(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119654556 A
(43)申请公布日 2025.03.18

(21)申请号 202380058220.7
(22)申请日 2023.08.07
(30)优先权数据
2022-126644 2022.08.08 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.02.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/028802 2023.08.07
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/034580 JA 2024.02.15
(71)申请人 株式会社先端生命科学研究所
地址 日本国东京都
(72)发明人 新井修 八木慎太郎 青柳克己
(74)专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444
专利代理师 龚敏 王刚
(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
C12P 21/08(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)

权利要求书1页 说明书22页
序列表（电子公布） 附图10页

(54)发明名称

检测CEACAM1的方法

(57)摘要

本发明提供高灵敏度地检测能够作为癌的标记物使用的特定蛋白质的技术。更具体地,本发明提供了一种检测CEACAM1的方法等,其包括:(1)在含有CEACAM1的样本中使CEACAM1改性,生成改性CEACAM1的工序;以及(2)通过使用具有识别改性CEACAM1能力的捕获抗体以及标记抗体这两者的夹心法测定,检测CEACAM1的工序。

CN 119654556 A

1.一种检测CEACAM1的方法,其特征在于,包括:

(1)在含有CEACAM1的样本中使CEACAM1改性,生成改性CEACAM1的工序;以及

(2)通过使用具有识别改性CEACAM1能力的捕获抗体以及标记抗体这两者的夹心法测定,检测CEACAM1的工序。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,所述改性选自改性剂、加热、以及它们的组合。

3.根据权利要求2所述的方法,其中,所述改性剂选自碱性物质、表面活性剂、还原剂、以及它们中的2种以上的组合。

4.根据权利要求1所述的方法,其中,作为所述捕获抗体和标记抗体中的一者,使用(a)具有识别由CEACAM1中的PANSGRETIY(序列号1)的氨基酸序列所示的表位的能力的抗体。

5.根据权利要求4所述的方法,其中,作为所述捕获抗体和标记抗体中的一者,进一步使用(b)具有识别由CEACAM1中的TESMP(序列号2)的氨基酸序列所示的表位的能力的抗体。

6.根据权利要求4所述的方法,其中,作为所述捕获抗体和标记抗体中的另一者,使用(c)具有识别由CEACAM1中的DTTYLWWINN(序列号3)的氨基酸序列所示的表位的能力的抗体。

7.根据权利要求4所述的方法,其中,作为所述捕获抗体和标记抗体中的另一者,使用(d)具有识别由CEACAM1中的EATGQFHVYP(序列号4)的氨基酸序列所示的表位的能力的抗体。

8.一种检测癌症的方法,其特征在于,包括:

(1)通过权利要求1~7中任一项所述的方法,测定从受试体采集的样本中的CEACAM1量的工序;以及

(2)将测定的CEACAM1量与基准值进行比较的工序。

9.根据权利要求8所述的方法,其中,所述癌症选自大肠癌、肝癌、胰腺癌、以及它们中的2种以上的组合。

10.一种癌症的治疗方法,其特征在于,包括:

(1)通过权利要求1~7中任一项所述的方法,测定从受试体采集的样本中的CEACAM1量的工序;

(2)将测定的CEACAM1量与基准值进行比较的工序;

(3)选择测定到高于基准值的CEACAM1量的受试体的工序;以及

(4)对选择的受试体给药抗癌剂的工序。

11.一种用于检测CEACAM1的试剂盒,其特征在于,包括:

(1)改性剂;

(2)具有识别改性CEACAM1能力的捕获抗体;以及

(3)具有识别改性CEACAM1能力的标记抗体。

检测CEACAM1的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检测CEACAM1的方法等。

背景技术

[0002] CEACAM1是属于癌胚抗原(CEA)家族的蛋白质。已知CEACAM1中存在12个同种型(isoform),其中3个为分泌型,存在于血清等体液中。另外,已知分泌型CEACAM1能够用作黑色素瘤、胰腺癌、尿路上皮膀胱癌等癌症的标记物。在胰腺癌中,确认到CEACAM1显示出高于通用癌标记物即CA19-9的诊断灵敏度和诊断特异性。因此,CEACAM1被期待作为癌标记物。

[0003] 关于CEACAM1,公开了一些现有技术。例如,专利文献1公开了具有识别CEACAM1特异性表位的能力的抗体(根据需要,具有与CEACAM蛋白质家族的其它亚型结合的能力的抗体)。专利文献2公开了使用具有与CEACAM1特异性结合的能力的抗体来诊断有无肝外胆管癌、肝内胆管癌、或胆囊癌的方法。专利文献3公开了加热酸性条件下的人血清或血浆而分离不需要的物质后,通过免疫检测检测癌胚性抗原(CEA)的方法。

[0004] 现有技术文献

专利文献

专利文献1:日本特表2015-502138号公报

专利文献2:日本特开2018-17723号公报

专利文献3:日本特公平2-503716号公报

发明内容

[0005] 发明要解决的技术问题

本发明的目的在于高灵敏度地检测能够作为癌的标记物使用的特定蛋白质。

[0006] 本发明的另一目的在于高灵敏度且特异性地检测能够用作癌的标记物的特定蛋白质。

[0007] 本发明人等进行了深入研究,结果发现,通过使用选择CEACAM1作为能够用作癌的标记物的特定蛋白质、并且在CEACAM1改性后使用具有识别改性CEACAM1的能力的捕获抗体和标记抗体这两者的夹心法测定,能够高灵敏度(和特异性)地检测能够用作癌的标记物的CEACAM1等,从而完成了本发明。现有技术既没有记载也没有提示在CEACAM1改性后使用这样的夹心法测定。

[0008] 即,本发明如以下所示。

[0009] 〔1〕一种检测CEACAM1的方法,其包括:

(1)在含有CEACAM1的样本中使CEACAM1改性,生成改性CEACAM1的工序;以及

(2)通过使用具有识别改性CEACAM1能力的捕获抗体以及标记抗体这两者的夹心法测定,检测CEACAM1的工序。

[0010] 〔2〕根据〔1〕的方法,其中,所述改性选自改性剂、加热、以及它们的组合。

[0011] 〔3〕根据〔2〕的方法,其中,所述改性剂选自碱性物质、表面活性剂、还原剂、以及它

们中的2种以上的组合。

[0012] 〔4〕根据〔1〕~〔3〕中任一项的方法,其中,作为所述捕获抗体和标记抗体中的一者,使用(a)具有识别CEACAM1中的PANSGRETIY(序列号1)的氨基酸序列所示的表位的能力的抗体。

[0013] 〔5〕根据〔4〕的方法,其中,作为所述捕获抗体和标记抗体中的一者,进一步使用(b)具有识别CEACAM1中的TESMP(序列号2)的氨基酸序列所示的表位的能力的抗体。

[0014] 〔6〕根据〔4〕或〔5〕的方法,其中,作为所述捕获抗体和标记抗体中的另一者,使用(c)具有识别CEACAM1中的DTTYLWWINN(序列号3)的氨基酸序列所示的表位的能力的抗体。

[0015] 〔7〕根据〔4〕或〔5〕的方法,其中,作为所述捕获抗体和标记抗体中的另一者,使用(d)具有识别CEACAM1中的EATGQFHVYP(序列号4)的氨基酸序列所示的表位的能力的抗体。

[0016] 〔8〕一种检测癌症的方法,其包括:

(1)通过〔1〕~〔7〕中任一项的方法测定从受试体采集的样本中的CEACAM1量的工序;以及

(2)将测定的CEACAM1量与基准值进行比较的工序。

[0017] 〔9〕根据〔8〕的方法,其中,所述癌症选自大肠癌、肝癌、胰腺癌、以及它们中的2种以上的组合。

[0018] 〔10〕一种癌症的治疗方法,其包括:

(1)通过〔1〕~〔7〕中任一项的方法测定从受试体采集的样本中的CEACAM1量的工序;

(2)将测定的CEACAM1量与基准值进行比较的工序;

(3)选择测定为高于基准值的CEACAM1量的受试体的工序;以及

(4)对选择的受试体给药抗癌剂的工序。

[0019] 〔11〕一种用于检测CEACAM1的试剂盒,其包括:

(1)改性剂;

(2)具有识别改性CEACAM1能力的捕获抗体;以及

(3)具有识别改性CEACAM1能力的标记抗体。

[0020] 发明效果

本发明的检测CEACAM1的方法,例如,在CEACAM1的高灵敏度且特异性的检测中是有用的。

[0021] 本发明的检测癌症的方法能够高灵敏度且特异性地测定癌症的标记物即CEACAM1,因此在高诊断灵敏度和高诊断特异度下的癌症的检测中是有用的。

[0022] 本发明的治疗疗法在基于抗癌剂的有效治疗中是有用的。

[0023] 另外,根据本发明的这些方法,能够降低或避免自身抗体的影响。

[0024] 本发明的试剂盒,例如,在本发明的方法的简便的实施中是有用的。

附图说明

[0025] 图1为表示表达蛋白(pAT-TrpE-His-CEACAM1-N、pAT-TrpE-His-CEACAM1-N-m3C3d、pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1、以及pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1-m3C3d)的氨基酸序列的图。

[0026] 图2为表示抗CEACAM1单克隆抗体的交叉反应性的图。

[0027] 图3为表示CEACAM家族的氨基酸序列对比的图。包含通过UniProt数据库检索到的CEACAM家族的信号序列的N结构域与A1结构域的氨基酸序列对比。利用黑色空白表示同源性高的氨基酸。将各抗体的表位示于CEACAM1的序列上,利用黑框表示被认为是各抗体表位的热点的氨基酸。

[0028] 图4为表示各种癌症样本的血中浓度分布的图。大肠癌样本(Colon cancer,n=42)、肝癌样本(Liver cancer,n=50)、胰腺癌样本(Pancreatic cancer:n=40)、健康人样本(Normal,n=36)。

[0029] 图5A为表示大肠癌样本中的ROC(Receiver Operating Characteristic:受试者操作特性曲线)分析的图。

[0030] 图5B为表示肝癌样本中的ROC分析的图。

[0031] 图5C为表示胰腺癌样本中的ROC分析的图。

[0032] 图6为表示有无基于SDS还原热处理的效果差异的图。表示使无改性处理(SDS还原热处理)或SDS还原热处理条件的CEACAM1抗原(1μg/mL)与A3054和A3073的共固相板反应,利用ALP标记A7004抗体检测的结果。

[0033] 图7为表示基于碱处理(NaOH)的样本改性处理的效果(其1)的图。

[0034] 图8为表示基于碱处理(NaOH)的样本改性处理的效果(其2)的图。

[0035] 图9为表示各种癌症样本的血中浓度分布的图。大肠癌样本(Colon cancer,n=42)、肝癌样本(Liver cancer,n=50)、胰腺癌样本(Pancreatic cancer:n=40)、健康人样本(Normal,n=36)。

[0036] 图10A为表示大肠癌样本相对于健康人样本的ROC分析的图。

[0037] 图10B为表示肝癌样本相对于健康人样本的ROC分析的图。

[0038] 图10C为表示胰腺癌样本相对于健康人样本的ROC分析的图。

[0039] 图11为表示SDS还原热处理与碱处理的相关性的图。

[0040] 图12为表示针对自身抗体模型样本的改性处理的效果的图。A)不包含改性处理的测定系,B)包含改性处理的测定系。

具体实施方式

[0041] 本发明提供一种检测CEACAM1的方法,其包括:

(1)在含有CEACAM1的样本中使CEACAM1改性,生成改性CEACAM1的工序;以及

(2)通过使用具有识别改性CEACAM1能力的捕获抗体以及标记抗体这两者的夹心法测定,检测CEACAM1的工序。

[0042] 在上述工序(1)中,在含有CEACAM1的样本中CEACAM1被改性,由此生成改性CEACAM1。

[0043] 在本发明中,为了提高基于抗体的识别,进行改性,使得在自然状态(即,非改性状态)下未露出的CEACAM1的线性表位露出。其原因在于,例如,在CEACAM1处于凝聚状态的情况下,或者在形成多聚体、复合体的情况下,线性表位被覆盖,因此线性表位无法充分露出。

[0044] 改性能够通过改性剂、或加热、或它们的组合来进行。作为改性剂,例如可举出碱性物质、表面活性剂、离液改性剂(例如,尿素、胍)、还原剂、以及它们中的2种以上的组合。

[0045] 作为碱性物质,例如可举出无机物质(例如,金属离子)和有机物质。作为碱性物质,存在多种物质,其中,通用碱金属(例如,钠、钾)或碱土金属(例如,镁、钙)的氢氧化物。因此,能够优选使用这样的氢氧化物。

[0046] 碱性物质的浓度只要能够使CEACAM1改性就没有特别限定,例如可以为0.1M以上,优选为0.2M以上,更优选为0.3M以上,进一步更优选为0.35M以上的浓度。碱性物质的浓度还可以为5M以下、2M以下、或1M以下的浓度。

[0047] 碱性物质可以与表面活性剂一起使用。作为表面活性剂,优选非离子型表面活性剂、阴离子型表面活性剂、阳离子型表面活性剂、两性离子型表面活性剂。特别优选非离子型表面活性剂。作为非离子型表面活性剂,可举出聚氧乙烯(23)月桂基醚(Brij35)、聚乙二醇十六烷基醚(Brij58)等醚型表面活性剂、聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯(Tween20)、聚氧乙烯山梨糖醇酐单棕榈酸酯(Tween40)、聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯(Tween80)等聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯(例如,Tween(商品名·注册商标)系列)、聚氧乙烯辛基苯基醚等聚氧乙烯烷基苯基醚(例如,Triton(商品名·注册商标)系列)、Tergitol(注册商标)15-S-7等仲醇聚氧乙烯醚(例如,TERGITOL(商品名·注册商标)系列)、聚(乙二醇)-嵌段-聚(丙二醇)-嵌段-聚(乙二醇)(PluronicF108)等环氧乙烷与环氧丙烷的共聚物(例如,Pluronic(商品名·注册商标)系列)等。表面活性剂的浓度没有特别限定,能够适当设定。

