

(19)日本国特許庁(J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 231555

(P2001 - 231555A)

(43)公開日 平成13年8月28日(2001.8.28)

| (51) Int.Cl <sup>7</sup> | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I            | 技術表示箇所 |
|--------------------------|------|--------|----------------|--------|
| C 1 2 N 15/02            | ZNA  |        | A 6 1 K 39/395 | D      |
| A 6 1 K 39/395           |      |        |                | N      |
|                          |      |        | 45/00          |        |
|                          |      | 45/00  | A 6 1 P 31/04  |        |
| A 6 1 P 31/04            |      |        | 35/00          |        |

審査請求 未請求 請求項の数 20 O L (全 14数) 最終頁に続く

|             |                                 |         |   |
|-------------|---------------------------------|---------|---|
| (21)出願番号    | 特願2000 - 389166(P2000 - 389166) | (71)出願人 | 398032751<br>デイド・ベーリング・マルブルク・ゲゼル<br>シャフト・ミット・ベシユレンクテル・ハ<br>フツング |
| (22)出願日     | 平成12年12月21日(2000.12.21)         |         | ドイツ連邦共和国 マルブルク/ラーン(番<br>地なし)                                    |
| (31)優先権主張番号 | 19962417:8                      | (72)発明者 | ハーラルト・アルトハウス  |
| (32)優先日     | 平成11年12月22日(1999.12.22)         |         | ドイツ連邦共和国デー - 35083ヴェター .シ<br>ュールシュトラーセ20アー                      |
| (33)優先権主張国  | ドイツ(DE)                         | (74)代理人 | 100091731<br>弁理士 高木 千嘉 (外1名)                                    |
| (31)優先権主張番号 | 10016277:0                      |         |   |
| (32)優先日     | 平成12年4月3日(2000.4.3)             |         |   |
| (33)優先権主張国  | ドイツ(DE)                         |         |   |
| (31)優先権主張番号 | 10041215:7                      |         |   |
| (32)優先日     | 平成12年8月22日(2000.8.22)           |         |   |
| (33)優先権主張国  | ドイツ(DE)                         |         |   |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗 - プロカルシトニン抗体、その調製および使用

(57)【要約】

【課題】 本発明は、抗 - プロカルシトニン抗体、その調製および、特に治療および診断における使用に関する。

【解決手段】 この抗体は、プロカルシトニンに結合するが、遊離のカルシトニン、遊離のカタカルシンおよび遊離のN - プロカルシトニンには結合しないものである。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 プロカルシトニンには結合するが、遊離のカルシトニン、遊離のカタカルシンおよび遊離のN-プロカルシトニンには結合しない抗体。

【請求項2】 アミノ酸配列：Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser、またはアミノ酸配列：Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Serを有するペプチドに結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】 ハイブリドーマ細胞系98-31/04(DSM ACC 2437)により産生される請求項1または2に記載の抗体。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体により認識されるエピトープに結合する特異的結合パートナー。

【請求項5】 抗体、特異的結合パートナーの両者またはいずれかが固相および/またはレポーターシステムの成分と会合した、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体または特異的結合パートナー。

【請求項6】 インビトロもしくはインビボ診断剤としてまたはインビトロもしくはインビボ診断剤の成分として使用される、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体または特異的結合パートナー。

【請求項7】 試料中の分析対象物、好ましくはプロカルシトニンの定量的検出法または定性的検出法において使用される、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体または特異的結合パートナー。

【請求項8】 アフィニティークロマトグラフィーにおいて使用される、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体または特異的結合パートナー。

【請求項9】 医薬上適する無菌の注射用媒体中における、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体または特異的結合パートナー。

【請求項10】 薬剤または薬剤の処方成分として使用される、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体または特異的結合パートナー。

【請求項11】 敗血症、SIRSおよび/または腫瘍の治療のための、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体または特異的結合パートナー。

【請求項12】 請求項1～5のいずれか1項に記載の1つ以上の抗体および/または1つ以上の特異的結合パートナーを含む試験キット。

【請求項13】 請求項1～4のいずれか1項に記載の1つ以上の抗体および/または1つ以上の特異的結合パートナーを含む医薬。

【請求項14】 アミノ酸配列：Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly、好ましくはアミノ酸配列：Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Serおよび/またはアミノ酸配列：Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Aps、好ましくはVal-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Serを含む1つ以上のペプチドを免疫感作に使用することからなる、請求項

1～3のいずれか1項に記載の抗体の調製方法。

【請求項15】 免疫感作に使用する少なくとも1つのペプチドがオリゴペプチド、好ましくは担体結合オリゴペプチドである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体を産生する動物、植物、原核細胞または単離したヒト細胞。

【請求項17】 請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞系。

【請求項18】 受託番号DSMZに寄託された、請求項17に記載の98-31/04と命名された、ハイブリドーマ細胞系。

【請求項19】 アミノ酸配列：Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Serを有するペプチド。

【請求項20】 アミノ酸配列：Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Serを有するペプチド。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗-プロカルシトニン抗体、その調製および使用に関する。

【0002】

【従来の技術】プロカルシトニン(pCT)は116アミノ酸からなり、約13,000ダルトンの分子量を有するタンパク質である。これは、正常な代謝状態において産生され、甲状腺のC細胞により分泌されるカルシトニンのプロホルモンである。pCTおよびカルシトニンの合成は、141アミノ酸からなる前駆体ペプチドであるプレプロカルシトニン(プレ-pCT)の翻訳により開始される。ヒトプレ-pCTのアミノ酸配列は、FEBS Letters, 167:93-97, 1984にてMoulliec等により記載されている。pCTは、シグナルペプチド(プレ-pCTの最初の25アミノ酸)の脱離後に形成される。健康人においては、ホルモンのカルシトニン(pCTアミノ酸配列の60～91アミノ酸)、およびN-プロカルシトニン(pCTアミノ酸配列の1～59アミノ酸)およびカタカルシン(pCTアミノ酸配列の96～116アミノ酸)は、pCTから特異的タンパク質分解により細胞内で産生される(Conlan等, (1988) Biochem. J., 256:245-250を参照)。pCTおよびその断片は、特に特定の新生物疾患(Ghillani等 (1989) Cancer Research, 49:6845-6851)および敗血症(EP-B1-0656121)およびSIRS(全身性炎症反応症候群)(Snider等, (1997) J. Investig. Med., 45:552-560)の場合において、患者の血清または血漿中における濃度の減少にて検出される。

【0003】典型的な敗血症では、細菌は連続的にまたは段階的に病巣から血流に放出される。エンドトキシンまたは身体の機構と相互作用する他の発熱性および毒性物質は、臨床的兆候を引き起こす。急性の発症では悪寒、重大な場合ではショック応答が引き起こされる。敗

血症ショックの特定の型は、Waterhouse-Friderichsen 症候群およびトキシックショック症候群（TSS）である。TSSは、特定のスタフィロコッカストキシンにより引き起こされるスタフィロコッカス感染における急性な臨床的事態として知られている。重い敗血症は、例えば新生物疾患、重い火傷およびトラウマなどの深刻な主な疾病を有する患者においてしばしば進行する。

【0004】血中において病原体を検出する敗血症診断（陽性血液培養、菌血症）の重要性は、一般的に血液培養は敗血症の場合の20～40%においてのみ陽性であるため、後方に追いやられてしまった。従って、用語「敗血症」は変化している。現代の用語「敗血症」は、一般的に発熱、白血球増加症、意識変容、過度筋力循環（hyperdynamic circulation）（高温ショック）および代謝過剰状態を含む臨床的症候群と言うもので、陽性血液培養はもはや敗血症診断の必須条件として要求されるものではない。WO 98/33524は、敗血症およびSIRSの治療のためにpCTに結合する抗体の使用を示唆している。

