

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3833637号
(P3833637)

(45) 発行日 平成18年10月18日(2006.10.18)

(24) 登録日 平成18年7月28日(2006.7.28)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
CO 7 K 19/00	(2006.01)	CO 7 K 19/00	
GO 1 N 33/574	(2006.01)	GO 1 N 33/574	A
CO 7 K 16/18	(2006.01)	CO 7 K 16/18	

請求項の数 4 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2003-286450 (P2003-286450)	(73) 特許権者	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-
(65) 公開番号	特開2004-93563 (P2004-93563A)		6050、アボット・パーク、アボット・
(43) 公開日	平成16年3月25日(2004.3.25)		パーク・ロード・100、チャド・037
審査請求日	平成15年8月5日(2003.8.5)		7/エイ・ピー・6・デー2
(31) 優先権主張番号	08/174,964	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成5年12月29日(1993.12.29)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	米国(US)	(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) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

α 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、該被検体は生体サンプル中で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、前記隠れたエピトープは結合分子との結合により被検体に対してマスクされ得るエピトープであり、前記隠れていないエピトープは結合分子との結合により被検体に対してマスクされていないエピトープであり、α 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では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し、前記隠れたエピトープは結合分子との結合により被検体に対してマスクされ得るエピトープであり、前記隠れていないエピトープは結合分子との結合により被検体に対してマスクされていないエピトープである被検体。

【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

10

20

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（PSA）の新たな免疫検定法を提示する。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 α_1 -抗キモトリプシン（ACT）との複合体に似た、PSA-抗PSA複合体も提示する。さらに、PSAに対するポリクローナル抗体を、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を提示する。

10

【背景技術】

【0002】

前立腺特異抗原（PSA）については、M. C. WangらがInvest Urol. 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。PSA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. Wangらによる前掲文献およびY. BanらによるBiochem Biophys Res Commun. 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. WattらによるProc Natl Acad Sci USA, 83巻3166頁（1986年））、PSAの遺伝子がクローンされている（A. LundwallによるBiochem Biophys Res Commun. 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かなりの部分の血中で、低濃度のPSAを検出することが可能になった（栗山らによるCancer Res. 40巻4658頁（1980年））。

20

【0003】

PSA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. LangeらによるUrology, 33巻（補遺6）13頁（1989年6月）；C. S. KillianらによるCancer Res. 45巻886頁（1985年））。治療してもPSAの上昇が続く場合、あるいは治療後のPSA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. BrawerらによるUrology, 33巻（補遺5）11頁（1989年5月）；J. K. SiddalらによるEur Urol. 12巻1号3頁（1986年）；T. A. StameyらによるN Engl J Med. 317巻909頁（1987年）；P. H. LangeらによるJ Urol. 141巻873頁（1989年）；T. A. StameyらによるJ Urol. 141巻1076頁（1989年）；T. A. StameyらによるJ Urol. 141巻1084頁（1989年）；T. A. StameyらによるJ Urol. 141巻1088頁（1989年）；D. W. ChanらによるClin Chem. 33巻1916頁（1987年））。

30

【0004】

PSA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。

40

【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 Natl Cancer Inst. 68巻99頁（1982年）；T. A. StameyらによるN Engl J Med. 317巻909頁（1987年）；P. H. LangeらによるJ Urol. 141巻873頁（1989年）；T. A. StameyらによるJ Urol. 141巻1076頁（1989年）；T. A. StameyらによるJ Urol. 141巻1084頁（1989年）；T. A. StameyらによるJ Urol. 141巻1088頁（1989年）；D. W. Cha

50

nらによるClin Chem. 33巻1916頁(1987年); J. E. Oest erlingらによるJ Urol. 139巻766頁(1988年))。

【0006】

血清PSA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PSA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(DuffyによるAnn Clin Biochem(1989年); BrawerらによるUrology Suppl(1989年))。