[0048] 在利用包含碱性物质的改性处理液进行改性的情况下,在改性处理后,为了中和或调整pH,可以进一步包括添加包含酸化剂的中和液或具有缓冲能力的缓冲液的工序。作为酸化剂,可举出盐酸、硫酸、乙酸等。另外,在不包括添加中和液的工序的情况下,例如,在下述的反应工序中,可以通过调整混合的缓冲液的缓冲能力和pH等来中和改性处理液的碱性物质,缓和反应工序中的影响。反应工序中的pH能够根据反应工序中包含的成分而适当设定,例如,能够以成为pH 5.5～9.5的方式适当设定反应工序的液体中包含的酸化剂或缓冲液等的添加量。

[0049] 作为表面活性剂,例如可举出阴离子型表面活性剂、阳离子型表面活性剂、两性离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂。作为表面活性剂,能够使用1种或2种以上的表面活性剂。作为表面活性剂,可以单独使用阴离子型表面活性剂,另外,也可以使用阴离子型表面活性剂与其它表面活性剂的组合。作为阴离子型表面活性剂,例如可举出硫酸酯型表面活性剂(例如,十二烷基硫酸钠(SDS))、羧酸型表面活性剂(例如,N-癸酰基肌氨酸钠(NDS)、N-月桂酰基肌氨酸钠水合物(NLS))、磺酸型表面活性剂(例如,1-壬烷磺酸钠(NSS)、十二烷基苯磺酸钠(SDBS))、以及羧酸型-磺酸型表面活性剂(例如,软骨素硫酸钠(CSSS))。作为两性离子型表面活性剂,例如可举出C10APS(N-癸基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸盐)、C12APS(N-十二烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸盐)、C14APS(N-十四烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸盐)、C16APS(N-十六烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸盐)等。作为阳离子型表面活性剂,例如可举出癸基三甲基氯化铵、十二烷基三甲基氯化铵、十四烷基三甲基氯化铵、十六烷基三甲基氯化铵(C16TAC)、癸基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十四烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、月桂基吡啶鎓氯化物、十四烷基吡啶鎓氯化物、十六烷基吡啶鎓氯化物等。

[0050] 表面活性剂的浓度只要能够使CEACAM1改性就没有特别限定,例如可以为0.5重量%以上,优选为1重量%以上,更优选为2重量%以上,进一步更优选为5重量%以上的浓度。表

面活性剂的浓度还可以为20重量%以下、或15重量%以下的浓度。

[0051] 作为还原剂,能够使用能够切断CEACAM1中存在的二硫键的试剂。作为这样的还原剂,例如可举出三羧基乙基膦(TCEP)、半胱氨酸、二硫苏糖醇、还原型谷胱甘肽、β-巯基乙醇。作为蛋白酶,例如可举出胰蛋白酶、糜蛋白酶、Lys-C、Asp-N、Glu-C、Arg-C、天冬酰胺酰基内肽酶、精氨酰基内肽酶和V8蛋白酶等。

[0052] 还原剂的浓度例,如只,要能够切断CEACAM1中存在的二硫键就没有特别限定,例如可以为0.5mM以上,优选为1mM以上,更优选为2mM以上,进一步更优选为5mM以上的浓度。还原剂的浓度还可以为100mM以下或50mM以下的浓度。

[0053] 应予说明,上述改性剂(碱性物质、表面活性剂和还原剂)的浓度的值是以包含改性剂的改性处理液的重量或体积为基准的值。在改性处理液中,除了改性剂以外,还包含溶剂或分散介质(例如,水)以及根据需要的添加剂。作为添加剂,可举出EDTA等螯合剂。

[0054] 加热,例如,可以为35℃以上、40℃以上、45℃以上、50℃以上、55℃以上、60℃以上、65℃以上、70℃以上、75℃以上、80℃以上、85℃以上、90℃以上、95℃以上、或约100℃(即,煮沸)。加热还可以为100℃以下。

[0055] 在特定的实施方式中,改性可以通过组合表面活性剂和还原剂来进行。改性也可以组合表面活性剂、还原剂和加热来进行(例如,SDS还原热处理)。

[0056] 用于使CEACAM1改性的处理时间(例如,在样本中添加改性剂后的孵育时间、加热处理时间),例如,根据改性处理的种类及其程度(例如,浓度、加热温度)等因素而变动,例如可以为1秒以上、5秒以上、10秒以上,优选为30秒以上,更优选为1分钟以上,进一步更优选为2分钟以上、3分钟以上、或5分钟以上。这样的时间还可以为1小时以下、30分钟以下、或20分钟以下。

[0057] 含CEACAM1样本是含有CEACAM1的任意样本。含CEACAM1样本优选为生物学液体样本。含CEACAM1样本也可以在用于本发明的方法之前,进行其它处理。作为这样的处理,例如可举出离心分离、提取、过滤、沉淀、加热、冻结、冷藏和搅拌。

[0058] 在一个实施方式中,含CEACAM1样本可以是源自动物的液体样本。作为液体样本来源的动物,例如可举出哺乳动物(例如,人、猴等灵长类;小鼠、大鼠、兔等啮齿类;牛、猪、山羊、马、绵羊等有蹄类;狗、猫等食肉类;鸟类(例如,鸡))等动物。优选地,动物为哺乳动物,优选为人。源自动物的液体样本可以是源自上述动物的体液样本。作为体液样本,例如可举出血液样本(例如,全血、血清和血浆)、尿、唾液、淋巴液、组织液、脑脊髓液、腹水、汗、精液、泪液、粘液、乳汁、胸腔液、支气管肺泡清洗液和羊水。体液优选为血液样本、尿或唾液。

[0059] 在其它实施方式中,含CEACAM1样本也可以是培养上清样本。培养上清样本可以是细胞培养上清样本,也可以是组织培养上清样本。培养的细胞或组织来源的动物的例子和优选例如上述所示。

[0060] CEACAM1能够根据其来源的动物的种类来确定。CEACAM1来源的动物的例子和优选例与上述的动物同样。因此,CEACAM1为哺乳动物CEACAM1,优选为人CEACAM1。CEACAM1还存在12个同种型,其中3个为分泌型(CEACAM1-4C1、CEACAM1-3、CEACAM1-3C2)。因此,在使用体液样本的情况下,CEACAM1也可以包含这样的分泌型CEACAM1。

[0061] 在上述工序(1)之后,可以利用溶液(例如,缓冲液)稀释包含改性CEACAM1的样本。由此,在上述工序(1)中得到的样本包含高浓度的改性剂的情况下,能够稀释改性剂的浓

度,甚至能够良好地进行上述工序(2)的夹心法测定。

[0062] 在上述工序(2)中,通过夹心法测定检测CEACAM1。在夹心法测定中,能够使用具有识别改性CEACAM1的能力的捕获抗体和标记抗体这两者。夹心法测定能够以使用这样的抗体的任意方式进行。作为这样的方式,例如可举出化学发光免疫测定(CLIA)〔例如,化学发光酶免疫测定法(CLEIA)〕、酶免疫测定法(EIA)、放射免疫测定(RIA)、荧光免疫测定(FIA)和免疫色谱法。

[0063] 捕获抗体可以固相化于固相。另外,针对CEACAM1的抗体也可以是在反应工序中能够固相化于固相的抗体。在本说明书中,有时将固相化于固相的抗体、以及在反应工序中能够固相化于固相的抗体简称为固相化抗体。捕获抗体是用于将目标抗原(本发明的情况下为改性CEACAM1)捕获于固相的抗体。作为固相,例如可举出颗粒(例如,琼脂糖珠(sepharose beads)、琼脂糖珠(agarose beads)、磁性颗粒)、支承体(例如,膜)、容器(例如,塑料板等板、管、微流路)。抗体与固相的固定能够利用现有公知的方法。例如,能够通过物理吸附法、共价键法、利用亲和性物质(例如,生物素、链霉亲和素)的方法、以及离子键法,以共价键或非共价键进行。捕获抗体可以是1种捕获抗体固定于1种固相(例如,磁性颗粒等颗粒)而得到的抗体,也可以是2种以上的捕获抗体固定于1种固相(例如,磁性颗粒等颗粒)而得到的抗体,另外,也可以是2种以上的捕获抗体分别固定于2种以上的固相(例如,磁性颗粒等颗粒)而得到的抗体。

[0064] 标记抗体是利用标记物质标记得到的抗体。作为标记物质,例如可举出酶(例如,过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶(luciferase)、β-半乳糖苷酶)、亲和性物质(例如,链霉亲和素、生物素)、荧光物质或荧光蛋白质(例如,荧光素(fluorescein)、异硫氰酸荧光素、罗丹明、绿色荧光蛋白质、红色荧光蛋白质)、发光或吸光物质(例如,虫荧光素(luciferin)、吖啶鎓、钌)、放射性物质(例如,^{3}H、^{14}C、^{32}P、^{35}S、^{125}I)。抗体的基于标记物质的标记能够以共价键或非共价键进行。

[0065] 在本发明中,抗体是包含具有对目标抗原的结合能力的部分(例如,可变区或与其相当的部分)的蛋白质。因此,作为捕获抗体和标记抗体中的抗体,例如可举出全长抗体(例如,IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、IgY)和抗体的抗原结合性片段(例如,$F(ab')_2$、Fab′、Fab、Fv)、单链抗体等改性抗体。抗体还可以是多克隆抗体或单克隆抗体。

[0066] 在本发明中,作为捕获抗体和标记抗体,能够使用具有识别改性CEACAM1的能力的抗体。具有识别改性CEACAM1能力的抗体可以是具有特异性识别改性CEACAM1能力的抗体,也可以是具有非特异性识别改性CEACAM1能力的抗体。作为具有非特异性识别改性CEACAM1的能力的抗体,例如可举出(i)具有不仅识别改性CEACAM1而且识别自然(即,非改性)CEACAM1的能力的抗体、(ii)具有不仅识别改性CEACAM1而且识别其它CEACAM1(例如,CEACAM3)的能力的抗体、以及(iii)具有不仅识别改性CEACAM1而且识别自然(即,非改性)CEACAM1以及其它CEACAM1(例如,CEACAM3)的能力的抗体。捕获抗体和标记抗体中的至少1种优选为具有特异性识别改性CEACAM1的能力的抗体。

[0067] 在本发明中,作为如上所述的捕获抗体和标记抗体,可以使用(a)具有识别CEACAM1中的PANSGRETIY(序列号1)的氨基酸序列所示的表位的能力的抗体、(b)具有识别CEACAM1中的TESMP(序列号2)的氨基酸序列所示的表位的能力的抗体、(c)具有识别CEACAM1中的DTTYLWWINN(序列号3)的氨基酸序列所示的表位的能力的抗体、或(d)CEACAM1

中的EATGQFHVYP(序列号4)。这些表位均通过如上所述的改性而特别地露出,因此与非改性CEACAM1相比,是与改性CEACAM1更好地反应的表位。根据使用TESMP(序列号2)的氨基酸序列所示的肽的试验,上述(b)的抗体不仅与CEACAM1发生交叉反应,而且与CEACAM3、CEACAM5和/或CEACAM6发生交叉反应,因此不是CEACAM1特异性抗体(参照实施例和图3)。但是,本发明人等发现,通过辅助性地使用上述(b)的抗体进行夹心法测定,CEACAM1的检测灵敏度提高。另外,确认到通过在上述(b)的抗体的基础上并用具有识别CEACAM1的能力的其它抗体,能够避免CEACAM3、CEACAM5和/或CEACAM6的检测(参照实施例)。

[0068] 在特定的实施方式中,作为捕获抗体或标记抗体的一者,可以使用上述(a)的抗体、或上述(a)的抗体与上述(b)的抗体的组合,作为另一者,可以使用上述(c)的抗体、上述(d)的抗体、或上述(c)的抗体与上述(d)的抗体的组合。由此,能够特异性且高灵敏度地检测CEACAM1。优选地,作为捕获抗体,可以使用上述(a)的抗体、或上述(a)的抗体与上述(b)的抗体的组合,作为标记抗体,可以使用上述(c)的抗体、上述(d)的抗体、或上述(c)的抗体与上述(d)的抗体的组合。

[0069] 在组合上述(a)的抗体和上述(b)的抗体的情况下的(a):(b)的重量比,例如,能够为1:9~9:1,优选为2:8~8:2,更优选为3:7~7:3,进一步优选为4:6~6:4,最优选为4.5:5.5~5.5:4.5。

[0070] 具有识别上述表位的能力的抗体能够通过利用CEACAM1或其部分蛋白质作为抗原来制作。实际上,产生上述(a)、(b)、(c)和(d)的抗体的杂交瘤分别成功地以2/500(0.4%)、4/500(0.8%)、1/800(0.1%)和1/120(0.8%)的概率制作。另外,通过利用包含上述(a)、(b)、(c)和(d)的抗体识别的表位的肽、或富含其的多肽(包含多个上述表位的多肽)作为抗原(例如,与白蛋白等载体蛋白质的融合),能够高效地制作产生具有识别上述表位的能力的抗体的杂交瘤。或者,具有识别上述表位的能力的抗体能够通过使用上述表位从抗体库中进行选择而高效地获得。

[0071] 本发明还提供一种检测癌症的方法,其包括:

(1)通过上述检测CEACAM1的方法,测定从受试体采集的样本中的CEACAM1量的工序;以及

(2)将测定的CEACAM1量与基准值进行比较的工序。

[0072] 检测癌症的方法中的上述(1)的工序能够与上述的检测CEACAM1的方法同样地进行。作为被采集样本的受试体,与上述动物相同,优选为哺乳动物,更优选为人。样本与源自上述动物的液体样本(例如,体液样本)相同。

[0073] 检测癌症的方法中的上述(2)的工序将测定的CEACAM1量与基准值进行比较。在测定的CEACAM1量高于基准值的情况下,能够作为受试体有可能罹患癌症的指标进行利用。已知分泌型CEACAM1等CEACAM1能够作为黑色素瘤(melanoma)、胰腺癌、尿路上皮膀胱癌、肺癌、胃癌、大肠癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、黑色素瘤等各种癌症的标记物。因此,本发明的癌症的检测方法在这样的各种癌症(例如,参照实施例中所示的大肠癌、肝癌和胰腺癌、以及它们中的2种以上的组合)的检测中是有用的。

