

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/057622

発行日 平成30年7月12日 (2018. 7. 12)

(43) 国際公開日 **平成29年4月6日 (2017. 4. 6)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00 Z	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705	4 H O 4 5
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/02 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2017-543587 (P2017-543587)	(71) 出願人 390037327 積水メディカル株式会社 東京都中央区日本橋二丁目1番3号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/078901	
(22) 国際出願日 平成28年9月29日 (2016. 9. 29)	
(31) 優先権主張番号 特願2015-191707 (P2015-191707)	(74) 代理人 110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(32) 優先日 平成27年9月29日 (2015. 9. 29)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 海老沼 宏幸 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水 メディカル株式会社内
	(72) 発明者 藤村 建午 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水 メディカル株式会社内
	Fターム(参考) 4B064 AG20 AG26 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA13
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫測定用抗体とその作製方法

(57) 【要約】

抗体作製に必要な量の s I L - 2 R 抗原を効率よく製造する方法、及び該抗原を用いた抗 s I L - 2 R 抗体の製造方法の提供。S C C - 3 細胞を培養すること、及び該細胞の培養物から可溶性インターロイキン 2 レセプターを回収することを含む、可溶性インターロイキン 2 レセプターの製造方法。該方法で製造された s I L - 2 R で動物を免疫することを含む、抗可溶性インターロイキン 2 レセプター抗体の製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S C C - 3 細胞を培養すること；及び
該細胞の培養物から可溶性インターロイキン 2 レセプターを回収すること、
を含む、可溶性インターロイキン 2 レセプターの製造方法。

【請求項 2】

S C C - 3 細胞を培養して可溶性インターロイキン 2 レセプターを調製すること；及び
該可溶性インターロイキン 2 レセプターで動物を免疫すること、
を含む、抗可溶性インターロイキン 2 レセプター抗体の製造方法。

【請求項 3】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記免疫した動物から採取した脾臓細胞又はリンパ節由来 B 細胞と骨髓腫細胞とのハイブリドーマを作製することをさらに含む、請求項 2 又は 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記 S C C - 3 細胞をインフルエンザウイルス刺激する工程を含まない、請求項 2 ~ 4
のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

S C C - 3 細胞を培養して可溶性インターロイキン 2 レセプターを調製すること；
該可溶性インターロイキン 2 レセプターで動物を免疫すること；及び
該免疫した動物から採取した脾臓細胞又はリンパ節由来 B 細胞と骨髓腫細胞とを細胞融
合すること、
を含む、抗可溶性インターロイキン 2 レセプター抗体産生ハイブリドーマの製造方法。

【請求項 7】

9 2 2 1 2 (N I T E B P - 0 2 1 2 4) 及び 9 2 2 1 5 R (N I T E B P - 0 2
1 2 5) からなる群より選択される可溶性インターロイキン 2 レセプター抗体産生ハイブ
リドーマ。

【請求項 8】

S C C - 3 細胞に産生された可溶性インターロイキン 2 レセプターで動物を免疫するこ
とによって得られたことを特徴とする、抗可溶性インターロイキン 2 レセプター抗体。

【請求項 9】

モノクローナル抗体である、請求項 8 記載の抗体。

【請求項 10】

請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法で製造された抗可溶性インターロイキン 2 レセ
プター抗体を用いることを特徴とする、ヒト可溶性インターロイキン 2 レセプターの免疫
測定方法。

【請求項 11】

エピトープが異なる 2 種類のモノクローナル抗可溶性インターロイキン 2 レセプター抗
体を用いたサンドイッチ免疫測定法である、請求項 10 記載の免疫測定方法。

【請求項 12】

前記サンドイッチ免疫測定法が、ラテックス免疫比濁法又はサンドイッチ E L I S A で
ある、請求項 11 記載の免疫測定方法。

【請求項 13】

請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法で製造された抗可溶性インターロイキン 2 レセ
プター抗体を含む、ヒト可溶性インターロイキン 2 レセプター測定用試薬。

【請求項 14】

ラテックス免疫比濁法又はサンドイッチ E L I S A を行うための試薬である、請求項 1
3 記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本発明は、抗可溶性インターロイキン2レセプター抗体、及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

可溶性インターロイキン2レセプター（以下、sIL-2Rと記す）は、T細胞の細胞膜蛋白質であるIL-2Rの鎖が切り離されることで生成される可溶性形態のIL-2Rであり、生体の血中に存在する。sIL-2Rは、IL-2との結合性を保持していること、及び免疫反応が活性化する感染症や各種疾患の患者において血中濃度が上昇することから、個体の免疫活性化を反映する指標として考えられている。臨床的には、sIL-2Rは、悪性リンパ腫の診断及び経過の観察のためのマーカーとして利用されている。

10

【0003】

従来、sIL-2Rを測定する方法としては、異なるエピトープに対する2種類のモノクローナル抗sIL-2R抗体を用いた酵素結合免疫吸着法（ELISA法）又は化学発光酵素免疫測定法（CLEIA法）を原理とした測定試薬が開発され、体外診断薬として販売されている。しかしながら、ELISA法は、操作が煩雑な上に測定に長時間を要することが問題とされ、一方CLEIA法は、専用の測定装置が必要であるという欠点を有する。したがって、簡単、迅速かつ汎用の自動分析装置に適用可能なsIL-2R免疫測定用試薬の開発が望まれている。

【0004】

さらに、より高精度なsIL-2Rの測定のためには、抗体の特性、抗体と固相担体との相性、及び抗体の非特異反応を制御して、より特異性の高いsIL-2R免疫測定用試薬を開発する必要がある。免疫測定用試薬の開発効率向上のためには、候補となる抗sIL-2Rモノクローナル抗体の選択肢をできるだけ広く獲得することが望ましい。そのためには、さまざまな由来のsIL-2Rを免疫原として、それぞれ必要量のsIL-2Rをできるだけ多く確保することが求められる。またsIL-2Rは、測定したsIL-2Rの定量のための標準品としても重要である。したがって、抗sIL-2R抗体を作製する際の免疫原の供給源、あるいはsIL-2R定量解析のための標準品の供給源として使用できる、大量かつ簡便にsIL-2Rを供給することができる供給源が求められている。

20

【0005】

従来の抗sIL-2R抗体の作製方法に関しては、ヒト血液から採取された末梢血液単核細胞（PBMC）をインフルエンザウイルスで刺激し、それを免疫原として抗体を得る方法が報告されている（特許文献1）。しかしながら、ヒト血液由来PBMCは大量に確保することが困難であることから、この方法で試薬開発に必要な量の免疫原を得ることは容易ではない。別の抗sIL-2R抗体の作製方法として、リンパ腫細胞株等のIL-2Rを発現している細胞そのものを免疫原とする方法が報告されている（特許文献2、3）。しかしながら、この方法は、予め細胞表面における抗体の発現を確認するため、操作が非常に煩雑である上に、これを免疫原として得られた抗体が細胞外に切り出されたsIL-2Rに反応することが保障されているものではない。また、非特許文献1には、いくつかのリンパ腫細胞株がsIL-2Rを分泌することが記載されているが、その濃度は非常に少なく、抗体作製の免疫原とするには不適である。一方、非特許文献2には、単球性の非ホジキン性リンパ腫細胞株であるSCC-3が細胞表面にIL-2Rを発現することが報告されているが、この細胞のsIL-2R分泌に関する報告はない。

