(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-516763
(P2025-516763A)
(43)公表日　令和7年5月30日(2025.5.30)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 16/18	*(2006.01)*	C07K	16/18	ZNA	4B064
C12N 15/13	*(2006.01)*	C12N	15/13		4B065
C12N 15/63	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4H045
C12N 1/15	*(2006.01)*	C12N	1/15		
C12N 1/19	*(2006.01)*	C12N	1/19		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全110頁）　最終頁に続く

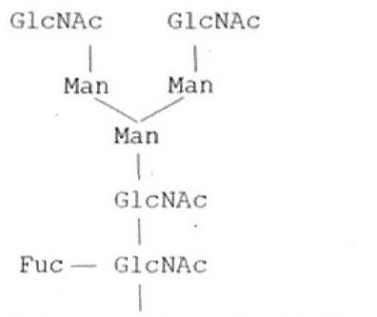
(21)出願番号　特願2024-568236(P2024-568236)
(86)(22)出願日　令和5年5月12日(2023.5.12)
(85)翻訳文提出日　令和6年12月13日(2024.12.13)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/062762
(87)国際公開番号　WO2023/222543
(87)国際公開日　令和5年11月23日(2023.11.23)
(31)優先権主張番号　22173621.8
(32)優先日　令和4年5月16日(2022.5.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　591003013
エフ．ホフマン－ラ ロシュ アーゲー
Ｆ．ＨＯＦＦＭＡＮＮ－ＬＡ ＲＯＣＨＥ ＡＫＴＩＥＮＧＥＳＥＬＬＳＣＨＡＦＴ
スイス・シーエイチ－４０７０バーゼル・グレンツアーヘルストラツセ１２４
(74)代理人　100118902
弁理士　山本 修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前 徹
(74)代理人　100196508
弁理士　松尾 淳一
(74)代理人　100157923
弁理士　鶴喰 寿孝
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　α－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテインに特異的に結合する高親和性抗体

(57)【要約】
本発明は、ＡＦＰ－Ｌ３のコア成分であるα－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）に特異的に結合するモノクローナル抗体および抗原結合断片に関する。したがって、本明細書で提供される抗体および抗原結合断片はまた、ＡＦＰ－Ｌ３抗体と称される場合がある。本発明の抗体または抗原結合断片をコードするポリヌクレオチド、本発明の抗体および抗原結合断片を発現する宿主細胞、本発明の抗体および抗原結合断片を産生するための方法、ならびに本発明の抗体および抗原結合断片の使用も提供される。α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰへの本発明の抗体および抗原結合断片の結合を促進する前処理剤も本明細書で提供される。本発明は更に、本発明の抗体および抗原結合断片と、任意に本発明の前処理剤とを含むキットに関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
α－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）または前記α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列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断片であって、前記モノクローナル抗体または抗原結合断片が、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２または最大で２つのアミノ酸置換および／または最大で１つの挿入もしくは欠失によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；ならびに配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアントを含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１または最大で２つのアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３または１つのアミノ酸置換により改変されたそのバリアントを含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、
を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。
【請求項２】
前記α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの前記部分配列が、式Ｉ
【化１】



（配列番号２）
（式Ｉ）
の糖ペプチドを含むかまたはそれからなる、請求項１に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【請求項３】
前記モノクローナル抗体または抗原結合断片が、請求項２に示される式Ｉの糖ペプチドおよび式ＩＩ
【化２】



（配列番号２）
（式ＩＩ）
の糖ペプチドに特異的に結合する、請求項１または２に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【請求項４】
式ＩＩの糖ペプチドと式Ｉの糖ペプチドへの結合についてのK_Dの比が、少なくとも２である、請求項３に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

【請求項５】
（ｉ）前記重鎖可変ドメイン（ＶＨ）が、配列番号１１または１２と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または好ましくは少なくとも９７．５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、
（ｉｉ）前記軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）が、配列番号１３または１４と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または好ましくは少なくとも９７．３％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、
請求項１～４のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【請求項６】
（ｉ）前記重鎖可変ドメイン（ＶＨ）が、配列番号１１または１２のアミノ酸配列を有し、
（ｉｉ）前記軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）が、配列番号１３または１４のアミノ酸配列を有する、
請求項１～４のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【請求項７】
請求項２に記載の式Ｉの糖ペプチドに１００ｎＭ以下、２０ｎＭ以下、１０ｎＭ以下または３．１ｎＭ以下のK_Dで結合し、任意に、前記K_Dが３７℃で測定される、請求項１～６のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【請求項８】
請求項２に記載の式Ｉの糖ペプチドに対する、配列番号１１または１２の前記重鎖可変ドメインと配列番号１３または１４の前記軽鎖可変ドメインとを含むウサギＩｇＧ抗体のK_Dの１０倍未満、８倍未満、６倍未満、４倍未満または２倍未満のK_Dで請求項２に記載の式Ｉの糖ペプチドに結合し、前記K_D値が、同じ条件下で、同じ方法を用いて測定される、請求項１～７のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【請求項９】
ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットであって、
（ｉ）請求項１～８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくは抗原結合断片の前記重鎖もしくは重鎖可変ドメイン、および／または
（ｉｉ）請求項１～８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくは抗原結合断片の前記軽鎖もしくは軽鎖可変ドメイン
をコードする、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセット。
【請求項１０】
請求項９に記載のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを含むベクター。
【請求項１１】
請求項９に記載のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセットまたは請求項１０に記載のベクターを含み、請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片を発現する、宿主細胞。
【請求項１２】
請求項１～８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片を製造する方法であって、請求項１１に記載の宿主細胞を培養することと、前記抗体または抗原結合断片を単離することとを含む、方法。
【請求項１３】
請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片、請求項９に記載のポリヌクレオチド、請求項１０に記載のベクターまたは請求項１１に記載の宿主細胞を含む、組成物。
【請求項１４】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏイムノアッセイ、特に、α－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）を検出するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏイムノアッセイのための、請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片または請求項１３に記載の組成物の使用。

【請求項１５】
請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片を用いて、試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは前記α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列を検出するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏイムノアッセイ法であって、任意に、請求項１６に記載の前処理試薬による前記試料の前処理を含む、ｉｎ　ｖｉｔｒｏイムノアッセイ法。
【請求項１６】
α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む試料を処理するための前処理試薬であって、前記前処理試薬が、還元剤、特にタンパク質還元剤を含む、前処理試薬。
【請求項１７】
請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片と、任意に請求項１６に記載の前処理試薬とを含む、キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ＡＦＰ－Ｌ３のコア成分であるα－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）に特異的に結合するモノクローナル抗体および抗原結合断片に関する。したがって、本明細書で提供される抗体および抗原結合断片はまた、ＡＦＰ－Ｌ３抗体と称される場合がある。本発明の抗体または抗原結合断片をコードするポリヌクレオチド、本発明の抗体および抗原結合断片を発現する宿主細胞、本発明の抗体および抗原結合断片を製造するための方法、ならびに本発明の抗体および抗原結合断片の使用も提供される。α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰへの本発明の抗体および抗原結合断片の結合を促進する前処理剤も本明細書で提供される。本発明は更に、本発明の抗体および抗原結合断片と、任意に本発明の前処理剤と、を含むキットに関する。
【背景技術】
【０００２】
肝臓がんは、世界で７番目に多いがんであり、がんによる２番目の死因である。
【０００３】
肝細胞癌腫（ＨＣＣ）は、世界中で発生している原発性肝がんの中で主要な組織型であり、総負荷量の７０％～８５％を占める。肝線維症および肝硬変等の基礎肝疾患がＨＣＣ発症の主な危険因子であることが知られている。ＨＣＣは、早期に診断された患者に対して、切除、肝移植、または高周波による局所アブレーションによって処置することができる。したがって、ＨＣＣの初期段階の検出および最小侵襲スクリーニング方法の場合は非常に重要である。
【０００４】
ＨＣＣの診断のための最も一般的な方法は、超音波検出、コンピュータ軸断層撮影（ＣＡＴスキャン）または磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）等のイメージング技術および血清学的バイオマーカーである。しかし、超音波検出は、少なくとも２ｃｍの腫瘍塊を必要とするため、予後の値が悪く、イメージング技術は病変ごとの感度が低く、コストが高い。一方、近年、高リスク患者におけるＨＣＣの早期検出のための監視プログラムに用いることができる新たな血液バイオマーカーの発見に多くの焦点が当てられている（Ｙａｎｇ　ＪＤ．Ｄｅｔｅｃｔ　ｏｒ　ｎｏｔ　ｔｏ　ｄｅｔｅｃｔ　ｖｅｒｙ　ｅａｒｌｙ　ｓｔａｇｅ　ｈｅｐａｔｏｃｅｌｌｕｌａｒ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ？Ｔｈｅ　ｗｅｓｔｅｒｎ　ｐｅｒｓｐｅｃｔｉｖｅ．Ｃｌｉｎ　Ｍｏｌ　Ｈｅｐａｔｏｌ．２０１９；２５（４）：３３５－４３）。
【０００５】
いくつかの現在の医療ガイドラインは、超音波または他のイメージングモダリティを使用して６ヶ月ごとに高リスク患者を監視することを推奨している。しかしながら、イメージングアプローチの限界として、早期腫瘍に対する感度の低さ、操作者依存性、および肥満または非アルコール性脂肪性肝炎の患者における質の低さが挙げられる。

【０００６】
α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）は、肝細胞がん（ＨＣＣ）の現在最もよく確立されたバイオマーカーである。しかしながら、ＨＣＣ診断、特に早期ＨＣＣ診断のためにＡＦＰの感度および特異度を更に改善する必要がある。
【０００７】
ＡＦＰは糖タンパク質であり、ＡＦＰの種々のグリコシル化形態が記載されている。特に、ＡＦＰは、アスパラギン２５１でＮ－グリコシル化される。レクチンは、糖タンパク質の分析に使用することができる。糖タンパク質の糖鎖構造に対するレクチンの選択的結合能を利用することにより、特定の糖鎖構造を有するマーカー糖タンパク質画分（複数可）を分離および濃縮することが可能である。ＡＦＰの場合、レンズマメ（Ｌｅｎｓ ｃｕｌｉｎａｒｉｓ）アグルチニン－Ａ（ＬＣＡ）由来のレクチンが広く用いられている。ＬＣＡを使用して、ＡＦＰを３つのバリアントＬ１、Ｌ２およびＬ３に分画することができ、ＡＦＰ－Ｌ３はＬＣＡに対する親和性が最も高い。ＡＦＰ－Ｌ３画分はＡＦＰから構成され、ＡＦＰは、α－１，６－コア－フコシル化（すなわち、Ｎ型糖鎖の還元末端にα－１，６結合を介して位置するＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）にフコース糖が結合したＡＦＰ）を含むＮ－グリカンを用いてＡｓｎ－２５１でＮ－グリコシル化される。したがって、ＡＦＰ－Ｌ３はα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰから構成されるので、ＡＦＰ－Ｌ３およびα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰという用語は、本明細書では互換的に使用される。α－フェトプロテイン（ＡＦＰ－Ｌ３）のレンズマメ（Ｌｅｎｓ ｃｕｌｉｎａｒｉｓ）アグルチニン（ＬＣＡ）反応性画分は、ＨＣＣ患者において特異的に増加する（Ｋｈｉｅｎ ＶＶ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍａｒｋｅｒｓ．２００１；１６（２）：１０５－１１１）。
【０００８】
最近の刊行物は、入力変動要素の性別、年齢、ＡＦＰおよびデスカルボキシプロトロンビン（ＤＣＰ＝ＰＩＶＫＡ－ＩＩ）（＝ＧＡＡＤスコア）または性別、年齢、ＡＦＰ、ＡＦＰ－Ｌ３およびデスカルボキシプロトロンビン（ＤＣＰ＝ＰＩＶＫＡ－ＩＩ）（＝ＧＡＬＡＤスコア）を含むスコアが、ＨＣＣスクリーニング努力の結果、特に早期ＨＣＣの検出も改善することができ、またこれらを改善するであろうことを明確に指摘している（Ｚｈｏｕ，Ｊ－Ｍ．，Ｗａｎｇ，Ｔ．，Ｚｈａｎｇ，Ｋ－Ｈ．ＡＦＰ－Ｌ３ ｆｏｒ ｔｈｅ ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ｏｆ ｅａｒｌｙ ｈｅｐａｔｏｃｅｌｌｕｌａｒ ｃａｒｃｉｎｏｍａ，Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０２１；１００（４３）：ｐ ｅ２７６７３）。
【０００９】
したがって、ＡＦＰ－Ｌ３を確実に検出および定量する必要性が高い。
【００１０】
μＴＡＳＷａｋｏ ＡＦＰ－Ｌ３アッセイ（Ｆｕｊｉｆｉｌｍ Ｗａｋｏ）は現在、ＡＦＰ－Ｌ３を検出および定量するための最も広く使用されている方法である。このアッセイは、ＡＦＰ－Ｌ３を分離するためにＬＣＡを使用するアフィニティーキャピラリー電気泳動に基づく。しかしながら、この方法にはいくつかの欠点がある。第１に、Ｎ－グリカン分岐は、誤ったＡＦＰ－Ｌ３レベルの検出をもたらし得る。第２に、この方法は面倒であり、特別な器具を必要とする。したがって、抗体ベースの方法を設計することが強く望まれている（Ｅｇａｓｈｉｒａ Ｙ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ，２０１９，９：１２３５９）。第３に、レクチンは抗体よりも特異性が低く、典型的には低い結合親和性しか示さない。
【００１１】
特開昭６３－３０７９００号には、ＬＣＡ結合性ＡＦＰ（ＡＦＰ－ＬＣＡ－Ｒ）には結合するが、ＬＣＡ非結合性ＡＦＰ（ＡＦＰ－ＬＣＡ－ＮＲ）には結合しない抗体が開示されている。しかしながら、当該抗体のエピトープは不明であり、当該抗体が、同一の糖部分を有するＡＦＰ以外のタンパク質も認識するか否かは不明である。
【００１２】

欧州特許第３２５２０７３号、米国特許出願公開第２０１８／０１１０８８９号明およびＥｇａｓｈｉｒａ Ｙ ｅｔ ａｌ．（Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ，２０１９，９：１２３５９）は、コア－フコース依存的に結合し、ＡＦＰペプチド骨格の一部にも結合する、コア－フコシル化ＡＦＰ（すなわち、ＡＦＰ－Ｌ３）に対するモノクローナル抗体を開示している。しかし、当技術分野で周知のように、またＥｇａｓｈｉｒａ Ｙ ｅｔ ａｌ．（Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ，２０１９，９：１２３５９）に記載されているように、ほとんどの抗炭水化物抗体は、それらの抗原に対して低い親和性を有する。抗体ＦａｓＭａｂの親和性は典型的な抗炭水化物抗体よりも強いと記載されているが、K_D値はわずか６．５×１０$^{-7}$Ｍである。典型的には、Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）アッセイ（Ｒｏｃｈｅ）等の完全自動免疫アッセイで使用される抗体は、有意に低いK_D値（例えば、低ナノモル濃度範囲で）、すなわちＡＦＰ－Ｌ３に対するより高い親和性を有する。

【００１３】

したがって、改善された動態学的特性、特により高い親和性（すなわち、より低いK_D）を有する、α－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（すなわち、ＡＦＰ－Ｌ３）に特異的に結合する新規抗体を提供する必要がある。さらに、ＡＦＰ－Ｌ３を検出するための改良されたイムノアッセイを提供する必要がある。

【発明の概要】

【００１４】

上記の必要性は、本発明において提供されるモノクローナル抗体およびその抗原結合断片、ならびにその使用によって解決される。

【００１５】

本発明の第１の態様において、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列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断片が提供される。

【００１６】

本明細書で提供されるモノクローナル抗体およびその抗原結合断片は、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ（本明細書ではコア－フコシル化ＡＦＰ、および１，６ｆｕｃＡＦＰとも呼ばれる）を高い特異性で関連構造と区別する。第１に、本明細書で提供されるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを、α－１，６－コア－フコース残基を欠くＡＦＰ（すなわち、α－１，６－コア－フコース残基を欠くＮ－グリカンを有するアグリコシル化ＡＦＰまたはＡＦＰ）と区別することができる。第２に、本明細書で提供されるモノクローナル抗体または抗原結合断片は、α－１，６－コア－フコース残基を有する遊離Ｎ－グリカンとα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを区別することができる。第３に、本明細書で提供されるモノクローナル抗体または抗原結合断片は、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを、Ｎ－グリコシル化部位Ｎ－２５１を含むアグリコシル化ＡＦＰペプチドと区別する。この結合挙動に基づいて、抗体およびその抗原結合断片は、α－１，６－コア－フコシル化と、例えば配列番号２のＡＦＰペプチド配列との両方の存在に依存して、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰに結合すると結論付けることができる。したがって、本明細書で提供される抗体および抗原結合断片は、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰに特異的であり、（ｉ）類似のα－１，６－コア－フコシル化Ｎ－グリカン構造を有する他のタンパク質、および（ｉｉ）α－１，６－コア－フコース残基を欠くＡＦＰまたはその部分配列を有意に認識しない。

【００１７】

この特異性により、本明細書で提供される抗体および抗原結合は、試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ（ＡＦＰ－Ｌ３と臨床的に同等）のレベルを検出するためのイムノアッセイに使用するための貴重なツールである。したがって、抗体および抗原結合断片ならびにそれらを使用するイムノアッセイは、ＨＣＣ、特に早期ＨＣＣの検出を助けることができる。

【００１８】

本明細書で提供される抗体および抗原結合断片は、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰペプチドへの結合を分析することによって本明細書に例示されるように、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰに対して驚くほど高い親和性を示す。そのような相互作用について測定されたK_Dは、一桁のナノモル範囲内であり、すなわち、そのようなＡＦＰ糖ペプチド抗体についての先行技術の教示に基づいて予想され得るK_Dよりも低い桁数である（Ｅｇａｓｈｉｒａ Ｙ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ，２０１９，９：１２３５９）。Ｅｇａｓｈｉｒａ Ｙ ｅｔ ａｌ．は、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰに対する抗体について、驚くほど低いK_D（すなわち、高い結合親和性）として６５０ｎＭの親和性を報告しており、本明細書に記載の親和性を有する抗体を同定することができるという予想外の知見であることを強調している。

【００１９】

興味深いことに、本明細書で同定された２つの最良のモノクローナル抗体、すなわちクローン１９Ｂ１２および３Ｃ５は、特にＣＤＲ残基においても非常に高い配列相同性を示す。ＣＤＲ残基には、１つの挿入および２つのアミノ酸置換の合計３つのアミノ酸の相違がある。

【００２０】

したがって、実施形態において、本開示の第１の態様によるモノクローナル抗体または抗原結合断片は、

（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ１）、または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ２）、または最大で２つのアミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ３）、または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアントを含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ１）、または最大で２つのアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ２）、または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ３）、または１つのアミノ酸置換により改変されたそのバリアントを含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【００２１】

第２の態様において、本発明は、

（ｉ）第１の態様のモノクローナル抗体もしくは抗原結合断片の重鎖もしくは重鎖可変ドメイン、および／または

（ｉｉ）第１の態様のモノクローナル抗体または抗原結合断片の軽鎖または軽鎖可変ドメイン、をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【００２２】

第３の態様において、本発明の第２の態様に記載のポリヌクレオチドを含むベクターが開示される。

【００２３】

本発明の第４の態様によれば、第２の態様のポリヌクレオチドまたは第３の態様のベクターを含む宿主細胞が本明細書で提供される。

【００２４】

第５の態様において、本発明は、第１の態様のモノクローナル抗体または抗原結合断片を製造する方法であって、当該方法が、第４の態様の宿主細胞を培養することと、当該抗体または抗原結合断片を単離することと、を含む方法に関する。そのような方法によって得られるまたは得ることができる抗体も開示される。

【００２５】

第６の態様によれば、第１の態様のモノクローナル抗体もしくは抗原結合断片、第２の態様のポリヌクレオチド、第３の態様のベクター、または第４の態様の宿主細胞を含む組成物が提供される。

【００２６】

第６の態様の実施形態において、本発明の第１の態様による抗体を含む診断用組成物が提供される。

【００２７】

本発明の抗体または抗原結合断片を使用して、本発明者らは、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰのレベルを決定するためのイムノアッセイを作製した。このアッセイで測定されたα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰのレベルは、μＴＡＳＷａｋｏ　ＡＦＰ－Ｌ３アッセイで測定されたレベルと非常によく相関しており、これは現在、ＡＦＰ－Ｌ３を検出および定量するために最も広く使用されている方法である。したがって、本発明の抗体を使用するイムノアッセイは、μＴＡＳＷａｋｏ　ＡＦＰ－Ｌ３の欠点を克服する、例えばＨＣＣ検出を補助するための信頼性の高いツールである。

【００２８】

したがって、第７の態様において、本発明は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏイムノアッセイ、特に、α－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）またはＡＦＰ－Ｌ３を検出するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏイムノアッセイのための、第１の態様の抗体または抗原結合断片の使用に関する。

【００２９】

同様に、本発明の第８の態様は、第１の態様のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を用いて、試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列を検出するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏイムノアッセイ法に関する。

【００３０】

本発明者らはまた、前処理（例えば、還元剤を使用すること）が、そのようなイムノアッセイにおいて得られるシグナルを改善し得ることを見出し、このことは、本明細書で提供される抗体および抗原結合断片によって認識されるエピトープが、そのような前処理の際により良好に接近可能になることを示唆している。

【００３１】

したがって、本明細書の第９の態様において、還元剤（例えばＤＴＴ）を含む前処理剤または前処理組成物も提供される。

【００３２】

第１０の態様において、本発明は、本発明の第１の態様のモノクローナル抗体または抗原結合断片を含むパーツキットを提供する。実施形態において、キットは、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰの検出および／または定量のためのイムノアッセイ用である。実施形態において、キットは、本発明の第９の態様の前処理剤または組成物を更に含む。

【図面の簡単な説明】

【００３３】

以下の図は、本発明の理解を助けるために提供される。

【図１】α－１，６－コア－フコシル化を強調する、Ａｓｎ－２５１（Ｎ２５１）におけるＡＦＰのＮ－グリカン構造を示す概略図。

【図２Ａ】２５℃でのフコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉ（濃い灰色）および非フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉ（薄い灰色）に対する相互作用を示す例示的な抗体動態。Ａ）フコシル化ＡＦＰ－Ｌ３－ペプチドへの特異的結合および許容可能なバックグラウンドを有する選択された抗体。Ｂ）フコシル化ＡＦＰ－Ｌ３ペプチドと非フコシル化ＡＦＰ－Ｌ３ペプチド（ＡＦＰ－Ｌ１とも呼ばれる）との間の結合、複合体結合挙動または分化のいずれもない、選択されなかった抗体。

【図２Ｂ】２５℃でのフコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉ（濃い灰色）および非フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉ（薄い灰色）に対する相互作

用を示す例示的な抗体動態。Ａ）フコシル化ＡＦＰ－Ｌ３－ペプチドへの特異的結合および許容可能なバックグラウンドを有する選択された抗体。Ｂ）フコシル化ＡＦＰ－Ｌ３ペプチドと非フコシル化ＡＦＰ－Ｌ３ペプチド（ＡＦＰ－Ｌ１とも呼ばれる）との間の結合、複合体結合挙動または分化のいずれもない、選択されなかった抗体。

【図３Ａ】様々なペプチドに結合する抗体１９Ｂ１２、３Ｃ５、３Ｄ２、３Ａ３および６Ｂ６の動態プロファイル。Ａ）フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．０００１４８）の抗体相互作用。３．３～９０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５については、ラングミュアフィッティングモデル、Ｒｍａｘグローバル、ＲＩ＝０（明るい灰色）が重ねられる。Ｂ）Ａｓｎ（Ｇ０Ｆ）－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．０００１５０）についての抗体相互作用。３．３～２７０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。Ｃ）非フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．０００１５１）の抗体相互作用。３．３～２７０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５については、ラングミュアフィッティングモデル、Ｒｍａｘグローバル、ＲＩ＝０（明るい灰色）が重ねられる。Ｄ）ＡＦＰ（２４３－２６１）－（Ｆｕｃ－ＧｌｃＮＡｃ）－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．１００００１）の抗体相互作用。３．３～２７０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５については、ラングミュアフィッティングモデル、Ｒｍａｘグローバル、ＲＩ＝０（明るい灰色）が重ねられる。

【図３Ｂ】様々なペプチドに結合する抗体１９Ｂ１２、３Ｃ５、３Ｄ２、３Ａ３および６Ｂ６の動態プロファイル。Ａ）フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．０００１４８）の抗体相互作用。３．３～９０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５については、ラングミュアフィッティングモデル、Ｒｍａｘグローバル、ＲＩ＝０（明るい灰色）が重ねられる。Ｂ）Ａｓｎ（Ｇ０Ｆ）－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．０００１５０）についての抗体相互作用。３．３～２７０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。Ｃ）非フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．０００１５１）の抗体相互作用。３．３～２７０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５については、ラングミュアフィッティングモデル、Ｒｍａｘグローバル、ＲＩ＝０（明るい灰色）が重ねられる。Ｄ）ＡＦＰ（２４３－２６１）－（Ｆｕｃ－ＧｌｃＮＡｃ）－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．１００００１）の抗体相互作用。３．３～２７０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５については、ラングミュアフィッティングモデル、Ｒｍａｘグローバル、ＲＩ＝０（明るい灰色）が重ねられる。

【図３Ｃ】様々なペプチドに結合する抗体１９Ｂ１２、３Ｃ５、３Ｄ２、３Ａ３および６Ｂ６の動態プロファイル。Ａ）フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．０００１４８）の抗体相互作用。３．３～９０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５については、ラングミュアフィッティングモデル、Ｒｍａｘグローバル、ＲＩ＝０（明るい灰色）が重ねられる。Ｂ）Ａｓｎ（Ｇ０Ｆ）－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．０００１５０）についての抗体相互作用。３．３～２７０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。Ｃ）非フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．０００１５１）の抗体相互作用。３．３～２７０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５については、ラングミュアフィッティングモデル、Ｒｍａｘグローバル、ＲＩ＝０（明るい灰色）が重ねられる。Ｄ）ＡＦＰ（２４３－２６１）－（Ｆｕｃ－ＧｌｃＮＡｃ）－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．１００００１）の抗体相互作用。３．３～２７０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。抗体１９Ｂ１

２および３Ｃ５については、ラングミュアフィッティングモデル、Ｒｍａｘグローバル、ＲＩ＝０（明るい灰色）が重ねられる。
【図３Ｄ】様々なペプチドに結合する抗体１９Ｂ１２、３Ｃ５、３Ｄ２、３Ａ３および６Ｂ６の動態プロファイル。Ａ）フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．０００１４８）の抗体相互作用。３．３～９０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５については、ラングミュアフィッティングモデル、Ｒｍａｘグローバル、ＲＩ＝０（明るい灰色）が重ねられる。Ｂ）Ａｓｎ（Ｇ０Ｆ）－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．０００１５０）についての抗体相互作用。３．３～２７０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。Ｃ）非フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．０００１５１）の抗体相互作用。３．３～２７０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５については、ラングミュアフィッティングモデル、Ｒｍａｘグローバル、ＲＩ＝０（明るい灰色）が重ねられる。Ｄ）ＡＦＰ（２４３－２６１）－（Ｆｕｃ－ＧｌｃＮＡｃ）－Ｂｉ（ＢＭＯ　３５．１００００１）の抗体相互作用。３．３～２７０ｎＭの範囲の濃度系列が示されており、３０ｎＭが重複として示されている（黒色）。抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５については、ラングミュアフィッティングモデル、Ｒｍａｘグローバル、ＲＩ＝０（明るい灰色）が重ねられる。
【図４】抗体１９Ｂ１２結合非フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉについてのシミュレーション。オーバーレイは、シミュレートされたデータセットに対して７．３μＭ～１０ｎＭ、実験データセットに対して１～２７０ｎＭの２つの濃度範囲を示す。描かれた黒い線は、２７０ｎＭの実験データおよびシミュレートデータのデータである。計算された親和性＞６２０ｎＭ。
【図５－１】ｎ＝２の結合性ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０ＦおよびＡＦＰ（２４８－２５６）を有する抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５の溶液データにおける親和性。
【図５－２】ｎ＝２の結合性ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０ＦおよびＡＦＰ（２４８－２５６）を有する抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５の溶液データにおける親和性。
【図５－３】ｎ＝２の結合性ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０ＦおよびＡＦＰ（２４８－２５６）を有する抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５の溶液データにおける親和性。
【図６】Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）アッセイフォーマットにおけるタンパク質検出（総ＡＦＰ、ＡＦＰ－Ｌ３、ＡＦＰ－Ｌ１を約２つの濃度約７０および７ｎＭで試験した）についての５つの抗体ｍＡｂ＜ＡＦＰ－Ｌ３＞ｒＲｂ－ｘｘ－ＩｇＧ－ＳｕｌｆｏＢＰＲｕ（ｘｘ：６Ｂ６、３Ａ３、３Ｃ５、３Ｄ２、１９Ｂ１２）の比較。試料前処理剤を使用する場合、５０ｍＭクエン酸塩、２０ｍＭ　ＥＤＴＡ、１１０ｍＭ　ＤＴＴ　ｐＨ４．９（対照：ＰＢＳ＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ　２０を使用）。
【図７】方法比較１９Ｂ１２－ＩｇＧ（Ｐ８）対Ｗａｋｏ　ＡＦＰ－Ｌ３（ｎｇ／ｍＬ）を使用したＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ＡＦＰ－Ｌ３プロトタイプａ。
【図８】方法比較３Ｃ５－ＩｇＧ（Ｐ８）対Ｗａｋｏ　ＡＦＰ－Ｌ３（ｎｇ／ｍＬ）を使用したＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ＡＦＰ－Ｌ３プロトタイプｂ。
【図９】低ＡＦＰ－Ｌ３濃度試料（マスターキャリブレータおよび天然試料）についての、ＰＴ１中のＤＤＴを用いるまたは用いないＡＦＰ－Ｌ３検出。
【図１０】中濃度および高濃度のＡＦＰ－Ｌ３濃度試料（マスターキャリブレータおよび天然試料）についての、ＰＴ１におけるＤＤＴの有無にかかわらないＡＦＰ－Ｌ３検出。
【図１１】臨床パネルで測定したＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ＡＦＰ－Ｌ３のＲＯＣ曲線。
【図１２】１９Ｂ１２および３Ｃ５　ＶＨおよびＶＬ配列のアラインメント。ＫａｂａｔによるＣＤＲ配列を太字で示す。
【発明を実施するための形態】
【００３４】
以下、本発明の要素について説明する。これらの要素は特定の態様および実施形態と共

に列挙されているが、これらは任意の方法および任意の数で組み合わされて追加の態様および実施形態を創出し得ることを理解されたい。

【００３５】

第１の態様において、本開示は、α－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）または当該α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列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断片に関する。

【００３６】

当該技術分野で知られているように、ヒトＡＦＰは、配列番号１のアミノ酸配列を有する糖タンパク質（またはＵｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ　Ｐ０２７７１（バージョン２０９）に記載されているその天然バリアント）であり、Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ　Ｐ０２７７１のＡｓｎ－２５１に対応する単一のＮ－グリコシル化部位を含む。Ａｓｎ－２５１のＮ－グリカンは、コアフコース残基を含むことができる（図１を参照）。当技術分野で更に理解されるように、グリカン内の「コアフコシル化」という用語は、フコース残基が、ＡＦＰタンパク質のＡｓｎ－２５１に結合したコアＧｌｃＮａｃ残基またはＡｓｎ－２５１に対応するＡｓｎを含むその部分配列にα－１，６結合していることを示す。「コア－フコシル化」および「α－１，６－コア－フコシル化」という用語は、交換可能であると認識される。したがって、「コア－フコシル化ＡＦＰおよび／またはコア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列に特異的（または特異的に結合する）」という用語は、「α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰおよびα－１，６－コア－フコシル化を含むその部分配列に特異的（または特異的に結合する）」という用語と交換可能である。本発明の抗体および抗体抗原結合断片はまた、本明細書では１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体およびその抗原結合断片と互換的に呼ばれる。

【００３７】

上記のように、１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片との関連で言及されるα－１，６－コア－フコースは、ヒトＡＦＰ（配列番号１を参照）の残基Ｎ２５１に結合したＮ－グリカンの一部である。

【００３８】

Ｎ－グリカン中のα－１，６－コア－フコースの位置を図１に示す。

【００３９】

ＡＦＰの部分配列は、配列番号２を含み得る。特定の実施形態において、ＡＦＰの部分配列のペプチド部分は、配列番号２からなる。

【００４０】

添付の実施例において実証されるように、本発明者らは、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ（すなわち、ＡＦＰ－Ｌ３を特徴付ける成分）に対する高い特異性を特徴とする２つのモノクローナル抗体（１９Ｂ１２および３Ｃ５）を同定した。モノクローナル抗体はα－１，６－コア－フコース依存的に結合するが、ＡＦＰのペプチド部分もα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰの結合に寄与する。したがって、本発明者らによって同定されたモノクローナル抗体およびその抗原結合断片は、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを、Ａｓｎ－２５１においてα－１，６－コア－フコシル化を欠く異なるＡＦＰ種と区別するが、α－１，６－コア－フコシル化Ｎ－グリカンで修飾された他のタンパク質も区別する。

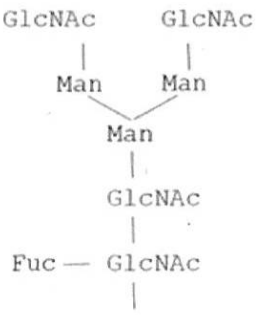
【００４１】

本発明のモノクローナル抗体および抗原断片は、特に高い親和性（すなわち、低いK_D）を示す。これは、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ（Ｅｇａｓｈｉｒａ　Ｙ　ｅｔａｌ．，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｒｅｐｏｒｔｓ，２０１９，９：１２３５９）に対する以前に報告された抗体に基づいて、幾分予想外で驚くべきことであった。さらに、本発明のモノクローナル抗体は、完全に自動化されたハイスループットイムノアッセイで使用するための好ましい動態パラメータ、例えば、高い会合速度定数k_aおよび低い解離速度定数k_dを示す。

【００４２】

上に明記したように、本明細書で提供されるモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片は、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列に特異的に結合する。α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列は、式Ｉの糖ペプチドを含み得るか、またはそれからなり得る。

【化１】



（配列番号２）

（式Ｉ）

【００４３】

式Ｉの糖ペプチドは、ＡＦＰのＡｓｎ－２５１に対応するＡｓｎアミノ酸残基を３位に含む配列番号２のアミノ酸配列を有するＡＦＰペプチドを表し、当該ＡＦＰペプチドは、α－１，６－コア－フコシル化を含むＮ－グリカンで改変されている。

【００４４】

したがって、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体およびそれらの抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドまたは式Ｉの糖ペプチドを含む糖タンパク質に特異的に結合し得る。

【００４５】

実施形態において、本明細書で提供されるモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片によって特異的に結合されたα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列は、式ＩＩの糖ペプチドを含み得るか、またはそれからなり得る。

【化２】



（配列番号２）

（式ＩＩ）

【００４６】

式ＩＩの糖ペプチドは、ＡＦＰのＡｓｎ－２５１に対応するＡｓｎアミノ酸残基を３位に含む配列番号２のアミノ酸配列を有するＡＦＰペプチドを表し、当該ＡＦＰペプチドは、α－１，６－コア－フコシル化を含むＮ－グリカンで改変されている。

【００４７】

α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列が式ＩＩの糖ペプチドを含む実施形態において、例えば、更なるアミノ酸がペプチド配列中に存在し得るか、または更なる糖部分がグリカン中に存在し得る（好ましくはＧｌｃＮＡｃに結合している）。

【００４８】

したがって、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体およびそれらの抗原結合断片は、式ＩＩの糖ペプチドまたは式ＩＩの糖ペプチドを含む糖タンパク質に特異的に結合し得る。

【００４９】
実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体およびそれらの抗原結合断片は、式ＩまたはＩＩの糖ペプチド、または式ＩまたはＩＩの糖ペプチドを含む糖タンパク質に特異的に結合し得る。
【００５０】
添付の実施例において実証されるように、本開示の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドおよび式ＩＩの糖ペプチドの両方に高親和性（すなわち、低いK_D）で結合する。驚くべきことに、式Ｉの糖ペプチドに対する結合親和性が、式ＩＩの糖ペプチドに対する結合よりもわずかに高い（すなわち、K_Dがより低い）ことが観察された。これは、式ＩのＮ－グリカン中の付加糖部分が結合を幾分促進することを示している。天然において、Ｎ－グリカン構造は、典型的には、式Ｉの糖ペプチドに示されるもの等、より複雑であるので、この結合挙動は、より複雑なＮ－グリコシル化ＡＦＰ種に対する特異性を増加させるという点で有利であり得る。
【００５１】
したがって、実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体およびそれらの抗原結合断片は、式ＩＩの糖ペプチドよりも高い親和性（すなわち、より低いK_D）で式Ｉの糖ペプチドに結合し得る。実施形態において、式ＩＩの糖ペプチドと式Ｉの糖ペプチドとの結合のK_Dの比は、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７または少なくとも１０であり得る。特定の実施形態において、式ＩＩの糖ペプチドと式Ｉの糖ペプチドとの結合のK_Dの比は、少なくとも７であり得る。実施形態において、式ＩＩの糖ペプチドと式Ｉの糖ペプチドとの結合に関するK_Dの比は、最大で１１、最大で１２、または最大で１５であり得る。実施形態において、式ＩＩの糖ペプチドと式Ｉの糖ペプチドとの結合に関するK_Dの比は、最大で１２であり得る。
【００５２】
既に上で論じたように、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体およびそれらの抗原結合断片は、（ｉ）α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列（例えば、式Ｉ）と、（ｉｉ）ＡＦＰまたはα－１，６－コア－フコース残基を欠くその部分配列とを区別する。
【００５３】
α－１，６－コア－フコース残基を欠くＡＦＰまたはその部分配列としては、（ｉ）Ａｓｎ－２５１またはそれに相当する位置にＮ－グリコシル化されているがＮ－グリカン中にコアフコースを欠くＡＦＰまたはその部分配列、および（ｉｉ）アグリコシル化されたＡＦＰまたはその部分配列が挙げられる。
【００５４】
さらに、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体およびそれらの抗原結合断片は、（ｉ）α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列（例えば、式Ｉ）と、（ｉｉ）ＡＦＰ以外のタンパク質の単離または存在下でのα－１，６－コア－フコシル化Ｎ－グリカンとを区別する。
【００５５】
また本明細書で以下に定義するように、「区別する」という用語は、１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗原結合断片が、他の抗原（「非標的抗原」）、例えば、単離された形態で、または他のグリコシル化タンパク質もしくはペプチドとの関連で、コアフコース残基および／またはコア－フコシル化グリカンを欠くＡＦＰ／ＡＦＰ部分配列に結合するよりも高い親和性および／または特異性で、特異的抗原標的（すなわち、コアフコシル化ＡＦＰおよびそのコアフコシル化部分配列）に結合することを示す。例えば、非標的抗原から／非標的抗原に対して標的抗原を識別する特徴は、非標的抗原に対する親和性よりも少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも１８０倍または少なくとも２４５倍優れた標的抗原に対する親和性を有する１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗体抗原結合断片を特徴とし得る。（すなわち、標的抗原への結合のK_Dは、非標的抗原への結合のＫＤよりも少なくとも１０倍、少な

