

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5817838号
(P5817838)

(45) 発行日 平成27年11月18日(2015.11.18)

(24) 登録日 平成27年10月9日(2015.10.9)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533
GO 1 N 33/542 (2006.01)	GO 1 N 33/542 A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C
CO 7 K 16/00 (2006.01)	CO 7 K 16/00 Z N A

請求項の数 34 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2013-541635 (P2013-541635)
 (86) (22) 出願日 平成24年11月1日(2012.11.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2012/007025
 (87) 国際公開番号 W02013/065314
 (87) 国際公開日 平成25年5月10日(2013.5.10)
 審査請求日 平成26年3月14日(2014.3.14)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-241402 (P2011-241402)
 (32) 優先日 平成23年11月2日(2011.11.2)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000102212
 ウシオ電機株式会社
 東京都千代田区大手町二丁目6番1号
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫
 (72) 発明者 上田 宏
 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 R
 1-18 東京工業大学 資源化学研究所
 内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光標識抗体可変領域含有ポリペプチド複合体を用いた蛍光免疫測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドの両方が蛍光色素により標識された、前記抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体を備えたキットであって、

液相中の抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが正の相関関係にあることを指標として、抗原濃度の測定又は抗原の可視化を可能とすることを特徴とする抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項2】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 (Fragment, antigen binding)、あるいは F a b 抗体 2 つがヒンジを介してジスルフィド結合で結合した F (a b ´)₂ 抗体、あるいは完全体の抗体のいずれかである、請求項1記載のキット。

【請求項3】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 (Fragment, antigen binding) である、請求項2記載のキット。

【請求項4】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 2 つがヒンジを介してジスルフィド結合で結合した F (a b ´)₂ 抗体である、請求項2記載のキット。

【請求項 5】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、完全体の抗体である、請求項 2 記載のキット。

【請求項 6】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 (Fragment, antigen binding)、あるいは F a b 抗体 2 つがヒンジを介してジスルフィド結合で結合した F (a b ´)₂ 抗体、あるいは完全体の抗体のいずれかであり、

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドのいずれか一方が蛍光色素により標識された、前記抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体を備えたキットであって、

液相中の抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが正の相関関係にあることを指標として、抗原濃度の測定又は抗原の可視化を可能とすることを特徴とする抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 7】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 (Fragment, antigen binding) である、請求項 6 記載のキット。

【請求項 8】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 2 つがヒンジを介してジスルフィド結合で結合した F (a b ´)₂ 抗体である、請求項 6 記載のキット。

【請求項 9】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、完全体の抗体である、請求項 6 記載のキット。

【請求項 10】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドのいずれか一方が蛍光色素、他方が該蛍光色素を消光するクエンチャーにより標識された、前記抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体であって、蛍光色素が抗原の非存在下でクエンチャー及び抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド及び/又は抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド中のトリプトファン残基により消光されている複合体を備えたキットであって、

液相中の抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが正の相関関係にあることを指標として、抗原濃度の測定又は抗原の可視化を可能とすることを特徴とする抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 11】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 (Fragment, antigen binding)、あるいは F a b 抗体 2 つがヒンジを介してジスルフィド結合で結合した F (a b ´)₂ 抗体、あるいは完全体の抗体のいずれかである、請求項 10 記載のキット。

【請求項 12】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 (Fragment, antigen binding) である、請求項 11 記載のキット。

【請求項 13】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 2 つがヒンジを介してジスルフィド結合で結合した F (a b ´)₂ 抗体である、請求項 11 記載のキット。

【請求項 14】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、完全体の抗体である、請求項 11 記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドが、それぞれ同一の蛍光色素により標識されたことを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 16】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドが、それぞれ異なる種類の蛍光色素により標識されたことを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 17】

蛍光色素が、ローダミン系蛍光色素及びオキサジン系蛍光色素から選ばれることを特徴とする請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の抗原濃度測定・検出用キット。

10

【請求項 18】

蛍光色素が、カルボキシローダミン 110、カルボキシテトラメチルローダミン及び ATTO 655 (商標名) から選ばれることを特徴とする請求項 17 記載の抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 19】

クエンチャーが、7-ニトロベンゾフラザン (NBD) であることを特徴とする請求項 10 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 20】

下の工程 (a) ~ (c) を順次備えることを特徴とする抗原濃度測定・検出方法。
 (a) 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドの両方が蛍光色素により標識された、前記抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体を、測定用試料中の抗原に接触させる工程；
 (b) 蛍光色素の蛍光を検出、又は蛍光色素の蛍光強度を測定する工程；
 (c) 抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、検体に含まれる抗原量を算出、又は抗原を可視化する工程；

20

【請求項 21】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 (Fragment, antigen binding)、あるいは F a b 抗体 2 つがヒンジを介してジスルフィド結合で結合した F (a b ')₂ 抗体、あるいは完全体の抗体のいずれかである、請求項 20 記載の抗原濃度測定・検出方法。

30

【請求項 22】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 (Fragment, antigen binding) である、請求項 21 記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 23】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 2 つがヒンジを介してジスルフィド結合で結合した F (a b ')₂ 抗体である、請求項 21 記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 24】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、完全体の抗体である、請求項 21 記載の抗原濃度測定・検出方法。

40

【請求項 25】

以下の工程 (a) ~ (c) を順次備えることを特徴とする抗原濃度測定・検出方法。
 (a) 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 (Fragment, antigen binding) あるいは F a b 抗体 2 つがヒンジを介してジスルフィド結合で結合した F (a b ')₂ 抗体、あるいは完全体の抗体のいずれかであり、

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドのいずれか一方が蛍光色素により標識された、前記抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重

50

鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体を、測定用試料中の抗原に接触させる工程；

(b) 蛍光色素の蛍光を検出、又は蛍光色素の蛍光強度を測定する工程；

(c) 抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、検体に含まれる抗原量を算出、又は抗原を可視化する工程；

【請求項 26】

下の工程 (a) ~ (c) を順次備えることを特徴とする抗原濃度測定・検出方法。

(a) 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドのいずれか一方が蛍光色素、他方が該蛍光色素を消光するクエンチャーにより標識された、前記抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体であって、蛍光色素が抗原非存在下でクエンチャー及び抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド及び/又は抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド中のトリプトファン残基により消光されている複合体を、測定用試料中の抗原に接触させる工程；

(b) 蛍光色素の蛍光を検出、又は蛍光色素の蛍光強度を測定する工程；

(c) 抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、検体に含まれる抗原量を算出、又は抗原を可視化する工程；

【請求項 27】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 (Fragment, antigen binding)、あるいは F a b 抗体 2 つがヒンジを介してジスルフィド結合で結合した F (a b ')₂ 抗体、あるいは完全体の抗体のいずれかである、請求項 26 記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 28】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 (Fragment, antigen binding) である、請求項 27 記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 29】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 2 つがヒンジを介してジスルフィド結合で結合した F (a b ')₂ 抗体である、請求項 27 記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 30】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、完全体の抗体である、請求項 27 記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 31】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドが、それぞれ同一の蛍光色素により標識されたことを特徴とする請求項 20 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 32】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドが、それぞれ異なる種類の蛍光色素により標識されたことを特徴とする請求項 20 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 33】

抗原が、低分子化合物であることを特徴とする請求項 20 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 34】

抗原が、ヒトオステオカルシン、ビスフェノール A、血清アルブミン、クレンブテロール、ラクタミン、コチニン、インフルエンザ A 型ウィルスヘマグルチニン、モルヒネ類、メタンフェタミン類、コカイン、テトラヒドロカンナビノール、ケタミンであることを特徴とする請求項 20 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の抗原濃度測定・検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、固相化工程及び洗浄工程を必要とせず高感度で低分子化合物の検出が可能な抗原濃度測定・検出用キットや、抗原濃度測定・検出方法に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

抗体と抗原の結合を利用した免疫測定法は、試料中の物質の検出や濃度測定に広く用いられている。これら抗原や抗体の濃度を測定する方法のうち、臨床診断、基礎研究や環境調査などに最も広く用いられている測定方法は、同一の抗原の異なるエピトープを認識する2種類のモノクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を使用する、サンドイッチE L I S A法（あるいはサンドイッチR I A法）と呼ばれる免疫測定法である。サンドイッチ法の詳細は以下に述べる通りである。第一段階として一次抗体と呼ばれるモノクローナル又はポリクローナル抗体を測定用プレートに固定化し、そこに抗原を含む検体を注ぎ、一定時間反応させて抗体と抗原を結合させる。次に、第二段階として、抗体に結合した夾雑物や、プレートに非特異的に結合した抗原を洗浄液で洗浄して取り除く。第三段階として、予め酵素、蛍光色素あるいはラジオアイソトープなどのレポーター分子を結合させた標識二次抗体溶液を注ぎ、一定時間反応させ、一次抗体によって補足された抗原にさらに標識二次抗体を結合させる。反応後に、洗浄液で余分の標識抗体を取り除き、測定用プレートに結合したレポーター分子の量を酵素活性、蛍光あるいはラジオアイソトープなどで測定することにより検体中の抗原量を測定する。

【 0 0 0 3 】

前述のように、通常のスンドイッチE L I S A法では、エピトープの異なる2種類の抗体が必要となるが、例えば、低分子化合物などを抗原とする場合には、異なるエピトープを認識する複数の抗体を作製することは困難である。このため、上田らは、1種類の抗体の軽鎖可変領域（V L）と重鎖可変領域（V H）とを用いた、オープンサンドイッチ法と呼ばれる、精度の高い低分子化合物の免疫測定法を確立した（特許文献1及び2、非特許文献1及び2）。この方法は、抗原を特異的に認識する抗体のV H領域ポリペプチド及びV L領域ポリペプチドを調製し、一方のポリペプチドをレポーター分子で標識して標識化ポリペプチドとし、他方のポリペプチドを固相に固定して固定化ポリペプチドとし、抗原含有試料及び標識化ポリペプチドを固定化ポリペプチドに接触させ、固定化ポリペプチドに結合した標識化ポリペプチドのレポーター分子の量を測定する抗原濃度測定方法である。また、低分子化合物を測定するための測定法としては、免疫測定法の他にも液体クロマトグラフ法等があるが、高精度な測定機器が必要な上、被検体の必要量も多く、測定時間もかかり、しかも汎用性が低いという問題があった。

【 0 0 0 4 】

また、蛍光色素標識した抗体を用いて抗原の濃度を測定する免疫測定方法としては、抗体と抗原とをそれぞれ異なる蛍光色素により標識し、蛍光色素間で起こる蛍光共鳴エネルギー転移（F R E T）の効率の変化を指標とした免疫測定方法や（非特許文献3及び4）、蛍光標識した抗体にあらかじめ消光物質を混合することにより消光されていた抗体の蛍光が、目的検出物質の導入により増大する現象を用いるクエンチングによる効率の変化を指標とした免疫測定方法や、蛍光色素で標識した抗体を用いて、標識抗体と測定対象物が凝集することにより起こる蛍光強度の減少を測定する免疫測定方法（特許文献3）が知られている。

【 0 0 0 5 】

しかしながら、免疫測定方法の多くは、抗体又は抗原を固相化する工程と、非特異的な標識化合物の吸着を除去するための洗浄工程とを必要とするものであった。これらの工程は作業が煩雑で時間が掛かる上に、測定結果のばらつきの原因となることから、固相化工程や洗浄工程を必要としない液相系免疫測定方法の開発が求められていた。そこで、本発明者らは、固相化工程と洗浄工程とを必要としない液相系であって、迅速かつ簡便に目的物質の定量的な測定を可能とし、かつ、抗原を可視化することが可能な免疫測定法である「均一系蛍光免疫測定法（「均一系蛍光免疫アッセイ法」や「Q u e n c h b o d y測定

法」や「Q - b o d y 測定法」ともいう。)を開発した(特許文献4、非特許文献5、図1~3)。

【0006】

前記「均一系蛍光免疫測定法」の免疫測定法は、消光(クエンチング)現象を利用した技術を用いた測定方法であり、(1)抗体軽鎖可変領域(VLと称される領域)ポリペプチドと抗体重鎖可変領域(VHと称される領域)ポリペプチドとを備え、前記抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと抗体重鎖可変領域ポリペプチドのいずれか一方が蛍光色素により標識されたキットであって、液相中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが正の相関関係にあることを指標として、抗原濃度の測定又は抗原の可視化を可能とする抗原濃度測定・検出用キットや、(2)VLポリペプチドとVHポリペプチドとが結合した一本鎖抗体である前記(1)記載の抗原濃度測定・検出用キットに関するものである。すなわち、VLポリペプチドとVHポリペプチドのどちらか一方を蛍光標識した2本の抗体断片、又は蛍光標識したVLポリペプチドとVHポリペプチドとが結合した一本鎖抗体(s c F v)(これら(1)及び(2)を「Q u e n c h b o d y」又は「Q - b o d y」ともいい、(1)をVH+VL型Q - b o d y、(2)をs c F v型Q - b o d yともいう。)を、抗原が含まれているか否かを検査する被検試料溶液に混合し、上記蛍光色素の蛍光強度と抗原濃度が正の相関関係にあることを指標として、抗原濃度の測定又は抗原の可視化を可能とする蛍光免疫測定方法である(図1~3)。かかる測定方法の原理は、抗体分子内の保存性の高いトリプトファン残基と蛍光色素が相互作用して蛍光色素を消光し、抗原が加わることによって抗原依存的にかかる消光が解消されることにある。

【0007】

前記Q - b o d yを用いた「均一系蛍光免疫測定法」の手法の利点は、1)洗浄工程が不要で、少量のサンプルと混合して蛍光強度を測定するだけで測定が完了する極めて簡便な測定技術であること、2)抗体中に存在する保存性の高いトリプトファンを消光に利用するため、抗体の種類を変えても消光効果が得られ、様々な抗体を用いて種々の物質の検出にも広く適用が可能な点で汎用性に優れていること、3)抗原部位が1ヶ所でのため、原理的に低分子化合物に対しても適用可能であることなどがあげられる(特許文献4参照、図1)。そして、洗浄工程がなく、簡便な測定方法であることから、測定デバイスを非常にコンパクトに設計し、携帯可能な手のひらサイズまで小型化することが可能であり、専門教育を受けていない一般の人が現場で測定することも可能であると想定される。しかしながら、前述のとおり非常に有用な蛍光免疫測定方法であるが、抗原が存在しないときの蛍光強度と抗原が飽和に達したときの蛍光強度の比は、大きいもので6倍、小さいものでは1.2倍程度であったため、測定結果のダイナミックレンジをより広げて感度を上げ、性能をさらに向上させることが期待されていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開平10-78436号公報

【特許文献2】特許第3784111号公報

【特許文献3】特開平10-282098号公報

【特許文献4】WO2011/061944号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】上田宏, 薬学雑誌 27:71-80 (2007)

【非特許文献2】Lim SL, et al., Anal Chem. 79(16):6193-200 (2007)

【非特許文献3】Iijima I. and Hohsaka T., Chembiochem. 17;10(6):999-1006 (2009)

【非特許文献4】Kajihara D, et al., Nat Methods. 3(11):923 (2006)

【非特許文献5】Abe R, et al., J. Am. Chem. Soc. 133(43):17386-17394 (2011)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本願発明の課題は、固相化工程と洗浄工程とを必要としない、液相において迅速かつ簡便に目的の物質の検出及び/又は定量的な測定を可能とし、かつ、抗原を可視化することが可能な免疫測定法であって、かかる測定結果のダイナミックレンジがさらに広く、感度が高い蛍光免疫測定方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

抗原が存在しない溶液中で消光している蛍光標識一本鎖抗体 (s c F v) をグアニジン塩酸で変性させた抗体の蛍光強度と、抗原が飽和に達したときの蛍光強度は、ほぼ同程度であったことから、抗原非存在時の消光効率を高めることがダイナミックレンジを広げる有効な手段であると考え、以下の検討を行なった。

