

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-542723

(P2008-542723A)

(43) 公表日 平成20年11月27日(2008.11.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577	B

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)

(21) 出願番号 特願2008-513688 (P2008-513688)
 (86) (22) 出願日 平成18年5月24日 (2006. 5. 24)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年1月15日 (2008. 1. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/020154
 (87) 国際公開番号 W02006/127850
 (87) 国際公開日 平成18年11月30日 (2006. 11. 30)
 (31) 優先権主張番号 60/684, 239
 (32) 優先日 平成17年5月24日 (2005. 5. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507316789
 ベックマン コールター, インコーポレ
 イテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 928
 34, フラートン, エヌ. ハーバー
 ブールバード 4300, メール コ
 ード エー-42-シー
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

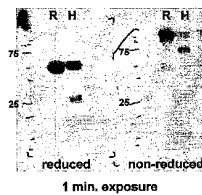
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ミュラー管ホルモンについての免疫アッセイおよび抗体

(57) 【要約】

本発明は、サンプル、例えば、霊長類、げっ歯類、ウマ
 またはウシサンプルなどの哺乳類サンプル中の抗ミュラ
 ー管ホルモン (AMH) の量を測定するための組成物お
 よび方法を開示する。本明細書において、本組成物お
 よび方法はまた、AMHのタンパク質分解に対して安定で
 あるAMH上のエピトープと結合する抗体を提供する (図 I A) 。 1つの実施形態において、本発明は、第1の
 抗体および第2の抗体を含む組成物を提供する。この組
 成物は、抗ミュラー管ホルモンの成熟領域において、第
 1の抗体が第1のエピトープと結合し、第2の抗体が第
 2のエピトープと結合する。

AMH antibody 7A



Conclusion

AB 7A:

- recognizes pro-region of rat and human AMH, both under reduced and non-reduced conditions.
- shows additional band after additional cleavage of human AMH
- after longer exposure, the mature region is faintly seen under non-reduced conditions

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

第 1 の抗体および第 2 の抗体を含む組成物であって、抗ミューラー管ホルモンの成熟領域において、第 1 の抗体が第 1 のエピトープと結合し、第 2 の抗体が第 2 のエピトープと結合する組成物。

【請求項 2】

前記第 1 の抗体および前記第 2 の抗体がモノクローナル抗体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記第 1 の抗体と結合している固体支持体をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

前記固体支持体が、マイクロタイタープレート、コロイド状金属粒子、酸化鉄粒子、ラテックス粒子および高分子ビーズからなる群から選択されるタンパク質結合表面を含む、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

標識と結合している前記第 2 の抗体をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記標識が、化学発光剤、比色分析剤、エネルギー移動剤、酵素、蛍光剤または放射性同位元素を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記抗ミューラー管ホルモンが霊長類、げっ歯類、ウマおよびウシの抗ミューラー管ホルモンからなる群から選択される哺乳類抗ミューラー管ホルモンを含む、請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 8】

前記霊長類抗ミューラー管ホルモンがヒト抗ミューラー管ホルモンを含み、前記げっ歯類抗ミューラー管ホルモンがマウスまたはラットの抗ミューラー管ホルモンを含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

抗ミューラー管ホルモンを含有するサンプル中の抗ミューラー管ホルモンの量を測定する方法であって、

30

(a) 抗ミューラー管ホルモンを含有するサンプルを、既知量の標識抗ミューラー管ホルモンと混合して、スパイクサンプルを作製するステップと、

(b) 該スパイクサンプル中の該抗ミューラー管ホルモンおよび該標識抗ミューラー管ホルモンを抗体と結合させるステップであって、該抗体が、該抗ミューラー管ホルモンの成熟領域と結合して複合体を生じ、そして該標識抗ミューラー管ホルモンの成熟領域と結合して標識複合体が生じるステップと、

(d) 該標識複合体の量を測定するステップと、

(e) 該サンプル中の抗ミューラー管ホルモンの量を算出するステップと

を含む方法。

【請求項 10】

前記抗体と結合している固体支持体をさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記固体支持体がマイクロタイタープレート、コロイド状金属粒子、酸化鉄粒子、ラテックス粒子および高分子ビーズからなる群から選択されるタンパク質結合表面を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記標識抗ミューラー管ホルモンが、化学発光剤、比色分析剤、エネルギー移動剤、酵素、蛍光剤および放射性同位元素からなる群から選択される標識を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

50

前記抗ミューラー管ホルモンが、霊長類、げっ歯類、ウマおよびウシの抗ミューラー管ホルモンからなる群から選択される哺乳類抗ミューラー管ホルモンを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

抗ミューラー管ホルモンを含有するサンプル中の抗ミューラー管ホルモンの量を測定する方法であって、

(a) 第 1 の抗体を抗ミューラー管ホルモンと結合させるステップであって、該第 1 の抗体が該抗ミューラー管ホルモンの成熟領域中の第 1 のエピトープと結合するステップと、

(b) 第 2 の抗体を抗ミューラー管ホルモンと結合させるステップであって、該第 2 の抗体が該抗ミューラー管ホルモンの成熟領域中の第 2 のエピトープと結合し、それによって、結合している第 2 の抗体の量が生じるステップと、

(c) 結合している該第 2 の抗体の量を測定するステップと、

(d) 該サンプル中の抗ミューラー管ホルモンの量を算出するステップとを含む方法。

【請求項 15】

前記第 1 の抗体と結合している固体支持体をさらに含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記固体支持体が、マイクロタイタープレート、コロイド状金属粒子、酸化鉄粒子、ラテックス粒子および高分子ビーズからなる群から選択されるタンパク質結合表面を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記第 2 の抗体と結合している標識をさらに含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

前記標識が化学発光剤、比色分析剤、エネルギー移動剤、酵素、蛍光剤または放射性同位元素を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記抗ミューラー管ホルモンが、霊長類、げっ歯類、ウマおよびウシの抗ミューラー管ホルモンからなる群から選択される哺乳類抗ミューラー管ホルモンを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 20】

(a) 抗ミューラー管ホルモンの成熟領域と結合する、第 1 の抗体および第 2 の抗体であって、該抗ミューラー管ホルモンの成熟領域において、該第 1 の抗体が第 1 のエピトープと結合し、該第 2 の抗体が第 2 のエピトープと結合する、第 1 の抗体および第 2 の抗体と、

(b) 該第 1 の抗体と結合している固体支持体と、

(c) 該第 2 の抗体と結合している標識と、

を含む、サンプル中の抗ミューラー管ホルモンの量を測定するための組成物。

【請求項 21】

前記抗ミューラー管ホルモンが霊長類、げっ歯類、ウマおよびウシの抗ミューラー管ホルモンからなる群から選択される哺乳類抗ミューラー管ホルモンを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記固体支持体が、マイクロタイタープレート、コロイド状金属粒子、酸化鉄粒子、ラテックス粒子および高分子ビーズからなる群から選択されるタンパク質結合表面を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記標識が、化学発光剤、比色分析剤、エネルギー移動剤、酵素、蛍光剤または放射性同位元素を含む、請求項 20 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

(発明の分野)

本発明は、概して、生体化合物を測定する免疫アッセイおよび方法に関する。詳しくは、本発明は、サンプル、例えば、ヒト、マウスまたはラットサンプルなどの哺乳類サンプル中の抗ミュラー管ホルモン(AMH)を測定する新規方法に関する。特に、抗ミュラー管ホルモンの成熟領域と結合する抗体を提供する。

【背景技術】

【0002】

(関連技術の詳細)

抗ミュラー管ホルモン(AMH)は、ミュラー管阻害物質(MIS)としても知られ、TGF- β および種々のインヒピンおよびアクチピン糖タンパク質を含むトランスフォーミング増殖因子(TGF β)スーパーファミリーに属する140キロダルトン(kDa)の二量体の糖タンパク質ホルモンである(Teixeiraら、2001年)。このスーパーファミリーのすべてのメンバーが二量体の糖タンパク質であり、すべてが組織増殖および分化の調節に関与している。AMHはその他のTGF β タンパク質と共通して、短いシグナル配列と、それに続くホモ二量体を形成するプレプロホルモンを含む大きな前駆体として合成される。分泌前に、成熟ホルモンがグリコシル化および二量体化を受けて、ジスルフィド結合している同一の70kDaの単量体サブユニットからなる140kDaの二量体を生じ、各単量体は、N末端ドメイン(「プロ」領域とも呼ばれる)およびC末端ドメイン(「成熟」領域とも呼ばれる)を含む。その他のTGF β スーパーファミリーメンバーとは対照的に、AMHは全生体活性に達するようC末端ドメインの活性を増強するために、N末端ドメインを必要とすると考えられている(Wilsonら、1993年)。次いで、細胞質移行の間に、5~20%の間のAMHが、70kDaの単量体のN末端ドメイン(プロ領域)とC末端ドメイン(成熟領域)の間の特定の部位で切断され、58kDa(プロ領域)および12kDa(成熟領域)の2つのポリペプチドを形成する。単量体のこれら2つの部分は非共有結合を保つ。AMHをコードするヒト遺伝子は配列決定され、単離されており、染色体19の短腕に位置する(Picardら、1986年)。AMHの特異的受容体の構造も、単離され、特性決定されている(diClementeら、1994年; Barreandsら、1995年)。AMHは、種を超えて、11~12個の保存シスチン残基を保持し、そのうち7個は成熟領域に位置する。この領域は種間で最大程度のアミノ酸配列相同性を示し、最後の112個の残基のうち108個がラットとヒト配列間で保存されている(Leeら、1993年)。

【0003】

AMHは、発達の際に性分化において重要な役割を有している。AMHは、男性では精巣のセルトリ細胞によって、女性では卵巣の顆粒膜細胞によって産生される。男性では、胎児発達の間、睾丸のセルトリ細胞からのAMHの分泌がミュラー管の退化、ひいては、男性生殖器官の正常な発達にとって不可欠である(Piconら、1969年)。ミュラー管は、女性では、子宮、卵管および膈の上部の原基である。男性では、セルトリ細胞によるAMHの分泌は、胚発生の際に始まり、一生を通じて継続する。レベルは、思春期後に低下し、比較的低い思春期後の値までゆっくりと低下する(Teixeiraら、2001年)。女性では、血清AMHは、男性と比較して比較的低いレベルで維持される。思春期後、月経周期が始まると、循環AMHは一生を通じてゆっくりと低下し、閉経期には検出不能となる。マウスでは、AMH機能の消失が、卵胞の喪失の増大および卵巣周期の早期停止を引き起こす(Durlingerら、1999年)。