【0005】長年にわたり、ポリクローナル抗体がカルシトニンによる免疫感作から得られ、カルシトニンだけではなくさらにプロカルシトニンおよび別のプロカルシトニン断片が含まれている、いわゆる免疫応答性カルシトニンを検出するために使用されてきた。プロカルシトニン断片に対応するアミノ酸配列を有する合成ペプチドによる免疫感作で、種々のカルシトニンおよびカタカルシンのエピトープに結合する種々のモノクローナル抗体の産生を成功させた（Ghillani等（1988）, J. Immunol., 141: 3156-3163）。

【0006】これらの抗体に基づき血清試料中のpCTおよびカルシトニンを検出するためのサンドイッチイムノアッセイもまた開発された。抗-カタカルシン抗体と抗-カルシトニン抗体の組合せが、カルシトニン前駆体分子の検出のために提案されている（EP-B1-0 65612 1）。しかしながら、そのような方法の欠点は、pCT検出がpCT断片に結合する少なくとも2つの抗体を必要とすることであり、これはなかなか可能なことではない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って、ただの1つの特異的結合パートナーによりpCT検出を可能にする他の特異的結合パートナーを提供することが当業者の課題であった。

【0008】

【課題を解決するための手段】この課題は、プロカルシトニンには結合するが、遊離のカルシトニン、遊離のカタカルシンおよび遊離のN-プロカルシトニンには結合しない、本発明の抗体が提供されることにより達成される。本発明によれば、アミノ酸配列Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Serを有するペプチドに結

合する抗体と、アミノ酸配列Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Serを有するペプチドに結合する抗体が好ましい。

【0009】これに対して公知の抗体はpCTに結合するが、同時に遊離のカルシトニン、遊離のカタカルシンまたは遊離のN-プロカルシトニンに結合するものであり、本発明の抗体はまた競合アッセイまたは免疫組織化学法において特異的pCT検出にそれ単体で使用してもよい。また、本発明の抗体は、アフィニティークロマトグラフィーによりpCT断片を含有する試料からpCTを精製するのに得に適する。

【0010】Ghillani等は彼らの免疫感作実験において、アミノ酸配列：Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Aspおよびアミノ酸配列：Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Serからなるペプチドを使用した。彼らはカルシトニンと成熟型カルシトニンもしくはpCTを認識する抗体、またはカタカルシンとカルシトニンもしくはpCTを認識する抗体の提供に成功しただけであるが、大変な努力によりpCTエピトープを特定した。驚くべきことに、プロカルシトニンに結合するが、遊離のカルシトニン、遊離のカタカルシンおよび遊離のN-プロカルシトニンには結合しない抗体が本発明にて成功裡に作成されたのである。

【0011】本発明の特定の態様を次に詳細に記載する。好ましくは、本発明はプロカルシトニンに結合するが、遊離のカルシトニン、遊離のカタカルシンおよび遊離のN-プロカルシトニンには結合しない抗体に関する。

【0012】本発明によれば、用語「抗体」はイムノグロブリン、例えばIgA、IgD、IgE、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgMのクラスまたはサブクラスのイムノグロブリンを意味する。抗体は、抗原またはハプテン上のエピトープ（しばしば抗原決定基と称される）に対する少なくとも1つの結合部位（しばしばパラトープと称される）を含む。そのようなエピトープは、例えばその三次元構造および/または極性基および/または無極基の存在により特徴付けられる。抗体結合部位はエピトープと相補的である。抗原-抗体反応またはハプテン-抗原反応は、「鍵と鍵穴原理」と称されるものに従って作用し、一般的には高度に特異的であること、即ち抗体は抗原またはハプテンにおける一次構造、三次元構造および立体配置における僅かな違いを見分けることが可能である。特に抗体のいわゆる相補性決定領域が抗体と抗原またはハプテンとの結合に寄与する。

【0013】用語「抗原」には一価および多価抗原が包含される。多価抗原は、1つ以上のイムノグロブリンが同時に結合しうる単一分子または分子複合体であるのに対して、単一の抗体は常に一価抗原にのみ結合しうる。ハプテンは、それ自体は免疫原性ではないが、通常は免

疫感作の目的のために担体に結合する分子を意味する。

【0014】本発明によれば、用語「抗体」は、完全な抗体ばかりでなく、例えばFab、Fv、F(ab)<sub>2</sub>、Fabなどの抗体断片；キメラ、ヒト型化、ピ-またはオリゴ-特異的または単鎖抗体をも意味することは明白であり；さらに、抗原またはハプテンに対する結合特性が保たれる限りにおいてはイムノグロブリンおよび/またはその断片の凝集体、ポリマーおよび接合体をも意味する。抗体断片は、例えばペプシンまたはパepsinなどの酵素を使用する抗体の酵素分解により調製することができる。抗体凝集体は、ポリマーおよび接合体は、多重化の方法により、例えば熱処理、グルタルアルデヒドなどの物質との反応、イムノグロブリン結合分子との反応、抗体のピオチン化およびその後のストレプトアビジンもしくはアビジンとの反応などにより作成することができる。

【0015】本発明による抗体は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体とすることができる。抗体は、通常の方法により、例えばヒト、または例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどの動物の免疫感作 (Messerschmid (1996), *BIOforum*, 11:500-502を参照) およびその後の抗血清を調製すること；またはハイブリドーマ細胞の構築およびその後分泌された抗体を精製を精製すること；または天然の抗体と抗原またはハプテンとの結合を担うアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列もしくはその修飾領域のクローニングおよびその発現により調製することができる。

【0016】「遊離」のカルシトニン、カタカルシンおよびN-プロカルシトニンは、pCT開裂産物のカルシトニン、カタカルシンおよびN-プロカルシトニンを意味し、これらは既に上記しており、pCTのタンパク質分解によりインビボで形成される。

【0017】本発明に従う特に好ましい抗体は、アミノ酸配列：Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Serを有するペプチドまたはアミノ酸配列：Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Serを有するペプチドに結合する抗体である。本発明に従う別の好ましい抗体は、アミノ酸配列：Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Glyを有するペプチドまたはアミノ酸配列：Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Aspを有するペプチドに結合する抗体である。

【0018】本発明に従う特に好ましい抗体はまた、ハイブリドーマ細胞系98-31/04により産生されるpCT-結合性抗体である。このハイブリドーマ細胞系は、DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, Braunschweig, Germany) に1999年12月16日に受託番号DSMACC 2437にて寄託されている。

【0019】本発明はまた、本発明の抗体により認識されるエピトープに結合する特異的結合パートナーに関する

。「特異的結合パートナー」は、特異的結合対の一つを意味する。特異的結合対は、各々が他の分子の構造に相補的な少なくとも1つの構造を有する2つの分子であり、2つの分子が相補的構造への結合を介して互いに結合し得るものである。用語「分子」には、例えばアポ酵素と補酵素からなる酵素、複数のサブユニットからなるタンパク質、タンパク質と脂質からなるリポタンパク質などのタンパク質複合体をも包含される。特異的結合パートナーは天然に生じた物質であってもよいが、例えば化学合成、微生物学的技術および/または遺伝子工学的の方法により製造してもよい。例は、チロキシン結合グロブリン、ステロイド結合タンパク質、抗体、抗原、ハプテン、酵素、レクチン、核酸、リプレッサー、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド、プロテインA、プロテインG、アビジン、ストレプトアビジン、ピオチン、補体成分C1q、核酸結合タンパク質などであるが、これは説明のためのものであり、用語「特異的結合パートナー」を限定するものではない。特異的結合パートナーは、例えば抗体/抗原、抗体/ハプテン、オペレーター/リプレッサー、ヌクレアーゼ/核酸、ピオチン/アビジン、レクチン/多糖類、ステロイド/ステロイド結合タンパク質、活性成分/活性成分レセプター、ホルモン/ホルモンレセプター、酵素/基質、IgG/プロテインA、相補的オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドなどである。

【0020】当業者であれば、本発明の抗体が提供されることにより、例えば競合実験 (Peters等, (1985) *Monoklonale Antikörper*, Springer Verlag, section 12.2 "Epitop-Analyse" を参照) により、本発明の抗体のエピトープに結合する抗体を包含する他の特異的結合パートナーを特定することが可能である。故に、当業者に知られた技術により、ファージ表示ライブラリー、合成ペプチドデータベースまたは組換え抗体ライブラリー (Larrick & Fry (1991), *Human Antibodies and Hybridomas*, 2: 172-189) を用いて特異的結合パートナーを選択することが可能である。

