

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3439195号
(P3439195)

(45)発行日 平成15年8月25日(2003.8.25)

(24)登録日 平成15年6月13日(2003.6.13)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I
G 0 1 N 33/533		G 0 1 N 33/533
33/561		33/561
33/563		33/563

請求項の数 10 (全 34数)

(21)出願番号 特願2000 - 620173(P2000 - 620173)

(86)(22)出願日 平成12年2月17日(2000.2.17)

(86)国際出願番号 PCT/JP00/00903

(87)国際公開番号 W001/061351

(87)国際公開日 平成13年8月23日(2001.8.23)

審査請求日 平成12年4月26日(2000.4.26)

(73)特許権者 000236436
浜松ホトニクス株式会社
静岡県浜松市市野町1126番地の1

(72)発明者 久田 素
静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子
バイオホトニクス研究所内

(72)発明者 伊藤 由紀子
静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子
バイオホトニクス研究所内

(72)発明者 松本 浩幸
静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子
バイオホトニクス研究所内

(74)代理人 100088155
弁理士 長谷川 芳樹 (外2名)

審査官 山村 祥子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗原の定量的検出方法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、発蛍光団色素で標識されており、且つ分析用試料に含まれる抗原と免疫複合体を形成する等電点均一化F a b '抗体を提供する第1の工程と、前記等電点均一化F a b '抗体と、前記抗原を含む前記分析用試料とを混合し、前記免疫複合体を含む混合物を得る第2の工程と、前記混合物を担体中で電気泳動させ、前記混合物を分離させる第3の工程と、前記第3の工程で分離された前記混合物に、前記発蛍光団色素を励起可能な励起光を照射して、前記免疫複合体に蛍光を生じせしめる第4の工程と、前記蛍光を検出する第5の工程と、を含む、抗原の定量的検出方法。

2

【請求項2】 前記アミノ酸配列が、前記等電点均一化F a b '抗体のL鎖のC末端に隣接するように付加されている、請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項3】 前記発蛍光団色素が、前記等電点均一化F a b '抗体のC H 1領域のC末端に隣接するアミノ酸配列におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に結合している、請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項4】 前記電気泳動が、等電点電気泳動法により実施される、請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項5】 前記電気泳動が、キャピラリー電気泳動法により実施される、請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項6】 前記等電点均一化F a b '抗体が、F a b '抗体のV H領域、C H 1領域、および該C H 1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするF d鎖遺伝子

を提供する第 1 の工程と、
 前記 F d 鎖遺伝子において、前記 C H 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変 F d 鎖遺伝子を得る第 2 の工程と、
 前記改変 F d 鎖遺伝子と、前記 F a b ' 抗体の L 鎖をコードする L 鎖遺伝子とを発現可能な状態で連結させ、改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得る第 3 の工程と、
 前記改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を、前記 L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得る第 4 の工程と、
 前記荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ C H 1 領域の C 末端に隣接して L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b ' 抗体を得る第 5 の工程と、
 前記第 5 の工程で得られた等電点均一化 F a b ' 抗体における L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第 6 の工程と、
 を含む方法により製造されたものである、請求の範囲第 1 項記載の方法。

【請求項 7】 前記等電点均一化 F a b ' 抗体が、F a b ' 抗体の V H 領域、C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする F d 鎖遺伝子を提供する第 1 の工程と、
 前記 F d 鎖遺伝子において、前記 C H 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変 F d 鎖遺伝子を得る第 2 の工程と、
 前記 F a b ' 抗体の L 鎖をコードする L 鎖遺伝子を提供する第 3 の工程と、
 前記 L 鎖遺伝子を、前記 L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与 L 鎖遺伝子を得る第 4 の工程と、
 前記改変 F d 鎖遺伝子と、前記荷電性付与 L 鎖遺伝子を発現可能な状態で連結させ、荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得る第 5 の工程と、
 前記荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ C H 1 領域の C 末端に隣接して L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b ' 抗体を得る第 6 の工程と、

前記第 6 の工程で得られた等電点均一化 F a b ' 抗体における L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第 7 の工程と、
 を含む方法により製造されたものである、請求の範囲第 1 項記載の方法。

【請求項 8】 前記等電点均一化 F a b ' 抗体が、F a b ' 抗体の V H 領域、C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする F d 鎖遺伝子と、該 F a b ' 抗体の L 鎖をコードする L 鎖遺伝子とを提供する第 1 の工程と、
 前記 F d 鎖遺伝子と前記 L 鎖遺伝子とを発現可能な状態で連結させ、F a b ' 抗体発現遺伝子を得る第 2 の工程と、
 前記 F a b ' 抗体発現遺伝子を、前記 L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、且つ、前記 F a b ' 抗体発現遺伝子における前記 C H 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得る第 3 の工程と、
 前記荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ C H 1 領域の C 末端に隣接して L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b ' 抗体を得る第 4 の工程と、
 前記第 4 の工程で得られた等電点均一化 F a b ' 抗体における L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第 5 の工程と、
 を含む方法により製造されたものである、請求の範囲第 1 項記載の方法。

【請求項 9】 前記等電点均一化 F a b ' 抗体が、第 1 の F a b ' 抗体の C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする C H 1 遺伝子と、該第 1 の F a b ' 抗体の C L 領域をコードする C L 遺伝子とを提供する第 1 の工程と、
 前記 C H 1 遺伝子において、C H 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変 C H 1 遺伝子を得る第 2 の工程と、
 前記改変 C H 1 遺伝子を制限酵素で切断し C H 1 領域をコードする遺伝子を含む遺伝子断片を得る第 3 の工程と、
 第 2 の F a b ' 抗体の V H 領域をコードする V H 遺伝子と、該第 2 の F a b ' 抗体の V L 領域をコードする V L

された試料をキャピラリー中で電気泳動させ、励起光を照射して生じる蛍光を光検出器等で検出する。この方法によれば、微量の試料であっても高精度の定量的検出が可能であるため、タンパク質等の超高感度分析方法として注目されている。

近年、生体内の微量成分を上記のような電気泳動法の分析の対象物とする場合が増加している。このような分析を行う場合は、生体内の微量成分と、該微量成分を抗原として認識する抗体とを結合させ免疫複合体を形成させて、該免疫複合体を検出することが行われる。高精度の検出のためには免疫複合体が蛍光標識されていることが好ましい。このとき、抗原もしくは抗体のいずれかが蛍光標識されている必要があるが、抗原もしくは抗体を一般的な標識方法により蛍光標識することは以下に述べる理由により好ましくない。

すなわち、抗原の多くと抗体はタンパク質からなっており、タンパク質のN末端のアミノ基およびリシン側鎖のアミノ基の数とその解離状態は、タンパク質の等電点を定める大きな要因となるので(続生化学実験講座2、タンパク質の化学 - 上、日本生化学会、1987)、アミノ基を利用して発蛍光団色素を化学結合させる一般的な標識方法によれば、タンパク質自身の等電点が大きく変化してしまう。

また、タンパク質には蛍光標識物質と反応可能なアミノ酸が多く存在するため、結合する蛍光標識物質の数と位置が不特定となり、結果として、一つのタンパク質であるにもかかわらず複数の等電点を示す混合物となってしまう。このため、等電点電気泳動で正確な分析をすることが困難となる。さらに、発蛍光団色素による標識のためタンパク質の3次構造が変化するために、タンパク質自身の化学的安定性が悪くなるという問題もある。

検出に用いる抗体として、ハイブリドーマにより産出させて得られた、分子量が均一なモノクローナル抗体を用いた場合でも等電点電気泳動法で正確な分析ができない場合がある。これは、ハイブリドーマ産出の分子量が均一なモノクローナル抗体であっても、等電点が必ずしも均一とならないmicroheterogeneityと呼ばれる現象が生じるからである(Bouman H et al. Z Immunitatsforsch. Exp Klin Immunol. 1975 Oct; 150(4): 370-7)。

このような等電点不均一の原因としては、タンパク質の脱アミド化(Robinson ABら, Proc Natl Acad Sci U S A. 1970 Jul; 66(3):753-7)、N末端のピログルタミン化(Stott DIら, Biochem J 1972 Aug; 128(5):1221-7)、糖鎖の付加(Cohenford MAら, Immunol Commun 1983; 12(2):189-200)、ミリスチル化(Pillai Sら, Proc Natl Acad Sci U S A 1987 Nov; 84(21):7654-8)等が提唱されているが、タンパク質の等電点不均一性のメカニズムは、未だ特定されていない。

したがって、等電点電気泳動を行った結果、試料が複数の等電点を有することが判明したとしても、それが抗

原に起因するのか抗体に起因するのかわからないことがある。これは、上述のように、抗原および抗体の両者とも等電点の不均一性を有する可能性があるからである。

上記のことから、抗原抗体反応を利用して電気泳動法により分析を行う場合は、少なくとも抗体は等電点的に均一である必要があり、等電点が均一な抗体を発蛍光団色素で標識する場合は、上述のようなアミノ基を利用した蛍光標識方法は好ましくないといえることができる。

等電点が均一な抗体を用いて抗原を定量的に検出する方法としては、Shimura Kおよび Karger BLの方法が知られている(Anal Chem 1994 Jan 1; 66(1):9-15、または特表平8-506182号公報参照)。これらの文献に開示の方法を模式的に示すと図8A~Gのようになる。すなわち、ハイブリドーマ産出のIgG抗体(図8A)をタンパク質分解酵素(ペプシン)により切断し、得られたF(ab')₂抗体(図8B)を分離する。これをメルカプトエチルアミン等の還元剤で処理して3つの連結ジスルフィド結合(S-S結合)を還元し、Fab'抗体を得る(図8C)。このFab'抗体を酸化して反応性チオール基(SH基)を1つだけ残すようにして(図8D)、このチオール基に発蛍光団色素を結合させる(図8E)。得られた蛍光標識Fab'抗体を用いて等電点電気泳動を行い、等電点が均一な蛍光標識Fab'抗体を泳動担体から取り出す(図8F)。取り出した等電点が均一な蛍光標識Fab'抗体を抗原と結合させ電気泳動を行い励起光で生じた蛍光を測定する(図8G)。

発明の開示

しかしながら、上記のShimura Kおよび Karger BLの文献に開示の方法により等電点電気泳動を行う場合においては、等電点が均一なFab'抗体を得るまでの工程が煩雑であることに加えて、測定対象である抗原の等電点と蛍光標識された抗体の等電点が近い場合、電気泳動の結果、抗原と抗体からなる免疫複合体と、余剰の抗原および/または抗体がほぼ等しい移動時間で検出されるために、ピークが重なってしまい精度の高い検出ができないという問題点がある。

本発明は上記の従来技術の問題点を鑑みてなされたものであり、測定対象である抗原の等電点と蛍光標識された抗体の等電点が近い場合であっても、高精度で抗原を分析することが可能な、抗原の定量的検出方法を提供することを目的とする。

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加された蛍光標識等電点均一化Fab'抗体を用いることにより、測定対象である抗原の等電点と蛍光標識された抗体の等電点が近い場合であっても、高精度で抗原を分析することが可能であることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、発蛍光団色素で標識されており、

且つ分析用試料に含まれる抗原と免疫複合体を形成する等電点均一化 F a b ' 抗体を提供する第 1 の工程と、前記等電点均一化 F a b ' 抗体と、前記抗原を含む前記分析用試料とを混合し、前記免疫複合体を含む混合物を得る第 2 の工程と、前記混合物を担体中で電気泳動させ、前記混合物を分離させる第 3 の工程と、前記第 3 の工程で分離された前記混合物に、前記発蛍光団色素を励起可能な励起光を照射して、前記免疫複合体に蛍光を生じせしめる第 4 の工程と、前記蛍光を検出する第 5 の工程とを含む抗原の定量的検出方法を提供するものである。

本発明の抗原の定量的検出方法においては、前記アミノ酸配列が、前記等電点均一化 F a b ' 抗体の L 鎖の C 末端に隣接するように付加されていることが好ましく、前記発蛍光団色素が、前記等電点均一化 F a b ' 抗体の C H 1 領域の C 末端に隣接するアミノ酸配列における L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に結合していることが好ましい。

本発明の抗原の定量的検出方法においては、前記電気泳動が、等電点電気泳動法により実施されることが好ましく、また、前記電気泳動が、キャピラリー電気泳動法により実施されることが好ましい。

また、前記等電点均一化 F a b ' 抗体が、F a b ' 抗体の V H 領域、C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする F d 鎖遺伝子を提供する第 1 の工程と、前記 F d 鎖遺伝子において、前記 C H 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変 F d 鎖遺伝子を得る第 2 の工程と、前記改変 F d 鎖遺伝子と、前記 F a b ' 抗体の L 鎖をコードする L 鎖遺伝子とを発現可能な状態で連結させ、改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得る第 3 の工程と、前記改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を、前記 L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得る第 4 の工程と、前記荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ C H 1 領域の C 末端に隣接して L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b ' 抗体を得る第 5 の工程と、前記第 5 の工程で得られた等電点均一化 F a b ' 抗体における L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第 6 の工程とを含む方法により製造されたものであることが好ましい。

