(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2021-520492
(P2021-520492A)
(43)公表日　令和3年8月19日(2021.8.19)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	ZNAD	4B064
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543	555D	4B065
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13		4H045
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 109 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-554225 (P2020-554225)
(86)(22)出願日　平成31年4月4日(2019.4.4)
(85)翻訳文提出日　令和2年12月2日(2020.12.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/025726
(87)国際公開番号　WO2019/195514
(87)国際公開日　令和1年10月10日(2019.10.10)
(31)優先権主張番号　62/652,701
(32)優先日　平成30年4月4日(2018.4.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71)出願人　509012625
ジェネンテック，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ディーエヌエー　ウェイ　1
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　ロウ，　ジョン　ホク　ニン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０－４９９０，　サウス　サン　フランシスコ，　ディーエヌエー　ウェイ　１，　シー／オー　ジェネンテック，　インコーポレイテッド

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＦＧＦ２１を検出及び定量化する方法

(57)【要約】
本開示の主題は、ＦＧＦ２１に結合する抗体、及びその使用方法を提供する。特に、本開示は、試料中の活性ＦＧＦ２１及び全ＦＧＦ２１レベルを検出及び定量化するための免疫アッセイ法、並びにそのような方法を実施するためのキットを提供する。
【選択図】図５

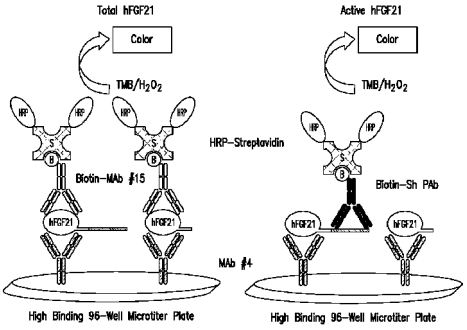


FIGURE 5

【特許請求の範囲】
【請求項１】
試料中の全ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定するための免疫アッセイ法であって、
（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体を前記試料と接触させて、試料－捕捉抗体組合せ材料を生成することと、
（ｂ）前記試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する検出抗体と接触させることと、
（ｃ）前記試料－捕捉抗体組合せ材料に結合している前記検出抗体を検出することと、
（ｄ）結合した前記検出抗体のレベルに基づき、前記試料中に存在する全ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、を含む、免疫アッセイ法。
【請求項２】
前記捕捉抗体及び前記検出抗体が、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する、請求項１に記載の免疫アッセイ法。
【請求項３】
試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定するための免疫アッセイ法であって、
（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体を前記試料と接触させて、試料－捕捉抗体組合せ材料を生成することと、
（ｂ）前記試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する検出抗体と接触させることと、
（ｃ）前記試料－捕捉抗体組合せ材料に結合している前記検出抗体を検出することと、
（ｄ）結合した前記検出抗体のレベルに基づき、前記試料中に存在する活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、を含む、免疫アッセイ法。
【請求項４】
試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定するための免疫アッセイ法であって、
（ａ）（ｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の捕捉抗体を前記試料と接触させて、第１の試料－捕捉抗体組合せ材料を生成すること、（ｉｉ）前記第１の試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の検出抗体と接触させること、（ｉｉｉ）前記試料－捕捉抗体組合せ材料に結合した前記第１の検出抗体を検出すること、及び（ｉｖ）結合した前記第１の検出抗体のレベルに基づき、前記試料中に存在する全ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、
（ｂ）（ｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第２の捕捉抗体を前記試料と接触させて、第２の試料－捕捉抗体組合せ材料を生成すること、（ｉｉ）前記第２の試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する第２の検出抗体と接触させること、（ｉｉｉ）前記試料－捕捉抗体組合せ材料に結合した前記第２の検出抗体を検出すること、及び（ｉｖ）結合した前記第２の検出抗体のレベルに基づき、前記試料中に存在する活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、
（ｃ）工程（ａ）で測定した前記全ＦＧＦ２１タンパク質の量を、工程（ｂ）で測定した前記活性ＦＧＦ２１タンパク質の量と比較して、前記試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定することと、を含む、免疫アッセイ法。
【請求項５】
前記第１の捕捉抗体及び前記第１の検出抗体が、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する、請求項４に記載の免疫アッセイ法。
【請求項６】
前記第１の捕捉抗体及び第２の捕捉抗体が、同一の抗体である、請求項４に記載の免疫アッセイ法。
【請求項７】
前記免疫アッセイが、酵素結合免疫吸着検定法（ｅｎｚｙｍｅ－ｌｉｎｋｅｄ　ｉｍｍ

ｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ　ａｓｓａｙ：ＥＬＩＳＡ）である、請求項１～６のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【請求項８】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、常磁性ビーズに固定化される、請求項１～７のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【請求項９】
前記検出抗体、第１の検出抗体、及び第２の検出抗体のうち１つ以上が、ビオチンにコンジュゲートされる、請求項１～８のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【請求項１０】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、K_d約10^{-10}M～10^{-13}MでＦＧＦ２１に結合する、請求項１～９のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【請求項１１】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、K_d約10^{-10}M～10^{-13}MでＦＧＦ２１に結合する、請求項１及び４～９のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【請求項１２】
前記試料が、血液試料である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【請求項１３】
前記試料が、血漿試料である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【請求項１４】
前記方法が、ウェル内感度約２ｐｇ／ｍｌ～約２０ｐｇ／ｍｌで前記試料中にて、全ＦＧＦ２１タンパク質又は活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を検出する、請求項１～１３のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【請求項１５】
前記免疫アッセイ法が、単分子検出器具を用いて実施される、請求項１～１３のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【請求項１６】
前記単分子検出器具が、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａ　ＨＤ－１　Ａｎａｌｙｚｅｒ（商標）である、請求項１５に記載の免疫アッセイ法。
【請求項１７】
前記方法が、ウェル内感度約０．２ｐｇ／ｍｌ～約０．５ｐｇ／ｍｌで前記試料中にて、全ＦＧＦ２１タンパク質又は活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を検出する、請求項１５又は１６に記載の免疫アッセイ法。
【請求項１８】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２６及び２７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３０及び３１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３４及び３５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３８及び３９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４２及び４３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４６及び４７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、請求項１～１７のいずれか一

項に記載の免疫アッセイ法。
【請求項１９】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号５４、５５、７４、及び７５からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５０、５１、７０、及び７１からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、請求項１～１７のいずれか一項に記載の免疫アッセイ。
【請求項２０】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２２、２３、６６、及び６７からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号１８、１９、６２、及び６３からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、請求項１～１７のいずれか一項に記載の免疫アッセイ。
【請求項２１】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２８及び２９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３２及び３３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３６及び３７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号４０及び４１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４４及び４５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４８及び４９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、請求項１及び４～１７のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【請求項２２】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号５６、５７、７２、及び７３からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５２、５３、６８、及び６９からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、請求項１及び４～１７のいずれか一項に記載の免疫アッセイ。
【請求項２３】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２４、２５、６４、及び６５からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号２０、２１、６０、及び６１からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、請求項１及び４～１７のいずれか一項に記載の免疫アッセイ。
【請求項２４】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２６の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３０の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｃ）配列番号３４の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３８の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４２の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４６の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、請求項１８に記載の免疫アッセイ法。
【請求項２５】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号５４の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５０の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、請求項２４に記載の免疫アッセイ。
【請求項２６】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２２の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号１８の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、請求項２５に記載の免疫アッセイ。
【請求項２７】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２９の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３３の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３７の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号４１の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４５の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４９の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、請求項２１に記載の免疫アッセイ法。
【請求項２８】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号５７の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５３の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、請求項２７に記載の免疫アッセイ。
【請求項２９】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２５の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号２１の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、請求項２８に記載の免疫アッセイ。
【請求項３０】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、以下：
（ａ）配列番号２６及び２７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３０及び３１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｃ）配列番号３４及び３５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３８及び３９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４２及び４３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４６及び４７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む抗体と競合的に結合する、請求項１～１７のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【請求項３１】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、以下：
（ａ）配列番号２８及び２９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３２及び３３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３６及び３７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号４０及び４１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４４及び４５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４８及び４９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む抗体と競合的に結合する、請求項１及び４～１７のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【請求項３２】
試料中の全ＦＧＦ２１タンパク質を検出するためのキットであって、
（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する、捕捉抗体又はその抗原結合部分と、
（ｂ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する、検出抗体又はその抗原結合部分と、
（ｃ）検出試薬と、を備える、キット。
【請求項３３】
前記捕捉抗体及び前記検出抗体が、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する、請求項３２に記載のキット。
【請求項３４】
試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質を検出するためのキットであって、
（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する、捕捉抗体又はその抗原結合部分と、
（ｂ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する、検出抗体又はその抗原結合部分と、
（ｃ）検出試薬と、を備える、キット。
【請求項３５】
試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定するためのキットであって、
（ａ）（ｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の捕捉抗体又はその抗原結合部分、及び（ｉｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の検出抗体又はその抗原結合部分と、
（ｂ）（ｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第２の捕捉抗体又はその抗原結合部分、及び（ｉｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する第２の検出抗体又はその抗原結合部分と、

（ｃ）１つ以上の検出試薬と、を備える、キット。
【請求項３６】
前記第１の捕捉抗体及び第２の捕捉抗体が、同一の抗体である、請求項３５に記載のキット。
【請求項３７】
前記第１の捕捉抗体及び前記第１の検出抗体が、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する、請求項３５に記載のキット。
【請求項３８】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、常磁性ビーズに固定化される、請求項３２～３７のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３９】
前記検出抗体、第１の検出抗体、及び第２の検出抗体のうち１つ以上が、ビオチンにコンジュゲートされる、請求項３２～３８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４０】
前記検出試薬が、ストレプトアビジン－β－Ｄ－ガラクトピラノース複合体、ストレプトアビジン－ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項３２～３９のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４１】
レゾルフィンβ－Ｄ－ガラクトピラノシド、テトラメチルベンジジン、過酸化水素、又はその組合せをさらに備える、請求項４０に記載のキット。
【請求項４２】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、K_d約10^{-10}Ｍ～10^{-13}ＭでＦＧＦ２１に結合する、請求項３２～４１のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４３】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、K_d約10^{-10}Ｍ～10^{-13}ＭでＦＧＦ２１に結合する、請求項３２及び３５～４２のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４４】
前記検出抗体又は第１の検出抗体が、約０．１μｇ／ｍｌ～約１μｇ／ｍｌの濃度を持つ、請求項３２及び３５～４３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４５】
前記検出抗体又は第２の検出抗体が、約１μｇ／ｍｌ～約３μｇ／ｍｌの濃度を持つ、請求項３３～４２のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４６】
前記ストレプトアビジン－β－Ｄ－ガラクトピラノース複合体が、約１００ｐＭ～約４００ｐＭの濃度を持つ、請求項４０に記載のキット。
【請求項４７】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２６及び２７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３０及び３１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３４及び３５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３８及び３９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４２及び４３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４６及び４７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を備える、請求項３２～４６のいずれ

か一項に記載のキット。
【請求項４８】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号５４、５５、７４、及び７５からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５０、５１、７０、及び７１からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を備える、請求項３２～４６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４９】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２２、２３、６６、及び６７からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号１８、１９、６２、及び６３からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖と、を備える、請求項３２～４６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項５０】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２８及び２９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３２及び３３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３６及び３７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号４０及び４１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４４及び４５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４８及び４９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を備える、請求項３２及び３５～４６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項５１】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号５６、５７、７２、及び７３からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５２、５３、６８、及び６９からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を備える、請求項３２及び３５～４６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項５２】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２４、２５、６４、及び６５からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号２０、２１、６０、及び６１からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖と、を備える、請求項３２及び３５～４６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項５３】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２６の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３０の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｃ）配列番号３４の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３８の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４２の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４６の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を備える、請求項４７に記載のキット。
【請求項５４】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号５４の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５０の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を備える、請求項５３に記載のキット。
【請求項５５】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２２の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号１８の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を備える、請求項５４に記載のキット。
【請求項５６】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２９の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３３の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３７の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号４１の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４５の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４９の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を備える、請求項５０に記載のキット。
【請求項５７】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号５７の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５３の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を備える、請求項５６に記載のキット。
【請求項５８】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２５の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号２１の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を備える、請求項５７に記載のキット。
【請求項５９】
前記捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、以下：
（ａ）配列番号２６及び２７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３０及び３１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｃ）配列番号３４及び３５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３８及び３９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４２及び４３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４６及び４７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む抗体と競合的に結合する、請求項３２～４６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項６０】
前記検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、以下：
（ａ）配列番号２８及び２９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３２及び３３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３６及び３７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号４０及び４１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４４及び４５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４８及び４９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む抗体と競合的に結合する、請求項３２及び３５～４６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項６１】
前記試料が、血液試料である、請求項３２～６０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項６２】
前記試料が、血漿試料である、請求項３２～６０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項６３】
前記キットが、ウェル内感度約０．２ｐｇ／ｍｌ～約０．５ｐｇ／ｍｌで前記試料中にて、全ＦＧＦ２１タンパク質又は活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を検出する、請求項３２～６２のいずれか一項に記載のキット。
【請求項６４】
単離された抗ＦＧＦ２１抗体又はその抗原結合部分であって、
（ａ）配列番号２６～２９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３０～３３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３４～３７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３８～４１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４２～４５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４６～４９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、単離された抗ＦＧＦ２１抗体又はその抗原結合部分。
【請求項６５】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２６の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域Ｃ

ＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３０の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３４の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３８の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４２の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４６の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、請求項６４に記載の単離された抗体。
【請求項６６】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２７の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３１の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３５の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３９の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４３の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４７の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、請求項６４に記載の単離された抗体。
【請求項６７】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２８の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３２の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３６の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号４０の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４４の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４８の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、請求項６４に記載の単離された抗体。
【請求項６８】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２９の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３３の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３７の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号４１の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４５の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域Ｃ

ＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４９の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、請求項６４に記載の単離された抗体。
【請求項６９】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号５４の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５０の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、請求項６５に記載の単離された抗体。
【請求項７０】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号５５の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５１の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、請求項６６に記載の単離された抗体。
【請求項７１】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号５６の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５２の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、請求項６７に記載の単離された抗体。
【請求項７２】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号５７の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５３の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、請求項６８に記載の単離された抗体。
【請求項７３】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号７５の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号７１の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、請求項６５に記載の単離された抗体。
【請求項７４】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号７４の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号７０の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、請求項６６に記載の単離された抗体。
【請求項７５】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号７３の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号６９の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、請求項６７に記載の単離された抗体。
【請求項７６】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号７２の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号６８の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と

、を含む、請求項６８に記載の単離された抗体。
【請求項７７】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２２の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号１８の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む
、請求項６９に記載の単離された抗体。
【請求項７８】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２３の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号１９の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む
、請求項７０に記載の単離された抗体。
【請求項７９】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２４の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号２０の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む
、請求項７１に記載の単離された抗体。
【請求項８０】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２５の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号２１の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む
、請求項７２に記載の単離された抗体。
【請求項８１】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号６７の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号６３の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む
、請求項７３に記載の単離された抗体。
【請求項８２】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号６６の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号６２の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む
、請求項７４に記載の単離された抗体。
【請求項８３】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号６５の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号６１の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む
、請求項７５に記載の単離された抗体。
【請求項８４】
前記抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号６４の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号６０の前記アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む
、請求項７６に記載の単離された抗体。
【請求項８５】
請求項６４～８４のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合部分をコードする、単離された核酸。
【請求項８６】
請求項８５に記載の核酸を含む、宿主細胞。
【請求項８７】
抗体が産生されるように、請求項８６に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体を産生する方法。
【請求項８８】

前記抗体を前記宿主細胞から回収することをさらに含む、請求項８７に記載の方法。
【請求項８９】
請求項６４～８４のいずれか一項に記載の１つ以上の抗体又はその抗原結合部分を含む、組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１８年４月４日に出願された米国特許仮出願第６２／６５２，７０１号の利益を主張するものであり、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれている。
【０００２】
配列表
本出願には、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介してＡＳＣＩＩフォーマットで提出され、その全体が参照により本明細書に援用される配列表が含まれる。２０１９年４月２日に作成された該ＡＳＣＩＩコピーは、００Ｂ２０６＿０８０９＿ＳＬ．ｔｘｔという名称であり、１０５，５９５バイトのサイズである。
【０００３】
発明の分野
本発明は、ＦＧＦ２１に結合する抗体、並びにそれを用いた免疫アッセイ法及びキットに関する。
【背景技術】
【０００４】
線維芽細胞増殖因子２１（ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ２１：ＦＧＦ２１）はＦＧＦスーパーファミリの内分泌メンバであり、グルコース及び脂質代謝の調節に役割を果たす。ＦＧＦ２１は、シグナル伝達にＦＧＦ受容体（ＦＧＦ－ｒｅｃｅｐｔｏｒ：ＦＧＦＲ）アイソフォーム及び膜結合型共受容体Ｋｌｏｔｈｏ－β（ｍｅｍｂｒａｎｅ－ｂｏｕｎｄ ｃｏ－ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｋｌｏｔｈｏ－ｂｅｔａ：ＫＬＢ）を必要とする（Ｏｇａｗａら、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第１０４巻、第１８号：第７４３２～３７頁（２００７年）；米国特許出願公開第２０１０／０１８４６６５号）。ＦＧＦ２１は、グルコース恒常性及びインスリン感受性に有益な効果を示す、強力な疾患修飾タンパク質であり、動物疾患モデルで肥満及び２型糖尿病を反転することが示されている（Ｋｈａｒｉｔｏｎｅｎｋｏｖら、「Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．」、第１１５巻、第６号：第１６２７～３５頁（２００５年））。組換えＦＧＦ２１の投与は、レプチンシグナル伝達欠損（ｏｂ／ｏｂ若しくはｄｂ／ｄｂ）マウス又は高脂肪食（ｈｉｇｈ－ｆａｔ ｄｉｅｔ：ＨＦＤ）給餌マウスにおいて、肝脂質を低下させ、インスリン感受性を改善し、血糖コントロールを正常化することが示されている（Ｄｕｎｓｈｅｅら、「Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．」、第２９１巻、第１１号：第５９８６～９６頁（２０１６年）；米国特許出願公開第２０１５／０２１８２７６号）。組換えＦＧＦ２１で毎日処理した肥満かつ糖尿病のアカゲザルでは、血糖の低下及び様々な心血管リスク因子の改善もまた観察されている。
【０００５】
ＦＧＦ２１はＮ末端とＣ末端との両方でタンパク質分解性に切断されてもよく、このような切断はＦＧＦ２１の活性に影響することが示されている。Ｎ末端では、ヒトＦＧＦ２１における配列Ｈｉｓ－Ｐｒｏ－Ｉｌｅ－Ｐｒｏ（ＨＰＩＰ（配列番号７６））を有する最初のアミノ酸４つは、ジペプチジルペプチダーゼにより切断され得る（Ｄｕｎｓｈｅｅら（２０１６年））。Ｃ末端では、エンドペプチダーゼ線維芽細胞活性化タンパク質（ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｐｒｏｔｅｉｎ：ＦＡＰ）は、ヒトＦＧＦ２１におけるアミノ酸配列Ｓｅｒ－Ｇｌｎ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｓｅｒ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ａｌａ－Ｓｅｒ（ＳＱＧＲＳＰＳＹＡＳ（配列番号７７））を有する最も末端の

アミノ酸１０個を切断する（Ｄｕｎｓｈｅｅら（２０１６年））。４つのＮ末端アミノ酸を欠くＦＧＦ２１は完全に活性である一方、最後のＣ末端アミノ酸１０個を欠くＦＧＦ２１は共受容体ＫＬＢに結合できず、不活性である（Ｙｉｅら、「ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ」、第５８３巻：第１９～２４頁（２００９年））。

【０００６】

ＦＧＦ２１の血清レベルの増加が、肥満対象、非アルコール性脂肪性肝疾患（ｎｏｎａｌｃｏｈｏｌｉｃ ｆａｔｔｙ ｌｉｖｅｒ ｄｉｓｅａｓｅ：ＮＡＦＬＤ）対象、及び２型糖尿病対象で観察されたことから、循環ＦＧＦ２１は、糖尿病などの代謝障害のバイオマーカーであることが提示されている（Ｚｈａｎｇら、「Ｄｉａｂｅｔｅｓ」、第５７巻、第５号：第１２４６～１２５３頁（２００８年）；Ｌｉら、「Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｒｅｓ．Ｃｌｉｎ．Ｐｒａｃｔ．」、第９３巻、第１号：第１０～１６頁（２０１１年））。代謝障害の治療及び発症におけるＦＧＦ２１の重要な役割を考えると、個体におけるＦＧＦ２１タンパク質の量を判定するためのアッセイに対する当技術分野での必要性が依然として存在する。

【発明の概要】

【０００７】

本開示は、線維芽細胞増殖因子２１（ＦＧＦ２１）に結合する抗体、並びに試料中のＦＧＦ２１タンパク質、例えば、全ＦＧＦ２１タンパク質及び／又は活性ＦＧＦ２１タンパク質を検出及び定量化するための免疫アッセイ法におけるそのような抗体の使用を提供する。

【０００８】

ある特定の実施形態では、本開示は、試料中の全ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定するための免疫アッセイを提供する。例えば、限定するものではないが、試料中の全ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定する方法は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体を該試料と接触させて、試料－捕捉抗体組合せ材料を生成することと、（ｂ）該試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する検出抗体と接触させることと、（ｃ）該試料－捕捉抗体組合せ材料に結合した該検出抗体を検出することと、（ｄ）結合した該検出抗体のレベルに基づき、該試料中に存在する全ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、を含むことができる。ある特定の実施形態では、該捕捉抗体及び該検出抗体は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する。

【０００９】

ある特定の実施形態では、本開示は、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定するための免疫アッセイを提供する。例えば、限定するものではないが、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定する方法は、（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体を該試料と接触させて、試料－捕捉抗体組合せ材料を生成することと、（ｂ）該試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する検出抗体と接触させることと、（ｃ）該試料－捕捉抗体組合せ材料に結合した該検出抗体を検出することと、（ｄ）結合した該検出抗体のレベルに基づき、該試料中に存在する活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、を含むことができる。

【００１０】

ある特定の実施形態では、本開示は、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定するための免疫アッセイを提供する。例えば、限定するものではないが、本方法は、（ｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の捕捉抗体を該試料と接触させて、第１の試料－捕捉抗体組合せ材料を生成することと、（ｉｉ）該第１の試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の検出抗体と接触させることと、（ｉｉｉ）該試料－捕捉抗体組合せ材料に結合した該第１の検出抗体を検出することと、（ｉｖ）結合した該第１の検出抗体のレベルに基づき、該試料中に存在する全ＦＧＦ２

１タンパク質の量を算出することと、を含むことができる。ある特定の実施形態では、本方法は、（ｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第２の捕捉抗体を該試料と接触させて、第２の試料－捕捉抗体組合せ材料を生成することと、（ｉｉ）該第２の試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する第２の検出抗体と接触させることと、（ｉｉｉ）該試料－捕捉抗体組合せ材料に結合した該第２の検出抗体を検出することと、（ｉｖ）結合した該第２の検出抗体のレベルに基づき、該試料中に存在する活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、をさらに含むことができる。ある特定の実施形態では、本方法は、算出した全ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出した活性ＦＧＦ２１タンパク質の量と比較して、該試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定することを含むことができる。ある特定の実施形態では、該第１の捕捉抗体及び第２の捕捉抗体は、同一の抗体である。ある特定の実施形態では、該第１の捕捉抗体及び該第１の検出抗体は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する。

【００１１】

ある特定の実施形態では、免疫アッセイ法は、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）である。ある特定の実施形態では、免疫アッセイ法は、ウェル内感度約２ｐｇ／ｍｌ～約２０ｐｇ／ｍｌで該試料中にて、全ＦＧＦ２１タンパク質又は活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を検出する。

【００１２】

ある特定の実施形態では、免疫アッセイ法は単分子検出アッセイであり、例えば、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａ　ＨＤ－１　Ａｎａｌｙｚｅｒ（商標）を使用する。ある特定の実施形態では、免疫アッセイ法は、ウェル内感度約０．２ｐｇ／ｍｌ～約０．５ｐｇ／ｍｌで該試料中にて、全ＦＧＦ２１タンパク質又は活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を検出する。

【００１３】

本開示は、ＦＧＦ２１タンパク質を検出及び定量化する免疫アッセイ法を実施するためのキットをさらに提供する。ある特定の実施形態では、本開示は、試料中の全ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定するためのキットを提供する。例えば、限定するものではないが、全ＦＧＦ２１タンパク質の量を定量化するためのキットは、（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体と、（ｂ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する検出抗体と、（ｃ）検出試薬と、を備える。ある特定の実施形態では、該捕捉抗体及び該検出抗体は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する。

【００１４】

ある特定の実施形態では、本開示は、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定するためのキットを提供する。例えば、限定するものではないが、活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を定量化するためのキットは、（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体と、（ｂ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する検出抗体と、（ｃ）検出試薬と、を備える。

【００１５】

ある特定の実施形態では、本開示は、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定するためのキットを提供する。例えば、限定するものではないが、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定するためのキットは、（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の捕捉抗体と、（ｂ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の検出抗体と、（ｃ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第２の捕捉抗体と、（ｄ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する第２の検出抗体と、（ｅ）１つ以上の検出試薬と、を備えることができる。ある特定の実施形態では、該第１の捕捉抗体及び第２の捕捉抗体は、同一の抗体である。ある特定の実施形態では、該第１の捕捉抗体及び該第１の検出抗体は、ＦＧＦ２１のア

ミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する。
【００１６】
ある特定の実施形態では、該検出抗体、第１の検出抗体、及び／又は第２の検出抗体を検出するための検出試薬は、ストレプトアビジン－β－Ｄ－ガラクトピラノース複合体、ストレプトアビジン－ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体、及びその組合せからなる群から選択することができる。ある特定の実施形態では、該ストレプトアビジン－β－Ｄ－ガラクトピラノース複合体は、約１００ｐＭ～約４００ｐＭの濃度を持つ。
【００１７】
ある特定の実施形態では、本開示のキットは、レゾルフィンβ－Ｄ－ガラクトピラノシド、テトラメチルベンジジン、過酸化水素、又はその組合せをさらに含むことができる。例えば、限定するものではないが、本開示のキットは、検出試薬としてストレプトアビジン－β－Ｄ－ガラクトピラノース複合体を含んでもよく、レゾルフィンβ－Ｄ－ガラクトピラノシドをさらに含んでもよい。ある特定の実施形態では、本開示のキットは、検出試薬としてストレプトアビジン－ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体を含んでもよく、テトラメチルベンジジン及び過酸化水素をさらに含んでもよい。
【００１８】
ある特定の実施形態では、本明細書で開示されるキットは、ウェル内感度約２ｐｇ／ｍｌ～約２０ｐｇ／ｍｌで該試料中にて、全ＦＧＦ２１タンパク質又は活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を検出する。ある特定の実施形態では、本明細書で開示されるキットは、ウェル内感度約０．２ｐｇ／ｍｌ～約０．５ｐｇ／ｍｌで該試料中にて、全ＦＧＦ２１タンパク質又は活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を検出する。
【００１９】
ある特定の実施形態では、該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体は、常磁性ビーズに固定化される。ある特定の実施形態では、該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び／又は第２の捕捉抗体は、K_d約10^{-10}Ｍ～10^{-13}ＭでＦＧＦ２１に結合する。ある特定の実施形態では、該検出抗体、第１の検出抗体、及び第２の検出抗体は、ビオチンにコンジュゲートされる。ある特定の実施形態では、該検出抗体及び／又は第１の検出抗体は、K_d約10^{-10}Ｍ～10^{-13}ＭでＦＧＦ２１に結合する。ある特定の実施形態では、全ＦＧＦ２１タンパク質の量の検出に使用する検出抗体及び／又は第１の検出抗体は、約０．１μｇ／ｍｌ～約１μｇ／ｍｌの濃度を持つ。ある特定の実施形態では、活性ＦＧＦ２１タンパク質の量の検出に使用する検出抗体及び／又は第２の検出抗体は、約１μｇ／ｍｌ～約３μｇ／ｍｌの濃度を持つ。
【００２０】
ある特定の実施形態では、該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び／又は第２の捕捉抗体は、以下：（ａ）配列番号２６及び２７からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば２６、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号３０及び３１からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば３０、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、（ｃ）配列番号３４及び３５からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば３４、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、（ｄ）配列番号３８及び３９からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば３８、並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、（ｅ）配列番号４２及び４３からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば４２、並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、（ｆ）配列番号４６及び４７からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば４６並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む抗体を含むか、又は該抗体と競合的に結合する。
【００２１】
ある特定の実施形態では、該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び／又は第２の捕捉抗体は、以下：（ａ）配列番号５４、５５、７４、及び７５からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば５４、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、（ｂ）配列番号５０、５１、７０、及び７１からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば５０、並びに

その保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む抗体を含むか、又は該抗体と競合的に結合する。ある特定の実施形態では、該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び／又は第２の捕捉抗体は、以下：（ａ）配列番号２２、２３、６６、及び６７からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば２２、並びにその保存的置換を備える、重鎖と、（ｂ）配列番号１８、１９、６２、及び６３からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば１８、並びにその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む抗体を含むか、又は該抗体と競合的に結合する。

【００２２】

ある特定の実施形態では、該検出抗体及び／又は第１の検出抗体は、以下：（ａ）配列番号２８及び２９からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば２９、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号３２及び３３からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば３３、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、（ｃ）配列番号３６及び３７からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば３７、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、（ｄ）配列番号４０及び４１からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば４１、並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、（ｅ）配列番号４４及び４５からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば４５、並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、（ｆ）配列番号４８及び４９からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば４９並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む抗体を含むか、又は該抗体と競合的に結合する。

【００２３】

ある特定の実施形態では、該検出抗体及び／又は第１の検出抗体は、以下：（ａ）配列番号５６、５７、７２、及び７３からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば５７、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、（ｂ）配列番号５２、５３、６８、及び６９からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば５３、並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む抗体を含むか、又は該抗体と競合的に結合する。ある特定の実施形態では、該検出抗体及び／又は第１の検出抗体は、以下：（ａ）配列番号２４、２５、６４、及び６５からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば２５、並びにその保存的置換を備える、重鎖と、（ｂ）配列番号２０、２１、６０、及び６１からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば２１、並びにその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む抗体を含むか、又は該抗体と競合的に結合する。

【００２４】

ある特定の実施形態では、開示された免疫アッセイ法で使用される抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体であり得る。ある特定の実施形態では、開示された免疫アッセイ法で使用される抗体は、抗体断片、例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、ｓｃＦｖ、ダイアボディ、又はＦ（ａｂ’）$_2$断片であり得る。

【００２５】

ある特定の実施形態では、分析される試料は、対象から得られた血液試料である。ある特定の実施形態では、試料は、対象から得られた血漿試料である。

【００２６】

本開示は単離された抗ＦＧＦ２１抗体をさらに提供する。ある特定の実施形態では、単離された抗ＦＧＦ２１抗体又はその抗原結合部分は、（ａ）配列番号２６～２９からなる群から選択されるアミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号３０～３３からなる群から選択されるアミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、（ｃ）配列番号３４～３７からなる群から選択されるアミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、（ｄ）配列番号３８～４１からなる群から選択されるアミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、（ｅ）配列番号４２～４５からなる群から選択されるアミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、（ｆ）配列番号４６～４９からなる群から選択されるアミノ酸配列及びその保存的置換を

備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む。
【００２７】
ある特定の実施形態では、単離された抗ＦＧＦ２１抗体又はその抗原結合部分は、（ａ）配列番号５４～５７及び配列番号７２～７５からなる群から選択されるアミノ酸配列を備える重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列と、（ｂ）配列番号５０～５３及び配列番号６８～７１からなる群から選択されるアミノ酸配列を備える軽鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列と、を含む。ある特定の実施形態では、単離された抗ＦＧＦ２１抗体又はその抗原結合部分は、（ａ）配列番号２２～２５及び配列番号６４～６７からなる群から選択されるアミノ酸配列を備える重鎖配列と、（ｂ）配列番号１８～２１及び配列番号６０～６３からなる群から選択されるアミノ酸配列を備える軽鎖配列と、を含む。
【図面の簡単な説明】
【００２８】
【図１】図１は、抗ＦＧＦ２１抗体を発現する８０のハイブリドーマ上清のＥＬＩＳＡスクリーニングの結果を示す。
【図２】図２は、ｍＡｂ４又はｍＡｂ９捕捉抗体及びｍＡｂ１１検出抗体を用いたサンドイッチＥＬＩＳＡによる、インタクトＦＧＦ２１検出対切断ＦＧＦ２１検出の用量反応を示す。
【図３】図３は、抗ＦＧＦ２１抗体であるｍＡｂ４、ｍＡｂ９、ｍＡｂ１１、及びｍＡｂ１５のＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）表面プラズモン共鳴分析を示す。
【図４】図４は、ＦＧＦ２１に結合する抗ＦＧＦ２１抗体を示す模式図を示す（ＦＧＦ１９を陰性対照として用いる）。
【図５】図５は、全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１を検出するための比色ＥＬＩＳＡ法の非限定的な実施形態の模式図を示す。
【図６】図６は、全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイを実施するためのプロトコルの非限定的な実施形態を示す。
【図７】図７は、ｍＡｂ４又はｍＡｂ１１捕捉抗体のいずれか、及び種々の検出抗体を用いたＥＬＩＳＡアッセイの結果を示す。
【図８】図８は、例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイを用いた、野生型ヒトＦＧＦ２１及び切断されたヒトＦＧＦ２１の検出感度の比較を示す。
【図９】図９は、例示的な全ＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイを用いたヒトＦＧＦ２１の検出を示す。
【図１０】図１０は、例示的な抗ＦＧＦ２１抗体がマウスＦＧＦ２１と交差反応しないことを示すＥＬＩＳＡアッセイを示す。
【図１１】図１１は、例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイにおける、捕捉抗体ｍＡｂ４及びｍＡｂ９の感度の比較を示す。
【図１２】図１２は、捕捉抗体としてｍＡｂ４を、及び検出抗体としてｍＡｂ１５を使用する例示的な全ＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイの感度に対する、コーティング緩衝液及び濃度の効果を示す。
【図１３】図１３は、捕捉抗体としてｍＡｂ４を、及び検出抗体としてヒツジＣ末端ｐＡｂを使用する例示的な活性ＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイの感度に対する、コーティング緩衝液及び濃度の効果を示す。
【図１４】図１４は、捕捉抗体としてｍＡｂ４を、及び検出抗体としてｍＡｂ１５を使用する例示的な全ＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイの感度に対する、ビオチンコンジュゲート検出抗体及びＨＲＰ濃度の効果を示す。
【図１５】図１５は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａ　ＨＤ－１　Ａｎａｌｙｚｅｒ（商標）（「Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａ」）を用いて全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１を検出するための、単分子検出法の非限定的な実施形態の模式図を示す。
【図１６】図１６は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイのための２段階アッセイプロトコルの非限定的な実施

形態を示す。
【図１７】図１７は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた例示的な全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１アッセイによる、インタクトＦＧＦ２１検出対切断ＦＧＦ２１検出の用量反応を示す。
【図１８】図１８は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いて例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイを実施するためのプロトコルの非限定的な実施形態を示す。
【図１９】図１９は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイにおける標準曲線を示す。
【図２０】図２０は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイにおける、標準曲線実績を示す。
【図２１】図２１は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイでの、ＢＡ０１０及びＩＬ－１２緩衝液の存在下における全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１の検出感度の比較を示す。
【図２２】図２２は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイの感度に対する、高ビーズ（ｈｉｇｈ　ｂｅａｄ：ＨＢ）濃度及び低ビーズ（ｌｏｗ　ｂｅａｄ：ＬＢ）濃度の影響を示す。
【図２３】図２３は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイにおける、３つの捕捉常磁性ビーズロットを使用した全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１の検出感度の比較を示す。
【図２４】図２４は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた例示的な全ＦＧＦ２１アッセイにおける、様々な検出抗体を使用した全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１の検出感度の比較を示す。
【図２５】図２５は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた、捕捉抗体としてｍＡｂ４を、及び検出抗体としてｍＡｂ１５を使用する例示的な全ＦＧＦ２１アッセイにおけるフック効果の分析を示す。
【図２６】図２６は、例示的な全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイを用いた、健常ドナー由来の血漿及び血清試料中の全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１の検出を示す。
【図２７】図２７は、例示的な全ＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイ及び活性ＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイを用いた、高血圧であるドナー及び投薬を受けていないドナー由来の、血漿試料又はＭＳ－ＳＡＦＥで処理された血漿試料中の全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１の検出を示す。
【図２８Ａ】図２８Ａは、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイ（１日目）を使用して、健常者及び２型糖尿病患者由来の血漿試料中の全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１の検出を示す。
【図２８Ｂ】図２８Ｂは、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイ（２日目）を使用して、健常者及び２型糖尿病患者由来の血漿試料中の全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１の検出を示す。
【図２９】図２９は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを使用した、健常者及び２型糖尿病患者由来の血漿試料中の全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１の検出に使用される、例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイの再現性を示す。
【図３０】図３０は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた、２型糖尿病患者由来の血漿試料中の全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１の検出に使用される、例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイの希釈の線型性を示す。
【図３１】図３１は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた、２型糖尿病患者由来の血漿試料中の全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１の検出に使用される、例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイにおける定量下限（ｌｏｗｅｒ　ｌｉｍｉｔ　ｏｆ　ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ：ＬＬＯＱ）の決定を示す。
【図３２】図３２は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた、２型糖尿病患者由来の

血漿試料中の全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１の検出に使用される、例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイの特異性を示す。
【図３３】図３３は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイを使用して、Ｐ８００又はK_2－ＥＤＴＡを用いて調製した血漿試料中の全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１の検出を示す。
【図３４】図３４は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイにおける、ＧＣ２９８１９試験からのＰ８００及びK_2－ＥＤＴＡ血漿試料で検出した全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１の分析を示す。
【図３５】図３５は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いる例示的な全ＦＧＦ２１アッセイを使用して定量化されたＰ８００及びK_2－ＥＤＴＡ血漿試料（ＧＣ２９８１９臨床試験）において検出された、全ＦＧＦ２１と活性ＦＧＦ２１との量の間の相関性を示す。
【図３６】図３６は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いる例示的な活性ＦＧＦ２１アッセイを使用して定量化されたＰ８００及びK_2－ＥＤＴＡ血漿試料（ＧＣ２９８１９試験）において検出された、全ＦＧＦ２１と活性ＦＧＦ２１との量の間の相関性を示す。
【図３７】図３７は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた例示的な全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイを使用した、ＧＣ２９８１９試験からのＰ８００血漿試料の安定性の評価を示す。
【図３８】図３８は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた全アッセイ及び活性アッセイに対する、１０μｇ／ｍｌのマウスＩｇＧ又はヒツジＩｇＧを含有するアッセイ希釈液の効果を示す。
【図３９】図３９は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた全アッセイ及び活性アッセイに対する、１０μｇ／ｍｌのマウスＩｇＧ及びヒツジＩｇＧを含有するアッセイ希釈液の効果を示す。
【図４０】図４０は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いた全アッセイ及び活性アッセイに対する標準曲線上における、１０μｇ／ｍｌのマウスＩｇＧ又はヒツジＩｇＧを含有するアッセイ希釈液の効果を示す。
【図４１Ａ】図４１Ａは、例示的な抗ＦＧＦ２１抗体の軽鎖可変領域の配列を示す。軽鎖可変領域配列を、配列番号５０、５１、５２、５３、７１、７０、６９、及び６８として、それぞれ記載の順で開示する。ＣＤＲ－Ｌ１配列を、配列番号３８、３９、４０、４１、３８、３９、４０、及び４１として、それぞれ記載の順で開示し、ＣＤＲ－Ｌ２配列を、配列番号４２、４３、４４、４５、４２、４３、４４、及び４５として、それぞれ記載の順で開示し、ＣＤＲ－Ｌ３配列を、配列番号４６、４７、４８、４９、４６、４７、４８、及び４９として、それぞれ記載の順で開示する。
【図４１Ｂ】図４１Ｂは、例示的な抗ＦＧＦ２１抗体の重鎖可変領域の配列を示す。重鎖可変領域配列を、配列番号５４、５５、５６、５７、７５、７４、７３、及び７２として、それぞれ記載の順で開示する。ＣＤＲ－Ｈ１配列を、配列番号２６、２７、２８、２９、２６、２７、２８、及び２９として、それぞれ記載の順で開示し、ＣＤＲ－Ｈ２配列を、配列番号３０、３１、３２、３３、３０、３１、３２、及び３３として、それぞれ記載の順で開示し、ＣＤＲ－Ｈ３配列を、配列番号３４、３５、３６、３７、３４、３５、３６、及び３７として、それぞれ記載の順で開示する。
【発明を実施するための形態】
【００２９】
明確にするためであって、限定するものではないが、本願で開示された主題の詳細な説明は、以下の小項目に分けられる：
Ｉ．定義
ＩＩ．免疫アッセイ
ＩＩＩ．抗体：
ＩＶ．キット；及び、
Ｖ．例示的な実施形態。