【0004】

ヒトにおける血清AMHを測定するためのいくつかの臨床適用が同定されている。これらの中に、小児における半陰陽障害(Leeら、2003年)、早発思春期および遅発性思春期、停留睾丸、無睾丸症の診断ならびに男性生殖腺機能の評価(Teixeiraら、2001年)がある。その他の可能性がある適用として、女性における閉経前後の推移の調査および顆粒膜細胞癌患者の検出およびモニタリングが挙げられる(Longら、2

10

20

30

40

50

000年)。最近の研究によって、AMHは女性における卵巣予備能力および生殖能力の評価の循環マーカーとして可能性を有することがわかった(van Rooijら、2002年; te Veldeら、2002年; Gruijtersら、2003年)。AMHは、長い年月、難解な分析物として記載されることがあったが、今では通常の臨床マーカーとしてのその可能性に相当な関心がある。

【0005】

ほとんどすべてのこれまでのAMH調査研究は、2種のイムノアッセイのうち一方を用いて実施されてきた。Hudsonらによって開発された一方のアッセイ(Hudsonら、1990年)は、ヒト組換えAMHに対する2種のモノクローナル抗体を用い、これらは双方とも分子のプロ領域中のエピトープを対象とする。幼児から成人期のヒトにおいてAMHを測定するためのこのアッセイの使用は、Leeら(1996年)によって報告されている。Leeら(1996年)はまた、-20℃で保存した場合に最大2年間または最高3回の凍結融解サイクルの間安定であるが、2年の保存を超えると、測定される値は2~3倍高まり、3回の凍結融解サイクルの後には50%以上減少すると報告している。さらに、Leeら(1996年)は、Hudsonアッセイに用いた抗体はAMHのカルボキシ末端断片(成熟領域)を認識せず、全長のプロセシングされていないヒトAMHに高度に特異的であるが(プロセシングされていないとは、70kDaの単量体のプロおよび成熟領域間で切断されていないことを意味する)、プロセシングされていないタンパク質に対してよりもアミノ末端断片(プロ領域)に対してかなり低い親和性を有すると報告している。したがって、Leeら(1996年)によって報告されたAMH濃度の個々の変動のいくらかは、*in vivo*で生じるAMHタンパク質のプロセシング度の相違に起因する可能性がある。Leeら(1996年)はまた、Hudsonアッセイ抗体は非ヒト霊長類ならびにヒトAMHを認識するが、ウシまたはげっ歯類AMHを認識しないと報告している。AMH調査研究に用いられる第2のアッセイは、一对のモノクローナル抗体を用い、その一方はヒトAMHのプロ領域中のエピトープに対するものであり、もう一方は成熟領域中のエピトープに対するものである(Longら、2000年)。第3の、より最近記載されたアッセイでは、プロ領域に対する2種のモノクローナル抗体を用いる(Al-Qahataniら、2005年)。

【0006】

現在利用可能なアッセイを用いて測定されるサンプル中のAMHのタンパク質分解も報告されており、その結果、信頼性のある結果を得るには、サンプル収集および保存に特に細心の注意が必要であり得る。AMHのプロ領域は溶液中でのインキュベーションの間のタンパク質分解切断の対象である(Cateら、特許文献1)。AMHの成熟領域は、1つにはその複数のシスチン残基のためにプロ領域と比較してタンパク質分解に対してより安定である。

【0007】

先のAMHアッセイでは、ヒトAMHを測定するが、おそらくはプロ領域のアミノ酸配列が種間で相当異なるために、げっ歯類サンプル中のAMHを測定するためには使用できない。マウス、ラット、ヒト、ウシおよびニワトリAMHにおけるプロ領域間のアミノ酸配列全体の相同性は、37~89%とさまざまである(GenBank、National Centers for Biotechnology Information (NCBI) genetic database)。複数の種、例えば、マウスおよびラットならびにヒトなどの哺乳類種においてAMHを測定するために使用できるアッセイは、当技術分野ではまだ利用可能でない。臨床適用の他に、このようなアッセイは、AMH測定の種々の臨床およびその他の適用に関連する研究において有用な適用を有する。さらに、AMHの測定の適用は、サンプル中のAMHの安定かつ正確な測定された値、例えば、AMHのタンパク質分解によって影響を受けないAMH測定値を提供するアッセイから恩恵を受ける。

【0008】

本発明は、サンプル中のAMHを測定するための組成物および方法、ならびにAMHの

10

20

30

40

50

成熟領域と結合する抗体を提供する。本発明はまた、生体サンプル、例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、ウシおよびウマサンプルなどの哺乳類サンプル中のAMHを測定するための組成物および方法を提供する。さらに、本発明は、測定されるAMHの量がサンプルにおけるAMHのタンパク質分解によって影響を受けない、サンプル中のAMHを測定するための組成物および方法を提供する。したがって、本発明は当技術分野におけるこれらの長年の必要性および念願を満たす。

【特許文献1】米国特許第5,359,033号明細書

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の要旨)

本発明は、サンプル中の抗ミュラー管ホルモン(AMH)を測定するための組成物および方法を開示する。

【0010】

本発明の一実施形態は、第1の抗体および第2の抗体を含む組成物であって、抗ミュラー管ホルモンの成熟領域において、第1の抗体が第1のエピトープと結合し、第2の抗体が第2のエピトープと結合する組成物を開示する。

【0011】

さらなる実施形態は、抗ミュラー管ホルモンを含有するサンプルを、既知量の標識抗ミュラー管ホルモンと混合してスパイクサンプルを作製するステップと、スパイクサンプル中の抗ミュラー管ホルモンと標識抗ミュラー管ホルモンを抗体と結合させるステップであって、抗体が抗ミュラー管ホルモンの成熟領域と結合して複合体を生じ、また、標識抗ミュラー管ホルモンの成熟領域と結合して標識複合体を生じるステップと、標識複合体の量を測定するステップと、サンプル中の抗ミュラー管ホルモンの量を算出するステップとを含む、抗ミュラー管ホルモンを含有するサンプル中の抗ミュラー管ホルモンの量を測定する方法を開示する。

【0012】

もう1つの実施形態は、第1の抗体を抗ミュラー管ホルモンと結合させるステップであって、第1の抗体が抗ミュラー管ホルモンの成熟領域中の第1のエピトープと結合するステップと、第2の抗体を抗ミュラー管ホルモンと結合させるステップであって、第2の抗体が抗ミュラー管ホルモンの成熟領域中の第2のエピトープと結合し、それによって結合している第2の抗体の量が生じるステップと、結合している第2の抗体の量を測定するステップと、サンプル中の抗ミュラー管ホルモンの量を算出するステップとを含む、抗ミュラー管ホルモンを含有するサンプル中の抗ミュラー管ホルモンの量を測定する方法を開示する。

【0013】

さらにもう1つの実施形態は、抗ミュラー管ホルモンの成熟領域と結合する第1の抗体および第2の抗体であって、抗ミュラー管ホルモンの成熟領域において第1の抗体が第1のエピトープと結合し、第2の抗体が第2のエピトープと結合する第1の抗体および第2の抗体と、第1の抗体と結合している固体支持体と、第2の抗体と結合している標識とを含む、サンプル中の抗ミュラー管ホルモンの量を測定する組成物を開示する。

【0014】

本発明のその他のおよびさらなる態様、特徴および利点は、以下の本発明の目下のところ好ましい実施形態の説明から明らかとなる。これらの実施形態は、開示目的で示される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

(発明の詳細な説明)

上記で列挙された本発明の特徴、利点および目的ならびに明らかとなるその他のものが得られ、詳細に理解され得よう、上記で短く要約された本発明のより詳しい説明を、添

10

20

30

40

50

付の図面中に示されるような特定の実施形態を参照することによって行うことができる。これらの図面は、本明細書の一部を形成する。しかし、添付の図面は本発明の好ましい実施形態を示すものであり、したがって、その範囲の制限と考えられるべきではないということは留意するべきである。

【0016】

本発明は、サンプル中の抗ミューラ管ホルモン（AMH）を測定するための組成物および方法を対象とする。

【0017】

本発明は、第1の抗体および第2の抗体を含む組成物であって、抗ミューラ管ホルモンの成熟領域において第1の抗体が第1のエピトープと結合し、第2の抗体が第2のエピトープと結合する組成物を開示する。このような抗体は、サンプル中のAMHの量を測定するイムノアッセイにおいて有用である。第1の抗体および第2の抗体はモノクローナル抗体であり得る。このような抗体はAMHの成熟領域中のエピトープと、または一部はAMHの成熟領域中に位置し、一部はAMHのプロ領域中にするエピトープと結合できる。一方の抗体の、そのエピトープとの結合がもう一方の抗体の結合を干渉しないよう、第1の抗体が結合する第1のエピトープは、第2の抗体が結合する第2のエピトープとは異なっているてもよい。第1の抗体および第2の抗体はまた抗体フラグメントを含み得る。

10

【0018】

一態様では、固体支持体を第1の抗体と結合させることができる。抗体は、当技術分野で公知の技術を用いてこのような固体支持体と結合させるか、その上にコーティングすることができる。固体支持体、あるいは、固相粒子の例として、タンパク質結合表面、例えば、マイクロタイタープレート、コロイド状金属粒子、酸化鉄粒子、ラテックス粒子、高分子ビーズが挙げられる。固体支持体または固相粒子のその他の例として、常磁性ビーズ、セルロース、アガロース、デキストランコーティング炭、フィコール、セファデックス、ガラスビーズ、セラミックビーズまたはタンパク質結合に適した当技術分野で公知のその他の不活性表面が挙げられる。

20

【0019】

もう1つの態様では、第2の抗体は標識と結合させることができるが、あるいは、第1の抗体および第2の抗体の双方を異なる標識と結合させることができる。このような標識は、当技術分野で公知の技術を用いて、抗体と結合またはコンジュゲートさせることができる。標識の代表的な種類として、化学発光剤、比色分析剤、エネルギー移動剤、酵素、蛍光剤または放射性同位元素が挙げられる。このような薬剤により、当技術分野で公知の方法を用いて測定される検出可能なシグナルが生じ、次いで、測定値を用い、標準技術を用いてサンプル中の分析物の量を算出する。化学発光剤の例として、酵素と反応した場合に化学発光エネルギーを生じる基質の存在下で化学発光シグナルを生じる酵素が挙げられる。このような酵素の例として、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）およびアルカリホスファターゼ（AP）が挙げられる。化学発光剤のその他の例として、非酵素的直接化学発光標識、例えば、アクリジニウムエステル系が挙げられる。比色分析剤の例として、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびアセチルコリンエステラーゼ（AChE）などの酵素が挙げられる。エネルギー移動剤の一例として、蛍光ランタニドキレートがあり、蛍光色素は蛍光剤として使用できる。代表的な放射性同位元素として、¹²⁵I、¹⁴Cおよび³Hが挙げられる。

