

(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 - 112768**

( P2002 - 112768A )

(43)公開日 平成14年4月16日 (2002.4.16)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード ( 参考 )
C 1 2 N 15/02		C 0 7 K 7/06	ZNA 4 B 0 2 4
C 0 7 K 7/06	ZNA	16/18	4 B 0 6 4
16/18		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		33/577	B 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L ( 全 16数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 304946(P2000 - 304946)

(22)出願日 平成12年10月4日(2000.10.4)

(71)出願人 390004097

株式会社医学生物学研究所

愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号

住友商事丸の内ビル5F

(72)発明者 矢野 竹男

長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063 - 10

3 株式会社医学生物学研究所内

(72)発明者 柴田 昌夫

長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063 - 10

3 株式会社医学生物学研究所内

(74)代理人 100108280

弁理士 小林 洋平

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アンジオスタチン特異的モノクローナル抗体、及びこのモノクローナル抗体を用いたアンジオスタチンの検出方法等

(57)【要約】

【課題】 プラスミノーゲンの79番目の断点に対する新たなモノクローナル抗体を作製するための合成ペプチドと、この合成ペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体を提供するとともに、このモノクローナル抗体を産生する細胞、該モノクローナル抗体を液相中でアンジオスタチンと特異的に反応させるための溶液条件と該モノクローナル抗体とこの溶液条件とを用いたアンジオスタチンを測定する免疫学的測定方法を提供すること。

【解決手段】 プラスミノーゲンの79-84番目の合成ペプチド ( VYLSEC )と特異的に結合するモノクローナル抗体は、例えば、融合細胞クローン4A2 ( 受託番号 F E R M P - 1 8 0 5 9 ) により産生される。このモノクローナル抗体4A2-ABをELISA用プレートなどに固相化し、このモノクローナル抗体がアンジオスタチンと特異的に反応する液相条件下でサンプルと固相化モノクローナル抗体を反応させ、さらに抗プラスミノーゲン抗体を利用してELISA法を行えば、検体中のアンジオスタチンを定量的に測定することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト、マウス、ラットのプラスミノゲンの79番目から84番目の Val-Tyr-Leu-Ser-Glu-Cys からなるアミノ酸配列を特徴とするペプチド。

【請求項2】 請求項1記載のペプチドと特異的に結合することを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項3】 請求項2記載のモノクローナル抗体を産生することを特徴とする融合細胞。

【請求項4】 請求項1記載のペプチドを免疫感作させた哺乳動物から取得される抗体産生細胞と哺乳動物由来骨髄腫系細胞との融合により得られることを特徴とする請求項3記載の融合細胞。

【請求項5】 請求項2記載のモノクローナル抗体を用いて検体中のアンジオスタチンを検出することを特徴とするアンジオスタチンの検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アンジオスタチン特異的モノクローナル抗体、及びこのモノクローナル抗体を用いたアンジオスタチンの検出方法等に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】ガンが増殖や転移プロセスは血管内皮細胞増殖因子(VEGF)や塩基性ファイブロブラスト増殖因子(bFGF)などの血管新生刺激因子と血管新生抑制因子との間のバランス関係によって制御されている(Hanahan, D and Folkman, J., Cell, 86, 353-364, 1996)。アンジオスタチン(ANS)は血管新生抑制活性を持ったプラスミノゲンのクリングルドメイン部分のポリペプチドである(図1)。最初、担ガンマウス尿から分子量38kDのペプチド性血管新生抑制因子として単離・精製され、アミノ酸シーケンスの結果、そのN末端は、プラスミノゲンの79番目のバリンから始まっていることが明らかにされ、その分子量からプラスミノゲンが有する5個のクリングルドメインのうちの始めの4個のクリングルドメインを含むフラグメントであることが予想された。また、in vitro でヒトプラスミノゲンをエラスターゼ処理すると40, 42, 45 kDの分子量を持ったマウスのアンジオスタチンと同等の血管新生抑制活性のあるフラグメントが得られた。各フラグメントのアミノ酸シーケンスの結果、ヒトプラスミノゲンの78番目のリジンまたは80番目のチロシンから始まっていることが示された。また、アンジオスタチンのC末端側は、分子量とエラスターゼの断点から452番目であると予想されている(特表平9-512173号、O'Reilly M S., et al., Cell, 79, 315-328, 1994)。

【0003】しかしながら、アンジオスタチンの産生メカニズム、作用機序等には不明な点が多く、ヒト血中または尿中の存在も未だ明らかとなっていない。O'Reillyらは、アンジオスタチンは正常マウス尿にはなく、担

ガンマウス尿にのみ存在していたと報告していることから、ガン患者の血中、尿中に多く存在する可能性が示唆される。さらに、アンジオスタチンの尿中の存在については、正常人尿中  $3 \pm 2$  ng/ml, ガン患者尿中  $27 \pm 75$  ng/mlの濃度で存在するという報告があった(ANTICANCER Res. 19: 3409-3414 1999)。しかし、上記患者尿については、腎臓障害などの他の疾患も考慮しなければならず、詳細な解析結果は未だ示されていない。また、アンジオスタチンの血中の存在については、アンジオスタチンのみを他のプラスミノゲン由来物質から分離して検出し得る抗体が見つかっていないことから、明確な報告がなされていない。

【0004】ところで、in vitro において、プラスミノゲンをアンジオスタチンに変換する酵素としては、metalloelastase (Cell 88, 801-810 1997), MMP-7 (JBC 272, 28823-28825 1997), MMP-9 (JBC 272, 28823-28825 1997), MMP-3 (Biochemistry 37, 4699-4702 1998), MMP-2 (JBC 274, 29568-29571 1999), 24k-bacterial endopeptidase (Biochemistry 39, 479-488 2000)などのプロテアーゼが報告されている。また、最近、ガン細胞株培養上清中にプラスミノゲンをアンジオスタチンに変換するいくつかの酵素が存在する可能性があることも報告された(Int. J. Cancer 86, 760-767 2000)。しかし、in vivo でのアンジオスタチンおよびその変換酵素の存在については、明らかにされていない。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】このように、in vivo でのアンジオスタチンの産生メカニズム、作用機序、及びヒト血中・尿中での存在の有無を明らかにすることで、例えばガンのように血管新生を伴う疾患の診断・治療等に有効に利用できると考えられており、そのためにアンジオスタチン特異的な抗体は非常に有用なものであると考えられている。しかしながら、現在までのところ、そのような抗体は作製されていない。このため、アンジオスタチンを検出するには、従来のプラスミノゲンを抗原として得られた抗体が使用されているが、その抗体はクリングルドメインを認識するものであることから、プラスミノゲンやアンジオスタチン以外のプラスミノゲンフラグメントも同時に検出する。このため、特に多くの峡雑蛋白質の混入が考えられる生体由来のサンプル中のアンジオスタチンを検出する場合には、得られた結果の解析が非常に困難であった。

【0006】本発明は上記課題に鑑みなされたものであり、プラスミノゲンの79番目から84番目のペプチド (Val-Tyr-Leu-Ser-Glu-Cys(VYLSEC)、以下「Pla79-84」と言うことがある)と、このペプチドに対して特異的に結合するモノクローナル抗体、これを産生する融合細胞、該モノクローナル抗体をアンジオスタチンと特異的に反応させる液相条件、並びに、前記モノクローナル抗体と液相条件を利用した免疫学的手法によるアンジオ