【００３０】
Ｉ．　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技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されている意味を有する。以下の参考文献は、本発明において使用される多くの用語の一般的な定義を当業者に提供する：Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎら、「Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」（第２版、１９９４年）；「Ｔｈｅ Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ」（Ｗａｌｋｅｒ編、１９８８年）；「Ｔｈｅ Ｇｌｏｓｓａｒｙ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ」、第５版、Ｒ．Ｒｉｅｇｅｒら（編）、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ（１９９１年）；及び、Ｈａｌｅ＆Ｍａｒｈａｍ、「Ｔｈｅ Ｈａｒｐｅｒ Ｃｏｌｌｉｎｓ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｙ」（１９９１年）。本明細書で使用される場合、以下の用語は、特に明記されない限り、以下に記載される意味を有する。
【００３１】
用語「約」又は「およそ」とは、本明細書で使用される場合、当業者によって決定される特定の値の許容できる誤差範囲を指し、これは、その値がどのように測定又は決定されるか、例えば、測定システムの限界に部分的に依存する。例えば、「約」とは、所与の値の１実施当たり１つ又は１つよりも多くの標準偏差以内を意味し得る。特定の値が本願及び本特許請求の範囲に記載されている場合、別段の記載がない限り、用語「約」は、特定の値の許容される誤差範囲、例えば用語「約」によって修正された値の±１０％などを意味することができる。
【００３２】
用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」とは、本明細書で同義に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは、直鎖状であっても分岐状であってもよく、修飾アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸によって中断されていてもよい。これらの用語はまた、自然に、又は介入、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、若しくは任意の他の操作又は修飾、例えば、標識成分とのコンジュゲーションにより修飾されたアミノ酸ポリマーも包含する。例えば、アミノ酸（例えば、非天然アミノ酸等を含む）の１つ以上の類似体を含有するポリペプチド、及び当該技術分野で既知の他の修飾もまたこの定義に含まれる。用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」とは、本明細書で使用される場合、抗体を具体的に包含する。
【００３３】
用語「線維芽細胞増殖因子２１」又は「ＦＧＦ２１」とは、本明細書で使用される場合、別途指定されない限り、霊長類（例えば、ヒト）及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含む、任意の脊椎動物源由来の任意の天然ＦＧＦ２１を指す。この用語は、「全長」のプロセシングされていないＦＧＦ２１、及び細胞におけるプロセシングから生じるＦＧＦ２１の任意の形態を包含する。この用語はまた、別途指定されない限り、ＦＧＦ２１の天然に存在するバリアント、例えば、スプライスバリアント又は対立遺伝子バリアントも包含する。完全長ヒトＦＧＦ２１アミノ酸の非限定的な例を以下に示す：
【００３４】
ＨＰＩＰＤＳＳＰＬＬＱＦＧＧＱＶＲＱＲＹＬＹＴＤＤＡＱＱＴＥＡＨＬＥＩＲＥＤＧＴＶＧＧＡＡＤＱＳＰＥＳＬＬＱＬＫＡＬＫＰＧＶＩＱＩＬＧＶＫＴＳＲＦＬＣＱＲＰＤＧＡＬＹＧＳＬＨＦＤＰＥＡＣＳＦＲＥＬＬＬＥＤＧＹＮＶＹＱＳＥＡＨＧＬＰＬＨＬＰＧＮＫＳＰＨＲＤＰＡＰＲＧＰＡＲＦＬＰＬＰＧＬＰＰＡＬＰＥＰＰＧＩＬＡＰＱＰＰＤＶＧＳＳＤＰＬＳＭＶＧＰＳＱＧＲＳＰＳＹＡＳ（配列番号１）。
用語「全ＦＧＦ２１」とは、本明細書で使用される場合、ＦＧＦ２１の未処理形態、並びに細胞プロセシング、例えば、Ｎ末端切断ＦＧＦ２１及びＣ末端切断ＦＧＦ２１から生じる全ての形態のＦＧＦ２１を含む。１０個のＣ末端アミノ酸を欠くヒトＦＧＦ２１アミノ酸の非限定的な例は、
ＨＰＩＰＤＳＳＰＬＬＱＦＧＧＱＶＲＱＲＹＬＹＴＤＤＡＱＱＴＥＡＨＬＥＩＲＥＤＧ

ＴＶＧＧＡＡＤＱＳＰＥＳＬＬＱＬＫＡＬＫＰＧＶＩＱＩＬＧＶＫＴＳＲＦＬＣＱＲＰＤＧＡＬＹＧＳＬＨＦＤＰＥＡＣＳＦＲＥＬＬＬＥＤＧＹＮＶＹＱＳＥＡＨＧＬＰＬＨＬＰＧＮＫＳＰＨＲＤＰＡＰＲＧＰＡＲＦＬＰＬＰＧＬＰＰＡＬＰＥＰＰＧＩＬＡＰＱＰＰＤＶＧＳＳＤＰＬＳＭＶＧＰ（配列番号５８）である。４個のＮ末端アミノ酸を欠くヒトＦＧＦ２１アミノ酸の非限定的な例は、

ＤＳＳＰＬＬＱＦＧＧＱＶＲＱＲＹＬＹＴＤＤＡＱＱＴＥＡＨＬＥＩＲＥＤＧＴＶＧＧＡＡＤＱＳＰＥＳＬＬＱＬＫＡＬＫＰＧＶＩＱＩＬＧＶＫＴＳＲＦＬＣＱＲＰＤＧＡＬＹＧＳＬＨＦＤＰＥＡＣＳＦＲＥＬＬＬＥＤＧＹＮＶＹＱＳＥＡＨＧＬＰＬＨＬＰＧＮＫＳＰＨＲＤＰＡＰＲＧＰＡＲＦＬＰＬＰＧＬＰＰＡＬＰＥＰＰＧＩＬＡＰＱＰＰＤＶＧＳＳＤＰＬＳＭＶＧＰＳＱＧＲＳＰＳＹＡＳ（配列番号５９）である。例えば、限定するものではないが、用語「全ＦＧＦ２１」は、配列番号１、配列番号５８、又は配列番号５９に示されるアミノ酸配列を有するＦＧＦ２１タンパク質を含む。

【００３５】

用語「活性ＦＧＦ２１」とは、本明細書で使用される場合、そのＣ末端断片を保持するＦＧＦ２１タンパク質を指す。ある特定の実施形態では、この用語は、ＦＧＦ２１のＮ末端断片、例えば配列番号１のアミノ酸残基１～４が切断されているものといった、ＦＧＦ２１の処理形態を含む。例えば、限定するものではないが、用語「活性ＦＧＦ２１」は、配列番号１に示されるアミノ酸配列、又は配列番号５９に示されるアミノ酸配列を有するＦＧＦ２１タンパク質を含む。

【００３６】

用語「抗体」とは、本明細書では最も広い意味で使用され、それらが所望の抗原結合活性を呈する限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体断片を含めた（これらに限定されない）、様々な抗体構造を包含する。

【００３７】

「抗体断片」とは、インタクトな抗体が結合する抗原に結合する、インタクトな抗体の一部分を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例として、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）$_2$；ダイアボディ；線状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【００３８】

目的とする抗原、例えば、ＦＧＦ２１タンパク質に「結合する」抗体は、その抗体が、アッセイ試薬、例えば、捕捉抗体又は検出抗体として有用であるように充分な親和性で抗原に結合するものである。典型的には、かかる抗体は、他のポリペプチドと有意に交差反応しない。標的分子へのポリペプチドの結合に関して、特定のポリペプチド標的上の特定のポリペプチド又はエピトープの「特異的結合」、又はそれに「特異的に結合する」、又はそれに「特異的な」という用語は、非特異的相互作用とは測定可能な程度に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、一般に結合活性を有しない同様の構造を有する分子である対照分子の結合と比較して標的分子の結合を決定することによって測定され得る。

【００３９】

用語「抗ＦＧＦ２１抗体」とは、抗体が、例えば本明細書に記載のアッセイにおける作用物質としてＦＧＦ２１を標的とする際の作用物質として有用であるような充分な親和性で、ＦＧＦ２１に結合することができる抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗ＦＧＦ２１抗体が関係のない非ＦＧＦ２１タンパク質に結合する程度は、例えば、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）によって測定される、抗体のＦＧＦ２１との結合の約１０％未満である。ある特定の実施形態では、ＦＧＦ２１に結合する抗体は、１Ｍ以下、１００ｍＭ以下、１０ｍＭ以下、１ｍＭ以下、１００μＭ以下、１０μＭ以下、１μＭ以下、１００ｎＭ以下、１０ｎＭ以下、１ｎＭ以下、０．１ｎＭ以下、０．０１ｎＭ以下、又は０．００１ｎＭ以下の解離定数（K_d）を有する。ある特定の実施形態では、本明細書で開示されるＦＧＦ２１に結合する抗体のK_dは、10^{-3}Ｍ以下又は10^{-8}Ｍ以下、例えば10^{-8}Ｍ

～10^{-13}M、例えば10^{-9}M～10^{-13}Mであり得る。ある特定の実施形態では、本明細書で開示されるＦＧＦ２１に結合する抗体のK_dは、10^{-10}M～10^{-13}Mであり得る。ある特定の実施形態では、抗ＦＧＦ２１抗体は、異なる種のＦＧＦ２１間で保存されているＦＧＦ２１のエピトープに結合する。

【００４０】

本明細書の目的のための「アクセプタヒトフレームワーク」は、以下に定義される、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来する、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）フレームワーク又は重鎖可変ドメイン（ＶＨ）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「由来の」アクセプタヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含んでいてもよく、又はアミノ酸配列の変更を含んでいてもよい。ある特定の実施形態では、アミノ酸変更の数は、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、又は２以下である。ある特定の実施形態では、ＶＬアクセプタヒトフレームワークの配列は、ＶＬヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と同一である。

【００４１】

「親和性」とは、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナ（例えば、抗原）との間の、合計の非共有性相互作用の強度を指す。別途指定されない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」とは、結合対のメンバ（例えば、抗体及び抗原）間の１：１の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Ｘの、そのパートナＹに対する親和性は、一般に、解離定数（K_d）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当技術分野で公知の一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例証的説明及び例示的な実施形態が、以下に記載される。

【００４２】

「親和性成熟」抗体とは、変化を有しない親抗体と比較して、１つ以上の超可変領域（ＣＤＲ）において１つ以上の変化を有し、かかる改変によって抗原に対する抗体の親和性を改善する、抗体を指す。

【００４３】

参照抗体と「結合において競合する抗体」とは、競合アッセイにおいて参照抗体のその抗原への結合を５０％以上遮断する抗体を指し、逆に、参照抗体は、競合アッセイにおいて抗体のその抗原への結合を５０％以上遮断する。例示の競合アッセイが、「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ」、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー）に記載されている。

【００４４】

「捕捉抗体」とは、本明細書で使用される場合、試料中の標的分子、例えばＦＧＦ２１の形態に特異的に結合する抗体を指す。ある特定の条件下で、捕捉抗体は標的分子と複合体を形成し、これにより、抗体－標的分子複合体が試料の残りから分離され得る。ある特定の実施形態では、かかる分離は、捕捉抗体に結合しなかった試料中の物質又は材料を洗い流すことを含み得る。ある特定の実施形態では、捕捉抗体は、例えば常磁性ビーズなどのプレート又はビーズ等であるが、これらに限定されない固体支持体表面に結合し得る。

【００４５】

「検出抗体」とは、本明細書で使用される場合、試料又は試料－捕捉抗体組合せ材料中の標的分子に特異的に結合する抗体を指す。ある特定の条件下で、検出抗体は、標的分子又は標的分子－捕捉抗体複合体と複合体を形成する。検出抗体は、増幅され得る標識を用いて直接、又は例えば標識され、かつ検出抗体に結合する別の抗体を使用して間接的に、のいずれかで検出されることができる。直接標識の場合、検出抗体は、典型的には、例えばビオチン又はルテニウムを含むが、これらに限定されない、いくつかの手段によって検出可能な部分にコンジュゲートされる。

【００４６】

用語「キメラ」抗体とは、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の源又は種に由来し、重鎖及び／又は軽鎖の残りが異なる源又は種に由来する抗体を指す。

【００４７】

抗体の「クラス」とは、その重鎖によって保有される定常ドメイン又は定常領域の型を指す。５つの主要なクラスの抗体、つまり：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭが存在し、これらのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1、及びIgA_2にさらに分けられてもよい。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。

【００４８】

本明細書で使用される「細胞毒性薬」という用語は、細胞機能を阻害若しくは阻止し、及び／又は細胞死若しくは破壊を引き起こす物質を指す。細胞毒性薬としては、放射性同位体（例えば、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}、及びＬｕの放射性同位体）；化学療法剤又は化学療法薬（例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンＣ、クロラムブシル、ダウノルビシン、若しくは他の挿入剤）；増殖阻害剤；核酸分解酵素などの酵素及びそれらの断片；抗生物質；細菌、真菌、植物、又は動物起源の小分子毒素又は酵素活性毒素（それらの断片及び／若しくはバリアントを含む）などの毒素；及びに下に記載される様々な抗腫瘍剤又は抗がん剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【００４９】

「エフェクタ機能」とは、抗体のアイソタイプにより異なる抗体のＦｃ領域に起因する生物活性を指す。抗体エフェクタ機能の例としては、以下：Ｃ１ｑ結合及び補体依存性細胞毒性（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ：ＣＤＣ）；Ｆｃ受容体結合；抗体依存性細胞媒介細胞毒性（ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｅｌｌ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ：ＡＤＣＣ）；食作用；細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体）の下方制御；並びにＢ細胞活性化が挙げられる。

【００５０】

用語「Ｆｃ領域」とは、本明細書では定常領域の少なくとも一部分を含有する免疫グロブリン重鎖のＣ末端領域を定義するために使用される。この用語は、天然配列Ｆｃ領域及びバリアントＦｃ領域を含む。ある特定の実施形態では、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は、Ｃｙｓ２２６又はＰｒｏ２３０から、重鎖のカルボキシル末端に及ぶ。しかしながら、Ｆｃ領域のＣ末端のリジン（Ｌｙｓ４４７）は、存在する場合もあれば、しない場合もある。本明細書で特に指示がない限り、Ｆｃ領域又は定常領域のアミノ酸残基の番号付けは、Ｋａｂａｔ ら、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」、第５版、Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ、メリーランド州ベセスダ（１９９１年）に記載されている、ＥＵインデックスとも呼ばれるＥＵ番号付けシステムに従う。

【００５１】

「フレームワーク」又は「ＦＲ」とは、超可変領域（ＣＤＲ）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのＦＲは、一般に、４つのＦＲドメイン：ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４からなる。したがって、ＣＤＲ及びＦＲ配列は、一般に、ＶＨ（又はＶＬ）において次の配列：ＦＲ１－Ｈ１（Ｌ１）－ＦＲ２－Ｈ２（Ｌ２）－ＦＲ３－Ｈ３（Ｌ３）－ＦＲ４で出現する。

【００５２】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」とは、本明細書で、天然抗体構造と実質的に同様の構造を有するか、又は本明細書に定義されるＦｃ領域を含有す

る重鎖を有する抗体を指すように同義に使用される。
【００５３】
「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞によって産生された、若しくはヒト抗体レパートリを利用する非ヒト源に由来する、抗体のアミノ酸配列、又は他のヒト抗体コード配列に対応する、アミノ酸配列を保有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を明確に除外する。
【００５４】
「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンＶＬ又はＶＨフレームワーク配列の選択において最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンＶＬ又はＶＨ配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからである。一般に、配列のサブグループは、Ｋａｂａｔら、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」、第５版、ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ９１～３２４２、メリーランド州ベセスダ（１９９１年）、第１～３巻にあるようなサブグループである。ある特定の実施形態では、ＶＬの場合、サブグループは、Ｋａｂａｔら（上記参照）に見られるようなサブグループカッパＩである。ある特定の実施形態では、ＶＨの場合、サブグループは、Ｋａｂａｔら（上記参照）に見られるようなサブグループＩＩＩである。
【００５５】
「ヒト化」抗体とは、非ヒトＣＤＲからのアミノ酸残基及びヒトＦＲからのアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。ある特定の実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含むものであり、それにおいて、ＣＤＲ（例えば、ＣＤＲ）の全て又は実質的に全てが非ヒト抗体のものに相当し、ＦＲの全て又は実質的に全てがヒト抗体のものに相当する。ヒト化抗体は、場合によって、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。抗体、例えば非ヒト抗体の、「ヒト化型」とは、ヒト化を受けた抗体を指す。
【００５６】
用語「超可変領域」又は「ＣＤＲ」とは、本明細書で使用される場合、配列が超可変であり（「相補性決定領域」又は「ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ：ＣＤＲ」）、かつ／又は構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成し、かつ／又は抗原接触残基（「抗原接触体」）を含有する、抗体可変ドメインの領域の各々を指す。別途指定されない限り、ＣＤＲ残基、及び可変ドメイン中の他の残基（例えば、ＦＲ残基）は、Ｋａｂａｔら（前出）に従って本明細書では番号付けされる。一般に、抗体は６つのＣＤＲを含み、３つがＶＨ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）にあり、３つがＶＬ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）にある。本明細書における例示的なＣＤＲは、
（ａ）アミノ酸残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）、９１～９６（Ｌ３）、２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）、及び９６～１０１（Ｈ３）で生じる超可変ループ（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ、「Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．」、第１９６巻：第９０１～９１７頁（１９８７年））；
【００５７】
（ｂ）アミノ酸残基２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）、８９～９７（Ｌ３）、３１～３５ｂ（Ｈ１）、５０～６５（Ｈ２）、及び９５～１０２（Ｈ３）で生じるＣＤＲ（Ｋａｂａｔら、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」、第５版、Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ、メリーランド州ベセスダ（１９９１年））；
（ｃ）アミノ酸残基２７ｃ～３６（Ｌ１）、４６～５５（Ｌ２）、８９～９６（Ｌ３）、３０～３５ｂ（Ｈ１）、４７～５８（Ｈ２）、及び９３～１０１（Ｈ３）で生じる抗原接触（ＭａｃＣａｌｌｕｍら、「Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．」、第２６２巻：第７３２～７４５頁（１９９６年））；並びに、
（ｄ）ＣＤＲアミノ酸残基４６～５６（Ｌ２）、４７～５６（Ｌ２）、４８～５６（Ｌ

２）、４９～５６（Ｌ２）、２６～３５（Ｈ１）、２６～３５ｂ（Ｈ１）、４９～６５（Ｈ２）、９３～１０２（Ｈ３）、及び９４～１０２（Ｈ３）を含む、（ａ）、（ｂ）、及び／又は（ｃ）の組合せ、を含む。

【００５８】

「免疫複合体」とは、細胞毒性薬を含むが、これに限定されない１つ以上の異種分子（複数可）にコンジュゲートされる抗体を指す。

【００５９】

「単離された」抗体は、その自然環境の構成成分から分離された抗体である。ある特定の実施形態では、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、等電点電気泳動（ＩＥＦ）、キャピラリ電気泳動）、又はクロマトグラフ（例えば、イオン交換又は逆相ＨＰＬＣ）によって決定される、９５％超又は９９％超の純度まで精製される。抗体純度の評価のための方法の総説については、例えば、Ｆｌａｔｍａｎら、「Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ｂ」、第８４８巻：第７９～８７頁（２００７年）を参照されたい。

【００６０】

「単離された」核酸とは、その自然環境の構成成分から分離された核酸分子を指す。単離核酸には、核酸分子を通常含有する細胞内に含有される核酸分子であるが、その核酸分子が、染色体外に、又はその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する核酸分子を含む。

【００６１】

「抗体をコードする単離された核酸」（特異的抗体、例えば、抗ＦＧＦ２１抗体への言及を含む）とは、抗体重鎖及び軽鎖（又はその断片）をコードする１つ以上の核酸分子、例えば、単一のベクター又は別個のベクター中の核酸分子（複数可）及び宿主細胞内の１つ以上の位置に存在する核酸分子（複数可）を指す。

【００６２】

用語「モノクローナル抗体」とは、本明細書で使用される場合、実質的に均一な抗体の集合から得られる抗体を指す。すなわち、集合に含まれる個々の抗体が、同一であり、及び／又は同じエピトープに結合するが、但し、例えば、天然に存在する変異又はモノクローナル抗体製剤の製造中に生じる変異を含む、可能なバリアント抗体は除く。このようなバリアントは、一般的に、少量存在する。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は対照的に、モノクローナル抗体調製物の各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。したがって、修飾語「モノクローナル」とは、実質的に同種の抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものと解釈されるべきではない。例えば、本願で開示された主題に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えＤＮＡ法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全て又は一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含むが、これらに限定されない様々な技法によって作製することができ、かかる方法及び他の例示のモノクローナル抗体の作製方法は、本明細書に記載されている。

【００６３】

「ネイキッド抗体」とは、異種性部分（例えば、細胞傷害性部分）又は放射標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。ネイキッド抗体は、医薬製剤中に存在し得る。

【００６４】

「天然抗体」とは、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然ＩｇＧ抗体は、ジスルフィド結合されている２つの同一の軽鎖及び２つの同一の重鎖からなる約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。Ｎ末端からＣ末端まで、各重鎖は、可変重ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＨ）を有し、続いて３つの定常ドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３）を有する。同様に、Ｎ末端からＣ末端まで、各軽鎖は、可変軽ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＬ）を有し、続いて定常軽（ＣＬ）ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる２

種類の１つに割り当てられてもよい。
【００６５】
「精製された」ポリペプチド（例えば、抗体）とは、本明細書で使用される場合、ポリペプチドがその天然環境下で存在するよりもさらに純粋な形態で存在するように、及び／又は実験室条件下で最初に合成及び／又は増幅されたときに、ポリペプチドの純度が増加することを指す。純度は、相対用語であり、必ずしも絶対純度を意味しない。
【００６６】
用語「添付文書」とは、本明細書で使用される場合、パッケージの構成要素の使用に関する情報を含有する、商用パッケージに習慣的に含まれる指示書を指す。
【００６７】
参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、配列をアラインメントし、配列同一性最大パーセントを得るのに必要な場合はギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の部分として考慮せずに、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基の割合として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、当技術分野の範囲内の様々な方式で、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。当業者であれば、比較される配列の全長にわたる最大のアラインメントを達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含めた、配列を整列させるのに適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書での目的のために、アミノ酸配列同一性（％）の値は、配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ－２を使用して生成される。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータプログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．の著作であり、ソースコードは、ユーザ文書と共に米国著作権庁（Ｕ．Ｓ．Ｃｏｐｙｒｉｇｈｔ　Ｏｆｆｉｃｅ、ワシントンＤＣ、２０５５９）に提出されて、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７として登録されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．（カリフォルニア州サウスサンフランシスコ）から公的に入手可能であるか、又はソースコードからコンパイルされてもよい。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、デジタルＵＮＩＸ　Ｖ４．０Ｄを含めたＵＮＩＸオペレーティングシステムで使用する場合はコンパイルするべきである。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ－２プログラムによって設定され、変動しない。
ＡＬＩＧＮ－２がアミノ酸配列比較に用いられる状況下で、所与のアミノ酸配列Ｂへの、それとの、又はそれに対する所与のアミノ酸配列Ａのアミノ酸配列同一性％（あるいは、所与のアミノ酸配列Ｂへの、それとの、又はそれに対するある特定のアミノ酸配列同一性％を有するか、又は含む所与のアミノ酸配列Ａと表現され得る）は、以下のように計算される：
分率Ｘ／Ｙ×１００
【００６８】
式中、Ｘは、配列整列プログラムＡＬＩＧＮ－２によって、そのプログラムのＡとＢとのアラインメントにおいて完全な一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Ｙは、Ｂ中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと等しくない場合、Ｂに対するＡのアミノ酸配列同一性（％）は、Ａに対するＢのアミノ酸配列同一性（％）と等しくはならないことが理解されるだろう。特に別段明記されない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性（％）の値は、ＡＬＩＧＮ－２コンピュータプログラムを使用して直前の段落に記載されるように得られる。
【００６９】
「可変領域」又は「可変ドメイン」との用語とは、抗原に対する抗体の結合に関与する抗体重鎖又は軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、ＶＨ及びＶＬ）は、一般に類似の構造を有し、各ドメインが４つの保存フレームワーク領域（ＦＲ）及び３つの超可変領域（ＣＤＲ）を含む。（例えば、Ｋｉｎｄｔら、「Ｋｕｂｙ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」、第６版、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏ．、第

９１頁（２００７年）を参照されたい。）単一のＶＨ又はＶＬドメインは、抗原結合特異性を付与するために充分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、抗原に結合する抗体のＶＨ又はＶＬドメインを使用し、それぞれ、相補的ＶＬ又はＶＨドメインのライブラリをスクリーニングして、単離してもよい。例えば、Ｐｏｒｔｏｌａｎｏら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１５０巻：第８８０～８８７頁（１９９３年）；Ｃｌａｒｋｓｏｎら、「Ｎａｔｕｒｅ」、第３５２巻：第６２４～６２８頁（１９９１年）を参照されたい。

【００７０】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養」とは、本明細書で同義に使用され、かかる細胞の子孫を含む、外因性核酸が導入された細胞を指す。宿主細胞としては、初代形質転換細胞、及び継代の数にかかわらずそれに由来する子孫を含む、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれる。子孫は、親細胞と完全に同一の核酸含量でない場合があるが、突然変異を含んでもよい。元々の形質転換された細胞についてスクリーニングされるか、又は選択されるのと同じ機能又は生物活性を有する変異体子孫が本発明に含まれる。

【００７１】

用語「ベクター」とは、本明細書で使用される場合、連結している別の核酸を増殖することができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、及びそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれるベクターを含む。特定のベクターは、それらが作動可能に連結している核酸の発現を誘導し得る。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と称される。

【００７２】

用語「標識」又は「検出可能な標識」とは、本明細書で使用される場合、検出又は定量化される物質に結合し得る任意の化学基又は部分、例えば、抗体を指す。標識は、物質の高感度検出又は定量化に好適である検出可能な標識である。検出可能な標識の非限定的な例としては、発光標識、例えば、蛍光、リン光、化学発光、生物発光、及び電気化学発光標識、放射性標識、酵素、粒子、磁性物質、及び電気活性種などが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、検出可能な標識は、特異的結合反応に関与することによってその存在をシグナル伝達し得る。かかる標識の非限定的な例としては、ハプテン、抗体、ビオチン、ストレプトアビジン、Ｈｉｓタグ、ニトリロ三酢酸、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ、及びグルタチオンなどが挙げられる。

【００７３】

用語「検出手段」とは、本明細書で使用される場合、あるアッセイで後に読み取られるシグナル報告により検出可能な抗体の存在を検出するために使用される部分又は技法を指す。典型的には、検出手段は、例えば、マイクロタイタプレート上で捕捉される標識などの固定化標識を増幅する検出試薬、例えば、アビジン、ストレプトアビジン－ＨＲＰ、又はストレプトアビジン－β－Ｄ－ガラクトピラノースを使用する。

【００７４】

用語「検出すること」とは、本明細書では、標的分子、例えばＦＧＦ２１又はその処理形態の定性的測定と定量的測定との両方を含むように使用される。ある特定の実施形態では、検出は、単に試料中の標的分子の存在を特定することと、標的分子が検出可能なレベルで試料中に存在するかを決定することとを含む。

【００７５】

本明細書で同義に使用される「個体」又は「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物には、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト、及びサル等の非ヒト霊長類）、ウサギ、及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、個体又は対象は、ヒトである。

【００７６】

「試料」とは、本明細書で使用される場合、より大量の材料のわずか一部を指す。ある特定の実施形態では、試料は、培養中の細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、生体

体液（例えば、血液、血漿、血清、便、尿、リンパ液、腹水、管洗浄液、唾液、及び脳脊髄液）、及び組織試料を含むが、これらに限定されない。試料の供給源は、固形組織（例えば、新鮮、凍結、及び／又は保存臓器、組織試料、生検材料、若しくは穿刺液）、血液若しくは任意の血液成分、体液（例えば、尿、リンパ液、脳脊髄液、羊水、腹腔液、若しくは間質液）、又は順肝細胞を含む個体由来の細胞であり得る。

ＩＩ．免疫アッセイ

【００７７】

本願で開示された主題は、ＦＧＦ２１タンパク質の検出及び定量化の方法を提供する。ある特定の実施形態では、本開示は、試料中の全ＦＧＦ２１タンパク質及び／又は活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定するための免疫アッセイを提供する。本開示は、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定するための免疫アッセイ法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、本開示の免疫アッセイ法は、本明細書に開示された抗ＦＧＦ２１抗体を使用する。本願で開示された方法で使用される抗ＦＧＦ２１抗体の非限定的な例は、表８～表１３及び表１６～表１９に提供される。

【００７８】

ある特定の実施形態では、本開示は、ヒトＦＧＦ２１タンパク質を検出及び定量化する免疫アッセイ法を提供する。例えば、免疫アッセイ法は、試料中のＦＧＦ２１、例えば、全ヒトＦＧＦ２１及び／又は活性ヒトＦＧＦ２１タンパク質の検出及び定量化に用いることができる。本開示の免疫アッセイ法は、サンドイッチアッセイ、酵素結合免疫吸着検定（ＥＬＩＳＡ）アッセイ、ＥＬＩＳＡのデジタル形態、電気化学アッセイ（ＥＣＬ）アッセイ、及び磁気的免疫アッセイ法を含むが、これらに限定されない、当技術分野で公知の戦略を組み込むことができる。ある特定の実施形態では、免疫アッセイ法は、例えば、単一分子アレイを用いる単一分子免疫アッセイである。例えば、限定するものではないが、免疫アッセイ法は、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ器具、例えばＳｉｍｏａ　ＨＤ－１　Ａｎａｌｙｚｅｒ（商標）を用いて実施することができる。

【００７９】

ある特定の実施形態では、本開示の方法は、試料中の捕捉抗ＦＧＦ２１抗体（ｃａｐｔｕｒｅ　ａｎｔｉ－ＦＧＦ２１　ａｎｔｉｂｏｄｙ）のＦＧＦ２１タンパク質への結合が許容される条件下において、対象から得られた試料を、本明細書に記載されるものなどの捕捉抗ＦＧＦ２１抗体と接触させることを含む。例えば、限定するものではないが、試料を、ＦＧＦ２１上に存在するエピトープに結合する捕捉抗体と共にインキュベートして、試料－捕捉抗体組合せ材料を生成することができる。試料及び捕捉抗体のインキュベーションのための条件は、アッセイの感度を最大にするため及び／又は解離を最小にするため、並びに試料中に存在するＦＧＦ２１タンパク質が捕捉抗体に結合することを確実にするために、選択することができる。

【００８０】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される免疫アッセイ法で使用される捕捉抗体は、約０．１μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌの濃度で使用することができる。例えば、限定するものではないが、捕捉抗体は、約０．１μｇ／ｍｌ～約０．５μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約１．０μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約１．５μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約２．０μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約２．５μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約３．０μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約３．５μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約４．０μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約４．５μｇ／ｍｌ、約０．５μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約１．０μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約１．５μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約２．０μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約２．５μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約３．０μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約３．５μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約４．０μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約４．５μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約０．５μｇ／ｍｌ～約２．０μｇ／ｍｌ、又は約０．５μｇ／ｍｌ～約１．０μｇ／ｍｌ、例えば約０．５μｇ／ｍｌの濃度で使用することができる。

【００８１】
ある特定の実施形態では、捕捉抗体は、コーティング緩衝液中で希釈することができる。コーティング緩衝液の非限定的な例として、ＰＢＳ、炭酸塩緩衝液、重炭酸塩緩衝液、又はそれらの組合せが挙げられる。ある特定の実施形態では、コーティング緩衝液は、炭酸水素ナトリウムである。ある特定の実施形態では、コーティング緩衝液は、ＰＢＳである。ある特定の実施形態では、コーティング緩衝液は、約１０ｍＭ～約１Ｍの濃度で使用することができる。例えば、限定するものではないが、コーティング緩衝液は、約１０ｍＭ～約１００ｍＭ、約１０ｍＭ～約２００ｍＭ、約１０ｍＭ～約３００ｍＭ、約１０ｍＭ～約４００ｍＭ、約１０ｍＭ～約５００ｍＭ、約１０ｍＭ～約６００ｍＭ、約１０ｍＭ～約７００ｍＭ、約１０ｍＭ～約８００ｍＭ、約１０ｍＭ～約９００ｍＭ、約１００ｍＭ～約１Ｍ、約２００ｍＭ～約１Ｍ、約３００ｍＭ～約１Ｍ、約４００ｍＭ～約１Ｍ、約５００ｍＭ～約１Ｍ、約６００ｍＭ～約１Ｍ、約７００ｍＭ～約１Ｍ、約８００ｍＭ～約１Ｍ、又は約９００ｍＭ～約１Ｍの濃度で使用することができる。

【００８２】
捕捉抗体は、本明細書で使用される場合、固相上に固定化してもよい。例えば、限定するものではないが、固相は、例えば、表面、粒子、多孔質マトリクス、及びビーズなどの形態の支持体を含む、免疫測定アッセイにおいて有用な任意の不活性支持体又は担体であり得る。一般に使用されている支持体の非限定的な例としては、小シート、ＳＥＰＨＡＤＥＸ（登録商標）、ゲル、ポリ塩化ビニル、プラスチックビーズ、並びにポリエチレン、ポリプロピレン、及びポリスチレンなどから製造されたアッセイプレート又は試験管、例えば、９６ウェルマイクロタイタプレート、並びに濾紙等の粒子材料、アガロース、架橋デキストラン、及び他の多糖が挙げられる。ある特定の実施形態では、固定化に使用される固相は、ビーズであってもよい。例えば、限定するものではないが、本明細書に開示される捕捉抗体は、常磁性ビーズに固定化される。ある特定の実施形態では、固定化捕捉抗体は、一度にいくつかの試料を分析するために使用され得るマイクロタイタプレート上にコーティングされる。

【００８３】
ある特定の実施形態では、捕捉抗体に結合した常磁性ビーズは、約０．１×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約１０．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、例えば、約０．１×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約０．５×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約０．１×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約１．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約０．１×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約２．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約０．１×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約３．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約０．１×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約４．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約０．１×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約５．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約０．１×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約６．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約０．１×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約７．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約０．１×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約８．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約０．１×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約９．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約０．５×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約１０．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約１．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約１０．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約２．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約１０．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約３．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約１０．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約４．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約１０．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約５．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約１０．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約６．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約１０．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約７．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約１０．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約８．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約１０．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約９．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約１０．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約０．５×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約１．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、約０．５×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約２．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、又は約０．５×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約３．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌの濃度で使用することができる。ある特定の実施形態では、常磁性ビーズは、約０．５×１０^{7}ビーズ／ｍｌ～約２．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌの濃度で使用することができる。ある特定の実施形態では、常磁性ビーズは、１．０×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、例えば約１．２２×１０^{7}ビーズ／ｍｌの濃度、又は約０．５×１０^{7}ビーズ／ｍｌ、例え

ば約０．５９×１０^{7}ビーズ／ｍｌの濃度で使用することができる。

【００８４】

本明細書に開示された免疫アッセイ法は、試料－捕捉抗体組合せ材料を検出抗体と接触させることをさらに含み得る。ある特定の実施形態では、検出抗体は、ＦＧＦ２１上に存在するエピトープに結合する。ある特定の実施形態では、検出抗体は試料－捕捉抗体組合せ材料上に存在するエピトープに結合するが、ＦＧＦ２１の不在下では捕捉抗体上には結合しない。ある特定の実施形態では、試料－捕捉抗体の組合せに結合した検出抗体を、続いて、検出手段、例えば１つ以上の検出試薬を用いて、検出抗体について測定又は定量して、検出抗体によって結合されたＦＧＦ２１タンパク質、例えば全ＦＧＦ２１又は活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定する。

【００８５】

ある特定の実施形態では、検出抗体は、約０．１μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌの濃度で使用することができる。例えば、限定するものではないが、検出抗体は、約０．１μｇ／ｍｌ～約０．５μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約１．０μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約１．５μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約２．０μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約２．５μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約３．０μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約３．５μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約４．０μｇ／ｍｌ、約０．１μｇ／ｍｌ～約４．５μｇ／ｍｌ、約０．５μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約１．０μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約１．５μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約２．０μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約２．５μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約３．０μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約３．５μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約４．０μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約４．５μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌ、約１．０μｇ／ｍｌ～約３．０μｇ／ｍｌ、約０．５μｇ／ｍｌ～約３．０μｇ／ｍｌ、又は約０．５μｇ／ｍｌ～約２．０μｇ／ｍｌの濃度で使用することができる。ある特定の実施形態では、全ＦＧＦ２１タンパク質を検出するための免疫アッセイは、約０．１μｇ／ｍｌ～約１．０μｇ／ｍｌ、例えば約０．４μｇ／ｍｌ又は約０．８μｇ／ｍｌの濃度の検出抗体を使用することができる。ある特定の実施形態では、活性ＦＧＦ２１タンパク質を検出するための免疫アッセイは、約１．０μｇ／ｍｌ～約３．０μｇ／ｍｌ、例えば約１．１μｇ／ｍｌ又は約２．１μｇ／ｍｌの濃度の検出抗体を使用することができる。

【００８６】

ある特定の実施形態では、開示された方法で使用するための抗ＦＧＦ２１抗体を標識することができる。標識には、直接的に検出される標識又は部分、例えば、蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、及び放射性標識など、並びに例えば、酵素反応又は分子相互作用を介して間接的に検出される部分、例えば、酵素又はリガンドが含まれるがこれらに限定されない。標識の非限定的な例としては、放射性同位体^{32}Ｐ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、及び^{131}Ｉ、希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体などのフルオロフォア、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第４，７３７，４５６号）、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタラジンジオン、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖質オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース－６－リン酸塩デヒドロゲナーゼ、過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化させる酵素、例えば、ＨＲＰ、ラクトペルオキシダーゼ、又はマイクロペルオキシダーゼとカップリングされたウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなどの複素環式オキシダーゼ、ビオチン／アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、並びに安定した遊離ラジカルなどが挙げられる。ある特定の実施形態では、検出抗体はビオチンで標識され、例えば、検出抗体はビオチンにコンジュゲートされる。

【００８７】

ある特定の実施形態では、ビオチン化検出抗体の検出試薬は、アビジン、ストレプトアビジン－ＨＲＰ、又はストレプトアビジン－β－Ｄ－ガラクトピラノース（ＳＢＧ）であ

る。ある特定の実施形態では、検出試薬の読み出しは、蛍光又は比色である。例えば、限定するものではないが、テトラメチルベンジジン及び過酸化水素を読み出しとして使用することができる。ある特定の実施形態では、検出試薬がストレプトアビジン－ＨＲＰである場合、テトラメチルベンジジン及び過酸化水素を使用することによって、読み出しを比色測定することができる。あるいは、ある特定の実施形態では、レゾルフィンβ－Ｄ－ガラクトピラノシドを読み出しとして使用することができる。例えば、限定するものではないが、検出試薬がＳＢＧである場合、レゾルフィンβ－Ｄ－ガラクトピラノシドを使用することによって、読み出しを蛍光測定することができる。

【００８８】

ある特定の実施形態では、検出試薬、例えばＳＢＧは、約５０～約５００ｐＭの濃度で使用することができる。例えば、限定するものではないが、検出試薬は、約５０～約１００ｐＭ、約５０～約１５０ｐＭ、約５０～約２００ｐＭ、約５０～約２５０ｐＭ、約５０～約３００ｐＭ、約５０～約３５０ｐＭ、約５０～約４００ｐＭ、約５０～約４５０ｐＭ、約１００～約５００ｐＭ、約１５０～約５００ｐＭ、約２００～約５００ｐＭ、約２５０～約５００ｐＭ、約３００～約５００ｐＭ、約３５０～約５００ｐＭ、約４００～約５００ｐＭ、約４５０～約５００ｐＭ、約１００～約４００ｐＭ、又は約２００～約４００ｐＭの濃度で使用することができる。ある特定の実施形態では、検出試薬は、約１００ｐＭ～約４００ｐＭの濃度で使用することができ、例えば、ＳＢＧは、約１１０ｐＭ、約１５５ｐＭ、又は約３１０ｐＭの濃度で使用することができる。ある特定の実施形態では、ＳＢＧは約３１０ｐＭの濃度で使用される。ある特定の実施形態では、検出試薬、例えばＨＲＰは、約１／１０～約１／１０００の希釈で使用することができる。例えば、限定するものではないが、検出試薬は、約１／１０～約１／１００、約１／１０～約１／５００、約１／１００～約１／１０００、又は約１／５００～約１／１０００の希釈で使用することができる。ある特定の実施形態では、検出試薬は約１／１００～約１／１０００の希釈で使用することができ、例えばＨＲＰは約１／１００又は約１／５００の希釈で使用することができる。

【００８９】

ある特定の実施形態では、本開示の方法は、ブロッキング緩衝液で捕捉抗体を遮断することを含み得る。ある特定の実施形態では、ブロッキング緩衝液には、ＰＢＳ、ウシ血清アルブミン（ｂｏｖｉｎｅ　ｓｅｒｕｍ　ａｌｂｕｍｉｎ：ＢＳＡ）、及び／又は殺生物剤、例えば、ＰｒｏＣｌｉｎ（商標）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ミズーリ州セントルイス）を挙げることができる。ある特定の実施形態では、本方法は、複数の洗浄工程を含んでもよい。ある特定の実施形態では、洗浄に使用する溶液は、一般に、限定されるものではないが、界面活性剤、例えばＴｗｅｅｎ　２０を含むＰＢＳ緩衝液などの緩衝液（例えば、「洗浄緩衝液」）である。例えば、限定するものではないが、捕捉抗体は遮断後に洗浄することができ、及び／又は試料は、捕捉されていない材料を除去するために、例えば洗浄によって捕捉抗体から分離することができる。

