

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5675597号
(P5675597)

(45) 発行日 平成27年2月25日 (2015. 2. 25)

(24) 登録日 平成27年1月9日 (2015. 1. 9)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 G

GO 1 N 33/542 (2006. 01)

GO 1 N 33/542 A

GO 1 N 33/543 (2006. 01)

GO 1 N 33/543 5 O 1 A

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

請求項の数 15 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-513012 (P2011-513012)
 (86) (22) 出願日 平成21年6月5日 (2009. 6. 5)
 (65) 公表番号 特表2011-524013 (P2011-524013A)
 (43) 公表日 平成23年8月25日 (2011. 8. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/FI2009/050481
 (87) 国際公開番号 W02009/150295
 (87) 国際公開日 平成21年12月17日 (2009. 12. 17)
 審査請求日 平成24年5月17日 (2012. 5. 17)
 (31) 優先権主張番号 20085579
 (32) 優先日 平成20年6月12日 (2008. 6. 12)
 (33) 優先権主張国 フィンランド (FI)

前置審査

(73) 特許権者 501374390
 テクノロジアン・トゥトキムスケスクス・
 ブイティティ
 フィンランド共和国、エフアイー・O 2 O
 4 4 ブイティティ、プオリミエヘン
 ティエ 3
 (74) 代理人 100108855
 弁理士 蔵田 昌俊
 (74) 代理人 100109830
 弁理士 福原 淑弘
 (74) 代理人 100103034
 弁理士 野河 信久
 (74) 代理人 100075672
 弁理士 峰 隆司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 大麻の使用の検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

テトラヒドロカンナビノール (THC) と配列番号 1 および配列番号 2 のアミノ酸配列を有する抗-THC抗体フラグメントとの免疫複合体を特異的に認識し、かつ、抗体の軽鎖および重鎖の相補性決定領域 (CDRs) を含む抗体フラグメントであって、前記軽鎖の領域が、配列番号 3 のアミノ酸 23-35、51-57、および 93-100 のアミノ酸配列を有し、前記重鎖の領域が、配列番号 4 のアミノ酸 29-35、50-60、および 99-109 のアミノ酸配列を有する抗体フラグメント。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗体フラグメントであって、配列番号 3 のアミノ酸 1-111 および配列番号 4 のアミノ酸 1-120 を含む抗体フラグメント。

10

【請求項 3】

請求項 2 に記載の抗体フラグメントであって、配列番号 3 および配列番号 4 のアミノ酸配列を含む抗体フラグメント。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の抗体フラグメントおよび別の抗体フラグメントを含む、THCを検出するためのテストキットであって、別の抗体フラグメントが配列番号 1 および配列番号 2 のアミノ酸配列を含むテストキット。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のテストキットであって、非競合的均一イムノアッセイのための試薬を

20

含むテストキット。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のテストキットであって、時間分解蛍光共鳴エネルギー移動 (TR-FRET) のための試薬を含むテストキット。

【請求項 7】

請求項 4 ~ 6 の何れか 1 項に記載のテストキットであって、複数の乱用薬物をアッセイするための試薬を含むテストキット。

【請求項 8】

大麻を使用したことについてテストされるヒトから採取した身体サンプルにおいてテトラヒドロカンナビノール (THC) を検出するための、請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の抗体フラグメントと抗-THC抗体フラグメントとの使用であって、前記抗-THC抗体フラグメントが配列番号 1 および配列番号 2 のアミノ酸配列を含む使用。

10

【請求項 9】

身体から採取したサンプルにおいて分析物を検出するためのイムノアッセイ方法であって、分析物に特異的に結合する第一の抗体フラグメントおよび分析物と第一の抗体フラグメントの複合体に特異的に結合する第二の抗体フラグメントを含む試薬ペアと、サンプルを反応させ、前記複合体への第二の抗体フラグメントの結合を決定し、このことが、サンプル中の分析物の存在を示し、

前記分析物がテトラヒドロカンナビノール (THC) であること、前記第一の抗体フラグメントが、配列番号 1 および配列番号 2 のアミノ酸配列を含み、ならびに前記第二の抗体フラグメントが、抗体の軽鎖および重鎖の相補性決定領域 (CDRs) を含み、ここで前記軽鎖の領域が、配列番号 3 のアミノ酸 23-35、51-57、および 93-100 のアミノ酸配列を有し、前記重鎖の領域が、配列番号 4 のアミノ酸 29-35、50-60、および 99-109 のアミノ酸配列を有することを特徴とする、イムノアッセイ方法。

20

【請求項 10】

非競合的均一イムノアッセイ方法である、請求項 9 に記載のイムノアッセイ方法。

【請求項 11】

TR-FRETである、請求項 10 に記載のイムノアッセイ方法。

【請求項 12】

請求項 9 ~ 11 の何れか 1 項に記載のイムノアッセイ方法であって、分析されるサンプルが、血液、尿、および口腔流体からなる群より選択されるイムノアッセイ方法。

