

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B1)

(11) 特許番号

特許第6189499号
(P6189499)

(45) 発行日 平成29年8月30日(2017.8.30)

(24) 登録日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 V
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 D
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 B
	GO 1 N 33/574 E

請求項の数 18 (全 25 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2016-146202 (P2016-146202)</p> <p>(22) 出願日 平成28年7月26日(2016.7.26)</p> <p>審査請求日 平成28年7月26日(2016.7.26)</p> <p>(31) 優先権主張番号 1650619-8</p> <p>(32) 優先日 平成28年5月9日(2016.5.9)</p> <p>(33) 優先権主張国 スウェーデン(SE)</p> <p>早期審査対象出願</p>	<p>(73) 特許権者 516224156 グリコボンド・アクチボラゲット GLYCOBOND AB スウェーデン、583 30 リンショー ピング、テクニクリンゲン、1・エフ</p> <p>(74) 代理人 110001195 特許業務法人深見特許事務所</p> <p>(72) 発明者 ペータル・ポールソン スウェーデン、582 46 リンショー ピング、ベルネルスガタン、26</p> <p>審査官 草川 貴史</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規の結合アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト個体が肝細胞癌(HCC)を患うリスクを評価するための方法であって、
 - 固相に固定化された、配列番号1によるアミノ酸を有するペプチドと90%、95%、99%、または100%同一性などの少なくとも90%同一性を有する1価フコース結合性ペプチドを供給するステップと、
 - 試料を固定化フコース結合性ペプチドと接触させるステップと、
 - 前記フコース結合性ペプチドに結合した任意のフコシル化AGPを検出するステップとを含む、試料においてフコシル化 1 - 酸性糖タンパク質(AGP)を検出するための方法を用いて前記個体から試料におけるフコシル化AGPを検出するステップを含み、
ここにおいて、HCCを患っていないヒト個体に由来した参照濃度と比較しての、フコシル化AGPの濃度の増加が、個体がHCCを患うリスクの増加を示しており、肝硬変および/または肝炎を患っているが、HCCを患っていないヒト個体に由来した参照濃度と比較しての、フコシル化AGPの濃度の増加が、個体がHCCを患うリスクの増加を示している、方法。

【請求項2】

試料においてAGPの量を定量化することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

任意の結合したフコシル化AGPの検出が、前記のフコース結合性ペプチドに結合したフコシル化AGPに特異的に結合する能力がある第1の検出抗体と、任意の結合したフコ

シル化 A G P を接触させることにより実施される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

第 1 の検出抗体が、ヒト A G P のアミノ酸残基 1 8 3 ~ 2 0 1 (配列番号 3) を含むエピトープに特異的である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

第 1 の検出抗体が検出可能な標識にコンジュゲートされている、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記フコース結合性ペプチドに結合した任意のフコシル化 A G P の検出が、前記フコース結合性ペプチドに結合したフコシル化 A G P に特異的に結合する能力がある第 1 の検出抗体、および第 1 の検出抗体に特異的に結合する能力がある第 2 の検出抗体と接触させることにより実施され、かつ第 2 の検出抗体が検出可能な標識にコンジュゲートされている、請求項 3 または 4 に記載の方法。

10

【請求項 7】

検出可能な標識が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびグルコースオキシダーゼを含む酵素、ならびにフルオロフォアからなる群から選択される、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

第 1 の検出抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である、請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 9】

第 2 の検出抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 10】

第 1 の検出抗体が、ヒト A G P のアミノ酸残基 1 8 3 ~ 1 8 9 と少なくとも一部分、重複するエピトープに特異的に結合する能力がある抗体である、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

任意の結合したフコシル化 A G P の検出が、フコース結合性ペプチドを固相から遊離させて、ペプチド：A G P 複合体を固相から分離し、分離された画分において A G P を検出することを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

30

【請求項 12】

分離された画分における A G P の検出が S D S - P A G E またはウェスタンブロットを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

総 A G P 濃度および総 - フェトプロテイン (A F P) 濃度の少なくとも 1 つを測定することをさらに含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

総 A G P 濃度および総 - フェトプロテイン (A F P) 濃度を測定することをさらに含む、請求項 1 2 に記載の方法。

40

【請求項 15】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法における、固相に固定化された、配列番号 1 によるアミノ酸を有するペプチドと 9 0 %、9 5 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一性などの少なくとも 9 0 % 同一性を有する 1 価フコース結合性ペプチド、および前記フコース結合性ペプチドに結合したフコシル化 A G P に特異的に結合する能力がある少なくとも第 1 の検出抗体を含む部品を構成要素とするキットの使用。

【請求項 16】

第 1 の検出抗体が検出可能な標識にコンジュゲートされている、請求項 1 5 に記載の使用。

【請求項 17】

50

第1の検出抗体に特異的に結合する能力がある第2の検出抗体をさらに含み、第2の検出抗体が検出可能な標識にコンジュゲートされている、請求項16に記載の使用。

【請求項18】

検出可能な標識が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびグルコースオキシダーゼを含む酵素、ならびにフルオロフォアからなる群から選択される、請求項16または17に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、バイオマーカー、およびバイオマーカーの検出に用いるアッセイの分野、ならびにそのようなアッセイにおいて有用な抗体に関する。特に、本発明は、原発性肝臓癌（肝細胞癌、HCC）を示すバイオマーカーを検出するためのアッセイに関する。

【背景技術】

【0002】

背景

原発性肝臓癌（肝細胞癌、HCC）は、最も高頻度で見られるヒト癌の1つであり、3番目に致死性が高い。HCCのたいていの症例は、肝硬変を背景に発症し、硬変およびHCCを発症する主な原因は、慢性B型肝炎ウイルス（HBV）またはC型肝炎ウイルス（HCV）感染である。HBVおよびHCV感染は、世界中の全HCC症例の80%より多くと関連している¹⁻³。HCCの発症の非ウイルス性背景には、アルコール性疾患、糖尿病、ならびに代謝性疾患および自己免疫性疾患によって引き起こされる肝硬変が挙げられる。

【0003】

HCC腫瘍が初期に検出された場合には、外科的切除、移植術、または高周波アブレーションを用いる治療的処置を施すことができる。しかしながら、治療の可能性のある処置に適している初期においては、HCC腫瘍の30%が検出されるのみである。

【0004】

HCCの進行を診断および測定するために最もよく用いられる血清バイオマーカーは、
- フェトプロテイン（AFP）である。しかしながら、HCCを検出するAFPの診断能力は限られている。肝硬変と肝炎のどちらもAFPのレベルの上昇をもたらす得、HCCと診断された患者の半数近くは、AFPのレベルの上昇を示さない。別のバイオマーカーである、デス - - カルボキシプロトロンビン（DCP）は、いくつかの臨床研究において、診断感度がAFPより若干高いことが示されている⁴。しかしながら、AFPとDCPのどちらも、スクリーニングマーカーとして用いられるには不十分な診断感度および特異性を示し、監視においてそれらを診断マーカーとして用いることは、国際ガイドラインでは推奨されていない⁵。超音波は、より高い診断感度および特異性を示しているが（60~80%）、高い費用と、初期において腫瘍を検出できないことを欠点にもつ⁶。

【0005】

血清糖タンパク質のグルコシル化変化が、肝臓疾患ならびにHCCの発症および進行と関連することが示されている。最もよく研究された例は、AFPのコアフコシル化型である、AFP-L3の増加であり、それは、単独でAFPを用いるより、HCCに対してより高い特異性を示している⁷。

【0006】

血漿タンパク質のフコシル化の増加は、HCCに関連づけられた一般的な所見であり、質量分析研究により、肝硬変患者とHCC患者との間でのフコシル化パターンの特定の違いが明らかにされている⁸⁻¹³。しかしながら、フコースに対して幅広い特異性を有するヒヨクチャワンタケ（*Aleuria aurantia*）由来のフコース結合性レクチン（AAL）などのレクチンを用いる研究は、HCCを有する患者と肝硬変を有する患者とを区別するのに問題がある場合が多い^{14, 15}。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

フコース結合性レクチン A A L は、疾患に関連づけられた血漿タンパク質のフコシル化変化を研究するために広く用いられている。A A L は、2つの同一のサブユニットで構成され、各サブユニットは、フコースに対する5つの結合部位を含有する^{1 6}。A A L は、フコシル化オリゴ糖に対する幅広い特異性を示し、S L e^xおよびS L e^aなどのシアリル化構造およびフコシル化構造を含む、1 - 6、1 - 2、1 - 3、および1 - 4 連結したフコースを有するオリゴ糖に結合する。5つの異なる結合部位は、結合特異性および親和性が異なる。

【 0 0 0 8 】

A A L に由来した1価フコース結合性ペプチドは国際公開第2009/136859号から知られている。結合部位2のみを含むA A L の組換え型、S 2 が作製されている^{1 7}。この組換え型は、A A L と比較して、フコシル化オリゴ糖に対してより限定された結合性を示し、シアリル化/フコシル化オリゴ糖に対する結合性が低下していた。それはまた、フコシル化構造に対する親和性の全般的な低下を示し、多フコシル化オリゴ糖および1 - 6 連結型フコースを含有するオリゴ糖に対して最も高い親和性を示した。

10

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【 特許文献 1 】 国際公開第2009/136859号

【 発明の概要 】

20

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

本発明は、原発性肝臓癌（肝細胞癌、H C C ）に特異的なグリコシル化パターンを有する1 - 酸性糖タンパク質（A G P ）をアッセイするためのアッセイに関する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