くとも２０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも１８０倍または少なくとも２４５倍低い）。製剤は、少なくとも「ＸＸ」は、非標的抗原に対するK_Dが非常に高く、使用される方法では検出できないという実施形態も包含する。したがって、抗体または抗原結合断片が標的構造を非標的構造と区別することができるかどうかは、同じ方法（例えば、本明細書中下記で記載されるようなK_Dを決定するための好ましい方法）を使用して、それぞれの結合についてのK_D値を決定することであり得る。

【００５６】

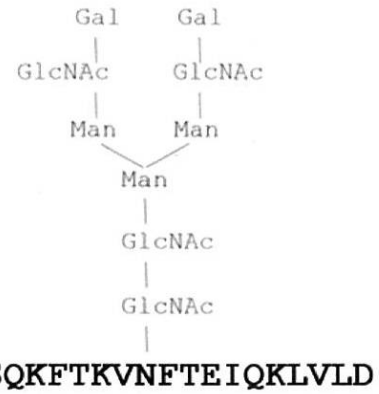
実施形態において、抗体が標的抗原を非標的抗原から／標的抗原に対して区別する能力は、試験される抗体または抗原結合断片の標的構造への結合が検出されるイムノアッセイを用いて評価することができる。そのようなイムノアッセイを使用して、規定された濃度の標的抗原を含む第１の試料で得られたイムノアッセイシグナルを、同じ濃度の非標的抗原を含む第２の試料で得られたイムノアッセイシグナルと比較することができる。第１の試料の免疫測定シグナルが第２の試料からの免疫測定シグナルよりも高いことは、標的抗原と非標的抗原との識別を示す。実施形態において、試験された抗体または抗原結合断片は、第１の試料のイムノアッセイシグナルが、第２の試料よりも少なくとも５倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍高い場合、標的構造と非標的構造とを区別し得る。そのような分析に使用することができる例示的であるが非限定的なイムノアッセイを実施例７に提供する。標的抗原および非標的抗原の例示的な濃度は１２ｎＭであり得る。

【００５７】

実施形態において、α－１，６－コア－フコース残基を欠くＡＦＰまたはその部分配列は、式ＩＩＩの糖ペプチドを含み得るか、またはそれからなり得る。

【００５８】

【化３】



（配列番号２）

（式ＩＩＩ）

式ＩＩＩはコア－フコースを欠くため、１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体またはそれらの抗原結合断片は、これを式Ｉの糖ペプチドまたはこれを含む糖タンパク質と式ＩＩＩの糖ペプチドとを区別することができる。

【００５９】

したがって、式Ｉの糖ペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）と式ＩＩＩの糖ペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）とを区別する１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体およびその抗原結合断片が本明細書で提供される。

【００６０】

実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗原結合断片は、式ＩＩの糖ペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）と式ＩＩＩの糖ペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）とを区別する。

【００６１】
実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）と配列番号２または配列番号２５のペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）とを区別する。
【００６２】
実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗原結合断片は、式ＩＩの糖ペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）と配列番号２または配列番号２５のペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）とを区別する。
【００６３】
実施形態において、本明細書で提供される１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）と、式ＩＩＩの糖ペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）と配列番号２または配列番号２５のペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）の両方を区別する。
【００６４】
実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗原結合断片は、式ＩＩの糖ペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）と、式ＩＩＩの糖ペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）と配列番号２５のペプチド（またはそれを含むＡＦＰ配列）の両方を区別する。
【００６５】
実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗原結合断片が、（ｉ）α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ、またはα－１，６－コア－フコシル化（例えば式Ｉの糖ペプチド）を含む部分ＡＦＰ配列に、（ｉｉ）α－１，６－コア－フコース残基を欠くＡＦＰ、またはα－１，６－コア－フコース残基を欠くＡＦＰの部分配列（例えば、式ＩＩＩまたは配列番号２もしくは２５の糖ペプチド）への結合についての平衡解離定数K_Dより少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも１８０倍、少なくとも１８３倍または少なくとも２４５倍低いK_Dで結合する。具体的な実施形態において、K_Dの当該差は、少なくとも１００倍である。別の具体的な実施形態において、解離定数の当該差は、少なくとも１８０倍である。更に別の具体的な実施形態において、解離の当該差は、少なくとも１８３倍である。（ｉ）および（ｉｉ）に対する結合親和性は、同じ条件下で決定される。
【００６６】
実施形態において、α－１，６－コア－フコース残基を欠くＡＦＰまたはα－１，６－コア－フコース残基を欠くＡＦＰの部分配列は、Ｎ－グリコシル化ＡＦＰまたはコアフコース残基を欠くその部分配列（例えば式ＩＩＩの糖ペプチド）であり、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗原結合断片は、（ｉ）α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ、またはα－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列（例えば、配列番号２）に、（ｉｉ）α－１，６－コア－フコース残基を欠くＡＦＰ、またはα－１，６－コア－フコース残基を欠くＡＦＰの部分配列に結合するための平衡解離定数（K_D）よりも少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも１８０倍、少なくとも１８３倍または少なくとも２４５倍低いK_Dで、結合する。具体的な実施形態において、K_Dの当該差は、少なくとも１００倍である。別の具体的な実施形態において、解離定数の当該差は、少なくとも１８０倍である。更に別の具体的な実施形態において、解離の当該差は、少なくとも１８３倍である。（ｉ）および（ｉｉ）に対する結合親和性は、同じ条件下で決定される。
【００６７】
実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗原結合断片は、（ｉ）式Ｉの糖ペプチドに、（ｉｉ）式ＩＩＩの糖ペプチドへの抗体または抗原結合断片の結合についての平衡解離定数（K_D）よりも少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも１８０倍、少なくとも１８３倍または少なくとも２４５倍低いK_Dで結合する。具体的な実施形態において、

K_Dの当該差は、少なくとも１００倍である。別の具体的な実施形態において、解離定数の当該差は、少なくとも１８０倍である。更に別の具体的な実施形態において、解離の当該差は、少なくとも１８３倍である。（ｉ）および（ｉｉ）に対する結合親和性は、同じ条件下で決定される。

【００６８】

実施形態において、α－１，６－コア－フコース残基を欠くＡＦＰまたはα－１，６－コア－フコース残基を欠くＡＦＰの部分配列は、アグリコシル化ＡＦＰまたはアグリコシル化部分ＡＦＰ配列（例えば、配列番号２または２５）であり、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗原結合断片は、（ｉ）α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたはα－１，６－コア－フコシル化（例えば式Ｉの糖ペプチド）を含む部分ＡＦＰ配列に、当該アグリコシル化ＡＦＰまたはアグリコシル化部分ＡＦＰ配列（例えば、配列番号２または２５）への結合についての平衡解離定数（K_D）より少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも１８０倍、少なくとも１８３倍または少なくとも２４５倍、少なくとも５００倍、少なくとも１０００倍、少なくとも３０００倍または少なくとも５０００倍低いK_Dで結合する。いくつかの実施形態において、K_Dの当該差は、少なくとも１０００倍である。いくつかの実施形態において、K_Dの当該差は、少なくとも５０００倍である。（ｉ）および（ｉｉ）に対する結合親和性は、同じ条件下で決定される。

【００６９】

実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗原結合断片は、（ｉ）式Ｉの糖ペプチドに、（ｉｉ）配列番号５０のＡＦＰペプチドへの抗体または抗原結合断片の結合についての平衡解離定数（K_D）よりも少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも２５倍または少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも１８０倍、少なくとも１８３倍または少なくとも２４５倍、少なくとも５００倍、少なくとも１０００倍、少なくとも３０００倍または少なくとも５０００倍低いK_Dで、結合する。いくつかの実施形態において、K_Dの当該差は、少なくとも１０００倍である。いくつかの実施形態において、K_Dの当該差は、少なくとも４０００倍である。いくつかの実施形態において、K_Dの当該差は、少なくとも５０００倍である。（ｉ）および（ｉｉ）に対する結合親和性は、同じ条件下で決定される。

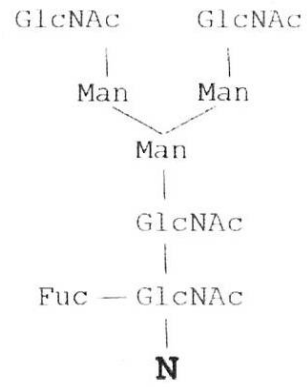
【００７０】

添付の実施例および図においてそれぞれの糖ペプチドおよびグリカンを用いて実証されるように、本発明のモノクローナル抗体または抗原結合断片は、（ｉ）α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列（例えば式Ｉの糖ペプチド）と、（ｉｉ）単離されたα－１，６－コア－フコシル化グリカン（例えば、式（ＩＶ））およびα－１，６－コア－フコシル化グリカンを有する他の糖タンパク質（すなわち、式ＩＶの糖ペプチドを含むが、式Ｉの糖ペプチドを含まないタンパク質）とを区別する。

【００７１】

式ＩＶの糖鎖は、以下の構造を有する。

【化４】



（式ＩＶ）

【００７２】

したがって、実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、（ｉ）α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列（例えば式Ｉの糖ペプチド）と、（ｉｉ）単離されたα－１，６－コア－フコシル化グリカン（例えば、式（ＩＶ））およびα－１，６－コア－フコシル化グリカンを有する他の糖タンパク質（すなわち、式ＩＶの糖ペプチドを含むが、式Ｉの糖ペプチドを含まないタンパク質）とを区別する。

【００７３】

特定の実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、（ｉ）α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ、またはα－１，６－コア－フコシル化（例えば式Ｉの糖ペプチド）を含む部分ＡＦＰ配列に、（ｉｉ）単離されたα－１，６－コア－フコシル化グリカン（例えば、式（ＩＶ））およびα－１，６－コア－フコシル化グリカン（すなわち、式ＩＶの糖ペプチドを含むが、式Ｉの糖ペプチドを含まないタンパク質）を有する他の糖タンパク質への抗体または抗原結合断片の結合についての平衡解離定数（K_D）よりも少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも１８０倍、少なくとも２４５倍低いK_Dで結合する。（ｉ）および（ｉｉ）に対する結合親和性は、同じ条件下で決定される。具体的な実施形態において、K_Dの当該差は、少なくとも１００倍である。別の具体的な実施形態において、解離定数の当該差は、少なくとも１８０倍である。更に別の具体的な実施形態において、解離の当該差は、少なくとも１８３倍である。（ｉ）および（ｉｉ）に対する結合親和性は、同じ条件下で決定される。

【００７４】

更により具体的な実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、（ｉ）式Ｉの糖ペプチドに対して、（ｉｉ）式（ＩＶ）の単離されたα－１，６－コア－フコシル化グリカンへの抗体または抗原結合断片の結合についての平衡解離定数（K_D）よりも少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも１８０倍、少なくとも２４５倍低いK_Dで結合する。（ｉ）および（ｉｉ）に対する結合親和性は、同じ条件下で決定される。具体的な実施形態において、K_Dの当該差は、少なくとも１００倍である。別の具体的な実施形態において、解離定数の当該差は、少なくとも１８０倍である。更に別の具体的な実施形態において、解離の当該差は、少なくとも１８３倍である。（ｉ）および（ｉｉ）に対する結合親和性は、同じ条件下で決定される。

【００７５】

実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドと式ＩＩＩの糖ペプチドおよび式ＩＶのコア－フコシル化グリカンの両方とを区別する。本明細書の他の箇所（例えば、上記）で言及される個々の構造対間のK_D値の倍数差に関して述べたことは、必要な変更を加えて適用される。

【００７６】
実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドと、以下の３つ：式ＩＩＩの糖ペプチド、式ＩＶのコア－フコシル化グリカンおよび配列番号２５または２のＡＦＰペプチド（例えば、配列番号２５）の全てとを区別する。
【００７７】
本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチド（上記を参照）に対して、すなわちα－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰ配列に対して、驚くほど高い親和性（すなわち、低いK_D）を有することが分かった。低いK_Dは、典型的には、イムノアッセイに有利である。
【００７８】
実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、１００ｎＭ以下、２０ｎＭ以下、好ましくは１０ｎＭ以下、より好ましくは３．１ｎＭ以下または２．５ｎＭ以下のK_Dで式Ｉの糖ペプチドに結合する。K_Dが溶液中の親和性によって決定される場合、K_Dはまた、０．９ｎＭ以下または０．４ｎＭ以下であり得る。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、２０ｎＭ以下のK_Dで式Ｉの糖ペプチドに結合する。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、１０ｎＭ以下のK_Dで式Ｉの糖ペプチドに結合する。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、５ｎＭ以下のK_Dで式Ｉの糖ペプチドに結合する。
【００７９】
実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドに対する配列番号１１の重鎖可変ドメインと配列番号１３の軽鎖可変ドメインとを含むウサギＩｇＧ抗体（例えば、抗体１９Ｂ１２）のK_Dの１０倍未満、８倍未満、６倍未満、４倍未満、または２倍未満であるK_Dで式Ｉの糖ペプチドに結合しており、K_D値は同じ条件下で同じ方法を用いて測定される。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドに対して配列番号１１の重鎖可変ドメインと配列番号１３の軽鎖可変ドメインとを含むウサギＩｇＧ抗体（例えば、抗体１９Ｂ１２）のK_Dと等しいかまたはそれ未満のK_Dで式Ｉの糖ペプチドに結合し、K_D値は同じ条件下で同じ方法を用いて測定される。
【００８０】
実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドに対する配列番号１２の重鎖可変ドメインと配列番号１４の軽鎖可変ドメインとを含むウサギＩｇＧ抗体（例えば、抗体３Ｃ５）のK_Dの１０倍未満、８倍未満、６倍未満、４倍未満、または２倍未満であるK_Dで式Ｉの糖ペプチドに結合しており、K_D値は同じ条件下で同じ方法を用いて測定される。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドに対して配列番号１２の重鎖可変ドメインと配列番号１４の軽鎖可変ドメインとを含むウサギＩｇＧ抗体（例えば、抗体３Ｃ５）のK_Dと等しいかまたはそれ未満のK_Dで式Ｉの糖ペプチドに結合し、K_D値は同じ条件下で同じ方法を用いて測定される。
【００８１】
本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチド（上記を参照）、すなわちα－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰ配列への結合について、驚くほど高い会合速度（k_a）定数を有することが更に見出された。高いk_aは、平衡状態で抗体が抗原に迅速に結合するために重要である。したがって、高いk_aは、イムノアッセイにおける低いインキュベーション時間にとって重要である。

【００８２】
本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、少なくとも２．０×１０^{4}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$、実施形態では少なくとも２．１×１０^{4}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$、実施形態では少なくとも１０^{5}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$、実施形態では少なくとも２．５×１０^{5}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$、実施形態では少なくとも６．０×１０^{5}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$、および実施形態では少なくとも１．０×１０^{6}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$である、式Ｉの糖ペプチドへの結合についての会合速度定数（ｋ$_{a}$）を有し得る。
【００８３】
実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドに対する配列番号１１の重鎖可変ドメインと配列番号１３の軽鎖可変ドメインとを含むウサギＩｇＧ抗体（例えば、抗体１９Ｂ１２）のｋ$_{a}$よりも３．４％、５％、１０％、２０％、５０％、８０％または９０％高いｋ$_{a}$で式Ｉの糖ペプチドに結合し、ｋ$_{a}$値は同じ条件下で、同じ方法を用いて測定される。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドに対して配列番号１１の重鎖可変ドメインと配列番号１３の軽鎖可変ドメインとを含むウサギＩｇＧ抗体（例えば、抗体１９Ｂ１２）のｋ$_{a}$と等しいかまたはそれよりも高いｋ$_{a}$で式Ｉの糖ペプチドに結合し、ｋ$_{a}$値は同じ条件下で同じ方法を用いて測定される。
【００８４】
実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドに対する配列番号１２の重鎖可変ドメインと配列番号１４の軽鎖可変ドメインとを含むウサギＩｇＧ抗体（例えば、抗体３Ｃ５）のｋ$_{a}$よりも２．０％、３．４％、５％、１０％、２０％、５０％、８０％または９０％高いｋ$_{a}$で式Ｉの糖ペプチドに結合し、ｋ$_{a}$値は同じ条件下で、同じ方法を用いて測定される。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドに対して配列番号１２の重鎖可変ドメインと配列番号１４の軽鎖可変ドメインとを含むウサギＩｇＧ抗体（例えば、抗体３Ｃ５）のｋ$_{a}$と等しいかまたはそれよりも高いｋ$_{a}$で式Ｉの糖ペプチドに結合し、ｋ$_{a}$値は同じ条件下で同じ方法を用いて測定される。
【００８５】
本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチド（上記を参照）、すなわちα－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰ配列への結合について、驚くほど低い解離速度（ｋ$_{d}$）定数を有することが更に見出された。
【００８６】
本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、最大で１．２×１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$、最大で１．３×１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$、最大で×１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$、最大で８．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$、最大で７．３×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$、最大で３．２×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$または最大で１．５×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$である、式Ｉの糖ペプチドについての解離速度定数（ｋ$_{d}$）を有し得る。
【００８７】
実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドに対する配列番号１１の重鎖可変ドメインと配列番号１３の軽鎖可変ドメインとを含むウサギＩｇＧ抗体（例えば、抗体１９Ｂ１２）のＫ$_{d}$の１．５、２、２．５、３、３．５または３．７５倍より低いＫ$_{d}$で式Ｉの糖ペプチドに結合しており、Ｋ$_{d}$値は同じ条件下で同じ方法を用いて測定される。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドに対して配列番号１１の重鎖可変ドメインと配列番号１３の軽鎖可変ドメインとを含むウサギＩｇＧ抗体（例えば、抗体１９Ｂ１２）のｋ$_{d}$と等しいかまたはそれより低いｋ$_{d}$で式Ｉの糖ペプチドに結合し、ｋ$_{d}$値は同じ条件下で同じ方法

を用いて測定される。

【００８８】

実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドに対する配列番号１２の重鎖可変ドメインと配列番号１４の軽鎖可変ドメインとを含むウサギＩｇＧ抗体（例えば、抗体３Ｃ５）のK_dの１．５、２、２．５、３、３．５、３．７５、５、６、７、または８倍より低いK_dで式Ｉの糖ペプチドに結合しており、K_d値は同じ条件下で同じ方法を用いて測定される。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドに対して配列番号１２の重鎖可変ドメインと配列番号１４の軽鎖可変ドメインとを含むウサギＩｇＧ抗体（例えば、抗体３Ｃ５）のk_dと等しいかまたはそれより低いk_dで式Ｉの糖ペプチドに結合し、k_d値は同じ条件下で同じ方法を用いて測定される。

【００８９】

実施形態において、本明細書に開示される全てのK_D、k_aおよびk_d値は、３７℃でのK_D、k_aおよびk_d値であり得る。

【００９０】

当技術分野で理解されているように、K_D、k_aおよびk_d値は、当業者に知られている任意の従来の手段によって、または本明細書に記載されているように決定され得る。

【００９１】

本発明との関連で、本明細書、特に本明細書で上記のK_D、k_aおよびk_d値は、好ましくは表面プラズモン共鳴分光法（例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標））によって決定される。２つのK_D値、それぞれ２つのk_a値および２つのk_d値の間の倍数差（すなわち、比）を、プラズモン共鳴分光法によって測定された２つのそれぞれの値に基づいて計算することができる。分析を実施するための好ましいペプチドおよび方法は、添付の実施例および図に開示されている。

【００９２】

本明細書では、実施例３に記載の表面プラズモン共鳴分光法を使用してK_D、k_aおよびk_d値を決定することが特に好ましい。

【００９３】

したがって、K_D、k_aおよび／またはk_d値を決定するための表面プラズモン共鳴分光法は、モノクローナル抗体または抗原結合断片をＣ１センサチップ（例えば、直列ＳＣ１センサチップ）上に捕捉すること、および分析される糖ペプチドを分析物として注入することを含み得、当該決定は３７℃の温度で行われる。ＨＢＳ－ＥＴ　ｐＨ７．４（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、３ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０５％ｗ／ｖ　Ｔｗｅｅｎ２０（登録商標））をシステム緩衝液として使用してもよく、１ｍｇ／ｍｌカルボキシメチルデキストランを補足した当該システム緩衝液を試料緩衝液として使用してもよい。

【００９４】

実施形態において、結合パラメータK_Dおよび／またはk_aおよび／またはk_dは、例えばＢＩＡｃｏｒｅ（商標）Ｔ２００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　ＳＷ　３．２に従って、ラングミュアフィット１：１フィッティングモデルによって決定され得る。好ましくは、フィッティングはR_{max}ｇｌｏｂａｌである。代替的または追加的に、ラングミュア１：１フィッティングＳｃｒｕｂｂｅｒ－ＳＷ　Ｖ２．０ｃを適用してもよい。

【００９５】

表面プラズモン共鳴分光法は、当技術分野で公知の異なる機器を用いて実施され得る。特に好ましい実施形態において、ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）Ｔ２００または８Ｋ機器が使用され得る。

【００９６】

表面プラズモン共鳴測定に用いられる抗体または抗原結合断片の濃度は、１５０ｎＭであってもよく、例えば、１０μｌ／分で３０秒間注入してもよい。分析物（例えば、ペプ

チドまたは糖ペプチド）には、３．３～２７０ｎｍの濃度系列を使用してもよい。分析物の注入は、６０μｌ／分であってもよい。

【００９７】

表面プラズモン共鳴分光測定における会合相は、例えば、３分間監視され得る。解離相は、例えば、１０分間監視され得る。再生は、１０ｍＭグリシンｐＨ２．０を２０μＬ／分で３０秒間注入し、続いて１０ｍＭグリシンｐＨ２．２５を６０秒間２回注入することによって行ってもよい。

【００９８】

好ましい実施形態において、K_Dおよび／またはk_aおよび／またはk_dは、以下のように決定され得る。

【００９９】

シリーズＳ　Ｃ１センサを使用する３７℃のＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ製のＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）Ｔ２００機器が使用され得る。ウサギ抗体捕捉系（例えば、実施例に記載されるとおり）を、例えば７００ＲＵ～８００ＲＵでフローセルに固定化し得る。１つのフローセルを対照として使用してもよく、３つのフローセルを測定に使用してもよい。次いで、１５０ｎＭの試験対象の抗体または抗原結合断片を１０μＬ／分で３０秒間注入してもよい。共鳴単位ＲＵにおける捕捉レベル（ＣＬ）を監視してもよい。３．３～２７０ｎＭからの一連の分析物濃度を６０μｌ／分で注入してもよい。会合相を３分間監視してもよく、解離相を１０分間監視してもよい。再生は、１０ｍＭグリシンｐＨ２．０を２０μＬ／分で３０秒間注入し、続いて１０ｍＭグリシンｐＨ２．２５を６０秒間２回注入することによって行ってもよい。動態学的速度定数および解離平衡定数K_Dは、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）Ｔ２００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　ＳＷ　３．２に従ってラングミュア１：１フィッティングモデルを使用して決定され得る。次に、ラングミュア１：１フィッティングＳｃｒｕｂｂｅｒ－ＳＷ　Ｖ２．０ｃを適用してもよい。

【０１００】

本明細書で明示的に反対のことが言及されていない場合、本明細書で提供されるK_D値（および速度定数）は、モノクローナル抗体または抗原結合断片をチップ（例えば、Ｃ１センサチップ）上に捕捉し、分析される分析物を注入することを使用する表面プラズモン共鳴分光法によって決定される。当技術分野で周知のように、K_D値および／または速度定数を決定するための当技術分野で公知の代替方法もある。これらの方法を用いて抗体３Ｃ５および１９Ｂ１２について得られた結果が、実施例３における抗体について本明細書に報告される結果と一致する限り、このような代替方法も使用され得る。

【０１０１】

添付の実施例では、K_D値を決定するための代替方法：溶液分析における親和性も記載されている。添付の実施例に示すように、溶液分析における親和性を用いて決定されたK_D値は、上記の捕捉に基づく方法と非常に類似しているが、ある程度異なっていてもよい。本明細書で言及されるK_D値は、そのような技術を明示的に言及する場合、溶液中の親和性によって測定されるK_Dのみに関する。不一致の場合、上記の抗体捕捉ベースの表面プラズモン共鳴分光法データセットを使用するものとする。

【０１０２】

溶液測定における親和性は、ＣＡＰ－Ｋｉｔ（Ｃｙｔｉｖａ）の販売者の説明書に従って記載されるように行われ得る。例えば、ビオチン化分析物（例えば、糖ペプチドまたはペプチド）は、ＣＡＰチップセンサ表面に捕捉され得る。１０ｎＭの試験される抗体または抗原結合断片と、１２０ｎＭ～０．０１ｎＭの様々な濃度の非ビオチン化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆそれぞれとの混合物、２００μＭ～－０．１ｎＭの非ビオチン化ＡＦＰ（２４８－２５６）の様々な濃度を、平衡が達成されるまでインキュベートし得る。表面に表示された分析物に対する混合物の結合事象を監視してもよい。競合剤としてのペプチド濃度が増加すると、溶液中の「遊離」抗体は減少する。次いで、競合実験のために決定された遊離抗体濃度を、ペプチド競合剤濃度に対してプロットしてもよい。ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアからの溶液中の親和性モデルを使

用して、データを評価し、K_Dを決定してもよい。

【０１０３】

いくつかの実施形態において、K_Dを決定するための方法は、

（１）配列番号１１の配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号１３の配列を有する軽鎖可変ドメインを含むウサギＩｇＧ抗体と、

（２）式Ｉの糖ペプチド、との間の結合定数ＫＤが、

２．５（方法の±誤差、例えば０．０８％）ｎＭであると決定されるように選択される。

【０１０４】

いくつかの実施形態において、K_Dを決定するための方法は、

（１）配列番号１２の配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号１４の配列を有する軽鎖可変ドメインを含むウサギＩｇＧ抗体と、

（２）式Ｉの糖ペプチド、との間の結合定数ＫＤが、

３．１（方法の±誤差、例えば０．１３％）ｎＭであると決定されるように選択される。

【０１０５】

添付の実施例において実証されるように、また、本明細書中下記で更に議論されるように、１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片は、本発明による前処理剤（本明細書中の他の箇所を参照）により前処理されたα－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）（例えば、ヒト対象から得られた血液試料（例えば、血漿または血清）中に生じる天然のα－１，６－コア－フコシル化）を、そのような前処理を行わない場合よりもはるかに良好に検出することができる。したがって、実施形態において、本開示のモノクローナル抗体または抗原結合断片は、α－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）に、かかる前処理なしのα－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）よりも良好に結合する。そのような「より良好な」結合を検出するための尺度は、添付の実施例に開示されている免疫アッセイ設定のうちの１つを使用してシグナルを伝達し得る。前処理剤としては、ＤＴＴ等の還元剤が好ましい。

【０１０６】

驚くべきことに、本明細書で同定された２つの最良のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体（すなわち１９Ｂ１２および３Ｃ５）は、非常に高い配列相同性を示すが、フレームワーク領域だけでなくＣＤＲ残基にも一定の差がある。これは、同定された抗体の根底にあるＣＤＲ配列ならびにＶＨおよびＶＬ配列が、１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体およびその抗原結合断片を作製するための非常に価値のある構成要素を規定することを実証している。しかしながら、ＶＨおよびＶＬに見られる配列可変性はまた、抗体特性に有意に悪影響を及ぼすことなく、ＶＨおよびＶＬのＣＤＲおよびフレームワーク領域の両方で特定のアミノ酸交換を行うことができることを実証している。理解されるように、当業者は、本発明の抗体または抗原結合断片配列の容易なバリアントを作製することができ、そのような抗体が本明細書に開示される利点特性を維持するかどうかを本明細書の開示に基づいて決定することができる。例えば、親和性成熟は、１９Ｂ１２または３Ｃ５と同じまたは改善された特性を有するそのような親和性成熟によって得られるアミノ酸置換を有する１９Ｂ１２または３Ｃ５のＶＨおよびＶＬを含むバリアントモノクローナル抗体または抗原結合断片を得るために適用され得る。

【０１０７】

実施形態において、本明細書で提供されるモノクローナル抗体または抗原結合断片は、

（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ１）または１つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失によって改変されたそのバリアント；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ２）を有するＣＤＲ－Ｈ２、または最大で２つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ

酸配列（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ３）を有するＣＤＲ－Ｈ３、または１つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失によって改変されたそのバリアントを含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ１）を有するＣＤＲ－Ｌ１、または最大で２つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ２）または１つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失によって改変されたそのバリアント；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ３）または１つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失により改変されたそのバリアントを含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【０１０８】

具体的な実施形態において、本明細書で提供されるモノクローナル抗体または抗原結合断片は、

（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ１）；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ２）、または１つのアミノ酸の置換および／もしくは１つのアミノ酸の挿入もしくは欠失により改変された配列番号４もしくは５のバリアント、および配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ３）を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ１）を有するＣＤＲ－Ｌ１、または１つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ２）；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ３）を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【０１０９】

具体的な実施形態において、本明細書で提供されるモノクローナル抗体または抗原結合断片は、

（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ１）；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ２）、または１つのアミノ酸の置換および／もしくは１つのアミノ酸の挿入もしくは欠失により改変された配列番号４もしくは５のバリアント、および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ３）を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ１）からなるＣＤＲ－Ｌ１、または１つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ２）；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ３）を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。

【０１１０】

実施形態において、本明細書で提供されるモノクローナル抗体または抗原結合断片は、

（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ１）または１つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失によって改変されたそのバリアント；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ２）からなるＣＤＲ－Ｈ２、または最大で２つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ３）からなるＣＤＲ－Ｈ３、または１つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失によって改変されたそのバリアントを含む、重鎖可変

ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ１）からなるＣＤＲ－Ｌ１、または最大で２つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ２）または１つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失によって改変されたそのバリアント；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ３）または１つのアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失により改変されたそのバリアントを含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【０１１１】

モノクローナル抗体または抗原断片のＣＤＲ配列の変異は、全てのＣＤＲ配列における置換、挿入および欠失の合計が最大で８個、最大で７個、最大で６個、最大で５個、最大で４個、最大で３個、または最大で２個であるようなものであり得る。

【０１１２】

特定の実施形態において、全てのＣＤＲ配列におけるアミノ酸の置換、挿入および欠失の合計は、最大で３であり得る。実施形態において、最大で３つのアミノ酸置換、挿入および欠失の事象は、最大で２つのアミノ酸置換および１つの挿入または欠失であり得る。

【０１１３】

別の特定の実施形態において、全てのＣＤＲ配列におけるアミノ酸の置換、挿入および欠失の合計は、最大で２であり得る。

【０１１４】

実施形態において、本明細書で提供されるモノクローナル抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ１）、または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ２）、または最大で２つのアミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ３）、または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアントを含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ１）、または最大で２つのアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ２）、または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ３）、または１つのアミノ酸置換により改変されたそのバリアントを含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【０１１５】

本明細書で使用される場合、「１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント」という表現は、示された親配列に対して当該バリアント配列に含まれる正確に１つの（１つ以下の）アミノ酸置換があることを意味する。

【０１１６】

特定の実施形態において、モノクローナル抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２または最大で２つのアミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアントを含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１、または最大で２つのアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバ

リアント；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３または１つのアミノ酸置換により改変されたそのバリアントを含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【０１１７】

モノクローナル抗体または抗原断片のＣＤＲ配列の変異は、全てのＣＤＲ配列におけるアミノ酸置換の合計が最大で８個、最大で７個、最大で６個、最大で５個、最大で４個、最大で３個、または最大で２個であるようなものであり得る。

【０１１８】

特定の実施形態において、全てのＣＤＲ配列におけるアミノ酸置換の合計は、最大で３であり得る。

【０１１９】

別の特定の実施形態において、全てのＣＤＲ配列におけるアミノ酸置換の合計は、最大で２であり得る。

【０１２０】

実施形態において、本明細書で提供されるモノクローナル抗体または抗原結合断片は、

（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ１）、または１つの保存的アミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ２）、または最大で２つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ３）、または１つの保存的アミノ酸置換によって改変されたそのバリアントを含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ１）、または最大で２つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ２）、または１つの保存的アミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ３）、または１つの保存的アミノ酸置換により改変されたそのバリアントを含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【０１２１】

特定の実施形態において、モノクローナル抗体または抗原結合断片は、

（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１または１つの保存的アミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２または最大で２つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３または１つの保存的アミノ酸置換によって改変されたそのバリアントを含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１、または最大で２つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２または１つの保存的アミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３または１つの保存的アミノ酸置換により改変されたそのバリアントを含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【０１２２】

実施形態において、本明細書で提供されるモノクローナル抗体または抗原結合断片は、

（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ１）、または１つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ２）、または最大で２つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ３）、または１つの高度に保存

的なアミノ酸置換によって改変されたそのバリアントを含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１（それぞれ１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ１）、または最大で２つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ２）、または１つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３（１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ３）、または１つの高度に保存的なアミノ酸置換により改変されたそのバリアントを含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【０１２３】
特定の実施形態において、モノクローナル抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１または１つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２または最大で２つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３または１つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変されたそのバリアントを含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１、または最大で２つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２または１つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３または１つの高度に保存的なアミノ酸置換により改変されたそのバリアントを含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【０１２４】
１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ中のアミノ酸配列は、３つのアミノ酸が異なる。具体的には、３Ｃ５（すなわち、配列番号５）のＣＤＲ－Ｈ２に対する１９Ｂ１２（すなわち、配列番号４）のＣＤＲ－Ｈ２にアミノ酸の挿入およびアミノ酸置換がある。さらに、１９Ｂ１２（すなわち、配列番号７）のＣＤＲ－Ｌ１と３Ｃ５（すなわち、配列番号８）のＣＤＲ－Ｌ１とは、１つのアミノ酸が異なる。

【０１２５】
したがって、本明細書で提供される１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含み得る。

【０１２６】
特定の実施形態において、モノクローナル抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２、または１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１、または１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含み得る。

【０１２７】
実施形態において、抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または１つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または１つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含み得る。

【０１２８】
特定の実施形態において、モノクローナル抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２、または１つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１、または１つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含み得る。

【０１２９】
実施形態において、抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または１つの保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または１つの保存的もしくは高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含み得る。

【０１３０】
特定の実施形態において、モノクローナル抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２、または１つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１、または１つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含み得る。

【０１３１】
１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５のＣＤＲ中のアミノ酸配列は、３つのアミノ酸が異なる。具体的には、３Ｃ５（すなわち、配列番号５）のＣＤＲ－Ｈ２に対して１９Ｂ１２（すなわち、配列番号４）のＣＤＲ－Ｈ２の３位にアミノ酸の挿入がある。また、１９Ｂ１２のＣＤＲ－Ｈ２の５位（すなわち、配列番号４）と、３Ｃ５のＣＤＲ－Ｈ２の４位（すなわち、配列番号５）のアミノ酸が異なっている。これらの位置は、前述の挿入を考慮して互いに対応する。最後に、１９Ｂ１２のＣＤＲ－Ｌ１（すなわち、配列番号７）および３Ｃ５のＣＤＲ－Ｌ１（すなわち、配列番号８）は、７位のアミノ酸が異なる。

【０１３２】

したがって、本開示のモノクローナル１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または５位のアミノ酸において１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号４のバリアント、または４位のアミノ酸において１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または７位のアミノ酸が１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含み得る。

【０１３３】
より具体的な実施形態において、本開示のモノクローナル抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２、または５位のアミノ酸において１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号４のバリアント、または４位のアミノ酸において１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１、または７位のアミノ酸が１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【０１３４】
実施形態において、本開示のモノクローナル抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または５位のアミノ酸において１つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号４のバリアント、または４位のアミノ酸において１つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または７位のアミノ酸が１つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【０１３５】
より具体的な実施形態において、本開示のモノクローナル抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２、または５位のアミノ酸において１つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号４のバリアント、または４位のアミノ酸において１つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１、または７位のアミノ酸が１つの保存的アミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【０１３６】
実施形態において、本開示のモノクローナル抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または５位のアミノ酸において１つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号４のバリアント、または４位のアミノ酸において１つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または７位のアミノ酸が１つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【０１３７】

より具体的な実施形態において、本開示のモノクローナル抗体または抗原結合断片は、

（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２、または５位のアミノ酸において１つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号４のバリアント、または４位のアミノ酸において１つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１、または７位のアミノ酸が１つの高度に保存的なアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。

【０１３８】

別段の指定がない限り、配列番号３～１０のバリアントのいずれか１つ（例えば、全体として）におけるアミノ酸置換（複数可）は、任意のアミノ酸交換であり得る。特定の実施形態において、配列番号３～１０のバリアントのいずれか１つ（例えば、全体として）におけるアミノ酸置換（複数可）は、保存的アミノ酸交換（複数可）であり得る。更により具体的な実施形態において、配列番号３～１０のバリアントのいずれか１つ（例えば、全体として）におけるアミノ酸置換（複数可）は、高度に保存的なアミノ酸交換（複数可）であり得る。

【０１３９】

実施形態において、本開示のモノクローナル抗体または抗原結合断片は、

（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または５位のアミノ酸において１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号４のバリアント、または４位のアミノ酸において１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７または８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含み、

配列番号４のバリアントの５位のアミノ酸がセリンに改変されており、配列番号５のバリアントの４位のアミノ酸がアスパラギンに改変されている。

【０１４０】

より具体的な実施形態において、本開示のモノクローナル抗体または抗原結合断片は、

（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２、または５位のアミノ酸において１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号４のバリアント、または４位のアミノ酸において１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７または８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含み、

配列番号４のバリアントの５位のアミノ酸がセリンに改変されており、配列番号５のバリアントの４位のアミノ酸がアスパラギンに改変されている。

【０１４１】

本発明によるモノクローナル抗体または抗原結合断片は、本明細書で同定されるモノクローナル抗体１９Ｂ１２のＣＤＲ配列を含み得る。

【０１４２】
したがって、本発明のモノクローナル抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含み得る。
【０１４３】
本発明によるモノクローナル抗体または抗原結合断片は、本明細書で同定されるモノクローナル抗体３Ｃ５のＣＤＲ配列を含み得る。
【０１４４】
したがって、本開示のモノクローナル抗体または抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１；配列番号５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含み得る。
【０１４５】
本明細書において上記では、配列番号３、４、５、６、７、８、９および１０に示されるようなアミノ酸配列を列挙するいくつかの実施形態ならびに任意にそれらのバリアントが開示される。「配列番号３」への言及が「配列番号１１または１２に含まれるＣＤＲ－Ｈ１配列」に置き換えられ、「配列番号４」への言及が「配列番号１１に含まれるＣＤＲ－Ｈ２配列」に置き換えられ、「配列番号５」への言及が「配列番号１２に含まれるＣＤＲ－Ｈ２配列」に置き換えられ、「配列番号６」への言及が「配列番号１１または１２に含まれるＣＤＲ－Ｈ３配列」に置き換えられ、「配列番号７」への言及が「配列番号１１に含まれるＣＤＲ－Ｌ１配列」に置き換えられ、「配列番号８」への言及が「配列番号１２に含まれるＣＤＲ－Ｌ１配列」に置き換えられ、「配列番号９」への言及が「配列番号１１または１２に含まれるＣＤＲ－Ｌ２配列」に置き換えられ、および／または「配列番号１０」への言及が「配列番号１１または１２に含まれるＣＤＲ－Ｌ１配列」に置き換えられる対応する実施形態も本明細書で提供される。
【０１４６】
実施形態において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、
（ｉ）配列番号１１または１２と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または好ましくは少なくとも９７．５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号１３または１４と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または好ましくは少なくとも９７．３％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。
【０１４７】
したがって、α－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）または当該α－１，６－コア－フコシル化（例えば、式Ｉの糖ペプチド）を含むＡＦＰの部分配列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断片であって、
（ｉ）配列番号１１もしくは１２のアミノ酸配列、または配列番号１１もしくは１２と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、もしくは好ましくは少なくとも９７．５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号１３もしくは１４のアミノ酸配列、または配列番号１３もしくは１４と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、もしく

