

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4601884号
(P4601884)

(45) 発行日 平成22年12月22日(2010.12.22)

(24) 登録日 平成22年10月8日(2010.10.8)

(51) Int.Cl.

F I

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53

D

請求項の数 3 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2001-533423 (P2001-533423)	(73) 特許権者	397056695
(86) (22) 出願日	平成12年10月25日 (2000.10.25)		サノフィー・アベンティス・ドイツュラント
(65) 公表番号	特表2003-513243 (P2003-513243A)		・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンク
(43) 公表日	平成15年4月8日 (2003.4.8)		テル・ハフツング
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/010482		ドイツ連邦共和国デー 6 5 9 2 9 フラン
(87) 国際公開番号	W02001/031336		クフルト・アム・マイン、ブリュニングシ
(87) 国際公開日	平成13年5月3日 (2001.5.3)		ユトラーセ 5 0
審査請求日	平成19年10月16日 (2007.10.16)	(74) 代理人	100127926
(31) 優先権主張番号	199 51 684.7		弁理士 結田 純次
(32) 優先日	平成11年10月27日 (1999.10.27)	(74) 代理人	100091731
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 高木 千嘉
		(74) 代理人	
			西村 公佑

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトインシュリンおよびその誘導体サンプル中のCペプチド含有不純物を測定する新規な免疫学的アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 遺伝子組換えによって製造されるヒトインシュリンまたはその誘導体サンプルを調製し；

(b) 前記サンプルを希釈緩衝液と混合し；

(c) 化学発光トレーサーを (b) の混合物に添加し；

(d) Cペプチド含有不純物に対して特異的な抗体を (c) の混合物に添加し；

(e) 少なくとも1つの標識を有する、ヤギ抗インシュリンCペプチド抗体を捕捉するための二次抗体で被覆したビーズを (d) の混合物に添加し；そして

(f) Cペプチド含有不純物の存在を検出または測定する

工程からなる、遺伝子組換えによって製造されたヒトインシュリンまたはその誘導体サンプル中のCペプチド含有不純物を非放射性アッセイによって検出または測定する方法であって、

この方法は 8.5 から 9.0 の pH で実施する、上記方法。

【請求項 2】

Cペプチド含有不純物がCペプチド、プレプロインシュリンもしくはその誘導体、またはCペプチド含有インシュリンもしくはその誘導体である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

Cペプチド含有不純物に特異的な抗体がサルCペプチドを認識する請求項 1 に記載の方法。

10

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

はじめに：

リコンビナントインシュリンは形質転換させた大腸菌 (E. coli) が発現した融合蛋白質の下流部プロセッシングによって製造される。折り畳み反応の後、トリプシン処理によって、インシュリンの正確なジスルフィド架橋を含むインシュリン前駆体をプレプロインシュリンから切断する。(トリプシンは - A r g - A r g - (B 3 1 - B 3 2) および - L y s - A r g - (A 1 - A 0) の配列部位での同時切断によりCペプチドを遊離させる)。サルCペプチドのアミノ酸配列は、ヒトCペプチドと37位のアミノ酸が異なるだけである (P r o に対して L e u)。

10

【0002】

精製工程後に、ヒトインシュリン最終生成物は少量のプレプロインシュリンおよびその派生物、Cペプチド含有インシュリン誘導体並びに単離Cペプチド(集合的にCペプチド様活性と称する)の存在について分析する必要がある。以下の記述では、略語“H I”は“ヒトインシュリン”として、“H I A 1”は“G l y (A 2 1) - A r g (B 3 1) - A r g (B 3 2) - ヒトインシュリン”として、さらに“H I A 2”は“L y s (B 3) , G l u (B 2 9) - ヒトインシュリン”としてそれぞれ用いられる。前記分析は通常は放射性イムノアッセイ(“R I A”)により実施される。

【0003】

前記R I A法の欠点は、新しくヨウ素付加したトレーサーおよび3日間のインキュベーション期間を必要とし、その結果、実施場所が限定されるという欠点がある。さらにまた、サンプルの調製は非常に時間を要し、かつ変化に鋭敏であり、以前の測定によれば、いくつかの事例ではトレーサーの品質、サンプルの取り扱い、および3日間のインキュベーション時の沈殿による予想できない障害のためにアッセイが左右されることが判明した。その結果再検査が必要となり時間の空費という結果をもたらすだけである。

20

【0004】

R I A法のまた別の欠点は、前記方法は、カルボキシペプチダーゼB(“C P B”)による切断前の精製工程から得られるH I A 1またはH Iサンプルに対しては利用できないということである。なぜならば、これらのサンプルはこのアッセイ方法で与えられるpHでは沈殿するからである。R I Aアッセイの緩衝液のpHを高めることによりサンプルの溶解は改善されるが、アッセイの性能は低下する。本発明の目的は、H I (INSUMAN(登録商標))、H I A 1 (GLARGINE(登録商標))およびH I A 2製造のエンドプローブ(end probe)中のインシュリンCペプチド含有不純物を定量するとともに、前記3種のインシュリン垂型のインプロセスアイテム(in process item)中のインシュリンCペプチド含有不純物を定量するためにイムノアッセイで利用できる抗体を作製することである。

30

【0005】

これらの抗体は単離されたサルCペプチドおよび(プレ)プロインシュリン(“P R I”)に親和性を示すだけでなく、例えば以下のようなモデル化合物とも結合しなければならない：P P I、ヒトおよび/またはサルCペプチド、H I還元/アルキル化型、E D PでエンドプロテイナーゼA s p - Nにより切断されたH I、H I A 2のCペプチド、およびH I A 2 P P I。これらのモデル化合物は、インシュリンの工業的遺伝子組換え製造で予想される一群の副生成物および不純物を示すようにデザインされる。

40

【0006】

上記の要求を満たす抗体調製物は適当なアッセイ様式で用いて、選択した特定のインプロセスアイテムについてだけでなく、インシュリン製造のエンドプローブ中のインシュリンCペプチド様免疫反応性を定量することができる。

【0007】

検査アイテムの物理的特性のために、使用される抗体は、約8.5~9.0のpHで十分な親和性で抗原と反応する必要がある。そのような相互反応は、約1mg/mLのインシュリン含有量を含むことを特徴とするサンプルマトリックスによって影響を受けてはならない。

50

本イムノアッセイは、10 ng/mL (ヒトインシュリンの10 ppmに匹敵する) 未満のCペプチド含有不純物(インシュリンCペプチド様免疫反応性)を定量することが可能でなければならない。

理論的にはいくつかのCペプチド含有不純物がインシュリン製造の副生成物として予想できる。それらは図1aに示されている。

【0008】

【発明の概要】

本発明は、

(a) 遺伝子組換えにより製造されるヒトインシュリンまたはその誘導体サンプルを調製し；

10

(b) 前記サンプルを希釈緩衝液と混合し；

(c) トレーサーを(c)の混合物に添加し；

(d) 抗体を(c)の混合物に添加し；

(e) 少なくとも1つの標識を有する"Cペプチド第二抗体ビーズ"を(d)の混合物に添加し；そして

(f) Cペプチド不純物の存在を検出または測定する

遺伝子組換えにより製造されるヒトインシュリンまたはその誘導体サンプル中のCペプチド不純物を非放射性アッセイによって検出または測定する方法に関する。

【0009】

図面の説明

20

図1Aは、想定されるCペプチド含有不純物の模式図である。

図1Bは、図1Aの記号の説明である。

図2は、スーパーデックスペプチド(10/30)を用いた、検定物質であるチトクロームC(C)、アプロチニン(A)およびビタミンB1(B)の溶出プロファイルを示す。Cペプチドトレーサーは、チトクロームCおよびアプロチニンの間の位置に対称性ピークとして溶出する(太線)。

図3は、半合成ヒトインシュリン調製物中のCペプチド不純物を検出および特定する6種の異なるアッセイの実施で得た標準曲線を示す。

【0010】

図4A、図4Bは、PPI EMDフラクトゲルカラムに適用した抗サルインシュリンCペプチド抗体を含む単離血清サンプルの溶出プロファイルを示す。

30

図5は、前記カラム(PPI EMDフラクトゲルカラム)から得た抗サルインシュリンCペプチド抗体を含む濃縮グリシン溶出物の溶出プロファイルを示す。この溶出物のクロマトグラフィーはスーパーデックス200(26/60)排除カラムで実施した。

図6は、スーパーデックス200(26/60)排除カラムから得た分画17-24の第二のゲル濾過クロマトグラフィーの溶出プロファイルを示す。より高純度を得るために同じカラムを用いた。

【0011】

図7は、エンドプロテイナーゼA sp - Nによる切断に対するHI、HI還元/アルキル化型の感受性を分析するSDSゲルを示す。サンプルは一切のジスルフィド架橋を還元するためにDTEを含んでいる。

40

図8は、本発明の被覆ビーズアッセイ手順を用いた、コントロール抗原類HI PPI、ヒトCペプチド、サルCペプチドおよびPPI還元/アルキル化型の分析を示す。99 Ser 9調製物を坑血清として用いた。

図9は、本発明の被覆ビーズアッセイ手順を用いた、コントロール抗原類サルCペプチド、エンドプロテイナーゼA sp - N切断HI PPI、HIA2 PPI、およびHIA2 Cペプチドの分析を示す。99 Ser 9調製物を坑血清として用いた。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明は、本来のRIAの上記の欠点を回避できる新規な非放射性イムノアッセイに関する

50

る。本新規なアッセイは以下を基にしている：

- 1．P P Iでアフィニティー精製したヒツジS 9 5 - 1 1由来の抗体、
- 2．サンプル溶解後に各サンプルでp H制御およびp H調節を必要としない簡略化した二工程サンプル希釈手順、
- 3．長期にわたって安定で、その結果長期間同一のトレーサーでアッセイを実施することができる化学発光Cペプチドトレーサー、
- 4．結合抗原またはトレーサーの存在下、非存在下でヤギ抗インシュリンCペプチド抗体を捕捉するための二次抗体（Daiichi Radioisotope Labs. LTD）で被覆したポリスチロールビーズ、
- 5．全成分をわずか5時間一緒にインキュベートする一工程同時インキュベーション。

10

【0013】

本アッセイはp H 8 . 5 ~ 8 . 7で実施されるので、H IおよびH I A 1検査アイテムは両方とも全インキュベーション時間中溶解したままであり、さらに同アッセイによって変動することなく分析される。

リコンビナントインシュリンH IおよびH I A 1のCペプチドはサルのプロインシュリンから得られたので、サルインシュリンのCペプチドを検出するために適切なアッセイが、H M Rリコンビナントインシュリンエンドプローブおよびインプロセスアイテム中のインシュリンCペプチド様免疫反応性を定量するために必要とされる。

H I A 2のCペプチドは、ヒトインシュリンのCペプチドと比較した場合突然変異を有し、そのC末端領域で切り縮められている。したがってそれは人工的産物で天然に存在するペプチドではない。

20

【0014】

血清中のインシュリンCペプチドの濃度を決定するために利用できる市販の診断用イムノアッセイがいくつか存在する。全てのアッセイは、ヒトインシュリンCペプチドに対する種特異性を示し、いくつかのものはラット、ウシおよびブタのCペプチドに対して種特異性を示すが、サルCペプチドに対して特異性を示すものはない。

前記市販アッセイの目的は、Cペプチドまたはプロインシュリンのいずれかに対して可能な限り特異性を示させることである。しかしながら、本出願人の意図は、CペプチドおよびP P Iの両方にほぼ同じ親和性で相互作用する抗体（アッセイ）を得ることであった。

30

【0015】

本発明の方法で用いられる抗体は、哺乳類（好ましくはヒツジ）を精製されたインシュリンのC鎖（好ましくは欧州特許0032675に記載されたサルインシュリンC鎖）で免疫し、続いて適当な担体に固定したインシュリンでアフィニティー精製することによって得られる。前記固定されるインシュリンは、好ましくは半合成ヒトインシュリンまたはリコンビナントヒトP P Iである。この抗体の精製は実施例および添付図面で詳述する。