第1の態様において、本発明は、以下のステップを含む、試料においてフコシル化1 - 酸性糖タンパク質（A G P ）を検出するための方法に関する：

- 固相に固定化された、配列番号1によるアミノ酸を有するペプチドと85%、90%、95%、99%、または100%同一性などの少なくとも80%同一性を有する1価フコース結合性ペプチドを供給するステップ；
- 試料を固定化フコース結合性ペプチドと接触させるステップ；および
- 前記フコース結合性ペプチドに結合した任意のフコシル化A G P を検出するステップ。

30

【 0 0 1 2 】

さらなる態様において、本発明は、ヒト個体が肝臓癌（H C C ）を患うリスクを評価するための方法であって、上記態様による方法を用いて前記個体由来の試料においてフコシル化A G P を検出するステップを含み、H C C を患っていないヒト個体に由来した参照濃度と比較して、フコシル化A G P の濃度の増加が、その個体がH C C を患うリスクの増加を示す、方法に関する。

40

【 0 0 1 3 】

さらなる態様において、本発明は、固相に固定化された、配列番号1によるアミノ酸を有するペプチドと85%、90%、95%、99%、または100%同一性などの少なくとも80%同一性を有する1価フコース結合性ペプチド、および前記フコース結合性ペプチドに結合したフコシル化A G P に特異的に結合する能力がある少なくとも第1の検出抗体を含む部品のキットに関する。

【 0 0 1 4 】

本発明はまた、上記態様による方法における、本発明によるキットの使用に関する。

さらなる態様において、本発明は、配列番号3によるアミノ酸配列と88%、94%、または100%などの少なくとも83%同一性を有するアミノ酸配列からなる単離された

50

ペプチド、および抗体の産生におけるその使用に関する。そのような抗体は、上記態様による方法において有用である。

【0015】

本発明はまた、ヒトAGPのアミノ酸残基183～189と少なくとも一部分、重複するエピトープに特異的に結合する能力がある抗体、およびヒトAGPのアミノ酸残基183～201と少なくとも一部分、重複するエピトープに特異的に結合する能力があるIgG抗体に関する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A】上部パネル：固体支持体上に固定化された抗体#058を用いた標準ELISAの図解。下部パネル：肝細胞癌（HCC）、硬変を有する患者から得られた試料、ならびに陰性および陽性対照についての測定された吸光度値。

10

【図1B】上部パネル：固体支持体上に固定化されたS2を用いた逆ELISAの図解。下部パネル：肝細胞癌（HCC）、硬変を有する患者から得られた試料、ならびに陰性および陽性対照についての測定された吸光度値。

【図2】逆S2-ELISAにおけるウサギポリクローナル抗体#058と市販の抗AGP抗体の比較。肝細胞癌（HCC）を有する患者、硬変を有する患者、肝炎を有する患者から得られた試料、および正常対照について分析を実施した。

【図3】患者血漿試料由来の、AALで濃縮された、およびS2で濃縮された1-酸性糖タンパク質（AGP）のウェスタンブロット分析。レーン1～4は硬変試料、レーン5～8はHCC試料、レーン9は肝炎試料、レーン10は正常血漿試料を表す。AGPは、抗ヒトAGP抗体058を用いて検出された。

20

【図4A】逆S2-ELISAアッセイにおける患者試料由来の異なる濃度の精製AGPの結合。HCC試料（黒色三角形）、硬変試料（黒色四角形）、および正常試料（黒色円形）由来のAGPの結合を、逆S2-ELISAにおいて分析した。

【図4B】逆S2-ELISAにおけるマトリックス効果の分析。1%BSAを含有するPBS中に希釈された（円形）、および正常血漿中に希釈された（黒色四角形）、HCC患者試料由来の異なる濃度の精製AGPの結合。

【図4C】逆S2-ELISAアッセイにおける異なる濃度のdsAGPの結合。

【図5A】肝炎、硬変、およびHCCを有する患者におけるS2結合AGPのレベルの散布図。

30

【図5B】肝炎、硬変、およびHCCを有する患者におけるAGPのレベルの散布図。

【図5C】肝炎、硬変、およびHCCを有する患者におけるAFPのレベルの散布図。

【図6】AGPおよびS2結合AGPのレベルの相関プロット。rスクエア値は0.11である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

定義

本明細書に用いられる全ての用語および単語は、一般的に、当業者によりそれらに一般的に与えられた意味を有するものと解釈されるべきである。明瞭にするために、いくつかの用語を下記で明確に定義する。

40

【0018】

抗体に関して本明細書で用いられる場合、「特異性」は、特定のエピトープに、類似しているが非同一のエピトープと比較して有意により高い親和性で結合する抗体の質を意味する。

【0019】

本明細書で用いられる場合、「親和性」は、物質間または粒子間における、それらを化学的に結合させ、そのまま留まらせる引力を意味する。親和性は、2つの物質が強い、もしくは弱い化学結合を形成して、分子もしくは複合体を形成する傾向、または抗原-抗体複合体の熱力学的結合強度を表す。複合体における2つの物質間の非共有結合性結合の強

50

度は、複合体の解離定数により測定される。免疫学の範囲内では、親和性は、単一の抗原結合部位と単一の抗原決定基との間の相互作用の強度の熱力学的表現、およびしたがって、それらの間での立体化学的適合性の熱力学的表現である。

【0020】

本明細書で用いられる場合、「AGP」は、1-酸性糖タンパク質（別名オロソムコイド）を意味する。AGPは、2.8～3.8のpIを有する41～43kDaの糖タンパク質である。成熟ヒトAGPについて、ペプチド部分は、2つのジスルフィド架橋を有する183個のアミノ酸の単鎖である。糖含有量は、分子量の45%に相当し、5～6個の、高度にシアリル化された複合型N結合型グリカンの形で付着している。ヒトAGPの配列は、配列番号2として提供され、その配列において、残基1～18は、成熟タンパク質中には存在しないシグナルペプチドである。本開示のAGPにおける特定のアミノ酸位置は、配列番号2による配列を用いて参照される。

10

【0021】

本明細書で用いられる場合、「HCC」は、肝細胞癌を意味する。HCCは、肝臓の原発性悪性腫瘍であり、主に、基礎慢性肝臓疾患および/または肝硬変を有する患者に起こる。原発性悪性腫瘍とは、HCCが転移性肝臓癌と区別されるべきであることが意図され、その転移性肝臓癌とは、別の器官から生じ、その後、転移を通して肝臓へ広がっている。HCCは肝臓癌の大部分を占める。

【0022】

本明細書で用いられる場合、「同一性」は、2つのアミノ酸配列が、アラインメントにおいて同じ位置に同じ残基を有する程度を意味する。同一性は、パーセンテージとして表される。アラインメントは、同一性および保存の最大レベルを達成するように、2つまたはそれより多くのアミノ酸配列のアミノ酸残基をうまく整合させる工程または結果である。アミノ酸配列のアラインメントは、European Bioinformatics Instituteのウェブサイト、<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>上で利用可能なClustal Omegaなどのいくつかの利用可能なツールによりなされ得る。

20

【0023】

配列番号1によるアミノ酸を有するペプチドと85%、90%、95%、99%、または100%同一性などの少なくとも80%同一性を有するペプチドは、本開示において、まとめて「S2」または「S2ペプチド」と呼ばれる。

30

【0024】

配列

配列番号1は、結合部位2のみを含むヒヨロチャワンタケ (*Aleuria aurantia*) レクチン (AAL) の組換え型のアミノ酸配列である。

【0025】

配列番号2は、ヒト1-酸性糖タンパク質 (AGP) の配列を示す。

配列番号3は、ヒト1-酸性糖タンパク質 (AGP) のアミノ酸残基183～201を示す。

【0026】

発明の詳細な説明

本発明者らは、下記でS2-ペプチドと表示された、配列番号1によるアミノ酸配列を有する1価フコース結合性ペプチドが、肝細胞癌を示すグリコシル化パターンを有する1-酸性糖タンパク質 (AGP) の存在をアッセイすることにおいて有用である結合特性を示すことを同定している。

40

【0027】

肝炎、硬変、およびHCCを有する患者由来の血漿においてAAL結合AGPの量に差があるかどうかを分析するために、レクチンアガロースビーズ沈降を用いた。正常と比較して、硬変患者試料とHCC患者試料の両方においてAAL結合AGPの増加があり、それは、フコシル化の増加と一致している。しかしながら、S2-ペプチドを用いて免疫沈

50

降を実施した場合、硬変患者と肝炎患者の両方と比較して、HCC患者はそれらの血漿においてレクチン結合AGPのレベルが増加する傾向があった。

【0028】

したがって、第1の態様において、本発明は、以下のステップを含む、試料においてフコシル化 1 - 酸性糖タンパク質 (AGP) を検出するための方法に関する：

- 固相に固定化された、配列番号1によるアミノ酸を有するペプチドと85%、90%、95%、99%、または100%同一性などの少なくとも80%同一性を有する1価フコース結合性ペプチド (S2 - ペプチド) を供給するステップ；
- 試料を固定化フコース結合性ペプチドと接触させるステップ；および
- 前記フコース結合性ペプチドに結合した任意のフコシル化AGPを検出するステップ

10

【0029】

固相は、生物学的アッセイにおいて有用ないかなる型のものでよい。現在、好ましい実施形態には、ストレプトアビジンが共有結合的に付着している、ポリスチレンマイクロタイタープレートおよびアガロースビーズが挙げられる。固体支持体の他の型には、ゲルマトリックス、セルロースおよびニトロセルロースマトリックス、ゲルビーズ、磁気ビーズ、プラスチック (例えば、ポリスチレン) ビーズ、ならびに平面基板 (スライド) が挙げられる。S2 - ペプチドは、標準技術を用いて固相に固定化することができる。