30

40

【0020】

本発明のもう1つの実施形態では、本明細書において開示される組成物および方法は、哺乳類サンプル中の抗ミューラ管ホルモンの量を測定するために有用であり、これとしては、霊長類、げっ歯類、ウマまたはウシ抗ミューラ管ホルモンが挙げられる。霊長類抗ミューラ管ホルモンとしては、ヒト抗ミューラ管ホルモンが挙げられ、げっ歯類抗ミューラ管ホルモンとしては、マウスまたはラット抗ミューラ管ホルモンが挙げられる。測定される抗ミューラ管ホルモンを含有するサンプルは細胞溶解物もしくは培養培地などの生体サンプルまたは血清、血漿、脳脊髄液、唾液、尿、乳汁、精液もしくはその他の体液などの

50

体液であり得る。

【0021】

もう1つの実施形態は、抗ミュー管ホルモンを含有するサンプルを、既知量の標識抗ミュー管ホルモンと混合してスパイクサンプルを作製するステップと、スパイクサンプル中の抗ミュー管ホルモンと標識抗ミュー管ホルモンを抗体と結合させるステップであって、抗体が抗ミュー管ホルモンの成熟領域と結合して複合体を生じ、また、標識抗ミュー管ホルモンの成熟領域と結合して標識複合体を生じるステップと、標識複合体の量を測定するステップと、サンプル中の抗ミュー管ホルモンの量を算出するステップとを含む、抗ミュー管ホルモンを含有するサンプル中の抗ミュー管ホルモンの量を測定する方法を開示する。一実施形態では、このような方法は抗体と結合している固体支持体をさらに含み、固体支持体はタンパク質結合表面、例えば、マイクロタイプレート、コロイド状金属粒子、酸化鉄粒子、ラテックス粒子または高分子ビーズを含み得る。標識抗ミュー管ホルモンは、化学発光剤、比色分析剤、エネルギー移動剤、酵素、蛍光剤または放射性同位元素などの標識を含み得る。

10

【0022】

測定される抗ミュー管ホルモンは、哺乳類抗ミュー管ホルモン、例えば、ヒト抗ミュー管ホルモンなどの霊長類抗ミュー管ホルモン、ラットまたはマウス抗ミュー管ホルモンなどのげっ歯類抗ミュー管ホルモン、ウマおよびウシ抗ミュー管ホルモンを含み得る。

20

【0023】

本明細書に記載される実施形態は、競合型のイムノアッセイを含み得る種々の型のイムノアッセイに使用できる。競合であり得るイムノアッセイの例として、酵素イムノアッセイもしくは酵素結合免疫吸着測定法（EIAもしくはELISA）、蛍光イムノアッセイ、ラジオメトリックもしくはラジオイムノアッセイ（RIA）、磁気分離アッセイ（MSA）、ラテラルフローアッセイ、拡散イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、固体支持体と結合している分析物を用いる免疫吸着もしくは「抗原ダウン」アッセイまたは凝集アッセイが挙げられる。1つのこのようなアッセイでは、サンプルは未知量の測定されようとする分析物を含み、これは抗ミュー管ホルモンなどのタンパク質であり得る。分析物はまた抗原とも呼ぶこともできる。サンプルは既知量または固定量の標識分析物を用いてスパイクできる。次いで、スパイクサンプルを、分析物と結合する抗体とともにインキュベートし、その結果、サンプル中の分析物およびサンプルに加えられた標識分析物が、利用可能な抗体結合部位との結合について競合する。標識分析物は、サンプル中に存在する未標識分析物の相対濃度に応じて、程度の差はあるが、抗体結合部位と結合できる。したがって、抗体と結合している標識分析物の量を測定すると、サンプル中の未標識分析物の量に反比例する。次いで、当技術分野における標準技術を用いて、測定された標識分析物の量に基づいて最初のサンプル中の分析物の量を算出できる。

30

【0024】

もう1つの種類の競合イムノアッセイでは、分析物と結合する抗体は、リガンドと結合またはコンジュゲートでき、リガンドはサンプル中に添加されたさらなる抗体と結合する。このようなりガンドの一例としてフルオレセインが挙げられる。さらなる抗体は固体支持体と結合できる。さらなる抗体は、抗体と結合しているリガンドと結合し、この抗体が次いで分析物と、あるいは、標識分析物と結合し、大量複合体を形成し、これによって標識分析物と結合している標識によって生じるシグナルの単離および測定が可能となる。もう1つの種類の競合イムノアッセイでは、測定される分析物を固体支持体と結合させることができ、分析物と結合する抗体と、測定される分析物を含有しているサンプルの双方とともにインキュベートすることができる。抗体は、サンプル中の分析物の濃度に応じて、固体支持体と結合している分析物、またはサンプル中の分析物のいずれかと相対的比率で結合する。次いで、固体支持体と結合している分析物と結合する抗体を、標識と結合している別の抗体、例えば、抗マウスIgGと結合させる。次いで、標識から生じたシグナルの量を検出して、固体支持体と結合している分析物と結合している抗体の量を測定する。

40

50

このような測定値は、サンプル中に存在する分析物の量と反比例する。このようなアッセイは、マイクロタイプレート形式で使用できる。競合的であり得るもう1つのイムノアッセイとして、凝集アッセイが挙げられる。このようなアッセイでは、サンプル中の測定される分析物は、第1の固体支持体粒子、例えば、フィコールと結合している分析物と、抗分析物抗体の結合部位について競合する。抗体は、第2の固体支持体粒子と結合させるか、またはその上にコーティングすることができる。粒子間の架橋結合または凝集は、第1の固体支持体粒子と結合している分析物分子が、第2の固体支持体粒子と結合している抗体分子と結合して、共同凝集反応格子の固まりを形成すると生じる。あるいは、抗体分子は、サンプル中の遊離分析物と結合し、その結果、凝集量はサンプル中の分析物の量に反比例する。凝集量は標準技術、例えば、分光光度法を用いて測定できる。

10

【0025】

本発明のさらなる実施形態は、第1の抗体を抗ミュー管ホルモンと結合させるステップであって、第1の抗体が抗ミュー管ホルモンの成熟領域中の第1のエピトープと結合するステップと、第2の抗体を抗ミュー管ホルモンと結合させるステップであって、第2の抗体が抗ミュー管ホルモンの成熟領域中の第2のエピトープと結合し、それによって結合している第2の抗体の量を作製するステップと、結合している第2の抗体の量を測定するステップと、サンプル中の抗ミュー管ホルモンの量を算出するステップとを含む、抗ミュー管ホルモンを含有するサンプル中の抗ミュー管ホルモンの量を測定する方法を開示する。一態様では、固体支持体を第1の抗体と結合させることができる。固体支持体はタンパク質結合表面、例えば、マイクロタイプレート、コロイド状金属粒子、酸化鉄粒子、ラテックス粒子または高分子ビーズを含み得る。もう1つの態様では、標識を第2の抗体と結合させることができる。可能性のある標識として、化学発光剤、比色分析剤、エネルギー移動剤、酵素、蛍光剤または放射性同位元素が挙げられる。

20

【0026】

本明細書に開示される本発明の実施形態を用いて、分析物を、分析物上の種々のエピトープと結合する抗体の間に結合させるか、サンドイッチできる、イムノメトリック、「ツェーサイト」または「サンドイッチ」イムノアッセイと呼ばれるイムノアッセイを実施できる。このようなイムノアッセイの代表的な例として、酵素イムノアッセイまたは酵素結合免疫吸着測定法（EIAまたはELISA）、免疫放射線測定法（IRMA）、蛍光イムノアッセイ、ラテラルフローアッセイ、拡散イムノアッセイ、免疫沈降アッセイおよび磁気分離アッセイ（MSA）が挙げられる。1つのこのようなアッセイでは、「捕捉」抗体として記載できる第1の抗体を、固体支持体、例えば、タンパク質結合表面、コロイド状金属粒子、酸化鉄粒子、ラテックス粒子または高分子ビーズと結合させることができる。捕捉抗体は、当技術分野で公知の手順を用いて固体支持体と結合させるか、その上にコーティングすることができる。あるいは、捕捉抗体を、固体支持体と結合しているか、その上にコーティングされているさらなる抗体によって認識されるリガンドと結合させることができる。捕捉抗体の、リガンドを介したさらなる抗体との結合が、ひいては、間接的に、捕捉抗体を固体支持体上に固定する。このようなリガンドの例として、フルオレセインがある。「検出」抗体として記載できる第2の抗体は、標識と結合させることができ、標識は化学発光剤、比色分析剤、エネルギー移動剤、酵素、蛍光剤または放射性同位元素を含み得る。検出抗体は、当技術分野で公知の手順を用いて標識と結合またはコンジュゲートさせることができる。標識は、第1のタンパク質、例えば、第2の抗体と結合しているビオチンおよび第2のタンパク質、例えば、酵素と結合しているストレプトアビジンを含み得る。第2のタンパク質は、第1のタンパク質と結合する。酵素は、基質とともに提供されると、測定されるシグナルの量が分析物と結合している第2の抗体の量と対応するよう検出可能なシグナルを生じる。西洋ワサビペルオキシダーゼはこのような酵素の一例であり、可能性のある基質として、TMB（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、OPD（o-フェニレンジアミン）およびABTS（2,2'-アジノ-ビス（3-エチルペンズチアゾリン-6-スルホン酸）が挙げられる。

30

40

【0027】

50

本発明のさらなる実施形態は、抗ミューラー管ホルモンの成熟領域において、第1の抗体が第1のエピトープと結合し、第2の抗体が第2のエピトープと結合する、抗ミューラー管ホルモンの成熟領域と結合する第1の抗体および第2の抗体と、第1の抗体と結合している固体支持体と、第2の抗体と結合している標識とを含む、サンプル中の抗ミューラー管ホルモンの量を測定するための組成物を開示する。測定される抗ミューラー管ホルモンは、哺乳類抗ミューラー管ホルモン、例えば、霊長類、げっ歯類、ウマおよびウシの抗ミューラー管ホルモンを含み得る。このような組成物を用いて、ヒト、ラットまたはマウス抗ミューラー管ホルモン、ならびにその他の種の抗ミューラー管ホルモン、例えば、ウマ、ウシおよびサル抗ミューラー管ホルモンを測定できる。一態様では、固体支持体は、タンパク質結合表面を含み、これとしては、マイクロタイタープレート、コロイド状金属粒子、酸化鉄粒子、ラテックス粒子または高分子ビーズが挙げられる。標識は、化学発光剤、比色分析剤、エネルギー移動剤、酵素、蛍光剤もしくは放射性同位元素または当技術分野で公知のその他の種類の標識を含み得る。本発明において開示されるこのような組成物は、サンプル中の抗ミューラー管ホルモンの量を測定するのに有用なキットを含み得る。

