

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5391071号
(P5391071)

(45) 発行日 平成26年1月15日(2014.1.15)

(24) 登録日 平成25年10月18日(2013.10.18)

(51) Int.Cl.	F I
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18
G01N 33/574 (2006.01)	G01N 33/574 Z N A A
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 B
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 1 O 2

請求項の数 8 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-537894 (P2009-537894)	(73) 特許権者	399115851 株式会社先端生命科学研究所 埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号
(86) (22) 出願日	平成20年9月29日(2008.9.29)	(74) 代理人	100102668 弁理士 佐伯 憲生
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/002716	(74) 復代理人	100182486 弁理士 中村 正展
(87) 国際公開番号	W02009/054091	(72) 発明者	青柳 克己 埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端生命科学研究所内
(87) 国際公開日	平成21年4月30日(2009.4.30)	(72) 発明者	井澤 雪路 埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端生命科学研究所内
審査請求日	平成23年4月27日(2011.4.27)	審査官	三原 健治
(31) 優先権主張番号	特願2007-278843 (P2007-278843)		最終頁に続く
(32) 優先日	平成19年10月26日(2007.10.26)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-10991		
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-10992		
前置審査			

(54) 【発明の名称】 ガストリン放出ペプチド前駆体に対する抗体及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1に示されるアミノ酸配列の47-68番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識する2種以上の異なるモノクローナル抗体を用いて、ガストリン放出ペプチド前駆体及び/又はその分解物を測定する方法であって、

該2種以上の異なるモノクローナル抗体は、少なくとも寄託番号FERM BP-10991で寄託されたハイブリドーマGCY9が産生するモノクローナル抗体、及び、寄託番号FERM BP-10992で寄託されたハイブリドーマGCY17が産生するモノクローナル抗体を含む、

方法。

【請求項2】

サンドイッチ免疫測定法である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

寄託番号FERM BP-10991で寄託されたハイブリドーマGCY9が産生するモノクローナル抗体。

【請求項4】

寄託番号FERM BP-10992で寄託されたハイブリドーマGCY17が産生するモノクローナル抗体。

【請求項5】

寄託番号FERM BP-10991で寄託されたハイブリドーマGCY9。

10

20

【請求項 6】

寄託番号 F E R M B P - 1 0 9 9 2 で寄託されたハイブリドーマ G C Y 1 7。

【請求項 7】

請求項 3 に記載のモノクローナル抗体、及び請求項 4 に記載のモノクローナル抗体を含む、ガストリン放出ペプチド前駆体もしくはその分解物を測定するためのキット。

【請求項 8】

癌の診断又は治療効果のモニタリングを行うためのキットである、請求項 7 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、ガストリン放出ペプチド前駆体に対する抗体及びその使用に関するものであり、肺小細胞がんを含む各疾病の早期発見や治療のモニタリング、再発のモニタリング等に広く利用されるものである。

【背景技術】

【0002】

わが国における死因の第 1 位は悪性新生物であり、その中でも肺癌の死亡率は、男性では胃癌を抜いて第 1 位、女性でも第 3 位となっており、年々上昇する傾向にある。肺癌は病理組織学的に以下の主に 4 つの組織型に分類されている。すなわち、肺門部に発生する肺扁平上皮癌 (squamous - cell carcinoma) と肺小細胞癌 (small - cell lung carcinoma: SCLC)、肺野部に発生する肺腺癌 (adenocarcinoma) と肺大細胞癌 (Large - cell lung carcinoma) である。

20

【0003】

特に肺小細胞癌は、増殖が速く早期に遠隔転移を起こすため、初診時ではすでに全身性に転移した進行癌で発見されることが多い。この型の癌の治療率については、病変が一側の肺野に限局している肺小細胞癌の限局型 (Limited disease: LD) 患者の治療率は約 20% であるが、両肺や他の臓器に転移した進展型 (extensive disease: ED) の患者では、事実上治療は難しいと言われている。

【0004】

30

また、肺小細胞癌は抗癌剤に感受性が高いため、化学療法が治療法の第一選択とされるのに対して、非肺小細胞癌 (non - small - cell lung carcinoma: non - SCLC) は、化学療法の奏功率が低いため外科療法が治療法の第一選択とされている。

【0005】

そのため、肺小細胞癌は肺癌の中でも特に早期発見・治療が必要な癌であり、そのためにも肺小細胞癌と非肺小細胞癌を鑑別診断することは、治療方針を決定する上で極めて重要である。

【0006】

肺癌を発見する方法のひとつに喀痰検査がある。しかし、喀痰検査は主に肺扁平上皮癌の検査には好適であるが、肺小細胞癌に対する陽性率は低いという問題がある。また、X線撮影法も肺癌の発見に広く用いられている方法であるが、肺門部に生じる肺扁平上皮癌や肺小細胞癌に対しては、肺門部が心臓の影となるので癌組織の陰影が非常に撮影され難いという問題がある。また、肺小細胞癌については、肺野の異常陰影を呈する患者に対して喀痰細胞診、胸部 X 線単純撮影、CT スキャン、気管支内視鏡等を用いても、この型の肺癌の早期発見は容易ではないとされている。

40

【0007】

また、癌を診断するための検査方法の幾つか、例えば放射線照射やバイオプシー、気管支内視鏡などは、患者に対して苦痛を与え、また高価な機器や熟練した技術などを必要とする。

50

【0008】

そのため、より簡便な血液検査によって治癒可能な時期に癌を高率に診断することを可能とする、腫瘍マーカーの研究が行われている。今日では、癌疾患の発見、診断、病状経過のモニタリングの指標、再発診断等に30以上の腫瘍マーカーが利用されている。

【0009】

肺癌は組織型が多彩であるため、全ての型の肺癌の発見あるいは診断に有効な腫瘍マーカーはいまだ報告されていない。そのため今日では、肺癌の組織型ごとに有効なマーカーが選択され、使用されている。

【0010】

例えば、肺腺癌に対しては癌胎児性抗原(carcinoembryonic antigen:CEA)やシアリルLex-i抗原が、肺扁平上皮癌に対しては扁平上皮癌関連抗原(squamous-cell carcinoma related antigen:SCC)が、肺小細胞癌に対しては神経特異エノラーゼ(neuron-specific enolase:NSE)などが、主に選択、使用されている。

10

【0011】

しかしNSEは、(1)治癒可能な早期癌に対する陽性率が低いこと、(2)治療による一過性の測定値の上昇が認められること、(3)採血時の溶血により測定値が上昇すること、(4)肺小細胞癌患者と健常人との測定値差が小さいこと、などの欠点があり、肺小細胞癌に対する有効な腫瘍マーカーであるとは必ずしも言えなかった。

【0012】

ガストリン放出ペプチド(Gastrin-Releasing Peptide:GRP)は、McDonaldらが1978年にブタ胃組織から単離した、ガストリン分泌促進作用を有する27個のアミノ酸よりなる脳腸ペプチドである。ヒトにおいてもGRPの存在は確認されており、ヒトGRPをコードする遺伝子も1984年にクローニングされている。

20

【0013】

国立がんセンターの山口らは、神経内分泌細胞に由来すると考えられている肺小細胞癌の生物学的特性の研究過程で、ACTH(adrenocorticotrophic hormone)やカルシトニンなどを含む15種類以上の脳腸ホルモンを測定し、GRPが最も高頻度にかつ高濃度に培養肺小細胞癌株で積極的に分泌されることを明らかにした(非特許文献1)。さらに、血中GRPの濃縮法を組み合わせたラジオイムノアッセイ(RIA)を構築し、肺小細胞癌患者は健康な人に比べ高い血中GRP濃度を呈することを明らかにした。しかし、GRPは血中で速やかに分解されるため血中濃度が低く、また上記アッセイは煩雑な濃縮操作を必要としたため、臨床応用が困難であった。

30

【0014】

その後の研究により、各種の細胞においてalternative RNA splicingによって3種のGRP前駆体(ProGRP)が産生されることが明らかにされた(非特許文献2)。これら3種のProGRPは、その1-98番目においてアミノ酸配列が共通している一方、99番目以降はalternative RNA splicingによって、互いに異なるアミノ酸配列となっている。この共通する1~98番目のアミノ酸配列を配列番号1に示す。以後、特に断らない限り、本発明におけるProGRP、その部分配列、分解物等のアミノ酸残基の番号表示は、配列番号1のアミノ酸配列のそれをもって表すこととする。

40

【0015】

3種のProGRPの1-27番目のアミノ酸配列は、ガストリン分泌促進活性をもつ成熟GRPのそれと同一である。これら3種の前駆体は、いずれもホルモン前駆体切断酵素によって、1-27番目のアミノ酸配列からなる成熟型GRPと、31番目以降のアミノ酸配列からなるガストリン分泌促進活性をもたないProGRPの分解物であるC末端側フラグメント(ProGRP-Cfrag)とに分解される。

