

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5798679号

(P5798679)

(45) 発行日 平成27年10月21日(2015.10.21)

(24) 登録日 平成27年8月28日(2015.8.28)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/40 (2006.01)

C O 7 K 16/40 Z N A

C 1 2 N 15/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 C

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

G O 1 N 33/573 (2006.01)

G O 1 N 33/573 A

G O 1 N 33/574 (2006.01)

G O 1 N 33/574 A

請求項の数 8 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-506322 (P2014-506322)
 (86) (22) 出願日 平成24年4月17日(2012.4.17)
 (65) 公表番号 特表2014-512379 (P2014-512379A)
 (43) 公表日 平成26年5月22日(2014.5.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2012/002911
 (87) 国際公開番号 W02012/144784
 (87) 国際公開日 平成24年10月26日(2012.10.26)
 審査請求日 平成25年12月6日(2013.12.6)
 (31) 優先権主張番号 10-2011-0035619
 (32) 優先日 平成23年4月18日(2011.4.18)
 (33) 優先権主張国 韓国(KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2012-0034928
 (32) 優先日 平成24年4月4日(2012.4.4)
 (33) 優先権主張国 韓国(KR)

(73) 特許権者 513262676
 インダストリー・アカデミック・コーポレ
 ーション・ファウンデーション・ヨンセイ
 ・ユニヴァーシティ
 大韓民国・ソウル・120-743・ソデ
 ムング・シンチョン・ドン・ヨンセイ
 ・50・ヨンセイ・ユニヴァーシティ
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

微生物の受託番号 KCLRF KCLRF-BP-00282

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト肝-カルボキシルエステラーゼ1を特異的に認識するモノクローナル抗体、前記抗体を生産するハイブリドーマ細胞株及びその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

寄託番号 K C L R F - B P - 0 0 2 8 2 のハイブリドーマにより生産されるヒト肝-カルボキシルエステラーゼ1タンパク質に特異的に結合することを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項2】

ヒト肝-カルボキシルエステラーゼ1タンパク質の配列番号1に示されるエピトープ配列を認識することを特徴とする請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】

I g G 1 の免疫グロブリン単位型(i s o t y p e)であることを特徴とする請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】

請求項1のモノクローナル抗体を生産する寄託番号 K C L R F - B P - 0 0 2 8 2 であることを特徴とするハイブリドーマ細胞。

【請求項5】

請求項1によるモノクローナル抗体を含むことを特徴とするヒト肝-カルボキシルエステラーゼ1タンパク質の分離及び精製用組成物。

【請求項6】

請求項1によるモノクローナル抗体を含むことを特徴とするヒト肝-カルボキシルエステラーゼ1の検出用組成物。

10

20

【請求項 7】

請求項 1 によるモノクローナル抗体を試料サンプルと接触させて抗原－抗体複合体形成を検出する段階を含むことを特徴とする尿または血中ヒト肝－カルボキシルエステラーゼ 1 の濃度検出方法。

【請求項 8】

請求項 1 によるモノクローナル抗体を含むことを特徴とする肝臓診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組織及び血液のようなヒト臨床検体でヒト肝－カルボキシルエステラーゼ 1 の発現量を客観的に分析するために使用することができるヒト肝－カルボキシルエステラーゼ 1 を特異的に認識するモノクローナル抗体、前記抗体を生産するハイブリドーマ細胞株及びその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトカルボキシルエステラーゼ(hCE: human carboxylesterase)は、hCE 1、hCE 2、hCE 3 などのお互いに異なる性質と構造を有するイソフォーム(isoform)に分類することができる(Imai T、Drug Metab Pharmacokinet., vol. 21, pp. 173-185, 2006)。ヒト肝－カルボキシルエステラーゼ 1(hCE 1)は、主に肝で生合成される酵素として、組織内に吸収される化学物質に対して親水性分子のアシル基(acyl group)を認識して分解させる。一方、ヒトカルボキシルエステラーゼ 2(hCE 2)は、主に腸から発現される酵素として、hCE 1 との同質性(homology)が 47% で別個のタンパク質であり、腸内に吸収される疎水性分子のアシル基と反応する。ヒトカルボキシルエステラーゼ 3(hCE 3)は、主に脳から発現される酵素として、hCE 1 と 50% の同質性があり、これも別個のタンパク質であると言える。

【0003】

肝－カルボキシルエステラーゼ 1 は、肝、腸、腎臓、肺、心臓、大食細胞などから発現される酵素であるが、肝から 10 倍～100 倍以上高く発現され、主要役目は大きく 3 種に分類される。1. 薬物学的異物代謝(xenobiotic metabolism)として人体内に流入される非活性薬物のエステル(ester)、アミド(amide)構造を変形させて活性薬物に転換する作用をする。その例として、ロバスタチン(lovastatin)を活性型で転換してコレステロール低下効果を示すようにし、体内で毒性作用をするコカイン(cocaine)及びヘロイン(heroin)を非毒性型であるコカエチレン(cocaeethylene)とモルヒネ(morphine)に各々転換させる役目をする。2. 体内のコレステロールと脂肪酸のエステル構造を必要によって分解及び結合してコレステロール代謝を調節する。3. 細胞内小胞体(endoplasmic reticulum)で大食細胞免疫の認識タンパク質である C-reactive protein(CRP)と直接的に結合して機能を調節する役目をする(Redinbo MR., Biochem. Soc. Trans., 31, pp. 620-624, 2003; Redinbo MR., Drug Discov. Today., 10, pp. 313-325, 2005)。肝－カルボキシルエステラーゼ 1 の他の特性は、化学物質により肝臓が誘導されたラットの肝マイクロゾームで酵素の活性が急激に低下される(Maki T., Jpn. J. Cancer Res., 82, pp. 800-806, 1991)ことであり、この機序は今まで明かされなかった。

【0004】

今まで生体内の肝－カルボキシルエステラーゼ 1 の活性度分析は、エステラーゼ酵素の非特異的気質であるパラ－ニトロフェニルリン酸(p-nitrophenyl phosphate)やパラ－ニトロフェニル酢酸(p-nitrophenyl acetate)を用いて酵素力価反応値で分析した。このような方法は、特に血液内でエステラーゼ機能