10

【0028】

本発明のもう1つの可能性のある実施形態は、抗ミューラー管ホルモンの成熟領域中の、タンパク質分解に対して安定であるエピトープと結合する抗体を開示する。結果として、サンプル中の測定される抗ミューラー管ホルモンの量は、サンプル中の抗ミューラー管ホルモンのタンパク質分解によって影響を受けない。抗体エピトープがタンパク質分解によって破壊されないため、そのために、当技術分野で標準のアッセイ条件、例えば、延長されたインキュベーション時間を用いてサンプル中の抗ミューラー管ホルモンの量を正確に測定することが可能となる。

20

【0029】

以下の実施例は、本発明の種々の実施形態を示す目的で示され、本発明をどのようにも制限しようとするものではない。

【実施例】

【0030】

(実施例1)

抗体作製

C57B1/6Jバックグラウンドの雌のAMHヌルマウスを、先に記載されるように調製した組換えヒトAMHを用いて免疫化した(Hudsonら、1990年)。50 μ gの組換えヒトAMHの最初の注射を、Ribijuant(Sigma M6536)中で皮下に与え、4週間の間隔で、各動物に2回の同様のブースター注射を行った。3回目のブースターの4日後、ELISAによるスクリーニングのために各動物から5 μ lの血液を採取した。各サンプルを、1%BSA(w/v)および保存料として0.1%(w/v)NaN₃を含有する2mlのPBSで希釈し、以下のようにスクリーニングした。Nunc Maxisorbプレート(SLS、UK)を、0.2M炭酸ナトリウム-重炭酸バッファー、pH9.4(Perbio)中0.1 μ g/mlの、Dr Richard Cate(Biogen、Cambridge、Mass. USA)によって提供された組換えヒトAMHを用いて一晚コーティングした(50 μ l/ウェル)。吸着後、プレートを吸引し、ウェルあたり100 μ lの、PBS中1%(w/v)のBSAを用いて1時間ブロックした。次いで、このプレートを洗浄バッファー(0.15M NaClおよび0.05%(v/v)Tween-20(Sigma)を含有する0.05M Tris-HClバッファー)を用いて洗浄し、その後、動物の血清を、Trisコンジュゲートバッファー(0.15M NaClおよび0.5%(w/v)Tween20を含有する25mM Tris-HCl、pH7.5中、1%BSA(w/v))で希釈したプレートに全体わたって滴定し、室温で1時間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄バッファーで十分に洗浄し、Trisコンジュゲートバッファー中1:2000希釈の、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG(HRP、Dako)50 μ lを各ウェルに添加した。30分のインキュベーション期間の後、プレートを洗浄し、

30

40

50

50 μ l / ウェルの TMB (テトラメチルベンジジンペルオキシダーゼ (Dyna tech)) を添加した。適したレベルの色に到達した時点 (約 10 ~ 15 分) で、50 μ l の 6% (v/v) オルト - リン酸 (BDH) を各ウェルに添加することによって反応を停止させた。Biotek プレートリーダー (Bio - Tek instruments) を用いて 450 nm での吸光度を測定した。最高の反応をする動物を選択し、脾臓過剰刺激のために処理し、その後、屠殺した。最終ブーストは、50 μ g の滅菌 AMH を静脈内注射することによって実施した。脾臓を無菌的に採取し、アリコートに分け、液体窒素中で保存し、その後融合した。

【0031】

(実施例 2)

抗体スクリーニング。脾細胞の 1 アリコートを、ポリエチレングリコール (Boehringer Mannheim) の存在下、Kohler および Milstein (Leera, 1996 年) に従って SP2 / 0 骨髄腫細胞と融合した。融合物は、まず、ヒト成熟領域のみの大腸菌発現版である AMH に対して ELISA によってスクリーニングした (R&D Systems)。第 2 ラウンドのスクリーニングは、Weenen ら (Weenen ら, Mol Hum Reprod 2004 年) によって記載されるとおり、無傷のラット AMH の調製物でコーティングした ELISA プレート上で実施した。高反応クローンをメチルセルロース培地 (Clonacell HY) 上で再クローニングし、細胞株を低濃度の IgG を含有する増殖培地で増殖させた。抗体をプロテイン G クロマトグラフィーによって精製し、水溶性 LC ビオチンエステル (Pierce Chemicals) を用いてビオチン化した。用いた手順は標準プロトコール (Harlow および Lane) に由来するものであった。このように、イムノアッセイ研究のために選択したこれらのクローンをスクリーニングして、少なくとも一部は AMH の成熟領域中にあり、ラットおよびヒト AMH に共通する AMH 中のエピトープを提供した。以下のクローンをさらなる分析のために選択した: F2 / A4、F2 / A2、F2B / 12F、F2B / 7H、F2B / 7A、F2B / 12H、F2B / 6L、F2B / 7C、F2B / 5B および F2A / 23。

【0032】

(実施例 3)

ウエスタンブロットティング。マウスモノクローナル抗体 5 / 6A、9 / 6、2 / 6、F2B12H (抗体 12H) および F2B7A (抗体 7A) を用いてウエスタンブロット解析を実施した。5 / 6A、9 / 6 および 2 / 6 抗体は、これまでに記載されたヒト AMH に対する抗体であり (Al - Qahatani ら, 2005 年)、これらの抗体を用いて得られた結果が、12H および 7A 抗体の特徴と比較する目的で本明細書に示されている。5 / 6A 抗体はヒト AMH の成熟領域と結合し、2 / 6 および 9 / 6 抗体はヒト AMH のプロ領域と結合する。組換えラットおよびヒト AMH は、還元および非還元条件下、10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて分離した。タンパク質はニトロセルロースメンブレンに移し、1 : 1000 希釈の抗体、続いて、1 : 10000 希釈の二次ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス抗体とともにインキュベートした。タンパク質は ECL およびウエスタンブロットティング検出システム (Amersham Biosciences) によって可視化した。

【0033】

図 1 (A ~ B) は、AMH 抗体 F2B7A (抗体 7A) が、還元および非還元条件下でラットおよびヒト AMH と結合することを実証するウエスタンブロットを示す。図 1A 中、1 分曝露は、抗体 7A (A B 7A) が、還元および非還元条件下双方で、ラットおよび組換えヒト AMH のプロ領域を認識することを示す (58 kDa バンド)。還元および非還元条件下で、ヒト AMH のプロ領域内に存在する「さらなる切断部位」の切断後にさらなるバンド (約 25 kDa) が見られる (レーン「H」および図 3 参照のこと)。図 1B では、同じプロットの 4 分曝露が、より長い曝露の後には、抗体 7A が、非還元条件下でラットおよび組換えヒト AMH 双方の成熟領域を認識することを示す (12 kDa バンド

10

20

30

40

50

)。

【0034】

図2(A~B)は、AMH抗体F2B12H(抗体12H)が、非還元条件下で、ヒトおよびラットAMH双方の成熟領域を認識することを実証するウエスタンブロットを示す。図2Aは、抗体12Hが、1分の曝露で、非還元条件下では組換えヒトおよびラットAMHの成熟領域を認識するが、還元条件下では認識しないことを示す(12kDaバンド)。図2Bは、同一ブロットの4分の曝露で、抗体12Hが非還元条件下では組換えヒトおよびラットAMH双方のプロ領域を認識するが、還元条件下では認識しないことを示す(58kDaバンド)。

【0035】

(実施例4)

マウスイムノアッセイ研究のためのプレートのコーティング

以下のプロトコルを用いて、マウスサンプルにおいてAMHを測定するための候補抗体のイムノアッセイ試験用のコーティングされたプレートを提供した。

【0036】

1. Nunc maxisorbプレートを、0.05M重炭酸バッファーpH9.4中、2 μ g/mlの濃度の各抗体0.05mlを用いてコーティングした。

【0037】

2. プレートを一晚コーティングしたままにした。

【0038】

3. プレートを個々に吸引し、タオル上にたたきつけて乾燥させ、6%スクロースを含有する0.5%(w/v)カゼインバッファー200 μ lを添加した。カゼインバッファー(CLB-M2052)はMast Cell Group、Derby Road、Bottle、Merseyside、L20 1EA、UKから入手した。カゼインバッファーは5%溶液として提供され、使用前にPBSで10倍に希釈する。

【0039】

4. プラスチック上の過剰の部位をカゼインにブロッキングさせた1時間後、ウェルの内容物をペーパータオル上にたたきつけて完全に出し、プレートを、工業用加湿器からの強制空気流のある乾燥チャンバー(Munters)中に入れる。

【0040】

5. 一晚乾燥させた後、各プレートを、デシカント(dessicant)バッグを含むアルミニウムポーチ中に密閉した。

【0041】

(実施例5)

イムノアッセイのための抗体対の選択

種々の抗体対を、ツーサイトELISAによってAMHを測定するその能力について試験するために以下の標準アッセイプロトコルを適用した。すべてのプレートの洗浄は0.05%(w/v)tween 20を含有するPBSを用いて行った。

【0042】

1. 標準およびサンプルは、Mast cell groupから入手したHPE一般的なアッセイ希釈液(CLB M1940)で希釈した。これは、作用強度を得るために水で希釈される5 \times 濃縮液として提供されている。

【0043】

2. プレート上のウェルに、0.05mlの各サンプルまたは標準を2連で添加した。

【0044】

3. プレートを、蓋をしてシェーカー上で2時間インキュベートした。

【0045】

4. プレートを洗浄し(5 \times)、適当なビオチン化抗体を、作用強度カゼインバッファー中、最終濃度0.3 μ g/mlで添加した。各ウェルに0.05mlのビオチン化抗体を加え、このプレートを室温で1時間振盪した。

10

20

30

40

50

【0046】

5. プレートを洗浄し、ポリHRPストレプトアビジンコンジュゲートの10,000中1希釈を加えた。ストックコンジュゲートはMast GroupからCLB M2051として入手した。使用まで-20で保存する。コンジュゲートの希釈液は、作用強度カゼインバッファーで作製する。

【0047】

6. プレートをシェーカー上で30分間インキュベートし、次いで、洗浄し、たたきつけて乾燥させ、0.1mlのKPLペルオキシダーゼ基質を加えた。

【0048】

7. 発色を進行させ、10~20分後6%リン酸0.1mlを添加することによってプレート

10

【0049】

8. 620nmブランクに対して450nmでの吸光度を読み取った。

【0050】

(実施例6)

抗体イムノアッセイ。本明細書に記載されるように作製した抗体対を、ELISA手順で試験して、数種に由来するサンプル中のAMHを検出するその能力を調べた。このような抗体対を用いるイムノアッセイの結果を、先に記載される、AMHに対して先に開発された抗体を用いる類似のイムノアッセイの結果(AI-Qaharaniら、2005年)と比較した。結果は表1に示されている。