【0021】本発明はまた、固相および/またはレポーターシステム成分に結合した本発明の抗体または本発明の特異的結合パートナーに関する。本発明によれば、用語「固相」は、多孔性および/または無孔性の、一般的には水不溶性物質からなり、例えば容器、試験管、マイクロタイタープレート、ビーズ、微粒子、棒状、帯状、濾紙またはクロマトグラフィー紙などの非常に様々な形状を有するものである。一般的には固相の表面は疎水性であるか、または疎水性にすることができる。固相は、例えば無機および/または有機物質、合成物質、天然生じる物質および/または修飾した天然に生じる物質などの非常に様々な物質からなりうる。固相物質の例は、例えばセルロース、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリ塩化ビニル、ポリアクリルアミド、架橋デキ

ストラン分子、アガロース、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリメタクリレートまたはナイロンなどのポリマー；セラミック；ガラス；金属、特に金や銀などの貴金属；磁鉄鉱；これらの混合物または組合せなどである。用語「固相」はまた、細胞、リポソームまたはリン脂質小胞を包含する。

【0022】固相は例えばタンパク質、炭水化物、親油性物質、生体ポリマー、有機ポリマーまたはこれらの混合物の1つ以上の層の被膜を有して、例えば固相への試料成分の非特異的結合を抑制もしくは防止するか、または例えば粒状の固相の懸濁物安定性、保存性、形状安定性またはUV光、細菌もしくは他の有害な薬剤への耐性の向上を達成することができる。

【0023】「レポーターシステム」は、少なくとも1つが検出可能な標識である、1つ以上の成分としうる。標識は、それ自体シグナルを発生するか、または例えば蛍光物質、放射性物質、酵素もしくは化学発光物質などのシグナルの発生を誘起しうる任意の分子である。シグナルは、例えば酵素活性、発光、光吸収、光散乱、電磁波もしくは放射線放射または化学反応により検出または測定することができる。

【0024】標識はそれ自体検出可能なシグナルを発生しうるものであり、故に他の成分を必要としない。多くの有機分子は紫外線および可視光を吸収するが、これらの分子は光吸収によって転移したエネルギーのために励起エネルギーレベルに達して、吸収したエネルギーを入射光とは異なる波長の光として放出しうるものである。他の標識は、例えば放射性同位元素または色素など直接的に検出可能なシグナル発生しうるものである。

【0025】他の標識にはシグナル発生のために付加的成分を必要とする、即ちシグナル発生システムであり、この場合シグナルの発生に必要な全ての成分、例えば基質、補酵素、クエンチャー、促進剤、付加的酵素、酵素産物と反応する基質、触媒、活性剤、補因子、阻害剤などを包含する。

【0026】適する標識 (EP-A2-0515194; US 5,340,716; US 5,545,834; Bailey等 (1987), J. Pharmaceutics & Biomedical Analysis 5: 649-658を参照) は、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、ウレアーゼおよびアセチルコリンエステラーゼを包含する酵素；染料；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、臭化エチジウム、5-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホニルクロリドおよび蛍光性稀土類キレートを包含する蛍光物質；ルミノール、イソルミノール、アクリジン化合物、オレフィン、エノールテル、エナミン、アリーールビニルエーテル、ジオキサン、アリーールイミダゾール、ルシゲニン、ルシフ

エリンおよびエクオリンを包含する化学発光物質；エオシン、9,10-ジプロモアントラセン、メチレンブルー、ポルフィリン、フタロシアニン、クロロフィル、ローズベンガルを包含する増感剤；補酵素；酵素基質；<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>14</sup>C、<sup>3</sup>H、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>51</sup>Cr、<sup>59</sup>Fe、<sup>57</sup>Coおよび<sup>75</sup>Seを包含する放射性同位元素；磁性粒子または粒子、それ自体、例えば染料、増感剤、蛍光物質、化学発光物質、同位元素または他の検出可能な標識により標識されうるもの、好ましくはラテックス粒子を包含する粒子；金および銀のソルを包含するソル粒子；検出可能な標識によりそれ自体標識されうるリポソームまたはセルである。

【0027】レポーターシステムはまた、近距離で検出可能な様式にて互いに相互作用しうる成分、例えばエネルギー供与体とエネルギー受容体、例えば光線感作物質と化学発光物質 (EP-A2-0515194)、光線感作物質とフルオロフォア (WO 95/06877)、放射性ヨウ素-125とフルオロフォア (Udenfriend等 (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 8672-8676)、フルオロフォアとフルオロフォア (Mathis (1993), Clin. Chem. 39:1953-1959)、フルオロフォアと蛍光消光物質 (US 3,996,345)などを包含してもよい。

【0028】成分間の相互作用は成分間、例えば光または電子照射と短時間で消滅する放射性化学物質を介しての直接的エネルギー転移を包含する。これにはさらに、一成分の活性が1つ以上の他のものにより阻害または促進される過程、例えば酵素活性における阻害もしくは増加、または影響を受けた成分から放射される電磁波の阻害、増加もしくは変化 (例えば波長のシフト、極性化) が包含される。成分間の相互作用はまた、酵素カスケードを包含する。この場合、成分は酵素、共役基質変換の最大または最小反応速度において生じる2番目のものに対する基質を供給する少なくとも1つの成分である。成分間の効果的な相互作用は一般的には、これらが空間的に近接する、即ち例えば数μmの距離内において、特に600nmの距離内、好ましくは400nm以下、より好ましくは200nm以下にある場合に開始される。

【0029】微粒子は固相および/または標識として通常使用される。本発明によれば用語「微粒子」は、少なくとも約20nmで約20μm以下の直径を有する粒子を意味するが、通常は40nm~10μmの間、好ましくは0.1~10μmの間、特にこのまは0.1~5μmの間、非常に好ましくは0.15~2μmの間である。微粒子は、規則的または不規則な形であってよい。これらは、球体、長球体、幾分大きな腔または孔を有する球体を包含しうる。微粒子には、有機材料、無機材料または両方の混合物もしくは組合せが包含されうる。これらは多孔性または無孔性材料であり、膨張性または非膨張性材料であってよい。主に微粒子は任意の密度を有し得るが、しかしながら、水の密度に非常に近い密度、例えば

約0.7～約1.5 g/mlの密度を有する粒子が好ましい。好ましい微粒子は、水溶液中に懸濁可能であり、できるだけ長期にわたり安定である。これらは、透明、部分的に透明または不透明であり得る。微粒子は複数の層を含む、例えばコアと1つ以上の取り巻き層を有するいわゆる「コアアンドシェル」粒子とすることができる。用語「微粒子」には、例えば染料、結晶、金属ソル、シリカ粒子、ガラス粒子、磁性粒子、ポリマー粒子、油滴、脂質粒子、デキストランおよびタンパク質凝集体が包含される。好ましい微粒子は水溶液中に懸濁可能なものであり、水不溶性ポリマー材料、特に置換ポリエチレンが含まれる。特に好ましいものは、例えばポリスチレン、アクリル酸ポリマー、メタクリル酸ポリマー、アクリロニトリルポリマー、アクリロニトリル/ブタジエン/スチレン、ポリ酢酸ビニル/アクリレート、ポリビニルピリジン、ポリ塩化ビニル/アクリレート製のラテックス粒子である。格別所望のものは、共有結合、例えば特異的パートナーとラテックス粒子との共有結合を促進する反応性基、例えばカルボキシル、アミノまたはアルデヒド基をその表面に有するラテックス粒子である。ラテックス粒子の製造は、例えばEP-0080614、EP-0227054およびEP-0246446に記載されている。

