

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5949890号  
(P5949890)

(45) 発行日 平成28年7月13日(2016.7.13)

(24) 登録日 平成28年6月17日(2016.6.17)

(51) Int.Cl.

F 1

|                      |                  |               |   |
|----------------------|------------------|---------------|---|
| <b>GO 1 N 33/542</b> | <b>(2006.01)</b> | GO 1 N 33/542 | A |
| <b>GO 1 N 33/53</b>  | <b>(2006.01)</b> | GO 1 N 33/53  | J |
| <b>GO 1 N 33/577</b> | <b>(2006.01)</b> | GO 1 N 33/53  | G |
| <b>GO 1 N 21/78</b>  | <b>(2006.01)</b> | GO 1 N 33/577 | B |
| <b>GO 1 N 21/64</b>  | <b>(2006.01)</b> | GO 1 N 21/78  | C |

請求項の数 17 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-261183 (P2014-261183)  
 (22) 出願日 平成26年12月24日(2014.12.24)  
 (65) 公開番号 特開2016-121919 (P2016-121919A)  
 (43) 公開日 平成28年7月7日(2016.7.7)  
 審査請求日 平成28年3月28日(2016.3.28)

微生物の受託番号 NITE BP-01970

早期審査対象出願

(73) 特許権者 000102212  
 ウシオ電機株式会社  
 東京都千代田区丸の内一丁目6番5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 阿部 亮二  
 神奈川県川崎市川崎区南渡田町1番12号  
 THINK研究C棟5階 ウシオ電機株  
 式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光標識された抗体可変領域を含むポリペプチドを含む抗原結合タンパク質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からなり、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抗原結合タンパク質を含む、抗原濃度測定又は検出用キットであって、

前記抗原結合タンパク質が検査対象の抗原と結合して複合体を形成したときに、抗原と抗原結合タンパク質の複合体が前記蛍光色素のクエンチャーとなり、

液相中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが負の相関関係にあり、抗原と抗原結合タンパク質の複合体が形成したときに前記蛍光色素がより強くクエンチされることにより蛍光強度が減少し、

液相中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが負の相関関係にあることを指標として、測定又は検出される蛍光に基づい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又は検出用キット。

【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抗原結合タンパク質が、scFv抗体であることを特徴とする請求項1に記載の抗原濃度測定又は検出用キット。

【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

10

20

抗原結合タンパク質が、Fab抗体、Fab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(ab')<sub>2</sub>抗体、及び完全体の抗体からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 記載の抗原濃度測定又は検出用キット。

【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 3 記載の抗原濃度測定又は検出用キット。

【請求項 5】

蛍光色素が、ローダミン系蛍光色素であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の抗原濃度測定又は検出用キット。

10

【請求項 6】

蛍光色素が、カルボキシテトラメチルローダミンであることを特徴とする請求項 5 記載の抗原濃度測定又は検出用キット。

【請求項 7】

以下の工程 ( a ) ~ ( c ) を順次行うことを特徴とする抗原濃度測定又は検出方法：

( a ) 液相中で、抗原結合タンパク質と検査対象の抗原を接触させる工程であって、

抗原結合タンパク質が、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り、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のいずれか一方又は両方が、抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド又は抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドに標識された状態でクエンチされる蛍光色素により標識され、抗原結合タンパク質と検査対象の抗原が抗原と抗原結合タンパク質の複合体を形成したときに、検査対象の抗原と抗原結合タンパク質の複合体が蛍光色素のクエンチャーとして作用する、工程；

20

( b ) 蛍光色素の蛍光を測定又は検出する工程；並びに

( c ) 抗原濃度を測定し又は抗原を検出する工程であって、

前記抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗原結合タンパク質が抗原と結合し抗原と抗原結合タンパク質の複合体を形成したときに蛍光色素のクエンチが解消されずより強くクエンチされることにより蛍光強度が減少することにより液相中の抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが負の相関関係にあることを指標として、測定又は検出された蛍光に基づいて検査対象の抗原の量を算出し、又は、検査対象の抗原を検出する工程。

30

【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抗原結合タンパク質が、scFv抗体であることを特徴とする請求項 7 記載の抗原濃度測定又は検出方法。

【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抗原結合タンパク質が、Fab抗体、Fab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(ab')<sub>2</sub>抗体、及び完全体の抗体からなる群から選択されることを特徴とする請求項 7 記載の抗原濃度測定又は検出方法。

40

【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 9 記載の抗原濃度測定又は検出方法。

【請求項 11】

抗原が、低分子化合物であることを特徴とする請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗原濃度測定又は検出方法。

【請求項 12】

抗原が、大麻成分であることを特徴とする請求項 7 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の抗原濃度測定又は検出方法。