20

【0051】

【表 1 - 1】

表 1

捕捉および検出抗体の6つの異なる組合せのイムノアッセイ結果

サンプル番号	サンプル	F2B/7A プレート F2A/4 標識 Ng/ml ヒト標準由来 AMH	F2B/7A プレート F2A2 標識 Ng/ml ヒト標準由 来AMH	F2B/12H プレート F2B/7A 標識 Ng/ml ヒト標準由 来	F2A2 プレート F2B/7A 標識 Ng/ml ヒト標準 由来	F2B12/F プレート F2B/7A 標識 Ng/ml ヒト標準由 来	F2B/7H プレート F2B/7A 標識 Ng/ml ヒト標準由 来	F2A/4 プレート F2B/7A Ng/ml ヒト標準 由来	9/6標識 および2/ 6検出を用 い、既存の ブルックス アッセイを 用いて得ら れた値
1	去勢されたウシ血清66	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	
2	去勢されていないウシ血清67	1.46	0.96	0.7	0.9	0.4	0.6	2.1	
3	卵巣切除ウシ血清68	.41	0.3	UD	0.3	UD	0.3	0.4	
4	雌ブタ28、 1.1歳	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	
5	雌ブタ37 2.4歳	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	
6	ウマ血清	.51	0.3	0.4	0.37	UD	0.5	0.3	
7	マウス血清 A	UD	1.39	2.4	1.3	2.7	2.7	UD	
8	マウス血清 B	UD	6.8	8.8	6.8	6.1	9.4	0.3	
9	ロバ血清	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	
10	ウサギ血清	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	
11	ヤギ血清	UD	UD	UD	UD	UD	0.3	UD	
12	若い雌ウシ1 2ヶ月	UD	UD	UD	UD	UD	0.3	0.3	
13	雌ウシ8歳	UD	UD	UD	UD	UD	0.3	0.3	
14	雌ウシ12歳	UD	UD	UD	UD	UD	UD	0.4	

10

20

30

【 0 0 5 2 】

【表 1 - 2】

表1 続き

19	2.5 ng/ml ラット標準	2.08	1.17	0.6	1.1	0.79	1.1	1.3	
25	ヒト女性血清 137	7.9	5.5	7.3	5.5	4.4	7.8	6.7	5.08
26	ヒト女性血清 216	3.47	2.0	3.3	2.0	2.3	3.6	2.8	1.37
27	ヒト女性血清 029	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
28	ヒト女性血清 081	5.1	3.4	4.8	3.4	3.2	5.3	4.7	2.16
29	ヒト女性血清 200	1.7	1.1	1.5	1.1	1.4	1.7	1.5	1.05
アッセイ希 釈液におけ るヒトの推 定検出限界		0.039 ng/ml	0.3 ng/ml	0.013 ng/ml	0.013 ng/ml	0.078 ng/ml	0.078ng/m l	0.026	
推定ラット交 差反応		83%	46%	24%	44%	31%	44%	52%	
				マウスAMH の最良交差 反応					

40

50

上記の表 1 において、「プレート」とは、プレート表面と結合している捕捉抗体を表し、「標識」とは標識と結合している検出抗体を表し、「UD」とは「検出不可能」を表す。表 1 の右端の列は、先に開発された (A l - Q a h t a n i ら、2005 年) A M H に対する抗体 9 / 6 および 2 / 6 を用いて得られた結果 (「既存のブルックスアッセイ」) を示す。9 / 6 および 2 / 6 抗体は双方とも A M H のプロ領域と結合する。表 1 中の結果は、F 2 B / 1 2 H (抗体 1 2 H) および F 2 B / 7 A (抗体 7 A) 抗体の使用が、ヒト、ラットおよびマウスサンプルにおいて A M H を測定するアッセイにおいて有効であることを示す。捕捉のために F 2 B / 1 2 H 抗体を、また検出のために F 2 B / 7 A 抗体を用いることによって、マウス血清における A M H の最高の推定値、ヒト A M H に対する感受性アッセイおよび組換えラット A M H との良好な交差反応 (24%) が提供される。9 / 6 および 2 / 6 抗体を用いるアッセイによって得られた値について、良好な相互関係が観察されるが、9 / 6 および 2 / 6 抗体を用いて得られたものの約 2 倍の値である。

10

【0053】

(実施例 7)

イムノアッセイにおける組換えヒト A M H 免疫反応性の安定性

図 4 (A ~ C) は、プローブとして A M H 抗体 5 / 6、2 / 6 および 9 / 6 を用いてプロービングされたラットおよびヒト組換え A M H のウエスタンブロットアッセイを示し、これでは、ヒト A M H (h A M H) は種々の条件下で保存された。図 4 A は、抗体 5 / 6 はヒト組換え A M H およびラット A M H の成熟領域 (12 k D a) を認識することを示す。図 4 B は、抗体 2 / 6 は、「さらなる切断部位」のタンパク質分解切断後に生じる両バンドを含むヒト組換え A M H のプロ領域を認識することを示す (図 3 参照のこと)。したがって、2 / 6 抗体エピトープは、抗体が両バンドを認識するのでタンパク質分解に対して安定である。抗体 2 / 6 はラット A M H を認識しない。図 4 C は、抗体 9 / 6 はラットおよびヒト A M H のプロ領域を認識するが、ヒト組換え A M H のプロ領域の、「さらなる切断部位」でのタンパク質分解切断後の小さな断片は認識しないことを示す。したがって、9 / 6 抗体エピトープはタンパク質分解に対して安定でない。

20

【0054】

表 2 は、先に記載された 2 / 6 および 9 / 6 抗体を用いる類似のアッセイ (A l - Q a h t a n i ら、2005 年) と比較した、F 2 B / 7 A および F 2 B / 1 2 H 抗体を用いる E L I S A イムノアッセイにおけるヒト組換え A M H 免疫反応性の安定性を示す。

30

【0055】

【表 2】

表2

AMH免疫反応性の安定性

	A	B	注釈
	捕捉のための2/6抗体および検出のための9/6を用いたイムノアッセイによって得られた値。 Biogen Standardに対する読み取り値。	捕捉のためのF2B/12H抗体および検出のためのF2B/7Aを用いたイムノアッセイによって得られた値。 Biogen Standardに対する読み取り値。	
名目上の濃度30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のDr Axel Themmenによって提供された精製組換えヒトAMHの溶液。	2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	29.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Themmen組換え調製物からは9/6および2/6AMHアッセイにおける免疫反応性の大部分が失われていた。
37°Cで6日間インキュベートされた上記AMHの溶液	0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	30.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	F2B/7AおよびF2B/12HアッセイにおいてThemmenおよびBiogen AMHは同様の免疫活性を有し、免疫反応性は37°Cでのインキュベーションに対して安定である。

10

20

30

2/6および9/6抗体対を用いる最初のイムノアッセイでは、組換えヒトAMH調製物(Dr. Axel Themmenから入手)は、Biogenヒト組換えAMHと比較して、極めて低い濃度推定値を示すことがわかった。その後の研究により、これらの抗体のエピトープは双方とも、精製AMH中に残存する酵素に対して不安定であることが示された。同じ組換えヒトAMH調製物を37°Cで6日間インキュベートした場合、見かけの免疫反応性量はさらに減少する。対照的に、同じ組換えヒトAMH調製物は、F2B/12およびF2B/7A抗体を用いて測定された場合には免疫反応性のわずかな減少を伴うのみで37°Cで6日間インキュベートできる。この結果は、両エピトープがタンパク質分解に対して、9/6および2/6抗体によって認識されるものよりもより安定であることを必要とする。インキュベートされたサンプルには、保存料として0.1%(w/v)ナトリウムアジドが添加されていた。Biogen組換えヒトAMHはDr. Richard Cateから提供された。

40

【0056】

(実施例8)

加齢に伴うマウスにおける血清AMHの減少の測定。本明細書に記載される12Hおよび7A抗体に基づくアッセイを用いて、老齢の雌のマウスから得たマウス血清中のAMHのレベルを調べた(図5参照のこと)。マウスは、膻スミアに基づいて発情期の日に、種々の年齢で屠殺した。続いて、血清サンプルを、41倍希釈後に、アッセイを用いるAMH分析に付した。4、6および8ヶ月齢の血清AMHレベルは異なっておらず、約28.

50

5 ng/ml ヒト標準であった。10 および 12 ヶ月齢のマウスは AMH レベルの低下を示した (22.0 および 20.5 ng/ml ヒト標準。より老齢のマウス、14、16 および 18 ヶ月齢は、さらにより低下した AMH レベルを示した：それぞれ 8.2、6.4 および 3.8 ng/ml ヒト標準。

【0057】

(実施例 9)

マウスにおける発情周期を通じた AMH レベル。4 ヶ月齢の雌のマウスを、膣スメアおよび死後卵胞分析に基づいて発情周期の種々の段階に分類した。血清 AMH レベルは抗体 7A および 12H に基づく AMH アッセイを用いて調べた。血清 AMH レベルは、より高いレベル、40 ng/ml AMH ヒト標準が見られた発情期を除き、発情周期を通じて約 29 ng/ml ヒト標準のレベルで安定であった (図 6A を参照のこと)。予備分析から、AMH レベルと、これらの動物の卵巣中の前胞状卵胞および小胞状卵胞の数との相関が示された (図 6B 参照のこと)。

10

【0058】

(実施例 10)

マウストラנסジェニックバックグラウンドにおけるラット AMH の測定。抗体 7A および 12H に基づくアッセイを用いて、マウストラנסジェニックバックグラウンドにおいて産生されたラット AMH のレベルを調べた。PEPCK プロモーターの制御下、組換えラット AMH の発現を駆動する構築物を保持するトランスジェニックマウスを屠殺し、その血清中の AMH を調べた。トランスジェニック系統の血清のウエスタンブロットに基づいて、2つの系統を先に同定しておいた：低発現系統 21 および高発現系統 30。抗体 7A および 12H に基づくアッセイによって、これらの系統における AMH レベルを以下のとおりに調べた：系統 21：9 ng/ml AMH ヒト標準、系統 30：70 ng/ml AMH ヒト標準。両系統とも、その卵巣が、雌において AMH を産生する卵胞および顆粒膜細胞を欠くために、内因性マウス AMH をわずかしき、または全く分泌しないと予想される。

20

【0059】

(実施例 11)

サルおよび去勢されていないウシ由来サンプルにおける、本明細書に記載されるアッセイを用いる AMH レベルの測定。表 3 に示されるように、種々の年齢の、および閉経期状態の雌のサルにおいて、血清 AMH 値を調べた。

30

【0060】

【表 3】

表3

雌のサルにおける血清AMH測定値

誕生年	状態	AMH [ng/ml]
1975	閉経期	0.89
1982	閉経期	0.24
1990	周期期	5.71
1990	周期期	19.59
1990	周期期	11.15
1990	周期期	1.28
1990	周期期	9.16
1990	周期期	4.36

