

(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2004-93563

(P2004-93563A)

(43) 公開日 平成16年3月25日(2004.3.25)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	4 H O 4 5
CO 7 K 19/00	CO 7 K 19/00	
GO 1 N 33/574	GO 1 N 33/574	A
// CO 7 K 16/18	CO 7 K 16/18	

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2003-286450 (P2003-286450)	(71) 出願人	391008788
(22) 出願日	平成15年8月5日 (2003.8.5)		アボット・ラボラトリーズ
(62) 分割の表示	特願平7-518164の分割		ABBOTT LABORATORIES
原出願日	平成6年12月22日 (1994.12.22)		アメリカ合衆国、イリノイ・60064-
(31) 優先権主張番号	08/174,964		6050、アボット・パーク、アボット・
(32) 優先日	平成5年12月29日 (1993.12.29)		パーク・ロード・100、チャド・037
(33) 優先権主張国	米国 (US)		7/エイ・ピー・6・デー2
		(74) 代理人	100062007
			弁理士 川口 義雄
		(72) 発明者	バリー・エル・ドウエル
			アメリカ合衆国、イリノイ・60060、
			マンデレイン、ナイツブリッジ・ドライブ
			・197

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺特異抗原の免疫検定法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 癌免疫検定法分野に関する。

【解決手段】 前立腺特異抗原 (PSA) の新たな免疫検定法。また、PSA用の免疫検定法においてキャリブレーションまたは対照として使用できるPSAと - 抗キモトリプシン (ACT) の複合体に似た複合体、および、PSAに対するポリクロナール抗体を、PSAがACTに結合することでマスクされるエピトープと結合するもの、およびこのようなエピトープと結合しないものに分別する方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

H E 抗体に架橋した生体サンプルからの被検体を含んで成る複合体で、該被検体は遊離被検体としても、あるいは結合分子と結合して被検体 - 結合分子複合体を形成した形でも存在でき、該被検体は少なくとも1つの隠れたエピトープと隠れていないエピトープを有し、H E 抗体は遊離被検体に結合できるが被検体 - 結合分子複合体とは結合できない被検体に対する抗体である複合体。

## 【請求項 2】

被検体が P S A および結合分子が A C T である、請求項 1 に記載の複合体。

## 【請求項 3】

結合分子に架橋する生体サンプルからの被検体で、該被検体は生体サンプル中に遊離被検体としても、あるいは生体サンプルに内在性の結合分子に結合して被検体 - 結合分子複合体を形成した形でも存在することができ、且つ、少なくとも1つの隠れたエピトープと隠れていないエピトープを有する被検体。

10

## 【請求項 4】

請求項 2 に記載の複合体の被検体の検定におけるキャリブレーションまたは対照としての使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、癌免疫検定法の分野に関する。より詳細には、前立腺特異抗原 ( P S A ) の新たな免疫検定法を提示する。また、P S A 用の免疫検定法においてキャリブレーションまたは対照として使用できる、P S A と  $\alpha$  - 抗キモトリプシン ( A C T ) との複合体に似た、P S A - 抗 P S A 複合体も提示する。さらに、P S A に対するポリクロナール抗体を、P S A が A C T に結合することでマスクされるエピトープと結合するものおよびこのようなエピトープと結合しないものに分別する方法を提示する。

20

## 【背景技術】

## 【0002】

前立腺特異抗原 ( P S A ) については、M . C . W a n g らが *I n v e s t U r o l* . 17 巻 159 頁 ( 1979 年 ) で最初に記述した。これは前立腺上皮の分泌物であり、前立腺癌細胞によっても産生される。P S A は、プロテアーゼ活性を有する分子量 33,000 ~ 34,000 ダルトンの糖蛋白モノマーであると解析されている ( M . C . W a n g らによる前掲文献および Y . B a n らによる *B i o c h e m B i o p h y s R e s C o m m u n* . 123 巻 482 頁 ( 1984 年 ) ) 。最近では、同抗原のアミノ酸配列が報告され ( W . K . W a t t らによる *P r o c N a t l A c a d S c i U S A* , 83 巻 3166 頁 ( 1986 年 ) ) 、P S A の遺伝子がクローンされている ( A . L u n d w a l l による *B i o c h e m B i o p h y s R e s C o m m u n* . 161 巻 1151 頁 ( 1989 年 ) ) 。栗山らによる酵素免疫検定法の開発によって、悪性および良性の前立腺疾患患者ならびに正常男性のかなりの部分の血中で、低濃度の P S A を検出することが可能になった ( 栗山らによる *C a n c e r R e s* . 40 巻 4658 頁 ( 1980 年 ) ) 。

30

40

## 【0003】

P S A 試験は、前立腺癌の手術または薬物による治療後の患者で、悪性疾患または良性疾患を検出するのに大いに役立つ ( P . H . L a n g e らによる *U r o l o g y* , 33 巻 ( 補遺 6 ) 13 頁 ( 1989 年 6 月 ) ; C . S . K i l l i a n らによる *C a n c e r R e s* . 45 巻 886 頁 ( 1985 年 ) ) 。治療しても P S A の上昇が続く場合、あるいは治療後の P S A ベースラインが上昇するのであれば、疾患の再発または残留を示している ( M . K . B r a w e r らによる *U r o l o g y* , 33 巻 ( 補遺 5 ) 11 頁 ( 1989 年 5 月 ) ; J . K . S i d d a l らによる *E u r U r o l* . 12 巻 1 号 3 頁 ( 1986 年 ) ; T . A . S t a m e y らによる *N E n g l J M e d* . 317 巻 909 頁 ( 19

50

87年) ; P . H . L a n g e らによる J U r o l . 1 4 1 巻 8 7 3 頁 ( 1 9 8 9 年 ) ; T . A . S t a m e y らによる J U r o l . 1 4 1 巻 1 0 7 6 頁 ( 1 9 8 9 年 ) ; T . A . S t a m e y らによる J U r o l . 1 4 1 巻 1 0 8 4 頁 ( 1 9 8 9 年 ) ; T . A . S t a m e y らによる J U r o l . 1 4 1 巻 1 0 8 8 頁 ( 1 9 8 9 年 ) ; D . W . C h a n らによる C l i n C h e m . 3 3 巻 1 9 1 6 頁 ( 1 9 8 7 年 ) ) 。

【0004】

P S A 検査単独では、一般集団におけるスクリーニング手順としても疾患の段階決定の指針としても推奨できない。

【0005】

その代わり、前立腺癌患者の管理における補助的検査としては広く受け入れられている ( 栗山らによる J N a t l C a n c e r I n s t . 6 8 巻 9 9 頁 ( 1 9 8 2 年 ) ; T . A . S t a m e y らによる N E n g l J M e d . 3 1 7 巻 9 0 9 頁 ( 1 9 8 7 年 ) ; P . H . L a n g e らによる J U r o l . 1 4 1 巻 8 7 3 頁 ( 1 9 8 9 年 ) ; T . A . S t a m e y らによる J U r o l . 1 4 1 巻 1 0 7 6 頁 ( 1 9 8 9 年 ) ; T . A . S t a m e y らによる J U r o l . 1 4 1 巻 1 0 8 4 頁 ( 1 9 8 9 年 ) ; T . A . S t a m e y らによる J U r o l . 1 4 1 巻 1 0 8 8 頁 ( 1 9 8 9 年 ) ; D . W . C h a n らによる C l i n C h e m . 3 3 巻 1 9 1 6 頁 ( 1 9 8 7 年 ) ; J . E . O e s t e r l i n g らによる J U r o l . 1 3 9 巻 7 6 6 頁 ( 1 9 8 8 年 ) ) 。

【0006】

血清 P S A 濃度の測定は、現在では前立腺癌患者の診断に広く使用されているが、血清 P S A 濃度の上昇は良性前立腺肥大症でも前立腺の外科的外傷に派生しても報告されている ( D u f f y による A n n C l i n B i o c h e m ( 1 9 8 9 年 ) ; B r a w e r らによる U r o l o g y S u p p l ( 1 9 8 9 年 ) ) 。

【0007】

1992年2月6日に公開された H . L i l j a らによる P C T 特許出願 W O 9 2 / 0 1 9 3 6 号「遊離および複合前立腺特異抗原 ( P S A ) のアッセイ」では、遊離 P S A ならびにプロテイナーゼインヒビター複合体としての P S A の免疫検定法を開示している。遊離 P S A および P S A 複合体は、2種類以上のモノクロナール抗体を採用した非競合的免疫検定法により測定する。この発明はさらに、問題の P S A プロテイナーゼインヒビター複合体が  $\gamma_1$  - 抗キモトリプシン ( A C T ) 、  $\gamma_1$  - プロテアーゼインヒビター ( A P I ) または  $\gamma_2$  - マクログロブリンのいずれかで形成されることを特徴とする。さらに、この発明は、遊離 P S A 、 P S A プロテイナーゼインヒビター複合体およびその両者の総 P S A に対する比を、前立腺癌患者の診断に応用することを特徴とする。

