

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-238377

(P2004-238377A)

(43) 公開日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/28	C O 7 K 16/28 Z N A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53 D	4 B O 6 4
G O 1 N 33/577	G O 1 N 33/577 B	4 H O 4 5
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 A	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 22 頁)		

(21) 出願番号 特願2003-32117 (P2003-32117)

(22) 出願日 平成15年2月10日 (2003.2.10)

(71) 出願人 398014458

日清キョーリン製薬株式会社

東京都千代田区神田錦町三丁目1番地

(74) 代理人 230104019

弁護士 大野 聖二

(74) 代理人 100106840

弁理士 森田 耕司

(74) 代理人 100105991

弁理士 田中 玲子

(72) 発明者 今井 伸二郎

埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡5丁目3番1号

日清キョーリン製薬株式会社創薬研究所

内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 DA06

EA04 GA11 HA15

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ステロイドに対する耐性をアッセイするための方法および試薬

(57) 【要約】

【課題】ステロイド感受性を判定する臨床検査法として、ヒトグルココルチコイドリセプターαおよびβに対する選択性の高いモノクローナル抗体を作成して、酵素抗体法による測定系を提供すること。

【解決手段】ヒトグルココルチコイドリセプターを免疫学的にアッセイする方法であって、ヒトグルココルチコイドリセプターαおよびβを認識するモノクローナル抗体と、ヒトグルココルチコイドリセプターβを認識するがヒトグルココルチコイドリセプターαを認識しないモノクローナル抗体とを用いることを特徴とする方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトグルココルチコイドリセプターを免疫学的にアッセイする方法であって、ヒトグルココルチコイドリセプター α および β を認識するモノクローナル抗体と、ヒトグルココルチコイドリセプター β を認識するがヒトグルココルチコイドリセプター α を認識しないモノクローナル抗体とを用いることを特徴とする方法。

【請求項 2】

ヒトグルココルチコイドリセプター β を認識するがヒトグルココルチコイドリセプター α を認識しないモノクローナル抗体が、ヒトグルココルチコイドリセプター β のC末端領域を認識することを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

ヒトグルココルチコイドリセプター α および β を認識するモノクローナル抗体が、ヒトグルココルチコイドリセプターのN端側 1-367 のアミノ酸配列を含むN末端領域を認識する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ヒトグルココルチコイドリセプター β を認識するがヒトグルココルチコイドリセプター α を認識しないモノクローナル抗体が、ヒトグルココルチコイドリセプター β のアミノ酸配列 727-742 を含むC末端領域を認識する、請求項 1-3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

測定をサンドイッチ法により、酵素免疫学的に行うものであることを特徴とする請求項 1-4 のいずれか一記載の方法。

20

【請求項 6】

ヒトグルココルチコイドリセプターのN端側 1-367 のアミノ酸配列を含むN末端領域を認識し、ヒトグルココルチコイドリセプタープロと免疫反応するモノクローナル抗体。

【請求項 7】

ヒトグルココルチコイドリセプター α のアミノ酸配列 727-777 を含むC末端領域を認識し、ヒトグルココルチコイドリセプター β と免疫反応しないモノクローナル抗体。

【請求項 8】

ヒトグルココルチコイドリセプター β のアミノ酸配列 727-742 を含むC末端領域を認識し、ヒトグルココルチコイドリセプター α と免疫反応しないモノクローナル抗体。

30

【請求項 9】

ヒトグルココルチコイドリセプターの検出限界値が 0.1 ng/ml である、請求項 6-8 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 10】

ヒトグルココルチコイドリセプターの検出限界値が 0.01 ng/ml である、請求項 6-8 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 11】

ヒトグルココルチコイドリセプターを免疫学的にアッセイするキットであって、ヒトグルココルチコイドリセプター α および β を認識するモノクローナル抗体と、ヒトグルココルチコイドリセプター β を認識するがヒトグルココルチコイドリセプター α を認識しないモノクローナル抗体とを含むキット。

40

【請求項 12】

ヒトグルココルチコイドリセプター β を認識するがヒトグルココルチコイドリセプター α を認識しないモノクローナル抗体が、ヒトグルココルチコイドリセプター β のC末端領域を認識することを特徴とする、請求項 11 記載のキット。

【請求項 13】

ヒトグルココルチコイドリセプター α および β を認識するモノクローナル抗体が、ヒトグルココルチコイドリセプターのN端側 1-367 のアミノ酸配列を含むN末端領域を認識する、請求項 11 または 12 に記載のキット。

【請求項 14】

50

ヒトグルココルチコイドリセプター β を認識するがヒトグルココルチコイドリセプター α を認識しないモノクローナル抗体が、ヒトグルココルチコイドリセプター β のアミノ酸配列727-742を含むC末端領域を認識する、請求項11-13のいずれかに記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ステロイド耐性を判定する方法に関する。より詳細には、本発明は、抗ヒトグルココルチコイドリセプターを認識するモノクローナル抗体、及びそのモノクローナル抗体を用いて、検体中に存在するヒトグルココルチコイドリセプター β を定量する方法に関する。 10

【0002】

【従来の技術】

ステロイド剤は気管支喘息、膠原病、ネフローゼ、炎症性腸疾患、アレルギー疾患など非常に広い範囲の疾患に効果を示す抗炎症剤であり、難病といわれる特定疾患にも著効を示す場合がある。しかし、ステロイド剤は使用が長期にわたることが多く、長期使用により薬剤感受性が低下し、全く効果を示さないステロイド耐性に陥る事が少なからずある。このような場合、ステロイド剤は副作用が強いことから、投与したステロイド自体がかえって病態を悪化させる。また、特にリンパ性白血病などの血液腫瘍では、ステロイド自体が細胞殺作用を有する化学療法剤としても使われるが、投与を繰り返すうちに腫瘍細胞がステロイドに対して耐性となることもしばしば経験されている。そこで医療現場ではステロイド感受性の診断法の確立が求められている。 20

【0003】

ステロイドの感受性を事前に診断する臨床検査薬は現時点で販売されていない。現在医療現場ではステロイドの耐性を、ステロイド剤投与後にその効果で判断せざるを得ない状況にある。ステロイドには耐性という問題以外に、全身性の副作用が問題となる。ステロイド耐性患者ではその薬理効果が損なわれるにも係わらず、全身性の副作用は残存するという不都合な点がある。ステロイド耐性の事前診断には、不用な薬剤の投与という医療経済的な側面に加えて、無意味な副作用を抑制するという有用性もある。

【0004】

ステロイドの薬効メカニズムはステロイドが古い薬物であるにも関わらず、現在でも不明な点が多い。しかし近年の分子生物学の進歩により、図1に示すようなメカニズムが考えられている。すなわち、脂溶性の性質を有するステロイド（グルココルチコイドGC）は、細胞膜を通過して細胞質に入ると、その受容体タンパク質であるグルココルチコイドレセプター α アイソフォーム（GR α ）に結合する。このGC-GR α は、ホモダイマーを形成し、（1）核に移行、サイトカイン遺伝子などの転写制御領域にあるDNA上の結合部位GRE（Glucocorticoid Responsive Element）と結合し、対象遺伝子の転写を制御する、（2）種々の遺伝子の転写を活性化する転写因子NF- κ Bを、その阻害因子であるI- κ Bの合成を亢進させて抑制し、NF- κ Bで活性化される遺伝子発現を抑制する、（3）同様の転写因子AP-1と結合して不活化し、AP-1によって活性化される遺伝子発現を抑制する、などの機序で、主に免疫反応を亢進させる遺伝子の発現を抑制すると考えられている。 30 40

【0005】

この機能的受容体であるGR α ときわめて構造の類似したグルココルチコイドレセプター β アイソフォーム（GR β ）が存在することが知られている。このGR β はGCと結合するドメインを欠く構造をもっており、GR α と結合してヘテロダイマーを形成し、GR α ホモダイマー形成を阻害する優性阻害型の拮抗作用を発揮してGCの生物活性を抑制すると考えられている（図1）。

