

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-16660

(P2020-16660A)

(43) 公開日 令和2年1月30日(2020.1.30)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------|-----------------------|-------------|
| GO 1 N 33/574 (2006.01) | GO 1 N 33/574 Z N A A | 4 H O 4 5 |
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 O 1 A | |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 D | |
| CO 7 K 16/18 (2006.01) | CO 7 K 16/18 | |
| C 1 2 N 15/13 (2006.01) | C 1 2 N 15/13 | |

審査請求 有 請求項の数 11 O L 外国語出願 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2019-169343 (P2019-169343)
 (22) 出願日 令和1年9月18日 (2019.9.18)
 (62) 分割の表示 特願2016-562949 (P2016-562949)
 の分割
 原出願日 平成27年4月14日 (2015.4.14)
 (31) 優先権主張番号 14164809.7
 (32) 優先日 平成26年4月15日 (2014.4.15)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 512325266
 セザンヌ ソシエテ パ アクシオンス
 シンプリフィエ
 フランス国, エフ-30035 ニーム
 セデ 1, パルク サイアンティフィク
 ジョルジュ ブッセ, アレー グラハム
 ベル, 280
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 カルエル パスカリーヌ
 フランス国 エフ-30900 ニーム
 シュマン デュ カルチェ デスパルニユ
 1038ベ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クロモグラニンAを検出するための免疫アッセイ法および抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 クロモグラニンA (またはその断片) を検出するための免疫アッセイ法を提供する。

【解決手段】 クロモグラニンAを含んでいると予想される試料を、クロモグラニンAに特異的な第一の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体およびクロモグラニンAに特異的な第二の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体に、クロモグラニンAと2つの抗体または抗原結合断片もしくはそれらの誘導体との三重複合体が形成できる条件で接触させる工程、ならびに2つの抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体とクロモグラニンAとの結合を検出する工程を含む、免疫アッセイ法。クロモグラニンAの124~144番目および280~301番目のアミノ酸残基に対する抗体および免疫アッセイ法におけるその使用。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

クロモグラニン A またはその断片を検出するための免疫アッセイ法であって、

a) クロモグラニン A を含んでいると予想される試料を、

(i) クロモグラニン A に特異的な第一の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体、ここで前記第一の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体は、配列番号 1 の 124 ~

144 番目のアミノ酸残基にかけての配列中にあるエピトープに特異的である、および

(ii) クロモグラニン A に特異的な第二の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体と、

クロモグラニン A と前記 2 つの抗体または抗原結合断片もしくはそれらの誘導体との三重複合体が形成できる条件で接触させる工程、

ならびに

b) 前記 2 つの抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体とクロモグラニン A との結合を検出する工程、

を含む、免疫アッセイ法。

【請求項 2】

前記第二の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体が、配列番号 1 の 280 ~ 301 番目のアミノ酸残基にかけての配列中にあるエピトープに特異的である、請求項 1 の免疫アッセイ法。

【請求項 3】

前記第一の抗体が DSM ACC3231 として寄託された 537 / H2 ハイブリドーマ細胞株によって生産されたものである、請求項 1 または 2 のいずれか 1 項に記載の免疫アッセイ法。

【請求項 4】

前記第二の抗体が DSM ACC3232 として寄託された 541 / E2 ハイブリドーマ細胞株によって生産されたものである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の免疫アッセイ法。

【請求項 5】

前記試料が対象の体液または組織由来のもの、例えば、血液、血清、血漿および尿から選択される体液である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の免疫アッセイ法。

【請求項 6】

前記アッセイが均一な相または不均一な相で行われる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の免疫アッセイ法。

【請求項 7】

前記抗体のうちの 1 つが標識されており、その他の抗体が固相に結合しているかまたは固相に選択的に結合させることができる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の免疫アッセイ法。

【請求項 8】

前記抗体第一のおよび前記第二の抗体が液体反応混合物中に分散して存在しており、および蛍光 - 消光もしくは増幅または化学発光 - 消光もしくは増幅に基づく標識システムの一部である第一の標識成分が前記第一の抗体に結合しており、および前記標識システムの第二の標識成分が前記第二の抗体に結合しているため、両方の抗体が検出すべきクロモグラニン A に結合すると、測定溶液中で形成されたサンドイッチ複合体の検出を可能にする測定可能なシグナルが生成される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の免疫アッセイ法。

【請求項 9】

前記標識システムが、蛍光色素または化学発光色素、特にシアニン系色素と共に、希土類のクリプテートまたは希土類のキレートを含んでいる、請求項 8 の免疫アッセイ法。

【請求項 10】

DSM ACC3231 として寄託された 537 / H2 細胞株および DSM ACC3232 として寄託された 541 / E2 細胞株から選択されるハイブリドーマ細胞株によっ

10

20

30

40

50

て生産されるモノクローナル抗体。

【請求項 1 1】

クロモグラニン A を検出するためのキットであって、

(i) クロモグラニン A に特異的な第一の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体、ここで前記第一の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体は、配列番号 1 の 1 2 4 ~ 1 4 4 番目のアミノ酸にかけての配列中にあるエピトープに特異的である；および

(i i) クロモグラニン A に特異的な第二の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体、
を含んでいるキット。

【請求項 1 2】

前記第二の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体が、配列番号 1 のクロモグラニン A の 2 8 0 ~ 3 0 1 番目のアミノ酸にかけての配列中にあるエピトープに特異的な、請求項 1 1 のキット。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 のキットであって、ここで

(i) 前記第一の抗体が D S M A C C 3 2 3 1 として寄託された 5 3 7 / H 2 細胞株から選択され、

(i i) 前記第二の抗体が D S M A C C 3 2 3 2 として寄託された 5 4 1 / E 2 細胞株から選択される、キット。

【請求項 1 4】

対象における疾患または病状の診断、予後予測、リスク評価、リスク層別化、治療管理および/または術後管理のための、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の免疫アッセイ法、請求項 1 0 に記載の抗体、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載のキットの使用。

【請求項 1 5】

前記疾患または病状が、癌、胃炎、肺疾患、心筋梗塞、高血圧症、心不全、肺疾患、血栓溶解、肥満および糖尿病の群から選択される、請求項 1 4 の使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

クロモグラニン A (C g A) は、1 9 6 5 年にウシ副腎髄質のクロム親和性細胞から同定・単離されたタンパク質である (バンクスら、1 9 6 5、生物化学雑誌 (B i o c h e m J) 9 7 : 4 0 C - 1 C ; タウペノットら、2 0 1 0、ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン、3 4 8 : 1 1 3 4 - 4 9)。クロム親和性細胞とは、主に哺乳類の副腎髄質に見られる神経内分泌細胞である。クロモグラニン A は様々な神経内分泌腫瘍、つまり、多発性内分泌腺腫症の 1 型および 2 型 (M E N 1 / M E N 2)、甲状腺髄様癌、カルチノイド腫瘍、膵島腫瘍、褐色細胞腫 / 傍神経節腫、低分化 / 小細胞 / 非定型肺カルチノイド、小細胞肺癌、メルケル細胞癌を含む、神経内分泌細胞に起因して稀に生じる新生物の腫瘍マーカーとして確立されたものであり (デフトスら、1 9 9 1、内分泌批評 (E n d o c r . R e v . 1 2 : 1 8 1 - 7 ; コルティら、1 9 9 6、英国癌学会誌 (B r J C a n c e r) 7 3 : 9 2 4 - 3 2)、また、複数のガイドラインでも取り上げられている (ラマゲら、2 0 1 2、国際胃腸・肝臓学雑誌 (G u t) 6 1 : 6 - 3 2 ; ヴィニクら、2 0 1 0、米国内分泌腫瘍学会 (N A N E T S) 膵臓 3 9 (6) : 7 1 3 - 7 3 4 ; パペら、2 0 1 2、欧州内分泌腫瘍学会 (E N E T S) 9 5 : 1 3 5 - 1 5 6)。

【0 0 0 2】

ヒトクロモグラニン A は、4 3 9 アミノ酸残基の配列を有し (配列番号 1 参照)、4 9 k D a の酸性の糖タンパク質を構成している。このタンパク質は貯蔵され、内分泌細胞、ニューロンおよび神経内分泌細胞のクロム親和性顆粒から、それぞれに対応するホルモン、神経伝達物質、および神経ペプチドと共に放出される (キムら、2 0 0 1、セル 1 0 6 : 4 9 9 - 5 0 9)。

10

20

30

40

50

【0003】

クロモグラニンAは、クロモグラニン/セレクトグラニンファミリーの主要なメンバーである。クロモグラニン/セレクトグラニンファミリーは、異なる遺伝子ではあるが、複数の特徴、すなわち酸性のアミノ酸残基が豊富なこと、翻訳後プロセッシングに関連するであろう位置に多数の塩基性アミノ酸の対を含むこと(メッツ-ブティグら、1993、欧州生物化学雑誌(Eur. J. Biochem) 217: 247-257)および切断の点で共通している種々の遺伝子に由来する一群のタンパク質からなっている。