は好ましくは少なくとも９７．３％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が本明細書で提供される。

【０１４８】

添付の実施例および図から明らかなように、本明細書で同定された２つの抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５は、ＣＤＲならびにＶＨおよびＶＬのフレームワーク領域において有意な配列類似性を示すが、いくつかのアミノ酸置換も有する。これらの抗体のＶＨおよびＶＬ配列に基づいて、１９　Ｂ１２および３Ｃ５と配列類似性を共有する同様の特徴（例えば、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰに対する特異性、親和性および他の動態パラメータ）を有する更なる抗体を生成することができる。例えば、そのようなバリアント抗体は、親和性成熟によって生成され得る。

【０１４９】

したがって、実施形態において、本発明の抗体または抗原結合断片は、

（ｉ）配列番号１１または１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、または配列番号１１もしくは１２の親和性成熟バリアントと、

（ｉｉ）配列番号１３もしくは１４のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または配列番号１３もしくは１４の親和性成熟バリアントと、を含み得る。

【０１５０】

実施形態において、本発明の抗体または抗原結合断片は、

（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２、または５位のアミノ酸において１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号４のバリアント、または４位のアミノ酸において１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３；または当該ＶＨの親和性成熟バリアントを含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７または８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３；または当該ＶＬの親和性成熟バリアントを含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含み得る。

【０１５１】

親和性成熟バリアントは、定義により、１９Ｂ１２または３Ｃ５と少なくとも同じ親和性を有し、１９Ｂ１２または３Ｃ５と少なくとも同じ結合優先性（すなわち、異なる構造の結合の識別）を示す。親和性成熟バリアントは、アミノ酸の置換、挿入および／または欠失を含み得る。実施形態において、親和性成熟バリアントは、アミノ酸置換を含み得る。実施形態において、親和性成熟バリアントは、それぞれの親ＶＨまたはＶＬ配列（例えば、配列番号１１～１４のいずれか１つ）と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の配列同一性を示す。

【０１５２】

抗体の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインは、３つのＣＤＲに加えて、４つのフレームワークドメインを含むことが当技術分野で公知である。具体的には、フレームワーク領域１（ＦＷ１）が可変鎖ドメインのほとんどのＮ末端部分を表し、フレームワーク領域４（ＦＷ４）がほとんどのＣ－末端部分を表すことが知られており、フレームワーク領域間、すなわちＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＣＤＲ２－ＦＷ３－ＣＤＲ３－ＦＷ４の間にＣＤＲが散在している。

【０１５３】

重鎖または軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域（ＦＷ）または相補性決定領域（ＣＤＲ）のどちらに言及されているかは文脈から明らかであるが、ＦＷおよびＣＤＲは、本明細書では標識「Ｈ」または「Ｌ」で区別される。例えば、重鎖可変ドメインの構成要素ＦＷおよびＣＤＲは、本明細書では以下に概略的に表されるものとして言及される。

（ＦＷ－Ｈ１）－（ＣＤＲ－Ｈ１）－（ＦＷ－Ｈ２）－（ＣＤＲ－Ｈ２）－（ＦＷ－Ｈ３）－（ＣＤＲ－Ｈ３）－（ＦＷ－Ｈ４）

【０１５４】

同様に、軽鎖可変ドメインの構成要素ＦＷおよびＣＤＲは、本明細書では以下に概略的に表されるものとして言及される。

（ＦＷ－Ｌ１）－（ＣＤＲ－Ｌ１）－（ＦＷ－Ｌ２）－（ＣＤＲ－Ｌ２）－（ＦＷ－Ｌ３）－（ＣＤＲ－Ｌ３）－（ＦＷ－Ｌ４）

【０１５５】

実施形態において、本発明のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ特異的抗体または抗原結合断片のＶＨは、フレームワーク領域（ＦＷ）を含み、以下の構造を有する。

ＦＷ－Ｈ１－ＣＤＲ－Ｈ１－ＦＷ－Ｈ２－ＣＤＲ－Ｈ２－ＦＷ－Ｈ３－ＣＤＲ－Ｈ３－ＦＷ－Ｈ４

【０１５６】

ＦＷ－Ｈ１は、配列番号１５のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９８％、または更により好ましくは少なくとも９９％を有するそのバリアントを含むか、またはそれからなり得る。

【０１５７】

ＦＷ－Ｈ２は、配列番号１６もしくは１７のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９８％、または更により好ましくは少なくとも９９％を有する配列番号１６もしくは１７のバリアントを含むか、またはそれからなり得る。

【０１５８】

ＦＷ－Ｈ３は、配列番号１８のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９８％、または更により好ましくは少なくとも９９％を有するそのバリアントを含むかまたはそれからなり得る。

【０１５９】

ＦＷ－Ｈ４は、配列番号１９のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９８％、または更により好ましくは少なくとも９９％を有するそのバリアントを含むか、またはそれからなり得る。

【０１６０】

実施形態において、ＶＨのフレームワーク配列が最大で２つまたは最大で１つのアミノ酸置換、挿入および／または欠失の事象を有する。

【０１６１】

実施形態において、本発明のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ特異的抗体または抗原結合断片のＶＬは、フレームワーク領域（ＦＷ）を含み、以下の構造を有する。

ＦＷ－Ｌ１－ＣＤＲ－Ｌ１－ＦＷ－Ｌ２－ＣＤＲ－Ｌ２－ＦＷ－Ｌ３－ＣＤＲ－Ｌ３－ＦＷ－Ｌ４

【０１６２】

ＦＷ－Ｌ１は、配列番号２０のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９８％、または更により好ましくは少なくと

も９９％を有するそのバリアントを含むか、またはそれからなり得る。
【０１６３】
ＦＷ－Ｌ２は、配列番号２１もしくは２２のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９８％、または更により好ましくは少なくとも９９％を有する配列番号２１もしくは２２のバリアントを含むか、またはそれからなり得る。
【０１６４】
ＦＷ－Ｌ３は、配列番号２３のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９８％、または更により好ましくは少なくとも９９％を有するそのバリアントを含むか、またはそれからなり得る。
【０１６５】
ＦＷ－Ｌ４は、配列番号２４のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは少なくとも９８％、または更により好ましくは少なくとも９９％を有するそのバリアントを含むか、またはそれからなり得る。
【０１６６】
実施形態において、ＶＨのフレームワーク配列は、最大で４つ、最大で３つ、最大で２つまたは最大で１つのアミノ酸置換、挿入および／または欠失の事象を有する。
【０１６７】
実施形態において、本発明の抗体または抗原結合断片のＶＨおよび／またはＶＬのフレームワーク領域は、ウサギ由来フレームワーク配列ＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３およびＦＷ４を含み得る。
【０１６８】
実施形態において、本発明の抗体または抗原結合断片のＶＨおよび／またはＶＬのフレームワーク領域は、１９Ｂ１２または３Ｃ５のフレームワーク領域と同じ（ウサギ）生殖系列に由来する。
【０１６９】
実施形態において、本発明のモノクローナル抗体および抗原結合断片は、ウサギ抗体であり得る。
【０１７０】
実施形態において、本発明のモノクローナル抗体および抗原結合断片は、それに結合した検出標識を有し得る。
【０１７１】
実施形態において、本発明のモノクローナル抗体および抗原結合断片は、それに結合した捕捉標識を有し得る。
【０１７２】
本発明者らは、１９Ｂ１２のＦｖドメインを２倍超（従来の抗体の場合のように）、例えば８倍超（本明細書ではｐ８とも呼ばれる）含む多価１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体を使用すると、添付の実施例に記載されるようなイムノアッセイのシグナル対ノイズ比を増加させることができることを見出した。
【０１７３】
したがって、実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体は、本発明の抗体の重鎖および軽鎖に関連して本明細書中上記で記載されるようなＶＨドメインとＶＬドメインとの任意の組合せによって形成される少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個または少なくとも８個のＦｖドメインを含む多価抗

体であり得る。実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体が、本明細書に記載のＶＨドメインとＶＬドメインの任意の組合せを少なくとも３回、少なくとも４回、少なくとも５回、少なくとも６回、少なくとも７回または少なくとも８回（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９または１０回）含み得る。実施形態において、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体が、本明細書に記載のＶＨドメインとＶＬドメインとの任意の組合せによって形成されたＦｖを含む少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個または少なくとも８個のＦａｂドメインを含むものであり得る。一実施形態において、本発明の多価抗体は、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８または少なくとも１０コピー（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９または１０コピー）の、本明細書において上記で規定した抗体１９Ｂ１２またはそのバリアントのＦｖドメイン（ＶＨおよびＶＬによって形成される）を含む。

【０１７４】

本明細書で使用される多価抗体は、少なくとも３つのＦｖドメインを含む抗体に関する。好ましい実施形態において、多価抗体は、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８または少なくとも１０コピー（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９または１０コピー）の同じＦｖを含む。

【０１７５】

多価抗体のための例示的であるが非限定的な実施形態およびそのような抗体を作製するための方法は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公開第２０１９／０５７８１６号に開示されている。具体的には、そのような多価抗体の構造的構成およびそのような多価抗体（ｐ３、ｐ４、ｐ５、ｐ６、ｐ７またはｐ８とも呼ばれる）を作製するための方法に関する全ての実施形態が、参照により本明細書に開示される。

【０１７６】

実施形態において、本発明の多価抗体は、例えばリンカー配列（例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０１９／０５７８１６号に記載されているリンカー配列の１つ）に隣接する複数の（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９または１０コピー、特定の実施形態において８）ＶＨ－ＣＨ１ドメイン（例えば、いずれも本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片の（好ましくは同じ）ＶＨを含む）を含む重鎖を含み得る。従来の抗体と比較した追加のＶＨ－ＣＨ１ドメインは、ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３配列の上流および／または下流に配置され得る。そのような多量体抗体における軽鎖は、ＶＬおよび定常ドメインからなる従来の軽鎖であり得る。

【０１７７】

多価抗体を作製するための代替方法は、抗体または抗原結合断片の化学重合／架橋を含む。

【０１７８】

本発明の抗体は、添付の実施例に記載されるような免疫化方法および選択方法を使用して作製され得る。

【０１７９】

本発明の抗体および抗体抗原結合断片を生成または単離するための別の適切な方法としては、限定されないが、目的の結合活性を使用してペプチドまたはタンパク質ライブラリー（例えば、限定されないが、バクテリオファージ、リボソーム、オリゴヌクレオチド、ＲＮＡ、ｃＤＮＡまたは酵母ディスプレイライブラリー）から組換え抗体を選択する方法が挙げられる。例えば、抗体または抗原結合断片は、式Ｉの糖ペプチドへの特異的結合について陽性選択し、式ＩＩＩの糖ペプチドおよび／または式ＩＶのコア－フコシル化グリカンおよび／または配列番号２もしくは２５のペプチドへの結合について陰性選択することによって、そのようなライブラリーから選択することができる。ディスプレイライブラリーは、当技術分野で周知であり、例えば、限定されないが、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅｓｈｉｒｅ、ＵＫ）、ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ（Ｍａｒｔｉｎｓｒｉｅｄ／Ｐｌａｎｅｇｇ，Ｄｅｌ．）、Ｂｉｏｖａ

ｔｉｏｎ（Ａｂｅｒｄｅｅｎ，Ｓｃｏｔｌａｎｄ，ＵＫ）およびＢｉｏｉｎｖｅｎｔ（Ｌｕｎｄ、Ｓｗｅｄｅｎ）を含む様々な市販業者から入手可能である。ここでも、選択されたクローンは、その後の組換え処理のための慣例的な方法に従って処理することができる。

【０１８０】

本明細書に開示される抗体または抗原結合断片のバリアントは、本明細書に開示される配列を使用して日常的な組換えＤＮＡ技術を使用して生成することができる。例えば、組換えＤＮＡ技術を使用して、本明細書に開示される抗体および／または抗体抗原結合断片をコードする、例えば本明細書で上に記載の重鎖および／または軽鎖可変ドメインをコードするＤＮＡ配列を取り出しまたは修飾し得る。例えば、組換えＤＮＡ技術を使用して、目的の抗原（複数可）への特異的かつ選択的な結合を維持するために必要ではないコード配列（複数可）の一部を置換または除去し得る。そのような修飾または切断されたＤＮＡ分子から発現される分子も、本発明の抗体に包含される。

【０１８１】

本発明の抗体は、組換え発現され得る。したがって、特定の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は組換え抗体であり得る。組換え抗体を製造する方法は、当技術分野で公知である。抗体発現のための例示的な実施形態は、添付の実施例および本明細書の他の箇所に開示されている。

【０１８２】

第２の態様において、本発明は、本明細書に開示される１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または１，６ｆｕｃＡＦＰ抗原結合断片をコードする核酸分子またはポリヌクレオチドのセットを提供する。特に、本明細書中上記で定義されるような１，６ｆｕｃＡＦＰ重鎖および／または軽鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドが提供される。本明細書で使用される場合、「核酸分子」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」および類似の用語は、ゲノムＤＮＡとｃＤＮＡの両方、ならびに本発明の抗体または抗原結合断片の発現を駆動することができるＲＮＡを含む。本明細書で使用される場合、「ＲＮＡ」という用語は、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡおよびｒＲＮＡを含むが、ＲＮＡウイルスのＲＮＡの場合等、ゲノムＲＮＡも含む全ての形態のＲＮＡを含むことが理解される。好ましくは、「ＲＮＡ」と記載する実施形態はｍＲＮＡに関する。本発明の核酸分子／核酸配列は、天然ならびに合成または半合成起源のものであり得る。したがって、核酸分子は、例えば、有機化学の従来のプロトコルに従って、組換え方法に従って合成された、または半合成的に、例えば化学合成と組換え方法とを組み合わせることによって製造された核酸分子であり得る。当業者は、そのような核酸分子の調製および使用に精通している。「ポリヌクレオチドのセット」は、抗体または抗原結合断片の一部がコードされている少なくとも２つのポリヌクレオチドに関する。例えば、重鎖可変ドメインをコードする第１のポリヌクレオチドおよび軽鎖可変ドメインをコードする第２のポリヌクレオチドを使用してもよい。

【０１８３】

実施形態において、本発明の第１の態様との関連で開示されるＶＨおよびＶＬの組合せの１つをコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットが提供される。したがって、本明細書に記載の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体またはその抗原結合断片に関する態様および実施形態のそれぞれについて、それぞれの抗体または抗原結合断片をコードする対応するポリヌクレオチドが必要な変更を加えて提供される。

【０１８４】

特定の実施形態において、本発明の第一の態様との関連で規定される配列番号１１もしくは１２の抗体重鎖可変ドメインＶＨもしくはそのバリアント、および／または本発明の第１の態様との関連で規定される配列番号１３もしくは１４の抗体軽鎖可変ドメインもしくはそのバリアントをコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットが提供される。

【０１８５】

別の特定の実施形態において、配列番号１１のＶＨおよび配列番号１３のＶＬをコード

するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットが提供される。
【０１８６】
別の特定の実施形態において、配列番号１２のＶＨおよび配列番号１４のＶＬをコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットが提供される。
【０１８７】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、本発明の重鎖および／または軽鎖可変ドメインを含む全長抗体（例えば、ＩｇＧ）が発現されるように、重鎖および軽鎖可変ドメインだけでなく、残りの重鎖および／または軽鎖定常領域も確実に発現させるための、更なる配列を含み得る。
【０１８８】
第３の態様において、本発明の第２の態様によるポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを含むベクターが本明細書で提供される。特に、本発明の抗体または抗体抗原結合断片をコードする核酸分子を含むベクターが提供される。本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、導入された宿主細胞において自己複製することができる環状または線状の核酸分子に関する。本発明での使用に適したベクターの非限定的な例としては、コスミド、プラスミド（例えば、ネイキッド、またはリポソームに包含）、ウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）およびバクテリオファージが挙げられる。しかしながら、当技術分野は多くの適切なベクターを提供し、その選択は所望の機能に依存する。適切なベクターの開発および使用は、当技術分野において十分に文書化されており、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌ“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎ．Ｙ．（２００１）ａｎｄ Ａｕｓｕｂｅｌ，“Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ”，Ｇｒｅｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎ．Ｙ．（１９８９），（１９９４）に記載される技術を参照されたい。本発明に関連して使用されるベクターは、本明細書に開示される１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片をコードする核酸配列を含む。したがって、本明細書に記載のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰに特異的に結合するモノクローナル抗体または抗原結合断片に関する態様および実施形態のそれぞれについて、それぞれの抗体または抗原結合断片をコードする対応するポリヌクレオチドを含むベクターが本明細書で提供される。
【０１８９】
本明細書で使用される場合、「～を含むベクター」という用語に関して、宿主細胞における所望のベクター活性に必要および／または十分である、例えばベクターの複製を駆動する（したがって、コードする核酸配列）および／または本発明の抗体もしくは抗原結合断片を発現するように宿主細胞に指示する更なる核酸配列がベクター中に存在することが当技術分野で理解される。そのような更なる核酸配列には、ベクター複製および／または特定の細胞系における所望の配列の発現を制御する配列が含まれるが、これらに限定されない。例えば、ベクターは、作動可能に連結されている、かつ／または調節配列の制御下の、本発明の抗体または抗体抗原結合断片をコードする核酸分子を含み得る。「調節配列」という用語は、それらが作動可能に連結されているコード配列の発現をもたらすのに必要なＤＮＡ配列を指す。「制御配列」という用語は、少なくとも、存在が発現にも必要でもあり得る全ての構成要素を含むことを意図しており、例えば複製を可能にするための追加の有利な構成要素を更に含み得る。当技術分野で理解されるように、そのような調節配列および制御配列の性質は、宿主生物に応じて異なる。例えば、原核生物において、制御配列は概して、プロモーター、リボソーム結合部位、およびターミネーターを含む。真核生物において、制御配列は、概してプロモーター、ターミネーター、およびいくつかの場合においてはエンハンサー、転写活性化因子または転写因子を含む。
【０１９０】
本発明で使用されるベクターは、好ましくは発現ベクターである。発現ベクターは、宿

主細胞における本発明の核酸分子の複製および発現を指示することができ、したがって、例えば、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰモノクローナル抗体または抗原結合断片の重鎖可変ドメインおよび／または軽鎖可変ドメインの発現を提供する。いくつかの実施形態において、ベクターは、本発明の重鎖および／または軽鎖可変ドメインを含む全長抗体（例えば、ＩｇＧ）が発現されるように、重鎖および軽鎖可変ドメインだけでなく、残りの重鎖および軽鎖定常領域も確実に発現させるための、更なる配列を含み得る。適切な発現ベクターは文献に広く記載されており、特定の細胞系のための適切な発現ベクターの決定は、慣例的な方法を使用して当業者によって容易に行うことができる。好ましくは、本明細書に開示されるベクターは、組換えポリヌクレオチド（すなわち、本発明のモノクローナル抗体をコードする核酸配列）ならびに発現可能に連結された制御配列を含む。本明細書で提供されるベクターは、好ましくはプロモーターを更に含む。本明細書に記載されるベクターはまた、選択マーカー遺伝子および宿主における複製を確保する複製起点を含み得る。さらに、本明細書において提供されるベクターはまた、転写のための終結シグナルを含み得る。当技術分野で公知の発現ベクターは、宿主細胞における一過性または構成的発現を駆動し得る。

【０１９１】

本発明の核酸分子および／またはベクターは、当技術分野で公知であるかまたは本明細書に記載される任意の手段によって、原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞へのトランスフェクションのために設計することができる。適切な方法の非限定的な例として、化学ベースの方法（ポリエチレンイミン、リン酸カルシウム、リポソーム、ＤＥＡＥ－デキストラン、ヌクレオフェクション）、非化学的方法（エレクトロポレーション、ソノポレーション、光トランスフェクション、遺伝子電気泳動、流体力学的送達、または細胞を本発明の核酸分子と接触させた際の天然形質転換）、粒子ベースの方法（遺伝子銃、マグネトフェクション、インパルフェクション）ファージベクターベースの方法およびウイルス法が挙げられる。例えば、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、セムリキ森林ウイルスまたはウシパピローマウイルス等のウイルスに由来する発現ベクターを、標的細胞集団への核酸分子のトランスフェクションに使用してもよい。さらに、バキュロウイルス系を、本発明の核酸分子の真核生物発現系におけるベクターとして使用することもできる。

【０１９２】

「原核生物」という用語は、本発明のタンパク質の発現のためにＤＮＡまたはＤＮＡもしくはＲＮＡ分子で形質転換、形質導入またはトランスフェクトすることができる全ての細菌を含むことを意味する。原核生物宿主としては、グラム陰性細菌ならびにグラム陽性細菌、例えば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、Ｓ・ティフィムリウム（Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、セラチア・マルセッセンス（Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃｅｎｓ）、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）（グルタミクム）、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）（フルオレッセンス）、ラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、ストレプトミセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）および枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）が挙げられる。「真核生物」という用語は、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞を含むことを意味する。当技術分野で典型的に使用される宿主細胞の非限定的な例としては、Ｈｅｌａ、ＨＥＫ２９３、Ｈ９、Ｐｅｒ．Ｃ６およびＪｕｒｋａｔ細胞、マウスＮＩＨ３Ｔ３、ＮＳ／０、ＳＰ２／０およびＣ１２７細胞、ＣＯＳ細胞、例えばＣＯＳ１またはＣＯＳ７、ＣＶ１、ウズラＱＣ１－３細胞、マウスＬ細胞、マウス肉腫細胞、ボーズメラノーマ細胞およびチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞が挙げられる。

【０１９３】

第４の態様によれば、本発明は、本発明の第２の態様のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、または第３の態様のベクターを含む宿主細胞に関する。宿主細胞は、本明細書で提供される１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片が発現されるように構成され得る。宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得る。好ましい実施形態に

おいて、宿主細胞は、真核細胞である。例示的な原核細胞および真核細胞は、本発明の第３の態様との関連において上に開示されている。特定の実施形態において、細胞はＨＥＫ細胞である。別の特定の実施形態において、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞である。

【０１９４】

本発明による宿主細胞は、真核細胞（例えば、ＨＥＫまたはＣＨＯ）であることが好ましい。本明細書に開示されるような抗体および抗原結合断片を原核生物および真核生物宿主細胞の両方において発現させることが可能であるが、真核生物細胞における抗体の発現が好ましく、哺乳動物宿主細胞における抗体の発現が最も好ましい。なぜなら、そのような真核生物細胞（特に、哺乳動物細胞が最も好ましい）は、免疫学的に活性であるような適切な翻訳後修飾を含有する、適切に折り畳まれた抗体／抗体断片を発現する可能性がより高いからである。

【０１９５】

本明細書に開示される抗体重鎖および／または軽鎖可変ドメインをコードする組換え発現ベクターが宿主細胞に導入される場合、抗体または抗体抗原結合断片は、宿主細胞において抗体または抗原結合断片を発現させるか、または好ましくは、宿主細胞が成長している培地中に抗体または抗原結合断片を分泌させるのに十分な期間にわたって宿主細胞を培養することによって製造される。抗体および／または抗原結合断片は、標準的なタンパク質精製方法を使用して培地から回収することができる。

【０１９６】

したがって、第５の態様において、本発明はまた、本発明の抗体または抗原結合断片を発現する本発明の宿主細胞を適切な条件下で培養すること、および製造された１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片を単離することを含む、本明細書に開示される１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体抗原結合断片の産生のための方法を提供する。

【０１９７】

形質転換された宿主細胞は、バイオリアクター内で成長させ、最適な細胞成長を達成するために当技術分野で公知の技術によって培養することができる。本発明の抗体および／または抗体抗原結合断片は、次いで任意の従来の手段、例えば限定されないが、アフィニティークロマトグラフィー（例えば、Ｓｔｒｅｐ－ｔａｇ　ＩＩまたはＨｉｓ$_6$タグ等の融合タグを使用する）、ゲル濾過（サイズ排除クロマトグラフィー）、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、逆相ＨＰＬＣまたは免疫沈降によって細胞画分または成長培地から単離され得る。

【０１９８】

第６の態様において、本発明の第５の態様による方法によって得ることが可能なまたは得られる１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片が本明細書で提供される。

【０１９９】

第７の態様において、本発明は、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクターまたは本発明の宿主細胞を含む組成物に関する。好ましい実施形態において、組成物は診断用組成物、すなわち診断用途に使用するための組成物である。好ましい実施形態において、組成物は、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ（すなわち、ＡＦＰ－Ｌ３の臨床的に重要な部分）を検出するためのｉｎｖｉｔｒｏ診断試験で使用するためのものである。好ましい実施形態において、診断用組成物は、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ（すなわち、ＡＦＰ－Ｌ３の臨床的に重要な部分）を検出するためのイムノアッセイ用試薬であり得る。診断用組成物は、好ましくは、対象から得られた試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ（すなわち、ＡＦＰ－Ｌ３の臨床的に重要な部分）の検出を可能にするように構成される。試料は、体液であってもよい。特定の実施形態において、試料は、血液試料（例えば、全血、血清または血漿）であり得る。

【０２００】

実施形態において、本発明の組成物が、好ましくはイムノアッセイを用いた、試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ（すなわち、ＡＦＰ－Ｌ３の臨床的に重要な部分）のｉｎ　ｖｉｔｒｏ検出（好ましくは定量）用組成物である。実施形態において、イムノアッセイは、異種イムノアッセイである。実施形態において、イムノアッセイは、サンドイッチイムノアッセイである。実施形態において、イムノアッセイは、競合的イムノアッセイである。実施形態において、イムノアッセイは、本発明のイムノアッセイである。

【０２０１】

本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗体抗原結合ドメイン、ならびにそれらの製造方法および使用方法は、診断ツールとして提供されるだけでなく、疾患および疾患症候の処置および改善における適用性、ならびに疾患療法を調査するためのモデルシステムにおける適用性を有することも想定される。したがって、本発明は、１つ以上の薬学的に許容される担体と、（ｉ）１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体またはその抗原結合断片；（ｉｉ）（ｉ）の抗体または抗原結合断片をコードするポリヌクレオチド；（ｉｉｉ）（ｉｉ）のポリヌクレオチドを含むベクター；または（ｉｖ）（ｉｉ）のポリヌクレオチドおよび／または（ｉ）の抗体もしくは抗原結合断片を発現する（ｉｉｉ）のベクターを含む宿主細胞とを含む医薬組成物を提供する。

【０２０２】

本明細書に開示される医薬組成物は、ヒトまたは動物対象への投与に適するように製剤化される。医薬製剤の製造において、本発明の抗体または抗原結合断片は、薬学的に許容され得る担体、賦形剤および／または希釈剤と混合される。担体、賦形剤および／または希釈剤は、当然、製剤中の任意の他の成分と適合性であるという意味で許容されなければならず、対象に有害であってはならない。抗体ベースの組成物と共に使用するのに適した医薬担体の例は当技術分野で周知であり、従来の方法によって製剤化することができる。

【０２０３】

第８の態様において、ｉｎ　ｖｉｔｒｏイムノアッセイ、特に試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ（またはα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含むその部分配列）を検出する（および任意に定量する）ためのｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイのための、本発明による１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体もしくは抗原結合断片、または本発明による組成物の使用が本明細書で提供される。α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰは、ＡＦＰ－Ｌ３のコア成分であるため、イムノアッセイは、試料中のＡＦＰ－Ｌ３を検出（および任意に定量）するためのイムノアッセイとも称され得る。

【０２０４】

試料は、限定されないが、血液試料、脳脊髄液、精液、唾液または尿等の組織スライドまたは体液であり得る。実施形態において、試料は、全血、血清または血漿等の血液試料である。実施形態において、試料は、血清または血漿である。

【０２０５】

イムノアッセイの非限定的な例は、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ＥＬＩＳＡ）、酵素イムノアッセイ（ＥＩＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、ウエスタンブロットアッセイ、または発光、蛍光、化学発光もしくは電気化学発光の検出に基づくイムノアッセイである。

【０２０６】

検出および／または定量のために１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片（本明細書で提供される異なる抗体）を使用する更なる例示的なイムノアッセイフォーマットは、欧州特許第３２５２０７３号、米国特許出願公開第２０１８／０１１０８８９号およびＥｇａｓｈｉｒａ　Ｙ　ｅｔ　ａｌ．（Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｒｅｐｏｒｔｓ，２０１９，９：１２３５９）にも記載されており、これらは全て、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２０７】

本発明による１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片（またはそれを含む組成物）を使用するイムノアッセイの原理は、１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片（また

はそれを含む組成物）を試料（α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む疑いがある、または含む）とインキュベートすることである。目的の分析物（すなわち、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ）が存在する場合、１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片とα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰとを含む検出複合体が、抗体抗原結合反応／結合によって形成される。α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを検出および／または定量するために、検出複合体の形成を検出してもよい。検出器複合体の形成を検出する方法は周知である。例えば、検出は、検出標識（例えば、本発明の抗体または抗原結合断片に結合する）を含み得る。

【０２０８】

したがって、本発明の第８の態様による使用は、

ａ）α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む試料を、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰと本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片とを含む検出複合体が形成されるように、本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片とインキュベートすることと、

ｂ）検出用複合体を検出することにより、試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰの存在またはレベルを検出することと、を含み得る。

【０２０９】

添付の実施例に示すように、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む試料の前処理（例えば、還元前処理）を用いることにより、イムノアッセイにおけるシグナルを大幅に増加させることができた。前処理は、本発明の抗体または抗原結合断片のエピトープの接近可能性を促進するようである。

【０２１０】

したがって、第８の態様による使用は、好ましくは試料と本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片とのインキュベーションの前に、（本明細書の他の箇所に記載されるような）本発明による前処理剤を試料に添加することを含み得る。

【０２１１】

使用はまた、前処理後の試料の更なる希釈物、例えば、好ましくは本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片の試料への添加の前または添加と同時に、特定の体積を添加することによる試料の更なる希釈物を含み得る。言い換えれば、前処理剤の濃度は、検出複合体の形成に許容される濃度まで低下され得る。例えば、前処理剤の成分の濃度は、２～３倍に希釈されてもよい。

【０２１２】

実施形態において、前処理は還元前処理であり得る、すなわち還元剤（例えば、タンパク質還元剤）の試料への添加を含み得る。言い換えれば、前処理試薬は、還元剤を含み得るか、またはそれからなり得る。

【０２１３】

タンパク質還元剤は、タンパク質／ポリペプチド鎖内またはタンパク質／ポリペプチド鎖間のジスルフィド結合を還元／分解することができる還元剤である。

【０２１４】

前処理に使用される還元剤またはタンパク質還元剤の非限定的な例は、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、β－メルカプトエタノールおよびジチオブチルアミン（ＤＴＢＡ）である。実施形態において、還元剤またはタンパク質還元剤は、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）およびジチオブチルアミン（ＤＴＢＡ）から選択され得る。実施形態において、還元剤またはタンパク質還元剤は、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）およびトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）から選択され得る。実施形態において、還元剤またはタンパク質還元剤は、ＤＴＴであり得る。

【０２１５】

実施形態において、ｐＨ７でのＤＴＴの酸化還元電位の５０％～１５０％であるｐＨ７での酸化還元電位を有するタンパク質還元剤が使用される。ｐＨ７でのＤＴＴの酸化還元

電位は、－０．３３Ｖである。
【０２１６】
前処理時のｐＨは、還元性化合物が効率的な還元力を有するように選択される。当技術分野で周知のように、ＤＴＴは、例えば、ｐＨ６．５～９．０（好ましくはｐＨ７～８）でのみ効率的な還元活性を有する。ＴＣＥＰは、例えば、約１．５～約８．５のｐＨ範囲でレドックス活性である。
【０２１７】
（タンパク質）還元剤の濃度は変えることができ、使用される正確な還元剤に依存する。添付のＤＴＴの実施例に示すように、効率的な前処理に使用される濃度は、他の点では同一であるイムノアッセイを行う前に、異なる濃度の（タンパク質）還元剤を使用して、検出可能なレベルのα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む試料のイムノアッセイシグナルを比較することによって決定することができる。
【０２１８】
例示的には、ＤＴＴが（タンパク質）還元剤として使用される場合、前処理中の試料中のＤＴＴの最終濃度は、０．１ｍＭ～１００ｍＭ、０．１ｍＭ～６０ｍＭ、０．１ｍＭ～５０ｍＭまたは０．１ｍＭ～４７．８ｍＭであり得る。実施形態において、ＤＴＴの濃度は、少なくとも０．２ｍＭ、少なくとも０．３ｍＭ、少なくとも０．５ｍＭまたは少なくとも１ｍＭであり得る。実施形態において、ＤＴＴ濃度は、最大で１００ｍＭ、最大で６０ｍＭ、最大で５０ｍＭ、または最大で４７．８ｍＭであり得る。実施形態において、ＤＴＴの濃度は、２．２ｍＭであり得る。実施形態において、ＤＴＴの濃度は、２．３ｍＭであり得る。実施形態において、ＤＴＴは、前処理剤と試料との混合物中のＤＴＴの最終濃度は、０．６ｍＭ～１０７．８ｍＭであり得る。実施形態において、ＤＴＴは、前処理剤と試料との混合物中のＤＴＴの最終濃度は、０．７ｍＭ～１０７．８ｍＭであり得る。
【０２１９】
前処理剤中のＤＴＴの濃度は、前処理中の試料の最終混合物中よりも高い。例えば、前処理剤は、２倍～２０倍または２倍～１０倍濃縮物（例えば、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、１７倍、１８倍、１９倍または２０倍濃縮物）、すなわち、原液であってもよい。
【０２２０】
試料の前処理に使用される前処理剤は、イオンに結合するキレート剤等のキレート剤を更に含んでもよい。このようなキレート剤を添加すると、前処理剤の安定性が向上することが分かった。特定の実施形態において、キレート剤は、イオンに結合するキレート剤であってもよい。より具体的な実施形態において、キレート剤は、二価イオンに結合するキレート剤であってもよい。
【０２２１】
（二価）イオンに結合するためのキレート剤の非限定的な例は、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）およびジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）等のアミノポリカルボン酸、またはポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、エチレングリコール－ビス（β－アミノエチルエーテル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）である。
【０２２２】
キレート剤の更なる非限定的な例は、ＤＴＰＡ、ＥＣ、ＤＭＳＡ、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ、Ｃｙ－ＥＤＴＡ、ＥＤＴＭＰ、ＤＴＰＡ、ＤＴＰＡ、ＣｙＤＴＰＡ、Ｃｙ２ＤＴＰＡ、ＢＯＰＴＡ、ＤＴＰＡ－ＭＡ、ＤＴＰＡ－ＢＡ、ＤＴＰＭＰ、ＤＯＴＡ、ＴＲＩＴＡ、ＴＥＴＡ、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＴＡ－ＭＡ、ＨＰ－ＤＯ３Ａ、ｐＮＢ－ＤＯＴＡ、ＤＯＴＰ、ＤＯＴＭＰ、ＤＯＴＥＰ、ＤＯＴＰＰ、ＤＯＴＢｚＰ、ＤＯＴＰＭＥ、ＨＥＤＰ、ＤＴＴＰ、ａｎＮ３Ｓトリアミドチオール、ＤＡＤＳ、ＭＡＭＡ、ＤＡＤＴ、Ｎ２Ｓ４ジアミンテトラチオール、Ｎ２Ｐ２ジチオール－ビスホスフィン、６－ヒドラジノニコチン酸、プロピレンアミンオキシム、テトラアミン、シクラム、またはそれらの組合せである。
【０２２３】
いくつかの実施形態において、キレート剤は、ＥＤＴＡである。

【０２２４】
試料の前処理中のキレート剤の濃度は変えることができ、使用される正確なキレート剤および還元剤に依存し得る。有用な濃度範囲は、異なる濃度のキレート剤を使用して、検出可能なレベルのα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む別個の試料の免疫アッセイシグナルを比較することによって決定することができる。
【０２２５】
例えば、ＥＤＴＡを使用する場合、試料の前処理中の例示的な濃度は、０．１ｍＭ～５０ｍＭ、０．１ｍＭ～２０ｍＭ、０．１ｍＭ～１０ｍＭ、０．１ｍＭ～５ｍＭおよび０．１ｍＭ～４ｍＭである。
【０２２６】
実施形態において、前処理剤は、緩衝物質（本明細書では緩衝剤とも呼ばれる）を更に含む。緩衝剤は、タンパク質還元剤がジスルフィド結合を還元するのに必要なｐＨに応じて選択され得る。
【０２２７】
実施形態において、前処理剤は、タンパク質還元剤およびイオンのためのキレート剤（例えば二価イオン）および任意に緩衝剤を含むかまたはそれらからなる。
【０２２８】
実施形態において、前処理剤は、ＤＴＴおよびＥＤＴＡと、任意に緩衝液とを含む。
【０２２９】
試料の前処理は、異なる時間に行ってもよい。例えば、前処理は、１分～３０分、２分～２０分または３分～１０分で行われ得る。いくつかの実施形態において、前処理を９分間行ってもよい。
【０２３０】
実施形態において、前処理は、試料をｐＨ６．５～９．０（好ましくはｐＨ７～８）のＤＴＴと共に所定の時間（例えば、少なくとも２、３、４、５、６、７、８または９分）インキュベートすることであり得る。任意に、上記のようなキレート剤（例えばＥＤＴＡ）も存在してもよい。実施形態において、前処理はまた、試料中のｐＨを７超に調整する緩衝液（例えば、１０ｍＭ～２００ｍＭ、３０ｍＭ～１５０ｍＭ、５０ｍＭ～１３０ｍＭ、または１００ｍＭの濃度のトリス）の試料への添加を含み得る。前処理の後、検出複合体が依然として形成され得るように、ＤＴＴの濃度を低下させてもよい。
【０２３１】
実施形態において、使用は、試料を、本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片とのＡＦＰへの結合について競合しないＡＦＰ特異的抗体とインキュベートすることを更に含み得る。これらの実施形態において、検出複合体は、当該ＡＦＰ特異的抗体、すなわち、本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ、および本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片とのＡＦＰへの結合について競合しないＡＦＰ特異的抗体を含むサンドイッチを更に含む。前処理を用いる実施形態において、抗体が前処理剤の存在下でもＡＦＰに結合することができるように、ＡＦＰ特異的抗体を選択するものとする。
【０２３２】
本発明の抗体と結合について競合しないＡＦＰ特異的抗体の非限定的な例は、市販の抗ＡＦＰ抗体Ｔｕ１１（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　Ｄｅｕｔｓｃｈｌａｎｄ　ＧｍｂＨ、材料番号：１１４９２０８０１０３）である。したがって、本発明の抗体とＡＦＰへの結合について競合しない抗体は、Ｔｕ１１と同じエピトープを有する抗体もしくはその抗原結合断片であり得るか、またはＴｕ１１抗体とＡＦＰへの結合について競合し得る。添付の実施例によって実証されるように、Ｔｕ１１抗体は、本発明による試料の前処理とも適合する。
【０２３３】
実施形態において、使用は、本発明の抗体または抗原結合断片とのインキュベーションの前に、試料に含まれるα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを糖ペプチドおよびペプチ

ド（例えば、プロテアーゼを使用して）に消化することを含み得、当該糖ペプチドは、ＡＦＰ（例えば、本明細書の他の箇所に記載される）のα－１，６－コア－フコシル化Ａｓｎ－２５１を含む部分ＡＦＰ配列を含む。任意に、糖ペプチドまたはペプチドを生成するための薬剤は、本発明の抗体または抗原結合断片を添加する前に除去または不活性化され得る。次いで、試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰの存在またはレベルを、ＡＦＰのα－１，６－コア－フコシル化Ａｓｎ－２５１を含む部分ＡＦＰ配列および本発明の抗体または抗原結合断片を含む検出複合体の検出に基づいて決定され得る。

