

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4689597号
(P4689597)

(45) 発行日 平成23年5月25日(2011.5.25)

(24) 登録日 平成23年2月25日(2011.2.25)

(51) Int.Cl. F1
GO1N 33/53 (2006.01) GO1N 33/53 B

請求項の数 5 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2006-509465 (P2006-509465)	(73) 特許権者	507010430 レセプター バイオロジックス インク、 アメリカ合衆国、94080 カルフォル ニア州、サウス サン フランシスコ、ス ウィート エイ、ベテランズ ブルバード 1140
(86) (22) 出願日	平成16年3月29日(2004.3.29)	(74) 代理人	100081411 弁理士 三澤 正義
(65) 公表番号	特表2006-521569 (P2006-521569A)	(72) 発明者	グリムズ, ステフェン アメリカ合衆国 95776 カリフォル ニア州、ウッドランド, ピー. オー. ボッ クス 1049
(43) 公表日	平成18年9月21日(2006.9.21)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/009666		
(87) 国際公開番号	W02004/088326		
(87) 国際公開日	平成16年10月14日(2004.10.14)		
審査請求日	平成19年3月29日(2007.3.29)		
(31) 優先権主張番号	60/458,244		
(32) 優先日	平成15年3月28日(2003.3.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ガストリンホルモン免疫アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) ガストリンホルモンのC末端エピトープに選択的に結合する固定化抗体を提供する工程と、

(b) N末端ガストリンペプチドG17(1-9)の存在下、患者から得られたガストリンホルモン含有生体液試料中の前記ガストリンホルモンが前記抗体に結合するのに適した条件で、前記ガストリンホルモンに結合した前記抗体の固定化複合体を生成させるために、前記試料をインキュベートする工程と、

(c) 該固定化複合体を洗浄し、未結合成分及びN末端ガストリンペプチドを除去するために、及び前記複合体をガストリンホルモンのN末端エピトープに選択的に結合し、検出可能なマーカー抱合固定化抗体複合体を形成させるために、適した検出可能なマーカー抱合抗体とともにインキュベートする工程と、

(d) 該検出可能なマーカー抱合固定化抗体複合体を洗浄し、及び展開試薬とともにインキュベートする工程と、

(e) 前記生体液試料中の前記ガストリンホルモンの全量を決定するために、該展開試薬を測定する工程

とを含む、生体液試料中のガストリンホルモンの全量を決定する方法。

【請求項2】

前記体液は血清である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記ガストリンホルモンのC末端エピトープを選択的に結合する抗体及び/又は前記ガストリンホルモンのN末端エピトープを選択的に結合する抗体はモノクローナル抗体である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記ガストリンホルモンはG17又はG17-Glyであり、かつ前記ガストリンホルモンのC末端エピトープを選択的に結合する抗体及び前記ガストリンホルモンのN末端エピトープを選択的に結合する抗体はG17に結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記ガストリンホルモンはG34又はG34-Glyであり、かつ前記ガストリンホルモンのC末端エピトープを選択的に結合する抗体及び前記ガストリンホルモンのN末端エピトープを選択的に結合する抗体はG34又はG34-Glyに結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[発明の分野]

本発明は、生体液中の生体ペプチド、特にガストリンホルモンペプチドを検出及び/又は定量するELISA法に関する。詳細には、本発明は、生体液中の遊離ペプチド、及び抗体結合ペプチドを含む全ペプチドを検出及び/又は定量する方法に関する。

20

【0002】

[関連出願]

本出願は、2003年3月28日付けで出願された「ガストリンホルモンアッセイ」と題する米国仮出願第60/458,244号の利益を主張し、その明細書は本明細書中その全体が参照により援用される。また、2004年3月29日付けで、「ガストリンホルモンに対するモノクローナル抗体」と題する米国仮出願第60/*****と同時出願されており、その明細書は本明細書中その全体が参照により援用される。

【背景技術】

【0003】

[発明の背景]

ガストリンホルモンは100年前に初めて同定されて1960年代に精製されたものの、正常組織及び疾患組織での異なる組織へのその作用はいまだ完全には理解されていない。ガストリン系の知識にこのようなギャップがある1つの主な理由は、複数の形のガストリンホルモンのそれぞれを別々に検出及び同定することが難しいためであった。

30

【0004】

哺乳類では、ペプチドホルモンであるガストリンは複数の形で存在し、ペプチド鎖にあるアミノ酸残基の数に基づいて、主に2つの大きさのクラス、「小」ガストリンと「大」ガストリンにグループ化される。「小」ガストリン形には、成熟ガストリン17(G17)及びグリシン伸長型G17(G1-Gly)が含まれ、「大」ガストリン形には、ガストリン34(G34)及びグリシン伸長型G34(G34-Gly)が含まれる。G17の成熟形は、胃酸分泌の主要なエフェクターであり、この役割においてはG34の約6倍効果があると見積もられている。様々な形のガストリンが、前駆体ペプチドであるプロガストリンから、開裂により、また場合によっては開裂形の修飾により、*in vivo*で産生される。ヒトG34は、そのC末端にG17の全17アミノ酸配列を有し、そして予想どおり、G17と免疫学的に交差反応する。

40

【0005】

成熟G17は、アミノ末端残基及びカルボキシ末端残基の両方で修飾される。N末端グルタミン酸は環化してピログルタミン酸(pGlu)を形成し、そしてC末端フェニルアラニン残基の遊離カルボキシル基は酵素、ペプチジル-アミド化モノオキシゲナーゼ(PAM)によりアミド化してC末端Phe-NH₂を形成する。(Dockray他著、Ann. Re

50

v. *Physiol.* (2001) 63: 119-139を参照)。

【0006】

ヒトの「小」ガストリンの主要な形である成熟G17は、アミノ酸配列：pEGPWLEEEEA YGWMD F - NH₂ (配列番号1)を有する。G17 - Glyは、健康なヒト被検体の「小」ガストリンの少数成分として見いだされる、ガストリンの不完全処理形であり、アミノ酸配列：pEGPWLEEEEA YGWMD FG (配列番号2)を有する。

【0007】

ヒトの「大」ガストリンの主要な形であるガストリン - 34は、アミノ酸配列：pELGPQGPPHLVADPSKKEGPWLEEEEA YGWMD F - NH₂ (配列番号3)を有し、C末端グリシン残基を余計に持つグリシン伸長型ガストリン34 (G34 - Gly)は、アミノ酸配列：pELGPQGPPHLVADPSKKEGPWLEEEEA YGWMD FG (配列番号4)を有する。

