

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02009/044650

発行日 平成23年2月3日(2011.2.3)

(43) 国際公開日 平成21年4月9日(2009.4.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 14/00 (2006.01)	CO7K 14/00 ZNA	4HO45
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 N	
GO1N 33/532 (2006.01)	GO1N 33/532 A	
CO7K 14/31 (2006.01)	CO7K 14/31	
CO7K 14/47 (2006.01)	CO7K 14/47	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

出願番号	特願2009-536020 (P2009-536020)	(71) 出願人	000000941 株式会社カネカ 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2008/067171	(74) 代理人	110000338 特許業務法人原謙三国際特許事務所
(22) 国際出願日	平成20年9月24日(2008.9.24)	(72) 発明者	佐藤 伸彦 日本国大阪府摂津市鳥飼西5-1-1 株式会社カネカ内
(31) 優先権主張番号	特願2007-262110 (P2007-262110)	(72) 発明者	大原 一将 日本国大阪府摂津市鳥飼西5-1-1 株式会社カネカ内
(32) 優先日	平成19年10月5日(2007.10.5)	(72) 発明者	荻野 英司 日本国大阪府摂津市鳥飼西5-1-1 株式会社カネカ内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有する、標識されたペプチド、および上記ペプチドを用いた免疫グロブリンの検出方法または測定方法

(57) 【要約】

動物種によらず同一条件で安価かつ簡便に免疫グロブリンを検出または測定することを可能とする化合物、またはそれを用いた免疫グロブリンの検出方法または測定方法を提供する。

標識剤を含む免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有するペプチドを用いることにより、動物種によらず同一条件で安価かつ簡便に免疫グロブリンの検出または測定を行うことができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

標識剤が結合しているペプチド又は標識剤を含むペプチドであって、免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有することを特徴とするペプチド。

【請求項 2】

上記免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有するペプチドは、プロテイン A の部分ペプチド、プロテイン G の部分ペプチド、プロテイン H の部分ペプチド、プロテイン M の部分ペプチド、リウマチ因子の部分ペプチド、および補体の部分ペプチドからなる群から選択される、少なくとも 1 種のペプチドであることを特徴とする、請求項 1 に記載のペプチド。

10

【請求項 3】

上記プロテイン A の部分ペプチド、プロテイン G の部分ペプチド、プロテイン H の部分ペプチド、プロテイン M の部分ペプチド、リウマチ因子の部分ペプチド、および補体の部分ペプチドは、それぞれ、プロテイン A、プロテイン G、プロテイン H、プロテイン M、リウマチ因子および補体の部分ペプチドの改変体を含むことを特徴とする、請求項 2 に記載のペプチド。

【請求項 4】

上記免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有するペプチドは、プロテイン G の部分ペプチドまたは当該部分ペプチドの改変体であることを特徴とする、請求項 1 に記載のペプチド。

20

【請求項 5】

上記標識剤は、放射性物質、酵素、補酵素、発光性物質、蛍光物質、および蛍光性蛋白からなる群から選択される、少なくとも 1 種の標識剤であることを特徴とする、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 6】

上記標識剤は、³⁵S 放射性標識メチオニン、HRP、アルカリフォスファターゼ、ビオチン、アクリジニウム誘導体、フルオレセイン、および GFP からなる群から選択される、少なくとも 1 種の標識剤であることを特徴とする、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

30

【請求項 7】

上記標識剤と上記ペプチドとの結合は、共有結合であることを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のペプチドを用いた免疫グロブリンの検出方法または測定方法。

【請求項 9】

上記ペプチドを用いた免疫グロブリンの検出方法または測定方法は、

(a) 固相に免疫グロブリンを含む溶液を接触させることにより、免疫グロブリンを固相上に直接的または間接的に結合または吸着させる工程と、

(b) 固相上に直接的または間接的に結合または吸着した免疫グロブリンに請求項 1 から 7 に記載のペプチドを接触させることにより、当該固相上に結合または吸着した免疫グロブリンと当該ペプチドとを結合させる工程と、

(c) 当該固相上に結合または吸着した免疫グロブリンに結合した当該ペプチドの量を測定する工程と、

を含むこと特徴とする、請求項 8 に記載の免疫グロブリンの検出方法または測定方法。

40

【請求項 10】

免疫グロブリンと接触させる固相に、予め免疫グロブリンと結合する抗原が固定化されていることを特徴とする請求項 9 に記載の検出方法または測定方法。

【請求項 11】

請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のペプチドを用いることを特徴とする、免疫グロ

50

ブリンの検出キットまたは測定キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は動物種に関わらず同一条件のもとで安価かつ簡便に試料中の免疫グロブリンを検出または測定することを可能とするペプチドを提供すること、または上記ペプチドを用いた免疫グロブリンの検出方法または測定方法、並びに上記ペプチドを用いた免疫グロブリンの検出キットまたは測定キットに関する。

