

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 272458

(P2002 - 272458A)

(43)公開日 平成14年9月24日(2002.9.24)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/02	ZNA	C 0 7 K 16/18	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/18		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		33/577	B 4 B 0 6 5
G 0 1 N 33/53		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
33/577		C 1 2 N 15/00	ZNA C

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 13数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 301898(P2001 - 301898)

(22)出願日 平成13年9月28日(2001.9.28)

(31)優先権主張番号 特願2000 - 299300(P2000 - 299300)

(32)優先日 平成12年9月29日(2000.9.29)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000001926

塩野義製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号

(72)発明者 浅田 英久

大阪府摂津市三島2丁目5番1号 塩野義製薬

株式会社内

(72)発明者 辻 哲男

大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野義製

薬株式会社内

(74)代理人 100108970

弁理士 山内 秀晃 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 イヌBNPに対する特異抗体を用いたサンドイッチ測定方法

(57)【要約】

【課題】 イヌBNPの免疫測定方法を提供する。

【解決手段】 イヌBNPを認識し、互いにイヌBNPへの結合を阻害しない2種類の単一特異的な抗体を組み合わせたイヌBNPのサンドイッチ免疫測定方法を見出した。配列番号1記載のアミノ酸配列のうち、135位のAsnから140位のTyrを認識するモノクローナル抗体および118位のCysから134位のCysを認識するモノクローナル抗体を組み合わせたイヌBNPのサンドイッチ免疫測定方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1記載のアミノ酸配列のうち、109位のSerから140位のTyrからなるイヌBNPを認識する、イヌBNPのサンドイッチ免疫測定に使用可能な単一特異的な抗体。

【請求項2】 配列番号1記載のアミノ酸配列のうち、(a)109位のSerから117位のGly；(b)118位のCysから134位のCys；または(c)135位のAsnから140位のTyr；

のいずれか1つの部位を認識する請求項1記載の抗体。 10

【請求項3】 配列番号1記載のアミノ酸配列のうち、135位のAsnから140位のTyrを認識する請求項1記載の抗体。

【請求項4】 モノクローナル抗体である請求項3記載の抗体。

【請求項5】 マウスハイブリドーマdBC107(FERM P-18005)により産生される請求項4記載の抗体。

【請求項6】 配列番号1記載のアミノ酸配列のうち、118位のCysから134位のCysを認識する請求項1記載の抗体。 20

【請求項7】 モノクローナル抗体である請求項6記載の抗体。

【請求項8】 マウスハイブリドーマdBR103(FERM P-18004)により産生される請求項7に記載の抗体。

【請求項9】 イヌBNPに対するモノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマdBC107(FERM P-18005)。

【請求項10】 イヌBNPに対するモノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマdBR103(FERM P-18004)。 30

【請求項11】 請求項1および2記載の抗体から選ばれる、互いにイヌBNPに対する結合を阻害しない2種類の単一特異的な抗体を組合わせたサンドイッチ免疫測定方法。

【請求項12】 118位のCysから134位のCysを認識する単一特異的な抗体および135位のAsnから140位のTyrを認識する単一特異的な抗体を組合わせた請求項11記載の免疫測定方法。 40

【請求項13】 118位のCysから134位のCysを認識するモノクローナル抗体および135位のAsnから140位のTyrを認識するモノクローナル抗体を組合わせた請求項11記載の測定方法。

【請求項14】 ハイブリドーマdBC107(FERM P-18005)およびハイブリドーマdBR103(FERM P-18004)により産生される2種類のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする請求項13に記載の測定方法。

【請求項15】 請求項1から8のいずれかに記載の抗 50

体を含むイヌBNP測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する分野】本発明は、イヌBNPを認識する単一特異的な抗体および該抗体を用いたイヌBNPのサンドイッチ免疫測定方法に関する。

【0002】

【従来技術】1988年、Sudohらはブタ脳から心房性利尿ペプチド(Atrial Natriuretic Peptide; ANP)と構造が極めて類似したペプチドを分離同定し、脳性ナトリウム利尿ペプチド(Brain Natriuretic Peptide; BNP)と命名した(Nature, 332(6159), 78-81(1988).)。その後、SaitoらはBNPはブタ心臓でも合成され、血中に分泌されることを示した(Biochemical and Biophysical Research Communications, 158(2), 360-368(1989).)。その後、他の動物種からもBNPは単離されている。1989年には、Itohらがラット心房から(Biochemical and Biophysical Research Communications, (2)161, 732-739(1989).)、Seilhamerらがイヌから(Biochemical and Biophysical Research Communications, 165(2), 650-658(1989).)BNPを単離し、1990年にはKambayashiらがヒト心房からBNPを単離した(FEBS Letters, 259(2), 341-345(1990).)。

【0003】現在までの臨床研究を通じて、ヒトBNPの血中濃度測定は心疾患における心機能を反映する機能評価法として広く臨床応用されるに至っている。一方、イヌは人によってもっとも多く飼育されている愛玩動物の一つであり、家族と変わることなく人の生活に入り込んでいる動物種であるが、その心臓病の発生頻度はヒトなどに比べて壮年以降のイヌにおいては極めて多い。日本においては、飼育されているイヌは登録されて管理されており、病院も都市を中心に充実しているものの、心臓の簡便な機能評価法がないため、心疾患を早期に発見することが難しく、タイムリーな治療ができない現状にある。このような背景から、ヒトと同様にBNPの測定の臨床応用はイヌのQOL改善をはじめとして、イヌ心疾患の診断と治療に大きな意味があると考えられ、その測定系の構築が望まれている。イヌBNPが単離されてから現在までに報告されているイヌBNPの免疫学的測定法は、イヌBNPを抗原とし、ウサギを免疫して得た抗血清を用いて測定している。しかしながら、効率的なサンドイッチ免疫測定を可能にするほどには特異性が高くはない抗血清を用いたため、臨床応用が可能な高感度測

定系は提供されていなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】イヌBNPに対するポリクローナル抗体は得られているものの、感度の高いサンドイッチ測定系構築に必要なイヌBNPに結合性を有する特異抗体は未だ得られていない。本発明は、イヌBNPの効率的なサンドイッチ免疫測定を可能とするような特定部位に高い特性を持つ単一特異的な抗体および該抗体を用いたサンドイッチ免疫測定方法を提供するものである。

【0005】

【課題を解決する手段】本発明者らは、イヌBNPの高感度の測定方法の提供を目的として研究した結果、本発明を見出し、これを完成した。

【0006】すなわち、本発明は、

(1) 配列番号1記載のアミノ酸配列のうち、109位のSerから140位のTyrからなるイヌBNPを認識する、イヌBNPサンドイッチ免疫測定に使用可能な単一特異的な抗体；