30

【請求項 13】

THCが唾液から決定される、請求項 9 に記載のイムノアッセイ方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の抗体フラグメントをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の抗体フラグメントを発現することができる宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

40

【0001】

本発明は、大麻の使用を検出するためのイムノアッセイを向上させるための手段を提供する。とりわけ、本発明は、結合パートナー、とりわけテトラヒドロカンナビノール (THC) と抗-THC-抗体の免疫複合体に結合することができる抗体フラグメントに関する。また本発明は、結合パートナーを含むテストキット、および大麻の使用を検出するための前記結合パートナーの使用に関する。更に、本発明は、前記結合パートナーを使用するイムノアッセイに関する。更に、本発明は、前記結合パートナーをコードするポリヌクレオチド、およびそれを発現することができる宿主細胞に関する。

【発明の技術背景】

【0002】

50

薬物乱用は、とりわけ交通安全に対する重大な脅威であり、このため幾つかのアッセイが、乱用薬物の簡便なテストのために開発されている。テストの多くは、イムノアッセイであり、これらは、ほとんど競合的イムノアッセイであり、これらは、一般に非競合的なものより特異的でない。Kerrigan and Phillipsは、全血および尿において、アヘン剤、メタンフェタミン、ベンゾジアゼピン、コカイン代謝産物、フェンシクリジンおよびカンナビノイドについて、たとえば、12の商業的に入手可能なELISAs（酵素結合イムノソルベントアッセイ）を比較した（Kerrigan S., & Phillips, W., 2001 *Clinical Chemistry* 47(3):540-547）。テスト形式は、競合的イムノアッセイであり、結果は、完全に満足のものではなく、幾つかの偽の結果および望ましくない交差反応性を得た。

【0003】

10

乱用薬物は、血液や尿からだけでなく、唾液からアッセイされてもよく、これは、道端テストのための選り抜きのテストマトリクスである。Lo Muzio et al.は、尿中の薬物を検出するための市販の迅速な免疫学的スクリーニングテストをテストし、二つの生物学的マトリクス：非慣用的なものである唾液と従来型のものである尿を比較した。彼らは、唾液の検体が、大麻、THC、ベンゾジアゼピン、および三環系抗うつ薬について免疫学的テストで陰性であるが、ガスクロマトグラフ質量分析（GC-MS）により、その低濃度が明らかにされることを見出し、テストキットは、唾液で使用前に改良されなければならないと結論づけた（Lo Muzio L., et al., 2005, *Int J Immunopathol Pharmacol.* 18(3):567-573）。

【0004】

20

WO 2004/046733は、小さな分析物、たとえば乱用薬物をアッセイするための非競合的イムノアッセイを開示する。このアッセイは、分析物に特異的な第一の抗体、および第一の抗体と分析物の免疫複合体（IC）に特異的な第二の抗体を使用して、アッセイの感度および特異性を改良する。使用される抗-IC抗体は、ナイーブなヒト抗体フラグメントファージディスプレイライブラリーから出発して、ディスプレイファージを第一の抗体と結合させてプレインキュベートして、それ自体で第一の抗体に結合しているものを選別し、その後、未結合のファージを分離し、分析物および固定した第一の抗体の混合物とインキュベートして、抗体それ自体に結合しないが、固定された第一の抗体と分析物との間で形成された免疫複合体に結合するファージを選択することにより得た。唾液中のモルヒネの決定について非常に優れた結果が得られた。

【0005】

30

$\Delta 9$ -テトラヒドロカンナビノール（ $\Delta 9$ -THC）は、大麻の親（parental）薬物であり、尿で測定され得る11-nor- $\Delta 9$ -THC-COOHまたは11-OH- $\Delta 9$ -THCへ迅速に代謝される。よって、大麻の使用は、好ましくは、唾液中の $\Delta 9$ -THCをアッセイすることにより検出され、これは、代謝産物が尿で検出されるときよりも、最近の使用をうまく表している。しかし、この分析物のためのクイックテストを開発することは難しいことが分かり、市販のテストキットの感度は十分でない。

【0006】

US 6,326,159およびUllman et al., 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci* 90:1184-1189は、一次抗体の親和性および特異性を向上させるために抗-IC-抗体を使用したイムノアッセイを記載する。これらの文書において、分析物と結合した一次抗-分析物抗体に結合するが、一次抗体や分析物のみに結合しない二次抗-IC抗体が開発された。テトラヒドロカンナビノール（THC）に対する抗体の免疫複合体を認識する抗体が開示される。抗-IC抗体は、親和性標識抗-THC抗体を免疫原として用いて、 $\Delta 9$ THCの存在により結合が増大する抗-IC抗体を選択して取得した。たとえばTHC-代謝産物との交差反応性が観察され、これは法医学の薬物分析において望ましくない。抗体は、慣用的なハイブリドーマ技術により調製され、これにより、抗体は均一（homogenous）イムノアッセイで適用するためには非常に大きいものになる。