【0008】

同特許出願では、3種類のモノクロナール抗体 ( 以下、「M A B」という ) を開示している。A C T と P S A との複合体 ( 以下、P S A - A C T 複合体という ) および遊離 P S A は、M A B 2 E 9 および 2 H 1 1 とされた。M A B 5 A 1 0 は遊離 P S A を認識するが、P S A - A C T 複合体を認識しない。M A B 2 E 9 は、免疫プロット上の遊離 P S A および P S A - A C T 複合体を容易に識別した唯一の抗 P S A M A B である。抗 P S A M A B 2 E 9 、 2 H 1 1 または 5 A 1 0 のいずれも、互いに結合して固相結合 P S A になるのを有意に阻止しなかった。

【0009】

ヒト血清の非競合的免疫検定法において様々な M A B を組み合わせて使用することで、遊離 P S A および P S A - A C T 複合体の双方を測定することにより臨床的特異度が上昇すること、また遊離 P S A / 総 P S A 比および遊離 P S A / P S A - A C T 複合体比が良性前立腺肥大症患者と前立腺癌患者とでは有意に異なることを同出願は明らかにした。

【0010】

遊離 P S A に特異な M A B および P S A - A C T 複合体に反応する M A B は、たとえば C a n A g D i a g n o s t i c s A B ( スウェーデン イエテボリ ) などから市販されている。自社 M A B を様々な組み合わせで使用した場合の阻害試験および用量反応関

係を分析した Can Ag Diagnostics AB は、PSA 分子上に少なくとも 9 種類の主要抗原決定基があることに気づいた。その MAB 決定エピトープの 1 つの基は、複合体化していない PSA および PSA - ACT 複合体の双方上で曝露され、またその MAB 決定エピトープのもう 1 つの基は遊離 PSA でのみ曝露された (Can Ag Diagnostics AB、Nilsson らによる「PSA のエピトープマッピング、および PSA の様々なイソ型決定のための分析法の開発」、および同表題の要約、要約 P 38、J. Tumor Marker Oncology、第 10 回ヒト腫瘍マーカー国際会議、1993 年 9 月 8 ~ 11 日、於ドイツ、ボン)。

#### 【0011】

PSA の競合的放射免疫検定法は市販されている (たとえば、Yang Laboratories, Inc. (ワシントン州ベルビュー) の PROS - CHECK PSA) 10。PROS - CHECK PSA は、PSA に対するポリクロナールウサギ抗体、ならびに <sup>125</sup>I 標識した PSA を使用する。

#### 【0012】

現在は、2 種類の PSA 非競合的サンドイッチ免疫検定法が上市されている。その 1 種類は、PSA に特異な 2 セットの MAB を使用するもので、(1) 1 セットの MAB (「捕捉抗体」) は固相に結合してサンプル中の PSA を捕捉し、(2) もう 1 セットの MAB (「プローブ抗体」) は標識されて遊離溶液の形にあって、捕捉された PSA と結合してこれを検出する。

#### 【0013】

これらの検定法は、本書では「MONO 検定法」と呼ばれる。一般に、これらの MAB の PSA との結合は、ACT が PSA に結合しても妨げられない。すなわち、一般にこれらの MAB は遊離 PSA と PSA - ACT 複合体とも結合できるわけである。このような検定法の例としては、Hybritech Tandem - E および Tandem - R PSA アッセイ (Hybritech、カリフォルニア州ラホラ) がある。 20

#### 【0014】

第 2 のタイプのサンドイッチ検定法では、固相では PSA に特異な MAB を、またプローブ抗体として PSA に対するポリクロナール抗体を使用する。一般にこれらの検定法では、MAB は遊離 PSA と PSA - ACT 複合体の双方と結合することができる。これに対してポリクロナール抗体のプールには、遊離 PSA および PSA - ACT 複合体の双方と結合できる抗体、ならびに遊離 PSA とは結合するが PSA - ACT 複合体とは結合できない抗体が入っている。後者の場合、これらの抗体が結合したエピトープは、ACT が PSA に結合すると阻止される。この種の検定法の例としては、Abbott IMx (登録商標) PSA Assay (本出願人) および ACS<sup>TM</sup> PSA assay (Ciba - Corning Diagnostics Corporation、マサチューセッツ州イーストワルポール) がある。 30

#### 【0015】

第 2 の種類のサンドイッチ検定法は PSA - ACT 複合体よりも遊離 PSA のほうを優先的に検出することがわかっている (ここではこの現象を「バイアス」と呼ぶ)。他方、一部の MONO 検定法にはそのようなバイアスはない。B. Bluestein らによる J. Tumor Marker Oncology, 7 巻 4 号 41 頁 (1992 年) を参照。 40

#### 【0016】

良性前立腺肥大症 (BPH) 患者の血清中には PSA - ACT 複合体よりも遊離 PSA のほうが多くあることがわかっている。他方、前立腺癌患者の血清中では遊離 PSA よりも PSA - ACT 複合体のほうが多い。(H. Lilja らによる Clin. Chem. 37 巻 1618 頁 (1991 年); U. Stenman らによる Cancer Res. 51 巻 222 頁 (1991 年); H. Lilja らによる Cancer Suppl. 70 巻 230 頁 (1992 年); A. Christensson らによる J. Urology, 150 巻 100 頁 (1993 年))。 50

## 【0017】

## 発明の要約

本発明は1つの態様として、サンプル中のPSAを検出して定量するための新しいMO  
LY検定法およびMONO検定法を提示する。これらの方法では遊離PSAとは結合する  
がPSAとACTの複合体(「PSA-ACT複合体」とは結合しないHE<sub>PSA</sub>抗体  
でサンプルを処理する。検定法にHE<sub>PSA</sub>抗体を加えることで、これらの検定法におけ  
るバイアスが減るかもしくは排除される。これらの検定法を実施するためのキットも提示  
する。

## 【0018】

本発明のもう1つの態様として、PSAとHE<sub>PSA</sub>抗体の複合体(「PSA-HE<sub>PSA</sub>  
抗体複合体」)を提示するが、これはPSA-ACT複合体に似ている。この複合体  
は、PSA免疫検定法のキャリブレーターまたは対照あるいはその両者として有用である  
。

10

## 【0019】

本発明のさらに別の態様として、ポリクロナール抗体をPSAに分別して、PSAとA  
CTの結合によってマスクされるエピトープ(「隠れるエピトープ」)を結合する抗体、  
およびこのようなエピトープと結合しない抗体を含有する分画を得る方法を提示する。同  
様に、このような分別に有用なアフィニティーカラムも提示する。

## 【0020】

本発明の上記の態様は一般に遊離状態または結合分子と複合体を形成した状態で存在す  
ることのできるあらゆる被検体に適用できる。

20

## 【0021】

## 発明の詳細な説明

ここでいう「抗体」とは、ポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体、免疫グロブ  
リン全長ならびに免疫グロブリンの抗原結合フラグメントを含む。これらのフラグメント  
の例としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>およびFvがある。このようなフラグメントは、  
当該技術分野で既知の方法により作製できる。

## 【0022】

ここでいう「HE抗体」または「HE」とは、標的抗原(「被検体」)との結合が当  
該被検体に別の分子(「結合分子」)が結合することで妨げられるような抗体のことである  
。「非HE抗体」または「nHE」とは、被検体への結合が当該被検体と結合分子が  
結合することで妨げられない抗体のことをいう。被検体に結合分子が結合することでマス  
クされる被検体上のエピトープのことを「隠れるエピトープ」(「HE」)という。同様  
に、被検体に結合分子が結合することでマスクされない被検体上のエピトープのことを「  
隠れないエピトープ」(「nHE」)という。「被検体」または「A」とは、HE  
であれ nHEであれ、被検体に対する抗体のことをいう。