(2) 配列番号1記載のアミノ酸配列のうち、

(a) 109位のSerから117位のGly；

(b) 118位のCysから134位のCys；または

(c) 135位のAsnから140位のTyr；

のいずれか1つの部位を認識する(1)記載の抗体；

(3) 配列番号1記載のアミノ酸配列のうち、135位のAsnから140位のTyrの部位を認識する(1)記載の抗体；

(4) モノクローナル抗体である(3)記載の抗体；

(5) マウスハイブリドーマdBC107(FERM P-18005)により産生される(4)記載の抗体；

(6) 配列番号1記載のアミノ酸配列のうち、118位のCysから134位のCysの部位を認識する

(1)記載の抗体；

(7) モノクローナル抗体である(6)記載の抗体；

(8) マウスハイブリドーマdBR103(FERM P-18004)により産生される(7)に記載の抗体；

(9) イヌBNPに対するモノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマdBC107(FERM P-18005)；

(10) イヌBNPに対するモノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマdBR103(FERM P-18004)；

(11) (1)および(2)記載の抗体から選ばれる、互いにイヌBNPに対する結合を阻害しない2種類の抗体を組合せたサンドイッチ免疫測定方法；

(12) 118位のCysから134位のCysを認識する単一特異的な抗体および135位のAsnから140位のTyrを認識する単一特異的な抗体を組合せ

た(11)記載の免疫測定方法；

(13) 118位のCysから134位のCysを認識するモノクローナル抗体および135位のAsnから140位のTyrを認識するモノクローナル抗体を組合せた(11)記載の免疫測定方法；

(14) ハイブリドーマdBC107(FERM P-18005)およびハイブリドーマdBR103(FERM P-18004)により産生されるモノクローナル抗体を組合せることを特徴とする(13)に記載の免疫測定方法および；

(15) (1)から(8)のいずれかに記載の抗体を含むイヌBNP測定キット；に関する。

【0007】本発明において、「単一特異的な抗体」とは、単一のエピトープを認識する抗体を意味する。そのような抗体は、目的とするエピトープを含むポリペプチドを免疫原とすることで得られる抗体および単一のエピトープのみを認識するような抗体成分だけをアフィニティ精製することにより得られる抗体が含まれ、例えば、モノクローナル抗体が挙げられる。従って、複数のエピトープを有するポリペプチドを免疫原として得られる抗体、例えば、生理活性を有するタンパク質全体を免疫原とすることで得られるポリクローナル抗体は、本発明の「単一特異的な抗体」には含まれない。「イヌBNP」とは、配列番号1記載のアミノ酸配列のうち109位のSerから140位のTyrまでの32アミノ酸残基からなるポリペプチドを意味する。また、「イヌBNP」は、配列番号1記載のアミノ酸配列のうち118位と134位のCysがS-S結合を形成し、シスチンとなることで環状構造を形成することがあり、そのような構造をとる場合、配列番号1記載の109位のSerから117位のGlyの9アミノ酸残基からなる部位を「N末端」、118位のCysから134位のCysの17アミノ酸残基からなる部位を「リング」、135位のAsnから140位のTyrの6アミノ酸残基からなる部位を「C末端」という。

【0008】「サンドイッチ免疫測定に使用可能」とは、互いに異なるエピトープを認識する単一特異的な抗体であって、該抗体が目的とする測定対象、例えば、イヌBNPにお互いの結合を阻害することなく結合しうることを意味する。本発明において、「マウスハイブリドーマdBC107」とは、イヌBNPのC末端配列を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマであり、該ハイブリドーマは、茨城県つくば市東1丁目1番地1の行政独立法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、平成12年8月29日付けで、受託番号：FERM P-18005として寄託されている。本発明において、「マウスハイブリドーマdBR103」とは、イヌBNPのリングを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマであり、該ハイブリドーマは、茨城県つくば市東1丁目1番1番地1の行政独立法

人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、平成12年8月29日付けで、受託番号：FERM P-18004として寄託されている。

【0009】「互いにイヌBNPに対する結合を阻害しない2種類の単一特異的な抗体を組合わせたサンドイッチ免疫測定方法」とは、イヌBNPを単一特異的に認識する、エピトープの異なる2種類の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定方法であって、該抗体は、一方が、他方に阻害されることなくイヌBNPと結合することが可能な抗体を組合わせた免疫測定方法である。このような2種類の単一特異的な抗体の組合わせとしては、例えば、N末端とリングにそれぞれ単一特異的な抗体、N末端とC末端にそれぞれ単一特異的な抗体、リングとC末端に単一特異的な抗体などの組合わせが挙げられるが、好ましくは、リングとC末端を単一特異的に認識する抗体の組合わせである。本測定方法に使用される2種類の単一特異的な抗体としては、単一のエピトープを認識する抗体であればいずれの抗体でも良く、好ましくは、モノクローナル抗体であり、更に好ましくは、マウスハイブリドーマdBC107およびマウスハイブリドーマdBR103により産生されるモノクローナル抗体である。

【0010】「測定キット」は、本発明の単一特異的な抗体を含んでおり、好ましくは、本発明の2種類の単一特異的な抗体を含んでいる。使用する2種類の抗体のうち、一方の抗体は担体に固相化されていても良い。抗体の担体への固相は直接的でも間接的でも良い。間接的な固相方法としては、使用する抗体に対する抗体（ただし、測定対象への結合は阻害しないもの）、アビジン-ビオチンや測定対象とは異なる抗原抗体等の組合わせた方法が例示される。さらに、測定キットに固相化担体が含まれていても良い。また、他方の抗体は標識されていても良い。標識の抗体への結合は直接的でも間接的でも良い。標識としては、放射性同位体、酵素、蛍光物質などが例示される。好ましくは、 ^{125}I 、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ルミノールである。また、間接的な抗体への標識は前記標識を結合した使用する抗体に対する抗体（ただし、測定対象への結合は阻害しないもの）、アビジン-ビオチンや測定対象とは異なる抗原抗体等の組合わせた方法が例示される。このキットは、更に、検量線、標準試薬、標準試薬の取り扱い指示書などを含むことができる。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明の方法を説明する。

免疫

イヌBNPに対する単一特異的な抗体を作製するためには、まず、適切な抗原で動物を免疫する。特に、抗体とイヌBNPとの結合部位を考慮して抗体を作製する場合には、結合させたい部位のみを含むペプチドを用いて抗体を産生しえるような適切な免疫原を作製して、動物を免疫する。免疫に使用する動物としては、例えば、マウ

