

(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2011-526689

(P2011-526689A)

(43) 公表日 平成23年10月13日(2011.10.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566	4 B O 6 4
CO 7 K 16/28 (2006.01)	CO 7 K 16/28 Z N A	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 H O 4 5
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533	
GO 1 N 33/534 (2006.01)	GO 1 N 33/534	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-515587 (P2011-515587)	(71) 出願人	509316028 ユニヴェルシテ ジョセフ フーリエ UNIVERSITE JOSEPH F OURIER フランス、エフ-38041 グルノーブ ル セデックス09、ビー. ピー. 53、 ドメヌ ユニヴェルシテール、アベニュー セントラル、621 621, avenue Centrale , Domaine Universita ire, B. P. 53, F-38041 Grenoble Cedex09, FR ANCE
(86) (22) 出願日	平成21年7月6日 (2009.7.6)	(74) 代理人	100065248 弁理士 野河 信太郎
(85) 翻訳文提出日	平成23年3月2日 (2011.3.2)		
(86) 国際出願番号	PCT/FR2009/051335		
(87) 国際公開番号	W02010/001079		
(87) 国際公開日	平成22年1月7日 (2010.1.7)		
(31) 優先権主張番号	08/03802		
(32) 優先日	平成20年7月4日 (2008.7.4)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 診断及び予後の方法を実施するためのIRAPタンパク質の使用

(57) 【要約】

本発明は、診断及び予後の方法を実施するためのIRAPタンパク質の使用に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

IRAPタンパク質(「インスリン応答性アミノペプチダーゼ」)の細胞外ドメインの、哺乳動物、特にヒトの血清、血漿又は組織における分泌されたIRAPタンパク質細胞外ドメインの濃度のインビトロアッセイ法を実施するための使用。

【請求項 2】

前記IRAPタンパク質がそのアイソフォーム、特に配列番号1～3により規定されるアイソフォームの1つ又はその変形体、特に配列番号4～6により規定される変形体の1つに相当し、前記細胞外ドメインが配列番号7～11で表される請求項1に記載のIRAPタンパク質の細胞外ドメインの使用。

10

【請求項 3】

GLUT4グルコース輸送体又は関連タンパク質の転位欠損に関連する病状のインビトロ診断及び/若しくは予後又はインビトロモニタリングのための、請求項1又は2に記載のIRAPタンパク質及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の細胞外ドメインの使用。

【請求項 4】

健常個体と比べて患者におけるIRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の原形質膜での過剰発現及び/又はその原形質膜への転位の増加に関連する病状のインビトロ診断及び/又は予後、或いは健常個体と比べて患者におけるIRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の原形質膜での過剰発現及び/又はその原形質膜への転位の増加に関連する病状のインビトロモニタリングのための、請求項3に記載のIRAPタンパク質及び/又はそのアイソフォーム若しくは変形体の細胞外ドメインの使用。

20

【請求項 5】

健常個体と比べて患者におけるIRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の原形質膜での過少発現及び/又は原形質膜への転位の減少に関連する病状のインビトロ診断及び/又は予後、或いは健常個体と比べて患者におけるIRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の原形質膜での過少発現及び/又は原形質膜への転位の減少に関連する病状のインビトロモニタリングのための、請求項3に記載のIRAPタンパク質及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の細胞外ドメインの使用。

【請求項 6】

抗癌剤に対する化学療法抵抗性のインビトロ診断及び/又は予後のための、請求項3に記載のIRAPタンパク質の細胞外ドメインの使用。

30

【請求項 7】

病状がインスリン抵抗性、2型糖尿病、妊娠糖尿病、妊娠誘発性高血圧(子癇前症)及び早期分娩のリスクに関連する病状からのものである、請求項1～3及び5のいずれか1項に記載のIRAPタンパク質及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の細胞外ドメインの使用。

【請求項 8】

病状が、増殖性疾患、とりわけ癌、特に卵巣腺癌、子宮内膜癌、絨毛上皮腫、膵臓癌、乳癌、前立腺癌、胃癌、直腸癌若しくは頭頸部癌、のようなIRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体が過剰発現し及び/又はそれらの膜への転位が増加する癌、自己免疫疾患又は炎症性疾患である、請求項1～4のいずれか1項に記載のIRAPタンパク質及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の細胞外ドメインの使用。

40

【請求項 9】

前記アッセイが抗体を用いて実施される、請求項1～8のいずれか1項に記載のIRAPタンパク質及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の細胞外ドメインの使用。

【請求項 10】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項9に記載のIRAPタンパク質及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の細胞外ドメインの使用。

【請求項 11】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項9に記載のIRAPタンパク質及び/又はその

50

アイソフォーム及び/若しくは変形体の細胞外ドメインの使用。

【請求項 1 2】

前記モノクローナル抗体がハイブリドーマにより産生される、請求項 1 1 に記載の抗体の使用。

【請求項 1 3】

IRAP(インスリン応答性アミノペプチダーゼ)タンパク質及び/又はそのアイソフォーム、特に配列番号 1 ~ 3 により規定されるアイソフォームの 1 つ及び/又はその変形体、特に配列番号 4 ~ 6 により規定される変形体の 1 つの循環性細胞外ドメイン又は細胞外ドメインのエピトープの 1 つを特異的に認識する抗体であって、前記細胞外ドメインが配列番号 7 ~ 11 の配列により規定される抗体。

10

【請求項 1 4】

医薬として使用するため、特に癌、特に卵巣腺癌、子宮内膜癌、絨毛上皮腫、膵臓癌、乳癌、前立腺癌、胃癌、直腸癌若しくは頭頸部癌のようなIRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体が過剰発現し及び/又はそれらの膜への転位が増加する癌、自己免疫疾患又は炎症性疾患の治療のため或いは化学療法への抵抗性の処置のための請求項 1 3 に記載の抗体。

【請求項 1 5】

前記抗体がポリクローナル抗体である請求項 1 3 又は 1 4 に記載の抗体。

【請求項 1 6】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 3 又は 1 4 に記載の抗体。

20

【請求項 1 7】

以下：

- CNCM(Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, Paris, France)に2009年7月2日、アクセッション番号CNCM I-4181で寄託されたハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体、
 - CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM I-4182で寄託されたハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体、
 - CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM I-4183で寄託されたハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体、
 - CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM I-4184で寄託されたハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体、及び
 - CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM I-4185で寄託されたハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体
- から選択される請求項 1 6 に記載のモノクローナル抗体。

30

【請求項 1 8】

放射性核種、蛍光体、量子ドット、酵素標識、酵素基質、酵素補助因子、酵素阻害剤又はハプテンから選択される化合物で標識されている、請求項 1 6 又は 1 7 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 1 9】

ヒト化抗体である、請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体。

40

【請求項 2 0】

請求項 1 6 又は 1 7 に記載の抗体を産生するハイブリドーマ、特に以下：

- a . CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM I-4181で寄託されたハイブリドーマ、
- b . CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM I-4182で寄託されたハイブリドーマ、
- c . CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM I-4183で寄託されたハイブリドーマ、
- d . CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM I-4184で寄託されたハイブリドーマ、及び

50

e . CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM 1-4185で寄託されたハイブリドーマから選択されるハイブリドーマ。

【請求項21】

哺乳動物の血清、血漿、赤血球又は組織においてIRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/又はその1つの変形体の細胞外ドメインの濃度を測定する工程を含んでなる、哺乳動物におけるIRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/又はその1つの変形体の濃度のインビトロアッセイ法。

【請求項22】

酵素抗体法若しくは免疫組織化学法、又はRIA若しくはIRMAにより実施される、請求項21に記載のアッセイ法。

【請求項23】

以下：

a . 請求項13又は15～19のいずれか1項に記載の抗体を使用して、哺乳動物においてIRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/又はその1つの変形体の循環性細胞外ドメインの濃度をインビトロ測定する工程、

b . 工程a . で得られた濃度を健常哺乳動物でインビトロで得られた濃度と比較する工程、

c . 工程a . で得られた濃度が工程b . の濃度より低いとき、前記哺乳動物はインスリン抵抗性を有するという事実を、工程b . から推論する工程、

を含んでなる、インスリン抵抗性、2型糖尿病、妊娠糖尿病、妊娠誘発性高血圧(子癩前症)及び早期分娩のリスクに関連する病状のインビトロ診断法。

【請求項24】

以下：

a . 請求項13又は15～19のいずれか1項に記載の抗体を使用して、哺乳動物においてIRAPタンパク質及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の循環性細胞外ドメインの濃度をインビトロ測定する工程、

b . 工程a . で得られた濃度をコントロール哺乳動物でインビトロで得られた濃度と比較する工程、

c . 工程a . で得られた濃度が工程b . の濃度より高いとき、前記哺乳動物は癌を有するという事実を、工程b . から推論する工程

を含んでなる、癌、特に卵巣腺癌のようなIRAP及び/又はその1つのアイソフォーム及び/又はその1つの変形体が過剰発現し又はそれらの膜への転位が増加する癌、自己免疫疾患又は炎症性疾患に関連する病状或いは化学療法への抵抗性のインビトロ診断法。

【請求項25】

少なくとも1つの緩衝液及び少なくとも1つの請求項13又は15～19のいずれか1項に記載の抗体を含んでなる、哺乳動物においてIRAPタンパク質及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の1つの循環性細胞外ドメインの濃度をインビトロ測定するためのキット。

【請求項26】

IRAPタンパク質の基質及び抗体により認識されるペプチドも含んでなる請求項25に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、診断及び予後の方法を実施するためのIRAPタンパク質の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

IRAPタンパク質(インスリン調節性アミノペプチダーゼ; EC 3.4.11.3)は、胎盤ロイシンアミノペプチダーゼ(P-LAP)及びロイシン-シスチニルアミノペプチダーゼ(L-CAP)とし

10

20

30

40

50

ても知られ、3つのアイソフォーム(Swiss-Prot : Q9UIQ6 : 1、2および3 ; それぞれ配列番号1 ~ 3で表される)で存在する膜貫通垂鉛メタロプロテイナーゼタンパク質である。

【0003】

これは原形質膜に挿入されると、その細胞外ドメインが切断されて分泌され得る。

IRAPと推定されるタンパク質の未特定アイソフォームの分泌部分が、血中で、メチオニンの存在下に非特異的合成基質L-ロイシン-ニトロアニリドを用いる酵素的方法によりアッセイされた(Mizutani, S., Yoshino, M.及びOya, M. (1976) Clin Biochem 9(1), 16-18)。