【００９０】

ある特定の実施形態では、本開示の免疫アッセイ法を使用して、例えばＦＧＦ２１の全長型及び処理形態を検出することによって、試料中の全ＦＧＦ２１タンパク質の量を検出することができる。例えば、限定するものではないが、全ＦＧＦ２１タンパク質を検出するための免疫アッセイ法は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内、例えば配列番号１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する１つ以上の抗体を使用することができる。ある特定の実施形態では、捕捉抗体は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する抗体であり、検出抗体は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する抗体である。ある特定の実施形態では、捕捉抗体及び検出抗体は同一の抗体である一方で、他の実施形態では、捕捉抗体及び検出抗体は異なる抗体であるが、両方ともＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する。ある特定の実施形態では、該捕捉抗体及び該検出抗体は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する。例えば、限定するも

のではないが、捕捉抗体及び検出抗体は、重複しないＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する。ある特定の実施形態では、捕捉抗体及び該検出抗体は、部分的に重複するＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内のエピトープに結合する。

【００９１】

ある特定の実施形態では、試料中の全ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定する免疫アッセイは、（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体を該試料と接触させて、試料－捕捉抗体組合せ材料を生成することと、（ｂ）該試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する検出抗体と接触させることと、（ｃ）該試料－捕捉抗体組合せ材料に結合した該検出抗体を検出することと、（ｄ）結合した該検出抗体のレベルに基づき、該試料中に存在する全ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、を含むことができる。

【００９２】

ある特定の実施形態では、本開示の免疫アッセイ法を使用して、例えばそのＣ末端断片を保持するＦＧＦ２１タンパク質によって、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を検出することができる。ある特定の実施形態では、全ＦＧＦ２１タンパク質を検出するための免疫アッセイ法は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内、例えば配列番号１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する１つ以上の抗体と、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する１つ以上の抗体と、を使用することができる。例えば、限定するものではないが、活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を検出する免疫アッセイ法は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体と、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する検出抗体と、を使用することができる。ある特定の実施形態では、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２に結合する検出抗体は、カタログ番号３１００２として販売されているＥｐｉｔｏｐｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．（カリフォルニア州サンディエゴ）製の抗ＦＧＦ２１抗体であってもよい。ある特定の実施形態では、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２に結合する検出抗体は、カタログ番号３０６６１として販売されているＥｐｉｔｏｐｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．（カリフォルニア州サンディエゴ）製の抗ＦＧＦ２１抗体であってもよい。ある特定の実施形態では、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定する免疫アッセイ法は、（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体を該試料と接触させて、試料－捕捉抗体組合せ材料を生成することと、（ｂ）該試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する検出抗体と接触させることと、（ｃ）該試料－捕捉抗体組合せ材料に結合した該検出抗体を検出することと、（ｄ）結合した該検出抗体のレベルに基づき、該試料中に存在する活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、を含むことができる。

【００９３】

本開示は、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定するための免疫アッセイ法をさらに提供する。例えば、限定するものではないが、そのような方法は、全ＦＧＦ２１タンパク質を検出するための免疫アッセイを、活性ＦＧＦ２１タンパク質を検出するための免疫アッセイと組み合わせることを含んでもよい。ある特定の実施形態では、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定する免疫アッセイ法は、（ａ）（ｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の捕捉抗体を該試料と接触させて、第１の試料－捕捉抗体組合せ材料を生成すること、（ｉｉ）該第１の試料－捕捉抗体組合せ材料をＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の検出抗体と接触させること、（ｉｉｉ）該試料－捕捉抗体組合せ材料に結合した該第１の検出抗体を検出すること、及び（ｉｖ）結合した該第１の検出抗体のレベルに基づき、該試料中に存在する全ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、（ｂ）（ｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第２の捕捉抗体を該試料と接触させて、第２の試料－捕捉抗体組合せ材料を生成すること、（ｉｉ）該第２の試料－捕捉抗体組合せ

材料をＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する第２の検出抗体と接触させること、（ｉｉｉ）該試料－捕捉抗体組合せ材料に結合した該第２の検出抗体を検出すること、及び（ｉｖ）結合した該第２の検出抗体のレベルに基づき、該試料中に存在する活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、を含むことができる。この方法は、工程（ａ）で測定した該全ＦＧＦ２１タンパク質の量を、工程（ｂ）で測定した該活性ＦＧＦ２１タンパク質の量と比較して、該試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定することと、をさらに含むことができる。ある特定の実施形態では、該第１の捕捉抗体及び第２の捕捉抗体は、同一の抗体である。あるいは、ある特定の実施形態では、第１の捕捉抗体及び第２の捕捉抗体は異なる抗体であるが、両方ともＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する。ある特定の実施形態では、該第１の捕捉抗体及び該第１の検出抗体は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する。例えば、限定するものではないが、第１の捕捉抗体及び第１の検出抗体は、重複しないＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する。ある特定の実施形態では、第１の捕捉抗体及び第１の検出抗体は、部分的に重複するＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内のエピトープに結合する。

【００９４】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示された免疫アッセイ法は、約２ｐｇ／ｍｌ～約２０ｐｇ／ｍｌの検出感度、例えばウェル内感度を有する。例えば、限定するものではないが、本明細書に開示の免疫アッセイは、約２ｐｇ／ｍｌ～約３ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約４ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約５ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約６ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約７ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約８ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約１０ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約１１ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約１２ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約１３ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約１４ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約１５ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約１６ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約１７ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約１８ｐｇ／ｍｌ、約２ｐｇ／ｍｌ～約１９ｐｇ／ｍｌ、約３ｐｇ／ｍｌ～約１５ｐｇ／ｍｌ、約３ｐｇ／ｍｌ～約１０ｐｇ／ｍｌ、又は約３ｐｇ／ｍｌ～約５ｐｇ／ｍｌの感度を有する。ある特定の実施形態では、本明細書に開示の免疫アッセイは、約２ｐｇ／ｍｌ以上、１ｐｇ／ｍｌ以上、又は０．５ｐｇ／ｍｌ以上の感度を有する。ある特定の実施形態では、本明細書に開示の免疫アッセイは、検出感度、例えば約０．２ｐｇ／ｍｌ～約２．０ｐｇ／ｍｌのウェル内感度、例えば、約０．２ｐｇ／ｍｌ～約０．５ｐｇ／ｍｌ、約０．２ｐｇ／ｍｌ～約１．０ｐｇ／ｍｌ又は約０．２ｐｇ／ｍｌ～約１．５ｐｇ／ｍｌのウェル内感度を有する。例えば、限定するものではないが、本明細書に開示の免疫アッセイ、例えばＳｉｍｏａ　ＨＤ－１　Ａｎａｌｙｚｅｒ（商標）を用いる単一分子免疫アッセイは、感度、例えば約０．２ｐｇ／ｍｌ～約０．５ｐｇ／ｍｌのウェル内感度を有する。

【００９５】

本開示の免疫アッセイ法によって分析される試料は、臨床試料、培養中の細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清試料、血漿試料、他の生体体液（例えば、リンパ液）試料、又は組織試料であり得る。ある特定の実施形態では、試料の供給源は、固体組織（例えば、新鮮、凍結、及び／又は保存臓器、組織試料、血清、血漿、生検材料、又は穿刺液由来）、又は対象由来の細胞であり得る。ある特定の実施形態では、試料は、血液試料である。ある特定の実施形態では、試料は、血漿試料である。ある特定の実施形態では、試料、例えば、血液又は血漿試料を対象から得て、１つ以上のプロテアーゼ、エステラーゼ、ＤＤＰ－ＩＶ、及び／又はホスファターゼ阻害剤で処理することができる。例えば、限定するものではないが、試料を、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤のカクテル、例えばＭＳ－ＳＡＦＥ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ミズーリ州セントルイス）で処理することができる。ある特定の実施形態では、試料は、抗凝固剤で処理されるか、又は抗凝固剤、例えばK_2－ＥＤＴＡを含有するチューブ内に収集される。ある特定の実施形態では、試料は、Ｐ８００血液収集システム（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カリフォルニア州サンノ

ゼ）を用いて収集することができる。

ＩＩＩ．抗体

【００９６】

本開示は、ＦＧＦ２１に結合する抗体、例えばヒトＦＧＦ２１をさらに提供する。本開示の抗体は、試料中のＦＧＦ２１タンパク質レベルの検出及び定量化に有用である。ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、本明細書に開示されるＦＧＦ２１タンパク質を検出及び定量化する免疫アッセイ法において使用することができる。例えば、限定するものではないが、本開示の抗体を用いて、試料中の全ＦＧＦ２１タンパク質及び／又は活性ＦＧＦ２１タンパク質のレベルを検出することができる。

【００９７】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、ヒト化され得る。ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、アクセプタヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークを含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体を含むモノクローナル抗体であり得る。例えば、限定するものではないが、本開示の抗体は、キメラであり得る。ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、抗体断片、例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、ｓｃＦｖ、ダイアボディ、又はＦ（ａｂ’）$_2$断片であり得る。ある特定の実施形態では、抗体は、ＩｇＧである。ある特定の実施形態では、抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４から選択される。ある特定の実施形態では、抗体は、完全長抗体、例えば、本明細書において定義されるインタクトなＩｇＧ１抗体、又は他の抗体クラス若しくはアイソタイプである。ある特定の実施形態では、本明細書で開示の抗ＦＧＦ２１抗体を標識することができ、例えば、ビオチンにコンジュゲートすることができる。ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、以下に詳述される項目１～項目７に記載されるような特徴のうちのいずれかを単独で又は組合せで組み込み得る。

【００９８】

Ａ．例示の抗ＦＧＦ２１抗体

本開示は、ＦＧＦ２１タンパク質に結合する単離された抗体を提供する。ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２、例えば配列番号１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合することができる。ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２、例えば配列番号１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合することができる。ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１～４、例えば配列番号１のアミノ酸残基１～４内に存在するエピトープには結合しない。抗ＦＧＦ２１抗体の非限定的な例は、表８～表１３及び表１６～表１９、並びに図４１Ａ～図４１Ｂに開示されている。

【００９９】

本開示は抗ＦＧＦ２１抗体を提供し、ある特定の実施形態では、該抗ＦＧＦ２１抗体は、（ａ）配列番号２６～２９のいずれか１つのアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１及びその保存的置換と、（ｂ）配列番号３０～３３のいずれか１つのアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及びその保存的置換と、（ｃ）配列番号３４～３７のいずれか１つのアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３及びその保存的置換と、（ｄ）配列番号３８～４１のいずれか１つのアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１及びその保存的置換と、（ｅ）配列番号４２～４５を含むＣＤＲ－Ｌ２及びその保存的置換と、（ｆ）配列番号４６～４９のいずれか１つのアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３及びその保存的置換と、から選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、又は６つのＣＤＲを含む。

【０１００】

本開示は抗ＦＧＦ２１抗体を提供し、ある特定の実施形態では、該抗ＦＧＦ２１抗体は、（ａ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１及びその保存的置換と、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及びその保存的置換と、（ｃ）配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３及びその保存的置換と、（ｄ）配列番号３８のア

ミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１及びその保存的置換と、（ｅ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及びその保存的置換と、（ｆ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３及びその保存的置換と、を含む。

【０１０１】

本開示は抗ＦＧＦ２１抗体を提供し、ある特定の実施形態では、該抗ＦＧＦ２１抗体は、（ａ）配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１及びその保存的置換と、（ｂ）配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及びその保存的置換と、（ｃ）配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３と、（ｄ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１及びその保存的置換と、（ｅ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及びその保存的置換と、（ｆ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３及びその保存的置換と、を含む。

【０１０２】

本開示は抗ＦＧＦ２１抗体を提供し、ある特定の実施形態では、該抗ＦＧＦ２１抗体は、（ａ）配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１及びその保存的置換と、（ｂ）配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及びその保存的置換と、（ｃ）配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３及びその保存的置換と、（ｄ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１及びその保存的置換と、（ｅ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及びその保存的置換と、（ｆ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３及びその保存的置換と、を含む。

【０１０３】

本開示は抗ＦＧＦ２１抗体を提供し、ある特定の実施形態では、該抗ＦＧＦ２１抗体は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１及びその保存的置換と、（ｂ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及びその保存的置換と、（ｃ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３及びその保存的置換と、（ｄ）配列番号４１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１及びその保存的置換と、（ｅ）配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及びその保存的置換と、（ｆ）配列番号４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３及びその保存的置換と、を含む。

【０１０４】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号５４～５７及び配列番号７２～７５のいずれか１つのアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、又は欠失を含有するが、その配列を含む抗ＦＧＦ２１抗体は、ＦＧＦ２１に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、置換、挿入、及び／又は欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、又は欠失は、ＣＤＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号５４～５７及び配列番号７２～７５のいずれか１つのアミノ酸配列を含むＶＨ配列を備える。

【０１０５】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号５０～５３及び配列番号６８～７１のいずれか１つのアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、又は欠失を含有するが、その配列を含む抗ＦＧＦ２１抗体は、ＦＧＦ２１に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、置換、挿入、及び／又は欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、又は欠失は、Ｃ

ＤＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号５０～５３及び配列番号６８～７１のいずれか１つのアミノ酸配列を含むＶＬ配列を備える。

【０１０６】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号５４のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＨ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号５０のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＬ配列を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。

【０１０７】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号５５のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＨ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号５１のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＬ配列を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。

【０１０８】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号５６のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＨ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号５２のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＬ配列を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。

【０１０９】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号５７のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＨ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号５３のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＬ配列を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３３のア

ミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号４１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。

【０１１０】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号７５のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＨ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号７１のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＬ配列を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。

【０１１１】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号７４のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＨ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号７０のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＬ配列を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。

【０１１２】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号７３のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＨ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号６９のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＬ配列を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。

【０１１３】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号７２のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＨ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号６８のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９

９％、又は１００％の配列同一性を有するＶＬ配列を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号４１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、又は３つのＣＤＲを含む。

【０１１４】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号２２～２５及び配列番号６４～６７のいずれか１つのアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する完全長重鎖（ＨＣ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有するＨＣ配列は、参照配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、又は欠失を含有するが、その配列を含む抗ＦＧＦ２１抗体は、ＦＧＦ２１に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、置換、挿入、及び／又は欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、又は欠失は、ＣＤＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号２２～２５及び配列番号６４～６７のいずれか１つのアミノ酸配列を含むＨＣ配列を備える。

【０１１５】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号１８～２１及び配列番号６０～６３のいずれか１つのアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する完全長軽鎖（ＬＣ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有するＬＣ配列は、参照配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、又は欠失を含有するが、その配列を含む抗ＦＧＦ２１抗体は、ＦＧＦ２１に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、置換、挿入、及び／又は欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、又は欠失は、ＣＤＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号１８～２１及び配列番号６０～６３のいずれか１つのアミノ酸配列を含むＬＣ配列を備える。

【０１１６】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号２２のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＨＣ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号１８のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＬＣ配列を含む。

【０１１７】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号２３のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＨＣ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号１９のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＬＣ配列を含む。

【０１１８】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号２４のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７

％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＨＣ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号２０のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＬＣ配列を含む。

【０１１９】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号２５のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＨＣ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号２１のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＬＣ配列を含む。

【０１２０】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号６７のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＨＣ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号６３のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＬＣ配列を含む。

【０１２１】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号６６のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＨＣ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号６２のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＬＣ配列を含む。

【０１２２】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号６５のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＨＣ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号６１のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＬＣ配列を含む。

【０１２３】

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号６４のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＨＣ配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、配列番号６０のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するＬＣ配列を含む。

【０１２４】

ある特定の実施形態では、上に示した実施形態のいずれかにおけるＶＨと、上に示した実施形態のいずれかにおけるＶＬとを含む、抗ＦＧＦ２１抗体が提供される。ある特定の実施形態では、上に示した実施形態のいずれかにおける完全長ＨＣと、上に示した実施形態のいずれかにおける完全長ＬＣとを含む、抗ＦＧＦ２１抗体が提供される。

【０１２５】

１．抗体親和性

ある特定の実施形態では、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、１Ｍ以下、１００ｍＭ以下、１０ｍＭ以下、１ｍＭ以下、１００μＭ以下、１０μＭ以下、１μＭ以下、１００ｎＭ以下、１０ｎＭ以下、１ｎＭ以下、０．１ｎＭ以下、０．０１ｎＭ以下、又は０．００１ｎＭ以下の解離定数（K_d）を有し得る。ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、約１

10^{-3}以下又は10^{-8}M以下、例えば10^{-8}M～10^{-13}M、例えば10^{-9}M～10^{-13}M のK_dを有してもよい。ある特定の実施形態では、本明細書で公開される抗ＦＧＦ２１抗体は、約10^{-10}M～10^{-13}M のK_dを有してもよい。例えば、限定するものではないが、本開示の捕捉抗体又は検出抗体は、約10^{-10}M～10^{-13}M のK_dでＦＧＦ２１に結合する。

【０１２６】

ある特定の実施形態では、K_dは、放射標識抗原結合アッセイ（ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ ａｎｔｉｇｅｎ ｂｉｎｄｉｎｇ ａｓｓａｙ：ＲＩＡ）によって測定され得る。ある特定の実施形態では、ＲＩＡは、目的とされる抗体のＦａｂバージョン及びその抗原で実行され得る。例えば、限定するものではないが、抗原に対するＦａｂの溶液結合親和性は、未標識抗原の一連の滴定の存在下で、Ｆａｂを最小濃度の（^{125}Ｉ）標識抗原と平衡化し、その後抗Ｆａｂ抗体コーティングプレートと結合した抗原を捕捉することによって測定される（例えば、Ｃｈｅｎら、「Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．」、第２９３巻：第８６５～８８１頁（１９９９年）を参照されたい）。アッセイの条件を確立するために、ＭＩＣＲＯＴＩＴＥＲ（登録商標）マルチウェルプレート（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、５０ｍＭの炭酸ナトリウム（ｐＨ９．６）中の５μｇ／ｍｌの捕捉用抗Ｆａｂ抗体（Ｃａｐｐｅｌ Ｌａｂｓ）で一晩コーティングし、その後、ＰＢＳ中の２％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミンで２～５時間にわたって室温（およそ２３℃）で遮断する。非吸着性プレート（Ｎｕｎｃ番号２６９６２０）中、１００ｐＭ又は２６ｐＭの［^{125}Ｉ］－抗原を、目的とされるＦａｂの段階希釈液と混合する（例えば、Ｐｒｅｓｔａら、「Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．」、第５７巻：第４５９３～４５９９頁（１９９７年）における抗ＶＥＧＦ抗体Ｆａｂ－１２の評価と一貫する）。その後、目的とするＦａｂを一晩インキュベートするが、インキュベーションをより長い期間（例えば、約６５時間）続けて、平衡に達することを確実にすることができる。その後、室温でのインキュベーション（例えば、１時間）のために混合物を捕捉プレートに移す。次に、溶液を除去し、プレートを、ＰＢＳ中０．１％のポリソルベート２０（ＴＷＥＥＮ－２０（登録商標））で８回洗浄する。プレートが乾燥したら、１５０μｌ／ウェルの閃光物質（ＭＩＣＲＯＳＣＩＮＴ－２０（商標）、Ｐａｃｋａｒｄ）を添加し、プレートをＴＯＰＣＯＵＮＴ（商標）ガンマカウンタ（Ｐａｃｋａｒｄ）により１０分間計数する。最大結合の２０％以下をもたらす各Ｆａｂの濃度を競合結合アッセイでの使用に選択する。

【０１２７】

ある特定の実施形態では、K_dは、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイを用いて測定することができる。例えば、限定するものではないが、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）－２０００、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）－３０００、ＢＩＡＣＯＲＥ Ｘ１００、又はＢＩＡＣＯＲＥ Ｔ２００処理ユニット（Ｂｉａｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．、ニュージャージー州ピスカタウェイ）を用いたアッセイを、約１０応答単位（ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｕｎｉｔ：ＲＵ）での固定化抗原ＣＭ５チップを用いて２５℃で実施する。ある特定の実施形態では、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ（ＣＭ５、Ｂｉａｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．）を、供給業者の指示書に従って、Ｎ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）及びＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）で活性化する。抗原をｐＨ４．８である１０ｍＭの酢酸ナトリウムによって５μｇ／ｍｌ（約０．２μＭ）に希釈した後、５μｌ／分の流量で注入し、カップリングされたタンパク質のおよそ１０応答単位（ＲＵ）を達成する。抗原の注入後、１Ｍのエタノールアミンを注入して、未反応基を遮断する。反応速度測定のために、Ｆａｂの２倍段階希釈液（０．７８ｎＭ～５００ｎＭ）を、２５℃の０．０５％ポリソルベート２０（ＴＷＥＥＮ－２０（商標））界面活性剤（ＰＢＳＴ）を有するＰＢＳ中におよそ２５μｌ／分の流量で注入する。会合速度（ｋｏｎ）及び解離速度（ｋｏｆｆ）を、会合センサグラム及び解離センサグラムを同時に適合することによって、単純１対１Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデル（ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ第３．２版）を使用して計算する。平衡解離定数（K_d）を、ｋｏｆｆ／ｋｏｎ比として計算

し得る。例えば、Ｃｈｅｎら、「Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．」、第２９３巻：第８６５～８８１頁（１９９９年）を参照されたい。オン速度が、上記の表面プラズモン共鳴アッセイによって、$10^6 M^{-1} s^{-1}$を超える場合、オン速度は、撹拌されたキュベットを備えるストップトフロー装着分光光度計（Ａｖｉｖ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）又は８０００シリーズＳＬＭ－ＡＭＩＮＣＯ（商標）分光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ）等の分光計において測定される、漸増濃度の抗原の存在下で、２５℃でのＰＢＳ（ｐＨ７．２）中の２０ｎＭ抗－抗原抗体（Ｆａｂ型）の蛍光発光強度（励起＝２９５ｎｍ、発光＝３４０ｎｍ、１６ｎｍ帯域通過）の増加又は減少を測定する、蛍光消光技法を使用することによって、判定することができる。

【０１２８】

２．抗体断片

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、抗体断片である。抗体断片としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、$F(ab')_2$、Ｆｖ、及びｓｃＦｖ断片、並びに以下に記載する他の断片が挙げられるがこれらに限定されない。特定の抗体断片の総説としては、Ｈｕｄｓｏｎら、「Ｎａｔ　Ｍｅｄ．」、第９巻：第１２９～１３４頁（２００３年）を参照のこと。ｓｃＦｖ断片の参照には、例えば、「Ｔｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　ｏｆ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ」、第１１３巻、Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ　ａｎｄ　Ｍｏｏｒｅ　ｅｄｓ．（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、ニューヨーク）、第２６９～３１５頁（１９９４年）中のＰｌｕｃｋｔｈｕｎを参照のこと。また、国際公開第９３／１６１８５号、並びに米国特許第５，５７１，８９４号及び同第５，５８７，４５８号も参照のこと。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、インビボでの半減期が長くなったＦａｂ及び$F(ab')_2$断片の説明については、米国特許第５，８６９，０４６号を参照されたい。

【０１２９】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体はダイアボディであり得る。ダイアボディは、二価であっても又は二重特異性であってもよい、２つの抗原結合部位を含む抗体断片である。例えば、欧州特許第４０４，０９７号、国際公開第１９９３／０１１６１号、Ｈｕｄｓｏｎら、「Ｎａｔ　Ｍｅｄ．」、第９巻：第１２９～１３４頁（２００３年）、及びＨｏｌｌｉｎｇｅｒら、「Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ」、第９０巻：第６４４４～６４４８頁（１９９３年）を参照されたい。本開示の抗体の範囲内にある追加の抗体断片である、トリアボディ及びテトラボディはまた、Ｈｕｄｓｏｎら、「Ｎａｔ．Ｍｅｄ．」、第９巻：第１２９～１３４頁（２００３年）に記載される。

【０１３０】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、単一ドメイン抗体であり得る。単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て若しくは一部、又は軽鎖可変ドメインの全て若しくは一部を含む、抗体断片である。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である（Ｄｏｍａｎｔｉｓ，Ｉｎｃ．、マサチューセッツ州ウォルサム；例えば、米国特許第６，２４８，５１６Ｂ１号を参照のこと）。

【０１３１】

抗体断片は、本明細書に記載される、インタクトな抗体のタンパク分解と、組換え宿主細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ又はファージ）の産生とを含むが、これらに限定されない、様々な技法によって作製され得る。

【０１３２】

３．キメラ抗体及びヒト化抗体

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、キメラ抗体である。ある種のキメラ抗体は、例えば、米国特許第４，８１６，５６７号；及びＭｏｒｒｉｓｏｎら、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第８１巻６８５１～６８５５頁（１９８４年）に開示されている。ある特定の実施形態では、本開示のキメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はサルなどの非ヒト霊長類由来の可変領域）、及びヒト定常領域を含む。更なる例では、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが

親抗体のクラス又はサブクラスから変化した「クラススイッチ」抗体であり得る。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

【０１３３】

ある特定の実施形態では、本開示のキメラ抗体は、ヒト化抗体であり得る。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減する一方で、親非ヒト抗体の特異性及び親和性は保持するようにヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、ＣＤＲ、例えば、ＣＤＲ（又はその一部）が非ヒト抗体由来であり、かつＦＲ（又はその一部）がヒト抗体配列由来である１つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、任意に、ヒト定常領域の少なくとも一部も含む。ある特定の実施形態では、ヒト化抗体におけるいくつかのＦＲ残基は、例えば、抗体特異性又は親和性を復元又は改善するように、非ヒト抗体（例えば、ＣＤＲ残基が由来する抗体）由来の対応する残基で置換される。

【０１３４】

ヒト化抗体及びこれを製造する方法は、例えば、Ａｌｍａｇｒｏ ａｎｄ Ｆｒａｎｓｓｏｎ、「Ｆｒｏｎｔ．Ｂｉｏｓｃｉ．」、第１３巻：第１６１９～１６３３頁（２００８年）に記載され、さらに、例えば、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、「Ｎａｔｕｒｅ」、第３３２巻：第３２３～３２９頁（１９８８年）；Ｑｕｅｅｎら、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第８６巻：第１００２９～１００３３頁（１９８９年）；米国特許第５，８２１，３３７号、第７，５２７，７９１号、第６，９８２，３２１号及び第７，０８７，４０９号；Ｋａｓｈｍｉｒｉら、「Ｍｅｔｈｏｄｓ」、第３６巻：第２５～３４頁（２００５年）（特異性決定領域（ＳＤＲ）のグラフト接合を記載する）；Ｐａｄｌａｎ、「Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第２８巻：第４８９～４９８頁（１９９１年）（「リサーフェシング」を記載する）；Ｄａｌｌ’Ａｃｑｕａら、「Ｍｅｔｈｏｄｓ」、第３６巻：第４３～６０頁（２００５年）（「ＦＲシャッフリング」を記載する）；並びに、Ｏｓｂｏｕｒｎら、「Ｍｅｔｈｏｄｓ」、第３６巻：第６１～６８頁（２００５年）、及びＫｌｉｍｋａら、「Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ」、第８３巻：第２５２～２６０頁（２０００年）（ＦＲシャッフリングに対する「ガイド付き選択」手法を記載する）にさらに記載される。

【０１３５】

ヒト化に使用可能なフレームワーク領域としては、限定されないが、「ベストフィット」方法を用いて選択されるフレームワーク領域（例えば、Ｓｉｍｓら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１５１巻：第２２９６頁（１９９３年）を参照）；軽鎖又は重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列から誘導されるフレームワーク領域（例えば、Ｃａｒｔｅｒら、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第８９巻：第４２８５頁（１９９２年）；及びＰｒｅｓｔａら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１５１巻：第２６２３頁（１９９３年）を参照）；ヒト成熟（体細胞性変異を受けた）フレームワーク領域又はヒト生殖系フレームワーク領域（例えば、Ａｌｍａｇｒｏ ａｎｄ Ｆｒａｎｓｓｏｎ、「Ｆｒｏｎｔ．Ｂｉｏｓｃｉ．」、第１３巻：第１６１９～１６３３頁（２００８年）を参照）；並びに、ＦＲライブラリのスクリーニングから誘導されるフレームワーク領域（例えば、Ｂａｃａら、「Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．」、第２７２巻：第１０６７８～１０６８４頁（１９９７年）及び、Ｒｏｓｏｋら、「Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．」、第２７１巻：第２２６１１～２２６１８頁（１９９６年）を参照）が挙げられる。

【０１３６】

４．ヒト抗体

ある特定の実施形態では、本開示の抗体はヒト抗体であり得る。ヒト抗体は、当該技術分野で既知の様々な技法を使用して産生され得る。ヒト抗体は通常、ｖａｎ Ｄｉｊｋ及びｖａｎ ｄｅ Ｗｉｎｋｅｌ、「Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．」、第５巻：第３６８～７４頁（２００１年）及びＬｏｎｂｅｒｇ、「Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第２０巻：第４５０～４５９頁（２００８年）に記載されている。

【０１３７】

ヒト抗体は、抗原投与に応答してヒト可変領域を有するインタクトなヒト抗体又はインタクトな抗体を産生するように修飾されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製することができる。かかる動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、又は染色体外に存在するか、若しくは動物の染色体にランダムに組み込まれるヒト免疫グロブリン遺伝子座の全て又は一部を含有する。このようなトランスジェニックマウスにおいて、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般的に不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得る方法の総説として、Ｌｏｎｂｅｒｇ、「Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．」、第２３巻：第１１１７～１１２５頁（２００５年）を参照されたい。また、例えば、ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（商標）技術を記載する米国特許第６，０７５，１８１号及び同第６，１５０，５８４号；ＨＵＭＡＢ（登録商標）技術を記載する米国特許第５，７７０，４２９号；Ｋ－Ｍ　ＭＯＵＳＥ（登録商標）技術を記載する米国特許第７，０４１，８７０号；及び、ＶＥＬＯＣＩＭＯＵＳＥ（登録商標）技術を記載する米国特許出願公開第２００７／００６１９００号も参照されたい。かかる動物によって生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによってさらに修飾され得る。

【０１３８】

ヒト抗体は、ハイブリドーマに基づく方法によっても製造することができる。ヒトモノクローナル抗体を産生するためのヒト骨髄腫及びマウス－ヒト異種骨髄腫細胞株が記載されている。（例えば、Ｋｏｚｂｏｒ、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１３３巻：第３００１頁（１９８４年）；Ｂｒｏｄｅｕｒら、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」、第５１～６３頁（Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．、ニューヨーク、１９８７年）；及びＢｏｅｒｎｅｒら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１４７巻：第８６頁（１９９１年）を参照されたい。）ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されるヒト抗体はまた、Ｌｉら、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第１０３巻：第３５５７～３５６２頁（２００６年）にも記載されている。更なる方法は、例えば、米国特許第７，１８９，８２６号（ハイブリドーマ細胞株由来のモノクローナルヒトＩｇＭ抗体の産生を記載する）及びＮｉ、「Ｘｉａｎｄａｉ　Ｍｉａｎｙｉｘｕｅ」、第２６巻、第４号：第２６５～２６８頁（２００６年）（ヒト－ヒトハイブリドーマを記載する）を含む。ヒトハイブリドーマ技術（トリオーマ技術）はまた、Ｖｏｌｌｍｅｒｓ　ａｎｄ　Ｂｒａｎｄｌｅｉｎ、「Ｈｉｓｔｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｈｉｓｔｏｐａｔｈｏｌｏｇｙ」、第２０巻、第３号：第９２７～９３７頁（２００５年）及びＶｏｌｌｍｅｒｓ　ａｎｄ　Ｂｒａｎｄｌｅｉｎ、「Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ｆｉｎｄｉｎｇｓ　ｉｎ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　ａｎｄ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ」、第２７巻、第３号：第１８５～９１頁（２００５年）にも記載されている。

【０１３９】

ヒト抗体は、ヒト由来のファージディスプレイライブラリから選択されるＦｖクローン可変ドメイン配列を単離することによって生成することもできる。その後、かかる可変ドメイン配列は、所望のヒト定常ドメインと組み合わせられ得る。抗体ライブラリからヒト抗体を選択するための技法が以下に記載されている。

【０１４０】

５．ライブラリ由来抗体

本開示の抗体は、コンビナトリアルライブラリを所望の活性（複数可）を有する抗体についてスクリーニングすることによって単離され得る。例えば、ファージディスプレイライブラリを生成し、所望の結合特性を保有する抗体に関してかかるライブラリをスクリーニングするための様々な方法が当該技術分野で公知である。そのような方法は例えば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、「Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ」、第１７８巻：第１～３７頁（Ｏ’Ｂｒｉｅｎら編、Ｈｕｍａｎ　Ｐｒｅｓｓ、ニュージャージー州トトワ、２００１年）で確認され、例えば、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら、「Ｎａｔｕｒｅ」、第３４８巻：第５５２～５５４頁；Ｃｌａｃｋｓｏｎら、「Ｎａｔｕｒｅ

」、第３５２巻：第６２４～６２８頁（１９９１年）；Ｍａｒｋｓら、「Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．」、第２２２巻：第５８１～５９７頁（１９９２年）；Ｍａｒｋｓ ａｎｄ Ｂｒａｄｂｕｒｙ、「Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」、第２４８巻：第１６１～１７５頁（Ｌｏ編、Ｈｕｍａｎ Ｐｒｅｓｓ、ニュージャージー州トトワ、２００３年）；Ｓｉｄｈｕら、「Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．」、第３３８巻、第２号：第２９９～３１０頁（２００４年）；Ｌｅｅら、「Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．」、第３４０巻、第５号：第１０７３～１０９３頁（２００４年）；Ｆｅｌｌｏｕｓｅ、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第１０１巻、第３４号：第１２４６７～１２４７２頁（２００４年）；及びＬｅｅら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ」、第２８４巻、第１～２号：第１１９～１３２頁（２００４年）で更に説明されている。

【０１４１】

ある種のファージディスプレイ法では、ＶＨ及びＶＬ遺伝子のレパートリはポリメラーゼ連鎖反応（ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａｉｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ：ＰＣＲ）により別々にクローニングされ、ファージライブラリ内で無作為に再結合され、次いでＷｉｎｔｅｒら、「Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１２巻：第４３３～４５５頁（１９９４年）に記載されているような、抗原結合ファージに対してスクリーニングすることが可能である。ファージは、典型的には、抗体断片を一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片又はＦａｂ断片のいずれかとしてディスプレイする。免疫化源からのライブラリは、ハイブリドーマを構築する必要なく、免疫原に対する高親和性抗体を与える。あるいは、ナイーブレパートリーは、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓら、「ＥＭＢＯ Ｊ」、第１２巻：第７２５～７３４頁（１９９３年）によって記載されるように、（例えば、ヒトから）クローニングされて、いかなる免疫化も伴うことなく、広範囲の非自己抗原及び自己抗原に対する単一抗体源を提供することができる。ある特定の実施形態では、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ａｎｄ Ｗｉｎｔｅｒ、「Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．」、第２２７巻：第３８１～３８８頁（１９９２年）に記載されるように、幹細胞からの再編成されていないＶ遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含有するＰＣＲプライマーを使用して高度に可変的なＣＤＲ３領域をコードし、インビトロでの再編成を達成することによってナイーブライブラリを合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリについて記載している特許公報としては、例えば、米国特許第５，７５０，３７３号、並びに米国特許出願公開第２００５／００７９５７４号、同第２００５／０１１９４５５号、同第２００５／０２６６０００号、同第２００７／０１１７１２６号、同第２００７／０１６０５９８号、同第２００７／０２３７７６４号、同第２００７／０２９２９３６号、及び同第２００９／０００２３６０号が挙げられる。

【０１４２】

ヒト抗体ライブラリから単離された抗体又は抗体断片は、本明細書においてヒト抗体又はヒト抗体断片と見なされる。

【０１４３】

６．多重特異性抗体

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体であり得る。多重特異性抗体は、少なくとも２つの異なるエピトープに対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある特定の実施形態では、結合特異性の一方は、ＦＧＦ２１上に存在するエピトープへのものであり、他方は、任意の他の抗原へのものである。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片として調製され得る。

【０１４４】

多重特異性抗体を作製するための技法としては、異なる特異性を有する２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の組換え同時発現（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｃｕｅｌｌｏ、「Ｎａｔｕｒｅ」、第３０５巻：第５３７頁（１９８３年））、国際公開第９３／０８８２９号、及びＴｒａｕｎｅｃｋｅｒら、「ＥＭＢＯ Ｊ．」、第１０巻：第３６５５頁（１９９１年）を参照）、及び「ノブ・イン・ホール（ｋｎｏｂ－ｉｎ－ｈｏｌｅ）」操作（例えば、米国特許第５，７３１，１６８号を参照）が挙げられるが、これらに限定されない

。多重特異性抗体はまた、静電的ステアリング（ｅｌｅｃｔｒｏｓｔａｔｉｃ　ｓｔｅｅｒｉｎｇ）効果を操作して抗体Ｆｃ－ヘテロ二量体分子を作製すること（国際公開第２００９／０８９００４Ａ１号）、２つ以上の抗体又は断片を架橋すること（例えば、米国特許第４６７６９８０号、及びＢｒｅｎｎａｎら、「Ｓｃｉｅｎｃｅ」、第２２９巻：第８１頁（１９８５年）を参照）、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を産生すること（例えば、Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１４８巻、第５号：第１５４７～１５５３頁（１９９２年）を参照のこと）、「ダイアボディ」技術を使用して二重特異性抗体断片を作製すること（例えば、Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒら、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第９０巻：第６４４４～６４４８頁（１９９３年））、及び１本鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体を使用すること（例えば、Ｇｒｕｂｅｒら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１５２巻：第５３６８頁（１９９４年））、並びに例えば、Ｔｕｔｔら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１４７巻：第６０頁（１９９１年）に記載される三重特異性抗体を調製することによって、作製されてもよい。

【０１４５】

「オクトパス抗体」を含む３つ以上の機能的抗原結合部位を有する操作された抗体もまた、本明細書に含まれる（例えば、米国特許出願公開第２００６／００２５５７６Ａ１号を参照のこと）。

【０１４６】

７．抗体バリアント

本願で開示された主題はさらに、開示された抗体のアミノ酸配列バリアントを提供する。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善することが望ましくあり得る。抗体のアミノ酸配列バリアントは、抗体をコードするヌクレオチド配列中に適正な修飾を導入することによって、又はペプチド合成によって調製されてもよい。かかる修飾としては、本抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び／又はそれへの挿入、及び／又はその置換が挙げられるが、これらに限定されない。最終構築物に到達するために欠失、挿入、及び置換を任意に組み合わせることができるが、但し、その最終抗体修飾、すなわち修飾された抗体が、所望の特性、例えば抗原結合を保有することを条件とする。

【０１４７】

ａ）置換、挿入、及び欠失バリアント

抗体バリアントは、１以上のアミノ酸置換、挿入、及び／又は欠失を有し得る。このような変異のための目的とする部位は、ＣＤＲ及びＦＲを含むが、これらに限定されない。保存的置換の非限定的な例は、表１において「好ましい置換」の見出しの下に示される。より実質的な変化の非限定的な例を表１で「例示的置換」の見出しの下に示し、またアミノ酸側鎖クラスに関して下にさらに記載する。アミノ酸置換は、目的の抗体中に導入され得、その産物は、所望の活性、例えば、保持／改善された抗原結合、減少した免疫原性、又は改善された補体依存性細胞毒性（ＣＤＣ）若しくは抗体依存性細胞媒介細胞毒性（ＡＤＣＣ）についてスクリーニングされ得る。

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ａｌａ（Ａ）	Ｖａｌ；Ｌｅｕ；Ｉｌｅ	Ｖａｌ
Ａｒｇ（Ｒ）	Ｌｙｓ；Ｇｌｎ；Ａｓｎ	Ｌｙｓ
Ａｓｎ（Ｎ）	Ｇｌｎ；Ｈｉｓ；Ａｓｐ；Ｌｙｓ；Ａｒｇ	Ｇｌｎ
Ａｓｐ（Ｄ）	Ｇｌｕ；Ａｓｎ	Ｇｌｕ
Ｃｙｓ（Ｃ）	Ｓｅｒ；Ａｌａ	Ｓｅｒ
Ｇｌｎ（Ｑ）	Ａｓｎ；Ｇｌｕ	Ａｓｎ
Ｇｌｕ（Ｅ）	Ａｓｐ；Ｇｌｎ	Ａｓｐ
Ｇｌｙ（Ｇ）	Ａｌａ	Ａｌａ
Ｈｉｓ（Ｈ）	Ａｓｎ；Ｇｌｎ；Ｌｙｓ；Ａｒｇ	Ａｒｇ
Ｉｌｅ（Ｉ）	Ｌｅｕ；Ｖａｌ；Ｍｅｔ；Ａｌａ；Ｐｈｅ；ノルロイシン	Ｌｅｕ
Ｌｅｕ（Ｌ）	ノルロイシン；Ｉｌｅ；Ｖａｌ；Ｍｅｔ；Ａｌａ；Ｐｈｅ	Ｉｌｅ
Ｌｙｓ（Ｋ）	Ａｒｇ；Ｇｌｎ；Ａｓｎ	Ａｒｇ
Ｍｅｔ（Ｍ）	Ｌｅｕ；Ｐｈｅ；Ｉｌｅ	Ｌｅｕ
Ｐｈｅ（Ｆ）	Ｔｒｐ；Ｌｅｕ；Ｖａｌ；Ｉｌｅ；Ａｌａ；Ｔｙｒ	Ｔｙｒ
Ｐｒｏ（Ｐ）	Ａｌａ	Ａｌａ
Ｓｅｒ（Ｓ）	Ｔｈｒ	Ｔｈｒ
Ｔｈｒ（Ｔ）	Ｖａｌ；Ｓｅｒ	Ｓｅｒ
Ｔｒｐ（Ｗ）	Ｔｙｒ；Ｐｈｅ	Ｔｙｒ
Ｔｙｒ（Ｙ）	Ｔｒｐ；Ｐｈｅ；Ｔｈｒ；Ｓｅｒ	Ｐｈｅ
Ｖａｌ（Ｖ）	Ｉｌｅ；Ｌｅｕ；Ｍｅｔ；Ｐｈｅ；Ａｌａ；ノルロイシン	Ｌｅｕ

