

好ましくは、グリコシル化された哺乳動物NGALは、配列番号1又は33のアミノ酸配列を含む。あるいは、グリコシル化された哺乳動物NGALは、配列番号2又は30のアミノ酸配列を含む。

【0096】

50

さらに、本明細書中にさらに論述されているように、哺乳動物NGALは、抗体産生のために動物を免疫化するための免疫原として使用することが可能であり、例えば、動物は、マウス、ウサギ、ニワトリ、ラット、ヒツジ、ヤギ、サメ、ラクダ、ウマ、ネコ、イヌ、非ヒト霊長類、ヒト又はその他の動物であり得る。一実施形態において、免疫原は、グリコシル化された哺乳動物NGAL、特に配列番号1、2、30又は33の配列を含むグリコシル化されたヒトNGALを含む。別の実施形態において、哺乳動物NGALは、イヌ、ネコ、ラット、マウス、ウマ、非ヒト霊長類、ヒト又は他の哺乳動物のものである。

【0097】

C. ヒトNGAL抗体

本発明は、野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）又はヒトNGAL断片に特異的に結合する抗体を提供する。抗体は、アミノ酸配列が野生型配列（配列番号1又は33）の少なくとも1つのアミノ酸置換を含有して変異体又は非固有配列（例えば、配列番号2又は30）を含むヒトNGALにも場合によって結合する。

10

【0098】

特に、一態様において、本発明は、野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33、配列番号1の付番は、シグナルペプチド及び何れかのMet開始残基の直後に存在する成熟配列のGln残基から始まる。）の連続していないアミノ酸残基112、118及び147を含む（又は、幾つかの実施形態では、これらからなる）エピトープ、特に、立体構造的エピトープに結合する単離された抗体を提供する。本明細書中に記載されている、立体構造的エピトープ（非連続エピトープとしても知られる。）は、順番に連続していないが、三次元空間中で互いに近接している残基によって形成されるエピトープの種類である。別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、118及び147並びに少なくとも1つのヒトNGALタンパク質の追加のアミノ酸（追加のアミノ酸は、野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基117又は119である。）を含む立体構造的エピトープに結合する単離された抗体を提供する。さらに別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、117、118、119及び147を含む立体構造的エピトープに結合する単離された抗体を提供する。

20

【0099】

別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号7のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有する単離された抗体に関する。

30

【0100】

別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号7のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有し、並びに、さらに（1）野生型ヒトNGALタンパク質（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、118及び147、（2）野生型ヒトNGALタンパク質（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、118及び147並びに野生型NGALタンパク質の少なくとも1つの追加のアミノ酸（追加のアミノ酸は、野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基117又は119である。）又は（3）野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、117、118、119及び147を含む立

40

【0101】

別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号11のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体に関する。

【0102】

別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号11のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有し、並びに、さらに（1）野生型ヒトNGALタンパク質（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、118及び147、（2）野生型ヒトNGALタンパク質（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、118及び147並びに野生型NGALタンパク質の少なくとも1つの追加

50

のアミノ酸（追加のアミノ酸は、野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基117又は119である。）又は（3）野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、117、118、119及び147を含む立体構造的エピトープに結合する、単離された抗体に関する。

【0103】

別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号7のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号11のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体に関する。

【0104】

別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号7のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号11のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有し、並びに、さらに（1）野生型ヒトNGALタンパク質（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、118及び147、（2）野生型ヒトNGALタンパク質（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、118及び147並びに野生型NGALタンパク質の少なくとも1つの追加のアミノ酸（追加のアミノ酸は、野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基117又は119である。）又は（3）野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、117、118、119及び147を含む立体構造的エピトープに結合する、単離された抗体に関する。

10

【0105】

さらに別の態様において、本発明は、2006年11月21日に寄託されたATCC受託番号PTA-8024を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-2322-455に関する。さらに別の態様において、本発明は、2006年11月21日に寄託されたATCC受託番号PTA-8024を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-2322-455によって産生された抗体に関する。マウスハイブリドーマ細胞株1-2322-455によって産生された抗体は、（1）野生型ヒトNGALタンパク質（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、118及び147、（2）野生型ヒトNGALタンパク質（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、118及び147並びに野生型NGALタンパク質の少なくとも1つの追加のアミノ酸（追加のアミノ酸は、野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基117又は119である。）又は（3）野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基112、117、118、119及び147を含む立体構造的エピトープに結合することができる。マウスハイブリドーマ細胞株1-2322-455は、配列番号7のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン及び配列番号11のアミノ酸配列を含む可変軽ドメインを有する。

20

30

【0106】

さらに別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号17のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有する単離された抗体に関する。

【0107】

さらに別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号17のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有し、並びに、さらに（1）野生型ヒトNGALタンパク質（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基15及び109、（2）野生型ヒトNGALタンパク質（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基15及び109並びに野生型NGALタンパク質の少なくとも1つの追加のアミノ酸（追加のアミノ酸は、野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基158、159又は160である。）又は（3）野生型ヒトNGAL（すなわち、配列番号1又は33）のアミノ酸残基15、109、158、159又は160を含む立体構造的エピトープに結合する、単離された抗体に関する。

40

【0108】

さらに別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号

50

21のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体に関する。

【0109】

さらに別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号21のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有し、並びに、さらに(1)野生型ヒトNGALタンパク質(すなわち、配列番号1又は33)のアミノ酸残基15及び109、(2)野生型ヒトNGALタンパク質(すなわち、配列番号1又は33)のアミノ酸残基15及び109並びに野生型ヒトNGALタンパク質の少なくとも1つの追加のアミノ酸(追加のアミノ酸は、野生型ヒトNGAL(すなわち、配列番号1又は33)のアミノ酸残基158、159又は160である。)又は(3)野生型ヒトNGAL(すなわち、配列番号1又は33)のアミノ酸残基15、109、158、159又は160を含む立体構造的エピトープに結合する、単離された抗体に関する。

10

【0110】

別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号17のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号21のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する単離された抗体に関する。

【0111】

別の態様において、本発明は、野生型ヒトNGALに特異的に結合し、配列番号17のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号21のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有し、並びに、さらに(1)野生型ヒトNGALタンパク質(すなわち、配列番号1又は33)のアミノ酸残基15及び109、(2)野生型ヒトNGALタンパク質(すなわち、配列番号1又は33)のアミノ酸残基15及び109並びに野生型ヒトNGALタンパク質の少なくとも1つの追加のアミノ酸(追加のアミノ酸は、野生型ヒトNGAL(すなわち、配列番号1又は33)のアミノ酸残基158、159又は160である。)又は(3)野生型ヒトNGAL(すなわち、配列番号1又は33)のアミノ酸残基15、109、158、159又は160を含む立体構造的エピトープに結合する、単離された抗体に関する。

20

【0112】

さらに別の態様において、本発明は、2006年11月21日に寄託されたATCC受託番号PTA-8026を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-903-430に関する。さらに別の態様において、本発明は、2006年11月21日に寄託されたATCC受託番号PTA-8026を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-903-430によって産生された抗体に関する。マウスハイブリドーマ細胞株1-903-430によって産生された抗体は、(1)野生型ヒトNGALタンパク質(すなわち、配列番号1又は33)のアミノ酸残基15及び109、(2)野生型ヒトNGALタンパク質(すなわち、配列番号1又は33)のアミノ酸残基15及び109並びに野生型ヒトNGALタンパク質の少なくとも1つの追加のアミノ酸(追加のアミノ酸は、野生型ヒトNGAL(すなわち、配列番号1又は33)のアミノ酸残基158、159又は160である。)又は(3)野生型ヒトNGAL(すなわち、配列番号1又は33)のアミノ酸残基15、109、158、159又は160を含む立体構造的エピトープに結合することができる。マウスハイブリドーマ細胞株1-903-430は、配列番号17のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン及び配列番号21のアミノ酸配列を含む可変軽ドメインを有する。

30

40

【0113】

さらに別の実施形態において、本発明は、配列番号1、2、30又は33に記載されている(特に、配列番号30又は33に記載されている)ヒトNGALタンパク質に特異的に結合する単離された抗体に関し、

(a) 残基N116に関して、約 $^1H = 9.47$ 又は約 $^15N = 118.30$ に位置する共鳴位置；

(b) 残基Q117に関して、約 $^1H = 7.79$ 又は約 $^15N = 117.67$ に位置する共鳴位置；

(c) 残基H118に関して、約 $^1H = 8.75$ 又は約 $^15N = 116.43$ に位置す

50

る共鳴位置；

(d) 残基 T 1 4 1 に関して、約 $^1\text{H} = 7.99$ 又は約 $^{15}\text{N} = 109.06$ に位置する共鳴位置；

(e) 残基 K 1 4 2 に関して、約 $^1\text{H} = 7.82$ 又は約 $^{15}\text{N} = 114.25$ に位置する共鳴位置；

(f) 残基 E 1 4 3 に関して、約 $^1\text{H} = 7.40$ 又は約 $^{15}\text{N} = 114.00$ に位置する共鳴位置；及び

(g) 残基 E 1 5 0 に関して、約 $^1\text{H} = 8.70$ 又は約 $^{15}\text{N} = 118.80$ に位置する共鳴位置；

からなる群から選択される、配列番号 1 又は 3 3 の残基に対応するアミノ酸に対するアミド共鳴位置の少なくとも 3 つ、4 つ又は 5 つ、特に、配列番号 1、2、3 0 又は 3 3 の（特に、配列番号 3 0 又は 3 3 の）残基に対応するアミノ酸に対するアミド共鳴位置の約 2 から 6 の T R O S Y プロトン - 窒素相関 N M R スペクトルにおいて、

前記抗体を（一般に、過剰に、特に化学量論的に過剰に）ヒト N G A L タンパク質に添加した結果として、前記抗体が添加されていない場合と比べて、前記抗体は、

(1) ^1H 共鳴位置における約 0.05 ppm から約 1.0 ppm、特に、約 0.04 ppm から約 0.06 ppm、特に、 ^1H 共鳴位置における約 0.05 ppm の擾乱、

(2) ^{15}N 共鳴位置における約 0.3 ppm から約 3.0 ppm、特に、約 0.01 ppm から約 2.0 ppm の、特に約 0.1 ppm、約 0.3 ppm 若しくは ^{15}N 共鳴位置における約 0.6 ppm の擾乱、又は

(3) 共鳴強度の約 2.5 倍から約 20 倍の減少、特に、蛍光強度の約 3 倍から約 15 倍の減少、特に約 4 倍から約 10 倍の減少、

を引き起こす。換言すれば、シフトは、野生型 N G A L タンパク質中の残基に対応する共鳴位置中に存在する。

【0114】

さらに別の実施形態において、本発明は、配列番号 1、2、3 0 又は 3 3 に記載されている（特に、配列番号 3 0 又は 3 3 に記載されている）ヒト N G A L タンパク質に特異的に結合する単離された抗体に関し、

(a) 残基 Y 6 4 に関して、約 $^1\text{H} = 9.15$ 又は約 $^{15}\text{N} = 113.30$ に位置する共鳴位置；

(b) 残基 V 8 4 に関して、約 $^1\text{H} = 9.34$ 又は約 $^{15}\text{N} = 121.50$ に位置する共鳴位置；

(c) 残基 G 8 6 に関して、約 $^1\text{H} = 8.32$ 又は約 $^{15}\text{N} = 111.60$ に位置する共鳴位置；

(d) 残基 T 9 3 に関して、約 $^1\text{H} = 9.32$ 又は約 $^{15}\text{N} = 112.80$ に位置する共鳴位置；

(e) 残基 L 9 4 に関して、約 $^1\text{H} = 7.71$ 又は約 $^{15}\text{N} = 122.72$ に位置する共鳴位置；

(f) 残基 G 9 5 に関して、約 $^1\text{H} = 9.30$ 又は約 $^{15}\text{N} = 113.70$ に位置する共鳴位置；及び

(g) 残基 S 9 9 に関して、約 $^1\text{H} = 8.18$ 又は約 $^{15}\text{N} = 114.50$ に位置する共鳴位置；

からなる群から選択される配列番号 1 又は 3 3 の残基に対応するアミノ酸に対するアミド共鳴位置の少なくとも 3 つ、4 つ又は 5 つ、特に、配列番号 1、2、3 0 又は 3 3 の（特に、配列番号 3 0 又は 3 3 の）残基に対応するアミノ酸に対するアミド共鳴位置の約 2 から 6 の T R O S Y プロトン - 窒素相関 N M R スペクトルにおいて、

前記抗体を（一般に、過剰に、特に化学量論的に過剰に）ヒト N G A L タンパク質に添加した結果として、前記抗体が添加されていない場合と比べて、前記抗体は、

(1) ^1H 共鳴位置における約 0.05 ppm から約 1.0 ppm、特に、約 0.04 ppm から約 0.06 ppm、特に、 ^1H 共鳴位置における約 0.05 ppm の擾乱、

10

20

30

40

50

(2) ^{15}N 共鳴位置における約 0.3 ppm から約 3.0 ppm、特に、約 0.01 ppm から約 2.0 ppm の、特に約 0.1 ppm、約 0.3 ppm 若しくは ^1H 共鳴位置における約 0.6 ppm の擾乱、又は

(3) 共鳴強度の約 2.5 倍から約 20 倍の減少、特に、約 3 倍から約 15 倍の減少、特に共鳴強度の約 4 倍から約 10 倍の減少、を引き起こす。

【0115】

D. NGAL 抗体を作製及び使用する方法

本発明の抗体は、本分野において公知の様々な異なる技術を用いて作製することができる。例えば、野生型ヒト NGAL に対するポリクローナル及びモノクローナル抗体は、適切な免疫原を含有する免疫原性調製物で適切な対象（ウサギ、ヤギ、マウス又は他の哺乳動物など（但し、これらに限定されない。））を免疫化することによって産生され得る。免疫化のために使用することができる免疫原には、ヒト NGAL を発現することが知られている不死化された細胞株 NSO から得られる細胞などの細胞が含まれ得る。

10

【0116】

あるいは、免疫原は、精製された若しくは単離されたヒト野生型 NGAL タンパク質そのもの（すなわち、配列番号 1 又は 33）又はそのヒト NGAL 断片であり得る。例えば、アフィニティークロマトグラフィー、免疫沈降又は本分野において周知である他の技術を用いて、タンパク質（NSO など）を産生する細胞から単離された野生型ヒト NGAL（配列番号 1 又は 33 参照）を免疫原として使用することができる。あるいは、本分野において公知の定型的技術（合成装置など（但し、これに限定されない。））を使用する化学的合成を用いて、免疫原を調製することが可能である。

20

【0117】

次いで、抗体が野生型ヒト NGAL 又はヒト NGAL 断片に結合するかどうかを測定するために、対象中で産生される抗体をスクリーニングすることができる。このような抗体は、本明細書中に記載されている方法を用いてさらにスクリーニングすることができる（例えば、実施例 1 参照）。例えば、これらの抗体が野生型ヒト NGAL のアミノ酸残基 112、118 及び 147 又は野生型ヒト NGAL のアミノ酸残基 15 及び 109（配列番号 1 又は 33 参照）に結合するかどうかを測定するために、これらの抗体をアッセイすることができる。所望される特徴を有する抗体を同定するための適切な方法が、本明細書に記載されている（実施例 1 参照）。さらに、変異体 NGAL（配列番号 2 又は 30 参照）に結合する抗体を用いて得られた結果は、野生型 NGAL の結合へ完全に翻訳可能であること、及び抗体は野生型ヒト NGAL（配列番号 1 又は 33 参照）の同等の残基に結合することが完全に理解される。従って、便宜上、特定の事例において変異体 NGAL を使用しない合理的基礎が欠如しなければ、抗体の結合特性を評価するために、変異体 NGAL を使用することができる。

30

【0118】

免疫原（すなわち、精製されたタンパク質、タンパク質を発現する腫瘍細胞又は組換え的に発現されたヒト NGAL タンパク質）の単位用量及び免疫化計画は、免疫化されるべき対象、その免疫状態及び対象の体重に依存する。対象中の免疫応答を増強させるために、免疫原はフロイントの完全又は不完全アジュバントなどのアジュバントとともに投与することができる。

40

【0119】

上記されているような免疫原での対象の免疫化は、ポリクローナル抗体応答を誘導する。免疫化された対象中の抗体力価は、固定化された抗原、すなわち、本明細書に記載されているようなヒト NGAL（配列番号 1 若しくは 33 又はそのヒト NGAL 断片）を用いる ELISA などの標準的な技術によって、経時的にモニターすることができる。

【0120】

ヒト NGAL（配列番号 1 若しくは 33 又はそのヒト NGAL 断片）に対する抗体を生産する方法には、ヒト免疫グロビン遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを使用す

50

ることが含まれる（例えば、WO 91/00906、WO 91/10741又はWO 92/03918を参照）。あるいは、ヒトモノクローナル抗体は、ヒト抗体を産生する細胞又は組織（例えば、ヒト骨髄細胞、末梢血リンパ球（PBL）、ヒト胎児リンパ節組織又は造血性幹細胞）が移植された免疫欠損マウス中に抗原を導入することによって作製することができる。このような方法には、SCID-huマウス（例えば、WO 93/05796、米国特許第5,411,749号又はMcCune et al., Science, 241:1632-1639 (1988)）又はRag-1/Rag-2欠損マウス中で抗体を生産することが含まれる。ヒト抗体免疫欠損マウスも市販されている。例えば、Rag-2欠損マウスは、Taconic Farms (Germantown, NY) から入手可能である。

10

【0121】

モノクローナル抗体は、対象を免疫原で免疫化することによって作製することができる。免疫化後の適切な時点で、例えば、抗体力価が十分に高いレベルになった時点で、標準的な技術を用いてモノクローナル抗体を調製するために、抗体産生細胞を免疫化された動物から採集し、使用することができる。例えば、抗体産生細胞は、標準的な体細胞融合手法によって、ハイブリドーマ細胞を産生するために、骨髄腫細胞などの不死化細胞と融合させ得る。このような技術は本分野において周知であり、例えば、「Kohler and Milstein, Nature, 256:495-497 (1975)」によって最初に開発されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbar et al., Immunology Today, 4:72 (1983)）及びヒトモノクローナル抗体を作製するためのEBV-ハイブリドーマ技術（Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96 (1985)）が含まれる。モノクローナル抗体ハイブリドーマを作製するための技術は、当業者に周知である。

20

【0122】

モノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し、及びヒトNGALタンパク質で免疫化されたトランスジェニックマウスから抗体産生細胞、例えば、脾細胞を採集することによっても作製することができる。脾細胞は、ヒト骨髄腫との融合を通じて、又はエプシュタイン-バーウイルス（EBV）での形質転換を通じて不死化することができる。これらのハイブリドーマは、本分野において記載されているヒトB細胞又はEBV-ハイブリドーマ技術を用いて作製することができる（例えば、Boyle et al., 欧州特許公開0614984号参照）。

30

【0123】

野生型ヒトNGALタンパク質（配列番号1又は33）又はそのヒトNGAL断片に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、ハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって、例えば、不死化されたヒトNGALタンパク質に特異的に結合する抗体を選択するためにスクリーニングすることによって、又は抗体が所望される特徴、すなわち、本明細書に記載されているアミノ酸残基においてヒトNGALに結合する能力を有するかどうかを決定するために本明細書に記載されている抗体を検査することによって検出される。所望の特異性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後、例えば、限界希釈手法、例えば、Wands他（Gastroenterology 80:225-232 (1981)）によって記載されている手法によってクローンがサブクローニングされ、標準的な方法によって増殖され得る。

40

【0124】

本明細書に記載されているスクリーニングアッセイ中で陽性検査結果を示すモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、ハイブリドーマ細胞が培地中にモノクローナル抗体を分泌することによって、完全な抗体を産生するのに十分な条件下及び時間で、栄養素培地中において培養することができる。ハイブリドーマ細胞に適した組織培養技術及び培地は、本分野において全般に記載されている（例えば、R. H. Kenneth, i

50

n Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, N.Y. (1980) 参照。)。次いで、抗体を含有する馴化されたハイブリドーマ培養上清を収集することができる。サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、プロテインAクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィーなどの慣用の免疫グロブリン精製手法によって、場合によって培地から単離することができる。

【0125】

モノクローナル抗体は、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーを構築し、ヒトNGALタンパク質を用いてライブラリーをスクリーニングすることによって操作することができる。ファージディスプレイライブラリーを作製及びスクリーニングするためのキットは、市販されている(例えば、the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01; 及びthe Stratagene SurfZAP Phage Display Kit, Catalog No. 240612 参照)。同様に、酵母ディスプレイベクターは本分野において公知であり、市販されている(例えば、Invitrogen Corp., Carlsbad, CA から入手可能な pYD1)。要約すれば、野生型ヒトNGALタンパク質(配列番号1又は33)に特異的に結合する抗体を発現するファージ又は酵母細胞を同定及び単離するために、抗体ライブラリーがスクリーニングされる。好ましくは、ライブラリーの一次スクリーニングは、固定化された野生型ヒトNGALタンパク質又はその断片を用いたスクリーニングを含む。

10

20

【0126】

スクリーニング後に、ディスプレイファージ又は酵母が単離され、選択された抗体をコードするポリヌクレオチドをディスプレイファージ又は酵母から(例えば、ファージ又は酵母ゲノムから)回収し、周知の組換えDNA技術によって他の発現ベクター中に(例えば、サッカロミセス・セレピシアエ細胞、例えば、EBY10細胞(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA))サブクローニングすることができる。ポリヌクレオチドは、宿主細胞中でさらに操作し(例えば、さらなる定常領域などのさらなる免疫グロブリンドメインをコードする核酸に連結される。)、及び/又は発現させることができる。

30

【0127】

あるいは、抗体に対するヒト患者による応答を最小化するために、キメラ及びヒト化抗体などの抗体の組換え形態も調製することができる。非ヒト対象中で産生された又は非ヒト抗体遺伝子の発現に由来する抗体がヒトの中で治療的に使用される場合、抗体は様々な程度で外来と認識され、患者中で免疫応答が生成され得る。この免疫反応を最小限に抑え又は除去するための1つのアプローチは、キメラ抗体誘導体、すなわち、非ヒト動物可変領域及びヒト定常領域を組み合わせた抗体分子を作製することである。このような抗体は、元のモノクローナル抗体のエピトープ結合特異性を保持しているが、ヒトに投与されたときに免疫原性がより低下し得、従って、患者によって許容される可能性がより高い。

40

【0128】

キメラモノクローナル抗体は、本分野において公知の組換えDNA技術によって作製され得る。例えば、非ヒト抗体分子の定常領域をコードする遺伝子は、ヒト定常領域をコードする遺伝子で置換される(例えば、PCT特許公開PCT/US86/02269、欧州特許出願184,187号又は欧州特許出願171,496号を参照されたい。)

【0129】

抗原結合に関与していない可変領域の一部をヒト可変領域由来の等価な一部で置換することによって、キメラ抗体は、さらに「ヒト化」することができる。「ヒト化された」キメラ抗体の一般的な総説は、「Morrisson, S.L., Science, 229: 1202-1207 (1985) 及びOiet al., BioTechnique

50

s, 4-214(1986)」に見出すことができる。このような方法には、重又は軽鎖の少なくとも1つから得られる免疫グロブリン可変領域の全部又は一部をコードする核酸配列を単離し、操作し、及び発現させることが含まれる。次いで、ヒト化キメラ抗体又はその断片をコードするcDNAを適切な発現ベクター中にクローニングすることができる。あるいは、適切な「ヒト化された」抗体は、相補性決定領域(CDR)置換によって作製することができる(例えば、米国特許第5,225,539号; Jones et al., Nature, 321:552-525(1986); Verhoeyan et al., Science 239:1,534(1988);及びBeidler et al., J.Immunol., 141:4053-4060(1988)参照)。

10

【0130】

野生型ヒトNGALタンパク質(配列番号1又は33)又はそのヒトNGAL断片に対して特異的な抗体(例えば、ハムスター抗体)の結合特異性を保持する「ヒト」抗体ポリペプチド二量体を作製するために、エピトープインプリンティングも使用することができる。要約すれば、抗原への特異的結合を有する非ヒト可変領域(VH)及びヒト定常領域(CH1)をコードする遺伝子をイー・コリ中で発現させ、ヒトV_H・C_H1遺伝子のファージライブラリーに感染させる。次いで、ヒトNGALタンパク質への結合に関して、抗体断片を提示するファージをスクリーニングする。V_H・C_H1鎖の発現に関して、選択されたヒトV_H遺伝子を再度クローニングし、これらの鎖を有するイー・コリをヒトVHCH1遺伝子のファージライブラリーに感染させ、抗原によって被覆されたチューブを用いたスクリーニングの繰り返りにライブラリーを供する(WO93/06213参照)。