30

## 【0023】

被検体は生体サンプルで見られる抗原であることが好ましく、また当該サンプルに内在  
性のものであることが好ましい。結合分子は当該サンプルに内在性のものであることが好  
ましく、またしばしば被検体を伴う。結合分子および被検体は蛋白であることが望ましい  
。被検体の例としては血清プロテアーゼが、その結合分子としては血清プロテアーゼイン  
ヒビターが挙げられる。血清プロテアーゼおよびそのインヒビター(括弧内)としては、  
たとえばプロテインC(プロテインCインヒビター)、エラスターゼ(抗トリプシン)、  
カテプシンG(ACT)、PSA(ACT)、PSA(<sub>2</sub>-マクログロブリン)、トロ  
ンピン(抗トロンピンIII)、C<sub>1</sub>-エステラーゼ(C<sub>1</sub>-インヒビター)、t-PA(  
PAI-1)、uPA(PAI-1)、プラスミン(<sub>2</sub>-抗プラスミン)、PSA(  
<sub>1</sub>-プロテアーゼインヒビター)、およびPSA(プロテインCインヒビター)がある。  
「PAI-1」とは、プラスミノゲン活性化因子インヒビター1型のことである。「t  
-PA」とは、組織プラスミノゲン活性化因子のことである。「uPA」とは、尿中プ  
ラスミノゲン活性化因子のことである。当業者であれば、結合分子は血清プロテアーゼ

40

50

でもよく、被検体は血清プロテアーゼインヒビターでもよいことがわかるだろう。

【0024】

「MOLY検定法」とは、捕捉抗体がMABで、プローブ抗体がポリクロナール抗体である、あるいはその逆であるような免疫検定法のことをいう。

【0025】

本発明は、試験サンプル中にある被検体の免疫検定法を開示する。サンプルは、一般的には生体サンプルである。生体サンプルとしては、血液、血清、前立腺液、精液、尿、リンパ液、髄液がある。

【0026】

サンプルに結合分子と結合しない被検体（これら未結合の被検体を、ここでは「遊離被検体」ともいう）および結合分子と複合体を形成する被検体（「複合体形成被検体」または「被検体-結合分子複合体」）を含有する場合には、被検体用のMOLY検定法および一部のMONO検定法はバイアスを呈し、複合体形成被検体のないサンプルでは複合体形成被検体のあるサンプルよりも読取り値が高くなる。たとえば被検体検出に使用したポリクロナール抗体の一部が遊離被検体とは結合できるが複合体形成被検体とは結合できない場合に、このようなことが生じうる。

10

【0027】

本発明者は、反応混合液に遊離HE抗体を加えることで被検体用のMOLY検定法および一部のMONO検定法で見られるバイアスを是正できるのを発見した。遊離HE抗体を加えることを除いては、特定被検体用のMOLY検定法およびMONO検定法は、この種の検定法の技術分野で既知の方法に従って実施することができる。さらに、サンプル中の被検体がサンプルを固相とインキュベートしたときに固相に直接結合できるのであれば、捕捉抗体は必要ない。プローブ抗体および捕捉抗体は、当該分野で既知の方法に従って作製することができる。プローブ抗体は、当該技術分野で既知の方法を使って、化学発光標識、蛍光標識、酵素および放射標識などで標識することができ、採用した標識に応じて検定法を設定する。発光標識した免疫測定法の例は、W. G. WoodらによるEur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 29巻787頁(1991年)に載っている。HE抗体および非HE抗体は、既知の方法、たとえば以下に述べるHE<sub>PSA</sub>抗体および非HE<sub>PSA</sub>抗体の作製に使用する方法を使って作製できる。HE抗体は、以下に述べるようにモノクロナール抗体もしくは特異的ポリクロナールHE抗体であることが望ましい。

20

30

【0028】

そこで本発明の1つの態様として、生体サンプル中の被検体のためのサンドイッチ非競合的免疫検定法を提示する。捕捉抗体（「nHE」）は、当該被検体の隠れないエピトープに向けられたもので、固相に付着して、生体サンプル中に存在するかもしれない被検体を捕捉する。生体サンプルを加えながら、あるいは加えた後、捕捉抗体をHE抗体（「HE」）とインキュベートする。あるいは、HEを捕捉抗体に曝露する前にサンプルとインキュベートしてもよい。HEはMABであることが望ましい。十分な時間インキュベートして、{(nHE)(被検体)(HE)}の複合体が形成されるようにする。次いで、固相に結合していなかった試薬を反応混合液からすべて取り除く。これには、当該技術分野で既知の洗浄手順によって行う。たとえば、未結合試薬を水性媒体に溶解して固相から洗い流し、固相には{(nHE)(被検体)(HE)}複合体だけを残す。

40

【0029】

次いで、ポリクロナール抗被検体抗体（「被検体<sup>\*</sup>」）を加える。被検体<sup>\*</sup>は、できれば検出用に標識したもので、たとえば酵素標識、放射標識、蛍光標識または化学発光標識したものが好ましい。

【0030】

反応混合液を十分な時間インキュベートして、{(nHE)(被検体)(HE)(被検体<sup>\*</sup>)}複合体および{(nHE)(被検体)(結合分子)(被検体<sup>\*</sup>)}複

50

合体を形成する。{( N H E ) ( 被検体 ) ( H E ) ( 被検体 \* ) } 複合体では、H E と 被検体 \* の双方が複合体中の被検体に結合している点を注意すること。サンプル中に結合分子が存在するならば、別の複合体、すなわち{( n H E ) ( 被検体 ) ( 結合分子 ) ( 被検体 \* ) } の複合体も形成されることがある。

**【 0 0 3 1 】**

次いで、未結合試薬を分離する。標識した 被検体 \* を検出して、固相上に{( n H E ) ( 被検体 ) ( H E ) ( 被検体 \* ) } および{( n H E ) ( 被検体 ) ( 結合分子 ) ( 被検体 \* ) } の複合体が形成されていることを検出する。サンプル中に被検体が存在しなければ、これらの複合体は生じない。これらの複合体の存在量は、サンプル中の被検体濃度に正比例する。あるいは、残っている未結合の標識 被検体 \* の存在量を定量すれば、この量はサンプル中に存在する被検体の量に反比例する。

10

**【 0 0 3 2 】**

上記の検定形式は、バイアスを呈する M O N O 検定法でも使用することができる。M O N O 検定法では、被検体 \* を標識した n H E ( すなわち「 n H E \* 」 ) とするだけで、それ以外は上記の方法をそのまま適用することができる。

**【 0 0 3 3 】**

捕捉抗体がポリクロナール抗体でプローブ抗体が M A B の場合には、捕捉抗体を 被検体または n H E にし( n H E はたとえば以下に述べる分別方法でポリクロナール抗体から分別することができる )、またプローブ抗体を n H E \* にする以外は上記の方法をそのまま適用できる。捕捉抗体の 被検体に H E のサブ集団が含まれる場合には、上記の検定手順によって得られる{( H E ) ( 被検体 ) ( n H E \* ) } の追加複合体もある。

20

**【 0 0 3 4 】**

これまでに述べたことでは、被検体上に1つしか H E がないと仮定している。しかし、特定の H E が被検体上の全 H E をマスクしない場合には、被検体上の他の H E 部位に向けた追加 H E 抗体を使用することになる。

**【 0 0 3 5 】**

当業者であれば、プローブ抗体が標識してある別の分子によって特異的に結合されうるのであれば、プローブ抗体は標識を要しないことがわかるだろう。さらに、被検体を固相に直接結合できれば、捕捉抗体を使用する必要はない。

30

**【 0 0 3 6 】**

本特許出願では、上記の検定法を実施するための検定用キットも提示する。検定用キットには、未標識 H E 抗体の入った容器、また当該被検体に対する捕捉抗体が入っている別の容器があることが望ましく、これらの抗体は非 H E に対するものであることが好ましく、また M A B であればさらに好ましく、最も望ましいのは固相に結合したものである。未標識 H E 抗体は、捕捉抗体またはプローブ抗体と同じ容器に入っている別の容器に入れてもよい。M O L Y 検定法のためには、キットにはこの他に被検体に対するプローブポリクロナール抗体で、できれば検出用に標識されている抗体が入っている容器、ならびに抗体上の標識と反応して信号を発生する試薬が入っている容器がある。たとえば、ポリクロナール抗体はアルカリホスファターゼなどの酵素で標識することができ、それと反応する試薬は酵素基質となる。アルカリホスファターゼの場合、4 - メチルウンベリフェリリン酸 ( M U P ) が便利ながわかっており、その反応については以下の例 II で述べる。あるいは、プローブ抗体はモノクロナール抗体で、捕捉抗体がポリクロナール抗体でもよい。このような場合、モノクロナールプローブ抗体は非 H E 抗体であるのが好ましい。M O N O 検定法のためには、プローブ抗体および捕捉抗体は被検体に対する M A B とする。プローブ M A B および捕捉 M A B は非 H E 抗体であることが好ましい。上記のキットでは、抗体は溶液、たとえば緩衝液で、免疫検定法の有害作用をもたらさないものに入っていることが好ましい。上記のキットには、さらにキャリブレーターの入った容器 ( 1 ないし複数 ) または対照の入った容器 ( 1 ないし複数 ) あるいはその両者を追加することもできる。被検体検定のためのキャリブレーターおよび対照には、以下に述べるように遊離被検