【0006】

この2つのアイソフォームは、同一のGR遺伝子から転写されたmRNA前駆体（pre 50

mRNA) から選択的スプライシングといわれる選択的RNAプロセッシングによってGR α 、GR β をコードする特異的mRNAが生成され、タンパク質合成が起こることが知られてきた(図2)。この選択的RNAプロセッシングを行う酵素は未だ同定されていない。またステロイドの作用メカニズムの内、その耐性に最も関係しているものは、上述のAP-1を介したメカニズムであるとの報告もある。

【0007】

本発明者らは、ステロイド剤が治療の第一選択薬である炎症性腸疾患の一つである潰瘍性大腸炎患者において、ステロイドに反応しない症例では末梢血単核球のGR α 特異的mRNA、GR β 特異的mRNAの発現及び、GR α タンパク質、GR β タンパク質の発現が容易に検出されること、一方ステロイドで症状が改善する感受性症例ではGR α 特異的mRNA、GR α タンパク質のみが検出されてGR β 特異的mRNA、GR β タンパク質は検出されないこと、すなわちGR β 特異的mRNA、GR β タンパク質の出現がステロイド耐性のマーカーであることを報告した(Honda, M. et al., Gastroenterology 2000; 118: 859-866)。また、その後GR mRNAについてキャピラリーPCRを用いて定量解析したところ、ステロイド耐性患者末梢血単核球では、GR α 特異的mRNAの発現量は不変で、GR β 特異的mRNAの発現量の増大が認められることが明らかとなった。従ってGR β タンパク質もステロイド抵抗性症例では増加していることが考えられる。しかし、タンパク質レベルでGR α 、GR β の定量を行うためには、GR α 、GR β をそれぞれ選択的、特異的に認識する強い力価の抗体が必要である。GR α 、GR β をそれぞれ選択的、特異的に認識する抗体は市販され、またその使用の報告もある(Hecht, K. et al., J Biol Chem 1997; 272: 26659-26664; Christodouloulopoulos, P. et al. J Allerg Clin Immunol 2000; 106: 479-484; Gougat, C. et al., J. Mol. Med. 2002; 80: 309-318)。しかし、それらの抗体は力価が弱いためにウェスタンブロッティングでの使用に制限されており、実質的に酵素抗体法による定量が行えないため、これまでタンパク質レベルでの定量を行うことができなかった。

【0008】

本発明に関連する先行技術文献情報としては以下のものがある。

【特許文献1】

USP 5770176

【非特許文献1】

Honda, M. et al., Gastroenterology 2000; 118: 859-866

【非特許文献2】

Hecht, K. et al., J Biol Chem 1997; 272: 26659-26664

【非特許文献3】

Christodouloulopoulos, P. et al. J Allerg Clin Immunol 2000; 106: 479-484

【非特許文献4】

Gougat, C. et al., J. Mol. Med. 2002; 80: 309-318

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ステロイド感受性を判定する臨床検査法として、ヒトグルココルチコイドリセプター α および β に対する選択性の高いモノクローナル抗体を作成して、酵素抗体法による測定系を提供することを目的とする。

【0010】

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

本発明は、ヒトグルココルチコイドリセプターを免疫学的にアッセイする方法を提供する。該方法は、ヒトグルココルチコイドリセプター α および β を認識するモノクローナル抗体と、ヒトグルココルチコイドリセプター β を認識するがヒトグルココルチコイドリセプター α を認識しないモノクローナル抗体とを用いることを特徴とする。好ましくは、ヒトグルココルチコイドリセプター β を認識するがヒトグルココルチコイドリセプター α を認識しないモノクローナル抗体は、ヒトグルココルチコイドリセプター β のC末端領域を認識する。

【0011】

本発明の好ましい態様においては、ヒトグルココルチコイドリセプター α および β を認識する上述のモノクローナル抗体は、ヒトグルココルチコイドリセプターのN端側1-367のアミノ酸配列を含むN末端領域を認識する。また好ましくは、ヒトグルココルチコイドリセプター β を認識するがヒトグルココルチコイドリセプター α を認識しない上述のモノクローナル抗体は、ヒトグルココルチコイドリセプター β のアミノ酸配列727-742を含むC末端領域を認識する。 10

【0012】

特に好ましくは、本発明の方法は、測定をサンドイッチ法により、酵素免疫学的に行う。

【0013】

別の観点においては、本発明は、ヒトグルココルチコイドリセプターのN端側1-367のアミノ酸配列を含むN末端領域を認識し、ヒトグルココルチコイドリセプタープロと免疫反応するモノクローナル抗体を提供する。本発明はまた、ヒトグルココルチコイドリセプター α のアミノ酸配列727-777を含むC末端領域を認識し、ヒトグルココルチコイドリセプター β と免疫反応しないモノクローナル抗体を提供する。本発明はまた、ヒトグルココルチコイドリセプター β のアミノ酸配列727-742を含むC末端領域を認識し、ヒトグルココルチコイドリセプター α と免疫反応しないモノクローナル抗体を提供する。 20

【0014】

好ましくは、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトグルココルチコイドリセプターの検出限界値が0.1 ng/mlであり、より好ましくは0.01 ng/mlである。

【0015】

また別の観点においては、本発明は、ヒトグルココルチコイドリセプターを免疫学的にアッセイするキットであって、ヒトグルココルチコイドリセプター α および β を認識するモノクローナル抗体と、ヒトグルココルチコイドリセプター β を認識するがヒトグルココルチコイドリセプター α を認識しないモノクローナル抗体とを含むキットを提供する。 30

【0016】

本発明の方法を用いることにより、末梢血試料を用いてヒトグルココルチコイドリセプター α および β を定量し、臨床の現場でステロイド耐性・感受性を簡便に判定することができる。本発明のモノクローナル抗体はさらに、組織や細胞の免疫学的染色のための研究用試薬としても有用である。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明のモノクローナル抗体は、グルココルチコイドリセプター α と β とを区別して認識することができる。GR β mRNA、GR β タンパク質の出現がステロイド耐性のマーカーであることから、本発明のモノクローナル抗体を用いて、ステロイドに対する耐性・感受性を判定することができる。 40

【0018】

グルココルチコイドリセプター α および β の構造は、Hollenbergら(Nature 318, 635-641, 1985)およびEncioら(J. Biol. Chem. 266, 7182-7188, 1991)に記載されている。 α および β は、共通のN末端領域を有し、C末端領域においてのみ異なる。したがって、 α およ 50

び β のそれぞれのC末端領域を認識するモノクローナル抗体を用いることにより、 α および β の存在を特異的に検出することができる。

【0019】

本発明のモノクローナル抗体は、ヒトグルココルチコイドリセプターで免疫した哺乳動物の抗体産生細胞（脾臓細胞、リンパ節等）と、ミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、所望の反応特異性を有する抗体を産生するハイブリドーマを選択し、このハイブリドーマから常法により調製することができる。本発明のモノクローナル抗体を得るためには、hGR α β 共通領域、hGR α C端固有領域またはhGR β C端固有領域のそれぞれに対応するヒトグルココルチコイドリセプターフラグメントを調製し、これを免疫原として用いる。

10

【0020】

免疫原として用いられるヒトグルココルチコイドリセプターは、ヒトグルココルチコイドリセプターをコードする遺伝子を用いて組み換え的に製造することができる。ヒトグルココルチコイドリセプターをコードする遺伝子の既知の塩基配列にしたがい、適当なヒトcDNAをテンプレートとして用いて、PCRによりヒトグルココルチコイドリセプターの所望の領域をコードする遺伝子をクローニングすることができる。これを発現ベクターに挿入して適当な宿主に導入し、組換えヒトグルココルチコイドリセプターを発現させることができる。