【０１４８】

アミノ酸は、一般的な側鎖の性質に従ってグループ化することができる：

（１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ；

（２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ；

（３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；

（４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；

（５）鎖の配向に影響を与える残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ；

（６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。

【０１４９】

ある特定の実施形態では、非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つのメンバを別のクラスと交換することを伴うことになる。

【０１５０】

ある特定の実施形態では、一種の置換バリアントは、親抗体、例えばヒト化抗体又はヒト抗体の超可変領域残基の１つ以上の置換を伴う。一般に、更なる試験のために選択される結果として生じるバリアント（複数可）は、親抗体と比較した、親和性の増加、免疫原性の低減などのこれらに限定されないある特定の生物学的特性の修正、例えば、改善を有

し、かつ／又は実質的に保持された親抗体のある特定の生物学的特性を有する。置換型バリアントの非限定的な例は、例えば、本明細書に記載の技法等のファージディスプレイに基づく親和性成熟技法を使用して好都合に生成され得る親和性成熟抗体である。簡潔には、１つ以上のＣＤＲ残基が変異され、バリアント抗体がファージ上にディスプレイされ、特定の生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【０１５１】

ある特定の実施形態では、改変（例えば、置換）がＣＤＲに行われて、例えば、抗体親和性を改善することができる。そのような改変は、ＣＤＲ「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で変異を受けるコドンによってコードされる残基（例えば、Ｃｈｏｗｄｈｕｒｙ、「Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．」、第２０７巻：第１７９～１９６頁（２００８年）を参照）、及び／又は抗原と接触する残基内で行われ得、結果として得られるバリアントＶＨ又はＶＬが結合親和性について試験される。二次ライブラリを構築し、それから再選択することによる親和性成熟が、例えば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、「Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ」、第１７８巻：第１～３７頁に記載されている（Ｏ’Ｂｒｉｅｎら編、Ｈｕｍａｎ　Ｐｒｅｓｓ、ニュージャージー州トトワ（２００１年））。親和性成熟のある特定の実施形態では、多様性が、様々な方法（例えば、エラープローンＰＣＲ、鎖シャフリング、又はオリゴヌクレオチド指向性変異誘発）のうちのいずれかによって、成熟させるために選択された可変遺伝子に導入され得る。その後、二次ライブラリが作製される。その後、このライブラリがスクリーニングされて、所望の親和性を有する任意の抗体バリアントを特定する。多様性を導入するための別の方法は、いくつかのＣＤＲ残基（例えば、一度に４～６個の残基）をランダム化する、ＣＤＲ指向性アプローチを含む。抗原結合に関与するＣＤＲ残基は、例えば、アラニンスキャニング変異誘発又はモデリングを使用して、特異的に特定され得る。特にＣＤＲ－Ｈ３及びＣＤＲ－Ｌ３が標的とされることが多い。

【０１５２】

ある特定の実施形態では、置換、挿入、及び／又は欠失は、かかる改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、１つ以上のＣＤＲ内で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的改変（例えば、本明細書に提供される保存的置換）がＣＤＲで行われ得る。そのような改変は、例えば、ＣＤＲ内の抗原接触残基の外側であってもよい。上述のバリアントＶＨ配列及びＶＬ配列のある特定の実施形態では、各ＣＤＲは、改変されないか、又は１つより多く、２つより多く、若しくは３つより多くのアミノ酸置換を含有しないかのいずれかである。

【０１５３】

変異を標的とし得る抗体の残基又は領域の同定のための有用な方法は、Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ　ａｎｄ　Ｗｅｌｌｓ（１９８９年）、「Ｓｃｉｅｎｃｅ」、第２４４巻：第１０８１～１０８５頁によって記載されるように、「アラニンスキャニング突然変異生成」と呼ばれる。この方法では、残基又は標的残基群（例えば、ａｒｇ、ａｓｐ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、及びｇｌｕ等の荷電残基）が特定され、中性又は負荷電アミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）によって置き換えられて、抗体と抗原との相互作用に影響が及ぼされたかを決定する。更なる置換が最初の置換に対する実行感度を示すアミノ酸位置に導入され得る。あるいは、又は加えて、抗体と抗原との間の接触点を特定するための抗原－抗体複合体の結晶構造。かかる接触残基及び隣接する残基が置換の候補として標的とされ得るか、又は排除され得る。バリアントをスクリーニングして、それらが所望の性質を含有するかどうかを決定してもよい。

【０１５４】

アミノ酸配列挿入としては、１個の残基から１００個以上の残基を含むポリペプチドまでの長さ範囲を融合するアミノ末端及び／又はカルボキシル末端、並びに１個又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。末端挿入の例として、Ｎ末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入型バリアントとしては、抗体の血清半減期を増加させる、酵素（例えば、抗体指向性酵素プロドラッグ療法（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄ

ｉｒｅｃｔｅｄ ｅｎｚｙｍｅ ｐｒｏｄｒｕｇ ｔｈｅｒａｐｙ：ＡＤＥＰＴ）のため）又はポリペプチドへの抗体のＮ末端又はＣ末端の融合が挙げられる。

【０１５５】

ｂ）グリコシル化バリアント

本開示の抗体は、ある特定の実施形態では、抗体がグリコシル化される程度を増加又は減少させるように改変され得る。例えば、限定するものではないが、抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、１つ以上のグリコシル化部位が作製又は除去されるようにアミノ酸配列を改変することによって好都合に達成され得る。

【０１５６】

本開示の抗体がＦｃ領域を含む場合、それに結合した炭水化物が存在するならば、それを改変することができる。哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は、典型的には、一般にＮ結合によってＦｃ領域のＣＨ２ドメインのＡｓｎ２９７に結合される分岐状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Ｗｒｉｇｈｔら、「ＴＩＢＴＥＣＨ」、第１５巻：第２６～３２頁（１９９７年）を参照のこと。オリゴ糖としては、様々な炭水化物、例えば、マンノース、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）、ガラクトース、及びシアル酸、並びに二分岐オリゴ糖構造の「幹」のＧｌｃＮＡｃに結合したフコースが挙げられ得る。ある特定の実施形態では、ある特定の特性が改善された抗体バリアントを作製するために、本開示の抗体におけるオリゴ糖の修飾が行われ得る。

【０１５７】

ある特定の実施形態では、Ｆｃ領域に（直接又は間接的に）結合したフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体バリアントが提供される。例えば、そのような抗体におけるフコースの量は、約１％～約８０％、約１％～約６５％、約５％～約６５％、又は約２０％～約４０％、及びこれらの間の値であり得る。

【０１５８】

ある特定の実施形態では、フコースの量は、例えば、国際公開第２００８／０７７５４６号に記載のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析によって測定される、Ａｓｎ２９７に結合した全ての糖構造（例えば、複合体、ハイブリッド、及び高マンノース構造）の合計に対するＡｓｎ２９７での糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定され得る。Ａｓｎ２９７とは、Ｆｃ領域内の約２９７位（Ｆｃ領域残基のＥｕ番号付け）に位置するアスパラギン残基を指すが、Ａｓｎ２９７は、抗体内のわずかな配列変異のため、２９７位から約±３アミノ酸上流又は下流に、すなわち、２９４位と３００位との間に位置し得る。かかるフコシル化バリアントは、改善されたＡＤＣＣ機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開第２００３／０１５７１０８号（Ｐｒｅｓｔａ，Ｌ．）；同第２００４／００９３６２１号（Ｋｙｏｗａ Ｈａｋｋｏ Ｋｏｇｙｏ Ｃｏ．，Ｌｔｄ）を参照のこと。「脱フコシル化」又は「フコース欠損」抗体バリアントに関する公報の例としては、米国特許出願公開第２００３／０１５７１０８号；国際公開第２０００／６１７３９号；同第２００１／２９２４６号；米国特許出願公開第２００３／０１１５６１４号；同第２００２／０１６４３２８号；同第２００４／００９３６２１号；同第２００４／０１３２１４０号；同第２００４／０１１０７０４号；同第２００４／０１１０２８２号；同第２００４／０１０９８６５号；国際公開第２００３／０８５１１９号；同第２００３／０８４５７０号；同第２００５／０３５５８６号；同第２００５／０３５７７８号；同第２００５／０５３７４２号；同第２００２／０３１１４０号；Ｏｋａｚａｋｉら、「Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．」、第３３６巻：第１２３９～１２４９頁（２００４年）；Ｙａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉら、「Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｅｎｇ．」、第８７巻：第６１４頁（２００４年）が挙げられる。

【０１５９】

脱フコシル化抗体は、タンパク質のフコシル化が欠損している任意の細胞株において産生され得る。細胞株の非限定的な例としては、タンパク質フコシル化で欠損したＬｅｃ１３ ＣＨＯ細胞（Ｒｉｐｋａら、「Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．」、第２４９巻：第５３３～５４５頁（１９８６年）；米国特許出願公開第２００３／０１５７

１０８Ａ１号、Ｐｒｅｓｔａ，Ｌ；及び国際公開第２００４／０５６３１２Ａ１号，Ａｄａｍｓら、特に実施例１１において）、並びにα－１，６－フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、ＦＵＴ８、ノックアウトＣＨＯ細胞などのノックアウト細胞株（例えば、Ｙａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉら、「Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｅｎｇ．」、第８７巻：第６１４頁（２００４年）；Ｋａｎｄａ，Ｙ．ら、「Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．」、第９４巻、第４号：第６８０～６８８頁（２００６年）；及び国際公開第２００３／０８５１０７号）が挙げられる。

【０１６０】

例えば、抗体のＦｃ領域に結合した二分岐オリゴ糖がＧｌｃＮＡｃによって二分される二分オリゴ糖を有する抗体バリアントがさらに提供される。かかる抗体バリアントは、低減されたフコシル化及び／又は改善されたＡＤＣＣ機能を有し得る。このような抗体バリアントの非限定的な例は、例えば、国際公開第２００３／０１１８７８号（Ｊｅａｎ－Ｍａｉｒｅｔら）；米国特許第６，６０２，６８４号（Ｕｍａｎａら）；及び米国特許出願公開第２００５／０１２３５４６第（Ｕｍａｎａら）に記載されている。Ｆｃ領域に結合したオリゴ糖内に少なくとも１つのガラクトース残基を有する抗体バリアントも提供される。かかる抗体バリアントは、改善されたＣＤＣ機能を有し得る。このような抗体バリアントは、例えば、国際公開第１９９７／３００８７号（Ｐａｔｅｌら）、国際公開第１９９８／５８９６４号（Ｒａｊｕ，Ｓ．）、及び国際公開第１９９９／２２７６４号（Ｒａｊｕ、Ｓ．）に記載される。

【０１６１】

ｃ）Ｆｃ領域バリアント

ある特定の実施形態では、１つ以上のアミノ酸修飾が本明細書に提供される抗体のＦｃ領域に導入され、それにより、Ｆｃ領域バリアントが生成され得る。Ｆｃ領域バリアントは、１つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば、置換）を含むヒトＦｃ領域配列（例えば、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４　Ｆｃ領域）を含み得る。

【０１６２】

ある特定の実施形態では、本開示は、いくつかの、しかし全てではないエフェクタ機能を有する抗体バリアントを提供する。そのような限定されたエフェクタ機能は、インビボでの抗体の半減期が重要であるが、特定のエフェクタ機能（補体及びＡＤＣＣなど）が不必要又は有害である適用のため、抗体バリアントを望ましい候補としてもよい。インビトロ及び／又はインビボ細胞毒性アッセイを行って、ＣＤＣ及び／又はＡＤＣＣ活性の低減／欠乏を確認してもよい。例えば、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）結合アッセイを行って、抗体がＦｃγＲ結合を欠く（故にＡＤＣＣ活性を欠く可能性が高い）が、ＦｃＲｎ結合能力を保持していることを確実にすることができる。ＡＤＣＣの媒介のための主要な細胞であるＮＫ細胞がＦｃγＲＩＩＩのみを発現する一方で、単球は、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、及びＦｃγＲＩＩＩを発現する。造血細胞内でのＦｃＲ発現は、Ｒａｖｅｔｃｈ　ａｎｄ　Ｋｉｎｅｔ、「Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第９巻：第４５７～４９２頁（１９９１年）の第４６４頁、表３にまとめられている。目的の分子のＡＤＣＣ活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第５，５００，３６２号（例えば、Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍ，Ｉ．ら、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第８３巻：第７０５９～７０６３頁（１９８６年）を参照）、及びＨｅｌｌｓｔｒｏｍ，Ｉ．ら、「｛Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第８２巻：第１４９９～１５０２頁（１９８５年）；米国特許第５，８２１，３３７号（Ｂｒｕｇｇｅｍａｎｎ，Ｍ．ら、「Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．」、第１６６巻：第１３５１～１３６１頁（１９８７年）を参照）に記載される。あるいは、非放射性アッセイ方法を使用してもよい（例えば、フローサイトメトリー（Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｉｎｃ．、カリフォルニア州マウンテンビュー）のためのＡＣＴＩ（商標）非放射性細胞毒性アッセイ；及びＣＹＴＯＴＯＸ　９６（登録商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ、ウィスコンシン州マディソン）を参照されたい）。かかるアッセイに有用なエフェクタ細胞としては、末梢血単核球（ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ　ｂｌｏｏｄ　ｍｏｎｏｎｕｃｌｅａｒ

ｃｅｌｌ：ＰＢＭＣ）及びナチュラルキラー（Ｎａｔｕｒａｌ　Ｋｉｌｌｅｒ：ＮＫ）細胞が挙げられる。あるいは、又は加えて、目的とする分子のＡＤＣＣ活性は、例えばＣｌｙｎｅｓら、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第９５巻：第６５２～６５６頁（１９９８年）に開示されるような動物モデルにおいて、インビボで評価することができる。Ｃ１ｑ結合アッセイを実行して、抗体がＣ１ｑに結合することができず、それ故にＣＤＣ活性を欠くことを確認することができる。例えば、国際公開第２００６／０２９８７９号及び国際公開第２００５／１００４０２号のＣ１ｑ及びＣ３ｃ結合ＥＬＩＳＡを参照されたい。補体活性化を評価するために、ＣＤＣアッセイを実施してもよい（例えば、Ｇａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏｒｏら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ」、第２０２巻：第１６３頁（１９９６年）、Ｃｒａｇｇ，Ｍ．Ｓ．ら、「Ｂｌｏｏｄ」、第１０１巻：第１０４５～１０５２頁（２００３年）、及びＣｒａｇｇ，Ｍ．Ｓ．及びＭ．Ｊ．Ｇｌｅｎｎｉｅ、「Ｂｌｏｏｄ」、第１０３巻：第２７３８～２７４３頁（２００４年）を参照されたい）。ＦｃＲｎ結合及びインビボクリアランス／半減期決定もまた、当該技術分野で既知の方法を使用して行われ得る（例えば、Ｐｅｔｋｏｖａ，Ｓ．Ｂ．ら、「Ｉｎｔ’ｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１８巻、第１２号：第１７５９～１７６９頁（２００６年）を参照のこと）。ある特定の実施形態では、例えば、米国特許第６，１９４，５５１号、国際公開第９９／５１６４２号、及びＩｄｕｓｏｇｉｅら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１６４巻：第４１７８～４１８４頁（２０００年）に記載されるように、変化した（すなわち、改善されたか又は減少したかのいずれか）Ｃ１ｑ結合及び／又は補体依存性細胞毒性（ＣＤＣ）をもたらす改変が、Ｆｃ領域において行われる。

【０１６３】

エフェクタ機能が低下した抗体としては、Ｆｃ領域の残基２３８、２６５、２６９、２７０、２９７、３２７及び３２９の１つ以上の置換を有するものが挙げられる（米国特許第６，７３７，０５６号）。このようなＦｃ変異体としては、アミノ酸位置２６５、２６９、２７０、２９７及び３２７のうち２つ以上での置換を有するＦｃ変異体が挙げられ、残基２６５及び２９７がアラニンに置換されている、いわゆる「ＤＡＮＡ」Ｆｃ変異体を含む（米国特許第７，３３２，５８１号）。

【０１６４】

ＦｃＲに対する結合が向上又は減少した特定の抗体バリアントが記載される。例えば、米国特許第６，７３７，０５６号、国際公開第２００４／０５６３１２号、及びＳｈｉｅｌｄｓら、「Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．」、第９巻、第２号：第６５９１～６６０４頁（２００１年）を参照されたい。

【０１６５】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体バリアントは、ＡＤＣＣを改善する１つ以上のアミノ酸置換、例えば、Ｆｃ領域の２９８、３３３、及び／又は３３４位（残基のＥＵ番号付け）での置換を有するＦｃ領域を含む。

【０１６６】

ある特定の実施形態では、抗体のＦｃ領域で起こる改変、例えば本明細書に開示される二重特異性抗体は、増加した半減期及び新生児型Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）への改善された結合を有する、バリアント抗体を作成することができ、これは母体ＩｇＧの胎児への移入の原因であり（Ｇｕｙｅｒら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１１７巻：第５８７頁（１９７６年）及びＫｉｍら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第２４巻：第２４９頁（１９９４年））、米国特許出願公開第２００５／００１４９３４Ａ１号（Ｈｉｎｔｏｎら）に記載される。それらの抗体は、Ｆｃ領域のＦｃＲｎへの結合を改善する１つ以上の置換を有するＦｃ領域をそこに含む。かかるＦｃバリアントは、Ｆｃ領域残基：２３８、２５６、２６５、２７２、２８６、３０３、３０５、３０７、３１１、３１２、３１７、３４０、３５６、３６０、３６２、３７６、３７８、３８０、３８２、４１３、４２４又は４３４のうち１つ以上における置換、例えばＦｃ領域残基４３４の置換を伴うものを含む（米国特許第７，３７１，８２６号）。

【０１６７】

Ｆｃ領域バリアントのその他の例に関係するＤｕｎｃａｎ＆Ｗｉｎｔｅｒ、「Ｎａｔｕｒｅ」、第３２２巻：第７３８～４０頁（１９８８年）；米国特許第５，６４８，２６０号；同第５，６２４，８２１号；及び国際公開第９４／２９３５１号もまた参照のこと。

【０１６８】

ｄ）システイン操作抗体バリアント

ある特定の実施形態では、抗体の１つ以上の残基がシステイン残基で置換されているシステイン操作された抗体、例えば、「ｔｈｉｏＭＡｂ」を作製することが望ましい場合がある。特定の実施形態では、置換残基は、抗体の利用しやすい部位において生じる。これらの残基をシステインで置換することによって、反応性のチオール基がそれにより抗体の利用しやすい部位に位置付けられ、それを使用して、薬物部分又はリンカー－薬物部分等の他の部分に抗体を複合体化して、本明細書にさらに記載されるように、免疫複合体を作製することができる。ある特定の実施形態では、以下の残基のうちの任意の１つ以上を、システインで置換してもよい：軽鎖のＶ２０５（Ｋａｂａｔ番号付け）、重鎖のＡ１１８（ＥＵ番号付け）、及び重鎖Ｆｃ領域のＳ４００（ＥＵ番号付け）。システイン操作抗体は、例えば、米国特許第７，５２１，５４１号に記載されるように生成され得る。

【０１６９】

ｅ）抗体誘導体

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、当該技術分野で既知であり、容易に入手可能な、追加の非タンパク質性部分を含有するように、さらに修飾され得る。抗体の誘導体化に好適な部分としては、限定するものではないが、水溶性ポリマーが挙げられる。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール（ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ　ｇｌｙｃｏｌ：ＰＥＧ）、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマー又はランダムコポリマーのいずれか）、及びデキストラン又はポリ（ｎ－ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロプロピレン（ｐｒｏｐｒｏｐｙｌｅｎｅ）グリコールホモポリマー、プロリプロピレン（ｐｒｏｌｙｐｒｏｐｙｌｅｎｅ）オキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコール、並びにそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造時に有利であり得る。このポリマーは、任意の分子量を有していてもよく、分岐していてもよく、又は分岐していなくてもよい。本抗体に結合したポリマーの数は異なってもよく、１つより多くのポリマーが結合している場合、それらは、同じ分子又は異なる分子であり得る。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び／又は種類は、改善される本抗体の具体的な特性又は機能、本抗体の誘導体が規定の状態下である療法で使用されるか等を含むが、これらに限定されない検討事項に基づいて決定され得る。

【０１７０】

ある特定の実施形態では、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る抗体及び非タンパク質性部分の複合体が提供される。一実施形態では、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである（Ｋａｍら、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第１０２巻：第１１６００～１１６０５頁（２００５年））。ある特定の実施形態では、放射線は、いずれの波長のものであってもよく、これには、限定するものではないが、通常の細胞を傷つけないが、抗体－非タンパク質性部分に近接する細胞が殺滅される温度まで非タンパク質性部分を加熱する波長が挙げられる。

【０１７１】

Ｂ．抗体産生の方法

本明細書に開示される抗体は、当技術分野で利用可能な技術又は既知の技術を用いて作製することができる。例えば、限定するものではないが、抗体は、例えば米国特許第４，８１６，５６７号に記載されているように、組換え方法及び組成物を用いて産生すること

ができる。抗体を生成するための詳細な手順は、以下の実施例に記載されている。
【０１７２】
本願で開示された主題は、本明細書に開示される抗体をコードする単離された核酸をさらに提供する。例えば、単離された核酸は、抗体のＶＬを含むアミノ酸配列及び／又はＶＨを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖及び／又は重鎖）をコードすることができる。ある特定の実施形態では、単離された核酸は、配列番号５４に示される配列を有する重鎖可変領域アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、及び／又は配列番号５０に示される配列を有する軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含み得る。ある特定の実施形態では、単離された核酸は、配列番号５７に示される配列を有する重鎖可変領域アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、及び／又は配列番号５３に示される配列を有する軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含み得る。
【０１７３】
ある特定の実施形態では、核酸は、１つ以上のベクター、例えば発現ベクター中に存在し得る。本明細書で使用される場合、用語「ベクター」とは、連結している別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指す。ベクターの１種は「プラスミド」であり、これは、追加のＤＮＡセグメントがライゲートされ得る環状二本鎖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、追加のＤＮＡセグメントがウイルスゲノムにライゲートされ得る。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内で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及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、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある特定のベクター、発現ベクターは、それらが作動可能に連結する遺伝子の発現を誘導することができる。一般に、組換えＤＮＡ技法において利用される発現ベクターは、プラスミド（ベクター）の形態である場合が多い。しかしながら、開示された主題は、同等の機能を果たすウイルスベクター（例えば、複製欠陥レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス）のような他の形態の発現ベクターなどを含むことを意図している。
【０１７４】
ある特定の実施形態では、本開示の抗体をコードする核酸、及び／又は核酸を含む１つ以上のベクターを、宿主細胞に導入することができる。ある特定の実施形態では、細胞への核酸の導入は、トランスフェクション、電気穿孔、マイクロインジェクション、核酸配列を含有するウイルス又はバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体媒介遺伝子導入、マイクロセル媒介遺伝子導入、スフェロプラスト融合等を含むが、これらに限定されない、当技術分野で公知の任意の方法によって行うことができる。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、（１）抗体のＶＬを含むアミノ酸配列及び抗体のＶＨを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は（２）抗体のＶＬを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第１のベクター、及び抗体のＶＨを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第２のベクターを含み得る（例えば、これらで形質転換されている）。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｈａｍｓｔｅｒ　Ｏｖａｒｙ：ＣＨＯ）細胞又はリンパ系細胞（例えば、Ｙ０、ＮＳ０、Ｓｐ２０細胞）である。
【０１７５】
ある特定の実施形態では、開示された抗ＦＧＦ２１抗体を作製する方法は、抗体をコードする核酸が導入された宿主細胞を抗体の発現に好適な条件下で培養することと、任意に、宿主細胞及び／又は宿主細胞培養培地から抗体を回収することと、を含み得る。ある特定の実施形態では、抗体は、クロマトグラフィ技術によって宿主細胞から回収される。
【０１７６】
本開示の抗体の組換え産生のために、例えば上記のような、抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内での更なるクローニング及び／又は発現のために１つ以上のベクターに挿入され得る。そのような核酸は、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖及び軽

鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）、容易に単離し、配列決定することができる。

【０１７７】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に好適な宿主細胞は、本明細書に記載の原核生物細胞又は真核生物細胞を含む。例えば、抗体は、特にグリコシル化及びＦｃエフェクタ機能が必要とされない場合に、細菌中で産生され得る。細菌での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第５，６４８，２３７号、同第５，７８９，１９９号、及び同第５，８４０，５２３号を参照されたい。（Ｅ．ｃｏｌｉにおける抗体断片の発現を記載している、Ｃｈａｒｌｔｏｎ、「Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」、第２４８巻（Ｂ．Ｋ．Ｃ．Ｌｏ編、Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ、ニュージャージー州トトワ（２００３年）、第２４５～２５４頁もまた参照されたい。）発現後、抗体は、可溶性画分中で細菌細胞ペーストから単離され得、さらに精製され得る。

【０１７８】

原核生物に加え、真核生物の微生物、例えば、糸状菌又は酵母は、抗体をコードするベクターに適切なクローニング又は発現の宿主であり、グリコシル化経路が「ヒト化」された真菌株及び酵母株を含み、部分的又は完全にヒトグリコシル化パターンを有する抗体を産生する。Ｇｅｒｎｇｒｏｓｓ、「Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．」、第２２巻：第１４０９～１４１４頁（２００４年）、及びＬｉら、「Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．」、第２４巻：第２１０～２１５頁（２００６年）を参照されたい。グリコシル化抗体の発現に好適な宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）からも得られる。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。数多くのバキュロウイルス株が同定されており、特に、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞のトランスフェクションのために、これを昆虫細胞と組み合わせて使用してもよい。

【０１７９】

グリコシル化抗体の発現に好適な宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）からも得られる。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。数多くのバキュロウイルス株が同定されており、特に、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞のトランスフェクションのために、これを昆虫細胞と組み合わせて使用してもよい。

【０１８０】

ある特定の実施形態では、植物細胞培養物を宿主細胞として利用することができる。例えば、米国特許第５，９５９，１７７号、同第６，０４０，４９８号、同第６，４２０，５４８号、同第７，１２５，９７８号、及び同第６，４１７，４２９号（トランスジェニック植物で抗体を産生するためのＰＬＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ（商標）技術を記載している）を参照されたい。

【０１８１】

ある特定の実施形態では、脊椎動物細胞を宿主として使用することもできる。例えば、限定するものではないが、懸濁液中で増殖するように適合された哺乳動物細胞株が有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の非限定的な例は、ＳＶ４０（ＣＯＳ－７）によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株；ヒト胎児性腎株（例えば、Ｇｒａｈａｍら、「Ｊ．Ｇｅｎ Ｖｉｒｏｌ．」、第３６巻：第５９頁（１９７７年）に記載される２９３又は２９３細胞）；ベビーハムスター腎細胞（ｂａｂｙ ｈａｍｓｔｅｒ ｋｉｄｎｅｙ ｃｅｌｌ：ＢＨＫ）；マウスセルトリ細胞（例えば、Ｍａｔｈｅｒ、「Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．」、第２３巻：第２４３～２５１頁（１９８０年）に記載されるＴＭ４細胞；サル腎細胞（ＣＶ１）；アフリカミドリザル腎細胞（ＶＥＲＯ－７６）；ヒト子宮頸がん細胞（ＨＥＬＡ）；イヌ腎細胞（ＭＤＣＫ）；バッファロラット肝細胞（ＢＲＬ ３Ａ）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８）；ヒト肝細胞（Ｈｅｐ Ｇ２）；マウス乳がん（ＭＭＴ ０６０５６２）；ＴＲＩ細胞、例えばＭａｔｈｅｒら、「Ａｎｎａｌｓ Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．」、第３８３巻：第４４～６８頁（１９８２年）に記載される細胞；ＭＲＣ５細胞；及

びＦＳ４細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、ＤＨＦＲ－ＣＨＯ細胞（Ｕｒｌａｕｂら、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第７７巻：第４２１６頁（１９８０年））を含むチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、並びにＹ０、ＮＳ０、及びＳｐ２／０などの骨髄腫細胞株が挙げられる。抗体産生に好適なある特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Ｙａｚａｋｉ及びＷｕ、「Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」、第２４８巻（Ｂ．Ｋ．Ｃ．Ｌｏ編、Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ、ニュージャージー州トトワ）、第２５５～２６８頁（２００３年）を参照されたい。

【０１８２】

ある特定の実施形態では、二重特異性抗体及び／又は多重特異性抗体を作製するための技法としては、異なる特異性を有する２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の組換え同時発現（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｃｕｅｌｌｏ、「Ｎａｔｕｒｅ」、第３０５巻：第５３７頁（１９８３年））、国際特許出願第９３／０８８２９号、及びＴｒａｕｎｅｃｋｅｒら、「ＥＭＢＯ Ｊ．」、第１０巻：第３６５５頁（１９９１年）を参照）、及び「ノブ・イン・ホール」操作（例えば、米国特許第５，７３１，１６８号を参照）が挙げられるが、これらに限定されない。二重特異性抗体はまた、静電的ステアリング効果を操作して抗体Ｆｃ－ヘテロ二量体分子を作製すること（国際公開第２００９／０８９００４Ａ１号）、２つ以上の抗体又は断片を架橋すること（例えば、米国特許第４６７６９８０号、及びＢｒｅｎｎａｎら、「Ｓｃｉｅｎｃｅ」、第２２９巻：第８１頁（１９８５年）を参照）、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を産生すること（例えば、Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１４８巻、第５号：第１５４７～１５５３頁（１９９２年）を参照のこと）、「ダイアボディ」技術を使用して二重特異性抗体断片を作製すること（例えば、Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒら、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第９０巻：第６４４４～６４４８頁（１９９３年））、及び１本鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体を使用すること（例えば、Ｇｒｕｂｅｒら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１５２巻：第５３６８頁（１９９４年））、並びに例えば、Ｔｕｔｔら、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１４７巻：第６０頁（１９９１年）に記載される三重特異性抗体を調製することによって、作製されてもよい。

【０１８３】

本開示の二重特異性分子及び多重特異性はまた、科学技術（例えば、Ｋｒａｎｚ（１９８１年）、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第７８巻：第５８０７頁）、「ポリドーマ（ｐｏｌｙｄｏｍａ）」技術（例えば、米国特許第４，４７４，８９３号）、又は組換えＤＮＡ技術を使用して作製することもできる。本願で開示された主題の二重特異性分子及び多重特異性分子はまた、当技術分野で公知の方法及び本明細書に記載されているような方法を用いて、成分結合特異性、例えば第１のエピトープ及び第２のエピトープ結合特異性をコンジュゲートさせることによって調製することもできる。例えば、限定するものではないが、二重特異性分子及び多重特異性分子の各結合特異性は、別々に生成され、次いで互いにコンジュゲートされ得る。結合特異性がタンパク質又はペプチドである場合、種々のカップリング剤又は架橋剤を共有結合に使用することができる。架橋剤の非限定的な例としては、タンパク質Ａ、カルボジイミド、Ｎ－スクシンイミジル－Ｓ－アセチル－チオアセテート（ＳＡＴＡ）、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、及びスルホスクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロハキサン－１－カルボキシレート（ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ ４－（Ｎ－ｍａｌｅｉｍｉｄｏｍｅｔｈｙｌ）ｃｙｃｌｏｈａｘａｎｅ－１－ｃａｒｂｏｘｙｌａｔｅ）（スルホ－ＳＭＣＣ）が挙げられる（例えば、Ｋａｒｐｏｖｓｋｙ（１９８４年）、「Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．」、第１６０巻：第１６８６頁；Ｌｉｕ（１９８５年）、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第８２巻：第８６４８頁を参照されたい）。他の方法としては、Ｐａｕｌｕｓ（「Ｂｅｈｒｉｎｇ Ｉｎｓ．Ｍｉｔｔ．」（１９８５年）、第７８番第１１８～１３２頁；Ｂｒｅｎｎａｎ（１９８５年）、「Ｓｃｉｅｎｃｅ」、第２２９巻：第８１～８３頁）、Ｇｌｅｎｎｉｅ（１９８７

年）、「Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．」、第１３９巻：第２３６７～２３７５頁）に記載される方法が挙げられる。結合特異性が抗体（例えば、２つのヒト化抗体）である場合、それらは２つの重鎖のＣ末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介してコンジュゲートされ得る。ある特定の実施形態では、ヒンジ領域は、コンジュゲーションの前に、奇数のスルフヒドリル残基、例えば１つを含有するように修飾することができる。

【０１８４】

ある特定の実施形態では、二重特異性抗体の両方の結合特異性は、同じベクター中にコードされ、同じ宿主細胞中で発現され、組み立てられ得る。この方法は、二重特異性分子及び多重特異性分子が、ＭＡｂ×ＭＡｂ、ＭＡｂ×Ｆａｂ、Ｆａｂ×Ｆ（ａｂ’）$_2$、又はリガンド×Ｆａｂ融合タンパク質である場合に特に有用である。ある特定の実施形態では、本開示の二重特異性抗体は、単鎖二重特異性抗体、１つの単鎖抗体及び結合決定基を含む単鎖二重特異性分子、又は２つの結合決定基を含む単鎖二重特異性分子などの単鎖分子であり得る。二重特異性分子及び多重特異性分子はまた、単鎖分子であってもよく、又は少なくとも２つの単鎖分子を含んでもよい。二重特異性分子及び多重特異性分子を調製する方法は、例えば、米国特許第５，２６０，２０３号；米国特許第５，４５５，０３０号；米国特許第４，８８１，１７５号；米国特許第５，１３２，４０５号；米国特許第５，０９１，５１３号；米国特許第５，４７６，７８６号；米国特許第５，０１３，６５３号；米国特許第５，２５８，４９８号；及び米国特許第５，４８２，８５８号に記載される。「オクトパス抗体」を含む３つ以上の機能的抗原結合部位（例えば、エピトープ結合部位）を有する操作された抗体もまた、本明細書に含まれる（例えば、米国特許出願公開第２００６／００２５５７６Ａ１号を参照のこと）。

【０１８５】

ある特定の実施形態では、動物系を用いて、本開示の抗体を産生することができる。ハイブリドーマを調製するための１つの動物系は、マウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ産生は非常によく確立された手法である。融合のための免疫化脾細胞の単離のための免疫化プロトコル及び技術は、当技術分野において公知である。融合パートナ（例えば、マウス骨髄腫細胞）及び融合手順もまた公知である（例えば、Ｈａｒｌｏｗ及びＬａｎｅ（１９８８年）、「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ」、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバーを参照されたい）。

【０１８６】

Ａ．結合競合アッセイ

本明細書に提供される本開示の抗ＦＧＦ２１抗体は、当技術分野で公知及び本明細書で提供される様々なアッセイによって、それらの物理的／化学的性質及び／又は生物活性について特定する、スクリーニングする、又は特徴付けることができる。

【０１８７】

１．結合アッセイ及び他のアッセイ

本開示の抗体は、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、又はウェスタン・ブロット・アッセイなどの公知の方法によってその抗原結合活性について試験することができる。これらのアッセイの各々は、一般に、目的の複合体に特異的な標識試薬（例えば、抗体）を用いることによって、特定の目的のタンパク質－抗体複合体の存在を検出する。例えば、ＦＧＦ２１－抗体複合体は、例えば、抗体－ＦＧＦ２１複合体を認識しこれに特異的に結合する、酵素結合抗体又は抗体断片を用いて検出することができる。あるいは、複合体は、様々な他の免疫アッセイのいずれかを用いて検出することができる。例えば、抗体を放射性標識し、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）で使用することができる（例えば、参照によって本明細書に組み込まれる、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，Ｂ．、「Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ，Ｓｅｖｅｎｔｈ Ｔｒａｉｎｉｎｇ Ｃｏｕｒｓｅ ｏｎ Ｒａｄｉｏｌｉｇａｎｄ Ａｓｓａｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ」、Ｔｈｅ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｓｏｃｉｅｔｙ、（１９８６年３月）を参照されたい）。放射性同位体は、ガイガカウンタ若しくはシンチレーションカウ

ンタの使用、又はオートラジオグラフィなどによって検出することができる。
【０１８８】
ある特定の実施形態では、競合アッセイを用いて、ＦＧＦ２１への結合について、本開示の抗ＦＧＦ２１抗体、例えばｍＡｂ４又はｍＡｂ１５と競合する抗体を特定することができる。ある特定の実施形態では、かかる競合抗体は、ｍＡｂ４又はｍＡｂ１５により結合されるのと同じエピトープ（例えば、線状又は立体構造エピトープ）に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示の方法が、Ｍｏｒｒｉｓ（１９９６年）、「Ｅｐｉｔｏｐｅ Ｍａｐｐｉｎｇ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ」、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、第６６巻（Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ、ニュージャージー州トトワ）に提供されている。
【０１８９】
競合アッセイの非限定的な例では、固定化されたＦＧＦ２１を、ＦＧＦ２１に結合する第１の標識抗体（例えば、ｍＡｂ４又はｍＡｂ１５）と、ＦＧＦ２１への結合について第１の抗体と競合するその能力について試験されている第２の非標識抗体と、を含む溶液中でインキュベートすることができる。第２の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在し得る。対照として、第１の標識抗体を含むが第２の非標識抗体を含まない溶液中で、固定化ＦＧＦ２１をインキュベートする。ＦＧＦ２１への第１の抗体の結合を許容する条件下でのインキュベーション後に、結合していない過剰な抗体を除去し、固定化ＦＧＦ２１と会合した標識の量を測定する。固定化ＦＧＦ２１に関連する標識の量が対照試料と比較して試験試料中で実質的に低減される場合、それは、第２の抗体がＦＧＦ２１への結合について第１の抗体と競合していることを示す。Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（１９８８年）、「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」、第１４章、（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー）を参照のこと。
【０１９０】
Ｂ．免疫複合体
本願で開示された主題は、化学療法剤若しくは薬物、増殖阻害剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、若しくは動物起源の酵素活性毒素、又はそれらの断片）、又は放射性同位体などの１つ以上の細胞毒性薬にコンジュゲートされた、抗体を含む免疫複合体をさらに提供する。例えば、開示された主題の抗体又は抗原結合部分は、別の抗体、抗体断片、ペプチド、又は結合模倣物などの１つ以上の他の結合分子に機能的に結合され得る（例えば、化学的カップリング、遺伝的融合、非共有結合、又は他の方法による）。
【０１９１】
ある特定の実施形態では、免疫複合体は抗体薬剤複合体（ＡＤＣ）であり、抗体が、これらに限定されるわけではないが、マイタンシノイド（米国特許第５，２０８，０２０号、同第５，４１６，０６４号、及び欧州特許第０４２５２３５号を参照のこと）；モノメチルオーリスタチン薬剤部分ＤＥ及びＤＦ（ＭＭＡＥ及びＭＭＡＦ）などのオーリスタチン（米国特許第５，６３５，４８３号、同第５，７８０，５８８号、及び同第７，４９８，２９８号を参照のこと）；ドラスタチン；カリケアマイシン又はその誘導体（米国特許第５，７１２，３７４号、同第５，７１４，５８６号、同第５，７３９，１１６号、同第５，７６７，２８５号、同第５，７７０，７０１号、同第５，７７０，７１０号、同第５，７７３，００１号、及び同第５，８７７，２９６号；Ｈｉｎｍａｎら、「Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．」、第５３巻：第３３３６～３３４２頁（１９９３年）；並びにＬｏｄｅら、「Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．」、第５８巻：第２９２５～２９２８頁（１９９８年）を参照のこと）；ダウノマイシン及びドキソルビシン等のアントラサイクリン（Ｋｒａｔｚら、「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．」、第１３巻：第４７７～５２３頁（２００６年）；Ｊｅｆｆｒｅｙら、「Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ&Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔｅｒｓ」、第１６巻：第３５８～３６２頁（２００６年）；Ｔｏｒｇｏｖら、「Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．」、第１６巻：第７１７～７２１頁（２００５年）；Ｎａｇｙら、「Ｐｒｏｃ

．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、第９７巻：第８２９～８３４頁（２０００年）；Ｄｕｂｏｗｃｈｉｋら、「Ｂｉｏｏｒｇ．＆Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔｅｒｓ」、第１２巻：第１５２９～１５３２頁（２００２年）；Ｋｉｎｇら、「Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．」、第４５巻：第４３３６～４３４３頁（２００２年）；及び米国特許第６，６３０，５７９号を参照のこと）；メトトレキサート；ビンデシン；ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセル等のタキサン；トリコテセン；並びにＣＣ１０６５を含む１つ以上の薬剤に結合している。

【０１９２】

ある特定の実施形態では、免疫複合体は、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素Ａ鎖（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ由来）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンシン（ｄｉａｎｔｈｉｎ）タンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃａ ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、及びＰＡＰ－Ｓ）、ｍｏｍｏｒｄｉｃａ ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、ｓａｐａｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン（ｍｉｔｏｇｅｌｌｉｎ）、レストリクトシン、フェノマイシン（ｐｈｅｎｏｍｙｃｉｎ）、エノマイシン（ｅｎｏｍｙｃｉｎ）、並びにトリコテセン（ｔｒｉｃｏｔｈｅｃｅｎｅ）を含むがこれらに限定されない酵素活性毒素又はその断片に複合された本明細書に記載される抗体を含む。

