

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2009/125831

発行日 平成23年8月4日(2011.8.4)

(43) 国際公開日 平成21年10月15日(2009.10.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/22 (2006.01)	C07K 16/22	ZNA 4B064
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00	1O2 4B065
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	D 4H045
GO1N 30/88 (2006.01)	GO1N 30/88	2O1R
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 23 頁)

出願番号	特願2010-507277 (P2010-507277)	(71) 出願人	507044114 有限会社スリーピー
(21) 国際出願番号	PCT/JP2009/057327		京都府京都市左京区岡崎法勝寺町1番地の4
(22) 国際出願日	平成21年4月10日(2009.4.10)	(71) 出願人	593146877 株式会社特殊免疫研究所
(31) 優先権主張番号	特願2008-103242 (P2008-103242)		東京都文京区後楽1丁目1番10号
(32) 優先日	平成20年4月11日(2008.4.11)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	中村 健二 京都府京都市左京区岡崎法勝寺町1-4
		(72) 発明者	青井 理恵 栃木県下野市下石橋170 株式会社特殊免疫研究所 栃木工場内
		Fターム(参考)	4B064 AG27 CA10 CA20 DA01 DA13 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NK4に対するモノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明の目的は、NK4を特異的に認識することができる新規な抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、並びに該抗体を用いたNK4の検出方法及び精製方法を提供することである。本発明によれば、NK4と特異的に反応し、HGFとは反応しないことを特徴とする、モノクローナル抗体が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エラスターゼ消化によって得られる HGF (Hepatocyte Growth Factor) の α 鎖からなる、分子量が約 55~69 kDa であり、c-Met/HGF レセプターのアンタゴニスト活性を有するタンパク質 (NK4) と特異的に反応し、HGF とは反応しないことを特徴とする、モノクローナル抗体。

【請求項 2】

HGF 又は HGF をエラスターゼ消化して得られる HGF の α 鎖からなるタンパク質、又はその部分配列を有するペプチドを単独又はキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを抗原として免疫動物に免疫することにより得られる、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。 10

【請求項 3】

HGF をエラスターゼ消化して得られる HGF の α 鎖からなるタンパク質又はその部分配列を有するペプチドにスペーサーを結合させ、さらにキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを抗原として免疫動物に免疫することにより得られる、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

免疫動物がマウスである、請求項 2 又は 3 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

1 ng/mL の NK4 を検出できる、請求項 1 から 4 の何れかに記載のモノクローナル抗体。 20

【請求項 6】

受託番号 FERM BP-11101 又は受託番号 FERM BP-11102 を有するハイブリドーマにより産生される、請求項 1 から 5 の何れかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 の何れかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 8】

受託番号 FERM BP-11101 又は受託番号 FERM BP-11102 を有するハイブリドーマ。 30

【請求項 9】

請求項 1 から 6 の何れかに記載のモノクローナル抗体を含む、NK4 検出のための試薬。

【請求項 10】

請求項 1 から 6 の何れかに記載のモノクローナル抗体を固定化した担体、及び NK4 を認識できる第二の抗体を少なくとも含む、NK4 検出キット。

【請求項 11】

請求項 1 から 6 の何れかに記載のモノクローナル抗体と、NK4 を含む試料とを反応させることを含む、NK4 の検出方法。

【請求項 12】

請求項 1 から 6 の何れかに記載のモノクローナル抗体を固定化した担体からなる、NK4 精製カラム。 40

【請求項 13】

請求項 1 から 6 の何れかに記載のモノクローナル抗体と、NK4 を含む試料とを接触させることを含む、NK4 の精製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、NK4 に対するモノクローナル抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、並びに該抗体を用いた NK4 の検出方法などに関する。

【背景技術】

【0002】

NK4は、HGF (Hepatocyte Growth Factor) がプロテアーゼ (エラスターゼ) により切断され発生する産物であり、HGFに対するアンタゴニストである。HGFは肝細胞の増殖因子として発見されたが、その後、組織形成や発生など、様々な作用を有する物質であることが確認され、ヒトHGFのcDNAもクローニングされている (BBRC Vol.172, No.1, 321-327, 1990)。また、HGFには血管新生作用を有することから、治療薬としての治験も進められている。HGFの血管新生作用は、癌においては癌細胞の浸潤や転移を促進するとの報告がある。NK4はHGFの作用を阻害し、HGFが引き起こす癌細胞の浸潤や転移を阻害する治療薬としての開発が期待されている。例えば、特許第3832674号公報には、エラスターゼ消化によって得られるHGFの α 鎖からなる蛋白質を有効成分として含有する抗癌剤が記載されている。

10

【0003】

NK4を治療薬として開発するためには、治験などでその効果を確認する必要がある。HGFには反応せず、NK4に特異的に反応するモノクローナル抗体を用いたNK4測定系を確立することができれば、NK4治療薬のモニタリング、又は治療薬中に存在するNK4の同定・確認などに利用することが可能になる。しかしながら、HGFには反応せず、NK4に特異的に反応するモノクローナル抗体に関する報告はない。

【0004】

【非特許文献1】BBRC Vol.172, No.1, 321-327, 1990

【特許文献1】特許第3832674号公報

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、NK4を特異的に認識することができる新規な抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、並びに該抗体を用いたNK4の検出方法及び精製方法を提供することを解決すべき課題とした。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、HGF又はHGFをエラスターゼ消化して得られるHGFの α 鎖からなるタンパク質又はその部分配列を有するペプチドを単独で、又はキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを抗原として免疫動物に免疫することにより、NK4と特異的に反応し、HGFとは反応しないことを特徴とするモノクローナル抗体を製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

30

【0007】

すなわち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) エラスターゼ消化によって得られるHGF (Hepatocyte Growth Factor) の α 鎖からなる、分子量が約55~69 kDaであり、c-Met/HGFレセプターのアンタゴニスト活性を有するタンパク質 (NK4) と特異的に反応し、HGFとは反応しないことを特徴とする、モノクローナル抗体。

(2) HGF又はHGFをエラスターゼ消化して得られるHGFの α 鎖からなるタンパク質、又はその部分配列を有するペプチドを単独又はキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを抗原として免疫動物に免疫することにより得られる、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

40

(3) HGFをエラスターゼ消化して得られるHGFの α 鎖からなるタンパク質又はその部分配列を有するペプチドにスペーサーを結合させ、さらにキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを抗原として免疫動物に免疫することにより得られる、(1)に記載のモノクローナル抗体。

(4) 免疫動物がマウスである、(2)又は(3)に記載のモノクローナル抗体。

(5) 1 ng/mLのNK4を検出できる、(1)から(4)の何れかに記載のモノクローナル抗体。

50

(6) 受託番号FERM BP-11101又は受託番号FERM BP-11102を有するハイブリドーマにより産生される、(1)から(5)の何れかに記載のモノクローナル抗体。