【0004】

CgAは、ヒトおよび他の種において記述のある複数の生物学的に活性なペプチド断片の前駆物質であり、そのような生物学的に活性なペプチド断片としては、バソスタチン(ドリーズら、1991、内分泌学会誌(Endocrinology) 129: 3381-7)、クロモスタチン(ガリンドら、1991、米国アカデミー紀要88: 1426-30)、クロモシン(ストラブラ、1997、米国生化学分子生物学会誌(J Biol Chem) 272: 11928-36)、パンクレアスタチン(タテモトら、1986、ネイチャー324: 476-8)、WE-14(カリーら、1992、FEBSレター301: 319-321)、カテスタチン(マハタラ、1997、米国臨床試験学会誌(J Clin Invest) 100: 1623-33)、パラスタチン(ファシオットら、1993、内分泌学会誌133: 461-6)およびGE-25(カークメアら、1995、生化学雑誌(Biochem J) 310(Pt1): 331-6)がある。ユニプロットデータベースでは、放出されるペプチドが予測可能な切断部位に基づいて、この他にも、ヒトクロモグラニンA(受入番号P10645)に関連するペプチドが登録されている: アミノ酸配列1~76を含むバソスタチン-1、アミノ酸配列1~113を含むバソスタチン-2、アミノ酸配列116~207を含むEA-92、アミノ酸配列210~242を含むES-43、アミノ酸配列254~301を含むパンクレアスタチン、アミノ酸配列304~321を含むSS-18、アミノ酸配列324~337を含むWE-14、アミノ酸配列324~331を含むWA-8、アミノ酸配列340~358を含むLF-19、アミノ酸配列362~372を含むAL-11、アミノ酸配列375~393を含むGV-19、アミノ酸配列395~438を含むGR-44およびアミノ酸配列402~438を含むER-37。さらに別の神経内分泌細胞が別の様式で分子をプロセッシングする可能性があることも示されている(ポータラ-ゴメスら、2001、組織細胞化学雑誌(J Histochem Cytochem) 4: 483-90)。

【0005】

クロモグラニンAは、癌(例えば前立腺癌)を含むいくつかの疾患および状態のバイオマーカーとして記載されてきた(国際公開第2013/070088号A1; 国際公開第2013/070089号A1; 米国特許第6,238,877号B1; 国際公開第2012/065025号A2)。

【0006】

現在、クロモグラニンAを検出するためのアッセイとしては、非放射性CE標識アッセイ4種類が市販されている: 145~197番目のアミノ酸と219~234番目のアミノ酸に相当するエピトープに対する2種類のモノクローナル抗体を利用するシスバイオ(Cis-Bio)ELISAアッセイ(シスバイオ・バイオアッセイズ、コドレ、フランス)、23kDaのC末端断片に対するウサギポリクローナル抗体を理容するダコ(DAKO)ELISAアッセイ(ダコ・デンマークA/S、グロストルブ、デンマーク)、236~251番目のアミノ酸と264~279番目のアミノ酸に相当するエピトープに対する2種類のモノクローナル抗体を利用するユーロ・ディアグノスチカ(Euro-Diagnostica)NEOLISA(登録商標)サンドイッチELISAアッセイ(ユーロ・ディアグノスチカAB、マルメ、スウェーデン)である(国際公開第2011/135035号A1および国際公開第99/58980号A1もまた参照のこと)。

【0007】

クロモグラニンA検出用の完全に自動化されたアッセイとして唯一利用可能なアッセイ

10

20

30

40

50

としては、クロモグラニン A KRYPTOR アッセイ (サーモフィッシャー・サイエンティフィック B. R. A. H. M. S GmbH、ヘニッヒスドルフ、ドイツ) があり、このアッセイでは、250 ~ 301 番目のアミノ酸に相当するエピトープに結合する、1つのモノクローナル抗体と2つのモノクローナル抗体が使われる (ポポビチら、2014、臨床生化学雑誌 (Clin Biochem) 47: 87 - 91)。

【0008】

この分子はタンパク質分解性が高いため、これらのアッセイによって測定される濃度は、採取された試料の長期保存や、アッセイで利用する抗体によって測定できる断片の種類によって変わる可能性がある。従って改良型のクロモグラニン A アッセイは、この分子の最も安定な断片を対象とし、様々な保存条件における試料の安定性についても評価されたものとなるべきである。

10

【0009】

クロモグラニン A 免疫アッセイの臨床結果に及ぼす抗体エピトープおよびアッセイのデザインの影響が様々な論文に記載されている (コルティら、1996、欧州生物化学雑誌 235: 275 - 280、シュトライズバーgerら、2003、内分泌学会誌 177: 337 - 41)。

【発明の概要】

【0010】

本発明は、クロモグラニン A またはその断片を検出するためのアッセイの新規デザインに関する。このアッセイは、これまで抗原性部位が少ない、または非結合性の抗原部位であるとされてきたエピトープに結合する抗体を1つ以上利用するものである (コルティら、1996、欧州生物化学雑誌 235: 275 - 280)。驚くことに本発明のアッセイは、既存の全自動クロモグラニン A KRYPTOR アッセイ (B. R. A. H. M. S GmbH、ヘニッヒスドルフ、ドイツ) と比較して、試料に含まれる分析物の高い安定性を示した。さらに本明細書で提供する免疫アッセイは検出範囲が広い、つまり、少なくとも約 9 ng/ml ~ 約 3 mg/ml の濃度範囲の標的タンパク質を検出することができる。検出範囲が広いと試料を希釈する必要が少なくなるので、これは経済的な利点と言える。そのため本発明のアッセイを、例えば、様々な濃度のクロモグラニン A を高い特異性をもって検出するための研究ツールとして使用することができ、また、臨床に応用することもできる。临床上の応用の点では、疾患または病状の診断、予後予測、リスク評価、リスク層別化、治療管理および/または術後管理するための親試料中のクロモグラニン A の検出に、本発明のアッセイを使用することができる。

20

30

【0011】

具体的には、本発明は、クロモグラニン A またはその断片を検出するための免疫アッセイ法を提供し、この方法は、

a) クロモグラニン A を含んでいると予想される試料を、クロモグラニン A に特異的な第一の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体およびクロモグラニン A に特異的な第二の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体と、クロモグラニン A と2つの抗体または抗原結合断片もしくはそれらの誘導体との三重複合体が形成できる条件で接触させる工程、ならびに

40

b) 2つの抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体とクロモグラニン A との結合を検出する工程、を含む。

【0012】

本発明の免疫アッセイ法では、前記第一の抗体はクロモグラニン A の配列 (配列番号 1) 中にあるエピトープに特異的なものであってよく、好ましくは、配列番号 1 の 124 ~ 144 番目のアミノ酸の配列中にあるエピトープに特異的である。

【0013】

本発明の免疫アッセイ法を、診断法において使用することができる。本発明はさらに、本発明の方法において使用する抗体およびキットに関する。

【図面の簡単な説明】

50

【0014】

【図1】図1では、実施例4の免疫アッセイ法で使用した、様々な濃度のクロモグラニンAを使って作成した検量線を示している。

【図2】図2は、本発明の免疫アッセイの切断プロファイルを、先行技術であるK R Y P T O R クロモグラニンAアッセイ（サーモフィッシュャー・サイエンティフィックB・R・A・H・M・S GmbH、ヘニツヒスドルフ、ドイツ）と比較して示している（実施例5）。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、クロモグラニンAまたはその断片を検出するための免疫アッセイ法に関する。この免疫アッセイ法は、クロモグラニンAに特異的な1つ以上の抗体、好ましくはモノクローナル抗体を使ったクロモグラニンAの検出に基づくものである。この免疫アッセイは、配列番号1のクロモグラニンAの配列の124～144番目および/または280～301番目のアミノ酸残基にかけての配列中にあるエピトープを検出するものであることが好ましい。従って、本明細書で提供する免疫アッセイでは、クロモグラニンAの配列の124～144番目および/または280～301番目のアミノ酸残基を含んでいるクロモグラニンAの断片も検出することができる。そのため、「クロモグラニンAまたはその断片」または「クロモグラニンまたはその断片（類）」という用語は、クロモグラニンAと、本発明の免疫アッセイによって検出される、つまり、本発明の免疫アッセイによって検出可能なエピトープ（類）を含むその全ての断片を包含する。このアッセイは、配列番号1のクロモグラニンA配列の124～144番目のアミノ酸残基にかけての配列中にあるエピトープを検出する抗体を少なくとも1つ使用することが好ましい。クロモグラニンAまたは（場合により）その断片を、本発明の免疫アッセイに従って、クロモグラニンAまたはその断片に対する1つまたは好ましくは2つの抗体の結合によって、定性的におよび/または定量的に検出することができる。サンドイッチ形式の免疫アッセイ（つまり2つの抗体を使う免疫アッセイ）の例では、両方の抗体がクロモグラニンAまたはその断片に結合すれば、クロモグラニンAまたはその断片が含まれていると検出される。言い換えれば、本発明は一態様において、試料中に含まれるクロモグラニンAまたはその断片を検出するための免疫アッセイに関し、この方法は、前記試料を、第一の抗クロモグラニンA抗体（または抗原結合断片もしくはその誘導体）および第二の抗クロモグラニンA抗体（または抗原結合断片もしくはその誘導体）と接触させる工程、ならびに前記抗体およびクロモグラニンA（またはその断片）の三重免疫複合体を検出する工程、を含む。この免疫複合体は、前記抗体/抗体と前記試料との間に免疫反応が起こる条件において（つまり、抗体がクロモグラニンAまたはその断片と結合可能な、つまり、サンドイッチアッセイの例では、三重複合体の形成が可能な条件において）形成される。免疫アッセイ法では、例えばサンドイッチ形式のアッセイでは、好ましくは2つの抗体の組み合わせをしてもよい（以下を参照のこと）。従って本発明は、クロモグラニンA（またはその断片）を検出するための免疫アッセイ法に関し、この方法は、