【0030】

ポリスチレンで構成された固相を用いる場合、S2 - ペプチドは、当技術分野において知られているような、および実施例に記載されたような受動的吸着によって固定化することができる。S2 - ペプチドはまた、例えば、実施例にも記載されているようにS2 - ペプチドをビオチン化し、共有結合的に付着したストレプトアビジン部分を有する固相を用いることにより、固相上に可逆的に固定化することができる。

20

【0031】

1価フコース結合性ペプチドは、配列番号1によるアミノ酸を有するペプチドと100%同一ではない場合、好ましくは、実施例1に開示された条件下で、配列番号1によるアミノ酸配列を有するペプチドと本質的に同じ、またはより高い、肝細胞癌を示すグリコシル化パターンを有するフコシル化AGPに対する親和性を示す。

【0032】

本方法に用いられる試料は、好ましくは、血漿、血清、または血液試料である。試料は、好ましくは、HCCを患っているのではないかと疑われるヒト個体由来である。試料に任意で存在するフコシル化AGPがS2 - ペプチドに結合することを可能にするのに適した条件下で、固体支持体上に固定化されたS2 - ペプチドと試料を接触させる。例示的な条件は、実施例に提供されている。

30

【0033】

一実施形態において、任意の結合したフコシル化AGPの検出は、前記フコース結合性ペプチドに結合したフコシル化AGPに特異的に結合する能力がある第1の検出抗体と、任意の結合したフコシル化AGPを接触させることにより実施される。

【0034】

一実施形態において、第1の検出抗体は、第1の検出抗体に対する特異性を示す第2の検出抗体を用いることにより検出される。例えば、第1の検出抗体が、ある特定の種において産生されたポリクローナルIgG抗体である場合には、第2の検出抗体は、当技術分野において一般的に用いられているように、この種由来のIgG抗体に対して産生された抗体であり得る。この実施形態において、第2の検出抗体は、検出可能な標識にコンジュゲートされている。

40

【0035】

上記実施形態に用いられる検出可能な標識は、選択されたアッセイ形式において適しいかなる検出可能な標識であってもよく、それらには、非限定的に、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびグルコースオキシダーゼを含む酵素、ならび

50

にフルオロフォアが挙げられる。

【0036】

一実施形態において、S2 - ペプチドは、固相に可逆的に固定化されている。その後、任意の結合したフコシル化AGPの検出は、S2 - ペプチドを固相から遊離させ、かつS2 - ペプチドに結合した任意のフコシル化AGPと共にS2 - ペプチドを溶出し、またはフコシル化AGPをS2 - ペプチドから遊離させることにより、実施され得る。その後、フコシル化AGPは、検出することができ、任意で、溶出液において定量化することができる。

【0037】

さらなる態様において、本発明は、ヒト個体が肝細胞癌(HCC)を患うリスクを評価するための方法であって、上記のような方法を用いて前記個体由来の試料においてフコシル化AGPを検出するステップを含み、HCCを患っていないヒト個体に由来した参照濃度と比較して、フコシル化AGPの濃度の増加が、その個体がHCCを患うリスクの増加を示す、方法に関する。

10

【0038】

前の態様に関して、試料は、好ましくは、血液、血清、または血漿の試料である。

この態様の一実施形態において、本発明は、試料において総AGP濃度および総 - フェトプロテイン(AFP)濃度の1つまたは両方を測定することをさらに含む。総AGPおよび総AFPについてのアッセイは、いくつかの供給業者、例えば、Fujirebio Diagnostics, Inc., R&D Systems, Inc.、およびLifeSpan Biosciences, Inc.から市販されている。これらの1つまたは2つの追加のバイオマーカーの組み合わせを用いることにより、S2 - ペプチドに結合したフコシル化AGPのみの測定と比較して、一方の側のHCCと他方の側の硬変および肝炎との間のさらに確実な区別が可能になる。

20

【0039】

さらなる態様において、本発明は、本発明による方法を実施するための部品のキットに関する。そのようなキットは、好ましくは、固相に固定化された、配列番号1によるアミノ酸を有するペプチドと85%、90%、95%、99%、または100%同一性などの少なくとも80%同一性を有する1価フコース結合性ペプチド、および前記フコース結合性ペプチドに結合したフコシル化AGPに特異的に結合する能力がある少なくとも第1の

30

【0040】

第1の検出抗体は、検出可能な標識にコンジュゲートされていてもよく、またはキットは、第1の検出抗体に特異的に結合する能力がある第2の検出抗体を含んでもよく、その場合、第2の検出抗体が検出可能な標識にコンジュゲートされている。検出可能な標識は上記で開示されている通りである。

【0041】

一実施形態において、試料においてフコシル化 1 - 酸性糖タンパク質(AGP)を検出するために用いられる方法は、逆ELISAにおいて具体化される。

【0042】

ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)は、血清などの分析混合物から成分を検出および定量化するための周知の方法であり、1971年に最初に報告された。それ以後、その方法は、さらに発達し、広く用いられている。直接的ELISAは別として、3つのバリエーション;間接的ELISA、サンドイッチELISA、および競合的ELISAが一般的に用いられている。ELISA分析および標準プロトコールの詳細な開示は、ウェブサイトELISAエンサイクロペディア(<http://www.elisa-antibody.com/>)で見出すことができる。

40

【0043】

一般的に、ELISA分析は、以下のステップを含む。ELISA全手順中の全ての洗浄ステップは、緩衝溶液で行われる。緩衝溶液は、好ましくは、Tweenを含むリン酸

50

緩衝食塩水 (P B S T) である。

【 0 0 4 4 】

固体支持体調製：固体支持体は、抗原または捕獲抗体の固体支持体への受動的吸着によってコーティングされる。固体についての材料は、通常、ポリスチレンであり、通常、ポリスチレンのチューブまたはマイクロタイタープレートが用いられる。好ましくは、96ウェルマイクロタイタープレート (マイクロプレート) が用いられる。

【 0 0 4 5 】

抗原または抗体は、ポリスチレン表面への受動的吸着により固体支持体に固定化される。これは、通常、一晩などの長時間にわたって、4 で実施される。pH 7でのコーティングがいくつかの適用について許容でき得るが、アルカリ条件が固定化ステップについて好ましい。固定化ステップ後、固体支持体を洗浄し、通常、分析に影響する可能性がある、いかなる他の未知の分子であれ、それらが固体支持体に固定化されることを阻害するために、タンパク質でブロックする。ブロックは、通常、リン酸緩衝食塩水 (P B S) 溶液中のウシ血清アルブミン (B S A) を用いることにより実施される。ブロック後、固体支持体を洗浄する。

【 0 0 4 6 】

アッセイ手順：液体の形での、試験されるべき試料を固体支持体に加え、その後、インキュベートする。固体支持体上に固定化された抗原または捕獲抗体に対する親和性または特異性を有するいかなる抗体または抗原もそれらに結合することになる。液体試料を除去し、結合していない分子を全て除去するために固体支持体を洗浄する。

【 0 0 4 7 】

その後、少なくとも1つの検出抗体を加えるが、その抗体は、ポリクローナルでもモノクローナルでもよい。それは、試験試料由来の抗原に結合する第1の検出抗体、続いて、第1の検出抗体に対して方向づけられた第2の酵素コンジュゲート化検出抗体であり得る。試験試料由来の抗体が固体支持体上の抗原に結合している場合には、酵素コンジュゲートされた第2の検出抗体を、検出のためにすぐに加えてもよい。

【 0 0 4 8 】

第2の検出抗体として、通常、試料由来の抗体に対する、または第1の検出抗体に対する特異性を有する I g G 免疫グロブリンが用いられる。例えば、第1の検出抗体がウサギ由来である場合には、第2の検出抗体は抗ウサギとなる。この第2の検出抗体は、それにコンジュゲートされた酵素を有する。この目的のためにいくつかの酵素が用いられており、それらには、アルカリホスファターゼ (A P) 、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) 、グルコースオキシダーゼ、および p - ニトロフェニルホスファターゼが挙げられる。市販されているコンジュゲートは、ペルオキシダーゼとのグルタルアルデヒド連結方法を用いて調製されている。しかしながら、二次的な試薬は、抗体の代わりに、E L I S A 分析に用いるのに適している限り、抗原に特異的に結合し、かつ酵素にコンジュゲートされ得る任意の他の分子に関係してもよい。これは、例えば、フルオロフォアであり得る。

【 0 0 4 9 】

抗体を加えた後、および第1の検出抗体の添加と第2の検出抗体の添加の間で、固体支持体を再び、洗浄する。

【 0 0 5 0 】

その後、基質溶液を加え、固体支持体をしばらくインキュベートしておく。基質は、酵素に有色の反応産物を生じさせることになる。必要とされる時間は、検出のために選択された酵素および基質の組み合わせに依存する。

【 0 0 5 1 】

上記の酵素に有色反応産物を生じさせるために用いられ得る基質は、用いられる酵素に依存して異なる。4 - ニトロフェニルリン酸は A P について一般的に用いられる基質である。H R P に関して一般的に用いられる基質は、5 - アミノサリチル酸、3 , 3 ' - ジアミノベンジジン、2 , 2 ' - アジノビス [3 - エチルベンゾチアゾリジン - 6 - スルホン酸] ニアンモニウム塩、o - フェニレンジアミン二塩酸塩、3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラ

10

20

30

40

50

メチルベンジジンである。p - ニトロフェニルホスファターゼに関して用いられる基質は、通常、p - ニトロフェニルリン酸二ナトリウムである。

【0052】

必要とされる時間の経過後、停止溶液を加えて反応を停止させる。その後すぐに、有色反応産物の測定を、産物からの透過光の強度、すなわち光学密度を分光光度計により測定することにより検出する。読み取りは、好ましくは、マイクロプレートリーダーで行われる。反応産物の検出は、用いられる酵素および基質に依存して、色素生産性、化学蛍光性、または化学発光性であり得る。

【0053】

基質は市販されており、当業者は、検出抗体にコンジュゲートされた酵素に応じて基質溶液を容易に調製し得る。マイクロプレートリーダーもまた容易に商業的に入手できる。

【0054】

結果の計算：分析に含まれる平均ゼロ標準吸光度を用いて、各ウェルまたはチューブについての平均吸光度を計算する。平均吸光度を、標準曲線において濃度に対してプロットする。

【0055】

本発明者らは、抗原検出剤として第1の検出抗体がマイクロプレート上に固定化されている標準ELISAを構築した(図1A参照)。用いられる第1の検出抗体は、ヒト血漿由来1 - 酸性糖タンパク質(AGP)に対して方向づけられた抗体であった。その後、固体支持体を患者血漿試料とインキュベートした。その時、患者血漿試料中に存在する任意の1 - 酸性糖タンパク質が第1の検出抗体に結合している。その後、ビオチンとコンジュゲートされた1価フコース結合性ペプチドを加える。ビオチンコンジュゲート化フコース結合性ペプチドは、検出のためのTris緩衝液中の、酵素としてのアルカリホスファターゼに連結されたストレプトアビジンおよびpNPP基質を用いて、フコシル化されている任意のAGPに結合し、これを検出する(図1A参照)。

【0056】

しかしながら、この標準ELISAは、満足なシグナル対バックグラウンド比を示さなかった。

【0057】

したがって、本発明者らは、本発明による方法を開発し、それらのうち、1つの好ましい実施形態が図1Bの上部パネルに模式的に開示されており、その場合、シグナル対ノイズ比が大幅に改善された。これは、図1Aおよび図1B、それぞれの下部パネルに提供された結果を比較することによりわかる。ヒト血漿由来AGPに対して方向づけられた抗体を固体支持体に固定化する代わりに、S2 - ペプチドを固体支持体上に固定化する。そのようにすることにより、前記支持体を患者血漿試料とインキュベートした場合、フコシル化タンパク質のみが、固体支持体に結合することになる。その後、ヒト血漿由来AGPに対して方向づけられた第1の検出抗体を加え、その結果、第1の検出抗体は、固体支持体上に吸着されているS2 - ペプチドに結合した任意のAGPに結合することになる。最後に、S2 - ペプチドに結合したAGPを検出できるように、第1の検出抗体に対して方向づけられたHRPコンジュゲートされた第2の検出抗体を加える。その後、ELISA分析についての標準手順であるように、検出を実施する。このモデルをS2 - 逆ELISAと呼ぶ。

【0058】

一態様において、本発明は、配列番号3によるアミノ酸配列と88%、94%、または100%などの少なくとも83%同一性を有するアミノ酸配列からなるペプチドが免疫原として用いられることを特徴とする、抗体を産生するための方法に関する。そのような抗体は、ヒトAGPのC末端部分に位置するエピトープに対する特異性を示し、本発明による方法およびキットにおいて第1の検出抗体として有用である。

【0059】

一態様において、本発明はまた、配列番号3によるアミノ酸配列と88%、94%、ま

10

20

30

40

50

たは100%などの少なくとも83%同一性を有するアミノ酸配列からなるペプチド、および抗体の産生における免疫抗原としてのその使用に関する。

【0060】

本出願での方法において産生され、かつ用いられる抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。

【0061】

モノクローナル抗体は、抗原内の単一のエピトープを認識する抗体の集団を表す。それらは、典型的には、免疫化哺乳動物の単一のB細胞から産生され、それにより、お互いに同一で、かつ全てが特定の抗原の同じエピトープを認識する、抗体のクローン集団を生じる。モノクローナル抗体の産生は、Kohlerおよび共同研究者らにより最初に報告された¹⁸。原則として、この方法は以下のステップを含む。

10

【0062】

哺乳動物を、関心対象となる抗原で免疫化し、その結果、哺乳動物は、前記抗原に対して抗体を発生する。これに続いて、免疫応答をブーストし、かつ特定の免疫抗原に対する抗体のより高い力価を生じさせるために、2次および3次の注射を行う。哺乳動物は、例えば、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ヒツジ、ヤギ、またはウマであり得る。注射後、血液を脾臓から収集し、抗体産生B細胞を単離する。抗体を採取するためにB細胞を用いることができるが、その欠点は、これらの細胞が有限の寿命をもち、最終的には、抗体の産生を停止することになることである。

【0063】

20

特定の抗体産生B細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、ハイブリドーマ細胞が形成され、したがって、B細胞の限られた寿命を克服することができる。B細胞と骨髄腫細胞の融合は、ポリエチレングリコール、ウイルスを用いることにより、または両方の細胞型を含む細胞培養物のエレクトロポレーションにより行われ得る。融合後、ハイブリドーマの選択を行わなければならない。これは、ヒポキサンチンからのヌクレオチドの合成に関与する酵素である、HGPRT、すなわち、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼを用いることにより行われる。骨髄腫細胞はHGPRT⁻であり、B細胞はHGPRT⁺である。HGPRT⁺細胞のみを維持することができるHAT（ヒポキサンチン - アミノプテリン - チミジン）培地中で培養物を成長させる。別の骨髄腫細胞と融合し、または全く融合していない骨髄腫細胞は、それらがHGPRT⁻であるため、HAT培地において死ぬ。別のB細胞と融合し、または全く融合していないB細胞は、それらが無制限に分裂する能力をもたないため、死ぬ。B細胞と骨髄腫細胞との間でのハイブリドーマのみが、HGPRT⁺と癌性の両方であるので、生存する。

30

【0064】

用いられる哺乳動物由来のB細胞の最初の収集物は、不均一であり、すなわち、それらが全て、同じ抗体を産生するわけではない。したがって、ハイブリドーマ集団は、単一の抗体を産生するわけではない。したがって、各ハイブリドーマを培養し、当技術分野内において周知で、かつ当業者によく知られた方法を用いてスクリーニングする。いったん、正しい抗体を産生する、ある特定のハイブリドーマが検出されたならば、その不死化B細胞 - 骨髄腫ハイブリドーマは、非常に特異的なモノクローナル抗体の一定した供給を提供することができる。モノクローナル抗体は1つのエピトープを認識するだけなので、それらは一般的に、非特異性抗原との交差反応性は低い。

40

【0065】

ポリクローナル抗体は、1つの単一免疫化動物の免疫応答により活性化されている複数個のB細胞クローンから収集された抗体の集団を表す。伝統的には、ヤギ、ヒツジ、マウス、またはウサギなどの哺乳動物に、一次免疫応答を誘発する、関心対象となる特定の抗原を注射する。これに続いて、その特定の免疫抗原に対する抗体のより高い力価を生じる、二次および3次の注射を行う。抗体を含有する血清を哺乳動物から収集し、典型的には、問題の抗原に対して産生された抗体を濃縮するためにアフィニティ精製する。この工程により、関心対象となる抗原の全てのエピトープに対する高い力価、高い親和性のポリク

50

ローナル抗体の産生がもたらされる。ポリクローナル抗体の産生は、例えば、Marlies Leenaarsおよび共同研究者らにより報告されている¹⁹。

【0066】

実施例

以下の実施例は、本発明をさらに例証するために含まれ、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではなく、本発明の範囲とは、添付された特許請求の範囲の範囲である。

【実施例1】

【0067】

実施例1 標準ELISAと逆ELISAの比較

10

患者試料

HCCを有する1人の患者および硬変を有する2人の患者由来の血漿試料を、Huddinge、SwedenのKarolinska University Hospitalから入手した。正常対照は、健康な供血者由来の血漿プールであった。陽性対照は、2 μ g/mlの濃度でのdsAGPであった。

【0068】

抗体の産生

ポリクローナル抗ヒト1-酸性糖タンパク質抗体058の産生は、Agriser antibodies (Vannas, Sweden)により行われた。手短に述べれば、ヒト1-酸性糖タンパク質のC末端アミノ酸183~201に対応する合成ペプチドがAgriserによって合成された。そのペプチドを、その末端システインを介して、マレイミド架橋剤を用いてKLHにコンジュゲートし、ウサギをKLHコンジュゲート化ペプチドで4回、免疫化した。2mLのUltraLinkヨードアセチル樹脂 (Pierce, Rockford, IL, USA)に連結された合成ペプチドを用いて、血清から抗AGP抗体を精製した。

20

【0069】

標準レクチンELISA

マイクロタイタープレート (Maxisorp, Nunc) を、0.05M炭酸-重炭酸塩緩衝液、pH9.6 (Medicago) 中10 μ g/mLの抗体058で、4で一晩、コーティングした。ウェルを、PBS (Medicago) 中3%BSAで1時間、ブロッキングした。プレートを、1%BSAを含有するPBS中1:50に希釈した患者血漿試料を加え、かつ200rpmで振盪しながら1時間、インキュベートする前に、PBS+0.05%Tween 20 (PBST) で3回、洗浄した。上記のようにウェルを洗浄した後、1%BSAを含有するPBS中0.25 μ g/mLでビオチン化S2-ペプチドを加え、室温 (RT) で穏やかに振盪しながら1時間、インキュベートした。結合したS2-ペプチドを、アルカリホスファターゼコンジュゲート化 Extravidine および pNPP 基質 (Sigma-Aldrich) を用いて検出した。30分後、結合したS2-ペプチドの量を、VERSAmaxマイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corporation) を用いて490nmで測定した。