30

40

【0006】

目的蛋白質に対する抗体作製に用いられる抗原として、目的蛋白質のリコンビナント蛋白質も一般的に用いられている。しかしながら、リコンビナント抗原で免疫して作製したモノクローナル抗体においては、検体中に含まれているnativeな目的蛋白質への反応性が得られないことや弱いことをしばしば経験する。この現象は、リコンビナント蛋白質がnativeな蛋白質の部分配列しか含まないこと、又は、たとえ全長配列を含む場合であっても蛋白質の折り畳みの違いによる立体構造変化を有すること、などに起因する

50

と推測されている。さらに、リコンビナント蛋白質による免疫で *n a t i v e* な目的蛋白質に反応する複数種の抗体が作製できた場合でも、該複数種の抗体間で抗原決定配列が近傍に偏ることにより、免疫測定に必要な異なるエピトープに対する２種類のモノクローナル抗体の選択肢は極端に減少する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開昭62-70761号公報

【特許文献2】特開昭61-56083号公報

【特許文献3】特開平2-171199号公報

10

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Blood.2011;118,2809-2820

【非特許文献2】Jpn. J. Cancer Res.1986;77,862-865

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、抗体作製に必要な量の *s I L - 2 R* 抗原を効率よく製造する方法、該抗原を用いた抗 *s I L - 2 R* 抗体の製造方法、及び該抗体を用いた *s I L - 2 R* 免疫測定用試薬の提供に関する。

20

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、非ホジキン性リンパ腫患者由来ヒト単球細胞である *S C C - 3* 細胞が多量の *s I L - 2 R* を分泌すること、ならびに、*S C C - 3* 細胞から分泌される *s I L - 2 R* の形状がヒト血中に存在する *s I L - 2 R* と一致し、かつリコンビナント *s I L - 2 R* とは一致していないことから、該細胞が免疫原として利用する *s I L - 2 R* の生産に極めて好適であることを見出した。さらに本発明者らは、*S C C - 3* 細胞から分泌された *s I L - 2 R* を免疫原として抗体を作製することにより、*s I L - 2 R* 免疫測定のための２種類のモノクローナル抗体の組み合わせの選択肢を多く確保することができることを見出した。

30

【0011】

すなわち、本発明は、次の〔1〕～〔13〕を提供するものである。

〔1〕*S C C - 3* 細胞を培養すること；及び

該細胞の培養物から可溶性インターロイキン2レセプターを回収すること、を含む、可溶性インターロイキン2レセプターの製造方法。

〔2〕*S C C - 3* 細胞を培養して可溶性インターロイキン2レセプターを調製すること；及び

該可溶性インターロイキン2レセプターで動物を免疫すること、を含む、抗可溶性インターロイキン2レセプター抗体の製造方法。

〔3〕前記抗体がモノクローナル抗体である、〔2〕記載の方法。

40

〔4〕前記免疫した動物から採取した脾臓細胞又はリンパ節由来B細胞と骨髓腫細胞とのハイブリドーマを作製することをさらに含む、〔2〕又は〔3〕記載の方法。

〔5〕前記 *S C C - 3* 細胞をインフルエンザウイルス刺激する工程を含まない、〔2〕～〔4〕のいずれか1項記載の方法。

〔6〕*S C C - 3* 細胞を培養して可溶性インターロイキン2レセプターを調製すること；該可溶性インターロイキン2レセプターで動物を免疫すること；及び

該免疫した動物から採取した脾臓細胞又はリンパ節由来B細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合すること、

を含む、抗可溶性インターロイキン2レセプター抗体産生ハイブリドーマの製造方法。

〔7〕92212 (N I T E B P - 0 2 1 2 4) 及び92215 R (N I T E B P -

50

02125) からなる群より選択される可溶性インターロイキン2レセプター抗体産生ハイブリドーマ。

〔8〕SCC-3細胞に産生された可溶性インターロイキン2レセプターで動物を免疫することによって得られたことを特徴とする、抗可溶性インターロイキン2レセプター抗体。

〔9〕モノクローナル抗体である、〔8〕記載の抗体。

〔10〕〔2〕～〔5〕のいずれか1項記載の方法で製造された抗可溶性インターロイキン2レセプター抗体を用いることを特徴とする、ヒト可溶性インターロイキン2レセプターの免疫測定方法。

〔11〕エピトープが異なる2種類のモノクローナル抗可溶性インターロイキン2レセプター抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法である、〔10〕記載の免疫測定方法。

〔12〕前記サンドイッチ免疫測定法が、ラテックス免疫比濁法又はサンドイッチELISAである、〔11〕記載の免疫測定方法。

〔13〕〔2〕～〔5〕のいずれか1項記載の方法で製造された抗可溶性インターロイキン2レセプター抗体を含む、ヒト可溶性インターロイキン2レセプター測定用試薬。

〔14〕ラテックス免疫比濁法又はサンドイッチELISAを行うための試薬である、〔13〕記載の試薬。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、抗体作製に必要な量のsIL-2R抗原を効率よく提供することが可能になる。したがって、本発明によれば、より効率よい抗sIL-2R抗体作製が可能になるため、sIL-2R免疫測定に好適な2種類のモノクローナル抗sIL-2R抗体の組み合わせの選択肢をより多く提供することができる。さらに本発明によれば、抗sIL-2R抗体の特異性評価のための基質又はsIL-2R定量解析のための標準品として使用することができるsIL-2Rを大量に提供することができる。したがって、本発明は、効率のよいsIL-2R免疫測定用試薬の開発を可能にする。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】SCC-3細胞由来sIL-2RとリコンビナントsIL-2Rの電気泳動解析結果。A：SCC-3細胞由来sIL-2R、B-C：市販リコンビナントsIL-2R。

【図2】SCC-3細胞株由来sIL-2RとリコンビナントsIL-2Rのゲル濾過クロマトグラフィー解析結果。

【図3】本発明の抗体を用いたLTI法によるヒト血清検体中sIL-2R濃度の測定結果と市販キットを用いた測定結果の相関。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、SCC-3細胞からsIL-2Rを製造する方法、及び、当該方法で得られたsIL-2Rを免疫原として抗sIL-2R抗体を製造する方法を提供する。

【0015】

本発明のsIL-2Rの製造方法は、SCC-3細胞を培養すること、及び該細胞の培養物から可溶性インターロイキン2レセプターを回収することを含む。したがって、本発明のsIL-2Rの製造方法は、より詳細にはヒトsIL-2Rの製造方法である。上記本発明の方法に用いられるSCC-3細胞は、独立行政法人医薬基盤研究所JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) 細胞バンクから入手することができる (細胞番号JCRB0115; http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/en/search_res_det.cgi?ID=285参照)。

【0016】

上記本発明の方法において、SCC-3細胞の培養は、当該分野で一般的な方法に従って行うことができる。ヒト末梢血液単核細胞(PBMC)の場合と異なり、本発明の方法

10

20

30

40

50

においては、培養前又は培養中の細胞に対してインフルエンザウイルス、コンカナバリン A (ConA)、フィトヘムアグルチニン (PHA) 等による sIL-2R を分泌させるための刺激を与える必要はない。培養のための培地としては、上記 JCRB 細胞バンクで推奨されている 10% FBS 含有 RPMI-1640 培地が好ましい。あるいは、培養上清に分泌された sIL-2R を精製する際に培地中に添加した FBS の影響を無くす目的で、FBS 不含 RPMI-1640 培地を用いることも可能である。培養条件としては、37℃、5% CO₂ 下で 1~7 日間が好ましい。上記手順で培養した SCC-3 細胞の培養物中には、該細胞から分泌された sIL-2R が含有されている。したがって、該培養物、例えば、細胞を除いた培養液又は培養上清から sIL-2R を回収することができる。あるいは、該培養物から分離した細胞の溶解液から sIL-2R を回収することも可能である。さらに、上記培養液又は培養上清と上記細胞溶解液との両方から sIL-2R を回収してもよい。上記培養液又は培養上清から回収する方法が、簡便かつ効率的であるため好ましい。

