(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6444976号
(P6444976)

(45)発行日　平成30年12月26日(2018.12.26)　(24)登録日　平成30年12月7日(2018.12.7)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18	ZNA
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	

請求項の数 13　(全 111 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-502880 (P2016-502880)
(86)(22)出願日　平成26年3月14日 (2014.3.14)
(65)公表番号　特表2016-516045 (P2016-516045A)
(43)公表日　平成28年6月2日 (2016.6.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/028725
(87)国際公開番号　WO2014/144355
(87)国際公開日　平成26年9月18日 (2014.9.18)
審査請求日　平成29年3月10日 (2017.3.10)
(31)優先権主張番号　13/836,229
(32)優先日　平成25年3月15日 (2013.3.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　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
特許業務法人川口國際特許事務所
(72)発明者　トゥー，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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＧＰ７３モノクローナル抗体およびそれを得る方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ゴルジタンパク質７３（「ＧＰ７３」）に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号１３のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン領域を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項２】

免疫接着分子、画像化剤および治療剤からなる群から選択される薬剤をさらに含む請求項１に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項３】

ＶＳＱＥＮＰＥＭＥＧＰＥＲＤＱＬＶＩＰＤＧＱＥＥＥＱＥＡＡＧＥＧＲ（ｈＧＰ７３　３０７－３３９）（配列番号１０１）のアミノ酸配列内のＧＰ７３エピトープに結合する請求項１又は２に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項４】

請求項１から３のいずれかに記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、
ｉ）４．０×１０$^{-9}$から１．８×１０$^{-12}$の間の平衡解離定数（K_D）、
ｉｉ）１．５×１０$^{-3}$から８．０×１０$^{-6}$の間の解離速度（k_{off}）または
ｉｉｉ）１．０×１０^{5}から４．１×１０^{6}の間の結合速度（k_{on}）を有する、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項５】

請求項１から４のいずれか一項に記載の、抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸配列を含む核酸分子。
【請求項６】
請求項５に記載の単離された核酸分子を含み、かつ発現する宿主細胞。
【請求項７】
請求項１から４のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片、および担体を含む組成物。
【請求項８】
試験試料中のＧＰ７３濃度を決定するための方法であって、
（ａ）試験試料を少なくとも１つの捕捉抗体と接触させること、ここで、捕捉抗体がＧＰ７３上のエピトープまたはＧＰ７３の断片に結合して、捕捉抗体－ＧＰ７３抗原複合体を形成する；
（ｂ）捕捉抗体－ＧＰ７３抗原複合体を、検出可能な標識を含む少なくとも１つの検出抗体と接触させること、ここで、検出抗体が、捕捉抗体が結合していないＧＰ７３上のエピトープに結合し、捕捉抗体－ＧＰ７３抗原－検出抗体複合体を形成する；および
（ｃ）（ｂ）において形成された捕捉抗体－ＧＰ７３抗原－検出抗体複合体における検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料中のＧＰ７３濃度を決定すること
を含み、
少なくとも１つの捕捉抗体が、または少なくとも１つの検出抗体が、請求項１から４のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片を含む、方法。
【請求項９】
試験試料中のＧＰ７３がフコシル化されている、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
試験試料中のＧＰ７３濃度の直接的または間接的指標として検出可能な標識によって生じたシグナルを、対照または較正物質中のＧＰ７３濃度の直接的または間接的指標として生じたシグナルと比較することをさらに含む請求項８または９に記載の方法。
【請求項１１】
試験試料中のＧＰ７３濃度が、対象が肝疾患を有するか、または発症する危険性があるかどうかを決定するか、または評価するために使用される請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３について試験試料をアッセイするためのキットであって、
（ａ）ＧＰ７３またはＧＰ７３の断片上のエピトープに結合する少なくとも１つの捕捉抗体、
（ｂ）捕捉抗体が結合していないＧＰ７３上のエピトープに結合する少なくとも１つの検出抗体、および
（ｃ）ＧＰ７３について試験試料をアッセイするための説明書を含み、
少なくとも１つの捕捉抗体または少なくとも１つの検出抗体が、請求項１から４のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片を含み、少なくとも１つの捕捉抗体が少なくとも１つの検出抗体と異なる、キット。
【請求項１３】
対照または較正物質中のＧＰ７３濃度を示す参照標準物質をさらに含む請求項１２に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ＧＰ７３、特に抗ＧＰ７３モノクローナル抗体、少なくとも１つの抗体（例えば、モノクローナル抗体）の使用を伴うアッセイ、例えば、イムノアッセイ、ならびに関連するアミノ酸および核酸配列およびそれを含むベクターおよび宿主細胞に関する。

【背景技術】
【０００２】
ゴルジタンパク質７３（「ＧＰ７３」）は、７３ｋｄの常駐ゴルジ膜タンパク質である。ＧＰ７３は、単一のＮ末端の膜貫通ドメインおよびゴルジ装置の内腔表面上に位置する大規模なＣ末端のコイルドコイルドメインを有するＩＩ型膜貫通タンパク質である。ＧＰ７３は、ウイルス性および非ウイルス性の慢性肝疾患における肝細胞において上方制御されることが示され、これは、該タンパク質が、肝細胞の細胞性疾患応答に関与し得ることを示唆している。さらに、ＧＰ７３レベルは、健常人に比べて肝臓がんの患者において高くなっている。フコシル化糖鎖付加は、肝細胞癌（ＨＣＣ）患者からの分泌されたＧＰ７３の４分の３に見出されている。初期の研究は、ＧＰ７３およびフコシル化ＧＰ７３が、アルファーフェトプロテイン（ＡＦＰ）などの現在のマーカーよりも肝疾患の早期診断のためのより信頼性の高いバイオマーカーであり得て、これは、ＡＦＰが、他の肝疾患を含む多くの状況下で生成されているため、偽陽性の結果を生じさせるという欠点がある。また、ＡＦＰは、ＨＣＣを有する全ての患者に存在しない。さらに、以前から知られている抗ＧＰ７３抗体である１４Ｈ４－２３モノクローナル抗体（Ａｎａｎｄ　Ｍｅｈｔａ博士、Ｄｒｅｘｅｌ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｓｃｈｏｏｌ　ｏｆ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅによる提供）は、ＧＰ７３分子上のフコース糖部分の存在または不存在の影響を受けない。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
前述を考慮すると、本開示の課題は、ＧＰ７３分子上のフコース糖部分の存在もしくは不存在に感受性があり、ＧＰ７３のフコシル化形態に結合することができ、あるいは、ＧＰ７３分子上のフコース糖部分の存在または不存在に感受性がないが、ＧＰ７３および／またはフコシル化されたＧＰ７３を検出するためのイムノアッセイにおける使用に十分な結合親和性を有する抗ＧＰ７３モノクローナル抗体を提供することである。この及び他の目的及び利点、並びに本発明の特徴は、本明細書で提供される詳細な説明から明らかになる。
【課題を解決するための手段】
【０００４】
（要旨）
本発明は、ＶＳＱＥＮＰＥＭＥＧＰＥＲＤＱＬＶＩＰＤＧＱＥＥＥＱＥＡＡＧＥＧＲ（ｈＧＰ７３　３０７－３３９）（配列番号１０１）のアミノ酸配列内のエピトープに結合することができる単離された抗体または該抗体の抗体断片に関する。単離された抗体また抗体断片は、ヒト抗体、免疫グロブリン分子、ジスルフィド連結されたＦｖ、モノクローナル抗体、親和性成熟、ｓｃＦｖ、キメラ抗体、単一ドメイン抗体、ＣＤＲ移植抗体、ダイアボディ、ヒト化抗体、多重特異的抗体、Ｆａｂ、二重特異的抗体、ＤＶＤ、ＴＶＤ、Ｆａｂ’、二特異的抗体、Ｆ（ａｂ’）２およびＦｖからなる群から選択される。単離された抗体または抗体断片はヒトである。単離された抗体または抗体断片は、ヒトＩｇＭ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ４定常ドメイン、ヒトＩｇＧ１定常ドメイン、ヒトＩｇＥ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ２定常ドメイン、ヒトＩｇＧ３定常ドメインおよびヒトＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。
【０００５】
本発明は、ＥＱＶＶＥＤＲＰＶＧＧＲ（ｈＧＰ７３　２７６－２８７）（配列番号１０２）のアミノ酸配列内のエピトープに結合することができる単離された抗体または該抗体の抗体断片に関する。単離された抗体また抗体断片は、ヒト抗体、免疫グロブリン分子、ジスルフィド連結されたＦｖ、モノクローナル抗体、親和性成熟、ｓｃＦｖ、キメラ抗体、単一ドメイン抗体、ＣＤＲ移植抗体、ダイアボディ、ヒト化抗体、多重特異的抗体、Ｆａｂ、二重特異的抗体、ＤＶＤ、ＴＶＤ、Ｆａｂ’、二特異的抗体、Ｆ（ａｂ’）２およびＦｖからなる群から選択される。単離された抗体または抗体はヒトである。単離された抗体または抗体断片は、ヒトＩｇＭ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ４定常ドメイン、ヒトＩｇ

Ｇ１定常ドメイン、ヒトＩｇＥ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ２定常ドメイン、ヒトＩｇＧ３定常ドメインおよびヒトＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。

【０００６】

本発明は、ＬＲＧＥＤＤＹＮＭＤＥＮＥＡＥＳＥＴＤＫ（ｈＧＰ７３　３４４－３６３）（配列番号１０３）のアミノ酸配列内のエピトープに結合することができる単離された抗体または該抗体の抗体断片に関する。抗体は、ヒト抗体、免疫グロブリン分子、ジスルフィド連結されたＦｖ、モノクローナル抗体、親和性成熟、ｓｃＦｖ、キメラ抗体、単一ドメイン抗体、ＣＤＲ移植抗体、ダイアボディ、ヒト化抗体、多重特異的抗体、Ｆａｂ、二重特異的抗体、ＤＶＤ、ＴＶＤ、Ｆａｂ’、二特異的抗体、Ｆ（ａｂ’）２およびＦｖからなる群から選択される。抗体または抗体断片はヒトである。抗体または抗体断片は、ヒトＩｇＭ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ４定常ドメイン、ヒトＩｇＧ１定常ドメイン、ヒトＩｇＥ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ２定常ドメイン、ヒトＩｇＧ３定常ドメインおよびヒトＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。

【０００７】

本発明は、ＥＬＫＫＮＥＦＱＧＥＬＥＫＱＲＥＱＬＤＫＩＱＳＳＨＮＦＱＬＥＳＶＮＫ（ｈＧＰ７３　６３－９６）（配列番号１０４）のアミノ酸配列内のエピトープに結合することができる単離された抗体または該抗体の抗体断片に関する。抗体は、ヒト抗体、免疫グロブリン分子、ジスルフィド連結されたＦｖ、モノクローナル抗体、親和性成熟、ｓｃＦｖ、キメラ抗体、単一ドメイン抗体、ＣＤＲ移植抗体、ダイアボディ、ヒト化抗体、多重特異的抗体、Ｆａｂ、二重特異的抗体、ＤＶＤ、ＴＶＤ、Ｆａｂ’、二特異的抗体、Ｆ（ａｂ’）２およびＦｖからなる群から選択される。抗体または抗体断片はヒトである。抗体または抗体断片は、ヒトＩｇＭ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ４定常ドメイン、ヒトＩｇＧ１定常ドメイン、ヒトＩｇＥ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ２定常ドメイン、ヒトＩｇＧ３定常ドメインおよびヒトＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。

【０００８】

本発明は、ゴルジタンパク質７３（「ＧＰ７３」）に免疫特異的に結合する単離された抗体または該抗体の抗体断片に関し、該抗体または抗体断片のＧＰ７３への結合はＧＰ７３のフコシル化に感受性である。抗体は、ヒト抗体、免疫グロブリン分子、ジスルフィド連結されたＦｖ、モノクローナル抗体、親和性成熟、ｓｃＦｖ、キメラ抗体、単一ドメイン抗体、ＣＤＲ移植抗体、ダイアボディ、ヒト化抗体、多重特異的抗体、Ｆａｂ、二重特異的抗体、ＤＶＤ、ＴＶＤ、Ｆａｂ’、二特異的抗体、Ｆ（ａｂ’）２およびＦｖからなる群から選択される。抗体または抗体断片はヒトである。抗体または抗体断片は、ヒトＩｇＭ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ４定常ドメイン、ヒトＩｇＧ１定常ドメイン、ヒトＩｇＥ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ２定常ドメイン、ヒトＩｇＧ３定常ドメインおよびヒトＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。

【０００９】

本発明は、ゴルジタンパク質７３（「ＧＰ７３」）に免疫特異的に結合する単離された抗体または該抗体の抗体断片に関し、該抗体または抗体断片のＧＰ７３への結合はＧＰ７３のフコシル化に非感受性である。抗体は、ヒト抗体、免疫グロブリン分子、ジスルフィド連結されたＦｖ、モノクローナル抗体、親和性成熟、ｓｃＦｖ、キメラ抗体、単一ドメイン抗体、ＣＤＲ移植抗体、ダイアボディ、ヒト化抗体、多重特異的抗体、Ｆａｂ、二重特異的抗体、ＤＶＤ、ＴＶＤ、Ｆａｂ’、二特異的抗体、Ｆ（ａｂ’）２およびＦｖからなる群から選択される。抗体または抗体断片はヒトである。抗体または抗体断片は、ヒトＩｇＭ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ４定常ドメイン、ヒトＩｇＧ１定常ドメイン、ヒトＩｇＥ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ２定常ドメイン、ヒトＩｇＧ３定常ドメインおよびヒトＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。

【００１０】

本発明は、ゴルジタンパク質７３（「ＧＰ７３」）に結合する単離された抗体または抗

体断片に関し、抗体は、（ａ）配列番号１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域、（ｂ）配列番号５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域、（ｃ）配列番号９のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域、（ｄ）配列番号１３のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域、（ｅ）配列番号１７のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域、（ｆ）配列番号２１のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域、（ｇ）配列番号２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域、（ｈ）配列番号２９のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域、（ｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域、（ｊ）配列番号３７のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域、（ｋ）配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域、（ｌ）配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域、（ｍ）配列番号１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域、（ｎ）配列番号９のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号１３のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域、（ｏ）配列番号１７のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２１のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域、（ｐ）配列番号２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２９のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域、（ｑ）配列番号３３のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号３７のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域、（ｒ）配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域、（ｓ）配列番号２のアミノ酸配列を含む相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、（ｔ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖、（ｕ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、（ｖ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖、（ｗ）配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、（ｘ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖、（ｙ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、（ｚ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖、（ａａ）配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、（ｂｂ）配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖、（ｃｃ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、（ｄｄ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖、（ｅｅ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖、（ｆｆ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖、（ｇｇ）配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号２２のアミノ酸

配列を含むＣＤＲ１、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖、（ｈｈ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖、（ｉｉ）配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖、および（ｊｊ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲを含む可変重ドメイン鎖、および配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽ドメイン鎖からなる群から選択されるドメインまたは領域を含む。抗体は、ヒト抗体、免疫グロブリン分子、ジスルフィド連結されたＦｖ、モノクローナル抗体、親和性成熟、ｓｃＦｖ、キメラ抗体、単一ドメイン抗体、ＣＤＲ移植抗体、ダイアボディ、ヒト化抗体、多重特異的抗体、Ｆａｂ、二重特異的抗体、ＤＶＤ、ＴＶＤ、Ｆａｂ’、二特異的抗体、Ｆ（ａｂ’）２およびＦｖからなる群から選択される。抗体または抗体断片はヒトである。抗体または抗体断片は、ヒトＩｇＭ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ４定常ドメイン、ヒトＩｇＧ１定常ドメイン、ヒトＩｇＥ定常ドメイン、ヒトＩｇＧ２定常ドメイン、ヒトＩｇＧ３定常ドメインおよびヒトＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。抗体または抗体断片は、配列番号１、配列番号９、配列番号１７、配列番号２５、配列番号３３および配列番号４１からなる群から選択される配列を含む可変重鎖領域を含む。抗体または抗体断片は、配列番号５、配列番号１３、配列番号２１、配列番号２９、配列番号３７および配列番号４５からなる群から選択される配列を含む可変軽鎖領域を含む。抗体または抗体断片は、配列番号１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を含む。抗体または抗体断片は、配列番号９のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号１３のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を含む。抗体または抗体断片は、配列番号１７のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２１のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を含む。抗体または抗体断片は、配列番号２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２９のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を含む。抗体または抗体断片は、配列番号３３のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号３７のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を含む。抗体または抗体断片は、配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を含む。抗体または抗体断片は、相補性決定領域（ＣＤＲ）残基：配列番号２、配列番号３および配列番号４；配列番号１０、配列番号１１および配列番号１２；配列番号１８、配列番号１９および配列番号２０；配列番号２６、配列番号２７および配列番号２８；配列番号３４、配列番号３５および配列番号３６；または配列番号４２、配列番号４３および配列番号４４を含む可変重鎖ドメインを含む。抗体または抗体断片は、相補性決定領域（ＣＤＲ）残基：配列番号６、配列番号７および配列番号８；配列番号１４、配列番号１５および配列番号１６；配列番号２２、配列番号２３および配列番号２４；配列番号３０、配列番号３１および配列番号３２；配列番号３８、配列番号３９および配列番号４０；または配列番号４６、配列番号４７および配列番号４８を含む可変軽鎖ドメインを含む。抗体または抗体断片は、相補性決定領域（ＣＤＲ）残基配列番号２、配列番号３および配列番号４を含む可変重鎖ドメイン、および相補性決定領域（ＣＤＲ）残基配列番号６、配列番号７および配列番号８を含む可変軽鎖ドメインを含む。抗体または抗体断片は、相補性決定領域（ＣＤＲ）残基配列番号１０、配列番号１１および配列番号１２を含む可変重鎖ドメイン、および相補性決定領域（ＣＤＲ）残基配列番号１４、配列番号１５および配列番号１６を含む可変軽鎖ドメインを含む。抗体または抗体断片は

、相補性決定領域（ＣＤＲ）残基配列番号１８、配列番号１９および配列番号２０を含む可変重鎖ドメイン、および相補性決定領域（ＣＤＲ）残基配列番号２２、配列番号２３および配列番号２４を含む可変軽鎖ドメインを含む。抗体または抗体断片は、相補性決定領域（ＣＤＲ）残基配列番号２６、配列番号２７および配列番号２８を含む可変重鎖ドメイン、および相補性決定領域（ＣＤＲ）残基配列番号３０、配列番号３１および配列番号３２を含む可変軽鎖ドメインを含む。抗体または抗体断片は、相補性決定領域（ＣＤＲ）残基配列番号３４、配列番号３５および配列番号３６を含む可変重鎖ドメイン、および相補性決定領域（ＣＤＲ）残基配列番号３８、配列番号３９および配列番号４０を含む可変軽鎖ドメインを含む。抗体または抗体断片は、相補性決定領域（ＣＤＲ）残基配列番号４２、配列番号４３および配列番号４４を含む可変重鎖ドメイン、および相補性決定領域（ＣＤＲ）残基配列番号４６、配列番号４７および配列番号４８を含む可変軽鎖ドメインを含む。抗体または抗体断片は、免疫接着分子、画像化剤および治療剤からなる群から選択される薬剤をさらに含む。画像化剤は、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識およびビオチンからなる群から選択される。放射性標識は、３Ｈ、１４Ｃ、３５Ｓ、９０Ｙ、９９Ｔｃ、１１１Ｉｎ、１２５Ｉ、１３１Ｉ、１７７Ｌｕ、１６６Ｈｏおよび１５３Ｓｍからなる群から選択される。抗体または抗体断片は、ＶＳＱＥＮＰＥＭＥＧＰＥＲＤＱＬＶＩＰＤＧＱＥＥＥＱＥＡＡＧＥＧＲ（ｈＧＰ７３　３０７－３３９）（配列番号１０１）のアミノ酸配列内のＧＰ７３エピトープに結合する。抗体または抗体断片は、配列番号９のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域；配列番号１３のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号９のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号１３のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。抗体または抗体断片は、ＥＱＶＶＥＤＲＰＶＧＧＲ（ｈＧＰ７３　２７６－２８７）（配列番号１０２）のアミノ酸配列内のＧＰ７３エピトープに結合する。抗体または抗体断片は、配列番号１７のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域；配列番号２１のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号１７のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２１のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。抗体または抗体断片は、ＬＲＧＥＤＤＹＮＭＤＥＮＥＡＥＳＥＴＤＫ（ｈＧＰ７３　３４４－３６３）（配列番号１０３）のアミノ酸配列内のＧＰ７３エピトープに結合する。抗体または抗体断片は、配列番号１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域；配列番号５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号２のアミノ酸配列を含む相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列

番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。抗体または抗体断片は、ＥＬＫＫＮＥＦＱＧＥＬＥＫＱＲＥＱＬＤＫＩＱＳＳＨＮＦＱＬＥＳＶＮＫ（ｈＧＰ７３　６３－９６）（配列番号１０４）のアミノ酸配列内のＧＰ７３エピトープに結合する。抗体または抗体断片は、配列番号３３のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域；配列番号３７のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号３３のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号３７のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。ＧＰ７３への抗体または抗体断片の結合は、ＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または不存在に感受性である。抗体または抗体断片は、配列番号２５または配列番号３３のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域；配列番号２９または配列番号３７のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン、および配列番号２９のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号３３のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号３７のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。ＧＰ７３への抗体または抗体断片の結合は、ＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または不存在に非感受性である。抗体または抗体断片は、配列番号１、配列番号９、配列番号１７または配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域；配列番号５、配列番号１３、配列番号２１または配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号９のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号１３のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号１７のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２１のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号１８のア

ミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。

【００１１】

本発明は、ＧＰ７３に特異的に結合し、式X_5－X_6－X_7－X_8－X_9（配列番号１０８）を有するＣＤＲ－Ｈ１、式X_{10}－Ｉ－X_{11}－X_{12}－X_{13}－X_{14}－X_{15}－$X_{16}$$X_{17}$－$X_{18}$－$X_{19}$－$X_{20}$－$X_{21}$－$X_{22}$－$X_{23}$－$X_{24}$－$X_{25}$－$X_{26}$－$X_{27}$（配列番号１０９）を有するＣＤＲ－Ｈ２、式$X_{28}$－$X_{29}$－$X_{30}$－$X_{31}$－$X_{32}$－$X_{33}$－$X_{34}$－$X_{35}$－$X_{36}$－$X_{37}$－$X_{38}$－$X_{39}$－Ｙ（配列番号１１０）を有するＣＤＲ－Ｈ３、式$X_{40}$－$X_{41}$－Ｓ－$X_{42}$－$X_{43}$－$X_{44}$－$X_{45}$－$X_{46}$－$X_{47}$－$X_{48}$－$X_{49}$－$X_{50}$－$X_{51}$－$X_{52}$－$X_{53}$－$X_{54}$（配列番号１１１）を有するＣＤＲ－Ｌ１、式$X_{55}$－$X_{56}$－Ｓ－$X_{57}$－$X_{58}$－$X_{59}$－$X_{60}$（配列番号１１２）を有するＣＤＲ－Ｌ２および式$X_{61}$－Ｑ－$X_{62}$－$X_{63}$－$X_{64}$－$X_{65}$－Ｐ－$X_{66}$－Ｔ（配列番号１１３）を有するＣＤＲ－Ｌ３を有する単離された抗体に関し、X_5は、Ｓ、ＮまたはＴであり；X_6は、ＹまたはＮであり；X_7は、Ｗ、Ｖ、Ｇ、ＡまたはＴであり；X_8は、Ｉ、ＶまたはＭであり；X_9は、Ｅ、Ｈ、ＳまたはＮであり；X_{10}は、Ｅ、Ｙ、Ｖ、ＴまたはＲであり；X_{11}は、Ｌ、Ｗ、ＳまたはＲであり；X_{12}は、Ｐ、Ｓ、ＲまたはＴであり；X_{13}は、存在しないまたはＫであり；X_{14}は、存在しないまたはＲであり；X_{15}は、Ｇ、ＴまたはＹであり；X_{16}は、Ｓ、ＧまたはＮであり；X_{17}は、Ｇ、Ｄ、Ｓ、ＴまたはＹであり；X_{18}は、Ｎ、Ｓ、Ｙ、ＧまたはＴであり；X_{19}は、ＴまたはＩであり；X_{20}は、Ｎ、Ｋ、ＹまたはＦであり；X_{21}は、ＹまたはＦであり；X_{22}は、Ｎ、ＰまたはＡであり；X_{23}は、Ｅ、ＳまたはＤであり；X_{24}は、Ｋ、ＡまたはＳであり；X_{25}は、Ｆ、ＬまたはＶであり；X_{26}は、ＫまたはＭであり；X_{27}は、Ｇ、ＳまたはＤであり；X_{28}は、Ｇ、Ｑ、Ｄ、ＥまたはＮであり；X_{29}は、Ｒ、Ｑ、Ｐ、Ｙ、ＷまたはＧであり；X_{30}は、Ｇ、Ｌ、Ｆ、ＤまたはＴであり；X_{31}は、Ｓ、Ｔ、ＳまたはＧであり；X_{32}は、Ｙ、Ｄ、Ｇ、ＥまたはＴであり；X_{33}は、Ｒ、Ｙ、Ｄ、ＬまたはＦであり；X_{34}は、Ｙ

、Ｆ、ＴまたはＨであり；X_{35}は、ＨまたはＹであり；X_{36}は、Ｗ、ＤまたはＹであり；X_{37}は、Ｆ、ＹまたはＡであり；X_{38}は、存在しないまたはＦもしくはＭであり；X_{39}は、ＡまたはＤであり；X_{40}は、Ｋ、Ｔ、ＲまたはＳであり；X_{41}は、ＡまたはＳであり；X_{42}は、Ｑ、ＳまたはＫであり；X_{43}は、ＳまたはＧであり；X_{44}は、ＶまたはＬであり；X_{45}は、ＤまたはＬであり；X_{46}は、Ｙ、ＤまたはＨであり；X_{47}は、存在しないまたはＳであり；X_{48}は、Ｄ、Ｖ、ＮまたはＩであり；X_{49}は、Ｇ、ＶまたはＳであり；X_{50}は、Ｄ、Ｋ、ＳまたはＩであり；X_{51}は、Ｓ、Ｔ、ＩまたはＮであり；X_{52}は、ＹまたはＤであり；X_{53}は、Ｍ、ＬまたはＶであり；X_{54}は、Ｎ、Ｉ、Ｓ、ＨまたはＹであり；X_{55}は、Ａ、Ｌ、Ｓ、ＱまたはＲであり；X_{56}は、Ａ、Ｖ、ＴまたはＭであり；X_{57}は、Ｎ、Ｋ、ＹまたはＳであり；X_{58}は、ＬまたはＲであり；X_{59}は、Ｅ、Ｄ、ＹまたはＡであり；X_{60}は、ＳまたはＩであり；X_{61}は、Ｑ、Ｗ、ＨまたはＡであり；X_{62}は、Ｓ、Ｇ、Ｈ、ＹまたはＮであり；X_{63}は、Ｎ、Ｔ、Ｆ、ＨまたはＬであり；X_{64}は、Ｅ、Ｈ、Ｔ、ＲまたはＳであり；X_{65}は、Ｄ、Ｆ、Ｔ、Ｓ、ＬまたはＩであり；およびX_{66}は、ＹまたはＬである。

【００１２】

本発明は、ゴルジタンパク質７３（「ＧＰ７３」）に免疫特異的に結合する単離された抗体または該抗体の抗体断片に関し、該抗体は、約４．０×１０－９から約１．８×１０－１２の間の平衡解離定数（ＫＤ）を有する。

【００１３】

本発明は、ゴルジタンパク質７３（「ＧＰ７３」）に免疫特異的に結合する単離された抗体または該抗体の抗体断片に関し、該抗体は、約１．５×10^{-3}から約８．０×10^{-6}の間の解離速度（ｋｏｆｆ）を有する。

【００１４】

本発明は、ゴルジタンパク質７３（「ＧＰ７３」）に免疫特異的に結合する単離された抗体または該抗体の抗体断片に関し、該抗体は、約１．０×10^{5}から約４．１×10^{6}の間の結合速度（ｋｏｎ）を有する。

【００１５】

本発明は、配列番号１から４８のいずれか１つをコードする単離された核酸に関する。

【００１６】

本発明は、請求項１、５、９、１３、１７、２１、２５、６０、６１、６２または６３に記載の抗体または抗体断片をコードする単離された核酸に関する。

【００１７】

本発明は、配列番号４９から９６の少なくとも１つの核酸配列を含む単離された核酸に関する。

【００１８】

本発明は、場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号１、（ｉｉ）配列番号５もしくは（ｉｉｉ）配列番号１および配列番号５のアミノ酸配列；場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号９、（ｉｉ）配列番号１３もしくは（ｉｉｉ）配列番号９および配列番号１３のアミノ酸配列；場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号１７、（ｉｉ）配列番号２１もしくは（ｉｉｉ）配列番号１７および配列番号２１のアミノ酸配列；場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号２５、（ｉｉ）配列番号２９もしくは（ｉｉｉ）配列番号２５および配列番号２９のアミノ酸配列；場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号３３、（ｉｉ）配列番号３７もしくは（ｉｉｉ）配列番号３３および配列番号３７のアミノ酸配列；または場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号４１、（ｉｉ）配列番号４５もしくは（ｉｉｉ）配列番号４１および配列番号４５のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸に関する。請求項６７に記載の単離された核酸であって、該核酸は、場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号４９、（ｉｉ）配列番号５３もしくは（ｉｉｉ）配列番号４９および配列番号５３のヌクレオチド配列；場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号５７、（ｉｉ）配列番号６１もしくは（ｉｉｉ）配列番号５７および配列番

号６１のヌクレオチド配列；場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号６５、（ｉｉ）配列番号６９もしくは（ｉｉｉ）配列番号６５および配列番号６９のヌクレオチド配列；場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号７３、（ｉｉ）配列番号７７もしくは（ｉｉｉ）配列番号７３および配列番号７７のヌクレオチド配列；場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号８１、（ｉｉ）配列番号８５もしくは（ｉｉｉ）配列番号８１および配列番号８５のヌクレオチド配列；または場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号８９、（ｉｉ）配列番号９３もしくは（ｉｉｉ）配列番号８９および配列番号９３のヌクレオチド配列を含む。

【００１９】

本発明は、場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号１、（ｉｉ）配列番号５もしくは（ｉｉｉ）配列番号１および配列番号５のアミノ酸配列；場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号９、（ｉｉ）配列番号１３もしくは（ｉｉｉ）配列番号９および配列番号１３のアミノ酸配列；場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号１７、（ｉｉ）配列番号２１もしくは（ｉｉｉ）配列番号１７および配列番号２１のアミノ酸配列；場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号２５、（ｉｉ）配列番号２９もしくは（ｉｉｉ）配列番号２５および配列番号２９のアミノ酸配列；場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号３３、（ｉｉ）配列番号３７もしくは（ｉｉｉ）配列番号３３および配列番号３７のアミノ酸配列；または場合によってベクターの一部として、（ｉ）配列番号４１、（ｉｉ）配列番号４５もしくは（ｉｉｉ）配列番号４１および配列番号４５のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸を含み、且つ発現する宿主細胞に関する。

【００２０】

本発明は、請求項１、５、９、１３、１７、２１、２５、６０、６１、６２または６３に記載の抗体、該抗体の抗体断片、混合物または誘導体を含む医薬組成物に関する。本発明は、試験試料中のＧＰ７３濃度を決定するための方法に関し、該方法は、試験試料を少なくとも１つの捕捉抗体と接触させること、ここで、捕捉抗体がＧＰ７３上のエピトープまたはＧＰ７３の断片に結合して、捕捉抗体－ＧＰ７３抗原複合体を形成する；捕捉抗体－ＧＰ７３抗原複合体を、検出可能な標識を含む少なくとも１つの検出抗体と接触させること、ここで、検出抗体が、捕捉抗体が結合していないＧＰ７３上のエピトープに結合し、捕捉抗体－ＧＰ７３抗原－検出抗体複合体を形成する；および先の工程において形成された捕捉抗体－ＧＰ７３抗原－検出抗体複合体における検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料中のＧＰ７３濃度を決定することを含み、少なくとも１つの捕捉抗体が、請求項１、５、９、１３、１７、２１、２５、６０、６１、６２または６３に記載の単離された抗体または抗体断片を含み、少なくとも１つの検出抗体が、請求項１、５、９、１３、１７、２１、２５、６０、６１、６２または６３に記載の単離された抗体または断片抗体を含み、少なくとも１つの捕捉抗体が、少なくとも１つの検出抗体とは異なる。本方法は、試験試料中のＧＰ７３濃度の直接的または間接的指標として検出可能な標識によって生じたシグナルを、対照または較正物質中のＧＰ７３濃度の直接的または間接的指標として生じたシグナルと比較することをさらに含む。試験試料中のＧＰ７３濃度が、対象が肝疾患を有するか、または発症する危険性があるかどうかを決定するまたは評価するために使用される。対照または較正物質中のＧＰ７３濃度と比較したＧＰ７３濃度の増加が、対象が肝疾患を有することを示す。肝疾患は、肝硬変または肝がんである。

【００２１】

本発明は、試験試料中のＧＰ７３濃度を決定するための方法に関し、該方法は、試験試料を少なくとも１つの捕捉抗体と接触させること、ここで、捕捉抗体がＧＰ７３上のエピトープまたはＧＰ７３の断片に結合して、捕捉抗体－ＧＰ７３抗原複合体を形成する；捕捉抗体－ＧＰ７３抗原複合体を、検出可能な標識を含む少なくとも１つの検出抗体と接触させること、ここで、検出抗体が、捕捉抗体が結合していないＧＰ７３上のエピトープに結合し、捕捉抗体－ＧＰ７３抗原－検出抗体複合体を形成する；（ｂ）において形成された捕捉抗体－ＧＰ７３抗原－検出抗体複合体における検出可能な標識によって生じたシグ

ナルに基づいて、試験試料中のＧＰ７３濃度を決定することを含み、少なくとも１つの捕捉抗体が、配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン；配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号４２のアミノ酸配列を含む相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含み；少なくとも１つの検出抗体が、配列番号２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン；配列番号２９のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２９のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびにおよび配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。

【００２２】

本発明は、試験試料中のフコシル化ＧＰ７３濃度を決定するための方法に関し、該方法は、試験試料を少なくとも１つの捕捉結合タンパク質と接触させること、ここで、捕捉結合タンパク質がＧＰ７３の領域またはＧＰ７３の断片に結合して、捕捉結合タンパク質－ＧＰ７３複合体を形成する、ステップ；捕捉結合タンパク質－ＧＰ７３複合体を、検出可能な標識を含む少なくとも１つの検出結合タンパク質と接触させること、ここで、検出結合タンパク質が、捕捉結合タンパク質が結合していないＧＰ７３の領域に結合し、捕捉結合タンパク質－ＧＰ７３－検出結合タンパク質複合体を形成する；先の工程において形成された捕捉結合タンパク質－ＧＰ７３－検出結合タンパク質複合体における検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料中のＧＰ７３濃度を決定することを含み、少なくとも１つの捕捉結合タンパク質が、ＧＰ７３への結合がＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または不存在に感受性であるタンパク質、抗体または抗体断片を含み、少なくとも１つの検出結合タンパク質が、ＧＰ７３への結合がＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または不存在に非感受性であるタンパク質、抗体または抗体断片を含む。

【００２３】

本発明は、試験試料中のフコシル化ＧＰ７３濃度を決定するための方法に関し、該方法は、試験試料を少なくとも１つの捕捉結合タンパク質と接触させること、ここで、捕捉結合タンパク質がＧＰ７３の領域またはＧＰ７３の断片に結合して、捕捉結合タンパク質－ＧＰ７３複合体を形成する；捕捉結合タンパク質－ＧＰ７３複合体を、検出可能な標識を含む少なくとも１つの検出結合タンパク質と接触させること、ここで、検出結合タンパク質が、捕捉結合タンパク質が結合していないＧＰ７３の領域に結合し、捕捉結合タンパク質－ＧＰ７３－検出結合タンパク質複合体を形成する；および先の工程において形成された捕捉結合タンパク質－ＧＰ７３－検出結合タンパク質複合体における検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料中のＧＰ７３濃度を決定することを含み、少なくとも１つの捕捉結合タンパク質が、ＧＰ７３への結合がＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または不存在に非感受性であるタンパク質、抗体または抗体断片を含み、少なくとも１つの検出結合タンパク質が、ＧＰ７３への結合がＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または不存在に感受性であるタンパク質、抗体または抗体断片を含む。ＧＰ７３への結合

がＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または不存在に感受性であるタンパク質、抗体または抗体断片が、アレウリア・アウランティア（Ａｌｅｕｒｉａ　ａｕｒａｎｔｉａ）レクチン（ＡＡＬ）もしくはその断片；配列番号２５もしくは配列番号３３のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域；配列番号２９もしくは配列番号３７のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２９のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号３３のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号３７のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖および配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖および配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。ＧＰ７３への結合がＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または不存在に非感受性であるタンパク質、抗体または抗体断片が、配列番号１、配列番号９、配列番号１７もしくは配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域；配列番号５、配列番号１３、配列番号２１もしくは配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号９のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号１３のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号１７のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２１のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１２のアミノ酸配

列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。本方法は、試験試料中のＧＰ７３濃度の直接的または間接的指標として検出可能な標識によって生じたシグナルを、対照または較正物質中のＧＰ７３濃度の直接的または間接的指標として生じたシグナルと比較することをさらに含む。試験試料中のＧＰ７３濃度が、対象が肝疾患を有するか、または発症する危険性があるかどうかを決定するまたは評価するために使用される。対照または較正物質中のＧＰ７３濃度と比較したＧＰ７３濃度の増加が、対象が肝疾患を有することを示す。肝疾患は、肝硬変または肝がんである。

【００２４】

本発明は、対象における肝疾患を診断および治療するための方法に関し、該方法は、対象から血液を含む生物学的試料を得ること；請求項８１に記載の方法を用いて、対象からの生物学的試料中のＧＰ７３濃度を決定すること；生物学的試料中のＧＰ７３濃度を正常な対照または較正物質中のＧＰ７３濃度と比較すること；生物学的試料中のＧＰ７３濃度が正常な対照または較正物質中のＧＰ７３濃度よりも高い場合に、対象を肝疾患と診断すること；および肝疾患を有すると診断された対象に肝疾患治療レジメンを施すことを含む。対象の生物学的試料が、組織試料、体液、全血、血漿、血清、尿、気管支肺胞洗浄液、およびそれらの細胞培養懸濁液またはその画分から選択される。対象の生物学的試料が血液血漿または血液血清である。肝疾患は、肝硬変または肝がんである。本方法は、生物学的試料中の肝疾患の少なくとも１つのさらなるバイオマーカーのレベルを決定すること、および肝疾患の少なくとも１つのさらなるバイオマーカーのレベルを肝疾患の少なくとも１つのバイオマーカーの参照濃度値と比較することをさらに含む。肝疾患のさらなるバイオマーカーが、ＰＩＶＫＡ－ＩＩ、ＡＦＰ、ＡＦＰ－Ｌ３、Ｆｕｃ－ＨＰＸ、Ｆｃ－ＫｉｎおよびＦ－ＡＴからなる群から選択される。

【００２５】

本発明は、対象が１つ以上の医薬組成物の投与に応答しているかどうかを決定するための方法に関し、本方法は、請求項８１に記載の方法を用いて、対象からの試料中のＧＰ７３濃度を測定すること；試料中のＧＰ７３濃度を正常な対照または較正物質中のＧＰ７３濃度と比較すること、ここで、ＧＰ７３濃度の変化が、対象が１つ以上の医薬組成物の投与に応答していないことを示す；および対象が１つ以上の医薬組成物の投与に応答していない場合に、対象の治療を調整することを含む。

【００２６】

本発明は、対象における肝疾患を診断および治療するための方法に関し、該方法は、試験試料を少なくとも１つの捕捉抗体と接触させること、ここで、捕捉抗体がＧＰ７３上のエピトープまたはＧＰ７３の断片に結合して、捕捉抗体－ＧＰ７３抗原複合体を形成する；捕捉抗体－ＧＰ７３抗原複合体を、検出可能な標識を含む少なくとも１つの検出抗体と接触させること、ここで、検出抗体が、捕捉抗体が結合していないＧＰ７３上のエピトープに結合し、捕捉抗体－ＧＰ７３抗原－検出抗体複合体を形成する；（ｂ）において形成された捕捉抗体－ＧＰ７３抗原－検出抗体複合体における検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料中のＧＰ７３濃度を決定すること；試料中のＧＰ７３濃度を正常な対照または較正物質中のＧＰ７３濃度と比較すること；生物学的試料中のＧＰ７３濃度が正常な対照または較正物質中のＧＰ７３濃度よりも高い場合に、対象を肝疾患と診断すること；および肝疾患を有すると診断された対象に肝疾患治療レジメンを施すこと

を含み、少なくとも１つの捕捉抗体が、配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン；配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号４２のアミノ酸配列を含む相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖ドメイン；配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含み；少なくとも１つの検出抗体が、配列番号２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン；配列番号２９のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２９のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。肝疾患は、肝硬変または肝がんである。

【００２７】

本発明は、請求項１、５、９、１３、１７、２１、２５、６０、６１、６２または６３に記載の抗体、該抗体の抗体断片、混合物または誘導体を含むキットに関する。

【００２８】

本発明は、請求項１、５、９、１３、１７、２１、２５、６０、６１、６２または６３に記載の抗体または抗体断片をコードする単離された核酸を含むキットに関する。

【００２９】

本発明は、ＧＰ７３について試験試料をアッセイするためのキットに関し、キットは、ＧＰ７３上のエピトープまたはＧＰ７３の断片に結合する少なくとも１つの捕捉抗体、捕捉抗体が結合していないＧＰ７３上のエピトープに結合する少なくとも１つの検出抗体、およびＧＰ７３について試験試料をアッセイするための説明書を含み、少なくとも１つの捕捉抗体が、請求項１、５、９、１３、１７、２１、２５、６０、６１、６２または６３に記載の単離された抗体または抗体断片を含み、少なくとも１つの検出抗体が、請求項１、５、９、１３、１７、２１、２５、６０、６１、６２または６３に記載の単離された抗体または抗体断片を含み、少なくとも１つの捕捉抗体が、少なくとも１つの検出抗体と異なる。キットは、対照または較正物質中のＧＰ７３濃度を示す参照標準物質をさらに含む。

【００３０】

本発明は、ＧＰ７３について試験試料をアッセイするためのキットに関し、キットは、ＧＰ７３上のエピトープまたはＧＰ７３の断片に結合する少なくとも１つの捕捉抗体、捕捉抗体が結合していないＧＰ７３上のエピトープに結合する少なくとも１つの検出抗体、およびＧＰ７３について試験試料をアッセイするための説明書を含み、少なくとも１つの捕捉抗体が、配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン；配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号４２のアミノ酸配列を含む相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８の

アミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含み、少なくとも１つの検出抗体が、配列番号２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン；配列番号２９のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２９のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含み、少なくとも１つの検出抗体は、場合によって検出可能に標識されている。

【００３１】

本発明は、フコシル化ＧＰ７３について試験試料をアッセイするためのキットに関し、ＧＰ７３またはＧＰ７３の断片に結合する少なくとも１つの捕捉結合タンパク質、捕捉結合タンパク質が結合していない、ＧＰ７３に結合する少なくとも１つの検出結合タンパク質、およびＧＰ７３について試験試料をアッセイするための説明書を含み、少なくとも１つの捕捉結合タンパク質が、ＧＰ７３への結合がＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または不存在に非感受性であるタンパク質、抗体または抗体断片を含み、少なくとも１つの検出結合タンパク質が、ＧＰ７３への結合がＧＰ７３上のフコシル化に感受性であるタンパク質、抗体または抗体断片を含む。

【００３２】

本発明は、フコシル化ＧＰ７３について試験試料をアッセイするためのキットに関し、キットは、ＧＰ７３またはＧＰ７３の断片に結合する少なくとも１つの捕捉結合タンパク質、捕捉結合タンパク質が結合していない、ＧＰ７３に結合する少なくとも１つの検出結合タンパク質、およびＧＰ７３について試験試料をアッセイするための説明書を含み、少なくとも１つの捕捉結合タンパク質が、ＧＰ７３への結合がＧＰ７３のフコシル化に感受性であるタンパク質、抗体または抗体断片を含み、少なくとも１つの検出結合タンパク質が、ＧＰ７３への結合がＧＰ７３上のフコシル化に非感受性であるタンパク質、抗体または抗体断片を含む。ＧＰ７３への結合がＧＰ７３のフコース化に感受性であるタンパク質、抗体または抗体断片が、アレウリア・アウランティアレクチン（ＡＡＬ）またはその断片；配列番号２５もしくは配列番号３３のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域；配列番号２９もしくは配列番号３７のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２９のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号３３のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号３７のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖および配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３２のアミノ

酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖および配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。ＧＰ７３への結合がＧＰ７３のフコシル化に非感受性であるタンパク質、抗体または抗体断片が、配列番号１、配列番号９、配列番号１７もしくは配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域；配列番号５、配列番号１３、配列番号２１もしくは配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号９のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号１３のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号１７のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２１のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；または配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。キットは、対照または較正物質中のＧＰ７３濃度を示す参照標準物質をさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【００３３】

【図１】Ｅ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＧＰ７３コンストラクトを示す図である。

【図２】ＣＨＯとＨＥＫ　ＧＰ７３－ｈＦｃコンストラクトを示す図である。

【図３】遊離ＡＡＬによるビオチン標識抗ＧＰ７３ｍＡｂの競合的阻害アッセイを示す図である。

【図４】マウス－ヒトキメラＩｇＧ、Ｅ．コリで発現したＧＰ７３、およびＨＥＫ細胞で発現したＧＰ７３－ｈＦｃ組換え抗原との抗ＧＰ７３ｍＡｂの反応性を示す図である。
【図５】遊離フコースでビオチン標識抗ＧＰ７３ｍＡｂの競合的阻害アッセイを示す図である。
【図６】過ヨウ素酸化ＧＰ７３とのｍＡｂ１Ａ－３１８７反応性を示す図である。
【図７】過ヨウ素酸化ＧＰ７３とのｍＡｂ１Ａ－４２４６反応性を示す図である。
【図８】過ヨウ素酸化ＧＰ７３とのｍＡｂ１Ｂ－３２４６反応性を示す図である。
【図９】過ヨウ素酸化ＧＰ７３とのｍＡｂ１Ｂ－３４４０反応性を示す図である。
【図１０】過ヨウ素酸化ＧＰ７３とのｍＡｂ１Ｂ－４８６３反応性を示す図である。
【図１１】過ヨウ素酸化ＧＰ７３とのｍＡｂ１Ｂ－４９７１反応性を示す図である。
【図１２】ｍＡｂ１Ａ－３１８７の可変重鎖配列（図１２Ａ）および可変軽鎖配列（図１２Ｂ）のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の図である。
【図１３】ｍＡｂ１Ａ－４２４６の可変重鎖配列（図１３Ａ）および可変軽鎖配列（図１３Ｂ）のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の図である。
【図１４】ｍＡｂ１Ｂ－３２４６の可変重鎖配列（図１４Ａ）および可変軽鎖配列（図１４Ｂ）のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の図である。
【図１５】ｍＡｂ１Ｂ－３４４０の可変重鎖配列（図１５Ａ）および可変軽鎖配列（図１５Ｂ）のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の図である。
【図１６】ｍＡｂ１Ｂ－４８６３の可変重鎖配列（図１６Ａ）および可変軽鎖配列（図１６Ｂ）のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の図である。
【図１７】ｍＡｂ１Ｂ－４９７１の可変重鎖配列（図１７Ａ）および可変軽鎖配列（図１７Ｂ）のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の図である。
【図１８】ＧＰ７３－ｈＦｃに対する抗ＧＰ７３ｍＡｂのエピトープペプチド地図を示す図である。
【図１９】ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）サンドイッチイムノアッセイ原則の一例を示す図である。
【図２０】ｍＡｂ１４Ｈ４－２３または１Ａ－４２４６を捕捉抗体（０．１ｍｇ／ｍＬ）として、および、１Ｂ－４８６３を検出抗体（０．５ｎＭ）として用いる、ＧＰ７３　ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）アッセイを示す図である。
【図２１】ｍＡｂ１Ａ－４２４６（０．２ｍｇ／ｍＬ）を捕捉抗体として、１Ｂ－４８６３を検出抗体（０．５または２ｎＭ）として用いる、ＧＰ７３　ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）アッセイを示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００３４】
本発明は、抗ゴルジタンパク質７３（ＧＰ７３）抗体、ならびにそれを必要とする対象において疾患を同定、診断および治療するために、ＧＰ７３およびフコシル化ＧＰ７３のレベルを分析するためのイムノアッセイにおける該抗体の使用に関する。本発明の抗ＧＰ７３抗体は、以前より入手可能な抗体よりも高い結合親和性を有する。本発明の抗体は、広範囲の濃度にわたって、ＧＰ７３および／またはフコシル化ＧＰ７３を検出し、したがって、ＧＰ７３および／またはフコシル化ＧＰ７３を検出するための抗体の固有の組合せを提供するためのイムノアッセイにおいて使用することができる。このようなイムノアッセイにおけるこれらの抗体の使用は、より汎用性があり、より感受性のあるアッセイを提供する。また、本発明の抗体は、イムノアッセイにおいて約３倍、既知の抗ＧＰ７３抗体より優れていることが判明した。
【００３５】
開示されているイムノアッセイの検出可能な濃度範囲の増大は、患者における肝疾患およびがんを診断し、区別するためのより正確であり、より感受性のアッセイを提供する。したがって、開示されているイムノアッセイは、対照または較正物質試料と比較して、試料中のＧＰ７３濃度の増加または減少を検出するために使用され得て、よって、肝疾患およびがんなどの、患者における様々な疾患を同定するために使用され得る。ＧＰ７３のイ

