

(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 - 277469

(P2002 - 277469A)

(43)公開日 平成14年9月25日(2002.9.25)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	V
33/574			33/574	B

審査請求 未請求 請求項の数 9書面 (全 12数)

(21)出願番号 特願2001 - 257021(P2001 - 257021)

(22)出願日 平成13年7月24日(2001.7.24)

(31)優先権主張番号 09/624692

(32)優先日 平成12年7月24日(2000.7.24)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/851263

(32)優先日 平成13年5月8日(2001.5.8)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 593108772

ヘルス リサーチ インコーポレイテッド
HEALTH RESEARCH, I N
C .

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 14263、
バッファロー、エルム アンド カールト
ン ストリーツ(番地なし)、ロズウェル
パーク キャンサー インスティテュート
ディヴィジョン内

(74)代理人 100059959

弁理士 中村 稔 (外9名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血清中の前立腺特異的膜抗原の検出方法

(57)【要約】

【課題】 体液中の前立腺特異的膜抗原 (P S M A) の
検出方法を提供する。

【解決手段】 体液中の P S M A を検出する方法であっ
て、 P S M A 抗体を使用して、 P S M A を含む体液サン
プルから P S M A を捕捉する工程、及び、捕捉した P S
M A を、抗 ₁ - 抗キモトリプシン抗体を用いて検出す
る工程、を含み、 P S M A を免疫アッセイにより検出す
ることを特徴とする方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 体液中の前立腺特異的膜抗原(P S M A)を検出する方法であって、P S M A抗体を使用して、P S M Aを含む体液サンプルからP S M Aを捕捉する工程、及び、捕捉したP S M Aを、抗_γ-抗キモトリプシン抗体を用いて検出する工程、を含み、P S M Aを免疫アッセイにより検出することを特徴とする方法。

【請求項2】 P S M Aを、以下の工程：P S M A抗体を希釈することにより該P S M A抗体を使用する工程、10 得られた溶液を用いて表面をコーティングする工程、該表面上の非特異的部位をブロックする工程、サンプルをブロッキング緩衝液で希釈する工程、及び、希釈したサンプルをウェルに適用してP S M Aを捕捉する工程により捕捉する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 捕捉したP S M Aを、抗_γ-抗キモトリプシン抗体を用いて、以下の工程：ウェルを洗浄することにより非捕捉物質を除去する工程、20 ブロッキング溶液中で希釈した抗_γ-抗キモトリプシン抗体を適用する工程、及び、結合したP S M Aを、ペルオキシダーゼで標識した抗ウサギI g G及びOPD基質を用いて検出する工程、により検出する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 体液が血清である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 体液が血清である、請求項2に記載の方法。

【請求項6】 体液が血清である、請求項3に記載の方法。

【請求項7】 体液が尿である、請求項1に記載の方法。30

【請求項8】 体液が尿である、請求項2に記載の方法。

【請求項9】 体液が尿である、請求項3に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野及び従来の技術】本出願は同時係属している米国出願第09/624,692号(2000年7月24日出願)の一部継続出願である。前立腺40 特異的膜抗原(P S M A)のモニターが前立腺癌の検出及び処置にとって望ましいことがだんだん明らかになってきている。前立腺癌は米国の男性において最も発症率の高い癌である。前立腺癌の早期検出の効率は、前立腺特異的抗原(P S A)についての血清テストを用いて増加してきた。しかしながら、P S Aは組織特異的でもなく疾患特異的でもない。前立腺のその他多くの状態、良性の中のあるものは、血清中のP S Aレベルの異常な上昇を引き起こすことができる(Polascikら、P rostate-specific antigen: 50

A decade of discovery - what we have learned and where we are going, J. Urol, vol 162, pp 293-306, 1999)。前立腺特異的膜抗原(P S M A)は細胞内ドメイン及び細胞外ドメインの両方を有する膜貫通型糖タンパク質であり、前立腺組織に高度に特異的である(Israeliら、Molecular cloning of a complementary DNA encoding of prostate-specific membrane antigen, Cancer Res, vol 53, pp 227-230, 1993)。P S M Aは、良性及び悪性の前立腺上皮で発現し、免疫組織化学的に検出することができる(Horoszewiczら、Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients, Anticancer Res, vol 7, pp 927-936, 1987; Silverら、Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues, Clin Cancer Res, vol 3, pp 81-85, 1997; Wrightら、Expression of prostate-specific membrane antigen (P S M A) in normal, benign, and malignant prostate tissues, Urol Oncol, vol 1, pp 18-28, 1995; Bostwickら、Prostate-specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma; A study of 184 cases, Cancer, vol 82, pp 2256-2261, 1998及びSweatら、Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastasis, Urology, vol 52, pp 637-640, 1998)。P S M Aの血清レベルは進行型の疾患を患う前立腺癌患者における徴候の有意性(prognostic significance)であることが提案されてきている。例えば、Grassoら、Combined nested RT-PCR assay for prostate-specific antigen and prostat

e-specific membrane antigen in prostate cancer patients: correlation with pathological stage, Cancer Research vol 58, pp 1456-1459, 1998を参照のこと。