a) クロモグラニンAを含んでいると予想される試料（またはその断片）を、クロモグラニンAに特異的な第一の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体またはその断片およびクロモグラニンAに特異的な第二の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体またはその断片と接触させる工程、ならびに

b) 2つの抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体とクロモグラニンAまたはその断片との結合を検出する工程、を含む。本発明の免疫アッセイ法では、前記第一の抗体は、クロモグラニンAの配列（配列番号1）に特異的、好ましくは配列番号1の124～144番目のアミノ酸にかけての配列に含まれているエピトープに特異的であることが好ましい。第一の抗体は好ましくはモノクローナル抗体である。

【0016】

本発明はまた、クロモグラニンA（またはその断片）を検出するための免疫アッセイ法に関し、この方法は、

10

20

30

40

50

a) クロモグラニン A を含んでいると予想される試料 (またはその断片) を、クロモグラニン A に特異的な第一の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体もしくはその断片およびクロモグラニン A に特異的な第二の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体もしくはその断片と、クロモグラニン A またはその断片と 2 つの抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体との三重複合体が形成可能な条件で接触させる工程、および

b) 2 つの抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体とクロモグラニン A またはその断片との結合を検出する工程、を含む。本発明の免疫アッセイ法では、前記第一の抗体は、クロモグラニン A の配列 (配列番号 1) に特異的、好ましくは配列番号 1 の 1 2 4 ~ 1 4 4 番目のアミノ酸にかけての配列に含まれているエピトープに特異的であることが好ましい。第一の抗体は好ましくはモノクローナル抗体である。

10

【0017】

本発明はまた、クロモグラニン A またはその断片を検出するための免疫アッセイ法に関し、この方法は、

a) クロモグラニン A を含んでいると予想される試料を、クロモグラニン A またはその断片に特異的な抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体を、クロモグラニン A と抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体との間の免疫複合体が形成可能な条件で接触させる工程を含み、ここで前記第一の抗体は、クロモグラニン A 配列 (配列番号 1) の 1 2 4 ~ 1 4 4 番目のアミノ酸にかけてのエピトープに特異的である。クロモグラニン A 配列の 1 2 4 ~ 1 4 4 番目のアミノ酸にかけてのエピトープに特異的な抗体は、2014年2月20、ライプニッツ・インスティテュート・ドイツ微生物資源研究所 (Deutsche Sammlungen von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH、DSMZ、Inhoffenstrabe 7 B、38124 ブラウンシュバイク、ドイツ) に DSM ACC 3 2 3 1 として寄託されたハイブリドーマ細胞株 5 3 7 / H 2 から生産された抗体であることが好ましい。

20

【0018】

これ以降「抗体」という用語は、そうでないことが明示されていない限り、抗原結合断片または誘導体をも包含する。

【0019】

「抗体」という用語は通常、モノクローナルおよびポリクローナル抗体ならびにその結合断片、特に Fc 断片およびいわゆる「単鎖抗体」(パード R. E. ら (1988) サイエンス 242: 423-6)、キメラ抗体、ヒト化抗体、特に CDR 接ぎ木抗体、ならびにディアボディまたはテトラボディ (ホリガー P. ら (1993) 米国アカデミー紀要 90: 6444-8) を含む。また、例えば、ファージディスプレイなどの技術によって、試料に含まれている目的の分子に特異的に結合するとして選択された免疫グロブリン様タンパク質も含まれる。本明細書中において「特異的」および「特異的に結合する」という用語は、目的の分子またはその断片に対する抗体を指す。抗体は、目的の分子 (ここではクロモグラニン A) またはその前述した断片に対する親和性が、目的の分子を含んでいる試料中に含まれている他の分子に対する親和性よりも少なくとも 50 倍高い、好ましくは 100 倍高い、最も好ましくは少なくとも 1000 倍高い場合に特異的であると見なされる。所与の特異性を有する抗体をどのように開発し、選択するかは当該分野でよく知られている。本明細書で前述したように、モノクローナル抗体が好ましい。

30

40

【0020】

本明細書でこの後詳述するように、本明細書に記載の免疫アッセイ法の (第一のおよび/または第二の) 抗体またはその抗原結合断片もしくは誘導体は例えば、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であっても、または遺伝子改変したモノクローナル抗体であってもよい。

【0021】

本発明の免疫アッセイ法において前記第一の抗体は、クロモグラニン A の配列 (配列番号 1)、好ましくは配列番号 1 の 1 2 4 ~ 1 4 4 番目のアミノ酸にかけての配列中にあるエピトープに特異的なものであってよい。第一の抗体はモノクローナル抗体であることが

50

好ましい。

【0022】

本発明の免疫アッセイ法において前記第二の抗体は、クロモグラニンAの配列（配列番号1）、好ましくは配列番号1の280～301番目のアミノ酸にかけての配列中にあるエピトープに特異的なものであってよい。第二の抗体はモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0023】

本発明の免疫アッセイの特定の態様では、第一の抗体はクロモグラニンA（配列番号1）の124～144番目のアミノ酸残基にかけての配列中にあるエピトープに特異的であり、第二の抗体は、クロモグラニンA（配列番号1）の280～301番目のアミノ酸残基にかけての配列中にあるエピトープに特異的である。第一のおよび第二の抗体は好ましくはモノクローナル抗体である。

10

【0024】

第一の抗体またはその抗原結合断片もしくは誘導体は、例えば、2014年2月20日、DSMZ（Inhoffenstrabe7B、38124 ブラウンシュバイク、ドイツ）にDSMZ ACC3231として寄託されたハイブリドーマ細胞株537/H2から生産されたものであってよい。ハイブリドーマ細胞株537/H2から生産される抗体は、クロモグラニンA配列（配列番号1）の124～144番目のアミノ酸残基、つまり配列番号2に特異的に結合する。これは、配列番号4の抗原性ペプチドを使って生産した。

20

【0025】

第二の抗体またはその抗原結合断片もしくは誘導体は、例えば、2014年2月20日、DSMZ（Inhoffenstrabe7B、38124 ブラウンシュバイク、ドイツ）にDSMZ ACC3232として寄託されたハイブリドーマ細胞株541/E2から生産されたものであってよい。ハイブリドーマ細胞株541/E2から生産される抗体は、クロモグラニンA配列（配列番号1）の280～301番目のアミノ酸残基、つまり配列番号3に特異的に結合する。これは、配列番号5の抗原性ペプチドを使って生産した。

【0026】

本発明の免疫アッセイ法の特定の態様では、第一の抗体は、2014年2月20日、DSMZ（Inhoffenstrabe7B、38124 ブラウンシュバイク、ドイツ）にDSMZ ACC3231として寄託されたハイブリドーマ細胞株537/H2から生産されるものであり、第二の抗体は、2014年2月20日、DSMZ（Inhoffenstrabe7B、38124 ブラウンシュバイク、ドイツ）にDSMZ ACC3232として寄託されたハイブリドーマ細胞株541/E2から生産されるものである。

30

【0027】

抗体とクロモグラニンA（またはその断片）の結合は、好適な条件（つまり、免疫反応が起こり得る条件、つまり抗体とクロモグラニンAが結合し、免疫複合体の形成が生じる条件）で起こる。そのような条件は、当業者には知られており、また、免疫アッセイ法の標準的な形式、例えば以下で説明するような形式を用いることができる。そのような条件は、好ましくは、生理的な温度、pHおよびイオン強度であり、例えばリン酸緩衝生理食塩水（PBS）などの媒体中で起こり得る。