40

50

体、被検体 - H E 抗体の複合体、あるいは被検体 - 結合分子の複合体が入っていることが望ましい。

【0037】

発明の好ましい実施例では、被検体は P S A で、結合分子は A C T である。P S A に対する H E 抗体は、遊離 P S A とは結合するが P S A - A C T 複合体とは結合しない抗体である。これらの抗体をここでは「H E<sub>P S A</sub> 抗体」と呼ぶ。対応する非 H E 抗体のことは「非 H E<sub>P S A</sub> 抗体」と呼ぶ。

【0038】

H E<sub>P S A</sub> 抗体（および非 H E<sub>P S A</sub> 抗体）を得る方法は、当該技術分野で既知のものである。たとえば、H . L i l j a らによる前掲の P C T 特許出願 W O 9 2 / 0 1 9 3 6 号、また C a n A g D i a g n o s t i c s A B、N i l s s o n らによる「P S A のエピトープマッピング、および P S A の様々なイソ型決定のための分析法の開発」、および同表題の要約（前掲）で述べられている。H E<sub>P S A</sub> 抗体の例としては、(1) W O 9 2 / 0 1 9 3 6 号に記載の M A B 5 A 1 0、(2) K . P e t t e r s s o n らによる「早期前立腺癌と良性前立腺肥大症の判別を向上させるための P S A に関する免疫蛍光法の開発」（第 15 回臨床化学国際会議、於オーストラリアメルボルン、1993 年 11 月 14 ~ 19 日）に述べられている M A B 9 B 1 0（同論文では M A B H 1 1 7 および H 5 0 についても述べている）、(3) C a n A g D i a g n o s t i c s A B（スウェーデン イェーテボリ）から市販されている M A B P S A 6、P S A 3 0、P S A 1 7、P S A 1 9、P S A 2 0、および P S A 2 5 がある。米国特許出願 0 8 / 0 9 4, 9 0 1 号（1993 年 7 月 22 日出願）で M . M a t i k a i n e n らは M A B 5 A 1 0 および 9 B 1 0 の双方と、これらの生産および特徴について開示している。そこでは、これらの M A B を分泌するハイブリドーマはそれぞれ 5 A 1 0 E 7 F 1 1 H 4 および 9 B 1 0 A 9 H 3 と名付けられている。これらのハイブリドーマは 1993 年 3 月 12 日に公衆衛生研究部応用微生物学研究センターの欧州動物細胞培養コレクション（E C A C C）（P o r t o n D o w n, S a l i s b u r y, W i l t s h i r e S P 4 0 J G、英国）に寄託され、それぞれ 9 3 0 3 1 2 0 1 および 9 3 0 3 1 2 0 2 の E C A C C 受託番号を付された。上記の出版物および特許出願をここで引用して本書の一部とする。

【0039】

このように本発明では特に P S A 検定法に有用な 3 つの発明、すなわち H E<sub>P S A</sub> 抗体を用いた新しい P S A 検定法、特異的ポリクロナール H E<sub>P S A</sub> 抗体および隠れないエピトープ用の抗体の選択方法、ならびに P S A - A C T 複合体に似ている P S A - H E<sub>P S A</sub> 抗体複合体を提供する。最初の 2 つの発明では、従来技術の M O L Y 検定法で見られるバイアスを回避するかもしくは減らす。最後の発明は M O N O および M O L Y の双方の P S A 検定法のキャリブレーターまたは対照あるいはその両者として有用である。第 2 の方法で選択した特異的ポリクロナール非 H E<sub>P S A</sub> 抗体は、P S A 用の M O L Y 免疫検定法でも（プローブ抗体または捕捉抗体のいずれかとして、あるいは両者として）、非競合的免疫検定法でも（捕捉抗体として）利用できる。他方、H E<sub>P S A</sub> 抗体は遊離 P S A に特異な検定法で使用することもできれば、先に述べたようにバイアスをもたらしやすい P S A 免疫検定法（M O L Y または M O N O のいずれでも）でこのようなバイアスを緩和または排除するために利用することができる。

【0040】

本出願においては、P S A、A C T および H E<sub>P S A</sub> 抗体と非 H E<sub>P S A</sub> 抗体を使って本発明を説明する。ただし、当業者であれば、本発明をいかなる被検体、結合分子、および H E 抗体と非 H E 抗体にも応用できることがわかるだろう。

I . 新しい P S A 免疫検定法

図 1 では、従来の P S A M O L Y 検定法（パート A）および本発明の P S A M O L Y 検定法（パート B）を比較して、H E<sub>P S A</sub> 抗体が遊離 P S A および P S A - A C T 複合体に特異な検定法をいかに改良するかを示している。

## 【0041】

パートAは、バイアスを生じやすい従来のMOLY検定法を示している。パートBに工程B1が追加される点を除けば、パートAの手順とパートBの手順は同じである。

## 【0042】

パートAの手順は次のとおりである。

## 【0043】

工程A1：PSA分子上の隠れないエピトープ（nHE1と命名）に特異な非HE抗体（nHE1）を固相に結合させる。遊離PSAまたはPSA-AC T複合体のいずれかを含有するサンプルを固相に結合したnHE1と反応させると、遊離PSAおよびPSA-AC T複合体の双方が、nHE1エピトープを通じて排他的に結合できる。他方、その後他の抗体と反応するために遊離PSA上でHEがいまだに利用できる。

10

## 【0044】

工程A2：その後、HEに特異な標識抗体（HE\*）および非HE2に特異な抗体（nHE2\*）の双方を含有する標識したPSAに対するポリクロナール抗体（「標識ポリクロナール」）を追加すると、両方のタイプの抗体が遊離PSAに結合する。それに対して、HEはPSA-AC T複合体中のAC Tによってマスクされるので、同じ標識ポリクロナールは隠れないエピトープnHE2とのみ結合できる。これらの標識ポリクロナールは、検出の目的で標識に接合されている。標識の例としては、当該技術分野で既知の化学発光標識、放射標識および酵素標識がある。この実施例では、標識は酵素である。未結合の試薬を、たとえば当該技術分野で既知の方法を使って固相から洗い流すなどして固相から取り除く。

20

## 【0045】

工程A3：引続き固相に酵素基質を加えると酵素産物が信号を発生するので、それをモニターする。2つの標識ポリクロナールと結合している遊離PSAは、1つの標識ポリクロナールとしか結合していないPSA-AC T複合体に比べ信号を2倍発生し、このために遊離形式のPSAについてプラス方向のバイアス（数値のずれ）をもたらす。

## 【0046】

パートBは本発明の検定法を示したもので、パートAで述べた検定法にさらに未標識HE<sub>PSA</sub>抗体を加えており（工程B1）、それによって検定法にバイアスが生じなくなっている。

30

## 【0047】

パートBの工程は次のとおりである。

## 【0048】

工程B1：サンプルを未標識HE<sub>PSA</sub>抗体（HE）で事前処理する。この抗体は遊離PSA上のHEとは反応するが、PSA-AC T複合体とは結合しない。あるいは、未標識HEを工程B2または工程B3で追加してもよい。

## 【0049】

工程B2：パートAのようにしてnHE1抗体に結合した固相にサンプルを加える。

## 【0050】

工程B3：さらに、HEを認識する標識抗体（HE\*）および非HEを認識する抗体（nHE2\*）を含有する標識ポリクロナールを加えると、遊離PSAおよびPSA-AC T複合体の双方にnHE2\*が結合する。HE\*は遊離PSAともPSA-AC T複合体とも結合できない。これは、HEが遊離PSA中の未標識HEで、またPSA-AC T複合体中のAC Tでそれぞれマスクされているからである。

40

## 【0051】

工程B4：基質を加え、信号をモニターする。遊離PSAおよびPSA-AC T複合体のいずれもnHE2\*としか結合していないので、双方が等しい信号を発生する。そのため、検定でPSA-AC T複合体に比べて遊離PSAにバイアスが生じることがない。