【0007】

40

Kintz P. et al.は、唾液で薬物をテストするための市販の薬物デバイスをテストし、

50

その結果をGC-MC分析結果と比較したところ、テストデバイスは、THCに晒された運転手一人のみを同定するが、GC-MSでは18人の運転手が陽性とテストされることを見出した。彼らは、道端テストのためにこの試料を使用することの現在の限界は、親化合物（THC）を十分に低い濃度で検出する適切なイムノアッセイが存在しないことであると結論づけた（Kintz P., et al., 2005. J Anal Toxicol. 29(7):724-727）。

【0008】

大麻の使用を決定するための現在のイムノアッセイは、とりわけ低い特異性および感度のため満足のいくものではない。よって、簡単、迅速、かつ信頼性のある大麻使用の薬物テストであって、たとえば道端テストのため、好ましくは経口流体サンプルを分析するために使用することができ、非侵襲的で、実施しやすく、接近した監視の下で行われ得るものに対するニーズがなお存在している。本発明は、これらのニーズの少なくとも一部を満足する。

10

【発明の概要】

【0009】

本発明は、大麻の使用の迅速かつ信頼性のある検出を促進する新規な試薬を提供する。試薬は、カンナビノイドと抗-カンナビノイドとの間で形成される免疫複合体を特異的に認識することができるタンパク質である。より具体的には、本発明は、抗体の軽鎖および重鎖の相補性決定領域（CDRs）を含む結合パートナーであって、前記軽鎖の領域が、配列番号3のアミノ酸23-35、51-57、および93-100のアミノ酸配列を有し、前記重鎖の領域が、配列番号4のアミノ酸29-35、50-60、および99-109のアミノ酸配列を有する結合パートナーを提供する。

20

【0010】

更に本発明は、結合パートナーを含むテストキット、および大麻を使用したことについてテストされるヒトから採取した身体サンプルにおいてカンナビノイドを検出するための結合パートナーの使用を提供する。高い特異性と感度、および好ましくは小さいサイズのため、結合パートナーは、大麻の使用について疑わしい運転手の唾液をテストするために道端で使用され得る非競合的均一（homogenous）イムノアッセイに特に適している。

【0011】

更に本発明は、身体から採取したサンプルにおいて分析物を検出するためのイムノアッセイであって、分析物に特異的に結合する第一の結合パートナーおよび分析物と第一の結合パートナーの複合体に特異的に結合する第二の結合パートナーを含む試薬ペアと、サンプルを反応させ、前記複合体への第二の結合パートナーの結合を決定し、このことが、サンプル中の分析物の存在を示し、前記分析物がカンナビノイドであり、前記第二の結合パートナーが、抗体の軽鎖および重鎖の相補性決定領域（CDRs）を含み、ここで前記軽鎖の領域が、配列番号3のアミノ酸23-35、51-57、および93-100のアミノ酸配列を有し、前記重鎖の領域が、配列番号4のアミノ酸29-35、50-60、および99-109のアミノ酸配列を有する、イムノアッセイを提供する。

30

【0012】

更に本発明は、結合パートナーをコードするポリヌクレオチド、および結合パートナーを発現することができる宿主細胞を提供する。ポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAである。

40

【0013】

本発明の有利な態様は、従属請求項に記載される。

【0014】

本発明の他の目的、詳細および利点は、以下の図面、詳細な説明および実施例から明らかになるでしょう。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、抗-THC T3 Fab軽鎖（配列番号1）および抗-THC T3 Fab VH-CH1重鎖（配列番号2）のアミノ酸配列を示す。前記免疫グロブリン鎖の各々の3つの相補性決定領

50

域CDR1、CDR2およびCDR3を示す。

【図2】図2は、抗-T3+THC免疫複合体Fab 104軽鎖（配列番号3）および抗-T3+THC免疫複合体Fab 104重鎖（配列番号4）のアミノ酸配列を示す。前記免疫グロブリン鎖の各々の3つの相補性決定領域CDR1、CDR2およびCDR3を示す。

【図3】図3は、種々の薬物および薬物代謝産物に対して、抗-THC T3 Fabおよび抗-T3+THC免疫複合体Fab 104を併用して得られたTHC TR-FRETテスト結果を示す。

【詳細な説明】

【0016】

カンナビノイドは、植物のインド大麻（*Cannabis sativa*）で見られるテルペンフェノール分子の一般名称である。より一般的には、テトラヒドロカンナビノール（THC）に構造的に関連し、カンナビノイドレセプターに結合する一群の分子を包含する。THCは、大麻の主要な向精神性カンナビノイドであり、 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール（ Δ^9 -THC）およびD9-テトラヒドロカンナビノール（D9-THC）と同義語であり、これら全ては、本明細書において交換可能に使用され得る。THCは、体内でとりわけ11-nor-D9-THC-COOHおよび11-OH-D9-THCに代謝され、これらは、他のカンナビノイドの例である。本発明の結合パートナーは、THCと抗-THCの免疫複合体を特異的に認識し、それにより、その代謝産物との反応は有意に低い。