【0007】

1992年2月6日に公開されたH. LiljaらによるPCT特許出願WO 92/01936号「遊離および複合前立腺特異抗原(PSA)のアッセイ」では、遊離PSAならびにプロテイナーゼインヒビター複合体としてのPSAの免疫検定法を開示している。遊離PSAおよびPSA複合体は、2種類以上のモノクローナ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PSAプロテイナーゼインヒビター複合体が α_1 -抗キモトリプシン(AC₁T)、 α_1 -プロテアーゼインヒビター(AP₁I)または α_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PSA、PSA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PSA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種類のモノクローナル抗体(以下、「MAB」という)を開示している。AC₁TとPSAとの複合体(以下、PSA-AC₁T複合体という)および遊離PSAは、MAB 2E9および2H11とされた。MAB 5A10は遊離PSAを認識するが、PSA-AC₁T複合体を認識しない。MAB 2E9は、免疫プロット上の遊離PSAおよびPSA-AC₁T複合体を容易に識別した唯一の抗PSA MABである。抗PSA MAB 2E9、2H11または5A10のいずれも、互いに結合して固相結合PSA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MABを組み合わせて使用することで、遊離PSAおよびPSA-AC₁T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PSA/総PSA比および遊離PSA/PSA-AC₁T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PSAに特異なMABおよびPSA-AC₁T複合体に反応するMABは、たとえばCanAg Diagnostics AB(スウェーデン イェテボリ)などから市販されている。自社MAB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CanAg 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-AC₁T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(CanAg 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P38、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)。PROS-CHECK PSAは、PSAに対するポリクローナルウサギ抗体、ならびに¹²⁵I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(「

10

20

30

40

50

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とも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ア)がある。

【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ACSTTM 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。

【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。

【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))。

【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_{PSA}抗体でサンプルを処理する。検定法にHE_{PSA}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_{PSA}抗体の複合体(「PSA-HE_{PSA}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。

【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ACT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、

10

20

30

40

50

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。

【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、F a b、F (a b ' 2) および F v がある。このようなフラグメントは、10

【0022】

ここでいう「H E 抗体」または「 α H E」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H E 抗体」または「 α n H E」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」（「H E」）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」（「n H E」）という。「 α 被検体」または「 α A」とは、 α H E であれ α n H E であれ、被検体に対する抗体のことをいう。20

【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（A C T）、P S A（A C T）、P S A（ α_2 -マクログロブリン）、トロンビン（抗トロンビンIII）、C₁ -エステラーゼ（C₁ -インヒビター）、t - P A（P A I - 1）、u P A（P A I - 1）、プラスミン（ α_2 -抗プラスミン）、P S A（ α_1 -プロテアーゼインヒビター）、およびP S A（プロテインCインヒビター）がある。30
「P A I - 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 - P A」とは、組織プラスミノゲン活性化因子のことである。「u P A」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】

「M O L Y 検定法」とは、捕捉抗体がM A B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。40

【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M O L Y 検定法および一部のM O N O 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。50

【0027】

本発明者は、反応混合液に遊離H E抗体を加えることで被検体用のM O L Y検定法および一部のM O N O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H E抗体を加えることを除いては、特定被検体用のM O L Y検定法およびM O N O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. W o o dらによるE u r. J . C l i n. C h e m. C l i n. B i o c h e m. 29巻787頁(1991年)に載っている。H E抗体および非H E抗体は、既知の方法、たとえば以下に述べるH E_{P S A}抗体および非H E_{P S A}抗体の作製に使用する方法を使って作製できる。H E抗体は、以下に述べるようにモノクローナル抗体もしくは特異的ポリクローナルH E抗体であることが望ましい。

10

【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(「 α nH E」)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H E抗体(「 α H E」)とインキュベートする。あるいは、 α H E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。 α H EはM A Bであることが望ましい。十分な時間インキュベートして、{ (α nH E) (被検体) (α H E) } 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{ (α nH E) (被検体) (α H E) } 複合体だけを残す。