50

## 【請求項 13】

大麻成分がテトラヒドロカンナビノール (THC)、テトラヒドロカンナビノール酸 (THC-A) 及びカンナビノール (CBN) からなる群から選択されることを特徴とする請求項 12 記載の抗原濃度測定又は検出方法。

## 【請求項 14】

受託番号NITE BP-01970で国際寄託されている、テトラヒドロカンナビノール (THC) 又はその誘導体に結合する抗体を産生するハイブリドーマ。

## 【請求項 15】

請求項 14 記載のハイブリドーマが産生する、テトラヒドロカンナビノール (THC) 又はその誘導体に結合するモノクローナル抗体。

10

## 【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からなる抗原結合タンパク質が、請求項 15 記載のモノクローナル抗体の抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと該モノクローナル抗体の抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗原結合タンパク質である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗原濃度測定又は検出用キット。

## 【請求項 17】

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抗原結合タンパク質が、請求項 15 記載のモノクローナル抗体の抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと該モノクローナル抗体の抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗原結合タンパク質である、請求項 7 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の抗原濃度測定又は検出方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

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等の検出が可能な抗原濃度測定又は検出用キット、並びに該キットを用いた抗原の濃度測定又は検出方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

本発明者らは、先に、非天然アミノ酸導入技術を利用して一本鎖抗体 (scFv) のN末端近傍を部位特異的に蛍光標識することで、抗原結合依存的に蛍光強度が増大する抗体断片である蛍光標識抗体 (Quenchbody : Q-body (登録商標)) を開発した (特許文献 1 及び非特許文献 1 を参照)。この現象は、抗原非依存時に標識色素がscFvを構成する可変領域 $V_H/V_L$ 界面近傍の、保存性の高いトリプトファン残基と相互作用して消光 (クエンチ) し、それが抗原結合により解除されるために起こる。すなわち、該蛍光標識抗体を用いた測定においては、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、抗原濃度の測定を可能とする。

30

## 【0003】

また、本発明者らは、上記のQ-bodyにおいて一本鎖抗体 (scFv) を、Fab等の蛍光標識抗体可変領域を含むポリペプチド複合体とすることにより、トリプトファン残基による消光だけでなく、色素間の消光効果 (H-dimer) によりさらに高い検出感度が得られることを見出し、該複合体をUQ-body (登録商標) と命名した (特許文献 2)。UQ-bodyを用いた抗原の測定においても、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、抗原濃度の測定を可能とする。

40

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0004】

【特許文献 1】 W02011/061944号公報

【特許文献 2】 W02013/065314号公報

50

## 【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Abe et al., J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 17386-17394

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、蛍光色素の蛍光強度と抗原濃度が負の相関関係にあることを指標として、抗原濃度の測定を可能とする抗原濃度測定又は検出用キット、並びに該キットを用いた抗原濃度測定又は検出方法の提供を目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

【0007】

先に本発明者らは、蛍光色素で標識した、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の複合体を用いてクエンチング（消光）現象を利用して、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検出、測定を行う方法を開発した（WO2011/061944号公報及びWO2013/065314号公報）。該方法においては、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複合体が抗原と結合していないときには、蛍光色素が重鎖可変領域に存在するトリプトファン残基や他の蛍光色素やクエンチャーによりクエンチ（消光）されているが、該複合体が抗原と結合するとコンフォメーションの変化により蛍光色素のクエンチが弱まり、蛍光強度が高くなる。

【0008】

本発明者らは、さらにクエンチングを利用した抗原の測定、検出方法について鋭意検討を行ったところ、抗原が結合することにより蛍光色素がクエンチされ、蛍光色素の発する蛍光強度が減少する現象を見出した。すなわち、蛍光色素の蛍光強度と抗原濃度が負の相関関係にあることを見出した。この現象は、検査対象である抗原が、蛍光色素と主として疎水的、静電的に相互作用が可能な場合に生じ、抗原ポケットと蛍光色素がより親和性が高まる結果、よりクエンチが高まることにより生じる。

【0009】

本発明者らは、上記原理に基づいて、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り、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抗原結合タンパク質であって、蛍光色素の蛍光強度と抗原濃度が負の相関関係になり得る抗原結合タンパク質を開発するとともに、該抗原結合タンパク質を用いた抗原の濃度測定又は検出方法を開発し、本発明を完成させるに至った。

【0010】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[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からなり、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抗原結合タンパク質を含む、抗原濃度測定又は検出用キットであって、

前記抗原結合タンパク質が検査対象の抗原と結合して複合体を形成したときに、抗原と抗原結合タンパク質の複合体が前記蛍光色素のクエンチャーとなり、

液相中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが負の相関関係にあり、抗原と抗原結合タンパク質の複合体が形成したときに前記蛍光色素がより強くクエンチされることにより蛍光強度が減少し、

液相中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが負の相関関係にあることを指標として、測定又は検出される蛍光に基づい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又は検出用キット。

