

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-60306
(P2005-60306A)

(43) 公開日 平成17年3月10日(2005.3.10)

(51) Int.Cl. ⁷	F 1	テーマコード (参考)
C07K 7/08	C 07K 7/08	Z N A 4 B 024
C07K 16/18	C 07K 16/18	4 H 045
GO1N 33/53	GO1N 33/53	D
// C12N 15/09	C 12N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2003-292584 (P2003-292584)	(71) 出願人 591122956 株式会社三菱化学ビーシーエル 東京都板橋区志村3-30-1
(22) 出願日	平成15年8月12日 (2003.8.12)	(74) 代理人 100088904 弁理士 庄司 隆
		(74) 代理人 100124453 弁理士 資延 由利子
		(72) 発明者 堀江 均 東京都板橋区志村3丁目30番1号
		(72) 発明者 一田 誠 東京都板橋区志村3丁目30番1号
		(72) 発明者 松山 雅彦 東京都板橋区志村3丁目30番1号
		F ターム (参考) 4B024 AA11 BA80 HA11 4H045 AA10 AA11 AA30 BA16 CA40 EA50

(54) 【発明の名称】 Cペプチドの測定法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 尿中において分解されたCペプチドを測定し、臍細胞機能を正確に把握するために用いるCペプチド測定の改良技術を提供する。

【解決手段】 Cペプチドを構成する一部のアミノ酸に対する抗体を作製し、改良を加える。具体的には、1) 特定のアミノ酸配列からなるペプチド、2) 特定のアミノ酸配列の少なくとも5つの配列を含む免疫原性を維持したペプチド、3) 特定のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも1のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されているが、特定の配列のペプチドと実質的に同一の免疫原性を維持したペプチドから選択されるポリペプチドに対する抗体を作製し、使用することによる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下から選択されるポリペプチド；

- 1) 配列表の配列番号 1 に表されたアミノ酸配列からなるペプチド。
- 2) 配列表の配列番号 1 に表されたアミノ酸配列の少なくとも 5 つの配列を含む免疫原性を維持したペプチド。
- 3) 配列表の配列番号 1 に表されたアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも 1 のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されているが、配列番号 1 のペプチドと実質的に同一の免疫原性を維持したペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリペプチドの何れか一を認識する抗体。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の抗体の何れか一を使用する免疫学的測定方法。

【請求項 4】

C ペプチドの測定に使用する請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法に使用する何れか一の抗体を含む試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、プロインシュリンの 32-33 残基および 65-66 残基の切断で分離される 33-63 の残基由来の免疫原を保持したポリペプチド、該ポリペプチドに対する抗体、およびその抗体を利用した免疫学的測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

プロインシュリンはインシュリンの生合成前駆体で、分子量約 9000、86 個のアミノ酸残基で構成される。その構造は、N 末から B 鎖（30 アミノ酸残基）、C ペプチド（31 アミノ酸残基）、A 鎖（21 アミノ酸残基）の順に並び、各ペプチド鎖は Arg-Arg および Lys-Arg の塩基性ジペプチドで結合されている。B 鎖と A 鎖は 2 箇所でジスルフィド結合を介して結合している。プロインシュリンは、滑面小胞体、ゴルジ装置、B 顆粒へと細胞内を移行する過程で、転換酵素により 2 箇所の塩基性ジペプチド部位で切断され、B 鎖と A 鎖よりなるインシュリンと C ペプチドに転換し、分泌刺激に応じて血中に放出される。

血中 C ペプチドは内因性インスリン分泌量を、尿中 C ペプチドは 24 時間蓄尿により 1 日のインスリン分泌量を推定できるとされており、糖尿病患者の臍 細胞機能を知る目的で、血中および尿中の C ペプチドが日常検査で広く利用されている。

この C ペプチドを測定する方法としては既に数社から実用化されている（非特許文献 1 ~ 3）。

【0003】

しかしながら、従来法で提供された C ペプチド抗体の認識部位は、蓄尿時・保存時に分解してしまい、C ペプチドとしての測定ができなくなってしまっていた。

【非特許文献 1】佐藤光代、他：C - ペプチド測定用改良キットの基礎検討。機器・試薬、20(1), 113-118, 1997.

