

明 細 書

発明の名称：抗体、又はその抗原結合フラグメント

技術分野

[0001] 本明細書には、ヒトPRB1タンパク質への結合能を有する、抗体、又はその抗原結合フラグメントが開示される。

背景技術

[0002] 特許文献1には、腎機能のマーカーとして唾液腺、及び唾液中のPRB1タンパク質の測定値を使用することが記載されている。

特許文献2には、慢性腎不全モデルマウスにおいて、腎機能低下に伴い唾液腺、及び唾液中のPRB1タンパク質の測定値が上昇することが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：米国特許出願公開第2019/0033325号明細書
特許文献2：米国特許出願公開第2019/0218587号明細書

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、唾液だけでなく、血清中のヒトPRB1タンパク質を検出できる抗体を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明は、以下の実施形態を含み得る

項1.

重鎖可変領域が、配列番号11の第21番目から第141番目のアミノ酸配列で表される重鎖可変領域と同一性が95%以上であるアミノ酸配列を含み、

軽鎖可変領域が、配列番号16の第26番目から第132番目のアミノ酸配列で表される軽鎖可変領域と同一性が95%以上であるアミノ酸配列を含

む、

ヒトPRB1タンパク質への結合能を有する、抗体、又はその抗原結合フラグメント。

項2.

重鎖可変領域が、

配列番号13で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、

配列番号14で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び

配列番号15で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3、

を含み、

軽鎖可変領域が、

配列番号18で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、

配列番号19で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び

配列番号20で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3、

を含む、

項1に記載の抗体、又はその抗原結合フラグメント。

項3.

配列番号11の第21番目から第141番目のアミノ酸配列で表される重鎖可変領域と同一性が95%以上であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

項4.

重鎖可変領域が、

配列番号13で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、

配列番号14で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び

配列番号15で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3、

を含む、項3に記載のポリヌクレオチド。

項5.

項3に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

項6.

項４に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

項７．

配列番号１１の第２１番目から第１４１番目のアミノ酸配列で表される重鎖可変領域と同一性が９５％以上であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むポリペプチドを発現する細胞。

項８．

重鎖可変領域が、

配列番号１３で表されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、

配列番号１４で表されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び

配列番号１５で表されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３、

を含む、項７に記載の細胞。

項９．

配列番号１６の第２６番目から第１３２番目のアミノ酸配列で表される軽鎖可変領域と同一性が９５％以上であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

項１０．

軽鎖可変領域が、

配列番号１８で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、

配列番号１９で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び

配列番号２０で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３、

を含む、項９に記載のポリヌクレオチド。

項１１．

項９に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

項１２．

項１０に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

項１３．

配列番号１６の第２６番目から第１３２番目のアミノ酸配列で表される軽鎖可変領域と同一性が９５％以上であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を

含むポリペプチドを発現する細胞。

項 1 4 .

軽鎖可変領域が、

配列番号 1 8 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1、

配列番号 1 9 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2、及び

配列番号 2 0 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3、

を含む、項 1 3 に記載の細胞。

項 1 5 .

標識物質で標識されている、項 1 又は 2 に記載の抗体、又はその抗原結合フラグメント。

項 1 6 .

項 1 又は 2 に記載の抗体、又はその抗原結合フラグメントが固定化された固相。

発明の効果

[0006] 血清中のヒト P R B 1 タンパク質を検出することができる。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]モノクローナル抗体8A10クローンの各領域の配列を示す。

[図2]モノクローナル抗体2B3クローンの各領域の配列を示す。

[図3]唾液中のヒトPRB1タンパク質濃度を測定した際の検量線を示す。

[図4]各被検者から採取した唾液中のヒトPRB1タンパク質濃度を示す。

[図5]血清中のヒトPRB1タンパク質濃度を測定した際の検量線を示す。

[図6]各被検者から採取した血清中のヒトPRB1タンパク質濃度を示す。

[図7]ヒト唾液サンプル中、及び血清サンプル中のhPRB1の検出結果を示す。

[図8]hPRB1とヒトCKDとの関連を解析した結果を示す。(a) LightGBM 分類器を使用した解析結果を示す。(b) ロジスティック回帰モデルを使用した解析結果を示す。