ス、ラット、ウサギ、ヤギなどが挙げられる。抗原には、イヌBNP自体またはその任意の部分のペプチドフラグメントを用いることができ、好ましくは、C末端またはリングのペプチドフラグメントである。ペプチドフラグメントは、アミノ酸配列情報に基づき、ペプチド合成機により化学的に合成され、免疫原として用いることができる。免疫原はそのまま使用することもできるが、キャリアタンパク質と結合させてコンジュゲートで使用することもできる。キャリアタンパク質としては、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)、ヘモシアニン、およびウシチオグロブリン(BTG)などの高分子が挙げられるが、好ましくは、BSAである。コンジュゲートを作製するために、ペプチドとキャリアタンパク質を架橋試薬を用いて結合することもある。その様な架橋試薬として、スクシンイミジル基およびマレイミド基を有する2官能性架橋試薬であるマレイミド化合物を用いることができ、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(SMPB)、ならびにSulfo-MBS、Sulfo-SMCCなどが例示される。これらの架橋試薬のスクシンイミジル基が第一アミンと反応し、さらにチオール反応性マレイミドと反応して、システイン残基のチオール基と共有結合を形成し架橋される。免疫原による免疫反応を高めるために、例えば、フロイントの完全アジュバント(CFA)および不完全アジュバント(IFA)を投与してもよい。

【0012】ポリクローナル抗体は、例えば、レーンらの方法(Antibodies; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).)などに従って作製することができる。哺乳動物に抗原をフロイントの完全アジュバントなどの適切なアジュバントに乳濁した乳濁液を腹腔内、皮下、または静脈内に投与して数週間に渡り複数回投与することで免疫された哺乳動物を得て、それらの哺乳動物から血清を採取し、精製することで作製できる。血中の抗体力価は、イヌBNPをヨウ素125で標識した $^{125}\text{I}-\text{Y}_0$ -イヌBNP-32をトレーサーとする競合法RIAによって調べることができる。イヌBNPの目的部位以外に結合する抗体を除去したい場合は、目的部位のペプチドを固相化した担体を作製し、公知の方法によりアフィニティ精製することで除去できる。

【0013】抗イヌBNPマウスモノクローナル抗体の作製

また、モノクローナル抗体は、それらの哺乳動物から脾臓またはリンパ節を採取し、それらから得られた抗体産生細胞を骨髓腫(ミエローマ)細胞と融合させることに

より、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得ることができる。細胞融合の方法は既知の方法で行うことができ、例えば、ケーラーとミルスタインの方法(Nature, 256, 495-497(1975).)に従って作製することができる。イヌBNPを認識する特異抗体を作製するために、上記に記載した方法に従ってマウスを免疫する。十分に血中抗体力価が上昇していることを確認し、採血または脾臓細胞を分離する。モノクローナル抗体、特に、C末端やリングを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、このようにして分離した脾臓細胞とミエロマ細胞を融合して作製し得る。脾臓細胞は前記で免疫した動物、好ましくはマウス由来である。ミエロマ細胞は、哺乳類由来であり、好ましくはマウスミエロマ細胞である。細胞の融合にはポリエチレングリコールなどを用い得る。融合により得られたハイブリドーマをスクリーニングおよびクローニングすることにより、望ましいハイブリドーマを選択し得る。モノクローナル抗体の作製するには、前記で得られたハイブリドーマをインビトロまたはインビボで培養する。好ましくは、インビボで培養する。例えば、マウスモノクローナルを含む腹水を産生させるために、マウスの腹腔内に前記ハイブリドーマを投与する。モノクローナル抗体は、産生された腹水から、当業者に公知の方法により容易に精製され得る。

【0014】免疫学的測定法

本免疫測定方法に用いる単一特異的な抗体としては、安定的に供給しうるモノクローナル抗体が望ましい。以下、モノクローナル抗体を用いて例示する。抗体(第一のモノクローナル抗体)を固相に固定し、抗原を含む資料と共にインキュベートする工程、さらに標識した第二のモノクローナル抗体を加えて、得られた混合物をインキュベートする工程、および混合物中の生成した標識された抗原抗体複合体を検出する工程を包含するサンドイッチ免疫学的測定法が例示される。また、本発明の免疫学的測定法では、試料と、固相化した第一のモノクローナル抗体および標識した第二のモノクローナル抗体とを同時にインキュベートしてもよい。

【0015】本発明のサンドイッチ免疫学的測定法としては、その検出方法により、サンドイッチ放射免疫測定法(RIA法)、サンドイッチ酵素免疫測定法(EIA法)、サンドイッチ蛍光免疫測定法(FIA法)、サンドイッチ発光免疫測定法(CLIA法)、サンドイッチ発光酵素免疫測定法(CLEIA法)、サンドイッチ法に基づく免疫クロマトグラフ法などの全てのサンドイッチ免疫測定法が応用しうる。定量のためには、RIA法、EIA法が好ましい。本発明の第一の単一特異的な抗体は、マイクロタイタープレート、ビーズ、チューブ、メンブレン、濾紙、プラスチック性カップなどの担体に固相することができ、特に、ポリエチレンビーズが好適に用いられる。測定する試料は、イヌの血漿、血

清、血液、尿などイヌBNPを含む試料であり得る。本発明の第二のモノクローナル抗体は、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質、または目視判定可能な官位測定法などでは金コロイドや着色ラテックスなどにより標識されえる。標識に用いられる放射性同位元素としては、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I などであり、特に、 ^{125}I が好適に用いられる。これらは、クロラミンT法、ペルオキシダーゼ法、Iodogen法、ポルトハンター法などにより、モノクローナル抗体に結合され得る。標識に用い得る酵素としては、例えば、ガラクトシダーゼ(GAL)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)などを含む。これらは、仲根法、石川らの方法(医学書院; 酵素免疫測定法, 第3版, 75-127, (1987).)などによりモノクローナル抗体に結合され得る。標識に用いる蛍光物質としては、フルオレセイン、フルオレサミン、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどがある。標識に用いる発光物質としては、ルシフェリン、ルミノール誘導体、アクリジニウムエステルなどがある。簡易測定法などでは、金コロイドや着色ラテックスを用いてもよい。