【0016】

50

H o l s t ら (非特許文献 3) は、P r o G R P の 4 2 - 5 3 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (以下、P r o G R P (4 2 - 5 3) とする) に対する抗血清を用いたラジオイムノアッセイ (R I A) 法によって、肺小細胞癌患者の血漿中の P r o G R P または P r o G R P - C f r a g の レベルが高いことを報告した。しかし、この方法では沈殿抽出操作が必要であり、感度も十分ではなかった。

【 0 0 1 7 】

三宅らは、P r o G R P が G R P よりも血中で安定性が高いこと、ならびに 3 種の P r o G R P の共通部分である 3 1 - 9 8 番目のアミノ酸配列が他の蛋白質のアミノ酸配列に対して相同性を示さないことに着目し、同アミノ酸配列からなる組換え体ペプチド (以下、P r o G R P (3 1 - 9 8) とする) を抗原として得た高力価の抗血清を用いて、
10

【 0 0 1 8 】

しかし、この方法は抽出操作を必要としない点で有利であるが、測定に 4 日間を必要とすることや感度が 1 0 p M (7 7 . 3 p g 抗原 / m L) と十分でないため、健常人血清中の P r o G R P 値を測定することはできず、臨床応用には至っていない。

【 0 0 1 9 】

また、前述した H o l s t ら及び三宅らの R I A 法はインヒビション法であるため、P r o G R P の断片の一部でも抗原性を有していれば測定可能であるが、その感度はサンドイッチ法に比べて低く、高感度化が必要な P r o G R P 測定法の臨床応用は困難である。
20

【 0 0 2 0 】

山口、青柳らは、P r o G R P の肺小細胞癌用腫瘍マーカーとしての臨床応用を目的として、enzyme-linked immunosorbent assay (E L I S A) を原理とする、サンドイッチ法を用いた簡便で高感度な P r o G R P 測定試薬を開発した (特許文献 1) 。この方法は約 2 時間で結果を与え、また高い感度 (2 p g / m L) を有していることから、現在幅広く臨床応用されており、肺小細胞癌において N S E よりも高い感度、特異性を有していることが明らかとなっている。

【 0 0 2 1 】

また、この測定法を用いて、肺小細胞癌以外にも、神経内分泌腫瘍 (甲状腺髄様癌など) 、神経内分泌腫瘍的性格を示す癌 (食道小細胞癌、膵小細胞癌、前立腺小細胞癌など) でも血清 P r o G R P 値が上昇することが明らかとなり、今後これらの腫瘍の早期発見や治療のモニタリングなどにも応用されていくと思われる。

【 0 0 2 2 】

しかしながら、P r o G R P の血中での安定性は、G R P のそれと比較した場合には高いが、一般的な他の腫瘍マーカーに比べて、測定値のばらつきが認められる。そのため、P r o G R P を検出対象とした方法では、測定用検体は、採血後すみやかに測定時まで凍結保存されなければならないという制約がある (非特許文献 4) 。

【 0 0 2 3 】

青柳は、P r o G R P (3 1 - 9 8) の内部領域である P r o G R P の 4 0 - 7 5 番目のアミノ酸残基あるいは P r o G R P の 4 0 - 7 9 番目のアミノ酸残基を認識する 2 種類以上の抗体を用いたサンドイッチ測定法を開発した (特許文献 3) 。この方法は、4 で保存した検体の測定で比較的安定な結果を与え、また特許文献 2 に記載されている方法とほぼ同等の検出感度を示す。しかしながら、この方法は、特許文献 3 の実施例 4 に示されるとおり、1 0 0 μ L という一般的な免疫測定法と比較して多めの検体量を必要とする。
40

【特許文献 1】特許第 3 2 1 0 9 9 4 号公報

【特許文献 2】特開平 6 - 9 8 7 9 4 号

【特許文献 3】国際特許公開 W O 2 0 0 6 / 1 1 7 9 9 4 号パンフレット

【非特許文献1】Cancer Research、1994年、第54巻、第2136 - 2140頁

【非特許文献2】Spindelら、Mol. Endocrinol.、1987年、第1巻、第224 - 232頁

【非特許文献3】Holstら、J. Clin. Oncol.、1989年、第7巻、第1831 - 1838頁

【非特許文献4】臨床検査、1995年、第39巻、第981 - 986頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0024】

10

特許文献3に記載された方法において、検出感度を維持しつつ必要な検体量をさらに少量にすることができれば、臨床現場において、測定に要するコストの削減や患者の負担軽減を達成することができる。また、検体の保存による測定感度の低下がより少ない測定方法は、検体の取扱いをより簡便にすることができる。本発明は、検体の保存によっても検出感度の低下が少なく、より少量の検体量で測定が可能である、新しいProGRPの測定法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0025】

本発明は、ProGRPの特定の領域に対する抗体を用いたイムノアッセイ法が上記の課題を解決できることを見だし、以下の各発明を完成した。

20

【0026】

(1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列の47 - 68番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識する2種以上の異なる抗体を用いて、ガストリン放出ペプチド前駆体及び/又はその分解物を測定する方法。

【0027】

(2) サンドイッチ免疫測定法である、(1)に記載の方法。

【0028】

(3) 配列番号1に示されるアミノ酸配列の47 - 68番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識するモノクローナル抗体。

30

【0029】

(4) 寄託番号FERM P - 21308で寄託されたハイブリドーマGCY9が産生する(3)に記載のモノクローナル抗体。

【0030】

(5) 寄託番号FERM P - 21309で寄託されたハイブリドーマGCY17が産生する(3)に記載のモノクローナル抗体。

【0031】

(6) 寄託番号FERM P - 21308で寄託されたハイブリドーマGCY9。

【0032】

(7) 寄託番号FERM P - 21309で寄託されたハイブリドーマGCY17。

【0033】

40

(8) 2種以上の異なる抗体の少なくとも一方が(4)又は(5)のいずれかに記載の抗体である、(1)に記載の方法。

【0034】

(9) (3) ~ (5)のいずれかに記載の抗体を含む、ガストリン放出ペプチド前駆体もしくはその分解物を測定するためのキット。

【0035】

(10) 癌の診断又は治療効果のモニタリングを行うためのキットである、(9)に記載のキット。

【発明の効果】

【0036】

50

本発明の方法は、検体中でも安定に保存されているProGRPの分解物を測定対象とすることによって、従来の測定法と同等の検出感度が得られることに加え、採取後の検体の取扱い方に影響を受けにくくなり、再現性の高い測定値が得られる、などの効果を奏する。このことにより、肺小細胞癌などの疾病の診断のために、検体を採血する臨床現場において、採血後の検体の取扱いがさらに容易になり、ProGRPの測定値が検体の取扱いによってばらつくことがなくなり、より安定した結果が得られ、測定値の信頼性が高くなる。また臨床所見から追加試験の要請あるいは再検査の必要性が生じた場合など、凍結保存検体ではなく冷蔵保存検体を用いた測定が可能となり、測定に要するコストを削減することができる。また、本発明の方法は、高い検出感度を維持しながら、測定検体量の減少及び測定時間の短縮が可能となり、臨床場面におけるコストを削減し、患者の負担を軽減することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】マルチピンペプチドで合成した8個の連続するアミノ酸配列からなる各ポリペプチドに対するモノクローナル抗体PGCY9の結合能を示すグラフである。横軸は各ポリペプチドとその配列番号1におけるアミノ酸残基の番号を、縦軸は吸光度を示す。

【図2】マルチピンペプチドで合成した8個の連続するアミノ酸配列からなる各ポリペプチドに対するモノクローナル抗体PGCY17の結合能を示すグラフである。横軸は各ポリペプチドとその配列番号1におけるアミノ酸残基の番号を、縦軸は吸光度を示す。

【図3】マルチピンペプチドで合成した8個の連続するアミノ酸配列からなる各ポリペプチドに対するモノクローナル抗体PGCY24の結合能を示すグラフである。横軸は各ポリペプチドとその配列番号1におけるアミノ酸残基の番号を、縦軸は吸光度を示す。

20

【図4】マルチピンペプチドで合成した8個の連続するアミノ酸配列からなる各ポリペプチドに対するモノクローナル抗体PGCY12の結合能を示すグラフである。横軸は各ポリペプチドとその配列番号1におけるアミノ酸残基の番号を、縦軸は吸光度を示す。

【図5】マルチピンペプチドで合成した8個の連続するアミノ酸配列からなる各ポリペプチドに対するモノクローナル抗体PGCY5の結合能を示すグラフである。横軸は各ポリペプチドとその配列番号1におけるアミノ酸残基の番号を、縦軸は吸光度を示す。