10

20

30

40

50

を有するアルブミン、アセチルコリンエステラーゼ、ブチルコリンエステラーゼなども同一な活性があるため、肝－カルボキシルエステラーゼ1のみの特異的な活性を測定することが不可能である(Li B., Niochem. Pharmacol., 70, pp.1673-1684, 2005)。したがって、短時間で多量の検体から肝－カルボキシルエステラーゼ1タンパク質を選択的で且つ効果的に分析することができる方法が必要である。このような方法では酵素免疫分析方法がある。酵素免疫分析は、目的するタンパク質(抗原)と結合する抗体を反応させて抗原－抗体結合を誘導し、結合程度を抗体に結合された酵素と気質複合反応を利用することで発色または蛍光発色などから臨床検体内の目的タンパク質を定量する方法である。

【0005】

10

最近、本発明者らは、ヒト血漿で肝－カルボキシルエステラーゼ1の存在を証明し、肝癌組織で正常肝組織より発現量が低くなったこととは反対に、肝癌患者の血漿では健常者の血漿に比べて平均2.8倍以上増加することを証明した(Na K. et al., Proteomics. 9, pp.3989-3999, 2009)。しかし、前記実験で使用された肝－カルボキシルエステラーゼ1の抗体は、商業的に製品化されたポリクローナル抗体(Abcam, ab1875)として、非特異的な他のタンパク質が結合されることができ、免疫沈降反応の効率性も落ちる短所がある。

【先行技術文献】**【非特許文献】****【0006】**

20

【非特許文献1】 Imai T, Drug Metab Pharmacokinet., vol.21, pp.173-185, 2006

【非特許文献2】 Redinbo MR., Biochem. Soc. Trans., 31, pp.620-624, 2003

【非特許文献3】 Redinbo MR., Drug Discov. Today., 10, pp.313-325, 2005

【非特許文献4】 Maki T., Jpn. J. Cancer Res., 82, pp.800-806, 1991

【非特許文献5】 Li B., Niochem. Pharmacol., 70, pp.1673-1684, 2005

30

【非特許文献6】 Na K. et al., Proteomics. 9, pp.3989-3999, 2009

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0007】**

したがって、前記のような従来の諸問題点を解消するために提案されたものであって、本発明の目的は、組織、血液などで肝－カルボキシルエステラーゼ1を効果的に分析することができる肝－カルボキシルエステラーゼ1のモノクローナル抗体と前記抗体を生産するハイブリドーマ細胞株を提供することにある。

【0008】

40

本発明の他の目的は、前記モノクローナル抗体を利用して肝－カルボキシルエステラーゼ1を分離精製するか、血中から検出するか、特異的に肝癌を診断する前記抗体の用途を提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0009】**

前記目的を達成するために本発明は、寄託番号KCLRF-BP-00282であるハイブリドーマにより生産される、ヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。

【0010】

また、本発明によるモノクローナル抗体を生産する寄託番号KCLRF-BP-002

50

82であるハイブリドーマ細胞を提供する。

【0011】

また、本発明によるモノクローナル抗体を含むヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1タンパク質の分離及び精製用組成物を提供する。

【0012】

また、本発明によるモノクローナル抗体を含むヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1の検出用組成物を提供する。

【0013】

また、本発明によるモノクローナル抗体を試料サンプルと接触させて抗原－抗体複合体形成を検出する段階を含む尿または血中ヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1の濃度検出方法を提供する。

10

【0014】

また、本発明によるモノクローナル抗体を含む肝癌診断キットを提供する。

【発明の効果】

【0015】

本発明のヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1のモノクローナル抗体は、ヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1タンパク質との高い特異結合を通じて、組織、細胞、血液などで肝－カルボキシルエステラーゼ1の探知に使われることができる。特に、血液で簡単に肝癌を早期診断するために有用に使用することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】抗原ペプチド基をマウスに3次まで免疫化した後、マウスの尻尾から血清を分離して肝－カルボキシルエステラーゼ1を分析した結果を示した図である。

【図2】肝－カルボキシルエステラーゼ1の抗原ペプチドに対する免疫化されたマウスの脾臓細胞とミエローマの融合細胞に対する反応性を示した写真図である。

【図3】肝－カルボキシルエステラーゼ1の抗原ペプチドにより反応性が高い免疫化されたマウスの脾臓細胞を利用して肝－カルボキシルエステラーゼ1のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞株を選別した結果を示した図である。

【図4】本発明のモノクローナル抗体と公知の肝－カルボキシルエステラーゼ1のポリクローナル抗体の抗原－抗体結合程度を比較した結果である。

30

【図5】本発明のモノクローナル抗体と公知の肝－カルボキシルエステラーゼ1のポリクローナル抗体を利用して健常者、肝炎患者、肝硬変患者、肝癌患者の血漿(plasma)で抗原－抗体結合程度を比較した結果である。

【図6】(a)は、本発明のモノクローナル抗体と公知の肝－カルボキシルエステラーゼ1のポリクローナル抗体を利用して抗原－抗体結合による試料の発色結果であり、(b)は、肝－カルボキシルエステラーゼ1の濃度別抗原－抗体結合による吸光度数値を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、本発明の構成を詳しく説明する。

40

【0018】

本発明者らは、既存の商業的に販売されているヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1の抗体より効率性が高いモノクローナル抗体とその抗体を生産するハイブリドーマ細胞株を開発し、血漿内の肝－カルボキシルエステラーゼ1を分離してその酵素の量を客観的に比較分析する手段を提供することで、本発明を完成した。

【0019】

したがって、本発明は、寄託番号KCLRF-BP-00282のハイブリドーマにより生産される、ヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体、前記モノクローナルを生産するハイブリドーマ細胞及びその製造方法を提供する。

50

【0020】

本明細書で「ヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1」は、タンパク質その自体、その遺伝子再組合タンパク質及びこれらの人工変異体及び突然変異体だけではなくタンパク質の天然形態及びその機能的等価物を含む。

【0021】

本発明のヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1に対して特異的なモノクローナル抗体は、本発明が属する技術分野においてよく知られている融合方法(fusion method)により製造することができる(Kohler及びMilstein(1976) European Journal of Immunology 6:511-519参照)。モノクローナル抗体を分泌する「ハイブリドーマ」を作るために融合される二つの細胞集団の中で一つの集団は、ヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1を注射したマウスのような免疫学的に適した宿主動物の細胞を利用し、残り一つの集団では、癌または骨髄種細胞株を利用する。このような二つの集団の細胞をポリエチレングリコールのような本発明が属する技術分野において公知されている方法により融合させてから抗体－生産細胞を標準的な組織培養方法により増殖させる。限界希釈法(limited dilution technique)によるサブクロニングにより均一な細胞集団を収得した後、ヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1に対して特異的な抗体を生産することができるハイブリドーマ細胞株を酵素免疫測定法(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay)またはウェスタンブロット分析法で選別し、標準技術に従って試験管内または生体内で大量に培養する。前記生体内での大量培養はハイブリドーマ細胞株をマウスの腹腔に注射して高濃度の抗体生産を誘導した後、腹水(ascites)から分離することを意味する。