20

【0131】

別の態様において、本発明は、抗体が抗体断片であることを想定する。例えば、抗体断片には、Fab、Fab'、Fab'-SH断片、ジスルフィド結合されたFv、一本鎖Fv(scFv)及びF(ab')₂断片が含まれ得るが、これらに限定されない。抗体断片を作製するために、様々な技術が当業者に公知である。例えば、このような断片は、完全な抗体のタンパク分解的消化を介して得ることができ(例えば、Morimoto et al., J.Biochem.Biophys.Methods, 24:107-117(1992)及びBrennan et al., Science, 229:81(1985)参照)、又は組換え宿主細胞によって直接産生され得る。例えば、Fab'-SH断片は、イー・コリから直接回収し、F(ab')₂断片を形成するために化学的に連結することができる(Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167(1992)参照)。別の実施形態において、F(ab')₂は、F(ab')₂分子の集合を促進するために、ロイシンジッパーGCN4を用いて形成される。あるいは、Fv、Fab又はF(ab')₂断片は、組換え宿主細胞培養から直接単離することができる。一本鎖可変領域断片(scFv)は、短い連結ペプチドを使用することにより軽及び/又は重鎖可変領域を連結することによって作製される(Bird et al., Science, 242:423-426(1998)参照)。連結ペプチドの例は、GPAKELTPLKEAKVS(配列番号31)である。次いで、薬物の付着又は固体支持体への付着など、さらなる機能のためにリンカーを修飾することが可能である。本発明において使用することができる他のリンカー配列の例は、「Bird et al., Science, 242:423-426(1988)」、Houston et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 85:5879-5883(1988)及び「McCafferty et al., Nature, 348:552-554(1990)」に見出すことができる。

30

40

【0132】

一本鎖変形物は、組換え的に又は合成的に作製することができる。scFvの合成的産生のために、自動化された合成装置を使用することができる。scFvの組換え的産生のために、scFvをコードするポリヌクレオチドを含有する適切なプラスミドは、適切な

50

宿主細胞（酵母、植物、昆虫若しくは哺乳動物などの真核生物又はイー・コリなどの原核生物の何れか）中に導入することができる。目的の s c F v をコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの連結などの定型的操作によって作製することができる。本分野において公知の標準的タンパク質精製技術を用いて、得られた s c F v を単離することができる。さらに、ダイアボディなどの一本鎖抗体の他の形態も、本発明によって想定される。ダイアボディは、VH 及び VL ドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現されているが、同じ鎖上の 2 つのドメイン間の対合が不可能なほど短く、これにより、ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対合させ、2 つの抗原結合部位を作製するリンカーを用いて発現される二価の二重特異的抗体である（例えば、Holliger, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444 - 6448 (1993); Poljak, R. J., et al., Structure, 2: 1121 - 1123 (1994) 参照）。

【0133】

さらに、本明細書に記載されている本発明の幾つかの態様において（例えば、対照としての使用）、市販の抗 NGAL 抗体又は文献に記載されている抗 NGAL 抗体又はその作製方法を使用することが可能であり得る。これらには、（1）抗 NGAL モノクローナル抗体（Antibody Shop A/S, Gentofte, Denmark から市販されている HYB 211 - 01、HYB 211 - 02 又は HYB 211 - 05）；（2）マウス抗 NGAL モノクローナル抗体（例えば、クローン番号 697、カタログ番号 HM 2193 B、HyCult Biotechnology, Uden, Netherlands）；（3）ラット抗 NGAL モノクローナル抗体（例えば、クローン番号 220310、カタログ番号 MAB 1757, R&D Systems, Minneapolis, MN）；（4）遊離の NGAL 形態（すなわち、ヘテロ二量体中に複合体化されていない形態）を検出すると称される Quantikine^(R) NGAL ELISA キット DL CN 20 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 中に含有される抗 NGAL 抗体（米国特許公開 2007/0196876 号）；（5）マウスハイブリドーマ細胞中で産生されるウサギ抗ヒト NGAL モノクローナル抗体（EP 0 756 708 及び米国特許第 6,136,526 号）；（6）ヒト NGAL に対する精製されたモノクローナル又はポリクローナル抗体（Kjeldsen et al., J. Biol. Chem., 268: 10425 - 32 (1993); Kjeldsen et al., J. Immunol. Methods, 198 (2): 155 - 64 (1996)）；（7）ヒト NGAL に対するポリクローナル抗体（PCT 国際公開 WO 2002/031507）及び / 又は（8）ヒト NGAL に対するモノクローナル抗体を作製するための NGAL の溶媒に露出したペプチドループ領域の使用を論述する（米国特許第 7,056,702 号及び米国特許公開 US 2004/0115728 号）が含まれるが、これらに限定されない。

【0134】

本発明の抗体は、様々な用途を有する。一態様において、本発明の抗体は、1 つ又はそれ以上の免疫診断試薬として使用することができる。例えば、本発明の抗体は、検査試料中のヒト NGAL 抗原の存在を検出するための 1 つ又はそれ以上の方法において 1 つ又はそれ以上の免疫診断試薬として使用することができる。より具体的には、本発明の抗体は、検査試料中のヒト NGAL の存在を検出するためのイムノアッセイにおいて 1 つ若しくはそれ以上の捕捉抗体、1 つ若しくはそれ以上の連結抗体又は 1 つ若しくはそれ以上の捕捉抗体及び 1 つ若しくはそれ以上の連結抗体の両方として使用することができる。

【0135】

E. 試料の収集及び前処理

例えば、本発明の抗体が免疫診断薬として及び / 又は NGAL イムノアッセイキット中で使用される場合、尿、血液、血清及び血漿並びに他の体液を収集し、取り扱い及び処理するための本分野で周知の方法が本発明の実施に際して使用される。

【0136】

10

20

30

40

50

検査試料は、抗体、抗原、ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドなどの目的NGAL分析物の他に、さらなる部分を含み得る。例えば、試料は、対象から得られた全血試料であり得る。検査試料、特に、全血は、本明細書に記載されているようなイムノアッセイの前に、例えば、前処理試薬で処理することが必要であり得、又は所望され得る。前処理が不要である場合でさえ（例えば、多くの尿試料）、前処理は、場合によって、単に便宜のために実施され得る（例えば、市販のプラットフォーム上での計画の一環として）。前処理試薬は、異種の因子又は同質の因子であり得る。

【0137】

本発明の異種の前処理試薬を用いると、前処理試薬は試料中に存在する分析物結合タンパク質（例えば、NGALを結合することができるタンパク質）を沈殿させる。このような前処理工程は、前処理剤の試料への添加によって形成された混合物の上清を沈殿した分析物結合タンパク質から分離することによって、あらゆる分析物結合タンパク質を除去することを含む。このようなアッセイでは、結合タンパク質が一切存在しない混合物の上清がアッセイにおいて使用され、抗体捕捉工程に直接進む。

10

【0138】

同質の前処理試薬が使用される場合には、このような分離工程は存在しない。抗体捕捉工程において、検査試料と前処理試薬の混合物全体を捕捉抗体と接触させる。このようなアッセイのために使用される前処理試薬は、典型的には、抗体捕捉工程の前に又は抗体補足抗体で抗体と遭遇している間に、前処理された検査試料混合物中に希釈される。このような希釈に関わらず、抗体捕捉の間に、検査試料混合物中に前処理試薬のある量（例えば、5Mメタノール及び/又は0.6Mエチレングリコール）がなお存在する（又は残存する）。

20

【0139】

前処理試薬は、本発明のイムノアッセイ及びキットとともに使用するのに適したあらゆる試薬であり得る。前処理は、(a) 1つ若しくはそれ以上の溶媒（例えば、メタノール及びエチレングリコール）及び塩、(b) 1つ若しくはそれ以上の溶媒、塩及び界面活性剤、(c) 界面活性剤又は(d) 界面活性剤及び塩を場合によって含む。前処理試薬は本分野において公知であり、このような前処理は、文献に記載されているように（例えば、Yatscoff et al., Abbott TDX Monoclonal Antibody Assay Evaluated for Measuring Cyclosporine in Whole Blood, Clin. Chem., 36: 1969-1973 (1990) 及び Wallemacq et al., Evaluation of the New AxSYM Cyclosporine Assay: Comparison with TDX Monoclonal Whole Blood and EMIT Cyclosporine Assays, Clin. Chem. 45: 432-435 (1999) 参照）に記載されているように、及び/又は市販されているように、Abbott TDX、AxSYM^(R) 及び ATCHITECT^(R) 分析装置 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 上でのアッセイのために使用されるように使用され得る。さらに、前処理は、Abbottの米国特許第5,135,875号、EP0 471 293、2006年12月29日出願された米国特許出願60/878,017号及び2006年6月21日出願された米国特許出願11/490624号（参照により、前処理に関するその教示に関して全体が組み込まれる。）に記載されているように行うことができる。また、単独で又は他の何れかの前処理剤（例えば、溶媒、界面活性剤、塩など）と組み合わせて、プロテアーゼを使用することができる。

30

40

【0140】

F. NGALイムノアッセイ

イムノアッセイは、サンドイッチフォーマットなどの（但し、これに限定されない。）本分野において公知のあらゆるフォーマットを用いて実施することができる。具体的には

50

、本発明の一態様において、検査試料中のヒトNGAL又はヒトNGAL断片を分離及び定量するために、少なくとも2つの抗体が使用される。より具体的には、少なくとも2つの抗体は、「サンドイッチ」と称される免疫複合体を形成するヒトNGAL又はヒトNGAL断片のあるエピトープに結合する。一般に、イムノアッセイにおいて、検査試料中のヒトNGAL又はヒトNGAL断片を捕捉するために、1つ又はそれ以上の抗体を使用することが可能であり（これらの抗体は、「捕捉」抗体としばしば称される。）、サンドイッチに検出可能な（すなわち、定量可能な）標識を結合するために、1つ又はそれ以上の抗体を使用することができる（これらの抗体は、「検出抗体」、「連結物」としばしば称される。）。

【0141】

本発明の抗体は、例えば、検査試料中のヒトNGAL抗原の存在を検出するための方法において、免疫診断剤として使用することができる。このような使用及びアッセイは、2007年10月19日に出版された米国仮特許出願60/981,473号に記載されている（このようなアッセイに関するその教示に関して、参照により組み込まれる。）。捕捉抗体、検出抗体として、又は捕捉及び検出抗体として、本発明の抗体を用いて、優れたイムノアッセイ、特に、サンドイッチアッセイを実施することができる。本発明の抗体を使用する他の具体的なアッセイは、2007年10月19日に出版された米国仮特許出願60/981,473号に記載されている（このようなアッセイに関するその教示に関して、参照により組み込まれる。）。

【0142】

ヒトNGAL又はヒトNGAL断片に関して検査されている（例えば、これらを含むことが疑われている）検査試料は、少なくとも1つの捕捉抗体（又は複数の抗体）及び少なくとも1つの検出抗体（第二の検出抗体又は第三の検出抗体である。）と同時に又は順次に、任意の順序で接触させることができる。例えば、検査試料は少なくとも1つの捕捉抗体とまず接触させ、次いで（順次）少なくとも1つの検出抗体と接触させることができる。あるいは、検査試料は、少なくとも1つの検出抗体とまず接触させ、次いで（順次）少なくとも1つの捕捉抗体と接触させることができる。さらに別の代替例において、検査試料は、捕捉抗体及び検出抗体と同時に接触させることができる。

【0143】

サンドイッチアッセイフォーマットにおいて、第一の抗体/ヒトNGAL複合体の形成を可能とする条件下で、ヒトNGAL又はヒトNGAL断片を含むと疑われる検査試料をまず少なくとも1つの第一の捕捉抗体と接触させる。2以上の捕捉抗体が使用される場合、第一の複数の捕捉抗体/ヒトNGAL複合体が形成される。サンドイッチアッセイにおいて、抗体、好ましくは、少なくとも1つの捕捉抗体は、検査試料中に予測されるヒトNGAL又はヒトNGAL断片の最大量のモル濃度過剰量で使用される。例えば、抗体の約5 µg/mLから約1 mg/mL/mL緩衝液（例えば、微小粒子コーティング緩衝液）を使用することができる。

【0144】

場合によって、検査試料を少なくとも1つの捕捉抗体（例えば、第一の捕捉抗体）と接触させる前に、検査試料からの第一の抗体/ヒトNGAL複合体の分離を促進するために、少なくとも1つの捕捉抗体を固体支持体に結合させることができる。ウェル、管又はビーズの形態のポリマー性材料から作製された固体支持体など（但し、これらに限定されない。）、本分野において公知のあらゆる固体支持体を使用することができる。1つの抗体（又は複数の抗体）は、吸着によって、化学的連結剤を用いた共有結合によって又は本分野によって公知の他の手段によって、固体支持体に結合させることができる（但し、このような結合は、ヒトNGAL又はヒトNGAL断片を結合する抗体の能力を妨害しない。）。あるいは、1つの抗体（又は複数の抗体）は、（例えば、Seradyne, Indianapolis, Indianaから入手可能な、Power-BindTM-SAMPTストレプトアビジンによって被覆された微粒子を用いて）ストレプトアビジン又はビオチンで予め被覆された微粒子と結合させることができる。あるいは、1つの抗体（又は

10

20

30

40

50

複数の抗体)は、抗種特異的モノクローナル抗体で予め被覆された微粒子を用いて結合させることができる。さらに、必要であれば、固体支持体は、抗体上の様々な官能基との反応性を許容するために誘導化することができる。このような誘導化には、無水マレイン酸、N-ヒドロキシスクシンイミド及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどの(但し、これらに限定されない。)ある種のカップリング剤の使用が必要とされる。

【0145】

ヒトNGAL若しくはヒトNGAL断片に関して検査されている及び/又はヒトNGAL若しくはヒトNGAL断片を含有すると疑われている検査試料を少なくとも1つの捕捉抗体(例えば、第一の捕捉抗体)と接触させた後、第一の抗体(又は複数の抗体)-ヒトNGAL複合体の形成を可能とするために、混合物を温置する。温置は、約2 から約45 の温度で、約4.5から約10.0のpHで、少なくとも約1分から約18時間、好ましくは、約1から約20分、より好ましくは約18分間の期間、実施し得る。本明細書に記載されているイムノアッセイは、1つの工程で(検査試料、少なくとも1つの捕捉抗体及び少なくとも1つの検出抗体が全て、順次に又は同時に反応容器へ添加されることを意味する。)、又は2つ工程、3つの工程など、2以上の工程で実施することができる。

10

【0146】

(第一の又は複数の)捕捉抗体/ヒトNGAL複合体の形成後、次いで、複合体を少なくとも1つの検出抗体((第一の又は複数の)捕捉抗体/ヒトNGAL/第二の抗体検出複合体の形成を可能とする条件下で)と接触させる。少なくとも1つの検出抗体は、イムノアッセイにおいて使用される第二、第三、第四などの抗体であり得る。捕捉抗体/ヒトNGAL複合体が2以上の検出抗体と接触される場合、(第一の又は複数の)捕捉抗体/ヒトNGAL/(複数の)検出抗体複合体が形成される。捕捉抗体(例えば、第一の捕捉抗体)と同様に、少なくとも第二の(及び後続の)検出抗体を捕捉抗体/ヒトNGAL複合体と接触させる場合、(第一の又は複数の)捕捉抗体/ヒトNGAL/(第二の又は複数の)検出抗体複合体の形成のために、上述の条件と類似の条件下での温置の期間が必要とされる。好ましくは、少なくとも1つの検出抗体は、検出可能な標識を含有する。検出可能な標識は、(第一の又は複数の)捕捉抗体/ヒトNGAL/(第二の又は複数の)検出抗体複合体の形成前に、同時に又は後に、少なくとも1つの検出抗体(例えば、第二の検出抗体)に結合させることができる。本分野において公知のあらゆる検出可能な標識を使用することができる。例えば、検出可能な標識は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P などの放射性標識、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース6-リン酸脱水素酵素などの酵素的標識、アクリジニウムエステル、ルミナール、イソルミノール、チオエステル、スルホンアミド、フェナントリジニウムエステルなどの化学発光標識、フルオレセイン(5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'-6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロ-フルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナートなど)、ローダミン、フィコピリタンバク質、R-フィコエリトリンなどの蛍光標識、量子ドット(硫化亜鉛がキャッピングされたセレン化カドミニウム)、温度測定標識又は免疫ポリメラーゼ連鎖反応標識であり得る。標識への導入、標識の手法及び標識の検出は、「Polak and Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2nd ed., Springer Verlag, N.Y. (1997)」及び「(Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregonによって出版されたハンドブックとカタログの組み合わせである)Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1996)」に見出される。

20

30

40

【0147】

検出可能な標識は、直接又は連結剤を介して抗体に結合させることができる。使用可能な連結剤の例は、Sigma-Aldrich, St. Louis, MOから市販

50

されているEDAC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、塩酸塩)である。使用可能な他の連結剤は、本分野において公知である。検出可能な標識を抗体に結合するための方法は、本分野において公知である。さらに、N10-(3-スルホプロピル)-N-(3-カルボキシプロピル)-アクリジニウム-9-カルボキサミド(CPSP-アクリジニウムエステルとしても知られる。)又はN10-(3-スルホプロピル)-N-(3-スルホプロピル)-アクリジニウム-9-カルボキサミド(SPSP-アクリジニウムエステルとしても知られる。)など、抗体への検出可能な標識の連結を容易にする末端基を既に含有する多くの検出可能な標識を購入又は合成することができる。

【0148】

(第一の又は複数の)捕捉抗体/ヒトNGAL/(第二の又は複数の)検出抗体複合体は、標識の定量前に、検査試料の残りから分離させることが可能であるが、分離させなければならないわけではない。例えば、少なくとも1つの捕捉抗体(例えば、第一の捕捉抗体)がウェル又はビーズなどの固体支持体に結合されている場合、分離は、固体支持体との接触から(検査試料の)液体を除去することによって達成することができる。あるいは、少なくとも第一の捕捉抗体が固体支持体に結合されている場合、第一の捕捉抗体は、第一の(複数の)抗体/ヒトNGAL/第二の(複数の)抗体複合体を形成するために、ヒトNGAL含有試料及び少なくとも1つの第二の検出抗体と同時に接触させた後、固体支持体との接触から液体(検査試料)を除去することができる。少なくとも1つの第一の捕捉抗体が固体支持体に結合されていないければ、(第一の又は複数の)捕捉抗体/ヒトNGAL/(第二の又は複数の)検出抗体複合体は、標識の量の定量のために、検査試料から除去する必要はない。

【0149】

標識された捕捉抗体/ヒトNGAL/検出抗体複合体(例えば、第一の捕捉抗体/ヒトNGAL/第二の検出抗体複合体)の形成後、本分野において公知の技術を用いて、複合体中の標識の量が定量される。例えば、酵素標識が使用されるのであれば、標識された複合体を、発色などの定量可能な反応を与える標識に対する基質と反応させる。標識が放射性標識であれば、標識はシンチレーションカウンターを用いて定量される。標識が蛍光標識であれば、1つの色(「励起波長」と知られる。)の光で標識を刺激し、刺激に応答して標識によって発光された別の色(「発光波長」として知られる。)を検出することによって、標識が定量される。標識が化学発光標識であれば、標識は、視覚的に又は光測定装置、X線フィルム、高速写真フィルム、CCDカメラなどを使用することによって、発光された光を検出して定量される。複合体中の標識の量が定量されたら、既知濃度のヒトNGAL又はヒトNGAL断片の系列希釈を用いて作製された標準曲線の使用によって、検査試料中のヒトNGAL又はヒトNGAL断片の濃度が測定される。ヒトNGAL又はヒトNGAL断片の系列希釈を使用する以外に、標準曲線は、重量分析、質量分析法によって及び本分野において公知の他の技術によって作製することができる。

【0150】

本明細書に記載されている方法(すなわち、イムノアッセイ及びキット)は、検査試料中に存在するNGALのレベルの測定に基づいて、対象の尿細管細胞傷害状態を評価するために使用することができる。評価されるべき対象は、現在、尿細管細胞傷害を有し、又は尿細管細胞傷害を発症するリスクを有し得る。

【0151】

本明細書に記載されている方法は、尿細管細胞傷害に対して対象を治療した後に、又は対象が尿細管細胞傷害を現在経験しながら、対象に対して実施することができる。

【0152】

本明細書に記載されている方法は、対象中での薬物又は他の治療剤の腎毒性副作用をモニターするために使用することができる。

【0153】

本明細書に記載されている方法は、外科的処置の後など(心臓手術、冠動脈バイパス手

10

20

30

40

50

術、心血管手術、血管手術又は腎臓移植後など)、対象によって経験される現象の後に、対象が腎臓への低下した血液供給を経験した後に、(対象が、損傷を受けた心機能、卒中、外傷、敗血症及び脱水からなる群から選択される医学症状を有し、又は経験している場合)集中治療室への患者の入室後に、1つ若しくはそれ以上の医薬の対象への投与後に、又は1つ若しくはそれ以上の造影剤を対象に投与した後に、実施し、又は実行することができる。

【0154】

本明細書中のある種の実施形態は、尿細管細胞傷害の状態を評価するために使用されたときに有利であることは言うまでもないが、イムノアッセイ及びキットは、他の疾病、例えば、癌、敗血症及びNGALの評価を伴うあらゆる疾病、疾患又は症状においてNGALを評価するためにも、場合によって使用することができる。

10

【0155】

より具体的には、腎疾患、疾病及び傷害の評価の他に(例えば、米国特許公開2008/0090304号、2008/0014644号、2008/0014604号、2007/0254370号及び2007/0037232号参照)、本明細書に記載されているアッセイ及びアッセイ成分は、他のあらゆるNGALアッセイにおいて、又はNGALレベル若しくは濃度の評価が有用であると判明し得る他のあらゆる状況、例えば、癌関連アッセイ(例えば、全般的に又はより具体的に、膵臓癌、乳癌、卵巣/子宮癌、白血病、大腸癌及び脳癌が含まれるが、これらに限定されない。例えば、米国特許公開2007/019876号参照;米国特許第5,627,034号及び5,846,739号も参照)、全身性炎症応答症候群(SIRS)、敗血症、重篤な敗血症、敗血症ショック及び多発性臓器機能障害症候群(MODS)の診断(例えば、米国特許公開2008/0050832号及び2007/0092911号参照;米国特許第6,136,526号も参照);血液学用途(例えば、細胞の種類)の推測);とりわけ子癩前症、肥満(メタボリックシンドローム)、インシュリン抵抗性、高血糖、組織再構築(MMP-9と複合される場合、例えば、米国特許公開2007/0105166号及び米国特許第7,153,660号参照)、自己免疫疾患(例えば、関節リウマチ、炎症性腸疾患、多発性硬化症)、過敏性腸症候群(例えば、米国特許公開2008/0166719及び2008/0085524参照)、神経変性疾患、呼吸器疾患、炎症、感染、歯周病(例えば、米国特許第5,866,432号参照)及び静脈血栓塞栓疾患を含む心血管疾患(例えば、米国特許公開2007/0269836号)の評価においても場合によって使用することが可能である。

20

30

【0156】

G. NGALイムノアッセイキット

本発明は、検査試料中の哺乳動物のNGAL抗原の存在を検出するためのキットも想定する。このようなキットは、本明細書に記載されている免疫診断試薬(例えば、抗体)の1つ又はそれ以上を含み得る。より具体的には、キットがイムノアッセイを実施するためのキットである場合、キットは、本明細書に記載されている免疫診断試薬及び指示書の場合によって含むことができる。例えば、本明細書に記載されている免疫診断試薬及び抗体などの様々なイムノアッセイキットが、2007年10月19日に出願された米国仮特許出願60/981,473号(このようなアッセイに関するその教示に関して、参照により組み込まれる。)に記載されている。

40

【0157】

従って、本発明は、1つ若しくはそれ以上の組換え抗体又は本発明の哺乳動物NGALを含む診断用及び品質管理キットをさらに提供する。場合によって、本発明のアッセイ、キット及びキット成分は、市販のプラットフォーム上での使用(例えば、Abbott Laboratories, Abbott Park, ILのPrism^(R)、AxSYM^(R)、ARCHITECT^(R)及びEIA(ビーズ)プラットフォーム上でのイムノアッセイ並びに他の市販の及び/又はインビトロ診断用アッセイ)に対して最適化される。さらに、前記アッセイ、キット及びキット成分は、他の形式で、例えば、電気化

