

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報(A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 522158

(P2003 - 522158A)

(43)公表日 平成15年7月22日(2003.7.22)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード(参考)
C 0 7 K 16/40	ZNA	C 0 7 K 16/40	ZNA 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/40		C 1 2 M 1/40	B 4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/48		C 1 2 Q 1/48	Z 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/573		G 0 1 N 33/573	A 4 B 0 6 4
33/577		33/577	B 4 H 0 4 5

審査請求 有 予備審査請求(全 42数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 557590(P2001 - 557590)

(86)(22)出願日 平成12年8月10日(2000.8.10)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月9日(2001.10.9)

(86)国際出願番号 PCT/KR00/00882

(87)国際公開番号 W001/058482

(87)国際公開日 平成13年8月16日(2001.8.16)

(31)優先権主張番号 2000/5808

(32)優先日 平成12年2月8日(2000.2.8)

(33)優先権主張国 韓国(KR)

(71)出願人 キム ヒョ ジョン
大韓民国 425 - 040 アンサン スングボ
ドンク スンクユング APT 3 - 1001

(72)発明者 キム ヒョ ジョン
大韓民国 425 - 040 アンサン スングボ
ドンク スンクユング エ-ピーテ-
ィー 3 - 1001

(72)発明者 チョ ケイ セウング
大韓民国 135 - 110 ソウル アプグジュ
ングドンク 369 ヒュンダイ エ-ピーテ-
ィー 33 - 705

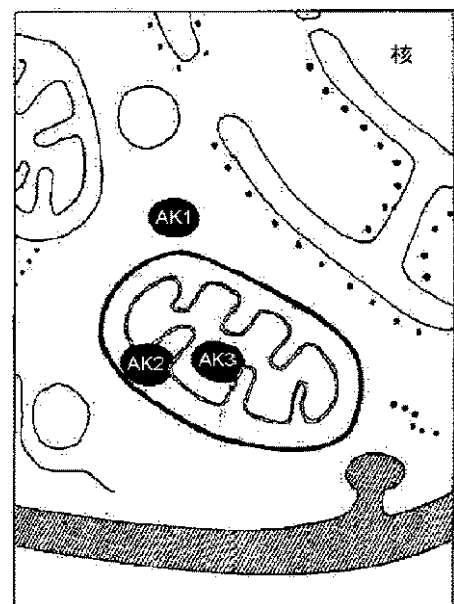
(74)代理人 弁理士 杉村 純子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗 - ヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイム抗体、診断製剤及び心臓疾患用診断キット

(57)【要約】

本発明はヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイムを使用する心臓疾患用の免疫学的製剤及び診断キットに関するものである。本発明は、骨格筋細胞には存在せず心筋細胞に存在し、心筋疾患診断のための容易かつ正確な診断マ-カ-として作用するミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイムを使用する免疫学的製剤及び心臓疾患用の診断キットを提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項1】**

免疫グロブリンは、ヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイム及びその一部を含む免疫原に対して反応性を有する動物種で生成されることを特徴とする、ヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイムA2及びA3とその一部に対して特異的な免疫グロブリン。

【請求項2】

ヒト臓器から又は遺伝子組み替え形態から得られた前記ヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイムは、ヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイム2 (AK2)またはミトコンドリアのアデニレートキナーゼアイソザイム3 (AK3)である、請求項1記載の免疫グロブリン。

【請求項3】

前記免疫グロブリンは、IgA、IgG、IgM、IgD、IgE、IgY、Fab、Fab'及びF(ab)'₂の断片から選ばれる、請求項1または請求項2記載の免疫グロブリン。

【請求項4】

前記動物種は、ポリクローナルである、請求項1又は請求項2記載の免疫グロブリン。

【請求項5】

前記動物種は、モノクローナルである、請求項1又は請求項2記載の免疫グロブリン。

【請求項6】

請求項1の免疫グロブリンと検出マーカーの結合の形態で構成された、心臓疾患診断用免疫学的製剤。

【請求項7】

前記検出マーカーは、放射性同位元素の標識、酵素、化学発光化合物(chemoluminescent compound)、フルオレセイン、フィコプロテイン、希土類キレート、ロダミンなどの蛍光物質、酵素補助因子(enzyme cofactor)、ストレプトアビジン及びビオチンからなる群より選ばれる、請求項6記載の心臓疾患診断用免疫学的製剤。

【請求項 8】

請求項 6 の免疫学的製剤と生物学的試料を接触させて、前記の結合された免疫グロブリンマーカ―を検出する、生物学的試料中のアデニレートキナーゼアイソザイムを検出する方法。

【請求項 9】

前記生物学的試料は、人体から分離された尿、血液、血清又は血漿である、請求項 6 の生物学的試料中のアデニレートキナーゼアイソザイムを検出する方法。

【請求項 10】

請求項 1 の検出マーカ―と結合した免疫グロブリンと製薬学上許容範囲である担体を含む、心臓疾患診断キット。

【請求項 11】

前記検出マーカ―は、放射性同位元素の標識、酵素、化学発光化合物(chemoluminescent compound)、フルオレセイン、フィコプロテイン、希土類キレート、ロダミンなどの蛍光物質、酵素補助因子(enzyme cofactor)、ストレプトアビジン及びビオチンからなる群より選ばれる、請求項 10 記載の心臓疾患の診断キット。

【請求項 12】

前記診断キットは、更に陽性対照群(positive control)又は陰性対照群(negative control)を含む、請求項 10 記載の診断キット。

【請求項 13】

検体試料中のアデニレートキナーゼアイソザイムを検出するにあたり、次の段階、

(a)検体試料と対照試料(control sample)を各々抗-アデニレートキナーゼアイソザイム抗体またはその一部と反応させて免疫複合体を形成させる段階；

(b)上記段階(a)によって形成された免疫複合体を検出する段階；及び

(c)検体試料と対照試料の検出結果を比較する段階を含む、

検体試料中のアデニレートキナーゼアイソザイムの検出方法。

【請求項 14】

前記ヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイムは、ヒトミトコン

ドリアアデニレートキナーゼアイソザイム2 (AK2)またはヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイム3 (AK3)である請求項13記載の検体試料中のアデニレートキナーゼアイソザイムの検出方法。

【請求項15】

前記検出段階は、免疫蛍光抗体法、酵素-気質発色法、化学発光物質結合法、金粒子(gold particle)複合法のいずれかの方法により行われる、請求項13又は請求項14記載の検体試料間中のアデニレートキナーゼアイソザイムの検出方法。

【請求項16】

前記対照試料は、免疫蛍光抗体法、酵素-気質発色法、化学発光物質結合法、金粒子(gold particle)複合法のいずれかの方法により陽性と判別される血清である、請求項13又は請求項14記載のアデニレートキナーゼアイソザイムの検出方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明はヒトのミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイムを用いた免疫学的製剤及び心臓疾患の診断キットに関するもので、さらに詳細には心筋梗塞、狭心症のような心臓疾患の診断指標として心筋特異的な発現を有するアデニレートキナーゼアイソザイムAK3を利用することを特徴とする免疫学的製剤及び診断キットに関するものである。AK3を利用することにより、判別力が優れ、誤診の可能性が少なく、診断が容易かつ正確となる技術である。

【0002】**(従来技術)**

40代以後の成人病の一種として急性心筋梗塞を含む心臓疾患が頻繁に発生しており、このような心臓疾患による死亡者も世界的に増加している。国内の総合病院と大学病院でも月平均一病院当たり200回以上の心臓疾患の診断が行われている。アメリカでは年数百万に至る人々が胸部痛症で病院救急室を訪れている。

【0003】

従来、胸部痛症患者の心臓疾患を診断する一般的な方法は、心電図を使用することである。心電図(ECG又は心臓の超音波)を使用して心筋梗塞を診断する場合、心電図のQ波と非正常的なST-T波の変化で心筋梗塞を判定した。しかし、急性心筋梗塞で救急室を訪れる患者の中で約50%の以上が誤診を受け、5%の心筋梗塞症の患者が救急室から帰宅でき、16%の患者がこのような誤診により死亡していた。

【0004】

このような諸問題を解決するために、心筋梗塞に対する種々の生物学的マーカーが開発され始めた。心筋梗塞に対する理想的な生物学的マーカーは次のような特徴を有することが望ましい。第一番目は心筋細胞にのみ存在するものであり、心筋の壊死に伴い血液内へ放出されなければならない。第二番目は心筋が損傷した後、早く血液内へ放出されなければならないが、これは生物学的マーカーの分

子の大きさと細胞分布に依存する。第三番目は心筋傷害の程度と放出された生物学的マーカーの量の間には線形的な比例関係があるべきである。第四番目は分析するときに特別な訓練や技術が要求されることなく、また検査に必要な試薬が廉価で安定的でなければならない。第五番目は胸痛を感じた後、血液内に生物学的マーカーの量が増加されるべきである。第六番目は放出された生物学的マーカーは連続的な心筋梗塞を確認することができるように、迅速に除去されるべきである。しかし、不幸にも、このような条件を全部満足する生物学的マーカーは存在しない。

【0005】

現在、生物学的マーカーを利用する心筋梗塞症の診断にはクレアチンキナーゼ (CK) 質量分析 (mass assay) とトロポニンテストが活用されている。CKは筋肉組織中ではMM型、脳及び脊髄中ではBB型、そして骨格筋や心臓筋中ではハイブリットのMB型を有するので、組織損傷や癌に対する指標としてこれらの血清濃度が活用される。特に、CK MBは急性心筋梗塞症の程度を現す酵素として知られており、これらは火傷及び外傷から心臓及び骨格筋疾患に至るまですべての筋疾患において、血液力価の約5%の変化レンジを示す。しかし、CK MBを利用する心筋梗塞の診断方法は、問題点を有し、約20%の程度の偽りの結果 (false signal) が現れて正確度が落ちる短所があるため、完璧な診断手段にならない。現在、世界保健機構 (WHO) の基準による心筋梗塞の診断根拠は (1) 典型的な胸痛、(2) ECGのQ波の異状、(3) 前述する酵素学的最大正常数値2倍以上の酵素流出量増加であり、この中で二つが該当するとき心筋梗塞と確定診断するようになっている。

【0006】

一方、ネルボイスら (Boyce N. et al., (1996) Clinical Laboratory News 22 (1), 1-14) は、上記のような従来の心臓損傷マーカーとしてクレアチンキナーゼ (CK MB) を使用する方法の誤診可能性を減らすために、心臓トロポニン (cTnT) テストを開発した。この方法はFDA (United States Food and Drug Administration) から公認されて、Boehringer Mannheim Diagnostics社 (Mannheim, ドイツ) によって製品化され、アメリカでは1996年11月から使用

