

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-505828

(P2015-505828A)

(43) 公表日 平成27年2月26日(2015.2.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/26 (2006.01)</b>	C07K 16/26	ZNA 4B024
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G01N 33/53	B 4B064
<b>G01N 33/543 (2006.01)</b>	G01N 33/53	U 4H045
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	G01N 33/543	501J
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>	C12N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-544806 (P2014-544806)	(71) 出願人	594197872
(86) (22) 出願日	平成24年11月27日 (2012.11.27)		イーライ リリー アンド カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成26年7月11日 (2014.7.11)		アメリカ合衆国 インディアナ州 462
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/066587		85 インディアナポリス リリー コー
(87) 国際公開番号	W02013/081993		ポレイト センター (番地なし)
(87) 国際公開日	平成25年6月6日 (2013.6.6)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	61/566,080		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成23年12月2日 (2011.12.2)	(74) 代理人	100084146
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(74) 代理人	100157956
			弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗グルカゴン抗体およびその使用

## (57) 【要約】

グルカゴンに結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。これらの抗体は、グルカゴンレベルのイムノアッセイにおいておよび/または *in vivo*、*ex vivo* もしくは *in vitro* での免疫化学方法において、ならびにグルカゴンレベルを検出するため、診断、予後と予防の目的のため、およびグルカゴンシグナル伝達が病因にかかわっている患者の治療レジメンを最適化するための他の画像診断方法において有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アミノ酸配列HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT（配列番号 29）からなるグルカゴンに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体またはそのフラグメントは、

アミノ酸配列KASENAGTYVA（配列番号 1）、NGSHRYD（配列番号 2）およびGQSYSYPWT（配列番号 3）をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域 L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 と、

アミノ酸配列GYNFNDYWLN（配列番号 4）、NAYPGWGIINYNEKFKS（配列番号 5）およびDYDNAY（配列番号 6）をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域 H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 と  
10  
を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 2】

配列番号 7 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（L C V R）と、  
配列番号 9 に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（H C V R）と  
を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 3】

配列番号 11 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖と、  
配列番号 13 に示すアミノ酸配列を含む重鎖と  
20  
を含む、請求項 1 または 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 4】

2 つの軽鎖と 2 つの重鎖を含み、前記軽鎖の各々が配列番号 11 に示すアミノ酸配列からなり、および前記重鎖の各々が配列番号 13 に示すアミノ酸配列からなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 5】

配列番号 29 に示すアミノ酸配列からなるグルカゴンに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体またはそのフラグメントは、

アミノ酸配列RSPKSLVGPMPGRITYLY（配列番号 15）、RRNNLAP（配列番号 16）およびMQHLEFPLT（配列番号 17）をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域 L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 と、  
30

アミノ酸配列GYNFNDYWLN（配列番号 18）、YFSTHSDYAIINQKFRD（配列番号 19）およびGGLGLSY（配列番号 20）をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域 H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 と

を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 6】

配列番号 29 に示すアミノ酸配列からなるグルカゴンに特異的に結合する請求項 5 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体またはその抗原結合性フラグメントは、  
40

前記アミノ酸配列がそれぞれRSPKSLVGPMPGRITYLY（配列番号 15）、RRNNLAP（配列番号 16）およびMQHLEFPLT（配列番号 17）である軽鎖相補性決定領域 L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 と、

前記アミノ酸配列がそれぞれGYNFNDYWLN（配列番号 18）、YFSTHSDYAIINQKFRD（配列番号 19）およびGGLGLSY（配列番号 20）である重鎖相補性決定領域 H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 と

を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 7】

配列番号 21 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（L C V R）と、

配列番号 23 に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（H C V R）とを含む、請求項 5  
50

に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 8】

配列番号 25 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖と、  
配列番号 27 に示すアミノ酸配列を含む重鎖と  
を含む、請求項 5、6 または 7 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 9】

2 つの軽鎖と 2 つの重鎖とを含み、前記軽鎖の各々が配列番号 25 に示すアミノ酸配列  
からなり、および前記重鎖の各々が配列番号 27 に示すアミノ酸配列からなる、請求項 5  
~ 8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント。

10

【請求項 10】

検出可能な標識をさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗  
体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 11】

前記検出可能な標識が発色団、色素原、色素、蛍光剤、蛍光発生剤、蓄光剤、化学発光  
剤、生物発光剤、放射性核種、ポジトロン放出断層撮影画像形成剤、および磁気共鳴画像  
形成剤からなる群から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のモノクローナ  
ル抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラ  
グメント、および診断上許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む組成物。

20

【請求項 13】

配列番号 29 に示すグルカゴンアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合するモ  
ノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む容器を備えるキットであって  
、前記モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントが、

アミノ酸配列 RSPKSLVGPMPGRITYLY (配列番号 15)、RRNNLAP (配列番号 16) および MQH  
LEFPLT (配列番号 17) をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域 L C D R 1、L C D R 2 およ  
び L C D R 3 と、

アミノ酸配列 GYNFTDYWIH (配列番号 18)、YFSTHSDYAIINQKFRD (配列番号 19) およ  
び GGLGLSY (配列番号 20) をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域 H C D R 1、H C D R 2  
および H C D R 3 と

30

を含む、キット。

【請求項 14】

前記モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントに結合する二次抗体と、任  
意に、*in vivo* または *in vitro* でグルカゴンを検出するために前記二次抗  
体の有無にかかわらず前記モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを使用  
するための説明書とを含む容器をさらに備える請求項 13 に記載のキット。

【請求項 15】

前記二次抗体が酵素に結合されている、請求項 14 に記載のキット。

【請求項 16】

前記酵素の発色基質を有する容器をさらに含む、請求項 15 に記載のキット。

40

【請求項 17】

体液中のグルカゴンレベルを決定する方法であって、

(a) 配列番号 29 に示すアミノ酸配列、前記抗体またはその抗原結合性フラグメント  
からなるグルカゴンに特異的に結合し、アミノ酸配列 RSPKSLVGPMPGRITYLY (配列番号 15)  
、RRNNLAP (配列番号 16) および MQHLEFPLT (配列番号 17) をそれぞれ含む軽鎖相補性  
決定領域 L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 と、アミノ酸配列 GYNFTDYWIH (配列番  
号 18)、YFSTHSDYAIINQKFRD (配列番号 19) および GGLGLSY (配列番号 20) をそれぞ  
れ含む重鎖相補性決定領域 H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 とを含む、抗グルカ  
ゴン診断用モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントと体液とを接触させる

50

ことと；

(b) 任意に、非特異的に結合したモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを除去することと；

(c) グルカゴンに特異的に結合しているモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を検出および/または定量化することと

を含む、方法。

【請求項 18】

前記体液が血液、血清または血漿であり、および前記接触することが *ex vivo* で生じる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

血清または血漿中のグルカゴンの量を定量化する方法であって、

a. プレートまたはビーズに捕捉抗体 I B A 0 0 9 をコーティングすることであって、前記捕捉抗体が直接的にコーティングされ得る、またはビオチン標識されて、ストレプトアビジン、ニュートラアビジンもしくはアビジンをコーティングされたビーズまたはプレートにコーティングされ得る、コーティングすることと；

b. 前記捕捉抗体のコーティングの前もしくは後に、T w e e n 2 0 などの界面活性剤を含むもしくは含まない T r i s 緩衝生理食塩水またはリン酸緩衝食塩水などの適切な緩衝液に溶解させたニワトリ卵白アルブミンまたは他の非哺乳類タンパク質を用いて前記プレートをブロックすることと；

c. 決定される血清試料を、H E P E S、E D T A、E G T A、塩化ナトリウム、および T r i t o n X - 1 0 0 を含む緩衝液、および 1 % 卵白アルブミン、または緩衝剤、塩、二価カチオンキレート剤、界面活性剤および担体もしくはブロッキングタンパク質の組み合わせを含む別の適切な希釈緩衝液で希釈することであって、前記希釈緩衝液がヘテロ親和性ブロッキング試薬 I などのブロッキング剤を含んでもまたは含まなくともよい、希釈することと；

d. 前記捕捉抗体をコーティングしたプレートまたはビーズを希釈血清試料または希釈血漿試料と接触させることと；

e. 前記プレートを適切な洗浄緩衝液で洗浄して非結合タンパク質を除去することと；

f. 結合グルカゴンを、検出できるように標識されている第 2 の抗グルカゴン検出抗体 I B A 0 3 2 と接触させることと；

g. 前記プレートを適切な洗浄緩衝液で洗浄して、非結合抗グルカゴン検出抗体を除去することと；

h. 既知量のグルカゴンの標準曲線に対して比較することによって結合標識を定量化することと

を含む、方法。

【請求項 20】

グルカゴン受容体拮抗剤による治療前、治療中、または治療後に糖尿病患者においてグルカゴンレベルを決定する方法であって、請求項 17 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法によるグルカゴン定量化を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医療分野に関する。より詳しくは、本発明は、グルカゴンの標識、マーキング、特定または定量化を必要とする診断技術、例えばグルカゴンレベルの画像診断および決定において有用な検出可能なグルカゴン/抗グルカゴンモノクローナル抗体複合体を形成するようにグルカゴンに結合する抗体に関する。本発明の抗体は、グルカゴンレベルの変化をもたらす状態の患者を特定する、ならびにグルカゴン受容体拮抗剤または他の治療薬による患者の治療をモニターするおよび/または改善する際に役立つ診断用途に有用である。

【背景技術】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 2 】

グルカゴンは、29残基のポリペプチドホルモンであり、膵臓中でランゲルハンス島の細胞によって生成され、このペプチドのアミノ酸配列は哺乳類において完全に保存されている。グルカゴンペプチドおよびグルカゴン様ペプチドは、膵臓、腸および脳で発現される共通のプログルカゴン遺伝子から転写される。基礎的な量のグルカゴンは、正常血糖を維持するために不可欠であり、かつグルカゴンの主要な生理的役割は低血糖を防ぐことである。グルカゴンレベルは低血糖に反応して急速に増加し、かつグルカゴン反応は、血糖を正常レベルに戻すために体が活用する一次防御機構である。

## 【 0 0 0 3 】

グルカゴン分泌の適切な調節にはシグナル伝達因子の複雑な相互作用が必要とされる。グルコース、ランゲルハンス島内のパラクリン因子（例えばインスリンおよびGLP-1）および中枢神経系と自律神経系を含むこれらの制御因子は、協調的な様式で相互作用して、グルカゴン分泌を調節する。グルカゴン受容体は肝臓で主に発現され、その活性化によりグルコース産生の増加をもたらされる。また、グルカゴン受容体は多くの他の組織でも低いレベルで発現される。

10

## 【 0 0 0 4 】

グルカゴンは、糖尿病の病理における重要な因子であると考えられてきた。グルカゴンの発現が不相当であると、糖尿病において高血糖症の発症の一因となり得ることが提唱されてきた。近年の研究でも、エネルギー代謝の調節の過程において重要な成分としてグルカゴンを意味づけている。グルコースホメオスタシスおよび糖尿病におけるグルカゴンの重要性を考慮して、グルカゴンは糖尿病および抗糖尿病療法の発達に関連した重要なバイオマーカーと考えられてきた（R. Krishna, G. Herman, および J. A. Wagner, Accelerating Drug Development Using Biomarkers: A Case Study with Sitagliptin, A Novel DPP4 Inhibitor for Type 2 Diabetes, AAPS Journal, Vol. 10, No. 2, p401-409, June 2008）。

20

## 【 0 0 0 5 】

正常血糖を調節する際のグルカゴンシグナル伝達の役割、および正常血糖を維持できないことから起こる病的状態に起因して、グルカゴンシグナル経路は、抗糖尿病療法の魅力的な標的として考えられている。例えば、近年、グルカゴン受容体拮抗剤からの試験結果は、糖尿病患者における血糖値およびヘモグロビンA1cレベルの有意な減少を表している。しかし、グルカゴン受容体拮抗剤はグルカゴンレベルを上昇させることも報告されており、したがって、グルカゴンレベルを決定するための高感受性で正確な技術が、糖尿病患者のグルカゴンレベルの分析と、グルカゴン受容体拮抗剤および/または他の治療薬の開発との両方で必要とされている。

30

## 【 0 0 0 6 】

グルカゴンを検出する諸方法は当技術分野で既知であるが、これらの方法は、所望の特性の特定の組み合わせおよび本発明で見いだされた利点が欠如している。グルカゴンを測定するラジオイムノアッセイは、50年前に初めて記述された。その時以来、ランゲルハンス島からのインスリン、グルカゴンおよび膵島アミロイドポリペプチド（IAPP）分泌物の同時定量化についてのキャピラリー電気泳動競合イムノアッセイを詳述するGuilloらに記述されているものなどのイムノアッセイ方法に進歩があった（Simultaneous capillary electrophoresis competitive immunoassay for insulin, glucagon, and islet amyloid polypeptide secretion from mouse islets of Langerhans. Journal of Chromatography. Guillo C. Roper MG., 1218(26): 4059-64, July 2011）。だが、GuilloおよびRoperの方法は、Sigma-Aldrichから販売されており、ラジオイムノアッセイにおいて $6.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ の親和定数でグルカゴンに結合すると報告されているモノクローナル抗体K79bB10（製品番号G2654）を利用している（製品番号G2654の製品添付文書およびWitt, S.,ら, Acta Histochem., Suppl XX