50

学的な又はその他の携帯式又は治療場所でのアッセイ系に対して使用することができる。例えば、本発明は、TnI、CKMB及びBNPを含む幾つかの心臓マーカーに対するサンドイッチイムノアッセイを実施する市販のAbbott Point of Care (i-STAT[®]), Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)電気化学的イムノアッセイ系に対して適用可能である。イムノセンサー及び使い捨て検査装置中でイムノセンサーを作動させる方法は、例えば、米国特許公開20030170881号、20040018577号、20050054078号及び20060160164号(参照により、本明細書に組み込まれる。)に記載されている。電気化学的なイムノセンサー及びイムノセンサーの他の種類の製造に関するさらなる背景は、米国特許第5,063,081号(同じく、これらに関するその記述に関して、参照により組み込まれる。)に見出される。

10

【0158】

場合によって、キットは、品質管理試薬(例えば、感度パネル、検量用試料及び陽性対照)を含む。品質管理試薬の調製は本分野において周知であり、例えば、様々な免疫診断用製品同封シート上に記載されている。NGAL感度パネルの一員は、例えば、適切なアッセイ緩衝液(例えば、リン酸緩衝液)中に本発明のNGAL抗体の既知量をスパイクすることによって、例えば、「低」から「高」にわたるNGAL抗体の既知量を含有する可変量で場合によって調製することができる。これらの感度パネルの一員は、アッセイの性能特性を確立するために場合によって使用され、さらに、場合によって、イムノアッセイキット試薬の完全性及びアッセイの標準化の有用な指標である。

20

【0159】

別の実施形態において、本発明は、アッセイの性能特性を評価し、並びに/又はアッセイ中に使用される抗原の完全性を定量及びモニターするための感度パネルとして使用するための1つ又はそれ以上の本発明の抗体を含む品質管理キットを提供する。

【0160】

キットに提供される抗体は、蛍光色素、放射性部分、酵素、ビオチン/アビジン標識、発色団、化学発光標識などの検出可能な標識を取り込むことができ、又はキットは、抗体を標識するための試薬若しくは抗体を検出するための試薬(例えば、検出抗体)及び/又は抗原を標識するための試薬若しくは抗原を検出するための試薬を含み得る。抗体、検量用試料及び/若しくは対照は別の容器中に与えることができ、又は、適切なアッセイフォーマット中に、例えばマイクロタイタープレート中に予め分配させることができる。

30

【0161】

キットは、診断アッセイを実施し、又は緩衝液、塩、酵素、酵素補因子、基質、検出試薬などの品質管理評価を容易にするために必要とされる他の試薬を場合によって含み得る。検査試料を単離及び/又は治療するための緩衝液及び溶液などの他の成分(例えば、前処理試薬)も、キットに含め得る。キットは、1つ又はそれ以上の他の対照をさらに含み得る。キットの成分の1つ又はそれ以上は凍結乾燥させることができ、キットは、凍結乾燥された成分の再構成に適した試薬をさらに含み得る。

【0162】

キットの様々な成分は、場合によって、適切な容器中に与えられる。上述のように、容器の1つ又はそれ以上は、マイクロタイタープレートであり得る。さらに、キットは、試料を保持又は保存するための容器(例えば、血液又は尿試料用の容器又はカートリッジ)を含むことができる。適宜、キットは、反応容器、混合容器及び試薬又は検査試料の調製を容易にする他の成分も場合によって含み得る。キットは、注射器、ピペット、鉗子、測定用スプーンなどの検査試料の取得を補助するための1つ又はそれ以上の機器も含み得る。

40

【0163】

キットは、紙形態又はディスク、CD、DVDなどのコンピュータ読み取り可能な形態で提供され得る使用説明書を場合によってさらに含み得る。

【0164】

50

例として、限定することなく、ここで、本発明の実施例を記載する。

【0165】

H. アッセイキットの改良

キット（又はその成分）並びに本明細書に記載されている成分及び方法を用いるアッセイによって、検査試料中のNGAL抗原の濃度を測定する方法は、例えば、米国特許第5,089,424号及び同第5,006,309号に記載されているように、並びに、例えば、ARCHITECT^(R)としてAbbott Laboratories (Abbott Park, IL)によって市販されているように、様々な自動化又は半自動化されたシステム（固相が微粒子を含むシステムを含む。）で使用するために改良することができる。

10

【0166】

自動化されていないシステム（例えば、ELISA）と比較した自動化又は半自動化されたシステムの差の幾つかには、第一の特異的結合パートナー（例えば、NGAL捕捉抗体）が付着されている基質（サンドイッチ形成及び分析物の反応性に影響を与えることができる。）並びに捕捉の長さやタイミング、検出及び/又は何らかの場合によって行われる洗浄工程が含まれる。ELISAなどの自動化されていないフォーマットは、試料及び捕捉試薬との相対的により長い温置時間を必要とし得るのに対して（例えば、約2時間）、自動化又は半自動化されたフォーマット（例えば、ARCHITECT^(R), Abbott Laboratories）は相対的により短い温置時間（例えば、ARCHITECT^(R)に関して約18分間）を有し得る。同様に、ELISAなどの自動化されていない形式は、相対的により長い温置時間（例えば、約2時間）、連結物試薬などの検出抗体を温置し得るのに対して、自動化又は半自動化されたフォーマット（例えば、ARCHITECT^(R)）は、相対的により短い温置時間（例えば、ARCHITECT^(R)に関して約4分）を有し得る。

20

【0167】

Abbott Laboratoriesから入手可能な他のプラットフォームには、AxSYM^(R)、IMx^(R)（例えば、参照により本明細書にその全体が組み込まれる米国特許第5,294,404号参照）、PRISM^(R)、EIA（ビーズ）及びQuantumTM II並びに他のプラットフォームが含まれるが、これらに限定されない。さらに、アッセイ、キット及びキット成分は、他のフォーマット、例えば、電気化学的又は他の携帯式若しくは治療地点でのアッセイ系において使用することができる。本開示は、例えば、サンドイッチイムノアッセイを実施する市販のAbbott Point of Care (i-STAT^(R)、Abbott Laboratories)電気化学的イムノアッセイシステムに対して適用可能である。イムノセンサー並びに使い捨て検査装置におけるその製造及び操作方法は、例えば、米国特許第5,063,081号、米国特許公開2003/0170881号、米国特許公開2004/0018577号、米国特許公開2005/0054078号及び米国特許公開2006/0160164号（これらに関する教示に関して、参照により、その全体が組み込まれる。）に記載されている。

30

【0168】

特に、i-STAT^(R)システムへのNGALアッセイの改造に関して、以下の構成が好ましい。微小加工されたシリコンチップは、金電流測定作用電極及び銀-塩化銀参照電極の一对を用いて製造される。作用電極の1つの上で、固定化された捕捉抗体を有するポリスチレンビーズ（直径0.2mm）が電極の上にパターン化されたポリビニルアルコールのポリマーコーティングに接着される。このチップは、イムノアッセイに適した流体装置フォーマットを有するi-STAT^(R)カートリッジ中に組み立てられる。カートリッジの試料保持チャンバーの壁の一部上に、アルカリホスファターゼ（又は他の標識）で標識された第二の検出抗体を含む層が存在する。カートリッジの流体袋内には、p-アミノフェノールリン酸を含む水性試薬である。

40

【0169】

50

作動時に、NGAL抗原を含有すると疑われる試料は、検査カートリッジの保持チャンパーに添加され、カートリッジはI-STAT^(R)読取装置中に挿入される。第二の抗体(検出抗体)が溶液中に溶解された後、カートリッジ内のポンプ要素がチップを含有する伝導路内に試料を押し出す。ここで、ポンプ要素は、NGAL抗原、NGAL捕捉抗体及び標識された検出抗体間でのサンドイッチの形成を促進するために、周期的に振動する。アッセイの最後から2番目の工程において、試料をチップから廃棄チャンパーの中に洗浄するために、液体は袋から伝導路の中に押し出される。アッセイの最後の工程において、アルカリホスファターゼ標識は、p-アミノフェノールリン酸と反応してリン酸基を切断し、放出されたp-アミノフェノールを作用電極において電気化学的に酸化させる。測定された電流に基づいて、読取装置は、埋め込まれたアルゴリズム及び工場で測定された校正曲線を用いて、試料中のNGAL抗原の量を計算することができる。

10

【0170】

さらに、本明細書に記載されている方法及びキットは、イムノアッセイを実施するための他の試薬及び方法を必ず包含することは言うまでもない。例えば、連結物希釈剤及び/又は検量用試料希釈剤として、例えば洗浄のために、本分野において公知の様々な緩衝液及び/又は使用するために容易に調製し、又は最適化され得る様々な緩衝液が包含される。典型的な連結物希釈剤は、ある種のキットにおいて使用され、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、塩、タンパク質ブロッキング剤、抗微生物剤及び界面活性剤を含有するARCHITECT^(R)連結物希釈剤(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)である。典型的な検量用試料希釈剤は、MES、他の塩、タンパク質ブロッキング剤及び抗微生物剤を含有する緩衝液を含む、ある種のキットにおいて使用されるARCHITECT^(R)ヒト連結物希釈剤(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)である。

20

【実施例1】

【0171】

NGALマウス細胞株の開発

本明細書中に具体的に記載されていない全ての野生型NGAL組換え抗原(rAg)及び変異体C87SNGALNGALrAgクローン、サブクローン、ハイブリッド及びハイブリドーマ(名称及び番号を含む。)、ベクター及びベクター構築物は全て、これらの全体が、2007年10月19日に出願された米国仮特許出願60/981,470号(これらに関するその教示に関して、参照により組み込まれる。)に記載されている。参照を容易にするために、これらの材料の幾つか又は米国仮特許出願60/981,470号から得られる図解も本明細書に含まれる。

30

【0172】

具体的には、図1(ヒトNGAL野生型抗原配列(配列番号1)を示す。);図2(米国仮特許出願60/981,470号の実施例1に記載されている野生型ヒトNGAL配列を含有するプラスミドpJV-NGAL-A3(pJV-NGAL-hisAとしても知られる。)を示す。);図3(ヒトNGALC87S変異体抗原配列(配列番号2)を示す。);図4(野生型ヒトNGALポリヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。);及び図5(変異体ヒトNGALポリヌクレオチド配列(配列番号4)を示す。)

40

【0173】

米国仮特許出願60/981,470号中のこれらの材料の幾つか及びさらに市販されているポリペプチドは、本明細書にさらに記載されているように、特定の細胞株の作製及び/又は評価において使用された。特に、ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)に対する免疫応答を刺激するための動物免疫原性試験において、2つのマウス系統及び1つのウサギ系統、すなわち、CAF1/Jマウス、RBF/DnJマウス(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)及びNZWウサギ(Covance, Kalamazoo, MI)を使用した。動物中に免疫化された4つのNGAL抗原は、(1)NSO骨髄腫細胞から産生された組換えヒトNGAL(R&D Systems (Minneapolis, MN));(2)HEK

50

293細胞中で産生された組換えヒトNGAL(一過性の発現系、Abbott Laboratoriesで行われた研究);(3)ヒト白血球から単離された固有の哺乳動物由来ヒトNGAL(Diagnostics Development(Uppsala, Sweden));及び(4)イー・コリ中で産生された組換えNGAL(ProSpec-Tany TechnoGene(Rehovot, Israel))であった。

【0174】

フロイントのアジュバント(Difco, Detroit, MI)及びRibiaアジュバント(Corixa, Hamilton, MT)を交互に、NGAL5µgの5回の隔週免疫化をマウスに与えた。以下に記載されているEIAで評価するために、5回目の免疫化の9から14日後に、血清試料を採取した。アジュバント研究において、ウサギを使用し、4つのアジュバント計画の1つを用いて、NGAL20µgを用いて、5回の免疫化を毎月行った。内容は下記の通り:(1)Adjuliteフロイントのアジュバント(Pacific Immunology Ramona, CA);(2)メチル化されていないCpGヌクレオチドを含有するオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN, Cell Sciences, Canton, MA)と組み合わせたAlhydrogel水酸化アルミニウムゲルアジュバント(Accurate Chemical, Westbury, NY);(3)DifcoフロイントアジュバントとRibiaアジュバントを交互に、及び(4)DifcoフロイントアジュバントとCpG-ODNが補充されたQuilA(Brenntag Biosector, Denmark)を交互に行った。

10

20

【0175】

ヒツジ抗マウスIgGFc(Jackson Immunoresearch, West Grove PA)又はヒツジ抗ウサギIgGFc(Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)を、5µg/mLで、96ウェルマイクロタイターEIAプレート(Nunc Corporation, Rochester NY)上に被覆した。捕捉試薬を固相上に被覆した後、捕捉試薬を除去し、PBS(ブロック溶液)中の2%BSA溶液を用いて、プレート上に残存している全ての占有されていない結合部位をブロックした。プレートを洗浄し、対照抗体及び動物血清試料のlog3系列希釈を1時間の温置のために添加した。プレートを蒸留水中で洗浄し、1.0µg/mLから始まってブロック溶液中に希釈されたNGAL抗原のlog4系列希釈をプレートに添加し、10分間温置させた。抗原を蒸留水でプレートから洗浄し、ブロック溶液中に100ng/mLになるように希釈されたビオチン標識されたヤギ抗NGALポリクローナル抗体(R&D Systems, Minneapolis MN)を添加し、30分間温置した。この温置後、蒸留水を用いて抗原をプレートから洗浄した。約200ng/mLになるように、ストレプトアビジン-HRPO(Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)をブロック溶液中に希釈し、プレートに添加し、30分間温置した。プレートを蒸留水で洗浄し、シグナルを生成させるための発色原として、0.05%Tween20及びo-フェニレンジアミン基質(OPD;Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)を使用した。492nmでプレートを読み取り、Kaleida Graphソフトウェア(Synergy Software, Reading, PA)を用いて、以下の式:

30

40

$$y = m_1 + m_2 * m_0 (m_3 + m_0)$$

を用いてプロットすることによって、結果を分析した。

【0176】

(m1はバックグラウンドシグナルであり、m2は最大シグナルであり、m0は可変抗原濃度であり、yはシグナル(すなわち、光学密度)であり、及びm3は最大結合の50%での抗原濃度である。)。総抗NGAL力価に基づいて、及び最大結合シグナルの50%において生成される値であり、従って、最高親和性に変換されるAg₅₀に基づいて、

50

血清試料を互いに対して順位付けした。この検査は、「Friguet et al., J. Immunolog. Methods, 1985, 77:305-319」に詳述されている検査と同様に行った。

【0177】

総抗NGAL力価に基づいて、及び最小抗原濃度を用いて最大結合シグナルの50%において生成され、従って、最高親和性に変換されるに基づいて、血清試料を互いに対して順位付けした。検査は、「Friguet et al., J. Immunolog. Methods, 77:305-319(1985)」に詳述されている検査と同様に行った。結果は、表1A、1B及びC1に示されている。

【0178】

【表1】

表 1A

抗原入手先	宿主	CAF1/J マウス 平均力価	CAF1/J マウス 平均 Ag ₅₀ (ng/mL)	CAF1/J マウス Ag ₅₀ 範囲 (ng/mL)
R&D Systems	NSO 骨髄腫	1:42,120	23	9-45
Abbott Laboratories	HEK293	1:35,200	21	1-43
Diagnostics Development	ヒト白血病	1:44,000	23	15-29
ProSpec-Tany	イー・コリ	1:72,900	24	6-37

【0179】

【表2】

表 1B

抗原入手先	宿主	RBF/DnJ マウス 平均力価	RBF/DnJ マウス 平均 Ag ₅₀ (ng/mL)	RBF/DnJ マウス Ag ₅₀ 範囲 (ng/mL)
R&D Systems	NSO 骨髄腫	1:1,487	44	22-70
Abbott Laboratories	HEK293	1:5,850	84	46-137
Diagnostics Development	ヒト白血病	1:12,444	69	27-121
ProSpec-Tany	イー・コリ	1:170,100	93	32-185

【0180】

10

20

30

【表 3】

表 1C

抗原入手先	宿主/アジュバント	NZW ウサギ 平均力価	NZW ウサギ 平均 Ag ₅₀ (ng/mL)	NZW ウサギ Ag ₅₀ 範囲 (ng/mL)
Abbott Laboratories	HEK293 Adjulite フロイント	1:906,332	8	6-9
Abbott Laboratories	HEK293 水酸化アルミニウム /Cpg-ODN	1:338,749	13	8-18
Abbott Laboratories	HEK293 Difco フロイント /Ribi	1:200,384	16	10-19
Abbott Laboratories	HEK293 Difco フロイント /QuilA	1:300,245	19	15-22

10

【0181】

表 1 A 及び 1 B 中のマウス血清から得られた E I A の結果は、C A F 1 / j マウスがずっと高い力価及び N G A L 抗原に対する改善された相対的親和性 (A g ₅₀) を示すことを明確に示唆した。C A F 1 / j マウスは、R B F / D n j マウスより強く、より高度に特異的な哺乳動物によって産生され及びグリコシル化された抗原に対する免疫応答を示した。これは、おそらく、「R u d d e t a l . , S c i e n c e , 2 9 1 : 2 3 7 0 - 2 3 7 6 (2 0 0 1) 」によって記載されているマウス免疫系への抗原の主要組織適合複合体 (M H C) 提示の役割によるものである。マウスの C A F 1 / j 系統は、グリコシル化された抗原を加工し、より効率的な免疫応答をもたらすために、R B F / D n j マウスより遺伝的に優れるように操作されたように見受けられる。

20

【0182】

ウサギの血清試料から得られた表 1 C 中の結果は、A d j u l i t e フロイントアジュバントを用いて H E K 2 9 3 発現された組換え N G A L で免疫化されたウサギ血清は残りの 3 つのアジュバント計画を用いたウサギより、統計的により高い抗体力価を与えたことを示唆する。さらに、A d j u l i t e フロイントのアジュバントを用いて免疫化されたウサギは、改善された相対的親和性を与えた。これらの動物は、C p G - O D N と組み合わせて水酸化アルミニウムを用いて免疫化された動物と統計学的に類似していた。抗 N G A L 分泌性ハイブリドーマ細胞株を作製するために、ウサギ B 細胞が使用され得るのに対して (S p i e k e r - P o l e t e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 9 2 , 9 3 4 8 - 9 3 5 2 (1 9 9 5)) 、アッセイ感度要件は、マウスハイブリドーマ細胞株を用いて充足された。

30

【0183】

N G A L 抗原に対して最高の力価及び親和性を首尾よく示した後、抗原の融合前強化免疫の前に、C A F 1 / J マウス番号 1 3 、 1 4 及び 2 0 を 7 週間休息させた。融合の 3 日前に、マウスに麻酔をかけ、体腔を開け、脾臓を露出させるために、切開した。0 . 9 % 生理的溶液中に希釈された組換えヒト N G A L 抗原 (R & D S y s t e m s , M i n n e a p o l i s , M N) の 1 0 μ g 注射を各マウスの脾臓中に直接与え、脾臓周囲の体腔中に、さらに 1 0 μ g 与えた。手術用ステープルを用いて、切開を閉じ、融合前にマウスを休息させた。

40

【0184】

融合の当日に、マウスを安楽死させ、抗 N G A L 脾細胞を含有する脾臓を採集し、ハイブリドーマ無血清培地 (H S F M) (I n v i t r o g e n C o r p . , C a r l s

50

bad, CA)中に配置した。「Kohler and Milstein, Nature, 256:495-7(1975)」によって記載されているように、細胞融合を行った。HSFMを含有する別個のペトリ皿中に、各マウスの脾臓を置いた。HSFMを含有する注射器及び細胞へらを用いて、各脾臓から脾細胞を灌流して流出させ、次いで、血球計を用いて計数した。各マウスから、約 1.7×10^7 個の脾細胞をプールし、細胞沈降物中への遠心によって洗浄し、HSFM中に再懸濁した。これらの脾細胞をSP2/0骨髄腫細胞の等しい数と混合し、沈降物中に遠心した。HSFM中の50%ポリエチレングリコール(PEG)(分子量1300から1600、ATCC、Manassas VA)に脾細胞及びSP2/0細胞を曝露させることによって、融合を達成した。30秒にわたって、細胞沈降物にPEG溶液1mLを添加した後、さらに1分間温置した。30秒にわたって、HSFMの30mLをゆっくり添加することによって、PEG及び沈降物を希釈した。次いで、遠心によって、融合された細胞を懸濁物から除去し、容器を傾けて上清を除去した。

10

ハイブリドーマを選択するために、15%FBS(Hyclone Laboratories, Logan UT)、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)(Sigma Laboratories, St. Louis, MO)、HT補充物(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)、ハイブリドーマクロニング因子(Bioveris Corporation, Gaithersburg MD)及びL-グルタミン(Invitrogen Corp., Grand Island, NY)が補充されたHSFM428mL中に、細胞懸濁物を再懸濁した。24個の96ウェル細胞培養プレート中に、0.2mL/ウェルで細胞を播種した。5、7、11及び12日目に、吸引によって各ウェル中の培地の半分を除去し、15%FBS、HT補充物及びL-グルタミンが補充されたHSFMと置換した。抗体産生に関する上清のスクリーニングの前に、10又は13日間、ハイブリドーマを増殖させた。

20

【0185】

EIAによって、細胞上清試料を抗NGAL抗体に関して分析した。ウサギ抗マウスIgGFc又はヒツジ抗マウスIgGFc(Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)の何れかを、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、96ウェルマイクロタイターEIAプレート上に被覆した。固相上に捕捉試薬を被覆した後、捕捉試薬を除去し、ブロック溶液を用いて、プレート上のあらゆる開放された結合部位をブロックした。次いで、ブロックされたプレートに細胞上清を添加し、室温で少なくとも1時間温置した。抗マウスIgGFcは、上清から抗NGALマウス抗体を捕捉する。温置後、蒸留水を用いて上清を洗浄した。ビオチンで標識されたNGAL抗原を、 100 から $200 \text{ ng}/\text{mL}$ でプレートに添加し、30分間温置した。この温置後、蒸留水を用いて、抗原をプレートから洗浄した。約 $200 \text{ ng}/\text{mL}$ になるように、ストレプトアビジン-HRPO(Jackson Immunoresearch)をブロック溶液中に希釈し、プレートに添加し、30分間温置した。NGAL-ビオチンを除去するためにプレートを蒸留水で洗浄し、シグナルを生成させるための発色原として、o-フェニレンジアミン基質(OPD; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)を使用した。492nmでプレートを読み取り、結果を分析した。ハイブリッドがバックグラウンドより少なくとも3倍大きなEIAシグナルを有する場合に、ハイブリッドを陽性と考えた(下表2参照)。

30

40

【0186】

【表 4】

表 2

ハイブリッド番号	バックグラウンド	1:10,000での CAF1 #14 血清	ハイブリッド
1-903	0.25	1.71	1.76
1-2322	0.08	1.73	2.50

【 0 1 8 7 】

10

10% FBS 及び HT 補充物が補充された HSF M 中で、24 ウェルプレートに、陽性ハイブリッドを増殖した。3 から 7 日の増殖後、相対的親和性の順位付けを行うために、ビオチン標識された NGAL の複数の濃度が使用されたことを除き、上述のように、24 ウェル培養物を EIA によって評価した（下表 3 及び 4 参照）。さらなる評価のために、BIAcore 装置（BIAcore International AB, Uppsala, Sweden）を用いて、このアッセイにおいて、NGAL への相対的に高い親和性を示したハイブリッドを培養フラスコに増殖させた。

【 0 1 8 8 】

【表 5】

表 3

20

試料番号	0ng/mL	50ng/mL	500ng/mL
NC	0.07	0.06	0.09
抗体 Shop HYB211-01	0.05	0.88	1.56
抗体 Shop HYB211-02	0.05	0.64	1.42
抗体 Shop HYB211-05	0.07	0.29	1.67
1-2322	0.07	1.47	1.82

30

【 0 1 8 9 】

【表 6】

表 4

試料番号	0ng/mL	25ng/mL	250ng/mL
抗体 Shop HYB211-01	0.05	0.68	1.54
1-903	0.05	0.76	2.01