10

20

表 4 に示されるように、ウシ血清サンプルにおいても、血清 A M H レベルを本明細書に記載されるアッセイを用いて測定した。

【 0 0 6 1 】

【表 4】

表4

ウシサンプルにおける血清AMH測定値

サンプル	AMH(ng/ml)
雄ウシ1(去勢されたウシ)	0.00
雄ウシ2(去勢されたウシ)	0.00
雄ウシ3(去勢されたウシ)	0.45
ヤングボーン(youngborn)雄子ウシ1	8.12
ヤングボーン(youngborn)雄子ウシ2	8.20

30

40

(実施例 1 2)

血清における M I S / A M H の定量測定のための E L I S A アッセイ。本明細書に開示される M I S / A M H E L I S A は酵素増幅ツースイトイムノアッセイである。このアッセイでは、標準、対照および未知血清サンプルを、抗 M I S / A M H 抗体を用いてコーティングしておいたマイクロタイションウェル中でインキュベートする。インキュベーションおよび洗浄した後、ウェルを、ビオチンで標識した別の抗 M I S / A M H 検出抗体を用いて処理する。第 2 のインキュベーションおよび洗浄ステップの後、ウェルをストربتアビジン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) とともにインキュベートする。第 3 のインキュベーションおよび洗浄ステップの後、ウェルを基質テトラメチルベンジジン (T M B) とともにインキュベートする。次いで、酸性停止溶液を加え、4 5 0 および 6

50

20 nmでの二波長吸光度測定によって基質の酵素ターンオーバー度を調べる。測定された吸光度は、存在するMIS / AMHの濃度と正比例する。一連のMIS / AMH標準を用いて、吸光度の標準曲線対MIS / AMH濃度をプロットし、これから未知のもののMIS / AMH濃度を算出できる。

【0062】

試薬

A. 抗MIS / AMHコーティングマイクロタイションストリップ：

抗MIS / AMH IgGを各ウェルの内壁に固定化した、96マイクロタイションウェルを有するストリップホルダー。これらは、湿度から保護するために乾燥剤とともに2～8 で保存した。

10

【0063】

B. MIS / AMHサンプル希釈液：

非水銀保存料を含むタンパク質ベースのバッファー中、0 ng / mLという濃度のMIS / AMHを含有するサンプル希釈液。サンプル希釈液は2～8 で保存した。

【0064】

C. MIS / AMH標準：

非水銀保存料を含むタンパク質ベースのバッファー中、約0.025、0.10、0.25、1.5、7.5および15 ng / mLという濃度のMIS / AMHを含有する標準。標準は2～8 で保存した。

20

【0065】

D. MIS / AMH対照：

対照は、非水銀保存料を含むタンパク質ベースのバッファー中、低および高濃度のMIS / AMHを含有する標識レベルIおよびIIとした。対照は2～8 で保存した。

【0066】

E. MIS / AMH抗体 - ビオチンコンジュゲート - RTU：

2～8 で保存された、非水銀保存料を含むタンパク質ベースのバッファー中のビオチン化MIS / AMH抗体。

【0067】

F. ストレプトアビジン - 酵素コンジュゲート - RTU：

タンパク質ベースの(BSA)バッファーおよび非水銀保存料中のストレプトアビジン - HRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ)、2～8 で希釈せずに保存。

30

【0068】

G. MIS / AMHアッセイバッファー：

2～8 で保存された、非水銀保存料を含むタンパク質ベースの(BSA) - バッファー。

【0069】

H. TMB色素原溶液：

2～8 で保存された、過酸化水素を含むクエン酸バッファー中のテトラメチルベンジン(TMB)の溶液。

40

【0070】

I. 洗浄濃縮物：

2～8 または室温(約25)で保存された、非イオン性界面活性剤を含む緩衝生理食塩水。洗浄濃縮物は使用前に脱イオン水で10倍希釈した。

【0071】

J. 停止溶液：

2～8 または室温(約25)で保存された、0.2 M硫酸の溶液。

【0072】

すべての試薬およびサンプルは室温(約25)に到達させ、使用前に穏やかに反転させることによって十分に混合した。

【0073】

50

アッセイ手順

すべてのサンプルおよび試薬は室温（約 25 ）に到達させ、使用前に穏やかに反転させることによって十分に混合した。標準、対照および未知のものを二連でアッセイした。

【 0 0 7 4 】

プロトコール：

1 . 使用するマイクロタイションストリップに印をつける。

【 0 0 7 5 】

2 . 標準、対照および未知のものを適当なウェルにピペットで 2 0 μ L 入れる。

【 0 0 7 6 】

3 . 半自動ディスペンサーを用いて、各ウェルに 1 0 0 μ L の M I S / A M H アッセイバッファを加える。 10

【 0 0 7 7 】

4 . オービタルマイクロプレートシェーカー上で速い速度（ 5 0 0 ~ 7 0 0 r p m ）で振盪しながら室温（約 2 5 ）で 1 時間ウェルをインキュベートする。

【 0 0 7 8 】

5 . 各ウェルを、自動マイクロプレートウォッシャーを用いて、または各ウェルから液体を吸引することと、各ウェルに 0 . 3 5 m L の洗浄溶液を分配することと、洗浄溶液を吸引することとによって洗浄溶液で 5 回吸引および洗浄する。吸湿剤上でプレートを反転することによってプロットを乾燥させる。 20

【 0 0 7 9 】

6 . 半自動ディスペンサーを用いて、各ウェルに 1 0 0 μ L の抗体 - ビオチンコンジュゲート - R T U を加える。

【 0 0 8 0 】

7 . オービタルマイクロプレートシェーカー上で速い速度（ 5 0 0 ~ 7 0 0 r p m ）で振盪しながら室温（約 2 5 ）で 1 時間ウェルをインキュベートする。

【 0 0 8 1 】

8 . 各ウェルを、自動マイクロプレートウォッシャーを用いて、または各ウェルから液体を完全に吸引することと、各ウェルに 0 . 3 5 m L の洗浄溶液を分配することと、洗浄溶液を吸引することとによって洗浄溶液で 5 回吸引および洗浄する。吸湿剤上でプレートを反転することによってプロットを乾燥させる。 30

【 0 0 8 2 】

9 . 半自動ディスペンサーを用いて各ウェルに 1 0 0 μ L のストレプトアビジン - 酵素コンジュゲート - R T U を加える。

【 0 0 8 3 】

1 0 . オービタルマイクロプレートシェーカー上で速い速度（ 5 0 0 ~ 7 0 0 r p m ）で振盪しながら室温（約 2 5 ）で 3 0 分間ウェルをインキュベートする。

【 0 0 8 4 】

1 1 . 各ウェルを、自動マイクロプレートウォッシャーを用いて、または各ウェルから液体を完全に吸引することと、各ウェルに 0 . 3 5 m L の洗浄溶液を分配することと、洗浄溶液を吸引することとによって洗浄溶液で 5 回吸引および洗浄する。吸湿剤上でプレートを反転することによってプロットを乾燥させる。 40

【 0 0 8 5 】

1 2 . 半自動ディスペンサーを用いて各ウェルに 1 0 0 μ L の T M B 色素原溶液を加える。

【 0 0 8 6 】

1 3 . オービタルマイクロプレートシェーカー上で速い速度（ 5 0 0 ~ 7 0 0 r p m ）で振盪しながら室温（約 2 5 ）で 1 5 ~ 3 0 分間ウェルをインキュベートする。直射日光に対する曝露は避ける。

【 0 0 8 7 】

1 4 . 半自動ディスペンサーを用いて各ウェルに 1 0 0 μ L の停止溶液を加える。 50

【 0 0 8 8 】

15.450 nmに設定したマイクロプレートリーダーを用いて30分以内のウェル中の溶液の吸光度を読み取る。マイクロタイトレーションウェルの吸光度を読み取る際には、ゼロ標準を「ブランク」として調整することが必要である。波長補正が利用可能な場合は、機器を、450 nmで二波長測定に設定し、バックグラウンド波長補正は600 nmまたは620 nmに設定する。

【 0 0 8 9 】

結果の算出：

1. 標準、対照または未知のもの各々の平均吸光度を算出する。

【 0 0 9 0 】

2. 直線曲線適合を用いて、x軸に沿ったng/mlでのMIS/AMH濃度のlogに対してy軸に沿った標準各々の平均吸光度読み取り値のlogをプロットする。あるいは、データは直線対直線をプロットしてもよく、平滑化スプライン曲線適合を使用できる。

【 0 0 9 1 】

3. 2連の点の平均によって最良の適合曲線を描く。

【 0 0 9 2 】

4. 標準曲線から、その平均吸光度読み取り値を対応するMIS/AMH濃度とマッチさせることによって対照および未知のものMIS/AMH濃度を決定する。

【 0 0 9 3 】

(実施例13)

ヒト血清中のAMHのイムノアッセイ測定。12Hおよび7A抗体を用いる本明細書に記載されるELISAアッセイによるヒト血清におけるAMH測定の性能特性を以下の表5および表6に示す。この実施例では、抗体12Hを捕捉抗体として用い、抗体7Aを検出抗体として用いた。0 ng/ml MIS/AMH標準の8の反復の平均および2つの標準偏差の補間によって算出される、理論上の感度または最低検出限界は0.0058 ng/mlであった。

【 0 0 9 4 】

表5は、ヒト血清サンプル中のAMHの測定される量の希釈物の直線性を示す。回収率は、予想濃度によって除した実測濃度のパーセントとして算出される。

【 0 0 9 5 】

10

20

30

【表 5】

表5

ELISAアッセイを用いて、ヒト血清サンプルにおいて測定されたAMH値の希釈物の直線性。

希釈物の直線性				
サンプル番号 測定されたAMH値 (ng/ml)	希釈係数	予測値 (ng/ml)	実測値 (ng/ml)	回収パーセント
I 1.931	---	---		---
	1:2	0.965	0.997	103
	1:4	0.482	0.445	92
	1:8	0.241	0.222	92
	1:16	0.120	0.096	80
	1:32			
II 2.462	---			
	1:2	1.231	1.225	100
	1:4	0.615	0.569	92.5
	1:8	0.307	0.259	84
	1:16	0.154	0.149	97
	1:32			
III 7.650	---			
	1:2	3.825	4.159	109
	1:4	1.912	2.097	110
	1:8	0.956	0.981	93
	1:16	0.478	0.441	92
	1:32			

10

20

30

表 6 は、アッセイ内およびアッセイ間の精度およびアッセイの回収特性を示す。アッセイ内の精度は、8 の反復各々の平均から求めた。回収率は予想濃度によって除した実測濃度のパーセントとして算出される。