【0016】

我々は、3種の市販アッセイについてそれらが必要条件を満たすか否か検査した。前記3アッセイは、（1）R I A被覆Cペプチド；（2）ヒトCペプチドR I Aキット；および（3）ヒトプロインシュリンR I Aキットであった。

40

- 1．R I A被覆Cペプチド（カタログ番号323.171: BYK Sangtec Diagnostica GmbH & Co . KG 63120 Dietzenbach, Germany; 3時間プロトコル）

本アッセイは、与えられたサンプルに存在するサルインシュリンCペプチドを定量するためには適当ではなかった。これは以下の理由による：

- a) サルCペプチドおよび/またはP P Iとの交差反応性が不十分（供給元によれば2 5 %）；
- b) サンプル緩衝液の成分が不適当；または
- c) サンプル中の高濃度のヒトインシュリン（1 m g / m L）による妨害。

【0017】

- 2．ヒトCペプチドR I Aキット（カタログ番号HCP-20K: Linco Research Inc. St. Lou

50

is, MO63304-USA ; 2 日間アッセイプロトコル)

本アッセイはヒトCペプチドに対する抗体を基にしており、本抗体はサルCペプチドに対して90%、およびヒトプロインシュリンに対して4%未満の交差反応性を示す。

本アッセイはHIサンプルを分析するために使用できる。しかしながら、キット緩衝液のpHのためにHI製造のインプロセスアイテムでは沈殿が生じる。HIA1の場合(これはpH7.4では溶解しない)、本アッセイは使用できない。本発明の化学発光物質被覆ビーズアッセイと比較したとき、次のことが示される。すなわち、このアッセイで使用される抗体はヒトおよびサル由来の単離Cペプチドとより強力に結合するが、それでも本キットの抗体は、HI、PPIまたはEDP部位で切断したPPIとは本発明の抗体調製物ほど十分な相互反応をしない。本発明の被覆ビーズアッセイはpH8.7で実施され、一方、前記LincoアッセイはpH7.4で実施されることは留意されるべきである。

【0018】

3. ヒトプロインシュリンRIAキット(カタログ番号HPI-15K,K: Linco Research Inc. St. Louis, MO63304-USA ; 3 日間アッセイプロトコル)

本アッセイはサルCペプチドを検出できない。したがってその特異性はわれわれの要求には十分ではない。

【0019】

ヒトCペプチドまたはヒトプロインシュリンに対する抗体を基準とし、中性pHで実施されるアッセイでは、我々が必要とする要件は満足されないことが結論された。

【0020】

本発明のアッセイのための要件は以下のとおりである：

- アッセイpHは8.5より高い；
- PPIに対して十分な特異性を有する；
- モデル検査化合物に対して十分な結合親和性を有する；
- 1mg/mLのHIの存在が本抗体の結合親和性に干渉しない；
- 放射性活性を使わない；および
- アッセイ時間が短い。

【0021】

必要なアッセイを得るための手段は以下のとおりである：

- 担体と結合していないサルインシュリンCペプチドで免疫し；
- PPIカラムでアフィニティー精製し；
- ヒトインシュリンと特異的または非特異的に相互反応する一切の抗体を免疫吸着により除去し；
- 種々の血液から得られた抗体をそれらと化学発光CペプチドトレーサーとのpH8.5での結合を精査することによってスクリーニングし；
- モデル検査化合物を作製し；さらに
- 当該pHで高い緩衝能力をもつ緩衝液を用いて8.5より高いpHでのアッセイを確立する。

【0022】

【実施例】

本発明をこれから実施例によって詳述するが、ただしこれら実施例に限定されるわけではない。

以下の実施例では、下記の材料および装置のいくつかまたは全てが用いられる：

2 回蒸留水

リン酸ナトリウム、Riedel(04269)

塩化ナトリウム、Merck

アジ化ナトリウム、Merck

ウシ血清アルブミン、Behringwerke(ORHD20/21)

ウシガンマグロブリン、Sigma(G-5009)

グリシン、Riedel(33226)

ポリエチレングリコール - 20% (" P E G - 20 ")、Biodata
 水酸化ナトリウム - フィキザナル、Riedel(38210)
 水酸化ナトリウム - 2 M、Riedel(35254)
 酢酸ナトリウム三水和物、Merck(6267)
 リン酸、85%、Riedel(30417)
 半合成ヒトインシュリン (H I et) バッチ : A48U114およびA48U118
 R I A ポリスチレン管、12 × 7.5 mm、Sarstedt(55476)
 C ペプチド第二抗体ビーズ、C P III、Daiichi Radioisotope Labs; Ltd, Tokyo
 プロクリン (Proclin) 300、Supelco(4-8127)
 ダルベッコーリン酸緩衝食塩水 (" P B S ")、Sigma(D-5652) 10
 ベリラックス (Berilux) 溶液 R 1 および R 2、Behring
 センサーチップ C M 5、Pharmacia BIAcore
 カルボジイミドカップリングキット、Pharmacia BIAcore
 蛋白質濃度定量用 B C A アッセイ、Pierce (溶液 A : No.23223 ; 溶液 B : No.23224)
 蛋白質濃度測定用 I g G スタンダード、Pierce(31204)
 フラクトゲル E M D アズラクトン (Fractogel EMD Azlacton) 650 (S)、Merck(1.1008
 7)
 N u P A G E 4 - 12% および M E S 泳動緩衝液を使用する S D S ゲル電気泳動系、Nov
 ex
 銀染色キットプラスワン、Pharmacia Biotech(コード番号17-1150-01) 20
 (他の全ての化学物質は、Sigma、MerckまたはRiedel de Haenから購入した)
 【 0 0 2 3 】
 装置 :
 マルチベット、Eppendorf
 マイクロリットルピペット、Abimed, Gilson
 マイクロラブ M、Hamilton
 メスフラスコおよびメスシリンダー
 旋回ミキサーレックス (Reax) 2000、Heidolph
 デジタルペーハーメーター、Knick
 オートクリニルマット (AutoCliniLumat) L B 9 5 2 T / 16、Berthold 30
 ウォラックウィザード (Wallac Wizard) 1470 マルチディテクターガンマカウンター
 (RIA-Calc, Multi-Calcソフトウェア搭載)、Wallac
 ビアコア (BIAcore) 1000、Pharmacia BIAcore
 冷却遠心機 (G S - 6)、Beckmann
 スupraフュージ (Suprafuge) 22、Heraeus Sepatech
 バイオフュージ (Biofuge) 13 R、メガフュージ (Megafuge) 1.0 R、Heraeus Sepat
 ech
 S D S ゲル電気泳動系 (モデル 3540 パワーサプライを含む)、Novex
 エッペンドルフ管インキュベーター、Eppendorf
 ヘーファー (Hoefer) 自動ゲル染色装置、Pharmacia 40
 天秤 P M 400、P M 4000、Mettler
 A T 261 デルタレンジ、Mettler
 ウльтраフリー - 15 10 kDa、Millipore (UFV2BGC)
 グラスプレフィルター (直径 47 mm)、Schleicher & Schuell (421026)
 メンブレンフィルター (直径 50 mm)、5 μm、Schleicher & Schuell (400214)
 メンブレンフィルター (直径 50 mm)、0.2 μm、Schleicher & Schuell (404114)
 【 0 0 2 4 】
 アフィニティークロマトグラフィー用 F P L C 1、Pharmacia
 コントローラー L C C - 500 プラス
 2 × ポンプ P - 500 50

ポンプ P 5 0

ポンプ P - 1

ユビコード S II および伝導率検出装置

E R C 3 3 1 2 脱気装置

2 2 1 1 スーパーラックフラクションコレクター

4 × M V - 8 バルブ

1 × M V - 7 バルブ

【 0 0 2 5 】

ゲル透過クロマトグラフィー用 F P L C 2、Pharmacia

コントローラー L C C - 5 0 0 プラス

10

2 × ポンプ P - 5 0 0

ポンプ P - 1

ユビコード S 検出装置

E R C 3 6 1 2 脱気装置

2 2 1 1 スーパーラックフラクションコレクター

1 × M V - 7 バルブ

液流ストッパー

手動バルブ S R V - 4

【 0 0 2 6 】

略語：

20

B S A：ウシ血清アルブミン

C V：変動係数

E L I S A：酵素結合免疫吸着アッセイ

H I e t：半合成ヒトインシュリン

P B S：リン酸緩衝食塩水

P P I：プレプロインシュリン

Q C：クオリティーコントロール

R I A：放射性免疫アッセイ

【 0 0 2 7 】

以下の実施例で用いられる固有のアッセイの成分：

30

抗体：

抗体はヒツジ (S 9 5 - 1 1) を精製インシュリン C ペプチドで免疫して得た。動物から採血して得た血清サンプルを実施例 1 の精製プロトコルにしたがって精製した。得られたアフィニティー精製抗体は 1 : 1 5 0 0 の希釈で本アッセイに用いることができる。

【 0 0 2 8 】

以下の抗体が得られた：

Z 2 1 2 7 , 9 9 Ser 1 _ _ S D 2 / F 1 7 - 2 2 ;

Z 9 4 , 9 9 Ser 2 _ _ S D 2 / P 3 ;

S 9 5 - 1 1 , 9 9 Ser 7 / S D 2 - 6 5 0 / F 1 7 - 2 2 ;

S 9 5 - 1 1 , 9 9 Ser 8 / S D 2 - 6 5 1 / F 1 7 - 2 1 ;

40

S 9 5 - 1 1 , 9 9 Ser 9 / S D 2 - 6 5 2 / F 1 7 - 2 4 ;

S 9 5 - 1 1 , 9 9 Ser 1 0 / S D 2 - 6 8 0 / F 1 5 - 2 5 ;

S 9 5 - 1 1 , 9 9 Ser 1 1 / S D 2 - 6 8 1 / F 1 5 - 2 4 ;

S 9 5 - 1 1 , 9 9 Ser 1 2 / S D 2 - 6 8 2 / F 1 5 - 2 4

【 0 0 2 9 】

トレーサーおよび標準物質：

リコンビナントヒト H I インシュリンから単離した C ペプチド (ヒト配列の代わりにサルの配列) をスタンダードおよびトレーサーとして用いる。純度は 9 9 % である。

【 0 0 3 0 】

サンプル緩衝液：

50

サンプル緩衝液は100mLの蒸留水に0.326gのピシン(Bicine; Sigma B-3876)を溶解して調製した。pHは1NのNaOHを用いて8.7に調節する。スタンダード/希釈緩衝液:

半合成ヒトインシュリン(HIet、材料の項参照)を10mMのHClに溶解し10mg/mL溶液とする。このインシュリン溶液をさらにサンプル緩衝液を用いて1:10に希釈する。

抗体緩衝液:

市販のPBS粉末(Sigma D-5652)を約980mLの水に溶解し、pHを1NのNaOHを添加して7.7に調節する。洗剤TWEEN-20(登録商標)を添加してその最終濃度を0.05%にする。本緩衝液の容積をメスシリンダーで正確に1Lに調整する。最後にBSAを1.5%(w/v)となるように溶解する。

10

【0031】

実施例の詳細

実施例1:

I. アッセイの実施

A. サンプルの溶解:

約0.5~0.8mgのサンプルを10mMのHClに溶解して10mg/mL溶液を得た。続いてこの完全に溶解させた材料をさらにサンプル緩衝液で1:10に希釈した。

B. トレーサー調製物:

アクリジニウムアシルスルホンアミド誘導体Ki256(それぞれドイツ特許DE3805318およびDE3628573)を用いて、発光アクリジニウムエステル部分とCペプチドとの直接共有結合によりCペプチドトレーサーを作製できる。化学発光はアルカリ性H₂O₂(F. McCarpa, Acc. Chem. Res. 9:201ff. (1976))の添加によって誘発される。

20

【0032】

この化学発光Cペプチドトレーサーを調製するために、以下の溶液を混合し、周囲温度で20分インキュベートした:

