

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-187421**(P2005-187421A)**(43) 公開日 **平成17年7月14日(2005.7.14)**(51) Int.Cl.⁷**C07K 16/42****C12Q 1/28****G01N 33/53**// **C07K 19/00**

F I

C O 7 K 16/42

C 1 2 Q 1/28

G O 1 N 33/53

C O 7 K 19/00

テーマコード (参考)

4 B O 6 3

4 H O 4 5

N

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2003-432774 (P2003-432774)

(22) 出願日 平成15年12月26日 (2003.12.26)

(71) 出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72) 発明者 高村 博行

静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和

醗酵工業株式会社医薬総合研究所内

(72) 発明者 又木 陽一

山口県宇部市大字藤曲2548番地 協和

醗酵工業株式会社安全性研究所内

(72) 発明者 浜村 淳

山口県防府市協和町1番1号 協和醗酵工

業株式会社生産技術研究所内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ22 QR58 QS26 QS36
QX01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 DA75

EA50 GA26

(54) 【発明の名称】 ヒトイムノグロブリンの定常領域と特異的に反応する抗体

(57) 【要約】

【課題】 サル血漿の存在下でヒト化抗体等のヒトイムノグロブリン(ヒトIg)の定常領域を含む蛋白質の検出および定量をするのに用いることができる、抗体が求められている。

【解決手段】 ヒトIg、ヒトIgの定常領域またはヒトIgの定常領域の部分断片を抗原として、サルを免疫し、該抗原と特異的に反応する抗体を採取することにより、サルイムノグロブリンと反応せずヒトIgの定常領域を含む蛋白質と特異的に反応する抗体を得ることができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サルイムノグロブリンに反応せず、ヒトイムノグロブリンの定常領域と特異的に反応する抗体または該抗体断片。

【請求項 2】

サルがカニクイザルである請求項 1 に記載の抗体または該抗体断片。

【請求項 3】

ヒトイムノグロブリン、ヒトイムノグロブリンの定常領域およびヒトイムノグロブリンの定常領域の部分断片から選ばれる抗原を用いてサルを免疫し、該抗原と特異的に反応する抗体を採取する工程を含む、請求項 1 または 2 に記載の抗体または該抗体断片の製造方法

10

【請求項 4】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 3 に記載の製造方法。

(a) ヒトイムノグロブリン、ヒトイムノグロブリンの定常領域およびヒトイムノグロブリンの定常領域の部分断片から選ばれる抗原を用いてサルを免疫し、該抗原と特異的に反応する抗体を採取する工程

(b) サルイムノグロブリンと (a) で採取した抗体を接触させた後、サルイムノグロブリンと結合しなかった抗体を回収する工程

【請求項 5】

以下の (a) ~ (c) の工程を含む、請求項 4 に記載の製造方法。

20

(a) ヒトイムノグロブリン、ヒトイムノグロブリンの定常領域およびヒトイムノグロブリンの定常領域の部分断片から選ばれる抗原を用いてサルを免疫し、該抗原と特異的に反応する抗体を採取する工程

(b) サルイムノグロブリンと (a) で採取した抗体を接触させた後、サルイムノグロブリンと結合しなかった抗体を回収する工程

(c) ヒトイムノグロブリンの定常領域を含む蛋白質と (b) で回収した抗体を接触させた後、該蛋白質と結合した抗体を該蛋白質から解離させて回収する工程

【請求項 6】

サルがカニクイザルである、請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 7】

30

抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、二量体化 V 領域、およびジスルフィド安定化 V 領域から選ばれる抗体断片である請求項 1 または 2 に記載の抗体断片。

【請求項 8】

請求項 1 または 2 に記載の抗体または該抗体断片を放射性同位元素、蛋白質または低分子化合物で標識した誘導体。

【請求項 9】

蛋白質がホースラディッシュ・ペルオキシダーゼである、請求項 8 に記載の誘導体。

【請求項 10】

請求項 1 もしくは 2 に記載の抗体または該抗体断片、または請求項 8 もしくは 9 に記載の誘導体を用いることを特徴とする、ヒトイムノグロブリンの定常領域を含む蛋白質を免疫学的に検出または定量する方法。

40

【請求項 11】

請求項 1 もしくは 2 に記載の抗体または該抗体断片、または請求項 8 もしくは 9 に記載の誘導体を用いることを特徴とする、サル血漿存在下で、ヒトイムノグロブリンの定常領域を含む蛋白質を免疫学的に検出または定量する方法。

【請求項 12】

免疫学的に検出または定量する方法が、酵素免疫測定法である、請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】

ヒトイムノグロブリンの定常領域を含む蛋白質が、ヒトイムノグロブリン、ヒト化抗体お

50

よびヒトイムノグロブリンの定常領域と他の蛋白質との融合蛋白質から選ばれる蛋白質である、請求項10または11に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サルイムノグロブリン（以下、イムノグロブリンをIgと略す）には反応せずヒトIgの定常領域（以下、C領域と略す）と特異的に反応する抗体または該抗体断片、該抗体または該抗体断片の製造方法、該抗体または該抗体断片を標識した誘導体、該抗体、該抗体断片または該誘導体を用いる、ヒトIgのC領域を含む蛋白質を免疫学的に検出または定量する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

ヒトIgはヒトの免疫機能をなす蛋白質である。近年、非ヒト動物で作製したモノクローナル抗体のヒト体内での免疫原性を低くし、細胞障害活性を高めるため、該モノクローナル抗体の可変領域（以下、V領域と称する）とヒトIgのC領域からなるヒト型キメラ抗体、該モノクローナル抗体の相補性決定領域（以下、CDRと称する）をヒトIgのV領域中に移植したヒト型CDR移植抗体（以下、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体を合わせてヒト化抗体と称する）、あるいはヒトIg遺伝子を有する非ヒトトランスジェニック動物を用いて作製したヒトIgが医薬品として開発されている（非特許文献1参照）。

【0003】

20

ヒトIgおよびヒト化抗体は通常、マウス、ウサギ、ヒツジ等の抗ヒトIgG抗体を用いて、免疫学的に検出または定量することができる。また、サルに投与したヒト化抗体を、サル血液中で検出または定量する場合は、ヒト化抗体の抗原をコートしたプレートに血液サンプルを反応させて洗浄し、サル血中のサルIgと分離した後、上記の抗ヒトIgG抗体を反応させて検出する方法が行われている（非特許文献1、2および3参照）。

【非特許文献1】「ザ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー・アンド・エクスペリメンタル・セラピューティクス（The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics）」，（米国），1999年，第291巻，第3号，p. 1060 - 1067

【非特許文献2】「ザ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー・アンド・エクスペリメンタル・セラピューティクス（The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics）」，（米国），1999年，第292巻，第2号，p. 810 - 816

30

【非特許文献3】「イムノロジー（Immunology）」，（イギリス），1995年，第85巻，第4号，p. 668 - 674

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

サルは分類学的にヒトに近くIgのアミノ酸配列もヒトと非常に相同性が高いと考えられる。したがって、サルに投与したヒトIgを、サル血液中で検出または定量する場合に、通常用いられるマウス、ウサギ、ヒツジ等の抗ヒトIgG抗体を、血液サンプルと直接反応させると、抗IgG抗体がサルの血液中に存在するサルIgGとも反応し、正確に検出や定量ができない。また、測定するヒトIgのV領域と特異的に反応する抗体または該ヒトIgの抗原を用いれば、サル血液中で検出や定量は可能であると考えられるが、個々の抗体ごとに、抗原やV領域が異なるので、確立した測定法を別のヒトIgの測定に適用できないという問題を持つ。

40

【0005】

サルの血漿の存在下でヒトIgのC領域を含む蛋白質の検出または定量をするのに用いることができる、サルIgに反応せず、ヒトIgのC領域と特異的に反応する抗体が求められている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

50

本発明は以下の(1)～(13)に関する。

(1) サルイムノグロブリンに反応せず、ヒトイムノグロブリンの定常領域と特異的に反応する抗体または該抗体断片。

(2) サルがカニクイザルである(1)に記載の抗体または該抗体断片。

(3) ヒトイムノグロブリン、ヒトイムノグロブリンの定常領域およびヒトイムノグロブリンの定常領域の部分断片から選ばれる抗原を用いてサルを免疫し、該抗原と特異的に反応する抗体を採取する工程を含む、(1)または(2)に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。

(4) 以下の(a)および(b)の工程を含む、(3)に記載の製造方法。

(a) ヒトイムノグロブリン、ヒトイムノグロブリンの定常領域およびヒトイムノグロブリンの定常領域の部分断片から選ばれる抗原を用いてサルを免疫し、該抗原と特異的に反応する抗体を採取する工程

(b) サルイムノグロブリンと(a)で採取した抗体を接触させた後、サルイムノグロブリンと結合しなかった抗体を回収する工程

(5) 以下の(a)～(c)の工程を含む、(4)に記載の製造方法。

(a) ヒトイムノグロブリン、ヒトイムノグロブリンの定常領域およびヒトイムノグロブリンの定常領域の部分断片から選ばれる抗原を用いてサルを免疫し、該抗原と特異的に反応する抗体を採取する工程

(b) サルイムノグロブリンと(a)で採取した抗体を接触させた後、サルイムノグロブリンと結合しなかった抗体を回収する工程

(c) ヒトイムノグロブリンの定常領域を含む蛋白質と(b)で回収した抗体を接触させた後、該蛋白質と結合した抗体を該蛋白質から解離させて回収する工程

(6) サルがカニクイザルである、(3)～(5)のいずれか1項に記載の製造方法。

(7) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、二量体化V領域、およびジスルフィド安定化V領域から選ばれる抗体断片である(1)または(2)に記載の抗体断片。

【0007】

(8) (1)または(2)に記載の抗体または該抗体断片を放射性同位元素、蛋白質または低分子化合物で標識した誘導体。

(9) 蛋白質がホースラディッシュ・ペルオキシダーゼである、(8)に記載の誘導体。

(10) (1)もしくは(2)に記載の抗体または該抗体断片、または(8)もしくは(9)に記載の誘導体を用いることを特徴とする、ヒトイムノグロブリンの定常領域を含む蛋白質を免疫学的に検出または定量する方法。

(11) (1)もしくは(2)に記載の抗体または抗体断片、または(8)もしくは(9)に記載の誘導体を用いることを特徴とする、サル血漿存在下で、ヒトイムノグロブリンの定常領域を含む蛋白質を免疫学的に検出または定量する方法。

(12) 免疫学的に検出または定量する方法が、酵素免疫測定法である、(10)または(11)に記載の方法。

(13) ヒトイムノグロブリンの定常領域を含む蛋白質が、ヒトイムノグロブリン、ヒト化抗体およびヒトイムノグロブリンの定常領域と他の蛋白質との融合蛋白質から選ばれる蛋白質である、(10)または(11)に記載の方法。