20

【0029】

次いで、ポリクローナル抗被検体抗体(「 α 被検体^{*}」)を加える。 α 被検体^{*}は、できれば検出用に標識したもの、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。

30

【0030】

反応混合液を十分な時間インキュベートして、{ (α nH E) (被検体) (α H E) (α 被検体^{*}) } 複合体および{ (α nH E) (被検体) (結合分子) (α 被検体^{*}) } 複合体を形成する。{ (α nH E) (被検体) (α H E) (α 被検体^{*}) } 複合体では、 α H Eと α 被検体^{*}の双方が複合体中の被検体に結合している点に注意すること。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{ (α nH E) (被検体) (結合分子) (α 被検体^{*}) } の複合体も形成されることがある。

【0031】

次いで、未結合試薬を分離する。標識した α 被検体^{*}を検出して、固相上に{ (α nH E) (被検体) (α H E) (α 被検体^{*}) } および{ (α nH E) (被検体) (結合分子) (α 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 α 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。

40

【0032】

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、 α 被検体^{*}を標識した α nH E(すなわち「 α nH 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。

【0033】

50

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 α 被検体または α n H Eにし（ α 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 α 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 α 被検体に α 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{（ α H E）（被検体）（ α n H E^{*}）}の追加複合体もある。

【0034】

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 α 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。

10

【0035】

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。

【0036】

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）が便利なのがわかっており、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。

20

30

【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_{P S A}抗体」と呼ぶ。対応する比H E抗体のことは「非H E_{P S A}抗体」と呼ぶ。

40

【0038】

H E_{P S A}抗体（および非H E_{P S A}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WO 92/01936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_{P S A}抗体の例としては、（1）WO 92/01936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、199

50

3年11月14～19日)に述べられているMAB 9B10(同論文ではMAB H117およびH50についても述べている)、(3) CanAg Diagnostics AB(スウェーデン イェーテボリ)から市販されているMAB PSA6、PSA30、PSA17、PSA19、PSA20、およびPSA25がある。米国特許出願08/094,901号(1993年7月22日出願)でM. MatikainenらはMAB 5A10および9B10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MABを分泌するハイブリドーマはそれぞれ5A10E7F11H4および9B10A9H3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(10
ECACC)(Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG、英国)に寄託され、それぞれ93031201および93031202のECACC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PSA検定法に有用な3つの発明、すなわちHE_{PSA}抗体を用いた新しいPSA検定法、特異的ポリクロナールHE_{PSA}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PSA-AC_T複合体に似ているPSA-HE_{PSA}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MOLY検定法で見られるバイアスを回避するかもしれない。最後の発明はMONOおよびMOLYの双方のPSA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HE_{PSA}抗体は、PSA用のMOLY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、HE_{PSA}抗体は遊離PSA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PSA免疫検定法(MOLYまたはMONO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、PSA、AC_TおよびHE_{PSA}抗体と非HE_{PSA}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HE抗体と非HE抗体にも応用できることがわかるだろう。

I. 新しいPSA免疫検定法

図1では、従来のPSA MOLY検定法(パートA)および本発明のPSA MOLY検定法(パートB)を比較して、HE_{PSA}抗体が遊離PSAおよびPSA-AC_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(αnHE1)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αnHE1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。

【0044】

工程A2: その後、HEに特異な標識抗体(αHE*)および非HE2に特異な抗体(αnHE2*)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

10

20

30

40

50

クロナールは隠れないエピトープ nHE 2 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。

【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。

10

【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_{PSA}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。

【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_{PSA}抗体（αHE）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αHEを工程B2または工程B3で追加してもよい。

20

【0049】

工程B2：パートAのようにしてαnHE1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（αHE*）および非HEを認識する抗体（αnHE2*）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αnHE2*が結合する。αHE*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αHE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。

【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αnHE2*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。

30

【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、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。

