

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4851620号
(P4851620)

(45) 発行日 平成24年1月11日(2012.1.11)

(24) 登録日 平成23年10月28日(2011.10.28)

(51) Int. Cl.	F I
C07K 16/22 (2006.01)	C07K 16/22 ZNA
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 IO2
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 D
G01N 30/88 (2006.01)	G01N 30/88 O1R
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08

請求項の数 10 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2010-507277 (P2010-507277)
 (86) (22) 出願日 平成21年4月10日 (2009.4.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2009/057327
 (87) 国際公開番号 W02009/125831
 (87) 国際公開日 平成21年10月15日 (2009.10.15)
 審査請求日 平成23年3月16日 (2011.3.16)
 (31) 優先権主張番号 特願2008-103242 (P2008-103242)
 (32) 優先日 平成20年4月11日 (2008.4.11)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-11101
 微生物の受託番号 IPOD FERM BP-11102

早期審査対象出願

(73) 特許権者 507044114
 有限会社スリーピー
 京都府京都市左京区岡崎法勝寺町1番地の4
 (73) 特許権者 593146877
 株式会社特殊免疫研究所
 東京都文京区後楽1丁目1番10号
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (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

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) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

エラストーゼ消化によって得られるHGF (Hepatocyte Growth Factor) の鎖からなる、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、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上記のモノクローナル抗体。

【請求項2】

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3】

請求項1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4】

請求項1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5】

請求項1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6】

請求項1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。

10

20

【請求項 7】

請求項 1 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 8】

エラスターゼ消化によって得られる HGF (Hepatocyte Growth Factor) の鎖からなる、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非ヒト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 固相プレートと前記ヒト HGF 固相プレートとの反応性を比較し、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、上記の製造方法。

【請求項 9】

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 8 に記載の方法。

【請求項 10】

非ヒト免疫動物がマウスである、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、NK 4 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 NK 4 の検出方法などに関する。

【背景技術】

【0002】

NK 4 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。NK 4 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。

【0003】

NK 4 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、NK 4 に特異的に反応するモノクローナル抗体を用いた NK 4 測定系を確立することができれば、NK 4 治療薬のモニタリング、又は治療薬中に存在する NK 4 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、NK 4 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

【発明の開示】

10

20

30

40

50

【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。

【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。

(3) HGFをエラスターゼ消化して得られるHGFの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パーサーを結合させ、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。

(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

10

20

30

40

50

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、大きなクリングルと呼ばれるドメイン4個からなる鎖が存在している。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個のク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、([NH(CH₂CH₂O)₂-CH₂CO]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

10

20

30

40

50

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 (Galfre, 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。

【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

10

20

30

40

50

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。

10

【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ム細胞、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。

20

【0019】

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。

30

【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

40

50

、ガラス、フェライトなどの不溶性の支持体を挙げることができる。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。インキュベート後の洗浄は、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ことができる。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(^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I 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、 α -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、ピオチン、ルテニウムなどを挙げることができる。標識物質としてピオチンを用いる場合には、ピ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。インキュベートの後、洗浄し、標識されたNK4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NK4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NK4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NK4の検出とは、NK4の存在の検出のみならず、NK4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NK4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】

10

20

30

40

50

(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 µg/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 µg/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 µg/匹で尻尾の静脈へ接種した。

【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レクションを行なった。

【0036】

(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 r N K 4 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 µLずつ分注し、4 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 µL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。r N K 4 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 µg/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 r N K 4 を50 µg/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。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

(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 μ g/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

10

【 0 0 4 1 】

(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 \times 10⁷cells/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

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。

20

【 0 0 4 2 】

(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 μ 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 μ g/匹で尻尾の静脈へ接種した。

【 0 0 4 3 】

(6 - 2) 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、陽性判定とされたサンプルについて、2ndスクリーニングを行った。

40

【 0 0 4 4 】

(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チ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

50

、24時間培養し、発現されたヒトHGFを含む培養上清を得た。

【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で単一な精製ヒトHGFを得た。

【0046】

上記ヒトHGF抗原を、ウサギ1羽に対して100 μ 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 of 皮下約10カ所へ100 μ 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。

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 μ g/mL)をアッセイプレートに50 μ Lずつ分注し4にて一晚固相化し、40%BA-TBSにてブロック処理した。プレートを洗浄後、rNK4あるいはrヒトHGFを1ng/mLで含む40%BA-TBSを50 μ 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。

【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、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。

【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 μ 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

10

20

30

40

50

ータ)

【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(20µg/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。

(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。

10

【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も検出しなかつた。

20

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、より高感度の測定キット(NK4 EIAキット)に改良した。抗NK4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。NK4 EIAキットの組成及び操作方法を以下に示す。

30

* NK4 EIA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】

* NK4 EIAキットの操作方法；

40

(1) 抗NK4モノクローナル抗体固相プレートへ検体希釈液を50µLずつウェルに分注
(2) NK4標準液および検体を検体希釈液の入ったウェルへ50µL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℃、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100µLずつウェルに分注

(6) 37℃、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100µLずつウェルに分注

(8) 25℃、30分、暗所にて静置反応

50

(9) 反応停止液を 100 μ 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

【0057】

(2) NK 4 EIA キットについて、イムニス HGF EIA 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 EIA では、ヒト HGF ならびに NK 4 両方を測定しうるが、NK 4 EIA 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。