[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からなる抗原結合タンパク質が、scFv抗体であることを特徴とする[1]の抗原濃度測定又は

10

20

30

40

50

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からなる抗原結合タンパク質が、Fab抗体、Fab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(ab')<sub>2</sub>抗体、及び完全体の抗体からなる群から選択されることを特徴とする [ 1 ] の抗原濃度測定又は検出用キット。

[ 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、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 [ 3 ] の抗原濃度測定又は検出用キット。

[ 5 ] 蛍光色素が、ローダミン系蛍光色素であることを特徴とする [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかの抗原濃度測定又は検出用キット。

[ 6 ] 蛍光色素が、カルボキシテトラメチルローダミンであることを特徴とする [ 5 ] の抗原濃度測定又は検出用キット。

【 0 0 1 1 】

[ 7 ] 以下の工程 ( a ) ~ ( c ) を順次行うことを特徴とする抗原濃度測定又は検出方法：

( a ) 液相中で、抗原結合タンパク質と検査対象の抗原を接触させる工程であって、  
抗原結合タンパク質が、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り、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のいずれか一方又は両方が、抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド又は抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドに標識された状態でクエンチされる蛍光色素により標識され、抗原結合タンパク質と検査対象の抗原が抗原と抗原結合タンパク質の複合体を形成したときに、検査対象の抗原と抗原結合タンパク質の複合体が蛍光色素のクエンチャーとして作用する、工程；

( b ) 蛍光色素の蛍光を測定又は検出する工程；並びに

( c ) 抗原濃度を測定し又は抗原を検出する工程であって、

前記抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗原結合タンパク質が抗原と結合し抗原と抗原結合タンパク質の複合体を形成したときに蛍光色素のクエンチが解消されずより強くクエンチされることにより蛍光強度が減少することにより液相中の抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが負の相関関係にあることを指標として、測定又は検出された蛍光に基づいて検査対象の抗原の量を算出し、又は、検査対象の抗原を検出する工程。

[ 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抗原結合タンパク質が、scFv抗体であることを特徴とする [ 7 ] の抗原濃度測定又は検出方法。

[ 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抗原結合タンパク質が、Fab抗体、Fab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(ab')<sub>2</sub>抗体、及び完全体の抗体からなる群から選択されることを特徴とする [ 7 ] の抗原濃度測定又は検出方法。

[ 1 0 ] 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 [ 9 ] の抗原濃度測定又は検出方法。

[ 1 1 ] 抗原が、低分子化合物であることを特徴とする [ 7 ] ~ [ 1 0 ] のいずれかの抗原濃度測定又は検出方法。

[ 1 2 ] 抗原が、大麻成分であることを特徴とする [ 7 ] ~ [ 1 1 ] のいずれかの抗原濃度測定又は検出方法。

[ 1 3 ] 大麻成分がテトラヒドロカンナビノール (THC)、テトラヒドロカンナビノール酸 (THC-A) 及びカンナビノール (CBN) からなる群から選択されることを特徴とする [ 1 2 ] の抗原濃度測定又は検出方法。

【 0 0 1 2 】

[ 1 4 ] 受託番号NITE BP-01970で国際寄託されている、テトラヒドロカンナビノール (T

10

20

30

40

50

HC)又はその誘導体に結合する抗体を産生するハイブリドーマ。

[ 1 5 ] [ 1 4 ]のハイブリドーマが産生する、テトラヒドロカンナビノール (THC)又はその誘導体に結合するモノクローナル抗体。

[ 1 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抗原結合タンパク質が、[ 1 5 ]のモノクローナル抗体の抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと該モノクローナル抗体の抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗原結合タンパク質である、[ 1 ] ~ [ 6 ]のいずれかの抗原濃度測定又は検出用キット。

[ 1 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抗原結合タンパク質が、[ 1 5 ]のモノクローナル抗体の抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと該モノクローナル抗体の抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗原結合タンパク質である、[ 7 ] ~ [ 1 3 ]のいずれかの抗原濃度測定又は検出方法。

【発明の効果】

【 0 0 1 3 】

本発明の、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り、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抗原結合タンパク質を抗原と接触させたとき、抗原濃度が増加すると蛍光色素はクエンチされ、蛍光強度が低くなる。すなわち、蛍光色素の蛍光強度と抗原濃度が負の相関関係にある。この原理を利用した場合、上記抗原結合タンパク質を抗原と接触させ、結合させるだけで、抗原濃度を測定し、又は抗原を検出することができる。また、負の相関関係が成立している場合、検査対象物に目的の抗原があれば蛍光量が減少することによって検出され、検査対象物に目的の抗原がなく、何らかの不純物として蛍光成分があるときには蛍光量が増加するので区別が容易となる。