【０２３４】

本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片を用いるイムノアッセイは、異種イムノアッセイであってもよい。

【０２３５】

追加的または代替的に、本発明による１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片は、サンドイッチイムノアッセイ（例えば、異種サンドイッチイムノアッセイ）に使用され得る。

【０２３６】

実施形態において、イムノアッセイは、免疫組織化学（ＩＨＣ）アッセイであり得る。

【０２３７】

実施形態において、イムノアッセイは、式Ｉの糖ペプチドまたは式Ｉの糖ペプチドを含む糖タンパク質を検出するためのものであり得る。

【０２３８】

本開示から明らかなように、本発明の抗体および抗原結合断片は、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列を、（ｉ）ＡＦＰまたはα－１，６－コア－フコシル化を欠く部分ＡＦＰ配列および／または（ｉｉ）ＡＦＰ以外のα－１，６－コア－フコシル化タンパク質と区別することができる。したがって、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列を、（ｉ）ＡＦＰまたはα－１，６－コア－フコシル化を欠く部分ＡＦＰ配列および／または（ｉｉ）ＡＦＰ以外のα－１，６－コア－フコシル化タンパク質特別するための１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および抗原結合断片の使用も本明細書で提供される。

【０２３９】

第９の態様において、本発明は、本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片を使用して、試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列を検出するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏイムノアッセイ法を提供する。

【０２４０】

第８の態様による使用との関連で開示される実施形態は、必要な変更を加えて適用される。

実施形態において、第９の態様による方法は、

（ｉ）検出複合体を形成するように、本発明の抗体または抗原結合断片を、試料に含まれるα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列に結合させることと、

（ｉｉ）検出複合体を検出し、それによって試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列の存在および任意に量を決定することによって、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは当該α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列を検出することと、を含み得る。

【０２４１】

実施形態において、第９の態様による方法は、

ａ）α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む試料を、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰと本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片とを含む検出複合体が形成されるように、本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片とインキュベ

ートすることと、
ｂ）検出用複合体を検出することにより、試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰの存在またはレベルを検出することと、を含み得る。
【０２４２】
添付の実施例に示すように、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む試料の前処理（例えば、還元前処理）を用いることにより、イムノアッセイにおけるシグナルを大幅に増加させることができた。前処理は、全長α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰに関連して、本発明の抗体または抗原結合断片のエピトープの接近可能性を促進するようである。
【０２４３】
したがって、本発明の第９の態様による方法は、好ましくは、試料と本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片とのインキュベーションの前に、本発明による前処理剤を試料に添加することを含み得る。
【０２４４】
したがって、第９の態様による方法は、
ａ）本発明による前処理試薬の存在下で試料（例えば、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む試料）をインキュベートすることと、
ｂ）α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰと本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片とを含む検出複合体が形成されるように、前処理された試料を本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片とインキュベートすることと、
ｃ）検出用複合体を検出することにより、試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰの存在またはレベルを検出することと、を含み得る。
【０２４５】
方法は、前処理後の試料の更なる希釈物、例えば、好ましくは本発明の抗体または抗原結合断片の試料への添加の前または添加と同時に、特定の体積を添加することによる試料の更なる希釈物を含み得る。言い換えれば、前処理剤の濃度は、検出複合体の形成に許容される濃度まで低下され得る。
【０２４６】
実施形態において、前処理は還元前処理であり得る、すなわち還元剤（例えば、タンパク質還元剤）の試料への添加を含み得る。言い換えれば、前処理試薬は、還元剤（例えば、タンパク質還元剤）を含むか、またはそれからなり得る。
【０２４７】
タンパク質還元剤は、タンパク質／ポリペプチド鎖内またはタンパク質／ポリペプチド鎖間のジスルフィド結合を還元／分解することができる還元剤である。
【０２４８】
前処理に使用される還元剤またはタンパク質還元剤の非限定的な例は、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、β－メルカプトエタノールおよびジチオブチルアミン（ＤＴＢＡ）である。実施形態において、還元剤またはタンパク質還元剤は、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）およびジチオブチルアミン（ＤＴＢＡ）から選択され得る。実施形態において、還元剤またはタンパク質還元剤は、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）およびトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）から選択され得る。実施形態において、還元剤またはタンパク質還元剤は、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）であり得る。
【０２４９】
実施形態において、ｐＨ７でのＤＴＴの酸化還元電位の５０％～１５０％であるｐＨ７での酸化還元電位を有するタンパク質還元剤が使用される。ｐＨ７でのＤＴＴの酸化還元電位は、－０．３３Ｖである。
【０２５０】
前処理時のｐＨは、還元性化合物が効率的な還元力を有するように選択される。当技術分野で周知のように、ＤＴＴは、例えば、６．５から９．０（好ましくはｐＨ７から８）

のｐＨ値で効率的な還元活性を有する。ＴＣＥＰは、例えば、約１．５～約８．５のｐＨ範囲でレドックス活性である。

【０２５１】

（タンパク質）還元剤の濃度は変えることができ、使用される正確な還元剤に依存する。添付のＤＴＴの実施例に示すように、効率的な前処理に使用される濃度は、他の点では同一であるイムノアッセイを行う前に、異なる濃度の（タンパク質）還元剤を使用して、検出可能なレベルのα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む試料のイムノアッセイシグナルを比較することによって決定することができる。

【０２５２】

例示的には、ＤＴＴが（タンパク質）還元剤として使用される場合、前処理中の試料中のＤＴＴの最終濃度は、０．１ｍＭ～１００ｍＭ、０．１ｍＭ～６０ｍＭ、０．１ｍＭ～５０ｍＭまたは０．１ｍＭ～４７．８ｍＭであり得る。実施形態において、ＤＴＴの濃度は、少なくとも０．２ｍＭ、少なくとも０．３ｍＭ、少なくとも０．５ｍＭまたは少なくとも１ｍＭであり得る。実施形態において、ＤＴＴ濃度は、最大で１００ｍＭ、最大で６０ｍＭ、最大で５０ｍＭ、または最大で４７．８ｍＭであり得る。実施形態において、ＤＴＴの濃度は、２．２ｍＭであり得る。実施形態において、ＤＴＴの濃度は、２．３ｍＭであり得る。実施形態において、ＤＴＴは、前処理剤と試料との混合物中のＤＴＴの最終濃度は、０．６ｍＭ～１０７．８ｍＭであり得る。実施形態において、ＤＴＴは、前処理剤と試料との混合物中のＤＴＴの最終濃度は、０．７ｍＭ～１０７．８ｍＭであり得る。

【０２５３】

前処理剤中のＤＴＴの濃度は、前処理中の試料の最終混合物中よりも高い。例えば、前処理剤は、２倍～２０倍または２倍～１０倍濃縮物（例えば、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、１７倍、１８倍、１９倍または２０倍濃縮物）、すなわち、原液であってもよい。

【０２５４】

試料の前処理に使用される前処理剤は、イオンに結合するキレート剤等のキレート剤を更に含んでもよい。そのようなキレート剤は、ＤＴＴ等の還元剤を含む前処理剤の安定性を改善することが見出されている。特定の実施形態において、キレート剤は、イオンに結合するキレート剤であってもよい。より具体的な実施形態において、キレート剤は、二価イオンに結合するキレート剤であってもよい。

【０２５５】

（二価）イオンに結合するためのキレート剤の非限定的な例は、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）およびジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）等のアミノポリカルボン酸、またはポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、エチレングリコール－ビス（β－アミノエチルエーテル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）である。

【０２５６】

キレート剤の更なる非限定的な例は、ＤＴＰＡ、ＥＣ、ＤＭＳＡ、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ、Ｃｙ－ＥＤＴＡ、ＥＤＴＭＰ、ＤＴＰＡ、ＣｙＤＴＰＡ、Ｃｙ２ＤＴＰＡ、ＢＯＰＴＡ、ＤＴＰＡ－ＭＡ、ＤＴＰＡ－ＢＡ、ＤＴＰＭＰ、ＤＯＴＡ、ＴＲＩＴＡ、ＴＥＴＡ、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＴＡ－ＭＡ、ＨＰ－ＤＯ３Ａ、ｐＮＢ－ＤＯＴＡ、ＤＯＴＰ、ＤＯＴＭＰ、ＤＯＴＥＰ、ＤＯＴＰＰ、ＤＯＴＢｚＰ、ＤＯＴＰＭＥ、ＨＥＤＰ、ＤＴＴＰ、ａｎＮ３Ｓトリアミドチオール、ＤＡＤＳ、ＭＡＭＡ、ＤＡＤＴ、Ｎ２Ｓ４ジアミンテトラチオール、Ｎ２Ｐ２ジチオール－ビスホスフィン、６－ヒドラジノニコチン酸、プロピレンアミンオキシム、テトラアミン、シクラム、またはそれらの組合せである。

【０２５７】

いくつかの実施形態において、キレート剤は、ＥＤＴＡである。

【０２５８】

試料の前処理中のキレート剤の濃度は変えることができ、使用される正確なキレート剤および還元剤に依存し得る。有用な濃度範囲は、異なる濃度のキレート剤を使用して、検出可能なレベルのα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む別個の試料の免疫アッセイ

シグナルを比較することによって決定することができる。
【０２５９】
例えば、ＥＤＴＡを使用する場合、試料の前処理中の例示的な濃度は、０．１ｍＭ～５０ｍＭ、０．１ｍＭ～２０ｍＭ、０．１ｍＭ～１０ｍＭ、０．１ｍＭ～５ｍＭである。
【０２６０】
実施形態において、前処理剤は、緩衝物質（本明細書では緩衝剤とも呼ばれる）を更に含む。緩衝剤は、タンパク質還元剤がジスルフィド結合を還元するのに必要なｐＨに応じて選択され得る。
【０２６１】
実施形態において、前処理剤は、タンパク質還元剤およびイオンのためのキレート剤（例えば二価イオン）および任意に緩衝剤を含むかまたはそれらからなる。
【０２６２】
実施形態において、前処理剤は、ＤＴＴおよびＥＤＴＡと、任意に緩衝液とを含む。
【０２６３】
試料の前処理は、異なる時間に行ってもよい。例えば、前処理は、１分～３０分、２分～２０分または３分～１０分で行われ得る。いくつかの実施形態において、前処理を９分間行ってもよい。
【０２６４】
実施形態において、前処理は、試料をｐＨ６．５～９．０（好ましくはｐＨ７～８）のＤＴＴと共に所定の時間（例えば、少なくとも２、３、４、５、６、７、８または９分）インキュベートすることであり得る。任意に、上記のようなキレート剤（例えばＥＤＴＡ）も存在してもよい。実施形態において、前処理はまた、試料中のｐＨを７超に調整する緩衝液（例えば、１０ｍＭ～２００ｍＭ、３０ｍＭ～１５０ｍＭ、５０ｍＭ～１３０ｍＭ、または１００ｍＭの濃度のトリス）の試料への添加を含み得る。そのようなｐＨは、ＤＴＴの還元電位を確実にする。好ましくは、ｐＨは、７～１０、７～９、または７～８のｐＨに調整され得る。
【０２６５】
前処理の後、検出複合体が依然として形成され得るように、ＤＴＴの濃度を低下させてもよい。
【０２６６】
実施形態において、第９の態様の方法は、試料を、本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片とのＡＦＰへの結合について競合しないＡＦＰ特異的抗体とインキュベートすることを更に含み得る。これらの実施形態において、検出複合体は、当該ＡＦＰ特異的抗体、すなわち、本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ、および本発明の１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片とのＡＦＰへの結合について競合しないＡＦＰ特異的抗体を含むサンドイッチを更に含む。前処理を用いる実施形態において、抗体が前処理剤の存在下でもＡＦＰに結合することができるように、ＡＦＰ特異的抗体を選択するものとする。
【０２６７】
本発明の抗体と結合について競合しないＡＦＰ特異的抗体の非限定的な例は、市販の抗ＡＦＰ抗体Ｔｕ１１（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　Ｄｅｕｔｓｃｈｌａｎｄ　ＧｍｂＨ、材料番号：１１４９２０８０１０３）である。したがって、本発明の抗体とＡＦＰへの結合について競合しない抗体は、Ｔｕ１１と同じエピトープを有する抗体もしくはその抗原結合断片であり得るか、またはＴｕ１１抗体とＡＦＰへの結合について競合し得る。添付の実施例によって実証されるように、Ｔｕ１１抗体は、本発明による試料の前処理とも適合する。
【０２６８】
実施形態において、第９の態様の方法は、本発明の抗体または抗原結合断片とのインキュベーションの前に、試料に含まれるα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを糖ペプチドおよびペプチド（例えば、プロテアーゼを使用して）に消化することを含み得、当該糖ペ

プチドは、ＡＦＰ（例えば、本明細書の他の箇所に記載される）のα－１，６－コア－フコシル化Ａｓｎ－２５１を含む部分ＡＦＰ配列を含む。任意に、糖ペプチドまたはペプチドを生成するための薬剤は、本発明の抗体または抗原結合断片を添加する前に除去または不活性化され得る。次いで、試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰの存在またはレベルを、ＡＦＰのα－１，６－コア－フコシル化Ａｓｎ－２５１を含む部分ＡＦＰ配列および本発明の抗体または抗原結合断片を含む検出複合体の検出に基づいて決定され得る。

【０２６９】

実施形態において、第９の態様による方法は、異種イムノアッセイであり得る。実施形態において、第９の態様による方法は、サンドイッチイムノアッセイ（例えば、異種サンドイッチイムノアッセイ）であり得る。実施形態において、第９の態様による方法は免疫組織化学（ＩＨＣ）アッセイであり得、試料は組織スライドであり得る。実施形態において、第９の態様による方法は、体液イムノアッセイであり、試料は体液である。

【０２７０】

第９の態様による方法で使用される試料は、限定されないが、血液試料、脳脊髄液、精液、唾液または尿等の組織スライドまたは体液であり得る。実施形態において、試料は、全血、血清または血漿等の血液試料である。実施形態において、試料は、血清または血漿である。

【０２７１】

第９の態様による方法は、対象から以前に得られた試料に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ法である。

【０２７２】

当技術分野で知られているように、ＡＦＰ－Ｌ３は有用なマーカーであり、好ましくは早期肝細胞がん（ＨＣＣ）の検出のための他のマーカーと併せて、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰはＡＦＰ－Ｌ３のコア成分である。

【０２７３】

したがって、ＨＣＣの検出または検出を補助するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法であって、

ａ）第９の態様に記載の方法を用いて、対象から得られた試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰのレベルを決定することと、

ｂ）試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰの決定されたレベルを、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰの基準レベルと比較することと、

ｃ）ＨＣＣの検出を補助すること、または比較に基づいてＨＣＣを検出することと、を含む方法が本明細書で提供される。

【０２７４】

特に、ＡＦＰ－Ｌ３、したがってα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰもまた、ＨＣＣを検出するためのスコアにおいて他のバイオマーカーおよび／または臨床的もしくは人口統計学的情報と組み合わせて頻繁に使用される－例示的なスコアは、性別、年齢、ＡＦＰ－Ｌ３、ＡＦＰおよびＤＣＰ（ＰＩＶＫＡ－ＩＩとしても知られる）を含むいわゆるＧＡＬＡＤスコアである。

【０２７５】

その結果、ＨＣＣの検出を補助するための、またはＨＣＣを検出するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法であって、

ａ）本発明の第９の態様に記載の方法を用いて、対象から得られた試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰのレベルを決定することと、

ｂ）決定されたα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰのレベルを考慮してＨＣＣ検出のスコアを計算することと、

ｃ）（例えば、ＨＣＣを示す当該スコアの基準値と比較することによって）計算されたスコアに基づいてＨＣＣの検出を補助すること、またはＨＣＣを検出することとを含む、方法が本明細書で提供される。

【０２７６】

ＨＣＣ検出のスコアは、ＨＣＣ検出のための少なくとも１つの追加のバイオマーカー（例えば、ＡＦＰまたはＤＣＰ）のレベルを考慮に入れてもよい。したがって、方法は、試料または対象から採取された別の試料（例えば、同時に）中の当該少なくとも１つの追加のＨＣＣバイオマーカーのレベルを決定または受信することを更に含み得る。

【０２７７】

ＨＣＣ検出のスコアは、追加的または代替的に、対象の臨床パラメータ（例えば、超音波データ）または人口統計学的情報（例えば、年齢および／または性別）を考慮に入れてもよい。したがって、本方法は、対象の当該臨床パラメータまたは当該人口統計学的情報を受信することを更に含んでもよい。

【０２７８】

特定の実施形態において、ＨＣＣ検出のスコアは、試料中のＡＦＰのレベルおよびＤＣＰのレベル、ならびに対象の性別および年齢を含み得る、すなわちＧＡＬＡＤスコアであり得る。したがって、本方法は、対象から（例えば、同時に）採取された試料または別の試料中のＡＦＰのレベルおよびＤＣＰのレベル（ＰＩＶＫＡ－ＩＩ）を決定または受信すること、ならびに対象の年齢および性別を受信することを更に含み得る。

【０２７９】

ＨＣＣを検出するためのコンピュータ実装方法であって、

ａ）本発明の第９の態様に記載の方法を用いて、対象から得られた試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰのレベルを受信することと、

ｂ）決定されたα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰのレベルを考慮してＨＣＣ検出のスコアを計算することと、

ｃ）（例えば、ＨＣＣを示す当該スコアの基準値と比較することによって）計算されたスコアに基づいてＨＣＣの検出を補助すること、またはＨＣＣを検出することとを含む、方法が本明細書で提供される。

【０２８０】

本発明の第９の態様による方法を使用して対象から得られた試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰの決定されたレベルを考慮したスコアを使用してＨＣＣを検出するための上述のｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法の実施形態は、更なるバイオマーカーのレベルを受信し、決定されないという唯一の例外を除いて、必要な変更を加えて適用される。

【０２８１】

第１０の態様において、本発明は、還元剤を含む、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰの検出のためのイムノアッセイ（例えば、本発明の抗体または抗原結合断片を使用する）に使用するための前処理試薬を提供する。

【０２８２】

前処理試薬という用語は、本明細書では「前処理剤（ｐｒｅｔｒｅａｔｍｅｎｔ　ａｇｅｎｔ）」、「前処理剤（ｐｒｅｔｒｅａｔｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）」および「前処理試薬」という用語と互換的に使用され、試料に含まれるα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰへの１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体の結合を促進するために試料（例えば、血清または血漿等の血液試料）に適用される前処理組成物に関する。

【０２８３】

いくつかの実施形態において、本開示の第１０の態様の前処理試薬は、還元剤がタンパク質還元剤であってもよい。言い換えれば、前処理試薬は、タンパク質還元剤を含み得るか、またはそれからなり得る。

【０２８４】

タンパク質還元剤は、タンパク質／ポリペプチド鎖内またはタンパク質／ポリペプチド鎖間のジスルフィド結合を還元／分解することができる還元剤である。

【０２８５】

還元剤またはタンパク質還元剤の非限定的な例は、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、β－メルカプトエタノールおよびジチオブチルアミン（ＤＴＢＡ）である。実施形態において、還元剤またはタンパク質

還元剤は、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）およびジチオブチルアミン（ＤＴＢＡ）から選択され得る。実施形態において、還元剤またはタンパク質還元剤は、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）およびトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）から選択され得る。実施形態において、還元剤またはタンパク質還元剤は、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）であり得る。

【０２８６】

実施形態において、還元剤は、ｐＨ７でのＤＴＴの酸化還元電位の５０％～１５０％であるｐＨ７での酸化還元電位を有するタンパク質還元剤であり得る。ｐＨ７でのＤＴＴの酸化還元電位は、－０．３３Ｖである。

【０２８７】

前処理試薬のｐＨは、広い範囲で選択することができ、前処理剤に含まれる成分に応じて変得てもよい。必要に応じて、還元電位が可能な限り高くなるようにｐＨを選択してもよく、または還元剤の安定性（貯蔵寿命）が保たれるようにｐＨを選択することができる。実施形態において、ｐＨは、前処理試薬が添加される試料のｐＨが、試料に添加された後の還元剤の還元活性を可能にするｐＨに調整されるように選択され得る。

【０２８８】

例示的には、還元剤はＤＴＴであり、前処理剤のｐＨはｐＨ６．５未満（例えば、ｐＨ４～６．５、ｐＨ５～６．５、ｐＨ５～６．５またはｐＨ５．５～６．５）に選択される。この範囲のｐＨ値は、ＤＴＴを安定化させる、すなわち前処理剤のより長い貯蔵を可能にする。

【０２８９】

前処理剤中の（タンパク質）還元剤の濃度は変えることができ、使用される正確な還元剤および前処理剤が最終使用濃度にわたって濃縮される因子に依存する。さらに、還元剤の安定性は、正確な濃度に依存し得る。当業者は、試料（例えば、血漿または血清等の血液試料）中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰへの１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片の結合を容易にするように、前処理剤中の還元剤の濃度を選択することができる。例えば、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む対照試料を使用し、前処理剤中の異なる濃度の還元剤を使用するイムノアッセイのシグナルを比較してもよく、最も高いイムノアッセイシグナルを有する濃度を選択してもよい。例示的なアッセイを添付の実施例に記載する。

【０２９０】

例示的には、ＤＴＴが還元剤として使用される場合、前処理剤中の濃度は、０．１ｍＭ～１００ｍＭ、０．１ｍＭ～６０ｍＭ、０．１ｍＭ～５０ｍＭまたは０．１ｍＭ～４７．８ｍＭの前処理の間の試料中のＤＴＴの最終濃度が達成され得るように（例えば、前処理試薬の添加によって試料を２倍超、３倍超、４倍超、５倍超または１０倍超希釈せずに）選択され得る。実施形態において、前処理剤中の濃度は、少なくとも０．２ｍＭ、少なくとも０．３ｍＭ、少なくとも０．５ｍＭまたは少なくとも１ｍＭの前処理の間の試料中のＤＴＴの最終濃度が達成され得るように（例えば、前処理試薬の添加によって試料を２倍超、３倍超、４倍超、５倍超または１０倍超希釈せずに）選択され得る。実施形態において、前処理剤中のＤＴＴ濃度は、最大で１００ｍＭ、最大で６０ｍＭ、最大で５０ｍＭ、または最大で４７．８ｍＭの前処理の間の試料中のＤＴＴの最終濃度が達成され得るように（例えば、前処理試薬の添加によって試料を２倍超、３倍超、４倍超、５倍超または１０倍超希釈せずに）選択され得る。実施形態において、前処理剤中の濃度は、２．２ｍＭの前処理の間の試料中のＤＴＴの最終濃度が達成され得るように（例えば、前処理試薬の添加によって試料を２倍超、３倍超、４倍超、５倍超または１０倍超希釈せずに）選択され得る。実施形態において、前処理剤中の濃度は、２．３ｍＭの前処理の間の試料中のＤＴＴの最終濃度が達成され得るように（例えば、前処理試薬の添加によって試料を２倍超、３倍超、４倍超、５倍超または１０倍超希釈せずに）選択され得る。実施形態において、前処理剤中のＤＴＴの濃度は、０．７ｍＭ～１０７．８ｍＭの前処理の間の試料中のＤＴＴの最終濃度が達成され得るように（例えば、前処理試薬の添加によって試料を２倍超

、３倍超、４倍超、５倍超または１０倍超希釈せずに）選択され得る。実施形態において、前処理剤中のＤＴＴの濃度は、０．６ｍＭ～１０７．８ｍＭの前処理の間の試料中のＤＴＴの最終濃度が達成され得るように（例えば、前処理試薬の添加によって試料を２倍超、３倍超、４倍超、５倍超または１０倍超希釈せずに）選択され得る。

【０２９１】

前処理剤中の還元剤（例えばＤＴＴ）の例示的な濃度は、０．１ｍＭ～１５０ｍＭ、０．１ｍＭ～１１０ｍＭ、０．５ｍＭ～１００ｍＭ、１ｍＭ～５０ｍＭ、１ｍＭ～２０ｍＭまたは１ｍＭ～１０ｍＭであり得る。実施形態において、前処理剤中の還元剤（例えばＤＴＴ）の濃度は、１ｍＭ～１０ｍＭ（例えば１０ｍＭ）であり得る。実施形態において、前処理剤中の還元剤（例えばＤＴＴ）の濃度は、３ｍＭ～１１０ｍＭであり得る。

【０２９２】

実施形態において、前処理剤は、２倍～２０倍または２倍～１０倍濃縮物（例えば、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、１７倍、１８倍、１９倍または２０倍濃縮物）、すなわち、原液であってもよい。いくつかの実施形態において、前処理剤は、４～８倍濃縮物であってもよい。

【０２９３】

本発明の第１０の態様にかかる前処理剤は、イオンに結合するキレート剤等のキレート剤を更に含んでもよい。このようなキレート剤の添加により、ＤＴＴ等の還元剤を含む前処理試薬の安定性が向上することが分かった。特定の実施形態において、キレート剤は、イオンに結合するキレート剤であってもよい。より具体的な実施形態において、キレート剤は、二価イオンに結合するキレート剤であってもよい。

【０２９４】

（二価）イオンに結合するためのキレート剤の非限定的な例は、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）およびジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）等のアミノポリカルボン酸、またはポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、またはエチレングリコール－ビス（β－アミノエチルエーテル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）である。

【０２９５】

キレート剤の更なる非限定的な例は、ＤＴＰＡ、ＥＣ、ＤＭＳＡ、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ、Ｃｙ－ＥＤＴＡ、ＥＤＴＭＰ、ＤＴＰＡ、ＣｙＤＴＰＡ、Ｃｙ２ＤＴＰＡ、ＢＯＰＴＡ、ＤＴＰＡ－ＭＡ、ＤＴＰＡ－ＢＡ、ＤＴＰＭＰ、ＤＯＴＡ、ＴＲＩＴＡ、ＴＥＴＡ、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＴＡ－ＭＡ、ＨＰ－ＤＯ３Ａ、ｐＮＢ－ＤＯＴＡ、ＤＯＴＰ、ＤＯＴＭＰ、ＤＯＴＥＰ、ＤＯＴＰＰ、ＤＯＴＢｚＰ、ＤＯＴＰＭＥ、ＨＥＤＰ、ＤＴＴＰ、ａｎＮ３Ｓトリアミドチオール、ＤＡＤＳ、ＭＡＭＡ、ＤＡＤＴ、Ｎ２Ｓ４ジアミンテトラチオール、Ｎ２Ｐ２ジチオール－ビスホスフィン、６－ヒドラジノニコチン酸、プロピレンアミンオキシム、テトラアミン、シクラム、またはそれらの組合せである。

【０２９６】

いくつかの実施形態において、キレート剤は、ＥＤＴＡである。

【０２９７】

前処理剤中のキレート剤の濃度は変えることができ、使用される正確なキレート剤および前処理剤が最終使用濃度にわたって濃縮される因子に依存する。当業者は、試料（例えば、血漿または血清等の血液試料）中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰへの１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片の結合を容易にするように、前処理剤中のキレート剤の濃度を選択することができる。例えば、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む対照試料を使用し、前処理剤中の異なる濃度のキレート剤を使用するイムノアッセイのシグナルを比較してもよく、最も高いイムノアッセイシグナルおよび／またはより高い保存安定性を有する濃度を選択してもよい。例示的なアッセイを添付の実施例に記載する。

【０２９８】

例えば、ＥＤＴＡがキレート剤として使用される場合、試料の前処理中の例示的な濃度は、０．１ｍＭ～５０ｍＭ、０．１ｍＭ～２０ｍＭ、０．１ｍＭ～１０ｍＭ、０．１ｍＭ

～５ｍＭ（例えば４ｍＭ）である。

【０２９９】

実施形態において、前処理剤は、緩衝物質（本明細書では緩衝剤とも呼ばれる）を更に含む。緩衝剤は、タンパク質還元剤がジスルフィド結合を還元するのに必要なｐＨに応じて選択され得る。例えば、トリス、Ｈｅｐｅｓまたはクエン酸塩を使用してもよい。

【０３００】

実施形態において、前処理剤は、タンパク質還元剤およびイオンのためのキレート剤（例えば二価イオン）および任意に緩衝剤を含むかまたはそれらからなる。

【０３０１】

実施形態において、前処理剤は、ＤＴＴおよびＥＤＴＡと、任意に緩衝液とを含む。当該前処理剤は、４～５倍濃縮物であり得、８～１２ｍＭのＤＴＴ（例えば１０ｍＭ）および１～５ｍＭのＥＤＴＡ（例えば４．５ｍＭ）を含み得る。前処理試薬のｐＨは、ｐＨ５．５以下（例えば、ｐＨ４～５．５、またはｐＨ５．５）であってもよい。

【０３０２】

具体的な実施形態において、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ（例えば、本発明の抗体または抗原結合断片を使用する工程）の検出のためのイムノアッセイに使用するための前処理試薬のセットが提供される。前処理試薬の当該セットは、それぞれ別々の容器に提供される第１および第２の前処理組成物を含み得る。第１の前処理組成物は、第１０の態様との関連で定義される前処理剤のいずれかであってもよく、還元剤を含む。第１前処理組成物のｐＨは、成分の安定性が高くなるように選択されることが好ましい。

【０３０３】

第２の前処理組成物は、緩衝液を含んでもよく、第１および第２の前処理組成物の両方が試料に添加された場合に還元剤の還元活性を可能にするｐＨおよび緩衝液濃度を有してもよい。

【０３０４】

特定の実施形態において、第１の前処理組成物は、ＤＴＴおよびＥＤＴＡを含み得る。当該前処理剤は、４～５倍濃縮物であり得、８～１２ｍＭのＤＴＴ（例えば１０ｍＭ）および１～５ｍＭのＥＤＴＡ（例えば２ｍＭ）を含み得る。前処理試薬のｐＨは、ｐＨ５．５以下（例えば、ｐＨ４～５．５、またはｐＨ５．５）であってもよい。第２の前処理組成物は、緩衝剤を含んでもよく、６．５～９、例えば７．５～８．５のｐＨを有してもよい。緩衝液濃度は、１０ｍＭ～１５０ｍＭ、２０ｍＭ～１００ｍＭ、または３０ｍＭ～８０ｍＭ（例えば１００ｍＭ）であり得る。緩衝液は、７～９、例えば７．５～８．５のｐＫａを有する緩衝液であり得る。実施形態において、緩衝液は、トリス（例えば、ｐＨ８．５）であり得る。

【０３０５】

第１１の態様において、本発明は、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片を含むキットを提供する。キットは、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは試料（例えば、血漿または血清等の血液試料）中の当該α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列の検出および／または定量のためのキットであり得る。キットは、試料（例えば、血漿または血清等の血液試料）中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰの検出および／または定量のためのキットであり得る。

【０３０６】

実施形態において、キットは、サンドイッチイムノアッセイ（例えば、異種サンドイッチイムノアッセイ）用のキット等のイムノアッセイキットであり得る。

【０３０７】

特定の実施形態において、本発明の第１１の態様によるキットは、本発明の前処理剤（上記を参照）または前処理剤のセット（上記を参照）を更に含む。実施形態において、抗体または抗原結合断片および前処理試薬は、別々の容器に提供される。

【０３０８】

添付の実施例において実証されるように、特に、本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体また

は抗原結合断片と本発明の前処理剤との組合せは、イムノアッセイ、例えば、本発明との関連で記載されるようなイムノアッセイを使用して、高シグナルで天然のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰの検出および定量を可能にする。

【０３０９】

本発明は、特に以下の項目にも関する。

【０３１０】

１．α－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）または前記α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列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断片。

【０３１１】

２．（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２または最大で２つのアミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアントを含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または最大で２つのアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３または１つのアミノ酸置換により改変されたそのバリアントを含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、

を含む、項目１に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

【０３１２】

３．（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２または最大で２つのアミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアントを含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１、または最大で２つのアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２または１つのアミノ酸置換によって改変されたそのバリアント；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３または１つのアミノ酸置換により改変されたそのバリアントを含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、

を含む、項目１または２に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

【０３１３】

４．全てのＣＤＲ配列におけるアミノ酸置換の総和が、最大で８、最大で７、最大で６、最大で５、最大で４、最大で３、または最大で２である、項目２または３に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

【０３１４】

５．（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ２、または１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、

（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ１、または１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、

を含む、項目１～４のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

【０３１５】

６．（ｉ）配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ１；配列番号４もしくは５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ２、または１つのアミノ酸置換によって改変された配列

番号４もしくは５のバリアント；および配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号７もしくは８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ１、または１つのアミノ酸置換によって改変された配列番号７もしくは８のバリアント；配列番号９のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ２；および配列番号１０のアミノ酸配列からなるＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、
を含む、項目１～５のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３１６】
７．配列番号４または５の前記バリアントにおけるアミノ酸置換（複数可）が、配列番号４の５位または配列番号５の４位におけるアミノ酸置換を含み、および／または配列番号７または８のバリアントにおけるアミノ酸置換（複数可）が、それぞれ配列番号７または８の７位におけるアミノ酸置換を含む、項目２～６のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３１７】
８．配列番号４または５の前記バリアントにおけるアミノ酸置換（複数可）が、配列番号４の５位における保存的アミノ酸置換または配列番号５の４位における保存的アミノ酸置換を含み、および／または配列番号７または８のバリアントにおけるアミノ酸置換が、配列番号７または８の７位における保存的アミノ酸置換（複数可）を含む、項目１～７のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３１８】
９．全ての前記アミノ酸置換が、保存的アミノ酸置換または高度に保存的なアミノ酸置換である、項目２～７のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３１９】
１０．配列番号４の５位もしくは配列番号５の４位の前記アミノ酸に対応する配列番号４もしくは５のバリアントにおけるアミノ酸がセリンまたはアスパラギンであり、および／または配列番号７もしくは８の７位のアミノ酸に対応する配列番号７もしくは８のバリアントのアミノ酸がセリンもしくはグリシンである、項２～８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３２０】
１１．配列番号４の５位または配列番号５の４位および／または配列番号７もしくは８の７位以外の全てのアミノ酸置換が、保存的または高度に保存的なアミノ酸置換である、項目７、８および１０のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３２１】
１２．前記保存的置換（複数可）が、アミノ酸の同じ群から選択される別のアミノ酸による置換であり、アミノ酸の前記群が、
ａ）Ｇｌｙ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、ＴｒｐおよびＭｅｔからなる非極性疎水性アミノ酸；
ｂ）Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、ＡｓｎおよびＧｌｎからなる極性中性アミノ酸；
ｃ）Ａｒｇ、ＬｙｓおよびＨｉｓからなる、正電荷を有する塩基性アミノ酸、ならびに
ｄ）ＡｓｐおよびＧｌｕからなる、負電荷を有する酸性アミノ酸、であり、
Ｃｙｓが保存的に置換される場合、それはＳｅｒまたはＡｌａで置換され、Ｐｒｏが保存的に置換される場合、それはＡｌａで置換される、
項目８、９または１１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３２２】
１３．前記高度に保存的なアミノ酸置換が以下から選択される、項目９、１１または１２に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片抗体：
ａ）Ｖａｌ、Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＧｌｙによるＡｌａの置換；
ｂ）ＬｙｓによるＡｒｇの置換；
ｃ）ＧｌｎによるＡｓｎの置換；

ｄ）ＧｌｕによるＡｓｐの置換；
ｅ）ＳｅｒによるＣｙｓの置換；
ｆ）ＡｓｎによるＧｌｎの置換；
ｇ）ＡｓｐによるＧｌｕの置換；
ｈ）ＡｌａによるＧｌｙの置換；
ｉ）ＡｒｇによるＨｉｓの置換；
ｊ）Ｌｅｕ、ＶａｌまたはＡｌａによるＩｌｅの置換；
ｋ）Ｉｌｅ、ＶａｌまたはＡｌａによるＬｅｕの置換；
ｌ）ＡｒｇによるＬｙｓの置換；
ｍ）Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＶａｌによるＭｅｔの置換；
ｎ）ＴｙｒまたはＴｒｐによるＰｈｅの置換；
ｏ）ＡｌａによるＰｒｏの置換；
ｐ）ＴｈｒによるＳｅｒの置換；
ｑ）ＳｅｒによるＴｈｒの置換；
ｒ）ＰｈｅまたはＴｙｒによるＴｒｐの置換；
ｓ）ＰｈｅまたはＴｒｐによるＴｙｒの置換；および
ｔ）Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＡｌａによるＶａｌの置換。

【０３２３】

１４．以下を含む、項目１～１３のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片：

（ｉ）配列番号１１または１２と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または好ましくは少なくとも９７．５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、および

【０３２４】

（ｉｉ）配列番号１３または１４と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または好ましくは少なくとも９７．３％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）。

【０３２５】

１５．前記　ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２およびＣＤＲ－Ｌ３が、項目２～１３のいずれか一項に記載の、項目１４に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

【０３２６】

１６．前記重鎖可変ドメイン（ＶＨ）がフレームワーク領域（ＦＷ）を含み、以下の構造を有する、項目１～１５のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片：

ＦＷ－Ｈ１－ＣＤＲ－Ｈ１－ＦＷ－Ｈ２－ＣＤＲ－Ｈ２－ＦＷ－Ｈ３－ＣＤＲ－Ｈ３－ＦＷ－Ｈ４

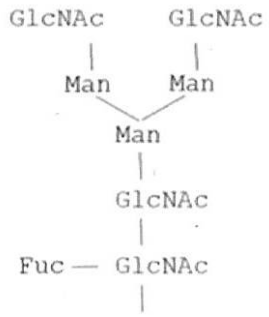
（式中、ＦＷ－Ｈ１は、配列番号１５のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは９８％、更により好ましくは９９％を有するそのバリアントを有し、

ＦＷ－Ｈ２は、配列番号１６もしくは１７のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは９８％、更により好ましくは９９％を有する配列番号１６もしくは１７のバリアントを有し、

ＦＷ－Ｈ３は、配列番号１８のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なく

とも９５％、更により好ましくは９８％、更により好ましくは９９％を有するそのバリアントを有し、
ＦＷ－Ｈ４は、配列番号１９のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは９８％、更により好ましくは９９％を有するそのバリアントを有する）。
【０３２７】
１７．前記軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）がフレームワーク領域（ＦＷ）を含み、以下の構造を有する、項目１～１６のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片：
ＦＷ－Ｌ１－ＣＤＲ－Ｌ１－ＦＷ－Ｌ２－ＣＤＲ－Ｌ２－ＦＷ－Ｌ３－ＣＤＲ－Ｌ３－ＦＷ－Ｌ４
（式中、ＦＷ－Ｌ１は、配列番号２０のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくはそれに対して少なくとも９５％、更により好ましくは９８％、更により好ましくは９９％を有するそのバリアントを有し、
ＦＷ－Ｌ２は、配列番号２１もしくは２２のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは９８％、更により好ましくは９９％を有する配列番号２１もしくは２２のバリアントを有し、
ＦＷ－Ｌ３は、配列番号２３のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは９８％、更により好ましくは９９％を有するそのバリアントを有し、
ＦＷ－Ｌ４は、配列番号２４のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、更により好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、更により好ましくは少なくとも９５％、更により好ましくは９８％、更により好ましくは９９％を有するそのバリアントを有する）。
【０３２８】
１８．（ｉ）配列番号１１または１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、
（ｉｉ）配列番号１３または１４のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、
を含む、項目１～１７のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３２９】
１９．前記ＡＦＰの部分配列が、配列番号２を含むかまたはこれからなる、項目１～１８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３３０】
２０．前記α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは前記α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列が、式Ｉの糖ペプチドを含むか、またはそれからなる、項目１～１９のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