【非特許文献 2】佐久間伸子、他：C - ペプチドキット「第一」3 の基礎的検討。PEPTIDE HORMONES IN PANCREAS, 10, 141, 1990.

【非特許文献 3】金森勇雄、他：DPC・C - ペプチドRIA キットの基礎的検討。核医学技術、8(3), 201-206, 1988

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の課題は、臍 細胞のインスリン分泌量を正確に把握するために、C ペプチドを

10

20

30

40

50

安定に測定可能な改良技術を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、上記課題を解決するため、Cペプチドを構成する一部のアミノ酸に対する抗体を作製し、改良を加えた。その結果、配列表の配列番号1に表されたアミノ酸配列をもとに作製されたペプチドに対する抗体を使えば、分解および非分解Cペプチドを確実に測定できることを見出し、本発明を完成した。

【0006】

すなわち本発明は以下からなる。

1. 以下から選択されるポリペプチド；

1) 配列表の配列番号1に表されたアミノ酸配列からなるペプチド。

2) 配列表の配列番号1に表されたアミノ酸配列の少なくとも5つの配列を含む免疫原性を維持したペプチド。

3) 配列表の配列番号1に表されたアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも1のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されているが、配列番号1のペプチドと実質的に同一の免疫原性を維持したペプチド。

2. 前項1に記載のポリペプチドの何れか一を認識する抗体。

3. 前項2に記載の抗体の何れか一を使用する免疫学的測定方法。

4. Cペプチドの測定に使用する前項3に記載の方法。

5. 前項4に記載の方法に使用する何れか一の抗体を含む試薬キット。

10

20

30

40

50

【発明の効果】

【0007】

本発明によって提供される抗体は、Cペプチドの分解の影響が少ないアミノ酸部位を認識し、Cペプチドの定量を可能とした。本発明の抗体を使用することにより、膵細胞のインスリン分泌量を正確に把握するために用いるCペプチド測定の改良技術を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

Cペプチドのアミノ酸配列は公知であるが、分解の影響が少ないアミノ酸部位を見出したことが本発明の最大の特徴である。本発明のペプチドは、配列番号1に示す14個のアミノ酸残基をもとにしたオリゴペプチドからなり、本発明において有用なペプチドは、必ずしも配列番号1に表された配列に限定されるものではない。具体的には、1) 配列表の配列番号1に表されたアミノ酸配列からなるペプチド、2) 配列表の配列番号1に表されたアミノ酸配列の少なくとも5つの配列を含む免疫原性を維持したペプチド、3) 配列表の配列番号1に表されたアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも1のアミノ酸が置換、欠失、付加または挿入されているが、配列番号1のペプチドと実質的に同一の免疫原性を維持したペプチドから選択される。本発明のオリゴペプチドは、自体公知の手法により調製することができる。さらに、当業者であれば、自体公知の手法により、適宜少なくとも3個、好ましくは5個のペプチドを合成して調製することができる。該ペプチドを構成するアミノ酸配列は、必ずしも配列番号1に表される配列と同一である必要はなく、上記説明したように該ペプチドと同様の免疫原としての機能を有するものであれば、該ペプチドのアミノ酸配列に、適宜、欠失、置換、付加、挿入などの変異を導入したペプチドであってよい（以下、等価ペプチドと呼ぶこともある）。

【0009】

本発明では、上記のようなオリゴペプチドを認識する抗体が調製される。該抗体は例えば配列番号1に表される配列をもとにしたペプチドに対する抗体である。該抗体は、抗原性ポリペプチドによって、アジュバンドの存在下または不存在下で、単独でまたは担体に連結して、細胞性応答および/または体液性応答による誘導によって調製される。抗原性ポリペプチドは、配列番号1に表されたアミノ酸配列より設計される。通常5個程度のアミノ酸からなる断片が抗原性領域を特徴付けていることから、配列番号1に表された配列

を中心として、少なくとも 5 個のアミノ酸配列を含む抗原性ポリペプチドとするのは好ましい。小さすぎて免疫原性が十分でない場合には、このポリペプチドを適当な担体に結合させることで、抗原性を発揮させることもできる。