40

【 0 1 9 0 】

BIAcore を用いて、NGAL に対する相対的結合親和性に関して、NGAL ハイブリッド上清を評価し、これに従って、NGAL 結合エピトープ群中でグループ分けした。親和性アッセイは、以下のように、ヤギ抗マウス IgG Fc 捕捉バイオセンサー上で完結した。0.1% BSA 及び 0.1% CM-デキストランを加えた HBS-EP 緩衝液を含有する走行緩衝液（以下、「走行緩衝液」と）と、10 μ L / 分で、まず、フローセルを平衡化させた。次に、バイオセンサー上に上清由来の抗 NGAL 抗体を捕捉する各フローセルを横切って、上清 13 μ L を浮遊させ、1つのフローセルは参照フローセルとしてブランクとした。次いで、走行緩衝液を用いて、50 μ L / 分で 5 分間、フローセルを洗浄

50

し、チップを横切って100 nM濃度のNGAL抗原150 μ Lを注射した後、走行緩衝液を5分注射した。センサーグラムを介して、相対的結合速度論、会合及び解離をモニターした。会合及び解離速度並びに総合 K_D を測定するために、Scrubber 2.0ソフトウェア(BioLogic Software Pty Ltd., Australia)を用いて、センサーグラムを分析した。下表5に、結果が示されている。

【0191】

【表 7】

表 5

NGAL mAb	エピトープ群	k(on) (M ⁻¹ s ⁻¹)	k(off) (s ⁻¹)	K _D (M)
NGAL 1-2322	1	4.68 x 10 ⁵	7.28 x 10 ⁻⁵	1.55 x 10 ⁻¹⁰
NGAL 1-181	1	4.67 x 10 ⁵	8.49 x 10 ⁻⁵	1.82 x 10 ⁻¹⁰
NGAL 1-680	1	3.81 x 10 ⁵	8.54 x 10 ⁻⁵	2.24 x 10 ⁻¹⁰
NGAL 1-192	1	4.58 x 10 ⁵	1.07 x 10 ⁻⁴	2.34 x 10 ⁻¹⁰
NGAL 1-1886	1	3.82 x 10 ⁵	1.21 x 10 ⁻⁴	3.17 x 10 ⁻¹⁰
NGAL 1-821	1	5.09 x 10 ⁵	1.74 x 10 ⁻⁴	3.42 x 10 ⁻¹⁰
NGAL 1-809	1	6.22 x 10 ⁵	2.23 x 10 ⁻⁴	3.58 x 10 ⁻¹⁰
HYB 211-01	1	2.00 x 10⁶	1.60 x 10⁻³	8.00 x 10⁻¹⁰
NGAL 1-1944	1	3.18 x 10 ⁵	2.82 x 10 ⁻⁴	8.86 x 10 ⁻¹⁰
NGAL 1-2194	1	4.30 x 10 ⁵	5.50 x 10 ⁻⁴	1.28 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-1952	1	2.08 x 10 ⁵	3.69 x 10 ⁻⁴	1.77 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-2415	1	2.97 x 10 ⁵	1.04 x 10 ⁻³	3.49 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-2315	1	2.13 x 10 ⁵	1.06 x 10 ⁻³	4.96 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-1191	1	3.14 x 10 ⁵	1.56 x 10 ⁻³	4.97 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-714	1	1.68 x 10 ⁵	9.12 x 10 ⁻⁴	5.42 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-1672	1	2.37 x 10 ⁵	1.41 x 10 ⁻³	5.96 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-2374	1	4.50 x 10 ⁵	0.00271	6.02 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-916	1	1.98 x 10 ⁵	1.47 x 10 ⁻³	7.42 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-1638	1	1.68 x 10 ⁵	1.31 x 10 ⁻³	7.81 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-904	1	1.44 x 10 ⁵	0.01241	8.64 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-362	1	2.28 x 10 ⁵	2.04 x 10 ⁻³	8.96 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-2045	1	1.43 x 10 ⁵	1.97 x 10 ⁻³	1.38 x 10 ⁻⁸
NGAL 1-269	1	4.08 x 10 ⁵	5.87 x 10 ⁻³	1.44 x 10 ⁻⁸
NGAL 1-986	2	2.91 x 10 ⁵	2.44 x 10 ⁻⁴	8.40 x 10 ⁻¹⁰
NGAL 1-902	2	2.90 x 10 ⁵	2.68 x 10 ⁻⁴	9.23 x 10 ⁻¹⁰
NGAL 1-903	2	2.69 x 10 ⁵	2.72 x 10 ⁻⁴	1.01 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-1026	2	2.73 x 10 ⁵	2.76 x 10 ⁻⁴	1.01 x 10 ⁻⁹
HYB 211-02	2	1.10 x 10⁵	1.30 x 10⁻⁴	1.18 x 10⁻⁹
NGAL 1-2357	2	2.03 x 10 ⁵	2.80 x 10 ⁻⁴	1.38 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-2190	2	7.22 x 10 ⁵	1.10 x 10 ⁻³	1.52 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-205	2	3.92 x 10 ⁵	6.71 x 10 ⁻⁴	1.71 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-174	2	6.16 x 10 ⁵	1.51 x 10 ⁻³	2.45 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-2080	2	1.28 x 10 ⁵	6.35 x 10 ⁻⁴	4.96 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-2092	2	1.21 x 10 ⁵	6.29 x 10 ⁻⁴	5.20 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-1826	2	3.00 x 10 ⁵	6.33 x 10 ⁻³	2.11 x 10 ⁻⁸
NGAL 1-1732	3	2.35 x 10 ⁵	1.77 x 10 ⁻⁴	7.51 x 10 ⁻¹⁰
NGAL 1-1427	3	1.71 x 10 ⁵	1.37 x 10 ⁻⁴	8.02 x 10 ⁻¹⁰
NGAL 1-281	3	2.63 x 10 ⁵	2.76 x 10 ⁻⁴	1.05 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-2302	3	2.71 x 10 ⁵	2.99 x 10 ⁻⁴	1.10 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-2314	3	2.86 x 10 ⁵	3.15 x 10 ⁻⁴	1.10 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-1090	3	2.72 x 10 ⁵	3.20 x 10 ⁻⁴	1.18 x 10 ⁻⁹
NGAL 1-1034	3	1.94 x 10 ⁵	3.87 x 10 ⁻⁴	1.99 x 10 ⁻⁹

10

20

30

40

NGAL 1-1136	3	1.94×10^5	4.24×10^{-4}	2.18×10^{-9}
NGAL 1-1148	3	1.88×10^5	4.18×10^{-4}	2.22×10^{-9}
NGAL 1-505	3	4.25×10^5	1.03×10^{-3}	2.42×10^{-9}
NGAL 1-141	3	1.09×10^6	0.00265	2.43×10^{-9}
NGAL 1-831	3	2.25×10^5	8.86×10^{-4}	3.94×10^{-9}
NGAL 1-652	3	2.47×10^5	9.94×10^{-4}	4.03×10^{-9}
NGAL 1-936	3	2.13×10^5	8.91×10^{-4}	4.19×10^{-9}
NGAL 1-1552	3	1.43×10^6	6.04×10^{-3}	4.24×10^{-9}
NGAL 1-280	3	2.52×10^5	1.21×10^{-3}	4.81×10^{-9}
NGAL 1-289	3	1.96×10^5	9.63×10^{-4}	4.91×10^{-9}
NGAL 1-406	3	3.15×10^6	0.01712	5.43×10^{-9}
NGAL 1-1947	3	1.15×10^5	6.69×10^{-4}	5.84×10^{-9}
NGAL 1-2389	3	1.59×10^5	1.06×10^{-3}	6.70×10^{-9}
NGAL 1-2405	3	1.41×10^5	9.57×10^{-4}	6.77×10^{-9}
NGAL 1-1959	3	1.99×10^5	1.41×10^{-3}	7.07×10^{-9}
NGAL 1-438	3	1.83×10^5	1.29×10^{-3}	7.09×10^{-9}
NGAL 1-277	3	1.35×10^5	1.09×10^{-3}	8.11×10^{-9}
NGAL 1-469	3	1.30×10^5	1.09×10^{-3}	8.41×10^{-9}
NGAL 1-1684	3	1.37×10^5	1.18×10^{-3}	8.57×10^{-9}
NGAL 1-1118	3	3.99×10^5	3.91×10^{-3}	9.80×10^{-9}
NGAL 1-1167	3	6.29×10^5	6.32×10^{-3}	1.01×10^{-8}
NGAL 1-2444	3	2.32×10^5	2.64×10^{-3}	1.14×10^{-8}
NGAL 1-1716	3	1.27×10^5	1.46×10^{-3}	1.15×10^{-8}
NGAL 1-1733	3	4.66×10^5	6.09×10^{-3}	1.31×10^{-8}
HYB 211-05	3	3.00×10^4	7.80×10^{-4}	2.60×10^{-8}
NGAL 1-419	3	3.15×10^5	0.01284	4.08×10^{-8}

10

20

30

40

50

【 0 1 9 2 】

NGAL上に異なる別個の結合エピトープを有することが知られている、HYB 211-01、HYB 211-02又はHYB 211-05として知られた3つの市販のモノクローナル抗体のうちの一つにNGALが予め複合体を形成している場合に、各NGALハイブリッドmAbがmAb-抗原-mAbサンドイッチを完了する能力を測定することによって、NGAL結合エピトープ群を決定した。簡潔に述べれば、上記親和性アッセイにおけるように、Fc捕捉バイオセンサー及び走行緩衝液の同じ種類を用いて、各フローセル上に、3つの社外販売業者のmAbのそれぞれ12 μ Lを搭載する前に、5 μ L/分で2分間、チップを走行緩衝液と平衡化させる。1つのフローセルはブランクとし、参照として使用する。走行緩衝液を用いてフロー細胞を2分間洗浄し、次いで、マウスIgGの高度に濃縮された溶液10 μ Lを用いて、全ての空のFc捕捉部位をブロックする。1 μ M NGAL又は走行緩衝液のみの何れか15 μ L上に浮遊させる前に、チップをさらに2分間平衡化させる。さらに2分の温置をもう一度行った後、NGALハイブリッド上清15 μ Lをバイオセンサー表面上に浮遊させる。

【 0 1 9 3 】

走行緩衝液のみを表面上に注射したときと比べて、NGALの存在下で、NGALハイブリッドmAbが有意なシグナルを生成する場合、そのNGALハイブリッドmAbは、市販のmAbとのmAb-抗原-mAbサンドイッチを形成することができる。NGALハイブリッドは、社外販売業者のmAbとサンドイッチを形成する能力に基づいて、3つの異なるエピトープ群にグループ分けされた。mAbがNGALと上手くサンドイッチを形成した場合、陽性のスコアを与え、ペアを成すmAbがNGALへ同時に結合できるという証拠と考えた。各エピトープ群は、2つの他の群の何れかとサンドイッチを形成する

ことができるが、それ自身の群の要素とは形成できない。(下表6参照)。

【0194】

【表8】

表6

エピトープ群1	エピトープ群2	エピトープ群3
HYB211-01	HYB211-02	HYB211-05
1-2322	1-903	1-419
1-181		

10

【0195】

NGALハイブリッドは、Biacore阻害データ及び速度論的スクリーニングに基づいて、相対的に順位付けられる。ハイブリッド1-903及び1-2322は、改善された相対的親和性で、2つの明確に異なるNGALエピトープに結合したので、さらなる評価のために選択した。細胞株を安定化させ、混合された細胞集団が確実に存在しないようにするためのクローニングのために、これらのハイブリッドを選択した。

【0196】

半固体組織培地中で細胞を増殖させ、ClonepixFL装置(Genetix Ltd., Hampshire, UK)を用いた継代培養のためにコロニーを取り出すことによって、ハイブリッド1-903をクローニングした。簡潔に述べれば、10% FBSが補充されたHSFMの2倍濃度及びCloneMatrixメチルセルロース培地(Genetix Ltd., Hampshire, UK)の等容量中に、ハイブリッド細胞懸濁液を希釈した。半固体細胞懸濁液を組織培養プレート中に播種し、37で約7日間温置した。細胞播種の時点で、ヤギ抗マウスIgG-FITC溶液の5µg/mL溶液(Clone Detect, Genetix Ltd., Hampshire, UK)を半固体培地に添加した。増殖を開始した単一の細胞が移動され、他の細胞と混合することはなかったため、半固体培地中で増殖されたコロニーは、クローンであると考えられる。コロニーによって産生されている抗体と蛍光を発するヤギ抗マウスIgG-Fc-FITCとの間で免疫沈降反応が起こる。蛍光が明るいほど、より多くの抗体がコロニーによって産生される。

20

30

【0197】

ClonepixFL上の蛍光に関してコロニーを分析し(図6参照)、10% FBSを加えたHSFMを含有する96ウェル組織培養プレートへの自動化された転移のために、最も強いシグナルを有するコロニーを選択した。これらのプレートを7から10日間温置し、上に先述されているように、抗NGAL力価に関してクローン上清を検査した。さらなる評価のために、クローン1-903-102を選択した。FBSを加えないHSFMにこの細胞株を引き離し、上記半固体培地を用いてサブクローニングした。大規模化及び細胞バンクへの保管の目的で、細胞株1-903-430も選択した。細胞バンクの長期間保存のために、液体窒素凍結装置を使用する。要約すると、抗NGAL mAbハイブリッド1-903-102は、サブクローン1-903-430が由来した親クローンである。

40

【0198】

限界希釈によるクローニングのために、ハイブリッド1-2322を選択した。簡潔に述べると、10% FBSを含有するHSFM中にハイブリッド細胞を系列希釈し、96ウェル組織培養プレート中に播種した。集密的な増殖が明白になるまで、これらのプレートを温置した。上に先述されているように、抗NGAL力価に関して、クローン上清を検査した(図7参照)。さらなる評価のために、クローン1-2322-101を選択し、増殖のために、FBSを加えないHSFM中に引き離した。上記半固体培地を用いて、この細胞株をサブクローニングした。大規模化及び細胞バンクへの保管の目的のために、細胞株

50

1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 を選択した。細胞バンクの長期間保存のために、液体窒素凍結装置を使用する。要約すると、抗 N G A L m A b ハイブリッド 1 - 2 3 2 2 - 1 0 1 は、サブクローン 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 が由来した親クローンである。

【実施例 2】

【0199】

抗体の性質決定

I s o s t r i p M o u s e M o n o c l o n a l A n t i b o d y I s o t y p i n g K i t (R o c h e D i a g n o s t i c s , B a s e l , S w i t z e r l a n d) を用いて、1 - 9 0 3 - 4 3 0 及び 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 細胞株の各々から精製された抗体を検査した。各試料に対して $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の分取試料 $150 \mu\text{L}$ を発色チューブに添加し、混合した。各チューブに I s o s t r i p を加え、細片のバンド上で発色するまで、5 から 10 分間温置した。結果は、1 - 9 0 3 - 4 3 0 及び 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 の何れもが 軽鎖を有するマウス I g G 1 サブタイプであることを示唆した。

10

【実施例 3】

【0200】

抗体産生及び精製

1 - 9 0 3 - 4 3 0 及び 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 細胞株を H S F M 中で増殖させ、約 0.5×10^5 細胞 / mL で、ローラー瓶の中に播種した。約 1 回転 / 分で回転させながら、10 から 14 日間又は最終の終末培養が得られるまで、37 で培養物を温置した。最終ローラー瓶の上清を採集し、 $0.45 \mu\text{M}$ フィルターで清澄化した。P e l l i c o n システムを用いて、清澄化された上清を濃縮し、 $0.45 \mu\text{M}$ フィルターを用いてろ過した。p H 8 . 9 の 1.5 M グリシン / 3 NaCl 緩衝液の等容量を用いて、m A b 濃縮物を希釈し、次いで、A K T A 自動化精製システム (A m e r s h a m / P h a r m a c i a) を用いて、予め平衡化された 5 mL のプロテイン A カラム上に搭載した。次いで、結合緩衝液の 5 mL カラム容量を用いて、カラムを洗浄し、安定なベースラインが達成された時点で、p H 3 . 0 のクエン酸緩衝液を用いて、m A b を溶出した。次いで、P B S 中への交換のために、G 2 5 カラム 70 mL に m A b を移した。抗体を分取し、- 70 で保存した。

20

【実施例 4】

【0201】

抗体結合親和性

S a p i d y n e I n s t r u m e n t s (B o i s e , I d a h o) から入手可能な K i n e t i c E x c l u s i o n A s s a y (K i n E x A ^(R)) を用いて、抗 N G A L 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 及び 1 - 9 0 3 - 4 3 0 m A b の両方に対する平衡解離定数を測定した (D a r l i n g a n d B r a u l t , A s s a y a n d D r u g D e v e l o p m e n t T e c h n o l o g i e s , 2 (6) : 6 4 7 - 6 5 7 (2 0 0 4) 参照)。I g G 抗体 (1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 又は 1 - 9 0 3 - 4 3 0) の一定量をヒト N G A L 抗原の様々な濃度 ($5 \times 10^{-8} \text{ M}$ から 10^{-12} M) とともに温置し、試料採取前に、平衡化に到達させた (3 から 8 時間)。固相ポリメチルメタクリレート (P M M A) ビーズ上に固定化されたヒト N G A L 上に抗体 / ヒト N G A L 反応混合物を注射することによって、遊離の結合部位の量を測定した。続いて、蛍光性 C Y 5 が連結されたヤギ抗マウスポリクローナル抗体 (G A M - C y 5) を用いて、ヒト N G A L によって被覆されたビーズに結合された遊離の抗 N G A L 抗体を検出した。結合された G A M - C y 5 の程度は、ヒト N G A L によって被覆されたビーズに結合された抗 N G A L I g G の量に比例した。製造業者 (S a p i d y n e I n s t r u m e n t s , B o i s e , I d a h o) によって提供されたソフトウェアを用いて、反応試料中に存在する抗原の量に対して、遊離の結合部位の量を分析することによって、 K_D を求めた。実験は、P B S、p H 7 . 4 及び 1 % B S A 反応希釈剤中で行った。N G A L 野生型抗原及び N G A L 変異体 C 8 7 S 抗原に対する抗 N G A L 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 I g G 及び 1 - 9 0

30

40

50

3 - 430 IgGの K_D が、下表7に報告されている。

【0202】

【表9】

表7

	野生型 NGALrAg (CHO クローン#62)	変異体 C87S NGALrAg (CHO 細胞クローン#734)
1-903-430	$3.2 \times 10^{-10}M$	$1.1 \times 10^{-9}M$
1-2322-455	$2.4 \times 10^{-11}M$	$2.3 \times 10^{-11}M$

10

【0203】

KinExAによって測定された親和性の結果は、モノクローナル抗体1-2322-455が野生型NGAL及び変異体C87SNGALの両方に対して同じ親和性を有することを示した。モノクローナル抗体1-903-430は、変異体C87SNGAL抗原の親和性より高い親和性を野生型NGAL抗原に対して有する。

【実施例5】

【0204】

精製された抗体の能力

この実験の目的は、化学発光アッセイフォーマット中でサンドイッチを形成する能力に関してクローンを検査することであった。PBS中、 $2 \mu g/mL$ で、白色の96ウェルマイクロタイターイムノアッセイプレート上に、ヤギ抗マウスIgG Fcを被覆した。捕捉試薬が固相上に被覆された後、捕捉試薬を除去し、PBS溶液中の2% Fishゲルを用いて、プレート上の全ての開放された結合部位をブロックした。次いで、ブロック溶液を洗浄除去し、mAb 1-2322-101からの精製された抗体をPBS中に $1 \mu g/mL$ で添加し、室温で1時間温置した。この温置後、水でプレートを洗浄し、CHO細胞中で産生されたNGALrAgを、PBS中に、0から $100 ng/mL$ までlog2系列希釈でプレートに添加し、室温で1時間温置した。この温置後、水でプレートを洗浄し、二次mAb試薬を添加する前に、未結合のヤギ抗マウスIgG Fc捕捉抗体を占拠させるために、FishGelブロック中の1%正常マウス溶液で再びブロッキングした。このブロッキングの後、プレートを洗浄し、アクリジニウム標識された二次モノクローナル試薬を、ブロック溶液中に、 250 から $500 ng/mL$ で添加した。室温で30分間、二次mAbを温置し、次いで、水で洗浄した。Architect Pre-trigger Solution (Abbott No. 6E23-65)及びArchitect Trigger Solution (Abbott No. 6C55-60)がその中に添加されているWallac Microbeta Jet Instrument (Perkin Elmer, Waltham MA)上で、アッセイシグナルを読み取り、発光カウント/秒(LCPS)でフラッシュ化学発光を測定する。

20

30

【0205】

図8は、抗原滴定曲線のグラフ化を示し、1-2322-101捕捉された抗体はこのアッセイにおいて検査されたエピトープ群1(すなわち、HYB211-01及び1-181-128)の2つの他の要素とサンドイッチを形成しないことを示す。

40

【0206】

mAb 1-2322-101は、エピトープ群2(すなわち、1-903-102及びHYB211-02)及びエピトープ群3(すなわち、1-419-182)の要素と首尾よくサンドイッチを形成することができる。このデータは、BIACore阻害エピトープグループ分けアッセイを用いて、ハイブリッド段階で同定されたエピトープのグループ分けを確認する。このデータは、二次抗体1-903-102とともに使用された捕捉mAb 1-2322-101が最良の抗体対であったことも示唆する。

【実施例6】

50

【0207】

抗体の配列決定

この実験の目的は、NGALmAb1-903-430可変遺伝子配列及びNGALmAb1-2322-455可変遺伝子配列を決定することであった。

【0208】

製造業者の推奨に従って、市販の試薬(Oligotex direct mRNA kit, Qiagen)を用いて、適切なハイブリドーマ細胞培養物からmRNAを抽出した。標準的なプロトコールに従って、それぞれ、市販のマウスIgプライマーMuIgGVH3'-2及びMuIgkVL3'-1(Mouse Ig-Primer set, Novagen)を用いて、抽出されたmRNAからIgG重鎖cDNA及び軽鎖cDNAを作製した。次いで、標準的な方法を用いて、上記されている同じ市販のマウスIgプライマーキットからのIgG及びIg 特異的プライマーのプールを用いて、それぞれのcDNAから、可変重(VH)及び可変軽(VL)遺伝子をPCR増幅した。製造業者の指示に従って、市販のベクター(pCR2.1-TOPO cloning kit, QIAGEN, Valencia, CA)中に、増幅されたVH及びVLP CR産物をクローニングし、イー・コリ中に形質転換した。VH及びVL遺伝子配列を同定するために、複数の形質転換されたイー・コリコロニーから単離されたプラスミドに対して、配列分析を行った(BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit, Applied Biosystems, Foster City, CA)。

10

20

【0209】

NGALmAb1-2322-455及び1-903-430可変遺伝子及びポリペプチド配列が、図9AからB及び10AからB並びに配列番号17及び21(mAb1-903-430に対して)並びに配列番号7及び11(mAb1-2322-455に対して)に示されている。

【実施例7】

【0210】

mAb結合のためにエネルギー的に重要なNGAL残基の同定

抗NGALモノクローナル抗体は、NGALの概ね完全長を包含する約10から20残基長の一連の直鎖配列に対して反応性を示さなかった。このことは、抗NGAL1-903-430及び1-2322-455mAb系統が立体構造的エピトープ又は不連続なエピトープに反応したことを示唆する。従って、抗NGALmAbの群との相互作用によって重要な残基を決定するために、変異されていない(野生型(「WT」))NGAL抗原及び酵母接合タンパク質AGA2への融合物として酵母表面上のNGAL抗原のライブラリーを発現させるために、酵母ディスプレイ系を使用した(Boder and Witttrup, Nature Biotechnology, 15:553-557(June 1997)参照)。プライマーNGALpYD41for及びNGALpYD41revを用いて、野生型NGAL抗原DNAコード配列をPCR増幅し、標準的な分子生物学技術を用いて、酵母ディスプレイベクターpYD1(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)中にクローニングした。pYD1ベクターは、ガラクトース誘導性プロモーター、C末端V5エピトープタグ並びに、それぞれ、EBY100及びイー・コリ選択のためのトリプトファン及びアンピシリンマーカを含む。プライマーは、以下のとおりである。

30

40

NGALpYD41for:

【0211】

【化1】

CAGCCGGCCATGGCCCAGGACTCCACCTCAGAC (SEQ ID NO:25).

NGALpYD41 rev:

【0212】

50

【化2】

CTCTAGACTCGAGGCCGTCGATACTGGTCGATTG (SEQ ID NO:26).