されているが、骨格筋由来のトロポニンTと交差反応性があることが確認されて、現在トロポニンIテストを使用している。しかし、cTnT及びcTnIの場合、胸痛後12-24時間後に放出されるので、早期マーカーとしては使用することができなかった(Eisenbrey et al, (1995) The Journal of American Medical Association, 74, 1343-1344)。従って、これらの方法も満足な代替法ではなく、CK-MBテストの補助手段で使用されるだけである。又、上記のすべての診断方法は高価な分析装置と心臓専門医及び高度の訓練を受けた人が必要であるため、少数の大学病院及び総合病院にのみ活用可能とされるに留まり、さらに検査費用が高価であるという問題点を有する。さらに、トロポニンの場合、大韓民国国内では医療保険の適用は1回に限られるため、持続的な検査を必要とする患者たちの使用が制限されているのが実情である。

【0007】

以上のように、現在まで利用されてきた心臓疾患診断のための従来の生物学的マーカーは、正確度及び検査の便宜性の面で満足できるものではなく、従って、より正確で迅速な診断を可能にするとともに高価な分析装置を必要とせず、小規模の病院及び個人が容易に検査することができる心筋損傷についての新しい診断指標(diagnostic indicator)の開発が切実に要求されている。

【0008】

(発明の開示)

本発明の目的は、上述した従来の技術の技術的要求に対応するもので、上記の理想的な心筋梗塞の診断指標の条件を全部満足させる診断指標候補物質が特に心筋細胞中に存在し、さらに細胞レベル下(subcellular)の分布が相異なるヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイムを特異的に認識する抗-AK抗体を利用することによって正確性及び感度が優秀で検査を容易にするヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイムを利用した心臓疾患と心筋梗塞診断用の免疫学的製剤及び診断用キットを提供することである。

【0009】

すなわち、本発明は、ヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイム(AK)及びこれらの一部に対して特異的な免疫グロブリンを提供し、該免疫グ

ロブリンは、ヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイム(AK)及びその一部を含む免疫原に対して反応性がある動物種から生成されるものである。

【0010】

さらに、本発明は、本発明の免疫グロブリンと検出マーカの結合形態で構成される免疫学的製剤を提供する。

【0011】

さらに、本発明は、検出マーカが結合する本発明の免疫グロブリンと製薬学上許容範囲内の担体を含む心臓疾患用診断キットを提供する。

【0012】

本発明は、

(a) 検体試料と対照試料(control sample)を各々抗-アデニレートキナーゼアイソザイム3(AK3)抗体又はその一部と反応させて免疫複合体を形成させる段階；

(b) 上記段階(a)によって得られた免疫複合体を検出する段階；及び

(c) 検体試料と対照試料の検出結果を比較する段階を含む、検体試料のヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイム3(AK3)の検出方法を提供する。

【0013】

(発明を実施するための最良の形態)

以下、本発明を添付図面を参照し、更に詳細に説明する。

本出願で“生物学的試料(biological sample)”とは、体液又は体液の一部を意味し、具体的には人体から分離される尿、血液、血清、血漿を含む。

【0014】

本出願で“検出マーカ(detection marker)”とは、免疫複合体の検出のためのマーカを意味し、具体的には、放射性同位体標識、金の粒子、酵素、化学発光化合物(chemoluminescent compound)、フルオレセイン、フィコビリプロテイン、希土類キレート、ローダミンのような蛍光物質、酵素補助因子(enzyme cofactor)、ビオチン、ストレプトアビジン等を包含するが、必ずしもこれらだけに

限定されるのではない。

【0015】

本出願で“モノクローナル(monoclonal)”とは、単クローンハイブリドーマ細胞系及び単一形態の抗体を生成できる系から誘導された免疫グロブリン細胞を意味し、ハイブリドーマ細胞ラインのような細胞融合の結果として生成される。

【0016】

本出願で“ポリクローナル(polyclonal)”とは、免疫原にたいして一般的に多重の親和性を有する多数形態の細胞から誘導される免疫グロブリンを生成できる系を意味し上記免疫グロブリンは一般的に後天的免疫性を有する動物の生体内で合成される免疫グロブリンを意味する。

【0017】

本願で“ミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイム”とは、ミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイム2(AK2)及びミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイム3(AK3)のようなミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイムそれ自体、これらの遺伝子組換え蛋白質及びこれらの人工変異体及び突然変異体を意味する。また、“ミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイムの一部”というものはミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイムの抗体反応性部分(antibody-reactive portion)を包含するミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイムの切断ペプチド断片を意味する。

【0018】

アデニレートキナーゼ(AK)は、下記反応式で示すような細胞内のXTP、ADP及びAMPの可逆的リン酸転移反応を触媒することによりアデニンヌクレオチド間の迅速な動的平衡を維持させる酵素である。

【0019】

(反応式 1)



(XTPは、ATP又はGTPを表す)

【0020】

上記酵素は細胞代謝活性及び信号伝達と関連するリン酸化反応に必須的とされる

酵素中の一つである。更に、エネルギー代謝、アポトーシス(apoptosis)、腫瘍発生(tumorigenesis)等に関与する酵素として知られており、生物系で約40余種が報告されている(Matsuura, S., Igarashi, M., Tanizawa, Y., Yamada, M., Kishi, F., Kajii, T., Fujii, H., Miwa, S., Sakurai, M., & Nakazawa, A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 10148-10152)。

脊椎動物の細胞には、図1に示す通り、細胞質に存在するAK1(EC2.7.4.3)、ミトコンドリアの膜間スペース(mitochondria intermembrane space)に存在するAK2、ミトコンドリアマトリックスに存在するAK3(EC 2.7.4.10)等の3種類のアイソザイムが多様なサブタイプとして存在している(Kuby S.A., Palmieri, R.H., Frischat, A., Wu, L.H., Maland, L., & Manship, M. (1984) *Biochemistry* 23, 2392-2399; Sachsenheimer, W., & Schulz, G.E. (1977) *J. Mol. Biol.* 114, 23-36; Egner, U., Tomasselli, A.G., & Schulz, G.E. (1987) *J. Mol. Biol.* 195, 649-658)。

【0021】

推定上のヒトAK3は、ウシ及びネズミのAK3の類似性に基づいて同定される。しかし、ヒトAK3 cDNAは、新規に同定されたネズミA4遺伝子と、より近似しており、従ってヒトAK3遺伝子は、AK4と改めて命名された[Yoneda, t., Sato, M., Maeda, M., Takagi, H. (1998) Identification of a novel adenylate kinase system in brain; cloning of the fourth adenylate kinase. *Mol. Brain. Res.*, 62, 187-195]。

本文献において、我々は名前AK3をAK4に代えて使用する。これは、ネズミのAK4は、脳型アイソザイムであるが、AK3はヒトの脳には存在しないからである。ヒトにおいては、AK5が近年、脳型アイソザイムとして同定された。

【0022】

ヒト遺伝子のAK2(hAK2)内の二種類のサブタイプのAK2A及びAK2Bの遺伝子が各々クローニングされ、さらに hAK1及びhAK2のmRNAが心筋、骨格筋、肝臓等のいろいろな組織で確認された(Lee, Y., J.W.Kim, I.A.Lee, H.B.Kang, Y.K.Choe, H.G.Lee, J.S.Lim, H.J.Kim, C.K.Park, 及びI.S.Choe, (1996) *Biochem. Mol. Biol. International*, 39(4), 833-842)。又、これらの遺伝子の産物は、組織特

異的発現様相を現し、AK1の場合には、心筋と骨格筋ですべて発現されるが、AK2の場合には骨格筋では発現されないことが明らかになった(Lee、Y.、J.W.Kim、S.M.Lee、H.J.Kim、K.S.Lee、C.Park、&I.S.Choe (1998)J.Biochem.-Tokyo、123、47-54)。

【0023】

ヒトアデニレートキナーゼアイソザイム 3(AK3)は223個のアミノ酸よりなる燐酸転移酵素であり、ヌクレオシドトリホスフェートアデニレートホスホトランスフェラーゼ(nucleosidetriphosphate-adenylate phosphotransferase)とも称する。ヒトのAK3の遺伝子配列、及びアミノ酸の1次配列はXu等(Xu、G.、O'Connell、P.、Stevens、J.及びWhite、R.(1992)Characterization of human adenylylase kinase 3 (AK3) cDNA and mapping of the AK3 pseudogene to an intron of the NF1 gene. Genomics 13 : 537-542)により確認された。ヒトのAK3のアミノ酸配列を配列リストの配列番号1に示す。

ヒトのアデニレートキナーゼアイソザイム 3(AK3)は、反応式 2のような反応を触媒する(Chiga、M.、Rogers、A.E.、Paut、G.W.E.(1961)J.Biol.Chem.、236、1800;Albrecht、G.J.、(1970)Biochemistry、9:2426)。

【0024】

(反応式 2)



【0025】

そのうちAK3 酵素に関する研究は、他の酵素に比べて活発ではなく、AK3酵素の人体内での組織特異性はまだ報告されていない。

【0026】

人体中のAK酵素の遺伝的欠陥は、遺伝性の溶血性貧血を誘発することが明らかにされ、(Matsuura、S.、Igarashi、M.、Tanizawa、Y.、Yamada、M.、Kishi、F.、Kajii、T.、Fujii、H.、Miwa、S.、Sakurai、M. and Nakazawa、A. (1989) J. Biol. Chem. 264、10148-10152) 筋肉及び脳組織中でクレアチンキナーゼとAKとの相互作用により焦性リン酸チアミンが生合成されることが明らかにされた。

【0027】

本発明者らは、AK3も、AK2のように心筋では発現されるが、骨格筋では発現されなかったことを最初に確認し、これを心筋梗塞のような心臓疾患の診断に応用した。

【0028】

本発明者らは、ヒトの筋組織からミトコンドリアアイソザイム、AK2(hAK2)とAK3(hAK3)各々の遺伝子をクローニングして、pQE-AK2及びpQE-AK3発現ベクターを構築し、形質転換大腸菌の培養により遺伝子組換えAK2及びAK3を大量に分離精製して、1.1mgのAK2/L培養液と9.8mgのAK3/L培養液の遺伝子組換え大腸菌(E. coli)発現系に到達した。

【0029】

遺伝子組換えhAKアイソザイムの確認は、アミノ酸成分分析により確認される。hAK2の特異的活性は1,000 U/mg、pI値は6.6であり、hAK3の特異的活性は400mU/mg、pI値は>11.7であることを確認した。このような物理化学的特性は牛の肝臓から単離したAK3アイソザイムの報告された値と類似である。

【0030】

AKアイソザイムの生理的機能を見出すために、まず組織特異的発現様相を検討するため、hAK1、hAK2及びhAK3を使用してポリクローンウサギ抗血清を各々誘導し、アイソザイム相互間の交差認識抗体を除去して、抗-hAK1、抗-hAK2及び抗-AK3抗体を得た。前記抗体を使用してパラフィンに包埋された組織(paraffin embedded tissue)に対する免疫組織化学検査(immunohistochemistry)の結果、hAK1の場合は全組織で検出されたが、hAK2は肝臓、脳、心筋、腎臓、肺のみ、また、hAK3は肝臓、心筋、腎臓、肺のみで検出された。特に、脳、心筋及び骨格筋に対するウェスタンブロット分析でも、AK1は脳骨格筋、心筋の両組織で確認されたが、AK2とAK3は骨格筋では発現されず、心筋特異的である発現を示すことを確認した。従って、アデニレートキナーゼアイソザイムの分布パターンが生体組織部位によって特に、心筋と骨格筋で異なるという点は、心筋細胞傷害と関連した循環器疾患に対する臨床的指標(clinical marker)としての活用可能性が極めて高いことを立証するものである。