10

【0017】

回収した sIL-2R は、そのまま免疫原として用いてもよいが、好ましくは精製される。精製は、当該分野で通常使用される蛋白質精製手段に従って行えばよい。精製手段の例としては、これらに限定されないが、限外濾過、電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティー精製などが挙げられ、このうちアフィニティー精製が好ましい。

20

【0018】

上記本発明の sIL-2R の製造方法は、sIL-2R の生産性が高く、インフルエンザウイルス刺激したヒト PBMC に生産させる従来の方法 (例えば特許文献 1) と比べて多量の sIL-2R を確保できる。したがって、本発明の sIL-2R の製造方法は、抗 sIL-2R 抗体作製の免疫原として使用する sIL-2R を提供するための非常に優れた手段であり、また、sIL-2R の定量解析用の標準品の提供手段としても非常に有用である。

【0019】

本発明の抗 sIL-2R 抗体の製造方法においては、上記の手順で SCC-3 細胞から得られた sIL-2R が免疫原として用いられる。当該方法においては、上記手順で調製された sIL-2R を免疫原として動物を免疫する。好ましくは、当該方法においては、上記手順で SCC-3 細胞の培養物から回収し、精製された精製 sIL-2R を免疫原として動物を免疫する。あるいは、当該方法においては、該 SCC-3 細胞培養物から回収された未精製 sIL-2R を免疫原として動物を免疫してもよい。またあるいは、当該方法においては、該 SCC-3 細胞培養物、その培養液若しくは培養上清、又は該培養物から分離された細胞自体を免疫原として動物を免疫してもよい。

30

【0020】

本発明の抗 sIL-2R 抗体の製造方法は、ポリクローナル抗体の製造にもモノクローナル抗体の製造にも適用可能である。当該ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はいずれも、上記免疫原で免疫した動物から、当該分野で周知の方法に従って製造することができる。

40

【0021】

例えば、ポリクローナル抗体は、上記免疫原で動物を免疫し、次いで該動物から抗血清を採取することにより製造される。必要に応じて、さらに該抗血清からポリクローナル抗体を精製してもよい。免疫する動物としては、限定されないが、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリなどが挙げられる。

【0022】

モノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体作製方法、例えば、長宗香明、寺田弘共著、「単クローン抗体」廣川書店 (1990年) や、James W. Golding, "Monoclonal Antibody", 3rd edition, Academic Press, (1996年) に記載された方法に従って製造することができる。よ

50

り詳細には、モノクローナル抗体は、上記免疫原で動物を免疫し、次いで該動物から採取した抗体産生細胞から目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製することにより製造される。免疫する動物としては、限定ではないが、マウス、ラットなどが挙げられる。

【0023】

ポリクローナル抗体を製造する場合及びモノクローナル抗体を製造する場合のいずれにおいても、上記動物の免疫は、当該分野で一般的な手法に従って行うことができる。該免疫のための免疫原には、上述したSCC-3細胞培養物、その培養液若しくは培養上清、該培養物から分離された細胞、該培養物から回収された未精製sIL-2R、精製sIL-2R、又はそれらのいずれか2種以上の混合物をそのまま用いてもよく、あるいはそれらを通常の緩衝液若しくは生理食塩水に懸濁させた液体の形態で用いてもよい。好ましくは、該免疫原は、免疫賦活効果を有する補液との混合物の形態であり得る。該免疫賦活効果を有する補液としては、完全若しくは不完全フロイントアジュバンドなどが挙げられる。該免疫原は、該動物の皮下、皮内、腹腔などに一回又は複数回投与されることが好ましい。該免疫原の投与量は、投与経路、動物種などに応じて適宜決定されるが、好ましい投与量は1回当たり10 μ g~1mg程度である。

10

【0024】

モノクローナル抗体製造において、ハイブリドーマ作製に用いられる上記免疫された動物から採取した抗体産生細胞としては、最終免疫の3~4日後に該動物から摘出された脾臓細胞又はリンパ節由来B細胞が好適である。また、該抗体産生細胞と細胞融合させる骨髓腫細胞(以下、「ミエローマ細胞」という)としては、既に確立されている公知の各種ミエローマ細胞株が好ましく、例えば、マウスにおけるNS1(例えば、P3/NSI/I-Ag4-1)[Eur. J. Immunol. 6:511-519(1976)]、SP2/O(例えば、SP2/O-Ag14)[Nature 276:269(1978)]、P3-X63-Ag8.653[J. Immunol. 123:1548(1979)]、P3-X63-Ag8U.1[Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81:1(1978)]等、及びラットにおけるY3-Ag1.2.3.[Nature 277:131-133(1979)]、YB2/O(例えば、YB2/3HL/P2.G11.16Ag.20)[Methods Enzymol. 73B:1(1981)]等が挙げられる。

20

30

【0025】

ハイブリドーマ作製における上記抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合には、通常用いられる方法、例えばポリエチレングリコール(PEG)法、センダイウイルス(HVJ)法などを使用することができる。細胞融合の手順は、通常の方法と同様である。例えば、PEG法の場合、上記ミエローマ細胞と、該ミエローマ細胞に対して約1~10倍(細胞数)の上記抗体産生細胞との混合ペレットに、平均分子量1000~6000のPEGを30~60%の濃度で滴下し、混合する。目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択には、通常の方法、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン(以下、「HAT」という)を含む培地を使用する。HAT培地で培養して得られたハイブリドーマを用いて、通常の方法により、目的抗体の産生株の検索及び単一クローン化を行えばよい。目的抗体の産生株は、例えば酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、RIAなどにより、nativeなsIL-2Rに反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択することにより得られる。本発明により提供されるsIL-2R産生ハイブリドーマの例としては、92212(NITE BP-02124)及び92215R(NITE BP-02125)が挙げられる。

40

【0026】

上記通常の手順で作製した目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを培養し、次いで培養上清中の抗体を回収することで、目的のモノクローナル抗sIL-2R抗体を製造することができる。あるいは、該培養したハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与し、モノクローナル抗sIL-2R抗体を含む腹水を回収してもよい。

50

【0027】

本発明の抗sIL-2R抗体の製造方法において、上記手順で得られたモノクローナル又はポリクローナル抗sIL-2R抗体は、必要に応じてさらに単離又は精製されてもよい。抗体を単離又は精製する手段としては、従来公知の方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAカラム等によるアフィニティー精製などが挙げられる。

【0028】

好ましくは、上記本発明の方法によって得られた抗sIL-2R抗体は、sIL-2Rに対する特異性を評価される。該特異性評価には、抗体特異性を調べる一般的方法、例えば免疫染色（ウエスタンブロット法）、ELISA、フローサイトメトリーなどを用いることができる。