## 【0052】

固相の材料は、免疫検定法に使用する材料であれば何でもよい。天然材料、合成材料、

50

天然材料を合成修飾したものが使える。たとえば、多糖類（たとえば紙、セルロース、セルロース誘導体〔酢酸セルロースやニトロセルロース〕などのセルロース材料）、シリカ、ガラス繊維、無機材料（不活性化アルミニウム、けい藻土、あるいは塩化ビニル、塩化ビニル-プロピレン共重合体、塩化ビニル-酢酸ビニル共重合体などの重合体でできた多孔性高分子マトリックス中に均一に拡散した微粉碎した他の無機材料、天然布地（たとえば木綿）および合成布地（たとえばナイロン）、多孔性ゲル（シリカゲル、アガロース、デキストラン、ゼラチン）、高分子フィルム（たとえばポリアクリルアミド）、磁性粒子、微量定量プレート、ポリスチレンチューブ、蛋白結合膜、アガロース、セファデックス（Pharmacia Fine Chemicals, Inc.、ニュージャージー州ピスカッタウェイ）、Trisacryl（Pointet-Girard、フランス）、シリコン粒子、多孔性繊維マトリックスなどである。固相は合成微粒子が好ましく、直径0.1~10ミクロンのポリスチレン、塩化ビニルまたはラテックスでできた合成微粒子が望ましい。

10

#### II. 被検体に対するポリクロナル抗体の分別方法

本発明は、被検体に対するポリクロナル抗体を分別してそれぞれHE抗体および非HE抗体を含有する分画をもたらす方法も提示する。被検体に対するポリクロナル抗体は、当該技術分野で既知の方法を使って産生できる。たとえば、ウサギ、ラット、ヤギ、マウス、等々の宿主動物に被検体またはそのフラグメントを単独であるいは必要に応じて適当な担体に接合させて注入し、抗体反応を引き起こして抗体を生み出すことができる。

#### 【0053】

この方法では、HE部位を結合分子またはHE抗体のいずれかでマスクされた被検体（「マスクされた被検体」）に対してポリクロナル抗体を曝露する。マスクされた被検体と結合し、しかも溶出できる抗体は、遊離被検体および被検体-結合分子の複合体の双方と結合する非HE抗体である。したがって、遊離状態であるいは複合体の形であっても、被検体を検出するための非HE抗体を使った免疫検定法ではバイアスが生じない。こうして得られた非HE抗体は、MOLY免疫検定法でも（プローブ抗体または捕捉抗体、あるいはその両者として）、競合的免疫検定法でも（捕捉抗体として）使用することができる。他方、マスクされた被検体と結合しないポリクロナル抗体はHE抗体である。HE抗体は、遊離被検体に特異な検定法で使用するか、もしくは前述のようにバイアスの生じる被検体検定法（MOLY免疫検定法であれMONO免疫検定法であれ）に加えてそのようなバイアスを緩和もしくは解消するのに利用できる。

20

30

#### 【0054】

前述の分別は、アフィニティークロマトグラフィーを利用して行うのが好ましい。マスクされた被検体は、結合分子、HE抗体、または非HE抗体と架橋するのが好ましい。架橋は、当該分野で既知の方法もしくは当業者であれば知っているその改良法により行うことができる。分子の架橋の方法を開示している文献の例としては、T. H. JiによるMethods in Enzymology 91巻580頁（1983年）；S. S. Wongらによる「Biocatalyst Design for Stability and Specificity」（M. E. Himmel、G. Gerogiou編、American Chemical Society、ワシントンDC（1993年））第22章266~282頁；M. N. Guptaによる同書第26章307~326頁；「Chemical Reagent for Protein Modification」第2版（R. L. Lundblad、CRC Press、ボストン）がある。これらの発表文献は、引用して本書の一部とする。

40

#### 【0055】

こうして得られた複合体は、固相に直接結合するか、もしくは固相上に固定化したHE抗体などの結合剤を利用して固相に結合し、アフィニティークロマトグラフィーで利用してHE抗体を選択するのが好ましい。アフィニティークロマトグラフィーの一般的方法、たとえば抗体および固相の準備、およびその手順は、当該技術分野で既知のものであり、たとえば、Bio-Rad Bulletin 1099「Immunoaffinit

50

y Chromatography with Affinity Supports」(1990年); Pharmacia LKB Biotechnology「Affinity Chromatography, Principles & Methods」(1993年); および「分子生物学の方法」第10巻「Immunochemical Protocols」(M. M. Manson編) 89~91頁(1992年); 「Immunochemistry in Practice」のA. Johnstoneらによる第10章202~232頁(Scientific Publications、オックスフォード、1982年); および「Current Opinion in Biotechnology」第2巻「蛋白分離用アフィニティークロマトグラフィー(Affinity Chromatography for Protein Isolation)」のW. H. Scoutenによる37~43頁(1991年)を参照されたい。これらの公表文献は本願中で引例とする。

10

## 【0056】

図2に、例としてPSA、ACTおよびHE<sub>PSA</sub>抗体を使ってHE抗体および非HE抗体にポリクロナル抗体を分別する3種類の方法を示している。この方法は次のとおりである。

## 【0057】

パートA: ACTを使ったPSAとの結合

ACTを、臭化シアン活性化セファロース-4B(Pharmacia LKB Biotechnology、スウェーデンから市販)などの固相に抱合させる。精製したPSAをACTと反応させて、隠れるエピトープ(HE)をマスクするPSA-ACT複合体が生成する。この複合体を化学的架橋によりさらに安定させることもできる。PSAに対するポリクロナル抗体をPSA-ACT-固相とインキュベートすると、HE<sub>PSA</sub>抗体は未結合である。隠れていないエピトープに特異な非HE<sub>PSA</sub>抗体、たとえばnHE1およびnHE2は結合し、低pHなどの標準的方法で溶出できる。こうして、ポリクロナル抗PSA抗体がHE<sub>PSA</sub>抗体および非HE<sub>PSA</sub>抗体に分離される。

20

## 【0058】

パートB: HE<sub>PSA</sub>抗体(HE)を使ったPSAとの結合HE<sub>PSA</sub>抗体(HE)を、臭化シアン活性化セファロース-4Bなどの固相に抱合させる。精製したPSAをHEと反応させて、隠れているエピトープ(HE)をマスクするPSA-HE複合体を生成する。この複合体を化学的架橋によりさらに安定させることもできる。PSAに対するポリクロナル抗体をPSA-HE-固相とインキュベートすると、ポリクロナルHE<sub>PSA</sub>抗体は固相に結合しない。他方、ポリクロナル非HE<sub>PSA</sub>抗体は結合し、低pHなどの標準的方法で溶出できる。特定のHEがPSA上のHEすべてをマスクしない場合には、他のHE部位に向けた追加のHE抗体を同時に、あるいは好ましくは順次分画カラムで使用することができる点に注目されたい。

30

## 【0059】

パートC: 非HE<sub>PSA</sub>抗体(nHE1)を使ったPSAとの結合とその後のHE<sub>PSA</sub>抗体(HE)を使ったHEのブロック

隠れていないエピトープ1(nHE1)に向けた非HE<sub>PSA</sub>抗体(nHE1)を、臭化シアン活性化セファロース-4Bなどの固相に抱合させる。精製したPSAをnHE1と反応させて、PSA-nHE1複合体を生成する。HE<sub>PSA</sub>抗体(HE)をPSA-nHE1と反応させて、隠れているエピトープ(HE)をマスクする複合体を精製する。この複合体を化学的架橋によりさらに安定させることもできる。PSAに対するポリクロナル抗体を固相-nHE1-PSA-HEとインキュベートすると、HEおよびnHE1に対する抗体は固相に結合しない。nHE1以外の隠れないエピトープに対する非HE<sub>PSA</sub>抗体は固相に結合し、低pHなど標準的な方法で溶出できる。固相に結合しない抗体は、方法AまたはBによってさらに分離することができる。こうして、ポリクロナル抗PSA抗体はHE<sub>PSA</sub>抗体、nHE1に対する抗体、およびnHE1以外のnHEに分離される。特定のHEがPSA上のHEすべてをマスクしない場合に

40

50

は、他の H E 部位に向けた追加の H E 抗体を同時に、あるいは好ましくは逐次分画カラムで 사용할 ことができる点に注目されたい。

### III. P S A 検定のキャリブレーターおよび対照として有用な被検体 - H E 抗体の複合体

本発明では、被検体の検定におけるキャリブレーターおよび対照として役立つ被検体 - H E 抗体の複合体も提示する。この複合体は、被検体に過剰な H E 抗体を加えることで生成できる。H E 抗体は、被検体の 2 倍から 1 0 0 倍多いことが好ましく、1 0 倍多いことがより望ましい。あるいは、被検体を H E 区隊に架橋することができる。前述の被検体と結合分子の架橋方法が、被検体と H E 抗体の架橋にも同じく適用できる。複合体は、リン酸緩衝食塩水、トリス - H C l、または H E P E S などの不活性緩衝液中に保存するのが好ましい。貯蔵温度は 2 ~ 2 5 が望ましい。p H は 5 ~ 9 が望ましい。被検体の検定でキャリブレーターまたは対照の役もなす被検体とその結合分子の架橋複合体も、同じようにして生成できる。