【0017】

本発明の結合パートナーは、サンプル中のTHCを検出するためのサンドイッチアッセイで 사용할 ことができ、それにより、THCに特異的に結合する第一の結合パートナー、およびTHCと抗-THCの免疫複合体を特異的に認識することができる本発明の結合パートナーである第二の結合パートナーを含む試薬ペアとサンプルを反応させる。第一の結合パートナーとTHCの免疫複合体への第二の結合パートナーの結合は、サンプル中にTHCが存在することを示す。

【0018】

本明細書で使用される「結合パートナー」は、通常、タンパク質またはポリペプチド、たとえば所望の結合特性を有する抗体フラグメントを含む抗体である。抗体は、免疫グロブリン分子であり、クラスIgG、IgM、IgE、IgAまたはIgDの何れかに属することができ；IgGおよびIgMが最も頻繁に使用される。好ましくは、結合パートナーは、リガンド結合部位、たとえばFabを含む抗体フラグメント、またはscFvフラグメントである。Fabフラグメント（フラグメント抗原結合）として公知のフラグメントは、免疫グロブリン重鎖の可変および第一定常ドメインにジスルフィド架橋により共有結合した免疫グロブリン軽鎖の可変および定常ドメインからなる。Fv（可変ドメイン）は、リガンド結合を担う免疫グロブリン分子の可変領域を意味する。ScFv（単鎖Fv）は、抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメインが、ペプチドにより連結して、単一のmRNA分子から合成されるポリペプチド単鎖を形成している分子を意味する。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域は、一緒にリガンド結合を担う。リガンドは、結合パートナーが結合する物質であり、抗体と関連して抗原またはハプテンである。

【0019】

結合パートナーは、簡便には、たとえばWO 2004/046733に記載されるとおり、組換えファージディスプレイ結合パートナーライブラリーを用いて調製される。第一の結合パートナーが選択されたら、それをリガンドと複合体を形成させ、この複合体が、組換えライブラリーから第二の結合パートナーを選択するために使用される。リガンドなしの第一の結合パートナーは、逆選択（contraselection）として使用される。第二の結合パートナーは、複合体のみを認識し、遊離の第一の結合パートナーも遊離の抗原も有意な程度で認識すべきでない。

【0020】

ファージディスプレイ抗体ライブラリーは、免疫グロブリンドメインをコードするcDNAを適切なファージディスプレイベクターにクローニングすることにより構築することができる。抗体フラグメントの無数の変異体をコードするDNAは、ファージコートタンパク質

10

20

30

40

50

の一部としてベクターにバッチクローニングされる。様々な特異性を備えた無数の抗体フラグメントを含有する大きなライブラリーは、細菌でベクターを形質転換することにより得ることができる。細菌の培養は、抗体フラグメントをその表面にディスプレイするファージの発現につながる。ディスプレイされた抗体の遺伝子は、ファージゲノムにおいて運ばれ、これにより遺伝子型と表現型をリンクさせる。ディスプレイされたタンパク質とそのDNAとの物理的なつながりが、タンパク質の膨大な数の変異体のスクリーニングを可能にし、パンニング (panning) と呼ばれる単純なインビトロ選択手順により、それぞれを対応のDNAにリンクさせる。最も単純な形態において、パンニングは、ファージディスプレイ (phage-displayed) 変異体のプールを、担体に固定された対象のリガンドとインキュベートし、未結合のファージを洗い流し、特異的に結合したファージを、リガンドとの結合を破壊することにより溶出することにより行われる。溶出されたファージは、その後、インビボで増幅される。そのプロセスは、数回繰り返され、これにより、最も強固な結合の配列を選ぶようにファージプールの段階的な濃縮 (enrichment) に至る。約 3 ~ 6 ラウンドの選択および増幅の後、ベストなクローンを、配列決定し、更なる発現のために宿主細胞に形質転換する。宿主細胞は、真核または原核細胞、たとえば酵母、動物、植物または昆虫細胞または細菌細胞とすることができる。それは、形質転換後に組換えモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞であってもよい。組換え結合パートナーまたは少なくともその一部は、合成により作製してもよい。

【 0 0 2 1 】

カンナビノイドを認識する第一の結合パートナー、およびカンナビノイドと前記第一の結合パートナーの免疫複合体を認識する第二の結合パートナーを含む試薬ペアは、カンナビノイドの非競合的サンドイッチアッセイを実行可能にする。サンドイッチは、標準的なイムノアッセイの全てにより検出することができる。一方のパートナーは、担体、たとえばマイクロタイターウェルまたはビーズに固定してもよい。サンドイッチは、分析物およびもう一方の結合パートナーの存在下で形成される。サンドイッチは、二次抗体を使用することにより、または結合パートナーの少なくとも一方を標識することにより検出してもよい。標識は、任意の慣用的な標識、たとえば放射性標識、酵素、または蛍光化合物とすることができる。アッセイは、たとえばELISAまたはFIAとすることができる。