40

50

XV, 217 (1988)を参照されたい)。

【0007】

糖尿病患者におけるグルカゴンの重要な役割を考慮して、グルカゴンレベルの変化を特定およびモニタリングするためにグルカゴンの生体レベルを検出および/または定量化し、ならびにこれらの変化を考慮して治療介入を改善するためには、特異性、親和性および感受性を含む所望の特性の組み合わせを改善することによる診断用抗体技術の必要性が存在する。例えば、1または複数のグルカゴン受容体拮抗剤、または他の治療薬による治療が患者のグルカゴンレベルの変化をもたらしたかどうかを決定するには、技術が必要である。

【0008】

特に、グルカゴンに特異的であり、向上した結合親和性を有する抗グルカゴン抗体が必要である。より具体的には、グルカゴンに特異的であり、向上した結合親和性を有し、かつグルカゴン決定において感受性の増大を示す抗グルカゴン抗体が必要である。より具体的には、グルカゴンに特異的であり、向上した結合親和性を有し、かつグルカゴン決定において感受性の増大と、最小干渉および広範な希釈直線性をもたらすELISAアッセイ条件の改善とを示す抗グルカゴン抗体が必要である。好ましくは、抗体はモノクローナル抗体であって、グルカゴン上で2つの異なるエピトープを認識する2つの異なる抗体を含む。

【0009】

本発明の抗体は、K79bB10と比較するとグルカゴンへの親和性が驚くほど向上していることがわかる。本発明の抗グルカゴン抗体によるグルカゴンの結合により、最小の血漿タンパク質干渉および感受性の向上による患者の治療前、治療中、および/または治療後のグルカゴンレベルの診断評価が可能になる。したがって、本発明は、グルカゴンのC末端に結合するものを含むグルカゴンの別個のエピトープに特異的に結合する代替の抗グルカゴン抗体を提供する。本発明は、さらに、高スループット形式でグルカゴンを定量化するための迅速な従来の方法を提供する、優れた感受性、回収率および希釈直線性を有する特異性の高い電気化学発光(EL)サンドイッチイムノアッセイを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1A】グルカゴン抗体特異性。(A)捕捉抗体IBA009のBiacore分析。10nMグルカゴン(「GCG 10nM」と呼ぶ)、100nMオキシントモジュリン(「Oxy 100nM」と呼ぶ)および緩衝液のみの負の対照(「緩衝液」と呼ぶ)による結合を示す。捕捉抗体IBA009はグルカゴンの内部領域に結合し、オキシントモジュリンと交差反応することが決定される(図1A)。

【図1B】グルカゴン抗体特異性。(B)検出/結合抗体IBA032のBiacore分析。10nMグルカゴン(「GCG 10nM」と呼ぶ)、100nMオキシントモジュリン(「Oxy 100nM」と呼ぶ)および緩衝液のみの負の対照(「緩衝液」と呼ぶ)による結合を示す。検出抗体IBA032はオキシントモジュリンとの交差反応を示さず、したがって、グルカゴンのC末端に特異的である(図1B)が、同時に結合親和性の大幅な増加を示す。

【図2】グルカゴンサンドイッチELISA方法の展開。図2は、実施例3に記述のELISAで得られた典型的な標準曲線を示す。グルカゴンペプチド(配列番号29)を用いて、1950pmol/Lの濃度で開始し、1:3段階希釈により検量線を作成する(図2、曲線「IBA009捕捉-IBA032検出」)。抗中間領域抗体IBA009は捕捉抗体であり、および抗グルカゴンC末端抗体IBA032は検出抗体である。図2が示すように、実施例3のELISAは広範なダイナミックレンジ、低バックグラウンドおよび高感受性を有する。実施例3のELISAも、最低1:2希釈までおよび最高1:16希釈までの許容される希釈直線性を示す。比較のために、市販のMesoscale DiscoveryグルカゴンELISAキット(カタログK11160C-1)用の製品添付文書に報告されているデータを「MSDKIT」として示す。

10

20

30

40

50

【図3】グルカゴン濃度の相関。血漿グルカゴン濃度間の相関は、実施例3のELISAならびにALPCO (Salem, New Hampshire) から販売されている競合RIAによって決定される。グルカゴン濃度は26の試料に対して決定され、および図3は両アッセイで分割試料を分析した後に得られた結果を示す。図3に図示するように、2つの異なるアッセイで得られたグルカゴン値は、相関が高かった ( $r = 0.97$ 、 $P < 0.001$ )。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の一態様は、配列番号29に示すアミノ酸配列からなるグルカゴンに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントに関し、前述の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、

アミノ酸配列KASENAGTYVA (配列番号1)、NGSHRYD (配列番号2) およびGQSYSYPWT (配列番号3) をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3と、

アミノ酸配列GYNFNDYWLN (配列番号4)、NAYPGWGIINYNEKFKS (配列番号5) およびDYDNAY (配列番号6) をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2およびHCDR3とを含む。

【0012】

本発明の別の実施形態は、配列番号29に示すアミノ酸配列からなるグルカゴンに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントであり、前述のモノクローナル抗体は、

配列番号7に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(LCVR)と、

配列番号9に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(HCVR)とを含む。

【0013】

別の実施形態において、本発明は、配列番号29に示すアミノ酸配列からなるグルカゴンに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供し、前述のモノクローナル抗体は、

配列番号11に示すアミノ酸配列を含む軽鎖と、

配列番号13に示すアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。

【0014】

本発明の別の態様は、配列番号29に示すアミノ酸配列からなるグルカゴンに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントに関し、前述の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、

アミノ酸配列RSPKSLVGPGRITYLY (配列番号15)、RRNNLAP (配列番号16) およびMQHLEFPLT (配列番号17) をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3と、

アミノ酸配列GYNFTDYWIH (配列番号18)、YFSTHSDYAIINQKFRD (配列番号19) およびGGLGLSY (配列番号20) をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2およびHCDR3とを含む。

【0015】

本発明の別の態様は、配列番号29に示すアミノ酸配列からなるグルカゴンに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントに関し、前述の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、

アミノ酸配列がそれぞれRSPKSLVGPGRITYLY (配列番号15)、RRNNLAP (配列番号16) およびMQHLEFPLT (配列番号17) である軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3と、

アミノ酸配列がそれぞれGYNFTDYWIH (配列番号18)、YFSTHSDYAIINQKFRD (配列番号19) およびGGLGLSY (配列番号20) である重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2およびHCDR3とを含む。

【0016】

本発明の別の実施形態は、配列番号29に示すアミノ酸配列からなるグルカゴンに特異

10

20

30

40

50

的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントであり、前述のモノクローナル抗体は、

配列番号 21 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (LCVR) と、

配列番号 23 に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (HCVR) とを含む。

【0017】

別の実施形態において、本発明は、配列番号 29 に示すアミノ酸配列からなるグルカゴンに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供し、前述のモノクローナル抗体は、

配列番号 25 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖と、

配列番号 27 に示すアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。

10

【0018】

本発明の好ましい実施形態は、(配列番号 13) の重鎖を 2 つおよび (配列番号 11) の軽鎖を 2 つ含む、本明細書で IBA009 と称する抗体である。本発明のより好ましい実施形態は、(配列番号 27) の重鎖を 2 つおよび (配列番号 25) の軽鎖を 2 つ含む、本明細書で IBA032 と称する抗体である。

【0019】

本発明の別の実施形態は、本発明の前述の抗グルカゴンモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントのうちの少なくとも 1 つ、および診断上許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む診断上有用な組成物を提供する。そのような一実施形態において、本発明の抗グルカゴンモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントは、標識に共有結合、非共有結合、または部分的に共有結合および部分的に非共有結合される。

20

【0020】

別の実施形態において、本発明は、配列番号 29 に示すグルカゴンアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合した本発明の前述の抗グルカゴンモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントのうちの少なくとも 1 つを含む組成物を包含する。好ましくは、本発明の抗グルカゴンモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントは、配列番号 29 の C 末端を含むエピトープで配列番号 29 に示すグルカゴンアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合される。より好ましくは、本発明は、配列番号 29 に示すグルカゴンアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合した本発明の前述の抗グルカゴンモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントのうちの少なくとも 1 つを含み、かつ診断上許容される担体、希釈剤または賦形剤をさらに含む組成物を包含する。

30

【0021】

他の実施形態において、本発明は、配列番号 29 に示すグルカゴンアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む容器を備えるキットを提供し、前述のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントは、

アミノ酸配列 RSPKSLVGPGRITYLY (配列番号 15)、RRNNLAP (配列番号 16) および MQHLEFPLT (配列番号 17) をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域 L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 と、

アミノ酸配列 GYNFTDYWIH (配列番号 18)、YFSTHSDYAIINQKFRD (配列番号 19) および GGLGLSY (配列番号 20) をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域 H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 とを含む。

40

【0022】

他の実施形態において、本発明は、配列番号 29 に示すグルカゴンアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する第 1 のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む容器であって、前述のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントが、

アミノ酸配列 RSPKSLVGPGRITYLY (配列番号 15) RRNNLAP (配列番号 16) および MQHLEFPLT (配列番号 17) をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域 L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 と、

50

アミノ酸配列GYNFTDYWIH (配列番号18)、YFSTHSDYAIINQKFRD (配列番号19)およびGGLGLSY (配列番号20)をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2およびHCDR3とを含む容器と;

ならびに配列番号29に示すグルカゴンアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する第2のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む容器であって、前述のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントが、

アミノ酸配列KASENAGTYVA (配列番号1)、NGSHRYD (配列番号2)およびGQSYSYPWT (配列番号3)をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3と、

アミノ酸配列GYNFNDYWLN (配列番号4)、NAYPGWGIINYNEKFKS (配列番号5)およびDYDNAY (配列番号6)をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2およびHCDR3とを含む容器とを備えたキットを提供する。 10

#### 【0023】

特定の実施形態において、前述のキットは、*in vivo*、*ex vivo*、または*in vitro*でグルカゴンを検出するために、本発明のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントに結合する二次抗体と、任意に、二次抗体の有無にかかわらず前述のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを使用するための説明書とを含む第2の容器を備えることもある。一部の実施形態において、二次抗体はイムノアッセイで用いられることが知られている酵素に結合されることができる。他の実施形態において、前述のキットは、上述の酵素の発色基質を含む別の容器をさらに備えることができる。 20

#### 【0024】

他の実施形態において、本発明は、哺乳類細胞によって発現されるグルカゴンを検出する方法も包含し、該方法は、

(a) 配列番号29に示すアミノ酸配列からなるグルカゴンに特異的に結合し、検出可能なように標識されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントと細胞とを接触させることであって、前述のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントが、

アミノ酸配列RSPKSLVGPGRITYLY (配列番号15)、RRNNLAP (配列番号16)およびMQHLEFPLT (配列番号17)をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3と、 30

アミノ酸配列GYNFTDYWIH (配列番号18)、YFSTHSDYAIINQKFRD (配列番号19)およびGGLGLSY (配列番号20)をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2およびHCDR3とを含む、接触させることと;

(b) 任意に、非特異的に結合したモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを除去することと;

(c) 当技術分野で既知の任意の方法、例えば細胞数測定技法または免疫組織化学技法を用いて、グルカゴンに特異的に結合している標識モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を検出および/または定量化することを含む。 40

好ましくは、グルカゴンは、尿、腹水、リンパ液、髄液、気管支液など、より好ましくは血液、血清または血漿などの糖尿病患者由来の生物組織または体液中で検出される。

#### 【0025】

本発明は、体液中のグルカゴンレベルを決定する方法も提供し、該方法は、(a) 配列番号29に示すアミノ酸配列からなるグルカゴンに特異的に結合する抗グルカゴン診断用モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントと体液とを接触させることであって、前述の抗体またはその抗原結合性フラグメントが、

アミノ酸配列RSPKSLVGPGRITYLY (配列番号15)、RRNNLAP (配列番号16)およびMQHLEFPLT (配列番号17)をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3と、 50

アミノ酸配列GYNFTDYWIH (配列番号18)、YFSTHSDYAIINQKFRD (配列番号19)およびG

GLGLSY (配列番号 20) をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域 HCDR1、HCDR2 および HCDR3 とを含む、接触させることと；

(b) 任意に、非特異的に結合したモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを除去することと；

(c) グルカゴンに特異的に結合しているモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を検出および/または定量化することとを含む。好ましくは、本方法で用いられる抗体は IBA032 である。

#### 【0026】

本発明は、哺乳類の生物組織または糖尿病患者もしくは糖尿病を発症するリスクのある患者由来の体液 (例えば尿、腹水、リンパ液、髄液、気管支液、および好ましくは血液、血清または血漿) 中のグルカゴンレベルを検出および/または定量化する方法も提供し、該方法は、