【0016】好ましい実施態様によれば、イヌBNPサンドイッチRIA法が行われ得る。イヌBNPサンドイッチRIA法は、具体的には、標準イヌBNP溶液または試料に、第一のモノクローナル抗体を固相したビーズを加えて混和し、4 から45、好ましくは25 から37で、1から4時間、好ましくは2時間インキュベートする(第一反応)。洗浄後、例えば ^{125}I で標識した第二のモノクローナル抗体を含む溶液を加え、4 から45、好ましくは25 から37で、1から4時間好ましくは2時間インキュベートし、ビーズ上に抗体/イヌBNP/抗体複合体を形成する(第二反応)。洗浄後、ビーズに結合した抗原抗体複合体の放射活性をガンマカウンターなどで検出することによりイヌBNPの量を測定し得る。他の好ましい実施態様によれば、イヌBNPサンドイッチEIA法が行われ得る。イヌBNPサンドイッチEIA法は、具体的には、標準イヌBNP溶液または試料に、第一のモノクローナル抗体を固定したビーズを加えて混和し、4 から45、好ましくは25 から37で、1から4時間、好ましくは2時間インキュベートする(第一反応)。洗浄後、酵素標識、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で標識した第二のモノクローナル抗体を含む溶液を加え、4 から45、好ましくは25 から37で、1から4時間好ましくは2時間インキュベートし、ビーズ上に抗体-イヌBNP-抗体からなる免疫複合体を形成する(第二反応)。ビーズ上の酵素活性を、酵素に特異的な基質、例えば、標識酵素がHRPであればテトラメチルベンジチン(TMB)を介して比色法により

測定し、それによりビーズ上の捕獲されたイヌBNPの量を測定し得る。比色定量は、通常の分光光度計などで行われ得る。

【0017】

【実施例】本発明を以下の実施例によりさらに説明する。

実施例1

イヌBNPに対する競合RIA法の設定

ヒトBNPのリング部位を認識し、イヌBNPに交叉結合性を有する抗ヒトBNPモノクローナル抗体KY-h BNP- I I (特願平2-99623)、および 125 I-Y₀-ヒトBNP(1-32)を用いることにより、イヌBNP測定のために競合系RIAを構築した。モノクローナル抗体KY-hBNP- I Iを産生するハイブリドーマKY-hBNP- I Iは、平成2年(1990年)4月11日から、茨城県つくば市東1丁目1番1番地の行政独立法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、Mouse Hybridoma KY-hBNP- I I、受託番号:FERMBP-2863として、ブタペスト条約に基づき寄託されている。RIAにはアッセイ緩衝液として0.01M PBS、pH 7.4(1mM EDTA・2Na、0.01%(W/V) NaN₃、0.2%(W/V) BSAを含む)を使用した。 125 I-Y₀-ヒトBNPはクロラミンT法(Biochemical and Biophysical Research Communications, 124(3), 815-821(1984).)により調製した。次の方法により、ヒトBNPおよびイヌBNPの標準曲線を作成した。まず、ポリスチレンチューブに各種濃度のBNP標準溶液を100 μ L、 125 I-Y₀-ヒトBNPを100 μ L(40,000cpm)、モノクローナル溶液を100 μ Lおよびアッセイ緩衝液を200 μ Lを分注し、攪拌した後、4で20時間インキュベートした。この溶液に2.5%(W/V)-グロブリンを100 μ Lおよび25%(W/V)PEG-6000を100 μ L加え、4で10分間攪拌し後、3,000rpmで20分間遠心分離を行い、得られた沈殿物の放射活性をガンマカウンターで測定した。

【0018】ヒトBNPおよびイヌBNPの標準溶液における各種濃度と放射活性との関係を、標準曲線として第1図に示した。図中、横軸は各種BNP濃度を、縦軸は各種BNP濃度における放射活性(B)とBNPゼロ濃度における放射活性(B₀)との比率(B/B₀)を示している。その結果、リングを認識するモノクローナル抗体KY-hBNP- I Iの標識抗原との反応は、イヌBNPによって競合され、ヒトBNPとほぼ同等の最小検出限界を有する容量依存的な競合曲線を描いた。そこで、さらなる反応系の最適化を行なった。イヌBNPの標準溶液における各種濃度と放射活性との関係を示す標

準曲線および正常イヌより採取した血漿サンプル3種類の測定結果を第2図に示す。その結果、イヌBNPの最小検出限界は約600pg/mLであり、正常イヌより採取した血漿サンプルでは全く競合が起らなかった。よって、イヌBNP測定の臨床応用にはサンドイッチ免疫測定法のような、より高感度の測定法の構築が必要であった。

【0019】実施例2 モノクローナル抗体の調製

(1)BNPのリングを認識するモノクローナル抗体dBR103の調製

ペプチド合成機により調製した約2mgのイヌBNP(10-26)を、カルボキシイミドを用いて、9mgの牛チログロブリン(シグマ社製)に結合させた。フロイントの完全アジュバントに乳濁させた約20 μ gのイヌBNP(10-26)を含有する上記化合物を、2から3週間間隔で、BALB/c系マウスの背部皮下および腹腔内投与して免疫をおこなった。6匹中5匹のマウスにおいて抗体価が上昇したので、より高い反応性を示した1匹をからモノクローナル抗体作製のための脾臓細胞を摘出し、細胞融合に用いた。脾臓細胞とマウスミエロマ細胞X63-Ag8.653との融合は、Mukoyamaらの方法(Hypertension, 12, 117-121(1988).)に従った。細胞融合の後、抗体反応陽性を示した全ての融合株をクローン化して、最も強い反応性を有するクローンを選択した。このように確立されたモノクローナル抗体をdBR103と命名した。得られたハイブリドーマは、抗体産生能に基づき選択し、限界希釈法によりクローン化して、BALB/cマウスの腹腔内で増殖させた。モノクローナル抗体のアイソタイプは、マウスモノクローナルタイピングキット(マイルス社製)を用いて、オクタロニー法により決定した。親和定数(Ka(M⁻¹))は、Scatchardらのスキッチャードプロット(Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, 660(1949).)から得られた。dBR103は、イヌBNPに対して3.0 \times 10⁸M⁻¹の親和性を有する。しかしながら、ヒトBNP及びヒトANPとの交叉反応性は、いずれにおいても0.01%であった。

【0020】(2)BNPのC末端を認識するモノクローナル抗体dBC107の調製

イヌBNP(27-32)を抗原として上記(1)の方法と同様にしてC末端を認識するモノクローナル抗体dBC107を作製した。細胞融合の後、抗体反応陽性を示した全ての融合株をクローン化して、最も強い反応性を有するクローンを選択した。このように確立されたモノクローナル抗体をdBC107と命名した。dBC107は、上記(1)と同様にして培養し、Kaを計算した。dBC107はイヌBNPに対して1.7 \times 10¹⁰M⁻¹の親和性を有する。しかしながら、ヒトBNP及びヒトANPとの交叉反応性は、いずれにおいても0.0