【0002】血清中のPSMAを確実に検出する試みは成功しておらず、現在、前立腺癌患者の血清中のPSMAレベルをモニターするために利用することができるルーチンな方法論は存在していない。ヒト前立腺組織におけるPSMA発現は、7E11・C5-抗体を用いた免疫組織化学的染色によりはじめて考証された(前出、Horoszewiczら)。ヒト前立腺癌細胞(LNCaP)に対して産生された7E11・C5モノクローナル抗体は、PSMAのアミノ末端近くの細胞内エピトープに結合することが知られている。CYT-356と命名された7E11・C5のアイソトープコンジュゲート形態は、局所及び遠位(distant)の前立腺癌の転移及び再発の同定に利用されてきた。7E11・C5抗体は、ATCC寄託番号HB10494でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(Rockville, Maryland, USA)に寄託されている。PSMAの免疫反応性は、良性の前立腺肥大(BPH)及び正常細胞と比較して高度な前立腺腫瘍において高いことが見いだされた(前出、Horoszewiczら;前出、Silverら;前出、Wrightら;前出、Bostwickら及び前出、Sweatら)。しかしながら、前出、Horoszewiczらにより試験された33の細胞系の中では、前立腺のリンパ節癌(LNCaP)細胞においてのみPSMAの免疫反応性が検出された。1997年、米国食品医薬品庁は、局在的前立腺癌の検出のための7E11・C5のラジオイムノコンジュゲート形態(CYT356)の使用を承認した。前立腺癌患者の血清中のPSMAをウエスタンブロット分析により測定する試みは確証的なものではない(Troyerら, Detection and characterization of the prostate-specific membrane antigen(PSMA) in tissue extracts and body fluids, Int. J. Cancer, vol 62, pp 552-558, 1995; Rochonら, Western-blot assay for prostate-specific membrane antigen in serum of prostate cancer patients, Prostate, vol 25, pp 219-223, 1994及びBeckettら, Prostate-specific membrane antigen levels in sera from healthy men and pa-

tients with benign prostate hyperplasia or prostate cancer, Clin Cancer Res, vol 5, pp 4034-4040, 1999)。ウエスタンブロット分析は、後期C₁、D₁及びD₂前立腺癌患者において健常者よりも血清PSMAレベルが増加していることを示すことができることが報告されている(前出、Rochonら)。一方、前出、Troyerらは、前立腺癌患者の血清中のPSMAを検出することができなかったことを報告している。前出、Beckettらは、血清中のPSMAを検出することができたが、疾患の初期と後期とを区別することができなかったことを報告している。

【0003】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】本発明よりも前においては、前立腺癌を検出するために単純なELISAを使用する試みは成功していなかった。「競合阻害」ELISAにおいて、PSMAは前立腺癌患者由来の血清の46%で検出され、BPH又は健常者においては検出されなかった(前出、Horoszewiczら)。このことは、決定的な試験について明らかに十分な信頼性である。同時係属している米国特許出願第09/624,692号(2000年7月24日出願)に記載されているように、本発明者等の過去の研究において、PSAはチオフィリック(Thiophilic)ゲル(1S、2S及び3S)に対して強いアフィニティを有することが示された。最近、本発明者等は、PSMAもT-ゲルに対しても強いアフィニティを有するという観察結果を得た。要約すると、T-ゲルスラリーをカラム(0.5×5cm)に充填し、1M硫酸ナトリウムを含有する25mM Hepes緩衝液、pH7.0で平衡化する。PSMA源、例えばLNCaP細胞(5×10⁷細胞/ml)由来の可溶性細胞抽出物又はヒト血清(400µl)を、カラム平衡化緩衝液を用いて再構成し、これをカラムに適用する。次いでカラムを約10空隙容量のカラム平衡化緩衝液で洗浄し、結合したタンパク質を25mM Hepes緩衝液、pH7.0を用いて溶離する。種々のカラム画分中のPSMAの存在を、SDS-PAGE及びモノクローナル抗PSMA抗体、例えば7E11・C5を用いたウエスタンブロット分析により検出する。例として、画分の電気泳動を、4~15%勾配のポリアクリルアミドゲル中の非還元条件下で行った。サンプルを、比較可能なタンパク質レベルを含有する等量でロードし、200ボルトで40分間泳動にかけた。電気泳動後、ゲル中のタンパク質を、ポリビニリデンジフルオライド(PVDF)膜へ電気泳動的に移した。移動用緩衝液は25mM Tris、192mM グリシン及び20%メタノールを含み、pH8.3であった。移動は100ボルトで1時間行った。移動後、膜を、穏やかに攪拌した広範

に機能するタンパク質をベースとするブロッカー中で1時間ブロックした。前記のブロッカーはアルブミン、カゼイン又はドライミルク溶液を含んでいる。前記のブロッカーはNAP-Sure blocker (登録商標) (Geno-Technology, Inc., St. Louis, MO) として商業的に入手することができる。免疫染色は、NAP-Sure blocker (登録商標) (Geno-Technology, Inc., St. Louis, MO) で濃度5 μ g/mlに希釈した7E11.C5抗体又は γ_1 -抗キモトリプシンに対するモノクローナル抗体を用いて1時間行った。二次抗体、セイヨウワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートしたヤギ抗マウスIgG (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA) を1% アルブミン/PBS/0.1% Tween 20で1:5000に希釈したものを、膜と共に45分間インキュベートした。セイヨウワサビペルオキシダーゼに対する強化ルミノール (ECL) 試薬を用いてタンパク質を検出した。前記の試薬は商標名NEL102 (NEL, Boston, MA) の下で入手可能である。複合タンパク質をX線フィルムに曝露し、陽性のバンドを可視化した。

【0004】本発明は、イムノアッセイにより前立腺特異的膜抗原 (PSMA) を含む体液サンプル中のPSMAを検出する方法であって、サンプル由来のPSMAをPSMA抗体を用いて捕捉する工程及び捕捉したPSMAを抗 γ_1 -抗キモトリプシン抗体を用いて検出する工程を含む方法を含んでいる。好ましい態様において、PSMAは、抗PSMA抗体の適切な希釈物を使用する工程、得られた溶液を用いて表面、例えばマイクロタイタープレート中のウェル表面をコーティングする工程、前記表面上の非特異的部位をブロッキング溶液、例えばアルブミンでブロックする工程、サンプルをブロッキング緩衝液、例えば緩衝化アルブミンで希釈する工程、及び、希釈したサンプルを前記表面に適用してPSMAを捕捉する工程により捕捉される。体液は好ましくは血清であるが、その他の液体、例えば尿であってもよい。捕捉したPSMAを検出するための好ましい態様は、前記表面を洗浄することにより非捕捉物質を除去する工程、ブロッキング溶液、例えばアルブミン溶液中で希釈した抗 γ_1 -抗キモトリプシン抗体を適用する工程、及び、結合したPSMAを二次抗体、例えばペルオキシダーゼで標識した抗ウサギIgG及び基質、例えばO-フェニレンジアミン (OPD) を用いて検出する工程を含んでいる。