検出可能なグルカゴン/抗グルカゴンモノクローナル抗体複合体の形成を可能にする条件下で、グルカゴンに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原特異的フラグメントと前述の組織を接触させることであって、前述のモノクローナル抗体またはその抗原特異的フラグメントが、

アミノ酸配列 RSPKSLVGMGRITYLY (配列番号 15)、RRNNLAP (配列番号 16) および MQHLEFPLT (配列番号 17) をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域 LCDR1、LCDR2 および LCDR3 と、

アミノ酸配列 GYNFTDYWIH (配列番号 18)、YFSTHSDYAIINQKFRD (配列番号 19) および GLGLSY (配列番号 20) をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域 HCDR1、HCDR2 および HCDR3 とを含む、接触させることと；

前述の複合体 (単数または複数) を検出および/または定量化することとを含む。好ましくは、本方法で用いられる抗体は IBA032 である。好ましくは、試料と本発明の抗体とを接触させることは、*ex vivo* で起こる。より好ましくは、本方法で用いられる抗体は IBA032 であり、および試料と本発明の抗体とを接触させることは、*ex vivo* で起こる。

#### 【0027】

種々の実施形態において、接触させることは *in vivo* で実施されることができ、抗グルカゴンモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントは、注射または注入によって非経口的に投与されることができ、さらに、種々の実施形態において、抗グルカゴンモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントは、本明細書に記述される標識または当技術分野で既知の標識を含むがこれらに限定されない少なくとも 1 つの検出可能な標識で標識される。検出は、特定の検出可能な標識に適していることが当技術分野で知られている方法、技術および/または装置を用いて *in vitro* および/または *in vivo* で実施されることができ、これらは 計数器、シンチレーション計数器、オートラジオグラフィによって、例えば、蛍光測定装置、生物発光測定装置、磁気共鳴イメージング (MRI) 装置、磁気装置、ポジトロン放出断層撮影 (PET) 装置、コンピュータ断層撮影 (CT) 装置、超音波装置、光干渉断層撮影 (OCT) 装置および/または単一光子放射型コンピュータ断層撮影 (SPECT) 装置を含む装置が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0028】

別の実施形態では、本発明は、

(a) 細胞中または細胞上のグルカゴンを検出および/または定量化するため；

(b) 患者内で細胞を発現させるグルカゴンを検出および/または定量化するため；

(c) 患者の組織試料中で細胞を発現させるグルカゴンを検出および/または定量化するため；

(d) 血液、血漿、血清、尿、腹水、リンパ液、髄液および気管支液などの患者由来の体液中のグルカゴンを検出および/または定量化するため；

(e) グルカゴン発現が健康な対照被験者中のそれよりも高いまたは低い個人が糖尿病で

10

20

30

40

50

あるか、または糖尿病発症のリスクがあるかどうかを評価するため；

( f ) グルカゴン受容体拮抗剤での治療の条件を有する患者を選択するため；

( g ) グルカゴン受容体拮抗剤での治療に対する反応を決定するため；および/または

( h ) 糖尿病を治療するために、

グルカゴン（配列番号 29）に特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを含むキットの使用を提供し、前述のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントが、

アミノ酸配列 RSPKSLVGPMPGRITYLY（配列番号 15）、RRNNLAP（配列番号 16）および MQHLEFPLT（配列番号 17）をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域 L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 と、

10

アミノ酸配列 GYNFTDYWIH（配列番号 18）、YFSTHSDYAIINQKFRD（配列番号 19）および GGLGLSY（配列番号 20）をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域 H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 とを含む。

【 0 0 2 9 】

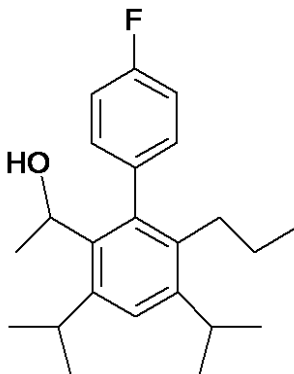
好ましくは、上記の ( g ) および ( h ) に関して、治療は、下記の構造 1（Petersen, K F. Sullivan, J T., Effects of a novel glucagon receptor antagonist (Bay 27-9955), on glucagon-stimulated glucose production in humans. Diabetologia. 44(11): 2018-24, 2001 Nov）に示す Bay - 27 - 9955 などのグルカゴン受容体拮抗剤の投与を含む。

20

【 0 0 3 0 】

構造 1：

【 化 1 】



30

【 0 0 3 1 】

このように、本明細書に記述の抗グルカゴン抗体は、診断法として有用であり、グルカゴンレベルの変化によって糖尿病患者を特定する、またはグルカゴンのレベルの上昇をもたらすことが知られている他の状態を診断するのに役立つことができる。さらに、本発明の抗グルカゴン抗体を用いて、Bay 27 - 9955 などの治療薬または国際公開第 2005 / 123668 号に記載のグルカゴン受容体の小分子拮抗剤ならびに国際公開第 2009 / 120530 号に記載のものなどのグルカゴン受容体の抗体拮抗剤を標的にするグルカゴンシグナル伝達による糖尿病患者の治療をモニターするおよび/または最適化することが可能である。

40

【 0 0 3 2 】

本発明の別の態様は、本発明の抗グルカゴン抗体をコードする単離された核酸分子と、該核酸分子を含む発現ベクターと、該核酸分子を含む宿主細胞とを提供する。

【 0 0 3 3 】

本明細書で用いる場合、グルカゴンは、特に明記しない限り、いかなる哺乳類種のグルカゴン 1 - 29 を言う。グルカゴンの配列は、以下のように示される；

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT、および本明細書では配列番号 29 と呼ぶ。

【 0 0 3 4 】

全長抗体は、ジスルフィド結合によって相互連結した 2 つの重 ( H ) 鎖と 2 つの軽 ( L

50

鎖とを含む免疫グロブリン分子である。各鎖のアミノ末端部分は、その中に含まれる相補性決定領域(CDR)を介して、主に抗原認識に關与する約100~110のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能に關与する定常領域を規定する。軽鎖は または として分類され、これらは当技術分野で既知のように特定の定常領域によって特徴づけられる。重鎖は 、 $\mu$ 、 、 または として分類され、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgEとして抗体のアイソタイプを規定する。IgG抗体は、さらに、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4のサブクラスに分けられることができる。各重鎖のタイプも、当技術分野で周知の配列を有する特定の定常領域によって特徴づけられる。本明細書で用いる場合、「抗原結合性フラグメント」とは、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、およびグルカゴンに結合する一本鎖Fvフラグメントをいう。本明細書で用いる場合、用語「グルカゴンに結合する」とは、グルカゴン(配列番号29)のエピトープとの相互作用をいう。本明細書で用いる場合、用語「エピトープ」とは、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントによって認識される抗原上の不連続な三次元部位をいう。

10

20

30

40

50

#### 【0035】

CDRはより保存されている、フレームワーク領域(「FR」)と称する領域によって分散されている。各軽鎖可変領域(LCVR)および重鎖可変領域(HCVR)は、アミノ末端からカルボキシ末端にFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順番に配列した3つのCDRと4つのFRで構成される。軽鎖の3つのCDRは、「LCDR1、LCDR2およびLCDR3」と呼ばれ、および重鎖の3つのCDRは、「HCDR1、HCDR2およびHCDR3」と呼ばれる。CDRは、抗原と特定の相互作用を形成する残基の大部分を含んでいる。本発明の抗体または抗原結合性フラグメントのLCVRおよびHCVR領域内のCDRアミノ酸残基の番号付けと位置決めは、周知のKabata番号付け規約によって、またはKabataとChothiaの番号付け規約によって決定される。

#### 【0036】

本明細書で用いる場合、用語「抗体」とは、特に明記しない限りモノクローナル抗体をいう。用語「モノクローナル抗体」、その省略形「mAb」およびその文法的に正しい型は、例えば、いかなる真核生物クローン、原核生物クローンまたはファージクローンを含む単一コピーもしくはクローンに由来する抗体をいうことを意図し、かつそれが生成される方法は意図しない。本発明のモノクローナル抗体は、好ましくは、均質集団または実質的に均質集団中に存在する。完全なmAbは、2つの重鎖と2つの軽鎖を含む。そのようなモノクローナル抗体の「抗原結合性フラグメント」としては、例えば、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、一本鎖Fvフラグメント、および単一ドメイン可変フラグメントが挙げられる。本発明のモノクローナル抗体およびその抗原結合性フラグメントは、例えば、組換え技術、ファージディスプレイ技術、合成技術(例えばCDR移植技術)もしくはそのような技術の組み合わせ、または当技術分野で既知の他の技術によって生成されることができる。抗原結合性フラグメントが特定されるかどうかに関係なく、本明細書で用いる場合、用語「抗体」および「モノクローナル抗体」とは、特に明記しない限り、そのようなフラグメント、ならびに一本鎖型を含むと理解されよう。

#### 【0037】

本発明の別の態様は、上述の抗グルカゴン抗体のいずれかをコードする単離された核酸分子と、該核酸分子を含む発現ベクターと、該核酸分子を含む宿主細胞とに關する。さらに、本発明は、発現配列、プロモーター配列および/またはエンハンサー配列などの制御配列に機能的に結合した前述のポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを提供する。細菌系および真核細胞系などの原核細胞系中での抗体ポリペプチドの効率的な合成のための種々の発現ベクターは、酵母培養系および哺乳類細胞培養系を含むがこれらに限定されずに開発されてきた。本発明のベクターは、染色体配列、非染色体配列および合成DNA配列のセグメントを含むことができる。

## 【0038】

抗体および抗原結合性フラグメントを生成して精製する方法は、当技術分野で周知であり、例えば、Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, chapters 5-8 and 15, ISBN 0-87969-314-2に見出すことができる。抗原結合性フラグメントは、従来の方法によって調製されることもできる。ヒトフレームワーク生殖系列配列は、Immunogenetics (IMGT) のウェブサイト <http://imgt.cines.fr> から、またはMarie-Paule Lefranc and Gerard Lefrancによる *The Immunoglobulin Facts Book*, Academic Press, 2001, ISBN 012441351から取得することができる。本発明は、前述の組換えベクターを含む組換え宿主細胞も提供する。特定の好みの細胞系は、高レベルの発現、目的タンパク質の恒常的発現、および宿主タンパク質からの最小限度の混入に基づいて選択される。発現用の宿主として利用可能な哺乳類細胞系は当技術分野で周知であり、COS-7細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞、およびリンパ腫細胞、骨髄腫細胞またはハイブリドーマ細胞などのリンパ球由来の細胞系を含む多くの他の細胞などの多くの不死化細胞系が挙げられるがこれらに限定されない。ベクターの形質転換用および本発明の抗体の発現用の好ましい宿主細胞は、例えば、NS0細胞 (非分泌性 (0) マウス骨髄腫細胞)、ヒト胎児由来腎臓 (HEK) 293、SP20およびチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞ならびにリンパ腫細胞、骨髄腫細胞またはハイブリドーマ細胞などのリンパ球由来の他の細胞系の哺乳類細胞である。本発明の抗体は、ハイブリドーマ以外の細胞系で発現することができる。酵母などの他の真核生物宿主は、代わりに使用されることができる。抗体およびより具体的にはその抗原結合性フラグメントも、大腸菌 (*Escherichia coli*) などの原核細胞から生成されることができる。本発明による抗体をコードする配列を含む核酸は、好適な哺乳類宿主細胞の形質転換で用いられることができる。例えば、重鎖 (例えば、配列番号27により与えられるアミノ酸配列) および軽鎖 (例えば、配列番号25により与えられるアミノ酸配列) をコードする cDNA 配列は、クローン化されて、好適な一過性トランスフェクション発現ベクターに設計されることも可能である。設計された免疫グロブリン発現ベクターは、次いで、HEK 293細胞にトランスフェクトされることができる。トランスフェクタントは、グルカゴンに特異的に結合する抗体の発現について検証されることができる。

10

20

30

## 【0039】

本発明は、さらに、上述の抗グルカゴン抗体のいずれかを精製する方法を提供する。本発明の改変抗体または抗原結合性フラグメントは、既知の方法を用いて調製され、精製されることができる。抗グルカゴン抗体に関して「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から特定されて、分離および/または回収されたものである。その自然環境の混入成分は、その抗体に関する診断用途を妨げる可能性のある物質であり、酵素、ホルモンおよび他のタンパク質性または非タンパク質性溶質であり得る。好適な実施形態において、本発明の抗体は、(1) ローリー法で決定される場合、抗体の95重量%を超えるまで、最も好ましくは99重量%を超えるまで、(2) スピニングカップ配列決定装置の使用により、N末端または内部のアミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、または(3) 還元または非還元条件下でクーマシーブルー、または好ましくは銀染色を用いて、SDS-PAGEによって均一になるまで精製される。本発明の抗グルカゴン抗体に関して用語「単離される」とは、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しなくなるので、組換え細胞内に *in situ* で抗体を含むことがある。本発明の抗グルカゴン抗体は、当技術分野で既知の任意の方法によって単離または精製されることができ、それらの方法としては生理食塩水に対する透析に続く硫酸アンモニウムまたは硫酸ナトリウムによる沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーもしくは免疫アフィニティークロマトグラフィー (プロテインAおよび/またはプロテインGアフィニティークロマトグラフィーを含むがこれらに限定されない)、ならびにゲル濾過またはゾーン電気泳動が挙げられる。