[0074] 本发明进一步提供一种癌症的治疗方法,其包括:

(1)通过上述检测CEACAM1的方法,测定从受试体采集的样本中的CEACAM1量的工序;

(2)将测定的CEACAM1量与基准值进行比较的工序;

(3)选择测定为高于基准值的CEACAM1量的受试体的工序;以及

(4)对选择的受试体给药抗癌剂的工序。

[0075] 癌症的治疗方法中的上述(1)和(2)的工序能够与检测癌症的方法中的上述(1)和(2)的工序同样地进行。

[0076] 癌症的治疗方法中的上述(3)的工序能够通过基于上述(2)的比较结果选择测定为高于基准值的CEACAM1量的受试体来进行。

[0077] 癌症的治疗方法中的上述(4)的工序是对选择的受试体给药抗癌剂。给药的抗癌剂能够根据癌的种类适当决定。另外,也可以并用放射线疗法等其它治疗方法。

[0078] 本发明进一步提供一种CEACAM1检测用试剂盒,其包括:

(1)改性剂;

(2)具有识别改性CEACAM1能力的捕获抗体;以及

(3)具有识别改性CEACAM1能力的标记抗体。

[0079] 改性剂、具有识别改性CEACAM1的能力的捕获抗体、以及具有识别改性CEACAM1的能力的标记抗体与上述相同。具有识别改性CEACAM1的能力的捕获抗体和具有识别改性CEACAM1的能力的标记抗体可以以使用这些抗体的夹心法测定用试剂的形式提供。本发明的试剂盒,例如,在本发明的方法的简便且迅速的实施中是有用的。

[0080] 实施例

通过以下实施例更详细地说明本发明,但本发明并不限定于以下实施例。应予说明,后述的实施例中的成分中附记的%是指重量%。

[0081] 实施例1:免疫抗原和筛选用抗原的表达以及纯化

(A)抗原表达质粒的构建

为了制备作为免疫用抗原的TrpE-His-CEACAM1-N-m3C3d和TrpE-His-CEACAM1-A1-m3C3d、作为筛选用抗原的TrpE-His-CEACAM1-N、TrpE-His-CEACAM1-A1,进行抗原表达质粒的构建。以相当于人CEACAM1的cDNA为模板,在pAT-TrpE-His-CEACAM1-N表达质粒的构建中使用2种引物(5′-GACTCGTACGCAGCTCACTACTGAATCCATG-3′(序列号16)、5′-GACTGTCGACTTACGGGTATACATGGAACTGTCC-3′(序列号17)),在pAT-TrpE-His-CEACAM1-N-m3C3d表达质粒的构建中使用2种引物(5′-GACTCGTACGCAGCTCACTACTGAATCCATG-3′(序列号18)、5′-GACTCTCGAGCCCGGGTATACATGGAACTGTCC-3′(序列号19)),在pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1表达质粒的构建中使用2种引物(5′-GACTCGTACGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGC-3′(序列号20)、5′-GACTGTCGACTTAATTCAAGGTGACTGGGTCACT-3′(序列号21)),在pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1-m3C3d表达质粒的构建中使用2种引物(5′-GACTCGTACGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGC-3′(序列号22)、5′-GACTCTCGAGCCATTCAAGGTGACTGGGTCACT-3′(序列号23))进行PCR。PCR使用KAPA Taq EXtra(日本Genetics公司)的试剂盒,在25个循环的条件下进行:DNA改性95℃、15秒,退火55℃、15秒,DNA合成72℃、45秒,通过1.2%琼脂糖凝胶电泳分离得到的DNA片段,利用Freeze′N Squeeze™DNA Gel Extraction Spin Columns(BIO-RAD公司)进行纯化。在TrpE-His-CEACAM1-N或TrpE-His-CEACAM1-A1的构建中,在限制酶反应液20μl〔100mM NaCl、50mM Tris-HCl、10mM $MgCl_2$、1mM DTT、pH7.9〕中加入10单位的BsiWI和10单位的SalI而成的溶液中,在pAT-TrpE-His-CEACAM1-N-m3C3d或pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1-m3C3d的构建中,在限

制酶反应液20μl〔100mM NaCl、50mM Tris-HCl、10mM $MgCl_2$、1mM DTT、pH7.9〕中加入10单位的BsiWI和10单位的XhoI到而成的溶液中,将该扩增的CEACAM1基因片段0.5μg在37℃下消化1小时,然后进行1.2%琼脂糖凝胶电泳,利用与上述PCR产物相同的方法将CEACAM1基因的BsiWI-SalI片段或BsiWI-XhoI片段纯化。

[0082] 接着,在pAT-TrpE-His-CEACAM1-N或pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1的构建中,在限制酶反应液20μl〔100mM NaCl,50mM Tris-HCl,10mM $MgCl_2$,1mM DTT,pH7.9〕中加入10单位的BsiWI和10单位的SalI而成的溶液中,在pAT-TrpE-His-CEACAM1-N-m3C3d或pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1-m3C3d的构建中,在限制酶反应液20μl〔100mM NaCl,50mM Tris-HCl,10mM $MgCl_2$,1mM DTT,pH7.9〕中加入10单位的BsiWI和10单位的XhoI到而成的溶液中,将作为表达载体的pAT-trpE-His或pAT-trpE-His-m3C3d的DNA 1μg在37℃下消化1小时,然后进行1.2%琼脂糖凝胶电泳,利用Freeze'N Squeeze™DNA Gel Extraction Spin Columns(BIO-RAD公司)将BsiWI-SalI或BsiWI-XhoI处理载体纯化。

[0083] 在将得到的BsiWI-SalI或BsiWI-XhoI处理载体DNA与上述限制酶处理后的CEACAM1片段以成为相同重量的方式混合而成的DNA溶液中添加等量的DNA Ligation Kit<Mighty Mix>(TAKARA BIO公司),在16℃下保温30分钟,进行连接反应。为了得到表达质粒,使用该连接反应液转化大肠杆菌XL1-blue MRF(Stratagen公司)。

[0084] 用于转化的敏感性大肠杆菌株由Mix&Go E.coli Transformation Kit&Buffer Set制备。将转化大肠杆菌涂布在包含100μg/ml氨苄青霉素的LB板(1%胰蛋白胨、0.5%NaCl、1.5%琼脂)上,在37℃保温过夜。利用灭菌牙签采取在板上产生的菌的菌落,转移到包含100μg/ml的氨苄青霉素的2YT培养基中,在37℃下培养一夜。

[0085] 离心1.5ml的菌培养液并集菌,使用Wizard(R)Plus SV Minipreps DNA Purification Systems(Wizard(R)Plus SV小量DNA纯化系统)(Promega公司)进行质粒DNA的小量制备(Minipreparation)。在TrpE-His-CEACAM1-N或A1的构建中,在限制酶反应液20μl〔100mM NaCl、50mM Tris-HCl、10mM $MgCl_2$、1mM DTT、pH7.9〕中加入10单位的BsiWI和10单位的SalI而成的溶液中,在TrpE-His-CEACAM1-N-m3C3d或A1-m3C3d的构建中,在限制酶反应液20μl〔100mM NaCl、50mM Tris-HCl、10mM $MgCl_2$、1mM DTT、pH7.9〕中加入10单位的BsiWI和10单位的XhoI而成的溶液中,将得到的质粒DNA 1μg在37℃下消化1小时,然后进行1.2%琼脂糖凝胶电泳,在pAT-TrpE-His-CEACAM1-N或pAT-TrpE-His-CEACAM1-N-m3C3d中筛选出产生约450bp的片段的表达质粒,在pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1或pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1-m3C3d中筛选出产生约400bp的片段的表达质粒。

[0086] (B)抗原的表达以及纯化

将利用pAT-TrpE-His-CEACAM1-N或pAT-TrpE-His-CEACAM1-N-m3C3d和pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1或pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1-m3C3d转化的大肠杆菌在包含100μg/ml氨苄青霉素的LB培养基中在37℃下培养一夜。将其接种于以1%浓度包含100μg/ml氨苄青霉素的M9-CA,在37℃下培养一夜。培养结束后,通过离心收集菌体,再悬浮于50ml的Lysis液[50mM Tris-HCl(pH8.5)、30mM NaCl、5mM EDTA]中,加入1ml的溶菌酶液(10mg/ml Lysozyme),在37℃下处理1小时。对该悬浮液进行超声波处理(150W、90秒2次)破坏细胞。以15000rpm在4℃下离心30分钟,回收不溶性级分。将不溶性级分再悬浮于50ml的包含1%NP40的A溶液[50mM Tris-HCl(pH8.5)]。将悬浮液以15000rpm在4℃下离心30分钟,回收不溶性级分。将

不溶性级分再悬浮于50ml的包含2M尿素的A溶液。将悬浮液以15000rpm在4℃下离心30分钟,回收不溶性级分。将不溶性级分再悬浮于50ml的包含6M尿素的A溶液。将悬浮液以15000rpm在4℃下离心30分钟,回收可溶性级分。

[0087] 从利用包含6M尿素的溶液进行助溶得到的抗原溶液中,通过使用了S Sepharose HP柱(GE Healthcare公司)的离子交换法和使用了HisTrapHP柱(GE Healthcare公司)的IMAC法,纯化抗原蛋白质TrpE-His-CEACAM1-N、TrpE-His-CEACAM1-N-m3C3d、TrpE-His-CEACAM1-A1、TrpE-His-CEACAM1-A1-m3C3d。

[0088] 实施例2:获得抗CEACAM1单克隆抗体

(A)免疫

将通过所述方法制备的抗原蛋白质TrpE-His-CEACAM1-N-m3C3d或TrpE-His-CEACAM1-A1-m3C3d溶解于6M尿素后,在包含0.15M NaCl的10mM磷酸缓冲液(pH7.3)(PBS)中以最终浓度成为1.0mg/ml的方式进行稀释,与等量的弗氏佐剂混合,对4～6周龄的BALB/c小鼠皮下给药50～100μg。每2周进行同样的追加免疫,进一步将溶解于PBS的抗原蛋白质100μg作为最终免疫进行腹腔内给药。

[0089] (B)细胞融合

在最终免疫后第三天,从该小鼠无菌地摘除脾脏,使用镊子和细胞过滤器将脾脏拆解为单个细胞,悬浮于RPMI1640培养基(未添加血清)。使用1ml的Red Blood Cell Lysing Buffer(红细胞裂解液,MERCK公司)对通过离心分离(1000rpm,5分钟,室温)而沉淀的细胞进行移液,在室温下静置1分钟。在该细胞中添加20mL的RPMI1640培养基(未添加血清),充分悬浮。通过离心分离(1000rpm,5分钟,室温)沉淀的细胞利用RPMI1640培养基(未添加血清)进行悬浮。从培养烧瓶中回收对数生长期的骨髓瘤细胞(小鼠骨髓瘤细胞株Sp2/0 Ag14),通过离心分离(1000rpm,5分钟,室温)使其沉淀,利用RPMI1640培养基(未添加血清)进行悬浮。将骨髓瘤细胞与脾脏细胞以1:1的细胞数比混合,以合计细胞数成为3.4×10^7的方式进行分注。将该细胞混合液离心分离(1000rpm,5分钟,室温)后,除去上清,利用ECF缓冲液(0.3M甘露醇,0.1mM氯化钙,0.1mM氯化镁溶液)清洗2次。使用细胞融合装置ECFG21(NEPA GENE公司)和MS支架型腔室铂电极CUY497P2(0.8mL),在液量0.35ml、交流电压40Vrms、交流时间10sec、DC电压350V、脉冲宽度30μsec、脉冲间隔0.5sec、脉冲次数3次、衰减率10%、极性切换+(无切换)、后融合7sec、衰减正弦波ON的条件下,使最终悬浮在0.35ml的ECF缓冲液中的混合细胞液进行细胞融合。融合后立即悬浮于包含血清的RPMI1640培养基中,静置10分钟,由此使细胞膜恢复。然后,悬浮于包含10%胎牛血清和次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT)的RPMI-1640培养基中,接种于96孔细胞培养板。培养约10天,仅使杂交瘤增殖后,回收培养上清,用于后述的筛选。

[0090] (C)抗CEACAM1抗体产生杂交瘤的筛选

通过使用上述抗原蛋白质TrpE-His-CEACAM1-N和TrpE-His-CEACAM1-A1的ELISA法查找产生目标抗体的杂交瘤。为了选择识别线性表位的抗体,利用包含1mM TCEP和6M尿素的TBS将各种抗原以成为1μg/mL的方式进行稀释。将稀释的抗原以每孔50μL添加到Nunc公司的多模块板(multi-module plate)中,在4-8℃静置一夜。除去抗原稀释液后,每孔加入100μL的封闭液(0.1%酪蛋白、1mM EDTA、PBS),在室温下静置1小时,将抗原固定于板。

[0091] 在各孔中加入利用反应液(0.1%酪蛋白、1mM EDTA、PBS)稀释的培养上清50μL,在

室温下静置1小时。利用包含0.05%Tween20的PBS清洗孔后,加入50μL的辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗小鼠IgG Fc特异性抗体,在室温下静置1小时。利用包含0.05%Tween20的PBS清洗孔后,在各孔中添加TMB溶液50μL,诱导显色。然后,将2M H_2SO_4添加到各孔中,使反应停止,在450nm的波长处测定吸光度。

[0092] 认为与TrpE-His-CEACAM1-N和TrpE-His-CEACAM1-A1两者反应的杂交瘤的培养上清识别了TrpE-His序列或大肠杆菌来源的夹杂蛋白质,因此进行排除,得到具有期望的反应特异性的产生抗体的杂交瘤。

[0093] 将从免疫了抗原蛋白质TrpE-His-CEACAM1-N-m3C3d的小鼠脾脏得到的杂交瘤命名为A3029、A3048、A3054、A3057、A3067、A3073、A6056,将从免疫了抗原蛋白质TrpE-His-CEACAM1-A1-m3C3d的小鼠脾脏得到的杂交瘤命名为A7004。