【0030】用語「会合した」(associated)は広い意味を有するが、例えば共有および非共有結合、直接的および間接的結合、表面への吸着、窪みまたは孔への封入などが含まれる。共有結合の場合、抗体または結合パートナーは、固相または標識に化学結合を介して結合する。非共有結合の例は、表面吸着、孔への封入または2つの特異的結合パートナーの結合である。固相または標識への直接的結合を除いて、抗体または結合パートナーはまた、他の特異的結合パートナーとの特異的な相互作用を通じて固相または標識に間接的に結合しうる(EP-A2-0411945を参照)。これは、例をもって詳細に説明されるべきもので、すなわちビオチン化抗体は、標識-結合アビジンを介して標識に結合しうる；またはフルオレセインと抗体との複合体は、固相結合-抗フルオレセイン抗体を介して固相に結合しうる；または抗体はイムノグロブリン結合性タンパク質を介して固相または標識に結合しうる。

【0031】さらに、本発明は、インビトロまたはインビボ診断剤としてまたはインビトロまたはインビボ診断剤の成分として使用される、本発明に従う抗体または特異的結合パートナーに関する。インビボ診断剤の場合、例えば放射性同位元素で標識した、本発明による抗体または本発明による特異的結合パートナーは生物、例えばヒトまたは動物などに投与される。増加した量にてpCTを含有または産生するそれらの器官または組織に蓄積されるのが好ましい。放射強度が増加している位置を検出することにより、例えばpCT産生腫瘍の位置を限定し、造影法を用いてそれを三次元的に表示することが可

能となる。インビトロ診断剤の場合、検出すべき分析物、例えばプロカルシトニンを試料中にてヒトもしくは動物の外で検出するか、またはその濃度もしくは量を測定する。

【0032】本発明によれば「試料」は、検出すべき物質をおそらく含有しているであろう材料を意味する(例えば、用語「分析対象物」の意味、EP-A2-0515194、第8～15頁を参照)。用語「試料」には、例えば体液または組織、特にヒトまたは動物のもので、血液、血漿、血清、唾液、滲出液、気管支肺胞の洗浄液、リンパ液、滑液、精液、腔粘液、糞、尿、CSF、毛髪、皮膚、組織試料または組織断片などが含まれる。さらに、細胞培養試料、植物液体または組織、法医学的試料、水および排水試料、食物、医薬などが含まれる。分析対象物を検出法に利用可能にするかまたは邪魔するような試料の成分を除去することが適当である場合には、試料を前処理することが必要である。試料のそのような前処理には、除去および/または細胞の溶解、沈殿、加水分解または試料成分、例えばタンパク質などの変性、試料の遠心分離、有機溶媒、例えばアルコール、特にメタノールを用いる試料の処理、界面活性剤を用いる試料の処理が包含される。試料はしばしば、他のもの、通常は検出法に干渉しない水性媒体中に移される。

【0033】本発明による抗体および/または本発明による特異的結合パートナーは、試料中の分析対象物、好ましくはプロカルシトニンの定量的または定性的検出法において使用することができる。定量試験において、試料中の分析対象物の量または濃度が測定される。用語「定量試験」には、試料中の分析対象物のおおよその量または濃度を測定するかまたは相対的量または濃度を表す半定量法も含まれる。定性試験は、実際に試料中の分析対象物の存在を検出するか、または試料中の分析物の濃度が特定の閾値より高いかもしくは低いかを示すことを意味する。

【0034】本発明による抗体および/または本発明による特異的結合パートナーを使用すると、例えば不鮮明な組織切片または組織試料中において免疫組織学的にpCTを検出することが可能になる。故に、例えば凍結切片またはパラフィン切片を試験すべき試料から調製する。切片は、適する反応条件において本発明による抗体とインキュベートされる。未結合の本発明の抗体を洗い流した後、本発明の抗体が結合した領域を検出する。例えば抗体が蛍光標識されている場合には、さらなる中間行程を行う必要はない。また、結合した本発明の抗体は、標識に結合され、結合した本発明の抗体と結合しうる適当な特異的結合パートナーを用いて検出することができる。

【0035】本発明の抗体および/または本発明の特異的結合パートナーを用いるpCTの検出は、例えばウェスタンブロット、ドットブロット、免疫電気泳動法、免

疫固定電気泳動法、電気免疫拡散法、免疫沈殿法、放射免疫拡散法、免疫固定法、免疫クロマトグラフィー、ラテックス凝集、濁度または比濁試験、均一または不均一結合アッセイ、間接アッセイ、競合アッセイ、ケアポイント試験 [point of care test] などの方法によって実施することができる。これらのおよび他の検出法は、例えば "Labor und Diagnose", ed. L. Thomas, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt, 1998, chapter 60 または "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques", ed. T. Chard, Elsevier, Amsterdam, 1987 に記載されている。

【0036】結合アッセイにおいて、分析対象物は、試料中に存在する場合は1つ以上の分析対象物 - 特異的結合パートナーに結合し、分析対象物 / 分析対象物 - 特異的結合パートナー複合体を形成させる。均一結合アッセイにおいて、遊離の分析対象物および複合体結合分析物は分離されない。均一イムノアッセイの例 (Boguslaski & Li (1982), Applied Biochemistry and Biotechnology, 7: 401-414 を参照) は、多くの濁度または比濁法であり、特異的結合パートナーを用いてラテックス粒子と結合したものを検出することが可能である。EMIT (アッセイ; CEDIA (アッセイ; 蛍光偏光イムノアッセイ; 発光酵素伝達イムノアッセイ (EP-A2-0515194; Ullman 等, (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 5426-5430; Ullman 等, (1996) Clinical Chemistry, 42: 1518-1526) など。

【0037】不均一結合アッセイには、1つ以上の分離工程および / または洗浄工程が含まれる。分離は、例えば免疫沈降法、ポリエチレングリコールまたはアンモニウム塩などを用いる沈殿法、濾過、磁気分離、固相、例えば試験管、ビーズ、マイクロタイタープレート壁または濾紙もしくはクロマトグラフィー紙などへの結合により実施することができる。不均一結合アッセイにおいて、しばしば1つの特異的結合パートナーを固相に結合させる (間接的結合については、EP-A2-0411945 を参照)。本明細書において、特異的結合パートナーは異なっても同じでもよく、分析物が1つ以上のエピトープを含有している場合は、例えば分析物 - 特異的結合パートナーは、捕集剤 (例えば固相抗体として) および標識抗体の両方として使用することができる。

【0038】不均一サンドイッチアッセイにおいて、分析対象物は通常固相に会合した特異的結合パートナーとレポーターシステムの成分と結合した特異的結合パートナーにより結合される。サンドイッチイムノアッセイの場合において、特異的結合パートナーは分析対象物 - 特異的抗体であるか、または分析対象物自体が抗体である場合には、抗原および / または修飾抗原、例えば標識抗原、抗原断片、抗原のアナログとすることができる。そのようなサンドイッチ複合体の例は、固相抗体 < > 分

析対象物 < > 抗体 標識、または固相 抗原 < > 分析対象物 (= 抗体) < > 抗原 標識 である。

【0039】不均一イムノアッセイの他の態様は、間接イムノアッセイであり：この場合、分析対象物は抗体である。特異的結合パートナーの1つはその抗原自体および / または修飾抗原であり、他の特異的結合パートナーは分析対象物および / またはイムノグロブリン結合タンパク質に結合する抗体である。間接イムノアッセイにおいて形成されるその様な複合体の例は：固相 抗 - IgM 抗体 < > 分析対象物 (= 抗 - Hb s A g I g M) < > Hb s A g 標識または固相 Hb s A g < > 分析対象物 (= 抗 - Hb s A g I g G) < > プロテイン A 標識 である。

【0040】不均一競合イムノアッセイにおいて、試料分析対象物は、分析対象物 - 特異的結合部位の数が限定されるために、「修飾分析対象物」、例えば 標識分析対象物、分析対象物断片、分析対象物のアナログなどと競合する。原理を説明する例としては：(i) 試料分析対象物が、分析対象物特異的抗体と会合した固相への結合について、レポーターシステムの成分と会合した分析物と競合する、または (ii) 試料分析対象物が、レポーターシステムの成分と会合した分析対象物への結合について、分析物と会合した固相と競合するものである。サンドイッチアッセイ、競合アッセイおよび間接アッセイは、均一アッセイ法として実施することもできる (EP-A2-0515194 を参照)。