ムノアッセイの使用は、肝疾患またはがんなどの疾患を有する患者の正確な診断およびその後の治療を与えることができる。

【００３６】

このセクションおよび本明細書における開示全体において使用されるセクションの表題は、構成のためだけであり、限定を意図しない。

【００３７】

１．定義

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての科学用語および技術用語は、当業者によって通常理解されているものと同じ意味を有する。相反した場合、定義を含む本明細書が支配する。明細書に記載されているものと同様または同等である方法および材料が本発明の実施または試験で用いられ得るが、好ましい方法および材料が以下に記載される。本明細書で言及されている全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、参照により全体として組み込まれる。本明細書に開示されている材料、方法および実施例は、単に例示的なものであり、限定を意図しない。

【００３８】

「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「有している（ｈａｖｉｎｇ）」、「有する（ｈａｓ）」、「できる」、「含有する」という用語およびそれらの変形体は、本明細書で使用するとき、追加の作用または構造の可能性を妨げないオープンエンドの移行句、用語または単語であることが意図される。単数形の「１つの（ａ）」、「および」および「その（ｔｈｅ）」は、文脈が明らかに別段の記載をしていなければ、複数形を含む。本開示はまた、明確に記載されているかどうかにかかわらず、本明細書に示されている実施形態または要素「を含む」、「からなる」および「から本質的になる」他の実施形態を考慮する。

【００３９】

本明細書において互換的に使用されている「１４Ｈ４－２３」、「１４Ｈ４－２３モノクローナル抗体」および「モノクローナル抗体１４Ｈ４－２３」は、ＧＰ７３に結合するマウスモノクローナル抗体を意味する。１４Ｈ４－２３モノクローナル抗体は、ドレクセル大学医科大学のＡｎａｎｄ　Ｍｅｈｔａ博士およびＴｉｍ　Ｂｌｏｃｋ博士の研究室から譲り受けた。１４Ｈ４－２３モノクローナル抗体の結合は、ＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または非存在に感受性でない。

【００４０】

「親和性成熟された抗体」とは、変化（単数または複数）を有しない親抗体と比べて、１つ以上のＣＤＲ中に、標的抗原に対する抗体の親和性（すなわち、K_D、k_dまたはk_a）の改善をもたらす１つ以上の変化を有する抗体を意味する。例示的な親和性成熟された抗体は、標的抗原に対してナノモル濃度またはピコモル濃度の親和性さえ有する。親和性成熟された抗体を生成するための様々な手法が、当該技術分野において公知であり、例えば、バイオディスプレイを用いて調製されたコンビナトリー抗体ライブラリーのスクリーニングが挙げられる。例えば、Ｍａｒｋｓら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１０：７７９－７８３頁（１９９２）は、ＶＨおよびＶＬドメインシャッフリングによる親和性成熟を記載している。ＣＤＲおよび／またはフレームワーク残基の無作為な突然変異誘発は、Ｂａｒｂａｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９１：３８０９－３８１３頁（１９９４）；Ｓｃｈｉｅｒら、Ｇｅｎｅ、１６９：１４７－１５５頁（１９９５）；Ｙｅｌｔｏｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ、１５５：１９９４－２００４頁（１９９５）；Ｊａｃｋｓｏｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ、１５４（７）：３３１０－３３１９頁（１９９５）；およびＨａｗｋｉｎｓら、Ｊ．ＭｏＩ．Ｂｉｏｌ．２２６：８８９－８９６頁（１９９２）によって記載されている。活性増大アミノ酸残基による選択的突然変異誘発位置および接触または過剰変異位置での選択的変異は、米国特許第６，９１４，１２８Ｂ１号に記載されている。

【００４１】

本明細書において互換的に使用されている「アレウリア・アウランティアレクチン」お

よび「ＡＡＬ」は、フコシル化グリカンを特異的に認識する２つの同一の３１２アミノ酸サブユニットで構成される真菌タンパク質を指し、フコースに対する特異的プローブとして幅広く使用されている。ＡＡＬは、Ｎ－アセチルグルコサミンに（α－１，６）結合されたフコース、またはＮ－アセチルラクトサミン関連構造に（α－１，３）結合されたフコースに優先的に結合する。

【００４２】

「抗体」および「複数の抗体」は、本明細書で使用するとき、モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体（完全または部分的ヒト化）、動物抗体、例えば限定されないが、トリ（例えば、カモまたはガチョウ）、サメ、クジラおよび非霊長類（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）または非ヒト霊長類（例えば、サル、チンパンジーなど）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、単一ドメイン抗体、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ジスルフィド結合Ｆｖ（「ｓｄＦｖ」）および抗イディオタイプ（「抗Ｉｄ」）抗体、二重ドメイン抗体、二重可変ドメイン（ＤＶＤ）または三重可変ドメイン（ＴＶＤ）抗体（二重可変ドメイン免疫グロブリンおよびこの作製方法は、それぞれの内容が参照により本明細書に組み込まれるＷｕ，Ｃら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２５（１１）：１２９０－１２９７（２００７）および国際公開第２００１／０５８９５６号に記載されている。）、ならびに上記のいずれかの機能的に活性なエピトープ結合断片を指す。特に、抗体としては、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片、即ち分析物結合部位を含む分子が挙げられる。免疫グロブリン分子は、任意の型（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２）またはサブクラスのものであり得る。簡素化のために、分析物に対する抗体は、本明細書では「抗分析物抗体」または単に「分析物抗体」（例えば、抗ＧＰ７３抗体またはＧＰ７３抗体）と称されることが多い。

【００４３】

「抗体断片」は、本明細書で使用するとき、抗原結合部位または可変領域を含むインタクトな抗体の一部を指す。その一部は、インタクトな抗体のＦｃ領域の定常重鎖ドメイン（即ち、抗体のアイソタイプに応じて、ＣＨ２、ＣＨ３またはＣＨ４）を含まない。抗体断片の例としては、限定されないが、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆａｂ’－ＳＨ断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、Ｆｄ断片、Ｆｖ断片、ダイアボディ、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）分子、１つの軽鎖可変ドメインのみを含有する一本鎖ポリペプチド、軽鎖可変ドメインの３つのＣＤＲを含有する一本鎖ポリペプチド、１つの重鎖可変領域のみを含有する一本鎖ポリペプチドおよび重鎖可変領域の３つのＣＤＲを含有する一本鎖ポリペプチドが挙げられる。

【００４４】

「曲線下面積」または「ＡＵＣ」とは、ＲＯＣ曲線下の面積を指す。ＲＯＣ曲線下ＡＵＣは精度の測定である。１の面積は、完全な試験を表し、一方、０．５の面積は、重要でない試験を表す。好ましいＡＵＣは、少なくとも約０．７００、少なくとも約０．７５０、少なくとも約０．８００、少なくとも約０．８５０、少なくとも約０．９００、少なくとも約０．９１０、少なくとも約０．９２０、少なくとも約０．９３０、少なくとも約０．９４０、少なくとも約０．９５０、少なくとも約０．９６０、少なくとも約０．９７０、少なくとも約０．９８０、少なくとも約０．９９０または少なくとも約０．９９５であってもよい。

【００４５】

結合定数を本明細書で説明する。用語「結合速度定数」、「k_{on}」または「k_{a}」は、本明細書で使用するとき、以下の方程式によって示されているように、標的抗原に対する抗体の結合速度または抗体と抗原の間の複合体形成速度を示す値を指す：

抗体（Ａｂ）＋抗原（Ａｇ）→Ａｂ－Ａｇ。

【００４６】
用語「解離速度定数」、「k_{off}」または「k_d」は、本明細書で互換的に使用するとき、以下の方程式によって示されているように、標的抗原からの抗体の解離速度、またはＡｂ－Ａｇ複合体が遊離抗体および抗原に経時的に分離することを示す値を指す：
抗体（Ａｂ）＋抗原（Ａｇ）←Ａｂ－Ａｇ。
【００４７】
結合および解離速度定数を測定するための方法は、当該技術分野において周知である。蛍光ベースの技術を使用することによって、平衡状態にある生理学的緩衝液中で試料を調べるための高い感度および能力が得られる。ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）（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および装置が使用され得る（例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＡＢ、ａ ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ ｃｏｍｐａｎｙ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎから入手可能な装置）。さらに、Ｓａｐｉｄｙｎｅ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ（Ｂｏｉｓｅ，Ｉｄａｈｏ）から入手可能なＫｉｎＥｘＡ（登録商標）（Ｋｉｎｅｔｉｃ Ｅｘｃｌｕｓｉｏｎ Ａｓｓａｙ）アッセイも使用することができる。
【００４８】
用語「平衡解離定数」、「Ｋｄ」、「K_d」または「K_D」は、本明細書で互換的に使用するとき、解離速度（ｋｏｆｆ）を結合速度（ｋｏｎ）で割ることによって得られた値を指す。結合速度、解離速度および平衡解離定数は、抗原に対する抗体の結合親和性を表すために使用される。
【００４９】
「結合タンパク質」は、本明細書において使用され、例えば、ポリペプチド、抗原、化合物または他の分子または任意の種類の基質などの結合パートナーに結合して複合体を形成する単量体または多量体タンパク質を指す。結合タンパク質は、結合パートナーに特異的に結合する。結合タンパク質としては、抗体および当該技術分野において公知のおよび本明細書における下記のこの抗原結合断片およびその他の種々の形態およびこれらの誘導体、ならびに抗原分子または抗原分子上の特定の部位（エピトープ）に結合する１つ以上の抗原－結合ドメインを含む他の分子が挙げられる。したがって、結合タンパク質としては、限定されないが、抗体、四量体免疫グロブリン、ＩｇＧ分子、ＩｇＧ１分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ＣＤＲ移植抗体、ヒト化抗体、親和性成熟抗体、および抗原に結合する能力を保持する任意のこのような抗体の断片が挙げられる。
【００５０】
「二特異性抗体」は、本明細書において、クアドローマ技術（Ｍｉｌｓｔｅｉｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３０５（５９３４）：５３７－５４０（１９８３）参照）によって、２つの異なるモノクローナル抗体の化学的コンジュゲーションによって（例えば、Ｓｔａｅｒｚら、Ｎａｔｕｒｅ、３１４（６０１２）：６２８－６３１（１９８５）参照）または変異をＦｃ領域に導入するノブ・イントゥ・ホール（ｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅ）もしくは類似のアプローチによって（Ｈｏｌｌｉｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０（１４）：６４４４－６４４８（１９９３）参照）作製され、この結果、複数の異なる免疫グロブリン種が得られる全長抗体を指すのに使用され、このうち１つのみが、機能性二特異性抗体である。二特異性抗体は、この２つの結合アーム（一組のＨＣ／ＬＣ）の一方上で１つの抗原（またはエピトープ）に結合し、この第２のアーム（別組のＨＣ／ＬＣ）上で異なる抗原（またはエピトープ）に結合する。この定義によれば、二特異性抗体は、２つの別個の抗原結合アーム（特異性およびＣＤＲ配列の両方において）を有し、これが結合する各抗原に対して一価である。
【００５１】
本明細書における数値範囲の記載について、同程度の正確さを有するその数値範囲の間にある各数値が、明示的に意図される。例えば、６から９の範囲については、数値７および８は、６および９に加えて明示的に意図される。そして、６．０から７．０の範囲においては、数値６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．

８、６．９、および７．０が明示的に意図される。

【００５２】

「がん」は、本明細書で使用するとき、生体における異常細胞の制御されないおよび調節されない増殖を指す。がん性細胞はまた、悪性細胞と呼ばれる。がんは、生体の隣接する部分に侵入することができ、またリンパ系もしくは血流を通じて生体のより遠位な部分に広がり得る。がんには、副腎皮質がん、肛門がん、膀胱がん、脳腫瘍、乳がん、カルチノイド腫瘍、消化管、不明な原発性の癌腫、子宮頸がん、大腸がん、子宮体がん、食道がん、肝外胆管がん、ユーイングファミリー腫瘍（ＰＮＥＴ）、頭蓋外胚細胞腫瘍、眼内黒色腫眼がん、胆嚢がん、胃がん（胃）、性腺外胚細胞腫瘍、妊娠性絨毛腫瘍、頭頸部がん、下咽頭がん、膵島細胞癌、腎臓がん（腎細胞がん）、喉頭がん、急性リンパ芽球性白血病、白血病、急性骨髄性、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ヘアリー細胞白血病、口唇がんおよび口腔がん、肝がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、中枢神経系（原発性）リンパ腫、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、ホジキン病リンパ腫、非ホジキン病リンパ腫、悪性中皮腫、メラノーマ、メルケル細胞癌、原発不明の転移性扁平上皮頸部がん、多発性骨髄腫および他の形質細胞新生物、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、骨髄増殖性疾患、鼻咽頭がん、神経芽細胞腫、口腔がん、咽頭がん、骨肉腫、卵巣上皮がん、卵巣胚細胞腫瘍、膵臓がん、外分泌、膵臓がん、膵島細胞癌、副鼻腔および鼻腔がん、副甲状腺がん、陰茎がん、下垂体がん、形質細胞腫、前立腺がん、横紋筋肉腫、直腸がん、腎細胞がん（腎臓がん）、移行上皮腎盂および尿管、唾液腺がん、セザリー症候群、皮膚がん、小腸がん、ソフト組織肉腫、精巣がん、悪性胸腺腫、甲状腺がん、尿道がん、子宮がん、小児の珍しいがん、膣がん、外陰がんおよびウィルムス腫瘍が挙げられる。

【００５３】

「ＣＤＲ」は、本明細書において、抗体可変配列内の「相補性決定領域」を指すのに使用される。重鎖および軽鎖の可変領域それぞれに３つのＣＤＲがあり、これらは、各可変領域の「ＣＤＲ１」、「ＣＤＲ２」および「ＣＤＲ３」と指定されている。用語「ＣＤＲセット」は、本明細書で使用するとき、抗原に結合する単一の可変領域中に存在する３つのＣＤＲの一群を指す。これらのＣＤＲの正確な境界は、異なるシステムに従って異なって定義されている。Ｋａｂａｔ（Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９８７）ａｎｄ（１９９１））によって記載されているシステムは、抗体の任意の可変領域に適用可能な一義的な残基ナンバリングシステムを提供するだけではなく、３つのＣＤＲを定義する正確な残基境界も提供する。これらのＣＤＲは、「ＫａｂａｔのＣＤＲ」と称され得る。Ｃｈｏｔｈｉａおよび共同研究者（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ，１９６：９０１－９１７（１９８７）；およびＣｈｏｔｈｉａら、Ｎａｔｕｒｅ、３４２：８７７－８８３（１９８９））は、ＫａｂａｔのＣＤＲ内の特定の下位部分が、アミノ酸配列のレベルで大きな多様性を有するにもかかわらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体構造をとることを見出した。これらの下位部分は、「Ｌ１」、「Ｌ２」および「Ｌ３」または「Ｈ１」、「Ｈ２」および「Ｈ３」と指定され、ここで、「Ｌ」および「Ｈ」は、軽鎖領域および重鎖領域をそれぞれ指定する。これらの領域は、「ＣｈｏｔｈｉａのＣＤＲ」と称され得、ＫａｂａｔのＣＤＲと重複する境界を有する。ＫａｂａｔのＣＤＲと重複するＣＤＲを定義する他の境界は、Ｐａｄｌａｎ，ＦＡＳＥＢ Ｊ．、９：１３３－１３９（１９９５）およびＭａｃＣａｌｌｕｍ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ、２６２（５）：７３２－７４５（１９９６）によって記載されている。さらに他のＣＤＲ境界定義は、本明細書のシステムの１つに厳密には従わない場合があるが、それでもなおＫａｂａｔのＣＤＲと重複し、特定の残基または残基群またはＣＤＲ全体でさえ抗原結合に有意な影響を与えないという予測または実験的知見を踏まえて、短くなることもあるし、または長くなることもある。本明細書で使用される方法は、これらのシステムのいずれかに従って定義されたＣＤＲを用い得るが、特定の実施形態は、ＫａｂａｔまたはＣｈｏｔｈｉａによって定義されるＣＤＲを使用する。

【００５４】
「成分」、「複数の成分」または「少なくとも１つの成分」は、一般に、本明細書に記載される方法および当該技術分野において公知の他の方法に従って、試験試料、例えば、患者の尿、血清または血漿試料をアッセイするためのキットに含まれ得る捕捉抗体、検出またはコンジュゲート較正物質、対照、感受性パネル、容器、緩衝液、希釈液、塩、酵素、酵素の補助因子、検出試薬、前処理試薬／溶液、基質（例えば、溶液として）、停止溶液などを指す。アッセイで使用するために、幾つかの成分は溶液性のものでもよいし、または再構成用に凍結乾燥したものでもよい。
【００５５】
抗体の「誘導体」は、本明細書で使用するとき、本来の抗体または親抗体と比較して、アミノ酸配列に１つ以上の改変を有する抗体を指し、改変されたドメイン構造を示し得る。誘導体は、ネイティブな抗体に見られる典型的なドメイン構造およびアミノ酸配列を依然としてとることができ、標的（抗原）に特異的に結合することができる。抗体誘導体の典型的な例は、他のポリペプチドにカップリングされた抗体、再配置された抗体ドメインまたは抗体断片である。誘導体はまた、少なくとも１つのさらなる化合物、例えば、共有結合または非共有結合によって連結されているタンパク質ドメインを含み得る。連結は、当該技術分野において公知の方法による遺伝子融合に基づくものであり得る。本発明に従って用いられる抗体を含む融合タンパク質中に存在するさらなるドメインは、好ましくは、柔軟なリンカー、有利には、さらなるタンパク質ドメインのＣ末端と抗体のＮ末端との間の距離（またはこの逆も同様である。）を結ぶのに十分な長さの複数の親水性ペプチド結合アミノ酸を含むペプチドリンカーによって連結され得る。抗体は、生物学的活性または固体支持体に対する選択的結合に適切な立体構造を有するエフェクター分子、例えば、生物学的に活性な物質（例えば、サイトカインまたは成長ホルモン）、化学薬剤、ペプチド、タンパク質または薬物に連結され得る。
【００５６】
「二重特異性抗体」は、本明細書において、その２つの結合アーム（一対のＨＣ／ＬＣ）のそれぞれにおいて２つの異なる抗原（またはエピトープ）に結合することができる全長抗体を指すのに使用される（国際公開第０２／０２７７３号を参照されたい。）。したがって、二重特異性結合タンパク質は、同一の特異性および同一のＣＤＲ配列を有する２つの同一の抗原結合アームを有し、これが結合する各抗原に対して二価である。
【００５７】
「二重可変ドメイン」は、本明細書において、結合タンパク質上の２つ以上の抗原結合部位を指すのに使用され、二価（２つの抗原結合部位）、四価（４つの抗原結合部位）または多価結合タンパク質であり得る。ＤＶＤは、単一特異性、即ち、１つの抗原（または１つの特異的エピトープ）に結合することができるまたは多重特異性、即ち、２つ以上の抗原（即ち、同じ標的抗原分子の２つ以上のエピトープまたは異なる標的抗原の２つ以上のエピトープ）に結合することができる。好ましいＤＶＤ結合タンパク質は、２つの重鎖ＤＶＤポリペプチドおよび２つの軽鎖ＤＶＤポリペプチドを含み、「ＤＶＤ免疫グロブリン」または「ＤＶＤ－Ｉｇ」と称される。したがって、このようなＤＶＤ－Ｉｇ結合タンパク質は、四量体であり、ＩｇＧ分子を連想させるが、ＩｇＧ分子よりも多くの抗原結合性の部位を提供する。したがって、四量体ＤＶＤ－Ｉｇ分子の半分はそれぞれ、ＩｇＧ分子の半分の一方を連想させ、重鎖ＤＶＤポリペプチドおよび軽鎖ＤＶＤポリペプチドを含むが、単一の抗原結合ドメインを提供するＩｇＧ分子の一組の重鎖および軽鎖とは異なり、ＤＶＤ－Ｉｇの一組の重鎖および軽鎖は、２つ以上の抗原結合部位を提供する。
【００５８】
ＤＶＤ－Ｉｇ結合タンパク質の各抗原結合部位は、ドナー（「親」）モノクローナル抗体に由来し得、したがって、抗原結合部位あたりの抗原結合に関与する合計６つのＣＤＲを有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。したがって、２つの異なるエピトープ（即ち、２つの異なる抗原分子の２つの異なるエピトープまたは同じ抗原分子の２つの異なるエピトープ）に結合するＤＶＤ－Ｉｇ結合タンパク質は、

第一の親モノクローナル抗体に由来する抗原結合部位および第二の親モノクローナル抗体の抗原結合部位を含む。

【００５９】

ＤＶＤ－Ｉｇ結合分子の設計、発現および特性決定についての説明は、国際公開第２００７／０２４７１５号、米国特許第７，６１２，１８１号明細書、およびＷｕら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．、２５：１２９０－１２９７（２００７）に提供されている。このようなＤＶＤ－Ｉｇ分子の好ましい例は、構造式ＶＤ１－（Ｘ１）ｎ－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）ｎ（式中、ＶＤ１は、第一の重鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は、第二の重鎖可変ドメインであり、Ｃは、重鎖定常ドメインであり、Ｘ１は、リンカーであり、ただし、ＣＨ１ではなく、Ｘ２は、Ｆｃ領域であり、およびｎは、０または１であるが、好ましくは、１である。）を含む重鎖；ならびに構造式ＶＤ１－（Ｘ１）ｎ－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）ｎ（式中、ＶＤ１は、第一の軽鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は、第二の軽鎖可変ドメインであり、Ｃは、軽鎖定常ドメインであり、Ｘ１は、リンカーであり、ただし、ＣＨ１ではなく、Ｘ２は、Ｆｃ領域を含まず、およびｎは、０または１であるが、好ましくは、１である。）を含む軽鎖を含む。このようなＤＶＤ－Ｉｇは、２つのこのような重鎖および２つのこのような軽鎖を含み得、ここで、各鎖は、可変領域の間に介在する定常領域を有さずに、タンデムに連結された可変ドメインを含み、重鎖および軽鎖は結合して、タンデムな機能性抗原結合部位を形成し、一対の重鎖および軽鎖は、別の対の重鎖および軽鎖と結合して、４つの機能性抗原結合部位を有する四量体結合タンパク質を形成し得る。別の例において、ＤＶＤ－Ｉｇ分子は、可変ドメインの間に介在する定常領域を有さずに、タンデムに連結された３つの可変ドメイン（ＶＤ１、ＶＤ２、ＶＤ３）をそれぞれ含む重鎖および軽鎖を含み得、ここで、一対の重鎖および軽鎖は結合して、３つの抗原結合部位を形成し得、一組の重鎖および軽鎖は、別の対の重鎖および軽鎖と結合して、６つの抗原結合部位を有する四量体結合タンパク質を形成し得る。

【００６０】

好ましい実施形態では、本発明のＤＶＤ－Ｉｇ結合タンパク質は、その親モノクローナル抗体が結合する同じ標的分子に結合するだけではなく、１つ以上のその親モノクローナル抗体の１つ以上の所望の特性も有する。好ましくは、このようなさらなる特性は、１つ以上の親モノクローナル抗体の抗体パラメータである。１つ以上のその親モノクローナル抗体に由来するＤＶＤ－Ｉｇ結合タンパク質に寄与し得る抗体パラメータとしては、限定されないが、抗原特異性、抗原親和性、効力、生物学的機能、エピトープ認識、タンパク質安定性、タンパク質溶解度、生産効率、免疫原性、薬物動態、バイオアベイラビリティ、組織交差反応性およびオルソロガス抗原結合が挙げられる。

【００６１】

ＤＶＤ－Ｉｇ結合タンパク質は、ＧＰ７３の少なくとも１つのエピトープに結合する。ＤＶＤ－Ｉｇ結合タンパク質の非限定的な例としては、ＧＰ７３の１つ以上のエピトープに結合するＤＶＤ－Ｉｇ結合タンパク質、ヒトＧＰ７３のエピトープおよび別の種（例えば、マウス）のＧＰ７３のエピトープに結合するＤＶＤ－Ｉｇ結合タンパク質、ならびにヒトＧＰ７３のエピトープおよび別の標的分子のエピトープに結合するＤＶＤ－Ｉｇ結合タンパク質が挙げられる。

【００６２】

「エピトープ」もしくは「複数のエピトープ」または「対象とするエピトープ」は、認識される任意の分子上の部位（単数または複数）であって、その特異的な結合パートナー上の相補的部位（単数または複数）に結合することができる部位を指す。分子および特異的結合パートナーは、特異的結合対の一部である。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（例えば、限定されないが、糖脂質、糖タンパク質またはリポ多糖）または多糖上にあり得る。その特異的結合パートナーは、限定されないが、抗体であり得る。

【００６３】

「Ｆ（ａｂ’）２断片」は、本明細書で使用するとき、ヒンジ領域のいくつかをインタ

クトのままにしながら、大部分のＦｃ領域を除くために、全ＩｇＧ抗体のペプシン消化によって生じる抗体を指す。Ｆ（ａｂ’）２断片は、ジスルフィド結合によって一緒に連結された２つの抗原結合のＦ（ａｂ）部分を有し、したがって、二価であり、分子量は約１１０ｋＤａである。二価抗体断片（Ｆ（ａｂ’）２断片）は、ＩｇＧ分子全体よりも小さく、組織へ良好な浸透を可能にし、したがって、免疫組織化学においてより良好な抗原認識を促進する。Ｆ（ａｂ’）２断片の使用はまた、生細胞上のＦｃ受容体またはタンパク質Ａ／Ｇへの非特異的な結合を回避する。Ｆ（ａｂ’）２断片は、抗原に結合し、沈殿させることができる。

【００６４】

「フレームワーク」（ＦＲ）または「フレームワーク配列」は、本明細書で使用するとき、ＣＤＲを除いた可変領域の残りの配列を意味する。ＣＤＲ配列の正確な定義は、様々なシステムによって決定することができるため（例えば、上記を参照）、フレームワーク配列の意味は、これに対応して様々な解釈がなされる。６つのＣＤＲ（軽鎖のＣＤＲ－Ｌ１、－Ｌ２および－Ｌ３ならびに重鎖のＣＤＲ－Ｈ１、－Ｈ２および－Ｈ３）はまた、軽鎖および重鎖上のフレームワーク領域を各鎖上の４つの小領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４）に分け、この場合、ＣＤＲ１はＦＲ１とＦＲ２との間に位置し、ＣＤＲ２はＦＲ２とＦＲ３との間に位置し、ＣＤＲ３はＦＲ３とＦＲ４との間に位置する。他のものによって言及される場合、フレームワーク領域は、特定の小領域をＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３またはＦＲ４と指定せずに、単一の天然に存在する免疫グロブリン鎖の可変領域内のＦＲを一体としたもの表す。本明細書で使用するとき、ＦＲは、４つの小領域のうち１つを表し、複数のＦＲは、フレームワーク領域を構成する４つの小領域のうち２つ以上を表す。

【００６５】

当該技術分野において公知の技術を使用して非ヒト抗体をヒト化するために、重鎖および軽鎖「アクセプター」フレームワーク配列（または単に「アクセプター」配列）として使用され得るヒト重鎖および軽鎖ＦＲ配列は、当該技術分野において公知である。一実施形態では、ヒト重鎖および軽鎖アクセプター配列は、公的に利用可能なデータベース、例えば、Ｖ－ｂａｓｅ（ハイパーテキスト転送プロトコル：／／ｖｂａｓｅ．ｍｒｃ－ｃｐｅ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／）、または国際的ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ（登録商標）（ＩＭＧＴ（登録商標））情報システム（ハイパーテキスト転送プロトコル：／／ｉｍｇｔ．ｃｉｎｅｓ．ｆｒ／ｔｅｘｔｓ／ＩＭＧＴｒｅｐｅｒｔｏｉｒｅ／ＬｏｃｕｓＧｅｎｅｓ／）に列挙されているフレームワーク配列から選択される。

【００６６】

「フコシル化ＧＰ７３」は、本明細書において、フコース糖部分が付加されたゴルジ膜タンパク質７３を説明するために使用される。

【００６７】

「機能的抗原結合部位」とは、本明細書で使用するとき、標的抗原に結合することができる結合タンパク質（例えば、抗体）上の部位を意味し得る。抗原結合部位の抗原結合親和性は、抗原結合部位が由来する親結合タンパク質、例えば、親抗体ほど強くなくてもよいが、抗原に結合する能力は、抗原に結合するタンパク質、例えば、抗体を評価するための様々な公知の方法のいずれか１つを使用して測定可能でなければならない。さらに、本明細書において、多価タンパク質、例えば、多価抗体の抗原結合部位のそれぞれの抗原結合親和性は、定量的に同じである必要はない。

【００６８】

「ＧＰ７３」は、本明細書において、ゴルジ膜タンパク質１（ＧＯＬＭ１）およびゴルジリンタンパク質２（ＧＯＬＰＨ２）としても知られているゴルジタンパク質７３を記述するために使用される。ＧＰ７３は、ＧＯＬＭ１遺伝子によってコードされるタンパク質である。これは、粗面小胞体で合成されたタンパク質を処理し、ゴルジ装置を介して、タンパク質積み荷の輸送を支援する。ＧＰ７３は、いくつかの組織由来の正常な上皮細胞で幅広く発現される。上方制御された細胞内ＧＰ７３発現は、ＧＰ７３の細胞内タンパク質

分解切断のための機会を与える、エンドソーム経路を介してその細胞内輸送を高め、結果として切断型ＧＰ７３の分泌をもたらす。ＧＰ７３発現は、ウイルス感染に応答して上方制御されるが、ウイルス性および非ウイルス性肝疾患を有する患者からの肝細胞において上方制御されることが見出されている。ＧＰ７３は、前立腺がんおよび肺腺がん組織において過剰発現される。フコシル化糖鎖付加は、肝細胞癌患者からの分泌型ＧＰ７３の４分の３において見出されている。

【００６９】

「ヒト化抗体」は、本明細書において、非ヒト種（例えば、マウス）由来の重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、ＶＨおよび／またはＶＬ配列の少なくとも一部が、より「ヒト様」、即ち、ヒト生殖系列可変配列とより類似するように変更されている抗体を説明するのに使用される。「ヒト化抗体」は、対象とする抗原に免疫特異的に結合し、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク（ＦＲ）領域と、非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域（ＣＤＲ）とを含む抗体またはその変異体、誘導体、類似体もしくは断片である。本明細書で使用するとき、用語「実質的に」は、ＣＤＲとの関連で、非ヒト抗体ＣＤＲのアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を有するＣＤＲを指す。ヒト化抗体は、ＣＤＲ領域の全部または実質的に全部が、非ヒト免疫グロブリン（即ち、ドナー抗体）のものに対応し、フレームワーク領域の全部または実質的に全部が、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである少なくとも１つの、通常２つの可変ドメイン（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦａｂＣ、Ｆｖ）の実質的に全部を含む。一実施形態において、ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）、典型的には、ヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部を含む。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖と、重鎖の少なくとも可変ドメインとを含有する。抗体はまた、重鎖のＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３およびＣＨ４領域を含み得る。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖のみを含有する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖のみを含有する。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメインおよび／またはヒト化重鎖のみを含有する。

【００７０】

ヒト化抗体は、ＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＥを含む免疫グロブリンの任意のクラス、ならびに限定されないが、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４を含む任意のアイソタイプから選択され得る。ヒト化抗体は、２つ以上のクラスまたはアイソタイプ由来の配列を含み得、特定の定常ドメインは、当該技術分野において周知の技術を使用して、所望のエフェクター機能を最適化するように選択され得る。

【００７１】

ヒト化抗体のフレームワーク領域およびＣＤＲは、親配列と正確に対応する必要はなく、例えば、ドナー抗体ＣＤＲまたはコンセンサスフレームワークは、少なくとも１つのアミノ酸残基の置換、挿入および／または欠失によって変異誘発され、そのため、その部位のＣＤＲまたはフレームワーク残基は、ドナー抗体またはコンセンサスフレームワークに対応していなくてもよい。しかしながら、好ましい実施形態において、このような変異は大規模なものではない。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも８０％、好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、最も好ましくは少なくとも９５％は、親のＦＲおよびＣＤＲ配列のものに対応する。本明細書で使用するとき、用語「コンセンサスフレームワーク」は、コンセンサス免疫グロブリン配列中のフレームワーク領域を指す。本明細書で使用するとき、用語「コンセンサス免疫グロブリン配列」は、関連免疫グロブリン配列のファミリーにおいて最も高頻度に存在するアミノ酸（またはヌクレオチド）から形成される配列を指す（例えば、Ｗｉｎｎａｋｅｒ、Ｆｒｏｍ Ｇｅｎｅｓ ｔｏ Ｃｌｏｎｅｓ（Ｖｅｒｌａｇｓｇｅｓｅｌｌｓｃｈａｆｔ、Ｗｅｉｎｈｅｉｍ、１９８７）を参照されたい。）。したがって、「コンセンサス免疫グロブリン配列」は、「コンセンサスフレームワーク領域」および／または「コンセンサスＣＤＲ」を含み得る。免疫グロ

ブリンのファミリーでは、コンセンサス配列中の各位置は、ファミリーにおいて当該位置で最も高頻度に存在するアミノ酸によって占められている。２つのアミノ酸が等頻度に存在する場合には、コンセンサス配列中にいずれかが含まれ得る。

【００７２】

「同一」または「同一性」は、本明細書において使用するとき、２つ以上のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列との関連で、該配列が、指定領域にわたって指定割合の同一残基を有することを意味し得る。２つの配列を最適にアライメントし、指定領域にわたって２つの配列を比較し、両配列で同一残基が存在する位置の数を決定して一致位置の数を得て、一致位置の数を指定領域の位置の総数で割り、この結果に１００を乗じて配列同一性の割合を得ることによって、上記割合を計算することができる。２つの配列が異なる長さのものであるまたはアライメントにより１つ以上の付着末端が生じ、指定の比較領域に単一配列のみが含まれる場合には、単一配列の残基を計算の分母に含めるが、分子には含めない。

【００７３】

「単離されたポリヌクレオチド」は、本明細書で使用するとき、ポリヌクレオチド（例えば、ゲノム、ｃＤＮＡもしくは合成起源またはこれらの組合せ）を意味し得、この起源によって、単離されたポリヌクレオチドは、天然では「単離されたポリヌクレオチド」が共に見られるポリヌクレオチドの全部または一部と結合していない；天然では連結していないポリヌクレオチドと作動可能に連結されている；または天然ではより長い配列の一部として存在しないものである。

【００７４】

「標識」および「検出可能な標識」は、本明細書で使用するとき、抗体と分析物の間の反応を検出可能にするために抗体または分析物に結合された部分を指し、このようにして標識された抗体または分析物は「検出可能に標識された」と称される。標識は、視覚的手段または機器的手段によって検出可能なシグナルを生成し得る。様々な標識としては、シグナル生成物質、例えば、色素原、蛍光化合物、化学発光化合物、放射性化合物などが挙げられる。標識の代表例としては、光を生成する部分、例えば、アクリジニウム化合物、および蛍光を生成する部分、例えば、フルオレセインが挙げられる。他の標識は、本明細書に記載されている。これに関して、部分それ自体は検出可能ではなくてもよいが、さらに別の部分と反応して検出可能になり得る。用語「検出可能に標識された」の使用は、このような標識を包含するものとする。

【００７５】

当該技術分野において公知の任意の適切な検出可能な標識が使用され得る。例えば、検出可能な標識は、放射性標識（例えば、３Ｈ、１４Ｃ、３２Ｐ、３３Ｐ、３５Ｓ、９０Ｙ、９９Ｔｃ、１１１Ｉｎ、１２５Ｉ、１３１Ｉ、１７７Ｌｕ、１６６Ｈｏおよび１５３Ｓｍ）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ペルオキシダーゼ、グルコース６－リン酸デヒドロゲナーゼなど）、化学発光標識（例えば、アクリジニウムエステル、チオエステルまたはスルホンアミド；ルミノール、イソルミノール、フェナントリジニウムエステルなど）、蛍光標識（例えば、フルオレセイン（例えば、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ネートなど））、ローダミン、フィコビリタンパク質、Ｒ－フィコエリトリン、量子ドット（例えば、硫化亜鉛でキャップされたセレン化カドミウム）、温度測定標識またはイムノポリメラーゼ連鎖反応標識であり得る。標識への導入、標識化手法および標識の検出は、Ｐｏｌａｋ ａｎｄ Ｖａｎ Ｎｏｏｒｄｅｎ，Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｉｍｍｕｎｏｃｙｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、第２編、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ、Ｎ．Ｙ．（１９９７）、および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合せであるＨａｕｇｌａｎｄ、Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｂｅｓ ａｎｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（１

９９６）に見られる。蛍光標識は、ＦＰＩＡで使用され得る（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第５，５９３，８９６号明細書、同第５，５７３，９０４号明細書、同第５，４９６，９２５号明細書、同第５，３５９，０９３号明細書および同第５，３５２，８０３号明細書を参照されたい。）。アクリジニウム化合物は、均一な化学発光アッセイにおいて、検出可能な標識として使用され得る（例えば、Ａｄａｍｃｚｙｋら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．１６：１３２４－１３２８（２００６）；Ａｄａｍｃｚｙｋら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．４：２３１３－２３１７（２００４）；Ａｄａｍｃｚｙｋら、Ｂｉｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．１４：３９１７－３９２１（２００４）；およびＡｄａｍｃｚｙｋら、Ｏｒｇ．Ｌｅｔｔ．５：３７７９－３７８２（２００３）を参照されたい。）。

【００７６】

一態様において、アクリジニウム化合物は、アクリジニウム－９－カルボキサミドである。アクリジニウム－９－カルボキサミドを調製するための方法は、Ｍａｔｔｉｎｇｌｙ，Ｊ．Ｂｉｏｌｕｍｉｎ．Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎ．６：１０７－１１４（１９９１）；Ａｄａｍｃｚｙｋら、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６３：５６３６－５６３９（１９９８）；Ａｄａｍｃｚｙｋら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　５５：１０８９９－１０９１４（１９９９）；Ａｄａｍｃｚｙｋら、Ｏｒｇ．Ｌｅｔｔ．１：７７９－７８１（１９９９）；Ａｄａｍｃｚｙｋら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．１１：７１４－７２４（２０００）；Ｍａｔｔｉｎｇｌｙら、Ｉｎ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ；Ｄｙｋｅ，Ｋ．Ｖ．Ｅｄ．；ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ：Ｂｏｃａ　Ｒａｔｏｎ、ｐｐ．７７－１０５（２００２）；Ａｄａｍｃｚｙｋら、Ｏｒｇ．Ｌｅｔｔ．５：３７７９－３７８２（２００３）；ならびに米国特許第５，４６８，６４６号明細書、同第５，５４３，５２４号明細書および同第５，７８３，６９９号明細書（これらはそれぞれ、上記に関するこの教示について、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。）に記載されている。

【００７７】

アクリジニウム化合物の別の例は、アクリジニウム－９－カルボキシレートアリールエステルである。式ＩＩのアクリジニウム－９－カルボキシレートアリールエステルの例は、１０－メチル－９－（フェノキシカルボニル）アクリジニウムフルオロスルホネート（Ｃａｙｍａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ，Ａｎｎ　Ａｒｂｏｒ，ＭＩから入手可能）である。アクリジニウム－９－カルボキシレートアリールエステルを調製するための方法は、ＭｃＣａｐｒａら、Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍ．Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌ．４：１１１１－２１（１９６５）；Ｒａｚａｖｉら、Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ　１５：２４５－２４９（２０００）；Ｒａｚａｖｉら、Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ　１５：２３９－２４４（２０００）；および米国特許第５，２４１，０７０号明細書（これらはそれぞれ、上記に関するこの教示について、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。）に記載されている。このようなアクリジニウム－９－カルボキシレートアリールエステルは、シグナルの強度および／またはシグナルの速度に関して、少なくとも１つのオキシダーゼによる分析物の酸化において生成された過酸化水素の効率的な化学発光指標である。アクリジニウム－９－カルボキシレートアリールエステルについての化学発光の経過は、迅速に、即ち１秒未満で完了するが、アクリジニウム－９－カルボキサミドの化学発光は、２秒を超えて継続する。しかしながら、アクリジニウム－９－カルボキシレートアリールエステルは、タンパク質の存在下でこの化学発光特性を喪失する。したがって、この使用は、シグナルの生成および検出の間にタンパク質が存在しないことを必要とする。試料中のタンパク質を分離または除去するための方法は当業者に周知であり、限定されないが、限外ろ過、抽出、沈殿、透析、クロマトグラフィーおよび／または消化が挙げられる（例えば、Ｗｅｌｌｓ，Ｈｉｇｈ　Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ　Ｂｉｏａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｓａｍｐｌｅ　Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｕｔｏｍａｔｉｏｎ　Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ（２００３）を参照されたい。）。試験試料から除去または分離されるタンパク質の量は、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約

７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％または約９５％であり得る。アクリジニウム－９－カルボキシレートアリールエステルおよびこの使用に関するさらなる詳細は、２００７年４月９日に出願された米国特許出願第１１／６９７，８３５号明細書に記載されている。アクリジニウム－９－カルボキシレートアリールエステルは、脱気無水Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）または水性コール酸ナトリウムなどの任意の適切な溶媒に溶解され得る。

【００７８】

「連結配列」または「連結ペプチド配列」は、対象とする１つ以上のポリペプチド配列（例えば、全長、断片など）に接続された天然または人工のポリペプチド配列を指す。用語「接続された」は、対象とするポリペプチド配列への連結配列の結合を指す。このようなポリペプチド配列は、好ましくは、１つ以上のペプチド結合によって接続される。連結配列は、約４から約５０アミノ酸の長さを有し得る。好ましくは、連結配列の長さは、約６から約３０アミノ酸である。天然の連結配列は、アミノ酸の置換、付加または欠失によって改変され、人工の連結配列を作ることができる。例示的な連結配列としては、限定されないが、以下のものが挙げられる：（ｉ）アミノ酸配列ＨＨＨＨＨＨ（配列番号１０５）を有する６×Ｈｉｓタグなどのヒスチジン（Ｈｉｓ）タグは、対象とするポリペプチドおよび抗体の単離および精製を容易にするために連結配列として有用である；（ｉｉ）Ｈｉｓタグのようなエンテロキナーゼ切断部位は、対象とするタンパク質および抗体の単離および精製に使用される。多くの場合、エンテロキナーゼ切断部位は、対象とするタンパク質および抗体の単離および精製において、Ｈｉｓタグと共に使用される。種々のエンテロキナーゼ切断部位が、当技術分野において公知である。エンテロキナーゼ切断部位の例としては、限定されないが、アミノ酸配列ＤＤＤＤＫ（配列番号１０６）およびこの誘導体（例えば、ＡＤＤＤＤＫ（配列番号１０７）など）が挙げられる；（ｉｉｉ）一本鎖可変領域断片の軽鎖可変領域および／または重鎖可変領域を連結または接続するために、種々の配列を使用することができる。他の連結配列の例は、Ｂｉｒｄら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２６（１９８８）；Ｈｕｓｔｏｎら、ＰＮＡＳ ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３（１９８８）；およびＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら、Ｎａｔｕｒｅ ３４８：５５２－５５４（１９９０）に見ることができる。さらなる機能、例えば、薬物の結合または固体支持体への結合のために、連結配列が改変され得る。本開示との関連では、モノクローナル抗体は、例えば、Ｈｉｓタグ、エンテロキナーゼ切断部位またはこの両方などの連結配列を含有し得る。

【００７９】

「肝がん」は、本明細書で使用するとき、肝臓に由来するがんを指す。肝がんは、肝細胞癌（ＨＣＣ）および線維層板型癌を含む。ほとんどの場合、肝がんの原因は、通常、肝臓（すなわち、肝硬変）の瘢痕である。

【００８０】

「肝硬変」は、本明細書で使用するとき、線維症、瘢痕組織および再生結節（損傷組織が再生する過程に起因して生じる塊であって、肝機能の喪失をもたらす。）による肝組織の置換によって特徴付けられる慢性肝疾患の結果を指す。肝臓の機能単位の構造上組織が非常に破壊されるようになり、肝臓を介した血流および肝機能が破壊されるようになる。肝硬変は、最も一般的には、アルコール依存症、Ｂ型およびＣ型肝炎、ならびに脂肪肝疾患によって引き起こされるが、他に多数の可能な原因を有する。いくつかの症例は特発性（すなわち、原因不明）である。肝硬変が発症すると、門脈圧亢進症、肝不全および肝がんを含む肝疾患の重篤な合併症が生じることがある。肝硬変が発症すると、肝がんの危険性は大きく増大し、肝硬変は、前がん状態であると考える必要がある。肝硬変は、アルコール乱用、肝臓の自己免疫疾患、Ｂ型またはＣ型肝炎ウイルス感染、長期（慢性）の肝臓の炎症、および生体における鉄過剰負荷（ヘモクロマトーシス）によって引き起こされる可能性がある。Ｂ型またはＣ型肝炎を有する患者は、肝硬変を発症していない場合でも、肝がんのリスクがある。

【００８１】

「肝疾患」は、本明細書で使用するとき、肝臓への損傷または肝臓の疾患を指す。肝機能障害の症状は、身体的徴候と消化器系の問題、血糖値の問題、免疫障害、脂肪の異常な吸収、および代謝の問題に関連する様々な症状の両方を含む。肝疾患は、肝線維症、肝硬変および肝がんを含む。全ての慢性肝疾患は、肝線維症をもたらし得る。慢性肝疾患は、慢性ウイルス性Ｂ型肝炎およびアルコール性肝疾患によって引き起こされることがある。

【００８２】

「肝線維症」は、本明細書中で使用するとき、慢性肝疾患のほとんどのタイプで生じるコラーゲンを含む細胞外マトリクスタンパク質の過剰な蓄積を指す。肝線維症は、傷害または病気に対する肝臓応答を表す瘢痕化プロセスである。肝線維症は、Ｂ型およびＣ型肝炎に起因した感染、寄生虫、過剰なアルコール使用および医薬品を含む有毒な化学物質への暴露、ならびに胆管閉塞によって引き起こされる場合がある。進行性肝線維症は、肝硬変、肝不全および門脈圧亢進症をもたらし、多くの場合、肝移植を必要とする。

【００８３】

「モノクローナル抗体」は、本明細書で使用するとき、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体を指し、すなわち、該集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能な天然に存在する変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、非常に特異的であり、単一抗原に対して指向される。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対して指向される異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物と比較して、各々のモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。本明細書におけるモノクローナル抗体は、具体的には、重鎖および／または軽鎖の部分が、特定の種に由来するまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応するする配列と同一であるまたは相同である「キメラ」抗体を含み、一方、鎖（単数または複数）の残りは、それらが所定の生物学を示す限り、別の種に由来するまたは別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体における対応する配列、ならびにこのような抗原の断片と同一であるまたは相同である。

【００８４】

本明細書において、「多価結合タンパク質」は、２つ以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質（本明細書において「抗原結合ドメイン」とも称される。）を指すのに使用される。多価結合タンパク質は、好ましくは、３つ以上の抗原結合部位を有するように操作され、一般に、天然に存在する抗体ではない。用語「多重特異性結合タンパク質」は、同じ標的分子の２つ以上の異なるエピトープに結合することができる結合タンパク質を含む、２つ以上の関連または非関連標的に結合することができる結合タンパク質を指す。

【００８５】

「所定のカットオフ」および「所定のレベル」は、本明細書で使用するとき、所定のカットオフ／レベルが、種々の臨床パラメータ（例えば、疾患の存在、疾患のステージ、疾患の重症度、疾患の進行、非進行または改善など）と既に結びつけられているまたはこれらに関連付けられている場合、所定のカットオフ／レベルに対してアッセイ結果を比較することによって、診断、予測または治療効果の結果を評価するのに使用されるアッセイカットオフ値を指す。本発明の開示は、例示的な所定のレベルを提供する。しかしながら、カットオフ値が、イムノアッセイの性質（例えば、用いられる抗体、反応条件、試料純度など）に応じて変化し得ることは周知である。さらに、この開示によって与えられる記載に基づいて、他のイムノアッセイについてのイムノアッセイ特異的カットオフ値を得るために、本明細書における開示を他のイムノアッセイにあてはめることは、当該技術分野における通常の技術範囲内である。所定のカットオフ／レベルの厳密な値はアッセイ間で変化し得るのに対して、本明細書に記載されている相関関係は一般に適用可能でなければならない。

【００８６】

「前処理試薬」、例えば、溶解、沈殿および／または可溶化試薬は、本明細書に記載される診断アッセイで使用するとき、任意の細胞を溶解しおよび／または試験試料中に存在する任意の分析物を可溶化するものである。さらに本明細書に記載されているように、前

処理は全ての試料に必要ではない。とりわけ、分析物（即ち、ＧＰ７３、ＧＰ７３の断片、ＧＰ７３の変異体またはこれらの任意の組合せ）を可溶化することは、試料中に存在する任意の内在性結合タンパク質からの分析物の放出を伴う。前処理試薬は、均一（分離工程を必要としない。）または不均一（分離工程を必要とする。）であり得る。不均一前処理試薬を使用する場合、アッセイの次の工程へ進む前に、沈殿した分析物結合タンパク質が試験試料から除去される。前処理試薬は、（ａ）１つ以上の溶媒および塩、（ｂ）１つ以上の溶媒、塩および洗浄剤、（ｃ）界面活性剤、（ｄ）界面活性剤および塩、または（ｅ）細胞溶解および／もしくは分析物の可溶化に適切な任意の試薬または試薬の組合せを場合によって含み得る。