[0094] 得到的杂交瘤产生的抗体的表位如实施例3所示,产生同一表位的抗体的杂交瘤A3054和A3067是从杂交瘤阳性500孔中得到的2个克隆,产生同一表位的抗体的杂交瘤A3029、A3048、A3057、A3073是从杂交瘤阳性500孔中得到的4个克隆,A7004是从杂交瘤阳性800孔中得到的1个克隆,A6056是从杂交瘤阳性120孔中得到的1个克隆。

[0095] (D)杂交瘤的克隆

对于得到的杂交瘤,通过极限稀释法进行单一克隆化,建立产生抗体杂交瘤。

[0096] (E)抗CEACAM1单克隆抗体的制备

将建立的小鼠杂交瘤在无血清培养基(Hybridoma-SFM、GIBCO)中驯化培养。在T75烧瓶扩大培养至50mL,在细胞密度为约5E5cells/ml时,移植至利用500mL的无血清培养基充满的培养袋(Nipro公司)。培养2-4周,回收培养上清。将培养液应用于填充有Protein G Sepharose(GE Healthcare公司)的柱,利用pH3的缓冲液洗脱结合的抗体。利用2M Tris(pH8)将洗脱液迅速中和,利用脱盐柱与PBS进行缓冲液交换。能够从培养液500mL中获得5-20mg的抗CEACAM1单克隆抗体。

[0097] 实施例3:抗CEACAM1单克隆抗体的表位分析

为了分析得到的抗CEACAM1单克隆抗体的表位,使大肠杆菌表达将CEACAM1的N结构域蛋白或A1结构域蛋白从C末端各截断10或20个氨基酸而得的缺失蛋白质和将N结构域蛋白从N末端各截断3个氨基酸而得的缺失蛋白质,通过使用该大肠杆菌破碎液的斑点印迹(Dot blot)进行分析。

[0098] (A)缺失蛋白质表达质粒的构建

缺失蛋白质表达质粒的构建使用KOD-Plus-Mutagenesis Kit(TOYOBO公司)进行。作为模板,N结构域缺失蛋白质表达质粒的构建使用pAT-GST-His-CEACAM1-N(Nfull),A1结构域缺失蛋白质表达质粒的构建使用pAT-TrpE-His-CEACAM1-N-A1(A1full)。使用的引物设定在想要缺失的各区域的外侧。将与各种缺失蛋白质对应的氨基酸序列示于表1。按照制造商的使用说明书,依次进行基于反向PCR、DpnI的模板质粒的分解、PCR产物的磷酸化和自环化。使用该自环化的PCR产物,转化大肠杆菌XL1-blue MRF(Stratagen公司)。将转化大肠杆菌涂布在包含100μg/ml氨苄青霉素的LB板(1%胰蛋白胨、0.5%NaCl、1.5%琼脂)上,在37℃下保温过夜。利用灭菌牙签采取在板上产生的菌的菌落,转移到包含100μg/ml的氨苄青霉素的2YT培养基中,在37℃下培养一夜。将其接种于以1%浓度包含100μg/ml氨苄青霉素的M9-CA,在37℃下培养一夜。培养结束后,通过离心收集菌体,利用1×SDS-PAGE样品缓冲液

(62.5mM Tris-HCl、10%Glycerol(甘油)、2%SDS、20mM DTT)进行助溶,制备各缺失蛋白质的大肠杆菌破碎液。进行大肠杆菌破碎液的SDS-PAGE,通过考马斯亮蓝染色和使用抗His-Tag抗体的免疫印迹确认目标蛋白质的表达。

[0099] [表1]

表1.与各种缺失蛋白质对应的氨基酸序列

表达蛋白质名	氨基酸序列
Nfull	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQA TPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYP (序列号24)
N-98	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQA TPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNE (序列号25)
N-88	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQA TPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTL (序列号26)
N-68	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQA TPGPANSGRETIY (序列号27)
N-58	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQA TPG (序列号28)
N-48	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGY (序列号29)
N-28	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQL (序列号30)
N-18	QLTTESMPFNVAEGKEVL (序列号31)
N-8	QLTTESMP (序列号32)
N4-18	TESMPFNVAEGKEVL (序列号33)
N7-18	MPFNVAEGKEVL (序列号34)
N10-18	NVAEGKEVL (序列号35)
A1full	PKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSLPVSPRLQLSNGNRT LTLLSVTRNDTGPYECEIQNPVSANRSDPVTLN (序列号36)
A1-68	PKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSLPVSPRLQLSNGNRT LTLLSVTRNDTGP (序列号37)
A1-48	PKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSLPVSPRLQ (序列号38)
A1-38	PKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINN (序列号39)
A1-28	PKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQ (序列号40)

在N结构域缺失蛋白质的N末端添加GST-His、在A1结构域缺失蛋白质的N末端添加TrpE-His-N

[0100] (B)斑点印迹法

将上述的各种大肠杆菌裂解物在硝化纤维素膜上各点样1μL并风干,在转印缓冲液(25mM Tris、192mM甘氨酸、20%MetOH)中在室温下浸渍10分钟后,使用反应液(0.1%酪蛋白钠、1mM EDTA、PBS)进行封闭。将利用反应液以成为1μg/mL的方式稀释的各抗体与上述点样的硝化纤维素膜(点膜)反应,在室温下静置1小时。使用清洗液(0.05%Tween20、PBS)清洗点膜,使其与利用反应液稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记抗小鼠IgG Fc特异性抗体反应,在室温下静置1小时。使用清洗液清洗点膜,使其与发光底物SuperSignal West Pico (Thermo scientific公司)反应,在室温下静置5分钟后,利用CCD成像仪检测化学发光。

[0101] (C)结果

基于斑点印迹的表位分析的结果显示,A3054、A3067抗体的N结构域的TESMP(序列号2)的氨基酸序列是表位。显示A3029、A3048、A3057、A3073抗体的N结构域的PANSGRETIY(序列号1)的氨基酸序列是表位。显示A6056抗体的N结构域的EATGQFHVYP(序列号4)的氨基酸序列是表位。显示A7004抗体的A1结构域的DTTYLWWINN(序列号3)的氨基酸序列是表位。

[0102] 实施例4:使用重组抗原的交叉反应性评价

使用市售的重组抗原CEACAM1(R&D Systems公司)、CEACAM3(R&D Systems公司)、CEACAM5(R&D Systems公司)、CEACAM6(R&D Systems公司),评价获得的抗CEACAM1单克隆抗体(对于表位相同的抗体选择一种)的交叉反应性。

[0103] (A)抗原固相ELISA

利用包含1mM TCEP和6M尿素的TBS将各种抗原稀释,使其成为1μg/mL。将稀释的抗原以每孔50μL添加到Nunc公司的多模块板中,在室温下静置一夜。除去抗原稀释液,利用PBS清洗后,每孔加入100μL的封闭液(0.1%酪蛋白钠、150mM NaCl、1mM EDTA、PBS),在室温下静置1小时。

[0104] 除去封闭液,在各孔中加入利用反应液(0.1%酪蛋白钠、150mM NaCl、1mM EDTA、PBS)稀释的各种抗体50μL,在室温下静置1小时。利用包含0.05%Tween20的PBS清洗孔后,加入50μL的辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗小鼠IgG Fc特异性抗体,在室温下静置1小时。利用包含0.05%Tween20的PBS清洗孔后,在各孔中添加TMB溶液50μL,诱导显色。然后,将2M H_2SO_4添加到各孔中,使反应停止,在450nm的波长处测定吸光度。

[0105] (B)结果

将CEACAM1抗体的交叉反应性评价的结果示于图2。相对于CEACAM3、CEACAM5和CEACAM6的反应性,以相对于CEACAM1的相对值表示(相对结合率(%))。A3054抗体相对于CEACAM5显示出18%左右的交叉反应性,但CEACAM3、CEACAM6为小于5%的交叉反应性。A3073抗体对CEACAM3、CEACAM5和CEACAM6均不显示交叉反应性,CEACAM1特异性最高。A6056抗体在CEACAM5中未显示交叉反应性,但相对于CEACAM6显示50%左右的交叉反应性,相对于CEACAM3显示250%的交叉反应性。A7004抗体相对于CEACAM3、CEACAM6显示5%左右的交叉反应性,相对于CEACAM5显示150%的交叉反应性。

[0106] 实施例5:与CEACAM家族的序列比较

对各抗体的表位与CEACAM家族的氨基酸序列比对(图3)进行比较可知,A3054抗体和A3073抗体识别出包含CEACAM1固有的氨基酸(分别为TESMP(序列号2)中的苏氨酸残基(T)和PANSGRETIY(序列号1)中的天冬酰胺残基(N))的序列(图3中以黑框表示)。根据交叉反应性的评价结果,这两个抗体与CEACAM5和CEACAM6的交叉反应性低,因此认为这些CEACAM1固有的氨基酸是表位的热点。A6056抗体在交叉反应性的评价结果中,CEACAM6显示中等程度的交叉反应,CEACAM5未发生交叉反应,因此认为EATGQFHVYP(序列号4)中的组氨酸残基(H)是表位的热点(图3中以黑框表示)。该序列也存在于CEACAM3和CEACAM4中,因此A6056抗体存在与它们发生交叉反应的可能性。A7004抗体在交叉反应性的评价结果中,与CEACAM5强烈地发生交叉反应而不与CEACAM6发生反应,因此认为DTTYLWWINN(序列号3)中的天冬氨酸残基(D)是表位的热点(图3中以黑框表示)。该序列仅由CEACAM1和CEACAM5具有,因此认为与其它CEACAM家族不发生交叉反应。

[0107] 实施例6:使用肽的交叉反应性评价

对于认为识别CEACAM1特异性序列的A3054、A3067抗体和A3029、A3048、A3067、A3073抗体,进行使用合成肽的交叉反应性评价。

[0108] (A)肽固相ELISA

利用包含1mM TCEP和6M尿素的TBS将各种合成肽稀释,使其成为20μg/mL。将稀释的抗原以每孔50μL添加到Nunc公司的多模块板中,在室温下静置一夜。除去抗原稀释液,利用PBS清洗后,每孔加入100μL的封闭液(0.1%酪蛋白钠、150mM NaCl、1mM EDTA、PBS),在室温下静置1小时。

[0109] 除去封闭液,在各孔中加入利用反应液(0.1%酪蛋白钠、150mM NaCl、1mM EDTA、PBS)稀释的各种抗体50μL,在室温下静置1小时。利用包含0.05%Tween20的PBS清洗孔后,加入50μL的辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗小鼠IgG Fc特异性抗体,在室温下静置1小时。利用包含0.05%Tween20的PBS清洗孔后,在各孔中添加TMB溶液50μL,诱导显色。然后,将2M H_2SO_4添加到各孔中,使反应停止,在450nm的波长处测定吸光度。

[0110] (B)结果

在表2、3中以相对于CEACAM1的序列的比(%)表示各抗体的交叉反应性。A3054、A3067抗体对CEACAM3、CEACAM5、CEACAM6显示交叉反应性。A3073、A3029、A3048、A3057对任何CEACAM家族的序列都不显示交叉反应性,显示高的CEACAM1特异性。

[0111] [表2]

表2. A3054和A3067抗体的交叉反应性

肽名	氨基酸序列	A3054	A3067
CEACAM1	QLTTESMPFN (序列号41)	100%	100%
CEACAM3	KLTIESMPLS (序列号42)	79%	81%
CEACAM4	QFTIEALPSS (序列号43)	0%	0%
CEACAM5,6	KLTIESTPFN (序列号44)	97%	103%
CEACAM7	QTNIDVVPFN (序列号45)	0%	0%
CEACAM8	QLTIEAVPSN (序列号46)	0%	0%

% CEACAM1

[0112] [表3]

表3. A3029、A3048、A3057和A3073抗体的交叉反应性

肽名	氨基酸序列	A3029	A3048	A3057	A3073
CEACAM1	QATPGPANSGRETIY (序列号47)	100%	100%	100%	100%
CEACAM3	QATPGAAYSGRETIY (序列号48)	0%	0%	0%	0%
CEACAM4	ANIPGAAYSGRETVY (序列号49)	0%	0%	0%	0%
CEACAM5	QATPGPAYSGREIIY (序列号50)	0%	0%	1%	0%
CEACAM6	QATPGPAYSGRETIY (序列号51)	0%	0%	0%	0%
CEACAM7	ENAPGPAHNGRETIY (序列号52)	0%	0%	0%	0%
CEACAM8	QITPGPAYSNRETIY (序列号53)	0%	0%	0%	0%

% CEACAM1

[0113] 实施例7:CEACAM1夹心测定系的构建

(A)生物素标记抗体的制备

使用脱盐柱将抗体溶液的缓冲液替换为PBS,将抗体浓度制备为0.5mg/mL。在该抗体溶液中添加Sulfo-NHS-LC-Biotin(Thermo Scientific公司),使其成为约70μM,在室温下反应90分钟。在其中添加1/20容量的1M Tris(pH7)使反应停止,作为生物素标记物。

[0114] (B)夹心ELISA抗体组合

利用PBS将各种抗体进行稀释,使其成为5或10μg/mL。将稀释的抗体以每孔50μL添加到Nunc公司的多模块板中,在4-8℃静置一夜。除去抗体稀释液,利用PBS清洗后,每孔加入100μL的封闭液(0.1%酪蛋白钠、150mM NaCl、1mM EDTA、PBS),在室温下静置1小时,制备抗体固相板。使利用LUMIPULSE(注册商标)样本稀释液(富士瑞必欧公司)以成为1或0μg/mL的方式将市售的CEACAM1抗原(R&D Systems公司)进行稀释得到的样本50μL与50μL的改性处理液(10%SDS、3.75%EDTA2Na、10mM TCEP)混合,进行1000rpm的振荡,在80℃下加热10分钟,制备改性处理样本。将改性处理样本20μL与100μL的反应液(100mM Tris-HCl、200mM NaCl、20mM EDTA3Na、0.1%ProClin300、2%BSA、pH7.5)混合,将其中的50μL添加到除去了上述封闭液的抗体固相板的孔中,在室温下静置1小时。利用包含0.05%Tween20的PBS清洗孔后,在孔中添加利用标记物稀释液(50mM MES、100mM NaCl、0.3mM $ZnCl_2$、1mM $MgCl_2$、2%BSA、0.10%NaN_3、pH6.8)以成为1μg/mL的方式进行稀释的生物素标记抗体,在室温下静置1小时。利用包含0.05%Tween20的PBS清洗孔后,在孔中添加利用标记物稀释液稀释的碱性磷酸酶(ALP)标记链霉亲和素,在室温下静置30分钟。利用包含0.05%Tween20的PBS清洗孔后,添加LUMIPULSE底物液(富士瑞必欧公司),测定基于酶反应的化学发光量。