【0041】用語「ケアポイント試験」(point-of-care tests) または「POC 試験」は広い意味を有している。これには、試験を実施または評価するにあたり個別の分析または測定装置を必要としない試験が含まれる。多くの場合、POC 試験は、イムノクロマトグラフィー法が濾過または免疫固定技術による免疫複合体の分離を基礎とするものである。POC 試験は、特にその場での、例えば病院のベットでのまたは家庭での測定のために、緊急医および / または一般の開業医に対して意図するものであり、大規模な研究所に対するものではない。POC 試験はまた、特に研究室用薬剤の分野における医療の技術および経験について十分な訓練を受けていない人により実施されるものである。本発明によれば、用語「POC 試験」は、いわゆるホームテストか、または医療の素人などにより実施されるOTC 試験、例えば家庭で試用するために販売されている種々の妊娠試験を意味する。他のPOC 試験は、例えば心臓発作マーカー、薬剤、医薬、感染マーカーおよび炎症マーカーの検出に関する。多くのPOC 試験において、特異的結合パートナーは、試験の間は濾紙もしくはクロマトグラフィー帯紙またはディスクと会合されている。溶性または陰性試験反応は、例えば特定の試験領域における着色バンドの出現もしくは非出現および / または記号、例えば "+" や "-" の出現もしくは非出現および / またはそ

それぞれの測定シグナルの強度に関連付けられている。

【0042】pCT用のPOC試験は、例えば次の様式にて構成される：試料およびpCTに結合しうる標識抗体を試験帯紙に適用する。適する標識は、例えば着色ラテックス粒子、金コロイド、酵素などである。pCTが試料中に存在する場合、pCT/抗体複合体が形成される。pCTの異なるエピトープに結合しうる抗体が、例えばバンドとして固定される、または試験過程に（例えばビオチン/アビジン架橋を介して）固定されるであろう部分に向けて、これらの複合体は毛細管力により移動する。標識pCT/抗体複合体はこの部位において結合し、固定された抗体とともにサンドイッチ複合体を形成する。標識シグナルの強度は、この場合pCT試料濃度に比例する。競合POC試験法では、pCTおよび/またはpCT断片が、例えば試験帯紙の部分に固定されるか、または試験過程に固定される。この固定されたpCTは、標識した抗-pCT抗体への結合について、試料由来のpCTと競合する。別法として、固定された抗-pCT抗体および標識したpCTもまた、競合pCT試験を構成させるために使用することができる。

【0043】本発明に従う方法の特に好ましい態様は、比濁または濁度試験、特に本発明の抗体および/または本発明の特異的結合パートナー、好ましくはラテックス粒子に会合したものを使用する試験である。

【0044】さらに、本発明は、1つ以上の本発明の抗体および/または1つ以上の本発明の特異的結合パートナーを含む試験キットに関する。そのようなキットは、通常は放送形態において全てまたは一部のみの試験成分を含有する。本発明の抗体および/または本発明の特異的結合パートナーは、例えば1つ以上の固相および/または1つ以上のレポーターシステムの成分と会合させてもよい。試験キットは、例えば標準；対照；およびさらに、例えば緩衝液、洗浄溶液、測定されるシグナル誘発溶液および/または酵素基質などの試薬；キュベット；ピペットおよび/または説明書を含んでもよい。特に好ましい本発明の試験キットは、ラテックス粒子に会合した本発明の抗体を含有する。

【0045】本発明の抗体および本発明の特異的結合パートナーはまた、アフィニティークロマトグラフィーに使用することができる。用語「アフィニティークロマトグラフィー」は、基質、特に生体高分子を精製して単離する方法であり、そして多くの基質が選択的に、非共有結合にて、可逆的様式でその特異的結合パートナーに結合しうるという事実に基づく方法を意味する。この方法の原理は、一般的に特異的結合パートナーを共有結合的に不溶性基質（例えば多孔性ガラス、アガロースをベースとしたゲル、セルロース、デキストラン、ポリマーおよびシリカゲル）に結合させ、物質を含有する試料と接触させることを包含する。所望の物質は、基質に結合した特異的結合パートナーとのその特異的相互作用により

固定されて保持されるが、試料中に含まれる他の全ての物質は溶出により除去される。所望の生体高分子は、次いで物質と特異的結合パートナーとの間の非共有結合を解除するのに適する溶出液を使用して、基質から引き離される（E. Buddecke (1989), Grundrisse der Biochemie, Walter de Gruyter, chapter 7 "Proteine"を参照）。

【0046】さらに本発明は、医薬上適する無菌の注射媒体中の本発明の抗体および/または本発明の特異的結合パートナーを包含する。医薬上適する無菌の注射媒体とは、医薬、ワクチンまたは造影媒体の静脈内、筋肉内、腹膜内または皮下投与において慣用的に使用されるような、例えば無菌の発熱性物質を含まない溶液、例えば生理食塩水または電解液を意味する。

【0047】また、本発明は診断剤として、診断剤の処方成分として、医薬としてまたは医薬の処方成分として本発明の抗体および/または本発明の特異的結合パートナーの使用に関する。本発明はまた、SIRS（全身性炎症反応症候群）、敗血症および/または腫瘍、特に悪性のpCT産生性腫瘍を治療するための本発明の抗体および/または本発明の特異的結合パートナーの使用に関する。SIRSは、遠隔器官の機能障害を伴う組織の損傷に対する全身性炎症反応である。また、本発明には、本発明の抗体および/または本発明の特異的結合パートナーを含有する、例えば腫瘍、敗血症および/またはSIRSを治療するための医薬の製造方法を包含される。

【0048】本発明の抗体および/または本発明の特異的結合パートナーは、肉体内あるいは肉体外の治療に使用することができる。本発明の抗体および/または本発明の特異的結合パートナーは、放射性同位元素によりおよび/または薬理的活性物質に連結させることによりその活性が増強される。WO 98/33524は、抗-pCT抗体の治療への応用を詳細に記載している。さらに、pCTは、例えば透析に類似する方法により患者の血液から除去することができ、血液または血漿を肉体外で無菌で固定された本発明の抗体および/または本発明の特異的結合パートナーと接触させる。

【0049】さらに本発明は、アミノ酸配列：Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly、好ましくはアミノ酸配列：Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser、および/またはアミノ酸配列：Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp、好ましくはアミノ酸配列：Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Serを有する1つ以上のペプチドを免疫感作に使用することからなる、本発明の抗体の調製方法に関する。本発明の好ましい方法において、免疫感作に使用する少なくとも1つのペプチドは、オリゴペプチド、好ましくは担体結合オリゴペプチドである。さらに好ましい本発明の抗体の調製方法は、アミノ酸配列：Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly、アミノ酸配列：Asp-Ser-Pro-Arg-S

er-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser、アミノ酸配列：Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Aspおよび/またはアミノ酸配列：Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Serを有する1つ以上のペプチドを免疫感作に使用することからなり、これらのペプチドについて担体に結合させることも可能である。本発明の抗体はまた、免疫原として天然に生じたpCTおよび/または組換えpCTを使用することにより調製することができる。さらに、次のアミノ酸配列：Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly、Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser、Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Aspおよび/またはVal-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser、例えばアミノ酸配列Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly、Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly、またはAsp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser-Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Serの1つ以上を含むペプチドをそれぞれ免疫感作に使用することができる。

【0050】本発明のよれば、用語「ペプチド」には、加水分解においてアミノ酸に分解されるアミド、例えばポリペプチド、オリゴペプチド、タンパク質またはタンパク質断片などのアミノ酸ポリマーが含まれる。一般的に結合した10個以下のアミノ酸を有する分子はオリゴペプチドと称される。本発明の定義に従うオリゴペプチドには、約20個までのアミノ酸鎖もまた含まれる。