【0031】

本発明の免疫グロブリンは、ヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイム(AK)及びその一部を包含する免疫原に対して反応性を有する動物種で生成されることを特徴とする。望ましくは、上記ヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイムは、ヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイム 2(AK2)及び ヒトミトコンドリアアデニレートキナーゼアイソザイム 3(AK3)である。このように本発明で用いる免疫グロブリン(モノクローナル又はポリクローナル)は IgA、IgG、IgM、IgD、IgE 又はIgYに限定されず、全ての形態の免疫グロブリンが使用可能である。又、完全な抗体を使用する必要はなく、抗原結合部位を包含する抗体の断片、たとえば Fab、Fab'、又は F(ab)'₂ のような断片も使用することができる。

【0032】

このようなアデニレートキナーゼアイソザイムに対する特異的である免疫グロブリンは、精製されたアデニレートキナーゼアイソザイムで免疫された動物の血清から、または動物の脾臓リンパ球と骨髄腫細胞との融合により生成されたハイブリドーマ細胞から、又は試験管内で形質転換させたリンパ球から得られる。具体的に、アデニレートキナーゼアイソザイムに対する特異的であるモノクローナル抗体は、本発明が属する技術分野においてよく知られている融合方法(fusion method)により製造できる。(たとえば Kohler及び Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 参照)。上記モノクローナル抗体は、2000年5月19日に韓国細胞主研究財団(KCLRF)に寄託されてKCLRF-BP-00030の受託番号を付与された。このような方法においては、抗体を分泌する "ハイブリドーマ"を作るために融合される二つの細胞群の一つはアデニレートキナーゼアイソザイムを注射したマウスのような免疫学的に適合な宿主動物からの細胞を用い、他の一つの細胞群としては、癌又は骨髄腫細胞ラインを用いる。このような二つの細胞群をポリエチレングリコールのような本発明が属する技術分野において広く知られている方法により融合させて、抗体-生産細胞を標準的な組織培養方法により増殖させる。限界希釈法(limited dilution technique)によるサブクローニングにより均質な細胞群を得てから、アデニレートキナーゼアイソザイムに対する

特異的である免役グロブリンを生産できるハイブリドーマを標準的な技術によって試験管で又はインビボで大量に培養する。

【0033】

このような方法により得られたモノクローナル抗体は、精製しないで使用することもできるが、最善の結果を得るためには、本発明が属する技術分野においてよく知られている方法により高純度で精製して使用することが好ましい。このような精製技術としては、塩沈澱(salt precipitation)、イオン交換クロマトグラフィー、又は親和性クロマトグラフィー等がある。

【0034】

本発明で用いるポリクローナル抗体は、精製されたアデニレートキナーゼアイソザイム 2又は 3を動物に注射し、当該動物から収集した抗体を包含する血清を得る従来の方法により、生産することができる。このようなポリクローナル抗体は、当技術分野で知られているいかなる方法によっても精製されることができ、山羊、兎、羊、猿、馬、豚、牛、犬等の任意の動物種の宿主から得ることができる。

【0035】

本発明においてアデニレートキナーゼアイソザイムを、従来の方法により単離して使用したり、そのいろいろな断片を既存の遺伝工学技術により生合成することができる。又、アデニレートキナーゼアイソザイム3ペプチドを、有機蛋白質合成技術により化学合成することもできる。

【0036】

本発明の他の具現例においては、上述した本発明の免役グロブリンと検出マーカーが結合された形態で構成される免疫学的製剤を提供する。このような免疫学的製剤に関し、検出マーカーは、放射性同位元素標識、金の粒子、酵素、化学発光化合物(chemoluminescent compound)、蛍光物質、酵素補助因子(enzyme cofactor)、ストレプトアビジン、ビオチンから成る群より選ばれることができる。

【0037】

本発明において、アデニレートキナーゼアイソザイムに対する特異的な抗体は

、血液又は其の他の体液を包含する生物学的試料中のアデニレートキナーゼアイソザイムの存在を測定するのに使用される。特に、本発明の免疫学的製剤と生物学的試料とを接触させて、上記結合した免疫グロブリンを検出することによって、生物学的試料内のアデニレートキナーゼアイソザイム(AK)の存在を決定することができる。本発明に用いる検出方法は特別に制限されず、たとえば、マイクロタイタルプレート又は96-ウェルプレートに抗体を附着させて血清試料を反応させた後、2次抗体を附着させて酵素的に発色させるサンドイッチ ELISA(sandwich enzyme-linked immunosorbent assay)の方法により、また、ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動による単離された蛋白質をニトロセルロース又はPVDF膜にブロッディングして抗体を反応させるアッセーがある。

【0038】

本発明の心臓疾患診断キットは本発明の免疫グロブリンと製薬学上許容可能なキャリアーとを含む。診断キットを製造するために、蛋白質成分を変えるべきであるので、本発明のキットはパッチ(patch)タイプ又はストリップタイプで製造されることができる。たとえば、本発明の心臓疾患診断キットには、入ったアデニレートキナーゼアイソザイムとアデニレートキナーゼアイソザイムに対する特異的な抗体を各テストサンプル中に含むことができる。アデニレートキナーゼアイソザイム及びアデニレートキナーゼアイソザイムに対する特異的な抗体は、膜(membrane)類の固相(solid phase)に固定されることができ、標識(labeling)されることができる。酵素標識(enzyme label)を利用する場合、本発明のキットは酵素基質を含むことができる。免疫複合体をラベリングする第2の抗体を使用して分析する場合には、本発明のキットは、抗-アデニレートキナーゼアイソザイム抗体又はアデニレートキナーゼアイソザイムに対する特異的な第2の抗体を含むことができる。又本発明のキットは、適切な標準(standard)、陽性及び陰性対照(positive or negative control)及びその他の使用説明書等を更に包むことができる。

【0039】

本発明の他の例において、は(a)検体試料と対照試料(control sample)を各々抗-アデニレートキナーゼアイソザイム(AK)抗体又はその一部と反応させて免

疫複合体を形成させる段階；(b) 上記段階(a)により得られた免疫複合体を検出する段階；及び(c) 検体試料と対照試料の検出結果を比較する段階を包むことを特徴とする、検体試料内のアデニレートキナーゼアイソザイム(AK)の存在検出方法に関する。このような方法においては、上記検出段階は免疫蛍光抗体法、酵素-基質発色法、化学蛍光物質結合法、金粒子(gold particle)複合法によりなされることができ、上記対照試料には、免疫蛍光抗体法、酵素-気質発色法、化学発光物質結合法、金粒子複合法により陽性と判明された血清を利用することができる。しかし、本発明で使用可能な検出方法は必ずしも上記諸方法に制限されるわけではなく、その他当技術分野で一般的に使用されるいかなる検出方法も全て使用することができる。

【0040】

以下で本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、以下の実施例は本発明の保護範囲を制限するものと解されてはならない。

【0041】

例 1 ; AK3 遺伝子のクローニング

【0042】

ヒト骨格筋からトータル RNA 抽出

RNAを単離するために、100mgの筋組織に、1mlのRNAzol(4Mグアニジンチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム、0.5%サルコシル(salcosyl)、0.1M2-メルカプトエタノール)を添加して均質にした後、クロロホルム100 μ lを入れて15秒間震盪して、15分間氷中に放置した。細胞溶解質溶液を12,000xgで15分間遠心分離して、不溶の細胞残屑を除去して、上澄み層を新しいチューブに移した後、同量のイソプロパノールを添加して混合した後、-70の温度で15分間培養した。その後、該混合物を12,000xg, 4で15分間遠心分離して、RNAペレットを沈澱させた後、75%エタノールで洗浄して乾燥させた後、100 μ lのDEPC処理水を添加してトータルRNAを抽出した。

【0043】

RT-PCRによる AK3 cDNAの作成

上記単離したトータルRNA10.5 μ lと500ng/ μ lのオリゴdT1 μ l, 2.5mM dNTPs1.

5 μ l, 100 mM DTT 1 μ l, 200単位/ μ l MMLV 逆転写酵素1 μ l, 5X逆転写酵素緩衝液6 μ l, DEPC-処理水9 μ lを混合して総体積が30 μ lになるようにして42 °Cで30分間反応させて、75 °Cで30分間不活性化させた。PCR反応混合物の組成は、上記合成したcDNAをテンプレートcDNAとして使用した。2.5 mM dNTPs 8 μ l、5単位/ μ l Ex taqDNA ポリメラーゼ 1 μ l、10X DNA ポリメラーゼ 緩衝液10 μ l、センスプライマーとアンチセンスプライマー (100 pmol/ μ l) 各1 μ lを添加してから蒸留水を添加して全体の体積が100 μ lになるようにした。反応は98 °Cで10秒間変性、55 °Cで30秒間アニーリング、72 °Cで40秒間エクステンションさせ、この重合化鎖反応を35回繰り返した。この過程で二つのプライマー、すなわち 5'-GGATCCATGGCTTCCAAACTCCTGC-3' (sense) 及び 5'-CAGGGTCAATATGCTTCTTTGG-3' (antisense) を使用して、PCR生成物を1%アガロースゲル中で検出した。(図2)

【0044】

AK3サブクローニングベクター (pCR2.1-AK3) の構築

アガロースゲルから680 bpのAK3 PCR生成物をゲル抽出キットを使用して精製し、pCR 2.1 (invitrogen) PCRクローニングキットを使用してクローニングした(図3)。ライゲーション(結紮)混合物は、50 ngの線形 pCR 2.1ベクター 1 μ l、PCR生成物 5 μ l、4単位/ μ l T4 DNAリガーゼ 1 μ l、10X リガーゼ緩衝液 1 μ l、dH₂O 2 μ lを混合して総体積が10 μ lとし、16 °Cで12時間反応させた。構築するpCR2.1-AK3プラスミドを形質転換させるために、宿主細胞は大腸菌 (E. coli) 菌株JM109を使用した。JM109コンピテント細胞 (competent cell) 50 μ lに2 μ lのライゲーション混合物を入れて氷中で30分間放置した後、42 °Cで45秒間熱衝撃 (heat shock) をし、氷に2分間漬けて置いた後、SOC培地250 μ lを入れて 37 °C、225 rpmで1時間培養し、X-galとIPTGを含むLB/アンピシリンのプレートに100 μ lをプレティングして37 °Cで一晩培養した。