[0115] 将夹心ELISA的固相抗体和标记抗体组合研究的结果示于表4。Δ 0计数值是从CEACAM1抗原1μg/mL的测定值减去0μg/mL的测定值得到的差。将CEACAM1特异性最高的A3073抗体用于固相,将A7004抗体或A6056抗体用作标记物时,显示出高反应性。

[0116] [表4]

表4. 夹心ELISA的固相抗体和标记抗体的组合

Δ0计数值		固相抗体			
		A3054	A3073	A7004	A6056
生物素标记抗体	A3054		78170	1010	560
	A3073	72890		26140	9550
	A7004	3870	145160		2550
	A6056	14520	161880	4320	

[0117] (C)固相抗体组合

研究将作为固相抗体的A3054抗体(或A3067抗体)和A3073抗体(或A3029、A3048、A3057)组合时的效果。测定方法按照上述“(B)夹心ELISA抗体组合”。固相条件使用PBS,在单独固相中以成为5或10μg/mL的方式进行稀释,在共固相中分别以成为5μg/mL的方式进行

混合。测定利用LUMIPULSE样本稀释液(富士瑞必欧公司)以成为1或0μg/mL的方式将市售的CEACAM1抗原(R&D Systems公司)进行稀释得到的样本。

[0118] 将固相抗体组合的结果示于表5。Δ 0计数值是从CEACAM1抗原1μg/mL各自的测定值减去0μg/mL的测定值得到的差。与A3054抗体(或A3067抗体)和A3073抗体(或A3029、A3048、A3057)各自的单独固相相比,共固相显示高的反应性。该值大于单独固相各自的和,因此认为CEACAM1结合力表现出协同效果。

[0119] [表5]

表5. 固相抗体的组合

固相抗体		固相浓度(μg/mL)	Δ0计数值	
			A6056	A7004
A3054		5	380	670
		10	540	1760
A3067		5	270	2860
		10	270	4920
A3029		5	14695	46630
		10	19800	55705
A3048		5	18735	61915
		10	23710	78160
A3057		5	10710	42610
		10	14950	53110
A3073		5	11530	49640
		10	12990	57395
A3054 +	A3029	5+5	66713	173820
	A3048	5+5	55453	167410
	A3057	5+5	57167	168395
	A3073	5+5	34545	145560
A3067 +	A3029	5+5	42240	146645
	A3048	5+5	35333	143515
	A3057	5+5	36300	143410
	A3073	5+5	22005	121520

[0120] (D)夹心测定系中的交叉反应性评价

确认将作为固相抗体的A3054抗体(或A3067抗体)和A3073抗体(或A3029、A3048、A3057)组合时的交叉反应性。测定方法按照上述“(B)夹心ELISA抗体组合”。固相条件使用PBS,以A3054抗体(或A3067抗体)和A3073抗体(或A3029、A3048、A3057)分别成为5μg/mL的方式进行混合。测定利用LUMIPULSE样本稀释液(富士瑞必欧公司)以成为1或0μg/mL的方式将市售的CEACAM1抗原(R&D Systems公司)、CEACAM3抗原(R&D Systems公司)、CEACAM5抗原(R&D Systems公司)、CEACAM6抗原(R&D Systems公司)稀释得到的样本。

[0121] 将夹心测定系中的交叉反应性评价的结果示于表6。Δ 0计数值是从CEACAM1抗原1μg/mL的测定值减去0μg/mL的测定值得到的差。在任一固相抗体组合中,对于CEACAM3、CEACAM5和CEACAM6均未显示出显著的交叉反应。表示具有交叉反应性的A3054抗体(或A3067抗体)不影响A3073抗体(或A3029、A3048、A3057)的CEACAM1特异性。

[0122] [表6]

表6.夹心测定系中的交叉反应性

标记抗体	固相抗体组合		Δ0计数值				相对于CEACAM1(%)		
			CEACAM1	CEACAM3	CEACAM5	CEACAM6	CEACAM3	CEACAM5	CEACAM6
A6056	A3054	A3029	66713	183	113	483	0.3%	0.2%	0.7%
		A3048	55453	163	0	243	0.3%	0.0%	0.4%
		A3057	57167	87	217	737	0.2%	0.4%	1.3%
		A3073	34545	265	215	285	0.8%	0.6%	0.8%
	A3067	A3029	42240	580	0	760	1.4%	0.0%	1.8%
		A3048	35333	433	513	343	1.2%	1.5%	1.0%
		A3057	36300	170	0	160	0.5%	0.0%	0.4%
		A3073	22005	0	185	335	0.0%	0.8%	1.5%
A7004	A3054	A3029	173820	0	690	50	0.0%	0.4%	0.0%
		A3048	167410	0	360	0	0.0%	0.2%	0.0%
		A3057	168395	0	545	0	0.0%	0.3%	0.0%
		A3073	145560	0	320	0	0.0%	0.2%	0.0%
	A3067	A3029	146645	0	405	0	0.0%	0.3%	0.0%
		A3048	143515	0	295	0	0.0%	0.2%	0.0%
		A3057	143410	30	580	400	0.0%	0.4%	0.3%
		A3073	121520	30	670	300	0.0%	0.6%	0.2%

[0123] 实施例8:使用全自动化学发光酶免疫测定系统的CEACAM1测定系统的评价

(A)抗CEACAM1抗体结合铁氧体颗粒的制备

在10mM MES缓冲液(pH5.0)中向磁性颗粒添加抗CEACAM1抗体(A3054和A3073),得到包含0.04mg/mL抗CEACAM1抗体(A3054和A3073)和5mg/mL磁性颗粒的悬浮液。一边缓慢搅拌该悬浮液一边在25℃下孵育1小时,使抗CEACAM1抗体(A3054和A3073)与磁性颗粒固相化。然后,利用磁铁对磁性颗粒进行集磁,利用清洗液(50mM Tris缓冲液、150mM NaCl、2.0% BSA、pH7.2)清洗磁性颗粒,得到抗CEACAM1抗体(A3054和A3073)固相化颗粒。

[0124] (B)碱性磷酸酶(ALP)标记抗CEACAM1抗体的制备

将脱盐处理后的碱性磷酸酶和N-(4-马来酰亚胺丁酰氧基)-琥珀酰亚胺(GMBS)(终浓度0.3mg/mL)在0.1M磷酸缓冲液(pH7.0)中混合,在30℃下静置1小时进行马来酰亚胺化。使用偶联缓冲液进行脱盐处理后,将Fab′化的抗CEACAM1单克隆抗体A7004与马来酰亚胺化碱性磷酸酶以摩尔比1:1的比例混合,在25℃下静置30分钟进行偶联。将反应后的抗体和ALP的混合液浓缩,使用ALP缓冲液(1mM $MgCl_2$、0.1mM $ZnCl_2$、0.1%NaN_3、0.15M NaCl、0.1M MES、pH6.8)进行凝胶过滤纯化,得到ALP标记抗CEACAM1抗体。

[0125] (C)CEACAM1测定方法

按照以下方法,进行使用全自动化学发光酶免疫测定系统的CEACAM1的测定。将样本50μL和改性处理液(10%SDS、3.75%EDTA2Na、10mM TCEP)50μL混合,进行1000rpm的振荡,在80℃下加热10分钟,制备改性处理样本。将其中50μL与包含抗CEACAM1抗体A3054和A3073共结合得到的磁性颗粒的磁性颗粒液(100mM Tris-HCl、200mM NaCl、20mM EDTA3Na、0.1% ProClin300、2%BSA、pH7.5)50μL混合,反应8分钟。对磁性颗粒进行集磁·清洗,除去未与磁性颗粒结合的成分,添加利用标记物稀释液(50mM MES、100mM NaCl、0.3mM $ZnCl_2$、1mM $MgCl_2$、2%BSA、0.10%NaN3、pH6.8)以成为0.2μg/mL的方式稀释的ALP标记A7004抗体50μL,反应8分钟。对磁性颗粒进行集磁·清洗,除去未与磁性颗粒结合的成分,添加包含AMPDD的底物液(LUMIPULSE底物液、富士瑞必欧公司制造)200μL。对酶反应产生的发光量进行计数,使

用标准曲线,由上述计数算出样本中的CEACAM1值。校准曲线是与样本同样地测定相当于0、1.6、8、40、200、1000ng/mL的CEACAM1量的CEACAM1(R&D Systems公司)标准液,基于对各标准液得到的发光量而制成的。本实施例的样本改性处理以后的工序全部使用自动分析仪器LUMIPULSE L2400(注册商标、富士瑞必欧公司制造)进行。

[0126] (D)疾病样本测定

通过使用上述全自动化学发光酶免疫测定系统的CEACAM1测定方法,进行大肠癌样本(从TRINA BIOREACTIVES AG购入)(n=42)、肝癌样本(从TRINA BIOREACTIVES AG购入)(n=50)、胰腺癌样本(从TRINA BIOREACTIVES AG购入)(n=40)、健康人样本(n=36)的测定。图4表示它们的血中浓度分布图,图5表示各癌样本的ROC(Receiver Operating Characteristic:受试者操作特性曲线)分析图。健康人样本的CEACAM1浓度平均为125.7±49.4ng/mL,显示出比较稳定的值。大肠癌样本、肝癌样本和胰腺癌样本的CEACAM1平均浓度分别为216.1±108.4ng/mL、399.9±119.3ng/mL、430.9±259.4ng/mL,与健康人样本相比为显著高值。ROC分析的结果,在大肠癌样本中,曲线下面积为0.836,临界值设为154.4ng/mL时的特异度为0.778,灵敏度为0.762。在肝癌样本中,曲线下面积为0.996,临界值设为201.6ng/mL时的特异度为0.994,灵敏度为1.0。在胰腺癌样本中,曲线下面积为0.969,临界值设为181.9ng/mL时的特异度为0.917,灵敏度为0.925。

[0127] (E)基于CEA吸收的CEACAM1特异性的评价

为了评价CEACAM1测定系统的特异性,使用LUMIPULSE Presto CEA测定试剂(富士瑞必欧公司制造)的抗CEA单克隆抗体结合颗粒液,比较吸收了CEA的样本[吸收(+)]和未处理样本[吸收(-)]的CEACAM1测定值,确认未受到共存的CEA的影响。

[0128] 将浓缩至2倍的抗CEA单克隆抗体结合颗粒液50μL和样本50μL混合,进行1000rpm的振荡,在37℃下反应30分钟。对磁性颗粒进行集磁,回收上清,由此制备吸收了CEA的样本[吸收(+)]。另外,将不包含颗粒的颗粒稀释液50μL和样本50μL混合,进行1000rpm的振荡,在37℃下反应30分钟,制备未处理样本[吸收(-)]。使用这些样本进行CEACAM1测定和CEA测定。CEACAM1测定按照上述的使用了全自动化学发光酶免疫测定系统的CEACAM1测定方法,CEA测定按照LUMIPULSE Presto CEA测定试剂(富士瑞必欧公司制造)的附件,使用自动分析仪器LUMIPULSE L2400(富士瑞必欧公司制造)进行。

[0129] 表7中示出基于CEA吸收的CEACAM1特异性的评价结果。在CEA测定值超过100ng/mL的样本1、样本2中,吸收(+)尽管是能够吸收约90%的CEA的条件,但CEACAM1测定值几乎没有变化。由此,表示构建的CEACAM1测定系统不受CEA的影响而特异性地检测CEACAM1。

[0130] [表7]

表7. 基于CEA吸收的CEACAM1特异性的评价

样本	CEACAM1测定			CEA测定		
	吸收(+) ng/mL	吸收(-) ng/mL	吸收(+)/(-)	吸收(+) ng/mL	吸收(-) ng/mL	吸收(+)/(-)
1	80.4	81.8	0.98	36.4	371.5	0.10
2	145.3	138.9	1.05	18.6	137.7	0.14
3	58.3	63.0	0.93	0.2	0.5	0.43
4	37.4	37.1	1.01	0.3	0.7	0.41

[0131] 实施例9:抗CEACAM1抗体表位露出方法的研究

本发明中获得的抗CEACAM1抗体识别线性表位,因此,为了提高抗原抗体反应,需要抗原的改性处理工序。在上述的实施例中,作为抗原的改性处理方法,使用SDS还原热处理。如图6所示,通过对抗原进行SDS还原热处理而使表位露出,CEACAM1特异性信号上升约1000倍。作为与此不同的改性处理方法,研究了基于碱的改性处理。

[0132] (A)碱处理的研究

利用PBS分别以成为5μg/mL的方式将A3054和A3073进行稀释。将稀释的抗体以每孔50μL添加到Nunc公司的多模块板中,在4-8℃下静置一夜。除去孔内的抗体液,利用PBS清洗后,每孔加入100μL的封闭液(0.1%酪蛋白钠、150mM NaCl、1mM EDTA、PBS),在室温下静置1小时,制备抗体固相板。使利用LUMIPULSE(注册商标)样本稀释液(富士瑞必欧公司)以成为1000或0ng/mL的方式将市售的CEACAM1抗原(R&D Systems公司)进行稀释得到的样本50μL与50μL的改性处理液(0-0.5M NaOH)混合,在37℃下保温7分钟,制备改性处理样本。将改性处理样本50μL与50μL的反应液(1.5M Tris-HCl、100mM NaCl、10mM EDTA3Na、0.1% ProClin300、5%BSA、pH7.5)混合,将其中的50μL添加到除去了上述封闭液的抗体固相板的孔中,在室温下静置1小时。利用包含0.05%Tween20的PBS清洗孔后,在孔中添加利用标记物稀释液(50mM MES、100mM NaCl、0.3mM $ZnCl_2$、1mM $MgCl_2$、2%BSA、0.10%NaN_3、pH6.8)以成为1μg/mL的方式进行稀释的ALP标记A7004抗体,在室温下静置1小时。利用包含0.05%Tween20的PBS清洗孔后,添加LUMIPULSE底物液(富士瑞必欧公司),测定基于酶反应的化学发光量。