30

40

【0070】

逆S2-ELISA

マイクロタイタープレート (Maxisorp, Nunc) を、0.05M炭酸-重炭酸塩緩衝液、pH9.6 (Medicago) 中5 μ g/mLのS2で、4で一晩、コーティングした。ウェルを、PBS (Medicago) 中3%BSAで1時間、ブロッキングした。プレートを、1%BSAを含有するPBS中1:50に希釈した患者血漿試料を加え、かつ200rpmで振盪しながら1時間、インキュベートする前に、PBS+0.05%Tween 20 (PBST) で3回、洗浄した。上記のようにウェルを洗浄した後、1%BSAを含有するPBS中1 μ g/mLのウサギ抗ヒト1-酸性糖タンパク質058を加え、室温 (RT) で穏やかに振盪しながら1時間、インキュベートした。

50

結合した抗ヒト 1 - 酸性糖タンパク質を、西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートされたヤギ抗ウサギ IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories、West Grove、PA) および O - フェニレンジアミン二塩酸塩基質 (Sigma - Aldrich) を用いて検出した。30分後、25 µL / ウェルの 1 M H₂SO₄ を添加して、反応を停止させ、結合した抗 AGP の量を、VERSAmax マイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corporation) を用いて 490 nm で測定した。

【0071】

結果

標準 ELISA についての結果は、図 1 A に示されており、逆 ELISA については図 1 B に示されている。逆 ELISA は、標準 ELISA と比較してより高いシグナル強度を示した。HCC 試料および陽性対照試料に関する標準 ELISA におけるシグナル対バックグラウンド比は、それぞれ、1.05 および 1.38 であり、一方、同じ HCC 試料および同じ陽性対照に関するシグナル対ノイズ比は、それぞれ、5.1 および 5.2 に改善された (図 1) 。

【実施例 2】

【0072】

実施例 2 検出抗体の比較

患者試料

HCC を有する 1 人の患者、硬変を有する 1 人の患者、肝炎を有する 1 人の患者由来の血漿試料、および健康な供血者由来の血漿プール (正常) について分析を実施した。

【0073】

アッセイ

(上記で例示されているような) 逆 S2 - ELISA を用いて、市販の抗 AGP 抗体を Ab - 058 と比較した。058 抗体 (図 2 における試料 12) を、以下のリストによるいくつかの市販のポリクローナルまたはモノクローナル抗 AGP 抗体と比較した。

【0074】

検出抗体

検出用に以下の抗体を用いた。

1. ヒト 1 - 酸性糖タンパク質抗体 (R & D Systems、カタログ番号 AF3694)

- ・供給源：ポリクローナルヤギ IgG
- ・免疫原：ヒト血漿由来 1 - 酸性糖タンパク質

2. ヒト 1 - 酸性糖タンパク質抗体 (AGP - 1 / 2、Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号 sc - 51018)

- ・供給源：ポリクローナルヤギ IgG
- ・免疫原：ヒト起源の AGP - 1 の内部領域内に位置するペプチド

3. ORM 1 ポリクローナル抗体、ヒト種およびマウス種 (ProteinTech、カタログ番号 16439 - 1 - AP)

- ・供給源：ポリクローナルウサギ IgG
- ・免疫原：Ag 9758、オロソムコイド 1

4. ORM 2 ポリクローナル抗体、ヒト種 (ProteinTech、カタログ番号 11199 - 1 - AP)

- ・供給源：ポリクローナルウサギ IgG
- ・免疫原：Ag 1667、オロソムコイド 2

5. 抗 - ORM 1 / オロソムコイド抗体 (LSBio、カタログ番号 LS - C292722)

- ・供給源：ポリクローナルウサギ IgG
- ・免疫原：大腸菌 (E. coli) において産生された組換えヒト 1 - AGP (アミノ酸 19 ~ 201)

10

20

30

40

50

6. ヒト 1 - 酸性糖タンパク質抗体 (AGP - 1 (29A1)、カタログ番号 sc - 69753)
- ・供給源: モノクローナルマウス IgG
 - ・免疫原: ヒト起源の精製 1 - AGP
7. モノクローナル抗ORM 1抗体、クローン2F9 - 1F10 (Sigma、カタログ番号 WH0005004M1 - 100 μg)
- ・供給源: モノクローナルマウス IgG
 - ・免疫原: ORM 1 (AAH26238、アミノ酸18 ~ アミノ酸202) GST - タグを有する完全長組換えタンパク質
8. ORM 1モノクローナル抗体、ヒト種 (ProteinTech、カタログ番号 66097 - 1 - Ig)
- ・供給源: モノクローナルマウス IgG
 - ・免疫原: Ag19248、オロソムコイド1
9. ヒト 1 - 酸性糖タンパク質抗体 (Thermo Scientific、カタログ番号 PA1 - 9530)
- ・供給源: ポリクローナルニワトリ IgY
 - ・免疫原: ヒト 1 - 酸性糖タンパク質の残基149 ~ 160および190 ~ 201に対応する合成ペプチドの混合物
10. ヒト 1 - 酸性糖タンパク質抗体 (Sigma、カタログ番号 A - 0534)
- ・供給源: ポリクローナルウサギ IgG
 - ・免疫原: 精製ヒト 1 - 酸性糖タンパク質
11. ヒト 1 - 酸性糖タンパク質抗体 (Dako、カタログ番号 Q0326)
- ・供給源: ポリクローナルウサギ IgG
 - ・免疫原: 精製ヒト 1 - 酸性糖タンパク質
12. ヒト 1 - 酸性糖タンパク質抗体、アフィニティ精製 #058 (Agriser)
- ・供給源: ポリクローナルウサギ IgG
 - ・免疫原: アミノ酸183 ~ 201に対応する合成ペプチド CEP 19

結果

結果は、図2に示されている。これらの結果は、種々の検出抗体が、シグナル対バックグラウンド比、および非HCC試料からHCC試料を区別することにおける性能の点で異なることを示している。058抗体(番号12)およびR&D Systems製のポリクローナルIgG抗体(番号1)のみ、ならびに、より少ない程度ではあるが、Thermo Scientific製のポリクローナルIgY抗体(番号9)もまた、非HCC試料からHCC試料を区別することについての選択性を示すが、他の抗体はそのような選択性を示していない。しかしながら、058抗体は、R&D Systems製のポリクローナルIgG抗体と比較して、若干より良いシグナル対バックグラウンド比を示した。

【0075】

アッセイ番号1、9、および12における一次検出抗体は、AGPの非グリコシル化C末端部分に位置するエピトープに対する親和性を有すると仮定されている。このエピトープは、肝細胞癌を示すグリコシル化パターンを有するAGPがS2 - ペプチドに結合している時、結合に利用可能であり得るが、AGPが硬変、肝炎から生じるグリコシル化パターン、またはHCC、硬変、もしくは肝炎に罹っていない個体から生じる正常なグリコシル化パターンを有する場合、同じ程度では利用できない。さらに、試験された抗体のいくつかは、058とは対照的に、高いバックグラウンド染色を示し、それは、抗体が、コーティングされたS2に直接、非特異的に結合することを示しており、それにより、逆S2 - ELISAにおけるそれらの使用が制限される。

【実施例3】

【0076】

実施例3 精製AGP試料を用いた逆S2 - ELISAの確証

A G P の精製

A G P を、A s a o らによる 2 段階イオン交換クロマトグラフィー法を用いて、血漿試料から単離した²⁰。1 m L の血漿試料を、2 0 m M クエン酸リン酸緩衝液、p H 4 で平衡化された H i T r a p 脱塩カラム (G E H e a l t h c a r e、U p p s a l a、S w e d e n) に適用した。脱塩されたピークを、2 0 m M クエン酸リン酸緩衝液、p H 4 で平衡化された H i T r a p D E A E カラム (G E H e a l t h c a r e) に適用した。A G P を含有する画分を、2 0 0 m M N a C l を含有する 2 0 m M クエン酸リン酸緩衝液、p H 7 で溶出し、プールし、2 0 m M クエン酸リン酸緩衝液、p H 4 で平衡化された、2 つの連結された H i T r a p 脱塩カラムに適用した。脱塩されたピークを、2 0 m M クエン酸リン酸緩衝液、p H 4 で平衡化された H i T r a p S P カラム (G E H e a l t h c a r e) に適用し、A G P を 2 0 m M クエン酸リン酸緩衝液、p H 4 . 8 で溶出した。溶出された画分を、水に対して透析し、凍結乾燥した。

10

【 0 0 7 7 】

ポリクローナル抗ヒト 1 - 酸性糖タンパク質 0 5 8 の産生

ポリクローナル抗ヒト 1 - 酸性糖タンパク質抗体 0 5 8 の産生は、実施例 1 に記載されているように A g r i s e r a a n t i b o d i e s (V a n n a s、S w e d e n) によって行われた。