【0004】

この方法を用いて、Mizutani, Oya及びTomodaは、妊娠女性の血清中で、濃度が妊娠中に増加するシスチニル-ロイシンアミノペプチダーゼを検出した(Yamahara, N., Nomura, S., Suzuki, T., Itakura, A., Ito, M., Okamoto, T., Tsujimoto, M., Nakazato, H.及びMizutani, S. (2000) Life Sci 66(15), 1401-1410)。このアミノペプチダーゼは、本質的に、胎盤起源であり、したがってP-LAPと呼ばれ(Tsujimoto, M., Mizutani, S., Adachi, H., Kimura, M., Nakazato, H.及びTomoda, Y. (1992) Arch Biochem Biophys 292(2), 388-392)、前記タンパク質の分泌ドメインに相当する。

【0005】

この酵素は、オキシトシン(Naruki, M., Mizutani, S., Goto, K., Tsujimoto, M., Nakazato, H., Itakura, A., Mizuno, K., Kurauchi, O., Kikkawa, F.及びTomoda, Y. (1996) Peptides 17(2), 257-261)、バソプレッシン(Wallis, M. G., Lankford, M. F.及びKeller, S. R. (2007) Am J Physiol Endocrinol Metab 293(4), E1092-1102)、アンジオテンシンII及びIII(Matsumoto, H., Rogi, T., Yamashiro, K., Kodama, S., Tsuruoka, N., Hattori, A., Takio, K., Mizutani, S.及びTsujimoto, M. (2000) Eur J Biochem 267(1), 46-52)並びに一連の他のペプチド(Albiston, A. L., Peck, G. R., Yeatman, H. R., Fernando, R., Ye, S.及びChai, S. Y. (2007) Pharmacol Ther 116(3), 417-427)を分解する。このアミノペプチダーゼの血清濃度は、男性及び非妊娠女性では報告されていない。

【0006】

クローニング時、P-LAPはIRAPタンパク質にもアンジオテンシンIVレセプターにも相当するように見えた(Keller, S. R., Scott, H. M., Mastick, C. C., Aebersold, R.及びLienhard, G. E. (1995) J Biol Chem 270(40), 23612-23618 ; Rogi, T., Tsujimoto, M., Nakazato, H., Mizutani, S.及びTomoda, Y. (1996) J Biol Chem 271(1), 56-61 ; Albiston, A. L., McDowall, S. G., Matsacos, D., Sim, P., Clune, E., Mustafa, T., Lee, J., Mendelsohn, F. A., Simpson, R. J., Connolly, L. M.及びChai, S. Y. (2001) J Biol Chem 276(52), 48623-48626)。

【0007】

特許出願WO 2005/038462は、P-LAPタンパク質全体での免疫により得られる抗-P-LAPポリクローナル抗体を含んでなる、癌腫の診断及び/又は予後評価用試薬を記載している。異なるアミノペプチダーゼ間の強い相同性を考えると、この抗体は、おそらく、IRAPに特異的ではなく、他のアミノペプチダーゼも認識するはずである。したがって、この抗体によりIRAPの発現又は血漿濃度の変更に正確な様式で関連する病状を診断することが可能になるはずはない。

【0008】

GLUT4は、インスリンに応答して筋肉及び脂肪組織による循環グルコースの取り込みを可能にするグルコース輸送体である。非刺激条件(基準条件)下で、GLUT4は、未知の保持機構によって、細胞内部で、細胞内区画(小胞)中に効果的に保持される。インスリン刺激に応答して、GLUT4は輸送された後、増加した転位により原形質膜中に挿入される。こうしてグルコースの細胞取込みが可能になる。

【0009】

IRAPはグルコース輸送体GLUT4と共存し、化学量論的にGLUT4と同時転位する(Keller, S

. R. (2004) Biol Pharm Bull 27(6), 761-764)。原形質膜へのこの転位は、GLUT4の転位と同じ様式で、インスリンによって刺激される(Karylowski, O., Zeigerer, A., Cohen, A. 及びMcGraw, T. E. (2004) Mol Biol Cell 15(2), 870-882; Subtil, A., Lampson, M. A., Keller, S. R. 及びMcGraw, T. E. (2000) J Biol Chem 275(7), 4787-4795)。

【 0 0 1 0 】

更に、IRAP^{-/-}トランスジェニック動物でGLUT4レベルは50~80%減少するので、IRAPの発現はGLUT4の発現を条件付けている(Keller, S. R., Davis, A. C. 及びClairmont, K. B. (2002) J Biol Chem 277(20), 17677-17686)。

2型糖尿病で、筋肉及び脂肪組織におけるGLUT4発現の減少及び原形質膜へのGLUT4転位の減少の両方が見出されている(Kahn, B. B. (1992) J Clin Invest 89(5), 1367-1374)

10

【 0 0 1 1 】

IRAPの細胞レベルは変更するが、その転位は同様に2型糖尿病の筋肉及び脂肪組織において減少する(Garvey, W. T., Maianu, L., Zhu, J. H., Brechtel-Hook, G., Wallace, P. 及びBaron, A. D. (1998) J Clin Invest 101(11), 2377-2386; Maianu, L., Keller, S. R. 及びGarvey, W. T. (2001) J Clin Endocrinol Metab 86(11), 5450-5456)。

【 0 0 1 2 】

更に、IRAPタンパク質と抗癌剤に対する化学療法抵抗性の発症との間の関係が証明されている(Kondo C.ら, Int J. Cancer, 118, 1390-1394, 2006)。この論文によれば、IRAPは、実際、アポトーシス-誘導因子の発現の阻害及びアポトーシス-阻害因子の発現の増大によって、抗癌剤に対する感受性を減少させる。

20

【 0 0 1 3 】

IRAPの細胞外ドメインは、ADAM9(SwissProt Q13443)及びADAM12(SwissProt O43184)を含むADAMファミリーにおそらく属するメタロプロテナーゼにより切断され(Ito, N., Nomura, S., Iwase, A., Ito, T., Kikkawa, F., Tsujimoto, M., Ishiura, S. 及びMizutani, S. (2004) Biochem Biophys Res Commun 314(4), 1008-1013)、血液循環中に放出される。ADAM9(MDC9)は、骨格筋及び脂肪組織を含む種々の組織で発現し(Hotoda, N., Koike, H., Sasagawa, N. 及びIshiura, S. (2002) Biochem Biophys Res Commun 293(2), 800-805)、ADAM12は本質的には筋肉で発現する。このファミリーの幾つかの他のメンバーもまた筋肉及び脂肪組織で発現する。

30

【 0 0 1 4 】

現時点で、生物学的媒体中でのIRAP細胞外ドメインの濃度と重篤な子癩前症及び早期分娩のリスクに関する病状との間の関係が唯一記載されている。これら2つの病状において、循環P-LAP濃度は、等しい妊娠期間のコントロール女性で観察される濃度より低い。しかし、先行技術に記載される方法は、非特異基質を用いるIRAP細胞外ドメインの酵素アッセイに基づいている。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 5 】

したがって、循環IRAPの細胞外ドメインをアッセイすることを可能にする信頼性のある特異的方法を提供するという現実の必要性が存在する。

40

本発明の目的の1つは、哺乳動物の血清又は血漿又は組織中のIRAPタンパク質、具体的にはIRAPタンパク質の細胞外ドメインの濃度をアッセイするインビトロ法を提供することである。

【 0 0 1 6 】

本発明の別の目的は、IRAPタンパク質の異なるアイソフォームの細胞外ドメインに特異的なモノクローナル抗体を提供することである。

本発明の別の目的は、IRAPタンパク質濃度の過剰又は減少が関与する病状の診断方法を提供することである。

最後の目的は、治療観点から、IRAPタンパク質の異なるアイソフォームの細胞外ドメイ

50

ンに特異的なモノクローナル抗体及びそれらの酵素活性の阻害剤を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0017】

結果として、本発明は、IRAPタンパク質(「インスリン応答性アミノペプチダーゼ」)の細胞外ドメインの、哺乳動物、特にヒトの血清、血漿又は組織における分泌されたIRAPタンパク質細胞外ドメインの濃度のインビトロアッセイ法を実施するための使用に関する。

【0018】

IRAPタンパク質は異なる名称を有し得る。たとえば：「インスリン応答性アミノペプチダーゼ」、「インスリン調節性膜アミノペプチダーゼ」、「ロイシル-シスチニルアミノペプチダーゼ(L-CAP)」、「胎盤ロイシンアミノペプチダーゼ(P-LAP)」、「シスチニルアミノペプチダーゼ」、「オキシトシナーゼ」、「OTアーゼ」、「165kDaの小胞タンパク質」、「Vp165」又は「GP160」。これらは全て、Swiss-ProtデータベースにNo. Q9UIQ6 1、2及び3で登録されたタンパク質のアイソフォームの1以上に相当する。

これら異なる名称は、本明細書中の残りの部分で互換的に使用し得、同じタンパク質を指称する。

【0019】

IRAPタンパク質は、アイソフォームに関わらず、原形質に存在する約110アミノ酸のN末端部分と、約20アミノ酸の膜貫通部分と、残るアミノ酸を含んでなる細胞外C末端部分とによって構成される。

上記のように、細胞外ドメインは切断され、分泌され得る。

結果的に、表現「細胞外ドメイン」は、細胞膜に依然として結合しておりその結果として組織中に見出される細胞外ドメインと、血液循環中に見出される循環性細胞外ドメイン(すなわち、切断及び分泌後の細胞外ドメイン)との両方を含む。

【0020】

「哺乳動物」とは、約5400種からなる脊椎動物に含まれる分類群を意味する。前記の種は、Wilson, D. E.及びReeder, D. M.(編), Mammal Species of the World, Johns Hopkins University Press, 16/11/2005に規定されている。

【0021】

したがって、本発明のインビトロアッセイ法の利点の1つは、哺乳動物におけるIRAPタンパク質の細胞外ドメイン、より具体的には：

- 血清又は血漿中を循環している細胞外ドメイン、又は
 - 組織(赤血球を含む)中で膜に結合している細胞外ドメイン
- の特異的アッセイを可能にするというものである。

【0022】

1つの有利な実施形態において、本発明は、IRAPタンパク質の細胞外ドメインであって、該IRAPタンパク質がそのアイソフォーム、特に配列番号1~3により規定されるアイソフォームの1つ又はその変形体、特に配列番号4~6により規定される変形体の1つに相当する、配列番号7~11で表される細胞外ドメインの使用に関する。