【0213】

プライマー pYD41for 及び pYD41rev を用いて、製造業者の指示に従い、Genemorph II 無作為突然変異導入キット (Stratagene, La Jolla, CA) を用いる変異誘発条件下で、野生型 NGAL 抗原 DNA コード配列を増幅することによって、NGAL 中に無作為な変異を含有するライブラリーを作製した。これらのプライマーは、以下のとおりである。

pYD41for :

【0214】

【化3】

TAGCATGACTGGTGGACAGC (SEQ ID NO:27).

pYD41rev :

【0215】

【化4】

CGTAGAATCGAGACCGAG (SEQ ID NO:28).

【0216】

記載されているように (Schiestl and Gietz, Current Genetics, 16 (5-6) : 339-46 (Dec 1989))、酵母中に形質転換した後、内在性の相対的組換え系を用いて、得られたレポーターを直鎖化された pYD1 酵母ディスプレイベクター中に挿入した。再構成されたベクター上に存在する栄養要求性トリプトファンマーカを用いて、形質転換された酵母細胞を選択的に回収した。変異体ライブラリーは、178 残基の NGALrAg の各位置での全てのアミノ酸の置換の可能な数より二桁超高い 5×10^6 の多様な要素を含有していた。

【0217】

NGAL 抗原発現のために誘導された変異体ライブラリーは、抗 NGAL mAb の群 (1-2322-101 及び 1-903-102) を用いる、「Chao et al., J. Mol. Biol., 342 : 539-550 (2004)」に記載されているような蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) の連続する繰り返しのための最初のプールであった。抗 NGAL mAb 1-2322-101 及び 1-903-102 は、それぞれ、抗 NGAL サブクローン 1-2322-455 及び 1-903-430 が得られた親クローンである。一次 NGAL mAb とともに細胞を温置し、洗浄し、フィコエリトリン (GaM-PE) と連結されたヤギ抗マウスポリクローナル抗体を用いて、細胞表面に結合された残りの mAb を検出した。選択の各巡において、特定の抗 NGAL mAb によって結合され得る能力を破壊した変異を含有する完全長クローンを、結合相互作用を変化させなかった変異を含有するクローンから選択的に濃縮した。mAb 結合の喪失をもたらす変異の位置を特定するために、各 mAb 選択から単離された多数の各クローンを配列決定した。次いで、NGAL 抗原の立体構造を全体的に破壊する明白な変異を除去するために、溶媒が接近可能な表面領域に従って、変異体残基のリストを篩にかけた (下表 8 参照)。

【0218】

10

20

30

40

【表 10】

表 8

NGAL mAb 1-2322-101	NGAL mAb 1-903-102
S112N	K15N K15M K15Q K15T K15E
Q117P Q117L	R109Q R109L
H118P	S158F
A119D	L159P
E147K E147V E147G	G160V, D, C

10

【0219】

20

各 NGAL mAb サブクローンの機能的エピトープ（直接接触残基）を確認するために、アラニンへの部位指定突然変異導入によって、エピトープ選択から同定された NGAL rAg 残基の各々の側鎖を変化させた。酵母細胞表面上に、各 NGAL rAg アラニン変異体を発現させ、各 NGAL mAb の滴定後に (5×10^{-6} M から 1×10^{-11} M)、結合の量を測定することによって、親和性を測定した。簡潔に述べれば、室温で4時間から一晩、一次 NGAL mAb (1-2322-455 又は 1-903-430) とともに室温を温置し、洗浄し、フローサイトメトリーアッセイを用いて、フィコエリトリンが連結されたヤギ抗マウスポリクローナル抗体 (GaM-PE) を用いて、細胞表面上の抗原に結合されたままの mAb を検出した。

【0220】

30

親和性は、以下の式 [1] を用いて計算した。

【0221】

【数 1】

$$F = F_{\max} (L_F / (K_D + L_F)) + B \quad [1]$$

(F は抗原結合チャンネル中の観察された平均蛍光強度 (「観察された蛍光」) であり、 F_{\max} は飽和された mAb 結合での蛍光の量、 L_F は遊離のリガンド濃度であり、 K_D は平衡解離定数であり、及び B はバックグラウンド蛍光である。)

40

【0222】

mAb 結合に対する各アラニン置換のエネルギー的影響を評価するために、Gibbs の自由結合エネルギーの変化 ($\Delta\Delta G_{Ala-WT}$) を測定した。以下の式 [2] を用いて、アラニン置換時の Gibbs の自由結合エネルギーの変化を計算した。

【0223】

【数 2】

$$\Delta\Delta G_{Ala-WT} = RT \ln(K_{D,Ala} / K_{D,WT}) \quad [2]$$

(R は気体定数 (1.9872×10^{-3} kcal / M · Kelvin) であり、T は

50

温度であり (2 9 7 ° K e l v i n) であり、 $K_{D, Ala}$ 及び $K_{D, WT}$ は、それぞれ、変異体及び野生型抗原に対する平衡解離定数である。))

【 0 2 2 4 】

これらの実験に関して、式 [1] を用いて K_D を求めるために、観察された蛍光 (F) を使用した。次いで、アラニン置換の際の $G i b b s$ の自由結合エネルギーの変化を求めるために、式 [1] に由来する K_D を式 [2] において使用した。接触残基を求めるためのデータとして使用されたエピトープマッピング結合等温式が、図 1 1 及び図 1 2 に示されている。 K_D は、変曲点で曲線の各々の横軸から読み取られる。

【 0 2 2 5 】

1 kcal / mole 以上のデルタデルタ G_{Ala-WT} 値を有する残基を有意と考え、下表 9 に太字で列記されている。

10

【 0 2 2 6 】

【 表 1 1 】

表 9

クローン	K_D (M)	ΔK_D	$\Delta \Delta G_{Ala-WT}$ (kcal/モル)
mAb 1-2322-455:			
WT	8.10×10^{-12}	1.00	0.00
S112A	7.93×10^{-11}	9.79	1.35
Q117A	3.07×10^{-11}	3.79	0.79
H118A	1.14×10^{-11}	14.07	1.56
A119G	7.83×10^{-12}	0.97	-0.02
E147A	4.92×10^{-7}	6.1×10^4	6.50
mAb 1-903-430:			
WT	2.04×10^{-10}	1.00	0.00
S14A	2.81×10^{-10}	1.38	0.19
K15A*	5.00×10^{-6}	2.45×10^4	5.97
R109A*	5.00×10^{-6}	2.45×10^4	5.97
S158A	2.42×10^{-10}	1.19	0.1
L159A	1.37×10^{-11}	0.67	-0.23
G160A	1.64×10^{-10}	0.8	-0.13

20

30

* 検査された最高の mAb 力価濃度を K_D 値として列記した

【 0 2 2 7 】

表 9 から明らかなように、抗 N G A L m A b 1 - 2 3 2 2 - 4 5 5 は、セリン (S , S e r) 1 1 2、ヒスチジン (H , H i s) 1 1 8 及びグルタミン酸 (E , G l u) 1 4 7 残基に直接接触する。抗 N G A L 1 - 9 0 3 - 4 3 0 は、リジン (K , L y s) 1 5 及びアルギニン (R , A r g) 1 0 9 側鎖に直接接触する。これらの残基の何れかをアラニンに変化させる (及びこれらの側鎖を除去する) ことによって結合が喪失するので、抗 N G A L 1 - 9 0 3 - 4 3 0 認識のために、これらの残基の両方が必要とされる。ヒト N G A L の X 線結晶構造上の m A b 結合変異のために不可欠なアミノ酸残基 (P D B 1 Q Q S) の分子モデル化が、図 1 3 に示されている。ヒト N G A L との抗体結合において重要であるとして図 1 3 に強調表示され及び本実施例に記載されている部位指定突然変異導入によって同定された残基も、以下の実施例に記載されているように、NMR を用いて同定されたことには注目する価値がある。

40

50

【実施例 8】

【0228】

NMRを用いた抗体相互作用の性質決定

イー・コリ中でのヒトNGALの発現

それぞれ、5'及び3'末端に、EcoRI及びBamHI部位を有するように、成熟ヒトNGALタンパク質(配列番号33)をコードするポリペプチド配列を設計した。開始コドンがベクターによって供給されるシャイン・ダルガルノ配列の開始から最適な距離の下流に位置するように(典型的には、12から14塩基)、所望の配列のすぐ上流に、開始コドンをインフレームに挿入した。開始コドンの後に、設計された配列は、成熟NGALタンパク質(シグナルペプチドなし(配列番号33参照))に加えて、6ヒスチジンのC末端配列をコードする。この配列は、イー・コリ中での高レベル発現に対してコドン最適化された。NGALタンパク質の一部をコードし、相補的な重複する末端を含有するオリゴヌクレオチドを徐冷し、末端を充填し、二段階PCRプロセスにおいて、得られた組み立てられた産物を増幅した。第一のPCR工程において、5'-クロニング部位(EcoRI)及びC末端ヒスチジntagの一部をコードする配列を組み立てられた遺伝子の末端に導入し、第二のPCR工程において、ヒスチジntagをコードする配列の残りが取り込まれ、その後に停止コドンが続いた。増幅された産物を精製し、EcoRI及びBamHIを用いて消化し、同様に消化されたpKRR826ベクター(非融合産物を生成するpLを基礎とする発現ベクター、例えば、米国特許第5,922,533号に記載されている。)中に連結した。イー・コリのプロテアーゼ欠損BL21系統中に、連結産物を形質転換した。アンピシリン耐性によって、クローンを選択した。設計されたヒトNGAL配列を有するクローン(NGAL(+))1と称された。)が確認された。

10

20

【0229】

発現されたNGALがジスルフィド結合された二量体を形成する可能性を最小限に抑えるために、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene, Cedar Creek, TX)(配列番号29及び30並びに図14参照)を用いて、クローンNGAL(+))1のアミノ酸87をCys残基からSer残基に変化させた。変異されたプラスミドの配列を確認し(配列番号29に記載されており、残基-1にMetをコードする変異を受けたNGALポリヌクレオチド配列)、得られたプラスミド(NGAL(+))mut8と称される。)をプロテアーゼ欠損イー・コリ株BL2-21(Amersham Pharmacia Biotech(ApBiotech), Uppsala, Sweden, 現在GE Healthcare)中に形質転換した。

30

【0230】

0.55のOD₅₉₅に達するまで、細胞を30で増殖させ、この時点で、発現を誘導するために温度を42にシフトさせた。42での誘導の3時間後、遠心によって細胞を採集し、BugBuster Extraction Reagent(Novagen, Madison, WI)を用いて、沈降された細胞を溶解した。発現されたNGALは可溶化液の可溶性画分中に存在し、His-Bind^(R)Purification Kit(Novagen, Madison, WI)を用いて精製し、0.15M NaCl(PBS)を含有する0.01Mリン酸緩衝液、pH7.4中に透析した。

40

【0231】

NMR研究用の同位体標識されたNGALの調製

本明細書に先述されているように、イー・コリ株BL21中でタンパク質を発現させることによって、ヒトNGALタンパク質を調製した。100%²H₂Oを含有する市販のリッチ培地(Cambridge Isotope Laboratories(CIL), Andover, MA)中で細胞を増殖させることによって、²Hバックグラウンド中の均一に¹⁵N標識されたヒトNGAL試料を調製した。U-¹³C-グルコース(3g/L, Cambridge Isotope Laboratories(CIL), Andover, MA)及び¹⁵NH₄Cl(1g/L, Cambrid

50

ge Isotope Laboratories (CIL), Andover, MA) を用いて、均一に ^{13}C , ^{15}N 標識された試料を M9 培地上で調製し、 H_2O 及び $10\ \mu\text{M FeSO}_4$ を添加した。本明細書に先述されているように、可溶性タンパク質を精製した。

【0232】

モノクローナル抗体 (mAb 2322、mAb 809、mAb 269、mAb 181 及び mAb 903) からの Fab 断片の調製

選択されたハイブリドーマを大規模化し、rProteinA-Poros A50 カラムを用いて、組織培地からモノクローナル抗体を単離した。さらなる研究のために、6つのモノクローナル抗体、すなわち、mAb 2322、mAb 809、mAb 269、mAb 181 及び mAb 903 を選択した。

10

【0233】

以下のように、一般的な消化プロトコールを用いて、パパインでの IgG 抗体の限定的消化によって、Fab 断片を調製した。簡潔に述べると、 $1\ \text{mM}$ ジチオスレイトール (DTT) 及び $1\ \text{mM}$ EDTA の存在下で、 $100:1$ (w/w) の IgG / パパイン比で固定化されたパパイン (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) と、PBS 中の 2 から $6\ \text{mg/mL}$ の濃度範囲の抗体を混合し、室温で回転装置の上に置いた。Tosho K3433 G2000 SWx IHP LC カラム上で、 30 分又は 60 分ごとに、試料を走行させることによって、消化をモニターした。完了後、遠心によって、固定化された酵素を除去し、消化されていない IgG 及び Fc 断片を吸収させるために、rProteinA-Poros A50 カラムに試料を通過させた。濃縮後、PBS に対して Fab 断片を透析した。PAGE 及び HPLC によって、 80% より高い Fab 断片の純度が確認された (図 15 参照)。Fab 調製物中の何れの不純物も 5% を超えなかった。

20

【0234】

NMR 実験 (NGAL 共鳴のアサインメント)

NMR 試料は、 $90\% \text{H}_2\text{O} / 10\% ^2\text{H}_2\text{O}$ 中に、 0.15 から $0.50\ \text{mM}$ の標識されたタンパク質を含有した。ヒト NGAL に対するタンパク質共鳴のアサインメントは、公開データベース Biological Magnetic Resonance Data Bank (データベースエントリ-4267; http://www.bmrb.wisc.edu/data/library__gen__saveframe) から得られた (Coles, M., et al., J Mol Biol 289: 139-57 (1999) 参照)。本実施例で使用した構築物は C87S 置換を有するが、その他の点では、「Coles, M., et al., J Mol Biol 289: 139-57 (1999)」に記載されている研究において使用されたものと同じである。3DHNCA (Yamazaki, T., et al., J. Am. Chem. Soc. 116, 11655-11666 (1994) 参照) 実験及び $3\text{D } ^1\text{H} / ^{15}\text{N}$ 分解された NOESY (Fesik, S.W., et al., J. Magn. Reson. 78, 588-593 (1988) 参照) スペクトルを取得し、公開されたアサインメントと比較した (Coles, M., et al., J Mol Biol 289: 139-57 (1999) 参照)。C87S 変異に隣接する残基を除き、アサインメントに著しい差は観察されなかった。アサインメントは、 $\text{pH } 6.0$ の $50\ \text{mM}$ 酢酸ナトリウム緩衝液中の $500\ \mu\text{M}$ ヒト NGAL からなる試料を用いて行った。全ての NMR スペクトルは、Bruker DRX 600 又は DRX 800 NMR 分光光度計上で、 25°C で収集した。

30

40

【0235】

NMR 実験 (結合によって誘導されたシフト)

ヒト NGAL - Fab 複合体は $150\ \mu\text{M}$ 同位体標識されたヒト NGAL を含有し、6つの mAb の各々から得られた非標識 Fab 断片 $200\ \mu\text{M}$ を研究した。 ^{15}N , ^2H 標識された NGAL の $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ - TROSY HSQC (Pervushin, K.,

50

et al., Proc Natl Acad Sci USA 94, 12366-71 (1997)及び Shimada, I, Methods Enzymol 394, 483-506 (2005)参照)スペクトル又は ^1H - ^1H 標識されたヒトNGAL単独及びNGAL-Fab複合体中の ^1H - ^1H CHSQC (Bodenhausen, G, et al., Chem. Phys. Lett. 69, 185-188 (1980)参照)を比較することによって、化学シフト又はピーク幅の増大をモニターした。抗体結合によって共鳴の擾乱が最低限であった場合に、化学的シフトの変化又は相対的な幅の増大は「変化なし」と分類され、又はスペクトルの変化の大きさに応じて、「中」若しくは「大きな」擾乱と分類した。これらの擾乱の例は、mAb 2322の添加後、ヒトNGALに対して図16に示されている。

10

【0236】

NMRの結果及び考察

NMRは、タンパク質-タンパク質相互作用の接触残基又はエピトープの決定を可能にする方法である (Shimada, I, Methods Enzymol., 394:483-506 (2005), Clarkson, J., et al., Biochem Soc Trans., 31:1006-9 (2003), Foster, M.P., et al., Biochemistry, 46:331-40 (2007), Zuiderweg, E.R., Biochemistry, 41:1-7 (2002), Betz, S.F., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 95:7909-7914 (1998)参照)。この方法は、タンパク質配列中で連続していないが、タンパク質の折り畳みのために近接している接触残基(いわゆる、「不連続」又は「立体構造的」エピトープ)を同定することができる。NMRスペクトルは、固有の抗原-抗体相互作用を反映し、接触の極めて強固な指標である。

20

【0237】

図16は、ヒトNGAL及びヒトNGAL/抗体mAb 2322複合体の ^1H - ^1H NTROSYHSQCスペクトルの一部を示す (Shimada, I, Methods Enzymol, 394:483-506 (2005)及び Fernandez, C, et al., Curr Opin Struct Biol, 13:570-80 (2003)参照)。図16は、複合体のスペクトル(太い灰色の線)中の共鳴の多くが、遊離のタンパク質のスペクトル(細い黒線)の共鳴位置上にほぼ正確に重なることを示している。これらのヒトNGAL共鳴は、抗体結合によって著しい影響を受けない。一例が図16中の93Tであり、位置の著しいスペクトル変化を示さず、従って、抗体接触部位から遠いと推測される (Shimada, I, Methods Enzymol, 394:483-506 (2005), Clarkson, J., et al., Biochem Soc Trans., 31:1006-9 (2003), Foster, M.P., et al., Biochemistry, 46:331-40 (2007), Zuiderweg, E.R., Biochemistry, 41:1-7 (2002)参照)。しかしながら、抗体の存在によって非常に擾乱される115Y及び150Eのような残基は、抗体と直接接触しており(第一の接触殻)、又は直接接触している残基と接触している残基(第二球体接触(second sphere contact))と推定される。これらの接触結果は何れも、NMRによって検出可能なmAb接触のスペクトルのシグナチャをもたらす。残基115、118及び150に対する擾乱を示すこれらのデータは、実施例7中の機能喪失変異データ及び自由エネルギー結合データの変化と合致し、これらを補うものであって、mAb 2322によって残基112、118及び147が直接接触されていることを裏付ける。これらの残基又は付近の残基は、抗体の結合によって擾乱され得ると予想される。

30

40

【0238】

^1H - ^1H NTROSYHSQCスペクトルの他に、側鎖共鳴の擾乱は、特に、 ^1H - ^1H CHSQCスペクトルからのメチル基中において測定することができる。共鳴が重複

50

しているので、 $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ 共鳴のごく一部のみを分析において使用した。 $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ から得られたこの追加のデータは、 $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ TROSY HSQC スペクトルの結果を補い、擾乱された共鳴を有する残基を列記する下表 10 に含まれている。

【 0 2 3 9 】

【表 1 2】

表10. NGAL 骨格(^1H - ^{15}N) NMR スペクトル中の抗体によって誘導された擾乱

アミノ酸 残基／抗体	mAb 2322	mAb 809	mAb 269	mAb 181	mAb 903	mAb 419
15 Lys	2	2	0	2	3	0
22 Phe	0	0	N.D.	N.D.	2	0
24 Asp	0	0	2	N.D.	0	0
26 Gln	0	0	2	0	0	0
29 Gly	0	0	N.D.	0	0	0
38 Gly	0	0	0	0	2	0
52 Tyr	0	0	0	0	N.D.	2
54 Thr	0	0	0	0	0	0
59 Lys	0	0	N.D.	0	0	2
61 Asp	3	3	0	0	0	0
64 Tyr	0	0	0	0	2	2
81 Arg	0	0	0	0	N.D.	2
84 Val	0	0	0	N.D.	1	2
86 Gly	0	0	0	0	2	1
93 Thr	0	0	0	0	2	2
94 Leu	0	0	0	0	2	2
95 Gly	0	0	0	0	2	2
99 Ser	0	0	0	0	3	3
107 Leu	0	0	0	0	0	N.D.
109 Arg	0	0	0	N.D.	N.D.	0
110 Val	0	0	0	0	0	0
111 Val	2	2	0	2	N.D.	N.D.
112 Ser	2	2	2	2	0	0
113 Thr	0	0	N.D.	N.D.	0	0
115 Tyr	2	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
116 Asn	2	2	2	2	0	0
117 Gln	3	3	3	3	3	-0.11
118 His	3	3	3	2	0	0
127 Ser	0	0	0	0	0	0
135 Ile	1	1	0	N.D.	N.D.	N.D.
141 Thr	2	2	2	2	0	0
142 Lys	3	3	2	3	0	0
143 Glu	3	3	2	3	0	0
145 Thr	2	2	2	2	N.D.	0
149 Lys	0	0	0	0	0	0
150 Glu	3	3	2	3	N.D.	0
154 Arg	3	3	N.D.	3	N.D.	0
160 Gly	0	0	0	0	N.D.	0
166 Ile	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

【 0 2 4 0 】

以下の分類に従って、表 1 0 中の擾乱の大きさを順位付けした。

(a) 「測定せず」 - 実験中の共鳴状態が不明瞭であったので、測定されなかった。ピ

50

ークが十分に分割されておらず、擾乱を割り当てることができない。

(b) 「0」 - 変化なし、シフト < 0.2 ppm (1H + 15N)。他のピーク同様に幅が広がっている。

(c) 「1」 - 小さなシフト: 0.5 ppm > シフト > 0.2 ppm (1H + 15N)

。

(d) 「2」 - 大きなシフト。シフト > 0.5 ppm (1H + 15N)。

(e) 「3」 - 幅広い又は大きなシフト、ピークが消失。

(f) 重複したピークは、表 10 に含まれていない。

【0241】

図 17 A に示されているように、mAb 903 結合 (図 17 A) による固有の抗原であるヒト NGAL の共鳴の擾乱を観察することができ、mAb 2322 などの異なる抗体の結合によって観察される擾乱 (図 17 B) と区別することができる。これは、異なる結合界面が特徴的な異なるスペクトル変化をどのように有するかを図解する。このアプローチによって、抗原タンパク質であるヒト NGAL の異なる表面上で相互作用する抗体間の識別が可能とする。

10

【0242】

図 18 A から 18 F は、研究された全ての抗体に対して観察された共鳴変化を要約するグラフを示している。共鳴変化 (縦軸) を配列 (横軸) に対してグラフ化すると、擾乱された共鳴の全てが配列中で連続する残基から得られるわけではないことが明らかである。さらに、プロットは共鳴の同じ組を比較するので、共鳴の擾乱が抗体に関して異なるときに観察することが容易である。このデータの比較から、6つの研究されている mAb を 3つの異なる群に組み合わせることができる。第一の群 (「エピトープ群 1」) には、図 18 A から D に示されている mAb 2322、mAb 809 及び mAb 269 及び mAb 181 が含まれる。残りの 2つの抗体 mAb 903 (図 18 E) 及び mAb 419 (図 18 F) は、明瞭に異なる NMR 共鳴擾乱シグナチャを示し、2つの別個の群、すなわち、群 2 及び群 3 に割り当てられる (すなわち、それぞれ、「エピトープ群 2」及び「エピトープ群 3」)。

20

【0243】

図 19 A から B は、共鳴が擾乱されている残基がタンパク質の三次元構造上にどのようにマッピングされるかを示している。NMR (Coles, M., et al., J Mol Biol, 289:139-57 (1999) 参照) 及び X線結晶学 (Goetz, D.H., et al., Mol Cell, 10:1033-43 (2002) 及び Holmes, M.A., et al., Structure, 13:29-41 (2005) 参照) を用いて、NGAL 三次元構造を決定した。予想通り、抗体結合によってその共鳴が影響を受けたアミノ酸残基は、タンパク質表面上に位置しており、抗体との接触相互作用に関与している可能性がある。これらのアミノ酸残基は、第一球体又は接触残基としばしば定義される。表面上に露出されておらず、タンパク質分子の内部に埋め込まれている所謂第二球体残基も存在する。これらのアミノ酸は、第一球体中の残基の位置決めが必要であり、この微小環境は、抗体と相互作用した際にも擾乱され得る。

30

40

【0244】

その上、これらのアミノ酸残基は、結合エピトープの NMR シグナチャにも寄与する。さらに、抗体と直接接触していないが、結合表面中での結合によって誘導される立体構造の調整のために擾乱された状態となるエピトープの周辺上の残基の共鳴中に擾乱を登録することもしばしば可能である。