40

II. 被検体に対するポリクロナール抗体の分別方法

本発明は、被検体に対するポリクロナー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ール抗体は

50

、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、H E 部位を結合分子またはH E 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ール抗体を曝露する。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H E 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H E 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H E 抗体は、M O L Y 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ール抗体はH E 抗体である。H E 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（M O L Y 免疫検定法であれM O N O 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。

【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、H E 抗体、または非H E 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. J i によるM e t h o d s i n E n z y m o l o g y 91巻580頁（1983年）；S. S. W o n g らによる「B i o c a t a l y s t D e s i g n f o r S t a b i l i t y a n d S p e c i f i c i t y」（M. E. H i m m e l、G. G e r o g i o u 編、A m e r i c a n C h e m i c a l S o c i e t y、ワシントンDC（1993年））第22章266～282頁；M. N. G u p t a による同書第26章307～326頁；「C h e m i c a l R e a g e n t f o r P r o t e i n M o d i f i c a t i o n」第2版（R. L. L u n d b l a d、C R C P r e s s、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。

【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H E 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H E 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、B i o - R a d B u l l e t i n 1099「I m m u n o a f f i n i t y C h r o m a t o g r a p h y w i t h A f f i n i t y S u p p o r t s」（1990年）；P h a r m a c i a L K B B i o t e c h n o l o g y「A f f i n i t y C h r o m a t o g r a p h y, P r i n c i p l e s & M e t h o d s」（1993年）；および「分子生物学の方法」第10巻「I m m u n o c h e m i c a l P r o t o c o s」（M. M. M a n s o n 編）89～91頁（1992年）；「I m m u n o c h e m i s t r y i n P r a c t i c e」のA. J o h n s t o n e らによる第10章202～232頁（S i e t i f i c P u b l i c a t i o n s、オックスフォード、1982年）；および「C u r r e n t O p i n i o n i n B i o t e c h n o l o g y」第2巻「蛋白分離用アフィニティークロマトグラフィー（A f f i n i t y C h r o m a t o g r a p h y f o r P r o t e i n I s o l a t i o n）」のW. H. S c o u t e n 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。

【0056】

図2に、例としてP S A、A C T およびH E_{P S A} 抗体を使ってH E 抗体および非H E 抗体にポリクロナール抗体を分別する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。

10

20

30

40

50

【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ー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ール抗体をPSA-ACT-固相とインキュベートすると、HE_{PSA}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_{PSA}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、ポリクロナール抗PSA抗体がHE_{PSA}抗体および非HE_{PSA}抗体に分離される。

10

【0058】

パートB：HE_{PSA}抗体（αHE）を使ったPSAとの結合HE_{PSA}抗体（αHE）を、臭化シアン活性化セファロースー4Bなどの固相に抱合させる。精製したPSAをαHEと反応させて、隠れているエピトープ（HE）をマスクするPSA-αHE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ール抗体をPSA-αHE-固相とインキュベートすると、ポリクロナールHE_{PSA}抗体は固体相に結合しない。他方、ポリクロナール非HE_{PSA}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αHE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点に注目されたい。

20

【0059】

パートC：非HE_{PSA}抗体（αnHE1）を使ったPSAとの結合とその後のHE_{PSA}抗体（αHE）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_{PSA}抗体（αnHE1）を、臭化シアン活性化セファロースー4Bなどの固相に抱合させる。精製したPSAをαnHE1と反応させて、PSA-αnHE1複合体を生成する。HE_{PSA}抗体（αHE）をPSA-αnHE1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ール抗体を固相-αnHE1-PSA-αHE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 30
に対する非HE_{PSA}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、ポリクロナール抗PSA抗体はHE_{PSA}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αHE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逐次分画カラムで使用する点に注目されたい。