生成した白いコロニー中、10個のコロニーを選択して 50 μ l/mlのアンピシリンを含有するLB培地に添加して、37 °Cで一晩培養した。培養生成は、プラスミドprepキットを使用してプラスミドDNAを単離して、単離したプラスミド DNA 5 μ l、EcoRI 1 μ l、EcoRI 反応緩衝液 1 μ lとdH₂O 3 μ lを混合して1時間反応させた後、1%アガロースゲル中で電気泳動させてPCR生成物がサブクローニングし

たことを確認した(図4)。サブクロニングが正確になされたかどうかを確認するために、PCR生成物が挿入されたプラスミドを自動DNAシーケンサーを使用して塩基配列を確認した。このとき使用したプライマーとしては、M13逆方向プライマー(センスプライマー)とT7プロモータープライマー(アンチセンスプライマー)を使用した。

【0045】

例2 ; AK3の発現ベクターの構築及び組換えAK3の単離精製

【0046】

AK3遺伝子をサブクロニングするpCR2.1-AK3ベクターをBamHIとXhoIで二重切断(double digestion)した後、アガロースゲルから挿入体(insert)を溶離した。AK3の発現ベクターを作成するために、プラスミドpQE 30(Quiagene 製品)をBamHIとSalIで切断して、大きい断片をアガロースゲルから溶離して使用した。DNAフラグメントのライゲーションは、pQE30大きい断片 3 μ l、切断されたAK3断片 5 μ l、T4 DNAリガーゼ 1 μ l、10X リガーゼ反応緩衝液 1 μ lを混合して16 $^{\circ}$ Cで一晩培養することにより行った。形質転換に使用した宿主細胞は大腸菌(E. coli) M15であり、アンピシリンとカナマイシンが含有されたプレートにプレーティングして得られたコロニーをLB培地で一晩培養してプラスミドを単離した後、EcoRIで切断して挿入体の存在を確認した。(図5及び図6)。遺伝子の挿入が確認されたコロニーを、100 μ g/mlのアンピシリンが含有された 50 ml LB培地で一晩培養した後、50mlの培養生成物を他のLB培地1Lに接種した。37 $^{\circ}$ Cで1時間震盪培養した後、0.5-0.7単位の600nm可視光線吸収光度により、組換え細菌の成長を検出した。IPTGが最終的に 1mM濃度になるように添加して、更に4時間、組換えタンパク質の発現を誘導した。誘導された培養液を4,000xgで20分間遠心分離して、細胞ペレットを得た後、緩衝液(結合緩衝液 ; 5mMイミダゾール、0.5 M NaCl、 0.1% Tween 20を含有する 20 mM Tris/HCl、 pH 7.9) 50 mlに懸濁させて、-20 $^{\circ}$ Cで放置した。これを融解させた後、細胞を溶解させるために30秒間超音波破碎した後、1分間の休止期間であるサイクルを5回行い、4 $^{\circ}$ Cの温度 10,000xgで、30分間遠心分離して上層液を採取し、可溶性蛋白質が入っている粗抽出物を得た。

【0047】

発現したAK3を精製するために、キレート樹脂 (Pharmacia) を使用し、キレート樹脂をカラムでベッド体積 (bed volume) が5mlになるようにパッキングした後、蒸留水で5カラム容積程洗浄して、エタノールを除去した後、5カラム容積の充填緩衝液 (charge buffer ; 0.1% Tween 20を含有する50 mM NiSO₄) を使用してNi⁺をキレート樹脂に結合させた後、3カラム容積の蒸留水で洗浄し、5カラム容積の結合緩衝液で平衡化させた。得られた粗抽出物をローディングした後、10カラム容積の結合緩衝液で洗浄し、非特異的結合を除去するために5カラム容積の洗浄緩衝液 (60 mM イミダゾール、0.5 M NaCl, 0.1% Tween 20を含有する 20mM Tris/HCl、pH 7.9) で洗浄した後、5カラム容積の溶出緩衝液 (0.5 M NaCl, 1M イミダゾール、0.1% tween 20を含有する 10mM Tris/HCl, pH 7.9) で溶出した。この時すべての段階の流速 (flow rate) は、1ml/分となるようにした。精製されたAK3から塩を除去して濃縮させるために透析緩衝液 (0.1% Tween 20を含有する 10mM Tris/HCl, pH 7.9) で緩衝液を12時間に3回交換させながら塩を除去した後 PEG8000を使用して濃縮した。濃縮された蛋白質は、BCA蛋白質定量分析キットを使用して定量し、精製収率 (purification yield) を計算して下記表1に示した。精製されたAK3はSDS-PAGE分析 (図7) 又は抗体の精製及び生産に使用した。

【0048】

【表1】

組換え AK3 の精製

精製段階	全体の蛋白質(mg)	精製収率(%)
均質物(homogenate)	949.05	100
可溶性留分	178.75	18
Ni-キレート親和性クロマトグラフィー	14.3	1.5

【0049】

例3 ; 抗-AK3ウサギ抗体の製造及び精製

【0050】

体重 2 kgのNZW系ウサギ (雄) に、精製したAK3蛋白質 1mlとフロインド完全ア

ジュヴァント (Freund's complete adjuvant ; FCA) 1mlを乳化機シリンジ (emulsifier) で混合した後、得られたエマルジョンを静脈内 (i.v.) あるいは皮内 (i.d.) 方法で注射した。第一週には 50~100 μ g/mlの抗原エマルジョンをi.d.方法でウサギの多くの部位に初回抗原刺激注射 (prime injection) した。次の注射からは、2週間隔で、不完全フロインドアジュヴァント (I F A) で乳化した抗原 100 μ g/mlを、i.d.方法で2回、追加抗原刺激注射 (boosting injection) した。最終接種の1週後に、抗体生成を確認するためにウサギの耳の静脈から採血して、ドットブロッキング (dot blotting) により抗体生成を検査した。第五週には、蛋白質 100 μ gを i.d.方法で注射した。第六週には、追加抗原刺激のためアジュヴァントを混合しなかった蛋白質溶液 (20 μ g/ml) を i.v.方法で注射した。そして、24時間絶食させた後、心臓穿刺により心臓から採血して血清を分離した。

【0051】

採取した血液をガラス容器に入れて室温で1時間放置して凝固 (clotting) させた後、4 で6時間定置した後、凝固した部分を4 、2,500xgで30分間遠心分離して、上層血清部分を単離した。分離した血清を下記の抗体精製方法により精製して、AK3と相同性が高いアイソザイム AK1とAK2に対する交差反応性抗体を除去して、ポリクローナル抗 - A K 3抗体を精製した。各500 μ lの血清アリコートで-80 で保管しながら、患者血清のスクリーニングのための生化学分析に使用した。

【0052】

抗A K 3ポリクローナル抗体精製方法は、下記のような方法である。

単離したウサギ血清に、抗体の回収率の高いCM Affi-ゲルブルー親和性クロマトグラフィーを、適用した。CM Affi-ゲルブルー樹脂を、1.4M NaClと40%イソプロパノールを含む0.1 Mの酢酸 (pH 3.0) で洗浄し、次い蒸留水で洗浄して、ガラスカラム中にパッキングした。PBSでカラムを平衡化した。抗-血清をカラムにローディングした後、初めて現われた全体ピークの溶出物を集めて、硫酸アンモニウム濃度45%の飽和条件で硫酸アンモニウム沈澱により、免疫グロブリンを得た。これらの免疫グロブリンの中でAK3に対して特異性を有し、AK1及びAK2と

交差反応性がないAK3にたいする抗体を得るために、精製したAK1 (図 8)、AK2 (図 9) をaffi-ゲル15 (BIO-RAD) に、AK3をaffi-ゲル10 (BIO-RAD) にカップリングして、親和性クロマトグラフィーを準備した。AK1とAK2そしてAK3が各々ローディングされた親和性カラムクロマトグラフィーを、順次的に連結した後0.5M塩化ナトリウムを含有した0.1M磷酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) で平衡化させた。非特異的結合抗体を除去するために、1M KClを含有する0.1M磷酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) で洗浄し、最終的にAK3特異性抗体を0.1Mグリシン/HCl (pH2.5) で溶出させた (図 10)。該溶出物を、1/20容量の2M Tris/HCl (pH7.5) に添加して、強酸性を中和した。このように精製されたAK3特異的ポリクローン抗体は、PBS中で透析された後、4℃で保管され、ウェストンブロッディング分析のときに使用した。

【0053】

調製されたアデニレートキナーゼアイソザイム抗体 (抗-AK1 Ab, 抗-AK2 Ab 及び 抗 -AK3 Ab) に対する AK1、AK2及びAK3抗原を、下記の方法によりウェストンブロッディング分析して、相互間の交差反応性がないことを確認した (図 11 及び図 12)。精製した組換えAKを電気泳動する場合には、一般的な Laemmli のSDS-PAGEを施行し、置換していない (非還元 ; nonsubstitution) 条件の場合では、変形の本来の (native) ゲル電気泳動実施した。ウェスタンブロッディングはSDS-PAGEまたは変形されたnativeゲル電気泳動を終えた後に、ゲルホルダー上ファイバーを設置してからその上に慮過紙をおいて、エタノールで処理したPVDF膜を設置した後、その上にゲルをおいてからファイバーで覆って転移サンドイッチ (transfer sandwich) を作った。転移サンドイッチ (Transfer sandwich) を、冷却装置を備えた緩衝液タンクに入れて、一定電力 (90 V, 0.8 A) を2時間かけた。事前に染色したマーカー (prestained marker) を検査した後、ゲルのホルダーから PVDF膜を取って、脱脂粉乳を5%含有したTBSTブロッキング溶液に漬けて、2分間弱く震盪した。蛋白質がプロットされたPVDF膜を適当な濃度の抗-AK3抗体溶液に浸漬して、1時間室温で震盪した。当該抗体結合膜をTBSTで2回洗浄して、非特異的な結合抗体を除去した。洗浄したPVDF膜をワサビダイコンのペルオキシダーゼ共役 (conjugated) 抗ラビット抗体溶液で1