40

【0028】

好ましい検出方法には、様々な形式の免疫測定、例えば放射免疫測定（RIA）、化学発光免疫測定および蛍光免疫測定、酵素免疫アッセイ（EIA）、酵素結合免疫測定（ELISA）、ルミネックスを使用したビーズアレイ、タンパク質マイクロアレイ検定、結果が早く出る形式の検定（例えば免疫クロマトグラフ試験紙など）ならびに選択/多重反応モニタリング（SRM/MRM）が含まれる。

【0029】

アッセイは、均一なアッセイでも不均一なアッセイであっても、競合型のアッセイであ

50

っても非競合型のアッセイであってもよい。特に好ましい態様では、アッセイは、非競合型の免疫アッセイ法であるサンドイッチアッセイの形式であり、この場合、検出される分子および/または定量される分子は、第一の抗体と第二の抗体に結合している。第一の抗体は固相、例えばビーズ、ウェルもしくは他の容器の表面、チップまたは試験紙に結合していてもよく、第二の抗体は、例えば色素、放射性同位元素、または反応性もしくは触媒性の活性部分で標識された抗体であるか、またはその逆である。その後、分析物に結合した標識抗体の量を、適切な方法で測定する。「サンドイッチアッセイ」に関連する一般的な組成および手法は十分に確立されており、当業者に知られている（免疫アッセイハンドブック（The Immunoassay Handbook）、デビッド・ワイルド編、エルゼビア社、オックスフォード；第三版（2005年5月）、ISBN-13：978-0080445267；ハルトシグら、化学生物学に関する最新の知見（Curr Opin Chem Biol）2006 2月；10（1）：4-10。PMID：16376134、参照することにより本明細書に組み入れられる）。

10

【0030】

特に好ましい態様では、アッセイには、液体反応混合物中にいずれも分散して存在する2つの抗体が含まれ、ここで、第一の標識成分は第一の抗体に結合しており、前記第一の標識成分は蛍光-消光もしくは増幅または化学発光-消光もしくは増幅に基づく標識システムの一部であり、かつ、前記標識システムの第二の標識成分は第二の抗体に結合しているため、両方の補足分子が分析物に結合すると、試料を含んでいる溶液中で形成されたサンドイッチ複合体の検出を可能にする測定可能なシグナルが生成される。

20

【0031】

より好ましくは、前記標識システムは、蛍光色素または化学発光色素、特にシアニン色素と共に、希土類のクリプテートまたは希土類のキレートを含んでいてもよい。

【0032】

本発明においては、蛍光に基づくアッセイに色素の使用を含めてもよく、そのような色素は、例えば、FAM（5-もしくは6-カルボキシフルオレセイン）、VIC、NED、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、IRD-700/800、シアニン色素（例えばCY3、CY5、CY3.5、CY5.5、Cy7）、キサンテン、6-カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロフルオレセイン（HEX）、TET、6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトジフルオレセイン（dimethoxyfluorescein）（JOE）、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン（TAMRA）、6-カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、5-カルボキシローダミン-6G（RG6）、6-カルボキシローダミン-6G（RG6）、ローダミン、ローダミングリーン、ローダミンレッド、ローダミン110、ボディピイ（BODIPY）色素（例えばBODIPY TMR）、オレゴングリーン、クマリン類（例えばウンベリフェロン）、ベンズイミド（例えばヘキスト（Hoechst）33258）、フェナントリジン（例えばテキサスレッド）、ヤキマイエロー、アレクサ・フルオロ、PET、エチジウムブロマイド、アクリジニウム色素、カルバゾール色素、フェノキサジン色素、ポルフィリン色素、ポリメチン色素などを含む群から選択される。

30

40

【0033】

本発明では、化学発光に基づくアッセイには、化学発光物質に関して説明された自然原理に基づく色素の使用が含まれる（カーク-オスマー、化学技術大辞典（Encyclopedia of chemical technology）第四版、J.I.クロスピッツ編集長；M.ハウ-グラント編、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ、1993、15号、518-562頁、551~562頁を引用すると共に、参照することにより本明細書に組み入れられる）。好ましい化学発光色素はアクリジニウムエステルである。クロモグラニンAを、例えば、B.R.A.H.M.S KRYPTORコンパクトPLUS装置（サーモ・サイエンティフィックB.R.A.H.M.S GmbH、ヘニッヒスドルフ/ベルリン、ドイツ）を使った全自動のサンドイッチ免疫アッセイシステムで検出して

50

もよい。この無作為アクセス分析器は、2つの蛍光標識試薬間の非放射性転移に基づいた高感度な時間分解増幅クリプテート発光 (Time Resolved Amplified Cryptate Emission、TRACE) 技術を利用するものである。

【0034】

本発明の特定の態様では、抗体のうちの1つ(例えば第一の抗体)が標識されており、その他の抗体(例えば第二の抗体)が固相に結合しているか、または固相に選択的に結合させることができる。しかしながら前述したように、本発明の方法においては、第一の抗体と第二の抗体が液体反応混合物中に分散して存在し、ここで、蛍光または化学発光の消光または増幅に基づく標識システムの一部である第一の標識成分が第一の抗体に結合して

10

【0035】

本明細書で使用する「アッセイ」または「診断的アッセイ」とは、診断の分野で使用されているいかなる型のアッセイであってもよい。このようなアッセイは、検出する分析物と、特定の親和性を有する1つ以上の補足プローブとの結合に基づくものであってよい。抗体と標的分子または目的の分子との間の相互作用について考慮すると、親和性定数は $10^8 / M$ よりも大きいことが好ましい。

【0036】

本発明の免疫アッセイ法は、診断対象に由来する試料にクロモグラニンA(またはその断片)が含まれているかおよび/または含まれていないかを検出する、あるいはクロモグラニンA(またはその断片)のレベルを検出する、診断および/または予後予測の方法において使用してもよい。クロモグラニンAは、カルチノイド腫瘍、神経内分泌腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、胃炎、肺疾患、心筋梗塞、高血圧症、心不全、肺疾患、血栓溶解、肥満および糖尿病を含む数多くの疾患および状態に関連していると考えられている。従って、本発明の免疫アッセイを、癌(カルチノイド腫瘍、神経内分泌腫瘍、前立腺癌および膀胱癌)、胃炎、肺疾患、心筋梗塞、高血圧症、心不全、肺疾患、血栓溶解、肥満および糖尿病の群より選択される疾患または状態の診断に使用してもよい。

20

【0037】

アッセイの「感度」とは、そうであることが正確に同定された真に陽性の割合、つまり、陽性の結果を同定する能力(真に陽性だった陽性の結果/陽性の総数)に関するものである。従って、そのアッセイによって検出できる分析物の濃度が低ければ低いほど、そのアッセイの感度は高いと言える。アッセイの「特異度」とは、そうであることが正確に同定された陰性の割合、つまり陰性の結果を同定する能力(真陰性/偽結果)に関するものである。抗体に関する「特異性」は、個々の抗原結合部位が1つだけの抗原性エピトープと反応する能力として定義される。抗体の結合挙動は、その「親和性」および「結合活性(avidity)」としても特徴付けることができる。抗体の「親和性」とは、1つの抗原性エピトープと1つの抗原結合部位との間の反応の強さに関する指標である。抗体の「結合活性」とは、多数のエピトープを有する抗体と、多価抗体との間の全体的な結合強度に関する指標である。

30

40

【0038】

診断および/または予後予測試験の感度および特異度は、その試験の分析的な「質」だけでなく、何を異常な結果とするかの定義にも依存する。実際には、通常、変数の値に対して「正常」集団(つまり、出生前診断で疾患または状態を持っていなかった健康な見込みの対象)および「疾患」集団をプロットすることで、受診者動作特性曲線(ROC曲線)を算出する。任意の特定のマーカーでは、疾患を有している対象と疾患を有していない対象のマーカーレベルの分布はほぼ一致する。このような条件では、試験によって、正常と疾患とを100%の正確性で間違いなく区別することはできず、また、重なっている範囲は、試験を行ってもその範囲では正常と疾患とを区別できないことを示している。それ

50

より下では試験が正常に機能せず、それより上では試験が正常に機能する閾値を選択する。ROC曲線下面積は、受信した測定値が状態の正しい判定を促すであろう確率の指標である。ROC曲線は、試験結果が正確な数を示す必要がない場合にも使用することができる。結果を順位付けることができれば、ROC曲線を作成することができる。例えば、「疾患」試料に対する試験結果は、その程度に従って順位付けされるだろう（例えば1 = 軽度、2 = 中等度、および3 = 重篤）。この順位付けを、「正常」集団の結果や、作成したROC曲線と関連づけることができる。これらの方法は、当該分野ではよく知られている。例えば、ハンリーら、1982、北米放射線医学会誌（Radiology）143：29 - 36を参照のこと。閾値は、好ましくは、ROC曲線面積が約0.5より大きくなるように、より好ましくは約0.7より大きくなるように、さらにより好ましくは約0.8より大きくなるように、その上さらにより好ましくは約0.85より大きくなるように、最も好ましくは約0.9より大きくなるように選択される。本明細書中において「約」という用語は、所与の測定値の+/-5%を指す。