40

## 【0040】

50

本明細書に開示される抗グルカゴン抗体は、*in vivo*でおよび/または種々の形状の *ex vivo* 調製物にかかわらず、細胞、組織または臓器の内部もしくは表面に、および体液中に存在するグルカゴンのレベルを検出することによって、診断手法、予後方法および/または患者のモニタリング手法に有用である。用語「体液」とは、健常人または患者の身体に由来するいかなる流体または流体様物質、例えば血液、血清、血漿、リンパ液、髄液、尿、唾液、涙、脳脊髄液、乳、羊水、胆汁、尿、気管支液、腹水、膿および他のいかなる生物分泌物をいう。また、流体様物質が意味する範囲内には、臓器または組織の抽出物、および被験者由来の細胞または組織調製物がインキュベートされた培地が含まれる。本明細書に記述の抗グルカゴンモノクローナル抗体は、酵素に結合させて、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) で用いることができる。そのようなアッセイは、例えば、Butler (1994) "ELISA" (Chapter 29), In: van Oss, C. J.ら, 編集, Immunochemistry, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 759-803に詳細に記述されている。本発明の抗グルカゴン抗体は、グルカゴン発現についてのラジオイムノアッセイおよび蛍光標示式細胞分取器 (FACS) 分析でも用いられることができる。

10

#### 【0041】

グルカゴン用の抗グルカゴン抗体の親和性に関して本明細書で用いる場合、語句「特異的に結合する」とは、特に明記しない限り、基本的には本明細書に記述のSPRバイオセンサを用いることを含み当技術分野で既知の一般的な方法で決定される場合、好ましくは、約  $1 \times 10^{-10}$  M未満の  $K_D$ 、より好ましくは、約  $1 \times 10^{-10}$  Mと約  $1 \times 10^{-11}$  Mの間、さらにより好ましくは、約  $1 \times 10^{-10}$  Mと約  $1 \times 10^{-13}$  Mの間、さらにより好ましくは、約  $1 \times 10^{-11}$  Mと約  $1 \times 10^{-13}$  Mの間を意味するように意図される。

20

#### 【0042】

本明細書で用いる場合、用語「接触させること」とは、抗体、例えば本発明の抗体を、グルカゴン抗原、例えばグルカゴンレベルが決定されることになる試料中の分析物に、前述のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントがグルカゴンに結合できる条件下で一時の間、曝すことをいう。そのような時間および条件は、当業者には既知であり、および/または本明細書に引用される参考文献によれば当技術分野で既知の方法によって日常的に決定されることができる。

30

#### 【0043】

本明細書で用いる場合、感受性とは、許容される正確度および精度で測定されることができる分析物(この場合、グルカゴン)の最も低いレベルをいう。感受性は、例えば、本発明により、グルカゴンの試料を採取し、%CV(変動係数)が20%を超えるまで該試料を段階的に希釈することによって決定される定量化の下限(LLoQ)によって反映される。

#### 【0044】

用語「糖尿病」および「糖尿病性」とは、異常なグルコース調節によって典型的に特徴づけられる哺乳類での生理的状态をいうまたは説明する。例としては、I型糖尿病、II型糖尿病、高血糖症、高インスリン血症、細胞休止、第1相反応の回復による細胞機能の改善、食事高血糖症、代謝症候群、低血糖症、高カリウム血症/低カリウム血症、正規化するグルカゴンレベル、糖尿病の結果としての肥満、膵島炎、膵島移植、小児糖尿病、妊娠糖尿病、糖尿病性後期合併症、微量/顕性アルブミン尿、グルカゴン投与に起因する腸運動の低下、インスリン抵抗性症候群、シンドロームX、グルカゴン産生腫瘍、急性膵炎、肥満の結果としての糖尿病、糖尿病性脂質異常症が挙げられるがこれらに限定されない。好ましくは、糖尿状態は、I型またはII型糖尿病である。より好ましくは、糖尿状態は、II型糖尿病である。

40

#### 【0045】

##### 抗体組成物と方法

安定した検出可能な抗原抗体複合体を形成するために当業者が使用することができる周知の方法が当技術分野にはある(例えば、Antibodies, A Laboratory Manual by Harlow

50

and Lane (現行版), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, for conditions permitting formation of detectable antigen/antibody complexesを参照されたい)。

#### 【0046】

本発明の抗グルカゴンモノクローナル抗体または本明細書に記述のグルカゴン/抗グルカゴンモノクローナル抗体複合体は、当技術分野で周知の任意の方法を用いて、検出できるように標識されることができる(例えば、Antibody Engineering Volume 2, Kontermann, Roland; Dubel, Stefan (編集)を参照されたい)。これに限定されないが、グルカゴンまたは検出できるように標識されたグルカゴン/抗グルカゴンモノクローナル抗体の複合体は、*in vivo*、*ex vivo*または*in vitro*のいずれかで、細胞上またはそのフラグメント上に存在することができる。例えば、これに限定されないが、そのような細胞またはそのフラグメントは、*in situ*でその自然起源の状態から単離されることができる、または例えば、細胞ペレット、異種移植片、組織、臓器、体液、またはその濃縮、精製、強化されたいずれの形状の試料中に存在し得る。これらの方法のいずれにおいて、接触させることおよび検出することとは、各々*in vitro*で行われることができ、または接触させることは*in vivo*で行われることができ、および検出することとは、*in vitro*で行われることができ、または接触させることおよび検出することとは各々*in vivo*で行われることができる。標識としては、例えば、発光剤または吸光剤、発色団、色素原、磁性粒子または鉄粒子、色素、蛍光剤、フルオロフォア、蓄光剤、化学発光剤、生物発光剤、放射性核種、酵素、ポジトロン放出断層撮影画像形成剤、磁気マイクロビーズ、磁性流体ナノ粒子、二次抗体、および磁気共鳴画像形成剤であってもよいが、これらに限定されない。

10

20

#### 【0047】

用語「検出できるように標識された」とは、本発明の抗グルカゴン抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、またはグルカゴン/抗グルカゴンモノクローナル抗体の複合体が、有用な検出可能な標識に共有結合的または非共有結合的のいずれかで付着していることを意味する。直接的な結合標識抗体方法において、多くの異なる有用な標識を使用することができ、そのような標識には、例えば、補欠分子族複合体、発色団、色素原(発色基質)、色素、蛍光化合物、蛍光発生物質、放射性同位体、常磁性同位体、およびポジトロン放出断層撮影法(PET)と磁気共鳴画像法(MRI)によって撮像されることができる化合物が挙げられる。計数器、シンチレーション計数器、PETスキャンまたはオートラジオグラフィによって簡単に検出される有用な放射標識としては、 $^3\text{H}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ および $^{14}\text{C}$ が挙げられる。*in vivo*診断の場合、放射性核種は、DTPAおよびEDTAなどのキレート剤を用いて、直接的または間接的のいずれかでモノクローナル抗体または抗原結合性フラグメントに結合されることができる。そのような放射性核種の例としては、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{90}\text{Y}$ および $^{201}\text{Tl}$ が挙げられる。他の好適な標識は当技術分野で周知である、または日常的な実験で決定されることができる。間接的な方法では、二次抗体は、例えば酵素を用いて結合されることができる。

30

40

次いで、標的抗原に結合される一次抗体との二次抗体の結合は、検出可能なシグナルを得るための適切な条件下で、酵素の発色基質との反応によって検出されることができる。

#### 【0048】

高消衰係数で発色団を有する、または発色団をもたらし、したがって容易に検出することができる発色性化合物を使用して、比色検出を用いることができる。後で、適切な反応条件下でその基質にさらされると、酵素は、その基質と反応して、例えば、分光光度法、蛍光定量法または視覚的方法によって検出されることができる化学標識を生成する。

#### 【0049】

この目的で一般的に用いられる酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸脱水素酵素、ブド

50

ウ球菌ヌクレアーゼ、 $\alpha$ -V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコール脱水素酵素、  
 $\alpha$ -グリセロリン酸脱水素酵素、トリオースリン酸イソメラーゼ、アスパラギナーゼ、グル  
 コース酸化酵素、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、  
 グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。好適な補欠分子族複  
 合体の例としては、例えば、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが  
 挙げられるがこれらに限定されない。これらの複合体を使用するアッセイは臨床診断検査  
 室で容易に行われることができ、およびこれらの検査室で一般的に利用可能な機器で病理  
 学者によって精査されることができるので、色素原の使用は好まれる。一般的に用いられ  
 る色素原としては、ジアミノベンジジン(DAB)；増感型DAB；3-アミノ-9-エ  
 チルカルバゾール(AEC)；4-クロロ-1-ナフトール(4-CN)；ハンカー-イ  
 エーツ試薬； $\alpha$ -ナフトールピロニン；3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)；  
 ファストブルーBB；ファストレッドTR；ニューフクシン；BCIP-NBT；  
 テトラゾリウム；テトラニトロブルー-テトラゾリウム(TNBT)；および銀増感に  
 よるイムノゴールドが挙げられる。

#### 【0050】

有用な蛍光標識としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチ  
 オシアネート、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ローダミン、ダンシル基、  
 フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド、フル  
 オレサミンおよびCy5が挙げられる(Haugland (1996) Handbook of Fluorescent Prob  
 es and Research Chemicals, 第6版, Molecular Probes, Eugene, OR)。

#### 【0051】

本発明の抗グルカゴン抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、またはグルカゴン/  
 抗グルカゴンモノクローナル抗体複合体は、検出できるように、 $^{152}\text{Eu}^+$ 、またはラン  
 タニド系統の他のメンバーなどの蛍光発光金属を用いて、これらを、ジエチレントリア  
 ミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)などの金属キレート  
 基を用いて付着させることによって標識されることもできる。

#### 【0052】

本発明の抗グルカゴン抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、またはグルカゴン/  
 抗グルカゴンモノクローナル抗体複合体は、リン光化合物または化学発光化合物に結合さ  
 せることによって検出されるように標識されることができ、次いで化学反応の過程におい  
 て生じるリン光または発光によって検出されることができる。有用な化学発光化合物の例  
 としては、ルミノール、イソルミノール、セロマティックアクリジニウムエステル、イミ  
 ダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルが挙げられる。同様に、ルシフェリ  
 ン、ルシフェラーゼまたはエクオリンなどの生物発光化合物を用いて、抗体ペプチドを標  
 識することができる。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することで決定さ  
 れる。

#### 【0053】

本発明は、融合タンパク質を生成するために、ポリペプチド(またはその部分、該ポリ  
 ペプチドの少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90または1  
 00の連続アミノ酸を含むことが好ましい)に組換えで融合された、または化学的に結合  
 (共有結合および非共有結合の両方を含む)された抗体を包含する。融合は必ずしも直接  
 的である必要はないが、リンカー配列を介してもよい。

#### 【0054】

本発明のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントは、標的抗原のイムノ  
 アッセイまたは精製に特に有用である固体支持体に付着させることもできる。そのような  
 固体支持体としては、例えば、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポ  
 リスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられるがこれらに限定されない  
 。

#### 【0055】

ポリペプチドに融合または結合された抗体は、当技術分野で既知の方法を用いて、in

10

20

30

40

50

*in vitro*内でのイムノアッセイでおよび精製方法で使用されてもよい（例えば、Harborら、上掲、および国際公開第93121232号；欧州特許第439,095号；Naramuraら（1994）*Immunol. Lett.* 39:91-9；U.S. Patent No. 5,474,981；Gilliesら1992 PNAS 89:1428-32；Fellら1991 *J. Immunol.* 146:2446-52を参照されたい）。

#### 【0056】

本発明は、可変領域以外の抗体ドメインに融合または結合したポリペプチド（またはそのフラグメント）を含む組成物をさらに含む。ポリペプチド（またはそのフラグメント）を抗体または抗体部分に融合または結合する方法は、既知である（例えば、米国特許第5,336,603号；同第5,622,929号；同第5,359,046号；同第5,349,053号；同第5,447,851号；同第5,112,946号；欧州特許第307,434号；同第367,166号；国際公開第96/04388号；同第9106,570号；Ashkenaziら（1991）PNAS 88:10535-10539；Zhengら（1995）*J. Immunol.* 154:5590-5600；およびVieら（1992）PNAS 89:11337-11341を参照されたい）。

#### 【0057】

ポリペプチド、ポリペプチドフラグメントを本明細書に記述の抗体またはその抗原結合性フラグメントに融合または結合して、*in vivo*半減期を増加させてもよい。さらに、ポリペプチド、ポリペプチドフラグメントを抗体またはその抗原結合性フラグメントに融合または結合して、精製を促進させてもよい。好適な実施形態において、ポリペプチドは、その多くが市販されている他のポリペプチドの中でpQEベクター（QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA）に備えられているタグなどのヘキサヒスチジンペプチドである。ヘキサヒスチジンは、タンパク質の簡便な精製を提供する（Gentzら（1989）PNAS 86:821-824）。精製に有用な他のペプチドタグとしては、例えば、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する「HA」タグ（Wilsonら（1984）*Cell* 37:767）および「フラグ」タグが挙げられる。