時間37 で処理した。膜からTBSTを完全に除去した後、ECLウェストンブロッキング分析キットを使用して反応させた後、X-線に露出させて現像した。

【0054】

例4；患者の血清からAK3の確認

【0055】

上述したウェストンブロット分析方法で、骨格筋と心筋中の組織分布を調査して見た結果、AK1は骨格筋と心筋の両方に存在し、AK2とAK3は心筋にのみ存在した(図13)。このようなAK2とAK3の心臓組織に対する特異性は、心筋梗塞のような心臓疾患の診断を可能にする生物学的マーカーとしての可能性を提示する。そこで心筋梗塞患者の血清のAK2とAK3の測定に関して検査するために、患者血清を還元条件と非還元条件各々電気泳動した後、ウェストンブロッキングで確認した(図14)。これにより、AK2とAK3の存在は、これらの条件の置換(substitution)のもとでは、血清タンパク質との非特異的結合により、ウェストンブロッキングにおいては確認することができなかった。SDS-DAGE条件下ではAK2は確認することができなかったが、AK3は精製されたAK3と同じ位置に心筋梗塞患者の血清からバンドを確認することができた。しかし、非特異的な多数のバンドが常に検出されたのでAK3のみを確認することができる新しい電気泳動方法を開発した。新しい電気泳動の方法は、従来のアクリルアミドゲル電気泳動を施行するときの電流の一般的な方向に反して逆方向で流れるようにする方法で、nativeゲルはモノマー溶液(40%T 5%Cbis)2ml、4X分離ゲル緩衝液(158 mM Tris, 0.256 N H_3PO_4 pH 6.9)2.5 ml、 H_2O 4.25 ml、触媒(0.06% 硫酸アンモニウム、0.02% リボフラビンホスフェート)1.25 mlとTEMED 20 μ lで構成されており、試料は、血清1 μ lにDW8 μ lと試料緩衝液(50% サッカロース、0.1% ブロモフェノールブルー)1 μ lを混合してローディングし、タンク緩衝液(25 mM Tris, 5.5% グリシン)中で20 mAの電流を2時間逆方向にながした。

【0056】

上記の方法で、患者血清と正常血清と精製されたAK1、AK2そしてAK3をローディングしてゲル上でAKらの移動方向を検討した結果、塩基性が強いAK3はゲル内部へ、AK1及びAK2はタンク緩衝液へ拡散されることを確認した。(図15)。

【0057】

例 5 ; 抗 AK-2及び抗-AK3モノクローン 抗体の製造

抗-AK3及び抗-AK2単クローン抗体に関し、4週齢のBalb/c (H-2dハプロタイプ) マウスに、50ugの抗原蛋白質溶液と同じ体積のフロイント完全アジュヴァントとを混合することにより得られたエマルジョン (0.1ml) を、両足裏(Foot pad) に1次注射し、10日おきに2回、追加で接種した。追加接種の場合、免疫補助薬は不完全アジュヴァントを使用した。マウスの血清中に抗体が生成したことを確認した後、リンパ節(Lymph node)を切取して、牛胎児血清(fetal calf serum)、IL-2、ペニシリン�ストレプトマイシン(Penicillin-Streptomycin)等を含有したDMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)培養液で細胞懸濁液(cell suspension)を作った後、かかる細胞懸濁液中のB細胞と前もって準備した同じマウス系列の腫瘍細胞の Sp2/0-Ag14 細胞系とPEG処理により細胞融合をさせた。免疫細胞(Immune cell)とSp2 細胞を各々 1.5×10^8 細胞ずつ分取して、50 ml 遠心分離チューブ (centrifuge tube)に入れて、400xgで10分間遠心分離してペレットを形成させ、上層液を除去した後、37 °C の 50% PEG1500溶液を 1 ml 添加して、ピペットの端で1分間慎重に混合してかき混ぜてから、追加で37 °C の血清を包含しない培地を 1 ml 添加して1分間、そして、無血清培地(serum-free medium)を続けて添加しながら混ぜて、PEGによる細胞溶解が起こらないように、徐々に稀釈した。最後に、7 mlの無血清培地を添加して3分ほど攪拌した。細胞を洗浄した後、20 mlの培養液を添加して十分に細胞を分散させ、96-ウェル組織培養プレートに 0.1 ml ずつ分株して、これを37 °C、7% CO₂ インキュベートで24時間培養してマスタプレート(master plate)を作成した。

【0058】

ハイブリッド細胞(Hybrid cell)の選別は、HAT(Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine)培地での生存能を利用して実施した。細胞融合を実施した翌日に、各ウェルに0.1 mlの HAT培地を添加した。そして 2、3、5、8 及び 11日目に培養液を半分ずつアスピレートし、新しい0.1 mlのHAT培地を部分交換した。以後 3-4日おきに同じ操作を反復し、4週経過後、生存したウェルの細胞らを全部独立して選別し、これらの上層液を取って、AK3を処理した96ウェルマイクロ-タ

イタールプレートを使用してELISAを施行し、これらの内、405nmの吸光度が0.3以上であるウェルらだけを1 mlの培地 (culture)を用いて選択した。24-ウェル組織培養プレートに選択した細胞を移動して、1mlのスケールでBalb/c由来の供与細胞(feeder cell)(Balb/cの脾臓細胞を赤血球溶解操作後 ミトマイシンで処理した細胞懸濁液)と一緒に HATの代わりに、HT培地条件で15日にわたって 2 ml、10mlの培地で増殖させ、この段階で限界希釈法(limiting dilution method)によってハイブリドーマ細胞のクローニングを試図した。

【0059】

96-ウェルマイクロ-タイタールプレートで、36ウェルには 5細胞/ウェル、又異なる 36ウェルには 1細胞/ウェル、そして残りの24ウェルには 0.5細胞/ウェルの密度で希釈させ、培養 5日後と12日目にパッシング(passing)を実施し、1 mlの培養スケールまで前述したように増殖させた。単クローン性の抗体が誘導されたものと思われるウェルの培養上層液を選別して、抗体スクリーン(antibody screen)を ELISAにより実施し、本段階でAK1及びAK2に対する交差反応性(cross-reactivity)を示すクローンを除去し、AK3だけを特異的に認識するハイブリドーマ細胞を厳選して抗-AK3モノクローン生成細胞系として区別した。最終的に選択されたハイブリドーマを、 5 ml培養フラスコへ移して増殖培養を施行した。

【0060】

作成された細胞系からの単クローン抗体の生産は、ハイブリドーマ細胞を、培地中にmAbをセアト(sereted)した補助剤(10%胎児ウシ血清、HAT、ペニシリン及びG418)を有するRPMI 1640中で培養した。モノクローン抗体を培地から単離して精製した(1 ml培地あたり25 µgの抗体)。代わりにmAbをねずみの腹水から誘導した。ハイブリドーマ細胞をDMEM培養液で、5%二酸化炭素存在下で培養し、3日後 2×10^6 個の状態が良好な融合細胞をBalb/cマウスに腹腔注射して腹水(ascites)腫瘍を誘発させ、腹水から抗体を誘導し、AK3親和性カラムクロマトグラフィー(affinity column chromatography)により、0.8 mg 抗体/mlの収率で分離精製した。

【0061】

例6；AK3抗体を利用する心筋梗塞の診断と心筋梗塞に対する生化学マーカーとしてのAK3の有用性

【0062】

筋肉組織に関するAK3の発現様相は、心筋に特異的であることを図13で確認することができた。心筋の傷害によってAK3が血液中に放出されることができるとを考慮して、本例では一般の救急室の外来患者から収集した血清試料を利用して、AK3を心筋梗塞の診断マーカーとして活用することができるかどうかを実験した。

【0063】

血清試料は30個体とし、ケース別疾患名を表2に示した。この中で心筋梗塞の患者は急性4名と慢性1名を含んで5名で、臨床病理検査室で各血清のCKMBユニットを測定した。参考に定常人の血清のCKMBユニットは7以下である。

【0064】

前記方法で、29名の患者の血清を抗-AK3抗体を利用するウェストンブロッディング分析により行った結果、心筋梗塞症の患者にとっては、CKMBの濃度と一致してAK3の検出が確認された(図16)。しかし、足の骨折の手術患者の場合、CKMBが44単位で偽陽性(false positive)だったが、AK3は検出されなかった(図16、パネルB、レイン8)。又、脳出血の手術患者22番(表2)のCKMBの数値は56.3で数値が高すぎたが、心臓異常は確認されず、本方法ではAK3が検出されなかった。このような結果は抗-AK3抗体を利用したAK3の検出が、心筋梗塞の診断においてCKMBより正確性が優位であることを立証する。従って、心筋梗塞(急性又は慢性)の診断において抗-AK3抗体を利用する免疫学的製剤又は診断キットは、既存のCKMB、ミオグロブリンを利用する診断の手段より正確であることが確認され、本発明の抗体による診断キットは臨床的に心筋梗塞に特異的であることを確認した。

【0065】

【表2】

患者番号	病名	性別 / 年齢	CKMB の数値	AK3 検出 有無
0	定常 対照 血清	M/26		-
1	安定 狭心症	M/62	2.7	-
2	不安定 狭心症	M/53	4.6	-
3	腹膜炎 手術	M/54	7.3	-
4	急性 心筋梗塞	M/56	22.1	+
5	盲腸炎 手術	F/32	3.0	-
6	心房 細動	M/45	3.3	-
7	虚血性 心筋症(心筋梗塞 病歴者)	M/78	2.8	-
8	食道 癌	M/55	1.1	-
9	足 骨折 手術	M/25	44.0	-
10	不安定 狭心症	M/67	3.6	-
11	心室 衝撃 欠損 手術	M/34	8.5	-
12	喘息	M/76	9.2	-
13	急性 心筋梗塞	M/40	40.4	+
14	不安定 狭心症	M/67	2.5	-
15	不安定 狭心症	M/58	5.8	-
16	心室 衝撃 欠損 手術	M/34	12.8	-
17	腹膜炎 手術	M/85	5.6	-
18	心筋梗塞	M/41	18.0	+
19	重症 筋無力症	F/45	6.2	-
20	不安定 狭心症	M/67	0.7	-
21	肺癌	M/79	2.7	-
22	脳出血 手術	M/25	56.6	-
23	腸破裂 手術	M/64	4.6	-
24	心筋 肥大 糖尿	M/67	2.9	-
25	不整脈	F/52	2.7	-
26	多発性 肋骨 骨折	M/18	3.9	-
27	糖尿,高血圧,心房 細動	F/91	2.4	-
28	身体的障害(精神病)	M/28	3.1	-
29	急性 心筋梗塞	M/34	56.3	+

【0066】

図16は、患者の血清の中にあるAK3の検出のためのウェストンプロット分析を示す図であり、図16の試験血清に関する情報は表3及び表4に示した。

【0067】

【表3】

図 16 の試験血清に関する情報 (パネル A の説明)

レーン番号	病名	CKMB 単位 ^{a)}	表 2 の患者番号
1	急性 心筋梗塞	22.1	4
2	急性 心筋梗塞	40.4	13
3	急性 心筋梗塞	18	18
4	急性 心筋梗塞	56.3	29
s	ヒト 心臓 組織 試料		
n	正常 血清		
a k 2	精製された組換え AK 2		
p	精製された組換え AK 3		

a)定常血清のCKMB値は7単位の未満だった。

【0068】

【表4】

図 16 の試験血清に関する情報(パネル B の説明)

レーン番号	病名	CKMB 単位	表 2 の患者番号
5	安定 狭心症	2.7	1
6	食道癌	1.1	8
7	心房 細動	3.3	6
8	足 骨折	44.0	9
9	心室 衝撃 欠損 手術	12.8	16
10	腹膜炎 手術	5.6	17
11	肺癌	2.7	21
N	定常 血清		
P	AK3		