1%であった。

【0021】(3) イヌBNPに対する抗血清の調製
上記(1)および(2)で得られた各モノクローナル抗体の比較検討のため、イヌBNPに対する抗血清を調製した。免疫原としてイヌBNPを、免疫動物として5羽の家兎を用い免疫を行った。免疫原は2~3週間隔で計5回の免疫を行い、各回での抗体力価を測定した。抗血清は常法に従って調製した。その結果を表1に示す。但*

*し、「-」は採血を実施していないことを示している。
5羽の家兎のうちAntisera-4が第4回の免疫時で83000と高い抗体力価を示したので、検討に用いる抗血清を採取する対象として選択し、血液を採取して抗血清を調製した。また、今回検討に使用した各種抗体の親和定数(Ka)およびヒトBNPおよびヒトANPとの交叉反応性を表2に示した。

【表1】

Antisera	第1回	第2回	第3回	第4回	第5回
1	-	-	2100	7100	19300
2	-	-	2700	8800	7400
3	-	-	100	2700	7500
4	-	-	79000	83000	-
5	-	-	1400	4000	4800

【表2】

	Ka (M ⁻¹)	交叉反応 (%)	
		ヒトBNP	ヒトANP
dBC107	1.7×10 ⁻¹⁰	<0.01	<0.01
dBR103	3.0×10 ⁻⁸	<0.01	<0.01
Antisera-4	2.0×10 ⁻⁹	<0.01	<0.01

【0022】実施例3

(1) ゲルろ過クロマトグラフィーによるイヌBNPと抗体との複合体の分析

イヌBNPと抗体とによって形成される複合体の評価をゲルろ過法を用いて行なった。抗体として、モノクローナル抗体dBC107およびdBR103、ならびにウサギ抗イヌBNP抗血清Antisera-4を用いた。イヌBNPの¹²⁵I標識体(¹²⁵I-Y₀-イヌBNP)は、クロラミンT法により標識ヒトBNPと同様に30して調製し、クロマトグラフィー緩衝液(0.2% BSAを含む)に溶解したものをを用いた。試薬としてアッセイ緩衝液0.01M PBS、pH7.4(1mM EDTA・2Na、0.01%(W/V) Na₂N₃、0.2%(W/V) BSAを含む)およびクロマトグラフィー緩衝液10mM Tris-NaCl、pH7.0(0.15M NaClを含む)を使用した。クロマトグラフィーの操作は全て室温で行った。まず、ポリスチレンチューブに適当な濃度に調製したdBC107抗体溶液、dBR107/dBR103抗体溶液40を100μL分注したものと抗体溶液を分注していないものに、¹²⁵I-Y₀-イヌBNP溶液100μLおよびアッセイ緩衝液200μLを添加し、各試料を攪拌後、室温で終夜インキュベートした。得られた各反応液はSuperose HR12カラム(ファルマシアバイオテク社製)を用いてゲルろ過クロマトグラフィーにて分画を行った。クロマトグラフィー緩衝液で平衡化したSuperose HR12カラムに、各試料をかけ、流速0.5mL/分で溶出した。カラムからのすべての溶出物は、0.01M PBS、pH7.4(2% 50

BSA含む)100μLが入っているポリプロピレンチューブに0.5mLで分画し、チューブ中の放射線量を - カウンターで計測した。その結果を第3図に示した。¹²⁵I-Y₀-イヌBNPのみのものは()、¹²⁵I-Y₀-イヌBNPとdBC107の組み合わせは()、¹²⁵I-Y₀-イヌBNPとdBC107およびdBR103の組み合わせは()で溶出パターンを示した。¹²⁵I-Y₀-イヌBNPは、40本目に、¹²⁵I-Y₀-イヌBNPと抗体が1:1で結合した複合体は24本目に、1:2で結合したサンドイッチ複合体は22本目にそれぞれ溶出した。

【0023】適当な濃度に調製したAntisera-4抗体溶液、dBC107/Antisera-4抗体溶液を100μL分注したものと抗体溶液を分注していないものに、¹²⁵I-Y₀-イヌBNP溶液100μLおよびアッセイ緩衝液200μLを添加し、各試料を攪拌後、室温で終夜インキュベートした。得られた各反応液はSuperose HR12カラム(ファルマシアバイオテク社製)を用いてゲルろ過クロマトグラフィーにて分画を行った。上記同様にクロマトグラフィー緩衝液で平衡化したSuperose HR12カラムに、各試料をかけ、流速0.5mL/分で溶出した。ゲルろ過クロマトグラフィーを行い、0.01M PBS、pH7.4(2% BSA含む)100μLが入っているポリプロピレンチューブに0.5mLで分画し、チューブ中の放射線量をガンマーカウンターで測定した。その結果を第4図に示した。¹²⁵I-Y₀-イヌBNPのみのものは()、¹²⁵I-Y₀-イヌBNPとAntisera-4の組み合わせは()、¹²⁵I-Y₀-イ

又BNPとAntiser a - 4およびdBC107の組合わせは()で溶出パターンを示した。 $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNPは、40本目に、 $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNPと抗体が1:1で結合した複合体は24本目に、1:2で結合したサンドイッチ複合体は22本目にそれぞれ溶出した。

【0024】(2)抗体の組み合わせによるサンドイッチ複合体の形成の検討

一般に、分子に2個以上の抗体結合部位(エピトープ)をもつ化合物を免疫して得られた抗血清は、それぞれのエピトープに対して抗体が産生されるため、固相及び標識に同一の抗血清を用いてもサンドイッチ免疫反応が可能である。測定する対象物がある程度の大きさをもったペプチドであれば、通常はエピトープの数が2個以下ということは少なく、抗血清との反応の結果、巨大分子が形成されることが多い。このような巨大分子は、一度複合体を形成すると、加温や洗浄等によって乖離が起こりにくく、むしろ測定系構築には好ましい場合も多い。ヒトBNPは、N末端、リング部位、C末端に抗体を産生可能であることから、少なくとも3個以上のエピトープが存在すると想像される。実際、サンドイッチ測定が可能であることから、2個以上の抗体が同時に結合しうる。イヌBNPは、ヒトBNPとアミノ酸配列も異なり、その高次構造の推察はできないが、少なくとも力価の高い抗血清を選択することにより、サンドイッチ測定系を構築できると推定できる。

