

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5706320号
(P5706320)

(45) 発行日 平成27年4月22日 (2015. 4. 22)

(24) 登録日 平成27年3月6日 (2015. 3. 6)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C O 7 K	16/18	(2006. 01)	C O 7 K	16/18	
C 1 2 N	5/10	(2006. 01)	C 1 2 N	5/00	1 O 2
G O 1 N	33/53	(2006. 01)	G O 1 N	33/53	V
C 1 2 P	21/08	(2006. 01)	C 1 2 P	21/08	

請求項の数 18 (全 83 頁)

(21) 出願番号 特願2011-514772 (P2011-514772)
 (86) (22) 出願日 平成21年6月17日 (2009. 6. 17)
 (65) 公表番号 特表2011-524751 (P2011-524751A)
 (43) 公表日 平成23年9月8日 (2011. 9. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/047623
 (87) 国際公開番号 W02009/155324
 (87) 国際公開日 平成21年12月23日 (2009. 12. 23)
 審査請求日 平成24年3月2日 (2012. 3. 2)
 (31) 優先権主張番号 61/073, 624
 (32) 優先日 平成20年6月18日 (2008. 6. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/089, 172
 (32) 優先日 平成20年8月15日 (2008. 8. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
 パーク アボット パーク ロード 10
 0
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 ブロフィー, スーザン・イー
 アメリカ合衆国、イリノイ・60046、
 リンデンハースト、マラード・ドライブ・
 2477

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P I G F - 1 アッセイ並びにそのキット及び成分

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 32 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号 29 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する、
 ヒト P I G F - 1 又はヒト P I G F - 1 断片に特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 2】

配列番号 35 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号 43 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する、
 ヒト P I G F - 1 又はヒト P I G F - 1 断片に特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 3】

A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 6 を有する細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 及び A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 9 を有する細胞株 2 - 8 2 6 - 3 3 5 からなる群から選択されるマウスハイブリドーマ細胞株。

【請求項 4】

A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 6 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 によって産生される抗体及び A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 9 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 2 - 8 2 6 - 3 3 5 によって産生される抗体からなる群から選択される抗体。

【請求項 5】

検査試料中のヒト P I G F - 1 又はヒト P I G F - 1 断片の量を測定する方法であって

(a) 第一の捕捉抗体 / ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片複合体を形成させるために、ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片を含有すると疑われる検査試料を、ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片に結合する少なくとも1つの第一の捕捉抗体と接触させる工程；

(b) 第二の検出抗体 / ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片 / 第一の捕捉抗体複合体を形成させるために、前記抗体 / ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片複合体を、ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片に結合し、検出可能な標識に連結されており、並びに前記第一の捕捉抗体と異なる少なくとも1つの第二の検出抗体と接触させる工程；並びに

(c) 工程 (b) において形成された第二の検出抗体 / ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片 / 第一の捕捉抗体複合体の量に基づいて、検査試料中に含有されるヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片の量を測定する工程；
を含み、

少なくとも1つの第一の捕捉抗体又は少なくとも1つの第二の検出抗体が A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 6 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 によって産生される抗体、A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 9 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 2 - 8 2 6 - 3 3 5 によって産生される抗体及びこれらの組み合わせからなる群から選択される抗体である、
方法。

【請求項 6】

前記少なくとも1つの第一の捕捉抗体が、前記検査試料との接触の前又は後の何れかで、固相上に固定化されている、請求項 5 の方法。

【請求項 7】

前記検出可能な標識が、放射性標識、酵素標識、化学発光標識、蛍光標識、温度測定標識及び免疫 - ポリメラーゼ連鎖反応標識からなる群から選択される、請求項 5 又は 6 の方法。

【請求項 8】

検査試料中のヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片の量が、対象が心血管疾患、鎌状赤血球病、慢性閉塞性肺疾患、加齢性黄斑変性症、末梢血管閉塞性疾患、炎症、子癩前症、乾癬、クローン病、子宮内膜症及び関節リウマチからなる群から選択される疾病、疾患又は症状に罹患しているかどうかの指標となる、請求項 5 から 7 の何れかの方法。

【請求項 9】

評価されるヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片の量が遊離のヒト P L G F - 1 又は遊離のヒト P L G F - 1 断片である、請求項 5 から 8 の何れかの方法。

【請求項 10】

検査試料中の遊離のヒト P L G F - 1 又は遊離のヒト P L G F - 1 断片の量を測定する方法であって、

(a) 第一の捕捉抗体 / ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片複合体を形成させるために、遊離のヒト P L G F - 1 又は遊離のヒト P L G F - 1 断片を含有すると疑われる検査試料を、遊離のヒト P L G F - 1 又は遊離のヒト P L G F - 1 断片に結合し、及び、s F l t - 1 に既に結合されているヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片に実質的に結合しない少なくとも1つの第一の捕捉抗体と接触させる工程；

(b) 第二の検出抗体 / ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片 / 第一の捕捉抗体複合体を形成させるために、前記抗体 / ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片複合体を、ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片に結合し、検出可能な標識に連結されており、並びに前記第一の捕捉抗体と異なる少なくとも1つの第二の検出抗体と接触させる工程；並びに

(c) 工程 (b) において形成された第二の検出抗体 / ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片 / 第一の捕捉抗体複合体の量に基づいて、検査試料中に含有される遊離のヒ

10

20

30

40

50

ト P L G F - 1 又は遊離のヒト P L G F - 1 断片の量を測定する工程；
を含み、

少なくとも1つの第一の捕捉抗体が (i) A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 9 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 2 - 8 2 6 - 3 3 5 によって産生される抗体、又は (i i) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する抗体である、及び / 又は

少なくとも1つの第二の検出抗体が (i) A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 6 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 によって産生される抗体、又は (i i) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する抗体である、

方法。

【請求項 1 1】

自動化された系又は半自動化された系での使用に対して適合されている、請求項 1 0 の方法。

【請求項 1 2】

自動化された系又は半自動化された系が、自動化されていない E L I S A より、遊離の P L G F - 1 を検出する上で、1 . 5 から 2 倍優れている、請求項 1 1 の方法。

【請求項 1 3】

検査試料中のヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片の存在を検出するための改良した方法であって、前記方法は、

(a) ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片 / 抗体複合体の形成を可能とする時間及び条件下で、ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片を含有すると疑われる検査試料を前記ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片に対して特異的な少なくとも1つの抗体と接触させること；及び

(b) 前記ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片の存在の指標として、形成された何れかの哺乳動物ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片 / 抗体複合体を検出すること；

を含み、

前記改良は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 及び配列番号 8 からなる群から選択されるグリコシル化された又は脱グリコシル化されたヒト P L G F - 1 又はグリコシル化されたヒト P L G F - 1 断片を含む検量物質又は対照を、検量物質又は対照として使用することを含み、ならびに前記抗体が請求項 1、2 および 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその組み合わせである、前記方法。

【請求項 1 4】

(a) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する、ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片に特異的に結合する単離された抗体；

(b) A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 6 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 によって産生される抗体；

(c) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する、ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片に特異的に結合する単離された抗体；並びに

(d) A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 9 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 2 - 8 2 6 - 3 3 5 によって産生される抗体；

からなる群から選択される1つ又はそれ以上の抗体を含む免疫診断試薬。

【請求項 1 5】

(a) A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 6 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 によって産生される抗体及び A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 9 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 2 - 8 2 6 - 3 3 5 によって産生される抗体からなる群から選

10

20

30

40

50

扱われる少なくとも1つの抗体；及び

(b) キットを使用するための指示書、
を含む、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片を検出するための診断用キット。

【請求項16】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8からなる群から選択されるグリコシル化された若しくは脱グリコシル化されたヒトPLGF-1又はグリコシル化されたヒトPLGF-1断片を含む検量物質又は対照をさらに含む、請求項15のキット。

【請求項17】

(a) ATCC受託番号PTA-8536を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-255-713によって産生される抗体及びATCC受託番号PTA-8539を有するマウスハイブリドーマ細胞株2-826-335によって産生される抗体からなる群から選択される少なくとも1つの抗体；

(b) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8からなる群から選択されるグリコシル化された若しくは脱グリコシル化されたヒトPLGF-1又はグリコシル化されたヒトPLGF-1断片を含む少なくとも1つの検量物質又は対照；並びに

(c) キットを使用するための指示書、
を含む、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片を検出するための診断用キット。

【請求項18】

配列番号27及び配列番号30のポリヌクレオチド配列を含む、単離された又は精製されたポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の情報

本願は、2008年6月18日に出願された米国特許出願61/073,624号、2008年8月15日に出願された米国特許出願61/089,172号及び2009年6月16日に出願された米国特許出願12/485,114号(これらの各々の内容は、参照により、本明細書に組み込まれる。)に対する優先権を主張する。

【0002】

技術分野

本開示は、とりわけ、ヒトPLGF-1(すなわち、グリコシル化されたヒトPLGF-1及び脱グリコシル化されたヒトPLGF-1の両方)及びヒトPLGF-1を使用する方法に関する。本開示は、ヒトPLGF-1に結合する抗体及びこれらの抗体を使用する方法にも関する。最後に、本開示は、ヒトPLGF-1イムノアッセイ及びキット並びにイムノアッセイ及びキットにおいて、ヒトPLGF-1及びヒトPLGF-1に結合する抗体を使用する方法にさらに関する。

【背景技術】

【0003】

(背景)

血管新生は、組織の正常な増殖及び発達のために必要とされる基本的なプロセスであり、既存の血管からの新たな毛細血管の増殖を伴う。血管新生は、胚の発達及び正常な組織の増殖、修復及び再生に関与するのみならず、雌の生殖サイクル、妊娠状態の確立及び維持並びに創傷及び骨折の修復にも関与している。健康な個体で起こる血管新生の他に、多数の病的なプロセスにおいて、特に、腫瘍の増殖及び転移並びに(特に、微小血管系の)血管増殖が増加する他の症状(糖尿病性網膜症、乾癬及び関節症など)に血管新生現象が関与している。血管新生の阻害は、これらの病的なプロセスを予防又は緩和する上で有用である。

【0004】

10

20

30

40

50

極めて多くの生理的及び病的プロセスにおける血管新生の重要な役割の故に、血管新生の調節に関与する因子は、集中的に調べられてきた。多数の増殖因子が、血管新生の制御に関与していることが示されてきた。この増殖因子には、繊維芽細胞増殖因子 (FGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) 及び肝細胞増殖因子 (HGF) が含まれる (Folkman et al., J. Biol. Chem., 267: 10931-10934 (1992) 参照)。

【0005】

増殖因子のPDGF及びVEGFファミリーは、それらの特異的な受容体と相互作用するために、何れも二量体形態として天然に存在する点で類似している。さらに、増殖因子のこれらのファミリー及びそれらの対応する受容体は、内皮細胞の増殖及び分化の刺激並びに分化した細胞のある種の機能に主として必要とされると考えられている。これらの因子は、受容体チロシンキナーゼ (RTK) を介して作用すると考えられている。

【0006】

多数のPDGF/VEGFファミリーの要素が同定されてきた。これらには、PDGF-A (例えば、GenBank 受付番号 X06374 参照)、PDGF-B (例えば、GenBank 受付番号 M12783 参照)、PDGF-C (例えば、PCT 国際出願 WO00/18212 参照)、PDGF-D (例えば、PCT 国際出願 WO00/027879 参照)、VEGF (VEGF-A としても、又は特定のイソフォームによって知られる)、胎盤増殖因子 PlGF (例えば、米国特許第 5,919,899 号参照)、VEGF-B (VEGF 関連因子 (VRF) としても知られる; 例えば、PCT 国際出願 WO96/26736 及び WO96/26736 参照)、VEGF-C、(例えば、米国特許第 6,221,839 号及び WO98/33917 参照)、VEGF-D (c-fos 誘導性増殖因子 (FIGF; c-fos-induced growth factor としても知られる。); 例えば、米国特許第 6,235,713 号及び PCT 国際出願 WO98/07832 参照)、VEGF-E (NZ7VEGF 又は OVNZ7 としても知られる。; 例えば、PCT 国際出願 WO00/025805 及び米国特許公開第 2003/0113870 号)、NZ2VEGF (OVNZ2 としても知られる; GenBank 受付番号 S67520 参照)、D1701VEGF 様タンパク質 (例えば、GenBank 受付番号 AF106020; Meyer et al., EMBO J., 18: 363-374 参照) 及び NZ10VEGF 様タンパク質 (例えば、PCT 国際出願 WO00/25805; Stacker and Achen, Growth Factors, 17: 1-11 (1999); Neufeld et al., FASEB J., 13: 9-22 (1999); Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999) 参照) が含まれる。

【0007】

胎盤増殖因子 1 型 (PlGF-1) は、血管新生性のホモ二量体糖タンパク質である。二量体形態の場合、PlGF-1 は血管新生活性を示す。単量体形態において、PlGF-1 は非活性である。PlGF-1 タンパク質をコードする完全なポリヌクレオチド配列が、そのポリペプチド配列とともに、欧州特許公開 0550519 及び PCT 国際出願 WO92/06194 に記載されている。PlGF-1 は、ホモ二量体としてその受容体 (fms 様チロシンキナーゼ Flt-1 受容体) に結合する。Flt-1 受容体 (sFlt-1) の可溶性形態が同定されている。sFlt-1 は、Flt-1 受容体の膜貫通及び細胞質ドメインを欠如するが、受容体の外側部分の 7 つの IgG 様ドメインを含有する Flt-1 受容体のスプライズバリエーションである。PlGF-1 は、sFlt-1 受容体にも結合する。PlGF-1 は、病的な血管新生においてこのような重要な役割を果たすので、ある種の疾病 (例えば、心血管疾患及び妊娠時高血圧を含む高血圧性疾患) のリスクを同定又は予想する上で使用するための予後マーカーとなる可能性を秘めている。さらに、互いに結合された PlGF-1 及び sFlt-1 タンパク質の循環複合体に対して報告された生物学的役割は存在しないので、これらのタンパク質の遊離の (複合体を形成して

10

20

30

40

50

いない)形態の検出は、(例えば、米国特許出願第2007/0111326号に公開されている)より有用な臨床情報を提供できる可能性を秘めている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開第00/18212号

【特許文献2】国際公開第00/027879号

【特許文献3】米国特許第5,919,899号明細書

【特許文献4】国際公開第96/26736号

【特許文献5】米国特許第6,221,839号明細書

10

【特許文献6】国際公開第98/33917号

【特許文献7】米国特許第6,235,713号明細書

【特許文献8】国際公開第98/07832号

【特許文献9】国際公開第00/025805号

【特許文献10】米国特許出願公開第2003/0113870号明細書

【特許文献11】欧州特許出願公開第0550519号明細書

【特許文献12】国際公開第92/06194号

【特許文献13】米国特許出願公開第2007/0111326号明細書

【非特許文献】

【0009】

20

【非特許文献1】Folkman他、J. Biol. Chem., 1992年、267、pp. 10931 - 10934

【非特許文献2】Stacker and Achen, Growth Factors, 1999年、17、p. 1 - 11

【非特許文献3】Neufeld他、FASEB J., 1999年、13、p. 9 - 22

【非特許文献4】Ferrara, J. Mol. Med., 1999年、77、pp. 527 - 543

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0010】

従って、PLGF-1をモニターするために使用することができる方法及びキット並びにこれらの成分に対する要望が本分野において存在する。さらに、遊離のPLGF-1をモニターするために使用することができる方法及びキット並びにこれらの成分に対する要望も本分野において存在する。本開示のこれらの及び他の目的は、本明細書中の以下の記載から明らかとなる。

【課題を解決するための手段】

【0011】

(要旨)

一実施形態において、本開示は、(a)配列番号32のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有し、(b)配列番号29のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有し、又は(c)配列番号32のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号29のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する、

40

ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体に関する。このような抗体には、ATCC受託番号PTA-8536を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-255-713によって産生される抗体が含まれ、本開示は、ATCC受託番号PTA-8536を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-255-713をさらに提供する。

【0012】

別の実施形態において、本開示は、(a)配列番号35のアミノ酸配列を含む可変重ド

50

メイン領域を有し、(b)配列番号43のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有し、又は(c)配列番号35のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号43のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する、

ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体を提供する。このような抗体には、ATCC受託番号PTA-8539を有するマウスハイブリドーマ細胞株2-826-335によって産生される抗体(及び連結体として使用することができるその断片、例えば、Fab'2断片)が含まれ、本開示は、ATCC受託番号PTA-8539を有するマウスハイブリドーマ細胞株2-826-335をさらに提供する。

【0013】

本開示は、

(a)第一の捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体を形成させるために、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片を含有すると疑われる検査試料を少なくとも1つの第一の捕捉抗体と接触させる工程(前記少なくとも1つの第一の捕捉抗体は、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に結合する。);

(b)第二の検出抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/第一の捕捉抗体複合体を形成させるために、抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体を、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に結合し、並びに検出可能な標識に連結されている少なくとも1つの第二の検出抗体と接触させる工程(少なくとも1つの第二の検出抗体は第一の捕捉抗体と異なる。);及び

(c)工程(b)で形成された第二の検出抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/第一の捕捉抗体複合体の量に基づいて、検査試料中に含有されるヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片の量を測定する工程を含み、

前記少なくとも1つの第一の捕捉抗体又は前記少なくとも1つの検出抗体が、ATCC受託番号PTA-8536を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-255-713によって産生される抗体、ATCC受託番号PTA-8539を有するマウスハイブリドーマ細胞株2-826-335によって産生される抗体及びこれらの組み合わせからなる群から選択される抗体である、

検査試料中のヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片の量を測定する方法をさらに提供する。

【0014】

本発明の一態様において、少なくとも1つの第一の捕捉抗体は、検査試料との接触の前又は後の何れかで、固相上に固定化される。あるいは、少なくとも1つの第一の捕捉抗体は、第二の検出抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/第一の捕捉抗体複合体の形成の前に、固相上に固定化される。場合によって、少なくとも1つの第一の捕捉抗体は、第一の捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体の形成の前に、固相上に固定化される。さらに場合によって、少なくとも1つの第一の抗体は、第一の捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体の形成の後に、固相上に固定化される。

【0015】

このような方法において、場合によって、検出可能な標識は、放射性標識、酵素標識、化学発光標識、蛍光標識、温度測定標識及び免疫-ポリメラーゼ連鎖反応標識からなる群から選択される。一態様において、検出可能な標識はアクリジニウムである。

【0016】

前記方法は、様々な疾病、疾患及び症状の評価において実施することができる。一態様において、前記方法は、対象が心血管疾患、鎌状赤血球病、慢性閉塞性肺疾患、加齢性黄斑変性症、末梢血管閉塞性疾患、炎症、子癇前症、乾癬、クローン病、子宮内膜症又は関節リウマチに罹患しているかどうかを評価するために実施される。別の態様において、前記方法は、対象が子癇前症又は心血管疾患に罹患しているかどうかを評価するために実施

10

20

30

40

50

される。

【0017】

一実施形態において、前記方法は、自動化された系又は半自動化された系において使用するために適合される。最適には、自動化又は半自動化された系は、特に、約2.5から約50（例えば、約2.5、約5、約10、約20、約30、約40又は約50）のs - F1t - 1 : P1GFモル比の範囲内で、自動化されていないELISAより、遊離のP1GF - 1を検出する上で、約1.5から約2倍優れている。

【0018】

本明細書に記載されている方法において、場合によって、評価されるヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片の量は、遊離のヒトP1GF - 1又は遊離のヒトP1GF - 1断片である。従って、本開示は、検査試料中の遊離のヒトP1GF - 1又は遊離のヒトP1GF - 1断片の量を測定するための方法を提供する。一実施形態において、この方法は、

10

(a) 第一の捕捉抗体 / ヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片複合体を形成させるために、遊離のヒトP1GF - 1又は遊離のヒトP1GF - 1断片を含有すると疑われる検査試料を少なくとも1つの第一の捕捉抗体と接触させる工程（前記少なくとも1つの第一の捕捉抗体は、遊離のヒトP1GF - 1又は遊離のヒトP1GF - 1断片に結合し、及び、さらに、前記少なくとも1つの捕捉抗体は、s F1t - 1に既に結合されているヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片に実質的に結合しない。）；

(b) 第二の検出抗体 / ヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片 / 第一の捕捉抗体複合体を形成させるために、抗体 / ヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片複合体を、ヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片に結合し、並びに検出可能な標識に連結されている少なくとも1つの第二の検出抗体と接触させる工程（少なくとも1つの第二の検出抗体は第一の捕捉抗体と異なる。）；及び

20

(c) 工程(b)において形成された第二の検出抗体 / ヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片 / 第一の捕捉抗体複合体の量に基づいて、検査試料中に含有される遊離のヒトP1GF - 1又は遊離のヒトP1GF - 1断片の量を測定する工程；を含む。

【0019】

このような方法において、場合によって、少なくとも1つの第一の捕捉抗体は、ATCC受託番号PTA - 8539を有するマウスハイブリドーマ細胞株2 - 826 - 335によって産生される抗体であり、さらに、場合によって、少なくとも1つの第二の検出抗体は、ATCC受託番号PTA - 8536を有するマウスハイブリドーマ細胞株1 - 255 - 713によって産生される抗体並びにこれらの組み合わせである。あるいは、場合によって、少なくとも1つの第一の捕捉抗体はMAB264である。第二の検出抗体は、MAB264と異なるあらゆる適切な抗体（ポリクローナルpB264など）であり得る。さらに場合によって、前記方法は、自動化された系又は半自動化された系において使用するために適合される。最適には、自動化又は半自動化された系は、特に、約2.5から約50（例えば、約2.5、約5、約10、約20、約30、約40又は約50）のs - F1t - 1 : P1GFモル比の範囲内で、自動化されていないELISAより、遊離のP1GF - 1を検出する上で、約1.5から約2倍優れている。

30

40

【0020】

従って、本開示は、とりわけ、

(a) ヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片に特異的に結合する単離された抗体（該抗体は、配列番号32のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有する。）；

(b) ヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片に特異的に結合する単離された抗体（該抗体は、配列番号29のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する。）；

(c) ヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片に特異的に結合する単離された抗体（該抗体は、配列番号32のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号29のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する。）；

50

(d) ATCC 受託番号 PTA - 8536 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 255 - 713 によって産生された抗体；

(e) ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片に特異的に結合する単離された抗体 (該抗体は、配列番号 35 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域を有する。)；

(f) ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片に特異的に結合する単離された抗体 (該抗体は、配列番号 43 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する。)；

(g) ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片に特異的に結合する単離された抗体 (該抗体は、配列番号 35 のアミノ酸配列を含む可変重ドメイン領域及び配列番号 43 のアミノ酸配列を含む可変軽ドメイン領域を有する。)；並びに

(h) ATCC 受託番号 PTA - 8539 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 2 - 826 - 335 によって産生された抗体；

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

【0021】

本開示は、グリコシル化されたヒト P L G F - 1 又はグリコシル化されたヒト P L G F - 1 断片を産生する哺乳動物細胞株をさらに提供する。哺乳動物細胞株は、あらゆる細胞株であり得るが、場合によって、チャイニーズハムスター卵巣細胞株又はヒト胎児性腎臓細胞株である。従って、本開示は、ATCC 受託番号 PTA - 8538、ATCC 受託番号 PTA - 8546 及び ATCC 受託番号 PTA - 8537 からなる群から選択されるチャイニーズハムスター卵巣細胞株も提供する。

【0022】

一態様において、哺乳動物細胞株 (例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞株) は、131 アミノ酸のアミノ酸配列を有する完全長ヒト P L G F - 1 であるグリコシル化されたヒト P L G F - 1 を産生する。あるいは、哺乳動物細胞株 (例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞株) は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むグリコシル化されたヒト P L G F - 1 を産生する。さらに、哺乳動物細胞株 (例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞株) は、115 アミノ酸のアミノ酸配列を有するヒト P L G F - 1 断片であるグリコシル化されたヒト P L G F - 1 を場合によって産生する。あるいは、グリコシル化されたヒト P L G F - 1 断片は、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 及び配列番号 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0023】

別の態様において、グリコシル化されたヒト P L G F - 1 又は、グリコシル化されたヒト P L G F - 1 断片は、少なくとも 1 つの連結配列を場合によってさらに含む。とりわけ、少なくとも 1 つの連結配列は、ヒスチジンタグ、エンテロキナーゼ切断部位又はヒスチジンタグとエンテロキナーゼ切断部位の組み合わせからなる群から選択される。

【0024】

さらに別の実施形態において、グリコシル化されたヒト P L G F - 1 又はそのグリコシル化されたヒト P L G F - 1 断片を作製する方法が、本開示によって提供される。場合によって、前記方法は、

(a) グリコシル化されたヒト P L G F - 1 又はグリコシル化されたヒト P L G F - 1 断片が産生されるような条件下で、ヒト P L G F - 1 をコードする遺伝子で細胞株を形質移入する工程；及び

(b) 細胞株 (例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞株) によって産生されたグリコシル化されたヒト P L G F - 1 又はグリコシル化されたヒト P L G F - 1 断片を回収する工程；

を含む。

【0025】

この方法は、工程 (a) において、細胞株を増幅遺伝子で形質移入すること、増幅された細胞に対する選択を実施すること、及び、次いで、工程 (b) を実施することを場合によってさらに含む。この方法の一態様において、増幅遺伝子は、ジヒドロ葉酸還元酵素又

10

20

30

40

50

はグルタミン合成酵素を場合によってコードし、選択はメトトレキサート又はグルタミンを用いて行われる。別の態様において、グリコシル化されたヒト P1GF-1 は、131 アミノ酸のアミノ酸配列を有する完全長ヒト P1GF-1 である。場合によって、グリコシル化されたヒト P1GF-1 は、少なくとも 1 つの連結配列をさらに含み、特に、少なくとも 1 つの連結配列は、ヒスチジントグ、エンテロキナーゼ切断部位及びヒスチジントグとエンテロキナーゼ切断部位の組み合わせからなる群から選択される。

【0026】

この方法の別の態様において、グリコシル化されたヒト P1GF-1 は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8 及びこれらのあらゆる断片からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、又は 115 10 アミノ酸のアミノ酸配列を有するヒト P1GF-1 断片である。場合によって、グリコシル化されたヒト P1GF-1 断片は、少なくとも 1 つの連結配列をさらに含み、特に、少なくとも 1 つの連結配列は、ヒスチジントグ、エンテロキナーゼ切断部位及びヒスチジントグとエンテロキナーゼ切断部位の組み合わせからなる群から選択される。

【0027】

従って、本開示は、ヒト P1GF-1 又はヒト P1GF-1 断片が配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 及び配列番号 8 20 からなる群から選択される配列を含む単離された又は精製されたグリコシル化されたヒト P1GF-1 又はグリコシル化されたヒト P1GF-1 断片をさらに提供する。

【0028】

さらに、本開示は、グリコシル化されたヒト P1GF-1 又はグリコシル化されたヒト P1GF-1 断片の少なくとも 1 つのアミノ酸残基が脱グリコシル化の結果、異なるアミノ酸残基へ転化されている、単離された又は精製された脱グリコシル化されたヒト P1GF-1 又は脱グリコシル化されたヒト P1GF-1 断片を提供する。例えば、少なくとも 1 つのアスパラギン残基が、脱グリコシル化の結果、アスパラギン酸残基へ転化され得る。

【0029】

さらに、本開示は、前記脱グリコシル化されたヒト P1GF-1 又は脱グリコシル化されたヒト P1GF-1 断片が配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39 及び配列番号 40 からなる群から選択される配列を含む、単離された又は精製された脱グリコシル化されたヒト P1GF-1 又は脱グリコシル化されたヒト P1GF-1 断片も提供 30 する。

【0030】

さらに、本開示は、検査試料中のヒト P1GF-1 を検出するためのアッセイにおいて使用するための検量物質又は対照を提供し、前記検量物質又は対照はグリコシル化されたヒト P1GF-1 又はグリコシル化されたヒト P1GF-1 断片を含み、特に、グリコシル化されたヒト P1GF-1 又はグリコシル化されたヒト P1GF-1 断片が配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 及び配列番号 8 からなる群から選択される。

【0031】

さらに、本開示は、検査試料中のヒト P1GF-1 を検出するためのアッセイにおいて使用するための検量物質又は対照を提供し、前記検量物質又は対照は脱グリコシル化されたヒト P1GF-1 を含み、特に、脱グリコシル化されたヒト P1GF-1 は配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39 及び配列番号 40 からなる群から選択される。

【0032】

この開示によって、野生型配列と比べて、配列番号 2 のアミノ酸残基 89 が平均約 100% グリコシル化されており、及び配列番号 2 の残基 21 が平均約 70% グリコシル化されている、単離された又は精製されたグリコシル化されたヒト P1GF-1 又はグリコシル化されたヒト P1GF-1 断片も提供される。

10

20

30

40

50

ルコサミン)₄ フコース又は(ガラクトース 1 - 4 N - アセチル - D - グルコサミン)
 (ガラクトース)₃ (マンノース)₃ (N - アセチル - D - グルコサミン)₅ フコース、
 (d) (N - アセチルノイラミン酸)₂ (ガラクトース)₃ (マンノース)₃ (N - アセチル - D - グルコサミン)₅ フコース、(e) (N - アセチルノイラミン酸)₃ (ガラクトース)₃ (マンノース)₃ (N - アセチル - D - グルコサミン)₅ フコース、(f) (N - アセチルノイラミン酸)₃ (ガラクトース 1 - 4 N - アセチル - D - グルコサミン)
 (ガラクトース)₃ (マンノース)₃ (N - アセチル - D - グルコサミン)₅ フコース
 又は(N - アセチルノイラミン酸)₃ (ガラクトース)₄ (マンノース)₃ (N - アセチル - D - グルコサミン)₆ フコース、(g) (N - アセチルノイラミン酸)₄ (ガラクトース)₄ (マンノース)₃ (N - アセチル - D - グルコサミン)₆ フコース及び(h) (N - アセチルノイラミン酸)₄ (ガラクトース 1 - 4 N - アセチル - D - グルコサミン)
 (ガラクトース)₄ (マンノース)₃ (N - アセチル - D - グルコサミン)₆ フコース
 からなる群から選択される構造を有する少なくとも1つのN - グリカンでグリコシル化されている、単離された又は精製されたヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片を提供する。

10

【0038】

さらに、検査試料中のヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片の存在を検出するための方法の改良が本開示によって提供される。このような改良された方法は、

(a) ヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片/抗体複合体の形成を可能とする時間及び条件下で、ヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片を含有すると疑われる検査試料をヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片に対して特異的な少なくとも1つの抗体と接触させること；及び

20

(b) ヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片の存在の指標として、形成された何れかの哺乳動物ヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片/抗体複合体を検出すること；

を含み、

前記改良は、検量物質又は対照として、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8からなる群から選択されるグリコシル化された又は脱グリコシル化されたヒトP1GF - 1又はグリコシル化されたヒトP1GF - 1断片を含む検量物質又は対照を使用することを含む。

30

【0039】

さらに、本開示は、

(a) ATCC受託番号PTA - 8536を有するマウスハイブリドーマ細胞株1 - 255 - 713によって産生される抗体及びATCC受託番号PTA - 8539を有するマウスハイブリドーマ細胞株2 - 826 - 335によって産生される抗体からなる群から選択される少なくとも1つの抗体；及び

(b) キットを使用するための指示書、

を含む、ヒトP1GF - 1又はヒトP1GF - 1断片を検出するための診断用キットに関する。

【0040】

一態様において、キットは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8からなる群から選択されるグリコシル化された又は脱グリコシル化されたヒトP1GF - 1又はグリコシル化されたヒトP1GF - 1断片を含む検量物質又は対照をさらに含む。

40

【0041】

別の態様において、

(a) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8からなる群から選択されるグリコシル化された又は脱グリコシル化されたヒトP1GF - 1又はグリコシル化されたヒトP1GF - 1断片を含む少なくとも1つの検量物質又は対照；並びに

50

(b) キットを使用するための指示書、を含む、ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片を検出するための診断用キットが本明細書において提供される。場合によって、キットは、A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 6 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 によって産生される抗体及び A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 9 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 2 - 8 2 6 - 3 3 5 によって産生される抗体からなる群から選択される少なくとも 1 つの抗体をさらに含む。

【 0 0 4 2 】

さらなる実施形態において、本開示は、

(a) A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 6 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 によって産生される抗体及び A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 9 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 2 - 8 2 6 - 3 3 5 によって産生される抗体からなる群から選択される少なくとも 1 つの抗体；

(b) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 及び配列番号 8 からなる群から選択されるグリコシル化された又は脱グリコシル化されたヒト P L G F - 1 又はグリコシル化されたヒト P L G F - 1 断片を含む少なくとも 1 つの検量物質又は対照；並びに

(c) キットを使用するための指示書、を含む、ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片を検出するための診断用キットを提供する。

【 0 0 4 3 】

さらに、本開示によって、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 30 及び配列番号 31 からなる群から選択される単離された又は精製されたポリヌクレオチドが本明細書において提供される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 4 】

【 図 1 】 図 1 は、ヒト P L G F - 1 に対するポリヌクレオチド配列（配列番号 22）を示す。抗体 軽鎖シグナル配列は斜字体で示されており、H i s タグに下線が付されている。

【 図 2 】 図 2 は、ベクター p J V - H i s - ヒト P L G F - 1（1 から 131）を示している。

【 図 3 】 図 3 は、実施例 2 に記載されている -メルカプトエタノール含有搭載緩衝液中で、還元条件下において、二量体 / 四量体の形態のヒト P L G F - 1 の単量体への転化を示すドデシル硫酸ナトリウム（S D S）ポリアクリルアミドゲル電気泳動（P A G E）である。レーン 1 は、タンパク質マーカーである。レーン 2 は、ブランクである。レーン 3 は、ヒト P L G F - 1 - H i s（1 - 131）、G P C G 3 0 0 0 であり、O D 2 8 0 による評価で 2 μ g。レーン 4 は、ヒト P L G F - 1 - H i s（1 - 131）、G P C S 1 0 0 であり、O D 2 8 0 による評価で 2 μ g。レーン 5 は、ヒト P L G F - 1 - H i s（R & D S y s t e m s , イー・コリ中で産生）であり、O D 2 8 0 による評価で 2 μ g。レーン 6 は、ヒト P L G F - 1 - H i s（1 - 131）、G P C G 3 0 0 0 であり、B r a d f o r d タンパク質アッセイによる測定で 2 μ g。レーン 7 は、ヒト P L G F - 1 - H i s（1 - 131）、G P C S 1 0 0 であり、B r a d f o r d タンパク質アッセイによる測定で 2 μ g。及び、レーン 8 は、ヒト P L G F - 1（R & D S y s t e m s , イー・コリ中で産生）であり、B r a d f o r d タンパク質アッセイによる測定で 2 μ g。

【 図 4 A 】 図 4 は、抗ヒト P L G F - 1 モノクローナル抗体（すなわち、モノクローナル抗体 1 - 2 5 5 - 7 1 3（255）又は 2 - 8 2 6 - 3 3 5（826）の何れか）が非還元形態の組み換えヒト P L G F - 1 抗原に結合することを示した実施例 2 に記載されているアッセイの結果を示すウェスタンブロットである。図 4 A 及び 4 B において、レーン 1