【0245】

図 19 A に示されているように、mAb 2322 によって (例えば、下表 11 から、残基 K142 から E150 まで)、ヒト NGAL のその共鳴が擾乱されている残基は全て、タンパク質の 1つの表面上に存在する。これらの残基には、実施例 7 の自由エネルギー結合データの機能喪失変異及び変化によって独立に同定された残基 147 が含まれる。表面

50

上で擾乱された残基は、直接接触球体中に存在する。第二球体中の残基はこれらの残基に接触し、結合による構造的再配置のために、間接的に擾乱される可能性がある。これらの残基は、抗体との相互作用表面を確定するために使用され得る。表面は、タンパク質の折り畳みのために近接している非連続的な残基からなる。従って、抗体は、タンパク質の固有状態に類似する折り畳みを認識する。

【0246】

mAb903結合によって擾乱される残基の対応する位置が、図19Bに示されている。これは、図中に示されているように、mAb2322のものから追放された相互作用表面がタンパク質の底部に位置していることを確定する。2つの接触領域は、重複しておらず、従って、それらを識別するために使用することができるNMR共鳴の擾乱によって確定された相互作用表面を有する。従って、それらがタンパク質の隣接する表面上に位置する場合でさえ、各抗体に特有な接触が存在する。実施例7中の機能喪失変異及び自由エネルギー結合データの変化によって同定された、擾乱された残基L18及びQ88が残基15及び109に近接していることに注目することも意味がある。

【0247】

メチル($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)基スペクトル及びアミド($^1\text{H} - ^{15}\text{N}$)スペクトル中のシフト並びに($^1\text{H} - ^{15}\text{N}$)スペクトルの幅の増大が、以下の表11に要約されている。

【0248】

【表13】

表11

Fab断片	メチルのシフト	アミドのシフト	アミドの幅の拡大
	($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)スペクトル	($^1\text{H} - ^{15}\text{N}$)スペクトル	($^1\text{H} - ^{15}\text{N}$)スペクトル
1-809-174	51, 66, 67 (148), 110, 135	112, 117, 116, 135, 138, 139	15, 111, 114, 115, 118, 141, 142, 143, 145, 150, 154
1-903-102	16, 18, 84, 93, 94, 103, 108, 120, 121	86, 95, 64, 93, 94	88, 18, 84
1-419-182	66, 70, 80, 94, 84, 93	28, 93, 64, 95, 86, 94	62, 99, 59, 81, 80, 63
1-181-150	51, 110, 136, 120 (148)*	117, 116	15, 111, 118, 141, 142, 143, 145, 150, 154
1-269-161	51, 55, 66, 94, 114	118, 117	24, 26, 116, 141, 142, 143, 145, 150
1-2322-455	51, 66, 110, 135, (148)*	112, 116, 117 (135, 138)*	15, 111, 114, 115, 118, 141, 142, 143, 145, 149, 150, 154

*固有のNGAL中の低強度ピーク。シフトしたメチル(暫定的に148に割り当てた。)は、 ^{13}C ppm22.14及び ^1H -0.54ppmである。

【0249】

一般に、本実施例のデータは、機能喪失変異及び自由エネルギー結合データの変化に関して実施例7に得られたエピトープマッピングデータと一致し、これを補う。幾つかの事例において、 $^{13}\text{C} / ^{15}\text{N}$ マッピングデータの不存在は、シフトの規模が極めて大きいので、シフトしたピークの同定が妨げられることに起因し得る。

【実施例9】

【0250】

溶液中での抗体親和性及びサンドイッチ形成の測定
蛍光性標識及び消光物質でのNGAL及びmAbの標識化

His-Bind Purification Kits (Novagen, EMD Chemicals, Inc. San Diego) を用いて、イー・コリ中で産生されたヒトNGAL (C87S) を精製した。BHQ-10S スクシンイミジルエステル (Black Hole Quencher^(R), Biosearch Technologies, Inc. Novato, CA) を用いて、精製されたヒトNGAL を標識した。ALEXAFluor 488 カルボン酸、スクシンイミジルエステル (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) を用いて、抗NGAL mAb (1-809-174、1-903-102、2-9405、1-2322-101) を標識した。PBS で平衡化されたG-25 カラム上で、標識されていないBHQ-10 及びALEXAFluor 488 を除去した。

10

【0251】

BHQ-10S からの寄与に関する補正を含めて、Cary 4 分光光度計 (Varian, Sugarland, TX) 上で、 $E_{279}^{1\text{mg/mL}} = 1.25$ を用いて、1 cm キュベット中でのUV吸収によって、標識されたNGALの濃度を測定した。ALEXAFluor 488 からの寄与に関する補正を含めて、 $E_{279}^{1\text{mg/mL}} = 1.50$ を用いて、1 cm キュベット中でのUV吸収によって、標識されたmAbの濃度を測定した。

【0252】

製造業者によって提供された指示書に従って、標識されたタンパク質の標識手法及び濃度測定を行った。

20

【0253】

平衡解離定数の測定

直接的結合実験において、NGAL 及び6つの抗NGAL抗体の平衡解離定数 (K_D) を測定した。15の試料の系列で、pM から μM 以下の範囲まで、BHQ-NGAL 濃度を増分で増加させながら、ALEXA 488-mAb を一定の濃度 (0.05 nM) に保った。30分の温置後、SLM 8100 光子計数分光蛍光光度計上で全ての試料を測定した。480 nm で試料を励起し、530 nm (30 nm のバンド幅) 干渉フィルター (Chroma Technology Corp., Rockingham, VT) を通じて、発光を収集した。全ての結合測定は、0.15 M NaCl、3 mM EDTA 及び0.005% 界面活性剤 P20 を含有する10 mM HEPES 緩衝液、pH 7.4 中で行

30

【0254】

ALEXA 488 標識された抗体 (mAb 2322、mAb 809、mAb 269、mAb 181 及び mAb 903) の蛍光発光は、BHQ 標識されたNGAL に結合すると、25 から 40% 消光されることが見出された。残念ながら、ALEXA 488-mAb 419 へのBHQ-NGALの結合は、抗体蛍光を10%未満消光し、このため、その滴定を正確に定量することが不可能であった。従って、mAb 419 に対する解離定数は、測定されなかった。

【0255】

蛍光強度の変化がBHQ-NGALに結合された抗体の割合に正比例すると仮定すると、リガンドが結合していない(又は遊離の)BHQ-NGALの濃度は、以下の式[3]から計算することができる。

40

【0256】

【数3】

$$\text{リガンド}_{\text{遊離}} = \text{リガンド}_{\text{総}} - \text{ABS}_{\text{総}} \times F_{\text{結合}} \quad [3]$$

(リガンド_総 及びABS_総 は、それぞれ、BHQ-NGAL 濃度及び総抗体結合部位であり、 $F_{\text{結合}}$ は結合された抗体部位の割合である。) 式[4]に従って、平衡解離定数 (K_D) を得るために、結合データを単純な結合モデルとフィッティングさせた。

50

【 0 2 5 7 】

【 数 4 】

$$F_{\text{結合}} = \frac{[\text{リガンド}]_{\text{遊離}}}{K_d + [\text{リガンド}]_{\text{遊離}}}, \quad [4]$$

【 0 2 5 8 】

図 20 は、抗 N G A L m A b 及び N G A L の結合曲線を示し、抗 N G A L m A b に対する計算された平衡解離定数 (K_D) が表 12 に列記されている。

【 0 2 5 9 】

10

【 表 1 4 】

表 12

MAb	K _D (nM)
1-809-174	0.09 ± 0.02
1-903-102	1.2 ± 0.2
1-2322-101	0.06 ± 0.02
1-181-150	0.57 ± 0.1
1-269-161	1.4 ± 0.1
1-419-182	N/A

20

【 0 2 6 0 】

表 12 中の測定された値は全て、N G A L への高い親和性を示唆する。

【 0 2 6 1 】

サンドイッチ形成に対する抗 N G A L 抗体の評価

二重色蛍光交差相関分光法 (D C - F C C S ; dual - color fluorescence cross - correlation spectroscopy) を用いて、6 つの抗 N G A L m A b に対して、2 つの抗体及びヒト N G A L からなる複合体 (以下、サンドイッチと称する。) を形成する能力を評価した。

30

【 0 2 6 2 】

D C - F C C S の概念は、「 P r o c N a t l A c a d S c i U S A 9 1 : 5 7 4 0 - 5 7 4 7 (1 9 9 4) 」に記載されているように、E i g e n 及び R i g l e r によって定式化された。交差相関曲線は、2 つの異なる発光波長に対して最適化された 2 つの光学チャンネル中で測定されたシグナルの時間的相関によって計算される。関心を有する 2 つの分子種に 2 つの異なる蛍光標識をタグ付加すると、分子複合体のみが、両チャンネル中で同時に検出することができる。これは、溶液中の分子複合体の濃度に比例する交差相関プロットの規模をもたらす。D C - F C C S は、実際上、あらゆるサイズの分子に適用することができる。従って、D C - F C C S は、自動相関機能分析を用いてこれらの種を分割するために、遊離の種及び結合された種の拡散係数の少なくとも 2 倍の差が存在する必要性によって制約を受ける伝統的な蛍光相関分光法 (F C S) の能力を拡張する (M e s e t h , U . , e t a l . , B i o p h y s J . , 7 6 : 1 6 1 9 - 3 1 (1 9 9 9) 参照) 。

40

【 0 2 6 3 】

D C - F C C S の最初の実験的な実践は、異なる蛍光色素で標識された 2 つの一本鎖オリゴヌクレオチドのハイブリッド形成の研究において達成された (S c h w i l l e , P . , e t a l . , B i o p h y s J . , 7 2 : 1 8 7 8 - 8 6 (1 9 9 7))

50

参照)。計算された交差相関曲線の大きさが形成された二本鎖DNA複合体の量に依存するように、蛍光標識された各一本鎖DNAを別個のチャンネル中で独立にモニターした。その後、DC-FCCSは、幾つかのDNAプロセッシング酵素の活性を研究するために(Collini, M., et al., *Nucleic Acids Res.*, 33:e165(2005), Kettling, U., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:1416-20(1998)及びRarbach, M., et al., *Methods*, 24:104-116(2001)参照)、特異的なDNA配列を検出するために(Berland, K. M., *J Biotechnol*, 108:127-136(2004)参照)及びタンパク質への2つのDNA二重鎖の同時結合を性質決定するために(Rippe, K., *Biochemistry*, 39:2131-2139(2000)参照)使用された。DNA研究の他に、タンパク質-タンパク質相互作用の定量的性質決定に対して、DC-FCCSを応用することが提案されている(Schwille, P., et al., *Biophys.*, 772:1878-1886(1997)及びWeidemann, T., et al., *Single Molecules*, 3:49-61(2002)参照)。

10

20

30

40

50

【0264】

DC-FCCS装置及びデータ解析

倒立NikonEclipseTE300蛍光顕微鏡(Nikon Ins Tech Co., Ltd., Kanagawa, Japan)が一体化された二重チャンネル蛍光相関分光測定装置ALBA(ISS, Champaign, IL)を用いて、DC-FCCS実験を行った。

【0265】

5W Millennia VI(Spectra-Physics, Mountain View, CA)を用いて拍動される、モードがロックされたTsunami Titanium-Sapphireレーザーを、二光子励起光源として使用した。Tsunamiは、100f秒パルス幅を用いて80MHzで作動し、700nmと1000nmの間で整調可能である。レーザー光線は、NikonPlanApo60X/1.2W対物レンズの背部開口部を過充填して、回折限界の局所スポットを作製するために、650から10000nm領域に対して被覆されたHigh Laser Beam Expander HB-4X-AR.16(Newport Corp., Irvine CA)を用いて、レーザー光線が拡大される。

【0266】

試料へ励起光線を、及び発光蛍光を検出装置に誘導するために、二色性鏡(700DCSPXR, Chroma Technology Corp., Rockingham, VT)が顕微鏡中に取り付けられている。さらに、励起光の全ての漏れをさらに低下させるために、検出装置の前に、バンドパスフィルター(E700sp-2p, Chroma Technology)が配置されている。

【0267】

検出ボックス(Alba box)は、垂直に併置された、50未満のダークカウント/秒を有する2つのSPCM-AQR-15-SiAPDSingle Photon Counting Modules(Perkin Elmer Inc., Fremont, CA)からなる。DC-FCCS測定を行うときには、さらなる二色性の鏡Q5651p及び2つのバンドパスフィルターHQ535/50、HQ645/75(全てChroma Technology)を、検出装置の前の光の通路に配置した。

【0268】

ISSによって開発された特有のFCSデータ獲得カード(ISS, Champagne, IL)は、さらなる分析又は悪いデータ点の除去のために使用することができる全ての生データを保存する。カードの他の特徴には、2つのチャンネルから別個に得られるデータを同時に保存し、最短40ナノ秒(ns)又は最長1.3ミリ秒(ms)のデータ

を収集する能力が含まれる。

【0269】

ローダミン110 (Molecular Probes, Eugene, OR) の分析的に調製された35 nM溶液を用いて、励起容積のサイズを較正した。FCSデータから計算された自己相関曲線を、単一成分モデル及び270 μm²/秒に等しいローダミン110拡散係数を用いてフィッティングした。典型的には、得られた値及びZ₀/比は、それぞれ、0.3 μm及び4であった。

【0270】

自己相関曲線を計算するために、強度自己相関関数を使用するVistaFCSソフトウェア (ISS) を用いて、DC-FCCSデータを処理した。

10

【0271】

96マイクロウェル光学底プレート (Nalge Nunc International, Rochester, NY) 中に、試料を配置した。試料に対して810 nm、3 mWに、励起波長を設定した。試料採取速度を200 KHzに設定し、各測定のために1,000万の点を収集した。各試料は、二回測定した。1時間の温置後、各試料に対して実験を行った。

【0272】

各抗体対において、一方の抗体は緑の蛍光色素 (ALEXA 488) で標識し、他の抗体は赤色の蛍光色素 (Texas Red) で標識した。標識された抗体を等濃度で (10 nM mAbの40 μL) 混合し、リガンド (15 nM NGAL) を溶液に添加した。NGALを添加する前及び後に、交差相関曲線を各チャンネル中に獲得されたデータの組から計算し、データを標準化した。

20

【0273】

2つのチャンネル*i*及び*j*に対して、標準化された蛍光交差相関関数G_x(τ)は、式[5]において、以下に定義されている。

【0274】

【数5】

$$G_x(\tau) = \frac{\langle \Delta F_i(t) \cdot \Delta F_j(t+\tau) \rangle}{\langle F_i(t) \rangle \langle F_j(t) \rangle} \quad [5]$$

30

(観察された蛍光F₁(t)と平均蛍光値<F₁>の差デルタF₁(t)は、時間tの関数としてチャンネル*i*内の蛍光強度の変動を表す：デルタF₁(t) = F₁(t) - <F₁>。減衰時間 = 0において、G(0)の外挿された値は、自己又は交差相関関数の大きさを反映する。

【0275】

DC-FCCS実験の結果

図21は、NGALの添加前及び添加後に、3つの抗体対 [(A) mAb 2322及びmAb 903; (B) mAb 2322及びmAb 809; (C) mAb 809及びmAb 181] の交差相関曲線の例を示す。交差相関曲線の大きさは、形成された抗体サンドイッチの濃度に比例する。従って、交差相関曲線及びG_x(0)値の大きさの大きな増加は、生産的なサンドイッチ形成を示唆する。

40

【0276】

例示のために、実際、抗体にNGALを添加する前及び後のG_x(0)値の比である各抗体対に相対的な数を割り当てた(表13)。全ての比の値は、バックグラウンドに対して補正した。「1」の値は、サンドイッチが形成されないことを示し、1.1と2.5の間の値は不良なサンドイッチ形成を示し、2.6を上回る全ての値は、生産的な抗体対形成を示す。

【0277】

下表13は、各抗体対にNGALを添加する前及び後に、G_x(0)の比の値(補正さ

50

れたバックグラウンド)を示す。

【0278】

【表15】

表13

mAb	2322	809	903
2322	0.7	1.5	3.5
181	2.1	0.9	3.6
269	1.2	0.9	4.0
809	1.5	1.0	3.5
903	3.7	3.0	1.0
419	1.6	2.6	2.0

10

【0279】

表13から明らかなように、DC-FCCS実験の結果は、前述されているNMRの擾乱とよく一致する。すなわち、mAb2322及びエピトープ群1から得られる他の抗体(例えば、mAb181、mAb269及びmAb809)は、mAb903(エピトープ群2)と効果的にサンドイッチを作製する。これに対して、mAb419(エピトープ群3)は、群1又は群2の何れかから得られた抗体とのサンドイッチ形成において効果的でない。

20

【実施例10】

【0280】

ATCC寄託情報

2007年10月19日に出願された米国仮特許出願60/981,470号(NGAL抗原に関するその教示に関して、参照により組み込まれる。)に記載されているように、野生型NGALrAgCHO662細胞株は、2006年11月21日に、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に寄託され、ATCC受託番号PTA-8020を与えられ、変異体NGALrAgCHO87S細胞株(CHO細胞クローン#734(変異体C87SNGALrAgCHO734としても知られる。))は、2007年1月23日に、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に寄託され、ATCC受託番号PTA-8168を与えられた。

30

【0281】

マウスハイブリドーマ細胞株1-903-430及び1-2322-455は、2006年11月21日に、10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(以下、A.T.C.C)にそれぞれ寄託された。細胞株1-903-430には、ATCC受託番号PTA-8026が割り当てられた。細胞株1-2322-455には、ATCC受託番号PTA-8024が割り当てられた。

40

【0282】

当業者に容易に理解されるように、本発明は目的を実施し、記載されている結果及び利点を得ると共に、それらに内在する結果及び利点を得るために好適である。本明細書に記載されている分子複合体及び方法、手順、処置、分子、具体的化合物は好ましい実施形態の本明細書における代表例であり、例示であり、本発明の範囲を限定するものではない。当業者に容易に理解されるように、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、本明細書に開示されている本発明に種々の置換及び変更を加えることができる。

50

【0283】

本明細書に引用した全ての特許及び公報は、本発明が属する分野の当業者の技術水準を示唆するものである。全ての特許及び公報は、個別の各公報が参照により具体的且つ個別に取り込まれると記されているのと同じ程度まで、参照によって本明細書に組み込まれる。特に、本開示と同時出願された以下の2つの米国特許出願、2007年10月19日出願された米国仮特許出願60/981,470号及び2007年10月19日出願された米国仮特許出願60/981,473号の全体が、参照により組み込まれる。

【0284】

本明細書に具体的に記載する本発明は、本明細書に具体的に開示しない要素、限定の不在下で適切に実施され得る。従って、例えば、本明細書の各事例において、「～を含む」、「～から本質的に構成される」及び「から構成される」という用語は何れも、相互に置き換えることができる。利用した用語及び表現は、限定ではなく、説明として使用されており、このような用語及び表現の使用において、表示及び記載されている特徴又はその部分の等価物を除外することを意図するものではなく、特許請求の範囲に記載されている本発明の範囲内で、種々の変更が可能であるとみなされる。従って、本発明は好ましい実施形態及び非必須の特徴によって具体的に開示されているが、当然のことながら本明細書に開示されている概念の変更及び変形が当業者によって採用することができ、並びにこのような変更及び変形は、添付の特許請求の範囲に定義するような本発明の範囲に含むものとみなす。さらに、「定義」においてある種の用語が定義されており、「詳細な説明」の他の箇所でも別段の定義、記載又は論述が為されている場合には、このような定義、記載及び論述は全て、このような用語に帰するものと理解しなければならない。また、このような用語及び表現の使用に際して、表示及び記載されている特徴又はその部分の等価物を除外することを意図するものではない。さらに、小見出し（例えば、「定義」）が「詳細な説明」において使用されているが、このような使用は、参照を容易にするためのものに過ぎず、ある見出し内に行われた何れかの開示をその見出しのみに限定することを意図するものではない。むしろ、1つの小見出しの下に為されたあらゆる開示は、それぞれのあらゆる他の小見出し下の開示を構成するものとする。

10

20

【 図 5 】

```

ATGCCCTAGSTCCCTGCTGGCTGGGCTAGCCCTGTGGGGGCTCTGCATGCCCAAGCCCA
GGACTCCACTCAGACCTGATCCGAGCCGACCTCTGAGCAAGTCCCTCTGGAGCCAGACT
TCCAGGCAACCAATTCAGGGGAAGTGGTATGTGGTAGGCTGGCAAGGATCGAATTCCT
AGAGAGACAAGAGCCGCAAGAGATGTATGTCACCTCTGAGACTGAAAGAGACAGAG
CTACAAAGTCACTCCCTCCCTGTTTAGGAAAGAAAGTGTGACTACTGGRTCAAGACTTTTG
TTCCAGGTTGCGAGTCCGSHAGTTCAGGCTGGGCAACATTAGAGATTACCTGGATTAAAG
AGTTACTCTGTCGAGTGGTGGACCCACTACAAACCAGCATGCTATGGTGTCTTCAAGAA
AGTTTCTCAAAACAGGAGTACTTCAGAGATCAGCCCTACGGGGAGAACCAAGGAGCTGACTT
CGGAACTAAGGGGAATTCATCCGCTTCTCAAAATCTCTGGGCTCCCTGAAAACACATA
GTCTCCCTGTCCCAATCGACAGTGTATGGAGGCCATCATCAACATCACCAAT