30

III. PSA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-HE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-HE抗体の複合体も提示する。この複合体は、被検体に過剰なHE抗体を加えることで生成できる。HE抗体は、被検体の2倍から100倍多いことが好ましく、10倍多いこと 40
がより望ましい。あるいは、被検体をHE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HE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-HCl、またはHEPES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2～25℃が望ましい。pH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。

【0060】

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。

【0061】

実施例

50

【実施例 1】

【0062】

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」）。 10

【0063】

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。

【0064】

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）のものと同一で以下のとおりである。 20

【0065】

（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。

【0066】

（2）反応混合液のアリコートを 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。 30

【0067】

（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、および微粒子に結合していない M A B 9 B 1 0 を除去する。

【0068】

（4）ヤギポリクロナール抗 P S A : 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。 40

【0070】

（6）基質である 4－メチルウンベリフェリルリン酸（M U P）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 M U P を 4－メチルウンベリフェロン（M U）に変換し、その蛍光を I M x（登録商標）機器の M E I A 光学アセンブリで測定する。

【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 P S A 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）、P S A 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。 50

【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

値はc/s/sで読み取った。

【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

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MAB9B10の濃度（μg/ml）			
	0	5	10	20
JP1	50.49	77.88	83.71	85.72
C8	1.37	2.01	2.02	2.08
C9	3.25	5.06	4.97	5.16
C10	13.02	18.99	19.21	19.69
C11	36.65	60.88	62.62	64.93
92-297-0384	26.59	48.15	47.41	50.13

値はng/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

10

20

30

40

50

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だが、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pH7.0の0.1M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℃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】

- Abbott IMx（登録商標）PSA Assay（修正なし）
- 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）
- Abbott IMx（登録商標）PSA AssayおよびMAB H50プローブ抗体ならびに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】

【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_{PSA}抗体をPSAと混和するとPSA-HE_{PSA}抗体複合体が形成され、ここでは隠れるエピトープはPSA-AC_T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。

10

【0082】

精液PSAをpH7.4の0.01M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_{PSA}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100ng/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を使って、PSA上のHEをマスクすることでPSA-AC_T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

20

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_{PSA}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 Principles and Methods、Pharmacia LKB Biotec hnology、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。

30

【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(Na₂HPO₄)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℃で一晩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 Na₂HPO₄ (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 NaCl (pH 4.0)、および0.1M Na₂HPO₄と1M NaCl (pH 8.0)で交互に2回洗浄する。カラムにPBS溶液(0.01M NaHPO₄、0.15M NaCl、pH 7.2)を充填して洗浄し、次いで0.1Mグリシン、0.1M 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。

40

【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HE_{PSA}抗体と結合できない。架橋剤

50

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。ゲルが落ち着いたら、残留緩衝液を除く。パックされたゲル 1 mL につき精製 PSA 10 mg を、0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で最初の濃度が 2 mg/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 °C で一晩インキュベートする。

10

【0091】

一晩インキュベートした後に、ブフナー漏斗で 10 容の 0.2 M 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 40 mM 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 0.01 M リン酸緩衝食塩水 (pH 7.4%) および 0.02 % アジ化ナトリウムで洗浄する。

【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ール抗体を精製する。

20

【0093】

抗 PSA ポリクロナール抗体をカラム緩衝液 (0.01 M リン酸緩衝食塩水、pH 7.4) で 1 : 1 希釈する。(ポリクロナー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ー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、280 nm で光学密度をモニターする。吸光度がベースラインまで下がったならば、結合している非 HE 抗体を 0.1 M グリシン-HCl (pH 2.5) で素早く溶出させる。分画を等容の 0.1 M トリス-HCl (pH 8.5) に採集し、素早く pH を中性に調整する。精製した HE 抗体および非 HE 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 °C で保存する。あるいは、抗体は凍結させてもよい。

30

【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。

40

【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、HE_{PSA} 抗体によって遊離 PSA および PSA-AC_T 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、HE_{PSA} 抗体によって遊離 PSA および PSA-AC_T 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。