【図6】ProGRP(31-98)と各種モノクローナル抗体が認識するエピトープの位置の関係を示す模式図である。

30

【図7】アミノ酸番号47-68番目の部分ペプチドに結合する抗体であるPGCY9とPGCY17を用いた測定法の標準曲線である。横軸はProGRPの濃度を、縦軸は吸光度を示す。

【図8】マイクロプレートの固相に抗マウスIgG(Fc)抗体を介して結合させたProGRPに対する各モノクローナル抗体と、ビオチン化ProGRPとの反応性を示すグラフである。横軸に各モノクローナル抗体を、縦軸に吸光度を示している。

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

本発明は、ProGRPの47-68番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識することができる2以上の異なる抗体を使用し、サンドイッチ免疫測定法によってProGRP又はProGRPの47-68番目のアミノ酸残基を有するProGRPの分解物を検出する方法である。当該イムノアッセイ法は、採取された検体を冷蔵保存した場合でも、その検出感度が低下しないという特徴を有している。このことは、ProGRPの47-68番目のアミノ酸残基を有するProGRPの分解物は、検体に含まれるプロテアーゼあるいはその他の原因による検体保存中のさらなる分解反応に対して比較的安定であることを意味するものと推察される。

40

【0039】

本発明の方法で利用することができる抗体は、ProGRPの47-68番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識することができる抗体であり、これによってProGRPの47-68番目のアミノ酸残基を有するProGRPの分解物に結合する

50

ことができる。斯かる抗体はモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0040】

本発明の方法で利用することができる抗体は、好ましくはProGRPの47-68番目のアミノ酸配列におけるN末端部分に提示されるエピトープと、C末端部分に提示されるエピトープを認識することのできる2以上の異なるモノクローナル抗体であることが望ましい。特に、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に受託番号FERMP-21308として寄託されたハイブリドーマGCY9及び受託番号FERMP-21309として寄託されたハイブリドーマGCY17が産生するモノクローナル抗体であるPGCY9とPGCY17の利用が特に好ましい。この2種類のハイブリドーマ細胞は、大腸菌を利用して生産した組み換えProGRPの31-98番目のアミノ酸配列からなるポリペプチド(以下、ProGRP(31-98)と表すこととする)を抗原として免疫したマウスの抗体産生細胞から通常の方法で作製されたハイブリドーマ細胞であり、ProGRP(31-98)内部のペプチドを用いたスクリーニングによって選別された、ProGRPの47-68番目のアミノ酸によって提示されるエピトープを認識する抗体を産生する細胞である。

10

【0041】

この様に、本発明で利用することができる抗体は、ProGRP(31-98)を抗原としてマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ヤギ、ヒツジ、ウシなどの実験動物を免疫して回収される抗体産生細胞から、通常の方法でモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製し、ProGRPの47-68番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド(以下、ProGRP(47-68)と表すこととする)を用いて所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることで得ることができる。また、ProGRP(47-68)を抗原として用いてもよい。また、前記ポリペプチドは、サイクログロブリンやキーホールリンペットヘモシアニンなどの担体に結合させて使用してもよい。

20

【0042】

マウスを例に取って、動物を免疫する方法を説明する。ProGRP(31-98)などのポリペプチドをフロインド完全アジュバント、TiterMax Gold(CytRx社)等のアジュバントと1:1に混ぜ、交流ジョイントで結合した二本の注射筒で繰り返しジョイントを通過させる、あるいは超音波処理する等の方法によりエマルジョンを作製する。作製した抗原含有エマルジョンを、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内のいずれか、または複数部位に注入する。一回目の免疫終了の後、1~4週間の間隔を開け、二回目の免疫を同様に実施する。以後同様に、血中のProGRPに対する抗体の抗体価が上昇するまで、免疫を続ける。

30

【0043】

抗体価の測定は以下の様に行うことができる。ProGRP(31-98)を1 μ g/mLの濃度でPBSに溶解し、ウエルあたり50 μ Lの容量で96穴マイクロタイタープレートの各ウエルに添加し、4で一晚吸着する。0.05%Tween20入りPBS(PBS-T)で各ウエルを洗浄後アッセイに用いる。アッセイの前に、1%BSA入りPBS等でブロッキングを行ってもよい。眼窩静脈叢、尾静脈または尾動脈等から採血し、PBS-Tで30倍に希釈した後遠心を行う。得られた上清をPBS-Tで希釈系列を作成し、ProGRP(31-98)をコートしマイクロタイタープレートの各ウエルに50 μ Lずつ添加する。室温で30分反応後、PBS-Tで洗浄し、PBS-Tなどで適切に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウスIgG溶液を各ウエルに50 μ Lずつ添加する。更に室温で30分反応後、過酸化水素、オルトフェニレンジアミン基質液を添加して30分間反応させ、2N H₂SO₄を50 μ L添加して反応を停止させ、各ウエルの吸光度を測定する。

40

【0044】

免疫したマウスで、十分に投与した抗原に対する抗体価が上昇していることを確認した後、脾臓を取り出し、脾臓細胞を単離する。別に培養しておいたマウスミエローマ(例え

50

ばSP2/0-Ag14等)と、ポリエチレングリコール等を用いることにより融合する。融合に成功した細胞をHAT(ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン)培地で選択培養する。7~14日程度、数日おきに培地を半量交換しながら培養を継続した後、培養上清の抗体価を測定する。ポジティブウエルの細胞を限界希釈法にてクローニングし、目的の抗体産生ハイブリドーマを得る。

【0045】

上記方法で得られた抗体のエピトープを解析することによって、ProGRPの47-68番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識する抗体を、取得することができる。エピトープ解析は、マルチピンペプチド法により合成したProGRP(31-98)の連続する8-12アミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいはProGRP(47-68)に対する抗体の反応を調べることによって行うことができる。例えば、組換え体で発現させたProGRP(47-68)あるいはFmoc法やBoc法で化学合成させたProGRP(47-68)をマイクロタイタープレートにコートし、上述した免疫測定法で、抗体の各ペプチドに対する反応性を調べることにより、決定することができる。

10

【0046】

マルチピンペプチド法により合成した、ProGRP(31-98)の連続する8-12アミノ酸配列からなるポリペプチドを用いたエピトープ解析の結果、本発明で特に好ましい抗体の一つであるPGCY9は、ProGRPの47-68番目のアミノ酸によって提示されるエピトープのうち、55-66番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識するモノクローナル抗体であることが確認された。また本発明で特に好ましいもう一つの抗体であるPGCY17は、少なくとも45-57番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識するモノクローナル抗体であることが確認された。

20

【0047】

本発明で利用される抗体は、担体やマイクロプレートに固相化したり、ビオチン等の適当なラベル化試薬でラベリングしたりすることも可能である。固相化やラベリングの各操作は、種々の実験手法の解説書に記載されている方法に準じて行えばよく、本発明で利用される抗体に特有の操作は特に必要とはされない。

【0048】

本発明の方法は、上記の抗体を利用したサンドイッチイムノアッセイ法、具体的にはサンドイッチELISA法である。サンドイッチELISA法の基本操作は、「超高感度免疫測定法」(石川栄治、1993年、学会出版センター)あるいはその他種々の実験手法の解説書に記載されている方法に準じて行うことができ、本発明の実施に特有の操作は特に必要とはされないが、次のような工程で行うことができる。

30

【0049】

すなわち、ProGRP及び/又はその分解物は、(1)ProGRPの47-68番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識する第一の抗体と検体中のProGRP及び/又はその分解物とを反応させる工程、(2)該抗体により捕捉されたProGRP及び/又はその分解物を、(1)の抗体とは異なるがProGRPの47-68番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識する第二の抗体と反応させる工程、及び(3)(2)により生ずる免疫複合体を検出する工程を含む測定法によって、検出することができる。

40

【0050】

本発明の方法の操作法の例は、次のように表すことができる。第一の抗体を1~10µg/mL程度の濃度になるように緩衝液、例えば0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)に溶解した溶液を、マイクロタイタープレートの各ウエルに等量置き、4で一晩インキュベートする。PBS等の洗浄用緩衝液で各ウエルを洗浄後、第一の抗体が結合していない各ウエルの内壁を、カゼインナトリウム等の適当なタンパク質を含む緩衝溶液を用いて数時間インキュベートを行ってブロッキングする。ブロッキング液を除去後、各ウエルに、Tween20等の界面活性剤を含む反応液と検体を添加する。検体の添加量は、その測定

50

法の感度によって適宜変更される。37 程度の温度で1時間ほど反応させた後、界面活性剤を含む緩衝液(例えば Tween 20 を含む PBS - T)で各ウエルを洗浄し、適当なラベル試薬でラベル化された第二の抗体を各ウエルに添加して数十分反応後、各ウエルを洗浄し、ラベル試薬に応じた方法で第二の抗体を検出する。なお、この上記の操作は飽くまで例であり、各段階の操作の詳細、例えば緩衝液、ラベル試薬、添加量等は、適宜調節することができる。