【 0 0 1 0 】

上記目的の結合方法として多くの方法が当該分野で公知であり、それには、Pierce Company, Rockford, Illinois から入手される N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート (SPDP) およびスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC) を用いてジスルフィド結合を形成する方法が包含される [例えば Immun. Rev. (1982) 62:185] 。担体としては、それ自身が宿主に対して有害な抗体の生産を誘導しないものであれば、いずれの担体も用いることができる。適当な担体は、典型的には、タンパク質、多糖体、重合アミノ酸、アミノ酸共重合体および不活性ウイルス粒子がある。特に有用なタンパク質として、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、チログロブリン、卵アルブミン、テタヌス毒素を例示することができ、さらに当業者に公知の他のタンパク質を挙げることができる。

10

【 0 0 1 1 】

(抗体の調製)

調製された免疫原性ポリペプチドは、ポリクローナルおよびモノクローナルの両抗体を生産するのに使用することができる。ポリクローナル抗体が所望であれば、免疫原性ポリペプチドを用いて、選択された哺乳動物 (例えは、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマなど) を免疫することにより得ることができる。免疫された動物から得られた血清を回収し、公知の方法によって処理する。ポリクローナル抗体を含有する血清が所望以外の抗原に対する抗体を含んでいる場合には、このポリクローナル抗体は免疫アフィニティークロマトグラフィーによって精製することができる。ポリクローナルな抗血清を生産し、加工処理する方法は、当該分野では公知である。例えは Mayer および Walker (1987) : IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London) を参照することができる。

20

【 0 0 1 2 】

モノクローナル抗体もまた、当業者により容易に生産することができる。ハイブリドーマによってモノクローナル抗体を調製する一般的な方法は公知である。例えはケーラーとミルシュタインの方法 (Kohler and Milstein, Nature 256, 495-497, 1975) にしたがつて作製することができる。骨髄腫細胞として、マウス、ラット、ヒトなど由来のものが使用され、例えはマウスミエローマ P3X63-Ag8、P3X63-Ag8-U1、P3NS1-Ag4、SP2/0-Ag14、P3X63-Ag8・653などの株化骨髄腫細胞が例示される。抗体産生細胞と骨髄腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製する方法は、ポリエチレンギリコール (PEG) を用いる方法、センダイウイルスを用いる方法、電気融合装置を用いる方法などが例示される。融合操作後の細胞は選択培地で培養して、ハイブリドーマの選択を行う。選択培地は、親細胞株を死滅させ、融合細胞のみが増殖しえる培地であり、通常ヒポキサンチン - アミノブテリン - チミジン (HAT) 培地が使用される。

30

他の方法として、腫瘍原性DNAを用いた B リンパ球の直接形質転換、あるいは Epstein-Barrウイルスを用いたトランスフェクションのような他の方法によってもまた調製することができる。例えは、J. Virol. 60: 1153. Schreier, M. ら (1980); Virology 162:167. Hamerling ら (1981); British Medical J. 295: 946. Kennett ら (1980) を参照することができる。また、ヒトの疾患の診断・治療に使用可能なように、これのモノクローナル抗体をヒト化することをも含む。

40

【 0 0 1 3 】

形成されたモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は、いずれも特に配列番号 1 に表されたアミノ酸配列をもとにしたペプチド、いわゆる等価ペプチドから選択されるペプチドを認識可能な抗体であり、抗原抗体反応性においてすぐれている。その結果、本発明で得られる抗体は、C ペプチドをマーカーとする各種診断において有用である。

【 0 0 1 4 】

50

(イムノアッセイおよび診断用キット)

本発明のペプチドを認識する抗体は、イムノアッセイにおいて、生物学的試料におけるCペプチドの存在を検出するために有用である。このイムノアッセイの設計は多くの変更を行うことが可能であり、これらアッセイの多様性については当該技術分野では既知である。このイムノアッセイでは、例えば、上記等価ペプチドから選択されるペプチドのエピトープに対する1種のモノクローナル抗体、前記ペプチドの異なるエピトープに対するモノクローナル抗体、並びに前記ペプチドを認識するポリクローナル抗体を使用することができる。インムノアッセイ法のプロトコールは、例えば、競合分析法、直接反応タイプ分析法、あるいはサンドイッチタイプ分析法を基本とすることができる。これらのプロトコールでは、また、固体支持体を用いるか、あるいは免疫沈澱法も採用することができる。ほとんどのアッセイは標識化抗体あるいはマーカー・ポリペプチドの使用を含む。この標識物には、例えば、螢光分子、化学発光分子、放射性分子、あるいは色素分子がある。このプローブからのシグナルを増幅するアッセイもまた公知である。その例としては、ビオチン、アビジンおよびストレプトアビジンを利用するアッセイ、および酵素標識および酵素媒介イムノアッセイ（例えばRIA法）がある。