さらに、前記等電点均一化 F a b ' 抗体が、F a b ' 抗体の V H 領域、C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基

を含むアミノ酸配列をコードする F d 鎖遺伝子を提供する第 1 の工程と、前記 F d 鎖遺伝子において、前記 C H 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変 F d 鎖遺伝子を得る第 2 の工程と、前記 F a b ' 抗体の L 鎖をコードする L 鎖遺伝子を提供する第 3 の工程と、前記 L 鎖遺伝子を、前記 L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与 L 鎖遺伝子を得る第 4 の工程と、前記改変 F d 鎖遺伝子と、前記荷電性付与 L 鎖遺伝子を発現可能な状態で連結させ、荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得る第 5 の工程と、前記荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ C H 1 領域の C 末端に隣接して L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b ' 抗体を得る第 6 の工程と、前記第 6 の工程で得られた等電点均一化 F a b ' 抗体における L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第 7 の工程とを含む方法により製造されたものであることが好ましい。

また、前記等電点均一化 F a b ' 抗体が、F a b ' 抗体の V H 領域、C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする F d 鎖遺伝子と、該 F a b ' 抗体の L 鎖をコードする L 鎖遺伝子とを提供する第 1 の工程と、前記 F d 鎖遺伝子と前記 L 鎖遺伝子とを発現可能な状態で連結させ、F a b ' 抗体発現遺伝子を得る第 2 の工程と、前記 F a b ' 抗体発現遺伝子を、前記 L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、且つ、前記 F a b ' 抗体発現遺伝子における前記 C H 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得る第 3 の工程と、前記荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ C H 1 領域の C 末端に隣接して L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b ' 抗体を得る第 4 の工程と、前記第 4 の工程で得られた等電点均一化 F a b ' 抗体における L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第 5 の工程とを含む方法により製造されたものであることが好ましい。

さらに、前記等電点均一化 F a b ' 抗体が、第 1 の F a b ' 抗体の C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端

に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするCH1遺伝子と、該第1のFab'抗体のCL領域をコードするCL遺伝子とを提供する第1の工程と、前記CH1遺伝子において、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変CH1遺伝子を得る第2の工程と、前記改変CH1遺伝子を制限酵素で切断しCH1領域をコードする遺伝子を含む遺伝子断片を得る第3の工程と、第2のFab'抗体のVH領域をコードするVH遺伝子と、該第2のFab'抗体のVL領域をコードするVL遺伝子を提供する第4の工程と、前記遺伝子断片、前記CL遺伝子、前記VH遺伝子および前記VL遺伝子を発現可能な状態で連結し、改変Fab'抗体発現遺伝子を得る第5の工程と、前記改変Fab'抗体発現遺伝子を、前記CL領域のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子を得る第6の工程と、前記荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化Fab'抗体を得る第7の工程と、前記第7の工程で得られた等電点均一化Fab'抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に蛍光団色素を結合させる第8の工程とを含む方法により製造されたものであることが好ましい。

加えて、前記等電点均一化Fab'抗体が、第1のFab'抗体のCH1領域、および該CH1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするCH1遺伝子と、該第1のFab'抗体のCL領域をコードするCL遺伝子とを提供する第1の工程と、前記CH1遺伝子において、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変CH1遺伝子を得る第2の工程と、前記改変CH1遺伝子を制限酵素で切断しCH1領域をコードする遺伝子を含む遺伝子断片を得る第3の工程と、前記CL遺伝子を、前記CL領域のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与CL遺伝子を得る第4の工程と、第2のFab'抗体のVH領域をコードするVH遺伝子と、該第2のFab'抗体のVL領域をコードするVL遺伝子を提供する第5の工程と、前記遺伝子断片、前記荷電性付与CL遺伝子、前記VH遺伝子および前記VL遺伝子を発現可能な状態で連結し、荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子を得る第6の工程と、前記荷電性付与改変Fab'

b'抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化Fab'抗体を得る第7の工程と、前記第7の工程で得られた等電点均一化Fab'抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に蛍光団色素を結合させる第8の工程とを含む方法により製造されたものであることが好ましい。

図面の簡単な説明

図1は、ヒトのIgG1抗体を示す模式的に示す図である。

図2Aは、等電点均一化Fab'抗体発現遺伝子の構成図である。

図2Bは、等電点均一化Fab'抗体発現遺伝子が導入されたpCANTAB5Eプラスミドベクターを示す図である。

図3は、改変を行っていない抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体を用いて蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動を行った際の移動時間と蛍光強度を示す図である。

図4は、改変を行った抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体(H-N162D改変Fab'抗体)を用いて蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動を行った際の移動時間と蛍光強度を示す図である。

図5は、等電点均一化Fab'抗体と抗原の免疫複合体を電気泳動で分離した際の移動時間と蛍光強度を示す図である。

図6は、荷電性のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加された等電点均一化Fab'抗体と抗原の免疫複合体を電気泳動で分離した際の移動時間と蛍光強度を示す図である。

図7Aは、等電点均一化Fab'抗体を発現する遺伝子を組み込んだ大腸菌を模式的に示す図である。

図7Bは、IPTGによる抗体誘導により生じた等電点均一化Fab'抗体を模式的に示す図である。

図7Cは、蛍光標識された等電点均一化Fab'抗体を模式的に示す図である。

図7Dは、蛍光標識された等電点均一化Fab'抗体と抗原の免疫複合体を電気泳動で分離したときに得られる、移動時間と蛍光強度の関係を模式的に示す図である。

図8Aは、ハイブリドーマ産出のIgG抗体を模式的に示す図である。

図8Bは、ハイブリドーマ産出のIgG抗体をタンパク質分解酵素により切断して得られたF(ab')₂抗体を模式的に示す図である。

図8Cは、F(ab')₂抗体を還元剤で処理してジスルフィド結合を還元して得られたFab'抗体を模式

的に示す図である。

図 8 D は、酸化により反応性チオール基を 1 つだけ残した F a b ' 抗体を模式的に示す図である。

図 8 E は、蛍光標識された F a b ' 抗体を模式的に示す図である。

図 8 F は、蛍光標識された F a b ' 抗体を等電点電気泳動した時に得られる電気泳動像を模式的に示す図である。

図 8 G は、等電点電気泳動して取り出された蛍光標識された等電点均一化 F a b ' 抗体と、抗原の免疫複合体を電気泳動で分離したときに得られる、移動時間と蛍光強度の関係を模式的に示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の抗原の定量的検出方法は、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、発蛍光団色素で標識されており、且つ分析用試料に含まれる抗原と免疫複合体を形成する等電点均一化 F a b ' 抗体を提供する第 1 の工程と、前記等電点均一化 F a b ' 抗体と、前記抗原を含む前記分析用試料とを混合し、前記免疫複合体を含む混合物を得る第 2 の工程と、前記混合物を担体中で電気泳動させ、前記混合物を分離させる第 3 の工程と、前記第 3 の工程で分離された前記混合物に、前記発蛍光団色素を励起可能な励起光を照射して、前記免疫複合体に蛍光を生じせしめる第 4 の工程と、前記蛍光を検出する第 5 の工程とを含むものである。

抗体は、ヒト I g G 1 抗体を例にとると、図 1 の模式図に示すように、L 鎖 (light chain、軽鎖) と呼ばれるポリペプチド鎖 2 本と、H 鎖 (heavy chain、重鎖) と呼ばれるポリペプチド鎖 2 本が、Y 字型の対をなした構造を有しており、F a b ' 抗体とは、V H 領域および C H 1 領域からなる F d 鎖 (ヒンジ領域より N 末端側の H 鎖) と、V L 領域および C L 領域とからなる L 鎖とが - S - S - 結合で連結した F a b 部分に、ヒンジ領域またはその一部が付加した抗体の断片をいう。

本発明で用いる F a b ' 抗体は、抗原の検出のために用いることから、分析用試料に含まれる該抗原と特異的に反応して、免疫複合体を形成するものでなければならない。本発明の定量的検出方法の検出対象である抗原の種類に関しては、抗原抗体反応を生じるものであればよく、特に制限はない。分析用試料に関しても特に制限はなく、検出対象である抗原を含むものであればよい。

また、本発明で用いる F a b ' 抗体は、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加されているが、本発明において荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加された F a b ' 抗体とは、+ または - に荷電する荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が、F a b ' 抗体の F d 鎖、L 鎖、ヒンジ領域 (またはその一部) のいずれかの部位に少なくとも 1 つ付加したものをいう。+ に荷電する荷電性アミノ酸としては、アルギニン、リシン等が挙げられ、- に荷電する荷電性アミノ酸としては、アス

パラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加される F a b ' 抗体の部位は特に制限されないが、F a b ' 抗体が抗原と結合する部位は V H 領域および V L 領域に存在しているため、抗原抗体反応になるべく影響を与えないという観点から、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列は、F a b ' 抗体の H 鎖または L 鎖に C 末端側に付加されていることが好ましい。なかでも、L 鎖の C 末端に隣接するように付加されていることが好ましい。また、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列のアミノ酸残基の数は 1 以上であればよく特に制限されないが、その数は 1 ~ 5 0 であることが好ましい。また、当該アミノ酸配列中の荷電性アミノ酸残基の数も特に制限されないが、その数は 1 ~ 3 0 であることが好ましい。

F a b ' 抗体に、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列を付加する方法に関して特に制限はないが、例えば、後述するように、等電点均一化 F a b ' 抗体を発現する遺伝子を鋳型として、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列を付加するためのプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行うことにより、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加された等電点均一化 F a b ' 抗体を発現する遺伝子が得られるので、これにより形質転換された宿主細胞を培養すればよい。また、等電点均一化 F a b ' 抗体に別途合成した荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列を結合させてもよい。

本発明で用いる F a b ' 抗体は、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列の付加されていることに加えて、等電点も均一化されている。F a b ' 抗体に等電点の均一性を付与する方法については、特に制限はないが、後述するように、F a b ' 抗体の C H 1 領域におけるアミド基含有アミノ酸 (アスパラギンおよび/またはグルタミン) を、システインを除くアミド基非含有アミノ酸に遺伝子工学的に変異させることにより等電点の均一性を付与することが好ましい。

本発明で用いる F a b ' 抗体は、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、等電点が均一化されているが、これに加え発蛍光団色素により標識されている。発蛍光団色素としては、ローダミン、フルオレセイン、シアニン、インドシアニン、インドカルボシアニン、ピロニン、ルシファーイエロー、キナクリン、スクエア酸、クマリン、フルオロアンセルナルレイミド、アントラセン等を挙げることができる。発蛍光団色素としてはローダミンおよび/またはシアニンを用いることが好ましく、ローダミンを用いることがより好ましい。ローダミンは、メタノール中において、5 5 6 n m に極大吸収 (モル吸光係数 9 3 , 0 0 0) を有し、また 5 7 6 n m を極大とする蛍光を発する。ローダミンに関しては、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 5th Edition MOLECULAR PROBES, INC., 1992 を参照することができる。

更に、本発明においては、アントラセン、ナフタレン、フェナントレン、キノリン、ピレン、ペリレン等に代表される芳香族複素環式化合物や多環芳香族炭化水素を発蛍光団色素として用いることも可能である。このような発蛍光団色素に関しては、例えば、蛍光リン分析、西川泰治、平木敬三著、共立出版、1989を参照することができる。

上記の発蛍光団色素とF a b '抗体とを反応させる場合、発蛍光団色素により標識されるF a b '抗体の部位には特に制限はないが、発蛍光団色素はF a b '抗体のシステイン残基のS H基に結合することが好ましく、F a b '抗体のC H 1領域のC末端に隣接するアミノ酸配列におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基のS H基に結合させることがより好ましい。

上記の発蛍光団色素とF a b '抗体とを反応させる場合、反応により生じる結合の種類についても特に制限はないが、結合は、チオエステル結合、ジチオエステル結合、チオエーテル結合からなる群より選ばれる少なくとも1つの結合であることが好ましい。このとき、F a b '抗体のアミノ酸残基が有するS H基等の官能基に発蛍光団色素を直接反応させてもよいが、発蛍光団色素中の官能基(例えば、ハロゲン化メチル基、活性エステル基、酸塩化物基、酸無水物基、マレイミド基等)に反応性の官能基と、F a b '抗体のアミノ酸残基が有するS H基等の官能基に反応性の官能基とをそれぞれ少なくとも1個有した多官能化合物を介して結合させてもよい。

本発明においては、第1の工程に続く第2の工程として、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ発蛍光団色素で標識された上記の等電点均一化F a b '抗体と、上記の抗原を含む分析用試料とを混合し、免疫複合体を含む混合物を得る。