【0023】

IRAPタンパク質は、少なくとも3つのアイソフォーム(Swiss-Prot : Q9UIQ6 1、2及び3 ; それぞれ配列番号1~3で表される)並びにアイソフォーム1の幾つかの変形体 : それぞれ配列番号4~6で表される031616(S86P、86位でセリンがプロリンで置換)、012812(A763T、763位でアラニンがスレオニンで置換)及び031617(I963V ; 963位でイソロイシンがバリンに置換)で存在し得る。

【0024】

各アイソフォーム1~3の細胞外ドメインは、それぞれ配列番号7~9で表され、変形体031616、0128412及び031617の細胞外ドメインは、配列番号7、10及び11で表される。

本明細書を通じて、用語IRAPは、単独で使用することもあるが、そのアイソフォーム及び/又は変形体も含む。

【0025】

10

20

30

40

50

1つの有利な実施形態では、本発明は、上記のIRAPタンパク質及び/又は上記のその1つのアイソフォーム及び/又は上記のその1つの変形体の細胞外ドメインの、GLUT4グルコース輸送体又は関連タンパク質(IRAPを含む)の転位欠損に関連する病状のインビトロ診断及び/若しくは予後又はインビトロモニタリングのための使用に関する。

【0026】

「インビトロ診断」とは、故障、問題又は疾患の原因(起源)のインビトロ同定に至る推論を意味する。

「インビトロ予後」とは、疾患の重篤度及びその後の進展(転帰を含む)のインビトロ評価を意味する。

上記のように、IRAPはGLUT4グルコース輸送体と共存し、化学量論的にGLUT4と同時転位する。

【0027】

結果的に、血清若しくは血漿、赤血球又は組織中に存在する上記のIRAPタンパク質又はその1つのアイソフォーム若しくはその1つの変形体の濃度の測定により、転位が表され、したがってグルコースの輸送量が表される。

したがって、本発明のアッセイ法の別の利点は、グルコース輸送欠損の判定であり、その結果としての、病状の原因若しくは重篤度の同定又は病状及びその進展のモニタリングである。

【0028】

1つの有利な実施形態において、上記アッセイ法は、治療前後で得られるIRAPタンパク質細胞外ドメインの濃度を比較することによって、当該疾患に向けられた治療の評価を可能にする。

グルコース輸送欠損に関係する病状は、インスリン抵抗性、2型糖尿病、妊娠糖尿病であり得るがこれらに限定されない。1つのより有利な実施形態によれば、上記のIRAPタンパク質及び/又は上記のその1つのアイソフォーム及び/又は上記のその1つの変形体の細胞外ドメインの使用により、健常個体と比べてIRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の原形質膜での過剰発現及び/又はその原形質膜への転位の増加に関連する病状のインビトロ診断及び/又は予後或いは健常個体と比べて患者におけるIRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の過剰発現に関連する病状のインビトロモニタリングが可能になる。

【0029】

IRAPタンパク質の過剰発現及び/又はその原形質膜への転位の増加に関して、本発明のアッセイ法により患者で測定される分泌又は未分泌のIRAPタンパク質細胞外ドメインの濃度は、健常個体で得られる濃度より高い。このことはIRAPタンパク質の過剰発現を示している。

患者におけるIRAPタンパク質の過剰発現及び/又はその原形質膜への転位の増加に関連する病状のモニタリングに関して、本発明のアッセイ法により前記患者で治療中に測定したIRAPタンパク質細胞外ドメインの濃度が、治療前に測定したIRAPタンパク質細胞外ドメインの濃度に比べて減少していることにより、当該治療の効果の証明が可能になる。

【0030】

逆に、前記患者で治療中に測定したIRAPタンパク質細胞外ドメインの濃度が、治療前に測定した分泌又は未分泌のIRAPタンパク質細胞外ドメインの濃度に比べて増加又は安定していることは、当該治療が効果のないことを示す。このため、使用する用量又は活性物質の変更が可能になる。

結果として、上記分泌又は未分泌のIRAPタンパク質の濃度の最大値が患者で25%以上増加しているとき、個体において、IRAPタンパク質の原形質膜での過剰発現及び/又はその原形質膜への転位増加が存在すると考えられる。

【0031】

IRAPタンパク質の原形質膜での過剰発現及び/又はその原形質膜への転位の増加に関連する病状の例は、以下のものに限定されないが、増殖現象が関与する全ての疾患、特に癌

10

20

30

40

50

、網羅的ではないが例えば、卵巣腺癌、子宮内膜癌、絨毛上皮腫、膵臓癌、乳癌、前立腺癌、胃癌、直腸癌又は頭頸部癌である。

【0032】

より有利な実施形態によれば、上記IRAPタンパク質及び/又は上記のその1つのアイソフォーム及び/又は上記のその1つの変形体の細胞外ドメインの使用により、健常個体と比べてIRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の原形質膜での過少発現及び/又はその原形質膜への転位の減少に関連する病状のインビトロ診断及び/又は予後或いは患者におけるIRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の原形質膜での過少発現及び/又はその原形質膜への転位の減少に関連する病状のインビトロモニタリングが可能になる。

10

【0033】

IRAPタンパク質の原形質膜での過少発現及び/又はその原形質膜への転位の減少に関して、本発明のアッセイ法により患者で測定される分泌又は未分泌のIRAPタンパク質細胞外ドメインの濃度は、健常個体で得られる濃度より低い。このため、IRAPタンパク質の原形質膜での過少発現タンパク質及び/又はその原形質膜への転位の減少が示唆される。

患者におけるIRAPタンパク質の原形質膜での過少発現及び/又はその原形質膜への転位の減少に関連する病状のモニタリングに関して、本発明のアッセイ法により前記患者で治療中に測定したIRAPタンパク質細胞外ドメインの濃度が、治療前に測定したIRAPタンパク質細胞外ドメインの濃度に比べて増加していることにより、当該治療の効果の証明が可能になる。

20

【0034】

逆に、前記患者で治療中に測定したIRAPタンパク質細胞外ドメインの濃度が、治療前に測定したIRAPタンパク質細胞外ドメインの濃度に比べて減少又は安定していることは、当該治療が効果のないことを示す。このため、使用する用量又は活性物質の変更が可能になる。

上記IRAPタンパク質の濃度の最大値が25%以上減少しているとき、IRAPタンパク質の過少が存在すると考えられる。

【0035】

1つの有利な実施形態では、上記IRAPタンパク質及び/又は上記のその1つのアイソフォーム及び/又は上記のその1つの変形体の細胞外ドメインの使用により、抗癌剤に対する化学療法抵抗性のインビトロ診断及び/又は予後が可能になる。

30

用語「化学療法抵抗性」とは、抗癌剤での化学療法のための抗癌治療に対する感受性の減少又は完全な欠如を意味し、これは後天的又は先天的であり、抗癌治療の効果制限するか又は完全に消失させる。

【0036】

抗癌剤の例は、パクリタキセル(タキソール)、カルボプラチンなどであるが、これらに限定されない。

結果として、IRAP及び/又は上記のその1つのアイソフォーム及び/又は上記のその1つの変形体の細胞外ドメインのアッセイ(特に上記IRAPタンパク質の濃度の最大値が患者において25%以上増加しているとき、個体におけるIRAPタンパク質の原形質膜での過剰発現及び/又はその原形質膜への転位の増加を示す)により、化学療法に対する抵抗性の診断及び/又は予後が可能になる。

40

【0037】

1つの有利な実施形態によれば、上記IRAPタンパク質及び/又は上記のその1つのアイソフォーム及び/又は上記のその1つの変形体の細胞外ドメインの使用により、GLUT4グルコース輸送体の転位欠損、特にIRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体の過少発現に関連する病状(インスリン抵抗性、2型糖尿病、妊娠糖尿病に関連する病状のうちからのもの)のインビトロ診断及び/若しくは予後又はインビトロモニタリングが可能になる。

【0038】

50

インスリン抵抗性は、インスリンへの応答に際して感受性組織による不十分なグルコース取込みを導く。この疾患は、血中グルコースレベル(血糖)が正常値(絶食時110mg/dL及びグルコース75g摂取の2時間後140mg/dL)を超えると現れる2型糖尿病に進展する。この血中グルコースレベルの増加は膵臓を過剰刺激し、膵臓は血糖増加を補償するためインスリン分泌を増加させる。

【0039】

妊娠糖尿病は、糖尿病であることが以前には知られていなかった女性において妊娠の間に現れる、いずれかのグルコース不耐性状態(重篤度に関わらず)を表す。

子癇前症は、動脈性高血圧、蛋白尿及び浮腫を伴う体重増加の組合せによって特徴付けられる疾患である。

早期分娩のリスクは、子宮頸の短縮及び開口(妊娠36週目終了前の分娩を引き起こすことがある)を生じる子宮収縮により特徴付けられる。

【0040】

結果的に、本発明の別の利点は、組織及び血清、血漿又は赤血球の両方でGLUT4グルコース輸送体の転位欠損に関連する病状のインビトロ診断及び/若しくは予後又はインビトロモニタリングを可能にすることである。

【0041】

別の有利な実施形態によれば、上記IRAPタンパク質及び/又は上記のその1つのアイソフォーム及び/又は上記のその1つの変形体の細胞外ドメインの使用により、GLUT4グルコース輸送体の転位欠損に関連する病状、特に癌、特に卵巣腺癌、子宮内膜癌、絨毛上皮腫、膵臓癌、乳癌、前立腺癌、胃癌、直腸癌又は頭頸部癌のようなIRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体が過剰発現する癌、自己免疫疾患又は炎症性疾患のインビトロ診断及び/若しくは予後又はインビトロモニタリングが可能になる。

【0042】

絨毛上皮腫は、絨毛膜絨毛が完全に消失した、細胞栄養層及び合胞体栄養層の細胞エレメントの並置により構成される高度に悪性の腫瘍である。

1つの有利な実施形態では、本発明の方法による文献WO 2005/038462で言及された癌の検出は、血清中で、また血漿中又は赤血球上でも行われる。

自己免疫疾患とは、その生物中に通常存在する物質又は組織に対する免疫系の活動亢進に起因する疾患、例えば自己免疫性甲状腺炎、慢性関節リウマチ、強直性脊椎炎、グジュローシェーグレン症候群を意味する。