10

【0029】

上記本発明の方法によって得られた抗sIL-2R抗体は、sIL-2Rの免疫測定のための抗体として好適に使用される。したがって、本発明はまた、上記本発明の方法によって得られた抗sIL-2R抗体を用いることを特徴とするsIL-2R免疫測定方法、及びそのための試薬を提供する。好ましくは、当該本発明の試薬は、ヒトsIL-2Rの免疫測定のための試薬であり、より詳細にはヒト血中sIL-2Rの免疫測定のための試薬である。また好ましくは、当該試薬は、免疫染色（ウエスタンブロット法）、ELISA、免疫比濁法（TIA）、ラテックス免疫比濁法（LTIA）、エンザイムイムノアッセイ（EIA）、化学発光イムノアッセイ（CLIA）、蛍光イムノアッセイ（FIA）などに基づくsIL-2Rの免疫測定を行うための試薬である。好ましくは、当該試薬は、サンドイッチ免疫測定法に基づくsIL-2R測定のための試薬である。例えば、当該試薬は、本発明の方法で得られた抗sIL-2R抗体とsIL-2Rに親和性を有する物質とを用いたサンドイッチELISAに基づく免疫測定用試薬である。また例えば、当該試薬は、本発明の方法で得られた、エピトープが異なる2種類のモノクローナル抗sIL-2R抗体を用いたLTIA又はサンドイッチELISAに基づく免疫測定用試薬である。

20

【0030】

LTIA又はサンドイッチELISAに好適な、エピトープが異なる2種類のモノクローナル抗sIL-2R抗体は、本発明の方法で得られた2種類のモノクローナル抗sIL-2R抗体をそれぞれ固相抗体及び検出抗体として用いたサンドイッチELISA測定系を構築し、当該系でのsIL-2Rの検出感度を評価することによって選択することができる。

30

【0031】

本発明で提供されるsIL-2R免疫測定用試薬は、本発明の方法で得られた抗sIL-2R抗体、好ましくは、本発明の方法で得られた、エピトープが異なる2種類のモノクローナル抗sIL-2R抗体を含有する。必要に応じて、当該試薬はさらに、該抗sIL-2R抗体を結合するための固相担体、該抗sIL-2R抗体を検出するための標識又は標識化抗体、各種緩衝液などを含有していてもよい。また必要に応じて、該抗sIL-2R抗体は、固相担体に結合されていてもよい。

40

【0032】

上記本発明のsIL-2Rの製造方法によって得られたsIL-2Rは、sIL-2Rの定量解析用の標準品としても用いることができる。該定量解析の方法としては、上述した抗sIL-2R抗体を用いた免疫染色、ELISA、TIA、LTIA、EIA、CLIA、FIA、サンドイッチ免疫測定法などの免疫測定法に基づく定量解析が挙げられるが、これらに限定されない。より詳細には、本発明のsIL-2Rの製造方法によって得られたsIL-2Rから調製された既知濃度のsIL-2R標準品の測定値を基準に、試験試料からの測定値を校正することで、試験試料中のsIL-2R濃度を定量する。

【実施例1】

【0033】

50

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0034】

比較例1 リコンビナント s I L - 2 R を免疫原としたモノクローナル抗体の作製

(1) 動物への免疫

Recombinant Human s I L - 2 Receptor (Pepr o t e c h社製; Code: 200-02R) を10mMリン酸緩衝液(pH7.2; 以下、PBSという)に溶解し、フロインド完全アジュバンドを等量混合してエマルジョン調製した。該エマルジョンを、メスのBALB/cマウス及びF344/Jc1ラットの皮下に1匹あたり50 μ g/回の量で1週間ごとに5回注射した。その後、該マウス及びラットの尾静脈より採血して得た抗血清中の抗体価を、後述する抗原固相化ELISA法にて測定した。

10

【0035】

(2) 血清抗体価の測定

上記(1)で免疫抗原として用いたRecombinant Human s I L - 2 Receptor を0.5 μ g/mLになるようPBSに溶解した。該溶液50 μ Lを96穴マイクロプレートの各ウェルに分注して、室温で1時間静置した。次いで、各ウェルを0.05% Tween (登録商標) 20を含むPBS(以下、PBSTという)300 μ Lで3回洗浄した後、1%牛血清アルブミンを含むPBST(以下、BSA-PBSTという)200 μ Lを加え、室温で1時間ブロッキングを行った。さらに各ウェルをPBSTで3回洗浄した後、BSA-PBSTで数百倍から数万倍に希釈したマウス抗血清50 μ Lを添加し、室温で1時間静置し、次いでPBSTで3回洗浄した。その後、マウス抗血清サンプルに対しては、7500倍希釈したAnti mouse I g G (H+L) Goat I g G HRP (Southern Biotech社製)50 μ Lを上記各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。ラット抗血清サンプルに対しては、Recombinant Human s I L - 2 Receptor をウサギに免疫して作製したポリクローナル抗体(自家作製)をビオチン標識し、BSA-PBSTで希釈した希釈液(I g G含量として2.0 μ g/mL)を調製した。該希釈液50 μ Lを上記各ウェルに分注し、室温で1時間静置させ、PBSTで3回洗浄した後、HRP標識ストレプトアビジン(PIERCE社製)のBSA-PBST溶液(0.2 μ g/mL)50 μ Lを添加し、室温で30分間静置した。

20

30

【0036】

次いで、各ウェルをPBSTで3回洗浄した後、0.2%オルトフェニレンジアミン(OPD)及び0.02%過酸化水素を含むクエン酸緩衝液(pH5.0)50 μ Lを加え、室温で10分間放置後、7.7%の硫酸50 μ Lを加えて酵素反応を停止させ、波長492nmにおける吸光度を測定し、抗体価を評価した。抗体価が十分に上昇していた抗血清を産生したマウス及びラットから脾臓又はリンパ節を摘出して脾臓細胞又はリンパ節由来細胞を調製し、ハイブリドーマ作製に用いた。

【0037】

(3) ハイブリドーマ作製

上記(2)で調製された脾臓細胞又はリンパ節由来細胞のいずれかとミエローマ細胞とを細胞数で6対1の比で混合し、ポリエチレングリコールを用いた常法により細胞融合を行った。ミエローマ細胞はSP2/Oを用いた。得られた融合細胞は、脾臓細胞として2.5 $\times 10^6$ cells/mLになるようにヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン(HAT)、ならびに15%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地に懸濁した。該懸濁液200 μ Lを96穴マイクロプレートの各ウェルに分注し、CO₂インキュベーター内で37 $^{\circ}$ C、5%CO₂にて7日間培養して、融合細胞(ハイブリドーマ)を得た。