【0005】

【発明の実施の形態】本明細書で使用する「PSMA」とは、前立腺腫瘍及びLNCaP細胞膜に存在し、 γ_1 -抗キモトリプシン (ACT) と複合体を形成する抗原で

ある。「抗 γ_1 -抗キモトリプシン抗体」(抗ACT抗体)とは、 γ_1 -抗キモトリプシンと特異的に複合体を形成する抗体である。本明細書で使用する「PSMA抗体」とは、PSMAを選択的に捕捉する抗体を意味する。PSMA抗体の例は7E11.C5 (ATCC寄託番号HB-10494、米国特許第5,162,504号)及びB-6 (ATCC寄託番号PTA-3160)である。「ブロッキング溶液」とは、非特異的結合部位をブロックするために使用する広範囲の抗原を有するブロッキング化合物を含む溶液である。最も一般的なブロッキング溶液はアルブミン、通常はウシ血清アルブミン (BSA) の溶液である。その他のブロッキング化合物、例えばミルク固形物、カゼイン又は混合した多糖を使用してブロッキング溶液を形成してもよい。「ブロッキング緩衝液」とは、緩衝化ブロッキング溶液である。最も一般的な緩衝液はリン酸緩衝液である。特定の抗体による検出のためにブロッキング溶液を1以上の工程で使用する場合、通常は同一のブロッキング化合物がブロッキング溶液中に存在する。55名の前立腺癌患者由来の血清サンプル、前立腺炎と診断された患者由来の9つのサンプル、BPH患者由来の46のサンプル及び健康者ドナー由来の20の血清サンプルを、PSMAを選択的に保持するチオフィリック吸着クロマトグラフィーにより処理した。単離したPSMAをSDS-PAGE及び7E11.C5抗体を用いたウエスタンブロットにより分析した。ウエスタンブロット分析におけるPSMA検出の前に、血清サンプルをチオフィリックゲルクロマトグラフィーにより処理することは必須である。しかしながら、ELISAによるPSMA決定の場合、チオフィリックゲルクロマトグラフィー工程は要求されない。どんな処理をすることなくPSMAを血清中でモニターすることができる。

【0006】二重決定 (double determinant) ELISAは、PSMAに対する「捕捉」抗体としてのPSMA抗体及び「検出」抗体としてのポリクローナル抗 γ_1 -抗キモトリプシン抗体を用いて開発された。ELISAの結果は、3名の進行した前立腺癌患者由来のプールした血清の希釈物に基づく検量線から導かれた任意単位 (arbitrary unit) で表現する。結果：PSMAはチオフィリックゲルに対して強いアフィニティーを有している。チオフィリックゲルにおける患者血清のクロマトグラフィーは、アルブミンを含む90%より多くのタンパク質を除去する。これにより、PSMA抗体を用いて染色したときに、PSMAのウエスタンブロット分析において、~75から90kDaに対応する単一のバンドとして可視化することが可能になる。非癌性血清 (健康者、前立腺炎及びBPH) と比較して前立腺癌患者の血清では、染色がより強かった。前立腺癌細胞系LNCaPから単離して同様に処理したPSMAも単一のバンドを示した。しかしなが

ら、そのバンドは100~110kDaに対応するやや大きい分子量であった。直接的なサンドイッチ型酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を、血清PSMAの決定のために開発した。ELISAにおいて、PSMAレベルを任意の単位として表したところ、結果は疾患のステージと十分に相関する。

【0007】

【実施例】LNCaP細胞抽出物の調製

LNCaP細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(Rockville, MD)(ATCC 10494)及びB-6ハイブリドーマ細胞系(ATCC PTA3160)は、本発明者等の研究所においてルーチン的に維持され、また、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、そこから入手可能である。7E11.C5抗体及びB-6抗体は、化学的に安定なアミド結合を介して架橋したアガロースビーズ(例えば、Affi-Gel Protein-A M APS II system, Bio-rad, Laboratories, Hercules, CA)に結合したタンパク質Aを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、公表された製造者の指示に従い、マウスの腹水から精製した。モノクローナル抗体7E11.C5及びB-6は、LNCaP細胞を用いた免疫化により生成したマウス免疫グロブリン(IgG1)である。これらの抗体はLNCaP細胞の膜リッチ画分とは反応するが、サイトソル又は抗原性物質、例えば前立腺特異的抗原(PSA)又は前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)との反応性は有しない。

LNCaP細胞は、10%ウシ胎仔血清及び1mM L-グルタミンを補充した完全RPMI 1640増殖培地(G. Mooreら, AMA, V. 199, pp. 519, 1967により公開)中で維持した。LNCaP細胞の集密単層をトリプシン処理し、PBSで洗浄し、細胞懸濁液を1µg/mlのプロテアーゼ阻害剤(Aprotinin, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)の存在下、-70℃で凍結した。凍結及び解凍からなる追加のサイクルを1回した後、細胞溶解液を3000×gで遠心分離して核及び不完全な破壊細胞を除去した。上清を、0.5%のNP40を含むように再構成し、回転式振盪機中に4℃で30分間置いた。可溶化した物質を15000×gで30分間回転させた。上清を集め、使用するまで-70℃で保存した。

血清サンプル

110名の患者(前立腺炎、BPH及び前立腺腫瘍)及び20名の健常者ドナーに由来する血清サンプルを、本研究に使用した。患者の中で、37の血液サンプルは、クリニックにおいて定期的な外来通院の間に新たに採血したものであり、18の患者血清サンプルは、Department of Laboratory Medicine at Roswell Park Cancer Instituteから保存された血清サンプルとして入手したものである。残り54名の患者の血清サンプルはニューヨーク西地区の泌尿器クリニックへの定期的通院の間に患者から新たに採取したものである。採取後90日以内に分析した保存サンプルを除く全ての血清サンプルを-70℃で凍結して維持し、72時間以内に処理した。健常者を含む全てのドナーは、地方条例の要求により書面によるインフォームドコンセントを受けた。血清サンプルは使用するまで-70℃で凍結して維