【0015】

免疫診断用の標識された試薬を含むキットは、適切な材料を適当な容器中に包装することによって得られる。この適切な材料には、標準Cペプチド、あるいは上記説明したように配列表の配列番号1に表されたアミノ酸配列をもとにした各種ペプチドに対する抗体が含まれる。このキットは、アッセイを実施するのに必要な残りの試薬および材料と、さらにアッセイの指示書の適当なセットとを含む。

【0016】

RIA法は、抗原もしくは抗体のいずれかの濃度を測定するのに利用され得る。この方法は、一定量の放射性ヨウ素標識抗原と未知検体抗原が抗体に対して競合的に結合し、何らかの方法で標識抗原・抗体結合物と非結合標識抗原を分離し、その放射能を測定することによる。標識化するために好適な放射性標識物は、当該技術分野で公知のものを使用することができ、例えば、¹²⁵Iを挙げることができる。Cペプチドの測定は、本発明の抗体、一定量の放射性ヨウ素標識Cペプチドおよび未知検体をチューブ内（例えば、ガラスやプラスチック製チューブまたはマイクロプレート）でインキュベートし、PEGで標識抗原・抗体結合物と非結合標識抗原を分離することにより行われる。分離された沈殿物の放射能を測定して、標準品の結合率より標準曲線を作成して、未知検体のCペプチド濃度を換算することができる。

【0017】

以上のような測定法によって、本発明で提供する抗体を利用する測定系が確立され、Cペプチドを安定に測定可能であることを見出した。

【実施例】

【0018】

以下、実施例を示して本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではなく、本発明の技術的思想を逸脱しない範囲内で種々の応用が可能である。

【0019】

(実施例1)配列表の配列番号1のペプチドを認識する抗体の作成

配列番号1: GQVELGGPGAGSL

配列番号1に表されたアミノ酸配列からなるペプチドを、固相法により常法どおり合成し、このポリペプチドを抗原として、アジュバントとともにモルモットに免疫して抗血清を得た。合成ペプチドの純度は高速液体クロマトグラフィー質量分析により確認した。

【0020】

(試験例2)

プラスチックチューブ内で未知検体またはCペプチド標準品100μL、放射性ヨウ素標識100μLおよび作製した抗血清100μLを混和し、4~24時間反応させた。次に反応終了後、1% -グロブリン溶液400μLおよび20%PEG溶液800μLを加え混和し、4~15分反応させた

10

20

30

40

50

。その後、4 3000 rpmで15分遠心分離を行い、上清を吸引後 -カウンターで放射能を測定した。Cペプチド濃度はCペプチド標準品を加えたときの標準曲線より求めた。

【0021】

測定結果を図2～6に示した。図2はこの新測定法の標準品を加えたときの標準曲線を示した。図3～5は市販試薬を用いた結果を示し、図6は本発明の抗体を用いた結果を示した。何れも健常人の尿サンプルを使い、採取後48時間後に測定した。各図のグラフの左側は-80 保存、右側は37 保存の結果である。本発明の抗体は、37 48時間保存後であってもCペプチドをとらえており、保存中の分解に影響されずCペプチドの測定が可能なことを示す。