【0069】

例 7 ; AK 3 抗体を利用する心筋梗塞の診断と心筋梗塞の臨床的特異性の試験

【0070】

本例においては、心臓疾患診断用の生物学的マーカーとしてのAK3の臨床的特異性(clinical specificity)を確認するために、高麗大学校附属舊路病院の循環器内科に依頼して心筋梗塞と診断された入院患者の入院当日の血清を確保して、CKMBの濃度を測定し、ECL-ウェストンブロッキング及びサンドイッチELISAを実施した。

【0071】

ELISAは親和性精製されたウサギの抗-AK3のポリクローン抗体(450ng/ウェル)

を96マイクロタイトルプレートに附着させた後、100 μ lの血清を加えて30 で1時間反応させた。その後、燐酸緩衝液生理食塩水(PBS)で十分に洗浄し、バイオティン化ラビット抗-AK3ポリクローナル抗体で2次反応させた後、ストレプトアビジンが接合されたHRPを結合し、発色気質処理した後、ELISA判読機で吸光度を判読した。この時、基準の物質は本発明者達が分離精製した遺伝子組み替AK3を使用した。CKMBとAK3抗体を利用した急性心筋梗塞(AMI)の診断結果を下記表5に示した。

【0072】

【表5】

	試料 ID	病名	CKMB ^{a)} (ng/ml)	AK3		備考 (年齢/性別)
				ウェスト ンブロッ キング 分析 ^{d)}	サンドイ ッチ ^{b)} ELISA(μ g/ml)	
1	417	心筋梗塞	406.6	++	2.0	75/M
2	436	心筋梗塞	123.8	++	10.0	58/M
3	464	心筋梗塞	230.9	+++	4.7	67/F
4	474	心筋梗塞	47.23	++	11.6	65/M
5	481	心筋梗塞	378.6	+	2.0	53/M
6	487	心筋梗塞		+	3.0	
7	503	心筋梗塞	51.1	+	7.3	56/M
8	514	心筋梗塞	33.2	++	7.6	53/M
9	526	心筋梗塞	2.15	++	3.3	57/F
10	547	心筋梗塞	314.2	+++	7.0	60/M
11	548	心筋梗塞	71.79	+	4.2	63/M
12	553	心筋梗塞	175.4	+++	5.8	52/M
13	565(6)	心筋梗塞	>500.0	+++	4.7	61/M
14	578	心筋梗塞	176.7	+	8.1	57/M
15	606	心筋梗塞	1.55	+	1.2	64/M
16	607	心筋梗塞		+++	10.0	
17	614	心筋梗塞	19.84	+	n,d ^{c)}	62/M
18	616	心筋梗塞	97.93	++	n,d	45/M
19	621	心筋梗塞	1.79	+	n,d	66/M
20	625	心筋梗塞	1.85	+	n,d	51/M
21	626	心筋梗塞	1.62	++	5.0	41/M

a) CKMB分析；高麗大学附属安山病院で実施

b) サンドイッチELISA正常ヒト血清の吸光度の値； $A_{490} < 0.02$ ；

(正常人から分離された6個の試料の場合、リファレンス範囲以下の数値を示した。)

c) 血清の不足のために試験を実施することができなかった。

d) 全てAK3 - 陽性である。

【0073】

ECL基質を利用したAK3ウェストンブロッディング分析の結果を図17a及びbに図示した。

【0074】

前記表5の結果から確認された通り、高麗大学附属舊九路病院の循環器内科で心筋梗塞と確診された患者21試料と漢陽大学附属病院で確保した心筋梗塞症の患者の10個の試料を含んで総60名の患者の血清試料に対してCKMB及びAK3診断指標の分析の結果、AK3は100%の正確度で検知された。このような結果は現在の心筋梗塞診断の最善の代表的な指標として使用されるCKMBテストにおいて偽陰性(false negative)と判定された患者も、AK3分析により陽性と判定されることが可能となった。従って、本発明の免疫学的製剤は、現在使用されているCKMBテストより正確性が極めて優れ、病理生化学的分析の特異性が高く、また臨床的特異性が高いという長所を有していることを確認することができた。

【0075】

【産業上の利用可能性】

以上、説明したことから明らかなように、本発明において特徴的に使用されるアデニレートキナーゼアイソザイム、特にAK3は、以下の特徴を有する。(1)心筋細胞特異的損傷によって循環血液内へ放出される。(2)心筋傷害の際、即時放出される特性を有する。(3)循環の間、十分な寿命を有するので、持続的に上昇する数値が心筋傷害の連続性を現す(表2の試料 No.7の症例の場合、心筋梗塞の病歴があるが、血清の中にAK3が確認されなかった；データは図示しなかった)。従って、AMIの開始後、時間とAK3の異常な病的濃度の関係は直線関係を示した。(4)胸痛が発生した後、2時間以内の血清濃度の上昇が確認(図16、レーン3)される。

【0076】

従って、本発明の免疫学的製剤又は診断キットは心筋梗塞などの心臓疾患の早期診断を可能にし、適切な臨床的分析結果を得るのに特別な技術又は訓練を不要とし、容易に自動分析ができる。更に、分析試料は安定であり、安価で、妨害及び干渉がない。現在のすべての臨床病理で基本的に使用される既存の診断指標であるCKMBより正確度が高い。更に診断キット化する場合、既存のパッチ(patch)タイプ又はストリップ(strip)タイプのキット全部に適用することができるので、検査の迅速性及び簡便性を提供することができる。又、既存の諸診断方法は、高価な設備と高度の診断技術の習得が前提とされ、限られた少数の総合病院での実施にとどまるが、本発明の診断キットは個人又は医院級の小規模の医療機関でも広く使用することができ、価格も低廉であり、更に、高価な輸入診断試薬及び診断キットを国産製品に代替する輸入代替の効果を提供することもできる。

【配列表】

서열 목록

<110> KIM, Hyo,Joon
 CHO, Key,Seung
 LEE, Sang,Min

<120> ANTI-HUMAN MITOCHONDRIAL ADENYLATE KINASE ISOZYME ANTIBODY,
 DIAGNOSTIC FORMULATION AND DIAGNOSTIC KIT FOR CARDIAC DISEASE

<130> 00-pct-3

<150> KR 2000-5808

<151> 2000-02-08

<160> 1

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ser Lys Leu Leu Arg Ala Val Ile Leu Gly Pro Pro Gly Ser

1 5 10 15

Gly Lys Gly Thr Val Cys Gln Arg Ile Ala Gln Asn Phe Gly Leu Gln

20 25 30

His Leu Ser Ser Gly His Phe Leu Arg Glu Asn Ile Lys Ala Ser Thr

35 40 45

Glu Val Gly Glu Met Ala Lys Gln Tyr Ile Glu Lys Ser Leu Leu Val

50 55 60

Pro Asp His Val Ile Thr Arg Leu Met Met Ser Glu Leu Glu Asn Arg
 65 70 75 80

Arg Gly Gln His Trp Leu Leu Asp Gly Phe Pro Arg Thr Leu Gly Gln
 85 90 95

Ala Glu Ala Leu Asp Lys Ile Cys Glu Val Asp Leu Val Ile Ser Leu
 100 105 110

Asn Ile Pro Phe Glu Thr Leu Lys Asp Arg Leu Ser Arg Arg Trp Ile
 115 120 125

His Pro Pro Ser Gly Arg Val Tyr Asn Leu Asp Phe Asn Pro Pro His
 130 135 140

Val His Gly Ile Asp Asp Val Thr Gly Glu Pro Leu Val Gln Gln Glu
 145 150 155 160

Asp Asp Lys Pro Glu Ala Val Ala Ala Arg Leu Arg Gln Tyr Lys Asp
 165 170 175

Val Ala Lys Pro Val Ile Glu Leu Tyr Lys Ser Arg Gly Val Leu His
 180 185 190

Gln Phe Ser Gly Thr Glu Thr Asn Lys Ile Trp Pro Tyr Val Tyr Thr
 195 200 205

Leu Phe Ser Asn Lys Ile Thr Pro Ile Gln Ser Lys Glu Ala Tyr
 210 215 220

【図面の簡単な説明】

【図1】

細胞中のアデニレートキナーゼアイソザイムの細胞下レベルの分布

【図2】

アデニレートキナーゼアイソザイム3 (AK3) のPCR生成物の電気泳動を示す図

【図3】

pCR2.1-AK3の遺伝子マップ (gene map)