10

【0008】

ガストリンは、ガストリン放出ペプチド (GRP) に応答して胃の幽門洞G細胞により分泌される。ガストリン分泌は、胃酸と、複数のペプチドホルモン、最も顕著には、ソマトスタチンの傍分泌作用とにより抑制される。ガストリンペプチドは、健康な個体の胃で酸の分泌を刺激するように機能すると、長い間認識されてきたが、最近になって初めてこれらのペプチドが、胃腸管 (GI) 系の様々な型の細胞の増殖、分化、及び成熟の制御も行うことが示された。

20

【0009】

GI系でのそれらの局所的活性に加えて、G17、及びそれより劣るがG17 - Glyは、血流中に放出され、胃癌、結腸直腸癌、及び膵癌などの胃腸障害及び疾患にかかっている患者の血清では増加することが見いだされている。さらに最近では、これらのガストリン種が胃腸管に付随しないで小細胞肺癌 (SCLC) 及び肝臓転移腫瘍を含む他の疾患に付随することもまた見いだされている。例えば、「ガストリンと大腸癌：統合的仮説 (Gastrin and Colon Cancer: a unifying hypothesis)」S. N. Joshi他著、*Digestive Diseases* (1996) 14: 334-344、及び「ガストリンと結腸直腸癌 (Gastrin and colorectal cancer)」Smith, A. M. and Watson, S. A. 著、*Alimentary Pharmacology and Therapeutics* (2000) 14 (10): 1231-1247を参照。

30

【0010】

抗体は、医薬、獣医学、及び他の分野で用いられる多数のアッセイ技法において、重要な試薬である。そのような検査には、多くの日常的に用いられる免疫アッセイ技法、例えば、酵素結合免疫吸着 (immunosorbant) 検定法 (ELISA)、放射免疫アッセイ (RIA)、免疫組織化学 (IHC)、及び免疫蛍光 (IF) アッセイなどが含まれる。

【0011】

モノクローナル抗体 (MAb) は、独自の特徴を有しており、これによりモノクローナル抗体は、これらのアッセイの多くにおいて用いられる場合に、多くの点でポリクローナル抗血清及びポリクローナル抗血清から精製された抗体より優れている。これらの寄与として、標的抗原に対するモノデターミナント (monodeterminant) 特異性 (すなわち、単独のエピトープに対する特異性)、異なる抗体調製物の中で特異性を変化させないこと、ならびに親和性及び化学組成を経時で変化させないことが挙げられる。そのうえさらに、MAbは、in vitro法により無期限かつ無限の量で産生され得る。これらの性質は、ポリクローナル抗体のそれと明らかに対照的であり、ポリクローナル抗体は、生物学的変異性を必ず伴い、かつ免疫化動物の一生にかかる抗体産生能力の制限を受ける in vivo免疫化法を必要とする。

40

【0012】

これらの利点にも関わらず、個々のMAbの間には、たとえそれらが同じエピトープに対して特異的であったとしても、違いが存在する。例えば、単一の抗原性エピトープ領域を用いた免疫化により誘導されたMAb間に、以下の特徴のいずれか又は全てに関して差

50

異が生じ得る。1) エピトープの分子組成及び立体構造に対する精密な特異性、2) 抗体イディオタイプ、3) 抗体親和性、4) 抗体アロタイプ、及び5) 抗体アイソタイプ。これらの特徴的な違いは、同じ抗原領域に対して発生した異なるMAb単離物が所定のアッセイで異なる挙動を取り得るというように、特定の免疫アッセイにおいてMAbの挙動に悪影響を及ぼすおそれがある。結果として、MAbの中には特定の免疫アッセイで試薬として用いられた場合に、同じエピトープに結合する他のものよりも優れているものがある。

【0013】

免疫アッセイは、酵素結合免疫吸着 (immunosorbant) 検定法 (ELISA)、あるいは放射免疫アッセイ (RIA) か、ELISPOT、スロットプロット、及びウェスタンプロットなどの免疫検出アッセイであってもよい。そのような技法の総合的案内として、例えば、Ausubel他(編) (1987) の「分子生物学の最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」John Wiley and Sons著、New York, N. Y.を参照。代替的に、免疫アッセイは、組織試料中のガストリンホルモンを視覚化する、免疫組織化学 (IHC) 染色法又は免疫蛍光 (IF) 手順であってもよい。例えば、「免疫アッセイの原理と実践 (Principles and Practice of Immunoassay)」(1991) Christopher P. Price and David J. Neoman (編), Stockton Press, New York, N. Y.を参照。

10

【0014】

G17のN末端領域及びC末端領域に特異的なモノクローナル抗体が記載されている。例えば、Azuma他著、Gastroenterologica Japonica (1986) 21 (4): 319-324; Ohning他著、Peptides (1994) 15 (3): 417-423; Fuerle他著、Pancreas (1995) 10 (3): 281-286; Kovacs他著、Peptides (1996) 17 (4): 583-587; Ohning他著、Am. J. Physiol. (1996) 271 (3 Pt 1): G470-476; Sipponen他著、(2002) Scand. J. Gastroenterol. 37 (7): 785-791を参照。しかしながら、これらの抗体のいずれも、単独又は組合せてのいずれかで、正常状態及び疾患状態の生体液で見いだされるガストリンホルモンの形のそれぞれを認識及び定量し得ることを示していない。

20

【0015】

抗ガストリンポリクローナル抗体は、ガストリン活性を阻害するのに有効であることが示されている (「ガストリンのC末端テトラペプチドに対する抗体を用いたインキュベーションによるガストリン活性の阻害 (Inhibition of gastrin activity by incubation with antibodies to the C-terminal tetrapeptide of gastrin)」Jaffe他著、Surgery (1969) 65 (4): 633-639)。また、非ヒト抗ガストリンポリクローナル抗体は、摂食による刺激なしに過剰なガストリンが産生される病的状態であるゾリンジャー・エリソン症候群を患っている患者の治療に応用されている。Hughes他著「ゾリンジャー・エリソン症候群におけるガストリン抗体を用いた治療 (Therapy with Gastrin Antibody in the Zollinger-Ellison Syndrome)」Hughes他著、Digestive Diseases (1976) 21 (3): 201-204を参照。しかしながら、これらのウサギ抗ガストリン抗体は「この患者では最善でも短期間の効果」しか有していなかった。(Hughes at p. 204)。