【背景技術】

【0002】

21世紀に突入し、ヒトゲノム解読の終了が告げられた。これを受けて、免疫グロブリン型医薬（抗体医薬）をはじめ多種多様の医薬品の開発が盛んに行われるようになってきている。現在開発されている免疫グロブリン型医薬のほとんどは免疫グロブリンGに属するIgG型抗体である。IgG型抗体は特異的に抗原を認識する可変部位のFab領域と定常部位のFc領域で構成されている。免疫グロブリン型医薬はIgG型抗体における可変部位の多様性を利用し、ある物質にのみ特異的に結合することにより生理活性を阻害したり、逆に活性を上げたりすることを可能としている。そのため副作用も少ない。

【0003】

免疫グロブリン型医薬の開発においてはまず始めに、抗原に対するスクリーニングなどの利便性の観点から、Fab領域とFc領域のすべてがマウスやラットなどヒト以外の動物に由来する免疫グロブリンからスタートする。しかしながら、免疫グロブリンを構成するすべての部位がヒト以外の動物種に由来する完全異種動物化免疫グロブリンである場合、ヒトへの投与の際に異物とみなされ、それに対する免疫グロブリンが産生されるなど、主に安全性の側面で大きな問題が生じることがある。そこで次に、抗原を認識するFab領域は異種動物由来のまま、定常部位のFc領域はヒト由来に改変した、いわゆるキメラ型免疫グロブリンへ変換させる。それでも尚、安全性に対する問題を払拭することができない場合は、抗原を認識するFab領域の中でも抗原を認識するより狭い領域、つまり相補性決定領域のみ異種動物由来とし、他のFab領域とFc領域はすべてヒト化させたヒト化免疫グロブリンへ変換する。最終的にはすべてヒト化させた完全ヒト化免疫グロブリンへと変換することも考えられる。このように完全異種動物化免疫グロブリンからキメラ免疫グロブリン、ヒト化免疫グロブリン、完全ヒト化免疫グロブリンへと変換させたとき、同一抗原であってもその抗原に対する結合の強さは変わってくる。しかしながら、それらの免疫グロブリンは動物種が異なっている、または動物種が混合しているために、同一の条件で抗原に対する結合性を比較することは困難である。さらに動物や細胞などを使ったバイオアッセイは煩雑であると共に定量を行うのは非常に難しく、同一条件で動物種の異なる免疫グロブリンの結合性や活性を測定することはできない。さらにはその結合の強さを絶対的な指標パラメーターで評価することも難しい。

【0004】

一方、特定疾患の診断や難治療性疾患の研究という観点に立って考えてみても、多種多様な免疫グロブリンを同一条件のもと同一の土俵で測定する基盤的テクノロジーが望まれている。一般的に、ある特定の疾患に対して研究を行う場合、または、医薬品などの治療のための研究を行ったりする場合には、その疾患に相当するモデル動物を作成して実験を行う。例えば、自己免疫疾患では自己免疫グロブリンの作用する抗原で免疫し、特異免疫グロブリンを誘発したモデル動物を使用する。しかしながら、作成したモデル動物で基礎的な自己免疫グロブリンの結合性や阻害活性のデータを蓄積した後に、それをヒトに移行する際に大きな障害がある。モデル動物の免疫グロブリンとヒトの免疫グロブリンとは動物種が異なるため同一であっても抗原に対する結合性や活性が異なり、同一条件のもと同一の土俵で免疫グロブリンの測定を行うことができない。そのため、両者の免疫グロブリンの対応付けや比較を行うことができないという大きな問題がある。

【0005】

10

20

30

40

50

加えて、特定疾患の診断において体液中の特異的免疫グロブリンを定量する場合、指標のスタンダードとなる他動物の免疫グロブリンと試料サンプルとを同一条件で評価する手法がないために、体液中の特異的免疫グロブリンの抗体価や活性を絶対的な指標パラメータで置換して評価することは不可能である（非特許文献 1 および非特許文献 2）。

【 0 0 0 6 】

これを実現させる化合物として蛍光標識されたプロテイン A やプロテイン G などがあるが、数万 Da のタンパク質であり失活しやすい、扱いが難しい、高価である、など種々の問題が考えられる。