【0022】

前記ハイブリドーマ細胞株が生産するモノクローナル抗体は、精製しないで使用するか、本発明が属する技術分野においてよく知られている方法によって高純度(例えば、95%以上)に精製して使用することができる。このような精製技術では、例えば、ゲル電気泳動、透析、塩沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、親和性抗原コラムクロマトグラフィーなどの方法を利用して培養培地または腹水(ascites)から分離することができる。

【0023】

本発明によるモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマをハイブリドーマYPRC 10E8で名付けて、これを2012年3月28日付けでソウル市鍾路区蓮建洞所在のソウル大学校医科大学癌研究所内の国際寄託機関である韓国細胞株研究財団(Korean Cell Line Research Foundation)に寄託番号KCLRF-BP-00282で寄託した。本明細書で、「ハイブリドーマYPRC 10E8」が生産するモノクローナル抗体を「YPRC 10E8」で名付けた。

【0024】

抗原を検出するためにモノクローナル抗体を使用する場合は、モノエピトープを認知することで特定の相互作用を有する利点がある。このように抗原と抗体間の相互作用に關与するエピトープをマッピング(mapping)するために多様な接近方法を利用することができる。例えば、ファージディスプレイペプチドライブラリを使用してバイオパニングする方法、抗原ポリペプチドをプロテアーゼで分解して生成された断片を免疫ブロッティングしてスクリーニングすることでエピトープ配列を含む断片を決定する方法、活性化された膜またはポリエチレニンのような固体上に固定されたペプチドアレイをスクリーニングする方法、エピトープ配列内の各々のアミノ酸配列残基の重要な可溶性ペプチドを使用した競争的ELISA検定方法などがある。

【0025】

本発明のモノクローナル抗体が認知するヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1上のエピトープは、Ab Frontier社のソフトウェアを使用してヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1の3次構造で分析し、分析されたペプチドリットから免疫化させるマウスの該

当タンパク質のアミノ酸配列と異なることを確認した後、分析されたヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1に特異的なペプチドを基準で再選別して選定した。

【0026】

このようなエピトープを土台としてヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1のアミノ酸配列のうちC－末端の554～567に該当する配列目録の配列番号1の線形エピトープを指定することができた。

【0027】

前記モノクローナル抗体の抗原結合親和性は、通常の方法によって決定でき、特別に限定しないが、より具体的には、放射能免疫分析法(RIA)、酵素免疫測定法(ELISA)、免疫沈降法、免疫蛍光法、色彩粒子結合法、化学発光物質結合法または免疫ブロッティングを通じて抗原との結合親和性を測定する。本発明のモノクローナル抗体は、ポリクローナル抗体対比20倍以上の結合親和度を示す。

【0028】

本発明によるモノクローナル抗体は、IgG1の免疫グロブリン単位型(isotype)である。

【0029】

したがって、本発明は、ヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1のアミノ酸配列のうちC－末端の554～567に該当する配列目録の配列番号1の線形エピトープを認識し、ヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。

【0030】

本明細書で使われた用語「モノクローナル抗体」とは、当該分野において公知された用語として、単一抗原性部位に対して指示される高度の特異的な抗体を意味する。通常的に、相異なっているエピトープ(抗原決定基)に対して指示される相異なっている抗体を含むポリクローナル抗体とは異なり、モノクローナル抗体は、抗原上の単一決定基に対して指示される。モノクローナル抗体は、抗原－抗体結合を利用する診断及び分析学的分析法の選択性と特異性を改善させる長所があり、また、ハイブリドーマ培養により合成されるので、他の免疫グロブリンにより汚染されない長所を有する。本明細書では、ヒト肝－カルボキシルエステラーゼ1に対する抗体として、全体抗体だけではなく抗体分子の機能的な断片を含む。全体抗体は、2個の全体長さの軽鎖及び2個の全体長さの重鎖を有する構造であり、各々の軽鎖は重鎖とジスルフィド結合で連結されている。重鎖不変領域は、ガンマ(γ)、ミュー(μ)、アルファ(α)、デルタ(δ)、エプシロン(ϵ)タイプを有し、サブクラスでガンマ1($\gamma 1$)、ガンマ2($\gamma 2$)、ガンマ3($\gamma 3$)、ガンマ4($\gamma 4$)、アルファ1($\alpha 1$)及びアルファ2($\alpha 2$)を有する。軽鎖の不変領域は、カッパー(κ)及びラムダ(λ)タイプを有する(Cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M. J., Ed., Chapter 45, pp. 41-50, W. B. Saunders Co. Philadelphia, PA(1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2nd Ed., Chapter 4, pp. 45-65, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984))。

【0031】

抗体分子の機能的な断片とは、抗原結合機能を保有している断片を意味し、Fab、F(ab')、F(ab')₂及びFvなどを含む。抗体断片の中でFabは、軽鎖及び重鎖の可変領域と軽鎖の不変領域及び重鎖の一番目の不変領域(CH1)を有する構造で、1個の抗原結合部位を有する。Fab'は、重鎖CH1ドメインのC末端に一つ以上のシステイン残基を含むヒンジ領域(hinge region)を有する点でFabと差がある。F(ab')₂抗体は、Fab'のヒンジ領域のシステイン残基がジスルフィド結合を成している。Fvは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のみを有している最小の抗体切れでFv断片を生成する再組合せ技術は、国際公開特許WO88/10649、WO88/106630、WO88/07085、WO88/07086及びWO88/09344に開示されている。dsFv(二鎖Fv)は、非共有結合で重鎖可変領域と軽鎖可変領域が連結されており、

s c F v (単鎖 F v) は、一般的にペプチドリンカーを通じて重鎖の可変領域と単鎖の可変領域が共有結合で連結されるかまたは C 末端ですぐ連結されているので、d s F v のようにダイマー構造を成すことができる。

【0032】

このような抗体断片は、タンパク質加水分解酵素を利用して得ることができ(例えば、全体抗体をパパインで制限切断すれば、F a b を得ることができ、ペプシンで切断すれば、F (a b')₂ 断片を得ることができる)、好ましくは、遺伝子再組合せ技術を通じて製作することができる。本発明で抗体は、好ましくは、F a b 形態であるか全体抗体である。また、重鎖不変領域は、ガンマ(γ)、ミュー(μ)、アルファ(α)、デルタ(δ)またはエプシロン(ϵ)のいずれか一つのタイプから選択されることができる。軽鎖不変領域は、カッ