【 0 0 1 4 】

本発明の方法によれば、抗原結合タンパク質と抗原とを接触させて複合体を形成させることにより、標識した蛍光色素の蛍光強度の減少に基づいて、抗原濃度を測定し、あるいは抗原を検出することができる。従って、本発明の方法は、固相化工程や洗浄工程を必要とせず、高感度で抗原を検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 5 】

【図 1】本発明の抗原結合タンパク質の構造、及び抗原結合タンパク質を用いた測定法の原理を示す図である。

【図 2】ハイブリドーマA-04が産生するモノクローナル抗体のTHCA、THC及びCBNとの反応性を示す図である。

【図 3】Cy3で標識したBGPに結合するscFv型抗原結合タンパク質を用いたBGP測定結果を示す図である。

【図 4】EvoBlue10で標識したBGPに結合するscFv型抗原結合タンパク質を用いたBGP測定結果を示す図である。

【図 5】異色ダブルラベルFab型抗原結合タンパク質を用いたテトラヒドロカンナビノール (THC) 測定結果を示す図である。

【図 6】異色ダブルラベルFab型抗原結合タンパク質を用いたカンナビノール (CBN) 測定結果を示す図である。

【図 7】同色ダブルラベルFab型抗原結合タンパク質を用いたテトラヒドロカンナビノール (THC)、テトラヒドロカンナビノール酸 (THC - A) 及びカンナビノール (CBN) の測定結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、抗体軽鎖可変領域 (VL)を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域 (VH)を含むポリペプチドからなり、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

10

20

30

40

50

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ている抗原結合タンパク質を含む、抗原濃度測定又は検出用キットである。

また、本発明は上記抗原濃度測定又は検出用キットを用いた抗原の検出方法である。

【0017】

1. 抗原濃度測定又は検出用キット

抗体軽鎖可変領域は、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、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よい。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。

10

【0018】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドは、抗体軽鎖可変領域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、中でも抗体軽鎖可変領域にCを付与したポリペプチド等が好ましい。検査対象の抗原に応じて、抗原を認識し得る抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドを適宜作製することができる。

【0019】

抗体重鎖可変領域は、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、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よい。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。

20

【0020】

抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドは、抗体重鎖可変領域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、抗体重鎖可変領域に、抗体重鎖定常領域(CH1)や、さらにヒンジ部分やFc領域を付与したポリペプチドとすることができ、中でも抗体重鎖可変領域にCH1を付与したポリペプチド等が好ましい。検査対象の抗原に応じて、抗原を認識し得る抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドを適宜作製することができる。

30

【0021】

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は、複合体を形成することが好ましく、抗体軽鎖可変領域及び抗体重鎖可変領域に、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(CH1やCなど)の他、2量体を形成する一方を抗体軽鎖可変領域に他方を抗体重鎖可変領域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。

40

【0022】

本発明において、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抗原結合タンパク質と呼ぶ。また、該複合体は抗原に結合するという抗体が有する特性を有しているため、抗体分子と呼ぶこともできる。また、抗原結合タンパク質は抗体も含み、例えば、後述のscFv抗体(一本鎖抗体: single chain variable fragment)、Fab抗体、F(ab')<sub>2</sub>抗体等を含む。本発明において、scFv抗体や、Fab抗体をscFv型抗原結合タンパク質やFab型抗原結合タンパク質ということがある。

【0023】

本発明の抗原結合タンパク質は、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変

50

領域を含む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、本発明の蛍光標識された抗原結合タンパク質の機能を損なわない限りは、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。

#### 【0024】

また、本発明の抗原結合タンパク質は、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得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て使用されてもよい。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。本発明の抗原結合タンパク質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、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、本発明の抗原結合タンパク質としては、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Fab抗体や、Fab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(ab')<sub>2</sub>抗体や、完全体の抗体が好ましく、中でもFab抗体が最も好ましい。

#### 【0025】

また、本発明の抗体結合タンパク質は、抗体軽鎖可変領域と抗体重鎖可変領域とからなるscFv抗体（一本鎖抗体：single chain variable fragment）であってもよい。

#### 【0026】

scFv抗体及びFab抗体は、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド1つと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド1つからなり、F(ab')<sub>2</sub>抗体及び完全体の抗体は、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド2つと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド2つからなる。scFv抗体及びFab抗体において、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドのみが蛍光標識されていてもよく、抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドのみが蛍光標識されていてもよく、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標識されていてもよい。また、F(ab')<sub>2</sub>抗体及び完全体の抗体は、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド2つ及び抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド2つの計4つのポリペプチドからなるが、その蛍光標識のパターンとして、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド1つ、又は2つが標識されているもの、抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド1つ、又は2つが標識されているもの、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド1つと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド1つの2つのポリペプチドが標識されているもの、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド2つと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド1つの3つのポリペプチドが標識されているもの、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド1つと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド2つの3つのポリペプチドが標識されているもの、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド2つと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド2つの4つのポリペプチドが標識されているものがある。