【0051】

モノクローナル抗体 PG CY 9 と PG CY 17 の2種類のモノクローナル抗体を用いた本発明の方法の検出感度は 2.5 pg/mL であり、検体量は $25 \mu\text{L}$ 程度を用いればよい。この検出感度は、ほぼ全ての健常人の血中 ProGRP の測定を可能にするものであり、臨床現場において検査コストの削減、患者の負担軽減に寄与するものである。

10

【0052】

本発明は、上述の方法に加え、検体中の ProGRP もしくはその分解物を測定するためのキット、特に ProGRP 及び/又はその分解物を測定することによって肺小細胞癌の診断や化学療法モニタリングを行うための診断薬キットも提供する。かかるキットは、上述した ProGRP の47 - 68 番目のアミノ酸によって提示されるエピトープを認識する抗体を少なくとも2種含み、その他任意に反応緩衝液や2次抗体の希釈液、ProGRP の標準物質、説明書その他の構成物を含んでいてもよい。キットに含まれる抗体の好ましい例としては、ProGRP の47 - 68 番目のアミノ酸によって提示されるエピトープを認識する2種以上の異なる抗体であり、代表例としてはモノクローナル抗体 PG CY 9 とモノクローナル抗体 PG CY 17 である。

20

【0053】

ProGRP 及び/又はその分解物と結合する抗体は、ProGRP の47 - 68 番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識する抗体のみを選択して使用することが好ましいが、再現性の高い測定値を得ることができる範囲内で、かかる抗体以外の抗体が測定系に含まれていてもよい。

【0054】

以下、実施例を挙げて本発明をさらに説明する。

【実施例】

【0055】

実施例 1

30

【0056】

特許第3210994号の実施例1に記載した方法により組換え体を作成し、大腸菌で発現させた配列番号1に示されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを精製した。特許第3210994号の実施例1では、この組換え体はGRP(31 - 98)と記載されているが、正しくはGRP前駆体(ProGRP)の(31 - 98)部分であるので、ProGRP(31 - 98)とここでは記載する。

【0057】

ProGRP(31 - 98) : ブタサイログロブリン(TG)を重量比1 : 3で結合させた抗原タンパク質(ProGRP - TGと表す)を、0.15 MのNaClを含む100 mMリン酸緩衝液(pH6.0)に希釈し、等量のタイターマックスと混和し、ProGRP - TG懸濁液とした。ProGRP(31 - 98)の濃度が 0.05 mg/0.1 mL となるように調製した該懸濁液を、4 ~ 6週令のBALB/c系マウスの腹腔内に約20日の間隔で4 ~ 6回投与した。さらに約4週間後、追加免疫として、ProGRP(31 - 98)の濃度が 0.1 mg/0.1 mL となるように調製した生理食塩水溶液を2日間投与した。最終追加免疫後3日目に、この免疫動物より無菌的に脾臓を摘出し、ハサミで切片としてさらにメッシュを用いて脾臓を個々の細胞にほぐし、RPMI - 1640培地で3回洗浄後、8 - アザグアニジンを含む同培地で数日間培養した。復帰突然変異体を完全に除いた対数増殖期のマウス骨髄腫細胞株SP2/0 - Ag14をRPMI - 1640培地で洗浄後、該細胞 2.4×10^7 個と前記脾臓細胞 2.0×10^8 個を遠心管

40

50

に入れ混合した。混合した2種類の細胞を、 $200 \times g$ 、5分間遠心分離を行なって上清を除去した後、HVJ Envelop Cell Fusion Kit (GenomONE-CF、石原産業(株))を用いて細胞融合させた。融合した細胞を、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン(以下、3種類の化合物を纏めてHATと表す)、10%ウシ胎児血清(FCS)及びマウスインターロイキン-6(R&D systems)を含むRPMI-1640培地で希釈し、96ウエルプレートに添加して1~2週間培養した。培養約1~2週間後、抗原としてProGRP(31-98)を用いたELISA法を行って、ProGRP(31-98)に対して反応特異性を有する本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。

【0058】

得られたハイブリドーマについて、常法の限界希釈法に従い、ProGRP(31-98)を用いて目的とする抗体の産生株の検索及び単クローン化を行ない、最終的に5株のハイブリドーマ細胞を得、GCY9、GCY17、GCY12、GCY24及びGCY5とそれぞれ命名した。GCY9とGCY17は、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6にある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に、平成19年6月22日付で寄託申請を行なった(GCY9の寄託番号:FERM P-21308、GCY17の寄託番号:FERM P-21309)。また、GCY9とGCY17は、平成20年8月5日付にてそれぞれ国際寄託された(GCY9の国際寄託番号:FERM BP-10991、GCY17の国際寄託番号:FERM BP-10992)。

【0059】

実施例2

【0060】

(1)実施例1に記載の方法により得られたハイブリドーマを、マウスインターロイキン-6を含む無血清培地(Hybridoma-SFM、Invitrogen社)で培養し、産生されるモノクローナル抗体を、プロテインAを結合させたセファロースカラム(アマシャム)を用いて精製回収した。各ハイブリドーマGCY9、GCY17、GCY12、GCY24及びGCY5より産生されたモノクローナル抗体を、それぞれPGCY9、PGCY17、PGCY12、PGCY24及びPGCY5と命名した。PGCY9、PGCY17、PGCY12、PGCY24及びPGCY5のサブタイプは、ウサギ抗マウスIg各サブタイプキット(Zymed社)を用いた実験により、PGCY9、PGCY12、PGCY24及びPGCY5がIgG1、PGCY17がIgG2aであることが明らかとなった。

【0061】

(2)ProGRP(31-98)のアミノ酸配列に基づき、1アミノ酸ずつずらして調製された連続した8個のアミノ酸からなる計61種類のポリペプチドを、マルチピンペプチド法で合成した。さらに、各ペプチドのN末端にビオチンを結合させた。ビオチン化ポリペプチドそれぞれをジメチルホルムアミドに溶解し、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるようにPBSで希釈した。希釈された各ビオチン化ポリペプチド溶液を、アビジンが固相化された96ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに $100 \mu\text{L}$ ずつ添加し、4で一晚インキュベートした。0.05%Tween20を含むPBS緩衝液(PBS-T)で各ウエルを洗浄後、各モノクローナル抗体を $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した溶液を、各ウエルに $100 \mu\text{L}$ ずつ添加した。室温で30分間反応後、PBS-Tで各ウエルを5回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウスIgG抗体溶液を各ウエルに $100 \mu\text{L}$ ずつ添加した。更に室温で30分間反応後、PBS-Tで5回各ウエルを洗浄し、基質溶液($2 \text{mg}/\text{mL}$ のオルトフェニレンジアミン、30%過酸化水素水 $0.9 \mu\text{L}/\text{mL}$ を含む0.1Mクエン酸リン酸緩衝液、 $\text{pH}5.0$)を各ウエルに $100 \mu\text{L}$ ずつ添加し、室温で30分間反応後、2N硫酸を $100 \mu\text{L}$ ずつ添加し、ただちに492nmにおける吸光度を測定した。モノクローナル抗体PGCY9、PGCY17、PGCY24、PGCY12及びPGCY5のProGRP(31-98)内部の各ペプチドに対する反応を図1~図5に示す。

10

20

30

40

50

【0062】

図1に示されるように、モノクローナル抗体PGCY9は、ProGRP(57-64)に対して非常に弱く結合することが確認された。また図2と図3に示されるように、モノクローナル抗体PGCY17及びPGCY24は、ProGRP(31-98)のアミノ酸配列における連続した8個のアミノ酸からなるポリペプチドには結合しないことが確認された。このことから、PGCY17及びPGCY24は、8個の連続するアミノ酸配列ではなく、8個より長いアミノ酸配列からなるポリペプチドによって提示されるエピトープを認識するものと推察される。一方、図4に示されるように、モノクローナル抗体PGCY12はProGRP(34-41)に強く結合し、その前後のProGRP(33-40)及びProGRP(35-42)には弱く結合することが確認された。したがって、PGCY12は、ProGRPの34-41番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識するものと推察される。また、モノクローナル抗体PGCY5は、ProGRP(69-76)とProGRP(70-77)に対して強く結合し、ProGRP(71-78)に結合し、またProGRP(68-75)には非常に弱く結合することが確認された。したがって、モノクローナル抗体PGCY5は、ProGRPの69-76番目のアミノ酸配列と70-77番目のアミノ酸配列によって提示される共通のエピトープを認識するものと推察される。