(7) (1)から(6)の何れかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

(8) 受託番号FERM BP-11101又は受託番号FERM BP-11102を有するハイブリドーマ。

(9) (1)から(6)の何れかに記載のモノクローナル抗体を含む、NK4検出のための試薬。

(10) (1)から(6)の何れかに記載のモノクローナル抗体を固定化した担体、及びNK4を認識できる第二の抗体を少なくとも含む、NK4検出キット。

(11) (1)から(6)の何れかに記載のモノクローナル抗体と、NK4を含む試料とを反応させることを含む、NK4の検出方法。

(12) (1)から(6)の何れかに記載のモノクローナル抗体を固定化した担体からなる、NK4精製カラム。

(13) (1)から(6)の何れかに記載のモノクローナル抗体と、NK4を含む試料とを接触させることを含む、NK4の精製方法。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、HGFとは反応せず、NK4を特異的に認識することができる新規な抗体が提供される。本発明の抗NK4モノクローナル抗体を使用することにより、NK4を特異的に精製するカラムを作製することが可能になる。また、本発明のNK4 EIAキットを併用することにより、これまでできなかったヒト血液等の検体に含まれるHGFとその一部の構造からなるNK4それぞれの量を分けて測定することが可能になった。NK4のC末端部位の前後は、どの動物種にも共通のアミノ酸配列になっていることから、本発明の抗NK4モノクローナル抗体は、ヒトをはじめとして、ラット、マウスなどのほ乳類、その他の動物のNK4も認識するものと思われる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明のモノクローナル抗体は、NK4と特異的に反応し、HGFとは反応しないことを特徴とする抗体であり、好ましくは、HGF又はHGFをエラスターゼ消化して得られるHGFの α 鎖からなるタンパク質、又はその部分配列を有するペプチドを単独又はキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを抗原として免疫動物に免疫することにより得られる抗体、さらに好ましくは、HGFをエラスターゼ消化して得られるHGFの α 鎖からなるタンパク質又はその部分配列を有するペプチドにスペーサーを結合させ、さらにキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを抗原として免疫動物に免疫することにより得られる抗体である。本発明では、上記のタンパク質又はその部分配列を有するペプチドを抗原として用いることによって、NK4と特異的に反応し、HGFとは反応しない抗体を取得することができるが、これは、そのアミノ酸配列が、HGFの構造上では表に出ず、NK4ではC末端に位置して露出するためである。キャリアタンパク質の種類は特に限定されないが、例えば、KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) などを用いることができる。本発明でも用いることができる抗原の具体例としては、Cys-[NH(CH₂CH₂O)₂-CH₂CO]₂-Glu-Gly-Asp-Thr-Thr-Pro-Thr-Ile-Val及び/又はPro-Ile-Ser-Arg-Cys-Glu-Gly-Asp-Thr-Thr-Pro-Thr-Ile-Valで表されるペプチドをキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを挙げることができる。

【0010】

本発明においては、NK4で特異的に露出している目的抗原部位は14個のアミノ酸しかなく、その前には、大きなリングルと呼ばれるドメイン4個からなる α 鎖が存在している。エラスターゼ切断により出現する14個のアミノ酸はその4個のリングル構造に

対して非常に小さく、抗体が反応するものとして認識が難しく、通常の免疫からは特異性の高い抗体を得ることは非常に難しい。そこで、14個或いはその一部を含むアミノ酸配列を有する合成ペプチドを抗原と宿主に認識してもらうために、合成ペプチド中にスペーサーを入れるよう設計し、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたとき、抗原アミノ酸の自由度が高まることを想定した免疫原を準備した。スペーサーの種類は特に限定されないが、例えば、 $(\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CO})_2$ などを用いることができる。

【0011】

また、HGFの構造の中で、Cysはジスルフィド結合により、立体的形状に大きく関与している。上記14個のアミノ酸配列で、アミノ酸Cysを介してキャリアタンパク質へコンジュゲートさせた時に、Cysを中心に実際に近い立体構造を作り出すことを想定し、14個の全アミノ酸からなる合成ペプチドも準備した。

【0012】

本発明のモノクローナル抗体およびハイブリドーマを製造する方法は、当該技術分野において公知である（例えば、Campbell, "Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1984; St. Groth et al., J. Immunol. Methods 35:1-21, 1980）。

【0013】

抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはトリ、ウサギ、サル等が使用される。抗原を動物に免疫するには、例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4~21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞（例えば、脾臓細胞）を採取し、細胞融合を行うことができる。

【0014】

免疫細胞と融合される細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いることができる。ミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfré, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133)等を使用できる。免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、公知の方法（例えば、Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)に準じて行うことができる。細胞融合は、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ)等を用いて実施できる。上記のようにして得られたハイブリドーマは、例えばHAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地）などの選択培地で培養することにより選択される。

【0015】

続いて、ELISAアッセイ、ウエスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ等の当該技術分野においてよく知られる方法を用いて、NK4を認識する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を選択することができる。本発明の抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈法等によりクローニングすることができる。所望の抗体を分泌するハイブリドーマを

クローニングし、適切な条件下で培養し、分泌された抗体を回収し、当該技術分野においてよく知られる方法、例えばイオン交換カラム、アフィニティークロマトグラフィー等を用いて精製することができる。

【0016】

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いることもできる。具体的には、抗NK4抗体を産生するハイブリドーマから、抗NK4抗体の可変(V)領域をコードするmRNAを単離する。得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。得られたcDNAを精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とするDNAの塩基配列を確認する。目的とする抗NK4抗体のV領域をコードするDNAをそれぞれ得たのち、これを、所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAを含む発現ベクターへ組み込む。本発明の抗NK4抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。また、組換え型抗体の産生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニック動物を使用することもできる。

10

【0017】

本発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマにより産生される抗体、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生される抗体のいずれでもよい。本発明の抗体の種類は特に制限されず、マウス抗体、ヒト抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ラクダ抗体、トリ抗体等や、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体等の何れでもよい。遺伝子組換え型抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域(CDR)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(framework region; FR)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる。

20

30

【0018】

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる(特公平1-59878参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体(scFv)としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知である。

40

【0019】

50

また、本発明のモノクローナル抗体は、NK4と特異的に反応し、HGFとは反応しないという特性を失わない限り、抗体断片（フラグメント）等の低分子化抗体や抗体の修飾物などであってもよい。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Diabodyなどを挙げるができる。このような抗体断片を得るには、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい。抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（PEG）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。

【0020】

NK4の検出方法は、本発明の抗NK4抗体を用いた免疫学的方法により行うことができる。免疫学的方法としては、例えば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ、免疫沈降法、免疫比濁法、ウエスタンブロット、免疫染色、免疫拡散法、イムノクロマトグラフィー法などを挙げるができるが、好ましくはエンザイムイムノアッセイであり、特に好ましいのはELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (例えば、サンドイッチELISA) である。ELISAなどの上述した免疫学的方法は当業者に公知の方法により行うことが可能である。一般的な検出方法としては、例えば、抗NK4抗体を担体に固定し、ここにNK4を含む被検試料を加え、インキュベーションを行い、抗NK4抗体とNK4タンパク質を結合させた後、洗浄し、NK4を特異的に認識する抗体を介して担体に結合したNK4タンパク質を検出することにより、被検試料中のNK4タンパク質の検出を行うことができる。本発明で用いる担体としては、例えば、アガロース、セルロースなどの不溶性の多糖類、シリコン樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、ナイロン樹脂、ポリカーボネイト樹脂などの合成樹脂や、ガラス、フェライトなどの不溶性の支持体を挙げるができる。担体は、好ましくはプレート（96穴マルチウェルプレート等）である。