【０１９３】

ある特定の実施形態では、免疫複合体は、放射性原子に複合体化されて放射性複合体を形成する、本明細書に記載される抗体を含む。放射性複合体の産生には、様々な放射性同位体が利用可能である。非限定的な例としては、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}、及びＬｕの放射性同位体が挙げられる。放射性コンジュゲートが検出のために使用される場合、それは、シンチグラフィ研究のための放射性原子、例えば、ｔｃ９９ｍ若しくはＩ１２３、又は核磁気共鳴（ＮＭＲ）画像法（別名、磁気共鳴画像法、ｍｒｉ）のためのスピン標識、例えば、この場合もやはりヨウ素－１２３、ヨウ素－１３１、インジウム－１１１、フッ素－１９、炭素－１３、窒素－１５、酸素－１７、ガドリニウム、マンガン、若しくは鉄を含むことができる。

【０１９４】

抗体及び細胞毒性薬の複合体は、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、アジプイミド酸ジメチルＨＣｌ）、活性エステル（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン２，６－ジイソシアネート）、及びビス－活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）等の多様な二官能性タンパク質結合剤を使用して作製され得る。例えば、リシン免疫毒素は、Ｖｉｔｅｔｔａら、「Ｓｃｉｅｎｃｅ」、第２３８巻：第１０９８頁（１９８７年）に記載されているように調製することができる。炭素－１４標識１－イソチオシアナトベンジル－３－メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、放射性ヌクレオチドを抗体にコンジュゲートするための例示的なキレート剤である。国際公開第９４／１１０２６号を参照されたい。リンカーは、細胞内での細胞毒性薬物の放出を容易にする「切断可能リンカー」であってもよい。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、感光性リンカー、ジメチルリンカー、又はジスルフィド含有リンカー（Ｃｈａｒｉら、「Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．」、第５２巻：第１２７～１３１頁（１９９２年）；米国特許第５，２０８，０２０号）を使用することができる。

【０１９５】

本明細書に開示される免疫複合体は、市販されている（例えば、Ｐｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．製、米国イリノイ州ロックフォード）、ＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ－ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、ＳＭＣＣ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ－ＥＭＣＳ、スルホ－ＧＭＢＳ、スルホ－ＫＭＵＳ、スルホ－ＭＢＳ、スルホ－ＳＩＡＢ、スルホ－ＳＭＣＣ、及びスルホ－ＳＭＰＢ、並びにＳＶＳＢ（サクシニミジル－（４－ビニルスルホン）安息香酸塩）を含むが、これらに限定されない架橋剤試薬で調製されるかかるコンジュゲートを明示的に企図するが、これらに限定されない。

【０１９６】

ＩＶ．キット

本願で開示された主題は、本開示の免疫アッセイを実施するのに有用な材料を含有するキットをさらに提供する。ある特定の実施形態では、キットは、本明細書に開示される抗ＦＧＦ２１抗体を含有する容器を含む。好適な容器の非限定的な例としては、ボトル、試験管、バイアル、及びマイクロタイタプレートが挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。ある特定の実施形態では、キットは、開示された免疫アッセイ法において抗ＦＧＦ２１抗体を使用するための指示を提示する添付文書をさらに含む。

【０１９７】

ある特定の実施形態では、キットは、１つ以上の抗ＦＧＦ２１抗体を含有する１つ以上の容器を含むことができる。抗ＦＧＦ２１抗体の非限定的な例は、表８～表１３及び表１６～表１９、並びに図４１Ａ及び図４１Ｂに開示されている。例えば、限定するものではないが、キットは、抗ＦＧＦ２１捕捉抗体を含む少なくとも１つの容器と、抗ＦＧＦ２１検出抗体を含む少なくとも１つの容器と、を含むことができる。

【０１９８】

ある特定の実施形態では、試料中の全ＦＧＦ２１タンパク質を検出するためのキットは、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体を含有する第１の容器と、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する検出抗体を含有する第２の容器と、検出試薬を含有する第３の容器と、を含む。

【０１９９】

ある特定の実施形態では、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質を検出するためのキットは、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体を含有する第１の容器と、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する検出抗体を含有する第２の容器と、検出試薬を含有する第３の容器と、を含む。

【０２００】

ある特定の実施形態では、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定するためのキットは、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の捕捉抗体を含有する第１の容器と、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の検出抗体を含有する第２の容器と、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第２の捕捉抗体を含有する第３の容器と、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する第２の検出抗体を含有する第４の容器と、検出試薬を含有する第５の容器と、を備える。ある特定の実施形態では、該第１の捕捉抗体及び第２の捕捉抗体は同一の抗体であり、単一の容器で提供してもよい。あるいは、該第１の捕捉抗体及び第２の捕捉抗体は異なる抗体であり、別々の容器で提供してもよい。

【０２０１】

ある特定の実施形態では、捕捉抗体及び／又は検出抗体は、約０．１μｇ／ｍｌ～約５．０μｇ／ｍｌの濃度で本開示のキットにて提供することができる。ある特定の実施形態では、検出抗体を、例えば、ビオチンで標識することができる。

【０２０２】

ある特定の実施形態では、本開示のキットにて提供される検出試薬は、アビジン、ストレプトアビジン－ＨＲＰ、又はストレプトアビジン－β－Ｄ－ガラクトピラノース（ＳＢＧ）であり得る。ある特定の実施形態では、本開示のキットは、テトラメチルベンジジン、過酸化水素、及び／又はレゾルフィンβ－Ｄ－ガラクトピラノシドをさらに含むことができる。ある特定の実施形態では、キットがストレプトアビジン－ＨＲＰを含む場合、キットはテトラメチルベンジジン及び過酸化水素をさらに含むことができる。ある特定の実施形態では、キットがＳＢＧを含む場合、キットはレゾルフィンβ－Ｄ－ガラクトピラノシドをさらに含むことができる。ある特定の実施形態では、ＳＢＧは、約１００ｐＭ～約４００ｐＭの濃度でキットにて提供することができる。

【０２０３】

ある特定の実施形態では、捕捉抗体は、例えば常磁性ビーズなどのプレート又はビーズ等であるが、これらに限定されない固体支持体表面に結合して提供してもよい。あるいは又はさらに、キットは、捕捉抗体に連結され得る固体支持体表面をさらに含むことができる。ある特定の実施形態では、固体支持体は常磁性ビーズであってもよく、約０．１×10^7ビーズ／ｍｌ～約１０．０×10^7ビーズ／ｍｌの濃度で提供することができる。

【０２０４】

あるいは又はさらに、キットは、他の緩衝液、希釈液、及びフィルタを含む、商業的観点及びユーザの観点から望ましい他の材料を含み得る。ある特定の実施形態では、キットは、血液試料を収集及び／又は処理するための材料を含むことができる。

【０２０５】

Ｖ．例示的な実施形態

【０２０６】

Ａ．ある特定の非限定的な実施形態では、本願で開示された主題は、試料中の全ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定する免疫アッセイ法であって、

（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体を該試料と接触させて、試料－捕捉抗体組合せ材料を生成することと、

（ｂ）該試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する検出抗体と接触させることと、

（ｃ）該試料－捕捉抗体組合せ材料に結合している該検出抗体を検出することと、

（ｄ）結合した該検出抗体のレベルに基づき、該試料中に存在する全ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、を含む、免疫アッセイ法を提供する。

【０２０７】

Ａ１．該捕捉抗体及び該検出抗体が、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する、前述のＡに記載の免疫アッセイ法。

【０２０８】

Ｂ．ある特定の非限定的な実施形態では、本願で開示された主題は、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を判定する免疫アッセイ法であって、

（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体を該試料と接触させて、試料－捕捉抗体組合せ材料を生成することと、

（ｂ）該試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する検出抗体と接触させることと、

（ｃ）該試料－捕捉抗体組合せ材料に結合している該検出抗体を検出することと、

（ｄ）結合した該検出抗体のレベルに基づき、該試料中に存在する活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、を含む、免疫アッセイ法を提供する。

【０２０９】

Ｃ．ある特定の非限定的な実施形態では、本願で開示された主題は、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定する免疫アッセイ法であって、

（ａ）（ｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の捕捉抗体を該試料と接触させて、第１の試料－捕捉抗体組合せ材料を生成すること

、（ｉｉ）該第１の試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の検出抗体と接触させること、（ｉｉｉ）該試料－捕捉抗体組合せ材料に結合した該第１の検出抗体を検出すること、及び（ｉｖ）結合した該第１の検出抗体のレベルに基づき、該試料中に存在する全ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、

（ｂ）（ｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第２の捕捉抗体を該試料と接触させて、第２の試料－捕捉抗体組合せ材料を生成すること、（ｉｉ）該第２の試料－捕捉抗体組合せ材料を、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する第２の検出抗体と接触させること、（ｉｉｉ）該試料－捕捉抗体組合せ材料に結合した該第２の検出抗体を検出すること、及び（ｉｖ）結合した該第２の検出抗体のレベルに基づき、該試料中に存在する活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を算出することと、

（ｃ）工程（ａ）で測定した該全ＦＧＦ２１タンパク質の量を、工程（ｂ）で測定した該活性ＦＧＦ２１タンパク質の量と比較して、該試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定することと、を含む、免疫アッセイ法を提供する。

【０２１０】

Ｃ１．該第１の捕捉抗体及び第２の捕捉抗体が、同一の抗体である、前述のＣに記載の免疫アッセイ法。

【０２１１】

Ｃ２．該第１の捕捉抗体及び該第１の検出抗体が、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する、前述のＣに記載の免疫アッセイ法。

【０２１２】

Ｃ３．該免疫アッセイが、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）である、前述のＡ～Ｃ２のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。

【０２１３】

Ｃ４．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、常磁性ビーズに固定化される、前述のＡ～Ｃ３のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。

【０２１４】

Ｃ５．該検出抗体、第１の検出抗体、及び第２の検出抗体のうち１つ以上が、ビオチンにコンジュゲートされる、前述のＡ～Ｃ４のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。

【０２１５】

Ｃ６．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、K_d約10^{-10}Ｍ～10^{-13}ＭでＦＧＦ２１に結合する、前述のＡ～Ｃ５のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。

【０２１６】

Ｃ７．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、K_d約10^{-10}Ｍ～10^{-13}ＭでＦＧＦ２１に結合する、前述のＡ及びＣ～Ｃ６のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。

【０２１７】

Ｃ８．該試料が、血液試料である、前述のＡ～Ｃ７のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。

【０２１８】

Ｃ９．該試料が、血漿試料である、前述のＡ～Ｃ７のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。

【０２１９】

Ｃ１０．該方法が、ウェル内感度約２ｐｇ／ｍｌ～約２０ｐｇ／ｍｌで該試料中にて、全ＦＧＦ２１タンパク質又は活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を検出する、前述のＡ～Ｃ９のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。

【０２２０】

Ｃ１１．該免疫アッセイ法が、単分子検出器具を用いて実施される、前述のＡ～Ｃ９の

いずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【０２２１】
Ｃ１２．該単分子検出器具が、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａ　ＨＤ－１　Ａｎａｌｙｚｅｒ（商標）である、前述のＣ１１に記載の免疫アッセイ法。
【０２２２】
Ｃ１３．該方法が、ウェル内感度約０．２ｐｇ／ｍｌ～約０．５ｐｇ／ｍｌで該試料中にて、全ＦＧＦ２１タンパク質又は活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を検出する、前述のＣ１１及びＣ１２に記載の免疫アッセイ法。
【０２２３】
Ｃ１４．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２６及び２７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３０及び３１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３４及び３５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３８及び３９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４２及び４３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４６及び４７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、前述のＡ～Ｃ１３のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【０２２４】
Ｃ１５．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号５４、５５、７４、及び７５からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５０、５１、７０、及び７１からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、前述のＡ～Ｃ１３のいずれか一項に記載の免疫アッセイ。
【０２２５】
Ｃ１６．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２２、２３、６６、及び６７からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号１８、１９、６２、及び６３からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、前述のＡ～Ｃ１３のいずれか一項に記載の免疫アッセイ。
【０２２６】
Ｃ１７．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２８及び２９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３２及び３３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３６及び３７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号４０及び４１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４４及び４５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４８及び４９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的

置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、前述のＡ及びＣ～Ｃ１３のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。

【０２２７】

Ｃ１８．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号５６、５７、７２、及び７３からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、

（ｂ）配列番号５２、５３、６８、及び６９からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、前述のＡ及びＣ～Ｃ１３のいずれか一項に記載の免疫アッセイ。

【０２２８】

Ｃ１９．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号２４、２５、６４、及び６５からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖と、

（ｂ）配列番号２０、２１、６０、及び６１からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、前述のＡ及びＣ～Ｃ１３のいずれか一項に記載の免疫アッセイ。

【０２２９】

Ｃ２０．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号２６の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、

（ｂ）配列番号３０の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｃ）配列番号３４の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、

（ｄ）配列番号３８の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、

（ｅ）配列番号４２の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｆ）配列番号４６の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、前述のＣ１４に記載の免疫アッセイ法。

【０２３０】

Ｃ２１．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号５４の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、

（ｂ）配列番号５０の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、前述のＣ２０に記載の免疫アッセイ。

【０２３１】

Ｃ２２．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号２２の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、

（ｂ）配列番号１８の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、前述のＣ２１に記載の免疫アッセイ。

【０２３２】

Ｃ２３．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号２９の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、

（ｂ）配列番号３３の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｃ）配列番号３７の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、

（ｄ）配列番号４１の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、

（ｅ）配列番号４５の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４９の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、前述のＣ１７に記載の免疫アッセイ法。
【０２３３】
Ｃ２４．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号５７の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５３の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、前述のＣ２３に記載の免疫アッセイ。
【０２３４】
Ｃ２５．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２５の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号２１の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、前述のＣ２４に記載の免疫アッセイ。
【０２３５】
Ｃ２６．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、以下：
（ａ）配列番号２６及び２７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３０及び３１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３４及び３５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３８及び３９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４２及び４３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４６及び４７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む抗体と競合的に結合する、前述のＡ～Ｃ１３のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【０２３６】
Ｃ２７．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、以下：
（ａ）配列番号２８及び２９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３２及び３３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３６及び３７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号４０及び４１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４４及び４５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４８及び４９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む抗体と競合的に結合する、前述のＡ及びＣ～Ｃ１３のいずれか一項に記載の免疫アッセイ法。
【０２３７】
Ｄ．ある特定の非限定的な実施形態では、本願で開示された主題は、試料中の全ＦＧＦ２１タンパク質を検出するキットであって、
（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体と、
（ｂ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する検出抗

体と、
（ｃ）検出試薬と、を備える、キットを提供する。
【０２３８】
Ｄ１．該捕捉抗体及び該検出抗体が、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する、前述のＤに記載のキット。
【０２３９】
Ｅ．ある特定の非限定的な実施形態では、本願で開示された主題は、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質を検出するキットであって、
（ａ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する捕捉抗体と、
（ｂ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する検出抗体と、
（ｃ）検出試薬と、を備える、キットを提供する。
【０２４０】
Ｆ．ある特定の非限定的な実施形態では、本願で開示された主題は、試料中の活性ＦＧＦ２１タンパク質と全ＦＧＦ２１タンパク質との比率を判定するキットであって、
（ａ）（ｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の捕捉抗体、及び（ｉｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第１の検出抗体と、
（ｂ）（ｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内に存在するエピトープに結合する第２の捕捉抗体、及び（ｉｉ）ＦＧＦ２１のアミノ酸残基１７３～１８２内に存在するエピトープに結合する第２の検出抗体と、
（ｃ）１つ以上の検出試薬と、を備える、キットを提供する。
【０２４１】
Ｆ１．該第１の捕捉抗体及び第２の捕捉抗体が、同一の抗体である、前述のＦに記載のキット。
【０２４２】
Ｆ２．該第１の捕捉抗体及び該第１の検出抗体が、ＦＧＦ２１のアミノ酸残基５～１７２内の異なるエピトープに結合する、前述のＦに記載のキット。
【０２４３】
Ｆ３．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、常磁性ビーズに固定化される、前述のＤ～Ｆ２のいずれか一項に記載のキット。
【０２４４】
Ｆ４．該検出抗体、第１の検出抗体、及び第２の検出抗体のうち１つ以上が、ビオチンにコンジュゲートされる、前述のＤ～Ｆ３のいずれか一項に記載のキット。
【０２４５】
Ｆ５．該検出試薬が、ストレプトアビジン－β－Ｄ－ガラクトピラノース複合体、ストレプトアビジン－ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体、及びこれらの組合せからなる群から選択される、前述のＤ～Ｆ４のいずれか一項に記載のキット。
【０２４６】
Ｆ６．レゾルフィンβ－Ｄ－ガラクトピラノシド、テトラメチルベンジジン、過酸化水素、又はその組合せをさらに備える、前述のＦ５に記載のキット。
【０２４７】
Ｆ７．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、Ｋｄ約10^{-10}Ｍ～10^{-13}ＭでＦＧＦ２１に結合する、前述のＤ～Ｆ６のいずれか一項に記載のキット。
【０２４８】
Ｆ８．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、Ｋｄ約10^{-10}Ｍ～10^{-13}ＭでＦＧＦ２１に結合する、前述のＤ及びＦ～Ｆ７のいずれか一項に記載のキット。
【０２４９】

Ｆ９．該検出抗体又は第１の検出抗体が、約０．１μｇ／ｍｌ～約１μｇ／ｍｌの濃度を持つ、前述のＤ及びＦ～Ｆ８のいずれか一項に記載のキット。

【０２５０】

Ｆ１０．該検出抗体又は第２の検出抗体が、約１μｇ／ｍｌ～約３μｇ／ｍｌの濃度を持つ、前述のＥ～Ｆ７のいずれか一項に記載のキット。

【０２５１】

Ｆ１１．該ストレプトアビジン－β－Ｄ－ガラクトピラノース複合体が、約１００ｐＭ～約４００ｐＭの濃度を持つ、前述のＦ５に記載のキット。

【０２５２】

Ｆ１２．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号２６及び２７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、

（ｂ）配列番号３０及び３１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｃ）配列番号３４及び３５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、

（ｄ）配列番号３８及び３９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、

（ｅ）配列番号４２及び４３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｆ）配列番号４６及び４７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、前述のＤ～Ｆ１１のいずれか一項に記載のキット。

【０２５３】

Ｆ１３．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号５４、５５、７４、及び７５からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、

（ｂ）配列番号５０、５１、７０、及び７１からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、前述のＤ～Ｆ１１のいずれか一項に記載のキット。

【０２５４】

Ｆ１４．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号２２、２３、６６、及び６７からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖と、

（ｂ）配列番号１８、１９、６２、及び６３からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、前述のＤ～Ｆ１１のいずれか一項に記載のキット。

【０２５５】

Ｆ１５．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号２８及び２９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、

（ｂ）配列番号３２及び３３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｃ）配列番号３６及び３７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、

（ｄ）配列番号４０及び４１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、

（ｅ）配列番号４４及び４５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｆ）配列番号４８及び４９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的

置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む抗体と競合的に結合する、前述のＤ及びＦ～Ｆ１１のいずれか一項に記載のキット。

【０２５６】

Ｆ１６．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号５６、５７、７２、及び７３からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、

（ｂ）配列番号５２、５３、６８、及び６９からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、前述のＤ及びＦ～Ｆ１１のいずれか一項に記載のキット。

【０２５７】

Ｆ１７．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号２４、２５、６４、及び６５からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、重鎖と、

（ｂ）配列番号２０、２１、６０、及び６１からなる群から選択されるアミノ酸配列、並びにその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、前述のＤ及びＦ～Ｆ１１のいずれか一項に記載のキット。

【０２５８】

Ｆ１８．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号２６の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、

（ｂ）配列番号３０の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｃ）配列番号３４の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、

（ｄ）配列番号３８の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、

（ｅ）配列番号４２の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｆ）配列番号４６の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、前述のＦ１２に記載のキット。

【０２５９】

Ｆ１９．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号５４の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、

（ｂ）配列番号５０の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、前述のＦ１８に記載のキット。

【０２６０】

Ｆ２０．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号２２の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、

（ｂ）配列番号１８の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、前述のＦ１９に記載のキット。

【０２６１】

Ｆ２１．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、

（ａ）配列番号２９の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、

（ｂ）配列番号３３の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、

（ｃ）配列番号３７の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、

（ｄ）配列番号４１の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、

（ｅ）配列番号４５の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４９の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、前述のＦ１５に記載のキット。
【０２６２】
Ｆ２２．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号５７の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５３の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、を含む、前述のＦ２１に記載のキット。
【０２６３】
Ｆ２３．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、
（ａ）配列番号２５の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号２１の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、前述のＦ２２に記載のキット。
【０２６４】
Ｆ２４．該捕捉抗体、第１の捕捉抗体、及び第２の捕捉抗体のうち１つ以上が、以下：
（ａ）配列番号２６及び２７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３０及び３１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３４及び３５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３８及び３９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４２及び４３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４６及び４７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む抗体と競合的に結合する、前述のＤ～Ｆ１１のいずれか一項に記載のキット。
【０２６５】
Ｆ２５．該検出抗体及び第１の検出抗体のうち１つ以上が、以下：
（ａ）配列番号２８及び２９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３２及び３３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３６及び３７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号４０及び４１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４４及び４５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４８及び４９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む抗体と競合的に結合する、前述のＤ及びＦ～Ｆ１１のいずれか一項に記載のキット。
【０２６６】
Ｆ２６．該試料が、血液試料である、前述のＤ～Ｆ２５のいずれか一項に記載のキット。
【０２６７】
Ｆ２７．該試料が、血漿試料である、前述のＤ～Ｆ２５のいずれか一項に記載のキット。

【０２６８】
Ｆ２８．該キットが、ウェル内感度約０．２ｐｇ／ｍｌ～約０．５ｐｇ／ｍｌで該試料中にて、全ＦＧＦ２１タンパク質又は活性ＦＧＦ２１タンパク質の量を検出する、前述のＤ～Ｆ２７のいずれか一項に記載のキット。
【０２６９】
Ｇ．ある特定の非限定的な実施形態では、本願で開示された主題は、単離された抗ＦＧＦ２１抗体又はその抗原結合部分であって、
（ａ）配列番号２６～２９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３０～３３からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３４～３７からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３８～４１からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４２～４５からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４６～４９からなる群から選択されるアミノ酸配列並びにその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、単離された抗ＦＧＦ２１抗体又はその抗原結合部分を提供する。
【０２７０】
Ｇ１．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２６の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３０の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３４の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３８の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４２の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４６の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、前述のＧに記載の単離された抗体。
【０２７１】
Ｇ２．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２７の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３１の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３５の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号３９の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４３の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４７の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、前述のＧに記載の単離された抗体。
【０２７２】
Ｇ３．該抗体又はその抗原結合部分が、

（ａ）配列番号２８の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３２の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３６の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号４０の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４４の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４８の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、前述のＧに記載の単離された抗体。

【０２７３】

Ｇ４．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２９の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ１と、
（ｂ）配列番号３３の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｃ）配列番号３７の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、
（ｄ）配列番号４１の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ１ドメインと、
（ｅ）配列番号４５の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ２ドメインと、
（ｆ）配列番号４９の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域ＣＤＲ３ドメインと、を含む、前述のＧに記載の単離された抗体。

【０２７４】

Ｇ５．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号５４の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５０の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、
を含む、前述のＧ１に記載の単離された抗体。

【０２７５】

Ｇ６．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号５５の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５１の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、
を含む、前述のＧ２に記載の単離された抗体。

【０２７６】

Ｇ７．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号５６の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５２の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、
を含む、前述のＧ３に記載の単離された抗体。

【０２７７】

Ｇ８．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号５７の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号５３の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、
を含む、前述のＧ４に記載の単離された抗体。

【０２７８】

Ｇ９．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号７５の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号７１の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、

を含む、前述のＧ１に記載の単離された抗体。
【０２７９】
Ｇ１０．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号７４の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号７０の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、
を含む、前述のＧ２に記載の単離された抗体。
【０２８０】
Ｇ１１．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号７３の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号６９の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、
を含む、前述のＧ３に記載の単離された抗体。
【０２８１】
Ｇ１２．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号７２の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖可変領域と、
（ｂ）配列番号６８の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖可変領域と、
を含む、前述のＧ４に記載の単離された抗体。
【０２８２】
Ｇ１３．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２２の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号１８の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、
前述のＧ５に記載の単離された抗体。
【０２８３】
Ｇ１４．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２３の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号１９の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、
前述のＧ６に記載の単離された抗体。
【０２８４】
Ｇ１５．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２４の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号２０の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、
前述のＧ７に記載の単離された抗体。
【０２８５】
Ｇ１６．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号２５の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号２１の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、
前述のＧ８に記載の単離された抗体。
【０２８６】
Ｇ１７．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号６７の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号６３の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、
前述のＧ９に記載の単離された抗体。
【０２８７】
Ｇ１８．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号６６の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号６２の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、
前述のＧ１０に記載の単離された抗体。
【０２８８】
Ｇ１９．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号６５の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号６１の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、

前述のＧ１１に記載の単離された抗体。
【０２８９】
Ｇ２０．該抗体又はその抗原結合部分が、
（ａ）配列番号６４の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、重鎖と、
（ｂ）配列番号６０の該アミノ酸配列及びその保存的置換を備える、軽鎖と、を含む、前述のＧ１２に記載の単離された抗体。
【０２９０】
Ｈ．ある特定の非限定的な実施形態では、本願で開示された主題は、Ｇ～Ｇ２０のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合部分をコードする、単離された核酸又はその抗原結合部分を提供する。
【０２９１】
Ｉ．ある特定の非限定的な実施形態では、本願で開示された主題は、Ｈに記載の核酸を含む宿主細胞を提供する。
【０２９２】
Ｊ．ある特定の非限定的な実施形態では、本願で開示された主題は、該抗体が産生されるように、Ｉに記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体を産生する方法を提供する。
【０２９３】
Ｊ１．該抗体を該宿主細胞から回収することをさらに含む、前述のＪに記載の方法。
【０２９４】
Ｋ．ある特定の非限定的な実施形態では、本願で開示された主題は、Ｇ～Ｇ２０のいずれか一項に記載の１つ以上の抗体又はその抗原結合部分を含む、組成物を提供する。
【実施例】
【０２９５】
以下の実施例は、本願で開示されている主題の単なる例示であり、いかなる意味においても制限とみなすべきではない。
【０２９６】
実施例１：抗ＦＧＦ２１抗体生成
モノクローナル抗体は、ＳＪＬ及びＢａｌｂ／ｃマウスを組換えヒトＦＧＦ２１で免疫化することによって生成した。ＥＬＩＳＡにより８０のハイブリドーマ上清をスクリーニングした（図１）。２０のハイブリドーマを、インタクトなヒトＦＧＦ２１（ＰＵＲ９８２７１）、インタクトなカニクイザルＦＧＦ２１（ＰＵＲ９８２７０）、及びヒトＦＡＰによるインタクトなヒトＦＧＦ２１の消化により生成された切断ヒトＦＧＦ２１（ＰＵＲ１０２２４７）への結合に基づいて選択した。
【０２９７】
実施例２：抗ＦＧＦ２１抗体特徴付け
実施例１で同定された選択された２０のハイブリドーマから得られたＩｇＧを、ＥＬＩＳＡによってさらに特徴付けた。ＥＬＩＳＡを以下の通りに行った：９６ウェルＭａｘｉＳｏｒｐプレート（４３９４５４、Ｎａｌｇｅ Ｎｕｎｃ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ；ニューヨーク州ロチェスタ）を、１μｇ／ｍＬの抗ＦＧＦ２１ ｍＡｂｓ又は抗ＦＧＦ２１ヒツジｐＡｂｓ（カタログ番号ＲＤ１８４１０８１００、Ｂｉｏｖｅｎｄｏｒ、ノースカロライナ州アシュビル）によりコーティング緩衝液（５０ｍＭ炭酸ナトリウム、ｐＨ９．６）中において４℃で一晩コーティングした。翌日、０．５％のＢＳＡ及びｐＨ７．４で１０ｐｐｍのＰｒｏＣｌｉｎを含有するＰＢＳで遮断した後、洗浄緩衝液（ＰＢＳ、０．０５％Ｔｗｅｅｎ ２０、ｐＨ７．２）で洗浄し、プレートを、アッセイ緩衝液（２５ｍＭ ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．２、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、０．２ｍＭ $CaCl_2$、０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、０．０５％Ｔｗｅｅｎ ２０）中の０．０００００１８６～２０００ｐｇ／ｍＬのインタクトなヒトＦＧＦ２１（完全長非切断ＦＧＦ２１；カタログ番号２５３９－ＦＧ、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）又はＦＡＰ切断ヒトＦＧＦ２１と共に、室温にて１～２時間インキュベートした。洗浄緩衝液で洗浄した後、プレートを０．５μｇ／ｍｌの二次抗体（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、ビオチン化ヤギ抗ＦＧＦ２１

ｐＡｂ　ＢＡＦ２５３９）と共に室温にて１～２時間インキュベートした。洗浄緩衝液で洗浄した後、プレートを、アッセイ緩衝液中で１：１，０００に希釈した高感度ストレプトアビジン－ＨＲＰ（ＰＩＥＲＣＥカタログ番号２１１３０）と共にインキュベートした。洗浄緩衝液で洗浄した後、抗ＦＧＦ２１の組換えＦＧＦ２１との結合を、基質３，３’，５，５’テトラメチルベンジジン（ＴＭＢＥ１０００、Ｍｏｓｓ；メリーランド州パサデナ）を添加することによって評価した。二重ウェルからの平均吸光度値を抗体濃度の関数としてプロットし、データを３つのパラメータ方程式に当てはめて、Ｐｒｉｓｍ　６（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．、カリフォルニア州ラホヤ）を用いて、各抗体について５０％効果濃度（EC_{50}）値を算出した（表２）。

【０２９８】

表２．各ＦＧＦ２１抗体に対するEC_{50}値。

初回抗体	二次抗体	インタクトＦＧＦ２１ EC_{50}（ｐｇ／ｍＬ）	切断ＦＧＦ２１ EC_{50}（ｐｇ／ｍＬ）	EC_{50}比（切断／インタクト）
ｍＡｂ１	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	１２６	２２８	１．８
ｍＡｂ２	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	２１０８	３１８７	１．５
ｍＡｂ３	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	２９２	４５０	１．５
ｍＡｂ４	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	９０	１７０	１．９
ｍＡｂ５	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	５５０６	１９３３１	３．５
ｍＡｂ６	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	１９９３	４８１３	２．４
ｍＡｂ７	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	８７９７	２５４０３	２．９
ｍＡｂ８	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	５０３	７７７	１．５
ｍＡｂ９	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	８５５	１３８５	１．６
ｍＡｂ１０	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	１３６	２４９	１．８
ｍＡｂ１１	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	１４９	３１８	２．１
ｍＡｂ１２	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	５６３３	３０３８６	５．４
ｍＡｂ１３	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	１６９	３００	１．８
ヒツジｐＡｂ	ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ	４８	８４	１．７

【０２９９】

インタクトＦＧＦ２１対切断ＦＧＦ２１及び絶対EC_{50}値の差次的検出に基づいて、抗体ｍＡｂ５、ｍＡｂ６、ｍＡｂ７、及びｍＡｂ１２を更なる分析から除外した。抗体ｍＡｂ１、ｍＡｂ２、ｍＡｂ３、ｍＡｂ４、ｍＡｂ８、ｍＡｂ９、ｍＡｂ１０、ｍＡｂ１１、ｍＡｂ１３、ｍＡｂ１５、及びｍＡｂ１６を、ＥＺ－Ｌｉｎｋ（商標）ＮＨＳ－ＰＥＧ固相ビオチン化キット（ＰＩＥＲＣＥカタログ番号２１４５０）を用いてビオチン化し、サンドイッチＥＬＩＳＡを、インタクトＦＧＦ２１を用いてペアワイズコンビナトリアル（ｐａｉｒｗｉｓｅ　ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ）様式で実施した（表３及び表４）。ビオチン化ヤギ抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ　ＢＡＦ２５３９（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を、陽性対照として使用した。

【０３００】

表３．サンドイッチＥＬＩＳＡにおける抗ＦＧＦ２１　ｍＡｂｓの適合性。

	ビオチン化１	ビオチン化１０	ビオチン化１１	ビオチン化４	ビオチン化９	ビオチン化１３	ビオチン化２	ビオチン化３	ビオチン化８	ＢＡＦ２５３９
ｍＡｂ１				ＸＸ	ＸＸ					ＸＸ
ｍＡｂ１０				ＸＸ	ＸＸ	Ｘ				ＸＸ
ｍＡｂ１１				ＸＸ	ＸＸ	Ｘ				ＸＸ
ｍＡｂ４	ＸＸ	ＸＸ	ＸＸ							ＸＸ
ｍＡｂ９	ＸＸ	ＸＸ	ＸＸ							ＸＸ
ｍＡｂ１３	Ｘ	Ｘ	Ｘ							ＸＸ
ｍＡｂ８	ＸＸ	ＸＸ	ＸＸ	ＸＸ		Ｘ		Ｘ		ＸＸ
ｍＡｂ２										ＸＸ
ｍＡｂ３										ＸＸ
ヒツジｐＡｂ										ＸＸ

ＸＸ：ＯＤ＞１の強いシグナル、Ｘ：ＯＤ＜１の強いシグナル

【０３０１】

ＸＸ：ＯＤ＞１の強いシグナル、Ｘ：ＯＤ＜１の強いシグナル

【０３０２】

表４．サンドイッチＥＬＩＳＡにおける抗ＦＧＦ２１　ｍＡｂｓの適合性。

	ビオチン化１	ビオチン化１０	ビオチン化１１	ビオチン化４
ｍＡｂ４		ＸＸ	ＸＸ	Ｘ
ｍＡｂ８	－	－	－	
ｍＡｂ９		ＸＸ	ＸＸ	Ｘ
ｍＡｂ１１	ＸＸ		ＸＸ	
ｍＡｂ１５	ＸＸ	Ｘ		
ｍＡｂ１６	－			

ＸＸ：ＯＤ＞１．５の強いシグナル、Ｘ：０．５＜ＯＤ＜１．５の強いシグナル、－：６５３ｐｇ／ｍＬのＦＧＦ２１を使用した際ＯＤ＜０．５であった。インタクトＦＧＦ２１とＦＡＰ切断ＦＧＦ２１との平均値を用いて表を作成した。

【０３０３】

ＸＸ：ＯＤ＞１．５の強いシグナル、Ｘ：０．５＜ＯＤ＜１．５の強いシグナル、－：６５３ｐｇ／ｍＬのＦＧＦ２１を使用した際ＯＤ＜０．５であった。インタクトＦＧＦ２１とＦＡＰ切断ＦＧＦ２１との平均値を用いて表を作成した。

【０３０４】

表３に示される結果に基づいて、抗体ｍＡｂ２、３、及び１３を更なる分析から除外した。表３からの結果により、抗体ｍＡｂ１、４、８、９、１０、及び１１を、３つのエピトープビンに配置した（表５）。

【０３０５】

表５．エピトープビニング。

エピトープビン	ｍＡｂ
１	１，１０，１１
２	４，９
３	８

【０３０６】

次いで、抗体ｍＡｂ１、４、８、９、１０、及び１１を、コンビナトリアル様式でイン

タクトなヒトＦＧＦ２１（カタログ番号２５３９－ＦＧ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて、ＥＬＩＳＡで試験した。吸光度値を抗体濃度の関数としてプロットし、データを３つのパラメータ方程式に当てはめて、Ｐｒｉｓｍ　６（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．、カリフォルニア州ラホヤ）を用いて、各抗体について５０％効果濃度（$ＥＣ_{５０}$）値を算出した（表６）。表６に示すように、抗体ｍＡｂ４又は９を捕捉抗体として使用し、抗体ｍＡｂ１０又は１１をインタクトなヒトＦＧＦ２１に対する検出抗体として使用した場合、より良好な効力が観察された。

【０３０７】

表６．サンドイッチＥＬＩＳＡにおける様々な抗ＦＧＦ２１　ｍＡｂの組合せによる$ＥＣ_{５０}$値。

捕捉ｍＡｂ	検出ｍＡｂ	$ＥＣ_{５０}$［ｐｇ／ｍＬ］
４	１０	１０８
４	１１	１３３
９	１１	１５６
９	１０	１６１
１１	４	１６１
１０	４	１７２
８	１０＋４	１８２
１０	９	１９１
４	１	１９３
１１	９	１９５
８	１１＋４	１９８
８	１＋４	２０２
１	４	２２２
８	４	２２８
８	１０	２３７
９	１	２４９
８	１１	３０３
８	１	３０８
１	９	３２３

【０３０８】

次いで、抗体ｍＡｂ４、８、９、１０、１１、１５、及び１６を、コンビナトリアル様式でインタクトなヒトＦＧＦ２１（カタログ番号２５３９－ＦＧ、Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）又はＦＡＰ切断ヒトＦＧＦ２１を用いて、ＥＬＩＳＡで試験した。吸光度値を抗体濃度の関数としてプロットし、データを、Ｐｒｉｓｍ　６（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．、カリフォルニア州ラホヤ）を用いて各抗体について３つのパラメータ方程式に当てはめた。最も一致した結果は、抗体ｍＡｂ４又は９を捕捉抗体として使用し、抗体ｍＡｂ１１又はｍＡｂ１５を検出抗体として使用した場合に観察された（図２及び表７）。したがって、ｍＡｂ８及び１６を更なる分析から除外した。図２は、抗体がインタクトＦＧＦ２１及びＦＡＰ切断ＦＧＦ２１（ｃＦＧＦ２１）に等しく結合することを示し、これは、全ＦＧＦ２１の濃度（すなわち、インタクト及びＦＡＰ切断の両方）を検出するのに重要である。

【０３０９】

表７．サンドイッチＥＬＩＳＡにおける様々な抗ＦＧＦ２１　ｍＡｂの組合せによるＥＣ$_{50}$値。

捕捉ｍＡｂ	検出ｍＡｂ	インタクトＦＧＦ２１によるＥＣ$_{50}$（ｐｇ／ｍＬ）	ＦＡＰ切断ＦＧＦ２１によるＥＣ$_{50}$（ｐｇ／ｍＬ）
９	１１	１６５．８	１５６．３
４	１１	１９４．７	１４８
１１	４	２０４．５	２０３．８
４	１５	２３２．１	２６２．６
９	１５	４３１．４	３６２．６
１５	４	５３６．８	５６１．７
１１	１５	７７４．４	６３０．１
４	１６	１２４６	７０４４
１５	１１	１３８８	１２３９
９	１６	１４５１	６２３４
１６	４	４８９３	１５７５０
８	１１	４０２７２	１０６１９５
８	１５	４２５４９	７８８５７
８	４	４４４１１	１２１３０００００

【０３１０】

抗体ｍＡｂ４、９、１１、及び１５を、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）表面プラズモン共鳴によってさらに分析し、K_dを決定した。図３に示すように、ｍＡｂ４は３．６８９×１０$^{-10}$のK_dを有し、ｍＡｂ９は８．８９５×１０$^{-10}$のK_dを有し、ｍＡｂ１１は２．７０４×１０$^{-10}$のK_dを有し、ｍＡｂ１５は３．９５５×１０$^{-12}$のK_dを有する。

【０３１１】

実施例３：エピトープ分析

一過性にトランスフェクトしたＨＥＫ２９３培養上清中で、ＦＧＦ１９、ＦＧＦ２１、又はＦＧＦ１９－ＦＧＦ２１キメラタンパク質をＦＬＡＧタグ化タンパク質として発現させ、抗体ｍＡｂ４、９、１１、及び１５の結合をＥＬＩＳＡにより試験することで、エピトープマッピングを行った。ＥＬＩＳＡのために、９６ウェルＭａｘｉＳｏｒｐプレート（４３９４５４、Ｎａｌｇｅ　Ｎｕｎｃ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ；ニューヨーク州ロチェスタ）を、分泌タンパク質を含有する１５μＬの培養上清と、１３５μＬの１倍コーティング緩衝液（５０ｍＭ炭酸ナトリウム、ｐＨ９．６）との混合物によって４℃で一晩コーティングした。ＦＧＦ２１のＣ末端に結合する、市販の抗体Ｒ５及びＲ９を、陽性対照として使用した。

【０３１２】

ヒトＦＧＦ１９：

ＲＰＬＡＦＳＤＡＧＰＨＶＨＹＧＷＧＤＰＩＲＬＲＨＬＹＴＳＧＰＨＧＬＳＳＣＦＬＲＩＲＡＤＧＶＶＤＣＡＲＧＱＳＡＨＳＬＬＥＩＫＡＶＡＬＲＴＶＡＩＫＧＶＨＳＶＲＹＬＣＭＧＡＤＧＫＭＱＧＬＬＱＹＳＥＥＤＣＡＦＥＥＥＩＲＰＤＧＹＮＶＹＲＳＥＫＨＲＬＰＶＳＬＳＳＡＫＱＲＱＬＹＫＮＲＧＦＬＰＬＳＨＦＬＰＭＬＰＭＶＰＥＥＰＥＤＬＲＧＨＬＥＳＤＭＦＳＳＰＬＥＴＤＳＭＤＰＦＧＬＶＴＧＬＥＡＶＲＳＰＳＦＥＫ（配列番号２）