#### 【 0 0 6 0 】

以下に、本発明の実施例を示すが、これらに限定されるものではない。

#### 【 0 0 6 1 】

実施例

#### 【 実施例 1 】

#### 【 0 0 6 2 】

新しい P S A 検定方法

以下の実験は、I M x (登録商標) P S A A s s a y 用試薬を使用し、I M x (登録商標) P S A A s s a y 添付書の手順に従って I M x (登録商標) 機器 (本出願人) で実施したが、本発明では遊離 P S A とは結合するが P S A - A C T 複合体とは結合しない M A B 9 B 1 0 または 5 A 1 0 (前述) 0 ~ 2 0 μ g / m L を追加含有する検定用希釈剤を使用した点のみ異なる。I M x (登録商標) P S A A s s a y 試薬としては次のものがある。(1) 遊離 P S A および複合体化 P S A (すなわち A C T と複合体を形成した P S A) の双方と結合し捕捉する捕捉抗体 M A B H 5 0 で被覆された微粒子 (「抗 P S A 被覆微粒子」)、および (2) 検出用にアルカリホスファターゼで標識された P S A に対するヤギポリクロナール抗体 (プローブ抗体として働く) (「ヤギポリクロナール抗 P S A : アルカリホスファターゼ抱合体」または「プローブポリクロナール抗体」)。

#### 【 0 0 6 3 】

前立腺癌患者から採取した血清試料を試験サンプルとした。

#### 【 0 0 6 4 】

I M x (登録商標) 機器の説明、操作および一般手順は、B a r n e s らによる J . C l i n . I m m . 1 4 巻 2 号 1 1 5 ~ 1 1 9 頁 (1 9 9 1 年) および E P - A - 2 8 8 , 7 9 3 ; L u d i n g t o n らによる C l i n . C h e m . 3 4 巻 9 号 1 7 2 6 ~ 1 7 3 2 頁 (1 9 8 8 年) に記載されている。反応セルの構成要素は C l i n . C h e m . 3 4 巻 9 号 1 7 2 7 頁の図 2 ( a ) に示されている。この場合、反応方法は微粒子酵素免疫検定法 (M E I A) のものと同じで以下のとおりである。

#### 【 0 0 6 5 】

(1) I M x (登録商標) 機器のプローブ / 電極アセンブリで、サンプル、抗 P S A 被覆微粒子および検定希釈剤を反応セルのインキュベーションウェルに入れる。この反応混合液をインキュベートしている間に、サンプル中の遊離 P S A および複合体化 P S A が抗 P S A 被覆微粒子と結合して抗体 - 抗原複合体を形成する。M A B 9 B 1 0 が次いで抗 P S A 被覆微粒子と結合している P S A (A C T と複合体を形成していない) と結合して、抗体 - 抗原 - 抗体複合体を形成する。

#### 【 0 0 6 6 】

(2) 反応混合液のアリコートをして I M x (登録商標) 機器のガラス繊維マトリックスに移す。微粒子はガラス繊維マトリックスと不可逆的に結合する。

#### 【 0 0 6 7 】

(3) マトリックスを洗浄して未結合物質、たとえば血清蛋白、検定希釈剤、および微

10

20

30

40

50

粒子に結合していないMAB 9B10を除去する。

【0068】

(4) ヤギポリクロナール抗PSA：アルカリホスファターゼ接合体をマトリックスに加え、抗体-抗原-抗体複合体に結合させる。

【0069】

(5) マトリックスを洗浄して未結合物質を除去する。

【0070】

(6) 基質である4-メチルウンベリフェリルリン酸(MUP)をマトリックスに加えると、表面結合アルカリホスファターゼが非蛍光発生MUPを4-メチルウンベリフェロン(MU)に変換し、その蛍光をIMx(登録商標)機器のMEIA光学アセンブリで測定する。

10

【0071】

上記の検定の工程は別々に行ったが、サンプルの代わりに遊離PSAを含有するキャリブレーターおよび対照を同時に使用した。サンプル(すなわちパネル)の読取り値をキャリブレーターから読み取って(表1)、PSA値を求めたところ、表2および表3に報告するとおりになった。

【0072】

【表1】

表1

キャリブレーター(遊離PSA) (ng/ml)	検定希釈剤中のMAB9B10の濃度(μg/ml)			
	0	5	10	20
0	7.0	6.3	6.4	6.1
2	90.9	58.0	58.3	57.4
10	373.6	248.6	248.8	247.1
30	877.3	640.1	623.4	606.3
60	1394.8	1084.8	1084.8	1053.7
100	1834.3	1486.1	1520.8	1493.8

20

値はc/s/sで読み取った。

30

【0073】

【表2】

表2

対照(遊離PSA)	検定希釈剤中のMAB9B10の濃度(μg/ml)			
	0	5	10	20
低濃度(3-5ng/ml)	3.98	4.14	4.17	3.86
中濃度(12-18ng/ml)	15.18	15.02	15.12	14.95
高濃度(36-54ng/ml)	46.90	42.85	45.87	48.20

40

値はng/mlで報告。

【0074】

【表 3】

表 3

パネル (前立腺癌患者のプール血清)	検定希釈剤中のMAB 9B10の濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )			
	0	5	10	20
JP 1	50.49	77.88	83.71	85.72
C 8	1.37	2.01	2.02	2.08
C 9	3.25	5.06	4.97	5.16
C 10	13.02	18.99	19.21	19.69
C 11	36.65	60.88	62.62	64.93
92-297-0384	26.59	48.15	47.41	50.13

値は  $\text{ng}/\text{ml}$  で報告。

## 【0075】

上記の表から、検定における遊離 MAB 9B10 の量が増えるとキャリブレーション曲線の信号が減り、サンプルパネル値が高くなることがわかる。MAB 9B10 がパネルの値に及ぼす影響は、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  付近で飽和するようである。上記の実験を、MAB 9B10 の代わりに MAB 5A10 を使って繰り返し行ったが、同じ様な結果が出た。

## 【0076】

次の実験では、前記の検定希釈剤中の MAB 9B10 が  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  という飽和レベルを使って、遊離 PSA と複合体 PSA の間のバイアスを実証した。遊離 PSA を含有するサンプルを精製した ACT と混和して、複合体を形成させた。精製 PSA および ACT はマルモ大学の Hans Lilja 博士から入手した。PSA および ACT の精製ならびに PSA と ACT の複合体の生成はすでに述べられているとおりである (A. Christensson らによる Eur. J. Biochem. 194 巻 755 ~ 763 頁 (1990 年))。精製した精液 PSA を 7.5% ウシ血清アルブミンおよび 0.05% アジ化ナトリウムを含有する pH 7.0 の 0.1 M リン酸緩衝液に入れ、これに 100 モル倍過剰の精製 ACT を混和した。PSA の対照サンプルを ACT の代わりに緩衝液と混和した。これらのサンプルを 35 °C で一晩インキュベートした。インキュベートした後に、これらの試料を IMx (登録商標) PSA Assay に以下の修正を施した方法で検定した。

## 【0077】

- a. Abbott IMx (登録商標) PSA Assay (修正なし)
  - b. Abbott IMx (登録商標) PSA Assay および 9B10 の入った検定希釈剤 (すなわち検定希釈剤に  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の 9B10 を添加)
  - c. Abbott IMx (登録商標) PSA Assay および MAB H50 プロ
- ープ抗体ならびに MAB H117 捕捉抗体 (すなわち H117 被覆微粒子および標識 H50 を使用)

前述のようにして検定を行った。表 4 に、遊離 PSA サンプルおよび ACT を添加した PSA サンプルで得られた PSA の量を示す。PSA 対照に比べて、ACT を含有するサンプルで検出された PSA の量が少ない場合、バイアスが生じているのを示す。

## 【0078】

10

20

30

40

【表 4】

表 4

行った検定	遊離PSA	PSA+ACT	バイアス率(%)
AbbottIMx® PSAAssay	64.7	40.9	36.8
AbbottIMx® PSAAssay および 9B10 の入った検定希釈剤	67.2	61.3	8.8
AbbottIMx® PSAAssay および MABH50 プローブ抗体 ならびに MABH117 捕捉抗体	68.8	70.1	-1.8

値は ng/ml で読み取った。

## 【0079】

表 4 のデータから、MONO 検定法 (MAB H50 をプローブ抗体とし、MAB H117 を捕捉抗体とする) にはバイアスがないことがわかる。それに対して、MOLY 検定法 (Abbott IMx (登録商標) PSA Assay) では 36.8% のバイアスが見られ、この検定法に遊離 MAB 9B10 を加えるとそのバイアスが劇的に減少することがわかる。