【 0 0 0 7 】

上記の理由から、動物種を問わず試料中の多種の免疫グロブリンを同一条件で安価且つ簡易に検出または測定することを可能とする化合物、または上記化合物を用いた免疫グロブリンの検出方法または測定方法が望まれている。

【非特許文献 1】Kaisa Granfors, Matti K. Viljanen, and Auli Toivanen, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 14, No. 1, July 1981, p.6-14

【非特許文献 2】Mark P. Hedger And Shyamani Hettiarachchi, Journal of Andrology, Vol. 15, No. 6, November/December 1994, p.583-590

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

本発明の目的は動物種を問わず試料中の免疫グロブリンを同一条件で安価且つ簡易に検出または測定することを可能とする化合物、または上記化合物を用いた免疫グロブリンの検出方法または測定方法ならびに上記化合物を用いた免疫グロブリンの検出キットまたは測定キットを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、試料中に含有された免疫グロブリンを、安価且つ簡便に、更に同一条件のもとでその免疫グロブリンを動物種によらず検出または測定する方法について鋭意検討を行った。その結果、免疫グロブリンおよび / または免疫グロブリン複合体に結合活性を有する、標識されたペプチドを用いることで試料中の免疫グロブリンを安価且つ簡便に、そして、免疫グロブリンの動物種を問わず検出または測定しうることを見出し、本発明を完成するに至った。本発明の検出法または測定法を用いれば、ヒトの抗体価と他動物の抗体価を一度に測定することができるため、ある特定の動物の抗体価をスタンダードとした場合に、そのスタンダードの抗体価を指標としてヒトの抗体価を算出し、スタンダード以外の動物種の抗体価とヒトの抗体価を同じ土俵で比較することができる。

【 0 0 1 0 】

即ち、本発明は安価且つ簡便な動物種を問わない免疫グロブリン検出法または測定法に関する。

【 0 0 1 1 】

本発明における免疫グロブリンおよび / または免疫グロブリン複合体に結合活性を有するペプチドとは、プロテイン A の部分ペプチド、プロテイン G の部分ペプチド、プロテイン H の部分ペプチド、プロテイン M の部分ペプチド、リウマチ因子の部分ペプチド、および補体の部分ペプチドのうち少なくとも 1 種のペプチドである。上記ペプチドはプロテイン A、プロテイン G、プロテイン H、プロテイン M、リウマチ因子、または補体の部分ペプチドを改変したペプチドであってもよい。

【 0 0 1 2 】

ここで、プロテイン A、プロテイン G、プロテイン H、プロテイン M、リウマチ因子、または補体の部分ペプチドを改変したペプチド、すなわち、プロテイン A、プロテイン G、プロテイン H、プロテイン M、リウマチ因子、または補体の部分ペプチドの改変体とは、プロテイン A、プロテイン G、プロテイン H、プロテイン M、リウマチ因子、または補体の部分ペプチドのアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入

10

20

30

40

50

、および/または付加されたアミノ酸配列からなるもので、免疫グロブリンに結合する活性を有するものをいう。なお、上記の「アミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列」とは、公知の変異ポリペプチド作製法により任意に置換、欠失、挿入、もしくは付加できる程度の数(好ましくは10個以下、より好ましくは7個以下、最も好ましくは5個以下)のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されていることを意味する。このような変異ポリペプチドは、公知の変異ポリペプチド作製法により人為的に導入された変異を有するポリペプチドに限定されるものではなく、天然に存在するポリペプチドを単離精製したものであってもよい。好ましい変異は、保存性もしくは非保存性アミノ酸置換、欠失、または添加である。より好ましくは、サイレント置換、添加、および欠失であり、特に好ましくは、保存性置換である。

10

【0013】

また、免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体結合活性を有するペプチドの標識剤は、具体的に言えば放射性物質、酵素、補酵素、発光性物質、蛍光物質、または蛍光性蛋白質であり、この標識剤は免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体結合活性を有するペプチドに含まれた形であっても、共有結合で結合している形であってもよい。

【発明の効果】

【0014】

本発明における、免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体結合活性を有する、標識されたペプチドを用いた免疫グロブリンの検出法または測定法は、安価且つ簡便な方法であり、さらに、免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体結合活性を有する標識されたペプチドは、動物種を問わず種々の免疫グロブリンに結合活性を有することから、同一の方法で多様な動物種の免疫グロブリンを測定または検出することができる。よって当該検出方法または測定方法は既存方法とは一線を画すものであり、病因物質や疾患マーカーの測定や難治療性疾患の病因追及など医療分野を筆頭に幅広い分野への利用が期待される。