スタチンの検出法を提供するものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するための第1の発明は、ヒト、マウス、ラットのプラスミノージェンの79番目から84番目の Val-Tyr-Leu-Ser-Glu-Cys からなるアミノ酸配列を特徴とするペプチドである。請求項2の発明は、請求項1記載のペプチドと特異的に結合することを特徴とするモノクローナル抗体である。請求項3の発明は、請求項2記載のモノクローナル抗体を産生する融合細胞である。請求項4の発明は、請求項1記載のペプチドを免疫感作させた哺乳動物から取得される抗体産生細胞と哺乳動物由来骨髄腫系細胞との融合により得られることを特徴とする請求項3記載の融合細胞である。請求項5の発明は、請求項2記載のモノクローナル抗体を用いて検体中のアンジオスタチンを検出することを特徴とするアンジオスタチンの検出方法である。

【0008】

【発明の作用、及び発明の効果】従来のプラスミノージェン関連物質（プラスミン（プラスミノージェンが、プラス 20 ミノージェンアクチベーターにより、図1中、560番目のアルギニンと561番目のバリンのペプチド結合が限定分解され、S-S結合で結ばれた2本鎖のプラスミンとなる）、E-タイププラスミノージェン（図1中、1番目のグルタミン酸（E）をN末端とするプラスミノージェン）、及びK-タイププラスミノージェン（図1中、78番目のリジン（K）をN末端とするプラスミノージェン））を免疫物質として得られた抗体では、主として五個のクリングルドメインを認識する抗体であったため、79番目をN末端とするアンジオスタチンのみに反応する抗体を得ることができなかつた。ところが、請求項1のペプチドを利用することにより、E-及びK-タイプ 30 プラスミノージェンには反応せず、アンジオスタチンにのみ特異的に反応するモノクローナル抗体を得ることができる。また、このペプチドを利用することにより、従来の抗体及び新たに得られた抗体の反応特異性を確認できる。

【0009】請求項2に記載のモノクローナル抗体によれば、アンジオスタチン特異的に反応するので、体液中（例えば、尿中または血液中）における夾雑物（プラス 40 ミノージェン関連物質）の影響を受けることがない。また、このモノクローナル抗体を利用すれば、請求項5に記載のように免疫学的方法によって、アンジオスタチンのみを検出または定量することが可能となる。また、請求項3または請求項4に記載の融合細胞を利用すれば、アンジオスタチン特異的に反応するモノクローナル抗体を得ることができる。

【0010】

【発明の実施の形態】アンジオスタチンの特異的な検出は、プラスミノージェン関連物質（プラスミン、E-及び 50

K-タイププラスミノージェン）と反応せず、アンジオスタチンとのみ反応する抗体により可能となる。本発明者らは既に報告されている生体内のアンジオスタチンのN末端側のアミノ酸配列（特表平9-512173号、O'Reilly M S., et al., Cell, 79, 315-328, 1994）を基にヒト、マウス、ラットのプラスミノージェンの79番目から84番目のアミノ酸配列を持つ合成ペプチド（VYLSE C）を免疫原に用いることで、78番目から84番目のアミノ酸配列を持つ合成ペプチドおよび80番目から84番目のアミノ酸配列を持つ合成ペプチドとは反応せず、79番目から84番目のアミノ酸配列を持つ合成ペプチドとのみ特異的に反応するモノクローナル抗体を作製することに成功した。

【0011】さらに液相中において、78番目のアミノ酸から始まっていると考えられているK-タイププラスミノージェンとは反応せず、アンジオスタチンとのみ反応する溶液条件を見つけ、前記モノクローナル抗体とこの溶液条件を組み合わせることにより、新たな検出・測定系の発明に至った。

【0012】1. ペプチドPIa79-84に特異的に反応するモノクローナル抗体及び、このモノクローナル抗体を産生する融合細胞の作製について

A. 抗原

プラスミノージェンの79-84番目のアミノ酸配列（VYLSE C）を持つペプチドPIa79-84を合成し、免疫原として使用する。当該ペプチドPIa79-84は比較的低分子であるため、このペプチドをそのまま免疫しても抗体ができにくい。また、アンジオスタチンのN末端側の断点を認識する抗体を作製する必要がある。そこで、このペプチドPIa79-84のC末端側のシステイン残基をm-maleimide-benzoyl-N-hydroxysuccinimide ester（MBS）を用いて、キャリアー蛋白質（スカシガイヘモシアニン（KLH）、アルブミン、サイログロブリンなど）と結合させることにより免疫原として使用する。

【0013】B. 上記抗原による免疫

免疫動物としては哺乳動物であるマウスのほかラット、ハムスターなども用いることができる。通常マウスが最も汎用され、BALB/cマウス、その他の系統（BDF1マウスなど）のマウスを用いることができる。この際、免疫計画及び抗原の濃度は十分な量の抗原刺激を受けたリンパ球が形成されるよう選ばれるべきである。例えば、マウス1匹に25 µgの抗原を2週間間隔で腹腔に3回免疫後、さらに25 µgの抗原を静脈に投与する。最終免疫の数日後に細胞融合のための脾臓細胞を取り出す。なお、同様にフットパッドに免疫を行い、リンパ節を細胞融合のために用いることも可能である。

【0014】C. 細胞融合

上記のごとく免疫した哺乳動物の個体から脾臓またはリンパ節を無菌的に取り出し、そこから単細胞懸濁液を調製する。この単細胞懸濁液（抗体産生細胞）を適当な骨

髄腫細胞と適当な融合促進剤の使用により細胞融合をさせる。骨髓腫細胞としては免疫動物と同種の哺乳動物に由来するものが望ましいが、ラット、ハムスターの抗体産生細胞とマウスの骨髓腫細胞とを融合させることもできる。抗体産生細胞と骨髓腫細胞の好ましい比率は、約20:1から約2:1の範囲である。約 $10^8$ 個の抗体産生細胞について、0.5ml~1.5ml融合媒体の使用が適当である。好ましい融合促進剤としては、例えば平均分子量1000-4000のポリエチレングリコールを有利に使用できるが、この分野で知られている他の融合促進剤(例えばセンダイウイルス(HVJ))を用いることもできる。また、これらの融合促進剤を用いた方法以外に電気ショックを用いる方法により細胞融合を行ってもよい。

【0015】D. 目的とするモノクローナル抗体を産生する融合細胞の選択

別の容器(例えばマイクロタイタープレート)で未融合の抗体産生細胞、未融合の骨髓腫細胞及び融合細胞の混合物を骨髓腫細胞を支持しない選択培地で希釈し、骨髓腫細胞を死滅させるのに十分な時間(1週間~2週間)培養する。培地は薬剤抵抗性(例えば8-アザグアニン抵抗性)で骨髓腫細胞を支持しないもの(例えば、HAT培地)が使用される。ヌクレオチドの生合成経路には二つの経路があり、そのうちの一つは de novo 経路であり、他の一つはサルベージ経路である。アミノプテリンは、葉酸アナログであり、de novo 合成経路で葉酸リダクターゼを阻害するためプリンとピリミジンの生合成を阻害する。従って、アミノプテリン存在下で細胞が生き延びるためには、ヒポキサンチンとチミジンを利用して、ヌクレオチドを合成しなければならない。この経路がサルベージ経路である。8-アザグアニン耐性株は、サルベージ経路に必要な hypoxanthine-guanin-phosphoribosyl transferase (HGPRT酵素)を持っていない。そのため、この選択培地中では未融合の骨髓腫細胞または骨髓腫細胞が融合した細胞は死滅する。また、未融合の抗体産生細胞または抗体産生細胞が融合した細胞は非腫瘍細胞なので、ある一定期間(1週間~2週間)で死滅する。これに対して抗体産生細胞と骨髓腫細胞とが融合した融合細胞は、二種類の親細胞の両方の特性、すなわち腫瘍性とHGPRT酵素を利用したヌクレオチドの生合成能とを合わせ持つため、選択培地中で生存できる。一定期間経過後、融合細胞が確認できた後、前記ペプチドPl<sub>a</sub>79-84に対する抗体について酵素免疫測定法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA)によりスクリーニングを行い、ペプチドPl<sub>a</sub>79-84と特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する融合細胞だけを選択する。このような融合細胞として、本発明者らが発明した融合細胞クローン(Anti-pla 79-84 monoclonal antibody4A2以下「4A2」と省略する)(工業技術院 受託番号:FERM P-18059)が挙げられる。