【0021】

組換えタンパク質の製造および精製は、当該技術分野において知られる任意の方法を用いることができる。精製を容易にするために、適当なタグを付加した融合タンパク質として発現させてもよい。例えば、ヒトグルココルチコイドリセプターをHis-Tag融合タンパク質として発現させれば、アフィニティークロマトグラフィーを用いて容易に精製することができる。次にエンテロキナーゼ処理によりHis-Tag部分を容易に除去することができる。

20

【0022】

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得るためには、上述のようにして製造した組換えヒトグルココルチコイドリセプターまたはそのフラグメントを免疫原として哺乳動物の皮下または腹腔内に注射する。免疫する動物としては、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウサギ等の哺乳動物を用いることができる。免疫応答性を高めるために、必要に応じて完全フロインドアジュバント、RIBIアジュバントなどのアジュバントを用いてもよい。免疫した動物の抗体価をモニターし、抗体価の上昇した動物から脾臓細胞を採取し、マウスミエローマ細胞と融合させる。マウスミエローマ細胞としては、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損等の選択マーカーを有するものを用いる。融合は、当該技術分野において知られる方法を用いて行なうことができ、融合促進剤としてポリエチレングリコール、センダイウイルス等を用いてもよい。

30

【0023】

細胞融合の後、ハイブリドーマのみが生育できるHAT培地等の選択培地で培養することによりハイブリドーマを選択し、ELISA法を用いて所望の抗体を産生するか否かを測定する。ELISA法は当該技術分野においてよく知られる方法にしたがって行うことができる。免疫原として用いたヒトグルココルチコイドリセプターまたはそのフラグメントをプレート上に結合させ、ハイブリドーマの培養上清を反応させる。次に酵素等で標識した抗マウス抗体を用いて抗体を検出することにより、所望の抗体を産生するコロニーを選択する。次に得られたハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングして、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

40

【0024】

ヒトグルココルチコイドリセプター β 特異的モノクローナル抗体を得るためには、hGR α 組換えタンパク質およびhGR β 組換えタンパク質をそれぞれプレートに固定化して各ハイブリドーマの上清を反応させ、hGR β に結合するがhGR α には結合しないハイブリドーマを選択する。同様にして、ヒトグルココルチコイドリセプター α 特異的モノクロー

50

ーナル抗体、および h G R α と h G R β との両方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をそれぞれ選択することができる。

【0025】

得られたハイブリドーマは R P M I 1 6 4 0 培地などの適当な培養液で培養して増殖させ、その培養上清から 1 0 ~ 1 0 0 μ g / m l の濃度のモノクローナル抗体を得ることができる。また、大量に抗体を得るためには、あらかじめプリスタンを投与したマウスの腹腔にハイブリドーマを移植することにより、モノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。このようにして得られるモノクローナル抗体は、さらにアフィニティー精製、イオン交換クロマトグラフィー、限外濾過などにより精製してもよい。また、本発明のモノクローナル抗体から、F (a b ') 2 , F a b ' , F a b 等のフラグメントを調製して用いてもよく、あるいはキメラ抗体を作製してもよい。

【0026】

本発明のモノクローナル抗体は、ヒトグルココルチコイドリセプター α および β の検出に有用である。検出は例えば、当該技術分野においてよく知られるサンドイッチ E L I S A 法により行うことができる。サンドイッチ法においては、本発明のモノクローナル抗体をプレート等の表面に固定化し、これに検体中のグルココルチコイドリセプターを結合させ、次に酵素等で標識した本発明のモノクローナル抗体を用いてグルココルチコイドリセプターをサンドイッチした後に、結合した酵素の量を測定することにより検体中のグルココルチコイドリセプターを検出する。

【0027】

サンドイッチ法においては、バックグラウンドを低下させるために、固定化抗体と標識抗体とは異なるものを用いることが好ましい。すなわち、本発明の方法の好ましい態様においては、固定化抗体としてヒトグルココルチコイドリセプターの N 末端領域を認識するモノクローナル抗体を用い、標識抗体としてヒトグルココルチコイドリセプター β の C 末端領域を認識するモノクローナル抗体を用いる。あるいは、逆に、固定化抗体としてヒトグルココルチコイドリセプター β の C 末端領域を認識するモノクローナル抗体を用い、標識抗体としてヒトグルココルチコイドリセプターの N 末端領域を認識するモノクローナル抗体を用いてもよい。

【0028】

サンドイッチ法において用いるための標識としては、酵素標識（ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等）、放射性標識、蛍光標識、化学発光標識、着色コロイド標識等を利用することができる。本発明のモノクローナル抗体に標識を結合させる方法、ならびに発色試薬等を用いてこれらの標識を定量する方法は、当該技術分野においてよく知られている。

【0029】

また、本発明の方法においては、サンドイッチ法の代わりに競合法を用いてもよい。また、本発明のモノクローナル抗体をラテックス等の担体に結合させ、ラテックス凝集免疫測定法を用いてヒトグルココルチコイドリセプターを検出してもよい。あるいは、本発明のモノクローナル抗体は、カートリッジ式の簡易検出装置において用いてもよい。

【0030】

【実施例】

以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されず、様々な実施形態が可能であり、本発明は本明細書及び図面に開示の思想に従ったものであるかぎり、すべての実施形態を包含することは理解されるべきである。

【0031】

実施例 1 組換え体抗原の作製

組換え体抗原の作製のために用いた種々のプラスミドを図 3 - 7 に示す。グルココルチコイドリセプターの D N A 配列は、G e n B a n k 受託番号 X 0 3 2 2 5（配列番号 7）および X 0 3 3 4 8（配列番号 8）に基づく。

h G R 遺伝子のクローニング

10

20

30

40

50

ヒトリンパ球由来 cDNA を鋳型に用いて、GR α 遺伝子を 3 ブロックに分け、PCR を
 行い遺伝子を増幅した。すなわち、3 ブロックについて各ブロック特異的なプライマーの
 組み合わせで PCR を実施した。なお、PCR 増幅には KOD⁺ DNA ポリメラーゼ
 を使用した。得られた、増幅 DNA はアガロース電気泳動で精製し、断片を制限酵素マッ
 ピング、配列確認後、断片をベクター pCR2.1 に挿入し、クローニングした。得られ
 た、クローン T1 (pGR003)、K2 (pGR004)、K3 (pGR005) は制
 限酵素マッピングにより挿入断片を確認後、DNA シークエンシングにより全配列の確
 認を行った。遺伝子組換えを行ない、3 ブロックに分けたグルココルチコイドリセプター
 遺伝子を繋ぎ合せ、T7 系プロモーターを有する pET3 系ベクターに挿入した。GR
 NdeS, BCXPAS プライマーを用い PCR により pGR003 (T1) 遺伝子を 10
 増幅した。目的断片 468 bp は増幅され、XbaI, NdeI 消化した。消化断片は 1
 .5% アガロースゲル電気泳動上で分離され、GeneClean キットで精製した。p
 UC18 を NdeI, XbaI で消化し、約 2.5 kbp のバンドをアガロース Gel から精製した。この切断ベクターと上記精製断片を、TAKARA DNA ligation
 kit でライゲーションした。このライゲーション溶液を直接大腸菌に形質転換した
 。pGR007 をメチラーゼ産生が無い大腸菌株 *Epiculian coli* SCSS
 -101 に形質転換し、XbaI で消化した。その結果、目的通り切断された。非メチル
 化 pGR007 を BanII, XbaI で消化した。pGR005 (K3) を BanII
 II, XbaI で消化した。pGR007 消化物はフェノール処理後 Microspinn
 G25 により精製した。pGR005 消化物はアガロースゲルから切り出し、GeneC
 lean により精製した。精製した両 DNA をライゲーション後、大腸菌 DH5a に形質
 転換して、プラスミド pGR008 を得た。pGR008 及び pGR004 (K2) を B
 anII, XbaI 消化し、精製、ライゲーション、形質転換を行い、HindIII
 で消化したときに目的サイズ (4134, 554, 368 bp) のバンドを与えるプラス
 ミド pGR009 を得た。pGR009 および発現用ベクター pET3a を NdeI, B
 amHI でそれぞれ消化し、pGR009 由来 2.3 kbp 断片を精製、pET3a にラ
 イゲーションし、形質転換を行い、プラスミド pGR011 を得た。順方向、逆方向から
 各 3 種のプライマーによりジデオキシ法でシークエンシングして、目的配列と一致するこ
 とを確認した。