は、ヒトPLGF-1-His (R&D Systems, イー・コリ中で産生) であり、OD280により2 µg。レーン2は、ヒトPLGF-1-His (1-131)、GPCS100であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、非還元。レーン3は、ヒトPLGF-1-His (17-131)、GPCS300であり、OD280により約2 µg、非還元。レーン4は、ブランクである。レーン5は、ヒトPLGF-1-His (R&D Systems, イー・コリ中で産生) であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、還元。レーン6は、ヒトPLGF-1-His (1-131)、GPCS3000であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、還元。レーン7は、ヒトPLGF-1-His (17-131)、GPCS300であり、OD280により約2 µg、還元。及びレーン8は、タンパク質マーカーである。図4Cにおいて、レーン1は、タンパク質マーカーである。レーン2は、ヒトPLGF-1-His (7-131)、GPCS300であり、OD280により約2 µg、還元。レーン3は、ヒトPLGF-1-His (1-131)、GPCS3000であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、還元。レーン4は、ヒトPLGF-1-His (R&D Systems, イー・コリ中で産生)、GPCG3000であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、還元。レーン5は、ブランクである。レーン6は、ヒトPLGF-1-His (17-131)、GPCS300であり、OD280により約2 µg、非還元。レーン7は、ヒトPLGF-1-His (1-131)、GPCS100であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、非還元。レーン8は、ヒトPLGF-1-His (1-131)、GPCS100であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、非還元。

10

20

【図4B】図4は、抗ヒトPLGF-1モノクローナル抗体(すなわち、モノクローナル抗体1-255-713(255)又は2-826-335(826)の何れか)が非還元形態の組み換えヒトPLGF-1抗原に結合することを示した実施例2に記載されているアッセイの結果を示すウェスタンブロットである。図4A及び4Bにおいて、レーン1は、ヒトPLGF-1-His (R&D Systems, イー・コリ中で産生) であり、OD280により2 µg。レーン2は、ヒトPLGF-1-His (1-131)、GPCS100であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、非還元。レーン3は、ヒトPLGF-1-His (17-131)、GPCS300であり、OD280により約2 µg、非還元。レーン4は、ブランクである。レーン5は、ヒトPLGF-1-His (R&D Systems, イー・コリ中で産生) であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、還元。レーン6は、ヒトPLGF-1-His (1-131)、GPCS3000であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、還元。レーン7は、ヒトPLGF-1-His (17-131)、GPCS300であり、OD280により約2 µg、還元。及びレーン8は、タンパク質マーカーである。図4Cにおいて、レーン1は、タンパク質マーカーである。レーン2は、ヒトPLGF-1-His (7-131)、GPCS300であり、OD280により約2 µg、還元。レーン3は、ヒトPLGF-1-His (1-131)、GPCS3000であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、還元。レーン4は、ヒトPLGF-1-His (R&D Systems, イー・コリ中で産生)、GPCG3000であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、還元。レーン5は、ブランクである。レーン6は、ヒトPLGF-1-His (17-131)、GPCS300であり、OD280により約2 µg、非還元。レーン7は、ヒトPLGF-1-His (1-131)、GPCS100であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、非還元。レーン8は、ヒトPLGF-1-His (1-131)、GPCS100であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 µg、非還元。

30

40

【図4C】図4は、抗ヒトPLGF-1モノクローナル抗体(すなわち、モノクローナル抗体1-255-713(255)又は2-826-335(826)の何れか)が非還

50

元形態の組み換えヒトP1GF-1抗原に結合することを示した実施例2に記載されているアッセイの結果を示すウェスタンブロットである。図4A及び4Bにおいて、レーン1は、ヒトP1GF-1-His (R&D Systems, イー・コリ中で産生) であり、OD280により2 μ g。レーン2は、ヒトP1GF-1-His (1-131)、GPCS100であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 μ g、非還元。レーン3は、ヒトP1GF-1-His (17-131)、GPCS300であり、OD280により約2 μ g、非還元。レーン4は、ブランクである。レーン5は、ヒトP1GF-1-His (R&D Systems, イー・コリ中で産生) であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 μ g、還元。レーン6は、ヒトP1GF-1-His (1-131)、GPCS3000であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 μ g、還元。レーン7は、ヒトP1GF-1-His (17-131)、GPCS300であり、OD280により約2 μ g、還元。及びレーン8は、タンパク質マーカである。図4Cにおいて、レーン1は、タンパク質マーカである。レーン2は、ヒトP1GF-1-His (7-131)、GPCS300であり、OD280により約2 μ g、還元。レーン3は、ヒトP1GF-1-His (1-131)、GPCS3000であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 μ g、還元。レーン4は、ヒトP1GF-1-His (R&D Systems, イー・コリ中で産生)、GPCG3000であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 μ g、還元。レーン5は、ブランクである。レーン6は、ヒトP1GF-1-His (17-131)、GPCS300であり、OD280により約2 μ g、非還元。レーン7は、ヒトP1GF-1-His (1-131)、GPCS100であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 μ g、非還元。レーン8は、ヒトP1GF-1-His (1-131)、GPCS100であり、Bradfordタンパク質アッセイによる測定で2 μ g、非還元。

10

20

【図5】図5は、ESI-MSを用いたヒトP1GF-1のグリコシル化分析、具体的には、脱グリコシル化されたヒトP1GF-1の分子量を示している。分子量15646が、最も量が多いピークであった。上のパネルの横軸：質量対電荷比(「m/z」)、原子質量単位(「amu」)。下のパネルの横軸：分子量(「質量」)、原子質量単位(「amu」)。

【図6】図6は、ヒトP1GF-1断片に対するポリヌクレオチド配列(配列番号23)を示す。抗体 軽鎖シグナル配列は斜字体で示されており、Hisタグに下線が付されている。

30

【図7】図7は、ベクターpJV-His-ヒトP1GF-1(17-131)を示している。

【図8】図8は、実施例4に記載されているように、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞によって産生された二量体の形態のヒトP1GF-1断片(17-131)の遊走を示すSDS-PAGEゲル電気泳動である。レーン1は、タンパク質マーカである。レーン2は、ブランクである。レーン3は、ヒトP1GF-1断片(17-131)6 μ g、非還元である。レーン4は、ヒトP1GF-1断片(17-131)2 μ g、非還元である。

40

【図9】図9は、ヒトP1GF-1に対するポリヌクレオチド配列(配列番号26)を示す。抗体 軽鎖シグナル配列は斜字体で示されており、Hisタグには下線が付されており、エンテロキナーゼ切断部位(DDDDK)が太字で示されている。

【図10】図10は、ベクターpJV-His-ヒトP1GF-1(1-131)を示している。

【図11】図11は、実施例6に記載されているように、組み換えヒトP1GF-1(1-131)エンテロキナーゼ抗原の遊走を示すSDS-PAGEゲル電気泳動である。レーン1は、タンパク質マーカである。レーン2は、室温での、ヒトP1GF-1-EK40 μ L+Invitrogenエンテロキナーゼの3Uである。レーン3は、室温での、ヒトP1GF-1-EK40 μ L+Invitrogenエンテロキナーゼの0.5U

50

である。レーン4は、室温での、ヒトP1GF-1-EK40 μ L+Invitrogenエンテロキナーゼの0.05Uである。レーン6は、室温での、エンテロキナーゼ対照なしのヒトP1GF-1-EK40 μ Lである。レーン7は、室温での、ヒトP1GF-1-EK40 μ L+Novagenエンテロキナーゼの2Uである。レーン8は、室温での、ヒトP1GF-1-EK40 μ L+Novagenエンテロキナーゼの0.2Uである。及びレーン9は、4'での、エンテロキナーゼ対照なしのヒトP1GF-1-EK40 μ Lである。

【図12】図12は、上の配列において、モノクローナル抗体1-255-713に対する可変軽鎖ポリヌクレオチド配列（配列番号27及び28）を示している。下の配列は、上の配列の相補物を含有し、3'から5'の方向に示されている。

10

【図13】図13は、モノクローナル抗体1-255-713の軽鎖に対するアミノ酸配列を示し、相補性決定領域（CDR）1、2及び3は斜字体で、下線が付されている（配列番号29）。

【図14】図14は、上の配列において、モノクローナル抗体1-255-713に対する可変重鎖ポリヌクレオチド配列（配列番号30及び31）を示している。下の配列は、上の配列の相補物を含有し、3'から5'の方向に示されている。

【図15】図15は、モノクローナル抗体1-255-713の重鎖に対するアミノ酸配列を示し、CDR1、2及び3は斜字体で、下線が付されている（配列番号32）。

【図16】図16は、上の配列において、モノクローナル抗体2-826-335に対する可変軽鎖ポリヌクレオチド配列（配列番号41及び42）を示している。下の配列は、上の配列の相補物を含有し、3'から5'の方向に示されている。

20

【図17】図17は、モノクローナル抗体2-826-335の軽鎖に対するアミノ酸配列を示し、CDR1、2及び3は斜字体で、下線が付されている（配列番号43）。

【図18】図18は、上の配列において、モノクローナル抗体2-826-335に対する可変重鎖ポリヌクレオチド配列（配列番号33及び34）を示している。下の配列は、上の配列の相補物を含有し、3'から5'の方向に示されている。

【図19】図19は、モノクローナル抗体2-826-335の重鎖に対するアミノ酸配列を示し、CDR1、2及び3は斜字体で、下線が付されている（配列番号35）。

【図20】図20は、トリプシン消化され、及び脱グリコシル化されたヒトP1GF-1（配列番号40）を示す。アミノ酸位置21で、脱グリコシル化の後に、アスパラギン（N）は、アスパラギン酸（D）（斜字体及び太字で示されている。）に転化された。89位において、アスパラギン（N）とアスパラギン酸の両方が検出された（太字でのみ示されている。）。

30

【図21】図21は、実施例2においてさらに記載されているように、ヒトP1GF-1N-グリカン1-8のLC/MS分析の抽出されたイオンクロマトグラムを示している。

【図22】図22は、実施例15に記載されているように、典型的なP1GF-1イムノアッセイフォーマットに対する、P1GF濃度対妊娠期間のプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0045】

(詳細な記述)

40

本開示は、ヒトP1GF-1タンパク質（すなわち、グリコシル化された及び脱グリコシル化されたヒトP1GF-1タンパク質）及びある種のヒトP1GF-1タンパク質に結合する抗体に関する。ヒトP1GF-1タンパク質単独又はヒトP1GF-1タンパク質に対して誘導された抗体と組み合わせたヒトP1GF-1タンパク質は、様々な用途（例えば、診断用アッセイの成分として、又はイムノアッセイキット中に存在して、又は改善されたイムノアッセイにおける抗体を作製するための免疫原として）を有する。

【0046】

A. 定義

本明細書において使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈上明確に別段の記載がなければ、複数表記を包含する。本明細書の数的範囲の表記に関して

50

、同じ精度を有するその間に介在するそれぞれの数字が明示的に意図される。例えば、6から9の範囲に関しては、6及び9の他に、数字7及び8が意図され、6.0から7.0の範囲に関しては、数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9及び7.0が明示的に意図される。

【0047】

a) 抗体

本明細書において使用される「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体（完全に又は部分的にヒト化）、動物抗体（一態様において、トリ（例えば、アヒル又はガチョウ）、別の態様において、サメ又はクジラ、さらに別の態様において、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウスなど）及び非ヒト霊長類（サル、例えば、カニクイザル、チンパンジーなど）を含む哺乳動物）、組み換え抗体、キメラ抗体、一本鎖Fv (scFv)、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合されたFv (sdFv) 及び抗イディオタイプ（抗Id）抗体（例えば、本開示の抗体に対する抗Id抗体を含む。）及び上記の何れかの機能的に活性なエピトープ結合断片を表す。特に、抗体には、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片（すなわち、抗原結合部位を含有する分子）が含まれる。免疫グロブリン分子は、あらゆる種類（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、クラス（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂）、サブクラス、これらの断片又は誘導体のものであり得る。単純化のために、分析物に対する抗体は、「抗分析物抗体」又は単に「分析物抗体」（例えば、ヒトPLGF-1抗体）としばしば称される。抗体は、本分野において公知の1つ又はそれ以上の化学的、ペプチド又はポリペプチド部分の付着によって誘導化され得る。抗体は、化学的部分と連結させ得る。

【0048】

b) 結合定数（例えば、K_D、k_a及びk_d）

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

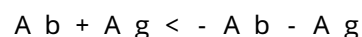
【0049】

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



【0050】

本明細書において互換的に使用される「解離速度定数」、「k_{off}」又は「k_d」という用語は、以下の式によって示される、その標的抗原からの抗体の解離速度又は遊離の抗体と抗原への経時的なAb-Ag複合体の分離を示す値を表す。



【0051】

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

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

c) 心血管疾患

本明細書において使用される「心血管疾患」という用語は、心臓、血管又は循環を含む様々な臨床的疾患、疾患又は症状を表す。疾病、疾患又は症状は、冠動脈、脳又は末梢動脈のアテローム性動脈硬化性の障害によるものであり得る。心血管疾患には、冠動脈疾患、末梢血管疾患、高血圧、心筋梗塞、心不全などが含まれるが、これらに限定されない。例えば、心不全において、心血管疾患の「増加された重度」は、例えば、クラスⅢ又はクラスⅣへの増加したNYHA分類によって表される疾病の悪化を表し、心血管疾患の「低下した重度」とは、例えば、クラスⅢ又はⅣからクラスⅡ又はⅠへの低下したNYHA分類によって表される疾病の改善を表す。

10

【 0 0 5 3 】

d) グリコシル化されたヒトPLGF-1又はグリコシル化されたヒトPLGF-1断片

本明細書において使用される、本明細書において互換的に使用される「オリゴ糖部分」又は「オリゴ糖分子」という用語は、インビボ又はインビトロでのグリコシル化によって、(例えば、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片などのグリコシル化されたポリペプチドを産生するために)ポリペプチドに付着され得る、1つ又はそれ以上の単糖残基を含む炭水化物含有分子を表す。ポリペプチドに付着されているオリゴ糖部分の数が明示的に示されている場合を除いて、「本明細書において引用されている「オリゴ糖部分」という全ての表記は、ポリペプチドに付着された1つ又はそれ以上のこのような部分を表すものとする。好ましくは、前記炭水化物分子が付着され得るポリペプチドは、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片であり、すなわち、本明細書中でさらに記載されているような「グリコシル化されたヒトPLGF-1」又は「グリコシル化されたヒトPLGF-1断片」を与える。

20

【 0 0 5 4 】

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

30

【 0 0 5 5 】

「インビトログリコシル化」という用語は、場合によって架橋剤を用いて、ポリペプチドの付着基へオリゴ糖部分を共有結合することを通常含む、インビトロで行われる合成的グリコシル化を表す。インビトログリコシル化は、様々な異なる化学を用いて、ポリペプチド(例えば、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片など)への化学的に合成されたオリゴ糖構造を付着させることによって達成することができる。例えば、使用することができる化学は、場合によって短いスペーサーを介して、オリゴ糖が官能基に連結される、タンパク質へポリエチレングリコール(PEG)を付着させるために使用される化学である。インビトログリコシル化は、約0.02から約2.0mLの容量で、約0.5から約2.0mg/mLのタンパク質濃度で、約4.0から約7.0のpHで、適切な緩衝液中で実施することができる。他のインビトログリコシル化法は、例えば、Aplin他によるWO87/05330、Lundblad他による、Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc., Boca Raton, Fla中のCRC Crit. Rev. Biochem. 259-306(1981)、Yan et al., Biochemistry, 23:3759-3765(1982)及びDoebber et al., J. Biol. Chem., 257:2193-2199(1982)に記載されている。

40

【 0 0 5 6 】

50

e) 心不全

本明細書において使用される「心不全」という用語は、心臓が身体の残部に効率的に血液を拍出することができない症状を表す。心不全は、心臓に対する損傷又は梗塞、心筋症（原発性又は続発性）、高血圧、冠動脈疾病、弁の疾患、出生異常若しくは感染による動脈の狭窄によるものであり得る。さらに、心不全は、慢性、うつ血性、急性、非代償性、心臓収縮性又は心臓拡張性として記載することができる。ニューヨーク心臓協会（NYHA）分類は、患者の機能的な能力に基づいて疾病の重度を記載している。NYHAクラスは、治療又は治療に対する応答の欠如に基づいて、進行し及び/又は退行し得る。

【0057】

f) ヒトP1GF-1断片

本明細書において使用される「ヒトP1GF-1断片」という用語は、ヒトP1GF-1の全体（131アミノ酸、成熟タンパク質と称される場合がある。）又はシグナルペプチドを含むP1GF-1（149アミノ酸、非成熟タンパク質と称される場合がある。）より少ない（すなわち、非完全長）部分を含むポリペプチドを表す。特に、ヒトP1GF-1断片は、配列番号1、2、3又は4の約5から約130の連続するアミノ酸を含む。特に、ヒトP1GF-1断片は、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約5の連続するアミノ酸、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約10の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4のアミノ酸の少なくとも約15の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約20の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約25の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約30の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約35の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約40の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約45の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約50の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約55の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約60の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約65の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約70の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約75の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約80の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約85の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約90の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約95の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約100の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約105の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約110の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約115の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約120の連続するアミノ酸残基、配列番号1、2、3若しくは4の少なくとも約125の連続するアミノ酸残基又は配列番号1、2、3若しくは4の130の連続するアミノ酸残基を含む。

【0058】

本開示によって想定されるヒトP1GF-1断片の例には、

(a) 配列番号5に示されているアミノ酸配列を有する少なくとも約115の連続するアミノ酸のヒトP1GF-1断片；

(b) 配列番号6に示されているアミノ酸配列を有する少なくとも約121の連続するアミノ酸のヒトP1GF-1断片（配列番号5と同一であるが、連結配列、具体的には、Hisタグ（HHHHHH（配列番号17）を含む。））；

(c) 配列番号7に示されているアミノ酸配列を有する少なくとも約122の連続するアミノ酸のヒトP1GF-1断片（配列番号5と同一であるが、連結配列、具体的には、エンテロキナーゼ切断部位（DDDDK（配列番号18）を含む。））；並びに

(d) 配列番号7に示されているアミノ酸配列を有する少なくとも約128の連続する

10

20

30

40

50

アミノ酸のヒト P L G F - 1 断片（配列番号 8 は、配列番号 5 と同一であるが、2 つの連結配列、具体的には、H i s タグ（H H H H H H（配列番号 1 7）及びエンテロキナーゼ切断部位（D D D D K）（配列番号 1 8）を含む。）；

が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 9 】

g) ヒト P L G F - 1 ポリヌクレオチド

本明細書において使用される「ヒト P L G F - 1 ポリヌクレオチド」という用語は、ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片をコードするポリヌクレオチドを表す。ヒト P L G F - 1 ポリヌクレオチドは、単離され、精製され、又は単離及び精製されることができ、本開示のヒト P L G F - 1 ポリヌクレオチドは、RNA 又は DNA（例えば、c D N A、ゲノム DNA 又は合成 DNA）の何れでもあり得る。DNA は、二本鎖又は一本鎖の何れかであり、一本鎖の場合には、コード鎖又は非コード鎖（アンチセンス）鎖の何れかである。

【 0 0 6 0 】

本開示の典型的なヒト P L G F - 1 ポリヌクレオチドは、(a) 配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 2 2、配列番号 2 3 又は配列番号 2 6 及び (b) 配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 2 2、配列番号 2 3 又は配列番号 2 6 の完全な配列と少なくとも約 8 0 %、約 8 1 %、約 8 2 %、約 8 3 %、約 8 4 %、約 8 5 %、約 8 6 %、約 8 7 %、約 8 8 %、約 8 9 %、約 9 0 %、約 9 1 %、約 9 2 %、約 9 3 %、約 9 4 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 % 又は約 9 9 % 同一であるポリヌクレオチド配列を含む又はこれらからなる単離された、精製された又は単離及び精製されたヒト P L G F - 1 ポリヌクレオチドである。配列番号 9 は、配列番号 1 の完全長ヒト P L G F - 1 配列のポリヌクレオチド配列である。配列番号 1 0 は、H i s タグを含有する配列番号 2 の完全長ヒト P L G F - 1 配列のポリヌクレオチド配列である。配列番号 1 1 は、エンテロキナーゼ切断部位を含有する配列番号 3 の完全長ヒト P L G F - 1 配列のポリヌクレオチド配列である。配列番号 1 2 は、H i s タグ及びエンテロキナーゼ切断部位を含有する配列番号 4 の完全長ヒト P L G F - 1 配列のポリヌクレオチド配列である。配列番号 1 3 は、配列番号 5 の配列を有するヒト P L G F - 1 断片のポリヌクレオチド配列である。配列番号 1 4 は、H i s タグを含有する、配列番号 6 の配列を有するヒト P L G F - 1 断片のポリヌクレオチド配列である。配列番号 1 5 は、エンテロキナーゼ切断部位を含有する、配列番号 7 の配列を有するヒト P L G F - 1 断片のポリヌクレオチド配列である。配列番号 1 6 は、H i s タグ及びエンテロキナーゼ切断部位を含有する、配列番号 8 の配列を有するヒト P L G F - 1 断片のポリヌクレオチド配列である。配列番号 2 2 は、H i s タグ及び抗体 軽鎖シグナル配列を含有する、配列番号 2 の完全長ヒト P L G F - 1 配列のポリヌクレオチド配列である。配列番号 2 3 は、H i s タグ及び抗体 軽鎖シグナル配列を含有する、配列番号 6 の完全長ヒト P L G F - 1 配列のポリヌクレオチド配列である。配列番号 2 6 は、H i s タグ、エンテロキナーゼ切断部位及び抗体 軽鎖シグナル配列を含有する、配列番号 8 のポリヌクレオチド配列である。

【 0 0 6 1 】

h) ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 ポリペプチド

本明細書において互換的に使用される「ヒト P L G F - 1」又は「ヒト P L G F - 1 ポリペプチド」という用語は、シグナルペプチドあり又はなしの、あらゆる完全長（すなわち、その断片でない。）ヒト P L G F - 1 配列を表す。例えば、完全長ヒト P L G F - 1 は、システインノット構造を形成する 8 つの保存されたシステイン残基を有する中心に配置された P D G F 様ドメインを有する 1 8 アミノ酸のシグナル配列を有する 1 4 9 アミノ酸の非成熟ポリペプチドであり得る。あるいは、ヒト P L G F - 1 は、1 8 アミノ酸シグナル配列を含有しない 1 3 1 アミノ酸の成熟ポリペプチドであり得る（配列番号 1 に示されているものなど）。P L G F は、少なくとも 4 つの選択的にスプライシングされた形態

(P 1 G F - 1、P 1 G F - 2、P 1 G F - 3及びP 1 G F - 4) で存在し得る。P 1 G F - 2及びP 1 G F - 4は、P 1 G F - 2及びP 1 G F - 4中へヘパリン結合ドメインが挿入されている(細胞膜との増加した会合又はP 1 G F受容体に対する変化した親和性をもたらし得る。)点で、他の形態と異なり得る。ヒトP 1 G F - 1ポリヌクレオチド及びポリペプチド(例えば、ポリアミノ酸)配列は、天然に見出される配列を基本とすると、天然に見出されるとおりであり、単離され、合成、半合成、組み換え又はその他であり得る。

【 0 0 6 2 】

従って、本明細書中の開示は、原核生物及び/又は真核生物のバックグラウンド(例えば、その結果、コドン認識に対して最適化されている。)中に存在し及び/又は産生される多数の異なるヒトP 1 G F - 1ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列を包含する。まとめると、ヒトP 1 G F - 1ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列は、(a) 1つ又はそれ以上のシグナル配列(例えば、シグナルペプチド); (b) 1つ又はそれ以上の連結配列; 及び(c) 等業者に自明である他の変形を含んでもよく、又は含まなくてもよい。

【 0 0 6 3 】

典型的な配列には、本明細書中に記載されているもの、すなわち、(a) 配列番号 1 (1 3 1 アミノ酸を含み、及びシグナル配列又は一切の連結配列を含有しないヒトP 1 G F - 1である。)、配列番号 2 (配列番号 2 は、連結配列、具体的には、His タグ (H H H H H (配列番号 1 7)) を含むことを除き、配列番号 1 と同じである。)、配列番号 3 (配列番号 3 は、連結配列、具体的には、エンテロキナーゼ切断部位 (D D D D K (配列番号 1 8)) を含むことを除き、配列番号 1 と同じである。) 又は配列番号 4 (配列番号 4 は、2つの連結配列、具体的には、His タグ (H H H H H H (配列番号 1 7)) 及びエンテロキナーゼ切断部位 (D D D D K (配列番号 1 8)) を含むことを除き、配列番号 1 と同じである。)、及び(b) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 又は配列番号 4 の完全な配列と少なくとも約 8 0 %、約 8 1 %、約 8 2 %、約 8 3 %、約 8 4 %、約 8 5 %、約 8 6 %、約 8 7 %、約 8 8 %、約 8 9 %、約 9 0 %、約 9 1 %、約 9 2 %、約 9 3 %、約 9 4 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、約 9 9 % 同一であるポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 4 】

i) 妊娠性高血圧性疾患

本明細書において、「妊娠性高血圧性疾患 (H D P ; h y p e r t e n s i v e d i s o r d e r o f p r e g n a n c y) 」は、「National Heart, Lung and Blood Institute (N H L B I) (R o b e r t s , e t a l . (2 0 0 3) H y p e r t e n s i o n 4 1 (3) : 4 3 7 - 4 5 参照) によって定義された文脈で使用される。NHLBIは、HDPを4つのカテゴリーに分類する。

【 0 0 6 5 】

- 子癇前症 (P E) : 妊娠 2 0 週より後で、血圧 (B P) $\geq 1 4 0 / 9 0$; $> 3 0 0$ m g / 2 4 時間タンパク尿として定義される。

【 0 0 6 6 】

- 慢性高血圧 (C H T N) : 妊娠前又は妊娠 2 0 週より前で、B P $\geq 1 4 0 / 9 0$ として定義される。

【 0 0 6 7 】

- 慢性高血圧との混合型子癇前症 (P E + C H T N) : 妊娠 2 0 週より後に既存の慢性高血圧症を有する女性における、新たに増加したタンパク尿の発生として定義される。

【 0 0 6 8 】

- 妊娠性高血圧 (G H) : 2 0 週より後にタンパク尿がない高血圧として定義される。

【 0 0 6 9 】

これらの測定を所定の値と比較することによって、例えば、子癇前症と慢性高血圧を区別するために、患者の高血圧状態を決定することが可能になる。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 0 】

j) 高血圧状態

本明細書において使用される「高血圧状態」という用語は、高血圧性疾患（例えば、慢性高血圧、妊娠に関連する高血圧性疾患（HDP）又は抗血管新生薬物治療に関連する高血圧性疾患）の存在又は不存在に関する対象の状態を表す。

【 0 0 7 1 】

k) 同一の

2つ又はそれ以上のポリペプチド又はポリヌクレオチド配列に関して本明細書において使用される「同一の」又は「同一性」とは、当該配列が同一である残基の指定されたパーセントを指定された領域上に有することを意味し得る。パーセントは、2つの配列を最適に並置し、指定された領域にわたって2つの配列を比較し、両配列中に同一の残基が存在する位置の数を求めて、合致した位置の数を与え、指定された領域中の位置の総数で合致した位置の数を除し、結果に100を乗じて、配列同一性のパーセントを得ることによって計算され得る。2つの配列が異なる長さであり又は並置が1つ又はそれ以上のずれた末端をもたらす、指定された比較の領域が単一の配列のみを含む場合には、単一の配列の残基は計算の分母に含まれるが、分子には含まれない。

【 0 0 7 2 】

l) 免疫診断試薬

本開示に係る「免疫診断試薬」は、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片の領域に特異的に結合する1つ又はそれ以上の抗体を含む。例えば、免疫アッセイにおける並びに/又は検量物質、対照及び免疫診断剤としての本開示のこのような抗体の使用が、本明細書に記載されている。しかしながら、本発明の抗体は、本明細書に記載されているような改善されたヒトPLGF-1アッセイにおいても、場合によって使用することができる。

【 0 0 7 3 】

m) 連結配列

本明細書において使用される「連結配列」という用語は、目的の1つ又はそれ以上のポリペプチド配列（例えば、完全長、断片など）に接続されている天然の又は人工のポリペプチド配列を表す。「接続する」という用語は、目的のポリペプチド配列への連結配列の連結を表す。このようなポリペプチド配列は、好ましくは、1つ又はそれ以上のペプチド結合によって連結される。

【 0 0 7 4 】

連結配列は、約4から約50アミノ酸の長さを有し得る。好ましくは、連結配列の長さは、約6から約30アミノ酸である。天然の連結配列は、人工の連結配列を作製するために、アミノ酸置換、付加又は欠失によって修飾され得る。

【 0 0 7 5 】

典型的な連結配列には、以下のものが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 6 】

(a) HHHHHH（配列番号17）のアミノ酸配列を有する6×Hisタグなどのヒスチジン（His）タグ。ヒスチジンタグは、目的のポリペプチド及び抗体の単離及び精製を容易にするための連結配列として有用である。

【 0 0 7 7 】

(b) エンテロキナーゼ切断部位。エンテロキナーゼ切断部位は、Hisタグと同様、目的のポリペプチド及び抗体の単離及び精製において使用される。しばしば、エンテロキナーゼ切断部位は、目的のポリペプチド及び抗体の単離及び精製において、Hisタグとともに使用される。様々なエンテロキナーゼ切断部位が本分野において公知である。エンテロキナーゼ切断部位の例には、DDDDK（配列番号18）のアミノ酸配列及びその誘導体（例えば、ADDDDKなど）が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 8 】

(c) 分類不能の配列。このような配列には、一本鎖可変領域断片の軽及び/又は重鎖

10

20

30

40

50

可変領域を連結又は接続するために使用することができるアミノ酸配列GPAKELTPLLKEAKVS（配列番号19）などの連結配列が含まれる。使用することができる他の連結配列の例は、「Bird et al., Science, 242:423-426(1988)」、「Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883(1988)」及び「McCafferty et al., Nature, 348:552-554(1990)」に見出すことができる。連結配列は、さらなる機能（薬物の付着又は固体支持体への付着など）のために修飾することも可能である。

【0079】

本開示において、目的のポリペプチド（例えば、ヒトPLGF-1ポリペプチドのグリコシル化された及び脱グリコシル化された完全長及び断片形態）及び抗体は、1つ又はそれ以上の連結配列を含有し得る。例えば、本開示のポリペプチド及び抗体は、Hisタグ、エンテロキナーゼ切断部位又はHisタグ及びエンテロキナーゼ切断部位の両方を含有し得る。

10

【0080】

n) 平均

本明細書において使用される「平均」という用語は、検討又は調査されている値の群の典型的な例を代表する単一の値を表す。

【0081】

o) PLGF-1ハイブリッド

20

本明細書において使用される「PLGF-1ハイブリッド」又は「PLGF-1ハイブリドーマ」という用語は、目的の抗PLGF-1抗体を産生する（明記されているとおりの）特定のハイブリドーマクローン又はサブクローンを表す。一般に、同じ種類のサブクローンから得られた抗体と比べて、ハイブリドーマクローンによって産生される抗体の親和性には、幾らかの小さな変動が存在し得る（例えば、クローンの純度を反映する。）。比較すると、同じクローンに由来し、さらに、目的の抗PLGF-1抗体を産生する全てのハイブリドーマサブクローンは、同じ配列及び/又は同じ構造の抗体を産生することが十分に確立されている。

【0082】

p) 子癇前症

30

本明細書において使用される「子癇前症」という用語は、妊娠中に観察される多臓器疾患（タンパク尿及び/又は子癇前症の他の症候（以下参照）の開始に伴う又は開始前の高血圧によって特徴付けられる。）及び抗血管新生治療（例えば、化学療法）に関連する「子癇前症様症候群」（PLS）の両方を表す。「子癇前症」という用語は、「子癇前症/子癇」のNHLBIDP表記並びに軽度、中度及び重度の子癇前症を含む本疾患の様々な臨床形態を包含する。「子癇前症」は、溶血、上昇した肝臓酵素レベル及び低い血小板数を伴う重度の子癇前症の変形物であるHELLP症候群も含む。

【0083】

「子癇前症様症候群（PLS）」という用語は、タンパク尿及び子癇前症の潜在的な他の症候（以下参照）を伴う又は伴わない高血圧の新たな開始によって特徴付けられる、抗血管新生治療（例えば、化学療法）の間に観察される多系疾患を表す。

40

【0084】

「子癇前症の症候」という用語は、高血圧（妊娠20週後での、140mmHg超の収縮期血圧（BP）及び90mmHg超の拡張期BP）；新しいタンパク尿の開始（尿分析用の試験紙によって1+、24時間の尿収集中にタンパク質300mg超又は0.3を超える無作為尿タンパク/クレアチニン比）及び出産後26週までに、又は抗血管新生治療の中止に際して、高血圧とタンパク尿が分離するなど、患者の身体的及び分析的な所見及び病状の両方を表す。子癇前症の症候には、腎機能不全、糸球体内皮症、浮腫、神経障害、凝固障害及び/又は疲労も含まれ得る。

【0085】

50

q) 前処理試薬 (例えば、溶解、沈殿及び/又は可溶化試薬)

本明細書に記載されているような診断アッセイにおいて使用される前処理試薬は、検査試料中に存在する何れかの細胞を溶解する試薬及び/又は何れかの分析物を可溶化する試薬を表す。本明細書中にさらに記載されているように、前処理は全ての試料に対して必要なわけではない。とりわけ、分析物(すなわち、ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片)の可溶化には、試料に存在するあらゆる内在性結合タンパク質から分析物を放出させることを含む。前処理試薬は、均質(分離工程を必要としない。)又は不均質(分離工程を必要とする。)であり得る。不均質な前処理試薬を用いる場合、アッセイの次の工程に進む前に、検査試料からの沈殿したあらゆる分析物結合タンパク質の除去が存在する。前処理試薬は、(a) 1つ若しくはそれ以上の溶媒及び塩、(b) 1つ若しくはそれ以上の溶媒、塩及び変性剤、(c) 変性剤、(d) 変性剤及び塩又は(e) 細胞溶解及び/若しくは分析物の可溶化に適したあらゆる試薬若しくは試薬の組み合わせを場合によって含むことができる。

10

【0086】

r) 固相

本明細書において使用される「固相」は、不溶性である又はその後の反応によって不溶性にされ得るあらゆる物質を表す。固相は、捕捉剤を惹き付け及び固定化するその固有の能力のために選択され得る。あるいは、固相は、固相に付着された、捕捉剤を惹き付け及び固定化する能力を有する連結剤を有することができる。連結剤には、例えば、捕捉剤自体と反対に帯電した帯電物質又は捕捉剤に連結された帯電物質と反対に帯電した帯電物質が含まれ得る。一般に、連結剤は、固相上に固定化されており(付着されており)、及び結合反応を通じて、捕捉剤を固定化する能力を有するあらゆる結合対(好ましくは、特異的な)であり得る。連結剤は、アッセイの実行前に又はアッセイの実行の間に、捕捉剤の固相材料への間接的な結合を可能にする。例えば、固相は、例えば、試験管、マイクロタイターのウェル、シート、ビーズ、微粒子、チップ及び当業者に公知の他の構成などの、プラスチック、誘導化されたプラスチック、磁性又は非磁性金属、ガラス又はシリコンであり得る。

20

【0087】

s) 実質的に同一の

本明細書において使用される「実質的に同一の」とは、約8から約100又はそれ以上の残基(特に、約8から約100残基内のあらゆる範囲を含む。)の領域にわたって、第一及び第二の配列が少なくとも約50%から約99%同一であることを意味し得る。