【0012】

すなわち、消光の主たる要因は、V LポリペプチドやV Hポリペプチドに高度に保存されたトリプトファン残基と、標識した蛍光色素とが接触することによるものであり、抗原結合に伴う可変領域の構造安定化により蛍光色素が抗原結合ポケットから追い出されることで、消光状態が解消され、蛍光強度が増加すると推測した。そして、V LポリペプチドやV Hポリペプチドが2種類のタンパク質として存在する場合は、V LポリペプチドやV Hポリペプチドが解離しており相互作用が弱い場合、蛍光色素とトリプトファン残基との接触効率が低くそれに伴い消光状態も低いものであったと予想した。また、一本鎖抗体 (s c F v) においては、V LポリペプチドとV Hポリペプチドとを人工的なペプチドリンカーにて一本鎖抗体として結合させたことで、V LポリペプチドとV Hポリペプチドとの相互作用を高めることができるが、人工的なペプチドリンカーの付加により本来に有する抗原との結合活性や安定性などの抗体の機能を低下させている可能性が考えられた。抗体軽鎖可変領域 (V L) 及び抗体軽鎖定常領域からなるポリペプチドと、抗体重鎖可変領域 (V H) 及び抗体重鎖定常領域からなるポリペプチドとが、ジスルフィド結合で結合した1分子のヘテロダイマータンパク質からなるF a b抗体 (Fragment, antigen binding) であれば、本来に有する抗体の機能を保持していると推測し、F a b抗体のV H含有ポリペプチド又はV L含有ポリペプチドのいずれか一方を蛍光標識したところ、抗原非存在下でかかる蛍光色素はより強く消光し、バックグラウンドを下げられることを見いだした。さらに、F a b抗体のV H含有ポリペプチド及びV L含有ポリペプチドのそれぞれに同色の蛍光色素を標識したところ、蛍光色素とトリプトファン残基との接触による消光に加え、色素間の消光効果 (H-dimer) が加わりさらに高い検出感度を得られることを見いだした。また、F a b抗体のV H含有ポリペプチド及びV L含有ポリペプチドのそれぞれに異色の蛍光色素を標識したところ、蛍光色素とトリプトファン残基との接触による消光と色素間の消光効果に加えてFRET効果による消光効果も得られ、さらに高い検出感度を得られることを見いだした。さらに、F a b抗体のV H含有ポリペプチド及びV L含有ポリペプチドのそれぞれに蛍光色素と該蛍光色素を消光するクエンチャーを標識したところ、蛍光色素とトリプトファン残基との接触による消光と蛍光色素とクエンチャー間の消光効果も得られ、高い検出感度を得られることを見いだした。

【0013】

従来の蛍光標識一本鎖抗体 (s c F v) と本発明の蛍光標識F a b型複合体の熱安定性を測定したところ、蛍光標識一本鎖抗体 (s c F v) が変性する温度は61であったが、蛍光標識F a b型複合体が変性する温度は73と耐熱性に優れ、保存性にも優れていることを見いだした。本発明はこれら知見に基づいて完成するに至ったものである (図4)。

【0014】

すなわち本発明は、

(1) 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドのいずれか一方又は両方が蛍光色素により標識された、前記抗体軽鎖可変領域を含むポリペ

10

20

30

40

50

チドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体を備えたキットであって、液中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが正の相関関係にあることを指標として、抗原濃度の測定又は抗原の可視化を可能とすることを特徴とする抗原濃度測定・検出用キット；

〔 2 〕 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドが、それぞれが同一の蛍光色素により標識されたことを特徴とする前記〔 1 〕記載の抗原濃度測定・検出用キット；

〔 3 〕 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドが、それぞれが異なる種類の蛍光色素により標識されたことを特徴とする前記〔 1 〕記載の抗原濃度測定・検出用キット；

〔 4 〕 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドが、一方が蛍光色素、他方が該蛍光色素を消光するクエンチャーにより標識されたことを特徴とする前記〔 1 〕記載の抗原濃度測定・検出用キット；

〔 5 〕 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドのいずれか一方が、蛍光色素により標識されたことを特徴とする前記〔 1 〕記載の抗原濃度測定・検出用キット；

〔 6 〕 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 (Fragment, antigen binding) であることを特徴とする前記〔 1 〕 ~ 〔 5 〕 のいずれか記載の抗原濃度測定・検出用キット；

〔 7 〕 蛍光色素が、ローダミン系蛍光色素及びオキサジン系蛍光色素から選ばれることを特徴とする前記〔 1 〕 ~ 〔 6 〕 のいずれか記載の抗原濃度測定・検出用キット；

〔 8 〕 蛍光色素が、カルボキシローダミン 1 1 0、カルボキシテトラメチルローダミン及び A T T O 6 5 5 (商標名) から選ばれることを特徴とする前記〔 7 〕記載の抗原濃度測定・検出用キット；

〔 9 〕 クエンチャーが、7 - ニトロベンゾフラザン (N B D) であることを特徴とする前記〔 4 〕 ~ 〔 8 〕 のいずれか記載の抗原濃度測定・検出用キット；
に関する。

【 0 0 1 5 】

また本発明は、

〔 1 0 〕 以下の工程 (a) ~ (c)、

(a) 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドのいずれか一方又は両方が蛍光色素により標識された、前記抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体を、測定用試料中の抗原に接触させる工程；

(b) 蛍光色素の蛍光を検出、又は蛍光色素の蛍光強度を測定する工程；

(c) 抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、検体に含まれる抗原量を算出、又は抗原を可視化する工程；

を順次備えることを特徴とする抗原濃度測定・検出方法；

〔 1 1 〕 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドが、それぞれが同一の蛍光色素により標識されたことを特徴とする前記〔 1 0 〕記載の抗原濃度測定・検出方法；

〔 1 2 〕 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドが、それぞれが異なる種類の蛍光色素により標識されたことを特徴とする前記〔 1 0 〕記載の抗原濃度測定・検出方法；

〔 1 3 〕 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドが、一方が蛍光色素、他方が該蛍光色素を消光するクエンチャーにより標識されたことを特徴とする前記〔 1 0 〕記載の抗原濃度測定・検出方法；

〔 1 4 〕 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドのいずれか一方が、蛍光色素により標識されたことを特徴とする前記〔 1 0 〕記載の抗原濃度測定・検出方法；

10

20

30

40

50

〔 1 5 〕 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が、F a b 抗体 (Fragment, antigen binding) であることを特徴とする前記〔 1 0 〕 ~ 〔 1 4 〕 のいずれか記載の抗原濃度測定・検出方法；

〔 1 6 〕 抗原が、低分子化合物であることを特徴とする前記〔 1 0 〕 ~ 〔 1 5 〕 のいずれか記載の抗原濃度測定・検出方法；

〔 1 7 〕 抗原が、ヒトオステオカルシン、ビスフェノール A、血清アルブミン、クレンプテロール、ラクトパミン、コチニン、インフルエンザ A 型ウィルスヘマグルチニン、モルヒネ類、メタンフェタミン類、コカイン、テトラヒドロカンナビノール、ケタミンであることを特徴とする前記〔 1 0 〕 ~ 〔 1 5 〕 のいずれか記載の抗原濃度測定・検出方法；
に関する。

10

【発明の効果】

【 0 0 1 6 〕

本発明によれば、液相系において迅速かつ簡便に目的物質の検出及び/又は定量的な測定が可能であり、低分子化合物をも測定することができる高感度な免疫測定方法や、該測定方法による抗原の測定を行うためのキットを提供することができる。本発明の測定方法は、いずれか一方又はそれぞれ両方が蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド (以下、「V L 含有ポリペプチド」ともいう。) と抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド (以下、「V H 含有ポリペプチド」ともいう。) からなる複合体 (以下、「本発明の蛍光標識複合体」ともいう。) と、抗原との結合を、前記蛍光色素の蛍光強度を指標として検出及び/又は測定することができる。本発明の蛍光標識複合体は抗原と結合していないときは、前記蛍光色素が効果的に消光 (クエンチ) された状態にあるため、抗原を感度よく検出及び/又は測定することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 〕

【図 1】 Q - b o d y 測定法の特徴を表す図である。抗体重鎖可変領域ポリペプチドと抗体軽鎖可変領域ポリペプチドのいずれか一方に蛍光標識した 2 種類のポリペプチド (V H + V L)、又は、抗体重鎖可変領域ポリペプチドと抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとを結合した蛍光標識一本鎖抗体 (s c F v) は、抗原と混ぜるだけで、迅速、高感度に抗原濃度を測定することができる (W O 2 0 1 1 / 0 6 1 9 4 4 号公報参照)。

【図 2】 Q - b o d y の原理を表す図である。蛍光色素と、抗体可変領域に広く保存されているアミノ酸、すなわち抗体重鎖可変領域の T r p 3 3, T r p 4 7, T r p 3 6, T r p 1 0 6 や抗体軽鎖可変領域の T r p 4 0 との相互作用により、抗原非存在下では蛍光が消光されているが、抗原濃度依存的に消光が解除され蛍光が増加する。蛍光標識 (V H + V L) 及び蛍光標識 s c F v を Q u e n c h b o d y (Q - b o d y) と呼ぶ。

30

【図 3】 Q - b o d y を利用して抗原濃度を測定した、均一系蛍光免疫アッセイ法の実施の一例を示す図である。Q - b o d y である T A M R A 標識抗 B G P 一本鎖抗体 (s c F v) に抗原濃度を变化させ、蛍光分光光度計 (FluoroMax-4) を用いて蛍光スペクトルおよび蛍光イメージアナライザー (F M - B I O I I I) を用いて蛍光強度を測定した結果を示した。

【図 4】 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドのいずれか一方又は両方が蛍光色素により標識された、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体を模式的に表す図である。すなわち本発明の蛍光ラベル複合体を模式的に示した (上図)。また、実施例に用いた Q - b o d y、及び、本発明のシングルラベル F a b 型複合体、同色ダブルラベル F a b 型複合体、異色ダブルラベル F a b 型複合体を模式的に表す図である (下図)。

40

【図 5】 本発明の蛍光標識 F a b 型複合体の作製方法を模式的に表す図である。本発明のシングルラベル F a b 型複合体を作製する場合は、P r o X タグ (T A G)、V H、C H₁、C 末端にリンカー及び H i s タグの D N A 配列を付与した遺伝子を含むプラスミドと、P r o X タグ (T T T)、V L、C、C 末端にリンカー及び F L A G タグの D N A 配列を付与した遺伝子を含むプラスミドと、T A M R A - A F - t R N A a m b e r (Clov

50

erDirect)とを大腸菌無細胞合成キット(RYTS)に加え、20 で2時間反応させTAMRA標識VH含有ポリペプチドとVL含有ポリペプチドを共発現にて合成した。その後、4 16時間静置し複合体を形成した。C末に付与したFLAGとHisタグを用いてタンパク質を精製した。同色ダブルラベルとする場合は、VH含有遺伝子およびVL含有遺伝子のN末側にProXタグ(TAG)を付与したプラスミドを用いて、シングルラベルFab型複合体と同様の方法で合成、精製した。また異色ダブルラベルとする場合は、ProXタグ(TAG)とProXタグ(CGGG)を、それぞれどちらかの遺伝子のN末側に付与したプラスミドを用いて、色素A-AF-tRNAamber、色素B-AF-tRNACGGG(CloverDirect)を添加した上記の方法により合成、精製した。枠欄に4塩基コドンによる蛍光標識アミノ酸導入の模式図を示した。

10

【図6】本発明のシングルラベルFab型複合体が、VH+VL型Q-bodyやscFv型Q-bodyよりも高い蛍光強度比でBGPやビスフェノールAを測定することができたことを示す図である。

【図7】本発明の同色ダブルラベルFab型複合体が、本発明のシングルラベルFab型複合体よりも高い蛍光強度比でBGPを測定することができたことを示す図である。

【図8】本発明の同色ダブルラベルFab型複合体が、本発明のシングルラベルFab型複合体よりも高い蛍光強度比でHSAを測定することができたことを示す図である。

【図9】本発明の異色ダブルラベルFab型複合体が、本発明のシングルラベルFab型複合体よりも高い蛍光強度比でBGPを測定することができたことを示す図である。

【図10】本発明の異色ダブルラベルFab型複合体が、本発明のシングルラベルFab型複合体よりも高い蛍光強度比でHSAを測定することができたことを示す図である。

20

【図11】CR110で標識した抗SA抗体の重鎖可変領域(VH)と抗体重鎖定常領域(CH₁)を含むポリペプチドと、TAMRAで標識した抗SA抗体の軽鎖可変領域(VL)と抗体軽鎖定常領域(C)を含むポリペプチドからなる、抗SA抗体の異色ダブルラベルFab型複合体が、本発明のシングルラベルFab型複合体よりも高い蛍光強度比でHSAを測定することができたことを示す図である。

【図12】本発明の一方が蛍光色素、他方が該蛍光色素を消光するクエンチャーにより標識されたFab型複合体が高い蛍光強度比でBGPを測定し得たことを示す図である。いずれも、Ex/Em= 530/ 580で測定した。

【図13】本発明の蛍光ラベルFab型複合体の熱変性を起す温度は、蛍光ラベルscFvの熱変性を起す温度より12 高く、温度安定性に優れていることを示す図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の抗原濃度測定・検出用キットとしては、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド(VL含有ポリペプチド)と抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド(VH含有ポリペプチド)からなる複合体を備え、前記VL含有ポリペプチドとVH含有ポリペプチドのいずれか一方又は両方が蛍光色素により標識されている、前記複合体を備えたキットであって、液相中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが正の相関関係にあることを指標として、抗原濃度の測定又は抗原の可視化を可能とすることを特徴とする抗原濃度測定・検出用キットであれば特に制限されないが、いずれか一方又は両方が蛍光色素により標識されている、VL含有ポリペプチドとVH含有ポリペプチドからなる複合体を構成要素として含む他は、標準物質として使用できる抗原や、通常この種の免疫測定キットに用いられる試薬等、器具、取扱説明書等を備えていてもよい。

40

【0019】

上記抗原としては、上記VH含有ポリペプチドや上記VL含有ポリペプチド、これらのポリペプチドからなる複合体により特異的に認識される抗原であれば特に制限されず、例えば、タンパク質、ペプチド、糖質、脂質、糖脂質、低分子化合物の他、リン酸化、メチル化等のタンパク質修飾等やこれらの修飾を受けたタンパク質等を挙げることができ、本発明の抗原濃度測定・検出用キットは検出感度に優れることから、低分子化合物の検出において特に有用である。

50

【 0 0 2 0 】

本発明の抗原濃度測定・検出用キットにおける、V L含有ポリペプチドとV H含有ポリペプチドからなる複合体を構成する、V L含有ポリペプチドとV H含有ポリペプチドは、そのいずれか一方又は両方が蛍光色素により標識されていればよく、(i)いずれか一方が蛍光色素により標識された複合体、(ii)それぞれが同一の蛍光色素により標識された複合体、(iii)それぞれが異なる種類の蛍光色素により標識された複合体、又は(iv)いずれか一方が蛍光色素、他方が該蛍光色素を消光するクエンチャーにより標識された複合体とすることができる。V H含有ポリペプチド及びV L含有ポリペプチドのいずれか一方に付加される場合、蛍光色素はいずれのポリペプチドに付加されてもよいが、高い検出感度を得られる方に付加することが好ましい。それぞれが異なる2種の蛍光色素がV H含有ポリペプチド及びV L含有ポリペプチドに付加される場合は、いずれの蛍光色素がどちらのポリペプチドに付加されてもよく、高い検出感度を得られる蛍光色素とポリペプチドの組み合わせとすることが好ましい。V L含有ポリペプチドとV H含有ポリペプチドは、いずれも前記蛍光色素の発光や検出、クエンチングが阻害されない限りは、任意のアミノ酸配列からなるタンパク質や、P r o Xタグ(配列番号1)、F L A Gタグ、H i sタグ、H Aタグ、N iタグ等のペプチドタグ、任意のアミノ酸配列からなるリンカー、安定放射性同位体、酵素、前記蛍光色素と異なる種類の蛍光色素等により標識される他、糖鎖付加やリン酸化、メチル化等の修飾を受けていてもよい。

10

【 0 0 2 1 】

抗体軽鎖可変領域(V L)は、抗体軽鎖遺伝子のV領域及びJ領域のエクソンによりコードされる抗体軽鎖可変領域(V L)に特異的なアミノ酸配列を含むものであれば特に制限されるものではなく、前記V L含有ポリペプチド、又は本発明の蛍光標識複合体と抗原との親和性が損なわれない限りは、上記抗体軽鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列のN末端及び/又はC末端側に、さらに任意のアミノ酸配列が付加されたものであっても、1又は2以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入されていてもよい。かかる抗原との親和性は、E L I S A法やF A C S等の常法により適宜調べることができる。また、上記抗体軽鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列としては、カバット(Kabat)の番号付け系で第35番目のアミノ酸がトリプトファンであるアミノ酸配列であることが好ましい。

20

【 0 0 2 2 】

抗体重鎖可変領域(V H)は、抗体重鎖遺伝子のV領域、D領域、及びJ領域のエクソンによりコードされる抗体重鎖可変領域(V H)に特異的なアミノ酸配列を含むものであれば特に制限されるものではなく、前記V H含有ポリペプチド又は本発明の蛍光標識複合体と、抗原との親和性が損なわれない限りは、上記抗体重鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列のN末端及び/又はC末端側に、さらに任意のアミノ酸配列が付加されたものであっても、1又は2以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入されていてもよい。かかる抗原との親和性は、E L I S A法やF A C S等の常法により適宜調べることができる。また、上記抗体重鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列としては、カバット(Kabat)の番号付け系で第36番目、第47番目、又は第103番目のアミノ酸がトリプトファンであるアミノ酸配列であることが好ましい。