第2の工程において複合体を形成せしめる方法は特に制限されない。例えば、抗原を含む分析用試料を所望の濃度で超純水もしくは緩衝液に溶解した溶液と、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され発蛍光団色素で標識された等電点均一化F a b '抗体(以下、場合により、荷電性の蛍光標識等電点均一化F a b '抗体と呼ぶことがある)を所望の濃度で超純水もしくは緩衝液に溶解した溶液を混合し、低温(4程度)~室温(25程度)で数分~数十分保持することにより、複合体を形成させることが可能である。抗原と、荷電性の蛍光標識等電点均一化F a b '抗体との混合溶液は、さらに電気泳動用の泳動担体に溶解させる。泳動担体は電気泳動の種類によって異なり、例えば、スラブゲル等電点電気泳動を行う場合は、ポリアクリルアミドゲル等が泳動担体として用いられ、キャピラリー等電点電気泳動を行う場合は、Pharmalyte(アマシャム ファルマシアパイオテク社製)等の両性担体が用いられる。なお、キャピラリー等電点電気泳動を行う場合は、電気浸透流やタンパク質の吸着を防ぐために、ヒドロキシプロピルメチル

セルロース等をさらに添加してもよい。

第3の工程では、第2の工程で得られた混合物を担体中で電気泳動させ、該混合物を分離させる。

第3の工程において実施する電気泳動の方法に関しては、特に制限はないが、検出精度が高いことから等電点電気泳動法によることが好ましい。また、免疫複合体が微量しか存在しない場合であっても検出が可能ことから、キャピラリー電気泳動法を用いることが好ましい。また、マイクロセル電気泳動法やチップ電気泳動法を用いることも可能である。本発明においては、微量の免疫複合体を高精度で検出が可能キャピラリー等電点電気泳動法を用いることがより好ましい。

キャピラリー電気泳動を行う場合のキャピラリーとしては、例えば、ソーダ石灰ガラス等からなり、内径が数十~百 μ m程度、外径が数百 μ m程度、長さが数十~百cm程度のものが用いられる。なお、これらの寸法、特に長さは、測定しようとする免疫複合体の種類等によって適宜選択される。

印加する電圧についても特に制限はなく、電気泳動の種類、測定しようとする免疫複合体の種類や濃度、泳動担体の形状や長さ、用いる電気泳動装置の種類等により適宜選択が可能である。

第4の工程においては、第3の工程で分離された混合物に、発蛍光団色素を励起可能な励起光を照射して、免疫複合体に蛍光を生じせしめる

励起光の種類に関して特に制限はない。発蛍光団色素としてローダミンを用いる場合は、アルゴンレーザー、半導体励起Y A Gレーザー、ヘリウムネオンレーザー等を好適に用いることができる。

第5の工程では、第4の工程で生じた蛍光を検出する。蛍光を掲出する手段としては蛍光検出が可能光検出器を用いることができる。光検出器としては、例えば、デンストメータ(例えば、島津製作所製、島津二波長フライングスポットスキャンデンストメータC S 9 3 0 0 P C)を好適に用いることができる。

光検出器により蛍光強度が測定されるが、用いた発蛍光団色素に関して、濃度-蛍光強度との関係をあらかじめ測定して得られたデータに基づいて、検出した複合体の濃度を定量化することが可能である。

以上説明したように、本発明においては用いられる抗体は、等電点が均一であるため、電気泳動の結果複数のピークが観察された場合は、その複数のピークは抗原の等電点の不均一性に起因するものであると特定することができる。また、本発明において用いられる抗体は、発蛍光団色素等により蛍光標識されているため高精度の検出が可能である。さらに、本発明において用いられる抗体は、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加されているために、荷電性アミノ酸残基の種類および/または導入量を変化させることにより、等電点の均一性を保ったまま等電点を所望の値に変化させることができる

ため、測定対象である抗原の等電点と抗体の等電点が近い場合であっても、電気泳動の結果、免疫複合体と、余剰の抗原および/または抗体がほぼ等しい移動時間で検出されることがなく、精度の高い検出が可能になる。

上述したShimura Kおよび Karger BLの方法で用いられるF a b ' 抗体も、化学変性することにより電荷を付与し等電点を抗体の等電点と異なるようにすることも不可能ではないが、化学変性のために使用するF a b ' 抗体の官能基(例えば、アミノ基)は、抗体中にランダムに分布しているため均一な変性が不可能であり、また、変性によって等電点の均一性が損なわれることも考えられる。したがって、Shimura Kおよび Karger BLの方法では、測定対象である抗原の等電点と蛍光標識された抗体の等電点が近い場合、精度の高い検出をすることが不可能である。

本発明においては、抗体の定量的検出に用いる荷電性の蛍光標識等電点均一化F a b ' 抗体は、以下に述べる遺伝子工学的的手法による第1~第5の製造方法のいずれかにより製造することが好ましい。

遺伝子工学的的手法による第1の製造方法は、F a b ' 抗体のVH領域、CH1領域、および該CH1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするFd鎖遺伝子を提供する第1の工程と、前記Fd鎖遺伝子において、前記CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変Fd鎖遺伝子を得る第2の工程と、前記改変Fd鎖遺伝子と、前記F a b ' 抗体のL鎖をコードするL鎖遺伝子とを発現可能な状態で連結させ、改変F a b ' 抗体発現遺伝子を得る第3の工程と、前記改変F a b ' 抗体発現遺伝子を、前記L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変F a b ' 抗体発現遺伝子を得る第4の工程と、前記荷電性付与改変F a b ' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化F a b ' 抗体を得る第5の工程と、前記第5の工程で得られた等電点均一化F a b ' 抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に蛍光団色素を結合させる第6の工程とを含む製造方法である。

第1の工程において、F a b ' 抗体のVH領域、CH1領域、および該CH1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするFd鎖遺伝子を提供する方法には特に制限はなく、例えば、以下に述べるような方法により得ることができる。

すなわち、抗原で動物を免疫した後、例えば、Autibodies : A Laboratory Manual, Chapter 6, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988に記載の方法に準じて、モノクローナル抗体生産細胞(ハイブリドーマ)を調製し、このモノクローナル抗体生産細胞から、例えば、BioMag mRNA purification kit (PerSeptive社)のプロトコールに従って全mRNAを抽出して、このmRNAを用いて1本鎖cDNAを合成する(例えば、アマシャム ファルマシアバイオテク社製、cDNA合成システム・プラスを好適に使用することができる)。

次いで、この1本鎖cDNAを鋳型にして、CH1領域のC末端に隣接する部分にL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列を導入するように設計したFd鎖遺伝子単離用のDNAプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによりFd鎖遺伝子を得ることができる。このFd鎖遺伝子単離用のDNAプライマーは、例えば、Kabatらの分類した可変領域(V領域)と定常領域(C領域)の核酸塩基配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1991)を参考にすることができる。また、CH1領域のC末端に隣接する部分にL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列を導入するためのプライマーの設計には、Hoogenboom HR et al. (Nucleic Acids Res 1991 Aug 11;19(15):4133-7), Kang AS et al. (Methods (San Diego) (1991), 2(2), 111 -18)等の各種文献を参考にすることができる。

CH1領域のC末端に隣接する部分に導入するアミノ酸配列のアミノ酸残基の数は1以上であればよく特に制限されないが、その数は1~30であることが好ましい。また、当該アミノ酸配列中のシステイン残基の数も特に制限されないが、その数は1~3であることが好ましく、1であることがより好ましい。

なお、モノクローナル抗体生産細胞を調製するにあたり、動物を免疫する抗原の種類、および抗原で免疫される動物の種類には特に制限はない。抗体遺伝子としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ由来のものが使用できる。抗体のクラスおよびサブクラスについても特に制限はないが、全抗体中に占める割合が多いことからIgG抗体を構成する配列を用いることが好ましい。

第2の工程では、前記Fd鎖遺伝子において、前記CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させるが、この変異の方法については特に制限はない。例えば、遺伝子のヌクレオチド配列の変異法として多用される部位特異的突然変異誘発(site-specific mutagenesis)が適用可能である。部位特異的突然変異誘発の方法に関しては、例えば、Sambrook et al., Molecular C

loning : A Laboratory Manual 2nd Edition, 15.2- 15.113, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参考にすることができる。

上記の部位特異的変異は、C H 1領域のアミド基含有アミノ酸残基の少なくとも一つをシステインを除くアミド基非含有アミノ酸残基に置換するように設計されたC H 1領域増幅用プライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応により実施されることが好ましい。このC H 1領域増幅用プライマーは、F d鎖のC H 1領域における少なくとも一つのアミド基含有アミノ酸残基を含む領域をコードする塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーであって、該塩基配列におけるアミド基含有アミノ酸をコードするコドンに相補的なコドンの少なくとも一つが、システインを除くアミド基非含有アミノ酸をコードするコドンに相補的なコドンに置換されたプライマーである。

上記のアミド基含有アミノ酸残基とは、側鎖にアミド基を有するアミノ酸残基を意味し、このようなアミノ酸残基としては、アスパラギン残基およびグルタミン残基が挙げられる。第2の工程においては、これらのアミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させる。ここで、アミド基非含有アミノ酸残基とは、側鎖にアミド基を有しないアミノ酸残基を意味する。システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基としては、天然アミノ酸残基および非天然アミノ酸残基のいずれも適用可能である。天然アミノ酸残基としては、グリシン残基、アラニン残基、バリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、セリン残基、トレオニン残基、メチオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、リシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、プロリン残基、ヒスチジン残基、およびトリプトファン残基が挙げられる。また、非天然アミノ酸残基としては、天然アミノ酸の側鎖を芳香環等で置換したアミノ酸、化学合成したアミノ酸等の人工アミノ酸の残基等が挙げられる。

本発明においては、アミド基含有アミノ酸残基の少なくとも一つをシステインを除くアミド基非含有アミノ酸残基に変異させることが好ましいが、アミド基非含有アミノ酸残基としてシステイン残基を用いた場合は、得られるF a b '抗体の等電点は均一になるものの、L鎖との結合に関与しないシステイン残基が多数導入されることとなり、システイン残基を介して発蛍光団色素を結合させた場合、発蛍光団色素の数と位置が不特定となり、複数の等電点を示す混合物となってしまう。このために、本発明においては、アミド基非含有アミノ酸残基としてシステイン残基を用いないことが好ましい。

本発明においては、得られる等電点均一化F a b '抗体の等電点の均一性が優れることから、上記のアミド基非含有アミノ酸残基は、アスパラギン酸残基、グルタミ

ン酸残基、グリシン残基、またはセリン残基であることが好ましい。また、用いるF a b '抗体が、カバットの番号付けによるH鎖第162番にアスパラギン残基を有するF a b '抗体であって、このアスパラギン残基をシステインを除くアミド基非含有アミノ酸残基に部位特異的変異させることが好ましい。本発明においては、カバットの番号付けによるH鎖第162番のアスパラギン残基を、アスパラギン酸残基に変異させることが更に好ましい。カバットの番号付けによるH鎖第162番にアスパラギン残基を有するF a b '抗体としては、マウスI g G抗体由来のF a b '抗体や、ヒトI g G抗体由来のF a b '抗体が挙げられる。マウスI g G抗体およびヒトI g G抗体には様々なサブクラスが存在するが、サブクラスが異なるものであっても、これらの抗体由来のF a b '抗体はカバットの番号付けによるH鎖第162番にアスパラギン残基を有している。ここで、カバットの番号付けによるH鎖162番のアミノ酸残基とは、F a b '抗体のH鎖(F d鎖)における162番目のアミノ酸残基を意味し、この162番は、Elvin A Kabatによる、Sequences of Proteins of Immunological Interest (Paperback 5th edition (September 1992))に記載の方法に基づいて特定されるアミノ酸残基の位置を意味する。なお、F a b '抗体のカバットの番号付けによるH鎖第162番はF d鎖のC H 1領域中に存在する。

第3の工程において、上述した第2の工程により得られた改変F d鎖遺伝子を、F a b '抗体のL鎖をコードするL鎖遺伝子と発現可能な状態で連結させ、改変F a b '抗体発現遺伝子を得る。

F a b '抗体のL鎖をコードするL鎖遺伝子は、第1の工程においてF d鎖遺伝子を得る方法と同様の方法により得ることができる。すなわち、抗原で動物を免疫した後、モノクローナル抗体生産細胞(ハイブリドーマ)を調製し、このモノクローナル抗体生産細胞から、全mRNAを抽出して、このmRNAを用いて1本鎖cDNAを合成し、このcDNAを鋳型としてL鎖遺伝子単離用DNAプライマーを用いてPCRを行えばよい。L鎖遺伝子は、第1の工程においてF d鎖遺伝子を単離すると同時に得ることもできる。この場合は、第1の工程において、F d鎖遺伝子単離用DNAプライマーとL鎖遺伝子単離用DNAプライマーを併用し、cDNAを鋳型としてPCRを行えばよい。