## 【0080】

MONO 検定法で MAB H50 を捕捉抗体として、MAB H117 をプローブ抗体として利用して前記の実験を繰り返し行った。このような MONO 検定法でもバイアスが生じ、また検定希釈剤に遊離 9B10 を加えるとそのバイアスを無くすることができるのがわかった。

## 【実施例 2】

## 【0081】

キャリブレーターおよび対照として有用な PSA-HE 抗体複合体

HE<sub>PSA</sub> 抗体を PSA と混和すると PSA-HE<sub>PSA</sub> 抗体複合体が形成され、ここでは隠れるエピトープは PSA-ACT 複合体と同様にブロックされる。この物質を、PSA 検定でキャリブレーターまたは対照として利用することができる。

## 【0082】

精液 PSA を pH 7.4 の 0.01 M リン酸緩衝食塩水に入れたものを 10 倍過剰にある 9B10 と混和し、2~8 で一晩インキュベートする。インキュベートした後、PSA-HE<sub>PSA</sub> 抗体複合体を IMx (登録商標) PSA キャリブレーター希釈剤で 0、2、10、30、60 および 100 ng/ml に希釈する。これらのキャリブレーターを IMx (登録商標) PSA Assay で使って、PSA 上の HE をマスクすることで PSA-ACT 複合体を模倣する。

## 【実施例 3】

## 【0083】

PSA-HE および PSA 非 HE に対するポリクロナール抗体を選択するための遊離 PSA への HE 抗体の架橋

本実施例では、前記図 2 のパート B で示した分別方法の実行について説明する。方法を説明するのに MAB 5A10 を使用するが、これの代わりにどのような HE<sub>PSA</sub> 抗体でも、たとえば MAB 9B10 などを使用することができる。

## 【0084】

最初の工程では、製造業者の推奨事項に従って臭化シアン活性化セファロース-4B に 5A10 を架橋させる。(Affinity Chromatography Prin

10

20

30

40

50

principles and Methods、Pharmacia LKB Biotechnology、スウェーデン、23～30頁(1993年)。

【0085】

その手順は次のとおりである。

【0086】

アフィニティーカラム用の5A10を0.1Mリン酸水素ナトリウム( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )と混和し、pHを9.0に調整する。それから5A10を臭化シアン活性化セファロース-4Bゲルと、ゲル1mLに対して5A10を2mgの割合で混ぜる。混合液を静かに振盪させながら2～8で一晚インキュベートする。

【0087】

5A10をセファロースゲルに結合させた後、ゲルを0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8.0)で洗浄して未結合リガンドを除き、それから1Mエタノールアミン(pH 8.0)と2～8で混和して、ゲル中に残っている活性基をブロックする。ゲルを蒸留水または脱イオン水で洗浄してから、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液と1M  $\text{NaCl}$  (pH 4.0)、および0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  と1M  $\text{NaCl}$  (pH 8.0)で交互に2回洗浄する。カラムにPBS溶液(0.01M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、0.15M  $\text{NaCl}$ 、pH 7.2)を充填して洗浄し、次いで0.1Mグリシン、0.1M  $\text{NaCl}$ 、pH 2.5で溶出する。それからカラムを0.1%アジ化ナトリウムを含有するpH 7.2のPBSで洗浄する。5A10アフィニティーカラムは2～8で保存する。

【0088】

手順の次の工程では、PSAをセファロース4B-5A10に結合させてから、化学的架橋によって5A10-PSA複合体を安定させる。PSAが5A10に結合すると、PSA上のHEがブロックされるので、HEは他の $\text{HE}_{\text{PSA}}$ 抗体と結合できない。架橋剤としてジメチルパレミデート(DMP)を使って不溶性蛋白を架橋する手順については、すでに述べられている(C. SchneiderらによるJ. Biol. Chem. 25巻10766～10769頁(1982年))。

【0089】

その手順は次のとおりである。

【0090】

カラムからセファロース4B-5A10ゲルを取り除き、それをメスシリンダーに入れる。ゲルが落ち着いたならば、残留緩衝液を除く。パックされたゲル1mLにつき精製PSA 10mgを、0.01Mリン酸緩衝液(pH 7.4)中で最初の濃度が2mg/mLで加える。三角フラスコに移し、静かに振盪させながら2～8で一晚インキュベートする。

【0091】

一晚インキュベートした後に、ブフナー漏斗で10容の0.2Mトリエタノールアミン、pH 9.0(TEA)でゲルを2回洗浄する。ゲルをビーカーに移し、TEA中に入った40mM DMP(pH 9.0)5部を加える。室温で振盪させながら1時間インキュベートする。ブフナー漏斗を使って10～20容のTEA(pH 9.0)および10～20容の0.01Mリン酸緩衝食塩水(pH 7.4%)および0.02%アジ化ナトリウム

【0092】

このプロセスの最終工程では、以下のような標準的アフィニティー手順でセファロース4B-5A10-PSAカラム上のPSAに対するポリクロナル抗体を精製する。

【0093】

抗PSAポリクロナル抗体をカラム緩衝液(0.01Mリン酸緩衝食塩水、pH 7.4)で1:1希釈する。(ポリクロナル抗体の例としては、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、マウスおよびラットのポリクロナル抗体が挙げられる。)サンプルをゆっくりとカラムに注入する。カラムに結合しなかった蛋白を採集する。この分画にはHE抗体が入っている。カラムをカラム緩衝液で洗浄し、280nmで光学密度をモニターする。吸光度がベ-

10

20

30

40

50

スラインまで下がったならば、結合している非H E抗体を0.1Mグリシン-HCl(pH2.5)で素早く溶出させる。分画を等容の0.1Mトリス-HCl(pH8.5)に採集し、素早くpHを中性に調整する。精製したH E抗体および非H E抗体の双方を希望する緩衝液に対して透析し、0.2ミクロンの滅菌フィルターを通して濾過してから2~8で保存する。あるいは、抗体は凍結させてもよい。

【0094】

本明細書で言及するあらゆる公表文献および特許出願は、個別に引例として指示した場合と同様に、本明細書に参照として引用する。

【0095】

前述の発明は、明確にしてわかりやすくする目的で図や例を使ってある程度詳しく述べたが、当業者の技能の範囲内で様々な修正や変更を施すことも添付の請求の範囲に入るものであることは明らかである。ここに示す基本的発明に対する明らかな変更を可能にする今後の技術の進歩も請求の範囲に入る。

10

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図1A】PSA検定のための従来の方法(パートA)と本発明の方法(パートB)を比較し、H E<sub>PSA</sub>抗体によって遊離PSAおよびPSA-ACT複合体に対する検定法の特異度が改変されたことを示している。

【図1B】PSA検定のための従来の方法(パートA)と本発明の方法(パートB)を比較し、H E<sub>PSA</sub>抗体によって遊離PSAおよびPSA-ACT複合体に対する検定法の特異度が改変されたことを示している。

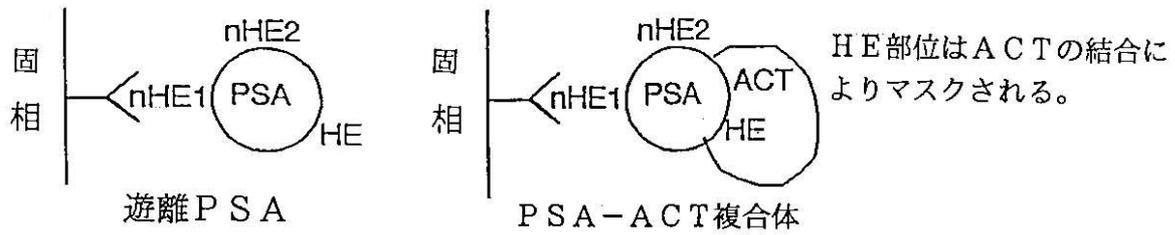
20

【図2】PSA上の隠れるエピトープと隠れないエピトープに対するポリクロナール抗体を獲得する方法を示している。

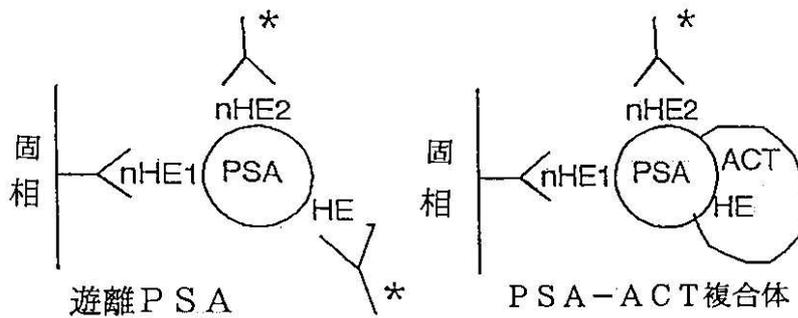
【図 1 A】

パート A : 従来の方法

ステップ A 1 : エピトープ 1 に対する非 HE 抗体 ( $\alpha nHE1$ ) を使って捕捉



ステップ A 2 : 隠れないエピトープ 2 に対する抗体 ( $\alpha nHE2^*$ ) および隠れるエピトープに対する抗体 ( $\alpha HE^*$ ) を含有するポリクロナール抱合体と反応