持した。

【0008】抗体

7E11.C5ハイブリドーマ細胞系(ATCC HB 10494)及びB-6ハイブリドーマ細胞系(ATCC PTA3160)は、本発明者等の研究所においてルーチン的に維持され、また、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、そこから入手可能である。7E11.C5抗体及びB-6抗体は、化学的に安定なアミド結合を介して架橋したアガロースビーズ(例えば、Affi-Gel Protein-A M APS II system, Bio-rad, Laboratories, Hercules, CA)に結合したタンパク質Aを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、公表された製造者の指示に従い、マウスの腹水から精製した。モノクローナル抗体7E11.C5及びB-6は、LNCaP細胞を用いた免疫化により生成したマウス免疫グロブリン(IgG1)である。これらの抗体はLNCaP細胞の膜リッチ画分とは反応するが、サイトソル又は抗原性物質、例えば前立腺特異的抗原(PSA)又は前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)との反応性は有しない。

二重決定ELISAによるPSMAの定量化

未処理の血清サンプル中のPSMAの定量化は以下の通りに行った。モノクローナル抗体7E11.C5を、20mMリン酸緩衝食塩水(pH7.0)中で5µg/mlに希釈し、マイクロタイタープレートのウェルの4で一晚のコーティングに使用した。ウェルを、PBSブロッキング緩衝液中の2%ウシアルブミンを用い1時間かけてブロックした。ブロッキング工程及び続くすべての工程は室温下で行った。試験サンプルをブロッキング緩衝液で希釈し、プレートへ三重に適用した(50µl/ウェル)。1時間インキュベーションした後、プレートをPBSで洗浄し、PBS/0.1% Tween 20の1%中のアルブミン溶液中で1:2000に希釈した。抗キモトリプシンポリクローナル抗体を適用した(50µl/ウェル)。結合した抗原を、ペルオキシダーゼ標識した抗ウサギIgG及びO-フェニレンジアミン(OPD)基質により検出した。T₃ステージの癌患者由来のプール血清を内部標準として使用し、結果を各プレートについて行った検量線から導いた任意単位にて表した。

【0009】結果

LNCaP細胞抽出物及び前立腺癌患者血清中のPSMAのウエスタンブロットによる検出別シリーズの実験において、本発明者等はPSMAが3S-チオフィリックゲルに対して強いアフィニティーを有することを示した。LNCaP細胞抽出物(1ml、5×10⁷細胞)又は前立腺癌患者由来の血清(400µl)を、前記と同様にして、3S、T-ゲル中のクロマトグラフィーに付した。10µlの溶離した画分を、

SDS PAGE / ウエスタンブロット分析に付し、7E11 . C5抗体を用いて免疫染色した。LNCaP細胞抽出物の場合、SDS - PAGE分析の前に溶離した画分を濃縮(6x)する必要があった。チオフィリックゲルクロマトグラフィーからのカラム溶離物を、全く凍結することなく直ちに分析した。その一例の結果を図1に示す。75~90kDa(血清)又は100~110kDa(LNCaP細胞抽出物)に対応する免疫反応性の唯一のバンドが、種々のサンプルの中で観察された。すべての場合において、患者血清から回収したPSMA 10は、LNCaP細胞中のPSMAと比較して常に分子量が小さい。しかしながら、数回の凍結解凍サイクル後のLNCaP細胞抽出物のカラム溶離物は、180kDaに対応する第二の弱いバンドをしばしば示した。この180kDaのバンドは、前出、Troyerらによっても観察されている。チオフィリックゲルクロマトグラフィーは血清中の多数のタンパク質を明らかに除去し、これにより、電気泳動的分離及びPVDF膜への移動後に抗PSMA抗体により染色したときのPSMA検出が許容される。チオフィリックゲルクロマトグラフィーの前 20に7E11 . C5を用いて患者血清のウエスタンブロットを染色したとき、免疫反応性は観察されなかった。PSMAの分子量はその起源に依存して変化する。LNCaP細胞抽出物中のPSMAは100~110kDaの分子量を有する(前出、Israeliら及び前出、Troyerら)。前立腺癌腫瘍組織から単離したPSMAは120kDaである(前出、Troyerら)。本発明者等の研究において、異なる前立腺癌患者の血清中のPSMAは約75~90kDaの分子量を有している 30ことを見いだした(図1)。これらの差異についての理由は不明である。PSAは異なるプロテアーゼ阻害剤と複合体を形成することが知られている(前出、Polascikら)。PSMAも異なるタンパク質/プロテアーゼ阻害剤と複合体を形成することが考えられる。本発明者等の研究では、そのような可能性を探求している。異なる疾患ステージにある前立腺癌患者由来の血清を、最初にチオフィリックゲル吸着クロマトグラフィーにより処理し、SDS - PAGE / ウエスタンブロットにより分析した。エレクトロブロットの後、膜を、抗PSMA抗体7E11 . C5又はプロテアーゼ阻害剤に対する 40抗体、例えば γ_1 -抗トリプシン、 γ_1 -抗キモトリプシン及びタンパク質C阻害剤に対するモノクローナル抗体等を用いて染色した。図2Aに示すデータは、7E11 . C5抗体との免疫反応の1つのバンドを示している。 γ_1 -抗トリプシン又はタンパク質C阻害剤に対する抗体との免疫反応性は観察されなかった。 γ_1 -抗キモトリプシンに対する抗体との免疫反応性が2つ観察された。一つはPSMA / γ_1 -抗キモトリプシン複合体に対応するものであり、他方は血清中に存在することが知られている遊離の γ_1 -抗キモトリプシンに対応する 50