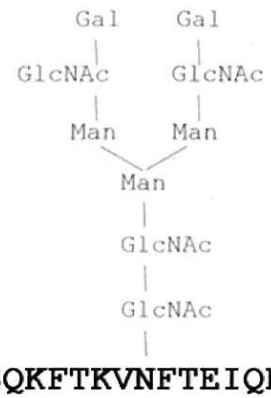
【化５】



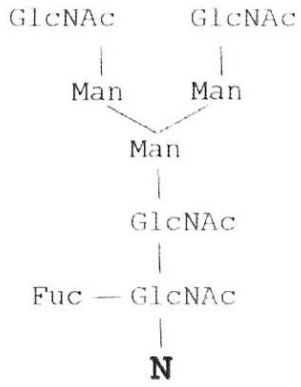
（配列番号２）
（式Ｉ）
【０３３１】
２１．前記α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは前記α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列が、式ＩＩの糖ペプチドを含むか、またはそれからなる、項目１～２０のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【化６】



（配列番号２）
（式ＩＩ）
【０３３２】
２２．前記抗体または抗原結合断片が、（ｉ）前記α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは前記α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列と、（ｉｉ）α－１，６－コア－フコシル化残基を欠くＡＦＰまたはその部分配列とを区別する、項１～２１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３３３】
２３．前記ＡＦＰの部分配列が、配列番号２を含むかまたはこれからなる、項目２０～２２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３３４】
２４．前記ＡＦＰまたはα－１，６－コア－フコース残基を欠くその部分配列が、式ＩＩの糖ペプチドを含むかまたはそれからなる、項目２２または２３に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【化７】



（配列番号２）
（式ＩＩＩ）
【０３３５】
２５．前記抗体または抗原結合断片が、（ｉ）前記α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたはα－１，６－コア－フコシル化を含む前記部分ＡＦＰ配列に、（ｉｉ）α－１，６－コア－フコース残基を欠く前記ＡＦＰ、または前記α－１，６－コア－フコース残基を欠くＡＦＰの前記部分配列との結合についての平衡解離定数（K_D）よりも少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも１８０倍または少なくとも２４５倍低い前記K_Dで結合し、（ｉ）および（ｉｉ）に対する結合親和性が、同じ条件下で決定される、項目２２～２４のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３３６】
２６．前記抗体または抗原結合断片が、（ｉ）前記α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは前記α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列と、（ｉｉ）式（ＩＶ）のα－１，６－コア－フコシル化グリカンとを区別する、項目１～２５のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【化８】



（式ＩＶ）
【０３３７】
２７．前記抗体または抗原結合断片が、（ｉ）前記α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ、またはα－１，６－コア－フコシル化を含む前記部分ＡＦＰ配列に、（ｉｉ）式（ＩＶ）の前記α－１，６－コア－フコシル化グリカンへの結合についての平衡解離定数（K_D）よりも少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも１８０倍、少なくとも２４５倍低い前記K_Dで結合し、（ｉ）および（ｉｉ）に対する前記結合親和性が、同じ条件下で決定される、項目２６に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３３８】
２８．前記抗体または抗原結合断片が、（ｉ）前記α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ、または前記α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの前記部分配列と、（ｉｉ）配列番号２または２５のＡＦＰペプチドとを区別する、項目１～２７のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３３９】
２９．前記抗体または抗原結合断片が、（ｉ）前記α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ、またはα－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列に、（ｉｉ）配列番号２または２５の前記ＡＦＰペプチドへの結合について平衡解離定数（K_D）よりも少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも５０倍、少なくとも１００倍、少なくとも５００倍、少なくとも１０００倍または少なくとも５０００倍低い前記K_Dで結合し、（ｉ）および（ｉｉ）に対する前記結合親和性が同じ条件下で決定される、項目２８に記載のモ

ノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３４０】
３０．前記抗体または抗原結合断片が、式Ｉによる糖ペプチドと、式ＩＩＩの糖ペプチドおよび式ＩＶのコア－フコシル化グリカンの両方とを区別する、項目１～２９のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３４１】
３１．前記抗体または抗原結合断片が、式Ｉによる糖ペプチドと、以下の３つ：式ＩＩＩの糖ペプチド、式ＩＶのコア－フコシル化グリカン、および配列番号２または２５のＡＦＰペプチドの全てとを区別する、項目１～３０のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３４２】
３２．前記式Ｉの糖ペプチドに、１００ｎＭ以下、２０ｎＭ以下、好ましくは１０ｎＭ以下、より好ましくは３．１ｎＭ以下または２．５ｎＭ以下のK_D（任意に、前記K_Dが溶液表面プラズモン共鳴分光法における親和性によって測定される場合、０．９ｎＭ以下または０．４ｎＭ以下）で結合し、任意に前記K_Dが３７℃で測定される、項目１から３１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３４３】
３３．式Ｉの糖ペプチドについての会合速度定数k_aが、少なくとも$2.0\times10^{4}M^{-1}s^{-1}$、実施形態において少なくとも$10^{5}M^{-1}s^{-1}$、実施形態において少なくとも$2.5\times10^{5}M^{-1}s^{-1}$、実施形態において少なくとも$6.0\times10^{5}M^{-1}s^{-1}$、実施形態において少なくとも$1.0\times10^{6}M^{-1}s^{-1}$であり、任意に前記$k_a$が３７℃で測定される、項目１～３２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片抗体。
【０３４４】
３４．式Ｉの糖ペプチドに対する解離速度定数k_dが、最大で$1.2\times10^{-2}s^{-1}$、最大で$8.0\times10^{-3}s^{-1}$、最大で$7.3\times10^{-3}s^{-1}$、最大で$3.2\times10^{-3}s^{-1}$または最大で$1.5\times10^{-3}s^{-1}$であり、任意に前記k_dが３７℃で測定される、項目１～３３のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片抗体。
【０３４５】
３５．（１つ以上のK_D値および／またはk_a値および／またはk_d値に言及する場合）前記K_D値および／またはk_a値および／またはk_d値（複数可）が、表面プラズモン共鳴分光法によって決定される、項目１～３４のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３４６】
３６．前記表面プラズモン共鳴分光法が、前記モノクローナル抗体または抗原結合断片をＣ１センサチップ上に捕捉することと、前記それぞれの糖ペプチドまたはペプチド（例えば式Ｉの糖ペプチド）を分析物として注入することとを含み、任意に前記決定が、３７℃の温度で、任意にシステム緩衝液としてＨＢＳ－ＥＴ　ｐＨ７．４（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、３ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０５％ｗ／ｖ　Ｔｗｅｅｎ　２０（登録商標））、および試料緩衝液として１ｍｇ／ｍｌカルボキシメチルデキストランを補足したシステム緩衝液を使用して行われる、項目３５に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３４７】
３７．前記K_D値および／またはk_a値および／またはk_d値（複数可）が３７℃で決定される、項目３５または３６に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片
【０３４８】
３８．前記表面プラズモン共鳴分光法が、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００または８Ｋ機器を用いて行われる、項目３５～３７のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。
【０３４９】

前記K_Dおよび／または前記k_aの決定が、ラングミュアフィッティングモデルを使用して表面プラズモン共鳴データを、任意にR_{max}ｇｌｏｂａｌでフィッティングすることを含む、項目３５～３８のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

【０３５０】

４０．前記K_Dが、ａｆｆｉｎｉｔｙ　ｉｎ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ法における親和性によって決定される、項目３５のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

【０３５１】

４１．前記ａｆｆｉｎｉｔｙ　ｉｎ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ法が、前記抗体または抗原結合断片と、チップに結合した分析物および溶液中の同じ分析物との結合についての競合を含む、項目４０に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

【０３５２】

４２．式Ｉの糖ペプチドに対する配列番号１１の重鎖可変ドメインおよび配列番号１３の軽鎖可変ドメインを含むウサギＩｇＧ抗体のK_Dの１０倍未満、８倍未満、６倍未満、４倍未満、または２倍未満である前記K_Dで式Ｉの前記糖ペプチドに結合し、前記K_D値が同じ条件下で同じ方法を用いて測定される、項目１～４１のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

【０３５３】

４３．式Ｉの糖ペプチドに対する配列番号１２の重鎖可変ドメインおよび配列番号１４の軽鎖可変ドメインを含むウサギＩｇＧ抗体のK_Dの１０倍未満、８倍未満、６倍未満、４倍未満、または２倍未満である前記K_Dで式Ｉの前記糖ペプチドに結合し、前記K_D値が同じ条件下で同じ方法を用いて測定される、項目１～４２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

【０３５４】

４４．７４～７８のいずれか一項に記載の前処理剤で前処理されたα－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）に結合する、項目１～４３のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

【０３５５】

４５．７４～７８のいずれか一項に記載の前処理剤で前処理されたα－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）に、前記前処理なしよりも良好に結合する、項目１～４３のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片。

【０３５６】

４６．ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットであって、

（ｉ）項目１～４５のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくは抗原結合断片の前記重鎖もしくは重鎖可変ドメイン、および／または

（ｉｉ）項目１～４５のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片の前記軽鎖または軽鎖可変ドメイン

をコードする、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセット。

【０３５７】

４７．項目４６に記載のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを含む、ベクター。

【０３５８】

４８．項目４６に記載のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、または項目４７に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【０３５９】

４９．原核生物細胞または真核生物細胞である、項目４８に記載の宿主細胞。

【０３６０】

５０．真核生物細胞であり、前記細胞がＣＨＯ細胞である、項目４８に記載の宿主細胞。

【０３６１】
５１．項目１～４５のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または抗原結合断片を製造する方法であって、項目４８～５０のいずれか１つに記載の宿主細胞を培養すること、および前記抗体または抗原結合断片を単離することを含む、方法。
【０３６２】
５２．項目５１に記載の方法によって得ることができる、項目１～４６のいずれか一項に記載の抗体。
【０３６３】
５３．項目１～４５および５２のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片、項目４６に記載のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセット、項目４７に記載のベクター、または項目４８～５０のいずれか一項に記載の宿主細胞を含む、組成物。
【０３６４】
５４．診断用組成物である、項目１～４５および５２のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片を含む組成物。
【０３６５】
５５．ｉｎ　ｖｉｔｒｏイムノアッセイ、特にα－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）またはＡＦＰ－Ｌ３を検出するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏイムノアッセイのための、項目１～４５および５２のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、または項目５３もしくは５４に記載の組成物の使用。
【０３６６】
５６．前記イムノアッセイが、異種イムノアッセイである、項目５５に記載の使用。
【０３６７】
５７．イムノアッセイが、免疫組織化学（ＩＨＣ）アッセイである、項目５５に記載の使用。
【０３６８】
５８．前記イムノアッセイのための試料が、血液、血漿または血清からなるか、またはそれらから調製される試料である、項目５５～５７のいずれか一項に記載の使用。
【０３６９】
５９．α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは前記α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列を検出するための、項目５５～５８のいずれか一項に記載の使用。
【０３７０】
６０．前記イムノアッセイが、式Ｉの糖ペプチドまたは式Ｉの糖ペプチドを含む糖タンパク質を検出するためのイムノアッセイである、項目５５～５９のいずれか一項に記載の使用。
【０３７１】
６１．α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは前記α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列を、（ｉ）ＡＦＰまたはα－１，６－コア－フコシル化を欠く部分ＡＦＰ配列、および／または（ｉｉ）ＡＦＰ以外のα－１，６－コア－フコシル化タンパク質と区別するための、項目５５～６０のいずれか一項に記載の抗体の使用。
【０３７２】
６２．項１～４５および５２のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片を用いて、試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは前記α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列を検出するための、ｉｎ　ｖｉｔｒｏイムノアッセイ法。
【０３７３】
６３．（ｉ）検出複合体を形成するように、前記試料に含まれるα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは前記α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列に、項目１～４５および５２のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片を結合させることと、（ｉｉ）前記検出複合体を検出し、それによって試料中のα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは前記α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列の存在および任

意に量を決定することによって、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは前記α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列を検出することと、を含む、項目６２に記載の方法。

【０３７４】

６４．前記方法がＩＨＣアッセイであり、試料が組織スライドである、項目６３に記載の方法。

【０３７５】

６５．前記方法が血清イムノアッセイであり、前記試料が体液である、項目６３に記載の方法。

【０３７６】

６６．前記体液が、血液試料、精液または尿である、項目６５に記載の方法。

【０３７７】

６７．前記体液が、全血、毛細管血、血清または血漿（好ましくは血清または血漿）である血液試料である、項目６５または６６に記載の方法。

【０３７８】

６８．前記方法が、（ｉ）前記試料を前処理剤で前処理することと、（ｉｉ）前記前処理され試料を項目１～４５および５２のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片とインキュベートすることとを含む、項目６５～６７のいずれか一項に記載の方法。

【０３７９】

６９．前記前処理剤が、項目７４～７８のいずれか一項に記載の前処理試薬である、項目６８に記載の方法。

【０３８０】

７０．前記方法が、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは前記α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列を、α－１，６－コア－フコシル化を欠くＡＦＰまたはα－１，６－コア－フコシル化を欠くその部分配列と区別する、項目６３～６９のいずれか一項に記載の方法。

【０３８１】

７１．前記方法が、サンドイッチ免疫アッセイであり、前記試料を、項目１～４５および５２に記載の抗体との結合について競合せず、前記α－１，６－コア－フコシル化とは無関係にＡＦＰに結合する、ＡＦＰ特異的抗体または抗原結合断片と共にインキュベートすることを含む、項目６５～７０のいずれか一項に記載の方法。

【０３８２】

７２．前記ＡＦＰ特異的抗体が、抗ＡＦＰ（Ｔｕ－１１）である、項目７１に記載の方法。

【０３８３】

７３．前記方法が、肝細胞がん、実施形態において早期肝細胞がんの検出または検出を補助するためのものである、項目６３～７２のいずれか一項に記載の方法。

【０３８４】

７４．α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰを含む試料を処理するための前処理試薬であって、前記前処理試薬が、還元剤、特にタンパク質還元剤を含む、前処理試薬。

【０３８５】

７５．前記還元剤が、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、β－メルカプトエタノールおよびジチオブチルアミン（ＤＴＢＡ）からなる群から選択される、項目７４に記載の前処理試薬。

【０３８６】

７６．前記還元剤がＤＴＴである、項目７４または７５に記載の前処理試薬。

【０３８７】

７７．前記前処理剤がキレート剤、実施形態においてイオン用キレート剤、特に二価イオン用キレート剤、実施形態においてエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、または

エチレングリコール－ビス（β－アミノエチルエーテル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）から選択されるキレート剤を更に含む、項目７４～７６のいずれか一項に記載の前処理試薬。

【０３８８】

７８．前記前処理剤が、トリス等の緩衝液を更に含む、項目７４～７７のいずれか一項に記載の前処理試薬。

【０３８９】

７９．項目１～４５および５２のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片を含む、キット。

【０３９０】

８０．イムノアッセイキットである、項７９に記載のキット。

【０３９１】

８１．前記キットが、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは前記α－１，６－コア－フコシル化を含む部分ＡＦＰ配列を検出または定量するためのものである、項目７９または８０に記載のキット。

【０３９２】

８２．前記キットが、前処理剤、例えば項目７４～７８のいずれか一項に記載の前処理剤を含む、項目７９～８１のいずれか一項に記載のキット。

【０３９３】

８３．前記抗体または抗原結合断片と前処理試薬とが別々の容器に提供される、項目８２に記載のキット。

【０３９４】

以下の定義および実施形態は、上記および特許請求の範囲に提供される本発明の全ての態様および実施形態に適用される。

【０３９５】

当該技術分野で知られているように、ヒトＡＦＰは、配列番号１のアミノ酸配列を有する糖タンパク質（またはＵｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ　Ｐ０２７７１（バージョン２０９）に記載されているその天然バリアント）であり、Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ　Ｐ０２７７１のＡｓｎ－２５１に対応する単一のＮ－グリコシル化部位を含む。Ａｓｎ－２５１のＮ－グリカンは、コアフコース残基を含むことができる（図１を参照）。当技術分野で更に理解されるように、グリカン内の「コアフコシル化」という用語は、フコース残基が、ＡＦＰタンパク質のＡｓｎ－２５１に結合したコアＧｌｃＮａｃ残基またはＡｓｎ－２５１に対応するＡｓｎを含むその部分配列にα－１，６結合していることを示す（図１を参照）。「コア－フコシル化」および「α－１，６－コア－フコシル化」という用語は、交換可能であると認識される。したがって、「コア－フコシル化ＡＦＰおよび／またはコア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列に特異的（または特異的に結合する）」という用語は、「α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰおよびα－１，６－コア－フコシル化を含むその部分配列に特異的（または特異的に結合する）」という用語と交換可能である。本発明の抗体および抗体抗原結合断片はまた、本明細書では１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体およびその抗原結合断片と互換的に呼ばれる。

【０３９６】

レクチンは、糖タンパク質の分析に使用することができる。糖タンパク質の糖鎖構造に対するレクチンの選択的結合能を利用することにより、特定の糖鎖構造を有するマーカー糖タンパク質画分（複数可）を分離および濃縮することが可能である。ＡＦＰの場合、レンズマメ（Ｌｅｎｓ　ｃｕｌｉｎａｒｉｓ）アグルチニン－Ａ（ＬＣＡ）由来のレクチンが広く用いられている。ＬＣＡを使用して、ＡＦＰを３つのバリアントＬ１、Ｌ２およびＬ３に分画することができ、ＡＦＰ－Ｌ３はＬＣＡに対する親和性が最も高い。ＡＦＰ－Ｌ３画分はＡＦＰから構成され、ＡＦＰは、α－１，６－コア－フコシル化（すなわち、Ｎ－型糖鎖の還元末端にα－１，６結合を介して位置するＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）にフコース糖が結合したＡＦＰ）を含むＮ－グリカンを用いてＡｓｎ－２５

１でＮ－グリコシル化される。したがって、ＡＦＰ－Ｌ３はα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰから構成されるので、ＡＦＰ－Ｌ３およびα－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰという用語は、本明細書では互換的に使用される。α－フェトプロテイン（ＡＦＰ－Ｌ３）のレンズマメ（Ｌｅｎｓ ｃｕｌｉｎａｒｉｓ）アグルチニン（ＬＣＡ）反応性画分は、ＨＣＣ患者において特異的に増加する（Ｋｈｉｅｎ ＶＶ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍａｒｋｅｒｓ．２００１；１６（２）：１０５－１１１）。

【０３９７】

本明細書で使用される場合、「抗体」、「抗体（複数）」という用語、および類似の用語は、完全な免疫グロブリン分子に関し、天然に存在する形態の抗体（ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥを含むが、これらに限定されない）、ならびに単鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、抗体融合タンパク質、多重特異性抗体、および多価抗体を含むがこれらに限定されない組換え抗体構築物、ならびに上記の全ての抗原結合断片および誘導体を包含する。本明細書で使用される場合、「抗体」、「抗体」という用語、および類似の用語は、これらが明示的にも言及されていない場合、その抗原結合断片も指す。抗体の抗原結合断片は、本明細書では抗体抗原結合断片、および／または単に抗原結合断片と称され得る。これらの用語は、標的抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の１つ以上の断片、すなわちα－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）または当該α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列（例えば、式Ｉまたは式ＩＩの糖ペプチド）を指し、当該技術分野で知られているように、Ｆｖドメイン（すなわち、対になった重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメイン）、例えばＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦｖ断片を含む抗原結合断片、ならびに当該技術分野でｓｃＦｖとして知られている単鎖Ｆｖドメイン等の組換え構築物を含むが、これらに限定されない。この用語はまた、本明細書で定義される抗原に特異的かつ選択的に結合する能力を保持する、当技術分野で公知の単一の非対重鎖または軽鎖可変ドメインを含む抗体抗原結合断片を含み、それには、限定されないが、ラクダの重鎖に基づく単一ドメイン抗体（当該技術分野ではｓｄＡｂ、ｄＡｂ、および／またはナノボディとも呼ばれる）およびV_HＨドメインが含まれる。

【０３９８】

特定の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、完全免疫グロブリン、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ＦｖまたはｓｃＦｖであり得る。具体的な実施形態において、本発明のモノクローナル抗体はＦａｂ断片であり得る。

【０３９９】

特定の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、多価抗体であり得る。

【０４００】

本明細書で使用される場合、「多価抗体」は、少なくとも３つのＦｖまたはＦａｂドメイン（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９または１０コピー）を含む抗体に関する。好ましい実施形態では、多価抗体は、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８または少なくとも１０コピー（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９または１０コピー）の同じF_Vを含む。

【０４０１】

多価抗体のための例示的であるが非限定的な実施形態およびそのような抗体を作製するための方法は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公開第２０１９／０５７８１６号に開示されている。具体的には、そのような多価抗体の構造的構成およびそのような多価抗体（ｐ３、ｐ４、ｐ５、ｐ６、ｐ７またはｐ８とも呼ばれる）を作製するための方法に関する全ての実施形態が、参照により本明細書に開示される。

【０４０２】

実施形態において、本発明の多価抗体は、例えばリンカー配列（例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０１９／０５７８１６号に記載されているリンカー配列の１つ）に隣接する複数の（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９または１０コピ

ー、特定の実施形態では８コピー）ＶＨ－ＣＨ１ドメイン（例えば、いずれも本発明の１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗原結合断片の（好ましくは同じ）ＶＨを含む）を含む重鎖を含み得る。従来の抗体と比較した追加のＶＨ－ＣＨ１ドメインは、ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３配列の上流および／または下流に配置され得る。そのような多量体抗体における軽鎖は、ＶＬおよび定常ドメインからなる従来の軽鎖であり得る。

【０４０３】

多価抗体を作製するための代替方法は、抗体または抗原結合断片の化学重合／架橋を含む。

【０４０４】

抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得る。本発明の抗体は、モノクローナルである。抗体またはその抗原結合断片に関して本明細書で使用される場合、「モノクローナル」という用語は、単一のＢ細胞クローンから産生される抗体ポリペプチドまたはその断片の集団を指し、その集団は、抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位の１つの特異性のみを含む。これは、複数の特異性の抗原結合部位を含む抗体ポリペプチドまたは抗原結合断片の集団を指す用語（複数可）である「ポリクローナル」抗体および組成物とは対照的である。本発明のモノクローナル抗体の改変形態、例えばそのヒト化バージョンまたはキメラバージョン、ならびに組換え抗体構築物、例えば抗体（または抗原結合断片）融合タンパク質も含まれ、ここで、抗体または抗原結合断片は、例えば組換えて作られた抗体／断片／構築物の単離および／または調製のための追加のドメイン（複数可）を含む。

【０４０５】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗原に対する抗体の結合に関与する抗体重鎖または抗体軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれＶＨおよびＶＬ）は、一般に類似の構造を有し、各ドメインは、４つの保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）および３つの超可変領域（ＨＶＲ）、例えば相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む。（例えば、Ｋｉｎｄｔ ｅｔ ａｌ．Ｋｕｂｙ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６ｔｈ ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ．，ｐａｇｅ ９１（２００７）を参照）。抗原結合特異性を付与するためには、単一のＶＨドメインまたはＶＬドメインで十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体を、その抗原に結合する抗体のＶＨドメインまたはＶＬドメインを用いて単離し、相補的なＶＬドメインまたはＶＨドメインそれぞれのライブラリーをスクリーニングし得る。例えば、Ｐｏｒｔｏｌａｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：８８０－８８７（１９９３）；Ｃｌａｒｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－６２８（１９９１）を参照されたい。

【０４０６】

本明細書で使用される場合、「超可変領域」または「ＨＶＲ」という用語は、配列が超可変であり、抗原結合特異性を決定する抗体可変ドメインの各領域、例えば、「相補性決定領域」（ＣＤＲ）を指す。

【０４０７】

一般に、抗体は６つのＣＤＲを含み、３つがＶＨにあり（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３）、３つがＶＬにある（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３）。本明細書における例示的なＣＤＲとしては、以下が挙げられる：

（ａ）アミノ酸残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）、９１～９６（Ｌ３）、２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）、および９６～１０１（Ｈ３）で生じる超可変ループ（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７）；

（ｂ）アミノ酸残基２４－３４（Ｌ１）、５０－５６（Ｌ２）、８９－９７（Ｌ３）、３１－３５ｂ（Ｈ１）、５０－６５（Ｈ２）および９５－１０２（Ｈ３）に存在するＣＤＲ（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａ

ｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１））；ならびに
（ｃ）アミノ酸残基２７ｃ～３６（Ｌ１）、４６～５５（Ｌ２）、８９～９６（Ｌ３）、３０～３５ｂ（Ｈ１）、４７～５８（Ｈ２）、および９３～１０１（Ｈ３）で生じる抗原接触（ＭａｃＣａｌｌｕｍ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２－７４５（１９９６））。

【０４０８】
特に指定されない限り、ＣＤＲは、上記のＫａｂａｔ ｅｔ ａｌ．に従い決定される。当業者は、ＣＤＲの表記は、上記Ｃｈｏｔｈｉａ、上記ＭｃＣａｌｌｕｍ、または、任意の他の科学的に認可された命名システムに従い決定することができることを理解するであろう。

【０４０９】
「フレームワーク」または「ＦＲ」は、相補性決定領域（ＣＤＲ）以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのＦＲは、一般的に４つのＦＲドメイン：ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４からなる。したがって、ＣＤＲおよびＦＲ配列は、一般的に、ＶＨ（またはＶＬ）において次の配列で出現する：ＦＲ１－ＣＤＲ－Ｈ１（ＣＤＲ－Ｌ１）－ＦＲ２－ＣＤＲ－Ｈ２（ＣＤＲ－Ｌ２）－ＦＲ３－ＣＤＲ－Ｈ３（ＣＤＲ－Ｌ３）－ＦＲ４で現れる。

【０４１０】
本明細書で使用される場合、抗体または抗体抗原結合断片に関連して「特異的に結合する」という語句は、それぞれの抗原が抗原抗体反応を介して抗体または抗体抗原結合断片に結合されることを示す。「特異的に結合する」という用語はまた、抗体または抗原結合断片が、交差反応性を示し得る他の構造よりも優先的に示された構造に結合することを表す。本明細書でも説明されているように、～から／に対して区別する、という用語は、本発明の抗体および抗原結合断片が標的抗原（すなわち、コア－フコシル化ＡＦＰおよび／またはそのコア－フコシル化部分配列、最も好ましくは式ＩまたはＩＩの糖ペプチド）に特異的に結合するが、式ＩＶに示す単一のコア－フコシル化アスパラギン等の別の状況ではコア－フコース残基および／またはコア－フコシル化グリカンを欠くＡＦＰ／ＡＦＰ部分配列に特異的に結合しないことを示す。

【０４１１】
本明細書で使用される場合、「～から／～に対して区別する」という用語および２つの抗原に関する類似の用語、例えば抗体が抗原Ｘを抗原Ｙから／に対して区別することは、抗体または抗原結合断片が標的抗原Ｘに特異的に結合するが非標的抗原Ｙには特異的に結合しないことを示す。したがって、本明細書で使用される場合、「区別する」という用語および類似の用語は、抗体または抗原結合断片が非標的抗原に「特異的に結合しない」／「有意に結合しない」（これらは互換的に使用される）ことを意味する。「特異的に結合する」および「有意に結合しない」という用語は、抗体が２つの抗原を区別する程度を表すことは当技術分野で周知である。これは、どのような条件であっても１つのエピトープのみと反応するという意味で、抗体が絶対特異性を有さないことが知られているからである。すなわち、他の（非標的）抗原が存在する場合、抗体または抗原結合ドメインは、これらの他の（非標的）抗原上の類似のエピトープとある程度反応することができる。しかしながら、モノクローナル抗体またはモノクローナル抗原結合断片の、その標的エピトープ／抗原に対する親和性は、関連するエピトープに対する親和性よりも有意に大きい。この親和性の差を使用して、抗体または抗原結合断片が特定のエピトープにほぼ排他的に結合するアッセイ条件を確立する。この点において、抗体または抗原結合断片の抗原への結合（または非結合）は、絶対的なものとして理解されない。すなわち、１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体および／または抗原結合断片は、他の（非）標的に対していくらかの（残余）結合活性を示し得るが、コア－フコシル化ＡＦＰまたはＡＦＰのコア－フコシル化部分配列、好ましくは式Ｉの糖ペプチドまたは式Ｉの糖ペプチドを含む糖タンパク質に対する結合活性と比較して有意に低いレベルである。

【０４１２】
例えば、非標的抗原から／非標的抗原に対して標的抗原を識別する特徴は、非標的抗原に対する親和性よりも少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも１８０倍または少なくとも２４５倍優れた標的抗原に対する親和性を有する１，６ｆｕｃＡＦＰ抗体または抗体抗原結合断片を特徴とし得る（すなわち、標的抗原への結合のK_Dは、非標的抗原への結合のＫＤよりも少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも１８０倍または少なくとも２４５倍低い）。製剤は、少なくとも「ＸＸ」は、非標的抗原に対するK_Dが非常に高く、使用される方法では検出できないという実施形態も包含する。したがって、抗体または抗原結合断片が標的構造を非標的構造と区別することができるかどうかは、同じ方法（例えば、本明細書中下記で記載されるようなK_Dを決定するための好ましい方法）を使用して、それぞれの結合についてのK_D値を決定することであり得る。

【０４１３】
実施形態において、抗体が標的抗原を非標的抗原から／標的抗原に対して区別する能力は、試験される抗体または抗原結合断片の標的構造への結合が検出されるイムノアッセイを用いて評価することができる。そのようなイムノアッセイを使用して、定義された濃度の標的抗原を含む第１の試料で得られたイムノアッセイシグナルを、同じ濃度の非標的抗原を含む第２の試料で得られたイムノアッセイシグナルと比較することができる。第１の試料の免疫測定シグナルが第２の試料からの免疫測定シグナルよりも高いことは、標的抗原と非標的抗原との識別を示す。実施形態において、試験された抗体または抗原結合断片は、第１の試料のイムノアッセイシグナルが、第２の試料よりも少なくとも５倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍または少なくとも１００倍高い場合、標的構造と非標的構造とを区別し得る。そのような分析に使用することができる例示的であるが非限定的なイムノアッセイを実施例７に提供する。標的抗原および非標的抗原の例示的な濃度は１２ｎｍであり得る。

【０４１４】
アミノ酸と関連して本明細書で使用される場合、「置換」、「交換」または「変異する」という用語は、アミノ酸を別のアミノ酸で置き換えることを指す。特定の位置でのアミノ酸の欠失および異なる位置での１つ（または複数）のアミノ酸の挿入は、「置換」という用語に明示的に包含されるものではない。述べられたように、本発明は、本明細書中上記で定義されたような保存的または高度に保存的なアミノ酸置換を包含する。

【０４１５】
アミノ酸は、本明細書では、１文字コードまたは３文字コードを使用して綴られるか、または略記される。

【０４１６】
本発明との関連では、それは、配列（特にＣＤＲ）のバリアントを指す。これらのバリアントは、典型的には、１つ以上のアミノ酸置換を含む。バリアントＣＤＲが、機能的バリアントであること、すなわち参照アミノ酸配列とは異なり得るが、異なる配列が、記載された重鎖および／または軽鎖可変ドメインの状況における参照配列と同じ機能活性を示すかまたは維持するアミノ酸配列を有することは明らかである。具体的には、本明細書で使用される場合、同じ機能活性という用語は、１つ以上のバリアントＣＤＲを含む本発明の抗体または抗体結合断片が、α－１，６－コア－フコシル化アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）または当該α－１，６－コア－フコシル化を含むＡＦＰの部分配列（例えば、式Ｉまたは式ＩＩの糖ペプチド）への特異的結合、ならびに非α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰまたは部分配列（例えば、式ＩＩＩの糖ペプチドまたは配列番号２もしくは２５のペプチド）および／または式ＩＶのグリカンからこれらの構造を区別する特性を維持することを意味する。実施形態において、機能活性はまた、式Ｉの糖ペプチドへの結合について本明細書で言及される動態学的パラメータが保存されることを意味し得る。

【０４１７】

本発明との関連で使用される場合、「保存的アミノ酸置換」は、同じ物理化学的群から選択される別のアミノ酸によるアミノ酸の置換を意味し、アミノ酸の物理化学的群は、以下のとおりである。

ａ）Ｇｌｙ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、ＴｒｐおよびＭｅｔからなる非極性疎水性アミノ酸；

ｂ）Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、ＡｓｎおよびＧｌｎからなる極性中性アミノ酸；

ｃ）Ａｒｇ、ＬｙｓおよびＨｉｓからなる、正電荷を有する塩基性アミノ酸、ならびに

ｄ）ＡｓｐおよびＧｌｕからなる、負電荷を有する酸性アミノ酸、であり、

Ｃｙｓが保存的に置換される場合、それはＳｅｒまたはＡｌａで置換され、Ｐｒｏが保存的に置換される場合、それはＡｌａで置換される。

【０４１８】

本発明との関連で使用される場合、「高度に保存的なアミノ酸置換」は、以下のアミノ酸置換を意味する：

ａ）Ｖａｌ、Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＧｌｙによるＡｌａの置換；

ｂ）ＬｙｓによるＡｒｇの置換；

ｃ）ＧｌｎによるＡｓｎの置換；

ｄ）ＧｌｕによるＡｓｐの置換；

ｅ）ＳｅｒによるＣｙｓの置換；

ｆ）ＡｓｎによるＧｌｎの置換；

ｇ）ＡｓｐによるＧｌｕの置換；

ｈ）ＡｌａによるＧｌｙの置換；

ｉ）ＡｒｇによるＨｉｓの置換；

ｊ）Ｌｅｕ、ＶａｌまたはＡｌａによるＩｌｅの置換；

ｋ）Ｉｌｅ、ＶａｌまたはＡｌａによるＬｅｕの置換；

ｌ）ＡｒｇによるＬｙｓの置換；

ｍ）Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＶａｌによるＭｅｔの置換；

ｎ）ＴｙｒまたはＴｒｐによるＰｈｅの置換；

ｏ）ＡｌａによるＰｒｏの置換；

ｐ）ＴｈｒによるＳｅｒの置換；

ｑ）ＳｅｒによるＴｈｒの置換；

ｒ）ＰｈｅまたはＴｙｒによるＴｒｐの置換；

ｓ）ＰｈｅまたはＴｒｐによるＴｙｒの置換；および

ｔ）Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＡｌａによるＶａｌの置換。

【０４１９】

本明細書で使用される場合、ポリペプチド／ペプチドのアミノ酸配列および／または核酸配列または核酸分子に関連する「配列同一性％」という用語は、アラインメントされた２つ以上の配列の、比較される配列（またはその全体的に比較される部分）の全長を構成する残基の数と比較した、同一のアミノ酸または核酸残基のマッチ数を表す。２つ以上の配列または部分配列のアラインメントを使用して、同一である残基のパーセンテージは、比較ウィンドウ上で、もしくは当技術分野で公知の配列比較アルゴリズムを使用して測定される指定された領域上で（部分）配列を比較し、最大一致についてアラインメントする場合、または手作業でアラインメントし、目視検査にする場合に決定され得る。配列同一性の決定に使用するためのアルゴリズムの非限定的な例としては、例えば、ＮＣＢＩ　ＢＬＡＳＴアルゴリズム（Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２５（１９９７）、３３８９－３４０２）、ＣＬＵＳＴＡＬＷコンピュータプログラム（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２（１９９４）、４６７３－４６８０）またはＦＡＳＴＡ（Ｐｅａｒｓｏｎ　ａｎｄ　Ｌｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，８５（１９８８），２４４４）に基づくものが挙げられる。ＦＡＳＴＡアルゴリズムは、典型的には、その計算において、配列における内部の一致しない欠失または付加、すなわちギャップを考慮しないが、これは、％配列同一性の過大

評価を回避するために手動で訂正され得る。しかしながら、ＣＬＵＳＴＡＬＷは、その同一性計算において配列ギャップを考慮する。ＢＬＡＳＴおよびＢＬＡＳＴ　２．０アルゴリズム（Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２５（１９７７）、３３８９）も利用可能である。

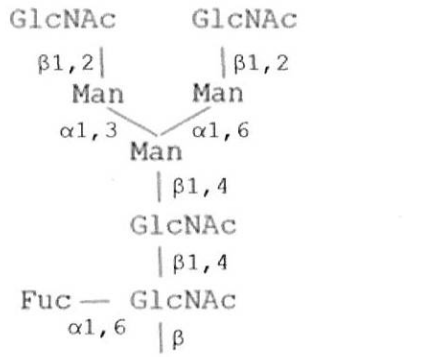
【０４２０】

本発明と関連して、ＡＦＰ（例えば、式Ｉ、式ＩＩ、式ＩＩＩ）およびＮ－グリカン構造（例えば、式ＩＶ）の糖ペプチドが開示される。上記の本明細書に記載のそれぞれの式では、結合の種類は示されていない。好ましい結合は、図１に示される例示的なグリカン構造に示されるものである。

【０４２１】

したがって、特定の実施形態において、式Ｉの糖ペプチドは、以下の構造Ｉａを有し得る。

【化９】



LSQKFTKVNFTEIQKLVLD

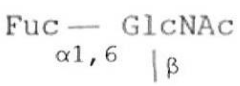
（配列番号２）

（式Ｉａ）

【０４２２】

したがって、特定の実施形態において、式ＩＩの糖ペプチドは、以下の構造ＩＩａを有し得る。

【化１０】



LSQKFTKVNFTEIQKLVLD

（配列番号２）

（式ＩＩａ）

【０４２３】

したがって、特定の実施形態において、式ＩＩＩの糖ペプチドは、以下の構造ＩＩＩａを有し得る。

【化１１】



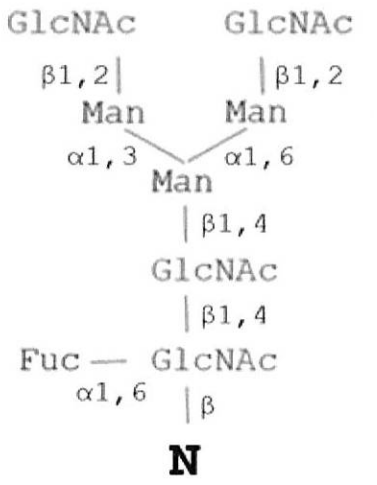
（配列番号２）

（式ＩＩＩａ）

【０４２４】

したがって、特定の実施形態において、式ＩＶのＮ－グリカンは、以下の構造ＩＶａを有し得る。

【化１２】



（式ＩＶａ）

【０４２５】

本明細書で使用される場合、「核酸分子」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」および類似の用語は、ゲノムＤＮＡとｃＤＮＡの両方、ならびに本発明の抗体または抗原結合断片の発現を駆動することができるＲＮＡを含む。本明細書で使用される場合、「ＲＮＡ」という用語は、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡおよびｒＲＮＡを含むが、ＲＮＡウイルスのＲＮＡの場合等、ゲノムＲＮＡも含む全ての形態のＲＮＡを含むことが理解される。好ましくは、「ＲＮＡ」と記載する実施形態はｍＲＮＡに関する。本発明の核酸分子／核酸配列は、天然ならびに合成または半合成起源のものであり得る。実施形態において、本発明の核酸／核酸配列は単離され得る。したがって、核酸分子は、例えば、有機化学の従来のプロトコルに従って、組換え方法に従って合成された、または半合成的に、例えば化学合成と組換え方法とを組み合わせることによって製造された核酸分子であり得る。当業者は、そのような核酸分子の調製および使用に精通している。