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

10

NK 4 EIA 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 EIA 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 EIA 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。

【0059】

20

(4) 添加回収試験 (図 5)

健常人血清検体 50 μ L に、NK 4 : 0.3、2.5、4.0 ng/mL の 3 種類の濃度を各 50 μ 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 r NK 4 モノクローナル抗体の特異性評価結果を示す図である。固相抗原をそれぞれ r NK 4、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。

30

【図 2】図 2 は、抗 r NK 4 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)、NK 4 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、r NK 4 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 r NK 4 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。

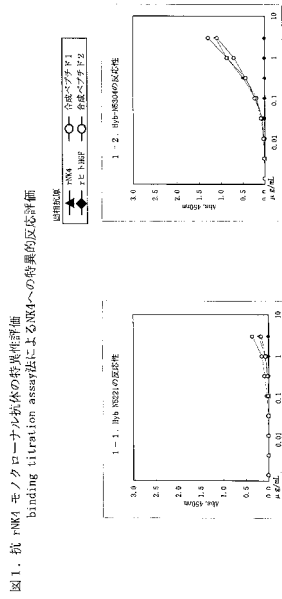
【図 3】図 3 は、NK 4 EIA キットとイムニス HGF EIA との特異性を比較した図である。両キットは r NK 4 に対し同等に発色を示し、直線性も良好であった。NK 4 EIA キットは、r HGF と反応しなかった。図 3 - 1 は、イムニス HGF EIA の標準液検量線を示す。図 3 - 2 は、NK 4 EIA キットの標準液検量線を示す。

40

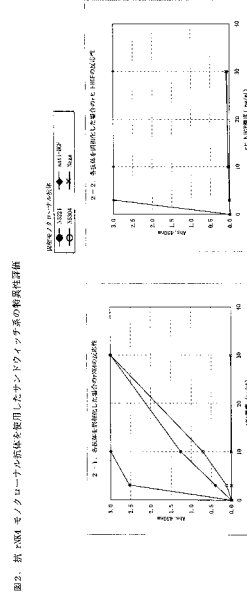
【図 4】図 4 は、健常人血清検体における NK 4 EIA キット及びイムニス HGF EIA による測定値を示した図である。

【図 5】図 5 は、各濃度の NK 4 を添加した場合の NK 4 EIA キットの添加回収率を示した図である。

【 図 1 】

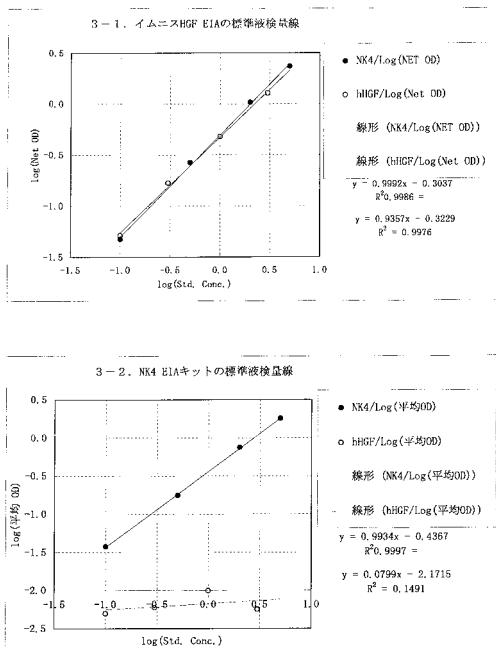


【 図 2 】



【 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
検量線	$y = 0.9735x - 0.4403$ $R^2 = 1$ 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

添加NK4濃度 測定結果	0.2ng/mL		2.2ng/mL		4.0ng/mL		NK4添加 回収率 平均%
	NK4濃度 ng/mL	回収率 %	NK4濃度 ng/mL	回収率 %	NK4濃度 ng/mL	回収率 %	
1	0.01	94.8	2.40	95.0	3.89	97.0	95.9
2	0.01	92.5	2.44	97.4	3.65	91.5	93.7
3	0.01	90.6	2.42	96.5	3.48	86.9	91.1

【 配列表 】

000485162000001.app

フロントページの続き

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 国際公開第99/055361(WO, A1)

大海忍 他, 細胞工学別冊実験プロトコルシリーズ 新版 抗ペプチド抗体実験プロトコル
- 遺伝子産物の同定からタンパク質機能解析まで -, 秀潤社, 2004年, 第2版第1刷, p.28
, p.130-132
日植病報, 1990年, Vol.56, pp.569-576

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 1/00 - 19/00

C12P 1/00 - 41/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	针对NK4的单克隆抗体		
公开(公告)号	JP4851620B2	公开(公告)日	2012-01-11
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		
当前申请(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		
审查员(译)	藤井美穗		
优先权	2008103242 2008-04-11 JP		
其他公开文献	JPWO2009125831A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供能够特异性识别NK4的新型抗体，产生该抗体的杂交瘤，以及使用该抗体检测和纯化NK4的方法。根据本发明，提供了一种特异性地与NK4反应并且不与HGF反应的单克隆抗体。

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
検量線	$y = 0.9735x - 0.4403$ $R^2 = 1$ 0ng/mL 0.007	$0.9493x - 0.2934$ 0.9997 0.015