30

【0016】

近年、血清中のガストリンホルモンのアミド化対非アミド化の比が、個体の十二指腸潰瘍又は胃粘膜萎縮 (gastric atrophy) を発症する危険性プロファイルの指標を提供することが示唆されている。T. C. Wangの「胃腸管障害の診断及び治療 (Diagnosis and Treatment of gastrointestinal Disease)」と題する公開された米国特許出願第2003/0049689号を参照。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

これまでのところ、ガストリンホルモンのG17、G17-Gly、G34、及びG34-Gly形のそれぞれを、高感度に検出することができ、そして正確に認識することができるMAbは得られていない。そのうえさらに、本発明に至るまでは、生体液の試料中

50

のガストリンホルモンのこれらの形における、それぞれの量を正確に測定することはできなかった。診断検査するためのアッセイで本発明のM a bを用いることは、正常状態及び疾患状態でのガストリンホルモンの生物学をより正確に定義し、薬学的に使用されるM A b組成物ならびにガストリン関連疾患及び状態の予防及び治療法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0018】

[発明の概要]

本発明は、生体液試料中の抗体結合及び遊離を含むガストリンホルモンの全量を決定する方法を提供する。この方法は以下の工程、(a)患者からガストリンホルモン含有生体液試料を得る工程と、(b)該ガストリンホルモンのC末端エピトープに選択的に結合する固定化抗体を提供する工程と、(c)N末端配列ガストリンペプチドの存在下、該試料中の該ガストリンホルモンが該抗体に結合するのに適した条件で、該ガストリンホルモンに結合した該抗体の固定化複合体を生成させるために、該試料をインキュベートする工程と、(d)該固定化複合体を洗浄しN末端配列ガストリンペプチドを除去するために、及び該複合体を、ガストリンホルモンのN末端エピトープに選択的に結合し、検出可能なマーカー-抱合固定化抗体複合体を形成させるために、適した検出可能なマーカー-抱合抗体とともにインキュベートする工程と、(e)該検出可能なマーカー-抱合固定化抗体複合体を洗浄し、及び展開試薬とともにインキュベートする工程と、(f)該生体液試料中の該ガストリンホルモンの全量を決定するために、該展開試薬を測定する工程とを含む。

10

【0019】

本発明はまた、生体液試料中の遊離ガストリンホルモン量を決定する方法を提供する。この方法は、以下の工程を含む。(a)患者からガストリンホルモン含有生体液試料を得る工程と、(b)該ガストリンホルモンのN末端エピトープに選択的に結合する固定化抗体を提供する工程と、(c)該試料中の該ガストリンホルモンが該抗体に結合するのに適した条件で、該ガストリンホルモンに結合した該抗体の固定化複合体を生成させるために、該試料をインキュベートする工程と、(d)該固定化複合体を洗浄し、該抗体を含む未結合の構成成分を除去するために、及び該複合体を、該ガストリンホルモンに結合したC末端エピトープに選択的に結合するために、適した検出可能なマーカー-抱合抗体と反応させる工程と、(e)該検出可能なマーカー-抱合固定化抗体複合体を洗浄し、及び展開試薬とともにインキュベートする工程と、(f)該展開試薬を測定し、該生体液試料中の遊離ガストリンホルモン量を決定する工程。

20

30

【0020】

本発明はさらに、生体液試料中の結合ペプチド+遊離ペプチドの全量を決定する方法を提供し、ここでペプチドの少なくとも一部分は第一結合配列で可逆的に結合している。この方法は以下の工程を含む。(a)ペプチドを含有する生体液試料を得る工程と、(b)第一結合配列中に存在しない、ペプチドの第一エピトープに選択的に結合する抗体でコーティングした固体基質を提供する工程と、(c)第一結合配列を含むが第一エピトープは含まないペプチドフラグメントの存在下、ペプチドがこの抗体に結合するのに適した条件で、ペプチドと結合したこの抗体の複合体を産生するために、試料の一部をインキュベートする工程と、(d)未結合抗体及びペプチドフラグメントを除去するために、ウェルを洗浄し、及び複合体をペプチドの第二エピトープと選択的に結合するために、適した検出可能なマーカー-抱合抗体と反応させる工程と、(e)ウェルを洗浄し、及び該ウェルに展開試薬を添加する工程と、(f)生体液試料中の結合ペプチド+遊離ペプチドの全量を決定するために、展開した試薬を測定する工程。

40

【0021】

本発明はまた、ガストリンホルモン関連疾患又は状態を患っている患者のガストリンホルモン遮断治療を評価する方法も提供する。この方法は以下の工程を含む。a)治療前又は治療の初期段階で患者から生体液の第一の試料を得る工程と、b)免疫アッセイ法により第一の試料中のガストリンホルモンレベルを決定する工程と、c)治療すべき疾患又は状態、及び第一の試料中のガストリンホルモンレベルに基づいて診断する工程と、d)ガ

50

ストリンホルモンに結合する第一薬剤又は第一薬剤を生成する物質を、これがその *in vivo* 中の標的受容体に結合することを調節することを含む、患者に治療を施す工程と、
 e) 治療が有効であると思われる適した時間後、患者から生体液の第二の試料を得る工程と、
 f) 第二の試料の第一の取分中の、結合ガストリンホルモン及び遊離ガストリンホルモンを含む全ガストリンホルモンレベルを、免疫アッセイ (immunassay) 法により決定する工程であって、第二の試料の第一の分取量は (i) 第一薬剤が結合した任意のガストリンホルモンに置き換わる第二薬剤と、(ii) 第二薬剤と結合しない、固定化抗ガストリンホルモン抗体、とがインキュベートされて、決定される工程、洗浄し第二薬剤を除去する工程、及びガストリンホルモンに結合するが固定化抗体と競合しない検出可能な抗体を添加する工程、ガストリンホルモンに結合した固定化抗体を含む免疫複合体を形成する工程、続いてガストリンホルモンが検出可能な抗体と結合する工程、
 g) 免疫複合体中の検出可能な抗体の量を検出し、かつ、それにより第二の試料中の全ガストリンホルモン量を決定する工程、
 h) 第二の試料の第二の分取分で工程 (f) 及び工程 (g) を繰り返すことにより、遊離ガストリンホルモンレベルを決定するのに、工程 (f) のインキュベーションは第二薬剤を用いずに決定する工程、
 j) 患者におけるガストリンホルモン遮断治療の有効性を決定するために、第一の試料中の遊離ガストリンホルモンで求められた量と第二の試料中の遊離及び全ガストリンホルモンの量とを比較する工程。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