10

【0063】

(3)表1に示されるProGRP(31-98)の部分アミノ酸配列からなるポリペプチドをFmoc法にて合成、精製した。6M尿素を溶解させたPBSに、BSAを20µg/mLの濃度で溶解し、96ウエルマイクロタイタープレート(NUNC、Maxisorp)の各ウエルに100µLずつ加え、室温で3時間インキュベートした。各ウエルを5回ずつPBSで洗浄し、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC)とN-ヒドロキシスクシミド(NHS)を各々1mg/mLとなるようにPBSで溶解した溶液を各ウエルに100µLずつ加え、室温で2時間インキュベートして、ウエルに固定されたBSAのカルボキシル基を活性化させた。各ウエルを3回ずつPBSで洗浄し、それぞれのポリペプチドを5µg/mLの濃度に0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)で希釈し、96ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに100µLずつ添加し、4℃で一晩インキュベートした。これにより、各ポリペプチドはアミノ基を介して固定化されたBSAに結合することになる。

20

30

【0064】

PBSで各ウエルを2回洗浄後、1%BSA、2%スクロースを含むPBSを各ウエルに350µLずつ添加し、室温で3時間インキュベーションを行い、その後吸引除去した。1µg/mLの濃度に希釈した各モノクローナル抗体を100µLずつ各ウエルに添加し、室温で60分間反応させた後、0.05%Tween20を含むPBS(PBS-T)で5回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウスIgG抗体溶液を100µLずつ各ウエルに添加し、室温で20分間反応させた。PBS-Tで5回洗浄後、基質溶液(2mg/mLのオルトフェニレンジアミン、30%過酸化水素水0.9µL/mLを含む0.1Mクエン酸リン酸緩衝液、pH5.0)を100µLずつ各ウエルに添加し、室温で20分間反応させた後、2N硫酸を100µLずつ各ウエルに添加して反応を停止させ、ただちに492nmにおける吸光度を測定した。本発明の各モノクローナル抗体のほかに、特許文献3に示された、ProGRPの40-60アミノ酸配列からなるポリペプチドを認識し、かつ8個の連続するアミノ酸配列からなるポリペプチドには反応しないモノクローナル抗体であるGRP-3D6-2のエピトープも、同時に検討した。その結果を表1に示す。

40

【0065】

【表 1】

ペプチド aa No.	モノクローナル抗体 (OD492/620)			
	PGCY9	PGCY17	PGCY24	GRP-3D6-2
31 - 52	0.008	0.008	0.008	0.008
42 - 53	0.009	0.008	0.008	0.009
44 - 55	0.005	0.004	0.003	0.004
45 - 57	0.004	0.004	0.004	0.003
46 - 59	0.004	0.017	0.010	0.006
47 - 61	0.004	0.074	0.057	0.082
55 - 66	0.134	0.003	0.005	0.002
57 - 68	0.239	0.004	0.002	0.003
40 - 60	0.003	0.160	0.156	0.097
44 - 62	0.040	0.297	0.269	0.243
54 - 78	0.376	0.004	0.003	0.004
54 - 90	0.399	0.004	0.004	0.003
70 - 90	0.008	0.006	0.008	0.007
31 - 98	3.304	1.391	1.041	1.624

aa No.; アミノ酸ナンバー

10

20

【0066】

検討した4種のモノクローナル抗体は、表1に示されるように、ProGRPの部分アミノ酸配列からなるポリペプチドを特異的に認識すること、また全てのモノクローナル抗体がProGRP(42-53)に結合しないことが確認できた。さらに、モノクローナル抗体PGCY9は、ProGRP(55-66)、ProGRP(57-68)、ProGRP(54-78)及びProGRP(54-90)に比較的強く結合した。また、モノクローナル抗体PGCY17及びPGCY24は、ProGRP(47-61)、ProGRP(40-60)及びProGRP(44-62)に比較的強く結合し、ProGRP(46-59)に非常に弱く結合した。モノクローナル抗体GRP-3D6-2は、ProGRP(47-61)、ProGRP(40-60)及びProGRP(44-62)に比較的強く結合した。

30

【0067】

(4) 実施例1で作成した組換え体ProGRP(31-98)を1µg/mLの濃度にPBSで希釈し、96ウエルマイクロタイタープレート(NUNC、Maxisorp)の各ウエルに50µLずつ加え、4℃で一晩インキュベートした。各ウエルを2回ずつPBSで洗浄し、0.5%カゼインナトリウムと2%スクロースを含むPBS(pH7.1)を各ウエルに350µLずつ添加し、室温で3時間インキュベーションを行い、その後吸引除去した。反応液(1%BSA、0.05%カゼインナトリウム、1%ポリビニルピロリドン、10mMEDTA-2Na、0.15MNaCl、0.05%Tween20を含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.2)で、各ペプチドを2µg/mLの濃度に希釈した溶液を、50µLずつ各ウエルに添加した。次に、1µg/mLの濃度に希釈した各モノクローナル抗体を50µLずつ各ウエルに添加して、室温で60分間インキュベートを行った。この工程で、固相化されたProGRP(31-98)と溶液中の各ペプチドが競合して、各モノクローナル抗体と結合反応が行われる。その後、各ウエルを、0.05%Tween20を含むPBS(PBS-T)で5回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウスIgG抗体溶液を100µLずつ各ウエルに添加し、室温で20分間反応させた。PBS-Tで5回洗浄後、基質溶液(2mg/mLのオルトフェニレンジアミン、30%過酸化水素水0.9µL/mLを含む0.1Mクエン酸リン酸緩衝液、pH5.0)を100µLずつ各ウエルに添加し、室温で20分

40

50

間反応させた後、2 N硫酸を100 μ Lずつ各ウエルに添加して反応を停止させ、492 nmにおける吸光度を測定した。ペプチドを添加していないウエル(コントロール)を100%として、その阻害率(%)を表2に示す。

【0068】

【表2】

ペプチド aa No.	モノクローナル抗体(阻害率%)			
	PGCY9	PGCY17	PGCY24	GRP-3D6-2
31 - 52	0.0	0.0	0.0	0.0
42 - 53	0.0	0.0	0.0	2.3
44 - 55	0.0	15.8	14.0	18.7
45 - 57	0.0	89.8	86.0	38.8
46 - 59	0.0	98.5	97.6	88.6
47 - 61	0.0	96.6	81.6	93.1
55 - 66	91.1	6.5	0.0	15.3
57 - 68	25.3	0.0	0.0	9.6
40 - 60	0.0	97.0	96.2	92.4
44 - 62	17.3	99.2	99.5	99.4
54 - 78	96.3	17.7	0.0	19.5
54 - 90	89.2	0.0	0.0	11.9
70 - 90	0.0	0.0	0.0	0.0
82 - 96	0.0	0.0	0.0	0.0
31 - 98	96.0	96.7	93.4	94.8

aa No.; アミノ酸ナンバー

【0069】

表2に示されるように、各モノクローナル抗体の固相ポリペプチドに対する結合は、全てProGRP(31-98)の存在で90%以上阻害され、また全てProGRP(42-53)の存在では阻害されないことが確認された。モノクローナル抗体PGCY9では、80%以上の結合阻害が確認されたポリペプチドは、ProGRP(55-66)、ProGRP(54-78)及びProGRP(54-90)であった。モノクローナル抗体PGCY17及びPGCY24では、80%以上の結合阻害が確認されたポリペプチドは、ProGRP(45-57)、ProGRP(46-59)、ProGRP(47-61)、ProGRP(40-60)及びProGRP(44-62)であった。なお、モノクローナル抗体GRP-3D6-2で、80%以上の結合阻害が確認されたポリペプチドは、ProGRP(46-59)、ProGRP(47-61)、ProGRP(40-60)及びProGRP(44-62)であり、PGCY17やPGCY24で阻害活性が確認されたProGRP(45-57)に対する結合は弱く阻害された。

【0070】

モノクローナル抗体PGCY9は、前記(3)に記載の通りProGRP(55-66)及びProGRP(57-68)に結合し、かつProGRP(57-68)にProGRP(55-66)よりも強く結合した。また(4)では、ProGRP(55-66)で十分な阻害がかかり、ProGRP(57-68)で弱い阻害反応が認められた。したがってモノクローナル抗体PGCY9は、ProGRPの55-68番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識するものと考えられる。

【0071】

また(3)(4)のエピトープ解析結果から、モノクローナル抗体PGCY17及びPGCY24は、ProGRPの47-57番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識するものと推察される。なお、モノクローナル抗体GRP-3D6-2は、PGCY17やPGCY24よりもC末端側のProGRPの47-59番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープであると考えられる。また、モノクローナル抗体PGC

Y5とモノクローナル抗体PGCY12が認識するエピトープは、8つの連続するアミノ酸配列から形成される連続エピトープである。さらに、モノクローナル抗体PGCY17及びPGCY24は、ProGRP(31-98)の内部の8個の連続するアミノ酸配列からなるポリペプチドには結合せず、ProGRP(47-57)の11個の連続するアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識するものと推定された。各モノクローナル抗体が認識すると推定されるエピトープを、表3に示す。

