

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-541560

(P2013-541560A)

(43) 公表日 平成25年11月14日(2013.11.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18	4H045
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	D
GO1N 33/531 (2006.01)	GO1N 33/531	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2013-535031 (P2013-535031)
 (86) (22) 出願日 平成23年10月19日 (2011.10.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年6月19日 (2013.6.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/056848
 (87) 国際公開番号 W02012/141737
 (87) 国際公開日 平成24年10月18日 (2012.10.18)
 (31) 優先権主張番号 61/394,640
 (32) 優先日 平成22年10月19日 (2010.10.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/480,154
 (32) 優先日 平成23年4月28日 (2011.4.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512159487
 バテル・メモリアル・インスティテュート
 アメリカ合衆国, ワシントン州 993
 52, リッチランド, バテル プール
 バード, 902, ピー.オー. ボッ
 クス 999
 (74) 代理人 100124257
 弁理士 生井 和平
 (72) 発明者 ジン, ホンジュン
 アメリカ合衆国, ワシントン州 993
 53, ウェスト リッチランド, スラ
 ッシュ コート, 5105

最終頁に続く

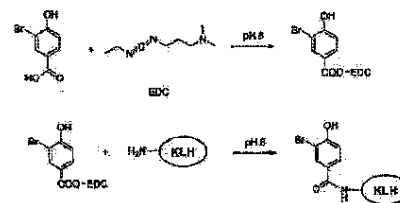
(54) 【発明の名称】 組成物、抗体、喘息診断方法、及び抗体の調製方法

(57) 【要約】

抗体を調製するための方法が提供され、この方法では、3-ブロモ-4-ヒドロキシ-安息香酸をタンパク質へ組み込むことにより抗原を形成し、当該抗原により哺乳類宿主に免疫性を与え、当該宿主からかかる抗原に対する親和性を有する抗体を回収する。モノハロチロシンに対する結合親和性を有する抗体が提供されるとともに、モノハロチロシンと結合した抗体を含む組成物が提供される。3-ブロモ-4-ヒドロキシ-安息香酸部分を有するタンパク質を含む組成物も提供される。喘息の重症度を評価するための方法が提供され、この方法では、モノハロチロシンに対する結合親和性を有する抗体を用いて患者の唾液を分析し、タンパク質に結合した抗体の量を測定する。体液中の好酸球活性を決定するための方法も提供され、この方法では、モノハロチロシンに対する結合親和性を有する抗体に対して体液を晒し、結合抗体の量を測定することにより好酸球活性を決定する。

【選択図】 図1

A. 3-Brominated KLH for immunization



B. NaOBr brominated BSA for screening of antibodies

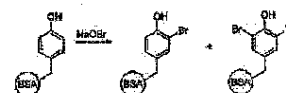


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

モノハロチロシンに対する結合親和性を有することを特徴とする抗体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗体において、前記モノハロチロシンはプロモチロシンであることを特徴とする抗体。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗体において、前記モノハロチロシンは、クロロチロシンであることを特徴とする抗体。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の抗体において、前記モノハロチロシンは、タンパク質の構成部分であることを特徴とする抗体。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の抗体において、前記抗体は、ジハロチロシンに対する結合親和性も有することを特徴とする抗体。

【請求項 6】

モノハロチロシンと結合した抗体を含むことを特徴とする組成物。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の組成物において、前記モノハロチロシンは、タンパク質の構成部分であることを特徴とする組成物。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の組成物において、前記モノハロチロシンは、プロモチロシン及び/又はクロロチロシンのうちの 1 つ又は両方であることを特徴とする組成物。

【請求項 9】

3 - プロモ - 4 - ヒドロキシ - 安息香酸部分を有するタンパク質を含むことを特徴とする組成物。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の組成物において、前記タンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H) であることを特徴とする組成物。

【請求項 11】

喘息の重症度を評価するための方法であって、該方法は、
モノハロチロシンに対する結合親和性を有する抗体を用いて患者の唾液を分析し、
タンパク質に結合した抗体の量を測定する、
ことを具備することを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の方法において、前記測定することは、定性的及び/又は定量的の一方又は両方であることを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 11 に記載の方法において、前記モノハロチロシンは、タンパク質の構成部分であることを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 11 に記載の方法において、前記モノハロチロシンは、プロモチロシン及び/又はクロロチロシンのうちの 1 つ又は両方であることを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 11 に記載の方法であって、さらに、炎症量を決定するために結合抗体の量を相関させることを具備することを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 11 に記載の方法であって、さらに、喘息発作への薬物反応をモニタするために結合抗体の量を用いることを具備することを特徴とする方法。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

体液中の好酸球活性を決定するための方法であって、該方法は、モノハロチロシンに対する結合親和性を有する抗体に対して体液を晒し、好酸球活性を決定するために結合抗体の量を測定する、ことを具備することを特徴とする方法。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の方法において、前記体液は、唾液であることを特徴とする方法。

【請求項 19】

請求項 17 に記載の方法において、前記モノハロチロシンは、タンパク質の構成部分であることを特徴とする方法。

【請求項 20】

請求項 17 に記載の方法において、前記モノハロチロシンは、プロモチロシン及びノ又はクロチロシンのうちの 1 つ又は両方であることを特徴とする方法。

【請求項 21】

請求項 17 に記載の方法であって、さらに、炎症及びノ又は薬物反応を決定するために結合抗体の量を相関させることを具備することを特徴とする方法。

【請求項 22】

抗体を調製するための方法であって、該方法は、

3 - プロモ - 4 - ヒドロキシ - 安息香酸をタンパク質へ組み込むことにより抗原を形成し、

前記抗原により哺乳類宿主に免疫性を与え、

前記宿主から前記抗原に対する親和性を有する抗体を回収する、

ことを具備することを特徴とする特徴とする方法。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の方法において、前記タンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H) であることを特徴とする方法。

【請求項 24】

請求項 22 に記載の方法において、前記抗体は、モノハロチロシンに対する結合親和性を有することを特徴とする方法。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の方法において、前記モノハロチロシンは、プロモチロシン及びノ又はクロチロシンのうちの 1 つ又は両方であることを特徴とする方法。

【請求項 26】

請求項 22 に記載の方法において、前記抗体は、タンパク質ハロチロシンに対する結合親和性を有することを特徴とする方法。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の方法において、前記ハロチロシンは、モノハロチロシン及びノ又はジハロチロシンのうちの 1 つ又は両方であることを特徴とする方法。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の方法において、前記モノハロチロシンは、3 - プロモチロシン及びノ又は 3 - クロチロシンのうちの 1 つ又は両方であることを特徴とする方法。

【請求項 29】

請求項 27 に記載の方法において、前記ジハロチロシンは、3、5 - ジプロモチロシン及びノ又は 3、5 - ジクロチロシンのうちの 1 つ又は両方であることを特徴とする方法。