20

【0015】

本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明における免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有するペプチドとは、具体的に言えば、プロテインAの部分ペプチド、プロテインGの部分ペプチド、プロテインHの部分ペプチド、プロテインMの部分ペプチド、リウマチ因子の部分ペプチド、または補体の部分ペプチドである。このペプチドはプロテインA、プロテインG、プロテインH、プロテインM、リウマチ因子または補体の部分ペプチドの改変体であってもよい。好ましくはそのペプチドはプロテインGの部分ペプチド、または当該部分ペプチドの改変体である。これらの免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有するペプチドは単独で用いても良く、または組み合わせて用いても構わない。

40

【0017】

また、本発明における免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有するペプチドの特徴としては、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウマ、イヌ、ヤギ、ハムスター、モルモット、ウシ、およびニワトリなど全てではないが多くの動物種の免疫グロブリンに結合することが望ましい。尚且つ、免疫グロブリンの各クラス、および各サブクラスに結合活性を有する方が良い。但し、上記の動物種は代表例として示しただけであり、本発明はこれらに限定されるものではない。さらに本発明における免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有するペプチドはすべての動物種の免疫グロブリンに結合することを特定しているわけでもない。

50

【0018】

本発明における標識剤は放射性物質、酵素、補酵素、発光性物質、蛍光物質、または蛍光性蛋白であり、さらに具体的には³⁵Sメチオニン、HRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）、アルカリフォスファターゼ、ビオチン、アクリジニウム誘導体、フルオレセイン、GFP（Green Fluorescent Protein：緑色蛍光蛋白質）である。これらの標識剤は単独で用いても良く、または組み合わせて用いても構わない。

【0019】

放射性物質の標識剤としては放射性ヨウ素、放射性炭素、放射性硫黄、放射性水素または放射性リンで標識されたアミノ酸が代表例として挙げられる。

【0020】

酵素に関して、基質と反応して発光、蛍光または発色を誘導するアルカリフォスファターゼや発光を誘導するHRPを上記に記載したが、それ以外にも蛍光を発生させるガラクトシダーゼや、基質であるルシフェリンと反応して蛍光を発するルシフェラーゼなどが代表例として挙げられる。

【0021】

蛍光物質としてはCydy系、フルオレセイン、Alexa Fluor色素、MFP 488、ローダミンなどが代表例として挙げられる。蛍光性蛋白質はGFPの他にもRFP（Red Fluorescent Protein：赤色蛍光蛋白質）、YFP（Yellow Fluorescent Protein：黄色蛍光蛋白質）、CFP（Cyan Fluorescent Protein：シアン色蛍光蛋白質）などが挙げられる。上記の標識剤は代表例として示したに過ぎず、本発明は特にこれら標識剤に限定されるものではない。

【0022】

上記標識剤以外にも免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有するペプチドにペプチドのタグ配列を導入または融合すれば標識化できる。例えば、スタグ配列ペプチドはSプロテインと結合することによりRNAを切断する触媒活性（Ribonuclease S活性）を持つため、FRETにより消光されたmRNAを加えることで蛍光を発する。この公知の技術（Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, p2019-2024, 1999年を参照）を利用すれば、このスタグ配列ペプチドを標識剤として免疫グロブリンの検出または測定が可能である。

【0023】

本発明における、免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有する、標識されたペプチドは種々の方法によって得られる。一般的に比較的短いペプチドは固相合成され、比較的長いペプチドは大腸菌などの菌による産生で合成される。最近では無細胞蛋白質合成系（The FEBS Journal Vol. 273, p4133-4140, 2006年を参照）でも長短のペプチドの合成は行われている。

【0024】

免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有するペプチドが短い場合は、固相合成のビルディングブロックの1つとして目的の標識剤を付加させることができる。この方法には標識剤の制限はなく、ペプチドに含まれるアミノ基やチオール基を利用すれば、上記のすべての標識剤を付加または含ませることが可能であると思われる。もちろん、固相合成後に結合させても良い。またペプチド同士間やペプチドと標識剤間などをケミカルライゲーション法で連結して作成することも可能である（J. Am. Chem. Soc., Vol. 128, p6640-6646, 2006年を参照）。

【0025】

次に免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有するペプチドが比較的長い場合は、そのペプチドを菌によって産生した後に、アミノ基やチオール基を利用して放射性物質、酵素、補酵素、蛍光物質、または蛍光蛋白質で標識することができる。

10

20

30

40

50

【0026】

標識剤が酵素やペプチドタグや蛍光性蛋白の場合は遺伝子的操作を施し、免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有するペプチドに融合して標識することもできる。また標識剤が35Sメチオニンのような本質的に天然アミノ酸と同じ場合は培養液中に天然アミノ酸の代わりに添加することで、標識することも可能である。