【0021】

抗NK4抗体とNK4タンパク質との結合は、緩衝液中で行うことができる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、炭酸塩緩衝液などが使用される。また、インキュベーションの条件としては、すでによく用いられている条件、例えば、4℃～37℃にて1時間～24時間のインキュベーションが行われる。インキュベーション後の洗浄は、例えば、Tween 20等の界面活性剤を含む緩衝液などを用いて行うことができる。

【0022】

本発明の抗NK4抗体を介して担体に結合したNK4タンパク質を検出するためには、標識物質で標識されたNK4を特異的に認識する抗体を用いる方法を挙げるができる。例えば、担体に固定された抗NK4抗体に被検試料を接触させ、洗浄後に、NK4タンパク質を特異的に認識する標識抗体を用いて検出することができる。

【0023】

NK4を特異的に認識する抗体の標識は常法により行うことができる。標識物質としては、蛍光色素、酵素、補酵素、化学発光物質、放射性物質などを用いることが可能であり、具体的な例としては、ラジオアイソトープ(³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、¹³¹Iなど)、フルオレセイン、ローダミン、ダンシルクロリド、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、ホースラディッシュスーパーオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ビオチン、ルテニウムなどを挙げるができる。標識物質としてビオチンを用いる場合には、ビオチン標識抗体を添加後に、ペルオキシダーゼなどの酵素を結合させたストレプトアビジンをさらに添加することが好ましい。標識物質とNK4を特異的に認識する抗体との結合には、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法、過ヨウ素酸法、などの公知の方法を用いることができる。

【0024】

具体的には、抗NK4抗体を含む溶液をプレートなどの担体に加え、抗NK4抗体を担体に固定する。担体を洗浄後、被検試料を担体に加える。インキュベーションの後、洗浄し、

標識されたNK 4を特異的に認識する抗体を加える。適度なインキュベーションの後、担体を洗浄し、担体に残った標識されたNK 4を特異的に認識する抗体を検出する。検出は、例えば、放射性物質による標識の場合には液体シンチレーションやRIA法により検出することができる。酵素による標識の場合には基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出することができる。基質の具体的な例としては、2, 2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ジアンモニウム塩(ABTS)、1, 2-フェニレンジアミン(オルソ-フェニレンジアミン)、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン(TMB)などを挙げることができる。蛍光物質または化学発光物質の場合にはルミノメーターにより検出することができる。

【0025】

本発明によれば、被検試料中のNK 4タンパク質を検出するための診断薬またはキットも提供される。なお、本発明におけるNK 4の検出とは、NK 4の存在の検出のみならず、NK 4の測定又は定量を含む意味を有するものとする。診断薬またはキットは、少なくとも、本発明の抗NK 4抗体を含む。診断薬またはキットがELISA法等のEIA法に基づく場合は、抗体を固相化する担体を含んでいてもよく、抗体があらかじめ担体に結合していてもよい。また、キットは、適宜、ブロッッキング溶液、反応溶液、反応停止液、試料を処理するための試薬等を含んでいてもよい。

【0026】

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【実施例】

【0027】

実施例1：原料の調製

(1) 免疫原の調製

(1-1) NK 4で特異的に露出しているC末端部分のペプチドを合成し、抗原性を持たせるためにキャリアタンパクにコンジュゲートした。ペプチドは以下の2種類を作製し免疫原性を強めるために自由度を持たせるよう工夫して合成ペプチド1はスペーサーを付け、合成ペプチド2は実際の構造に近い形になるようにキャリア蛋白に結合させた。その方法は以下のとおりである。

【0028】

(1-2) 合成ペプチドの作製

合成ペプチド1；Cys-[NH(CH₂CH₂O)₂-CH₂CO]₂-Glu-Gly-Asp-Thr-Thr-Pro-Thr-Ile-Val
([NH(CH₂CH₂O)₂-CH₂CO]₂はスペーサー) (NK 4 C末端アミノ酸10残基)

合成ペプチド2；Pro-Ile-Ser-Arg-Cys-Glu-Gly-Asp-Thr-Thr-Pro-Thr-Ile-Val (NK 4 C末端アミノ酸14残基)

【0029】

(3) 合成ペプチド-コンジュゲート免疫原の作製

MBS (m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)法にてキャリア蛋白(スカシガイヘモシアニン/Keyhole Limpet Hemocyanin(KLH); CALBIOCHEM, 374817)へ合成ペプチドをアミノ酸システイン(「C」)のチオール(-SH)基を利用して結合させる。

【0030】

【化1】

合成ペプチド1；KLH-Cys-[NH(CH₂CH₂O)₂-CH₂CO]₂-Glu-Gly-Asp-Thr-Thr-Pro-Thr-Ile-Val

合成ペプチド2；KLH-Cys-Arg-Ser-Ile-Pro

\ Glu-Gly-Asp-Thr-Thr-Pro-Thr-Ile-Val

10

20

30

40

50

【0031】

実施例2：抗体作製

(1) リコンビナントNK4を抗原としての抗体作製の試み（比較例）

リコンビナントNK4 (rNK4；特許第3832674号に記載)と完全フロイントアジュバント (DIFCO、263810) のエマルジョン液を免疫原投与量 $100\mu\text{g}/\text{匹}$ で6週令のBALB/cマウスの腹腔内に接種した。追加で、3回の免疫を行った。得られた抗体はいずれもNK4及びHGF両者に反応し、NK4のみに特異的に反応する抗体を得ることができなかった。

【0032】

(2) ヒトHGF寛容状態でのNK4免疫による抗体作製の試み（比較例）

10

生後24時間以内にHGFを皮下注射し、生後6週目にNK4を免疫し、マウスのHGF免疫寛容状態としてNK4のみに特異的に反応し、HGFに反応しない抗体を作製することを試みた。しかし、免疫寛容な状態を作ることができなかった。

【0033】

(3) 合成ペプチド1（スパーサーなし）を抗原としての抗体作製の試み（比較例）

スパーサーを付けない合成ペプチド1をKLHにコンジュゲートさせたものと完全フロイントアジュバント (DIFCO、263810) のエマルジョン液を免疫原投与量 $100\mu\text{g}/\text{匹}$ で6週令のBALB/cマウスの腹腔内に接種した。追加で、3回の免疫を行った。NK4のみに反応してHGFに反応しない抗体をセレクトしたが、反応が弱くELISAに使用できる抗体を得ることができなかった。

20

【0034】

(4) 合成ペプチドを抗原としての抗体作製（比較例）

(4-1) マウスへの抗原免疫

初回免疫：等容量のKLHコンジュゲート合成ペプチド1もしくは2と完全フロイントアジュバント (DIFCO、263810) のエマルジョン液を免疫原投与量 $100\mu\text{g}/\text{匹}$ で6週令のBALB/cマウスの腹腔内に接種した。