【請求項 30】

請求項 22 に記載の方法であって、さらに、好酸球活性を決定するために体液に対して抗体を晒すことを具備することを特徴とする方法。

【請求項 31】

請求項 22 に記載の方法であって、さらに、炎症を決定するために体液に対して抗体を晒すことを具備することを特徴とする方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 2】

請求項 2 2 に記載の方法であって、さらに、モノハロチロシン及びノ又はジハロチロシン部分を有するタンパク質の量を決定するために体液に対して抗体を晒すことを具備することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、2010年10月19日に出願した米国仮出願第61/394,640号及び2011年4月28日に提出した米国仮出願第61/480,154号に対して優先権を主張し、これらの各米国仮出願の記載内容はすべて本明細書に援用される。

10

(政府権利声明)

【0002】

本発明は、米国エネルギー省によって授与された契約DE-AC0576RLO1830の下、政府支援によりなされた。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。また本研究は、NIEHS 暴露生物学プログラム(U54/ES016015)及び米国国防総省乳がんポストドクトラルフェローシップW81XWH-10-1-0031によって支援された。

【0003】

(技術分野)

20

本開示は、抗体の調製及びその使用に関する。本開示に特有な実施形態は、モノハロチロシン及びモノハロチロシン部分を有するタンパク質に対して親和性を有する抗体の調製に関連する。

【背景技術】

【0004】

喘息は、気道の一時的な狭窄という特徴がある一般的な病気である。この病気は、米国において約2,300万の成人に影響を与える主要な公衆衛生の懸案事項である。細気管支への活性化好酸球の浸潤が、喘息の主要原因と考えられている。唾液及び肺生検標本中の好酸球数と好酸球ペルオキシダーゼ(EPO)等の分泌された好酸球粒状タンパク質の存在とが、喘息の重症度の指標である。プロモチロシンタンパク質修飾が喘息患者において増加するのはEPOに起因しており、このEPOは、次亜臭素酸塩の形成と、それに続くプロモチロシンの形成とを触媒する。質量分析検出によるガスクロマトグラフィーを使用した以前の研究では、3-プロモチロシン及び3,5-ジプロモチロシンが、それぞれ気管支肺胞洗浄液及び喘息患者からの唾液標本において大幅に上昇していたことが判明した。喘息における臭素化タンパク質の役割に関する研究は、生体液におけるプロモチロシンレベルをモニタするための迅速で簡単な方法が存在しなかったために限られていた。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】YASUHIRO KAMBAYASHI ET AL: "Preparation and Characterization of a Polyclonal Antibody against Protein", JOURNAL OF CLINICAL BIOCHEMISTRY AND NUTRITION, vol. 44, no. 1, 1 January 2009, pages 95-103, XP55036434, ISSN: 0912-0009, DOI: 10.3164/jcbrn.08-196

40

【非特許文献2】KATO Y ET AL: "Immunogenicity of a brominated protein and successive establishment of a monoclonal antibody to dihalogenated tyrosine", FREE RADICAL BIO

50

LOGY AND MEDICINE, ELSEVIER SCIENCE, US, vol. 38, no. 1, 1 January 2005, pages 24-31, XP27829746, ISSN; 0891-5849, DOI: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.09.013

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本開示の更なる利点及び新規な特徴は、以下に記載されると共に、本明細書に記載される説明及び実証から容易に明らかになるであろう。したがって、本開示の以下の説明は、本開示の例示として見なされるべきであり、限定されるべきものではない。

10

【0007】

プロモチロシン変性タンパク質は、気道酸化ストレスの安定したバイオマーカとして有用であり得る。3-プロモチロシンは、生体内で起こる優勢なプロモチロシンであると考えられる。しかしながら、以前の試みでは、3-プロモチロシンを認識する有用な抗体を生産することができなかった。例えば、1930年、Wormaldは、3、5-ジプロモチロシンに対するウサギ抗血清の生産を報告しているが、3-プロモチロシン抗体を生成する試みに失敗している。より最近では、カンバヤシら及びカトウらは、臭素化タンパク質に対するポリクローナル及びモノクローナル抗体を生成したが、彼らの抗体も3、5-ジプロモチロシンのみと反応する。

【0008】

20

このように3-プロモチロシンを認識する抗体の生産に失敗している理由としては、抗原を生産するために使用される条件に起因する。質量分析及び核磁気共鳴分析によれば、ジプロモチロシン修飾は、生体外タンパク質臭素化の結果として、3-プロモチロシン修飾に対して優先的に生産されることが示されている。生体内臭素化を模倣することが予想される試薬を用いると、3-プロモチロシンに対する良好な抗原を生産することは難しくなり得る。

【0009】

本開示では、3-プロモ-4-ヒドロキシ-安息香酸部分を有するタンパク質を含有し得る抗原組成を提供する。また本開示では、この抗原の生産方法を提供する。

【0010】

30

この抗原からは、ハロチロシンに対して親和性を有する抗体を識別することができ、この抗体は、モノ臭素化されたチロシン残基を認識すると考えられるだけでなく、他のハロゲン化されたチロシン残基を結合する。モノハロチロシン等のハロチロシンに対する親和性に加えて、この抗原に対する親和性を有するこれら抗体を生産するための方法が提供される。ハロチロシン部分を有するタンパク質に対して親和性を有する抗体が提供されると共に、ハロチロシンを結合した抗体を有する組成物が提供される。

【0011】

さらに本開示では、開示された抗体が、ヒトの唾液タンパク質におけるハロチロシンのレベル別に健常対照者と喘息患者とを区別できる、ということが実証される。喘息の重症度を評価するための方法が提供されると共に、好酸球数を決定するための方法が提供される。

40

【0012】

本開示の幾つかの実施形態が、次のような添付図面を参照して以下に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、本開示の一実施形態に係る抗原を生産するための合成スキームである。

【図2】図2は、本開示の一実施形態に係る生産された抗体の分析を示している。

【図3】図3は、本開示の一実施形態に係る生産された抗体を利用して得られたデータを示している。

【図4】図4は、本開示の一実施形態に係るタンパク質の構成部分を示すと共に、生産さ

50

れた抗体を利用して得られたデータを示している。

【図5】図5は、本開示の一実施形態に係る生産された抗体を利用して得られたデータを示している。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本開示の様々な利点及び新規な特徴が、ここに記載されると共に、以下の詳細な説明から当業者に対してさらに容易に明らかになるであろう。これ以前の説明及び以下の説明において、本開示の実施形態は、例示及び説明のために提供される。以下理解されるように、本開示から逸脱することなく、本開示は様々な点で変更が可能である。したがって、下に説明する実施形態の図面及び説明は制限的なものではなく、事実上例示として見なされるべきである。