30

【0088】

t) バリエーション

本明細書において使用される「バリエーション」は、アミノ酸の挿入、欠失又は保存的置換によって、アミノ酸配列が異なるが、少なくとも1つの生物活性を保持しているペプチド又はポリペプチドを意味し得る。本開示において、「生物活性」には、特異的抗体によって結合される能力が含まれる。アミノ酸の保存的置換(すなわち、あるアミノ酸を類似の特性(例えば、親水性、帯電した領域の程度及び分布)の異なるアミノ酸で置換すること)は、本分野において、典型的には僅かな変化を伴うものと認識されている。これらの僅かな変化は、本分野において理解されるように、1つには、アミノ酸のハイドロパチー指数を検討することによって同定することができる。K y t e e t a l . , J . M o l . B i o l . 1 5 7 : 1 0 5 - 1 3 2 (1 9 8 2) . アミノ酸のハイドロパチー指数は、アミノ酸の疎水性と電荷の検討に基づいている。類似のハイドロパチー指数のアミノ酸は置換すること可能であり、なおタンパク質を保持し得ることが本分野において知られている。一態様において、 ± 2 のハイドロパチー指数を有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性は、生物学的機能を保持するタンパク質をもたらす置換を明らかにするために使用することもできる。ペプチドに関してアミノ酸の親水性を検討することによって、そのペプチドの最大局所平均親水性(抗原性及び免疫原性とよく相関すると報告されている有用な指標)の計算が可能となる。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4

40

50

、554,101号。類似の親水性値を有するアミノ酸の置換は、本分野において理解されているように、生物学的活性、例えば、免疫原性を保持するペプチドをもたらす得る。一態様において、互いの±2内の親水性値を有するアミノ酸を用いて置換が行われる。アミノ酸の疎水性指数及び親水性値は何れも、そのアミノ酸の具体的な側鎖によって影響を受ける。その観察と合致して、生物学的機能と適合するアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、サイズ及び他の特性によって明らかとされるように、アミノ酸（特に、アミノ酸の側鎖）の相対的類似性に依存すると理解されている。

【0089】

バリエーションは、(i)約8から約100若しくはそれ以上の（特に、約8から約100残基内のあらゆる範囲を含む。）アミノ酸であり得る被参照タンパク質の一部又は(ii)被参照タンパク質と実質的に同一であるタンパク質であるタンパク質も表し得る。バリエーションは、タンパク質分解、リン酸化又は他の翻訳後修飾などによって、異なってプロセッシングされたタンパク質でもあり得る。

10

【0090】

u) 対象

本明細書において使用される「対象」及び「患者」という用語は、その対象が治療の何れかの形態を受けた又は現在受けているかどうかとは無関係に、互換的に使用される。本明細書において使用される「対象」という用語は、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット及びマウス）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル、チンパンジーなどのサル）及びヒトを含む哺乳動物を表す。好ましくは、対象はヒトである。

20

【0091】

v) 検査試料

本明細書において使用される「検査試料」という用語は、ヒトPLGF-1若しくはヒトPLGF-1断片などの目的の分析物に関して検査されている及び/又は目的の分析物を含有すると疑われている生物学的材料を全般的に表す。検査試料は、全血、血清、血漿、間質液、唾液、眼のレンズ液、脳脊髄液、汗、尿、乳、腹水、粘液、鼻汁、痰、滑液、腹腔液、腔液、月経血、羊水、精液などの（但し、これらに限定されない。）生理学的液体などのあらゆる生物源に由来し得る。検査試料は、生物源から取得されたまま直接、又は試料の特性を改変するための前処理後に使用され得る。例えば、このような前処理には、血液から血漿を調製すること、粘性のある液体を希釈することなどが含まれ得る。前処理の方法は、ろ過、沈殿、希釈、蒸留、混合、濃縮、妨害成分の不活化、試薬の添加、溶解なども含み得る。さらに、液体溶媒を形成させるために、又は分析物を放出させるために、固体検査試料を改変することも有益であり得る。

30

【0092】

本明細書において使用される用語は、特定の実施形態を記述することを目的とするものに過ぎず、その他の限定を意図するものではない。

【0093】

B. グリコシル化された及び脱グリコシル化されたヒトPLGF-1及びヒトPLGF-1断片

40

一態様において、本開示は、あらゆる種類のヒトPLGF-1形態（例えば、単離された、組み換え、変異体、合成、半合成など）に関する。本開示のヒトPLGF-1形態は、ヒトPLGF-1、ヒトPLGF-1断片又はヒトPLGF-1の変異体形態又はヒトPLGF-1断片であり得る。本明細書に記載されているヒトPLGF-1及びヒトPLGF-1断片は、それぞれ、場合によってグリコシル化され得る。さらに、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片の脱グリコシル化された形態を作製するために、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片のグリコシル化された形態は、本分野において公知の1つ又はそれ以上の技術を用いて、場合によって脱グリコシル化させることができる。これらのヒトPLGF-1形態の各々は、例えば、抗体を作製するための免疫原として、及び/又はこのような抗体の結合を評価する上で使用することができる。さらに、ヒトPL

50

GF - 1断片(場合によってグリコシル化又は脱グリコシル化され得る全てを含む。)は、イムノアッセイにおいて、1つ又はそれ以上の検量物質又は対照として使用することができる。

【0094】

一実施形態において、本開示は、単離されたグリコシル化されたヒトP1GF - 1の使用に関する。より具体的には、本開示は、少なくとも1つのオリゴ糖分子又は部分及び最大約10のオリゴ糖分子又は部分を含むグリコシル化されたヒトP1GF - 1に関する。例えば、本開示のグリコシル化されたヒトP1GF - 1は、配列番号1に示されているものなどの、131アミノ酸のアミノ酸配列を有する完全長ヒトP1GF - 1であり得る。具体的には、配列番号1又は配列番号2に示されているアミノ酸配列を有する完全長ヒトP1GF - 1は、配列番号1のアミノ酸15又は83に示されているアスパラギンにおいて(N結合型グリコシル化をもたらす。)、配列番号2のアミノ酸21又は89に示されているアスパラギンにおいて(N結合型グリコシル化をもたらす。)、並びに配列番号1のアミノ酸1、17、18、32、45、49、56、58、61、93、98及び105に示されているセリン残基の何れか又は全てにおいて(O結合型グリコシル化をもたらす。)グリコシル化され得る。あるいは、本開示のグリコシル化されたヒトP1GF - 1は、配列番号3又は配列番号4に示されているアミノ酸配列を有することができる。

10

【0095】

本開示の単離された又は精製されたグリコシル化されたヒトP1GF - 1は、あるアミノ酸残基に対するグリコシル化の異なるパーセントを含む得る。例えば、野生型配列と比較すると、配列番号1のアミノ酸残基15は、平均約70%グリコシル化されており、配列番号1のアミノ酸残基83は平均約100%グリコシル化されている。あるいは、野生型配列と比較すると、配列番号2のアミノ酸残基アミノ酸残基21は、平均約70%グリコシル化されており、配列番号2のアミノ酸残基89は平均約100%グリコシル化されている。

20

【0096】

配列番号1又は配列番号2に示されているアミノ酸配列を有する本開示の単離された又は精製されたヒトP1GF - 1形態は、配列番号1のアミノ酸15、83若しくは15及び83に示されている少なくとも1つのアスパラギン又は配列番号2のアミノ酸21、89若しくは21及び89に示されている少なくとも1つのアスパラギンにおいて、少なくとも1つのN-グリカンでグリコシル化され得る。少なくとも1つのグリカンは、(a) N-アセチルノイラミン酸(ガラクトース)₂(マンノース)₃(N-アセチル-D-グルコサミン)₄フコース、(b)(N-アセチルノイラミン酸)₂(ガラクトース)₂(マンノース)₃(N-アセチル-D-グルコサミン)₄フコース、(c)(N-アセチルノイラミン酸)₂(ガラクトース₁₋₄N-アセチル-D-グルコサミン)₂(ガラクトース)₂(マンノース)₃(N-アセチル-D-グルコサミン)₄フコース又は(ガラクトース₁₋₄N-アセチル-D-グルコサミン)(ガラクトース)₃(マンノース)₃(N-アセチル-D-グルコサミン)₅フコース、(d)(N-アセチルノイラミン酸)₂(ガラクトース)₃(マンノース)₃(N-アセチル-D-グルコサミン)₅フコース、(e)(N-アセチルノイラミン酸)₃(ガラクトース)₃(マンノース)₃(N-アセチル-D-グルコサミン)₅フコース、(f)(N-アセチルノイラミン酸)₃(ガラクトース₁₋₄N-アセチル-D-グルコサミン)(ガラクトース)₃(マンノース)₃(N-アセチル-D-グルコサミン)₅フコース又は(N-アセチルノイラミン酸)₃(ガラクトース)₄(マンノース)₃(N-アセチル-D-グルコサミン)₆フコース、(g)(N-アセチルノイラミン酸)₄(ガラクトース)₄(マンノース)₃(N-アセチル-D-グルコサミン)₆フコース及び(h)(N-アセチルノイラミン酸)₄(ガラクトース₁₋₄N-アセチル-D-グルコサミン)(ガラクトース)₄(マンノース)₃(N-アセチル-D-グルコサミン)₆フコースからなる群から選択される構造を有する。

30

40

【0097】

50

あるいは、本開示のグリコシル化されたヒト P L G F - 1 は、ヒト P L G F - 1 断片であり得る。典型的なグリコシル化されたヒト P L G F - 1 断片は、配列番号 5 に示されているものなどの、115 アミノ酸のアミノ酸配列を有するヒト P L G F - 1 断片である。例えば、配列番号 5 に示されているアミノ酸配列を有するヒト P L G F - 1 断片は、配列番号 5 のアミノ酸 1、2、16、29、33、40、42、45、77、82 又は 89 に示されているセリン残基の何れか又は全てにおいてグリコシル化され得る（O 結合型グリコシル化をもたらす。）。配列番号 5 のヒト P L G F - 1 断片は配列番号 1 のアミノ酸 15 に N 末端アスパラギンを含むしないので、配列番号 5 の配列を有するヒト P L G F - 1 断片は、配列番号 1 の完全長ヒト P L G F - 1 のような N 結合型グリコシル化を示さない。本開示の他の典型的なグリコシル化されたヒト P L G F - 1 断片は、配列番号 6、配列番号 7 又は配列番号 8 に示されているアミノ酸配列中に提供されている。

10

【0098】

あるいは、グリコシル化されたヒト P L G F - 1 は、配列番号 1 から 8 の対応するアミノ酸配列と比較したときに、1 つ又はそれ以上のアミノ酸置換、欠失又は付加を含むアミノ酸配列を含むグリコシル化された変異体ヒト P L G F (例えば、配列番号 1 から 4 の何れか) 又はグリコシル化された変異体ヒト P L G F - 1 断片 (例えば、配列番号 5 から 8 の何れか) であり得る。例えば、グリコシル化されたヒト P L G F - 1 は、ヒト P L G F - 1 のアミノ酸配列 (例えば、配列番号 1 から 4 参照) が少なくとも 1 つのアミノ酸置換、欠失又は付加を含むヒト P L G F - 1 であり得る。場合によって、グリコシル化されたヒト P L G F - 1 は、ヒト P L G F - 1 断片のアミノ酸配列 (例えば、配列番号 5 から 8 参照) が少なくとも 1 つのアミノ酸置換、欠失又は付加を含むヒト P L G F - 1 であり得る。このようなアミノ酸置換、欠失又は付加は、当業者に公知の定型的な技術を用いて作製することができる。

20

【0099】

本開示のヒト P L G F - 1 形態は、組み換え DNA 技術を用いて、化学合成によって、又は化学合成と組み換え DNA 技術の組み合わせによって作製することができる。具体的には、ヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片をコードするポリヌクレオチド配列は、目的のヒト P L G F - 1 又はヒト P L G F - 1 断片をコードするポリヌクレオチド配列を単離又は合成することによって構築され得る。例えば、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 22、配列番号 23 又は配列番号 26 のポリヌクレオチドの何れをも使用することができる。上に記載されているように、(例えば、場合によってグリコシル化された) ヒト P L G F - 1 は、完全長ヒト P L G F - 1、ヒト P L G F - 1 断片、変異体ヒト P L G F - 1 又は 1 つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換、欠失若しくは付加を含む変異体ヒト P L G F - 1 断片であり得る。このようなアミノ酸置換、欠失又は付加は、(例えば、例えば「Nelson and Long, Analytical Biochemistry 180:147-151 (1989)」に記載されているような周知の方法に従う部位指定突然変異誘発、無作為突然変異誘発又はシャフリングを使用する) 突然変異誘発によるなど、本分野において公知の定型的な技術を用いて作製することができる。

30

40

【0100】

目的のヒト P L G F - 1 形態の何れかをコードするポリヌクレオチド配列は、目的の所望されるヒト P L G F - 1 形態 (すなわち、完全長ヒト P L G F - 1、ヒト P L G F - 1 断片、ヒト P L G F - 1 の変異体形態又はヒト P L G F - 1 断片の変異体形態) のアミノ酸配列に基づいて、及び好ましくは、目的の組み換えヒト P L G F - 1 形態がその中で産生される宿主細胞中で好まれるコドンを選択することによってオリゴヌクレオチドが設計される化学的合成によって (例えば、オリゴヌクレオチド合成装置を使用することによって) 調製され得る。例えば、目的の所望されるヒト P L G F - 1 形態の一部をコードする幾つかの小さなオリゴヌクレオチドは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、連結又は連結連鎖反応 (LCR) によって合成され及び組み立てられ得る。各オリゴヌクレオチドは、

50

相補的な構造に対して5'又は3'突出部を通例含有する。

【0101】

(合成、部位指定突然変異誘発又は別の方法などによって)組み立てられたら、目的のヒトPLGF-1形態をコードするポリヌクレオチド配列は、組み換えベクター中に挿入され、所望の形質転換された宿主細胞中でのポリヌクレオチド配列の発現に必要なあらゆる調節配列に作用可能に連結され得る。

【0102】

全てのベクター及び発現調節配列が、目的のポリヌクレオチド配列を発現するように等しく良好に機能するわけではなく、全ての宿主が同じ発現系とともに同様に良好に機能するわけではないが、当業者は、本開示において使用するために、過度な実験操作なしに、これらのベクター、発現調節配列、最適化されたコドン及び宿主の中から容易に選択を行うことができると考えられる。例えば、ベクターを選択する際には、宿主は、ベクターが宿主内で複製可能でなければならず、又は染色体中に組み込まれなければならないので、宿主を検討しなければならない。ベクターのコピー数、そのコピー数を調節する能力及びベクターによってコードされる何れかの他のタンパク質(抗生物質マーカ―など)の発現も検討すべきである。発現調節配列を選択する際には、様々な要素も検討することができる。これらには、配列の相対的な強度、その調節可能性及び目的のヒトPLGF-1形態をコードするポリヌクレオチド配列とのその適合性(特に、潜在的な二次構造に関しての)が含まれるが、これらに限定されない。宿主は、選択されたベクターとの宿主の適合性、宿主のコドン使用、宿主の分泌特性、宿主がポリペプチドを正しく折り畳む能力、宿主の発酵又は培養の必要性、宿主がタンパク質をグリコシル化する能力(又は能力の欠如)及びヌクレオチド配列によってコードされる産物の精製の容易さなどを検討することによって選択すべきである。

【0103】

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

【0104】

好ましくは、ベクターは、目的のヒトPLGF-1形態をコードするポリヌクレオチド配列がポリヌクレオチド配列の転写のために必要とされる追加のセグメントに、その中で作用可能に連結されている発現ベクターである。ベクターは、典型的には、プラスミド又はウイルスDNAに由来する。本明細書中に挙げられている宿主細胞中での発現のために適した多数の発現ベクターが市販されており、又は文献中に記載されている。真核生物宿主に関して有用な発現ベクターには、SV40由来の発現調節配列を含むベクター、ウシ乳頭腫ウイルス、アデノウイルス及びサイトメガロウイルスが含まれるが、これらに限定されない。具体的なベクターには、pCDNA3.1(+)\Hyg(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)及びpCI-neo(Stratagene, La Jolla, CA, USA)が含まれる。酵母細胞中で使用するための発現ベクターの例には、2 μ プラスミド及びその誘導体、POT1ベクター(米国特許第4,931,373号)、pJSO37ベクター(Okkels, Ann. New York Acad. Sci., 782:202-207, (1996)に記載されている。)及びpPICZA、B又はC(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)が含まれるが、これらに限定されない。昆虫細胞中で証するための発現ベクターの例には、pVL941、pBG311(Cate et al., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance And Expression of the Human Gene In Animal Cells" Cell, 45:685-698 (1986)、pBluebac4.5及びpMelbac(これらの何れも、Invitrogen Corp., Carlsbad, CA. から入手可能で

10

20

30

40

50

ある。)が含まれるが、これらに限定されない。本発明において使用するために好ましいベクターは、pJV (Abbott Laboratories, Abbott Bio Research Center, Worcester, MAから入手可能)である。

【0105】

使用可能な他のベクターは、目的のヒトPLGF-1形態をコードするポリヌクレオチド配列のコピー数を増幅することを可能にする。このような増幅可能なベクターは、本分野において周知である。これらのベクターには、DHFR増幅によって増幅され得るベクター(例えば、Kaufinan、米国特許第4,470,461号、Kaufinan et al., "Construction Of A Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis Of Signals Utilized For Efficient Expression" Mol. Cell. Biol, 2:1304-1319(1982)参照)及びグルタミン合成酵素(GS)増幅(例えば、米国特許第5,122,464号及び欧州特許公開0338,841号参照)が含まれるが、これらに限定されない。

【0106】

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

【0107】

ベクターは、選択可能なマーカー、すなわち、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)をコードする遺伝子若しくはスキゾサッカロミセス・ポンベTPI遺伝子(P. R. Russell, Gene, 40:125-130(1985)参照)など、その産物が宿主細胞中での欠損を相補する遺伝子若しくはポリヌクレオチド、又はアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、ハイグロマイシン又はメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する遺伝子若しくはポリヌクレオチドも含み得る。糸状真菌に関しては、選択可能なマーカーには、amdS、pyrG、arcB、niaD及びsCが含まれるが、これらに限定されない。

【0108】

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

【0109】

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

【0110】

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

10

【0111】

哺乳動物細胞中での発現を改善するために、目的のヒトPLGF-1形態をコードするポリヌクレオチド配列の5'非翻訳領域中に、合成イントロンを挿入し得る。合成イントロンの例は、プラスミドpCI-Neoから得られる合成イントロンである（Promega Corporation, WI, USAから入手可能）。

【0112】

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

20

【0113】

酵母宿主細胞中で使用するのに適した調節配列の例には、酵母接合系のプロモーター、酵母トリオースリン酸イソメラーゼ（TPI）プロモーター、酵母解糖系遺伝子又はアルコール脱水素酵素遺伝子から得られるプロモーター、ADH2-4cプロモーター及び誘導性GALプロモーターが含まれる。

【0114】

糸状真菌宿主細胞において使用するのに適した調節配列の例には、ADH3プロモーター及びターミネーター、アスペルギルス・オリザエ（*Aspergillus oryzae*）TAKAアミラーゼトリオースリン酸イソメラーゼ又はアルカリプロテアーゼ、エー・ニガー（*A. niger*）-アミラーゼ、エー・ニガー又はエー・ニジュランス（*A. nidulans*）グルコアミラーゼ、エー・ニジュランス（*A. nidulans*）アセトアミダーゼ、リゾムコール・ミエヘイ（*Rhizomucor miehei*）アスパラギン酸プロテイナーゼ又はリパーゼをコードする遺伝子由来のプロモーター、TPI1ターミネーター及びADH3ターミネーターが含まれる。

30

【0115】

目的のヒトPLGF-1形態をコードするポリヌクレオチド配列は、シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでもよく、又は含まなくてもよい。その中で発現される細胞から目的のヒトPLGF-1形態が分泌されるべき場合には、シグナルペプチドが存在する。存在する場合、このようなシグナルペプチドは、ポリペプチドの発現のために選択された細胞によって認識されるものであるべきである。シグナルペプチドは、目的のヒトPLGF-1形態に対して相同（例えば、目的のヒトPLGF-1形態に本来付随しているものであり得る。）若しくは異種（すなわち、目的のヒトPLGF-1形態とは別の源に由来する。）であり得、又は宿主細胞に対して相同若しくは異種であり得る（すなわち、宿主細胞から本来発現されるシグナルペプチド又は宿主細胞から本来発現されないシグナルペプチド）。従って、シグナルペプチドは原核生物性であり得、例えば、細菌に由来し得、又は真核生物性であり得、例えば、哺乳動物若しくは昆虫、糸状真菌又は酵母細胞に由来し得る。

40

【0116】

50

シグナルペプチドの存在又は不存在は、例えば、目的の P L G F - 1 形態の産生のために使用される発現宿主細胞に依存する。糸状真菌中で使用するために、シグナルペプチドは、アスペルギルス種 (*Aspergillus* sp.) アミラーゼ又はグルコアミラーゼをコードする遺伝子、リゾムコール・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) リパーゼ若しくはプロテアーゼ又はフミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*) リパーゼをコードする遺伝子に都合よく由来し得る。昆虫細胞中で使用するために、シグナルペプチドは、鱗翅目マンデユカ・セクスタ (*Manduca sexta*) 脂質動員ホルモン前駆体 (米国特許第 5, 023, 328 号参照)、ミツバチのメリチン (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)、エクジステロイド UDP グルコシル転移酵素 (egt) (Murphy et al., Protein Expression and Purification 4:349-357 (1993) 又はヒト膵臓リパーゼ (hpl) (Methods in Enzymology, 284:262-272 (1997)) など、昆虫遺伝子に由来し得る (WO90/05783 参照)。

10

【0117】

哺乳動物細胞中で使用するためのシグナルペプチドの具体例には、マウス Ig 軽鎖シグナルペプチドが含まれる (Coloma, M, J. Imm. Methods, 152:89-104 (1992))。酵母細胞中での使用に関して、適切なシグナルペプチドには、エス・セレビシアエから得られる 因子シグナルペプチド (米国特許第 4, 870, 008 号参照)、マウス唾液アミラーゼのシグナルペプチド (O. Hagenbuchle et al., Nature, 289:643-646 (1981) 参照)、修飾されたカルボキシペプチダーゼシグナルペプチド (L. A. Vails et al, Cell, 48:887-897 (1987) 参照)、酵母 B A R 1 シグナルペプチド (WO87/02670 参照) 及び酵母アスパラギン酸プロテアーゼ 3 (Y A P 3) シグナルペプチド (M. Egel-Mitani et al., Yeast, 6:127-137 (1990) 参照) が含まれる。

20

【0118】

本開示の目的のグリコシル化されたヒト P L G F - 1 形態 (例えば、ヒト P L G F - 1、ヒト P L G F - 1 断片、変異体ヒト P L G F - 1 又は変異体ヒト P L G F - 1 断片) を産生するために、細菌、真菌 (酵母を含む。)、植物、昆虫、哺乳動物又は他の適切な動物細胞若しくは細胞株及びトランスジェニック動物又は植物を含むあらゆる適切な宿主が使用され得る。イー・コリなどの非グリコシル化生物が使用される場合、本開示の目的のグリコシル化されたヒト P L G F - 1 形態を産生するために、好ましくは、適切なインビトロでのグリコシル化がイー・コリ中での発現の後に続く。

30

【0119】

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

40

【0120】

50

適切な糸状真菌宿主細胞の例には、アスペルギルス (*Aspergillus*)、例えば、エー・オリザエ (*A. oryzae*)、エー・ニガー (*A. niger*) 又はエー・ニジュランス (*A. nidulans*)、フサリウム (*Fusarium*) 又はトリコデルマ (*Trichoderma*) の株が含まれるが、これらに限定されない。真菌細胞は、当業者に公知の技術を用いる、プロトプラスト形成、プロトプラストの形質転換及び細胞壁の再生を伴う方法によって形質転換され得る。アスペルギルス宿主細胞の形質転換のための適切な操作は、欧州特許出願 238023 号及び米国特許第 5,679,543 号に記載されている。フサリウム種を形質転換するための適切な方法は、「Maldari et al., Gene, 78:147-156 (1989)」及び WO96/00787 によって記載されている。酵母は、「Becker and Guarente 10
In Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., Journal of Bacteriology, 153:163 (1983); 及び Hinnen et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 75:1920 (1978)」によって記載されている操作を用いて形質転換され得る。

【0121】

好ましくは、本開示の目的のヒト P1GF-1 形態はインビボでグリコシル化される。20
目的のヒト P1GF-1 形態がインビボでグリコシル化されるべき場合には、宿主細胞は、目的のヒト P1GF-1 形態の所望されるグリコシル化を作製することができる宿主細胞の群から選択される。従って、宿主細胞は、酵母細胞、昆虫細胞又は哺乳動物細胞から選択され得る。

【0122】

適切な酵母細胞宿主の例には、サッカロミセス (*Saccharomyces*)、例えば、エス・セレビスシアエ (*S. cerevisiae*)、スキゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*)、クライベロミセス (*Kluyveromyces*)、ピー・パストリス又はピー・メタノリカ (*P. methanolica*) などのピキア (*Pichia*)、エイチ・ポリモルファ (*H. polymorpha*) 又はヤロウシア (*Yarrowia*) などのハンセニユラの株が含まれる。異種のポリヌクレオチドで酵母細胞を形質転換し、酵母細胞から異種のポリペプチドを産生するための方法は、Clontech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA, USA (YeastmakerTM Yeast Transformation System Kit に対する製品プロトコル中) によって、並びに「Reeves et al., FEMS Microbiology Letters, 99:193-198 (1992)」、「Manivasakam et al., Nucleic Acids Research, 21:4414-4415 (1993)」及び「Ganeva et al., FEMS Microbiology Letters, 121:159-164 (1994)」によって開示されている。40

【0123】

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

【0124】

適切な哺乳動物宿主細胞の例には、チャイニーズ・ハムスター卵巣 (CHO) 細胞株、ミドリザル細胞株 (COS)、マウス細胞 (例えば、NS/O)、ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞株、ヒト細胞 (ヒト胎児腎臓細胞 (例えば、HEK293 (A.T.C. 50

C. 受託番号CRL-1573))など)及び組織培養中の植物細胞が含まれる。好ましくは、哺乳動物の宿主細胞は、CHO細胞株及びHEK293細胞株である。別の好ましい宿主細胞は、B3.2細胞株(例えば、Abbott Laboratories, Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)又は別のジヒドロ葉酸還元酵素欠損(DHFR⁻)CHO細胞株(例えば、Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)から入手可能)である。一態様において、本開示は、グリコシル化された完全長ヒトPLGF-1及び少なくとも1つの連結配列(すなわち、(Hisタグを含有する)配列番号2のアミノ酸配列を有するもの)を産生するCHO細胞株に関し、該CHO細胞株は、2007年7月12日に、アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)に寄託され、ATCC受託番号PTA-8538を与えられた。別の態様において、本開示は、グリコシル化された完全長ヒトPLGF-1及び少なくとも1つの連結配列(すなわち、(エンテロキナーゼ切断部位を含有する)配列番号3のアミノ酸配列を有するもの)を産生するCHO細胞株に関し、該CHO細胞株は、2007年7月12日に、ATCCに寄託され、ATCC受託番号PTA-8537を与えられた。さらなる態様において、本開示は、グリコシル化されたヒトPLGF-1断片(すなわち、配列番号5のアミノ酸配列を有するもの)を産生するCHO細胞株に関し、該CHO細胞株は、2007年7月12日に、ATCCに寄託され、ATCC受託番号PTA-8540を与えられた。さらに別の態様において、本開示は、配列番号1、配列番号2、配列番号3及び配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み又は配列番号1、配列番号2、配列番号3及び配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる単離された、精製された又は単離及び精製されたヒトPLGF-1に関する。さらに別の態様において、本開示は、配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み又は配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる単離された、精製された又は単離及び精製されたヒトPLGF-1断片に関する。

【0125】

哺乳動物の宿主細胞中に外来ポリヌクレオチドを導入するための方法には、リン酸カルシウムによって媒介される形質移入、電気穿孔、DEAE-デキストランによって媒介される形質移入、リポソームによって媒介される形質移入、ウイルスベクター及びLipofectamineTM2000を用いるLife Technologies Ltd, Paisley, UKによって記載される形質移入法が含まれる。これらの方法は本分野において周知であり、例えば、「Ausbel et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, New York, USA (1996)」によって記載されている。哺乳動物細胞の培養は、例えば、「Jenkins, Ed., Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Human Press Inc. Totowa, N.J., USA (1999)」及び「Harrison and Rae General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press (1997)」に開示されているように、確立された方法に従って実施される。

【0126】

これらの作製方法では、本分野で公知の方法を用いて、目的のヒトPLGF-1形態の産生に適した栄養素培地中で細胞が培養される。例えば、細胞は、目的のグリコシル化されたヒトPLGF-1形態の発現及び/又は単離を可能とするのに適した培地中及び条件下で行われる、研究用又は産業用発酵装置中での、振盪フラスコ培養、小規模又は大規模発酵(連続、バッチ、フェドバッチ又は固体状発酵を含む。)によって培養される。培養は、本分野で公知の操作を用いて、炭素及び窒素源並びに無機塩を含む適切な栄養素培地中で行われる。適切な溶媒は、市販の供給業者から入手され、又は(例えば、アメリカ培養細胞系統保存機関のカタログ中の)公表された組成物に従って調製され得る。目的のグリコシル化されたヒトPLGF-1形態が栄養素培地中に分泌される場合、目的のヒトP

10

20

30

40

50

1 G F - 1 形態は培地から直接回収することができる。目的のヒト P 1 G F - 1 形態が分泌されなければ、細胞可溶化液から回収することができる。

【 0 1 2 7 】

得られた目的のヒト P 1 G F - 1 形態は、本分野において公知の方法によって回収され得る。例えば、目的のヒト P 1 G F - 1 形態は、遠心、ろ過、抽出、噴霧乾燥、蒸発又は沈殿を含む（但し、これらに限定されない。）慣用の操作によって、栄養素培地から回収され得る。

【 0 1 2 8 】

目的のヒト P 1 G F - 1 形態は、クロマトグラフィー（イオン交換、アフィニティー、疎水性、クロマトフォーカシング及びサイズ排除など、但し、これらに限定されない。）
、電気泳動操作（調製用等電点電気泳動など、但し、これに限定されない。）
、溶解度差（硫酸アンモニウム沈殿など、但し、これに限定されない。）
、SDS - PAGE 又は抽出（例えば、J - C Janson and Lars Ryden, editors, Protein Purification, VCH Publishers, New York (1989) 参照）。を含む（但し、これらに限定されない。）
、本分野で公知の様々な操作によって精製され得る。

【 0 1 2 9 】

目的のグリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 形態は、本分野における定型的な技術を用いて、場合によって脱グリコシル化することができる。具体的には、N 結合型グリコシル化（完全長ヒト P 1 G F - 1（例えば、配列番号 1 から 4）の場合）、1 つ若しくはそれ
以上の O 結合型グリコシル化（ヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片形態（例えば、配列番号 1 から 8）の場合）又は N 結合型グリコシル化と 1 つ若しくはそれ以上の O 結合型グリコシル化（ヒト P 1 G F - 1（例えば、配列番号 1 から 4）の場合）を除去するために、ヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片は脱グリコシル化することができる。このような N 結合型、O 結合型又は N 結合型及び O 結合型の両方のグリコシル化は、このようなヒト P 1 G F - 1 形態を 1 つ又はそれ以上の酵素で処理することによるなどの、本分野において公知の定型的な技術を用いて実施することができる。

【 0 1 3 0 】

脱グリコシル化のために使用することができる酵素の例には、N 結合型脱グリコシル化（Asn）のための PNG アーゼ F 及び O 結合型部位（Ser 及び Thr）から炭水化物
を除去するための O - グリカナーゼが含まれる。特殊な連結から炭水化物を切断する、シアリダーゼ、（1 - 4） - ガラクトシダーゼ及び - N - アセチル - グルコサミニダーゼなどの他の酵素も使用することができる。これらの酵素及びその他の酵素は、例えば、Prozyme (San Leandro, CA) 及び Sigma - Aldrich (St. Louis, MO) から入手することが可能であり、さらに、混合物又は「カクテル」の形態で購入し得る。例えば、Sigma - Aldrich E - DEGLY キットは、PNG アーゼ F、
- 2 (2, 6, 8, 9) ノイラミニダーゼ、O - グリコシダーゼ、
（1 - 4） - ガラクトシダーゼ及び - N - アセチル - グルコサミニダーゼのカクテルを含み、Prozyme の Enzymatic Deglycosylation Kit は、PNG アーゼ F、O - グリコシダーゼ及びシアリダーゼを含む。

【 0 1 3 1 】

本明細書中に記載されている方法を用いて脱グリコシル化された、目的のグリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 形態（すなわち、ヒト P 1 G F - 1、ヒト P 1 G F - 1 断片、ヒト P 1 G F - 1 の変異体形態又はヒト P 1 G F - 1 断片の変異体形態）は、脱グリコシル化の結果、異なるアミノ酸残基へ転化又は変化された少なくとも 1 つのアミノ酸残基を有する目的の脱グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 形態を産生し得る。脱グリコシル化の結果、2 以上のアミノ酸残基が変化又は転化される場合、目的の脱グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 形態中の得られた変化又は転化されたアミノ酸残基の何れか又は全部が、同じアミノ酸残基又は異なるアミノ酸残基へ変化され得る。例えば、目的の脱グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 形態は、（そのグリコシル化された形態と比較されたときに）

アスパラギン酸残基へ転化又は変化された少なくとも1つのアスパラギン残基を有し得る。別の例として、目的の脱グリコシル化されたヒトPIGF-1形態は、(そのグリコシル化された形態と比較されたときに)少なくともアスパラギン酸残基へ転化又は変化された第一のアスパラギン残基及びアスパラギン酸残基へ転化又は変化された第二のアスパラギン残基を有し得る。表Aは、脱グリコシル化の結果、変化又は転化された少なくとも1つのアミノ酸残基を含有する、幾つかの典型的な単離された又は精製された、目的の脱グリコシル化されたヒトPIGF-1形態を提供する。

【0132】

【表1】

表A

グリコシル化されたヒトPIGF-1形態	脱グリコシル化されたヒトPIGF-1形態	アミノ酸転化の位置	転化の種類	脱グリコシル化のために使用される酵素
配列番号1	配列番号36	15	Asn から Asp へ	PNG アーゼ F
配列番号2	配列番号37	21	Asn から Asp へ	PNG アーゼ F
配列番号1	配列番号38	15及び83	Asn から Asp へ (15及び83で)	PNG アーゼ F
配列番号2	配列番号39	21及び89	Asn から Asp へ (21及び89で)	PNG アーゼ F
	配列番号40	21及び89	Asn から Asp へ (21で); 89で、 Asn又はAspが検出された	トリプシン