#### 【0058】

##### 本発明の抗体を用いる諸方法

本発明の抗体を診断上用いて、例えば、確立された技法を用いる所定の治療レジメンの有効性を決定するために、臨床試験手法の一部として糖尿病の発症または進行をモニターすることができる。本発明の抗グルカゴンモノクローナル抗体は、臓器の組織に関係なくグルカゴンを標的にする。グルカゴンは膵細胞上で比較的大きく発現するために、膵細胞または他の細胞と細胞を区別することは可能である。また、細胞によるグルカゴンの発現のために、グルカゴンの画像診断は、細胞型数および/または分布における膵臓の変化をモニターするのに一般的に有用であり得る。*in vivo*または*in vitro*の画像診断を用いて、患者内のグルカゴン発現細胞またはグルカゴン過剰発現細胞の増殖、遊走もしくは減少を検出することができる。グルカゴンの発現は、前糖尿病患者または糖尿病患者のそれぞれにおいて疾病リスクまたは疾病進行と相関があり得る。グルカゴン標的画像診断を用いて、前糖尿病患者または糖尿病患者の糖尿病の進行を段階分けすることができることもあり、またはグルカゴンレベルの上昇が認められることと関連する別の疾病を検出することができ得る。

本発明の一実施形態は、グルカゴン受容体拮抗剤または他の抗糖尿病剤による治療について前糖尿病を有する患者を診断する方法を提供し、該方法は、（a）配列番号29に示すアミノ酸配列からなるグルカゴンに特異的に結合する抗グルカゴン診断用モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを体液と接触させることによって体液中のグルカゴンのレベルを決定することであって、前述の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、アミノ酸配列RSPKSLVGPGRITYLY（配列番号15）、RRNNLAP（配列番号16）およびMQHLEFPLT（配列番号17）をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3と、アミノ酸配列GYNFTDYWIH（配列番号18）、YFSTHSDYAIINQKFRD（配列番号19）およびGGLGLSY（配列番号20）をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2およびHCDR3とを含む、体液中のグルカゴンのレベルを決定すること

と；(b)任意に、非特異的に結合したモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを除去することと；(c)グルカゴンに特異的に結合しているモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を検出および/または定量化することを含み、グルカゴンに特異的に結合した抗体またはその抗原結合性フラグメントが健康な個人で認められる範囲外で存在すると、選択のための患者における前糖尿病の診断、および適切なグルカゴン受容体拮抗剤または他の抗糖尿病剤による治療が特定される。前糖尿病の段階には、例えば、空腹時高血糖および耐糖能障害が挙げられる。空腹時高血糖または空腹時血糖異常(IFG)とは、空腹時血糖が正常レベルと考えられるレベルを超えて上昇しているが、真性糖尿病として分類されるのには不十分である状態をいう。耐糖能障害(IGT)よりはリスクが少ないが、IFGはインスリン抵抗性および心血管病理学のリスク増大に関連している前糖尿病状態と考えられる。耐糖能異常は、インスリン抵抗性および心血管病理学のリスクの増大に関連している糖代謝障害の前糖尿病状態である。IGTは、2型真性糖尿病に何年も先行することがある。他の抗糖尿病剤は当技術分野で既知であり、例えば、インスリン、メトホルミン、グリメピリドなどのスルホニル尿素、またはシタグリプチンなどのDPP-IV阻害剤が挙げられる。

10

**【0059】**

グルカゴンおよびインスリンのレベルは、例えば、シタグリプチンの開発中に用いられた。さらに、バイオマーカーとしてのグルカゴンは、膵臓の神経内分泌腫瘍(NET)の診断および/または有効な治療、ならびに膵臓の悪性腫瘍の診断にも有用であり得る(Kob, A.,ら Glucagon/insulin ratio as a potential biomarker for pancreatic cancer in patients with new-onset diabetes mellitus. *Cancer Biol Ther.* 2009 Aug;8(16):1527-33)。

20

**【0060】**

通常、*in vivo*での診断用途の検出性で必要とされる標識抗体の量は、患者の年齢、状態、性別、疾患の程度、もしあれば禁忌、および他の変数によって変化し、および主治医または診断医によって容易に調整されることができる。好ましい診断方法は、ラジオイムノ・シンチグラフィ分析である。これは、連続全身ガンマカメラ画像をもたらし、かつ定量「関心領域(ROI)」分析によって領域活性の決定ができる方法で行われるのが好ましい。

**【0061】**

*in vivo*での用途の場合、本発明の検出できるように標識した抗グルカゴン抗体またはその抗原結合性フラグメントは、投与のために簡便な形状に製剤化されることができる。診断の場合、本発明の検出できるように標識した抗グルカゴン抗体またはその抗原結合性フラグメントは、注射または注入によって、例えば非経口的に、全身的に投与されることができる。そのような注射または注入は、いかなる既知の経路、好ましくは静脈内注射もしくは注入、皮下注射、筋肉内注射もしくは注入、頭蓋内注射もしくは注入、またはくも膜下腔内注射もしくは注入、または腹腔内投与によってなされることができる。注射剤は、液剤もしくは懸濁剤として、または固形剤としてのいずれかの従来形状で調製されることができる。そのような組成物は、当技術分野で周知の方法によって調製されることができる(例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed. (1995), A. Gennaro ら, Mack Publishing Co.,を参照されたい)、および本明細書に開示の抗グルカゴン抗体、および薬剤的もしくは診断上許容される担体、希釈剤または賦形剤を含むことができる。投与量は、0.01mg/kg体重から100mg/kg体重まで変えることができる。画像診断用の適切な用量に関するさらなるガイダンスは、Smithら(1977) *Antibodies in Human Diagnosis and Therapy*, Haber ら, 編集, Raven Press, New York, pages 365-389に見出すことができる。*in vivo*でのグルカゴン検出目的のために、本抗グルカゴンモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントについての用語「有効量」とは、患者に単回投与または繰り返し投与すると、*in vivo*でグルカゴンを検出できる能力をもたらす抗体の量をいう。

30

40

**【0062】**

50

### イムノアッセイにおける本発明の抗体の使用

グルカゴンなどの特定のタンパク質は、種々のイムノアッセイによって測定されることができ、そのような方法としては、ウエスタンブロットの技術を用いる競合および非競合アッセイ系、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、およびプロテインAイムノアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。免疫学的手法およびイムノアッセイ手法の概要については、例えば、Stites and Terr（編集）（1991）Basic and Clinical Immunology（第7版）を参照されたい。さらに、本発明のイムノアッセイは、当技術分野で既知の多くの構成で行われることができる（例えば、Maggio（編集）（1980）Enzyme Immunoassay CRC Press, Boca Raton, Florida; Gosling J P 2000 Immunoassays: A Practical Approach (Practical Approach Series) Oxford Univ Press; Diamandis & Christopoulos, 1996 Immunoassay Academic Press, San Diego, CAを参照されたい）。

10

20

30

40

50

#### 【0063】

定量化のためのイムノアッセイは、当技術分野で既知の種々の方法によって行われることができる。手短かに言えば、グルカゴンを測定するイムノアッセイは、競合または非競合結合アッセイである。競合結合アッセイにおいて、分析される試料は、固体の表面に結合された捕捉剤上で標識分析物と特異的結合部位において競合する。好ましくは、捕捉剤は、本明細書に記述のグルカゴンと特異的に反応するIBA032などの本発明の抗体である。捕捉剤に結合される標識分析物の濃度は、試料中に存在する遊離分析物の量と反比例する。

#### 【0064】

競合的結合イムノアッセイにおいて、試料（すなわちグルカゴン）中に存在する標的タンパク質は、標識グルカゴンと、IBA0032などの本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントにおいて競合する。IBA032などの本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、固体表面に結合して、非結合標識タンパク質から結合標識タンパク質の分離をもたらすことができる。あるいは、競合結合アッセイは液相で行われてもよく、および当技術分野で既知の種々の技術を用いて、非結合した標識タンパク質から結合した標識タンパク質を分離することができる。分離に続いて、結合された標識タンパク質の量が決定される。試料中に存在するタンパク質の量は、標識タンパク質の結合量に反比例する。

#### 【0065】

あるいは、均質イムノアッセイは、分離ステップを必要とせずに実施されることもある。これらのイムノアッセイにおいて、タンパク質上の標識は、その特異的結合組成物へのタンパク質の結合によって変えられる。標識タンパク質のこの変更により、標識によって発せられるシグナルの増減がもたらされ、その結果イムノアッセイの最後に標識を測定することでそのタンパク質の検出または定量化が可能になる。

#### 【0066】

タンパク質への結合親和性が知られている<sup>1 2 5</sup>I-抗体などの標識抗体と細胞を接触させてインキュベートし、次いで結合組成物への試験試料の結合親和性を測定する場合、競合アッセイも特に有用である。次いで、結合した遊離標識結合組成物を分離して、タンパク質結合の程度を評価する。結合した試験化合物の量は、標識した結合パートナーの既知のソースへの結合量に反比例する。多数の技法のいずれかを用いて、遊離タンパク質から結合を分離して、タンパク質の結合程度を評価することができる。この分離ステップは、通常は、フィルターへの付着とそれに続く洗浄、プラスチックへの付着とそれに続く洗浄、または細胞膜の遠心などの手法を含むことがある。

#### 【0067】

特定の抗原を免疫沈降させる本発明の抗体の能力は、例えば、ウエスタンブロット分析によって評価されることができる。抗体の抗原への結合を増大させる、およびバックグラ

ウンドを減少させる（例えば、細胞可溶化物をセファロースビーズで前もって除去することによって）ようにパラメータは変更可能であることについて当業者は周知である。免疫沈降プロトコルに関するさらなる考察は、例えば、Ausubelら，編集，1994，Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに見出すことができる。

#### 【0068】

##### E L I S Aにおける本発明の抗体の使用

E L I S A分析は、抗原を調製することと、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルを該抗原でコーティングすることと、酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）などの検出できる標識に結合した関心の抗体を該ウェルに添加して一定時間インキュベートすることと、該抗原の存在を検出することを含む。E L I S Aにおいて、関心の抗体は、検出可能な標識に結合させる必要はないが、代わりに、検出可能な標識に結合した第2の抗体（関心の抗体を認識する）をウェルに添加してもよい。さらに、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、捕捉抗体をウェルにコーティングしてもよい。この場合、第2の抗体、すなわち、分析物の区別できる非競合エピトープに特異的であり、かつ検出可能な標識に結合された検出抗体は、コーティングしたウェルに関心の抗原を添加した後に添加されてもよい。当業者は、過度の実験を実施することなく、例えば、シグナルを増大させるためにどのパラメータを調整するか、ならびにE L I S Aの場合、どのような他の変化を用いるべきであるかを決定することができる（例えば、Ausubelら，編集，1994，Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照されたい）。

#### 【0069】

例えば、I B A 0 3 2はグルカゴン1 - 29分子のC末端に特異的であり、およびグルカゴン1 - 29ペプチドの中間領域に特異的なI B A 0 0 9または当技術分野で既知の他のグルカゴン捕捉抗体などのグルカゴン捕捉抗体と組み合わせて用いる場合、ヒト血液、血清または血漿中の総グルカゴンを測定するためのグルカゴン検出抗体として有用であり得る。

#### 【0070】

あるいは、当技術分野で既知の抗グルカゴンモノクローナル抗体などの第2のグルカゴン検出抗体と組み合わせて用いる場合、I B A 0 3 2は、ヒト血液中の総グルカゴンを測定するためのグルカゴン捕捉抗体として有用である。さらに、当技術分野で既知の他の抗グルカゴン検出抗体と組み合わせて用いる場合、I B A 0 0 9は、血液、血漿または血清中のグルカゴン前駆体または部分的に処理された前駆体を測定するためのグルカゴン検出抗体として有用であり得る。

#### 【0071】

抗体の抗原への結合親和性および抗体 - 抗原相互作用の結合および解離速度は、例えば、競合結合アッセイを用いて決定されることができる。一非限定例は、非標識抗原の量を増加させて関心の抗原と共に標識抗原（例えば、<sup>3</sup>Hまたは<sup>125</sup>Iを用いて）をインキュベートすることと、標識抗原に結合した抗体の量を検出することを含むラジオイムノアッセイである。特定の抗原への関心の抗体の親和性および結合解離速度は、例えば、スクッチャードプロット分析によってデータから決定されることができる。第2の抗体との競合は、例えば、ラジオイムノアッセイを用いて決定されることもできる。

#### 【0072】

##### 製造物品およびキットにおける本発明の抗体の使用

本発明は、可溶性グルカゴンまたはグルカゴン陽性細胞を診断、検出、定量化および/または画像処理するのに有用な組成物を含む製造物品およびキットも提供する。製造物品は、ラベルが書かれた容器を含むこともある。容器は、検出できるように標識されている、または非標識されている本発明の抗グルカゴンモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む組成物を保持してもよい。容器のラベルは、該組成物が糖尿病を予知するもしくはモニターするために、またはグルカゴンを発現させる特定タイプの細胞を