【0016】E. 目的とするモノクローナル抗体の取得

目的とするモノクローナル抗体を産生する融合細胞を適当な方法(例えば限界希釈法)でクローン化した後、抗体は2つの異なった方法で産生させることができる。第1の方法によれば、融合細胞を一定期間、適当な培地で培養することにより、その培養上清からその融合細胞の産生するモノクローナル抗体を得ることができる。第2の方法によれば、融合細胞は同質遺伝子、または半同質遺伝子を持つ免疫動物の腹腔に移植することができる。一定期間後の宿主動物の腹水中または血液中より、その融合細胞の産生するモノクローナル抗体を得ることができる。

【0017】2. モノクローナル抗体とアンジオスタチンとを特異的に反応させるための液相条件について

モノクローナル抗体の反応特性は、標準物質(E-タイププラスミノゲン、K-タイププラスミノゲン、アンジオスタチン)を用いて判断できる。上述の本発明者らの方法によって得られたモノクローナル抗体は、SDS-PAGE後のWB(ウエスタンブロット)解析によって、K-タイププラスミノゲンに対しては、還元条件下または非還元条件下のいずれにおいても結合する。一方、アンジオスタチンに対しては、還元条件下のみで結合する抗体であることが判明した。この知見から適当な液相を選択することによって、モノクローナル抗体が、E-及びK-タイププラスミノゲンとは反応せず、アンジオスタチンとのみ反応する液相条件を見いだすことができる。そのような液相条件として例えば、10% 正常ヤギ血清、0.05% デオキシコロール酸(DOC)、0.05% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5% NP-40、0.3 M NaCl、0.1 M イプシロン-アミノ-n-カプロン酸(EACA)、15% グリセロールを含む25mM Tris-HCl pH 8.0(以下、「Treat溶液」と言う。)を用いることができる。この液相中に、標準物質を適当な濃度、例えば、500 ng/ml - 5ng/ml に希釈することで、モノクローナル抗体をE-及びK-タイププラスミノゲンとは反応せず、アンジオスタチンとのみ特異的に反応させることができる。

【0018】3. アンジオスタチンの免疫学的定量法について

A. モノクローナル抗体固相化プレート

モノクローナル抗体を固相化するには、モノクローナル抗体の溶液と不溶性担体とを接触させることにより、不溶性担体の表面に抗体を吸着させて行うほか、共有結合等の化学的な方法によっても行うことができる。不溶性担体としては、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアステル、ポリアクリルニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライドなどの高分子、その他、紙、ガラス、金属、アガロースおよびこれらの組み合わせなどを例示することができる。また、不溶性担体の形状としては、トレイ状、球状、棒状、繊維状、盤状、容器状、セル、試験管など種々の形状を使用することができる。

## 【0019】B. 検出用抗体

モノクローナル抗体と結合したアンジオスタチンを検出するために、精製プラスミノゲン免疫して得られる抗プラスミノゲン抗体(以下、「検出用抗体」という。)を用いることができる。検出用抗体としては、ヤギ、ウサギ等の哺乳動物に精製プラスミノゲンを免疫し得られた抗血清から精製した抗プラスミノゲンポリクローナル抗体を用いる。検出用抗体は、完全抗体であっても、F(ab)'<sub>2</sub>またはFab等のフラグメントであってもよい。また、検出用抗体は、ビオチン、ペルオキシダーゼ等の標識物質を標識した標識抗体でも良いし、通常

## 【0020】C. 検量線の作製

モノクローナル抗体固相化プレートに、10% 正常ヤギ血清、0.05% DOC、0.05% SDS、0.5% NP-40、0.3 M NaCl、0.1 M EACA、15% グリセロールを含む25mM Tris-HCl pH 8.0で適当な濃度に希釈した標準物質(アンジオスタチン)を反応させる。このときに用いる標準物質の濃度に依存して、モノクローナル抗体はアンジオスタチンと結合する。その後、一定濃度の検出用抗体を一定量加え、モノクローナル抗体に結合したアンジオスタチンを測定する。これにより、標準物質のモノクローナル抗体に対する結合量の関係、即ち検量線が得られる。

【0021】つまり、下記の工程a)-d)により、例えば血液・尿等の検体中のアンジオスタチンを免疫学的に定量することができる。a)モノクローナル抗体を不溶性支持体に結合させた固相化抗体を作製し、b) Treat溶液で希釈した標準物質(アンジオスタチン)または検体を固相化抗体と反応させ、c)この反応物質を検出用抗体で検出し、標準物質から検量線を作製する。次に、d)前記検量線から検体中に含まれるアンジオスタチンの濃度を算出する。

【0022】また、メンブレン上でアンジオスタチンを定量するには、下記の工程e)-g)により行うことができる。e)標準物質または検体をSDS-PAGE及びWBを行った後、モノクローナル抗体と反応させ、f)この反応物質をペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体で検出し、標準物質から検量線を作製する。さらに、g)前記検量線から検体中に含まれるアンジオスタチンの濃度を算出する。なお、前記e)工程において、モノクローナル抗体をビオチン標識したものを使用し、f)工程において、その反応物質の検出にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いることも可能である。

## 【0023】

【実施例】以下に、本発明の好適な実施例を説明する。尚、本発明の実施の形態は、下記の実施例に何ら限定されるものではなく、本発明の技術的範囲に属する限り種

々の形態を取り得ることはいうまでもない。

## (実施例1) 免疫原の作製

O'Reilly M S.ら(特表平9-512173号、Cell, 79, 315-328, 1994)のアンジオスタチンのデータを基にして、免疫原となるペプチド配列を決定した。図2(A)に示すように、アンジオスタチンのN末端部分の配列は、ヒト、マウス、及びラットにおいて共通なアミノ酸配列を有するプラスミノゲンの79-84番目のペプチド(Val-Tyr-Lue-Ser-Glu-Cys, (Pla79-84))を利用した。このペプチドの合成には、通常のペプチド合成機(例えば、(株)パーキンエルマージャパン製A431)を用いた。Pla79-84をMBS法によってKLHに結合させたものを免疫原とした。免疫原は0.1 ml づつ分注して-30℃に凍結して保存した。なお、コントロールペプチドとして、プラスミノゲンの78-84番目のペプチド(Lys-Val-Tyr-Lue-Ser-Glu-Cys, (Pla78-84))、及びプラスミノゲンの80-84番目のペプチド(Tyr-Lue-Ser-Glu-Cys, (Pla80-84))を合成し、Pla79-84と同様に処理したものを免疫原とした。