【0072】

【表3】

モノクローナル抗体	エピトープ (aa No.)
PGCY9	55-68
PGCY17	47-57
PGCY24	47-57
PGCY12	34-41
PGCY5	70-76
GRP-3D6-2	47-59

10

【0073】

実施例3

【0074】

本発明の各モノクローナル抗体と特許第3210994号の実施例6及び7に示されたモノクローナル抗体GRP-3G2を用いて、血清などの検体保存中で安定なProGRP部分ペプチドの同定を試みた。尚、モノクローナル抗体GRP-3G2は、特許文献3に示されているように、ProGRPの84-88番目のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識する抗体である。

【0075】

凍結及び4でそれぞれ1、4、7日間保存した8例の検体A~Hについて、下記の測定を行った。96ウエルマイクロプレートの各ウエルに、各モノクローナル抗体(PGCY17、PGCY9、GRP-3G2)を4µg/mLの濃度で100µL加え、4で一晩インキュベートした。0.15M NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.3)で2回洗浄後、ブロッキング液(0.5%カゼインナトリウム、2%スクロースを含む10mMリン酸緩衝液、pH7.1)を350µL加え2時間静置した。ブロッキング液を除去後、反応液(1%BSA、0.05%カゼインナトリウム、1%ポリビニルピロリドン、10mMEDTA-2Na、0.15M NaCl、0.05%Tween20を含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.2)100µLと測定検体50µLを各ウエルに加え、37で1時間反応させた。洗浄液(0.05%Tween20を含む10mMリン酸緩衝液、pH7.3)で5回洗浄し、HRP標識をした各モノクローナル抗体(PGCY12、PGCY17、PGCY9、PGCY5)溶液100µLを添加して室温で30分間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、基質溶液(2mg/mLのオルトフェニレンジアミン、30%過酸化水素水0.9µL/mLを含む0.1Mクエン酸リン酸緩衝液、pH5.0)を100µL加え、30分間インキュベートし、2N硫酸を100µL加えて酵素反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで492nm(リファレンス波長620nm)の吸光度を測定した。

20

30

40

【0076】

固相化抗体と標識抗体に認識部位の異なる抗体を組み合わせることで、検体中に存在するProGRPの部分分解物が有する部分アミノ酸配列を推定することができる。今回用いた抗体の組合せを図6に示す。モノクローナル抗体PGCY12とPGCY17を組み合わせると、検体中のProGRP分解物の内、ProGRPの34-57番目のアミ

50

ノ酸配列を有する分解物を測定することができる。同様に、PGCY17とPGCY9を組み合わせると47-68番目のアミノ酸配列を有する分解物を、PGCY9とPGCY5を組み合わせると55-76番目のアミノ酸配列を有する分解物を、PGCY9とGRP-3G2を組み合わせると55-88番目のアミノ酸配列を有する分解物を、PGCY5とGRP-3G2を組み合わせると70-88番目のアミノ酸配列を有する分解物を、それぞれ測定することができる。

凍結保存した検体におけるProGRP測定値を100%として、4で1、4、7日間保存した検体におけるProGRPの測定値を表4に示す。

【0077】

【表4】

サンプル	4°C 保存期間	標識抗体	PGCY12	PGCY17	PGCY5	PGCY9	PGCY5
		固相抗体	PGCY17	PGCY9	PGCY9	GRP-3G2	GRP-3G2
		抗体の組合せで認識できるペプチド領域					
		34-57	47-68	55-76	55-88	70-88	
A	0 time	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 day	105.2	100.5	100.2	88.6	85.4	
	4 days	102.6	101.0	99.6	74.6	73.4	
	7 days	99.1	96.9	95.5	67.0	63.1	
B	0 time	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 day	103.7	98.1	99.3	96.0	88.8	
	4 days	109.4	92.3	94.5	79.3	75.7	
	7 days	118.7	90.4	90.6	66.2	66.8	
C	0 time	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 day	109.3	97.3	96.8	88.9	86.1	
	4 days	101.4	93.6	91.0	66.7	59.4	
	7 days	92.0	83.0	81.3	49.9	45.3	
D	0 time	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 day	105.0	96.3	98.8	86.0	92.5	
	4 days	101.6	90.1	92.1	68.5	75.0	
	7 days	107.4	89.2	85.2	60.5	74.5	
E	0 time	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 day	97.4	100.8	95.2	82.7	78.6	
	4 days	82.4	92.3	85.3	63.1	55.6	
	7 days	85.6	87.4	81.9	51.0	48.5	
F	0 time	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 day	101.2	98.2	96.5	89.7	88.5	
	4 days	100.7	89.6	85.6	75.6	75.0	
	7 days	95.4	82.1	78.0	62.0	69.4	
G	0 time	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 day	99.3	99.5	98.5	79.8	89.4	
	4 days	90.8	94.5	93.3	64.7	62.1	
	7 days	77.7	85.8	82.8	45.9	50.0	
H	0 time	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 day	105.7	104.0	103.7	96.8	98.1	
	4 days	109.9	96.6	96.3	85.0	85.4	
	7 days	114.4	90.5	85.2	72.5	79.3	

【0078】

モノクローナル抗体PGCY9とGRP-3G2の組合せ、及びモノクローナル抗体PGCY5とGRP-3G2の組合せでは、ほとんどの検体において、1日保存で85%以上の免疫活性が保持されているが、4日保存では55~85%に、さらに7日保存では全ての検体の免疫活性が80%以下に低下した。これは、特許文献3に示されているように、保存期間中に血液中のプロテアーゼ等により、ProGRPが配列番号1のLys-79のC末端側で切断されることによる免疫活性の消失と考えられる。

【0079】

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体PGCY12とPGCY17の組合せ、モノクローナル抗体PGCY17とPGCY9の組合せ、及びモノクローナル抗体PGCY5とPGCY9の組合せでは、比較的安定に免疫活性が保持されているが、PGCY12とPGCY17の組合せでは8検体中2検体(BとH)で保存によって免疫活性が上昇し、7日保存で110%を超えた。

【0080】

また、モノクローナル抗体PGCY17とPGCY9の組合せとモノクローナル抗体PGCY5とPGCY9の組合せを比較すると、7日保存で、後者で4検体の免疫活性が85%以下に低下した。一方、前者では、7日保存において全て80%以上の免疫活性が保持されており、8検体中6検体で85%以上の免疫活性が保持されていた。このことは、特許文献3に記載された方法によって測定されるProGRPの分解物よりも、モノクローナル抗体PGCY17とPGCY9を組み合わせることで測定される分解物の方が、検体を4で保存する場合において劣化がより少なく、測定対象として有利であることを意味する。

10

【0081】

実施例4

【0082】

特許文献3の実施例4に記載された方法において、抗体をモノクローナル抗体PGCY17とPGCY9の組合せに変更して、同モノクローナル抗体の組合せを利用した方法で必要とされる測定時間、測定検体量、測定感度を検討した。

20

【0083】

96ウエルマイクロプレートの各ウエルに、モノクローナル抗体PGCY9を抗体固定液(0.6M NaClを含む0.1M炭酸緩衝液、pH9.6)に5 μ g/mLとなるように溶解した溶液を120 μ L加え、4で一晚インキュベートした。0.15M NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.3)で2回洗浄後、ブロッキング液(0.5%カゼインナトリウム、5%スクロースを含む10mMリン酸緩衝液、pH7.1)を350 μ L加え2時間静置し、ブロッキングした。ブロッキング液を除去後、プレートを乾燥させた。乾燥後、反応液(1%BSA、1%ポリビニルピロリドン、0.05%カゼインナトリウム、0.05%Tween20、0.1%Triton X100、0.15M NaCl、10mM EDTA-2Na、40 μ g/mLのマウスIgGを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液、pH7.0)100 μ Lと測定検体25 μ Lを各ウエルに加え、37で1時間反応させた。洗浄液(0.05%Tween20を含む10mMリン酸緩衝液、pH7.3)で5回洗浄し、HRP標識したPGCY17のFab'を標識抗体希釈液(2%BSA、0.25%ポリビニルピロリドン、0.05%Tween20、0.05%カゼインナトリウム、0.15M NaCl、1%スクロース、25 μ g/mLのマウスIgGを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液、pH6.5)で溶解した液200 μ Lを添加して室温で20分間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、基質溶液(2mg/mLのオルトフェニレンジアミン、30%過酸化水素水0.9 μ L/mLを含む0.1Mクエン酸リン酸緩衝液、pH5.0)を100 μ L加え、20分間インキュベートし、2N硫酸100 μ Lを加えて酵素反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで492nm(リファレンス波長620nm)の吸光度を測定した。その標準曲線を図7に示す。