発明を実施するための形態

[0008] 1. 抗体、又はその抗原結合フラグメント

本発明のある実施形態は、ヒトPRB1タンパク質（以下、「hPRB1」とも表記する）に結合する抗体、又はその抗原結合フラグメントに関する。

- [0009] 本明細書において、抗体はクラスを問わず重鎖と軽鎖が会合した1つのY型ユニットを意図する。抗体は、IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEのクラスを含む。さらに、抗体のY型ユニットは、重鎖に応じてサブクラスを含み得る。抗体のクラスがIgGの場合、サブクラスとしてIgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、及びIgG₄の4つのサブクラスから選択される1つを含む。抗体のクラスがIgAの場合、サブクラスはIgA1、及びIgA2の2つのサブクラスから選択される少なくとも1つを含む。
- [0010] 抗体は、2から5個のY型ユニットが結合した多量体構造を取り得る。特に、抗体がIgMである場合、5量体構造を取り得る。
- [0011] 抗体の軽鎖は、ラムダ鎖であってもカッパ鎖であってもよい。
- [0012] 抗体は、例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ブタ、ニワトリ、ダチョウ等由来であり得る。
- [0013] 本発明において、第1の抗体は、ヒトPRB1タンパク質への結合能を有する。第1の抗体の重鎖可変領域は、配列番号1の第19番目から第132番目のアミノ酸配列で表される重鎖可変領域と同一性が95%以上であるアミノ酸配列を含む。また、第1の抗体の軽鎖可変領域は、配列番号6の第21番目から第132番目のアミノ酸配列で表される軽鎖可変領域と同一性が95%以上であるアミノ酸配列を含む。
- [0014] 各可変領域の同一性は、好ましくは、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、又は100%である。同一性を有さない部分のアミノ酸配列には、配列番号1の第19番目から第132番目のアミノ酸配列で表される重鎖可変領域、及び／又は配列番号6の第21番目から第132番目のアミノ酸配列で表される軽鎖可変領域のアミノ酸配列に対してアミノ酸残基の置換、欠失、又は挿入を含み得る。

- [0015] 第1の抗体としてより好ましくは、重鎖可変領域は、
配列番号3で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、
配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び
配列番号5で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3、
を含み、
軽鎖可変領域が、
配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、
配列番号9で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び
配列番号10で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3、
を含む。
- [0016] 第1の抗体のさらに好ましい態様を図1に示す。第1の抗体のサブクラスは、好ましくはIgG₁であり、軽鎖はカッパ鎖である。
- [0017] 本発明において、第2の抗体は、ヒトPRB1タンパク質への結合能を有する。第2の抗体の重鎖可変領域は、配列番号11の第21番目から第141番目のアミノ酸配列で表される重鎖可変領域と同一性が95%以上であるアミノ酸配列を含む。第2の抗体の軽鎖可変領域は、配列番号16の第26番目から第132番目のアミノ酸配列で表される軽鎖可変領域と同一性が95%以上であるアミノ酸配列を含む。
- [0018] 各可変領域の同一性は、好ましくは、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、又は100%である。同一性を有さない部分のアミノ酸配列には、配列番号11の第21番目から第141番目のアミノ酸配列で表される重鎖可変領域、及び／又は配列番号16の第26番目から第132番目のアミノ酸配列で表される軽鎖可変領域のアミノ酸配列に対してアミノ酸残基の置換、欠失、又は挿入を含み得る。
- [0019] 第2の抗体として、より好ましくは、重鎖可変領域は、
配列番号13で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、
配列番号14で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び
配列番号15で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3、

を含み、

軽鎖可変領域が、

配列番号 18 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 1、

配列番号 19 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 2、及び

配列番号 20 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 3、

を含む。

[0020] 第2の抗体のさらに好ましい態様を図2に示す。第2の抗体のクラスは、好ましくは Ig Mであり、軽鎖はカッパ鎖である。

[0021] 抗体の抗原結合フラグメントは、上述した重鎖可変領域と、軽鎖可変領域を含む限り制限されない。抗原結合フラグメントとして、F (a b')、F a b、F (a b')₂、一本鎖 F v フラグメント (s c F v) 等を挙げることができる。

抗体、又はその抗原結合フラグメントは、標識物質により標識されていてもよい。

[0022] 標識物質として、例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、検出可能なシグナルを生じる物質等を挙げることができる。例えば、検出可能なシグナルを生じる物質は、それ自体がシグナルを発生する物質（以下、「シグナル発生物質」ともいう）であってもよく、他の物質の反応を触媒してシグナルを発生させる物質であってもよい。シグナル発生物質として、例えば、蛍光物質、放射性同位元素等を挙げることができる。