診断するもしくはモニターするために、またはグルカゴンレベルが前兆となる状態をモニターするために、または治療の効果的な標的を予測するために用いられることを表示してもよい。別の実施形態において、該組成物がグルカゴンを検出および/または定量化するのに有用であることを表示してもよく、および *in vivo* 使用または *in vitro* 使用のいずれかの使用説明を表示することもできる。

【0073】

本発明のキットは、二次抗体またはグルカゴン抗原さえ含む容器も含むことができ、好ましくは、グルカゴン抗原は配列番号29に示すヒトグルカゴンのC末端を含む。二次抗体またはグルカゴン抗原は、酵素または他の標識に結合されることができる。酵素の発色基質も、キットに含まれることができる。キットは、緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および *in vivo* 使用、*in vitro* 使用または両方用の説明書と共に添付文書を含む、商業上およびユーザの観点から望ましい他の材料を含んでもよい。

10

【0074】

本発明のモノクローナル抗体およびその抗原結合性フラグメントは、診断手法で有用であり、および例えば、前糖尿病患者および糖尿病患者を選択し層別化するため、所定の方法で採取された血液または組織試料を用いてグルカゴン受容体拮抗剤または他の糖尿病治療薬への患者の反応をモニターするために用いられることができる。

【0075】

したがって、本方法は、新たに診断された糖尿病患者に、非侵襲的方法を用いて所与の状態がその後糖尿病を進行させ得る可能性を評価するリスク層別化の方式を提供する。そのような情報により、個別の患者ベースで、適切なモニタリングおよび治療プロトコルを設計する能力が改善される。

20

【0076】

本明細書に開示の本発明のグルカゴン抗体またはグルカゴン/抗グルカゴンモノクローナル抗体複合体および方法は、種々の哺乳類種の診断において使用されることができ、およびヒト医学または獣医学の実践において同じように適用できる。したがって、これらの抗体、複合体および方法は、家畜および商業用動物と共に、最も好ましくはヒトと共に使用されることができる。

【0077】

以下の実施例は、例示目的だけに提供され、本発明の範囲を限定することを目的としない。

30

【0078】

実施例1 抗体発現と精製

マウス抗グルカゴン抗体のパネルを、標準ハイブリドーマ技術を用いて得て、スクリーニングし、ELISAベースアッセイを展開するのに用いることが可能な対の試薬を特定する。突然変異を各抗体の個々の相補性決定領域(CDR)に系統的に導入し、次いで親和性が向上したクローンを単離するために、得られたライブラリーを、抗原の濃度を低下させるおよび/または解離時間を増加させることで複数回の選択ラウンドにかける。個々の変異体の配列を決定し、コンビナトリアルライブラリーを構築するために用いる。このライブラリーを、個々のCDR領域間での相加変異または相乗変異の組み合わせを特定するために、ストリンジェンシーを増大させてさらなる選択ラウンドにかける。個々のコンビナトリアルクローンを配列決定して、結合特性を決定する。

40

【0079】

下記の表題「アミノ酸配列およびヌクレオチド配列」の節に収載するように、重鎖および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列と、完全重鎖および軽鎖のアミノ酸配列と、同鎖をコードするヌクレオチド配列とを有する、本明細書でIBA009およびIBA032と呼ぶ改変および/または最適化した抗グルカゴン抗体を得る。これらのフラグメントに対応する配列番号ならびに軽鎖と重鎖のCDRアミノ酸配列を下記の表1に示す。

【0080】

表1A：抗体IBA009のCDRアミノ酸配列

50

【表 1】

CDR	アミノ酸配列
IBA009 LCDR 1	KASENAGTYVA (配列番号 1)
IBA009 LCDR 2	NGSHRYD (配列番号 2)
IBA009 LCDR 3	GQSYSYPWT (配列番号 3)
IBA009 HCDR 1	GYNFNDYWLN (配列番号 4)
IBA009 HCDR 2	NAYPGWGIINYNEKFKS (配列番号 5)
IBA009 HCDR 3	DYDNAY (配列番号 6)

10

【0081】

表 1 B : 抗体 IBA032 の CDR アミノ酸配列

【表 2】

CDR	アミノ酸配列
IBA032 LCDR 1	RSPKSLVGPMPGRITYLY (配列番号 15)
IBA032 LCDR 2	RRNNLAP (配列番号 16)
IBA032 LCDR 3	MQHLEFPLT (配列番号 17)
IBA032 HCDR 1	GYNFTDYWIH (配列番号 18)
IBA032 HCDR 2	YFSTHSDYAINQKFRD (配列番号 19)
IBA032 HCDR 3	GGLGLSY (配列番号 20)

20

【0082】

表 1 C : IBA009 および IBA032 のアミノ酸配列

【表 3】

モノクローナル抗体 フラグメント	アミノ酸配列
IBA009 LCVR	配列番号 7
IBA009 HCVR	配列番号 9
IBA009 LC	配列番号 11
IBA009 HC	配列番号 13
IBA032 LCVR	配列番号 21
IBA032 HCVR	配列番号 23
IBA032 LC	配列番号 25
IBA032 HC	配列番号 27

30

【0083】

表 1 D : IBA009 および IBA032 アミノ酸配列をコードする cDNA 配列

【表 4】

モノクローナル抗体 フラグメント	名付けたフラグメントを コードする cDNA 配列
IBA009 LCVR	配列番号 8
IBA009 HCVR	配列番号 10
IBA009 LC	配列番号 12
IBA009 HC	配列番号 14
IBA032 LCVR	配列番号 22
IBA032 HCVR	配列番号 24
IBA032 LC	配列番号 26
IBA032 HC	配列番号 28

10

## 【0084】

IBA009 (配列番号 12 と配列番号 14) および IBA032 (配列番号 26 と配列番号 28) を含むがこれらに限定されない本発明の抗グルカゴン抗体またはその抗原結合性フラグメントは、標準トランスフェクション手法に続いて HEK293EBNA 細胞 (Edge BioSystems, #90500130) 中の発現に好適な当技術分野で既知のベクターを用いて、一時的に発現することができる。簡潔にいうと、配列番号 12 と配列番号 14、または配列番号 26 と配列番号 28 を含む組換えベクターまたはベクター類を構築し、それを用いて HEK293EBNA 細胞を一時的にトランスフェクトすることができる。トランスフェクション後、トランスフェクトした細胞をジェネテシン (G418) およびトブラマイシンを含む標準無血清培地で 48 ~ 120 時間、37 °C で培養する。抗グルカゴン抗体を 60 mL r Protein A Sepharose カラム (Amersham Biosciences; #17-1279-04) 上で製造業者の説明書に従って精製してもよく、およびさらに濃縮して、移動相としてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH 7.4 を用いて分子ふるいクロマトグラフィー (XK50/60 Superdex200, Pharmacia) で精製してもよい。次に、Millipore - GV、P VDF 膜、0.22 μm、33 mm (Millipore; #SLGV033RS) を用いて抗体調製物を濾過して、4 ~ 8 °C で貯蔵または -20 ~ -80 °C で凍結保存してもよい。

20

## 【0085】

## 実施例 2 抗体 IBA009 および IBA032 の結合反応速度および親和性

グルカゴンに対する本発明の抗グルカゴンモノクローナル抗体の結合反応速度は、当技術分野で既知の方法により、Biacore (登録商標) 2000、Biacore (登録商標) 3000 または Biacore (登録商標) T100 (GE Health Care, Piscataway, NJ) などの表面プラズモン共鳴バイオセンサによって決定してもよい。注記がある場合を除いて、すべての試薬と材料を Biacore (登録商標) から購入することが可能であり、測定は 25 °C で行ってもよい。

30

## 【0086】

簡潔に説明すると、抗グルカゴンモノクローナル抗体 IBA009 または IBA032 を HBS-E P 緩衝液 (150 mM 塩化ナトリウム、3 mM EDTA、0.005% (w/v) 界面活性剤 P-20、および 10 mM N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES) (pH 7.4); #BR-1001-88) 中で溶解させてもよい。抗グルカゴン抗体を捕捉するためにアミンカップリングケミストリーを用いて、ヤギ抗マウス Fc 抗体を CM5 センサチップのフローセル 1 ~ 4 上に 4000 応答単位 (RU) のレベルで固定する。結合を複数の分析サイクルを用いて評価してもよい。各サイクルは 50 μL / 分の流速で行い、以下のステップからなってもよい: 40 ~ 100 RU の捕捉を目標として約 10 μL の抗グルカゴンモノクローナル抗体 IBA009 または IBA032 を 10 μg/mL で注入、250 μL のグルカゴン (1-29) (Anaspec 22456) の注入 - (100 nM で開始して、各サイクルに対して 2 倍段階希釈法を用いる) 続いて 20 分間の解離、および約 30 μL の 10 mM グリシン塩酸塩 (

40

50

pH 1.5)を用いる再生。各サイクルの結合および解離速度は、BIAevaluationソフトウェア4.1での「1:1(Langmuir)結合」モデルを用いて評価されることができる。

【0087】

抗グルカゴンモノクローナル抗体IBA009およびIBA032をグルカゴンへの結合反応速度について試験してもよい。下記の表2に示すように、IBA009およびIBA032は、極めて高い結合親和性( $K_D$ )でグルカゴンに結合する。表2にも結合速度定数( $k_{on}$ )と解離速度定数( $k_{off}$ )のデータを示す。実施例1の抗体IBA009は、 $7.3 \times 10^{-13}$  Mの $K_D$ を有すると決定した。実施例1の抗体IBA032は、 $8.7 \times 10^{-12}$  Mの $K_D$ を有すると決定した。これらのデータは、抗体IBA009およびIBA032の各々が高親和性でグルカゴンに結合することを示している。IBA009は、グルカゴンへの親和性が当技術分野で2D3-2B11(Sigma-Aldrichから入手可能、製品番号WH0002641M1)として知られている抗グルカゴン抗体よりも約130倍強力であることを示している。IBA032は、グルカゴンへの親和性が当技術分野でK79bB10(Sigma-Aldrichから入手可能、製品番号G2654)として知られている抗グルカゴン抗体よりも約800倍強力であることを示している。

10

【0088】

表2：抗体IBA009およびIBA032の結合反応速度と親和性

【表5】

抗体	$k_{on}$ (結合速度定数) (1/Ms)	$k_{off}$ (解離速度定数) (1/s)	$K_D$ (M) <sup>a</sup>
IBA009	$1.5 \times 10^7$	$1.1 \times 10^{-5}$	$7.3 \times 10^{-13}$
IBA032	$2.7 \times 10^7$	$2.4 \times 10^{-4}$	$8.7 \times 10^{-12}$
<sup>a</sup> $K_D = k_{off}/k_{on}$ として計算			

20

30

【0089】

実施例3 IBA009およびIBA032を用いるヒトグルカゴンELISA

実施例1の抗体IBA009およびIBA032を利用して、患者におけるグルカゴンレベルについての酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を開発して検証する。グルカゴンサンドイッチELISAをMSDストレプトアビジン96ウェルプレート上で行い、該プレートをTBST(1mLのTween20/Lと共に10mmol/LのTris(pH7.40)、150mmol/LのNaClを含むTris緩衝生理食塩水)で3回洗浄し、次いでTBSTに溶解させた1%卵白アルブミン(Sigma)を用いて室温で1時間ブロックする。該プレートの洗浄に続いて、50μLのビオチン標識IBA009捕捉抗体(1μg/mL)を添加して、1時間軽く振盪しながら該プレートに結合させる。その後、ウェルをTBSTで3回洗浄し、次いで検量線を作成するために、50mmol/LのHEPES(pH7.40)、150mmol/LのNaCl、10mL/LのTritionX-100、5mmol/LのEDTAおよび5mmol/LのEGTAならびに1%卵白アルブミンからなり、100μg/mLのヘテロ親和性ブロッキング試薬(Scantibodies)を補充してあるアッセイ緩衝液に溶解させた種々の濃度のグルカゴンタンパク質(例えば、配列番号29)からなる各標準グルカゴン100μLを各ウェルに添加する。血漿サンプルを同じアッセイ緩衝液で1:8に希釈して、それぞれのウェルに添加し、軽く揺動させながら室温で2.5時間インキュベートする。吸引に続いて、ウェルをTBSTで3回洗浄し、50μLの1μg/mLルテニウム標識結合グルカゴン特異的検出抗体IBA032を各ウェルに添加して、これらを室温で2.5時間インキュベートする

40

50

。再度、プレートにTBSで3回洗浄し、各ウェルに150 $\mu$ Lの2X-MSD Read Buffer Tを添加する。次いでプレートを、ルテニウム電気化学発光を記録するMSDリーダー上でプレートを読み取る。4PLフィット(MSDディスクカバーワークベンチ)を用いて、試料中のグルカゴンの濃度を参照標準グルカゴン(Eli Lilly and Company)で作成した標準曲線に対して補間する。ELISA検量線のフィッティングおよび未知値の補間のためにMesoscale Discoveryソフトウェアを使用する(図2を参照されたい)。