1. 1LのH₂Oに8.17gのKH₂PO₄、7.12gのNa₂HPO₄、8.77gのNaClおよび0.5gのNaN₃を含む緩衝液255μL、pHは1NのNaOHを用いて8.0に調整;

2. H₂Oに2mg/mLの濃度のCペプチド125μL;

30

3. 120μLの標識Ki256(1mLのアセトニトリルに10mg)。

【0033】

前記標識とCペプチド内の官能基との共有結合反応は100μLのL-リジン(10mg/mL)の添加によって停止させた。この標識されたCペプチドをFPLC系に組み込んだスーパーデックスペプチド(Superdex Peptide)10/30カラム(Pharmacia)を用いサイズ選別ゲルクロマトグラフィーにより精製した。泳動緩衝液はPBS、0.04%プロクリン(Proclin)であった。流速は0.2mL/分であった。

アプロチニンとチトクロームCとの間の位置で溶出した蛋白質を採集し、一緒にして部分標本として凍結した(バッチ2)。トレーサー作製の再現性は一度立証された。アッセイでの使用に最適なトレーサーストック溶液の希釈は経験的に決定した。

40

【0034】

C. スーパーデックスペプチド(10/30)によるトレーサーの精製:

カリブレーターとしてのチトクロームC(C)、アプロチニン(A)、およびビタミンB1(B)の溶出は図2に示されている。未反応標識、リジンおよび他の緩衝液成分は、チトクロームCおよびアプロチニンとの間の位置で対称性ピーク(太線)として溶出するトレーサーから排除できる。

【0035】

D. スタンダードの調製:

インシュリンCペプチドの1mg/mLのストック溶液(下記#2のとおり)を水で調製する。このストックから一部分を取り、希釈緩衝液でさらに1:100に希釈する。両サンプ

50

ルを使用まで凍結保存する。

スタンダードは後者のサンプル (10 μ g/mL) から一部分を希釈緩衝液で 1 : 100 に希釈し、続いて 1 : 4 に 4 回希釈することによって調製する。その結果、100 ng/mL、25 ng/mL (S4)、6.25 ng/mL (S3)、1.563 ng/mL (S2) および 0.39 ng/mL (S1) のスタンダードが得られる。全ての希釈は、未知製品のインシュリンサンプルの条件に類似させるために 1 mg/mL の H Iet を含む希釈緩衝液で実施する。スタンダード S1 - S4 のみをアッセイに用いる。

【0036】

II. アッセイプロトコル

1. 各試験管当たりそれぞれの濃度のスタンダード 200 μ L を用い、各スタンダードはトリプリケートで用意する。 10

2. 200 μ L の溶解サンプルを用い、サンプルはデュプリケートで分析する。

3. 純粋な希釈緩衝液を用い (3 $\times$ 200 μ L) S0 値を得る。

4. トレーサー (パッチ 2) をサンプル緩衝液で 1 : 40000 に希釈する。このトレーサー溶液 100 μ L を各試験管に添加する。

【0037】

5. 抗体調製物 99 Ser9 を抗体緩衝液で 1 : 1500 に希釈し、100 μ L を各試験管に添加する。

6. 試験管内の内容物を混合する。その後、1つの“Cペプチド第二抗体ビーズ”を加える。 20

7. 周囲温度で 5 時間振盪した後、液体を吸引により除去する。真空ポンプに連結した手動 10 チップ洗浄ヘッドを用いて約 0.8 mL の水で 5 回ビーズを洗浄する。続いて、サンプルをルミノメーターで分析する。各々 0.3 mL の溶液 R1 (H_2O_2) および R2 (NaOH) の自動連続分散によってサンプル中の化学発光を刺激する。放射光を 1 秒間測定し、RLU (相対光単位) として表示する。

8. 結果の算出は、標準曲線の logit / log 変換を用いてアナライザー自体のソフトウェアによって自動的に実施される。

【0038】

III. アッセイの特徴

真性バックグラウンドの変動

A. 半合成ヒトインシュリンの測定

本アッセイの目的は、PPI、インシュリン C ペプチド、および想定されるインシュリン不純物 (ヒトインシュリンの A 鎖または B 鎖に共有結合した C ペプチドの一部を含む) を特定することである。これらの抗原構造は、正確なプロセッシングを受けた過剰量のインシュリンの存在下で決定されねばならない。このインシュリンバックグラウンドによって誘発される変動を分析するために、半合成インシュリン (濃度 1 mg/mL) を繰り返し分析した。半合成インシュリンは、それがサル C ペプチドに由来する不純物を含んでいないということ、さらに、それはスタンダード / 希釈緩衝液の成分であることを確認する目的のために使用されねばならない。

半合成インシュリンは、上記のサンプルの溶解で述べたように 1 mg/mL の濃度の 10 倍に溶解した。これらのインシュリンサンプルを同日のアッセイで分析した。このインシュリンサンプルについて得られた結果は表 1 に示す。 40

【0039】

【表 1】

表 1

1 mg/mLの半合成ヒトインシュリンサンプルおよび精製手順の工程
12/10で生じたインシュリンH I A 1 サンプルで得られた結果

サンプル	H I et	H I A 1 055AKR, 01+02
サンプル番号	B / B 0 (%)*	B / B 0 (%)*
1	91.5	80.0
2	105.1	79.8
3	101.8	85.9
4	102.6	86.6
5	105.6	77.7
6	91.3	82.2
7	102.1	85.0
8	106.3	84.1
9	103.1	80.0
10	101.0	77.2
平均値	101	81.9
標準偏差	3.9	3.4

* 全てのサンプルはデュープリケートで測定した。

【0040】

上記の結果は、半合成ヒトインシュリンは平均してトレーサーと抗体との結合を混乱させないことを示している。しかしながら、B / B 0 の最大値が106%で最小値が91%となるある程度の変動性がある。

この発見により、未知のサンプルにおいて得られる、B / B 0 が90% (= 平均値 - 3 × 標準偏差) を越える値は計算されるべきではないと結論され、バックグラウンドと解した(検出限界)。B / B 0 > 90%であるサンプルはおそらく< 0.4 ppmのCペプチド様活性を含んでいる。反復性(アッセイ内変動性)は、これらのH I et (バックグラウンド) サンプルで分析されたように4%である。

同じ4%の値が、約1 ng/mLのCペプチド様免疫反応性を含むサンプル(サンプルH I A 1 055AKR 01+02、表1参照)で見出された。H I et プローブのように、検査アイテムを1 mg/mLの濃度の10倍で溶解し、同じ日に分析した。

【0041】

B. インシュリン最終製品サンプルについての統計的アプローチの適用

同じ統計的アプローチをH I およびH I A 1 製造の最終製品に採用した。この目的のために、23の異なるH I サンプルおよび6つの異なるH I A 1 サンプルを同じ日に分析した。結果を表2に示す。

【0042】

【表2】

表 2 : 1 mg/mLのHIおよびHIA1サンプルで得られた結果

H I		H I A 1	
サンプルコード	B/B0 (%)*	サンプルコード	B/B0 (%)*
C038	99.3	U012	88.91
U030	93.2	U018	90.99
C033	92.5	U019	88.33
C034	89.8	U020	76.91
C035	100.2	U021	89.24
C036	99.4	U022	90.83
C037	97.4		
C039	90.8		
C040	93.8		
C041	99.5		
C042	102.7		
C044	102.2		
C045	104.9		
C046	92.5		
C047	100.8		
C048	106.3		
C049	108.9		
C050	101.6		
C051	94.7		
C052	101.7		
C053	98.9		
C054	102.3		
C043	100.2		
平均値	98.9		87.53
標準偏差	5.0		3.54

* 全てのサンプルはデュプリケートで測定した。

【0043】

上記データは、HIの最終製品は平均してCペプチド様活性を全く含んでいないことをはっきりと示している。なぜならば、個々の測定値の変動は半合成ヒトインシュリンで得られたものと類似しているからである。(24の個々のサンプルの)HI群とHIet(同じアッセイで10回分析された1つのサンプル)との間には顕著な相違はない。HIサンプルの最小値および最大値(それぞれ89.9%または109%)もまたHIetで得られた値(それぞれ91%または106%)に近い。

H I A 1 サンプルに関しては、C ペプチド様免疫反応性が最終製品に存在すると結論することができる。しかしながら、その含有量は、標準曲線を参考に定量したとき 0.5 ~ 1 p pm の範囲である（下記参照）。

【 0 0 4 4 】

C . 標準曲線：

6 つの異なるアッセイで得られた標準曲線を図 3 に示す。B / B 0 (%) で表したこれらの曲線の数値は表 3 にまとめた。曲線の統計分析は表 4 に示す。

【表 3】

表 3

標準曲線の元のデータ

スタンダード ng/mL	ア ッ セ イ 実 施 日					
	7月19日	7月20日	7月27日	8月3日	8月19日	8月24日
	B/B 0	B/B 0	B/B 0	B/B 0	B/B 0	B/B 0
0.39	89.2	92	93.6	93.6	92.5	91.0
1.56	68.4	66.6	67.9	71.2	71.8	68.8
6.25	32.4	32.5	35.7	34.6	35.8	35.9
25.0	13.5	13.8	14.3	14.5	14.1	13.8

【 0 0 4 5 】

上記曲線パラメーターは以下のとおりである：

- E D 20 = 1 4 . 4 4 ± 0 . 9 9 ng / mL (C V = 6 . 8 6 %)
- E D 50 = 3 . 2 1 ± 0 . 2 3 ng / mL (C V = 7 . 2 1 %)
- E D 80 = 0 . 9 1 ± 0 . 1 0 ng / mL (C V = 1 0 . 7 1 %)

【 0 0 4 6 】

【表 4】

10

20

30

表 4

6つの標準曲線および別の日に測定したコントロールサンプル
から得られたデータの統計的評価

スタンダード (ng/mL)	平均値 (B/B0)	標準偏差 (B/B0)	CV (%)
0.39	92.0	1.69	1.83
1.56	69.1	2.0	2.89
6.25	34.4	1.61	4.68
25.0	14	0.37	2.63
コントロールH I et (5回の測定)	97.80	3.82	3.90
コントロールH I バッチC038(5回の測定)	98.65	2.92	2.97

10

20

【0047】

上記に提示したデータは以下の事柄を示している：

1. この標準曲線の再現性は高い。
2. 半合成ヒトインシュリンは本抗体によって認識されない。
3. Cペプチド様活性はH I バッチC038では測定されない。
4. 得られたCV値（H I etでは3.9%、H I バッチC038では2.97%）が示すとおり、このアッセイによるサンプル分析の再現性は高い。

【0048】

IV. アッセイの特異性

30

上記に提示したデータは、概略した方法を用いたとき本アッセイは純粋なヒトインシュリンによって極めてわずかな影響しか受けないことをはっきりと示している。これは医薬用インシュリン調製物でのCペプチド様免疫反応性の測定の前提条件である。

【0049】

モデル化合物を含むCペプチドを用いて、既定のアッセイ様式で我々の抗体の特異性を調べた。モデル化合物についての説明は以下の節で述べる。

1. H I P P I
2. ヒトCペプチド

合成ヒトインシュリンC鎖はSigma（カタログ番号 C-5051）から入手した。純度は97%とされ、ペプチド含有量は84%である。

40

3. H I 還元/アルキル化型

この目的は保護されたNおよびC末端をもつ直鎖状Cペプチドを分析することである。このコントロールは折り畳まれていないP P Iに類似し、その中心部分と結合する抗体はアフニティー精製坑血清調製物の特異性に寄与することを示す。このコントロールサンプルの調製については実施例4で述べる。

【0050】

4. CペプチドのE D P（C6 - C7）部位でエンドプロテイナーゼA s p - Nで切断されたH I

この目的は共有結合したCペプチド配列をB鎖のC末端および/またはA鎖のN末端にもつヒトインシュリンを分析することである。このコントロールは、CペプチドのE D P部

50

位の酸切断によって得られる不純物に類似する。本コントロールはまた、不完全なトリプシン切断によって生じる想定される不純物に類似する。このコントロールサンプルの調製については実施例 5 で述べる。