10

【0015】

本開示により、組成物、抗体、抗原、抗原を生産するための方法、抗体を生産するための方法、喘息を評価するための方法、及び好酸球数を決定するための方法が提供される。

【0016】

抗体を調製するための方法が提供される。この方法には、3-プロモ-4-ヒドロキシ-安息香酸等のハロチロシン類似体をタンパク質に組み込むことにより抗原を形成することが含まれ得る。さらにこの方法には、かかる抗原により哺乳類宿主に免疫性を与えること、及びこの宿主から抗原に対する親和性を有する抗体を回収することが含まれ得る。実施例によれば、かかるタンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)であり得る。この方法によれば組成物は抗原を有し、この抗原は3-プロモチロシンを模倣する化合物でKLHを修飾することにより提供される。したがって、3-プロモ-4-ヒドロキシ-安息香酸部分を有するタンパク質を含み得る組成物が提供され、例えばこのタンパク質はKLHである。

20

【0017】

本開示の態様によれば、これにより生体外タンパク質臭素化及び主にジプロモチロシンの生産に関する問題を回避することができる。次に、モノ臭素化を最適化する条件下においてウシ血清アルブミン(BSA)を臭素化することができ、そしてこのウシ血清アルブミンを用いてハイブリドーマ細胞株をスクリーニングすると共に、生理学的関連チロシン修飾に対して親和性を有し得るクローンを同定する。この結果得られるBTk-94C抗体は、3-プロモチロシン及び3、5-ジプロモチロシンに対して親和性を有すると共に、3-クロロチロシン及び3、5-ジクロロチロシンに対しても親和性を有する。しかしながらBTk-94C抗体は、非修飾チロシン、3-ニトロチロシン、又は3-ヒドロキシチロシンに対しては親和性を有していない(例えば図2及び4を参照)。

30

【0018】

タンパク質のクロロチロシン修飾も、次亜塩素酸塩を使用することにより提供され、この次亜塩素酸塩は、ミエロペルオキシダーゼの産物であり、このミエロペルオキシダーゼは、好中球及びマクロファージで見つかる酵素である。この抗体は、すべての4つの生理学的に関連するハロゲン化されたタンパク質チロシン残基を結合すると考えられることから、BTk-94Cは一般的なハロチロシン抗体と考えられ得る。

40

【0019】

したがって、本開示の方法により、タンパク質ハロチロシンに対して、特に実施形態においてはモノハロチロシンに対して、結合親和性を有する抗体が提供される。このハロチロシンは、モノハロチロシン及び/又はジハロチロシンの1つ又は両方であり得る。このモノハロチロシンは、プロモチロシン及び/又はクロロチロシンの1つ又は両方であり得る。またこのモノハロチロシンは、3-プロモチロシン及び/又は3-クロロチロシンの1つ又は両方であり得る。このジハロチロシンは、3、5-ジプロモチロシン及び/又は3、5-ジクロロチロシンの1つ又は両方であり得る。また、抗原に結合された本開示の抗体を有する組成物が提供され、この抗原はハロチロシン及び/又はハロチロシンタンパク質である。

50

【 0 0 2 0 】

本開示の抗体を用いた実施例によれば、以前に用いられた方法に関する様々な問題を克服することができる。いくつかのポリクローナル及びモノクローナル抗体が臭素化タンパク質と反応することが報告されている一方で、これらの抗体はジプロモチロシンのみと反応するようであり、3 - プロモチロシンとは反応しない。3 - プロモチロシンは、生体内で観察される優勢な修飾であることから、これは重要な制限である。

【 0 0 2 1 】

さらに本開示により提供される方法は、体液に対してかかる抗体を晒すことにより、例えば、好酸球活性、炎症、及び/又はモノハロチロシン及び/又はジハロチロシン部分を有するタンパク質量のうちの1以上を決定することが含まれ得る。

10

【 0 0 2 2 】

喘息の重症度を評価するための方法も提供される。この方法には、モノハロチロシンに対する結合親和性を有する抗体を用いて患者の唾液を分析すること、及びタンパク質に結合される抗体の量を測定することが含まれ得る。この方法は、定性的及び/又は定量的のうちの1つ又は両方であり得る。この方法には、結合抗体の量を相関させることにより炎症の量を決定することが含まれ得る。この方法には、別々に又は一緒に、結合抗体の量を使用して喘息発作への薬物反応をモニタすることが含まれ得る。

【 0 0 2 3 】

体液中の好酸球活性を決定するための方法も提供される。この方法には、モノハロチロシンに対する結合親和性を有する抗体に対して体液を晒すこと、及び結合抗体の量を測定することにより好酸球活性を決定することが含まれ得る。かかる体液は、例えば、唾液又は洗浄液であり得る。この方法には、例えば、結合抗体の量を相関させることにより炎症及び/又は薬物反応を決定することも含まれ得る。

20

【 0 0 2 4 】

そして、BTK - 94Cは、喘息患者及び健常対照者から収集されたヒト唾液標本でテストされた。ELISAマイクロアレイ分析によれば、ヒト唾液標本中の4つのタンパク質が、喘息患者の場合には増加したレベルでハロゲン化されていることが実証された。これらのデータによれば、臭素化が好酸球活性の特異的指標であること、及び4つの特異タンパク質が喘息関連の好酸球活性に応じて修飾されることが示されている。さらに、これらのタンパク質のハロゲン化レベルは、喘息をモニタするために有用であり得る。

30

【 0 0 2 5 】

以下に説明されるものは、新規のモノクローナル抗体(BTK - 94C)であり、このモノクローナル抗体は、臭素化及び塩素化タンパク質を認識する。これらハロチロシンタンパク質修飾は、炎症細胞活性の指標となる。この抗体は、サンドイッチELISAにおいて検出試薬として使用され、これにより4つの唾液タンパク質のハロチロシンレベルが喘息患者において増加することが実証された。このようにして、BTK - 94C抗体は、喘息患者における炎症の指標を提供することができ、これらELISAは、喘息又は強い炎症性要素を有するその他の疾患において薬物反応を予測又はモニタすることに対して有用であることが分かる。

【 0 0 2 6 】

実施例における材料及び方法

ウシ血清アルブミン(BSA)を、Jackson ImmunoResearch Laboratoryから購入した。3 - プロモ - 4 - ヒドロキシ - 安息香酸を、Indofine Chemical Company Incから購入した。3, 5 - ジプロモ - 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド、3, 5 - ジクロロ - 4 - ヒドロキシ安息香酸、3, 4 - ジヒドロキシ安息香酸、3 - ニトロチロシン、及びL - チロシンを、Sigma - Aldrichから購入した。キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)、腹水調整試薬、Melonモノクローナル抗体精製キット、及びビオチン化キットEZ - リンクスルホ - NHS - ビオチンを、Pierce - Thermo Scientific(イリノイ州口

40

50

ックフォード)から購入した。次亜臭素酸ナトリウム溶液を、Fisher-Scientificから購入した。23ELISA用のキャプチャ抗体を、補助データに記載されているようにして購入した。