## 【0024】(実施例2) マウスの免疫

実施例1で凍結保存した合成ペプチド結合KLH溶液0.1 mlと完全フロインドアジュバント0.1 mlとをよく混合して懸濁液を作製し、この懸濁液を2匹のマウス(BALB/c)の腹腔に1匹あたり抗原として25 µgづつ投与した。さらに1週間おきに、合成ペプチド結合KLH溶液0.1 mlと不完全フロインドアジュバント0.1 mlとをよく混合した懸濁液を5回投与し、最終投与後3日後に脾臓を取り出し、実施例3に示すように細胞融合を行った。

## 【0025】(実施例3) 細胞融合及び目的とするモノクローナル抗体を産生する融合細胞の取得

摘出したマウスの脾臓細胞と同系マウスの骨髄腫細胞(SP-2/0 Ag-14)とを約10:1の割合で混合し、50% ポリエチレングリコール4000を融合促進剤として細胞融合を行った。融合後の細胞は $1 \times 10^6$  cells/mlの細胞濃度となるように10% FCSを含むヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む培地(HAT培地)に懸濁し、96ウエルのマイクロタイタープレートに1ウエルあたり0.1 ml づつ分注した。融合細胞はCO<sub>2</sub>インキュベータ(5% CO<sub>2</sub>, 37℃)中で1-2週間培養し、HAT培地による選択を行った。Pla79-84を固相化したマイクロプレートを用いて、融合細胞の上清をELISA法により検出し、抗体の有無を確認した。陽性となったウエルに対しては、限界希釈法によるクローニングを2回繰り返す、Pla79-84に対する反応性を有するクローンを1種類選出し、融合細胞クローン4A2(受託番号FERMP-18059)と名付けた。得られたクローン4A2は10% DMSOを含む90% FCSに懸濁させ、液体窒素中に保存した。4A2の産生するモノクローナル抗体4A2-ABは、クローン4A2をBALB/cマウスの腹腔内で増殖させた後、その腹水中からプロテインAセファロースゲルを用いて精製した。

【0026】なお、Pla78-84及びPla80-84の合成ペプチドを免疫原として、抗体の作製を試みた。その結果、Pla78-84を免疫原として得た抗体は、Pla78-84、Pla79-84、Pla80-84のいずれの合成ペプチドに対しても同様に反応する抗体であった。また、Pla80-84を免疫原として処理したが、抗体が得られなかった。さらに、プラスミンを抗原にして抗体の作製を試みたが、得られた抗体はプラスミン A chain (クリングルドメイン1-5) に対する抗体のみであった。これは、図3に模式的に示すように、プラスミンは5個のクリングルドメインを有しており、これらのクリングルドメインの抗原提示能が大きいためであると考えられた。このことから、プラスミンを抗原としたのでは、アンジオスタチンを特異的に認識する抗体を得ることは困難であることが示された。

【0027】(実施例4)モノクローナル抗体4A2-ABの特異性の確認

(4-1) ELISA法による Pla79-84ペプチドに対する反応性の確認

実施例3で得られた融合細胞クローン4A2から産生されたモノクローナル抗体4A2-ABについて、ELISA法により Pla79-84ペプチドに対する反応性を確認した。固相に

ANS ELISA MoAb

\*は、Pla78-84、Pla79-84、Pla80-84の各合成ペプチドを固相化したマイクロプレートを用いた(これらの作製法については、実施例5に後述する。)。検体としては、クローン4A2から産生されたモノクローナル抗体4A2-ABを、及び対照としてPla78-84をウサギに免疫して得られた抗血清Anti-Pla78-84を用いた。モノクローナル抗体4A2-AB、及びAnti-Pla78-84の各希釈系列を作製して、この溶液0.1 mlを上記3種類のペプチド(Pla78-84、Pla79-84、Pla80-84)を固相化したマイクロプレートの各ウェルに添加し、室温で1時間反応させた後、抗体溶液を捨て、PBSで3回洗浄した。

【0028】一定濃度に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGまたはペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG(バイオラッド社製)0.1 mlを各ウェルに添加し、室温で1時間反応させた後、標識抗体溶液を捨て、PBSで3回洗浄し、過酸化水素及びオルトフェニレンジアミンの溶液を添加して発色反応を行い各合成ペプチドに対する反応性を確認した。その結果を表1及び図4に示した。

【0029】

【表1】

MoAb 4A2 IgG (ug/ml)	plate		
	pep 78 - 84	pep 79 - 84	pep 80 - 84
0	0.005	0.006	0.012
0.01	0.011	0.724	0.013
0.1	0.018	1.503	0.014
1	0.012	1.599	0.013

Anti Pla 78-84 ( Rab. ) Serum ( dil. x100 )	plate		
	pep 78 - 84	pep 79 - 84	pep 80 - 84
0	0.003	0.001	0.001
1/500	0.214	0.076	0.035
1/50	1.077	0.522	0.276
1/5	2.04	1.844	0.949

【0030】なお、表1、図4中の4A2は、クローン4A2から産生されたモノクローナル抗体(4A2-AB)、Anti-pla78-84はPla78-84をウサギに免疫して得られた抗血清を表す。上記結果から、モノクローナル抗体4A2-ABは、Pla79-84にのみ反応性を示し、Pla78-84、Pla80-84には反応性を示さなかった。また、対照としたPla78-84ウサギ抗血清Anti-Pla78-84は、Pla78-84、Pla79-84、及びPla80-84のいずれのペプチドに対しても反応性を示した。このことから、モノクローナル抗体4A2-ABは、Pla79-84ペプチドに対して特異的に反応することが確認された。また、アンジオスタチンに対して特異的に反応する抗体を得るためには、プラスミンの78位または80位

のいずれを選択したペプチドによっても困難であり、79位から始まるペプチドに依らなければならないことが示された。

【0031】(4-2)イムノプロット法による特異性の確認(1)

さらに、精製蛋白質を用いて常法によるイムノプロット法により、モノクローナル抗体4A2-ABの反応性を確認した。その結果を図5に示す。対照としてプラスミノーゲンのクリングルドメイン1-4をバクテリアで発現したものを抗原にして、ウサギで作製したポリクローナル抗体K1-4を用いた。各々の抗体は1µg/mlの濃度で用いた。なお、標準物質(E-タイププラスミノーゲン(カタロ

グ番号528175)、K-タイププラスミノゲン(カタログ番号528185)、及びアンジオスタチン(カタログ番号176700)は、それぞれカルバイオケム社から購入したものを使用した。

【0032】図5(B)及び(E)に示すように、モノクローナル抗体4A2-AB(なお図中には、「4A2」と示した。)は、SDS-PAGE後のWBによって、還元条件下(Reduced)及び非還元条件下(Non-reduced)のいずれの条件下においても、E-タイププラスミノゲン(E-PG)とは反応せず、還元条件下及び非還元条件下のいずれの条件下においても、K-タイププラスミノゲン(K-PG)と反応した。また、アンジオスタチン(ANS)とは、還元条件下のみでしか反応しなかった。一方、図5(C)及び(F)に示すように、クリングルドメイン1-4に対する抗体K1-4は、還元条件下及び非還元条件下のいずれの条件下においても、E-, K-タイププラスミノゲン、及びアンジオスタチンのいずれにも反応した。

【0033】(4-3)イムノプロット法による特異性の確認(2)