```

Figure 5

【 図 6 】

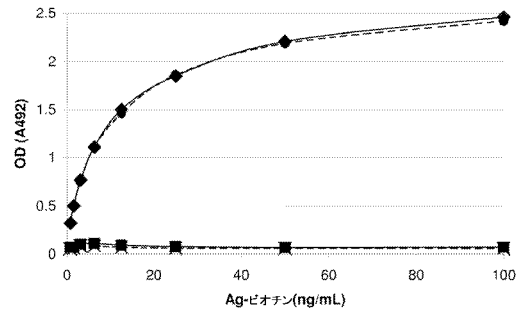


Figure 6

【 図 7 】

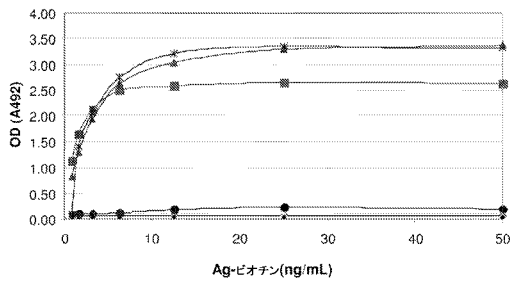


Figure 7

【 図 8 】

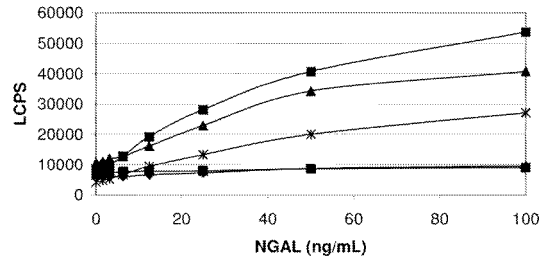


Figure 8

【 9 A 】

VH 番号
 GHWVGLIN LeuVal¹² SerGly¹³ GlyLeu¹⁴ Val¹⁵Leu¹⁶ SerGly¹⁷ GlyLeu¹⁸ SerGly¹⁹ Phe²⁰ Thr²¹Pro²²Asn²³ Thr²⁴Pro²⁵Asn²⁶ Thr²⁷Pro²⁸Asn²⁹ Thr³⁰Pro³¹Asn³² Thr³³Pro³⁴Asn³⁵ Thr³⁶Pro³⁷Asn³⁸ Thr³⁹Pro⁴⁰Asn⁴¹ Thr⁴²Pro⁴³Asn⁴⁴ Thr⁴⁵Pro⁴⁶Asn⁴⁷ Thr⁴⁸Pro⁴⁹Asn⁵⁰ Thr⁵¹Pro⁵²Asn⁵³ Thr⁵⁴Pro⁵⁵Asn⁵⁶ Thr⁵⁷Pro⁵⁸Asn⁵⁹ Thr⁶⁰Pro⁶¹Asn⁶² Thr⁶³Pro⁶⁴Asn⁶⁵ Thr⁶⁶Pro⁶⁷Asn⁶⁸ Thr⁶⁹Pro⁷⁰Asn⁷¹ Thr⁷²Pro⁷³Asn⁷⁴ Thr⁷⁵Pro⁷⁶Asn⁷⁷ Thr⁷⁸Pro⁷⁹Asn⁸⁰ Thr⁸¹Pro⁸²Asn⁸³ Thr⁸⁴Pro⁸⁵Asn⁸⁶ Thr⁸⁷Pro⁸⁸Asn⁸⁹ Thr⁹⁰Pro⁹¹Asn⁹² Thr⁹³Pro⁹⁴Asn⁹⁵ Thr⁹⁶Pro⁹⁷Asn⁹⁸ Thr⁹⁹Pro¹⁰⁰Asn¹⁰¹ Thr¹⁰²Pro¹⁰³Asn¹⁰⁴ Thr¹⁰⁵Pro¹⁰⁶Asn¹⁰⁷ Thr¹⁰⁸Pro¹⁰⁹Asn¹¹⁰ Thr¹¹¹Pro¹¹²Asn¹¹³ Thr¹¹⁴Pro¹¹⁵Asn¹¹⁶ Thr¹¹⁷Pro¹¹⁸Asn¹¹⁹ Thr¹²⁰Pro¹²¹Asn¹²² Thr¹²³Pro¹²⁴Asn¹²⁵ Thr¹²⁶Pro¹²⁷Asn¹²⁸ Thr¹²⁹Pro¹³⁰Asn¹³¹ Thr¹³²Pro¹³³Asn¹³⁴ Thr¹³⁵Pro¹³⁶Asn¹³⁷ Thr¹³⁸Pro¹³⁹Asn¹⁴⁰ Thr¹⁴¹Pro¹⁴²Asn¹⁴³ Thr¹⁴⁴Pro¹⁴⁵Asn¹⁴⁶ Thr¹⁴⁷Pro¹⁴⁸Asn¹⁴⁹ Thr¹⁵⁰Pro¹⁵¹Asn¹⁵² Thr¹⁵³Pro¹⁵⁴Asn¹⁵⁵ Thr¹⁵⁶Pro¹⁵⁷Asn¹⁵⁸ Thr¹⁵⁹Pro¹⁶⁰Asn¹⁶¹ Thr¹⁶²Pro¹⁶³Asn¹⁶⁴ Thr¹⁶⁵Pro¹⁶⁶Asn¹⁶⁷ Thr¹⁶⁸Pro¹⁶⁹Asn¹⁷⁰ Thr¹⁷¹Pro¹⁷²Asn¹⁷³ Thr¹⁷⁴Pro¹⁷⁵Asn¹⁷⁶ Thr¹⁷⁷Pro¹⁷⁸Asn¹⁷⁹ Thr¹⁸⁰Pro¹⁸¹Asn¹⁸² Thr¹⁸³Pro¹⁸⁴Asn¹⁸⁵ Thr¹⁸⁶Pro¹⁸⁷Asn¹⁸⁸ Thr¹⁸⁹Pro¹⁹⁰Asn¹⁹¹ Thr¹⁹²Pro¹⁹³Asn¹⁹⁴ Thr¹⁹⁵Pro¹⁹⁶Asn¹⁹⁷ Thr¹⁹⁸Pro¹⁹⁹Asn²⁰⁰ Thr²⁰¹Pro²⁰²Asn²⁰³ Thr²⁰⁴Pro²⁰⁵Asn²⁰⁶ Thr²⁰⁷Pro²⁰⁸Asn²⁰⁹ Thr²¹⁰Pro²¹¹Asn²¹² Thr²¹³Pro²¹⁴Asn²¹⁵ Thr²¹⁶Pro²¹⁷Asn²¹⁸ Thr²¹⁹Pro²²⁰Asn²²¹ Thr²²²Pro²²³Asn²²⁴ Thr²²⁵Pro²²⁶Asn²²⁷ Thr²²⁸Pro²²⁹Asn²³⁰ Thr²³¹Pro²³²Asn²³³ Thr²³⁴Pro²³⁵Asn²³⁶ Thr²³⁷Pro²³⁸Asn²³⁹ Thr²⁴⁰Pro²⁴¹Asn²⁴² Thr²⁴³Pro²⁴⁴Asn²⁴⁵ Thr²⁴⁶Pro²⁴⁷Asn²⁴⁸ Thr²⁴⁹Pro²⁵⁰Asn²⁵¹ Thr²⁵²Pro²⁵³Asn²⁵⁴ Thr²⁵⁵Pro²⁵⁶Asn²⁵⁷ Thr²⁵⁸Pro²⁵⁹Asn²⁶⁰ Thr²⁶¹Pro²⁶²Asn²⁶³ Thr²⁶⁴Pro²⁶⁵Asn²⁶⁶ Thr²⁶⁷Pro²⁶⁸Asn²⁶⁹ Thr²⁷⁰Pro²⁷¹Asn²⁷² Thr²⁷³Pro²⁷⁴Asn²⁷⁵ Thr²⁷⁶Pro²⁷⁷Asn²⁷⁸ Thr²⁷⁹Pro²⁸⁰Asn²⁸¹ Thr²⁸²Pro²⁸³Asn²⁸⁴ Thr²⁸⁵Pro²⁸⁶Asn²⁸⁷ Thr²⁸⁸Pro²⁸⁹Asn²⁹⁰ Thr²⁹¹Pro²⁹²Asn²⁹³ Thr²⁹⁴Pro²⁹⁵Asn²⁹⁶ Thr²⁹⁷Pro²⁹⁸Asn²⁹⁹ Thr³⁰⁰Pro³⁰¹Asn³⁰² Thr³⁰³Pro³⁰⁴Asn³⁰⁵ Thr³⁰⁶Pro³⁰⁷Asn³⁰⁸ Thr³⁰⁹Pro³¹⁰Asn³¹¹ Thr³¹²Pro³¹³Asn³¹⁴ Thr³¹⁵Pro³¹⁶Asn³¹⁷ Thr³¹⁸Pro³¹⁹Asn³²⁰ Thr³²¹Pro³²²Asn³²³ Thr³²⁴Pro³²⁵Asn³²⁶ Thr³²⁷Pro³²⁸Asn³²⁹ Thr³³⁰Pro³³¹Asn³³² Thr³³³Pro³³⁴Asn³³⁵ Thr³³⁶Pro³³⁷Asn³³⁸ Thr³³⁹Pro³⁴⁰Asn³⁴¹ Thr³⁴²Pro³⁴³Asn³⁴⁴ Thr³⁴⁵Pro³⁴⁶Asn³⁴⁷ Thr³⁴⁸Pro³⁴⁹Asn³⁵⁰ Thr³⁵¹Pro³⁵²Asn³⁵³ Thr³⁵⁴Pro³⁵⁵Asn³⁵⁶ Thr³⁵⁷Pro³⁵⁸Asn³⁵⁹ Thr³⁶⁰Pro³⁶¹Asn³⁶² Thr³⁶³Pro³⁶⁴Asn³⁶⁵ Thr³⁶⁶Pro³⁶⁷Asn³⁶⁸ Thr³⁶⁹Pro³⁷⁰Asn³⁷¹ Thr³⁷²Pro³⁷³Asn³⁷⁴ Thr³⁷⁵Pro³⁷⁶Asn³⁷⁷ Thr³⁷⁸Pro³⁷⁹Asn³⁸⁰ Thr³⁸¹Pro³⁸²Asn³⁸³ Thr³⁸⁴Pro³⁸⁵Asn³⁸⁶ Thr³⁸⁷Pro³⁸⁸Asn³⁸⁹ Thr³⁹⁰Pro³⁹¹Asn³⁹² Thr³⁹³Pro³⁹⁴Asn³⁹⁵ Thr³⁹⁶Pro³⁹⁷Asn³⁹⁸ Thr³⁹⁹Pro⁴⁰⁰Asn⁴⁰¹ Thr⁴⁰²Pro⁴⁰³Asn⁴⁰⁴ Thr⁴⁰⁵Pro⁴⁰⁶Asn⁴⁰⁷ Thr⁴⁰⁸Pro⁴⁰⁹Asn⁴¹⁰ Thr⁴¹¹Pro⁴¹²Asn⁴¹³ Thr⁴¹⁴Pro⁴¹⁵Asn⁴¹⁶ Thr⁴¹⁷Pro⁴¹⁸Asn⁴¹⁹ Thr⁴²⁰Pro⁴²¹Asn⁴²² Thr⁴²³Pro⁴²⁴Asn⁴²⁵ Thr⁴²⁶Pro⁴²⁷Asn⁴²⁸ Thr⁴²⁹Pro⁴³⁰Asn⁴³¹ Thr⁴³²Pro⁴³³Asn⁴³⁴ Thr⁴³⁵Pro⁴³⁶Asn⁴³⁷ Thr⁴³⁸Pro⁴³⁹Asn⁴⁴⁰ Thr⁴⁴¹Pro⁴⁴²Asn⁴⁴³ Thr⁴⁴⁴Pro⁴⁴⁵Asn⁴⁴⁶ Thr⁴⁴⁷Pro⁴⁴⁸Asn⁴⁴⁹ Thr⁴⁵⁰Pro⁴⁵¹Asn⁴⁵² Thr⁴⁵³Pro⁴⁵⁴Asn⁴⁵⁵ Thr⁴⁵⁶Pro⁴⁵⁷Asn⁴⁵⁸ Thr⁴⁵⁹Pro⁴⁶⁰Asn⁴⁶¹ Thr⁴⁶²Pro⁴⁶³Asn⁴⁶⁴ Thr⁴⁶⁵Pro⁴⁶⁶Asn⁴⁶⁷ Thr⁴⁶⁸Pro⁴⁶⁹Asn⁴⁷⁰ Thr⁴⁷¹Pro⁴⁷²Asn⁴⁷³ Thr⁴⁷⁴Pro⁴⁷⁵Asn⁴⁷⁶ Thr⁴⁷⁷Pro⁴⁷⁸Asn⁴⁷⁹ Thr⁴⁸⁰Pro⁴⁸¹Asn⁴⁸² Thr⁴⁸³Pro⁴⁸⁴Asn⁴⁸⁵ Thr⁴⁸⁶Pro⁴⁸⁷Asn⁴⁸⁸ Thr⁴⁸⁹Pro⁴⁹⁰Asn⁴⁹¹ Thr⁴⁹²Pro⁴⁹³Asn⁴⁹⁴ Thr⁴⁹⁵Pro⁴⁹⁶Asn⁴⁹⁷ Thr⁴⁹⁸Pro⁴⁹⁹Asn⁵⁰⁰ Thr⁵⁰¹Pro⁵⁰²Asn⁵⁰³ Thr⁵⁰⁴Pro⁵⁰⁵Asn⁵⁰⁶ Thr⁵⁰⁷Pro⁵⁰⁸Asn⁵⁰⁹ Thr⁵¹⁰Pro⁵¹¹Asn⁵¹² Thr⁵¹³Pro⁵¹⁴Asn⁵¹⁵ Thr⁵¹⁶Pro⁵¹⁷Asn⁵¹⁸ Thr⁵¹⁹Pro⁵²⁰Asn⁵²¹ Thr⁵²²Pro⁵²³Asn⁵²⁴ Thr⁵²⁵Pro⁵²⁶Asn⁵²⁷ Thr⁵²⁸Pro⁵²⁹Asn⁵³⁰ Thr⁵³¹Pro⁵³²Asn⁵³³ Thr⁵³⁴Pro⁵³⁵Asn⁵³⁶ Thr⁵³⁷Pro⁵³⁸Asn⁵³⁹ Thr⁵⁴⁰Pro⁵⁴¹Asn⁵⁴² Thr⁵⁴³Pro⁵⁴⁴Asn⁵⁴⁵ Thr⁵⁴⁶Pro⁵⁴⁷Asn⁵⁴⁸ Thr⁵⁴⁹Pro⁵⁵⁰Asn⁵⁵¹ Thr⁵⁵²Pro⁵⁵³Asn⁵⁵⁴ Thr⁵⁵⁵Pro⁵⁵⁶Asn⁵⁵⁷ Thr⁵⁵⁸Pro⁵⁵⁹Asn⁵⁶⁰ Thr⁵⁶¹Pro⁵⁶²Asn⁵⁶³ Thr⁵⁶⁴Pro⁵⁶⁵Asn⁵⁶⁶ Thr⁵⁶⁷Pro⁵⁶⁸Asn⁵⁶⁹ Thr⁵⁷⁰Pro⁵⁷¹Asn⁵⁷² Thr⁵⁷³Pro⁵⁷⁴Asn⁵⁷⁵ Thr⁵⁷⁶Pro⁵⁷⁷Asn⁵⁷⁸ Thr⁵⁷⁹Pro⁵⁸⁰Asn⁵⁸¹ Thr⁵⁸²Pro⁵⁸³Asn⁵⁸⁴ Thr⁵⁸⁵Pro⁵⁸⁶Asn⁵⁸⁷ Thr⁵⁸⁸Pro⁵⁸⁹Asn⁵⁹⁰ Thr⁵⁹¹Pro⁵⁹²Asn⁵⁹³ Thr⁵⁹⁴Pro⁵⁹⁵Asn⁵⁹⁶ Thr⁵⁹⁷Pro⁵⁹⁸Asn⁵⁹⁹ Thr⁶⁰⁰Pro⁶⁰¹Asn⁶⁰² Thr⁶⁰³Pro⁶⁰⁴Asn⁶⁰⁵ Thr⁶⁰⁶Pro⁶⁰⁷Asn⁶⁰⁸ Thr⁶⁰⁹Pro⁶¹⁰Asn⁶¹¹ Thr⁶¹²Pro⁶¹³Asn⁶¹⁴ Thr⁶¹⁵Pro⁶¹⁶Asn⁶¹⁷ Thr⁶¹⁸Pro⁶¹⁹Asn⁶²⁰ Thr⁶²¹Pro⁶²²Asn⁶²³ Thr⁶²⁴Pro⁶²⁵Asn⁶²⁶ Thr⁶²⁷Pro⁶²⁸Asn⁶²⁹ Thr⁶³⁰Pro⁶³¹Asn⁶³² Thr⁶³³Pro⁶³⁴Asn⁶³⁵ Thr⁶³⁶Pro⁶³⁷Asn⁶³⁸ Thr⁶³⁹Pro⁶⁴⁰Asn⁶⁴¹ Thr⁶⁴²Pro⁶⁴³Asn⁶⁴⁴ Thr⁶⁴⁵Pro⁶⁴⁶Asn⁶⁴⁷ Thr⁶⁴⁸Pro⁶⁴⁹Asn⁶⁵⁰ Thr⁶⁵¹Pro⁶⁵²Asn⁶⁵³ Thr⁶⁵⁴Pro⁶⁵⁵Asn⁶⁵⁶ Thr⁶⁵⁷Pro⁶⁵⁸Asn⁶⁵⁹ Thr⁶⁶⁰Pro⁶⁶¹Asn⁶⁶² Thr⁶⁶³Pro⁶⁶⁴Asn⁶⁶⁵ Thr⁶⁶⁶Pro⁶⁶⁷Asn⁶⁶⁸ Thr⁶⁶⁹Pro⁶⁷⁰Asn⁶⁷¹ Thr⁶⁷²Pro⁶⁷³Asn⁶⁷⁴ Thr⁶⁷⁵Pro⁶⁷⁶Asn⁶⁷⁷ Thr⁶⁷⁸Pro⁶⁷⁹Asn⁶⁸⁰ Thr⁶⁸¹Pro⁶⁸²Asn⁶⁸³ Thr⁶⁸⁴Pro⁶⁸⁵Asn⁶⁸⁶ Thr⁶⁸⁷Pro⁶⁸⁸Asn⁶⁸⁹ Thr⁶⁹⁰Pro⁶⁹¹Asn⁶⁹² Thr⁶⁹³Pro⁶⁹⁴Asn⁶⁹⁵ Thr⁶⁹⁶Pro⁶⁹⁷Asn⁶⁹⁸ Thr⁶⁹⁹Pro⁷⁰⁰Asn⁷⁰¹ Thr⁷⁰²Pro⁷⁰³Asn⁷⁰⁴ Thr⁷⁰⁵Pro⁷⁰⁶Asn⁷⁰⁷ Thr⁷⁰⁸Pro⁷⁰⁹Asn⁷¹⁰ Thr⁷¹¹Pro⁷¹²Asn⁷¹³ Thr⁷¹⁴Pro⁷¹⁵Asn⁷¹⁶ Thr⁷¹⁷Pro⁷¹⁸Asn⁷¹⁹ Thr⁷²⁰Pro⁷²¹Asn⁷²² Thr⁷²³Pro⁷²⁴Asn⁷²⁵ Thr⁷²⁶Pro⁷²⁷Asn⁷²⁸ Thr⁷²⁹Pro⁷³⁰Asn⁷³¹ Thr⁷³²Pro⁷³³Asn⁷³⁴ Thr⁷³⁵Pro⁷³⁶Asn⁷³⁷ Thr⁷³⁸Pro⁷³⁹Asn⁷⁴⁰ Thr⁷⁴¹Pro⁷⁴²Asn⁷⁴³ Thr⁷⁴⁴Pro⁷⁴⁵Asn⁷⁴⁶ Thr⁷⁴⁷Pro⁷⁴⁸Asn⁷⁴⁹ Thr⁷⁵⁰Pro⁷⁵¹Asn⁷⁵² Thr⁷⁵³Pro⁷⁵⁴Asn⁷⁵⁵ Thr⁷⁵⁶Pro⁷⁵⁷Asn⁷⁵⁸ Thr⁷⁵⁹Pro⁷⁶⁰Asn⁷⁶¹ Thr⁷⁶²Pro⁷⁶³Asn⁷⁶⁴ Thr⁷⁶⁵Pro⁷⁶⁶Asn⁷⁶⁷ Thr⁷⁶⁸Pro⁷⁶⁹Asn⁷⁷⁰ Thr⁷⁷¹Pro⁷⁷²Asn⁷⁷³ Thr⁷⁷⁴Pro⁷⁷⁵Asn⁷⁷⁶ Thr⁷⁷⁷Pro⁷⁷⁸Asn⁷⁷⁹ Thr⁷⁸⁰Pro⁷⁸¹Asn⁷⁸² Thr⁷⁸³Pro⁷⁸⁴Asn⁷⁸⁵ Thr⁷⁸⁶Pro⁷⁸⁷Asn⁷⁸⁸ Thr⁷⁸⁹Pro⁷⁹⁰Asn⁷⁹¹ Thr⁷⁹²Pro⁷⁹³Asn⁷⁹⁴ Thr⁷⁹⁵Pro⁷⁹⁶Asn⁷⁹⁷ Thr⁷⁹⁸Pro⁷⁹⁹Asn⁸⁰⁰ Thr⁸⁰¹Pro⁸⁰²Asn⁸⁰³ Thr⁸⁰⁴Pro⁸⁰⁵Asn⁸⁰⁶ Thr⁸⁰⁷Pro⁸⁰⁸Asn⁸⁰⁹ Thr⁸¹⁰Pro⁸¹¹Asn⁸¹² Thr⁸¹³Pro⁸¹⁴Asn⁸¹⁵ Thr⁸¹⁶Pro⁸¹⁷Asn⁸¹⁸ Thr⁸¹⁹Pro⁸²⁰Asn⁸²¹ Thr⁸²²Pro⁸²³Asn⁸²⁴ Thr⁸²⁵Pro⁸²⁶Asn⁸²⁷ Thr⁸²⁸Pro⁸²⁹Asn⁸³⁰ Thr⁸³¹Pro⁸³²Asn⁸³³ Thr⁸³⁴Pro⁸³⁵Asn⁸³⁶ Thr⁸³⁷Pro⁸³⁸Asn⁸³⁹ Thr⁸⁴⁰Pro⁸⁴¹Asn⁸⁴² Thr⁸⁴³Pro⁸⁴⁴Asn⁸⁴⁵ Thr⁸⁴⁶Pro⁸⁴⁷Asn⁸⁴⁸ Thr⁸⁴⁹Pro⁸⁵⁰Asn⁸⁵¹ Thr⁸⁵²Pro⁸⁵³Asn⁸⁵⁴ Thr⁸⁵⁵Pro⁸⁵⁶Asn⁸⁵⁷ Thr⁸⁵⁸Pro⁸⁵⁹Asn⁸⁶⁰ Thr⁸⁶¹Pro⁸⁶²Asn⁸⁶³ Thr⁸⁶⁴Pro⁸⁶⁵Asn⁸⁶⁶ Thr⁸⁶⁷Pro⁸⁶⁸Asn⁸⁶⁹ Thr⁸⁷⁰Pro⁸⁷¹Asn⁸⁷² Thr⁸⁷³Pro⁸⁷⁴Asn⁸⁷⁵ Thr⁸⁷⁶Pro⁸⁷⁷Asn⁸⁷⁸ Thr⁸⁷⁹Pro⁸⁸⁰Asn⁸⁸¹ Thr⁸⁸²Pro⁸⁸³Asn⁸⁸⁴ Thr⁸⁸⁵Pro⁸⁸⁶Asn⁸⁸⁷ Thr⁸⁸⁸Pro⁸⁸⁹Asn⁸⁹⁰ Thr⁸⁹¹Pro⁸⁹²Asn⁸⁹³ Thr⁸⁹⁴Pro⁸⁹⁵Asn⁸⁹⁶ Thr⁸⁹⁷Pro⁸⁹⁸Asn⁸⁹⁹ Thr⁹⁰⁰Pro⁹⁰¹Asn⁹⁰² Thr⁹⁰³Pro⁹⁰⁴Asn⁹⁰⁵ Thr⁹⁰⁶Pro⁹⁰⁷Asn⁹⁰⁸ Thr⁹⁰⁹Pro⁹¹⁰Asn⁹¹¹ Thr⁹¹²Pro⁹¹³Asn⁹¹⁴ Thr⁹¹⁵Pro⁹¹⁶Asn⁹¹⁷ Thr⁹¹⁸Pro⁹¹⁹Asn⁹²⁰ Thr⁹²¹Pro⁹²²Asn⁹²³ Thr⁹²⁴Pro⁹²⁵Asn⁹²⁶ Thr⁹²⁷Pro⁹²⁸Asn⁹²⁹ Thr⁹³⁰Pro⁹³¹Asn⁹³² Thr⁹³³Pro⁹³⁴Asn⁹³⁵ Thr⁹³⁶Pro⁹³⁷Asn⁹³⁸ Thr⁹³⁹Pro⁹⁴⁰Asn⁹⁴¹ Thr⁹⁴²Pro⁹⁴³Asn⁹⁴⁴ Thr⁹⁴⁵Pro⁹⁴⁶Asn⁹⁴⁷ Thr⁹⁴⁸Pro⁹⁴⁹Asn⁹⁵⁰ Thr⁹⁵¹Pro⁹⁵²Asn⁹⁵³ Thr⁹⁵⁴Pro⁹⁵⁵Asn⁹⁵⁶ Thr⁹⁵⁷Pro⁹⁵⁸Asn⁹⁵⁹ Thr⁹⁶⁰Pro⁹⁶¹Asn⁹⁶² Thr⁹⁶³Pro⁹⁶⁴Asn⁹⁶⁵ Thr⁹⁶⁶Pro⁹⁶⁷Asn⁹⁶⁸ Thr⁹⁶⁹Pro⁹⁷⁰Asn⁹⁷¹ Thr⁹⁷²Pro⁹⁷³Asn⁹⁷⁴ Thr⁹⁷⁵Pro⁹⁷⁶Asn⁹⁷⁷ Thr⁹⁷⁸Pro⁹⁷⁹Asn⁹⁸⁰ Thr⁹⁸¹Pro⁹⁸²Asn⁹⁸³ Thr⁹⁸⁴Pro⁹⁸⁵Asn⁹⁸⁶ Thr⁹⁸⁷Pro⁹⁸⁸Asn⁹⁸⁹ Thr⁹⁹⁰Pro⁹⁹¹Asn⁹⁹² Thr⁹⁹³Pro⁹⁹⁴Asn⁹⁹⁵ Thr⁹⁹⁶Pro⁹⁹⁷Asn⁹⁹⁸ Thr⁹⁹⁹Pro¹⁰⁰⁰Asn¹⁰⁰¹ Thr¹⁰⁰²Pro¹⁰⁰³Asn¹⁰⁰⁴ Thr¹⁰⁰⁵Pro¹⁰⁰⁶Asn¹⁰⁰⁷ Thr¹⁰⁰⁸Pro¹⁰⁰⁹Asn¹⁰¹⁰ Thr¹⁰¹¹Pro¹⁰¹²Asn¹⁰¹³ Thr¹⁰¹⁴Pro¹⁰¹⁵Asn¹⁰¹⁶ Thr¹⁰¹⁷Pro¹⁰¹⁸Asn¹⁰¹⁹ Thr¹⁰²⁰Pro¹⁰²¹Asn¹⁰²² Thr¹⁰²³Pro¹⁰²⁴Asn¹⁰²⁵ Thr¹⁰²⁶Pro¹⁰²⁷Asn¹⁰²⁸ Thr¹⁰²⁹Pro¹⁰³⁰Asn¹⁰³¹ Thr¹⁰³²Pro¹⁰³³Asn¹⁰³⁴ Thr¹⁰³⁵Pro¹⁰³⁶Asn¹⁰³⁷ Thr¹⁰³⁸Pro¹⁰³⁹Asn¹⁰⁴⁰ Thr¹⁰⁴¹Pro¹⁰⁴²Asn¹⁰⁴³ Thr¹⁰⁴⁴Pro¹⁰⁴⁵Asn¹⁰⁴⁶ Thr¹⁰⁴⁷Pro¹⁰⁴⁸Asn¹⁰⁴⁹ Thr¹⁰⁵⁰Pro¹⁰⁵¹Asn¹⁰⁵² Thr¹⁰⁵³Pro¹⁰⁵⁴Asn¹⁰⁵⁵ Thr¹⁰⁵⁶Pro¹⁰⁵⁷Asn¹⁰⁵⁸ Thr¹⁰⁵⁹Pro¹⁰⁶⁰Asn¹⁰⁶¹ Thr¹⁰⁶²Pro¹⁰⁶³Asn¹⁰⁶⁴ Thr¹⁰⁶⁵Pro¹⁰⁶⁶Asn¹⁰⁶⁷ Thr¹⁰⁶⁸Pro¹⁰⁶⁹Asn¹⁰⁷⁰ Thr¹⁰⁷¹Pro¹⁰⁷²Asn¹⁰⁷³ Thr¹⁰⁷⁴Pro¹⁰⁷⁵Asn¹⁰⁷⁶ Thr¹⁰⁷⁷Pro¹⁰⁷⁸Asn¹⁰⁷⁹ Thr¹⁰⁸⁰Pro¹⁰⁸¹Asn¹⁰⁸² Thr¹⁰⁸³Pro¹⁰⁸⁴Asn¹⁰⁸⁵ Thr¹⁰⁸⁶Pro¹⁰⁸⁷Asn¹⁰⁸⁸ Thr¹⁰⁸⁹Pro¹⁰⁹⁰Asn¹⁰⁹¹ Thr¹⁰⁹²Pro¹⁰⁹³Asn¹⁰⁹⁴ Thr¹⁰⁹⁵Pro¹⁰⁹⁶Asn¹⁰⁹⁷ Thr¹⁰⁹⁸Pro¹⁰⁹⁹Asn¹¹⁰⁰ Thr¹¹⁰¹Pro¹¹⁰²Asn¹¹⁰³ Thr¹¹⁰⁴Pro¹¹⁰⁵Asn¹¹⁰⁶ Thr¹¹⁰⁷Pro¹¹⁰⁸Asn¹¹⁰⁹ Thr¹¹¹⁰Pro¹¹¹¹Asn¹¹¹² Thr¹¹¹³Pro¹¹¹⁴Asn¹¹¹⁵ Thr¹¹¹⁶Pro¹¹¹⁷Asn¹¹¹⁸ Thr¹¹¹⁹Pro¹¹²⁰Asn¹¹²¹ Thr¹¹²²Pro¹¹²³Asn¹¹²⁴ Thr¹¹²⁵Pro¹¹²⁶Asn¹¹²⁷ Thr¹¹²⁸Pro¹¹²⁹Asn¹¹³⁰ Thr¹¹³¹Pro¹¹³²Asn¹¹³³ Thr¹¹³⁴Pro¹¹³⁵Asn¹¹³⁶ Thr¹¹³⁷Pro¹¹³⁸Asn¹¹³⁹ Thr¹¹⁴⁰Pro¹¹⁴¹Asn¹¹⁴² Thr¹¹⁴³Pro¹¹⁴⁴Asn¹¹⁴⁵ Thr¹¹⁴⁶Pro¹¹⁴⁷Asn¹¹⁴⁸ Thr¹¹⁴⁹Pro¹¹⁵⁰Asn¹¹⁵¹ Thr¹¹⁵²Pro¹¹⁵³Asn¹¹⁵⁴ Thr¹¹⁵⁵Pro¹¹⁵⁶Asn¹¹⁵⁷ Thr¹¹⁵⁸Pro¹¹⁵⁹Asn¹¹⁶⁰ Thr¹¹⁶¹Pro¹¹⁶²Asn¹¹⁶³ Thr¹¹⁶⁴Pro¹¹⁶⁵Asn¹¹⁶⁶ Thr¹¹⁶⁷Pro¹¹⁶⁸Asn¹¹⁶⁹ Thr¹¹⁷⁰Pro¹¹⁷¹Asn¹¹⁷² Thr¹¹⁷³Pro¹¹⁷⁴Asn¹¹⁷⁵ Thr¹¹⁷⁶Pro¹¹⁷⁷Asn¹¹⁷⁸ Thr¹¹⁷⁹Pro¹¹⁸⁰Asn¹¹⁸¹ Thr¹¹⁸²Pro