[0133] 图7表示基于碱的改性处理的研究结果。在基于NaOH的碱处理中,CEACAM1特异性信号浓度依赖地上升。该结果表明,对于表位的露出,不仅SDS还原热处理有效,而且碱处理也有效。

[0134] (B)碱处理NaOH浓度的最优化

按照上述测定方法,将改性处理液的NaOH浓度最优化为0-1M。将结果示于图8。表明通过NaOH处理,CEACAM1特异性信号浓度依赖地上升,在改性处理时浓度为0.25M以上的情况下,碱处理的效果几乎达到平台。

[0135] 实施例10:基于碱改性处理的CEACAM1的测定

(A)使用全自动化学发光酶免疫测定系统的CEACAM1的测定

将样本25μL和改性处理液(0.8M NaOH、0.5%Brij35(聚氧乙烯23月桂基醚))25μL

混合,在37℃下进行6.5分钟的改性处理。在其中加入50μL的中和液(1.5M Tris、10mM EDTA3Na、2%BSA、0.1%ProClin300、pH7.5)进行中和后,与包含将抗CEACAM1抗体A3054和A3073共结合而成的磁性颗粒的磁性颗粒液(1.5M Tris-HCl、20mM EDTA3Na、0.1% ProClin300、2%BSA、pH7.5)50μL混合,反应8分钟。对磁性颗粒进行集磁·清洗,除去未与磁性颗粒结合的成分,添加利用标记物稀释液(50mM MES、100mM NaCl、0.3mM $ZnCl_2$、1mM $MgCl_2$、2%BSA、0.10%NaN3、pH6.8)以成为0.2μg/mL的方式稀释的ALP标记A7004抗体50μL,反应8分钟。对磁性颗粒进行集磁·清洗,除去未与磁性颗粒结合的成分,添加包含AMPDD的底物液(LUMIPULSE底物液、富士瑞必欧公司制造)200μL。对酶反应产生的发光量进行计数,使用标准曲线,由上述计数算出样本中的CEACAM1值。校准曲线是与样本同样地测定相当于0、8、40、200、1000ng/mL的CEACAM1量的CEACAM1(R&D Systems公司)标准液,基于对各标准液得到的发光量而制成的。本实施例的工序全部使用自动分析仪器LUMIPULSE L2400(富士瑞必欧公司制造)进行。

[0136] (B)疾病样本测定

通过上述的使用了全自动化学发光酶免疫测定系统的CEACAM1测定方法,进行大肠癌样本(从TRINA BIOREACTIVES AG购入)(n=42)、肝癌样本(从TRINA BIOREACTIVES AG购入)(n=50)、胰腺癌样本(从TRINA BIOREACTIVES AG购入)(n=41)、健康人样本(n=36)的测定。图9表示它们的血中浓度分布图,图10表示各癌样本的ROC(Receiver Operating Characteristic:受试者操作特性曲线)分析图。健康人样本的CEACAM1浓度平均为166.3±64.9ng/mL,显示出比较稳定的值。大肠癌样本、肝癌样本和胰腺癌样本的CEACAM1平均浓度分别为276.7±124.7ng/mL、458.716±111.2ng/mL、424.3±237.7ng/mL,与健康人样本相比为显著高值。ROC分析的结果,在大肠癌样本中,曲线下面积为0.838,将临界值设为166.2时的特异度为0.583,灵敏度为0.952。在肝癌样本中,曲线下面积为0.994,将临界值设为262.9时的特异度为0.944,灵敏度为1.0。在胰腺癌样本中,曲线下面积为0.944,将临界值设为262.2时的特异度为0.944,灵敏度为0.756。

[0137] (C)与SDS还原热处理的比较

使用源自人的血液样本168例,比较了机外(off-board)SDS还原热处理(X轴)和机载(on-board)碱处理(Y轴)中的CEACAM1浓度(图11)。Pearson的相关系数为r=0.967,确认到高的正相关性。基于Passing-Bablok法的回归的斜率为1.04。

[0138] SDS还原热处理需要高温(80℃)下的样本改性处理,因此,不能使改性处理工序自动化,操作繁杂。通过导入不需要高温处理的碱处理,使包含改性处理的全部工序自动化,能够提供更简便的CEACAM1测定方法。

[0139] 实施例11:使用自身抗体模型样本的改性处理的效果

为了显示本发明的包含改性处理的CEACAM1测定系统的有用性,使用R&D Systems公司的ELISA试剂盒中使用的抗体,构建不包含改性处理的测定系,比较与自身抗体模型样本的反应性。

[0140] (A)使用RD公司抗体的CEACAM1的测定

将样本10μL与包含结合有抗CEACAM1抗体283324(R&D Systems公司)的磁性颗粒的磁性颗粒液(100mM Tris-HCl、20mM EDTA3Na、0.1%ProClin300、2%BSA、pH7.5)50μL混合,反应8分钟。对磁性颗粒进行集磁·清洗,除去未与磁性颗粒结合的成分,添加利用标记物

稀释液(50mM MES、100mM NaCl、0.3mM $ZnCl_2$、1mM $MgCl_2$、2%BSA、0.10%NaN3、pH6.8)稀释的0.1μg/mL生物素标记抗CEACAM1抗体BAF2244(R&D Systems公司)和0.2μg/mL碱性磷酸酶(ALP)标记链霉亲和素的混合液50μL,反应8分钟。对磁性颗粒进行集磁·清洗,除去未与磁性颗粒结合的成分,添加包含AMPDD的底物液(LUMIPULSE底物液、富士瑞必欧公司制造)200μL。对基于酶反应的发光量进行计数,使用标准曲线,由上述计数算出样本中的CEACAM1值。校准曲线是与样本同样地测定相当于0、8、40、200、1000ng/mL的CEACAM1量的CEACAM1(R&D Systems公司)标准液,基于对各标准液得到的发光量而制成的。本实施例的工序全部使用自动分析仪器LUMIPULSE L2400(富士瑞必欧公司制造)进行。

[0141] (B)CEACAM1多克隆抗体的竞争性评价

利用PBS将市售的重组抗原CEACAM1(R&D Systems公司)以成为1μg/mL的方式进行稀释。将稀释的抗原以每孔50μL添加到Nunc公司的多模块板中,在室温下静置一夜。除去抗原稀释液,利用PBS清洗后,每孔加入100μL的封闭液(0.1%酪蛋白钠、150mM NaCl、1mM EDTA、PBS),在室温下静置1小时。

[0142] 除去封闭液,在各孔中分别加入利用反应液(0.1%酪蛋白钠、150mM NaCl、1mM EDTA、PBS)以成为0.1μg/mL的方式进行稀释的各种抗体溶液或在以成为0.1μg/mL的方式进行稀释的各种抗体中加入10μg/mL的CEACAM1多克隆抗体(R&D Systems公司,AF2244)而成的溶液50μL,在室温下静置1小时。利用包含0.05%Tween20的PBS清洗孔后,加入50μL碱性磷酸酶(ALP)标记的抗小鼠IgG Fc特异性抗体或ALP标记链霉亲和素,在室温下静置1小时。利用包含0.05%Tween20的PBS清洗孔后,在各孔中添加AMPDD溶液50μL,测定化学发光量。

[0143] 表8表示基于添加抗CEACAM1多克隆抗体的各种抗体的结合率。R&D Systems公司抗体的BAF2244和283324的结合率降低,本发明的抗体A3054的结合率略微上升,但A3073和A7004的结合率降低。该结果表明,使用R&D Systems公司抗体的测定系和使用本发明的抗体的测定系均受到抗CEACAM1多克隆抗体的抑制。

[0144] [表8]

表8. 基于添加抗CEACAM1多克隆抗体的结合率

BAF2244	283324	A3054	A3073	A7004
44.8%	41.0%	113.9%	87.9%	55.3%

[0145] (C)使用了自身抗体模型样本的测定系的比较

在CEACAM1高值的癌症样本中以成为30μg/mL的方式添加抗CEACAM1多克隆抗体(R&D Systems公司,AF2244),制备自身抗体模型样本。对未添加抗CEACAM1多克隆抗体(-)、添加抗CEACAM1多克隆抗体(+)的样本进行“无改性处理”或“有改性处理”的CEACAM1测定。“有改性处理”按照上述基于碱改性处理的CEACAM1测定,“无改性处理”按照上述使用R&D Systems公司抗体的CEACAM1的测定方法。将结果示于图12。在无改性处理的R&D Systems公司抗体组合中,与未添加多克隆抗体(-)相比,添加(+)的定量值降低至约3%。另一方面,在本发明的有改性处理测定系中未受到大的影响,在添加(+)样本中也显示出约90%的定量值。

[0146] 存在一些针对CEA的自身抗体的报告,在癌症患者中的出现频率高(参考文献1、2)。CEACAM1属于CEA家族,因此认为自身抗体出现的可能性高。另外,包含CEACAM1的CEA家

族在序列、结构上同源性也高,因此针对CEA的自身抗体也存在对CEACAM1测定系统造成影响的可能性。从这样的观点出发,本发明的包含改性处理的CEACAM1测定系统能够避免自身抗体那样的阻碍物质的影响,因此能够进行高精度的诊断测定。

[0147] (参考文献)

1.K Albanopoulos et al.,Am J Gastroenterol.2000,Apr;95(4):1056-61,PMID:10763959,DOI:10.1111/j.1572-0241.2000.01982.x

2.D Haidopoulos et al.,Eur J Surg Oncol.2000,Dec;26(8):742-6,PMID:11087638,DOI:10.1053/ejso.2000.0996

（1）pAT-TrpE-His-CEACAM1-N

MKAIFVLKGSLDRDPELDHHHHHHIEFGRTQLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDG
NRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYP（
(序列号5)

（2）pAT-TrpE-His-CEACAM1-N-m3C3d

MKAIFVLKGSLDRDPELDHHHHHHIEFGRTQLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDG
NRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPGSS
GRGKFLNTAKDRNRWEEPDQQLYNVEATSYAGSGKFLNTAKDRNRWEEPDQQLYNVEATSYASGRGKFLN
TAKDRNRWEEPDQQLYNVEATSYAGSG（序列号6)

（3）pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1

MKAIFVLKGSLDRDPELDHHHHHHIEFGRTPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSL
PVSPRLQLSNGNRTLTLLSVTRNDTGPYECEIQNPVSANRSDPVTLN（序列号7)

（4）pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1-m3C3d

MKAIFVLKGSLDRDPELDHHHHHHIEFGRTPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSL
PVSPRLQLSNGNRTLTLLSVTRNDTGPYECEIQNPVSANRSDPVTLNGSSGRGKFLNTAKDRNRWEEPDQ
QLYNVEATSYAGSGKFLNTAKDRNRWEEPDQQLYNVEATSYASGRGKFLNTAKDRNRWEEPDQQLYNVEA
TSYAGSG（序列号8)