【0025】サンドイッチ測定系の感度を高めるためには、出来る限り多くの抗原分子が反応し、反応液中に未反応の抗原分子を残さないことが必要である。今回選択したウサギ抗イヌBNP抗血清Antiser a - 4は、表1に示すように血液採取時の抗体力価が83,000倍と高く、親和定数(Ka)も 2×10^{-9} と良好で、 $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNPと組合わせたゲルろ過クロマトグラフィー分析によれば、 $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNPは抗体との複合体溶出位置から回収されるが、 $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNPの単体溶出位置からほとんど回収されなかった。このことより、抗血清Antiser a - 4は、反応系に存在する $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNP分子のほとんどを結合できることが明らかとなった。この観点からすれば、この抗血清は、イヌBNP免疫測定システムに適した抗血清である。しかしながら、Antiser a - 4と $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNPとの反応液は、大部分が24本目の溶出位置から回収されていることから、 $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNPに抗体が1分子結合した複合体であり、22本目の溶出位置から回収される $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNPに抗体が2分子結合した複合体は、形成された複合体全体の約20%であった。この比率は抗血清の濃度を変化させても大きな変化は生じなかった。

【0026】通常の作製方法により、イヌBNPに対する抗血清を作製した場合には、イヌBNP上の複数のエ

ピトープに対して抗体が作製される。しかしながら、単純に抗体力価のみを指標として抗血清を選択すると、測定すべきイヌBNP分子の大部分にはサンドイッチ反応は起こらず、抗体が1分子だけ結合した複合体を形成するのみである。つまり、Antiser a - 4単独でサンドイッチ免疫測定方法を構築しても、抗原を有効に測定系に取り入れることができず、高感度化は難しい。抗体が1分子だけ結合する複合体が大部分を占めた原因はいくつか考えられるが、濃度依存的に比率に変化が生じないのであれば、反応液中の抗体量の不足が原因ではない。いずれかのエピトープに対する抗体が優先的に産生され、その抗体とイヌBNPが結合することによって他の抗体の結合を阻害していることが可能性としては高い。

【0027】一方、C末端を認識するモノクローナル抗体dBC107と $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNPとの反応液はゲルろ過クロマトグラフィー分析から、24本目の溶出位置から回収されていることから、dBC107は $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNPの大部分と結合し複合体を形成することができ、Antiser a - 4と同様にイヌBNP免疫測定に使用可能な抗体であることが明らかとなった(第3図)。そこで、 $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNPとAntiser a - 4の組合わせにAntiser a - 4より一桁高いKa値 2×10^{-10} を有するdBC107抗体を加えるたところ、その反応液のゲルろ過クロマトグラフィー分析から、22本目の溶出位置から回収され、全てのイヌBNPがサンドイッチ複合体を形成した(第4図)。イヌBNP分子の立体構造を推定することは難しいが、C末端とのみ結合し、Antiser a - 4より高いKa値を持ったdBC107抗体と $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNPの反応することにより、他の抗体の障害となっていた抗体の反応を阻害し、残りの抗体の結合を可能にしたものと考えられる。

【0028】次に、dBC107抗体と $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNPの組合わせに、イヌBNPのリングを認識するモノクローナル抗体dBR103抗体を加えたところ、その反応液のゲルろ過クロマトグラフィー分析から、24本目の溶出位置から回収され、イヌBNPがサンドイッチ複合体を形成した(第3図)。この結果は、C末端およびリングを認識する特異的に認識する抗体を組み合わせることで測定系を構築することにより、測定目的の $^{125}\text{I} - \text{Y}_0$ - イヌBNP分子のほとんどをサンドイッチ複合体とすることができることを示しており、イヌBNP高感度測定のためのサンドイッチ免疫測定方法に適する抗体の組み合わせであることが確認できた。

【0029】(3)サンドイッチRIA法
dBC107およびdBR103の両抗体を組み合わせ用い、イヌBNPのサンドイッチRIA系を確立した。試薬としてアッセイ緩衝液として0.01MPBS、pH7.4(1mM EDTA・2Na、0.01

% (W/V) NaN_3 、0.2% (W/V) BSAを含む)を、洗浄液として0.01M PB、pH7.2 (0.02% (W/V) Tween 20を含む)を用いた。まず、抗体固相ビーズを作製した。常法に従い、アッセイ緩衝液で100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調製したdBC107抗体溶液中にイムノビーズ ($D = 6.4 \text{ mm}$)を室温にて2時間放置し、抗体を固相化した。その後、4倍に希釈したブロックエース溶液を用いてブロックして抗体固相ビーズとした。また、常法に従い、dBR103抗体を放射性同位体 ^{125}I で標識するため、クロロミンT法にて ^{125}I を導入し、標識抗体とした。反応チューブに標準イヌBNP溶液または検体を100 μL 分注し、各チューブに標識抗体 (300, 000 cpm) 200 μL および抗体固相ビーズ1個を入れて緩やかに攪拌した。反応チューブはシールし、4にて18時間放置した後、ビーズを洗浄液にて4回洗浄し、ビーズの放射活性をガンマカウンターで測定した。標準溶液中のイヌBNP濃度と放射活性との関係から標準曲線を作成した。その結果を、第6図に示した。dBC107およびdBR103の両抗体を組み合わせたサンドイッチRIA法の最小検出限界値は10 pg/mL 以下であり、およそ数十 pg/mL とされる血漿中の健常イヌBNP (Journal of Veterinary Medical Science, 61, 523-529 (1999).)を十分に測定できる感度を有する測定系と考えられた。

【0030】

*【発明の効果】イヌBNPは、ヒトBNPと同じ32アミノ酸残基からなるものの、そのアミノ酸配列は異なる(第5図)。従って、イヌBNPの立体構造をヒトBNPの場合と同様に捉えることは不可能である。ところで、分子上に2個以上の抗体結合部位(エピトープ)を持つ分子を免疫原として得た抗血清は、それぞれのエピトープに対する抗体が産生されるため、固相および標識に同一の抗血清を用いてもサンドイッチ複合体を形成しうるとされている。そこで、常法に従い家兔抗血清を作成し、イヌBNPのサンドイッチ免疫測定方法の構築を試みたところ、イヌBNP上には複数のサンドイッチが可能なエピトープが存在することは確認できた。しかしながら、該反応系中の多くのイヌBNPは、サンドイッチ複合体を形成しなかった。このことより、従来の指標である抗体力価から選定されてきた抗体は、イヌBNPとのサンドイッチ免疫測定方法の構築には適さないことが明らかとなった。この問題を解決されるため、抗体作成時から特定のエピトープを定め、該エピトープにのみ結合する特異抗体の作製を試みた。その結果、本発明の特異抗体、特にC末端に対する特異抗体とリング部位に対する抗体を組み合わせることで、反応系中に存在するイヌBNPのほとんどがサンドイッチ複合体を形成することが明らかとなった。従って、本発明は、従来困難であったイヌBNPの高感度な免疫測定方法を提供するものである。