【 0 0 5 1 】

5 . H I A 2 C ペプチド (チャージ H D / 1 9 , 2 1 . 0 7 . 9 9 ; 純度 > 9 9 %) :
この C ペプチドは、H I C ペプチドと比較したときその N 末端が切り縮められており、したがって N 末端のエピトープが失われている。H I A 2 C ペプチドは、単離 H I C ペプチドでその N 末端が切断または改変されている不純物のためのモデルとして機能する。

6 . H I A 2 P P I (チャージ : U B 1 1 / 3 0 - H P 2 ; 純度 9 6 %) :

H I A 2 C ペプチドのように、この変異 P P I は、P P I (これは H I P P I と比べて劇的に改変された C ペプチド部分をもつ) とその抗体との免疫反応性をモニターするために役立つモデル抗原として機能する。

上記のモデル化合物を用いたコントロールアッセイの結果はその解釈と併せて実施例 7 に示す。

【 0 0 5 2 】

V . コントロール実験のまとめ

この一群のモデル化合物は我々のアフィニティー精製抗血清調製物 9 9 Ser 9 の特異性をはっきりと示している。

提示した全ての結果から、本出願で開示したビーズアッセイは、インシュリン製造から生じるサンプル中の C ペプチド様免疫反応性を測定するために非常に適切であると結論できる。示されたアッセイデザインで用いた抗体調製物は全てのモデル化合物を認識するので、リコンビナントインシュリン製造から生じるサンプル中の全ての主要な想定される C ペプチド不純物はこのアッセイによって認識されると結論することができる。

【 0 0 5 3 】

実施例 2 :

本発明のアッセイを用いた H I 精製時に夾雑する C ペプチド含有不純物の排除についての分析 (3 つの代替的アッセイとの比較)

3 つの異なる製造方法 (U A 1 1 4 、 U A 0 1 1 5 、 U A 1 1 6) における C ペプチド様免疫反応性の排除について調べるために新規なイムノアッセイを採用した。精製工程 1 2 (サンプル S B) 、 1 3 (サンプル K A および K B) および 1 4 (サンプル U A) に由来する検査アイテムを、インシュリン C ペプチド様免疫反応性について分析した。

本発明のビーズアッセイ (“ ビーズ ”) を用いて得られた結果を以下の市販の代替的アッセイの結果と比較する : (1) H M R - R I A (“ R I A ”) 、 (2) Linco Research Inc. のヒト C ペプチド R I A キット (“ Linco R I A ”) および (3) NewLab Diagnostic Systems GmbH が開発した E L I S A 法 (“ NewLab ”) 。

【 0 0 5 4 】

用いたアッセイの簡単な説明 :

(1) R I A (オリジナル) : 固定 P P I でアフィニティー精製した抗体 9 9 Ser 7 による放射性イムノアッセイ。サル C ペプチドをトレーサーとして用い、H I P P I をスタンダードとして用いる。標準曲線の範囲は 0 . 3 9 ~ 2 5 ng / mL である (検出限界 : 0 . 5 ng / mL) 。

(2) Linco R I A : 抗ヒト C ペプチド抗体による市販の放射性イムノアッセイ。このアッセイはサル C ペプチドと P P I の良好な交差反応性を示すが、H I P P I との結合はビーズアッセイと比べたとき 3 倍低下する (下記表 9 参照) 。ヒト C ペプチドがスタンダードおよびトレーサーとして用いられる。標準曲線の範囲は 0 . 1 ~ 5 . 0 ng / mL である (検出限界は 0 . 1 ng / mL) 。

【 0 0 5 5 】

(3) NewLab : NewLab Diagnostic Systems GmbH により開発されたサンドイッチ方式 E L I S A で、モノクローナル抗ヒト C ペプチド (Fitzgerald) およびポリクローナル抗サル C ペプチド血清を用いる。このアッセイは単離 C ペプチドに対して強い優先性を示す

(P P I 樹脂でのアフィニティー精製を実施していないモノクローナル抗ヒトCペプチドおよびポリクローナル抗サルCペプチド)サルCペプチドをスタンダードとして用いる。標準曲線の直線範囲は0.5 ~ 10 ng / mLである(検出限界は0.5 ng / mL)。

(4) ビーズ: 本発明のアッセイ。非放射性被覆ビーズアッセイは、H I P P I アフィニティーカラムでのアフィニティー精製後に得られた抗体99 Ser9 (R I Aの抗体と同様)を基にしている。サルCペプチドをスタンダードおよびトレーサーとして用いる。標準曲線の範囲は0.39 ~ 25.0 ng / mLである(検出限界0.4 ng / mL)。

【0056】

以下の表では、略語について以下の定義を用いる:

S B: 精製工程12(イオンクロマトグラフィー)後の検査アイテム;

K AおよびK B: 精製工程13(RPクロマトグラフィー)後の検査アイテム;

U A: 精製工程14(最終結晶化)後の検査アイテム;

N D: 実施せず。

【0057】

【表5】

表 5

プローブC054についての市販の他のアッセイと
本発明のビーズアッセイとの比較データ

プローブ	RIA(1) (ng/mL)	Linco(2) (ng/mL)	NewLab(3) (ng/mL)	ビーズ(4)(ng/mg)	
				#1	#2
C054	0.18	0.12	ND	0.03	0.00
UA-0114-1-01	0.06	0.10	<0.5	0.00	0.00
KB-0114-2-02	0.24	0.12	<0.7	0.00	0.03
SB-0114-2-01	1228.75	108.77	60.00	249.00	210.00
KA-0114-2-09	0.34	0.12	<0.6	0.00	0.00
SB-0114-1-03	691.13	78.22	<50	189.00	156.00
UA-0114-1-02	0.31	0.12	<0.5	0.15	0.17
KA-0114-2-05	0.34	0.13	<0.6	0.11	0.23
SB-0114-2-04	1502.86	114.05	90.00	257.0	252.0
KA-0114-2-10	0.19	0.11	<0.7	0.04	0.00
SB-0114-1-04	847.36	87.60	90.00	208.00	192.00
UA-0114-1-03	0.43	0.13	<0.6	0.11	0.13
KB-0114-2-08	0.65	0.15	<0.6	0.00	0.00
SB-0114-2-06	1273.23	137.98	120.00	346.00	335.00
KA-0114-2-11	0.63	0.15	<0.6	0.00	ND
SB-0114-1-05	961.21	116.83	80.00	216.00	172.00
UA-0114-1-05	0.36	0.12	<0.5	0.00	0.00
KA-0114-2-01	0.69	0.16	<0.6	0.00	0.00
SB-0114-1-01	847.67	80.65	70.00	241.00	179.00
KB-0114-2-04	0.71	0.13	<0.5	0.00	0.03
SB-0114-1-02	1030.86	107.76	70.00	237.00	218.00
HI(U103)	0.36	0.13	ND	0.05	0.19

【 0 0 5 8 】

【表 6】

表 6

プローブC055についての市販の他のアッセイと
本発明のビーズアッセイとの比較データ

プローブ	RIA(1) (ng/mL)		Linco(2) (ng/mL)		NewLab(3) (ng/mL)	ビーズ(4) (ng/mL)	
	#1	#2	#1	#2			
C055	0.00		0.13			0.02	10
UA-0115-1-01	0.77	11.04	0.17	0.50	<0.5	0.00	
KB-0115-2-02	0.00		0.12		<0.5	0.00	
SB-0115-1-01	828.04		78.58		60.00	185.00	
KA-0115-2-06	0.00		0.11		<0.5	0.00	
SB-0115-1-02	890.89		78.09		80.00	184.00	
UA-0115-1-02	0.00		0.11		<0.6	0.27	20
KB-0115-2-09	0.91		0.17		<0.5	0.07	
SB-0115-1-04	772.29		75.06		60.00	270.00	
KB-0115-2-13	0.00		0.14		<0.5	0.01	
SB-0115-1-07	530.41		54.19		50.00	132.00	
UA-0115-1-03	0.00		0.12		<0.6	0.05	
KB-0115-2-05	0.00		0.10		<0.5	0.00	
SB-0115-2-04	710.36		67.34		60.00	159.00	30
KA-0115-2-08	0.00		0.12		<0.5	0.00	
SB-0115-2-06	932.51		65.37		50.00	190.00	
UA-0115-1-04	8.03	1.44	0.41	0.17	<0.5	0.06	
KA-0115-2-03	0.00		0.12		<0.6	0.00	
SB-0115-2-02	661.85		62.54		50.00	138.00	
KB-0115-2-07	0.00		0.14		<0.5	0.38	40
SB-0115-2-05	726.52		59.09		50.00	151	
HI(U103)	0.00		0.11			0.20	

【 0 0 5 9 】

【 表 7 】

表 7

プローブC056についての市販の他のアッセイと
本発明のビーズアッセイとの比較データ

プローブ	RIA(1) (ng/mL)		Linco(2) (ng/mL)		NewLab(3) (ng/mL)	ビーズ(4) (ng/mL)	
	#1	#2	#1	#2			
C056	0.00		0.11			0.02	10
UA-0116-1-01	0.00		0.14		<0.7	0.28	
KB-0116-1-01	0.00		0.11		<0.5	0.06	
SB-0116-1-05	1114.96		138.90		90.00	333.00	
KA-0116-1-02	0.13		0.12		<0.5	0.06	
SB-0116-1-06	799.15		144.90		80.00	417.00	
UA-0116-1-02	2.90	1.28	0.30	0.18	<0.7	0.07	20
KB-0116-2-07	0.00		0.10		<0.5	0.62	
SB-0116-1-01	473.89		76.96		<50	174.00	
KA-0116-2-09	7.3	0.53	0.45	0.14	<0.5	0.07	
SB-0116-1-03	1009.20		112.36		90.00	326.00	
UA-0116-1-03	1.28	8.46	0.12	0.14	<0.5	0.00	
KB-0116-2-02	0.00		0.09		<0.5	0.00	
SB-0116-2-02	224.60		49.35		<50	194.00	30
KB-0116-2-06	0.00		0.09		<0.5	0.06	
SB-0116-2-07	849.40		93.30		<50	289.00	
UA-0116-1-04	0.00		0.13		<0.6	0.39	
KA-0116-2-05	0.72		0.20		<0.7	0.08	
SB-0116-2-06	902.50		92.68		<50	282.00	
KB-0116-2-08	0.00		0.14		<0.5	0.27	40
SB-0116-1-02	517.30		74.22		<50	98.00	
HI(U103)	0.00	0.35	0.10	0.13		0.28	

【 0 0 6 0 】

結果：

1. 本発明の新規なイムノアッセイによって、HI精製方法におけるインプロセスコントロールアイテム中におけるCペプチド免疫反応性の除去の程度を決定できる(表5~7、最下段ビーズ(4)を参照されたい)。Cペプチドがスタンダードとして用いられるので、本発明から得られた値はオリジナルRIAの場合よりも約2.5~3倍低い((4)と比較

した上記の(1)を参照されたい)。実際、4倍の違いが認められ(平均値)、これは、RIAと比較したとき劇的に短縮されたインキュベーション時間に比例する。

【0061】

2. Cペプチド様免疫反応性は、本発明の被覆ビーズアッセイを用いたときHIEndプロブでは検出されない。その算出濃度は、HIEtについて測定可能な値の範囲内にある。KA/KBおよびUAサンプルの平均値は以下のとおりである：

KA/KB 114 由来のサンプルについては 104.7 ± 3.7 (CV = 3.5%) (n = 8)

KA/KB 115 由来のサンプルについては 103.8 ± 5.3 (CV = 5.1%) (n = 8)

KA/KB 116 由来のサンプルについては 99.8 ± 3.7 (CV = 3.7%) (n = 8)

UA 114 由来のサンプルについては 102.3 ± 3.7 (CV = 3.6%) (n = 4)

UA 115 由来のサンプルについては 100.3 ± 3.2 (CV = 3.2%) (n = 4)

UA 116 由来のサンプルについては 99.1 ± 3.8 (CV = 3.8%) (n = 4)