#### 【0090】

インクレチンペプチドスーパーファミリーの他の密接に関連したメンバーに対するELISAの特異性も、オキシントモジュリン、GIP、GLP-1、GLP-2、セクレチンおよび血管作用性小腸ペプチドを用いて、例えば、各々100ng/mLの濃度で試験してもよい。これらの他のペプチドのいずれでも交差反応性は観察されず、実施例3のELISAがグルカゴンに対する特異性を備えていることを示す。本発明のELISAは、優れた回収率、精度および直線性、ならびに0.14pmol/Lから1950pmol/Lの広範なダイナミックレンジを示す。20%のCVでのLLOQが0.14pmol/Lであると決定する。分析の前に試料を1:8で希釈するので、これは報告できる下限の1.12pmol/Lに相当する。

#### 【0091】

58の健康な単一ドナー血漿試料を分析して参照範囲を確立する。平均グルカゴンレベルが13.1 $\pm$ 0.7pmol/Lであり、観察範囲が5.3~37.4pmol/Lであると決定し、正常な個人においてグルカゴンレベルを検出するための適切な感受性を超える感受性をELISAが有することを示す。

#### 【0092】

アセトン抽出に続いて、正常で健康な被験者からの血漿中のグルカゴンの測定により12pmol/Lの平均値が示されている(Von Schenck H, Nilsson OR. Radioimmunoassay of extracted glucagon compared with three non-extraction assays. Clinica Chimica Acta 1981; 109:183-191)。これは実施例3のELISAで測定した同様の試料から得られた値と一致する。

#### 【0093】

サンドイッチELISA形式での本発明の高親和性の改変モノクローナル抗体の使用により、感受性が高くかつ特異的なグルカゴンの濃度を測定するための確実に高感受性でありかつ簡便な高スループット方法を提供する。本明細書に記述のELISA方法には、現在利用できるRIA方法に勝るいくつかの利点がある。第一に、このアッセイは、グルカゴンに結合する2つの高親和性モノクローナル抗体を用いる。これのため、モノクローナル抗体の持続可能な生産が可能になり、かつポリクローナル抗血清に依存しない。ポリクローナル抗血清を避けることで、ポリクローナル血清の1バッチの量が限定される問題およびそのような抗血清バッチ間の変わりやすい品質を解決する。IBA032およびIBA009を含む本発明のELISAは、Alpco and Milliporeから現在入手できるラジオイムノアッセイ(RIA)キットに勝るいくつかの重要な利点を提供し、例えば、RIAで測定する場合、血漿グルカゴンレベルは、使用される特定の抗血清によって変化することがわかっている。C末端に向けられるポリクローナル抗血清を利用する当技術分野でのRIA方法は、恐らくグルカゴンペプチドの保存特質のせいで、特に短いダイナミックレンジ(約5pmol/Lから150pmol/L)を有し、したがって免疫原性が不十分である。対照的に、実施例3のサンドイッチELISAによる高親和性最適化モノクローナル抗体およびMesoscale Discovery(MSD)電気化学発光(EL)形式を利用すると、拡張範囲と優れた感受性を有するアッセイが提供される。さらに、ガラス管で行う必要のあるRIAの形式と対照的に、実施例3の96ウェルプレートをベースにするアッセイ形式により、より大きなスループットと良好な自動化が可能になる。加えて、実施例3のサンドイッチELISAは、さらに、放射性廃棄物に関連する経費、有効期限が短い標識トレーサー、および1~2ヵ月ごと製造する

10

20

30

40

50

必要のあるトレーサーのロット間の差異を回避する。

【 0 0 9 4 】

本モノクローナル抗体の別の利点は、抗体 I B A 0 3 2 の C 末端特異性であり、結果として本抗体はオキシントモジュリンに結合しない。オキシントモジュリンは、グルカゴン 1 - 2 9 配列および 8 アミノ酸カルボキシ末端伸長を含むペプチドであり、かつこの C 末端特異性がない当技術分野で既知の他のグルカゴンアッセイでは、偽陽シグナルの原因になり得る。

【 0 0 9 5 】

E L I S A アッセイは感受性の増大を示し、当技術分野で既知の諸方法よりおよそ 1 0 倍感受性が高い。さらに、E L I S A が必要とする試料は、少ない量、すなわちおよそ 1 0 倍少ない量を必要とし、およびアッセイが必要とする完了するまでの時間も R I A の 3 日と比べて、およそ 6 時間と短い。加えて、本発明の E L I S A は、確実なダイナミックレンジを示し、かつ試料レベルが当技術分野の R I A 方法のハイエンドの定量化範囲を超え、したがって一貫性のない結果をもたらすことが多いさらなる凍結融解と、より高い希釈度での再実行とを必要とする際に経験する問題を回避する。

10

【 0 0 9 6 】

図 2 に示すように感受性およびダイナミックレンジの増大のため、本発明の E L I S A は、同様に、M e s o S c a l e D i s c o v e r y ( M S D ) から販売されているキットに勝る利点を示す。本発明の E L I S A は、驚くほど向上した感受性を示し、かつ既存の M S D グルカゴンアッセイキットで試験可能であると報告されているレベルを下回るレベルで、血漿および/または血清の試料中のベースライングルカゴンを検出することができる。さらに、本発明の E L I S A は、著しく広範囲 ( 4 l o g を超える ) のグルカゴン濃度にわたるグルカゴンレベルにおいて比較的小さい変化を検出することができる。通常の希釈が 1 : 8 であり、結果として生じる 1 2 . 5 % 血清または血漿マトリックスおよび 8 7 . 5 % 緩衝液濃度が「マトリックス干渉」としても知られている混乱させる交差反応性を最小限に抑えるような感受性を本発明の E L I S A は示す。

20

【 0 0 9 7 】

アミノ酸配列およびヌクレオチド配列

< 配列番号 1 ; P R T 1、人工 > [ I B A 0 0 9 L C D R 1 ]  
KASENAGTYVA

30

< 配列番号 2 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 0 9 L C D R 2 ]  
NGSHRYD

< 配列番号 3 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 0 9 L C D R 3 ]  
GQSYSYPWT

< 配列番号 4 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 0 9 H C D R 1 ]  
GYNFNDYWLN

40

< 配列番号 5 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 0 9 H C D R 2 ]  
NAYPGWGI INYNEKFKS

< 配列番号 6 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 0 9 H C D R 3 ]  
DYDNAY

< 配列番号 7 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 0 9 L C V R ]

N I V M T Q S P K S M S M S V G E R V T L T C K A S E N A G T Y V A W Y Q Q K P E Q S P K L L I Y N G S H R Y D G V P D R F T G S G S A T D F T L T I S S V Q A  
E D L A D Y Y C G Q S Y S Y P W T F G G G T K L E M K R

50

< 配列番号 8 ; D N A ; 人工 > [ I B A 0 0 9 L C V R ]

AACATTGTGATGACCCAGAGCCCGAAAAAGCATGAGCATGAGCGTGGGCGAACGTGTGACCCCTGACCTGCAAAGCGAGCGA  
GAACGCTGGCACCTATGTTGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGAACAGTCTCCGAAACTGCTGATCTATAATGGGAGCCACC  
GGTATGACGGCGTGCCGGATCGTTTTACCGGCAGCGGCAGCGCAGCCGATTTACCCCTGACCATTAGCAGCGTGCAGGCG  
GAAGATCTGGCGATTATTACTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCGTGGACCTTTGGCGGTGGGACCAAGCTGGAAATGAA  
ACGG

< 配列番号 9 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 0 9 H C V R ]

QVQLLQPGAELVKPGASVKLSCKASGYNFNDYWLNWVKQRPGGLEWIGNAYPGWGIIINYNEKFKSKVTLTVDTSSSTVY  
MQLSSLTSDDSAVYYCARDYDNAYWGQGTITVTVSS

10

< 配列番号 10 ; D N A ; 人工 > [ I B A 0 0 9 H C V R ]

CAGGTGCAGCTGCTGCAGCCGGGTGCCGAACTGGTTAAACCGGGTGCAGCGTGAAACTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTA  
TAACTTCAACGACTATTGGCTTAACTGGGTGAAACAGCGTCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGGCAATGCCTATCCGG  
GCTGGGGCATCATTAACTATAACGAAAAATTCAAAAGCAAAGTGACCCTGACCGTGGATAACCAGCAGCAGCACCGTGTAT  
ATGCAGCTGTCTAGCCTGACCAGCGATGATAGCGCGGTGTATTATTGCGCGCGTGATTATGATAACGCGTATTGGGGTCA  
GGCACACGCGTCACCGTCTCCTCA

【 0 0 9 8 】

< 配列番号 11 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 0 9 L C ]

NIIVMTQSPKMSMSVGERVTLTKASENAGTYVAWYQQKPEQSPKLLIYNGSHRYDGVDPDRFTGSGSATDFTLTISSVQA  
EDLADYYCGQSYSPWTFGGGKLEMKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKIDNVKWKIDGSERQNGVL  
NSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSPIVKSFNRNEC

20

< 配列番号 12 ; D N A ; 人工 > [ I B A 0 0 9 1 L C ]

AACATTGTGATGACCCAGAGCCCGAAAAAGCATGAGCATGAGCGTGGGCGAACGTGTGACCCCTGACCTGCAAAGCGAGCGA  
GAACGCTGGCACCTATGTTGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGAACAGTCTCCGAAACTGCTGATCTATAATGGGAGCCACC  
GGTATGACGGCGTGCCGGATCGTTTTACCGGCAGCGGCAGCGCAGCCGATTTACCCCTGACCATTAGCAGCGTGCAGGCG  
GAAGATCTGGCGGATTATTACTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCGTGGACCTTTGGCGGTGGGACCAAGCTGGAAATGAA  
ACGGGCTGATGCGGCGCAACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGT  
GCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTG  
AACAGTTGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGA  
ACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGT  
GT

30

< 配列番号 13 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 0 9 H C ]

QVQLLQPGAELVKPGASVKLSCKASGYNFNDYWLNWVKQRPGGLEWIGNAYPGWGIIINYNEKFKSKVTLTVDTSSSTVY  
MQLSSLTSDDSAVYYCARDYDNAYWGQGTITVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSM/TLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS  
LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVPSSETVTCNVVAPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI  
FPPKPK  
DVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAF  
PAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI  
PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI  
MDTDGSYFVYS  
KLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

40

【 0 0 9 9 】

< 配列番号 14 ; D N A ; 人工 > [ I B A 0 0 9 H C ]

CAGGTGCAGCTGCTGCAGCCGGGTGCCGAACTGGTTAAACCGGGTGCAGCGTGAAACTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTA  
TAACTTCAACGACTATTGGCTTAACTGGGTGAAACAGCGTCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGGCAATGCCTATCCGG  
GCTGGGGCATCATTAACTATAACGAAAAATTCAAAAGCAAAGTGACCCTGACCGTGGATAACCAGCAGCAGCACCGTGTAT  
ATGCAGCTGTCTAGCCTGACCAGCGATGATAGCGCGGTGTATTATTGCGCGCGTGATTATGATAACGCGTATTGGGGTCA  
GGCACACGCGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCGCTAGCCCTGGATCTGCCGCCAGCA  
CCAACAGCATGGTGACCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGGCTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGACCTGGAACAGCGGCTCT  
CTGTCTAGCGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACACCCCTGAGCAGCAGCGTGACCGTGCCTAG

50

CAGCACATGGCCTAGCGAGACCGTGACATGCAACGTGGCCCACCTGCCTCTTCTACCAAGGTGGACAAGAAGATCGTGC  
 CCAGAGACTGCGGCTGCAAGCCTTGCATCTGCACCGTGCCTGAGGTGAGCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAAGCCCAAG  
 GACGTGCTCACCATCACCCTCACCCTCAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCAGGTCCAGTT  
 CAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCT  
 CAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTC  
 CCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAA  
 GGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGC  
 AGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGC  
 AAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCA  
 CCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAA

10

< 配列番号 15 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 3 2 L C D R 1 ]  
 RSPKSLVGPMPGRYLY

< 配列番号 16 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 3 2 L C D R 2 ]  
 RRNNLAP

< 配列番号 17 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 3 2 L C D R 3 ]  
 MQHLEFPLT

20

< 配列番号 18 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 3 2 H C D R 1 ]  
 GYNFTDYWIH

< 配列番号 19 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 3 2 H C D R 2 ]  
 YFSTHSDYAIINQKFRD

< 配列番号 20 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 3 2 H C D R 3 ]  
 GGLGLSY

【 0 1 0 0 】

< 配列番号 21 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 3 2 L C V R ]  
 DIVMTQAAPSVLVTPGESVSI SCRSPKSLVGPMPGRYLYWFLQRPQGSPQLLI YRRNNLAPGVPDRFSGSGSGTAFTLR I  
 SRVEAEDVGIYYCMQHLEFPLTFGAGTKLEIKR