【0043】

炎症性疾患の例は、限定されないが、以下のものである：

慢性関節リウマチ、エリテマトーデス、シェーグレン症候群、強皮症(全身性硬化症)、皮膚筋炎、多発性筋炎、リウマチ性多発性筋痛、変形性関節症、化膿性関節炎、痛風、偽痛風、脊椎関節症、強直性脊椎炎、ライター症候群、乾癬性関節症、腸疾患に基づく脊椎炎(spondylite enteropathique)、反応性関節症(arthropathie reactive)、クローン病、サルコイドーシスなど。

【0044】

抗癌剤での治療に関して、IRAPは、アポトーシス促進因子の発現を阻害すること及びアポトーシス阻害因子の発現を増加させることによって、これら医薬に対する感受性を減少させる(Kondoら, Int. J. Cancer: 118, 1390-1394, 2006)。

【0045】

より有利な実施形態によれば、上記IRAPタンパク質及び/又は上記のその1つのアイソフォーム及び/又は上記のその1つの変形体の細胞外ドメインを用いるインビトロアッセイの実施は、抗体を使用して行う。

用語「抗体」は、IRAPタンパク質の1つのアイソフォームの細胞外ドメインに特異的なポリクローナル又はモノクローナルの抗体を指称するために使用し、IRAPタンパク質の細胞外ドメインに特異的なモノクローナル抗体を模倣するフラグメント又は分子、特にエピトープに結合するフラグメントもまた含む。

10

20

30

40

50

フラグメント又分子は、モノクローナル抗体から、組換えDNA技術又は酵素的若しくは化学的方法により誘導することができ、抗原フラグメントに関するモノクローナル抗体の結合特性に類似する結合特性を有し得る。

【0046】

本発明の抗体は、完全長の上記抗体並びに該抗体のエピトープ結合性フラグメントの両方を含む。以下で使用するように、表現「抗体フラグメント」は、完全長の抗体により認識されるエピトープに結合する能力を保持する抗体の任意の部分を含み、一般に、「エピトープ結合性フラグメント」と呼ばれる。

抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'及びF(ab')₂、Fd、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィドブリッジで連結されたFv及びVL又はVH領域のいずれかを含んでなるフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。エピトープ結合性フラグメント(単鎖抗体を含む)は、可変領域を単独で又は以下のエレメントの全て若しくは一部との組合せで含んでなることができる：ヒンジ領域、CH1、CH2及びCH3ドメイン。

【0047】

これらフラグメントは、Fabフラグメントの一方若しくは両方又はF(ab')₂フラグメントを含有することができる。更に、フラグメントは、以下の免疫グロブリンカテゴリーのいずれかのメンバーであるか又は該メンバーを組合せることができる：IgG、IgM、IgA、IgD又はIgE及びそれらのサブクラス。

Fab及びF(ab')₂フラグメントは、酵素、例えばパバイン(Fabフラグメント)又はペプシン(F(ab')₂フラグメント)を使用するタンパク質分解性切断により製造することができる。

【0048】

本発明の抗体は、細胞融合によりハイブリドーマを製造するための動物の免疫及び脾臓細胞の回収を含んでなる従来方法を使用して製造することができる。本発明の抗体は、有利には、モノクローナル抗体の混合物の形態で使用することができる。

1つの有利な実施形態によれば、上記抗体はポリクローナル抗体である。

【0049】

「ポリクローナル抗体」とは、異なる複数のBリンパ球細胞株を起源とする抗体を意味する。

1つの有利な実施形態では、上記ポリクローナル抗体は、インスリン抵抗性又は癌に関しては哺乳動物、特にヒトからの血清、血漿又は赤血球中、或いはインスリン抵抗性に関しては哺乳動物からの組織中の上記IRAPタンパク質及び/又は上記のその1つのアイソフォーム及び/若しくは変形体の濃度のインビトロアッセイ法を実施するために使用する。

【0050】

別の有利な実施形態によれば、上記抗体はモノクローナル抗体である。

「モノクローナル抗体」とは、単一細胞クローン、すなわちハイブリドーマを起源とする抗体を意味する。

1つの有利な実施形態では、上記モノクローナル抗体は、インスリン抵抗性又は癌に関しては哺乳動物、特にヒトからの血清、血漿、赤血球又は組織中の上記IRAPタンパク質及び/又は上記のその1つのアイソフォーム及び/又はその1つの変形体の濃度のインビトロアッセイ法を実施するために使用する。

【0051】

1つの有利な実施形態によれば、上記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。

「ハイブリドーマ」とは、抗体を継続的に産生する融合細胞、すなわち無限に再生産することができる、哺乳動物の細胞と融合している腫瘍細胞を意味する。

【0052】

別の観点によれば、本発明は、IRAP(インスリン応答性アミノペプチダーゼ)タンパク質及び/又はそのアイソフォーム、特に配列番号1~3により規定されるアイソフォームの1つ及び/又はその変形体、特に配列番号4~6により規定される変形体の1つの循環性

10

20

30

40

50

細胞外ドメイン(配列番号7~11の配列で規定される)又は該細胞外ドメインの1つのエピトープを特異的に認識する抗体に関する。

【0053】

したがって、本発明の利点の1つは、IRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/又はその1つの変形体の細胞外ドメイン又は1つのエピトープに特異的な抗体、すなわち細胞外ドメインが細胞の原形質膜に依然として結合しているか又はADAMファミリー、特にADAM9及びADAM12に属するか若しくは属さないメタロプロテナーゼにより切断されており、よって循環しているかに関わらず、前記細胞外ドメイン又はその1つのエピトープを特異的に認識し、膜貫通部分も細胞内部分も認識しない抗体を提供することである。

10

【0054】

結果として、本発明の抗体は、GLUT4トランスポーターとの同時転位後の前記細胞外ドメイン又はその1つのエピトープを特異的に認識し、したがってGLUT4グルコース輸送体又は関連タンパク質の転位の欠損に関連する病状のインビトロ診断及び/若しくは予後法又はインビトロモニタリング法を可能にする。

【0055】

1つの有利な実施形態では、上記抗体は、医薬として、特に増殖性症候群及び癌、特にIRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/若しくは変形体が過剰発現し及び/又はその原形質膜への転位が増加するもの、例えば、卵巣腺癌、子宮内膜癌、絨毛上皮腫、膵臓癌、乳癌、前立腺癌、胃癌、直腸癌又は頭頸部癌、自己免疫疾患又は炎症性疾患の治療或いは化学療法に対する抵抗性の処置のための医薬として使用する。

20

【0056】

本発明の抗体での、IRAPの原形質膜での発現及び/又はその原形質膜への転位の減少、すなわち正常に近い血清又は組織中濃度(すなわち癌病状の出現前の濃度)への復帰又はその活性の部分的若しくは全体的阻害により、癌の治療が可能になる。

同様に、IRAPタンパク質は上記のように抗癌剤に対する感受性の減少に関与するので、本発明の抗体により、IRAP濃度の減少又はその活性及び/又は原形質膜への転位の部分的若しくは完全な阻害が可能になり、したがって抗癌剤に対する感受性の減少をなくすることができる。このため、化学療法に対する抵抗性の処置及び結果的に抗癌剤の効果の向上が導かれる。

30

【0057】

1つの有利な実施形態によれば、上記抗体はポリクローナル抗体である。

1つの有利な実施形態によれば、上記抗体はモノクローナル抗体である。

【0058】

本発明の別の有利な実施形態は、以下から選択する上記モノクローナル抗体に関する：

- CNCM(Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, Paris, France)に2009年7月2日、アクセス番号CNCM I-4181で寄託されたハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体、
- CNCMに2009年7月2日、アクセス番号CNCM I-4182で寄託されたハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体、
- CNCMに2009年7月2日、アクセス番号CNCM I-4183で寄託されたハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体、
- CNCMに2009年7月2日、アクセス番号CNCM I-4184で寄託されたハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体、及び
- CNCMに2009年7月2日、アクセス番号CNCM I-4185で寄託されたハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体。

40

【0059】

以下、モノクローナル抗体No. CNCM I-4181は抗体17H10-3H5-3D8若しくは抗体17H10とも、モノクローナル抗体No. CNCM I-4182は抗体14A4-3H9-2B6若しくは抗体14A4とも、モノクローナル抗体No. CNCM I-4183は抗体4G6-3B6若しくは抗体4G6とも、モノクローナル

50

抗体No. CNCM 1-4184は抗体38E1-2G4-3A2若しくは抗体38E1とも、モノクローナル抗体No. CNCM 1-4185は抗体40C10-2G8若しくは抗体40C10とも呼ぶ。

【0060】

1つの有利な実施形態によれば、モノクローナル抗体は、放射性核種、蛍光体、量子ドット、酵素標識、酵素基質、酵素補助因子、酵素阻害剤又はハプテンから選択した化合物で標識する。

試験で使用する特定の標識又は検出可能基は、一般的には、アッセイに使用する抗体の特異的結合を妨げない限り、本発明の重要な観点ではない。検出可能基は、検出可能な物理的又は化学的性質を有する任意の物質であり得る。このような検出可能な標識は、免疫学的アッセイの分野で十分に開発されており、一般には、本発明の方法に適用可能な方法

10

【0061】

よって、標識は、分光光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、放射線学的技術又は化学的手段により検出可能な任意の組成物である。本発明で有用な標識としては、磁性ビーズ(例えばDynabeads™)、蛍光色素(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミン)、放射活性標識した標識(例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C又は³²P)、酵素(例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びELISA試験で一般に使用する他のもの)及び比色標識、例えば、コロイド金、着色ガラス又はプラスチックビーズ(例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど)及び量子ドットが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0062】

標識は、当該分野において周知の方法に従って、所望の試験エレメントに直接又は間接にカップリングすることができる。上記のように、広範な標識が使用でき、標識の選択は、必要な感受性、化合物との接合の容易さ、安定性要件、利用可能な測定器具及び消失条件に依存する。放射活性標識は、しばしば、間接的手段により付着する。

【0063】

通例、リガンド分子(例えばビオチン)を抗体に共有結合させる。その後、リガンドを、本来的に検出可能であるか又はシグナル系(例えば検出可能な酵素、蛍光化合物又は化学発光化合物)に共有結合している抗-リガンド(例えばストレプトアビジン)分子に結合させる。幾つかのリガンド及び抗-リガンドが使用可能である。リガンドは、天然に存在する抗-リガンド、例えばビオチン、チロキシン及びコルチゾールであるとき、標識した天然に存在する抗-リガンドとの組合せで使用することができる。或いは、ハプテン性又は抗原性の化合物を抗体との組合せで使用することができる。