【００８７】

「品質管理試薬」は、本明細書に記載されるイムノアッセイおよびキットとの関連では、限定されないが、較正物質、対照および感受性パネルを含む。「較正物質」または「標準」は、典型的には、分析物、例えば、抗体または分析物の濃度を内挿するための較正（標準）曲線を確立するために（例えば、１つ以上、例えば複数）使用される。または、所定の正／負のカットオフに近い単一の較正物質を使用することができる。「感受性パネル」を構成するために、複数の較正物質（即ち、１を超える較正物質または様々な量の較正物質）を、併せて使用することができる。

【００８８】

「受信者動作特性」曲線または「ＲＯＣ」曲線は、その弁別閾値を変化させる場合、二値分類子システムの性能を例示するグラフプロットを指す。それは、陽性のうちの真陽性の割合（ＴＰＲ＝真陽性率）対陰性のうちの偽陽性の割合（ＦＰＲ＝偽陽性率）を様々な閾値設定でプロットすることにより作成される。ＴＲＰは、感受性として知られ、ＦＰＲは、特異性を差し引いたものであるまたは真陰性率である。

【００８９】

「組換え抗体」および「複数の組換え抗体」は、組換え技術によって、１つ以上のモノクローナル抗体の全部または一部をコードする核酸配列を適切な発現ベクター中にクローニングし、続いて、適切な宿主細胞中で抗体を発現させることを含む１つ以上の工程によって調製された抗体を指す。これらの用語は、限定されないが、組換え的に生産されたモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体（完全または部分的にヒト化）、抗体断片から形成された多重特異性または多価構造、二官能性抗体、ヘテロコンジュゲートＡｂ、ＤＶＤ－Ｉｇ（登録商標）および本明細書の（ｉ）に記載される他の抗体を含む。（二重可変ドメイン免疫グロブリンおよびこの作製方法は、Ｗｕ，Ｃ．ら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２５：１２９０－１２９７（２００７）に記載されている。）用語「二官能性抗体」は、本明細書で使用するとき、ある抗原性部位に対する特異性を有する第一のアームと、異なる抗原性部位に対する特異性を有する第二のアームとを含む抗体を指し、即ち、二官能性抗体は二重特異性を有する。

【００９０】

対象（患者など）の「リスク評価」、「リスク分類」、「リスク識別」または「リスク層化」は、本明細書で使用するとき、対象に関する治療決定がさらに多くの情報に基づいて行われ得るように、疾患の発症または疾患の進行を含む将来のイベントの発生リスクを予知するためのバイオマーカーを含む因子の評価を指す。

【００９１】

「試料」、「試験試料」、「標本」、「対象からの試料」および「患者試料」は、本明細書において互換的に使用され得、血液、組織、尿、血清、血漿、羊水、脳脊髄液、胎盤細胞もしくは組織、内皮細胞、白血球または単球の試料であってもよい。試料は、患者から得られた状態のまま直接使用することができ、または本明細書で考察されるいくつかの方法もしくは当該技術分野において公知の別の方法で試料の特性を改変するために、例えば、ろ過、蒸留、抽出、濃縮、遠心分離、干渉成分の不活性化および試薬の追加などによって前処理することができる。

【００９２】

試料を得るために、任意の細胞型、組織または体液が利用されてよい。このような細胞型、組織および体液は、生検および剖検試料などの組織の切片、組織学の目的のために採取された凍結切片、血液（全血など）、血漿、血清、痰、便、涙、粘液、唾液、気管支肺胞洗浄（ＢＡＬ）液、毛、皮膚、赤血球、血小板、間質液、眼球水晶体液、脳脊髄液、汗、鼻汁、滑液、帯下、羊水、精液などを含み得る。細胞型および組織はまた、リンパ液、腹水、婦人科学的な液体、尿、腹腔液、脳脊髄液、膣のすすぎによって回収した体液または膣洗浄によって集めた体液を含んでよい。組織または細胞型は、動物から細胞の試料を除去することによって提供され得るが、予め単離された（例えば、別の人から、別の時におよび／または別の目的のために単離された）細胞を用いることによって達成することもできる。処置または転帰歴を有するものなどの保存記録用組織も使用されてよい。タンパク質またはヌクレオチドの単離および／または精製が不必要な場合もある。

【００９３】

「一連の較正組成物」は、既知濃度のＧＰ７３を含む複数の組成物を指し、該組成物のそれぞれは、該ＧＰ７３の一連の濃度において、他の組成物と異なる。

【００９４】

「固相」は、不溶であるまたは後続反応によって不溶となり得る任意の材料を指す。固相は、捕捉剤を誘引および固定化する固有の能力について選択され得る。あるいは、固相は、これに、捕捉剤を誘引および固定化する能力を有する連結剤を付着させることができる。連結剤は、例えば、捕捉剤自体または捕捉剤にコンジュゲートした帯電物質に関して逆帯電した帯電物質を含み得る。一般に、連結剤は、固相上に固定化された（固相に結合した）および結合反応を通じて捕捉剤を固定化する能力を有する任意の（好ましくは特異的な）結合パートナーであり得る。連結剤によって、アッセイの実施の前またはアッセイの実施の間に、捕捉剤が固相材料に間接的に結合することが可能になる。例えば、固相は、プラスチック、誘導体化されたプラスチック、磁性金属もしくは非磁性金属、ガラスまたはシリコンであり得、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、チップおよび当業者に公知の他の構造物が挙げられる。

【００９５】

「特異的結合」または「特異的に結合すること」は、本明細書で使用するとき、抗体、タンパク質またはペプチドと第２の化学種の相互作用を指し得、ここで、相互作用は、化学種上の特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存する；例えば、抗体は、タンパク質一般にではなく、特定のタンパク質構造を認識して結合する。抗体が、エピトープ「Ａ」に対して特異的である場合には、標識された「Ａ」および抗体を含有する反応中のエピトープＡ（または遊離の、標識されていないＡ）を含有する分子の存在は、抗体に結合している標識されたＡの量を減少させる。

【００９６】

「特異的結合パートナー」は、特異的結合対のメンバーである。特異的結合対は、化学的または物理的手段によって互いに特異的に結合する２つの異なる分子を含む。したがって、一般的なイムノアッセイの抗原および抗体の特異的結合対に加えて、他の特異的結合対としては、ビオチンおよびアビジン（またはストレプトアビジン）、炭水化物およびレクチン、相補的ヌクレオチド配列、エフェクターおよび受容体分子、補助因子および酵素、酵素および酵素阻害剤などが挙げられ得る。さらに、特異的結合対としては、元の特異的結合メンバーの類似体であるメンバー、例えば、分析物類似体が挙げられ得る。免疫反応特異的結合メンバーとしては、単離されているまたは組換え的に生産されたかにかかわらず、抗原、抗原断片およびモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む抗体、ならびにこれらの複合体および断片が挙げられる。

【００９７】

「対象」および「患者」は、本明細書で使用するとき、互換的に、任意の脊椎動物を指し、例えば、限定されないが、哺乳動物（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、ラットおよびマウス、非ヒト霊長動物（例えば、サル、例えばカニクイザルまたはアカゲザル、チンパンジーなど）

およびヒト）が挙げられる。いくつかの実施形態において、対象は、ヒトまたは非ヒトであってもよい。対象または患者は、他の形態の治療を受けていてもよい。

【００９８】

「治療する」、「治療すること」または「治療」は、それぞれ、このような用語が適用される疾患またはこのような疾患の１つ以上の症候を、反転、軽減または疾患の進行を阻害することを説明するのに互換的に使用される。対象の症状に応じて、この用語はまた、疾患を予防することを指し、疾患の発症を予防すること、または疾患に関連する症候を予防することを含む。治療は、急性的に実施してもよいし、または慢性的に実施してもよい。この用語はまた、疾患に伴う苦痛の前に、疾患またはこのような疾患に関連する症候の重症度を減少させることを指す。苦痛の前の疾患の重症度のこのような予防または減少は、本発明の抗体または医薬組成物を、投与時点では疾患に罹患していない対象に投与することを指す。「予防すること」はまた、疾患またはこのような疾患に関連する１つ以上の症候の再発の予防を指す。「治療」および「治療的に」は、「治療すること」について上に定義したような治療行為を指す。

【００９９】

「変異体」は、本明細書において、アミノ酸の挿入、欠失または保存的置換によってアミノ酸配列が異なるが、少なくとも１つの生物学的活性を保持するペプチドまたはポリペプチドを説明するのに使用される。「生物学的活性」の代表例としては、特異的抗体によって結合される能力、または免疫反応を促進する能力が挙げられる。変異体はまた、本明細書において、少なくとも１つの生物学的活性を保持するアミノ酸配列を有する参照タンパク質と実質的に同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質を説明するのに使用される。アミノ酸の保存的置換、即ち、アミノ酸を、同様の特性（例えば、親水性および荷電領域の程度および分布）の異なるアミノ酸と置換することは、当該技術分野において、通常、微小変化を含むと認識されている。これらの微小変化は、部分的には、当該技術分野において理解されるように、アミノ酸のハイドロパシー指数を考慮することによって同定され得る。Ｋｙｔｅら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５７：１０５－１３２（１９８２）。アミノ酸のハイドロパシー指数は、この疎水性および電荷を考慮することに基づいている。同様のハイドロパシー指数のアミノ酸は、置換してもタンパク質機能を依然として保持し得るということが当該技術分野において公知である。一態様において、±２のハイドロパシー指数を有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性はまた、生物学的機能を保持するタンパク質をもたらす置換を明らかにするのに使用され得る。ペプチドとの関連でアミノ酸の親水性を考慮することによって、抗原性および免疫原性と十分に相関すると報告されている有用な尺度であるこのペプチドの最大局所平均親水性を算出することが可能になる。全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第４，５５４，１０１号を参照されたい。当該技術分野において理解されるように、同様の親水性値を有するアミノ酸の置換は、生物学的活性、例えば、免疫原性を保持するペプチドをもたらし得る。置換は、互いに±２以内の親水性値を有するアミノ酸を用いて実施され得る。アミノ酸の疎水性指数および親水性値は両方とも、アミノ酸の特定の側鎖によって影響を受ける。この知見と一致して、生物学的機能と適合するアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、大きさおよび他の特性によって明らかにされるように、アミノ酸、特に、これらのアミノ酸の側鎖の相対類似性に依存すると理解される。「変異体」はまた、抗ＧＰ７３抗体の抗原反応性断片であって、対応する抗ＧＰ７３抗体断片とはアミノ酸配列が異なるが依然として抗原反応性であり、ＧＰ７３に対する結合について、対応する抗ＧＰ７３抗体断片と競合することができる抗原反応性断片を指すのに使用され得る。「変異体」はまた、タンパク質分解、リン酸化または他の翻訳後修飾などによって異なって処理されるが、この抗原反応性を依然として保持するポリペプチドまたはこの断片を説明するのに使用され得る。

【０１００】

「ベクター」は、本明細書において、連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を説明するのに使用される。ベクターの一種は、「プラスミド」であり、これは、さらなるＤＮＡセグメントがライゲーションされ得る環状の二本鎖ＤＮＡループを指す

。別の種類のベクターは、ウイルスベクターであり、さらなるＤＮＡセグメントがウイルスゲノム中にライゲーションされ得る。ある特定のベクターは、これらが導入されている宿主細胞において自己複製することができる（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞に導入されると宿主細胞のゲノム中に組み込むことができ、これにより、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある特定のベクターは、これらが作動可能に連結されている遺伝子の発現を指示することができる。このようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」（または単に「発現ベクター」）と称される。一般に、組換えＤＮＡ技術において有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態である。プラスミドは、最も一般的に使用される形態のベクターであるため、「プラスミド」および「ベクター」は互換的に使用され得る。しかしながら、同等の機能を果たす他の形態の発現ベクター、例えば、ウイルスベクター（例えば、複製欠陥レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）を使用することができる。これに関して、本開示との関連では、ＲＮＡ型のベクター（ＲＮＡウイルスベクターを含む。）もまた用途があり得る。

【０１０１】

本明細書において別途定義されない限り、本開示に関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。例えば、本明細書に記載される、細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、タンパク質および核酸化学、ならびにハイブリダイゼーションに関して使用されるいずれかの命名法およびそれらの技術は、当該技術分野において周知であり、一般的に使用されるものである。用語の意味および範囲は明らかでなければならない；しかしながら、潜在的意味不明の場合には、本明細書に与えられている定義が辞書または外部の定義に優先する。さらに、文脈上別途要求されない限り、単数形の用語は、複数形の用語を含むものとし、複数形の用語は単数形の用語を含むものとする。

【０１０２】

２．ＧＰ７３抗体

本明細書で提供されるのは肝疾患および／またはがんなどの疾患を検出および処置する方法における使用のための抗体である。ゴルジタンパク質７３（「ＧＰ７３」）（またはその断片）に特異的に結合する単離された抗体は、本明細書で提供され「ＧＰ７３抗体」と称される。

【０１０３】

ａ．ゴルジタンパク質７３（ＧＰ７３）

「ゴルジ膜タンパク質１」、「ゴルジリン酸化タンパク質２」および「ゴルジ膜タンパク質ＧＰ７３」としても周知のゴルジタンパク質７３（ＧＰ７３）は、粗面小胞体において合成されたタンパク質を処理し、ゴルジ装置を通るタンパク質積荷の運搬を補助するタンパク質である。ヒトＧＰ７３は、ＧＯＬＭ１遺伝子によってコードされる４００アミノ酸タンパク質である。ＧＰ７３は、いくつかの組織由来の正常上皮細胞から広く発現されている。上方制御された細胞内ＧＰ７３発現は、エンドソーム経路を通るその細胞内輸送を増強し、ＧＰ７３の細胞内タンパク質分解切断の機会をもたらし、切断型ＧＰ７３の分泌を生じる。ＧＰ７３発現は、ウイルス感染への応答において上方制御されるが、ウイルス性および非ウイルス性肝疾患を有する患者由来の肝細胞においても上方制御されていることが見出されている。ＧＰ７３は、前立腺がんおよび肺腺がん組織において過発現されている。ヒトＧＰ７３は、次のアミノ酸配列を有していてよい：

【０１０４】

【化１】

MGLGNGRRSMKSPPLVLAALVACIIVLGFNYWIASSRSVDLQTRIMELEGRVR
RAAAERGAVELKKNEFQGELEKQREQLDKIQSSHNFQLESVNKLYQDEKAVLVNNITT
GERLIRVLQDQLKTLQRNYGRLQQDVLQFQKNQTNLERKFSYDLSQCINQMKEVKEQC
EERIEEVTKKGNEAVASRDLSENNDQRQQLQALSEPQPRLQAAGLPHTEVPQGKGNVL
GNSKSQTPAPSSEVVLDSKRQVEKEETNEIQVVNEEPQRDRLPQEPGREQVVEDRPVGG
RGFGGAGELGQTPQVQAALSVSQENPEMEGPERDQLVIPDGQEEEQEAAGEGRNQQKL
RGEDDYNMDENEAESETDKQAALAGNDRNIDVFNVEDQKRDTINLLDQREKRNHTL

（配列番号９７、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＡＡＦ４４６６３）。

【０１０５】

ヒトＧＰ７３は、配列番号９７の断片または変異体であってよい。ＧＰ７３の断片は、長さ５から４００アミノ酸の間、１０から４００アミノ酸の間、５０から４００アミノ酸の間、６０から４００アミノ酸の間、６５から４００アミノ酸の間、１００から４００アミノ酸の間、１５０から４００アミノ酸の間、１００から３００アミノ酸の間または２００から３００アミノ酸の間であってよい。断片は、配列番号９７由来の連続した番号のアミノ酸を含んでよい。

【０１０６】

ヒトＧＰ７３の断片は次のアミノ酸配列を有してよい：

【０１０７】

【化２】

ELKKNEELKKNEFQGELEKQREQLDKIQSSHNFQLESVNKLYQDEKAVLVNNI
TTGERLIRVLQDQLKTLQRNYGRLQQDVLQFQKNQTNLERKFSYDLSQCINQMKEVKE
QCEERIEEVTKKGNEAVASRDLSENNDQRQQLQALSEPQPRLQAAGLPHTEVPQGKGN
VLGNSKSQTPAPSSEVVLDSKRQVEKEETNEIQVVNEEPQRDRLPQEPGREQVVEDRPV
GGRGFGGAGELGQTPQVQAALSVSQENPEMEGPERDQLVIPDGQEEEQEAAGEGRNQQ
KLRGEDDYNMDENEAESETDKQAALAGNDRNIDVFNVEDQKRDTINLLDQREKRNHTL

（配列番号１００）、配列番号９７のアミノ酸６３－４００に対応する。

【０１０８】

ｂ．ＧＰ７３認識抗体

抗体は、ＧＰ７３、その断片、ＧＰ７３のエピトープまたはその変異体に結合する抗体である。抗体は、抗ＧＰ７３抗体またはその変異体もしくは誘導体の断片であってよい。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってよい。抗体は、キメラ抗体、１本鎖抗体、親和性成熟抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、完全なヒト抗体もしくはＦａｂ断片などの抗体断片またはこれらの混合物であってよい。抗体断片または誘導体は、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ＦｖまたはｓｃＦｖ断片を含んでよい。抗体誘導体は、ペプチド模倣薬によって産生され得る。さらに、１本鎖抗体の産生について記載された技術は、１本鎖抗体の産生に適合され得る。

【０１０９】

抗ＧＰ７３抗体は、キメラ抗ＧＰ７３またはヒト化抗ＧＰ７３抗体であってよい。一実施形態では、ヒト化抗体およびキメラ抗体の両方は一価である。一実施形態ではヒト化抗体およびキメラ抗体の両方は、Ｆｃ領域に連結した単一のＦａｂ領域を含む。

【０１１０】

ヒト抗体は、ファージディスプレイ技術またはヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニックマウスに由来してよい。ヒト抗体は、ヒトインビボ免疫応答の結果として生成され、単離され得る。例えば、Ｆｕｎａｒｏら，ＢＭＣ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏ

ｇｙ，２００８（８）：８５を参照されたい。したがって抗体は、ヒトおよび非動物レパートリーの産生物であってよい。これがヒト由来であるために、自己抗原に対する反応性の危険は最少化され得る。代替的に標準的酵母ディスプレイライブラリーおよびディスプレイ技術は、ヒト抗ＧＰ７３抗体を選択および単離するために使用され得る。例えば天然ヒト１本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）のライブラリーは、ヒト抗ＧＰ７３抗体を選択するために使用され得る。トランスジェニック動物は、ヒト抗体を発現するために使用され得る。

【０１１１】

ヒト化抗体は非ヒト種由来の１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有し所望の抗原に結合する非ヒト種抗体由来の抗体分子であってよい。

【０１１２】

抗体は、当技術分野において周知のものとは異なる生物学的機能（複数可）を有するという点で既知の抗体から識別可能である。

【０１１３】

（１）エピトープ

抗体は、ＧＰ７３（配列番号９７）、配列番号１００、それらの断片またはそれらの変異体に免疫特異的に結合できる。抗体は、配列番号１０１（配列番号９７のアミノ酸３０７－３３９）、配列番号１０２（配列番号９７のアミノ酸２７６－２８７）、配列番号１０３（配列番号９７のアミノ酸３４４－３６３）または配列番号１０４（配列番号９７のアミノ酸６３－９６）のエピトープペプチドを免疫特異的に認識および結合できる。抗体は、配列番号１０１、配列番号１０４、配列番号１０３または配列番号１０４のエピトープペプチド内の少なくとも３個のアミノ酸、少なくとも４個のアミノ酸、少なくとも５個のアミノ酸、少なくとも６個のアミノ酸、少なくとも７個のアミノ酸、少なくとも８個のアミノ酸、少なくとも９個のアミノ酸または少なくとも１０個のアミノ酸を免疫特異的に認識し、結合できる。抗体は、配列番号１０１、配列番号１０４、配列番号１０３または配列番号１０４のエピトープペプチドの少なくとも３個の連続したアミノ酸、少なくとも４個の連続したアミノ酸、少なくとも５個の連続したアミノ酸、少なくとも６個の連続したアミノ酸、少なくとも７個の連続したアミノ酸、少なくとも８個の連続したアミノ酸、少なくとも９個の連続したアミノ酸または少なくとも１０個の連続したアミノ酸を有するエピトープを免疫特異的に認識し、結合できる。

【０１１４】

（２）抗体結合特徴

抗体は、ＧＰ７３（配列番号９７）、配列番号１００、それらの断片またはそれらの変異体に免疫特異的に結合し、少なくとも１．５ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも１．６ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも１．７ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも１．８ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも１．９ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも２．０ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも２．１ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも２．２ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも２．３ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも２．４ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも２．５ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも５．０ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも１０．０ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも１５ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも５０ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも１００ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも５００ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも１０００ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも２０００ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも３０００ｘ１０$^{-12}$Ｍ、少なくとも３５００ｘ１０$^{-12}$ＭのK_Dを有する、または約１．５ｘ１０$^{-12}$Ｍから約３５００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約１０．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約３５００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約２５．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約３５００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約５０．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約３５００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約１００．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約３５００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約１５０．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約３５００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約２００ｘ１０$^{-12}$Ｍから約３５００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約５００ｘ１０$^{-12}$Ｍから約３５００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約１０００ｘ１０$^{-12}$Ｍから約３５００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約１．５ｘ１０$^{-12}$Ｍから約３０００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約１０．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約３０００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約

２５．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約３０００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約５０．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約３０００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約１．５ｘ１０$^{-12}$Ｍから約１０００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約２５．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約１０００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約５０．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約１０００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約１００．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約１０００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約１．５ｘ１０$^{-12}$Ｍから約５００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約５０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約５００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約１００ｘ１０$^{-12}$Ｍから約５００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約１．５ｘ１０$^{-12}$Ｍから約１００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約２５．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約１００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約５０．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約１００ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約１．５ｘ１０$^{-12}$Ｍから約５０ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、約１０．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約５０．０ｘ１０$^{-12}$Ｍまで、または約２５．０ｘ１０$^{-12}$Ｍから約５０ｘ１０$^{-12}$Ｍまでの範囲のK_dを有する。断片は、配列番号９７または配列番号１００であってよい。

【０１１５】

ＧＰ７３への抗体の結合は、ＧＰ７３分子上のフコース糖部分の存在または不存在に感受性または非感受性であってよい。ＧＰ７３分子上のフコース糖部分の存在または不存在に感受性である抗体は、フコース糖部分がＧＰ７３分子上に存在または不存在であることに依存してＧＰ７３への抗体の結合親和性が変化することを意味する。例えば、その結合がＧＰ７３分子上のフコース糖部分の存在または不存在に感受性である抗体は、フコース糖部分が存在する場合にＧＰ７３へのより低い結合親和性を有する場合がある。代替的に、その結合がＧＰ７３分子上のフコース糖部分の存在または不存在に感受性である抗体は、フコース糖部分が不存在である場合にＧＰ７３へのより低い結合親和性を有する場合がある。ＧＰ７３分子上のフコース糖部分の存在または不存在に非感受性である抗体は、ＧＰ７３分子上にフコース糖部分が存在または不存在である場合に、ＧＰ７３への抗体の結合親和性が変化しないことを意味する。

【０１１６】

（３）抗体構造

（ａ）重鎖および軽鎖ＣＤＲ

抗体は、ＧＰ７３（配列番号９７）、配列番号１００、これらの断片またはこれらの変異体に免疫特異的に結合でき、表１に示す可変重鎖（ＶＨ）および／または可変軽鎖（ＶＬ）を含んでよい。抗体は、ＧＰ７３、その断片またはその変異体に免疫特異的に結合でき、表１に示す１つ以上の重鎖または軽鎖ＣＤＲ配列を含んでよい。抗体の軽鎖は、カッパ鎖またはラムダ鎖であってよい。例えば表１を参照されたい。

【０１１７】

【表１】

表1

タンパク質領域	配列番号	配列
1B-3440 (VH)	1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNAMNW VRQAPGKGLEWVARIRTKRYNYTTFYADSVKDRFTIS RDDSQSMLFLQMNNLKTEDTAMYYCVTGGTGTFDY WGQGTTLTVSS
1B-3440 (VH) CDR-H1	2	TNAMN
1B-3440 (VH) CDR-H2	3	RIRTKRYNYTTFYADSVKD
1B-3440 (VH) CDR-H3	4	GGTGTFDY

1B-3440 (VL)	5	EIVLTQSPTTMPASPGEKVTFTCSASSGISSNYLHWYQL KPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGGGSGTSYSLTIGT MEAEDVATYYCQQGFSIPLTFGAGTKLELKR
1B-3440 (VL) CDR-L1	6	SASSGISSNYLH
1B-3440 (VL) CDR-L2	7	RTSNLAS
1B-3440 (VL) CDR-L3	8	QQGFSIPLT
1B-4971 (VH)	9	QVQLQQSGPALVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVIHW VKQKPGQGLERIGYIWPYNDGTKFNEKFKGKATLTSD KSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCSSQQLAYWGQGTTL TVSS
1B-4971 (VH) CDR-H1	10	NYVIH
1B-4971 (VH) CDR-H2	11	YIWPYNDGTKFNEKFKG
1B-4971 (VH) CDR-H3	12	QQLAY
1B-4971 (VL)	13	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLI WLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFT LRISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIKR
1B-4971 (VL) CDR-L1	14	KSSQSLLYSDGKTYLI
1B-4971 (VL) CDR-L2	15	LVSKLDS
1B-4971 (VL) CDR-L3	16	WQGTHFPYT
1B-3246 (VH)	17	DVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWV RQTPEKRLEWVATISRGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNA KNTLYLQMSSLKSEDTAIYYCTREYFSGDTYDYFDYW GQGTTLTVSS
1B-3246 (VH) CDR-H1	18	SYTMS
1B-3246 (VH) CDR-H2	19	TISRGGTYIYYPDSVKG
1B-3246 (VH) CDR-H3	20	EYFSGDTYDYFDY
1B-3246 (VL)	21	EIVMTQAAFANPVTLGTSVSISCRSSKSLLHSNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFT LRISRVEAEDVGIYYCAQNLELYTFGGGTKLEIKR
1B-3246 (VL) CDR-L1	22	RSSKSLLHSNGITYL
1B-3246 (VL) CDR-L2	23	QMSNLAS
1B-3246 (VL) CDR-L3	24	AQNLELYT
1B-4863 (VH)	25	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHWVR QSPGKGLEWLGVIWTGGSTNYNSALMSRLSISKDNSE SQVFLKVNSLQTDDTGMYYCARDPGTDYFDYWGQGT TLTVSS
1B-4863 (VH) CDR-H1	26	SYGVH
1B-4863 (VH) CDR-H2	27	VIWTGGSTNYNSALMS

1B-4863 (VH) CDR-H3	28	DPGTDYFDY
1B-4863 (VL)	29	DIVMTQSHKFMSTSIGDRVSISCKASQDVSIDVSWYQQ KPGQSPTLLIYSASYRYIGVPDRFTGSGSGTAFTFTISSV QAEDLAIYYCQQHFTTPLTFGAGTKLELKR
1B-4863 (VL) CDR-L1	30	KASQDVSIDVS
1B-4863 (VL) CDR-L2	31	SASYRY
1B-4863 (VL) CDR-L3	32	QQHFTTPLT
1A-3187 (VH)	33	QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTIRSYWIEWV KQRPGHGLEWIGEILPGSGNTNYNEKFKGTATFTADTS SNTVYLHLSSLTSEDSAVYYCANGRGSYRYHWFAYW GQGTLVTVSP
1A-3187 (VH) CDR-H1	34	SYWIE
1A-3187 (VH) CDR-H2	35	EILPGSGNTNYNEKFKG
1A-3187 (VH) CDR-H3	36	GRGSYRYHWFAY
1A-3187 (VL)	37	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYM NWYQQKPGQPPKVLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDF TLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEMKR
1A-3187 (VL) CDR-L1	38	KASQSVDYDGDSYMN
1A-3187 (VL) CDR-L2	39	AASNLES
1A-3187 (VL) CDR-L3	40	QQSNEDPYT
1A-4246 (VH)	41	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWV RLTPEKRLEWVATISSGGSSYTYYPDSVKGRFTISRDNV KSTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARNWDGELHYYAMD YWGQGTSVTVSS
1A-4246 (VH) CDR-H1	42	SYAMS
1A-4246 (VH) CDR-H2	43	TISSGGSSYTYYPDSVKG
1A-4246 (VH) CDR-H3	44	DGELHYYAMDY
1A-4246 (VL)	45	QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQ QKPGSSPKLWVYSTSSLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIN NMEAEDAATYFCHQYHRSPYTFGGGTKLEIKR
1A-4246 (VL) CDR-L1	46	TASSSVSSSYLH
1A-4246 (VL) CDR-L2	47	STSSLAS
1A-4246 (VL) CDR-L3	48	HQYHRSPYT

【０１１８】

抗体またはその変異体もしくは誘導体は、配列番号１－４８の１つ以上と９５％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％または５０％を超えて同一である１つ以上のアミノ酸配列を含有してよい。抗体またはその変異体もしくは誘導体は、配列番号４９－９６の１つ以上と９５％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％または５０％を超えて同一である１つ以上の核酸配列によってコードされてよい。ポリペプチド同一性および相同性は、例えば報告書：Ｗｉｌｂｕｒ，Ｗ．Ｊ．ａｎｄ　Ｌｉｐｍａｎ，Ｄ．Ｊ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８０，７２６－７３０（１９８３）に記載のアルゴリズムによって決定されてよい。本明細書に記載の抗体、その変異体または誘導体は、配列番号１７－３２の１つ以上の相補体にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされてよい。本明細書に記載の抗体、その変異体または誘導体は、配列番号１－４８の１つ以上をコー

ドする１つ以上の核酸の相補体に高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされてよい。

【０１１９】

一態様では単離された抗体は、ＧＰ－７３に特異的に結合し、式：ＣＤＲ－Ｈ１、X_5－X_6－X_7－X_8－X_9（配列番号１０８）を有するＣＤＲ－Ｈ１を有し、ここで：X_5はＳ、ＮまたはＴであり、X_6はＹまたはＮであり、X_7はＷ、Ｖ、Ｇ、ＡまたはＴであり、X_8はＩ、ＶまたはＭであり、X_9はＥ、Ｈ、ＳまたはＮである。

【０１２０】

別の態様では単離された抗体は、ＧＰ－７３に特異的に結合し、式：ＣＤＲ－Ｈ２、X_{10}－Ｉ－X_{11}－X_{12}－X_{13}－X_{14}－X_{15}－X_{16}－X_{17}－X_{18}－X_{19}－X_{20}－X_{21}－X_{22}－X_{23}－X_{24}－X_{25}－X_{26}－X_{27}（配列番号１０９）を有するＣＤＲ－Ｈ２を有し、ここで：X_{10}はＥ、Ｙ、Ｖ、ＴまたはＲであり、X_{11}はＬ、Ｗ、ＳまたはＲであり、X_{12}はＰ、Ｓ、ＲまたはＴであり、X_{13}は存在しないまたはＫであり、X_{14}は存在しないまたはＲであり、X_{15}はＧ、ＴまたはＹであり、X_{16}はＳ、ＧまたはＮであり、X_{17}はＧ、Ｄ、Ｓ、ＴまたはＹであり、X_{18}はＮ、Ｓ、Ｙ、ＧまたはＴであり、X_{19}はＴまたはＩであり、X_{20}はＮ、Ｋ、ＹまたはＦであり、X_{21}はＹまたはＦであり、X_{22}はＮ、ＰまたはＡであり、X_{23}はＥ、ＳまたはＤであり、X_{24}はＫ、ＡまたはＳであり、X_{25}はＦ、ＬまたはＶであり、X_{26}はＫまたはＭであり、X_{27}はＧ、ＳまたはＤである。

【０１２１】

さらに別の態様では単離された抗体は、ＧＰ－７３に特異的に結合し、式：ＣＤＲ－Ｈ３、X_{28}－X_{29}－X_{30}－X_{31}－X_{32}－X_{33}－X_{34}－X_{35}－X_{36}－X_{37}－X_{38}－X_{39}－Ｙ（配列番号１１０）を有するＣＤＲ－Ｈ３を有し、ここで：X_{28}はＧ、Ｑ、Ｄ、ＥまたはＮであり、X_{29}はＲ、Ｑ、Ｐ、Ｙ、ＷまたはＧであり、X_{30}はＧ、Ｌ、Ｆ、ＤまたはＴであり、X_{31}はＳ、Ｔ、ＳまたはＧであり、X_{32}はＹ、Ｄ、Ｇ、ＥまたはＴであり、X_{33}はＲ、Ｙ、Ｄ、ＬまたはＦであり、X_{34}はＹ、Ｆ、ＴまたはＨであり、X_{35}はＨまたはＹであり、X_{36}はＷ、ＤまたはＹであり、X_{37}はＦ、ＹまたはＡであり、X_{38}は存在しないまたはＦもしくはＭであり、X_{39}はＡまたはＤである。

【０１２２】

さらに別の態様では単離された抗体は、ＧＰ－７３に特異的に結合し、式：ＣＤＲ－Ｌ１、X_{40}－X_{41}－Ｓ－X_{42}－X_{43}－X_{44}－X_{45}－$X_{46}$$X_{47}$－$X_{48}$－$X_{49}$－$X_{50}$－$X_{51}$－$X_{52}$－$X_{53}$－$X_{54}$（配列番号１１１）を有するＣＤＲ－Ｌ１を有し、ここで：X_{40}はＫ、Ｔ、ＲまたはＳであり、X_{41}はＡまたはＳであり、X_{42}はＱ、ＳまたはＫであり、X_{43}はＳまたはＧであり、X_{44}はＶまたはＬであり、X_{45}はＤまたはＬであり、X_{46}はＹ、ＤまたはＨであり、X_{47}は存在しないまたはＳであり、X_{48}はＤ、Ｖ、ＮまたはＩであり、X_{49}はＧ、ＶまたはＳであり、X_{50}はＤ、Ｋ、ＳまたはＩであり、X_{51}はＳ、Ｔ、ＩまたはＮであり、X_{52}はＹまたはＤであり、X_{53}はＭ、ＬまたはＶであり、X_{54}はＮ、Ｉ、Ｓ、ＨまたはＹである。

【０１２３】

またさらに別の態様では単離された抗体は、ＧＰ－７３に特異的に結合し、式：ＣＤＲ－Ｌ２、X_{55}－X_{56}－Ｓ－X_{57}－X_{58}－X_{59}－X_{60}（配列番号１１２）を有するＣＤＲ－Ｌ２を有し、ここで：X_{55}はＡ、Ｌ、Ｓ、ＱまたはＲであり、X_{56}はＡ、Ｖ、ＴまたはＭであり、X_{57}はＮ、Ｋ、ＹまたはＳであり、X_{58}はＬまたはＲであり、X_{59}はＥ、Ｄ、ＹまたはＡであり、X_{60}はＳまたはＩである。

【０１２４】

さらに別の態様では単離された抗体は、ＧＰ－７３に特異的に結合し、式：ＣＤＲ－Ｌ３、X_{61}－Ｑ－X_{62}－X_{63}－X_{64}－X_{65}－Ｐ－X_{62}－Ｔ（配列番号１１３）を有するＣＤＲ－Ｌ３を有し、ここで：X_{61}はＱ、Ｗ、ＨまたはＡであり、X_{62}はＳ、Ｇ、Ｈ、ＹまたはＮであり、X_{63}はＮ、Ｔ、Ｆ、ＨまたはＬであり、X_{64}はＥ、Ｈ

、Ｔ、ＲまたはＳであり、X_{65}はＤ、Ｆ、Ｔ、Ｓ、ＬまたはＩであり、X_{66}はＹまたはＬである。

【０１２５】

またさらに別の態様では単離された抗体は、ＧＰ－７３に特異的に結合し、式：X_5－X_6－X_7－X_8－X_9（配列番号１０８）を有するＣＤＲ－Ｈ１、式：X_{10}－Ｉ－X_{11}－X_{12}－X_{13}－X_{14}－X_{15}－$X_{16}X_{17}$－X_{18}－X_{19}－X_{20}－X_{21}－X_{22}－X_{23}－X_{24}－X_{25}－X_{26}－X_{27}（配列番号１０９）を有するＣＤＲ－Ｈ２、式：X_{28}－X_{29}－X_{30}－X_{31}－X_{32}－X_{33}－X_{34}－X_{35}－X_{36}－X_{37}－X_{38}－X_{39}－Ｙ（配列番号１１０）を有するＣＤＲ－Ｈ３、式：X_{40}－X_{41}－Ｓ－X_{42}－X_{43}－X_{44}－X_{45}－$X_{46}X_{47}$－X_{48}－X_{49}－X_{50}－X_{51}－X_{52}－X_{53}－X_{54}（配列番号１１１）を有するＣＤＲ－Ｌ１、式：X_{55}－X_{56}－Ｓ－X_{57}－X_{58}－X_{59}－X_{60}（配列番号１１２）を有するＣＤＲ－Ｌ２および式：X_{61}－Ｑ－X_{62}－X_{63}－X_{64}－X_{65}－Ｐ－X_{62}－Ｔ（配列番号１１３）を有するＣＤＲ－Ｌ３を有し、ここで：X_5はＳ、ＮまたはＴであり、X_6はＹまたはＮであり、X_7はＷ、Ｖ、Ｇ、ＡまたはＴであり、X_8はＩ、ＶまたはＭであり、X_9はＥ、Ｈ、ＳまたはＮであり、X_{10}はＥ、Ｙ、Ｖ、ＴまたはＲであり、X_{11}はＬ、Ｗ、ＳまたはＲであり、X_{12}はＰ、Ｓ、ＲまたはＴであり、X_{13}は存在しないまたはＫであり、X_{14}は存在しないまたはＲであり、X_{15}はＧ、ＴまたはＹであり、X_{16}はＳ、ＧまたはＮであり、X_{17}はＧ、Ｄ、Ｓ、ＴまたはＹであり、X_{18}はＮ、Ｓ、Ｙ、ＧまたはＴであり、X_{19}はＴまたはＩであり、X_{20}はＮ、Ｋ、ＹまたはＦであり、X_{21}はＹまたはＦであり、X_{22}はＮ、ＰまたはＡであり、X_{23}はＥ、ＳまたはＤであり、X_{24}はＫ、ＡまたはＳであり、X_{25}はＦ、ＬまたはＶであり、X_{26}はＫまたはＭであり、X_{27}はＧ、ＳまたはＤであり、X_{28}はＧ、Ｑ、Ｄ、ＥまたはＮであり、X_{29}はＲ、Ｑ、Ｐ、Ｙ、ＷまたはＧであり、X_{30}はＧ、Ｌ、Ｆ、ＤまたはＴであり、X_{31}はＳ、Ｔ、ＳまたはＧであり、X_{32}はＹ、Ｄ、Ｇ、ＥまたはＴであり、X_{33}はＲ、Ｙ、Ｄ、ＬまたはＦであり、X_{34}はＹ、Ｆ、ＴまたはＨであり、X_{35}はＨまたはＹであり、X_{36}はＷ、ＤまたはＹであり、X_{37}はＦ、ＹまたはＡであり、X_{38}は存在しないまたはＦまたはＭであり、X_{39}はＡまたはＤであり、X_{40}はＫ、Ｔ、ＲまたはＳであり、X_{41}はＡまたはＳであり、X_{42}はＱ、ＳまたはＫであり、X_{43}はＳまたはＧであり、X_{44}はＶまたはＬであり、X_{45}はＤまたはＬであり、X_{46}はＹ、ＤまたはＨであり、X_{47}は存在しないまたはＳであり、X_{48}はＤ、Ｖ、ＮまたはＩであり、X_{49}はＧ、ＶまたはＳであり、X_{50}はＤ、Ｋ、ＳまたはＩであり、X_{51}はＳ、Ｔ、ＩまたはＮであり、X_{52}はＹまたはＤであり、X_{53}はＭ、ＬまたはＶであり、X_{54}はＮ、Ｉ、Ｓ、ＨまたはＹであり、X_{55}はＡ、Ｌ、Ｓ、ＱまたはＲであり、X_{56}はＡ、Ｖ、ＴまたはＭであり、X_{57}はＮ、Ｋ、ＹまたはＳであり、X_{58}はＬまたはＲであり、X_{59}はＥ、Ｄ、ＹまたはＡであり、X_{60}はＳまたはＩであり、X_{61}はＱ、Ｗ、ＨまたはＡであり、X_{62}はＳ、Ｇ、Ｈ、ＹまたはＮであり、X_{63}はＮ、Ｔ、Ｆ、ＨまたはＬであり、X_{64}はＥ、Ｈ、Ｔ、ＲまたはＳであり、X_{65}はＤ、Ｆ、Ｔ、Ｓ、ＬまたはＩであり、X_{66}はＹまたはＬである。

【０１２６】

抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＹ分子クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２）またはサブクラスであってよい。

【０１２７】

（ｂ）ヌクレオチド配列

本明細書で提供するのは、ＧＰ７３、その断片またはその変異体に免疫特異的結合する抗体をコードしている単離された核酸である。単離された核酸は、表１に示す重鎖または軽鎖ＣＤＲ配列を含む抗体をコードする核酸分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んでよい。単離された核酸は、表２に示すヌクレオチド配列を含んでよい。

【０１２８】
【表２】

表2

ヌクレオチド	配列番号	配列
1B-3440 (VH)	49	gaggtgcagcttgttgagactggtggaggattggtgcagcctaaagggtcattgaaactctcatgt gcagcctctggattcaccttcaataccaatgccatgaactgggtccgccaggctccaggaaagggg tttggaatgggttgctcgcataaggactaaacgttataattatacaacattttatgccgattcagtgaaa gacaggttcaccatctccagagatgattctcaaagcatgctctttctgcaaatgaacaacttgaaaac tgaggacacagccatgtattactgtgtgacagggggggactgggacgtttgactactggggccaag gcaccactctcacagtctcctca
1B-3440 (VH) CDR-H1	50	accaatgccatgaac
1B-3440 (VH) CDR-H2	51	cgcataaggactaaacgttataattatacaacattttatgccgattcagtgaaagac
1B-3440 (VH) CDR-H3	52	ggggggactgggacgtttgactac
1B-3440 (VL)	53	gaaattgtactcacccagtctccaaccaccatgcctgcatctcccggggagaaggtcactttcacct gcagtgccagctcaggtataagttccaattacttgcattggtatcagctgaagccaggattctcccct aaactcttgatttataggacatccaatctggcttctggagtcccagctcgcttcagtggcggtgggtc tgggacctcttactctctcacaattggcaccatggaggctgaagatgttgccacttactattgccagc agggttttagtataccgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaacgg
1B-3440 (VL) CDR-L1	54	agtgccagctcaggtataagttccaattacttgcat
1B-3440 (VL) CDR-L2	55	aggacatccaatctggcttct
1B-3440 (VL) CDR-L3	56	cagcagggttttagtataccgctcacg
1B-4971 (VH)	57	caggtccagctgcagcagtctggacctgcgctggtaaagcctggggcttcagtgaagatgtcctg caaggcttctggatacacattcactaactatgttatacactgggtgaaacagaagcctgggcaggg ccttgagcggattggatatatttggccttacaatgatggtactaagttcaatgagaaattcaaaggca aggccacactgacttcagacaaatcctccagcacagcctacatggagctcagcagcctgacctct gaggactctgcagtctattactgttcaagtcaacagctcgcctactggggccaaggcaccactctc acagtctcctca
1B-4971 (VH) CDR-H1	58	aactatgttatacac
1B-4971 (VH) CDR-H2	59	tatatttggccttacaatgatggtactaagttcaatgagaaattcaaaggc

1B-4971 (VH) CDR-H3	60	caacagctcgcctac
1B-4971 (VL)	61	gatgttgtgatgacccagactccactcactttgtcggttaccattggacaaccagcctccatctcttgc aagtcaagtcagagcctcttatatagtgatggaaagacatatttgatttggttgttacagaggccagg ccagtctccaaagcgcctaatctatctggtgtctaaactggactctggagtccctgacaggttcactg gcagtggatcagggacagatttcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatttgggagtt tattattgttggcaaggtacacattttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaac gg
1B-4971 (VL) CDR-L1	62	aagtcaagtcagagcctcttatatagtgatggaaagacatatttgatt
1B-4971 (VL) CDR-L2	63	ctggtgtctaaactggactct
1B-4971 (VL) CDR-L3	64	tggcaaggtacacattttccgtacacg
1B-3246 (VH)	65	gacgtgaagctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctg tgcagcctctggattcactttcagtagctataccatgtcttgggttcgccagactccggagaagaga ctggagtgggtcgcaaccattagtcgtggtggtacttacatctactatccagacagtgtgaagggcc gattcaccatctccagagacaatgccaagaacaccctgtacctgcaaatgagcagtctgaagtctg aggacacagccatatattactgtacaagagaatatttctccggtgatacctacgactactttgactatt ggggccaaggcaccactctcacagtctcctca
1B-3246 (VH) CDR-H1	66	agctataccatgtct
1B-3246 (VH) CDR-H2	67	accattagtcgtggtggtacttacatctactatccagacagtgtgaagggc
1B-3246 (VH) CDR-H3	68	gaatatttctccggtgatacctacgactactttgactat
1B-3246 (VL)	69	gagattgtgatgacgcaggctgcattcgccaatccagtcactcttggaacatcagtttccatctcctg caggtctagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatttgtactggtatctgcagaagccag gccagtctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgcctcaggagtcccagacaggttcagt agcagtgggtcaggaactgatttcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtgggtat ttactactgtgctcaaaatctagaactttacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacg g
1B-3246 (VL) CDR-L1	70	aggtctagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatttgtac
1B-3246 (VL) CDR-L2	71	cagatgtccaaccttgcctca
1B-3246 (VL) CDR-L3	72	gctcaaaatctagaactttacacg

1B-4863 (VH)	73	caggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccatcacttg cactgtctctgggttttcattaaccagctatggtgtacactgggttcgccagtctccaggaaagggtc tggagtggctgggagtaatatggactggtggaagcacaaattataattcggctctcatgtccagact gagcattagtaaagacaactccgagagccaagttttcttaaaagtgaatagtctgcaaactgatgac acaggcatgtactactgtgccagagatcctgggacggactactttgactactggggccaaggcac cactctcacagtctcctca
1B-4863 (VH) CDR-H1	74	agctatggtgtacac
1B-4863 (VH) CDR-H2	75	gtaatatggactggtggaagcacaaattataattcggctctcatgtcc
1B-4863 (VH) CDR-H3	76	gatcctgggacggactactttgactac
1B-4863 (VL)	77	gacattgtgatgacccagtctcacaaattcatgtccacatcaataggagacagggtcagcatctcct gcaaggccagtcaggatgtgagtattgatgtgtcctggtatcaacagaaaccaggacagtctccta cacttctgatttactcggcatcctaccggtacattggagtccctgatcgcttcactggcagtggatctg ggacggctttcactttcaccatcagcagtgtccaggctgaagacctggcaatttattactgtcagcaa cattttactactcctctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaacgg
1B-4863 (VL) CDR-L1	78	aaggccagtcaggatgtgagtattgatgtgtcc
1B-4863 (VL) CDR-L2	79	tcggcatcctaccggtacatt
1B-4863 (VL) CDR-L3	80	cagcaacattttactactcctctcacg
1A-3187 (VH)	81	cagggtcagctgcagcagtctggagctgaactgatgaagcctggggcctcagtgaagatatcctg caaggctactggctacacaatcaggagctactggatagagtgggtaaagcagaggcctggacat ggccttgagtggattggagagattttacctggaagtggtaatactaattataatgagaagttcaaggg gacggccacattcactgcagatacatcctccaacacagtctatttgcacctcagcagcctgacatct gaggactctgccgtctattactgtgcaaacgggaggggctcctataggtaccactggtttgcttact ggggccaagggactctggtcactgtctctcca
1A-3187 (VH) CDR-H1	82	agctactggatagag
1A-3187 (VH) CDR-H2	83	gagattttacctggaagtggtaatactaattataatgagaagttcaagggg
1A-3187 (VH) CDR-H3	84	gggaggggctcctataggtaccactggtttgcttac
1A-3187 (VL)	85	gacattgtgctgacccaatctccagcttctttggctgtgtctctagggcagagggccaccatctcctg caaggccagccaaagtgttgattatgatggtgatagttatatgaactggtaccaacagaaaccagg acagccacccaaagtcctcatctatgctgcatccaatctagaatctgggatcccagccaggtttagt ggcagtgggtctgggacagacttcaccctcaacatccatcctgtggaggaggaggatgctgcaac ctattactgtcagcaaagtaatgaggatccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaatga aacgg
1A-3187 (VL) CDR-L1	86	aaggccagccaaagtgttgattatgatggtgatagttatatgaac

1A-3187 (VL) CDR-L2	87	gctgcatccaatctagaatct
1A-3187 (VL) CDR-L3	88	cagcaaagtaatgaggatccgtacacg
1A-4246 (VH)	89	gaagtgatgctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctg tgcagcctctggattcactttcagtagctatgccatgtcttgggttcgcctgactccggagaagaggg ctggagtgggtcgcaaccattagtagtggtagcagttacacctactatccagacagtgtgaaggggc gattcaccatctccagagacaatgtcaagagcaccctgtacctgcaaatgagcagtctgaggtct gaggacacggccatgtattactgtgcaaggaactgggacggggaactccattactatgctatgga ctactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca
1A-4246 (VH) CDR-H1	90	agctatgccatgtct
1A-4246 (VH) CDR-H2	91	accattagtagtggtagcagttacacctactatccagacagtgtgaaggggg
1A-4246 (VH) CDR-H3	92	aactgggacggggaactccattactatgctatggactac
1A-4246 (VL)	93	caaattgttctcacccagtctccagcaatcatgtctgcatctctaggggaacgggtcaccatgacct gcactgccagctcaagtgtaagttccagttacttgcactggtaccagcagaagccaggatcctccc ccaaactctgggtttatagcacatccagcctggcttctggagtcccagctcgcttcagtggcagtgg gtctgggacctcttactctctcacaatcaacaacatggaggctgaagatgctgccacttatttctgcc accagtatcatcgttccccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgg
1A-4246 (VL) CDR-L1	94	actgccagctcaagtgtaagttccagttacttgcac
1A-4246 (VL) CDR-L2	95	agcacatccagcctggcttct
1A-4246 (VL) CDR-L3	96	caccagtatcatcgttccccgtacacg