40

【0038】

(4) 抗s I L - 2 R抗体産生ハイブリドーマの作製

(i) マウス由来のハイブリドーマの選別

50

AffiniPure Goat Anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Code: 115-005-071) を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう PBS に溶解した。該溶液 $50 \mu\text{L}$ を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注して、室温で 1 時間静置した。各ウェルを $300 \mu\text{L}$ の PBS-T で 3 回洗浄した後、 $200 \mu\text{L}$ の BSA-PBS-T を加え、室温で 1 時間ブロッキングを行った。次いで各ウェルを PBS-T で 3 回洗浄した後、2 倍希釈したマウス細胞由来ハイブリドーマの培養上清 $50 \mu\text{L}$ を添加し、室温で 1 時間静置した。免疫用抗原である Recombinant Human sIL-2 Receptor を BSA-PBS-T にて希釈し、希釈液 ($250 \text{ng}/\text{mL}$) を調製した。上記各ウェルを PBS-T で 3 回洗浄した後、該抗原希釈液 $50 \mu\text{L}$ を添加し、室温で 1 時間静置し、PBS-T で 3 回洗浄した。Recombinant Human sIL-2 Receptor をウサギに免疫して作製した抗 sIL-2 R ウサギポリクローナル抗体を精製し、ビオチン標識して標識ポリクローナル抗体を調製し、BSA-PBS-T にて希釈した ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$)。該抗体希釈液 $50 \mu\text{L}$ を上記各ウェルに添加し、室温で 1 時間静置し、次いで PBS-T で 3 回洗浄した後、HRP 標識ストレプトアビジン (PIERCE 社製) の BSA-PBS-T 溶液 ($0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$) $50 \mu\text{L}$ を添加し、室温で 30 分間静置した。各ウェルを PBS-T で 3 回洗浄した後、 $0.3 \text{mg}/\text{mL}$ のテトラメチルベンジジン (TMB) 及び 0.02% 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 ($\text{pH} 3.7$) $50 \mu\text{L}$ を加え、室温で 10 分間放置後、 7.7% の硫酸 $50 \mu\text{L}$ を加えて酵素反応を停止させ、波長 450nm における吸光度を測定し、抗 sIL-2 R 抗体産生ハイブリドーマの存在するウェル (陽性ウェル) を選別した。

【0039】

(ii) ラット由来のハイブリドーマの選別

AffiniPure Goat Anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Code: 112-005-008) を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう PBS に溶解した。該溶液 $50 \mu\text{L}$ を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注して、室温で 1 時間静置した。各ウェルを、 $300 \mu\text{L}$ の PBS-T で 3 回洗浄した後、 $200 \mu\text{L}$ の BSA-PBS-T を加え、室温で 1 時間ブロッキングを行った。次いで、各ウェルを PBS-T で 3 回洗浄した後、2 倍希釈したラット細胞由来ハイブリドーマの培養上清 $50 \mu\text{L}$ を添加し、室温で 1 時間静置した。免疫用抗原である Recombinant Human sIL-2 Receptor を BSA-PBS-T にて希釈し、希釈液 ($250 \text{ng}/\text{mL}$) を調製した。各ウェルを PBS-T で 3 回洗浄した後、該抗原希釈液 $50 \mu\text{L}$ を添加し、室温で 1 時間静置し、PBS-T で 3 回洗浄した。Biotylated Anti-human IL-2R Goat Antibody (R&D systems 社製、Code: BAF223) を BSA-PBS-T で希釈した ($250 \text{ng}/\text{mL}$)。該抗体希釈液 $50 \mu\text{L}$ を上記各ウェルに添加し、室温で 1 時間静置し、次いで PBS-T で 3 回洗浄した後、HRP 標識ストレプトアビジン (PIERCE 社製) の BSA-PBS-T 溶液 ($0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$) $50 \mu\text{L}$ を添加し、室温で 30 分間静置した。各ウェルを PBS-T で 3 回洗浄した後、 $0.3 \text{mg}/\text{mL}$ のテトラメチルベンジジン (TMB) 及び 0.02% 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 ($\text{pH} 3.7$) $50 \mu\text{L}$ を加え、室温で 10 分間放置後、 7.7% の硫酸 $50 \mu\text{L}$ を加えて酵素反応を停止させ、波長 450nm における吸光度を測定し、抗 sIL-2 R 抗体産生ハイブリドーマの存在するウェル (陽性ウェル) を選別した。

【0040】

(iii) native な sIL-2 R に反応するハイブリドーマの選別

上記 (i) 及び (ii) で選別された抗 sIL-2 R 抗体産生ハイブリドーマの中から、native な sIL-2 R に反応するハイブリドーマを選別した。選別は、上記 (i) 又は (ii) と同様の手順で行った、但し、ハイブリドーマ培養上清としては、上記陽性ウェルに含まれていたものと同じハイブリドーマの培養上清を用い、また免疫用抗原としては、Recombinant Human sIL-2 Receptor の代わり

に、コンカナバリンAで刺激したヒトPBMC (sIL-2Rを分泌する)の培養上清を用いた。

【0041】

(iv) ハイブリドーマの樹立

上記(iii)で得られた抗sIL-2R抗体産生ハイブリドーマから、限界希釈法にてハイブリドーマの単クローン化を行った。マウス由来で3種類(クローン番号; 92201、92202、92203)、及びラット由来で8種類(クローン番号; 92204R、92205R、92206R、92207R、92208R、92209R、92210R、92211R)の合計11種類のハイブリドーマが得られた。上記ハイブリドーマのうち92204Rは、出願人により、2015年9月25日に独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(〒292-0818千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に寄託されている。

10

92204R: 受領番号 NITE BP-02123

【0042】

(5) サンドイッチ免疫測定に適用可能な抗体組み合わせの評価

上記(4)で作製した11種類のハイブリドーマのそれぞれからモノクローナル抗sIL-2R抗体を精製し、以下に示す方法にてサンドイッチELISA系が成立する抗体の組み合わせを評価した。各モノクローナル抗sIL-2R抗体をPBSに溶解した(10 μ g/mL)。該溶液50 μ Lを96穴マイクロプレートの各ウェルに分注して、室温で1時間静置した。各ウェルを、300 μ LのPBSTで3回洗浄した後、200 μ LのBSA-PBSTを加え、室温で1時間ブロッキングを行った。次いで各ウェルをPBSTで3回洗浄した後、ヒトPBMC由来native sIL-2R(2000U/mL)を50 μ L添加し、室温で1時間静置した。ビオチン標識した各モノクローナル抗sIL-2R抗体をBSA-PBSTにて希釈し、希釈液(0.4 μ g/mL)を調製した。上記各ウェルをPBSTで3回洗浄した後、該抗体希釈液50 μ Lを添加し、室温で1時間静置し、PBSTで3回洗浄した後、HRP標識ストレプトアビジン(PIERCE社製)のBSA-PBST溶液(0.2 μ g/mL)50 μ Lを添加し、室温で30分間静置した。各ウェルをPBSTで3回洗浄した後、0.3mg/mLのテトラメチルベンジジン(TMB)及び0.02%過酸化水素を含むクエン酸緩衝液(pH3.7)50 μ Lを加え、室温で10分間放置後、7.7%の硫酸50 μ Lを加えて酵素反応を停止させ、波長450nmにおける吸光度を測定した。

20

30

【0043】

11種類のモノクローナル抗体の組み合わせを評価した結果を表1に示す。なお表1では、各組み合わせの波長450nmの吸光度が0.5OD未満:-、0.5OD以上:++、1.0OD以上:+++と判定した。サンドイッチELISA系が成立するレベルの吸光度変化が達成された抗体の組み合わせは、92204R-92205Rの僅か1組であった。

【0044】

【表 1】

		固相抗体										
		92201	92202	92203	92204R	92205R	92206R	92207R	92208R	92209R	92210R	92211R
ビオチン標識抗体	92201		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	92202	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	92203	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
	92204R	-	-	-		+++	-	-	-	-	-	-
	92205R	-	-	-	+++		-	-	-	-	-	-
	92206R	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
	92207R	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
	92208R	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
	92209R	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
	92210R	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	92211R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