30

【0064】

抗体はまた、例えば酵素又は蛍光体との接合により、シグナル発生化合物に直接接合することができる。標識として使用する、関心を引く酵素は、主に加水分解酵素、特にホスファターゼ、エステラーゼ及びグリコシダーゼ、又はオキシドレダクターゼ、特にペルオキシダーゼである。

蛍光化合物としては、フルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロンなどが挙げられる。化学発光化合物としては、ルシフェリン及び2,3-ジヒドロフタラジンジオン(例えばルミノール)及び量子ドットが挙げられる。標識又は他のシグナル生成系の概説は、米国特許第4,391,904号で入手可能である。

40

【0065】

標識を検出する手段は当該分野において周知である。よって、例えば、標識が放射活性標識であるとき、検出手段としては、若しくはシンチレーションカウンター又は例えばオートラジオグラフィ用フィルムのような写真フィルムが挙げられる。標識は、蛍光標識であるときは、適切な光又はレーザ波長で蛍光色素を励起し、生じる蛍光を検出することによって検出することができる。蛍光は、写真フィルム、電子検出器(例えば、電荷結合素子(CCD)又は光電子増倍管)の使用などにより視覚的に検出することができる。

同様に、酵素標識は、該酵素に適切な基質を提供し、生じる反応産物を検出することに

50

より検出することができる。最後に、単純な比色標識は、標識に関連する色を観察することによって直接検出することができる。

【0066】

1つの有利な実施形態によれば、上記モノクローナル抗体はヒト化抗体である。

「ヒト化抗体」とは、マウス抗体の最小限の部分がヒト抗体に組み込まれている遺伝子改変抗体を意味する；一般に、ヒト化抗体は、5～10%のマウス抗体及び90～95%のヒト抗体を含んでなる。

ヒト化抗体は、マウス又はキメラ抗体の使用で観察されるHAMA(ヒト抗-マウス抗体)及びHACA(ヒト抗-キメラ抗体)応答をブロックするという利点を有する。ヒト化抗体に対するヒト免疫系の応答は最小限にしか示されないか又は全く示されない。

10

【0067】

別の観点によれば、本発明は、上記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。

本発明の別の有利な観点は、下記から選択する上記ハイブリドーマに関する：

- CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM 1-4181で寄託されたハイブリドーマ、
- CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM 1-4182で寄託されたハイブリドーマ、
- CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM 1-4183で寄託されたハイブリドーマ、
- CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM 1-4184で寄託されたハイブリドーマ、及び
- CNCMに2009年7月2日、アクセッション番号CNCM 1-4185で寄託されたハイブリドーマ。

20

これらハイブリドーマの製造は実施例に記載されている。

【0068】

別の観点によれば、本発明は、哺乳動物の血清、血漿、赤血球又は組織中のIRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/若しくはその1つの変形体の細胞外ドメインの濃度を測定する工程を含んでなる、哺乳動物におけるIRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/若しくはその1つの変形体の濃度のインビトロアッセイ法に関する。

30

【0069】

したがって、本発明の方法により、GLUT4グルコース輸送体との同時転位後のIRAPタンパク質細胞外ドメインの特異的アッセイが可能になり、よって関連する病状の原因であるIRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/若しくはその1つの変形体の過剰発現若しくは過少発現及び/又はその転位の増加若しくは減少を測定することが可能になる。

【0070】

請求項18に記載のアッセイ法では、アッセイは、酵素抗体法若しくは免疫組織化学法又はRIA若しくはIRMAにより実施する。

40

IRAPタンパク質の細胞外ドメインのアッセイは、酵素抗体アッセイ(実施例3)、又は免疫組織化学アッセイ(実施例4)、RIA(ラジオイムノアッセイ)若しくはIRMA(免疫放射線アッセイ)により行うことができる。後者の場合、アッセイは、ヨウ素125又は他の任意の適切な放射性同位体で標識した、抗体若しくはタンパク質又はそれらのフラグメントを用いて行う。

【0071】

別の観点によれば、本発明は、インスリン抵抗性並びに2型糖尿病、妊娠糖尿病、妊娠誘発性高血圧(子癩前症)、早期分娩のリスクに関連する病状のインビトロ診断法に関し、該方法は、以下の工程を含んでなる：

- a. 哺乳動物において、上記抗体を用いて、IRAPタンパク質の循環性細胞外ドメイン(

50

すなわち、赤血球の原形質膜で発現するもの)及び/又はその1つのアイソフォーム及び/若しくはその1つの変形体の濃度をインビトロ測定する工程、

b. 工程 a. で得られた濃度を健常哺乳動物でインビトロで得られた濃度と比較する工程、

c. 工程 a. で得られた濃度が工程 b. の濃度より低いとき、哺乳動物はインスリン抵抗性を有しているという事実を工程 b. から推論する工程。

【0072】

したがって、本発明の別の利点は、IRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/若しくはその1つの変形体が過少発現している病状のインビトロ診断及び/若しくは予後法又はインビトロモニタリング法を提供することである。

10

【0073】

別の観点によれば、本発明は、癌を含む増殖性症候群、特にIRAP及び/又はその1つのアイソフォーム及び/若しくはその1つの変形体が過剰発現し及び/又はその原形質膜への転位が増加するもの、例えば、卵巣腺癌、又は自己免疫若しくは炎症性疾患、又は化学療法に対する抵抗性に関連する病状のインビトロ診断法に関し、該方法は、以下の工程を含んでなる：

a. 哺乳動物において、上記抗体を用いて、IRAPタンパク質の循環性細胞外ドメイン(すなわち、赤血球の原形質膜で発現するもの)及び/又はその1つのアイソフォーム及び/若しくはその1つの変形体の濃度をインビトロ測定する工程、

b. 工程 a. で得られた濃度をコントロール哺乳動物でインビトロで得られた濃度と比較する工程、

20

c. 工程 a. で得られる濃度が工程 b. の濃度より高いとき、哺乳動物は癌を有しているという事実を、工程 b. から推論する工程。

【0074】

したがって、本発明の別の利点は、IRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/若しくはその1つの変形体が過剰発現しているか又はその原形質膜への転位が増加している病状のインビトロ診断及び/若しくは予後法又はインビトロモニタリング法を提供することである。

【0075】

更に別の観点によれば、本発明は、哺乳動物におけるIRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/若しくは変形体の循環性細胞外ドメインの濃度のインビトロ測定のためのキットであって、少なくとも1つの緩衝液及び少なくとも1つの上記抗体を含んでなるキットに関する。

30

1つの好ましい実施形態では、上記キットはまた、IRAPタンパク質の基質及び抗体により認識されるペプチド又はIRAPのフラグメントを含んでなる。

基質の例は、L-ロイシン-ニトロアニリド、バソプレッシン、オキシトシン、メト-エンケファリンなどであるが、これらに限定されない。

「抗体により認識されるペプチド」とは、抗体により認識される、組換えIRAPタンパク質又はそのフラグメントを意味する。

【0076】

40

別の観点によれば、本発明は、癌、特にIRAP及び/又はその1つのアイソフォーム及び/若しくはその1つの変形体が過剰発現しているか又はその原形質膜への転位が増大しているもの、例えば、卵巣腺癌、又は自己免疫若しくは炎症性疾患、又は化学療法に対する抵抗性に関連する病状のインビトロ診断法に関し、該方法は、以下の工程を含んでなる：

a. 上記モノクローナル抗体の少なくとも1つ、優先的には上記モノクローナル抗体の2つ、特に抗体17H10及び4G6又は40C10を使用して、哺乳動物においてIRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/若しくはその1つの変形体の循環性細胞外ドメインの濃度をインビトロ測定する工程、

b. 工程 a. で得られた濃度をコントロール哺乳動物でインビトロで得られた濃度と比較する工程、

50

c. 工程 a. で得られた濃度が工程 b. の濃度より高いとき、哺乳動物は癌を有しているという事実を工程 b. から推論する工程。

【0077】

別の観点によれば、本発明は、インスリン抵抗性及び2型糖尿病、妊娠糖尿病、妊娠誘発性高血圧(子癇前症)、早期分娩のリスクに関連する病状のインビトロ診断法に関し、該方法は以下の工程を含んでなる：

a. 上記モノクローナル抗体の少なくとも1つ、優先的には上記モノクローナル抗体の2つ、特に抗体17H10及び4G6又は40C10を使用して、哺乳動物において、IRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/若しくはその1つの変形体の循環性細胞外ドメインの濃度をインビトロ測定する工程、

10

b. 工程 a. で得られた濃度を健常哺乳動物でインビトロで得られた濃度と比較する工程、

c. 工程 a. で得られた濃度が工程 b. の濃度より低いとき、哺乳動物はインスリン抵抗性を有しているという事実を、工程 b. から推論する工程。

【0078】

以下の図及び実施例は本発明をよりよく説明するが、本発明の範囲を限定するものではない。

【0079】

図1A~Eは、IRAPタンパク質に関するモノクローナル抗体17H10、14A4、4G6、38E1、40C10のアフィニティーの測定に対応するグラフを表す。

20

図1Aは、抗体4G6の濃度の関数として、IRAPタンパク質()又はIRAP His()の検出を測定したグラフを示す。

図1Bは、抗体14H4の濃度の関数として、IRAPタンパク質()又はIRAP His(X)の検出を測定したグラフを示す。

【0080】

図1Cは、抗体17H10の濃度の関数として、IRAPタンパク質()又はIRAP His(*)の検出を測定したグラフを示す。

図1Dは、抗体38E1の濃度の関数として、IRAPタンパク質(+)又はIRAP His(-)の検出を測定したグラフを示す。

図1Eは、抗体40C10の濃度の関数として、IRAPタンパク質()又はIRAP His(--)の検出を測定したグラフを示す。

30

【0081】

図2は、モノクローナル抗体17H10を捕捉抗体として使用し、モノクローナル抗体4G6を検出抗体として使用したELISAにおけるIRAPの検出についての用量-応答曲線を表す。()は組換えIRAPのアッセイを表し、()は妊娠女性の血清中のIRAPのアッセイを表し、()は男性の血清中のIRAPのアッセイを表す。

【0082】

図3は、モノクローナル抗体17H10を捕捉抗体として使用し、モノクローナル抗体40C10を検出抗体として使用したELISAにおけるIRAPの検出についての飽和用量曲線を表す。()は組換えIRAPのアッセイを表し、()は、妊娠女性の血清中に希釈した組換えIRAPのアッセイを表し、()は男性の血清中に希釈した組換えIRAPのアッセイを表す。