[0023] 蛍光物質として、例えば、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C)、ローダミン、A l e x a F l u o r (登録商標)等の蛍光色素、G r e e n F l u o r e s c e n t P r o t e i n (GFP)、B l u e F l u o r e s c e n t P r o t e i n (BFP)、C y a n F l u o r e s c e n t P r o t e i n (CFP)、Y e l l o w F l u o r e s c e n t P r o t e i n (YFP)、R e d F l u o r e s c e n t P r o t e i n (RFP)等の蛍光タンパク質等を挙げることができる。放射性同位元素として、例えば、¹²⁵I、¹⁴C、³²P等を挙げることがで

きる。

[0024] 他の物質の反応を触媒して検出可能なシグナルを発生させる物質としては、例えば、酵素を挙げることができる。酵素としては、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等を挙げることができる。

[0025] 抗体、又はその抗原結合フラグメントは、固相に固定化されていてもよい。固相として、例えば、マイクロプレート、ビーズ等を挙げることができる。固相の素材は特に限定されず、例えば、有機高分子化合物、無機化合物、生体高分子等から選択できる。有機高分子化合物としては、ラテックス、ポリスチレン、ポリプロピレンなどが挙げられる。無機化合物としては、磁性体（酸化鉄、酸化クロム及びフェライトなど）、シリカ、アルミナ、ガラス等が挙げられる。生体高分子としては、不溶性アガロース、不溶性デキストラン、ゼラチン、セルロース等を挙げることができる。

[0026] 抗体、又はその抗原結合フラグメントには、タグが付されていてもよい。タグとして、ヒスチジンタグ、FLAG（登録商標）タグ、ヘマグルチニン（HA）タグ、グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）タグ、mycタグ等を挙げることができる。

[0027] 2. ポリペプチド、ポリヌクレオチド、及びポリヌクレオチドを含むベクター

本発明のある実施形態は、前記抗体、又はその結合フラグメントの一部、又は全部を含むポリペプチド、及びこれをコードするポリヌクレオチドに関する。

[0028] ポリペプチドは、上記1. で述べた重鎖可変領域、及び／又は軽鎖可変領域と同一性が95%以上であるアミノ酸配列を含み、ポリヌクレオチドは当該ポリペプチドをコードする。

[0029] 抗体が第1の抗体である時、ポリヌクレオチドは、配列番号1の第19番目から第132番目のアミノ酸配列で表される重鎖可変領域と同一性が95%以上であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むポリペプチドをコード

する。

ポリヌクレオチドは、配列番号6の第21番目から第132番目のアミノ酸配列で表される軽鎖可変領域と同一性が95%以上であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする。

[0030] 好ましくは、抗体が第1の抗体である時、重鎖可変領域を含むポリヌクレオチドは、

配列番号3で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、
配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び
配列番号5で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3、
を含む、ポリペプチドをコードする。

[0031] また、抗体が第1の抗体である時、軽鎖可変領域を含むポリヌクレオチドは、

配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、
配列番号9で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び
配列番号10で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3、
を含む、ポリペプチドをコードする。

[0032] 抗体が第2の抗体である時、ポリヌクレオチドは、配列番号11の第21番目から第141番目のアミノ酸配列で表される重鎖可変領域と同一性が95%以上であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする。

ポリヌクレオチドは、配列番号16の第26番目から第132番目のアミノ酸配列で表される軽鎖可変領域と同一性が95%以上であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする。

[0033] 好ましくは、抗体が第2の抗体である時、重鎖可変領域を含むポリヌクレオチドは、

配列番号13で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、
配列番号14で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び
配列番号15で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3、

を含む、ポリペプチドをコードする。

[0034] また、抗体が第2の抗体である時、軽鎖可変領域を含むポリヌクレオチドは、

配列番号18で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、

配列番号19で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び

配列番号20で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3、

を含む、ポリペプチドをコードする。

[0035] 重鎖可変領域を含むポリペプチドと軽鎖可変領域を含むポリペプチドは、それぞれが異なるポリヌクレオチド鎖にコードされていても、1つのポリヌクレオチド鎖にコードされていてもよい。

[0036] ポリヌクレオチドは、DNAであってもRNAであってもよいが、好ましくはDNAである。また、ポリヌクレオチドは、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。