10

【0033】

また、本発明の抗体は、キメラ抗体またはキメラ抗体の免疫原性を一層減少させるためのヒト化抗体(humanized antibody)または CDR-移植抗体(CDR-grafted antibody)である。

【0034】

キメラ(chimeric)抗体とは、抗体可変領域(variable domain)は、ヒト以外の動物(例えば、マウス、兎、家禽類など)から由来し、抗体不変領域(constant domain)は、ヒトから由来した抗体を意味する。このようなキメラ抗体は、当業界に公知された遺伝子再組合せなどの方法で製造することができる。

20

【0035】

ヒト化抗体(humanized antibody)または CDR-移植抗体(CDR-grafted antibody)は、動物由来のモノクローナル抗体の高い親和度と特異性は維持しながら人体内での免疫誘発能を減少させるために、動物由来のモノクローナル抗体の抗原結合領域(CDR: Complementarity determining region)をヒト抗体に移植させて製造される抗体を意味し、抗原に対する親和度と人体内での免疫誘発程度を考慮してヒト化させる程度を選択することができる。

【0036】

また、他の様態として、本発明は、本発明によるモノクローナル抗体を含むヒト肝一カルボキシエステラーゼ 1 タンパク質の分離及び精製用組成物に関する。

30

【0037】

前記抗体を含む分離及び精製用組成物は、通常のイオン交換クロマトグラフィー及び親和性クロマトグラフィーなどの精製方法などに使われて、試料からヒト肝一カルボキシエステラーゼ 1 タンパク質を容易に分離及び精製することができるようにする。

【0038】

また、他の様態として、本発明は、本発明によるモノクローナル抗体を含むヒト肝一カルボキシエステラーゼ 1 の検出用組成物を提供する。

【0039】

また、本発明による一クローン抗体を試料サンプルと接触させて抗原-抗体複合体の形成を検出する段階を含む尿または血中ヒト肝一カルボキシエステラーゼ 1 の濃度検出方法を提供する。

40

【0040】

本発明は、前記モノクローナル抗体をヒトの尿、血清または血漿と接触させて抗原-抗体複合体形成を検出することでヒト肝一カルボキシエステラーゼ 1 を検出することができる。

【0041】

本明細書で使われた用語「抗原-抗体複合体」は、ヒトの尿、血清または血漿などの生物学的試料中のヒト肝一カルボキシエステラーゼ 1 の存在または不在を確認するための前記酵素とそれを認知するモノクローナル抗体の結合物を意味する。

【0042】

50

前記抗原-抗体複合体は、検出標識(detection label)を利用して検出することができる。例えば、酵素、蛍光物質、リガンド(ligand)、発光物質、微細粒子(microparticle)、レドックス分子または放射線同位元素などから選択することができ、これに特別に限定されるものではない。

【0043】

前記酵素には、例えば、 β -グルクロニダーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコースオキシダーゼ、ヘキソキナーゼとGDPase、RNase、グルコースオキシダーゼとルシフェラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ホスフェノールピルビン酸デカルボキシラーゼ、 β -ラクタマーゼなどがあり、これに限定されるものではない。蛍光物質には、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、フルオレスカミンなどがあり、これに限定されるものではない。リガンドには、ビオチン誘導体などがあり、これに限定されるものではない。発光物質には、アクリジニウムエステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼなどがあり、これに限定されるものではない。微細粒子には、コロイド金、着色されたラテックスなどがあり、これに限定されるものではない。レドックス分子には、フェロセン、ルテニウム錯体、ビオロゲン、キノン、Tiイオン、Csイオン、ジイミド、1,4-ベンゾキノン、ヒドロキノン、 $K_4W(CN)_8$ 、 $[Os(bpy)_3]^{2+}$ 、 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ または $[MO(CN)_8]^{4-}$ などがあり、これに限定されるものではない。放射線同位元素には、 3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I または ^{186}Re などがあり、これに限定されるものではない。

【0044】

前記抗原-抗体複合体の形成は、比色法(colorimetric method)、電気化学法(electrochemical method)、蛍光法(fluorimetric method)、発光法(luminometry)、粒子計数法(particle counting method)、視覚測定法(visual assessment)、またはシンチレーション計数法(scintillation counting method)などを使用して検出することができる。例えば、フローサイトメトリー(flow cytometry)、免疫細胞化学法、放射能免疫分析法(RIA)、酵素免疫測定法(ELISA)、ウェスタンブロッティング(Western Blotting)、免疫沈降分析法(Immunoprecipitation Assay)、免疫拡散分析法(Immunodiffusion assay)、補体固定分析法(Complement Fixation Assay)、タンパク質チップ(protein chip)などにより検出することができる。より具体的に、少量の目的タンパク質を回収するために有用な免疫沈降法(immune precipitation)及び免疫ブロッティングを通じて検出することができる。

【0045】

より具体的には、抗原-抗体複合体を酵素免疫測定法(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay)を利用して検出することができる。前記ELISAは、固体支持体に付着された抗原を認知する標識された抗体を利用する直接的ELISA、固体支持体に付着された抗原を認知する抗体の複合体で捕獲抗体を認知する標識された抗体を利用する間接的ELISA、固体支持体に付着された抗体と抗原の複合体で抗原を認知する標識されたまた他の抗体を利用する直接的サンドイッチELISA、固体支持体に付着された抗体と抗原の複合体で抗原を認知するまた他の抗体と反応させた後、この抗体を認知する標識された2次抗体を利用する間接的サンドイッチELISAなど多様なELISA方法を含む。

【0046】

前記ELISA検出方法によって、尿、血液、血清または血漿などの生物学的試料は、

固体支持体、例えば、マイクロタイタープレート、メンブレン、テストストリップなどにコーティングされた本発明のモノクローナル抗体と接触される。具体的一例として、マイクロタイタープレートのウェルを本発明のモノクローナル抗体でコーティングし、占有されなかった(nonoccupied)結合部位を、例えば、BSAで遮断した後、コーティングされたプレートのウェルを試料サンプルとインキュベーションし、引き継いで抗原-抗体複合体の存在を決定することができる。抗原-抗体複合体の存在は、抗原-抗体複合体の抗原に対して特異的な抗体、例えば、ヒト肝-カルボキシルエステラーゼ1に特異的に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を使用して確認することができる。前記モノクローナルまたはポリクローナル抗体は検出標識を有することができ、検出標識を有しない場合、これらモノクローナルまたはポリクローナル抗体を検出することができるまた他の抗体で処理して確認することができる。