本発明においては、F d鎖遺伝子におけるC H 1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つをシステインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させることに加え、上記のようにして得られたL鎖遺伝子における、C L領域のアミド基含有アミノ酸残基(アスパラギン残基および/またはグルタミン残基)をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させ

てもよい。この部位特異的変異は、改変 F d 鎖遺伝子と発現可能な状態で連結させる前もしくは後に行うことができる。この場合、用いる F a b ' 抗体が、カバットの番号付けによる L 鎖第 157 番、L 鎖第 161 番、L 鎖第 190 番（いずれも C L 領域中に存在）の少なくとも 1 つにアスパラギン残基を有する F a b ' 抗体であることが好ましく、このアスパラギン残基の少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基に部位特異的変異させることが好ましい。なかでも、カバットの番号付けによる L 鎖第 161 番のアスパラギン残基を、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基に部位特異的変異させることが好ましく、L 鎖第 161 番のアスパラギン残基をアスパラギン酸残基に変異させることが更に好ましい。部位特異的変異の方法に関しては、上記のように、Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd Edition, 15.2- 15.113, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 を参考にすることができる。また、C H 1 領域の場合と同様に、C L 領域の部位特異的変異は、C L 領域のアミド基含有アミノ酸残基の少なくとも一つをシステインを除くアミド基非含有アミノ酸残基に置換する C L 領域増幅用プライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応により実施されることが好ましい。

このようにして得られた L 鎖遺伝子と上記の改変 F d 鎖遺伝子とを、リンカー塩基配列等を介して連結させることにより、両遺伝子が発現可能な改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得ることができる。より詳しくは、L 鎖遺伝子、改変 F d 鎖遺伝子およびリンカー塩基配列を、例えば低融点アガロースゲル電気泳動で精製し、適当な制限酵素を用いてこれらを消化させ、改変 F d 鎖遺伝子、リンカー塩基配列、L 鎖遺伝子の順番に並ぶようにしてライゲーションすることにより、L 鎖遺伝子と改変 F d 鎖遺伝子とが発現可能な状態で連結した改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得ることができる。なお、リンカー塩基配列は、例えば、タンパク質発現用プラスミドベクターを鋳型とし、リンカー塩基配列単離用の DNA プライマーを用いて PCR により得ることができる。

上記の第 3 の工程に続く第 4 の工程において、前記改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得る。

この改変の方法は特に制限されないが、例えば、改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を鋳型として、F a b ' 抗体の L 鎖の C 末端に隣接する部分に荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列を付加するように設計されたプライマーを用いて PCR を行うことにより得ることが可能である。

第 5 の工程においては、前記荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質

転換体を培養することにより、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ C H 1 領域の C 末端に隣接して L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b ' 抗体を得る。

すなわち、第 4 の工程で得られた荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を適当なベクターに連結し、それを宿主細胞に導入し形質転換する。ベクターとしては、プラスミドに由来するもの、ファージに由来するもの、コスミド等様々な公知のベクターを使用することができる。宿主細胞としては、例えば、原核細胞すなわち、大腸菌 (SOLR, JM109, XL1-BlueKRF', BL21(DE3), HB2151)、枯草菌、パチルス・ブレビス (Bacillus brevis) 菌、真核細胞すなわち、酵母、動物由来の細胞 (HB101, CHO 細胞、COS 細胞、COP-5、C127、3T3 細胞等) を挙げることができる。宿主細胞としては、F a b ' 抗体が分解されにくい点から、タンパク質分解酵素非生産菌を使用することが好ましい。

ベクターを宿主細胞に導入する方法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法等を含む公知の方法が適用可能である。形質転換体の培養方法に関しても特に制限はなく、形質転換体の培養に適した培地を選択すればよい。また、形質転換体の培養により生産された等電点均一化 F a b ' 抗体を抽出する方法としては、細胞をホモジナイズする方法、S D S 等の界面活性剤や酵素を用いて細胞膜を溶解させる方法、超音波処理等がある。抽出された等電点均一化 F a b ' 抗体の精製法としては、例えば、超遠心や密度勾配遠心を利用した遠心分離法、アフィニティーカラム等を利用したカラム分離法、ポリアクリルアミドゲル等を利用したゲル分離法等が挙げられる。

第 6 の工程では、第 5 の工程で得られた等電点均一化 F a b ' 抗体の L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる。

発蛍光団色素としては上述したようなものを用いることができ、発蛍光団色素と等電点均一化 F a b ' 抗体とを反応させたときに生じる結合としては、上述のように、チオエステル結合、ジチオエステル結合、チオエーテル結合からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの結合であることが好ましい。このとき、等電点均一化 F a b ' 抗体の C H 1 領域の C 末端に隣接するアミノ酸配列中のシステイン残基の S H 基に発蛍光団色素を直接反応させてもよいが、発蛍光団色素中の官能基に反応性の官能基と、等電点均一化 F a b ' 抗体の前記 S H 基に反応性の官能基とをそれぞれ少なくとも 1 個有した多官能化合物を介して結合させてもよい。

以上述べた遺伝子工学的的手法による第 1 の製造方法では、第 3 の工程において改変 F d 鎖遺伝子と L 鎖遺伝子が発現可能な状態で連結させた後に、第 4 の工程において、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含む

アミノ酸配列が発現するように改変したが、改変 F d 鎖遺伝子と L 鎖遺伝子を連結させる前に、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように、L 鎖遺伝子を改変してもよい（この手法を、遺伝子工学的手法による第 2 の製造方法と呼ぶ）。

すなわち、遺伝子工学的手法による第 2 の製造方法においては、第 1 の工程において、F a b ' 抗体の V H 領域、C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする F d 鎖遺伝子を提供し、第 2 の工程において、前記 F d 鎖遺伝子の前記 C H 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変 F d 鎖遺伝子を得る。

この第 1 の工程および第 2 の工程は、上記の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 1 の工程および第 2 の工程と同様に行うことができる。なお、C H 1 領域の C 末端に隣接する部分に導入するアミノ酸配列のアミノ酸残基の数の好適な範囲、および当該アミノ酸配列中のシステイン残基の数の好適な範囲、抗原や抗体の種類は、遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法の第 1 の工程に記載と同様である。また、用いることのできるアミド基含有アミノ酸残基およびアミド基非含有アミノ酸残基の種類や好適な残基は、遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法の第 2 の工程に記載の方法と同様である。

第 3 の工程において、F a b ' 抗体の L 鎖をコードする L 鎖遺伝子を提供するが、L 鎖遺伝子は、上記の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 3 の工程に記載の方法と同様にして得ることができる。また、L 鎖遺伝子は、本製造方法の第 1 の工程において F d 鎖遺伝子を得ると同時に得ることもできる。

第 3 の工程に続く第 4 の工程においては、L 鎖遺伝子を、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与 L 鎖遺伝子を得る。この工程における改変は、上記の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 4 の工程に記載の方法と同様に行うことができる。なお、L 鎖遺伝子における、C L 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させてもよい。この部位特異的変異は第 3 の工程において行うこともできる。

第 5 の工程においては、上記改変 F d 鎖遺伝子と、上記荷電性付与 L 鎖遺伝子を発現可能な状態で連結させ、荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得る。この工程において、発現可能な状態で連結させる条件に関しては、上記の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 3 の工程に記載の方法と同様である。

次いで、第 6 の工程において、前記荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ C H 1 領域の C 末端に隣接して L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b ' 抗体を得て、第 7 の工程において、等電点均一化 F a b ' 抗体における L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる。この第 6 の工程および第 7 の工程は、上記の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 5 の工程および第 6 の工程にそれぞれ記載の方法と同様である。

以上述べた遺伝子工学的手法による第 1 および第 2 の製造方法では、F d 鎖遺伝子の部位特異的変異を行った後に、L 鎖遺伝子と連結を行ったが、遺伝子工学的手法による第 3 の製造方法として、F d 鎖遺伝子と L 鎖遺伝子とを連結した後に、F d 鎖遺伝子の部位特異的変異を行うことも可能である。

すなわち、まず、第 1 の工程として、F a b ' 抗体の V H 領域、C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする F d 鎖遺伝子と、該 F a b ' 抗体の L 鎖をコードする L 鎖遺伝子とを提供する工程を実施し、それに続く第 2 の工程において、この F d 鎖遺伝子と L 鎖遺伝子とを発現可能な状態で連結させ、F a b ' 抗体発現遺伝子を得る。ここで、F d 鎖遺伝子は、上述の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 1 の工程に記載の方法と同様にして得ることができ、L 鎖遺伝子は、遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 3 の工程に記載の方法と同様にして得ることができる。F d 鎖遺伝子および L 鎖遺伝子が発現可能な状態で連結させる方法も、遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 3 の工程に記載の方法と同様である。すなわち、タンパク質発現用プラスミドベクターを鋳型とし、リンカー塩基配列単離用の DNA プライマーを用いてリンカー塩基配列を得て、このリンカー塩基配列と F d 鎖遺伝子および L 鎖遺伝子をライゲーションすればよい。なお、C H 1 領域の C 末端に隣接する部分に導入するアミノ酸配列のアミノ酸残基の数の好適な範囲、および当該アミノ酸配列中のシステイン残基の数の好適な範囲も、遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法と同様である。

第 3 の工程では、前記 F a b ' 抗体発現遺伝子を、前記 L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、且つ、前記 F a b ' 抗体発現遺伝子における前記 C H 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得る。

ここで、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するようにする改変と、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異する改変とを行う順には特に制限はない。

例えば、Fab'抗体発現遺伝子を、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与Fab'抗体発現遺伝子を得て、該荷電性付与Fab'抗体発現遺伝子における、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異し、荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子を得てもよく、Fab'抗体発現遺伝子における、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異し、改変Fab'抗体発現遺伝子を得て、該改変Fab'抗体発現遺伝子を、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子を得てもよい。

第3の工程における、部位特異的変異の方法は、上記の遺伝子工学的的手法による第1の製造方法における第2の工程に記載の方法と同様に行うことができる。用いることのできるアミド基含有アミノ酸およびアミド基非含有アミノ酸残基の種類や好適な残基に関しても、上記の遺伝子工学的的手法による第1の製造方法と同様である。また、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するようにする改変は、上記の遺

伝子工学的的手法による第1の製造方法における第4の工程に記載の方法と同様に行うことができる。なお、第3の工程において、Fab'抗体発現遺伝子におけるCL領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させてもよい。この部位特異的変異は第1の工程において行うこともできる。

第4の工程においては、第3の工程において得られた荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化Fab'抗体を得る。このとき用いられる宿主細胞の種類、宿主細胞に導入されるベクターの種類、ベクターを宿主細胞に導入する方法、および形質転換体の培養により生産された等電点均一化Fab'抗体を抽出する方法に関しては、上記の遺伝子工学的的手法による第1の製造方法における第5

の工程に記載の方法と同様である。

第5の工程においては、第4の工程で得られた等電点均一化Fab'抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる。用いられる発蛍光団色素および好適なもの種類、システイン残基と発蛍光団色素との結合に関しては、上記の遺伝子工学的的手法による第1の製造方法における第6の工程に記載の方法と同様である。

上記の遺伝子工学的的手法による第1～第3の製造方法に加えて、以下に述べる遺伝子工学的的手法による第4の製造方法も適用可能である。

すなわち、まず、第1の工程として、第1のFab'抗体のCH1領域、および該CH1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするCH1遺伝子と、該第1のFab'抗体のCL領域をコードするCL遺伝子とを提供する工程を行う。

第1の工程におけるCH1遺伝子は、例えば、上述のように、モノクローナル抗体生産細胞(ハイブリドーマ)細胞から、全mRNAを抽出して、このmRNAを用いて1本鎖cDNAを合成し、このcDNAを鋳型としてCH1領域をカバーするプライマーであって、CH1領域のC末端に隣接する部分にL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列を導入するためのプライマーを用いてPCRを行うことにより得ることができる。CH1遺伝子はCH1領域を含む領域をコードするものであればよく、CH1領域のみをコードするものでも、CH1領域とVH領域をコードするものでもよい。また、CH1領域とヒンジ領域をコードするものでもよい。なお、VH領域およびヒンジ領域に関してはその少なくとも一部をコードすればよい。なお、CH1領域のC末端に隣接する部分に導入するアミノ酸配列のアミノ酸残基の数の好適な範囲、および当該アミノ酸配列中のシステイン残基の数の好適な範囲、抗原や抗体の種類は、遺伝子工学的的手法による第1の製造方法の第1の工程に記載の方法と同様である。