【 0 0 2 2 】

本発明の結合パートナーを含む試薬ペアの大きな利点は、均一 (homogenous) イムノアッセイ、すなわち溶液中で行われるイムノアッセイを可能にすることである。固定および洗浄の工程をなくすことにより、アッセイは非常に単純になる。均一アッセイは、たとえば運転手に警察の手入れを行う際に警察により使用される、オンサイド (on-side) テストのための優れた簡便なツールを提供する。本発明により提供されるイムノアッセイは、現在市販されている競合的アッセイよりも最大10倍感度が高い。分析されるサンプルは、任意の体液サンプル、たとえば血液、血清または尿とすることができるが、好ましくは唾液などの口腔流体である。分析物は、好ましくはTHCである。

【 0 0 2 3 】

好ましい均一イムノアッセイは、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づくものであり、Szollosi J. et al., 1998, Communications in Clinical Cytometry, 34:159-179を参照されたい。FRETにおいて、分子蛍光体 (ドナー) からのエネルギーは、高エネルギー状態に励起され、分子間双極子 - 双極子結合を介して、別の蛍光体 (アクセプター) に移動する。これは、ドナーとアクセプターとの距離が短く (10-100 Å)、ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルが部分的に重複する場合にのみ可能である。エネルギー移動は、その後、蛍光の変化として検出される。しばしば、時間分解蛍光が利用される (Hemmila I. et al., 1988, Clin. Chem. 34:2320-2322)。

【 0 0 2 4 】

FRETは、FRETドナーとアクセプターのペアを形成する蛍光体を備えた二つの結合パートナー、好ましくは抗体フラグメントを標識することにより、本発明に適用することができる。結合パートナーおよび分析物が小さい場合、蛍光体は、非常に密接に近接するように

なり、測定可能なFRETシグナルが得られる。

【0025】

あるいは、大麻の使用のためのイムノアッセイは、たとえば、マイクロタイターウェルでの慣用的なサンドイッチテストまたはラテラルフローテストとすることができる。

【0026】

本発明の結合パートナーは、テストキットに含めることができ、これは、使用説明書と一緒にアッセイのために必要な任意の他の試薬を更に含有してもよい。好ましくは、テストキットは、分析物を結合するための第一の結合パートナーを更に含有する。より好ましくは、前記結合パートナーは、抗体軽鎖および重鎖の相補性決定領域(CDRs)を含み、前記軽鎖の領域が、配列番号1のアミノ酸24-35、51-57、および90-98のアミノ酸配列を有し、前記重鎖の領域が、配列番号2のアミノ酸27-36、51-66、および99-107のアミノ酸配列を有する。好ましくは、テストキットは、非競合的均一アッセイを実施するための試薬、たとえばTR-FRETテストに必要な試薬を含む。キットは、反応溶液、緩衝液、洗浄溶液および検出手段、たとえば標識および任意にフルオロメーターを更に含んでいてもよい。

10

【0027】

テストの実施は、試薬がマイクロタイタープレートのウェル内にあり、サンプルの希釈シリーズが添加されるように行われ得る。たとえば警察現場の使用にとって好ましい様式において、試薬は乾燥形態で容器内に存在する。唾液が添加され、これが試薬を溶解し、更なる処理をすることなく結果を読み取ることができる。

20

【0028】

好ましくは、テストキットは、複数の乱用薬物をアッセイするための試薬、たとえばモルヒネ、コデイン、ヘロイン、アンフェタミン、メタンフェタミン、コカイン、バルビツレートおよびベンゾジアゼピンをアッセイするための試薬を含む。この場合、テストキットは、複数の試薬ペアを互いに物理的に分離して、たとえばマイクロアレイの形態で含んでいてもよく、これにより複数の薬物は、単一の唾液サンプルから同時にテストすることができる。

【0029】

本発明の結合パートナーは、配列番号3の配列を有する抗体軽鎖の3つのCDRsおよび配列番号4の配列を有する抗体重鎖の3つのCDRsを含む。本発明の一つの態様によれば、結合パートナーは、可変領域全体、すなわち前記軽鎖(VL)および重鎖(VH)のリガンド結合部分を含む。このため、これは、配列番号3のアミノ酸1-111および配列番号4のアミノ酸1-120を含有してもよい。とりわけ、前記結合パートナーは、配列番号3および4のアミノ酸配列を含む。これに相当するように、第一の結合パートナーは、配列番号1および配列番号2の可変領域、すなわち配列番号1のアミノ酸1-108および配列番号2のアミノ酸1-118を含んでいてもよい。特に、これは、配列番号1および2のアミノ酸配列を含む。説明および特許請求の範囲に記載される配列またはサブ配列の何れか一つのマイナーな変異または改変は、タンパク質の結合活性に影響を及ぼさないという条件で、本発明の範囲内である。かかる変異および改変は、とりわけ保存的アミノ酸置換を含む。