【0027】

他にも非天然アミノ酸導入法で標識する方法もある(Nature Methods Vol. 3, p923-929, 2006年; Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 103, p9785-9789, 2006年を参照)。この方法では蛍光性物質や放射性物質など多くの側鎖修飾アミノ酸の蛋白質への導入が確認されている。ここでは代表的な免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有する、標識されたペプチドの作成法について記述したが、本発明はこれらに限定されるものではない。

10

【0028】

本発明の免疫グロブリンの測定または検出の具体的方法として、例えば、ELISA(Enzyme linked Immuno Sorbent Assay: 酵素結合免疫吸着測定法)のようなイムノアッセイを利用した検出方法または測定方法が考えられる。

【0029】

具体的な方法の1つとして次の方法が挙げられる。まず、免疫グロブリンを含む溶液をプレートまたはウェルなどの固相と接触させ、溶液中の免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体を固相上に結合または吸着させる。洗浄工程を経た後、適当な手法でブロッキングし、免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有する、標識されたペプチドを添加する。最後に、洗浄工程を経た後、固相上の免疫グロブリンに特異的に結合した免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有するペプチドをその標識剤を利用して検出または測定することにより、溶液中の免疫グロブリンを検出または測定する。

20

【0030】

2つ目の方法として、抗原特異的な免疫グロブリンの検出方法または測定方法が挙げられる。始めに、適当な手法、例えばBSAにコンジュゲートした抗原をプレートまたはウェルなどの固相と接触させることにより、直接的または間接的に抗原を固相上に結合または吸着させる。必要に応じて適当な手法でブロッキングした後、免疫グロブリンを含む溶液を添加し、抗原に反応する免疫グロブリンを特異的に結合させる。洗浄操作を行った後に、免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有する、標識されたペプチドを添加し、抗原特異的に結合した免疫グロブリンに対して結合させる。洗浄後、1つ目の方法と同様に標識剤を利用し抗原に結合した特異的免疫グロブリンを検出または測定する。

30

【0031】

標識剤を利用した免疫グロブリンの検出または測定は、直接的または間接的に放出される標識剤のシグナルを検出することによって可能となる。例えば上記の放射性物質、蛍光物質、および蛍光性蛋白質のような自らがシグナルを放出する化合物の場合、照射行為以外は他から物質を加えたり外的な影響を与えたりすることなしに、適当な装置を用いて直接的にシグナルの検出が可能である。一方、HRP、アルカリフォスターゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼのような酵素は外的刺激なしではシグナルを放たない。そのため各々の酵素に適した基質を適した条件の下で加え、発光や蛍光または発色のようなシグナルを放つように誘導する必要がある。また、シグナルの停止を行うこともある。標識剤が上記酵素の場合にはこのようにシグナルを誘導し、間接的に標識剤のシグナル検出を行う。同様に適当な装置を用いてシグナルを検出する。標識剤がビオチンの場合、ビオチンが特異的に結合するアビジン/ストレプトアビジンを利用するのが一般的である。蛍光色素、放射性物質、HRP、アルカリフォスターゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラ

40

50

ーゼなどが付加または含まれたアビジン/ストレプトアビジンを用い免疫グロブリンに依存したシグナル放出を誘導する。

【0032】

本発明は免疫グロブリンを検出または測定すること以外にも免疫グロブリンの抗原の特定やエピトープマッピングへの適用も考えられる。例えば、96穴プレートに種々の抗原を固定化し、免疫グロブリンを含む溶液を加えた後に、本発明の免疫グロブリンおよび/または免疫グロブリン複合体に結合活性を有する標識されたペプチドで標識シグナルの検出を行えば、免疫グロブリンの抗原特定へも応用できる。免疫グロブリンのエピトープマッピングを行いたい場合にも同様に、96穴プレートに選定された抗原を固定化し、上記と同様の操作を行えば良い。本手法は動物種を問わないために同一のキットでハイスルー

10

【0033】

本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能である。すなわち、請求項に示した範囲で適宜変更した技術的手段を組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

【実施例】

【0034】

以下、実施例において本発明に関して詳細に述べるが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

20

【0035】

(実施例1)

< 標識化プロテインG部分ペプチドの作成 >

マレイミド化されたHRP(30mg)をリン酸緩衝液に溶解した。次に組み換え微生物菌株の産生によって得られた配列番号1に示したアミノ酸配列を有する、プロテインG由来の部分ペプチド(PGMP)(50mg)(特願平9-526738号の記載を参照)をリン酸緩衝液に溶解し、HRPの溶液に加えた。その後、透析を行い、凍結乾燥して、HRPコンジュゲートされたPGMPを得た。