第1の工程におけるCL遺伝子は、上記のCH1遺伝子を得ると同時にまたは別に、モノクローナル抗体生産細胞細胞由来のmRNAを用いて合成された1本鎖cDNAを鋳型として、CL遺伝子単離用プライマーを用いてPCRを行うことにより得ることができる。

なお、第1の工程で得られたCL遺伝子におけるアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させてもよい。

上記の第1の工程に続く第2の工程では、前記CH1遺伝子において、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドン

に部位特異的変異させて、改変 C H 1 遺伝子を得る。

この部位特異的変異の方法は、上記の遺伝子工学的的手法による第 1 の製造方法における第 2 の工程に記載の方法と同様に行うことができる。用いることのできるアミド基含有アミノ酸残基およびアミド基非含有アミノ酸残基の種類や好適な残基に関しても、上記の遺伝子工学的的手法による第 1 の製造方法と同様である。

次いで、第 3 の工程において、前記改変 C H 1 遺伝子を制限酵素で切断し C H 1 領域をコードする遺伝子を含む遺伝子断片を得る。ここで用いられる制限酵素に関し 10 ては特に制限はないが、制限酵素としては、例えば、BamHI、BglI を挙げることができる。

第 4 の工程において、第 2 の F a b ' 抗体の V H 領域をコードする V H 遺伝子と、該第 2 の F a b ' 抗体の V L 領域をコードする V L 遺伝子とを提供する。ここで第 2 の F a b ' 抗体の V H 遺伝子と V L 遺伝子は、例えば、第 2 の F a b ' 抗体が由来する抗体の mRNA を用いて 1 本鎖 c D N A を合成し、この c D N A を鋳型として V H 鎖遺伝子単離用 D N A プライマーおよび V L 遺伝子単離用 D N A プライマーを用いて P C R を行うことに 20 より得ることができる。なお、第 2 の F a b ' 抗体は、そのクラスやサブクラスが第 1 の F a b ' 抗体のものと異なっても同一であってもよい。例えば、第 2 の F a b ' 抗体がマウス I g A 抗体であり、第 1 の F a b ' 抗体がマウス I g G 抗体であってもよい。更に、第 2 の F a b ' 抗体が由来する動物種は、第 1 の F a b ' 抗体のものと異なっても同一であってもよい。例えば、第 2 の F a b ' 抗体がヒト I g G 抗体であり、第 1 の F a b ' 抗体がマウス I g G 抗体であってもよい。

第 4 の工程に続く第 5 の工程においては、上記遺伝子 30 断片、上記 C L 遺伝子、上記 V H 遺伝子、および上記 V L 遺伝子を発現可能な状態で連結し、改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得る。発現可能な状態で連結させる方法は、遺伝子工学的的手法による第 1 の製造方法における第 3 の工程に記載の方法と同様である。

第 6 の工程として、前記改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を、前記 F a b ' 抗体の L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子を得る。第 6 の工程における改変は、上記の遺伝子工学的的手法によ 40 る第 1 の製造方法における第 4 の工程に記載の方法と同様に行うことができる。

次いで第 7 の工程において、前記荷電性付与改変 F a b ' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ C H 1 領域の C 末端に隣接して L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b ' 抗体を得る。

このとき用いられる宿主細胞の種類、宿主細胞に導入 50

されるベクターの種類、ベクターを宿主細胞に導入する方法、および形質転換体の培養により生産された等電点均一化 F a b ' 抗体を抽出する方法に関しては、上記の遺伝子工学的的手法による第 1 の製造方法における第 5 の工程に記載の方法と同様である。

第 8 の工程において、第 7 の工程で得られた等電点均一化 F a b ' 抗体における L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる。用いられる発蛍光団色素および好適なものの種類、システイン残基と発蛍光団色素との結合に関しては、上記の遺伝子工学的的手法による第 1 の製造方法における第 6 の工程に記載の方法と同様である。

以上述べた遺伝子工学的的手法による第 4 の製造方法では、第 5 の工程において改変 C H 1 遺伝子の遺伝子断片、C L 遺伝子、V H 遺伝子および V L 遺伝子を発現可能な状態で連結させた後に、第 6 の工程において、C L 領域の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変したが、C L 遺伝子をその他の遺伝子（または遺伝子断片）と連結させる前に、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変してもよい（この手法を、遺伝子工学的的手法による第 5 の製造方法と呼ぶ）。

すなわち、遺伝子工学的的手法による第 5 の製造方法においては、第 1 の工程において、第 1 の F a b ' 抗体の C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする C H 1 遺伝子と、該第 1 の F a b ' 抗体の C L 領域をコードする C L 遺伝子とを提供し、第 2 の工程では、前記 C H 1 遺伝子において、C H 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変 C H 1 遺伝子を得る。さらに、第 3 の工程において、前記改変 C H 1 遺伝子を制限酵素で切断し C H 1 領域をコードする遺伝子を含む遺伝子断片を得る。

遺伝子工学的的手法による第 5 の製造方法における第 1 ~ 第 3 の工程は、遺伝子工学的的手法による第 4 の製造方法における第 1 ~ 第 3 の工程と同様に行うことができる。また、第 1 の工程で得られた C L 遺伝子におけるアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させてもよい。

次いで、第 4 の工程において、前記 C L 遺伝子を、前記 C L 領域の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与 C L 遺伝子を得る。第 4 の工程における改変は、上記の遺伝子工学的的手法による第 1 の製造方法における第 4 の工程に記載の方法と同様に行うことができる。なお、この第 4 の工程は、第 2 の工程の前に行うこともできる。

次いで、第 5 の工程として、第 2 の F a b ' 抗体の V

H領域をコードするVH遺伝子と、該第2のFab'抗体のVL領域をコードするVL遺伝子を提供する工程を行い、第6の工程として、前記遺伝子断片、前記荷電性付与CL遺伝子、前記VH遺伝子および前記VL遺伝子を発現可能な状態で連結し、荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子を得る。

VH遺伝子およびVL遺伝子を提供する工程は、遺伝子工学的的手法による第4の製造方法における第4の工程と同様にして行うことができ、発現可能な状態で連結させる方法は、遺伝子工学的的手法による第1の製造方法における第3の工程に記載の方法と同様にして行うことができる。

次いで第7の工程において、前記荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化Fab'抗体を得る。

このとき用いられる宿主細胞の種類、宿主細胞に導入されるベクターの種類、ベクターを宿主細胞に導入する方法、および形質転換体の培養により生産された等電点均一化Fab'抗体を抽出する方法に関しては、上記の遺伝子工学的的手法による第1の製造方法における第5の工程に記載の方法と同様である。

第8の工程において、第7の工程で得られた等電点均一化Fab'抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる。用いられる発蛍光団色素および好適なもの種類、システイン残基と発蛍光団色素との結合に関しては、上記の遺伝子工学的的手法による第1の製造方法における第6の工程に記載の方法と同様である。

(実施例)

以下、本発明の好適な実施例についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、実施例において、遺伝子工学的的手法に関して特に記載のないものはSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に従った。また、特に、記載のない試薬類は宝酒造株式会社または和光純薬工業株式会社より購入の試薬を使用した。

本実施例において使用する略語の名称を以下に示す。

PCR: ポリメラーゼ連鎖反応(遺伝子増幅法)

BAP: bacterial alkaline phosphatase

IPTG: isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

PBS: phosphate buffered saline

BSA: bovine serum albumin

(1) ハイブリドーマの樹立

ヒトアルファ1アンチトリプシン(カルピオケム-ノ

バピオケム社製)を免疫抗原として用い、抗ヒトアルファ1アンチトリプシン抗体を産生するハイブリドーマを以下に示す方法により作製した。

上記免疫原でBALB/cマウスを4回免疫後、脾細胞を採取し、培養マウス骨髄細胞[X63Ag8]とポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行い、クローニングした。得られたクローンの培養上清中の抗体の前述の免疫原への結合活性を酵素抗体法にて測定し、反応が陽性と思われるクローンについて、さらに、間接蛍光法を用いて確認し、抗アルファ1アンチトリプシン抗体を産生するハイブリドーマを9種類確立した。これらハイブリドーマ産出の抗体はヒトアルファ1アンチトリプシンに結合するものである。以下に述べる等電点均一化Fab'抗体のFd鎖遺伝子、L鎖(鎖)遺伝子の調製には、抗アルファ1アンチトリプシン活性を有するこれらの抗ヒトアルファ1アンチトリプシン抗体を産生する細胞を使用した。

(2) 抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体発現遺伝子の単離

ヒトアルファ1アンチトリプシンに対するIgG1抗体を産出するハイブリドーマより抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体発現遺伝子を以下のように単離した。

すなわち、抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体を産生する細胞からBioMag mRNA purification kit (PerSeptive)のプロトコールに従って全RNAを抽出し、cDNA合成システム・プラス(アマシャムファルマシアバイオテク社製)を用いて1本鎖cDNAを合成した。Kabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1991)の分類した可変領域(V領域)と定常領域(C領域)の核酸塩基配列をもとにして合成した、Fd鎖遺伝子単離用DNAプライマーおよびL鎖遺伝子単離用DNAプライマーを用いて、上記1本鎖cDNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。ここで、プライマー設計には、Hoogenboomら(Nucleic Acids Res 1991 Aug 11;19(15):413-7)、及びKang ASら(Methods (San Diego) (1991), 2(2), 111-18)の文献を参考にした。

ヒトアルファ1アンチトリプシンに対して結合する抗体は、Fab'抗体として発現させるため、重鎖(H鎖)、軽鎖(L鎖)ともに定常領域を含むようにDNAプライマーを設計した。すなわち、Fd鎖遺伝子単離用DNAプライマーとして、5'側プライマー(以下に示すF5-1プライマー)および3'側プライマー(以下に示すF3プライマー)を設計し、L鎖遺伝子単離用DNAプライマーとして、5'側プライマー(以下に示すKapper 5プライマー)および3'側プライマー(以下に示すK3-1プライマー)を設計した。

Fd鎖遺伝子単離用の5'側プライマーであるF5-

31

1 プライマーは、以下に示す配列 (配列番号 1) を有するものを用い、F d 鎖遺伝子単離用の 3' 側プライマーである F 3 プライマーは、以下に示す配列 (配列番号 2) を有するものを用いた。なお、以下の配列において、5'、3' は、それぞれプライマーの 5' 側、3' 側を表し、S は C または G、M は A または C、R は A または G、W は A または T を示す。

F 5-1 プライマー (配列番号 1):

5' SAGGTSMARCTGCAGSAGTCNGG 3'

F 3 プライマー (配列番号 2):

5' CGGTCATCTAGAACAACCACAATCCCTGGGCACA 3'

なお、F 3 プライマーは、CH 1 領域の C 末端に隣接する部分に L 鎖とのジスルフィド結合に関与しないシステイン残基を含む塩基配列を導入可能なように設計し、また、リンカーを介して L 鎖と連結させるため、Xba I サイトが付加するように設計した。

L 鎖遺伝子単離用の 5' 側プライマーである K a p p e r 5 プライマーは、以下に示す配列 (配列番号 3) を有するものを用い、L 鎖遺伝子単離用の 3' 側プライマーである K 3-1 プライマーは、以下に示す配列 (配列番号 4) を有するものを用いた。なお、W は A または T、S は C または G、B は A 以外の塩基、N は A、T、G、C、M は A または C、D は C 以外の塩基、Y は C または T、H は G 以外の塩基をそれぞれ表す。

Kapper 5 プライマー (配列番号 3):

5' CCAGWTSYGAGCTCSNBNTSACNCAGNMDYCH 3'

K 3-1 プライマー (配列番号 4):

5' ACACTCATTCCTGTGGAAGCT 3'

PCR の条件は、9 4 1 分、5 5 1 分、7 2 1 分で 3 0 サイクル行った。PCR 後、得られた F d 鎖、リンカー塩基配列、L 鎖 (鎖) の DNA 断片を、低融点アガロースゲル電気泳動で精製し、F d 鎖を Xba I で、リンカー塩基配列を Xba I、Sac I で、L 鎖 (鎖) を Sac I で消化した。リンカー塩基配列を挟んで、F d 鎖、リンカー塩基配列、L 鎖 (鎖) の順番に並ぶように、各 DNA 断片をライゲーションした。ライゲーション産物をフェーノール/クロロフォルム/イソアミルアルコール (25/24/1) で抽出した。これを TE バッファーに溶解し、鋳型として、F d 鎖の 5' 側に Sfi I サイト、L 鎖の 3' 側に Not I サイトを付加するように設計されたプライマーで再度、PCR を行った。PCR は、9 4 1 分、5 5 1 分、7 2 2.5 分で 2 5 サイクル行った。

得られた PCR 増幅産物を精製後、Sfi I (20U per reaction) で 5 0 にて 4 時間、Not I (40U per reaction) で 3 7 にて 4 時間で消化した。これを pCANTAB5E プラスミドベクター (アマシャム ファルマシアバイオテ