【発明の効果】

【0008】

本発明により、サルIgに反応せず、ヒトIgのC領域と特異的に反応する抗体が提供される。該抗体、該抗体断片または該抗体もしくは該抗体断片の誘導体を用いることにより、サルの血漿の存在下で、サルIgと区別してヒトIgのC領域を含む蛋白質の検出または定量をすることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明の抗体は、サルIgに反応せず、ヒトIgのC領域と特異的に反応する抗体であれば、いずれの抗体であってもよく、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等があ

10

20

30

40

50

げられる。

本発明においてサルとは、ヒト以外の霊長類に属する動物を意味する。具体的には、カニクイザル、アカゲザル、リスザル、マーモセット等をあげることができる。

【0010】

本発明の抗体を用いることにより、ヒトIgのC領域を含む蛋白質を検出または定量することができる。ヒトIgのC領域を含む蛋白質としては、ヒトIg、ヒト化抗体、およびヒトIgのC領域と他の蛋白質との融合蛋白質等があげられる。他の蛋白質としては、例えばサイトカイン受容体の細胞外ドメイン等があげられる。

以下に本発明の抗体、該抗体断片、該抗体または該抗体断片を標識した誘導体の製造方法、および該抗体、該抗体断片または該誘導体を用いたヒトIgのC領域を含む蛋白質の検出または定量方法について説明する。

10

【0011】

1. 本発明の抗体の製造方法

本発明の抗体は、ヒトIgのC領域を含む蛋白質を抗原としてサルを免疫することにより製造することができる。一般に、免疫する動物自身の蛋白質でその動物を免疫した場合には、免疫された動物自身の蛋白質に反応する抗体は作られないので、ヒトIgのC領域を含む蛋白質でサルを免疫することにより、ヒトIgのC領域と特異的に反応し、しかも自己の蛋白質であるサルIgとは反応しない抗体を製造することができる。

【0012】

(1) 抗原

20

抗原としては、ヒトIgのC領域を含む蛋白質であれば、いずれも用いることができる。ヒトIgのC領域を含む蛋白質としては、ヒトIg、ヒトIgのC領域、およびヒト化抗体およびヒトIgのC領域と他の蛋白質との融合蛋白質をあげることができる。他の蛋白質としてはサイトカイン受容体の細胞外ドメイン等があげられる。ヒトIgのC領域としては、C領域全てであってもその部分断片であっても抗原として用いることができる。ヒトIgのC領域の部分断片としては、ヒトIg重鎖のC領域の部分断片、ヒトIg軽鎖のC領域の部分断片をあげることができる。抗原とするヒトIgのC領域を含む蛋白質は、検出または定量するヒトIgのC領域を含む蛋白質のクラス(IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgE)と同じクラスのものを用いることが好ましい。ヒトIgは、市販されているものを用いることもできるし、ヒト血液から精製したものを用いることもできる。

30

【0013】

(2) 動物の免疫

免疫に用いる動物としては、サルであれば、いかなるサルでもよいが、血液中でのヒトIgのC領域を含む蛋白質の検出または定量を行なうサルと同じ種類のサルに免疫するのが好ましい。例えば、ヒトIgのC領域を含む蛋白質を投与し、体内中のヒトIgのC領域を含む蛋白質を検出または定量するためによく用いられるカニクイザル、アカゲザル、リスザル、マーモセット等をあげることができる。以下にカニクイザルを用いた例を説明する。

【0014】

0～20歳令のカニクイザルに、上記1.(1)で調製した抗原を免疫する。免疫は、動物の皮下、静脈内、腹腔内および筋肉内に、適当なアジュバントとともに抗原を5日～2週間おきに3～10回投与することにより行う。1回あたりの抗原の投与量はサル1匹当たり1～2mgが好ましい。アジュバントとしては、フロイントの完全アジュバント(Freund's Complete Adjuvant)、水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチン等があげられる。各投与後3～20日目に免疫したサルより採血して血清を回収し、該血清の抗原に対する反応性を、酵素免疫測定法(以下、ELISAと略す)等で測定し、その血清が十分な抗体価を示すまで免疫を続ける。

40

十分な抗体価を確認した後に頸動脈等から全血を回収し、ヒトIgのC領域を含む蛋白質に反応する抗血清を得る。

【0015】

ELISAは、以下のようにして行なうことができる。

50

ヒトIgを96ウェルプレート等にコートし、免疫したサルより回収した血清を第一抗体として反応させる。第一抗体反応後、プレートを洗浄して酵素またはビオチンで標識したヒトIgを二次抗体として添加し、反応させる。酵素で標識したヒトIgを反応させる場合は、反応後、プレートを洗浄し、標識した酵素に応じた発色反応を行い、発色量を分光光度計で測定する。発色量を指標として回収した血清中の抗体価を測定する。ビオチンで標識したヒトIgを反応させる場合は、プレートを洗浄後、さらに酵素標識したアビジンを添加し、反応させる。反応後、プレートを洗浄し、標識した酵素に応じた発色反応を行い、発色量を分光光度計で測定する。発色量を指標として回収した血清中の抗体価を測定する。標識に用いる酵素としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等があげられる。

10

【0016】

(3) 抗体の精製

1. (2) で作製した抗血清から、遠心分離、硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテインA-カラム、アフィニティークラム等を用いて、IgGあるいはIgM画分を回収することにより、本発明のポリクローナル抗体を精製することができる。特に、以下に示すようにサル血漿蛋白質またはサルIgを固定化したアフィニティークラムやヒトIgのC領域を含む蛋白質を固定化したアフィニティークラムを用いることにより、サルIgに反応せず、ヒトIgのC領域を含む蛋白質と特異的に反応する抗体を効率的に精製することができる。

【0017】

20

(2) で得られた抗血清中に、ヒトIgだけでなくサルIgに反応する抗体が含まれていると、サルIgが大量に含まれているサル血漿の存在下では、この抗体がサルIgにも反応するため、ヒトIgのC領域を含む蛋白質を特異的に検出または定量することができない。したがって(2) で得られた抗血清を、サルIgと接触させて、抗血清中のサルIgと反応する抗体をサルIgに結合させた後、サルIgと結合しなかった画分を回収することにより、(2) で得られた抗血清からサルIgと反応する抗体を除去し、本発明の、サルIgに反応せずヒトIgのC領域と特異的に反応する抗体を精製することができる。

【0018】

担体に結合させるサルIgは、精製したサルIgでもよいし、サル血漿蛋白質全体を用いてもよい。サルIgまたはサル血漿蛋白質は、血液中でのヒトIgのC領域を含む蛋白質の検出または定量を行なうサルと同じ種類のサルから得られたものが好ましい。サルIgを固定化する担体としては、臭化シアン(以下、CNBrとも表記する)で、結合用リンカーを活性化したセファロース等があげられる。

30

【0019】

抗血清とサルIg固定化担体を接触させて、サルIgと反応する抗体を該担体と結合させ、該担体と結合しなかった抗体を回収する方法としては、サルIgを固定化した担体をカラムにつめてアフィニティークラムを作製し、このカラムに抗血清を流し、素通りした抗血清を回収する方法、固定化担体を抗血清に添加し、攪拌して反応させた後、ろ過や遠心分離等により、抗血清を担体と分離して回収する方法等があげられる。サルIgと反応する抗体の除去のためには、回収した抗血清を用いて同じ操作を繰り返すのが好ましい。

40

【0020】

以上のようにして回収した画分を、ヒトIgのC領域を含む蛋白質を固定化した担体と接触させ、抗体を該蛋白質と結合させた後、該蛋白質と結合した抗体を該蛋白質から解離させて、回収することにより、サルIgに反応せず、ヒトIgのC領域を含む蛋白質と特異的に反応する抗体を精製することができる。該蛋白質を固定化する担体としては、臭化シアンで、結合用リンカーを活性化したセファロース等があげられる。

【0021】

抗体と該蛋白質固定化担体を接触させて、抗体を該蛋白質と結合させる方法としては、該蛋白質を固定化した担体をカラムにつめてアフィニティークラムを作製し、このカラムに抗体を含む溶液を流し結合させる方法、固定化担体を抗体を含む溶液に添加し、攪拌し

50

て反応させた後、ろ過や遠心分離等により担体を回収する方法等があげられる。本発明の抗体を効率的に回収するためには、カラムを素通りした画分や担体を回収した後の溶液を抗体を含む溶液として用いて、同じ操作を繰り返すのが好ましい。該蛋白質と結合した抗体を該蛋白質から解離させて、回収する方法としては、酸性溶液により溶出させる方法等があげられる。

【0022】

以上のようにして製造した本発明の抗体が、サルIgに反応せず、ヒトIgのC領域と特異的に反応することは、1.(2)に記載したELISAにおいて、プレートにヒトIgのC領域を含む蛋白質をコートし、サル血漿で希釈した本発明の抗体を一次抗体として用いて反応を行い、プレートを洗浄して酵素標識したヒトIgを二次抗体として添加し、反応させる。反応後、プレートを洗浄し、標識した酵素に応じた発色反応を行い、発色がみられることにより、確認することができる。

10

【0023】

2. 本発明の抗体断片の製造

本発明の抗体断片としては、Fab、Fab'およびF(ab')₂があげられる。

Fabは、抗体をパパインで処理して得られる断片のうち、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のFabは、本発明の抗体をパパインで処理して得ることができる。

F(ab')₂は、抗体をペプシンで処理して得られる断片のうち、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のF(ab')₂は、本発明の抗体をペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することもできる。

20

【0024】

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のFab'は、上記のF(ab')₂を還元剤ジチオスレイトールで処理して得ることができる。

【0025】

3. 本発明の抗体を標識した誘導体の製造

1. または2. に記載の方法で製造した本発明の抗体または該抗体断片中の適当な置換基、側鎖、または糖鎖に放射性同位元素、蛋白質あるいは低分子化合物などを化学的手法〔抗体工学入門、地人書館(1994)〕により結合させることにより、本発明の抗体および該抗体断片を標識した誘導体を製造することができる。

30

【0026】

放射性同位元素としては、³²P、³H、¹⁴C、¹²⁵I、¹³¹I等があげられ、例えば、クロラミンT法により、抗体のチロシン残基に¹²⁵Iまたは¹³¹Iを結合させることができる。

蛋白質としては、例えばβ-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素等の酵素があげられる。

【0027】

低分子化合物としては、例えばビオチン、フルオレセイン・イソチオシアネート(FITC)やフィコエリスリン等の蛍光色素およびジゴキシゲニン、ジニトロフェニル等の各種ハブテン等があげられる。