【0051】本発明はまた、アミノ酸配列：Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Serおよびアミノ酸配列：Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Serを有する2つのオリゴペプチドに関する。これらのペプチドは、免疫感作抗原として本発明の抗体の調製に使用することができる。

【0052】免疫感作抗原として用いるペプチドは、未結合および/または担体結合形態において免疫感作に用いることができる。典型的な担体は、例えばオバアルブミン、アルブミンもしくはヘモシアニンなどのタンパク質、または例えばポリエチレングリコール、ポリアクリルアミドもしくはポリ-d-グルタミン-d-リジンなどのポリマーである。ペプチドはこの担体に、例えばカルボジイミドまたはグルタルアルデヒドを用いて、あるいはスペーサーとして作用させることもできる二官能価試薬を用いて結合させることができる(例えば共役法、例えばWong S. (1993), Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press Inc., Boca Ratonを参照)。

【0053】免疫感作抗原は、例えばリン酸緩衝塩溶液中に懸濁して、フロイントアジュバンドで処理することができる。次いでこのエマルジョンを、動物、例えばウサギ、マウス、ラット、モルモット、ウマ、ヒツジ、ヤ

ギ、ニワトリなどに、例えば真皮内、腹膜内および/または皮下に投与してもよい。追加免疫注射は免疫応答を増加させるのに役立つが、この免疫感作抗原についても不完全フロイントアジュバンドで乳化させることが可能である。

【0054】本発明のポリクローナル抗体は、免疫した動物の抗血清から得ることができる。これらの抗体はさらに、例えばpCTまたは免疫感作抗原として用いたペプチドを結合させた基質上におけるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

【0055】本発明のモノクローナル抗体を作成するためには、免疫した動物、たとえばマウスなどの免疫細胞を、一般的に知られた方法に従って骨髄腫細胞と融合させ(例えばHarlow & Lane (1988), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; Peters等 (1985), Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung, Springer Verlagを参照)、モノクローナル抗体(MAb)を産生するハイブリドーマを作成し、次いで適するクローンを単離する。所望のMAb-産生クローンは、特定のスクリーニング法を用いて選択する。これらの方法において、細胞培養上清中に放出された抗体の結合特異性、例えば免疫感作抗原、免疫感作抗原の可能な担体、pCT、遊離のカルシトニン、遊離のカタカルシンおよび遊離のN-プロカルシトニンに対する結合特異性を、例えば酵素イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイおよび/またはウェスタンブロットを用いて試験する。本発明の抗体を産生するハイブリドーマをクローン化する。この方法で得られたハイブリドーマ細胞系は、継続的なMAb産生に利用可能である。多量の抗体は、例えば細胞培養上清から、特に発酵物またはローラー培養物および腹水から得ることができる。

【0056】用途の所望の目的次第では、例えばFab、F(ab)<sub>2</sub>またはFab<sub>2</sub>などの抗体断片のみを使用することは有利である。これらは、例えば津業者に知られた酵素分解法により作成することができる。(例えばHarlow & Lane (1988), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harborを参照)。

【0057】抗体の抗原結合部位は、V遺伝子によりコードされるいわゆる可変領域に位置する。公知の遺伝子工学法(例えばSambrook等 (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 第2版; McCafferty等 (1990), Nature 348: 552-554を参照)を使用すれば、本発明の抗体の対応する核酸配列を決定し、アミノ酸配列決定法が知られていなくともこれにより対応するアミノ酸配列もまた決定することができる。この種の分析において、ハイブリドーマ細胞または免疫した動物の抗体産生免疫細胞を出発材料として使用してもよい。

【0058】核酸配列および/またはアミノ酸配列が知れると、慣用される遺伝子工学および分子生物学的方法 (Johnson & Chiswell (1993), Current Opinion in Structural Biology, 3: 564-571を参照) を使用して、プロカルシトニンに結合するが、遊離のカルシトニン、遊離のカタカルシンおよび遊離のN - プロカルシトニンには結合しない、ヒト型化抗体、キメラ抗体、二重 - または多重 - 特異性の抗体、および相補性決定領域 (最小認識単位) から誘導されるペプチド、一本鎖断片および/または機能性融合産物、例えば組換え抗体 - 酵素構築物 (例えばLarrick & Fry (1991), Human Antibodies and Hybridomas, 2:172-189; Kitano等 (1986), Appl. Microbiol. Biotechnol., 24: 282-286; Thompson等 (1986), J. Immunol. Methods, 94:7-12を参照) を調製することが可能になる。

【0059】そのようなペプチドの使用も用語「抗体」に包含されるが、医薬またはインピボ診断剤として投与する場合には、例えば免疫原性の低下および/または効率の増強を達成することが可能であり、および/またはインピボ診断剤またはその一部として使用する場合には有利となる。抗体はまた、適当である場合には植物細胞、例えば酵母細胞など (Fischer等 (1999), Biol. Chem., 380: 825-839; Hiatt等 (1992), Genetic Engineering, 14: 49-64)、動物および原核細胞 (例えばWO 95/25172を参照) 並びに単離したヒト細胞において遺伝子工学的方法を用いて調製することができる。

【0060】さらに、本発明はまた、本発明の抗体を産生する動物、植物または原核細胞および単離したヒト細胞に関する。本発明の好ましい態様には、本発明の抗体を産生するハイブリドーマ細胞系、例えばハイブリドーマ細胞系 98 - 31 / 04 が包含される。このハイブリドーマ細胞系は、D S M Z (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, Braunschweig, Germany) において、受託番号 D S M A C C 2437として1999年12月16日に寄託されている。本発明の個々の態様を模範的に説明するために実施例を下記するが、これは本発明を限定するものと理解されるべきではない。

#### 【0061】

##### 【実施例】実施例1：ペプチド合成

ヒトのプロカルシトニンの53 ~ 64アミノ酸、88 ~ 99アミノ酸に相当し、且つ下記の配列：

P 1 : Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser

P 2 : Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser

を有する2つのペプチド“P 1”および“P 2”を次のように合成した：P 1およびP 2は、ペプチド合成機 (Applied Biosystems社製、モデル431A) において、9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル(fmoc)アミノ酸

化学を用いて合成する。存在する保護基はトリフルオロ酢酸処理により開裂除去した。

##### 【0062】実施例2：担体へのペプチドのカップリング

ペプチドをウシ血清アルブミン (BSA, Canteon Pharma, Marburg, Germany) (Rusin等 (1992), Biosens. Bioelectron., 7: 367-373; Kitagawa等 (1983), J. Biochem., 94: 1165-1172を参照) にカップリングさせた。詳細は次の通りである：20 mlのホウ酸リチウム緩衝液 pH 8.0 中の0.1 M 100 mgのBSAを41.8 mgのN - マレインイミドブチルオキシスクシンイミド (G M B S) (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Germany) と混合し、20 で30分間インキュベートする。後に、反応混合物について、0.1 M NaH<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>) pH 6.0を用いてpH調整する (BSA / G M B S溶液)。

【0063】17.5 mgのP 1またはP 2を1.75 mlの0.1 M ホウ酸リチウム緩衝液 pH 8.0 中に溶解し、ジオキサン中に溶解した2.1 mgの無水S - アセチルメルカプトコハク酸 (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen, Germany) (22.2 mg/ml) を添加し、そして20 で30分間インキュベートする。次いで、475 μlの1 Mヒドロキシルアミン溶液を添加し、さらに20 で15分間インキュベートする。生じた反応混合物を16 mlのBSA / G M B S溶液と混合し、20 で2時間インキュベートする。その後、反応を0.1 M N - マレインイミド溶液の添加により停止させ、リン酸緩衝液 pH 7.2を用いてpH調整する。