40

【 0 0 9 6 】

【表 6 - 1】

表6

精度(アッセイ内)					
サンプル番号	N	平均 (ng/ml)	SD	CV(パーセント)	
I	8	0.241	0.011	4.1	
II	8	1.422	0.038	2.7	
III	8	7.871	0.3	3.8	
精度(アッセイ内)					
サンプル番号	N	平均 (ng/ml)	SD	CV(パーセント)	
I	10	0.236	0.0134	5.7	
II	10	1.415	0.106	7.4	
III	10	7.584	0.568	7.5	
回収率					
サンプル番号	内因性 (ng/ml)	添加 (ng/ml)	予測 (ng/ml)	実測 (ng/ml)	回収率 (パーセント)
I	1.866	1.15	2.876	2.968	103
		2.3	3.886	3.540	91

【 0 0 9 7 】

【表 6 - 2】

II	2.919	1.15	3.848	4.211	109
		2.3	4.777	4.972	104
III	4.610	1.15	5.409	5.157	95
		2.3	6.208	6.548	105

上記の表 5 および 6 では、「N」は、サンプルの反復測定の数意味し、「SD」は標

10

20

30

40

50

準偏差を意味し、「CV」は変動係数を意味し、「内因性」とは既知量のAMHを添加する前のサンプルにおいて測定されたAMHの量を意味し、「添加」はサンプルに添加されたさらなる既知量のAMHを意味し、「予測」は、内因性および添加AMHの予測される測定される量を意味し、「実測」とは内因性および添加AMHの実際に測定された値を意味し、「回収率」はアッセイによって実際に測定された、添加された既知量のAMHのパーセントを意味する。

【0098】

(実施例14)

ラット血清におけるAMHのイムノアッセイ測定。12Hおよび7A抗体を用いて、本明細書に記載されるELISAアッセイを実施してラット血清中のAMHを測定した。この実施例では、抗体12Hを捕捉抗体として用い、抗体7Aを検出抗体として用いた。このアッセイの性能特性を表7および8に示す。表7は、ELISAアッセイを用いて測定された、ラットサンプル中のAMHの測定された量の希釈物の直線性を示す。ラット血清サンプルはサンプル希釈液(0 ng/ml AMH)を用いて希釈し、アッセイした。回収率は、予想濃度によって除した実測濃度のパーセントとして算出される。ラットAMHのELISAアッセイの理論上の感度は0.012 ng/mlであり、サンプル希釈物の16の反復測定値の平均および2つの標準偏差の補間によって算出した。

【0099】

【表 7】

表7

ELISAアッセイにおけるラット血清サンプルにおいて測定されたAMH値の希釈物の直線性

サンプル番号	希釈係数	予測	実測	回収率 (パーセント)
I	---		3.987	
	1:2	1.993	1.830	92
	1:4	0.997	0.902	91
	1:8	0.498	0.466	94
	1:16	0.249	0.237	95
II	---		6.268	
	1:2	3.134	3.007	96
	1:4	1.567	1.530	98
	1:8	0.783	0.802	102
	1:16	0.391	0.409	105
III	---		11.322	
	1:2	3.134	3.007	96
	1:4	1.567	1.530	98
	1:8	0.783	0.802	102
	1:16	0.391	0.409	105

10

20

30

表 8 は、ELISAアッセイにおけるラットAMHの測定された量の回収特性を示す。血清サンプルを、種々の既知量の高AMHストックサンプルを用いてスパイクし、アッセイした。回収率は予測濃度によって除した実測値のパーセントとして算出される。

40

【 0 1 0 0 】

【表 8】

表8

ELISAアッセイにおけるラット血清サンプルへの既知添加量のラットAMHの回収率

サンプル番号	内因性 (ng/ml)	添加 (ng/ml)	予測 (ng/ml)	実測 (ng/ml)	回収率 (パーセント)
I	1.534	2.7	3.982	4.315	108
		5.4	6.430	6.376	99
II	3.405	2.7	5.513	5.270	95.6
		5.4	7.621	7.253	95
III	6.760	2.7	8.258	8.135	98.5
		5.4	9.756	9.718	100

10

20

本明細書に提供された実施例は、サンプル、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシおよびウマサンプルなどの生体サンプル中のAMHを測定するために有効な組成物および方法を記載する。このような組成物および方法において有用な抗体が記載されている。本明細書に記載される抗体は、AMHの成熟領域と結合し、AMHのタンパク質分解に対して安定であるエピトープを認識し、その結果、測定されるAMHの量が、AMHのタンパク質分解によって影響を受けない。

【0101】

次の参考文献が、本明細書中で引用される：

【0102】

30

【表 9】

Al-Qahtani, A., Muttukrishna, S., Appasamy, M., Johns, J., Cranfield, M., Visser, J.A., Themmen, A.P.N., Groome, N.P. (2005) Development of a sensitive enzyme immunoassay for Anti-Müllerian Hormone (AMH) and the evaluation of potential clinical applications in males and females. *Clin. Endocrinol.*, **63(3)**, 267-73.

10

Baarends, W.M., Uilenbroek, J.T., Kramer, P., Hoogerbrugge, J.W., van Leeuwen, E.C., Themmen, A.P., *et al.* (1995). *Endocrinology*, **136**, 4951-4962.

Cate, R. L. and Pepinsky, R. B., US Patent 5,359,033.

di Clemente, N. *et al.* (1994). *Mol. Endocrinol.*, **8**, 1006-1020.

20

Durlinger, A.L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F.H., Uilenbroek, J.T., Grootegoed, J.A., *et al.* (1999). *Endocrinology*, **140**, 5789-5796.

GenBank, National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov.

Homology data derived from AMH gene sequences from the NCBI GenBank public nucleotide sequence database.

30

Gruijters, M., Visser, J., Durlinger, A., Themmen, A.P. (2003) Anti- Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **211**, 85-90.

Hudson, P., Dugas, I., Donahoe, P., Cate, R., Epstein, J., Pepinsky, RB.,

MacLaughlin, D. (1990). An immunoassay to detect human Müllerian inhibiting

40

【 0 1 0 3 】

【表 1 0】

substance in males and females during normal development. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **70**, 16-22.

Lee, M., Donahoe, P. (1993) Müllerian-inhibiting substance: A gonadal hormone with multiple functions. *Endocrine Reviews*, **142**, 152-164.

Lee, M., Donahoe, P., Hasegawa, T., Silverman, B., Crist, G., Best, S., Hasegawa, Y., Noto, R., Schoenfeld, D., MacLaughlin, D. (1996) Mullerian Inhibiting Substance in human: normal levels from infancy to adulthood. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81**, 571-575.

Lee, M., Misra, M., Donahoe, P., MacLaughlin, D. (2003) MIS/AMH in the assessment of cryptorchidism and intersex conditions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **211**, 91-98.

Long, W.Q., Ranchin, V., Pautier, P., Belville, C., Denizot, P., Cailla, H., Lhomme, C., Picard, J.Y., Bidart, J.M., Rey, R. (2000) Detection of minimal levels of serum anti-Müllerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, **85**, 540-544.

Picard, J.Y., *et al.* (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 5464-5468.

Picon, R. (1969). *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, **58**, 1-19.

te Velde, E., Pearson, P. (2002) The variability of female reproductive ageing. *Human Reproduction. Update*, **8**, 141-154.

【 0 1 0 4】

10

20

30

40

【表 1 1】

Teixeira, J. et al. (2001). *Endocrine Reviews*, **22**, 657-674.

van Rooij, I.A., Broekmans, F.J., teVelde, E.R., Fauser, B.C., Bancsi, L.F., de Jong, F.H., Themmen, A.P. (2002) Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Human Reproduction*, **17**, 3065-3071.

Wilson, C., Di Clemente, N., Ehrenfels, C., Pepinsky, R., Josso, N., Vigier, B., Cate, R. (1993) Müllerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological-activity, a novel finding within the transforming growth-factor-beta superfamily. *Molecular Endocrinology*, **7**, 247-257.

10

本明細書において記載される特許または刊行物はいずれも、本発明が関連する技術分野の当業者のレベルを示すものである。さらに、これらの特許および刊行物は、各個々の刊行物が参照により組み込まれるよう具体的および個々に示されるのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 0 5】

20

当業者ならば、本発明は目的を実施するために、また、記載された結果および利点ならびに本明細書に特有の目的、結果および利点を得るためにうまく適合されることは容易に理解するであろう。本実施例は、本明細書に記載される方法、手順、処理、分子および特定の化合物とともに、好ましい実施形態の目下のところ代表的なものであり、例示的なものであって、本発明の範囲に関する制限として意図されるものではない。本明細書における変法およびその他の用途が当業者には生じるが、これは特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨内に包含される。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 0 6】

【図 1】図 1 (A ~ B) は、AMH 抗体 F 2 B 7 A (抗体 7 A) が、還元および非還元条件下で、ラットおよびヒト AMH と結合することを実証するウエスタンブロットを示す。

30

【図 2】図 2 (A ~ B) は、AMH 抗体 F 2 B 1 2 H (抗体 1 2 H) が、非還元条件下で、ヒトおよびラット AMH 双方の成熟領域を認識することを実証するウエスタンブロットを示す。

【図 3】図 3 は、組換えヒト AMH の、プロおよび成熟領域へのタンパク質分解プロセッシングを示す。組換えヒト AMH のプロ領域内に存在する「さらなる切断部位」も示されている。

【図 4】図 4 (A ~ C) は、プローブとして AMH 抗体 5 / 6、2 / 6 および 9 / 6 を用いてプロービングされたラットおよびヒト組換え AMH のウエスタンブロットアッセイを示し、これでは、ヒト AMH (h AMH) は種々の条件下で保存された。図 4 A は抗体 5 / 6 はヒト組換えおよびラット AMH の成熟領域 (12 kDa) を認識することを示す。図 4 B は、抗体 2 / 6 は「さらなる切断部位」のタンパク質分解切断後に生じる両バンドを含むヒト組換え AMH のプロ領域を認識することを示す。したがって、抗体が両バンドを認識するために、2 / 6 抗体エピトープはタンパク質分解に対して安定である。抗体 2 / 6 はラット AMH を認識しない。図 4 C は、抗体 9 / 6 はラットおよびヒト AMH のプロ領域を認識するが、ヒト組換え AMH のプロ領域の「さらなる切断部位」でのタンパク質分解切断後のより小さい断片は認識しないことを示す。したがって、9 / 6 抗体エピトープはタンパク質分解に対して安定でない。

40

【図 5】図 5 は、1 2 H および 7 A 抗体を用いるイムノアッセイによる、雌マウスにおける一生を通じて測定された AMH レベルを示す。この結果は、雌マウスにおける血清 AM

50

H の加齢に伴う減少を示す。

【図6】図6(A~B)は、イムノアッセイにおいて12Hおよび7A抗体を用いた、雌マウスにおける発情周期の間のAMH血清レベルの測定値を示す。図6(A)は、発情周期の種々の段階にあるマウスにおけるAMH測定値の棒グラフを示す。図6(B)は、発情周期中の種々の段階における小さな胞状卵胞の数の相関グラフを示す。