【0031】

* 【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Shionogi & Co., Ltd.
 <120> A sandwich immunoassay using specific antibodies against dog BNP
 <130> 01P00104
 <150> JP2000-299300
 <151> 2000-09-29
 <160> 1
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris
 <300>
 <301> Seilhamer, Jeffrey J.
 Arfsten, Ann
 Miller, Judy A.
 Lundquist, Penny
 Scarborough, Robert M.
 Lewicki, John A.
 Porter, J. Gordon
 <302> Human and canine gene homologs of porcine brain natriuretic peptide
 <303> Biochem. Biophys. Res. Co

<304> 165
 <305> 2
 <306> 650-658
 <307> 1989-12-15
 <308> P16859
 <309> 1990-08-01
 <400> 1
 Met Glu Pro Cys Ala Ala Leu Pro Arg Ala
 Leu Leu Leu Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Leu His Leu Ser Pro Leu Gly Gly Arg Pro
 His Pro Leu Gly Gly Arg
 20 25 30
 Ser Pro Ala Ser Glu Ala Ser Glu Ala Ser
 Glu Ala Ser Gly Leu Trp
 35 40 45
 Ala Val Gln Glu Leu Leu Gly Arg Leu Lys
 Asp Ala Val Ser Glu Leu
 50 55 60
 Gln Ala Glu Gln Leu Ala Leu Glu Pro Leu
 His Arg Ser His Ser Pro
 65 70 75 80
 Ala Glu Ala Pro Glu Ala Gly Gly Thr Pro
 Arg Gly Val Leu Ala Pro 18

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒトBNPのC末端構造を認識するモノクローナル抗体（KY-hBNP115I）を用いた競合系RIA法の、ヒトBNP（1-32）およびイヌBNP（1-32）に対する標準曲線を示したものである。
 【図2】 ヒトBNPのC末端構造を認識するモノクローナル抗体（KY-hBNP115I）を用いた競合系RIA法の、正常イヌ由来の血漿に対する反応性のプロファイルを示したものである。
 【図3】 イヌBNPのC末端を認識するモノクローナル抗体（dBC107）と標識イヌBNPとの反応生成物（）、イヌBNPのリング構造を認識するモノクローナル抗体（dBR103）とモノクローナル抗体dBC107と標識イヌBNPとの反応生成物（）および標識BNP単体（）のゲルろ過クロマトグラフィーの*

*溶出プロフィールを示すものである。

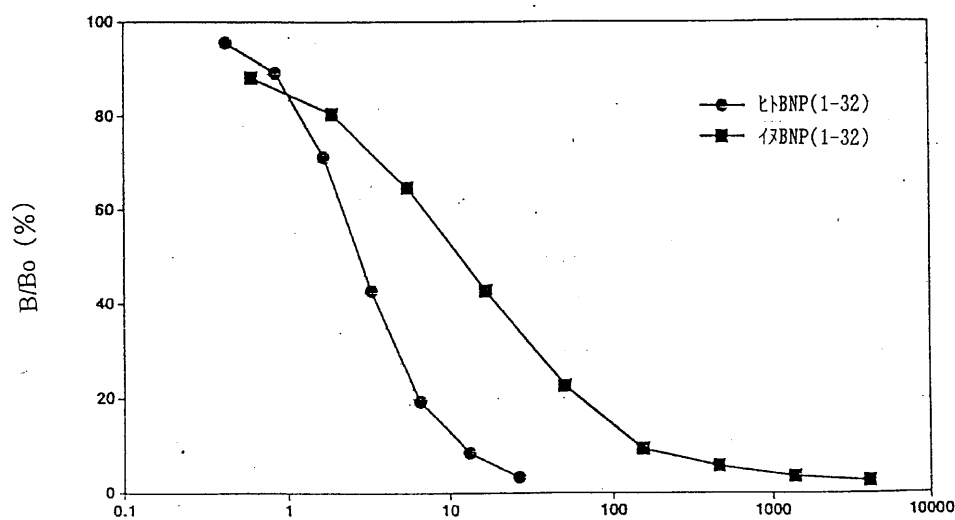
【図4】 イヌBNPに対するウサギ抗血清（Antiser-a-4）と標識イヌBNPとの反応生成物（）および標識BNP単体（）のゲルろ過クロマトグラフ上の溶出プロフィールを示すものである。
 【図5】 各種動物のBNPのアミノ酸配列を示したものである。
 【図6】 イヌBNPのC末端を認識するモノクローナル抗体（dBC107）およびリング構造を認識するモノクローナル抗体（dBR103）を用いたイヌBNPサンドイッチRIA法による各種イヌBNP標準溶液を測定した結果（標準曲線）を示したものである。

【図5】

B型ナトリウム利尿ペプチド (BNP)

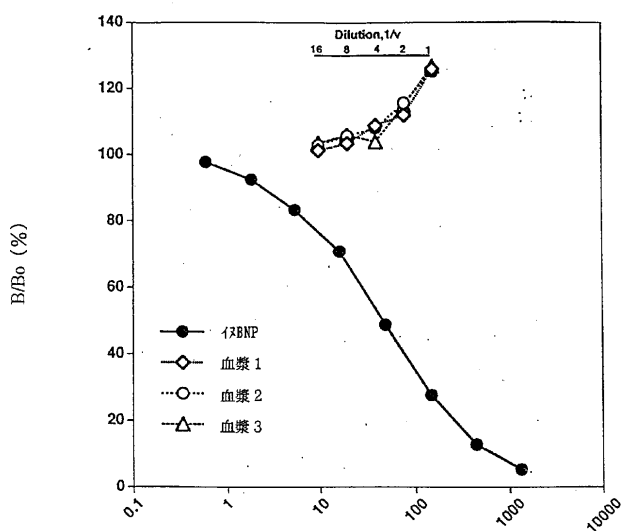
SPKTMRDSGCGRRLLDRIGSLSGLGCNVLRRY	ブ	タ	BNP-32
ALRGPKMMRDSGCGRRLLDRIGSLSGLGCNVLRRY	ウ	シ	BNP-35
SPKMMHKS GCGRRLLDRIGSLSGLGCNVLRKY	イ	ヌ	BNP-32
MMRDSGCGRRLLDRIGSLSGMGCNGSRKN	ニ	フトリ	NP-29
SPKMQVQSGCGFRKMDRISSSSLGCKVLRRH	ヒ	ト	BNP-32
SQDSAFRIQERLRNSKMAHSSGCGQKIDRIGAVSRLLGCDGLRLLF	ラ	ット	BNP-45