10

20

30

40

50

【0039】

ROC曲線の横軸は（1 - 特異度）を表し、大きくなるほど偽陽性の割合が高くなる。曲線の縦軸は感度を表し、高くなるほど、真陽性の割合が高くなる。従って、選択された特定のカットオフ値に対して（1 - 特異度）の値を決定することができ、対応する感受性を得ることができる。ROC曲線下面積は、測定されたマーカーレベルによって、疾患または状態を正確に判定することのできる確率の指標である。従って、ROC曲線下面積は、その試験の有効性を決定するのに使用することができる。

【0040】

他の態様では、陽性尤度比、陰性尤度比、オッズ比、またはハザード比を、その試験がリスクを予測する、または疾患もしくは状態（「疾患群」）を診断する能力の指標として用いる。陽性尤度比の場合には、1の値は、陽性の結果が「疾患」群と「対照」群の両方の対象において同程度で現れることを意味し；1よりも大きい値は、陽性の結果が疾患群でより多く現れることを意味し；1未満の値は、陽性の結果が対照群でより多く現れることを意味している。陰性尤度比の場合には、1の値は、陰性の結果が「疾患」群と「対照」群の両方の対象において同程度で現れることを意味し；1よりも大きい値は、陽性の結果が試験群でより多く現れることを意味し；1未満の値は、陰性の結果が対照群でより多く現れることを意味している。

【0041】

オッズ比の場合には、1の値は、陽性の結果が「疾患」群と「対照」群の両方の対象において同程度で現れることを意味し；1よりも大きい値は、陽性の結果が疾患群でより多く現れることを意味し；1未満の値は、陽性の結果が対照群でより多く現れることを意味している。

【0042】

ハザード比の場合には、1の値は、あるエンドポイント（例えば死亡）の相対リスクが「疾患」群と「対照」群の両方で等しいことを意味し；1よりも大きい値は、リスクが疾患群でより高いことを意味し；1未満の値は、リスクが対照群でより高いことを意味している。

【0043】

診断または予後予測の指標と、診断または今後の臨床転帰の予後リスクとの関連づけが統計分析であることを、当該分野の専門家は理解するだろう。例えば、マーカーレベルがXを下回ることは、統計的有意差のレベルから判定されるように、その患者が、マーカーレベルがXを上回るかまたはXと同等の患者よりも、有害転帰を被る可能性が高いことのシグナルとなり得る。従って、マーカー濃度の基準レベルからの変化は、患者の予後を反映するものである可能性があり、また、マーカーレベルの変化の度合いは、有害事象の重篤度に関連するものである可能性がある。統計的有意差は、2つ以上の集団を比較すること、および信頼区間および/またはp値を決定することで決定されることが多い。例えば、ドウディーおよびウェアデン、研究のための統計学（Statistics for

Research)、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ、ニューヨーク、1983を参照のこと。本発明の好ましい信頼区間は90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9%および99.99%であり、好ましいp値は0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001、および0.0001である。

【0044】

本発明はさらに、クロモグラニンAを検出するためのキットに関し、このキットは、
(i)クロモグラニンAまたはその断片に特異的な第一の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体；および
(ii)クロモグラニンAまたはその断片に特異的な第二の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体、
を含む。

10

【0045】

このキットの第一の抗体および第二の抗体は、同じクロモグラニンA断片(断片群)に特異的であることが好ましい。

【0046】

例えば、(i)第一の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体は、配列番号1の配列中にあるエピトープに特異的であり；および/または(ii)第二の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体は、配列番号1の配列中にあるエピトープに特異的である。好ましくは、キットの第一の抗体は、DSM ACC3231として寄託されたハイブリドーマ細胞株537/H2によって生産されたモノクローナル抗クロモグラニンA抗体であり、および/または第二の抗体は、DSM ACC3232として寄託されたハイブリドーマ細胞株541/E2によって生産されたモノクローナル抗クロモグラニンA抗体である。

20

【0047】

本発明はまた、DSM ACC3231として寄託された細胞株537/H2およびDSM ACC3232として寄託された細胞株541/E2から選択されるハイブリドーマ細胞株も提供する。

【0048】

本発明はさらに、例えば、体液由来の生体試料に含まれるクロモグラニンAまたはその断片を検出および/または定量するための、サンドイッチ形式の免疫アッセイにおける、本発明によるキットの使用に関する。一態様においてそのような断片は少なくとも、2つの抗体が指向する2つのエピトープにかかる配列を含む。例えば、このキットを使用して、クロモグラニンAを検出および/または定量することができる。

30

【0049】

「試料」という用語は、好ましくは生体試料である。本明細書で使用する場合「試料」とは、例えば、目的の対象、例えば患者の診断、予後予測、または評価の目的で得られた体液試料または組織試料を指す場合がある。

【0050】

本発明の目的に関する「患者」または「対象」は、ヒトおよび他の動物、特に哺乳動物、の両方ならびに他の生物を含む。従ってこの方法は、ヒトの診断および獣医学的な使用の両方に応用可能である。好ましい態様において患者は哺乳動物であり、最も好ましい態様では、患者または対象はヒトである。

40

【0051】

本明細書においては、試料は対象の体液試料または組織試料であることが好ましい。好ましくは、体液試料である。好ましい試験試料としては、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、唾液、痰、および胸水が挙げられる。加えて、当業者であれば、いくつかの試験試料は、分画および精製過程の後、例えば、全血を血清と血漿成分に分けた後、より速やかに分析できることが分かるだろう。

【0052】

50

従って、本発明の好ましい態様において試料は、血液試料、血清試料、血漿試料、髄液試料、唾液試料および尿試料または前述した試料いずれかの抽出物を含んでいる群から選択される。好ましくは、試料は血液試料であり、より好ましくは血清試料または血漿試料である。本発明では血清試料が最も好ましい試料である。

【0053】

本発明において「血漿」とは、遠心分離した後に得られる、抗凝固剤を含んでいる血液の実質的に細胞を含まない上清である。抗凝固剤の例としては、EDTAまたはクエン酸塩などのカルシウムイオン結合化合物およびヘパリナート(heparinate)またはヒルジンなどのトロンピン阻害剤が挙げられる。細胞を含まない血漿は、抗凝固剤を加えた血液(例えばクエン酸、EDTAまたはヘパリンを加えた血液)を2000~3000gで少なくとも15分間遠心分離することで得られる。

10

【0054】

「血清」とは、血液を凝固させた後に回収される、全血のうちの液体画分である。凝固した血液(塊になった血液)を遠心分離すると、血清が上清として得られる。上清にはフィブリノゲンが含まれないが、いくつかの凝固因子は含まれたままである。

【0055】

必要に応じて、本発明で使用する前に試料を均一化するか、または溶媒を使って抽出して、液体試料を得る必要がある。本発明において液体試料は、溶液であってもまたは懸濁液であってもよい。液体試料は本発明で使用する前に、1つ以上の前処理にかけられる場合もある。そのような前処理としては、これらには限定されないが、希釈、濾過、遠心分離、濃縮、沈降、沈澱、透析が挙げられる。前処理には、化学的または生化学的な物質、例えば、酸、塩基、緩衝剤、塩、溶媒、反応性色素、界面活性剤、乳化剤、キレーターを溶液に加えることを含む場合もある。

20

【0056】

本発明の方法はさらに、病状の診断もしくは予後予測もしくはリスク評価またはスクリーニングあるいは治療管理または術後管理のために、試料中に含まれるクロモグラニンA(またはその断片)のレベルを決定することにも関する。

【0057】

そのため、本発明の免疫アッセイ法、抗体またはキットを、対象における疾患または病状の診断、予後予測、リスク評価、リスク層別化、治療管理および/または術後管理のために使用してもよい。

30

【0058】

そのため本発明では、本発明の免疫アッセイ法、抗体またはキットを、疾患の治療管理および術後管理に用いてもよく、ここで疾患とは、様々な型の癌である。

【0059】

本明細書で前述したように、本発明における対象の疾患または病状は、好ましくは、癌(カルチノイド腫瘍、神経内分泌腫瘍、前立腺癌および膀胱癌など)、胃炎、肺疾患、心筋梗塞、高血圧症、心不全、肺疾患、血栓溶解、肥満および糖尿病から選択され得る。