【 0 0 7 8 】

脱シアリル化 A G P (d s A G P) の作製

A G P (1 . 7 m g、S i g m a) を、0 . 3 m l の 5 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液、p H 5 . 5 中に溶解した。ノイラミニダーゼ (6 0 m U、クロストリジウム・パーフリンジェンス (C l o s t r i d i u m p e r f r i n g e n s)、V 型、S i g m a) を加え、試料を 3 7 °C で 4 時間、インキュベートした。脱シアリル化 A G P を、5 m g の固定化抗 A G P 抗体 (D A K O、A 0 0 1 1) を有する 5 m l カラム (N H S 活性化 H i g h T r a p、A m e r s h a m B i o s c i e n c e s) におけるアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。クロマトグラフィーを、A K T A P r i m e 装置 (G E H e a l t h c a r e) 上で実施した。試料を、P B S、p H 7 . 4 (M e d i c a g o、U p p s a l a、S w e d e n) で 1 . 3 m l に希釈し、カラムに注入した。P B S での 2 0 分間の洗浄 (流速 5 m l / 分) 後、d s A G P を、0 . 1 M グリシン - H C l 緩衝液 p H 2 . 5 で溶出した。溶出を、2 6 0 n m での U V 吸光度によりモニターした。陽性画分をプールし、2 L のミリQ水の 3 回の交換に対して透析した。その後、透析された d s A G P を凍結乾燥した。

20

30

【 0 0 7 9 】

血漿試料からの S 2 結合性糖タンパク質および A A L 結合性糖タンパク質の濃縮

S 2 - ペプチドおよび組換え A A L を、E Z - L i n k S u l f o N H - L C ビオチン化キット (P i e r c e、R o c k f o r d、I L、U S A) を用いて、製造会社のプロトコールに従ってビオチン化した。1 タンパク質試料あたり 5 モル倍過剰のビオチン試薬をビオチン化に用いた。ビオチン / タンパク質比を、H A B A / アビジンアッセイを用いて決定し、1 S 2 分子あたり 1 ビオチン部分および 1 A A L 分子あたり 2 ビオチン部分と算出した。E Z v i e w R e d S t r e p t a v i d i n A f f i n i t y G e l (S i g m a - A l d r i c h、S a i n t L o u i s、M o、U S A) を用いて、製造会社のプロトコールに従い、血漿試料から S 2 結合性糖タンパク質および A A L 結合性糖タンパク質を濃縮した。簡単に述べれば、リン酸緩衝食塩水 (P B S)、p H 7 . 4 (M e d i c a g o、U p p s a l a、S w e d e n) で平衡化された 2 0 μ L の E Z v i e w R e d S t r e p t a v i d i n A f f i n i t y G e l を、1 0 μ g の S 2 または A A L と混合し、室温で 1 時間、インキュベートした。そのレクチンゲルを、1 μ L の血漿試料を加える前に、P B S で 1 回、P B S 中 3 % ウシ血清アルブミン (B S A) (S i g m a - A l d r i c h) で 1 回、および P B S で 3 回、洗浄した。1 時間のインキュベーション後、レクチンゲルを洗浄し、L a e m m l i 試料緩衝液 (B i o - R a d、H e r c u l e s、C A、U S A) と混合した。濃縮された糖タンパク質を、

40

50

勾配 (4 ~ 20%) Mini-protean TGXゲル (Bio-Rad) 上、変性条件下で分離し、ウェスタンブロット分析のためにPVD F膜に転写した。膜を、PBS中3% BSAで1時間、ブロッキングし、PBS中3% BSAにおける1 μ g/mLのウサギ抗ヒト 1 - 酸性糖タンパク質058とインキュベートし、続いて、PBS中1% BSAにおいて1:20000希釈されたヤギ抗ウサギIgG HRPコンジュゲート化抗体とインキュベートした。ECL基質 (GE Healthcare、Buckinghamshire、UK) を、濃縮されたAGPの検出に用いた。

【0080】

逆S2 - ELISA

マイクロタイタープレート (Maxisorp、Nunc) を、0.05 M炭酸 - 重炭酸塩緩衝液、pH 9.6 (Medicago) 中5 μ g/mLのS2 - ペプチドで、4で一晩、コーティングした。ウェルを、PBS (Medicago) 中3% BSAで1時間、ブロッキングした。プレートを、1% BSAを含有するPBS中に希釈した精製AGP試料を加え、かつ200 rpmで振盪しながら1時間、インキュベートする前に、PBS + 0.05% Tween 20 (PBST) で3回、洗浄した。上記のようにウェルを洗浄した後、PBS中1% BSAにおける1 μ g/mLのウサギ抗ヒト 1 - 酸性糖タンパク質058を加え、室温 (RT) で穏やかに振盪しながら1時間、インキュベートした。結合した抗ヒト 1 - 酸性糖タンパク質を、西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートされたヤギ抗ウサギIgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories、West Grove、PA) およびO - フェニレンジアミン二塩酸塩基質 (Sigma - Aldrich) を用いて検出した。30分後、25 μ L/ウェルの1 M H_2SO_4 を添加して、反応を停止させ、結合した抗AGPの量を、VERSAmaxマイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corporation) を用いて490 nmで測定した。

【0081】

結果

上記のように、組換え完全長ヒイロチャワントケ (*Aleuria aurantia*) レクチン (AAL) をアガロースビーズに結合させ、それを用いて、HCCを有する4人の患者、硬変を有する4人の患者、慢性肝炎を有する2人の患者由来の血漿試料、および正常血漿のプール由来の血漿試料においてフコシル化グリコフォームを捕獲された糖タンパク質を、抗体058を用いるウェスタンブロットにより分析した。

【0082】

全ての患者試料および正常対照においてAGPが検出された。しかしながら、肝炎試料および正常対照と比較して、HCC患者由来の試料および硬変試料においてより多くのAAL結合AGPが検出された。硬変試料とHCC試料との間において、AAL結合AGPの量の間で目に見える差はなかった (図3、上部パネル)。

【0083】

同じ試料から血漿糖タンパク質を濃縮するためにS2 - ペプチドを用いた場合、正常試料および肝炎試料において目に見えるAGP染色はほとんどなく、または全くなかった。さらに、天然AALとは対照的に、S2は、硬変試料と比較してHCC試料においてより多くのAGPを結合した。硬変試料は、S2結合AGPの染色を全く示さず、またはわずかに示したが、HCC患者由来の全ての試料は、S2結合AGPの染色を示し、それは、S2がHCCグリコシル化に対してより特異的であり得ることを示している (図3、下部パネル)。

【0084】

HCCを有する1人の患者、硬変を有する1人の患者から、および正常プールから、上記のようにAGPを精製し、逆S2 - ELISAを用いて、AGPの結合を測定した。上記のように、マイクロタイターウェルをS2 - ペプチドでコーティングし、058抗体を用いて、増加濃度の精製AGP試料を測定した。

【0085】

全ての3つの試料からのシグナルにおいて用量依存的増加があった。しかしながら、正常プールから単離されたAGPは、レクチン沈降データと一致して、逆S2-ELISAにおいて非常に低い吸光度値を示した。硬変患者由来の試料は、中間の吸光度値を示し、一方、HCC患者から精製されたAGP(HCC-AGP)は、高い吸光度値を示した。したがって、その分析は、逆S2-ELISAが、異なる試料間でグリコシル化の違いを特異的に検出し得ることを示した(図4A)。

【0086】

マトリックス効果を評価するために精製HCC-AGPを添加した正常血漿試料を用いて、逆S2-ELISAをさらに確証した。正常血漿試料の1:50の血漿希釈溶液を用いると、バックグラウンドシグナルは、血漿がアッセイから取り除かれた対照試料と同じであった(OD=0.2)。これは、正常血漿試料由来のAGPがS2-ペプチドに本質的に結合しなかったことを示す。HCC-AGPの正常血漿試料への増加濃度での添加は、加えられた血漿がない試料に関して見られた吸光度の増加に相関する、吸光度の用量依存的増加を示した。これは、S2結合AGPの増加が血漿試料において正確に測定できたことを示している(図4B)。

【0087】

逆レクチンアッセイにおいてS2のコートイング濃度、ならびに第1および第2の検出抗体の希釈度を最適化するために、異なるコートイング濃度および抗体濃度を用いて、HCC血漿試料および正常試料(バックグラウンド)について吸光度値を測定した。5µg/mlのS2のコートイング濃度、1:200の第1検出抗体濃度、および1:4000の第2検出抗体濃度が、10を超える最適なシグナル対バックグラウンド比を示すことが見出された(データ未呈示)。

【0088】

脱シアリル化型のAGP(dsAGP)を用いて標準曲線を構築した。正常なシアリル化型のAGPとは対照的に、S2は、dsAGP上の露出した末端Le^x構造に対する親和性を有することになる。dsAGPは、患者試料におけるS2結合型のAGPを反映していないが、それは、逆レクチンアッセイにおいて得られる吸光度値を関連づけるために用いることができる(図4C)。

【0089】

アッセイのアッセイ内精度を、同じプレート(96ウェル)上のdsAGP試料の反復分析により決定した。アッセイ内変動の変動係数(CV)は1.2%であった(未呈示)。

【0090】

アッセイ間変動性を、3つの異なるプレート上で中間の吸光度値および高い吸光度値をもつ2つのHCC試料を分析することにより決定した。HCCについてのCV(中間)およびHCCについてのCV(高い)は、それぞれ、2.8%および5.0%であった(未呈示)。

【実施例4】

【0091】

実施例4 患者試料を用いた逆S2-ELISAの確証
患者試料

肝硬変を有する32人の患者由来の血漿試料、HCCを有する28人の患者由来の血漿試料、および慢性肝炎を有する32人の患者由来の血漿試料が本研究に含まれた。全ての含まれたHCC試料は、処置前(1ヶ月間未満のソラフェニブ処置)に収集された。HCC試料のうち5つは再発性HCCを有する患者由来であった。肝硬変を有する患者のいずれも、試料採取から6ヶ月後、HCCのいかなる徴候も示さなかった。肝炎を有する患者は非硬変性と決定された。肝臓疾患の徴候がない供血者由来の血清のプールからなる正常試料は、対照として用いられた。