40

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】IRAPタンパク質に関するモノクローナル抗体17H10、14A4、4G6、38E1、40C10のアフィニティーの測定に対応するグラフを表す。

【図2】モノクローナル抗体17H10を捕捉抗体として使用し、モノクローナル抗体4G6を検出抗体として使用したELISAにおけるIRAPの検出についての用量-応答曲線を表す。

【図3】モノクローナル抗体17H10を捕捉抗体として使用し、モノクローナル抗体40C10を検出抗体として使用したELISAにおけるIRAPの検出についての飽和用量曲線を表す。

【実施例】

50

【 0 0 8 4 】

実施例

実施例 1 : IRAPタンパク質の製造

1 . クローニング :

昆虫ペプチドシグナル及びTEVプロテアーゼで切断可能なN末端6ヒスチジンタグに融合したIRAPの細胞外ドメインをコードする配列を含有する発現ベクターを構築し、Swiss-Protデータベース(Q9UIQ6)中の配列(pGTPb302-mel-His-Tev-PLAPextra, reference C640-CAP-06)との一致を配列決定により検証した。

組換えバクミド(bacmid)を製造し、作製したバクミド中での発現カセットの存在をPCRによりチェックした。

10

【 0 0 8 5 】

バクミドのSf9昆虫細胞株中へのトランスフェクションにより、組換えウイルスを作製した。

ウイルス増幅後、第2世代ウイルスをアッセイし、昆虫/バキュロウイルス細胞系における一連の発現試験に使用した。

【 0 0 8 6 】

2 . IRAP又はその1つのアイソフォーム若しくはその1つの変形体の循環性細胞外配列の発現及び精製。3つの異なる方法を使用することができる :

- 第1の方法 : 適切なE. coli株によりIRAPタンパク質又はその1つのアイソフォームを発現。次いで、分泌されたIRAPタンパク質又はその1つのアイソフォームをNi⁺⁺又はCo⁺⁺マトリクス上でのアフィニティーにより精製する。

20

最後に、ポリ-His配列を、特異的プロテアーゼを用いて切断する。

【 0 0 8 7 】

- 第2の方法 : バキュロウイルスにおける改変cDNAのクローニング後に、Sf9昆虫細胞によりIRAPタンパク質又はその1つのアイソフォーム若しくはその1つの変形体を発現。 : 発現試験は、2つの細胞株Sf9及びHighFiveにおいて、MOI(感染多重度)並びに感染の持続時間を変化させることにより行った。発現試験の分析は、感染の24、48及び72時間に採取した培養上清のサンプルについて抗Hisウェスタンブロットにより行った。最も生産性の高い条件は感染の48時間であった(HighFive MOI 0.1)。

次いで、分泌されたIRAPタンパク質又はその1つのアイソフォーム若しくはその1つの変形体を、Ni⁺⁺又はCo⁺⁺マトリクス上でのアフィニティーにより精製する。最後に、ポリ-His配列を、特異的プロテアーゼを用いて切断する。

30

【 0 0 8 8 】

実施例 2 : モノクローナル抗体の産生

一般的ポイント

プロトコルはハイブリドーマ技術(Kohler and Milstein protocol, 1976)に由来し、5つの工程に分割される :

- 工程 1 - 免疫 : IRAPのアイソフォーム又はその1つの変形体の細胞外部分に共通する特異配列に対応する幾つかのペプチドをマウスへ皮下注射。これらペプチド配列は、哺乳動物の他のアミノペプチダーゼ中には見出されない。

40

精製組換えIRAPタンパク質又はその1つのアイソフォームに対して抗血清をELISAにより試験する。応答するマウスの脾臓をハイブリドーマの作製に使用する。次いで、ハイブリドーマにより産生された抗体を、IRAPタンパク質又はその1つのアイソフォーム並びに妊娠及び非妊娠女性の血清に対してELISAにより再試験する。

【 0 0 8 9 】

- 工程 2 - 融合 : 脾臓細胞を取り出し、これら細胞をミエローマ細胞とポリエチレングリコール(化学融合剤)の存在下で融合させる。各ウェルが平均して1未満のハイブリッド細胞を含有するような希釈率でマイクロプレートウェルに混合物を分配する。ハイブリッド細胞のみ増殖し生存する一方、骨髄腫細胞及び脾臓の非融合形質細胞は急速に死滅する選択培地中で細胞を培養。

50

【0090】

- 工程3 - スクリーニング：各ウェル中での、組換えIRAPタンパク質又はその1つのアイソフォーム若しくはその1つの変形体を指向する抗体を探索。
- 工程4 - クローニング及び特徴付け：細胞クローンを得るために抗体産生ハイブリッド細胞を継代培養。液体窒素中で各クローンのコピーを保存。作製された抗体をイソタイプ決定。

【0091】

- 工程5 - 培養及び産生：抗-IRAP又はその1つのアイソフォーム若しくはその1つの変形体抗体を産生させるためにハイブリドーマを培養する2つの可能な方法：
 - o 細胞をインビトロ培養(培養培地中で抗体を産生)
 - o マウス腹腔内への細胞の注射によるインビボ培養。これにより、注射域での腫瘍、炎症及び腹水産生の出現が引き起こされる。抗体を含有する腹水を採取(1~10mg/mL)。

【0092】

特異的ハイブリドーマ

1 - 免疫

6匹の雌性OF1 Charles Riverマウス(18~20g)に、配列番号7~11のペプチドの混合物を、静脈内及び皮下注射により免疫した。5つのペプチドは、フロイント完全アジュバントの存在下で、KLH(キーホールリンペットヘモシアニン)にカップリングさせた。3匹のマウス(マウス1~3)には50 μ gのペプチド混合物を注射し、2匹のマウス(マウス4及び5)には15 μ gのペプチド混合物を注射した。

第1の注射の3週間後、マウスに、フロイント不完全アジュバントの存在下に2つのペプチドの混合物を再注射した(第1の追加免疫)。

第2の注射の3週間後、マウスに、フロイント不完全アジュバントの存在下に2つのペプチドの混合物を再注射した(第2の追加免疫)。

【0093】

第1の注射の1ヵ月後、注射したマウスの血清サンプルを採取し、配列番号7~11のペプチドに対する抗体の存在について血清を試験した。

全てのマウスの血清が、少なくとも1つのペプチドを認識する抗体を有していた。よって全ての血清を保存した。

血清試験の10日後、3匹のマウスに、20 μ gのペプチド混合物を、腹腔内及び静脈内に追加免疫した。追加免疫の3日後に、脾臓を取り出した。

血清試験の1ヵ月後、残る3匹のマウスに、15 μ gのペプチド混合物を、腹腔内及び静脈内に追加免疫した。追加免疫の3日後に、脾臓を取り出した。

【0094】

2 - 細胞融合

マウスを放血させ、DMEMで滅菌様式に脾臓を取り出した。脾臓を破碎し、グリッドを通して濾過した。

並行して、マウスの腹腔をDMEMで洗浄し、マクロファージを含むDMEMを回収した。マクロファージをMalassez cell中で計数し、以下の培地中に10⁴マクロファージ/mlの溶液を調製した：DMEM HAT 20% FCS ATB (DMEM、4mMグルタミン、HAT(ヒポキサンチン100 μ M、アミノプテリン0.4 μ M、チミジン16 μ M)、20%補体除去胎仔ウシ血清、1%抗生物質(ペニシリン/ストレプトマイシン))。

【0095】

次いで、得られた脾臓細胞をDMEMで3回洗浄した。

並行して、BalB/c Sp2/O Ag14マウスのミエローマ細胞(ATCC No. CRL 1581)をDMEM中で3回洗浄する。

脾臓細胞及びミエローマ細胞を5/1の脾臓細胞/ミエローマ比で混合し、244gで7分間遠心分離した。

上清を取り出し、1mlのPEG(37に加熱した、ポリエチレングリコール(MW1500)の40%溶液)を添加した。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 6 】

細胞を800rpm(108 g)で12分間遠心分離し、10mlの以下の培地DMEM HAT 20% FCS(DMEM、4 mMグルタミン、HAT(ヒポキサンチン100 μM、アミノプテリン0.4 μM、チミジン16 μM)、20%補体除去胎仔ウシ血清)をゆっくりと加えた。

細胞を1200rpm(244 g)で7分間遠心分離し、上清を取り出し、容量 v のDMEM HAT 20% FCS培地を加え、

$$v(\text{ml}) = \text{脾臓細胞の数} / 10^7 (\text{すなわち} 10^7 \text{細胞/ml})$$

となるようにペレット化した。試験管を周囲温度にて1時間放置した後、注意深く倒置して細胞を再懸濁させた。

【 0 0 9 7 】

100 μl/ウェルの溶液を10⁴マクロファージ/mlで96-ウェルプレートに加え、次いで100 μl/ウェルの融合細胞を以下の希釈率で加えた：

希釈率1/10：10⁵脾臓細胞/ウェルで3プレート

希釈率1/20：5 × 10⁴脾臓細胞/ウェルで5プレート(2 × 50ml)

希釈率1/40：2.5 × 10⁴脾臓細胞/ウェルで2プレート

プレートを37、5% CO₂のオープン中に10日間置いた。

【 0 0 9 8 】

3 - ハイブリドーマの選択

10日間の融合産物の培養後、2つの選択試験を行う：

- 試験1：細胞がコンフルエンスに達したウェルを分析する：

- 最初の3匹のマウスの脾臓細胞を起源とする融合物については、1017ウェルを分析し、

- 最後の3匹のマウスの脾臓細胞を起源とする融合物については、714ウェルを分析した。

これらウェルの各々から100 μlの上清を取り出し、ELISA試験を用いて上清を試験し、配列番号7～11の1以上のペプチドに対する抗体を検出した(抗-IRAPハイブリドーマの上清のスクリーニングを参照)。

【 0 0 9 9 】

ELISA試験後、選択した細胞(配列番号7～11の1以上のペプチドに対する抗体を分泌する細胞)を、24-ウェルプレートのウェル中0.4mlの培地に配置した。

細胞が増殖し始めたら(24～48時間)、1mlの培地：15% DMEM HAT FCS 1% HCF ATB(DMEM、4 mMグルタミン、HAT(ヒポキサンチン100 μM、アミノプテリン0.4 μM、チミジン16 μM)、15%補体除去胎仔ウシ血清、1% HCF(ハイブリドーマクローニングファクターマクロファージ-様起源)、1%抗生物質(ペニシリン/ストレプトマイシン))を添加した。