2回目および3回目免疫：初回免疫から2週間隔で追加免疫を3回まで実施した。方法は等容量のKLHコンジュゲート-合成ペプチドと不完全フロイントアジュバント (DIFCO、263910) のエマルジョン液を免疫原投与量 $100\mu\text{g}/\text{匹}$ で腹腔内に接種することにより行った。

最終免疫：3回目免疫の2週間後に同じ合成ペプチドを $50\mu\text{g}/\text{匹}$ で尻尾の静脈へ接種した

30

【0035】

(4-2) 細胞融合

最終免疫から3日後のマウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞液を調製した。マウス骨髄腫細胞、NS-1 (DSファーマバイオメディカル、85011427) と脾臓細胞をポリエチレングリコール1500 (Roche Diagnostics GmbH、10783641001) を使用し、KoehlerとMilsteinらの方法 (Koehler, G. et al. Nature vol.256, 495-497, 1975) に準じて細胞融合を実施した。融合細胞を選択するために、仔ウシ血清を含むHAT (H.A.T.SUPPLEMENT(50X); GIBCO in vitro cell culture、21060) 選択培地添加によりセクションを行なった。

【0036】

40

(4-3) 1stスクリーニング/ELISAによる反応性評価

融合細胞を播種した96穴プレートに対し、それぞれrNK4およびリコンビナント-ヒトHGF (rヒトHGF；特殊免疫研究所、6R71) を96穴アッセイプレート (Corning Incorporated、costar 2959) にウェルあたり $50\mu\text{L}$ ずつ分注し、 4°C にて一晩置き、固相化した。細胞融合後のセレクトされた培養上清を40 vol%ブロックエース (大日本住友製薬、UK-B40) を含む10mMトリス緩衝液 (pH 7.5) (40% BA-TBS) にて希釈して、培養上清サンプルとした。培養上清サンプルを $50\mu\text{L}$ ずつそれぞれの固相プレートに添加し、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG羊アフィニティー精製抗体 (MP Biomedicals, cappel 55569) およびペルオキシダーゼ標識抗マウスIgM羊アフィニティー精製抗体 (MP Biomedicals, cappel 55568) を10 vol%ブロックエース (大日本住友製薬、UK-B40) を

50

含む10mMトリス緩衝液 (pH 7.5) (10% BA-TBS) に混合希釈した液、さらに酵素基質液 (TMB; ScyTek Laboratories, TM4999) を用いてELISAを実施し、450nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。rNK4固相プレートに反応し、rヒトHGF固相プレートには反応しないサンプルを陽性判定とし、反応性を評価したが、陽性と判定される抗体は得られなかった。

【0037】

(5) 合成ペプチド及びリコンビナントNK4を抗原としての抗体作製 (参考例)

(5-1) マウスへの抗原免疫

初回免疫：等容量のKLHコンジュゲート合成ペプチドと完全フロイントアジュバント (DIFCO, 263810) のエマルジョン液を免疫原投与量 $100\mu\text{g}$ /匹で6週令のBALB/cマウスの腹腔内に接種した。 10

2回目および3回目免疫：初回免疫から2週間隔で追加免疫を3回まで実施した。追加免疫は、実施例2の(4-1)の「2回目及び3回目免疫」に記載の方法により行った。

最終免疫：3回目免疫の2週間後にrNK4を $50\mu\text{g}$ /匹で尻尾の静脈へ接種した。

【0038】

(5-2) 細胞融合

実施例2の(4-2)の細胞融合方法と同じ方法によりセレクションを行なった。

【0039】

(5-3) 1stスクリーニング

実施例2の(4-3)の1stスクリーニングと同じ方法により反応性を評価し、陽性判定とされた30サンプルについて、2ndスクリーニングを行った。 20

【0040】

(5-4) 2ndスクリーニング

rNK4およびrヒトHGFの固相プレートの他、合成ペプチド2種 (濃度： $5\mu\text{g}/\text{mL}$ -10mMリン酸緩衝液pH6.0) をそれぞれ固相化したプレート、および非特異的反応の確認として固相液を入れないプレートの計5種類のアッセイ用プレートを使用した。培養上清を40% BA-TBSにて希釈した培養上清サンプルについて、実施例2の(4-3)の1stスクリーニングと同じ方法でアッセイを行った。rNK4固相プレートへ反応し、rヒトHGF固相プレートには反応しないサンプルを陽性判定とし、合成ペプチドへの反応も確認した。合成ペプチドへの反応が強く、かつrヒトHGFへのシグナルに対するrNK4へのシグナルの比の良いものをセレクトし、合成ペプチド1からは6個、合成ペプチド2からは5個についてクローニング対象とした。 30

【0041】

(5-5) クローン化

限界希釈法によるクローニングにより、以下の方法で実施した。4~6週令のマウスから胸腺を摘出し、 1×10^7 cells/mL濃度の胸腺細胞培養液を調製し、クローニング用培養液として使用する。96穴プレート1ウェルに対して、抗体産生細胞を0.1、0.3、1、3個の濃度に、それぞれ24ウェルずつ撒き込む。合成ペプチド2種をそれぞれに固相したプレートを用意し、実施例2の(4-3)の1stスクリーニングと同様のアッセイより、1コロニーからなるウェルにおいて抗体産生が確認されたウェルを選別する。合成ペプチド1では6サンプルのクローニングから2個を、合成ペプチド2では5サンプルから3個のクローンを樹立した。樹立した細胞をプリスタン処理 (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン 0.5 mL /匹を腹腔内投与し、1~2週間飼育する。) したマウス2匹の腹腔内へ投与して腹水化し、得られた腹水を硫酸アンモニウムによる塩析法にて精製し、抗体の評価を行なった。得られた抗rNK4モノクローナル抗体をプレートに固相し、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトHGFモノクローナル抗体とのサンドウィッチ系 (特殊免疫研究所, 1EH1: イムニスHGF EIAの構成試薬を使用) にてrNK4およびrヒトHGFの検出を比較したところ、ヒトHGFは全く検出せずNK4を特異的に検出できたものの、反応が弱くELISAに使用できる抗体を得ることができなかった。 40

【0042】

(6) 合成ペプチドを抗原としての抗体作製

(6-1) マウスへの抗原免疫

初回免疫：等容量のKLHコンジュゲート合成ペプチド1あるいは2と完全フロイントアジュバント (DIFCO、263810) のエマルジョン液を免疫原投与量 $100\mu\text{g}$ /匹で6週令のBALB/cマウスの腹腔内に接種した。