30

【 0 0 2 3 】

V L含有ポリペプチドとしては、抗体軽鎖可変領域(V L)を含有していればよく、抗体軽鎖や、抗体軽鎖に任意のアミノ酸配列からなるペプチドを含むことができ、例えば、抗体軽鎖可変領域(V L)に、抗体軽鎖定常領域(C)や、さらにヒンジ部分を付与したポリペプチドとすることができ、中でもV LにCを付与したポリペプチド等が好ましい。前記V L含有ポリペプチドとして具体的には、配列番号5に配列番号4を付加したものの、配列番号7に配列番号4を付加したものの、配列番号10に配列番号4を付加したものの、配列番号15に配列番号4を付加したものの、配列番号17に配列番号4を付加したものの、配列番号19に配列番号4を付加したものの、配列番号21に配列番号4を付加したものの、配列番号23に配列番号4を付加したものの、配列番号25に配列番号4を付加したものの、配列番号27に配列番号4を付加したものの、及び配列番号29に配列番号4を付加した

40

50

もので示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを好適に例示することができる他、測定対象の抗原に応じて、抗原を認識しうるV L含有ポリペプチドを適宜作製することができる。

【0024】

V H含有ポリペプチドとしては、抗体軽重可変領域(V H)を含有していればよく、抗体重鎖や、抗体重鎖に任意のアミノ酸配列からなるペプチドを含むことができ、例えば、抗体重鎖可変領域(V H)に、抗体重鎖定常領域(C H₁)や、さらにヒンジ部分やF c領域を付与したポリペプチドとすることができ、中でもV HにC H₁を付与したポリペプチド等が好ましい。前記V H含有ポリペプチドとして具体的には、配列番号3に配列番号6を付加したものの、配列番号9に配列番号6を付加したものの、配列番号12に配列番号6を付加したものの、配列番号16に配列番号6を付加したものの、配列番号18に配列番号6を付加したものの、配列番号20に配列番号6を付加したものの、配列番号22に配列番号6を付加したものの、配列番号24に配列番号6を付加したものの、配列番号26に配列番号6を付加したものの、配列番号28に配列番号6を付加したものの、及び配列番号30に配列番号6を付加したもので示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを好適に例示することができる他、測定対象の抗原に応じて、抗原を認識しうるV H含有ポリペプチドを適宜作製することができる。

10

【0025】

V L含有ポリペプチドとV H含有ポリペプチドは、複合体を形成することが好ましく、抗体軽鎖可変領域(V L)及び抗体重鎖可変領域(V H)に、それぞれ複合体を形成するアミノ酸配列を含むペプチドが結合されたものであれば特に制限されるものではない。複合体を形成するペプチドとしては、上記抗体定常領域(C H₁やC など)の他、2量体を形成する一方をV Lに他方をV Hに付与することもできる。また、相互作用してこれらの複合体形成に寄与する2種類のタンパク質を選択することもできる。

20

【0026】

本発明の蛍光標識複合体における「複合体」としては、V L含有ポリペプチドとV H含有ポリペプチドとを構成要素として含み、複合体を形成するものであればよく、本発明の蛍光標識複合体の機能を損なわない限りは、前記V L含有ポリペプチドとV H含有ポリペプチドに加え、さらにペプチドやタンパク質、脂質、金属その他化合物等を構成要素として含んでもよい。

30

【0027】

また、本発明の複合体は、前記ポリペプチド同士が組み合わさって一体として機能しうる構造体であればよく、前記ポリペプチド間の化学結合の有無は特に問題とされない。前記結合としては、前記ポリペプチド同士による、ジスルフィド結合や、架橋剤を用いて形成された結合等を挙げることができ、これらの結合は1つの複合体において複数組み合わせで使用されてもよい。これらの中でもジスルフィド結合を好適に例示することができる。本発明の複合体は前記ポリペプチド同士が互いに近い距離となる複合体を形成することが好ましく、このような機能をもつペプチドを含む、V L含有ポリペプチドやV H含有ポリペプチドからなる複合体が好ましい。抗体分子において抗体軽鎖定常領域と抗体重鎖定常領域はその相互作用により抗体軽鎖可変領域と抗体重鎖可変領域をより近い距離とし、強固な抗原結合ポケットを形成する補助的役割を果たしている。このことから、本発明の複合体としては、抗体軽鎖可変領域と抗体軽鎖定常領域からなるポリペプチドと、抗体重鎖可変領域と抗体重鎖定常領域からなるポリペプチド鎖が、ジスルフィド結合で結合した1分子の抗体タンパク質であるF a b抗体や、F a b抗体2つがヒンジを介してジスルフィド結合で結合したF (a b ')₂抗体や、完全体の抗体が好ましく、中でもF a b抗体が最も好ましい。かかるV L含有ポリペプチド及びV H含有ポリペプチドからなる、F a b抗体を形成する本発明の蛍光標識複合体は、「本発明の蛍光標識F a b型複合体」ということもある。中でもV L含有ポリペプチド又はV H含有ポリペプチドのいずれか一方が蛍光標識された本発明の蛍光標識F a b型複合体は、「本発明のシングルラベルF a b型複合体」ということもある。また、V L含有ポリペプチド及びV H含有ポリペプチドがい

40

50

ずれも蛍光標識された本発明の蛍光標識 F a b 型複合体は、その 2 種の蛍光色素が同一の場合は「本発明の同色ダブルラベル F a b 型複合体」、2 種の蛍光色素が異なる場合は「本発明の異色ダブルラベル F a b 型複合体」ということもある。

【 0 0 2 8 】

本発明において、V L 含有ポリペプチドや、V H 含有ポリペプチドや、これらのポリペプチドを含む複合体やその構成要素等は、公知の化学合成法、遺伝子組換え技術、抗体分子のタンパク質分解酵素による分解方法等を用いて調製することができるが、中でも、比較的容易な操作でかつ大量に調製することが可能な遺伝子組換え技術により調製することが好ましい。遺伝子組換え技術により前記ポリペプチドを調製する場合には、かかるポリペプチドをコードする塩基配列を含む D N A を好適な発現ベクターに導入して組換えベクターを作製し、バクテリア、酵母、昆虫、動植物細胞などを宿主として用いた発現系や、無細胞翻訳系により目的のポリペプチドを発現させることができる(図 5)。無細胞翻訳系において目的のポリペプチドを発現を行う場合は、例えば、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球等の無細胞抽出液に、ヌクレオチド 3 リン酸や各種アミノ酸を加えた反応液中で、目的のポリペプチドを発現させることができる。この際、V L 含有ポリペプチドや、V H 含有ポリペプチドは P r o X タグや F L A G タグ、H i s タグ等のタグが付加されていてもよく、これらのタグは蛍光色素の付加や、ポリペプチドの精製等に利用することができる。このようにして得た V L 含有ポリペプチドや、V H 含有ポリペプチド同士は、蛍光色素による標識中又は標識の前後に、適当な溶媒中で複合体を形成させることができ、ジスルフィド結合又は架橋剤により結合させ、複合体を形成させる例を挙げることができる。例えば、前記 V L 含有ポリペプチド及び V H 含有ポリペプチドをコードする遺伝子を、大腸菌無細胞合成系で共発現後、4 で 1 6 時間インキュベーションすることによりジスルフィド結合を形成させ複合体を形成することができる。また、大腸菌無細胞合成反応系にタンパク質ジスルフィドイソメラーゼやプロリンシストランスイソメラーゼなどの分子シャペロンを添加することによりジスルフィド結合を促進することができる。また、前記架橋剤としては、ポリペプチド同士を架橋し結合させうる化合物であればよく、例えば、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、カルボジイミド類、イミドエステル類など挙げることができ、適宜市販品を入手し常法により使用することができる。また、本発明の複合体は、抗体を酵素などで切断して作製することもでき、例えばパパインや、ペプシンを用いて抗体を処理することにより、それぞれ F a b 抗体や、F (a b ')₂ 抗体を作製することもできる。

【 0 0 2 9 】

本発明において、蛍光色素により、V L 含有ポリペプチドや V H 含有ポリペプチドを標識する方法は特に制限されず、ポリペプチドの両端又は側鎖の官能基を利用して直接又は架橋剤等を介して間接的に標識する方法や、無細胞翻訳系を利用してポリペプチドを合成しながら部位特異的に標識する手法等を用いることができる。無細胞翻訳系を利用して標識する方法としては、アンバーサプレッション法(Elman J et al.(1991)Methods Enzymol.202:301-36)、4 塩基コドン法(Hohsaka T., et al., J. Am. Chem. Soc., 118, 9778-9779, 1996)、C 末端標識法(特開 2 0 0 0 - 1 3 9 4 6 8 号公報)、N 末端標識法(米国特許第 5, 6 4 3, 7 2 2 号公報、Olejnik et al.(2005)Methods 36:252-260)等が知られており、アンバーサプレッション法では、標識のターゲット部位のアミノ酸をコードするコドンを終止コドンの一つであるアンバーコドンに置き換えた D N A 又は m R N A を作製し、無細胞翻訳系を用いて該 D N A 又は m R N A からタンパク質を合成する。その際、タンパク質合成反応液に標識された非天然アミノ酸を結合させたサプレッサー t R N A を添加することで、アンバーコドンに置換した部位に標識アミノ酸が導入されたタンパク質を合成することができる。4 塩基コドン法ではコドンを主に C G G G に拡張し、アミノ酸をコードするコドンを C G G G に置き換えた D N A 又は m R N A を作製し、無細胞翻訳系を用いて該 D N A 又は m R N A からタンパク質を合成する。その際、タンパク質合成反応液に標識された非天然アミノ酸を結合させた t R N A_{C G G G} を添加することで、4 塩基コドンに置換した部位に標識アミノ酸が導入されたタンパク質を合成することができ

10

20

30

40

50

る。本発明における異色ダブルラベルには、無細胞翻訳系を用い、アンバーサプレッション法と4塩基コドン法を組み合わせることで共発現させることにより、VH含有ポリペプチド及びVL含有ポリペプチドに異なる蛍光色素で標識を行い、複合体を形成することができる。また、C末端標識法では、標識したピューロマイシンを最適濃度で添加した無細胞翻訳系において、DNA又はmRNAからタンパク質への翻訳を行うことにより、C末端特異的に標識が導入されたタンパク質を合成することができる。

【0030】

また、大腸菌や動物細胞を宿主とする遺伝子組み換え技術により部位特異的に蛍光色素を導入する手法を用いることもできる。アジドチロシンを認識するアミノアシルtRNA合成酵素と、サプレッサーアジドチロシル-tRNAを導入した大腸菌を宿主として、部位特異的にポリペプチドにアジドチロシンを導入し、導入したアジド基に蛍光色素を結合することができる。また、古細菌由来ピロリジルtRNA合成酵素と、サプレッサーピロリジル-tRNAを導入した動物細胞を宿主として、部位特異的にポリペプチドにアジドZリジンを導入し、導入したアジド基に蛍光色素を結合することができる。

【0031】

本発明において、蛍光標識に用いる蛍光色素としては、VH含有ポリペプチド及び/又はVL含有ポリペプチドを標識した場合、本発明の蛍光標識複合体を形成した状態で、抗原の非存在下でクエンチ(消光)される蛍光色素であって、かかる複合体と抗原が結合したときには消光機能が解除され蛍光が発せられる蛍光色素であれば特に制限されない。また、同一又は異なる種類の蛍光色素を、VH含有ポリペプチドとVL含有ポリペプチドのそれぞれに付加する場合は、前記のクエンチングに加え、抗原の非存在下で色素間のクエンチングやFRET効果によるクエンチングが効果的に起こる組み合わせを選択することが好ましい。蛍光標識に用いる蛍光色素としては、ローダミン、クマリン、Cy、EvoBlue、オキサジン、Carbopyronin、naphthalene、biphenyl、anthracene、phenanthrene、pyrene、carbazole等を基本骨格として有する蛍光色素やその蛍光色素の誘導体を例示することができ、具体的には、CR110: carboxyrhodamine 110: Rhodamine Green (商標名)、TAMRA: carbocytetremethylrhodamine: TMR、Carboxyrhodamine 6G: CR6G、ATTO655 (商標名)、BODIPY FL (商標名): 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 493/503 (商標名): 4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-8-propionic acid、BODIPY R6G (商標名): 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 558/568 (商標名): 4,4-difluoro-5-(2-thienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 564/570 (商標名): 4,4-difluoro-5-styryl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 576/589 (商標名): 4,4-difluoro-5-(2-pyrrolyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 581/591 (商標名): 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、Cy3 (商標名)、Cy3B (商標名)、Cy3.5 (商標名)、Cy5 (商標名)、Cy5.5 (商標名)、EvoBlue10 (商標名)、EvoBlue30 (商標名)、MR121、ATTO390 (商標名)、ATTO425 (商標名)、ATTO465 (商標名)、ATTO488 (商標名)、ATTO495 (商標名)、ATTO520 (商標名)、ATTO532 (商標名)、ATTO Rho6G (商標名)、ATTO550 (商標名)、ATTO565 (商標名)、ATTO Rho3B (商標名)、ATTO Rho11 (商標名)、ATTO Rho12 (商標名)、ATTO Thio12 (商標名)、ATTO610 (商標名)、ATTO611X (商標名)、ATTO620 (商標名)、ATTO Rho14 (商標名)、ATTO633 (商標名)、ATTO647 (商標名)、ATTO647N (商標名)、ATTO655 (商標名)、ATTO Oxa12 (商標名)、ATTO700 (商標名)、ATTO725 (商標名)、ATTO740 (商標名)、Alexa Fluor 350 (商標名)、Alexa Fluor 405

10

20

30

40

50

(商標名)、Alexa Fluor 430 (商標名)、Alexa Fluor 488 (商標名)、Alexa Fluor 532 (商標名)、Alexa Fluor 546 (商標名)、Alexa Fluor 555 (商標名)、Alexa Fluor 568 (商標名)、Alexa Fluor 594 (商標名)、Alexa Fluor 633 (商標名)、Alexa Fluor 647 (商標名)、Alexa Fluor 680 (商標名)、Alexa Fluor 700 (商標名)、Alexa Fluor 750 (商標名)、Alexa Fluor 790 (商標名)、Rhodamine Red - X (商標名)、Texas Red - X (商標名)、5(6) - TAMRA - X (商標名)、5 TAMRA (商標名)、SF X (商標名)を挙げることができるが、中でも、ローダミン系蛍光色素であるCR110やTAMRA、及びオキサジン系蛍光色素であるATTO655を特に好適に例示することができる。

10

【0032】

本発明におけるクエンチャーとしては、抗原非存在下の本発明の蛍光標識複合体において、その構成要素であるVL含有ポリペプチドとVH含有ポリペプチドのいずれか一方に標識された蛍光色素の蛍光を、もう一方のペプチドに付加されたクエンチャーが消光することができるクエンチャーであって、かかる複合体と抗原が結合した場合にはかかる消光機能が解除され蛍光が発せられるクエンチャーであれば特に制限されない。かかるクエンチャーは、NBD:7-nitrobenzofurazan、DABCYL、BHQ、ATTO、QXL、QSY、Cy、Lowa Black、IRDYE等を基本骨格とする消光色素やその消光色素の誘導体を例示することができ、具体的には、NBD、DABCYL、BHQ - 1 (商標名)、BHQ - 2 (商標名)、BHQ - 3 (商標名)、ATTO540Q (商標名)、ATTO580Q (商標名)、ATTO612Q (商標名)、QXL490 (商標名)、QXL520 (商標名)、QXL570 (商標名)、QXL610 (商標名)、QXL670 (商標名)、QXL680 (商標名)、QSY - 35 (商標名)、QSY - 7 (商標名)、QSY - 9 (商標名)、QSY - 21 (商標名)、Cy5Q (商標名)、Cy7Q (商標名)、Lowa Black FQ (商標名)、Lowa Black RQ (商標名)、IRDYE QC - 1 (商標名)を挙げることができるが、中でも、NBDが好ましい。また、本発明の複合体における蛍光色素とクエンチャーの組み合わせは、抗原非存在下でクエンチャーが蛍光色素を効果的に消光し、抗原存在下においては蛍光色素の蛍光を阻害しない組み合わせを適宜選択することができ、蛍光色素TAMRAとNBDの組み合わせを例示することができる。

20

30

【0033】

本発明の蛍光標識複合体、すなわちVL含有ポリペプチドとVH含有ポリペプチドからなる複合体であって、前記VL含有ポリペプチドとVH含有ポリペプチドのいずれか一方又は両方が蛍光色素により標識されている複合体は、抗原の非存在下では、前述の蛍光色素と抗体可変領域において保存されたトリプトファン残基との相互作用による蛍光色素の消光が起こる。それに加えて、同色の蛍光色素が前記ポリペプチドそれぞれに標識された本発明の蛍光標識複合体では、蛍光色素間のクエンチング効果が得られる。また、異色の蛍光色素が前記ポリペプチドそれぞれに標識された本発明の蛍光標識複合体では、前記トリプトファン残基によるクエンチング、蛍光色素間のクエンチングに加え、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)効果によるクエンチングの効果が得られる。さらに、蛍光色素とその色素を消光するクエンチャーが前記ポリペプチドそれぞれに標識された本発明の蛍光標識複合体では、蛍光色素とクエンチャー間のクエンチング効果により、ダイナミックレンジを増大することができる。

40

【0034】

本発明の抗原濃度測定・検出方法としては、
(a) 抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドのいずれか一方又は両方が蛍光色素により標識された、前記抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体を、測定用試料中の抗原に接触させる工程；