111クローンを同様に選択して凍結させた

【 0 1 0 0 】

- 試験2：試験1により選択された111クローンを起源とする細胞がコンフルエンスに達したウェルを分析した：

- 最初の3匹のマウスの脾臓細胞を起源とする融合物については、24-ウェルプレートの39ウェルを分析し、

- 最後の3匹のマウスの脾臓細胞を起源とする融合物については、24-ウェルプレートの72ウェルを分析した。

【 0 1 0 1 】

これらウェルの各々から100 μlの上清を取り出し、ELISA検査を用いて上清を試験し、IRAPの分泌ドメインに対する抗体を検出した(抗-IRAPハイブリドーマの上清のスクリーニングを参照)。

23クローンを同様に選択して凍結させた。

【 0 1 0 2 】

4 - 抗-IRAPハイブリドーマの上清のスクリーニング

使用した抗原(Ag)：KLH-ペプチド 配列番号7～11(第1のスクリーニング)及びHigh Fi

10

20

30

40

50

ve昆虫細胞で発現した組換えIRAPの分泌ドメイン(第2のスクリーニング)。

【0103】

【表1】

工程	条件	
コーティング (Agの吸着.) Agの濃度 緩衝液 容量/ウェル インキュベーション	96-ウェルプレート (Maxisorp, Nunc) 1 μ g/ml PBS 50 μ l 周囲温度で一晩	10
洗浄×1	PBS - 0.05% (v/v) Tween 20	
飽和 緩衝液 容量/ウェル インキュベーション	PBS-ミルク 2.5% (w/v) 150 μ l 25°Cで1時間	
洗浄×1	PBS - 0.05% (v/v) Tween 20	20
試験すべき抗体 予備培養物の上清 容量/ウェル インキュベーション	50 μ l 25°Cで2時間	
洗浄×3	PBS - 0.05% (v/v) Tween 20	
二次抗体 (ペルオキシダーゼ接合) 希釈率 緩衝液 容量/ウェル インキュベーション	抗-IgG及びIgM (115-036-044, Jackson) 1/10,000 PBS-0.05% (v/v) Tween 20-0.5% (w/v) BSA 50 μ l 25°Cで1時間	30
洗浄×3	PBS - 0.05% (v/v) Tween 20	
可視化 試薬 容量/ウェル インキュベーション	テトラメチルベンジジン(50-76-05, KPL, Inc.) 50 μ l 10 min	40
反応の停止 容量	H ₂ SO ₄ 1M (S1526, Sigma) 50 μ l	

【0104】

5 - 抗体のイソタイプ決定

抗体のイソタイプを、SouthernBiotech SBA Clonotyping System/HRPキット(Cliniscience, Montrouge, France)を用いて下記のように決定した：

【 0 1 0 5 】

1. プレートのコーティング

マウス抗-免疫グロブリン抗体を 5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に希釈する。ウェルあたり 50 μl を堆積させ、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間又は周囲温度で 16 時間インキュベートする。

2. 洗浄

200 μl /ウェルの PBS-Tween20 0.05% (v/v) で 1 回リンスする。

3. ブロッキング

各ウェルに 150 μl の PBS-乳 2.5% (w/v) を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートする。

4. 洗浄

PBS-Tween20 0.05% (v/v) 緩衝液で 1 回リンスする。

10

5. 試験する抗体サンプルの準備

ハイブリドーマ培養上清を PBS-Tween20 0.05% (v/v) -BSA 0.5% (w/v) で 1/10 に希釈する。ウェルあたり 50 μl を堆積させ、周囲温度で 2 時間インキュベートする。

【 0 1 0 6 】

6. 洗浄

PBS-Tween20 0.05% (v/v) 緩衝液で 3 回リンスする。

7. 二次抗体

50 μl /ウェルのペルオキシダーゼ (HRP) に接合した抗-マウス IgA、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 又は IgM 抗体 (PBS-Tween20 0.05% (v/v) -BSA 0.5% (w/v) で 1/2000 に希釈) を堆積し、周囲温度で 1 時間インキュベートする。

20

8. 洗浄

PBS-Tween20 0.05% (v/v) 緩衝液で 3 回リンスする。

9. 基質との反応

50 μl /ウェルのテトラメチルベンジジン (KPL, Inc.) を堆積させ、プレートを周囲温度で 10 分間インキュベートする。

10. 反応の停止

50 μl の H_2SO_4 を各ウェルに加え、450nm での吸光度をマイクロプレートリーダー (Dyner) で読み取る。

【 0 1 0 7 】

6 - 結果

30

図 1A ~ E に示されるように、配列番号 7 ~ 11 のペプチドの 1 つ及び組換え IRAP の分泌ドメインに関して優秀なアフィニティーのために、5 つのハイブリドーマを保存した：17H10、14A4、4G6、38E1、40C10。

1 mg/mL の IRAP 又は 2 mg/mL の 6 His タグを付した IRAP を固相化したプレート上で、抗体 17H10、14A4、4G6、38E1、40C10 の各々を ELISA により試験した。抗体をプレート中でインキュベートし、モノクローナル抗体の定常部分を認識するペルオキシダーゼ (HRP) カップリング二次抗体を用いて検出を可視化した。標識 IRAP-モノクローナル抗体-抗体免疫複合体を、TMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)、ペルオキシダーゼ色素原基質 (この色は、過酸化水素の存在下で青色に変わり、硫酸の存在下 (反応の停止) で黄色になる) を用いて可視化する。この反応は、450nm での検出により定量化することができる。

40

【 0 1 0 8 】

得られた結果は、選択したモノクローナル抗体が、サンドイッチ ELISA を用いる IRAP 分泌ドメイン検出用抗体として使用できることを示している。用量-応答曲線は、抗体による IRAP 分泌ドメインの検出限界 1 ~ 100 ng/ml を示している。

クローンを貯蔵し、96-ウェルプレートにおいて平均でウェルあたり 10、5、3、1 又は 5 細胞を含有する限界希釈物を作製することによりクローニングした。

クローニング産物を以下の培地 DMEM HT FCS 15% HCF 1% ATB (2) 中で凍結させた：10% DMSO (ジメチルスルホキシド) を備えた、DMEM、4 mM グルタミン、HAT (ヒポキサンチン 100 μM 、チミジン 16 μM)、15% 補体除去胎仔ウシ血清、1% HEF (ハイブリドーマ増強サプリメント)、1% 抗生物質 (ペニシリン/ストレプトマイシン)。

50

【0109】

実施例3：血清又は血漿における酵素抗体法によるIRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/若しくはその1つの変形体のアッセイ

血清又は血漿中で探索されるIRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォームを、マルチ-ウェルプレート上に吸着させた特異抗体に結合させる。次いで、結合したIRAPタンパク質及びそのアイソフォーム(その1以上の変形体でさえ)を可視化し、20mMのL-メチオニンの存在下でL-ロイシン-パラニトロアニリドを基質として使用して酵素活性を測定することによって定量化する。定量化により、可能性のある他のアミノペプチダーゼによる夾雑物との交差反応を回避することができる(Yamahara, N., Nomura, S., Suzuki, T., Itakura, A., Ito, M., Okamoto, T., Tsujimoto, M., Nakazato, H.及びMizutani, S. (2000) Life Sci 66(15), 1401-1410)。

10

【0110】

酵素的な方法、特にL-ロイシン-パラニトロアニリド基質を使用する酵素的な方法により、10 µg/mLの濃度からIRAPを検出することができる。免疫捕捉によるIRAPの富化によって検出閾値が1 µg/mLに低下する。

しかしながら、この高い検出閾値は、血清中のIRAPの検出には然程適合しない。

また、非常に特異的なモノクローナル抗体を使用してIRAPを精製することは、検出限界を低下させるために不可欠である。

モノクローナル抗体の効力を確認するために、抗体17H10及び4G6を用いてサンドイッチELISAを行った。

20

【0111】

モノクローナル抗体17H10を15 µg/mlで捕捉抗体として使用し、モノクローナル抗体4G6を検出抗体として使用する。17H10-IRAP-4G6複合体を、組換えIRAPのサンプル又は妊娠女性(14~16週)若しくは男性の血漿サンプルから、マウスIgG2に対するペルオキシダーゼ(HRP)接合抗-イソタイプ抗体により可視化する。

結果を図2に示す。

この使用条件下で、抗体17H10-4G6-抗IgG2a/HRPの組合せにより、IRAPタンパク質の分泌ドメインを濃度0.1 µg/mlまで検出することが可能になる。

この組合せは、試験した希釈率では、これら血漿中でのIRAPの検出を可能にしない。第4のアルカリホスファターゼ接合抗-HRP抗体の使用により、感度を1 ng/mlまで増大させることができる。

30

【0112】

実施例4：ヒト組織における免疫組織化学的方法によるIRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/又はその1つの変形体のアッセイ

アビジン-ビオチン免疫ペルオキシダーゼ技術を用いて免疫組織化学的アッセイを行った。事前に採取したヒト組織の4 µm厚切片を作製し、ストレプトアビジン/ビオチン/ペルオキシダーゼ法を用いて染色した。

パラフィンを除去した切片を0.01Mクエン酸緩衝液に入れ、マイクロ波オーブン中で90にて750Wで各回5分間3回処理した。

次いで、切片を過酸化水素中で20分間インキュベートした後、二次抗体の動物宿主の10%血清と10分間インキュベートして、内因性ペルオキシダーゼ活性及び非特異的免疫グロブリンへの結合をブロックした。

40

【0113】

希釈率1:100の実施例2のモノクローナル抗体を組織切片に加え、湿潤チャンバ中で周囲温度で1時間インキュベートして、IRAP及び/又はそのアイソフォーム及び/又はその1つの変形体をアッセイした。

抗体の結合を、ビオチン化マウス抗-Ig抗体に続く西洋ワサビペルオキシダーゼ接合ストレプトアビジンにより可視化した。

切片を3-アミノ-9-エチルカルバゾールに浸漬させることにより色素原発色を行った。

マイアーのヘマトキシリン対比染色により写真を分析した。

50

【0114】

実施例5：化学療法抵抗性の予後についてのIRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/又はその1つの変形体のアッセイ