2回目および3回目免疫：初回免疫から2週間隔で追加免疫を3回まで実施した。追加免疫は実施例2の(4-1)の「2回目および3回目免疫」に記載の方法により行った。

最終免疫：3回目免疫の2週間後に同じ合成ペプチドを $50\mu\text{g}$ /匹で尻尾の静脈へ接種した。

【0043】

(6-2) 1stスクリーニング

10

実施例2の(4-3)の1stスクリーニングと同じ方法により反応性を評価し、陽性判定とされたサンプルについて、2ndスクリーニングを行った。

【0044】

(6-3) 2ndスクリーニング

中村らによりクローニングされたヒトHGF cDNA 2.3kb (BBRC Vol.172, No.1, 321-327, 1990) をデハイドロフォーレトレダクダーゼ(DHFR)およびネオマイシン(Nmr)を組み込んだベクター(pNOW)のサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターの下流に挿入し、ヒトHGF cDNA発現ベクターを構築した。そのヒトHGF cDNA発現ベクターをリポフェクションにてチャイニーズハムスター(CHO)細胞にトランスフェクションした。形質転換した細胞をG418耐性により選別し、続いてメトレキセート(MTX)により遺伝子増幅した。ヒトHGF高産生株について、CHO-S-SFM II培地(GIBCO社製、22052-039)中で、 37°C 、24時間培養し、発現されたヒトHGFを含む培養上清を得た。

20

【0045】

ヒトHGFを含む培養上清を東尾らの方法(Higashio et al. BBRC Vol. 170, 397-404, 1990)を若干改変した方法で、SP Sepharose Fast Flow(GEヘルスケア社製、17-0729-01)、HiTrap Heparin カラム(GEヘルスケア社製、17-407-01)による2段階のクロマト精製を行ない、SDS-PAGEで単一の精製ヒトHGFを得た。

【0046】

上記ヒトHGF抗原を、ウサギ1羽に対して $100\mu\text{g}$ を完全フロイントアジュバントとのエマルジョン液を作製し、背中の皮下約10カ所へ $100\mu\text{L}$ ずつ、2週間隔で4回繰り返し投与し、最終免疫から1週間後に抗血清を得た。

30

得られた抗血清からヒトHGFに対するポリクローナル抗体をProteinG affinity カラム(GEヘルスケア社製、17-0404-03)を用いて精製した。

【0047】

抗ヒトHGFウサギポリクローナル抗体生理的食塩水溶液($20\mu\text{g}/\text{mL}$)をアッセイプレートに $50\mu\text{L}$ ずつ分注し 4°C にて一晩固相化し、40%BA-TBSにてブロッキング処理した。プレートを洗浄後、rNK4あるいはrヒトHGFを $1\text{ng}/\text{mL}$ で含む40%BA-TBSを $50\mu\text{L}$ ずつウェルに分注し、室温で1時間反応させたものをrNK4あるいはrヒトHGF固相プレートとした。また、合成ペプチド2種の固相プレートと固相なしのプレートも準備した。

【0048】

培養上清を40%BA-TBSにて希釈した培養上清サンプルについて、実施例2の(4-3)の1stスクリーニングと同じ方法でアッセイを行った。

40

【0049】

rNK4固相プレートへ反応し、rヒトHGF固相プレートには反応しないサンプルを陽性判定とし、合成ペプチドへの反応も確認した。合成ペプチドへの反応が強く、かつrヒトHGFへのシグナルに対するrNK4へのシグナルの比の良いものをセレクトし、クローニング対象とした。

【0050】

(6-4) クローン化

限界希釈法によるクローニングを行った。実施例2の(5-5)に記載の方法により、

50

合成ペプチド1由来ではHyb-N5221を含む7個を、合成ペプチド2由来ではHyb-N5304を含む5個のクローンを得た。

【0051】

(6-5) モノクローンの樹立

得られたモノクローンについて、順次培養スケールをアップして細胞凍結し、ならびにマウス2匹へ細胞を接種して腹水を作製した。まず、樹立したクローンを、プリスタン 0.5mL/匹投与2週間後のマウスに、細胞を 1×10^7 個/匹以上で腹腔内へ接種した。得られた腹水について、50%飽和硫酸塩析精製により精製抗体を調製した。上記で得られたハイブリドーマHyb-N5221及びHyb-N5304は、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 つくばセンター 中央第6）に、2007年10月31日にそれぞれ受託番号FERM P-21417及びFERM P-21418として寄託されており、受託番号FERM P-21417及びFERM P-21418の寄託はそれぞれ、受託番号FERM BP-11101又は受託番号FERM BP-11102として2009年3月2日に国際寄託に移管されている。

10

【0052】

実施例3：精製モノクローナル抗体を用いた特異性評価

得られたHyb-N5221及びHyb-N5304の塩析精製抗体を用いて、特異性および性能の評価を行った。rNK4、rヒトHGF、ならびに合成ペプチド2種を固相したアッセイプレートに、各モノクローナル抗体の塩析精製抗体 $3 \mu\text{g/mL}$ からの3倍希釈列サンプルを調製し反応させた。その結果、ヒトHGFには反応を示さず、他3種の抗原物質固相プレートに反応を示したことから、NK4に特異的に反応することが確認された。（図1；Bindingデータ）

20

【0053】

実施例4：NK4に特異的な抗体を用いたNK4検出サンドウィッチ系の作製及び検討

(1) 精製抗NK4モノクローナル抗体生理的食塩水溶液（ $20 \mu\text{g/mL}$ ）をプレートに分注して固相化した。また、抗ヒトHGFモノクローナル抗体を固相したイムニスHGF EIAのプレート及びNK4にもHGFにも関係しないモノクローナル抗体を固相したプレートの4種類のプレートを使用した。

(2) rNK4およびrヒトHGFを40%BA-TBSにて30 ng/mLから3倍希釈列を作製し、一次反応に供した。

30

(3) ペルオキシダーゼ標識抗ヒトHGFモノクローナル抗体とのサンドウィッチ系（特殊免疫研究所、1EH1：イムニスHGF EIAの構成試薬）を利用してアッセイを行った。

【0054】

(4) 結果（図2）

Hyb-N5221、Hyb-N5304を固相化したアッセイ系のどちらもNK4検出感度が良く、0濃度における非特異的発色は認められなかった。また、どちらの系もヒトHGFを検出せず、NK4を特異的に検出できることを確認した。両抗体ではHyb-N5221の感度がより良好であった。一方、抗ヒトHGFモノクローナル抗体固相のイムニスHGF EIAの場合は、ヒトHGFとNK4を同様に検出し、両者を測り分けられない。なお、NK4にもHGFにも関係しないモノクローナル抗体固相プレートでは、ヒトHGFもNK4も検出しなかった。

40

以上の様にHyb-N5221、Hyb-N5304の抗NK4モノクローナル抗体固相と標識抗ヒトHGFモノクローナル抗体を組み合わせて、NK4を検出するサンドウィッチ系が成り立つことが確認できた。

【0055】

実施例5：NK4 EIAキットの改良及び性能評価

(1) 抗NK4モノクローナル抗体固相-標識抗ヒトHGFモノクローナル抗体のNK4検出サンドウィッチ系について、ゲルろ過精製により固相用抗NK4モノクローナル抗体の純度を上げ、また各ステップのバッファーや発色液を変更することにより感度を上げ