【0027】

実施例における臭素化抗原及び関連修飾タンパク質の調製

抗原の調製については、"A Simple Modified Carbodiimide Method for Conjugation of Small-Molecular-Weight Compounds to Immunoglobulin G with Minimal Protein Crosslinking", Minh-Tam B. Davis and James F. Preston, Analytical Biochemistry 116, 402-407 (1981) (この内容は本明細書に援用される)に説明されるような、カルボジイミド法の修正後プロトコルが用いられた。簡単に説明すると、0.12mMの3-Br-HBAが、2.5mlのメタノールに溶解されると共に、2分間室温において2.5mlの20mMリン酸カリウムバッファ(pH5.0)において0.75mMのEDCと組み合わせられた。次にこの5ml溶液を、200mMリン酸カリウムバッファ(pH8.0)において8mlの2.5mg/mlKLHと混合し、室温で一晩インキュベートした。残っているEDC及び3-Br-HBAは、4で120mM PBSに対する透析により除去された。透析後、沈殿物を4で2時間かけて50,000gで遠心分離により除去した。pH8.0の200mMリン酸カリウムバッファにおいて、タンパク質濃度について280nmで吸光度を測定すると共に臭素化については310nmで測定することにより、修飾抗原を定量した。修飾KLHを、等分し-80で保存した。マウスを免疫して、血清を収集し、ハイブリドーマ細胞株及びそれらの上清、腹水生産、及び抗体アイソタイピングを、Washington State University Monoclonal Antibody Center (Pullman)において行った。BTK-94C抗体を、EZ-リンクスルホ-NHS-LC-ビオチン化キット(Pierce、ロックフォード、イリノイ)を使用し、製造者のプロトコルにしたがって、ビオチン化した。

【0028】

臭素化BSAを、以前に報告したように、次亜臭素酸ナトリウム(Fisher Scientific、ペンシルベニア州ピッツバーグ)を用いて調製した。3、5-ジプロモチロシンに対する3-プロモチロシンの量を最大化するために、以前に報告したように、我々は最適化された条件を使用した。すなわち、1mlの10mgBSA/mlを、新しく調製した200µlの20mM次亜臭素酸ナトリウム(pH7.2PBSにおいて)と、25で15時間反応させた。そしてこの溶液を、4でPBSに対して透析することにより、未反応試薬を除去した。塩素化BSA及びニトロ化BSAを生成するために、6%次亜塩素酸ナトリウム(The Clorox Company)及びペルオキシ亜硝酸(Millipore Corporation、マサチューセッツ州ボストン)を、以前に報告したようにそれぞれ用いた。

【0029】

実施例におけるELISAマイクロアレイアッセイ及び修飾チロシン類似体の阻害研究

初期ビオチン信号を、ビオチニルチラミドと組み合わせて西洋わさびペルオキシダーゼ(Jackson ImmunoResearch Laboratories)に結合したヤギ抗マウスIgMにより生成した以外は、サンドイッチELISAマイクロアレイを前述したように実施した。簡潔に説明すると、遠心分離によって如何なる微粒子をも除去した後、唾液標本をPBSにおいて0.1%BSA中で5倍に希釈した。各希釈サンプル/チップの25µlを、3つのチップにおいて分析した。各チップが、各キャプチャ抗体に対する4つの複製スポットを含むようにすることによって、23ELISAのそれぞれについて合計12複製物/サンプルが存在するようにした(例えば下記の表1参照)。

【0030】

表S1 - - 選択されたプラズマバイオマーカ及び喘息に対してこれらタンパク質を関連付

けるリファレンス

【表 1】

Capture antibodies	Abbreviation	Catalog # ⁵ and Source
alpha-lactalbumin	a-LB	Sc-58672 ²
amphiregulin	AmR	MAB262 ¹
ceruloplasmin	CP	sc-69767 ²
C-reactive protein	CRP	MAB17071 ¹⁰
epidermal growth factor (EGF)	EGF	DY236 kit ¹
EGF receptor	EGFR	AF-231 ¹
E-selectin	Esel	AF-724 ¹
basic fibroblast growth factor	FGFb	MAB233 ¹⁵
fibrinogen	Fibr	ID6-250310 ₃
heparin-binding epidermal growth factor	HBEGF	AF-292 ¹
hepatocyte growth factor	HGF	MAB694 ²⁰
intracellular adhesion molecular 1	ICAM	MAB720 ¹
insulin-like growth factor 1	IGF-1	MAB291 ¹
leptin	Leptin	MAB398 ¹
matrix metalloprotease 1	MMP1	AF901 ¹²⁵
matrix metalloprotease 2	MMP2	AF902 ¹
matrix metalloprotease 9	MMP9	AF911 ¹
platelet-derived growth factor A	PDGF	MAB221 ¹
RANTES	RANTES	MAB678 ³⁰
surfactant protein A	SP-A	LS-C17957 ⁴
transforming growth factor alpha	TGFa	AF-239 ¹
tumor necrosis factor alpha	TNFa	MAB610 ³⁵
vascular endothelial growth factor	VEGF	AF-293 ¹

1. R&D Systems; Minneapolis, MN, USA.
2. Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA USA.
3. ABBiotech, San Diego CA, USA
4. Lifespan Biosciences, Seattle WA, USA.

【 0 0 3 1 】

抗体結合特性を定義するためのマイクロアレイアッセイについては、変性及び未変性タンパク質を、それぞれアミノプロピルシランでコーティングされたスライド上にプリントした。次いでこれらスライドを、PBSにおいて2%BSAでブロックした。50μLのハイブリドーマ上清を、50μLの特定濃度のケミカルコンペティタ(0.1%BSA/PBSにおいて)により、12時間室温で、プレインキュベートした。個々のケミカルコンペティタを、ハイブリドーマ上清と混合する前に、連続的に希釈した。25μLの混合物を、室温での16時間にわたるインキュベーションの前に、各マイクロアレイチップに装填した。プレートを、前述したように、PBSにおいて0.05%Tween-20で3回洗浄した。ビオチン信号を、Cy3に結合したストレプトアビジンにより検出した後

、ScanArray Express HT laser scanner (Perkin-Elmer、ダウナーグローブ、イリノイ)を用いて画像化した。ScanArray Expressソフトウェアを用いて、画像を分析し、スポット蛍光シグナルを決定した。