【0133】

目的のグリコシル化された及び脱グリコシル化されたヒトPIGF-1形態(すなわち、ヒトPIGF-1、ヒトPIGF-1断片、ヒトPIGF-1の変異体形態又はヒトPIGF-1断片の変異体形態)は、様々な異なる目的のために、様々な異なる様式で使用することができる。具体的には、本明細書に記載されている目的のグリコシル化された及び脱グリコシル化されたヒトPIGF-1形態は、1つ若しくはそれ以上の検量物質、1つ若しくはそれ以上の対照又は1つ若しくはそれ以上の検量物質若しくは対照の組み合わせとして、検査試料中のヒトPIGF-1を検出するためのアッセイ(好ましくは、イムノアッセイ)において使用することができる。好ましくは、グリコシル化された及び脱グリコシル化された完全なヒトPIGF-1は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号36、配列番号37、配列番号38又は配列番号39の何れかのアミノ酸配列を含み又はこれらからなり、及びグリコシル化された及び脱グリコシル化されたヒトPIGF-1断片は、配列番号5、配列番号6、配列番号7又は配列番号8の何れかのアミノ酸配列を含み又はこれらからなる。

【0134】

さらに、及び本明細書中にさらに論述されているように、目的のヒトPIGF-1形態は、抗体産生のために動物を免疫化するための免疫原として使用することが可能であり、例えば、動物は、マウス、ウサギ、ニワトリ、ラット、ヒツジ、ヤギ、サメ、ラクダ、ウマ、ネコ、イヌ、非ヒト霊長類、ヒト又は他の動物であり得る。一実施形態において、免疫原は、グリコシル化された又は脱グリコシル化されたヒトPIGF-1、特に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号36、配列番号37、配列番号38若しくは配列番号39の配列の何れかを含み若しくはこれらからなるグリコシル化された若しくは脱グリコシル化されたヒトPIGF-1、又はグリコシル化された若しくは脱グリコシル化されたヒトPIGF-1断片、特に、配列番号5から8の配列の何れかを含み又はこれらからなるグリコシル化された若しくは脱グリコシル化されたヒトPIGF-1断片を含む。別の実施形態において、本明細書中にさらに論述されているように、ヒトPIGF-1断片(場合によってグリコシル化又は脱グリコシル化され得る全てを含む。)は、イムノアッセイにおいて、1つ又はそれ以上の検量物質又は対照として使用することができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 5 】

C . ヒト P 1 G F - 1 抗体

本開示は、P 1 G F - 2 (例えば、配列番号 1 - 4 の何れか) 又はヒト P 1 G F - 1 断片 (例えば配列番号 5 - 8 の何れか) に特異的に結合する抗体 (これは、本明細書中で既に述べたように、場合によってはグリコシル化され得るか又はグリコシル化されている場合は、場合によっては脱グリコシル化され得る。) を提供する。

【 0 1 3 6 】

特に、ある態様において、本開示は、ヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片に特異的に結合する単離された抗体 (この抗体は、配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域を有する。) に関する。

10

【 0 1 3 7 】

別の態様において、本開示は、ヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片に特異的に結合する単離された抗体 (この抗体は、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を有する。) に関する。

【 0 1 3 8 】

別の態様において、本開示は、ヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片に特異的に結合する単離された抗体 (この抗体は、配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域及び配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を有する。) に関する。

【 0 1 3 9 】

さらに別の態様において、本開示は、2007年7月12日に寄託された、ATCC 受託番号 P T A - 8 5 3 6 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 に関する。さらに別の態様において、本開示は、2007年7月12日に寄託された、ATCC 受託番号 P T A - 8 5 3 6 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 により産生される抗体に関する。マウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 は、配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン及び配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメインを有する。

20

【 0 1 4 0 】

またさらに別の態様において、本発明は、マウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 2 6 7 5 に関する。マウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 2 6 7 5 は、マウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 のサブクローンである。マウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 2 6 7 5 は、ハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 により産生される抗体と同一である抗体を産生する。マウスハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 2 6 7 5 は、配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン及び配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメインを有する。

30

【 0 1 4 1 】

さらに別の態様において、本開示は、ヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片に特異的に結合する単離された抗体 (この抗体は、配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域を有する。) に関する。

【 0 1 4 2 】

さらに別の態様において、本開示は、ヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片に特異的に結合する単離された抗体 (この抗体は、配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を有する。) に関する。

40

【 0 1 4 3 】

別の態様において、本開示は、ヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片に特異的に結合する単離された抗体 (この抗体は、配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を有する。) に関する。

【 0 1 4 4 】

さらに別の態様において、本開示は、2007年7月12日に寄託された、ATCC 受

50

託番号 P T A - 8 5 3 9 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 2 - 8 2 6 - 3 3 5 に関する。さらに別の態様において、本開示は、2007年7月12日に寄託された、A T C C 受託番号 P T A - 8 5 3 9 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 2 - 8 2 6 - 3 3 5 により産生される抗体に関する。マウスハイブリドーマ細胞株 2 - 8 2 6 - 3 3 5 は、配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメインを有する。

【 0 1 4 5 】

D . P 1 G F - 1 抗体を作製及び使用する方法

本開示の抗体は、当技術分野で公知の様々な異なる技術を用いて作製され得る。例えば、適切な免疫原を含有する免疫原性調製物で適切な対象（以下に限定されないが、ウサギ、ヤギ、マウス又はその他の哺乳動物など）に免疫付与することによって、ヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片に対するポリクローナル及びモノクローナル抗体を生成させることができる。免疫付与のために使用することができる免疫原は、ヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片を発現することが知られている不死化細胞株 N S O 由来の細胞などの細胞を含み得る。

10

【 0 1 4 6 】

あるいは、この免疫原は、精製もしくは単離ヒト P 1 G F - 1 タンパク質それ自身（即ち配列番号 1 - 4 の何れか）又はそのヒト P 1 G F - 1 断片（即ち配列番号 5 - 8 の何れか）であり得る。例えば、アフィニティークロマトグラフィー、免疫沈降又は当技術分野で周知であるその他の技術を用いてこのタンパク質を産生する細胞（N S O など）から単離されたヒト P 1 G F - 1（配列番号 1 - 4 参照）を免疫原として使用することができる。あるいは、免疫原は、当技術分野で公知の通常技術を用いて化学合成を使用して調製することができる（以下に限定されないが合成装置など）。

20

【 0 1 4 7 】

次に、対象において生成された抗体がヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片に結合するか否かを判定するために、この抗体をスクリーニングすることができる。本明細書中に記載の方法を用いて、このような抗体をさらにスクリーニングすることができる（例えば実施例 1 参照）。所望の特徴を有する抗体を同定するための適切な方法は、本明細書中に記載されている（実施例 1 参照）。さらに、ヒト P 1 G F - 1 断片（配列番号 5 - 8 参照）に結合する抗体を用いて得られる結果が、ヒト P 1 G F - 1 の結合に完全に置き換え可能であり、その抗体がヒト P 1 G F - 1（配列番号 1 - 4 参照）の対応する残基に結合するであろうことは十分に予想される。従って、便宜上、及び、抗体の結合特性を評価するためにヒト P 1 G F - 1 断片を使用しないことに対して特定の例において合理的根拠がない限り、抗体の結合特性を評価するために、ヒト P 1 G F - 1 断片を使用することができる。

30

【 0 1 4 8 】

免疫原の単位用量（即ち、本精製タンパク質、本タンパク質を発現する腫瘍細胞又は組み換え発現されるヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片）及び免疫付与方法は、免疫付与しようとする対象、その免疫状態及び対象の体重に依存する。対象における免疫反応を促進するために、フロイントの完全又は不完全アジュバントなどのアジュバントとともに免疫原を投与することができる。

40

【 0 1 4 9 】

上述のような免疫原での対象の免疫付与により、ポリクローナル抗体反応が誘発される。固定化された抗原、即ち、本明細書中に記載のような、ヒト P 1 G F - 1（例えば、配列番号 1 - 4）又はそのヒト P 1 G F - 1 断片（例えば、配列番号 5 - 8）を用いて、E L I S A などの標準的技術により、免疫付与した対象における抗体力価を長期間にわたり監視することができる。

【 0 1 5 0 】

ヒト P 1 G F - 1（例えば、配列番号 1 - 4）又はそのヒト P 1 G F - 1 断片（例えば、配列番号 5 - 8）に対する抗体を生成させるその他の方法には、ヒト免疫グロブリン遺

50

伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いることが含まれる（例えばPCT国際出願WO91/00906、WO91/10741又はWO92/03918参照）。あるいは、ヒト抗体産生細胞又は組織（例えば、ヒト骨髄細胞、末梢血液リンパ球（PBL）、ヒト胎児リンパ節組織又は造血幹細胞）を移植された免疫欠損マウスに抗原を導入することによって、ヒトモノクローナル抗体を作製することができる。このような方法には、SCID-huマウス（例えば、PCT国際出願WO93/05796、米国特許第5,411,749号；又はMcCuneら、Science、241:1632-1639（1988）参照）又はRag-1/Rag-2欠損マウスにおける抗体の生成が含まれる。ヒト抗体-免疫不全マウスもまた市販されている。例えば、Rag-2欠損マウスは、Taconic Farms（Germantown, NY）から入手可能である。

10

【0151】

免疫原で対象に免疫付与することによって、モノクローナル抗体を生成させることができる。免疫付与から適切な時間が経過した後、例えば、抗体力価が十分に高レベルとなった際に、免疫付与した動物から抗体産生細胞を回収し、標準的技術を用いてモノクローナル抗体を調製するために使用することができる。例えば、ハイブリドーマ細胞を得るために、骨髄腫細胞などの不死化細胞を用いて、標準的体細胞融合手順によって、抗体産生細胞を融合させることができる。このような技術は当技術分野で周知であり、これには、例えば、Kohler及びMilstein、Nature、256:495497（1975）により元来開発されたようなハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbarら、Immunology Today、4:72（1983））及び

20

【0152】

抗体産生細胞（例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し、ヒトPLGF-1タンパク質で免疫付与されたトランスジェニックマウス由来の脾臓細胞）を回収することによって、モノクローナル抗体を作製することもできる。ヒト骨髄腫との融合を通じて、又はエプスタインバーウイルス（EBV）での形質転換を通じて、脾臓細胞を不死化することができる。当技術分野で記載されるヒトB細胞又はEBV-ハイブリドーマ技術（例えば、Boyleら、欧州特許公開第0614984号参照）を用いてこれらのハイブリドーマを作製することができる。

30

【0153】

ヒトPLGF-1（例えば、配列番号1-4）又はそのヒトPLGF-1断片（例えば、配列番号5-8）に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、ハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることにより、例えば、固定化されたヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する抗体を選択するためにスクリーニングすることにより、又は抗体が所望の特性、即ちヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片への結合能を有するか否かを判定するために本明細書中に記載のように抗体を試験することにより、検出される。所望の特異性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、例えば、限界希釈手順（例えばWandsら（Gastroenterology 80:225-232（1981））により記載される手順）により、クローンをサブクローン化し、標準的方法によって増殖させることができる。

40

【0154】

ハイブリドーマ細胞がモノクローナル抗体を培地に分泌し、それにより全抗体の産生を可能にするために十分な条件下及び十分な時間にわたり、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイで試験結果が陽性となるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を栄養培地中で培養することができる。ハイブリドーマ細胞に適切な組織培養技術及び培地は全般的に、当技術分野で記載されている（例えば、R.H.Kenneth、Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Bi

50

ological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, N.Y. (1980) 参照)。次に、抗体を含有する馴化ハイブリドーマ培養上清を回収することができる。サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、場合によっては、例えばプロテインAクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順によって、培地から単離することができる。

【0155】

組み換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリを構築し、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片を用いてライブラリをスクリーニングすることによって、モノクローナル抗体を改変することができる。ファージディスプレイライブラリを作製し、スクリーニングするためのキットが市販されている(例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody Systems、カタログ番号27-9400-01;及びStratagene SurfZAP Phage Display Kit、カタログ番号240612参照)。同様に、酵母ディスプレイベクターは当技術分野で公知であり、市販されている(例えば、Invitrogen Corp., Carlsbad, CAから入手可能なpYD1)。簡潔に述べると、ヒトPLGF-1(例えば配列番号1-4)又はヒトPLGF-1断片(配列番号5-8)に特異的に結合する抗体を発現するファージ又は酵母細胞を同定し、単離するために、抗体ライブラリをスクリーニングする。好ましくは、ライブラリの一次スクリーニングは、固定化されたヒトPLGF-1又はそのヒトPLGF-1断片によるスクリーニングを含む。

【0156】

スクリーニング後、ディスプレイファージ又は酵母を単離し、選択された抗体をコードするポリヌクレオチドをディスプレイファージ又は酵母から(例えば、ファージ又は酵母ゲノムから)回収し、周知の組み換えDNA技術により、その他の発現ベクター(例えば、Saccharomyces cerevisiae(サッカロミセス・セレビスエ)細胞、例えばEBY100細胞(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA))へとサブクローニングすることができる。このポリヌクレオチドをさらに操作し(例えば、さらなる定常領域などのさらなる免疫グロブリンドメインをコードする核酸に連結)及び/又は宿主細胞で発現させることができる。

【0157】

あるいは、抗体に対するヒト患者による反応を最小化するために、キメラ及びヒト化抗体などの抗体の組み換え形態を調製することもできる。非ヒト対象で産生されるか又は、非ヒト抗体遺伝子の発現由来である抗体がヒトにおいて治療用として使用される場合、これらは、外来物として様々な程度認識され、免疫反応が患者において生じ得る。この免疫反応を最小化するか又は排除するためのあるアプローチは、キメラ抗体誘導體、即ち非ヒト動物可変領域及びヒト定常領域を組み合わせる抗体分子を作製することである。このような抗体は、元のモノクローナル抗体のエピトープ結合特異性を保持するが、ヒトに投与される場合、免疫原性が低くなり得、従って、患者にとって忍容性となる可能性がより高い。

【0158】

当技術分野で公知の組み換えDNA技術によって、キメラモノクローナル抗体を作製することができる。例えば、ヒト定常領域をコードする遺伝子で非ヒト抗体分子の定常領域をコードする遺伝子を置換する(例えば、PCT特許公開PCT/US86/02269、欧州特許出願第184,187号又は欧州特許出願第171,496号参照)。

【0159】

キメラ抗体は、抗原結合に関与しない可変領域の一部を、ヒト可変領域由来の同等部分で置き換えることにより、さらにヒト化され得る。「ヒト化」キメラ抗体の一般的な総説は、Morrisson, S.L., Science, 229:1202-1207(1985)及びOira, BioTechniques, 4-214(1986)で見出すことができる。このような方法には、重鎖又は軽鎖の少なくとも1つからの免疫グロブリン可

10

20

30

40

50

変領域の全て又は一部をコードする核酸配列を、単離し、操作し、発現させることが含まれる。次に、ヒト化キメラ抗体をコードするcDNA又はその断片を適切な発現ベクターにクローニングすることができる。適切な「ヒト化」抗体は、あるいは、相補性決定領域(CDR)置換により生成させることができる(例えば、米国特許第5,225,539号; Jonesら、Nature、321:552-525(1986); Verhoevanら、Science 239:1,534(1988);及びBeidlerら、J. Immunol.、141:4053-4060(1988)参照)。

【0160】

ヒトPLGF-1(例えば配列番号1-4)又はヒトPLGF-1断片(例えば配列番号5-8)に特異的な抗体(例えばハムスター抗体)の結合特異性を保持する「ヒト」抗体ポリペプチド二量体を作製するために、エピトープインプリンティングを使用することもできる。簡潔に述べると、抗原に対する特異的結合がある非ヒト可変領域(VH)及びヒト定常領域(CH1)をコードする遺伝子をE.コリで発現させ、ヒトV_HC_{H1}遺伝子のファージライブラリに感染させる。次に、ヒトPLGF-1タンパク質への結合に対して、抗体断片を提示するファージをスクリーニングする。V_HC_{H1}鎖の発現のために、選択されたヒトV_H遺伝子を再クローニングし、これらの鎖を有するE.コリにヒトV_HC_{H1}遺伝子のファージライブラリを感染させ、抗原被覆チューブを用いた一連のスクリーニングにこのライブラリを供する(WO93/06213参照)。

【0161】

別の態様において、本開示は、抗体が抗体断片であることを企図する。例えば、この抗体断片には、以下に限定されないが、Fab、Fab'、Fab'-SH断片、ジスルフィド結合Fv、一本鎖Fv(scFv)及びF(ab')₂断片が含まれ得る。抗体断片の作製のために、様々な技術が当業者にとって公知である。例えば、このような断片は、無傷の抗体のタンパク質分解性消化を介して得られ得るか(例えば、Morimotoら、J. Biochem. Biophys. Methods、24:107-117(1992)及びBrennanら、Science、229:81(1985)参照)又は組み換え宿主細胞により直接産生され得る。例えば、E.コリからFab'-SH断片を直接回収し、F(ab')₂断片を形成させるために化学的にカップリングすることができる(Carterら、Bio/Technology、10:163-167(1992)参照)。別の実施形態において、F(ab')₂は、F(ab')₂分子の集合を促進するために、ロイシンジッパーGCN4を用いて形成される。あるいは、組み換え宿主細胞培養物からFv、Fab又はF(ab')₂断片を直接単離することができる。短い連結ペプチド又は配列を用いることによって、軽及び/又は重鎖可変領域を連結することにより、一本鎖可変領域断片(scFv)が作製される(Birdら、Science、242:423-426(1998)参照)。連結配列の例は、GPAKELTPLKEAKVS(配列番号19)である。

【0162】

組み換え又は合成の何れかにより一本鎖変異体を作製することができる。合成によるscFvの作製の場合、自動合成装置を使用することができる。scFvの組み換え産生の場合、scFvをコードするポリヌクレオチドを含有する適切なプラスミドを適切な宿主細胞、真核(酵母、植物、昆虫又は哺乳動物細胞など)又は原核細胞(E.コリなど)の何れかに導入することができる。ポリヌクレオチドの結合(ライゲーション)などの通常の操作によって、関心のあるscFvをコードするポリヌクレオチドを作製することができる。当技術分野で公知の標準的タンパク質精製技術を用いて、得られたscFvを単離することができる。さらに、ダイアボディなどの一本鎖抗体のその他の形態も本開示により企図される。ダイアボディは、VH及びVLドメインが1つのポリペプチド鎖で発現される2価の2特異性抗体であるが、短すぎて同じ鎖上の2つのドメイン間で対形成することができないリンカーを用いており、それによりドメインは別の鎖の相補的ドメインと対形成させられ、2つの抗原結合部位が生じる。(例えば、Holliger、P.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444-6448(1993))

10

20

30

40

50

; Poljak, R. J.ら、Structure、2: 1121-1123 (1994)参照)。

【0163】

さらに、本明細書中に記載のような本発明のいくつかの態様において(例えば対照としての使用)、市販の抗PLGF-1抗体又は文献に記載の抗PLGF-1抗体又はそれらの作製のための方法を使用することが可能であり得る。これらには、以下に限定されないが、(1)モノクローナル抗体264(「MAB264」とも呼ばれる。)(これは、R&D systems、Inc.、Minneapolis、Minnesota(カタログ番号MAB264)から市販されているクローン37203からの非結合の(uncoujugated)マウス抗ヒトPLGF-1モノクローナル抗体である。);(2) 10 ポリクローナル抗体pB264(本明細書中で交換可能に使用されるように、「pB264」「AF-264-PB」「PAB264」又はAB-264-PBとも呼ばれる。)(これは、R&D systems、Inc.、Minneapolis、Minnesota(カタログ番号AF-264-PB)から入手可能である非結合の(uncoujugated)ヤギ抗ヒトPLGF-1ポリクローナル抗体である。);及び/又は(3)ラットモノクローナル抗体04(ラット抗ヒトPLGFクローン番号358932としても知られ、R&D systems、Inc.、Minneapolis、Minnesotaからの事前配布試薬として得られた。)が含まれる。

【0164】

本開示の抗体は、様々な用途がある。ある態様において、本開示の抗体は、1以上の免疫診断試薬として使用することができる。例えば、本開示の抗体は、試験試料中のヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片の存在を検出するための1以上の方法において1以上の免疫診断試薬として使用することができる。より具体的には、試験試料中のヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片の存在を検出するための免疫アッセイにおいて、1以上の捕捉抗体、1以上の連結体抗体又は1以上の捕捉抗体及び1以上の連結体抗体の両方として、本開示の抗体を使用することができる。 20

【0165】

E. 試料回収及び調製

例えば、本発明に従う抗体が、免疫診断試薬として及び/又はPLGF-1免疫アッセイキットにおいて使用される場合、尿、血液、血清及び血漿ならびにその他の体液を回収、操作及び処理するための当技術分野で周知の方法が、本開示の実施において使用される。 30

【0166】

試験試料は、関心のあるPLGF-1検体に加えて、抗体、抗原、ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドなど、さらなる部分が含まれ得る。例えば、この試料は、対象から得られた全血試料であり得る。試験試料、特に全血は、本明細書中に記載のような免疫アッセイ前に、例えば前処理試薬で処理することが必要であり得るか又は所望され得る。前処理が必要ではない場合(例えば胎どの尿試料)でも、前処理は、場合によっては、単なる便宜のために行われ得る(例えば、市販プラットフォームにおける方法の一部として)。前処理試薬は、不均一系試薬又は均一系試薬であり得る。 40

【0167】

本発明による1以上の不均一系前処理試薬の使用により、前処理試薬は、試料中に存在する検体結合タンパク質(例えばヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に結合可能なタンパク質)を沈殿させる。このような前処理段階は、試料への前処理試薬の添加により形成される混合物の上清を、沈殿した検体結合タンパク質から分離することによって、検体結合タンパク質を全て除去することを含む。このようなアッセイにおいて、結合タンパク質が存在しない混合物の上清は、アッセイにおいて、抗体捕捉段階に直接進み、使用される。 50

【0168】

均一系前処理試薬の使用ではこのような分離段階はない。抗体捕捉段階において、試験試料の混合物全体及び前処理試薬を捕捉抗体と接触させる。このようなアッセイのために使用される前処理試薬は、通常、抗体捕捉段階の前又は抗体捕捉段階での抗体との接触中に、前処理済み試験試料混合物中で希釈される。このような希釈にもかかわらず、抗体捕捉中、試験試料混合物中には、前処理試薬（例えば、5 Mメタノール及び/又は0.6 Mエチレングリコール）のある一定量が依然として存在（又は残存）する。

【0169】

前処理試薬は、本発明の免疫アッセイ及びキットとの使用に適切な何らかの試薬であり得る。前処理試薬は、場合によっては、(a) 1以上の溶媒（例えばメタノール及びエチレングリコール）及び塩、(b) 1以上の溶媒、塩及び界面活性剤、(c) 界面活性剤又は(d) 界面活性剤及び塩を含む。前処理試薬は、当技術分野で公知であり、このような前処理は、文献に記載のような（例えば、Yatscoffら、Abbott TDX Monoclonal Antibody Assay Evaluated for Measuring Cyclosporine in Whole Blood、Clin. Chem.、36:1969-1973 (1990) 及びWallemacqら、Evaluation of the New AxSYM Cyclosporine Assay: Comparison with TDX Monoclonal Whole Blood and EMIT Cyclosporine Assays、Clin. Chem. 45:432-435 (1999) 参照）及び/又は市販されているような、例えば、Abbott TDX、AxSYM^(R) 及びARCHITECT^(R) 分析装置（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）でのアッセイのために用いられるように、使用することができる。さらに、Abbottの米国特許第5,135,875号、欧州特許公開第0471293号、米国特許出願第60/878,017号（2006年12月29日出願）；及び米国特許出願第US2008-0020401号（前処理に関するその教示に対してその全体において参照により組み込まれる。）に記載のように前処理を行うことができる。

【0170】

F. ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片免疫アッセイ

本開示は、免疫アッセイにも関する。具体的には、ある態様において、本開示は、本明細書中、セクションBに記載のヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片を用いる、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片の検出のための、改善された免疫アッセイに関する。別の態様において、本開示は、本明細書中、セクションCに記載の抗体を用いる免疫アッセイに関する。

【0171】

本開示の免疫アッセイは、以下に限定されないがサンドイッチ方式など、当技術分野で公知の何らかの方式を用いて行うことができる。例えば、試験試料中のヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片を分離し、定量するために、少なくとも2種類の抗体が使用され得る。具体的には、少なくとも2種類の抗体は、「サンドイッチ」と呼ばれる免疫複合体を形成するヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片のある一定のエピトープに結合する。一般に、この免疫アッセイにおいて、試験試料中のヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片を捕捉するために、1以上の抗体（これらの抗体は「捕捉」抗体と呼ばれることが多い。）が使用され得、検出可能な（即ち定量可能な）標識をサンドイッチに結合させるために1以上の抗体が使用され得る（これらの抗体は、「検出抗体」又は「連結体」と呼ばれることが多い。）。本開示の免疫アッセイは、心血管疾患、鎌状赤血球病、慢性閉塞性肺疾患、加齢黄斑変性症、末梢血管閉塞性疾患、炎症、子癇前症、乾癬、クローン病、子宮内膜症、関節リウマチ又はそれらの何らかの組み合わせに対象が罹患しているか否かを評価するために行うことができる。

【0172】

上記で簡潔に述べたことにおいて、ある態様において、本開示は、本明細書中セクションBに記載のヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片を使用する、ヒトPLGF-1

10

20

30

40

50

又はヒトP1GF-1断片の検出のための免疫アッセイの改善に関する。本明細書中に記載のようなこの特定の方法は、捕捉及び/又は検出のための何らかの抗体を用いて、あらゆるヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片免疫アッセイで使用することができる。ある実施形態において、従って、本開示は、試験試料中のヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片の存在を検出するための方法の改善を提供し、この方法は、

(a) ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片/抗体複合体の形成を可能にする時間及び条件下で、ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片が疑われる試験試料を前記ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片に特異的な少なくとも1つの抗体と接触させることと、

(b) 前記ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片の存在を示すときに形成されるヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片/抗体複合体を検出することと、を含み、

この方法の改善は、検量物質又は対照として、本明細書中セクションBに記載のようなヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片(例えば、場合によっては、グリコシル化されたヒトP1GF-1、グリコシル化されたヒトP1GF-1断片、脱グリコシル化されたヒトP1GF-1又は脱グリコシル化されたヒトP1GF-1断片であり得る。)である検量物質又は対照を使用することを含む。

【0173】

一般的に言って、ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片(例えば含有する疑い)について試験されている試験試料を、少なくとも1つの捕捉抗体及び(第二の検出抗体又は第三の検出抗体の何れかである)少なくとも1つの検出抗体と、同時に、又は連続してあらゆる順番で、接触させることができる。例えば、試験試料を、最初に少なくとも1つの捕捉抗体と接触させ、次いで(連続して)少なくとも1つの検出抗体と接触させ得る。あるいは、試験試料を、最初に少なくとも1つの検出抗体と接触させ、次いで(連続して)少なくとも1つの捕捉抗体と接触させ得る。さらに別の代替法において、捕捉抗体及び検出抗体を同時に試験試料と接触させ得る。

【0174】

サンドイッチアッセイ方式において、第一の抗体/ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片複合体の形成を可能にする条件下で、ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片を含有する疑いのある試験試料を、最初に、少なくとも1つの第一の捕捉抗体と接触させる。複数の捕捉抗体が使用される場合、第一の多重捕捉抗体/ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片複合体が形成される。サンドイッチアッセイにおいて、抗体、好ましくは、少なくとも1つの捕捉抗体は、試験試料中で予想されるヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片の最大量のモル過剰量で使用される。例えば、緩衝液(例えば微小粒子コーティング緩衝液)1mLあたり抗体約5µg/mLから約1mg/mLを使用することができる。

【0175】

場合によっては、少なくとも1つの捕捉抗体(例えば第一の捕捉抗体)と試験試料を接触させる前に、試験試料からの第一の抗体/ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片複合体の分離を促進する固体支持体に、少なくとも1つの捕捉抗体を結合させ得る。以下に限定されないが、ウェル、チューブ又はビーズの形態のポリマー材料製の固体支持体を含む、当技術分野で公知の何らかの固体支持体を使用することができる。吸着によって、化学カップリング剤を用いた共有結合によって又は当技術分野で公知のその他の手段によって、固体支持体に抗体を結合させることができる(ただし、このような結合は、抗体の、ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片への結合能を妨害しない)。あるいは、ストレプトアビジン又はビオチンで既に被覆された微小粒子と、抗体を結合させることができる(例えば、Seradyn、Indianapolis、Indianaから入手可能な、Power-Bind™ SA-MPストレプトアビジン被覆微小粒子を用いて)。あるいは、抗種特異的モノクローナル抗体で既に被覆されている微小粒子を用いて、抗体を結合させ得る。さらに、必要に応じて、抗体上での様々な官能基との反応を可能にするために、固体支持体を誘導体化することができる。このような誘導体化は、以下に限

10

20

30

40

50

定されないが、無水マレイン酸、N-ヒドロキシスクシンイミド及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどのある種のカップリング剤の使用を必要とする。

【0176】

ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片を含有することについて試験される及び/又は含有する疑いがある試験試料を、少なくとも1つの捕捉抗体(例えば第一の捕捉抗体)と接触させた後、第一の抗体(又は多重抗体)-ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体の形成を可能にするために、混合物を温置する。約4.5から約10.0のpHで、約2 から約45 の温度で、少なくとも1分間から約18時間、好ましくは約1分間から20分間、最も好ましくは約18分間、温置することができる。1つの段階で(試験試料と、少なくとも1つの捕捉抗体と、少なくとも1つの検出抗体と、を全て連続的に又は同時に反応容器に添加することを意味する。)又は複数の段階(2段階、3段階など)で、本明細書中に記載の免疫アッセイを行うことができる。

10

【0177】

(第一又は多重)捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体の形成後、次に、((第一又は多重)捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/第二の抗体検出複合体の形成を可能にする条件下で)この複合体を少なくとも1つの検出抗体と接触させる。少なくとも1つの検出抗体は、第二、第三、第四などの、免疫アッセイで使用される抗体であり得る。捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体が複数の検出抗体と接触させられる場合、(第一又は多重)捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/(多重)検出抗体複合体が形成される。捕捉抗体(例えば第一の捕捉抗体)と同様に、少なくとも第二の(及び続く)検出抗体が捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体と接触させられる場合、(第一又は多重)捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/(第二又は多重)検出抗体複合体の形成のために、上述の条件と同様の条件下での温置時間が必要とされる。好ましくは、少なくとも1つの検出抗体は検出可能な標識を含有する。(第一又は多重)捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/(第二又は多重)検出抗体複合体の形成前、それと同時又はその後、少なくとも1つの検出抗体(例えば第二の検出抗体)に、検出可能な標識を結合させることができる。当技術分野で公知の何らかの検出可能な標識を使用することができる。例えば、検出可能な標識は、放射性標識、例えば³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²P、³³Pなど、酵素標識、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース6-ホスフェートデヒドロゲナーゼなど、化学発光標識、例えばアクリジニウムエステル(例えば、アクリジニウムエステル、アクリジニウムSPSP(N10-(3-スルホプロピル)-N-(3-スルホプロピルなど)、ルミノール、イソルミノール、チオエステル、スルホンアミド、フェナントリジニウムエステルなど、蛍光標識、例えばフルオレセイン(5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'-6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロ-フルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネートなど)、ローダミン、フィコピリタンパク質、R-フィコエリスリン、量子ドット(硫化亜鉛被覆セレン化カドミウム)、温度標識又は免疫ポリメラーゼ連鎖反応標識などであり得る。標識への導入、標識手順及び標識の検出は、Polak及びVan Noorden、Introduction to Immunocytochemistry、第2版、Springer Verlag、N.Y.(1997)及びHaugland、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals(1996)(これは、Molecular Probes、Inc.、Eugene、Oregonにより刊行されているカタログ兼用ハンドブックである。)で見出される。

20

30

40

【0178】

直接又はカップリング剤を通じて、検出可能な標識を抗体に結合させることができる。使用することができるカップリング剤の例は、Sigma-Aldrich、St.Lo

50

uis、MOから市販されているEDAC（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、塩酸塩）である。使用することができるその他のカップリング剤は当技術分野で公知である。検出可能な標識を抗体に結合させるための方法は当技術分野で公知である。さらに、N10-(3-スルホプロピル)-N-(3-カルボキシプロピル)-アクリジニウム-9-カルボキサミド（あるいはCPSP-アクリジニウムエステルとして知られる。）又はN10-(3-スルホプロピル)-N-(3-スルホプロピル)-アクリジニウム-9-カルボキサミド（あるいはSPSP-アクリジニウムエステルとして知られる。）など、検出可能な標識の抗体へのカップリングを促進する末端基を既に含有する、多くの検出可能な標識を購入するか又は合成することができる。

【0179】

（第一又は多重）捕捉抗体/ヒトヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/（第二又は多重）検出抗体複合体は、標識の定量前に、試験試料の残りから分離することができる（しかし、分離しなければいけない訳ではない。）。例えば、少なくとも1つの捕捉抗体（例えば第一の捕捉抗体）は、以下に限定されないが、ウェル又はビーズなどの固体支持体に結合される場合、固体支持体と接触しないように（試験試料の）液体を除去することによって分離を行うことができる。あるいは、少なくとも第一の捕捉抗体が固体支持体に結合される場合、第一の（多重）抗体/ヒトヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/第二の（多重）抗体複合体を形成させるために、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片-含有試料及び少なくとも1つの第二の検出抗体にこれを同時に接触させ、次いで液体（試験試料）を固体支持体に接触しないように除去することができる。少なくとも1つの第一の捕捉抗体が固体支持体に結合されない場合、標識量の定量のために、（第一又は多重）捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/（第二又は多重）検出抗体複合体を試験試料から除去する必要はない。

【0180】

標識された捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/検出抗体複合体（例えば第一の捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/第二の検出抗体複合体）の形成後、当技術分野で公知の技術を用いて、複合体中の標識量を定量する。例えば、酵素標識が使用される場合、発色など、定量可能な反応をもたらす標識に対する基質と標識複合体を反応させる。標識が放射性標識である場合、シンチレーションカウンターを用いて標識を定量する。標識が蛍光標識である場合、ある色の光（「励起波長」として知られる。）で標識を刺激し、刺激に反応して標識により放射される別の色（「発光波長」として知られる。）を検出することにより、標識を定量する。標識が化学発光標識である場合、目視で、又は、照度計、X線フィルム、高速度撮影フィルム、CCDカメラなどを用いることによるかの何れかで、放射される光を検出し、標識を定量する。複合体中の標識の量を定量したら、既知の濃度のヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片の連続希釈物を用いて作成された標準曲線を使用することにより試験試料中のヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片の濃度を決定する。ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片の連続希釈物を使用すること以外に、重量測定法で、質量分析により及び当技術分野で公知のその他の技術により、標準曲線を作成することができる。

【0181】

別の態様において、例えば、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片を含有する疑いのある試験試料中でのヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片の存在を検出するための方法において、免疫診断試薬として、本明細書中セクションCに記載の抗体を使用することができる。この方法は、

（a）ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/抗体複合体の形成を可能にする時間及び条件下で、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片を含有する疑いのある試料を本明細書中に記載のような免疫診断試薬と接触させ；

（b）抗原、即ち、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片の存在を示す場合に形成されるヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/抗体複合体を検出する、工程を含む。

10

20

30

40

50

【0182】

一実施形態において、本免疫診断試薬は、次のものからなる群から選択される1以上の抗体を含む。

【0183】

(a) 配列番号32のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域を有する、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体；

(b) 配列番号29のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を有する、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体；

(c) 配列番号32のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域及び配列番号29のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を有する、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体；

(d) ATCC受託番号PTA-8536を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-255-713により産生される抗体；

(e) 配列番号35のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域を有する、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体；

(f) 配列番号43のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を有する、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体；

(g) 配列番号35のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域及び配列番号43のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を有する、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体；及び