ものである(図2B)。本発明者等の以前の研究(データは示さず)において、遊離の γ_1 -抗キモトリプシンはチオフィリックゲルに対するアフィニティーを有することが実証されている。これが、血清中のPSMAが γ_1 -抗キモトリプシンとの複合体(PSMA - ACT)として存在していることの第一の証拠である。LNCaP細胞から調製したPSMAと女性の血清又は市販の γ_1 -抗キモトリプシンとのインキュベートにより前記の複合体を作成する試みは失敗した。

【0010】ウエスタンブロット及びELISAによる、前立腺癌患者血清中のPSMA - ACT複合体の検出

異なる疾患ステージにある前立腺癌患者55名に由来する血清、健常者(20名)、BPH(46名)及び前立腺炎(9名)の血清サンプルをブラインド様式で無作為化し、PSMAの存在について分析した。全ての血清サンプル最初にチオフィリックゲルクロマトグラフィーに付した。カラム溶離物を、SDS / PAGE / ウエスタンブロット分析及び7E11 . C5抗体を用いた免疫染色によりPSMAの存在について分析した。図3Aに示すデータは、対照、BPH、前立腺炎血清及び異なる疾患ステージ(T_1 、 T_2 、 T_3 及び T_4)にある8名の前立腺癌患者由来の血清を示している。全ての場合において、75~90kDaに対応する免疫反応性の唯一のバンドが観察された。免疫染色の強度は、非癌性患者と比較して癌患者由来の血清において有意に高かった。抗PSMA抗体B-6を用いて同様の結果が見いだされた(図6参照)。図2及び6において本発明者等は、患者血清中のPSMA - ACT複合体をPSMA抗体及び抗 γ_1 -抗キモトリプシン抗体を用いて同定することができ 50ることを実証した。この結果は、PSMA抗体、例えば7E11 . C5又はB-6を「捕捉」抗体として及び抗 γ_1 -抗キモトリプシン抗体を「検出」抗体として使用することにより、患者血清中のPSMAをモニターするためのELISAアッセイを開発するための機会をはじめて提供した。図3Bに示される全ての血清サンプルを、サンドイッチELISAにおいてPSMA - ACT複合体の存在について分析した。図3Aに示すELISAの結果は、490nMにおける吸光度として表した。BPH又は前立腺炎中のPSMA - ACTレベルは、より進行した疾患と比較して低い。ウエスタンブロット分析により検出されたPSMAレベル(図3B)は、サンドイッチELISAで見ることができ、かつ、血清に基づくPSMA調製物が今までのところ入手不可能であるという事実より、本発明者等は3名の前立腺癌患者(T_3 ステージ)由来のプール血清を使用して内部標準を調製し、血清のスクリーニングに使用した。本発明者等は、1:5~1:160の範囲の血清希釈を用いて、直線的な用量反応曲線を得た

(図5)。総数130の血清サンプルを、新規に開発したサンドイッチELISAにおいてPSMA-ACT複合体レベルについてアッセイし、結果を図4に示す。PSMAの結果は、各プレートについて行った検量線から導いた任意の単位で表した。対照、BPH及び前立腺炎のPSMAレベルは通常10単位よりも低いが、異なる疾患ステージにあるPSMAレベルは高く、通常は疾患の進行と十分に相関している。これらの結果は、通常は擬陽性が真の陽性をこえる現在のPSA試験よりもはるかに優れている。B-6ハイブリドーマクローンは、7E11・C5細胞の親となるソースでもある7E11ハイブリドーマ細胞の未クローン培養からはじめて単離した。B-6ハイブリドーマ細胞を、10%熱不活性化ウシ胎仔血清を含むRPMI1640培地中で消費(extend)した。B-6ハイブリドーマ細胞は低温保存した。B-6ハイブリドーマ細胞が前立腺特異的膜抗原を選択的に同定する抗体を産生する能力は、以下の3つの異なる方法により確認した。(a)間接的免疫ペルオキシダーゼ染色、(b)ウエスタンブロット及び(c)サンドイッチELISA。PSMAに対する抗体を含むB-6細胞由来のならし培地(conditioned medium)を、前立腺癌細胞の免疫染色に使用した。B-6細胞を使用してBalb/cマウス中で腹水を生成し、精製抗体をELISA及びウエスタンブロット分析に使用した。

【0011】モノクローナル抗体の産生と精製

Balb/cマウス(6~8週齢)に、B-6細胞(0.5ml PBS中、 5×10^6 細胞/マウス)を腹腔内注射した。3週間後に腹水を集め、モノクローナル抗体(B-6)を、硫酸アンモニウムを用いた沈殿、続く製造者の指示に従うタンパク質Aアガロースカラムクロマトグラフィーにより最初に精製した。IgGの精製を、SDS/PAGE及びクーマシーブルー染色により確認した。IgG濃度は、BCAアッセイ法(Pierce, Rockford, IL)により測定した。

間接的免疫ペルオキシダーゼ染色

免疫染色について、4つのヒト前立腺癌細胞系(PC-3、PC-3M、DU-145、LNCaP)及び2系統の正常なヒト繊維芽細胞(BG-9、MLD)を使用した。培養細胞、未固定及びホルマリン固定した、調製したばかりのサイトスピン(cytospin)標本を、最初にブロッキング溶液(PBS中の1%アルブミン)で1時間処理し、続いてB-6抗体を含むB-6ならし培地(ブロッキング溶液中1:500に希釈(dil))と共に1時間インキュベートした。PBSで細胞を3回洗浄した後、ペルオキシドをコンジュゲートしたヤギ抗マウスIgG(Jackson Immune Research Laboratories)の1:10000希釈物に60分間曝露した。呈色反応は、PBS(pH7.2)中の3,3'-ジアミノベンジジン