30

【0030】

本発明は、以下の非限定的な例により例証される。

40

【0031】

例1

抗-THC Fabの開発

マウスは、フロイントアジュバントにおいて、THC結合BSA(Fitzgerald)で免疫処置し、2回目のブースター後に血清サンプルをテストし、直接ELISAにおいて抗原に対してベストな応答を示すマウスを、抗体ファージディスプレイライブラリーの供給源となるように選択した。WO 2004/046733に記載されるとおり、抗体フラグメントファージディスプレイライブラリーを構築し、THC-特異的ファージを濃縮し(enrich)、個々のクローンのFab遺伝子フラグメントを単離し、発現させて特徴付けをした。抗-THC T3 Fabを、更なるア

50

ッセイのために選択した。

【0032】

抗-THC T3 Fab軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号1として記載され、抗-THC T3 Fab VH-CH1鎖は、配列番号2として記載される。Fab軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3は、配列番号1のアミノ酸24-35、51-57および90-98に相当する。Fab重鎖のCDR1、CDR2およびCDR3は、配列番号2のアミノ酸27-36、51-66および99-107に相当する。配列番号1のアミノ酸no 1-108は、軽鎖の可変領域を表し、配列番号2のアミノ酸no 1-118は、重鎖の可変領域を表す。配列番号1のアミノ酸no 109-215は、マウスのカッパ軽鎖の定常領域を表し、配列番号2のアミノ酸no 119-221は、マウスの重鎖の定常CH₁領域を表す。抗-THC T3 Fabのアミノ酸配列は、図1にも示される。

10

【0033】

例2

抗-THC FabとTHCの免疫複合体に対する抗-免疫複合体抗体の開発

ナイーブなヒトscFvファージディスプレイライブラリーからの免疫複合体特異的抗体の選択

T3 FabフラグメントをImmunoPure Sulfo-NHS-LC-Biotin Kit (Pierce) を用いてビオチン化した。ビオチン化抗体を精製し、緩衝液をEcono-Pac 10DG Columns (Bio-Rad, CA, USA) を用いてPBSに変更した。BSA/PBS中の200 μ lのナイーブなヒトscFvファージディスプレイライブラリー (カッパまたはラムダ軽鎖) を、10 μ lのストレプトアビジンコート磁気ビーズ (DynaI, M-280) および0.5 μ gのビオチン化T3 Fabと、+4 で一晩かけてプレインキュベートした。ナイーブなヒトscFvファージディスプレイライブラリーは、50人の健康な個体のプールリンパ球から構築した。ライブラリーのサイズは、 1×10^8 クローンであると推定された。ナイーブなヒトscFvファージディスプレイライブラリーは、カッパまたはラムダ特異的V_L-遺伝子の何れかと結合したIgM特異的V_H-遺伝子を含む。未結合のファージは、ビーズから分離し、それらの100 μ lを、100 ngのTHC、500 ngのビオチン化T3 Fab、および5 μ lのストレプトアビジンコート磁気ビーズと、シェーカーでRTで1時間インキュベートした。選択手順のためのバックグラウンドは、結合反応からTHCを除去したことを除いて同様の方法で実施した。磁気ビーズは、0.5 mlのPBSで5回洗浄し、結合したファージを100 μ lのHCl (pH 2.2) で30分間溶出した。溶出されたファージを1M Trisで中和し、E. coli XL1-Blue細胞を感染させた。細胞を増殖させ、ファージを、WO 2004/046733に記載されるとおり精製した。溶出したファージを、バックグラウンドコントロールウェルから溶出したファージの量と比較した場合、3回のパンニングラウンドの後、濃縮 (enrichment) が観察された。また、T3 FabとTHCにより形成された免疫複合体に特異的なバインダーの濃縮 (enrichment) は、選択ラウンドから溶出したファージプールをテストした場合、および個々のscFvファージクローンを分析することにより、ファージELISAで明らかに観察された。

20

30

【0034】

個々のクローンの特徴付け

T3+THC複合体に特異的に結合する個々のscFvファージクローンを採取し、配列決定し、発現させてテストした。クローン104は、更なる調査のために選択した。scFvは、発現と精製の間に凝集する傾向があるため、免疫複合体特定のクローン104は、ヒトのラムダ軽鎖の遺伝子領域およびIgG1 CH1定常領域をそれぞれV_LおよびV_H遺伝子にクローニングすることにより、Fabフラグメントに変換した。6つのヒスチジン残基を含むC-末端タグを、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) 精製のために、CH1のC-末端に挿入した。104 Fabフラグメントを、発現ベクターpKKtacにクローニングし、配列を確認した。抗-T3+THC免疫複合体Fab 104軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号3として記載され、Fab VH-CH1-6His-タグ領域のアミノ酸配列は、配列番号4として記載される。配列番号3のアミノ酸no 1-111は、軽鎖の可変領域を表し、配列番号4のアミノ酸no 1-120は、重鎖の可変領域を表す。配列番号3のアミノ酸no 112-216は、ヒトのラムダ軽鎖の定常領域を表し、配列番号4のアミノ酸no 121-223は、ヒトの重鎖CH₁領域の定常領域を表す。重