40

【0028】

4. 本発明の抗体を用いたヒトIgのC領域を含む蛋白質の検出または定量方法

(1) 本発明の抗体を用いた検出方法および定量方法

本発明の抗体、該抗体断片、または標識した該抗体もしくは該抗体断片の誘導体を用いて、測定試料中のヒトIgのC領域を含む蛋白質の検出または定量を行なうことができる。

【0029】

本発明の抗体、該抗体断片、または該抗体もしくは該抗体断片を標識した誘導体を用い

50

る、ヒトIgのC領域を含む蛋白質の検出方法または定量方法としては、蛍光抗体法、ELISA、放射免疫測定法(RIA)、免疫組織化学染色法、ウェスタンブロッティング法、表面プラズモン共鳴バイオセンサーを用いる方法などがあげられる。これらの検出方法または定量方法は、文献〔Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Third edition, Academic Press (1996); 単クローン抗体実験マニュアル, 講談社サイエンティフィック (1987); J. Immunol. Methods, 209, 1 (1997)〕の記載に基づいて行うことができる。

以下に、簡単に各方法を述べる。

【0030】

蛍光抗体法は、細胞や組織切片を測定試料とし、本発明の抗体もしくは該抗体断片を蛍光標識した誘導体を反応させ、蛍光物質をフローサイトメーター、蛍光顕微鏡等で測定する方法である。 10

免疫組織化学染色法は、細胞や組織切片を測定試料とし、本発明の抗体もしくは該抗体断片を酵素標識した誘導体を反応させ、酵素に対する発色反応を行うことにより、ヒトIgのC領域を含む蛋白質を検出する方法である。

【0031】

ELISAは、ヒトIgのC領域を含む蛋白質を含む測定試料に、本発明の抗体もしくは該抗体断片を酵素標識した誘導体を反応させ、さらに酵素反応により発色する基質を添加して反応を行ない、発色色素を分光光度計で測定する方法である。

RIAは、ヒトIgのC領域を含む蛋白質を含む測定試料に、本発明の抗体もしくは該抗体断片を放射性同位体で標識した誘導体を反応させ、シンチレーションカウンターなどで放射能を測定する方法である。 20

【0032】

ウェスタンブロッティング法は、ヒトIgのC領域を含む蛋白質を含む測定試料をドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分画した後、ゲルから蛋白質をポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜あるいはニトロセルロース膜にブロッティングし、この膜に本発明の抗体もしくは該抗体断片を酵素で標識した誘導体を反応させ、さらに酵素反応により発色あるいは発光する基質を添加して反応を行ない、ヒトIgのC領域を含む蛋白質をバンドとして検出する方法である。

【0033】

表面プラズモン共鳴バイオセンサーを用いる方法は、本発明の抗体、該抗体断片またはその誘導体を金をコートしたセンサーチップに結合させ、ヒトIgのC領域を含む蛋白質を含む測定試料を反応させた時のセンサーチップ表面の屈折率変化を測定する方法である。 30

【0034】

(2) サル血漿を含む測定試料中のヒトIgのC領域を含む蛋白質の検出または定量方法

ヒトIgのC領域を含む蛋白質を投与したサルから採取した血液や血清のような、サル血漿を含む測定試料中のヒトIgのC領域を含む蛋白質は、以下に示すように本発明の抗体、該抗体断片、あるいはこれらを標識した誘導体を用いたELISAやRIAにより、検出または定量することができる。例えば、ELISAは、以下のようにして行うことができる。

【0035】

サル血漿を含む測定試料はそのままでもよいが、適当なバッファーで希釈し、サル血漿濃度をある一定の濃度、例えば10%に低下させてもよい。測定試料と同じ種のサルの血漿を同じ濃度で含む溶液を用いて、ヒトIgのC領域を含む蛋白質の標品を2~100 ng/mLの濃度範囲で段階的に含む溶液を調製し、標準試料とする。 40

【0036】

本発明の抗体または該抗体断片をマルチウェルプレートの各ウェルに添加して静置することにより固定化する。プレートを洗浄後、ウシ血清アルブミンやスキムミルク等を含む溶液を添加して静置し、非特異的結合をブロックする。プレートを洗浄後、標準試料および希釈した測定試料を各ウェルに添加して静置することにより、各試料中のヒトIgのC領域を含む蛋白質をプレート上の抗体と結合させる。プレートを洗浄後、適当な濃度に希釈した、酵素標識した本発明の抗体または酵素標識した該抗体断片を各ウェルに添加して静 50

置することにより、ヒトIgのC領域を含む蛋白質と結合させる。プレートを洗浄後、酵素反応により発色する基質を添加して、反応を行ない、分光光度計により、基質の発色に応じた波長の吸光度を測定する。吸光度の強さを指標として測定試料中のヒトIgのC領域を含む蛋白質を検出できる。標準試料の濃度を横軸(X)、吸光度を縦軸(Y)にして、検量線を作成する。この検量線に基づいて、測定試料の吸光度から測定試料中のヒトIgのC領域を含む蛋白質の濃度を求めることができる。この濃度に測定試料の希釈倍率をかけることにより、元の測定試料中のヒトIgのC領域を含む蛋白質を定量することができる。

【0037】

また、測定試料がサル血漿でなくサル以外の非ヒト動物血漿を含む場合も、標準試料の調製をサル血漿の代わりにその非ヒト動物血漿を用いて行い、同様にして測定することにより、測定試料中のヒトIgのC領域を含む蛋白質の定量を行うことができる。

10

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例1】

【0038】

ヒトIgGに対するカニクイザル抗血清の作製

(1) カニクイザルの免疫

ヒトIgG(試薬グレード、シグマ・アルドリッチ社製)をリン酸バッファー〔PBSタブレット(宝酒造株式会社製)1錠をミリ(Milli)-Q II(ミリポア社製)で精製した水100 mLに用時溶解したもの、以下PBSと称する〕に溶解し、1 mg/mLヒトIgG溶液を調製した。ろ過滅菌後、1 mLずつ分注し-20℃以下で保存した。投与前に解凍し、等量のプロイント不完全アジュバント〔ICNバイオメディカルズ(ICN Biomedicals)社製〕を加え、室温で1時間攪拌した(以下、抗原溶液と称する)。調製した抗原溶液は用時まで5℃で保存した。

20

【0039】

雄カニクイザル〔S-4165C、サイコンブレック(Siconbrec)社より購入〕1匹に、1回当たり抗原溶液2 mLを5~10個所に分けて、6~7日ごとに3回皮下投与した。続いて1回に投与する抗原溶液の量を4 mLにし、7日ごとに3回皮下投与した。続いて6~7日ごとに5回、1回あたり抗原溶液2 mLを筋肉内投与し、さらに2 mLを腹腔内投与した。

投与2回目以降、投与前に約1 mLの血液を無麻酔下で後肢伏在静脈または大腿静脈から採取し、後述する(2)に記載の方法によりその血清中の抗ヒトIgG抗体価を測定した。その結果、投与1回目から6回目までが抗体価100、投与7回目から8回目までが抗体価1000、投与9回目から10回目までが抗体価10000であった。なお、陽性対照(1 mg/mLヒトIgG溶液)は、全ての測定で10000を示した。

30

【0040】

(2) ELISAによる血清中の抗ヒトIgG抗体価の測定

まず、採取したカニクイザルの血液を室温で1時間放置後、4℃、12000 rpmで5分間遠心分離して血清を得た。得られた血清は測定まで約5℃で保存した。

上記(1)で調製した1 mg/mLヒトIgG溶液を、濃度が2 µg/mLになるようにPBSで希釈したものを、50 µl/ウェルずつ96ウェルマイクロプレート〔ヌンク・イムノ・プレート・F96・マキシソープ(Nunc-Immuno plate F96 MaxiSorp)、ナルジェ・ヌンク・インターナショナル(Nalge Nunc International)社製〕に分注し、約5℃で一晩放置することにより、固定化した(以下、このプレートをIgG固定アッセイプレートと称する)。

40

【0041】

1%(w/v)のウシ血清アルブミン〔フラクションV、pH 7.0、セロロジカルズ・プロテインズ(Serologicals Proteins)社製、以下BSAと略す〕を含むPBS(以下、アッセイバッファーと称する)を調製した。未使用の96ウェルマイクロプレートにアッセイバッファー300 µLずつを加え、室温で1時間以上放置し、ブロッキングを行った後、プレートウォッシャー(イムノウォッシャーNK-300、ナルジェ・ヌンク・インターナショナル社製)を用いて、洗浄用バッファー〔0.05%(v/v)のツイーン(Tween)20(ナカライテスク社製

50

を含むPBS) 250 μ Lで3回洗浄した(以下のプレートの洗浄作業は、全てこの条件で行なった)。以下、このプレートを調製用プレートとよぶ。この調製用プレートを用いて、上記で得られた血清をアッセイバッファーおよびブランクのサル血漿(サル無処理血漿プール、免疫をしていない複数のカニクイザル(雄、3~5歳)の血漿を集めたもの(新日本科学社製))でそれぞれ $10^1 \sim 10^9$ 倍に希釈したもの、ブランクのサル血漿をアッセイバッファーで $10^2 \sim 10^{10}$ 倍に希釈したもの、および陽性対照として上記(1)で調製したヒトIgG溶液をアッセイバッファーで $10^2 \sim 10^{10}$ 倍に希釈したものを測定試料として調製した。

【0042】

IgG固定アッセイプレートを洗浄し、アッセイバッファー300 μ Lずつを加え、室温で1時間以上放置し、ブロッキングを行った。プレートを洗浄し、調製した測定試料を50 μ L/ウェルずつ加え、室温で1時間反応させた。洗浄後、二次抗体としてアッセイバッファーで2000倍に希釈したホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ(以下、HRPと略す)結合ヒトIgG(ICNバイオメディカルズ社製)を100 μ L/ウェルずつ加え、室温で1時間反応させた。洗浄後、基質溶液(2,2'-アジド-ジ-(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)を含む溶液(ABTSペルオキシダーゼ基質、KPL社製)および過酸化水素を含む溶液(ペルオキシダーゼ溶液B、KPL社製)を用時に等量ずつ混合したもの)を100 μ L/ウェルずつ加え、プレートミキサーで攪拌しつつ室温で20分間反応させた。反応停止液(5%(w/v) SDS(和光純薬社製)水溶液)を50 μ L/ウェルずつ加え反応を停止させた後、プレートリーダー(スペクトラ・マックス(SPECTRA MAX)340PC(モレキュラーデバイス社製))で測定波長415 nm、対照波長490 nmの吸光度($OD_{415/490}$)を測定した。測定は全て1測定試料あたり、2連で行った。得られた吸光度の平均が0.5を超える最大の希釈倍率を抗体価とした。

【0043】

(3) 抗血清の調製

(1)の免疫の結果、10000以上の十分な抗体価の上昇が見られたため、カニクイザルをソムノペンチル(シェリング・プラウ・アニマル・ヘルス(Schering-Plough Animal Health)社製)で麻酔の後、固定台に固定して、頸動脈にカニキュレーションし、回収可能な全ての血液を回収した。採取した血液は37℃で1時間静置した後に、さらに約5℃で1晩静置し、3000 rpm、4℃で5分間の遠心分離により血清を分離し、一部回収した後に5 mLずつに分注して約-80℃に保存した。合計155 mLの抗血清が得られた。