10

【0047】

具体的には、支持体に付着された捕獲モノクローナル抗体を生物学的試料と反応させて、引き継いでヒト肝-カルボキシルエステラーゼ1に特異的に結合するモノクローナル抗体を結合させてそれから検出標識信号を測定するか、これら複合体に検出可能な信号を生成することができる標識を有する2次抗体を添加してそれから検出標識信号を測定して、ヒト肝-カルボキシルエステラーゼ1を検出することができる。

【0048】

また、本発明は、本発明によるモノクローナル抗体を含む肝臓診断キットに関する。

【0049】

20

本発明の肝臓診断キットに使われるモノクローナル抗体は、この抗体がヒト肝-カルボキシルエステラーゼ1を選別的に認知することができる限り、モノクローナル抗体の断片も使用することができる。このような抗体断片は、F(ab')₂、Fab、Fab'、Fv断片などを含むことができる。

【0050】

前記肝臓診断キットは、本発明のモノクローナル抗体が付着されたタンパク質チップ形態で製造することができる。

【0051】

本発明の肝臓診断キットには、ヒト肝-カルボキシルエステラーゼ1を選別的に認知するモノクローナル抗体またはその断片及び免疫学的分析に使われる道具/試薬が含まれる。

30

【0052】

前記免疫学的分析に使われる道具/試薬には、適した担体、検出可能な信号を生成することができる標識物質、溶解剤、洗浄剤などが含まれる。また、標識物質が酵素の場合には、酵素活性を測定することができる気質及び反応停止剤を含むことができる。

【0053】

適した担体では、これに限定されないが、可溶性担体、例えば、当分野に公知された生理学的に許容される緩衝液、例えば、PBS、不溶性担体、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、仮橋デキストラン、ポリサカライド、ラテックスに金属をメッキした磁性微粒子のような高分子、その他紙、ガラス、金属、アガロース及びこれらの組合せであることができる。

40

【0054】

本発明の検出方法及び診断キットに使用するための検定システムは、これに限定されるものではないが、ELISAプレート、ディップステッキデバイス、免疫クロマトグラフィー試験ストリップ及び放射分割免疫検定デバイス及び流水式(flow-through)デバイスなどを含む。

【実施例】

【0055】

発明の実施のための形態

以下、本発明を実施例を通じて詳しく説明する。しかし、下記実施例は本発明を例示す

50

ることで、本発明の範囲が下記実施例に限定されるものではない。

【0056】

＜実施例1＞肝組織と血漿試料の需給

肝組織50mgは、細胞溶解RIPA緩衝溶液[50mMトリス(Tris)、150mM塩化ナトリウム(NaCl)、1%Nonidet P-40、0.25%デオキシコール酸ナトリウム(sodium deoxycholate)、pH7.4]に入れて、4℃冷蔵条件で粉碎し、14000rpmで20分間遠心分離してタンパク質溶液を回収した。

【0057】

病理学的に患者の個別情報が確保された健常者、肝炎患者、肝硬変患者、肝癌患者から分取された血漿は、延世セブランス病院の遺伝子銀行から提供を受けた。健常者の血漿は、肝癌指標標準検査要素である免疫欠乏ウイルス(HIV)由来のHIV-1及びHIV-2抗体、HIV-1抗原、B型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen)、B型肝炎核抗原(hepatitis B core antigen)、C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus)、T細胞白血病ウイルス(HTLV-1/II)抗原、梅毒菌検査で陰性で判別された試料を使用した。試料は、-70℃で実験前まで保管して使用した。血漿の入手は 延世医大癌研究所(yonsei medical center)の臨床試験委員会(IRB)の規定によった。

【0058】

＜実施例2＞最適抗原決定基の選定

肝-カルボキシルエステラーゼ1の3次構造で最適の抗原決定基を有するペプチドの選定は、韓国内の抗体製作会社であるAb Frontier社のソフトウェアを使用して分析した。分析されたペプチドリットで免疫化させるマウスの該当タンパク質のアミノ酸配列と異なるものを確認し、実際の研究で分析して肝-カルボキシルエステラーゼ1に特異的なペプチドを基準で再選別して最終13個のアミノ酸配列を有するペプチドを合成した(表1参照)。

【0059】

【表1】

類	アミノ酸配列	(n)	アミノ酸位置
Human	KAVEKPPQTEHIEL	13	554~567
Mouse	LRAKKPPQTGHTL	13	554~567

【0060】

＜実施例3＞マウスの免疫化

ペプチド基の各々同量の補助抗原(Freund's adjuvant)を乳状化して4匹の雌BALB/cの腹腔に1次注射し、4週後に2次注射し、また2週後に3次注射して免疫化させた。

【0061】

前記各々の注射前に全てのマウスの尻尾から血清を分離して酵素免疫分析法でペプチド抗原とマウスで生産された抗体反応程度を測定した。

【0062】

また、同時にタンパク質水準でも分析されるようにウェスタンブロット分析法も共に進行的した。肝-カルボキシルエステラーゼ1タンパク質との結合性測定は、ウェスタンブロット方法で実施し、基準試料(standard sample)として肝組織のタンパク質を使用した。

【0063】

定量されて添加された肝組織のタンパク質5μgは、10%SDS-PAGEで分離し、ゲルは、ニトロセルロース(NC:nitrocellulose)膜にトランスファーした後(transfer)、5%脱脂乳(skimmed milk)が含まれたTBS-T緩衝溶液[20mMトリス、137mM塩化ナトリウム、0.1%ツイン20(Tween

ー20)、pH7.6]で1時間の間ブロッキングした。ペプチドで免疫化されたマウスの血清を1次抗体として500:1の割合で5%脱脂乳とともに反応させた。2次抗体として抗マウスIgG-HRP(Santa Cruz)を5000:1の割合で反応させた。最終NC膜は、ECL Plusウェスタンブロット試薬(GE Healthcare)で3分間反応させて、Typhoon 9400スキャナを利用してスキャンして抗原-抗体結合で反応した肝-カルボキシルエステラーゼ1タンパク質の信号を分析した。

【0064】

図1は、免疫化期間別マウス血清での肝-カルボキシルエステラーゼ1の分析度を示した写真として、ゲル写真においてMは、タンパク質分子量別標準マーカ(5 μ g)を意味し、5 μ gは、肝組織タンパク質を意味する。