【０１２９】

ｃ．抗体調製／産生

抗体は、種々の技術のいずれかによって調製されてよい。一般に抗体は、抗体の産生を可能にするために従来の技術を介する、または抗体遺伝子、重鎖および／もしくは軽鎖の好適な細菌性もしくは哺乳動物細胞宿主へのトランスフェクションを介するモノクローナル抗体の生成を含む細胞培養技術によって産生されてよく、ここで抗体は組換えであってよい。用語「トランスフェクション」の種々の形態は、外来性ＤＮＡの原核または真核宿主細胞への導入のために慣用される多種多様な技術、例えば、電気穿孔法、リン酸カルシウム沈殿、ＤＥＡＥデキストラントランスフェクションなどを包含することが意図される。原核または真核宿主細胞のいずれでも本発明の抗体を発現できるが、真核細胞における抗体の発現は好ましく、そのような真核細胞（具体的には哺乳動物細胞）が適切にフォールディングされ、免疫学的に活性な抗体を構築および分泌するために原核細胞よりも好ましいことから、哺乳動物宿主細胞において最も好ましい。

【０１３０】

本発明の組換え抗体を発現するための例示的哺乳動物宿主細胞は、例えばＫａｕｆｍａｎ ａｎｄ Ｓｈａｒｐ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１５９：６０１－６２１（１９８２）に記載のＤＨＦＲ選択可能マーカーと共に使用されるチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ細胞）（Ｕｒｌａｕｂ ａｎｄ Ｃｈａｓｉｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７：４２１６－４２２０（１９８０）に記載のｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞を含む。）、ＮＳ０骨髄腫細胞、ＣＯＳ細胞およびＳＰ２細胞を含む。抗体遺伝子をコードしている組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞に導入される場合、抗体は宿主細胞における抗体の発現、またはより好ましくは宿主細胞が増殖されている培養培地への抗体の分

泌を可能にするために十分な期間宿主細胞を培養することによって産生される。抗体は、培養培地から標準的タンパク質精製方法を使用して回収されてよい。

【０１３１】

宿主細胞は、Ｆａｂ断片またはｓｃＦｖ分子などの機能性抗体断片を産生するためにも使用され得る。上の手順での変更が本発明の範囲内であることは理解される。例えば、本発明の抗体の軽鎖および／または重鎖のいずれかの機能性断片をコードしているＤＮＡで宿主細胞をトランスフェクトすることは望ましい場合がある。組換えＤＮＡ技術は、目的の抗原への結合のために必要ではない軽鎖および重鎖のいずれかまたは両方をコードしているＤＮＡのいくらかまたはすべてを除去するためにも使用され得る。そのような切断型ＤＮＡ分子から発現される分子も本発明の抗体によって包含される。付加的に二機能性抗体は、標準的化学的架橋法によって第２の抗体に本発明の抗体を架橋結合することによって、１本の重鎖および１本の軽鎖が本発明の抗体であり（すなわちヒトＧＰ７３に結合する。）、他の重鎖および軽鎖がヒトＧＰ７３以外の抗原特異的であるように産生されてよい。

【０１３２】

本発明の抗体またはその抗原結合部分の組換え発現のために好ましい系では、抗体重鎖および抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターがリン酸カルシウム媒介トランスフェクションによってｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞に導入される。組換え発現ベクター内で、抗体重鎖および軽鎖遺伝子は、遺伝子の高レベルの転写を駆動するためにそれぞれＣＭＶエンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター調節エレメントに作動可能に連結されている。組換え発現ベクターはメトトレキサート選択／増幅を使用してベクターでトランスフェクトされているＣＨＯ細胞の選択を可能にするＤＨＦＲ遺伝子も保持している。選択された形質転換宿主細胞は、抗体重鎖および軽鎖の発現を可能するように培養され、インタクトな抗体は培養培地から回収される。標準的分子生物学技術が組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、培養培地から抗体を回収するために使用される。さらに本発明は、本発明の組換え抗体が合成されるまで本発明の宿主細胞を好適な培養培地で培養することによって本発明の組換え抗体を合成する方法を提供する。方法は、培養培地から組換え抗体を単離することもさらに含んでよい。

【０１３３】

モノクローナル抗体を調製する方法は、所望の特異性を有する抗体を産生できる不死細胞株の調製も含む。そのような細胞株は、免疫化した動物から得られた脾臓細胞から産生されてよい。動物は、ＧＰ７３またはその断片および／もしくは変異体で免疫化されてよい。例えば、配列番号９７、配列番号９８、配列番号９９、配列番号１００、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３、配列番号１０４のいずれか、配列番号９７、配列番号９８、配列番号９９、配列番号１００、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３もしくは配列番号１０４の断片、または配列番号９７、配列番号９８、配列番号９９、配列番号１００、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３もしくは配列番号１０４の変異体は、動物を免疫化するために使用されてよい。動物を免疫化するために使用されるペプチドは、ヒトＦｃ、例えばヒト抗体の断片結晶化可能領域または尾部領域をコードするアミノ酸を含んでよい。次いで脾臓細胞は、例えば骨髄腫細胞融合パートとの融合によって不死化されてよい。種々の融合技術が用いられてよい。例えば脾臓細胞と骨髄腫細胞とは、非イオン性界面活性剤と数分間合わせられ、次いでハイブリッド細胞の増殖を支持するが、骨髄腫細胞はしない選択培地に低密度で蒔かれてよい。１つのそのような技術はヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン（ＨＡＴ）選択を使用する。別の技術は、電気融合を含む。十分な時間、通常約１から２週間後、ハイブリッドのコロニーが観察される、単一のコロニーは選択され、これらの培養上清がポリペプチドに対する結合活性について検査される。高い反応性および特異性を有するハイブリドーマは使用され得る。

【０１３４】

モノクローナル抗体は、増殖しているハイブリドーマコロニーの上清から単離され得る。付加的に種々の技術、マウスなどの好適な脊椎動物宿主の腹腔へのハイブリドーマ細胞株の注射などは、収率を増強するために用いられ得る。次いでモノクローナル抗体は、腹水または血液から採取され得る。混入物は、クロマトグラフィー、ゲルろ過、沈殿および抽出などの従来の技術によって抗体から除去され得る。親和性クロマトグラフィーは、抗体を精製するための工程において使用され得る方法の例である。

【０１３５】

タンパク質分解性酵素パパインは、ＩｇＧ分子を優先的に切断し、いくつかの断片を生じ、この２つ（Ｆ（ａｂ）断片）は、インタクトな抗原結合部位を含む共有結合性ヘテロ二量体をそれぞれ含む。酵素ペプシンは、両方の抗原結合部位を含むＦ（ａｂ’）２断片を含むいくつかの断片を提供するようにＩｇＧ分子を切断できる。

【０１３６】

Ｆｖ断片は、ＩｇＭの優先的およびまれにはＩｇＧまたはＩｇＡ免疫グロブリン分子のタンパク質分解性切断によって産生され得る。Ｆｖ断片は、組換え技術を使用して誘導され得る。Ｆｖ断片は、天然抗体分子の抗原認識および結合能力の大部分を保持している抗原結合部位を含む、非共有結合性ＶＨ：：ＶＬヘテロ二量体を含む。

【０１３７】

抗体、抗体断片または誘導体は、重鎖および軽鎖の相補性決定領域（「ＣＤＲ」）セットを含み、ＣＤＲへの支持を提供し、互いに関連するＣＤＲの空間関係を決める重鎖および軽鎖のフレームワーク（「ＦＲ」）セットの間にそれぞれ挿入されてよい。ＤＲセットは、重鎖または軽鎖Ｖ領域の３つの高頻度可変性領域を含んでよい。重鎖または軽鎖のＮ末端から進んで、３つの領域はそれぞれ「ＣＤＲ１」、「ＣＤＲ２」および「ＣＤＲ３」と表される。抗原結合部位は、したがって重鎖および軽鎖Ｖ領域のそれぞれからのＣＤＲセットを含む６個のＣＤＲを含んでよい。単一のＣＤＲ、（例えばＣＤＲ１、ＣＤＲ２またはＣＤＲ３）を含むポリペプチドは、「分子認識単位」と称される場合がある。抗原抗体複合体の結晶解析は、ＣＤＲのアミノ酸残基が結合された抗原と緊密な接触を形成し、最も緊密な抗原接触が重鎖ＣＤＲ３とであることを実証した。これにより分子認識単位は、抗原結合部位の特異性に主に関与している可能性がある。一般にＣＤＲ残基は、直接および最も実質的に抗原結合への影響に関与する。

【０１３８】

必要な特異性の抗体を産生または単離する他の好適な方法は、これだけに限らないが、ペプチドまたはタンパク質ライブラリー（例えば、これだけに限らないがバクテリオファージ、リボソーム、オリゴヌクレオチド、ＲＮＡ、ｃＤＮＡ、酵母など、ディスプレイライブラリー）、例えばＣａｍｂｒｉｄｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅｓｈｉｒｅ、ＵＫ）、ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ（Ｍａｒｔｉｎｓｒｅｉｄ／Ｐｌａｎｅｇｇ、Ｄｅｌ．）、Ｂｉｏｖａｔｉｏｎ（Ａｂｅｒｄｅｅｎ、Ｓｃｏｔｌａｎｄ、ＵＫ）、ＢｉｏＩｎｖｅｎｔ（Ｌｕｎｄ、Ｓｗｅｄｅｎ）などの種々の商業的供給業者から入手可能、から当技術分野において周知の方法を使用して、組換え抗体を選択する方法を含んで使用されてよい。米国特許第４，７０４，６９２号、第５，７２３，３２３号、第５，７６３，１９２号、第５，８１４，４７６号、第５，８１７，４８３号、第５，８２４，５１４号、第５，９７６，８６２号を参照されたい。代替的方法は、当技術分野において既知および／または本明細書に記載のとおりヒト抗体のレパートリーを産生できるトランスジェニック動物（例えば、ＳＣＩＤマウス、Ｎｇｕｙｅｎら（１９９７）Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４１：９０１－９０７、Ｓａｎｄｈｕら（１９９６）Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：９５－１１８、Ｅｒｅｎら（１９９８）Ｉｍｍｕｎｏｌ．９３：１５４－１６１）の免疫化に依存する。そのような技術は、これだけに限らないが、リボソームディスプレイ（Ｈａｎｅｓら（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９４：４９３７－４９４２、Ｈａｎｅｓら（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５：１４１３０－１４１３５）、単一細胞抗体産生技術（例えば、選択されたリンパ球抗体方法（「ＳＬＡＭ」

）（米国特許第５，６２７，０５２号、Ｗｅｎら（１９８７）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７：８８７－８９２、Ｂａｂｃｏｏｋら（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：７８４３－７８４８）、ゲル微小滴およびフローサイトメトリー（Ｐｏｗｅｌｌら（１９９０）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．８：３３３－３３７、ワンセルシステムズ（Ｏｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｍａｓｓ）．、Ｇｒａｙ　ら（１９９５）Ｊ．Ｉｍｍ．Ｍｅｔｈ．１８２：１５５－１６３、Ｋｅｎｎｙら（１９９５）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌ．１３：７８７－７９０）、Ｂ細胞選択（Ｓｔｅｅｎｂａｋｋｅｒｓら（１９９４）Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｏｒｔｓ　１９：１２５－１３４（１９９４））を含む。

【０１３９】

親和性成熟抗体は、当技術分野において既知の多数の手順のいずれか１つによって産生されてもよい。例えば、ＶＨおよびＶＬドメインのシャッフリングによる親和性成熟を記載しているＭａｒｋｓら，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：７７９－７８３（１９９２）を参照されたい。ＣＤＲおよび／またはフレームワーク残基の無作為変異導入は、Ｂａｒｂａｓら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９１：３８０９－３８１３（１９９４）、Ｓｃｈｉｅｒら，Ｇｅｎｅ，１６９：１４７－１５５（１９９５）、Ｙｅｌｔｏｎら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５５：１９９４－２００４（１９９５）、Ｊａｃｋｓｏｎら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５４（７）：３３１０－３３１９（１９９５）、Ｈａｗｋｉｎｓら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２６：８８９－８９６（１９９２）によって記載されている。選択的変異導入位置および活性増強アミノ酸残基を含む接触または高頻度変異位置での選択的変異は、米国特許第第６，９１４，１２８Ｂ１号に記載されている。

【０１４０】

本発明の抗体変異体は、本発明の抗体をコードしているポリヌクレオチドをトランスジェニック動物を提供するために好適な宿主、またはそのような抗体をこれらの乳中に産生するヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジなどの哺乳動物などに送達することを使用して調製され得る。これらの方法は、当技術分野において既知であり、例えば米国特許第５，８２７，６９０号、第５，８４９，９９２号、第４，８７３，３１６号、第５，８４９，９９２号、第５，９９４，６１６号、第５，５６５，３６２号および第５，３０４，４８９号に記載されている。

【０１４１】

抗体変異体は、そのような抗体、特定の部分もしくは変異体を植物の一部もしくはこれから培養される細胞中で産生するトランスジェニック植物ならびに培養植物細胞（例えば、これだけに限らないがタバコ、トウモロコシおよびウキクサ（ｄｕｃｋｗｅｅｄ））を提供するように本発明のポリヌクレオチドを送達することによっても調製され得る。例えば、Ｃｒａｍｅｒら（１９９９）Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４０：９５－１１８およびここに引用される参考文献は、例えば誘導可能なプロモーターを使用して多量の組換えタンパク質を発現しているトランスジェニックタバコ葉の産生を記載している。トランスジェニックトウモロコシは、他の組換え系において産生されたまたは天然供給源から精製されたものに匹敵する生物学的活性を有する哺乳動物タンパク質を商業的生産レベルで発現するために使用されている。例えばＨｏｏｄら，Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．（１９９９）４６４：１２７－１４７およびここに引用されている参考文献を参照されたい。抗体変異体は、タバコ種子およびジャガイモ塊茎を含むトランスジェニック植物種子から１本鎖抗体（ｓｃＦｖ’ｓ）などの抗体断片を含んで多量に産生されている。例えば、Ｃｏｎｒａｄら（１９９８）Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３８：１０１－１０９およびここに引用されている参考文献を参照されたい。これにより本発明の抗体は、既知の方法によりトランスジェニック植物を使用しても産生され得る。

【０１４２】

抗体誘導体は、例えば、免疫原性を修飾するまたは結合、親和性、オン速度、オフ速度

、アビディティー、特異性、半減期もしくは任意の他の好適な特徴を低減、増強もしくは修飾するために外来性配列を加えることによって産生されてよい。一般に非ヒトまたはヒトＣＤＲ配列の一部またはすべてが維持されている一方で、可変および定常領域の非ヒト配列はヒトまたは他のアミノ酸で置き換えられている。

【０１４３】

小さな抗体断片は、２つの抗原結合部位を有するダイアボディであってよく、断片は同じポリペプチド鎖（ＶＨＶＬ）中の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に連結した重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む。例えばＥＰ　４０４，０９７、ＷＯ　９３／１１１６１およびＨｏｌｌｉｎｇｅｒら，（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：６４４４－６４４８を参照されたい。同じ鎖上の２つのドメインの間を対合させるには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインは別の鎖の相補性ドメインと対合させられ、２つの抗原結合部位を形成する。参照によりその全体を本明細書に組み込む、親抗体の高頻度可変性領域に挿入された１つ以上のアミノ酸を有し、抗原に対して親抗体の結合親和性よりも少なくとも約２倍強い標的抗原に対する結合親和性を有する抗体変異体を開示しているＣｈｅｎらへの米国特許第６，６３２，９２６号も参照されたい。

【０１４４】

抗体は、直鎖抗体であってよい。直鎖抗体を作るための手順は、当技術分野において既知であり、Ｚａｐａｔａら（１９９５）Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．８（１０）：１０５７－１０６２に記載されている。簡潔にはこれらの抗体は、１組の抗原結合領域を形成する１組のタンデムＦｄセグメント（ＶＨ－ＣＨ１－ＶＨ－ＣＨ１）を含む。直鎖抗体は、二特異的または単一特異的であってよい。

【０１４５】

抗体は、これだけに限らないが、プロテインＡ精製、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性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およびレクチンクロマトグラフィーを含む既知の方法によって組換え細胞培養物から回収および精製され得る。高速液体クロマトグラフィー（「ＨＰＬＣ」）も精製のために使用され得る。

【０１４６】

検出可能な様にまたは治療用に抗体を標識することは有用である場合がある。これらの薬剤に抗体をコンジュゲートするための方法は、当技術分野において既知である。例示の目的のためだけに抗体は、放射性原子、クロモフォア、フルオロフォアなどの検出可能成分で標識され得る。そのような標識抗体は、インビボまたは単離された試験試料のいずれにおける診断技術のために使用され得る。抗体は、例えば化学療法剤または毒素などの医薬品にコンジュゲートされてもよい。これらは、サイトカイン、リガンド、別の抗体に連結されてよい。抗腫瘍効果を達成するために抗体にカップリングするための好適な薬剤は、インターロイキン２（ＩＬ－２）および腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）などのサイトカイン；アルミニウム（ＩＩＩ）フタロシアニンテトラスルホネート、ヘマトポルフィリンおよびフタロシアニンを含む光線力学的治療における使用のための光増感剤；ヨウ素１３１（１３１Ｉ）、イットリウム９０（９０Ｙ）、ビスマス－２１２（２１２Ｂｉ）、ビスマス２１３（２１３Ｂｉ）、テクネチウム９９ｍ（９９ｍＴｃ）、レニウム１８６（１８６Ｒｅ）およびレニウム１８８（１８８Ｒｅ）などの放射性核種；ドキソルビシン、アドリアマイシン、ダウノルビシン、メトトレキサート、ダウノマイシン、ネオカルチノスタチンおよびカルボプラチンなどの抗生物質；ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素Ａ、ブドウ球菌エンテロトキシンＡ、アブリン－Ａ毒素、リシンＡ（脱グリコシル化リシンＡおよび天然リシンＡ）、ＴＧＦ－アルファ毒素、チャイニーズコブラ（ｃｈｉｎｅｓｅ　ｃｏｂｒａ（ナジャナジャアトラ（ｎａｊａ　ｎａｊａ　ａｔｒａ））由来細胞毒およびゲロニン（植物毒素）などの細菌性、植物および他の毒素；リストリクトシン（アルペルギルス・レストリクタス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｒｅｓｔｒｉｃｔｕｓ）によって産生されるリボソーム不活性化タンパク質）、サポリン（サポナリア・オフィキナリス（Ｓａｐ

ｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ）由来リボソーム不活性化タンパク質）およびＲＮａｓｅなどの植物、細菌および真菌由来リボソーム不活性化タンパク質；チロシンキナーゼ阻害剤；ｌｙ２０７７０２（二フッ素化プリンヌクレオシド）；抗嚢胞薬剤（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、毒素、メトトレキサートなどをコードしているプラスミド）含有リポソーム；ならびに他の抗体またはＦ（ａｂ）などの抗体断片を含む。

【０１４７】

抗体は、配列決定されてよく、組換えまたは合成手段によって複製されてよい。これらは、これらをコードするヌクレオチドの直鎖状配列にさらに下に配列決定されてもよい。したがって本発明は、本発明の抗体の配列をコードするこれらのポリヌクレオチドを、単独でまたは上に記載のとおり担体、ベクターもしくは宿主細胞との組合せで提供する。

【０１４８】

ハイブリドーマ技術、選択リンパ球抗体法（ｓｅｌｅｃｔｅｄ　ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）（ＳＬＡＭ）、トランスジェニック動物および組換え抗体ライブラリーの使用を介する抗体産生物は、下により詳細に記載されている。

【０１４９】

（１）ハイブリドーマ技術を使用する抗ＧＰ７３モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換えおよびファージディスプレイ技術、またはこれらの組合せの使用を含む当技術分野において既知の多種多様な技術を使用して調製され得る。例えばモノクローナル抗体は、当技術分野において既知のものおよび例えばＨａｒｌｏｗら，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，第２版（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，１９８８）、Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇ，ら，Ｉｎ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ，（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８１）において教示のものを含むハイブリドーマ技術を使用して産生され得る。本明細書において使用される用語「モノクローナル抗体」がハイブリドーマ技術を通じて産生される抗体に限定されないことも言及される。用語「モノクローナル抗体」は、これが産生される方法によってではなく、任意の真核、原核またはファージクローンを含む単一クローンに由来する抗体を指す。

【０１５０】

一実施形態では本発明は、モノクローナル抗体を生成する方法および方法によって産生される抗体を提供する。方法は、本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養することを含んでよく、好ましくはハイブリドーマは、ＧＰ７３で免疫化した動物、例えばラットまたはマウスから単離された脾細胞を、骨髄腫細胞と融合すること、および次いで融合から生じたハイブリドーマを、本発明のポリペプチドに結合できる抗体を分泌するハイブリドーマクローンについてスクリーニングすることによって生成される。簡潔にはラットは、ＧＰ７３抗原で免疫化されてよい。好ましい実施形態ではＧＰ７３抗原は、免疫応答を刺激するためのアジュバントと共に投与される。そのようなアジュバントは、完全または不完全フロイントのアジュバント、ＲＩＢＩ（ムラミルジペプチド）またはＩＳＣＯＭ（免疫刺激複合体）を含む。そのようなアジュバントは、局所デポジットに隔離することによって急速な分散からポリペプチドを保護できるか、またはこれらは、マクロファージおよび免疫系の他の構成成分について走化性である因子を分泌するように宿主を刺激する物質を含有する場合がある。好ましくはポリペプチドが投与される場合、免疫化スケジュールは、数週間にわたるポリペプチドの２回以上の投与を含むが、ポリペプチドの単回の投与も使用されてよい。

【０１５１】

ＧＰ７３抗原での動物の免疫化後、抗体および／または抗体産生細胞は動物から得られ得る。抗ＧＰ７３抗体含有血清は、採血するまたは動物を屠殺することによって動物から得られる。血清は動物から得られたままで使用されてよく、免疫グロブリン画分は血清から得られ、抗ＧＰ７３抗体は血清から精製され得る。この手段において得られた血清または免疫グロブリンはポリクローナルであり、したがって特性の不均一なアレイを有する。

【０１５２】
免疫応答が検出されると、例えば抗原ＧＰ７３に特異的な抗体がラット血清において検出され、ラット脾臓は採取され、脾細胞は単離される。次いで脾細胞は周知の技術によって任意の好適な骨髄腫細胞、例えばＡｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ、Ｍａｎａｓｓａｓ、Ｖａ．、ＵＳ）から入手可能である細胞株ＳＰ２０由来の細胞に融合される。ハイブリドーマは、限界希釈によって選択およびクローン化される。次いでハイブリドーマクローンは、ＧＰ７３に結合できる抗体を分泌する細胞について当技術分野において既知の方法によってアッセイされる。一般に高レベルの抗体を含有する腹水は、陽性ハイブリドーマクローンでラットを免疫化することによって生成され得る。

【０１５３】
別の実施形態では抗体産生不死化ハイブリドーマは、免疫化した動物から調製されてよい。免疫化後、動物は屠殺され、脾臓Ｂ細胞は、当技術分野において周知のとおり不死化骨髄腫細胞に融合される。例えば上記Ｈａｒｌｏｗ　ａｎｄ　Ｌａｎｅを参照されたい。好ましい実施形態では骨髄腫細胞は、免疫グロブリンポリペプチドを分泌しない（非分泌性細胞株）。融合および抗菌薬選択後、ハイブリドーマはＧＰ７３もしくはこの一部またはＧＰ７３を発現している細胞を使用してスクリーニングされる。好ましい実施形態では最初のスクリーニングは、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）または放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、好ましくはＥＬＩＳＡを使用して実施される。ＥＬＩＳＡスクリーニングの例は、ＰＣＴ公開第ＷＯ　００／３７５０４号に提供されている。

【０１５４】
抗ＧＰ７３抗体産生ハイブリドーマは、選択、クローン化およびさらに、強力なハイブリドーマ増殖、高抗体産生および所望の抗体特徴を含む所望の特徴についてスクリーニングされる。ハイブリドーマは、同系の動物、免疫系が欠損している動物において、例えばヌードマウスにおいてインビボで、またはインビトロ細胞培養で培養および増殖されてよい。ハイブリドーマを選択、クローニングおよび増殖させる方法は、当業者に周知である。

【０１５５】
好ましい実施形態ではハイブリドーマは、ラットハイブリドーマである。別の実施形態ではハイブリドーマは、マウス、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはウマなどの非ヒト、非ラット種において産生される。さらに別の実施形態ではハイブリドーマは、ヒト非分泌性骨髄腫が抗ＧＰ７３抗体を発現しているヒト細胞に融合されているヒトハイブリドーマである。

【０１５６】
特異的エピトープを認識する抗体断片は、既知の技術によって生成され得る。例えば本発明のＦａｂおよびＦ（ａｂ’）２断片は、パパイン（２個の同一のＦａｂ断片を産生する。）またはペプシン（Ｆ（ａｂ’）$_2$断片を産生する。）などの酵素を使用する免疫グロブリン分子のタンパク質分解性切断によって産生されてよい。ＩｇＧ分子のＦ（ａｂ’）２断片は、両方の軽鎖（可変軽鎖および定常軽鎖領域を含有している。）、重鎖のＣＨ１ドメインならびに親ＩｇＧ分子のジスルフィド形成ヒンジ領域を含む、より大きな（「親」）ＩｇＧ分子の２つの抗原結合部位を保持している。したがってＦ（ａｂ’）２断片は、親ＩｇＧ分子と同様にまだ抗原分子を架橋結合できる。

【０１５７】
（２）ＳＬＡＭを使用する抗ＧＰ７３モノクローナル抗体
本発明の別の態様では組換え抗体は、米国特許第５，６２７，０５２号、ＰＣＴ公開第ＷＯ　９２／０２５５１号およびＢａｂｃｏｏｋら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９３：７８４３－７８４８（１９９６）に記載の当技術分野において選択リンパ球抗体方法（ＳＬＡＭ）と称される手順を使用して単一の、単離されたリンパ球から生成される。この方法では目的の抗体を分泌する単一の細胞、例えば、免疫化した動物のいずれか１種に由来するリンパ球は、抗原特異的溶血プラークアッセイを使用してスク

リーニングされ、抗原ＧＰ７３、ＧＰ７３のサブユニットまたはこれらの断片が、ビオチンなどのリンカーを使用してヒツジ赤血球細胞にカップルされ、ＧＰ７３に対する特異性を有する抗体を分泌する単一の細胞を同定するために使用される。目的の抗体分泌細胞の同定に続いて、重鎖および軽鎖可変領域ｃＤＮＡは、逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）によって細胞からレスキューされ、これらの可変領域は、好適な免疫グロブリン定常領域（例えばヒト定常領域）の場面で、ＣＯＳまたはＣＨＯ細胞などの哺乳動物宿主細胞で発現され得る。インビボ選択されたリンパ球由来の増幅された免疫グロブリン配列でトランスフェクトされた宿主細胞は、次いで例えば、ＧＰ７３に対する抗体を発現している細胞を単離するためにトランスフェクトされた細胞をパニングすることによって、さらなる分析および選択をインビトロで受けてよい。増幅された免疫グロブリン配列は、インビトロ親和性成熟化法によってなどインビトロでさらに操作されてよい。例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９７／２９１３１号およびＰＣＴ公開第ＷＯ　００／５６７７２号を参照されたい。

【０１５８】

（３）トランスジェニック動物を使用する抗ＧＰ７３モノクローナル抗体

本発明の別の実施形態では抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座のいくらかまたはすべてを含む非ヒト動物をＧＰ７３抗原で免疫化することによって産生される。一実施形態では非ヒト動物は、ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（登録商標）トランスジェニックマウス、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の大きな断片を含み、マウス抗体産生が欠損している操作されたマウス株である。例えばＧｒｅｅｎら，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，７：１３－２１（１９９４）ならびに米国特許第５，９１６，７７１号、第５，９３９，５９８号、第５，９８５，６１５号、第５，９９８，２０９号、第６，０７５，１８１号、第６，０９１，００１号、第６，１１４，５９８号および第６，１３０，３６４号を参照されたい。ＰＣＴ公開第ＷＯ　９１／１０７４１号、第ＷＯ　９４／０２６０２号、第ＷＯ　９６／３４０９６号、第ＷＯ　９６／３３７３５号、第ＷＯ　９８／１６６５４号、第ＷＯ　９８／２４８９３号、第ＷＯ　９８／５０４３３号、第ＷＯ　９９／４５０３１号、第ＷＯ　９９／５３０４９号、第ＷＯ　００／０９５６０号および第ＷＯ　００／３７５０４号も参照されたい。ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（登録商標）トランスジェニックマウスは、完全なヒト抗体の成体様（ａｄｕｌｔ－ｌｉｋｅ）ヒトレパートリーを産生し、抗原特異的ヒトモノクローナル抗体を生成する。ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（登録商標）トランスジェニックマウスは、ヒト重鎖遺伝子座およびｘ軽鎖遺伝子座の生殖系列配置ＹＡＣ断片のメガベースの大きさでの導入を通じてヒト抗体レパートリーのおよそ８０％を含有する。Ｍｅｎｄｅｚら，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１５：１４６－１５６（１９９７），Ｇｒｅｅｎ　ａｎｄ　Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１８８：４８３－４９５（１９９８）を参照されたい、この開示を参照により本明細書に組み込む。

【０１５９】

（４）組換え抗体ライブラリーを使用する抗ＧＰ７３モノクローナル抗体

インビトロ方法も本発明の抗体を作るために使用されてよく、抗体ライブラリーは所望のＧＰ７３結合特異性を有する抗体を同定するためにスクリーニングされる。組換え抗体ライブラリーのそのようなスクリーニングのための方法は、当技術分野において周知であり、例えば米国特許第５，２２３，４０９号（Ｌａｄｎｅｒら）、ＰＣＴ公開第ＷＯ　９２／１８６１９号（Ｋａｎｇら）、ＰＣＴ公開第ＷＯ　９１／１７２７１号（Ｄｏｗｅｒら）、ＰＣＴ公開第ＷＯ　９２／２０７９１号（Ｗｉｎｔｅｒら）、ＰＣＴ公開第ＷＯ　９２／１５６７９号（Ｍａｒｋｌａｎｄら）、ＰＣＴ公開第ＷＯ　９３／０１２８８号（Ｂｒｅｉｔｌｉｎｇら）、ＰＣＴ公開第ＷＯ　９２／０１０４７号（ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ）、ＰＣＴ公開第ＷＯ　９２／０９６９０号（Ｇａｒｒａｒｄら）、Ｆｕｃｈｓら，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，９：１３６９－１３７２（１９９１）、Ｈａｙら，Ｈｕｍ．Ａｎｔｉｂｏｄ．Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ，３：８１－８５（１９９２）、Ｈｕｓｅら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４６：１２７５－１２８１（１９８９）、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら，Ｎａｔｕｒｅ，３４８：５５２－５５４（１９９０）、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓら，ＥＭＢＯ　Ｊ．，１２：７２５－７３４（１９９３）、Ｈａｗｋｉｎｓら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ

．，２２６：８８９－８９６（１９９２）、Ｃｌａｃｋｓｏｎら，Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）、Ｇｒａｍら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：３５７６－３５８０（１９９２）、Ｇａｒｒａｒｄら，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，９：１３７３－１３７７（１９９１）、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１９：４１３３－４１３７（１９９１）、Ｂａｒｂａｓら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：７９７８－７９８２（１９９１）、米国特許出願公開第２００３／０１８６３７４号およびＰＣＴ公開第ＷＯ ９７／２９１３１号に記載の方法を含み、それぞれの内容を参照により本明細書に組み込む。

【０１６０】

組換え抗体ライブラリーは、ＧＰ７３またはＧＰ７３の一部で免疫化した対象由来であってよい。代替的に組換え抗体ライブラリーは、無処置対象、すなわちヒトＧＰ７３で免疫化されていないヒト対象由来のヒト抗体ライブラリーなどのＧＰ７３で免疫化されていない対象由来であってよい。本発明の抗体は、組換え抗体ライブラリーをヒトＧＰ７３を含むペプチドでスクリーニングすること、これによりＧＰ７３を認識する抗体を選択することによって選択される。そのようなスクリーニングおよび選択を実行するための方法は、前述の段落における参考文献に記載されたなど当技術分野において周知である。特定のK_{off}速度定数でヒトＧＰ７３から解離するものなどの、ＧＰ７３に対する特定の結合親和性を有する本発明の抗体を選択するために、表面プラズモン共鳴の当技術分野において既知の方法は、所望のK_{off}速度定数を有する抗体を選択するために使用され得る。特定のIC_{50}を有するものなどのｈＧＰ７３に対する特定の中和活性を有する本発明の抗体を選択するために、ＧＰ７３活性の阻害を評価するための当技術分野において周知の標準的方法が使用され得る。

【０１６１】

一態様では本発明は、ヒトＧＰ７３に結合する単離された抗体またはこの抗原結合部分に関与する。好ましくは抗体は、中和抗体である。種々の実施形態では抗体は、組換え抗体またはモノクローナル抗体である。

【０１６２】

例えば本発明の抗体は、当技術分野において既知の種々のファージディスプレイ方法を使用しても生成され得る。ファージディスプレイ方法では、機能性抗体ドメインは、これらをコードしているポリヌクレオチド配列を保有しているファージ粒子の表面上に提示されている。そのようなファージは、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えばヒトまたはネズミ（ｍｕｒｉｎｅ））から発現される抗原結合ドメインを提示するために利用され得る。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現しているファージは、例えば標識抗原または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を使用して抗原で選択または同定され得る。これらの方法において使用されるファージは、ファージ遺伝子ＩＩＩまたは遺伝子ＶＩＩＩタンパク質のいずれかに組換え的に融合されたＦａｂ、Ｆｖまたはジスルフィド安定化Ｆｖ抗体ドメインを有するファージから発現されるｆｄおよびＭ１３結合ドメインを含む、典型的には糸状ファージである。本発明の抗体を作るために使用され得るファージディスプレイ方法の例は、Ｂｒｉｎｋｍａｎｎら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１８２：４１－５０（１９９５）、Ａｍｅｓら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１８４：１７７－１８６（１９９５）、Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈら，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２４：９５２－９５８（１９９４）、Ｐｅｒｓｉｃら，Ｇｅｎｅ，１８７：９－１８（１９９７）、Ｂｕｒｔｏｎら，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，５７：１９１－２８０（１９９４）、ＰＣＴ公開第ＷＯ ９２／０１０４７号、ＰＣＴ公開第ＷＯ ９０／０２８０９号、第ＷＯ ９１／１０７３７号、第ＷＯ ９２／０１０４７号、第ＷＯ ９２／１８６１９号、第ＷＯ ９３／１１２３６号、第ＷＯ ９５／１５９８２号、第ＷＯ ９５／２０４０１号ならびに米国特許第５，６９８，４２６号、第５，２２３，４０９号、第５，４０３，４８４号、第５，５８０，７１７号、第５，４２７，９０８号、第５，７５０，７５３号、第５，８２１，０４７号、第５，５７１，６９８号、第５，４２７，９０８号、第５，５１

６，６３７号、第５，７８０，２２５号、第５，６５８，７２７号、第５，７３３，７４３号および第５，９６９，１０８号に開示のものを含む。

【０１６３】

上の参考文献に記載のとおりファージ選択後、ファージ由来の抗体コード領域は、例えば下に詳細に記載のとおり、単離されることができ、ヒト抗体または任意の他の所望の抗原結合性断片を含む全抗体を生成するために使用されることができ、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含む任意の所望の宿主において発現され得る。例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）$_2$断片を組換え的に産生するための技術は、ＰＣＴ公開第ＷＯ　９２／２２３２４号、Ｍｕｌｌｉｎａｘら，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，１２（６）：８６４－８６９（１９９２）、Ｓａｗａｉら，Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｐｒｏｄ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，３４：２６－３４（１９９５）およびＢｅｔｔｅｒら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４０：１０４１－１０４３（１９８８）において開示のものなどの当技術分野において既知の方法を使用して用いられ得る。１本鎖Ｆｖおよび抗体を産生するために使用され得る技術の例は、米国特許第４，９４６，７７８号および第５，２５８，４９８号、Ｈｕｓｔｏｎら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２０３：４６－８８（１９９１）、Ｓｈｕら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：７９９５－７９９９（１９９３）およびＳｋｅｒｒａら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４０：１０３８－１０４１（１９８８）に記載のものを含む。

【０１６４】

ファージディスプレイによる組換え抗体ライブラリーのスクリーニングへの代替として、大きなコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングするための当技術分野において既知の他の方法は、本発明の抗体の同定のために適用され得る。代替的発現系の１つの種類は、ＰＣＴ公開第ＷＯ　９８／３１７００号（Ｓｚｏｓｔａｋ　ａｎｄ　Ｒｏｂｅｒｔｓ）およびＲｏｂｅｒｔｓ　ａｎｄ　Ｓｚｏｓｔａｋ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９４：１２２９７－１２３０２（１９９７）に記載のとおり、組換え抗体ライブラリーがＲＮＡタンパク質融合物として発現されるものである。この系では共有結合融合物は、ピューロマイシン、ペプチジル受容体抗菌薬をその３’末端に保有している合成ｍＲＮＡのインビトロ翻訳によってコードしているペプチドまたはタンパク質とｍＲＮＡとの間で作られる。したがって特異的ｍＲＮＡは、ｍＲＮＡ（例えば、コンビナトリアルライブラリー）の複合体混合物から、コードされたペプチドまたはタンパク質、例えば抗体またはこの一部の二重特異的抗原への結合などの抗体またはこの一部の特性に基づいて濃縮されてよい。抗体またはこの一部をコードしており、そのようなライブラリーのスクリーニングから回収された核酸配列は、上に記載のとおり（例えば哺乳動物宿主細胞において）組換え手段によって発現されてよく、さらに、変異が元々選択された配列（複数可）に導入されているｍＲＮＡ－ペプチド融合物のスクリーニングの追加ラウンドのいずれかによって、または上に記載の組換え抗体のインビトロ親和性成熟化のための他の方法によって、さらなる親和性成熟化に供されてよい。この方法の好ましい例は、ＰＲＯ融合ディスプレイ技術である。

【０１６５】

別のアプローチでは本発明の抗体は、当技術分野において既知の酵母ディスプレイ方法を使用して生成されてもよい。酵母ディスプレイ方法では遺伝的方法が、抗体ドメインを酵母細胞壁にテザーし、これらを酵母の表面に提示するために使用される。具体的にはそのような酵母は、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えばヒトまたはネズミ）から発現される抗原結合ドメインを提示するために利用され得る。本発明の抗体を作るために使用され得る酵母ディスプレイ方法の例は参照により本明細書に組み込む米国特許第６，６９９，６５８号（Ｗｉｔｔｒｕｐら）に開示のものを含む。

【０１６６】

ｄ．組換えＧＰ７３抗体の産生

本発明の抗体は、当技術分野において既知の多数の技術のいずれかによって産生されてよい。例えば、重鎖および軽鎖をコードしている発現ベクター（複数可）が標準的技術に

よってトランスフェクトされている宿主細胞からの発現。用語「トランスフェクション」の種々の形態は、外来性ＤＮＡの原核または真核宿主細胞への導入のために慣用される多種多様な技術、例えば、電気穿孔法、リン酸カルシウム沈殿、ＤＥＡＥデキストラントランスフェクションなどを包含することが意図される。原核または真核宿主細胞のいずれでも本発明の抗体を発現することが可能であるが、真核細胞における抗体の発現は好ましく、そのような真核細胞（具体的には哺乳動物細胞）が正しくフォールディングされ、免疫学的に活性な抗体を構築および分泌するために原核細胞よりも好ましいことから、哺乳動物宿主細胞においてが最も好ましい。

【０１６７】

本発明の組換え抗体を発現するための例示的哺乳動物宿主細胞は、例えばＫａｕｆｍａｎ ａｎｄ Ｓｈａｒｐ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１５９：６０１－６２１（１９８２）に記載のＤＨＦＲ選択可能マーカーと共に使用される、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ細胞）（Ｕｒｌａｕｂ ａｎｄ Ｃｈａｓｉｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７：４２１６－４２２０（１９８０）に記載のｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞を含む。）、ＮＳ０骨髄腫細胞、ＣＯＳ細胞およびＳＰ２細胞を含む。抗体遺伝子をコードしている組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞に導入される場合、抗体は宿主細胞における抗体の発現、またはより好ましくは宿主細胞が増殖されている培養培地への抗体の分泌を可能にするために十分な期間宿主細胞を培養することによって産生される。抗体は、培養培地から標準的タンパク質精製方法を使用して回収され得る。

【０１６８】

宿主細胞は、Ｆａｂ断片またはｓｃＦｖ分子などの機能性抗体断片を産生するためにも使用され得る。上の手順での変更が本発明の範囲内であることは理解される。例えば、本発明の抗体の軽鎖および／または重鎖のいずれかの機能性断片をコードしているＤＮＡで宿主細胞をトランスフェクトすることは望ましい場合がある。組換えＤＮＡ技術は、目的の抗原への結合のために必要ではない軽鎖および重鎖のいずれかまたは両方をコードしているＤＮＡのいくらかまたはすべてを除去するためにも使用されてもよい。そのような切断型ＤＮＡ分子から発現される分子も本発明の抗体によって包含される。付加的に、標準的化学的架橋法によって第２の抗体に本発明の抗体を架橋結合することによって、１本の重鎖および１本の軽鎖が本発明の抗体であり（すなわちヒトＧＰ７３に結合する。）、他の重鎖および軽鎖がヒトＧＰ７３以外の抗原特異的である二機能性抗体は、産生されてよい。

【０１６９】

本発明の抗体またはこの抗原結合部分の組換え発現のために好ましい系では、抗体重鎖および抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターがリン酸カルシウム媒介トランスフェクションによってｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞に導入される。組換え発現ベクター内で、抗体重鎖および軽鎖遺伝子は、遺伝子の高レベルの転写を駆動するためにＣＭＶエンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター調節エレメントにそれぞれ作動可能に連結される。組換え発現ベクターはメトトレキサート選択／増幅を使用してベクターでトランスフェクトされているＣＨＯ細胞の選択を可能にするＤＨＦＲ遺伝子も保持している。選択された形質転換宿主細胞は、抗体重鎖および軽鎖の発現を可能するように培養され、インタクトな抗体は培養培地から回収される。標準的分子生物学技術が組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、培養培地から抗体を回収するために使用される。さらに本発明は、本発明の組換え抗体が合成されるまで本発明の宿主細胞を好適な培養培地で培養することによって本発明の組換え抗体を合成する方法を提供する。方法は、培養培地から組換え抗体を単離することもさらに含んでよい。

【０１７０】

（１）ヒト化抗体

ヒト化抗体は、目的の抗原に免疫特異的に結合し、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク（ＦＲ）領域および非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む抗体またはこれらの変異体、誘導体、類似物もしくは部分

であってよい。ヒト化抗体は、所望の抗原に結合し、非ヒト種由来の１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する非ヒト種抗体由来であってよい。

【０１７１】

本明細書において使用される用語「実質的に」は、ＣＤＲとの関連で、非ヒト抗体ＣＤＲのアミノ酸配列に少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を有するＣＤＲを指す。ヒト化抗体は、すべてまたは実質的にすべてのＣＤＲ領域が非ヒト免疫グロブリン（すなわちドナー抗体）のものに対応し、すべてまたは実質的にすべてのフレームワーク領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメイン（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦａｂＣ、Ｆｖ）の実質的にすべてを含む。一態様によりヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）、典型的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部も含む。いくつかの実施形態ではヒト化抗体は、軽鎖および重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有する。抗体は、重鎖のＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３およびＣＨ４領域も含む場合がある。いくつかの実施形態ではヒト化抗体は、ヒト化軽鎖だけを含有する。いくつかの実施形態ではヒト化抗体は、ヒト化重鎖だけを含有する。具体的な実施形態ではヒト化抗体は、軽鎖のおよび／または重鎖のヒト化可変ドメインだけを含有する。

【０１７２】

ヒト化抗体は、ＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＥを含む任意のクラスの免疫グロブリンならびに非限定的にＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４を含む任意のアイソタイプから選択され得る。ヒト化抗体は、１つより多いクラスまたはアイソタイプ由来の配列を含んでよく、具体的な定常ドメインは、当技術分野において周知の技術を使用して所望のエフェクター機能を最適化するために選択されてよい。

【０１７３】

ヒト化抗体のフレームワークおよびＣＤＲ領域は、親配列に正確に対応する必要はなく、例えばドナー抗体ＣＤＲまたはコンセンサスフレームワークは、その部位のＣＤＲまたはフレームワーク残基がドナー抗体またはコンセンサスフレームワークのいずれにも対応いしないように少なくとも１つのアミノ酸残基の置換、挿入および／または欠失によって変異誘発されてよい。しかし一実施形態ではそのような変異は、広範ではない。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％または少なくとも９９％は親ＦＲおよびＣＤＲ配列のものに対応する。本明細書において使用される用語「コンセンサスフレームワーク」は、コンセンサス免疫グロブリン配列中のフレームワーク領域を指す。本明細書において使用される用語「コンセンサス免疫グロブリン配列」は、関連する免疫グロブリン配列のファミリーにおいて最も頻繁に生じるアミノ酸（またはヌクレオチド）から形成される配列を指す（例えば、Ｗｉｎｎａｋｅｒ，Ｆｒｏｍ Ｇｅｎｅｓ ｔｏ Ｃｌｏｎｅｓ（Ｖｅｒｌａｇｓｇｅｓｅｌｌｓｃｈａｆｔ，Ｗｅｉｎｈｅｉｍ，Ｇｅｒｍａｎｙ １９８７）を参照されたい。）。免疫グロブリンのファミリーでは、コンセンサス配列中の各位置は、ファミリーにおいてその位置に最も頻繁に生じるアミノ酸によって占められている。２種のアミノ酸が等しい頻度で生じる場合、どちらがコンセンサス配列に含まれてもよい。

【０１７４】

ヒト化抗体は、ヒトレシピエントにおけるこれらの成分の持続期間および治療用適用の有効性を限定するげっ歯類抗ヒト抗体に対する望まれない免疫学的応答を最少化するように設計されてよい。ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からこれに導入された１個以上のアミノ酸残基を有する場合がある。これらの非ヒト残基は、しばしば「移入」残基と称され、典型的には可変ドメインから取り入れられる。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列について高頻度可変性領域配列を置換することによって実施されてよい。したがってそのような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少なく非ヒト種由来の対応する配列によって置換されているキメラ抗体である。例えば米国特許第４，８１６

，５６７号を参照されたい、この内容を本明細書に参照により組み込む。ヒト化抗体は、いくつかの高頻度可変性領域残基、潜在的にはいくつかのＦＲ残基が、げっ歯類抗体中の類似部位由来の残基によって置換されているヒト抗体であってよい。本発明の抗体のヒト化または操作は、これだけに限らないが米国特許第５，７２３，３２３号、第５，９７６，８６２号、第５，８２４，５１４号、第５，８１７，４８３号、第５，８１４，４７６号、第５，７６３，１９２号、第５，７２３，３２３号、第５，７６６，８８６号、第５，７１４，３５２号、第６，２０４，０２３号、第６，１８０，３７０号、第５，６９３，７６２号、第５，５３０，１０１号、第５，５８５，０８９号、第５，２２５，５３９号および第４，８１６，５６７号に記載のものなどの任意の既知の方法を使用して実施されてよい。

【０１７５】

ヒト化抗体はＧＰ７３に対する高い親和性および他の好ましい生物学的特性を保持できる。ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用して親配列および種々の概念的ヒト化産生物の分析工程によって調製され得る。三次元免疫グロブリンモデルは、一般に入手可能である。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元コンホメーション構造を例示および表示するコンピュータープログラムは、利用可能である。これらの表示の調査は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の期待される役割の分析、すなわちその抗原に結合する候補免疫グロブリンの能力に影響する残基の分析を可能にする。このようにＦＲ残基は、ＧＰ７３に対する親和性の増加などの所望の抗体の特徴が達成されるようにレシピエントから選択および組み合わされ、配列を移入することができる。一般に高頻度可変性領域残基は、抗原結合に直接および最も実質的に影響を与える場合がある。

【０１７６】

ヒト化の代替としてヒト抗体（本明細書において「完全なヒト抗体」とも称される。）は生成されてよい。例えば、ライブラリーからＰＲＯｆｕｓｉｏｎおよび／または酵母関連技術を介してヒト抗体を単離することは可能である。トランスジェニック動物を産生することも可能である（例えば免疫化で、内在性免疫グロブリン産生物の不存在下でヒト抗体の完全なレパートリーを産生できるマウス。例えばキメラおよび生殖系列変異体マウスにおける抗体重鎖連結領域（J_H）遺伝子のホモ接合性欠失は、内在性抗体産生の完全な阻害を生じる。そのような生殖系列変異体マウスでのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移行は、抗原チャレンジでのヒト抗体の産生を生じる。ヒト化または完全なヒト抗体は、それぞれの内容を本明細書に参照により組み込む米国特許第５，７７０，４２９号、第５，８３３，９８５号、第５，８３７，２４３号、第５，９２２，８４５号、第６，０１７，５１７号、第６，０９６，３１１号、第６，１１１，１６６号、第６，２７０，７６５号、第６，３０３，７５５号、第６，３６５，１１６号、第６，４１０，６９０号、第６，６８２，９２８号および第６，９８４，７２０号に記載の方法により調製され得る。