【０４２６】

本明細書で使用される場合、「イムノアッセイ」は、分析物の検出または定量が分析物と少なくとも１つの分析物特異的結合剤との反応に依存し、したがって分析物：結合剤複合体（検出複合体とも呼ばれる）を形成する、十分に確立された生物学的分析方法である。本発明との関連において、少なくとも１つの分析物特異的結合剤のうちの少なくとも１つは、本発明の抗体である。「サンドイッチ」イムノアッセイの具体的な実施形態は、複数の認識エピトープを有する分析物に使用することができる。したがって、サンドイッチアッセイには、分析物上の重複しないエピトープに付着する少なくとも２つの結合剤が必要である。「異種サンドイッチイムノアッセイ」では、結合剤の１つが分析物特異的捕捉結合剤の機能的役割を有し、この結合剤は固相上に固定化されているか、または（アッセイの過程で）固相上に固定化される。第２の分析物特異的結合剤は、液相に溶解形態で供給される。それぞれの分析物が第１および第２の結合剤によって結合されると、サンドイッチ状の複合体（結合剤－１：分析物：結合剤－２）が形成される。サンドイッチ状の複合体は、「検出複合体」とも呼ばれる。検出複合体内では、分析物は結合剤の間に挟まれており、すなわちそのような複合体では、分析物は第１の結合剤と第２の結合剤との間の接続要素を表す。

【０４２７】

（「均一」に対するものとして）「不均一」という用語は、アッセイ手順における２つの必須で別個の工程を示す。第１の工程では、標識を含む検出複合体が形成され、固定化されるが、未結合の標識がまだ複合体を囲んでいる。標識依存シグナルを判定する前に、未結合標識は固定化された検出複合体から除去されるため、第２の工程に相当する。対照的に、均一アッセイは、シングルステップインキュベーションによって分析物依存の検出可能なシグナルを生成し、洗浄工程を必要としない。

【０４２８】

不均一イムノアッセイでは、固相は、分析物と接触させる前に、その表面に機能性捕捉結合剤（第１の結合剤）が結合し得るように官能化されるか、または、固相の表面は、分析物と反応した後に、第１の結合剤を係留することができるように官能化されている。後者の場合、係留プロセスは、分析物を特異的に捕捉して結合する結合剤の能力を妨げてはならない。液相中に存在する第２の結合剤は、結合した分析物の検出に使用される。したがって、不均一イムノアッセイでは、分析物を第１の結合剤（捕捉）および第２の結合剤（検出器）に結合させる。これにより、分析物が捕捉結合剤と検出器結合剤との間に挟まれた「検出複合体」が形成される。典型的な実施形態において、検出器結合剤は、分析物と接触させる前に標識されるか、あるいは、分析物結合後に標識が検出器結合剤に特異的に付着される。検出複合体が固相に固定化されている場合、固相で検出可能な標識の量は、挟まれた分析物の量に相当する。未結合の標識を除去した後、分析物の存在と量を示す固定化された標識を検出できる。

【０４２９】

本明細書で使用される場合、「競合的イムノアッセイ」は、好ましくは、分析物と直接相互作用する単一の結合剤を使用する。「競合不均一イムノアッセイ」は、典型的には、試料中の分析物の量に逆に対応する検出標識のシグナルを検出する。

【０４３０】

本明細書で使用される場合、「検出可能な標識」は、検出を可能にする標識に関する。本発明の一実施形態によれば、検出可能な標識は、酵素、または一実施形態において蛍光、発光、化学発光、電気化学発光もしくは放射能を放出する標識である。好ましい実施形態において、標識は電気化学発光標識、一実施形態においてトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（ＩＩ）錯体（Ｒｕ（ｂｐｙ））である。干渉は、自己抗体および類似の干渉分子を引き付ける標識分子の三次元構造によって引き起こされ、例えば光または放射能等の当該標識のシグナル放出機構によっては引き起こされないため、上記の標識は全て本発明で使用することができる。

【０４３１】

本明細書で使用される場合、「捕捉標識」は、捕捉剤（例えば、捕捉標識が付着した抗

体）を表面（例えば、マイクロビーズ等の磁性粒子上）に固定化することができる標識に関する。非限定的な例は、結合対のメンバーである。捕捉標識の非限定的な例はビオチンまたはその誘導体であり、これはストレプトアビジンまたはその誘導体と相互作用することができる。様々な捕捉標識が当技術分野で周知である。

【０４３２】

「および／または」という用語は、選択肢の一方または両方を意味すると理解されるべきである。

【０４３３】

本明細書で使用される場合、特に明記しない限り、「約」という用語は「およそ」という用語と同義に使用されると理解されるべきである。実例として、特に明記しない限り、記載された数値または範囲と組み合わせて使用される場合の「約」という用語の使用は、記載された値または範囲よりも幾分大きいかまたはいくらか小さいことを示し、記載された値または範囲の±１５％、記載された値の±１０％、記載された値の±５％、または便宜上記載された値の±２％の範囲内であることを示す。したがって、そのような値は、「約」または「およそ」という用語を記載する特許請求の範囲に包含される。

【０４３４】

本明細書で使用される場合、「バイオマーカー」または「マーカー」という用語は、一般に、遺伝子、タンパク質、炭水化物構造、または糖脂質、代謝産物、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、タンパク質、ＤＮＡ（ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）、ＤＮＡコピー数を含む分子、またはエピジェネティックな変化、例えば、ＤＮＡメチル化の増加、減少もしくは変化（例えば、シトシンメチル化、またはＣｐＧメチル化、非ＣｐＧメチル化）；ヒストン修飾（例えば、（脱）アセチル化、（脱）メチル化、（脱）リン酸化、ユビキチン化、ＳＵＭＯ化、ＡＤＰ－リボシル化）；ヌクレオソームの配置の変化を指し、哺乳動物の組織または細胞の中または上でのそれらの発現または存在を標準的な方法（または本明細書に開示される方法）によって検出することができ、これは、個体の健康または疾患の予測、診断および／または予後診断であり得る。したがって、本明細書において以下では、より一般的な用語および定義を説明する際に、より一般的な「マーカー」という用語もまた使用される場合がある。マーカーという用語はまた、本開示において分析されるグリカン構造もしくはグリカン、または糖ペプチドを含む。

【０４３５】

「ｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法」という用語は、この方法が生物の外部で、好ましくは体液、単離された組織、器官または細胞に対して行われることを示すために使用される。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法はｅｘ　ｖｉｖｏ法と呼ばれることもある。

【０４３６】

肝細胞癌腫（ＨＣＣ）は、世界中で発生している原発性肝がんの中で主要な組織型であり、総負荷量の７０％～８５％を占める。肝線維症および肝硬変等の基礎肝疾患がＨＣＣ発症の主な危険因子であることが知られている。ＨＣＣは、早期に診断された患者に対して、切除、肝移植、または高周波による局所アブレーションによって処置することができる。この悪性腫瘍が早期に診断された場合には、ＨＣＣ患者の５年生存率は７０％と高い可能性がある。しかしながら、ＨＣＣ患者の５年生存率は、疾患の診断が遅くなるほど有意に減少し、ＨＣＣが疾患の後期に診断される場合には、わずか１５％に低下する（Ｔｓｕｃｈｉｙａ　Ｎ，Ｓａｗａｄａ　Ｙ，Ｅｎｄｏ　Ｉ，ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｍａｒｋｅｒｓ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｅａｒｌｙ　ｄｉａｇｎｏｓｉｓ　ｏｆ　ｈｅｐａｔｏｃｅｌｌｕｌａｒ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ．Ｗｏｒｌｄ　Ｊ　Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．２０１５；２１（３７）：１０５７３－８３；Ｓｉｅｇｅｌ　Ｒ，Ｎａｉｓｈａｄｈａｍ　Ｄ，Ｊｅｍａｌ　Ａ．Ｃａｎｃｅｒ　ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ，２０１３．ＣＡ：Ａ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｆｏｒ　Ｃｌｉｎｉｃｉａｎｓ．２０１３；６３（１）：１１－３０）。

【０４３７】

「肝細胞癌腫（ＨＣＣ）の検出を支援する」という用語は、本発明による方法が、例え

ば、医師等の医療専門家が、個人がＨＣＣを有するかまたはＨＣＣを発症するリスクがあるかどうかを評価するのに役立つ／支援することを示すために使用される。理解されるように、ＨＣＣの存在を検出または除外するために、医師はいくつかの代替方法（例えば、超音波、ラジオグラフィ、ＭＲＴ、またはＣＴ）を使用することができ、代替方法をグリカン構造データ等のｉｎ　ｖｉｔｒｏバイオマーカーデータと組み合わせることができる。ＨＣＣの最終診断は、通常、組織生検または手術後の組織試料によって行われる。「ＨＣＣの検出を支援する」という用語は、本方法が単独の診断的有用性として使用されること、または複数の診断的有用性のうちの１つとして使用されることを含む。ＨＣＣ患者の全員（１００％）においてマーカーの量が基準レベルを上回っているわけではなく、全ての健康な個体においてマーカーのレベルが基準レベルまたはカットオフレベルを下回っているわけではない。当業者が理解するように、多くの疾患において、生化学的マーカーは１００％の特異性および同時に１００％の感受性を有さない。むしろ、分析されたマーカーまたはこのマーカーを含むマーカーの組合せが、例えば、所与の特異性レベルまたは所与の感度レベルにあることは、試料が分析された個体が特定の臨床状態を有する、例えば、ＨＣＣを有するというある種の可能性を示す。当業者は、特異性、感受性、陽性予測値、陰性予測値、参照値または総誤差を計算するために使用される数学的／統計的方法に完全に精通している。これらのパラメータのいずれかを計算し、ＨＣＣの有無の指標を得るために使用することができる。

【０４３８】

実験室試験の診断精度を定量化するための１つの便利な目標は、その性能を単一の数で表すことである。最も一般的な大域的尺度は、ＲＯＣプロットの曲線下面積（ＡＵＣ）である。ＲＯＣ曲線下面積は、把握された測定値がある状態の正しい識別（または一方の状態と他方の状態との区別）を可能にする確率の尺度である。値は、典型的には、１．０（２つの群の試験値の完全な分離）～０．５（試験値の２つの群の間の明らかな分布差はない）の範囲である。面積は、例えば、対角線に最も近い点または９０％特異性での感受性等のプロットの特定の部分のみに依存するのではなく、プロット全体に依存する。これは、ＲＯＣプロットが完全なものにどれだけ近いかの定量的な記述表現である（面積＝１．０）。本発明と関連して、２つの異なる状態は、患者がＨＣＣを有するか否かであり得る。

【０４３９】

本明細書で使用される場合、「対象」または「個体」という用語は、一人の人間に関する。対象は、健康であるか、または患者、例えば、肝硬変を有し、ＨＣＣを発症するリスクがあり、ＨＣＣの１つ以上の徴候、症状、または他の指標を経験しているかまたは経験したことがある患者であり得る。対象として含まれることが意図されるのは、いかなる疾患の臨床徴候も示さない臨床研究試験に関与する任意の対象、または疫学的研究に関与する対象、またはその試料が対照の役割を果たす対象である。いくつかの実施形態において、対象は、例えば、慢性アルコール摂取、Ｂ型肝炎および／またはＣ型肝炎感染、非アルコール性脂肪肝疾患、ウィルソン病、遺伝性ヘモクロマトーシス、アルファ１－アンチトリプシン欠損症、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎および他の危険因子によって、ＨＣＣを発症するリスクがあることが分かっている場合がある。他の危険因子には、肥満および／または肝臓移植が含まれ得る。実施形態において、対象は、例えば肝線維症、非肝硬変性肝疾患、ＮＡＳＨ、慢性ＨＢＶおよび慢性ＨＣＶを介してＨＣＣを発症するリスクがあることがわかっている場合がある。

【０４４０】

本開示による一実施形態において、調査される試料が得られた対象は、健康な対象であり、日常的な腫瘍学監視の一環としてＨＣＣ（の存在）についてスクリーニングされる。

【０４４１】

本開示による一実施形態において、調査される試料が得られた対象は、ＨＣＣを発症するリスクがある対象であり、日常的な腫瘍学監視の一環としてＨＣＣ（の存在）についてスクリーニングされる。

【０４４２】
対象が慢性肝疾患、ウイルス性もしくは非ウイルス性肝炎および／または肝硬変に罹患していることが分かっている場合、対象はＨＣＣを発症するリスクがあり得る。
【０４４３】
本開示による一実施形態において、調査される試料が得られた対象は、慢性肝疾患、ウイルス性または非ウイルス性肝炎、肝硬変を有し、ＨＣＣの有無の鑑別診断に供される。
【０４４４】
本開示との関連で使用される場合、「試料」は、α－１，６－コア－フコシル化ＡＦＰ、またはα－１，６－コア－フコシル化を含むその部分配列を含む、または含むと予想される液体試料であり得る。試料は、特に、限定されないが、血液試料、脳脊髄液、精液、唾液または尿等の体液であり得る。好ましい実施形態において、試料は、全血、血清または血漿等の血液試料である。更により好ましい実施形態において、試料は、血清または血漿である。
【０４４５】
本明細書で使用される試料中の分析物の「量」または「レベル」という用語は、試料中の上記分析物の量または濃度に対応するか、または試料中の上記分析物の絶対量または濃度に比例する任意の絶対尺度、あるいは、任意の相対尺度、すなわち、上記分析物の基準の量または濃度それぞれに対する量または濃度を表す尺度に関する。
【０４４６】
本明細書で使用される場合、分析物（例えば、グリカン構造または糖ペプチド）に関する「基準量」（または「基準レベル」）という用語は、独立して確立された所定量の上記分析物を指す。当業者は、基準量が予め決定され、例えば、ＨＣＣ（例えば、早期ＨＣＣ）を検出する目的のための特異性および／または感度に関して定型的な要件を満たすように設定されることを理解するであろう。したがって、基準量は、それがＨＣＣ（例えば、早期ＨＣＣ）を示すように選択され得る。ＨＣＣを検出するための要件は、例えば、規制機関ごとに異なり得る。例えば、アッセイの感受性または特異性は、それぞれ、ある特定の限界、例えば、８０％、９０％、９５％、または９８％にそれぞれ設定されなければならない場合がある。これらの要件はまた、正の予測値または負の予測値に関して規定されてもよい。例えば、感度または特異性のレベルに関してそれぞれ選択された任意の要件については、参照範囲（評価された、減少した値が異常状態を示す場合）または基準レベルもしくはカットオフレベル（評価されたまたは減少した値が異常状態を示す場合）は、当業者が決定することができる。同様に、同じ原理に従って、参照比を決定することができる。
【０４４７】
本明細書で使用される場合、例えば、スコアの参照値との関連で「参照値」という用語は、それぞれのパラメータ（例えば、スコア）について独立して確立された所定の値に関する。当業者は、参照値が予め決定され、例えば、ＨＣＣ（例えば、早期ＨＣＣ）を検出する目的のための特異性および／または感度に関して定型的な要件を満たすように設定されることを理解するであろう。したがって、参照値は、それがＨＣＣ（例えば、早期ＨＣＣ）を示すように選択され得る。基準量に関して上記で述べたことが準用される。
【０４４８】
「グリカン構造」または「グリカン」という用語は、本明細書では互換的に使用される。本開示において、調査されるグリカンはＮ－グリカンである。したがって、本明細書におけるグリカンおよびＮ－グリカンという用語は互換的に使用される。グリカンまたはグリカン構造は、様々なタイプの糖部分からなる。結合は、好ましくは図１に示されるとおりである。Ｎ－グリカン構造は、アミノ酸アスパラギンの側鎖に結合している。
【０４４９】
「糖ペプチド」という用語は、グリカンが共有結合しているアミノ酸を含むより大きなポリペプチドのペプチドまたはペプチド断片を指すために使用される。
【０４５０】

単語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、ならびに「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」および「含むこと（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」のような変形は、記載された整数もしくは工程または整数もしくは工程のグループの包含を意味するが、いかなる他の整数もしくは工程または整数もしくは工程のグループの除外を意味しないことが理解される。

【０４５１】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、別途内容が明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。

【０４５２】

濃度、量、および他の数値データは、本明細書では「範囲」の形式で表現または提示され得る。このような範囲の形式は、便宜上および簡潔にするために単に使用されているに過ぎないことが理解され、したがって、その範囲の境界として明示的に列挙されている数値を含むだけではなく、各数値および部分範囲があたかも明示的に列挙されているかのごとく、その範囲内に包含される個々の数値または部分範囲の全てを含むことを柔軟に解釈するべきである。例示として、「１５０ｍｇ～６００ｍｇ」の数値範囲は、１５０ｍｇ～６００ｍｇの明示的に列挙された値を含むだけでなく、示された範囲内の個々の値および部分範囲も含むと解釈されるべきである。したがって、この数値範囲には、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、・・・５８０、５９０、６００ｍｇ等の個々の値、および１５０から２００、１５０から２５０、２５０から３００、３５０から６００等の部分範囲が含まれる。この同じ原理は、１つの数値のみを列挙する範囲にも適用される。さらに、このような解釈は、その範囲の幅または記載されている特性にかかわらず、適用すべきである。

【０４５３】

「約」という用語は、数値に関連して使用される場合、示された数値よりも５％小さい下限値を有し、かつ示された数値よりも５％大きい上限値を有する範囲内の数値を包含することを意味する。

【０４５４】

本発明の前述の詳細な説明では、いくつかの個々の要素、特徴、技法、および／または工程が開示されている。これらの各々は、単独で考慮または使用される場合に個々にだけでなく、互いに組み合わせて考慮および使用される場合にも利益を有することが容易に認識される。したがって、過度に繰り返される冗長な節を避けるために、この説明は、可能な全ての組合せおよび置き換えを繰り返すことを避けた。それにもかかわらず、明示的に列挙されているか否かにかかわらず、そのような組合せは完全に本開示の主題の範囲内にあることが理解される。

【０４５５】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解されている意味と同じ意味を有することが意図される。本明細書で使用される技術への言及は、当業者には明らかであろうそれらの技術のバリエーションまたは同等の技術の置換を含む、当技術分野で一般的に理解されている技術を指すことが意図される。

【０４５６】

本明細書で提供される全てのアミノ酸配列は、当技術分野で慣習的に行われるように、最もＮ－末端の残基で始まり、最もＣ末端の残基で終わり、本発明のいたるところでアミノ酸を同定するために使用される１文字または３文字のコード略語は、アミノ酸について一般的に使用されるものに対応する。

【０４５７】

本明細書では、特許出願および製造者のマニュアルを含む多くの文書が引用されている。これらの文献の開示は、本発明の特許性に関連するとは考えられないが、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。より具体的には、参照された全ての文書は、個々の文書が参照により組み込まれることが具体的かつ個々に示されている場合と同程度まで、参

照により組み込まれる。

【０４５８】

ここで、本発明の要素について説明する。これらの要素は、特定の実施形態を有する態様として列挙されているが、これらは任意の方法および任意の数で組み合わされて追加の態様および実施形態を創出し得ることを理解されたい。特に、一態様の関連で開示された実施形態は、必要な変更を加えて他の態様に適用される。種々の説明された実施例および好ましい実施形態は、本発明を明示的に説明された実施形態のみに限定するように解釈されるべきではない。この記載は、明示的に記載された実施形態を任意の数の開示および／または好ましい要素と組み合わせる実施形態を支持し、かつ包含するものと理解されるべきである。更にまた、本出願に記載されている全ての要素の任意の順列および組合せは、文脈が別段の意味を示さない限り、本出願の記載によって開示されているとみなされるべきである。

【０４５９】

配列の説明

以下のアミノ酸配列は、本開示との関連で言及される。

【０４６０】

配列番号１：ＡＦＰ配列（ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｐ０２７７１参照；バージョン２０９）；Ｎ－グリコシル化のための部位であるＡｓｎ－２５１に下線が引かれている

ＭＫＷＶＥＳＩＦＬＩＦＬＬＮＦＴＥＳＲＴＬＨＲＮＥＹＧＩＡＳＩＬＤＳＹＱＣＴＡ
ＥＩＳＬＡＤＬＡＴＩＦＦＡＱＦＶＱＥＡＴＹＫＥＶＳＫＭＶＫＤＡＬＴＡＩＥＫＰＴＧ
ＤＥＱＳＳＧＣＬＥＮＱＬＰＡＦＬＥＥＬＣＨＥＫＥＩＬＥＫＹＧＨＳＤＣＣＳＱＳＥＥ
ＧＲＨＮＣＦＬＡＨＫＫＰＴＰＡＳＩＰＬＦＱＶＰＥＰＶＴＳＣＥＡＹＥＥＤＲＥＴＦＭ
ＮＫＦＩＹＥＩＡＲＲＨＰＦＬＹＡＰＴＩＬＬＷＡＡＲＹＤＫＩＩＰＳＣＣＫＡＥＮＡＶ
ＥＣＦＱＴＫＡＡＴＶＴＫＥＬＲＥＳＳＬＬＮＱＨＡＣＡＶＭＫＮＦＧＴＲＴＦＱＡＩＴ
ＶＴＫＬＳＱＫＦＴＫＶ<u>Ｎ</u>ＦＴＥＩＱＫＬＶＬＤＶＡＨＶＨＥＨＣＣＲＧＤＶＬＤＣＬＱ
ＤＧＥＫＩＭＳＹＩＣＳＱＱＤＴＬＳＮＫＩＴＥＣＣＫＬＴＴＬＥＲＧＱＣＩＩＨＡＥＮ
ＤＥＫＰＥＧＬＳＰＮＬＮＲＦＬＧＤＲＤＦＮＱＦＳＳＧＥＫＮＩＦＬＡＳＦＶＨＥＹＳ
ＲＲＨＰＱＬＡＶＳＶＩＬＲＶＡＫＧＹＱＥＬＬＥＫＣＦＱＴＥＮＰＬＥＣＱＤＫＧＥＥ
ＥＬＱＫＹＩＱＥＳＱＡＬＡＫＲＳＣＧＬＦＱＫＬＧＥＹＹＬＱＮＡＦＬＶＡＹＴＫＫＡ
ＰＱＬＴＳＳＥＬＭＡＩＴＲＫＭＡＡＴＡＡＴＣＣＱＬＳＥＤＫＬＬＡＣＧＥＧＡＡＤＩ
ＩＩＧＨＬＣＩＲＨＥＭＴＰＶＮＰＧＶＧＱＣＣＴＳＳＹＡＮＲＲＰＣＦＳＳＬＶＶＤＥ
ＴＹＶＰＰＡＦＳＤＤＫＦＩＦＨＫＤＬＣＱＡＱＧＶＡＬＱＴＭＫＱＥＦＬＩＮＬＶＫＱ
ＫＰＱＩＴＥＥＱＬＥＡＶＩＡＤＦＳＧＬＬＥＫＣＣＱＧＱＥＱＥＶＣＦＡＥＥＧＱＫＬ
ＩＳＫＴＲＡＡＬＧＶ

【０４６１】

配列番号２　ＡＦＰのペプチド配列（配列番号１のＡＳ２４３から２６１）；Ａｓｎ－２５１に対応するＡｓｎに下線を引く

ＬＳＱＫＦＴＫＶ<u>Ｎ</u>ＦＴＥＩＱＫＬＶＬＤ

【０４６２】

配列番号３　ＣＤＲ－Ｈ１　１９Ｂ１２および３Ｃ５

ＴＹＧＭＧ

【０４６３】

配列番号４　ＣＤＲ－Ｈ２　１９Ｂ１２

ＩＩＧＤＮＧＳＴＹＹＡＮＷＡ

【０４６４】

配列番号５　ＣＤＲ－Ｈ２　３Ｃ５

ＩＩＤＳＧＳＴＹＹＡＮＷＡ

【０４６５】

配列番号６　ＣＤＲ－Ｈ３　１９Ｂ１２および３Ｃ５

ＤＲＤＰＳＳＳＧＹＹＦＫＭ

【０４６６】
配列番号７　ＣＤＲ－Ｌ１　１９Ｂ１２
ＱＡＳＱＳＩＳＳＹＬＡ
【０４６７】
配列番号８　ＣＤＲ－Ｌ１　３Ｃ５
ＱＡＳＱＳＩＧＳＹＬＡ
【０４６８】
配列番号９　ＣＤＲ－Ｌ２　１９Ｂ１２および３Ｃ５
ＧＡＳＮＬＥＳ
【０４６９】
配列番号１０　ＣＤＲ－Ｌ３　１９Ｂ１２および３Ｃ５
ＱＴＡＦＹＩＦＳＳＤＮＡ
【０４７０】
配列番号１１　ＶＨ配列１９Ｂ１２（ＣＤＲに下線）
ＱＳＶＥＥＳＧＧＲＬＶＡＰＧＴＰＬＴＬＴＣＴＶＳＧＩＤＬＳＴＹＧＭＧＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＩＧＩＩＧＤＮＧＳＴＹＹＡＮＷＡＫＧＲＦＴＩＳＫＴＳＴＴＶＤＬＫＭ
ＴＳＬＴＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＤＲＤＰＳＳＳＧＹＹＦＫＭＷＧＰＧＴＬＶＴＶＳＬ
【０４７１】
配列番号１２　ＶＨ配列３Ｃ５（ＣＤＲに下線）
ＱＳＶＥＥＳＧＧＲＬＶＡＰＧＴＰＬＴＬＴＣＴＶＳＧＩＤＬＳＴＹＧＭＧＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＹＩＧＩＩＤＳＧＳＴＹＹＡＮＷＡＫＧＲＦＴＩＳＫＴＳＴＴＶＤＬＫＭＴ
ＳＬＴＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＤＲＤＰＳＳＳＧＹＹＦＫＭＷＧＰＧＴＬＶＴＶＳＬ
【０４７２】
配列番号１３　ＶＬ配列１９Ｂ１２（ＣＤＲに下線）
ＡＬＶＭＴＱＴＰＳＳＶＳＡＡＶＧＧＴＶＴＩＮＣＱＡＳＱＳＩＳＳＹＬＡＷＹＱＱＫ
ＰＧＱＰＰＫＬＬＩＦＧＡＳＮＬＥＳＧＶＰＳＲＦＫＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＤＬＥ
ＣＤＤＡＡＴＹＹＣＱＴＡＦＹＩＦＳＳＤＮＡＦＧＧＧＴＥＶＶＶＫ
【０４７３】
配列番号１４　ＶＬ配列３Ｃ５（ＣＤＲに下線）
ＡＬＶＭＴＱＴＰＳＳＶＳＡＡＶＧＧＴＶＴＩＮＣＱＡＳＱＳＩＧＳＹＬＡＷＹＱＱＫ
ＰＧＱＰＰＲＬＬＩＹＧＡＳＮＬＥＳＧＶＰＳＲＦＫＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＤＬＥ
ＣＤＤＡＡＴＹＹＣＱＴＡＦＹＩＦＳＳＤＮＡＦＧＧＧＴＥＶＶＶＫ
【０４７４】
配列番号１５　１９Ｂ１２および３Ｃ５のＶＨのＦＷ１
ＱＳＶＥＥＳＧＧＲＬＶＡＰＧＴＰＬＴＬＴＣＴＶＳＧＩＤＬＳ
【０４７５】
配列番号１６　１９Ｂ１２のＶＨのＦＷ２
ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＩＧ
【０４７６】
配列番号１７　３Ｃ５のＶＨのＦＷ２
ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＹＩＧ
【０４７７】
配列番号１８　１９Ｂ１２および３Ｃ５のＶＨのＦＷ３
ＫＧＲＦＴＩＳＫＴＳＴＴＶＤＬＫＭＴＳＬＴＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲ
【０４７８】
配列番号１９　１９Ｂ１２および３Ｃ５のＶＨのＦＷ４
ＷＧＰＧＴＬＶＴＶＳＬ
【０４７９】
配列番号２０　１９Ｂ１２および３Ｃ５のＶＬのＦＷ１
ＡＬＶＭＴＱＴＰＳＳＶＳＡＡＶＧＧＴＶＴＩＮＣ

【０４８０】
配列番号２１　１９Ｂ１２のＶＬのＦＷ２
ＷＹＱＱＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＦ
【０４８１】
配列番号２２　３Ｃ５のＶＬのＦＷ２
ＷＹＱＱＫＰＧＱＰＰＲＬＬＩＹ
【０４８２】
配列番号２３　１９Ｂ１２および３Ｃ５のＶＬのＦＷ３
ＧＶＰＳＲＦＫＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＤＬＥＣＤＤＡＡＴＹＹＣ
【０４８３】
配列番号２４　１９Ｂ１２および３Ｃ５のＶＬのＦＷ４
ＦＧＧＧＴＥＶＶＶＫ
【０４８４】
配列番号２５　ＡＦＰ（配列番号１に示されるＡＦＰのＡＳ　２４８－２５６）のペプチド配列；Ａｓｎ－２５１に対応するＡｓｎに下線
ＴＫＶＮＦＴＥＩＱ
【０４８５】
配列番号２６　ＡＦＰ（配列番号１に示されるＡＦＰのＡＳ　２４３－２５６）のペプチド配列；Ａｓｎ－２５１に対応するＡｓｎに下線
ＬＳＱＫＦＴＫＶＮＦＴＥＩＱ
【０４８６】
配列番号２７　多価抗体における例示的なリンカー
ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ
【実施例】
【０４８７】
以下の実施例は、本発明の理解を助けるために提供される。
【０４８８】
実施例１：免疫およびスクリーニングのためのペプチドの合成
糖ペプチドの合成
ペプチドを、ペプチド合成機（例えばＰｒｏｔｅｉｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ製）でのフルオレニルメチルオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）固相ペプチド合成によって合成した。アミノ酸カップリングには、各アミノ酸誘導体の５当量を使用した。アミノ酸誘導体を、１当量の１－ヒドロキシ－７－アザベンゾトリアゾール（ＨＯＡｔ）を含有するジメチルホルムアミドに溶解した。ペプチドを、Ｓｉｅｂｅｒ　Ａｍｉｄｅ樹脂上で合成した。カップリング反応を、樹脂充填量に対して５当量の１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート（ＨＡＴＵ）および１０当量のＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ）を用いてジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中で５分間行った。ＤＭＦ中２０％ピペリジンを使用して、各合成工程後にＦｍｏｃ基を８分間切断した。二糖含有ペプチドの合成のために、ＡｓｎのＦｍｏｃ保護された糖アミノ酸構成要素を使用し（それぞれ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｎ（α－Ｌ－Ｆｕｃ（Ａｃ）３（１－６）－β－Ｄ－ＧｌｃＮＡｃ（Ａｃ）２）－ＯＨおよびＦｍｏｃ－Ａｓｎ（β－ＧｌｃＮＡｃ（Ａｃ）３β（１－４）ＧｌｃＮＡｃ（Ａｃ）２）－ＯＨ）、上記の標準条件によってカップリングした。複合二分岐グリカン（Ｇ０ＦおよびＧＦ）を含有するペプチドの場合、フェニルアラニン－トレオニンジペプチドをＦｍｏｃ保護シュードプロリン誘導体として使用し、ＡｓｎをＦｍｏｃ－Ａｓｎ（ＯＤｍａｐ）として導入した。Ａｓｐ（ＯＤｍａｂ）の樹脂切断時のペプチドのアセンブリを、ＤＭＦ中２％ヒドラジンで樹脂を洗浄し（５×５分間）、続いて水／メタノール（１：１）中５ｍＭ水酸化ナトリウムで１時間処理することによって達成した。合成樹脂からのペプチドの放出は、ジクロロメタン中１％トリフルオロ酢酸とのインキュベーション（１０×３分）によって達成した。その後、反応溶液を水で抽出し

、蒸発乾固した。粗材料をフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。精製された材料の同一性を、イオンスプレー質量分析法によって分析した。

【０４８９】

メタノール中で１，３－プロパンジチオール（４０当量）およびＤＩＰＥＡ（３０当量）を添加することによって、Ｇ０ＦおよびＧ２の二分岐グリコシルアジド＊）を対応するアミンに還元した。４時間撹拌した後、冷ジイソプロピルエーテルを添加することによって糖を沈殿させた。ペプチドへの糖カップリングは、２当量の糖アミン（Ｇ０ＦまたはＧ２）、２当量のＨＡＴＵ、２当量のＨＯＡｔ、８当量のＤＩＰＥＡを含むＤＭＦ／ＤＭＳＯ（１：１）を一晩用いて達成した。その後、酸不安定性保護基の開裂を、９、５ｍｌのトリフルオロ酢酸、０．２５ｍｌのトリイソプロピルシランおよび０、２５ｍｌの水を用いて室温で２時間にわたって達成した。その後、反応溶液を冷ジイソプロピルエーテルと混合してペプチドを沈殿させた。沈殿物をフィルタにかけ、冷ジイソプロピルエーテルで再度洗い流し、少量の酢酸水溶液に溶解し、凍結乾燥した。粗材料を、アセトニトリル／０．１％トリフルオロ酢酸含有水の勾配を使用する分取逆相ＨＰＬＣによって精製した。精製された材料の同一性を、イオンスプレー質量分析法によって分析した。免疫化およびスクリーニングのために合成および使用された全てのペプチドの概要を表１に示す。

＊）Ｌｉｔｅｒａｔｕｒｅ ｆｏｒ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｂｉ－ａｎｔｅｎｎａｒｙ ｆｕｃｏｓｙｌａｔｅｄ Ｎ－ｇｌｙｃｏｓｙｌ ａｚｉｄｅｓ：Ｊ．Ｓｅｉｆｅｒｔ，Ｃ．Ｕｎｖｅｒｚａｇｔ，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．１９９７，３８，７８５７－７８６０．

【０４９０】

ビオチン化Ａｓｎ（Ｇ０Ｆ）の合成

Ａｓｐ－ＯＢｚｌ、ビオチン－ＰＥＧ１２－ＮＨＳエステル（１当量）およびトリメチルアミン（８当量）をＤＭＦに溶解し、２．５時間撹拌した。粗生成物を、アセトニトリル／０．１％トリフルオロ酢酸含有水の勾配を使用する分取逆相ＨＰＬＣによって精製した。

【０４９１】

メタノール中の１，３－プロパンジチオール（４０当量）およびＤＩＰＥＡ（３０当量）を添加することによって、Ｇ０Ｆ－アジドを対応するアミンに還元した。４時間撹拌した後、冷ジイソプロピルエーテルを添加することによって糖を沈殿させた。ビオチン－ＰＥＧ１２－Ａｓｐ－ＯＢｚｌへの糖カップリングは、ＤＭＦ／ＤＭＳＯ（１：１）中の０．５当量の糖アミン、１当量のＨＡＴＵ、１当量のＨＯＡｔ、４当量のＤＩＰＥＡを使用して一晩で達成した。その後、反応溶液を冷ジイソプロピルエーテルと混合した。沈殿物をフィルタにかけ、冷ジイソプロピルエーテルで再度洗い流し、少量の酢酸水溶液に溶解し、凍結乾燥した。粗材料を、アセトニトリル／０．１％トリフルオロ酢酸含有水の勾配を使用する分取逆相ＨＰＬＣによって精製した。精製された材料の同一性を、イオンスプレー質量分析法によって分析した。α－１，６－コア－フコシル化を強調する、Ａｓｎ－２５１（Ｎ２５１）におけるＡＦＰのＮ－グリカン構造を示す概略図を図１に示す。

【０４９２】

免疫原の合成

リン酸緩衝液（２０ｍＭ、ｐＨ７．２）中のキーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）の溶液に、３－（マレイミド）プロピオン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステルを添加した。反応物を室温で５時間インキュベートし、次いで、リン酸緩衝液（０．１Ｍ、ｐＨ７．０）に対して透析した。システイン含有糖ペプチドをＤＭＳＯに溶解し、０．１Ｍエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）を含むマレイミド活性化ＫＬＨの溶液に加えた。溶液を室温で５時間インキュベートし、次いで、リン酸緩衝液（０．１Ｍ、ｐＨ７．０）に対して透析して、ＫＬＨ－ペプチドコンジュゲートを得た。

【０４９３】

糖ペプチドおよびペプチド

【表１－１】

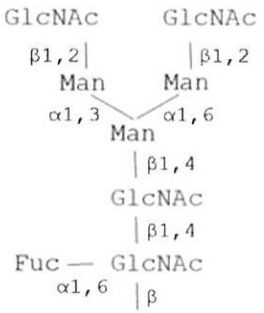
略称	名称	BMO番号	構造	説明／用途	配列番号 AFPペプチド部分
AFP（243－256）－G0F－IMG	AFP（243－256）[KLH－リンカー－243；Asn（G0F）251]	35.000146	KLH－MP－C－βAla－Ahx－βAla－βAla－LSQKFTKV－N（G0F）－FTEIQ－NH2	短G0Fペプチド 免疫原性	26
AFP（243－261）－G0F－Bi	AFP（243－261）[アセチル－243；Asn（G0F）251；Bi－PEG]：	35.000148	Ac－LSQKFTKV－N（G0F）－FTEIQKLVLD－E（ビオチニル－PEG）－NH2	ビオチン化G0F 陽性スクリーニング、biacore	2
AFP（243－261）－G2－Bi	AFP（243－261）[Ac－243；Asn（G2）251；Bi－PEG]	35.000151	Ac－LSQKFTKV－N（G2）－FTEIQKLVLD－E（ビオチニル－PEG）－NH2	ビオチン化G2 陰性スクリーニング	2
AFP（243－261）－G0F	AFP（243－261）[Ac－243；Asn（G0F）251]アミド	35.000315	Ac－LSQKFTKV－N（G0F）TEIQKLVLD－NH2	ビオチンを含まないG0F biacore	2
Asn（G0F）－Bi	AFP（251）[Bi－PEG－Asn（G0F）251]ベンジル	35.000150	Bi－PEG12－N（G0F）－ベンジル	ペプチドを含まないビオチン化Ans（G0F） biacore	－
AFP（248－256）	AFP（248－256）Ac－248]アミド	35.000373	Ac－TKVNFTEIQ－NH2	糖を含まない短いペプチド biacore	25
AFP（243－261）－（Fuc－GlcNAc）－Bi	AFP（243－261）[Asn（Fuc－GlcNAc）Bi－PEG]	35.100001	LSQKFTKV－N（Fuc－GlcNAc）－FTEIQKLVLD－E（ビオチニル－PEG）－NH2	フコシル化二糖を有するビオチン化ペプチド biacore、elecsys	2

【表１－２】

略称	名称	ＢＭＯ番号	構造	説明／用途	配列番号ＡＦＰペプチド部分
ＡＦＰ（２４３－２５６）－（ＧｌｃＮＡｃ－ＧｌｃＮＡｃ）－Ｂｉ	ＡＦＰ（２４３－２５６）[Ａｓｎ（ＧｌｃＮＡｃ－ＧｌｃＮＡｃ]Ｂｉ－ＰＥＧ	３５．１００００２	ＬＳＱＫＦＴＫＶ－Ｎ（ＧｌｃＮＡｃ－ＧｌｃＮａｃ）－ＦＴＥＩＱ－Ｅ（ビオチニル－ＰＥＧ）－ＮＨ２	非フコシル化二糖を有するビオチン化ペプチド ｅｌｅｃｓｙｓ	２６