プラスミノゲンをウロキナーゼで処理するとアンジオスタチンが得られることが知られている。そこで、プラスミノゲンをウロキナーゼで処理したアンジオスタチンサンプルと、三種類の合成ペプチド(Pla78-84、Pla79-84、及びPla80-84)を用いて、イムノプロット法による特異性の確認を行った。その結果を図6に示す。モノクローナル抗体4A2-AB、1µg/mlを各々の合成ペプチドPla78-84、Pla79-84、Pla80-84各100µg/mlとプレインキュベートした後、アンジオスタチンを転写したメンブレンと反応させた。

【0034】モノクローナル抗体4A2-ABは、合成ペプチドPla79-84とプレインキュベートすることにより、抗体とペプチドとの複合体を形成したため、アンジオスタチンに対する反応性が消失した(左から三番目のレーン(79-84)を参照)が、合成ペプチドPla78-84、Pla80-84とのプレインキュベーションでは反応性が消失しなかった(左から二番目(78-84)及び四番目(80-84)のレーンを参照)。このことから、モノクローナル抗体4A2-ABは、液相中でもPla79-84ペプチドにのみ特異的に反応することが確認された。

【0035】(実施例5)モノクローナル抗体4A2-ABをアンジオスタチンに特異的に反応させるための液相条件とその条件下でのモノクローナル抗体4A2-ABを用いたアンジオスタチンの定量法の構築

本発明者らは図5に示したように、モノクローナル抗体4A2-ABは、SDS-PAGE後のWBによって、還元条件下及び非還元条件下のいずれの条件下でもE-タイププラスミノゲン及びK-タイププラスミノゲンに結合するが、アンジオスタチンとは還元条件下のみでしか結合しない抗体であることを見出した。そこで、本発明者らは、

モノクローナル抗体4A2-ABは、液相の適当な条件下において、アンジオスタチンとのみ反応する条件が存在すると予想し、鋭意実験を行った。その結果、10%正常ヤギ血清、0.05%DOC、0.05%SDS、0.5%NP-40、0.3MNaCl、0.1MEACA、15%グリセロールを含む25mMTris-HClpH8.0の溶液を使用し、標準物質を適当な濃度、例えば、500ng/ml-5ng/mlに希釈することで、モノクローナル抗体4A2-ABをE-, K-タイププラスミノゲンとは反応せず、アンジオスタチンとのみ特異的に反応させることに成功した。その方法を示すと次の通りである。

【0036】モノクローナル抗体4A2-ABをPBSで5µg/mlの溶液に調製した。この4A2-AB溶液0.1mlをマイクロプレートの各ウエルに添加し、4で12~18時間反応させた後、抗体溶液を除き、5%BSA、5%シクロロース、0.1%アジ化ナトリウムを含むPBS0.35mlを各ウエルに添加し、4で12~18時間静置した後、マイクロプレートの未反応部位をブロッキングし、0.05%ツイーン20、0.15MNaClを含む10mMTris-HClpH8.0(T-TBS)で3回洗浄することにより、固相化4A2-ABプレートを得た。

【0037】一方、カルバイオケム社より購入した標準物質(E-タイププラスミノゲン(カタログ番号528175)、K-タイププラスミノゲン(カタログ番号528185)、及びアンジオスタチン(カタログ番号176700))を10%正常ヤギ血清を含む25mMTris-HClpH8.0(Non-Treat)または10%正常ヤギ血清、0.05%DOC、0.05%SDS、0.5%NP-40、0.3MNaCl、0.1MEACA、15%グリセロールを含む25mMTris-HClpH8.0(Treat)で希釈し、0.5,50,500ng/mlの標準蛋白質液を調製した。そして、各濃度の標準蛋白質液0.1mlを固相化4A2-ABプレートの各ウエルに添加し、室温(20-25)で1時間反応させた後、溶液を除き、T-TBSで5回洗浄した。その後、ピアス社のマニュアルに従い、作製したピオチン標識抗ヒトプラスミノゲン(ヤギ)抗体を10%正常ヤギ血清、0.5MNaCl、0.1MEACAを含む25mMTris-HClpH8.0で1µg/ml希釈した溶液0.1mlを各ウエルに添加し、室温(20-25)で1時間反応させた後、ピオチン標識抗体溶液を除き、T-TBSで5回洗浄した後、さらにストレプトアビジン-POD複合体溶液0.1mlを各ウエルに添加し、室温(20-25)で30分間反応させた。次にストレプトアビジン-POD複合体溶液を除き、T-TBSで5回洗浄し、過酸化水素及びオルトフェニレンジアミンの混合溶液0.1mlを各ウエルに添加して室温(20-25)で15分間発色反応を行った後、20%リン酸溶液0.1mlを各ウエルに添加して反応を停止した。発色した溶液につき波長492nmの吸光度を測定した。その結果を表2および図7に示す。

【0038】

【表2】

## ANS ELISA Specificity

Protein( ng/ml )	A492 ( n=2 ) Non-Treat			Treat		
	K-PG	ANS	E-PG	K-PG	ANS	E-PG
0	0.053	0.059	0.035	0.034	0.033	0.022
5	0.077	0.168	0.035	0.038	0.062	0.023
50	0.516	0.873	0.044	0.041	0.25	0.024
500	3	2.733	0.115	0.126	1.476	0.029

1st 1hr., 2nd( Biotnylated Ab, pla ( G ) 1ug/ml )1hr. 3rd( streptavidin-POD 1/20000 ) 30 min.

EACA : ε-aminocaproic acid. Fibrinolysis inhibitor. This inhibitor is able to dissociate reversible complexes ( e.g. PG-α2PI )

Washing Buffer : 0.05% Tween20 cont. TBS

【0039】Non-Treat溶液中でモノクローナル抗体4A2-ABと標準物質( E - タイププラスミノーゲン ( E-PG )、K - タイププラスミノーゲン ( K-PG )、及びアンジオスタチン ( ANS ) )とを反応させた場合には、E - タイププラスミノーゲンとは反応性を示さないものの、K - タイププラスミノーゲン及びアンジオスタチンのいずれに対しても反応性を示した。ところが、Treat溶液中でモノクローナル抗体4A2-ABと標準物質とを反応させた場合には、E - , K-タイププラスミノーゲンのいずれにも反応性を示さず、アンジオスタチンのみに特異的に反応させることができた。

【0040】上記の結果からサンプルを10% 正常ヤギ血清, 0.05% DOC, 0.05% SDS, 0.5% NP-40, 0.3 M NaCl, 0.1 M EACA, 15% グリセロールを含む25mM Tris-HCl pH\*  
未処理条件

\* 8.0溶液で希釈することにより、固相化モノクローナル抗体4A2-ABを液相中において、アンジオスタチンとのみ特異的に反応させることが可能であることが示された。

【0041】( 実施例6 ) 実施例5の検出方法を用いてのガン患者血清中のアンジオスタチンの検出と臨床的意義

ガン患者血清5例( P1-P5 )と正常者血清4例( N1-N4 )との合計9サンプルを、上記のNon-Treat溶液( 未処理条件 )またはTreat溶液( 処理条件 )を用いて、1/10に希釈した後、アンジオスタチンの濃度を測定した。その結果を表3及び表4に示した。

【0042】

【表3】

plate : 4A2 ( 5ug/ml )					
A492 ( n=2 )					
Protein( ng/ml )	ANS				
0	0.043				
5	0.245				
50	1.512				
500	2.697				
Std : ANS					
	A492 ( n=2 )	qua. ( ng/ml )	A492 ( n=2 )		
N1	0.123	50 ↓	N1	0.123	
N2	0.088	50 ↓	N2	0.088	
N3	0.081	50 ↓	N3	0.081	
N4	0.11	50 ↓	N4	0.11	
			Ave.	0.1005	
P1	0.304	55	SD	0.0194336	
P2	0.315	56	Ave.+2SD	0.139	
P3	0.622	105			
P4	0.388	65			
P5	0.202	50 ↓			
NGS	0.037	ND			
NRS	0.055	ND			
NMS	0.045	ND			