(h) ATCC受託番号PTA-8539を有するマウスハイブリドーマ細胞株2-826-335により産生される抗体。

【0184】

捕捉抗体、検出抗体として又は捕捉及び検出抗体として、本開示の抗体（例えば、即ちセクションCに記載のもののような）を使用して、優れた免疫アッセイ、特にサンドイッチアッセイを行うことができる。例えば、捕捉抗体の少なくとも1つ、検出抗体の少なくとも1つ又は捕捉抗体もしくは検出抗体の両方が、ATCC受託番号PTA-8536を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-255-713又はATCC受託番号PTA-8539を有するマウスハイブリドーマ細胞株2-826-335により産生される抗体であり得る。

【0185】

またさらなる態様において、ヒトPLGF-1アッセイは、遊離ヒトPLGF-1にのみ結合し、sFlt-1に結合したヒトPLGF-1を排除する捕捉抗体を利用するモノクローナル抗体サンドイッチを使用する。捕捉された遊離ヒトPLGF-1の量は、アクリジニウム付加抗ヒトPLGF-1モノクローナル抗体で検出する。ATCC受託番号PTA-8539を有し、2007年7月12日に寄託されたマウスハイブリドーマ細胞株2-826-335により産生されるモノクローナル抗体は、遊離ヒトPLGF-1にのみ結合し、sFlt-1に結合したヒトPLGF-1を排除する捕捉抗体として使用することができる。場合によっては、使用することができる検出抗体は、ATCC受託番号PTA-8536を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-255-713により産生される抗体である。

【0186】

ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片（例えば含有する疑い）について試験されている試験試料を、少なくとも1つの捕捉抗体及び（第二の検出抗体又は第三の検出抗体の何れかである）少なくとも1つの検出抗体と、同時に、又は連続してあらゆる順番で、接触させることができる。例えば、試験試料は、少なくとも1つの捕捉抗体と最初に接触させ、次いで（連続して）少なくとも1つの検出抗体と接触させ得る。あるいは、試験試料を、最初に少なくとも1つの検出抗体と接触させ、次いで（連続して）少なくとも1つの捕捉抗体と接触させ得る。さらに別の代替法において、試験試料を、捕捉抗体及び検出抗体と同時に接触させ得る。

10

20

30

40

50

【0187】

サンドイッチアッセイ方式において、第一の抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体の形成を可能にする条件下で、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片を含有する疑いのある試験試料を、少なくとも1つの第一の捕捉抗体と最初に接触させる。複数の捕捉抗体が使用される場合、第一の多重捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体が形成される。サンドイッチアッセイにおいて、抗体、好ましくは少なくとも1つの捕捉抗体は、試験試料中で予想されるヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片の最大量のモル過剰量で使用される。例えば、緩衝液(例えば微小粒子コーティング緩衝液)1mLあたり抗体約5µg/mLから約1mg/mLを使用することができる。捕捉抗体として使用することができるその他の抗体の例には、以下に限定されないが、(1)モノクローナル抗体264;(2)ポリクローナル抗体pB264;及び/又は(3)ラットモノクローナル抗体04が含まれる。

10

【0188】

場合によっては、少なくとも1つの捕捉抗体(例えば第一の捕捉抗体)と試験試料を接触させる前に、試験試料からの第一の抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体の分離を促進する固体支持体に、少なくとも1つの捕捉抗体を結合させ得る。以下に限定されないが、ウェル、チューブ又はビーズの形態のポリマー材料製の固体支持体を含む、当技術分野で公知の何らかの固体支持体を使用することができる。吸着によるか、化学カップリング剤を用いた共有結合によるか、又は当技術分野で公知のその他の手段によって、固体支持体に抗体を結合させることができる(ただし、このような結合は、抗体の、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片への結合能を妨害しない)。あるいは、ストレプトアビジン又はビオチンで既に被覆した微小粒子と、抗体(antibody又はantibodies)を結合させることができる(例えば、Seradyn、Indianapolis、Indianaから入手可能な、Power-BindTMSA-MPストレプトアビジン被覆微小粒子を用いて)。あるいは、抗種特異的モノクローナル抗体で既に被覆されている微小粒子と、抗体を結合させることができる。さらに、必要に応じて、抗体上での様々な官能基との反応を可能にするために、固体支持体を誘導体化することができる。このような誘導体化は、以下に限定されないが、無水マレイン酸、N-ヒドロキシスクシンイミド及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどのある種のカップリング剤の使用を必要とする。

20

30

【0189】

ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片を含有することについて試験される、及び/又は含有する疑いがある試験試料を少なくとも1つの捕捉抗体(例えば第一の捕捉抗体)と接触させた後、第一の抗体(又は多重抗体)-ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体の形成を可能にするために、混合物を温置する。約4.5から約10.0のpHで、約2 から約45 の温度にて、少なくとも1分から約18時間、好ましくは約1分から20分間、最も好ましくは約18分間、温置することができる。1つの段階で(試験試料と、少なくとも1つの捕捉抗体と、少なくとも1つの検出抗体と、を全て連続的に又は同時に反応容器に添加することを意味する。)又は複数の段階(2段階、3段階など)で、本明細書中に記載の免疫アッセイを行うことができる。

40

【0190】

(第一又は多重)捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体の形成後、次に、((第一又は多重)捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/第二の抗体検出複合体の形成を可能にする条件下で)この複合体を少なくとも1つの検出抗体と接触させる。少なくとも1つの検出抗体は、第二、第三、第四など、免疫アッセイで使用される抗体であり得る。捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体を複数の検出抗体と接触させる場合、(第一又は多重)捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/(多重)検出抗体複合体が形成される。検出抗体として使用することができるその他の抗体の例には、以下に限定されないが、(1)モノクローナル抗体264;(2)ポリクローナル抗体pB264;及び/又は(2)ラットモノクロー

50

ナル抗体04が含まれる。

【0191】

捕捉抗体（例えば第一の捕捉抗体）と同様に、少なくとも第二の（及び続く）検出抗体を捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片複合体と接触させる場合、（第一又は多重）捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/（第二又は多重）検出抗体複合体の形成のために、上述の条件と同様の条件下での温置時間が必要とされる。好ましくは、少なくとも1つの検出抗体は検出可能な標識を含有する。（第一又は多重）捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/（第二又は多重）検出抗体複合体の形成前に、それと同時に又はその後、少なくとも1つの検出抗体（例えば第二の検出抗体）に、検出可能な標識を結合させることができる。当技術分野で公知の何らかの検出可能な標識を使用することができる。例えば、検出可能な標識は、放射性標識、例えば³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²P、³³Pなど、酵素標識、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース6-ホスフェートデヒドロゲナーゼなど、化学発光標識、例えばアクリジニウムエステル、ルミノール、イソルミノール、チオエステル、スルホンアミド、フェナントリジニウムエステルなど、蛍光標識、例えばフルオレセイン（5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'-6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロ-フルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネートなど）、ローダミン、フィコビリタンパク質、R-フィコエリスリン、量子ドット（硫化亜鉛被覆セレン化カドミウム）、温度標識又は免疫ポリマーゼ連鎖反応標識などであり得る。標識への導入、標識手順及び標識の検出は、Polak及びVan Noorden、Introduction to Immunocytochemistry、第2版、Springer Verlag、N.Y.（1997）及びHaugland、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals（1996）（これは、Molecular Probes、Inc.、Eugene、Oregonにより刊行されているカタログ兼用ハンドブックである。）で見出される。

【0192】

直接又はカップリング剤を通じて、検出可能な標識を抗体に結合させることができる。使用することができるカップリング剤の例は、Sigma-Aldrich、St. Louis、MOから市販されているEDAC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド、塩酸塩）である。使用することができるその他のカップリング剤は当技術分野で公知である。検出可能な標識を抗体に結合させるための方法は当技術分野で公知である。さらに、N10-（3-スルホプロピル）-N-（3-カルボキシプロピル）-アクリジニウム-9-カルボキサミド（あるいはCPSP-アクリジニウムエステルとして知られる。）又はN10-（3-スルホプロピル）-N-（3-スルホプロピル）-アクリジニウム-9-カルボキサミド（あるいはSPSP-アクリジニウムエステルとして知られる。）など、抗体への検出可能な標識のカップリングを促進する末端基を既に含有する、多くの検出可能な標識を購入するか又は合成することができる。

【0193】

（第一又は多重）捕捉抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/（第二又は多重）検出抗体複合体は、標識の定量前に、試験試料の残りから分離することができる（しかし、分離しなければいけない訳ではない。）。例えば、少なくとも1つの捕捉抗体（例えば第一の捕捉抗体）は、ウェル又はビーズなどの固体支持体に結合される場合、固体支持体と接触しないように（試験試料の）液体を除去することによって分離を行うことができる。あるいは、少なくとも第一の捕捉抗体が固体支持体に結合される場合、第一の（多重）抗体/ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片/第二の（多重）抗体複合体を形成させるために、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片含有試料及び少なくとも1つの第二の検出抗体とこれを同時に接触させ、次いで液体（試験試料）を固体支持体に接触しないように除去することができる。少なくとも1つの第一の捕捉抗体が固体支持体

10

20

30

40

50

に結合されない場合、標識量の定量のために（第一又は多重）捕捉抗体／ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片／（第二又は多重）検出抗体複合体を試験試料から除去する必要はない。

【0194】

標識された捕捉抗体／ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片／検出抗体複合体（例えば第一の捕捉抗体／ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片／第二の検出抗体複合体）の形成後、当技術分野で公知の技術を用いて、複合体における標識量を定量する。例えば、酵素標識が使用される場合、発色など、定量可能な反応をもたらす標識に対する基質と、標識された複合体を反応させる。標識が放射性標識である場合、シンチレーションカウンターを用いて標識を定量する。標識が蛍光標識である場合、ある色の光（「励起波長」として知られる。）で標識を刺激し、刺激に反応して標識により放射される別の色（「発光波長」として知られる。）を検出することにより、標識を定量する。標識が化学発光標識である場合、視覚的に、又は、照度計、X線フィルム、高速度撮影フィルム、CCDカメラなどを用いることにより、放射される光を検出し、標識を定量する。複合体における標識量を定量したら、既知の濃度のヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片の連続希釈物を用いて作成された標準曲線を使用することにより、試験試料中のヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片の濃度を決定する。ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片の連続希釈物を使用すること以外に、重量測定法で、質量分析により及び当技術分野で公知のその他の技術により、標準曲線を作成することができる。

【0195】

ヒトP1GF-1又はヒトP1GF-1断片の量を測定するために試験されている試験試料を、少なくとも1つの捕捉抗体及び（第二の検出抗体又は第三の検出抗体の何れかである）少なくとも1つの検出抗体と、同時に、又は連続してあらゆる順番で、接触させることができる。例えば、試験試料を、少なくとも1つの捕捉抗体と最初に接触させ、次いで（連続して）少なくとも1つの検出抗体と接触させ得る。あるいは、試験試料を、最初に少なくとも1つの検出抗体と接触させ、次いで（連続して）少なくとも1つの捕捉抗体と接触させ得る。さらに別の代替法において、捕捉抗体及び検出抗体を同時に試験試料と接触させ得る。

【0196】

言うまでもないが、本明細書中に記載のような方法及びキットは、必ず、免疫アッセイを遂行するためのその他の試薬及び方法を包含する。例えば、当技術分野で公知のもの及び／又は、連結体希釈剤として及び／又は検量物質希釈剤として、例えば洗浄に対して使用されるために容易に調製され得るか又は最適化され得るものなどの様々な緩衝液が包含される。代表的な連結体希釈剤は、2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）、その他の塩、タンパク質阻害薬、抗菌剤及び界面活性剤を含有する、ARCHITECT^(R)ヒトP1GF-1連結体希釈剤（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）である。代表的な検量物質希釈剤は、ARCHITECT^(R)ヒトP1GF-1検量物質希釈剤（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）であり、これは、MES、その他の塩、タンパク質阻害薬及び抗菌剤を含有する緩衝液を含む。

【0197】

さらに、既に述べられているように、本方法及びキットは、場合によっては、自動又は半自動システムでの使用に適應する。非自動化システム（例えばELISA）と比較した場合の、自動又は半自動システムとの間の相違の一部には、捕捉抗体が連結される基質（サンドイッチ形成及び検体反応性に影響を与え得る。）及び、捕捉、検出及び／又は何らかの任意の洗浄段階の長さ及びタイミングが含まれる。ELISAなどの非自動化方式が、試料及び捕捉試薬との比較的長い温置時間（例えば約2時間）を含み得る一方で、自動又は半自動方式（例えばARCHITECT^(R)）の温置時間は比較的短いものであり得る（例えばARCHITECT^(R)の場合、およそ18分間）。同様に、ELISAなどの非自動化方式では、連結体試薬（Pb264）などの検出抗体が比較的長い時間温

10

20

30

40

50

置され得る一方で（例えば約2時間）、自動又は半自動方式（例えばARCHITECT^(R)）の温置時間は比較的短いものであり得る（例えばARCHITECT^(R)の場合、およそ4分間）。

【0198】

自動又は半自動アッセイ（例えば、本明細書中、実施例に記載のようなAbbott ARCHITECT^(R)アッセイ）を定量化し、比較するために（非自動化アッセイ（例えばELISA）と比較した場合）、様々なパラメータを使用することができる。しかし、ある態様において、本明細書中に包含されるような自動又は半自動アッセイが遊離PLGFを検出することに関して、より感度が高いか又は潜在的により特異的であるという点で、本明細書中に包含されるような自動又は半自動アッセイは、非自動化アッセイ（例えば、ELISA）よりも「優れている」と考えることができる。これは、自動又は半自動アッセイが、sFlt-1に対してより大きい阻害又は感度を示し、従って、遊離PLGFを検出する可能性がより高いという事実により裏付けられる。

10

【0199】

G. ヒトPLGF-1免疫アッセイキット

本開示は、試験試料中の、抗原、即ち、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1の存在を検出するための診断キットも企図する。ある態様において、このようなキットは、本明細書中、セクションCで既に記載の免疫診断試薬（例えば抗体）の1以上を含み得る。より具体的には、本キットが免疫アッセイを行うためのキットである場合、本キットは、場合によっては、本明細書中に記載の免疫診断試薬及び説明書を含み得る。別の態様において、このようなキットは、本明細書中、セクションBで既に記載のような少なくとも1つの検量物質又は対照を含む。またさらに別の態様において、このようなキットは、本明細書中、セクションCで既に記載の免疫診断試薬（例えば抗体）の1以上及び、本明細書中、セクションBで既に記載のような少なくとも1つの検量物質又は対照を含む。さらに、及び場合によっては、これらの各キットは、市販のプラットフォームでの使用に対して最適化され得るか又は様々なその他の方式において（例えば、電気化学的又はその他の携帯用又はポイントオブケアアッセイシステムにおいて）採用され得る。

20

【0200】

一態様において、本開示は、本明細書中、セクションCに記載の抗体の1以上を含む、診断用及び品質管理キットをさらに提供する。例えば、このようなキットは、次のうち少なくとも1つを含有し得る。

30

【0201】

(a) 配列番号32のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域を有する、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体；

(b) 配列番号29のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を有する、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体；

(c) 配列番号32のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域及び配列番号29のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を有する、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体；

(d) ATCC受託番号PTA-8536を有するマウスハイブリドーマ細胞株1-255-713により産生される抗体；

40

(e) 配列番号35のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域を有する、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体；

(f) 配列番号43のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を有する、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体；

(g) 配列番号35のアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン領域及び配列番号43のアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン領域を有する、ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片に特異的に結合する単離された抗体；

(h) ATCC受託番号PTA-8539を有するマウスハイブリドーマ細胞株2-826-335により産生される抗体；及び

50

(i) (a) - (h) の何れかの組み合わせ。

【 0 2 0 2 】

場合によっては、これらのキットは、品質管理試薬を含む（例えば、感度パネル、検量物質及び陽性対照）。検量物質又は対照は、本明細書中、セクション B で既に記載のような少なくとも 1 つの検量物質又は対照（即ち、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8 及び配列番号 1、2、3、4、5、6、7 又は 8 の組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1、グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 断片、脱グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 又は脱グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 断片）であり得る。品質管理試薬の調製は、当技術分野で周知であり、例えば、様々な免疫診断用製品の挿入シートに記載されている。P 1 G F - 1 感度パネルメンバーは、場合によっては、例えば本発明による P 1 G F - 1 抗体の既知の量を適切なアッセイ緩衝液（例えばリン酸緩衝液）に添加することによって、例えば「低」から「高」の範囲の P 1 G F - 1 抗体の既知の量を含有する様々な量で調製され得る。これらの感度パネルメンバーは、場合によっては、アッセイ性能特性を確立するために使用され、さらに、場合によっては、免疫アッセイキット試薬の完全性及びアッセイの標準化の有用な指標となる。

10

【 0 2 0 3 】

別の実施形態において、本開示は、アッセイ性能特性を評価するための及び / 又はこのアッセイで使用される抗原の完全性を定量及び監視するための、感度パネルとしての使用のための、1 つ又はそれ以上の本開示の（例えば、即ち、本明細書中、セクション C に記載の）抗体を含む、品質管理キットを提供する。

20

【 0 2 0 4 】

これらのキットで提供される抗体は、フルオロフォア、放射性部分、酵素、ビオチン / アビジン標識、発色団、化学発光標識などの検出可能標識を組み込み得るか又は本キットは、抗体を標識するための試薬、又は抗体（例えば検出抗体）を検出するための及び / 又は抗原を標識するための試薬、又は抗原を検出するための試薬を含み得る。この抗体、検量物質及び / 又は対照は、個別の容器中で提供され得るか又は適切なアッセイ方式に、例えばマイクロタイタープレートに、予め分配され得る。

【 0 2 0 5 】

別の態様において、本開示は、本明細書中、セクション B で既に記載のような少なくとも 1 つの検量物質又は対照を含有する免疫アッセイを行うためのキットに関する。しかし、好ましくは、本明細書中に記載のような免疫アッセイキットの場合、検量物質又は対照は、ヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片、特に、グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 又はグリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 断片、脱グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 又は脱グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 断片である。

30

【 0 2 0 6 】

従って、これらのキットは、少なくとも 1 つの検量物質又は少なくとも 1 つの対照又は少なくとも 1 つの検量物質及び少なくとも 1 つの対照の組み合わせを含み得、この場合、この検量物質又は対照は、本開示の、グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1、グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 断片、脱グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 又は脱グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 断片を含む。好ましくは、この少なくとも 1 つの検量物質又は少なくとも 1 つの対照は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8 及び配列番号 1、2、3、4、5、6、7 又は 8 の組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1、グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 断片、脱グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 又は脱グリコシル化されたヒト P 1 G F - 1 断片である。本キットが免疫アッセイを行うためのキットである場合、本キットは、場合によっては、(1) ヒト P 1 G F - 1 又はヒト P 1 G F - 1 断片に特異的に結合する少なくとも 1 つの捕捉抗体；(2) 少なくとも 1 つの連結体；(3) 免疫アッセイを行うための 1 以上の説明書；又は(4) 又は項目 (1) - (3) の何らかの組み合わせをさらに含む。項目 (1) 及び (2) は

40

50

、本明細書中、セクションCに記載の抗体の何れかであり得る。このようなキット中で提供される抗体は、何れも、フルオロフォア、放射性部分、酵素、ビオチン/アビジン標識、発色団、化学発光標識などの検出可能標識を組み込み得る。あるいは、本キットは、抗体を標識するための試薬、又は抗体（例えば検出抗体）を検出するための及び/又は抗原を標識するための試薬、又は抗原を検出するための試薬を含み得る。

【0207】

本明細書中に記載のような方法及びキットはまた、例えば米国特許第5,089,424号及び同第5,006,309号に記載のような及び例えばAbbott Laboratories (Abbott Park, IL)により市販されているような、様々な自動及び半自動システム（固相が微小粒子を含むものを含む。）での使用にも適応し得る。Abbottのプラットフォームには、以下に限定されないが、ARCHITECT^(R)、AxSYM^(R)、IMx^(R)（例えば、米国特許第5,294,404号（これは、その全体において参照により本明細書によって組み込まれる。）参照）、PRISM^(R)、EIA（ピース）及びQuantumTM I I機器ならびにその他のプラットフォームが含まれる。さらに、本開示は、場合によっては、サンドイッチ免疫アッセイを行うためのAbbott Laboratoriesの市販のPoint of Care（ポイントオブケア）（i-STAT^(R)；Abbott Laboratories、Abbott Park, IL）電気化学的免疫アッセイシステムに適応可能である。

10

【0208】

免疫センサー及び、使い捨て試験装置における、それらの製造及び操作の方法は、例えば、米国特許第5,063,081号、米国特許出願第2003/0170881号、米国特許出願第2004/0018577号、米国特許出願第2005/0054078号及び米国特許出願第2006/0160164号（これらは、同上に関するそれらの教示に対して参照によりそれらの全体において組み込まれる。）に記載されている。

20

【0209】

特に、I-STAT^(R)システムへの本自己抗体アッセイの適応に関して、次の構成が好ましい。微細加工シリコンチップは、金アンペロメトリー作用電極及び銀-塩化銀参照電極のペアを用いて製造される。作用電極の一方において、捕捉抗体が固定化されたポリスチレンピース（0.2mm直径）を、電極上のパターン化されたポリビニルアルコールのポリマーコーティングに接着させる。このチップは、免疫アッセイに適切な流体光学方式でI-STAT^(R)カートリッジへと組み立てられる。カートリッジの試料保持チャンバーの壁の一部に、アルカリホスファターゼ（又はその他の標識）で標識された第二の検出抗体を含む層がある。カートリッジの流体ポーチ内には、p-アミノフェノールホスフェートを含む水性試薬が入る。

30

【0210】

操作中、PLGF-1を含有する疑いがある試料が試験カートリッジの保持チャンバーに添加され、このカートリッジがI-STAT^(R)リーダーに挿入される。第二の抗体（検出抗体）を試料中へと溶解させた後、カートリッジ内のポンプ成分により、試料が、チップを含有するコンジットに入れられる。ここで、これを振動させて、第一の捕捉抗体と、PLGF-1と、標識された第二の検出抗体との間のサンドイッチの形成を促進する。アッセイの最後から2番目の段階で、液体をポーチからコンジットに流出させ、試料をチップから洗い流して廃液チャンバーに入れる。このアッセイの最終段階で、アルカリホスファターゼ標識が、p-アミノフェノールホスフェートと反応して、リン酸基を切断し、遊離したp-アミノフェノールが作用電極において電気化学的に酸化されるようになる。測定される電流に基づき、読み取り装置は、内蔵アルゴリズム及び出荷時に測定された標準曲線により、試料中の検体PLGF-1の量を計算することができる。

40

【0211】

さらに言うまでもないが、本明細書中に記載のような方法及びキットは、必ず、免疫アッセイを行うための、その他の試薬及び方法を包含する。例えば、当技術分野で公知のも

50

の及び/又は連結体希釈剤として及び/又は検量物質希釈剤として、例えば洗浄に対して使用されるために容易に調製され得るか又は最適化され得るものなどの様々な緩衝液が包含される。代表的な連結体希釈剤は、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、その他の塩、タンパク質阻害薬、抗菌剤及び界面活性剤を含有する、ARCHITECT^(R)ヒトPLGF-1連結体希釈剤(Abbott Laboratories、Abbott Park、IL)である。代表的な検量物質希釈剤は、ARCHITECT^(R)ヒトPLGF-1検量物質希釈剤(Abbott Laboratories、Abbott Park、IL)であり、これは、MES、その他の塩、タンパク質阻害薬及び抗菌剤を含有する緩衝液を含む。

【0212】

さらに、既に述べられたように、本方法及びキットは、場合によっては、自動又は半自動システムでの使用に適應する。非自動化システム(例えばELISA)と比較した場合の、自動又は半自動システムとの間の相違の一部には、捕捉抗体が連結される基質(サンドイッチ形成及び検体反応性に影響を与え得る。)及び、捕捉、検出及び/又は何らかの任意の洗浄段階の長さ及びタイミングが含まれる。ELISAなどの非自動化方式が、試料及び捕捉試薬との比較的長い温置時間(例えば約2時間)を含み得る一方で、自動又は半自動方式(例えばARCHITECT^(R))の温置時間は比較的短いものであり得る(例えばARCHITECT^(R)の場合、およそ18分間)。同様に、ELISAなどの非自動化方式では、連結体試薬(Pb264)などの検出抗体が比較的長い時間温置され得る一方で(例えば約2時間)、自動又は半自動方式(例えばARCHITECT^(R))の温置時間は比較的短いものであり得る(例えばARCHITECT^(R)の場合、およそ4分間)。

【0213】

例として、限定ではなく、本開示の実施例をここで与える。

【実施例1】

【0214】

ヒトPLGF-1(1-131)野生型抗原

ヒトPLGF-1(1-131)野生型遺伝子クローニング

ヒトPLGF-1プラスミドクローンpCMV6-XL4-PLGF1(Origene Technologies Inc.、Rockville、MD、カタログ番号TC118512、NM_002632)を鋳型として使用した。ヒト(野生型)PLGF-1遺伝子をクローニングするために、PCRプライマー対を設計した。5'末端プライマーは、軽鎖シグナル配列の部分配列、NruI制限部位及び6xHisタグを含有し、3'末端プライマーは、NotI制限部位及びヒトPLGF-1のC末端の部分配列を含有した。5'及び3'末端プライマーを下記で示す。

【0215】

ヒトPLGF-1 5'末端プライマー(PL01)

5'-CCGGCTCGCGATGCCATCATCACCATCACCATCTGCCTGCTGTGCCCCCCCAGCAGT-3'(配列番号20);

ヒトPLGF-1 3'-末端プライマー(Plrev)

5'-CCCCGCGGCGCTCACCTCCGGGGAACAGCATC-3'(配列番号21)。

【0216】

5'及び3'プライマー及びPfx DNAポリメラーゼ(Invitrogen Corp.、Carlsbad、CA)の1.25単位とともに、2x反応緩衝液(dNTP)中でPCR反応を行った。94で15秒間、続いて68で1分間30サイクルで、このPCRを行った。全部で30サイクル行った。シグナルペプチドを含む野生型ヒトPLGF-1抗原配列を図1で示す。

【0217】

440bpのPCR産物をゲル精製し、NruI及びNotIによる制限酵素切り出し

10

20

30

40

50

を行い、次いでpJVベクターにクローニングし、E.コリDH5 に形質転換した。Abbott Laboratories (Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA) からpJVベクターを得たが、これは、アンピシリン耐性遺伝子、pUC複製起点、SV40複製起点及びEF-Iaプロモーターを含む。得られたpJVに基づくベクターをpJV-His-PLGF-1(1-131)と名付けた(図2参照)。

【0218】

形質転換されたE.コリクローンを37 で振盪しながら一晩LBブロス中で増殖させた。QIAPrepスピニングミニプレップキット(QIAGEN, Valencia, CA)により、個々のクローンからプラスミドDNAを精製し、次いで、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencingキット(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて配列決定した。配列決定によりプラスミド pJV-His-PLGF-1(1-131)-T1を選択し、Vector NTI AdvanceTMソフトウェア(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)により分析した。pJVクローンを同定したら、pJVクローンを維持するために、pJV-His-PLGF-1(1-131)プラスミドを含有する個別のE.コリDH5 細胞バンクを作製した。

【0219】

安定CHO細胞株の確立及びヒトPLGF-1の発現

下記のように、遺伝子移入及び安定したヒトPLGF-1発現のために、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子が欠失したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株(B3.2, Abbott Laboratories, Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)を使用した。CHO細胞を培養し、製造者の説明書(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)に従い、標準的リポフェクタミン2000遺伝子移入により、pJV-His-PLGF-1(1-131)プラスミドで遺伝子移入した。96ウェルプレート中の、リボヌクレオシド及びデオキシリボヌクレオシドを欠き、5%透析済みFBS(dFBS)を含有するMEM培地(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)中で、ヒトPLGF-1を遺伝子移入したCHO細胞を数週間にわたり選択した。CHOクローンが50%密集度を超えて増殖したら、CHOクローンの性能を順位付けするために、酵素免疫測定法(EIA)により上清を試験した。抗ヒトPLGF-1抗体で96ウェルEIAプレートを室温で少なくとも1時間被覆し、次いで、2%BSA/PBS緩衝液で30分間、ブロッキング処理した。CHO細胞96ウェルプレートからの上清を被覆ウェルに添加し、室温で少なくとも1時間このプレートを温置した。温置後、このプレートを洗浄し、ビオチン標識ヒトPLGF-1抗原とともに約1時間温置した。次に、このプレートを洗浄し、乾燥させ、アビジン-HRPとともに30分間温置した。O-フェニレンジアミン-2HCl(OPD)を用いてこのプレートを発色させ、492nmの光学密度で読み取りを行った。EIAにおいて最大シグナルを与えた15個のCHOクローンを増殖させ、再びアッセイした。次に、EIA再アッセイで与えられる最大シグナルに基づき8個のクローンを選択し、ヒトPLGF-1分泌を促進するためにメトトレキサート(MTX)増幅を行った。

【0220】

CHO細胞クローン#6305のメトトレキサート増幅

遺伝子移入されたCHO細胞に対して、L-グルタミン及びFBSを追加し、0.02 μM、0.1 μM、0.25 μM、0.5 μM、1 μM、2 μM、5 μMから25 μMにメトトレキサート(MTX)濃度を漸増させたMEMの一連の培地交換を行った。8%CO₂が供給された加湿培養器中で、37 にて、全てのCHO培養物を温置した。

【0221】

Clonepix FLでのコロニー選択のための、CHO半固体増殖培地用のクローン培地(Clone Medium)(Genetix Ltd.)に播種することによ

10

20

30

40

50

り、25 μ M MTX上の形質転換CHO細胞をクローン化した。細胞をこの半固体培地に播種し、加湿培養器中で37 $^{\circ}$ Cにておよそ15日間にわたり増殖させた。増殖コロニーを含有する半固体培地の表面に、Alexa-488標識抗ヒトPLGF-1-255-189を噴霧し、これをさらに24時間温置した。ClonepixFLを用いて、コロニー周囲のAF488標識1-255-189免疫-沈降から生じる蛍光強度により測定した場合にヒトPLGF-1抗原の最大量を産生するものとして同定された半固体培地コロニーを、25 μ M MTX、8 mMグルタミン及び5%透析済みFBSが追加されたMEMが1ウェルあたり0.2 mL入った96ウェル組織培養プレートに移した。加湿培養器中、37 $^{\circ}$ Cで、これらのプレートを14-15日間温置した。増殖が明らかとなったときに、マイクロタイターEIA中で、抗PLGF-1 2-826-335及びビオチン標識ヤギ抗PLGF-1ポリクローナル抗体(R&D systemsからのpAb 264)とのサンドイッチ形成能について上清を試験し、結果として、主要なクローンCHO6305を選択した。上述のEIAで抗原分泌を監視しながら、このクローンを8 mM L-グルタミン及び25 μ M MTX入りのCHO DHFR陰性培地(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)に入れた。CHOサブクローン番号6305の細胞バンクを調製し、PLGF-1(1-131)組み換え抗原(rAg)CHO6305と名付けた。

【0222】

ヒトPLGF-1(1-131)野生型抗原精製

4000 rpmでの20分間の遠心により、CHO細胞培養物を回収し、ヒトPLGF-1が分泌された上清を回収した。リン酸緩衝食塩水(PBS)、pH7.2に緩衝液を交換するために、3回、Pellicon 2 mini(Millipore, MA)を用いてこの上清をダイアフィルトレーション処理した。ニッケル-ニトリロ三酢酸(Ni-NTA Qiagen, CA)金属アフィニティークロマトグラフィーを用いて、ダイアフィルトレーション処理済みヒトPLGF-1溶液を精製した。基本的に、NI-NTAスーパーフローレジンをFPLCカラムに組み立て、3体積の蒸留水で洗浄し、洗浄緩衝液(50 mM NaH_2PO_4 、10 mMイミダゾール、300 mM NaCl、0.05% Tween 20、6 N NaOHでpHを8.0に調整)で予め平衡化した。ダイアフィルトレーション処理済みヒトPLGF-1試料を0.5 mL/分の流速でカラムに載せ、洗浄緩衝液10-20体積で洗浄し、溶出緩衝液(50 mM NaH_2PO_4 、250 mMイミダゾール、300 mM NaCl、0.05% Tween 20、6 N NaOHでpHを8.0に調整)によりヒトPLGF-1タンパク質をカラムから溶出させた。3-5リットルのリン酸緩衝食塩水(PBS)、pH7.2を用いて、精製ヒトPLGF-1タンパク質を3回透析した。

【0223】

ゲル浸透クロマトグラフィー

透析済みタンパク質試料を約5 mLに濃縮し、10体積のPBS緩衝液、pH7.2でSephacryl S100又はG3000サイズ分離カラム(例えば、Amersham Biosciences、LKB/Pharmacia)を予め平衡化した。1 mL/分の流速で試料をサイズ分離カラムに載せた。全ての分画を回収し、SDS-PAGEゲルにより分析した。ヒトPLGF-1二量体分画を集め、凍結した。

【実施例2】

【0224】

組み換えヒトPLGF-1抗原の特性評価

SDS-PAGEゲル電気泳動

還元条件又は非還元条件下で、ヒトPLGF-1組み換え抗原を発現するCHO細胞(CHOクローン#6305)において、SDS-PAGEゲル電気泳動を行った。組み換えヒトPLGF-1抗原約3 μ gを還元剤(-メルカプトエタノール)含有又は不含ローディング緩衝液と混合し、10分間沸騰させ、次いで4-20% SDS-PAGEゲルに載せ、80ボルトで1.5時間、電気泳動を行った。単量体ヒトPLGF-1は、約2

10

20

30

40

50

0 kDaに移動するはずであり(計算MW: 15.5 kDa)、二量体ヒトPLGF-1は約40 kDaに移動するはずである。機能的ヒトPLGF-1は二量体の形態である。ヒトPLGF-1抗原を発現するCHO細胞は、発現されたヒトPLGF-1の約~60-80%が二量体であり、20~40%のヒトPLGF-1が四量体であることを示した。-メルカプトエタノール含有ローディング緩衝液中の還元条件下で、二量体/四量体の形態のヒトPLGF-1を単量体に変換した(図3参照)。

【0225】

ウェスタンブロット分析

100 で、SDS及び2-メルカプトエタノールにより、精製ヒト組み換えヒトPLGF-1タンパク質およそ0.5 µgを処理し、4-20%ポリアクリルアミド-SDSゲル(Laemmliら、Nature、227:680-685(1970))において電気泳動にかけた。25 mM Tris((ヒドロキシメチル)アミノメタン)、192 mMグリシン及び2.0%メタノール、pH 8.3を含む標準的な転写用緩衝液(Towbinら、Natl. Acad. Sci、73:4350-4354(1979))中での100ボルトでの1-2時間の電気泳動によって、このゲルからニトロセルロース膜にタンパク質を転写した。タンパク質を転写し、PBS中の2%BSAでニトロセルロースをブロッキング処理した後、このニトロセルロースを使用して、ヒト組み換え抗原の存在を調べた。PBS/2%BSA緩衝液、pH 7.2 10 mL中の抗ヒトPLGF-1又は抗Hisタグモノクローナル抗体(モノクローナル抗体1-255-713又は2-826-335の何れか)の適量とともにニトロセルロース膜を温置した。このニトロセルロース膜をリン酸緩衝食塩水(PBS) pH 7.2で洗浄し、続いて、HRPに結合されたヤギ抗マウスIgG抗体を添加した。このニトロセルロース膜を室温で1から2時間温置し、続いてPBSで洗浄した。最後に、用時調製した、安定過酸化水素緩衝液中の金属増感型DAB(Pierce Biotechnology、Rockford、IL)の添加によって、タンパク質に結合した抗体を視覚化した。このアッセイから、抗ヒトPLGF-1モノクローナル抗体(即ち、モノクローナル抗体1-255-713又は2-826-335の何れか)が、非還元形態の組み換えヒトPLGF-1抗原に結合し得ることが示された(図4A、4B及び4C参照)。