40

50

鎖の定常領域のC-末端にある6つのヒスチジン残基は、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)によるFabフラグメントの精製を促進する。

【0035】

104 Fabの発現および精製

104 Fabフラグメントの発現ベクターを、E. coli生産株RV308に形質転換した。細胞を、100 µg/mlアンピシリンおよび2%グルコースを含む25 mlのTB培地(酵母抽出物12 g/l、大豆ペプトン24 g/l、KH₂PO₄ 2.31 g/l、K₂HPO₄ 12.54 g/l、グリセロール 5 g/l、pH 7.1)に接種し、シェーカーで+37 °で一晩インキュベートした。一晩の培養の後、6 mlの接種物を、100 µg/mlのアンピシリンを含む300 mlのTBを含有する2つのエルレンマイヤーボトルに添加した。細胞は、OD₆₀₀が4になるまでシェーカーで+37 °でインキュベートし、その後、0.3 mlの1M IPTGおよび100 µg/mlのアンピシリンを培養物に添加し、インキュベーションをシェーカーで+30 °で一晩継続した。培地の上清を、104 Fabフラグメントの精製のために使用した。細胞を4 °で20分間4000 gで遠心分離し、上清をきれいなフラスコに注いだ。上清を、残りの染色体DNAを除去するために2 mg/mlのDNaseIで+37 °で1時間処理した。発現したFab 104は、そのC-末端に6xHis-タグを有しているため、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)により精製することができた。Fab 104は、Ni²⁺ Chelating Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech)により精製した。Fab 104の純度は、SDS-PAGEで確認した。

10

【0036】

例3

20

THCのための均一(homogenous)時間分解蛍光共鳴エネルギー移動(TR-FRET)イムノアッセイ

抗-THC FabフラグメントT3は、LANCIE Eu-W1024 ITC chelate Kit (Wallac)によりユーロピウムで標識した。標識T3の緩衝液は、50 mM Tris、pH 7.8、0.9% NaClに変更した。抗-T3 + THC 免疫複合体Fabフラグメント104は、Alexa Fluor Protein Labeling kit (Molecular Probes, Inc.)によりAlexa Fluor 647で標識した。

【0037】

1 µgのEu標識の抗-THC T3 Fabおよび1.5 µgのAlexa Fluor 647標識の抗-免疫複合体Fab 104を、マイクロタイターウェルに60 µlの唾液中で添加した。0、3.75、7.5、15、30、60および120 ng/mlの下記の薬物：D9-THC、11-OH-D9-THC、11-nor-D9-THC-COOH、ヘロインおよびアンフェタミンを混ぜた40 µl唾液サンプルを、ウェルに添加した。短時間の混合後、時間分解蛍光共鳴エネルギー移動(TR-FRET)を、Victor Vフルオロメーター(Perkin Elmer Wallac)により測定した。その結果を図3に示す。

30

【0038】

THCを混ぜた唾液サンプルは、高い蛍光値を示すが、THC代謝産物は、有意に低い蛍光値を示し、ヘロインおよびモルヒネは、コントロール(薬物を添加されていない標識T3および104フラグメント)から検出されるバックグラウンド蛍光に近い蛍光値を示した。Fab 104は、非常に高い特異性および感度で、T3とTHCの間で形成された免疫複合体に結合する。このテストは、現在市販されているクイックテストのカットオフレベル(唾液中20 ng/ml)をはるかに下回ってTHCを検出することが可能である。

40

【0039】

本発明の試薬およびアッセイを提供するための一つのストラテジーが説明されたが、多くの変形および改変が当業者に明らかになるでしょう。

THC-TR-FRET の交差反応性

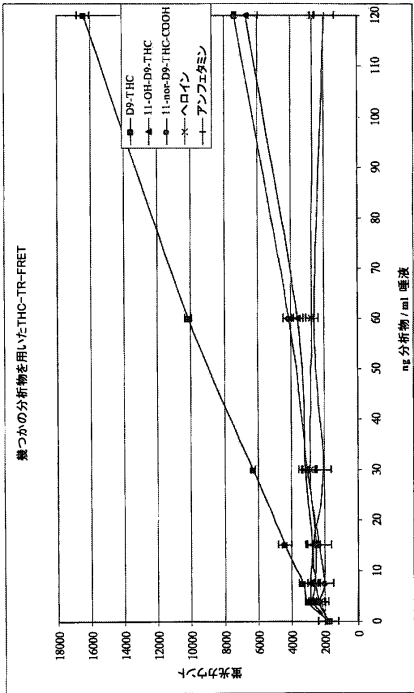


Fig. 3

図 1

抗-THC T3 Fab

抗-THC T3 Fab 軽鎖
DIVLTQSPPTMAASPGKITTCSASSSSSNYLHWYQKPG
FSPKLLVRTSNLASGVPAFSGSGSTSYSLTIGT
MEAEDVATYYCQGSISPLTFGAGTKLEKRAADAAPTYSI
FPPSSQQLTSGGASVYGFLLNFPKDKINAKWKIDGSEKQ
GVLSNWTQDSKDSSTYSMSSTLTLTDEYERHNSYTC
HKTSTSPVSKFNRNEC