#### 【0027】

本発明において、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドや、抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドや、これらのポリペプチドからなる複合体である抗原結合タンパク質や、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DNA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

10

20

30

40

50

リペプチドを発現させることができる。無細胞翻訳系において目的のポリペプチドの発現を行う場合は、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、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドや、抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドはProXタグやFLAGタグ、His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抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドや、抗体重鎖可変領域を含む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、前記抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体重鎖可変領域を含む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、4〜16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、例えばパバインや、ペプシンを用いて抗体を処理することにより、それぞれFab抗体や、F(ab')<sub>2</sub>抗体を作製することもできる。

10

20

## 【0028】

本発明の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抗原結合タンパク質において、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ている。いずれか一方が標識されている場合をシングルラベル抗原結合タンパク質（例えば、シングルラベルFab抗体等）と呼ぶ。また、両方が標識されている場合、同じ種類の蛍光色素でもよいし、別の種類の蛍光色素でもよい。本発明において、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、両方の蛍光色素が同じ種類である場合を同色ダブルラベル抗原結合タンパク質（例えば、同色ダブルラベルFab抗体）と呼び、異なる場合を異色ダブルラベル抗原結合タンパク質（例えば、異色ダブルラベルFab抗体）と呼ぶ。

30

## 【0029】

本発明の、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り、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抗原結合タンパク質は、抗原が結合していない状態で、標識蛍光色素がクエンチされていないか、又は弱くクエンチされている。抗体重鎖可変領域の第36番目、第47番目、第103番目（Kabatの番号付け系による）にはトリプトファン（W）残基が存在し、これらのトリプトファン残基はクエンチャーとして作用している（WO2011/061944号公報）。蛍光色素で標識した抗原結合タンパク質が抗原に結合していないとき、蛍光色素がトリプトファン残基の近傍に位置している場合、トリプトファン残基と相互作用して蛍光色素がクエンチ（消光）されており、弱い蛍光しか発生しない。一方、蛍光色素がトリプトファン残基の近傍に位置しておらず離れている場合、トリプトファン残基と相互作用しないので、蛍光色素はクエンチされず、蛍光を発生し得る。

40

## 【0030】

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抗原結合タンパク質が抗原と結合した場合、抗原と抗原結合タンパク質の複合体が蛍光色素にクエンチャーとして作用し、蛍光色素はさらにクエンチされ、蛍光色素が発生する蛍光の蛍光強度は弱くなる。この際、抗原結合タンパク質の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の標識に用いられた蛍光色素は、

50

抗原結合タンパク質の抗原結合ポケット中に位置し、重鎖可変領域のトリプトファンとより近接した位置に存在し、トリプトファンとの相互作用がより強くなり、クエンチされる。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で標識されている場合、両方の蛍光色素が抗原結合タンパク質の抗原結合ポケットに入り込み、2つの蛍光色素の間でも相互作用が生じ、蛍光色素間のクエンチング効果(H-dimer)が得られる。この際、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドの標識に用いた蛍光色素と抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドの標識に用いた蛍光色素が異なる蛍光色素であり、蛍光共鳴エネルギー移動のエネルギー供与体(ドナー)となる供与体色素とエネルギー受容体(アクセプター)となる受容体色素の組み合わせとなる場合、抗原結合タンパク質が抗原と結合したとき、両方の蛍光色素すなわちエネルギー供与体とエネルギー受容体の向きが変化し、エネルギー供与体が発するエネルギーからのエネルギー受容体への蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が生じなくなり、発生する蛍光の蛍光強度が弱くなる。

10

## 【0031】

すなわち、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り、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抗原結合タンパク質を用いて抗原を測定、検出する場合、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を得られ、クエンチが大きくなる。本発明において、蛍光色素は抗原と抗原結合タンパク質の複合体と疎水の相互作用や静電的相互作用等により相互作用し、クエンチの程度が強くなる。

20

## 【0032】

このように、本発明の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抗原結合タンパク質を用いて抗原濃度を測定し、又は抗原を検出する場合、抗原結合タンパク質に結合する抗原が多くなるほど、蛍光色素から発生する蛍光がクエンチされ、蛍光強度が低下する。すなわち、発生する蛍光強度は抗原濃度と負の相関関係にある。本発明に抗原結合タンパク質を、発生する蛍光強度が抗原濃度の負の相関関係にあるQ-body又はUQ-bodyと呼ぶこともできる。

## 【0033】

本発明の抗原結合タンパク質を構成する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ている場合であっても、抗原濃度と蛍光色素の蛍光強度が負の相関関係にある原理に基づいて適宜蛍光色素の種類を選択することができる。

30

## 【0034】

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、ATTO 390(商標名)、ATTO 425(商標名)、ATTO 465(商標名)、AT