表１：免疫化およびスクリーニングのための合成ペプチドの概要

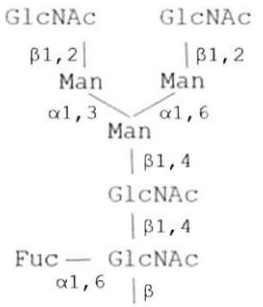
【０４９４】
略語
Ａｃ：Ｎ末端アセチル化
Ａｈｘ：６－アミノヘキサン酸
βＡｌａ：ベーター－アラニン
Ｂｉ：ビオチン
Ｆｕｃ：Ｌ－フコースＧ０Ｆ：フコシル化二分岐Ｎ－グリカン
Ｇ２：非フコシル化二分岐Ｎ－グリカン
ＧｌｃＮＡｃ：Ｎ－アセチルグルコサミン
ＩＭＧ：免疫原
ＭＰ：３－（マレイミド）プロピオン酸
－ＮＨ２：Ｃ末端カルボキシアミド
ＰＥＧ：ポリエチレングリコール
【０４９５】
糖ペプチドおよびペプチドの構造
ＢＭＯ　３５．０００１４６：
【化１３】



KLH-linker-LSQKFTKVNFTEIQ-NH2

（ＡＦＰペプチド部分は配列番号２６を有する）
【０４９６】
ＢＭＯ　３５．０００１４８：

【化１４】



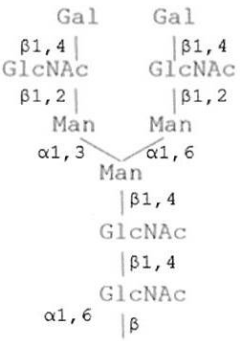
Ac-LSQKFTKVNFTEIQKLVLD-linker-biotin

（ＡＦＰペプチド部分は配列番号２を有する）

【０４９７】

ＢＭＯ　３５．０００１５１：

【化１５】



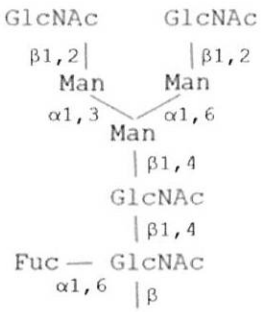
Ac-LSQKFTKVNFTEIQKLVLD-linker-biotin

（ＡＦＰペプチド部分は配列番号２を有する）

【０４９８】

ＢＭＯ　３５．０００３１５：

【化１６】



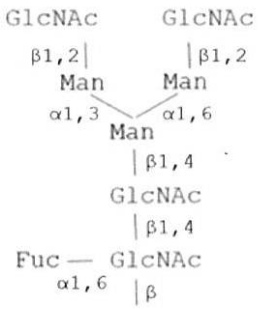
Ac-LSQKFTKVNFTEIQKLVLD-NH2

（ＡＦＰペプチド部分は配列番号２を有する）

【０４９９】

ＢＭＯ　３５．０００１５０：

【化１７】



【０５００】

ＢＭＯ　３５．０００３７３：

【化１８】

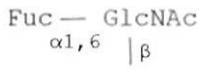
Ac-TKVNFTEIQ-NH2

（ＡＦＰペプチド部分は配列番号２５を有する）

【０５０１】

ＢＭＯ　３５．１００００１：

【化１９】



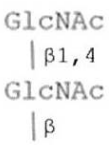
LSQKFTKVNFTEIQKLVLD-linker-biotin

（ＡＦＰペプチド部分は配列番号２を有する）

【０５０２】

ＢＭＯ　３５．１００００２：

【化２０】



LSQKFTKVNFTEIQ-linker-biotin

（ＡＦＰペプチド部分は配列番号２６を有する）

【０５０３】

実施例２：抗体の生成

免疫化

１２～１６週齢の２ｘ２ニュージーランドホワイト（ＮＺＷ）ウサギをＡＦＰ－Ｌ３糖ペプチド（ＡＦＰ（２４３－２５６）－Ｇ０Ｆ－ＩＭＧ）で免疫した。ペプチドの免疫原性を増強するために、担体タンパク質としてキーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）に結合させた。最初の月に、動物を毎週免疫した。２ヶ月目から、免疫化スケジュールを１ヶ月に１回に減らした。第１の免疫のために、５００μｇのＫＬＨ結合ＡＦＰ（２４３～２５６）－Ｇ０Ｆ－ＩＭＧを０．９％ＮａＣｌに溶解し、２ｍｌの完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）に乳化した。その後の全ての免疫化のために、ＣＦＡを１ｍＬの不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）エマルジョンに置き換えた。

【０５０４】

力価分析

ＥＬＩＳＡプロトコルを用いて力価分析を行った。ビオチン化ＡＦＰ（２４３－２６１

）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉスクリーニングペプチドを陽性対照として用いて血清滴定を行った。

【０５０５】

ビオチン化ペプチドをスクリーニングに使用したので、１００μｌ／ウェルの３１、２５ｎｇ／ｍｌ溶液を室温で６０分間インキュベートすることによって、９６ウェルストレプトアビジン被覆マイクロタイタープレートの表面に固定化した。その後の洗浄は、自動機器（Ｂｉｏｔｅｋ）を製造者の指示に従って使用して行った。各ウサギからの少量の血清（動物あたり２～３ｍｌ）を、免疫化キャンペーンの開始後４５日目および１０５日目に収集した。各ウサギ由来の血清を、１％ＢＳＡを含有するＰＢＳで１：３００、１：９００、１：２７００、１：８１００、１：２４３００、１：７２９００、１：２１８７００および１：６５６１００に希釈した。各希釈液１００μｌを、スクリーニングペプチドを用いて予め調製したプレートに添加し、室温で６０分間インキュベートした。結合した抗体を、ＨＲＰ標識Ｆ（ａｂ’）２ヤギ抗ウサギＦｃγ（Ｄｉａｎｏｖａ）およびＡＢＴＳ基質溶液（Ｒｏｃｈｅ）で検出した。分析した動物の力価を希釈曲線の５０％シグナル減少に設定した。

【表２】

免疫原	動物数	力価４５日目	力価１０５日目
ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉ	#Ｋ００６１８０	０	１０９６
ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉ	#Ｋ００６１８１	０	０
ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉ	#Ｋ００６１８４	３１２９	１０８７
ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉ	#Ｋ００６１８５	０	５６１

表２：ＫＬＨにカップリングされたＡＦＰ－Ｌ３ペプチドによる免疫後の例示的な力価

【０５０６】

表２の結果によって実証されるように、免疫化動物からのポリクローナル血清は、ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉスクリーニングペプチドに結合した。しかし、力価は極めて低いものであったが、糖ペプチドは免疫原性の低い免疫原であり、そのような分子に結合する抗体を開発することは極めて困難であることから、このことが予想された。さらに、非常に少数の抗体のみがコア－フコシル化ペプチドに特異的に結合し、非フコシル化ＡＦＰ－Ｌ１バリアントに対して低い交差反応性を示すことが予想される。

【０５０７】

抗原反応性Ｂ細胞の濃縮および単一細胞選別

抗原反応性Ｂ細胞を濃縮するために、３１．２５ｎｇ／ｍｌのビオチン化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉペプチドを、免疫化動物由来の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）プールと室温で１５分間プレインキュベートした。洗浄工程後、ペプチドをロードした抗原反応性Ｂ細胞をストレプトアビジン被覆ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）と共に室温で１５分間インキュベートした。ＭＡＣＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を用いた陽性Ｂ細胞の選別およびその後のインキュベーションを、陽性Ｂ細胞の選別にプレート結合ではなくＭＡＣＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）が関与したことをのみを除いて、Ｓｅｅｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ９（２０１４），ｉｓｓｕｅ ２，ｅ８６１８４に記載されているように行った。９６ウェルプレート中でＢ細胞を７日間培養した後、その後のＥＬＩＳＡ分析のために上清を収集し、クローニングのために細胞を溶解した。合計で、免疫化動物からのＢ細胞の抽出および濃縮を、免疫化動物あたりおよそ２１回、８４回行った。本明細書に記載の抗体開発のための方法の大きな利点は、動物を数回出血させることができ、抗体の成熟を免疫化キャンペーンの期間にわたって追跡することができることである。動物あたりの大量の種類はまた、ＡＦＰ－Ｌ１に対する交差反応性が低いＡＦＰ－Ｌ３に対して所望の特異性を有するクローンを同定することがどれだけ困難であったかを示

す。

【０５０８】

抗体スクリーニング

続いて、Ｈｉｔ－ＥＬＩＳＡ（すなわち、スクリーニング試薬への結合を試験するＥＬＩＳＡ）を使用して、所望の結合特性、すなわち、ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉペプチドをコア－フコシル化と結合するが、コア－フコースを含まない糖ペプチドであるＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉとは結合しない抗体を発現するＢ細胞を同定した。１００μｌ／ウェルの３１、２５ｎｇ／ｍｌ溶液をそれぞれ室温で６０分間インキュベートすることによって、ストレプトアビジン被覆３８４ウェルプレート（Ｎｕｎｃ）の表面にペプチドを固定化した。プレートを洗浄し、３０μｌのウサギＢ細胞培養上清を各ウェルに移し、室温で１時間インキュベートした。スクリーニング剤に結合した抗体の検出には、ＨＲＰ標識Ｆ（ａｂ’）２ヤギ抗ウサギＦｃγ（Ｄｉａｎｏｖａ）およびＡＢＴＳ基質溶液（Ｒｏｃｈｅ）を製造者の指示に従って使用した。コア－フコシル化を有する糖ペプチドに結合したが、コア－フコシル化を有さないペプチドには結合しなかったいくつかのクローンを同定した（合計４匹の免疫化ウサギによる８４回のＢ細胞選別実験のうち）（表２）。いくつかのクローンのＶ領域を哺乳動物発現ベクターにクローニングし、続いて２ｍｌのＨＥＫ２９３細胞で発現させた（Ｓｅｅｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　９（２０１４），ｉｓｓｕｅ　２，ｅ８６１８４．に記載される）。発現の１週間後、ウサギＩｇＧを含有するトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞の上清を、詳細な動態解析のための性能基準を満たす抗体のサブセットの最初のＳＰＲ　Ｂｉａｃｏｒｅに基づく選択のために使用した（表３を参照）。

【表３】

クローン	スクリーニングペプチド	OD
19B12	AFP（243－261）－G0F－Bi	3．040
	AFP（243－261）－G2－Bi	0．279
3C5	AFP（243－261）－G0F－Bi	2．886
	AFP（243－261）－G2－Bi	0．936
3D2	AFP（243－261）－G0F－Bi	1．98
	AFP（243－261）－G2－Bi	0．1860
13G6	AFP（243－261）－G0F－Bi	2．475
	AFP（243－261）－G2－Bi	0．4380
3A3	AFP（243－261）－G0F－Bi	1．259
	AFP（243－261）－G2－Bi	0．087
6B6	AFP（243－261）－G0F－Bi	2．020
	AFP（243－261）－G2－Bi	0．262

表３：陽性スクリーニング試薬に特異的に結合するが陰性スクリーニング試薬には結合しないことを特徴とする抗体を産生する例示的なクローンのＥＬＩＳＡ結果

【０５０９】

実施例３：動態スクリーニングおよび更なる動態学的特性評価

表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）－分光法－支援された動態スクリーニングおよび詳細な動態学的特性評価を実施して、優れた動態学的プロファイルおよび標的特異性を有する抗

体を選択した。

【０５１０】

動態スクリーニングを、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）Ｂ４００装置で２５℃で行った。Ｂｉａｃｏｒｅ ＣＭ５シリーズＳセンサを機器に取り付け、流体力学的にアドレスし、製造業者の指示に従って事前調整した。システム緩衝液は、ＨＢＳ ＥＴ ｐＨ７．４、１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、３ｍＭ ＥＤＴＡ、０．０５％（ｗ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ２０であった。システム緩衝液に１ｍｇ／ｍＬ ＣＭＤ（カルボキシメチルデキストラン、Ｓｉｇｍａ、カタログ番号８６５２４）を補充し、希釈系列を調製するための試料緩衝液として使用した。

【０５１１】

ウサギ抗体捕捉系をセンサ表面に固定化した。ポリクローナルヤギ抗ウサギＩｇＧ Ｆｃ捕捉抗体ＧＡＲｂＦｃγ（コード番号１１１－００５－０４６；Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、ロット番号１０５３３２）を、製造業者の説明書に従ってＥＤＣ／ＮＨＳ化学を使用してアミンカップリングした。

【０５１２】

１０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液ｐＨ４．５中３０μｇ／ｍＬのヤギ抗ウサギＦｃガンマ（ＧＡＲｂＦｃγ）をフローセル１、２、３および４のスポット１、２、４および５に予備濃縮し、１２０００～１３０００ＲＵの密度でセンサ表面に共有結合させた。遊離活性化カルボキシル基を１ＭエタノールアミンｐＨ８．５で飽和させた。

【０５１３】

スポット１および５を相互作用測定に使用し、スポット２および４を参照として使用した。一次細胞上清からの各ウサギ抗体を試料緩衝液で１：２に希釈し、１０μＬ／分の流量で２分間注入した。共鳴単位（ＲＵ）でのウサギ抗体捕捉レベル（ＣＬ）を監視した。高い十分な感度を達成するために、ビオチン化ペプチドＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉ、Ｒｏｃｈｅ ＢＭＯ ３５．０００１４８、４．３ｋＤａおよびＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉ、Ｒｏｃｈｅ ＢＭＯ ３５．０００１５１、４．５ｋＤａの追加の分子質量負荷をストレプトアビジン（ＳＡ）グラフト化によって生成した。ビオチン化ペプチド、ストレプトアビジンおよびアミノ－ＰＥＯ－ビオチン（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ、カタログ番号２１３４６）を１：１０：５の比で混合し、室温（ＲＴ）で２時間インキュベートした。ＳＡ－グラフト化－ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－ＢｉおよびＳＡ－グラフト化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉの分子量を、６４ｋＤａで算出した。ＳＡグラフトペプチドを１５０ｎＭの分析物としてそれぞれの表面に注入すると、３０μＬ／分で抗ＡＦＰ－Ｌ３抗体が示された。会合相および解離相を５分間監視した。

【０５１４】

ウサギクローンを、１０ｍＭグリシンｐＨ１．５を２０μＬ／分で２０秒間注入し、続いて１０ｍＭグリシンｐＨ１．７を６０秒間２回注入することによって、センサ表面から再生した。動態を、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）Ｂ４０００コントロールＳＷ Ｖ１．１によって監視し、Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ＳＷ Ｖ１．１で評価した。分析物注入の終了直前のＢｉｎｄｉｎｇ Ｌａｔｅ（ＢＬ）および解離相の終了直前にＳｔａｂｉｌｉｔｙ Ｌａｔｅ（ＳＬ）の報告ポイントを監視した。ＢＬおよびＳＬデータを使用して、抗体／抗原結合安定性を特徴付けた。また、ラングミュア１：１モデルにより、解離速度定数k_d［s^{-1}］を算出した。抗原／抗体複合体安定性半減時間（分）を、式ｌｎ（２）／６０＊k_dに従って計算した。結合化学量論を表すモル比を、以下の式を用いて計算した。

ＭＷ（抗体）／ＭＷ（抗原）＊ＢＬ（抗原）／ＣＬ（抗体）

【０５１５】

複数の抗体から、特異的抗体動態が同定され、抗体はフコシル化ＡＦＰ－Ｌ３ペプチドと非フコシル化ＡＦＰ－Ｌ３ペプチドとを区別した（図２を参照）。

【０５１６】

動態学的特性評価

ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ製のＢＩＡｃｏｒｅ（商標）Ｔ２００装置を用いて３７℃で詳細な動態調査を行った。動態スクリーニングによって同定された５匹のウサギｍＡｂ＜ＡＦＰ－Ｌ３＞１９Ｂ１２、３Ｃ５、３Ｄ２、３Ａ３および６Ｂ６を、ＡＦＰ－Ｌ３ペプチドの結合について動態学的に特徴付けた。

・ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉ
・Ａｓｎ（Ｇ０Ｆ）－Ｂｉ
・ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉ
・ＡＦＰ（２４３－２６１）－（Ｆｕｃ－ＧｌｃＮＡｃ）－Ｂｉ

【０５１７】

Ｓｅｒｉｅｓ　Ｓ　Ｃ１センサを用いて３７℃で測定した。

【０５１８】

ウサギ抗体捕捉系を、７００ＲＵ～８００ＲＵで記載されるようにフローセル１～４上に固定化した。フローセル１を基準として、フローセル２、３および４を相互作用測定に使用した。１５０ｎＭ抗体１～５を１０μＬ／分で３０秒間注入した。共鳴単位ＲＵにおける捕捉レベル（ＣＬ）を監視した。３．３～２７０ｎＭからのペプチド分析物濃度系列を６０μｌ／分で注入した。会合相を３分間監視し、解離相を１０分間監視した。再生は、１０ｍＭグリシンｐＨ２．０を２０μＬ／分で３０秒間注入し、続いて１０ｍＭグリシンｐＨ２．２５を６０秒間２回注入することによって行った。動態学的速度定数および解離平衡定数K_Dは、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）Ｔ２００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　ＳＷ　３．２に従ってラングミュア１：１フィッティングモデルを使用して決定した。次に、ラングミュア１：１フィッティングＳｃｒｕｂｂｅｒ－ＳＷ　Ｖ２．０ｃを適用した。

【０５１９】

ペプチドに結合する抗体１９Ｂ１２、３Ｃ５、３Ｄ２、３Ａ３および６Ｂ６の動態学的プロファイルを図３に示す。抗体１９Ｂ１２結合速度論対ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉを、k_a６．０Ｅ＋０５±０．０７％$M^{-1}s^{-1}$，k_d１．５Ｅ－０３±０．０５％s^{-1}，$t_{1/2diss}$＝８±０．０５分、ＭＲ＝１．４で決定した。親和性はK_D＝２．５±０．０８％ｎＭであった（表４および図４を参照）。目視検査により、抗体３Ｃ５の動態学的シグネチャは、示された最高濃度９０ｎＭの抗体飽和に近い。この相互作用は、複雑な結合挙動を示す。したがって、記載された定数は見かけの値を表す（表４および図３参照）。

【０５２０】

目視検査により、抗体３Ｄ２および３Ａ３は、ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉに結合すると、より遅い複合体形成を示し、最高濃度で抗体飽和に近づかない。相互作用はラングミュアの法則に従わない（図３を参照）。目視検査により、抗体６Ｂ６は、フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉとの最も弱い相互作用を示す（図３を参照）。

【０５２１】

これらの分析により、クローン１９Ｂ１２および３Ｃ５が、それらの特異性および親和性に関して最良の性能を示すことが明らかになった。両方のクローンは、コア－フコシル化に特異的であり、更にＡＦＰペプチド骨格に結合する。後者は、クローンとして重要であり、コア－フコースに結合するだけで、試料中の任意の他のコア－フコシル化タンパク質、例えばＩｇＧ型分子に結合する。

【表４】

mAb	分析物	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	$t/_{2\ diss}$ [分]	K_D [M]	R_{max} [RU]	CL [RU]	MR	デルタ K_D
19B12	AFP（243－261）－G0F－Bi	6．0E＋05±0．07%	1．5E－03±0．05%	8±0．05%	2．5E－09±0．08%	5．9	165	1．4	1
	Asn（G0F）－Bi	検出可能な結合なし					160		
	AFP（243－261）－G2－Bi	弱い結合が検出可能；データに基づくシミュレーション			6．2E－07	9．3	155		＞245
	AFP（243－261）－（Fuc－GlcNAc）－Bi	2．7E＋05±0．1%	4．7E－03±0．06%	2．5±0．06%	1．8E－08±0．1%	3．8	151	1．3	＞7
3C5	AFP（243－261）－	G0F－Bi	1．0E＋06±0．1%	3．2E－03±0．06%	3．6±0．06%	3．1E－09±0．13%	8．8	216	1．6
	Asn（G0F）－Bi	検出可能な結合なし					210		
	AFP（243－261）－G2－Bi	弱い結合が検出可能			5．6E－07		205		＞180
	AFP（243－261）－（Fuc－GlcNAc）－Bi	4．5E＋05±0．15%	1．6E－02±0．13%	0．7±0．13%	3．5E－08±0．14%	6．4	201	1．5	＞11

表４：抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５の結合定数

【０５２２】

抗体１９Ｂ１２についての非フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉ結合速度論は決定できなかった。測定された濃度範囲について決定された速度定数に基づいて、７．３μＭ～１０ｎＭの範囲の濃度についてのシミュレーションは、非フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉについて６２０ｎＭ超の弱い親和性を推定する。シミュレートされたデータの理論応答最大R_{max}９．３ＲＵは、実験捕捉レベル（ＣＬ）１５５ＲＵおよび分析物の分子量４．３ｋＤａの計算に基づく。図４には、シミュレーション濃度範囲および実験濃度範囲の両方についてオーバーレイが示されている。黒い線は、両方のデータセットの同一の濃度２７０ｎＭに似ている。

【０５２３】

実施例４：溶液分析における親和性

解離平衡定数K_Dを、Ａｆｆｉｎｉｔｙ　ｉｎ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ法（ＡｉＳ）によって決定した。ＣＡＰ－Ｋｉｔ（Ｃｙｔｉｖａ）の販売業者の指示に従って、ペプチドＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－ＢｉをＣＡＰチップセンサ表面に捕捉した。１２０ｎＭ

～０．０１ｎＭの様々な濃度の非ビオチン化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆそれぞれを有する１０ｎＭの抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５の混合物、２００μＭ～－０．１ｎＭの非ビオチン化ＡＦＰ（２４８－２５６）の様々な濃度を、平衡が達成されるまでインキュベートした。表面に表示されたＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉへの混合物の結合事象を監視した。

【０５２４】

競合剤としてのペプチド濃度が増加すると、溶液中の「遊離」抗体は減少する。競合実験のために決定された遊離抗体濃度を、ペプチド競合剤濃度に対してプロットした。再生は、Ｃｙｔｉｖａによって供給されるグアニジニウム／ＮａＯＨ溶液を使用して行った。各相互作用について２つの独立系列を分析した。Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアからの溶液中の親和性モデルを使用してデータを評価した。

【表５】

mAb	分析物	K_D	デルタK_D
１９Ｂ１２	ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ	０．９±０．１ｎＭ	
	ＡＦＰ（２４８－２５６）	５．７±０．５μＭ	＞５０００
３Ｃ５	ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ	０．４±０．１ｎＭ	
	ＡＦＰ（２４８－２５６）	１２．６±２．９μＭ	＞５０００

表５：抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５結合ペプチドＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０ＦおよびＡＦＰ（２４８－２５６）に対する溶液中の親和性

【０５２５】

抗体１９Ｂ１２結合ペプチドＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０ＦについてのＡｉＳベースのK_D　０．９±０．１ｎＭ、$R^2$０．９９７０２　ＲＵ、B_{tot}９．８±０．１ｎＭは、この文書において先に記載された濃度依存的動態と同じ範囲にあり、したがって、実験的アプローチを確認する（表５を参照）。さらに、Ａｆｆｉｎｉｔｙ　ｉｎ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎアプローチは、完全な競合によって、フコシル化ＡＦＰ（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆに対する抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５の優れた特異性を示す。

【０５２６】

抗体３Ｃ５については、K_D０．４±０．１ｎＭ、$R^2$０．９８９１７ＲＵ、B_{tot}９．７±０．１ｎＭを用いてＡｉＳを決定した（表５を参照）。それぞれＡｉＳベースのK_D５．７±０．５μＭ、$R^2$０．９８７６６ＲＵ、B_{tot}１０．１±０．１ｎＭ、１２．６±２．９μＭ、$R^2$０．９４７５９ＲＵ、B_{tot}１１．５±０．４ｎＭは、ペプチドＡＦＰ（２４８－２５６）に結合する抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５に対して弱い親和性を実証する。

【０５２７】

実施例５：抗体および抗体フォーマットのクローニング、抗体の発現、抗体の精製および標識

ＩｇＧ（Ｐ８）多価フォーマットとしてのＩｇＧ型抗体のクローニングおよび発現

国際公開第２０１９／０５７８１６号Ａ１に記載されているように、多価抗ＡＦＰ－Ｌ３抗体をクローニングし、発現させた。詳細には、多価抗ＡＦＰ－Ｌ３抗体を作製するために、リンカー配列（例えば、（Ｇ３Ｓ）４；配列番号２７）に隣接する複数のＶＨ－ＣＨ１配列をヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３コード配列の上流および下流に付加し、それにより、いくつかのＶＨ－ＣＨ１ドメインをコードする重鎖を作製し、発現ベクターにクローニングした。この重鎖ベクターは、ＶＬおよび定常ドメインからなる標準的な軽鎖をコードする軽鎖発現ベクターと共発現される。組換え発現を、ヒト胎児由来腎臓（ＨＥＫ）細胞において一過性に、またはＣＨＯ細胞において一過性もしくは非一過性に行った。形質転換された細胞は、多価単一特異的抗ＡＦＰ－Ｌ３抗体を、それらが単離された無血清培養上

清に分泌した。最終的な多価Ｐ８抗体フォーマットは、８個の異なるＦａｂ部分を含み、これらは全て同じ配列を有する（すなわち、１９Ｂ１２または３Ｃ５）。

【０５２８】

抗体の精製およびルテニウムとのコンジュゲーション

クローン１９Ｂ１２および３Ｃ５のモノクローナルな多価抗ＡＦＰ－Ｌ３抗体を、十分な収率で、かつ、タンパク質を使用する精製の期間中に著しい喪失を伴うことなく製造した。ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（Ｃｙｔｉｖａ）を用いた培養上清のアフィニティークロマトグラフィーを、供給者の説明書に従って行った。精製された多価組換え抗ＡＦＰ－Ｌ３抗体を、標準的なＮＨＳエステルカップリング化学を使用して、そのスルホン化形態の標識試薬トリス－ビピリジル－ルテニウム（「ｓＢＰＲｕ」とも呼ばれる）と反応させた。これらの条件下で、ルテニウム標識は、抗体主鎖中のリジンアミノ酸残基の官能基に共有結合している。

【０５２９】

ｍＡｂＴＵ１１（ｍＡＢ＜ＡＦＰ＞Ｍ－ＴＵ１１－Ｆ（ａｂ’）$_2$－Ｂｉの精製、断片化およびビオチンとの結合）

モノクローナル抗ＡＦＰ抗体クローンＴＵ１１をハイブリドーマ細胞で発現させ、ＳＰおよびＱ樹脂を使用する標準的なイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。得られた精製ＩｇＧをペプシンで更に処理し、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片を生成した。Ｆ（ａｂ’）$_2$－ＴＵ１１の断片を、標準的なＮＨＳエステルカップリング化学を用いて表面露出リジンを介して最終的にビオチン－ＰＥＧ２４－ＮＨＳ標識とコンジュゲートさせた。そして、Ｆ（ａｂ’）$_2$－Ｂｉ－ＰＥＧ２４コンジュゲートを、ｍＳＡ（ストレプトアビジンムテイン）を用いたアフィニティークロマトグラフィーを使用して更に精製して、非コンジュゲートＦ（ａｂ’）$_2$－断片を除去した。

【０５３０】

抗ＡＦＰ－Ｌ３抗体の発現および精製

モノクローナル抗ＡＦＰ－Ｌ３抗体をＨＥＫ２９３Ｆ中で一過性に発現させ、供給業者の指示に従ってＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（Ｃｙｔｉｖａ）を用いた標準的なプロテインＡアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。

【０５３１】

抗ウサギＦｃ抗体の精製およびコンジュゲーション

精製ウサギＦｃでヒツジを免疫することによって、ウサギＦｃに対するポリクローナル抗体を作製した。ポリクローナル抗ウサギＦｃ抗体をウサギＦｃ免疫吸着器による正の免疫吸着によって更に精製し、標準的なＮＨＳエステルカップリング化学を使用して、そのスルホン化形態のトリスビピリジル－ルテニウム（「ｓＢＰＲｕ」とも呼ばれる）で表面露出リジンを介して標識した。

【０５３２】

実施例６：ＡＦＰ－Ｌ３およびＬ１の精製ならびにタンパク質の標識化

ＡＦＰ－Ｌ１およびＡＦＰ－Ｌ３の精製

ヒト肝細胞がん細胞株からの精製ＡＦＰを、ＢｉｏＲａｄ（カタログ番号１３７５２６００）またはＳｃｒｉｐｐｓ（カタログ番号９０４９２－００５０）のいずれかから購入した。ＡＦＰは、レンズマメ（ｌｅｎｓ　ｃｕｌｉｎａｒｉｓ）アグルチニン（ＬＣＡ）を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供した（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、カタログ番号ＡＬ－１０３）。ランニングバッファー（５０ｍＭトリス－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$、１ｍＭ　ＣａＣｌ$_2$）を含むＬＣＡカラム上で実行されるＡＦＰを、ＡＦＰのＬＣＡ結合（ＡＦＰ－Ｌ３）形態および非結合（ＡＦＰ－Ｌ１）形態で分離することができた。結合したＡＦＰを、２００ｍＭ　α－メチルマンノシドおよび２００ｍＭ　α－メチルグルコシドの混合物をランニング緩衝液に添加することによってＬＣＡカラムから溶出した。

【０５３３】

ＡＦＰのビオチン化

精製ＡＦＰを、標準的なＮＨＳエステルカップリング化学を使用して、表面露出リジンを介してビオチン－ＤＤＳ－ＮＨＳ標識でビオチン化した。その後、未反応の標識を透析によって除去した。

【０５３４】

実施例７：免疫学的アッセイ（Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）アッセイフォーマット）におけるＡＦＰ－Ｌ３分析物への結合に関する選択された抗体クローンの比較

動態スクリーニングに基づいて選択された５つの異なる抗体クローンを、それらのＡＦＰ－Ｌ３特異性およびＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）機器、ｃｏｂａｓ（登録商標）ｅ６０１でのＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ベースのイムノアッセイでシグナル動態を生成するためのそれらの有用性についてｍＡｂ＜ＡＦＰ－Ｌ３＞ｒＲｂ－ｘｘ－ＩｇＧ（ｘｘ：６Ｂ６、３Ａ３、３Ｃ５、３Ｄ２、１９Ｂ１２）で試験した。

【０５３５】

簡潔には、ビオチン化ペプチドまたはタンパク質（試料）を、試験した１，６－ｆｕｃＡＦＰ抗体（６Ｂ６、３Ａ３、３Ｃ５、３Ｄ２、１９Ｂ１２）およびルテニウム化抗ウサギＦｃ抗体（実施例６を参照）と９分間インキュベートした。続いて、４０μｌのＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ビーズ（ストレプトアビジンでコーティング；「ＳＡビーズ」）を添加し、第１の工程で形成された検出複合体がビオチンとストレプトアビジンとの相互作用を介して固相に結合するように混合物を９分間インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物を測定セルに吸引し、そこでＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ビーズを電極の表面に磁気的に捕捉した。次いで、未結合物質を除去する。次いで、電極への電圧の印加は、光電子増倍管によって測定される電気化学発光を誘発する。

【０５３６】

試験プロトコルおよびサンドイッチ原理

第１のインキュベーション：４０μｌ試料＋６０μｌ試薬１＋６０μｌ試薬２、９分間のインキュベーション

【０５３７】

第２のインキュベーション：＋４０μｌ　ＳＡビーズ。ストレプトアビジン被覆微粒子の添加後、複合体はビオチンとストレプトアビジンとの相互作用を介して固相に結合するようになり、９分間のインキュベーション。

【０５３８】

インキュベーション後、反応混合物を測定セルに吸引し、そこで微粒子を電極の表面に磁気的に捕捉した。次いで、未結合物質を除去する。次いで、電極への電圧の印加は、光電子増倍管によって測定される電気化学発光を誘発する。

【０５３９】

試薬１：ｍＡｂ＜ＡＦＰ－Ｌ３＞ｒＲｂ－ｘｘ－ＩｇＧ（１μｇ／ｍＬ）（ｘｘ：６Ｂ６、３Ａ３、３Ｃ５、３Ｄ２、１９Ｂ１２）

試薬２：ｐＡｂ＜ｒＲｂ－Ｆｃｇ＞－Ｓ－ＩｇＧ（ＩＳ）－ｓｕｌｆｏＲｕ（Ｓｕｘ）（０．５μｇ／ｍＬ）

【０５４０】

試験緩衝液：４０ｍＭ　ＮａＰｉ　ｐＨ７．５／１５０ｍＭ　ＮａＣｌ／０．１％ＭＩＴ／０．１％オキシピリオン／０．１％ポリドカノール／０．１％ＰＡＫ－Ｒ－ＩｇＧ／２％ＲＰＬＡ　４

【０５４１】

試料：

ＰＢＳ／０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０（２つの濃度レベル）に希釈した以下のビオチン化ペプチドを試験した。

ＡＦＰ－（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－Ｂｉ：コア－フコシル化あり

２．ＡＦＰ－（２４３－２６１）－Ｇ２－Ｂｉ：コア－フコースなし（ＡＦＰ－Ｌ１バリアント）

３．ＡＦＰ－（２４３－２６１）－（Ｆｕｃ－ＧｌｃＮＡｃ）－ビジサッカリドＬ３

４．ＡＦＰ（２４３－２５６）－（ＧｌｃＮＡｃ－ＧｌｃＮＡｃ）－Ｂｉ：ジサッカリドＬ１

【０５４２】

さらに、以下のビオチン化タンパク質も試験した。

５．ヒト肝がん細胞株由来の、ＡＦＰ－Ｌ３画分を含有する総α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）

【０５４３】

レンズマメ（Ｌｅｎｓ　ｃｕｌｉｎａｒｉｓ）アグルチニンＡ（ＬＣＡ）アフィニティークロマトグラフィーをＡＦＰ　ｔｏｔａｌで行った。

【０５４４】

２つの画分を単離した：

ａ）α－フェトプロテイン（ＡＦＰ－Ｌ３）は、レンズマメ（Ｌｅｎｓ　ｃｕｌｉｎａｒｉｓ）アグルチニンＡと反応するＡＦＰのフコシル化バリアントである

ｂ）α－フェトプロテイン（ＡＦＰ－Ｌ１）は、レンズマメ（Ｌｅｎｓ　ｃｕｌｉｎａｒｉｓ）アグルチニンＡと反応すべきではないＡＦＰの非フコシル化バリアントである

【０５４５】

表６に示されるように、全ての試験された抗体は、ペプチドＡＦＰ－（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－ＢｉおよびＡＦＰ－（２４３－２６１）－（Ｆｕｃ－ＧｌｃＮＡｃ）－Ｂｉに結合している。クローン３Ｃ５および１９Ｂ１２で最も高いシグナル動態が観察され、動態解析における所見が確認され、これらの２つのクローンが最良のバインダーであることが示唆された。

【表６】

		6B6	3A3	3C5	3D2	19B12
	試料濃度（nM）	カウント				
PBS	－	577	560	570	564	580
AFP－（243－261）－G0F－Bi	12	581519	1091686	1876541	1212656	2686608
	5	175429	441198	837470	482747	1277382
AFP－（243－261）－G2－Bi	11	597	11221	98783	13482	147746
	4	568	1922	18589	2372	39772
AFP－（243－261）－（Fuc－GlcNAc）－Bi	16	713094	1054362	1556446	1140986	1913914
	6	437593	735784	1112834	796496	1414510
AFP－（243－256）－（GlcNAc－GlcNAc）－Bi	19	614	17278	57810	21482	85366
	8	598	4832	16958	6193	29625
総AFP	7	569	817	1252	869	1450
AFP－L3	7	608	920	1370	986	1573
AFP－L1	7	594	645	724	660	771

表６：ペプチドおよびタンパク質上の結合モチーフに対する５つのｍＡＢ候補を比較する初期Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）カウント測定。５つの抗体はいずれも、ペプチドＡＦＰ－（２４３－２６１）－Ｇ０Ｆ－ＢｉおよびＡＦＰ－（２４３－２６１）－（Ｆｕｃ－ＧｌｃＮＡｃ）－Ｂｉ）に結合する。

【０５４６】

ペプチドのレベルでは、選択された抗体は、コア－フコシル化バリアントと非フコシル化バリアントとを区別することができる。天然抗原のレベルでは、非常に低いシグナルが観察され、エピトープが容易にアクセスできない可能性があることを示した。それにもかかわらず、ＡＦＰ－Ｌ３画分は、抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５についてのＡＦＰ－Ｌ１画分よりも高いシグナルをもたらし、天然抗原のレベルでのそれらの特異性も確認した。

【０５４７】

実施例８：ＥｌｅｃｓｙｓにおけるＡＦＰ－Ｌ３の検出を改善するための前処理

天然のＡＦＰ－Ｌ３抗原は、ペプチド構造と比較して非常に低いシグナルを示したため、本発明者らは、エピトープ領域が、選択された抗ペプチド抗体について天然のＡＦＰ－Ｌ３において容易にアクセス可能ではないかもしれないと推測した。アクセスしやすさを改善するために、本発明者らは、エピトープを抗体にとってよりアクセスしやすくする目的で、所定の前処理時間にわたってＡＦＰ－Ｌ３含有試料に適用された様々な前処理条件を試験した。

【０５４８】

いくつかの前処理条件を最初に試験し、特にＤＴＴまたはＴＣＥＰ等のタンパク質還元剤による前処理がシグナルを有意に改善し得ると思われた。

【０５４９】

ＤＴＴ等のタンパク質還元剤が抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５の結合を促進するのに十分であるかどうか、およびこれが実施例７で試験した他の抗体とどのように比較するかを確認するために、以下の実験を行った。

【０５５０】

試験プロトコル：

第１の工程：前処理

手動の試料前処理を行った：１０μｌのタンパク質試料（ストック溶液中のタンパク質の濃度２５０μｇ／ｍＬまたは２５μｇ／ｍｌ）＋４９０μｌの前処理溶液ＡまたはＢ（下記を参照）；室温で３０分間の混合物のインキュベーション。

【０５５１】

以下のビオチン化タンパク質を試料として使用した。

１．ヒト肝がん細胞株由来の、ＡＦＰ－Ｌ３画分を含有する総α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）

２．レンズマメ（Ｌｅｎｓ　ｃｕｌｉｎａｒｉｓ）アグルチニンＡと反応するＡＦＰのフコシル化バリアントとしてのα－フェトプロテイン（ＡＦＰ－Ｌ３）

３．α－フェトプロテイン（ＡＦＰ－Ｌ１）は、レンズマメ（Ｌｅｎｓ　ｃｕｌｉｎａｒｉｓ）アグルチニンＡと反応すべきではないＡＦＰの非フコシル化バリアントである

【０５５２】

２つの異なる前処理溶液を各試料で試験した。

・５０ｍＭクエン酸塩、２０ｍＭ　ＥＤＴＡ、１１０ｍＭ　ＤＴＴ　ｐＨ４．９（前処理液Ａ）

・および陰性対照として：ＰＢＳ＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ　２０（前処理液Ｂ）

【０５５３】

試料前処理インキュベート中に使用されるタンパク質の最終濃度は、５０００ｎｇ／ｍＬまたは５００ｎｇ／ｍＬ（これは、試料前処理インキュベート中の約７０ｎＭおよび７ｎＭのタンパク質濃度に相当する）であった。試料前処理インキュベートにおけるＤＴＴの濃度は１０７ｍＭであった。

【０５５４】

手動前処理の後、以下のインキュベーション条件下で以下の試薬を使用して、ｃｏｂａｓ　ｅ６０１分析装置でアッセイを行った。

第２の工程：ルテニウム化ＡＦＰ－Ｌ３抗体の添加

４０μｌの前処理された試料（第１の工程から）＋６０μｌの試薬１＋６０μｌの試薬２、９分間のインキュベーション

【０５５５】

以下の試薬を使用した。

試薬１：ｍＡｂ＜ＡＦＰ－Ｌ３＞ｒＲｂ－ｘｘ－ＩｇＧ－ＳｕｌｆｏＢＰＲｕ（１μｇ／ｍＬ）（５つの異なるクローンを試験した：ｘｘ：６Ｂ６、３Ａ３、３Ｃ５、３Ｄ２、１９Ｂ１２）