32

社製) にクローニングした (図 2 A および B 参照)。pCANTAB5E プラスミドベクターは、ベクターに組み込まれた遺伝子を発現し、大腸菌のペリプラズム外に遺伝子由来の蛋白質を分泌するシグナルペプチドを含有している。ベクター構築の手順および方法に関しては、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

(3) 抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン F a b' 抗体発現のための形質転換

抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン F a b' 抗体発現遺伝子を pCANTAB5E プラスミドベクターにクローニングした抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン F a b' 抗体発現プラスミドを、市販の大腸菌 HB2151 (アマシャム ファルマシアバイオテク社製) に形質転換した。大腸菌 HB2151 のコンピテント細胞化は Expression Module/Recombinant Phage Antibody System (アマシャム ファルマシアバイオテク社製) のプロトコールに従った。形質転換した大腸菌 HB2151 を SOBAG 培地に播き、3 0 でオーバーナイトでインキュベーションした。生じたコロニーで HRP/Anti-E tag Conjugate (アマシャム ファルマシアバイオテク社製) のプロトコールに従いコロニーリフトアッセイ (colony lift assay) を行ない、ヒト アルファ 1 アンチトリプシンに対して抗原抗体反応を起す F a b' 抗体発現菌をスクリーニングした。

スクリーニングした F a b' 抗体発現菌を複数個選択して Expression Module/Recombinant Phage Antibody System (アマシャム ファルマシアバイオテク社製) のプロトコールに従い、2YT-AG 培地に接種し、3 0 で一夜振盪培養した。振盪培養した培養液を 1 0 倍量の 2YT-AG 培地に加え、3 0 で A600 が、0.5 になるまで振盪培養した。室温で遠心分離して、集菌し、上清を除いた。菌を同量の、2YT-AI (グルコース不含、100 μg/ml アンピシリン、1mM IPTG を含む) 培地に懸濁して、3 0 で終夜振盪培養し、抗体を誘導した。次いで、遠心分離で菌を沈殿化して、上清を取り、IPTG により誘導された抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン F a b' 抗体を含む培養上清を 1 0 0 μl 用い、マイクロタイタープレートに抗原吸着プレートとして、ヒト アルファ 1 アンチトリプシン (カルビオケム-ノババイオケム社製) を固定化し、HRP/Anti-E tag Conjugate (アマシャム ファルマシアバイオテク社製) のプロトコールに従い、ELISA を行い抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン F a b' 抗体発現菌をスクリーニングした。

(4) 塩基配列決定用の形質転換と抗体遺伝子の塩基配列の決定

スクリーニングにより得られた抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン F a b' 抗体発現菌よりプラスミド DNA を抽出し、塩基配列決定用に、市販の大腸菌 XL10-GOLD (Stratagene 社製) に形質転換した。抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン F a b' 抗体発現遺伝子で形質転換した XL10-GOLD は Epicurian Coli XL10-Gold ultracompete

nt Cells (Stratagene社製)に従い、抗体遺伝子を発現するベクターのDNA(約10ng)を混合し、30分間水中に放置した。次いで42℃で30秒間熱処理を行った後、NZY培地(NZアミン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム5g、塩化マグネシウム12.5mM、硫酸マグネシウム12.5mM、グルコース20mM)、pH7、5:1リットルあたり)900μLを加え、37℃で約1時間振盪培養した。50μg/mlアンピシリンを含むLB寒天培地(トリプシン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム5g、寒天15g[pH7]:1リットルあたり)に塗り広げ、形質転換された抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体発現遺伝子を含む耐性株を選抜した。

選抜した耐性株より、抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体発現遺伝子を含むpCANTAB5Eプラスミドを抽出して、ジデオキシヌクレオチド(パーキンエルマー社製)を用いたチェーンターミネータ法により抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体発現遺伝子の各部の塩基配列を決定したところ発現可能なオープンリーディングフレーム(ORF)をとっていた。また、単離された抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体発現遺伝子は、Fd鎖遺伝子(VH領域およびCH1領域の遺伝子)およびL鎖遺伝子(VL領域およびCL領域の遺伝子)を含むものであった。

(5)大腸菌産出抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体の誘導と精製

大腸菌産出抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体を以下に示す実験に使用するべく、スクリーニングした細胞株を用い、培養スケールを拡大して抗体を誘導し、精製した。すなわち、RPAS Purification Module(アマシャムファルマシアバイオテク社製)のプロトコールに従い以下の手順で抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体の誘導および精製を行った。

スクリーニングした抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体発現遺伝子を含む大腸菌HB2151細胞株より、単一コロニーを拾い、Expression Module/Recombinant Phage Antibody System(アマシャムファルマシアバイオテク社製)のプロトコールに従い、2YT-AG培地に接種し、30℃で一晩振盪培養した。振盪培養した培養液を10倍量の2YT-AG培地に加え、30℃でA600が0.5になるまで振盪培養した。室温で遠心分離して、集菌し、上清を除いた。菌を同量の、2YT-AI(グルコース不含)培地に懸濁して、30℃で終夜振盪培養した。遠心分離で菌を沈殿化して、上清を取り、0.45μmのフィルター(ミリポア社製)で濾過したあと、pHを7に調整して、培養上清とした。

IPTGにより誘導された抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体を含む培養上清を抗E-tagアフィニティカラムを使用し、5ml/分の流速でカラムに結合させ、添付の洗浄バッファー(Binding buffer)25ml(5ml

l/分の流速)を流して、抗体を含まない培養上清を洗い出し、添付の溶出バッファー(Elution buffer)10mlにて大腸菌産出抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体を溶出(5ml/分の流速)させた。溶出した抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体に、ただちに、中和バッファー(Neutralization buffer)を溶出バッファー(Elution buffer)に対して10分の1量加えて、中和した。以上のように、抗E-tag抗体をリガンドとして用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。中和された抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体はマイクロコン(画分分子量30000用)(ミリポア社製)を用いて、濃縮した後、PBSバッファー1mlに溶解して-80℃に保存した。

(6)大腸菌産出抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体の蛍光標識化

蛍光色素(蛍光標識剤)であるテトラメチルローダミン-5-ヨードアセタミドの調製は以下のように行った。すなわち、テトラメチルローダミン-6-ヨードアセタミド(モレキュラーブローブス社製)1mgを50%アセトニトリル0.6mlに溶解し、10,000rpm、5分間遠心分離を行い、沈澱を除去した。上澄を25%アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸溶液で平衡化した逆相クロマトグラフカラム(東ソ-ODS-80Ts、直径4.6mm、長さ25cm)にかけ、30分間にわたって25~55%のアセトニトリルの濃度直線勾配をかけて溶出し、280nmの吸収をモニターすることで検出を行った。最も大きなピークを分取し、543nmにおけるモル吸光係数を87,000として吸光度測定によってその濃度を決定した。これを精製テトラメチルローダミン-5-ヨードアセタミドとして、精製した抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体の蛍光標識に用いた。

精製した抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体は以下のようにして蛍光標識化した。すなわち、抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体濃縮液(100μl)を10倍量の0.1Mリン酸バッファー、5mMEDTA入り(pH7.0)で希釈し、マイクロコン(画分分子量30000用)(ミリポア社製)で遠心分離してバッファーを交換した。この操作を2回繰返した。抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体200μlに対して100mMメルカプトエチルアミン(ナカライテスク社製)を20μl加え、攪拌して37℃で30分インキュベートした。マイクロコン(画分分子量30000用)(ミリポア社製)で再び、20μlに濃縮して、200μlの0.1Mリン酸バッファー、5mMEDTA入り(pH7.5)で限外濾過を行った。

25nmolのテトラメチルローダミン-5-ヨードアセタミド(モレキュラーブローブス社製)を、5μlのN,N-ジメチルホルムアミド(シグマ社製)に溶解させ、75μlの0.1Mリン酸バッファー5mMEDTA入り(p

H7.5)) を加え、1 mM メルカプトエチルアミン (ナカライテスク社製) を 5 μ l 加え、37 °C で 10 分間インキュベートした。これをメルカプトエチルアミンで処理した抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン Fab' 抗体と混合し、暗所で一夜反応させた。反応産物は Sephadex G-25 (アマシャム ファルマシアバイオテック社製) で、反応していない蛍光色素と、蛍光標識した抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン Fab' 抗体 (蛍光色素 1 分子により標識されているため、以下場合により一分子蛍光標識抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン Fab' 抗体と呼ぶことがある) を分離して、以下の実験に用いた。一分子蛍光標識抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン Fab' 抗体の濃度は、543 nm におけるモル吸光係数を 87,000 として、吸光度測定によって決定した。

(7) 蛍光検出等電点電気泳動による評価

得られた一分子蛍光標識抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン Fab' 抗体をベックマン社製キャピラリー電気泳動装置 P/ACE5510 を用いて分離・検出を行った。キャピラリーとしては内壁をポリアクリルアミドで共有結合的に被覆した内径 0.05 mm、外径 0.375 mm、全長 27 cm の溶解シリカキャピラリー (ジーエルサイエンス社製) を使用し、陽極側から 20 cm の位置でレーザー励起による蛍光検出を行った。キャピラリーを Pharmalyte 3-10 (アマシャム ファルマシアバイオテック社製、原液の 40 倍希釈)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (Sigma 社製、以下 HPMC と略、終濃度 0.125%)、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED、ファルマシアバイオテック社製、終濃度 0.6%) を含む両性担体液で満たした後、一分子蛍光標識抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン Fab' 抗体を 2×10^{-8} M 含む両性担体液を陽極より高圧モードにて 30 秒間注入した。

陽極液として HPMC (終濃度 0.1%) を含む 20 mM リン酸、陽極液として 20 mM NaOH を用い、13.5 kV (500 V/cm) の電圧を 10 分間印荷した後、同じ電圧を維持したまま、陽極側に低圧モードで陽極液を注入し、pH 勾配中に焦点化した一分子蛍光標識抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン Fab' 抗体を検出した。蛍光色素の励起はアルゴンイオンレーザー (ベックマン社製、Laser Module 488) 波長 488 nm を用い、フィルターハウジングユニットには 488 nm ノッチフィルター (ベックマン社製) とローダミン用バンドパスフィルター (旭分光社製、特注品) をセットして検出を行った。得られた結果を図 3 に示す。図 3 からわかるように、大腸菌産出の一分子蛍光標識抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン Fab' 抗体の等電点は不均一であった。*

* (8) 部位特異的変異法による等電点不均一性の是正
抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン Fab' 抗体の等電点は不均一性を是正するために、以下に述べるような、C H 1 領域に部位特異的変異を生じせしめる DNA プライマーを設計して、抗体の改変を行った。なお、以下の実施例において、例えば、カバットの番号付けによる H 鎖第 162 番の N (アスパラギン) を D (アスパラギン酸) に変換する (または、変換した) ことを表す場合は、「H - N162D」なる記載を用いる場合がある。すなわち、カバットの番号付けによる H 鎖第 162 番の N (アスパラギン) を D (アスパラギン酸) に変換した Fab' 抗体を「H - N162D 改変 Fab' 抗体」のように表し、この抗体を発現する遺伝子を「H - N162D 改変 Fab' 抗体発現遺伝子」のように表す場合がある。

DNA プライマーとしては、以下の塩基配列を有する F5 - 1 プライマー (配列表における配列番号 5) および H - N162D - BamHI プライマー (配列表における配列番号 6) を用いた。なお、以下の配列において、5'、3' は、それぞれプライマーの 5' 側、3' 側を表し、S は C または G、M は A または C、R は A または G、W は A または T を示す。

F5 - 1 プライマー (配列番号 5) :

5' SAGGTSMBCTGCAGSAGTCWGG 3'

H-N162D-BamHI プライマー (配列番号 6) :

5' GCTGGACAGGGATCCAGAGTCCCAGGTCAGTCT 3'

これらのプライマーを用いて、(2) で得られた抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン Fab' 抗体発現遺伝子を鋳型として、PCR を行うことにより、カバットの番号付けによる H 鎖第 162 番の N (アスパラギン) が D (アスパラギン酸) に変換された遺伝子断片を調製し、これを BamHI で消化した。この消化産物に、抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン Fab' 抗体発現遺伝子の BamHI 消化産物を低融点アガロース電気泳動から回収した遺伝子断片をライゲーションした。

ライゲーションした産物を、(2) で用いたものと同じ pCANTAB5E プラスミドベクターに連結させるために、以下の塩基配列を有する F5 - 2 プライマーおよび K3 - 2 プライマーを用いて PCR を行い、SfiI、NotI の制限酵素を用いて消化した後、pCANTAB5E プラスミドベクターにライゲーションし、H - N162D 改変 Fab' 抗体発現遺伝子を含む発げベクターを作製した。