40

50

TO488 (商標名)、ATTO 495 (商標名)、ATTO 520 (商標名)、ATTO 532 (商標名)、ATTO Rho6G (商標名)、ATTO 550 (商標名)、ATTO 565 (商標名)、ATTO Rho3B (商標名)、ATTO Rho11 (商標名)、ATTO Rho12 (商標名)、ATTO Thio12 (商標名)、ATTO 610 (商標名)、ATTO 611X (商標名)、ATTO 620 (商標名)、ATTO Rho14 (商標名)、ATTO 633 (商標名)、ATTO 647 (商標名)、ATTO 647N (商標名)、ATTO 655 (商標名)、ATTO Oxa12 (商標名)、ATTO 700 (商標名)、ATTO 725 (商標名)、ATTO 740 (商標名)、Alexa Fluor 350 (商標名)、Alexa Fluor 405 (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)、5TAMRA (商標名)、SFX (商標名)を挙げることができるが、中でも、Cy3、EvoBlue10、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

#### 【0035】

上記蛍光色素中、同色ダブルラベルに対しては、TAMRAとTAMRAの組合せが特に好ましく、異色ダブルラベルに対しては、TAMRAとCR110の組合せ及びTAMRAとATTO 655の組合せが特に好ましい。

#### 【0036】

なお、蛍光色素によっては、極性に応じ蛍光強度を変化させる極性感受性を有するものがある (M. Renard et al., J. Mol. Biol. (2002) 318, 429-442)。例えば、IANBD、CNBD、Acrylodan、5-IAF等が挙げられる。これらの蛍光色素で標識した抗体を用いて蛍光クエンチングに基づく測定を行う場合、抗原が結合することにより蛍光物質が溶媒から遮蔽され、蛍光色素がクエンチャーと接触する機会が減少することによりさらにクエンチが進む。本発明においては、上記のような極性感受性を有する蛍光色素は除外され、極性感受性に基づかないクエンチの原理により抗原を測定し又は検出する。

20

#### 【0037】

本発明において、蛍光色素により、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドや抗体重鎖可変領域を含む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 (Ellman 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2000-139468号公報)、N末端標識法 (米国特許第5,643,722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DNA又はmRNAを作製し、無細胞翻訳系を用いて該DNA又はmRNA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ブレッサー-tRNA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CGGGに拡張し、アミノ酸をコードするコドンをCGGGに置き換えたDNA又はmRNAを作製し、無細胞翻訳系を用いて該DNA又はmRNA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tRNA CGGG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、軽鎖可変領域を含むポリペプチド及び重鎖可変領域を含む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

30

40

50

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。

【0038】

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L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。

10

【0039】

本発明の抗原濃度測定又は検出用キットは、抗原濃度測定又は抗原の検出を目的とする。抗原濃度測定とは抗原濃度を定量することをいい、抗原の検出は抗原を定性的に測定することをいい、蛍光色素による可視化も含む。ここで可視化とは、抗原に蛍光色素で標識された抗原結合タンパク質を結合させることにより抗原の存在が蛍光により確認できるようにすることをいう。本発明においては、例えば、生体に標識抗原結合タンパク質を投与し、抗原と結合させることにより、蛍光強度が減少することを利用して抗原を可視化することができる。

【0040】

抗原としては、上記抗体重鎖可変領域ポリペプチド及び上記抗体軽鎖可変領域ポリペプチド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、低分子化合物等を挙げることができる。すなわち、本発明の方法において、検査対象である抗原はイムノアッセイ、すなわち抗原抗体反応を利用したアッセイで測定し得る抗原又は抗体である。抗原としては抗体を作製し得るものなら如何なる抗原でもよく、例えば、タンパク質、多糖類、脂質、糖脂質等が挙げられる。これらの物質を含む原生動物、真菌、細菌、マイコプラズマ、リケッチア、クラミジア、ウイルス、動物組織等も検出し得る。また、麻薬、爆薬、農薬、香料、公害物質等の低分子化合物を含む化学物質も測定対象となり得る。このような物質として、例えば、テトラヒドロカンナビノール (THC)、テトラヒドロカンナビノール酸 (THC-A)、カンナビノール (CBN)、カンナビジオール (CBD)等のカンナビノイドと呼ばれる大麻成分、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、ニバレノール、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が挙げることができる。テトラヒドロカンナビノール (THC)には、二重結合の位置異性体があり、<sup>8</sup>-THCと<sup>9</sup>-THCがある。THCという場合、<sup>8</sup>-THCも<sup>9</sup>-THCも含まれる。上記の物質は各物質の誘導体も含む。