50

、より高感度の測定キット（NK 4 E I Aキット）に改良した。抗NK 4モノクローナル抗体としてはHyb-N5221を使用し、固相プレートは凍結乾燥により製造した。NK 4 E I Aキットの組成及び操作方法を以下に示す。

* NK 4 E I Aキットの組成；

- (1) 検体希釈液 仔牛胎児血清，マウス血清を含むリン酸緩衝液
- (2) 洗浄液 Tween 20を含む生理食塩水
- (3) 標識抗体液 ペルオキシダーゼ標識抗ヒトHGFモノクローナル抗体（マウス）
- (4) 酵素基質（発色液） TMB（BioFX社製）
- (5) 反応停止液 発色停止液（BioFX社製）

【0056】

10

* NK 4 E I Aキットの操作方法；

- (1) 抗NK 4モノクローナル抗体固相プレートへ検体希釈液を $50\mu\text{L}$ ずつウェルに分注
- (2) NK 4標準液および検体を検体希釈液の入ったウェルへ $50\mu\text{L}$ ずつウェルに分注
- (3) 検体希釈液と検体を振盪器にて攪拌
- (4) 37°C 、2時間、静置反応（一次反応）
- (5) 反応液を除き、プレートを洗浄液にて5回洗浄後、標識抗体液を $100\mu\text{L}$ ずつウェルに分注
- (6) 37°C 、1時間、静置反応（二次反応）
- (7) 反応液を除き、プレートを洗浄液にて5回洗浄後、酵素基質（発色液）を $100\mu\text{L}$ ずつウェルに分注
- (8) 25°C 、30分、暗所にて静置反応
- (9) 反応停止液を $100\mu\text{L}$ ずつウェルに分注して反応を停止し、プレートリーダーにて450 nmの吸光度を測定
- (10) 標準液の吸光度をプロットして検量線を作成し、各種検体の吸光度を当てはめてNK 4濃度を算出

20

【0057】

(2) NK 4 E I Aキットについて、イムニスHGF E I Aを対照としてヒトHGFとNK 4の特異性比較（図3）

イムニスHGF E I Aでは、ヒトHGFならびにNK 4両方を測定しうるが、NK 4 E I AキットではNK 4のみ検出し、ヒトHGFは検出しないことを確認した。

30

NK 4 E I Aキットの検量線はイムニスHGF E I Aと同等の発色を示すことを確認した。

NK 4 E I Aキットの標準液の検量線は、 $R^2=0.9997$ と良好な直線性を示すことが確認され、また最小検出感度はイムニスHGF E I Aと同等の1 ng/mLであることを確認した。

【0058】

(3) 健常人血清検体の測定（図4）

健常人血清検体23例について、NK 4およびHGFを測定した。その結果、イムニスHGF E I Aにおける健常人血清中のHGF値が0.13~0.55 ng/mLであったのに対し、NK 4はほとんど血中では検出されないことを確認した。

40

【0059】

(4) 添加回収試験（図5）

健常人血清検体 $50\mu\text{L}$ に、NK 4 : 0.3、2.5、4.0 ng/mLの3種類の濃度を各 $50\mu\text{L}$ ずつ添加して一次反応を行い、検体希釈液に同様に3種類の濃度のNK 4調製液を添加して反応させた時の吸光度を比較した。

健常人血清検体は3種のNK 4添加率についていずれも90%以上の回収率が得られ、添加回収率が良好な測定系であることを確認した。

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】 図1は、Binding titration assayによる抗rNK 4モノクローナル抗体の特異

50

性評価結果を示す図である。固相抗原をそれぞれ rNK4、rヒトHGF、合成ペプチド1、または合成ペプチド2とし、Hyb-N5221及びHyb-N5304を添加した。図1-1は、各固相抗原に対するHyb-N5221の反応性を示す。図1-2は、各固相抗原に対するHyb-N5304の反応性を示す。

【図2】 図2は、抗rNK4モノクローナル抗体を使用したサンドウィッチ系の特異性評価結果を示す図である。固相抗体をHyb-N5221、Hyb-N5304、抗HGF抗体(anti-HGF)、NK4にもHGFにも関係しないモノクローナル抗体の4種類にした場合について、rNK4及びrヒトHGFを段階希釈して測定を行った。図2-1は、各抗体を固相化した場合のrNK4の反応性を示す。図2-2は、各抗体を固相化した場合のrヒトHGFの反応性を示す。

【図3】 図3は、NK4 EIAキットとイムニスHGF EIAとの特異性を比較した図である。両キットはrNK4に対し同等に発色を示し、直線性も良好であった。NK4 EIAキットは、rHGFと反応しなかった。図3-1は、イムニスHGF EIAの標準液検量線を示す。図3-2は、NK4 EIAキットの標準液検量線を示す。

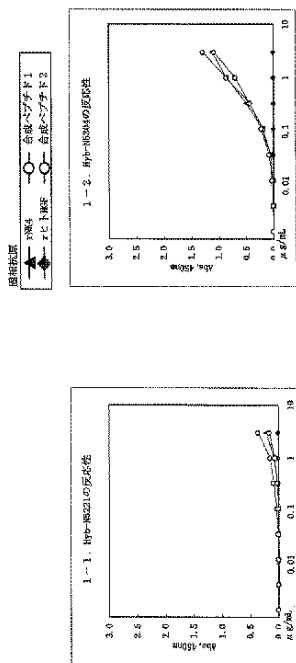
【図4】 図4は、健常人血清検体におけるNK4 EIAキット及びイムニスHGF EIAによる測定値を示した図である。

【図5】 図5は、各濃度のNK4を添加した場合のNK4 EIAキットの添加回収率を示した図である。

10

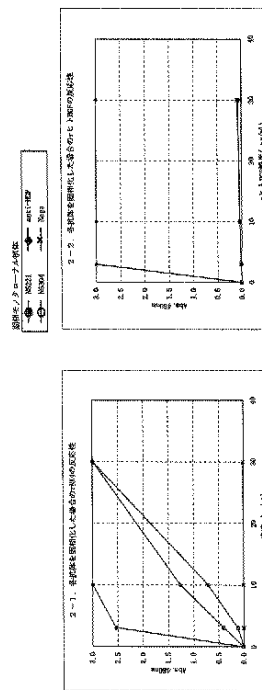
【図1】

図1. 抗rNK4モノクローナル抗体の特異性評価
binding titration assay法によるNK4への特異的反応評価



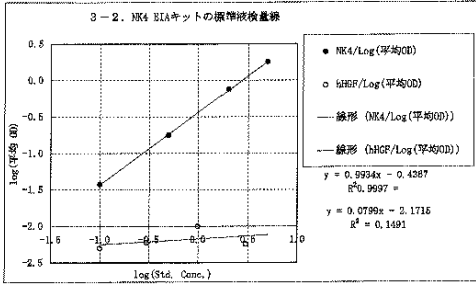
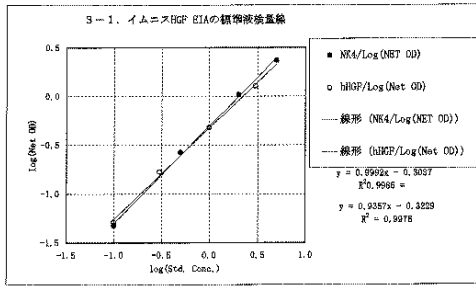
【図2】