【0032】

実施例におけるELISAマイクロアレイ

ELISAマイクロアレイチップのプリント及び処理については、"An Internal Calibration Method for Protein-Array Studies", Don Simone Daly, et al, Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology, Volume 9, Issue 1, 2010, Article 14 (この内容は本明細書に援用される)において、以前に詳述した。緑蛍光タンパク質(100pg/mL)を、各唾液サンプルにスパイクし、チップにおいて別々のキャプチャ及び検出抗体を用いたサンドイッチELISAを使用して分析した。この分析データを用いて、他のELISAからのデータを正規化し、この正規化では、PromAT Calibratorというカスタムのバイオインフォマティクスプログラムを用いた。このプログラムは、我々がこの目的のために特別に開発したもので、"An Internal Calibration Method for Protein-Array Studies", Don Simone Daly, et al, Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology, Volume 9, Issue 1, 2010, Article 14、及び"Preparation and Characterization of a Polyclonal Antibody Against Brominated Protein", Yasuhiro Kambayashi, et al., J. Clin. Biochem. Nutr. 44, 95-103, January 2009 (これらそれぞれの内容のすべてが本明細書に援用される)に説明されている。PromAT Calibratorは、www.pnl.gov/statistics/ProMAT/において自由に利用できる。実質上マイクロアレイチップを処理する手順は、単一検出抗体のみを使用した以外は、"An Internal Calibration Method for Protein-Array Studies", Don Simone Daly, et al, Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology, Volume 9, Issue 1, 2010, Article 14において以前に報告された手順と同じである。

【0033】

簡単に説明すると、各キャプチャ抗体を、4通りのスポットにおいて各チップ上にプリントした。このとき、一度にチップの4通りのうちのそれぞれにプリントした。加えて、GFP用抗体及びオリエンテーションスポットを、各チップに4通りでプリントした。個々のチップを、1つの希釈唾液標本とインキュベートすると共に、各標本を3つのチップ上で分析した。上述したビオチン化ハロチロシンモノクローナル抗体(BTK-94C)を用いて、キャプチャした抗原における3-プロモチロシンを検出した。処理したスライドを、ScanArray Express HT laser scanner (Perkin-Elmer、米国イリノイ州ダウナーグローブ)を用いて画像化した。ScanArray Expressソフトウェアを用いて、画像を分析し、スポット蛍光強度を決定した。

【0034】

実施例における統計

一元配置分散分析(Chambers, 1992)を用いて、統計比較を行った。統計的に有意な場合、Tukey's Honest Significant Difference

reference法を用いて、どの喘息グループがプロモチロシンの高いレベルを有しているかを定義した。確率値 $p = 0.05$ を用いて、すべての分析についての統計的有意性を表現した。

【0035】

実施例の結果

ハロチロシンのモノクローナル抗体の評価

次亜臭素酸塩が、タンパク質チロシンと反応することにより、3-プロモチロシンと3、5-ジプロモチロシン修飾との両方を生産する(図1B)。手順を用いて、3-臭素化チロシン又は関連するタンパク質修飾を含む抗原を発現させた。Aは、タンパク質への3-プロモ安息香酸の結合であり、これはマウス免疫に用いたKLH抗原を生成するために使用された。Bは、どのようにして次亜臭素酸ナトリウムが、生体内でチロシン残基を改変すると考えられているかを示す図である。この同じ化学的性質を用いて、修飾BSA抗原を生成した。当該修飾BSA抗原は、ハイブリドーマ細胞株のスクリーニングに使用された。3、5-ジプロモチロシン修飾は生体外反応について優勢である一方、3-プロモチロシンは、生体内で優勢である。したがって、生体外臭素化抗原に対して精製された以前の抗体が二臭化チロシン修飾のみを認識するという事実から、この障害が抗原を反映している可能性があることが示唆される。抗原については、3-プロモチロシンを模倣するタンパク質修飾、すなわちKLHに付加された3-プロモ-4-ヒドロキシ-安息香酸が用いられた。このようにして、かかる人工抗原が、生理学的関連臭素化タンパク質修飾を認識する抗体を生産したことが確認された。修飾KLH抗原で免疫したマウスの血清から回収された抗体が認められ、この抗体は臭素化BSAと結合する一方で、未修飾BSAとは結合しなかった(データは示されない)。これは、プロモチロシン模倣体の結果、生物学的に関連するタンパク質修飾と反応する抗体が生じたことを示している。

10

20

【0036】

そして免疫したマウスを用いて、225のモノクローナルハイブリドーマ細胞株を生成した。これらの培養された細胞株からの上清を、臭素化BSA、塩素化BSA、ニトロ化BSA、及び未修飾BSAの個々のスポットを含んだカスタムのタンパク質マイクロアレイチップを用いて、反応性及び特異性についてテストした。これらのテストにより、BTk-94抗体が、臭素化BSAと強く反応し、塩素化BSAと弱く反応し、未修飾BSA又はニトロ化BSAと反応しないことが実証された(図2)。

30

【0037】

図2は、異なる生体外修飾BSAでのBTk-94Cの認識パターンの評価を示している。左側は、スライド上にプリントされた抗原のパターンを示している。スポット径は、約200ミクロンである。右側は、Cy3スキャン蛍光画像であり、BTk-94Cの結合パターンを示している。A543は、Alexa543で修飾された抗体であり、オリエンテーションスポットとして使用される。BSA-BrOは、次亜臭素酸塩で処理されたBSAである。BSA-CIOは、次亜塩素酸塩で処理されたBSAである。BSA-ONOOは、ペルオキシ亜硝酸で処理されたBSAである。

【0038】

このハイブリドーマ細胞株をさらに培養し、それが本当にモノクローナルであることを確認した。この後のすべてのテストで使用されるBTk-94C抗体は、これらモノクローナル細胞株に由来する。テストにより、この抗体がBTk-94(図2)について示されたものと同じ結合特性を有することが示された。

40

【0039】

実施例における臭素化タンパク質に対するモノクローナル抗体の調製及びキャラクタリゼーション

BTk-94Cのアイソタイピングによって、これがIgM抗体であり、濃度依存的に臭素化BSAと反応したことが示された(図3)。図3では、臭素化BSAで生産された信号が、BTk-94C抗体の濃度と相関している。この細胞株からの腹水も、タンパク質マイクロアレイ分析を用いて特異性及び交差反応性について分析した。ハイブリドーマ

50

上清からの結果と一致しており（上記参照）、腹水で生産された BTK - 94C 抗体は、臭素化及び塩素化 BSA を結合する一方で、未修飾又はペルオキシ亜硝酸で処理された BSA との反応性は観察されなかった（データは示されない）。したがって、この抗体が優先的にハロゲン化タンパク質と反応することがさらに確認された。

【0040】

さらに当該抗体の特異性を特徴付けるため、臭素化 BSA に結合する BTK - 94C 抗体を阻害するためにチロシン修飾を模倣する試薬の能力を評価した。臭素化 BSA に対する BTK - 94C の結合が、3 - プロモ - 4 - ヒドロキシ安息香酸及び 3, 5 - ジプロモ、4 - ヒドロキシ安息香酸によって強く阻害される一方、3 - クロロチロシン及び 3, 5 - ジクロロ、4 - ヒドロキシ安息香酸によってはそれほど強くなく阻害された（図 4 B）。臭素化 BSA に対する結合は、そのままのチロシン、3 - ニトロチロシン、又は 3, 4 - ジヒドロキシ安息香酸によって阻害されなかった（図 4）。