ステップ A 3 : 基質を加えて反応を読み取る。

結果 :	
PSA の形態	相対的反応
遊離 PSA	2
PSA-ACT 複合体	1

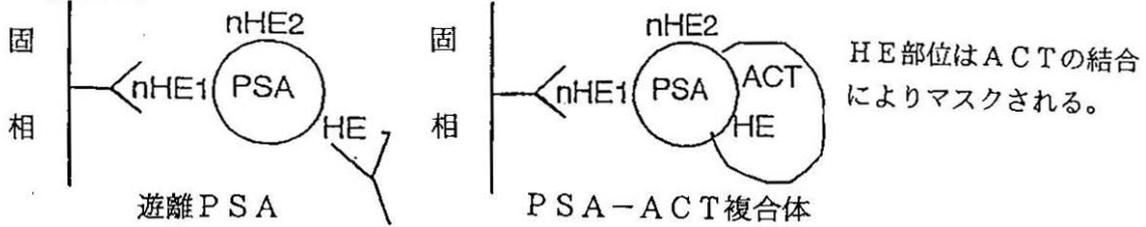
図 1 A

【図1B】

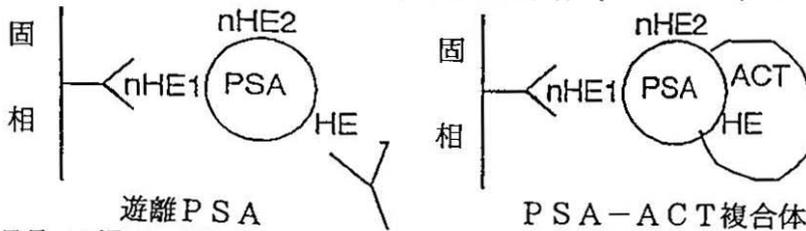
パートB：隠れるエпитープに対する抗体を用いた方法

ステップB1：隠れるエピトープに対する標識していない抗体 ( $\alpha$ HE) でサンプルを

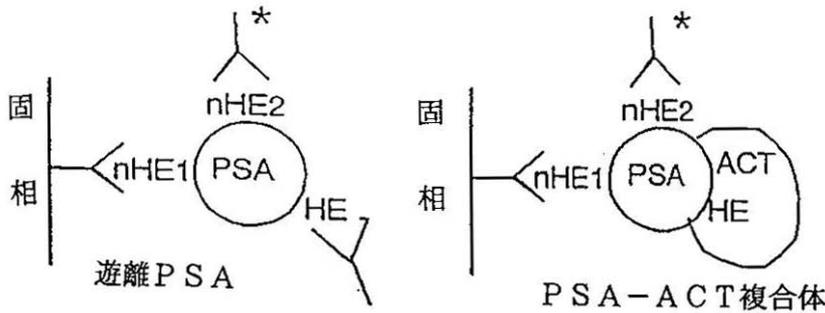
事前処理



ステップB2：エピトープ1に対する非HE抗体 ( $\alpha$ nHE1) を使って捕捉



ステップB3：隠れないエピトープ2に対する抗体 ( $\alpha$ nHE2\*) および隠れるエピトープに対する抗体 ( $\alpha$ HE\*) を含有するポリクロナール抱合体と反応



$\alpha$ HE\*抱合体の結合は未標識 $\alpha$ HEによりブロックされる。

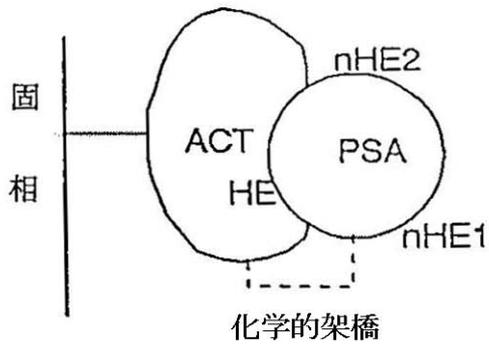
ステップB4：基質を加えて反応を読み取る。

結果：	
PSAの形態	相対的反応
游离PSA	1
PSA-ACT複合体	1

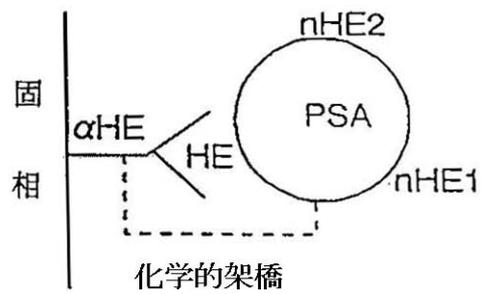
図1B

【 図 2 】

パートA : ACTを使ってPSAを結合



パートB : 隠れるエピトープに対する抗体 ( $\alpha$ HE) を使ってPSAを結合



パートC : 隠れないエピトープに対する抗体 ( $\alpha$ nHE1) を使ってPSAを結合した後、隠れるエピトープに対する抗体 ( $\alpha$ HE) を使ってHEをブロック

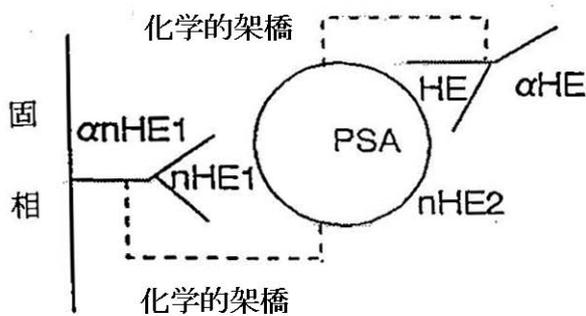


図 2

---

フロントページの続き

- (72)発明者 キヤロル・エー・キング  
アメリカ合衆国、イリノイ・60035、ハイランド・パーク、キャベル・アベニュー・1514
- (72)発明者 デブラ・ビー・アレクサンダー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60031、ガーニー、ホースシュー・レーン・17577
- (72)発明者 アラン・エイチ・スミス  
アメリカ合衆国、イリノイ・60099、ジオン、ウエスト・タルマツジ・10831
- (72)発明者 スーザン・ビー・オマロー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60517、ウツドブリッジ、ホルシー・ドライブ・6415

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA11 AA30 CA40 DA56 DA75 DA86 EA51

专利名称(译)	前列腺特异性抗原的免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004093563A</a>	公开(公告)日	2004-03-25
申请号	JP2003286450	申请日	2003-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	バリーエルドウエル キャロルエーキング デブラビーアレクサンダー アランエイチスミス スーザンビーオマロー		
发明人	バリー・エル・ドウエル キャロル・エー・キング デブラ・ビー・アレクサンダー アラン・エイチ・スミス スーザン・ビー・オマロー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 C07K16/18 C07K19/00 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/689 G01N33/57434 G01N2333/811 G01N2333/8121 G01N2800/342 Y10S435/962 Y10S435/967 Y10S435/975 Y10S436/813		
FI分类号	G01N33/53.D C07K19/00 G01N33/574.A C07K16/18		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA56 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA51		
优先权	08/174964 1993-12-29 US		
其他公开文献	JP3833637B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及癌症免疫测定领域。前列腺特异性抗原 (PSA) 的一种新的免疫测定方法。此外,与PSA和 $\alpha$ -抗胰凝乳蛋白酶 (ACT) 的复合物相似的复合物,可以在PSA免疫测定中用作校准物或对照,并且针对PSA的多克隆抗体被PSA与ACT的结合所掩盖。结合那些与所结合的表位结合的和的结合这些表位的结合体。[选择图]无

キャリアレーター (遊離PSA) (ng/ml)	検定希釈剤中のMAB9B10の濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	0	5	10	20
0	7.0	6.3	6.4	6.1
2	90.9	58.0	58.3	57.4
10	373.6	248.6	248.8	247.1
30	877.3	640.1	623.4	606.3
60	1394.8	1084.8	1084.8	1053.7
100	1834.3	1486.1	1520.8	1493.8