【表4】

処理条件	15	
	plate : 4A2 ( 5ug/ml )	
	A492 ( n=2 )	
Protein( ng/ml )	ANS	
0	0.021	
5	0.045	
50	0.139	
500	0.835	
	Std : ANS	
	A492 ( n=2 ) qua. ( ng/ml )	
N1	0.084	200
N2	0.076	170
N3	0.079	180
N4	0.089	220
P1	0.088	220
P2	0.176	540
P3	0.125	380
P4	0.112	320
P5	0.105	300
NGS	0.026	ND
NRS	0.028	ND
NMS	0.027	ND
	A492 ( n=2 ) qua. ( ng/ml )	
N1	0.084	200
N2	0.076	170
N3	0.079	180
N4	0.089	220
Ave.	0.082	192.5
SD	0.0057155	22.173558
Ave.+2SD	0.093	236.84

【0043】正常者血清 (N1-N4) の定量値+2SDを正常値域として、ガン患者血清の定量値と比較したところ、ガン患者血清の5例中4例の定量値が正常値域よりも有為に高い値を示した。この結果は、ガン患者において、本測定系で測定できるアンジオスタチンが上昇している検体があることを示唆すると共に、ガンの診断に本測定系が非常に有効であることを示唆するものである。

【0044】本発明は上記した実施例に限定されるものではなく、要旨を変更しない限り適当に変形して実施す

ることができる。また、本発明の技術的範囲は、均等の範囲にまで及ぶものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミノーゲン及びアンジオスタチンのアミノ酸配列を示す図である。

【図2】アンジオスタチンのN末端及びC末端付近のアミノ酸配列を示す図である。

(A) N末端付近のアミノ酸配列図

(B) C末端付近のアミノ酸配列図

10 【図3】プラスミノーゲンの一次元配列とクリングルドメインとの関係を示す模式図である。

【図4】クローン4A2が生産するモノクローナル抗体の反応性(A)と、Pla78-84をウサギに免疫して得られた抗血清Anti-Pla78-84の反応性(B)とを表すグラフである。

【図5】(A)~(C)は、還元条件下において、E-タイププラスミノーゲン(E-PG)、K-タイププラスミノーゲン(K-PG)及びアンジオスタチン(ANS)を電気泳動した後に、銀染色(A)、モノクローナル抗体4A2でウエスタンブロット(B)、又は抗クリングルドメイン1-4抗体K1-4でウエスタンブロット(C)したときの結果を示す図である。また、(D)~(F)は、非還元条件下において、同様の処理をしたときの結果を示す図である。

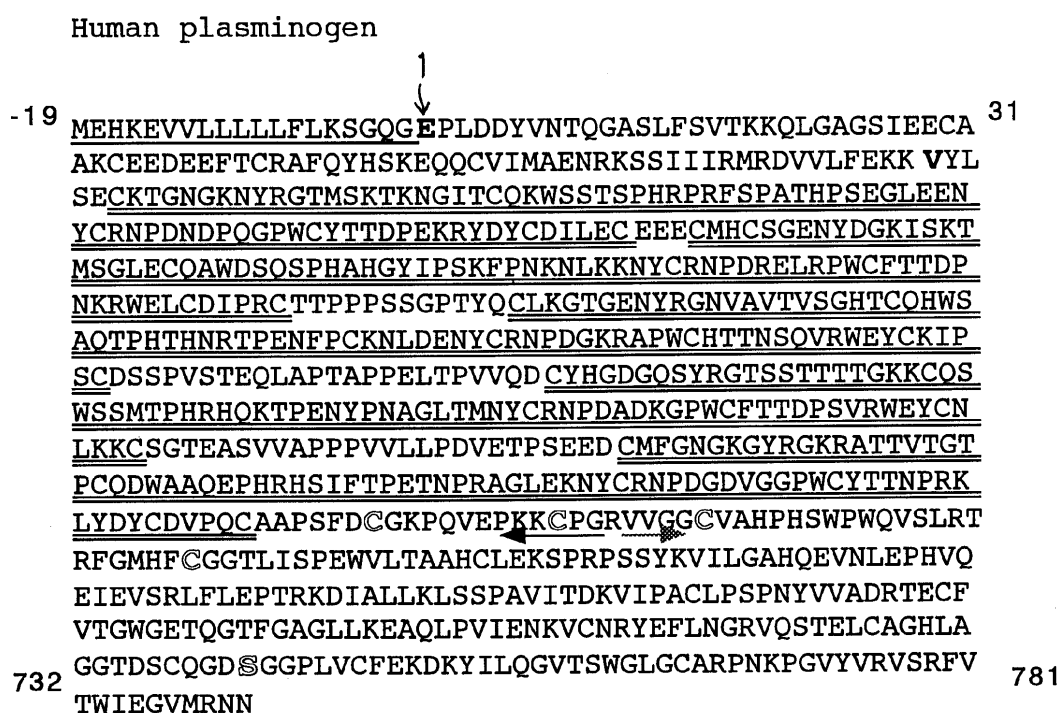
【図6】クローン4A2が生産するモノクローナル抗体を各種ペプチドとプレインキュベーションした後に、そのモノクローナル抗体とアンジオスタチンとの反応性を調べたときのウエスタンブロットの結果を示す図である。

【図7】クローン4A2が生産するモノクローナル抗体と、E-タイププラスミノーゲン(E-PG)、K-タイププラスミノーゲン(K-PG)及びアンジオスタチン(ANS)との反応性を調べたときのグラフである。

(A) Non-Treat溶液を使用したときのグラフ

(B) Treat溶液を使用したときのグラフ

## 【図1】



Underline : signal peptide

Double underline : klinge domaine

Shadow : active serine

Bold : a.a. 1 and 79

← : a chain      → : b chain

Outline : ss bound

【図2】

(A)

## Angiostatin N-末端アミノ酸配列

72	76	84	94	fragment size
	↓ ↓			
V V L F E K K V Y L S E C K T G N G K N Y R G				40,42,45 ( kD )Hu
V <u>I</u> L F E K <u>R</u> V Y L S E C K T G <u>I</u> G <u>N</u> <u>G</u> Y R G				38 ( kD )Ms
V <u>I</u> L F E K <u>R</u> V Y L S E C K T G <u>I</u> G <u>N</u> <u>G</u> Y R G				Rat
V <u>I</u> L <u>Y</u> E K <u>R</u> <u>I</u> Y L L E C K T G <u>N</u> G <u>Q</u> <u>T</u> Y R G				Bov
	↑			
72	79	84	94	

(B)

## Angiostatin C-末端アミノ酸配列

435	449	452	462
	↓	↓ Elastase	
Hu : K C S G T E A S V V A P P P V V L L P D V E T P S E E D C			
Ms : <u>R</u> C S E T G <u>G</u> S V V E L P T V S <u>Q</u> E P <u>S</u> <u>G</u> P <u>S</u> D S E <u>I</u> D C			