10

【0041】

図 4 を参照すると、修飾チロシン類似体による阻害に基づく臭素化アルブミンに対する BTK - 94C の結合特性が示されている。個々の化学物質及び BTK - 94C を一晩インキュベートし、臭素化 BSA とプリントされたタンパク質マイクロアレイチップに対して加えられた。略称、関連化学名、及び構造が、パネル A に示される。3 - Br - HBA は、3 - プロモ - 4 - ヒドロキシ安息香酸であり、DiBr - HBA は、3, 5 - ジプロモ - 4 - ヒドロキシベンズアルデヒドであり、DiCl - HBA は、3, 5 - ジクロロ - 4 - ヒドロキシ安息香酸であり、3 - OH - HBA は、3, 4 - ジヒドロキシ安息香酸であり、3 - NO₂ - Tyr は、3 - ニトロチロシンであり、そして Tyr は、L - チロシンである。パネル B では、結果が B / B₀ として相対的コンペティションとして表現されており、ここで B は、コンペティタの存在下で結合した抗体の量であり、B₀ は、コンペティタの不在下での量である。各点は、3 通りの分析の中央値を示している。これら結果により、BTK - 94C が 3 - プロモチロシン及びクロロチロシンタンパク質修飾を認識することが、さらに示唆される。

20

【0042】

実施例によるヒト唾液タンパク質におけるハロゲン化チロシン修飾の BTK - 94C 分析
この抗体により喘息患者における好酸球活性を評価することができるかを決定するために、ELISA マイクロアレイプラットフォームを利用し、このプラットフォームでは、BTK - 94C を唯一の検出抗体として用いた。この ELISA チップには、喘息に関連する可能性のある抗原に対する 23 のキャプチャ抗体がプリントされた（補足データ参照）。これらキャプチャ抗原のうち、健常対照者と比べると、喘息患者において唾液標本中の高い好酸球数又は低い好酸球数と共に AGT、ICAM、PDGF、及び RANTES の臭素化レベルについて統計学的に有意な増加が観察された（図 5）。

30

【0043】

図 5 を参照すると、ハロゲン化タンパク質は、喘息患者からの唾液中に存在するタンパク質で上昇している。A は、この調査でテストした唾液標本からの好酸球数である。B では、非免疫ウサギ IgG を、ELISA マイクロアレイ上にプリントし、ネガティブコントロールスポットは、すべてのテストされた唾液標本を通じて完全にフラットな信号を示した。C は、細胞内接着分子 1 (ICAM) についてのハロチロシンレベルであり、D は、血小板由来増殖因子 AA (PDGF) であり、E は、AGT であり、F は、RANTES である。側線は、中央値を示しており、ボックスは、25 番目と 75 の変位値である。

40

【0044】

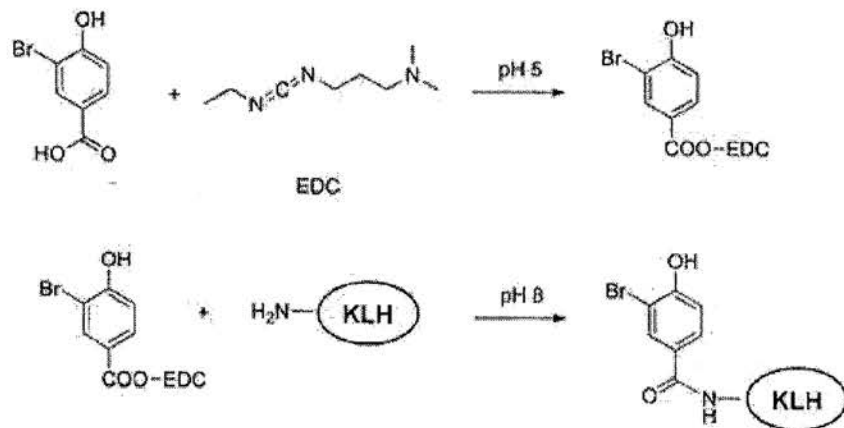
ELISA マイクロアレイ分析のデータによれば、ANOVA 及び Turkey のテストに基づいて有意に異なる ($p < 0.05$) ことが示されている。これに対して、かかるチップを用いて実施した他の 19 のアッセイでは、如何なる有意差も示さなれなかった。この ELISA マイクロアレイ分析については、非免疫ウサギ IgG をネガティブコントロールとしてプリントした。このスポットからの信号は、他のものと比較して低く、この信号には治療関連の変化が存在しなかった（図 5 B）。これにより、キャプチャ抗体を含

50

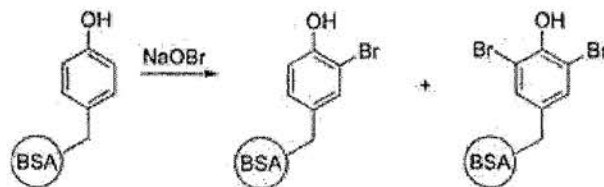
むスポットにおいて観測された喘息に関連の差分信号は、キャプチャ抗原の差分ハロゲン化に起因していたことが示唆される。