[0037] 上記ポリヌクレオチドは、ベクターに挿入されていてもよい。ベクターは、クローニングベクターであっても発現ベクターであってもよい。また、ベクターは、プラスミドベクター、ウイルスペクター、トランスポゾンベクター等であり得る。

[0038] 3. ポリペプチドを発現する細胞

本発明のある実施形態は、上記2. において述べたポリペプチドを発現する細胞に関する。細胞は、ハイブリドーマを挙げることができる。また、他の細胞として、大腸菌、酵母、哺乳類細胞（HEK293、CHO等の培養細胞等）、ニワトリ等の鳥類細胞、昆虫細胞等を挙げることができる。

[0039] 細胞は、上記2 において述べた重鎖可変領域を含むポリペプチドと軽鎖可変領域を含むポリペプチドをそれぞれ個別に発現していてもよい。また、細胞は重鎖可変領域を含むポリペプチドと軽鎖可変領域を含むポリペプチドの両方を発現していてもよい。

[0040] 4. 抗体、又はその抗原結合フラグメントの用途

上記1. において述べた抗体、又は抗原結合フラグメントは、免疫学的手

法を用いたヒトPRB1タンパク質の検出に使用できる。免疫学的手法として、例えば、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、ウエスタンブロッティング、免疫染色を挙げることができる。

実施例

[0041] 以下に、実施例を示して本発明についてより詳細に説明する。しかし、本発明は、実施例に限定して解釈されるものではない。

[0042] 1. モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体の作製は公知の方法にしたがって、作製した。具体的には、Exp293F cellsに、ヒトPRB1 (NCBI Reference Sequence ID: NP_005030.2) をトランスフェクションにより強制発現し、培養上清からリコンビナントタンパク質（以下、「hPRB1リコンビナントタンパク質」、又は「リコンビナントタンパク質」とも呼ぶ）を精製した。リコンビナントタンパク質の精製は、株式会社プロテイン・エクスプレス社に委託した。

[0043] 公知のプロトコルにしたがって、hPRB1リコンビナントタンパク質をラットに接種し、一定期間経過後に腹水単核球細胞を単離し、ハイブリドーマを作製し、抗hPRB1抗体を産生する8A10クローン (Ig G₁) と、2B3クローン (Ig M) を得た。抗体作製は、バイオゲート株式会社に委託した。

[0044] 抗体の精製は、公知の方法にしたがってイムノカラムを使って行い、得られた抗体は、0.05% NaN₃を添加したPBSに溶解し、抗体ストック液とした。以下、8A10クローンから得られたモノクローナル抗体を、「Rat anti-hPRB1 IgG(8A10) mAb」、又は「8A10 mAb」と称する。また、2B3クローンから得られたモノクローナル抗体を、「Rat anti-hPRB1 IgM(2B3) mAb」、又は「2B3 mAb」と称する。各抗体の可変領域のアミノ酸配列は、Kabatのスキームにしたがって決定した。

[0045] 2. ELISA測定

2-1. 標準液及び測定サンプルの準備

検量線を作製するため、KAIC0-hPRB1リコンビナントタンパク質をブロッキ

ングバッファーにより0 ng/mL、0.03125 ng/mL、0.0625 ng/mL、0.125 ng/mL、0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、3 ng/mL、4 ng/mL、6 ng/mL、8 ng/mL、10 ng/mLとなるように希釈し標準液とした。0 ng/mLの標準液はブランクとして使用した。

[0046] 唾液は、採取を行う約30分前に水で口腔内をすすいでから、綿棒を被検者に咥えていただき、口を軽く閉じて30秒間舌を左右に動かし唾液を綿棒の綿体に吸収させた。唾液を吸収させた綿体を保存液 (0.15M Sodium Citrate buffer pH4.0) に約30秒間浸し、綿棒を取り出した。綿体を浸した保存液を唾液検体とした。

血清は常法にしたがって被検者から採取した。

唾液検体は、ブロッキングバッファーにて100倍希釈し測定サンプルとした。血清検体は、ブロッキングバッファーにて50倍希釈し測定サンプルとした。

[0047] 2-2. ELISA測定

終濃度が10 µg/mLになるようにRat anti-hPRB1 IgM(2B3) mAbをSodium Carbonate-bicarbonate buffer (0.01M, pH9.6±0.2)で希釈した。希釈した2B3 mAbを50 µLずつELISAプレート(IWAKI, 3801-096)の各ウェルに添加した。添加後のプレートをプレートシール(stem, P96T01N)によってシールした後、さらに、アルミホイルで遮光し4℃で一晩静置しインキュベートした。