(0.05%) : H_2O_2 (0.01%)を用いて展開した。一次抗体に代えてPBS及びミエローマ細胞系由来の培養液を、追加の対照として含めた。免疫特異的染色の強度を、ツァイス(Zeiss)顕微鏡(40×対物、10×接眼)を用いて評価した。未固定の細胞系は、B-6抗体に対する免疫反応性を全く示さなかった。ホルマリンで固定した細胞のなかで、LNCaP細胞のみがB-6抗体に対する特異的な免疫反応性を示した。LNCaP細胞の免疫ペルオキシダーゼ染色の強度は、膜貫通領域において支配的である。そのような免疫反応性は、固定したPC-3、PC-3M、DU-145、BG-9及びMLD細胞においては見られなかった。

【0012】ウエスタンブロット分析

LNCaP、PC3及びDU-145由来の細胞溶解物を、B-6抗体を用いたウエスタンブロット分析に使用した。細胞をトリプシン処理し、PBSで洗浄し、2回の凍結解凍サイクルに付した。細胞溶解物を2000×gで10分間遠心分離し、NP-40(終濃度0.5%)を添加した後に、上清を4で30分間インキュベートした。可溶化した物質を10000×gで20分間遠心し、前記と同様にして上清を3S,T-ゲルクロマトグラフィーに使用した。PSMAを含むT-ゲルカラム由来の画分をプールし、濃縮(×6)し、非還元条件下で4~15% SDS/PAGEに適用した。PVD膜に電気泳動的に移した後、PSMA抗原を、B-6抗体により同定した。DU-145及びPC-3細胞由来の細胞溶解物は、B-6抗体に対する免疫反応性を全く示さなかった。しかしながら、LNCaP細胞調製物の場合、100~110kDaに対応する単一の免疫反応バンドが見られた。別実験において、B-6及び7E11・C5抗体の両方を用いてLNCaP細胞溶解物を平行して精査した。結果を図6に示す。両方の抗体は、LNCaP細胞溶解物中のPSMA抗原を同定することができた。

ELISA

B-6及び7E11・C5抗体を使用して、ELISAアッセイにより、前立腺癌患者の血清中のPSMAを測定した。正常な個体及びBPH患者由来の血清も含めた。96ウェル免疫プレートを2等分し、一方はB-6抗体でコーティングし、他方は7E11・C5抗体でコーティングした。プレートの各半分はPSMAに対する自身の内部標準を有していた。ELISA手順のその他の詳細は前記と同様であった。この試験の結果を図7に示す。各血清について、PSMA抗原のインデックスは、B-6及び7E11・C5抗体の両方と本質的に同一である。ELISA及びウエスタンブロットの結果に基づいて、B-6及び7E11・C5抗体の両方が、前立腺癌患者血清中のPSMAの存在を検出するために効果的に利用することができることが明らかになる。癌患

者のPSMAレベルは、BPH又は前立腺炎と比較して有意に高い。

【0013】本発明者等は、ELISA及びウエスタンブロット分析の両方による血清PSMAをモニターした。ウエスタンブロット分析について、血清を、血清タンパク質の大部分を除去する3S-チオフィリックゲル中でクロマトグラフィーに付した。チオフィリックゲル処理後の血清を、SDS-PAGE及びPSMA抗体を用いたウエスタンブロットにより分析した。全ての場合において、75~90kDaに対応する単一のPSMAバンドが観察された。総数130の血清サンプルを処理した。前立腺癌血清、BPH、前立腺炎及び正常血清を含む代表的な結果を図3Bに示す。血清及びLNCaP細胞抽出物に存在するPSMAの分子量は異なるということは言及する価値がある。血清PSMAは75~90kDaであり、LNCaP細胞由来のPSMAは100~110kDaである。LNCaP細胞由来のPSMAの分子量は、還元又は非還元条件下の両方で同一のままであった。しかしながら、還元条件下において、血清由来のPSMAはウエスタンブロットでは検出不能である。PSMAに対する追加の抗体は現在入手不能であるので(前出、Liuら及び前出、Grauerら)、異なる体液中のPSMAをモニターするためのイムノアッセイを開発する試みを行った。Sokoloffらは、PSMAに対する二重モノクローナルサンドイッチアッセイを開発した(Sokoloffら, A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: Levels in tissues, seminal fluid and urine, Prostate, vol 43, pp150-157, 2000)。Sokoloffらは、組織抽出物、尿及び精液中のPSMAレベルの測定には成功した。しかしながら、血清中のPSMAをモニターする試みは失敗している。本発明者等の血清中のPSMAレベルをモニターする試みは成功した。この成功は、血清中のPSMAが α_1 -抗キモトリプシンとの複合体(PSMA-ACT)として存在するとはじめての認識に大きく依存している。本発明者等のサンドイッチELISAにおいては、PSMA抗体7E11.C5及びB-6を「捕捉」抗体として、及び、抗 α_1 -抗キモトリプシン抗体を「検出」抗体として使用した。

【0014】PSMAは膜貫通型糖タンパク質である。PSMA抗体はPSMAのNH₂末端とのみ結合することも知られている。血清中で検出されたPSMAは、PSMAに対するエピトープを含む抗原の断片であるに違いなく、ACTと複合体を形成したときに、分子量が75~90kDaになる。ウエスタンブロット分析におけるPSMA検出は、妨害タンパク質の大部分を効率的に除去するチオフィリックゲルクロマトグラフィーにより