50

(b) 蛍光色素の蛍光を検出、又は蛍光色素の蛍光強度を測定する工程；
(c) 抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、検体に含まれる抗原量を算出、又は抗原を可視化する工程；
の工程(a)～(c)を順次備えることを特徴とする抗原濃度測定及び/又は検出方法であればよく、前記複合体は本発明の蛍光標識複合体であればよく、中でも本発明の蛍光標識Fab型複合体、より好ましくは本発明のシングルラベルFab型複合体、本発明の同色ダブルラベルFab型複合体、本発明の異色ダブルラベルFab型複合体を例示することができる。また本発明の抗原濃度測定・検出方法は、本発明の蛍光標識複合体や本発明の抗原濃度測定及び/又は検出用キットを用いて行うことができる。

【0035】

本発明の抗原濃度測定・検出用キットの使用、及び本発明の抗原濃度測定・検出方法は、液相中で本発明の蛍光標識複合体と抗原の接触を行うことが好ましく、そのため測定対象試料である検体は、適宜液体あるいは液体を含む、又は液体に浸された測定用試料として調製して前記工程(a)や本発明の抗原濃度測定・検出方法に供することが好ましい。本発明の抗原濃度測定及び/又は検出用キットの使用、及び本発明の抗原濃度測定及び/又は検出方法における検体の由来等は特に制限されず、適宜前処理等を施して前記測定用試料とすることができる。液体の検体は、そのまま測定用試料として測定に供することも、あるいは抗原を損なうことや抗原濃度測定・検出を阻害することもない限り、緩衝液や生理食塩水等で希釈、あるいは濃縮、又はpHや塩濃度等を適宜調整して測定用試料とすることもできる。かかる液体の検体としては、例えば測定対象となるターゲット抗原を含む可能性がある血清、血漿、唾液、髄液、尿等の体液、培養上清、細胞抽出液、菌体抽出液、工業廃水等を挙げることができる。

【0036】

固体等の液体以外の検体は、そのまま、あるいは抗原を損なうことや抗原濃度測定・検出を阻害することがない限り、適宜分割、細断、粉碎、すりつぶす、組織切片を作製する、あるいは検体の特定成分のみを除去あるいは抽出する、等の処理を施した上で、緩衝液や生理食塩水等の液体に溶解、懸濁、又は液浸することにより、本発明の蛍光標識複合体が抗原に接触できる状態とし、測定用試料とすることができる。前記組織切片の作製においては、抗原を損なわない範囲でパラホルムアルデヒドやグルタルアルデヒド等を用いて固定処理を施すことができ、さらにBSA(ウシ血清アルブミン)やスキムミルク等によりブロッキング処理を行うこともできる。かかる固体等の検体としては、例えば生体より採取された組織、細胞、タンパク質や糖等の成分がプロットされたニトロセルロース膜やPVDf膜、食品、土壌等を挙げることができる。また、測定用試料は、抗原を損なうことも抗原濃度測定・検出を阻害することもない限り、適宜防腐剤、防カビ剤、pH調整剤、界面活性剤、凝固防止剤、キレート剤等を含んでもよい。

【0037】

本発明においては、さらに、生体内の血液や髄液等の体液、組織等をも測定用試料とすることができる。すなわち、実験動物等の非ヒト動物に本発明の蛍光標識複合体を投与することにより、本発明の蛍光標識複合体と生体内の抗原とを接触させることができる。かかる非ヒト動物としては、ヒト以外の動物であればよく、例えば、脊椎動物、中でも哺乳類、魚類、鳥類、爬虫類、両生類等の非ヒト動物を挙げることができ、中でも哺乳類が好ましく、マウス、ラット、ハムスター、サル、ブタ等がより好ましい。また、上記投与方法も特に制限されず、筋肉内注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮下注射、埋込み、塗布等の非経口的な局所投与方法や、経口的な投与方法の中から適宜選択することができる。また、本発明の蛍光標識複合体投与と同時、あるいはその前後に他の薬剤等を投与してもよい。非ヒト動物に本発明の蛍光標識複合体を投与することにより、生体内における抗原の位置やその移動、抗原量やその変化を観察することも可能である。かかる観察においては、経時的に体液や組織等の検体を採取して測定用試料を調製し、蛍光強度測定や蛍光の局在観察を行うことも、あるいは生体中の蛍光強度やその変化、蛍光の局在やその移動をリアルタイムに検出し観察することもできる。

10

20

30

40

50

【0038】

本発明の蛍光標識複合体と測定用試料中の抗原とを接触させる反応条件としては、測定用試料に本発明の蛍光標識複合体を添加し、抗原抗体反応に一般的に用いることのできる条件でインキュベートするものであれば特に制限されず、温度条件は、例えば1~30、好ましくは18~25、反応時間は、例えば、瞬時~180分、好ましくは1~90分とすることができる。また、非ヒト動物体内において反応を行う場合は、投与後例えば5~180分、好ましくは60~120分インキュベートし、必要に応じて、組織、血液、細胞等を摘出、又は観察対象部位を露出させる等の処理を適宜行うことができる。インキュベート終了後の試料においては、抗原を認識した本発明の蛍光標識複合体におけるクエンチングが解消され、励起光の照射により蛍光が発せられるが、抗原を認識していない本発明の蛍光標識複合体は、クエンチングされたままで、励起光の照射によっても蛍光を

10

【0039】

本発明における測定用試料中の蛍光の検出方法は、蛍光色素から発せられる蛍光を検出できる限り特に制限されず、前記反応後の測定用試料に励起光を照射して蛍光色素の蛍光強度を測定及び/又は検出するものであればよい。照射する励起光及び、測定及び/又は検出する蛍光の波長は、使用する蛍光色素の種類に応じて適宜選択することができ、例えば蛍光色素にCR110を用いた場合は励起光波長480nmと蛍光波長530nm、TAMRAを用いた場合は励起光波長530nmと蛍光波長580nm、ATTO655を用いた場合は励起光波長630nmと蛍光波長680nmの組み合わせとすることができる。また、2種類の異なる蛍光色素を用いる場合も、抗原濃度を測定及び/又は抗原を検出することができる、励起光波長及び蛍光波長の組み合わせを適宜選択して使用すればよい。例えば、本発明の蛍光標識複合体と反応させた測定用試料に、前記蛍光標識複合体に含まれる蛍光色素のうちいずれか1つに適した励起波長の光を照射し、蛍光スペクトルを取得することを2種両方の蛍光色素について行うことにより、抗原濃度測定・検出に最適な励起光波長及び蛍光波長の組み合わせを特定することができる。例えば、励起光波長と蛍光波長の組み合わせとして、いずれか一方の蛍光色素に適した励起光波長及び蛍光波長の組み合わせを挙げることができ、より好ましくは、励起光波長及び蛍光波長が短い方の蛍光色素に適した、励起光波長及び蛍光波長の組み合わせを挙げるができる。なお蛍光は、蛍光スペクトルとして検出しても、特定の波長における光強度として検出してもよく、例えば、CR110とTAMRAの組み合わせを使用する場合は、励起光波長を480nmとし、波長530nmの蛍光を検出することも、波長515nm~650nmの蛍光スペクトルとして検出することもできる。2種類の異なる蛍光色素いずれか一方に適した励起光波長及び蛍光波長の組み合わせは、抗原非存在時のFRET(蛍光共鳴エネルギー移動: Fluorescence resonance energy transfer)効果によるバックグラウンドの低減を効率よく検出でき、より高感度に測定できる。

20

30

【0040】

本発明において蛍光検出に用いる光源や測定装置は適宜選択することができ、光源は励起光波長を照射できるものであればよく、光源としては水銀ランプ、キセノンランプ、LED、レーザー光等を挙げるができる、適当なフィルターを用いて特定の波長の励起光を得ることができる。蛍光測定装置は、蛍光観察に通常用いられるデバイスを用いることができ、励起光の光源及びその照射システム、蛍光画像取得システムを備えた顕微鏡等を適宜利用することができ、MF20/FluoroPoint-Light(オリンパス社製)やFMBIO-III(日立ソフトウェアエンジニアリング社製)等を例示することができる。蛍光強度と抗原の濃度とは正の相関関係にあるので、濃度既知の抗原を含む被検物質を用いたときの蛍光強度を測定して抗原濃度と蛍光強度との関係を示す標準曲線を作成し、この標準曲線から、濃度未知の抗原濃度を算出することができる。かかる抗原濃度の算出は、あらかじめ作成さ

40

50

れたに標準曲線に基づいて設定された変換式等により自動的に抗原量を算出することもできる。なお蛍光の検出は、蛍光スペクトルの検出であっても、特定の波長の蛍光強度の検出であってもよい。

【0041】

また、本発明の蛍光標識複合体を非ヒト動物に投与した場合は、その体液や組織等採取する他、非ヒト動物の検出対象領域に励起光を照射して、蛍光色素の蛍光を2次元又は3次的に測定及び/又は検出することもでき、この場合、蛍光顕微鏡や蛍光イメージアナライザー、光源を備えた内視鏡等を使用する例を挙げることができる。また、検出の際には、内視鏡、X線、CT、MRI、超音波、顕微鏡等を用いて、非ヒト動物の個体、組織、又は細胞の構造を示す画像も合わせて取得することが好ましい。測定及び/又は検出された蛍光強度と抗原量とは正の相関関係にあるので、検出された蛍光の2次元又は3次的画像に基づいて、抗原の局在(位置)及び/又は量を知ることができ、この際前記構造を示す画像と比較することもできる。これらの蛍光の検出に際しては、本発明の蛍光標識複合体を含まない、又は検体を含まない測定用試料等をネガティブコントロールとして調製し、合わせて測定及び/又は検出することが好ましい。また、前記ネガティブコントロールにおける蛍光測定値で、測定用試料における蛍光測定値を除いた、蛍光強度比を用いて、抗原量の測定等を行うこともできる。あるいは、本発明において蛍光強度と抗原量とは正の相関関係にあるので、適宜設定した閾値を越える蛍光強度が得られた場合に、測定試料中に抗原が存在すると判定することもできる。

【0042】

以上のように、本発明によると、ELISA法、免疫拡散法、ラテックス凝集法、イムノクロマト法、表面プラズモン共鳴法などの免疫測定法で測定することのできるすべての抗原類を検出することができる。例えば、低分子物質に対する免疫測定法は、一般的には競合ELISA法が用いられているが、本発明による低分子物質の検出測定は、手法の簡便さ、測定感度やSN比などで競合ELISA法より優れており、最もその能力を発することができる。例えば、アンフェタミン、メタンフェタミン、モルヒネ、ヘロイン、コデインなどの覚せい剤や麻薬類、アフラトキシン、ステリグマトシスチン、ネオソラニオール、ニパレノール、フモニシン、オクラトキシン、エンドファイト産生毒素などのカビ毒、テストステロンやエストラジオールなどの性ホルモン、クレンブテロールやラクタミンなどの飼料に不正に用いられる添加物、PCB、ゴシポール、ヒスタミン、ベンツピレン、メラミン、アクリルアミド、ダイオキシンなどの有害物質、アセタミプリド、イミダクロプリド、クロルフェナピル、マラチオン、カルバリル、クロチアニジン、トリフルミゾール、クロロタロニル、スピノサド、ランネート、メタミドホス、クロルピリホスなどの残留農薬、ビスフェノールAなどの環境ホルモンなどを挙げることができる。

【0043】

また本発明によると、測定結果が瞬時に得られる上に、検出方法が単純なため検出機器を小型化かつ低価格化することが可能となる。これらの利点は、低分子物質に限定されず、現場に出向き測定するオンサイト分析に威力を発揮することができる。しかも、測定が容易なため、専門家でなくても測定することができる。たとえば、インフルエンザ、伝染病や感染症などの原因ウイルスや細菌、薬物血中濃度やPOCTを含む臨床診断分野や職場、学校、保育園や家庭での簡易健康測定分野、炭疽菌、ボツリヌス毒素、サリンやVXガスなどテロ対策などの安心安全分野、現場サイドで測定が必要となる環境汚染物質やハウスダストなどの環境分野、免疫測定を必要とする研究開発分野などで、その能力を遺憾なく発揮することができる。

【0044】

以下に示す実施例において、本発明を具体的且つ更に詳細に説明するが、これらの実施例により本発明の技術的範囲が限定されるものではない。

【実施例1】

【0045】

1. 本発明の蛍光標識複合体を用いた均一系蛍光免疫測定法の確立

(発現ベクターの構築)

1) シングルラベル F a b 型複合体

ヒトオステオカルシン (human Bone Gla Protein; BGP) に対する抗体の軽鎖可変領域 (VL; 配列番号 5) と抗体軽鎖定常領域 (C_H1; 配列番号 4) を含むポリペプチドをコードする DNA 配列に、N 末端に ProX (商標名) タグ (9 番目のアミノ酸に対応する塩基配列は TTT であり、翻訳されると MSKQIEVNFSEET; 配列番号 1) の DNA 配列を、C 末端にリンカー (配列番号 14) 及び FLAG タグの DNA 配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3d ベクター (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) へ組み込んだ。また BGP に対する抗体の重鎖可変領域 (VH; 配列番号 3) と抗体重鎖定常領域 (C_H1; 配列番号 6) を含むポリペプチドをコードする DNA 配列に、N 末端にアンバーコドンを含む ProX タグ (9 番目のアミノ酸に対応する塩基配列は TAG であり、翻訳されると MSKQIEVNXSEET (X は蛍光標識アミノ酸); 配列番号 2) の DNA 配列を、C 末端にリンカー (配列番号 14) 及び His タグの DNA 配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3d ベクター (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) へ組み込んだ (図 5)。これらの構築した発現ベクターは、挿入した VL 又は VH の N 末端に ProX タグ (翻訳されると VH は標識され、VL は非標識) が、C 末端に His タグ又は FLAG タグが、それぞれ付加されるよう設計されている。

【0046】

ビスフェノール A (bisphenol A) に対する抗体の軽鎖可変領域 (VL; 配列番号 7) と抗体軽鎖定常領域 (C_H1; 配列番号 4) を含むポリペプチドをコードする DNA 配列に、N 末端に ProX タグ (配列番号 1) 及び GGG S 5 スペース (GGG S GGG S GGG S GGG S GGG S; 配列番号 8) の DNA 配列を、C 末端にリンカー (配列番号 14) 及び FLAG タグの DNA 配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3d ベクター (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) へ組み込んだ。またビスフェノール A に対する抗体の重鎖可変領域 (VH; 配列番号 9) と抗体重鎖定常領域 (C_H1; 配列番号 6) を含むポリペプチドをコードする DNA 配列に、N 末端にアンバーコドンを含む ProX タグ (配列番号 2) 及び GGG S 5 スペース (配列番号 8) の DNA 配列を、C 末端にリンカー (配列番号 14) 及び His タグの DNA 配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3d ベクター (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) へ組み込んだ (図 5)。これらの構築した発現ベクターは、挿入した VL 又は VH の N 末端に ProX タグ (翻訳されると VH は標識され、VL は非標識) が、C 末端に His タグ又は FLAG タグが、それぞれ付加されるよう設計されている。

【0047】

血清アルブミン (SA) に対する抗体の軽鎖可変領域 (VL; 配列番号 10) と抗体軽鎖定常領域 (C_H1; 配列番号 4) を含むポリペプチドをコードする DNA 配列に、N 末端に ProX タグ (配列番号 1) 及び GGG S 2 スペース (GGG S GGG S; 配列番号 11) の DNA 配列を、C 末端にリンカー (配列番号 14) 及び FLAG タグの DNA 配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3d ベクター (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) へ組み込んだ。また血清アルブミン (SA) に対する抗体の重鎖可変領域 (VH; 配列番号 12) と抗体重鎖定常領域 (C_H1; 配列番号 6) を含むポリペプチドをコードする DNA 配列に、N 末端にアンバーコドンを含む ProX タグ (配列番号 2) 及び GGG S 5 スペース (配列番号 8) の DNA 配列を、C 末端にリンカー (配列番号 14) 及び His タグの DNA 配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3d ベクター (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) へ組み込んだ (図 5)。これらの構築した発現ベクターは、挿入した VL 又は VH の N 末端に ProX タグ (翻訳されると VH は標識され、VL は非標識) が、C 末端に His タグ又は FLAG タグが、それぞれ付加されるよう設計されている。

【0048】

2) 同色ダブルラベル F a b 型複合体

BGP に対する抗体の軽鎖可変領域 (VL; 配列番号 5) と抗体軽鎖定常領域 (C_H1; 配列番号 4) を含むポリペプチドをコードする DNA 配列に、N 末端にアンバーコドンを

10

20

30

40

50

含むProXタグ（翻訳されると配列番号2）のDNA配列を、C末端にリンカー（配列番号14）及びFLAGタグのDNA配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3dベクターへ組み込んだ。またBGPに対する抗体の重鎖可変領域（VH；配列番号3）と抗体重鎖定常領域（CH₁；配列番号6）を含むポリペプチドをコードするDNA配列に、N末端にアンバーコドンを含むProXタグ（翻訳されると配列番号2）のDNA配列を、C末端にリンカー（配列番号14）及びHisタグのDNA配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3dベクターへ組み込んだ。これらの構築した発現ベクターは、挿入したVL又はVHのN末端にProXタグ（アンバー）が、C末端にHisタグ又はFLAGタグが、それぞれ付加されるよう設計されている。