10

【0045】

実施例 1 SCC-3 細胞株からの sIL-2R の調製

独立行政法人 医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより SCC-3 細胞株 (細胞番号 JCRB0115) を分譲し、指定の培地 (10% fetal bovine serum (FBS)、penicillin/streptomycin を含む RPMI-1640) で起眠後、十分に細胞を増殖させた。増殖した SCC-3 細胞を遠心分離により集め、FBS 不含 RPMI-1640 にて洗浄後、細胞濃度が 1×10^6 cells/mL となるように同培地で希釈し、37 にて CO₂ インキュベーターにて 7 日間培養した。その後、遠心分離により細胞を除去し、培養上清を回収した。培養上清中の sIL-2R の濃度を市販キット (セルフリー N IL-2R; 協和メデックス社製) で測定した結果、18000 U/mL と高濃度であり、免疫原や標準品の調製に十分な量の sIL-2R を容易に確保できることが分かった。

20

【0046】

比較例 2 ヒト PBMC 細胞からの sIL-2R の調製

ヒトの血液から PBMC を回収し、コンカナバリン A で刺激して sIL-2R を分泌させた。分泌された sIL-2R を回収し、実施例 1 と同様の手順で濃度を測定した。回収された sIL-2R の濃度は、実施例 1 と同じ手順 (セルフリー N IL-2R; 協和メデックス社製) で測定した結果、ヒト血液 1 mL 当たり 4000 U であった。

30

【0047】

実施例 2 SCC-3 細胞由来 sIL-2R のアフィニティー精製

自家調製した抗 sIL-2R ウサギポリクローナル抗体の精製 IgG を、CNBr-activated sepharose 4FF (GE Healthcare 社) に結合させ、抗体結合樹脂をカラムに詰めた。該カラムに、実施例 1 で得られた SCC-3 細胞培養物から回収した培養上清を通し、十分な量の PBS で洗浄し、溶出バッファ (150 mM NaCl を含む 0.1 M Citrate-Na、pH 3.0) で sIL-2R を含むフラクションを溶出させた。該 sIL-2R を含むフラクションを限外濾過フィルターによって濃縮後、PBS にて透析し、精製 sIL-2R を得た。実施例 1 と同じ手順 (セルフリー N IL-2R; 協和メデックス社製) で精製物を定量した結果、培養上清 6 L から 250000 kU の精製 sIL-2R が得られたことが分かった。

40

【0048】

実施例 3 SCC-3 細胞由来 sIL-2R を免疫原としたモノクローナル抗体の作製

(1) 抗 sIL-2R 抗体産生ハイブリドーマの作製

実施例 2 で精製した SCC-3 細胞由来 sIL-2R を PBS で希釈し、フロインド完全アジュバンドを等量混合してエマルジョンを調製した。該エマルジョンを、メスの BALB/c マウス、C57BL/6 Jc1 マウス及び F344/Jc1 ラットの皮下に 1 匹あたり 5 μg (sIL-2R 約 1000 kU 相当) / 回の量で 1 週間ごとに 5 回注射

50

した。各マウス又はラットから得られた抗血清から、比較例1(1)~(4)と同様の手順でハイブリドーマを作製した。BALB/cマウス由来で1種類(クローン番号; 92212)、C57BL/6JJc1マウス由来で1種類(クローン番号; 92218)、及びF344/Jc1ラット由来で6種類(クローン番号; 92213R、92214R、92215R、92216R、92217R、92219R)の合計8種類のハイブリドーマが得られた。上記ハイブリドーマのうち92212と92215Rは、出願人により、2015年9月25日に独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(〒292-0818千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に寄託されている。

92212: 受領番号 NITE BP-02124

92215R: 受領番号 NITE BP-02125

10

【0049】

(2) サンドイッチ免疫測定に適用可能な抗体組み合わせの評価 - 1

上記(1)で作製した8種類のハイブリドーマのそれぞれからモノクローナル抗sIL-2R抗体を精製し、比較例1(5)と同様の方法でサンドイッチELISA系が成立する抗体の組み合わせを評価した。8種類のモノクローナル抗体の組み合わせを評価した結果を表2に示す。33組の抗体の組み合わせでサンドイッチELISA系が成立するレベルの吸光度変化が達成された。

【0050】

【表2】

20

		固相抗体							
		92212	92213R	92214R	92215R	92216R	92217R	92218	92219R
ビオチン標識抗体	92212		+++	+++	-	+++	-	-	-
	92213R	+++		-	+++	-	+++	++	+++
	92214R	+++	-		+++	-	+++	-	+++
	92215R	-	+++	+++		+++	-	-	+++
	92216R	+++	-	-	+++		+++	++	+++
	92217R	++	+++	+++	++	+++		-	+++
	92218	-	+++	+++	-	+++	-		-
	92219R	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	

30

【0051】

(3) サンドイッチ免疫測定に適用可能な抗体組み合わせの評価 - 2

比較例1で作製した11種類の抗体と実施例3で作製した8種類の抗体を合わせた合計19種類のモノクローナル抗sIL-2R抗体の間で、比較例1(5)と同様の方法にてサンドイッチELISA系が成立する抗体の組み合わせを評価した。結果を表3に示す。122組の抗体の組み合わせでサンドイッチELISA系が成立するレベルの吸光度変化が生じたが、そのほとんどは、少なくとも一方がSCC-3細胞由来sIL-2Rを免疫原としたモノクローナル抗体である抗体の組み合わせであった。さらにSCC-3細胞由来sIL-2Rを免疫原としたモノクローナル抗体同士の場合、大きな吸光度変化が生じる割合はより高くなった。以上の結果から、SCC-3細胞株由来sIL-2Rを免疫原として作製したモノクローナル抗sIL-2R抗体は、サンドイッチ免疫測定用の抗体として好適であることが示された。

40

【0052】

【表 3】

		固相抗体																		
		92201	92202	92203	92204R	92205R	92206R	92207R	92208R	92209R	92210R	92211R	92212	92213R	92214R	92215R	92216R	92217R	92218	92219R
92201	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92204R	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92205R	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92206R	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92207R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92208R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92209R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92210R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92211R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92212	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92213R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92214R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92215R	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92216R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92217R	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92218	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++
92219R	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	+++

10

20

30

40

実施例4 SCC-3細胞由来sIL-2RとリコンビナントsIL-2Rの構造比較

実施例3の抗体組み合わせ評価の結果より、リコンビナントsIL-2R蛋白質とSCC-3細胞由来sIL-2R蛋白質との間に構造的な違いが存在することが示唆されたことから、両蛋白質を解析して構造を比較した。

【0054】

実施例2で調製したSCC-3細胞株由来精製sIL-2R(サンプルA)、比較例1で用いたpeprotech社製リコンビナントsIL-2R[Code:200-02R](サンプルB)、及びR&D systems社製リコンビナントsIL-2R(サンプルC)を、SDS含有非還元条件下で煮沸処理した。各処理液をSDS-PAGE(4-20%)の各レーンに、1レーン当たり約10ngアプライして電気泳動した。泳動終了後、ゲルよりタンパク質をPVDF膜へ転写し、Biotylated Anti-human IL-2R Goat Antibody(R&D systems社製)を室温で1時間反応させ、次にHRP標識ストレプトアビジン(PIERCE社製)を室温で30分間反応させた後、3,3'-ジアミノベンジジン及び過酸化水素にてIL-2R蛋白質を検出した。その結果、SCC-3細胞由来sIL-2R(A)とR/D systems社製リコンビナントsIL-2R(C)の分子量は30kDa付近と一致していたが、Peprrotech社製リコンビナントsIL-2R(B)の分子量は、40kDa付近と若干大きいことが確認された(図1)。