【実施例2】

【0044】

ヒトIgGに対するサルポリクローナル抗体の精製

(1) サル血漿蛋白カラムの作製

約3 gのCNBr活性化セファロース4ファスト・フロー(CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow、アマシャム・バイオサイエンス(Amersham Biosciences)社製)に、1 mmol/L HCl約60 mLを加え約5分間攪拌した後、水流アスピレーターに接続したG3ガラスフィルター(ブフナー型ガラスろ過器3G3、旭テクノグラス社製)上に移し、吸引しつつ約600 mLの1 mmol/L HClで洗浄した。続いて約200 mLの緩衝液A(0.5 mol/L NaCl、0.1 mol/L NaHCO₃、NaOHでpH 8.0に調整)で洗浄した。

【0045】

洗浄したCNBr活性化セファロース4ファスト・フローを50 mLチューブに移し、サル血漿(新日本科学株式会社製)4 mLとPBS 6 mLを加え、ローテーター(MTR-103、井内盛栄堂社製)に取り付け、速度最高で室温で約2時間反応させ、サル血漿蛋白質を結合させた。

反応後のCNBr活性化セファロース4ファストフローを水流アスピレーターに接続したG3ガラスフィルター上に移した。その後、吸引しつつ約100 mLの緩衝液B(0.5 mol/L NaCl、0.2 mol/L 酢酸、0.2 mol/L 酢酸ナトリウム三水和物溶液でpH 4.0に調整)を加え洗浄し、約100 mLの緩衝液Aを加え洗浄した。この2つの緩衝液での洗浄をさらに2回繰り返した。

。

【0046】

洗浄したCNBr活性化セファロース4ファスト・フローを50 mLチューブに移し、0.2 mol/Lグリシンを含む緩衝液A（NaOHでpH 8.0に調整）を加え、ローテーターに張り付け最高速度で室温で約2時間反応させ、カラム中の未反応の活性基をブロックした。

反応後のCNBr活性化セファロース4ファスト・フローをK9/15カラム（アマシャム・バイオサイエンス社製）に移し、ペリスタポンプにより、流速約3 mL/分で反応液を溶出させ、約100 mLの緩衝液Aを加えてカラムを洗浄後、冷蔵保存した。

【0047】

なおカラム作製に使用したサル血漿、サル血漿と担体の反応後に担体を取り出した反応液、反応後の担体を緩衝液Bと緩衝液Aとで1回目の洗浄した時の排出した洗浄液を試料として、非還元条件下、4 - 20%グラジエントゲルを用い、SDS-PAGEを行なった。その結果、カラム作製に使用したサル血漿と比較して、反応後の反応液中に残存する蛋白質はその1/10程度であること、反応後の洗浄液中に存在する蛋白質は微量であることから、カラムにサル血漿蛋白質が結合していることが確認された。（図1）。

【0048】

（2）サル血漿蛋白カラムを用いたサル血漿蛋白質と反応する抗体の除去

（1）で作製したサル血漿蛋白カラムにペリスタポンプを接続し、流速3 mL/分で0.05%トリフルオロ酢酸（以下、TFAと略す）50 mLおよびPBS 50mLを順にカラムに流し、洗浄した。続いて実施例1で作製したヒトIgGに対するサル抗血清10 mLをカラムに流し、フロースルーを回収した。その後、50 mLのPBS、50 mLの0.05% TFAおよび50 mLのPBSを順にカラムに流し、洗浄した。なお0.05% TFAの溶出画分は回収し、等量のPBSを加えて保存した。

【0049】

また、回収したフロースルーを再度カラムに流し、フロースルーを回収した。その後50 mLのPBS、50 mLの0.05% TFAおよび50 mLのPBSを順にカラムに流し、洗浄した。なお0.05% TFAの溶出画分は回収し、等量のPBSを加えて保存した。この過程をさらに2回繰り返した。

得られた4回分の0.05% TFAの溶出画分とカラムに4回通したフロースルーおよび元のヒトIgGに対するサル抗血清の、ヒトIgGに対する結合活性をELISAにて確認した。

【0050】

ELISAは実施例1（2）と同様にして行なった。ただし、IgG固定アッセイプレート作製の際に分注するヒトIgGは、ヒトIgG 10 mgにPBS 10 mLを添加して溶液を調製し、この溶液の280 nmの吸光度（OD₂₈₀）を測定し、濃度10 mg/mLのときのOD₂₈₀を14として正確な濃度（mg/mL）を算出した後、炭酸緩衝液（25 mmol/LNaHCO₃ 600 mLと50 mmol/L Na₂CO₃ 500 mLをpH 9.6になるように混合した溶液）を用いて0.25 μg/mLになるように希釈したものをを用いた。また、基質溶液添加後の反応は60分間行なった。測定は各測定試料について1連で行った。

【0051】

測定試料として、実施例1（2）と同様に作製した調製用プレートを用いて、上記の精製過程で回収した各画分（元のサル抗血清、1～4回目の0.05% TFAの溶出画分およびカラムに4回通したフロースルー）について、アッセイバッファー、サル血漿、およびアッセイバッファーで10倍に希釈したサル血漿（以下、10%サル血漿とよぶ）をそれぞれ用いて2、10、100および1000倍希釈したものを調製した。

【0052】

その結果、元の抗血清およびカラムに4回通したフロースルーには、アッセイバッファー中でもサル血漿存在下でも十分なヒトIgGに対する結合活性が見られたのに対し、0.05% TFAの溶出画分のヒトIgGに対する結合活性は弱く、4回目の0.05% TFAの溶出画分では検出できなかった（図2～4）。したがって、元の抗血清およびカラムに4回通したフロースルーは、サルIgに反応せずヒトIgのC領域を含む蛋白質に特異的に反応することが

10

20

30

40

50

確認された。カラムに4回通したフロースルーは、濃度依存的な結合活性が見られた。

【0053】

(3) ヒトIgGカラムの作製

約1gのBrCN活性化セファロース4ファスト・フローを秤量し、1mmol/L塩酸約20mLを加え約5分間攪拌した後、水流アスピレーターに接続したG3グラスフィルター上に移し、吸引しつつ約200mLの1mmol/L塩酸で洗浄した。続いて約40mLの緩衝液Aで洗浄した。

【0054】

洗浄したCNBr活性化セファロース4ファスト・フローをオープンチップカラム（アシスト株式会社製）へ移し、下部に密栓した後に、ヒトIgG 10mgをPBS 3mLに溶解させた溶液を加え蓋をし、ローテーターに張り付け速度最高で室温で約2時間反応させた。

10

反応後のCNBr活性化セファロース4ファストフローをペリスタポンプに接続し、流速約3mL/分で反応液を排出した後、約20mLの緩衝液Bを加え洗浄し、約20mLの緩衝液Aを加え洗浄した。この2つの緩衝液での洗浄をもう2回繰り返した。

【0055】

洗浄したカラム下部を密栓し、約3mLの0.2mol/Lグリシンを含む緩衝液Aを加えて蓋をした後、ローテーターに張り付け最高速度で室温で約2時間反応させた。

反応後、ペリスタポンプにより流速約3mL/分で反応液をカラムから溶出させ、約100mLの緩衝液Aを加えてカラムを洗浄後、冷蔵保存した。

カラムの作製に使用したヒトIgG溶液、ヒトIgG溶液と担体の反応後に排出した反応液、反応後のカラムを緩衝液Aおよび緩衝液Bで1回目の洗浄した時の排出した洗浄液を試料として、非還元条件下、4-20%グラジエントゲルを用いSDS-PAGEを行なった。その結果、反応後の反応液および洗浄液にはIgGは検出されず、カラムにヒトIgGが結合していることが確認された（図1）。

20

【0056】

(4) ヒトIgGカラムを用いた抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体の精製

(3)で作製したヒトIgGカラムにペリスタポンプを接続し、流速3mL/分で0.05% TFA 10mLおよびPBS 10mLを順にカラムに流し、洗浄した。続いて(2)で回収したサル血漿蛋白質カラムに4回通したフロースルーをカラムに流し、フロースルーを回収し再度カラムに流してフロースルーを回収し、フロースルー1とした。その後20mLのPBSでカラムを洗浄した。0.05% TFAをカラムに2mL流し、フロースルーをPBSが2mL入ったチューブに回収した。なおこの過程をさらに4回繰り返した。回収したフロースルーをそれぞれ溶出画分1~5とした。続いて10mLのPBSでカラムを洗浄した。フロースルーを回収し、洗浄画分とした。

30

【0057】

得られた溶出画分1~5とフロースルー1、洗浄画分および(2)で回収したサル血漿蛋白質カラムに4回通したフロースルーについて、OD₂₈₀を測定し、非還元条件下、4-20%グラジエントゲルを用いSDS-PAGEを行なった。図5に示すように、溶出画分1~5に精製された抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体が回収されていることが確認された。またこれらの各画分のヒトIgGに対する結合活性を、(2)に記載のELISAによる方法と同様にして確認した。その結果、溶出画分に回収された抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体は、アッセイバッファー中でもサル血漿存在下でもヒトIgGに対する濃度依存的な結合活性を有していることが確認された（図6~8）。したがって、溶出画分に回収された抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体は、サルIgと反応せず、ヒトIgのC領域を含む蛋白質に特異的に反応することが確認された。

40

【0058】

下記実施例3でHRP標識に用いた溶出画分3の1.5mL以外の、OD₂₈₀が0.1以上を示す溶出画分を1つにまとめ、OD₂₈₀が約0.14になるようにPBSで希釈し、-80℃で保存した。

【実施例3】

【0059】

抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体のHRP標識

50

(1) HRP標識

実施例 2 (4) で得られた抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体の溶出画分のうち最もOD₂₈₀の高い溶出画分 3 から、HRP標識に用いる試料として1.5mL (抗体量として約1.8mg) を分けた。LinKit抗体標識キットPeroxi-Link [イミュン・システムズ社 (Immune Systems Ltd.) 製] を用いて、キット付属のマニュアルに基いて以下のようにしてHRP標識を行なった。以下の反応の試薬、バッファー、カラム、チューブ等は全てキットに含まれているものを用いた。

【 0 0 6 0 】

活性化用チューブに活性化用バッファー 1 mLを加え均一になるよう攪拌した。また、活性化試薬に活性化用バッファー 1 mLを加え均一になるよう攪拌した。得られた活性化試薬溶液100μLを、上記の活性化用バッファーを添加した活性化用チューブに加えてスターラーで20分間、室温で緩やかに攪拌し、HRPの活性化反応を行った。反応後、終了バッファー0.4 mLを添加して攪拌し、反応を終了させた。 10