【図面の簡単な説明】

10

【0022】

【図1】4種類の市販キットを用いて37 保存の尿サンプルを時系列的に測定した結果である。

【図2】既知のCペプチド濃度を加えたときの新測定法の標準曲線である。

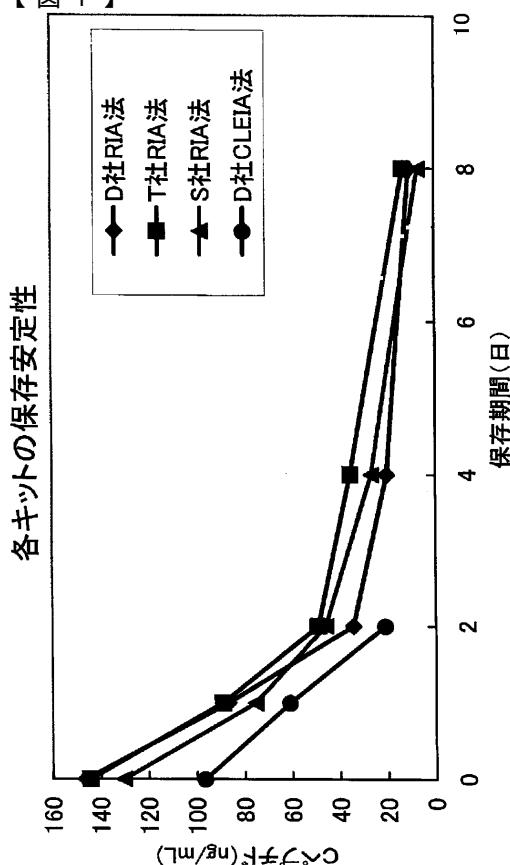
【図3】S社製品を使って、尿サンプル採取後48時間後に測定した結果である。図の棒グラフの左側は-80 保存、右側は37 保存の結果である。

【図4】L社のモルモットに免疫したCペプチド抗体を使って、尿サンプル採取後48時間後に測定した結果である。図の棒グラフの左側は-80 保存、右側は37 保存の結果である。

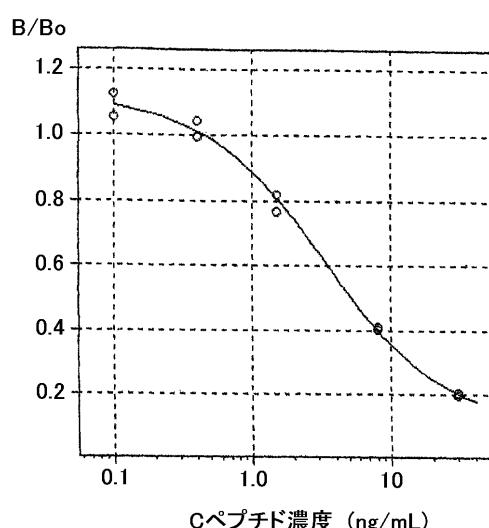
【図5】L社のウサギに免疫したCペプチド抗体を使って、尿サンプル採取後48時間後に測定した結果である。図の棒グラフの左側は-80 保存、右側は37 保存の結果である。