【0226】

グリコシル化分析

PLGF-1グリコシル化を調べるために、ESI-MSにより、CHO細胞で発現されたヒトPLGF-1抗原を分析した。変性溶液2.2 µL、界面活性剤2.2 µL、N-グリカナーゼ、O-グリカナーゼ、シアリダーゼA、(1-4)ガラクトシダーゼ及び-N-アセチル-グルコサミニダーゼ各1 µLとともに37 で48時間、ヒトPLGF-1溶液(30 µL)を温置した。Norgen界面活性剤除去装置を用いてこの溶液を浄化し、次いでMicrocon YM-10装置を用いて脱塩した。ESI-MSにより試料を分析した。15646 Daのピークの出現により示されるように、ヒトPLGF-1の脱グリコシル化形態が現れた。このことから、CHOで発現されたヒトPLGF-1にグリカンが存在することが分かった(図5参照)。

【0227】

グリコシル化部位の決定

CHO細胞で発現されたヒトPLGF-1抗原のグリコシル化部位を調べるために、トリプシン消化、PNGase脱グリコシル化及びLC/MS/MSを行った。ヒトPLGF-1 20 µgをVacufugeで乾燥させ、変性緩衝液(0.5 M Tris-HCl、2.75 mM EDTA、6 M Guanidinium-HCl。希HClでpH 8.1 +/- 0.1に調整)30 µLで再構成した。次に、ヒトPLGF-1をDTTで還元し、ヨードアセトアミドでアルキル化した。Microcon YM-10遠心装置を用いて溶液を脱塩した。1:25(w/w)トリプシンとともに、37で一晩、脱塩溶液を温置した。トリプシン消化済みヒトPLGF-1ペプチド20 µLを微小遠心管に移した。次に、この溶液をPNGase 1 µLとともに一晩温置した。ZipTip C-18を用

10

20

30

40

50

いて脱グリコシル化ペプチドを脱塩し、C18カラムを用いてLC/MS/MSにより分析した。LC/MS/MSの結果から、CHO細胞により発現されたヒトPLGF-1が2ヶ所のグリコシル化部位、N21及びN89を有することが明らかになった。N21は完全にグリコシル化され、一方でN89は一部グリコシル化されていた(図20参照)。抽出されたイオンクロマトグラムから、N89がグリコシル化されていないヒトPLGF-1由来のペプチドに対する、化N89がグリコシルされているヒトPLGF-1由来のペプチドに関して、2.5:1前後のピーク面積比が示された。

【0228】

糖鎖構造の特性評価

LC/MS/MSを用いて、CHO細胞で発現されたヒトPLGF-1のN-グリカン
10
を分析した。変性溶液2.5µL、界面活性剤2.5µL及びProzyme N-グリカナーゼ2µLとともに、37℃で72時間、ヒトPLGF-1溶液35µLを温置した。Carbographカラムを用いて、放出されたN-グリカンを回収した。Hypercarbカラムを使用して、回収したN-グリカンをLC/MS/MSにより分析した。この実験から、8個のN-グリカンの構造が明らかになった(図21参照)。各ピークに対するデータ及び各N-グリカンに対する構造を下記表Bで提供する。

【0229】

【表2】

表B

番号	実測 m/z	荷電状態	実験的 MW	理論的 MW	構造
1	1039.8929	2	2077.7858	2077.7455	NeuAcGal2Man3GlcNAc4-Fuc
2	1185.4482	2	2368.8964	2368.8409	NeuAc2Gal2Man3GlcNAc4-Fuc
	790.6433	3	2368.9299		
3	1034.0648	3	3099.1944	3099.1053	NeuAc2LacNAc2Gal2Man3GlcNAc4-Fuc 又は LacNAcGal3Man3GlcNAc5-Fuc
	1550.5689	2	3099.1378		
4	1368.0192	2	2734.0384	2733.9731	NeuAc2Gal3Man3GlcNAc5-Fuc
	912.3489	3	2734.0467		
5	1009.3865	3	3025.1595	3025.0685	NeuAc3Gal3Man3GlcNAc5-Fuc
	1513.5565	2	3025.113		
6	1131.0991	3	3390.2973	3390.2007	NeuAc3LacNAcGal3Man3GlcNAc5-Fuc 又は NeuAc3Gal4Man3GlcNAc6-Fuc
7	1228.135	3	3681.405	3681.2961	NeuAc4Gal4Man3GlcNAc6-Fuc
8	1349.8576	3	4046.5728	4046.4283	NeuAc4LacNAcGal4Man3GlcNAc6-Fuc

略語：Fuc：フコース；Gal：ガラクトース；GlcNAc：N-アセチル-D-グルコサミン；LacNAc：Galβ1-4GlcNAc二糖；Man：マンノース；NeuAc：N-アセチルノイラミン酸。

【実施例3】

【0230】

ヒトPLGF-1断片抗原17-131

ヒトPLGF-1プラスミドクローンpCMV6-XL4-ヒトPLGF-1(Origene Technologies Inc.、Rockville、MD、カタログ番号TC118512、NM_002632)を鋳型として使用した。ヒト(野生型)PLGF-1遺伝子をクローニングするために、PCRプライマー対を設計した。5'末端プライマーは、軽鎖シグナル配列の部分配列、NruI制限部位及び6xHisタグを含有し、3'末端プライマーは、NotI制限部位及びヒトPLGF-1C末端の部分配列を含有した。5'及び3'末端プライマーを下記で示す。

【0231】

ヒトPLGF-1断片(17-131)5'末端プライマー(Plfor)

5'-CCGGCTCGCGATGCCATCATCACCATCACCAATTCGT

10

20

30

40

50

CAGAGGTGGAAGTGGTACCCCTTCCAG - 3' (配列番号24);

ヒトPLGF-1 3'-末端プライマー(Plrev)

5'-CCCCGCGGCGCTCACCTCCGGGGAACAGCATC-3'
(配列番号21)。

【0232】

5'及び3'プライマー及びPfx DNAポリメラーゼ(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)の1.25単位とともに、2x反応緩衝液(dNTP)中で、PCR反応を行った。94 で15秒、続いて68 で1分間 30サイクル、このPCRを行った。全部で30サイクル行った。シグナルペプチドを含む野生型ヒトPLGF-1断片抗原配列を図6で示す。

10

【0233】

392bp PCR産物をゲル精製し、NruI及びNotIによる制限酵素切り出しを行い、次いでpJVベクターにクローニングし、E.コリDH5 に形質転換した。Abbott Laboratories (Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)からpJVベクターを得たが、これは、アンピシリン耐性遺伝子、pUC複製起点、SV40複製起点、EF-Iaプロモーターを含む。得られたpJVに基づくベクターをpJV-His-ヒトPLGF-1(17-131)と呼ぶ。形質転換されたE.コリクローンを37 で振盪しながら一晩LBブロス中で増殖させた。QIAprepスピンミニプレップキット(QIAGEN, Valencia, CA)により、プラスミドDNAを個々のクローンから精製し、次いで、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencingキット(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて配列決定した。配列決定によりプラスミドpJV-His-PLGF-1(17-131)-T1を選択し、Vector NTI AdvanceTMソフトウェア(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)により分析した。pJVクローンを同定したら、pJVクローンを維持するために、pJV-His-PLGF-1(17-131)プラスミドを含有する個別のE.コリDH5 細胞バンクを作製した。

20

【0234】

HEK293細胞におけるヒトPLGF-1(17-131)突然変異抗原一過性発現標準的技術により、EndofreeプラスミドMaxiキット(QIAGEN, Valencia, CA)を用いて、pJV-His-ヒトPLGF-1(17-131)-T1プラスミドDNAを大量(Maxi)調製した。次に、293フェクチン(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)によって、得られた高純度プラスミドDNAをHEK293細胞に一過性に遺伝子移入した。一過性発現ヒトPLGF-1抗原突然変異体を回収し、実施例1に記載のようにダイアフィルトレーション処理した。

30

【0235】

ヒトPLGF-1(17-131)突然変異抗原精製

実施例1に記載のように、ニッケル-ニトリロ三酢酸(Ni-NTA, Qiagen, Valencia, CA)金属アフィニティークロマトグラフィー及びゲル浸透クロマトグラフィーを用いて、ダイアフィルトレーション処理済みPLGF-1(17-131)突然変異体の溶液を精製した。

40

【0236】

安定なヒトPLGF-1(17-131)突然変異体発現CHO細胞株の確立及びメトトレキセート増幅

実施例1のように、遺伝子移入及びヒトPLGF-1安定発現のために、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子が欠失したチャイニーズハムスター卵巣細胞株(CHO, B3.2)を使用した。CHO細胞を培養し、標準的なリン酸カルシウム介在遺伝子移入によって、プラスミドpJV-His-ヒトPLGF-1(17-131)-T1で遺伝子移入した。10cm組織培養プレート中の、リボヌクレオシド及びデオキシリボヌクレオシドを欠き、5%透析済みFBS(dFBS)を含有する MEM培地(Invi

50

trogen Corp., Carlsbad, CA) 中で、遺伝子移入されたヒト P L G F - 1 (1 7 - 1 3 1) C H O 細胞を数週間にわたり選択した。遺伝子移入された C H O 細胞に対して、L - グルタミン及び F B S を追加し、0 . 0 2 μ M、0 . 1 μ M、0 . 2 5 μ M、0 . 5 μ M、1 μ M、2 μ M から 5 μ M にメトトレキサート (M T X) 濃度を漸増させた - M E M の一連の培地交換を行った。8 % C O ₂ が供給された加湿培養器中で、3 7 °C にて、全ての C H O 培養物を温置した。メトトレキサート増幅後、9 6 ウェルプレート中の 5 μ M M T X を追加した M E M + 5 % d F B S 培地への希釈限界法 (e n d p o i n t d i l u t i o n) によって、5 μ M M T X 増幅 C H O 細胞をサブクローン化した。抗 P L G F - 1 マウスモノクローナル抗体で E I A 9 6 ウェルプレートを被覆し、続いて洗浄し、次いで培養 C H O 細胞クローンからの上清とともに温置し、次いで再び洗浄し、ビオチン標識ヒト P L G F - 1 (R & D s y s t e m s、M i n n e a p o l i s、M N) とともに温置し、続いて再び洗浄し、ストレプトアビジン (S A) - H R P とともにさらに 3 0 分から 1 時間温置して、E I A アッセイを行い、細胞クローンを順位付けした。O - フェニレンジアミン - 2 H C l (O P D) を用いてこのプレートを発色させ、4 9 2 n m の光学密度で読み取りを行った。E I A において最大シグナルを与えた 2 個の C H O クローンを同定した。ヒト P L G F - 1 (1 7 - 1 3 1) 突然変異体 C H O 細胞クローン # 7 8 6 を同定し、血清不含培地、即ち D H F R - C H O 培地 (S i g m a - A l d r i c h、S t . L o u i s、M O) に入れた。ヒト P L G F - 1 (1 7 - 1 3 1) r A g C H O 細胞クローン # 7 8 6 の細胞バンクを確立した。

10

【実施例 4】

20

【0237】

組み換えヒト P L G F - 1 (1 7 - 1 3 1) 抗原の特性評価

S D S - P A G E ゲル電気泳動

非還元条件下で、C H O 細胞で発現されたヒト P L G F - 1 断片 (1 7 - 1 3 1) 組み換え抗原に対して S D S - P A G E ゲル電気泳動を行った。突然変異ヒト P L G F - 1 断片 (1 7 - 1 3 1) 抗原を還元剤不含ローディング緩衝液と混合し、1 0 分間沸騰させ、次いで 4 - 2 0 % S D S - P A G E ゲルに載せ、8 0 ボルトで 1 . 5 時間、電気泳動を行った。単量体ヒト P L G F - 1 断片 (1 7 - 1 3 1) は約 1 8 k D a (計算 M W : 1 3 . 9 k D a) に移動するはずである。二量体ヒト P L G F - 1 断片 (1 7 - 1 3 1) は約 3 6 k D a に移動するはずである。ヒト P L G F - 1 断片 (1 7 - 1 3 1) 抗原を発現する C H O 細胞は、約 9 5 % を超えるヒト P L G F - 1 断片 (1 7 - 1 3 1) が二量体形態であることを示した (図 8 参照)。ウエスタンブロット分析は実施例 2 で記載する。

30

【実施例 5】

【0238】

エンテロキナーゼ切断部位を有するヒト P L G F - 1 抗原 1 - 1 3 1

ヒト P L G F - 1 プラスミドクローン p C M V 6 - X L 4 - P L G F 1 (O r i g e n e T e c h n o l o g i e s I n c .、R o c k v i l l e、M D、カタログ番号 T C 1 1 8 5 1 2、N M _ 0 0 2 6 3 2) を鋳型として使用した。

【0239】

ヒト (野生型) ヒト P L G F - 1 遺伝子をクローニングするために、P C R プライマー対を設計した。5 ' 末端プライマーは、軽鎖シグナル配列の部分配列、N r u I 制限部位及び 6 x H i s タグを含有し、3 ' 末端プライマーは、N o t I 制限部位及びヒト P L G F - 1 C 末端の部分配列を含有した。5 ' 及び 3 ' 末端プライマーを下記で示す。

40

【0240】

P L G F - 1 H i s - E K - (1 - 1 3 1) 5 ' 末端プライマー (P l 0 3)

5 ' - G G C T C G C G A T G C C A T C A T C A C C A T C A C
C A T G G T G C A G A T G A C G A C G A C A A G C T G C C T
G C T G T G C C C C C C C A G - 3 ' (配列番号 2 5) ;

P L G F - 1 3 ' - 末端プライマー (P l r e v)

5 ' - C C C C G C G G C C G C T C A C C T C C G G G A A C A G C A T C - 3 ' 50

(配列番号 21)。

【0241】

5'及び3'プライマー及びPfx DNAポリメラーゼ(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)の1.25単位とともに、2x反応緩衝液(dNTP)中で、PCR反応を行った。94 で15秒間、続いて68 で1分間 30サイクルで、このPCRを行った。全部で30サイクルを行った。シグナルペプチドを含む野生型ヒトPLGF-1断片抗原配列を図9で示す。

【0242】

460bp PCR産物をゲル精製し、NruI及びNotIによる制限酵素切り出しを行い、次いでpJVベクターにクローニングし、E.コリDH5 に形質転換した。Abbott Laboratories (Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)からpJVベクターを得たが、これは、アンピシリン耐性遺伝子、pUC複製起点、SV40複製起点及びEF-Iaプロモーターを含む。得られたpJVに基づくベクターをpJV-His-ヒトPLGF-1(1-131)と呼ぶ(図10参照)。

【0243】

形質転換されたE.コリクローンを37 で振盪しながら一晩LBブロス中で増殖させた。プラスミドDNAをQIAprepスピンミニプレップキット(QIAGEN, Valencia, CA)により個々のクローンから精製し、次いで、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencingキット(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて配列決定した。配列決定によりプラスミドpJV-His-EK-PLGF-1(1-131)-T3を選択し、Vector NTI Advance™ソフトウェア(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)により分析した。pJVクローンを同定したら、pJVクローンを維持するために、pJV-His-EK-PLGF-1(1-131)-T3プラスミドを含有する個別のE.コリDH5 細胞バンクを作製した。

【0244】

安定したPLGF-1(1-131)EK突然変異体発現CHO細胞株の確立及びメトトレキセート増幅

実施例1におけるように、遺伝子移入及び安定したヒトPLGF-1発現のために、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子を欠失したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株(CHO, B3.2)を使用した。CHO細胞を培養し、製造者の説明書(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)に従い、標準的リポフェクタミン2000遺伝子移入により、pJV-His-ヒトPLGF-1(1-131)プラスミドを用いて遺伝子移入した。10cm組織培養プレート中の、リボヌクレオシド及びデオキシリボヌクレオシドを欠き、5%透析済みFBS(dFBS)を含有するMEM培地(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)中で、遺伝子移入されたヒトPLGF-1(1-131)EK CHO細胞を数週間にわたり選択した。CHOクローンが50%密集度を超えて増殖したら、CHOクローンの性能を順位付けするために、酵素免疫アッセイ(EIA)により上清を試験した。抗ヒトPLGF-1抗体で96ウェルEIAプレートを室温で少なくとも1時間被覆し、次いで、2%BSA/PBS緩衝液で30分間、反応物をブロッキング処理した。96ウェルプレートからの上清を被覆済みウェルに添加し、室温で少なくとも1時間このプレートを温置した。温置後、このプレートを洗浄し、ビオチン標識ヒトPLGF-1抗原と約1時間温置した。次に、このプレートを洗浄し、乾燥させ、アビジン-HRPとともに30分間温置した。O-フェニレンジアミン-2HCl(OPD)を用いてこのプレートを発色させ、492nmの光学密度で読み取りを行った。EIAにおいて最大シグナルを与えた18個のCHOクローンを増殖させ、再びアッセイした。次に、EIA再アッセイで与えられる最大シグナルに基づき、8個のクローンを選択し、ヒトPLGF-1分泌を促進するためにメトトレキセート(MTX)増幅を行った。

10

20

30

40

50

【0245】

CHO細胞クローン#350のメトトレキセート増幅

遺伝子移入されたCHO細胞に対して、L-グルタミン及びFBSを追加し、0.02 μM、0.1 μM、0.25 μM、0.5 μM、1 μM、2 μM、5 μMから25 μMにメトトレキセート(MTX)濃度を漸増させた。MEMの一連の培地交換を行った。8%CO₂が供給された加湿培養器中で、37℃にて、全てのCHO培養物を温置した。Clonepix FLでのコロニー選択のための、CHO半固体増殖培地用のクローン培地(Clone Medium)(Genetix Ltd.)に播種することにより、25 μM MTXにおける形質転換CHO細胞をクローン化した。この細胞をこの半固体培地に播種し、37℃の加湿培養器中でおよそ15日間にわたり増殖させた。増殖コロニーを含有する半固体培地の表面に、Alexa-488標識抗ヒトPLGF-1 1-255-189を噴霧し、これをさらに24時間温置した。Clonepix FLを用いて、コロニー周囲のAF488標識1-255-189免疫沈降から生じる蛍光強度により測定した場合にヒトPLGF-1抗原の最大量を産生するものとして同定されたこの半固体培地コロニーを、25 μM MTX、8 mMグルタミン及び5%透析済みFBSを追加した。MEMが1ウェルあたり0.2 mL入った96ウェル組織培養プレートに移した。加湿培養器中、37℃で、これらのプレートを14-15日間温置した。増殖が明らかとなったときに、マイクロタイターEIA中で、抗ヒトPLGF-1 2-826-335及びビオチン標識ヤギ抗PLGF-1ポリクローナル抗体(R&D systemsからのpAb264)とのサンドイッチ形成能について上清を試験し、結果として、主要なクローンCHO350を選択した。上述のEIAで抗原分泌を監視しながら、このクローンを8 mM L-グルタミン及び25 μM MTX入りのCHO DHFR陰性培地(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)に入れた。CHOサブクローン番号350の細胞バンクを調製し、ヒトPLGF-1(1-131)EK rAg CHO350と名付けた。

10

20

【0246】

ヒトPLGF-1(1-131)EK抗原精製

CHO細胞培養物を回収し、実施例1のようにダイアフィルトレーション処理した。実施例1に記載のように、ニッケル-ニトリロ三酢酸(Ni-NTA Qiagen、Valencia、CA)金属アフィニティークロマトグラフィーを用いて、ダイアフィルトレーション処理済みヒトPLGF-1(1-131)EK溶液を精製した。

30

【実施例6】

【0247】

組み換えヒトPLGF-1(1-131)EK抗原の特性評価

ニッケルカラム-精製したヒトPLGF-1-エンテロキナーゼ(EK)抗原を集め、試料の一部を室温でのエンテロキナーゼ切断に対して用いた。エンテロキナーゼ(Invitrogen Corp.、Carlsbad、CA又はNovagen、CA)の様々な量をヒトPLGF-1-EKとともに室温で一晩温置し、次いで還元条件下のSDS-PAGEゲル電気泳動で分析した。ヒトPLGF-1-EK抗原試料を還元剤入りのローディング緩衝液と混合し、10分間沸騰させ、次いで、4-20%SDS-PAGEゲルに載せて、80ボルトで1.5時間泳動した。単量体ヒトPLGF-1-EK(1-131)は、約20 kDaに移動するはずである(計算MW: 16.2 kDa)。エンテロキナーゼ処理により、6xHisタグ及びエンテロキナーゼ切断部位が除去され、従って、処理済み抗原は、ヒトPLGF-1-EKより小さい1557ダルトンとなる(図11参照)。

40

【実施例7】

【0248】

PLGF-1マウス細胞株の開発

マウスにおける免疫反応を刺激するために使用した抗原は、組み換えヒトPLGF-1(R&D systems、Minneapolis MN)であった(これは、E.コ

50

リで産生されたものとして報告されている。)。この試験では、Jax Labs、Bar Harbor、MEからのRBF/Dnjマウスを使用した。担体タンパク質とカップリングさせたヒトPLGF-1 5 µgで、隔週で5回の免疫付与をマウスに対して行い、続いて、担体タンパク質なしのヒトPLGF-1 2.5 µgで、隔週で3回の免疫付与を行った。これらの免疫付与では、フロイントのアジュバント(DIFCO、Detroit MI)と、RIBIアジュバント(MPL+TDM及びMPL+TDM+CWS)(Corixa、Hamilton、MO)の2種類のバリエーションとを交互に繰り返した。酵素免疫測定法(EIA)による評価のために、8回目の免疫付与から14日後にマウスからの血清試料を採取した。ウサギ抗マウスIgG Fc(Jackson Immunoresearch、West Grove PA) 5 µg/mLで96ウェルマイクロタイターEIAプレート(Nunc Corporation、Rochester NY)を被覆した。捕捉試薬で固相を被覆した後、これを除去し、リン酸緩衝食塩水(PBS)中の2%BSA溶液(ブロック溶液)を用いて、プレート上に残存する非占有結合部位を全てブロッキング処理した。このプレートを蒸留水で3回洗浄し、対照抗体のlog4連続希釈液及びマウス血清試料を添加して1時間温置した。このプレートを蒸留水で4回洗浄し、PBS中で希釈したビオチン標識ヒトPLGF-1抗原1500 pg/mL溶液をプレートに添加し、60分間にわたり温置した。この温置後、この抗原を蒸留水でプレートから洗い流し、ブロック溶液中で200 ng/mLに希釈したストレプトアビジン-HRPO(Zymed、San Francisco CA)をプレートに添加し、30分間温置した。この温置後、このプレートを蒸留水で4回洗浄し、シグナルを生成させるために、o-フェニレンジアミン基質(OPD; Abbott Laboratories、Abbott Park、IL)を発色団として使用した。492 nmでプレートの読み取りを行い、最大結合のおよそ50%を生じさせる血清希釈液を決定するために結果をプロットした。次に、ヒトPLGF-1抗原滴定EIAにおいて、各マウスに対して50%結合を生じさせる血清希釈液を使用した。96ウェルマイクロタイターEIAプレートを5 µg/mLのウサギ抗マウスIgG Fcでもう一度被覆した。捕捉試薬で固相を被覆した後、これを除去し、プレートをブロッキング処理した。このプレートを蒸留水で3回洗浄した。各マウスに対して、最大結合の50%を生じさせる希釈液を決定し、プレートに添加し、次いで60分間温置した。温置後、このプレートを蒸留水で4回洗浄し、4000 pg/mLから開始するビオチン標識ヒトPLGF-1のlog4希釈液を添加し、60分間温置した。この温置後、この抗原を蒸留水でプレートから洗い流し、ブロック溶液中で200 ng/mLに希釈したストレプトアビジン-HRPOをプレートに添加し、30分間温置した。このプレートをもう一度蒸留水で4回洗浄し、シグナルを生成させるために、OPDを発色団として使用した。このアッセイからの結果より、マウス番号527、529及び530と比較して、マウス番号528、531及び532がヒトPLGF-1抗原に対して高い力価及び親和性を示すことが分かった。

【0249】

ヒトPLGF-1抗原に対する高い力価及び親和性を明らかにした後、マウス番号528、531及び532を抗原の融合前免疫促進の前に休ませた。第45週に、融合の3日前に、マウスに麻酔し、切開して体腔を開き、脾臓を露出させた。0.9%食塩水で希釈した組み換えヒトPLGF-1抗原10 µgを各マウスの脾臓に直接注入し、さらなる10 µgを脾臓周囲の体腔に注入した。外科ステープリングを用いて切開部を閉じ、融合前にマウスを休ませた。

【0250】

ヒトPLGF-1融合#1に対して、これらのマウスからの脾臓細胞を使用した。ヒトPLGF-1融合#2に対して、マウス番号527、529、530及び533からなる群からの2匹のマウスを使用した。これらの4匹のマウスは、血清採取後、認識タグを喪失したので、元の認識番号が不明であった。これらにマウス番号1及び2を割り当てた。第47週、融合の3日前に、これらのマウスを麻酔し、切開して体腔を開き、脾臓を露出させた。0.9%食塩水で希釈した組み換えヒトPLGF-1抗原10 µgを各マウスの

10

20

30

40

50

脾臓に直接注入し、さらなる10 µgを脾臓周囲の体腔に注入した。外科ステープリングを用いて切開部を閉じ、融合前にマウスを休ませた。

【0251】

各融合日に、マウスを安楽死させ、抗ヒトPLGF-1脾臓細胞を含有するそれらの脾臓を回収し、ハイブリドーマ血清不含培地(Hybridoma Serum Free Medium、HSFM)(Invitrogen Corporation、Grand Island NY)に入れた。Kohler及びMilstein(Nature、256:495-7(1975))により記載されるように、細胞融合を行った。HSFMを含有する個別のペトリ皿に各マウスの脾臓を入れた。HSFMを含有するシリンジ及び細胞スクレーパーを用いて、各脾臓から脾臓細胞に灌流液を送り、次いで血球計算盤を用いて数えた。ヒトPLGF-1融合#1の場合、マウス532からのおよそ 3.0×10^7 個の脾臓細胞とともに、マウス番号528及び531から、およそ 2.0×10^7 個の脾臓細胞を集めた。ヒトPLGF-1融合#2の場合、マウス2からのおよそ 1.6×10^7 個の脾臓細胞とともに、マウス1からのおよそ 3.5×10^7 個の脾臓細胞を集めた。遠心して細胞ペレットにして、HSFM中で再懸濁することにより、各融合に対するプール脾臓細胞を洗浄した。脾臓細胞をSP2/0骨髄腫細胞の同数と混合し、遠心してペレットを得た。脾臓細胞及びSP2/0細胞をHSFM中の50%ポリエチレングリコール(PEG)(ATCC分子量1300-1600、Manassas VA)に曝露することによって、融合を遂行した。PEG溶液1mLを30秒かけて細胞ペレットに添加し、次いでさらに1分間温置した。HSFM30mLを30秒以上かけてゆっくりと添加することによって、PEG及び細胞ペレットを希釈した。次に、遠心によって懸濁液から融合細胞を取り出し、上清を傾瀉除去した。ハイブリドーマを選択するために、15%FBS(Hyclone Laboratories、Logan UT)、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)(Sigma Laboratories、St. Louis、MO)、HT Supplement(Invitrogen Corporation、Grand Island NY)、Hybridoma Cloning Factor(Bioveris Corporation、Gaithersburg MD)及びL-グルタミン(Invitrogen Corporation、Grand Island NY)を追加したHSFM中で、両融合物に対する細胞ペレットを再懸濁した。融合#1の場合、16枚の96ウェル細胞培養プレートに、1ウェルあたり0.2mL、細胞を播種し、融合#2の場合は、13枚のプレートに播種した。融合#1の場合、第5及び7日に、融合#2の場合、第5、7及び12日に、各ウェル中の培地の半分を吸引により除去し、15%FBS、HTサプリメント及びL-グルタミンを追加したHSFMに交換した。ハイブリドーマを10-12日間増殖させ、その後、抗体産生について上清をスクリーニングした。

【0252】

EIAによって、抗ヒトPLGF-1抗体について細胞上清試料を分析した。5 µg/mLのウサギ抗マウスIgG Fcで96ウェルマイクロタイターEIAプレート被覆した。捕捉試薬で固相を被覆した後、それを除去し、ブロック溶液を用いて、プレート上の非占有結合部位を全てブロッキング処理した。蒸留水でウェルを3回洗浄し、細胞上清をブロッキング処理済みプレートに添加し、室温で少なくとも1時間温置した。抗マウスIgG Fcは、上清から抗ヒトPLGF-1マウス抗体を捕捉する。温置後、蒸留水を用いて上清を洗い流した。ビオチンで標識されたヒトPLGF-1抗原を1500 pg/mLになるようにプレートに添加し、60分間温置する。この温置後、蒸留水を用いて抗原をプレートから洗い流す。ブロック溶液中でおよそ200 ng/mLに希釈したストربتアビジン-HRP Oをプレートに添加し、30分間温置する。このプレートを蒸留水で4回洗浄し、シグナルを生成させるためにo-フェニレンジアミン基質を発色団として使用した。492 nmでプレートの読み取りを行い、結果を分析した。バックグランドよりも少なくとも3倍大きいEIAシグナルを有した場合、ハイブリッドを陽性とみなした。それぞれ、バックグランドよりも少なくとも3倍大きいEIAシグナルを有したので、ハ

10

20

30

40

50

イブリッド番号 1 - 2 5 5 及び 2 - 8 2 6 を選択した。

【 0 2 5 3 】

10 % F B S 及び H t サプリメントを追加した H S F M 中で、24 ウェルプレートに対して、陽性ハイブリッドを増殖させた。増殖 4 - 11 日後、この実施例に記載のものと同様に、E I A により、24 ウェル培養物を評価し、もう一度、バックグランドよりも少なくとも 3 倍大きいシグナルを生じるハイブリッドを陽性とみなし、クローニング用に選択した(下記表 2 参照)。ハイブリッド番号 1 - 2 5 5 及び 2 - 8 2 6 の両方とも、それぞれ、バックグランドよりも少なくとも 3 倍大きい E I A シグナルを有した。

【 0 2 5 4 】

生存ハイブリッド細胞を分取するために、蛍光標識細胞分取 (F A C S) を用いて、ハイブリッド 1 - 2 5 5 及び 2 - 8 2 6 をクローニングした。F A C S によって個々の細胞の前方及び側方光散乱特性を監視することにより、細胞懸濁液から、死んだ細胞と分けて生存細胞を分取した。96 ウェル組織培養プレート内の 10 % F B S 入りの H T 追加 H - S F M 0 . 2 m L を含有するウェルに、1 又は 10 個の生存細胞を個別に入れた。加湿培養器中で、このプレートを 37 °C にて 7 - 14 日間温置した。増殖が明らかになったら、この実施例で既に記載のように、ヒト P L G F - 1 に対する反応性について、抗ヒト P L G F - 1 マイクロタイター E I A によって細胞培養上清を試験した。これらのクローンのそれぞれがバックグランドよりも少なくとも 3 倍大きい E I A シグナルを有したので、エピトープグループ化及び結合対評価のために、クローン 1 - 2 5 5 - 1 8 9 及び 2 - 8 2 6 - 1 2 7 を選択した。

【 0 2 5 5 】

エピトープグループ化アッセイでの使用のために、サブクローン化抗ヒト P L G F - 1 クローン (1 - 2 5 5 - 1 8 9 及び 2 - 8 2 6 - 1 2 7) からの抗体をビオチン標識した。簡潔に述べると、スルホ - N H S - L C - ビオチン (P i e r c e C h e m i c a l , R o c k f o r d , I L) を精製抗体に 20 モル過剰量で添加し、30 分間温置した。P B S 中での透析を通じて非標識ビオチンを除去し、それらの標識化を確認するために、E I A によりモノクローナル抗体 (M A b) に対して試験を行った。組み換えヒト P L G F - 1 抗原により 500 n g / m L で 96 ウェルマイクロタイタープレートを被覆した。固相を抗原で被覆した後、2 % B S A / P B S ブロック溶液で非占有結合部位をブロッキング処理した。このプレートを蒸留水で 3 回洗浄し、ブロック溶液又は 50 µ g / m L の非標識 M A b 溶液 (即ち、ビオチン標識を欠く 1 - 2 5 5 - 1 8 9 又は 2 - 8 2 6 - 1 2 7 からの精製抗体) の何れかをプレートに添加し、およそ 60 分間温置した。ビオチン標識 M A b の希釈液を B S A ブロック溶液又は非標識 M A b の上に重ね、10 - 15 分間温置した。マイクロタイタープレートを蒸留水で 4 回洗浄した。ブロック溶液中でおよそ 200 n g / m L に希釈したストレプトアビジン - H R P O をプレートに添加し、30 分間温置した。このプレートを蒸留水で 4 回洗浄し、シグナルを生成させるために発色団として o - フェニレンジアミン基質を使用した。492 n m でプレートの読み取りを行い、結果を分析した。この M A b は、(a) 固相を被覆するヒト P L G F - 1 抗原に対する結合能及び、B S A ブロック (1 - 2 5 5 - 1 8 9 - B t / ブロック及び 2 - 8 2 6 - 1 2 7 - B t / ブロック) とともにウェルに添加される場合のアッセイシグナル生成能及び (b) M A b の対応する非標識物 (1 - 2 5 5 - 1 8 9 - B t / 非標識物及び 2 - 8 2 6 - 1 2 7 - B t / 非標識物) によるこのシグナルの妨害に基づき、エピトープグループ化アッセイでの使用に対して適格であった。

【 0 2 5 6 】

エピトープグループ化実験のために、競合物がない場合に最大結合シグナルのおよそ 50 % を生成させ、M A b の対応する非標識物の 50 µ g / m L 溶液により完全に阻害された、ビオチン標識 M A b の希釈液を選択した。まさに記載したものと同一アッセイ方式を用いて、このエピトープグループ化アッセイを完遂した。この実験において、抗ヒト P L G F - 1 ハイブリドーマ全てからの非標識精製抗体を、ヒト P L G F - 1 抗原被覆プレートにおける結合スポットに対する各抗ヒト P L G F - 1 M A b の標識型とのそれらの競合

10

20

30

40

50

能について試験した。非標識MAbが標識MAbの結合を阻害した場合、これは、非標識MAbが同様の結合エピトープを共有することを示す。非標識MAbが結合に競合しない場合、非標識MAbは異なる領域に向けられている。これらのアッセイ結果に基づき、抗ヒトPLGF-1MAbのパネルがエピトープグループ化され得、サンドイッチアッセイに対する良好な結合対を予測することができる。32種類のMAbでのエピトープグループ化の結果から、1-255-189及び2-826-127が、ヒトPLGF-1抗原において個々に異なるエピトープに結合し(即ち、1-255-189は、いわゆる「エピトープグループ2」に結合し、2-826-127はいわゆる「エピトープグループ1」に結合する。)、サンドイッチアッセイに対して良好な結合対を形成することが分かった。