【 0 0 6 1 】

ろ過カラム中の液体を排出した後、カップリングバッファーを加え、液を排出した。この操作をもう一度繰り返した。このカラムに実施例 2 (4) で得られた精製抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体 (溶出画分 3) 1.5 mLを入れ、液を排出した。2.5 mLのカップリングバッファーをカラムに加え、溶出液を結合反应用チューブに受けて回収した。

ろ過カラムにカップリングバッファーを加え、洗浄した。この操作をもう一度繰り返した。上記のHRP活性化反応終了後の活性化チューブ内の溶液をカラムにいれ、液を排出した。カラムにカップリングバッファー2.5 mLをいれ、溶出液を、上記で溶出液を受けた結合反应用チューブに受けて回収した。カラムは、保存用バッファーで洗浄した後、再び保存用バッファーを2~3 mL加え保存した。 20

【 0 0 6 2 】

上記の溶出液を受けた結合反应用チューブをスターラーでゆっくり攪拌し、室温で2時間反応させた。ブロッキング試薬にカップリングバッファー 1 mLを加え、ゆるやかに攪拌して溶解させ、この溶液250μLを、反応後の結合反应用チューブ内の溶液に加えた。結合反应用チューブを氷上に置き、時々攪拌しつつ約2時間反応させた。反応後の溶液の一部を還元および非還元条件下、4-20%グラジエントゲルを用いたSDS-PAGEを行ない、コントロールの抗体 (ヒトIgG) と比較してバンドが高分子量側に移動しており、抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体がHRP標識されていることを確認した (図 9) 。 30

【 0 0 6 3 】

透析用チューブを沸騰水に入れ5分間煮沸した後に、室温まで戻した。反応後の結合反应用チューブ内の溶液を透析用チューブにいれ、冷蔵下で一晩、保存用バッファー中で透析を行った。透析終了後、チューブ内の溶液を孔径0.22μmのフィルターでろ過滅菌し、以下、HRP標識した抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体として用いた。溶液は、分注し冷蔵保存した。

【 0 0 6 4 】

(2) HRP標識した抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体のヒトIgG結合活性 40
HRP標識した抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体のヒトIgGに対する結合活性をELISAにより確認した。測定試料とするHRP標識した抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体は、実施例 1 (2) と同様にアッセイバッファーでブロッキングした後洗浄したプレートを用いて、アッセイバッファーおよびサル血漿をそれぞれ用いて10倍から公比 3 で196830倍まで段階希釈したものを調製した。ELISAは実施例 1 (2) と同様に行なった。ただし、IgG固定アッセイプレートに分注するヒトIgGは、ヒトIgG濃度が10μg/mLになるようにPBSで希釈したものを扱い、約 5 で一晩放置するかわりに37 で4時間保温した。また、基質溶液添加後の反応は5分間行なった。

【 0 0 6 5 】

その結果、図 1 0 に示すように抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体はHRP標識後もヒトIgGに対する結合活性を有していることが確認された。また、HRP標識抗ヒトIgGサルポリク 50

ローナル抗体は、サル血漿で希釈した場合にも、アッセイバッファーで希釈した場合と比較してやや低下するものの十分なヒトIgGに対する結合活性を示しており（図10）、サルIgに反応せず、ヒトIgのC領域を含む蛋白質に特異的に反応することが示された。

【実施例4】

【0066】

抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体を用いた非ヒト動物血漿中のヒトIgのC領域を有する抗体の濃度測定法の確立

（1）濃度測定法

（a）アッセイプレートの調製

実施例2で調製した抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体（-80℃で凍結保存したもの）を37℃のウォーターバス中で攪拌しつつ完全に溶解させた後、PBSで濃度1.6μg/mLに調製した。この抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体を50μL/ウェルずつ96ウェルマイクロプレートに分注し、約5℃で一晩放置することにより、固定化した（以下、このプレートをアッセイプレートと称する）。アッセイバッファー300μLずつ加え、室温で1時間以上放置した。

【0067】

（b）測定試料の希釈

未使用の96ウェルマイクロプレートにアッセイバッファーを300μLずつ加え、室温で1時間以上放置した。このプレートをイムノウォッシャーを用いて、250μL/ウェルの洗浄用バッファーで5回洗浄した後（以下、（c）でのアッセイプレートでの洗浄作業も、この条件で行なった）、血漿濃度を10%とするため、測定試料に9倍容量のアッセイバッファーを添加して10倍に希釈したものを100μL/ウェルずつ入れた。

【0068】

（c）測定

アッセイプレートを洗浄し、マルチチャンネルピペットを用いて、希釈した測定試料を（b）のプレートからアッセイプレートの同じ番号のウェルに50μL/ウェルずつ移した。アッセイプレートを室温で1時間反応後、洗浄した。二次抗体として、実施例3（1）で調製したHRP標識抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体をアッセイバッファーで1000倍に希釈したものを100μL/ウェルずつ加え、室温で1時間反応後、洗浄した。基質溶液を100μL/ウェルずつ加え、プレートミキサーで攪拌しつつ室温で60分間反応させた。反応停止液を50μL/ウェルずつ加え反応を停止させた後、プレートリーダーで測定波長415nm、対照波長490nmの吸光度（OD_{415/490}）を測定した。

【0069】

この測定方法により、サルの血漿の存在下でヒト化抗体の濃度が測定できることを以下（2）～（7）で検証した。

（2）特異性の検討

ヒト化抗体である抗GD3キメラ抗体KM-871（特開平5-304989、10.7mg/mL）をサル無処理プール血漿（新日本科学株式会社製）を用いて濃度100μg/mLに調製した。さらにこの溶液をサル無処理プール血漿を用いて20ng/mLの濃度に希釈した溶液を別々に3回ずつ調製した。これらの20ng/mL KM-871溶液および、コントロールとしてサル無処理個別血漿（オス、メスそれぞれ6個体ずつ、新日本科学株式会社製）およびサル無処理プール血漿を測定試料として、（1）の方法により吸光度の測定を行なった。その結果、抗GD3キメラ抗体KM-871の吸光度は、0.117～0.119だったのに対し、コントロールのサル無処理個別血漿およびサル無処理プール血漿の吸光度は0.037～0.061であり、明らかに低かった（第1表）。したがって、（1）の濃度測定法は、ヒトIgGやヒト化抗体等のヒトIgのC領域を含む蛋白質の濃度を特異的に測定できることが明らかとなった。

【0070】

【表 1】

第 1 表 特異性検討結果

試料名	吸光度 (OD _{415/490})
KM-871(20 ng/mL)	0.118
	0.119
	0.117
サル無処理プール血漿	0.060
サル個別血漿 雄 1	0.037
サル個別血漿 雄 2	0.044
サル個別血漿 雄 3	0.043
サル個別血漿 雄 4	0.042
サル個別血漿 雄 5	0.043
サル個別血漿 雄 6	0.056
サル個別血漿 雌 1	0.061
サル個別血漿 雌 2	0.057
サル個別血漿 雌 3	0.056
サル個別血漿 雌 4	0.051
サル個別血漿 雌 5	0.047
サル個別血漿 雌 6	0.038

10

20

30

【 0 0 7 1 】

(3) 検量線の作製と評価

サル無処理プール血漿を用いてKM-871を希釈し濃度100 μ g/mLとした。さらにこの溶液をサル無処理プール血漿を用いて希釈し、検量線用標準試料溶液(20、50、100、200、500、1000ng/mL)を2回調製した。調製ごとに、検量線用標準試料溶液を測定試料として、(1)の方法により吸光度の測定を行い、検量線を作製した。検量線用標準試料溶液の吸光度を検量線に当てはめた場合に算出される濃度を実測濃度とし、真度〔(実測濃度 - 調製濃度) / 調製濃度〕を求め、検量線の評価を行った。検量線の適合基準は、文献〔U.S.

40

Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation (2001); J. Pharm. Biomed. Anal., 21, 1249 (2000)〕のガイドラインに基づき、真度が定量下限の20 ng/mLでは $\pm 25\%$ 以内、それ以外の濃度では $\pm 20\%$ 以内とした。(3)～(7)における測定結果からの検量線、実測濃度、精度および真度の算出は、プレートリーダー付属の解析ソフトSOFTmaxPRO(日本モレキュラーデバイス株式会社製)もしくはMicrosoft Excel 2000(マイクロソフト社製)を用いて行った。検量線は、濃度を独立変数(X)、吸光度を独立変数(Y)とした4係数ロジスティック曲線で回帰し算出した。その結果、第2表に示すように、検量線(20～1000ng/mL)の濃度範囲において、真度は-20.0～10.0%を示し適合基準の範囲

50

内であった。

【 0 0 7 2 】

【 表 2 】

第 2 表 検量線から算出した実測濃度および真度

測定	調製濃度 (ng/mL)	実測濃度 (ng/mL)	真度 (%)
1	20	16	-20.0
	50	55	10.0
	100	101	1.0
	200	196	-2.0
	500	503	0.6
	1000	998	-0.2
2	20	19	-5.0
	50	50	0.0
	100	102	-2.0
	200	198	-1.0
	500	501	0.2
	1000	1000	0.0

10

20

30

【 0 0 7 3 】

(4) 日内変動の検討

サル無処理プール血漿を用いて KM-871 を希釈し濃度 100 μ g/mL とした。さらにこの溶液をサル無処理プール血漿を用いて希釈し、検量線用標準試料溶液 (20、50、100、200、500、1000 ng/mL) および日内変動検討用試料として 20、200 および 1000 ng/mL の溶液を調製した。日内変動検討用試料の溶液は別々に 5 回調製した。日内変動検討用試料の調製のたびに、日内変動検討用試料を測定試料として (1) の方法により吸光度を測定した。同時に、検量線用標準試料溶液を測定試料として (1) の方法により吸光度を測定して検量線を作製した。日内変動検討用試料の吸光度と検量線から得られる濃度を実測濃度とし、実測濃度の平均および標準偏差から、精度 (実測濃度の標準偏差 / 実測濃度の平均) および真度 [(実測濃度の平均 - 調製濃度) / 調製濃度] を求め、実測濃度の日内変動から測定の評価を行った。日内変動の適合基準は、文献 [U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation (2001); J. Pharm. Biomed. Anal., 21, 1249 (2000)] のガイドラインに基づき、200 および 1000 ng/mL においては精度が 20% 以内、真度が $\pm 20\%$ 以内、20 ng/mL においては精度が 25% 以内、真度が $\pm 25\%$ 以内とした。その結果、第 3 表に示すように、KM-871 の濃度 20、200 および 1000 ng/mL における精度はそれぞれ 7.9、2.4 および 2.2 %、真度はそれぞれ 7.0、-1.8 および -1.9% であり、適合基準の範囲内であった。日内変動の結果より、定量限界を日内変動において適合基準を満たす最低濃度である 20 ng/mL、