【0092】

全ての患者から書面による同意が得られ、本研究はLinköping Univer

10

20

30

40

50

sityおよびKarolinska Institutetにおける倫理委員会によって認可された。

【0093】

逆S2-ELISA

1%BSAを含有するPBS中1:50に希釈された血漿試料を用いて、上記のように逆S2-ELISAを実施した。

【0094】

総AFPおよび総AGPの分析

総AFP濃度は、Linköping University Hospitalの臨床ルーチン検査室においてCOBAS e602アナライザー(Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland)で決定され、総AGP濃度は、Kalmar County Hospitalの臨床ルーチン検査室においてBN ProSpecシステム(Siemens, Erlangen, Germany)で決定された。

【0095】

統計解析

全統計解析を、IBM SPSS 23を用いて実施した。群間の統計的有意差を、ANOVAにおいてチューキーの多重比較検定を用いて決定した。2項ロジスティック回帰分析を用いて、複数のマーカーの組み合わせを評価した。0.05未満のp値を、統計学的に有意であると定義した。受診者動作特性(ROC)曲線および列散布図を、GraphPad Prism 5(La Jolla, CA)で作成した。

【0096】

結果

逆S2-ELISAを用いて、肝炎患者、硬変患者、およびHCC患者由来の患者血清においてS2結合AGPを決定した。肝炎患者($p = 0.001$)および硬変患者($p = 0.005$)の両方の由来の血漿と比較して、HCC患者由来の血漿においてS2結合AGPの有意な増加があった。硬変患者を肝炎患者と比較した場合、S2結合AGPのレベルにおいて有意な増加はなかった(図5A)。

【0097】

逆S2-ELISA設定において、患者試料におけるAGPの濃度の変化が、検出されるグリコシル化変化に影響を及ぼす可能性があった。したがって、AGPの濃度を全試料において測定した。AGP濃度は0.3mg/mlから3.9mg/mlまでの変動を示した。HCC試料と肝炎試料との間($p = 0.008$)およびHCC試料と硬変試料との間($p = 0.02$)でAGP濃度の有意な増加があったが、硬変患者と肝炎患者との間でAGP濃度の有意な差はなかった(図5B)。しかしながら、S2結合AGPシグナルとAGP濃度の間に相関はなく(図6)、AGPの濃度差が逆S2-ELISAの診断性能に影響しなかったことを示している。

【0098】

比較のために、AFPのレベルもまた試料において測定した。AFPの平均値は、硬変を有する患者および肝炎を有する患者、それぞれにおける4ng/mlおよび6ng/mlと比較して、HCCを有する患者において5581ng/mlであった。しかしながら、これらの差は有意であるとは認められなかった($p = 0.1$ 、図5C)。

【0099】

各マーカーの異なる患者集団間を区別する全体的性能を決定するために、受診者動作特性(ROC)分析を実施した。HCCを肝炎から区別する場合、S2結合AGPについての曲線下面積(AUC)は0.94であった。HCCの硬変からの区別は、0.77のAUCを示した(表1)。AFPはS2結合AGPと類似した性能をもち、HCCと硬変の区別については0.77のAUC、およびHCCと肝炎の区別については0.82のAUCであった(表1)。AGP濃度のROC分析により、AGP濃度単独では、HCCを肝炎から区別すること(AUC 0.66)、およびHCCを硬変から区別すること(AU

10

20

30

40

50

C 0.65)の性能が弱かった。

【0100】

HCC患者を硬変患者と比較した場合、S2結合AGP、総AFP、および総AGPのいずれの平均値も増加があったので、これらのマーカーの性能を、ロジスティック回帰分析を用いる任意の2つまたは3つ全てのマーカーの組み合わせを用いてさらに分析した。全ての3つのマーカーの組み合わせが最も優れた区別を示し、HCCと硬変との間での区別について0.86のAUC、およびHCCと肝炎との間の区別について0.95のAUCであった(表1)。S2結合AGPとAFPの組み合わせおよびS2結合AGPとAGPの組み合わせもまた、単独で用いられるマーカーのどれよりも良い性能を示した(表1)。

10

【0101】

【表1】

表1. ROC分析 (HCC対肝炎およびHCC対硬変)

マーカー	肝炎対HCC		硬変対HCC	
	AUC	(95% CI)	AUC	(95% CI)
AFP	0.815	(0.699-0.93)	0.77	(0.646-0.894)
AGP	0.664	(0.522-0.806)	0.653	(0.509-0.797)
S2結合AGP	0.941	(0.886-0.997)	0.77	(0.644-0.893)
S2結合AGP+AFP	0.942	(0.887-0.997)	0.826	(0.713-0.939)
S2結合AGP+AGP	0.949	(0.893-1.000)	0.816	(0.706-0.926)
S2結合AGP+AFP+AGP	0.952	(0.896-1.000)	0.864	(0.769-0.959)

20

参考文献

30

1. Marrero JA. Hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol*. 2006;22: 248-253.
2. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006;45: 529-538.
3. Sarbah SA, Gramlich T, Younoszai A, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2004;49: 850-853.
4. Ertle JM, Heider D, Wichert M, et al. A combination of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma. *Digestion*. 2013;87: 121-131. 10
5. Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver D. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011;53: 1020-1022.
6. Singal A, Volk ML, Waljee A, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30: 37-47.
7. Nakagawa T, Miyoshi E, Yakushijin T, et al. Glycomic analysis of alpha-fetoprotein L3 in hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma patients. *J Proteome Res*. 2008;7: 2222-2233.
8. Ahn YH, Shin PM, Kim YS, et al. Quantitative analysis of aberrant protein glycosylation in liver cancer plasma by AAL-enrichment and MRM mass spectrometry. *Analyst*. 2013;138: 6454-6462. 20
9. Comunale MA, Rodemich-Betesh L, Hafner J, et al. Linkage specific fucosylation of alpha-1-antitrypsin in liver cirrhosis and cancer patients: implications for a biomarker of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2010;5: e12419.
10. Comunale MA, Wang M, Hafner J, et al. Identification and development of fucosylated glycoproteins as biomarkers of primary hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res*. 2009;8: 595-602.
11. Naitoh A, Aoyagi Y, Asakura H. Highly enhanced fucosylation of serum glycoproteins in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999;14: 436-445. 30
12. Tanabe K, Deguchi A, Higashi M, et al. Outer arm fucosylation of N-glycans increases in sera of hepatocellular carcinoma patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374: 219-225.
13. Wang M, Long RE, Comunale MA, et al. Novel fucosylated biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18: 1914-1921.
14. Asazawa H, Kamada Y, Takeda Y, et al. Serum fucosylated haptoglobin in chronic liver diseases as a potential biomarker of hepatocellular carcinoma development. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53: 95-102.
15. Comunale MA, Wang M, Anbarasan N, et al. Total serum glycan analysis is superior to lectin-FLISA for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Proteomics Clin Appl*. 2013;7: 690-700. 40

16. Wimmerova M, Mitchell E, Sanchez JF, Gautier C, Imberty A. Crystal structure of fungal lectin: six-bladed beta-propeller fold and novel fucose recognition mode for *Aleuria aurantia* lectin. *J Biol Chem.* 2003;278: 27059-27067.

17. Olausson J, Astrom E, Jonsson BH, Tibell LA, Pahlsson P. Production and characterization of a monomeric form and a single-site form of *Aleuria aurantia* lectin. *Glycobiology.* 2011;21: 34-44.

18. Köhler G, Milstein C, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", *Nature.* 1975 Aug 7;256(5517):495-7.

19. P.P.A. Marlies Leenaars, et al., "The production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 35", *ATLA* 27, 79-102, 1999.

20. Asao T, Yazawa S, Nishimura T, et al. Development of a novel system for mass spectrometric analysis of cancer-associated fucosylation in plasma alpha1-acid glycoprotein. *Biomed Res Int.* 2013;2013: 834790.

10

【要約】

【課題】試料においてフコシル化 1 - 酸性糖タンパク質 (AGP) を検出するための方法を提供する。

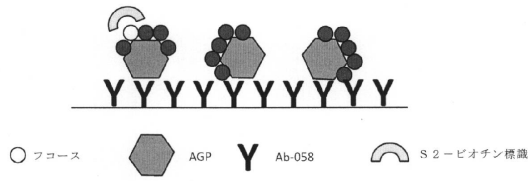
20

【解決手段】本発明は、固相に固定化された、配列番号 1 によるアミノ酸を有するペプチドと 85%、90%、95%、99%、または 100% 同一性などの少なくとも 80% 同一性を有する 1 価フコース結合性ペプチドを供給するステップ；試料を固定化フコース結合性ペプチドと接触させるステップ；および前記フコース結合性ペプチドに結合した任意のフコシル化 AGP を検出するステップを含む、試料においてフコシル化 1 - 酸性糖タンパク質 (AGP) を検出するための方法に関する。本発明はさらに、ヒト個体が肝細胞癌を患うリスクを評価するための方法、ならびに本発明による方法において有用な部品および抗体のキット、ならびにそのような抗体の産生において免疫抗原として有用なペプチドに関する。