30

40

【0084】

その結果、本発明の方法は、総反応時間が100分間で、サンプル量が25 μ Lと少量にもかかわらず、約2.5pg/mLのProGRPを検出できることが確認された。この感度は、健常人検体中のProGRP濃度を検出するうえで十分な感度である。また、特許文献3の実施例4に記載された方法と比較すると、測定時間は120分から100分に短縮され、測定用検体量が1/4に減少し、かつ検出感度は約1.7倍に上昇したことになる。

【0085】

50

実施例 5

【0086】

ヤギ抗マウスIgG(Fc)(Jackson Immuno Research)抗体を0.5M NaClを含む0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)に2.5µg/mLの濃度で溶解した溶液50µLを96ウエルマイクロプレートの各ウエルに加え、4℃で一晩インキュベートした。0.15M NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.3)で2回洗浄後、ブロッキング液(0.5%カゼインナトリウム、2%スクロースを含む10mMリン酸緩衝液、pH7.1)を350µL加え2時間静置した。ブロッキング液を除去後、室温で乾燥させた。各モノクローナル抗体を反応液(1%BSA、0.05%カゼインナトリウム、1%ポリビニルピロリドン、10mMEDTA-2Na、0.15M NaCl、0.05%Tween20を含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.2)に5µg/mLの濃度で希釈した液100µLを各ウエルに加え、37℃で2時間反応させた。この反応で、固相のヤギ抗マウスIgG(Fc)に、各モノクローナル抗体のFc部分が結合することになる。

10

【0087】

次に、洗浄液(0.05%Tween20を含む10mMリン酸緩衝液、pH7.3)で各ウエルを5回洗浄し、反応液(1%BSA、0.05%カゼインナトリウム、1%ポリビニルピロリドン、10mMEDTA-2Na、0.15M NaCl、0.05%Tween20を含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.2)100µLと、ビオチン化した組換え体ProGRP(31-98)(0pg/mL、200pg/mL、1000pg/mL)溶液50µLを各ウエルに添加し、37℃で1時間反応させた。この反応で、各モノクローナル抗体が、ビオチン化した組換え体ProGRP(31-98)と結合する。

20

【0088】

洗浄液(0.05%Tween20を含む10mMリン酸緩衝液、pH7.3)で4回洗浄し、反応液(1%BSA、0.05%カゼインナトリウム、1%ポリビニルピロリドン、10mMEDTA-2Na、0.15M NaCl、0.05%Tween20を含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.2)で希釈したHRP標識をしたアビジンD(Vector)溶液100µLを添加して、室温で30分間反応させた。洗浄液で4回洗浄し、基質溶液(2mg/mLのオルトフェニレンジアミン、30%過酸化水素水0.9µL/mLを含む0.1Mクエン酸リン酸緩衝液、pH5.0)100µLを加え、30分間インキュベートし、2N硫酸100µLを加えて酵素反応を停止させた。マイクロプレートリーダーで492nm(リファレンス波長630nm)の吸光度を測定した。その結果を、図8に示す。

30

【0089】

これらのモノクローナル抗体の中で、ProGRP(55-68)に結合するモノクローナル抗体PGCY9が最も高い反応性を示し、特許文献3の実施例4で固相に用いたモノクローナル抗体GRP-3D6-2と比較しても、約3.3倍高い値を示した。ProGRP(47-57)に結合するPGCY17及びPGCY24は、ほぼ同じような反応性を示し、PGCY17よりもわずかにC末端側であるProGRP(47-59)を認識するGRP-3D6-2は、PGCY17よりも高い反応性を示した。また、ProGRP(70-76)近傍を認識するPGCY5及びGRP-2B10は、これらのモノクローナル抗体の中で低い反応性を示し、それらよりさらにC末端側であるProGRP(84-88)を認識するGRP-3G2は、比較的高い反応性を示した。これらのモノクローナル抗体の認識部位と反応性から、55番目から68番目までのアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識するモノクローナル抗体を使用することにより、高感度で測定検体中のProGRP又はその分解物を捕捉することができると考えられる。また、PGCY5及びGRP-2B10の反応性が低いことから、70番以降のアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は反応性が低いと考えられ、55番目から69番目までのアミノ酸配列によって提示されるエピトープを認識するモノ

40

50

クローナル抗体を使用することによっても、高感度でProGRP又はその分解物を捕捉することができると考えられる。

【0090】

実施例6

【0091】

(1) 各モノクローナル抗体のビオチン化

各モノクローナル抗体0.5mgを1mLの0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)に添加し、ジメチルホルムアミドに溶解したSulfo-NHS-Biotin(PIERCE)をモル比IgG:Biotin=1:20となるように添加し、室温で60分間ゆるやかに攪拌した。1.5Mグリシン溶液(pH8.9)を100μL添加して、室温で10分間ゆるやかに攪拌した。PBSを移動相としてゲルろ過を行い、ビオチン化モノクローナル抗体を得た。

10

【0092】

(2) 各モノクローナル抗体の組合せの検討

96ウエルマイクロプレートの各ウエルに、各モノクローナル抗体を5μg/mLの濃度で抗体固定液(0.5M NaClを含む0.1M炭酸緩衝液、pH9.6)に溶解した溶液100μLを加え、4で一晚インキュベートした。0.15M NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.3)で2回洗浄後、ブロッキング液(0.5%カゼインナトリウム、2%スクロースを含む10mMリン酸緩衝液、pH7.1)を350μL加え2時間静置しブロッキングした。ブロッキング液を除去後、反応液(1%BSA、0.05%カゼインナトリウム、1%ポリビニルピロリドン、10mMEDTA-2Na、0.15M NaCl、0.05%Tween20を含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.2)100μLと組換え体ProGRP(0、100、500、2000pg/mL)を50μLずつ各ウエルに加え、37で1時間反応させた。洗浄液(0.05%Tween20を含む10mMリン酸緩衝液、pH7.3)で5回洗浄し、ビオチン化した各モノクローナル抗体を1μg/mLの濃度で反応液に溶解させたものを100μL添加して室温で30分間反応させた。反応液で希釈したHRP標識をしたアビジンD(Vector)溶液100μLを添加して、室温で30分間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、基質溶液(2mg/mLのオルトフェニレンジアミン、30%過酸化水素水0.9μL/mLを含む0.1Mクエン酸リン酸緩衝液、pH5.0)100μLを加え、20分間インキュベートし、2N硫酸を100μL加えて酵素反応を停止させた。マイクロプレートリーダーで492nm(リファレンス波長600nm)の吸光度を測定した。その反応性を、5段階(高い順から、☆;非常に高い反応性、◎;高い反応性、○;中程度の反応、△;わずかな反応性、×;反応せず)に分けて表5に示した。

20

30

【0093】

【表5】

ビオチン化抗体		PGCY12	PGCY17	PGCY24	GRP-3D6-2	PGCY9	PGCY5	GRP-2B10	GRP-3G2
固相抗体		34-41	47-57	47-57	47-59	55-68	70-76	71-75	84-88
PGCY12	34-41	×	○	○	×	×	×	×	△
PGCY17	47-57	○	×	×	×	☆	○	○	○
PGCY24	47-57	△	×	×	×	○	×	×	×
GRP-3D6-2	47-59	○	×	×	×	△	○	△	○
PGCY9	55-68	○	☆	☆	×	×	◎	○	◎
PGCY5	70-76	△	×	×	×	○	×	×	△
GRP-2B10	71-75	×	△	×	×	△	×	×	△
GRP-3G2	84-88	○	○	△	○	◎	○	△	×

☆:非常に高い反応性
◎:高い反応性
○:中程度の反応性
△:わずかな反応性
×:反応せず

40

【0094】

表5に示されるように、まず、同一モノクローナル抗体同士及び認識するエピトープが

50

同じ又はこれを提示するアミノ酸配列が大きく重なり合っていると思われる抗体同士は、反応性が確認できなかった。P G C Y 9を固相化した場合、ビオチン化抗体としては、P G C Y 17及びP G C Y 24が最も反応性が高く、次にG R P - 3 G 2及びP G C Y 5で、その次にG R P - 2 B 10及びP G C Y 12であり、G R P - 3 D 6 - 2では反応性は確認できなかった。

【0095】

P G C Y 17を固相化した場合、ビオチン化抗体としてはP G C Y 9が最も反応性が高く、次にG R P - 3 G 2、P G C Y 5、G R P - 2 B 10及びP G C Y 12であり、P G C Y 24及びG R P - 3 D 6 - 2の反応性は確認できなかった。

【0096】

P G C Y 24を固相化した場合、ビオチン化抗体としてはP G C Y 9が中程度の反応性を示したが、他の抗体はほとんど反応性を確認できなかった。

【0097】

G R P - 3 D 6 - 2を固相化した場合、ビオチン化抗体としてはG R P - 2 B 10よりも、G R P - 3 G 2、P G C Y 5、及びP G C Y 12が若干高い反応性を示した。