20

30

40

【0041】

被験試料も限定されず、血液、血清、血漿、尿、唾液、髄液等の生体由来体液試料、培養上清、細胞抽出液、菌体抽出液、廃水や、アレルゲン等の動物組織由来物質、麻薬等が付着している可能性がある物質を紙等で拭った試料等が挙げられる。また、大麻成分等の麻薬や覚せい剤を含む物質が挙げられる。大麻成分を含む物質として、葉、茎、根、種及び花卉等のアサの植物の部分若しくはその植物片、又は葉、茎、根、種及び花卉等のアサの植物の部分から取れる樹液を圧縮して固形状の樹脂にした大麻加工品である大麻樹脂等が挙げられる。通常、植物の部分又はその植物片は、乾燥した状態で乾燥大麻として使用される。本発明においては、植物の部分若しくはその植物片である検査対象物としては、

50

乾燥大麻、特に乾燥大麻植物片が用いられる。

【0042】

本発明の抗原結合タンパク質を構成する抗体軽鎖可変領域ポリペプチド及び抗体重鎖可変領域ポリペプチドは、モノクローナル抗体由来のものを用いることができる。すなわち、検査対象である抗原を免疫原として用いて常法でモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得て該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドを利用することができる。また、前記ハイブリドーマより、抗体軽鎖可変領域をコードするDNA及び抗体重鎖可変領域をコードするDNAを得て、該DNAを用いてリコンビナントタンパク質として、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗原結合タンパク質を製造することもできる。

10

【0043】

ハイブリドーマの例として、抗テトラヒドロカンナビノール (THC) またはその誘導体に対する抗体を産生するハイブリドーマが挙げられる。なお、THC、THC-A及びCBNは構造が類似しており、免疫学的に交叉反応するので、抗THC抗体を用いることにより、THC-A及びCBNを検出することもできる。そのようなハイブリドーマの例としてハイブリドーマA-04が挙げられ、該ハイブリドーマA-04は、2014年11月20日付で、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) 特許微生物寄託センター (NITE Patent Microorganisms Depository) (日本国 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室) に受託番号NITE BP-01970 (「識別の表示」は、「A-04」) で国際寄託されている。

20

【0044】

本発明の抗原濃度測定又は検出用キットは、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り、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抗原結合タンパク質を含み、さらに、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、希釈液等の試薬等、プレート等の器具、取扱い説明書等を備えていてもよい。

【0045】

2. 本発明の抗原濃度測定又は検出用キットを用いた抗原の検出法

本発明の抗原濃度測定又は検出用キットを用いた抗原の検出の原理は以下のとおりである。

30

【0046】

(i) 本発明の抗原濃度測定又は検出用キットの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り、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抗原結合タンパク質と検査対象の抗原が含まれている可能性がある被験試料とを混合し接触させる。

【0047】

前記抗原結合タンパク質が抗原と結合する前の結合していない状態では、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を標識している蛍光色素はクエンチされていないか、または弱くクエンチされている。弱いクエンチは、蛍光色素が抗原結合タンパク質の重鎖可変領域のトリプトファン残基の近傍に位置し、該トリプトファン残基と相互作用することにより、抗原結合タンパク質がクエンチャーとして作用し生じる。一方、蛍光色素が蛍光結合タンパク質の重鎖可変領域のトリプトファン残基の近傍に位置しない場合は、蛍光色素はクエンチされない。

40

【0048】

被験試料中に検査対象である抗原が存在する場合、該抗原と抗原結合タンパク質が結合し複合体を形成する。抗原と抗原結合タンパク質が結合した場合、抗原と抗原結合タンパク質の複合体又は抗原が標識蛍光色素に対するクエンチャーとして作用し、蛍光色素はさらにクエンチされる。すなわち、蛍光色素は抗原と抗原結合タンパク質の複合体又は抗原

50

と疎水的相互作用や静電的相互作用等により相互作用し、抗原結合タンパク質の抗原結合ポケットに入り込み、抗体重鎖可変領域のトリプトファン残基との相互作用が強くなり、クエンチの程度が強くなる。または、抗原と蛍光色素の相互作用が強くなるためにクエンチの程度が強くなる。

【0049】

さらに、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抗原結合タンパク質では、蛍光色素間のクエンチング効果(H-dimer)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、クエンチが大きくなる。

10

【0050】

(ii) 蛍光色素の発する蛍光を測定し、蛍光強度の低下を検出することにより、抗原の存在を検出し、あるいは定量することができる。

【0051】

この際、予め抗原結合タンパク質と既知の量の抗原が含まれる被験試料を混合接触させ、その際の蛍光の変化を測定し、検量線を作成しておくことが好ましい。あるいは、検出を行う際に、複数の既知の量の抗原を含むコントロール試料を準備しておき、コントロール試料についても同時に測定を行い検量線を作成してもよい。測定された蛍光と検量線から被験試料中の抗原の量を算出することができる。測定された蛍光強度と被験試料中の抗原の量が負の相関関係にあり、蛍光強度を指標に、被検出抗原の量を測定することができる。