試薬２：４０ｍＭ　ＮａＰｉ　ｐＨ７．５／１５０ｍＭ　ＮａＣｌ／保存剤／０．１％ポリドカノール

【０５５６】

第３の工程：第２工程の混合物：＋４０μｌのＳＡビーズ（ストレプトアビジン被覆微粒子）。ＳＡビーズの添加後、複合体はビオチンとストレプトアビジンとの相互作用を介して固相に結合するようになり、９分間のインキュベーション。

【０５５７】

インキュベーション後、反応混合物を測定セルに吸引し、そこで微粒子を電極の表面に磁気的に捕捉した。次いで、未結合物質を除去する。次いで、電極への電圧の印加は、光

電子増倍管によって測定される電気化学発光を誘発する。

【０５５８】

結果を図６に示す。

【０５５９】

結果の要約：

・ＤＴＴを含有する前処理溶液で前処理した試料は、対照溶液（ＤＴＴなし）で前処理した試料よりもはるかに高いシグナルをもたらした。これは、より良好なシグナル検出のために前処理溶液（還元剤を含有する）を使用することによるＡＦＰ－Ｌ３の認識の改善を示している。

・クローン３Ｃ５および１９Ｂ１２は最も高いシグナルを送達し、これにより、前処理されたＡＦＰ－Ｌ３とのこれらの抗体のより良好な結合も確認される。

・ＡＦＰおよびＡＦＰ－Ｌ３タンパク質（両方ともコア－フコシル化ＡＦＰを含む）は、ＡＦＰ－Ｌ１（コア－フコシル化されていない）タンパク質よりもはるかに高いシグナルを送達した。これにより、ＢｉａｃｏｒｅおよびＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）においてペプチドレベルで以前に示されたように、使用したクローンの特異性が確認される。

【０５６０】

実施例９：前処理の最適化

実施例８では、５０ｍＭクエン酸塩、２０ｍＭ　ＥＤＴＡ、１１０ｍＭ　ＤＴＴ　ｐＨ４．９を前処理に使用した。当技術分野で知られているように、ＤＴＴは、塩基性または中性ｐＨではるかに高い酸化還元電位を有するが、酸性ｐＨでははるかに安定である（ｐＨ＜５．５の緩衝液中のＤＴＴはより安定である）。したがって、実施例８の前処理溶液は良好な安定性を示すが、非常に高濃度のＤＴＴを使用した。

【０５６１】

ＤＴＴはｐＨ＞７で高い還元活性を示すので、試料前処理インキュベート中のｐＨがこのｐＨ範囲にある場合、より低いＤＴＴ濃度を使用できると本発明者らは推測した。

【０５６２】

はるかに低いＤＴＴ濃度での還元活性と十分な試薬安定性の両方を可能にするために、１つの前処理溶液を２つの異なるボトルに分割した：ＰＴ１およびＰＴ２

ＰＴ１：７．４ｍＭ　ＤＴＴ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ　ｐＨ５．５（安定ＤＴＴ保存条件を有するため）

ＰＴ２：ＰＴ２の２つの異なる製剤を試験した：１００ｍＭ　トリス　ｐＨ８．５または２００ｍＭ　ＮａＯＨ　ｐＨ＞１３

【０５６３】

この設定を使用して、試料前処理インキュベート（試料＋ＰＴ１＋ＰＴ２）においてｐＨ＞７．５を達成することができた。

【０５６４】

これらの前処理条件を、実施例７および８で使用した異なるアッセイフォーマットを用いて試験した。簡潔には、工程１において、試料（ここでは、ＡＦＰ－Ｌ３を含まないヒト血清、または８０９ｎｇ／ｍｌのＡＦＰ－Ｌ３でスパイク）をＰＴ１およびＰＴ２溶液と混合し、９分間インキュベートした。工程２では、Ｆ（ａｂ’）$_2$としてビオチン化ＡＦＰ特異的抗体ＴＵ１１を含むＲ１およびルテニウム化多価抗体（Ｐ８フォーマット）として抗体１９Ｂ１２を含むＲ２を添加し、混合物を９分間インキュベートした。最後に、工程３において、磁気ストレプトアビジンマイクロビーズを添加し、得られた混合物を再び９分間インキュベートした。

【０５６５】

使用した試薬：

Ｒ１：ｍＡｂ＜ＡＦＰ＞Ｍ－ＴＵ１１－Ｆ（ａｂ’）２－Ｂｉ（リンカー）２．３μｇ／ｍｌ

Ｒ２：ｍＡｂ＜ＡＦＰ－Ｌ３＞ｒＲｂ－１９Ｂ１２－ＩｇＧ（Ｐ８）－ＳｕｌｆｏＢＰＲｕ　１５μｇ／ｍｌ

【０５６６】
試験プロトコル：
３０μｌ試料＋１３μｌ　ＰＴ１＋２３μｌのＰＴ２、９分間のインキュベーション
＋５１μｌ　Ｒ１＋５３μｌ　Ｒ２、９分間のインキュベーション
＋２９μｌ　ＳＡビーズ、９分間のインキュベーション
【０５６７】
インキュベーション後、反応混合物を測定セルに吸引し、そこで微粒子を電極の表面に磁気的に捕捉した。次いで、未結合物質を除去する。次いで、電極への電圧の印加は、光電子増倍管によって測定される電気化学発光を誘発する。
【０５６８】
結果
【表７】

AFP−L3 (ng／mL)	PT2：100mM トリス pH8．5	PT2：200mM NaOH pH＞13
0．0000	717	789
809	134185	3255

表７：Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）は、２つのＰＴ２条件を比較して、低または高ＡＦＰ－Ｌ３タンパク質濃度を有するヒト血清の測定をカウントする。

【０５６９】
両方の前処理は測定可能なシグナルをもたらしたが、トリスｐＨ８．５を使用すると、ＰＴ２としてＮａＯＨを使用するよりもはるかに良好な性能を示した（より高いｐＨをもたらす）。
【０５７０】
実験からの結論は、ＰＴ２については、トリス緩衝液がより刺激の強いアルカリ溶液、例えばＮａＯＨよりも適しているということであった。
【０５７１】
さらに、本発明者らは、ＡＦＰ－Ｌ３抗体の多価Ｐ８フォーマットの代わりにＩｇＧを使用する同様の実験と比較して、この実験において、Ｐ８フォーマットがシグナルを増加させることに注目した。
【０５７２】
実施例１０：１９Ｂ１２クローンを用いた前処理溶液中の還元剤ＤＴＴの重要性の評価
実施例８および９は両方とも、前処理においてＤＴＴとは別にキレート剤ＥＤＴＡを使用した。前処理活性のためのＤＴＴの重要性におけるより多くの洞察を得るために、ヒト天然血清およびスパイク試料を使用して異なる条件を試験した（マスターキャリブレータはＭＫ１をＭＫ７に設定し、ＡＦＰ－Ｌ３抗原をスパイクしたヒト血清は濃度を上昇させる）。
【０５７３】
前処理に対するＤＴＴの役割を確認するために、ＰＴ１の以下の２つの組成物を試験した。
ＰＴ１バージョン１：１０ｍＭ　ＤＴＴ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ約４．７：ＤＴＴあり
ＰＴ１バージョン２：２ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ約４．７：ＤＴＴなし
ＰＴ２：１５０ｍＭ　トリスｐＨ８．５
【０５７４】
試験プロトコル：
使用したアッセイ原理は、実施例９と同じ、すなわちサンドイッチイムノアッセイであ

った。
工程１：３０μｌ試料＋１３μｌ　ＰＴ１（バージョン１または２）＋２３μｌ　ＰＴ２ａ、９分間のインキュベーション
　工程２：＋Ｒ１　５１μｌ＋Ｒ２　５３μｌ、９分間のインキュベーション
　工程３：＋２９μｌ　ＳＡ－Ｂｅａｄｓ、９分間のインキュベーション
　Ｒ１：ビオチン化モノクローナル抗ＡＦＰ抗体ｍＡｂ＜ＡＦＰ＞Ｍ－ＴＵ１１－Ｆ（ａｂ’）２－ＰＥＧ２４－Ｂｉ　３．４ｍｇ／Ｌ；トリス緩衝液２００ｍＭ、ｐＨ７．５；防腐剤
　Ｒ２：ルテニウム錯体ｍＡｂ＜ＡＦＰ－Ｌ３＞ｒＲｂ－１９Ｂ１２－ＩｇＧ（Ｐ８）－ＳｕｌｆｏＢＰＲｕ　２２．０ｍｇ／Ｌで標識したモノクローナル抗ＡＦＰ－Ｌ３抗体；トリス緩衝液２００ｍＭ、ｐＨ７．５；防腐剤
【０５７５】
　インキュベーション後、反応混合物を測定セルに吸引し、そこで微粒子を電極の表面に磁気的に捕捉した。次いで、未結合物質を除去する。次いで、電極への電圧の印加は、光電子増倍管によって測定される電気化学発光を誘発する。
【０５７６】
　図９および図１０に示される結果は、天然試料およびスパイク試料の両方についてのより良好なＡＦＰ－Ｌ３検出のためのＤＴＴ等の還元剤の重要な役割を示す。
【０５７７】
　実施例１１：ＰＴ２におけるＤＴＴ濃度（ｍＭ）およびトリス緩衝液濃度（ｍＭ）の変動
　この実験の目的は、ＰＴ１中のＤＴＴおよびＰＴ２中のトリスの異なる濃度を評価することであった。
【０５７８】
　ここでも、サンドイッチイムノアッセイフォーマットを使用した。
【０５７９】
　分析前処理条件：
　ＰＴ１中の異なる濃度を試験した。
　ＰＴ１：ｐＨ５．５、０～１０ｍＭまでのＤＴＴ変動＋ＥＤＴＡ　２ｍＭ
【０５８０】
　ＰＴ２では、２つの異なる濃度のトリスが試験されている。
　ＰＴ２：ｐＨ９．０、トリス緩衝液（５０または２００ｍＭ）
【０５８１】
　試薬１および２については、一定条件を使用した。
　試薬１：ｍＡｂ＜ＡＦＰ＞Ｍ－ＴＵ１１－Ｆ（ａｂ｀）２－Ｂｉ（ＰＥＧ２４）（２．５μｇ／ｍＬ）
　試薬２：ｍＡｂ＜ＡＦＰ－Ｌ３＞ｒＲｂ－１９　Ｂ１２－ＩｇＧ（Ｐ８）－ＳｕｌｆｏＢＰＲｕ（１５μｇ／ｍＬ）
【０５８２】
　測定試料：
　ＡＦＰ－Ｌ３タンパク質でスパイクしたヒト血清（＝「ＨＳ」）、ｐＨ８に設定
【０５８３】
　試験プロトコル：
　第１のインキュベーション：３９μｌ試料＋１６μｌ　ＰＴ１＋１６μｌ　ＰＴ２、９分間のインキュベーション
　第２のインキュベーション：混合物１回目のインキュベーション＋Ｒ１　５０μｌ＋Ｒ２　５２μｌ、９分間のインキュベーション
　第３のインキュベーション：混合物の第２のインキュベーション＋３０μｌのＳＡビーズ、９分間のインキュベーション
【０５８４】

インキュベーション後、反応混合物を測定セルに吸引し、そこで微粒子を電極の表面に磁気的に捕捉した。次いで、未結合物質を除去する。次いで、電極への電圧の印加は、光電子増倍管によって測定される電気化学発光を誘発する。

【０５８５】

試験したＤＴＴ濃度を以下の表８に要約する。

【表８】

ＤＴＴ濃度ＰＴ１フラスコ中のｍＭ （試料とのインキュベーション前）	０	３	６	１０
終了濃度試料中のＤＴＴ－前処理－インキュベート： （第１のインキュベーション中）	０	０．６７６	１．３５２	２．２５３
終了濃度全試薬中のＤＴＴ－インキュベート： （第３のインキュベーション後、測定における終了濃度）	０	０．２３７	０．４７３	０．７８８

表８：ＤＴＴ濃度変動。

【０５８６】

結果：

異なる試験条件について測定されたシグナルを表９に要約する。

【表９】

PT1	pH 5.5	PT2 pH 9	HS pH 8.0	HS pH 8.0
EDTA [mM]	DTT [mM]	Tris [mM]	0 ng/mL AFP-L3	
2	0	50	750	7929
		200	761	7684
	3	**50**	**741**	**120884**
		200	728	125011
	6	50	713	96751
		200	717	60056
	10	50	715	11765
		200	697	32065

表９：Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）は、異なる条件［ＰＴ１中のＤＴＴ濃度およびＰＴ２中のトリス濃度］を比較して、高いＡＦＰ－Ｌ３タンパク質濃度を有するヒト血清（＝ＨＳ）（異なるｐＨ調整）の測定をカウントする。

【０５８７】

結論：

表９に示すように、異なるＤＴＴ濃度を前処理に使用することができる。前処理試料混合物中の０．６７６ｍＭという低い濃度は、ＤＴＴなしに対してシグナルを増加させるのに十分であった。これは、更に低濃度のＤＴＴを使用できることを示している。

【０５８８】

本実施例では、ＰＴ１中の１～１０ｍＭの濃度のＤＴＴを試験した。先の実施例、特に実施例８では、ストック中の１１０ｍＭのより高いＤＴＴ濃度が使用されている。これは、前処理試料インキュベートの濃度およびｐＨにも依存して異なる程度であっても、シグナルを改善するために広範囲のＤＴＴ濃度を使用できることを示している。

【０５８９】
ＥＤＴＡは、ＰＴ１においてＤＴＴを安定化することが見出された（すなわち、２ｍＭを使用した）。
【０５９０】
実施例１２：Ｗａｋｏ機器に対するプロトタイプＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ＡＦＰ－Ｌ３アッセイの方法比較
臨床パネル（ＨＣＣ症例および対照を含む１０００の臨床試料）を、２つの異なるプロトタイプＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ＡＦＰ－Ｌ３アッセイで測定し、μＴＡＳＷａｋｏ ＡＦＰ－Ｌ３（Ｆｕｊｉｆｉｌｍ Ｗａｋｏ Ｐｕｒｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）と比較した。プロトタイプアッセイは、１９Ｂ１２または３Ｃ５ Ｐ８フォーマット多価抗体のいずれかを使用したことを除いて同一であった。
【０５９１】
アッセイ設定は以下のとおりであった。
【表１０】

工程１	工程２	工程３
１６μｌ ＰＴ１＋２５μｌ ＰＴ２＋３０μｌ試料	工程１＋５０μｌ Ｒ１＋５２μｌ Ｒ２	工程２＋３０μｌビーズ

表１０：アッセイプロトコル：

【０５９２】
使用した試薬：
ＰＴ１：６ｍＭ ＤＴＴ、２ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ５．５
ＰＴ２：１００ｍＭ トリス ｐＨ８．５
【０５９３】
表１１に示すように、２つのアッセイプロトタイプを評価した。
【表１１】

	プロトタイプａ	プロトタイプｂ
Ｒ１緩衝液（ｐＨ７．２）：	ｍＡｂ＜ＡＦＰ＞Ｍ－ＴＵ１１－Ｆ（ａｂ’）２－ＰＥＧ２４－Ｂｉ， ２．５μｇ／ｍＬ	ｍＡｂ＜ＡＦＰ＞Ｍ－ＴＵ１１－Ｆ（ａｂ’）２－ＰＥＧ２４－Ｂｉ， １．７５ｍｇ／ｍＬ
Ｒ２緩衝液（ｐＨ７．２）	ｍＡｂ＜ＡＦＰ－Ｌ３＞ｒＲｂ－１９Ｂ１２－ＩｇＧ（Ｐ８）－ＳｕｌｆｏＢＰＲｕ １５μｇ／ｍＬ	ｍＡｂ＜ＡＦＰ－Ｌ３＞ｒＲｂ－３Ｃ５－ＩｇＧ（Ｐ８）－ＳｕｌｆｏＢＰＲｕ １５μｇ／ｍＬ

表１１：プロトタイプアッセイａおよびｂ

【０５９４】
試料を、μＴＡＳＷａｋｏ ＡＦＰ－Ｌ３（Ｆｕｊｉｆｉｌｍ Ｗａｋｏ Ｐｕｒｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）によって製造業者の指示に従って更に測定して、ＡＦＰ－Ｌ３の含有量（％）およびＡＦＰの総濃度（ｎｇ／ｍＬ）を決定した。得られたＡＦＰ－Ｌ３の％と総ＡＦＰ濃度（ｎｇ／ｍＬ）のμＴＡＳＷａｋｏ値から、ＷａｋｏのＡＦＰ－Ｌ３濃度（ｎｇ／ｍＬ）を算出した。Ｅｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ＡＦＰ

－Ｌ３値は、実施例１１に記載されているようにプロトタイプａおよびｂの両方を使用してｎｇ／ｍＬで直接得た。

【０５９５】

両方のアッセイプロトタイプは、非常に類似した結果を示し、μＴＡＳＷａｋｏ ＡＦＰ－Ｌ３（Ｆｕｊｉｆｉｌｍ Ｗａｋｏ Ｐｕｒｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）と非常に良好な相関を示した（図７および図８を参照）。

【０５９６】

この方法比較の結果は、プロトタイプが、上市され、臨床的に検証されたμＴＡＳＷａｋｏ ＡＦＰ－Ｌ３（Ｆｕｊｉｆｉｌｍ Ｗａｋｏ Ｐｕｒｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）との良好な相関を示すことを確認する。これはまた、ＬＣＡレクチンが使用されない場合でも、本質的にＡＦＰ－Ｌ３が本発明のアッセイによって検出されることを確認する。

【０５９７】

実施例１３：臨床パネルにおけるアッセイの性能

抗体１９Ｂ１２および３Ｃ５を使用するＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ＡＦＰ－Ｌ３プロトタイプアッセイの臨床的価値を更に確認するために、臨床パネルを分析し、早期ＨＣＣを検出するための診断性能を評価した。このパネルには肝疾患を有する９６人の患者が含まれ、そのうち３８人はＨＣＣを有し、５８人は肝疾患を有していたが、ＨＣＣの診断はなかった（対照）。

【０５９８】

例示的な１９Ｂ１２ベースのプロトタイプを使用した。

【０５９９】

試験プロトコル：

サンドイッチイムノアッセイ

工程１：３０μｌ試料＋１３μｌ ＰＴ１＋２３μｌ ＰＴ２ａ、９分間のインキュベーション

工程２：＋Ｒ１ ５１μｌ＋Ｒ２ ５３μｌ、９分間のインキュベーション

工程３：＋２９μｌ ＳＡ－Ｂｅａｄｓ、９分間のインキュベーション

【０６００】

試薬

ＰＴ１：１０ｍＭ ＤＴＴ、２ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ＜５．５

ＰＴ２：１５０ｍＭ トリス ｐＨ８．５

Ｒ１：ビオチン化モノクローナル抗ＡＦＰ抗体ＴＵ１１；トリス緩衝液２００ｍＭ、ｐＨ７．５；防腐剤

Ｒ２：多価Ｐ８抗体としてルテニウム錯体で標識したモノクローナル抗ＡＦＰ－Ｌ３抗体１９Ｂ１２；トリス緩衝液２００ｍＭ、ｐＨ７．５；防腐剤

【０６０１】

ＲＯＣ曲線を図１１に示す。１９Ｂ１２に基づくＡＦＰ－Ｌ３アッセイのＡＵＣ（曲線下）は９１．４％（ＣＩ：８５．８～９７）であり、これは、このパネルにおけるアッセイのＨＣＣを検出するための非常に良好な性能を証明している。

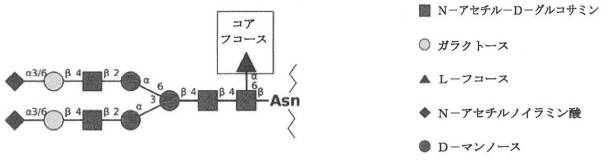
【表１２】

基準	カットオフ	感度	特異性
９５％特異性	５．２７ｎｇ／ｍＬ	６３．２	９４．８
９０％特異性	３．２８ｎｇ／ｍＬ	７１．１	８９．７

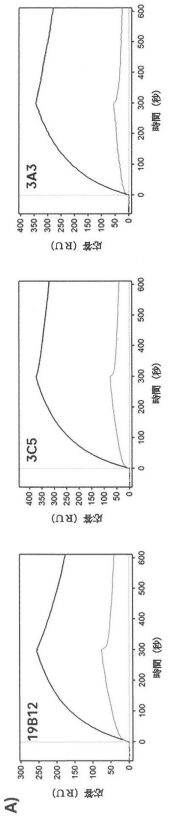
表１２：パネルＡで測定した所定の特異性基準でのＥｌｅｃｓｙｓ（登録商標）ＡＦＰ－Ｌ３アッセイの臨床性能（感度および特異性）

【図面】

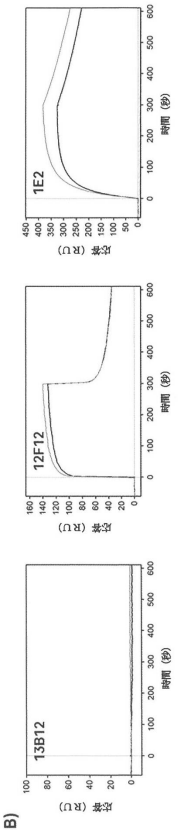
【図１】



【図２Ａ】

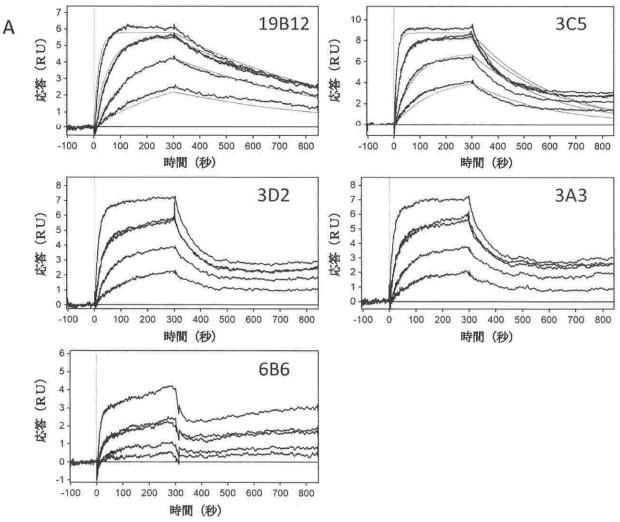


【図２Ｂ】



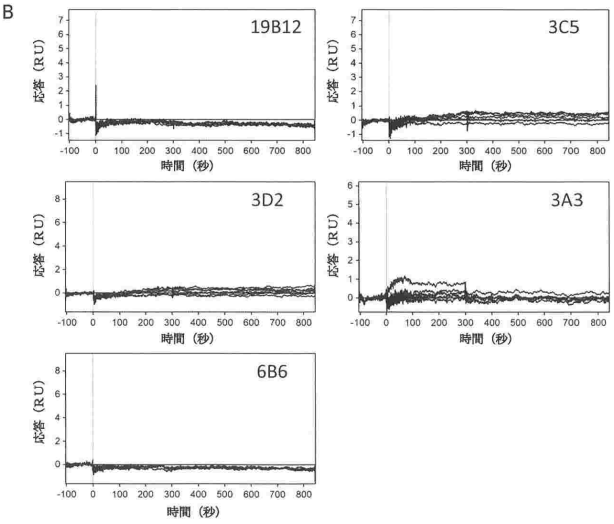
【図３Ａ】

図３



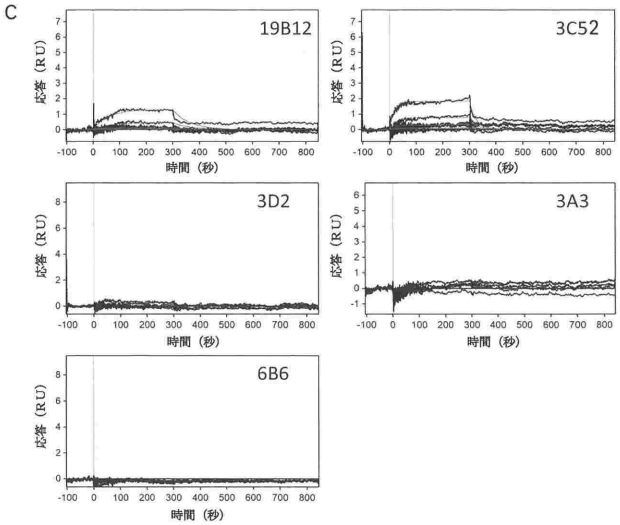
【図３Ｂ】

図３（続き）



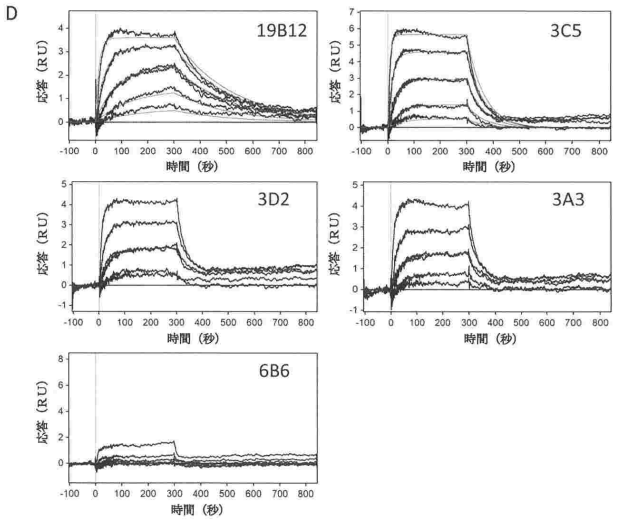
【図３Ｃ】

図３（続き）

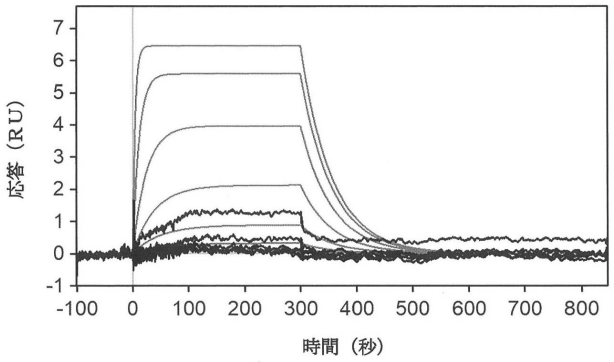


【図３Ｄ】

図３（続き）

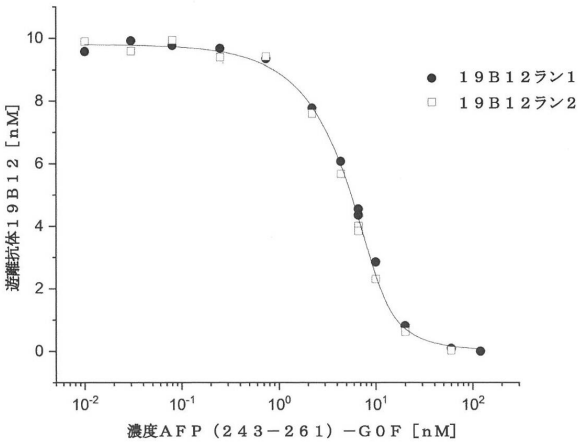


【図４】



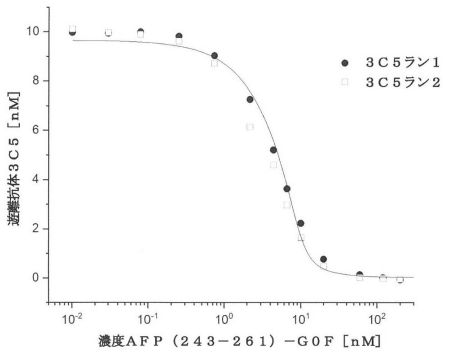
【図５－１】

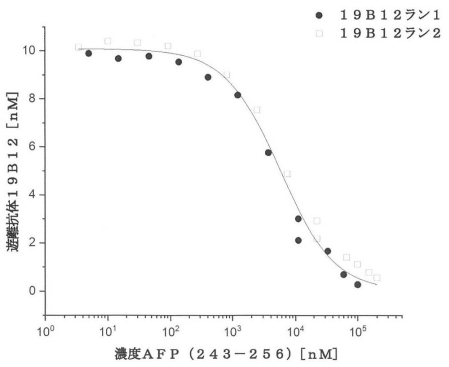
図５



【図５－２】

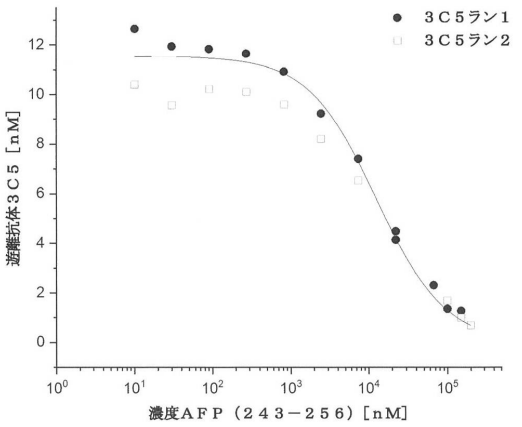
図５（続き）



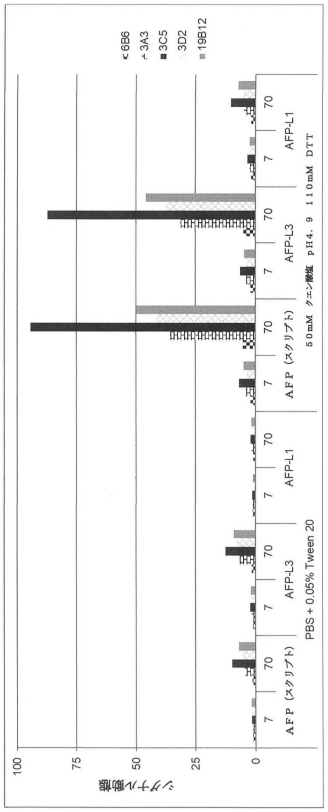


【図５－３】

図５（続き）



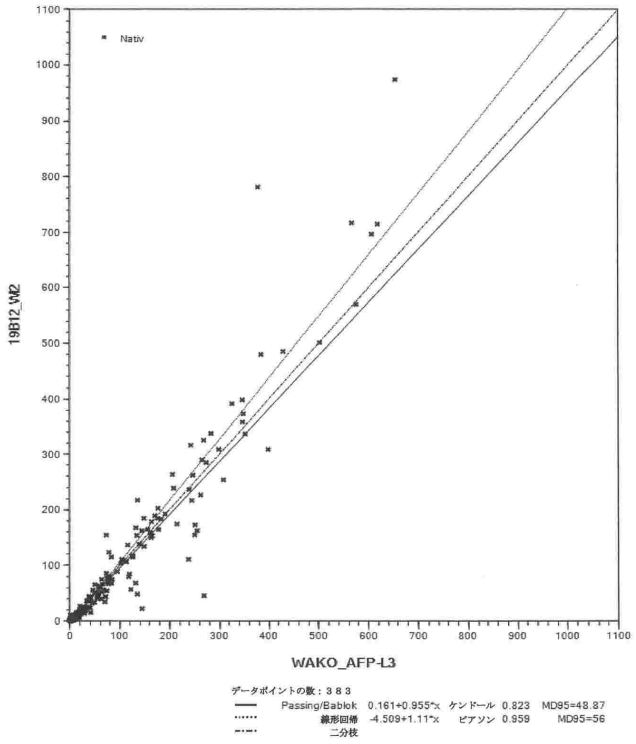
【図６】



【図７】

XApp：WAKO_AFP－L３．材料：血清

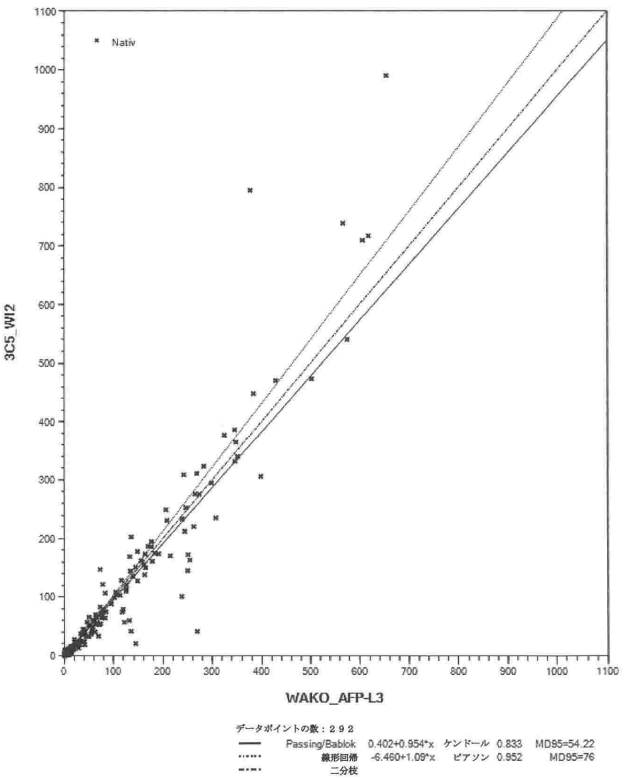
YApp：１９Ｂ１２_ＷＩ２．材料：血清



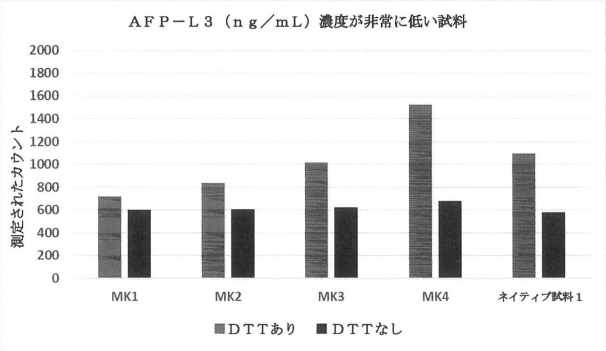
【図８】

XApp：WAKO_AFP－L３．材料：血清

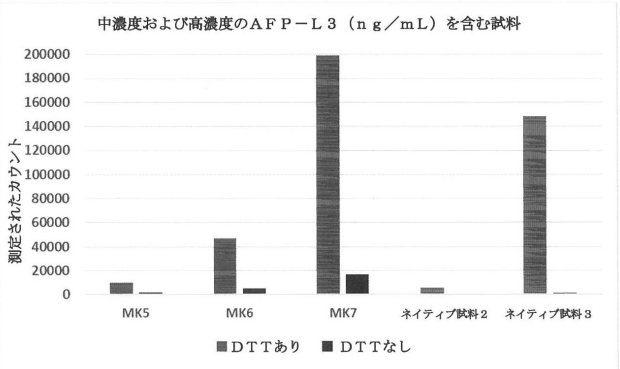
YApp：３Ｃ５_ＷＩ２．材料：血清



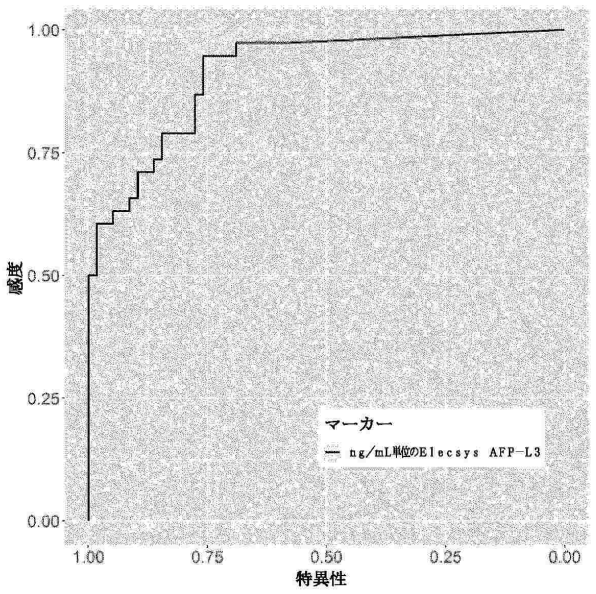
【図９】



【図１０】



【図１１】



【図１２】



【配列表】
20255167630000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/062762

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/18 G01N33/50
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EGASHIRA YURIKO ET AL: "Establishment and characterization of a fucosylated [alpha]-fetoprotein-specific monoclonal antibody: a potential application for clinical research", SCIENTIFIC REPORTS , vol. 9, no. 1 1 December 2019 (2019-12-01), page 12359, XP055971548, DOI: 10.1038/s41598-019-48821-x Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41598-019-48821-x.pdf cited in the application the entire document, in particular pg. 8 ----- -/--	1-17

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

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 July 2023	07/08/2023

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062762

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3 252 073 A1 (SYSMEX CORP [JP]) 6 December 2017 (2017-12-06) Examples 1-5 -----	1-17
X	US 2018/110889 A1 (HIGA YUKIKO [JP] ET AL) 26 April 2018 (2018-04-26) Examples 1-5 -----	1-17

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/062762

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 3252073 A1	06-12-2017	EP 3252073 A1	06-12-2017
		US 2017342140 A1	30-11-2017
US 2018110889 A1	26-04-2018	CN 107973855 A	01-05-2018
		JP 7002190 B2	04-02-2022
		JP 2018070454 A	10-05-2018
		US 2018110889 A1	26-04-2018

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21		
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10		
C12P 21/08 (2006.01)		C12P	21/08		
G01N 33/577(2006.01)		G01N	33/577	B	
G01N 33/574(2006.01)		G01N	33/574	E	
		G01N	33/574	B	

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

(72)発明者　ゲルク，ミヒャエル
ドイツ国　８２３７７　ペンツベルク，ノンネンバルト　２，ロシュ　ダイアグノスティックス　ゲーエムベーハー
(72)発明者　ヒルリングハウス，ラルス
ドイツ国　８２３７７　ペンツベルク，ノンネンバルト　２，ロシュ　ダイアグノスティックス　ゲーエムベーハー
(72)発明者　ユックニシュケ，ウテ
ドイツ国　８２３７７　ペンツベルク，ノンネンバルト　２，ロシュ　ダイアグノスティックス　ゲーエムベーハー
(72)発明者　ムート，アンナ・クリスティーネ
ドイツ国　８１４７７　ミュンヘン　スート，シュタッフェルゼーシュトラーセ　４，ロシュ　ダイアグノスティックス　ゲーエムベーハー
(72)発明者　エールシュレーゲル，トビアス
ドイツ国　８２３７７　ペンツベルク，ノンネンバルト　２，ロシュ　ダイアグノスティックス　ゲーエムベーハー
(72)発明者　ピンチュク，ボリス
ドイツ国　８２３７７　ペンツベルク，ノンネンバルト　２，ロシュ　ダイアグノスティックス　ゲーエムベーハー
(72)発明者　シュレームル，ミヒャエル
ドイツ国　８２３７７　ペンツベルク，ノンネンバルト　２，ロシュ　ダイアグノスティックス　ゲーエムベーハー
(72)発明者　ジーベンハール，ヨアンナ
ドイツ国　８２３７７　ペンツベルク，ノンネンバルト　２，ロシュ　ダイアグノスティックス　ゲーエムベーハー
(72)発明者　ティロー，ロランス
ドイツ国　８２３７７　ペンツベルク，ノンネンバルト　２，ロシュ　ダイアグノスティックス　ゲーエムベーハー

Ｆターム（参考）　4B064　AG27 CA19 CC24 CE12 DA13
4B065　AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 AC14 BA02 CA25 CA46
4H045　AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74 GA26