[0048] 続いて、インキュベーションが終わったELISAプレート内の希釈抗体液をアスピレーターにて吸引除去した。続いて、ブロッキングバッファー (0.2% ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBS-T (0.05% となるようにTween20を加えたPBS)) を各ウェルに50 µLずつ添加した。BSAは、Jakson ImmunoResearch社から商品番号001-000-161として発売されているIgG-Free、Protease-Freeのものをを使用した。添加後のプレートをプレートシールによってシールした後、さらに、アルミホイルで遮光し室温で2時間静置しインキュベートした。

[0049] 続いて、インキュベーションが終わったELISAプレート内をPBSにて各ウェルを5回洗浄した。

- [0050] 次に、検量線用の標準液、及び測定サンプルをそれぞれ別のウェルに50 μ Lずつ添加した。添加後のプレートをプレートシールによってシールした後、さらに、アルミホイルで遮光し室温で1時間静置しインキュベートした。
- [0051] 続いて、インキュベーションが終わったELISAプレート内をPBSにて各ウェルを5回洗浄した。
- [0052] 次に、ブロッキングバッファーで終濃度が10 μ g/mlになるように希釈したRat anti-hPRB1 IgG(8A10) mAbを50 μ Lずつ洗浄後のウェルに添加した。添加後のプレートをプレートシールによってシールした後、さらに、アルミホイルで遮光し室温で1時間静置しインキュベートした。
- [0053] 続いて、インキュベーションが終わったELISAプレート内をPBSにて各ウェルを5回洗浄した。
- [0054] 次に、ブロッキングバッファーで終濃度が0.18 μ g/mlになるように希釈したF(ab')₂ Goat anti-Rat IgG-Fc Fragment Antibody Biotinylated(BETHYL, A110-139B)を50 μ Lずつ洗浄後のウェルに添加した。添加後のプレートをプレートシールによってシールした後、さらに、アルミホイルで遮光し室温で1時間静置しインキュベートした。
- [0055] 続いて、インキュベーションが終わったELISAプレート内をPBSにて各ウェルを5回洗浄した。
- [0056] 次に、ブロッキングバッファーで20,000倍希釈したAvidin protein HRP (Thermo Fisher Scientific, 21123, 5.5 mg/ml) を50 μ Lずつ洗浄後のウェルに添加した。添加後のプレートをプレートシールによってシールした後、さらに、アルミホイルで遮光し室温で1時間静置しインキュベートした。
- [0057] 続いて、インキュベーションが終わったELISAプレート内をPBSにて各ウェルを5回洗浄した。
- [0058] 次に、TMB Chromogen Solution(for ELISA) (Thermo Fisher Scientific, 002023)を50 μ Lずつ洗浄後のウェルに添加し、アルミホイルで遮光し室温で5分静置しインキュベートした。2M H₂SO₄を50 μ Lずつウェルに添加して発色反応を停止した後、10分以内にプレートリーダー(Thermo Fisher Scientific

, Multiskan G0)にて450nmの吸光度を測定した。

[0059] 検量線サンプルの吸光度の値からブランクの吸光度の値を引いた値を用いて検量線カーブと回帰式を作成した。各測定サンプルについても、吸光度の値からブランクの吸光度の値を引いた値を検量線に代入し、得られた値に測定サンプル希釈率を乗じて、検体に含まれるhPRB1の濃度を計算した。

[0060] 3. 結果

唾液検体中のhPRB1と血清検体中のhPRB1の測定は独立して行い、その都度検量線を作成した。

[0061] 図3に、唾液中のhPRB1を測定した際の検量線を示す。回帰式は、 $y = 9.5475x^2 + 2.2399x$ であり、 $R^2 = 0.9902$ であった。各被検者から採取した唾液中のhPRB1の濃度を図4に示す。図中、「N0.」は各被検者の識別番号を示し、「OD₄₅₀」はELISA測定における実際の吸光度の測定値を示し、「-blank」はELISA測定における実際の吸光度の測定値からブランクの吸光度の測定値を減じた値を示し、「y」は回帰式に算出されたyの値（測定酸サンプル中のhPRB1の濃度）を示し、「ng/mL」はyの値に検体の希釈倍率を乗じた検体（唾液）中のhPRB1の濃度を示す。