10

【0065】

図1に示したように、#3マウスで高い抗原-抗体反応性を示して前記マウスを選択した。

【0066】

<実施例4>モノクローナル抗体を生産する最適ハイブリドーマ細胞株の選別

前記実施例3で選択した#3マウスの脾臓細胞を分離してSp2/0-Ag14ミエローマ細胞と融合させた後、HAT培地に希釈させて8個の96-ウェルプレートに分株して培養した。培養された細胞は、250ng/wellで合成されたペプチドを抗原として酵素免疫分析法を実行して吸光度が一番高い11個のウェルを選択し、各細胞は、24-ウェルで培養されて同一な方法の酵素免疫分析法で5個のウェル(#1B2、#1G11、#2F4、#3C1、#3F2)を選定した。また、各細胞は、96-ウェルプレートに分株して培養され、酵素免疫分析法を3回反復実行してその中で一番高い反応性を示す5個のクローン細胞(#1A9、#4H3、#6A10、#8F11、#10E8)を選定した。

20

【0067】

図2は、前記酵素免疫測定法で高い力価を有する各々一つの#3ウェル細胞の培養液をウェスタンブロット分析した結果として、肝-カルボキシルエステラーゼ1の位置と結合程度を示した写真である。#3F2融合細胞で高い反応性を示した。

【0068】

図3は、選別された5個の#ウェル細胞を更に96-ウェルプレートに分株して高い力価を示すウェルを3回反復して分析して最終選別されたウェルの細胞をウェスタンブロット分析した結果を示した写真として、#10E8ハイブリドーマ細胞で高い反応性を示した。

30

【0069】

したがって、高い抗原-抗体反応性を示す#10E8ハイブリドーマ細胞株を最終選択し、これをマウスの腹腔に注射してから1週後、腹水を取って抗原-親和性精製コラムを使用して最終濃度が2mg/mLになるように濃縮して実験前まで冷凍保管した。

【0070】

最終モノクローナル抗体#10E8のサブクラスアイソタイプ(subclass isotype)測定結果、IgG1型で判明された(表2参照)。

40

【0071】

【表2】

クローン	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	κ	λ	H鎖	L鎖
10E8	0.518	0.072	0.104	0.097	0.097	0.084	0.738	0.149	IgG1	κ

【0072】

<実施例5>モノクローナル抗体の抗原-抗体反応の効率性分析：免疫沈降法及び免疫ブロッティング

磁石型ビードである「Dynabead MyOneTM Tosyl activate

50

d」(Invitrogen)は、製造社マニュアルによって抗－肝－カルボキシエステラーゼ1ポリクローナル抗体(Abcam社、#Ab1875)と抗－肝－カルボキシエステラーゼ1モノクローナル抗体(クローン#10E8)で各々コーティングされた。各抗－肝－カルボキシエステラーゼ1抗体が結合されたビード10 μ l、20 μ l、30 μ l、40 μ l、50 μ lは、肝組織タンパク質100 μ gと一緒に1mLチューブで2時間の間免疫沈降させた。pH2で合わせたPBS-T緩衝溶液を使用して抗体に結合したタンパク質を回収し、免疫ブロッティングを実行してポリクローナル抗体とモノクローナル抗体(クローン#10E8)から結合された肝－カルボキシエステラーゼ1の変化をImageQuantプログラムを使用してポリクローナル抗体と比較分析した。

【0073】

10

図4は、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体(クローン#10E8)の抗原－抗体結合程度を比較した図として、pHCCは、肝癌患者15名の血漿を混合した試料200 μ lを抗体が結合されたビード30 μ lとともに免疫沈降したことで、5 μ gは、肝組織タンパク質を意味する。

【0074】

図4に示したように、同一な条件でポリクローナル抗体よりモノクローナル抗体#10E8が20倍高い抗原－抗体反応性を示した。

【0075】

<実施例6>モノクローナル抗体を利用した血漿内の肝－カルボキシエステラーゼ1タンパク質の分析：免疫沈降及び免疫ブロッティング

20

各々10名の健常者、肝炎患者、肝硬変患者、肝癌患者の血漿を混合した後、同一な200 μ lを実施例5で使われた肝－カルボキシエステラーゼ1ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体#10E8と免疫沈降反応した後、ウェスタンブロット分析法を実行した。同一条件でスキャンするためにスキャン解像度を100マイクロンにした時、分析された肝－カルボキシエステラーゼ1の信号強度をImageQuantプログラムを使用して分析した。

【0076】

図5及び表3に示したように、モノクローナル抗体と結合した肝－カルボキシエステラーゼ1の強度がポリクローナル抗体を使用した時より平均30倍以上分析効率が増加されたことを確認した。

30

【0077】

【表3】

抗体種類	健常者	肝炎患者	肝硬変患者	肝癌患者
ポリクローナル抗体	191,363	182,431	178,140	738,366
本発明のモノクローナル抗体	5,586,315	6,676,570	3,314,999	24,906,430

【0078】

<実施例7>モノクローナル抗体を利用した血漿内の肝－カルボキシエステラーゼ1タンパク質の分析：ELISA分析

40

希釈濃度が0.5mg/mLである前記モノクローナル抗体#10E8、ELISA適用可能なAbcam社の二つのポリクローナル抗体1と抗体2のポリクローナル抗体(#Ab1875、#Ab77730)200 μ lを96－ウェルプレートに添加した。前記96－ウェルプレートに添加して冷蔵状態で10時間反応させた後、比較試料で肝－カルボキシエステラーゼ1の標準タンパク質を混合した200 μ lを前記ウェルに添加して2時間の間反応させた。2次結合抗体としてHRP酵素が結合されたhCE1抗体(#Ab34595)を5000：1で同一に添加し、1時間反応させた後、TMB発色試薬を添加した。

【0079】

図6は、前記モノクローナル抗体#10E8とELISA適用可能なAbcam社の二

50

つの抗体 1 と抗体 2 のポリクローナル抗体(# A b 1 8 7 5、# A b 7 7 7 3 0)の抗原－抗体結合程度を比較した結果として、(A)は、抗原－抗体結合による試料の発色結果であり、(B)は、肝－カルボキシルエステラーゼ 1 の濃度別抗原－抗体結合による吸光度数値を示した図である。

【0080】

図 6 に示したように、標準曲線の分析された吸光度数値を比較すれば、本発明の # 1 0 E 8 抗体は、同一な含量の抗体対比本発明のモノクローナル抗体の結合効率性が既存抗体より顕著に高いことを確認した。

【産業上の利用可能性】

【0081】

本発明は、タンパク質または疾病診断分野で使用する事ができる。

【0082】

【表 4】



한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank)

110-744, 서울시 종로구 연건동 28번지 서울대학교 의과대학 암연구소 7층
 TEL : +82-2-3668-7915, FAX : +82-2-742-0021, <http://cellbank.snu.ac.kr>, kclb@plaza.snu.ac.kr
 Korean Cell Line Bank; Korean Cell Line Research Foundation, International Microorganism Depository Authority approved by WIPO
 Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, 28 Yungun-dong, Chongno-gu, Seoul 110-744, KOREA