图1

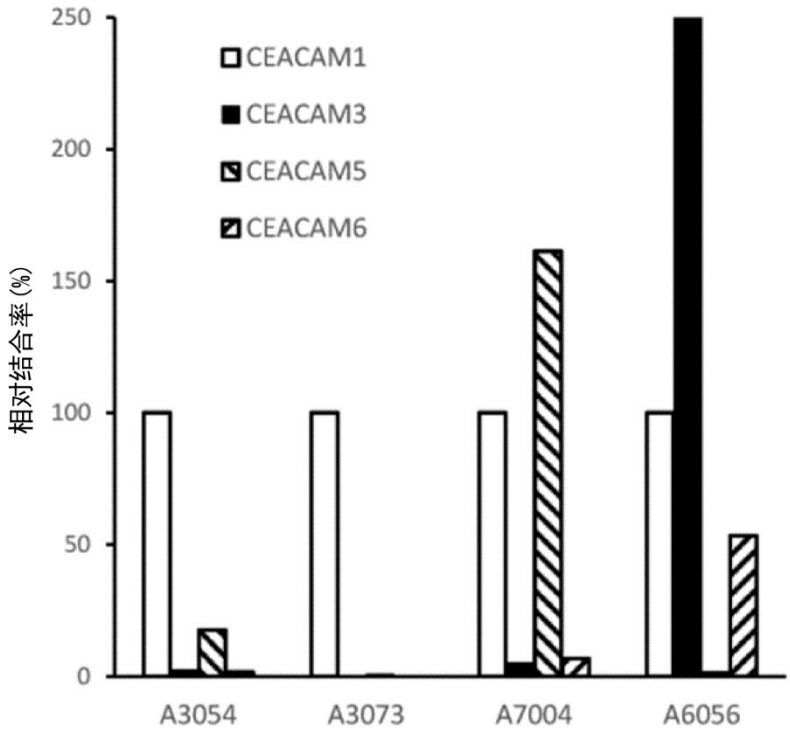

250
200
150
100
50
0
相对结合率(%)
CEACAM1
CEACAM3
CEACAM5
CEACAM6
A3054
A3073
A7004
A6056

图2

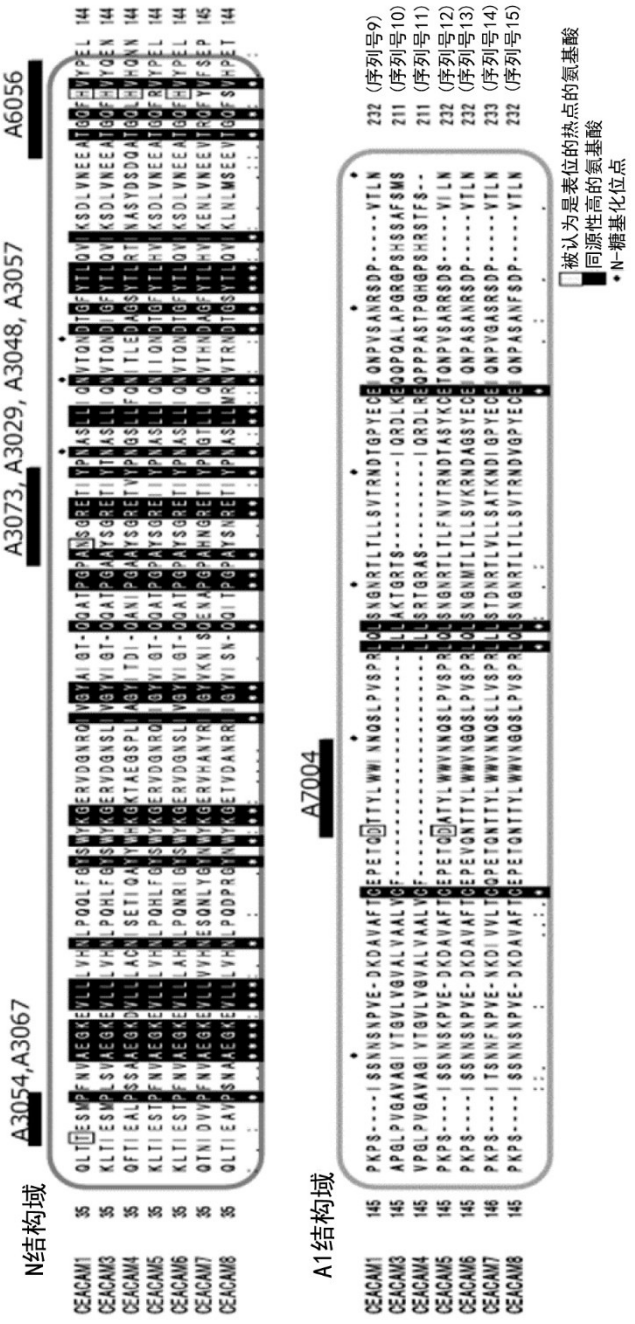

N结构域
A1结构域
A3054,A3067
A3073, A3029, A3048, A3057
A6056
A7004
被认为是表位的热点的氨基酸
同源性高的氨基酸
N-糖基化位点

图3

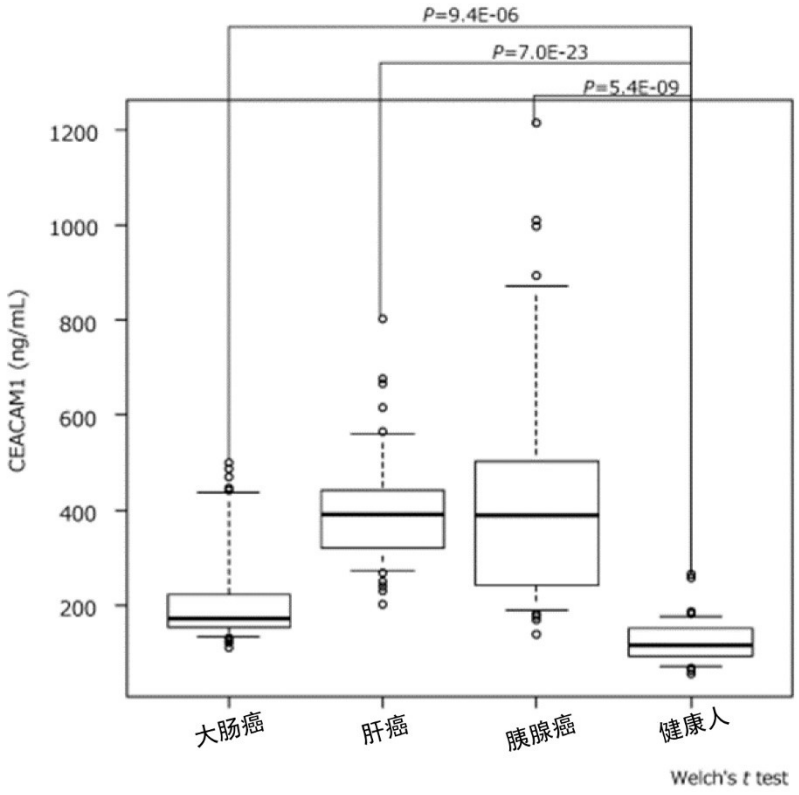

P=9.4E-06
P=7.0E-23
P=5.4E-09
CEACAM1 (ng/mL)
1200
1000
800
600
400
200
大肠癌
肝癌
胰腺癌
健康人
Welch's t test

图4

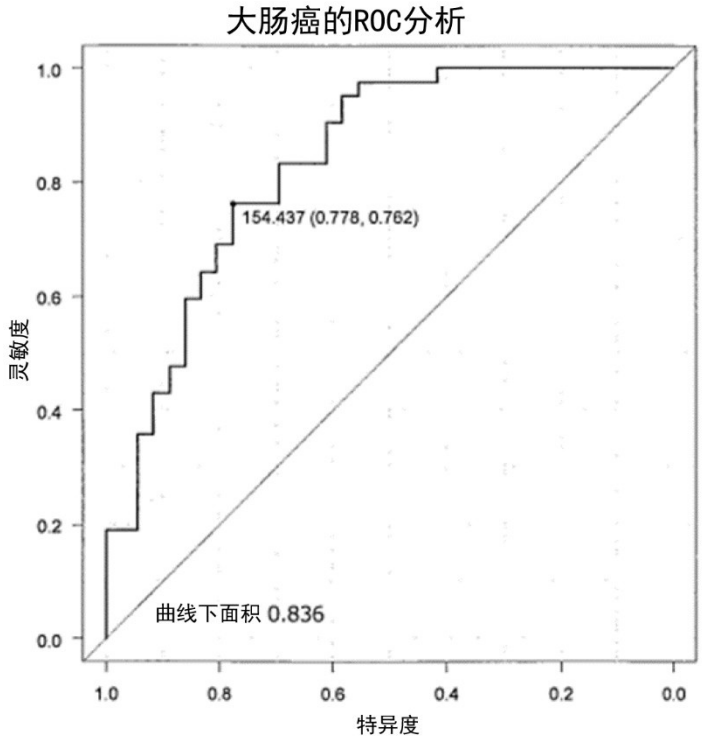

大肠癌的ROC分析
灵敏度
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
154.437 (0.778, 0.762)
曲线下面积 0.836
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
特异度

图5A

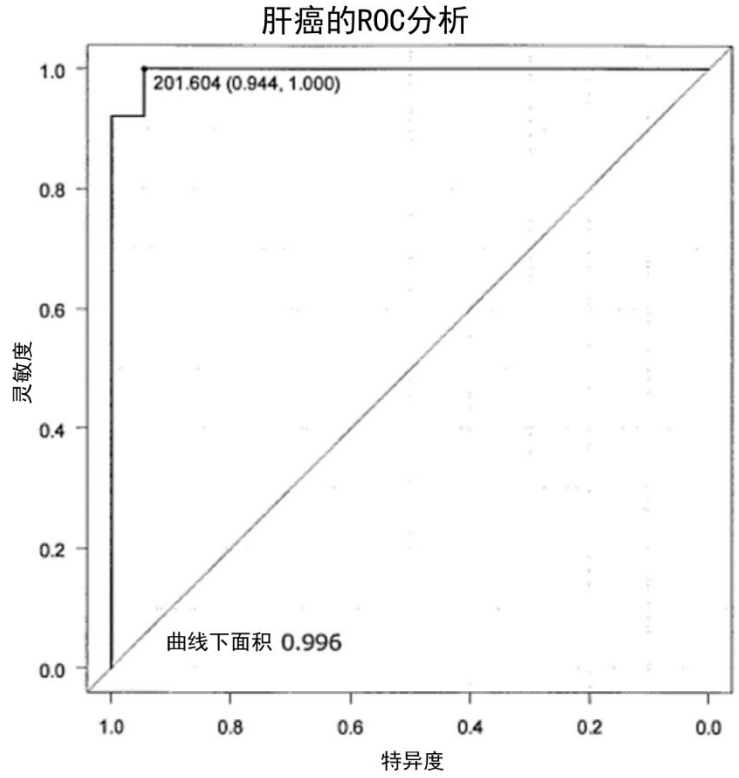

肝癌的ROC分析
201.604 (0.944, 1.000)
曲线下面积 0.996
灵敏度
特异度
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0

图5B

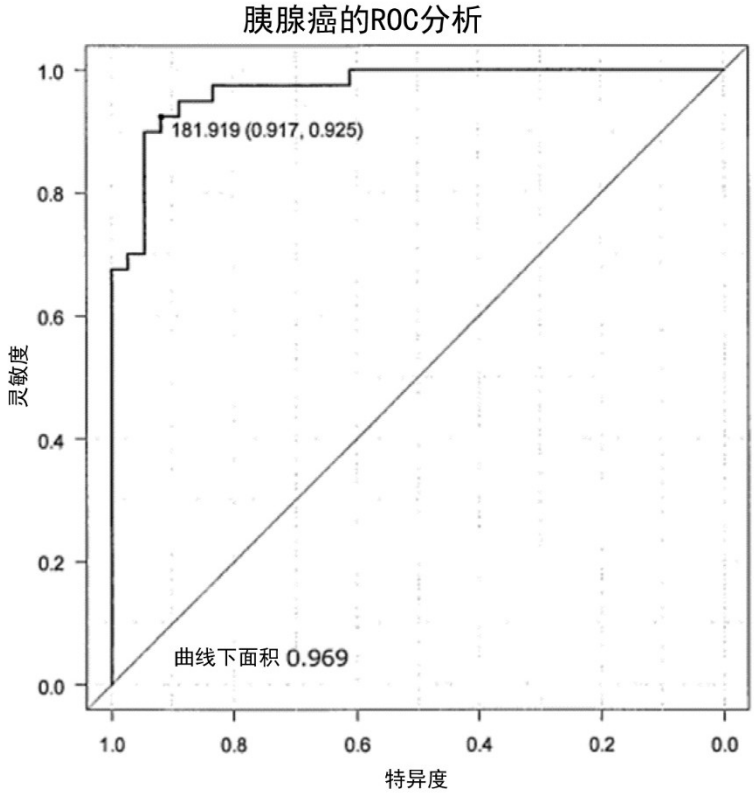

胰腺癌的ROC分析
181.919 (0.917, 0.925)
曲线下面积 0.969
灵敏度
特异度
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0

图5C

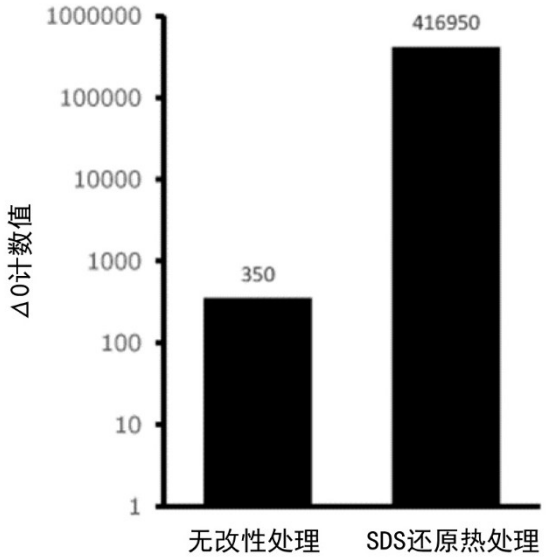

1000000
100000
10000
1000
100
10
1
ΔO计数值
350
416950
无改性处理
SDS还原热处理

图6

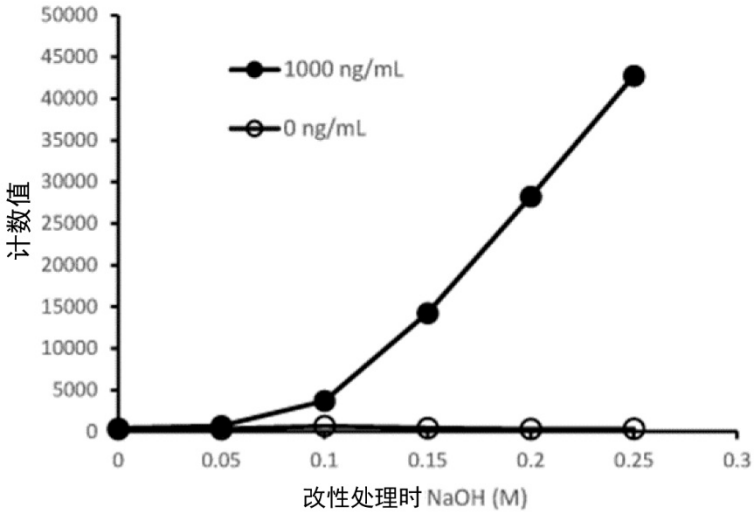

50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
计数值
1000 ng/mL
0 ng/mL
0
0.05
0.1
0.15
0.2
0.25
0.3
改性处理时 NaOH (M)

图7

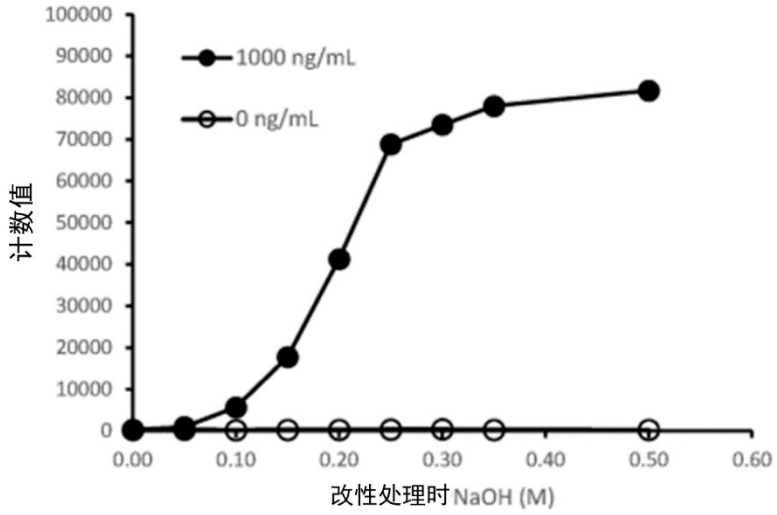

100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
1000 ng/mL
0 ng/mL
计数值
0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
改性处理时NaOH (M)