これら全ての値はHIEtを繰り返し測定して決定したその変動範囲に厳密に適合する。

【0062】

3. 表5の最下段(ビーズ(4))に示したデータは、本発明のアッセイは再現性のある結果を提供できることを明らかにした。

4. オリジナルRIA(1)の問題は、サンプルの取り扱いまたはアッセイの作業における明瞭な過誤では説明できないランナウェーを有することである。さらに、このアッセイは再現性が低いことが特徴である。

5. Lincor IA(2)はオリジナルRIA(1)よりはるかに強固で再現性についても改善されている。オリジナルRIAほど重大ではないが、このアッセイもまたオリジナルRIAと同様にサンプルの希釈方法に問題がある(表5~7参照)。Lincor IAは検査に用いた中でもっとも感度の高いアッセイであるので、0.1~0.5 ng/mLの濃度範囲で微量のインシュリンCペプチド様活性がいくつかの最終製品サンプルで検出できる。

6. RIA(1)、Lincor(2)およびビーズ(4)のアッセイでは、HIEtを常にコントロールとして導入した(表5~7参照)。理論的には、HIEt値を全ての結果から差し引いて、インシュリン精製の最終アイテムのほとんどで実際にはインシュリンCペプチド免疫反応性はまったく存在しないか、またはきわめて微量しか存在しないことを示すことができる。

【0063】

7. NewLab ELISAでは、そのバックグラウンドが検査アイテム自体(HIEtではなく)により決定されるので明瞭な結果は得られなかった。さらに、このアッセイは、PPIに対する交差反応性の程度が明らかでない抗ヒトプロインシュリンCペプチドモノクローナル抗体(クローンM607239; カタログ番号FZ10-C65)の親和性によって支配されている。NewLabアッセイでPPIとの相互反応がどの程度強いかを示すデータはない。このアッセイデザイン(主としてCペプチドの分析のためにデザインされている)の結果として、低い値(Lincorアッセイの場合よりもさらに低い)のCペプチド免疫反応性(存在する場合には)が“ソースサンプル”で測定できる。この事実については、サンプルは使用pHでは極めて良好には溶解されないという別の解釈も可能であろう。しかしながら、NewLab ELISAプロトコルの固有スタンダードの取り扱い手順では溶解が完全であることの確認は要求されていない。

【0064】

結論：

開示した本発明の新規なイムノアッセイは、ヒトインシュリン製造で生じるインプロセスコントロールアイテムにおけるCペプチド様免疫反応性の除去の分析に極めて適切で、高い感度、正確さおよび良好な再現性(CV < 5%)を示す。

本発明のアッセイで検出可能なインシュリンのCペプチド様活性の最低濃度は0.4 ng/mLである。したがって、この値未満の全ての値はバックグラウンドノイズであると考えら

10

20

30

40

50

れ、数値として表すべきではない。

【 0 0 6 5 】

本新規なアッセイの長所は以下のとおりである：

- 本アッセイは化学発光標識を使用する非放射性アッセイである。
- トレーサーは非常に安定である。したがって同一のトレーサー物質を長期間（品質の低下なく約 20 週）用いることができる。長期にわたりアッセイ条件が比較可能で安定であることは、日常的に使用することおよび結果を長期間にわたり比較しうることの前提条件である。
- 全アッセイ時間はわずかに 5 時間である。特定の調製作業は要求されない。アッセイはサンプルの到着後 1 ~ 2 日以内に実施できる。
- 本アッセイは、連続工程または中間洗浄を必要としない均質アッセイである。50 以上の異なるプローブを同じ日に分析できる。
- 本アッセイの実施に複雑な専門的装置は不要である。

10

【 0 0 6 6 】

- 本アッセイは安価である（日常的標識作業不要、放射能装置不要、放射性廃棄物はない、標準的な実験室器具のみが要求される）。
- アッセイの基本は単純で、その結果、特別な経験をもたない技術スタッフを訓練して本分析を迅速に実施させることができる。
- サンプルの希釈は単純な 2 工程手順でその後の pH 測定および調整を必要としない。サンプルは全インキュベーション時間の間溶解したままである。これは H I、H I A 1 最終製品でも、下流プロセッシング工程の全ての中間アイテムでもそのとおりである。これは他のアッセイのいずれでも達成できないことである。
- 本アッセイは 4 % の確実な再現性を有し（表 1 参照）、アッセイ間変動性は 4 % である（表 4 参照）。両数値は B / B 0 の未加工データを基準に算出した。

20

【 0 0 6 7 】

- H I プローブおよび H I A 1 プローブの両プローブを同じアッセイプロトコル、成分および緩衝液を用いて分析できる（表 5 ~ 8 参照）。
- H I A 2 の C ペプチド様免疫反応性は、同じアッセイプロトコル、成分および緩衝液を用い 10 ppm カットオフ（検出限界）により分析できる。
- 本アッセイは、特別な試験管またはマイクロプレートを用いるときは被覆試験管形式、またはマイクロウェル形式に変更できる。このようにして第二の抗体ビーズの購入を回避することができる。
- アッセイの感度は、インキュベーション時間の延長、より高濃度の抗体およびトレーサーの使用（これら両者の容積を減少させることができる）によって改善することができる。
- 本アッセイのみがその特異性を正確に開示する。

30

【 0 0 6 8 】

実施例 3：

“ プレプロインシュリン様活性 ” を定量するイムノアッセイで使用するヒツジ抗サルインシュリン C ペプチド抗体の精製

40

アフィニティー樹脂の調製

I . ヒトインシュリンとフラクトゲル E M D アズラクトン 6 5 0 (S) とのカップリング
A . 樹脂の条件付け

7 g のフラクトゲル (Fractogel) E M D アズラクトン (Azlacton) 6 5 0 (S) を 1 5 分間 1 4 0 mL の P B S (p H 7 . 4) で膨潤させた。前記のインキュベーションの後、ガラスフィルターを通過させて上清を除去した。残ったゲル (約 2 4 mL) を 2 0 mL の P B S (p H 7 . 4) に分散させた。

【 0 0 6 9 】

B . ヒトインシュリンの溶解

1 2 0 mg の半合成ヒトインシュリン (インシュリン E T [インシュリン H P U , H G R , I E S a p . N

50

r.:1163212, Muster A48, Ch.-B.:U118]) を 3 mL の 50 mM リン酸に溶解させた。この溶液をゆっくりと 50 mL の PBS (pH 9.4) に攪拌しながら滴下した。この工程の最後に pH は 6.65 に下降した。最後に、2 M の NaOH を注意深く添加してインシュリン溶液の pH を 7.4 に調整した。

【 0070 】

C . カップリング反応

前記インシュリン溶液と条件付けしたゲルを混合し、官能基をもつアズラクトンを介してカップリング反応を周囲温度で進行させた。反応ビーカーを進行方向にゆっくりと回転させることによって定常的かつ慎重に混合した。周囲温度で 4 時間後に、未反応リガンドを含む上清を濾過して除き、ゲルを 120 mL の PBS で洗浄した。HPLC 分析で 67 mg の未結合ヒトインシュリンを認めた。結果として 53 mg が EMD フラクトゲルに共有結合によって固定された。

10

【 0071 】

樹脂上の残りの活性基は 120 mL の 0.2 M グリシン (pH 8.0) の添加によって封鎖した。反応を周囲温度で進行させた。再び、反応ビーカーを進行方向にゆっくりと回転させることによって定常的かつ慎重に混合した。16 ~ 20 時間後に、未反応グリシンを含む上清を濾過して除き、各々 120 mL の PBS (pH 7.4)、0.1 M の酢酸ナトリウム、0.2 M のグリシン (pH 2.8) の 3 回サイクルでゲルを洗浄した。

得られたヒトインシュリン共有結合アフィニティー樹脂を、保存料として 0.04 % のプロクリン (Proclin) を含む PBS (pH 7.4) に分散させ、HR16 / 15 FPLC カラムに注入した。

20

【 0072 】

II . ヒト PPI とフラクトゲル EMD アズラクトン 650 (S) とのカップリング

A . 樹脂の条件付け

14.5 g のフラクトゲル EMD アズラクトン 650 (S) を 15 分間 290 mL の PBS (pH 7.4) で膨潤させた。前記のインキュベーションの後、グラスフィルターを通過させて上清を除去した。残ったゲル (約 50 mL) を 20 mL の PBS (pH 7.4) に分散させた。

B . PPI の溶解

250 mg の PPI を 6 mL の 50 mM リン酸に溶解させた。この溶液をゆっくりと 100 mL の PBS (pH 9.4) に攪拌しながら滴下した。この工程の最後に pH は 6.60 に下降した。最後に、2 M の NaOH を注意深く添加して PPI 溶液の pH を 7.4 に調整した。

30

【 0073 】

C . カップリング反応

前記 PPI 溶液と条件付けしたゲルを混合し、官能基をもつアズラクトンを介してカップリング反応を周囲温度で進行させた。反応ビーカーを進行方向にゆっくりと回転させることによって定常的かつ慎重に混合した。周囲温度で 4 時間後に、未反応リガンドを含む上清を濾過して除き、ゲルを 120 mL の PBS で洗浄した。HPLC 分析で 67 mg の未結合 PPI を認めた。結果として 171 mg が EMD フラクトゲルに共有結合によって固定された。

40

【 0074 】

樹脂上の残りの活性基は 250 mL の 0.2 M グリシン (pH 8.0) の添加によって封鎖した。反応を周囲温度で進行させた。再び、反応ビーカーを進行方向にゆっくりと回転させることによって定常的かつ慎重に混合した。16 ~ 20 時間後に、未反応グリシンを含む上清を濾過して除き、各々 250 mL の PBS (pH 7.4)、0.1 M の酢酸ナトリウム、0.2 M のグリシン (pH 2.8) の 3 回サイクルでゲルを洗浄した。

得られた PPI 共有結合アフィニティー樹脂を、保存料として 0.04 % のプロクリンを含む PBS (pH 7.4) に分散させ、XK26 / 20 FPLC カラムに注入した。

【 0075 】

III . 抗インシュリン C ペプチド抗体のアフィニティークロマトグラフィーによる精製

50

A . 血清の調製

抗体精製のための供給源は、精製サルインシュリンCペプチドで免疫したヒツジS95-11の血清である。この血清は融解まで-20℃で保存した。融解後、血清の全容積は79mLであった。これに65mLの水と16mLのPBS(10倍濃縮、0.4%のブロクリンを含む)を添加して容積を2倍にし、クロマトグラフィーのための緩衝条件を調整した。続いてこの希釈した血清を26000×gで30分4℃で遠心した。5μmおよび0.2μmのメンブレンを重ねガラスフィルターによって補強したもので上清を濾過した。

【0076】

B . アフィニティークロマトグラフィー

精製スケジュールの論理的根拠は、想定されるヒツジ抗インシュリン抗体のみならずEMDフラクトゲル樹脂およびヒトインシュリンの配列と非特異的に結合する抗体を、前記血清をヒトインシュリンアフィニティー樹脂に通すことによって第一の工程で除去することである。

第二の工程では、抗サルインシュリンCペプチド抗体をそれらがCペプチドに結合した後で精製できる(前記CペプチドはEMDフラクトゲル上に固定されたPPIの不可欠の部分である)。

PPIによるアフィニティークロマトグラフィーは、固定Cペプチドによるクロマトグラフィーに代わって採用した。なぜならば、PPI様免疫反応性の定量用イムノアッセイで精製抗体を使用するためには、インシュリン成分となお結合しているCペプチドおよび/またはCペプチドフラグメントとの結合が前提条件であるからである。

【0077】

IV . 精製プロトコル

A . サンプルの適用

ヒトインシュリンEMDフラクトゲルHR16/11カラム(“第一のカラム”)をPPIEMDフラクトゲルXK26/11カラム(“第二のカラム”)に直接連結することによって、希釈したヒツジの血清を一工程で2つのアフィニティークラムにポンプで送り込んだ(流速3.5mL/分)。第一のカラムは全ての望ましくない結合物を排除するが、抗インシュリンCペプチド抗体とは反応しない。第二のカラムは抗サルインシュリンCペプチド抗体と特異的に結合する。