【０３１３】

ヒトＦＧＦ２１：

ＨＰＩＰＤＳＳＰＬＬＱＦＧＧＱＶＲＱＲＹＬＹＴＤＤＡＱＱＴＥＡＨＬＥＩＲＥＤＧＴＶＧＧＡＡＤＱＳＰＥＳＬＬＱＬＫＡＬＫＰＧＶＩＱＩＬＧＶＫＴＳＲＦＬＣＱＲＰＤ

GALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP
GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPD
VGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS（配列番号１）

【０３１４】

ヒトＦＧＦ２１－１９キメラタンパク質（ＦＧＦ２１部分はイタリック体、ＦＧＦ１９部分は下線）：

HPIPDSSPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIR
ADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCM
GADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPV
SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHL
ESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK（配列番号３）

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRADG
VVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGAD
GKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLS
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESD
MFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK（配列番号４）

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG
VVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGAD
GKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLS
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESD
MFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK（配列番号５）

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG
TVGGAADQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGAD
GKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLS
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESD
MFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK（配列番号６）

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG
TVGGAADQSPESLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGAD
GKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLS
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESD
MFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK（配列番号７）

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG
TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVHSVRYLCMGAD
GKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLS
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESD
MFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK（配列番号８）

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG
TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCMGAD
GKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLS
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESD
MFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK（配列番号９）

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG
TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD
GALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP
GNKSPHRDPAPRGPARFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMF
SSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK（配列番号１０）

RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRE
DGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQR
PDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLH
LPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQP

ＰＤＶＧＳＳＤＰＬＳＭＶＧＰＳＱＧＲＳＰＳＹＡＳ（配列番号１１）
ＲＰＬＡＦＳＤＡＧＰＨＶＨＹＧＷＧＤＰＩＲＬＲＨＬＹＴＳＧＰＨＧＬＳＳＣＦＬＲ
ＩＲＥＤＧＴＶＧＧＡＡＤＱＳＰＥＳＬＬＱＬＫＡＬＫＰＧＶＩＱＩＬＧＶＫＴＳＲＦＬ
ＣＱＲＰＤＧＡＬＹＧＳＬＨＦＤＰＥＡＣＳＦＲＥＬＬＬＥＤＧＹＮＶＹＱＳＥＡＨＧＬ
ＰＬＨＬＰＧＮＫＳＰＨＲＤＰＡＰＲＧＰＡＲＦＬＰＬＰＧＬＰＰＡＬＰＥＰＰＧＩＬＡ
ＰＱＰＰＤＶＧＳＳＤＰＬＳＭＶＧＰＳＱＧＲＳＰＳＹＡＳ（配列番号１２）
ＲＰＬＡＦＳＤＡＧＰＨＶＨＹＧＷＧＤＰＩＲＬＲＨＬＹＴＳＧＰＨＧＬＳＳＣＦＬＲ
ＩＲＡＤＧＴＶＧＧＡＡＤＱＳＰＥＳＬＬＱＬＫＡＬＫＰＧＶＩＱＩＬＧＶＫＴＳＲＦＬ
ＣＱＲＰＤＧＡＬＹＧＳＬＨＦＤＰＥＡＣＳＦＲＥＬＬＬＥＤＧＹＮＶＹＱＳＥＡＨＧＬ
ＰＬＨＬＰＧＮＫＳＰＨＲＤＰＡＰＲＧＰＡＲＦＬＰＬＰＧＬＰＰＡＬＰＥＰＰＧＩＬＡ
ＰＱＰＰＤＶＧＳＳＤＰＬＳＭＶＧＰＳＱＧＲＳＰＳＹＡＳ（配列番号１３）
ＲＰＬＡＦＳＤＡＧＰＨＶＨＹＧＷＧＤＰＩＲＬＲＨＬＹＴＳＧＰＨＧＬＳＳＣＦＬＲ
ＩＲＡＤＧＶＶＤＣＡＲＧＱＳＰＥＳＬＬＱＬＫＡＬＫＰＧＶＩＱＩＬＧＶＫＴＳＲＦＬ
ＣＱＲＰＤＧＡＬＹＧＳＬＨＦＤＰＥＡＣＳＦＲＥＬＬＬＥＤＧＹＮＶＹＱＳＥＡＨＧＬ
ＰＬＨＬＰＧＮＫＳＰＨＲＤＰＡＰＲＧＰＡＲＦＬＰＬＰＧＬＰＰＡＬＰＥＰＰＧＩＬＡ
ＰＱＰＰＤＶＧＳＳＤＰＬＳＭＶＧＰＳＱＧＲＳＰＳＹＡＳ（配列番号１４）
ＲＰＬＡＦＳＤＡＧＰＨＶＨＹＧＷＧＤＰＩＲＬＲＨＬＹＴＳＧＰＨＧＬＳＳＣＦＬＲ
ＩＲＡＤＧＶＶＤＣＡＲＧＱＳＡＨＳＬＬＱＬＫＡＬＫＰＧＶＩＱＩＬＧＶＫＴＳＲＦＬ
ＣＱＲＰＤＧＡＬＹＧＳＬＨＦＤＰＥＡＣＳＦＲＥＬＬＬＥＤＧＹＮＶＹＱＳＥＡＨＧＬ
ＰＬＨＬＰＧＮＫＳＰＨＲＤＰＡＰＲＧＰＡＲＦＬＰＬＰＧＬＰＰＡＬＰＥＰＰＧＩＬＡ
ＰＱＰＰＤＶＧＳＳＤＰＬＳＭＶＧＰＳＱＧＲＳＰＳＹＡＳ（配列番号１５）
ＲＰＬＡＦＳＤＡＧＰＨＶＨＹＧＷＧＤＰＩＲＬＲＨＬＹＴＳＧＰＨＧＬＳＳＣＦＬＲ
ＩＲＡＤＧＶＶＤＣＡＲＧＱＳＡＨＳＬＬＥＩＫＡＶＡＬＲＴＶＡＩＫＧＶＨＳＶＲＹＬ
ＣＱＲＰＤＧＡＬＹＧＳＬＨＦＤＰＥＡＣＳＦＲＥＬＬＬＥＤＧＹＮＶＹＱＳＥＡＨＧＬ
ＰＬＨＬＰＧＮＫＳＰＨＲＤＰＡＰＲＧＰＡＲＦＬＰＬＰＧＬＰＰＡＬＰＥＰＰＧＩＬＡ
ＰＱＰＰＤＶＧＳＳＤＰＬＳＭＶＧＰＳＱＧＲＳＰＳＹＡＳ（配列番号１６）
ＲＰＬＡＦＳＤＡＧＰＨＶＨＹＧＷＧＤＰＩＲＬＲＨＬＹＴＳＧＰＨＧＬＳＳＣＦＬＲ
ＩＲＡＤＧＶＶＤＣＡＲＧＱＳＡＨＳＬＬＥＩＫＡＶＡＬＲＴＶＡＩＫＧＶＨＳＶＲＹＬ
ＣＭＧＡＤＧＫＭＱＧＬＬＱＹＳＥＥＤＣＡＦＥＥＥＩＲＰＤＧＹＮＶＹＲＳＥＫＨＲＬ
ＰＶＳＬＳＳＡＫＱＲＱＬＹＫＮＲＧＦＬＰＬＳＨＦＬＰＬＰＧＬＰＰＡＬＰＥＰＰＧＩ
ＬＡＰＱＰＰＤＶＧＳＳＤＰＬＳＭＶＧＰＳＱＧＲＳＰＳＹＡＳ（配列番号１７）

【０３１５】

図４に示すように、抗体ｍＡｂ４、９、１１、及び１５は、ヒトＦＧＦ２１のコアＦＧＦフォールドに結合し、Ｎ末端又はＣ末端の可撓性領域には結合しない。

【０３１６】

実施例４：ＦＧＦ２１　ＥＬＩＳＡアッセイ

インタクトＦＧＦ２１の検出における捕捉抗体としての抗体ｍＡｂ４及び１１の有用性を、ＥＺ－Ｌｉｎｋ（商標）ＮＨＳ－ＰＥＧ固相ビオチン化キット（ＰＩＥＲＣＥ第２１４５０番）を用いてビオチン化した、Ｃ末端特異性抗ＦＧＦ２１　ｐＡｂ（カタログ番号３０６６１、Ｅｐｉｔｏｐｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、カリフォルニア州サンディエゴ；本明細書では、「Ｃ末端ｐＡｂ」とも称する）と組み合わせて試験した。全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１レベルを測定するための免疫アッセイの概略図を図５に示す。

【０３１７】

ＥＬＩＳＡアッセイを以下の通りに行った：９６ウェルＭａｘｉＳｏｒｐプレート（カタログ番号４３９４５４、Ｎａｌｇｅ　Ｎｕｎｃ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ；ニューヨーク州ロチェスタ）を、０．５μｇ／ｍＬの抗ＦＧＦ２１　ｍＡｂｓによりコーティング緩衝液（５０ｍＭ炭酸ナトリウム、ｐＨ９．６）中において４℃で一晩コーティングした。翌日、０．５％のＢＳＡ及びｐＨ７．４で１０ｐｐｍのＰｒｏｃｌｉｎを含有するＰＢＳで遮断した後、洗浄緩衝液（ＰＢＳ、０．０５％Ｔｗｅｅｎ　２０、ｐＨ７．２）で洗浄し、プレートを、アッセイ緩衝液（２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．２、１５０ｍＭ

ＮａＣｌ、０．２ｍＭ ＣａＣｌ$_2$、０．１％ウシ血清アルブミン［ＢＳＡ］、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０）中の０．０００４～３２０００ｐｇ／ｍＬのインタクトなヒトＦＧＦ２１（２５３９－ＦＧ、Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ）と共に、室温にて１～２時間インキュベートした。洗浄緩衝液で洗浄した後、プレートを、Ｍａｇｉｃ緩衝液（１倍ＰＢＳ ｐＨ７．４、０．５％ＢＳＡ、０．０５％Ｔｗｅｅｎ ２０、０．２％ＢｇＧ、０．２５％ＣＨＡＰＳ、５ｍＭ ＥＤＴＡ、０．３５Ｍ ＮａＣｌ、１０ＰＰＭ Ｐｒｏｃｌｉｎ）中の０．５μｇ／ｍｌの二次抗体（ビオチン化抗ＦＧＦ２１ Ｃ末端ｐＡｂ ３０６１又は抗ＦＧＦ２１ ｍＡｂ１１若しくは１５）と共に室温で１～２時間インキュベートした。洗浄緩衝液で洗浄した後、プレートを、アッセイ緩衝液中で１：１，０００に希釈した高感度ストレプトアビジン－ＨＲＰ（ＰＩＥＲＣＥ第２１１３０番）と共にインキュベートした。洗浄緩衝液で洗浄した後、抗ＦＧＦ２１の組換えＦＧＦ２１との結合を、基質３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢＥ－１０００、Ｍｏｓｓ；メリーランド州パサデナ）を添加することによって評価した。より詳細なプロトコルを図６に提示する。二重ウェルからの平均吸光度値を抗体濃度の関数としてプロットし、データを、Ｐｒｉｓｍ ６（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．、カリフォルニア州ラホヤ）を用いて３つのパラメータ方程式に当てはめた（図７）。

【０３１８】

図８に示すように、全ＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイは５ｐｇ／ｍｌのウェル内感度を有し、活性ＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイは２８ｐｇ／ｍｌのウェル内感度を有した。活性ＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイは、最後の１０個のＣ末端アミノ酸を欠くＦＧＦ２１の切断型を検出しなかった。

【０３１９】

全ＦＧＦ２１ ＥＬＩＳＡアッセイに対する血清の影響を判定するために、更なる実験を行った。捕捉抗体としてｍＡｂ４を使用し、検出抗体でｍＡｂ１５を使用したＦＧＦ２１のＥＬＩＳＡアッセイを行った。図９に示すように、アッセイに対する血清干渉は最小であった。ヒトＦＧＦ２１に対するアッセイの特異性もまた試験した。図９に示すように、全ＦＧＦ２１に対するアッセイは、対照マウスと比較して、ヒトＦＧＦ２１ノックインマウスで発現したヒトＦＧＦ２１を検出した。図１０はまた、開示された抗体を用いるアッセイがヒトＦＧＦ２１に特異的であり、マウスＦＧＦ２１を検出しなかったことを示す。

【０３２０】

これらのデータに基づき、組換え発現のｃＤＮＡクローニングのために、４つの抗体、ｍＡｂ４、ｍＡｂ９、ｍＡｂ１１、及びｍＡｂ１５を選択した。これらの抗体のアミノ酸配列は、表８～表１３、並びに図４１Ａ及び図４１Ｂに提示される。組換えｍＡｂを、マウスＩｇＧ２ａバックグラウンドにおける１００ｍＬのＣＨＯ培養物中で発現させた。

【０３２１】

表８．マウス抗ＦＧＦ２１モノクローナル抗体に対する完全長軽鎖（ＬＣ）配列。

抗体	完全長軽鎖アミノ酸配列
４	ＱＩＶＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＰＬＧＥＲＶＴＭＴＣＴＡＳＳＳＶＳＳＳＹＬＨＷＹＱＱＫＰＧＳＳＰＫＶＷＩＹＲＴＴＮＬＡＳＧＶＰＴＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＨＱＹＨＲＳＰＰＴＷＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫＲＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰＳＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣＦＬＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱＮＧＶＬＮＳＷＴＤＱＤＳＫＤＳＴＹＳＭＳＳＴＬＴＬＴＫＤＥＹＥＲＨＮＳＹＴＣＥＡＴＨＫＴＳＴＳＰＩＶＫＳＦＮＲＮＥＣ（配列番号１８）
９	ＤＩＱＭＴＱＳＰＡＳＬＳＡＳＶＧＥＴＶＩＩＴＣＲＡＳＥＮＩＹＳＹＬＡＷＹＱＱＫＱＧＫＳＰＱＬＬＶＹＮＩＲＴＬＡＥＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＱＦＳＬＫＩＮＳＬＱＰＥＤＦＧＳＹＹＣＱＨＨＹＤＳＰＷＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫＲＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰＳＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣＦＬＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱＮＧＶＬＮＳＷＴＤＱＤＳＫＤＳＴＹＳＭＳＳＴＬＴＬＴＫＤＥＹＥＲＨＮＳＹＴＣＥＡＴＨＫＴＳＴＳＰＩＶＫＳＦＮＲＮＥＣ（配列番号１９）
１１	ＱＩＶＬＴＱＳＰＡＬＭＳＡＳＰＧＥＲＶＴＭＴＣＳＡＧＳＳＶＳＹＭＹＷＹＱＱＫＰＲＳＳＰＫＰＷＩＹＬＴＳＮＬＡＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＲＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫＲＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰＳＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣＦＬＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱＮＧＶＬＮＳＷＴＤＱＤＳＫＤＳＴＹＳＭＳＳＴＬＴＬＴＫＤＥＹＥＲＨＮＳＹＴＣＥＡＴＨＫＴＳＴＳＰＩＶＫＳＦＮＲＮＥＣ（配列番号２０）
１５	ＤＶＬＭＴＱＴＰＬＳＬＰＶＳＬＧＤＱＡＳＩＳＣＲＳＳＱＩＩＶＨＮＮＧＤＴＹＬＥＷＹＬＱＫＰＧＱＳＰＫＬＬＩＹＫＩＳＮＲＦＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＫＩＳＲＶＥＡＥＤＬＧＶＹＹＣＦＱＧＳＨＶＰＹＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫＲＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰＳＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣＦＬＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱＮＧＶＬＮＳＷＴＤＱＤＳＫＤＳＴＹＳＭＳＳＴＬＴＬＴＫＤＥＹＥＲＨＮＳＹＴＣＥＡＴＨＫＴＳＴＳＰＩＶＫＳＦＮＲＮＥＣ（配列番号２１）

【０３２２】

表９．マウス抗ＦＧＦ２１モノクローナル抗体に対する完全長重鎖（ＨＣ）配列。

抗体	完全長重鎖アミノ酸配列
４	ＥＶＫＬＶＥＳＧＧＤＬＶＫＰＧＧＳＬＫＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＳＹＧＭＳＷＶ ＲＱＴＰＤＫＲＬＥＷＶＡＴＩＳＴＧＧＧＹＴＹＹＰＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮ ＡＫＮＴＬＹＬＱＭＳＳＬＲＳＥＤＴＡＭＹＹＣＡＲＨＤＬＶＤＷＹＦＤＶＷＧＴ ＧＴＴＶＴＶＳＳＡＫＴＴＡＰＳＶＹＰＬＡＰＶＣＧＤＴＴＧＳＳＶＴＬＧＣＬＶ ＫＧＹＦＰＥＰＶＴＬＴＷＮＳＧＳＬＳＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＤＬＹＴＬＳＳ ＳＶＴＶＴＳＳＴＷＰＳＱＳＩＴＣＮＶＡＨＰＡＳＳＴＫＶＤＫＫＩＥＰＲＧＰＴ ＩＫＰＣＰＰＣＫＣＰＡＰＮＬＬＧＧＰＳＶＦＩＦＰＰＫＩＫＤＶＬＭＩＳＬＳＰ ＩＶＴＣＶＶＶＤＶＳＥＤＤＰＤＶＱＩＳＷＦＶＮＮＶＥＶＨＴＡＱＴＱＴＨＲＥ ＤＹＮＳＴＬＲＶＶＳＡＬＰＩＱＨＱＤＷＭＳＧＫＥＦＫＣＫＶＮＮＫＤＬＰＡＰ ＩＥＲＴＩＳＫＰＫＧＳＶＲＡＰＱＶＹＶＬＰＰＰＥＥＥＭＴＫＫＱＶＴＬＴＣＭ ＶＴＤＦＭＰＥＤＩＹＶＥＷＴＮＮＧＫＴＥＬＮＹＫＮＴＥＰＶＬＤＳＤＧＳＹＦ ＭＹＳＫＬＲＶＥＫＫＮＷＶＥＲＮＳＹＳＣＳＶＶＨＥＧＬＨＮＨＨＴＴＫＳＦＳ ＲＴＰＧＫ（配列番号２２）
９	ＥＶＱＬＱＱＳＧＰＥＬＶＫＰＧＡＳＶＫＩＰＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＹＹＭＧＷＶ ＫＱＳＨＧＫＳＬＥＷＩＧＤＩＮＰＮＮＧＶＴＩＮＮＱＮＦＫＧＫＡＴＬＴＶＤＫ ＳＳＳＴＡＹＭＥＬＲＳＬＡＳＥＤＴＡＶＹＹＣＴＲＧＹＧＧＡＬＤＹＷＧＱＧＴ ＳＶＴＶＳＳＡＫＴＴＡＰＳＶＹＰＬＡＰＶＣＧＤＴＴＧＳＳＶＴＬＧＣＬＶＫＧ ＹＦＰＥＰＶＴＬＴＷＮＳＧＳＬＳＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＤＬＹＴＬＳＳＳＶ ＴＶＴＳＳＴＷＰＳＱＳＩＴＣＮＶＡＨＰＡＳＳＴＫＶＤＫＫＩＥＰＲＧＰＴＩＫ ＰＣＰＰＣＫＣＰＡＰＮＬＬＧＧＰＳＶＦＩＦＰＰＫＩＫＤＶＬＭＩＳＬＳＰＩＶ ＴＣＶＶＶＤＶＳＥＤＤＰＤＶＱＩＳＷＦＶＮＮＶＥＶＨＴＡＱＴＱＴＨＲＥＤＹ ＮＳＴＬＲＶＶＳＡＬＰＩＱＨＱＤＷＭＳＧＫＥＦＫＣＫＶＮＮＫＤＬＰＡＰＩＥ ＲＴＩＳＫＰＫＧＳＶＲＡＰＱＶＹＶＬＰＰＰＥＥＥＭＴＫＫＱＶＴＬＴＣＭＶＴ ＤＦＭＰＥＤＩＹＶＥＷＴＮＮＧＫＴＥＬＮＹＫＮＴＥＰＶＬＤＳＤＧＳＹＦＭＹ ＳＫＬＲＶＥＫＫＮＷＶＥＲＮＳＹＳＣＳＶＶＨＥＧＬＨＮＨＨＴＴＫＳＦＳＲＴ ＰＧＫ（配列番号２３）
１１	ＱＶＱＬＱＱＳＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＬＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＮＹＧＩＳＷＶ ＫＱＲＴＧＱＧＬＥＷＩＧＥＩＹＰＲＳＤＮＴＹＹＮＥＫＦＫＧＫＡＴＬＴＡＤＫ ＳＳＳＴＡＹＭＥＬＲＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＦＣＴＲＳＤＹＧＦＦＤＹＷＧＱＧＴ ＴＬＴＶＳＳＡＫＴＴＡＰＳＶＹＰＬＡＰＶＣＧＤＴＴＧＳＳＶＴＬＧＣＬＶＫＧ ＹＦＰＥＰＶＴＬＴＷＮＳＧＳＬＳＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＤＬＹＴＬＳＳＳＶ ＴＶＴＳＳＴＷＰＳＱＳＩＴＣＮＶＡＨＰＡＳＳＴＫＶＤＫＫＩＥＰＲＧＰＴＩＫ ＰＣＰＰＣＫＣＰＡＰＮＬＬＧＧＰＳＶＦＩＦＰＰＫＩＫＤＶＬＭＩＳＬＳＰＩＶ ＴＣＶＶＶＤＶＳＥＤＤＰＤＶＱＩＳＷＦＶＮＮＶＥＶＨＴＡＱＴＱＴＨＲＥＤＹ ＮＳＴＬＲＶＶＳＡＬＰＩＱＨＱＤＷＭＳＧＫＥＦＫＣＫＶＮＮＫＤＬＰＡＰＩＥ ＲＴＩＳＫＰＫＧＳＶＲＡＰＱＶＹＶＬＰＰＰＥＥＥＭＴＫＫＱＶＴＬＴＣＭＶＴ ＤＦＭＰＥＤＩＹＶＥＷＴＮＮＧＫＴＥＬＮＹＫＮＴＥＰＶＬＤＳＤＧＳＹＦＭＹ ＳＫＬＲＶＥＫＫＮＷＶＥＲＮＳＹＳＣＳＶＶＨＥＧＬＨＮＨＨＴＴＫＳＦＳＲＴ ＰＧＫ（配列番号２４）
１５	ＱＶＱＬＩＱＳＧＰＧＬＶＱＰＳＱＳＬＳＩＴＣＴＶＳＧＦＳＬＴＧＹＡＩＨＷＶ ＲＱＳＰＧＫＧＬＥＷＬＧＭＩＷＫＳＧＮＴＤＹＮＡＡＦＭＳＲＬＳＩＴＫＤＮＳ ＫＳＱＶＦＦＫＭＮＳＬＱＡＤＤＴＡＩＹＹＣＡＲＮＧＹＤＹＥＦＶＹＷＧＱＧＴ ＬＶＴＶＳＡＡＫＴＴＡＰＳＶＹＰＬＡＰＶＣＧＤＴＴＧＳＳＶＴＬＧＣＬＶＫＧ ＹＦＰＥＰＶＴＬＴＷＮＳＧＳＬＳＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＤＬＹＴＬＳＳＳＶ ＴＶＴＳＳＴＷＰＳＱＳＩＴＣＮＶＡＨＰＡＳＳＴＫＶＤＫＫＩＥＰＲＧＰＴＩＫ ＰＣＰＰＣＫＣＰＡＰＮＬＬＧＧＰＳＶＦＩＦＰＰＫＩＫＤＶＬＭＩＳＬＳＰＩＶ ＴＣＶＶＶＤＶＳＥＤＤＰＤＶＱＩＳＷＦＶＮＮＶＥＶＨＴＡＱＴＱＴＨＲＥＤＹ ＮＳＴＬＲＶＶＳＡＬＰＩＱＨＱＤＷＭＳＧＫＥＦＫＣＫＶＮＮＫＤＬＰＡＰＩＥ ＲＴＩＳＫＰＫＧＳＶＲＡＰＱＶＹＶＬＰＰＰＥＥＥＭＴＫＫＱＶＴＬＴＣＭＶＴ ＤＦＭＰＥＤＩＹＶＥＷＴＮＮＧＫＴＥＬＮＹＫＮＴＥＰＶＬＤＳＤＧＳＹＦＭＹ ＳＫＬＲＶＥＫＫＮＷＶＥＲＮＳＹＳＣＳＶＶＨＥＧＬＨＮＨＨＴＴＫＳＦＳＲＴ ＰＧＫ（配列番号２５）

【０３２３】

表１０．マウス抗ＦＧＦ２１モノクローナル抗体に対する軽鎖可変領域（ＶＬ）配列。

抗体	軽鎖可変領域アミノ酸配列
４	ＱＩＶＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＰＬＧＥＲＶＴＭＴＣＴＡＳＳＳＶＳＳＳＹＬＨＷＹＱＱＫＰＧＳＳＰＫＶＷＩＹＲＴＴＮＬＡＳＧＶＰＴＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＨＱＹＨＲＳＰＰＴＷＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫ（配列番号５０）
９	ＤＩＱＭＴＱＳＰＡＳＬＳＡＳＶＧＥＴＶＩＩＴＣＲＡＳＥＮＩＹＳＹＬＡＷＹＱＱＫＱＧＫＳＰＱＬＬＶＹＮＩＲＴＬＡＥＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＱＦＳＬＫＩＮＳＬＱＰＥＤＦＧＳＹＹＣＱＨＨＹＤＳＰＷＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫ（配列番号５１）
１１	ＱＩＶＬＴＱＳＰＡＬＭＳＡＳＰＧＥＲＶＴＭＴＣＳＡＧＳＳＶＳＹＭＹＷＹＱＱＫＰＲＳＳＰＫＰＷＩＹＬＴＳＮＬＡＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＲＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫ（配列番号５２）
１５	ＤＶＬＭＴＱＴＰＬＳＬＰＶＳＬＧＤＱＡＳＩＳＣＲＳＳＱＩＩＶＨＮＮＧＤＴＹＬＥＷＹＬＱＫＰＧＱＳＰＫＬＬＩＹＫＩＳＮＲＦＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＫＩＳＲＶＥＡＥＤＬＧＶＹＹＣＦＱＧＳＨＶＰＹＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫ（配列番号５３）

【０３２４】

表１１．マウス抗ＦＧＦ２１モノクローナル抗体に対する重鎖可変領域（ＶＨ）配列。

抗体	重鎖可変領域アミノ酸配列
４	ＥＶＫＬＶＥＳＧＧＤＬＶＫＰＧＧＳＬＫＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＳＹＧＭＳＷＶＲＱＴＰＤＫＲＬＥＷＶＡＴＩＳＴＧＧＧＹＴＹＹＰＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＹＬＱＭＳＳＬＲＳＥＤＴＡＭＹＹＣＡＲＨＤＬＶＤＷＹＦＤＶＷＧＴＧＴＴＶＴＶＳＳ（配列番号５４）
９	ＥＶＱＬＱＱＳＧＰＥＬＶＫＰＧＡＳＶＫＩＰＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＹＹＭＧＷＶＫＱＳＨＧＫＳＬＥＷＩＧＤＩＮＰＮＮＧＶＴＩＮＮＱＮＦＫＧＫＡＴＬＴＶＤＫＳＳＳＴＡＹＭＥＬＲＳＬＡＳＥＤＴＡＶＹＹＣＴＲＧＹＧＧＡＬＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳＳ（配列番号５５）
１１	ＱＶＱＬＱＱＳＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＬＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＮＹＧＩＳＷＶＫＱＲＴＧＱＧＬＥＷＩＧＥＩＹＰＲＳＤＮＴＹＹＮＥＫＦＫＧＫＡＴＬＴＡＤＫＳＳＳＴＡＹＭＥＬＲＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＦＣＴＲＳＤＹＧＦＦＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳ（配列番号５６）
１５	ＱＶＱＬＩＱＳＧＰＧＬＶＱＰＳＱＳＬＳＩＴＣＴＶＳＧＦＳＬＴＧＹＡＩＨＷＶＲＱＳＰＧＫＧＬＥＷＬＧＭＩＷＫＳＧＮＴＤＹＮＡＡＦＭＳＲＬＳＩＴＫＤＮＳＫＳＱＶＦＦＫＭＮＳＬＱＡＤＤＴＡＩＹＹＣＡＲＮＧＹＤＹＥＦＶＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＡ（配列番号５７）

【０３２５】

表１２．マウス抗ＦＧＦ２１モノクローナル抗体に対する重鎖ＣＤＲ配列。

抗体	ＣＤＲ　Ｈ１	ＣＤＲ　Ｈ２	ＣＤＲ　Ｈ３
４	ＳＹＧＭＳ（配列番号２６）	ＴＩＳＴＧＧＧＹＴＹＹＰＤＳＶＫＧ（配列番号３０）	ＨＤＬＶＤＷＹＦＤＶ（配列番号３４）
９	ＤＹＹＭＧ（配列番号２７）	ＤＩＮＰＮＮＧＶＴＩＮＮＱＮＦＫＧ（配列番号３１）	ＧＹＧＧＡＬＤＹ（配列番号３５）
１１	ＮＹＧＩＳ（配列番号２８）	ＥＩＹＰＲＳＤＮＴＹＹＮＥＫＦＫＧ（配列番号３２）	ＳＤＹＧＦＦＤＹ（配列番号３６）
１５	ＧＹＡＩＨ（配列番号２９）	ＭＩＷＫＳＧＮＴＤＹＮＡＡＦＭＳ（配列番号３３）	ＮＧＹＤＹＥＦＶＹ（配列番号３７）

【０３２６】

表１３．マウス抗ＦＧＦ２１モノクローナル抗体に対する軽鎖ＣＤＲ配列。

抗体	ＣＤＲ　Ｌ１	ＣＤＲ　Ｌ２	ＣＤＲ　Ｌ３
４	ＴＡＳＳＳＶＳＳＳＹＬＨ（配列番号３８）	ＲＴＴＮＬＡＳ（配列番号４２）	ＨＱＹＨＲＳＰＰＴＷＴ（配列番号４６）
９	ＲＡＳＥＮＩＹＳＹＬＡ（配列番号３９）	ＮＩＲＴＬＡＥ（配列番号４３）	ＱＨＨＹＤＳＰＷＴ（配列番号４７）
１１	ＳＡＧＳＳＶＳＹＭＹ（配列番号４０）	ＬＴＳＮＬＡＳ（配列番号４４）	ＱＱＷＳＳＮＰＲＴ（配列番号４８）
１５	ＲＳＳＱＩＩＶＨＮＮＧＤＴＹＬＥ（配列番号４１）	ＫＩＳＮＲＦＳ（配列番号４５）	ＦＱＧＳＨＶＰＹＴ（配列番号４９）

【０３２７】

実施例５：ＦＧＦ２１　ＥＬＩＳＡアッセイの最適化

実施例４に記載したＦＧＦ２１　ＥＬＩＳＡアッセイをさらに最適化して、アッセイの感度を改善した。

【０３２８】

異なる捕捉抗体を比較して、どの捕捉抗体がより優れた検出をもたらすかを決定した。抗体ｍＡｂ４及びｍＡｂ９の両方を捕捉抗体として試験した。図１１に示すように、捕捉抗体としてｍＡｂ４を使用すると、ｍＡｂ９と比較して、より良好なアッセイ感度が得られた。

【０３２９】

異なるタイプのコーティング緩衝液と、検出抗体の固定濃度における異なる濃度のコーティング抗体とを、全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイについて分析した。重炭酸塩コーティング緩衝液及びＰＢＳコーティング緩衝液を、異なるコーティング抗体濃度で分析した。図１２に示すように、全ＦＧＦ２１アッセイについて、異なる濃度のコーティング抗体でさえ、炭酸水素ナトリウム及びＰＢＳコーティング緩衝液に対して同様のウェル内感度が観察された。例えば、ＰＢＳ中２μｇ／ｍｌであるｍＡｂ４のコーティングは２ｐｇ／ｍｌのウェル内感度を有し、２μｇ／ｍｌであるｍＡｂ４のコーティングは３ｐｇ／ｍｌのウェル内感度を有した。

【０３３０】

活性ＦＧＦ２１アッセイでは、類似のウェル内感度が炭酸水素ナトリウム及びＰＢＳコーティング緩衝液で観察された（図１３）。

【０３３１】

検出抗体（ｍＡｂ１５）の濃度及びホースラディッシュ過酸化物（ｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈ　ｐｅｒｏｘｉｄｅ：ＨＲＰ）の濃度が全ＦＧＦ２１アッセイの感度に及ぼす影響を決定するために、更なる実験を行った。０．２、１、及び２μｇ／ｍｌの濃度を検出抗体について試験し、１／１００及び１／５００の希釈をＨＲＰについて試験した。図１４に示すように、検出抗体及びＨＲＰのより高い濃度は、アッセイの感度を有意に改善しなかった。

【０３３２】

実施例６：Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いたＦＧＦ２１検出アッセイ

実施例５で議論したように、ＥＬＩＳＡフォーマットからの最適化に基づいて、Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａ　ＨＤ－１　Ａｎａｌｙｚｅｒ（商標）を用いるアッセイを、捕捉抗体としてｍＡｂ４と、検出抗体としてビオチン化ｍＡｂ１５（全ＦＧＦ２１の検出用）又はビオチン化Ｃ－末端ｐＡｂ（活性ＦＧＦ２１の検出用）のいずれかと、を使用するように適合させた。アッセイの概略図を図１５に示す。

【０３３３】

免疫アッセイの概要を提供する。Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａ免疫アッセイは、２段階アッセイプロトコル（図１６）を使用して、酵素複合体（ストレプトアビジンβ－ガラクトシダーゼ（ＳＢＧ））による全ＦＧＦ２１の捕捉及び標識化により開始する。ｍＡｂ４にコンジュゲートした磁気ビーズで捕捉した全ＦＧＦ２１と、ビオチン化検出抗体（全ＦＧＦ２１ではｍＡｂ１５－ビオチン、又は活性ＦＧＦ２１ではＣ末端ｐＡｂ－ビオチンのいずれか）とを一緒に添加して、捕捉した分析物サンドイッチを第１の工程で形成し、次いでＳＢＧを検出のために第２の工程で添加する。各工程の間にビーズを洗浄する。各洗浄サイクルの間、器具は、上清の自動吸引の前に、磁石を使用してビーズをペレット化する。最終洗浄サイクルの後、捕捉ビーズをレゾルフィンβ－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＲＧＰ）基質に再懸濁させる。次いで、造影及び分析物定量化のための準備において、ビーズをＳｉｍｏａディスクの入口ポートに移動する。

【０３３４】

ＦＧＦ２１の捕捉及び標識後、捕捉ビーズを、ウェル当たりビーズ１個以下（幅４．２５μｍ、深さ３．２５μｍ）を保持するような大きさである２１６，０００個の４０－ｆＬウェルを含有するアレイにロードする。ビーズ懸濁液は、入口チャネルを通ってアレイ上へと引っ張られる。ビーズは重力によっておよそ９０秒間ウェル中に沈降させる。油のアリコートをアレイ入口チャネル内に分注し、アレイ上に引っ張り、ビーズ及びＲＧＰ基質をマイクロウェル内にトラップすると共に、過剰なビーズを表面から除去する。ＦＧＦ２１分子が捕捉され、標識されている場合、ＳＢＧは、ＲＧＰ基質を加水分解して蛍光生成物であるレゾルフィンにする。蛍光生成物を封止したマイクロウェル内に蓄積して、単一分子の検出を可能にする。

【０３３５】

２段階ＥＤＡＣカップリングプロトコル（Ｓｉｍｏａ　Ｈｏｍｅｂｒｅｗ　２．０　Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ　Ｂｅａｄ　Ｃｏａｔｉｎｇ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌ　ＵＳＥＲ－２１３－１１）を用いて、多重捕捉ビーズを調製した。ビーズを０．５ｍｇ／ｍＬのｍＡｂ４及び０．２５ｍｇ／ｍＬのＥＤＡＣとカップリングさせる。カップリング反応は、抗体一次アミノ基とビーズ上のカルボキシル基との間で起こる。

【０３３６】

Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａアッセイを、９６ウェルのＮｕｎｃ（商標）９６－Ｗｅｌｌ　Ｐｏｌｙｐｒｏｐｙｌｅｎｅ　ＭｉｃｒｏＷｅｌｌ（商標）プレート（Ｖ底、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｎｕｎｃ　２４９９４４、ニューヨーク州ロチェスタ）中で行った。標準曲線について、組換えインタクトヒトＦＧＦ２１（ｉＦＧＦ２１）及び切断ヒトＦＧＦ２１（ｃＦＧＦ２１）を、Ｓｉｍｏａ緩衝液（ＰＢＳ　ｐＨ７．４、２％ＢＳＡ（画分Ｂ、プロテアーゼなし）、０．１％Ｔｗｅｅｎ、５ｍＭ　ＥＤＴＡ）中において、０．２００～５００ｐｇ／ｍＬ（図１７）又はＭａｇｉｃ緩衝液（ＢＡ０１０）から連続的に希釈した（図１９～図２５、図２８～図３２、及び図３３～図３７）。未

知のＦＧＦ２１濃度（例えば、血漿又は血清中）を判定するために、試験試料をＳｉｍｏａ緩衝液又はＭａｇｉｃ緩衝液中で１：５～１：２０に希釈した。必要な推奨試薬と共に、アッセイプレートをＳｉｍｏａ　ＨＤ－１　Ａｎａｌｙｚｅｒにロードした。各ウェルにおいて、各反応については、ｍＡｂ４にコンジュゲートした３２μＬの捕捉ビーズ、１μｇ／ｍＬ（ｍＡｂ１５－ビオチン又はＣ末端ｐＡｂ－ビオチン）で３２μＬの検出抗体、及び１１０μＬのＳＢＧを使用した。各ウェルについて、アッセイを二重に行った。自動化手順のプログラムとして、製造者による初期設定のカスタムアッセイ（Ｈｏｍｅｂｒｅｗ　Ａｓｓａｙ）を選択した。アッセイプロトコルに関する追加情報は、図１８に提示する。

【０３３７】

図１９に示すように、全（Ｔ）ＦＧＦ２１　Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａベースのアッセイ（Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａ－ｂａｓｅｄ　ａｓｓａｙ：ＱＳＡ）は、０．３ｐｇ／ｍｌのウェル内感度（ブランクウェルの２×平均ＡＥＢに基づく）を有するインタクト（野生型（ＷＴ））ＦＧＦ２１と、０．６ｐｇ／ｍｌのウェル内感度を有する、最後の１０個のＣ末端アミノ酸を持たないＦＧＦ２１の切断（ＣＬ）形態と、を検出した。活性（Ａ）ＦＧＦ２１　ＱＳＡは、ウェル内感度１．８ｐｇ／ｍｌを有するインタクトＦＧＦ２１を検出した。従来のＥＬＩＳＡと比較して、全ＦＧＦ２１のＱＳＡ及び活性ＦＧＦ２１のＱＳＡの両方において、アッセイ感度の有意な改善が観察された。図２０は、全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイについての標準曲線性能の代表を示す。良好な標準曲線性能が観察された。

【０３３８】

実施例７：Ｑｕａｎｔｅｒｉｘ　Ｓｉｍｏａを用いたＦＧＦ２１検出アッセイの最適化

実施例６に記載したＦＧＦ２１　ＱＳＡアッセイをさらに最適化して、アッセイの感度を改善した。

【０３３９】

アッセイ希釈液の種類がアッセイの感度に及ぼす影響を分析した。２つの異なる希釈液、ＢＡ０１０希釈液（ＰＢＳ、０．５％ＢＳＡ、０．２５％ＣＨＡＰＳ、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．３５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０、０．０５％Ｐｒｏｃｌｉｎ　３００、ｐＨ７．４）と、ＩＬ－１２希釈液（ＰＢＳ、１．５％ＢＳＡ、０．１５％Ｔｗｅｅｎ－２０、０．０５％Ｐｒｏｃｌｉｎ　３００、ｐＨ７．４）を試験した。ＢＡ０１０希釈液は、全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイの両方で良好に作用し、低バックグラウンド及び改善感度をもたらした（図２１）。

【０３４０】

常磁性ビーズの濃度がアッセイの感度に及ぼす影響もまた分析した。２つの異なる濃度、１．２２×10^7ビーズ／ｍｌの「高」ビーズ濃度と、０．５９×10^7ビーズ／ｍｌの「低」ビーズ濃度を試験した。図２２に示すように、全ＦＧＦ２１アッセイについて、高ビーズ濃度と低ビーズ濃度との間で同様のアッセイ感度が観察された。しかしながら、改善された感度は、活性ＦＧＦ２１アッセイについては低ビーズ濃度で観察された（図２２）。特に、活性ＦＧＦ２１アッセイは、低ビーズ濃度で観察された０．６ｐｇ／ｍｌのウェル内感度と比較して、高ビーズ濃度を用いた場合に１．２ｐｇ／ｍｌのウェル内感度を有した。３つの異なる常磁性ビーズロットもまた分析した。図２３に示すように、同様の結合曲線及びアッセイ感度が、捕捉常磁性ビーズの現ロット及び新規ロットで観察された。最適化したアッセイパラメータを表１４に示す。

【０３４１】

表１４．最適化したアッセイパラメータ。

試薬	濃度
アッセイ希釈液（ＢＡ０１０）	１倍
ビーズ	０．５９×１０^{7}ビーズ／ｍＬ
検出抗体（全体、活性）	０．８μｇ／ｍＬ、２．２μｇ／ｍＬ
ＳＢＧ	３１０ｐＭ