【図4】

特異な制限酵素切断によるプラスミドマッピングを示す図

【図5】

制限酵素切断パターンを示す図

【図6】

pQE30-AK3の遺伝子マップ

【図7a】

AK3のSDS-PAGE結果を示す図

【図7b】

AK3のウェスタンブロット分析結果を示す図

【図8a】

AK1のSDS-PAGE結果を示す図

【図8b】

AK1のウェスタンブロット分析結果を示す図

【図9a】

AK2のSDS-PAGE結果を示す図

【図9b】

AK2のウェスタンブロット分析結果を示す図

【図10】

抗-AK3ウサギの抗体の精製挙動を示すグラフ

【図11】

AKアイソザイムの精製組換え体を示す図

【図12】

精製された抗-AKアイソザイム抗体間の交差反応性 (cross-reactivity) アッセー結果を示す図

【図13】

AKアイソザイムの組織分布を示す図

【図14】

置換又は非置換の条件下で心筋梗塞症患者の血清の抗-AK2抗体 と抗-AK3抗体 を利用するウェスタンブロット分析結果を示す図

【図15】

AKとヒト血清の本来の (native) ゲルの電気泳動の移動パターンを示す図

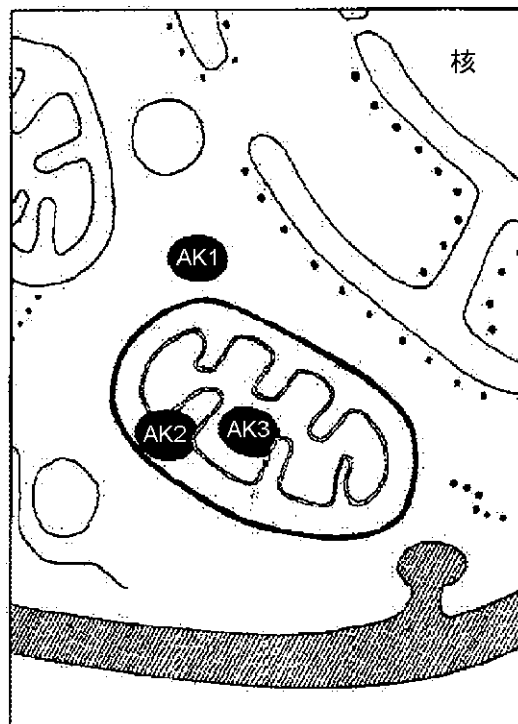
【図16】

患者の血清内にあるAK3を検出するためのウェスタンブロット分析の結果を示す図

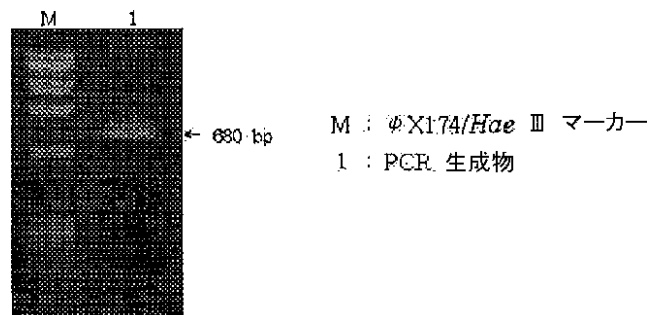
【図17】

例6のAK3のウェスタンブロット分析の結果を示す図

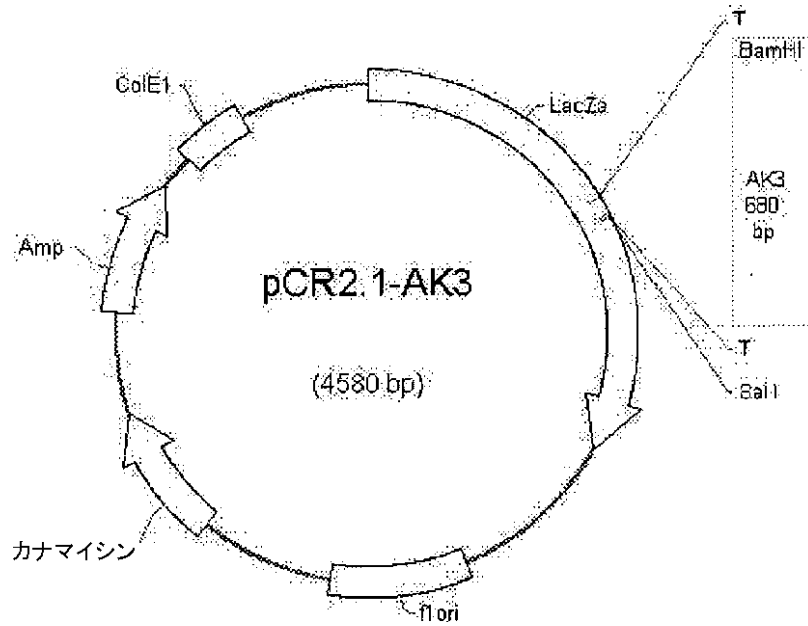
【図1】



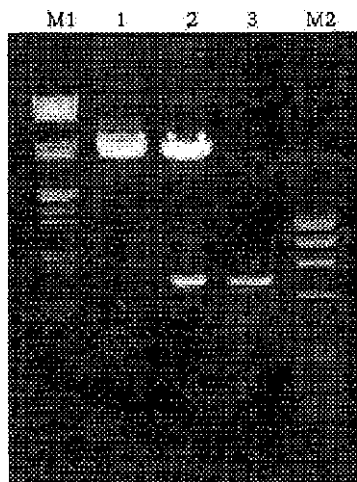
【図2】



【図3】

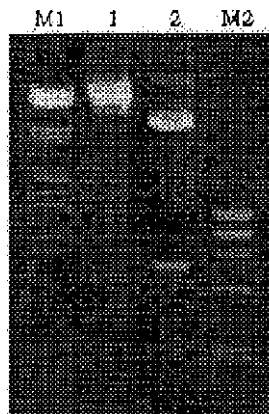


【図4】



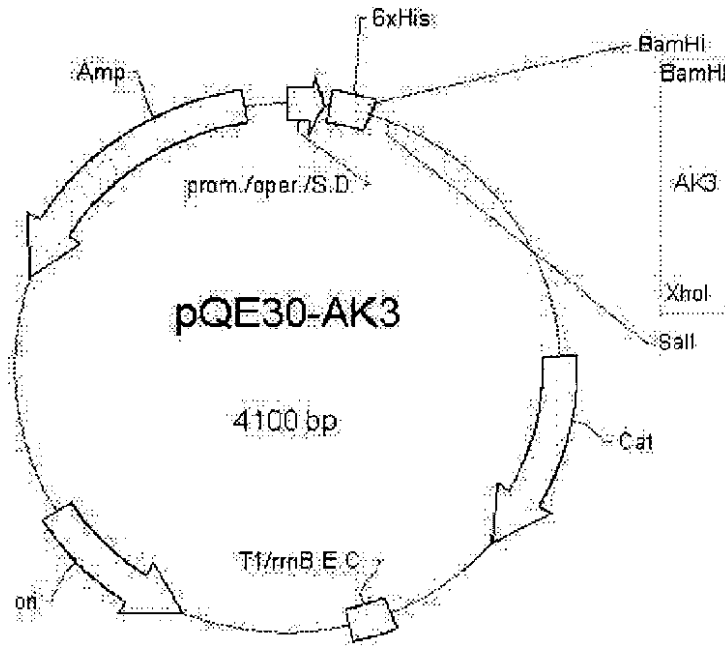
M1 : λ DNA *EcoR* I / *Hind* III マーカー
 1 : 切断せず
 2 : *EcoR* I 二重切断
 3 : 単精製断片
 M2 : ϕ X174 / *Hae* III

【図5】

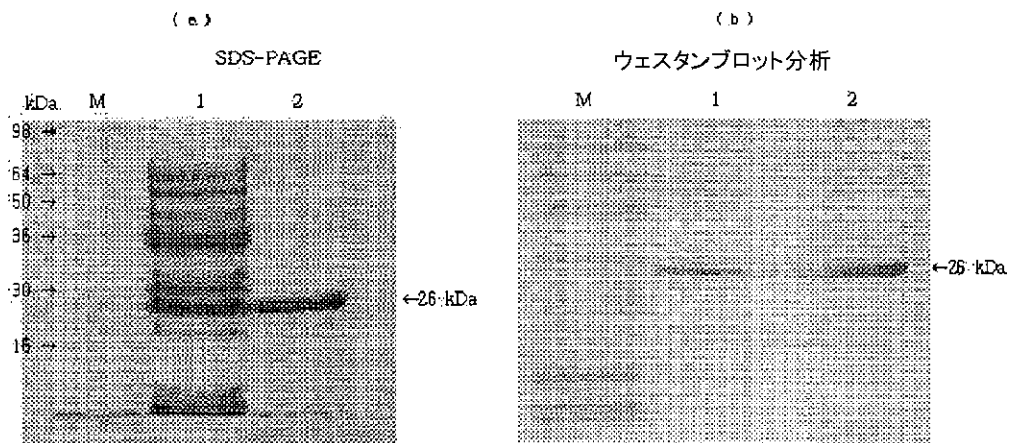


M1 : λ DNA / *EcoR* I + *Hind* III マーカー
 1 : pQE30-AK3
 2 : pQE30-AK3 / *Bam* H I & *EcoR* I
 M2 : ϕ X174 / *Hae* III

【図6】

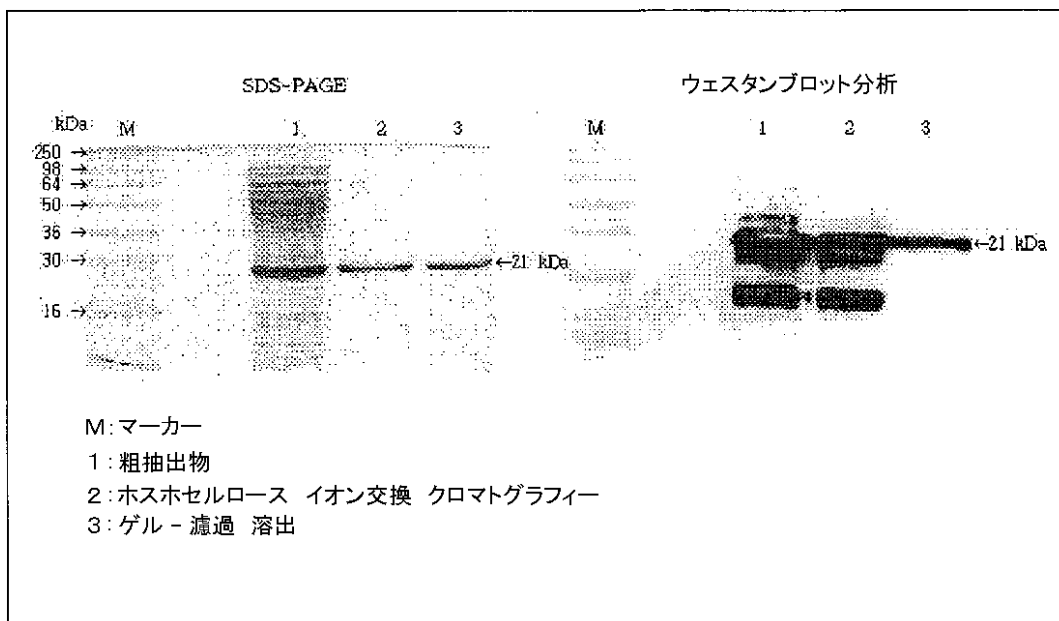


【図7】

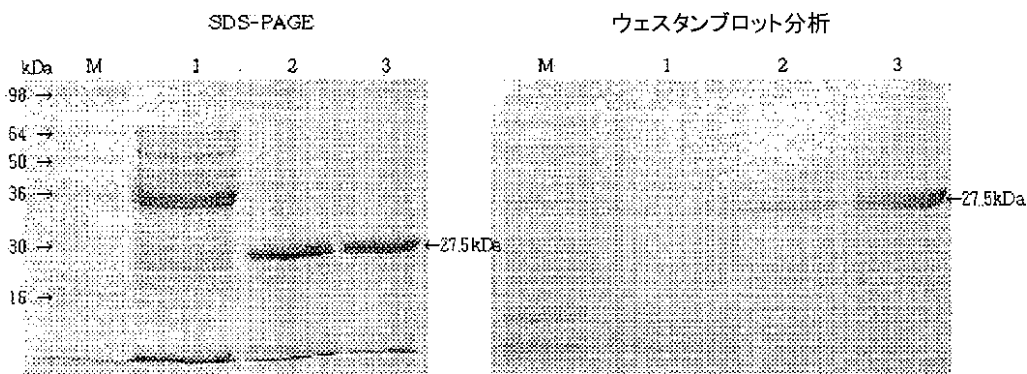


M : マーカー
1 : 粗抽出物
2 : Ni-NTA 親和性 クロマトグラフィー

【図8】

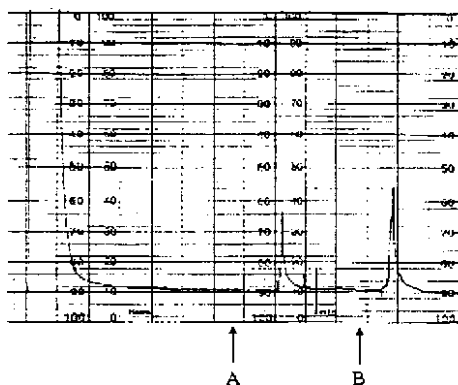


【図9】



M : マーカー
1 : 粗抽出物
2 : Ni-NTA 親和性 クロマトグラフィー
3 : ゲル-濾過 溶出

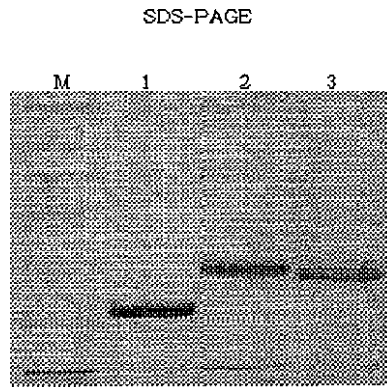
【図10】



A : 1M KCl を含有するリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5)