10

【0257】

EIA形式においてMAb1-255-189及び2-826-127がヒトPLGF-1とサンドイッチを形成する能力を調べた。PBS中で調製した1-255-189の1µg/mL溶液で96ウェルマイクロタイターアッセイプレートの固相を被覆し、2-8でおおよそ16時間温置した。捕捉試薬で固相を被覆した後、それを除去し、BSA/PBSブロック溶液を用いて、プレート上の非占有結合部位全てをブロッキング処理した。0から1000pg/mLのヒトPLGF-1抗原希釈液をマイクロタイタープレートに添加し、60分間温置した。次に、この抗原溶液を除去し、このプレートを蒸留水で4回洗浄した。ブロッキング緩衝液中で調製された125ng/mL濃度のビオチン標識ヒトPLGF-1MAb2-826-127を添加し、60分間温置した。このプレートを蒸留水で4回洗浄し、ブロック溶液中でおおよそ200ng/mLに希釈したストレプトアビジン-HRP0を添加し、30分間温置した。このプレートを蒸留水で洗浄し、シグナルを生成させるために発色団としてo-フェニレンジアミン基質を使用した。プレートを492nmで読み取り、得られた抗原滴定曲線をプロットした(データを示さず)。得られたプロットから、これらの2種類のMAbがヒトPLGF-1とサンドイッチを形成する能力が確認される。

20

【0258】

クローン1-255-189を増殖のために血清不含培地(1.0mg/mL Albumax入りのInvitrogen H-SFM)中に入れた。入れた後、半固体組織培養培地中で細胞を増殖させ、ClonепixFL装置(Genetix Ltd., Hampshire, UK)での二次培養のためにコロニーを拾うことによって、細胞株をクローン化した。簡潔に述べると、10%FBSを追加したHSFMの2x濃縮液及びClone Matrixメチルセルロース培地(Genetix Ltd.)の等体積中で細胞懸濁液を希釈した。組織培養プレートに半固体細胞懸濁液を播種し、37でおおよそ7日間温置した。細胞播種時に、ヤギ抗マウスIgG-FITC溶液(Clone Detect, Genetix Ltd.)の5µg/mL溶液を半固体培地に添加した。コロニーの起源となる単一細胞は移動できず、その他の細胞と混合できなかったため、半固体培地中で増殖させたコロニーをクローン性であるとみなした。このコロニーにより産生されている抗体と、蛍光を発するヤギ抗マウスIgG-Fc-FITCとの間で免疫沈降反応が起こった。蛍光が強いほど、多くの抗体が産生されている。ClonепixFLで蛍光についてコロニーを分析し、最も強いシグナルがあるものを選択して、10%FBS入りのHSFMを含有する96ウェル組織培養プレートに自動的に移した。これらのプレートを7-10日間温置し、この実施例で既に記載したように、抗ヒトPLGF-1力価についてクローン上清を試験した。この実施例で既に記載のように、生存ハイブリッド細胞を分取するために、(FACS)を使用して、さらに2回、クローン1-255-713をクローン化した。96-ウェル組織培養プレート中の、10%FBS入りのHT追加H-SFM0.2mLを含有するウェルに1個の生存細胞を個別に入れた。このプレートを加湿培養器中、37で7-14日間温置した。増殖が明らかとなったときに、この実施例で既に記載のように、ヒトPLGF-1に対する反応性について抗ヒトPLGF-1マイクロタイターEIAを用いて細胞培養上清を試験した。この細胞株(ここで、

30

40

50

1 - 2 5 5 - 2 6 7 5 と呼ぶ。) を F B S 不 含 H S F M に 入 れ た。ス ケ ー ル ア ッ プ 及 び 細 胞 バ ン ク の 目 的 の た め に、細 胞 株 1 - 2 5 5 - 2 6 7 5 を 選 択 し た。細 胞 バ ン ク の 長 期 保 存 の た め に 液 体 窒 素 フ リ ー ザ ー を 使 用 す る。細 胞 株 1 - 2 5 5 - 2 6 7 5 に よ り 産 生 さ れ る 抗 体 は、そ の 親 ク ロ ー ン で あ る 1 - 2 5 5 - 7 1 3 に よ り 産 生 さ れ る も の と 同 一 で あ る。

【 0 2 5 9 】

L - グ ル タ ミ ン 及 び A l b u m a x (I n v i t r o g e n) を 追 加 し た H - S F M に ク ロ ー ン 2 - 8 2 6 - 1 2 7 を 入 れ、次 い で、個 々 の 生 存 ハ イ ブ リ ド ー マ 細 胞 を 分 取 す る た め に 蛍 光 標 識 細 胞 分 取 (F A C S) を 用 い て ク ロ ー ン 化 し た。F A C S を 用 い て 個 々 の 細 胞 の 前 方 及 び 側 方 光 散 乱 特 性 を 監 視 す る こ と に よ り、細 胞 懸 濁 液 か ら、死 ん だ 細 胞 と 分 け て 生 存 細 胞 を 分 取 し た。9 6 - ウ ェ ル 組 織 培 養 プ レ ー ト 中 の、1 0 % F B S 追 加 H - S F M 0 . 2 5 m L を 含 有 す る ウ ェ ル に、1 個 の 生 存 2 - 8 2 6 - 1 2 7 細 胞 を 個 別 に 入 れ た。加 湿 培 養 器 中、3 7 ° C で、こ の プ レ ー ト を 7 - 1 4 日 間 温 置 し た。増 殖 が 明 ら か と な っ た と き に、こ の 実 施 例 で 既 に 記 載 の よ う に、抗 ヒ ト P L G F - 1 力 価 に つ い て、細 胞 培 養 上 清 を 試 験 し た。さ ら な る 評 価 の た め に、ク ロ ー ン 2 - 8 2 6 - 3 3 5 を 選 択 し た。こ の 細 胞 株 を F B S 不 含 H S F M に 入 れ た。ス ケ ー ル ア ッ プ 及 び 細 胞 バ ン ク の 目 的 の た め に、細 胞 株 2 - 8 2 6 - 3 3 5 を 選 択 し た。細 胞 バ ン ク の 長 期 保 存 の た め に 液 体 窒 素 フ リ ー ザ ー を 使 用 し た。

10

【 実 施 例 8 】

【 0 2 6 0 】

抗 体 の 特 性 評 価

I s o s t r i p マ ウ ス モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 I s o t y p i n g K i t (R o c h e D i a g n o s t i c s I n d i a n a p o l i s , I N) に よ り、1 - 2 5 5 - 2 6 7 5 及 び 2 - 8 2 6 - 3 3 5 細 胞 株 か ら の 精 製 抗 体 を 試 験 し た。各 試 料 の 0 . 1 5 又 は 0 . 2 μ g / m L の 1 5 0 μ L の 一 定 分 量 を 発 色 チ ュ ー ブ に 添 加 し、混 合 し た。各 チ ュ ー ブ に I s o s t r i p を 添 加 し、ス ト リ ッ プ の バ ン ド 上 で 発 色 が 起 こ る ま で 5 - 1 0 分 間、温 置 し た。こ の 結 果 か ら、1 - 2 5 5 - 2 6 7 5 が、軽 鎖 を 有 す る マ ウ ス I g G 2 a サ ブ タ イ プ で あ り、2 - 8 2 6 - 3 3 5 が 軽 鎖 を 有 す る マ ウ ス I g G 1 サ ブ タ イ プ で あ る こ と の 両 方 が 示 さ れ た。

20

【 0 2 6 1 】

製 造 者 の 指 示 に 従 い、P h a s t S y s t e m (G E H e a l t h c a r e B i o - S c i e n c e s C o r p . P i s c a t a w a y , N J) を 用 い て、S D S - P A G E 及 び I E F ゲ ル に お い て 精 製 抗 体 を 評 価 し た。0 . 1 か ら 0 . 4 m g / m L の 濃 度 で、D T T 処 理 し た 試 験 試 料 を S D S - P A G E ゲ ル の レ ー ン に 載 せ た。1 - 2 5 5 - 7 1 3 M A b に 対 す る 銀 染 色 に よ る 発 色 か ら、軽 鎖 分 子 量 (M W) が ~ 2 7 K D a で あ り、重 鎖 M W が ~ 5 0 K D a で あ る こ と が 示 さ れ た。2 - 8 2 6 - 3 3 5 M A b の 発 色 か ら、軽 鎖 分 子 量 (M W) が ~ 2 8 K D a で あ り、重 鎖 M W が ~ 5 2 K D a で あ る こ と が 示 さ れ た。0 . 2 μ g / m L で I E F 試 験 試 料 2 5 μ L を レ ー ン に 載 せ た。I E F 試 験 泳 動 の 発 色 か ら、1 - 2 5 5 - 7 1 3 M A b の p I 範 囲 が 6 . 7 8 - 7 . 8 0 で あ る こ と が 示 さ れ た (8 本 の バ ン ド が 見 ら れ る。)。2 - 8 2 6 - 3 3 5 M A b の 発 色 か ら、p I 範 囲 が 5 . 9 8 - 6 . 8 7 で あ る こ と が 示 さ れ た (8 本 の バ ン ド が 見 ら れ る。)。

30

40

【 実 施 例 9 】

【 0 2 6 2 】

抗 体 産 生 及 び 精 製

H S F M 中 で 1 - 2 5 5 - 7 1 3 及 び 2 - 8 2 6 - 3 3 5 細 胞 株 を 増 殖 さ せ、お よ そ 0 . 5 x 1 0 ⁵ 個 の 細 胞 / m L に な る よ う に ロ ー ラ ー ボ ト ル に 播 種 し た。1 0 - 1 4 日 間 に わ た り、又 は 最 終 的 培 養 物 が 得 ら れ る ま で、1 分 間 あ た り お よ そ 1 回 転、回 転 さ せ な が ら、こ の 培 養 物 を 3 7 ° C で 温 置 し た。最 終 的 な ロ ー ラ ー ボ ト ル 上 清 を 回 収 し、0 . 4 5 ミ ク ロ ン フ ィ ル タ ー で 透 明 化 し た。P e l l i c o n シ ス テ ム を 用 い て 透 明 化 上 清 を 濃 縮 し、0 . 4 5 ミ ク ロ ン フ ィ ル タ ー で 過 した。p H 8 . 9 の 1 . 5 M グ リ シ ン / 3 N N a C

50

1 緩衝液の等体積でMAb濃縮液を希釈し、次いで、AKTA自動精製システム(Amersham/Pharmacia)を用いて、予め平衡化した5mLプロテインAカラムに載せた。次に、このカラムを結合緩衝液5カラム体積で洗浄し、安定なベースラインに到達したら、pH3.0クエン酸緩衝液でMAbを溶出する。次に、PBSへの交換のために、このMAbを70mL G25カラムに移し、次いで、透析膜10,000分子量カットを用いて、さらにPBS中で透析した。この抗体を分注し、-70 で保存した。

【実施例10】

【0263】

ヒトPLGF-1抗原に対する抗ヒトPLGF-1抗体の親和性/動力学的特性評価
 BIAcore^(R)2000装置(BIAcore^(R)International AB、GE Healthcare company、Uppsala、Sweden)によるSPR(表面プラズモン共鳴)技術を用いて、ヒトPLGF-1(アミノ酸1-131を含む。)及びヒトPLGF-1断片(アミノ酸17-131を含む(例えば配列番号5参照。))抗原に対するモノクローナル抗体1-255-713及び2-826-355の親和性/反応速度を調べた。最初に、アミンカップリングキット中で提供されるEDC/NHS/エタノールアミン化学(BIAcore^(R)International AB、a GE Healthcare company、Uppsala、Sweden)を介して、CM4バイオセンサーチップ(BIAcore^(R)International AB、a GE Healthcare company、Uppsala、Sweden)にウサギ抗マウスIgG抗体(BIAcore^(R)International AB、GE Healthcare company、Uppsala、Sweden)をアミンカップリングすることによって、~5,500RUウサギ抗マウスIgG捕捉バイオセンサーを作製した。0.1%BSA及び0.1%CM-デキストランを添加したHBS-EP緩衝液(BIAcore^(R)International AB、GE Healthcare company、Uppsala、Sweden)から構成されるランニング緩衝液(本明細書中で以後、「ランニング緩衝液」と呼ぶ。)中でヒトPLGF-1モノクローナル抗体及びヒトPLGF-1抗原を希釈した。各ヒトPLGF-1モノクローナル抗体を0.2µg/mLに希釈し、3-倍希釈系列を用いて、各ヒトPLGF-1抗原、即ち、CHO-起源のヒトPLGF-1(アミノ酸1-131を含む;配列番号1参照(A.T.C.C.受託番号PTA-8537))及びヒトPLGF-1断片(アミノ酸17-131を含む(例えば、115アミノ酸;配列番号5参照)(A.T.C.C.受託番号PTA-8540。))(Abbott Laboratories、Abbott Park、IL)及びE.コリ起源のヒトPLGF-1(1-131を含む(R&D systems、Inc.、Minneapolis、Minnesota)から購入。))を0.0457から300nMの濃度の範囲に希釈した。

【0264】

ランニング緩衝液により、5µL/分で、ウサギ抗マウスIgG捕捉バイオセンサーを5分間平衡化した後、参照フローセルとして1個のセルを空のままにして、個々のフローセル全体にヒトPLGF-1モノクローナル抗体5から10µLを注入した。ランニング緩衝液により50µL/分でフローセルを6分間洗浄し、その後、バイオセンサー全域に、任意濃度のヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片抗原150µLを注入し、その後すぐにランニング緩衝液を15分間注入した。10µL/分の流速で、10mMグリシンpH1.7(BIAcore^(R)International AB、GE Healthcare company、Uppsala、Sweden)を1回、30µL注入することにより、バイオセンサーを再生した。各ヒトPLGF-1又はヒトPLGF-1断片抗原の全濃度を2回ずつの測定で試験した。センサーグラムを介して、結合反応速度、会合及び解離を監視した。センサーグラムを二重参照(double-referenced)し、Scrubber 2.0ソフトウェア(BioLogic Software Pty Ltd.、Australia)を用いて、質量輸送による1:1結合

モデルにフィットさせて、会合及び解離速度ならびに全体的な K_D を調べた。この結果を下記表1で示す。

【0265】

【表3】

表1

PIGF-1 MAb	PIGF-1 抗原の由来	K_{on}^* ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off}^* (s^{-1})	K_D^* (M)
1-255-713	CHO 1-313	$7.3(2) \times 10^4$	$1.23(2) \times 10^{-4}$	$1.70(5) \times 10^{-9}$
	CHO 17-131	$1.82(3) \times 10^5$	$1.29(1) \times 10^{-4}$	$7.1(1) \times 10^{-10}$
	E. コリ 1-313	$3.29(6) \times 10^5$	$1.21(1) \times 10^{-4}$	$3.68(8) \times 10^{-10}$
1-826-355	CHO 1-313	$6.52(7) \times 10^5$	$3.25(1) \times 10^{-4}$	$4.98(6) \times 10^{-10}$
	CHO 17-131	$1.33(1) \times 10^6$	$2.91(1) \times 10^{-4}$	$2.19(2) \times 10^{-10}$
	E. コリ 1-313	$2.34(3) \times 10^6$	$2.14(1) \times 10^{-4}$	$9.2(1) \times 10^{-11}$

*測定値の標準誤差は、最小桁の数値に対して括弧内で与える。

【実施例11】

【0266】

様々な代表的サンドイッチ免疫アッセイにおけるヒトPIGF-1の測定

多くの抗体が、ヒトPIGF-1抗原に対して惹起され、作製されたか（即ち、本明細書中実施例7-9に記載の、モノクローナル抗体1-255-713（本明細書中でMAb255と呼ぶ。）及び2-826-335（本明細書中でMAb826と呼ぶ。））又は、多くの様々な社外販売業者を通じて供給された。具体的には、社外販売業者から得た抗体は、ラットモノクローナル抗体04（本明細書中でMAb04とも呼ぶ。）、モノクローナル抗体264（本明細書中でMAb264とも呼ぶ。）、E.コリで発現される、アフィニティーカラム精製ヤギポリクローナル抗体pAb264及び組み換えPIGF-1（アミノ酸1-131を含む。）であった（これらは全て、R&D systems（Minneapolis、Minnesota）から購入した。）。

【0267】

受動被覆とそれに続くEDAC架橋によって、及び捕捉抗体としての使用のために、抗体MAb04、MAb255、MAb264及びMAb826を磁性微小粒子（Polymer Labs、Amherst、Massachusetts）に固定化した。アクリジニウムエステルで標識したヤギポリクローナル抗体又はアクリジニウムエステルで標識したMAb826を検出抗体として使用した。

【0268】

これらの実験に対して、ヒトPIGF-1抗原の起源は、E.コリ（アミノ酸1-131を含むヒトPIGF-1を産生）、CHO（アミノ酸1-137（配列番号2）を含むヒトPIGF-1又はヒトPIGF-1断片（アミノ酸17-131を含む（配列番号5））を産生）又はヒト胚腎臓細胞（アミノ酸1-137（配列番号2）を含むヒトPIGF-1又はヒトPIGF-1断片（アミノ酸17-131を含む（配列番号5））を産生）であった。

【0269】

各抗原コンストラクト（E.コリ、ヒト胚腎臓細胞及びCHO PIGF-1）を最初に「検量物質希釈剤」と呼ばれる緩衝マトリクス（2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）、その他の塩、タンパク質阻害薬及び抗菌剤を含有する緩衝液）中で溶解し、濃縮中間保存溶液を得た。その後、化学てんびんにより測定された重量を用いて、中間保存溶液を検量物質希釈剤中で希釈することによって、6種類の検量物質（0.0から1,500pg/mLの濃度の、CalAからCalFとした。）を調製した。

【0270】

自動ARCHITECT^(R)i2000分析装置（Abbott Laboratory

10

20

30

40

50

ries、Abbott Park、IL)によって、アッセイを行った。簡潔に述べると、このアッセイには、次の段階が含まれた：

1. 抗ヒトPLGF-1抗体(即ち、それぞれ、MAb04、MAb255、MAb264及びMAb826)で被覆された微小粒子50 μ Lと、各ヒトPLGF-1コンストラクト(E.コリ、ヒト胚腎臓細胞及びCHO)から調製した抗原検量物質(CalA、CalB、CalC、CalD、CalE及びCalF)の75 μ Lを混合。

【0271】

2. 33-38 $^{\circ}$ Cの周囲温度に維持して、およそ18分間、反応混合物を温置。試料中のヒトPLGF-1抗原は、微小粒子上の抗ヒトPLGF-1抗体に結合した。

【0272】

3. 磁気拘束された微小粒子から未結合ヒトPLGF-1を分離し、廃液入れに排出させた。微小粒子をリン酸緩衝液で洗浄した。

【0273】

4. アクリジニウムエステルで標識した検出抗体(ポリクローナルヤギ抗体pAb264又はマウスモノクローナルMAb826)50 μ Lを反応混合物に添加。

【0274】

5. 33-38 $^{\circ}$ Cでおよそ4分間、反応混合物を温置。抗ヒトPLGF-1抗体-アクリジニウム分子は、微小粒子上に固定化された抗体により捕捉されたヒトPLGF-1とサンドイッチを形成する。

【0275】

6. 微小粒子をリン酸緩衝液で洗浄。

【0276】

7. 捕捉されたヒトPLGF-1に光を放射させるために、プレトリガー(酸性溶液)及びトリガー(塩基性溶液)を添加(この光は、相対光単位(RLU)として装置により測定された)。RLUは、ARCHITECT^(R)システムにおいて利用される測定の光学単位を意味する。ARCHITECT^(R)光学システムは、基本的に、化学発光反応により放射される光において光子計数を行う光増幅管(PMT)である。化学発光反応により生成される光の量は、反応混合物中に存在するアクリジニウムトレーサーの量に比例し、それにより、試料検体の定量が可能となる(これもまた、化学発光反応が起こったときにその反応混合物中に残存するアクリジニウムの量に比例する)。「相対光単位」という用語は、ある一定のアクリジニウム量に対する光子計数の関係に由来する。各光学モジュールは、一連のアクリジニウム検量物質により較正される。化学発光反応が起きると、光が放射され、3秒間にわたり光子が測定される。PMTは、計数された光子をデジタルシグナルに変換し、次に、それが処理のための回路基板に送られる。光学回路基板は、PMTからのデジタルシグナルを、計数された光子に比例するアナログシグナルに変換し、これは同様に、存在するアクリジニウムの量に比例する。次に、このアナログシグナルがさらに処理され、RLU値が得られる。この関係は、光学モジュールの較正のための標準を生成させるために確立され、この場合、異なるアクリジニウム標準は、それらに対して割り当てられたRLU値を有する。従って、RLU単位それ自身が特定の値を表さない一方で、これはアクリジニウムのある一定量に比例(即ち相対)する。

【0277】

下記の表2は、捕捉抗体としてMAb04を使用し、検出抗体としてポリクローナル抗体pAB264を使用した、ヒトPLGF-1免疫アッセイからの結果を示す。

【0278】

10

20

30

40

【表 4】

表 2

微粒子 A b	MAb04	MAb04	MAb04	MAb04	MAb04
検出結合 A b	pAb264	pAb264	pAb264	pAb264	pAb264
PIGF-1(pg/mL)	E. コリ (RLU)	HEK(1-137) (RLU)	HEK(17-131) (RLU)	CHO(17-131) (RLU)	CHO(1-137) (RLU)
0	19041	18773	18702	18881	19118
15	51935	49710	39530	34223	32085
60	169247	159290	112195	89472	80081
250	570025	539030	382233	292914	246087
750	1359530	1255870	957276	751782	644333
1500	2188020	2054010	1637900	1301040	1129770

10

【 0 2 7 9 】

下記表 3 は、捕捉抗体として M A b 2 5 5 を使用し、検出抗体としてポリクローナル抗体 p A B 2 6 4 を使用した、ヒト P I G F - 1 免疫アッセイからの結果を示す。

【 0 2 8 0 】

【表 5】

表 3

微粒子 A b	MAb255	MAb255	MAb255	MAb255	MAb255
検出結合 A b	pAb264	pAb264	pAb264	pAb264	pAb264
PIGF-1(pg/mL)	E. コリ (RLU)	HEK(1-137) (RLU)	HEK(17-131) (RLU)	CHO(17-131) (RLU)	CHO(1-137) (RLU)
0	14337	14197	14207	14402	14524
15	47235	46664	32940	28739	26379
60	161152	165478	106859	81229	71591
250	543401	558975	363459	283058	226231
750	1318490	1311810	907658	712518	599081
1500	2192190	2143720	1618310	1246490	1051010

20

【 0 2 8 1 】

下記表 4 は、捕捉抗体として M A b 2 6 4 を使用し、検出抗体としてポリクローナル抗体 p A B 2 6 4 を使用した、ヒト P I G F - 1 免疫アッセイからの結果を示す。

【 0 2 8 2 】

【表 6】

表 4

微粒子 A b	MAb264	MAb264	MAb264	MAb264	MAb264
検出結合 A b	pAb264	pAb264	pAb264	pAb264	pAb264
PIGF-1(pg/mL)	E. コリ (RLU)	HEK(1-137) (RLU)	HEK(17-131) (RLU)	CHO(17-131) (RLU)	CHO(1-137) (RLU)
0	5112	4747	4881	4682	4646
15	15634	10414	8590	6874	6370
60	54994	31320	23483	14830	13774
250	195754	108625	77870	45959	38891
750	352417	277348	206404	119501	106432
1500	937030	507085	402849	222780	200511

40

【 0 2 8 3 】

下記表 5 は、捕捉抗体として M A b 8 2 6 を使用し、検出抗体としてポリクローナル抗体 p A B 2 6 4 を使用した、ヒト P I G F - 1 免疫アッセイからの結果を示す。

【 0 2 8 4 】

【表 7】

表 5

微粒子 A b	MAb826	MAb826	MAb826	MAb826	MAb826
検出結合 A b	pAb264	pAb264	pAb264	pAb264	pAb264
PIGF-1(pg/mL)	E. コリ (RLU)	HEK(1-137) (RLU)	HEK(17-131) (RLU)	CHO(17-131) (RLU)	CHO(1-137) (RLU)
0	6406	6532	6587	6681	6599
15	19630	15456	12756	11181	10065
60	65533	47721	36920	28243	22171
250	231051	173397	125686	93565	66110
750	606073	422924	336270	238842	179860
1500	1082570	759689	624446	456336	328636

10

【 0 2 8 5 】

下記表 6 は、捕捉抗体として M A b 2 5 5 を使用し、検出抗体としてモノクローナル抗体 M A b 8 2 6 を使用した、ヒト P I G F - 1 免疫アッセイからの結果を示す。

【 0 2 8 6 】

【表 8】

表 6

微粒子 A b	MAb255	MAB255	Mab255	MAB255	MAB255
検出結合 A b	MAB826	MAB826	Mab826	MAB826	MAB826
PIGF-1(pg/mL)	E. コリ (RLU)	HEK(1-137) (RLU)	HEK(17-131) (RLU)	CHO(17-131) (RLU)	CHO(1-137) (RLU)
0	6111	6114	5760	5938	6270
15	22706	26725	17195	13266	14521
60	83204	100887	57910	42063	42189
250	298156	367219	207293	143948	152791
750	779528	889552	576466	394631	399699
1500	1345170	1521830	1043690	750211	734140

20

【 0 2 8 7 】

上記表 2 - 6 で示されるように、HEKヒト P I G F - 1 断片 1 7 - 1 3 1 の結合は、全ての 5 種類の抗体サンドイッチ方式において、全長 HEKヒト P I G F - 1 (1 - 1 3 7) と同等であった。CHOヒト P I G F - 1 断片 1 7 - 1 3 1 及び全長 CHOヒト P I G F - 1 1 - 1 3 1 は、抗体に対する結合においてより弱かった。

30

【実施例 1 2】

【 0 2 8 8 】

ハイブリドーマ細胞株 1 - 2 5 5 - 7 1 3 及び 2 - 8 2 6 - 3 3 5 により産生されたモノクローナル抗体を用いたサンドイッチアッセイ

5 μ g/mL で精製ヒト P I G F - 1 M A b 1 - 2 5 5 - 7 1 3 により白色 9 6 ウェルマイクロタイター E I A プレート (N u n c C o r p o r a t i o n , R o c h e s t e r N Y) を被覆した。捕捉試薬で固相を被覆した後、それを除去し、PBS 中の 2 % F i s h G e l 溶液を用いて、プレート上に残存する非占有結合部位を全てブロック処理した。このプレートを洗浄し、研究フェーズの A R C H I T E C T ^(R) ヒト P I G F - 1 検量物質希釈剤 (M E S , その他の塩、タンパク質阻害薬及び抗菌剤を含有する緩衝液を含む ; A b b o t t L a b o r a t o r i e s , A b b o t t P a r k , I L) 中の 1 0 , 0 0 0 p g / m L から始まる組み換え抗原 (r A g) ロットの log 2 連続希釈液をプレートに添加して 1 時間温置した。このアッセイにおいて、E. コリで産生された精製ヒト P I G F - 1 r A g (R & D s y s t e m s M i n n e a p o l i s , M N) を陽性対照として使用し、精製 N G A L) r A g を陰性対照として使用した。このアッセイにおいて、CHO 細胞において社内で作製された精製ヒト P I G F - 1 - H i s (1 - 1 3 1) 及び (1 7 - 1 3 1) r A g も試験した。ヒト P I G F - 1 2 - 8 2 6 - 3 3 5 からの精製抗体を消化し、F a b ' 2 断片を形成させ、これをアクリジニ

40

50

ウム標識した。rAg溶液を洗い流した後、MES、その他の塩、タンパク質阻害薬、抗菌剤及び界面活性剤を含有する研究フェーズARCHITECT^(R)cヒトPLGF-1連結体希釈剤(Abbott Laboratories、Abbott Park、IL)中で、50ng/mLに希釈した標識済みFab'2断片をプレートに添加し、30分間温置した。この温置後、このプレートを蒸留水で4回洗浄し、紙タオル上で乾燥させた。Microbeta Jet装置(Perkin Elmer、Waltham MA)上で1秒間あたりの発光カウント(LCPS)を測定した。このプレートを装置に載せ、ここで、Architectプレトリガー溶液(Abbott Laboratories、Abbott Park、IL)100μLを各ウェルに添加し、続いてArchitectトリガー溶液100μLを添加し、その後、フラッシュ化学発光を読み取り、記録する。各rAgを用いて標準曲線を作成し、次のグラフにおいて記録した。これらの2種類のMAb試薬は、全3種類のヒトPLGF-1抗原と首尾よくサンドイッチを形成することができたが、一方で、陰性対照抗原の最大濃度では、僅かなサンドイッチ形成しか観察されなかった。

10

【実施例13】

【0289】

遊離PLGFに結合するアッセイ能力の確認

この実施例において、sFlt-1と複合体形成したヒトPLGF-1に対立するものとして、マウスハイブリドーマ細胞株1-255-713及び2-826-335からの抗体を用いたアッセイの、遊離ヒトPLGF-1への結合能を調べた。

20

【0290】

試薬は全て、先行する実施例に記載のとおりであった。sFlt-1較正抗原(ドメイン1-3を含むマウス骨髄腫組み換えDNAヒトsFlt-1)は、組み換えヒトVEGF R1/Flt-1(aa27-328)/Fcキメラ(R&D systemsから購入、カタログ番号3516-FL)であった。硫酸アンモニウム分画化及び、固定化ヘパリンカラム(Pall Membrane)(Roecklら、Exp Cell Res.、241:161-170(1998))上でのアフィニティークロマトグラフィーを用いて、胎盤組織から、ネイティブsFlt-1を単離した。

【0291】

12nM以下の濃度のsFlt-1とともに試料を温置することによって、ヒトPLGF-1アッセイを行った。ヒトPLGF-1 54pMを含有する試料を2から8で16時間温置し、その後、ARCHITECT^(R)アッセイで分析した。

30

【0292】

12nM sFlt-1で最大90%、ヒトPLGF-1アッセイが阻害された(データを示さず)。10%の残存活性は、固相抗体に結合しているPLGFと可溶性sFlt-1との間の競合の結果であると思われる。ヒトPLGF-1に関して、90%最大阻害には、ヒトPLGF-1よりも40倍過剰であるsFlt-1が必要であった。最初の温置における様々な結合反応は、最終的に、sFlt-1濃度を上昇させることにより影響を受けない、定常状態平衡に到達する。遊離ヒトPLGF-1、sFlt-1及び複合体化ヒトPLGF-1/sFlt-1の混合物を含有する試料を固定化捕捉ヒトPLGF-1抗体としばらくの間温置する場合、測定されるsFlt-1濃度が上昇する。このことから、sFlt-1に結合したヒトPLGF-1の除去が起こったことが示唆される。

40

【0293】

下記の表7において、ヒトPLGF-1アッセイの測定範囲内で、sFlt-1の全ての濃度をアッセイした。阻害%を括弧内で示す。ヒトPLGF-1におけるsFlt-1の相対的影響を評価するために測定したレベルは、第二及び第三トリメスターの妊婦に対して予想され得るものと一致する(データを示さず)。上述のように行われた滴定から、sFlt-1によるヒトPLGF-1の最大で90%の阻害が予想され得た。しかし、最大阻害は80%であり、これは、ヒトPLGF-1のより高い濃度に対して観察される。この最大阻害は、ヒトPLGF-1に対して測定される最大濃度(29のモル比)で起こ

50

り、ヒト P L G F - 1 のより低い濃度 (3 3 0 のモル比) では起こらない。これらのデータは、アッセイの複雑性を反映する。固相上の抗体ならびに溶液中の s F l t - 1 によるヒト P L G F - 1 に対する競合がある。可溶性タンパク質の濃度は、解離定数の大きさと同じ桁である。粒子上の固定化抗ヒト P L G F - 1 抗体の密度由来のアビジティーの影響がそこに加わる。

【 0 2 9 4 】

【 表 9 】

表 7

測定したヒト PIGF-1					
添加した sFlt-1、pM					
0	93	186	389	788	1,181
3.6pM	1.5pM(-58%)	1.2pM(-65%)	1.2pM(-67%)	1.2pM(-66%)	1.3pM(-64%)
6.8pM	3.1pM(-55%)	2.4pM(-65%)	2.0pM(-70%)	1.9pM(-72%)	1.9pM(-72%)
13.3pM	6.7pM(-49%)	4.9pM(-63%)	3.8pM(-72%)	3.3pM(-76%)	3.0pM(-77%)
27.1pM	15.6pM(-42%)	10.6pM(-61%)	7.5pM(-72%)	6.1pM(-78%)	5.4pM(-80%)
40.5pM	25.9pM(-36%)	17.8pM(-56%)	12.2pM(-70%)	9.2pM(-77%)	7.8pM(-81%)

10

【 0 2 9 5 】

これらの結果から、ヒト P L G F - 1 に対する本明細書中に記載の A R C H I T E C T (R) アッセイが、主にタンパク質の非複合体形態を測定することが確認される。2種類のタンパク質 (ヒト P L G F - 1 及び s F l t - 1) の平衡は、インビボ及びインビトロの両方で (アッセイ中に) かき乱され得る。タンパク質を捕捉するために使用される抗体は、平衡に影響を及ぼし得、従って、最終的結果に影響し得る。より重要なこととして、ヒト P L G F - 1 を封鎖することに対して、s F l t - 1 が「反応吸収物質」として作用し得ることは明らかである。s F l t - 1 の高濃度は、ヒト P L G F - 1 の循環レベルに顕著な影響を有し得る。

20

【 0 2 9 6 】

市販のモノクローナル抗体 2 6 4 (M A B 2 6 4) の結合が s F l t - 1 により阻害され、P L G F - 1 における抗体の認識部位が、s F l t - 1 結合に関して刊行物に記載される領域と同様なので (データを示さず。)、市販のモノクローナル抗体 2 6 4 (M A B 2 6 4) の結合が遊離 P L G F - 1 を認識することが同様に考えられる。

【 実施例 1 4 】

30

【 0 2 9 7 】

遊離ヒト P L G F - 1 を検出するための3種類のヒト P L G F - 1 アッセイ方式の比較
ヒト P L G F - 1 / s F l t - 1 複合体又は非複合体化ヒト P L G F - 1 を検出する、各アッセイの相対的能力を調べるために、3種類のアッセイ方式において、s F l t - 1 による阻害を評価した。方式 1 は、パラ磁性微小粒子上の固定化捕捉試薬としてヒト P L G F - 1 M A b 2 - 8 2 6 - 3 3 5 を使用し、アクリジニウム標識された検出試薬としてヒト P L G F - 1 M A b 1 - 2 5 5 - 7 1 3 を使用する。方式 2 は、パラ磁性微小粒子上の固定化捕捉試薬として P L G F - 1 M A b 2 6 4 を使用し、アクリジニウム標識された検出試薬としてヒト P L G F - 1 P b 2 6 4 を使用する。実施例 1 1 に記載のような A R C H I T E C T (R) i 2 0 0 0 アッセイ方式で、方式 1 及び 2 を試験する。方式 3 は、9 6 ウェルマイクロタイタープレート上の固定化捕捉試薬として P L G F - 1 M A b 2 6 4 を使用し、検出試薬として P L G F - 1 P b 2 6 4 を使用する、R & D s y s t e m s から購入した Q u a n t i k i n e (R) ヒト P L G F E L I S A である。R & D s y s t e m s から購入した P L G F - 1 を検量物質として両アッセイ方式で使用した。