【0032】

hGR β 完全長発現遺伝子の構築

次に示すプライマー GRBS, GRBAS で hGR β 固有領域の遺伝子を PCR 法で増幅
 した。

GRBS: CCTAAGGACGGTCTGAAGAGC

GRBAS: CCACGTATCCTAAAGGGCAC

鋳型にはヒトリンパ球由来 cDNA を用いた。得られた増幅産物 350 bp を pCR2.
 1 ベクターにクローニングし、これを pGR006 とした。pGR006 および pGR0
 11 を制限酵素 EcoT22I, BamHI で消化し、PCR 由来断片 256 bp を精製
 し、pGR011 ベクター部分にライゲーションし、形質転換を行い、プラスミド pGR
 012 を得た。このプラスミドをジデオキシ法によりシークエンシングして、目的配列と 40
 一致することを確認した。

【0033】

hGR α , β 共通領域 (N 端領域) 発現遺伝子の構築

hGR α 発現遺伝子 pGR011 の DNA 結合領域より上流に 5189 bp 目の C を T に
 置換し、Stop コドンの新設し、また同様に 5197 bp 目の T を C に換え、BamH
 I 認識配列を新設する目的で部位特異的突然変異を行った。

以下のプライマーを用いた。

STP5191S: GGTGCTAAGGATCCGGAGATGACAACTTGA
 CTTCTCTGGG

STP5191A: GTCAAGTTGTCAATCTCCGGATCCTTAGCAC 50

C T A T T C C A A T T T T C G G

このプラスミドを p G R 0 1 5 とした。この p G R 0 1 5 を B a m H I 消化し，アガロースゲル電気泳動による精製で 5 . 5 k b p のバンドを精製した。このバンドをセルフライゲーションさせて，プラスミド p G R 0 1 8 を得た。

【0034】

h G R α C 端固有領域発現遺伝子の構築

h G R α 発現遺伝子 p G R 0 1 1 の D N A 結合領域より下流 5 6 7 6 b p 目の C を A に，5 6 7 9 b p 目の C を T に，5 6 8 0 b p 目の C を G に置換し，N d e I 認識配列を新設する目的で部位特異的突然変異を行った。

以下のプライマーを用いた。

N D E 5 6 7 8 S : C G T T A C C A C A A C T C A C C C A T A T G C T G G T G T C
A C T G T T G G A G G

N D E 5 6 7 8 A : C A G T G A C A C C A G C A T A T G G G T G A G T T G T G G T
A A C G T T G C A G G

このプラスミドを p G R 0 1 6 とした。この p G R 0 1 6 を N d e I 消化し，アガロースゲル電気泳動による精製で 5 . 5 k b p のバンドを精製した。このバンドをセルフライゲーションして，プラスミド p G R 0 1 9 を得た。

【0035】

h G R β C 端固有領域発現遺伝子の構築

p G R 0 1 9 制限酵素 E c o T 2 2 I , B a m H I で消化し，上記 p G R 0 0 6 由来 3 5 0 b p 断片を精製し，p G R 0 1 9 ベクター部分にライゲーションして，プラスミド p G R 0 2 0 を得た。

【0036】

H i s - T a g 融合タンパク質発現遺伝子の作製

H i s - T a g 合成遺伝子は 2 本鎖を作るためにアニーリングし，その後 N d e I 消化した。この N d e I 消化断片を精製し，それぞれ制限酵素 N d e I で完全消化した p G R 0 1 8 , p G R 0 1 9 および p G R 0 2 0 とライゲーションして，H i s - T a g 融合タンパク質をコードするプラスミド p G R 0 2 4 , p G R 0 2 5 および p G R 0 2 6 を得た。

【0037】

H i s - T a g - h G R α β 共通領域融合タンパク質の精製

p G R 0 2 4 の B L 2 1 (D E 3) C o d o n P l u s R I L 形質転換体を 1 0 m l の M 9 Z B 培地で 3 7 ° C 振盪培養した。約 5 時間後濁度を測定しそれぞれの 5 5 0 n m の吸光度が 0 . 6 ~ 0 . 8 である事を確認し，I P T G を添加した。添加後同条件で 3 時間培養し，6 m l 分菌体を遠心分離により回収した。菌体を 1 m l の 8 M 尿素，5 0 0 m M N a C l , 2 0 m M N a P O 4 p H 7 . 8 (B u f f e r A) で懸濁した。懸濁液を T O M Y 精工社製超音波発生装置により超音波破碎し，1 5 0 0 0 r p m , 5 分間 4 ° C で遠心分離し，上清を回収した。

【0038】

この上清をアフィニティークロマトグラフィーにアプライした。アフィニティークロマトグラフィーは I n v i t r o g e n 社製 P r o B o n d (登録商標) R e s i n を使用した。予め 1 m l のゲルをカラムに充填し，1 0 m l の B u f f e r A で平衡化しておき，ここに上記菌体抽出液をアプライした。8 m l の同バッファーで洗浄し，次いで 2 m l の 8 M 尿素，5 0 0 m M N a C l , 2 0 m M N a P O 4 p H 6 . 5 (B u f f e r B) で洗浄後，8 M 尿素，5 0 0 m M N a C l , 2 0 m M N a P O 4 p H 4 . 0 (B u f f e r C) で溶出した。溶出液は 1 m l ずつ分画した。溶出液の 2 8 0 n m 吸光度を測定した。溶出液を S D S - P A G E で解析した。溶出液はシングルバンドであった。H i s - T a g - h G R α β 融合タンパク質は抽出液から 1 工程で精製されることが確認された。

【0039】

H i s - T a g 部分の切り出し

10

20

30

40

50

H i s - T a g 融合タンパク質をエンテロキナーゼ処理したところ、処理物はP r o B o n dカラムを素通りし、H i s - T a g 部分が除去されたことが確認された。

【0040】

H i s - T a g - h G R α , および H i s - T a g - h G R β 融合タンパク質の精製
p G R 0 2 5 あるいは p G R 0 2 6 の H M S 1 7 4 (D E 3) 形質転換体を 5 m l $\times$ 1 0 本の M 9 Z B 培地で 3 7 $^{\circ}$ C 振盪培養した。約 5 時間後濁度を測定しそれぞれの 5 5 0 n m の吸光度が 0 . 6 ~ 0 . 8 である事を確認し、I P T G を添加した。添加後同条件で 3 時間培養し、5 0 m l 分菌体を遠心分離により回収した。菌体を 5 m l の 6 M グアニジン-H C l , 5 0 0 m M N a C l , 2 0 m M N a P O ₄ p H 7 . 8 で懸濁した。懸濁液を T O M Y 精工社製超音波発生装置により超音波破碎し、1 5 0 0 0 r p m , 5 分間 4 $^{\circ}$ C で遠心分離し、上清を回収した。この上清をアフィニティークロマトグラフィーにアプライした。アフィニティークロマトグラフィーは I n v i t r o g e n 社製 P r o B o n d (登録商標) R e s i n を使用した。予め 1 m l のゲルをカラムに充填し、1 0 m l の 8 M 尿素, 5 0 0 m M N a C l , 2 0 m M N a P O ₄ p H 7 . 8 で平衡化しておき、ここに上記菌体抽出液をアプライした。8 m l の同バッファーで洗浄し、次いで 2 m l の 8 M 尿素, 2 0 m M N a P O ₄ p H 6 . 5 (B u f f e r B) で洗浄後、さらに 8 M 尿素, 2 0 m M N a P O ₄ p H 5 . 0 (B u f f e r D) で洗浄した。この後 8 M 尿素, 2 0 m M N a P O ₄ p H 5 . 0 (B u f f e r C) 溶出した。溶出液は 1 m l ずつ分画した。溶出液の 2 8 0 n m 吸光度を測定した。溶出液を S D S - P A G E で解析した。