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
 RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
 FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEPTION IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
 issued pursuant to Rule 7.1

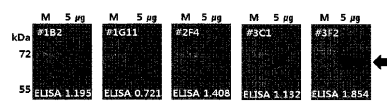
To: Paik, Young-Ki

Rm#422, Industry Research Center, Yonsei University, 134 Sinchon-dong,
 Seodaemun-gu, Seoul 120-749, Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : YPRC 10E8	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCLRF-BP-00282
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by :	
☒ A scientific description	
☒ A proposed taxonomic designation	
(Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on March 28, 2012	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Director Korean Cell Line Research Foundation	Signature(s) <i>Jaekook Paik</i>
Address : Cancer Research Institute Seoul National University College of Medicine 28 Yungun-dong, Chongno-Gu Seoul, 110-744, Korea	Date : 2012. 04. 02.

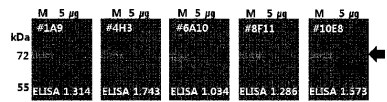
【図 2】

[Fig. 2]

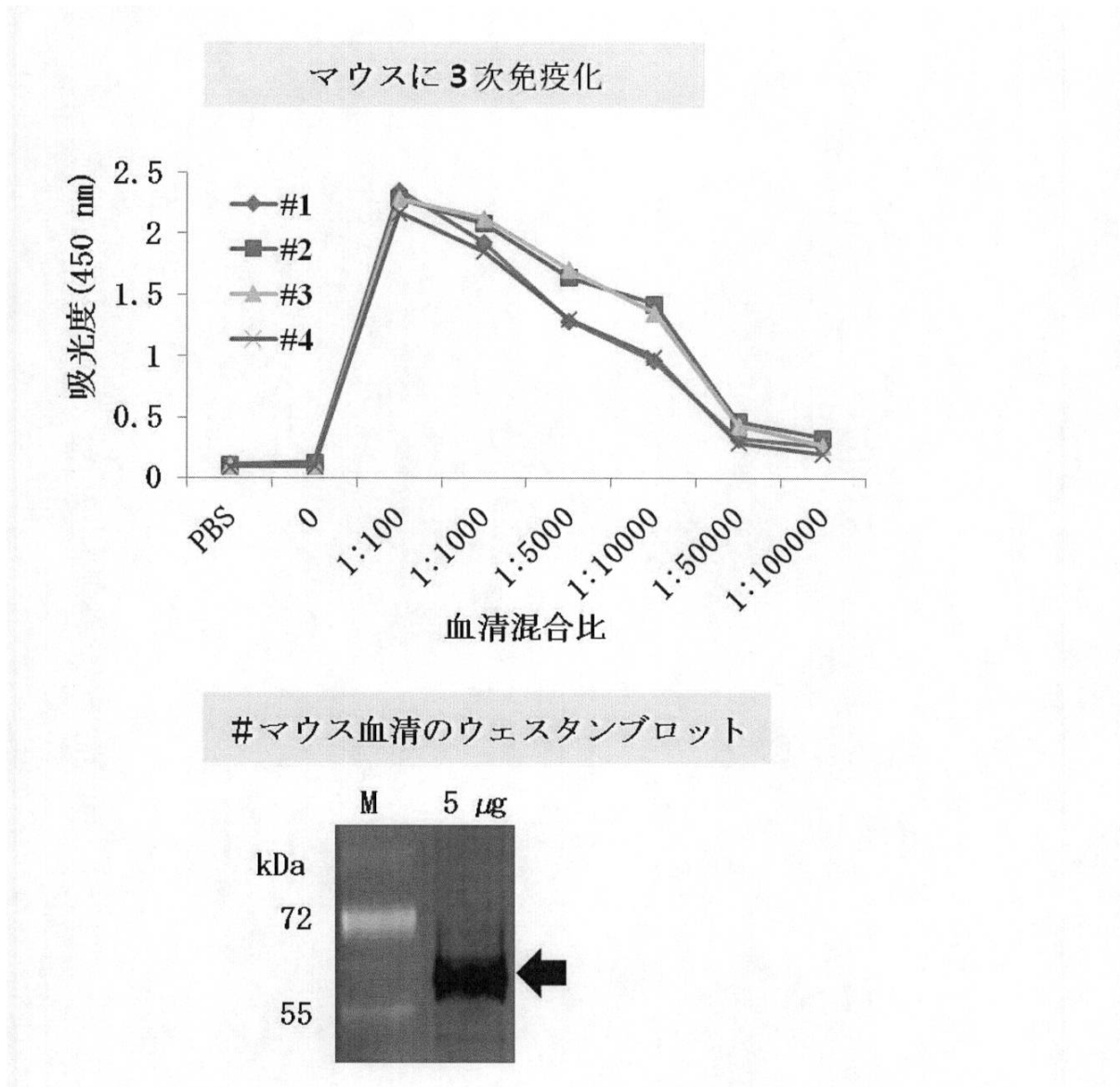


【図 3】

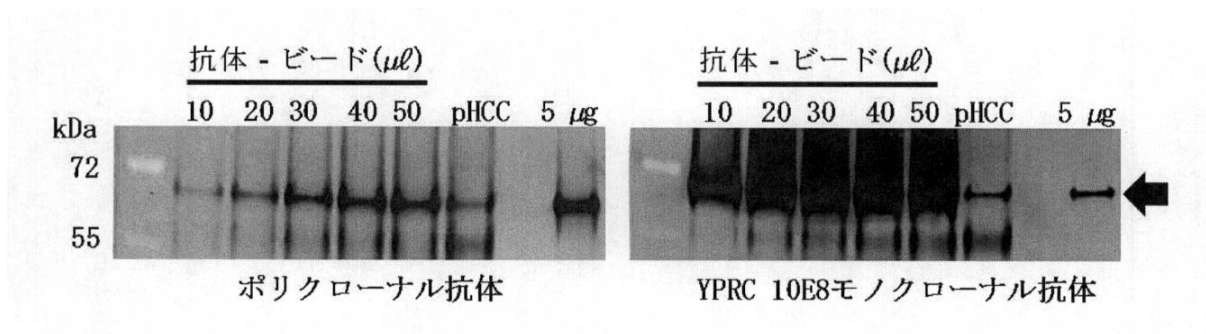
[Fig. 3]