抗-THC T3 Fab 重鎖
AEVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFNMYWV
WLRQTPEKLEWVWASISRGSGSTYYPSVKGRF
TISRDNARNILNQMSLSRSEDATAMYYCVRGTTINAG
DQWAGATTVTSSAKTTPSPYPLAPGSAACITN
SMVTLGCLVKGYFPEPTVTWNSGSLSSGVHTFPV
LQSDLYTLSSSVTPSPSPWSPSETVTCTNVAHPASS
TKVDKKVPRDCC

CDR1
CDR2
CDR3

Fig. 1

図 2

抗-T3+THC免疫
複合体 Fab 104

Fab 104 軽鎖:
NFMLTQPHSVSESFGKVTYISCTSGSGSIASNY
VQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPFGVPRFS
GSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSDSS
NQVFGGKTLTVLGQPKAAPSFTLPPSSSEL
QANKATLVCLISDFYFGAVTAVKADSSPVKA
GVETTTPSQSNINKYAASSYLSLTPEQWKSHK
SYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS

Fab 104 Fab VH-CH1-6His-Tag
QVQLVQSGTEVKKPGATVKISCKFSFGSDNFIIDYIMHWV
KQAGKGLEWLGVLVDLGDGGDTYAEKFKHGRGTTADS
SRDTAYMELSSLRSEDATVYCAAAKAYRQGVMDW
GGDTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPTVTWNSGALTSGVHTFPVLOSSGLYSLS
SVITVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKAEPKSH
HHHH

CDR1
CDR2
CDR3

Fig. 2

【配列表】

0005675597000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1
C 0 7 K	16/42 (2006.01)	C 0 7 K	16/42
C 0 7 K	16/16 (2006.01)	C 0 7 K	16/16

(74)代理人 100140176

弁理士 砂川 克

(72)発明者 タッキネン、クリスティーナ

フィンランド国、エフアイ - 0 2 2 0 0 エスボー、ハルティランティエ 1 2 アス 1

(72)発明者 セデルlund、ハンス

フィンランド国、エフアイ - 0 2 9 4 0 エスボー、サロンキティエ 1 9

(72)発明者 プッリ、ティモ

フィンランド国、エフアイ - 0 0 6 5 0 ヘルシンキ、ピックコスケンティエ 2 1 エー

審査官 吉岡 沙織

(56)参考文献 特表 2 0 0 6 - 5 0 6 6 3 4 (J P , A)

特開昭 6 3 - 1 1 2 5 9 9 (J P , A)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 9 9 3 年, Vol.90, No.4, p.1184-1189

Niemi M et al., X-ray analysis of the anti-THC Fab fragment T3, Annual Report 2007, 2
0 0 7 年, [平成 2 6 年 1 1 月 1 4 日検索]、インターネット<URL : http://hasyweb.desy.de/science/annual_reports/2007_report/part2/contrib/72/21410.pdf>

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8 , 1 5 / 0 0 - 1 5 / 0 9

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

专利名称(译)	检测大麻的使用情况		
公开(公告)号	JP5675597B2	公开(公告)日	2015-02-25
申请号	JP2011513012	申请日	2009-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	技术安妮政党成员金规模磁盘浮标茶		
申请(专利权)人(译)	技术安妮政党成员金规模磁盘浮标茶		
当前申请(专利权)人(译)	技术安妮政党成员金规模扫描箱Buititi		
[标]发明人	タツキネンクリスティーナ セデルルドハンス プッリティモ		
发明人	タツキネン、クリスティーナ セデルルド、ハンス プッリ、ティモ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/542 G01N33/543 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/42 C07K16/16		
CPC分类号	C07K16/16 C07K2317/21 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/622 G01N33/948		
FI分类号	G01N33/53.G G01N33/542.A G01N33/543.501.A C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K16/42 C07K16/16		
优先权	2008005579 2008-06-12 FI		
其他公开文献	JP2011524013A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了特异性识别结合配偶体的抗原 - 抗体免疫复合物的抗体片段，特别是抗THC和THC（四氢大麻酚）。结合配偶体促进非竞争性同源免疫测定以检测大麻的使用。还描述了含有结合配偶体的测试试剂盒。优选地，将免疫测定应用于从可疑驾驶员获得的唾液路边测试。

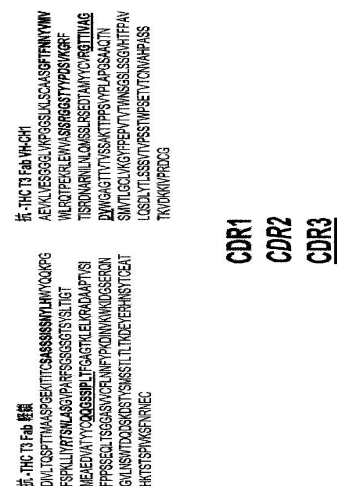


Fig. 1