非特異的ヒツジ抗体ならびに血清成分は第二のカラムのアフィニティー樹脂と反応することはできないので、したがってカラムを通過して溶出物中に流れ込む。アフィニティークラムによって特異的抗体が全て捕捉されていることを、流出物をBI-Acore(登録商標)系を用いて分析することによってチェックした。流出分画には検出可能な結合活性は存在しなかった。

【0078】

B . 溶出

血清の通過後、2つのカラムを切り離し、それぞれ別個に0.1Mのグリシン、0.04%のブロクリン(pH2.7)で溶出させた(流速:5mL/分)。

第一のカラムの場合、酸性溶出液によって直ちにアフィニティマトリックスが再生される。これを続いてPBS緩衝液で十分に平衡化させることによって条件付けすることができる。

PPIEMDフラクトゲルカラムの溶出プロフィールは図4Bに示されている。分画9-22は、BI-Acore(登録商標)系で分析したとき活性な抗サルインシュリンCペプチド抗体を含んでいる。表示の分画を一緒にし、Amicon Ultrafree-15(10kDaの分子量を排除するメンブレン)を用いて10mLに濃縮した。

【0079】

抗体をさらに精製し、それらを中性緩衝液に移すために、濃縮したグリシン溶出物をスーパーデックス200(26/60)サイズ排除カラムでクロマトグラフィーを実施した。その溶出プロフィールは図5に示されている。分画17-24は精製ヒツジ抗サルインシュリンCペプチド抗体を含んでいる。より純度の高い抗体を得るために、第二のゲル濾過

10

20

30

40

50

クロマトグラフィーを同じスーパーデックス200(26/60)カラムを用いて実施した(図6)。分画17-21に溶出した蛋白質を一緒にし、最終抗体調製物“99Ser9-rec hr”として保存した。

【0080】

PPIEMDフラクトゲルおよびスーパーデックス200カラムの溶出物と同様に、縦列連結アフィニティークラムの流出物をBIAcore(登録商標)系を用いて分析した。この技術は、センサーチップの表面で発生する60nLのフローセル中でアフィニティークロマトグラフィーを模倣することによって迅速な抗サルインシュリンCペプチド抗体の検出を可能にする。このフローセルに固定されたPPIと結合する活性な抗体は、高い感度をもつ表面プラスモン共鳴によって検出できる。

10

【0081】

結果：

抗体調製物の容積はメスシリンダーによって測定されたとおり24mLであった。蛋白質濃度は、供給元(Pierce)の指示にしたがってマイクロウェル方式でBCA法によって決定した。560nmでのODはSpectra III Elisa読み取り装置(SLT)を用いて測定した。既知濃度のIgGによる標準曲線を用いて抗体調製物の未知濃度を算出した。mg/mL値を作図データから直接読み取った。

開示した抗体調製物の濃度は0.454mg/mLであった。抗体の総収量は10.9mgであった。この抗体調製物を1mLずつの部分標本に分け、それぞれを99Ser9/rechr.F17-22で標識し、-70で保存した。

20

【0082】

結論：

上記に開示した抗体調製物(99Ser9/rechr.F17-22)をイムノアッセイ、特に変型アッセイ(被覆ビーズ化学発光アッセイ)で用いて、インシュリンCペプチド様免疫反応性を定量できる。

【0083】

実施例4：

ヒトPPI(バッチ216-1)のアルキル化：

3.28mgのPPIを109μLのH₂Oに溶解し、さらに109μLの10倍濃縮PBS緩衝液(0.4%プロクリン補充)を添加して希釈した。最終的に875μLのH₂Oを添加してPPI含有量が3mg/mLの溶液を調製した。このPPI溶液990μLに1MのDTE(水溶液)10μLをピペットで加えた。このサンプルを37で5時間インキュベートした。1時間の反応の後、蛋白質の沈殿が検出できた。残りの反応時間の間、pHを9.0に上昇させた後でなお沈殿は存在していた。

30

PPIのS-S架橋の還元を停止させるため、さらに遊離スルフヒドリルを再酸化および/または新規なS-S結合の発生から保護するために、185mgの固形ヨードアセトアミドを添加し、暗所で4で4時間インキュベートした。

【0084】

続いて、得られたアルキル化PPIを400mL PBS、0.04%プロクリンを用いて2回Tube-O-Dialyserで透析した。沈殿した蛋白質を遠心で除いた。サンプルの加水分解後にアミノ酸分析を実施することによって、透明な上清(1.3mL)中に23μg/mLの可溶性アルキル化PPIを測定できた。

40

SDSゲル電気泳動アミノ酸分析において侵入速度をかすかに遅延させることおよびエンドプロテイナーゼA sp-Nによって蛋白分解に対する感受性を向上させることによって、有効な誘導化が達成されたことが証明された。明らかに、エンドプロテイナーゼA sp-Nは、DP-部位の他に誘導システインで還元PPIを切断する。

【0085】

実施例5：

エンドプロテイナーゼA sp-NによるヒトPPIのEDP部位での切断

エンドプロテイナーゼA sp-Nは、ペプチド結合をアスパラギン酸およびシステイン酸

50

におけるN末端で特異的に切断する金属プロテアーゼである。ヒトPPI(HIA1 PPI)はその配列内にただ1つのアスパラギン酸を含むだけである。それはCペプチド内に存在し、プロリン残基のN末端に位置し、酸に不安定なDP(C6-C7)部位を生じる。この部位はおそらくPPI分子の外側表面に存在し、したがってエンドプロテイナーゼAsp-Nが近づくことができる。システイン残基は全てS-S架橋内に含まれ、前記分子の内部に埋没し、したがって蛋白分解攻撃から守られている。EDP部位でPPIを分割することによって、有用なモデル化合物が生成され、我々のアフィニティー精製抗体の特異性を正確に示すために役立つ。

【0086】

Cペプチド内のEDP部位を切断するために、50 μ LのPPI(水に0.7mg/mL)および50 μ Lの50mMトリス/塩酸(pH8.0)(0.2Mの尿素含有)を混合した。蛋白分解は25 μ LのエンドプロテイナーゼAsp-N(10mMのトリス-塩酸(pH7.5)に1 μ gを溶解)を添加して開始させ、37 $^{\circ}$ Cで32時間インキュベートした。反応はサンプルの凍結によって停止させた。

ゲル電気泳動およびその後の銀染色は、PPIがEDP部位で定量的に切断されたことを示した(酵素により切断された蛋白質ではジスルフィド結合の還元後2つのバンドは分離される)(実施例6を参照)。未切断の還元型PPI(これはなお単鎖分子である)の位置には目に見える蛋白質バンドは残っていない。

【0087】

エンドプロテイナーゼAsp-N切断PPIは、以下のようなモデル(コントロール)化合物として役立つ:

- EDP部位の酸による切断から生じる不純物を模擬する、
- 依然としてA鎖のC末端に結合したCペプチドの部分および/またはB鎖のN末端のCペプチドの部分を有する、不完全なトリプシン切断から生じたインシュリン派生物を模擬する。

【0088】

実施例6:

HIおよびHI還元/アルキル化型、並びにそのエンドプロテイナーゼAsp-N切断生成物のSDSゲル電気泳動(4~12%)による分析

S-S架橋を完全に還元するためにDTEを含むSDS緩衝液中でサンプルを電気泳動ゲルに適用した(図7を参照)。

【0089】

実施例7:

ヒツジS95-11から得たアフィニティー精製抗体の本開示アッセイ形式における特異性

1. 本出願で開示したアッセイを用いたHI PPI、HI(サル)Cペプチド、PPI還元/アルキル化型、およびHI Cペプチドの分析(99 Ser9調製物による)。全ての化合物は1mg/mLのHIetを含む希釈緩衝液で希釈した。結果については図8を参照されたい。

2. 本出願で開示したアッセイを用いたHI(サル)Cペプチド、エンドプロテイナーゼAsp-Nで切断したHI PPI、HIA2 PPI、およびHIA2 Cペプチドの分析(99 Ser9調製物による)。全ての化合物は1mg/mLのHIetを含む希釈緩衝液で希釈した。結果については図9を参照されたい。

【0090】

結果および解釈:

1. HI CペプチドおよびHI PPIは、平行的な希釈関係および分子量の相違と急激に減少させたインキュベーション時間に左右される曲線の右シフト(係数はおおよそ6)によって示されるように、抗体によって等しく認識される(下記の表8参照)。

2. ヒトCペプチドはこのアッセイによって認識されるが、50%抑制を得るためには約180ng/mLが必要である。これは、サルCペプチドと比較したとき55倍高い濃度であ

10

20

30

40

50

る。これらのデータは本抗体調製物のサルCペプチド(アミノ酸37(Proに対してLeu)だけがヒトの配列と異なっている)に対する高い特異性を明瞭に示している(表8参照)。

3. エンドプロテイナーゼ Asp - N 切断 PPI に対して明瞭な交差反応性が存在する。しかしながら、希釈曲線は波打っており、無傷の PPI と比較したときおよそ 10 倍の反応性低下が存在する(表8参照)。このことは、Cペプチドのただ一カ所に分割(split)を導入することによって構造的エピトープが破壊されること、および EDP 部位は 99 Ser 9 抗体調製物によって認識される主要な免疫学的エピトープであることを示している。

【0091】

10

4. アルキル化 PPI は顕著な免疫反応性の低下をもたらすことなく認識されるが、このことは、N末端およびC末端のアミノ酸を特異的に認識する抗体はアフィニティークロマトグラフィーによって除去され、その結果それら抗体は本抗体調製物の特異性に影響を及ぼすことができないことを示している。アルキル化 PPI は PPI のサイズを持った直鎖状Cペプチドを反映しているので、PPI および PPI 還元/アルキル化型の希釈曲線は多かれ少なかれ重なり合う。

5. そのCペプチドのN末端部分のエピトープが排除され変異している HIA2 Cペプチドおよび HIA2 PPI では、希釈曲線の強い平坦化が認められる。しかしながら、抗体 99 Ser 9 はなお、HI PPI の対応する構造と比較したとき約 35 倍低い親和性でこれら抗原と結合する。希釈曲線のこの波状状態は、単一特異性を有する抗体の多様な集団(ポリクローナル血清の如く)が、関連するが同一ではないエピトープをもつ抗原と反応する状況に典型的なものである。抑制曲線の低抗原濃度におけるこの急激な下降は、直鎖状Cペプチドの(不変)C末端部分と抗体群の反応を表している。曲線の平坦相は、かなりの量の抗体群が HIA2 Cペプチド(変異し HI PPI と比べて構造的に変化している)の中心部分およびN末端部分と低下したアフィニティーで結合したことを示している。これら関連抗原は、HI 抗原のように効果的にトレーサー(標識された HICペプチド)を抗体から追い出すことはできない。

20

【0092】

6. EDP 部位で切断された PPI HIA2 および PPI HI は本アッセイによってほぼ等しく認識されるが、このことはまた、抗体調製物 99 Ser 9 による免疫認識における EDP 部位の重要性を示している。10 ng/mL 以上の濃度のこれらの抗原または関連抗原は本アッセイによって検出できる。

30

オリジナル RIA (1) および Linc アッセイ (2) (上記実施例 2 参照) では、濃度は 20 ng/mL 以上でなければならない。New Lab (3) によって開発された ELISA については対応するデータを提供することは不可能である。なぜならば、コントロールは実施されず、この方法を用いた PPI の検出限界に関するデータは存在しないからである。アッセイデザインから推論すると、ELISA は、PPI および PPI 誘導体に対して Linc アッセイよりも低い交差反応性を示すであろう。

【0093】

【表 8】

40

表 8

異なる抑制アッセイおよび異なる抗原によって得られた I C 50 値

I C 50	ビーズアッセイ ng/mL	HMR-RIA* ng/mL	Lincoアッセイ ng/mL
C ペプチド (ヒト)	180.0	n. d.	1.0
C ペプチド (サル)	3.2	1.0	1.0
H I P P I	20.0	4.0	60.0
P P I (EDP部位で切断)	200.0	100.0	300.0