【0049】

血清アルブミン（SA）に対する抗体の軽鎖可変領域（VL；配列番号10）と抗体軽鎖定常領域（C；配列番号4）を含むポリペプチドをコードするDNA配列に、N末端にアンバーコドンを含むProXタグ（翻訳されると配列番号2）及びGGGS2スペーサー（配列番号11）のDNA配列を、C末端にリンカー（配列番号14）及びFLAGタグのDNA配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3dベクター（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）へ組み込んだ。またSAに対する抗体の重鎖可変領域（VH；配列番号12）と抗体重鎖定常領域（CH₁；配列番号6）を含むポリペプチドをコードするDNA配列に、N末端にアンバーコドンを含むProXタグ（翻訳されると配列番号2）及びGGGS2スペーサー（配列番号11）のDNA配列を、C末端にリンカー（配列番号14）及びHisタグのDNA配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3dベクターへ組み込んだ。これらの構築した発現ベクターは、挿入したVL又はVHのN末端にProXタグ（アンバー）が、C末端にHisタグ又はFLAGタグが、それぞれ付加されるよう設計されている。

【0050】

3) 異色ダブルラベルFab型複合体

BGPに対する抗体の軽鎖可変領域（VL；配列番号5）と抗体軽鎖定常領域（C；配列番号4）を含むポリペプチドをコードするDNA配列に、N末端にCGGG4塩基コドンを含むProXタグ（9番目のアミノ酸に対応する塩基配列はCGGGであり、翻訳されると配列番号2）のDNA配列を、C末端にリンカー（配列番号14）及びFLAGタグのDNA配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3dベクターへ組み込んだ。またBGPに対する抗体の重鎖可変領域（VH；配列番号3）と抗体重鎖定常領域（CH₁；配列番号6）を含むポリペプチドをコードするDNA配列に、N末端にアンバーコドンを含むProXタグ（翻訳されると配列番号2）のDNA配列を、C末端にリンカー（配列番号14）及びHisタグのDNA配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3dベクターへ組み込んだ（図5）。これらの構築した発現ベクターは、挿入したVL又はVHのN末端にProXタグが、C末端にHisタグ又はFLAGタグが、それぞれ付加されるよう設計されている。

【0051】

血清アルブミン（SA）に対する抗体の軽鎖可変領域（VL；配列番号10）と抗体軽鎖定常領域（C；配列番号4）を含むポリペプチドをコードするDNA配列に、N末端にCGGG4塩基コドンを含むProXタグ（翻訳されると配列番号2）及びGGGS2スペーサー（配列番号11）のDNA配列を、C末端にリンカー（配列番号14）及びFLAGタグのDNA配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3dベクター（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）へ組み込んだ。またSAに対する抗体の重鎖可変領域（VH；配列番号12）と抗体重鎖定常領域（CH₁；配列番号6）を含むポリペプチドをコードするDNA配列に、N末端にアンバーコドンを含むProXタグ（翻訳されると配列番号2）及びGGGS2スペーサー（配列番号11）のDNA配列を、C末端にリンカー（配列番号14）及びHisタグのDNA配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3dベクターへ組み込んだ。これらの構築した発現ベクターは、挿入したVL又はVHのN末端にProXタグが、C末端にHisタグ又はFLAGタグが、それぞれ付加されるよう設計されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

(蛍光標識 F a b 型複合体の合成)

R Y T S (商品名) 大腸菌無細胞合成キット (プロテイン・エクスプレス社製) を用いて、無細胞翻訳系による抗体可変領域含有ペプチド及びノ又は抗体可変領域含有ペプチドの N 末端領域への蛍光標識アミノ酸の導入を行った。

【 0 0 5 3 】

1) シングルラベル又は同色ダブルラベル F a b 型複合体

反応液 (6 0 μ L) は、3 μ L の Enzyme Mix、0 . 6 μ L の Methionine、3 0 μ L の 2 × Reaction Mix、2 0 μ L の E-coli Lysate、2 μ L の 2 種類の plasmid DNA (各 2 0 0 n g)、3 μ L の 蛍光標識アミノアシル - t R N A a m b e r (4 8 0 p m o l)、1 . 4 μ L の Nuclease Free Water を加えた。蛍光標識タンパク質を作製するための蛍光標識アミノアシル - t R N A (T A M R A - X - A F - t R N A a m b e r、C R 1 1 0 - X - A F - t R N A a m b e r、及び A T T O 6 5 5 - X - A F - t R N A a m b e r) は、CloverDirect (商標名) tRNA Reagents for Site-Directed Protein Functionalization (プロテイン・エクスプレス社製) を用いた。反応液は、2 0、2 時間で静置して反応させタンパク質合成を行なった後、さらに、4、1 6 時間の反応により複合化形成を完成させた。反応終了後、反応液 0 . 5 μ L を用いて S D S - P A G E (1 5 %) を行い、蛍光イメージアナライザー (FMBIO-III ; 日立ソフトウェアエンジニアリング社製) でタンパク質発現を観察した。さらに、抗 H i s タグ抗体又は抗 F L A G タグ抗体を用いてウエスタンブロットを行い、目的の蛍光標識抗体可変領域含有ペプチドが合成されていることを確認した。

【 0 0 5 4 】

2) 異色ダブルラベル F a b 型複合体

反応液 (6 0 μ L) は、3 μ L の Enzyme Mix、0 . 6 μ L の Methionine、3 0 μ L の 2 × Reaction Mix、2 0 μ L の E-coli Lysate、2 μ L の 2 種類の plasmid DNA (各 2 0 0 n g)、1 . 5 μ L の 2 種類の 蛍光標識アミノアシル - t R N A a m b e r 及び C G G G (各々 4 8 0 n m o l)、1 . 4 μ L の Nuclease Free Water を加えた。蛍光標識タンパク質を作製するための蛍光標識アミノアシル - t R N A (T A M R A - X - A F - t R N A a m b e r 又は C G G G、C R 1 1 0 - X - A F - t R N A a m b e r 又は C G G G、及び A T T O 6 5 5 - X - A F - t R N A a m b e r 又は C G G G) は、CloverDirect (商標名) tRNA Reagents for Site-Directed Protein Functionalization (プロテイン・エクスプレス社製) を用いた。V H 領域含有ポリペプチドや V L 領域含有ポリペプチドの標識には、それぞれ t R N A a m b e r、t R N A C G G G が使用される。反応液は、2 0、2 時間で静置して反応させタンパク質合成を行なった後、さらに、4、1 6 時間の反応により複合化形成を完成させた。反応終了後、反応液 0 . 5 μ L を用いて S D S - P A G E (1 5 %) を行い、蛍光イメージアナライザー (FMBIO-III ; 日立ソフトウェアエンジニアリング社製) でタンパク質発現を観察した。さらに、抗 H i s タグ抗体又は抗 F L A G タグ抗体を用いてウエスタンブロットを行い、目的の蛍光標識抗体可変領域含有ペプチドが合成されていることを確認した。

【 0 0 5 5 】

3) 一方が蛍光色素、他方が該蛍光色素を消光するクエンチャーにより標識された F a b 型複合体

蛍光色素として T A M R A、クエンチャーとして N B D - X、S E (Anspec 社) を使用した。N B D - X - A F - t R N A C G G G は阿部らの方法 (Abe R, et al., J. Biosci. Bioeng. 110(1) : 32-38 (2010)) の T A M R A - X、S E をそれぞれ N B D - X、S E (Anspec 社) に変えて合成した。反応液 (6 0 μ L) は、3 μ L の Enzyme Mix、0 . 6 μ L の Methionine、3 0 μ L の 2 × Reaction Mix、2 0 μ L の E-coli Lysate、2 μ L の 2 種類の plasmid DNA (各 2 0 0 n g)、1 . 5 μ L の T A M R A - X - A F - t R N A a m b e r 及び N B D - X - A F - t R N A C G G G (各々 4 8 0 n m o l)、1 . 4 μ L の Nuclease Free Water を加えた。V H 領域含有ポリペプチドや V L 領域含有ポリペ

10

20

30

40

50

チドの標識には、それぞれ tRNA_{amber}、tRNA_{CGG} が使用される。反応液は、20、2時間で静置して反応させタンパク質合成を行なった後、さらに、4、16時間の反応により複合化形成を完成させた。反応終了後、反応液0.5μLを用いてSDS-PAGE(15%)を行い、蛍光イメージアナライザー(FMBIO-III;日立ソフトウェアエンジニアリング社製)にてタンパク質発現を観察した。さらに、抗Hisタグ抗体又は抗FLAGタグ抗体を用いてウエスタンブロットを行い、目的の蛍光標識抗体可変領域含有ペプチドが合成されていることを確認した。

【0056】

(蛍光標識Fab型複合体の精製)

合成した蛍光標識Fab型複合体は、抗FLAG M2アフィニティーゲル(シグマアルドリッチ社製)やHis-Spin Trap Column(GEヘルスケア社製)により精製を行った。上記反応液(60μL)を、抗FLAG M2アフィニティーゲルを入れたカラムヘアプライシ、室温で15分間インキュベートした後にWash buffer(20mM Phosphate buffer(pH7.4)/0.5M NaCl/0.1%Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether)で3回洗浄を行った。次に200μLのElute buffer(20mM Phosphate buffer(pH7.4)/0.5M NaCl/100μg FLAG peptide/0.1%Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether)で3回溶出させた。次に溶出液は、His-Spin Trap Columnヘアプライシした。室温で15分間インキュベートした後にWash buffer(20mM Phosphate buffer(pH7.4)/0.5M NaCl/60mM imidazole/0.1%Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether)で3回洗浄を行った。次に200μLのElute buffer(20mM Phosphate buffer(pH7.4)/0.5M NaCl/0.5M imidazole/0.1%Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether)で3回溶出させた。さらに溶出液は、アミコンウルトラ-0.5遠心式フィルター10kDa(ミリポア社製)を使用し、PBS(+0.05%Tween20)でバッファー交換、濃縮を行った。精製後のサンプルの濃度は、蛍光イメージアナライザー(FMBIO-III;日立ソフトウェアエンジニアリング社製)を用いて測定した。

【0057】

(Q-bodyの作製)

TAMRAで標識した抗BGP抗体のVHとVL(VHを標識しVLは未標識)、及びTAMRAで標識した抗BGP抗体と抗ビスフェノールA抗体のVHとVLとをリンカー(GGGGSGGGGSGGGGS)により結合させた一本鎖抗体(scFv)の作製は、国際公開公報WO2011/061944に記載の方法によった。

【実施例2】

【0058】

2. 本発明の蛍光標識複合体を用いた均一系蛍光免疫測定法による測定

(シングルラベルFab型複合体を用いた蛍光スペクトル測定)

実施例1で作製した、BGP(ヒトオステオカルシン)に対する抗体の軽鎖可変領域(VL;配列番号5)と抗体軽鎖定常領域(C;配列番号4)を含むポリペプチドと、TAMRA蛍光で標識したBGPに対する抗体の重鎖可変領域(VH;配列番号3)と抗体重鎖定常領域(CH₁;配列番号6)を含むポリペプチドからなる、TAMRAシングルラベル抗BGP抗体Fab型複合体、又はTAMRA標識抗BGP抗体scFv、又はTAMRA標識抗BGP抗体VH+抗BGP抗体VLを用いて、BGP濃度を測定した。TAMRAシングルラベル抗BGP抗体Fab型複合体、又はTAMRA標識抗BGPscFv(70nM、6.25μL)、又はTAMRA標識抗BGP抗体VH+抗BGP抗体VL(70nM/mL、6.25μL)と、抗原であるBGP-C7(配列番号13)(0、1、3、10、25、100、又は1,000nM)とを、1%BSAを含むPBS(+0.05%Tween20)で計50μLになるように調製した。この溶液を25、70分間放置した後に、蛍光分光光度計(FluoroMax-4;ホリバ・ジョバンイボン社製)を用いて蛍光スペクトル測定を行った。543nmのHe-Neレーザーを用い、励起波長は530nmにセットし580nmでの蛍光強度を測定した。抗原なしの場合の蛍光

強度に対する、各抗原濃度における蛍光強度の比を図6左上のグラフに、BGP-C7が1,000nMの場合の蛍光強度の比を図6左下の表に示す。同様に、TAMRA蛍光で標識したビスフェノールAに対する抗体のVL(配列番号7)とC(配列番号4)を含むポリペプチドと、ビスフェノールAに対する抗体のVH(配列番号9)とCH₁(配列番号6)を含むポリペプチドからなる、TAMRAシングルラベル抗ビスフェノールA抗体Fab型複合体又は、TAMRA標識抗ビスフェノールA抗体scFvと、ビスフェノールA(0、1、3、10、30、100、又は1,000nM)とを反応させ、蛍光強度を測定した。抗原なしの場合の蛍光強度に対する、各抗原濃度における蛍光強度の比を図6右上のグラフに、ビスフェノールAが1,000nMの場合の蛍光強度の比を図6右下の表に示す。蛍光色素の種類や抗原濃度によらず、本発明のシングルラベルFab型複合体は、従来のscFv型Q-bodyやVH+VL型Q-bodyと比較して高い蛍光強度比を得ることができ、高感度に低分子化合物及びタンパク質を検出及び定量できることが確認できた。本発明のFab型複合体は、scFv型Q-bodyやVH+VL型Q-bodyと比較してその構成要素であるポリペプチド同士が互いに近い距離となる複合体を形成するため、抗体の可変領域のトリプトファンによる蛍光色素のクエンチング効果が効果的に起こるものと考えられる。

【実施例3】

【0059】

(同色ダブルラベルFab型複合体を用いた蛍光スペクトル測定)

実施例1で作製した、CR110、TAMRA、又はATTO655の蛍光色素で標識したBGPに対する抗体の軽鎖可変領域(VL;配列番号5)と抗体軽鎖定常領域(C;配列番号4)を含むポリペプチドと、同じ色素で標識されたBGPに対する抗体の重鎖可変領域(VH;配列番号3)と抗体重鎖定常領域(CH₁;配列番号6)を含むポリペプチドからなる、同色ダブルラベルFab型複合体(70nM、6.25μL)と、抗原であるBGP-C7(0~10,000nM)とを、1%BSAを含むPBS(+0.05%Tween20)で計50μLになるように調製した。コントロールとして、BGPに対する抗体VL(配列番号5)とC(配列番号4)を含むポリペプチド又はBGPに対する抗体VH(配列番号3)とCH₁(配列番号6)を含むポリペプチドのいずれか一方が蛍光標識されたシングルラベルFab型複合体のサンプルを用意した。これらの溶液を25、70分間放置した後に、蛍光分光光度計(FluoroMax-4;ホリバ・ジョバンイボン社製)を用いて蛍光スペクトル測定を行った。CR110蛍光色素標識同色ダブルラベルFab型複合体を使用した場合は、励起波長(Ex)は480nmにセットし、蛍光波長(Em)530nmでの蛍光強度を測定した。TAMRA蛍光色素標識同色ダブルラベルFab型複合体を使用した場合は、励起波長は530nmにセットし、蛍光波長580nmでの蛍光強度を測定した。ATTO655蛍光色素標識同色ダブルラベルFab型複合体を使用した場合は、励起波長は630nmにセットし、蛍光波長680nmでの蛍光強度を測定した。抗原なしの場合の蛍光強度に対する、各抗原濃度における蛍光強度の比を蛍光強度比とし、図7のグラフに示す。BGP-C7が1,000nM、又は10,000nMの場合の蛍光強度の比を図7の表に示す。

【0060】

また同様に、血清アルブミン(SA)に対する抗体の軽鎖可変領域(VL;配列番号10)と抗体軽鎖定常領域(C;配列番号4)を含むポリペプチドと、同じ色素で標識されたSAに対する抗体の重鎖可変領域(VH;配列番号12)と抗体重鎖定常領域(CH₁;配列番号6)を含むポリペプチドからなる同色ダブルラベルFab型複合体と、抗原であるHSA(0~100μM)を反応させ、蛍光強度を測定した。蛍光強度比を図8のグラフに、HSAが100μMの場合の蛍光強度の比を図8の表に示す。以上の結果から、蛍光色素や抗原の種類によらず、本発明の同色ダブルラベルFab型複合体は、シングルラベルFab型複合体よりも高い蛍光強度比で抗原量を測定することができると確認できた。同色ダブルラベルFab型複合体では、抗体の可変領域のトリプトファンによる蛍光色素のクエンチング効果に加え、蛍光色素間でのクエンチング効果(H-dime

10

20

30

40

50

r) が加わることで、バックグラウンドを低減することができ、ダイナミックレンジが増強されると考えられる。

【実施例 4】

【0061】

(異色ダブルラベル Fab 型複合体を用いた蛍光スペクトル測定)