[発明の詳細な説明]

20

以下に、本明細書中で使用される場合の用語及び語句の定義を提供する。

【0023】

本明細書中、互換的に使用される場合、「ガストリンホルモン」又は「ガストリンホルモン形」は、任意の、生物学的に活性の及び/又は免疫学的に交差反応性のガストリンホルモンペプチドを意味する。ガストリンホルモンの主な形として、C末端でアミド化されているか又は遊離C末端を有するかに関わらないガストリン17 (G17) ; グリシン伸長型ガストリン17 (G17-Gly) ; C末端アミド化形及び遊離C末端を有する形の両方を含むガストリン34 (G34) 、ならびにグリシン伸長型ガストリン34 (G34-Gly) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0024】

30

本明細書中使用される場合、ガストリンホルモンの特定の形に対して「選択的」という用語は、抗体が、ガストリンホルモンの特定の形の特定の標的エピトープに対して特異的であるものの、標的エピトープを含むガストリンホルモンのそれぞれの形と結合することを意味する。例えば、成熟 (アミド化) G17のC末端は、成熟G17及びG34と共通である。したがって、成熟G17C末端で見いだされる標的のC末端エピトープに対して特異的であるMAbは、G17に対して (及びG34に対して) も選択的である。

【0025】

本明細書中使用される場合、試料中のガストリンホルモン形の「全量」は、遊離 (未結合) ガストリンホルモン形の量 + 複合化 (結合) ガストリンホルモン形の量の合計を意味する。複合化ガストリンは、試料中の抗体又は他のガストリン結合部分で結合されていてもよい。

40

【0026】

本明細書中使用される場合、「生体液」は、生物由来の物質を含む任意の液体を意味する。本発明で使用するのに好適な生体液として、動物、特に哺乳類、好ましくはヒト被検体の体液が挙げられる。体液は、任意の体液であってもよく、血液、血漿、血清、リンパ、脳脊髄液 (CSF) などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0027】

本明細書中使用される場合、「保存剤」は、生体液の試料又は生物成分を含む液体試料中のガストリンの時間による分解を減少させる、任意の薬剤、補充物、又は添加物を意味する。本発明の実施に有用な保存剤には、当該分野で既知である多くの保存剤のいずれも

50

が含まれ、例えばアジ化ナトリウム、EDTAなどの一般的な化学保存料、及び例えばPMSF（フェニルメチルスルホニルフルオリド）、及びアプロチニン（例えばトラジロール（Trasylol））などのプロテアーゼインヒビター、又は例えばヘパリンなどの生物保存料が挙げられるが、これらに限定されない。

【0028】

本明細書中使用される場合、「検査プレート」は任意の固体基質を意味し、その上で、複数の液体試料が本発明の方法に従って個別にアッセイされ得る。本明細書中使用される場合、検査プレートの「ウェル」は、プレートの試料受入場所として用いられる、検査プレートのある範囲を意味する。代表的には、検査プレートのウェルは、試料体積+アッセイ手順の任意の工程で添加される任意の緩衝液又は洗浄液の体積を受け入れかつ保持するの

10

【0029】

標的分子に適用される場合、そして本明細書中使用される場合、「測定する」とは、分析物又は標的分子の量を検出、定量、又は量を決定することを意味する。

【0030】

具体的には、本発明は、生体液中の特定の形のガストリンホルモンを測定するように意図された免疫酵素検定法（immunoenzymometric assay）（一般に「ELISA」又は酵素結合免疫吸着と呼ばれる）に用いるのに特に適したMAbを開示する。

【0031】

本発明の実施に有用なMAbには、ガストリン17（G17）のN末端に、アミノ酸配列pEGPWL E（配列番号5）内のエピトープで選択的に結合するMAbが含まれる。

20

【0032】

同じく本発明の実施に有用なMAbには、ガストリン17（G17）又はガストリン34（G34）のC末端に、アミノ酸配列EEAYGWMD F - NH₂（配列番号6）内のエピトープで選択的に結合するMAbが含まれる。

【0033】

別の態様において、本発明の実施に有用なMAbには、ヒトガストリン34（hG34）のN末端に、アミノ酸配列pELGPQG（配列番号7）内のエピトープで選択的に結合するMAbが含まれる。

【0034】

さらに別の態様において、本発明の実施に有用なMAbには、グリシン伸長型ガストリン17（G17-G1y）及びグリシン伸長型ガストリン34（G34-G1y）のC末端に、アミノ酸配列YGWMD F G（配列番号8）内のエピトープで選択的に結合するMAbが含まれる。

30

【0035】

本発明の実施に有用なMAbは、好ましくは、それらが約 $10^6 \sim 10^7 \text{ LM}^{-1}$ の結合定数（ K_a ）で選択的な結合を示すガストリンホルモン形に結合し、好ましくはMAbは、約 $10^7 \sim 10^8 \text{ LM}^{-1}$ 、さらにより好ましくは約 $10^8 \sim 10^9 \text{ LM}^{-1}$ 、なおさらに好ましくは約 $10^9 \sim 10^{10} \text{ LM}^{-1}$ 、そしてより一層好ましくは約 $10^{10} \sim 10^{11} \text{ LM}^{-1}$ 、そして最も好ましくは約 $10^{11} \sim 10^{12} \text{ LM}^{-1}$ の K_a でガストリンホル

40

【0036】

本発明の方法に従って分析されるべき試料は、好ましくは哺乳類からの生体液の試料であり、この試料は、検出、定量、又は決定されるべきペプチドの量を含有しているか、あるいは含有していると思われる。好ましくは、試料はガストリンホルモンを少なくとも1種のガストリンホルモン形で含有する。最も好ましくは、保存剤が試料に添加されていて試料混合物を形成しており、そして試料混合物は、哺乳類からの試料採取より約1分～約15分の間の時間内で凍結されている。