LNCaP細胞抽出物を処理した後にのみ実施可能であった。LNCaP細胞抽出物及び血清中のPSMAの分子量は異なる。血清PSMAは75~90kDaであり、LNCaP細胞中のPSMAは100~110kDaである。血清PSMAはサンドイッチELISAによりはじめて検出することができる。明らかに、7E11.C5又はB-6抗体に対するエピトープを含むPSMA断片は、 α_1 -抗キモトリプシンと複合体化してPSMA-ACT複合体を形成する血清へ放出される。このことは、新規に開発するELISA試験についての基礎を構成する。本発明者等のELISA試験では、7E11.C5又はB-6抗体を使用してPSMAを捕捉し、検出は α_1 -抗キモトリプシン抗体の使用に基づく。ELISAにより検出されるPSMAのレベルは、疾患のステージと十分に相関する。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、チオフィリックゲルクロマトグラフィー後のLNCaP細胞抽出物及び前立腺癌患者におけるPSMAのウエスタンブロット検出を示している。LNCaP細胞抽出物又は患者血清を3-S-チオフィリックゲル中でクロマトグラフィーに付した。カラム溶離物中のPSMAの存在を、SDS-PAGE及び抗PSMA抗体7E11.C5を用いたウエスタンブロットにより検出した。「A」はLNCaP細胞抽出物を示し、「B」は前立腺癌血清(ステージT-3)を示している。LNCaP細胞抽出物の4つの異なる調製物及びステージT₃にある10名の患者の血清を分析した。結果は全ての場合において本質的に同一であった。

【図2】図2は、患者血清中のPSMAが、当該抗原と α_1 -抗キモトリプシンとの複合体の形態で存在することを示すウエスタンブロット分析を示している。ステージT₃の前立腺癌患者に由来する血清を3S、T-ゲル中でクロマトグラフィーに付し、ウエスタンブロットにより分析し、抗PSMA抗体7E11.C5(レーンA)又は抗 α_1 -抗キモトリプシン抗体(レーンB)を用いて免疫染色した。抗ACT抗体によって2つのバンドが検出された。1つは α_1 -抗キモトリプシン抗体(下部のバンド)に対応し、他方はPSMA-ACT複合体(上部のバンド)に対応する。同様の手順により更に13名の患者でPSMA-ACT複合体の存在を検出した。

【図3】図3は、サンドイッチELISA(A)及びウエスタンブロット(B)を用いた前立腺癌患者血清中のPSMA-ACT複合体検出の比較を示している。T₁、T₂、T₃及びT₄ステージの前立腺癌患者、対照(C)、前立腺炎(P)及びBPH由来の各血清サンプルにおいてPSMAを検出した。示されているデータは、異なるステージの疾患及び対照における12の代表的な血清サンプルを含んでいる。

【図4】図4は、患者血清におけるPSMA-ACT複

合体のELISAによる決定のグラフを示している。正常な対照(20)、前立腺炎(9)、BPH(46)及び異なるステージの前立腺癌(55)を含む全130の血清サンプルをサンドイッチELISAにより分析した。モノクローナル抗PSMA抗体7E11・C5により抗原を捕捉し、ポリクローナル抗ACT抗体により検出した。結果を、各マイクロプレート中に含まれる検量線から導かれる任意単位として表す。標準は、T3ステージの患者に由来するプールした血清の連続的な2倍希釈物(1単位(1:160希釈)~100単位(1:5

【図5】図5は、PSMA - ACT複合体についてのELISAの較正を示している。T-3ステージにある3名の前立腺癌患者に由来するプールした血清を連続希釈し、50µlのアリコートに抗PSMA抗体で被覆したマイクロタイタープレートに三重に添加した。抗ACT抗体を使用してPSMA - ACT複合体の存在を検出し*

*た。比較可能な希釈にある正常血清を対照として使用した。標準は、プールした血清の連続希釈物(1単位(1:160希釈)~100単位(1:5希釈)の範囲)から構成される。示される結果は、6つの独立したアッセイを示している。

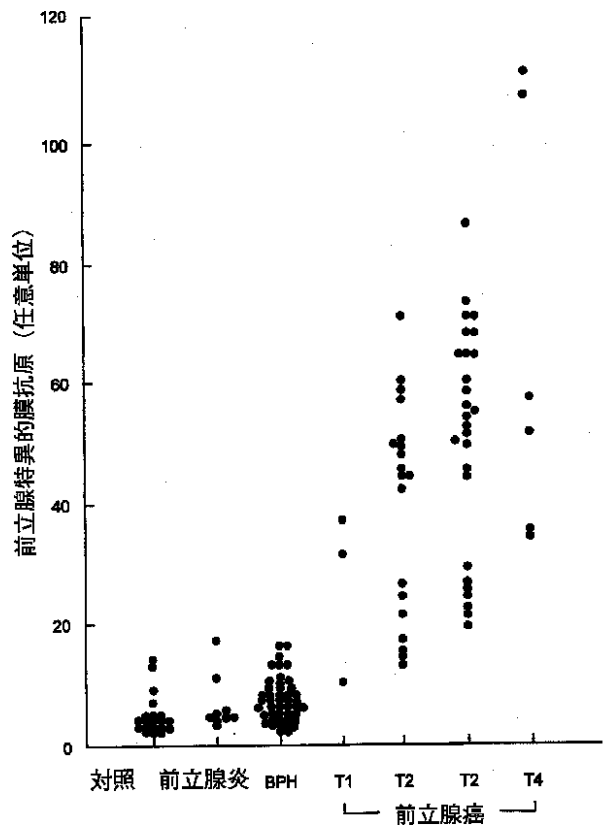
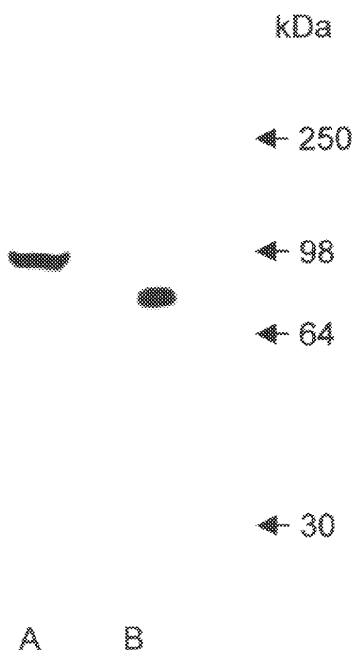
【図6】図6は、チオフィリックゲルクロマトグラフィーによる分離、続く(A)7E11・C5抗体及び(B)B-6抗体を用いたウエスタンブロット分析によるLNCaP細胞溶解物中のPSMA検出を示している。