40

50

定量範囲を日内変動において適合基準を満たす最低濃度から最高濃度の範囲である20～1000 ng/mLとした。

【 0 0 7 4 】

【表 3】

第3表 日内変動

調製濃度 (ng/mL)	実測濃度 (ng/mL)	実測濃度の平均 ±標準偏差 (ng/mL)	精度 (%)	真度 (%)
20	19	21.4± 1.7	7.9	7.0
	21			
	23			
	23			
	21			
200	197	196.4± 4.8	2.4	-1.8
	195			
	204			
	191			
	195			
1000	1009	980.6±21.1	2.2	-1.9
	950			
	977			
	986			
	981			

10

20

30

【 0 0 7 5 】

(5) 日間変動の検討

サル無処理プール血漿を用いてKM-871を希釈し、濃度100 μg/mLとした。さらにこの溶液をサル無処理プール血漿を用いて希釈し、検量線用標準試料溶液(20、50、100、200、500、1000 ng/mL)および日間変動検討用試料として50、200および800ng/mLの溶液を1日1回ずつ3日間調製した。日間変動検討用試料を測定試料として(1)の方法により吸光度を測定した。同時に、検量線用標準試料溶液を測定試料として(1)の方法により吸光度を測定して検量線を作製した。日間変動検討用試料の吸光度と検量線から得られる濃度を実測濃度とし、実測濃度の平均および標準偏差から、精度(実測濃度の標準偏差/実測濃度の平均)および真度[(実測濃度の平均 - 調製濃度)/調製濃度]を求め、実測濃度の日間変動から測定の評価を行った。日間変動の適合基準は、文献[U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation (2001); J. Pharm. Biomed. Anal., 21, 1249

40

50

(2000)のガイドラインに基づき、精度が20%以内、真度が±20%以内とした。その結果、第4表に示すように、KM-871の50、200および800ng/mLにおける精度はそれぞれ1.1、0.5および4.1%、真度はそれぞれ4.6、1.5および4.9%であり、各濃度の精度および真度は適合基準の範囲内であった。

【0076】

【表4】

第4表 日間変動

調製濃度 (ng/mL)	実測濃度 (ng/mL)	実測濃度の平均値 ±標準偏差 (ng/mL)	精度 (%)	真度 (%)
50	52	52.3± 0.6	1.1	4.6
	53			
	52			
200	203	203.0± 1.0	0.5	1.5
	202			
	204			
800	858	839.0±34.7	4.1	4.9
	860			
	799			

10

20

【0077】

(6) 分析者間変動の検討

30

(2)～(5)の測定をした測定者とは、別の測定者が(4)の日内変動の評価と同様の測定を行った。その結果、第5表に示すように、KM-871の20、200および1000ng/mLにおける精度はそれぞれ9.0、3.9および12.2%、真度はそれぞれ6.0、-6.2および-8.0%であり、各濃度の精度および真度は適合基準の範囲内であった。

【0078】

【表 5】

第5表 実測濃度の分析者間変動

調製濃度 (ng/mL)	実測濃度 (ng/mL)	実測濃度の平均値 ±標準偏差 (ng/mL)	精度 (%)	真度 (%)
20	18	21.2±1.9	9.0	6.0
	21			
	22			
	22			
	23			
200	194	187.6±7.4	3.9	-6.2
	176			
	188			
	194			
	186			
1000	830	919.8±112.6	12.2	-8.0
	808			
	888			
	1067			
	1006			

10

20

30

【0079】

以上(2)～(6)の評価から、ヒト化抗体の検量線用標準試料溶液およびサル血漿を含む測定試料を(1)の方法で測定することにより、得られた検量線と測定試料の吸光度から、試料中の該ヒト化抗体の濃度を、20～1000ng/mLという広い範囲で、測定時刻、測定日、測定者による変動が少なく安定して定量できることが確認された。

【0080】

(7) KM-871以外のヒト化抗体およびヒトIgGの濃度測定

カニクイザル無処理プール血漿を用いて、KM-871、ヒト化抗体である抗CD20キメラ抗体リツキサン(Rituxan、Genentech社製、10.42 mg/mL)、抗CD20キメラ抗体KM3065(WO 03/55993、1.43 mg/mL)、抗CCR4キメラ抗体KM2760(WO 01/64754、10.1 mg/mL)および抗CCR4キメラ抗体KM3060〔5-03株(WO 02/31140)より調製、1.5 mg/mL〕ならびにヒトIgG(ヒトIgG 10 mgにPBS 10 mLを添加して調製した溶液、正確な濃度は、280 nmの吸光度を測定し、濃度10 mg/mLのときの280 nmの吸光度を14として算出した)をそれぞれ希釈し、100 μg/mLの濃度とした。さらにこの溶液をサル無処理プール血漿を用いて希釈し、それぞれの検量線用標準試料溶液(20、50、100、200、500、1000 ng/mL)を調製した。

40

【0081】

それぞれの検量線用標準試料溶液を測定試料として、(1)の方法により吸光度を測定

50

した。ただし、1枚のアッセイプレートで常にKM-871の溶液とそれ以外の測定物質1種類の溶液の2種類の溶液の吸光度を測定した。その結果、全ての試料について、濃度依存的な吸光度の上昇が見られ、KM-871以外のヒト化抗体およびヒトIgGについても、本発明の抗体を用いた(1)の方法により、サル血漿が存在する試料の測定および定量が可能であることが確認された。

【0082】

また、それぞれの測定試料について、同じアッセイプレートで測定したKM-871の吸光度から検量線を作製し、その検量線に測定試料の吸光度を当てはめて算出される濃度を実測濃度とし、調製濃度と比較した。その結果、図11に示すように、ヒト化抗体の実測濃度は調製濃度とよく一致しており、本発明の方法はヒト化抗体であれば、抗体の種類による測定値の差が少ないことが明らかとなった。

10

【0083】

(8)サル以外の非ヒト動物血漿の存在下での濃度測定

サル無処理プール血漿、マウス無処理プール血漿(BALB/cA JcI、日本クレア株式会社製)およびラット無処理プール血漿(SIc:SD、日本エスエルシー株式会社製)をそれぞれ用い、KM-871を希釈し、濃度100 μ g/mLとした。さらにこれらの溶液を、それぞれサル無処理プール血漿、マウス無処理プール血漿およびラット無処理プール血漿を用いて希釈し、検量線用標準試料溶液(20、50、100、200、500、1000 ng/mL)を調製した。1枚のプレートでそれぞれの検量線用標準試料溶液を測定試料として、(1)の方法により吸光度を測定した。その結果、全ての試料について、濃度依存的な吸光度の上昇が見られ、サル

20

【0084】

また、サル無処理プール血漿で希釈した検量線用標準資料溶液の吸光度から検量線を作製し、その検量線をもとに、マウスまたはラット血漿で希釈した試料の吸光度から求められる濃度を実測濃度とし、調製濃度と比較した。その結果、図12に示すように、マウスまたはラット血漿で希釈した測定試料におけるKM-871の実測濃度は調製濃度とよく一致しており、本発明の方法は存在する非ヒト動物血漿の種類による測定値の差が少ないことが明らかとなった。

【0085】

30

以下に、市販の抗ヒトIgG抗体のサル血漿蛋白質との反応性を、参考例として示した。

参考例 市販抗ヒトIgG抗体のサル血漿蛋白質との反応性

(1)測定試料の調製

96ウェルマイクロプレートにアッセイバッファーB〔1% (w/v)カゼイン(和光純薬工業株式会社製、生化学用)、0.05% (v/v)ツイーン20を含むPBS〕を250 μ L/ウェルずつ加え、室温で1時間以上放置した後、プレートウォッシャー(プレートオートセラウォッシャーAMW-96SII、パイオテック株式会社製)を用いて、洗浄バッファー350 μ L/ウェルにて5回洗浄した。以下の測定時の洗浄も同様の条件で行なった。

【0086】

このプレート上で、HRP標識抗ヒトIgG抗体を、アッセイバッファーBを用いて100、300、900、2700、8100および24300倍に希釈した溶液を調製し、(2)の測定試料とした。HRP標識抗ヒトIgG抗体としては、(a)実施例3(1)で調製したHRP標識抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体、(b)HRP標識抗ヒトIgG1マウスモノクローナル抗体[mouse anti-human IgG1-HRP (clone JDC-1)、サザン・バイオテクノロジー・アソシエーツ社(Southern Biotechnology Associates, Inc.)製、カタログ番号9050-05、以下抗体1と呼ぶ]、(c)HRP標識抗ヒトIgGマウスモノクローナル抗体[a Hu IgG (clone MK1A6)-perox、ザ・バインディング・サイト(The Binding Site)社製、カタログ番号MP001、以下抗体2と呼ぶ]、(d)HRP標識抗ヒトIgGヒツジ抗体[sheep anti-human Immunoglobulins-peroxidase、ザ・バインディング・サイト社製、カタログ番号AP003、以下抗体3と呼ぶ]を用いた。

40

(2)測定

50

96ウェルマイクロプレートに、カニクイザル無処理プール血漿を50 μ L/ウェルずつ加え、37℃で4.5時間放置した。このプレートにアッセイバッファを250 μ L/ウェルずつ加え、室温で1時間以上放置した。プレートを洗浄し、測定試料を2連で50 μ L/ウェルずつ加え、室温で1時間反応させた。反応後、プレートを洗浄して、基質溶液を100 μ L/ウェルずつ加えてプレートシール（住友ベークライト株式会社製）をプレートに貼り、プレートミキサー（mx-5、三光純薬株式会社製）で攪拌しつつ室温で60分間反応させた。最後に反応停止液を各ウェル50 μ Lずつ加えプレートミキサーで30秒間攪拌した後に、プレートリーダーで測定波長415nm、対照波長490nmの吸光度（OD_{415/490}）を測定した。

【0087】

その結果を第6表および図13に示した。

10

【0088】

【表6】

第6表 HRP 標識抗ヒト Ig 抗体のサル血漿に対する反応性

抗体 希釈度	抗ヒト IgG サル抗体	抗体 1	抗体 2	抗体 3
100	0.012	0.371	0.517	0.698
300	0.009	0.178	0.362	0.343
900	0.007	0.071	0.235	0.158
2700	0.006	0.029	0.137	0.071
8100	0.006	0.014	0.079	0.030
24300	0.006	0.008	0.038	0.013

20

【0089】

30

実施例3で調製したHRP標識抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体はほとんどサル血漿と反応しないのに対し、市販のHRP標識抗ヒトIgG抗体である抗体1、抗体2および抗体3は、全てサル血漿と強く反応した。100倍希釈のHRP標識抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体と同じ反応性を示す希釈倍率から、抗体1～3のサル血漿に対する反応性はHRP標識抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体の81～243倍以上であると考えられた。したがって、サル血漿を含む測定試料中のヒト化抗体等のヒトIgのC領域を含む蛋白質の定量には、市販の抗ヒトIgG抗体は用いることができないことが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【0090】