実施例 1 で作製した、CR110、TAMRA、又は ATTO655 の蛍光色素で標識した BGP に対する抗体の軽鎖可変領域 (VL; 配列番号 5) と抗体軽鎖定常領域 (C; 配列番号 4) を含むポリペプチドと、前記と異なる色素で標識した BGP に対する抗体の重鎖可変領域 (VH; 配列番号 3) と抗体重鎖定常領域 (CH₁; 配列番号 6) を含むポリペプチドからなる、BGP 抗体の異色ダブルラベル Fab 型複合体 (70 nM、6.25 μL) と、抗原である BGP-C7 (0~1,000 nM) とを、1% BSA を含む PBS (+0.05% Tween 20) で計 50 μL になるように調製した。コントロールとして、同色ダブルラベル Fab 型複合体のサンプルを用意した。実施例 3 と同様に蛍光強度を想定し、抗原なしの場合の蛍光強度に対する、各抗原濃度における蛍光強度の比を得た。なお、CR110 及び TAMRA を用いた場合は、励起波長は 480 nm にセットし、蛍光波長 530 nm での蛍光強度を測定した (図 9 左グラフ)。CR110、TAMRA、及び ATTO655 を用いた場合は、励起波長は 530 nm にセットし、蛍光波長 580 nm での蛍光強度を測定した (図 9 中央グラフ)。TAMRA 及び ATTO655 を用いた場合は、励起波長は 630 nm にセットし、蛍光波長 680 nm での蛍光強度を測定した (図 9 右グラフ)。BGP-C7 が 1,000 nM の場合の蛍光強度の比を図 9 の各表に示す。

【0062】

また同様にして、実施例 1 で作製した、CR110、TAMRA、又は ATTO655 の蛍光色素で標識した SA に対する抗体の重鎖可変領域 (VH; 配列番号 12) と抗体重鎖定常領域 (CH₁; 配列番号 6) を含むポリペプチドと、前記と異なる色素で標識された SA に対する抗体の軽鎖可変領域 (VL; 配列番号 10) と抗体軽鎖定常領域 (C; 配列番号 4) を含むポリペプチドからなる、SA 抗体の異色ダブルラベル Fab 型複合体と、抗原である HSA (0~100 μM) とを反応させ、蛍光強度を測定した。抗原なしの場合の蛍光強度に対する、各抗原濃度における蛍光強度の比を蛍光強度比とし、図 10 のグラフに示す。HSA が 100 μM における蛍光強度比を図 10 の表に示す。

【0063】

さらに、CR110 で標識した抗 SA 抗体の重鎖可変領域 (VH; 配列番号 12) と抗体重鎖定常領域 (CH₁; 配列番号 6) を含むポリペプチドと、TAMRA で標識した抗 SA 抗体の軽鎖可変領域 (VL; 配列番号 10) と抗体軽鎖定常領域 (C; 配列番号 4) を含むポリペプチドからなる、抗 SA 抗体の異色ダブルラベル Fab 型複合体 (CR110__TAMRA と表記する。) と、抗原である HSA (1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} M) とを反応させ、波長 480 nm (図 11 左上グラフ) 又は波長 530 nm (図 11 右上グラフ) の励起光を照射し、蛍光スペクトルを測定した。また、CR110 で標識した抗 SA 抗体 VH (配列番号 12) と CH₁ (配列番号 6) を含むポリペプチドと、抗 SA 抗体 VL (配列番号 10) と C (配列番号 4) を含むポリペプチドからなる、抗 SA 抗体の CR110 シングルラベル Fab 型複合体 (CR110__no) と、抗原である HSA (1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} M) とを反応させ、波長 480 nm の励起光を照射し、蛍光スペクトルを測定した (図 11 左下グラフ)。抗 SA 抗体 VH (配列番号 12) と CH₁ (配列番号 6) を含むポリペプチドと、TAMRA で標識した抗 SA 抗体 VL (配列番号 10) と C (配列番号 4) を含むポリペプチドからなる、SA 抗体の TAMRA シングルラベル Fab 型複合体 (no__TAMRA) と、抗原である HSA (1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} M) とを反応させ、波長 530 nm の励起光を照射し、蛍光分光光度計 (FluoroMax-4) を用いて蛍光スペクトルを測定した (図 11 右下グラフ)。グラフにおける曲線は、上側から HSA 濃度が 1×10^{-4} M、 1×10^{-5} M、 1×10^{-6} M

、 1×10^{-7} M、0 Mのサンプルのデータである。

【0064】

この結果から、異色ダブルラベルFab型複合体CR110__TAMRAでは、波長480nmの励起光を照射した場合に抗原非存在下での約530nmの波長の蛍光がFRET効果により抑えられており、そのため約530nmの波長において高い蛍光強度の比を得られることがわかった。また、波長530nmの励起光を照射した場合にも、蛍光色素間でのクエンチング効果により、蛍光波長約530nmにおいて、CR110__TAMRAはno__TAMRAと比べて高い蛍光強度の比を得られることがわかった。したがって、抗体の変換領域のトリプトファンによる蛍光色素のクエンチング効果に加え、蛍光色素間でのクエンチング効果、さらにFRET効果が加わることでバックグラウンドを低減する
10

【実施例5】

【0065】

(蛍光標識とクエンチャー標識からなるFab型複合体を用いた蛍光スペクトル測定)

実施例1で作製した、TAMRA標識したBGPに対する抗体の重鎖可変領域(VH; 配列番号3)と抗体重鎖定常領域(CH₁; 配列番号6)とNBDで標識したBGPに対する抗体の軽鎖可変領域(VL; 配列番号5)と抗体軽鎖定常領域(C; 配列番号4)を含むポリペプチドからなるFab型複合体(70nM、6.25μL)と、抗原である
20 BGP-C7(0~10,000nM)とを、1%BSAを含むPBS(+0.05%Tween20)で計50μLになるように調製した。この溶液を25、70分間放置した後に、蛍光分光光度計(FluoroMax-4; ホリバ・ジョバンイボン社製)を用いて蛍光スペクトル測定を行った。励起波長は530nmにセットし、蛍光波長580nmでの蛍光強度を測定した。抗原なしの場合の蛍光強度に対する、各抗原濃度における蛍光強度の比を蛍光強度比とし、図12のグラフに示す。BGP-C7が1,000nMの場合の蛍光強度の比を図12の表に示す。

【0066】

この結果から、Fab型複合体TAMRA__NBDは、シングルラベルFab型複合体(TAMRA__No)(図7)と同程度の1nMの濃度でBGPを検出でき、かつダブルラベル(TAMRA__TAMRA)(図7)より高い27倍の蛍光増加により抗原を検出
30

【実施例6】

【0067】

(温度安定性の測定)

実施例1で作製した抗BGP__TAMRAシングルラベルFab複合体と抗BGP__TAMRAラベルscFvの熱安定性を測定するために、サーマルシフトアッセイを行った。StepOneリアルタイムPCRシステム(アプライドバイオシステムズ社)を用いて1分間に1ずつ温度を上昇させ、各温度での蛍光強度を測定した。それぞれの抗体が熱変性を起すと、その構造が崩れ消光状態が解消し蛍光強度が増加する原理に基づき、熱安定性を
40

【実施例7】

【0068】

(蛍光ラベルFab型複合体によるクレンプテロールの測定)

実施例1に示した方法で合成したクレンプテロールに対する抗体のCR110で標識された軽鎖可変領域(VL; 配列番15)と抗体軽鎖定常領域(C; 配列番号4)を含むポリペプチドと、TAMRAで標識されたクレンプテロールに対する抗体の重鎖可変領域
50

(VH ; 配列番号16)と抗体重鎖定常領域(CH₁ ; 配列番号6)を含むポリペプチドからなる異色ダブルラベルFab型複合体と、抗原であるクレンブテロール(0~16 μg/mL)を反応させ、実施例4の方法で蛍光強度を測定した。クレンブテロールが16 μg/mLの場合の蛍光強度の比を表1に示す。この結果、16 μg/mLのクレンブテロールを測定することができた。

【0069】

【表1】

蛍光ラベルFab型複合体によるクレンブテロールの測定

10

蛍光標識Fab抗体	抗原	標識蛍光色素		測定	蛍光増加*1
		VH含有 ポリペプチド	VL含有 ポリペプチド	Ex / Em	
Anti-Clenbuterol	Clenbuterol	TAMRA	CR110	480 / 530	1.5

*1 (16 μg/mL Clenbuterolの蛍光強度) / (抗原なしの蛍光強度)

【実施例8】

【0070】

(蛍光ラベルFab型複合体によるラクトパミン、コチニンの測定)

実施例1に示した方法で、ラクトパミンに対する抗体のTAMRAで標識された軽鎖可変領域(VL ; 配列番号17)と抗体軽鎖定常領域(C ; 配列番号4)を含むポリペプチドと、TAMRAで標識されたラクトパミンに対する抗体の重鎖可変領域(VH ; 配列番号18)と抗体重鎖定常領域(CH₁ ; 配列番号6)を含むポリペプチドからなる同色ダブルラベルFab型複合体を合成した。また、コチニンに対する抗体のTAMRAで標識された軽鎖可変領域(VL ; 配列番号19)と抗体軽鎖定常領域(C ; 配列番号4)を含むポリペプチドと、TAMRAで標識されたコチニンに対する抗体の重鎖可変領域(VH ; 配列番号20)と抗体重鎖定常領域(CH₁ ; 配列番号6)を含むポリペプチドからなる同色ダブルラベルFab型複合体を合成した。次いで、それぞれ抗原であるラクトパミン3.4 μg/mLまたはコチニン3.5 μg/mLを反応させ、実施例4の方法で蛍光強度を測定した。その結果を表2に示す。表2に示すように、蛍光増加比蛍光強度比を2.3および1.9で測定することができた。

20

30

【0071】

【表2】

蛍光ラベルFab型複合体によるラクトパミン、コチニンの測定

蛍光標識Fab抗体	抗原	標識蛍光色素		測定	蛍光増加
		VH含有 ポリペプチド	VL含有 ポリペプチド	Ex / Em	
Anti-Ractopamine	Ractopamine	TAMRA	TAMRA	530 / 580	2.3 *1
Anti-cotinine	Cotinine	TAMRA	TAMRA	530 / 580	1.9 *2

*1 (3.4 μg/mL Ractopamineの蛍光強度) / (抗原なしの蛍光強度)

*2 (3.5 μg/mL Cotinineの蛍光強度) / (抗原なしの蛍光強度)

40

【実施例9】

【0072】

(蛍光ラベルFab型複合体によるインフルエンザA型ウィルスヘマグルチニン(HA)の測定)

実施例1に示した方法で合成したインフルエンザA型H5N1, H1N1のヘマグルチ

50

ニン（HA）に対する抗体のCR110で標識された軽鎖可変領域（VL；配列番号21）と抗体軽鎖定常領域（C_H；配列番号4）を含むポリペプチドと、TAMRAで標識されたインフルエンザA型H5N1，H1N1のヘマグルチニン（HA）に対する抗体の重鎖可変領域（VH；配列番号22）と抗体重鎖定常領域（C_H；配列番号6）を含むポリペプチドからなる異色ダブルラベルFab型複合体と、それぞれの抗原30 μg/mLを反応させ、実施例4の方法で蛍光強度を測定した。その結果を表3に示す。表3に示すように、H5N1 HA、及びH1N1 HAそれぞれの抗原に対し、蛍光増加比はそれぞれ6.1及び7.1で測定することができた。

【0073】

【表3】

10

蛍光ラベルFab型複合体によるインフルエンザA型ウィルスHAの測定

蛍光標識Fab抗体	抗原	標識蛍光色素		測定	蛍光増加*1
		VH含有 ポリペプチド	VL含有 ポリペプチド	Ex / Em	
Anti-HA	H5N1 HA	TAMRA	CR110	480 / 530	6.1
	H1N1 HA	TAMRA	CR110	480 / 530	7.1

*1 (30 μg/mL 抗原の蛍光強度) / (抗原なしの蛍光強度)

20

【実施例10】

【0074】

（蛍光ラベルFab型複合体によるモルヒネ類、メタンフェタミン類、コカインの測定）
 実施例1に示した方法で合成したモルヒネに対する抗体のTAMRAで標識された軽鎖可変領域（VL；配列番号23）と抗体軽鎖定常領域（C_H；配列番号4）を含むポリペプチドと、TAMRAで標識されたモルヒネに対する抗体の重鎖可変領域（VH；配列番号24）と抗体重鎖定常領域（C_H；配列番号6）を含むポリペプチドからなる同色ダブルラベルFab型複合体を合成した。同様に、メタンフェタミンに対する抗体のTAMRAで標識された軽鎖可変領域（VL；配列番号25）と抗体軽鎖定常領域（C_H；配列番号4）を含むポリペプチドと、TAMRAで標識されたメタンフェタミンに対する抗体の重鎖可変領域（VH；配列番号26）と抗体重鎖定常領域（C_H；配列番号6）を含むポリペプチドからなる同色ダブルラベルFab型複合体、コカインに対する抗体のTAMRAで標識された軽鎖可変領域（VL；配列番号27）と抗体軽鎖定常領域（C_H；配列番号4）を含むポリペプチドと、TAMRAで標識されたコカインに対する抗体の重鎖可変領域（VH；配列番号28）と抗体重鎖定常領域（C_H；配列番号6）を含むポリペプチドからなる同色ダブルラベルFab型複合体を合成した。また、実施例1に従い、TAMRAで標識した抗モルヒネ抗体のVLとVHとをリンカー（GGGGS GGGS GGGS）により結合させた一本鎖抗体（scFv）と、抗メタンフェタミン抗体のVHとVLとをリンカー（GGGGS GGGS GGGS）により結合させた一本鎖抗体（scFv）を作製した。構築したTAMRAダブルラベルFab複合体およびTAMRAラベルscFvと種々のモルヒネ類、メタンフェタミン類、コカイン、ケタミンを反応させ、実施例3または実施例1の方法で蛍光強度を測定した。その結果を表4に示す。3種類の蛍光標識Fab複合体は特異的にそれぞれの抗原を認識し、かつ蛍光標識モルヒネFab複合体とscFvの比較、蛍光標識メタンフェタミンFab複合体とscFvの蛍光増加比は、いずれもFab複合体が高く、ダイナミックレンジが大きく増大した。

30

40

【0075】

【表4】

蛍光ラベルFab型複合体によるモルヒネ類、メタンフェタミン類、コカインの測定

蛍光ラベルFab抗体 抗原		抗原100 µg/mLでの蛍光増加値 *1							
		Anti-Morphine		Anti-Methamphetamine		Anti-Cocaine		Anti-Morphine	Anti-Methamphetamine
		VH含有 ポリペプチド	VL含有 ポリペプチド	VH含有 ポリペプチド	VL含有 ポリペプチド	VH含有 ポリペプチド	VL含有 ポリペプチド	scFv	scFv
		TAMRA	TAMRA	TAMRA	TAMRA	TAMRA	TAMRA	TAMRA	TAMRA
モルヒネ類									
	Morphine	7.8		0.9		0.9		1.5	
	Heroin	8.3						1.5	
	Codeine	8.1						1.5	
	Thebaine	6.2							
	Ethylmorphine	8.4							
	Dihydrocodeine	8.3							
メタンフェタミン類									
	Methamphetamine			7.2				1.0	1.8
	Amphetamine			6.8					
	MDMA			7.2					
	MDA	1.1		5.6		0.9			
コカイン									
	Cocaine	1.1		1.0		3.7		1.0	
ケタミン									
	Ketamine	1.1		1.0		0.9		1.0	

*1 (100 µg/mL 抗原の蛍光強度) / (抗原なしの蛍光強度)

10

20

【実施例11】

【0076】

(蛍光ラベルFab型複合体による大麻成分THCとケタミンの測定)

実施例1に示した方法で、大麻成分THCに対する抗体のTAMRAで標識された軽鎖可変領域(VL; 配列番号29)と抗体軽鎖定常領域(C_H1; 配列番号4)を含むポリペプチドと、TAMRAで標識された大麻成分THCに対する抗体の重鎖可変領域(VH; 配列番号30)と抗体重鎖定常領域(C_H2; 配列番号6)を含むポリペプチドからなる同色ダブルラベルFab型複合体を合成した。同様に、ケタミンに対する抗体のTAMRAで標識された軽鎖可変領域(VL; 配列番号31)と抗体軽鎖定常領域(C_H1; 配列番号4)を含むポリペプチドと、TAMRAで標識されたケタミンに対する抗体の重鎖可変領域(VH; 配列番号32)と抗体重鎖定常領域(C_H2; 配列番号6)を含むポリペプチドからなる同色ダブルラベルFab型複合体を合成した。次いで、それぞれ抗原であるTHC(100 µg/mL)またはケタミン(1.0 mg/mL)を反応させ、実施例4の方法で蛍光強度を測定した。表5に示すように、蛍光増加比蛍光強度比を1.3および2.0で測定することができた。

30

【0077】

【表5】

蛍光ラベルFab型複合体による大麻成分THC、ケタミンの測定

蛍光ラベルFab抗体	抗原	標識蛍光色素		測定	蛍光増加
		VH含有 ポリペプチド	VL含有 ポリペプチド	Ex / Em	
Anti-THC	THC	TAMRA	TAMRA	530 / 580	1.3 *1
Anti-Ketamine	Ketamine	TAMRA	TAMRA	530 / 580	2.0 *2