【図1】



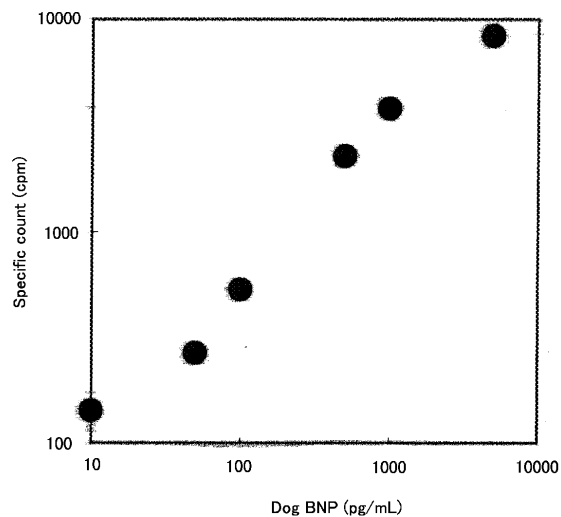
ヒトBNP及びイヌBNPの濃度

【図2】

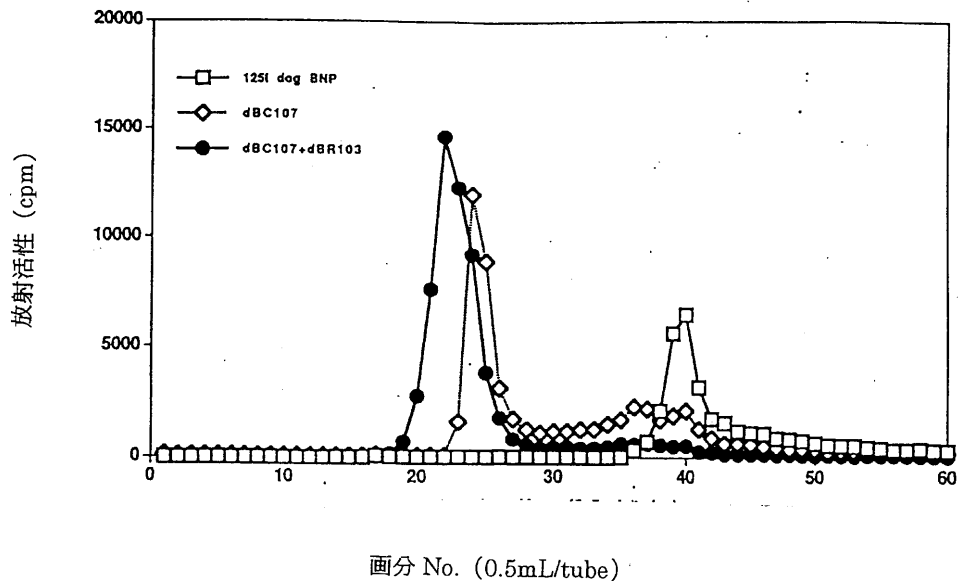


イヌBNP濃度

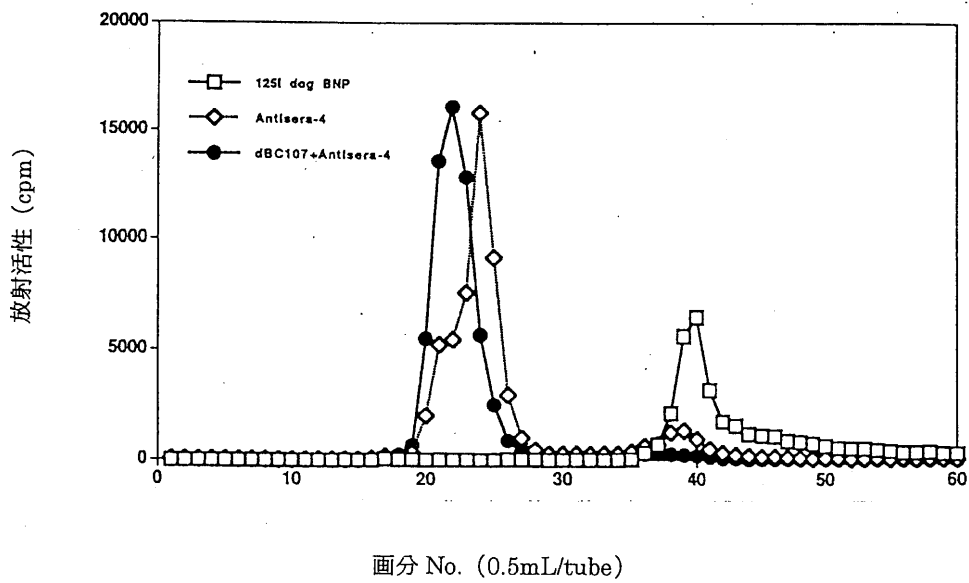
【図6】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マ-コード (参考)

// C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 5/00

B

(72)発明者 太田 英樹

大阪府大阪市福島区鷺洲5丁目12番4号

塩野義製薬株式会社内

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA43 GA05 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA91 AB02 CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76
EA50

专利名称(译)	使用针对犬BNP的特异性抗体测量夹心的方法		
公开(公告)号	JP2002272458A	公开(公告)日	2002-09-24
申请号	JP2001301898	申请日	2001-09-28
申请(专利权)人(译)	塩野义制薬株式会社		
[标]发明人	浅田英久 辻哲男 太田英樹		
发明人	浅田 英久 辻 哲男 太田 英樹		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.ZNA.C C12N5/00.B C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A C12N5/00.102 C12N5/12		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/GA05 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91 4B065/AB02 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50		
优先权	2000299300 2000-09-29 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供犬BNP的免疫测定方法。已经发现了用于犬BNP的夹心免疫测定方法，其结合了两种类型的识别犬BNP并且不会相互抑制与犬BNP结合的单特异性抗体。在SEQ ID NO：1的氨基酸序列中，一种用于狗BNP的夹心免疫分析方法，其结合了识别从位置135的Asn到位置140的Tyr的单克隆抗体和识别位置134的Cys到位置118的Cys的单克隆抗体。提供。

	K _a (M ⁻¹)	交叉反应 (%)	
		ヒトBNP	ヒトANP
dBC107	1.7×10 ⁻¹⁰	<0.01	<0.01
dBR103	3.0×10 ⁻⁹	<0.01	<0.01
Antisra-4	2.0×10 ⁻⁹	<0.01	<0.01