[0062] 図5に、血清中のhPRB1を測定した際の検量線を示す。回帰式は、 $y = 8.8369x^2 + 2.9909x$ であり、 $R^2 = 0.9815$ であった。各被検者から採取した血清中のhPRB1の濃度を図6に示す。図中、「N0.」は各被検者の識別番号を示し、「OD₄₅₀」はELISA測定における実際の吸光度の測定値を示し、「-blank」はELISA測定における実際の吸光度の測定値からブランクの吸光度の測定値を減じた値を示し、「y」は回帰式に算出されたyの値（測定酸サンプル中のhPRB1の濃度）を示し、「ng/mL」はyの値に検体の希釈倍率を乗じた検体（唾液）中のhPRB1の濃度を示す。

8A10 mAb及び2B3 mAbを使用したELISAシステムにより、唾液中、及び血清中のhPRB1を検出できることが示された。

[0063] 4. ヒト唾液サンプル中、及び血清サンプル中のhPRB1の検出

ヒト唾液サンプル中、及び血清サンプル中のhPRB1をELISA法により検出し

た。

終濃度が $10\mu\text{g/ml}$ になるようにRat anti-hPRB1 IgM(2B3) mAbをSodium Carbonate-bicarbonate buffer (0.01M , $\text{pH}9.6\pm0.2$)で希釈し捕捉抗体液とした。96ウェルプレートの各ウェルに捕捉抗体液を加え、 4°C で一晩コーティングし、コーティングされたウェルをブロッキングバッファーで2時間ブロッキングした。ブロッキングバッファーは、PBS-T (0.05% Tween-20を含むPBS)に 0.2% となるように牛血清アルブミン (BSA、Jackson ImmunoResearch)を溶解し作製した。ブロッキング終了後ブロッキングバッファーを除去し、hPRB1の標準およびサンプル(希釈した唾液、血清、または血漿)をウェルに加え、1時間インキュベートした。インキュベーション終了後各ウェルをPBS-Tで洗浄し、続いて、ブロッキングバッファーで $10\mu\text{g/mL}$ となるように希釈したRat anti-hPRB1 IgG (8A10) mAbを加え、1時間インキュベートした。インキュベーション終了後各ウェルをPBS-Tで再度洗浄し、 F(ab')_2 Goat anti-Rat IgG-Fc Fragment Antibody, Biotinylated (BETHYL)を各ウェルに加え1時間インキュベートした。各ウェルをPBS-Tにより洗浄後、Avidin protein HRP (Thermo Fisher Scientific)を加え1時間インキュベートした。各ウェルを洗浄後、TMB Chromogen Solution (Thermo Fisher Scientific)を添加した。TMBによる色の変化は5分以内に確認し、各ウェルに $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ を加えて反応を停止した。最後に、Multiskan GO マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific)を使用して 450 nm で各ウェルの吸光度を測定した。

[0064] 総タンパク質濃度は、TaKaRa Bradford Protein Assay Kit (TaKaRa Bio, Inc.)を使用し定量した。

[0065] 分析の結果、hPRB1は総唾液タンパク質の約 $0.001\sim30\%$ 重量を構成することがわかった(図7の左パネル)。ヒト唾液の総タンパク質濃度は約 2 mg/mL であるため、ヒト唾液中のhPRB1濃度は $0.02\sim600\mu\text{g/mL}$ となる。また、これまでhPRB1は血清中には存在しないと考えられていたが、血清サンプルからもhPRB1が検出された。しかし、血清中のhPRB1濃度は唾液中の濃度よりも大幅に低いものであった。hPRB1は、総血清タンパク質の約 $0.0000003\sim0.001$ 重量

%を構成していた（図7の右パネル）。総血清タンパク質は約80 mg/mLであるため、ヒト血清中のhPRB1濃度は0.24~800 ng/mLとなる。

[0066] また、8A10 mAbを検出抗体として用いたウエスタンブロットングによっても、唾液中のhPRB1を検出することができた。血清に関しては、8A10 mAbを使ってプルダウンアッセイを行いhPRB1を検出することができた。