10

20

【0041】

実施例 2 ヒトグルココルチコイドリセプター α β 共通領域モノクローナル抗体の作製
p G R 0 2 4 組換え体の免疫

免疫には、マウス 3 匹 (B a l b / c $\times$ 3) を用いた。h G R 組換え体を 1 匹あたり 5 0 μ g を腹腔内に免疫した。アジュバントとしては、R I B I 社の M P L + T D M E M U L S I O N を使用し、抗原とアジュバントを容量 1 : 1 で混合し、免疫した。免疫スケジュールとして 5 回免疫後にチェック採血を行い抗体価の上昇を E L I S A にて確認した。

【0042】

力価測定

5 回免疫後チェック採血について h G R 組換え体抗原固相化プレートを作製し、力価測定に供した。プレートについては、抗原 1 μ g / m l の濃度で使用した。またアッセイは室温で、血清 (一次) 反応 1 h r , 標識抗体 (二次) 反応 1 h r , T M B による発色 2 分で行った。各個体において力価の上昇が確認された。このうち、最も高い力価を示した個体についてアジュバントを含まない抗原 (5 0 μ g) で追加免疫を行い、以下に記載するようにフュージョンを行った。

30

【0043】

フュージョン

マウスから脾臓を摘出し、D M E M 培養液下で、ホモジネイトを行った。細胞懸濁液を遠心分離 (1 0 0 0 回転, 1 0 分) し、上清除去後、ペレットを D M E M 培養液に再懸濁した。細胞懸濁液をあらかじめ用意したマウスハイブリドーマ (P 3 U 1) 細胞懸濁液と混合し、遠心を行った (1 0 0 0 回転, 1 0 分間) 。上清除去後、フュージョン溶液 (P E G 4 0 0 0 1 m l , D M S O 0 . 3 m l , D M E M 1 m l) 下で、ピペットの攪拌操作を行い、更に D M E M を添加した。遠心分離 (8 0 0 回転, 1 0 分間) により得られた細胞を上清除去後、H A T 培養液に懸濁した。ついで 9 6 ウエルプレート 5 枚に滴下し (1 0 m l ピペット, 各 2 滴) , H A T 培地下で 2 週間培養を行った。培養 2 週間後、コロニーを確認し、事前に作製した E L I S A プレート (p G R 0 2 4 組換え体抗原 1 μ g / m l 固相化) にてアッセイを行った。結果として、9 6 ウエル $\times$ 5 枚のうち、5 個のウェルに I g G としての発色が確認された。

40

【0044】

限界希釈

50

発色が確認された5クローンのうち、2クローンについて限界希釈により上述のE L I S Aでモノクローン化を行った。発色が確認されたウエルについて細胞をパスツールピペットで懸濁し、R P M I / H T培地に希釈した。希釈したハイブリドーマを96ウエルプレートに滴下し、約2週間培養を行った。コロニー確認後、上述のE L I S Aにて発色を確認した。ウエルにおいて単一のクローンと確認されるまで、作業を繰り返し行った。ただし二回目以降の培地はR P M I / 15% F C Sを用い、最終的にはR P M I / 10% F C Sとした。最終的にクローンが単一であることが確認されたので、上述のE L I S Aの系にて2クローンの発色を確認した。各クローンともに、高い発色が確認された。これらのクローンについて細胞ストックを行った。細胞ストックは以下の手順に従った。十分に増殖が確認された細胞を15mlチューブに移し遠心(1000回転, 5分)した。上清除去後、細胞凍結保存液セルバンカー(ダイアマトロン)中に懸濁し、5本のセラムチューブに分注を行った後、直ちに-80℃フリーザーにストックした。3日後、ストックした5本のうち、1本をR P M I / 10% F C Sに起こし、細胞の増殖、上清中の活性を確認した。ストック後の細胞にも活性が確認された。

10

【0045】

実施例3 ヒトグルココルチコイドリセプターα特異的モノクローナル抗体の作製

ヒトグルココルチコイドリセプターα特異的モノクローナル抗体作成のための免疫原としてはp G R 0 2 5組換え体を使用した。免疫方法、力価測定、フュージョン、限界希釈は実施例2と同じ方法で実施した。ヒトグルココルチコイドリセプターα特異的クローンの選択には以下の方法を用いた。p G R 0 2 5由来ヒトグルココルチコイドリセプターα組換え体を1μg/mlの濃度で固相化したプレートと、p G R 0 2 6由来ヒトグルココルチコイドリセプターβ組換え体を1μg/mlの濃度で固相化したプレートをそれぞれ用意し、各々のプレートに選択するクローンの培養上清を反応させた。抗体の検出はH R P標識抗マウスI g G抗体で実施した。H R Pの発色はT M B基質により行った。h G R α特異的抗体の選択は、h G R α組換え体プレートに陽性を示し、h G R β組換え体プレートには陰性を示す事を指標に、クローンを限界希釈することで実施した。

20

【0046】

実施例4 ヒトグルココルチコイドリセプターβ特異的モノクローナル抗体の作製

ヒトグルココルチコイドリセプターβ特異的モノクローナル抗体作成のための免疫原としてはp G R 0 2 6組換え体を使用した。免疫方法、力価測定、フュージョン、限界希釈は実施例2と同じ方法で実施した。ヒトグルココルチコイドリセプターβ特異的クローンの選択には以下の方法を用いた。p G R 0 2 5由来ヒトグルココルチコイドリセプターα組換え体を1μg/mlの濃度で固相化したプレートと、p G R 0 2 6由来ヒトグルココルチコイドリセプターβ組換え体を1μg/mlの濃度で固相化したプレートをそれぞれ用意し、各々のプレートに選択するクローンの培養上清を反応させた。抗体の検出はH R P標識抗マウスI g G抗体で実施した。H R Pの発色はT M B基質により行った。h G R β特異的抗体の選択は、h G R β組換え体プレートに陽性を示し、h G R α組換え体プレートには陰性を示す事を指標に、クローンを限界希釈することで実施した。

30

【0047】

実施例5 モノクローナル抗体の精製

得られた各ハイブリドーマをR P M I 1640培地で培養した。マウス(B A L B / c)に1匹当たり0.5mlの腫瘍形成促進剤プリスタン(A l d r i c h C h e m. 製)を腹腔内投与した。1~3週間後に、各ハイブリドーマ1×10⁷個を同じく腹腔内投与し、さらに、その1~2週間後に4~7mg/mlのモノクローナル抗体を含む腹水が得られた。抗体含有各腹水を、アフィゲル プロテインA M A P S - I Iキット(B i o - R a d 製)を用いて精製した。

40

【0048】

実施例6 ヒトグルココルチコイドリセプターα及びβの定量

酵素標識抗体(ヒトグルココルチコイドリセプターα及びβ-H R P)の調製上記精製抗h G R α、及びh G R βモノクローナル抗体を1.8%食塩を含む0.1M炭酸水素ナ

50

トリウムバッファー pH 9.5 溶液でそれぞれ溶解し、 $300\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ とした。この IgG 溶液に 1mg を $50\mu\text{l}$ 蒸留水に溶解した EZ-Link Activated Peroxidase (PIERCE 社製) を混合した。この混合物を 4°C 終夜反応した後、 200mM L-Lysine $30\mu\text{l}$ を添加した。室温で 3 時間反応した。これを 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Superdex 75 カラムを用いてゲルろ過し、Fab'-HRP 複合体画分を分取後、等量のグリセロールを添加し、 -20°C で保存した。