【0037】

本明細書中使用される場合、結合に「適した条件」は、抗体のその同種抗原への結合、

50

及びマーカ-酵素標識が検出剤として用いられる抗体と抱合する反応であるマーカ-酵素標識の酵素反応を許容する、温度、pH、及びイオン強度の条件を意味する。抗体抗原結合についての、及び各種マーカ-酵素反応についてのそのような適した条件は、当業者に既知であり、そして過度の実験を行うことなく日常的な方法で、各反応について具体的に決定され得る。

【0038】

本明細書中使用される場合、「検出可能なマーカ-抱合抗体」は、任意の標識化抗体を意味し、ここで標識は、例えば酵素標識などの検出可能な信号を提供するか、例えば放射能標識、酵素標識、蛍光若しくは発光標識などの検出可能な信号、又はアビジン抱合部分により検出可能なビオチン標識などの別々に検出され得る部分を提供することによりそれ自身

10

【0039】

本明細書中使用される場合、「検出可能なマーカ-抱合抗体複合体」は、その同種抗原と結合した、検出可能なマーカ-が抱合した抗体を含む複合体であり、同種抗原は例えばガストリンホルモンであってもよい。そのようなガストリンホルモン抗体複合体は、測定され得る検出可能な信号を提供し、そして検出可能な抗体の濃度に直接関連している。好適な濃度範囲にわたって、信号は検出可能なマーカ-抱合抗体複合体の濃度に直接比例する。

【0040】

本明細書中使用される場合、「展開試薬」は、抗体抱合酵素により展開される試薬を意味する。例えば、アルカリホスファターゼの展開試薬はpNPPであり得る。

20

【0041】

本発明は、全（結合及び遊離）ガストリンホルモンを測定するアッセイ法及びガストリンホルモン遮断治療の評価法を提供する。これらのアッセイ法を以下に記載する。患者におけるガストリンホルモン遮断治療の評価法は、1つの治療レジメンを続けるのかそれとも別のものにするかを決定する時機が患者の転帰にとって重要であり得る実際の臨床で特に価値がある。本発明の方法は、これらの臨床上の判断の基礎となる情報を提供する。本方法は、治療前又は治療の初期段階（例えば、米国特許第5,622,702号に記載されるような、ガストリンホルモンペプチド抱合ワクチンでの接種直後）のガストリンホルモンの測定を提供し、また、治療が効果を上げ始めたと期待される期間後の全及び/又は遊離ガストリンホルモンの1つ以上の測定を提供する。

30

【0042】

分析方法

以下は、ヒト血漿などの生体液中に存在する全（非複合化+抗体複合化）又は遊離（非複合化）ヒトガストリンホルモン（G17、G17-Gly、G34、又はG34-Gly）のいずれかを決定するための、アッセイされているガストリンホルモンの特定の分子形のC末端又はN末端に対するモノクローナル抗体及び/又はポリクローナル抗体を用いることによる、本発明の分析法（免疫酵素検定法）の記載である。あるいは、分子のC末端又はN末端に対するポリクローナル抗体の組合せが、分子のN末端又はC末端それぞれに対するモノクローナル抗体と組み合わせて用いられてもよい。

40

【0043】

以下に記載されるアッセイにおいて、NUNC Maxisorp、F96 ELISAプレート（カタログ番号439454）検査プレートを用い、また抗体コーティング溶液をホウ酸ナトリウム緩衝液（20mM、pH8.0、0.1%アジ化ナトリウム含有）で調製した。

【0044】

1. プレートコーティング：検査されるべき特定のヒトガストリン分子形に対して選択的な抗体を、最適濃度で、検査プレートのマイクロウェル表面にコーティングした。

【0045】

最適抗体濃度は、アッセイされるべき形の標準ガストリンホルモンの既知濃度を用いて

50

標準曲線を作ることにより決定し、標準曲線は必要とされる有用な濃度範囲にわたって、必要とされる感度と正確さを有する。G 17については、アッセイの有用なG 17濃度範囲は、一般に、バックグラウンド（約4 pM又はそれ未満）～約25 pM又は約50 pMまでである。しかしながら、ガストリン産生腫瘍の患者では、血漿ガストリンホルモンレベルは、800 pMもの高さ、又は1000 pM（1.0マイクロモル）でさえあり得る。必要とされる範囲にわたる適切な感度及び精度の決定は、過度の実験を行うことなく当業者により容易に決定され得る。

【0046】

2. プレート洗浄：コーティング溶液を除去して洗浄緩衝液（1ウェルあたり約400 μ l）を添加し、そして除去する。この洗浄サイクルを、必要とされる回数繰り返す。洗浄緩衝液は、0.010Mのリン酸緩衝液；0.0027Mの塩化カリウム、及び0.137Mの塩化ナトリウム（pH7.4、0.01%w/vのTriton X-100を含有）であった。プレート洗浄は自動化されてもよい（以下に記載されるアッセイでは、Lab Systems Wellwash 4 Mk2、Life Sciences International (UK) Ltd, Basingstoke, UK を用いた）。

10

【0047】

3. プレートブロッキング：タンパク質及び洗浄剤（コーティング緩衝液中1%のBSA/0.1%のTriton X-100）を含有するブロッキング緩衝液をマイクロウェルに添加する。プレートはこの形で貯蔵されてもよい。

【0048】

4. 試料及び標準の添加：プレートを上記に記載のとおり洗浄する。ウサギIgG（400 μ g/ml）、及びEDTA（3.4mM）を含有するアッセイ緩衝液（洗浄緩衝液で調製した1%のBSA、0.1%のウシ-グロブリン、及び200KIU/mlのアプロチニン）を各ウェルに添加する（100 μ l/ウェル）。検査標準（例えば標準ガストリンホルモンの量を増やしながらか追加していったガストリン欠乏血漿など）及び検査血漿試料をウェルに添加する（20 μ l/ウェル）。名目上4で一晩反応を進行させる。血清試料のガストリン欠乏は、試料を室温で一晩放置することにより、容易に達成される。

20

【0049】

全ガストリンホルモン（抗体結合ガストリンホルモンを含む）がアッセイされるべきこれらのアッセイにおいて、乖離ペプチドG17（1-9）（100 μ g/ml）は、アッセイ緩衝液、すなわちウサギIgGEDTA混合物中に含まれる。