【0098】

P G C Y 9をビオチン化抗体として用いた場合、固相抗体としてP G C Y 17が最も高い反応性を示し、次にG R P - 3 G 2、その次にP G C Y 24、P G C Y 5が高かった。

【0099】

したがって、固相抗体にP r o G R P (5 5 - 6 8) に結合するP G C Y 9を用い、検出側の抗体である標識抗体にP r o G R P (4 7 - 5 7) に結合するP G C Y 17やP G C Y 24を用いる、あるいはその逆の、固相抗体にP G C Y 17やP G C Y 24を用い、検出側の抗体である標識抗体にP G C Y 9を用いることで、P r o G R P 又はその分解物の高感度な測定を行うことが可能である。

【産業上の利用可能性】

【0100】

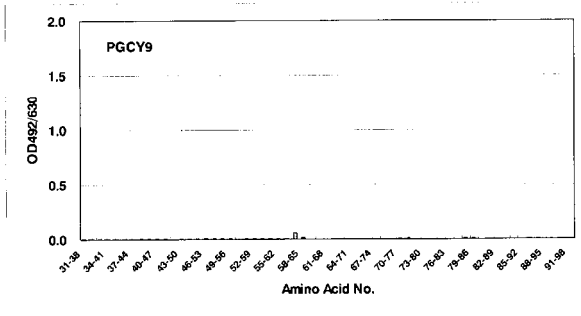
本発明の方法は、新たに確認された、検体中でも安定に保存されているP r o G R P のある種の分解物上のエピトープを測定対象とすることによって、従来の測定法と同等の検出感度が得られることに加え、採取後の検体の取扱い方に影響を受けにくくなり、再現性の高い測定値が得られるなど、血中P r o G R P の検出に有効である。

10

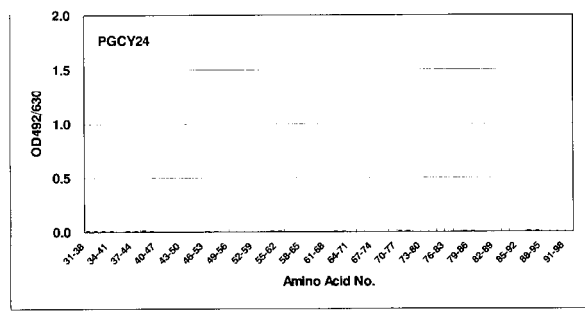
20

30

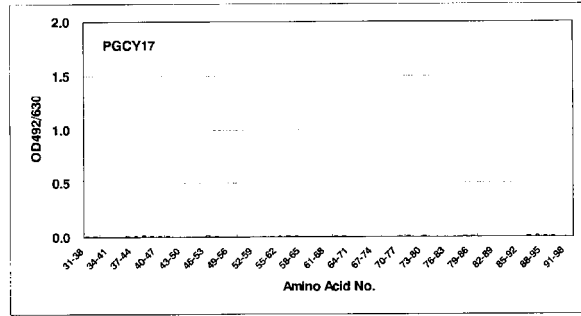
【 図 1 】



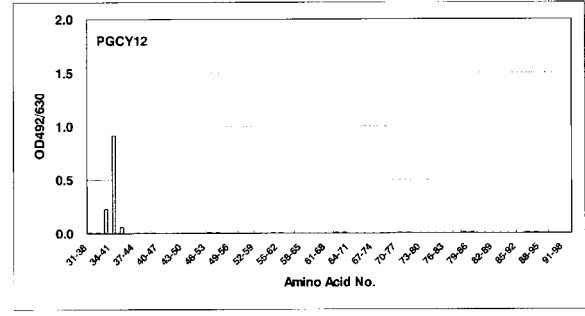
【 図 3 】



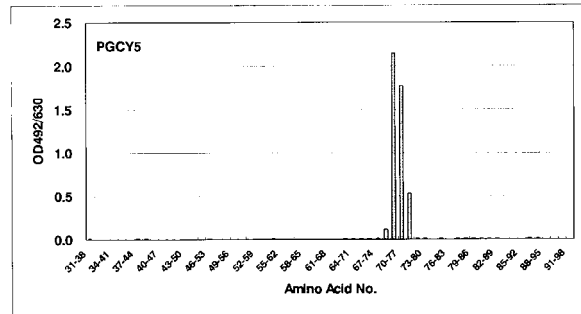
【 図 2 】



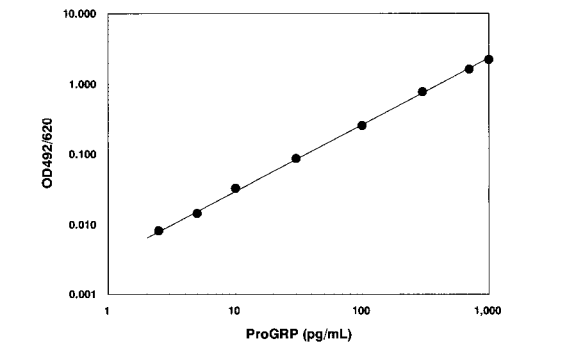
【 図 4 】



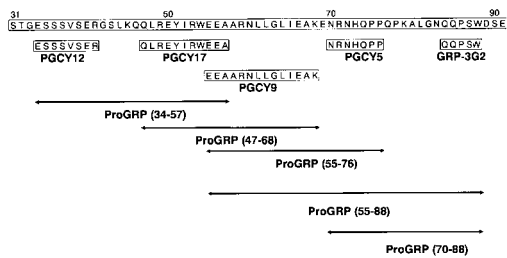
【 図 5 】



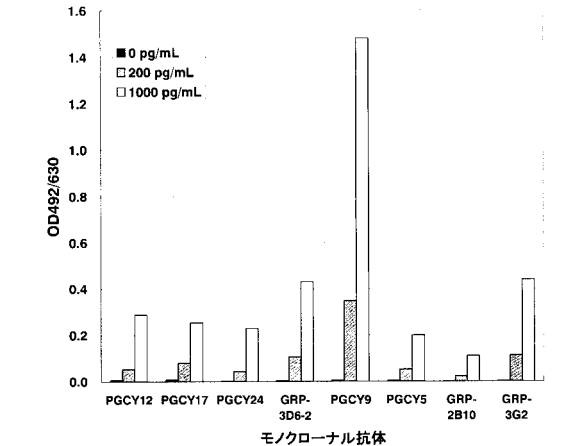
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



【配列表】

0005391071000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 6 / 1 1 7 9 9 4 (W O , A 1)
カタログ CanAg ProGRP EIA, Prod. No.220-85, Fujirebio Diagnostics AB, Sept.2007
Endocrinology, Vol.148, No.3(Mar.2007)p.1330-1339

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

专利名称(译)	抗胃泌素释放肽前体的抗体及其用途		
公开(公告)号	JP5391071B2	公开(公告)日	2014-01-15
申请号	JP2009537894	申请日	2008-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
[标]发明人	青柳克己 井澤雪路		
发明人	青柳 克己 井澤 雪路		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/574 G01N33/53 C12N15/09 C12N5/10 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/26 C07K2317/34 G01N33/57484 G01N33/74 G01N2333/5758 G01N2800/56		
FI分类号	C07K16/18 G01N33/574.ZNAA G01N33/53.B C12N15/00.A C12N5/00.102 C12P21/08		
代理人(译)	佐伯 宪生		
审查员(译)	三原贤治		
优先权	2007278843 2007-10-26 JP		
其他公开文献	JPWO2009054091A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供新的灵敏ProGRP测量方法，不存在测量变化和操作约束（如样品处理）等问题。一种使用两种或多种不同抗体测量胃泌素释放肽前体和/或其降解产物的方法，所述抗体识别由SEQ ID NO：1所示氨基酸序列的氨基酸序列47-68呈递的表位。本发明的方法可以在比传统测量方法更短的时间内在较短的时间内从少量的样品中检测ProGRP或其降解产物，并且具有较高的检测灵敏度，在冰箱中储存的样品中。

ペプチド aa No.	モノクローナル抗体 (OD492/620)			
	PGCY9	PGCY17	PGCY24	GRP-3D6-2
31 - 52	0.008	0.008	0.008	0.008
42 - 53	0.009	0.008	0.008	0.009
44 - 55	0.005	0.004	0.003	0.004
45 - 57	0.004	0.004	0.004	0.003
46 - 59	0.004	0.017	0.010	0.006
47 - 61	0.004	0.074	0.057	0.082
55 - 66	0.134	0.003	0.005	0.002
57 - 68	0.239	0.004	0.002	0.003
40 - 60	0.003	0.160	0.156	0.097
44 - 62	0.040	0.297	0.269	0.243
54 - 78	0.376	0.004	0.003	0.004
54 - 90	0.399	0.004	0.004	0.003
70 - 90	0.008	0.006	0.008	0.007
31 - 98	3.304	1.391	1.041	1.624