【０１７７】

ｅ．抗ＧＰ７３抗体

抗ＧＰ７３抗体は、上に記載の技術を使用して生成されてよい。抗ＧＰ７３抗体は、１Ｂ－３４４０モノクローナル抗体、１Ｂ－４９７１モノクローナル抗体、１Ｂ－３２４６モノクローナル抗体、１Ｂ－４８６３モノクローナル抗体、１Ａ－３１８７モノクローナル抗体、１Ａ－４２４６モノクローナル抗体またはこれらの抗体断片であってよい。

【０１７８】

（１）１Ｂ－３４４０

本明細書において使用される「１Ｂ－３４４０」または「ｍＡｂ　１Ｂ－３４４０」は、組換えＧＰ７３で免疫化されたＲＢＦ／ＤｎＪマウス株を使用して作られたハイブリドーマ細胞株によって産生されたモノクローナル抗体を指す。マウスの脾臓細胞は、マウス骨髄腫細胞株ＮＳ／０骨髄腫細胞と融合された。

【０１７９】

１Ｂ－３４４０は１Ｂ－４９７１、１Ｂ－３２４６、１Ｂ－４８６３、１Ａ－３１８７および１Ａ－４２４６が結合するエピトープとは異なるＧＰ７３上のエピトープに結合する。１Ｂ－３４４０は、配列番号６７のエピトープペプチドを認識する。１Ｂ－３４４０は、ＧＰ７３に対して９．１ｘ１０$^{-11}$Ｍの結合親和性（K_D）を有する。１Ｂ－３４４０は、配列番号４９のヌクレオチド配列によってコードされている配列番号１の重鎖アミノ酸配列および、配列番号５３のヌクレオチド配列によってコードされている配列番号５の軽鎖アミノ酸配列を有する。１Ｂ－３４４０は、配列番号５０－５２および５４－５６のヌクレオチド配列によってそれぞれコードされているＣＤＲ－Ｈ１（配列番号２）、ＣＤＲ－Ｈ２（配列番号３）およびＣＤＲ－Ｈ３（配列番号４）ならびにＣＤＲ－Ｌ１（配列番号６）、ＣＤＲ－Ｌ２（配列番号７）およびＣＤＲ－Ｌ３（配列番号８）を含む。

【０１８０】

（２）１Ｂ－４９７１

本明細書において使用される「１Ｂ－４９７１」または「ｍＡｂ　１Ｂ－４９７１」は、組換えＧＰ７３で免疫化したＲＢＦ／ＤｎＪマウス株を使用することによって作られたハイブリドーマ細胞株によって産生されたモノクローナル抗体を指す。マウスの脾臓細胞は、マウス骨髄腫細胞株ＮＳ／０骨髄腫細胞と融合された。

【０１８１】

１Ｂ－４９７１は１Ｂ－３４４０、１Ｂ－３２４６、１Ｂ－４８６３、１Ａ－３１８７および１Ａ－４２４６が結合するエピトープとは異なるＧＰ７３上のエピトープに結合する。１Ｂ－４９７１は、配列番号６５のエピトープペプチドを認識する。１Ｂ－４９７１は、ＧＰ７３に対して２．０ｘ１０$^{-12}$Ｍの結合親和性（K_D）を有する。１Ｂ－４９７１は、配列番号５７のヌクレオチド配列によってコードされている配列番号９の重鎖アミノ酸配列および配列番号６１のヌクレオチド配列によってコードされている配列番号１３の軽鎖アミノ酸配列を有する。１Ｂ－３４４０は、配列番号５８－６０および６２－６４のヌクレオチド配列によってそれぞれコードされているＣＤＲ－Ｈ１（配列番号１０）、ＣＤＲ－Ｈ２（配列番号１１）およびＣＤＲ－Ｈ３（配列番号１２）ならびにＣＤＲ－Ｌ１（配列番号１４）、ＣＤＲ－Ｌ２（配列番号１５）およびＣＤＲ－Ｌ３（配列番号１６）を含む。

【０１８２】

（３）１Ｂ－３２４６

本明細書において使用される「１Ｂ－３２４６」または「ｍＡｂ　１Ｂ－３２４６」は、組換えＧＰ７３で免疫化したＲＢＦ／ＤｎＪマウス株を使用して作られたハイブリドーマ細胞株によって産生されたモノクローナル抗体を指す。マウスの脾臓細胞は、マウス骨髄腫細胞株ＮＳ／０骨髄腫細胞と融合された。

【０１８３】

１Ｂ－３２４６は１Ｂ－３４４０、１Ｂ－４９７１、１Ｂ－４８６３、１Ａ－３１８７および１Ａ－４２４６が結合するエピトープとは異なるＧＰ７３上のエピトープに結合する。１Ｂ－３２４６は、配列番号６６のエピトープペプチドを認識する。１Ｂ－３２４６は、ＧＰ７３に対して７．９ｘ１０$^{-11}$Ｍの結合親和性（K_D）を有する。１Ｂ－３２４６は、配列番号６５のヌクレオチド配列によってコードされている配列番号１７の重鎖アミノ酸配列および、配列番号６９のヌクレオチド配列によってコードされている配列番号２１の軽鎖アミノ酸配列を有する。１Ｂ－３２４６は、配列番号６６－６８および７０－７２のヌクレオチド配列によってそれぞれコードされているＣＤＲ－Ｈ１（配列番号１８）、ＣＤＲ－Ｈ２（配列番号１９）およびＣＤＲ－Ｈ３（配列番号２０）ならびにＣＤＲ－Ｌ１（配列番号２２）、ＣＤＲ－Ｌ２（配列番号２３）およびＣＤＲ－Ｌ３（配列番号２４）を含む。

【０１８４】

（４）１Ｂ－４８６３

本明細書において使用される「１Ｂ－４８６３」または「ｍＡｂ　１Ｂ－４８６３」は、組換えＧＰ７３で免疫化されたＲＢＦ／ＤｎＪマウス株を使用して作られたハイブリド

ーマ細胞株によって産生されたモノクローナル抗体を指す。マウスの脾臓細胞は、マウス骨髄腫細胞株ＮＳ／０骨髄腫細胞と融合された。

【０１８５】

１Ｂ－４８６３は１Ｂ－３４４０、１Ｂ－４９７１、１Ｂ－３２４６、１Ａ－３１８７および１Ａ－４２４６が結合するエピトープとは異なるＧＰ７３上のエピトープに結合する。１Ｂ－４８６３は、ＧＰ７３に対して１．２ｘ１０$^{-10}$Ｍの結合親和性（K_D）を有する。１Ｂ－４８６３は、配列番号７３のヌクレオチド配列によってコードされている配列番号２５の重鎖アミノ酸配列および、配列番号７７のヌクレオチド配列によってコードされている配列番号２９の軽鎖アミノ酸配列を有する。１Ｂ－４８６３は、配列番号７４－７６および７８－８０のヌクレオチド配列によってそれぞれコードされているＣＤＲ－Ｈ１（配列番号２６）、ＣＤＲ－Ｈ２（配列番号２７）およびＣＤＲ－Ｈ３（配列番号２８）ならびにＣＤＲ－Ｌ１（配列番号３０）、ＣＤＲ－Ｌ２（配列番号３１）およびＣＤＲ－Ｌ３（配列番号３２）を含む。

【０１８６】

（５）１Ａ－３１８７

本明細書において使用される「１Ａ－３１８７」または「ｍＡｂ　１Ａ－３１８７」は、組換えＧＰ７３で免疫化したＣＡＦ１／Ｊマウス株を使用して作られたハイブリドーマ細胞株によって産生されたモノクローナル抗体を指す。マウスの脾臓細胞は、マウス骨髄腫細胞株ＮＳ／０骨髄腫細胞と融合された。

【０１８７】

１Ａ－３１８７は１Ｂ－３４４０、１Ｂ－４９７１、１Ｂ－３２４６、１Ｂ－４８６３および１Ａ－４２４６が結合するエピトープとは異なるＧＰ７３上のエピトープに結合する。１Ａ－３１８７は、配列番号６８のエピトープペプチドを認識する。１Ａ－３１８７は、ＧＰ７３に対して２．０ｘ１０$^{-9}$Ｍの結合親和性（K_D）を有する。１Ａ－３１８７は、配列番号８１のヌクレオチド配列によってコードされている配列番号３３の重鎖アミノ酸配列および配列番号８５のヌクレオチド配列によってコードされている配列番号３７の軽鎖アミノ酸配列を有する。１Ａ－３１８７は、配列番号８２－８４および８６－８８のヌクレオチド配列によってそれぞれコードされているＣＤＲ－Ｈ１（配列番号３４）、ＣＤＲ－Ｈ２（配列番号３５）およびＣＤＲ－Ｈ３（配列番号３６）ならびにＣＤＲ－Ｌ１（配列番号３８）、ＣＤＲ－Ｌ２（配列番号３９）およびＣＤＲ－Ｌ３（配列番号４０）を含む。

【０１８８】

（６）１Ａ－４２４６

本明細書において使用される「１Ａ－４２４６」または「ｍＡＢ　１Ａ－４２４６」は、組換えＧＰ７３で免疫化されたＣＡＦ１／Ｊマウス株を使用して作られたハイブリドーマ細胞株によって産生されたモノクローナル抗体を指す。マウスの脾臓細胞は、マウス骨髄腫細胞株ＮＳ／０骨髄腫細胞と融合された。

【０１８９】

１Ａ－４２４６は１Ｂ－３４４０、１Ｂ－４９７１、１Ｂ－３２４６、１Ｂ－４８６３および１Ａ－３１８７が結合するエピトープとは異なるＧＰ７３上のエピトープに結合する。１Ａ－４２４６は、配列番号６７のエピトープペプチドを認識する。１Ａ－４２４６は、ＧＰ７３に対して３．８ｘ１０$^{-9}$Ｍの結合親和性（K_D）を有する。１Ａ－４２４６は、配列番号８９のヌクレオチド配列によってコードされている配列番号４１の重鎖アミノ酸配列および、配列番号９３のヌクレオチド配列によってコードされている配列番号４５の軽鎖アミノ酸配列を有する。１Ａ－４２４６は、配列番号９０－９２および９４－９６のヌクレオチド配列によってそれぞれコードされているＣＤＲ－Ｈ１（配列番号４２）、ＣＤＲ－Ｈ２（配列番号４３）およびＣＤＲ－Ｈ３（配列番号４４）ならびにＣＤＲ－Ｌ１（配列番号４６）、ＣＤＲ－Ｌ２（配列番号４７）およびＣＤＲ－Ｌ３（配列番号４８）を含む。

【０１９０】

３．医薬組成物

抗体は、医薬組成物中の構成成分であってよい。医薬組成物は、医薬として許容される担体も含んでよい。本発明の抗体を含む医薬組成物は、これだけに限らないが障害を診断、検出またはモニタリングすること、障害またはこの症状１つ以上を予防、処置、管理または改善することおよび／または研究における使用のためである。具体的な実施形態では組成物は、１つ以上の本発明の抗体を含む。別の実施形態では医薬組成物は、１つ以上の本発明の抗体、および標的化ＧＰ７３の活性が有害である障害を処置するため本発明の抗体以外の１つ以上の予防剤または治療剤を含む。さらなる実施形態では予防剤または治療剤は、障害、または１つ以上のこの症状の予防、処置、管理または改善のために有用であることが知られている、または使用されてきたもしくは現在使用されている。これらの実施形態により組成物は、担体、希釈剤または賦形剤をさらに含んでよい。

【０１９１】

本発明の抗体は、対象への投与のために好適な医薬組成物中に組み入れられてよい。典型的には医薬組成物は、本発明の抗体および医薬として許容される担体を含む。本明細書において使用される「医薬として許容される担体」は、生理学的に適合性のありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌性および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。医薬として許容される担体の例は、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノールなどの１つ以上およびこれらの組合せを含む。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば糖、マンニトールなどのポリアルコール、ソルビトールまたは塩化ナトリウムを含むことは好ましい。医薬として許容される担体は、湿潤剤もしくは乳化剤、保存剤または緩衝液などの抗体の保存期間もしくは有効性を増強する少量の補助物質をさらに含んでよい。

【０１９２】

種々の送達系が既知であり、本発明の１つ以上の抗体または本発明の１つ以上の抗体の組合せおよび、障害またはこの１つ以上の症状を予防、管理、処置または改善するために有用な予防剤または治療剤を投与するために使用され得る、例えばリポソームへの封入、微粒子、マイクロカプセル、抗体または抗体断片を発現できる組換え細胞、受容体媒介エンドサイトーシス（例えばＷｕ　ａｎｄ　Ｗｕ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２（１９８７）を参照されたい。）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築など。本発明の予防剤または治療剤の投与方法は、これだけに限らないが、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外投与、腫瘍内投与ならびに粘膜投与（例えば鼻腔内および経口経路）を含む。付加的に、経肺投与は、例えば吸入具またはネブライザーおよびエアロゾル化剤を含む製剤の使用によって用いられ得る。例えば、それぞれその全体を参照により本明細書に組み込む米国特許第６，０１９，９６８号、第５，９８５，３２０号、第５，９８５，３０９号、第５，９３４，２７２号、第５，８７４，０６４号、第５，８５５，９１３号、第５，２９０，５４０号および第４，８８０，０７８号ならびにＰＣＴ公開第ＷＯ　９２／１９２４４号、第ＷＯ９７／３２５７２号、第ＷＯ９７／４４０１３号、第ＷＯ９８／３１３４６号および第ＷＯ９９／６６９０３号を参照されたい。一実施形態では本発明の抗体または本発明の組成物は、Ａｌｋｅｒｍｅｓ　ＡＩＲ（登録商標）経肺薬剤送達技術（Ａｌｋｅｒｍｅｓ、Ｉｎｃ．、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｍａｓｓ．）を使用して投与される。具体的な実施形態では本発明の予防剤または治療剤は、筋肉内、静脈内、腫瘍内、経口、鼻腔内、経肺または皮下に投与される。予防剤または治療剤は、任意の簡便な経路で投与されてよい、例えば注入またはボーラス注射によって、上皮または粘膜皮膚内膜（ｌｉｎｉｎｇｓ）（例えば、経口粘膜、直腸および腸粘膜など）を通じる吸収によって、ならびに他の生物学的に活性薬剤と一緒に投与されてよい。投与は、全身性または局所的であってよい。

【０１９３】

具体的な実施形態では、本発明の抗体を処置が必要な領域に局所的に投与することが望ましい場合がある、これは例えば限定の目的ではなく、局所注入によって、注射によってまたはインプラントの手段によって達成されてよく、前記インプラントはシラスティック

膜、ポリマー、線維性マトリクス（例えばＴｉｓｓｕｅｌ（登録商標））またはコラーゲンマトリクスなどの膜およびマトリクスを含む、多孔性または非多孔性材料である。一実施形態では本発明の１つ以上の抗体の有効量は、障害またはこの症状を予防、処置、管理および／または改善するために罹患した領域に局所的に対象に投与される。

【０１９４】

別の実施形態では抗体は、制御された放出または徐放系で送達されてよい。一実施形態ではポンプは、制御された放出または徐放を達成するために使用され得る（Ｌａｎｇｅｒ上記、Ｓｅｆｔｏｎ，１９８７，ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１４：２０、Ｂｕｃｈｗａｌｄら，１９８０，Ｓｕｒｇｅｒｙ ８８：５０７、Ｓａｕｄｅｋら，１９８９，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２１：５７４を参照されたい。）。別の実施形態ではポリマー性材料は、本発明の治療薬の制御された放出または徐放を達成するために使用され得る（例えばＭｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，Ｌａｎｇｅｒ ａｎｄ Ｗｉｓｅ（ｅｄｓ．），ＣＲＣ Ｐｒｅｓ．，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌａ．（１９７４）、Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｂｉｏａｖａｉｌａｂｉｌｉｔｙ，Ｄｒｕｇ Ｐｒｏｄｕｃｔ Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ，Ｓｍｏｌｅｎ ａｎｄ Ｂａｌｌ（ｅｄｓ．），Ｗｉｌｅｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８４）、Ｒａｎｇｅｒ ａｎｄ Ｐｅｐｐａｓ，１９８３，Ｊ．，Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｓｃｉ．Ｒｅｖ．Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．２３：６１を参照されたい、Ｌｅｖｙら，１９８５，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２８：１９０、Ｄｕｒｉｎｇら，１９８９，Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．２５：３５１、Ｈｏｗａｒｄら，１９８９，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．７１：１０５）、米国特許第５，６７９，３７７号、米国特許第５，９１６，５９７号、米国特許第５，９１２，０１５号、米国特許第５，９８９，４６３号、米国特許第５，１２８，３２６号、ＰＣＴ公開第ＷＯ９９／１５１５４号およびＰＣＴ公開第ＷＯ９９／２０２５３号も参照されたい。。徐放製剤において使用されるポリマーの例は、これだけに限らないが、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（エチレン－コ－ビニルアセテート）、ポリ（メタクリル酸）、ポリグリコリド（ＰＬＧ）、ポリ酸無水物、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリアクリルアミド、ポリ（エチレングリコール）、ポリラクチド（ＰＬＡ）、ポリ（ラクチド－コ－グリコリド）（ＰＬＧＡ）およびポリオルトエステルを含む。具体的な実施形態では徐放製剤において使用されるポリマーは、不活性、侵出可能（ｌｅａｃｈａｂｌｅ）な不純物を含まず、保存で安定、滅菌および生分解性である。さらに別の実施形態では制御された放出または徐放系は、予防または治療標的の近位に置かれることができ、それにより全身用用量の一部だけを必要とする（例えばＧｏｏｄｓｏｎ，ｉｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，ｓｕｐｒａ，ｖｏｌ．２，ｐｐ．１１５－１３８（１９８４）を参照されたい。）。

【０１９５】

制御された放出系は、Ｌａｎｇｅｒ（１９９０，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３）による総説において考察されている。当業者に既知の任意の技術は本発明の１つ以上の抗体を含む徐放製剤を産生するために使用され得る。例えば米国特許第４，５２６、９３８号、ＰＣＴ公開第ＷＯ９１／０５５４８号、ＰＣＴ公開第ＷＯ９６／２０６９８号、Ｎｉｎｇら，１９９６，“Ｉｎｔｒａｔｕｍｏｒａｌ Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｈｙ ｏｆ ａ Ｈｕｍａｎ Ｃｏｌｏｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｘｅｎｏｇｒａｆｔ Ｕｓｉｎｇ ａ Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ－Ｒｅｌｅａｓｅ Ｇｅｌ，”Ｒａｄｉｏｔｈｅｒａｐｙ ＆Ｏｎｃｏｌｏｇｙ ３９：１７９－１８９、Ｓｏｎｇら，１９９５，“Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｌｕｎｇ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｏｆ Ｌｏｎｇ－Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ Ｅｍｕｌｓｉｏｎｓ，”ＰＤＡ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ ＆ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ５０：３７２－３９７、Ｃｌｅｅｋら，１９９７，“Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ Ｐｏｌｙｍｅｒｉｃ Ｃａｒｒｉｅｒｓ ｆｏｒ ａ ｂＦＧＦ Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｆｏｒ Ｃａｒｄ

iovascular Application,”Pro. Int’l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24：853－854、and Lamら，1997，“Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery,”Proc. Int’l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24：759－760を参照されたい、それぞれその全体を参照により本明細書に組み込む。

【0196】

具体的な実施形態では本発明の組成物が抗体をコードしている核酸である場合に核酸は、適切な核酸発現ベクターの一部として構築され、細胞内になるように投与されることによって、例えばレトロウイルスベクターの使用によって（米国特許第4，980，286号を参照されたい。）または直接注射によって、または微粒子銃（microparticle bombardment）（例えば遺伝子銃、Biolistic、Dupont）または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクション剤でのコーティングの使用によって、または核に進入することが既知であるホメオボックス様ペプチドに連結して投与されることによって（例えばJoliotら，1991，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88：1864－1868を参照されたい。）、それがコードしている抗体の発現を促進するためにインビボで投与されてよい。代替的に核酸は、細胞内に導入され、相同組換えによる発現のために宿主細胞ＤＮＡ内に組み込まれてよい。

【0197】

本発明の医薬組成物は、投与の目的の経路に適合性であるように製剤される。投与の経路の例は、これだけに限らないが、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口、鼻腔内（例えば、吸入）、経皮的（例えば、局所）、経粘膜および直腸投与を含む。具体的な実施形態では組成物は、ヒトへの静脈内、皮下、筋肉内、経口、鼻腔内または局所投与に適合された医薬組成物として、日常的手順により製剤される。典型的には静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液の溶液である。必要な場合は組成物は、可溶化剤および、注射部位の疼痛を軽減するためにリグノカインなどの局所麻酔も含んでよい。

【0198】

本発明の組成物が局所的に投与される場合、組成物は、軟膏、クリーム、経皮的パッチ、ローション、ゲル、シャンプー、スプレー、エアロゾル、溶液、乳液の形態または当業者に周知の他の形態に製剤されてよい。例えば、Remington’s Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms，19版，Mack Pub. Co.，Easton，Pa.（1995）を参照されたい。噴霧不可能な局所投与形態について、局所適用に適合性の担体または1つ以上の賦形剤を含み、水よりも大きな動的粘度を有する粘稠性から半流動性または固形が典型的には用いられる。好適な製剤は、非限定的に、溶液、懸濁剤、乳濁剤、クリーム、軟膏、粉剤、リニメント、膏薬（salve）などを含み、所望により滅菌されるまたは例えば浸透圧などの種々の特性に影響を与えるために補助剤（例えば保存剤、安定化剤、湿潤剤、緩衝液または塩）と混合される。他の好適な局所投与形態は、噴霧可能なエアロゾル調製物を含み、活性成分は、例えば固形または液体の不活性担体との組合せで、加圧された揮発性物質との混合物で（例えば、フレオンなどのガス状噴霧剤）またはスクイーズボトルに充填される。保湿剤（moisturizer）または保水剤（humectant）も、所望により医薬組成物および投与形態に加えられてよい。そのような追加的成分の例は、当技術分野において周知である。

【0199】

本発明の方法が組成物の鼻腔内投与を含む場合、組成物は、エアロゾル形態、スプレー、ミストまたは滴下剤の形態に製剤化されてよい。具体的には本発明による使用のための予防剤または治療剤は、好適な噴霧剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロ

フルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の好適なガス）の使用で、加圧されたパックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレープレゼンテーション（ｐｒｅｓｅｎｔａｔｉｏｎ）の形態で簡便に送達されてよい。加圧されたエアロゾルの場合に投与単位は、測定された量を送達するためにバルブを準備することによって決定され得る。吸入具または注入器における使用のためのカプセルおよびカートリッジ（例えばゼラチンからなる。）は、化合物と乳糖またはデンプンなどの好適な原料粉末との粉末混合物を含有して製剤化されてよい。

【０２００】

本発明の方法が経口投与を含む場合に組成物は、錠剤、カプセル、カシェー（ｃａｃｈｅｔ）、ゲルキャップ、溶液、懸濁剤などの形態に経口用に製剤化されてよい。錠剤またはカプセルは、結合剤（例えば、プレゼラチン化（ｐｒｅｇｅｌａｔｉｎｉｓｅｄ）トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンもしくはヒロドキシプロピルメチルセルロース）；注入剤（例えば、乳糖、結晶セルロースもしくはリン酸水素カルシウム）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクもしくはシリカ）；崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプンもしくデンプングリコール酸ナトリウム）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）などの医薬として許容される賦形剤を含んで従来の手段によって調製されてよい。錠剤は、当技術分野において周知の方法によってコートされてよい。経口投与のための液体調製物は、これだけに限らないが、溶液、シロップもしくは懸濁剤の形態であってよく、またはそれらは使用前に水もしくは他の好適なビヒクルでの構成のための乾燥産生物として提示されてよい。そのような液体調製物は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または硬化食用脂肪（ｈｙｄｒｏｇｅｎａｔｅｄ ｅｄｉｂｌｅ ｆａｔ））；乳化剤（例えば、レシチンまたはアラビアゴム）；非水性ビヒクル（例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコールまたは分画植物油（ｆｒａｃｔｉｏｎａｔｅｄ ｖｅｇｅｔａｂｌｅ ｏｉｌ））；および保存剤（例えば、メチルもしくはプロピル－ｐ－ヒドロキシ安息香酸またはソルビン酸）などの医薬として許容される添加剤を含んで従来の手段によって調製されてよい。調製物は、緩衝塩、香味剤、着色料および甘味剤も適切に含有してよい。経口投与のための調製物は、予防剤もしくは治療剤（複数可）の持続放出、制御された放出または徐放のために好適に製剤化されてよい。

【０２０１】

本発明の方法は、エアロゾル化剤と共に製剤された組成物の、例えば吸入具またはネブライザーの使用による、経肺投与を含んでよい。例えば米国特許第６，０１９、９６８号、第５，９８５、３２０号、第５、９８５，３０９号、第５，９３４，２７２号、第５，８７４，０６４号、第５，８５５，９１３号、第５，２９０，５４０号および第４，８８０，０７８号ならびにＰＣＴ公開第ＷＯ ９２／１９２４４号、第ＷＯ ９７／３２５７２号、第ＷＯ ９７／４４０１３号、第ＷＯ ９８／３１３４６号ならびにＷＯ ９９／６６９０３を参照されたい、それぞれはこれら全体を参照により本明細書に組み込む。具体的な実施形態では本発明の抗体および／または本発明の組成物は、Ａｌｋｅｒｍｅｓ ＡＩＲ（登録商標）経肺薬剤送達技術（Ａｌｋｅｒｍｅｓ、Ｉｎｃ．、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｍａｓｓ．）を使用して投与される。

【０２０２】

本発明の方法は、注射による（例えば、ボーラス注射または持続注入による）非経口投与のために製剤化された組成物の投与を含んでよい。注射のための製剤は、加えられた保存剤を含む単位投与形態（例えば、アンプルでまたは複数用量容器中）で提示されてもよい。組成物は、懸濁剤、溶液または油性もしくは水性ビヒクル中の乳濁剤などの形態をとり、懸濁化、安定化および／または分散剤などの製剤用（ｆｏｒｍｕｌａｔｏｒｙ）薬剤を含有してよい。代替的に活性成分は、使用前に好適なビヒクル（例えば、滅菌された発熱物質不含有水）での構成のための粉末形態であってもよい。本発明の方法は、デポー調製物として製剤化された組成物の投与を追加的に含んでよい。そのような長期作用型の製剤は、インプランテーション（例えば、皮下にまたは筋肉内に）によって、または筋肉内

注射によって投与されてよい。それにより例えば組成物は、好適なポリマー性もしくは疎水性材料（例えば、許容可能な油中の乳濁剤として）またはイオン交換レジン、または難溶性誘導体（例えば、難溶性塩として）を含んで製剤されてよい。

【０２０３】

本発明の方法は、中性または塩形態として製剤された組成物の投与を包含する。医薬として許容される塩は、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸など由来のものなどのアニオンと形成されたものおよび、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、２－エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなど由来のものなどのカチオンと形成されたものを含む。

【０２０４】

一般に組成物の成分は、単位投与形態中で別々にまたは一緒に混合されてのいずれかで、例えば活性剤の量を表示したアンプルまたはサシェ（ｓａｃｈｅｔｔｅ）などの密封容器中に凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として供給される。投与の様式が注入である場合、組成物は滅菌医薬品グレード水または生理食塩水を含有する注入瓶に分注されてよい。投与の様式が注射による場合、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルは、成分が投与の前に混合され得るように提供されてよい。

【０２０５】

具体的には本発明は、本発明の１つ以上の抗体または医薬組成物が抗体の量を表示したアンプルまたはサシェなどの密封容器中に充填されているものも提供する。一実施形態では、本発明の１つ以上の抗体または医薬組成物は、乾燥滅菌凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として密封容器中に供給され、対象への投与のために適切な濃度に再構成（例えば、水または生理食塩水で）されてよい。一実施形態では本発明の１つ以上の抗体または医薬組成物は、乾燥滅菌凍結乾燥粉末として密封容器中に少なくとも５ｍｇ、例えば少なくとも１０ｍｇ、少なくとも１５ｍｇ、少なくとも２５ｍｇ、少なくとも３５ｍｇ、少なくとも４５ｍｇ、少なくとも５０ｍｇ、少なくとも７５ｍｇまたは少なくとも１００ｍｇの単位投与量で供給される。本発明の凍結乾燥された抗体または医薬組成物は、２℃から８℃の間でその元の容器中で保存されなければならず、本発明の抗体または医薬組成物は、再構成されてから１週間以内、例えば５日以内、７２時間以内、４８時間以内、２４時間以内、１２時間以内、６時間以内、５時間以内、３時間以内または１時間以内に投与されなければならない。代替的実施形態では、本発明の１つ以上の抗体または医薬組成物は、抗体の量および濃度を表示した密封容器中で液体形態で供給される。さらなる実施形態では投与される組成物の液体形態は、密封容器中で少なくとも０．２５ｍｇ／ｍｌ、例えば少なくとも０．５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１ｍｇ／ｍｌ、少なくとも２．５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも８ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１０ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも２５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも５０ｍｇ／ｍｌ、少なくとも７５ｍｇ／ｍｌまたは少なくとも１００ｍｇ／ｍｌで供給される。液体形態は、２℃から８℃の間でその元の容器中で保存されなければならない。

【０２０６】

本発明の抗体は、非経口投与のために好適な医薬組成物中に組み込まれてよい。一態様では抗体は、抗体０．１－２５０ｍｇ／ｍｌを含有する注射可能な溶液として調製される。注射可能な溶液は、フリントまたはアンバーバイアル、アンプルまたは予め充填されたシリンジ中の液体または凍結乾燥投与形態のいずれかで構成されてよい。緩衝液は、Ｌ－ヒスチジン（１－５０ｍＭ）、最適には５－１０ｍＭ、ｐＨ５．０から７．０（最適にはｐＨ６．０）であってよい。他の好適な緩衝液は、これだけに限らないが、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウムを含む。塩化ナトリウムは、０－３００ｍＭ（液体投与形態のために最適には１５０ｍＭ）の濃度で溶液の浸透圧を変更するために使用されてよい。抗凍結剤は、凍結乾燥投与形態のために含まれてよい、主に０－１０％ショ糖（最適には０．５－１．０％）。他の好適な抗凍結剤は、トレハロースおよび乳糖を含む。バルク化剤は、凍結乾燥投与形態のために含まれてよい、主に１－１０％マンニトール（最適には２－４％）。安定化剤は、液体および凍結乾燥

投与形態の両方で使用され得る、主に１－５０ｍＭ　Ｌ－メチオニン（最適には５－１０ｍＭ）。他の好適バルク化剤は、グリシン、アルギニンを含み、０．０５％ポリソルベート８０（最適には０．００５－０．０１％）として含まれてよい。追加的界面活性剤は、これだけに限らないがポリソルベート２０およびＢＲＩＪ界面活性剤を含む。注射可能な非経口投与用溶液として調製された本発明の抗体を含む医薬組成物は、抗体の吸収または分散を増加させるために使用されるものなどのアジュバントとして有用な薬剤をさらに含んでよい。特に有用なアジュバントは、Ｈｙｌｅｎｅｘ（登録商標）（組換えヒトヒアルロニダーゼ）などのヒアルロニダーゼである。注射可能な溶液へのヒアルロニダーゼの添加は、非経口投与、特に皮下投与後のヒト生物学的利用率を改善する。それは、より少ない疼痛および苦痛でより多い注射部位容量（すなわち１ｍｌを超える）も可能にし、注射部位反応の発生率を最少化する（参照により本明細書に組み込む国際特許出願公開第ＷＯ０４／０７８１４０号および米国特許出願公開第ＵＳ２００６１０４９６８号を参照されたい。）。

【０２０７】

本発明の組成物は、種々の形態であってよい。これらは、例えば液体溶液（例えば、注射可能なおよび不溶解性溶液）、分散剤または懸濁剤、錠剤、丸剤、粉剤、リポソームおよび座薬などの液体、半流動性および固体投与形態を含む。好ましい形態は、投与の目的の様式および治療用適用に依存する。組成物は、他の抗体でのヒトの受動的免疫化のために使用されるものに類似の組成物などの、注射可能なまたは不溶解性溶液の形態であってよい。一実施形態では抗体は、静脈内注入または注射によって投与される。別の実施形態では抗体は、筋肉内または皮下注射によって投与される。

【０２０８】

治療用組成物は、典型的には滅菌ならびに製造および保存の条件下で安定でなければならない。組成物は、溶液、ミクロ乳濁剤、分散剤、リポソームまたは高い薬物濃度に好適な他の秩序構造として製剤化されてよい。滅菌注射可能な溶液は、必要に応じて、上に列挙した成分の１つまたは組合せで適切な溶媒中に必要な量で活性化合物（すなわち、結合タンパク質、例えば本発明の抗体）を組み込み、続いてろ過滅菌によって調製されてよい。一般に、分散剤は、活性化合物を基本的な分散媒体および上に列挙したものから必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射可能な溶液の調製のための滅菌、凍結乾燥粉末の場合には、調製方法は、これらの既に滅菌ろ過した溶液から活性成分に加えて任意の追加的な所望の成分の粉末をもたらす真空乾燥およびスプレー乾燥を含む。溶液の適切な流動性は、例えばレシチンなどのコーティング剤の使用によって、分散剤の場合は所望の粒子サイズの維持によっておよび界面活性剤の使用によって維持され得る。注射可能な組成物の持効性吸収（ｐｒｏｌｏｎｇｅｄ　ａｂｓｏｒｐｔｉｏｎ）は、吸収を遅延させる薬剤例えば、モノステアレート塩およびゼラチンを組成物中に含むことによってもたらされ得る。

【０２０９】

本発明の抗体は、当技術分野において既知の種々の方法によって投与されてよい。多数の治療用適用について投与の経路／様式は、皮下注射、静脈内注射または注入であってよい。当業者によって理解されるとおり投与の経路および／または様式は、所望の結果に応じて変化する。ある特定の実施形態では活性化合物は、インプラント、経皮的パッチおよびマイクロカプセル化送達系を含む放出制御製剤など、急速な放出から化合物を保護する担体を含んで調製されてよい。エチレンビニルアセテート、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーは、使用され得る。そのような製剤の調製のための多数の方法は、特許出願されているまたは当業者に一般に既知である。例えばＳｕｓｔａｉｎｅｄ　ａｎｄ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌｅａｓｅ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｊ．Ｒ．Ｒｏｂｉｎｓｏｎ，ｅｄ．，Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９７８を参照されたい。

【０２１０】

ある特定の実施形態では本発明の抗体は、例えば不活性希釈剤または吸収可能な食用担体を含んで経口で投与されてよい。抗体（および所望により他の成分）は硬または軟シェルゼラチンカプセルに封入され、錠剤圧縮され、または対象の食事に直接組み入れられてもよい。経口治療用投与のために抗体は、賦形剤と共に組み入れられ、摂取可能な錠剤、バッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ、オブラートなどの形態で使用されてよい。本発明の抗体を非経口投与以外によって投与するために、その不活性化を妨げる材料で抗体をコートする、またはそれと抗体を同時投与することが必要である場合がある。

【０２１１】

ある特定の実施形態では本発明の抗体は、当技術分野において既知の半減期延長ビヒクルに連結される。そのようなビヒクルは、これだけに限らないが、Ｆｃドメイン、ポリエチレングリコールおよびデキストランを含む。そのようなビヒクルは、例えば、任意の目的のために参照により本明細書に組み込む米国特許出願第０９／４２８，０８２号および公開されたＰＣＴ出願第ＷＯ　９９／２５０４４号に記載されている。

【０２１２】

具体的な実施形態では本発明の抗体をコードしているヌクレオチド配列を含む核酸配列は、障害またはこの１つ以上の症状を遺伝子治療の方法によって処置、予防、管理または改善するために投与される。遺伝子治療は、発現されるまたは発現可能な核酸の対象への投与によって実施される療法を指す。本発明の本実施形態では核酸は、予防または治療効果を媒介するそれらがコードする本発明の抗体を産生する。

【０２１３】

技術分野において利用可能な遺伝子治療のための任意の方法は、本発明により使用され得る。遺伝子治療の方法の一般的評論については、Ｇｏｌｄｓｐｉｅｌら，１９９３，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｈａｒｍａｃｙ　１２：４８８－５０５、Ｗｕ　ａｎｄ　Ｗｕ，１９９１，Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ　３：８７－９５、Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ，１９９３，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２：５７３－５９６、Ｍｕｌｌｉｇａｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６０：９２６－９３２（１９９３）およびＭｏｒｇａｎ　ａｎｄ　Ａｎｄｅｒｓｏｎ，１９９３，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１－２１７、１９９３年5月，ＴＩＢＴＥＣＨ　１１（５）：１５５－２１５を参照されたい。使用され得る組換えＤＮＡ技術の当技術分野において一般に既知の方法はＡｕｓｕｂｅｌら（ｅｄｓ．），Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，ＮＹ（１９９３）およびＫｒｉｅｇｌｅｒ，Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ　ａｎｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ　Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９９０）に記載されている。遺伝子治療の種々の方法の詳細な記載は、参照により本明細書に組み込むＵＳ２００５００４２６６４　Ａ１に開示されている。

【０２１４】

本発明の抗体は、肝疾患および／もしくはがんに伴う疾患もしくは状態、またはＧＰ７３に関連する任意の他の疾患もしくは状態を処置するために単独でまたは組合せで使用されうる。組合せがそれらの意図する目的のために有用である組合せであることはさらに理解されるべきである。

【０２１５】

医薬組成物は、抗体の「治療有効量」または「予防有効量」を含んでよい。「治療有効量」は、所望の治療結果を達成するために必要な投与量および期間での有効な量を指す。抗体の治療有効量は、当業者によって決定されてよく個体の疾患の状態、年齢、性別および体重ならびに個体において所望の応答を引き出す抗体の能力などの因子によって変化する場合がある。治療有効量は、抗体の、ある場合、毒性または有害作用を治療に有益な効果が上回るものでもある。「予防有効量」は、所望の予防結果を達成するために必要な投与量および期間での有効な量を指す。典型的には予防用量は、疾患より先にまたは疾患の初期に対象において使用されることから、予防有効量は治療有効量よりも少ない。

【０２１６】
投薬レジメンは、最適な所望の応答（例えば治療または予防応答）を提供するために調整され得る。例えば単一のボーラスは投与されてよく、いくつかに分割された用量が経時的に投与されてよく、または用量は治療状況の緊急事態によって示されるとおり比例的に低減または増加されてよい。非経口組成物を、投与の簡便性および投薬の均一性のために投薬単位形態に製剤化することは特に有益である。本明細書において使用される投薬単位形態は、処置される哺乳動物対象に対する単位投薬として適する物理的に分けられた単位を指し、各単位は必要な医薬用担体と関連して所望の治療効果を生じるように算出された活性化合物の所定の量を含有する。投薬単位形態についての指定は（ａ）活性化合物の特有の特徴および達成される具体的な治療または予防効果、ならびに（ｂ）個体における感受性の処置のためにそのような活性化合物を配合する分野に固有の限定によって決定され、それに直接依存する。
【０２１７】
治療または予防のための抗体の有効量の例示的、非限定的範囲は、０．１から２００ｍｇ／ｋｇの間、例えば０．１から１０ｍｇ／ｋｇの間の投与量である。抗体の治療または予防有効量は、１から２００ｍｇ／ｋｇ、１０から２００ｍｇ／ｋｇ、２０から２００ｍｇ／ｋｇ、５０から２００ｍｇ／ｋｇ、７５から２００ｍｇ／ｋｇ、１００から２００ｍｇ／ｋｇ、１５０から２００ｍｇ／ｋｇ、５０から１００ｍｇ／ｋｇ、５から１０ｍｇ／ｋｇまたは１から１０ｍｇ／ｋｇの間であってよい。投薬値が、緩和される状態の種類および重症度で変化する場合があることは言及される。さらに抗体用量は、当業者によって決定されてよく、個体の疾患の状態、年齢、性別および体重ならびに個体において所望の応答を引き出す抗体の能力などの因子によって変化する場合がある。用量は、抗体の、ある場合、毒性または有害作用を治療に有益な効果が上回るものでもある。任意の具体的な対象について特異的投薬レジメンは、個体の必要性および組成物を投与しているまたは投与を監督している人の専門的判断によって時間をかけて調整されるべきであり、本明細書に前述の投薬範囲は、単なる例示であり、特許請求される組成物の範囲および実施を限定することを意図しないことは、さらに理解される。
【０２１８】
４．ＧＰ７３検出
本発明は、異なるＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３エピトープに結合する上記ＧＰ７３抗体を用いて、対象からの試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を検出および測定する方法に関する。本方法は、（ａ）対象から生体試料を得ること、（ｂ）捕捉抗体－ＧＰ７３抗原複合体を形成するために、ＧＰ７３（もしくはＧＰ７３断片）またはフコシル化ＧＰ７３（もしくはフコシル化ＧＰ７３断片）上のエピトープと結合する捕捉抗体に、生体試料を接触させること、（ｃ）検出可能な標識を含むとともに捕捉抗体が結合していないＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３上のエピトープと結合して捕捉抗体－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原－検出抗体を形成する検出抗体に、捕捉抗体－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原複合体を接触させること、ならびに、（ｄ）捕捉抗体－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原－検出抗体複合体中の検出可能な標識によって生ずるシグナルに基づいて、生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の存在、量、または濃度を決定することを含む。
【０２１９】
さらに、本発明は、上記ＧＰ７３抗体を用いて、対象からの試料中のフコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を検出および測定する方法に関する。ＧＰ７３抗体の結合は、ＧＰ７３のフコシル化に対して感受性がある場合と感受性がない場合がある。この方法は、（ａ）ＧＰ７３（もしくはＧＰ７３の断片）またはフコシル化ＧＰ７３（もしくはフコシル化ＧＰ７３の断片）の領域と結合する少なくとも１つの捕捉結合タンパク質に、試験試料を、接触させて捕捉結合タンパク質－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３複合体を形成すること、（ｂ）捕捉結合タンパク質が結合していないＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の領域に結合する、検出可能な標識を含む少なくとも１つの検出結合タンパク質に

、捕捉結合タンパク質－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３複合体を接触させて捕捉結合タンパク質－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３－検出結合タンパク質複合体を形成すること、（ｃ）（ｂ）で形成された捕捉結合タンパク質－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３－検出結合タンパク質複合体中の検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３濃度を決定することを含む。捕捉結合タンパク質は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３への結合がＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または非存在に感受性がある、タンパク質、抗体、または抗体断片を含み、ならびに、検出結合タンパク質は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３への結合がＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または非存在に対して非感受性である、タンパク質、抗体、または抗体断片を含む。あるいは、捕捉結合タンパク質は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３への結合がＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または非存在に対して非感受性である、タンパク質、抗体、または抗体断片を含み、ならびに、検出結合タンパク質は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３への結合がＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３上のフコース糖部分の存在または非存在に感受性がある、タンパク質、抗体、または抗体断片を含む。

【０２２０】

さらに、本発明は、対象からの試料中のＧＰ７３（もしくはＧＰ７３断片）レベルまたはフコシル化ＧＰ７３（もしくはフコシル化ＧＰ７３断片）レベルに基づいて、対象における疾患を診断する方法に関する。本方法は、（ａ）対象から生体試料を得る工程と、（ｂ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定する工程と、（ｃ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の基準レベルと比較する工程と、（ｄ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルがＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の基準レベルより大きい場合、対象が疾患を有するものと同定する工程と、（ｅ）疾患を有するものと同定された対象に対して、処置レジメンを施す工程とを含む。

【０２２１】

生体試料中に、少なくとも０．０５ｎｇ／ｍＬ、０．０６ｎｇ／ｍＬ、０．０７ｎｇ／ｍＬ、０．０８ｎｇ／ｍＬ、０．０９ｎｇ／ｍＬ、０．１０ｎｇ／ｍＬ、０．１１ｎｇ／ｍＬ、０．１２ｎｇ／ｍＬ、０．１３ｎｇ／ｍＬ、０．１４ｎｇ／ｍＬ、０．１５ｎｇ／ｍＬ、０．１６ｎｇ／ｍＬ、０．１７ｎｇ／ｍＬ、０．１８ｎｇ／ｍＬ、０．１９ｎｇ／ｍＬ、０．２０ｎｇ／ｍＬ、０．２５ｎｇ／ｍＬ、０．３０ｎｇ／ｍＬ、０．３５ｎｇ／ｍＬ、０．４０ｎｇ／ｍＬ、０．４５ｎｇ／ｍＬ、０．５０ｎｇ／ｍＬ、０．５５ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ、１５ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ、２１ｎｇ／ｍＬ、２２ｎｇ／ｍＬ、２３ｎｇ／ｍＬ、２４ｎｇ／ｍＬ、２５ｎｇ／ｍＬ、２６ｎｇ／ｍＬ、２７ｎｇ／ｍＬ、２８ｎｇ／ｍＬ、２９ｎｇ／ｍＬ、または３０ｎｇ／ｍＬのレベルのＧＰ７３（もしくはＧＰ７３断片）またはフコシル化ＧＰ７３（もしくはフコシル化ＧＰ７３断片）が検出され得る。

【０２２２】

ＧＰ７３およびフコシル化ＧＰ７３の検出の範囲は、他の市販のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３イムノアッセイと比較して、少なくとも５％、１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、１９０％、２００％、２１０％、２２０％、２３０％、２４０％、２５０％、２６０％、２７０％、２８０％、２９０％、３００％、４００％、または、５００％改善範囲サイズを有する。

【０２２３】

約０ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．０５ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．０６ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．０７ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．０８ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．０９ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．０９５ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．１０ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．１０５ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．１１ｎｇ／ｍＬか

ら約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．１２ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．１３ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．１４ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．１５ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約０．２０ｎｇ／ｍＬから約３０ｎｇ／ｍＬ、約１．００ｎｇ／ｍＬから約３０、約０ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．０５ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．０６ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．０７ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．０８ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．０９ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．０９５ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．１０ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．１０５ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．１１ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．１２ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．１３ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．１４ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．１５ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、０．２０ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、１．００ｎｇ／ｍＬから約２７．５ｎｇ／ｍＬ、約０ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．０５ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．０６ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．０７ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．０８ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．０９ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．０９５ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．１０ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．１０５ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．１１ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．１２ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．１３ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．１４ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．１５ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、０．２０ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、１．００ｎｇ／ｍＬから約２６ｎｇ／ｍＬ、約０ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．０５ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．０６ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．０７ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．０８ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．０９ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．０９５ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．１０ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．１０５ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．１１ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．１２ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．１３ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．１４ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．１５ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、０．２０ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、１．００ｎｇ／ｍＬから約２５ｎｇ／ｍＬ、約０ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．０５ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．０６ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．０７ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．０８ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．０９ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．０９５ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．１０ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．１０５ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．１１ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．１２ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．１３ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．１４ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．１５ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、０．２０ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、１．００ｎｇ／ｍＬから約２４ｎｇ／ｍＬ、約０ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．０５ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．０６ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．０７ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．０８ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．０９ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．０９５０ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．１０ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．１０５ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．１１ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．１２ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．１３ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．１４ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．１５ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、０．２０ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／ｍＬ、１．００ｎｇ／ｍＬから約２２．５ｎｇ／Ｍｌ、約０ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．０５ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．０６ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．０７ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．０８ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．０９ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．０９５ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．１０ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．１０５ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．１１ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．１

２ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．１３ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．１４ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．１５ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、０．２０ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、１．００ｎｇ／ｍＬから約２０ｎｇ／ｍＬ、約０ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．０５ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．０６ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．０７ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．０８ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．０９ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．０９５ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．１０ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．１０５ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．１１ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．１２ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．１３ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．１４ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．１５ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、０．２０ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬ、または１．００ｎｇ／ｍＬから約１５ｎｇ／ｍＬの範囲のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３が検出され得る。

【０２２４】

ａ．イムノアッセイ

ＧＰ７３およびフコシル化ＧＰ７３、ならびに／あるいはペプチドまたはその断片（すなわち、ＧＰ７３およびフコシル化ＧＰ７３断片）は、イムノアッセイにおいて上記抗体を用いて分析されてもよい。ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の存在または量は、抗体を用いて、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３に対する特異的結合を検出することによって、決定され得る。例えば、抗体またはその抗体断片は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３に対して特異的に結合することが可能である。必要に応じて、抗体の１つ以上は、１つ以上の市販のモノクローナル／ポリクローナル抗体と併用して用いられ得る。そのような抗体は、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）およびＥｎｚｏ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ．（Ｐｌｙｍｏｕｔｈ Ｍｅｅｔｉｎｇ，ＰＡ）から、入手可能である。

【０２２５】

体試料中に存在するＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の存在または量は、イムノアッセイを用いて容易に決定することが可能であり、このイムノアッセイとして、例えば、サンドイッチイムノアッセイ（例えば、放射性同位元素検出（放射性同位元素イムノアッセイ（ＲＩＡ））を含む、モノクローナル－ポリクローナルのサンドイッチイムノアッセイ）と、酵素検出（酵素イムノアッセイ（ＥＩＡ））または酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）（例えば、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ ＥＬＩＳＡ ａｓｓａｙｓ，Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）とが含まれる。化学発光微粒子イムノアッセイ、より具体的にはＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）自動分析器（Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ，ＩＬ）を用いるものは、好ましいイムノアッセイの一例である。他の方法として、例えば、質量分析法と、ＧＰ７３に対するＧＰ７３抗体（モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、ヒト化、ヒト、その他）またはＧＰ７３に対するそれらの抗体断片を用いる免疫組織化学（例えば、組織生検により得られた切片による）とが挙げられる。他の検出方法には、例えば、米国特許第６，１４３，５７６号、第６，１１３，８５５号、第６，０１９，９４４号、第５，９８５，５７９号、第５，９４７，１２４号、第５，９３９，２７２号、第５，９２２，６１５号、第５，８８５，５２７号、第５，８５１，７７６号、第５，８２４，７９９号、第５，６７９，５２６号、第５，５２５，５２４号、および第５，４８０，７９２号に記載されたものが含まれ、それらの各々をその全体として本明細書中に援用する。ＧＰ７３に対する抗体の免疫学的な特異的結合は、その抗体に結合した蛍光または発光タグ、金属、および放射性核種などの直接標識を介して、あるいは、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼなどの間接標識を介して、検出され得る。