524	↓ PM/Other SP	541
Hu : C Y T T N P R K L Y D Y C D V P O C		

PM : Cao,R., et al. PNAS 96 5728-5733 1999

Other SP : Stathkis, P et al. JBC 274 8910-8916 1999

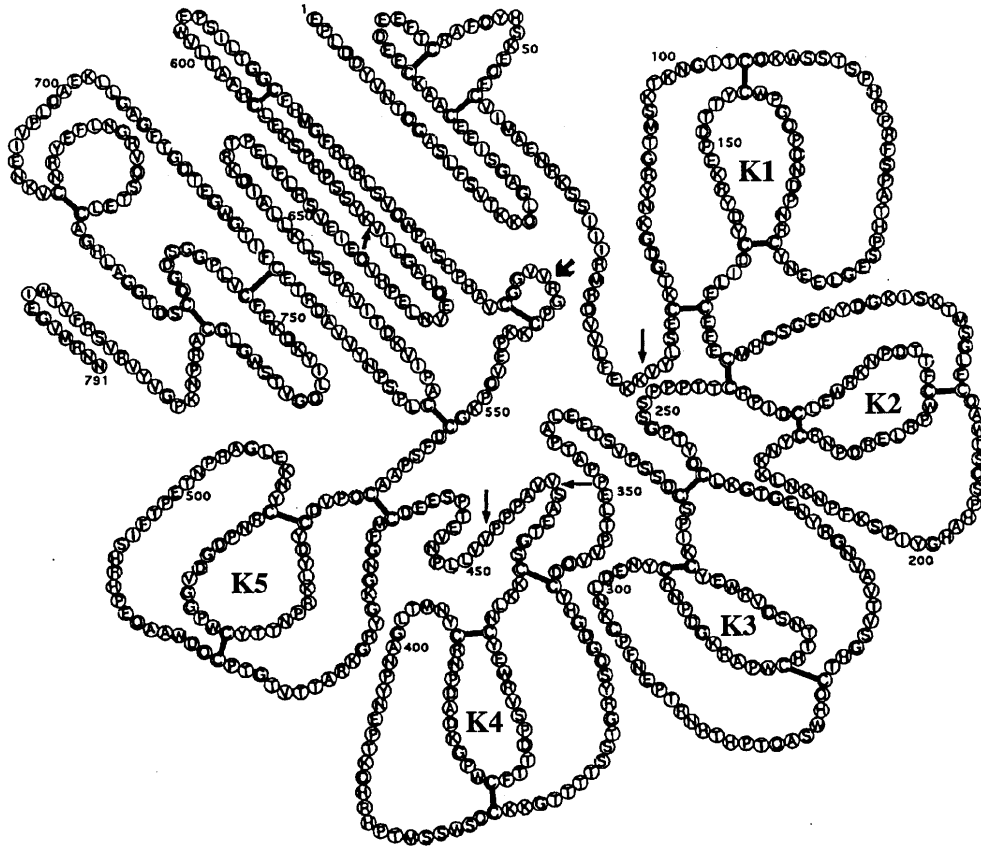
Hu Urine : 52/50, 45, 39, 30 kD ( nonreduing condition ) :

Sten-Linder, M et al. Anticancer Res. 19 3409-3414 1999

4A2/4C11 : 55, 53, 40, 38 kD ( pooled Hu Urine, reduing condition)

【図3】

Schematic representation of the primary structure of human plasminogen

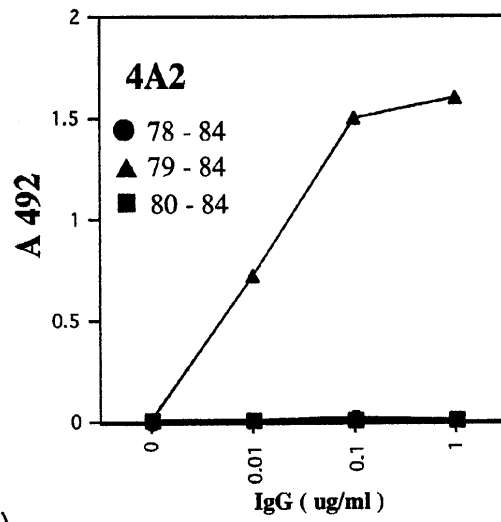


The amino acids are represented by their single-letter symbols, and black bars indicate disulfide bonds. The arrows indicate the cleavage site of 24k-bacterial endopeptidase (→) and of plasminogen activators (->).

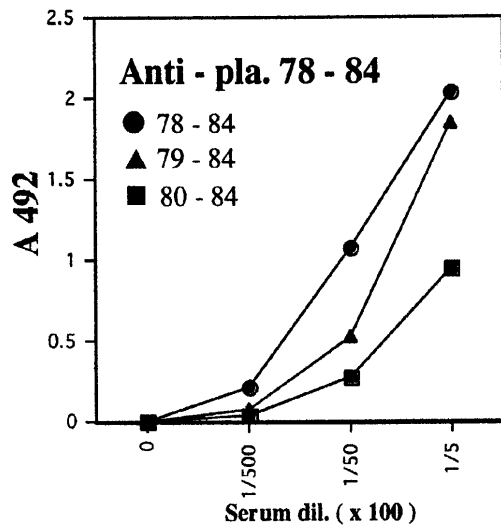
【図4】

MoAbs react with pla. 79-84 peptide but not with pla. 78-84 peptide and pla.80-84 peptide

(A)