【図7】図7は、ELISAによる前立腺癌患者血清中のPSMA - ACT複合体の測定についての7E11・C5とB-6抗体との比較を示している。正常な対照(11)、BPH(12)及び前立腺癌患者(35)を含む全58の血清サンプルを、サンドイッチELISAにより分析した。モノクローナル7E11・C5又はモノクローナルB-6抗体のいずれかにより抗原を捕捉し、ポリクローナル抗ACT抗体により検出した。その他の詳細は前記と同様である。結果は任意単位により示される。

【図1】

【図4】

図面代用写真



【図2】

図面代用写真

kDa

← 250

← 98

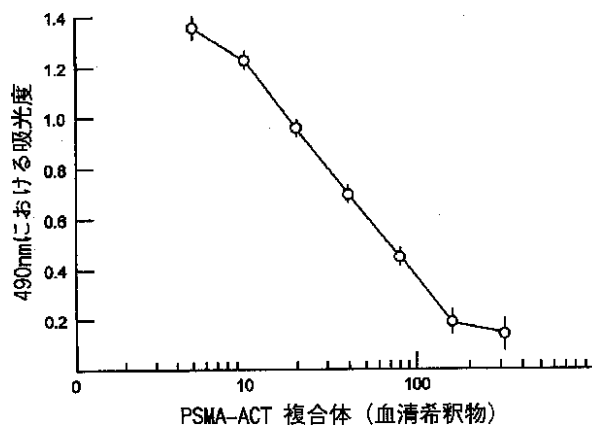
← 64

← 30

A

B

【図5】



【図6】

図面代用写真

MW(kDa)

- 110

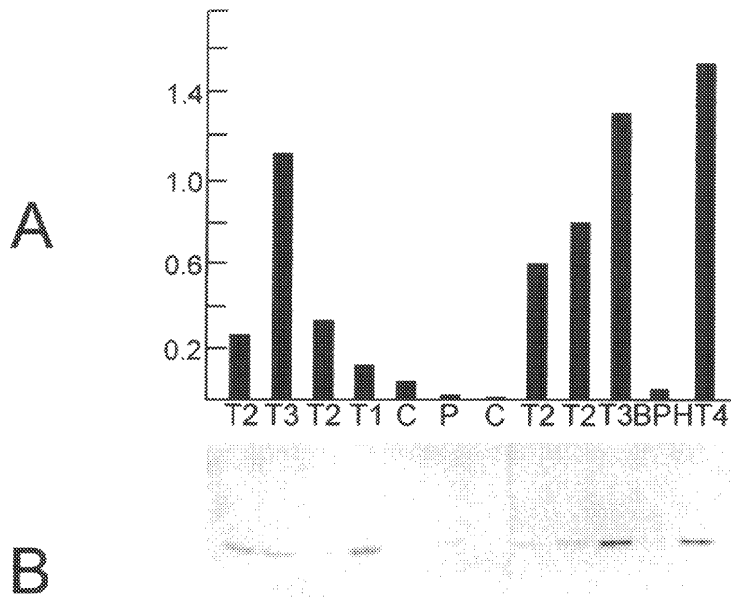
- 76

A

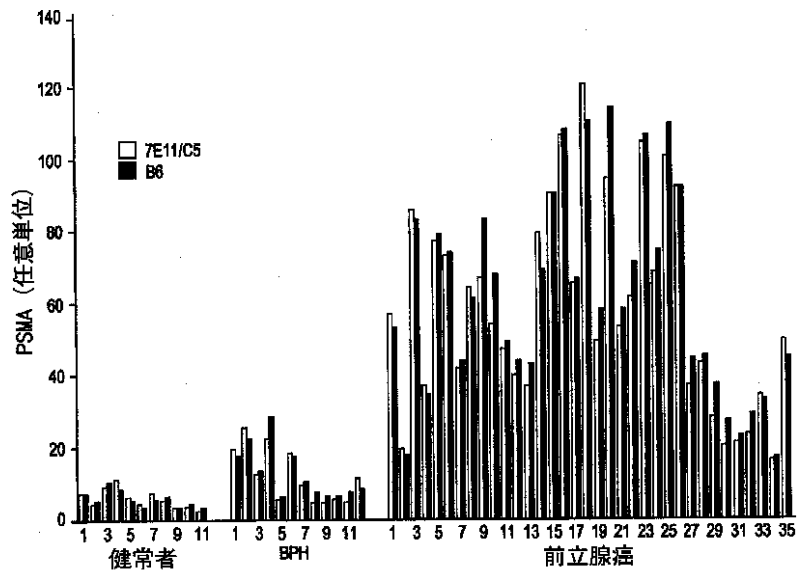
B

【図3】

図面代用写真



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 エルツビータ カウインスキー
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 14127
オーチャード パーク ジュエット ホ
ルムウッド 7600

(72)発明者 カイラッシュ シー チャッタ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 14221
ウィリアムスヴィル サマービュー ロ
ード 106

专利名称(译)	检测血清中前列腺特异性膜抗原的方法		
公开(公告)号	JP2002277469A	公开(公告)日	2002-09-25
申请号	JP2001257021	申请日	2001-07-24
[标]申请(专利权)人(译)	健康研究股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	健康研究公司		
[标]发明人	エルツビータカウインスキー カイラッシュシーチャッダ		
发明人	エルツビータ カウインスキー カイラッシュ シー チャッダ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/57434		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/574.B		
优先权	09/624692 2000-07-24 US 09/851263 2001-05-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种检测体液中前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的方法。一种检测体液中PSMA的方法，包括以下步骤：使用PSMA抗体从含有PSMA的体液样品中捕获PSMA，并用抗 α 1-抗胰凝乳蛋白酶捕获捕获的PSMA。用抗体检测，并通过免疫测定法检测PSMA。

【图4】