10

n. d. : 実施せず

* この方法での変動は、ビーズアッセイまたはLincoアッセイよりも
5 倍より高く、したがって表に提示されたデータの値に限界がある
ことは考慮しなければならない。

20

【 0 0 9 4 】

モデル化合物を用いて得られた全ての結果を要約すれば、ヒツジ S 9 5 - 1 1 から得られた抗体調製物 9 9 Ser 9 (および R I A で用いられる 9 9 Ser 7) は、種々の C ペプチド含有抗原 (“ C ペプチド様免疫反応性 ” という表現で表わされる) を明瞭に特定するために必要な要件を満たしているといえることができる。

【 0 0 9 5 】

実施例 9 :

インシュリン H I A 1 製造から生じるインプロセスアイテムの分析 - 下流処理工程でのインシュリン様免疫反応性の除去

【 0 0 9 6 】

30

【 表 9 】

表 9

サンプル、コード			Cペプチド様活性 ng/mL	
工程8	901/8	A003	15800	
		B003	15980	
		C003	17480	
工程9	901/9	A006	13540	10
		B006	15320	
		C006	13660	
工程10	901/10	A008	138100	
		B008	135720	
		C008	164260	
工程11a	0055	APK 02	5808	20
		APK 03	4424	
工程11/12	0055	API 02	5574	
		API 03	4310	
工程11/12	0055	AHP 01	5578	
		AHP 02	6901	
		AHP 03	5300	
工程12/10	0055	AKR 01+02	1.07	30
		AKR 03	0.4	

【0097】

実施例10：

免疫およびサルCペプチドに対して作製されたポリクローナル抗体を有するヒツジ（S95/11）の血清サンプリング

本実施例は、ヒツジの免疫およびサル由来のCペプチドに対して作製された抗体を有するヒツジの血清のサンプリングについて述べる。

雌のヒツジを Gerhard Mundschenk (Zwerggasse 2; 65468 Trebur-Astheim) から購入し、通常の標準的ヤギ用飼料で農場 (Hermann Kettenbach, Im Birkenfeld 38, 65719 Hofheim-Langenhain) で維持した。このヒツジに S95/11 と記号を付した。

【0098】

免疫の開始時に、前記ヒツジ（S95/11）を等容積の物質（1mLの食塩水 + 1mLの完全フロイントアジュバント（cFA; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA）の1：1混合物）中の抗原（最初に2mgのサルCペプチド）で免疫した。この乳液は投与直前に調製し、皮下の2～3カ所に注射した。2～4週間の間隔で実施したブースター注射は、食塩水（1mL）と不完全フロイントアジュバント（Sigma Chemicals, Heidelberg, Germany）（1mL）の1：1混合物中の同じ量の抗原（2mgのCペプチド）から成る。2週間から2カ月の間隔で、血液サンプルを頸静脈穿刺によって採取した。抗血清を分注し次の使用まで - 20℃ で保存した。インシュリン最終製品中のPPIを検出するアッセイの開

10

20

30

40

50

発のために特定のサンプルを選んだ。

【 0 0 9 9 】

リコンビナントヒトインシュリンは、トランスフェクトした大腸菌 (E. coli) で発現させた融合蛋白質から製造する。変性融合蛋白質からヒトインシュリンがプロセッシングされるときに、いわゆる P P I が中間物質として生成される。後者はさらに、トリプシンによって触媒される酵素切断によりさらにプロセッシングされる。2つの鎖をもつ異種二量体インシュリンが、- A r g - A r g - (B 3 1 - 3 2) および - L y s - A r g - (A 1 - A 0) の配列部位での同時切断により単鎖 P P I から生成される。インシュリンは更なる精製工程を経て製造される。最終製品の P P I の不純物 (< 1 0 ppm) を検出するイムノアッセイを開発するためには、インシュリンに由来する干渉交差反応がないので、C

10

【 0 1 0 0 】

使用される C ペプチド内の免疫原性を有するインシュリン様決定基 (C ペプチド 3 4 位または 3 4 - 3 5 位の - L y s または - L y s - A r g - の如き) を避けるために、これらの塩基性アミノ酸 A r g - を含まないサル C ペプチドを調製し、サル C ペプチドとして用いた。

c F A の最初の使用から i C A への切り替えを含む免疫手順およびタイムスケジュールは、個々の抗原およびペプチドに対して作製されるポリクローナル抗体の製造について文献に記載されている標準的な方法と一致する。

20

【 0 1 0 1 】

サル C ペプチドに対するポリクローナル抗体を含むヒツジの抗血清作製のための免疫スケジュールおよび血液サンプリングについて説明する。一定量の抗原 (サル C ペプチド) をそれぞれ 1 mL の 0 . 9 % 食塩水および 1 mL のアジュバントの 1 : 1 混合物に溶解した。血液サンプリングの日付は下記に示す。下記の実験に使用した抗原はサル C ペプチド (ロット番号: DJIII, -S43) である。使用した最初のアジュバントは K F A (D i f c o) Lot70052L A である。ブースターのアジュバントは I F A (S i g m a) Lot96H8950 である。

【 0 1 0 2 】

30

【表 1 0 】

表 1 0

免疫スケジュール

S 9 5 / 1 1	日付	日付	日付	日付	日付	日付	日付
	10/02 1998	10/22 1998	11/12 1998	11/12 1998	1/11 1999	2/11 1999	3/11 1999
	初期 投与	ブース ター 1	ブース ター 2	ブース ター 3	ブース ター 4	ブース ター 5	ブース ター 6
C ペプチド	2mg	2mg	2mg	2mg	2mg	2mg	2mg
食塩水/ アジュバント (mL/mL)	1.0/ 1.0	1.0/ 1.0	1.0/ 1.0	1.0/ 1.0	1.0/ 1.0	1.0/ 1.0	1.0/ 1.0

40

【 0 1 0 3 】

【表 1 1 】

表 11

S 9 5 / 1 1 についての血液サンプリングおよび血清の容積

日付	11/02	11/23	12/21	01/25	02/11	02/22	03/22	04/08
	1998	1998	1998	1999	1999	1999	1999	1999
血清(mL)	3.5	3.8	4.0	4.0	70.0	88.0	78.0	118.0

【 0 1 0 4 】

10

実施例 1 0 に関する参考文献：

1 . Cußler, K., Hartinger, J.: Gibt es Alternativen zum Einsatz von Freundschem Adjuvants bei der Immunisierung von Labortieren? Tagungsabschnitt " Immunisierung und Adjuvantien" des 4. Oesterreichischen Internationalen Kongresses Ueber " Ersatz und Ergaenzungsmethoden zu Tierversuchen in der biomedizinischen Forschung", 24-26. September 1995(Linz).

2 . Bennett, B., Check, I.J., Olsen, M.R., Hunter, R.L.: A comparison of commercially available adjuvants for use in research. J. Immunol. Meth. 153, 31-40, 1992.

3 . Finger, H.: " Das Freundschsche Adjuvants-Wesen und Bedeutung". Im: G. Heyman (Ed.): Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut, dem Georg-Speyer-Haus und dem Ferdinand-Blum-Institut zu Frankfurt a.M., Heft 60, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1964.

20

4 . Fineberg, S.E., Galloway, J.A., Fineberg, N., Goldman, J.: Effects of species origin, purification levels and formulation on insulin immunogenicity. Diabetes 32, 592, 1983.

【 0 1 0 5 】

実施例 1 1 : サンプル調製

インシュリンは結晶化または凍結乾燥後は中性溶液に比較的溶けにくいことが知られている。高濃度のインシュリン溶液を得るために、したがってインシュリンプローブは最初は酸（例えば希リン酸または塩酸のいずれか）に溶解し、続いて適量の NaOH を迅速に添加してアルカリ性 pH (9 . 0 ~ 1 0 . 5) に調整しなければならない。続いて使用 pH をタイトレーションにより、または対応する緩衝液を添加することにより調整する。上記に概略した方法は時間を要し、面倒で、さらに各プローブについて別個の注意が要求される。

30

【 0 1 0 6 】

この仰々しい手順を避けるために、我々はインシュリン溶解のための別のプロトコルを検討した。目的は 1 mg / mL の濃度で pH が 8 . 6 ~ 9 . 0 の透明なインシュリン溶液を得ることであった。

- 9 より高い pH は、（特にトリプシン切断後の）プロセスアイテム中の H I A 1 およびインシュリンを溶液（H I A 1 の I P は 7 . 4 ）として維持するために有益である。

40

- 9 . 0 より低い pH は高い親和性と安定性を有する抗原抗体反応に有益である。

我々は、pH 9 . 0 で安定な抗原（H I P P I）/ 抗体結合を選び出すために 8 . 0 ~ 9 . 5 の範囲の pH に適切な種々の緩衝液を調べた。検査した緩衝液は以下のとおりであった：トリス、TAPS、ピシン、G l y G l y、ビストリスプロパン、Ches、リン酸塩 / EDTA（Linco Research Inc. のヒト C ペプチド R I A キットで使用されている）。

さらに、種々の緩衝液濃度を分析し、pH 9 . 0 で緩衝液の濃度を高めることによって抗原 / 抗体結合が徐々に乱されることを示した。

【 0 1 0 7 】

先の考察から、我々は最終的な比較のために 2 0 mM の濃度の 4 種の緩衝液を選んだ：

1 . トリス (Tris) * (Merck-108382)

50

2 . T A P S ^{**} (Sigma T-5130)

3 . ビシン (Bicine) ^{***} (Sigma B-3876)

4 . G l y G l y ^{****} (Calbiochem 3630)

これらの緩衝液は必要量の固体を水に溶解し、適量の N a O H を添加して p H 9 . 0 に調節することによって調製した。全てが良好な抗原 / 抗体結合を約 8 . 5 から 9 . 0 の p H 範囲で示した。

約 0 . 5 mg ~ 0 . 8 mg のインシュリンサンプルを 1 0 mM の塩酸に溶解し、1 0 mg / mL 溶液を得た。続いてこの透明な溶解物質をさらに上記の緩衝液の 1 つを用いて 1 : 1 0 に希釈した。結果を下記の表に示す。

【 0 1 0 8 】

10

【表 1 2 】

表 1 2

	Tris [*]	TAPS ^{**}	Bicine ^{***}	GlyGly ^{****}
生成塩酸濃度	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
1/10の酸性インシュリン 添加後の p H	8.94	8.94	9.0	8.91
HIA1およびインプロセス アイテム中の沈殿	+	+	-	+

20

* トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、pKa=8.3

** (N-トリス [ヒドロキシメチル] -3-アミノプロパンスルホン酸)、
pKa=8.4

*** (N, N-ビス [2-ヒドロキシエチル] グリシン)、pKa=8.3

**** グリシルグリシン、pKa=8.2

30

【 0 1 0 9 】

全ての実験例で、p H は酸性インシュリン溶液の添加後に変化しないか、またはわずかし
か影響を受けない。しかしながら、驚いたことにビシン緩衝液でのみ常に透明な H I A 1
溶液またはインプロセスアイテム溶液が得られた。

したがって、ビシン緩衝液系を選択することによって、簡単なサンプル溶解方法の確立お
よびイムノアッセイのインキュベーション時間中の安定な分析物質 / 緩衝液の条件の確立
のために重要な突破口が得られた。

【図面の簡単な説明】

【図 1 A 】 想定される C ペプチド含有不純物の模式図である。

【図 1 B 】 図 1 A の記号の説明である。

40

【図 2 】 スーパーデックスペプチド (1 0 / 3 0) を用いた、検定物質であるチトクロ
ーム C (C) 、アプロチニン (A) およびビタミン B 1 (B) の溶出プロフィールを示す
。C ペプチドトレーサーは、チトクローム C およびアプロチニンの間の位置に対称性ピー
クとして溶出する (太線)。