30

【0050】

5. 抱合体の添加：洗浄に続いて、酵素標識と抱合した、アッセイされるべきガストリンホルモン形のN末端に対して特異的なモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を含有するアッセイ緩衝液、及びウサギIgG（100 μ g/ml）を各ウェルに添加する。マイクロプレートシェーカーを用いて震盪させながら、反応を室温（名目上+22）で進行させた。検出化合物の展開に用いるのに適した酵素基質の例として、アルカリホスファターゼについてニトロ-フェニルリン酸、又は西洋ワサビペルオキシダーゼについてテトラメチルベンジジンスルフォネート（TMBS）が挙げられる。色展開の程度は、吸光単位（AU、p-ニトロフェノールの場合は405nmで、TNBSの場合は450nmで読む）として読まれ（spread）、検査試料中に存在するG17の量を示しており、そして実際の濃度は、検査試料の吸光度を、濃度既知のガストリンホルモンを用いて作られた標準曲線に対して読むことにより決定される。

40

【0051】

7. 読み取り：十分なアッセイシグナルが得られたら、シグナルを、例えばマイクロプレート分光光度計又は蛍光光度計（fluorimeter）で測定する。

【0052】

8. データ処理：ガストリンホルモン形の既知標準溶液で得られたアッセイシグナルを用いて較正曲線（シグナル対濃度）を構築する。較正曲線を用いて、検査試料中のガスト

50

リンホルモン形の濃度を内挿する。

【 0 0 5 3 】

全ガストリンホルモン形及び遊離ガストリンホルモン形の量を決定する特定のアッセイプロトコルを以下に記載する。

【 0 0 5 4 】

全 G 1 7 の決定

このアッセイでは、ヒトガストリン 1 7 の C 末端に特異的な抗体で、検査プレートのマイクロウェル表面をコーティングした。プレート洗浄及びプレートブロッキングを、上記の一般法に記載されるとおりに行った。プレートを記載されるとおりに洗浄した。ウサギ Ig G (4 0 0 μ g / ml)、乖離ペプチド G 1 7 (1 9) (1 0 0 μ g / ml)、及び EDTA (3 . 4 mM) を含有するアッセイ緩衝液を各ウェルに添加した (1 0 0 μ L / ウェル)。検査標準 (0 - 4 . 1 - 1 0 . 2 - 2 6 . 6 - 6 4 - 1 6 0 - 4 0 0 - 1 0 0 0 pM の G 1 7 が添加されたガストリン欠乏血漿) 及び検査血漿試料をウェルに添加した (2 0 μ L / ウェル)。反応を、冷蔵庫中、名目上 4 で、一晚進行させた。洗浄に続いて、アルカリホスファターゼと抱合した、G 1 7 の N 末端に特異的なモノクローナル抗体、及びウサギ Ig G (1 0 0 μ g / ml) を含有するアッセイ緩衝液を各ウェルに添加した。洗浄に続いて、上記に記載されるとおり、色素生産性基質 (p N P P) を添加し、プレートをインキュベートして色を展開させ、そしてプレート読み取り機で読み取った。既知の標準 G 1 7 溶液で得られたアッセイシグナルを用いて較正曲線 (シグナル対濃度) を構築した。この較正曲線を用いて、検査試料中の G 1 7 濃度を内挿した。代表的な較正曲線を図 1 に示す。

【 0 0 5 5 】

遊離 G 1 7 の決定

ヒトガストリン 1 7 分子の N 末端に特異的な抗体で、検査プレートのマイクロウェル表面をコーティングした。プレート洗浄及びプレートブロッキングを、上記の一般法に記載されるとおりに行った。プレートを記載されるとおりに洗浄した。ウサギ Ig G (4 0 0 μ g / ml) を含有するアッセイ緩衝液 (洗浄緩衝液に調製した、1% の B S A、0 . 1 % のウシ - グロブリン及び 2 0 0 K I U / ml のアプロチニン) を添加して、マイクロプレートシェーカーを用いて震盪させながら、反応を室温 (名目上 + 2 2) で進行させた。洗浄に続いて、酵素標識としてのアルカリホスファターゼと抱合した、G 1 7 の C 末端に特異的なモノクローナル抗体、及びウサギ Ig G (1 0 0 μ g / ml) を含有するアッセイ緩衝液を各ウェルに添加した。マイクロプレートシェーカーを用いて震盪させながら、反応を室温 (名目上 + 2 2) で進行させた。洗浄に続いて、上記に記載されるとおり、色素生産性基質 (p N P P) を添加し、プレートをインキュベートして色を展開させ、そしてプレート読み取り機で読み取った。上記に記載される全 G 1 7 のアッセイのように、既知の標準 G 1 7 溶液で得られたアッセイシグナルを用いて較正曲線 (シグナル対濃度) を構築した。この較正曲線を用いて、検査試料中の G 1 7 濃度を内挿した。代表的な較正曲線を図 2 に示す。

【 0 0 5 6 】

全 G 1 7 - G 1 y 抗体の決定

上記に記載されるとおり、ヒトグリシン伸長型ガストリン 1 7 分子の C 末端に特異的な抗体で、検査プレートのマイクロウェル表面をコーティングした。プレート洗浄及びプレートブロッキングを、上記の一般法に記載されるとおりに行った。プレートを記載されるとおりに洗浄した。ウサギ Ig G (4 0 0 μ g / ml)、乖離ペプチド G 1 7 (1 9) (1 0 0 μ g / ml)、及び EDTA (3 . 4 mM) を含有するアッセイ緩衝液 (洗浄緩衝液で調製した、1% の B S A、0 . 1 % のウシ - グロブリン及び 2 0 0 K I U / ml のアプロチニン) を各ウェルに添加した (例えば 1 0 0 μ L / ウェル)。検査標準 (0 - 4 . 1 - 1 0 . 2 - 2 6 . 6 - 6 4 - 1 6 0 - 4 0 0 - 1 0 0 0 pM の G 1 7 - G 1 y で G 1 7 - G 1 y が添加されたガストリン欠乏血漿) 及び検査血漿試料をウェルに添加した (例えば 2 0 μ L / ウェル)。反応を、名目上 4 で、一晚進行させた。続く工程は、全 G