【0060】

本発明における対象の疾患または病状は、好ましくは、クロム親和性細胞腫、膵臓の内分泌腫瘍、胃腸の内分泌腫瘍、神経芽腫、甲状腺髄様癌、小細胞肺癌、多発性内分泌腺腫症1型および多発性内分泌腺腫症2型、前立腺癌、心血管疾患、感染に関連した状態および敗血症を含む神経内分泌腫瘍(NET)から選択される。

40

【0061】

「バイオマーカー」(生物学的マーカー)という用語は、健康におよび身体に関連する評価、例えば疾患リスク、精神医学的疾患、環境暴露およびその影響、疾患の診断、代謝過程、物質乱用、妊娠、細胞株の発達、疫学的研究などの指標として役立つ、測定可能かつ定量可能な生物学的指標(例えば、特定の酵素濃度、特定のホルモン濃度、集団における特定の遺伝子の表現型分布、生物学的な物質の有無)に関する。さらにバイオマーカーは、正常な生物学的過程、病原性の過程、または治療的介入に対する薬理的な反応の指

50

標として、客観的に測定され、評価される特徴として定義されている。バイオマーカーは、生体試料について測定される場合（血液、尿、または組織試験として）、ある人物から得られた記録である場合（血圧、ECG、またはホルター）、または画像試験である場合（子宮胎盤ドップラー超音波検査または胎児頂部浮腫測定（コンデ・アグデロら、2004、産科婦人科学雑誌（Obstet Gynecol）1104：1367-1391；ピンドラら、2002、産婦人科における超音波測定（Ultrasound Obstet Gynecol）20：219-225））がある。バイオマーカーは、様々な健康または疾患の特徴（環境要因への暴露のレベルもしくは型など）、遺伝子感受性、暴露に対する遺伝的な応答、無症状または臨床疾患のバイオマーカー、または治療への反応に関する指標などを表す可能性がある。従って単純に考えるとバイオマーカーとは、疾患体質（リスク因子またはリスクバイオマーカー）、疾患の状態（前臨床または臨床）、または疾患速度（進行）の指標である。従ってバイオマーカーを、前駆バイオマーカー（病気が発症するリスクを同定する）、スクリーニングバイオマーカー（無症状の疾患をスクリーニングするため）、診断的バイオマーカー（顕性疾患を認知する）、段階分けバイオマーカー（疾患重篤度を分類する）、または予後バイオマーカー（再発、治療への反応などの以降の疾患経過を予測する、および治療効果の監視）に分類することができる。バイオマーカーは、代替エンドポイントとしても役立つ可能性がある。代替エンドポイントとは、治験において治療の安全性と効果を評価するために、真に目的とするアウトカムを測定する代わりに用いることができるアウトカムである。代替エンドポイントトラックにおける変更が、目的のアウトカムにおける変化と密接な相関関係にあることが基本的な原則である。代替エンドポイントは、罹病率や死亡率など、評価に大規模な治験を必要とするエンドポイントよりも、短期間に安価で収集でき得る項目として利点がある。代替エンドポイントのその他の価値としては、代替エンドポイントの方が目的の暴露/介入とより密接な関連があるという事実、および代替エンドポイントの方が必然的に、測定するまでに時間的な間隔のあく臨床イベントよりも関連づけが容易であろうということが挙げられる。代替エンドポイントの重要な欠点としては、目的のエンドポイントが数多くの要因（代替エンドポイントに加えて）の影響を受ける場合、残差交絡によって代替エンドポイントの妥当性が損なわれる可能性があることが挙げられる。代替エンドポイントの妥当性は、代替エンドポイントによって、目的のアウトカムに対する暴露または介入の効果の少なくとも50%が説明できる場合により大きいことが示唆されている。例えば、バイオマーカーはタンパク質、ペプチドまたは核酸分子であってよい。

【0062】

本明細書において「クロモグラニンA」とは、ヒトクロモグラニンAを指す。ヒトクロモグラニンAのアミノ酸配列を配列番号1に示す。本発明によるクロモグラニンAポリペプチドまたは誘導体は、グリコリゼーション（glycosylation）、リポイジゼーション（lipidization）または誘導体化などの翻訳後修飾を受ける場合もある。

【0063】

本発明において「診断」とは、対象における疾患または臨床症状の認知および（早期）検出に関し、識別診断も含み得る。特定の態様においては、疾患または臨床症状の重篤度の評価もまた、「診断」という用語に包含され得る。

【0064】

「予後予測」とは、特定の疾患または臨床症状に罹患している対象に関し、アウトカムまたは特定のリスクを予測することに関する。これには、前記対象に関し、回復する可能性または有害事象の可能性を評価することも含まれ得る。

【0065】

本発明において「リスク評価」または「リスク層別化」という用語は、今後の予後予測に従って、対象を異なるリスク群に分類することに関する。リスク層別化はまた、予防的手段および/または治療的手段を適用するための層別化に関する。

【0066】

10

20

30

40

50

本発明における「治療管理」という用語は、前記患者の治療を監視および/または調整することを指す。

【0067】

本発明における「術後管理」という用語は、前記患者が外科手技を受けた後に、前記患者を監視することを指す。

【0068】

本発明における「スクリーニング」という用語は、特定のマーカーと既定のカットオフレベルを利用してある集団を調査し、その集団の中で、特定の疾患に対してより高いリスクを有する個人を同定する過程を指す。スクリーニングは集団に対して適用可能であり、診断は個々の患者レベルで適用するものである。

10

【0069】

以下に記載の実施例および図は、本発明をより詳細に説明するために使用されるが、本発明は前記実施例および図には限定されるものではない。

【0070】

本明細書中で引用する全ての特許および特許以外の参考文献は、参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる。

配列：

配列1（配列番号1）：シグナルペプチドを含まないヒトクロモグラニンA（CGA）（UniProt Accession no. P10645）；抗原性エピトープを下線で示す：

20

| | | | | |
|-------------------|------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 11 | 21 | 31 | 41 |
| LPVNSPMNKG | DTEVMKCIVE | VISDTLSKPS | PMPVSQECFE | TLRGDERILS |
| 51 | 61 | 71 | 81 | 91 |
| ILRHQNLKE | LQDLALQGAK | ERAHQKKHS | GFEDELSEVL | ENQSSQAELK |
| 101 | 111 | 121 | 131 | 141 |
| EAVEEPSSKD | VMEKREDSKE | <u>AEKSGEATDG</u> | <u>ARPQALPEPM</u> | <u>QESKAEGNNQ</u> |
| 151 | 161 | 171 | 181 | 191 |
| APGEEEEEEE | EATNTHPPAS | LPSQKYPGPQ | AEGDSEGLSQ | GLVDREKGLS |
| 201 | 211 | 221 | 231 | 241 |
| AEPGWQAKRE | EEEEEEEEAE | AGEEAVPEEE | GPTVVLNPHP | SLGYKEIRKG |
| 251 | 261 | 271 | 281 | 291 |
| ESRSEALAVD | GAGKPGAEEA | QDPEGKGEQE | <u>HSQQKEEEEE</u> | <u>MAVVPQGLFR</u> |
| 301 | 311 | 321 | 331 | 341 |
| <u>GGKSGELEQE</u> | EERLSKEWED | SKRWSKMDQL | AKELTAEKRL | EGQEEEEEDNR |
| 351 | 361 | 371 | 381 | 391 |
| DSSMKLSFRA | RAYGFRGPGP | QLRRGWRPSS | REDSLEAGLP | LQVRGYPEEK |
| 401 | 411 | 421 | 431 | |
| KEEEGSANRR | PEDQELESLS | AIEAELEKVA | HQLQALRRG | |

30

40

配列2（配列番号2）：ヒトクロモグラニンA（CGA）のエピトープ1（配列番号1の124～144番目の残基に相当）：

| | | |
|------------|------------|----|
| 1 | 11 | 21 |
| SGEATDGARP | QALPEPMQES | K |

配列3（配列番号3）：ヒトクロモグラニンA（CGA）のエピトープ2（配列番号1の280～301番目の残基の相当）：

1 11 21
EHSQQKEEEE EMAVVPQGLF RG

配列 4 (配列番号 4) : ヒトクロモグラニン A (CGA) の抗原性ペプチド断片 (配列番号 1 の 124 ~ 144 番目の残基の N 末端にシステイン残基が負荷された配列に相当) :

1 11 21
CSGEATDGAR PQALPEPMQE SK

配列 5 (配列番号 5) : ヒトクロモグラニン A (CGA) の抗原性ペプチド断片 (配列番号 1 の 280 ~ 301 番目の残基の N 末端にシステイン残基が負荷された配列に相当) :