【 図 1 】

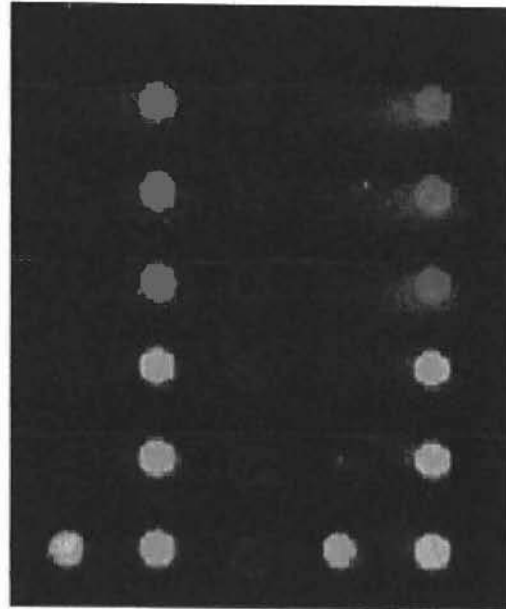
A. 免疫付与のための 3-臭素化 KLH



B. 抗体のスクリーニングのための NaOBr 臭素化 BSA

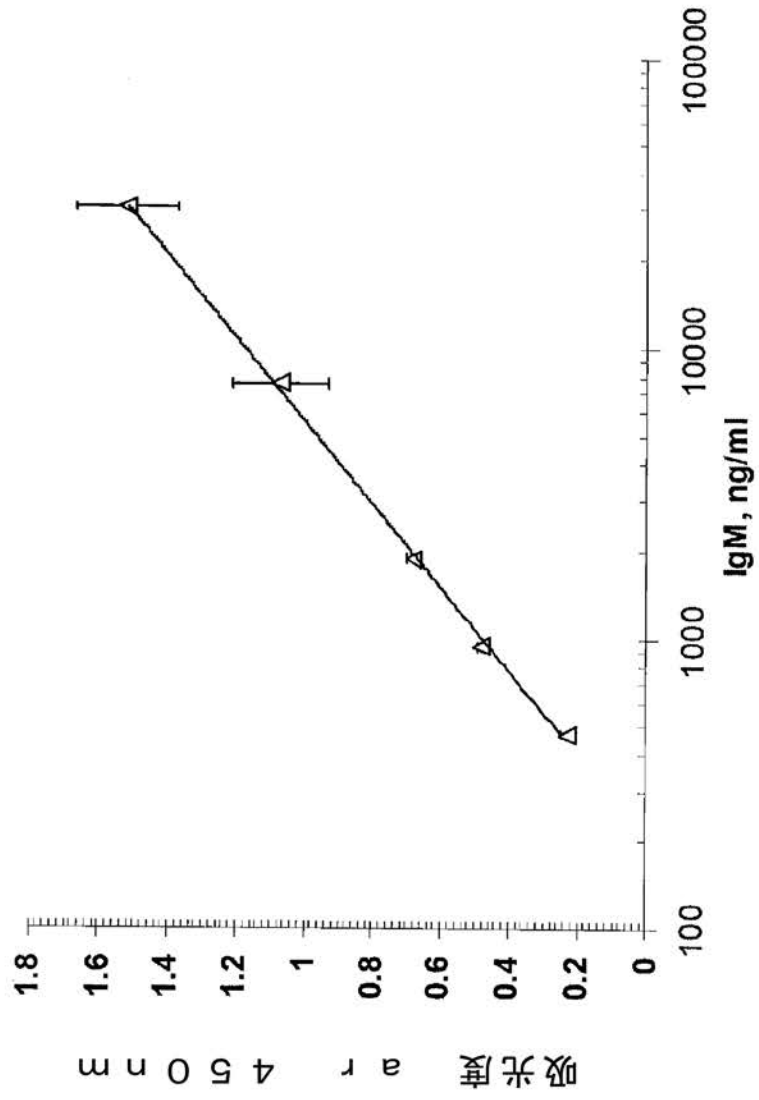


【 図 2 】

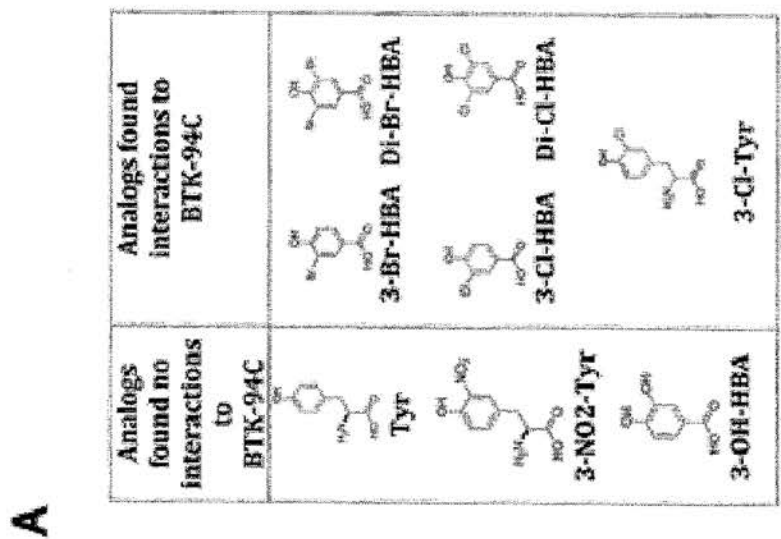
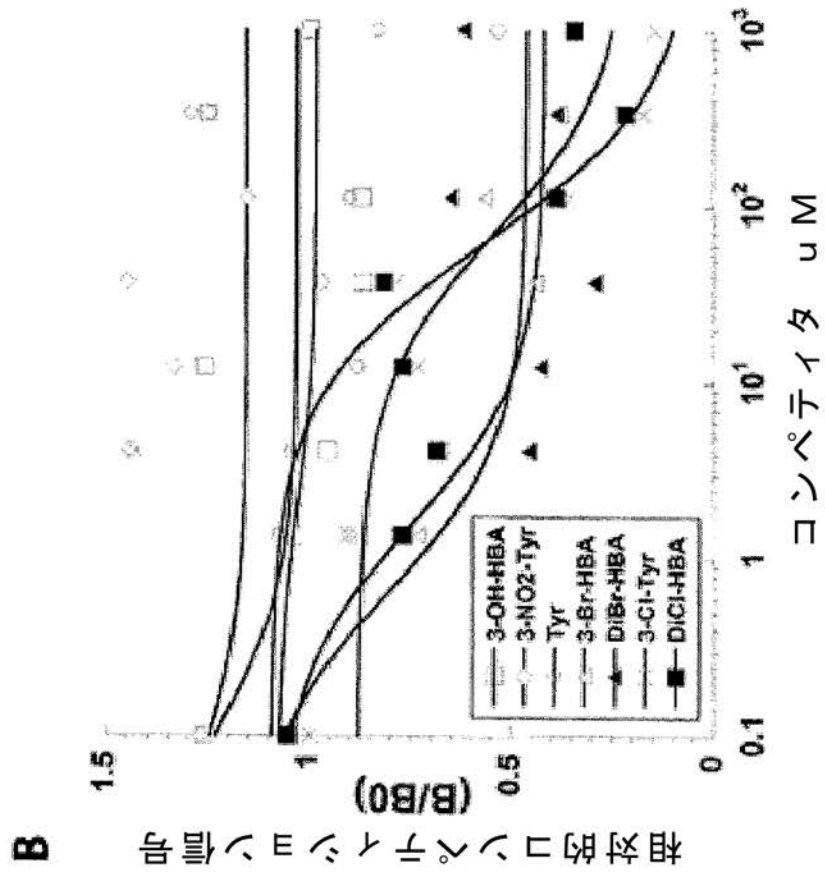


A546	PBS	BSA	BSA	BSA	BSA
BSA-BrC	BSA-BrC	BSA-BrC	BSA-C10	BSA-C10	BSA-C10
BSA-ONCO	BSA-ONCO	BSA-ONCO	BSA-ONCO	BSA-ONCO	BSA-ONCO
A546	PBS	BSA	BSA	BSA	BSA
BSA-BrC	BSA-BrC	BSA-BrC	BSA-C10	BSA-C10	BSA-C10