【図1】

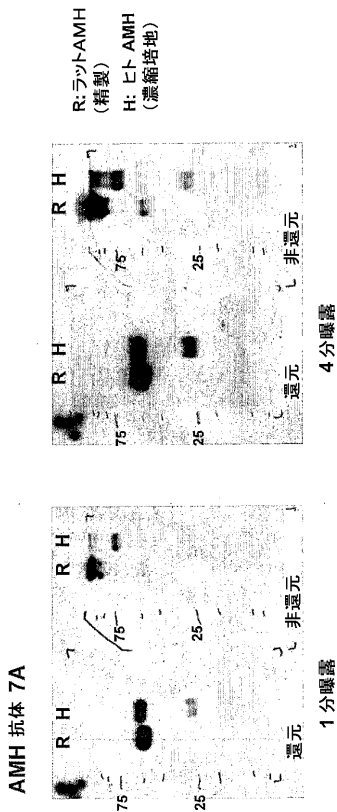


FIG. 1A

結論

AB 7A:

- 還元および非還元条件下双方で、ラットおよびヒトAMHのプロ領域を認識する。
- ヒトAMHのさらなる切断後にさらなるバンドを示す。
- より長い曝露の後、成熟領域が非還元条件下でかすかに見られる。

【図2】

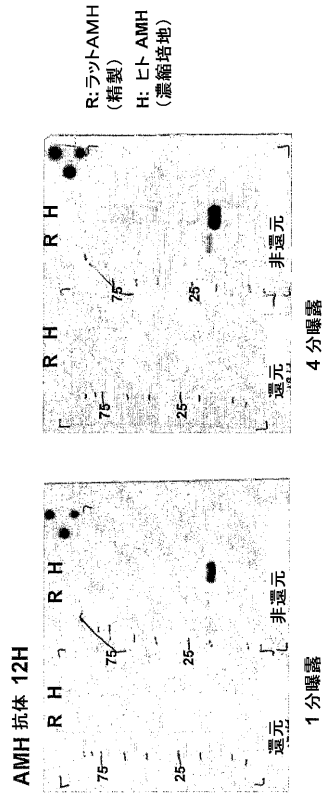


FIG. 2A

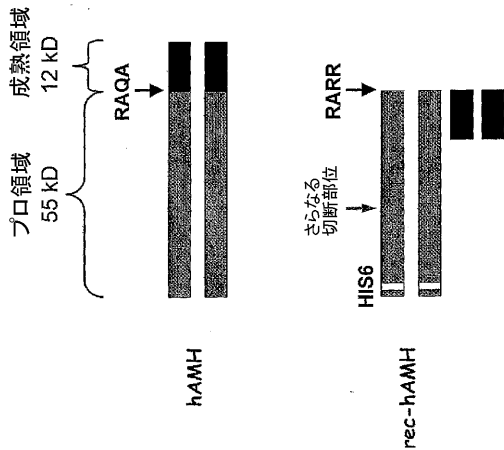
結論:

AB 12H

- 非還元条件下で、AMHの成熟領域を認識する。ヒトが好ましいが、より長い曝露の後にラットAMHも見られる。
- より長い曝露の後、プロ領域が還元条件下でかすかに見られる。

組換えヒトAMHのプロセッシング

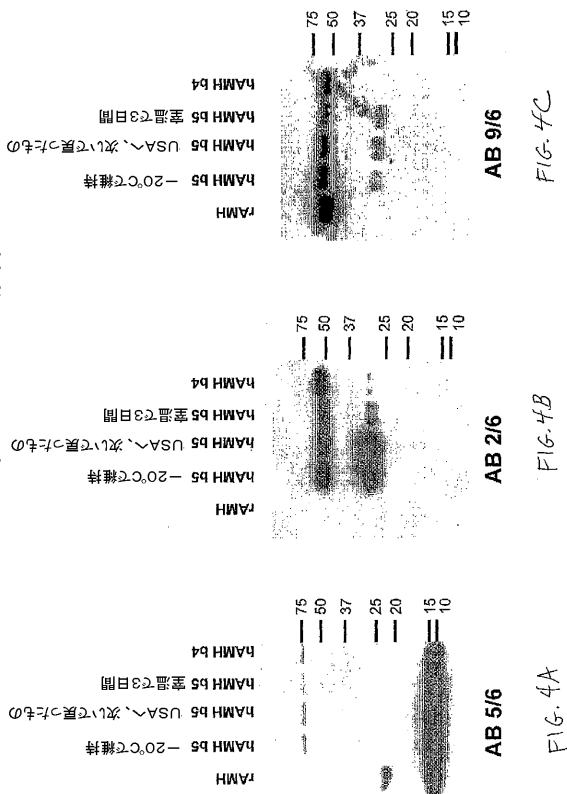
【 図 3 】



【 図 4 】

ヒトアッセイのためのAMH抗体: hAMH中のさらなる切断部位

FIG.3



【 図 5 】

一生の間の雌マウスAMHLレベル

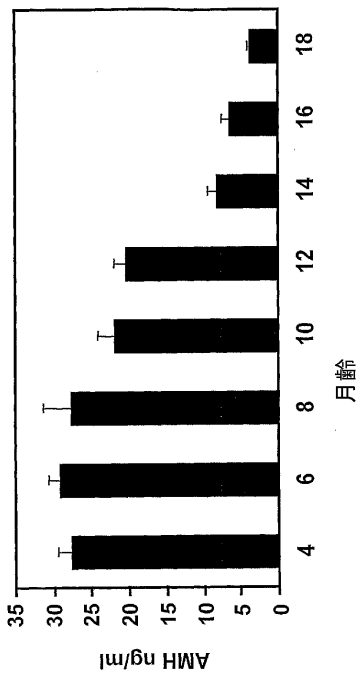


FIG.5

【 図 6 】

発情周期の間のAMH血清レベル

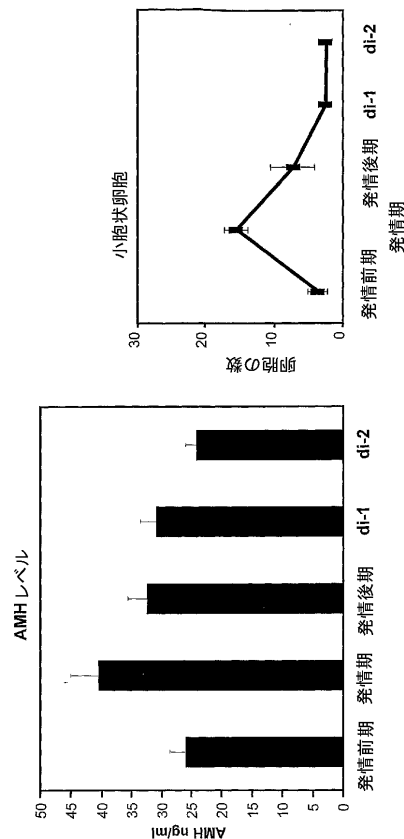


FIG.6A

FIG.6B

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/20154	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: G01N 33/53(2006.01),33/543(2006.01) G01N 33/566(2006.01) USPC: 435/7.1,7.92,7.94;436/501,518 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1, 7.92, 7.94; 436/501, 518 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH, PUBMED			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
Y	Belville et al., Mutations of the Anti-Mullerian Hormone Gene in Patients with Persistent Mullerian Duct Syndrome: Biosynthesis, Secretion and Processing of the Abnormal Proteins and Analysis Using a three-Dimensional Model, Molecular Endocrinology, 18(3): 708-721, 2004, see page 719.	1, 3-23	
Y	Hudson et al., An Immunoassay to Detect Human Mullerian Inhibiting Substance in Males and Females during Normal Development, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol 70, No. 1, 1990, pages 16-22.	1, 3-23	
A	MacLaughlin et al., Mullerian Duct Regression and Antiproliferative Bioactivities of Mullerian Inhibiting Substance reside in its Carboxy-terminal Domain, Endocrinology, Vol 131, No. 1, 1992, pages 291-296. entire document.	1-23	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents:		"J" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15 August 2006 (15.08.2006)		Date of mailing of the international search report 27 SEP 2006	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Gary Counts <i>Marc J. Wal</i> Telephone No. (703) 308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/20154

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Necklaws et al., Detection of Mullerian Inhibiting Substance in Biological Samples by a Solid Phase Sandwich Radioimmunoassay, Endocrinology, Vol. 118, No. 2, 1986, pages 791-796. see entire document.	1-23
A	US 5,310,880 (DONAHOE et al) 10 May 1994 (10.05.1994), column 12.	1-23
A	US 2003/0124620 A1 (SEIFER et al) 03 July 2003 (03.07.2003), page 6, example 2.	1-23

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 グルーム, ナイジェル パトリック
イギリス国 オーエックス7 7ビーエイチ オクソン, チッピング ノートン, ミドル
バートン, ノース ストリート 43

(72)発明者 クランフィールド, マーク
イギリス国 オーエックス17 3エヌエフ オックスフォード, バンベリー, アダーベリー
, オックスフォード ロード 5

(72)発明者 テメン, アクセル ピー. エヌ.
オランダ国 エヌエル-3311 ディーエル ドルドレヒト, ストゥーブラーン 1

(72)発明者 サブジャニ, ゴパール プイ.
アメリカ合衆国 テキサス 77058, ナッソー ベイ, アッパー ベイ ロード 187
18

(72)発明者 メータ, ケトウシャ
アメリカ合衆国 テキサス 77573, リーグ シティ, サバル パーク レーン 238
7

专利名称(译)	免疫测定抗苗勒管激素和抗体		
公开(公告)号	JP2008542723A	公开(公告)日	2008-11-27
申请号	JP2008513688	申请日	2006-05-24
[标]申请(专利权)人(译)	贝克曼考尔特公司		
申请(专利权)人(译)	贝克曼库尔特有限公司		
[标]发明人	グルームナイジェルパトリック クランフィールドマーク テメンアクセルピーエヌ サブジャニゴパールブイ メータケトウシャ		
发明人	グルーム, ナイジェル パトリック クランフィールド, マーク テメン, アクセル ピー. エヌ. サブジャニ, ゴパール ブイ. メータ, ケトウシャ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/26 G01N33/6872 G01N33/74 G01N2333/495		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/577.B		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/684239 2005-05-24 US		
其他公开文献	JP4852712B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了用于测量样品中的抗穆勒激素 (AMH) 量的组合物和方法, 所述样品包括哺乳动物样品, 例如灵长类, 啮齿动物, 马或牛样品。本文的组合物和方法还提供了结合到AMH上对AMH蛋白水解稳定的表位的抗体。