B : 0.1M グリシン HCl (pH2.5)

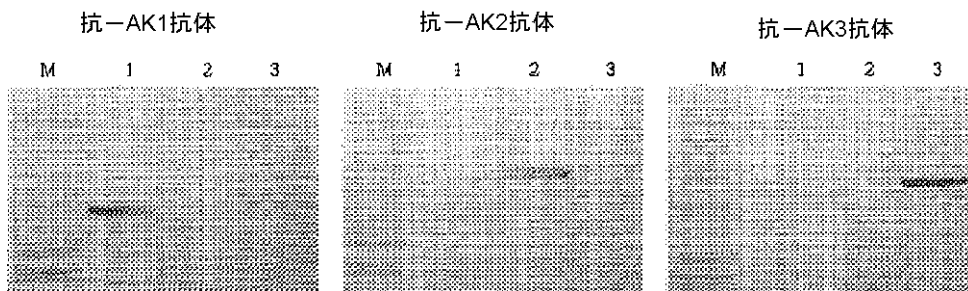
【図11】



M: マーカー
1: 精製した 組み換え AK1
2: 精製した 組み換え AK2
3: 精製した 組み換え AK3

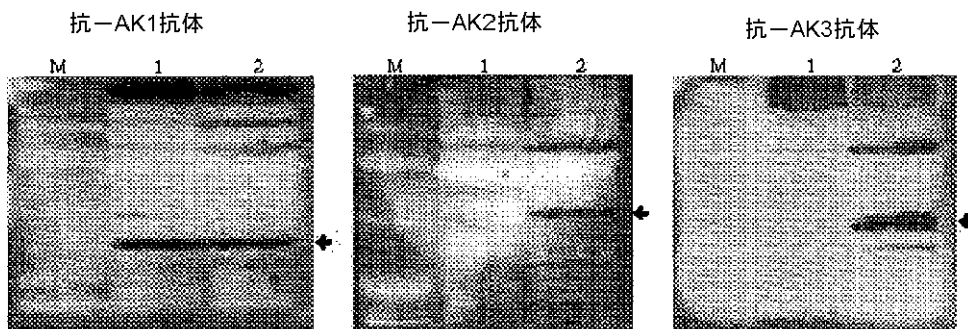
【図12】

ウェスタンブロット分析



M: マーカー
1: 精製した 組み換え AK1
2: 精製した 組み換え AK2
3: 精製した 組み換え AK3

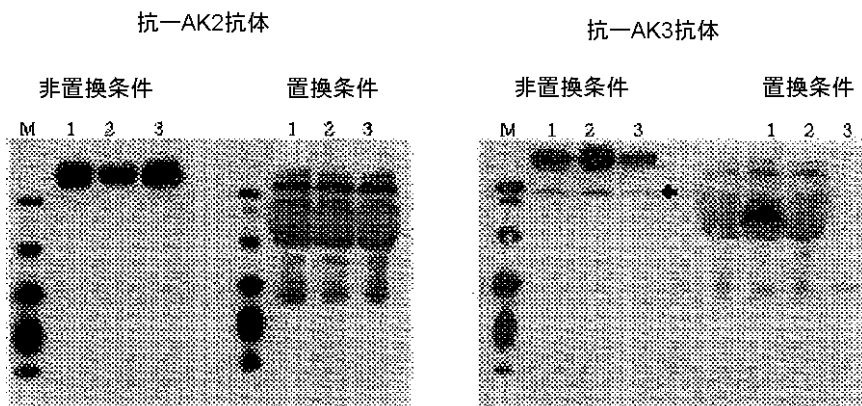
【図13】



M: マーカー
1: 骨格筋
2: 心筋

【図14】

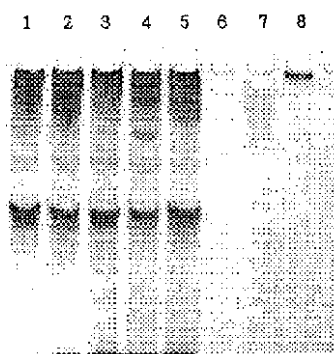
ウェスタンブロット分析



M: ECL マーカー
 1: 心筋梗塞症 患者 血清
 2: 心筋梗塞症 患者 血清
 3: 心筋梗塞症 患者 血清

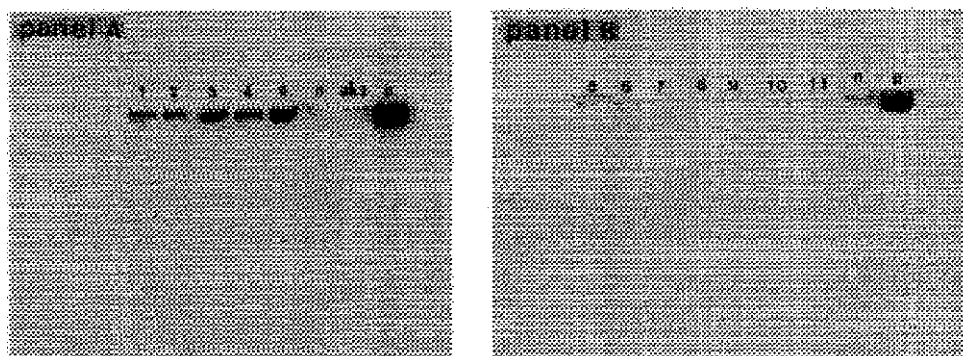
【図15】

SDS-PAGE

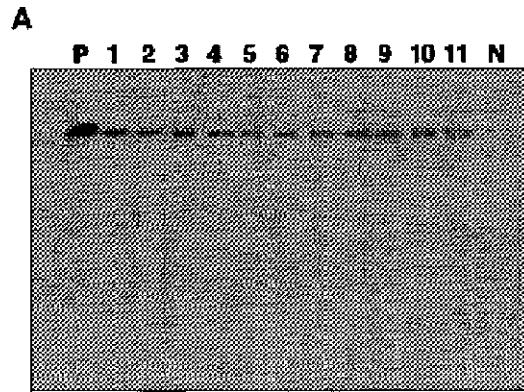


1: 急性 心筋梗塞症 患者 血清
 2: 急性 心筋梗塞症 患者 血清
 3: 急性 心筋梗塞症 患者 血清
 4: 足 骨折 患者 血清
 5: 正常人 血清
 6: 精製した AK1
 7: 精製した AK2
 8: 精製した AK3

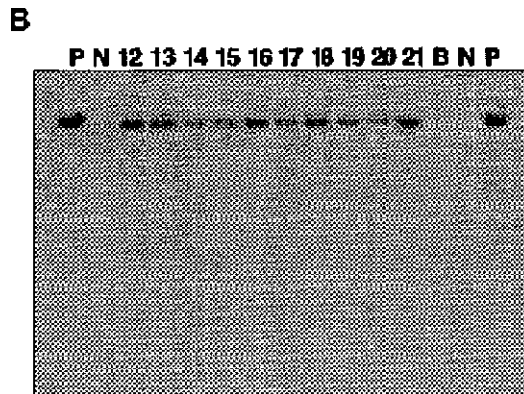
【図16】



【図17a】



【図17b】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR00/00882
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7 A61K 39/395		
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) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Patents and applications for inventions since 1975		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, CAS ON LINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Walker EJ and Dow JW. 'Location and properties of two isoenzymes of cardiac adenylate kinase' In Biochem. J. 1982 Vol. 203(2), p 361-369.	1-5, 13-16
X	Kurokawa, Y et al. 'Multiforms of mammalian adenylate kinase and its monoclonal antibody against AK1' In Enzyme 1990, Vol 43(2), p 57-71.	1-5, 13-16
A	Anfous K et al. 'Mitochondrial creatine kinase isoform expression does not correlate with its mode of action' In Biochem. J. 1997, Vol. 322(Pt 1), p 73-78.	6-12
A	Xu G et al. 'Characterization of human adenylate kinase 3 (AK3) cDNA and mapping of AK3 pseudogene to an intron of the NF1 gene' In Genomics 1992, Vol. 13(3), 537-542. cited in the application	6-12
<input 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 DECEMBER 2000 (06.12.2000)		Date of mailing of the international search report 08 DECEMBER 2000 (08.12.2000)
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Industrial Property Office Government Complex-Taejon, Dunsan-dong, So-ku, Taejon Metropolitan City 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer CHO, Myung Sun Telephone No. 82-42-481-5605

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト(参考)
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 15/00	A
(72)発明者	リー サング ミン 大韓民国 425 - 180 アンサン ボノドン グ ハンヤング エーピーティー 17 - 507		
F タ-ム(参考)	4B024 AA11 BA10 CA04 DA06 EA04 GA11 GA19 HA03 4B029 AA07 AA21 BB16 CC03 FA13 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ27 QR48 QR66 QS16 QS32 QX01 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72		

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003522158A5	公开(公告)日	2005-03-03
申请号	JP2001557590	申请日	2000-08-10
[标]申请(专利权)人(译)	金孝JOON		
申请(专利权)人(译)	金孝约翰		
当前申请(专利权)人(译)	金孝约翰		
[标]发明人	キムヒョジョン チョケイセウング リーサングミン		
发明人	キム ヒョ ジョン チョ ケイ セウング リー サング ミン		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 C12Q C12Q1/48 C07K16/40 C12N G01N G01N33/573 C12P C07K16/00 A61K35/00 C12M1/40 G01N33/53 C12N15/09 C12P21/08 C07K C12M A61K C12N9/12		
CPC分类号	C07K16/40 C12N9/1229		
FI分类号	C07K16/40.ZNA C12M1/40.B C12Q1/48.Z G01N33/573.A G01N33/577.B C12N15/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/HA03 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/BB16 4B029/CC03 4B029/FA13 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ27 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QS16 4B063/QS32 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	1020000005808 2000-02-08 KR		
其他公开文献	JP2003522158A JP3736798B2		

摘要(译)

本发明涉及用于心脏病的免疫学制剂和诊断试剂盒，其使用人线粒体腺苷酸激酶同工酶。本发明提供了一种使用线粒体腺苷酸激酶同工酶的免疫学制剂，其存在于心肌细胞中但不存在于骨骼肌细胞中，并且作为用于诊断心肌疾病和心脏病的简单而准确的诊断标志物。诊断工具包