10

【0055】

さらに、SCC-3細胞由来sIL-2R、リコンビナントsIL-2R(rIL-2R; Peprrotech社製及びR/D systems社製)、ヒトPBMC由来sIL-2R、及びsIL-2R高濃度ヒト血清をゲル濾過クロマトグラフィー解析した。各サンプル2000U分をゲル濾過クロマトグラフィー分離にかけ(カラム: HiLoad 16/60 Superdex 200 [GEヘルスケア]、溶離液: PBS、流速: 1mL/分)、溶出フラクションを2mLずつ分取し、各フラクション中のsIL-2Rの存在をサンドイッチELISAで検出した。結果、SCC-3細胞由来sIL-2Rの溶出位置はヒト血清中sIL-2R及びヒトPBMC由来sIL-2Rと一致していた一方、2種類のリコンビナントsIL-2Rはいずれも溶出がより遅くなった(図2)。したがって、SCC-3細胞由来sIL-2RはnativeなヒトsIL-2Rと同等の構造を有していると推定される一方で、リコンビナントsIL-2Rは、非変性状態でnativeなヒトsIL-2Rと分子量に違いがあることが判明した。

20

30

【0056】

以上の解析結果から、リコンビナントsIL-2R蛋白質は、ヒト血清中に存在しているsIL-2R蛋白質と構造が異なることが判明した。この構造上の違いがリコンビナントは蛋白質の抗原特異性を限定し、これが原因でサンドイッチ免疫測定に不向きな抗体しか作製できなかったという可能性が推察される。これに対し、SCC-3細胞由来sIL-2Rは、ヒト血清中に存在するsIL-2Rと同等の構造を有しており、抗ヒトsIL-2R抗体作製のための免疫原としてより有効であると考えられる。

【0057】

実施例5 L T I A法によるsIL-2Rの定量

40

実施例3(3)で調べた抗体を用いた抗体の組み合わせについて、ラテックス免疫比濁法(L T I A)用抗体としての適性を調べた。なお、以下の実施例において、特に言及しない限り、%濃度は(w/v)%を意味する。

【0058】

(1)抗体担持ラテックス粒子の調製

(a.材料)

抗sIL-2Rモノクローナル抗体(92204R抗体)液: 0.5Abs/mL(280nm)、感作液: 20mM MOPS-NaOH(pH7.0)

抗sIL-2Rモノクローナル抗体(92212抗体)液: 0.5Abs/mL(280nm)、感作液: 10mM Glycine-NaOH(pH9.0)

50

ラテックス粒子：平均粒子径 $0.307 \mu\text{m}$ 及び $0.216 \mu\text{m}$

(b. 方法)

上記 92204 R 抗体液と感作液で希釈した 1% ラテックス粒子液 (平均粒子径 $0.307 \mu\text{m}$) とを等容量混合して、4 で 2 時間攪拌後、混合液と等容量の 1% BSA を添加して 4 にて 1 時間ブロッキングした。これを MOPS 緩衝液 (pH 7.0) で透析して得られた液を、抗体担持ラテックス粒子溶液とした。

同様に、上記 92212 抗体液と感作液で希釈した 1% ラテックス粒子液 (平均粒子径 $0.216 \mu\text{m}$) を用い、上記と同様の方法で抗体担持ラテックス粒子溶液を得た。

【0059】

(2) L T I A 法第 1 試薬の調製

400 mM の塩化ナトリウム、0.1% BSA、0.05% ProClin 300 を含む 30 mM Citrate - NaOH 緩衝液 (pH 6.0) を調製し、第 1 試薬とした。

【0060】

(3) L T I A 法第 2 試薬の調製

上記 92212 抗体担持ラテックス粒子溶液と上記 92204 R 抗体担持ラテックス粒子溶液とをラテックス粒子の含量比で 1 : 1 になるよう混合し、5 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) で最終吸光度 3.0 OD (600 nm) に希釈して、第 2 試薬とした。

【0061】

(4) L T I A 測定

市販キット (セルフリー N I L - 2 R ; 協和メデックス社製) により予め s I L - 2 R の濃度を測定したヒト血清検体 (n = 43) を準備した。これらの検体の s I L - 2 R の濃度を、上記第 1 試薬と第 2 試薬とを用いた L T I A 法により測定した。測定には、日立 7170 形自動分析装置を用いた。具体的には、ヒト血清検体 $4 \mu\text{L}$ に、上記第 1 試薬 $100 \mu\text{L}$ を加えて 37 で 5 分間加温後、上記第 2 試薬 $100 \mu\text{L}$ を加えて攪拌した。その後 5 分間の凝集形成に伴う吸光度変化 (測光ポイント : 19 - 34) を、主波長 570 nm、副波長 800 nm にて吸光度測定した。

【0062】

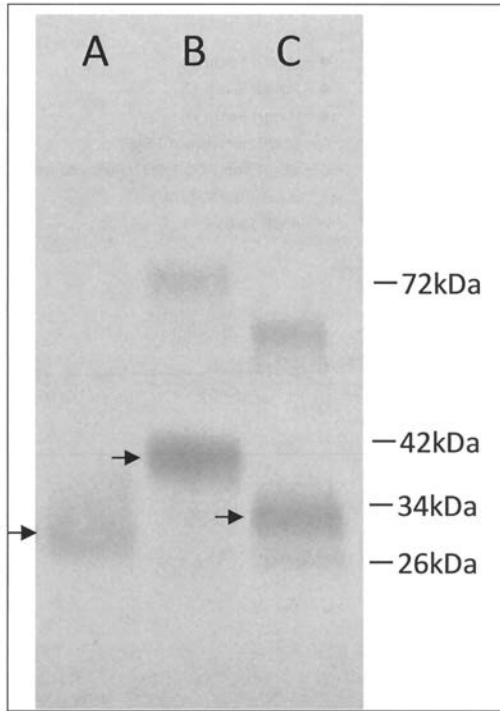
L T I A 法による測定結果は、市販キットによる測定結果と高い相関性 ($r = 0.922$) を示した (図 3)。したがって、SCC - 3 細胞由来 s I L - 2 R を免疫原として作製した抗体は、サンドイッチ免疫測定用抗体として好適であり、L T I A 法への応用も可能であることが確認された。以上のとおり、本発明により提供される SCC - 3 細胞由来 s I L - 2 R、及びこれを免疫原とする抗体の製造方法は、ヒト s I L - 2 R 免疫測定用試薬の構築に貢献する。