【0049】

Fab' 画分の調製

精製モノクローナル抗体 (IgG) を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解し、その溶液を以下述べるようにして固定化ペプシンで消化した。すなわち、上記 IgG 4mg に対して固定化ペプシン (PIERCE 社製 Immobilized Pepsin) $200\mu\text{l}$ を加え、 37°C 、6 時間消化した。遠心分離 (3300 回転、5 分間) により固定化ペプシンを除き、蒸留水に透析し、凍結乾燥した。凍結乾燥品を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Superdex 75 カラムを用いたゲルろ過により、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 画分を分取した。次に、この $\text{F}(\text{ab}')_2$ 画分を蒸留水中で透析し、凍結乾燥した。凍結乾燥品を $225\mu\text{l}$ の PBS で溶解し、 $25\mu\text{l}$ 200mM 2-メルカプトエチルアミンを加え 37°C で 90 分間還元した後、 5mM EDTA 含有 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.6) で平衡化した PD-10 カラムを用いて単純ゲルろ過し、Fab' 画分を分取した。

【0050】

抗ヒトグルココルチコイドリセプター $\alpha\beta$ Fab'-HRP 複合体画分の調製

Fab' に対して、マレイミド標識 HRP として EZ-Link Maleimide Activated HRP (PIERCE 社製) を等モルになるように両者を混合し、室温で 2 時間反応後これを膜濃縮した。これを 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Superdex 75 カラムを用いてゲルろ過し、Fab'-HRP 複合体画分を分取後、等量のグリセロールを添加し、 -20°C で保存した。

【0051】

サンドイッチ EIA 法 1 (hGR α , 及び hGR β の定量)

PBS で、抗 hGR $\alpha\beta$ 共通領域認識抗体を $5\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう調製し、 96 穴マイクロプレート (Nunc 社製) に $100\mu\text{l}$ 加えた。 4°C で終夜反応した後、液を除去し、ウェルにブロッキング液 (Block A 大日本製薬社製) $300\mu\text{l}$ を添加し、 37°C 1 時間反応した。次に洗浄緩衝液で 3 回プレートを洗浄した。次に、各濃度の標準 hGR α もしくは hGR β 組換え体、あるいは測定検体溶液をプレートに $100\mu\text{l}$ 添加した。組換え体、検体の希釈は希釈バッファーを用いた。プレートを 37°C 2 時間反応させ、この後洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。次に、上記 HRP 抗 hGR α あるいは抗 hGR β 抗体を 200 倍に反応バッファーで希釈し、 $100\mu\text{l}$ 添加し、 37°C で 2 時間反応した。プレートを洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。プレートに HRP 発色基質 TMB (MOS S 社製) を $100\mu\text{l}$ 加え、20 分間 37°C で反応した。 2N 硫酸 $100\mu\text{l}$ 添加し反応を停止させた。この反応混液の A_{450} をマイクロプレートリーダーを用いて測定し検量線より、検体中のヒトグルココルチコイドリセプター α , 及び β の濃度を求めた。本 EIA により測定したヒトグルココルチコイドリセプター α 測定の結果を図 8 に、ヒトグルココルチコイドリセプター β 測定の結果を図 9 に示す。

【0052】

サンドイッチ EIA 法 2 (hGR α , 及び hGR β の定量)

PBS で、抗 hGR α , あるいは hGR β 抗体を $5\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう調製し、 96 穴マイクロプレート (Nunc 社製) に各々 $100\mu\text{l}$ 加えた。 4°C で終夜反応した後、液を除去し、ウェルにブロッキング液 (Block A 大日本製薬社製) $300\mu\text{l}$ を添加し、 37°C 1 時間反応した。次に洗浄緩衝液で 3 回プレートを洗浄した。次に、抗 hGR α 抗体固相化プレートには各濃度の標準 hGR α , 抗 hGR β 抗体固相化プレートには hG

R β 組換え体，あるいは測定検体溶液をプレートに100 μ l添加した。組換え体，検体の希釈は希釈バッファーを用いた。プレートを37℃2時間反応させ，その後洗浄緩衝液で3回洗浄した。次に，上記Fab'-HRP抗hGR α β 抗体を200倍に反応バッファーで希釈し，100 μ l添加し，37℃で2時間反応した。プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した。プレートにHRP発色基質TMB（MOS S社製）を100 μ l加え，20分間37℃で反応した。2N硫酸100 μ l添加し反応を停止させた。この反応混液のA₄₅₀をマイクロプレートリーダーを用いて測定し検量線より，検体中のヒトグルココルチコイドリセプター α ，及び β の濃度を求めた。本EIAにより測定したヒトグルココルチコイドリセプター α 測定の結果を図10に，ヒトグルココルチコイドリセプター β 測定の結果を図11に示す。

10

【0053】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Nisshin Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Method and Reagent for Steroid Resistance Assay

<130> pnk-0001

<160> 8

<210> 1

<211> 21

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 1

cctaaggacg gtctgaagag c 21

<210> 2

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

ccacgtatcc taaaaggga c 21

30

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 3

40

ggtgctaagg atccggagat gacaactga cttctctggg 40

<210> 4

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 4

10

gtcaagtgt catctccgga tccttagcac ctattccaat tttcgg 46

<210> 5

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

20

<400> 5

cgttaccaca actcacccat atgctgggtgt cactgttgga gg 42

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> primer for point mutation

<400> 6

cagtgcacc agcatatggg tgagtgtgga taacgttgca gg 42

<210> 7

<211> 2334

<212> DNA

<213> Homo sapiens

40

<400> 7

atggactcca aagaatcatt aactcctggg agagaagaaa accccagcag tgtgcttgct 60
 caggagaggg gagatgtgat ggacttctat aaaacctaa gaggaggagc tactgtgaag 120
 gtttcigcgt cttcacctc actggcgtc gcttctcaat cagactccaa gcagcgaaga 180
 cttttgggtg attttccaaa aggcacagta agcaatgcgc agcagccaga tctgtccaaa 240
 gcagtttcac tctcaatggg actgtatatg ggagagacag aaacaaaagt gatgggaaat 300
 gacctgggat tcccacagca gggccaaatc agcctttctt cgggggaaac agacttaaaag 360
 cttttggaag aaagcattgc aaacctcaat aggtcgacca gtgttccaga gaaccccaag 420
 agttcagcat ccactgctgt gtctgtctcc cccacagaga aggagtctc aaaaactcac 480
 tctgaigtat cttcagaaca gcaacattg aagggccaga ctggcaccaa cgggtggcaat 540
 gtgaaattgt ataccacaga ccaaagcacc tttagacatt tgcaggattt ggagttttct 600
 tctgggtccc caggtaaaga gacgaatgag agtcttggga gatcagacct gtgatagat 660
 gaaaactgtt tgccttctcc tctggcggga gaagacgatt cattcctttt ggaaggaaac 720
 tcaatgagg actgcaagcc tctcatitta ccggacacta aacccaaaat taaggataat 780
 ggagatctgg ttttgtcaag cccagtaat gtaacactgc cccaagtga aacagaaaaa 840
 gaagattica tcaactctg caccctggg gtaattaaagc aagagaaact gggcacagtt 900
 tactgtcagg caagctttc tggagcaaat ataattggta ataaaatgtc tgccatttct 960
 gttaatgggt tgagtacct tggaggacag atgtaccact atgacatgaa tacagcatcc 1020
 ctttctcaac agcaggatca gaagcctatt tttaatgtca ttccaccaat tcccgttggg 1080
 tccgaaaatt ggaatagggt ccaaggatct ggagatgaca acttgacttc tctggggact 1140
 ctgaacttcc ctggctgaac agttttttct aatggctatt caagccccag catgagacca 1200
 gatgtaagct ctctccatc cagctctca acagcaacaa caggaccacc tcccaaactc 1260
 tgcctgggtg gctctgatga agcttcagga tgcattatg gagtcttaac ttgtggaagc 1320
 tgtaaagttt tcttcaaaag agcagtggaa ggacagcaca attacctatg tgctggaagg 1380
 aatgattgca tcatcgataa aattcgaaga aaaaactgcc cagcatgccg ctatcgaaaa 1440
 tgtcttcagg ctggaatgaa cctggaagct cgaaaaacaa agaaaaaat aaaaggaatt 1500
 cagcaggcca ctacaggagt ctcacaagaa acctctgaaa atcctggtaa caaaacaata 1560
 gtctctgcaa cgttaccaca actcaccct acctgggtgt cactgttgga ggttattgaa 1620
 cctgaagtgt tatatgcagg atatgatagc tctgttccag actcaacttg gaggatcatg 1680
 actacgtca acatgttagg agggcggcaa gtgattgcag cagtgaatg ggcaaaggca 1740