30

< ヒト 1-アドレノセプター抗体の 1-アドレノセプターのLoop1抗原に対するイムノアッセイ測定 >

配列番号2に記したアミノ酸配列を有する 1-アドレノセプターのLoop1抗原(bAR-L1)をウシ血清アルブミン(BSA)にコンジュゲートさせたBSA-L1を0.05M炭酸緩衝液(pH9.6)に溶解し3μg/mLに調製した。

【0036】

96穴プレート(NUNC社製-IMMUNO PLATE)の各ウェルに100μLずつ加え37度で1時間静置した。0.05%Tween20/PBS緩衝液(pH7.2)で各ウェルを300μLで5回ずつ洗浄した後、PBS緩衝液(pH7.2)にBSAを溶解させたブロッキング液(1%BSA)を各ウェルに200μLずつ加え37度

40

【0037】

次に、指標のスタンダードとする、Loop1抗原で免疫したウサギから精製したポリクローナル抗体を順次希釈し、検量線作成用の検体とした。拡張型心筋症患者の血清を検体として、検量線作成用の検体と適当に希釈した拡張型心筋症患者の血清検体とをブロッキングを行ったプレートの各ウェルに100μLずつ加え、37度で1時間静置し、抗原抗体反応を行った。その後、0.05%Tween20/PBS緩衝液(pH7.2)で各ウェルを300μLで5回ずつ洗浄した。

【0038】

最後に、生理食塩水に溶解した標識剤HRPでコンジュゲートしたPGMP(100μ

50

g / m L) を各ウェルに 100 μ L ずつ加え 1 時間静置した後、0.05% Tween 20 / P B S 緩衝液 (p H 7 . 2) で各ウェルを 300 μ L で 5 回ずつ洗浄し、H R P の基質 O P D (オルトフェニレンジアミン) を含む溶液 (0 . 0001% 過酸化水素含有 0 . 1% O P D のクエン酸溶液) を各ウェルに 100 μ L 加えた。37 度で 30 分静置した後、4 N 硫酸溶液を各ウェルに 50 μ L 加えて反応停止させ、マイクロプレートリーダーで波長 492 nm の吸光度を測定することにより、ヒト 1-アドレノセプター抗体の 1-アドレノセプターの L o o p 1 抗原に対するイムノアッセイ測定を行った。結果は表 1 に示した。

【 0039 】

(実施例 2)

< ヒト 1-アドレノセプター抗体の 1-アドレノセプターの L o o p 2 抗原に対するイムノアッセイ測定 >

配列番号 3 に記したアミノ酸配列を有する 1-アドレノセプターの L o o p 2 抗原 (b A R - L 2) をウシ血清アルブミン (B S A) にコンジュゲートさせた B S A - L 2 を 0 . 05 M 炭酸緩衝液 (p H 9 . 6) に溶解し 50 μ g / m L に調整した後、実施例 1 と同様に、プレートへの固定化、ブロッキングを行った。

【 0040 】

指標のスタンダードとして、L o o p 2 抗原で免疫したウサギから精製したポリクローナル抗体を順次希釈し、検量線作成用の検体とする以外は、実施例 1 と同様に、ヒト 1-アドレノセプター抗体の 1-アドレノセプターの L o o p 2 抗原に対するイムノアッセイ測定を行った。結果は表 1 に示した。

【 0041 】

【 表 1 】

	L o o p 1 に対する抗体価	L o o p 2 に対する抗体価
実施例 1	3.0	—
実施例 2	—	49

単位は μ g / m L

【 0042 】

(実施例 3)

< ウサギ 1-アドレノセプター抗体の 1-アドレノセプターの L o o p 1 抗原に対するイムノアッセイ測定 >

配列番号 2 に記したアミノ酸配列を有する 1-アドレノセプターの L o o p 1 抗原 (b A R - L 1) をウシ血清アルブミン (B S A) にコンジュゲートさせた B S A - L 1 を 0 . 05 M 炭酸緩衝液 (p H 9 . 6) に溶解し 3 μ g / m L に調整した後、実施例 1 と同様に、プレートへの固定化、ブロッキングを行った。

【 0043 】

検体として L o o p 1 抗原で免疫したウサギの血清検体を用いる以外は実施例 1 と同様に、ウサギ 1-アドレノセプター抗体の 1-アドレノセプターの L o o p 1 抗原に対するイムノアッセイを測定した。結果は表 2 に示した。