10

20

30

40

50

17のアッセイで上記に記載されたままであった。

【0057】

遊離G17-Gly抗体の決定

G17-Gly分子のN末端に特異的な抗体で、検査プレートのマイクロウェル表面をコーティングした。プレート洗浄及びプレートブロッキングを、上記の一般法に記載されるとおりに行った。記載される通りにプレートを洗浄した。ウサギIgG(400µg/ml)を含有するアッセイ緩衝液(洗浄緩衝液で調製した、1%のBSA、0.1%のウシ-グロブリン及び200KIU/mlのアプロチニン)(例えば100µl/ウェル)、続いて試料/標準(例えば50µl/ウェル)を添加した。マイクロプレートシェーカーを用いて震盪させながら、反応を室温(名目上+22)で進行させた。洗浄に続いて、アルカリホスファターゼと抱合した、G17-GlyのC末端に特異的なモノクローナル抗体、及びウサギIgG(100µg/ml)を含有するアッセイ緩衝液を各ウェルに添加した。マイクロプレートシェーカーを用いて震盪させながら、反応を室温(名目上+22)で進行させた。続く工程は、遊離G17のアッセイで上記に記載されたまさにそのままであった。

10

【0058】

G34の決定

ヒトガストリン34のN末端に特異的な抗体で、検査プレートのマイクロウェル表面をコーティングした。プレート洗浄及びプレートブロッキングを、上記の一般法に記載されるとおりに行った。記載される通りにプレートを洗浄した。ウサギIgG(400µg/ml)を含有するアッセイ緩衝液(洗浄緩衝液で調製した、1%のBSA、0.1%のウシ-グロブリン及び200KIU/mlのアプロチニン)(例えば100µl/ウェル)、続いて試料/標準(例えば50µl/ウェル)を添加した。マイクロプレートシェーカーを用いて震盪させながら、反応を室温(名目上+22)で進行させた。洗浄に続いて、アルカリホスファターゼと抱合した、G34のC末端に特異的なモノクローナル抗体、及びウサギIgG(100µg/ml)を含有するアッセイ緩衝液を各ウェルに添加して、マイクロプレートシェーカーを用いて震盪させながら、反応を室温(名目上+22)で進行させた。色素生産性基質(pNPP)の添加、そしてプレート読み取り機を用いたプレートウェル中の試料シグナルの読み取り、及び続くデータ処理は上記に記載されるとおりであった。既知の標準G34溶液で得られたアッセイシグナルを用いて較正曲線(シグナル対濃度)を構築する。この較正曲線を用いて、検査試料中のG34濃度を内挿する。

20

30

【実施例】

【0059】

〔実施例1〕

既知量のガストリン17を添加してあるガストリン欠乏血清試料における、全ガストリン17の決定。

血清を一晩室温に放置して、存在するガストリンホルモンを内因性プロテアーゼにより完全に分解させることにより、ガストリンホルモンを欠乏させた。

【0060】

アッセイ内の精度と確度を決定するために、既知量の標準ガストリン17(G17)を、複製した分取量のガストリン欠乏血清試料に添加して、表1に示される正常濃度とした。抗ガストリンホルモン抗体含有血清試料についてと同様な手順で、N末端ガストリンペプチドを用いて全G17についてアッセイを行った。N末端ガストリンペプチドG17(1-9)を、上記に記載される通り、100µg/mlの濃度で、試料及び標準の添加の工程で添加した。結果は、表1に提供されるが、アッセイがELISA法の許容限度内でG17を正確に定量したことを示し、このELISA限度は、+20%の相対誤差である。より大事なことは、患者で通常見られる濃度(上記に記載されるとおり)である100pM以下のG17濃度で、アッセイがもっとも正確であることである。

40

【0061】

50

【表 1】

全ガストリン17アッセイ

	ガストリン17濃度 (pM)				
	7.50	15.00	100.0	600.0	720.0
平均	7.5	14.3	99.3	717.1	814.1
s d	0.8	0.9	1.7	16.2	7.7
CV%	11.2	6.5	1.7	2.3	0.9
RE%	0.0	-4.7	-0.7	19.5	13.1

n = 6 6つの複製した試料をアッセイした

s d 標準偏差

CV 変動係数 (丸め前に計算)

RE 相対誤差 (丸め後に計算)

【0062】

〔実施例2〕

既知量のガストリン17を添加してあるガストリン欠乏血清試料における、遊離ガストリン17の決定。

このアッセイは、遊離ガストリン17 (G17) の決定について上記の「アッセイ手順」に記載された方法に従って行った。結果は、表2に提供されるが、アッセイがELISA法の許容限度内で遊離G17を正確に定量したことを示す。より大事なことは、患者に通常見られる濃度である100 pM以下のG17濃度で、アッセイがもっとも正確であることである。

【0063】

【表 2】

遊離ガストリン17アッセイ
アッセイ内精度及び確度データ

	遊離ガストリン17濃度 (pM)				
	7.50	15.00	100.0	600.0	900.0
平均	7.55	13.41	94.01	556.6	892.8
s d	1.67	1.26	5.47	43.01	112.1
CV%	22.2	9.4	5.8	7.7	12.6
RE%	0.7	-10.6	-6.0	-7.2	-0.8

n = 9 9つの複製した試料をアッセイした

s d 標準偏差

CV 変動係数 (丸め前に計算)

RE 相対誤差 (丸め後に計算)

【0064】

〔実施例3〕

ガストリン17安定性

ガストリンの室温 (約22)での安定性を、試料を調製して15 pM、100 pM、及び600 pMの既知G17濃度にした直後 (0時間試料)、及びベンチ上室温で2時間後の、全G17を測定することにより、上記に記載されるとおりの全ガストリンアッセイで評価した。結果は、試料それぞれでG17濃度が実質的に減少していることを実証し、以下の表3に示される。このことは、ガストリンホルモンについて試料を検査する本発明のアッセイ方法を用いて得られたガストリン値の確度に対して、血漿が患者血液試料から調製されるときに温度上昇への曝露を最小限にすることを含み、適切な試料取り扱い技術の重要性を実証する。