化学療法抵抗性はIRAPの過剰発現の結果である。したがって、これは、実施例3若しくは4に従って又はRIA若しくはIRMAによりアッセイすることができる。

【0115】

実施例6：早期分娩の発生を測定するためのIRAPタンパク質及び/又はその1つのアイソフォーム及び/又はその1つの変形体のアッセイ

IRAPの濃度は妊娠中に増加する。したがって、これは、実施例3若しくは4に従って又はRIA若しくはIRMAによりアッセイしたIRAPの循環濃度が低下した場合、予想することができる。

10

【0116】

実施例7：IRAPの細胞外部分を指向するモノクローナル抗体の特異性

本発明の抗体の特異性を確認するために、IRAP-抗体相互作用の測定を、希釈血清又は未希釈血清の存在下に行った。

抗体-IRAP相互作用は、組換えIRAP濃度の関数又は男性若しくは妊娠女性の1/100希釈血清中で希釈した組換えIRAPの関数として、抗体17H10及び40C10を使用するELISAサンドイッチにより測定した。

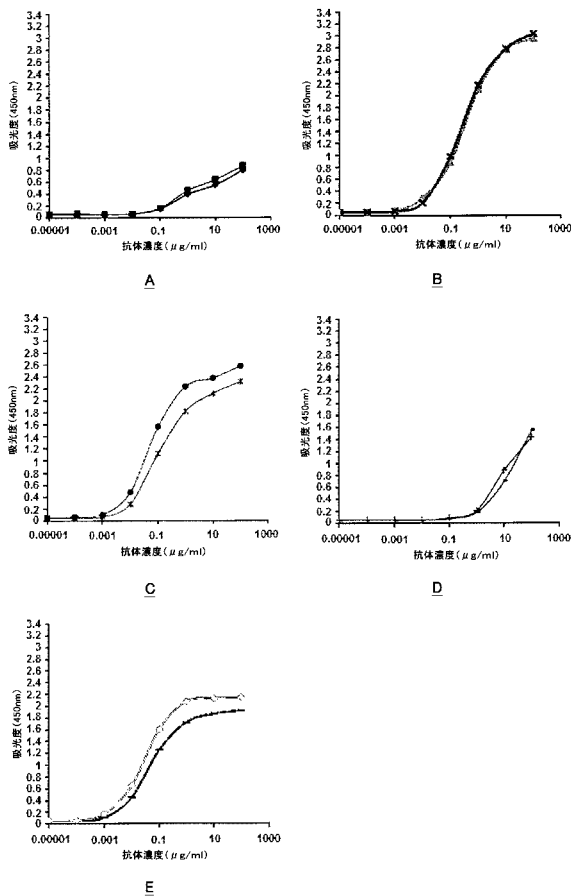
結果を図3に示す。

これら結果は、IRAPが希釈血清中0.1 µg/mLの濃度で検出可能であり、血清中に含まれる他のアミノペプチダーゼとの干渉がないことを示している。

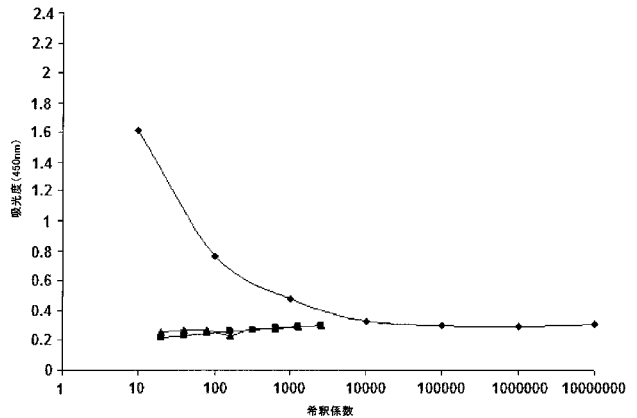
20

これら結果は、モノクローナル抗体がIRAPに非常に特異的であることを示している。

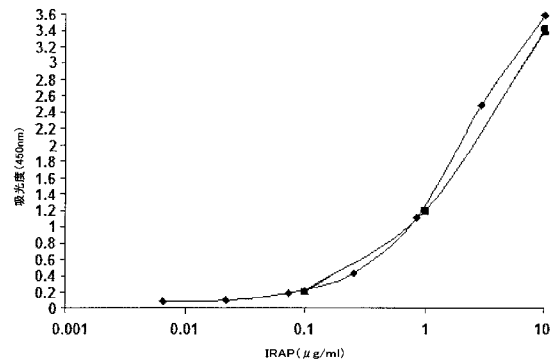
【図1】



【図2】



【図3】



【配列表】

2011526689000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2009/051335

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28		
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 G01N A61P		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YAMAHARA N. ET AL: "Placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in maternal serum and placental during normal pregnancy" LIFE SCIENCE, vol. 66, no. 15, 2000, pages 1401-1410, XP002512633 abstract page 1402, paragraph 3 page 1403, paragraphs 3,7,8 page 1405 page 1408, paragraph 2 ----- -/--	1-26
<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 document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 November 2009		Date of mailing of the international search report 01/12/2009
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 Keller, Yves

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2009/051335

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>TSUJIMOTO M ET AL: "The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - PROTEINS & PROTEOMICS, ELSEVIER, vol. 1751, no. 1, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 9-18, XP004995172 ISSN: 1570-9639 abstract page 10 - page 12 page 13, column 2 - page 14, column 1</p>	1-26
Y	<p>ALBISTON ET AL: "Therapeutic targeting of insulin-regulated aminopeptidase: Heads and tails?" PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, ELSEVIER, GB, vol. 116, no. 3, 20 November 2007 (2007-11-20), pages 417-427, XP022354101 ISSN: 0163-7258 figure 1 page 419 - page 422</p>	1-26
X	<p>IWASE A. ET AL.: "Characterization of a secretase activity for placental leucine aminopeptidase" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 393, no. 1, 10 August 2001 (2001-08-10), pages 163-169, XP002512634 abstract figure 1 page 164 "Immunoblotting"</p>	1-26

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n°

PCT/FR2009/051335

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07K16/28		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07K G01N A61P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	YAMAHARA N. ET AL: "Placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in maternal serum and placental during normal pregnancy" LIFE SCIENCE, vol. 66, no. 15, 2000, pages 1401-1410, XP002512633 abrégé page 1402, alinéa 3 page 1403, alinéas 3,7,8 page 1405 page 1408, alinéa 2	1-26
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention	
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément	
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier	
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets	
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
18 novembre 2009	01/12/2009	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Fax: (+31-70) 340-3016	Keller, Yves	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/051335

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>TSUJIMOTO M ET AL: "The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - PROTEINS & PROTEOMICS, ELSEVIER, vol. 1751, no. 1, 1 août 2005 (2005-08-01) , pages 9-18, XP004995172 ISSN: 1570-9639 abrégé page 10 - page 12 page 13, colonne 2 - page 14, colonne 1</p>	1-26
Y	<p>ALBISTON ET AL: "Therapeutic targeting of insulin-regulated aminopeptidase: Heads and tails?" PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, ELSEVIER, GB, vol. 116, no. 3, 20 novembre 2007 (2007-11-20), pages 417-427, XP022354101 ISSN: 0163-7258 figure 1 page 419 - page 422</p>	1-26
X	<p>IWASE A. ET AL.: "Characterization of a secretase activity for placental leucine aminopeptidase" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 393, no. 1, 10 août 2001 (2001-08-10) , pages 163-169, XP002512634 abrégé figure 1 page 164 "Immunoblotting"</p>	1-26

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/535 (2006.01)	G 0 1 N 33/535	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(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,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,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,PE,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

(74)代理人 100145229
弁理士 秋山 雅則

(74)代理人 100159385
弁理士 甲斐 伸二

(74)代理人 100163407
弁理士 金子 裕輔

(74)代理人 100166936
弁理士 稲本 潔

(72)発明者 ボッタリ,セルジュ

フランス、エフ - 3 8 3 3 0 ビヴィエール、シュマン デ アリオット、1 0 3 0

Fターム(参考) 4B064 AG26 AG27 BJ12 CA10 CA19 CC24 DA14
4B065 AA90X AA90Y AB04 AC14 BA08 CA24 CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA50 DA75 DA76 DA89 EA51 EA54
FA74

专利名称(译)	使用IRAP蛋白进行诊断和预后方法		
公开(公告)号	JP2011526689A	公开(公告)日	2011-10-13
申请号	JP2011515587	申请日	2009-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	UNIV约瑟夫·傅里叶		
申请(专利权)人(译)	Üniversite电约瑟夫·傅立叶		
[标]发明人	ポッターセルジュ		
发明人	ポッター,セルジュ		
IPC分类号	G01N33/566 C07K16/28 C12N5/10 G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535 C07K14/705 C12P21/08		
CPC分类号	A61P35/00 A61P37/00 C07K16/40 G01N33/574 G01N33/689 G01N2333/471 G01N2333/96494 G01N2800/368		
FI分类号	G01N33/566 C07K16/28.ZNA C12N5/00.102 G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535 C07K14/705 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA51 4H045/EA54 4H045/FA74		
代理人(译)	正徳秋山 清稻本潤一		
优先权	2008003802 2008-07-04 FR		
其他公开文献	JP5749643B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用IRAP蛋白实施诊断和预后方法。

工程	条件
コーティング (Agの吸着) Agの濃度 緩衝液 容量/ウエル インキュベーション	96-ウエルプレート (Maxisorp, Nunc) 1 µg/ml PBS 50 µl 周囲温度で一晩
洗淨 × 1	PBS - 0.05% (v/v) Tween 20
飽和 緩衝液 容量/ウエル インキュベーション	PBS-ミルク 2.5% (w/v) 150 µl 25°Cで1時間
洗淨 × 1	PBS - 0.05% (v/v) Tween 20
試験すべき抗体 予備培養物の上清 容量/ウエル インキュベーション	50 µl 25°Cで2時間
洗淨 × 3	PBS - 0.05% (v/v) Tween 20
二次抗体 (ペルオキシダーゼ接合) 希釈率 緩衝液 容量/ウエル インキュベーション	抗-IgG及びIgM (115-036-044, Jackson) 1/10,000 PBS-0.05% (v/v) Tween 20-0.5% (w/v) BSA 50 µl 25°Cで1時間
洗淨 × 3	PBS - 0.05% (v/v) Tween 20
可視化 試薬 容量/ウエル インキュベーション	テトラメチルベンジジン(50-76-05, KPL, Inc.) 50 µl 10 min
反応の停止 容量	H ₂ SO ₄ 1M (S1526, Sigma) 50 µl