【 0044 】

(実施例 4)

< ウサギ 1-アドレノセプター抗体の 1-アドレノセプターの L o o p 2 抗原に対するイムノアッセイ測定 >

配列番号 3 に記したアミノ酸配列を有する 1-アドレノセプターの L o o p 2 抗原 (b A R - L 2) をウシ血清アルブミン (B S A) にコンジュゲートさせた B S A - L 2 を

10

20

30

40

50

0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解し 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した後、実施例 2 と同様に、プレートへの固定化、ブロッキングを行った。

【0045】

検体として Loop 2 抗原で免疫したウサギの血清検体を用いる以外は実施例 2 と同様に、ウサギ 1-アドレノセプター抗体の 1-アドレノセプターの Loop 2 抗原に対するイムノアッセイ測定を行った。結果は表 2 に示した。

【0046】

【表 2】

	Loop 1 に対する抗体価	Loop 2 に対する抗体価
実施例 3	170	—
実施例 4	—	220

10

単位は $\mu\text{g}/\text{mL}$

【0047】

(実施例 5)

<コブタ 1-アドレノセプター抗体の 1-アドレノセプターの Loop 1 抗原に対するイムノアッセイ測定>

配列番号 2 に記したアミノ酸配列を有する 1-アドレノセプターの Loop 1 抗原 (bAR-L1) をウシ血清アルブミン (BSA) にコンジュゲートさせた BSA-L1 を 0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解し 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した後、実施例 1 と同様に、プレートへの固定化、ブロッキングを行った。

20

【0048】

検体として Loop 1 抗原で免疫したコブタの血清検体を用いる以外は実施例 1 と同様に、コブタ 1-アドレノセプター抗体の 1-アドレノセプターの Loop 1 抗原に対するイムノアッセイ測定を行った。結果は表 3 に示した。

【0049】

(実施例 6)

<コブタ 1-アドレノセプター抗体の 1-アドレノセプターの Loop 2 抗原に対するイムノアッセイ測定>

配列番号 3 に記したアミノ酸配列を有する 1-アドレノセプターの Loop 2 抗原 (bAR-L2) をウシ血清アルブミン (BSA) にコンジュゲートさせた BSA-L2 を 0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解し 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した後、実施例 2 と同様に、プレートへの固定化、ブロッキングを行った。

30

【0050】

検体として Loop 2 抗原で免疫したコブタの血清検体を用いる以外は実施例 2 と同様に、コブタ 1-アドレノセプター抗体の 1-アドレノセプターの Loop 1 抗原に対するイムノアッセイ測定を行った。結果は表 3 に示した。

40

【0051】

【表 3】

	Loop 1 に対する抗体価	Loop 2 に対する抗体価
実施例 5	0.056	—
実施例 6	—	26.8

単位は $\mu\text{g}/\text{mL}$

50

【産業上の利用可能性】**【0052】**

以上のように、本発明にかかるペプチドおよび当該ペプチドを用いた免疫グロブリンの検出方法または測定方法を利用すれば、多様な動物種の免疫グロブリンを安価且つ簡便に測定または検出することができる。それゆえ、本発明は、病因物質および疾患マーカーの測定、または難治療性疾患の病因追及などに利用することができ、医療分野および医薬品分野などの幅広い分野で利用することができる。

【配列表】

2009044650000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2008/067171
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/532(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C07K14/31(2006.01)i, C07K14/315(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/48-98, C07K14/31, C07K14/315, C07K14/47 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ARAI et at. "Construction of Chimeric Proteins between Protein G and Fluorescence-Enhanced Green Fluorescent Protein, and Their Application to Immunoassays" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, 1998, VOL.86, NO.5, p.440-445 (FIG.1 MATERIALS AND METHODS)	1-11
A	JP 2006-513398 A (Molecular Probes, Inc.), 20 April, 2006 (20.04.06), Claims; Par. Nos. [0042], [0043] & US 2003/0073149 A1 & GB 2397302 A & EP 1442302 A & CA 2462280 A	1-11
A	WO 97/26930 A1 (Kaneka Corp.), 31 July, 1997 (31.07.97), & US 6133431 A & EP 882463 A1 & DE 69733467 T & CA 2244734 A	1-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 October, 2008 (10.10.08)		Date of mailing of the international search report 21 October, 2008 (21.10.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2008/067171									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/532(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C07K14/31(2006.01)i, C07K14/315(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/48-98, C07K14/31, C07K14/315, C07K14/47											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2008年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2008年	日本国実用新案登録公報	1996-2008年	日本国登録実用新案公報	1994-2008年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2008年										
日本国実用新案登録公報	1996-2008年										
日本国登録実用新案公報	1994-2008年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X	ARAI et al. "Construction of Chimeric Proteins between Protein G and Fluorescence-Enhanced Green Fluorescent Protein, and Their Application to Immunoassays" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, 1998, VOL. 86, NO. 5, p. 440-445 (FIG. 1 MATERIALS AND METHODS)	1-11									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 10.10.2008		国際調査報告の発送日 21.10.2008									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 山村 祥子	2J 9217								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 6 7 1 7 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2006-513398 A (モレキュラー プロブス, インコーポレイテッド) 2006. 04. 20, 特許請求の範囲、【0042】、【0043】 & US 2003/0073149 A1 & GB 2397302 A & EP 1442302 A & CA 2462280 A	1-11
A	WO 97/26930 A1 (鐘淵化学工業株式会社) 1997. 07. 31, & US 6133431 A & EP 882463 A1 & DE 69733467 T & CA 2244734 A	1-11