*1 (100 µg/mL THCの蛍光強度) / (抗原なしの蛍光強度)

*2 (1.0 mg/mL Ketamineの蛍光強度) / (抗原なしの蛍光強度)

40

【産業上の利用可能性】

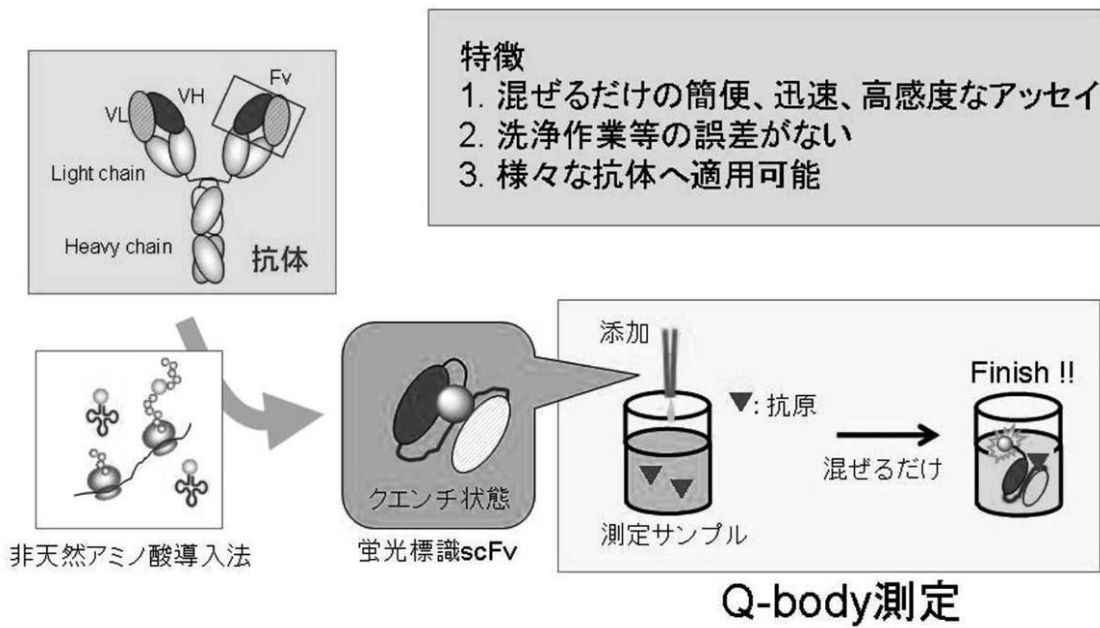
50

【 0 0 7 8 】

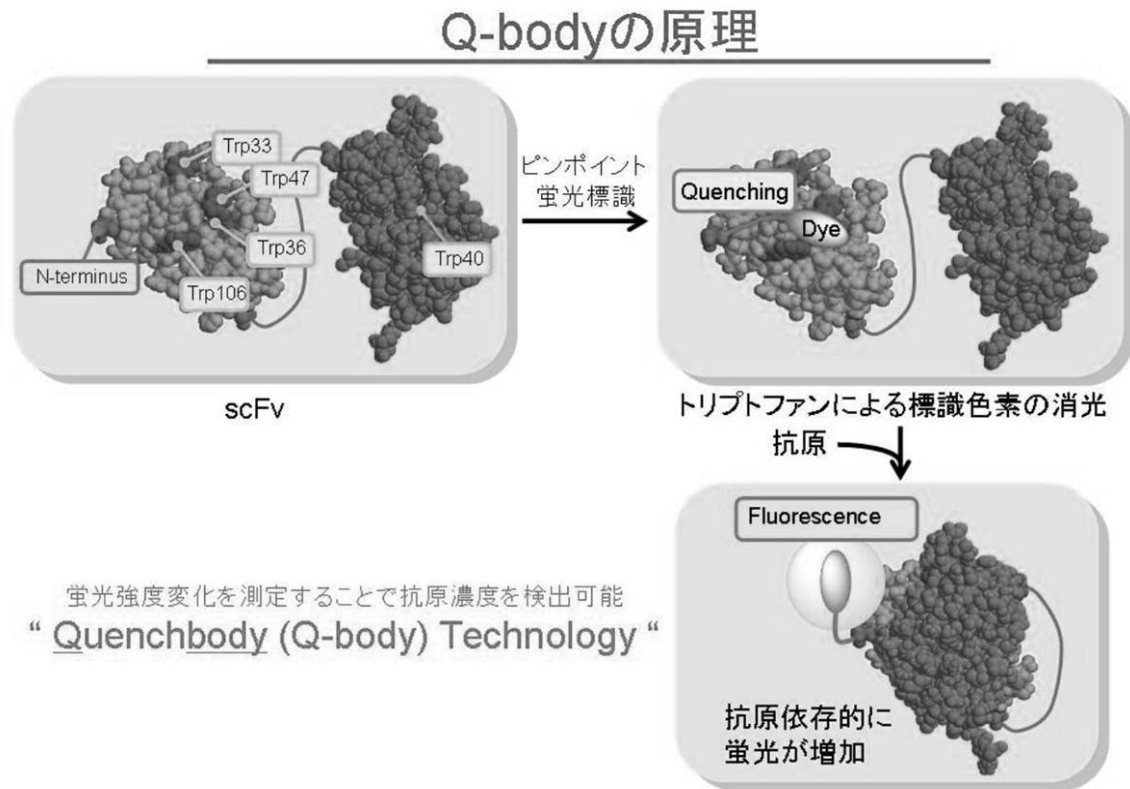
本発明は、試料分析や薬物検査の分野や、携帯型試料分析キットの分野等において有用に利用することができる。