1 11 21
CEHSQQKEEEE EEMAVVPQGL FRG

【実施例】

【0071】

実施例 1 : 抗体の生成

モノクローナル抗体の開発

免疫原は以下のように準備した : クロモグラニン A 分子の 124 ~ 144 番目のアミノ酸領域の N 末端にシステインを付加した配列に相当する CSGEATDGAR PQALPEPMQESK (配列番号 4) ペプチドをキャリア BSA に共有結合させた。クロモグラニン A 分子の 280 ~ 301 番目のアミノ酸領域の N 末端にシステインを付加した配列に相当する CEHSQQKEEEE EEMAVVPQGLFRG (配列番号 5) ペプチドをキャリア BSA に共有結合させた。

【0072】

クロモグラニン A の 124 ~ 144 ペプチドおよび 280 ~ 301 ペプチドに対するモノクローナル抗体を標準的な手法によって生成した (ハーロウ E、レーン D、抗体 : 実験の手引き (Antibodies : A Laboratory Manual) コールド・スプリング・ハーバー、コールド・スプリング・ハーバー研究所、1988 ; レーン、1985、医療研究会免疫学会誌 (Journal of Immunology Methods) 81 : 223 - 228)。

【0073】

完全フロイントアジュバントで希釈した 124 ~ 144 ペプチドまたは 280 ~ 301 ペプチドそれぞれ 100 μg を 8 週齢のメスの Balb/c マウスに接種した。2 回目以降は不完全フロイントアジュバントを使い、用量 50 μg で 61 日間、様々な時間間隔で接種した。

【0074】

融合させる前に、124 ~ 144 または 280 ~ 301 の固定化したペプチドを使った ELISA により、レシピエントの血清中に所望の抗体が含まれていることを検出した。次いで固定化した組換え CGA (組換えクロモグラニン A は、フランス国立科学研究センター (French National of Scientific Research)、"組換えタンパク質生産プラットフォーム (Plate-forme de Production de Proteines Recombinantes)" CRBM UMR 5237 CNRS、モンペリエにおいて調製した) を使った ELISA により、クローン 537/H2 および 541/E2 をスクリーニングした。

【0075】

イソ型の特徴解析には、マウスモノクローナル抗体イソ型同定 (Isotyping) キット (ロシュ) を使用した。

【0076】

抗体をプロテイン A ファストフロー・アフィニティクロマトグラフィー (GEヘルスケア・ライフサイエンス) を使い、製造業者の説明に従って精製した。

10

20

30

40

50

抗体の標識

【0077】

最後のアッセイでは、抗体537/H2をユーロピウム・クリプテート（シスバイオ・バイオアッセイズ、マルクール、フランス）に結合させ、抗体541/E2をアレクサ・フルオロ647（登録商標）（ライフテクノロジーズ、現サーモフィッシャーサイエンティフィック）に結合させた。結合反応は製造業者のプロトコールに従って実施した。

【0078】

実施例2：124～144/280～301アミノ酸領域指向性抗体を使ったクロモグラニンAアッセイの開発

クロモグラニンAの安定な断片を検出するために、時間分解増幅クリプテート発光（TRACER）技術（マチス、1993、臨床化学（Clin Chem）39（9）：1953-9）を使って均一なサンドイッチ型蛍光免疫測定法を開発した。

【0079】

使用する前に、クリプテート-537/H2複合抗体およびアレクサ・フルオロ（登録商標）-541/E2複合抗体のストックをアッセイ緩衝液（100mMリン酸塩（pH7）、422mMKF、0.1%ウシ血清アルブミン、0.15mg/mlマウスIgおよび0.07mg/mlウシIg）でそれぞれ0.265μg/mlおよび2.94μg/mlに希釈した。

【0080】

組換えクロモグラニンAをウマ血清で希釈してクロモグラニンAの標準物質を得た。免疫アッセイは、14μlの試料/標準物質、68μlのアレクサ・フルオロ（登録商標）-541/E2複合抗体溶液および68μlのクリプテート-537/H2複合抗体溶液をB.R.A.H.M.S KRYPTOR装置（サーモフィッシャー・サイエンティフィックB.R.A.H.M.S GmbH、ヘニッヒスドルフ/ベルリン、ドイツ）を製造業者の説明に従って使い、37℃でインキュベートすることによって行った。アッセイの反応時間は29分とした。B.R.A.H.M.S KRYPTOR装置を使い、665および620nmの同時二波長測定により特定の蛍光（RFU）を測定した。直接読み取り範囲を3000ng/mlまでと規定し、アッセイの機能感度は13.1ng/mlと推定した。

【0081】

実施例3：CgA IIAッセイを使った、血清試料プールに含まれているクロモグラニンAの後安定性

本試験では、回収した直後に-16℃以下で凍結させておいた3つの血清試料プールを使用した。

【0082】

1つのプールは健常人の血清試料から作製したもので（プール1）、その他の2つは病理学的な血清試料であった（プール2および3）。

【0083】

測定時間は以下の通りとした：2～8℃で1、2および3日後；18～25℃で1、2および3日後；凍結/融解サイクルを1、2および3回行った後。

【0084】

測定にはKRYPTOR装置を使い、上述した試薬と条件で行った。

【0085】

試料の安定性が許容可能であると見なすことができる基準は、様々な条件での減少が10%以下であることとする。

【0086】

得られた結果（表1）から、（537/H2-クリプテート；541/E2-アレクサ・フルオロ（登録商標））KRYPTORアッセイが3回までの凍結/融解サイクル、2～8℃または18～25℃で1日までの保存には影響を受けないことが分かった。2つの病理学的プールの安定性は、2～8℃または18～25℃で3日後の濃度が低下（11

10

20

30

40

50

%) した以外は、健常提供者のプールで見られた安定性よりも高かった。

【表 1】

537/H2-クリプテート；541/E2-アレクサ・フルオロ（登録商標）を使った KRYPTOR による 3 つの血清試料の後安定性

| 条件 | プール1 | | プール2 | | プール3 | |
|------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | 濃度 (ng/ml) | 基準に 対する% | 濃度 (ng/ml) | 基準に 対する% | 濃度 (ng/ml) | 基準に 対する% |
| 基準 | 85.5 | | 880 | | 2153 | |
| 2~8°Cで3日 | 65.7 | -23% | 786 | -11% | 1981 | -8% |
| 2~8°Cで2日 | 62.9 | -26% | 797 | -9% | 2011 | -7% |
| 2~8°Cで1日 | 79.8 | -7% | 825 | -6% | 2096 | -3% |
| 18~25°Cで3日 | 69.9 | -18% | 789 | -10% | 1976 | -8% |
| 18~25°Cで2日 | 71.2 | -17% | 798 | -9% | 2047 | -5% |
| 18~25°Cで1日 | 78.5 | -8% | 816 | -7% | 2070 | -4% |
| 凍結融解サイクル3回 | 82.8 | -3% | 851 | -3% | 2131 | -1% |
| 凍結融解サイクル2回 | 90.4 | 6% | 862 | -2% | 2137 | -1% |
| 凍結融解サイクル1回 | 85.4 | 0% | 875 | -1% | 2153 | 0% |

10

【0087】

20

実施例 4：検量線

図 1 は、時間分解増幅クリプテート発光 (TRACE) 技術を使った (537/H2-クリプテート；541/E2-アレクサ・フルオロ 647 (登録商標)) KRYPTOR アッセイの反応曲線を示している。

【0088】

検量線から、(537/H2-クリプテート；541/E2-アレクサ・フルオロ 647 (登録商標)) KRYPTOR アッセイの直接読み取り範囲が 3000 ng/ml までだと分かる。

【0089】

実施例 5：切断プロファイルおよび感度

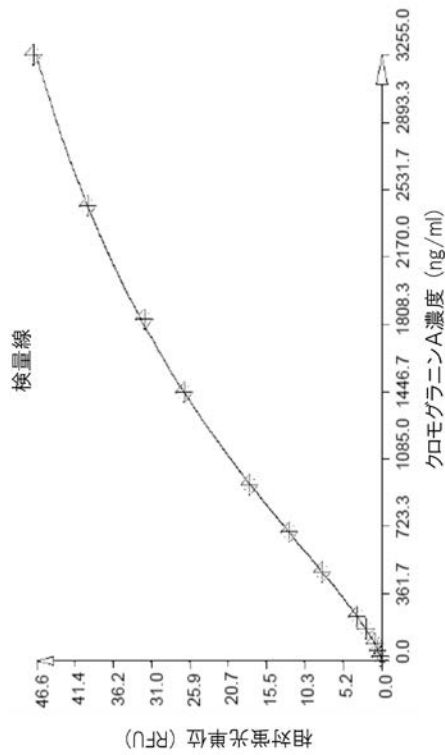
30

91 試料 (健常人提供者由来の 24 試料と病理学的試料 67 試料) を並行して、537/H2 および 541/E2 抗体を使い、前述した条件と先行技術である KRYPTOR クロモグラニン A アッセイ (サーモフィッシャー・サイエンティフィック B.R.A.H.M.S GmbH、ヘニッヒスドルフ、ドイツ) の条件で測定した。測定は 2 つ組で行い、各組の変動係数を同じグラフ上でクロモグラニン A の濃度に対してプロットした。いずれのアッセイにおいても切断プロファイルは同等であった。KRYPTOR クロモグラニン A アッセイに関して公表されているアッセイの機能感度は 9.04 ng/ml であり；(537/H2-クリプテート；541/E2-アレクサ・フルオロ 647 (登録商標)) KRYPTOR では、10% CV で予測されるアッセイの機能感度は 13.1 ng/ml である。