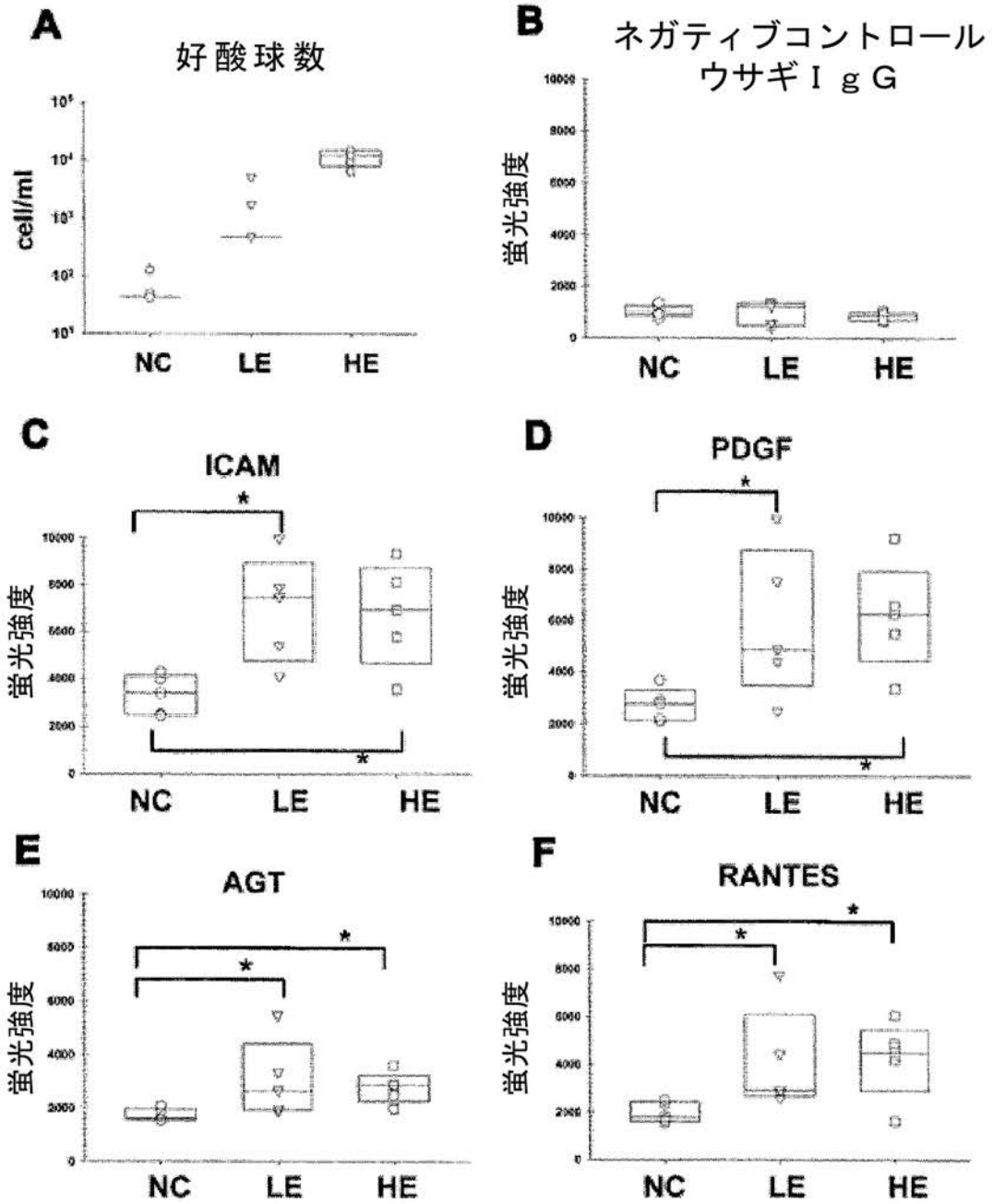
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/056848

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/44 ADD.		
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) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YASUHIRO KAMBAYASHI ET AL: "Preparation and Characterization of a Polyclonal Antibody against Brominated Protein", JOURNAL OF CLINICAL BIOCHEMISTRY AND NUTRITION, vol. 44, no. 1, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 95-103, XP55036434, ISSN: 0912-0009, DOI: 10.3164/jcbrn.08-196 the whole document ----- -/--	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 another 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 31 August 2012		Date of mailing of the international search report 07/09/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kalsner, Inge

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/056848

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KATO Y ET AL: "Immunogenicity of a brominated protein and successive establishment of a monoclonal antibody to dihalogenated tyrosine", FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE, ELSEVIER SCIENCE, US, vol. 38, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 24-31, XP27829746, ISSN: 0891-5849, DOI: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.09.013 the whole document</p> <p>-----</p>	1,2,4,5
A	<p>WU W ET AL: "3-Bromotyrosine and 3,5-Dibromotyrosine are major products of protein oxidation by eosinophil peroxidase: potential markers for eosinophil-dependent tissue injury in vivo", BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 38, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 3538-3548, XP002188233, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/BI982401L the whole document</p> <p>-----</p>	1-32
A	<p>RUTH E ALDRIDGE ET AL: "Eosinophil peroxidase produces hypobromous acid in the airways of stable asthmatics", FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE, vol. 33, no. 6, 1 September 2002 (2002-09-01), pages 847-856, XP55036450, ISSN: 0891-5849, DOI: 10.1016/S0891-5849(02)00976-0 the whole document</p> <p>-----</p>	1-32

フロントページの続き

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

(72)発明者 ツァンガー, リチャード, シー.

アメリカ合衆国, ワシントン州 99352, リッチランド, ゴーウェン, 1206
Fターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA71 FA74

专利名称(译)	组合物，抗体，哮喘诊断方法和抗体制备方法		
公开(公告)号	JP2013541560A	公开(公告)日	2013-11-14
申请号	JP2013535031	申请日	2011-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	巴特勒记忆研究所		
申请(专利权)人(译)	巴特尔纪念研究所		
[标]发明人	ジンホンジュン ツァンガーリチャードシー		
发明人	ジン, ホンジュン ツァンガー, リチャード, シー.		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	C07K16/44 G01N33/6812 G01N2800/122		
FI分类号	C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
优先权	61/394640 2010-10-19 US 61/480154 2011-04-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种制备抗体的方法，该方法包括将3-溴-4-羟基-苯甲酸掺入蛋白质中形成抗原，从而对哺乳动物宿主进行免疫，回收对这种抗原具有亲和力的抗体。提供了对单卤代酪氨酸具有结合亲和力的抗体，以及包含与单卤代酪氨酸结合的抗体的组合物。还提供了包含具有3-溴-4-羟基-苯甲酸部分的蛋白质的组合物。提供了一种评估哮喘严重程度的方法，其中用对单卤代酪氨酸具有结合亲和力的抗体分析患者的唾液，以确定与该蛋白结合的抗体的量。还提供了确定体液中嗜酸性粒细胞活性的方法，该方法包括将体液暴露于对单卤代酪氨酸具有结合亲和力的抗体并测量结合的抗体的量。确定活动。[选型图]图1