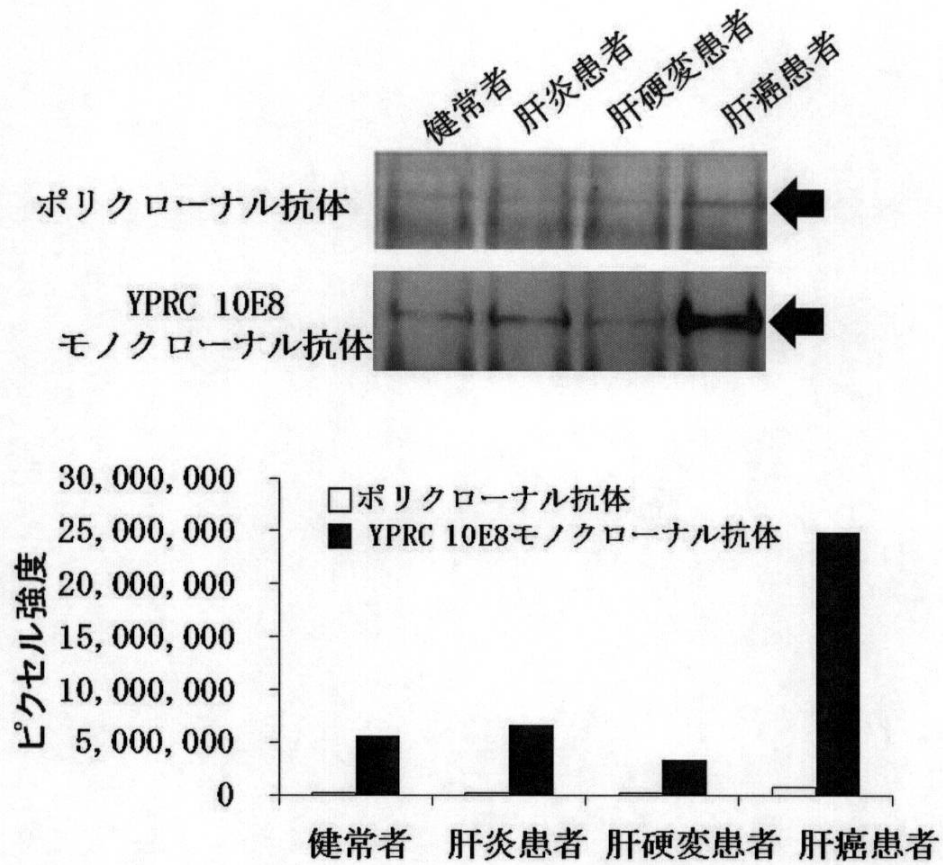
【図 1】



【図 4】

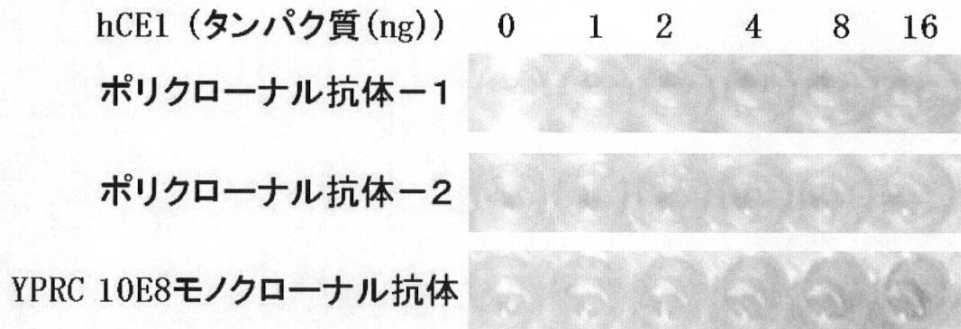


【図 5】

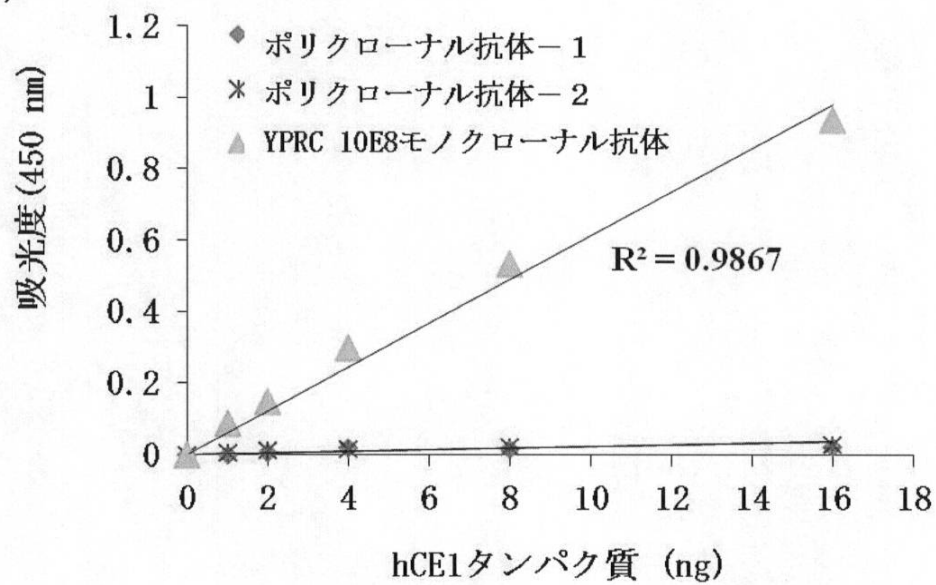


【図 6】

(a)



(b)



【配列表】

[0005798679000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N	33/577	(2006.01)	G 0 1 N 33/577 B
C 1 2 N	9/18	(2006.01)	C 1 2 N 9/18
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08

(72)発明者 ヨン・キ・ペク
大韓民国・137-907・ソウル・ソチョグ・ジャムウォンドン・65-32・シンバンポ
・7-チャ・アパート・303-809

(72)発明者 クン・ナ
大韓民国・121-871・ソウル・マポグ・ヨムニードン・45-1・16/6

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第2008/066964 (WO, A2)
国際公開第2009/113758 (WO, A1)
K. Na et al., "Human plasma carboxylesterase 1, a novel serologic biomarker candidate for hepatocellular carcinoma", Proteomics, 2009年, Vol. 9, p. 3989-3999

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1/00-19/00
G 0 1 N 33/48-33/98
C 1 2 N 15/00-15/90
C 1 2 N 9/00-9/99
C 1 2 P 1/00-41/00
C 1 2 N 1/00-7/08
UniProt/GeneSeq
PubMed
BIOSIS (STN)
EMBASE (STN)