【図1】サル血漿蛋白カラムおよびヒトIgGカラム作製時の各画分のSDS-PAGEを示す。左から、分子量マーカー、サル血漿（1 μ L）、サル血漿蛋白質と担体との反応後の反応液（10 μ L）、反応後の担体の1回目の洗浄時の洗浄液（10 μ L）、ヒトIgG溶液（1 μ L）、ヒトIgと担体との反応後の反応液（10 μ L）、反応後のカラムの1回目の洗浄時の洗浄液（10 μ L）を示す。左の数字は、分子量マーカーの分子量（kDa）、右の矢印はそれぞれIgG、アルブミンのバンドの位置を示す。

40

【図2】サル血漿蛋白カラムの各画分をアッセイバッファを用いて希釈した場合のヒトIgに対する結合活性を示す。縦軸はOD_{415/490}、横軸は希釈倍率を表す。○：カラムにかける前の抗血清、□：4回めのフロースルー、黒い四角：溶出画分（1回目）、●：溶出画分（2回目）、▲：溶出画分（3回目）、△：溶出画分（4回目）をそれぞれ示す。

【図3】サル血漿蛋白カラムの各画分を10%サル血漿を用いて希釈した場合のヒトIgに対

50

する結合活性を示す。縦軸は $OD_{415/490}$ 、横軸は希釈倍率を表す。○：カラムにかける前の抗血清、□：4回めのフロースルー、黒い四角：溶出画分（1回目）、●：溶出画分（2回目）、▲：溶出画分（3回目）、：溶出画分（4回目）をそれぞれ示す。

【図4】サル血漿蛋白カラムの各画分を100%サル血漿を用いて希釈した場合のヒトIgに対する結合活性を示す。縦軸は $OD_{415/490}$ 、横軸は希釈倍率を表す。○：カラムにかける前の抗血清、□：4回めのフロースルー、黒い四角：溶出画分（1回目）、●：溶出画分（2回目）、▲：溶出画分（3回目）、：溶出画分（4回目）をそれぞれ示す。

【図5】ヒトIgGカラムの各画分のSDS-PAGEを示す。左から、分子量マーカー、サル血漿蛋白質固定化カラムフロースルー4回目（1 μ L）、ヒトIgG固定化カラムフロースルー1（1 μ L）、溶出画分1（10 μ L）、溶出画分1（10 μ L）、溶出画分2（10 μ L）、溶出画分3（10 μ L）、溶出画分4（10 μ L）、溶出画分5（10 μ L）、洗浄画分（10 μ L）を示す。左の数字は、分子量マーカーの分子量（kDa）、右の矢印はそれぞれIgGのバンドの位置を示す。

【図6】ヒトIgGカラムの各画分をアッセイバッファーを用いて希釈した場合のヒトIgに対する結合活性を示す。縦軸は $OD_{415/490}$ 、横軸は希釈倍率を表す。○：サル血漿カラムフロースルー4回目、□：フロースルー1、黒い四角：溶出画分1、●：溶出画分2、▲：溶出画分3、：溶出画分4、▼：溶出画分5、×：洗浄画分をそれぞれ示す。

【図7】ヒトIgGカラムの各画分を10%サル血漿を用いて希釈した場合のヒトIgに対する結合活性を示す。縦軸は $OD_{415/490}$ 、横軸は希釈倍率を表す。○：サル血漿蛋白カラムフロースルー4回目、□：フロースルー1、黒い四角：溶出画分1、●：溶出画分2、▲：溶出画分3、：溶出画分4、▼：溶出画分5、×：洗浄画分をそれぞれ示す。

【図8】ヒトIgGカラムの各画分を100%サル血漿を用いて希釈した場合のヒトIgに対する結合活性を示す。縦軸は $OD_{415/490}$ 、横軸は希釈倍率を表す。○：サル血漿蛋白カラムフロースルー4回目、□：フロースルー1、黒い四角：溶出画分1、●：溶出画分2、▲：溶出画分3、：溶出画分4、▼：溶出画分5、×：洗浄画分をそれぞれ示す。

【図9】HRP標識抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体のSDS-PAGEを示す。左から、分子量マーカー、還元条件でのヒトIgG（約1 mg/mL、2 μ L）およびHRP標識抗ヒトIgGサル抗体（約1 mg/mL、2 μ L）、非還元条件でのヒトIgG（約1 mg/mL、2 μ L）およびHRP標識抗ヒトIgGサル抗体（約1 mg/mL、2 μ L）、を示す。左の数字は、分子量マーカーの分子量（kDa）、右の矢印はそれぞれHRP標識IgG（IgG+HRP）、IgG、HRP（二量体）、IgG重鎖、HRP（単量体）、IgG軽鎖のバンドの位置を示す。

【図10】HRP標識抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体のヒトIgGに対する結合活性を示す。縦軸は $OD_{415/490}$ 、横軸は希釈倍率を表す。○：アッセイバッファー、●：サル血漿でそれぞれ抗体の希釈を行った場合をそれぞれ示す。

【図11】HRP標識抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体を用いた各種ヒト化抗体およびヒトIgGの測定を示す。横軸は調製濃度（ng/mL）を、縦軸は実測濃度（KM-871の吸光度から作製した検量線から算出した濃度、ng/mL）を表す。○、□、：KM-871、●：ヒトIgG、黒い四角：KM2760、▲：KM3060、：リツキサン、▼：KM3065をそれぞれ示す。

【図12】各種非ヒト動物血漿で希釈したKM-871のHRP標識抗ヒトIgGサル抗体を用いた測定を示す。横軸は調製濃度（ng/mL）を、縦軸は実測濃度（サル血漿で希釈した試料の吸光度から作製した検量線から算出した濃度、ng/mL）を表す。▲（点線）：サル血漿、黒い四角（実線）：ラット血漿、▲（実線）：マウス血漿で希釈した場合をそれぞれ示す。

【図13】各種抗ヒトIgG抗体のサル血漿蛋白質に対する反応性を示す。横軸は希釈倍率、縦軸は $OD_{415/490}$ を表す。●：HRP標識抗ヒトIgGサルポリクローナル抗体、□：HRP標識抗ヒトIgG1マウスモノクローナル抗体（抗体1）：HRP標識抗ヒトIgGマウスモノクローナル抗体（抗体2）：HRP標識抗ヒトIgGヒツジ抗体（抗体3）をそれぞれ示す。