【０３４２】

異なる検出抗体を、全ＦＧＦ２１アッセイについて試験した。抗体ｍＡｂ１１、ｍＡｂ１５、及びＣ末端ｐＡｂを試験した。同様の感度が、全ＦＧＦ２１アッセイにおける種々の検出抗体で観察された（図２４）。しかしながら、ｍＡｂ１５に対する曲線は、最も低いバックグラウンドを示した。

【０３４３】

図１４、図１９、及び図２２に示される結果から、全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイについての検出器抗体及びＳＢＧの最適化された濃度を測定した（表１５）。全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイの両方のアッセイ感度は、検出抗体及びＳＢＧの濃度が増加した場合に改善された。全ＦＧＦ２１アッセイの感度は、０．８μｇ／ｍＬの検出抗体濃度及び３１０ｐＭのＳＢＧ濃度で改善し、活性ＦＧＦ２１アッセイの感度は、２．２μｇ／ｍＬの検出抗体濃度及び３１０ｐＭのＳＢＧ濃度で改善した。

【０３４４】

表１５．検出抗体濃度及びＳＢＧの最適化。

全ＦＧＦ２１アッセイ感度（ｐｇ／ｍＬ）		
検出抗体（μｇ／ｍＬ）	ＳＢＧ（ｐＭ）	
	３１０	１５５
０．８	**０．１**	０．４
０．４	０．７	０．３
活性ＦＧＦ２１アッセイ感度（ｐｇ／ｍＬ）		
検出抗体（μｇ／ｍＬ）	ＳＢＧ（ｐＭ）	
	３１０	１５５
２．２	**０．５**	１．１
１．１	２．２	１．４

【０３４５】

全ＦＧＦ２１アッセイをさらに分析して、フック効果が観察されるかどうかを判定した。フック効果は、典型的には、試料中に多量の分析物が存在し、かつ観察値が誤って低い場合に観察される。アッセイは次のように行った：全体アッセイについては、０．５９×１０^{7}ビーズ／ｍｌの濃度のｍＡｂ４結合常磁性ビーズによって実施される捕捉と、０．８μｇ／ｍＬのビオチン化ｍＡｂ１５を用いる検出とを実施した；活性アッセイについては、０．５９×１０^{7}ビーズ／ｍｌの濃度のｍＡｂ４結合常磁性ビーズを用いて捕捉を行い、２．２μｇ／ｍＬのビオチン化ヒツジ抗ＦＧＦ２１　Ｃ末端ｐＡｂを用いて検出を行った。図２５に示すように、フック効果は、全ＦＧＦ２１アッセイでは観察されなかった。さらに、全ＦＧＦ２１アッセイは、インタクトヒトＦＧＦ２１と、ＦＡＰ切断ヒトＦＧＦ２１（ＣＬ　ｈＦＧＦ２１）とを、同様の感度で検出した（図２５）。

【０３４６】

実施例８：ＦＧＦ２１　ＱＳＡを用いた血漿試料の分析

全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１　ＱＳＡを使用して、健常ヒトドナーから得た試料と

新たに調製した試料とを分析した。アッセイは実施例６に記載の通り行った。図２６に示すように、このアッセイは、健常ドナーの血清試料中の低レベルな活性ＦＧＦ２１を検出することができた。高血圧又は投薬を受けていないドナーで更なる実験を行い、プロテアーゼ阻害剤カクテルであるＭＳ－ＳＡＦＥの使用と比較した（図２７）。２型糖尿病患者で追加実験を行った。図２８Ａ～図２８Ｂに示すように、１４の試料のうち、全ＦＧＦ２１アッセイを用いて全試料（１００％）でＦＧＦ２１が検出された。活性ＦＧＦ２１アッセイについて、ＦＧＦ２１タンパク質は１２／１４の試料（８６％）で検出された（図２８Ａ～図２８Ｂ）。アッセイから得られた結果には再現性があった（図２９）。再現性は、全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイの両方において差異±３０％内の許容可能であった。

【０３４７】

希釈の線型性を、全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイで分析した。希釈の線型性は、全ＦＧＦ２１で最小希釈倍率（ｍｉｎｉｍｕｍ　ｒｅｑｕｉｒｅｄ　ｄｉｌｕｔｉｏｎ：ＭＲＤ）（１：２０希釈）から変化±３０％以内、及び活性ＦＧＦ２１アッセイにて１：４０希釈で許容可能であった（図３０）。初回ＭＲＤでは高濃度の傾向が認められた。ＬＬＯＱは、全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイについて判定した。最大希釈因子で平均算出濃度±３０％以内の許容回収率に基づき、全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１アッセイに対する予備的ＬＬＯＱを、それぞれ３．１５ｐｇ／ｍｌ及び１０．９４ｐｇ／ｍｌと決定した（図３１）。

【０３４８】

アッセイの特異性をさらに分析した。図３２に示すように、特異性は、全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイにおいて、１０μｇ／ｍＬのｍＡｂ４の存在下で、６つの２型糖尿病血漿試料すべてのＡＥＢ値の９０％を超える阻害によって示された。

【０３４９】

プロテアーゼ、エステラーゼ、及びＤＰＰ－ＩＶ阻害剤の組合せを含み、かつ抗凝固剤K_2－ＥＤＴＡを含むＰ８００血液採取システムの使用を、K_2－ＥＤＴＡ単独の使用と比較した（図３３）。Ｐ８００とＫ２ＥＤＴＡスクリーニング血漿試料との間の許容可能な差異±３０％の範囲内での比較可能な結果が、全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１アッセイで観察された（図３４）。全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１アッセイにおいて、Ｐ８００とK_2－ＥＤＴＡスクリーニング血漿試料との間に良好な相関が認められた（図３５～図３６）。２～８℃で保存した後の血漿試料の安定性を分析した。図３７に示すように、２～８℃の安定性試料由来の許容可能な回収率±３０％内の試料安定性が、全ＦＧＦ２１及び活性ＦＧＦ２１アッセイで観察された。

【０３５０】

図３８及び図３９に示すように、１００％より高い活性比が、全ＦＧＦ２１アッセイ及び活性ＦＧＦ２１アッセイによって分析されたK_2－ＥＤＴＡスクリーニング血漿試料において観察され、ヘテロ親和性抗体による干渉が示唆された。特に、アッセイ希釈液を単独で使用した場合、ＧＣ２９８１９試験由来の血漿試料９及び１０ではなく、K_2－ＥＤＴＡスクリーニング血漿試料１６及び１７から１００％より高い活性比が観察された。１００％より高い活性比を有する試料１６及び１７は、ヒト抗マウス抗体（ｈｕｍａｎ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ａｎｔｉｂｏｄｙ：ＨＡＭＡ）及びヒト抗ヒツジ抗体（ｈｕｍａｎ　ａｎｔｉ－ｓｈｅｅｐ　ａｎｔｉｂｏｄｙ：ＨＡＳＡ）を含有し、患者血漿試料中のＨＡＭＡ及びＨＡＳＡの存在が全活性アッセイ及び活性アッセイの正確性を妨害することを示した。図３８及び図３９に示すように、ＨＡＭＡは、全体アッセイ及び活性アッセイの両方に影響を及ぼした一方で、ＨＡＳＡは活性アッセイのみに影響を及ぼした。全体アッセイの希釈液への１０μｇ／ｍｌのマウスＩｇＧの添加と、活性アッセイの希釈液への１０μｇ／ｍｌのヒツジＩｇＧの添加とは、それぞれ、ＨＡＭＡ及びＨＡＳＡ干渉を効果的に除去し、観察された１００％よりも高い活性比を解消した（図３８及び図３９）。図４０に示すように、アッセイ希釈液中の１０μｇ／ｍｌの抗マウスＩｇＧ又は抗ヒツジＩｇＧの存在は、それぞれ、全体アッセイ及び活性アッセイの標準曲線に影響を及ぼさなかっ

た。

【０３５１】

実施例９：キメラ抗ＦＧＦ２１抗体

抗体ｍＡｂ４、ｍＡｂ９、ｍＡｂ１１、及びｍＡｂ１５を、Ｋ１４９Ｃ突然変異を有するヒトＩｇＧ１フレームワークに移植して、マウスＶＨ及びＶＬ領域、並びにＫ１４９Ｃ突然変異を有するヒト定常領域を有するマウス／ヒトキメラ抗ＦＧＦ２１抗体を生成した。キメラ抗体のアミノ酸配列は、以下の表１６～表１９、並びに図４１Ａ及び図４１Ｂに提示される。

【０３５２】

キメラＡｂ４（ＦＧＦ２１．ＧＮ３６．４．ｈＩｇＧ１；ＰＲＯ４１８１８９）
完全長軽鎖アミノ酸配列 ＱＩＶＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＰＬＧＥＲＶＴＭＴＣＴＡＳＳＳＶＳＳＳＹＬＨＷＹＱＱＫ ＰＧＳＳＰＫＶＷＩＹＲＴＴＮＬＡＳＧＶＰＴＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥ ＡＥＤＡＡＴＹＹＣＨＱＹＨＲＳＰＰＴＷＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩ ＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＣＶＤＮＡＬＱＳＧ ＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴ ＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号６３）
完全長重鎖アミノ酸配列 ＥＶＫＬＶＥＳＧＧＤＬＶＫＰＧＧＳＬＫＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＳＹＧＭＳＷＶＲＱＴ ＰＤＫＲＬＥＷＶＡＴＩＳＴＧＧＧＹＴＹＹＰＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＹ ＬＱＭＳＳＬＲＳＥＤＴＡＭＹＹＣＡＲＨＤＬＶＤＷＹＦＤＶＷＧＴＧＴＴＶＴＶＳＳＡ ＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷ ＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹ ＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰ ＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹ ＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥ ＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭ ＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬ ＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱ ＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号６７）
軽鎖可変領域 ＱＩＶＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＰＬＧＥＲＶＴＭＴＣＴＡＳＳＳＶＳＳＳＹＬＨＷＹＱＱＫ ＰＧＳＳＰＫＶＷＩＹＲＴＴＮＬＡＳＧＶＰＴＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥ ＡＥＤＡＡＴＹＹＣＨＱＹＨＲＳＰＰＴＷＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７１）
重鎖可変領域 ＥＶＫＬＶＥＳＧＧＤＬＶＫＰＧＧＳＬＫＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＳＹＧＭＳＷＶＲＱＴ ＰＤＫＲＬＥＷＶＡＴＩＳＴＧＧＧＹＴＹＹＰＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＹ ＬＱＭＳＳＬＲＳＥＤＴＡＭＹＹＣＡＲＨＤＬＶＤＷＹＦＤＶＷＧＴＧＴＴＶＴＶＳＳ （配列番号７５）

【０３５３】

キメラＡｂ９（ＦＧＦ２１．ＧＮ３６．９．ｈＩｇＧ１；ＰＲＯ４１８１９０）
完全長軽鎖アミノ酸配列 ＤＩＱＭＴＱＳＰＡＳＬＳＡＳＶＧＥＴＶＩＩＴＣＲＡＳＥＮＩＹＳＹＬＡＷＹＱＱＫＱ ＧＫＳＰＱＬＬＶＹＮＩＲＴＬＡＥＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＱＦＳＬＫＩＮＳＬＱＰ ＥＤＦＧＳＹＹＣＱＨＨＹＤＳＰＷＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ ＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＣＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱ ＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧ ＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号６２）
完全長重鎖アミノ酸配列 ＥＶＱＬＱＱＳＧＰＥＬＶＫＰＧＡＳＶＫＩＰＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＹＹＭＧＷＶＫＱＳ ＨＧＫＳＬＥＷＩＧＤＩＮＰＮＮＧＶＴＩＮＮＱＮＦＫＧＫＡＴＬＴＶＤＫＳＳＳＴＡＹ ＭＥＬＲＳＬＡＳＥＤＴＡＶＹＹＣＴＲＧＹＧＧＡＬＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳＳＡＳＴ ＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳ ＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣ ＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶ ＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤ ＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫ ＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫ ＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳ ＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳ ＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号６６）
軽鎖可変領域 ＤＩＱＭＴＱＳＰＡＳＬＳＡＳＶＧＥＴＶＩＩＴＣＲＡＳＥＮＩＹＳＹＬＡＷＹＱＱＫＱ ＧＫＳＰＱＬＬＶＹＮＩＲＴＬＡＥＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＱＦＳＬＫＩＮＳＬＱＰ ＥＤＦＧＳＹＹＣＱＨＨＹＤＳＰＷＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７０）
重鎖可変領域 ＥＶＱＬＱＱＳＧＰＥＬＶＫＰＧＡＳＶＫＩＰＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＹＹＭＧＷＶＫＱＳ ＨＧＫＳＬＥＷＩＧＤＩＮＰＮＮＧＶＴＩＮＮＱＮＦＫＧＫＡＴＬＴＶＤＫＳＳＳＴＡＹ ＭＥＬＲＳＬＡＳＥＤＴＡＶＹＹＣＴＲＧＹＧＧＡＬＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳＳ（配列番号７４）

【０３５４】

キメラＡｂ１１（ＦＧＦ２１．ＧＮ３６．１１．ｈＩｇＧ１；ＰＲＯ４１８１９１）
完全長軽鎖アミノ酸配列 ＱＩＶＬＴＱＳＰＡＬＭＳＡＳＰＧＥＲＶＴＭＴＣＳＡＧＳＳＶＳＹＭＹＷＹＱＱＫＰＲ ＳＳＰＫＰＷＩＹＬＴＳＮＬＡＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥ ＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＲＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳ ＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＣＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥ ＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬ ＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号６１）
完全長重鎖アミノ酸配列 ＱＶＱＬＱＱＳＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＬＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＮＹＧＩＳＷＶＫＱＲ ＴＧＱＧＬＥＷＩＧＥＩＹＰＲＳＤＮＴＹＹＮＥＫＦＫＧＫＡＴＬＴＡＤＫＳＳＳＴＡＹ ＭＥＬＲＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＦＣＴＲＳＤＹＧＦＦＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＡＳＴ ＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳ ＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣ ＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶ ＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤ ＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫ ＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫ ＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳ ＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧ　ＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫ ＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号６５）
軽鎖可変領域 ＡＬＭＳＡＳＰＧＥＲＶＴＭＴＣＳＡＧＳＳＶＳＹＭＹＷＹＱＱＫＰＲＳＳＰＫＰＷＩＹ ＬＴＳＮＬＡＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱ ＱＷＳＳＮＰＲＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号６９）
重鎖可変領域 ＱＶＱＬＱＱＳＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＬＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＮＹＧＩＳＷＶＫＱＲ ＴＧＱＧＬＥＷＩＧＥＩＹＰＲＳＤＮＴＹＹＮＥＫＦＫＧＫＡＴＬＴＡＤＫＳＳＳＴＡＹ ＭＥＬＲＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＦＣＴＲＳＤＹＧＦＦＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳ（配列番号７３）

【０３５５】

キメラＡｂ１５（ＦＧＦ２１．ＧＮ３６．１５．ｈＩｇＧ１；ＰＲＯ４１８１９２）
完全長軽鎖アミノ酸配列 ＤＶＬＭＴＱＴＰＬＳＬＰＶＳＬＧＤＱＡＳＩＳＣＲＳＳＱＩＩＶＨＮＮＧＤＴＹＬＥＷ ＹＬＱＫＰＧＱＳＰＫＬＬＩＹＫＩＳＮＲＦＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＫＩ ＳＲＶＥＡＥＤＬＧＶＹＹＣＦＱＧＳＨＶＰＹＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶ ＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＣＶＤＮＡＬＱ ＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬ　ＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣ ＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号６０）
完全長重鎖アミノ酸配列 ＱＶＱＬＩＱＳＧＰＧＬＶＱＰＳＱＳＬＳＩＴＣＴＶＳＧＦＳＬＴＧＹＡＩＨＷＶＲＱＳ ＰＧＫＧＬＥＷＬＧＭＩＷＫＳＧＮＴＤＹＮＡＡＦＭＳＲＬＳＩＴＫＤＮＳＫＳＱＶＦＦ ＫＭＮＳＬＱＡＤＤＴＡＩＹＹＣＡＲＮＧＹＤＹＥＦＶＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴ ＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳ ＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣ ＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶ ＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤ ＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫ ＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫ ＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳ ＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳ ＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号６４）
軽鎖可変領域 ＤＶＬＭＴＱＴＰＬＳＬＰＶＳＬＧＤＱＡＳＩＳＣＲＳＳＱＩＩＶＨＮＮＧＤＴＹＬＥＷ ＹＬＱＫＰＧＱＳＰＫＬＬＩＹＫＩＳＮＲＦＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＫＩ ＳＲＶＥＡＥＤＬＧＶＹＹＣＦＱＧＳＨＶＰＹＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号６８）
重鎖可変領域 ＱＶＱＬＩＱＳＧＰＧＬＶＱＰＳＱＳＬＳＩＴＣＴＶＳＧＦＳＬＴＧＹＡＩＨＷＶＲＱＳ ＰＧＫＧＬＥＷＬＧＭＩＷＫＳＧＮＴＤＹＮＡＡＦＭＳＲＬＳＩＴＫＤＮＳＫＳＱＶＦＦ ＫＭＮＳＬＱＡＤＤＴＡＩＹＹＣＡＲＮＧＹＤＹＥＦＶＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号７２）

【０３５６】

描写され、特許請求される様々な実施形態に加えて、本開示の主題は、本明細書に開示され、特許請求される特徴の他の組合せを有する他の実施形態も対象とする。したがって、本明細書に提示される特定の特徴は、本開示の主題が本明細書に開示される特徴の任意の好適な組合せを含むように、本開示の主題の範囲内において他の様式で互いに組み合わせられても良い。本開示の主題の特定の実施形態の前述の説明は、例証及び説明目的のために提示されている。包括的であるようにも本開示の主題を開示される実施形態に限定するようにも意図されていない。

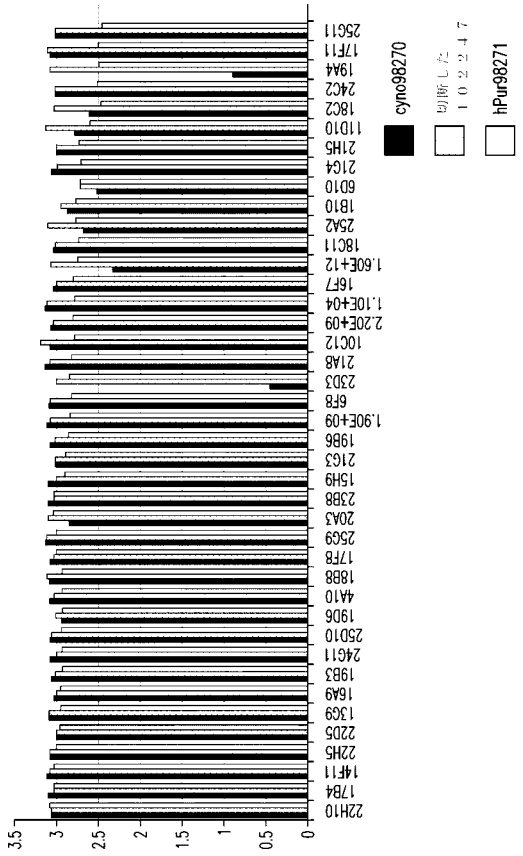
【０３５７】

本開示の主題の趣旨又は範囲から逸脱することなく、本開示の主題の組成物及び方法に様々な修正及び変形を加えることができることは、当業者には明らかである。したがって、本開示の主題が添付の特許請求の範囲及びそれらの等価物の範囲内の修正及び変形を含むよう意図されている。

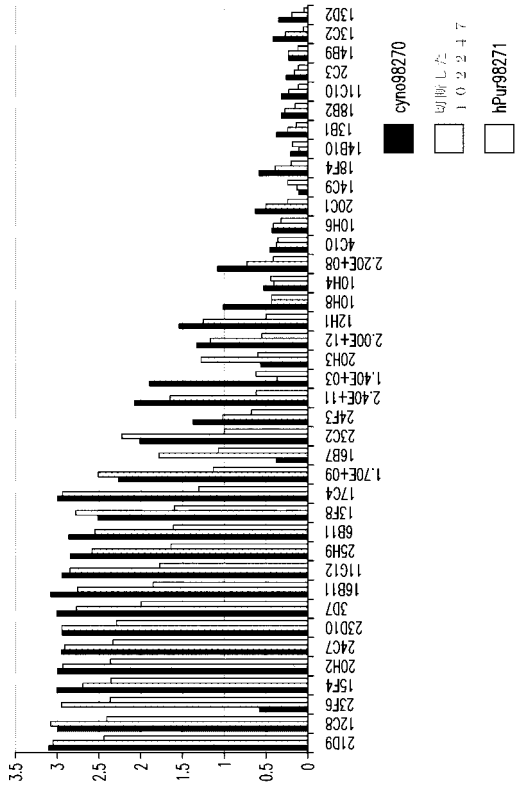
【０３５８】

様々な刊行物、特許、及び特許出願が本明細書に引用されており、それらの内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

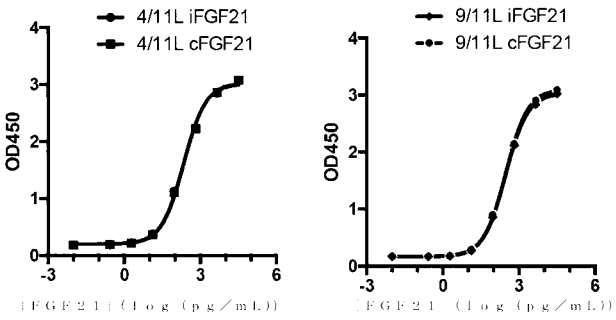
【図１－１】



【図１－２】

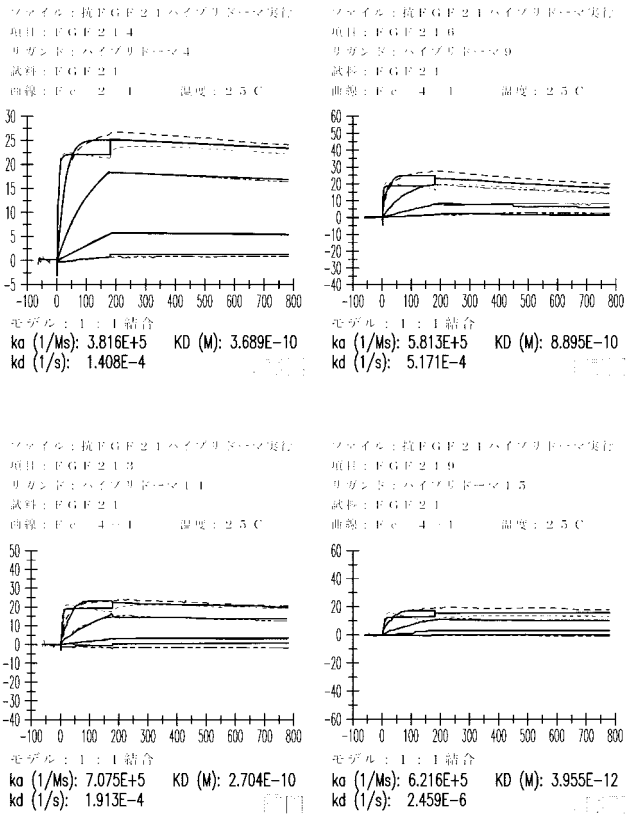


【図２】

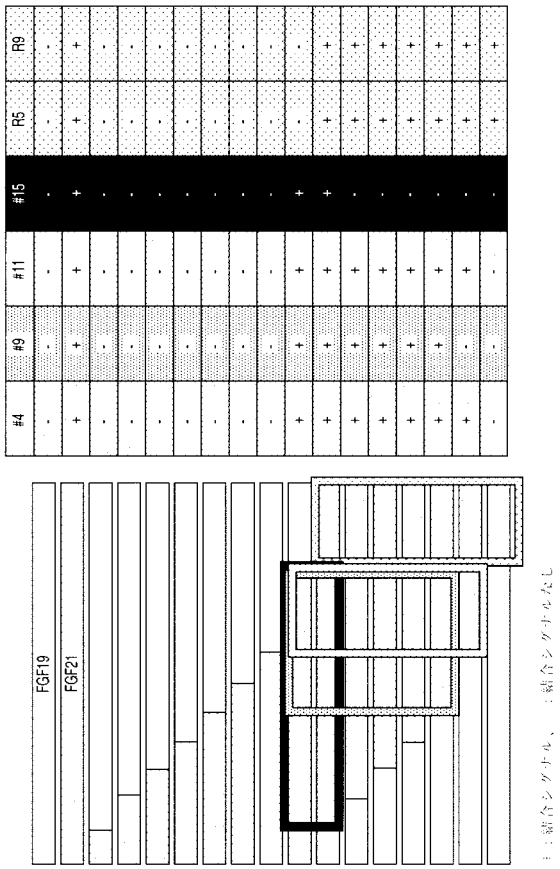


iFGF21：インタクトなFGF21
cFGF21：切断したFGF21

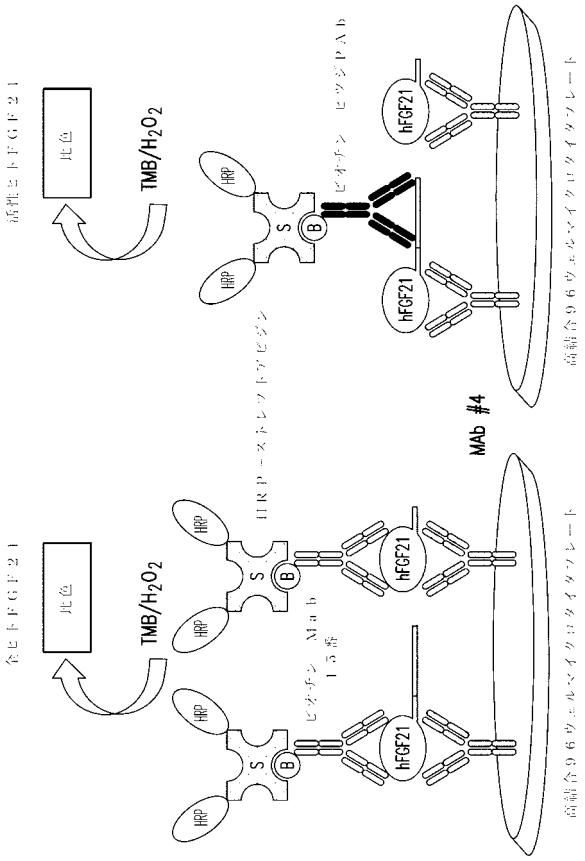
【図３】



【図４】



【図５】



【図６】

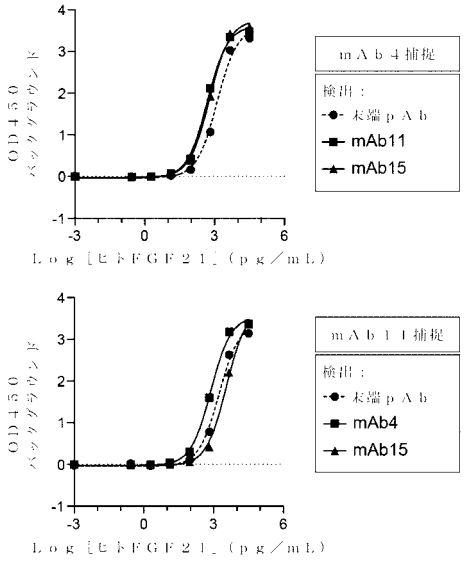
１　マイクロタイタープレートを、コーティング緩衝液P1ウェル当たり１００μＬのコーティング抗体０．５μｇ／ｍＬ、２～８℃で一晩コーティングする
２　プレートを、１サイクル当たり４００μＬ／ウェルの洗浄緩衝液で３回洗浄する
３　２００μＬ／ウェルのブロッキング緩衝液をプレートに加え、プレートを室温で振盪しながら１～３時間インキュベートする
（注：コーティングしたマイクロタイタープレートが連続した場合、次いで、気泡等を除去する振盪を、プレート内においてプレートを室温で１～３時間インキュベートする）
４　次の表のように標準（Ｓｔｄ）曲線を作製する：
濃度１５９０μｇ／ｍＬの野生型ヒトＦＧＦ２１標準溶液
例えば下の表に記載のように緩衝液２（Ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａｔｅ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ　２）を調製する：

ストック	濃度（pg／mL）	濃度（pg／mL）	倍数	加えた量（μL）	標準希釈液の体積（μL）	合計体積（μL）
標準液１	10000000	1590000000	159	3.1	496.9	500
中間液２	100000	10000000	100	5.0	495.0	500

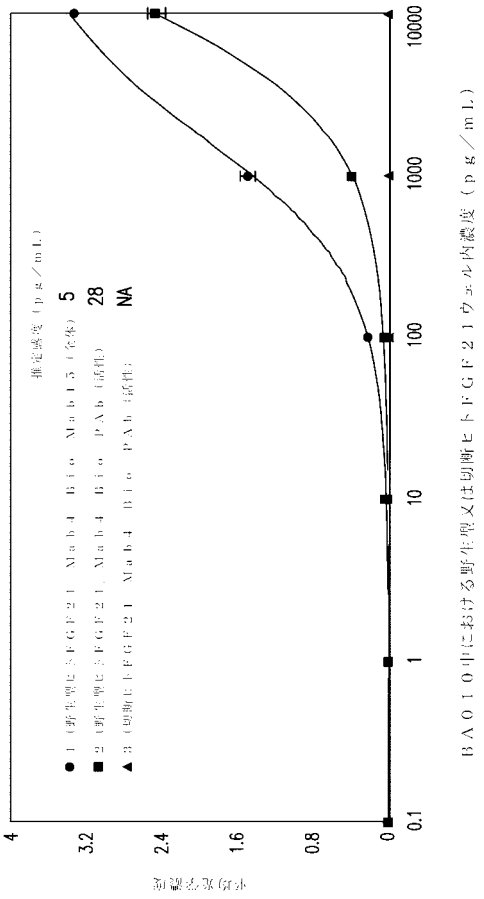
	標準濃度（pg／mL）	調製法
標準液１	4000	１００００ｐｇ／ｍＬで４０μＬの中間液２＋９６０μＬの標準希釈液
標準液２	1000	２５０μＬの標準液１＋７５０μＬの標準希釈液
標準液３	250	２５０μＬの標準液２＋７５０μＬの標準希釈液
標準液４	62.5	２５０μＬの標準液３＋７５０μＬの標準希釈液
標準液５	15.625	２５０μＬの標準液４＋７５０μＬの標準希釈液
標準液６	3.906	２５０μＬの標準液５＋７５０μＬの標準希釈液
標準液７	0.977	２５０μＬの標準液６＋７５０μＬの標準希釈液
標準液８	ＮＡ	ＮＡ
陰性対照（ＮＣ）	0.000	７５０μＬの標準希釈液

５　対照（ＱＣ）及び試料をアッセイ希釈液にてＸ（ＴＢＤ）希釈で希釈する
６　プレートを、１サイクル当たり４００μＬ／ウェルの洗浄緩衝液で３回洗浄する
７　プレートに希釈した標準液、対照液、試料を、１００μＬ／ウェルで二重に加える
８　プレートを２時間振盪しながら室温でインキュベートする
９　ビオチン化検出抗体をアッセイ希釈液中で０．５μＬ／ｍＬに希釈する
１０　プレートを、１サイクル当たり４００μＬ／ウェルの洗浄緩衝液で３回洗浄する
１１　１００μＬ／ウェルの希釈したビオチン化検出抗体をプレートに加える
１２　プレートを１時間振盪しながら室温でインキュベートする
１３　ＨＲＰ複合体ストック溶液、ＨＲＰ複合体希釈液中で１：５００希釈（ＴＢＤ）に希釈する
１４　プレートを、１サイクル当たり４００μＬ／ウェルの洗浄緩衝液で３回洗浄する
１５　１００μＬ／ウェルの希釈したＨＲＰ複合体をプレートに加える
１６　プレートを１時間振盪しながら室温でインキュベートする
１７　プレートを、１サイクル当たり４００μＬ／ウェルの洗浄緩衝液で４回洗浄する
１８　１００μＬ／ウェルのＴＭＢ基質をプレートに加える
１９　プレートをおよそ１５～２０分間振盪しながら室温でインキュベートする
２０　１００μＬ／ウェルの１Ｍリン酸をプレートに加える
２１　４５０ｎｍの読出し波長及び６３０ｎｍまたは６５０ｎｍの参照波長を使用するプレートを読み出す

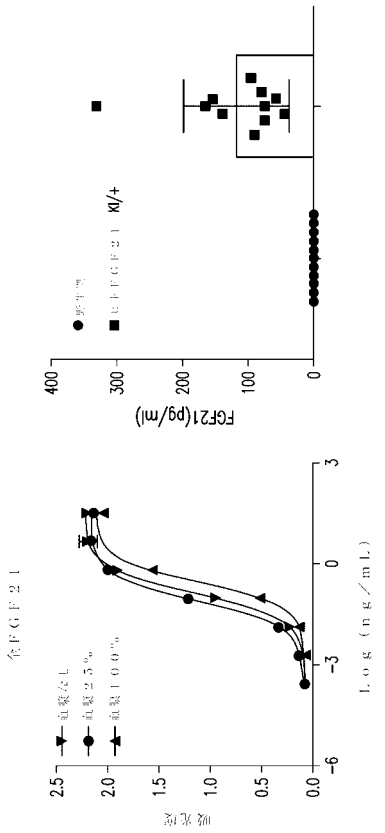
【図７】



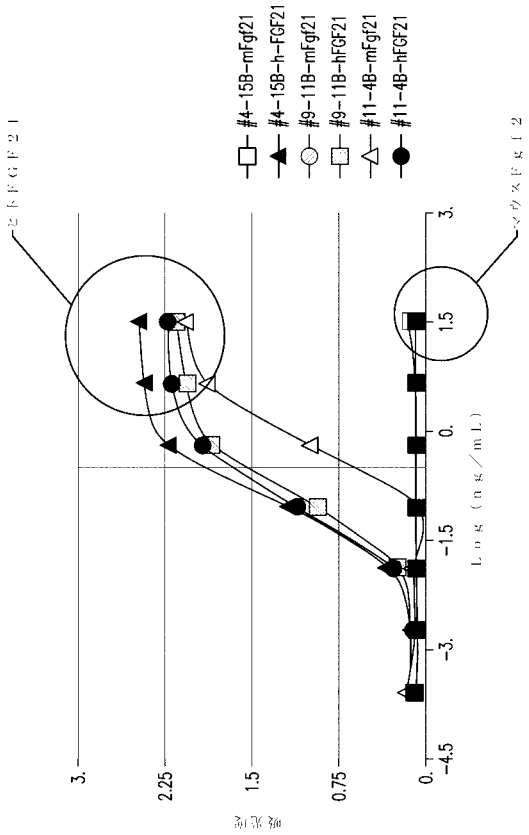
【図８】


推定感度（pg／mL）
1 (野生型ヒトFGF21 Mab4 Bio Mab15（全体） 5
2 (野生型ヒトFGF21 Mab4 Bio PAb（活性） 28
3 (切断ヒトFGF21 Mab4 Bio PAb（活性） NA
BA010中における野生型又は切断ヒトFGF21ウェル内濃度（pg／mL）
平均吸光濃度

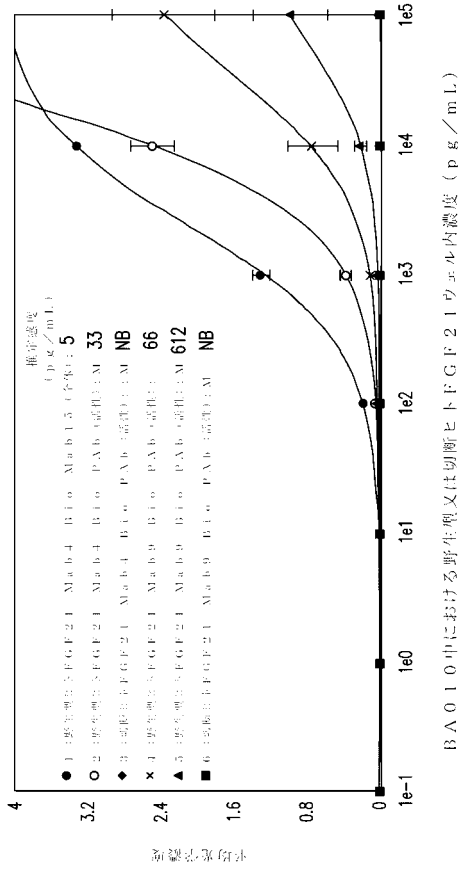
【図９】


FGF21(pg/ml)
野生型
ヒトFGF21 K/+
全FGF21
低製品L
低製品25%
低製品100%
吸光度
Log（ng／mL）

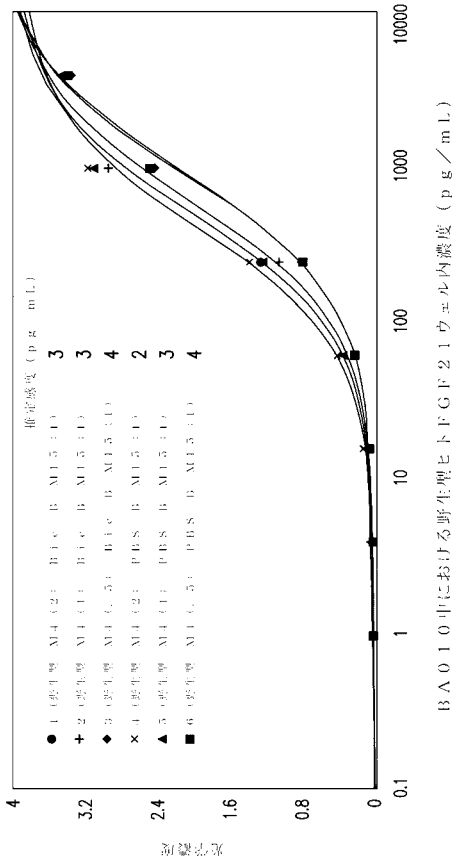
【図１０】


ヒトFGF21
マウスFgf21
#4-15B-mFgf21
#4-15B-h-FGF21
#9-11B-mFgf21
#9-11B-hFGF21
#11-4B-mFgf21
#11-4B-hFGF21
吸光度
Log（ng／mL）

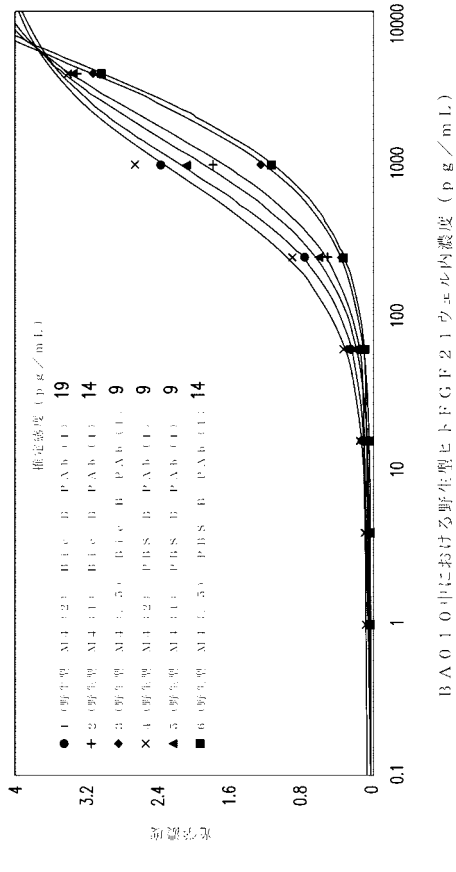
【図１１】


推定感度
（pg／mL）
5
33
NB
66
612
NB
BA010中における野生型又は切断ヒトFGF21ウェル内濃度（pg／mL）
平均吸光濃度

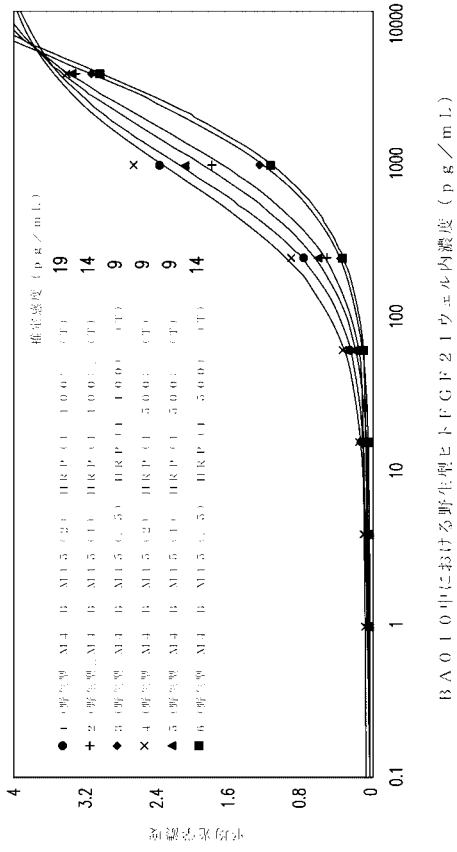
【図１２】



【図１３】



【図１４】



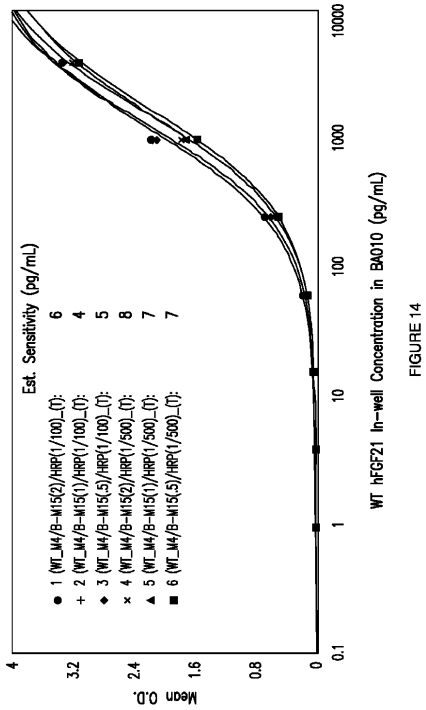
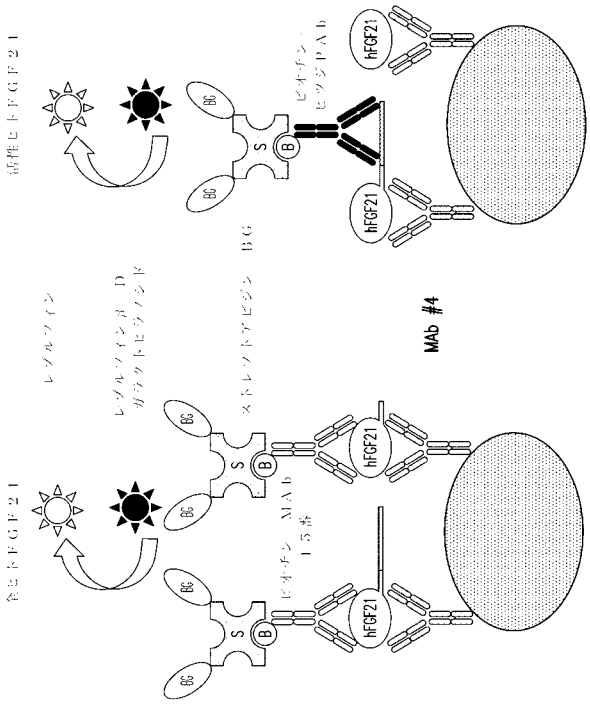