図2. 抗rNK4モノクローナル抗体を使用したサンドウィッチ系の特異性評価



【図 3】

図 3. NK4 EIAキット と イムニス HGF EIA との特異性比較



【図 4】

図 4. 健常人血清検体測定値

検体 No.	NK4	HGF
	ng/mL	ng/mL
1	0.01	0.24
2	0.01	0.34
3	0.01	0.30
4	0.01	0.55
5	0.01	0.23
6	0.01	0.30
7	0.01	0.22
8	0.01	0.49
9	0.01	0.41
10	0.01	0.46
11	0.01	0.29
12	0.01	0.34
13	0.01	0.22
14	0.01	0.27
15	0.01	0.40
16	0.01	0.13
17	0.01	0.22
18	0.01	0.28
19	0.01	0.13
20	0.01	0.18
21	0.02	0.23
22	0.01	0.18
23	0.01	0.23
平均	0.01	0.29
検査線	$y = 0.9736x - 0.4403$ $R^2 = 1$ 0ng/mL 0.007	$0.9493x - 0.2934$ 0.9997 0.015

【図 5】

図 5. NK4 EIAキットの添加回収率試験

測定結果 検査	0ng/mL		0.3ng/mL		2.5ng/mL		4.0ng/mL		NK4添加 回収率	
	濃度 ng/mL	回収率 %	NK4濃度 ng/mL	回収率 %	NK4濃度 ng/mL	回収率 %	NK4濃度 ng/mL	回収率 %	平均%	平均%
1	0.01	94.8	0.28	97.0	2.40	88.0	3.88	97.0	95.9	95.9
2	0.01	92.3	0.28	97.4	2.44	87.4	3.66	91.6	93.7	93.7
3	0.01	90.6	0.27	90.6	2.42	96.8	3.36	65.9	91.4	91.4

【配列表】

2009125831000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年1月25日(2010.1.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

エラスターゼ消化によって得られるHGF (Hepatocyte Growth Factor) の α 鎖からなる、分子量が約55~69kDaであり、c-Met/HGFレセプターのアンタゴニスト活性を有するタンパク質(NK4)と特異的に反応し、HGFとは反応しないモノクローナル抗体であって、前記NK4で特異的に露出している部位を有する抗原で免疫することによって得られた抗体群を、抗HGF抗体と前記NK4との反応物及び抗HGF抗体とHGFとの反応物との反応を指標としてスクリーニングすることにより得られることを特徴とする、モノクローナル抗体。

【請求項2】

前記NK4で特異的に露出している部位の全体又は部分配列を有するペプチドを、当該ペプチドに含まれるCysを中心として、実際のNK4に近い立体構造を作り出すように、キャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを抗原として免疫動物に免疫することにより得られる、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】

前記NK4で特異的に露出している部位の全体又は部分配列を有するペプチドにスペーサーを結合させ、当該ペプチドに含まれるCysを中心として、実際のNK4に近い立体構造を作り出すように、キャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを抗原として免疫動物に免疫することにより得られる、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】

NK4で特異的に露出している部位を有する抗原が、 $Cys - [NH(CH_2CH_2O)]_2 - CH_2CO$ 及び/又はPro-Ile-Ser-Arg-Cys-Glu-Gly-Asp-Thr-Thr-Pro-Thr-Ile-Valで表されるペプチドをキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートである、請求項1から3の何れかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】

前記抗体群を、抗HGFポリクローナル抗体と前記NK4との反応物及び抗HGFポリクローナル抗体とHGFとの反応物との反応を指標としてスクリーニングすることにより得られることを特徴とする、請求項1から4の何れかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】

免疫動物がマウスである、請求項2から5の何れかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項7】

1ng/mLのNK4を検出できる、請求項1から6の何れかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項8】

受託番号FERM BP-11101又は受託番号FERM BP-11102を有するハイブリドーマにより産生される、請求項1から7の何れかに記載のモノクローナル抗体。

。

【請求項9】

請求項1から8の何れかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項10】

受託番号FERM BP-11101又は受託番号FERM BP-11102を有するハイブリドーマ。

【請求項11】

請求項1から8の何れかに記載のモノクローナル抗体を含む、NK4検出のための試薬。

【請求項12】

請求項1から8の何れかに記載のモノクローナル抗体を固定化した担体、及びNK4を認識できる第二の抗体を少なくとも含む、NK4検出キット。

【請求項13】

請求項1から8の何れかに記載のモノクローナル抗体と、NK4を含む試料とを反応させることを含む、NK4の検出方法。

【請求項14】

請求項1から8の何れかに記載のモノクローナル抗体を固定化した担体からなる、NK4精製カラム。

【請求項15】

請求項1から8の何れかに記載のモノクローナル抗体と、NK4を含む試料とを接触させることを含む、NK4の精製方法。

【手続補正書】

【提出日】平成23年3月16日(2011.3.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

エラスターゼ消化によって得られるHGF (Hepatocyte Growth Factor) の α 鎖からなる、分子量が約55~69 kDaであり、c-Met/HGFレセプターのアンタゴニスト活性を有するタンパク質 (NK4) と特異的に反応し、HGFとは反応しないモノクローナル抗体であって、

抗ヒトHGF抗体をアッセイプレートに固相化し、

該固相化された抗ヒトHGF抗体に、NK4又はヒトHGFを反応させることで、NK4固相プレート及びヒトHGF固相プレートを作成し、

HGF又はHGFをエラスターゼ消化して得られるHGFの α 鎖からなるタンパク質、又はその部分配列を有するペプチドを単独又はキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを抗原として免疫動物に免疫することにより得られる抗体群の中から、前記NK4固相プレートに反応し、前記ヒトHGF固相プレートには反応しない抗体を選択するスクリーニングによって得られることを特徴とする、上記のモノクローナル抗体。

【請求項2】

抗ヒトHGF抗体が、抗ヒトHGFポリクローナル抗体である、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】

HGFをエラスターゼ消化して得られるHGFの α 鎖からなるタンパク質又はその部分配列を有するペプチドにスペーサーを結合させ、さらにキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを抗原として免疫動物に免疫する、請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】

抗原が、Cys-[NH(CH₂CH₂O)₂-CH₂CO]₂-Glu-Gly-Asp-Thr-Thr-Pro-Thr-Ile-Val及び/又はPro-Ile-Ser-Arg-Cys-Glu-Gly-Asp-Thr-Thr-Pro-Thr-Ile-Valで表されるペプチドをキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートである、請求項1から3のいずれかに記載の

モノクローナル抗体。

【請求項 5】

免疫動物がマウスである、請求項 1 から 4 の何れかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

1 ng/mL の NK 4 を検出できる、請求項 1 から 5 の何れかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】

受託番号 FERM BP-11101 又は受託番号 FERM BP-11102 を有するハイブリドーマにより産生される、請求項 1 から 6 の何れかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 の何れかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 9】