40

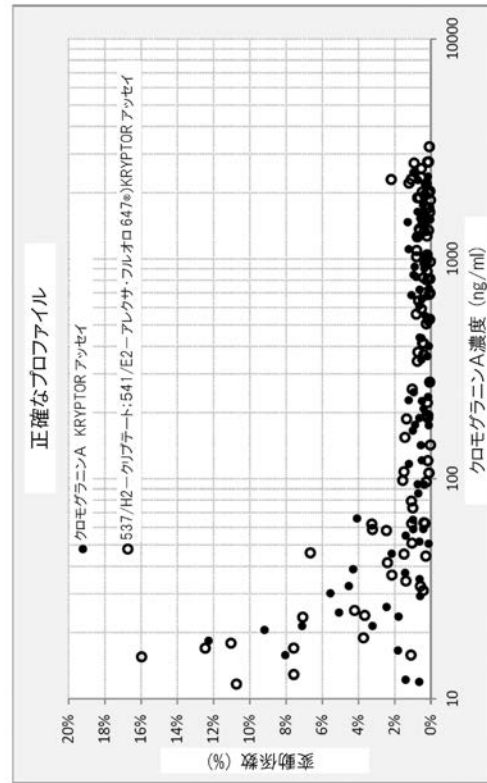
【 図 1 】

図 1



【 図 2 】

図 2



【 配列表 】

2020016660000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和1年10月15日 (2019.10.15)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

対象における神経内分泌腫瘍または前立腺がんの診断、予後予測、リスク評価、リスク層別化、治療管理および/または術後管理のための方法であって、

下記の工程を含む、免疫アッセイ法を用いた、前記対象からの試料における、クロモグラニンAまたはその断片の存在および/または不存在または、そのレベルを決定することを含む方法。

a) 前記試料を：

(i) クロモグラニンAに特異的な第一の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体(ここで、前記第一の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体は、配列番号1の124~144番目のアミノ酸残基にかけての配列中にあるエピトープに特異的である。); および、

(ii) クロモグラニンAに特異的な第二の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体; と、

クロモグラニンAと前記2つの抗体または抗原結合断片もしくはそれらの誘導体との三重複合体が形成できる条件下で接触させる工程、ならびに

b) 前記 2 つの抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体とクロモグラニン A との結合を検出する工程。

【請求項 2】

前記第二の抗体または抗原結合断片もしくはその誘導体が、配列番号 1 の 280 ~ 301 番目のアミノ酸残基にかけての配列中にあるエピトープに特異的である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第一の抗体が DSM ACC3231 として寄託された、537/H2 ハイブリドーマ細胞株によって生産されたものである、請求項 1 または 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記第二の抗体が DSM ACC3232 として寄託された、541/E2 ハイブリドーマ細胞株によって生産されたものである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記試料が、前記対象の体液または組織由来のものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記体液が、血液、血清、血漿および尿から選択される、請求項 5 に記載された、方法。

【請求項 7】

アッセイが、均一な相または不均一な相で行われる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体のうちの一つが標識されており、その他の抗体が固相に結合しているかまたは固相に選択的に結合させることができる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体第一のおよび前記第二の抗体が液体反応混合物中に分散して存在おり、そして、蛍光 - 消光もしくは増幅または化学発光 - 消光もしくは増幅に基づく標識システムの一部である第一の標識成分が前記第一の抗体に結合しており、および前記標識システムの第二の標識成分が前記第二の抗体に結合しているため、両方の抗体が検出すべきクロモグラニン A に結合すると、測定溶液中で形成されたサンドイッチ複合体の検出を可能にする測定可能なシグナルが生成される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記標識システムが、蛍光色素または化学発光色素、特にシアニン系色素と共に、希土類のクリプテートまたは希土類のキレートを含んでいる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記蛍光色素または化学発光色素が、シアニン系色素である、請求項 10 の方法。

フロントページの続き

(72)発明者 リゴール ヴァレリー

フランス国 エフ - 3 0 1 5 0 ロックモール アベニュー ランジュヴァン 3

(72)発明者 ゲラン ナディーヌ

フランス国 エフ - 3 0 2 0 0 パニョール シュル セーズアベニュー ベル オリゾン 2 1

Fターム(参考) 4H045 DA76 EA50 FA74 GA26

【 外国語明細書 】

2020016660000001.pdf

2020016660000002.pdf

2020016660000003.pdf

2020016660000004.pdf

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 嗜铬粒蛋白a的免疫测定方法和抗体 | | |
| 公开(公告)号 | JP2020016660A | 公开(公告)日 | 2020-01-30 |
| 申请号 | JP2019169343 | 申请日 | 2019-09-18 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 塞尚公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 塞尚兴业路ACCION扫描新Purifie | | |
| [标]发明人 | カルエルパスカリーヌ リゴールヴァレリー ゲランナディーヌ | | |
| 发明人 | カルエル パスカリーヌ リゴール ヴァレリー ゲラン ナディーヌ | | |
| IPC分类号 | G01N33/574 G01N33/543 G01N33/53 C07K16/18 C12N15/13 | | |
| CPC分类号 | C07K16/18 C07K16/30 C07K2317/34 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/68 G01N2800/042 G01N2800/044 G01N2800/062 G01N2800/12 G01N2800/321 G01N33/5748 G01N33/582 | | |
| FI分类号 | G01N33/574.ZNA.A G01N33/543.501.A G01N33/53.D C07K16/18 C12N15/13 G01N33/574.AZN.A | | |
| F-TERM分类号 | 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26 | | |
| 优先权 | 2014164809 2014-04-15 EP | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

提供一种用于检测嗜铬粒蛋白A (或其片段) 的免疫测定方法。解决方案: 用于检测嗜铬粒蛋白A (或其片段) 的免疫测定方法包括以下步骤: 与疑似包含嗜铬粒蛋白A, 其具有嗜铬粒蛋白A特异的第一抗体或其抗原结合片段或衍生物, 以及对嗜铬粒蛋白A特异的第二抗体或其抗原结合片段或衍生物, 其条件是允许在嗜铬粒蛋白A和嗜铬粒蛋白A之间形成三元复合物。两种抗体或其抗原结合片段或衍生物; 还提供了针对嗜铬粒蛋白A氨基酸124至144和280至301氨基酸残基的抗体及其在免疫测定方法中的用途。没有

| | | |
|-----------------------|----------------------------------|---|
| (19) 日本国特許庁 (JP) | (12) 公開特許公報 (A) | (11) 特許出願公開番号 特開2020-16660 (P2020-16660A) |
| | (43) 公開日 | 令和2年1月30日 (2020.1.30) |
| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| GO1N 33/574 (2006.01) | GO1N 33/574 ZNAA | 4H045 |
| GO1N 33/543 (2006.01) | GO1N 33/543 501A | |
| GO1N 33/53 (2006.01) | GO1N 33/53 D | |
| C07K 16/18 (2006.01) | C07K 16/18 | |
| C12N 15/13 (2006.01) | C12N 15/13 | |
| | 審査請求 有 | 請求項の数 11 O L 外国語出願 (全 22 頁) |
| (21) 出願番号 | 特願2019-169343 (P2019-169343) | (71) 出願人 |
| (22) 出願日 | 令和1年9月18日 (2019.9.18) | 512325266 |
| (62) 分割の表示 | 特願2016-562949 (P2016-562949) の分割 | セザンヌ ソシエテ バ アクションズ シンプリフィエ フランス国, エフ-30035 ニーム セザ 1, バルク サイアンティフィック ジョルジュ ブッセ, アレー グラハム, ベル, 280 |
| 原出願日 | 平成27年4月14日 (2015.4.14) | (74) 代理人 |
| (31) 優先権主張番号 | 14164809.7 | 11000109 |
| (32) 優先日 | 平成26年4月15日 (2014.4.15) | 特許業務法人特許事務所サイクス |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 欧州特許庁 (EP) | カルエル パスカリーヌ フランス国, エフ-30000 ニーム シュマン ダユ カルチュ デスパリーヌ 10386 |
| | | 最終頁に続く |
| (54) 【発明の名称】 | クロモグラニンAを検出するための免疫アッセイ法および抗体 | |