【図6】本発明の抗体を使って、尿サンプル採取後48時間後に測定した結果である。図の棒グラフの左側は-80 保存、右側は37 保存の結果である。

【図1】

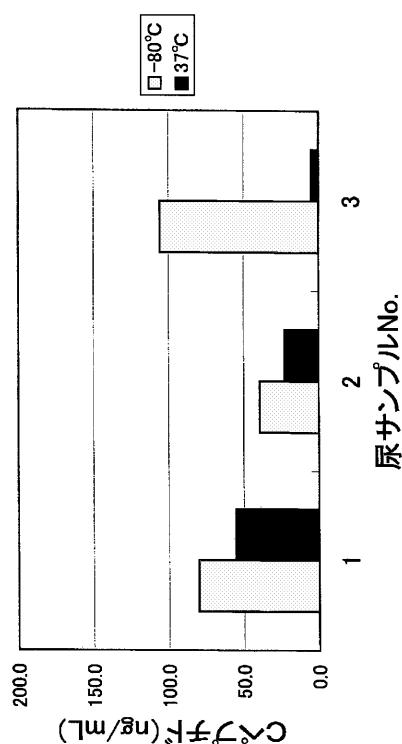


【図2】

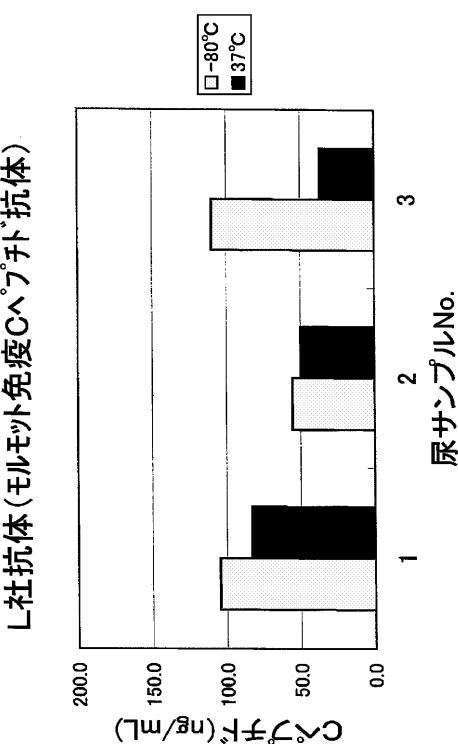


【図3】

S社キット

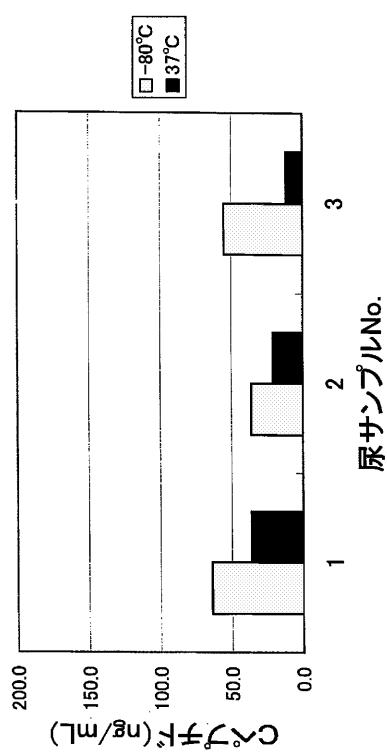


【図4】

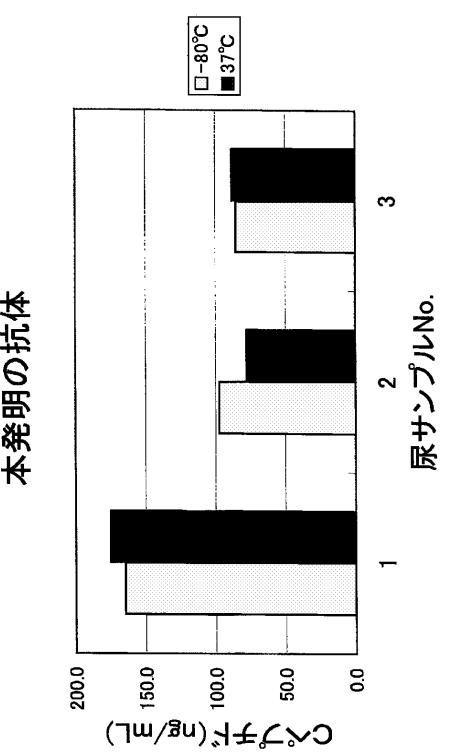


【図5】

L社抗体(ウサギ免疫Cペプチド抗体)



【図6】



【配列表】

2005060306000001.app

专利名称(译)	C肽的测量方法		
公开(公告)号	JP2005060306A	公开(公告)日	2005-03-10
申请号	JP2003292584	申请日	2003-08-12
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	三菱化学BCL		
[标]发明人	堀江均 一田誠 松山雅彦		
发明人	堀江均 一田誠 松山雅彦		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/08 C07K16/18 C12N15/09		
FI分类号	C07K7/08.ZNA C07K16/18 G01N33/53.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/HA11 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045/CA40 4H045/EA50		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种改进的技术来测量尿液中分解的C肽，该C肽可用于准确掌握胰腺β细胞功能。解决方案：制备并改进了针对构成C肽的一部分氨基酸的抗体。具体地，1) 具有特定氨基酸序列的肽，2) 包含至少5个特定氨基酸序列的序列的维持免疫原性的肽，和3) 具有特定氨基酸序列的肽的至少一个氨基酸。通过使用针对选自具有取代，缺失，添加或插入但与特定序列的肽基本相同的免疫原性的肽的多肽的抗体来产生。 [选择图]无