10

20

30

40

ataccagggtt tcaggaactt acacctggat gaccaaatga ccttactgca gtactcctgg 1800
 atgtttctta tggcatttgc tctgggggtgg agatcatata gacaatcaag tgcaaacctg 1860
 ctgtgttttg ctctgatct gattattaat gagcagagaa tgactctacc ctgcatgtac 1920
 gaccaatgta aacacatgct gtatgtttcc tctgagttac acaggettca ggtatcttat 1980
 gaagagtatc tctgtatgaa aaccttactg ctctctctct cagttcctaa ggacggctcg 2040
 aagagccaag agctatttga tgaaattaga atgacctaca tcaaagagct agggaaaagcc 2100
 atgttcaaga gggaaggaaa ctccagccag aactggcagc ggttttatca actgacaaaa 2160
 ctcttggatt ctatgcatga agtgggttga aatctcctta actattgctt ccaaactttt 2220
 ttggataaga ccatgagtat tgaattcccc gagatgttag ctgaaatcat caccaatcag 2280
 ataccaaaat attcaaattgg aaatatcaaa aaacttctgt ttcataaaaa giga 2334

<210> 8

<211> 2229

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atggactcca aagaatcatt aactcctggt agagaagaaa accccagcag tgtgcttgct 60
 caggagaggg gagatgtgat ggacttctat aaaaccttaa gaggaggagc tactgtgaag 120
 gtttcigcgt ctccacctc actggctgtc gccttctaat cagactccaa gcagcgaaga 180
 cttttggttg attttccaaa aggtcagta agcaatgcgc agcagccaga tctgtccaaa 240
 gcagtttcac tctcaatggg actgtatatg ggagagacag aaacaaaagt gatgggaaat 300
 gacctgggat tcccacagca gggccaaatc agcctttctt cgggggaaac agacttaaaag 360
 cttttggaag aaagcattgc aaacctcaat aggtcgacca gtgttccaga gaaccccaag 420
 agttcagcat ccactgctgt gtctgtgtcc cccacagaga aggagtttcc aaaaactcac 480
 tctgaigtat ctccagaaca gcaacattg aagggccaga ctggcaccaa cggttggcaat 540

10

20

30

40

glgaaatigt ataccacaga ccaaagcacc ttigacattt tgcaggattt ggagttttct 600
 tctgggtccc caggtaaaga gacgaatgag agtcccttga gatcagacct gtgatagat 660
 gaaaactigt tgcittctcc tctggcggga gaagacgatt cattcctttt ggaaggaaac 720
 tcgaatgagg actgcaagcc tctcatitta ccggacacta aacccaaaat taaggataat 780
 ggagatcigg ttttgtcaag ccccgatgaat gtaacactgc cccaagtga aacagaaaaa 840
 gaagatttca tcgaactctg cacccttggg gtaattaagc aagagaaact gggcacagtt 900
 tactgtcagg caagctttcc tggagcaaat ataattggta ataaaatgtc tgccatttct 960
 gtcatgggtg tgagtacctc tggaggacag atgtaccact atgacatgaa tacagcatcc 1020
 ctttctcaac agcaggatca gaagcctatt tttaatgtca ttccaccaat tcccgttggg 1080
 tccgaaaatt ggaatagggt ccaaggatct ggagatgaca acttgacttc tctggggact 1140
 ctgaacttcc ctggctgaac agttttttct aatggctatt caagccccag catgagacca 1200
 gatgtaagct ctctccatc cagctctca acagcaacaa caggaccacc tcccaacttc 1260
 tgcctggigt gctctgatga agcttcagga tgcattatg gagtcttaac ttgtggaagc 1320
 tgtaaagitt tcttcaaaag agcagtggaa ggacagcaca attacctatg tgctggaagg 1380
 aatgattgca tcatcgataa aattcgaaga aaaaactgcc cagcatgccg ctatcgaaaa 1440
 tgtcttcagg ctggaatgaa cctggaagct cgaaaaacaa agaaaaaaat aaaaggaatt 1500
 cagcaggcca ctacaggagt ctacaagaa acctctgaaa atcctggtaa caaaacaata 1560
 gtccctgcaa cgttaccaca actcaccctt acctgggtgt cactgttggg ggttattgaa 1620
 ccigaagigt tatatgcagg atatgatagc tctgttcag actcaacttg gaggatcatg 1680
 actacgtca acatgttagg agggcggcaa gtgattgcag cagtgaatg ggcaaaggca 1740
 ataccagggt tcaggaactt acacctggat gaccaaatga cctactgca gtactcctgg 1800
 atgtttctta tggcatttgc tctgggggtg agatcatata gacaatcaag tgcaaacctg 1860
 ctgtgttttg ctctgatct gattatlaat gagcagagaa tgactctacc ctgcatgtac 1920
 gaccaatgta aacacatgct gtatgtttcc tctgagttac acaggcttca ggtatcttat 1980
 gaagagtatc tctgtatgaa aacctactg ctctctctt cagtctctaa ggacggcttg 2040
 aagagccaag agctatttga tgaaattaga atgacctaca tcaaagagct agggaaaaggc 2100
 attgtcaaga gggaaggaaa ctccagccag aactggcagc ggttttatca actgacaaaa 2160
 ctcttggatt ctatgcatga aaatgttatg tggttaaaac cagaaagcac atctcacaca 2220
 ttaatctga 2229

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、グルココルチコイドの推定作用メカニズムを示す。

【図 2】図 2 は、グルココルチコイドリセプター α および β の発現メカニズムを示す。

【図 3】図 3 は、本発明において作製した組換えグルココルチコイドリセプター α および β ならびに融合タンパク質の構造を示す。

【図 4】図 4 は、本発明の実施例において作製した各種のプラスミドの構造を示す。

50

【図 5】図 5 は、本発明の実施例において作製した各種のプラスミドの構造を示す。

【図 6】図 6 は、本発明の実施例において作製した各種のプラスミドの構造を示す。

【図 7】図 7 は、本発明の実施例において作製した各種のプラスミドの構造を示す。

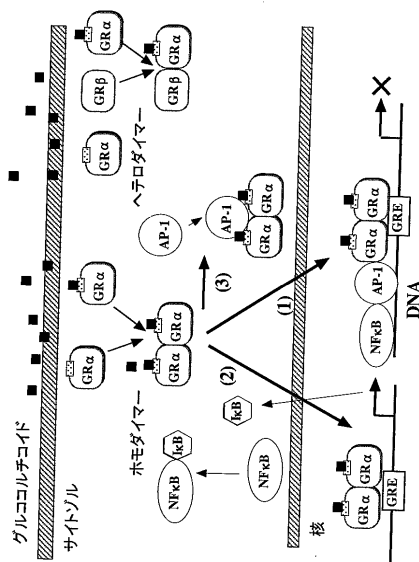
【図 8】図 8 は、本発明のモノクローナル抗体を用いるヒトグルココルチコイドリセプター α の定量を示す。