【 図 1 】

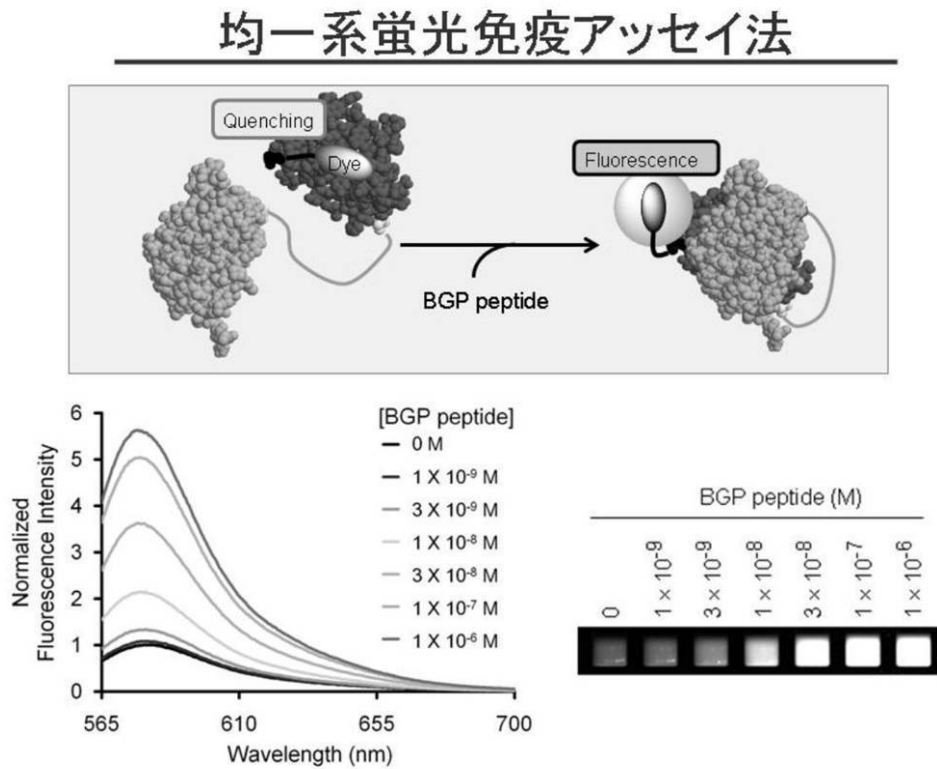
Q-body測定法



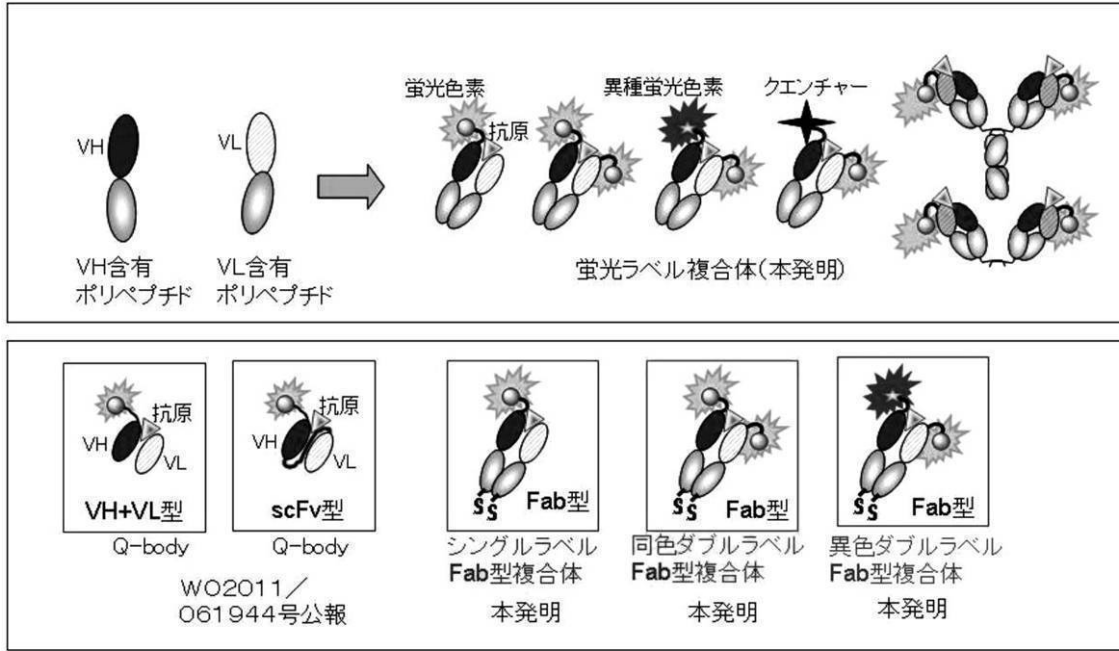
【 図 2 】



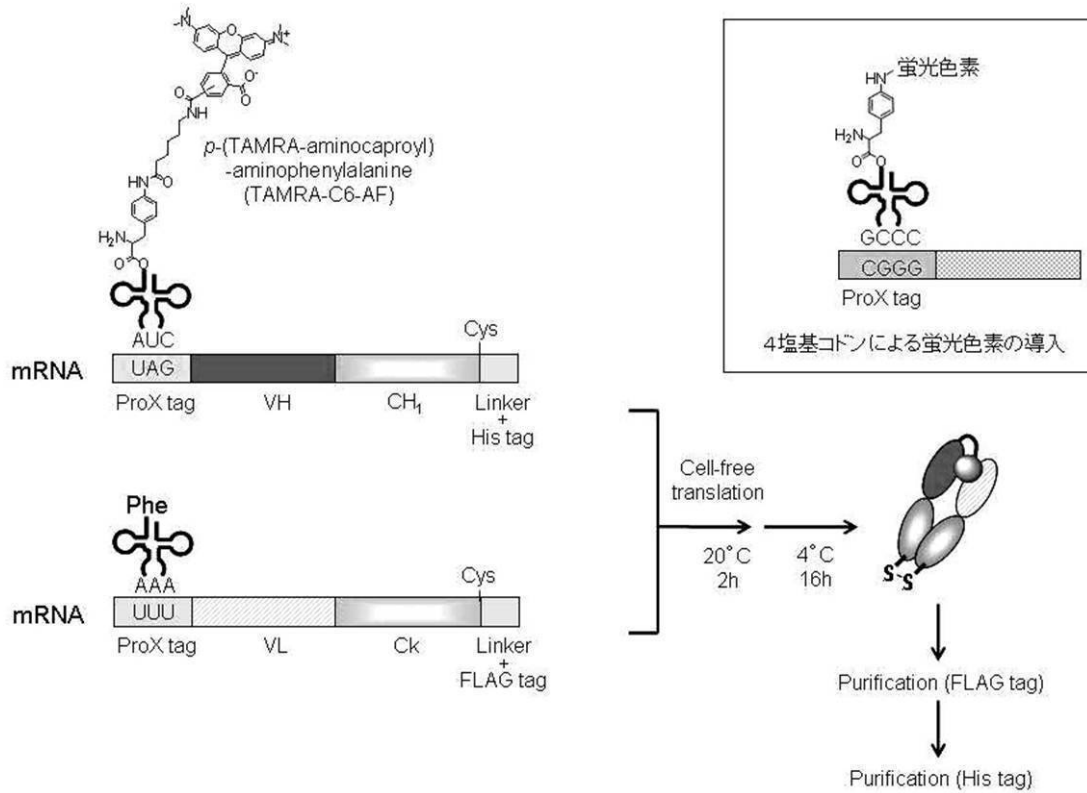
【 図 3 】



【 図 4 】

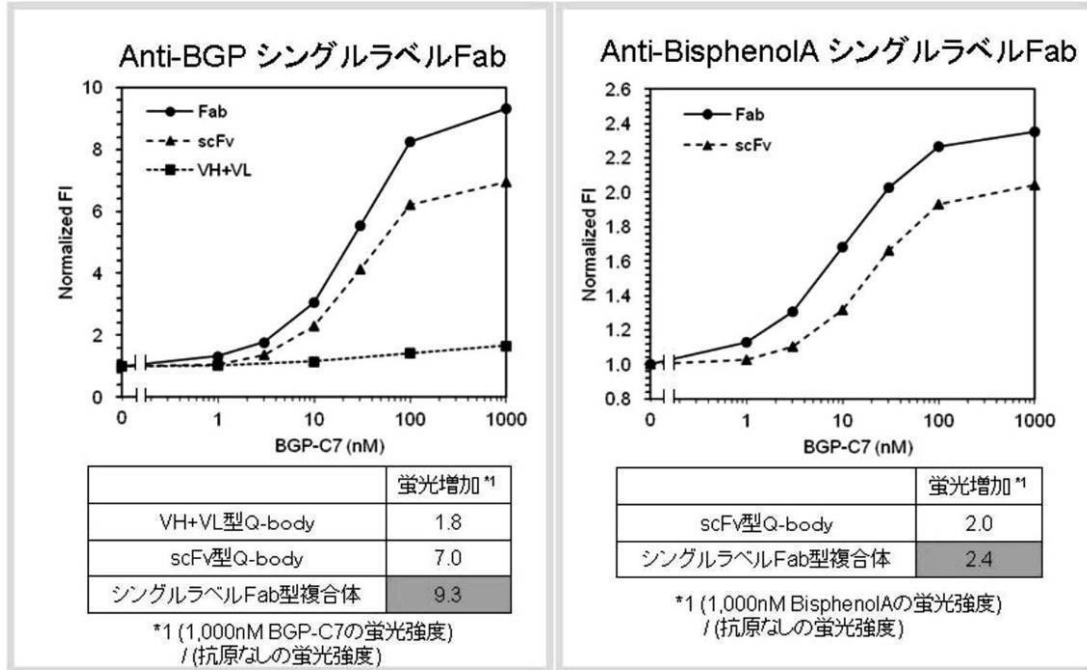


【 図 5 】



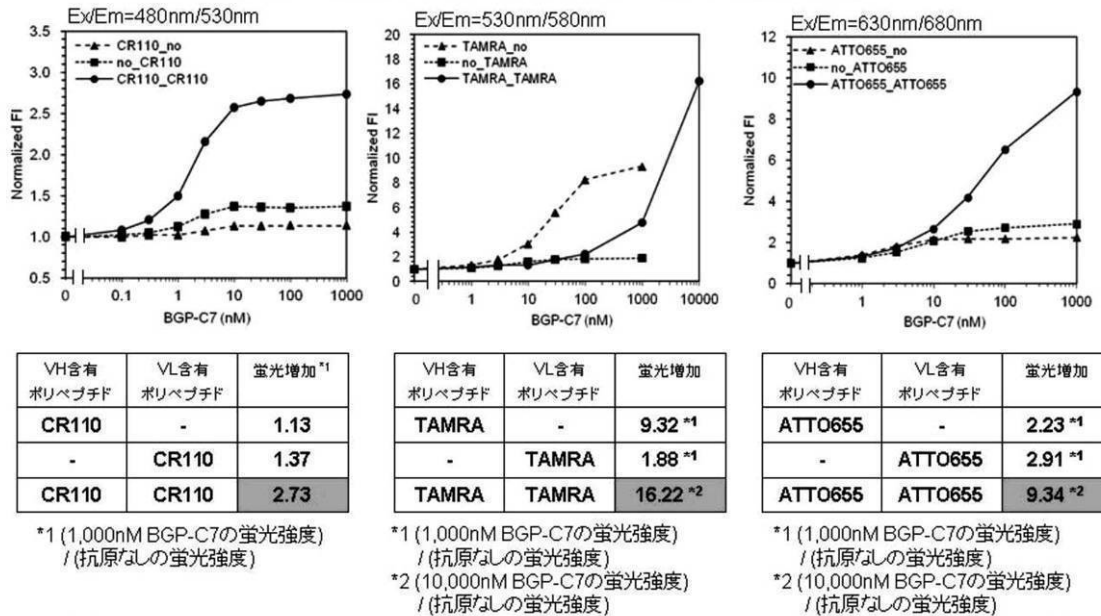
【 図 6 】

シングルラベルFab型複合体評価



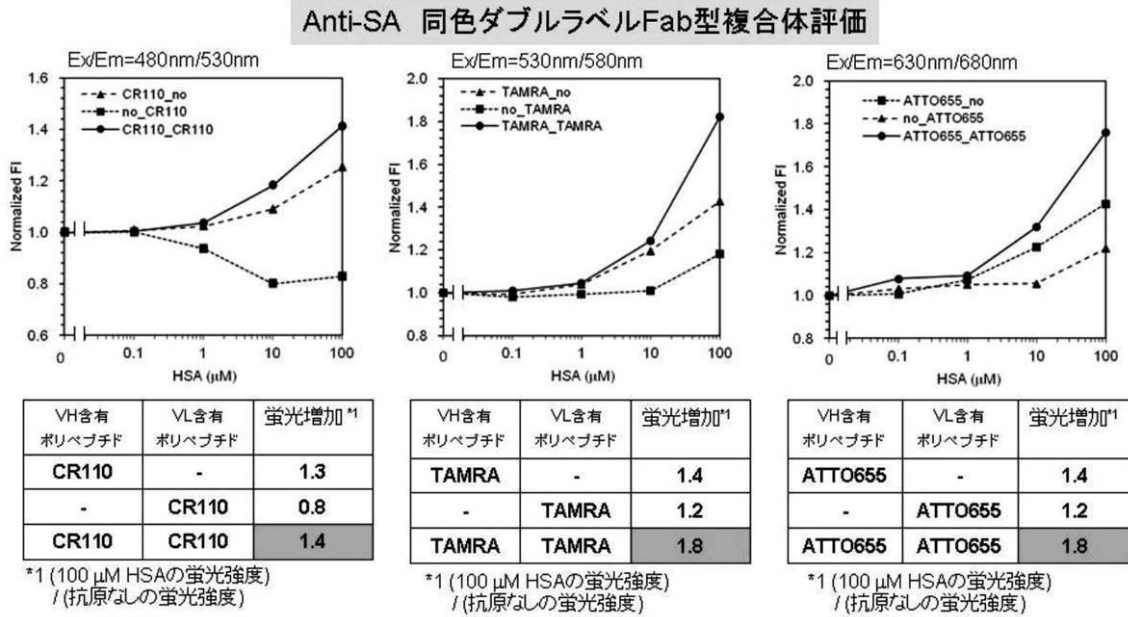
【 図 7 】

Anti-BGP 同色ダブルラベルFab型複合体評価



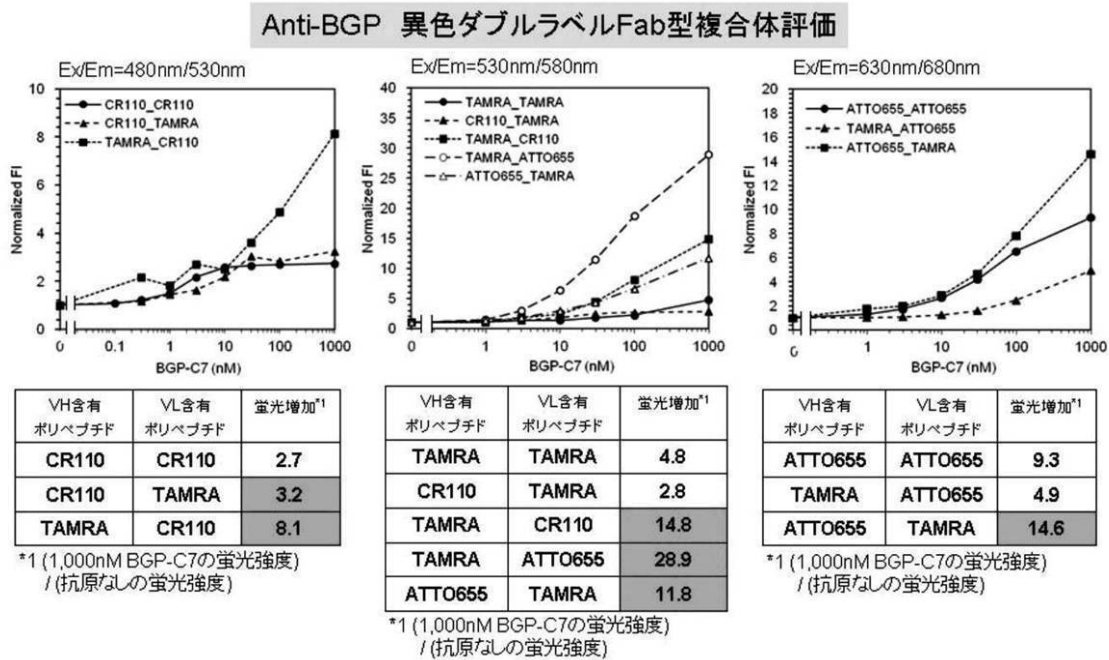
同色ダブルラベルによりクエンチ効果を増加させることができることが示された。

【 図 8 】



同色ダブルラベルによりクエンチ効果を増加させることができることが示された。

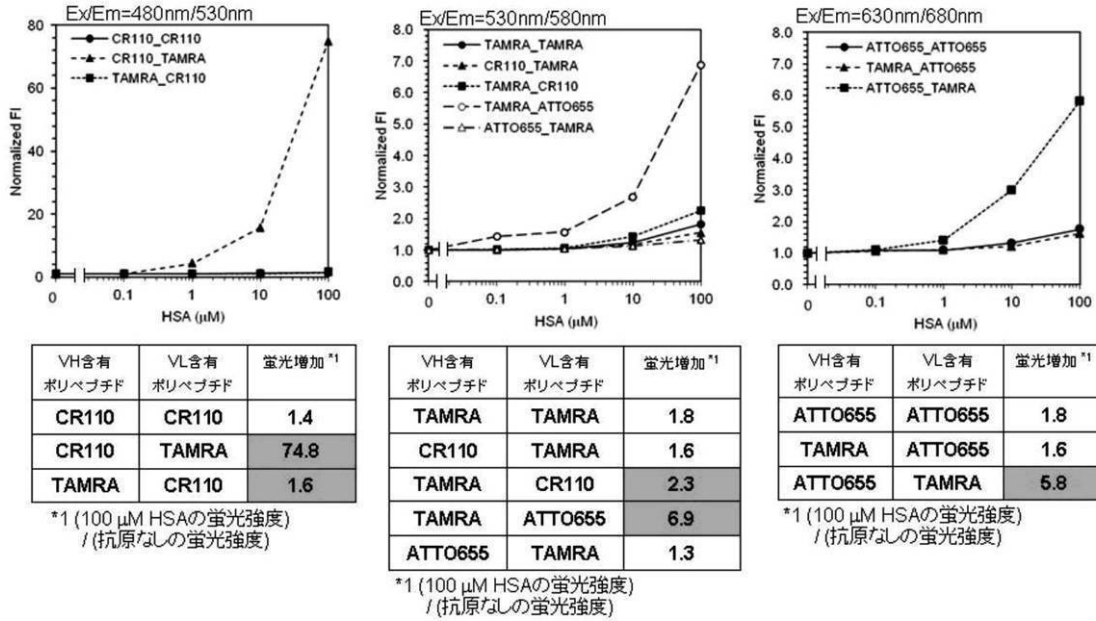
【 図 9 】



異色ダブルラベルにより蛍光変化をさらに増加させることができることが示された。

【 図 1 0 】

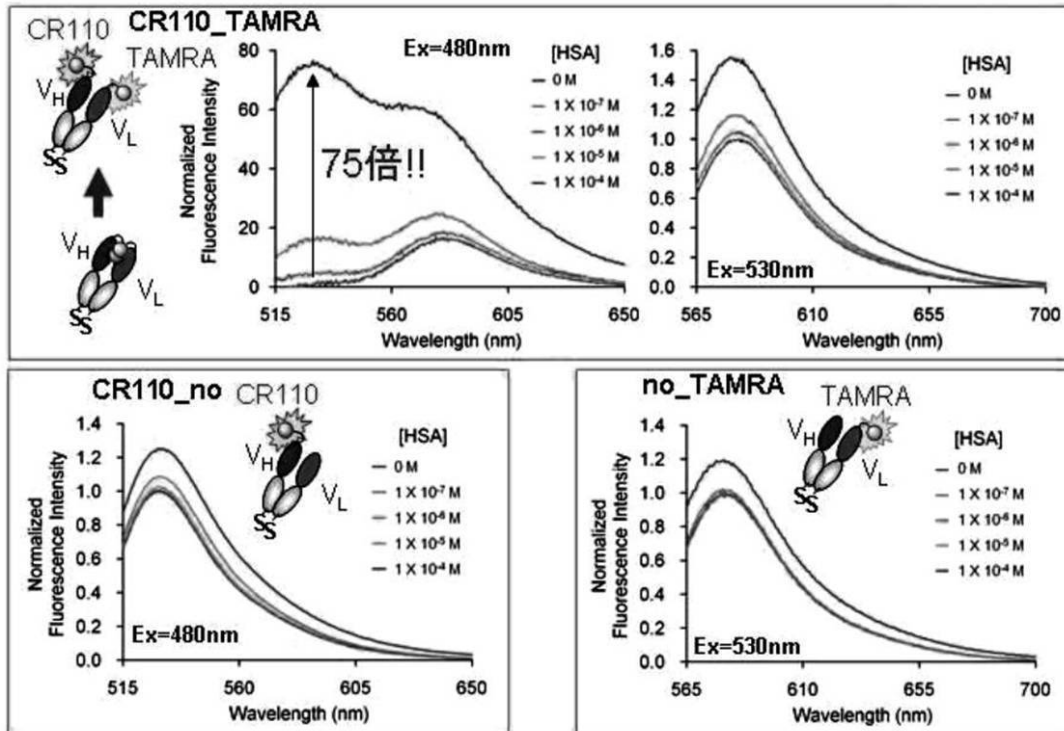
Anti-SA異色ダブルラベルFab型複合体評価



異色ダブルラベルにより蛍光変化をさらに増加させることができることが示された。

【 図 1 1 】

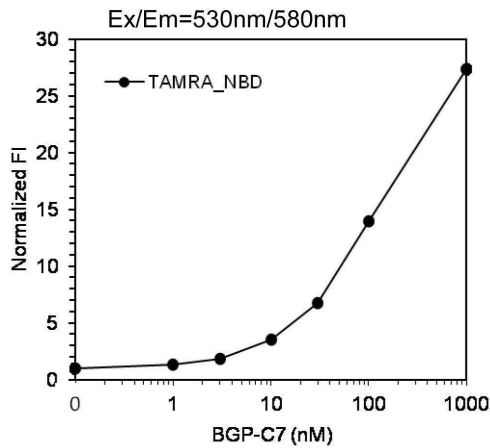
Anti-SA 蛍光標識Fab型複合体評価



CR110_TAMRAの場合、最大で75倍の蛍光増加が確認された。

【 図 1 2 】

Anti-BGP クエンチャー、蛍光色素のダブルラベルFab型複合体評価

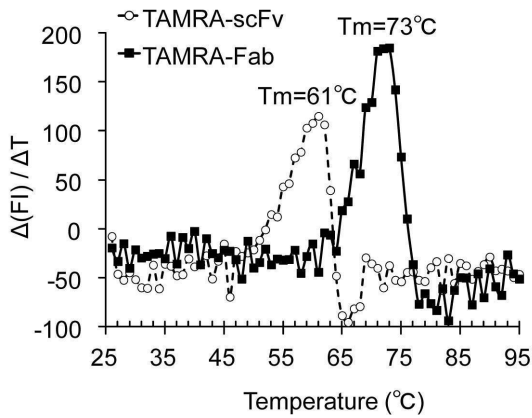


VH含有 ポリペプチド	VL含有 ポリペプチド	蛍光増加 ^{*1}
TAMRA	NBD	27.3

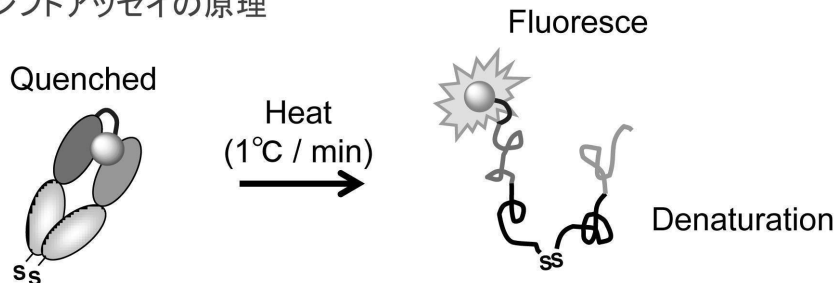
*1 (1,000nM BGP-C7の蛍光強度)
/ (抗原なしの蛍光強度)

【 図 1 3 】

Anti-BGP scFvとFab型複合体の温度安定性評価



サーマルシフトアッセイの原理



【 配列表 】

0005817838000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 阿部 亮二
神奈川県横浜市青葉区元石川町6409番地 ウシオ電機株式会社内
- (72)発明者 高木 広明
神奈川県横浜市青葉区元石川町6409番地 ウシオ電機株式会社内

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 特開2011-095085(JP,A)
国際公開第2011/061944(WO,A1)
国際公開第2004/027424(WO,A1)
特開平02-195256(JP,A)
特開2010-286467(JP,A)
特表2004-537047(JP,A)
米国特許出願公開第2008/0064025(US,A1)
J Am Chem Soc, 2011.10.06, Vol.133, No.43, Page.17386-17394
Protein Eng (Oxf), 2000, Vol.13, No.5, Page.369-376
生化学, 2010, 抄録CD, Page.ROMBUNNO.1P-1278
化学工学会年会研究発表講演要旨集(CD-ROM), 2010, Vol.75th, Page.ROMBUNNO.D309
化学工学会年会研究発表講演要旨集(CD-ROM), 2012.02.15, Vol.77th, Page.ROMBUNNO.A103

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/533
G01N 21/78
G01N 33/53
G01N 33/542
C07K 16/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	使用荧光标记的含抗体可变区的多肽复合物的荧光免疫测定方法		
公开(公告)号	JP5817838B2	公开(公告)日	2015-11-18
申请号	JP2013541635	申请日	2012-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	优志旺电机株式会社		
申请(专利权)人(译)	潮公司		
当前申请(专利权)人(译)	潮公司		
[标]发明人	上田宏 阿部亮二 高木広明		
发明人	上田 宏 阿部 亮二 高木 広明		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/542 G01N33/53 G01N21/78 C07K16/00		
CPC分类号	G01N33/536 C07K16/44 C07K2317/55 C07K2317/94 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/542 G01N33/56983 G01N33/582 G01N33/6857 G01N33/946 G01N33/948 G01N33/9486 G01N2021/6432		
FI分类号	G01N33/533 G01N33/542.A G01N33/53.D G01N21/78.C C07K16/00.ZNA		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2011241402 2011-11-02 JP		
其他公开文献	JPWO2013065314A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

它并不需要固定化步骤和洗涤步骤，以快速和简单地目的在液相使物质的定量测量，并且可以可视化抗原，高灵敏度免疫测定并提供制造它的方法。这样的问题，有 (a) 液体相，任一种或两种包含多肽和包含抗体轻链可变区已被标记有荧光染料的抗体重链可变区的多肽，其中所述抗体轻链可变的由多肽包含多肽和包含所述区的抗体重链可变区的复合物与在测量样品步骤的抗原接触;检测荧光 (b) 的荧光染料，或测量荧光强度; (C) 中的抗原浓度和荧光染料的荧光强度，作为指示，它是在正相关关系，计算样品中所含的抗原的量，或可视化抗原的步骤;顺序地执行，所述测试物质并测量溶液中存在的靶抗原的浓度。 点域4

(21) 出願番号	特願2013-541635 (P2013-541635)	(73) 特許権者	000102212
(86) (22) 出願日	平成24年11月1日 (2012.11.1)		ウシオ電機株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/007025		東京都千代田区大手町二丁目6番1号
(87) 国際公開番号	W02013/065314	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成25年5月10日 (2013.5.10)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成26年3月14日 (2014.3.14)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	特願2011-241402 (P2011-241402)		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成23年11月2日 (2011.11.2)	(74) 代理人	100111741
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 田中 夏夫
		(72) 発明者	上田 宏 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 R 1-18 東京工業大学 資源化学研究所 内