【０２２６】

固定化抗体またはその抗体断片の使用は、イムノアッセイに組み込まれてもよい。抗体は、種々の支持体、例えば磁気またはクロマトグラフィーマトリクス粒子、アッセイプレートの表面（例えば、マイクロタイターウェル）、固形基質材料の一部分、およびその他

の上に、固定化可能である。アッセイストリップは、抗体またはアレイ状の複数の抗体を固体支持体上に被覆することで、調製され得る。このストリップは、続いて試験生体試料に浸漬され、洗浄および検出工程を通して素早く処理され、着色されたスポットなどの測定可能なシグナルを生じ得る。

【０２２７】

不均一なフォーマットを用いることも可能である。例えば、対象から試験試料を得た後、第１の混合物を調製する。この混合物は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３について評価されている試験試料と第１の特異的結合パートナーとを含み、ここで、第１の特異的結合パートナーと試験試料に含まれる任意のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３とは、第１の特異的結合パートナー－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原複合体を形成する。第１の特異的結合パートナーは、配列番号９７の少なくとも３つの連続した（３）アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープに結合する抗ＧＰ７３抗体であってもよい。試験試料と第１の特異的結合パートナーとを加えて混合物を形成する順番は、重要ではない。第１の特異的結合パートナーが固相に固定されてもよい。イムノアッセイに用いられる固相（第１の特異的結合パートナー用と、任意選択で、第２の特異的結合パートナー用）は、当技術分野で既知の任意の固相であり、例えば、限定されるものではないが、磁粉、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、フィルム、濾紙、ディスク、およびチップであり得る。

【０２２８】

第１の特異的結合パートナー－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原複合体を含む混合物を形成した後、当技術分野で既知の任意の技術を用いて、いっさいの未結合ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を複合体から取り除く。例えば、未結合ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を洗浄によって取り除くことができる。しかしながら、望ましくは、第１の特異的結合パートナーは、試験試料中に存在するいっさいのＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３よりも上回って存在するようにして、第１の特異的結合パートナーが試験試料に存在するすべてのＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３に結合するようにする。

【０２２９】

いっさいの未結合ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を取り除いた後、第２の特異的結合パートナーを混合物に添加して、第１の特異的結合パートナー－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原－第２の特異的結合パートナー複合体を形成する。第２の特異的結合パートナーは、配列番号３３の少なくとも３つの連続した（３）アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープに結合する抗ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗体であってもよい。さらに、第２の特異的結合パートナーは、上記したような検出可能な標識によって標識されているか、またはそのような標識を含む。

【０２３０】

固定化抗体またはその抗体断片の使用は、イムノアッセイに取り込まれる可能性がある。抗体は、種々の支持体、例えば磁気またはクロマトグラフィーマトリクス粒子、アッセイプレートの表面（例えば、マイクロタイターウェル）、固形基質材料の一部分、およびその他の上に、固定化可能である。アッセイストリップは、抗体またはアレイ状の複数の抗体を固体支持体上に被覆することで、調製され得る。このストリップは、続いて試験生体試料に浸漬され、洗浄および検出工程を通して素早く処理され、着色されたスポットなどの測定可能なシグナルを生じ得る。

【０２３１】

（１）サンドイッチＥＬＩＳＡ

サンドイッチＥＬＩＳＡは、抗体（すなわち、少なくとも１つの捕捉抗体）と検出抗体（すなわち、少なくとも１つの検出抗体）との２つの相の間の抗原量を測定する。捕捉抗体および検出抗体は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３などの抗原上の異なるエピトープに結合する。望ましくは、エピトープに対する捕捉抗体の結合は、エピトープに対する検出抗体の結合を妨げない。モノクローナルまたはポリクローナル抗体のいずれも、サンドイッチＥＬＩＳＡにおいて捕捉抗体および検出抗体として用いることが可能である。

【０２３２】
通常、少なくとも２つの抗体を用いて、試験試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を分離して定量する。より詳しくは、少なくとも２つの抗体は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の特定のエピトープと結合して「サンドイッチ」と呼ばれる免疫複合体を形成する。試験試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を捕捉するために、１つ以上の抗体を用いることができ（これらの抗体は、しばしば、「捕捉」抗体または複数の「捕捉」抗体と呼ばれる。）、また、検出可能な（すなわち、定量化可能な）標識をサンドイッチに結合させるために、１つ以上の抗体が用いられる（これらの抗体は、しばしば、「検出」抗体または複数の「検出」抗体と呼ばれる。）。サンドイッチアッセイでは、望ましくは、そのエピトープへの抗体の結合は、アッセイにおいてあらゆる他の抗体がそのそれぞれのエピトープに結合することによって、減弱しない。抗体の選択は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を含むことを疑われる試験試料と接触させられる１つ以上の第１の抗体が第２またはそれ以降の抗体によって認識されるエピトープのすべてまたは一部と結合しないように行われ、１つ以上の第２の検出抗体がＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３に結合する能力を妨げる。

【０２３３】
抗体は、前記イムノアッセイの第１の抗体として使用可能である。抗体は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３上のエピトープと免疫特異的に結合する。本発明の抗体に加えて、前記イムノアッセイは、第１の抗体が認識または結合しないエピトープと免疫特異的に結合する第２の抗体を含んでもよい。

【０２３４】
ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を含むことが疑われる試験試料は、同時に、または、経時的に、少なくとも１つの第１の捕捉抗体（複数可）と少なくとも１つの第２の検出抗体とに接触され得る。サンドイッチアッセイフォーマットでは、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を含むことが疑われる試験試料は、第１の抗体－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原複合体の形成を可能にする条件下で特定のエピトープと特異的に結合する少なくとも１つの第１の捕捉抗体と、最初に接触させる。複数の捕捉抗体が用いられる場合、第１の多重捕捉抗体－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原複合体が形成される。サンドイッチアッセイでは、抗体、好ましくは少なくとも１つの捕捉抗体は、試験試料中にあることが予想されるＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の最大量のモル過量で用いられる。例えば、微粒子コーティング緩衝液１ｍｌあたり約５μｇ／ｍｌから約１ｍｇ／ｍｌの抗体を用いることが可能である。

【０２３５】
（ａ）抗ＧＰ７３捕捉抗体
任意選択で、少なくとも１つの第１の捕捉抗体に試験試料を接触させる前に、この少なくとも１つの第１の捕捉抗体を、試験試料から第１の抗体－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原複合体の分離を容易にする固体支持体に、結合させることができる。当技術分野で既知の任意の固体支持体を用いることができ、例えば、限定されるものではないが、ウェル、試験管、またはビーズの形状のポリマー材料から作られた固体支持体が挙げられる。抗体（複数可）は、吸着によって、化学カップリング剤を用いる共有結合によって、または当技術分野で既知の他の手段によって、固体支持体に結合され得る。ただし、そのような結合がＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３に結合する抗体の能力を妨げない場合に限る。さらに、必要に応じて、固体支持体を誘導体化して、抗体上の種々の官能基との反応性を可能にすることができる。そのような誘導体化は、特定のカップリング剤、例えば、限定されるものではないが、無水マレイン酸、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、および１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドの使用を必要とする。

【０２３６】
試験終了後、ＧＰ７３またはＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を含むことが疑われる試料が、第１の捕捉抗体（または多重抗体）－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原複合体の形成を可能にするために、インキュベートされる。インキュベーションは、約４．

５から約１０．０のｐＨで、約２℃から約４５℃の温度で、少なくとも約１分間から約１８時間、約２から６分間、または約３から４分間の時間にわたって、実行され得る。

【０２３７】

（ｂ）検出抗体

第１／多重捕捉抗体－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原複合体の形成後、次にこの複合体を少なくとも１つの第２の検出抗体に接触させる（第１／多重抗体－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原－第２の抗体複合体の形成を可能にする条件下で）。第１抗体－ＧＰ７３もしくはフコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原複合体を複数の検出抗体と接触させる場合、第１／多重捕捉抗体－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原－多重抗体検出複合体が形成される。第１の抗体と同様に、少なくとも第２の（およびそれに続く）抗体が第１の抗体－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原複合体と接触させられる場合、上記したものと類似の条件下でのインキュベーションの期間は第１／多重抗体－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原－第２／多重抗体複合体の形成に必要である。好ましくは、少なくとも１つの第２の抗体は、検出可能な標識を含む。検出可能な標識は、第１／多重抗体－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原－第２／多重抗体複合体の形成に先立って、同時に、またはその後に、少なくとも１つの第２の抗体に結合し得る。当技術分野で既知の任意の検出可能な標識を用いることができる。

【０２３８】

化学発光アッセイは、Ａｄａｍｃｚｙｋら，Ａｎａｌ．Ｃｈｉｍ．Ａｃｔａ５７９（１）：６１－６７（２００６）に記載された方法に従って、実行されることができる。任意の適当なアッセイフォーマットを使用できるとはいえ、マイクロプレート化学発光装置（Ｍｉｔｈｒａｓ　ＬＢ－９４０，Ｂｅｒｔｈｏｌｄ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｕ．Ｓ．Ａ．，ＬＬＣ，Ｏａｋ　Ｒｉｄｇｅ，ＴＮ）は、少量の複数の試料を迅速にアッセイするのを可能にする。ケミルミノメーターは、９６穴黒色ポリスチレンマイクロプレート（Ｃｏｓｔａｒ　＃３７９２）を用いる複数の試薬用インジェクターを備えることができる。各試料を別々のウェルに添加し、その後、用いたアッセイの種類によって決まる他の試薬を同時／連続的に添加する。望ましくは、酸性化などによって、アクリジニウムアリールエステルを使用する中性または塩基性の溶液中での擬塩基の形成を避ける。続いて、ウェルごとに化学発光応答が記録される。この点に関しては、化学発光応答を記録するための時間は、部分的に、用いた試薬と特定のアクリジニウムとの添加間隔の遅れに依存する。

【０２３９】

化学発光アッセイ用の混合物を形成するべく試験試料と特異的結合パートナー（複数可）とを添加する順序は、重要ではない。第１の特異的結合パートナーがアクリジニウム化合物によって検出可能に標識される場合、検出可能に標識された第１の特異的結合パートナー－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原複合体が形成される。あるいは、第２の特異的結合パートナーが使用され、かつ第２の特異的結合パートナーがアクリジニウム化合物によって検出可能に標識される場合、検出可能に標識された第１の特異的結合パートナー－ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３抗原－第２の特異的結合パートナー複合体が形成される。標識または非標識にかかわらず、いっさいの未結合特異的結合パートナーを、洗浄等の当技術分野で既知の任意の技術を使用して、混合物から除去することができる。

【０２４０】

過酸化水素を、混合物中にｉｎ　ｓｉｔｕで生じさせることができ、あるいは、過酸化水素がその混合物に、上記アクリジニウム化合物の添加の前、同時、または後に、提供または供給され得る。過酸化水素は、当業者には明らかであろういくつかの方法で、ｉｎ　ｓｉｔｕで生成され得る。

【０２４１】

あるいは、過酸化水素の供給源を、単に、混合物に添加することができる。例えば、過酸化水素の供給源は、過酸化水素を含むことが知られている１種以上の緩衝液または他の溶液であり得る。この点に関しては、過酸化水素の溶液を単に加えることができる。

【０２４２】
試料に対して少なくとも１種類の塩基性溶液を同時またはその後に添加すると、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の存在を示す検出可能なシグナル、すなわち化学発光シグナルが発生する。塩基性溶液は少なくとも１種類の塩基を含み、そのｐＨが１０またはそれ超、好ましくは１２またはそれ超である。塩基性溶液の例として、限定されるものではないが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化アンモニウム、水酸化マグネシウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウム、および重炭酸カルシウムが挙げられる。試料に加えられる塩基性溶液の量は塩基性溶液の濃度によって決まる。使用される塩基性溶液の濃度に基づいて、当業者は、試料に加える塩基性溶液の量を容易に決定することができる。

【０２４３】
発生する化学発光シグナルは、当業者に既知の常用の技術を使用して検出することができる。発生するシグナルの強度に基づいて、試料のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の量は、定量化され得る。具体的には、試料のＧＰ７３の量は、発生するシグナルの強度と比例している。存在するＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の量は、発生する光量をＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の標準曲線と比較することによって、または、参照標準との比較によって、定量化され得る。標準曲線は、質量分析、重量測定方法、および当技術分野で公知の他の技術によって、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の既知濃度からなる溶液、または、段階希釈を使用して、生成され得る。

【０２４４】
ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）（またはその後継のもの）分析器を使用する化学発光微粒子アッセイでは、コンジュゲート希釈剤のＰＨは約６．０＋／－０．２でなければならず、微粒子コーティング緩衝液は室温に保たれなければならず（すなわち、約１７－２７℃）、さらに、微粒子コーティング緩衝液のｐＨは約６．５＋／－０．２でなければならず、さらに、微粒子希釈剤のｐＨは約７．８＋／－０．２でなければならない。固体は、好ましくは、約０．２％未満、例えば約０．１５％未満、約０．１４％未満、約０．１３％未満、約０．１２％未満、または約０．１１％未満、例えば約０．１０％である。

【０２４５】
（２）抗ＧＰ７３抗体を用いる方法
本発明は、開示された抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて、試験試料中のＧＰ７３またはＧＰ７３断片の存在、量、または濃度を決定する方法に関する。この方法は、（ａ）捕捉抗体－ＧＰ７３またはＧＰ７３断片抗原複合体を形成するように、ＧＰ７３またはＧＰ７３断片上のエピトープと結合する捕捉抗体を試験試料に接触させる工程と、（ｂ）検出可能な標識を含み、かつ捕捉抗体が結合していないＧＰ７３またはＧＰ７３断片上のエピトープに結合する、少なくとも１つの検出抗体を、捕捉抗体－ＧＰ７３またはＧＰ７３断片抗原複合体に接触させて、捕捉抗体－ＧＰ７３またはＧＰ７３断片抗原－検出抗体複合体を形成する工程と、（ｃ）試験試料中のＧ７３またはＧＰ７３断片の存在、量、または濃度が決定される捕捉抗体－ＧＰ７３またはＧＰ７３断片抗原－検出抗体複合体中の検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料中のＧＰ７３またはＧＰ７３断片の存在、量、または濃度を決定する工程とを含む。

【０２４６】
捕捉抗体および検出抗体は、上記の抗ＧＰ７３抗体であってもよい。例えば、捕捉抗体は、１Ａ－４２４６抗体または以下のドメインもしくは領域を含んでもよい。すなわち、配列番号１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン；配列番号５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号２のアミノ酸配列を含む相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；あるいは、配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３のアミ

ノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに、配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖である。検出抗体は、１Ｂ－４８６３抗体または以下のドメインもしくは領域を含んでもよい。すなわち、配列番号９のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン；配列番号１３のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号９のアミノ酸配列を含む可変重鎖および配列番号１３のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；あるいは、配列番１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖である。

【０２４７】

また、本発明は、開示された抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて、試験試料中のフコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片の存在、量、または濃度を決定する方法に関する。この方法は、（ａ）捕捉抗体－フコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片抗原複合体を形成するように、フコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片上のエピトープと結合する捕捉抗体を試験試料に接触させる工程と、（ｂ）検出可能な標識を含み、かつ捕捉抗体が結合していないフコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片上のエピトープと結合する、少なくとも１つの検出抗体を、捕捉抗体－フコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片抗原複合体に接触させて、捕捉抗体－フコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片抗原－検出抗体複合体を形成する工程と、（ｃ）試験試料中のフコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片の存在、量、または濃度が決定される捕捉抗体－フコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片抗原－検出抗体複合体中の検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料中のフコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片の存在、量、または濃度を決定する工程とを含み、捕捉結合タンパク質は、タンパク質、抗体、または抗体断片を含み、フコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片に対するその結合が、ＧＰ７３上のフコース部分の存在または非存在に対して感受性があり、検出結合タンパク質がタンパク質、抗体、または抗体断片を含み、フコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片に対するその結合が、ＧＰ７３上のフコース部分の存在または非存在に対して感受性がない。

【０２４８】

フコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片に対するその結合が、フコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片上のフコース糖部分の存在または非存在に対して感受性がある、タンパク質、抗体、または抗体断片は、アレウリア・アウランティアレクチン（ＡＡＬ）またはその断片；配列番号２５または配列番号３３のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域；配列番号２９または配列番号３７のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２９のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号３３のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号３７のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含

む可変軽鎖；配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；あるいは配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および、配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。

【０２４９】

フコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３に対するその結合が、フコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片上のフコース糖部分の存在または非存在に対して感受性がない、タンパク質、抗体、または抗体断片は、配列番号１、配列番号９、配列番号１７、または配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域；配列番号５、配列番号１３、配列番号２１、または配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号９のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号１３のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号１７のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号２１のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号４５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域；配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；あるいは配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含んでもよい。

【０２５０】

捕捉抗体および検出抗体は、上記の抗ＧＰ７３抗体であってもよい。例えば、捕捉抗体は、１Ａ－４２４６抗体または以下のドメインもしくは領域を含んでもよい。すなわち、配列番号１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン；配列番号５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号１のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号５のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号２のアミノ酸配列を含む相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および、配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；あるいは配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、および、配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖を含む。検出抗体は、１Ｂ－４８６３抗体または以下のドメインもしくは領域を含んでもよい。すなわち、配列番号９のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン；配列番号１３のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号９のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号１３のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン；配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖；配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖；あるいは、配列番１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変重鎖、ならびに、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む可変軽鎖である。

【０２５１】

ｂ．対照群

対照試料を含むことが望ましい場合がある。対照試料は、上記の対象からの試料と同時に分析してもよい。対象試料から得られる結果は、対照試料から得られる結果と比較され得る。標準曲線を提供してよく、これにより、生体試料のアッセイ結果を比較することが可能である。そのような標準曲線は、マーカーのレベルをアッセイ単位の関数として表す（すなわち、蛍光標識が用いられる場合は蛍光シグナル強度）。複数のドナーから採取された試料を用いて、健常な組織中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の対照レベルに対して、標準曲線を用意することができ、また上記の１つ以上の特徴を有し得るドナーから採取した組織中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の「リスクがある」レベルに対しても標準曲線を用意することができる。

【０２５２】

したがって、上記に鑑みて、試験試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の存在、量、または濃度を測定する方法が提供される。この方法は、イムノアッセイによって試験試料をＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３についてアッセイすること、例えば、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３上のエピトープに結合する少なくとも１つの捕捉抗体、および、捕捉抗体に対するエピトープとは異なるＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３上のエピトープに結合し、かつ任意選択で検出可能な標識を含む少なくとも１つの検出抗体を用いること、ならびに、試験試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の存在、量、または濃度を直接的もしくは間接的に示す指標としての検出可能な標識によって生成されるシグナルを、較正物質中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の存在、量、または濃度の直接的もしくは間接的な指標として生成されるシグナルと比較することを含む。較正物質は、任意選択で、較正物質の各々がＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度によって他の較正物質とシリーズにおいて異なる一連の較正物質の一部で、望ましくはある。

【０２５３】

５．治療的／予防的処置の有効性を診断、予後判定、または評価する方法

方法は、試験試料を得た患者の治療的／予防的処置の有効性を診断、予後判定、または評価することを、さらに含み得る。方法が試験試料を得た患者の治療的／予防的処置の有効性を評価することをさらに含む場合、方法は、任意選択で、有効性を改善すべく必要に応じて患者の治療的／予防的処置を修正することを、さらに含む。ＧＰ７３およびフコシル化ＧＰ７３を測定および検出することによって、方法は、他の市販のＧＰ７３イムノアッセイと比べて、より多くの疾患がより正確に診断され、それに続いてより首尾よく治療されることを可能にする。方法は、自動化システムまたは半自動化システムでの使用に適合され得る。

【０２５４】

概して、所定のレベルは、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３について試験試料をアッセイする際に得られる結果を評価するためのベンチマークとして、使用され得る。概して、そのような比較をする際に、分析物の存在、量、または濃度を、疾患、障害、または状態（例えば、肝臓疾患またはがん）の特定の病期またはエンドポイントあるいは特定の徴候とリンクまたは関連させることがなし得るように、所定のレベルが特定のアッセイを適当な条件下で、充分な回数行って得られる。典型的に、所定のレベルは、参照対象（または対象の集団）のアッセイで得られる。測定されるＧＰ７３は、そのＧＰ７３断片、その分解産物、および／またはその酵素の切断産物を含み得る。フコシル化ＧＰ７３は、そのグリコシル化のＧＰ７３断片、その分解産物、および／またはその酵素切断産物を含み得る。

【０２５５】

より詳しくは、疾患進行および／または処置のモニタリングに用いられるような所定のレベルに関して、ＧＰ７３またはＧＰ７３断片あるいはフコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片の量または濃度は、「不変である」、「好ましい」（または「好ましく改変されている」）、あるいは、「好ましくない」（または「好ましくなく改変される」）場合がある。「上昇」または「増加」は、典型的または正常のレベルまたは範囲（例えば、所定のレベル）よりも高いまたは大きい、あるいは、別の基準レベルまたは範囲（例えば、以前の、またはベースライン試料）よりも高いまたは大きい試験試料中の量または濃度のことをいう。用語「低下」または「減少」は、典型的または正常のレベルまたは範囲（例えば、所定のレベル）よりも低いまたは少ない、あるいは、別の基準レベルまたは範囲（例えば、以前の、またはベースライン試料）よりも低いまたは少ない試験試料中の量または濃度のことをいう。「改変される」という用語は、典型的または正常のレベルまたは範囲（例えば、所定のレベル）を超えて、あるいは、別の基準レベルまたは範囲（例えば、以前の、またはベースライン試料）を超えて、改変（増加または減少）がなされている試料中の量または濃度のことをいう。

【０２５６】

ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の典型的または正常のレベルまたは範囲は、標準的な慣行に従って定義される。いわゆる改変されたレベルまたは改変は、典型的または正常のレベルまたは範囲あるいは基準レベルまたは範囲と比較して、実験誤差または試料変動によって説明され得ない何らかの正味の変化がある場合に生じたと、考えられ得る。したがって、特定の試料で測定されるレベルは、いわゆる正常な対象由来の類似の試料で決定されたレベルまたはレベル範囲と比較される。この文脈では、例えば、「正常な対象」とは、検出可能な疾患または障害を持たない個体であり、「正常な」（しばしば「対照」）患者または集団とは、それぞれ、検出可能な疾患または障害を示さない患者または集団である。「明らかに正常な対象」は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３もしくはフコシル化ＧＰ７３が評価されなかった対象、または、評価中の対象である。分析物が通常検出不可能（例えば、正常レベルがゼロ、または正常集団の約２５－約７５パーセンタイルの範囲内）であるが、試験試料では検出される場合や、分析物が正常レベルよりも高く存在する場合には、分析物のレベルが「上昇した」と言われる。したがって、本開示は、とりわけ、肝臓疾患またはがんを有する、またはそれを有するリスクのある対象のスクリーニン

グの方法を提供する。

【０２５７】

ａ．疾患を有する対象の診断を提供する方法

本明細書中で説明される方法は、対象中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定することによって疾患を有する対象の診断を提供するべく、用いられ得る。本方法は、上記した抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて対象の疾患を検出するべく、用いられてもよい。本方法は、（ａ）対象から生体試料を得る工程と、（ｂ）抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定する工程と、（ｃ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルをＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の基準レベルと比較する工程と、（ｄ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルがＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の基準レベルよりも大きい場合に、対象が疾患を有するものと同定する工程と、（ｅ）疾患を有するものと同定された対象に対して処置レジメンを施す工程とを含む。本方法で使用される抗ＧＰ７３抗体は、１Ａ－４２４６抗体および１Ｂ－４８６３抗体、またはそれらの抗体断片であってもよい。

【０２５８】

（１）肝臓疾患

本明細書中で記載される方法は、対象中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定することによって肝臓疾患を有する対象の診断を提供するべく、用いられ得る。本方法は、上記した抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて対象の肝臓疾患を検出するべく、用いられ得る。本方法は、（ａ）対象から生体試料を得る工程と、（ｂ）抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定する工程と、（ｃ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルをＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の基準レベルと比較する工程と、（ｄ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルがＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の基準レベルよりも大きい場合に、対象が肝臓疾患を有するものと同定する工程と、（ｅ）肝臓疾患を有するものと同定された対象に対して処置レジメンを施す工程とを含む。本方法で使用される抗ＧＰ７３抗体は、１Ａ－４２４６抗体および１Ｂ－４８６３抗体、またはそれらの抗体断片であってもよい。

【０２５９】

この方法の基準レベルは、肝臓疾患を有している患者におけるＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルであり得る。血清中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルが０．３０ｎｇ／ｍＬ、０．３１ｎｇ／ｍＬ、０．３２ｎｇ／ｍＬ、０．３３ｎｇ／ｍＬ、０．３４ｎｇ／ｍＬ、０．３５ｎｇ／ｍＬ、０．３６ｎｇ／ｍＬ、０．３７ｎｇ／ｍＬ、０．３８ｎｇ／ｍＬ、０．３９ｎｇ／ｍＬ、０．４０ｎｇ／ｍＬ、０．４１ｎｇ／ｍＬ、０．４２ｎｇ／ｍＬ、０．４３ｎｇ／ｍＬ、０．４４ｎｇ／ｍＬ、０．４５ｎｇ／ｍＬ、０．４６ｎｇ／ｍＬ、０．４７ｎｇ／ｍＬ、０．４８ｎｇ／ｍＬ、０．４９ｎｇ／ｍＬ、０．５０ｎｇ／ｍＬ、０．５１ｎｇ／ｍＬ、０．５２ｎｇ／ｍＬ、０．５３ｎｇ／ｍＬ、０．５４ｎｇ／ｍＬ、０．５５ｎｇ／ｍＬ、０．５６ｎｇ／ｍＬ、０．５７ｎｇ／ｍＬ、０．５８ｎｇ／ｍＬ、０．５９ｎｇ／ｍＬ、０．６０ｎｇ／ｍＬ、０．６１ｎｇ／ｍＬ、０．６２ｎｇ／ｍＬ、０．６３ｎｇ／ｍＬ、０．６４ｎｇ／ｍＬ、０．６５ｎｇ／ｍＬ、０．６６ｎｇ／ｍＬ、０．６７ｎｇ／ｍＬ、０．６８ｎｇ／ｍＬ、０．６９ｎｇ／ｍＬ、０．７０ｎｇ／ｍＬ、０．７１ｎｇ／ｍＬ、０．７２ｎｇ／ｍＬ、０．７３ｎｇ／ｍＬ、０．７４ｎｇ／ｍＬ、０．７５ｎｇ／ｍＬ、０．７６ｎｇ／ｍＬ、０．７７ｎｇ／ｍＬ、０．７８ｎｇ／ｍＬ、０．７９ｎｇ／ｍＬ、０．８０ｎｇ／ｍＬ、０．８１ｎｇ／ｍＬ、０．８２ｎｇ／ｍＬ、０．８３ｎｇ／ｍＬ、０．８４ｎｇ／ｍＬ、０．８５ｎｇ／ｍＬ、０．８６ｎｇ／ｍＬ、０．８７ｎｇ／ｍＬ、０．８８ｎｇ／ｍＬ、０．８９ｎｇ／ｍＬ、０．９０ｎｇ／ｍＬ、０．９１ｎｇ／ｍＬ、または０．９２ｎｇ／ｍＬよりも高い、または等しいレベルであると、対象が肝臓疾患を有すると同定される。

【０２６０】

（ａ）肝硬変

本明細書中で記載される方法は、対象中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定することによって肝硬変を有する対象の診断を提供するべく、用いられ得る。本方法は、上記抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて対象の肝硬変を検出するべく、用いられ得る。本方法は、（ａ）対象から生体試料を得る工程と、（ｂ）抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定する工程と、（ｃ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルをＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の基準レベルと比較する工程と、（ｄ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルがＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の基準レベルよりも大きい場合に、対象が肝硬変を有するものと同定する工程と、（ｅ）肝硬変を有するものと同定された対象に対して治療レジメンを施す工程とを含む。本方法で使用される抗ＧＰ７３抗体は、１Ａ－４２４６抗体および１Ｂ－４８６３抗体、またはそれらの抗体断片であってもよい。

【０２６１】

この方法の基準レベルは、肝硬変を有している患者におけるＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルであり得る。血清中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルが０．６８ｎｇ／ｍＬ、０．６９ｎｇ／ｍＬ、０．７０ｎｇ／ｍＬ、０．７１ｎｇ／ｍＬ、０．７２ｎｇ／ｍＬ、０．７３ｎｇ／ｍＬ、０．７４ｎｇ／ｍＬ、０．７５ｎｇ／ｍＬ、０．７６ｎｇ／ｍＬ、０．７７ｎｇ／ｍＬ、０．７８ｎｇ／ｍＬ、０．７９ｎｇ／ｍＬ、０．８０ｎｇ／ｍＬ、０．８１ｎｇ／ｍＬ、０．８２ｎｇ／ｍＬ、０．８３ｎｇ／ｍＬ、０．８４ｎｇ／ｍＬ、０．８５ｎｇ／ｍＬ、０．８６ｎｇ／ｍＬ、０．８７ｎｇ／ｍＬ、０．８８ｎｇ／ｍＬ、０．８９ｎｇ／ｍＬ、０．９０ｎｇ／ｍＬ、０．９１ｎｇ／ｍＬ、または０．９２ｎｇ／ｍＬよりも高い、または等しいレベルであると、対象が肝硬変を有すると同定する。

【０２６２】

（ｂ）肝臓がん

本明細書中で記載される方法は、対象中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定することによって肝臓がんを有する対象の診断を提供するべく、用いられ得る。本方法は、上記した抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて対象の肝臓がんを検出するべく、用いられ得る。本方法は、（ａ）対象から生体試料を得る工程と、（ｂ）上記抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定する工程と、（ｃ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルをＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の基準レベルと比較する工程と、（ｄ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルがＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の基準レベルよりも大きい場合に、対象が肝臓がんを有するものと同定する工程と、（ｅ）肝臓がんを有するものと同定された対象に対して治療レジメンを施す工程とを含む。本方法で使用される抗ＧＰ７３抗体は、１Ａ－４２４６抗体および１Ｂ－４８６３抗体、またはそれらの抗体断片であってもよい。

【０２６３】

この方法の基準レベルは、肝臓がんを有している患者におけるＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルであり得る。血清中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルが０．３０ｎｇ／ｍＬ、０．３１ｎｇ／ｍＬ、０．３２ｎｇ／ｍＬ、０．３３ｎｇ／ｍＬ、０．３４ｎｇ／ｍＬ、０．３５ｎｇ／ｍＬ、０．３６ｎｇ／ｍＬ、０．３７ｎｇ／ｍＬ、０．３８ｎｇ／ｍＬ、０．３９ｎｇ／ｍＬ、０．４０ｎｇ／ｍＬ、０．４５ｎｇ／ｍＬ、０．５０ｎｇ／ｍＬ、０．５５ｎｇ／ｍＬ、０．５８ｎｇ／ｍＬ、０．５９ｎｇ／ｍＬ、０．６０ｎｇ／ｍＬ、０．６１ｎｇ／ｍＬ、０．６２ｎｇ／ｍＬ、０．６３ｎｇ／ｍＬ、０．６４ｎｇ／ｍＬ、０．６５ｎｇ／ｍＬ、０．６６ｎｇ／ｍＬ、０．６７ｎｇ／ｍＬ、または０．６８ｎｇ／ｍＬよりも高い、または等しいレベルであると、対象が肝臓がんを有すると同定する。

【０２６４】

（２）がん

本明細書中で記載される方法は、対象中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定することによってがんを有する対象の診断を提供するべく、用いられ得る。本方法は、上記した抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて対象のがんを検出するべく、用いられ得る。本方法は、（ａ）対象から生体試料を得る工程と、（ｂ）抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定する工程と、（ｃ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルをＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の基準レベルと比較する工程と、（ｄ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルがＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の基準レベルよりも大きい場合に、対象ががんを有するものと同定する工程と、（ｅ）がんを有するものと同定された対象に対して治療レジメンを施す工程とを含む。本方法で使用される抗ＧＰ７３抗体は、１Ａ－４２４６抗体および１Ｂ－４８６３抗体、またはそれらの抗体断片であってもよい。

【０２６５】

この方法の基準レベルは、がんを有している患者におけるＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルであり得る。血清中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルが０．２９ｎｇ／ｍＬ、０．３０ｎｇ／ｍＬ、０．３１ｎｇ／ｍＬ、０．３２ｎｇ／ｍＬ、０．３３ｎｇ／ｍＬ、０．３４ｎｇ／ｍＬ、０．３５ｎｇ／ｍＬ、０．３６ｎｇ／ｍＬ、０．３７ｎｇ／ｍＬ、０．３８ｎｇ／ｍＬ、０．３９ｎｇ／ｍＬ、０．４０ｎｇ／ｍＬ、０．４１ｎｇ／ｍＬ、０．４２ｎｇ／ｍＬ、０．４３ｎｇ／ｍＬ、０．４４ｎｇ／ｍＬ、０．４５ｎｇ／ｍＬ、０．４６ｎｇ／ｍＬ、０．４７ｎｇ／ｍＬ、０．４８ｎｇ／ｍＬ、０．４９ｎｇ／ｍＬ、０．５０ｎｇ／ｍＬ、０．５１ｎｇ／ｍＬ、０．５２ｎｇ／ｍＬ、０．５３ｎｇ／ｍＬ、０．５４ｎｇ／ｍＬ、０．５５ｎｇ／ｍＬ、０．５６ｎｇ／ｍＬ、０．５７ｎｇ／ｍＬ、０．５８ｎｇ／ｍＬ、０．５９ｎｇ／ｍＬ、０．６０ｎｇ／ｍＬ、０．６１ｎｇ／ｍＬ、０．６２ｎｇ／ｍＬ、０．６３ｎｇ／ｍＬ、０．６４ｎｇ／ｍＬ、０．６５ｎｇ／ｍＬ、０．６６ｎｇ／ｍＬ、０．６７ｎｇ／ｍＬ、０．６８ｎｇ／ｍＬ、０．６９ｎｇ／ｍＬ、０．７０ｎｇ／ｍＬ、０．７１ｎｇ／ｍＬ、０．７２ｎｇ／ｍＬ、０．７３ｎｇ／ｍＬ、０．７４ｎｇ／ｍＬ、０．７５ｎｇ／ｍＬ、０．７６ｎｇ／ｍＬ、０．７７ｎｇ／ｍＬ、０．７８ｎｇ／ｍＬ、０．７９ｎｇ／ｍＬ、０．８０ｎｇ／ｍＬ、０．８１ｎｇ／ｍＬ、０．８２ｎｇ／ｍＬ、０．８３ｎｇ／ｍＬ、０．８４ｎｇ／ｍＬ、０．８５ｎｇ／ｍＬ、０．８６ｎｇ／ｍＬ、０．８７ｎｇ／ｍＬ、０．８８ｎｇ／ｍＬ、０．８９ｎｇ／ｍＬ、０．９０ｎｇ／ｍＬ、０．９１ｎｇ／ｍＬ、０．９２ｎｇ／ｍＬ、０．９３ｎｇ／ｍＬ、０．９４ｎｇ／ｍＬ、０．９５ｎｇ／ｍＬ、０．９６ｎｇ／ｍＬ、０．９７ｎｇ／ｍＬ、０．９８ｎｇ／ｍＬ、０．９９ｎｇ／ｍＬ、１．００ｎｇ／ｍＬ、１．０１ｎｇ／ｍＬ、１．０２ｎｇ／ｍＬ、１．０３ｎｇ／ｍＬ、１．０４ｎｇ／ｍＬ、１．０５ｎｇ／ｍＬ、１．０６ｎｇ／ｍＬ、１．０７ｎｇ／ｍＬ、１．０８ｎｇ／ｍＬ、１．０９ｎｇ／ｍＬ、または１．１０ｎｇ／ｍＬよりも高い、または等しいレベルであると、対象ががんを有すると同定する。

【０２６６】

ｂ．対象が肝臓疾患を発症するリスクを決定する方法

また、本明細書中に記載される方法は、上記した抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて、対象中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定することによって、対象が肝臓疾患を有しているか、または、それを発症するリスクを有しているかどうかを決定するべく、使用され得る。したがって、個々の実施形態において、本開示は、本明細書中で議論する肝臓疾患またはそのリスクを有している対象が治療または処置の候補であるかどうかを、決定する方法も提供する。概して、対象は、本明細書に記載されるように、疾患のいくつかの症状を経験したもの、または、そのような疾患もしくはそのリスクを有していると実際に診断されたもの、および／あるいは、好適ではない濃度または量のＧＰ７３またはＧＰ７３断片を示しているものである。

【０２６７】

具体的には、そのような方法は、（ａ）本明細書中に記載される方法または当技術分野で既知の方法を用いて、対象由来の試験試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量を決定する工程と、（ｂ）工程（ａ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量を所定のレベルと比較する工程とを含むことができ、ここで、工程（ａ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量が所定のレベルについて好適である場合、本明細書で議論され、かつ当技術分野で既知の肝臓疾患またはそのリスクを対象が有していないと、決定される。しかし、工程（ａ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量が所定のレベルについて好適ではない場合、本明細書で議論され、かつ当技術分野で既知の肝臓疾患またはそのリスクを対象が有していると、決定される。肝臓疾患は、肝硬変または肝臓がんであってもよい。

【０２６８】

ｃ．対象のがん発症リスクを決定する方法

また、本明細書中に記載される方法は、上記した抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて、対象中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定することによって、対象ががんを有しているか、または、それを発症するリスクを有しているかどうかを決定するべく、使用され得る。したがって、個々の実施形態において、本開示は、本明細書中で議論され、かつ当技術分野で既知のがんまたはそのリスクを有している対象が治療または処置の候補であるかどうかを、決定する方法も提供する。概して、本明細書中に記載されるように、対象は、疾患のいくつかの症状を経験したもの、または、そのような疾患もしくはそのリスクを有していると実際に診断されたもの、および／あるいは、好適ではない濃度または量のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を示しているものである。

【０２６９】

具体的には、そのような方法は、（ａ）本明細書中に記載される方法または当技術分野で既知の方法を用いて、対象由来の試験試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量を決定する工程と、（ｂ）工程（ａ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量を所定のレベルと比較する工程とを含むことができ、ここで、工程（ａ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量が所定のレベルについて好適である場合、本明細書で議論され、かつ当技術分野で既知のがんまたはそのリスクを対象が有していないと、決定される。しかし、工程（ａ）で決定されたＧＰ７３の濃度または量が所定のレベルについて好適ではない場合、本明細書で議論され、かつ当技術分野で既知のがんまたはそのリスクを対象が有していると、決定される。このがんは、大腸がん、胃がん、乳がん、前立腺がん、または肝臓がんであってもよい。

【０２７０】

ｄ．対象における疾患の進行をモニタリングする方法

本明細書中に記載される方法も、上記の抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて対象中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定することによって、対象における肝臓疾患またはがんなどの疾患の進行をモニターするべく、用いられ得る。最適には、方法は、（ａ）上記の抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて対象由来の試験試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量を決定する工程と、（ｂ）上記の抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて対象由来の後期試験試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量を決定する工程と、（ｃ）工程（ｂ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量を工程（ａ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量と比較する工程とを含み、工程（ｂ）で決定された濃度または量を工程（ａ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量と比較した場合に、工程（ｂ）で決定された濃度または量に変化がないまたは好適ではない場合、対象の疾患が、継続、進行、または悪化したと決定される。比較すると、工程（ｂ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量が、工程（ａ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量と比較したときに好適である場合、対象の疾患が、非継続、回帰、または改善したと決定される。

【０２７１】

任意選択で、方法は、工程（ｂ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量を所定のレベルと比較することを、さらに含む。さらに、任意選択で、方法は、工程（ｂ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量が所定のレベルについて好ましくはないかたちで改変される場合に、一定期間にわたって１種以上の医薬組成物で対象を処置することを含む。

【０２７２】

さらにまた、方法は、１種以上の医薬組成物で処置を受けている対象での処置をモニターするべく、用いられ得る。具体的には、そのような方法は、対象が１種以上の医薬組成物を投与される前に対象由来の第１の試験試料を提供することを含む。次に、対象由来の第１の試験試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量を決定する（例えば、本明細書中に記載される方法または当技術分野で既知の方法を用いて）。ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量が決定された後、任意選択で、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量が所定のレベルと比較される。第１の試験試料において決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量は所定のレベルよりも低い場合、対象を１種以上の医薬組成物で処置しないか、あるいは二者択一的に、対象を１種以上の医薬組成物で処置してもよい。第１の試験試料において決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量が所定のレベルよりも高い場合、対象を１種以上の医薬組成物で一定期間にわたって処置するか、あるいは二者択一的に、対象を１種以上の医薬組成物で処置しない。対象が１種以上の医薬組成物を用いた処置を受ける期間（例えば、期間は約７日から約２年まで、好ましくは約１４日から約１年まで）は、当業者によって決定され得る。

【０２７３】

１種以上の医薬組成物による処置の過程で、第２とそれ以降の試験試料を対象から得る。試験試料が対象から得られる際の試験試料の数と時間は、重要ではない。例えば、第２の試験試料は、対象が最初に１種以上の医薬組成物を投与されてから７日後に、得ることができ、第３の試験試料は、対象が最初に１種以上の医薬組成物を投与されてから２週間後に、得ることができ、第４の試験試料は、対象が最初に１種以上の医薬組成物を投与されてから３週間後に、得ることができ、第５の試料は、対象が最初に１種以上の医薬組成物を投与されてから４週間後に、得ることができた。

【０２７４】

各々の第２またはそれに続く試験試料を対象から得た後に、第２またはそれに続く試験試料におけるＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量を決定する（例えば、本明細書中に記載される方法または当技術分野で既知の方法を用いて）。次に、第２およびそれに続く試験試料の各々で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量を第１の試験試料（例えば、所定のレベルと比較した元々の任意選択である試験試料）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量と比較する。工程（ｃ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量が、工程（ａ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量と比較したときに好適である場合、対象の疾患が、非継続、回帰、または改善したと決定され、対象は、工程（ｂ）の１種以上の医薬組成物を投与され続けなければならない。工程（ｃ）で決定された濃度または量が、工程（ａ）で決定されたＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量と比較したときに変化していないか好適ではない場合、対象の疾患が、継続、進行、または悪化したと決定され、対象は、工程（ｂ）で対象に投与された１種以上の医薬組成物の濃度をより高くして処置されなければならず、あるいは、対象は、工程ｂ）で対象に投与された１種以上の医薬組成物とは異なる１種以上の医薬組成物で処置されなければならない。具体的には、前記対象のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３レベルを減少または低下させるべく既に対象が受けた１種以上の医薬組成物とは異なる１種以上の医薬組成物で、対象を処置することができる。

【０２７５】

概して、反復試験が実行され得るアッセイ（例えば、疾患の進行および／または処置に

対する応答をモニタリング）のために、対象から第１の試験試料を得た後の一定の時間で、第２またはそれに続く試験試料を得る。具体的には、第２の試験試料は、第１の試験試料を対象から得た数分後、数時間後、数日後、数週間後、または数年後に、対象から得られ得る。例えば、第２の試験試料は、対象から第１の試験試料を得た後、約１分、約５分、約１０分、約１５分、約３０分、約４５分、約６０分、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約７時間、約８時間、約９時間、約１０時間、約１１時間、約１２時間、約１３時間、約１４時間、約１５時間、約１６時間、約１７時間、約１８時間、約１９時間、約２０時間、約２１時間、約２２時間、約２３時間、約２４時間、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日、約７日、約２週、約３週、約４週、約５週、約６週、約７週、約８週、約９週、約１０週、約１１週、約１２週、約１３週、約１４週、約１５週、約１６週、約１７週、約１８週、約１９週、約２０週、約２１週、約２２週、約２３週、約２４週、約２５週、約２６週、約２７週、約２８週、約２９週、約３０週、約３１週、約３２週、約３３週、約３４週、約３５週、約３６週、約３７週、約３８週、約３９週、約４０週、約４１週、約４２週、約４３週、約４４週、約４５週、約４６週、約４７週、約４８週、約４９週、約５０週、約５１週、約５２週、約１．５年、約２年、約２．５年、約３．０年、約３．５年、約４．０年、約４．５年、約５．０年、約５．５年、約６．０年、約６．５年、約７．０年、約７．５年、約８．０年、約８．５年、約９．０年、約９．５年、または約１０．０年の期間で、対象から得ることができる。疾患進行をモニターするために用いられる場合、上記のアッセイを用いて、急性状態を罹患している対象で疾患の進行をモニターすることができる。急性の状態は、クリティカルケア状態とも知られており、例えば、心脈管系または排出系などが関わる急性の致命的な疾患または他の重篤な症状のことをいう。典型的に、クリティカルケア状態は、病院ベースの設定で急性医療行為（例えば、限定されるものではないが、救急治療室、集中治療部、外傷センター、または他の救急治療設定を含む。）、あるいは、救急医療士または他のフィールド・ベースの医療関係者による投与を、必要としているそれらの状態のことをいう。クリティカルケア状態では、反復モニタリングは、より短い期間内、すなわち、数分、数時間、または数日（例えば、約１分、約５分、約１０分、約１５分、約３０分、約４５分、約６０分、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約７時間、約８時間、約９時間、約１０時間、約１１時間、約１２時間、約１３時間、約１４時間、約１５時間、約１６時間、約１７時間、約１８時間、約１９時間、約２０時間、約２１時間、約２２時間、約２３時間、約２４時間、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日、または約７日）内で、概ね実施され、そして、同様に、初期アッセイは、より短い時間枠の範囲内、例えば、疾患または状態の開始の約数分、数時間、または数日内に、概ね実施される。

【０２７６】

また、アッセイは、慢性または非急性状態を罹患している対象での疾患の進行をモニターするべく、用いられ得る。重篤ではないケア状態または非急性状態は、急性で致命的な疾患または心脈管系および／もしくは排出系などに関わる他の重篤な症状以外の、状態のことをいう。典型的に、非急性状態は、より長期的または慢性の期間のものが含まれる。非急性状態について、反復モニタリングは、より長い時間枠で実施され、この時間枠は、例えば、数時間、数日間、数週間、数ヶ月間または数年（例えば、約１時間、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約７時間、約８時間、約９時間、約１０時間、約１１時間、約１２時間、約１３時間、約１４時間、約１５時間、約１６時間、約１７時間、約１８時間、約１９時間、約２０時間、約２１時間、約２２時間、約２３時間、約２４時間、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日、約７日、約２週、約３週、約４週、約５週、約６週、約７週、約８週、約９週、約１０週、約１１週、約１２週、約１３週、約１４週、約１５週、約１６週、約１７週、約１８週、約１９週、約２０週、約２１週、約２２週、約２３週、約２４週、約２５週、約２６週、約２７週、約２８週、約２９週、約３０週、約３１週、約３２週、約３３週、約３４週、約３５週、約３６週、約３７週、約３８週、約３９週、約４０週、約４１週、約４２週、約４３週、約４４週、約４５週、約４６週、約４７週、約４８週、約４９週、約５０週、約５１週、約５２週、約１．５

年、約２年、約２．５年、約３．０年、約３．５年、約４．０年、約４．５年、約５．０年、約５．５年、約６．０年、約６．５年、約７．０年、約７．５年、約８．０年、約８．５年、約９．０年、約９．５年、または約１０．０年）である。そして、同様に、最初のアッセイは、より長い時間枠の範囲内、例えば、疾患または状態の開始の約数時間、数日間、数ヶ月、または数年内に、概ね実施される。

【０２７７】

さらにまた、上記のアッセイは、対象から得られる第１の試験試料を用いて実行され得る。ここで、第１の試験試料は、１つの供給源（例えば尿、血清、または血漿）から得られる。任意選択で、上記のアッセイは、続いて、対象から得られる第２の試験試料を用いて繰り返され得る。ここで、第２の試験試料は、別の供給源から得られる。例えば、第１の試験試料が尿から得られる場合、第２の試験試料は血清または血漿から得られ得る。第１の試験試料と第２の試験試料とを用いるアッセイから得られる結果を比較することができる。この比較を用いて、対象での疾患または症状の状態を評価することができる。

【０２７８】

ｅ．対象が疾患に罹りやすいかどうか、または、疾患に罹患しているかどうかを決定する方法

さらに、本明細書に記載される方法は、疾患（例えば、本明細書で議論され、かつ当技術分野で既知の肝臓疾患またはがん）に罹患しやすい、または罹患している対象が処置から利益を受けられるかどうかについても決定されるべく、使用され得る。より詳しくは、本開示はＧＰ７３コンパニオン診断の方法および製品に関する。したがって、本明細書中に記載される「対象での疾患の処置をモニターする」方法もまた、肝臓切除術および肝移植などの肝臓疾患処置、または、外科手術、放射線療法、標的治療および化学療法などのがん処置の候補を選択または同定することも、さらに最適に包含し得る。

【０２７９】

ｆ．対象が医薬組成物の投与に応答しているかを決定する方法

また、本明細書中に記載される方法は、上記した抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて、対象中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定することによって、対象が１種以上の医薬組成物の投与に応答しているかを決定するべく、使用され得る。方法は、ＧＰ７３またはフコシル化Ｇ７３のレベルは、１種以上の医薬組成物による対象の処置の前または後に評価される（例えば、特に、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３が関わる作用の機序に関連した医薬で）、あるいは、ＧＰ７３のレベルがそのような処置の後に評価され、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度またはレベルが所定のレベルと比較される、本明細書中に記載のアッセイを任意選択で含む。処置の後に観察されるＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の量の好適ではない濃度によって、さらなる処置を受けることまたは続けて処置を受けることの利益を対象が受けないことが確認される。一方、処置の後に観察される好適ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度または量によって、対象がさらなる処置を受けること、または、続けて処置を受けることの利益を対象が受けることが確認される。この確認は、臨床試験の管理と改善された患者ケアの提供とによって、支えられる。