【図 3 】 半合成ヒトインシュリン調製物中の C ペプチド不純物を検出および特定する 6
種の異なるアッセイの実施で得た標準曲線を示す。

【図 4 A 】 P P I E M D フラクトゲルカラムに適用した抗サルインシュリン C ペプチ
ド抗体を含む単離血清サンプルの溶出プロフィールを示す。

【図 4 B 】 P P I E M D フラクトゲルカラムに適用した抗サルインシュリン C ペプチ
ド抗体を含む単離血清サンプルの溶出プロフィールを示す。

50

【図5】 前記カラム（PPI EMDフラクトゲルカラム）から得た抗サルインシュリンCペプチド抗体を含む濃縮グリシン溶出物の溶出プロフィールを示す。この溶出物のクロマトグラフィーはスーパーデックス200（26/60）排除カラムで実施した。

【図6】 スーパーデックス200（26/60）排除カラムから得た分画17-24の第二のゲル濾過クロマトグラフィーの溶出プロフィールを示す。より高純度を得るために同じカラムを用いた。

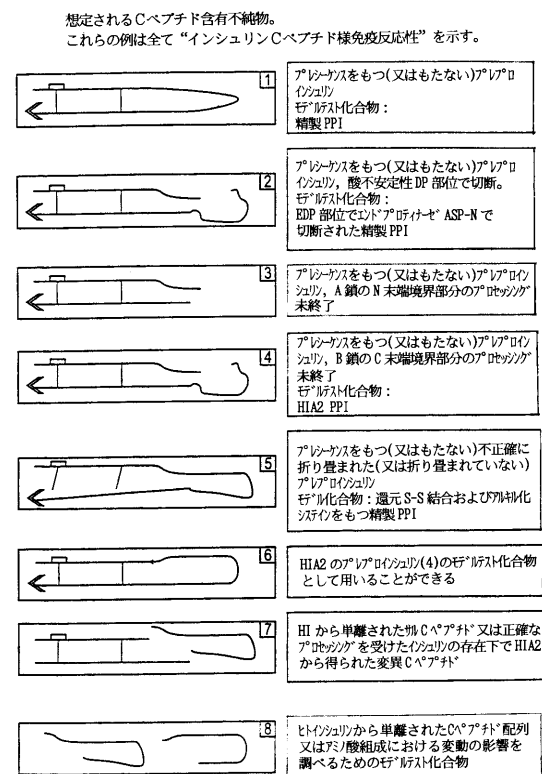
【図7】 エンドプロテイナーゼA sp - Nによる切断に対するHI、HI還元/アルキル化型の感受性を分析するSDSゲルを示す。サンプルは一切のジスルフィド架橋を還元するためにDTEを含んでいる。

【図8】 本発明の被覆ビーズアッセイ手順を用いた、コントロール抗原類HI PPI、ヒトCペプチド、サルCペプチドおよびPPI還元/アルキル化型の分析を示す。99Ser9調製物を抗血清として用いた。

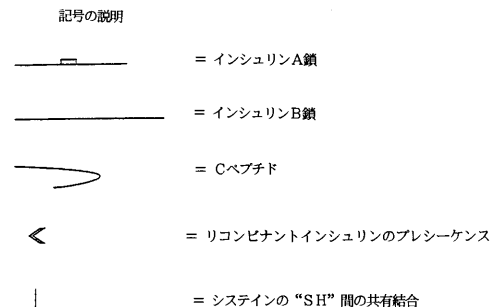
【図9】 本発明の被覆ビーズアッセイ手順を用いた、コントロール抗原類サルCペプチド、エンドプロテイナーゼA sp - N切断HI PPI、HIA2 PPI、およびHIA2 Cペプチドの分析を示す。99Ser9調製物を抗血清として用いた。

10

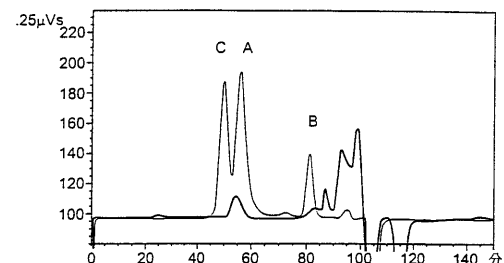
【図1A】



【図1B】



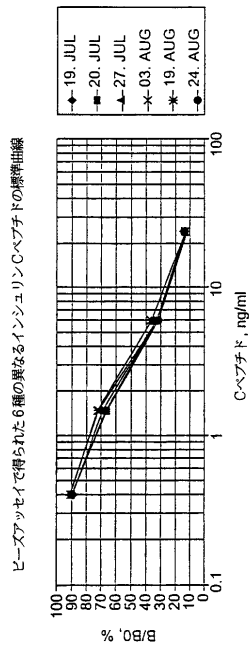
【図2】



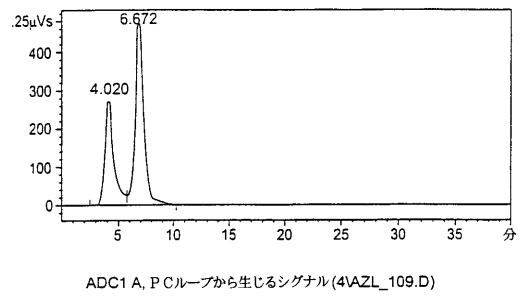
ADC1 A, P Cループから生じるシグナル (5\SDPE_008.D)

ADC1 A, P Cループから生じるシグナル (5\SDPE_031.D)

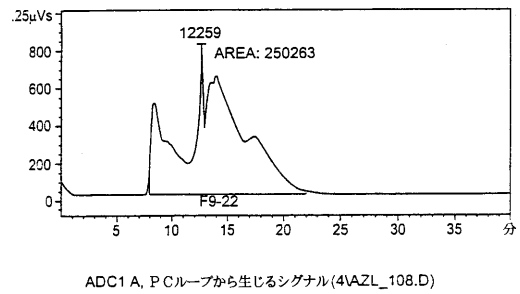
【図 3】



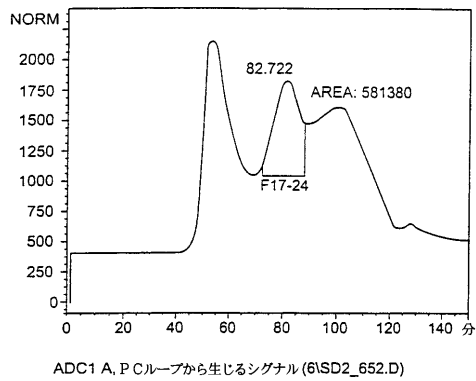
【図 4 A】



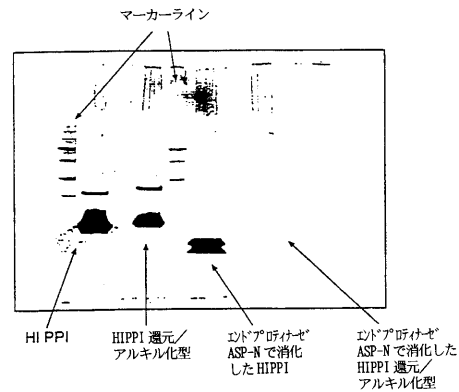
【図 4 B】



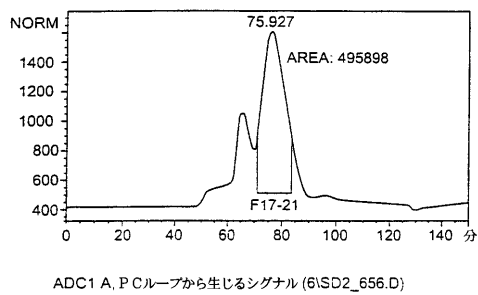
【図 5】



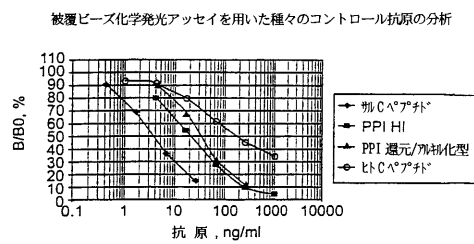
【図 7】



【図 6】

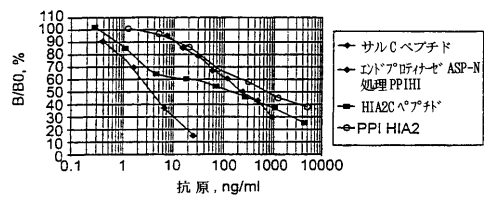


【図 8】



【図 9】

被覆ビーズ化学発光アッセイを用いた種々のコントロール抗原の分析



フロントページの続き

(72)発明者 マルティン・ゲール

ドイツ連邦共和国 6 5 5 2 7 ニーデルンハウゼン・ツアシュタインリッツ 4 8

(72)発明者 コルネーリア・シュタイネルト

ドイツ連邦共和国 6 5 2 0 7 ヴィースバーデン・リースリングシュトラッセ 3 0

審査官 浅野 美奈

(56)参考文献 特開平 0 4 - 1 7 7 1 6 6 (J P , A)

国際公開第 9 8 / 0 5 9 2 4 6 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/53

专利名称(译)	用于测量人胰岛素及其衍生物样品中含有C肽的杂质的新型免疫学测定法		
公开(公告)号	JP4601884B2	公开(公告)日	2010-12-22
申请号	JP2001533423	申请日	2000-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	安万特制药德国疗伤植物GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tzungu		
申请(专利权)人(译)	安万特制药Doichiuranto-GESELLSCHAFT米特Beshurenkuteru-有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	赛诺菲 - 安万特德国法理社会，米特Beshurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	マルティンゲール コルネーリアシュタイネルト		
发明人	マルティンゲール コルネーリア・シュタイネルト		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/74 G01N2333/62 Y10T436/105831		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	西村 公佑		
优先权	19951684 1999-10-27 DE		
其他公开文献	JP2003513243A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通过非放射性测定法检测或测定重组产生的人胰岛素或其衍生物样品中含C-肽杂质的方法，包括步骤：(a)制备重组产生的样品人胰岛素或其衍生物；(b)将样品与稀释缓冲液混合；(c)在混合物(b)中加入示踪剂；(d)向混合物(c)中加入对C-肽杂质特异的抗体；(e)向混合物(d)中加入具有至少一个标记的“C-肽第二抗体珠”；(f)检测或确定含有C肽的杂质的存在。

本発明のビーズアッセイとの比較データ					
ブローブ	RIA(1) (ng/mL)	Linco(2) (ng/mL)	NewLab(3) (ng/mL)	ビーズ(4)(ng/mg)	
				#1	#2
C054	0.18	0.12	ND	0.03	0.00
UA-0114-1-01	0.06	0.10	<0.5	0.00	0.00
KB-0114-2-02	0.24	0.12	<0.7	0.00	0.03
SB-0114-2-01	1228.75	108.77	60.00	249.00	210.00
KA-0114-2-09	0.34	0.12	<0.6	0.00	0.00
SB-0114-1-03	691.13	78.22	<50	189.00	156.00
UA-0114-1-02	0.31	0.12	<0.5	0.15	0.17
KA-0114-2-05	0.34	0.13	<0.6	0.11	0.23
SB-0114-2-04	1502.86	114.65	90.00	257.0	252.0
KA-0114-2-10	0.19	0.11	<0.7	0.04	0.00
SB-0114-1-04	847.36	87.60	90.00	208.00	192.00
UA-0114-1-03	0.43	0.13	<0.6	0.11	0.13
KB-0114-2-08	0.65	0.15	<0.6	0.00	0.00
SB-0114-2-06	1273.23	137.98	120.00	346.00	335.00
KA-0114-2-11	0.63	0.15	<0.6	0.00	ND
SB-0114-1-05	961.21	116.83	80.00	216.00	172.00
UA-0114-1-05	0.36	0.12	<0.5	0.00	0.00
KA-0114-2-01	0.69	0.16	<0.6	0.00	0.00
SB-0114-1-01	847.67	80.65	70.00	241.00	179.00
KB-0114-2-04	0.71	0.13	<0.5	0.00	0.03
SB-0114-1-02	1030.86	107.76	70.00	237.00	218.00
HI(U103)	0.36	0.13	ND	0.05	0.19