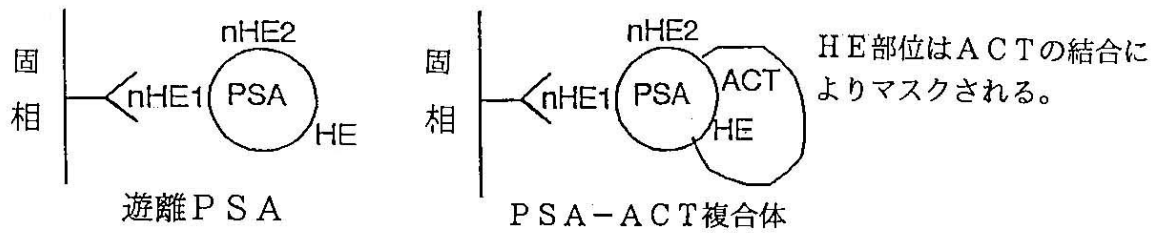
【図 2】 PSA 上の隠れるエピトープと隠れないエピトープに対するポリクロナール抗体を獲得する方法を示している。

50

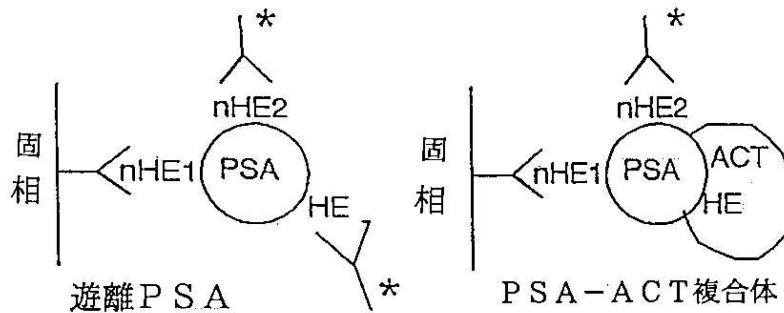
【図 1 A】

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 H E 抗体 (α n H E 1) 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 (α n H E 2 *) および隠れるエピトープに対する抗体 (α H E *) 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 P S A	2
P S A - A C T 複合体	1

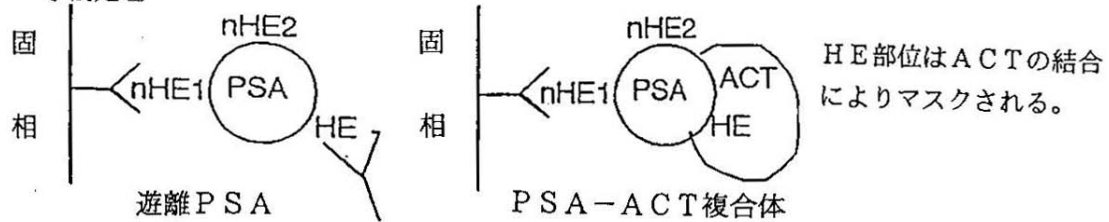
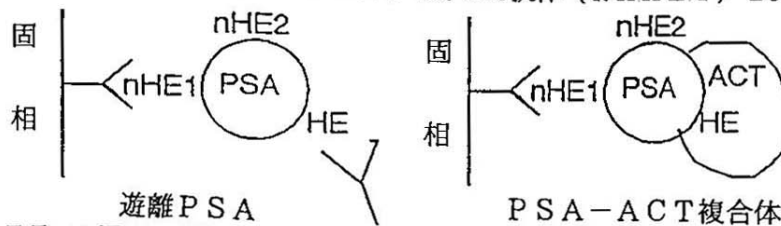
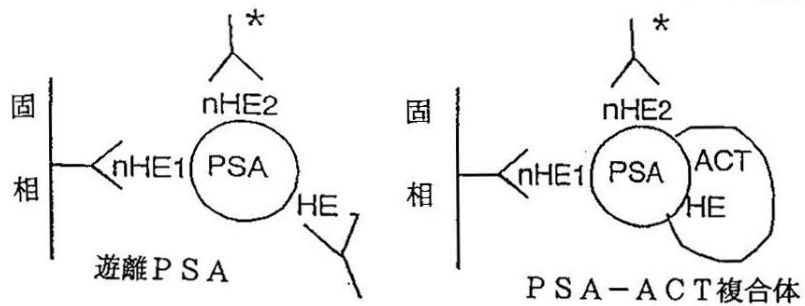
図 1 A