##### 【0064】実施例3：モノクローナル抗体の調製

###### a) マウスの免疫感作

完全フロイントアジュバンド中の20 μgのP 1 / B S A複合体または20 μgのP 2 / B S A複合体を用いて、B A L B / cマウスをそれぞれ腹腔内に免疫した。それぞれ4週間後に不完全フロイントアジュバンド (ICN Biomedical GmbH, Eschwege, Germany) 中の20 μgのP 1 / B S A複合体または20 μgのP 2 / B S A複合体の追加免疫を与え、そしてフロイントアジュバンドを用いずに20 μgのP 1 / B S A複合体または20 μgのP 2 / B S A複合体をそれぞれ8週間後に与えた。融合の少なくとも3日前において、20 μgのP 1 / B S A複合体または20 μgのP 2 / B S A複合体を用いてマウスを静脈内に追加免疫した。

###### 【0065】b) 融合

CO<sub>2</sub>吸入によりマウスを屠殺した後に、脾臓を取り出して、単一細胞懸濁物を血清不含Dulbecco's修飾イーグル培地 (DMEM, CC Pro GmbH, Neustadt / W, Germany) 中において調製した。細胞を遠心分離 (625 x g) して、細胞をD M E M培地中で2回洗浄した。次に、細胞数をトリパンブルー染色により測定した。2 x 10<sup>7</sup>個の骨髓腫細胞 (S p 2 / 0) を約10<sup>8</sup>個の脾臓細胞に

添加した。遠心分離(360×g)後、上清を捨て、1 mlのポリエチレングリコール溶液(PEG 4000, Merck Eurolab, Bruchsal, Germany; DME M中にける約50%)を細胞のペレットに添加し、懸濁した細胞を37で1分間インキュベートした。次いで、10 mlのDME Mを滴下し、室温で2~4分間インキュベートした。融合細胞を遠心分離(326×g)し、ペレットをDME M+20% FBS(ウシ胎児血清; BioWhittaker Europe, Verviers, Belgium) + HAT溶液(CC ProGmbH, Neustadt/W, Germany)中に再懸濁し、24穴細胞培養皿(Costar)に導入した。ウェル当たりのおおよその細胞濃度は、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞個であった。2~3週間後、生じた細胞のコロニー(ハイブリッド)を取り出し、新しい培養皿に移した。

【0066】c) 抗体特異性の決定

第1段階において細胞培養液中に放出された抗体の特異性を、免疫感作抗原(Nunc, タイプB)でコート(コーティング、0.2 µg/ml = 0.003 µg/ウェル)したマイクロタイタープレートを使用して試験した。100 µlの細胞培養上清(1:2希釈)をマイクロタイタープレート(20)の各ウェルにピペットで移し、+15~+25にて1時間インキュベートした。POD(OSEW; Dade Behring, Marburg, Germany)洗浄溶液を用いてプレートを2回洗浄した後、100 µlの抗-マウスIgG/F(ab)<sub>2</sub>-POD複合体(Dade Behring, Marburg, Germany)を各ウェルに導入し、+15~+25にて1時間インキュベートした。再度、プレートを2回洗浄した後、100 µlのクロモゲンTMB溶液(Dade Behring, Marburg, Germany)を各ウェルに導入し、さらに+15~+25にて30分間インキュベートした。インキュベーション後、100 µlのPOD(Dade Behring, Marburg, Germany)停止溶液を各ウェルに導入し、BEPII(Behring ELISA Processor II, Dade Behring, Marburg, Germany)にてマイクロタイタープレートを450 nmで評価した。第2段階において、ハイブリッドを下記のペプチドでコートしたマイクロタイタープレート(Nunc, タイプB)を用いて上記のように試験した:

【0067】i. 組換えヒトpCT(0.03 µg/ウェル\*)

表1

BEPII(Behring ELISA Processor II)にて450nmでマイクロタイタープレートを評価した抗体特異性の決定

| ハイブリッド<br>/クローン | 450nmにおける吸光度 |           |                   |        |        |                |
|-----------------|--------------|-----------|-------------------|--------|--------|----------------|
|                 | ペプチド<br>1    | ペプチド<br>2 | 組換えヒトプロ<br>カルシトニン | カルシトニン | カタカルシン | N-プロカル<br>シトニン |
| 98-47/44        | 0.975        | 陰性        | 0.100             | 0.561  | 2.5    | 陰性             |
| 98-31/04        | 陰性           | 1.715     | 0.290             | 陰性     | 陰性     | 陰性             |
| 98-31/74        | 陰性           | 2.374     | 陰性                | 0.118  | 0.149  | 陰性             |

陰性=450nmにおける吸光度<0.1であるか、または実験したハイブリッドの希釈度において吸光度に変化がない

\*ル)。ドイツ国特許庁に1999年12月22に出願された(出願番号第19962434.8号)特許出願、名称「ヒトプロカルシトニンおよび、その調製および使用」は、組換えpCTの調製について詳細に記載している。E.coliにおける発現に適するプラスミドは、DSMZ(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)において1999年12月16日付けで番号DSMZ 13203として寄託されている。このプラスミドは、標準的方法(Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, 1997)を用いて適するE.coli株(例えばJM 109; Stratagene, LaJolla, USA)中に形質転換される。クローンは、選択のための50 µg/mlのアンピシリンを含有するLB寒天プレートに形質転換混合物をプレーとした後に得ることができる。プロカルシトニンは、次の手法を使用して発現させることができる: 発現プラスミドで新たに形質転換したJM 109細胞を、100 µg/mlアンピシリン含有LB培地中にて37で震盪しながら増殖させ、次いで1 Lの新しいLB培地(100 µg/ml アンピシリン)中にて1:50に希釈し、さらに37で震盪し、OD<sub>600</sub> 0.4において2mM IPTGで3時間誘導した。次の至適条件から、未変性条件下においてその製品説明書に従って金属アフィニティクロマトグラフィー(Talon Metal Affinity Resin, Clontech社製, Palo Alto, USA)で、次いでゲル濾過により精製し、セファデックス75 Hi Load(Amersham Pharmacia社製)におけるゲル濾過で精製することにより、11の培養物から約13mgの融合タンパク質を得た。

【0068】ii. ヒトカルシトニンB S A複合体(0.5 µg/ウェル, Bachem, Prod. No.: H-2250)。

iii. ヒトカタカルシン(PDN-21) B S A複合体(0.5 µg/ウェル, Peninsula, Prod. No.: 6004)。

iv. カルシトニン N-末端フランキングペプチドB S A複合体(0.5 µg/ウェル, Bachem, Prod. No.: H-3076) = ヒトN-プロカルシトニン。

結果を表1に示す。

【0069】

【表1】

【0070】d) クローニング

50 本発明の抗体(ヒトPctに結合するが、遊離のカルシ

トニン、遊離のカタカルシンおよび遊離のN - プロカシトニンには結合しない)を産生する単一ハイブリッド細胞は、マイクロマニピュレーター (Leitz, Wetzlar, Germany) を用いてクローン化した。この方法にて得られたクローン98 - 31 / 04は、1999年12月16日付でDSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg1b, Braunschweig, Germany) に受託番号DSMZ ACC 2437にて寄託された。

【0071】e) 抗体のサブクラス決定  
抗体98 - 31 / 04のサブクラスは、IsoStrip™マウスモノクローナル抗体アイソタイプ判定キット (Boehringer Mannheim社製、Germany) によりIgG<sup>1</sup>と決定した。

【0072】f) 抗体の産生  
多量の抗体を産生するために、対応する細胞のクローンをローラー瓶 (Corning Costar Deutschland, Bodenheim) に移し、+37にて所望の量まで増大させた。その後、ローラー培養懸濁物を0.22 μmにて濾過して細胞を取り除く。ここで、細胞不含の抗体溶液を限外濾過器 (30,000ダルトンを境に分断) によって濃縮し、次いで精製した。

【0073】g) 抗体精製  
得られる抗体溶液について0.14Mリン酸緩衝液pH8.6でpHを調整し、rプロテインAセファロースFast Flow (Amersham Pharmacia社製) を充填したクロマトグラフィーカラムに供する (精製すべき抗体10mg当たり1mlのrプロテインAセファロースFast Flowを用いる)。全ての未結合成分は、0.14Mリン酸緩衝液pH8.6でカラムを洗浄することにより除去される。結合した抗体は、0.1Mクエン酸pH3.0によりカラムから溶出され、0.05M酢酸ナトリウム+0.5M NaCl+0.05M Tris+0.01%アジ化ナトリウムpH7.0に対して透析する。