30

< 配列番号 22 ; D N A ; 人工 > [ I B A 0 3 2 L C V R ]  
 GATATTGTGATGACCCAGGCAGCGCGAGCGTTCTGGTTACCCCGGTGAAAGCGTGAGCATTAGCTGCCGAAGCCCAAA  
 AAGCCTAGTGGTCCCATGGGAAGGACCTATCTATATTGGTTTCTGCAGCGTCCGGGTGAGAGCCCGCAGCTGCTGATTT  
 ATCGTCGGAACAACCTGGCACCAGGTGTGCCGATCGTTTTAGCGGCAGCGGTAGCGGCACCGGTTTACCCTGCGTATT  
 AGCCGTGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCATTTATTATTGCATGCAGCACCTGGAATTCCTGCTGACCTTTGGTGCGGGCAC  
 CAAGCTGGAAATCAAACGG

40

< 配列番号 23 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 3 2 H C V R ]  
 VQQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYNFTDYWIHWKERPGQGLEWIGYFSTHSDYAIINQKFRDKATLTADKSSRLAY  
 MQLSSLTSEDSAIIYFCARGGLGLSYWGQGTITVTVSS

< 配列番号 24 ; D N A ; 人工 > [ I B A 0 3 2 H C V R ]  
 CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCGGAACTGGTGAAACCGGGTGCAGCGTGAAAATGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTA  
 TAACTTTACAGATTATTGGATTCACTGGGTGAAAGAACGTCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGGCTATTTTTAGTACGC  
 ATAGCGATTATGCCATCATTAAACAGAAAATTCAGAGATAAAGCGACCCCTGACCGCGGATAAAGCAGCCGTCTGGCCTAT  
 ATGCAGCTGTCTAGCCTGACCAGCGAAGATAGCGGATTTATTACTGCGCGCTGGCGGCTTAGGCCTGAGCTATTGGGG  
 CCAGGGTACCACGGTCACAGTCTCCTCA

50

< 配列番号 25 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 3 2 L C ]

DIVMTQAAPSVLVTPGESVSI SCRSPKSLVGP MGRTYLYWFLQRPGQSPQLLI YRRNNLAPGV PDRFSGSGSGTAFTLR I SRVEAEDVGI YYCMQHLEFPLTFGAGTKLE I KRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKD I NVKWK I DG SER QNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSP I VKSFNRNEC

【 0 1 0 1 】

< 配列番号 26 ; D N A ; 人工 > [ I B A 0 3 2 L C ]

GATATTGTGATGACCCAGGCAGCGCCGAGCGTTCTGGTTACCCCGGGTGAAAGCGTGAGCATTAGCTGCCGAAGCCAAA AAGCCTAGTGGGTCCCATGGGAAGGACCTATCTATATTGGTTTTCTGCAGCGTCCGGGT CAGAGCCCGCAGCTGCTGATTT ATCGTCGGAACAACCTGGCACCAGGTGTGCCGATCGTTTTAGCGGCAGCGGTAGCGGCACCGGTTTACCCTGCGTATT AGCCGTGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCATTTATTATTGCATGCAGCACCTGGAATTTCCCGCTGACCTTTGGTGCGGGCAC CAAGCTGAAAATCAAACGGGCTGATGCGGCGCCACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAG GTGCTAGCGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGA CAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGAC CAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCT TCAACAGGAATGAGTGT

10

< 配列番号 27 ; P R T 1 ; 人工 > [ I B A 0 3 2 H C ]

QVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYNFTDYWI HWVKERPGQGLEW I GYFSTHSDYA I I NQKFRDKATLTADKSSRLAY MQLSSLTSEDSA I YYCARGGLGLSYWGQGT TVVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSM VTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKK I VPRDCGCKPC I CTVPEVSSVF I FPPKP KDVLTI TLTPKVT CVVD I SKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELP I MHQDWLNGKEFKCRVNSAA FPAP I EKI SKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMI TDFFPEDI TVEWQWNGQPAENYKNTQP I MDTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

20

【 0 1 0 2 】

< 配列番号 28 ; D N A ; 人工 > [ I B A 0 3 2 H C ]

CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCGGAACTGGTGAAAACCGGGTGCGAGCGTGAAAATGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTA TAACTTTACAGATTATTGGATTCACTGGGTGAAAGAACGTCCGGGCCAGGGCTGGAATGGATTGGCTATTTTTAGTACGC ATAGCGATTATGCCATCATTAAACAGAAAATTCAGAGATAAAGCGACCCCTGACCGCGGATAAAAAGCAGCCGTCTGGCCTAT ATGCAGCTGTCTAGCCTGACCAGCGAAGATAGCGCGATTTATTACTGCGCGCGTGGCGGCTTAGGCCTGAGCTATTGGGG CCAGGGTACCACGGTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCGCTAGCCCCTGGATCTGCCGCCC AGACCAACAGCATGGTGACCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGGCTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGACCTGGAACAGCGGC TCTCTGTCTAGCGCGTGCACACATTCCTGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACACCCTGAGCAGCAGCGTGACCGTGCC TAGCAGCACATGGCCTAGCGAGACCGTGACATGCAACGTGGCCACCCCTGCCTCTTCTACCAAGGTGGACAAGAAGATCG TGCCAGAGACTGCGGCTGCAAGCCTTGATCTGCACCGTGCCCTGAGGTGAGCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAAGCCC AAGGACGTGCTCACCATCACCCCTCACCCCAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCA GTTCAGCTGGTTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCC GCTCAGTCAGTGAACCTCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCT TTCCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCC CAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGT GGCAGTGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACA CTGACCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTAC AGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCTGCACAA CCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCACTCTCCTGGTAAA

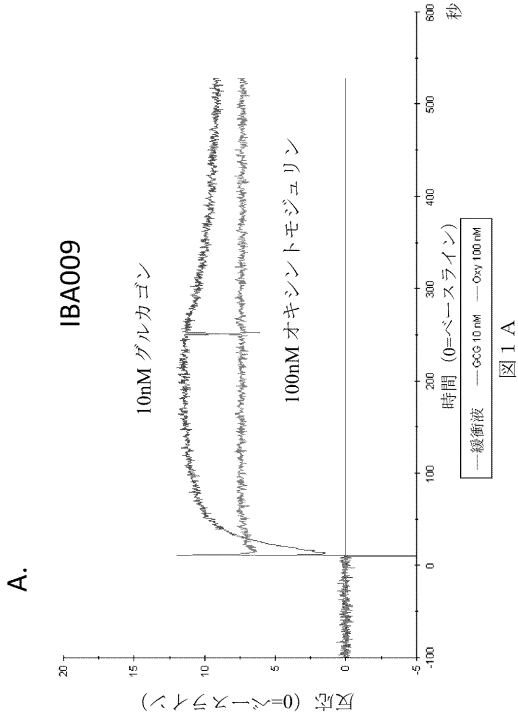
30

40

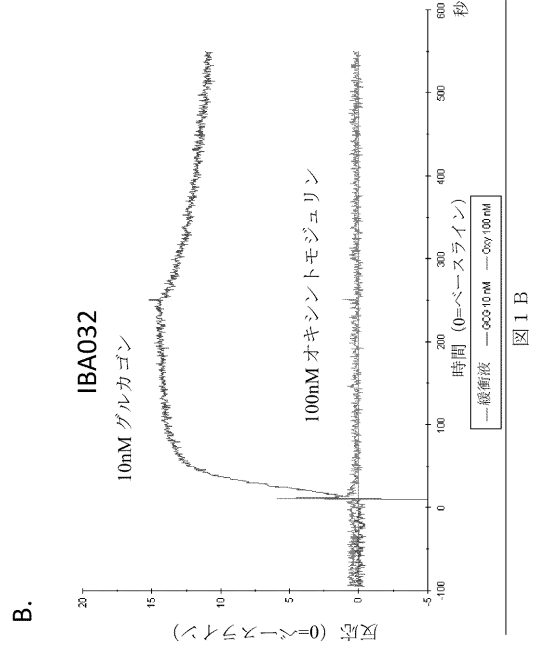
< 配列番号 29 ; P R T 1 ; ヒト > [ グルカゴン ]

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

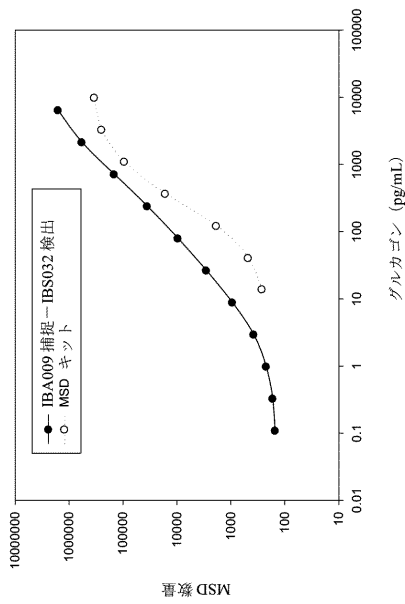
【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



【 図 2 】



【 図 3 】

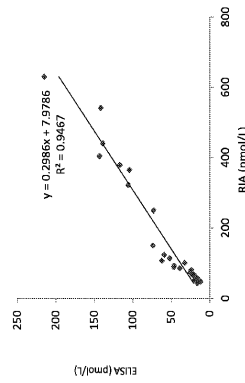


Fig. 3

【配列表】

2015505828000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2012/066587
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/26 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	JOHN H. SLOAN ET AL: "A novel high-sensitivity electrochemiluminescence (ECL) sandwich immunoassay for the specific quantitative measurement of plasma glucagon", CLINICAL BIOCHEMISTRY, vol. 45, no. 18, 4 August 2012 (2012-08-04), pages 1640-1644, XP055053978, ISSN: 0009-9120, DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.07.111 Available online: 4 August 2012 the whole document in particular table 2 fig. 1-3  -----  -/--	1-20
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 February 2013		05/03/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bernhardt, Wiebke

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2012/066587
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BRAND C L ET AL: "Immunoneutralization of endogenous glucagon with monoclonal glucagon antibody normalizes hyperglycaemia in moderately streptozotocin-diabetic rats", DIABETOLOGIA, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 37, no. 10, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 985-993, XP009089852, ISSN: 0012-186X, DOI: 10.1007/BF00400461 abstract page 986, right-hand column -----</p>	1-20
A	<p>CHRISTELLE GUILLO ET AL: "Simultaneous capillary electrophoresis competitive immunoassay for insulin, glucagon, and islet amyloid polypeptide secretion from mouse islets of Langerhans", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, NL, vol. 1218, no. 26, 6 May 2011 (2011-05-06), pages 4059-4064, XP028226052, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2011.05.006 [retrieved on 2011-05-13] abstract page 4060, left-hand column -----</p>	1-20
A	<p>WO 2009/120530 A1 (LILLY CO ELI [US]; MILLICAN ROHN LEE JR [US]; KORYTKO ANDREW IHOR [US]) 1 October 2009 (2009-10-01) cited in the application the whole document -----</p>	1-20

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/066587

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2009120530	A1	01-10-2009	AR 070844 A1	05-05-2010
			AU 2009228866 A1	01-10-2009
			CA 2719761 A1	01-10-2009
			CN 101983208 A	02-03-2011
			EA 201071126 A1	29-04-2011
			EP 2268670 A1	05-01-2011
			JP 2011518125 A	23-06-2011
			KR 20100117130 A	02-11-2010
			PE 16742009 A1	04-11-2009
			TW 201000126 A	01-01-2010
			US 2009252727 A1	08-10-2009
			US 2011212092 A1	01-09-2011
			WO 2009120530 A1	01-10-2009
-----				

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 P 21/08

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

(72) 発明者 デイビッド・エドワード・ワトソン

アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス 6 2 8 8、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内

(72) 発明者 ロバート・ダブリュー・シーゲル

アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス 6 2 8 8、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内

(72) 発明者 ナン・ジア

アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス 6 2 8 8、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内

(72) 発明者 ジョン・ハリソン・スローン

アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス 6 2 8 8、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA55 CA04 DA02 GA11 HA03

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA13

4H045 AA11 AA30 BA40 CA40 DA76 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	抗胰高血糖素抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015505828A</a>	公开(公告)日	2015-02-26
申请号	JP2014544806	申请日	2012-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	伊莱利利公司		
申请(专利权)人(译)	礼来公司		
[标]发明人	デイビッドエドワードワトソン ロバートダブリューシーゲル ナンジア ジョンハリソンスローン		
发明人	デイビッド・エドワード・ワトソン ロバート・ダブリュー・シーゲル ナン・ジア ジョン・ハリソン・スローン		
IPC分类号	C07K16/26 G01N33/53 G01N33/543 C12N15/09 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/26 C07K2317/565 C07K2317/75 C07K2317/92 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/26.ZNA G01N33/53.B G01N33/53.U G01N33/543.501.J C12N15/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA55 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	61/566080 2011-12-02 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了与胰高血糖素结合的单克隆抗体或其抗原结合片段。这些抗体可用于胰高血糖素水平的免疫测定，和/或体内，离体或体外免疫化学和其他成像方法，用于检测胰高血糖素水平，用于诊断，预后和预测目的，以及用于优化胰高血糖素患者的治疗方案。信号传导与发病机制有关。