F5-2プライマー (配列番号7): ³⁸

5' CATGTGAACTGACTGGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGTCCAGCTGCAGCAGTCAGG 3'

K3-2プライマー (配列番号8):

5' CCACGATTCTGGCGCCGCACACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTTGTAAT 3'

上記発現ベクターを、大腸菌HB2151に形質転換した。上記と同様にして抗体を誘導し、ELISAによるスクリーニングをおこなった。陽性反応を示す菌からプラスミドを抽出して、大腸菌XL10菌へ形質転換した。形質転換されたXL10菌からシーケンス反応に使用する量のプラスミドを抽出して、H-N162D改変Fab'抗体発現遺伝子の塩基配列を確認した。改変体作製においては、ポリメラーゼとしては、適合度 (fidelity) の高いPyrobestポリメラーゼ (宝酒造社製) を用いた。塩基配列を*

AKTTPPSVYPLAPGSAAGTNSMVTLGCLVRGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPVQLQSDLYTLSSSVTVPS
STWNPSETVTCNVVAPASSTKVDKKIVPRDCGCSR

この配列において、C末端側 (右側) のVPRDCGCSRの配列が、CH1領域のC末端に隣接する部分に導入されたL鎖との結合に関与しないシステイン残基 (C) を含むアミノ酸配列である。なお、L鎖との結合に関与しないシステイン残基はVPRDCGCSRの配列におけるC末端側

AKTTPPSVYPLAPGSAAGTNSMVTLGCLVRGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPVQLQSDLYTLSSSVTVPS
STWNPSETVTCNVVAPASSTKVDKKIVPRDCGCSR

上記2つの配列を比較すると、H-N162D改変を行う前のFab'抗体における、カバットの番号付けによるH鎖第162番のアスパラギン残基 (下線を付したN) が、改変後にはアスパラギン酸 (下線を付したD) になっていることがわかる。また、本実施例においては、H-N162D改変Fab'抗体におけるCH1領域のC末端に隣接する部分の配列 (VPRDCGCSR) は、H-N162D改変を行う前のFab'抗体におけるCH1領域のC末端に隣接する部分の配列 (VPRDCGCSR) と同一となっている。

(9) 蛍光標識等電点均一化Fab'抗体の蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動による分離・検出

(8) で得られたH-N162D改変Fab'抗体を、(6) に記載の方法と同様にして、テトラメチルローダミン-5-ヨードアセタミド (モレキュラープローブ社製) で蛍光標識して、一分子蛍光標識Fab'抗体を得た。この一分子蛍光標識Fab'抗体を、(7) と同様にしてベックマン社製キャピラリー電気泳動装置P/ACE5510を用いて分離・検出を行った。その結果を図4に示す。

図4からわかるように、一分子蛍光標識されたH-N

*確認した後、上記発現ベクターで形質転換された大腸菌HB2151の培養スケールを拡大して、H-N162D改変Fab'抗体を産出させ、該抗体をアフィニティーカラムにより精製し、H-N162D改変Fab'抗体の精製物を得た。

上記の方法により確認された、H-N162D改変Fab'抗体のCH1領域およびCH1領域のC末端に隣接する部分の配列 (配列表における配列番号9) を以下に示す。

のシステイン残基である。また、VPRDCGCSRの配列を除く部分はCH1領域の配列である。

なお、H-N162D改変を行う前のFab'抗体における同様の部分の配列 (配列表における配列番号10) は以下のとおりである。

162D改変Fab'抗体をキャピラリー電気泳動した場合は、移動時間29分付近に一つの大きなピークが現われ、他の部分には実質的にピークが現われなかった。これは、H-N162D改変Fab'抗体の等電点が均一であることを意味する。

(10) 荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列の付加 (8) で得られたH-N162D改変Fab'抗体のL鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列を付加するため、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列挿入用のDNAプライマーを設計して、上述のH-N162D改変Fab'抗体発現遺伝子を鋳型として用い、PCRを行うことにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加されたH-N162D改変Fab'抗体を発現する遺伝子 (以下、場合により、荷電性付与H-N162D改変Fab'抗体発現遺伝子と呼ぶ) を得た。DNAプライマーとしては、上述のF5-1プライマー (配列番号5)、F5-2プライマー (配列番号7)、および以下に示すK3+5RPSプライマー (配列番号11) を用いた。

K3+5RPSプライマー (配列番号 11):

5' GGTGATCGGCCCGAGGCCGGTCTACTTGGTCGACTTGGTCGACTAGGCTAGAAAGCACGTGAA
CACTCATTCTGTTGAAGCTC 3'

荷電性付与H-N162D改変Fab'抗体発現遺伝子を、制限酵素である SfiI、または SfiI および NotI を用いて、消化した後、タンパク質発現プラスミドベクター (pCANTAB5E プラスミドベクター等) にライゲーションを行い、荷電性付与H-N162D改変Fab'抗体発現遺伝子をを含む発現ベクターを作製した。

この発現ベクターを、大腸菌 HB2151 に形質転換した。上記と同様にして抗体を誘導し、ELISA によるスクリーニングをおこなった。陽性反応を示す菌からプラスミドを抽出して、大腸菌 XL10 菌へ形質転換した。形質

転換された XL10 菌からシークエンス反応に使用する量のプラスミドを抽出して、荷電性付与H-N162D改変Fab'抗体発現遺伝子の塩基配列を確認した。改変*
ADAAPTVEIFPPSSSEQLTSGGASVVCFLNPFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT
LTKDEYERHNSYTC EATHKTSSTPITKSFNRNECSRPSRPSRPSRPSRPSR

この配列において、C末端側 (右側) の SRPSRPSRPSR PSRP の配列が、CL領域のC末端 (L鎖のC末端) に隣接して付加された、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列である。この配列は、SRPなる配列が5回繰り返

ADAAPTVEIFPPSSSEQLTSGGASVVCFLNPFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT
LTKDEYERHNSYTC EATHKTSSTPITKSFNRNEC

この配列は、CL領域の配列 (配列番号 13) である。(11) 免疫複合体の蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動による分離・検出

(8) で得られた、H-N162D改変Fab'抗体を(6)に記載の方法と同様にして、テトラメチルローダミン-5-ヨードアセタミド (モレキュラープローブ社製) で一分子蛍光標識した (蛍光標識して得られたものを、以下、蛍光標識等電点均一化Fab'抗体と呼ぶ場合がある)。一方、(10) で得られた荷電性付与H-N162D改変Fab'抗体に関しても、(6)に記載の方法と同様にして、テトラメチルローダミン-5-ヨードアセタミド (モレキュラープローブ社製) で一分子蛍光標識した (蛍光標識して得られたものを、以下、荷電性が付与された蛍光標識等電点均一化Fab'抗体と呼ぶ場合がある)。

あらかじめ543nmにおけるモル吸光係数を87,000として濃度を測定した、蛍光標識等電点均一化Fab'抗体および荷電性が付与された蛍光標識等電点均一化Fab'抗体溶液は、それぞれ、マイクロコン-10 (分画分子量10,000) (ミリポア社製) で遠心分離して濃縮後、高圧蒸気滅菌したMilliQ水を加えて遠心分離する操作を計2回繰り返して脱塩を行い、最終的に80nMとなるよう高圧蒸気滅菌したMilliQ水に溶解した。

*体作製においては、ポリメラーゼとしては、適合度 (fidelity) の高い Pyrobest ポリメラーゼ (宝酒造社製) を用いた。塩基配列を確認した後、上記発現ベクターで形質転換された大腸菌 HB2151 の培養スケールを拡大して、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加されたH-N162D改変Fab'抗体 (以下、場合により、荷電性付与H-N162D改変Fab'抗体と呼ぶ) を産出させ、該抗体をアフィニティカラムにより精製し精製物を得た。

上記の方法により確認された、荷電性付与H-N162D改変Fab'抗体のCL領域およびCL領域のC末端 (L鎖のC末端) に隣接する部分の配列 (配列表における配列番号 12) を以下に示す。

返したものであり、R (アルギニン) が荷電性アミノ酸残基である。また、SRPSRPSRPSRPSRPの配列を除く部分の配列は以下のようであり、

ヒト アルファ1アンチトリプシン (カルピオケム社製) は高圧蒸気滅菌したMilliQ水を加えて溶解後、マイクロコン-10 (分画分子量10,000) (ミリポア社製) で遠心分離して濃縮後、高圧蒸気滅菌したMilliQ水を加えて遠心分離する操作を計2回繰り返して脱塩を行い、最終的に8µMとなるよう高圧蒸気滅菌したMilliQ水に溶解した。

蛍光標識等電点均一化Fab'抗体溶液とヒトアルファ1アンチトリプシン溶液を等量混合し、混合溶液と等量のPhrmaryte3-10 (アマシャム ファルマシアバイオテク社製、原液の20倍希釈)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (シグマ社製、終濃度0.8%) を含む両性担体溶液を混合し、遮光化、室温にて10分間反応させ免疫複合体を形成させた。荷電性が付与された蛍光標識等電点均一化Fab'抗体溶液に関しても、同様にして反応を行い免疫複合体を形成させた。得られた反応溶液を、それぞれ、バックマン社製キャピラリー電気泳動装置P/ACE5510を用いて分離・検出を行った。

蛍光標識等電点均一化Fab'抗体を用いた場合の結果を図5に示し、荷電性が付与された蛍光標識等電点均一化Fab'抗体を用いた場合の結果を図6に示す。図5においては、移動時間が約22分の大きなピークが、20分~25分の範囲における多くのピークと重なり合

っているために、十分な分離ができていないのに対して、図6においては、移動時間が2.2分付近の大きなピークと、移動時間が2.4分より大きい領域に現われたピークが十分分離されている。

以上説明した本発明の抗原の定量的検出方法を、等電点均一化Fab'抗体を製造する工程を含めて模式的に表すと図7A~Dのようになる。図7Aは等電点均一化Fab'抗体を発現する遺伝子を組み込んだ大腸菌を示し、この大腸菌に対してIPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を作用させることにより抗体を誘導する。図7Bは、この抗体誘導により生じた本発明の等電点均一化Fab'抗体を示す。この等電点均一化Fab'抗体は、アフィニティカラム等で精製した後、蛍光標識される。図7Cは、この蛍光標識された等電点均一化Fab'抗体を示す。蛍光標識された等電点均一化Fab'抗体と抗原とからなる免疫複合体を電気泳動した結果、図7Dに示すような移動時間と蛍光強度の関係図が得られる。

一方、特表平8-506182号公報に開示の従来技術による抗原の定量的検出方法を、等電点均一化Fab' 20

b'抗体を製造する工程を含めて模式的に表すと図8A~Gのようになる。図7A~Dと図8A~Gを比較して明らかなように、従来技術の検出方法は、等電点均一化Fab'抗体を得るまでの工程が非常に多く煩雑であることがわかる。これに加えて、上述したように従来技術の検出方法では、測定対象である抗原の等電点と等電点均一化Fab'抗体の等電点が近い場合、電気泳動の結果、免疫複合体と、余剰の抗原および/または等電点均一化Fab'抗体がほぼ等しい移動時間で検出されるために、ピークが重なってしまい精度の高い検出ができない。一方、図7A~Dに示す本発明の検出方法は、等電点均一化Fab'抗体を得るまでの工程が簡潔であり、測定対象である抗原の等電点と等電点均一化Fab'抗体の等電点が近い場合であっても、ピークを分離して検出することができるため高精度な検出が可能となる。

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明によれば、測定対象である抗原の等電点と蛍光標識された抗体の等電点が近い場合であっても、高精度で抗原を分析することが可能な、抗原の定量的検出方法を提供することが可能となる。

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Laboratory of Molecular Biophotonics

<120> Method for quantitative detection of antigen

<130> FP00-0008-00

<140>

<141>

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 1

saggtsmarc tgcagsagtc wgg

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

gcgtcacctc gaacaaccac atccctggg caca

34

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

ccagwlsyga gctcswbnts acncagnady ch

32

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

acactcattc ctgttgaagc t

21

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 5

saggtsmarc tgcagsagtc wgg

23

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 6

gctggacagg gatccagagt cccaggtcac tgt

33

<210> 7

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 7

catgtgaact gactgggccc agccggccat ggcogaggtc cagctgcagc agtcagg

57

<210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

ccacgattct gggcgccac actcattcct gttgaagctc ttgtaat

48

<210> 9

<211> 106

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 9

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asp Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

<211> 121

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 12

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 35 40 45

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 65 70 75 80

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 85 90 95

Ile Thr Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Ser Arg Pro Ser Arg Pro
 100 105 110

Ser Arg Pro Ser Arg Pro Ser Arg Pro
 115 120

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 13

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 35 40 45

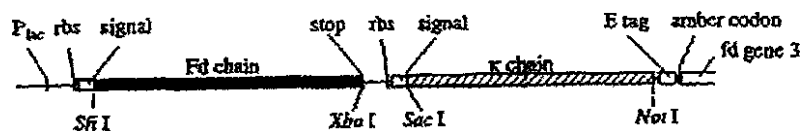
Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 65 70 75 80