【０２８０】

本方法は、（ａ）対象から生体試料を得る工程と、（ｂ）上記抗ＧＰ７３抗体またはその抗体断片を用いて生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを決定する工程と、（ｃ）生体試料中のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルをＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の基準レベルと比較し、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度を変えると、１種以上の医薬組成物の投与に対して対象が応答しないことが示される、工程と、（ｄ）１種以上の医薬組成物の投与に対して対象が応答しない場合に、対象の処置を調整する工程を含む。

【０２８１】

６．複数のバイオマーカーの併用

上記の抗体および方法は、疾患に特異的な１種以上のバイオマーカーまたはイムノアッ

セイとを併用して、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルまたは濃度を検出および測定するべく、使用されてもよい。ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３と、疾患に特異的な１種以上のバイオマーカーまたはイムノアッセイとの併用は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の測定単独と比較して、健常対照群と疾患罹患個体群との間をより大きく識別することが可能である。例えば、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３と新たな肝臓疾患バイオマーカーとのパネルを測定することは、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３単独のパネルと比較して、健常対照群と疾患罹患個体群との間をより大きく識別することが可能である。ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３と少なくとも１種以上のバイオマーカーとの併用は、健常対照群と肝臓疾患罹患個体群および／またはがん罹患個体群との間をより大きく識別することが可能である。

【０２８２】

１種以上のバイオマーカーの例として、ビタミンＫまたはアンタゴニストＩＩ（ＰＩＶＫＡ－ＩＩ）、α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）、ＡＦＰ－Ｌ３、凝血酵素（ＨＰＸ）、フコシル化凝血酵素（Ｆｕｃ－ＨＰＸ）、フコシル化キニノーゲン（Ｆｃ－Ｋｉｎ）、およびフコシル化ａ－１－抗トリプシン（Ｆ－ＡＴ）の欠損によって誘導されるタンパク質が挙げられる。

【０２８３】

ａ．ＰＩＶＫＡ－ＩＩ

ビタミンＫまたはアンタゴニスト－ＩＩ（ＰＩＶＫＡ－ＩＩ）（別名デス－ｇ－カルボキシプロトロンビン（ＤＣＰ））の欠損によって誘導されるタンパク質は、凝固タンパク質（プロトロンビン）の異常型であり、有害転帰の予測と早期再発および潜在的悪性病変の検出とを行うべく、日本ではＨＣＣ処置の過程およびその後にＡＦＰによって幅広く使用されている。ＰＩＶＫＡ－ＩＩは、ＨＣＣ（例えば肝硬変）の危険因子に対する感受性がわずかであることから、ＨＣＣの予測に最も有用である。それは、ＨＣＣと非悪性肝臓疾患とを区別する。しかしながら、肝内胆汁鬱滞に起因して、あるいは、長期にわたってビタミンＫ欠乏症である個体、および、ワーファリンまたは広範囲抗生物質を摂取している個体でビタミンＫの作用が損なわれる条件下で、重篤な閉塞性黄疸患者でＰＩＶＫＡ－ＩＩ濃度の見せかけの増加が見られる。

【０２８４】

ｂ．ＡＦＰ

アルファ胎児タンパク質（ＡＦＰ）（別名α－フェトプロテイン、アルファ－１－フェトプロテイン、およびアルファ－フェトグロブリン）は、ヒトにおけるＡＦＰ遺伝子によってコードされるタンパク質である。ＡＦＰは、ＨＣＣのリスクが高い患者をスクリーニングするために、早期再発を検出するべく超音波と併用してＨＣＣ患者の診断およびモニタリングのために、治療に対する応答をモニターするために、ならびに、早期再発を検出するために、世界的規模で臨床診療において幅広く使われている。しかしながら、ＡＦＰは、他の肝臓疾患を含む多くの状況下で生じ得るもので、偽陽性をもたらし、すべてのＨＣＣ患者には存在しない。

【０２８５】

ＡＦＰ（ＡＦＰ－Ｌ３）のレンズ・キュリナリス（Ｌｅｎｓ　ｃｕｌｉｎａｒｉｓ）赤血球凝集素反応画分はＡＦＰのフコシル化された糖型であり、これはＨＣＣの生物学的悪性度の程度を示すマーカーとして用いられる可能性がある。ＡＦＰ－Ｌ３アッセイは、ＡＦＰより高いその特異性のため、ＨＣＣの診断について米国食品医薬品局の承認を得もした。

【０２８６】

ｃ．ＨＰＸ

ベーター１Ｂ－糖タンパク質としても知られている凝血酵素（ＨＰＸ）は、ＨＰＸ遺伝子によってコードされる。ＨＰＸは、主に肝臓で発現され、ヒト血清中に豊富に存在する急性期タンパク質である。ＨＰＸは、あらゆる既知のタンパク質の最も高い親和性を持つヘムと結合する。その機能は、ヘモグロビンなどのヘムタンパク質の代謝回転によって放

出されるか失われるヘムを除去することであり、それにより、遊離ヘムが生じ得る酸化損傷から体を保護する。また、ＨＰＸは、肝細胞の表面に位置する特異的受容体と相互作用すると即座に、内在化のためのその結合リガンドを放す。ＨＰＸのこの機能は、体の鉄分を維持するためのものである。このタンパク質は、アクセプター配列（Ａｓｎ－Ｘ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ）にN連結している５つのグルコサミンオリゴ糖類を有する。フコシル化ＨＰＸ（Ｆｕｃ－ＨＰＸ）はヒト血清中のＨＰＸの２つのコアフコシル化部位を有し、それらはプロテオミクスのアプローチを用いて同定された。フコシル化凝結酵素（Ｆｕｃ－ＨＰＸ）は、レンズ・キュリナリス赤血球凝集素レクチン結合血清画分のＦｕｃ－ＨＰＸのレベルが小さな試料セットを用いた研究においてＨＣＣに関する良好な診断正確性を示したことから、ＨＣＣの潜在的バイオマーカーであると考えられる。

【０２８７】

ｄ．血清糖タンパク質

グリコシル化の変化は肝硬変の発症に関連しており、ＨＣＣが報告されている。血清糖タンパク質のグリコシル化の変化には、例えばフコシル化キニノーゲン（Ｆｃ－ｋｉｎ）およびフコシル化ａ１抗トリプシン（Ｆ－ＡＴ）があり、これらは、単独使用または他のＨＣＣマーカーとの併用の際の潜在的バイオマーカーであると思われる。

【０２８８】

７．肝臓疾患に罹患した対象の処置

上で議論した値に等しいかそれ超のＧＰ７３レベルを有している上記の方法で同定された対象は、肝臓疾患を罹患している患者と同定される。対象は、続いて肝臓疾患の処置を受ける。肝臓疾患の処置は、小分子ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３阻害剤と抗ＧＰ７３中和抗体とを含むものであってもよい。

【０２８９】

ａ．肝硬変

上で議論した値に等しいかそれ超のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを有している上記の方法で同定された対象は、肝硬変を罹患している患者と同定される。対象は、続いて肝硬変の処置を受ける。処置として、低ナトリウム食、投薬、外科手術（例えば、肝移植、タンパク質（アルブミン）輸液ありなしでの穿開術、内視鏡静脈瘤バンディングまたは硬化療法、バルーンタンポン法、経頸静脈肝内門脈静脈短絡術（ＴＩＰＳ））、アルコールの回避、鎮静薬（例えば睡眠薬、抗不安剤、および麻薬）の回避、ならびに非ステロイド系抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）（例えばアスピリン、イブプロフェンとナプロキセン）の回避を挙げることが可能である。薬物の例として、ＧＰ７３阻害剤、利尿薬（例えばスピロノラクトンとフロセミド）、抗生物質（例えばシプロフロキサシン、ネオマイシンまたはメトロニダゾール（Ｆｌａｇｙｌ）、およびセホタキシム）、β遮断薬（例えばプロプラノロールおよびナドロール）、血管収縮薬（例えばオクトレオチド、ラクツロース）免疫抑制薬（例えばプレドニゾンおよびアザチオプリン、ウルソデオキシコール酸（ＵＤＣＡ；ウルソジオール（Ａｃｔｉｇａｌｌ）、コルヒチン、メトトレキサート、エリスロポエチンおよびエポエチンアルファ（Ｅｐｏｇｅｎ、Ｐｒｏｃｒｉｔ））を挙げることが可能である。

【０２９０】

ｂ．肝臓がん

上で議論した値に等しいかそれ超のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを有している上記の方法で同定された対象は、肝臓がんを罹患している患者と同定される。対象は、続いて肝臓がんの処置を受ける。処置として、肝移植ありまたはなしのがんの外科的除去（肝臓切除術）、化学療法（例えば、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、タモキシフェン（Ｎｏｌｖａｄｅｘ）、オクトレオチド（Ｓａｎｄｏｓｔａｔｉｎ）、ゲムシタビン、シスプラチン、およびオキサリプラチン）、生物学的療法（例えば、ベバシズマブ、化学塞栓法（経動脈的化学塞栓またはＴＡＣＥ）、放射線塞栓形成法（選択的な体内の放射線治療；「ＳＩＲＴ」））、アブレーション（例えば高周波アブレーション（ＲＦＡ）治療、経皮エタノール（アルコール）注入、および

冷凍切除）、定位的放射線外科療法、ならびに陽子線治療を挙げることが可能である。処置には、血管新生経路の構成要素をブロックする薬物（例えば、ソラフェニブ（Ｎｅｘａｖａｒ））も含まれてもよい。処置は、ＧＰ７３阻害剤も含まれてもよい。薬物は、肝動脈または門静脈を経て送達されてもよい。

【０２９１】

８．がんに罹患した対象の処置

上で議論した値に等しいかそれ超のＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３のレベルを有している上記の方法で同定された対象は、がん罹患患者と同定される。対象は、続いてがんの処置を受ける。がんの処置として、外科手術、化学療法、放射線療法、小分子ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３阻害剤および／あるいはＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３阻害剤を挙げることが可能である。

【０２９２】

９．キット

本明細書中で提供されるものは、キットである。このキットは、ＧＰ７３またはＧＰ７３断片あるいはフコシル化ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３断片について、試験試料をアッセイするために用いられてもよい。キットは、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３について試験試料をアッセイするための少なくとも１つの構成要素と、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３について試験試料をアッセイするための説明書を含む。例えば、キットは、イムノアッセイ（例えば、化学発光微粒子イムノアッセイ）によってＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３について試験試料をアッセイするための説明書を含み得る。キットに含まれる説明書は、梱包物に添付されたもの、または添付文書として含まれるものとすることができる。説明書は典型的には書き込みされたものまたは印刷物であるが、それに限定されない。そのような説明書を格納可能で、かつ説明書をエンドユーザーに伝えることが可能ないかなる媒体も、本開示により企図される。そのような媒体として、限定されるものではないが、電子記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学式媒体（例えば、ＣＤ　ＲＯＭ）などが挙げられる。本明細書中に使用されるように、「説明書」という用語は、説明書を提供するインターネットサイトのアドレスを含むことができる。

【０２９３】

少なくとも１つの構成要素は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３に特異的に結合する１つ以上の単離抗体またはその抗体断片を含む少なくとも１つの組成物を含んでもよい。抗体は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３捕捉抗体および／あるいはＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３検出抗体であってもよい。抗体は、１Ａ－４２４６抗体、１Ｂ－４８６３抗体、またはその抗体断片を含んでもよい。抗体は、任意選択で検出可能に標識されている。

【０２９４】

二者択一的に、または、さらに加えて、キットは、較正物質または対照、例えば、精製され、任意選択で凍結乾燥された、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３、および／あるいは、アッセイを実施するための少なくとも１つの容器（例えば、試験管、マイクロタイタープレート、またはストリップであり、抗ＧＰ７３モノクローナル抗体ですでに被覆され得る）、および／あるいは、アッセイ緩衝液または洗浄緩衝液などで、そのうちの１つが濃縮溶液、検出可能な標識の基質溶液（例えば、酵素標識）、または停止溶液として提供され得る、緩衝液を、含み得る。好ましくは、キットは、アッセイを実行するのに必要である、すべての構成要素、すなわち、試薬、標準物質、緩衝液、希釈剤、その他を含む。説明書も、標準曲線を生成するための説明書を含むことができる。

【０２９５】

キットは、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を定量化するために、参照標準品を、さらに含んでもよい。参照標準品は、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３濃度の補間および／または外挿のための標準曲線を確立するために、使用されてもよい。参照標準品は、高いＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３濃度レベル（例えば、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１２

５ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、約１７５ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約２２５ｎｇ／ｍＬ、約２５０ｎｇ／ｍＬ、約２７５ｎｇ／ｍＬ、または約３００ｎｇ／ｍＬ）、中位ＧＰ７３濃度レベル（例えば、約２５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約４５ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７５ｎｇ／ｍＬ、または約１００ｎｇ／ｍＬ）、および／あるいは低いＧＰ７３濃度レベル（例えば、約１ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１２．５ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、または約２５ｎｇ／ｍＬ）を、含んでもよい。

【０２９６】

キットに提供される任意の抗体、例えばＧＰ７３に特異的な組換え抗体は、検出可能な標識、例えば蛍光体、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、またはその他を取り込むことができ、あるいは、キットは、抗体（例えば、検出抗体）を検出するための抗体もしくは試薬を標識するための、および／または、分析物を検出するための分析物もしくは試薬を標識するための、試薬を含み得る。抗体、較正物質および／または対照を、別々に容器に入れることができ、あるいは、適当なアッセイフォーマット、例えば、マイクロタイタープレートに、事前に分配することができる。

【０２９７】

任意選択で、キットは品質管理構成要素（例えば、感受性パネル、較正物質、および正の対照）を含む。品質管理試薬の調製は、当技術分野で周知であり、種々の免疫診断の製品のための挿入シート上に説明される。感受性パネルの構成要素は、アッセイ性能特性を確立するために、任意選択で用いられ、そして、さらには任意選択でイムノアッセイキット試薬の完全性とアッセイの標準化との有用な指標である。

【０２９８】

キットは、診断検査法を行うか、品質管理評価（例えば緩衝液、塩類、酵素、酵素コファクター、基質、検出試薬、およびその他）を容易にするために要求される他の試薬を任意選択で含むこともできる。また、他の構成要素（例えば、試験試料の単離および／または処置のための緩衝液および溶液（例えば、処理前の試薬））も、キットに含まれることができる。キットは、１つ以上の他の対照をさらに含むことができる。キットの構成要素の１つ以上は凍結乾燥されることができる、その場合には、キットは凍結乾燥された構成要素の再形成に適した試薬を更に含むことができる。

【０２９９】

キットの種々の構成要素は、任意選択で、マイクロタイタープレートなど、必要に応じて適当な容器に入れられて提供される。キットは、試料を保持するか、格納するために、容器をさらに含むことができる（例えば、尿、血漿、または血清試料のための容器またはカートリッジ）。必要に応じて、キットは、反応容器、混合容器、および試薬または試験試料の調製を容易にする他の構成要素を任意選択で含むこともできる。キットは、試験試料の採取を補助する１つ以上の器具、例えばシリンジ、ピペット、鉗子、計量スプーン、またはその他を含んでもよい。

【０３００】

検出可能な標識が少なくとも１つのアクリジニウム化合物である場合、キットは少なくとも１つのアクリジニウム－９－カルボキサミド、少なくとも１つのアクリジニウム－９－カルボキシレートアリールエステル、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。検出可能な標識が少なくとも１つのアクリジニウム化合物である場合、キットは、過酸化水素の供給源、例えば緩衝液、溶液、および／または少なくとも１つの塩基性溶液を含むことができる。必要に応じて、キットは、磁粉、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、フィルム、ろ過紙、ディスク、またはチップなどの固相を含むことができる。

【０３０１】

必要に応じて、キットは、バイオマーカー、例えば肝臓疾患または肝臓障害のバイオマーカーであり得る別の分析物の試験試料をアッセイするために、１つ以上の構成要素を、単独またはさらに説明書と組み合わせて、さらに含むことができる。

【０３０２】
ａ．キットおよび方法の適合
本明細書中に記載されるイムノアッセイによる試験試料に含まれるＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の濃度を測定するためのキット（またはその構成要素）、ならびに方法とは、例えば、米国特許第５，０８９，４２４号および第５，００６，３０９号に記載されているような、および、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）によってＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）として市販されているような様々な自動化および半自動化されたシステムで（例えば、固相が微粒子を含むようなものが含まれる）の使用に、適合させることができる。
【０３０３】
非自動化システム（例えば、ＥＬＩＳＡ）と比較して自動化または半自動化システム間の違いの一部として、第１の特異的結合パートナー（例えば、分析物抗体または捕捉抗体）が結合している基質（サンドイッチ形成と分析物反応性に影響を及ぼし得る）、捕捉、検出、および／またはいずれかの任意選択の洗浄工程の長さとタイミングを含む。ＥＬＩＳＡなどの非自動化フォーマットは試料および捕捉試薬とのインキュベーション時間が相対的に長いこと（例えば、約２時間）を必要とするが、自動化または半自動化フォーマット（例えば、ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）と任意の後継プラットフォーム、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）は、相対的に短いインキュベーション時間を有することが可能である（例えば、ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）の場合、およそ１８分）。同様に、ＥＬＩＳＡのような非自動化フォーマットは、相対的により長いインキュベーション時間（例えば、約２時間）用のコンジュゲート試薬などの検出抗体を、インキュベートする場合があるのに対して、自動化または半自動化フォーマット（例えば、ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）および任意の後続プラットフォーム）では、インキュベーション時間が相対的に短くてもよい（例えば、ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）および任意の後続プラットフォームではおよそ４分）。
【０３０４】
Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから入手可能な他のプラットフォームとして、限定されるものではないが、他のプラットフォームとともに、ＡｘＳＹＭ（登録商標）、ＩＭｘ（登録商標）（例えば、全体が参照として本明細書に援用される米国特許第５，２９４，４０４号を参照）、ＰＲＩＳＭ（登録商標）、ＥＩＡ（ビーズ）、およびＱｕａｎｔｕｍ（商標）ＩＩが挙げられる。さらに、アッセイ、キット、およびキット構成要素は、他のフォーマット、例えば電気化学的または他のハンドヘルドもしくはポイントオブケアアッセイシステムで、用いられ得る。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ポイントオブケア（ｉ－ＳＴＡＴ（登録商標）、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）電気化学イムノアッセイシステムに適用可能である。免疫センサーならびにその製造方法および使い捨ての試験装置での操作は、例えば、米国特許第５，０６３，０８１号、米国特許出願公開第２００３／０１７０８８１号、米国特許出願公開第２００４／００１８５７７号、米国特許出願公開第２００５／００５４０７８号、および米国特許出願公開第２００６／０１６０１６４号に記載されており、これらに対する教示内容の全体を参照として本明細書に援用する。
【０３０５】
より具体的には、Ｉ－ＳＴＡＴ（登録商標）システムへのアッセイの適合に関して、以下の構成が好ましい。微細作製されたシリコンチップは、一対の金の電流測定作用電極と銀塩化銀基準電極とにより製造されている。作用電極の１つの上で、固定捕捉抗体を有するポリスチレンビーズ（直径０．２ｍｍ）を、電極上にパターニングされたポリビニルアルコールからなるポリマーコーティングに対して、付着させる。このチップを、イムノアッセイに適したフルイディクスフォーマットのＩ－ＳＴＡＴ（登録商標）カートリッジに組み入れる。カートリッジの試料保持チェンバーの壁部の一部分に、アルカリホスファターゼ（または他の標識）で標識した検出抗体を含む層がある。カードリッジの流体袋内に、ｐ－アミノフェノールホスフェートを含む水性試薬がある。

【０３０６】
操作において、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３を含むと疑われる試料を試験カートリッジの保持チェンバーに添加し、カートリッジをＩ－ＳＴＡＴ（登録商標）リーダーに挿入する。第２抗体（検出抗体）が試料に溶け込んだ後、チップを含んでいる導管に、カートリッジ内のポンプ要素が試料を圧入する。ここで、振動させることで、第１の捕捉抗体、ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３、および標識第２検出抗体の間にサンドイッチを形成するのを促進させる。アッセイの最後から２番目のステップでは、液体を袋から強制的に出して導管に入れ、チップから試料を洗い落とし、廃棄物チェンバーに入れる。アッセイの最終ステップでは、アルカリホスファターゼ標識をｐ－アミノフェノールホスフェートと反応させてリン酸基を切断し、遊離ｐ－アミノフェノールが作用電極で電気化学的に酸化されるのを可能にする。測定された電流に基づいて、リーダーは埋め込みアルゴリズムと工場出荷時に決定された較正曲線とを使用して、試料に含まれる分析物ＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の量を計算することが可能である。

【０３０７】
本明細書中に記載した方法およびキットは、必要に応じて，イムノアッセイを実施する他の試薬と方法とを含む。例えば、含まれるものには、様々な緩衝液、例えば、当技術分野で知られたもの、および／または、例えば、洗浄用、コンジュゲート希釈剤および／もしくは較正物質希釈剤として容易に調製もしくは使用のために最適化され得るものである。例示的なコンジュゲート希釈剤は、特定のキットで用いられるＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）コンジュゲート希釈剤（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）であり、これには２－（Ｎ－モノホリノ）エンタンスルホン酸（ＭＥＳ）、塩、タンパク質阻害剤、抗微生物剤、および界面活性剤が含まれる。例示的な較正物質希釈剤は、特定のキットで用いられるＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）ヒト較正物質希釈剤（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）であり、これには、ＭＥＳ、他の塩、タンパク質阻害剤、および抗微生物剤を含む緩衝液が含まれる。さらに、２００８年１２月３１日に出願された米国特許出願公開第６１／１４２，０４８号に記載されるように、改善されたシグナル生成が、例えばＩ－ＳＴＡＴ（登録商標）カートリッジフォーマットで、シグナル増幅剤としてのシグナル抗体に連結した核酸配列を用いて、得られる。

【０３０８】
本明細書中の特定の実施形態が疾患（例えば肝臓疾患またはがん）の評価に使用される場合に有益である一方で、アッセイおよびキットも、任意選択で必要に応じて、他の疾患、障害、および状態におけるＧＰ７３の評価に用いられ得る。

【０３０９】
またアッセイ方法は、肝臓疾患またはがんなどの疾患を改善する化合物を同定するために使用され得る。例えば、ＧＰ７３を発現する細胞は、候補化合物と接触され得る。化合物と接触した細胞でのＧＰ７３またはフコシル化ＧＰ７３の発現レベルを、本明細書中に記載したアッセイの方法を用いて対照細胞のものと比較することができる。

【０３１０】
本発明は、以下の非限定的な実施例によって例示される、複数の態様を有する。

【実施例】

【０３１１】
本明細書中に記載の本開示の方法の他の適切な改変および適合が、容易に適用かつ評価されること、ならびに、本開示の範囲または本明細書中に開示された態様および実施形態から逸脱することなく適切な等価物を使用することで実施されることが、当業者には容易に明らかであろう。今や本開示が詳細に記載されたが、以下の複数の実施例を参照することにより、同じことがよりいっそう明確に理解されよう。それらの実施例は、単に本開示のいくつかの態様および実施形態を例示することを意図しており、本開示の範囲を限定するものと見なされるべきではない。本明細書中に言及されるすべての学術誌参考文献、米国特許、および刊行物の開示は、全体として参照によって本明細書中に援用される。

【０３１２】
本発明は、複数の態様を有し、以下の非限定的な実施例によって例示される。
【０３１３】
［実施例１］
ヒトＧＰ７３遺伝子発現
ヒトＧＰ７３タンパク質（別名ＧＯＬＭ１、ＧＯＬＰＨ２）は、シスゴルジ膜の４００アミノ酸（４５．２ｋＤａ）内在性タンパク質である。ＧｅｎＢａｎｋ配列ＡＡＦ４４６６３．１（配列番号９７）に基づいたヒトＧＰ７３（アミノ酸６３－４００）を合成し、発現のために、ｐＥＴベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ）にクローニングした。６ｘＨｉｓ Ｔａｇを、精製のために、Ｃ末端で融合させた。最終的なプラスミドｐＥＴ－ＧＰ７３（配列番号９８、図１を参照）をＢＬ２１（ＤＥ３）細胞に形質転換し、３０℃、４時間で１ｍＭＩＰＴＧによって誘導した。誘導されたＥ・コリ細胞を２０分間、３，９００ｒｐｍで遠心分離し、ＰＢＳで１回洗浄した。洗浄細胞ペレットを、１グラムの細胞ペレットあたり約５ｍＬのＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（登録商標）タンパク質抽出試薬（Ｎｏｖａｇｅｎ）で、再懸濁した。細胞懸濁液を、穏やかに振とうしながら、室温で３０分間、インキュベートした。ライセートを、４℃で２０分間、１，４０００ｒｐｍで遠心分離した。製造元の説明書に従ってニッケルアフィニティーカラムクロマトグラフィー（Ｎｏｖａｇｅｎ）を使用して、上清を精製した。
【０３１４】
さらに、洗浄細胞ペレットを、プロテアーゼ阻害剤（Ｓｉｇｍａ）を含む１×Ｈｉｓ結合緩衝液（Ｎｏｖａｇｅｎ）に溶解し、氷浴中、パルスの間に３０秒の休みを設けて５ｘ１０秒間パルスで超音波処理した。ライセートを、４℃で２０分間、１４，０００ｒｐｍで遠心分離した。製造元の説明書に従ってニッケルアフィニティーカラムクロマトグラフィー（Ｎｏｖａｇｅｎ）を使用して、上清を精製した。
【０３１５】
ヒトＧＰ７３（アミノ酸６３－４００）を、ｐＦｕｓｅ－ｈＩｇＧ１－Ｆｃベクター（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ）にもクローニングした。ヒトＦｃ領域をＣ末端で融合させて、ＧＰ７３－ｈＦｃ（ヒトＩｇＧの断片結晶領域に連結したＧＰ７３；配列番号９９、図２を参照）を生成した。最終的なプラスミドＤＮＡ ｐＦｕｓｅ－ＧＰ７３－Ｆｃを、直鎖状ポリエチレンイミン（ＰＥＩ、ＭＷ２５ｋＤａ）（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ， Ｉｎｃ．）を用いて、ＨＥＫ２９３Ｆ、ＣＨＯ、またはＨｅｐＧ２細胞にトランスフェクトさせた。５日間培養した後、上清を、２０分間、１，０００ｒｐｍの遠心分離によって回収し、その後、ろ過（０．２ミクロンフィルター）した。回収された上清は、製造元（ＧＥ ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）の説明書に従ってプロテインＧカラムクロマトグラフィーによって、精製した。
【０３１６】
［実施例２］
動物の免疫化
完全または不完全Ａｄｊｕｌｉｔｅフロイントアジュバント（Ｐａｃｉｆｉｃ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｒａｍｏｎａ、ＣＡ）で乳化された２０μｇの精製ＧＰ７３－ｈＦｃ（実施例１に記載）を７週ごとに用いて、雌のＣＡＦ１／ＪおよびＲＢＦ／ＤｎＪマウス（両方ともＴｈｅ Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｂａｒ Ｈａｒｂｏｒ、Ｍａｉｎｅから入手）を２回免疫化した。完全フロイントアジュバントは一次免疫化用に用い、不完全フロイントアジュバントは二次免疫化に用いた。各々の接種材料を、最初に、滅菌生理的食塩水（０．９％塩化ナトリウム、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で、ＧＰ７３－ｈＦｃを適当な濃度に希釈し、等量のアジュバントを添加し、次に、濃くて安定なエマルジョンが形成されるまで、３方活栓を介して２本のシリンジ間を往復させることで、混合することによって、調製した。二次免疫化の１０－１４日後、血清試料を採取した。Ｂ細胞回収の４日前および３日前に、滅菌生理的食塩水で希釈した３５μｇのＧＰ７３－ｈＦｃを、ＲＢＦ／ＤｎＪマウスに投与した。この接種材料は、脾臓近傍の体

腔に送達された。Ｂ細胞回収の３日前に、滅菌生理的食塩水で希釈した５０μｇのＧＰ７３－ｈＦｃを、ＣＡＦ１／Ｊマウスに投与した。この接種材料もまた、脾臓近傍の体腔にも送達された。

【０３１７】

［実施例３］

抗原反応性に関するマウス血清のスクリーニング

血清試料を、溶液相ＧＰ７３－ｈＦｃに対する反応性について、９６穴マイクロタイター酵素イムノアッセイ（ＥＩＡ）で試験した。リン酸緩衝生理的食塩水（ＰＢＳ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で２μｇ／ｍＬに希釈した１００μＬ／ウェルのヒツジ抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ特異抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ、ＰＡ）により、アッセイプレート（ＮＵＮＣ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｎａｐｅｒｖｉｌｌｅ、ＩＬ）を被覆した。プレートを一晩インキュベートし、捕捉抗体を除去し、２００μＬ／ウェルのブロッキング溶液を添加した（３％ｗ／ｖ［重量／容量］牛血清アルブミン（ＢＳＡ）および０．５％ｖ／ｖ［容量／容量］ポリソルベート－ＰＢＳで２０倍希釈（すべてＡｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ））。プレートを約３０分間インキュベートし、次に蒸留水（ｄＨ$_2$Ｏ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で洗った。マウス血清または正の対照の段階希釈（ブロック溶液中）をアッセイプレートに添加し（１００μＬ／ウェル）、約６０分間インキュベートし、続いてｄＨ$_2$Ｏで洗った。ブロッキングをさらに行うために、１００μＬ／ウェルの正常血清溶液（ＮＳＳ：２％ｖ／ｖ正常マウス血清を含むブロッキング溶液）を添加した。この溶液は、アッセイウェル内の非特異的結合が妨げられるのを促す。このプレートを約３０分間インキュベートし、続いてｄＨ$_2$Ｏで洗った。その後、短時間インキュベートするために、５００ｎｇ／ｍＬのＧＰ７３－ｈＦｃ溶液を１００μＬ／ウェルでアッセイウェルに添加した。その後、プレートをｄＨ$_2$Ｏで洗った。ＮＳＳで５００ｎｇ／ｍＬに希釈したウサギ抗ＧＰ７３抗体（（Ｄｒｅｘｅｌ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ）をすべてのアッセイウェルに添加した（１００μＬ／ウェル）。これらを３０分間インキュベートし、その後、ｄＨ$_2$Ｏで洗った。次に、ＮＳＳで２００ｎｇ／ｍＬに希釈した１００μＬの西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を添加して約３０分間インキュベートし、続いてプレートを洗った。ｏ－フェニレンジアミン（ＯＰＤ）基質（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を色原体として使用してシグナルを発生させ、１Ｎ硫酸（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を用いて反応をクエンチした。４９２ｎｍの波長でシグナルを読み取った。

【０３１８】

［実施例４］

相対的親和性に関するマウス血清のスクリーニング

抗原の限界濃度に対する反応性について試料を試験して、ＧＰ７３－ｈＦｃ抗原に対する各血清試料の相対的親和性を決定した。マウス血清試験試料の段階希釈を調製する代わりに一括して各試料を単一希釈で調製した点を除いて、アッセイフォーマットを上記のものと同じにした。さらに、ＧＰ７３－ｈＦｃ抗原を様々な濃度で調べ、ＮＳＳ中２０００ｎｇ／ｍＬで開始し、その後、同様にＮＳＳ中１０ｌｏｇ３希釈とした。結合曲線を作成し、そして相対的親和性を決定した。これらの結果に基づいて、ＣＡＦ１／Ｊマウス（「マウス＃４５８」）およびＲＢＦ／ＤｎＪマウス（「マウス＃５０１」）をＢ細胞融合用に選択した。

【０３１９】

［実施例５］

マウス脾細胞融合

融合の日に、マウスを安楽死させ、抗ＧＰ７３脾細胞を含む脾臓を回収し、Ｐｅｎ　Ｓｔｒｅｐ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）添加ハイブリドーマ無血清培地（ＨＳＦＭ）に入れた。ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ（Ｎａｔｕｒｅ（１９７５）２５６：４９５－７）の記載どおりに、細胞融合を実行した。各マウス脾臓を別々

のＨＳＦＭ含有ペトリ皿に入れた。脾臓細胞を、ＨＳＦＭを含むシリンジおよび細胞スクレーパーを用いて各脾臓から脾細胞を灌流し、次いで、血球計を用いてカウントした。マウス＃４５８由来の約３．９×１０^{7}の脾細胞を、融合１Ａ用に５０ｍＬ遠心管に単離し、マウス＃５０１由来の３．８×１０^{7}の脾細胞を、融合１Ｂ用に５０ｍＬの遠心管に単離した。各マウス由来の脾細胞を遠心分離によって洗って細胞ペレットにし、ＨＳＦＭに再懸濁した。これらの脾細胞を等しい数のＮＳ／０骨髄腫細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）と混合し、遠心分離してペレットにした。融合は、脾細胞とＮＳ／０細胞とを５０％ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）（ＭＷ１３００－１６００）含有ＨＳＦＭに曝露することで、達成された。１ｍＬのＰＥＧ溶液を３０秒かけて各々の細胞ペレットに添加し、さらに１分間インキュベートした。３０ｍＬのＨＳＦＭを３０秒かけてＰＥＧおよび細胞ペレットにゆっくり添加して希釈した。次に、融合細胞を遠心分離によって懸濁液から除去し、上清をデカントした。約１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）（Ｈｙｃｌｏｎｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、ＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）（Ｓｉｇｍａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、ＨＴサプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）、ＢＭ　コンディムドＨ１（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）、コレステロール、およびＬ－グルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を添加した約３００ｍＬのＨＳＦＭに、各々の融合に由来する細胞ペレットを再懸濁して、ハイブリドーマの選択を行った。融合細胞を、２．５×１０^{5}細胞／ｍＬの近似密度でＴ１６２培養フラスコに播種し、約４８時間にわたって３７℃、５％ＣＯ２でバルク培養した。ＨＡＴ選択の４８時間後、バルク培養を遠心分離し、ペレットを半固体組織培養培地に再懸濁した。半固体組織培養培地は、２×ＩＭＤＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）とＣｌｏｎｅＭａｔｒｉｘ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）との５０％混合物であり、１０％ＦＢＳ、ＨＴサプリメント、Ｐｅｎｎ／Ｓｔｒｅｐ、Ｌ－グルタミン、および５μｇ／ｍＬのＣｌｏｎｅＤｅｔｅｃｔ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）溶液が添加されている。半固体培養プレートによって、ＣｌｏｎｅｐｉｘＦＬ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）上のコロニー選択前に７－１０日間のインキュベートが可能になった。それを惹起している単一の細胞が移動して、増殖の間、他の細胞と混ざることは許されなかったので、半流動培地で大きくなるコロニーはクローンと考えられた。目的の細胞株すべてをサブクローニングし、クローン性を確保した。免疫沈降反応は、コロニーによって産生された抗体と蛍光を発するヤギ抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ－ＦＩＴＣとの間で、生じる。観察された蛍光シグナルがより輝くほど、抗体がより多く産生される。コロニーの蛍光に関する分析はＣｌｏｎｅｐｉｘＦＬ上で行い、最も輝く蛍光シグナルを有するものを選択して、１０％ＦＢＳおよびＬ－グルタミンとともにＨＳＦＭを含む９６穴組織培養プレートへ自動的に移送するものとした。９６穴組織培養プレートは、抗体産生に関する上清スクリーニングに先立って、３７℃での３から５日間の増殖を可能にした。

【０３２０】

［実施例６］

ハイブリドーマスクリーニングと選択

細胞上清試料を、ＥＩＡによって抗ＧＰ７３抗体について分析した。ヒツジ抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を１μｇ／ｍＬで、９６穴マイクロタイターＥＩＡプレートに被覆した。捕捉試薬で固相を被覆した後、それを取り除いてプレートをＢＳＡ／ＰＢＳブロッキング溶液を用いてブロックした。ウェルを蒸留水で洗浄し、細胞上清をブロックされたプレートに添加し、少なくとも１時間、室温でインキュベートした。マウスモノクローナル抗体１４Ｈ４－２３（（Ｄｒｅｘｅｌ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ）を正の対照として用いた。抗マウスＩｇＧ　Ｆｃは、上清から抗ＧＰ７３マウス抗体を捕捉した。インキュベーション後、蒸留水を用いて上清を洗い落とした。無関係なマウス－ヒトキメラ抗体をすべてのウェルに加えて、室温で３０分間インキュベートし、ＧＰ７３抗原に連結したヒトＩｇＧ　Ｆｃ融合タンパク質と反応するいっさいの捕捉マウス抗体をブロックした。ウェルを蒸留水で洗浄し、ＧＰ７３－ｈＦｃを２００

ｎｇ／ｍＬでプレートに添加し、３０分間インキュベートした。このインキュベーションの後、蒸留水を用いて抗原をプレートから洗い落とした。ビオチン標識ヤギ抗ＧＰ７３を２００ｎｇ／ｍＬでプレートに添加し、室温で３０分間インキュベートした。プレートを洗浄し、このプレートにストレプトアビジン－ＨＲＰＯ（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）（約２００ｎｇ／ｍＬに希釈）を添加し、３０分間インキュベートした。プレートを蒸留水で洗浄し、ＯＰＤ基質を色原体として用いてシグナルを発生させた。プレートを４９２ｎｍで読み取り、結果を分析した。ハイブリッドがバックグラウンドよりも少なくとも３倍大きいＥＩＡを有する場合、陽性であるとみなした。表３を参照。

【０３２１】

【表３】

表3

試料	OD (A492)
ﾊﾞｯｸｸﾞﾗｳﾝﾄﾞ	0.06
PC (14H4-23)	1.57
1A-3187	1.34
1A-4246	1.92
1B-3246	1.48
1B-3440	1.46
1B-4863	1.44
1B-4971	1.79

【０３２２】

陽性クローンを、１０％ＦＢＳおよびＨＴサプリメントが添加されたＩＭＤＭで、２４穴プレートに拡大した。５－１４日増殖の後、上清試料をＧＰ７３－ｈＦｃおよびＢＳＡに対して滴定して非特異的タンパク質バインダを除去したこと以外は既に記載したのと同じ方法で、２４穴培養をＥＩＡで評価した。。ふたたび、バックグラウンドよりも少なくとも３倍大きいシグナルを生ずるクローンを陽性とみなし、さらなる評価のために選択した。表４を参照。

【０３２３】

【表４】

表4

試料	希釈	BSA ﾊﾞｯｸｸﾞﾗｳﾝﾄﾞ OD (A492)	GP73-hFc OD (A492)
NC mAb	400 ng/mL	0.05	0.05
PC (14H4-23)	400 ng/mL	0.06	1.49
1A-3187	1:25	0.11	1.30
1A-4246	1:25	0.04	1.35
1B-3246	1:16	0.06	1.64
1B-3440	1:25	0.09	1.51
1B-4863	1:25	0.06	1.61
1B-4971	1:25	0.10	2.10

【０３２４】

次に、固相に直接被覆された捕捉試薬として使用したウサギ抗ＧＰ７３を用いてサンドイッチを形成する能力について、２４穴培養をＥｌＡによって評価した。すなわち、ウサギ抗ＧＰ７３抗体を１μｇ／ｍＬで被覆し、ＧＰ７３－ｈＦｃを２００ｎｇ／ｍＬで試験し、さらに、ＨＲＰ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ　ＦＣ抗体を、シグナルを発生させるためのコンジュゲート試薬として用いたことを除いて、既に記載した同一のＥＩＡプロトコルを使用した。表５を参照。

【０３２５】

【表５】

表５

試料	希釈	BSA ﾊﾞｯｸｸﾞﾗｳﾝﾄﾞ OD (A492)	GP73-hFc OD (A492)
NC mAb	400 ng/mL	0.10	0.10
PC (14H4-23)	400 ng/mL	0.10	1.34
1A-3187	1:125	0.09	0.97
1A-4246	1:25	0.12	0.85
1B-3246	1:125	0.10	0.79
1B-3440	1:125	0.12	0.76
1B-4863	1:125	0.10	1.41
1B-4971	1:125	0.10	1.60

【０３２６】

２４穴段階で陽性として同定されたクローンを、凍結保存用に拡大し、その後高密度細胞上清を生成した。これらのクローンからの上清を、ＥＩＡフォーマットのＳｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｃｌｏｎｏｔｙｐｉｎｇ Ｋｉｔを用いて、マウス抗体アイソタイプについて試験した。表６を参照。

【０３２７】

【表６】

表６

試料	ｱｲｿﾀｲﾌﾟ
1A-3187	IgG1k
1A-4246	IgG1k
1B-3246	IgG1k
1B-3440	IgG1k
1B-4863	IgG1k
1B-4971	IgG1k

【０３２８】

［実施例７］

ハイブリドーマスケールアップ、抗体精製、および抗体標識

細胞株は、Ｌ－グルタミンおよび１０％超低ＩｇＧ ＦＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を添加したＩＭＤＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）で拡大し、約０．５ ｘ１０^{5}細胞／ｍＬで、ローラーボトルに播種した。培養を３７℃でインキュベートしながら、１０－１４日間にわたって、または、末端培養（ｔｅｒｍｉｎａｌ ｅｎｄ ｃｕｌｔｕｒｅ）が得られるまで、１分間あたり約１回転で、回転させた。末端ローラーボトル上清を回収し、０．４５ミクロンフィルターで清澄した。清澄化した上清を等量の１．５Ｍグリシン／３Ｎ ＮａＣｌ緩衝液、ｐＨ８．９（Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で、希釈し、次に、ＡＫＴＡ自動化精製システム（Ａｍｅｒｓｈａｍ／Ｐｈａｒｍａｃｉａ／ＧＥ）を用いている、予め平衡化された５ｍＬプロテインＡカラム上にロードした。次に、カラムを約５カラム容量の結合緩衝液で洗浄し、安定したベースラインが達成された時、ｍＡｂをｐＨ３．０のクエン酸緩衝液（Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で溶出した。次に、ｍＡｂを、ＰＢＳに交換のための脱塩カラムに移し、１０，０００分子量カットオフ透析膜（Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ）を用いて、ＰＢＳ中でさらに透析した。精製抗体を、２次スクリーニング試薬として使用するために、ビオチン標識した。スルホ－ＮＨＳ－ＬＣ－ビオチン（Ｐｉｅｒｃｅ）を２０モル過剰で精製された抗体に添加し、３０分間インキュベートした。未結合ビオチンを、ＰＢＳでの透析により除去し、正常に標識されているかを確認するために、ｍＡｂをＥＩＡによって試験した。

【０３２９】

［実施例８］
精製抗体特徴づけ
１．フコースに対する感受性－アレウリア・アウランティアレクチン（ＡＡＬ）による競合阻害アッセイ
ビオチン標識抗ＧＰ７３ｍＡｂをＥＩＡによって試験して、それがＧＰ７３－ｈＦｃ抗原上のフコースの存在に感受性があるどうかを決定した。アレウリア・アウランティアレクチン（ＡＡＬ）（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）は、高い度合いの特異性でフコースに結合する。任意のグリコシル化／フコシル化部位を酸化する過ヨウ素酸塩で前処理したロバ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を約１μｇ／ｍＬで、９６穴マイクロタイターＥＩＡプレートに被覆した。過ヨウ素酸塩処理を行って、捕捉試薬に対するＡＡＬの非特異的結合を防いだ。捕捉試薬が固相を被覆した後、捕捉試薬を除去し、プレートをＰｒｏｔｅｉｎ－Ｆｒｅｅ　Ｔ２０（ＴＢＳ）ブロッキング緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて３０分間ブロックした。ウェルを蒸留水で洗浄し、ブロックされたプレートにＧＰ７３－ｈＦｃ抗原の２００ｎｇ／ｍＬ溶液を添加し、少なくとも３０分間室温でインキュベートした。抗ヒトＩｇＧＦｃは、ＧＰ７３抗原上のヒトＩｇＧ融合タンパク質を捕捉する。ウェルを蒸留水で洗浄し、ＡＡＬを０－２００ｎｇ／ｍＬの段階希釈でウェルに添加し、少なくとも３０分間インキュベートした。このインキュベーションの後、蒸留水を用いて抗原をプレートから洗い落とした。ビオチン標識抗ＧＰ７３ｍＡｂを、各々のｍＡＢに対して５０から２００ｎｇ／ｍＬという所定の濃度範囲でプレートに添加し、室温で１５分間インキュベートした。ビオチン標識ＡＡＬを、アッセイの陽性対照として使用し、ビオチン標識された無関係なｍＡｂをビオチン陰性対照として使用した。プレートを洗浄し、ストレプトアビジン－ＨＲＰＯ（約２００ｎｇ／ｍＬに希釈）をプレートに添加し、３０分間インキュベートした。プレートを蒸留水で洗浄し、ＯＰＤ基質を色原体として用いてシグナルを発生させた。プレートの読み取りを４９２ｎｍで行い、その結果を分析した。図３を参照。図３で示すように、ビオチン標識抗ＧＰ７３ｍＡｂ１Ａ－３１８７および１Ｂ－４８６３は、このアッセイで試験したより高い濃度で、ある程度の競合的阻害が遊離ＡＡＬで示されることを実証する。他のすべてのビオチン標識ｍＡｂは、２００ｎｇ／ｍＬでさえも阻害を示さない。
【０３３０】
２．ＩｇＧ、ＧＰ７３、およびＧＰ７３－ｈＦｃとの反応性
精製した抗ＧＰ７３ｍＡｂを、ヒトＩｇＧ、Ｅ・コリ産生ＧＰ７３、およびＨＥＫ２９３細胞産生ＧＰ７３－ｈＦｃに対するＥＩＡ反応性について試験した。マウス－ヒトキメラ抗体、Ｅ・コリ産生ＧＰ７３、およびＨＥＫ２９３細胞産生ＧＰ７３－ｈＦｃを、約１０００ｎｇ／ｍＬでマイクロタイタープレートに被覆し、４－８℃で一晩インキュベートした。捕捉試薬で固相を被覆した後、それを取り除きＢＳＡ／ＰＢＳブロッキング溶液を用いてブロックした。ウェルを、蒸留水で洗浄した。精製された抗ＧＰ７３および陰性対照ｍＡｂを、１０００ｎｇ／ｍＬで始まる連続希釈で、ブロックされたプレートに添加し、約３０分間室温でインキュベートした。ウェルを蒸留水で洗浄した。ヤギ抗マウスＩｇＧ－ＨＲＰ（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ）を、約２５０ｎｇ／ｍＬでウェルに添加し、室温で約３０分間インキュベートした。プレートを蒸留水で洗浄し、ＯＰＤ基質を色原体として用いてシグナルを発生させた。プレートを４９２ｎｍで読み取り、結果を分析した。図４を参照。図４で示すように、試験したｍＡｂのいずれも、マウス－ヒトキメラでヒトＩｇＧＦｃと反応せず、試験したすべてのｍＡｂがＧＰ７３－ｈＦｃとの反応性を示している。１Ａ－３１８７と１Ａ－４２４６は、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ融合タンパク質なしでＥ・コリ産生ＧＰ７３との反応性がないことを示しており、おそらくＥ・コリ産生生物にはグリコシル化が欠如していることに起因して、これがＧＰ７３－ｈＦｃとは構造的に異なることを示唆している。
【０３３１】
３．フコース感受性－遊離フコース抑制

ビオチン標識抗ＧＰ７３ｍＡｂをＥＩＡによって試験して、それがＧＰ７３－ｈＦｃ抗原上のフコースの存在に感受性があるどうかを決定した。アレウリア・アウランティアレクチン（ＡＡＬ）（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）は、高い度合いの特異性でフコースに結合する。ロバ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ）を約１μｇ／ｍＬで、９６穴マイクロタイターＥＩＡプレートに被覆した。捕捉試薬が固相を被覆した後、捕捉試薬を除去し、プレートをＰｒｏｔｅｉｎ－ＦｒｅｅＴ２０（ＴＢＳ）ブロッキング緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて３０分間ブロックした。ウェルを蒸留水で洗浄した。ＧＰ７３－ｈＦｃ抗原の２００ｎｇ／ｍＬ溶液を、ブロックされたプレートに添加し、少なくとも４５分間室温でインキュベートし、続いて蒸留水で洗浄した。フコースを、１０００μｇ／ｍＬから始まる段階希釈で、別の非吸収性マイクロタイタープレートのウェルに添加した。ビオチン標識抗ＧＰ７３ｍＡｂを、各々のｍＡｂに対して５０から２０００ｎｇ／ｍＬという所定の濃度範囲でプレートに添加し、室温で４５分間インキュベートした。混合物を、捕捉ＧＰ７３－ｈＦｃを有するマイクロタイタープレートに添加し、室温で１５－２０分間インキュベートした。ビオチン標識ＡＡＬをアッセイの陽性対照として使用し、ビオチン標識された無関係なｍＡｂを陰性対照として使用した。プレートを洗浄した。ストレプトアビジン－ＨＲＰＯ（約２００ｎｇ／ｍＬに希釈）をプレートに添加し、３０分間インキュベートした。プレートを蒸留水で洗浄し、ＯＰＤ基質を色原体として用いてシグナルを発生させた。プレートを４９２ｎｍで読み取り、結果を分析した。図５を参照。図５は、ビオチン標識ＡＡＬ結合が遊離フコースにより阻害されたが、ビオチン標識抗ＧＰ７３ｍＡｂのいずれも遊離ＡＡＬによる阻害を示さなかったことを示している。これらの結果は、ＧＰ７３ｍＡｂのいずれも溶液で単独でフコースと特異的に結合しないことを示す。