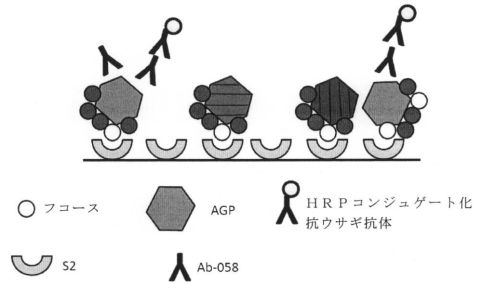
【選択図】図 1 B

30

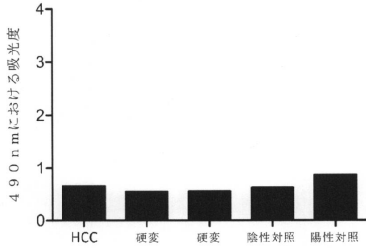
【図1A】



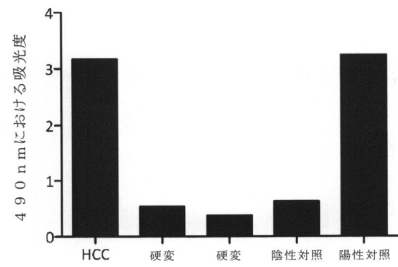
【図1B】



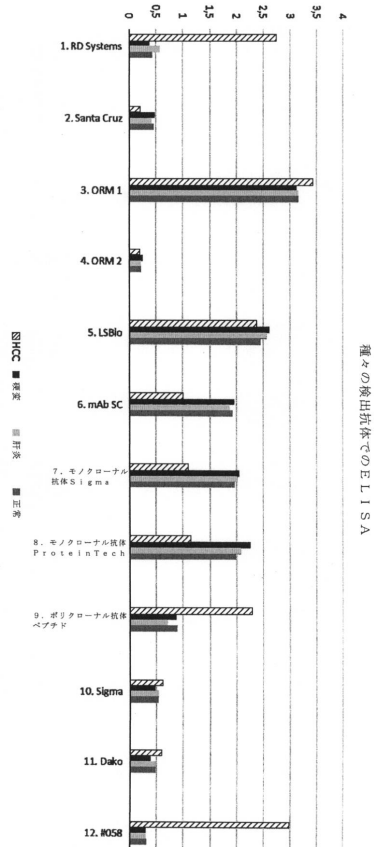
標準ELISA



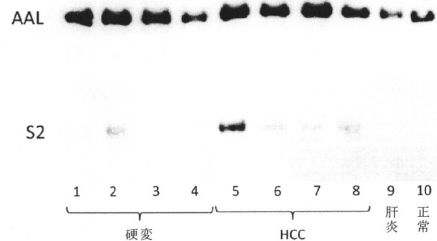
逆ELISA



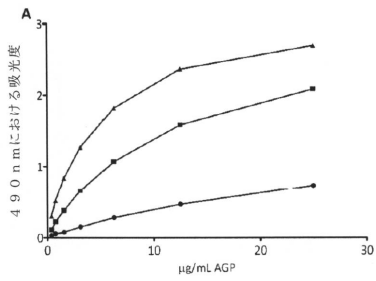
【図2】



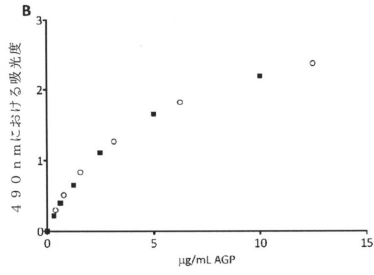
【図3】



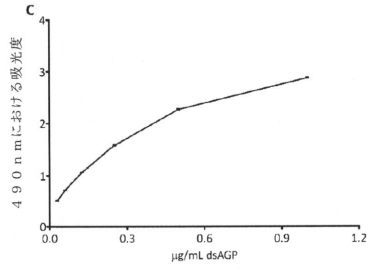
【図4A】



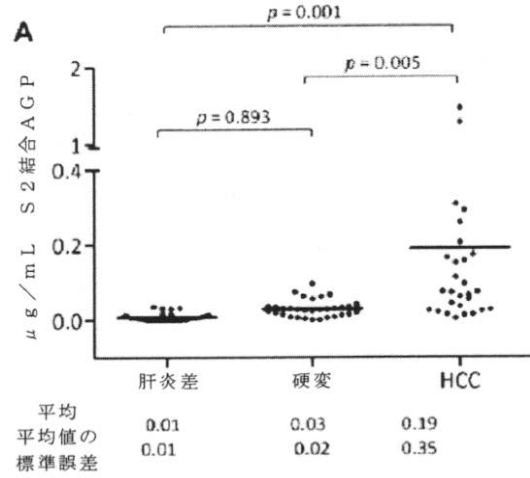
【 図 4 B 】



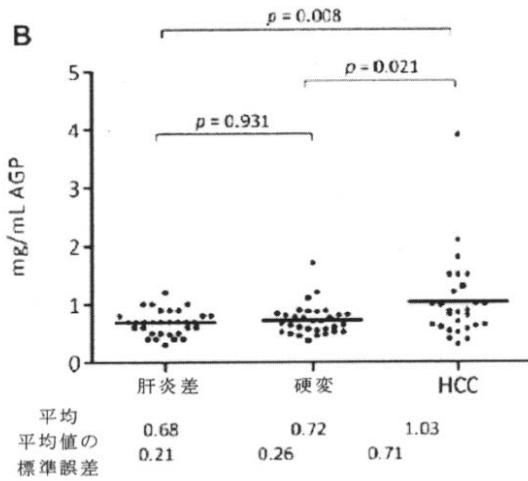
【 図 4 C 】



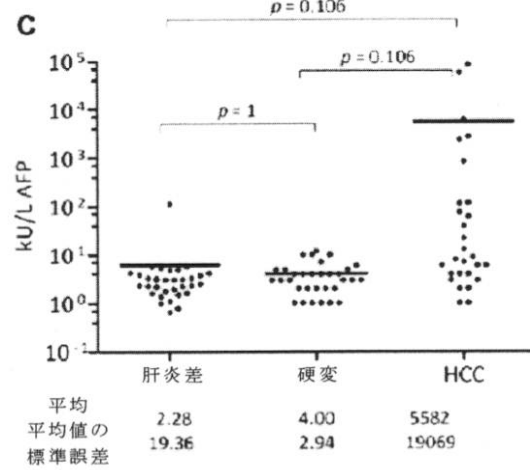
【 図 5 A 】



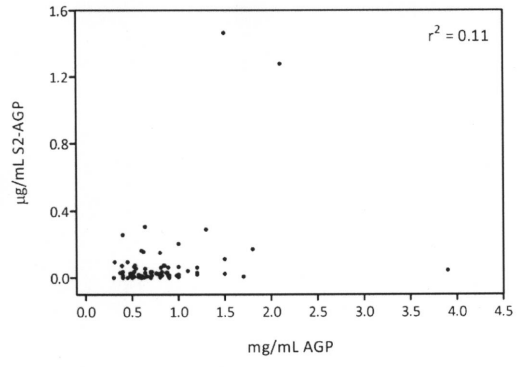
【 図 5 B 】



【 図 5 C 】



【 図 6 】



【 配列表 】

0006189499000001.app

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第2004/036216(WO, A1)
特開平02-242681(JP, A)
国際公開第2011/007797(WO, A1)
特表2008-541060(JP, A)
米国特許出願公開第2011/0065148(US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	新型结合试验		
公开(公告)号	JP6189499B1	公开(公告)日	2017-08-30
申请号	JP2016146202	申请日	2016-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	GLYCOBOND		
[标]发明人	ペータルポールソン		
发明人	ペータル・ポールソン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/57438 G01N33/57488 G01N2333/42		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/543.545.D G01N33/574.B G01N33/574.E		
优先权	1650619 2016-05-09 SE		
其他公开文献	JP2017203762A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种检测样品中岩藻糖基化的α1-酸性糖蛋白 (AGP) 的方法。本发明与具有固定在固相上的根据SEQ ID NO：1的氨基酸的肽提供至少80%的同一性，例如85%，90%，95%，99%或100%的同一性。样品中的岩藻糖基化包括：提供具有以下功能的单价岩藻糖结合肽；使样品与固定的岩藻糖结合肽接触的步骤；以及检测与所述岩藻糖结合肽结合的任何岩藻糖基化的AGP。本发明涉及一种检测α1-酸性糖蛋白 (AGP) 的方法。本发明进一步涉及评估人类个体患肝细胞癌的风险的方法，以及在根据本发明的方法中有用的试剂盒和部分试剂盒，以及在产生此类抗体中用作免疫抗原的肽。 [选择图]图1B

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B1)	(11) 特許番号 特許第6189499号 (P6189499)
(45) 発行日 平成29年8月30日 (2017. 8. 30)	(24) 登録日 平成29年8月10日 (2017. 8. 10)	
(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	V
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543	5 4 5 D
GO 1 N 33/574 (2006. 01)	GO 1 N 33/574	B
	GO 1 N 33/574	E
請求項の数 18 (全 25 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-146202 (P2016-146202)	(73) 特許権者 516224156	
(22) 出願日 平成28年7月26日 (2016. 7. 26)	グリコボンド・アクチボラゲット	
審査請求日 平成28年7月26日 (2016. 7. 26)	GLYCOBOND AB	
(31) 優先権主張番号 1650619-8	スウェーデン、5 8 3 3 0 リンショー	
(32) 優先日 平成28年5月9日 (2016. 5. 9)	ピング、テクニクリンゲン、1・エフ	
(33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)	110001195	
早期審査対象出願	(74) 代理人 特許業務法人深見特許事務所	
	ペータル・ポールソン	
	スウェーデン、5 8 2 4 6 リンショー	
	ピング、ベルネルスガタン、2 6	
	審査官 草川 貴史	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】新規の結合アッセイ