【図 9】図 9 は、本発明のモノクローナル抗体を用いるヒトグルココルチコイドリセプター β の定量を示す。

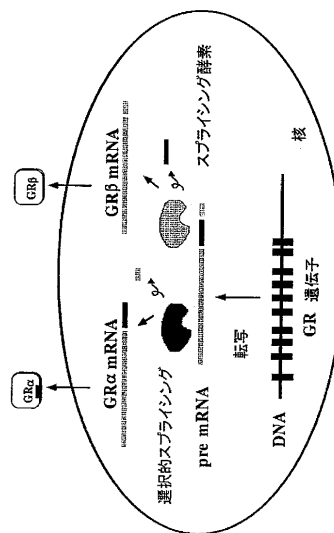
【図 10】図 10 は、本発明のモノクローナル抗体を用いるヒトグルココルチコイドリセプター α の定量を示す。

【図 11】図 11 は、本発明のモノクローナル抗体を用いるヒトグルココルチコイドリセプター β の定量を示す。 10

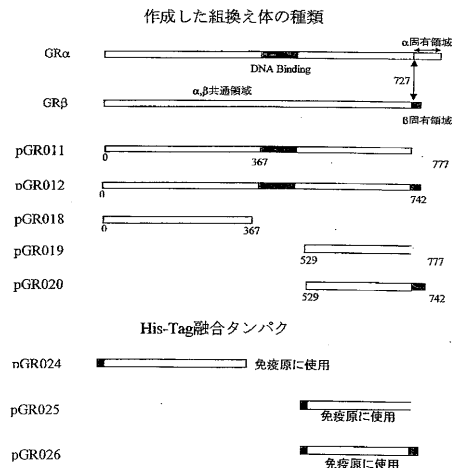
【図 1】



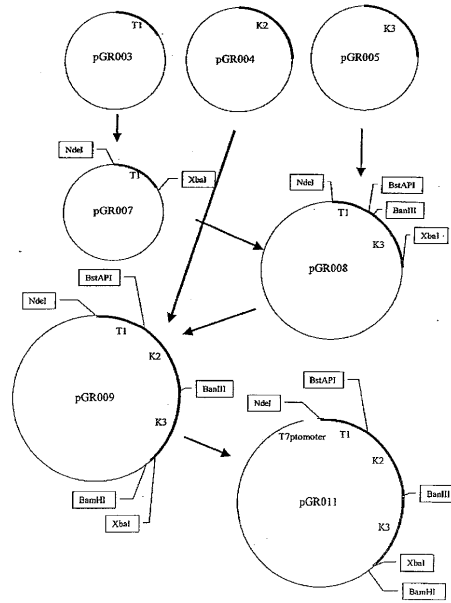
【図 2】



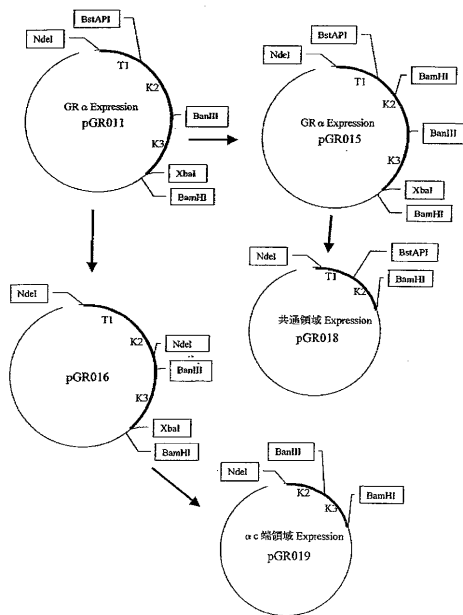
【図 3】



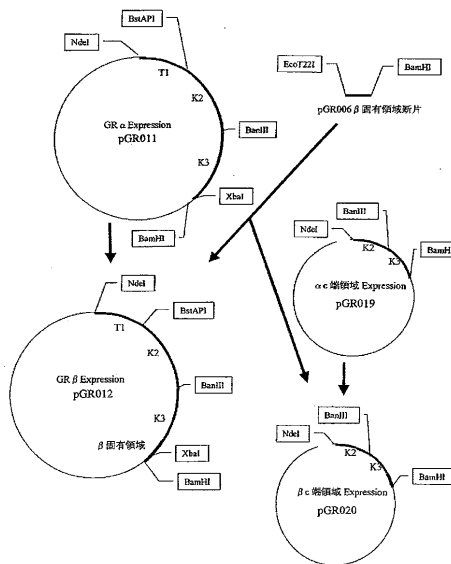
【図 4】



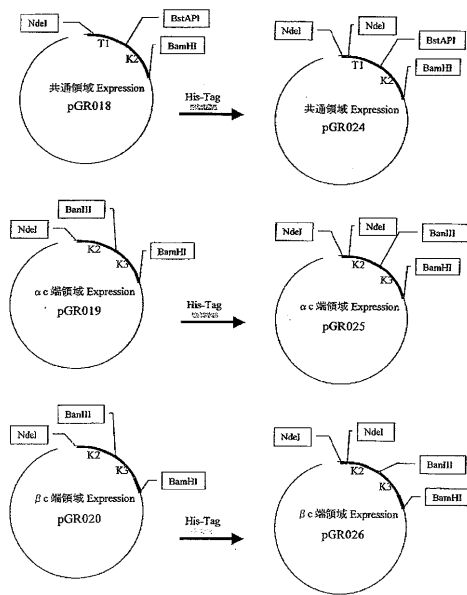
【図 5】



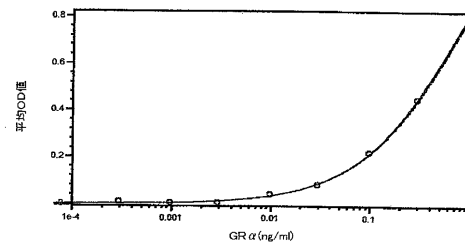
【図 6】



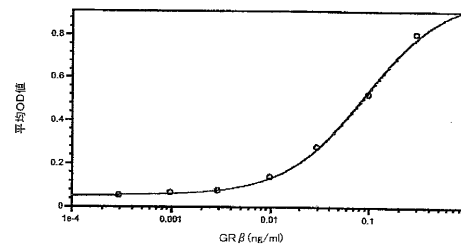
【図 7】



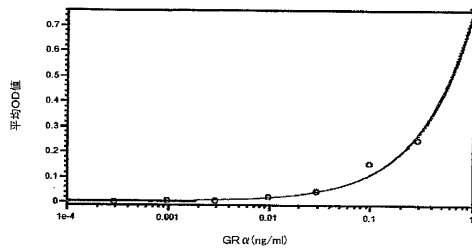
【図 8】



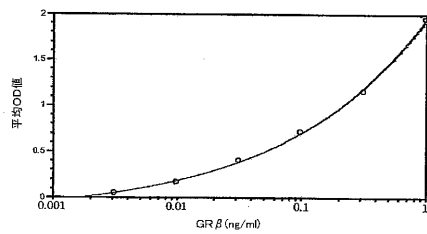
【図 9】



【図 10】



【図 11】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA50 FA72

专利名称(译)	用于测定对类固醇的耐受性的方法和试剂		
公开(公告)号	JP2004238377A	公开(公告)日	2004-08-26
申请号	JP2003032117	申请日	2003-02-10
[标]申请(专利权)人(译)	日清キョーリン制药		
申请(专利权)人(译)	杏林日新制药有限公司		
[标]发明人	今井伸二郎		
发明人	今井 伸二郎		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/28 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/28.ZNA G01N33/53.D G01N33/577.B C12N15/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：制备对人糖皮质激素受体 α 和 β 具有高选择性的单克隆抗体作为确定类固醇敏感性的临床测试方法，并提供一种通过酶抗体方法的测量系统。一种用于免疫测定人糖皮质激素受体的方法，该方法包括识别人糖皮质激素受体 α 和 β 以及人糖皮质激素受体 β 但识别人糖皮质激素受体 α 的单克隆抗体。并且不存在单克隆抗体。[选择图]无

【 図 2 】