【 図 1 1 】

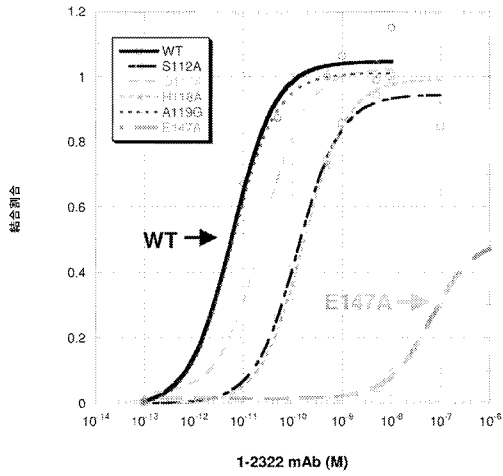


Figure 11

【 図 1 2 】

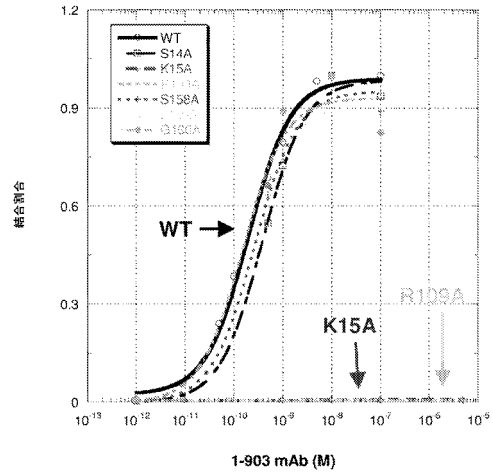


Figure 12

【 図 1 3 】

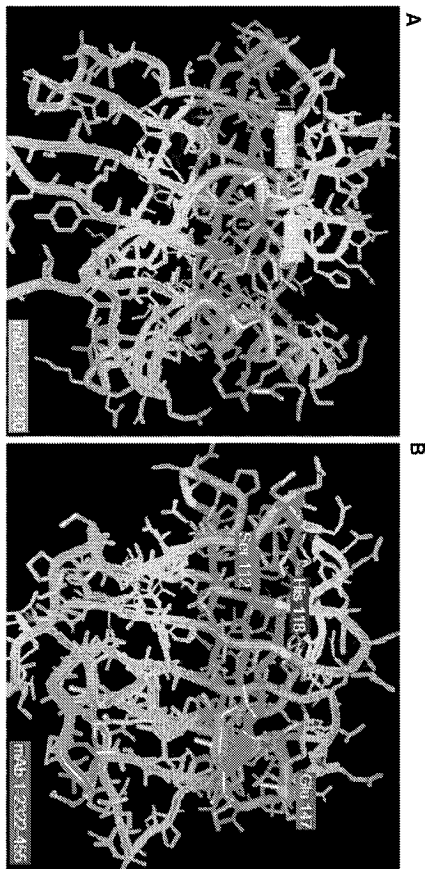


Figure 13

【 図 1 4 】

```

ATGCAGGACTGTACTTCGACCTGATTCGCGCTCCGCGCTGTCTTAAAGTCGCGCTGCAG
1----- 60
H Q D S I S D L I P A P P L S K V P L Q
CNGMCTTTCAGGACACCAAGTCCAGGGTAAATGGTACGTTTGCAGCCGCGGTGGTAAAC
61----- 120
Q N F Q D N Q F Q G K W Y V V G L A G R
SGGATGCTTCGCTGAGGACAAAGATCCGCGAANAATGTATGCTMTCATCTACGACCTENAA
121----- 180
A L L R E D K D P Q K M Y A T I Y E L K
GAGGCAAACTCTATAACCTGACCAAGCTTCGTTGCTGTAABAGAAATGTGACTACTGG
181----- 240
E D E S Y N V T S V L E R K K K C D Y R
AATCCAGCTTCGTCCCGGGTCTPCAGCCCGGAGTGTGACTCTGGGTACATCAAAATCT
241----- 300
I E T F V P G S G P G E E T L G R I K S
TACCGGGTCTGACTAGCTACCTGAGCGGTGCGTTCTACTTACTATAACCAAGCATGCT
301----- 360
Y P Q L T S Y L V R V V S T N Y N Q N A
ATGSGTGTGTTTCAAGAAAGTTTCCAGAACCTGAAATAGCTTCAAGATTACTGTGTACGHI
361----- 420
M V F F K K V S D N R E Y F K I T L Y G
CGTACAAAGACCTGACTCTGAGCTGAAGAAACTTCACTCGGTTCTCTAATCTCTG
421----- 480
R T K E L T S E L K E M F I K F E Y S L
GGCTGCGCGGAGAACCTATCTGTTTCCGGTTCGAGTCAACAGTGCATCGAGGG/CAT
481----- 540
G L P E N H I V F E V P I D Q C C I D G H
GATCAAGATCAGCAITGA
541----- 556
R H H R H *

```

Figure 14

【 図 1 5 】

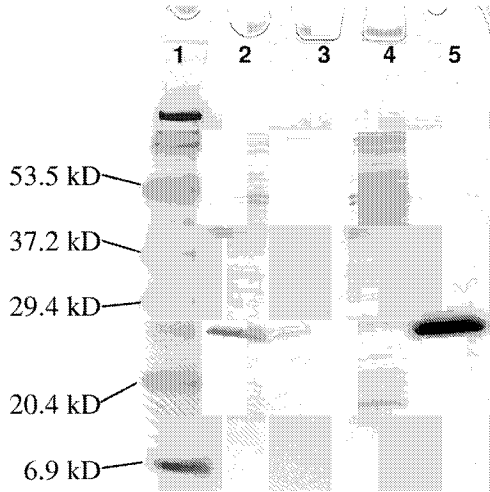


Figure 15

【 図 1 6 】

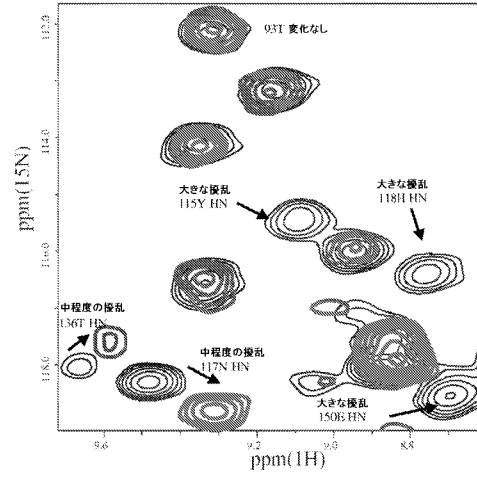


Figure 16

【 図 1 7 A 】

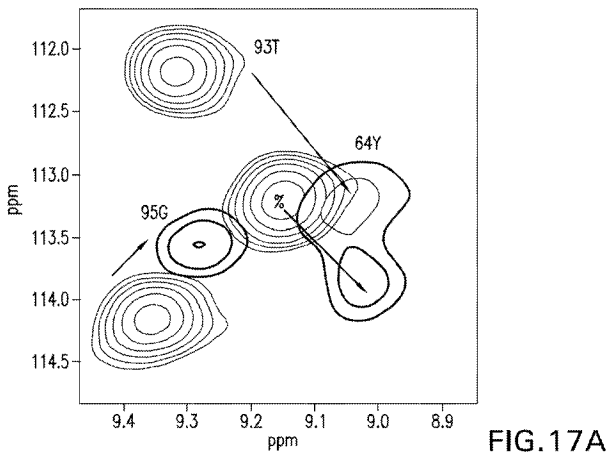


FIG.17A

【 図 1 7 B 】

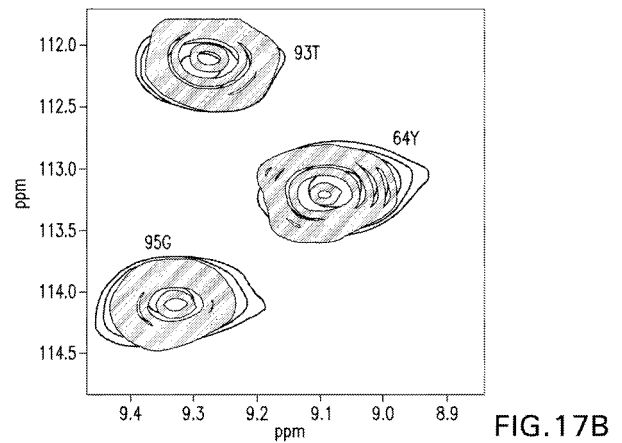


FIG.17B

【 図 1 8 A 】

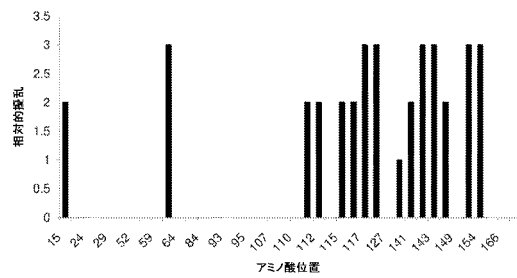


Figure 18A

【 図 1 8 B 】

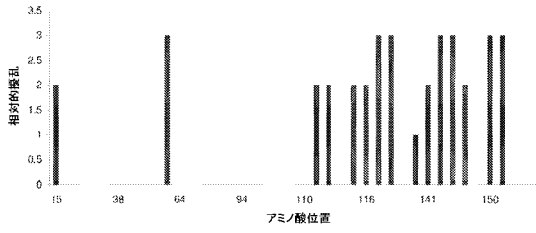


Figure 18B

【 図 1 8 D 】

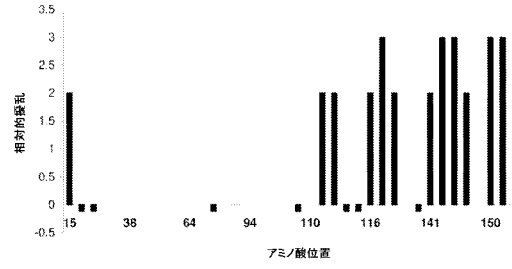


Figure 18D

【 図 1 8 C 】

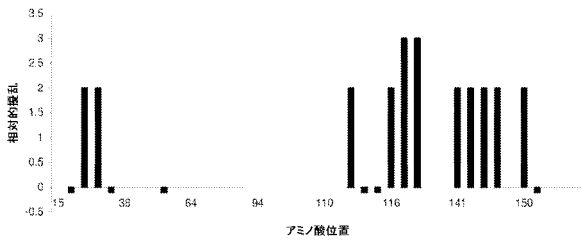


Figure 18C

【 図 1 8 E 】

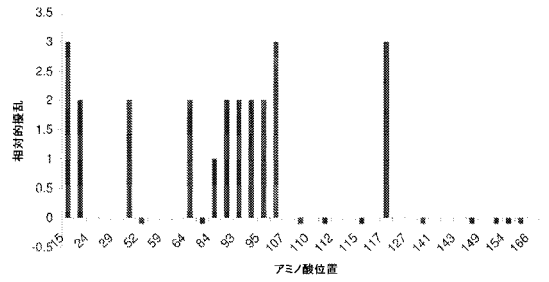


Figure 18E

【 図 1 8 F 】

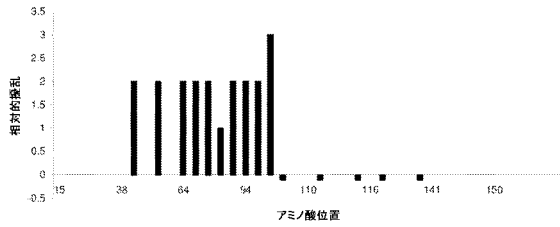


Figure 18F

【 図 1 9 】

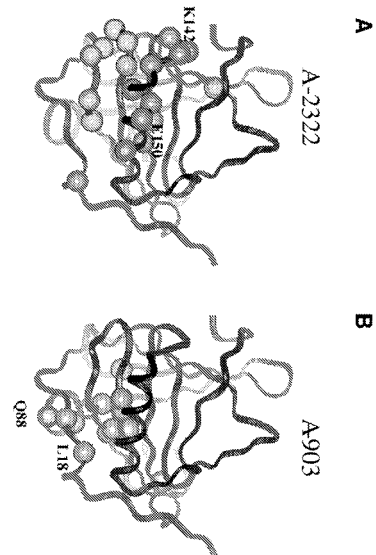


Figure 19

【 図 2 0 】

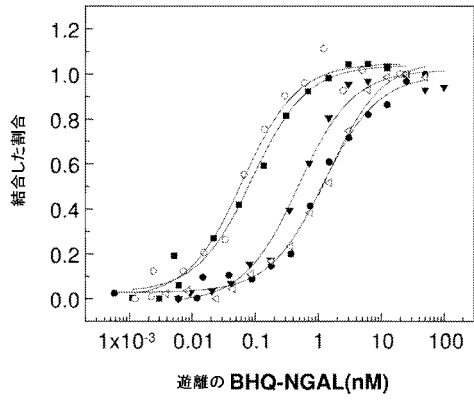


Figure 20

【 図 2 1 】

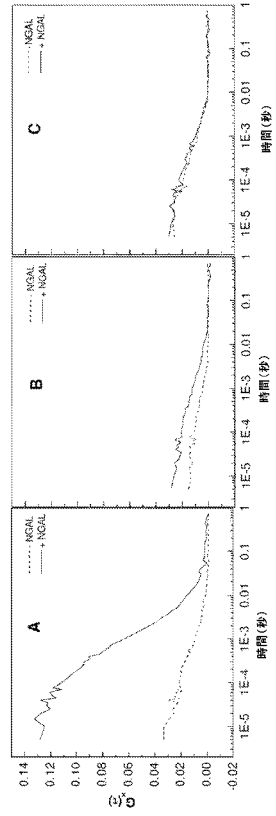


Figure 21

【 配 列 表 】

2011501753000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/080340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KJELDEN L ET AL: "Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 198, no. 2, 13 November 1996 (1996-11-13), pages 155-164, XP004071802 ISSN: 0022-1759 the whole document	1-3, 14-16
X	WO 2007/044994 A (CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER [US]; UNIV COLUMBIA [US]; BARASCH JONATH) 19 April 2007 (2007-04-19) example 1	1-3, 14-16
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 February 2009		Date of mailing of the international search report 09/03/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kalsner, Inge

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/080340

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YAN LI ET AL: "The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. MODULATION OF MMP-9 ACTIVITY BY NGAL" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US, vol. 276, no. 40, 5 October 2001 (2001-10-05), pages 37258-37265, XP002226670 ISSN: 0021-9258</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>KJELDEN L ET AL: "IDENTIFICATION OF NEUTROPHIL GELATINASE-ASSOCIATED LIPOCALIN AS A NOVEL MATRIX PROTEIN OF SPECIFIC GRANULES IN HUMAN NEUTROPHILS" BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 83, no. 3, 1 February 1994 (1994-02-01), pages 799-807, XP000564968 ISSN: 0006-4971</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/080340**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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

2. Claims Nos.:
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:

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 additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

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 Application No. PCT/US2008/080340

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-8, 15 (compl.); 14 (part.)

an isolated antibody that binds to a conformational epitope comprising aa residues 112, 118 and 147 of NGAL protein (SEQ ID NO: 1) and which is deposited under the ATCC accession number PTA-8024; and which has a heavy chain and a light chain variable region with the sequences shown in SEQ ID NO: 7 and 11, respectively; an immunodiagnostic reagent comprising the antibody

2. claims: 9-13, 16 (compl.); 14 (part.)

as above, but with respect to an antibody with the deposit number PTA-8026 having heavy and light chain variable region sequences as shown in SEQ ID NO: 17 and 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/080340

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007044994 A	19-04-2007	CA 2625937 A1	26-04-2007
		EP 1946105 A2	23-07-2008
		EP 1946107 A2	23-07-2008
		US 2008014644 A1	17-01-2008
		WO 2007047458 A2	26-04-2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08		

- (31)優先権主張番号 12/104,408
 (32)優先日 平成20年4月16日(2008.4.16)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 12/104,410
 (32)優先日 平成20年4月16日(2008.4.16)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 12/104,413
 (32)優先日 平成20年4月16日(2008.4.16)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, 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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

- (72)発明者 ホークスワース, デイビッド・ジエイ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60046、レイク・ビラ、ノースウインド・レイン・620
 (72)発明者 オレイニチャク, エドワード・テイ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60030、グレイズレイク、ローリー・コート・506
 (72)発明者 ルワン, チャオチャオ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60073、ラウンド・レイク、ウエスト・オータム・ドライブ・2629
 (72)発明者 シーゲル, ロバート・ダブリュ
 アメリカ合衆国、インディアナ・46130、ファウンテンタウン、ノース・デイビジョン・ロード・10969
 (72)発明者 テチン, セルゲイ・ワイ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60046、リンデンハースト、コンステイテューション・ドライブ・2680
 (72)発明者 テイマン, ブライアン・シー
 アメリカ合衆国、イリノイ・60126、エルムハースト、サウス・レックス・ブルバード・140
 (72)発明者 トウー, バイリン
 アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバティービル、バージニア・アベニュー・1748
 (72)発明者 タイナー, ジョーン・デー
 アメリカ合衆国、イリノイ・60087、ビーチ・パーク、ノース・オーチャード・ロード・37835
 (72)発明者 ツイマン, ロバート・エヌ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60046、リンデンハースト、フォーリング・ウオーターズ・ドライブ・2944

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA44 BA80 CA04 CA07 DA02 DA05 DA12 EA04 GA05
 GA11 HA03
 4B064 AG27 CA02 CA06 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA13

4B065 AA91X AA91Y AB05 AC14 BA02 CA25 CA46

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74

GA26

专利名称(译)	抗体结合哺乳动物NGAL及其用途		
公开(公告)号	JP2011501753A	公开(公告)日	2011-01-13
申请号	JP2010530148	申请日	2008-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	バーケンメイヤーラリージー デサイスーレツシユエム ホークスワースデイビツドジエイ オレイニチャクエドワードテイー ルワンチャオチャオ シーゲルロバートダブリユ テチンセルゲイワイ テイマンブライアンシー トワーバイリン タイナージヨーンデー ツイーマンロバートエヌ		
发明人	バーケンメイヤー,ラリージー デサイ,スーレツシユエム ホークスワース,デイビツドジエイ オレイニチャク,エドワードテイー ルワン,チャオチャオ シーゲル,ロバートダブリユ テチン,セルゲイワイ テイマン,ブライアンシー トワー,バイリン タイナー,ジヨーンデー ツイーマン,ロバートエヌ		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/09 C07K19/00 C07K14/47 C12N5/10 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K14/47 C07K2317/56 C07K2317/92 Y10T436/105831		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N15/00.A C07K19/00 C07K14/47 C12N5/00.102 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	60/981470 2007-10-19 US 60/981471 2007-10-19 US 60/981473 2007-10-19 US 12/104408 2008-04-16 US 12/104410 2008-04-16 US 12/104413 2008-04-16 US		
其他公开文献	JP5746861B2		

摘要(译)

本发明涉及对糖基化哺乳动物NGAL特异的抗体，以及制备和使用这些抗体的方法。



Figure 11