[0067] 5. 唾液中および血清中のPRB1とヒトCKDとの関連

まず、慢性腎臓病（CKD）を含むさまざまな種類の腎疾患、心血管疾患、又は代謝疾患を患う959人の患者の唾液と血清のhPRB1を測定し、LightGBM分類器を使用して、唾液および／または血清hPRB1レベルがCKDを含む以下の疾患を正しく区別できるかどうかを評価した。LightGBM分類器はCKD（糖尿病性腎疾患：DKD）vs CKD以外の疾患（血清hPRB1を使用）、CKDを伴う心房細動（AF）vs CKDを伴わないAF（血清hPRB1を使用）、CKDを伴う冠状動脈疾患（CAD）vs CKDを伴わないCAD（血清hPRB1を使用）、脂質異常症（DLP）を伴う心不全（HF）vs DLPを伴わないHF（唾液hPRB1を使用）、及びCKD vs CKDなし（血清hPRB1を使用）の間でAUC>0.7を示した（図8a）。

[0068] 次に、血清hPRB1レベルと各疾患種のオッズ比を計算するためのロジスティック回帰モデルを構築した。その結果、以下の疾患タイプでオッズ比>2、p値<0.05であった（図8b）：CKD（DKD）vs. CKD以外の疾患、CKD vs. CKD以外の疾患、CKD（高血圧性腎硬化症：HN）vs CKD以外の疾患、DLPを伴うCKD vs DLPを伴わないCKD、CADを伴うCKD vs CADを伴わないCKD、CKD（不明：Unk）vs CKD以外の疾患、高血圧（HTN）を伴うCKD vs HTNを伴わないCKD、AFを伴うCKD vs AFを伴わないCKD、CKD（腎臓血管炎：RV）vs CKD以外の疾患、CKD（慢性糸球体腎炎：CGN）vs CKD以外の疾患。これらの結果は、上記ELISAシステムによって想定された血清hPRB1濃度がCKD関連症状の評価に適していることを示している。

請求の範囲

- [請求項1] 重鎖可変領域が、配列番号 11 の第 21 番目から第 141 番目のアミノ酸配列で表される重鎖可変領域と同一性が 95%以上であるアミノ酸配列を含み、
- 軽鎖可変領域が、配列番号 16 の第 26 番目から第 132 番目のアミノ酸配列で表される軽鎖可変領域と同一性が 95%以上であるアミノ酸配列を含む、
- ヒト PRB1 タンパク質への結合能を有する、抗体、又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項2] 重鎖可変領域が、
- 配列番号 13 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、
- 配列番号 14 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、及び
- 配列番号 15 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3、
- を含み、
- 軽鎖可変領域が、
- 配列番号 18 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、
- 配列番号 19 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、及び
- 配列番号 20 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3、
- を含む、
- 請求項 1 に記載の抗体、又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項3] 配列番号 11 の第 21 番目から第 141 番目のアミノ酸配列で表される重鎖可変領域と同一性が 95%以上であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- [請求項4] 重鎖可変領域が、
- 配列番号 13 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、
- 配列番号 14 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、及

び

配列番号 15 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3、
を含む、請求項 3 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項 5] 請求項 3 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項 6] 請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項 7] 配列番号 11 の第 21 番目から第 141 番目のアミノ酸配列で表される重鎖可変領域と同一性が 95% 以上であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むポリペプチドを発現する細胞。

[請求項 8] 重鎖可変領域が、

配列番号 13 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、

配列番号 14 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、及

び

配列番号 15 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3、
を含む、請求項 7 に記載の細胞。

[請求項 9] 配列番号 16 の第 26 番目から第 132 番目のアミノ酸配列で表される軽鎖可変領域と同一性が 95% 以上であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[請求項 10] 軽鎖可変領域が、

配列番号 18 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、

配列番号 19 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、及

び

配列番号 20 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3、
を含む、請求項 9 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項 11] 請求項 9 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項 12] 請求項 10 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項 13] 配列番号 16 の第 26 番目から第 132 番目のアミノ酸配列で表される軽鎖可変領域と同一性が 95% 以上であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むポリペプチドを発現する細胞。

- [請求項14] 軽鎖可変領域が、
 配列番号18で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、
 配列番号19で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及
 び
 配列番号20で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3、
 を含む、請求項13に記載の細胞。
- [請求項15] 標識物質で標識されている、請求項1に記載の抗体、又はその抗原
 結合フラグメント。
- [請求項16] 請求項1に記載の抗体、又はその抗原結合フラグメントが固定化さ
 れた固相。