受託番号 FERM BP-11101 又は受託番号 FERM BP-11102 を有するハイブリドーマ。

【請求項 10】

請求項 1 から 7 の何れかに記載のモノクローナル抗体を含む、NK 4 検出のための試薬。

【請求項 11】

請求項 1 から 7 の何れかに記載のモノクローナル抗体を固定化した担体、及び NK 4 を認識できる第二の抗体を少なくとも含む、NK 4 検出キット。

【請求項 12】

請求項 1 から 7 の何れかに記載のモノクローナル抗体と、NK 4 を含む試料とを反応させることを含む、NK 4 の検出方法。

【請求項 13】

請求項 1 から 7 の何れかに記載のモノクローナル抗体を固定化した担体からなる、NK 4 精製カラム。

【請求項 14】

請求項 1 から 7 の何れかに記載のモノクローナル抗体と、NK 4 を含む試料とを接触させることを含む、NK 4 の精製方法。

【請求項 15】

エラスターゼ消化によって得られる HGF (Hepatocyte Growth Factor) の α 鎖からなる、分子量が約 55~69 kDa であり、c-Met/HGF レセプターのアンタゴニスト活性を有するタンパク質 (NK 4) と特異的に反応し、HGF とは反応しないモノクローナル抗体の製造方法であって、

抗ヒト HGF 抗体をアッセイプレートに固相化し、

該固相化された抗ヒト HGF 抗体に、NK 4 又はヒト HGF を反応させることで、NK 4 固相プレート及びヒト HGF 固相プレートを作成し、

HGF 又は HGF をエラスターゼ消化して得られる HGF の α 鎖からなるタンパク質、又はその部分配列を有するペプチドを単独又はキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを抗原として免疫動物に免疫することにより得られる抗体群の中から、前記 NK 4 固相プレートに反応し、前記ヒト HGF 固相プレートには反応しない抗体を選択することを

含む、
上記の製造方法。

【請求項 16】

抗ヒト HGF 抗体が、抗ヒト HGF ポリクローナル抗体である、請求項 15 に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/057327
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/18(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n 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) C07K16/18, C12N5/10, G01N30/88, G01N33/53, C12P21/08 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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 1999/055361 A1 (Toshikazu NAKAMURA), 04 November, 1999 (04.11.99), Full text & JP 4094814 B2 & US 2009/0023658 A1 & EP 1074264 A1 & DE 69939586 D & CA 2327382 A & AT 408415 T & DK 1074264 T & ES 2313777 T	1-13
Y	Shinobu OMI et al., "Saibo Kogaku Bessatsu Jikken Protocol Series Shinban Ko-peptide Kotai Jikken Protocol -Idenshi Sanbutsu no Dotei kara Tanpakushistu Kino Kaiseki made-", 2nd edition, 1st print, Shujunsha Co., Ltd., 2004, pages 28, 130 to 132	1-13
<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 24 April, 2009 (24.04.09)		Date of mailing of the international search report 12 May, 2009 (12.05.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057327

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/081035 A1 (ASKA Pharmaceutical Co., Ltd.), 23 September, 2004 (23.09.04), Page 4 & JP 3899362 B2 & US 2006/0127396 A1 & US 2009/0053202 A1 & EP 1614690 A1 & CA 2518548 A & KR 10-2005-0108390 A & CN 1761679 A	1-13
A	Kunio MATSUMOTO et al., "HGF-c-Met-kei o Bunshi Hyoteki to suru NK4 Idenshi Chiryo no Igi to Seigan Sayo", Gan Bunshi Hyoteki Chiryo, 2004, Vol.2, No.4, pages 272 to 281, 260	1-13
A	JP 3832674 B2 (Toshikazu NAKAMURA), 11 October, 2006 (11.10.06), Full text & JP 09-110716 A & US 2002/0004480 A1 & US 2006/0030517 A1 & EP 890361 A1 & WO 1997/016205 A1 & DE 69634138 D & DE 69634138 T & CA 2235805 A & AT 285785 T & DK 890361 T & ES 2235200 T	1-13

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 5 7 3 2 7	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18, C12N5/10, G01N30/88, G01N33/53, C12P21/08			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS(STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	WO 1999/055361 A1 (中村敏一) 1999.11.04, 全文 & JP 4094814 B2 & US 2009/0023658 A1 & EP 1074264 A1 & DE 69939586 D & CA 2327382 A & AT 408415 T & DK 1074264 T & ES 2313777 T	1-13	
Y	大海忍 他, 細胞工学別冊実験プロトコールシリーズ 新版抗ペプチド抗体実験プロトコール ―遺伝子産物の同定からタンパク質機能解析まで―, 第2版第1刷, 秀潤社, 2004, p.28, p.130-132	1-13	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日に後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 24.04.2009		国際調査報告の発送日 12.05.2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高 美葉子	4 N 4 4 3 4
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 5 7 3 2 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2004/081035 A1 (あすか製薬) 2004.09.23, 第4頁 & JP 3899362 B2 & US 2006/0127396 A1 & US 2009/0053202 A1 & EP 1614690 A1 & CA 2518548 A & KR 10-2005-0108390 A & CN 1761679 A	1-13
A	松本邦夫 他, HGF-c-Met系を分子標的とするNK4遺伝子治療の意義と制がん作用, がん分子標的治療, 2004, Vol. 2, No. 4, p. 272-281, p. 260	1-13
A	JP 3832674 B2 (中村敏一) 2006.10.11, 全文 & JP 09-110716 A & US 2002/0004480 A1 & US 2006/0030517 A1 & EP 890361 A1 & WO 1997/016205 A1 & DE 69634138 D & DE 69634138 T & CA 2235805 A & AT 285785 T & DK 890361 T & ES 2235200 T	1-13

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, RO, SE, SI, SK, 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, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B065 AA90X AB02 BA08 CA25 CA44 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 CA11 DA76 EA20 EA50

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	针对NK4的单克隆抗体		
公开(公告)号	JPWO2009125831A1	公开(公告)日	2011-08-04
申请号	JP2010507277	申请日	2009-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	困 株式会社特殊免疫研究所		
申请(专利权)人(译)	有限公司困 株式会社特殊免疫研究所		
[标]发明人	中村健二 青井理惠		
发明人	中村 健二 青井 理惠		
IPC分类号	C07K16/22 C12N5/10 G01N33/53 G01N30/88 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/74 C07K16/244		
FI分类号	C07K16/22.ZNA C12N5/00.102 G01N33/53.D G01N30/88.201.R C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AB02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50		
优先权	2008103242 2008-04-11 JP		
其他公开文献	JP4851620B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了：一种能够特异性识别NK4的新型抗体。能够产生抗体的杂交瘤；以及使用该抗体检测或纯化NK4的方法。具体公开了可以与NK4特异性反应但不能与HGF反应的单克隆抗体。

圖1、抗NK4抗体の特異性を示すELISAの結果を示すグラフ

縦軸：吸光度
横軸：濃度
中：コントロール