【図 1 B】

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 B 1 : 隠れるエпитープに対する標識していない抗体 (α HE) でサンプルを

事前処理

ステップ B 2 : エピトープ 1 に対する非 HE 抗体 (α nHE1) を使って捕捉ステップ B 3 : 隠れないエピトープ 2 に対する抗体 (α nHE2*) および隠れるエピトープに対する抗体 (α HE*) を含有するポリクロナール抱合体と反応 α HE* 抱合体の結合は未標識 α HE によりブロックされる。

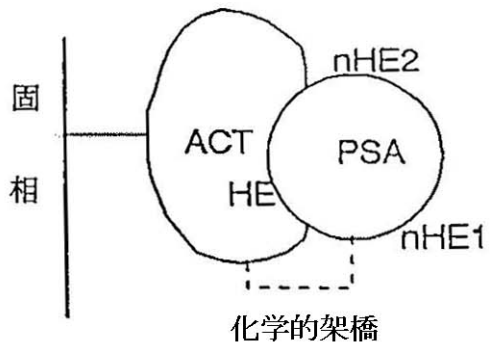
ステップ B 4 : 基質を加えて反応を読み取る。

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

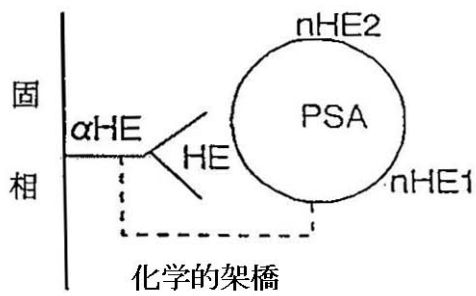
図 1 B

【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 (α 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 (α 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 (α HE) を使ってHEをブロック

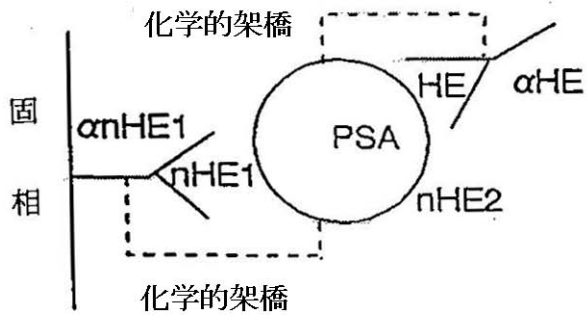


図 2

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

審査官 宮澤 浩

- (56)参考文献 国際公開第92/001936 (WO, A1)

专利名称(译)	前列腺特异性抗原的免疫测定		
公开(公告)号	JP3833637B2	公开(公告)日	2006-10-18
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		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	バリーエルドゥエル 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・ドゥエル 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 C07K19/00 G01N33/574 C07K16/18 A61K39/395 G01N33/543 G01N33/566 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		
审查员(译)	宫泽浩		
优先权	08/174964 1993-12-29 US		
其他公开文献	JP2004093563A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：在癌免疫检测领域提供前列腺特异性抗原（PSA）的免疫分析。ZSOLUTION：这种免疫分析用于前列腺特异性抗原（PSA）。在该方法中，类似于可用作校准物或对照的PSA的复合物和用于PSA的α-抗胰凝乳蛋白酶（ACT）和多克隆抗体的复合物被分类为通过PSA与ACT的结合掩蔽的表位结合的那些和那些不与表位结合。Z

对照（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