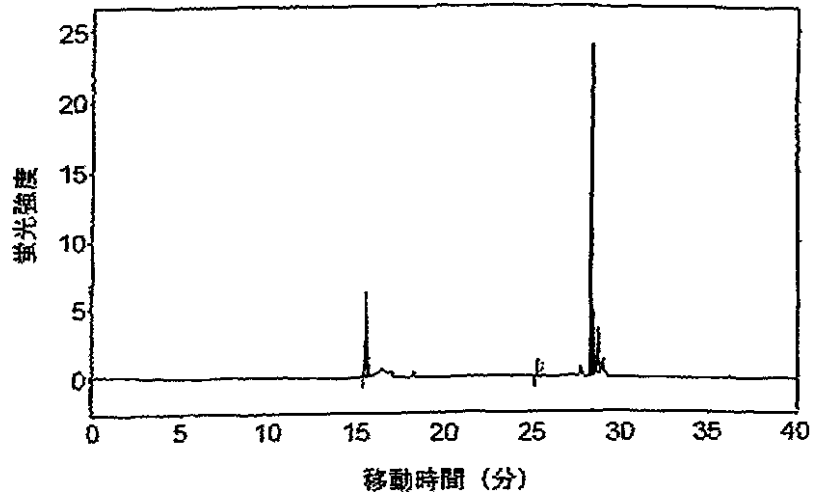
His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 85 90 95

Ile Thr Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 100 105

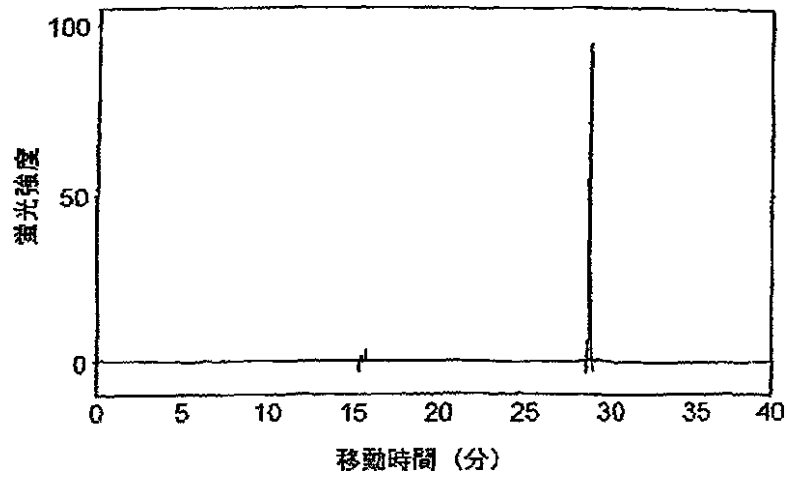
【 2 A 】



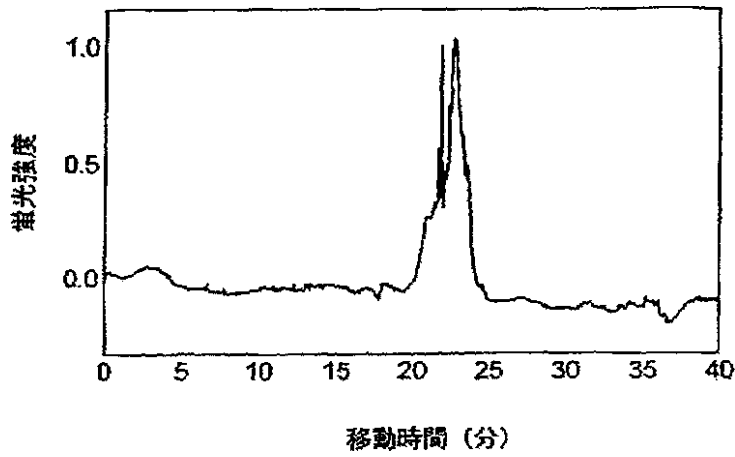
【図 3】



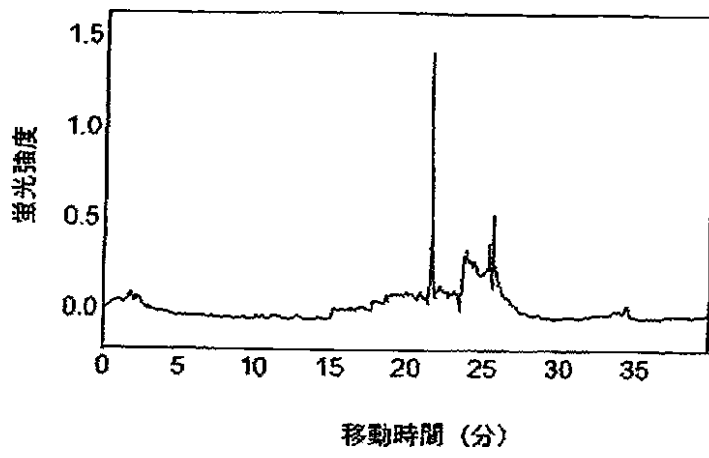
【図 4】



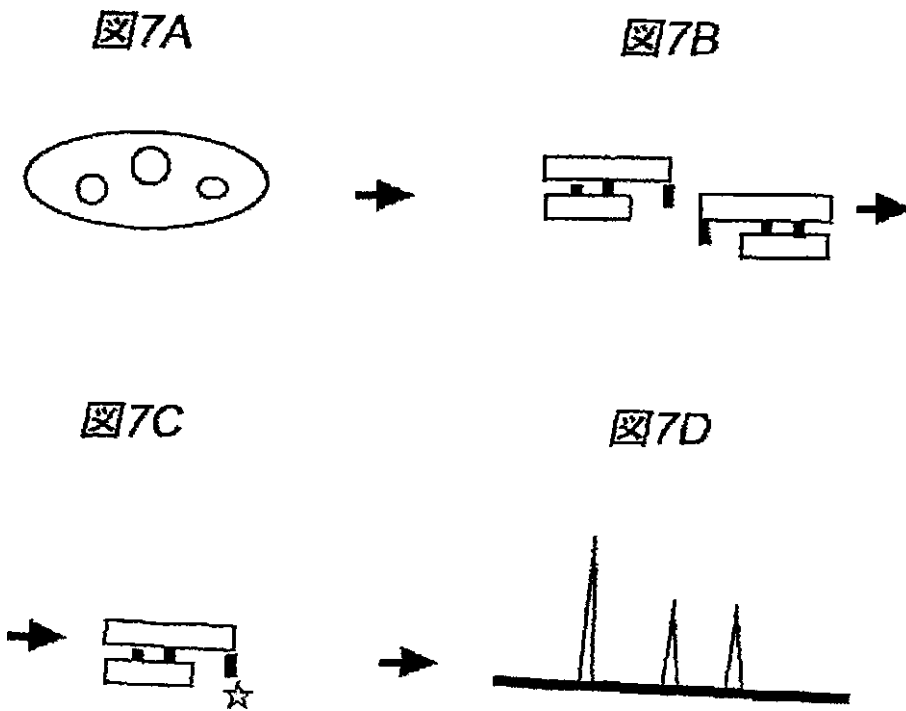
【図 5】



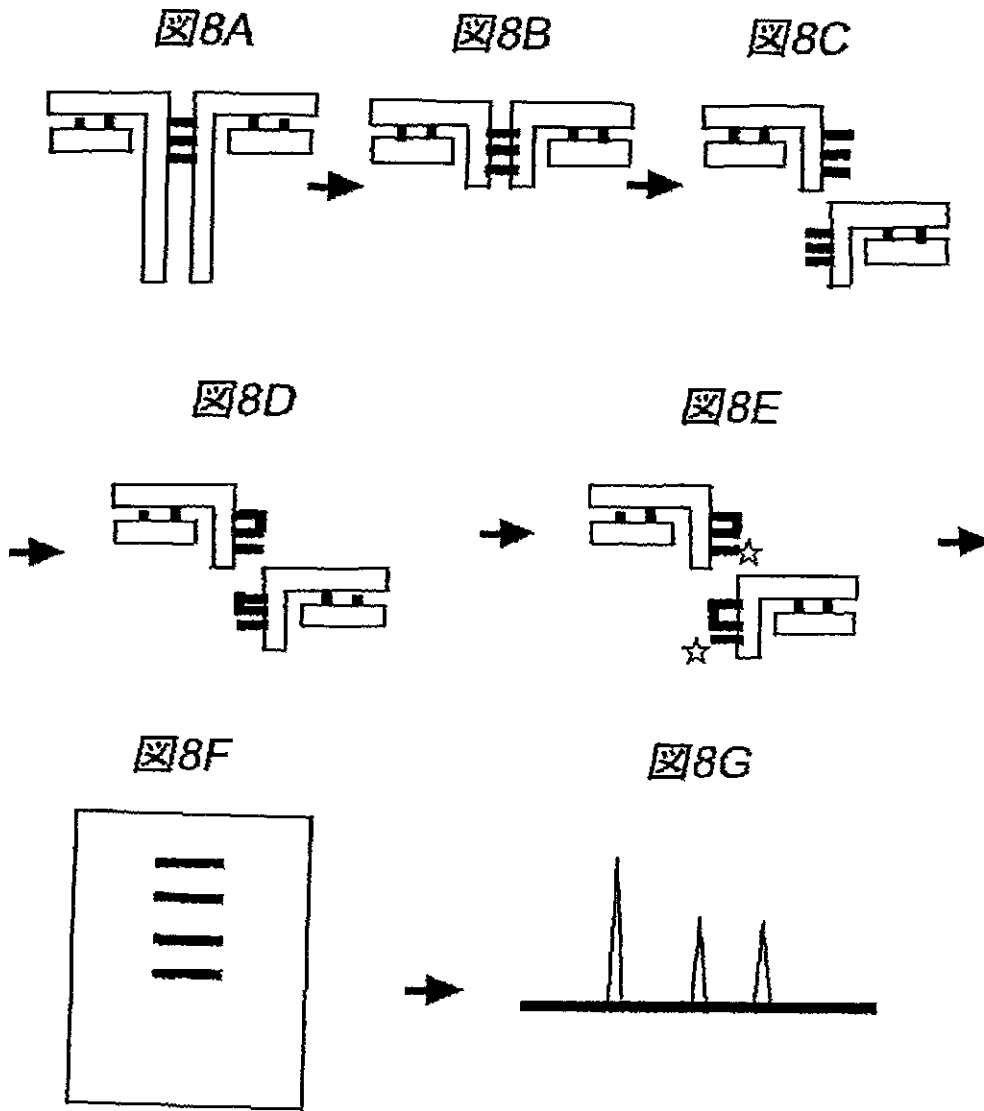
【図6】



【図7】



【図 8】



フロントページの続き

(72)発明者 志村 清仁
 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分
 子バイオホトニクス研究所内

(72)発明者 笠井 献一
 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分
 子バイオホトニクス研究所内

(56)参考文献 特開 平 5 - 322892 (J P , A)
 特表 平 8 - 506182 (J P , A)
 生物物理化学 第39巻、第 6 号
 (1995) 第349 - 353頁

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B 名)
 G01N 33/53 - 33/579

专利名称(译)	定量检测抗原的方法		
公开(公告)号	JP3439195B2	公开(公告)日	2003-08-25
申请号	JP2000620173	申请日	2000-02-17
[标]申请(专利权)人(译)	滨松光子学株式会社		
申请(专利权)人(译)	滨松光子KK		
当前申请(专利权)人(译)	滨松光子KK		
[标]发明人	久田素 伊藤由紀子 松本浩幸 志村清仁 笠井献一		
发明人	久田素 伊藤由紀子 松本浩幸 志村清仁 笠井献一		
IPC分类号	C07K16/38 G01N33/557 G01N33/561 G01N33/68 G01N33/533 G01N33/563		
CPC分类号	C07K16/38 C07K2317/54 G01N33/561 G01N33/6857		
FI分类号	G01N33/533 G01N33/561 G01N33/563		
其他公开文献	JPWO2001061351A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种等电点均一的Fab γ 39;抗体, 该抗体添加有包含可充电氨基酸残基的氨基酸序列, 并用荧光染料标记, 并与样品中包含的抗原形成免疫复合物以进行分析。 第一步, 等电点均质化Fab γ 39;抗体, 第二步, 将含有抗原的分析样品混合, 得到含有免疫复合物的混合物, 并将该混合物置于载体中电泳, 第三步分离混合物, 第三步分离出的混合物, 用能够激发荧光团染料, 免疫复合物中的荧光的激发光照射检测荧光的第五步骤是定量检测抗原的方法。

【图 2 B】