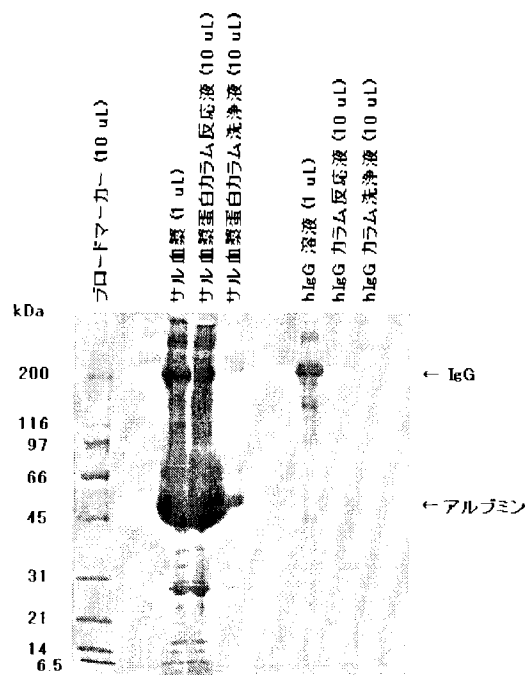
10

20

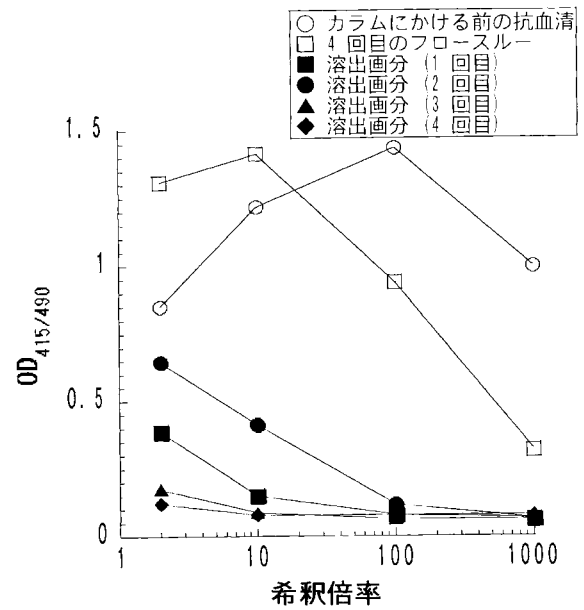
30

40

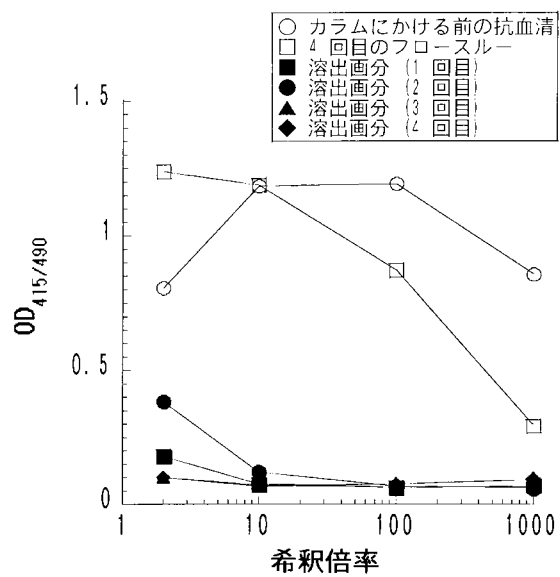
【図 1】



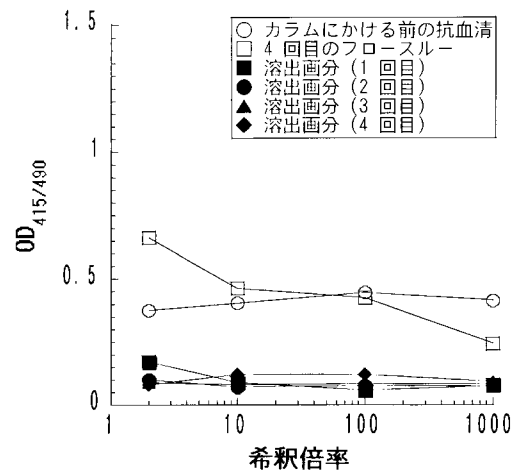
【図 2】



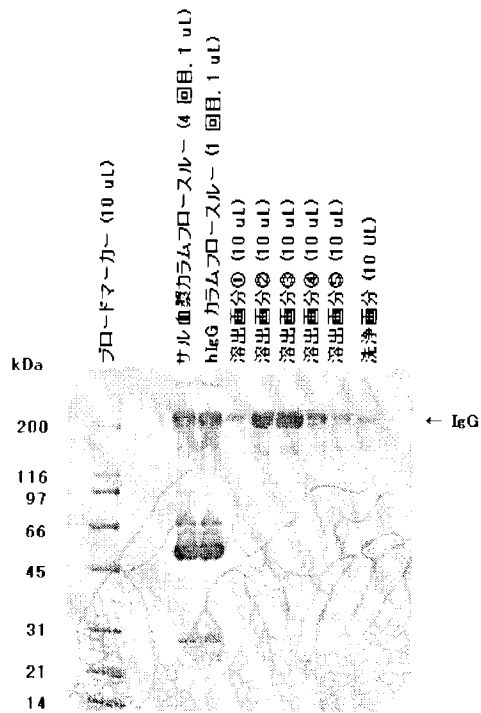
【図 3】



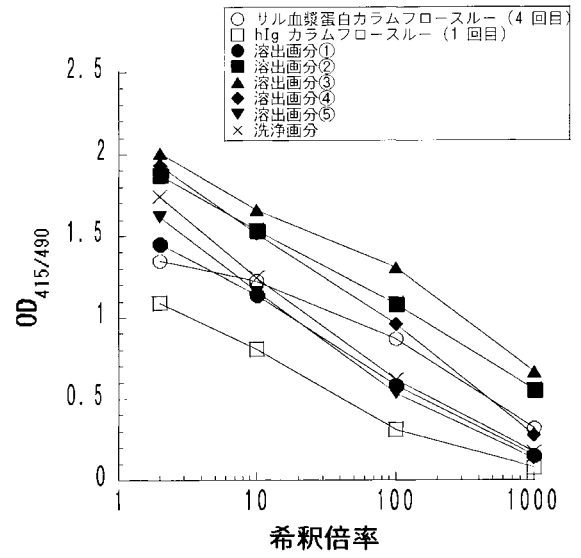
【図 4】



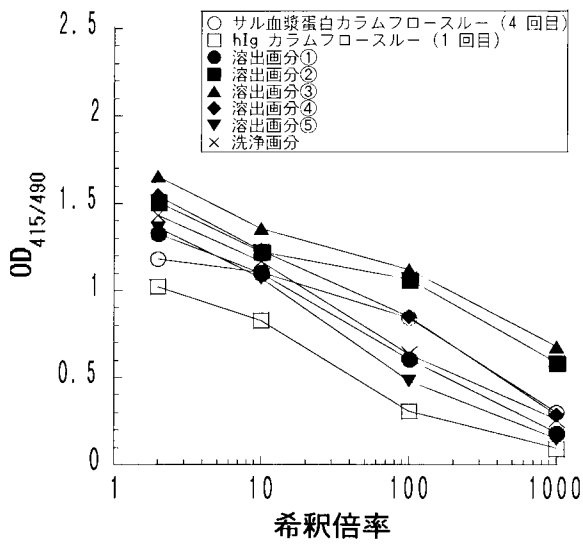
【図 5】



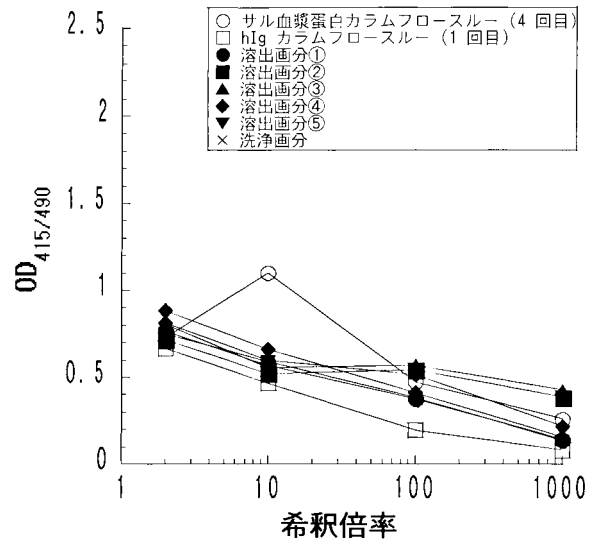
【図 6】



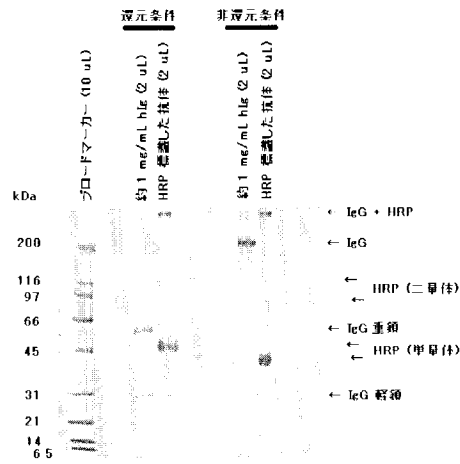
【図 7】



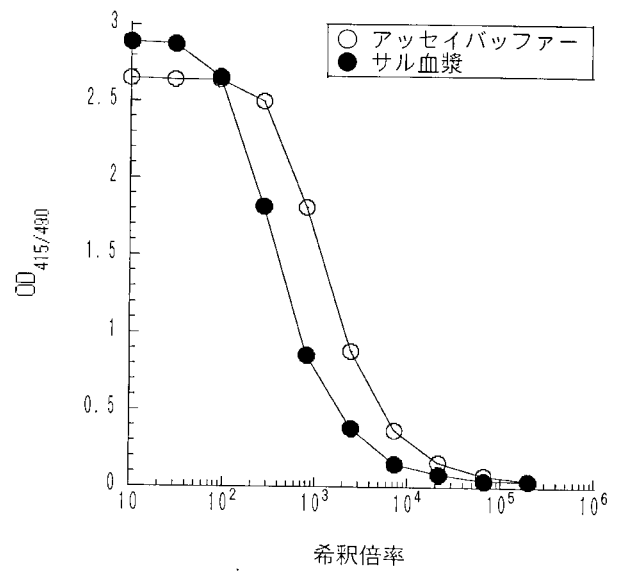
【図 8】



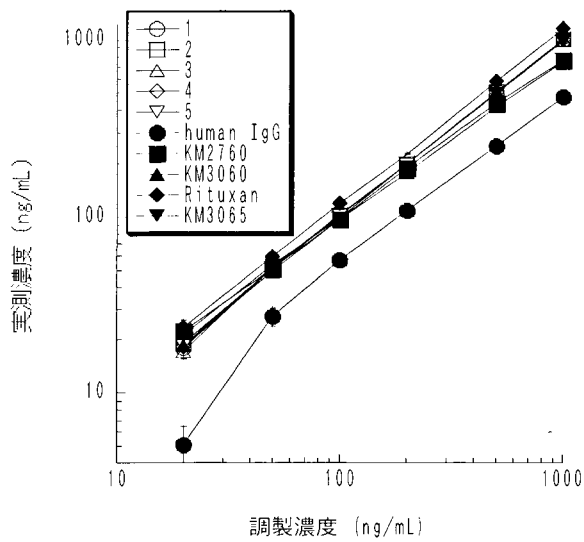
【図 9】



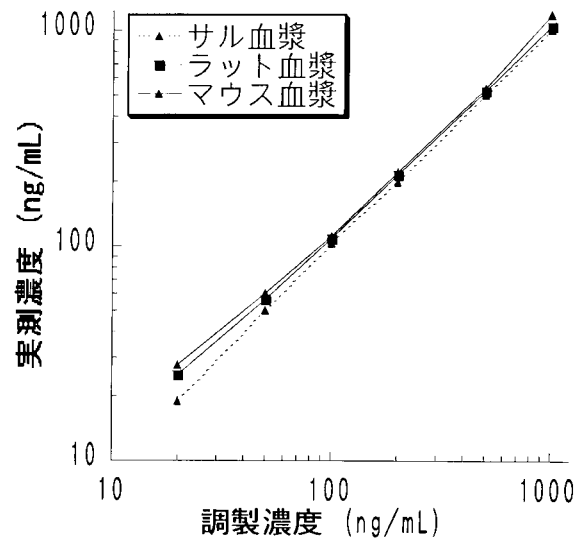
【図 10】



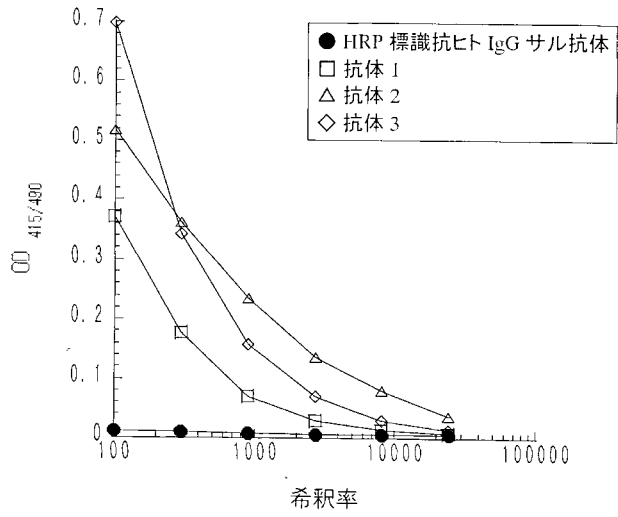
【図 11】



【図 12】



【図 13】



专利名称(译)	特异性地与人免疫球蛋白的恒定区反应的抗体		
公开(公告)号	JP2005187421A	公开(公告)日	2005-07-14
申请号	JP2003432774	申请日	2003-12-26
申请(专利权)人(译)	协和醗酵工业株式会社		
[标]发明人	高村博行 又木陽一 浜村淳		
发明人	高村 博行 又木 陽一 浜村 淳		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/42 C07K19/00 C12Q1/28		
FI分类号	C07K16/42 C12Q1/28 G01N33/53.N C07K19/00		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ22 4B063/QR58 4B063/QS26 4B063/QS36 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/GA26		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种抗体，其可用于在猴血浆存在下检测和定量含有人免疫球蛋白恒定区域（人Ig）的蛋白质，例如人源化抗体。解决方案：用人Ig的恒定区，人Ig或人Ig的恒定区作为抗原免疫猴，并收集与抗原特异性反应的抗体与猴免疫球蛋白反应可以获得与含有人Ig恒定区的蛋白质特异性反应的抗体。【选择图】无

試料名	吸光度 (OD _{415/490})
KM-871 (20 ng/mL)	0.118
	0.119
	0.117
サル無処理プール血漿	0.060
サル個別血漿 雄 1	0.037
サル個別血漿 雄 2	0.044
サル個別血漿 雄 3	0.043
サル個別血漿 雄 4	0.042
サル個別血漿 雄 5	0.043
サル個別血漿 雄 6	0.056
サル個別血漿 雌 1	0.061
サル個別血漿 雌 2	0.057
サル個別血漿 雌 3	0.056
サル個別血漿 雌 4	0.051
サル個別血漿 雌 5	0.047
サル個別血漿 雌 6	0.038