【0074】実施例4：試料中のpCTの検出  
a) ラテックス粒子へのMabの結合  
本発明の1つのモノクローナル抗体と1つのモノクローナル抗 - カタカルシン抗体それぞれを、EP-0246446に従って調製され、250 ~ 310nmの直径を有するラテッ\*40

\*クス粒子に結合させた：使用するラテックスポリマーは、4重量%の固体含量まで水を用いて希釈した。結合させる抗体は、5mg/mlのタンパク質含量まで0.05M酢酸ナトリウム+0.5M NaCl+0.05M Tris+0.01%アジ化ナトリウムpH7.0を用いて希釈した。1mlの上述のポリマーを200 μlの抗体溶液と混合した。次いで、0.050mlの20% Tween 20溶液 (Merck Eurolab, Darmstadt, Germany) を添加し、再度混合物を混合した。0.025mlの1N HClをこれに添加すると、約3のpHになった。室温で30分間インキュベートした後、0.25mlの1Mリン酸緩衝液pH6.5および0.25mlの水素化シアノホウ素ナトリウム溶液 (25mg/ml) を添加して、よく混合した。次いでこれを室温で1時間インキュベートした。

【0075】この負荷混合物を約50,000 × gにて30分間遠心分離し、上清を捨てた。残渣を4mlのイミダゾール緩衝液pH8.1 (5g/Lイミダゾール、40g/Lシヨ糖、1g/Lヒトアルブミン) 中に再懸濁させた。これを30秒間超音波処理 (Branson Sonifier B15) した。この方法で再分散させた試薬を前述のイミダゾール緩衝液を用いて1:7.5の体積比において希釈し、30秒間超音波処理した。

【0076】b) pCTの検出  
実施例4a) に従って本発明の抗体と抗 - カルシトニン抗体をラテックス粒子に結合させることにより調製した試薬を1:1の体積比で混合し、Behring社製比濁計分析機 (BNA, Dade Behring, Marburg, Germany) における患者の血清中のpCT測定に用いた。混合した試薬は、pCT含有試料との混合において凝集させた。BNAにおける散光の強度は、試料のpCT濃度に依存する。測定のために、100 μlの試料 (正常な血清 1, 患者からのpCT含有試料 3 (BRAHMS LUMItest<sup>(R)</sup> pCT, > 100ng/ml pCT)) を、反応キュベット中に100 μlのN - Diluens (Dade Behring, Marburg, Germany) および40 μlの混合試薬と混合し、測定されるシグナルの変化 (ピットにて) を12分後にBNAにおいて測定した。結果を表2にまとめる。

【0077】  
【表2】

表2

| 試料          | BNAにて測定されたシグナル (ピット) |
|-------------|----------------------|
| 正常血清        | 58                   |
| pCT - 含有試料1 | 212                  |
| pCT - 含有試料2 | 197                  |
| pCT - 含有試料3 | 592                  |

【0078】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Dade Behring Marburg GmbH

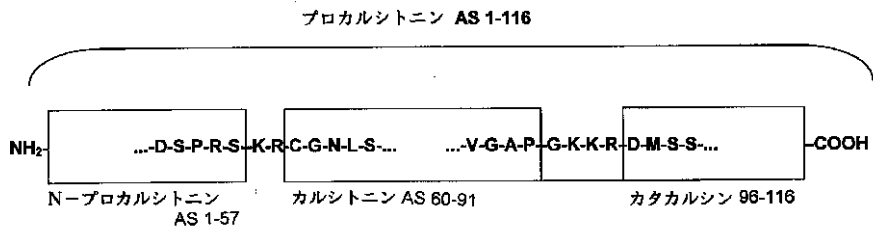
<120> Anti-procalcitonin antibodies and the preparation and

use thereof  
 <130> HES-4127  
 <140>  
 <141>  
 <150> 19962417.8  
 <151> 1999-12-22  
 <150> 10016277.0  
 <151> 2000-04-03  
 <150> 10041215.7  
 <151> 2000-08-22  
 <160> 4  
 <210> 1  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 Arg Ser Lys Arg Cys Gly  
 1 5  
 <210> 2  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 Asp Ser Pro Arg Ser Lys Arg Cys Gly Asn  
 Leu Ser  
 1 5 10  
 <210> 3  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3  
 Pro Gly Lys Lys Arg Asp  
 1 5  
 <210> 4  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4  
 Val Gly Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Met 24

【図面の簡単な説明】 Ser Ser る模式図を示している；A S = アミノ酸。

【図1】ヒトpCTとそのタンパク質分解産物を説明す 10

【図1】



フロントページの続き

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I     | テ-マコード (参考) |
|---------------------------|-------|---------|-------------|
| A 6 1 P                   | 35/00 | C 0 7 K | 16/26       |
| C 0 7 K                   | 16/26 |         | 17/00       |
|                           | 17/00 | C 1 2 N | 1/15        |
| C 1 2 N                   | 1/15  |         | 1/19        |
|                           | 1/19  |         | 1/21        |
|                           | 1/21  | C 1 2 P | 21/08       |
|                           | 5/10  | G 0 1 N | 33/53       |
| C 1 2 P                   | 21/08 | C 1 2 N | 15/00       |
| G 0 1 N                   | 33/53 |         | 5/00        |
|                           |       |         | F           |
|                           |       |         | Z N A C     |
|                           |       |         | B           |
|                           |       |         | C           |

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 抗降钙素原抗体，其制备和用途  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2001231555A</a>   | 公开(公告)日 | 2001-08-28 |
| 申请号            | JP2000389166  | 申请日     | 2000-12-21 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 日德白令maru堡ゲゼルシャフトミツトベシユレンクテルハフツング  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 德灵公司马尔堡，Gezerushiyafuto-Mitsuto-Beshiyurenkuteru-有限公司   |         |            |
| [标]发明人         | ハーラルトアルトハウス<br>ゲッツヴァルター   |         |            |
| 发明人            | ハーラルト・アルトハウス<br>ゲッツ・ヴァルター   |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 A61K39/395 A61K45/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K14/585 C07K16/26 C07K17/00<br>C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08  |         |            |
| CPC分类号         | C07K16/26 C07K14/585 C07K2317/34 Y10S435/81   |         |            |
| FI分类号          | A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K16/26 C07K17/00 C12N1/15<br>C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 G01N33/53.F C12N15/00.ZNA.C C12N5/00.B C12N5/00.C C07K7/00<br>C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A C12N5/00.102 C12N5/00.103 C12N5/26  |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/BA41 4B024/GA18 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064<br>/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AB08 4B065/AC14 4B065/CA25<br>4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C084/ZB352 4C085<br>/AA14 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/CC22 4C085/DD86 4C085/EE06 4C085/FF20 4H045/AA11<br>4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA24 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045<br>/FA72 |         |            |
| 优先权            | 19962417:8 1999-12-22 DE<br>10016277:0 2000-04-03 DE<br>10041215:7 2000-08-22 DE  |         |            |
| 其他公开文献         | JP4851645B2   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及抗降钙素抗体，其制备和用途，特别是在治疗和诊断中。该抗体与降钙素原结合，但不与游离降钙素，游离降钙素和游离N-降钙素结合。

| (51)Int. Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | FI            | 注(参考) |
|---------------------------|-------|---------------|-------|
| A 6 1 P 35/00             |       | C 0 7 K 16/26 |       |
| C 0 7 K 16/26             |       | 17/00         |       |
|                           | 17/00 | C 1 2 N 1/15  |       |
| C 1 2 N 1/15              |       | 1/19          |       |
|                           | 1/19  | 1/21          |       |
|                           | 1/21  | C 1 2 P 21/08 |       |
|                           | 5/10  | G 0 1 N 33/53 | F     |
| C 1 2 P 21/08             |       | C 1 2 N 15/00 | ZNAC  |
| G 0 1 N 33/53             |       | 5/00          | B     |
|                           |       |               | C     |