40

【 0 2 9 8 】

H E K 細胞で発現されたおよそ 9 5 0 p g / m L の精製ヒト P L G F - 1 (1 - 1 3 1) を正常ヒト血漿に添加した。添加したヒト P L G F - 1 血漿に、ヒト P L G F - 1 に対する 3 0 0 - 倍モル過剰量まで、ヒト胎盤組織から単離されたネイティブ s F l t - 1 を添加した。A R C H I T E C T (R) 及びマイクロタイタープレートアッセイで試験する

50

前に、ヒト P I G F - 1 及び s F l t - 1 添加血漿を周囲温度で 1 - 2 時間温置した。

【 0 2 9 9 】

結果を下記表 8 で示す。個々のアッセイ方式に対して、s F l t - 1 非存在下での測定濃度に基づき、% 阻害を計算する。両 A R C H I T E C T ^(R) アッセイ方式とも、ヒト P I G F - 1 量の 2 0 及び 3 0 - 倍モル過剰量の間で、9 0 % 阻害に達する。これらの結果から、両アッセイ方式が、ヒト P I G F - 1 に対する s F l t - 1 結合により阻害され、従って、遊離又は非複合体化ヒト P I G F - 1 を検出することができることが示される。

【 0 3 0 0 】

【 表 1 0 】

10

表 8

		PIGF-1 アッセイ方式					
		方式 1 (ARCHITECT)		方式 2 (ARCHITECT)		方式 3 (ELISA)	
sFlt-1:P IGF-1 モル比	添加した sFlt-1 (pmol/L)	測定した PIGF-1 (pg/mL)	%阻害	測定した PIGF-1 (pg/mL)	%阻害	測定した PIGF-1 (pg/mL)	%阻害
0	0	1021.2	0.0	786.5	0.0	865.0	0.0
2.5	77	593.8	41.9	494.0	37.2	706.9	18.3
5	153	366.6	64.1	276.2	64.9	652.1	24.6
10	307	196.6	80.7	143.0	81.8	583.2	32.6
20	613	119.5	88.3	82.9	89.5	515.3	40.4
30	920	95.1	90.7	68.2	91.3	475.5	45.0
40	1227	83.2	91.9	55.5	92.9	416.9	51.8
50	1533	76.6	92.5	50.4	93.6	414.7	52.1
75	2300	65.0	93.6	39.7	95.0	208.6	75.9
100	3067	60.3	94.1	33.8	95.7	165.6	80.9
150	4600	51.3	95.0	27.5	96.5	159.1	81.6
300	9200	42.1	95.9	20.0	97.5	153.6	82.2

20

30

表 8 から見られ得るように、R & D s y s t e m s E L I S A 方式では、ヒト P I G F - 1 量の 3 0 0 倍モル過剰量の s F l t - 1 量で 9 0 % 阻害に達しない。方式 2 及び 3 で使用される抗体は同じであるが、この 2 つの方式は、表 8 で示されるものと同程度まで阻害されない。試料及び捕捉試薬 (M A b 2 6 4) とともに 2 時間温置することを使用する挿入シートに従い、方式 3 の E L I S A を行うが、一方で、A R C H I T E C T ^(R) の温置時間はおよそ 1 8 分間である。同様に、方式 3 の E L I S A は、検出試薬 (P b 2 6 4) を約 2 時間温置し、一方で、A R C H I T E C T ^(R) の場合、この段階での温置はおよそ 4 分間である。方式 2 と 3 との間の阻害の相違は、この 2 種類のアッセイ方式におけるタイミングの相違によるものであると思われる。

【 0 3 0 1 】

40

この相違の根底にある機構にかかわらず、約 2 . 5 から約 5 0 の s F l t - 1 : P I G F 1 モル比の範囲内 (例えば、約 2 . 5、約 5、約 1 0、約 2 0、約 3 0、約 4 0 又は約 5 0) で、自動 / 半自動方式 1 及び 2 は、非自動化 E L I S A を用いて得られる測定 P I G F - 1 の阻害よりも阻害が約 1 . 5 から約 2 倍大きい、測定 P I G F - 1 の阻害を示す。このことから、本明細書中に記載のような自動アッセイ方式が、非自動化 E L I S A よりも、遊離 P I G F - 1 を検出することにおいて優れていることが示唆される。

【 実施例 1 5 】

【 0 3 0 2 】

ヒト P I G F - 1 に対する代替的免疫アッセイ方式

この実施例は、実施例 1 2 で述べられるものに対する代替的免疫アッセイ方式について

50

述べる。

【0303】

この実施例は、パラ磁性微小粒子上の固定化捕捉試薬として P L G F - 1 M A b 2 - 8 2 6 - 3 3 5 を使用し、アクリジニウム標識された連結体試薬として P L G F - 1 M A b 1 - 2 5 5 - 7 1 3 又は 1 - 2 5 5 - 2 6 7 5 を使用する、ヒト P L G F - 1 の検出のための、A R C H I T E C T (R) 免疫アッセイ方式を使用する。連結体試薬は、無傷の I g G M A b、F (a b ') 2 又は F a b 断片の何れかであり得る。実施例 1 1 に記載のように A R C H I T E C T アッセイを行った。アッセイの最適化中に 5 0 から 1 0 0 マイクロリットルの試料体積の範囲を使用した。典型的な試料体積は 5 0 から 7 5 マイクロリットルであり、最適試料体積は 5 0 マイクロリットルである。このアッセイに対する検量物質として、R & D s y s t e m s から購入した P L G F - 1 を使用した。0、1 0、3 0、6 0、5 0 0 及び 1, 5 0 0 p g / m L の P L G F - 1 濃度になるように検量物質を調製する。

10

【0304】

この実施例に記載のような免疫アッセイ方式を使用して、4 0 0 名の外見上正常な個体において P L G F - 1 を測定した。P r o M e d D x、L L C (N o r t o n、M A) から検体を購入し、これは、2 0 0 名の男性及び 2 0 0 名の女性から構成された。E D T A 血漿又は血清回収チューブの何れかに検体を回収した。試験の結果を下記の表 9 で示す。

【0305】

【表 1 1】

20

表 9

試料数	400
中央値	16.0
最小値	7.9
最大値	29.8
幾何平均	16.1
正規分布に対するコルモゴロフ・スミルノフ検定	正規性許容 (P=0.751)
パーセンタイル	
0.5	9.7
2.5	10.7
5	11.1
25	13.9
75	18.6
95	23.6
97.5	25.8
99.5	28.0
対数変換後に逆変換した値	

30

表 9 から見られ得るように、中央 P L G F 濃度は 1 6 . 0 p g / m L であり、上位 9 7 . 5 パーセンタイルは 2 5 . 8 p g / m L である。最低試料は 7 . 9 p g / m L であり最大値はこの試料セットにおいて 2 9 . 8 p g / m L である。

40

【0306】

4 . 5 から 3 9 週の範囲の妊娠持続期間の妊婦において P L G F を測定するために、代表的な免疫アッセイ方式を使用した。E D T A 血漿において検体を回収した。結果を図 2 2 で示す (N = 1, 4 9 0 検体)。図 2 2 から見られ得るように、およそ 3 0 週まで、妊娠持続期間の進行に伴い、P L G F 値の一定の上昇が観察される。およそ 3 2 週後、P L G F 値は広く分散する。これらの検体中の P L G F 濃度は、およそ 7 . 0 p g / m L からおよそ 4, 5 0 0 p g / m L の範囲である。較正範囲内の結果を得るために、1, 5 0 0 p g / m L より大きい初期値の検体は、4 倍希釈後に再試験した。

【0307】

50

これらの結果から、本明細書中に記載のような代表的免疫アッセイ方式によって、妊婦においてヒトPLGF-1が検出されることが確認される。子癩前症の者、心疾患症状がある患者及び腎細胞癌、肝細胞癌及び非小細胞癌などの悪性腫瘍のある患者においても、この免疫アッセイ方式を用いて、実験を行い、首尾よく結果が得られた（データを示さず。）。

【実施例16】

【0308】

ATCC寄託情報

マウスハイブリドーマ細胞株1-255-713及び2-826-335は、2007年7月12日に、American Type Culture Collection (本明細書中で以後、「A.T.C.C.」と呼ぶ。)、10801 University Blvd., Manassas, VAに寄託した。細胞株1-255-713には、A.T.C.C.受託番号PTA-8536が割り当てられた。細胞株2-826-335には、A.T.C.C.受託番号PTA-8539が割り当てられた。

10

【0309】

ヒトPLGF-1-エンテロキナーゼ(EK)(1-131)を発現するチャイニーズハムスター卵巣組み換え抗原細胞株(「CHO350」)は、2007年7月12日にA.T.C.C.に寄託し、A.T.C.C.受託番号PTA-8537が割り当てられた(これは、EK切断部位で除去されるHisタグ付きの全長ヒトPLGF-1 1-131である。)

20

【0310】

ヒトPLGF-1-ヒスチジンタグ(1-131)を含有するチャイニーズハムスター卵巣組み換え抗原細胞株(「CHO6305」)は、2007年7月12日にA.T.C.C.に寄託し、A.T.C.C.受託番号PTA-8538が割り当てられた。

【0311】

チャイニーズハムスター卵巣組み換え抗原細胞株(「CHO886」)ヒトPLGF-1断片(17-131)は、2007年7月12日にA.T.C.C.に寄託し、A.T.C.C.受託番号PTA-8540が割り当てられた。

【0312】

当業者にとって当然のことながら、本開示は、目的を遂行し、言及した結果及び長所ならびに本発明において固有の結果及び長所を得るためによく適応する。本明細書中に記載の、分子複合体及び方法、手順、治療、分子、具体的な化合物は、現在、好ましい実施形態の代表であり、典型であって、本開示の範囲を限定するものではない。当業者にとって当然のことながら、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、本明細書中で開示される発明に対して様々な置換及び変更がなされ得る。

30

【0313】

本明細書で言及する全ての特許及び刊行物は、本開示が属する分野において当業者のレベルを示すものである。全ての特許及び刊行物は、個々の刊行物が具体的かつ個別に参照により組み込まれることが示されるように、同じ程度に参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0314】

本明細書中で具体的に開示されない何らかの要素や制限なく、本明細書中で例示的に記載される発明が適切に実施され得る。従って、例えば、本明細書中の各例において、「含む(comprising)」、「基本的からなる(consisting essentially of)」及び「からなる(consisting of)」という用語は何れも、他の2つの用語の何れかで置き換えられ得る。使用してきた用語及び表現は、説明の用語として使用され、限定の用語として使用されず、かかる用語及び表現の使用は、示され記載されている特性又はその一部の何らかの同等物を排除するものではないが、特許請求される本開示の範囲内で様々な変更が可能であることを認識されたい。このように、好ましい実施形態及び任意の特性により本開示を具体的に開示してきたが、本明細書

50

中で開示される概念の変更及び改変が、当業者にとってなされ得、かかる変更及び改変が、添付の特許請求の範囲により定められる本発明の範囲内にあるとみなされることを理解されたい。

【 図 1 】

```

5'-
ATGGACATGGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCTGCTGCTGTTCCCGGC
TCGGGATGCCAATCACCACATCACCATCTGCCTGTGTGCCCGCCAGCAGTGGG
CCTTGTCTGCTGGAAACGGCTGTCAGAGGTGGAAGTGGTACCCCTCCAGAAAGT
CTGGGGCGGACCTACTCCGGGCGCTGGAGAGCGCTGGACGTCTGTCCGA
GTACCCAGCGAGGTGGAGCACATGTTTCAGCCATCCTGTGTCTCCCTGCTGGC
TGCACCGGCTGCTGGCGATGAGAAATCTGCACGTGTGTCCGGTGGAGACGGCC
AATGTACCATGCAGCTCTAAAGATCCGTCTGGGGACCGGCCCTCTACGTGG
AGCTGACGTTCTCAGCAGTTCGTCGGAATGCCGGCTCTGCGGGAGAAGAT
GAAGCCGAAAGGTGCGCGATGCTGTCCCGGAGG-3'

```

FIGURE 1

【 図 2 】

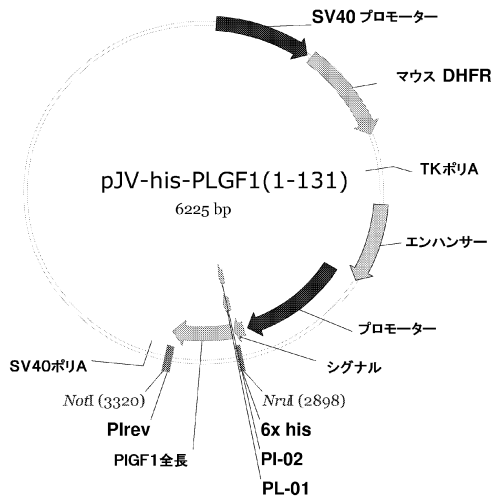


FIGURE 2

【 図 3 】

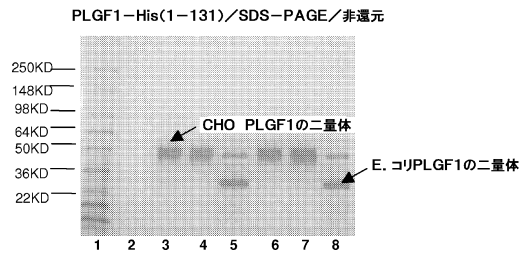


FIGURE 3

【 図 4 A 】

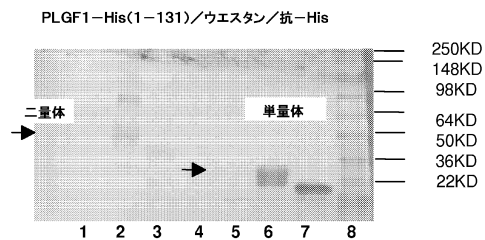


FIGURE 4A

【 図 4 B 】

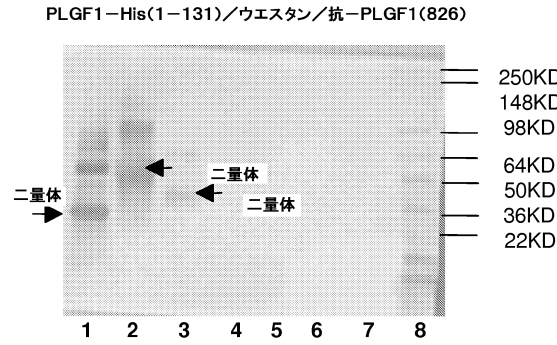


FIGURE 4B

【 図 4 C 】

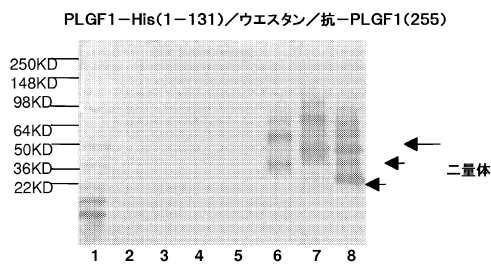


FIGURE 4C

【 図 6 】

```

5'-
ATGGACATGCGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGTTGGTTCC
CCGGCTCGCGATGCCATCATCACCATCACCAITTCGTGACAGGTGGAAAGTGTA
CCCTTCCAGGAAGTGTGGGGCCGAGCTACTGCGGGGCGCTGGAGAGGCTGG
TGGACGTCGTGTCAGAGTACCCAGCGAGGTGGAGCACATGTTACGCCATCC
TGTGTCTCCCTGCTGCGCTGACCCGCTGCTGGCGCGATGAGAATCTGCACTG
TGTGCGCGTGGAGACGCCCAATGTACCAATGCAGCTCCTAAGATCCGTTCTG
GGACCGGCCCTCCTACGTGGAGCTGACGTTCTCTCAGCACGTTCCGCTGCGAA
TGCCGGCCTCTGCGGGAGAAGATGAAGCCGAAAGGTGCGGCGATGCTGTTCC
CCCGGAGG-3'

```

FIGURE 6

【 図 7 】

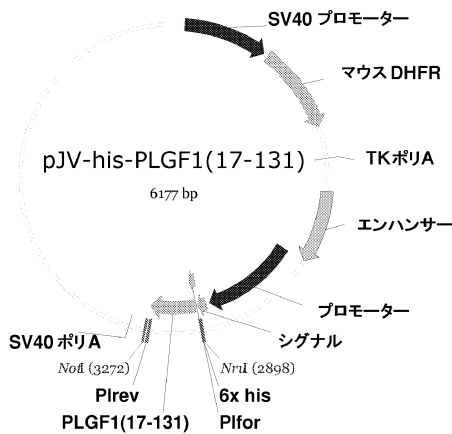


FIGURE 7

【 図 5 】

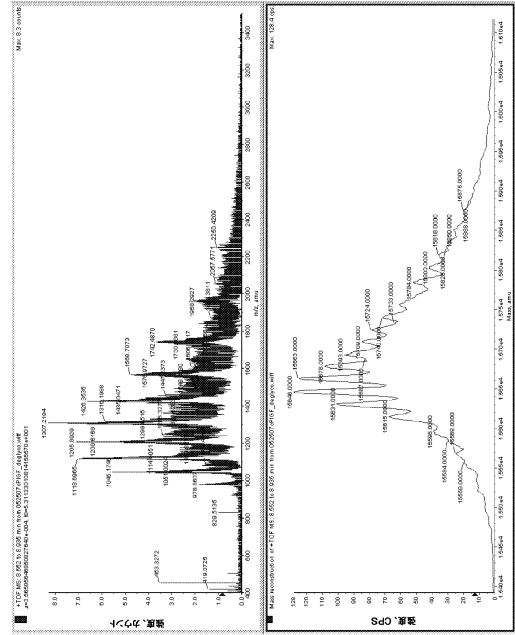


FIGURE 5

【 図 8 】

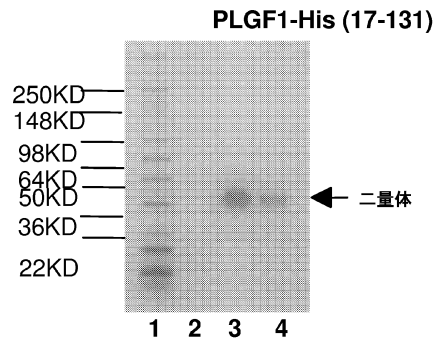


FIGURE 8

【 図 9 】

```

5'-
ATGGACATGCGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGTTGGTTCCCGGGC
TCGGCAATGCCATCACCAATCACCAATGGTGACGATGACGACGACAAGGTGCTC
GCTGTGCCCCCAGCAGTGGGCTTGTCTGCTGGGACGGCTCCTCAGAGGTGG
AAGTGGTACCCATCCAGGAAGTGTGGGGCCGAGCTACTGCGGGGCGCTGGAGA
GGCTGGTGGACGTCGTGTCGAGTACCCAGCGAGGTGGAGCACATGTTACGCC
CATCCGTGTGTTCCCTGCTGCGCTGACCCGGCTGCTGCGGGGATGAGAATCGCA
CTGTGTGCCGTTGGAGACGGCAATGTTCACCAATGCAGCTCCTAAGATCCGTTCT
GGGACCGGCCCTCCTACGTGGAGCTGACGTTCTTCACGACAGTTCGCTGGCAAT
GCCGCTCTGCGGGAGAAGATGAAGCCGAAAGGTGCGGCGATGCTGTTCCCG
GGAGG-3'

```

FIGURE 9

【 図 1 0 】

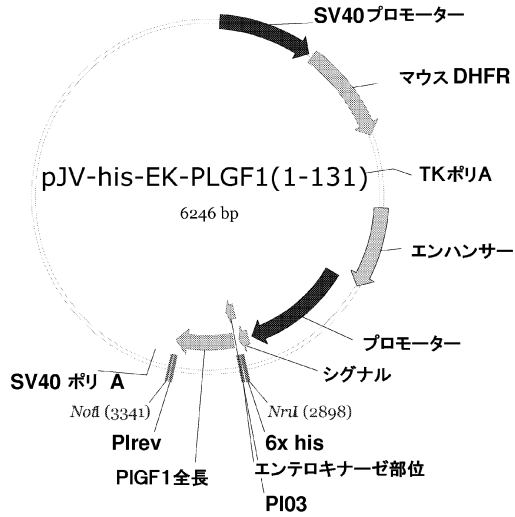


FIGURE 10

【 図 1 1 】

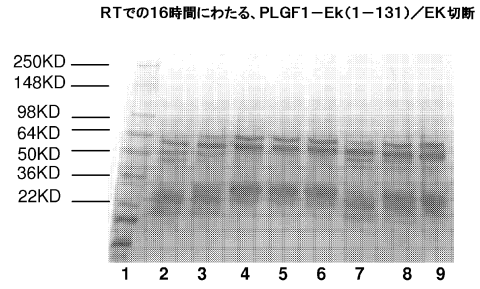


FIGURE 11

【 図 1 2 】

```

1  GATGTGTG ATGACCCAA AGTCCACT TCCTACTT GTCAGTCT GGAGATCAA
   CTCACACG TACTGGTT TGGGTGAG AGGATGGA CAGTCAGA CCTTAGTT
   CDR L1 (15 a.a.)
55  GCCTCAAT TCTTGAGA TCTAGTCA AGCTGTFA CACAGTAT GCACACAG
   CCGGATAG AGAACCTT AGATCAGT TCGAGCAT GTTCATA CDTGTGG
   CDR L1 (15 a.a.)
109 TATTTAGT TGGTACTG CAGAAGCA GGCCAGTCT CCAAGCTC CTGATCTAG
   AATAATGA ACCATGGAC GTCITGGI CCGTCAGA GGTTCGAG GACTAGATG
   CDR L2 (7 a.a.)
163 AAAGTTCG AACGATTI TCTGGGTC CCGACAGG GTCAGTGG AGTGGATCA
   TTCAAAGG TTGGCTAAA AGACCCAG GGGTGTCC CAGTCACG TCACCTAGT
217 GGGACAGT TTCACACT AAGATCAG AGAGTGGG GCTGAGAT CTGGGAGT
   CCTGTCTA AAGTGTGAG TCTAGTCT TCTCACC TCACCTCA GACCTCAA
   CDR L3 (9 a.a.)
271 TATTTTCG TCTCAAGT ACACATGT CCTCCAGC TTCGGTGA GGCACCAAG
   AATAAGAC AGAGTTCA TGTACAAA GGAGGCTGC AAGCCACT CCTGTGTC
325 CTGSAATC AAACGG
   GACCTTAG TTGCC

```

FIGURE 12

【 図 1 3 】

```

1  DVMITQPLS LEVSPGQAS ISCRSSSLV HSHGHTYLVH YLQKPGQSPK
51  LLTKYSHRF SSVPRVSGS GSGTDFLKI SRVERDLGV YFCQSTHVP
101  PTFGGSTLE IRR

```

FIGURE 13

【 図 1 5 】

```

1  QVHLQQSGAE LMKPGASVKI SCRATGYTFS SYNIWVKQR PGHGLEWIGE
51  LPLGVSNNF MERFKDKATL TADPSNTAY IQVSLTSED SAVIYCARST
101  GFYVGGHYDF HMGQGTLLAV SS

```

FIGURE 15

【 図 1 4 】

```

1  CAGTTCAC CTGACGAG TCTGGAGT GAGCTGATG AAGCCTGG CCCTCAGT
   GTCCAAAGT GAGCTGCT AGACCTCA CTGACTAC TTCGACCC CGGATCAC
   CDR H1 (10a.a.)
55  AAGATAAT TCAGAGCT ACTGGCTAC ACATTCAGT AGCTACTGG ATAGACTGG
   TTCTAAGG ACGTTCGA TGACCGATG TGAATGCA TCGATGAC TATCTACC
   CDR H2 (17a.a.)
109 GTAAAGCAG AGGCCITGA CATGCCCTT GAGTGGATT GGAGAGATT TTACTTGA
   CAITTCSTC TCCGGACT GTACCGAA CTCACCTAA CCTCTTAA AATGGACCT
   CDR H2 (17a.a.)
163 AGTGTAGT AATAATTC AATGAGAG TTCAGGAC AAGGCCACA CTCACTGA
   TCAGATCA TTAATAAG TTACTCTC AAGTCTCT TCCGGTGT GAGTGAAGT
217 GATCCTTC TCCAACCA CCTACATA CAAGTCAGT AECCTGCA TCTGAGGAC
   CTGGAAGG AGTGTGTG CCGATGAT GTGAGTGT TCGGACTGT AGACTCCTG
   CDR H3 (13a.a.)
271 TCTGCCCT TATFACGT GCAAGATCA ACGGCCTT TACTAGGG GGTACTAC
   AGCCGGCAG AATAATGA CGTTCATG TCCCGAAA AAGATGCC CCATGATG
   CDR H3 (13a.a.)
325 TTGACAC TGGSGCAA GGCACACT CTCGACTC TCCTCA
   AACTGSTG ACCCCGGT CCGTGTGA GAGCTCAG AAGAT

```

FIGURE 14

【 図 1 6 】

```

1  GCAATC CAGATG ACTCAG TCITCA TCCTCC TITCTT GTATCT CTGGGA GACAGA
   CGGTAG GTCATC TGACTG AGAATG AGGAGG ARAAGA CATAGA GACCTT CTGTCT
   CDR-L1 (11aa)
55  GTCACG ATTACT TGCAGT GCAGST GAGGAC ATATAT AATCGG TTCGCC TGGTAT
   CAGTGG TAATGA ACGTTC CGTCA CTCTGT TATATA TTAGCC AAGCGG ACCATA
   CDR-L2 (7aa)
109 CAGCAG AAACCC GGAATG GCTCCT AGGCTC TFAATA TCTGGT GCAGCC AGTITG
   GTGCTC TTTGGG CCTTAA CGAGGA TCCAGG AATTAT AGACCA CDTCCG TCAAAC
   CDR-L2 (7aa)
163 GAAGCT GGGGTT CCTTCA AGATTC AGTGGC AGTGGG TCGTGA CAGGAT TACACT
   CTCIGA CCCCAG GGAAGT TCTAAG TCACCG TCACCT AGACCT GTCCTA AITGTA
   CDR-L3 (9aa)
217 CTCAGC ATFACC AGTCTT CAGACT GAAGAT GTTGTCT ACTTAT TACTGT CACAG
   GAGTGG TAATGG TCAGAA GTCISA CTICTA CACAGA TGAATA ATGACA GTTGTG
   CDR-L3 (9aa)
271 TATTTG AGTACT CCGTGG ACGTTC GGTGGA GGCACC AAGCTG GAAATC AAACGG
   ATAAAC TCAATG GGCACC TGCACG CCACCT CCGTGG TTTGAC CTTTAG TTTGGC

```

FIGURE 16

【 図 1 7 】

```

1  AIQMTQSSSS FSVSLGDRVT ITCFASDIY HRFQWYQKP GNAPRLLSG
51  AASLEAGVPS RFGSGGSDQ YLGLTSLQT EDVATYYCQQ YNSTPHTFGG
101  GTKLEIKR

```

FIGURE 17

【 図 18 】

```

1   CAGGTGCAG CTGAAGCAG TCAGGACCT GGCCTTGTG CAGCCCTCA CAGAGCCTG
   GTCCACGTC GACTTGGTC AGTCCCTGA COGGAACAC GTCGGGAGT GTCCTGGAC
           CDR H1 (10a.a.)
55  TCCATCACC TGCACAGTC TCTGGTTC TCAITGACT ACGTAIAGT ATACACTGS
   AGSTAGTGG ACGTGTGAG AGACCAAGG AGTACTGA TGCATACCA TATGTGAGC
           CDR H2 (16a.a.)
109 GTTCCAGC TCCACAGGA AAGGTCTG CACTGGCTG GCAGTGATG TGGAGTGGT
   CAGCGGCTC AGGGTCTT TTCCAGAC CTCACCGAC CCTCCTAC ACGTCAACA
           CDR H2 (16a.a.)
163 GAGACACA GACTATGAT CAGAGTTC ATATCCAGA CTGAGGATC AGCAAGGAC
   CCTGTGTG CTGATCTA CGTCCAAAG TATAGTCTT GACTCGTAG TGGTCTCTG
217 AATTCCAAG AGCCAAATT TCTTTAAA ATGAACAGT CTGCAAGCT AATGACACA
   TTAAGGTTT TCGGTICAA AAGAAATTT TACTGTCA GACGTTGCA TFACTGTGT
           CDR H3 (8a.a.)
271 GGCATATAT TACTGTGCC AGATATAGG TTTATGGT ATGGACTC TGGGGTCAA
   CCGTATATA ATGACACGG TCTATATCC AAGATACCA TACCTGATG ACCCCAGTT
325 GGAACCTCA GTCACCGTC TCCTCA
   CCTTGGAGT CAGTGGCAG AGGAGT

```

FIGURE 18

【 図 19 】

```

1   QVQLKQSGPQ WYPSQSISL TCTVSGESLT FYGIRNRRQS PGKGLVHLGV
51  MWGGDTDYD AAFIRLRLSIS KINSGGVFF KNNLQMDTI GIYYCARYRF
101  YGMDYWGQGT SVIVSS

```

FIGURE 19

【 図 20 】

```

HHHHHHILPAV PPOOWALSAG DGSSEVEVVP FOEYVWGRSYC
RALERLYDVV SEYPSEVEHM EPPSCVSLR CTGCCDENL
HCVPVETAN(D)V TMLLKLRSQ DRPSYVELTF SQHVRCECRP
LREKMKPERC GDAVPRR

```

FIGURE 20

【 図 22 】

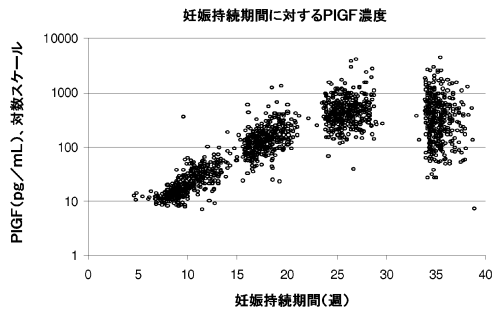


FIGURE 22

【 図 21 】

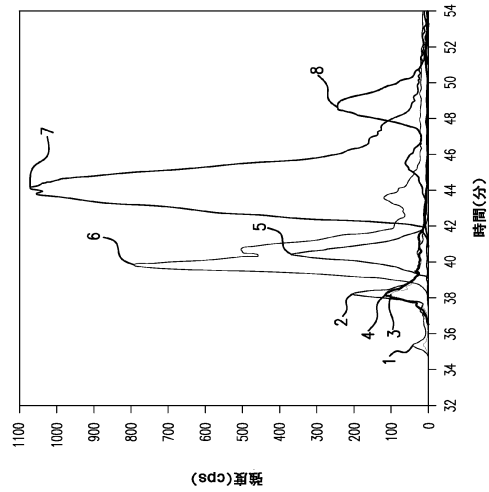


FIG. 21

【配列表】

0005706320000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 12/485,114
(32)優先日 平成21年6月16日(2009.6.16)
(33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-8536
微生物の受託番号 ATCC PTA-8539
微生物の受託番号 ATCC PTA-8537
微生物の受託番号 ATCC PTA-8538
微生物の受託番号 ATCC PTA-8540

- (72)発明者 チー, リエンリ
アメリカ合衆国、イリノイ・60085、ワウキガン、レイクハースト・ロード・526、アパートメント・2・アール
- (72)発明者 ダトビーラル, ソール・エイ
アメリカ合衆国、イリノイ・60201、エバンストン、オーク・アベニュー・1503、ナンバー・511
- (72)発明者 ホークスワース, デイビッド・ジエイ
アメリカ合衆国、イリノイ・60046、レイク・ビラ、ノースウインド・レイン・620
- (72)発明者 レアード, ドン・エム
アメリカ合衆国、イリノイ・60060、マンデライン、サークル・ドライブ・ウエスト・108
- (72)発明者 マーノイ, シヤーマラ
アメリカ合衆国、イリノイ・60004、アーリントン・ハイツ、フォックス・ラン・ドライブ・1625
- (72)発明者 ピンクス, メアリー・エス
アメリカ合衆国、イリノイ・60646、シカゴ、ノース・ランダーズ・5948
- (72)発明者 プツチ, ドミニク・エル
アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバティビル、エリツク・レイン・1724
- (72)発明者 ラムゼイ, キヤロル・エス
アメリカ合衆国、イリノイ・60005、アーリントン・ハイツ、サウス・ベイル・アベニュー・55、ユニット・ナンバー・906
- (72)発明者 ソージン, デイビッド・シー
アメリカ合衆国、イリノイ・60035、ハイランド・パーク、ウエイド・ストリート・1092
- (72)発明者 トウー, バイリン
アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバティビル、バージニア・アベニュー・1748
- (72)発明者 タイナー, ジョーン・デー
アメリカ合衆国、イリノイ・60087、ビーチ・パーク、ノース・オーチャード・ロード・37835
- (72)発明者 ユイ, チークワン
アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバティビル、サウス・イーグレット・コート・1986
- (72)発明者 ツイーマン, ロバート・エヌ
アメリカ合衆国、イリノイ・60046、リンデンハースト、フォーリング・ウオーターズ・ドライブ・2944

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 J. Biol. Chem., (2004), 279, [42], p.43929-43939

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed

UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	PIGF-1測定及其试剂盒和组分		
公开(公告)号	JP5706320B2	公开(公告)日	2015-04-22
申请号	JP2011514772	申请日	2009-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	ブロフィー・スーザン・イー チー・リエンリ ダトビーラル・ソール・エイ ホークスワース・デイビッド・ジエイ レアード・ドン・エム マーノイ・シヤーマラ ピンクス・メアリー・エス プッチ・ドミニク・エル ラムゼイ・キヤロル・エス ソージン・デイビッド・シー トウー・バイリン タイナー・ジヨン・デー ユイ・チークワン ツイー・マン・ロバート・エヌ		
发明人	ブロフィー,スーザン・イー チー,リエンリ ダトビーラル,ソール・エイ ホークスワース,デイビッド・ジエイ レアード,ドン・エム マーノイ,シヤーマラ ピンクス,メアリー・エス プッチ,ドミニク・エル ラムゼイ,キヤロル・エス ソージン,デイビッド・シー トウー,バイリン タイナー,ジヨン・デー ユイ,チークワン ツイーマン,ロバート・エヌ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12N5/10 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/22 C07K14/475 C07K2317/92 G01N33/74 G01N2333/475		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C12N5/00.102 G01N33/53.V C12P21/08		
優先権	61/073624 2008-06-18 US 61/089172 2008-08-15 US 12/485114 2009-06-16 US		
其他公开文献	JP2011524751A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开内容提供了使用糖基化和去糖基化的人PIGF-1，糖基化和去糖基化的人P / GF-1，与人P / GF-1结合的抗体，抗体的方法和人类PIGF-1免疫测定和试剂盒。

表A

グリコシル化されたヒトPIGF-1形態	脱グリコシル化されたヒトPIGF-1形態	アミノ酸転化の位置	転化の種類	脱グリコシル化のために使用される酵素
配列番号1	配列番号36	15	Asn から Asp へ	PNGアゼF
配列番号2	配列番号37	21	Asn から Asp へ	PNGアゼF
配列番号1	配列番号38	15及び83	Asn から Asp へ (15及び83で)	PNGアゼF
配列番号2	配列番号39	21及び89	Asn から Asp へ (21及び89で)	PNGアゼF
	配列番号40	21及び89	Asn から Asp へ (21で); 89で、 Asn又はAspが検出された	トリプシン