FIGURE 14

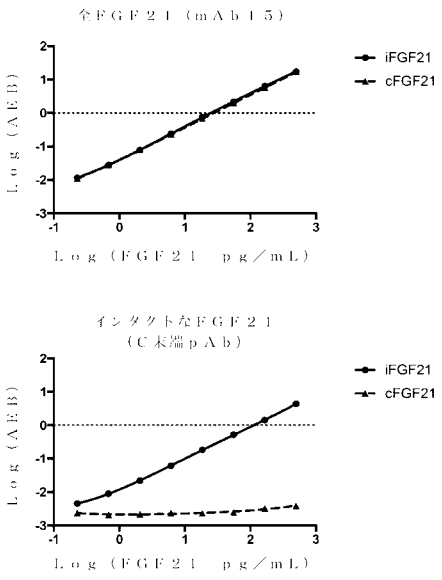
【図１５】



【図１６】

	工程	値	単位	分	成大	注
	工程1					
ヘ	ビーズ	カスタム1ビーズ				
	液体体積	25	µL	10	185	
	試料／標準物質					
	液体体積	100	µL	10	172	
	検出器	カスタム1ビーズ				
	液体体積	20	µL	10	185	
	インキュベーション時間	80	ケイデンス（45秒）	1	1120	60:00 min
ヘ	工程2					
	SBG	カスタム1SBG				
	液体体積	100	µL	10	185	
	インキュベーション時間	7	ケイデンス（45秒）	1	1120	5:15 min
ヘ	測定					

【図１７】



iFGF21：インタクトなFGF21
cFGF21：切断したFGF21

【図１８】

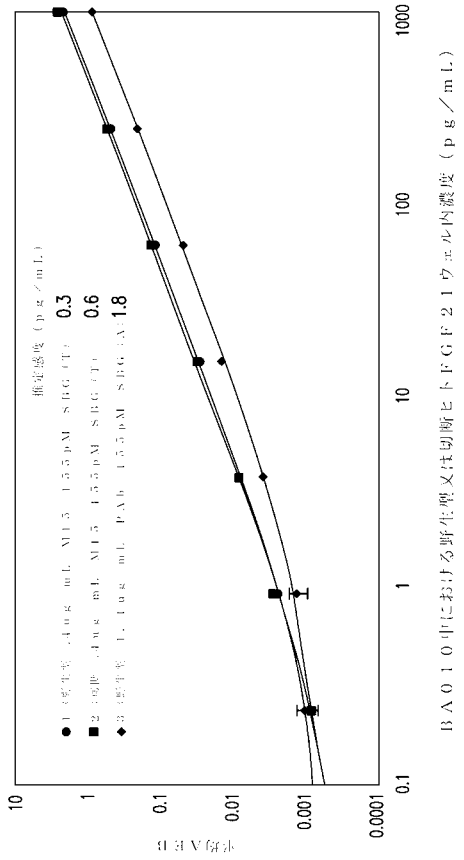
1　15mLまたは50mLのコニカルのポリプロピレン遠心分離管中に、抗ヒトFGF21 Mab第4番ストレプトアビジン常磁性ビーズ、ビオチン複合体、及びSBGの使用液を調製する
2　各使用液をそれぞれのQuanterixアッセイ試薬ボトルに移す
3　次の例のように標準（Std）希釈を作製する：
濃度10pg／mLの野生型ヒトFGF21標準ストック
例として以下の表に記載するように中間溶液2を調製する：

ストック	濃度（pg／mL）	高濃度（pg／mL）	希釈倍率	液の体積（µL）	標準希釈液の体積（µL）	合計体積（µL）
中間液1	100000	10000000	100	20.0	1980.0	2000
中間液2	1000	100000	100	20.0	1980.0	2000

	標準濃度（pg／mL）	調製法
標準液1	400	1000pg／mLで400µLの中間液2：600µLの標準希釈液
標準液2	100	250µLの標準液1：750µLの標準希釈液
標準液3	25	250µLの標準液2：750µLの標準希釈液
標準液4	6.3	250µLの標準液3：750µLの標準希釈液
標準液5	1.5625	250µLの標準液4：750µLの標準希釈液
標準液6	0.391	250µLの標準液5：750µLの標準希釈液
標準液7	0.098	250µLの標準液6：750µLの標準希釈液
標準液8	0.024	250µLの標準液6：750µLの標準希釈液
陰性対照（NC）	0.000	750µLの標準希釈液

4　通常、高対象及び低対照（QC）を使用し、希釈した内在性対照（EC）又は試料を1：20の最小希釈倍率（MRD）希釈で、その後、アッセイ希釈液で希釈する
5　プレートに希釈した標準液、対照液、試料を、複製に従って300pLのウェルを加える
6　完全に自動化したQuanterix Simoa HD－1器具をセットアップして、実験を行う

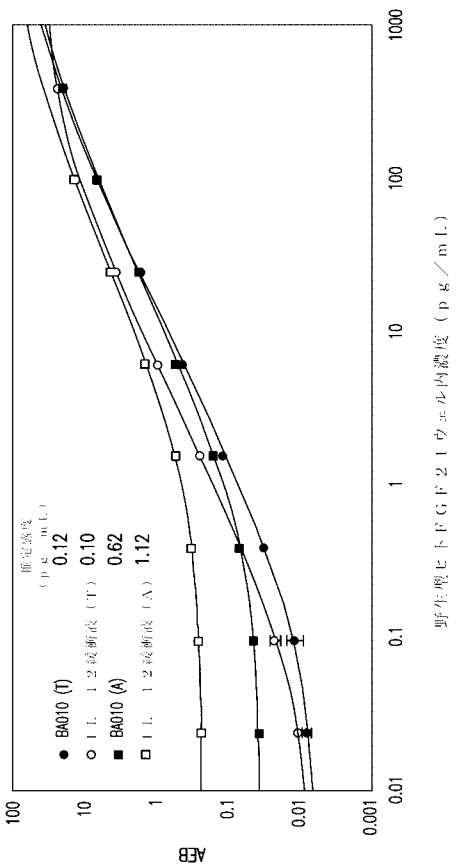
【図１９】



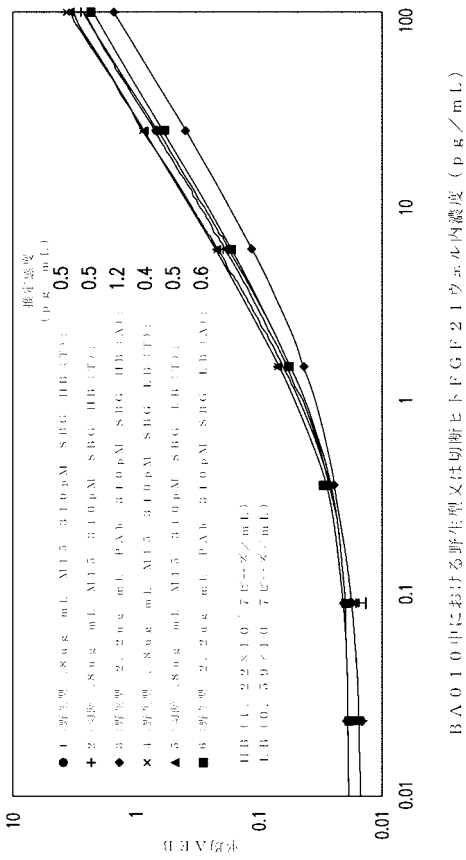
【図２０】

野生型ヒトFGF21	濃度（pg／mL）	平均AEB	Std.Dev.	CV%	S／N比	平均計算	回収率%
	1000	2.1119	0.0924	4.4	4036	1055	105
	250	0.4766	0.0029	0.6	911	245	98
	62.50	0.1130	0.0028	2.5	216	59	95
	15.63	0.0289	0.0004	1.4	55	15	98
	3.91	0.0080	0.0008	9.7	15	4	105
	0.98	0.0024	0.0003	12	4	1.0	102
	0.24	0.0010	0.0003	26	2	0.2	97
	Blank	0.0005	0.0001	11	1	検出せず	
切断ヒトFGF21	濃度（pg／mL）	平均AEB	Std.Dev.	CV%	S／N比	平均計算	回収率%
	1000	2.5205	0.0523	2.1	3183	1126	113
	250	0.5253	0.0014	0.3	663	240	96
	62.50	0.1266	0.0005	0.4	160	59	95
	15.63	0.0309	0.0007	2.2	39	15	93
	3.91	0.0082	0.0003	3.1	10	4	98
	0.98	0.0029	0.0001	3.5	4	1.3	129
	0.24	0.0008	0.0002	20	1	0.2	91
	Blank	0.0008	0.0001	15	1	0.2	
野生型ヒトFGF21	濃度（pg／mL）	平均AEB	Std.Dev.	CV%	S／N比	平均計算	回収率%
	1000	0.8592	0.0113	1.3	1085	1008	101
	250	0.2030	0.0011	0.5	256	244	98
	62.50	0.0492	0.0019	3.9	62	60	96
	15.63	0.0142	0.0003	2.4	18	17	110
	3.91	0.0039	0.0004	11	5	4	106
	0.98	0.0013	0.0004	28	2	0.8	78
	0.24	0.0010	0.0003	27	1	0.3	142
	Blank	0.0010	0.0002	16	1	0.4	

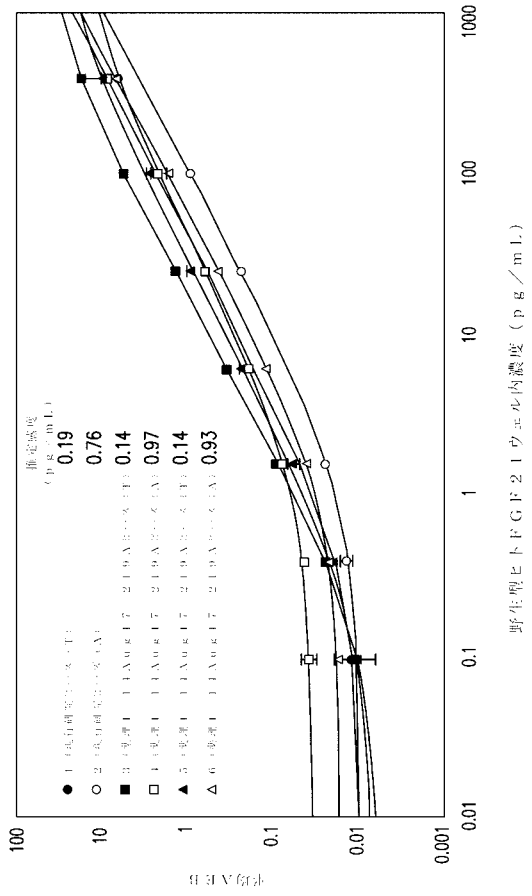
【図２１】



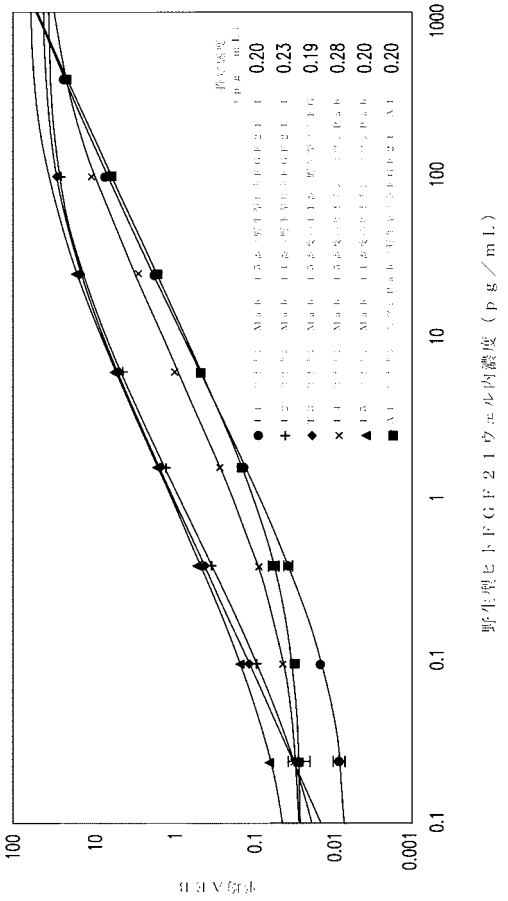
【図２２】



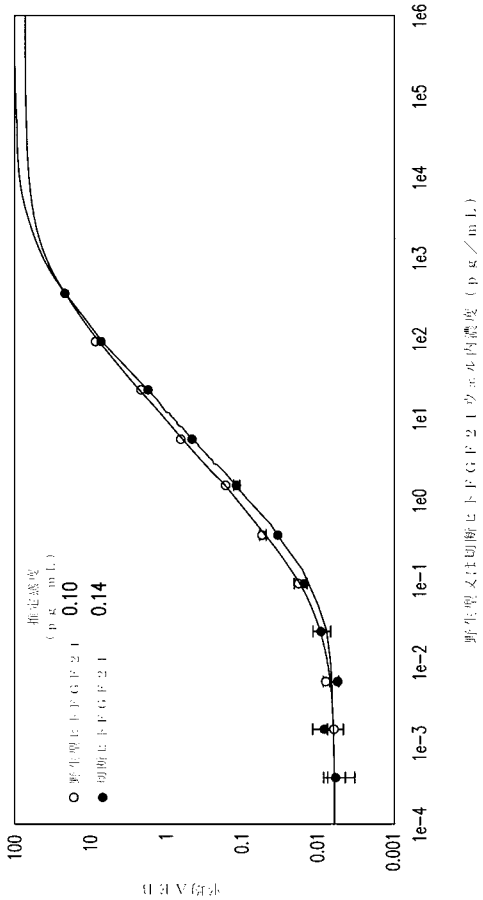
【図２３】



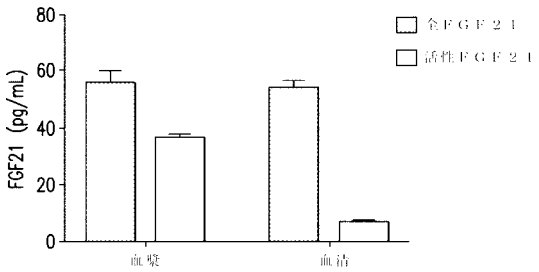
【図２４】



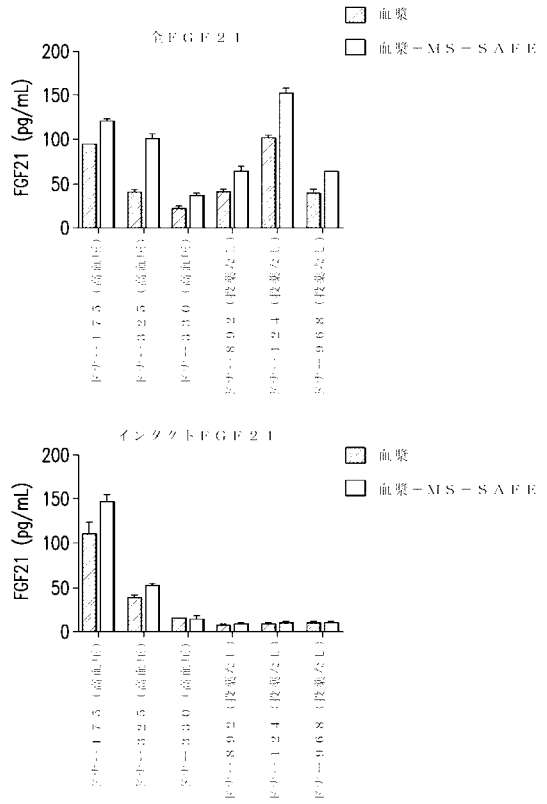
【図２５】



【図２６】



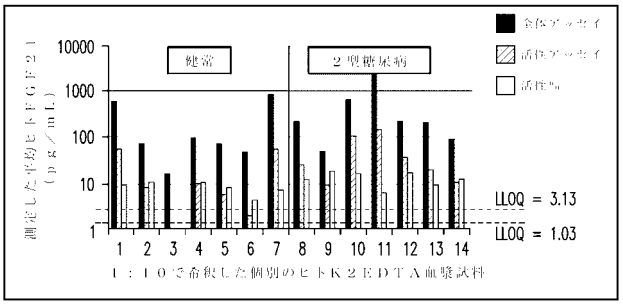
【図２７】



【図２８Ａ】

全ヒトＦＧＦ２１及び活性ヒトＦＧＦ２１アッセイ検出性（１日目）

	Ｎｏ．ＥＤＴＡ血漿試料	全体アッセイ	活性アッセイ	活性%
健常	1	596	56	9
	2	75	8	11
	3	17	0	0
	4	96	10	10
	5	73	6	8
	6	47	2	4
	7	841	60	7
２型糖尿病	8	210	25	12
	9	49	9	18
	10	635	102	16
	11	2389	144	6
	12	216	36	17
	13	207	19	9
	14	85	10	12

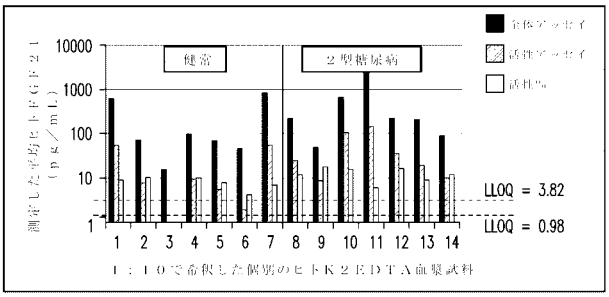


・検出性は、全体アッセイで１４／１４（１００%）、活性アッセイで１２／１４（８６%）である

【図２８Ｂ】

全ヒトＦＧＦ２１及び活性ヒトＦＧＦ２１アッセイ検出性（２日目）

	Ｎｏ．ＥＤＴＡ血漿試料	全体アッセイ	活性アッセイ	活性%
健常	1	596	56	9
	2	75	8	11
	3	17	0	0
	4	96	10	10
	5	73	6	8
	6	47	2	4
	7	841	60	7
２型糖尿病	8	210	25	12
	9	49	9	18
	10	635	102	16
	11	2389	144	6
	12	216	36	17
	13	207	19	9
	14	85	10	12



・検出性は、全体アッセイで１４／１４（１００%）、活性アッセイで１２／１４（８６%）である

【図２９】

		全体アッセイ（ｐｇ／ｍＬ）			活性アッセイ（ｐｇ／ｍＬ）		
	Ｎｏ．ＥＤＴＡ血漿試料	１日目	２日目	差異%	１日目	２日目	差異%
健常	1	596	345	-42	56	51	-9
	2	75	82	9	8	10	25
	3	17	19	12	0	0	NA
	4	96	93	-3	10	10	0
	5	73	75	3	6	6	0
	6	47	52	11	2	2	0
	7	841	787	-6	60	73	22
２型糖尿病	8	210	255	21	25	30	20
	9	49	57	16	9	11	22
	10	635	620	-2	102	124	22
	11	2389	2163	-9	144	171	19
	12	216	251	16	36	45	25
	13	207	202	-2	19	24	26
	14	85	89	5	10	13	30

【図３０】

	K2 EDTA 血漿試料	希釈	全体アッセイ			活性アッセイ		
			ヒト FGF21 pg/mL	MRD からの回収%	MRD からの変化%	ヒト FGF21 pg/mL	MRD からの回収%	MRD からの変化%
2型糖尿病	1	20	112	100	0	27	100	0
		40	110	98	−2	23	86	−14
		80	102	91	−9	16	58	−42
		160	96	86	−14	LTR	NA	NA
		320	98	88	−12	LTR	NA	NA
		640	108	97	−3	LTR	NA	NA
		1280	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
		2560	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
	2	20	185	100	0	37	100	0
		40	171	92	−8	34	92	−8
		80	163	88	−12	24	65	−35
		160	157	85	−15	23	63	−37
		320	158	85	−15	LTR	NA	NA
		640	171	92	−8	LTR	NA	NA
		1280	152	82	−18	LTR	NA	NA
		2560	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
	3	20	215	100	0	49	100	0
		40	194	90	−10	42	86	−14
		80	193	90	−10	35	70	−30
		160	186	86	−14	22	45	−55
		320	197	92	−8	LTR	NA	NA
		640	183	85	−15	LTR	NA	NA
		1280	217	101	1	LTR	NA	NA
		2560	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
	4	20	133	100	0	13	100	0
		40	143	108	8	13	96	−4
		80	132	100	0	LTR	NA	NA
		160	125	94	−6	LTR	NA	NA
		320	106	80	−20	LTR	NA	NA
		640	111	84	−16	LTR	NA	NA
		1280	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
		2560	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA

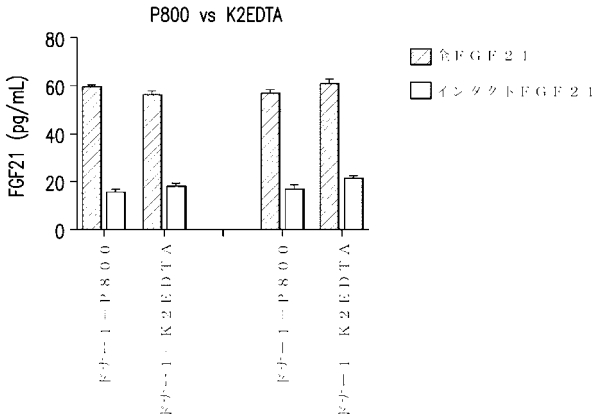
【図３１】

	K2 EDTA 血漿試料	希釈	全体アッセイ			活性アッセイ		
			ヒト FGF21 pg/mL	MRD からの回収%	LLOQ (pg/mL)	ヒト FGF21 pg/mL	MRD からの回収%	LLOQ (pg/mL)
2型糖尿病	1	20	112	100		27	100	
		40	110	98		23	86	0.583
		80	102	91		16	58	
		160	96	86		LTR	NA	
		320	98	88		LTR	NA	
		640	108	97	0.169	LTR	NA	
		1280	LTR	NA		LTR	NA	
		2560	LTR	NA		LTR	NA	
	2	20	185	100		37	100	
		40	171	92		34	92	0.851
		80	163	88		24	65	
		160	157	85		23	63	
		320	158	85		LTR	NA	
		640	171	92		LTR	NA	
		1280	152	89	0.119	LTR	NA	
		2560	LTR	NA		LTR	NA	
	3	20	215	100		49	100	
		40	194	90		42	86	
		80	193	90		35	70	0.432
		160	186	86		22	45	
		320	197	92		LTR	NA	
		640	183	85		LTR	NA	
		1280	217	112	1.069	LTR	NA	
		2560	LTR	NA		LTR	NA	
	4	20	133	100		13	100	
		40	143	108		13	96	0.321
		80	132	100		LTR	NA	
		160	125	94		LTR	NA	
		320	106	80		LTR	NA	
		640	111	84	0.173	LTR	NA	
		1280	LTR	NA		LTR	NA	
		2560	LTR	NA		LTR	NA	
				平均	0.158		平均	0.547
				標準偏差	0.026		標準偏差	0.230
				切断%	16.5		切断%	42.0
1：20希釈用に回収した最終LLOQ：					3.15			10.94

【図３２】

2型糖尿病 K2 EDTA 血漿試料	希釈	全体アッセイ 試料のみ 平均 AEB	全体アッセイ 試料のみ ヒト FGF21 pg/mL	全体アッセイ 試料＋10 μg/mL の MAb 4番 平均 AEB	全体アッセイ 試料＋10 μg/mL の MAb 4番 ヒト FGF21 pg/mL	全体アッセイ 阻害% (AEB)	活性アッセイ 試料のみ 平均 AEB	活性アッセイ 試料のみ ヒト FGF21 pg/mL	活性アッセイ 試料＋10 μg/mL の MAb 4番 平均 AEB	活性アッセイ 試料＋10 μg/mL の MAb 4番 ヒト FGF21 pg/mL	活性アッセイ 阻害% (AEB)
1	20	1.90	565	0.051	9	97	0.32	71	0.020	LTR	94
2	20	4.02	1321	0.015	LTR	100	1.07	284	0.015	LTR	99
3	20	12.03	4730	0.034	5	100	1.44	394	0.023	LTR	98
4	20	1.84	546	0.022	3	99	0.47	110	0.022	LTR	95
5	20	1.52	439	0.011	LTR	99	0.29	62	0.020	LTR	93
6	20	0.82	220	0.004	LTR	99	0.17	31	0.016	LTR	91

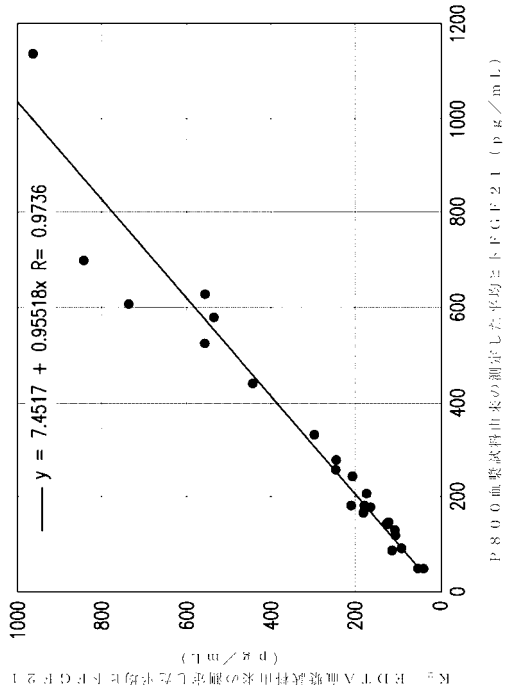
【図３３】



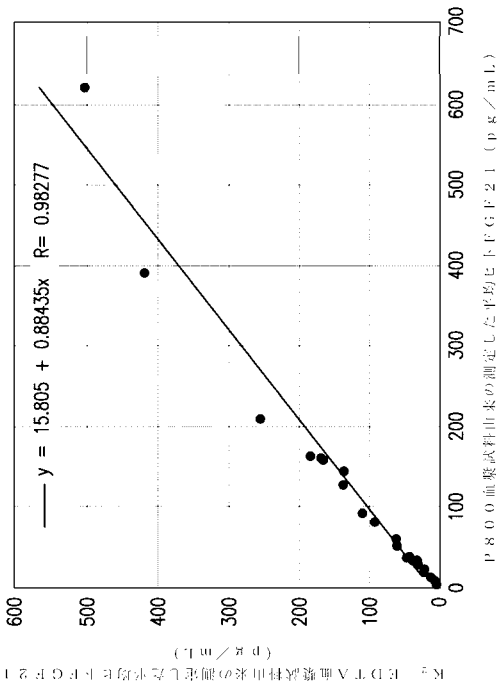
【図３４】

GC29819試験患者スクリーニング試料	血漿試料	全体アッセイ（pg／mL） P800	全体アッセイ（pg／mL） K2 EDTA	全体アッセイ（pg／mL） 差異%	活性アッセイ（pg／mL） P800	活性アッセイ（pg／mL） K2 EDTA	活性アッセイ（pg／mL） 差異%
	1	91	117	29	11	12	4
	2	607	735	21	145	138	−5
	3	169	184	9	35	34	−4
	4	49	57	16	LTR	LTR	NA
	5	LTR	99	NA	LTR	13	NA
	6	185	212	15	39	43	11
	7	699	840	20	158	166	5
	8	179	167	−7	39	49	27
	9	1137	959	−16	209	255	22
	10	628	557	−11	162	170	5
	11	334	298	−11	164	183	11
	12	122	108	−12	20	23	16
	13	147	128	−13	22	25	15
	14	181	179	−1.2	30	35	16
	15	279	248	−11	61	64	5
	16	132	109	−17	391	418	7
	17	259	249	−4	622	502	−19
	18	442	444	0.3	82	93	13
	19	579	536	−7	127	138	9
	20	148	125	−15	20	24	17
	21	49	47	−5	5	7	51
	22	247	209	−15	53	62	17
	23	211	177	−16	35	41	16
	24	524	557	6	93	110	18
	25	95	94	−2	15	16	8
	平均	312	297		110	109	
	標準偏差	263	257		143	127	
	切断%	84	86		129	117	

【図３５】



【図３６】

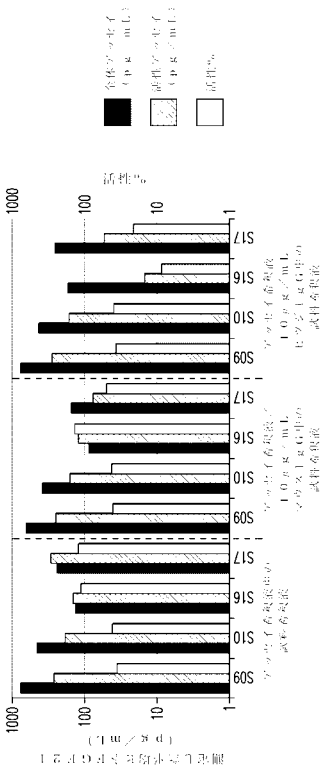


【図３７】

	対象番号	P800血漿安定性試料	全体アッセイ	2～8℃の回収率%	活性アッセイ	2～8℃の回収率%	活性%
GC29819試験患者スクリーニング試料	アッセイ高濃度中のInt全長型hFGF21	2–8℃	1064	100	885	100	83
		1X F/T	1000	94	853	96	85
		2X F/T	1016	95	837	95	82
		3X F/T	1009	95	843	95	84
	20008	2–8℃	425	100	80	100	19
		1X F/T	418	98	96	120	23
		2X F/T	422	99	94	118	22
		3X F/T	427	101	97	122	23
	20027	2–8℃	135	100	29	100	22
		1X F/T	121	90	24	82	20
		2X F/T	118	87	24	82	20
		3X F/T	120	89	23	79	19
	20024	2–8℃	480	100	107	100	22
		1X F/T	452	94	103	96	23
		2X F/T	425	89	96	90	23
		3X F/T	451	94	102	95	23
	20029	2–8℃	122	100	28	100	23
		1X F/T	106	87	24	86	22
		2X F/T	113	92	23	83	20
		3X F/T	104	85	22	81	21
	20036	2–8℃	218	100	86	100	39
		1X F/T	199	91	66	77	33
		2X F/T	191	88	63	73	33
		3X F/T	193	88	66	77	34

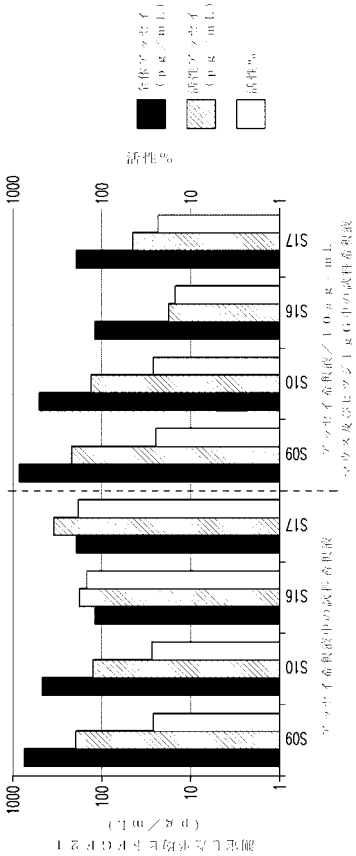
【図３８】

試料希釈液	GC29819 K_EDTA試料	全体アッセイ（pg／mL）	活性アッセイ（pg／mL）	活性%
アッセイ希釈液	S09	764	268	35
	S10	446	182	41
	S16	130	145	112
	S17	238	290	122
アッセイ希釈液／10μg／mL ヘクスイムG	S09	629	254	40
	S10	378	162	43
	S16	88	121	138
	S17	151	75	49
アッセイ希釈液／10μg／mL ヒツジIgG	S09	755	277	37
	S10	420	167	40
	S16	170	15	9
	S17	254	54	21

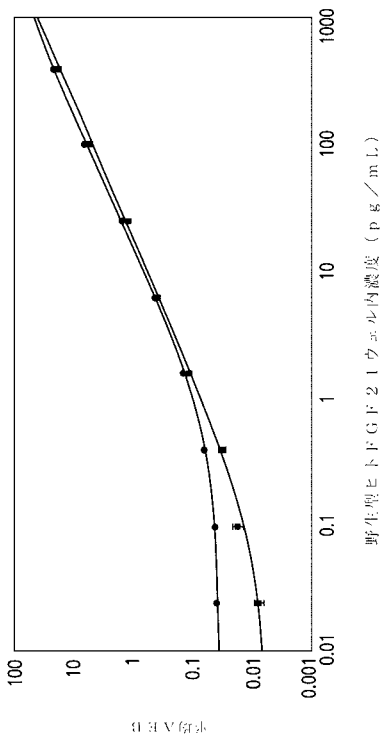


【図３９】

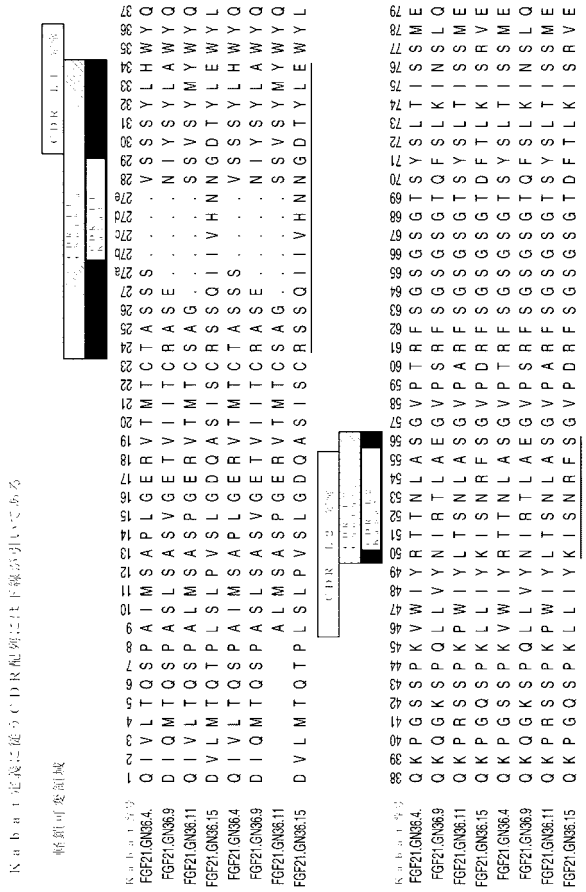
試料希釈液	GC29819 K_EDTA試料	全体アッセイ（pg／mL）	活性アッセイ（pg／mL）	活性%
アッセイ希釈液	S09	738	190	26
	S10	461	122	27
	S16	118	173	146
	S17	191	347	182
アッセイ希釈液／10μg／mL ヘクスイムG	S09	848	209	25
	S10	501	131	26
	S16	119	18	15
	S17	190	44	23



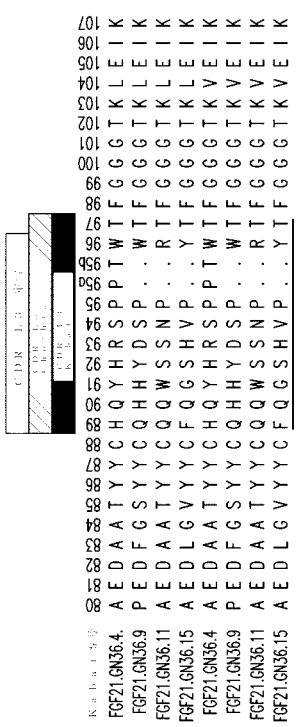
【図４０】



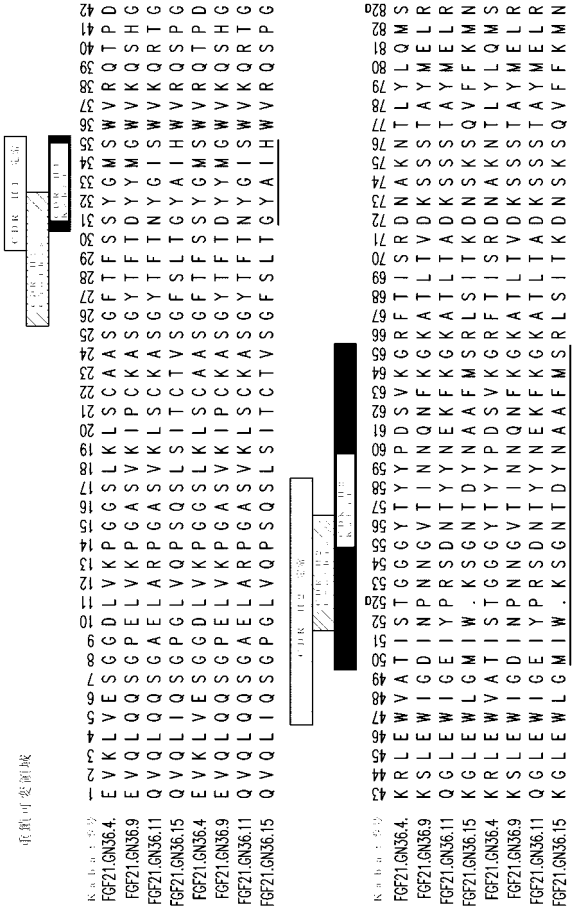
【図４１Ａ－１】



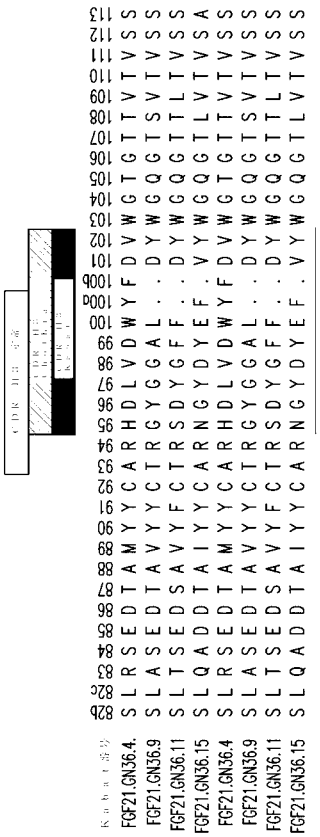
【図４１Ａ－２】



【図４１Ｂ－１】



【図４１Ｂ－２】



【配列表】
2021520492000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/025726

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/74 C07K16/26 A61K39/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TARA S UMBERGER ET AL: "Novel sandwich immunoassays for the measurement of total and active FGF21", BIOANALYSIS, vol. 6, no. 24, 1 December 2014 (2014-12-01), pages 3283-3293, XP055593858, London, UK ISSN: 1757-6180, DOI: 10.4155/bio.14.241 the whole document	1-89
X	EP 2 163 626 A1 (NOVARTIS VACCINES & DIAGNOSTIC [US]; UNIV KYOTO [JP]) 17 March 2010 (2010-03-17) par. 0087 - 0097	1,2,32, 33,47-89

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 June 2019	09/08/2019

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

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/025726

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Anonymous: "FGF21 fibroblast growth factor 21", , XP002791798, Retrieved from the Internet: URL:https://www.lsbio.com/targets/fgf21/g193379?fq=FilterReactConf%3a%22Human%22&prefix=a [retrieved on 2019-06-04] the whole document -----	64-89

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2019/025726

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2163626 A1	17-03-2010	AT 446365 T	15-11-2009
		AU 1922101 A	30-05-2001
		CA 2392103 A1	25-05-2001
		EP 1232264 A2	21-08-2002
		EP 2163626 A1	17-03-2010
		ES 2335386 T3	26-03-2010
		JP 2003516731 A	20-05-2003
		PT 1232264 E	26-11-2009
		WO 0136640 A2	25-05-2001

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19	
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21	
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10	
C07K	*16/24*	*(2006.01)*	C07K	16/24	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＵＮＩＸ

(72)発明者 ソノダ, ジュンイチロウ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０－４９９０, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ １, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA50 FA72 FA74