图8

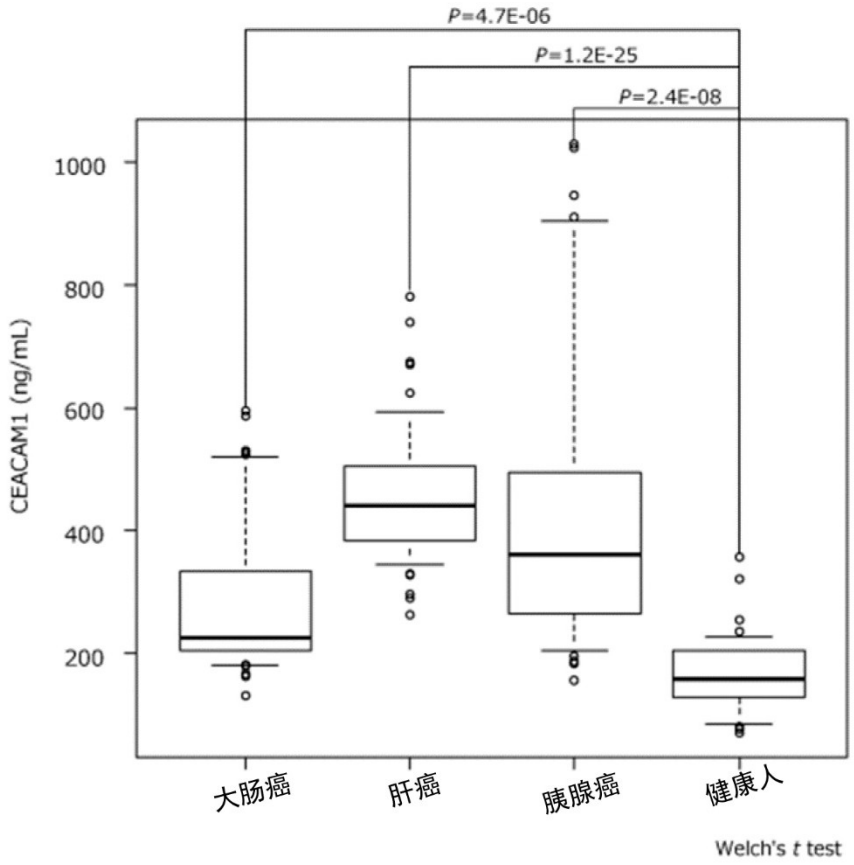

P=4.7E-06
P=1.2E-25
P=2.4E-08
1000
800
600
400
200
CEACAM1 (ng/mL)
大肠癌
肝癌
胰腺癌
健康人
Welch's t test

图9

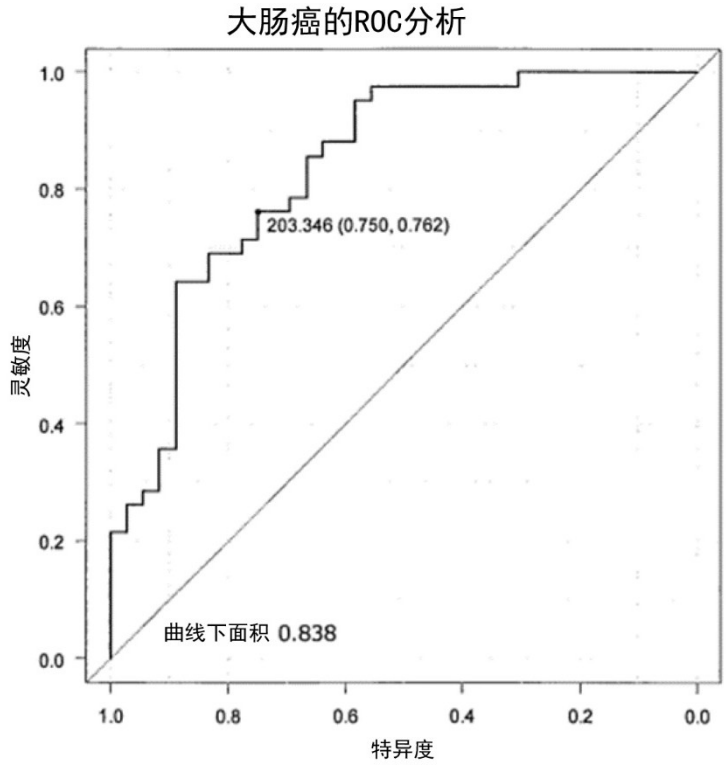

大肠癌的ROC分析
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
灵敏度
203.346 (0.750, 0.762)
曲线下面积 0.838
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
特异度

图10A

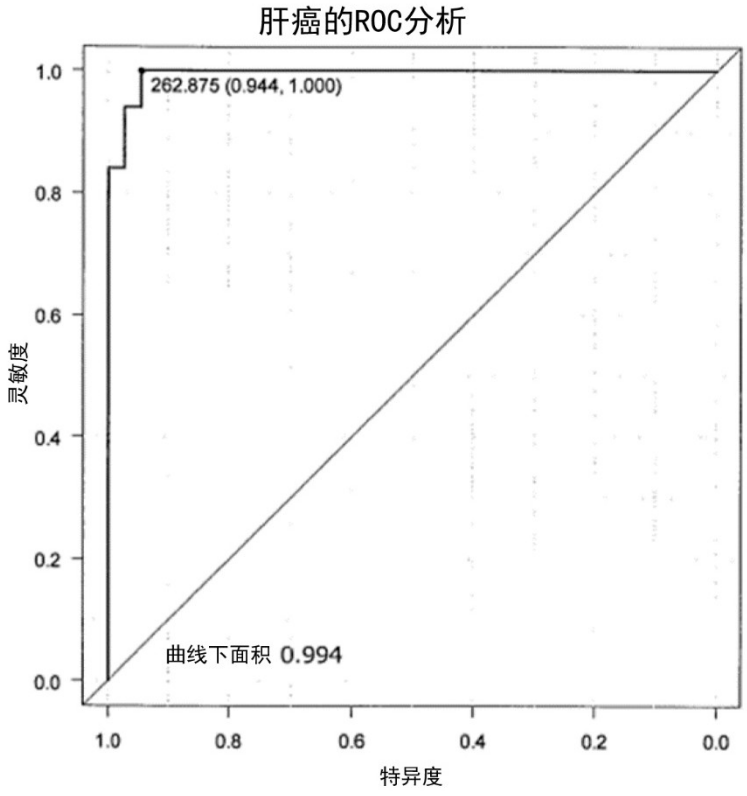

肝癌的ROC分析
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
灵敏度
262.875 (0.944, 1.000)
曲线下面积 0.994
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
特异度

图10B

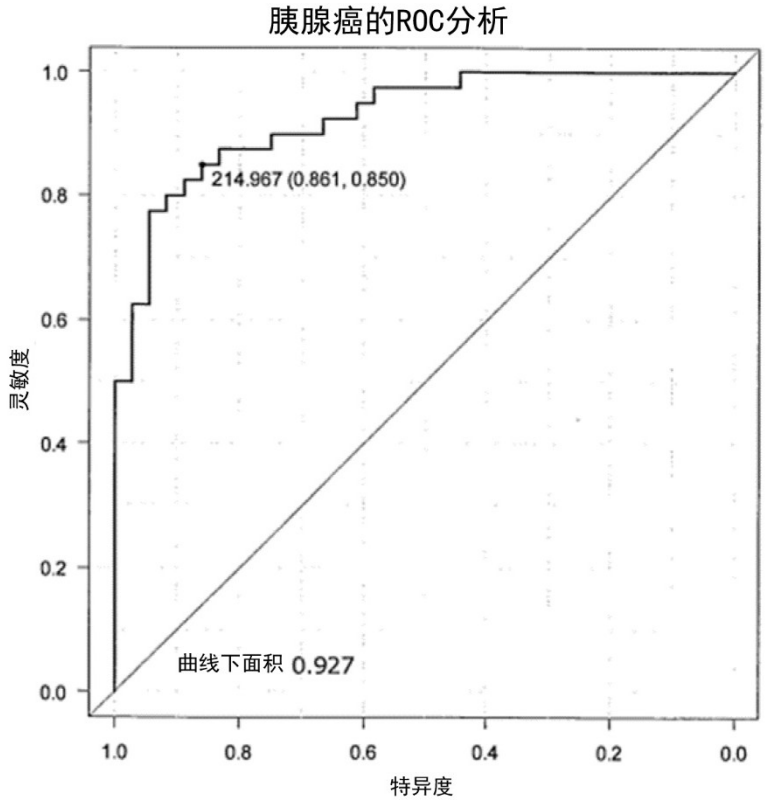

胰腺癌的ROC分析
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
灵敏度
214.967 (0.861, 0.850)
曲线下面积 0.927
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
特异度

图10C

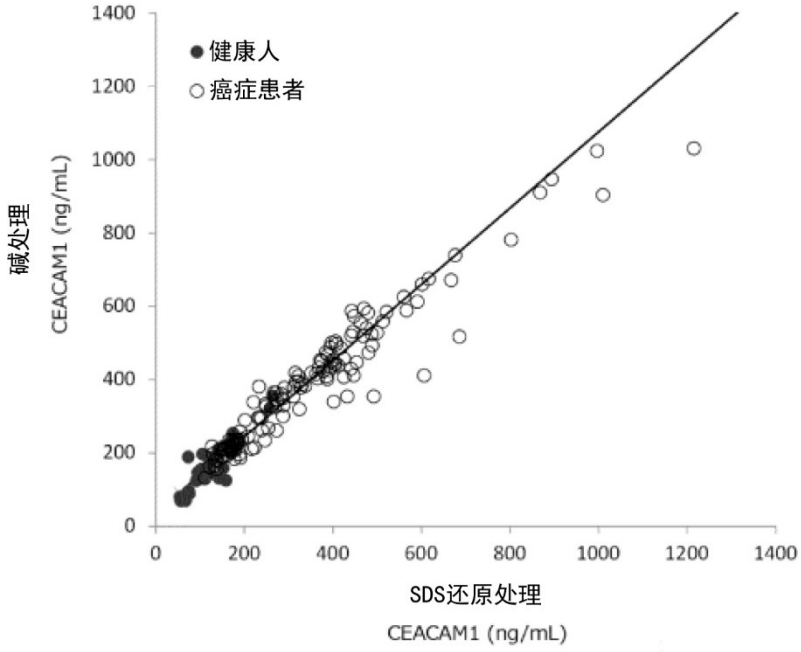

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
健康人
癌症患者
碱处理
CEACAM1 (ng/mL)
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
SDS还原处理
CEACAM1 (ng/mL)

图11

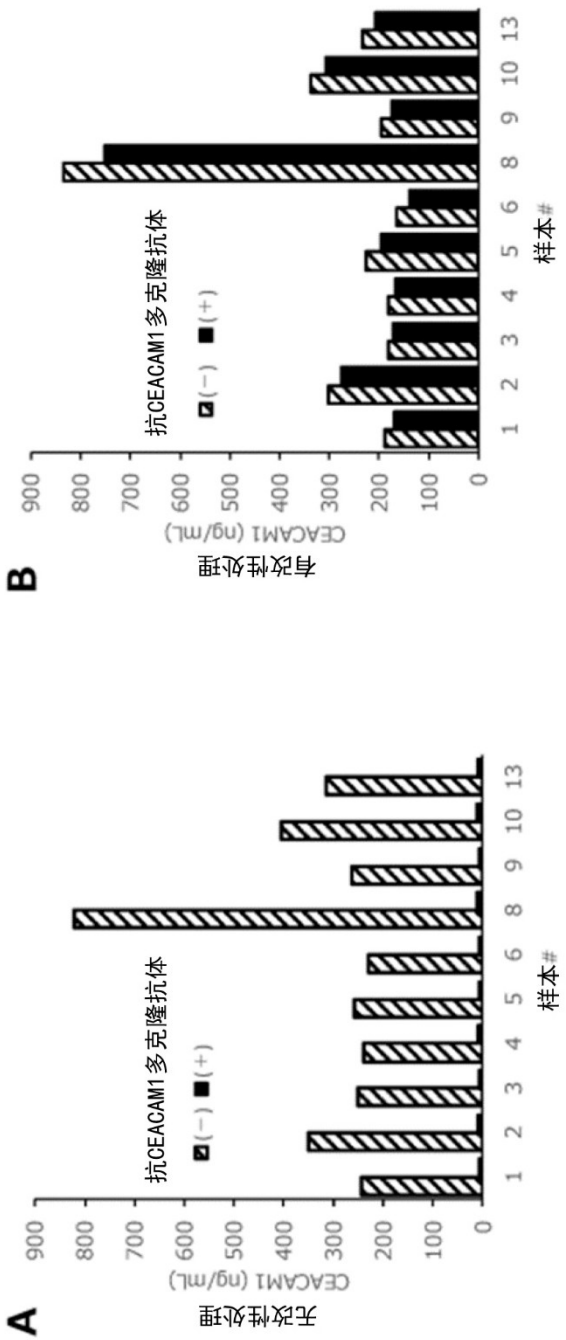

A
无改性处理
CEACAM1 (ng/mL)
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
抗CEACAM1多克隆抗体
(−)
(+)
1 2 3 4 5 6 8 9 10 13
样本#
B
有改性处理
CEACAM1 (ng/mL)
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
抗CEACAM1多克隆抗体
(−)
(+)
1 2 3 4 5 6 8 9 10 13
样本#

图12