10

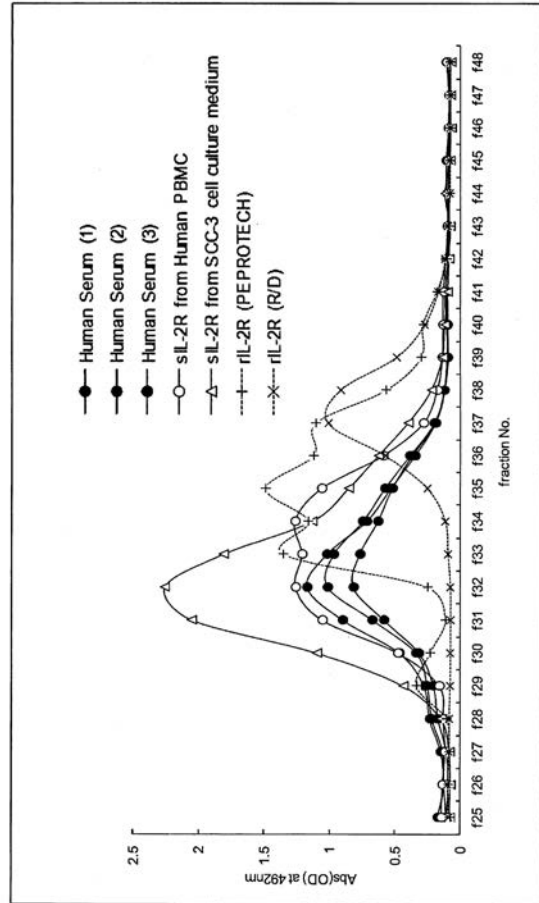
20

30

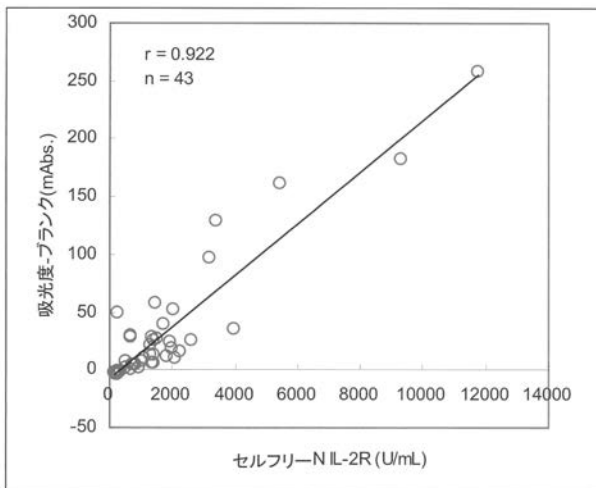
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/078901

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12P21/00(2006.01)i, C07K14/715(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N5/12(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i		
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) C12P21/00, C07K14/715, C07K16/28, C12N5/12, C12N15/02, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/543, G01N33/577		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	JACQUES Y., ET AL, A soluble interleukin 2 receptor produced by a normal alloreactive human T cell clone binds interleukin 2 with low affinity., J. Immunol., 1987, Vol.139, No.7, 2308-2316, ABSTRACT, MATERIALS AND METHODS	7-9/10-14/ 1-6
Y/A	JP 62-70761 A (The United States of America), 01 April 1987 (01.04.1987), claims & US 4707443 A claims & EP 202975 A2	10-14/1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 05 December 2016 (05.12.16)	Date of mailing of the international search report 13 December 2016 (13.12.16)	
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/078901

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIMURA Y., ET AL, Establishment and characterization of a monocytic cell line which expresses the interleukin-2 receptor., Jpn. J. Cancer Res., 1986, Vol.77, No.9, 862-865, Abstract	1-14
A	YANG Z.Z., ET AL, Soluble IL-2R α facilitates IL-2-mediated immune responses and predicts reduced survival in follicular B-cell non-Hodgkin lymphoma., Blood, 2011, Vol.118, No.10, p.2809-2820, page 2812, right column, 2nd paragraph to page 2814, 2nd paragraph, Table 1	1-14

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 7 8 9 0 1

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P21/00(2006.01)i, C07K14/715(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N5/12(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P21/00, C07K14/715, C07K16/28, C12N5/12, C12N15/02, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/543, G01N33/577		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y/A	JACQUES Y., ET AL, A soluble interleukin 2 receptor produced by a normal alloreactive human T cell clone binds interleukin 2 with low affinity., J. Immunol., 1987, Vol.139, No. 7, 2308-2316, ABSTRACT 及び MATERIALS AND METHODS	7-9/10-14/1-6
Y/A	JP 62-70761 A (アメリカ合衆国) 1987.04.01, 特許請求の範囲 & US 4707443 A, 特許請求の範囲 & EP 202975 A2	10-14/1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 05.12.2016	国際調査報告の発送日 13.12.2016	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 柴原 直司 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 3 5 3 4

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2016/078901
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	KIMURA Y., ET AL, Establishment and characterization of a monocytic cell line which expresses the interleukin-2 receptor., Jpn. J. Cancer Res., 1986, Vol.77, No.9, 862-865, Abstract	1-14
A	YANG Z.Z., ET AL, Soluble IL-2R α facilitates IL-2-mediated immune responses and predicts reduced survival in follicular B-cell non-Hodgkin lymphoma., Blood, 2011, Vol.118, No.10, p.2809-2820, 第2812頁右欄第2段落-第2814頁第2段落、Table 1	1-14

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 P
G 0 1 N	33/577	(2006.01)	G 0 1 N	33/577 B
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	G 0 1 N	33/543 5 8 7
			G 0 1 N	33/543 5 4 5 A

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

Fターム(参考) 4B065 AA87X AA87Y AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 AB02 AC14 BA08
CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 DA76 EA50 FA74

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	免疫测定用抗体及其制备方法		
公开(公告)号	JPWO2017057622A1	公开(公告)日	2018-07-12
申请号	JP2017543587	申请日	2016-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	海老沼宏幸 藤村建午		
发明人	海老沼 宏幸 藤村 建午		
IPC分类号	C12P21/00 C12P21/08 C07K14/705 C07K16/28 C12N15/02 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/543		
CPC分类号	C07K16/2839 C07K14/715 C07K14/7155 C07K16/06 C07K16/065 C07K16/2866 C07K2317/73 C12N5/12 C12N15/02 C12P21/00 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/6869		
FI分类号	C12P21/00.Z C12P21/08 C07K14/705 C07K16/28 C12N15/02.Z C12N5/10 G01N33/53.P G01N33/577.B G01N33/543.587 G01N33/543.545.A		
F-TERM分类号	4B064/AG20 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA87X 4B065/AA87Y 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2015191707 2015-09-29 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供有效地产生抗体产生所需的一定量的sIL-2R抗原的方法，以及使用该抗原产生抗sIL-2R抗体的方法。一种产生可溶性白介素2受体的方法，该方法包括培养SCC-3细胞并从细胞培养物中回收可溶性白介素2受体。一种制备抗可溶性白介素2受体抗体的方法，该方法包括用通过该方法产生的sIL-2R免疫动物。

(19) 日本国特許庁 (JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号 WO2017/057622
発行日 平成30年7月12日 (2018. 7. 12)	(43) 国際公開日 平成29年4月6日 (2017. 4. 6)	
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12P 21/00 (2006.01)	C12P 21/00	4B064
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B065
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4H045
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/02	Z
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く	
出願番号 特願2017-543587 (P2017-543587)	(71) 出願人 390037327	
(2) 国際出願番号 PCT/JP2016/078901	积水メディカル株式会社	
(2) 国際出願日 平成28年9月29日 (2016. 9. 29)	東京都中央区日本橋二丁目1番3号	
(31) 優先権主張番号 特願2015-191707 (P2015-191707)	110000084	
(32) 優先日 平成27年9月29日 (2015. 9. 29)	特許業務法人アルガ特許事務所	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 海老沼 宏幸	
	東京都中央区日本橋二丁目1番3号 积水	
	メディカル株式会社内	
	(72) 発明者 藤村 建午	
	東京都中央区日本橋二丁目1番3号 积水	
	メディカル株式会社内	
	Fターム (参考) 4B064 AG20 AG26 AG27 CA10 CA19	
	CA20 CC24 DA13	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 免疫測定用抗体とその作製方法		