【０３３２】

４．過ヨウ素酸塩処理および非過ヨウ素酸塩処理のＧＰ７３－ｈＦｃに対する反応性

ビオチン標識ｍＡｂをさらに評価して、その過ヨウ素酸処理ＧＰ７３－ｈＦｃ抗原と非ヨウ素酸処理ＧＰ７３－ｈＦｃ抗原とに対する反応性を比較した。過ヨウ素酸塩処理は、抗原上でグリコシル化／フコシル化部位を酸化する必要があるので、フコースとの反応性がある抗体は、過ヨウ素酸塩処理材料との反応性があるとしてはならない。任意のグリコシル化／フコシル化部位を酸化する過ヨウ素酸塩で前処理したロバ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ）を約１μｇ／ｍＬで、９６穴マイクロタイターＥＩＡプレートに被覆した。過ヨウ素酸塩処理を行って、捕捉試薬に対するフコース反応性抗体の非特異的結合を防いだ。捕捉試薬が固相を被覆した後、捕捉試薬を除去し、プレートをＰｒｏｔｅｉｎ－Ｆｒｅｅ　Ｔ２０（ＴＢＳ）ブロッキング緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ））を用いて室温で３０分間ブロックした。ウェルを蒸留水で洗浄した。過ヨウ素酸処理ＧＰ７３－ｈＦｃ抗原と非ヨウ素酸処理ＧＰ７３－ｈＦｃ抗原との両方の１００ｎｇ／ｍＬから始まる段階希釈を、ブロックされたプレートに添加し、少なくとも３０分間、室温でインキュベートした。プレートを洗浄した。ストレプトアビジンＨＲＰＯ（約２００ｎｇ／ｍＬに希釈）をプレートに添加し、室温で３０分間インキュベートした。プレートを蒸留水で洗浄し、ＯＰＤ基質を色原体として用いてシグナルを発生させた。図６－１１に示されるように、抗体１Ａ－３１８７、１Ｂ－４８６３、および１Ｂ－４９７１は、非過ヨウ素酸処理材料と比較して、過ヨウ素酸処理ＧＰ７３－ｈＦｃに対する結合の減少を示した。

【０３３３】

５．結合対

精製した抗ＧＰ７３ｍＡｂを、ＥＩＡによってＧＰ７３－ｈＦｃ抗原と結合対を形成する能力について試験した。抗ＧＰ７３産生抗体を、約１０００ｎｇ／ｍＬでマイクロタイタープレートに被覆し、４－８℃で一晩インキュベートした。捕捉試薬で固相を被覆した後、プレートをＢＳＡ／ＰＢＳブロッキング溶液を用いてブロックした。ウェルを蒸留水で洗浄し、ＢＳＡブロックで希釈された０－１００ｎｇ／ｍＬの段階希釈で、精製ＧＰ７３－ｈＦｃを、ブロックされたプレートに添加し、約３０分間、室温でインキュベートし

た。ウェルを蒸留水で洗い、ビオチン標識抗ＧＰ７３ｍＡｂを、各々のｍＡｂに対して５０から５０００ｎｇ／ｍＬという所定の濃度範囲でプレートに添加し、室温で３０分間インキュベートした。プレートを洗浄した。ストレプトアビジン－ＨＲＰＯ（約２００ｎｇ／ｍＬに希釈）をプレートに添加し、室温で３０分間インキュベートした。プレートを蒸留水で洗浄し、ＯＰＤ基質を色原体として用いてシグナルを発生させた。プレートを４９２ｎｍで読み取り、結果を分析した。表７は、各抗体対の組合せのアッセイシグナルをまとめたものであり、各結合対がサンドイッチを形成可能であったかどうかを示している。これらの抗体を、サンドイッチ形成パターンに基づいて６つの異なるエピトープに分類した。サンドイッチを形成しない、または、弱いサンドイッチを形成する抗体は、同じエピトープ群に割り当てた。同一または類似のエピトープに結合する抗体が、同一結合部位を競合することから、一緒にはＧＰ７３サンドイッチを形成することができなかったと仮定した。これに対する例外は、ビオチン標識されたものを含むすべての抗体とサンドイッチを形成することが可能である抗体１Ｂ－４８６３のようなケースであった。１つのヒトＩｇＧ　Ｆｃに結合する２つのＧＰ７３分子があったことから抗体がそれ自体とサンドイッチを形成することが可能であったが、これらのｍＡｂのほとんどにとって、第１の抗体の結合は同一ＧＰ７３－ｈＦｃ分子に存在する第２のエピトープをブロックし、同一エピトープに対する別の抗体が結合するのを妨げるように見えた。

【０３３４】

【表７】

表7

被覆	1B-3246-Bt	1B-3440-Bt	1A-4246-Bt	1B-4971-Bt	1A-3187-Bt	1B-4863-Bt	NC-Bt
1B-3246	0.47	3.20	2.52	3.04	3.06	2.94	0.06
1B-3440	3.12	0.42	3.10	3.45	3.47	3.09	0.07
1A-4246	3.32	3.68	0.10	4.65	4.08	3.50	0.08
1B-4971	1.78	1.62	1.18	0.63	1.57	1.42	0.06
1A-3187	1.03	0.85	0.52	0.86	0.29	1.08	0.06
1B-4863	2.61	2.85	2.52	3.27	2.90	2.41	0.06
NC	0.05	0.05	0.05	0.06	0.09	0.05	0.06

【０３３５】

６．抗ＧＰ７３抗体を用いるウエスタンブロット分析

哺乳動物細胞（ＨＥＫおよびＣＨＯ）発現ＧＰ７３－ｈＦｃまたはＥ・コリ発現ＧＰ７３を、上記したように、４－２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで電気泳動にかけた。ＧＰ７３タンパク質を、標準的な転写用緩衝液（２５ｍＭＴｒｉｓ、１９２ｍＭグリシン、および２０％メタノール、ｐＨ８．３）で、１－２時間、１００ボルトでニトロセルロース膜に移した。ニトロセルロース膜を、約１時間にわたって、５％脱脂粉乳および０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ緩衝液で、ブロックした。このニトロセルロース膜を、２．５％脱脂粉乳および０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含む１０ｍＬのＰＢＳ緩衝液（ｐＨ７．２）中で、適当量の抗ＧＰ７３モノクローナル抗体とともにインキュベートした。ニトロセルロース膜を０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０／ＰＢＳ（ｐＨ７．２）で洗浄し、ＨＲＰがコンジュゲートしたヤギ抗マウスＩｇＧ抗体と室温で１時間インキュベートし、さらに、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０／ＰＢＳ緩衝液で洗浄した。ＧＰ７３タンパク質に結合した抗体を、新たに調製した金属強化３，３’－ジアミノベンジジンの安定な過酸化物緩衝液（（Ｐｉｅｒｃｅ、ＩＬ）への添加によって、可視化した。表８を参照。

【０３３６】

【表８】

表８

抗体	HEK 発現 GP73-hFc 抗原のｳｪｽﾀﾝﾌﾞﾛｯﾄ	CHO 発現 GP73-hFc 抗原のｳｪｽﾀﾝﾌﾞﾛｯﾄ	E.ｺﾘ発現 GP73 抗原のｳｪｽﾀﾝﾌﾞﾛｯﾄ
抗 GP73 1B-3246	陽性	陽性	陽性
抗 GP73 1A-4246	陽性	陽性	陰性
抗 GP73 1A-3187	陽性	陽性	陰性
抗 GP73 1B-4863	陽性	陽性	陽性
抗 GP73 1B-3440	陽性	陽性	実施せず
抗 GP73 1B-3263	陽性	陽性	実施せず
GP73 14H4-23-288	陽性	実施せず	陽性

【０３３７】

抗体特性評価の概要を表９および１０に示す。

【０３３８】

【表９】

表９

ｸﾛｰﾝ#	ｱｲｿﾀｲﾌﾟ	W.ﾌﾞﾛｯﾄ CHO GP73	W.ﾌﾞﾛｯﾄ HEK GP73
1A-3187	IgG1k	+	+
1A-4246	IgG1k	+	+
1B-3246	IgG1k	+	+
1B-3440	IgG1k	+	+
1B-4863	IgG1k	+	+
1B-4971	IgG1k	+	+
14H4-23	N/A	+	+

【０３３９】

【表１０】

表１０

ｸﾛｰﾝ#	遊離 AAL 置換	E.ｺﾘ GP73 と結合	Hu IgG と結合	遊離ﾌｺｰｽ置換	過ﾖｳ素酸化 GP73 反応性
1A-3187	あり	なし	なし	なし	減
1A-4246	なし	なし	なし	なし	強
1B-3246	なし	あり	なし	なし	強
1B-3440	なし	あり	なし	なし	強
1B-4863	あり	あり	なし	なし	減
1B-4971	なし	あり	なし	なし	減
14H4-23	なし	あり	なし	なし	強

【０３４０】

［実施例９］

抗ＧＰ７３モノクローナル抗体遺伝子配列決定

市販の試薬（ＯｌｉｇｏｔｅｘダイレクトｍＲＮＡキット、Ｑｉａｇｅｎ）を用い、製造元の推奨に従って、ｍＲＮＡを適当なハイブリドーマ細胞培養から抽出した。Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ ＩＩＩ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）およびオリゴｄＴプライマー（Ｎｏｖａｇｅｎ）を用いて、標準的なプロトコルに従い、重鎖およびκ軽鎖ｃＤ

ＮＡを抽出ｍＲＮＡから作った。製造元の指示に従って、アプリコンを市販のベクター（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）にクローニングし、Ｅ・コリに形質転換した。Ｍ１３フォワードおよびリバースプライマーを用いた配列分析を、ＢｉｇＤｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　ｖ３．１サイクル配列決定キット（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ、ＣＡ）を用いて、複数の形質転換Ｅ・コリコロニーから単離したプラスミド上で実行し、重鎖および軽鎖コード配列を同定した。表１および２を参照。図１２－１７は、同定されたＣＤＲ配列を有する可変重鎖および軽鎖領域のアミノ酸およびヌクレオチド配列の図を示す。

【０３４１】

１Ａ－３１８７可変軽鎖（ＶＬ）配列は、ＩＧＫＶ２１サブグループのＶ部分を用いる。１Ａ－４２４６および１Ｂ－３４４０ＶＬ配列は、ＩＧＫＶ４／５サブグループのＶ部分を用いる。１Ｂ－４８６３ＶＬ配列は、ＩＧＫＶ１９／２８サブグループのＶ部分を用いる。１Ｂ－３２４６　ＶＬ配列は、ＩＧＫＶ２４／２５サブグループのＶ部分を用いる。１Ｂ－４９７１ＶＬ配列は、ＩＧＫＶ２サブグループのＶ部分を用いる。

【０３４２】

１Ａ－３１８７可変重鎖（ＶＨ）配列は、Ｉｇｈ－ＶＪ５５８　ＶＨ１ファミリーのＶ部分を用いる。ＣＤＲ－Ｈ２の後の第１のアミノ酸は、Ｋ／Ｒの代わりにＴを有しているＣＤＲの近くで、典型的な抗体配列からそれる。１Ｂ－４９７１ＶＨ配列も、Ｉｇｈ－ＶＪ５５８　ＶＨ１ファミリーのＶ部分を用いる。１Ｂ－３４４０ＶＨ配列は、ＩｇＨ－Ｖ１０ＶＨ１０ファミリーのＶ部分を用いる。１Ｂ－４８６３ＶＨ配列は、Ｉｇｈ－ＶＱ５２ＶＨ２ファミリーのＶ部分を用いる。１Ａ－４２４６および１Ｂ－３２４６ＶＨ配列は、Ｉｇｈ－Ｖ７１８３ＶＨ５ファミリーのＶ部分を用いる。

【０３４３】

［実施例１０］

抗ＧＰ７３ｍＡｂによるＧＰ７３エピトープマッピング

抗ＧＰ７３ｍＡｂによるＧＰ７３のエピトープマッピングを、エピトープ切除とそれに続くＬＣ／ＭＳ／ＭＳ方法を用いて完了させた。用いられる試料は、ＧＰ７３－ｈＦｃ抗原および抗ＧＰ７３ｍＡｂであった。

【０３４４】

１．ＣＮＢｒ－活性化セファロース樹脂に対する抗ＧＰ７３ｍＡｂの固定：ＣＮＢｒ活性化セファロース樹脂２０ｍｇを秤量して、フリット付きでコンパクトな反応カラムに入れた。樹脂を２００μＬの１ｍＭ　ＨＣｌで３回洗浄した。樹脂を２００μＬの１００ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$（ｐＨ８）／５００ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液で３回洗浄した。抗ＧＰ７３ｍＡｂをカラムに添加した。反応カラムは、４時間室温でローテーターに配置した。樹脂を２００μＬの１００ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$（ｐＨ８）／５００ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液で３回洗浄した。２００μＬの１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８）／５００ｍＭ　ＮａＣｌをカラムに添加し、このカラムを１時間室温で回転した。樹脂を、２００μＬの１００ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ４）／５００ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液と１００ｍＭＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８）５００ｍＭＮａＣｌ緩衝液とで３回洗浄した。樹脂を、２００μＬの１００ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$（ｐＨ８）／１００ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液で３回洗浄した。２００μＬの１００ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$（ｐＨ８）／１００ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液を添加して、カラムの上のトップキャップを固定した。

【０３４５】

２．抗原結合：反応カラムを２００μＬの１００ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$（ｐＨ８）／５００ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液で３回洗浄した。工程１で調製された５０μＬ抗体樹脂を新しい反応カラムに移した。樹脂を２００μＬの１００ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$（ｐＨ８）／１００ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液で３回洗浄した。ＧＰ７３－ｈＦｃ抗原試料は、カラムに加えられた。反応カラムは、４時間室温でローテーターに配置した。樹脂を２００μＬの１００ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$（ｐＨ８）／１００ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液で３回洗浄した。

【０３４６】

３．タンパク質分解：２００μＬの１００ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$（ｐＨ８）／１００ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液をカラムに添加した。トリプシンをカラムに添加し、反応カラムを室温で一晩、ローテーターに配置した。

【０３４７】

４．溶出：溶液をフラッシュしてフロースルー画分として回収した。樹脂を２００μＬの１００ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$（ｐＨ８）で３回／１００ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液で２回洗浄した。樹脂を２００μＬの１００ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$（ｐＨ８）／５００ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液で３回洗った。樹脂を２００μＬの１００ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$（ｐＨ８）／１００ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液で３回洗浄した。溶出のために２００μＬの２％ギ酸を添加した。溶出画分と他の画分をＥｐｐｅｎｄｏｒｆ　Ｖａｃｕｆｕｇｅで乾燥させた。

【０３４８】

５．ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ注入前の試料のＣ１８　ＺｉｐＴｉｐ脱塩：溶出画分を１０μＬの０．１％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）に戻した。Ｃ１８　ＺｉｐＴｉｐを３回、５０％のＡＣＮ／Ｈ$_2$Ｏで湿潤させた。Ｃ１８　ＺｉｐＴｉｐを３回、０．１％ＴＦＡで湿潤させた。結合のために、試料を１５回、吸引および分注した。チップを、０．１％のＴＦＡで７回、洗浄した。試料を１０μＬの５０％ＡＣＮ／Ｈ$_2$Ｏ、０．１％ＴＦＡで溶出した。

【０３４９】

６．溶出画分は、Ａｇｉｌｅｎｔ１２００ＨＰＬＣと連結したＡＢ　Ｓｃｉｅｘ　Ｑ－Ｓｔａｒ　Ｅｌｉｔｅ　ＭＳ機器を用いて、ＬＣ／ＭＳ／ＭＳによって分析した。表１１および図１８を参照。

【０３５０】

【表１１】

表11

抗 GP73 MAb	ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ
1A-3187	ELKKNEFQGELEKQREQLDKIQSSHNFQLESVNK (配列番号:104)
1B-4971	VSQENPEMEGPERDQLVIPDGQEEEQEAAGEGR (配列番号:101)
1B-3246	EQVVEDRPVGGR (配列番号:102)
1B-3440	LRGEDDYNMDENEAESETDK (配列番号:103)
1A-4246	不確定
1B-4863	不確定

【０３５１】

［実施例１１］

ＧＰ７３ｍＡｂ結合反応速度

ＨＥＫ発現組換えＧＰ７３－ｈＦｃ（Ａｂｂｏｔｔ、Ｉｌｌｉｎｏｉｓ、ＵＳＡ）に対する抗ヒトＧＰ７３モノクローナル抗体１Ａ－３１８７、１Ａ－４２４６、１Ｂ－３２４６、１Ｂ－３４４０、１Ｂ－４８６３、および１Ｂ－４９７１の親和性／反応速度を、Ｂｉａｃｏｒｅ　２０００機器（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を用いて、決定した。最初に、バイオセンサーを１００ｍＭ　ＨＣｌ、５０ｍＭ　ＮａＯＨ、および０．１％ＳＤＳの二重注入で前処理した後に、Ａｍｉｎｅ　Ｃｏｕｐｌｉｎｇ　Ｋｉｔ（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に提供されたＥＤＣ／ＮＨＳ／エタノールアミンケミストリを介して、約１３，０００－１５，０００のＲＵウサギ抗マウスＩｇＧ捕捉バイオセンサーを、ウサギ抗マウスＩｇＧ抗体（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）をＣＭ５バイオセンサーチップ（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にアミンカップリングさせることによって、作った。精製ＧＰ７３抗体と抗原（ＨＥＫ　ＧＰ７３－ｈＦｃ）を、０．１％ＢＳＡおよび０．１％ＣＭ－デキストランが添加されたＨＢＳ－ＥＰ緩衝液（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）から構成される泳動用緩衝液に希釈した（以下、「泳動用緩衝液

」という）。各々のＧＰ７３抗体を希釈して１μｇ／ｍＬにした。ＧＰ７３－ｈＦｃ抗原を、３倍希釈系列を用いて希釈して、０．４１２から１００ｎＭの濃度に希釈し、４９０ｋＤａのオリゴマー分子量を仮定した（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）。

【０３５２】

ＧＰ７３－ｈＦｃ抗原プログラムは、以下の通りだった。泳動用緩衝液により５μＬ／分で３分間、ウサギ抗マウスＩｇＧ捕捉バイオセンサーを平衡化させた後、ＧＰ７３抗体（７－１４μＬ）を個々のフローセルに注入し、その際、１つのフローセルを参照フローセルとしてブランクのままに残しておく。フローセルは、６０μＬ／分の流速で３分間、泳動用緩衝液で洗浄した。１５０μＬのＨＥＫ２９３発現ＧＰ７３－ｈＦｃ抗原をランダムな濃度でバイオセンサー全体に注入した。バイオセンサーを実質的に、６０μＬ／分の流速で５分間、泳動用緩衝液により実質的に再平衡化させた。バイオセンサー表面全体を、１０ｍＭグリシン、ｐＨ１．７（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒ）、１０μＬ／分の流速で、１回３０μＬ注入して再生させた。ＨＥＫ２９３発現抗原の濃度すべてを反復試験した。結合反応速度（結合と解離）は、抗原注入と泳動用緩衝液の再平衡化中に、センサーグラムを介してモニターした。センサーグラムを二重参照して、Ｓｃｒｕｂｂｅｒ　２．０ソフトウェア（ＢｉｏＬｏｇｉｃ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ．、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を使用して１：１結合モデルに適合させ、全体的なK_Dとともに、結合および解離速度を決定した。結果を表１２に示す。決定値の標準誤差を、最も小さい桁の値に対して括弧内に報告する。

【０３５３】

【表１２】

表12

	HEK 発現 GP73-hFc		
GP73 モノクローナル抗体	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
1A-3187	$1.228(5) \times 10^{5}$	$2.5(1) \times 10^{-4}$	$2.00(8) \times 10^{-9}$
1A-4246	$3.29(1) \times 10^{5}$	$1.26(2) \times 10^{-3}$	$3.83(5) \times 10^{-9}$
1B-3246	$3.18(1) \times 10^{6}$	$2.5(2) \times 10^{-4}$	$7.9(5) \times 10^{-11}$
1B-3440	$1.984(6) \times 10^{6}$	$1.8(1) \times 10^{-4}$	$9.1(5) \times 10^{-11}$
1B-4863	$2.058(6) \times 10^{6}$	$2.5(1) \times 10^{-4}$	$1.20(6) \times 10^{-10}$
1B-4971	$3.90(2) \times 10^{6}$	$1(2) \times 10^{-5}$	$2(5) \times 10^{-12}$

【０３５４】

［実施例１２］

ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）ＧＰ７３データ

ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）サンドイッチイムノアッセイ原則を図１９に示す。手短に言うと、微粒子に被覆されている抗体は、目的の分析物を捕捉する。次に、アクリジニウムにコンジュゲートした第２の抗体が分析物上の第２のエピトープに結合する。さらに、粒子を標識から分離させて、それに続いて読み取りを実行し、化学発光反応から相対的な光単位（ＲＬＵ）を決定する。

【０３５５】

捕捉抗体として使用されるＤｒｅｘｅｌ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙマウスモノクローナル抗体　１４Ｈ４－２３と検出抗体として使用されるウサギポリクローナル抗体とに結合するＧＰ７３の同一エピトープを模倣するべく、モノクローナル抗体の対（例えば捕捉モノクローナル抗体としての１Ａ－４２４６と検出モノクローナル抗体としての１Ｂ－４８６３）をＥＬＩＳＡによって試験した。初期ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）実験では、Ｄｒｅｘｅｌ捕捉抗体１４Ｈ４－２３を捕捉抗体１Ａ－４２４６と比較した。各捕捉抗体は検出抗体１－Ｂ４８６３で対にされた。そして、それは０．５ｎＭに希釈された。１Ｂ－４８６３の抗体に対するアクリジニウムの取り込み比率は、３．９であった。図２０に示すように、０－１４．４ｎｇ／ｍＬの範囲でＨＥＫ２９３の一時的トランスフェクションで産生される組換えＧＰ７３－ｈＦｃ融合タンパク質を用いる標準曲線に基づいて約３倍

、捕捉抗体１Ａ－４２４６はＤｒｅｘｅｌ捕捉抗体１４Ｈ４－２３に優る性能を示した。表１３を参照。

【０３５６】

【表１３】

表13　ARCHITECT（登録商標）GP73

uP 14H4-23 被覆 0.1 mg/mL, ｺﾝｼﾞｭｹﾞｰﾄ 1B4863 (IR 3.9) 0.5 nM

試料ID	ng/mL	平均	標準偏差	%CV	ｶｳﾝﾄ	CAL A に対する比率	CAL A に対するｽﾊﾟﾝ	ﾃﾞｰﾀ反復		
calA(rlu)	0	291.3	25.1	8.6	3			281	320	273
calB(rlu)	0.056	580.7	53.2	9.2	3	2.0	289.3	530	576	636
calC(rlu)	0.113	808.7	34.1	4.2	3	2.8	517.3	790	788	848
calD(rlu)	0.225	1436.7	104.5	7.3	3	4.9	1145.3	1453	1532	1325
calE(rlu)	0.45	2493.0	115.6	4.6	3	8.6	2201.7	2521	2366	2592
calF(rlu)	0.9	4522.0	235.3	5.2	3	15.5	4230.7	4254	4617	4695
calG(rlu)	1.8	8555.7	259.4	3.0	3	29.4	8264.3	8507	8324	8836
calH(rlu)	3.6	16995.3	376.4	2.2	3	58.3	16704.0	17403	16922	16661
calI(rlu)	7.2	33256.3	1752.1	5.3	3	114.2	32965.0	31916	32614	35239
calJ(rlu)	14.4	63405.0	1124.1	1.8	3	217.6	63113.7	62593	64688	62934

uP 1A4246 被覆 0.1 mg/mL, ｺﾝｼﾞｭｹﾞｰﾄ 1B4863 (IR 3.9) 0.5 nM

試料ID	ng/mL	平均	標準偏差	%CV	ｶｳﾝﾄ	CAL A に対する比率	CAL A に対するｽﾊﾟﾝ	ﾃﾞｰﾀ反復		
Cal A	0	322	16.3	5.1	3			333	310	
Cal B	0.056	1032	84.0	8.1	3	3.2	710.2	1033	1115	947
Cal C	0.113	1855	166.8	9.0	3	5.8	1533.2	1823	1706	2035
Cal D	0.225	3376	247.6	7.3	3	10.5	3054.2	3217	3661	3249
Cal E	0.45	6546	629.7	9.6	3	20.4	6224.5	6825	5825	6988
Cal F	0.9	12558	656.9	5.2	3	39.1	12236.2	11921	13233	12519
Cal G	1.8	24117	926.2	3.8	3	75.0	23795.2	23329	23884	25137
Cal H	3.6	46080	777.4	1.7	3	143.3	45758.8	45635	46978	45628
Cal I	7.2	89539	4212.5	4.7	3	278.5	89217.5	91530	84700	92387
Cal J	14.4	173701	3197.5	1.8	3	540.3	173379.5	176903	173692	170508

【０３５７】

フォローアップＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）実験において、１Ａ－４２４６を０．２ｍｇ／ｍＬの濃度の捕捉抗体として用い、１Ｂ－４８６３を０．５ｎＭまたは２ｎＭの濃度で検出抗体として用いた。１Ｂ－４８６３の抗体に対するアクリジニウムの取り込み比率は、６．１８であった。２ｎＭのより高いコンジュゲート濃度は、予想よりも大きいシグナルを生じる（図２１を参照）。しかし、ＣａｌＡにおいてより高いバックグラウンドがあった（表１４を参照）。このＧＰ７３　ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）データは、両方のモノクローナル抗体対の組換えＧＰ７３－ｈＦｃ抗原に対して、非常に線形の応答を示す。

【０３５８】

【表１４】

表14　ARCHITECT（登録商標）GP73

1A4246 uP 被覆 0.2 mg/mL, ｺﾝｼﾞｭｹﾞｰﾄ 1B4863 0.5 nM IR 6.18

試料ID	ng/mL	平均	標準偏差	%CV	ｶｳﾝﾄ	CAL A に対する比率	CAL A に対するｽﾊﾟﾝ	ﾃﾞｰﾀ反復		
Cal A	0	546	57.3	10.5	3			606	539	492
Cal B	0.056	2599	147.5	5.7	3	4.8	2053.3	2757	2465	2575
Cal C	0.113	4630	192.6	4.2	3	8.5	4084.0	4638	4818	4433
Cal D	0.225	8221	148.3	1.8	3	15.1	7675.7	8063	8357	8244
Cal E	0.45	16146	697.1	4.3	3	29.6	15600.7	16849	16135	15455
Cal F	0.9	30829	247.0	0.8	3	56.5	30283.3	31001	30546	30940
Cal G	1.8	60219	1095.7	1.8	3	110.4	59673.0	59211	61385	60060
Cal H	3.6	116737	2887.4	2.5	3	213.9	116191.3	117598	113517	119096
Cal I	7.2	213371	6890.7	3.2	3	391.0	212825.7	205710	215342	219062
Cal J	14.4	420567	9171.0	2.2	3	770.7	420021.7	427394	410143	424165

1A4246 uP 被覆 0.2 mg/mL, ｺﾝｼﾞｭｹﾞｰﾄ 1B4863 2 nM IR 6.18

試料ID	ng/mL	平均	標準偏差	%CV	ｶｳﾝﾄ	CAL A に対する比率	CAL A に対するｽﾊﾟﾝ	ﾃﾞｰﾀ反復		
Cal A	0	2489	593.3	23.8	3			1878	2525	3063
Cal B	0.056	5569	328.8	5.9	3	2.2	3080.7	5334	5945	5429
Cal C	0.113	9942	656.4	6.6	3	4.0	7453.7	10155	9206	10466
Cal D	0.225	16465	921.9	5.6	3	6.6	13976.7	15896	15971	17529
Cal E	0.45	30421	972.2	3.2	3	12.2	27932.7	29460	31404	30400
Cal F	0.9	58437	603.1	1.0	3	23.5	55948.3	58869	58694	57748
Cal G	1.8	113539	2427.9	2.1	3	45.6	111050.3	116218	112915	111484
Cal H	3.6	209923	1191.0	0.6	3	84.4	207434.7	209531	211261	208978
Cal I	7.2	404976	5626.5	1.4	3	162.7	402487.0	409800	398795	406332
Cal J	14.4	742497	19168.7	2.6	3	298.4	740008.3	747483	758680	721328

【０３５９】

前述の詳細な説明および添付の実施例は単に例示であり、添付の特許請求の範囲およびその均等物によってのみ定義される本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではないことが理解される。

【０３６０】

開示された実施形態に対する様々な変更および修正が当業者には明らかであろう。そのような変更および修正は、限定されるものではないが、本発明の化学構造、置換基、誘導体、中間体、合成、組成物、製剤、または使用の方法に関するものが含まれ、本発明の精神および範囲から逸脱することなく実施可能である。

【図１】

E. coli GP73ｺﾝｽﾄﾗｸﾄ

MELKKNEELKKNEFQGELEKQREQLDKIQSSHNFQLESVNKLYQDEKAVLVNNITTGE
RLIRVLQDQLKTLQRNYGRLQQDVLQFQKNQTNLERKFSYDLSQCINQMKEVKEQCEE
RIEEVTKKGNEAVASRDLSENNDQRQQLQALSEPQPRLQAAGLPHTEVPQGKGNVLGN
SKSQTPAPSSEVVLDSKRQVEKEETNEIQVVNEEPQRDRLPQEPGREQVVEDRPVGGRG
FGGAGELGQTPQVQAALSVSQENPEMEGPERDQLVIPDGQEEEQEAAGEGRNQQKLRG
EDDYNMDENEAESETDKQAALAGNDRNIDVFNVEDQKRDTINLLDQREKRNHTLSGHH
HHHH（配列番号 98）

太字Metは、開始ｺﾄﾞﾝ（ﾒﾁｵﾆﾝ）を示す。
下線の太字は、GP73ｱﾐﾉ酸63-400のﾌﾗｸﾞﾒﾝﾄの最初のｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸の繰り返しを示す。
下線の文字は、ﾘﾝｶｰを示す。
斜体の文字は、ﾎﾟﾘﾋｽﾁｼﾞﾝﾀｸﾞを示す。

FIGURE 1

【図２】

CHOおよびHEK GP73-hFcｺﾝｽﾄﾗｸﾄ

ELKKNEFQGELEKQREQLDKIQSSHNFQLESVNKLYQDEKAVLVNNITTGERLIRVLQD
QLKTLQRNYGRLQQDVLQFQKNQTNLERKFSYDLSQCINQMKEVKEQCEERIEEVTKK
GNEAVASRDLSENNDQRQQLQALSEPQPRLQAAGLPHTEVPQGKGNVLGNSKSQTPAP
SSEVVLDSKRQVEKEETNEIQVVNEEPQRDRLPQEPGREQVVEDRPVGGRGFGGAGELG
QTPQVQAALSVSQENPEMEGPERDQLVIPDGQEEEQEAAGEGRNQQKLRGEDDYNMDE
NEAESETDKQAALAGNDRNIDVFNVEDQKRDTINLLDQREKRNHTLRSVECPPCPAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPRE
EQFASTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号 99）

下線の文字は、ﾋﾄIgG Fcﾄﾞﾒｲﾝを示す。

FIGURE 2

【図３】

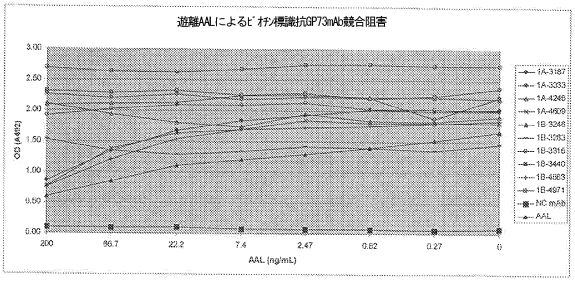


FIGURE 3

【図４】

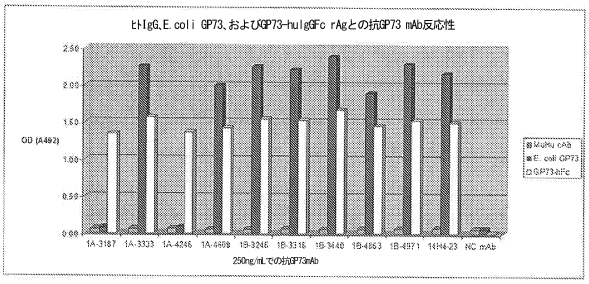


FIGURE 4

【図５】

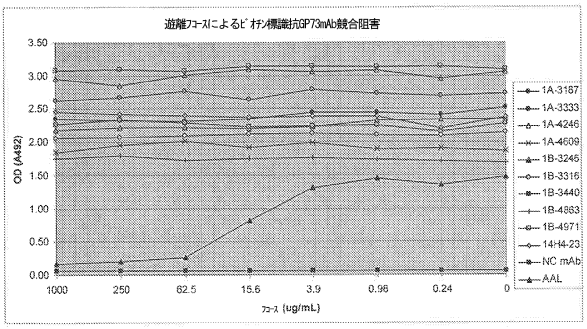


FIGURE 5

【図６】

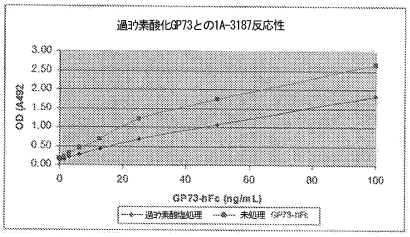


FIGURE 6

【図７】

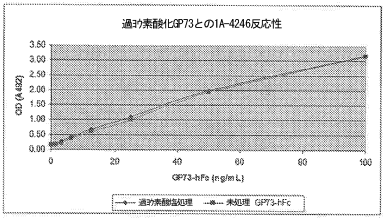


FIGURE 7

【図８】

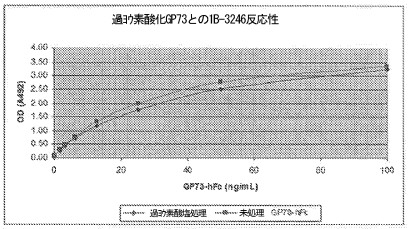


FIGURE 8

【図９】

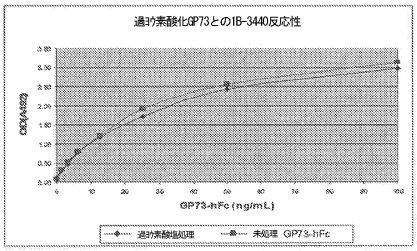


FIGURE 9

【図１０】

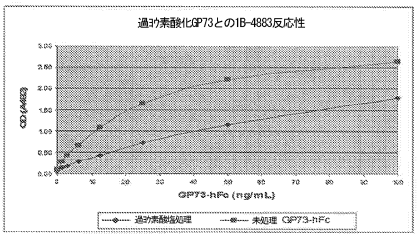


FIGURE 10

【図１１】

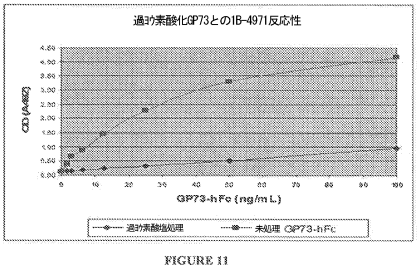
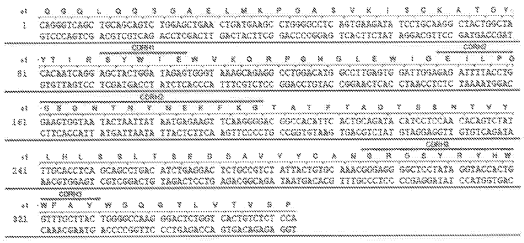


FIGURE 11

【図１２】

A

抗 GP73 1A-3187 VH 配列



B

抗 GP73 1A-3187 VL 配列

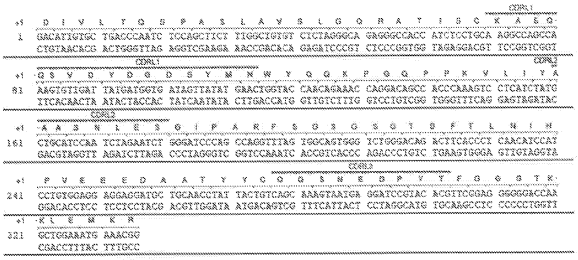


FIGURE 12

【図１３】

FIGURE 13

【図１４】

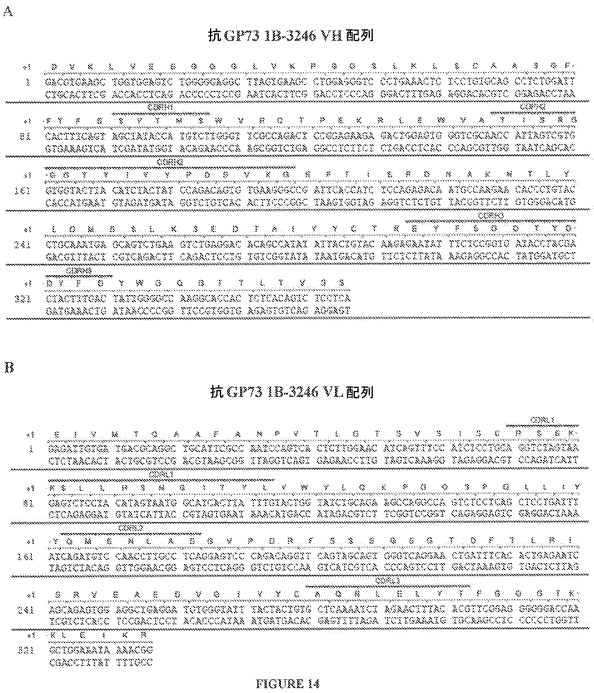


FIGURE 14

【図１５】

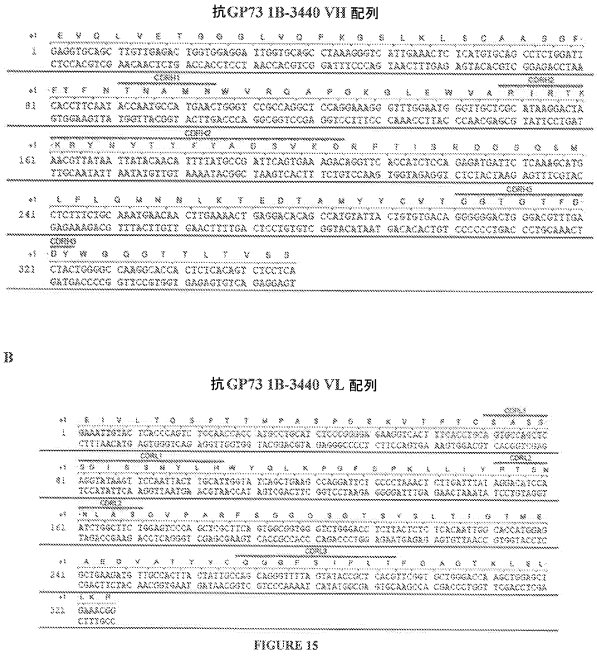


FIGURE 15

【図１６】

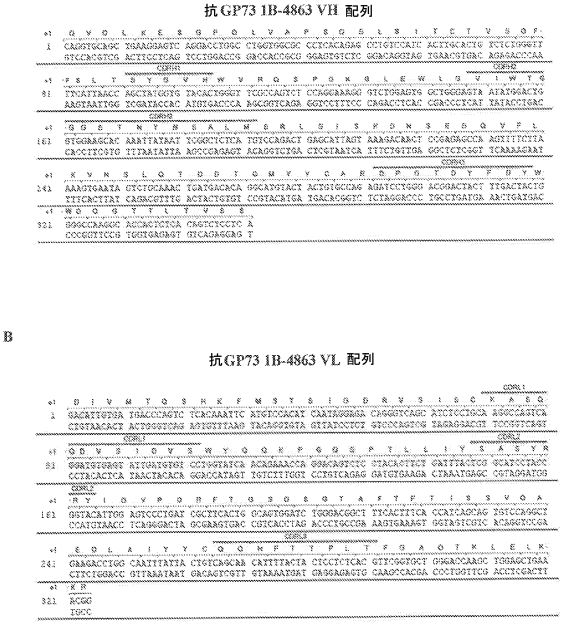


FIGURE 16

【図１７】

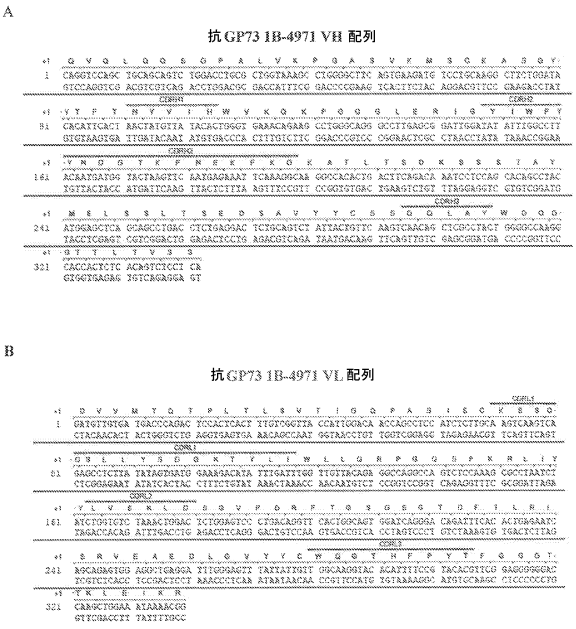
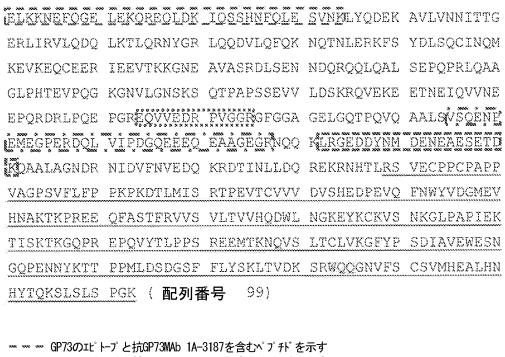


FIGURE 17

【図１８】



{ 配列番号 99}

… … … GP73のエピトープと抗GP73MAb 1A-3187を含むペプチドを示す
‥‥‥‥ GP73のエピトープと抗GP73MAb 1B-3246を含むペプチドを示す
— · — · GP73のエピトープと抗GP73MAb 1B-4971を含むペプチドを示す
～～～～ GP73のエピトープと抗GP73MAb 1B-3440を含むペプチドを示す
下線の文字はhuIgGを示す

FIGURE 18

【図１９】

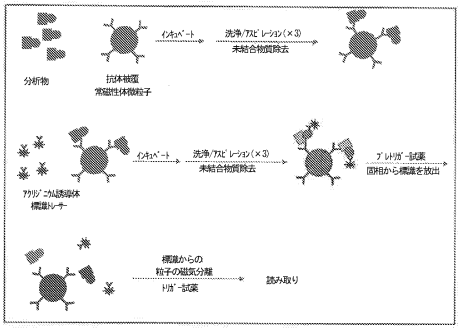


FIGURE 19

【図２０】

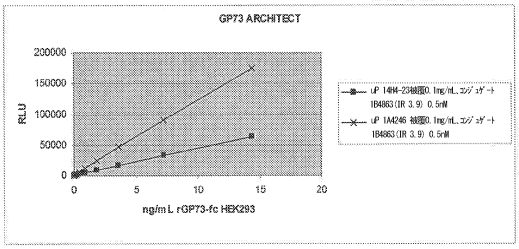


FIGURE 20

【図２１】

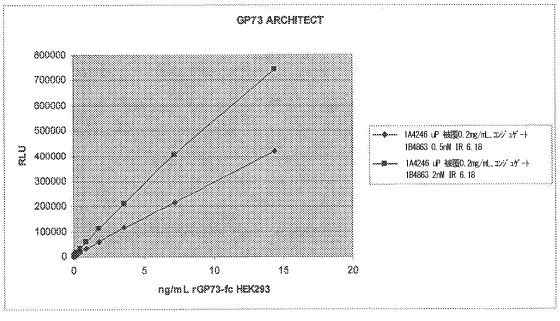


FIGURE 21

【配列表】
0006444976000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	***15/13***	***(2006.01)***	C12N	15/13	
A61K	***39/395***	***(2006.01)***	A61K	39/395	N
A61P	***1/16***	***(2006.01)***	A61P	1/16	
A61P	***35/00***	***(2006.01)***	A61P	35/00	
G01N	***33/53***	***(2006.01)***	G01N	33/53	V
G01N	***33/566***	***(2006.01)***	G01N	33/53	S
G01N	***33/574***	***(2006.01)***	G01N	33/566	
G01N	***33/577***	***(2006.01)***	G01N	33/574	A
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	G01N	33/577	B
			C12P	21/08	

(72)発明者　ツィーマン，ロバート・エヌ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６７、パラタイン、ウエスト・ドルセット・５２５
(72)発明者　ティーマン，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・ブールバード・１４０
(72)発明者　ヘンケン，フィリップ・エム
アメリカ合衆国、ウィスコンシン・５３１５８、プレザント・プレイリー、エイティス・ストリート・１００９１
(72)発明者　ラムゼイ，キャロル・エス
アメリカ合衆国、イリノイ・６０００５、アーリントン・ハイツ、サウス・ベイル・アベニュー・５５、アパートメント・９０６
(72)発明者　ストローベル，キャロリン・ジェイ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００８５、ウォーキガン、ウエスト・バターナッツ・レイン・４５１３
(72)発明者　ホークスワース，デイビッド・ジェイ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００４６、レイク・ビラ、ノースウィンド・レイン・６２０
(72)発明者　バーケンメイヤー，ラリー・ジー
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　ジャオ，チェン
アメリカ合衆国、イリノイ・６００８９、バッファロー・グローブ、チェスナット・コート・ウエスト・３２
(72)発明者　ブロフィー，スーザン・イー
アメリカ合衆国、イリノイ・６００４６、リンデンハースト、マラード・ドライブ・２４７７
(72)発明者　ダウエル，バリー・エル
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６０、マンデレイン、ナイツブリッジ・ドライブ・１９７
(72)発明者　ミュアーホッフ，アンソニー・エス
アメリカ合衆国、ウィスコンシン・５３１４３、ケノーシャ、シックスティエイス・プレース・１２１

審査官　伊藤　良子

(56)参考文献　中国特許出願公開第１０１９８８９２６（ＣＮ，Ａ）
国際公開第２０１２／１１２７９８（ＷＯ，Ａ１）
特表２００８－５４１０６０（ＪＰ，Ａ）
中国特許出願公開第１０１３２８２１４（ＣＮ，Ａ）
中国特許出願公開第１０１５５５２８２（ＣＮ，Ａ）

中国特許出願公開第１０１７３５３１９（ＣＮ，Ａ）
中国特許出願公開第１０１４０７５４４（ＣＮ，Ａ）
Clinical Biochemistry, ２０１０年, Vol.43, p.983-991
ANNALS OF CLINICAL BIOCHEMISTRY, 英国, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, ２００９年　１月１日, V46 N1, P38-43
ACTA ACADEMIAE MEDICINAE SINICAE, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES, ２０１１年　２月２８日, V33 N1, P39-44
CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE, WALTER DE GRUYTER & CO., ２０１１年　４月１日, V49 N4, P711-718
Journal of Biomedical Research, ２０１２年, Vol.26, No.6, p.467-473
Appl Microbiol Biotechnol, ２０１２年, Vol.96, p.1233-1241

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ　　１／００－１９／００
Ｇ０１Ｎ　３３／５３－３３／５７７
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ

专利名称(译)	抗GP73单克隆抗体及其获得方法		
公开(公告)号	JP6444976B2	公开(公告)日	2018-12-26
申请号	JP2016502880	申请日	2014-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	トゥーバイリン ツィーマンロバートエヌ ティーマンブライアンシー ヘンケンフィリップエム ラムゼイキャロルエス ストローベルキャロリンジェイ ホークスワースデイビッドジェイ バーケンメイヤーラリージー ジャオチェン ブロフィースーザンイー ダウエルバリーエル ミュアーホッフアンソニーエス		
发明人	トゥー,バイリン ツィーマン,ロバート·エヌ ティーマン,ブライアン·シー ヘンケン,フィリップ·エム ラムゼイ,キャロル·エス ストローベル,キャロリン·ジェイ ホークスワース,デイビッド·ジェイ バーケンメイヤー,ラリー·ジー ジャオ,チェン ブロフィー,スーザン·イー ダウエル,バリー·エル ミュアーホッフ,アンソニー·エス		
IPC分类号	C07K16/18 C12N1/19 C12N1/15 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/13 A61K39/395 A61P1/16 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	A61P1/16 A61P35/00 C07K16/18 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/92 G01N33/57438 G01N33/6893 G01N2800/085 C07K2317/21 C07K2317/56 C07K2317/565 G01N2333/47 G01N2800/50		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N1/19 C12N1/15 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/13 A61K39/395.N A61P1/16 A61P35/00 G01N33/53.V G01N33/53.S G01N33/566 G01N33/574.A G01N33/577.B C12P21/08		
审查员(译)	伊藤凉子		
优先权	13/836229 2013-03-15 US		
其他公开文献	JP2016516045A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在本说明书中，公开了使用该抗体检测样品中的高尔基体蛋白73（GP73）和岩藻糖基化GP73的抗体和方法。

(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6444976号
(P6444976)
(45)発行日　平成30年12月26日(2018.12.26)　(24)登録日　平成30年12月7日(2018.12.7)

(51)Int.Cl.　　F I
C07K 16/18 (2006.01)　C07K 16/18　ZNA
C12N 1/19 (2006.01)　C12N 1/19
C12N 1/15 (2006.01)　C12N 1/15
C12N 1/21 (2006.01)　C12N 1/21
C12N 5/10 (2006.01)　C12N 5/10

請求項の数 13　(全 111 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-502880 (P2016-502880)
(86)(22)出願日　平成26年3月14日(2014.3.14)
(65)公表番号　特表2016-516045 (P2016-516045A)
(43)公表日　平成28年6月2日(2016.6.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/028725
(87)国際公開番号　WO2014/144355
(87)国際公開日　平成26年9月18日(2014.9.18)
審査請求日　平成29年3月10日(2017.3.10)
(31)優先権主張番号　13/836,229
(32)優先日　平成25年3月15日(2013.3.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　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
特許業務法人川口國際特許事務所
(72)発明者　トゥー，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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＧＰ７３モノクローナル抗体およびそれを得る方法