【0065】

10

20

30

40

【表 3】

全ガストリン17アッセイ

ヒト血漿中のガストリン17の室温(約22℃)での安定性

		測定されたガストリン17濃度 (pM)		
		15	100	600
0時間	平均	11.6	89.4	605.5
	s d	2.8	4.3	25.0
	CV%	23.8	4.8	4.1
	RE%	-22.7	-10.6	0.9
2時間	平均	5.5	59.1	400.5
	s d	3.1	2.0	19.7
	CV%	55.2	3.5	4.9
	RE%	-63.3	-40.9	-33.3

a 平均結果をベースラインとして用いた

s d 標準偏差

CV 変動係数(丸め前に計算)

RE 相対誤差(丸め後に計算)

【0066】

[参照としての援用]

本明細書中に記載される全ての特許及び文献は、その全体が参照として本明細書により明示的に援用される。

【0067】

[ハイブリドーマ細胞株の寄託]

本発明の特定MAbを産生する以下のハイブリドーマは、2004年3月25日に、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC、バージニア州、マナサス)の寄託となった。

1. MAb 400-1 産生ハイブリドーマ400-1は寄託番号****が割り当てられた。

2. MAb 400-2 産生ハイブリドーマ400-2は寄託番号****が割り当てられた。

3. MAb 400-3 産生ハイブリドーマ400-3は寄託番号****が割り当てられた。

4. MAb 400-4 産生ハイブリドーマ400-4は寄託番号****が割り当てられた。

5. MAb 401-2 産生ハイブリドーマ401-2は寄託番号****が割り当てられた。

6. MAb 445-1 産生ハイブリドーマ445-1は寄託番号****が割り当てられた。

7. MAb 445-2 産生ハイブリドーマ445-2は寄託番号****が割り当てられた。

8. MAb 458-1 産生ハイブリドーマ458-1は寄託番号****が割り当てられた。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】全ガストリン17についての代表的な較正曲線であり、色素生産性基質としてテトラメチルベンジジンスルフォネート(TMB S)を用いた酵素触媒展開に続いて450nm(A₄₅₀)での吸光度に対してプロットされたピコモルオーダーのガストリン濃度を示す。

【図2】遊離ガストリン17についての代表的な較正曲線であり、上記のように450nm(A₄₅₀)での吸光度に対してプロットされたピコモルオーダーのガストリン濃度を示す。

10

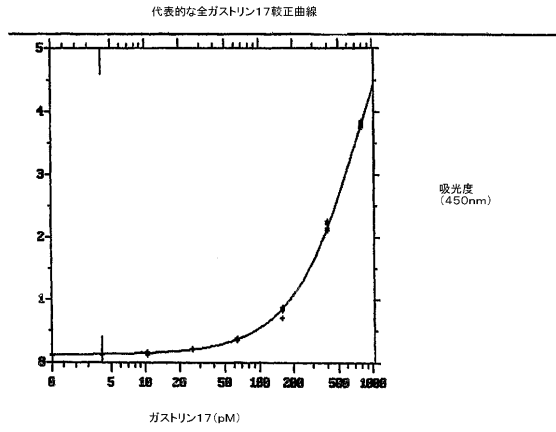
20

30

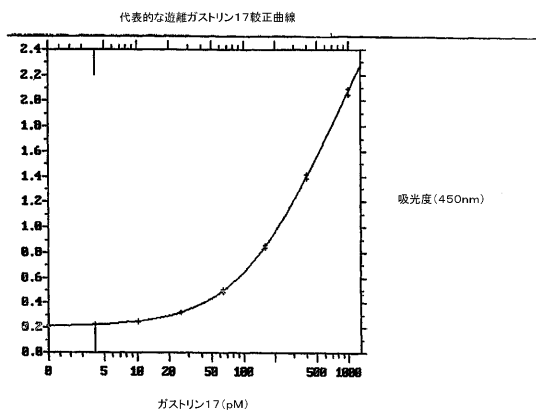
40

50

【図1】



【図2】



フロントページの続き

- (72)発明者 リトル, ジョン
イギリス国 ピーイー 17 5 エイチエス ケムブリッジ州, ハンティンドン, ピー・オー・ボックス 2
- (72)発明者 マクルーリン, ロレイン
イギリス国 ピーイー 17 5 エイチエス ケムブリッジ州, ハンティンドン, ピー・オー・ボックス 2

審査官 廣田 健介

- (56)参考文献 国際公開第 02 / 3 9 1 2 3 (W O , A 1)
特表平 0 4 - 5 0 3 0 7 2 (J P , A)
特表 2 0 0 4 - 5 1 7 3 2 2 (J P , A)
特表 2 0 0 2 - 5 4 3 4 3 3 (J P , A)
特表平 1 0 - 5 0 9 7 9 5 (J P , A)
菅野, ホルモンと臨床, 1 9 9 8 年, Vol. 46, 3 5 4 - 3 5 8
赤井, 日本内分泌学会誌, 1 9 8 8 年, Vol. 64, 1065-1080

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
G01N 33/48-33/98
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	胃泌素激素免疫分析		
公开(公告)号	JP4689597B2	公开(公告)日	2011-05-25
申请号	JP2006509465	申请日	2004-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	埃弗顿有限公司		
申请(专利权)人(译)	雅富顿公司		
当前申请(专利权)人(译)	受体生物油墨.		
[标]发明人	グリムズステフェン リトルジョン マクルーリンロレイン		
发明人	グリムズ,ステフェン リトル,ジョン マクルーリン,ロレイン		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/26 G01N33/537 G01N33/543 G01N33/68 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/74 G01N2333/595		
FI分类号	G01N33/53.B		
优先权	60/458244 2003-03-28 US		
其他公开文献	JP2006521569A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于检测和定量样品中包含总胃泌素激素和游离胃泌素激素的胃泌素激素的测定法。提供了适用于使用生物流体样品如哺乳动物，特别是人类受试者的血液，血浆或其他体液进行的ELISA型非均相测定。G17和G34的游离和总量的生物流体样品中的方法，以及甘氨酸-延长G17和甘氨酸延长的G34的游离和总量的准确测定。还提供了使用胃泌素激素免疫测定法确定适合患有胃泌素激素相关疾病或病症的患者的治疗方法。

全ガストリン17アッセイ

	ガストリン17濃度 (pM)				
	7.50	15.00	100.0	600.0	720.0
平均	7.5	14.3	99.3	717.1	814.1
sd	0.8	0.9	1.7	16.2	7.7
CV%	11.2	6.5	1.7	2.3	0.9
RE%	0.0	-4.7	-0.7	19.5	13.1

n=6 6つの複製した試料をアッセイした