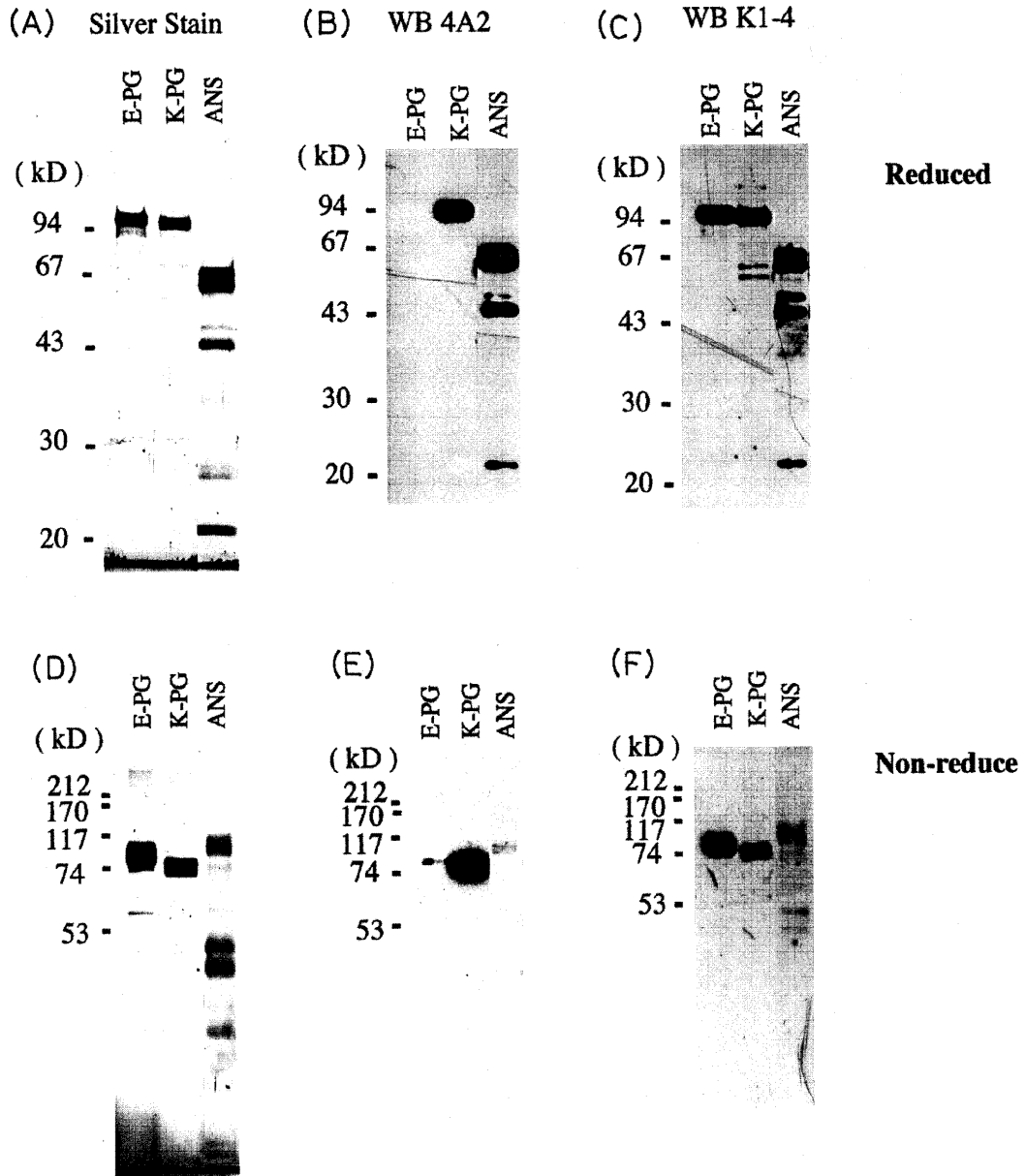


(B)



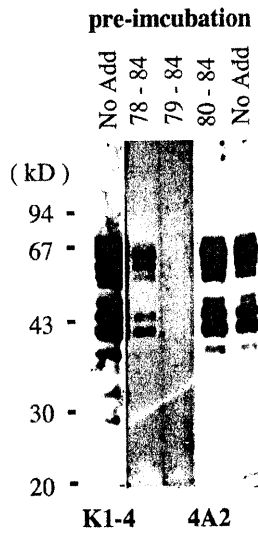
【図5】

### Western Blot Analysis of MoAb 4A2



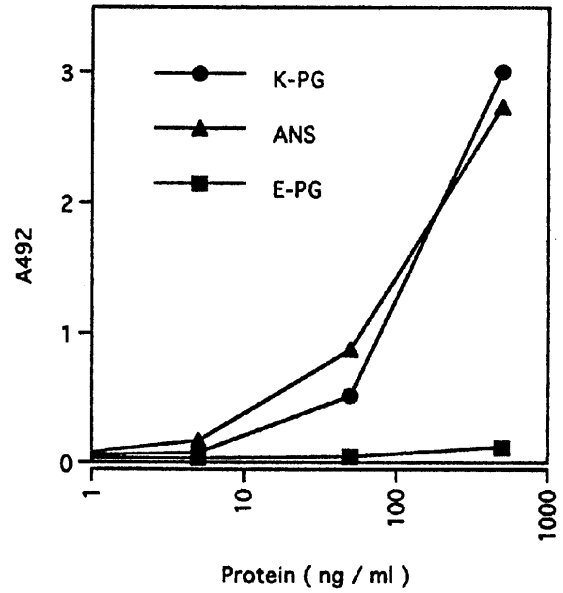
【図6】

Western Blot Analysis of MoAb 4A2

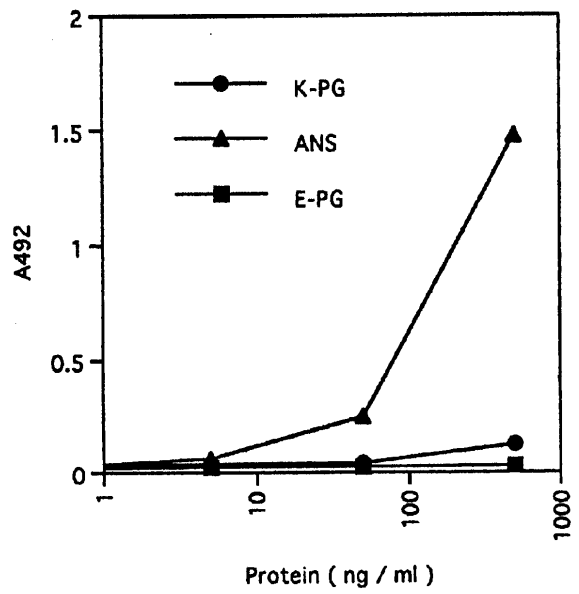


【図7】

(A) ANS ELISA specificity : Non-treat



(B) ANS ELISA specificity : Treat



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード(参考)
G 0 1 N 33/577		C 1 2 R 1:91)	
// C 1 2 P 21/08		(C 1 2 P 21/08	
(C 1 2 N 5/10		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 15/00	C
(C 1 2 P 21/08		5/00	B
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 R 1:91)	

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA53 GA03 HA15  
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA14  
 4B065 AA92X AC14 BA08 CA25  
 CA46  
 4H045 AA11 AA30 BA14 BA42 CA40  
 DA76 DA86 EA51 FA20 GA22  
 HA02

专利名称(译)	血管抑制素特异性单克隆抗体和使用该单克隆抗体检测血管抑制素的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002112768A</a>	公开(公告)日	2002-04-16
申请号	JP2000304946	申请日	2000-10-04
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社医学生物学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社医学生物学研究所		
[标]发明人	矢野竹男 柴田昌夫		
发明人	矢野 竹男 柴田 昌夫		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/06 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/577		
FI分类号	C07K7/06.ZNA C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/577.B C12P21/08 C12R1/91 C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA14 4B065/AA92X 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA14 4H045/BA42 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA51 4H045/FA20 4H045/GA22 4H045/HA02		
代理人(译)	小林洋平		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：要提供一种合成肽，用于产生针对纤溶酶原第79个断裂点的新型单克隆抗体，一种特异性识别该合成肽的单克隆抗体以及一种产生该单克隆抗体的细胞，提供一种使用使单克隆抗体与血管抑素在液相中特异性反应的溶液条件和单克隆抗体的溶液条件和该溶液条件来测定血管抑素的免疫学方法。 特异性结合纤溶酶原的第79-84位合成肽 (VYLSEC) 的单克隆抗体，例如通过融合细胞克隆4A2 (登录号 FERM P-18059) 产生。 将该单克隆抗体4A2-AB固定在ELISA板上，使样品和固定的单克隆抗体在该单克隆抗体与血管生成抑制素特异性反应的液相条件下反应，并添加抗纤溶酶原抗体。 利用ELISA法进行测定时，可以定量测定样品中的血管抑制素。

Protein(ng/ml)	A492 (n=2)					
	Non-Treat			Treat		
	K-PG	ANS	E-PG	K-PG	ANS	E-PG
0	0.053	0.059	0.035	0.034	0.033	0.022
5	0.077	0.168	0.035	0.038	0.062	0.023
50	0.516	0.873	0.044	0.041	0.25	0.024
500	3	2.733	0.115	0.126	1.476	0.029

st 1hr., 2nd( Biotylated Ab, pla ( G ) 1ug/ml) 1hr. 3rd( streptavidin-POD 1/20000 ) 30 min.

ACA: ε-aminocaproic acid. Fibrinolysis inhibitor. This inhibitor is able to dissociate reversible complexes ( e.g. lashing Buffer : 0.05% Tween20 cont. TBS