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4H045 AA30 CA11 CA30 CA40 EA50 FA74

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	具有与免疫球蛋白和/或免疫球蛋白复合物结合活性的标记肽，以及使用上述肽检测或测量免疫球蛋白的方法		
公开(公告)号	JPWO2009044650A1	公开(公告)日	2011-02-03
申请号	JP2009536020	申请日	2008-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	钟渊化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	Kaneka公司		
[标]发明人	佐藤伸彦 大原一将 荻野英司		
发明人	佐藤 伸彦 大原 一将 荻野 英司		
IPC分类号	C07K14/00 G01N33/53 G01N33/532 C07K14/31 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/6854 C07K11/13 C07K14/31 C07K14/315 C07K14/472 G01N33/532		
FI分类号	C07K14/00.ZNA G01N33/53.N G01N33/532.A C07K14/31 C07K14/47		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/CA30 4H045/CA40 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2007262110 2007-10-05 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了 (i) 能够在相同条件下经济且容易地检测或测定免疫球蛋白而与动物种类无关的化合物，以及 (ii) 通过使用该化合物检测或测定免疫球蛋白的方法。使用带有标记剂并具有结合免疫球蛋白和/或免疫球蛋白复合物的活性的肽使得可以在相同条件下经济且容易地检测或测定免疫球蛋白，而与动物物种无关。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2008/067171
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/532 (2006.01) I, G01N33/53 (2006.01) I, C07K14/32 (2006.01) I, C07K14/315 (2006.01) I, C07K14/47 (2006.01) I		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/48-9B, C07K14/31, C07K14/315, C07K14/47		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched JIKENYO SHIMAN KOKO 1992-1996 JIKENYO SHIMAN TOROKU KOKO 1996-2008 Kohai Jikenyō Shimam Koko 1971-2008 Toroku Jikenyō Shimam Koko 1994-2008		
Historic data base consulted during the international search (name of data base with, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), JSTPLUS (JDE:eamii), JMRPLUS (JDE:eamii)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IRAI et al: "CONSTRUCTION OF DIMERIC PROTEINS BETWEEN PROTEIN G AND FLUORESCENCE-ENHANCED GREEN FLUORESCENT PROTEIN AND THEIR APPLICATION TO IMMUNOCYTOLOGY" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, 1998, VOL. 86, NO. 5, P. 440-445 (PG. 1, INTRODUCTION AND METHODS)	1-11
A	JP 2006-51398 A (Molecular Probes, Inc.), 20 April, 2006 (20.04.06) CLAIMS, PAR. NOS. [0042], [0043] & DE 2003/0073149 A1 & GR 2397362 A & EP 1442302 A & CA 2462880 A	1-11
A	NO 97/26930 A1 (Kaneka Corp.), 31 July, 1997 (31.07.97), & DE 633431 A & EP 882463 A1 & DE 69733467 T & CA 2244734 A	1-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "1" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "2" earlier application or patent but published on or after the international filing date "3" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the inventive date of another citation or other special reason (as specified) "4" document referred to as cited document, see, exhibition or other means "5" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "6" later document published after the international filing date or priority date and for which the application has either to be understood the principle or theory underlying the invention "7" document of particular relevance: the claimed invention cannot be seen when the document is taken alone "8" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken in view of or in combination with other documents, such combination being to be given effect to the art "9" document number of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 October, 2008 (20.10.08)		Date of mailing of the international search report 24 October, 2008 (24.10.08)
Name and mailing address of the ISA/ Office Espacenet, PATENT OFFICE		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.