20

【0052】

図1に原理及び抗原結合タンパク質の構造を示す。図1Dは、本発明の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り、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抗原結合タンパク質の構造を示す模式図であり、1がscFv抗体、2がFab抗体、3がF(ab')<sub>2</sub>抗体、4が完全体の抗体を示す。図中、VL1、VL2と表示された円柱(それぞれ、黒、斜め線の円柱)は抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドを示し、VH1、VH2と表示された円柱(それぞれ、白、横線の円柱)は抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドを示す。また、Cと表示された縦線の円柱は抗体の定常領域を示し、Sを付した円の結合はジスルフィド結合を示す。図1Dの例では、1及び2において、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド1つのみが標識され、3及び4において、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド2つが標識されている。図1A、B及びCは標識されたFab抗体を用いて本発明の方法の原理を示す。図1Aは、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドのみが標識されたシングルラベル抗原結合タンパク質の例であり、図1Bは抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドが同じ蛍光色素で標識された同色ダブルラベル抗原結合タンパク質の例であり、図1Cは抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドが異なる蛍光色素(蛍光色素1及び蛍光色素2)で標識された異色ダブルラベル抗原結合タンパク質の例である。図1A、B及びCのa及びbは抗原が結合していない状態であり、aは蛍光色素が抗原結合タンパク質のトリプトファンと相互作用しておらずクエンチされていない状態を示し、bは蛍光色素が抗原結合タンパク質のトリプトファンと相互作用しており、抗原結合タンパク質がクエンチャーとして作用し弱くクエンチされている状態を示す。cは抗原が結合した状態を示し、蛍光色素が抗原と抗原結合タンパク質の複合体と相互作用し、抗原と抗原結合タンパク質の複合体がクエンチャーとして作用し強くクエンチされている状態を示す。

30

40

【0053】

本発明の抗原濃度測定又は検出用キットを用いた抗原の検出は、以下の工程で行うことができる。

【0054】

50

( a ) 液相中で、抗原結合タンパク質と検査対象の抗原を接触させる工程であって、

抗原結合タンパク質が、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り、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のいずれか一方又は両方が、抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド又は抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドに標識された状態でクエンチされる蛍光色素により標識され、抗原結合タンパク質と検査対象の抗原が抗原と抗原結合タンパク質の複合体を形成したときに、検査対象の抗原と抗原結合タンパク質の複合体が蛍光色素のクエンチャーとして作用する、工程；

( b ) 蛍光色素の蛍光を測定又は検出する工程；並びに

( c ) 抗原濃度を測定し又は抗原を検出する工程であって、

前記抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗原結合タンパク質が抗原と結合し抗原と抗原結合タンパク質の複合体を形成したときに蛍光色素のクエンチが解消されずより強くクエンチされることにより蛍光強度が減少することにより液相中の抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが負の相関関係にあることを指標として、測定又は検出された蛍光に基づいて検査対象の抗原の量を算出し、又は、検査対象の抗原を検出する工程。

【 0 0 5 5 】

本発明の方法によれば、蛍光強度の減少により、抗原の存在を検出することができ、蛍光強度を測定することより抗原を定量することができる。

【 0 0 5 6 】

本発明の方法によれば、抗原結合タンパク質と抗原とを接触させて複合体を形成させることにより、標識した蛍光色素の蛍光強度の減少に基づいて、抗原濃度を測定し、あるいは抗原を検出することができる。従って、本発明の方法は、固相化工程や洗浄工程を必要とせず、高感度で抗原を検出することができる。

【 0 0 5 7 】

本発明の抗原濃度測定又は検出用キットを用いた抗原の検出方法における蛍光の測定には、通常、蛍光検出に用いる光源や測定装置を用いることができる。光源としては励起光波長を照射できるものであればよく、具体的には水銀ランプ、キセノンランプ、LED（発光ダイオード）、レーザー光等が挙げられる。この際、適当な蛍光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。蛍光測定装置としては、例えば、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等を備えた蛍光顕微鏡等を利用することができる、例えば、MF20 / FluoroPoint-Light（オリンパス社製）やFMB10-III（日立ソフトウェアエンジニアリング社製）等が挙げられる。また、光源、照射システム、測定システムを備えた小型で持ち運び可能な蛍光検出装置を用いてもよい。このような小型の装置を用いることにより、被験試料を採取して実験室に運んで測定することなく、採取現場で抗原を検出することが可能になる。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。

【 0 0 5 8 】

また、本発明の抗原濃度測定又は検出用キットを用いた抗原の検出方法において、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ればよい。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を用い、TAMRAを用いた場合は励起光波長530nmと蛍光波長580nmを用い、ATTO655を用いた場合は励起光波長630nmと蛍光波長680nmを用いられればよい。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。

【 実施例 】

【 0 0 5 9 】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【 0 0 6 0 】

[ 実施例 1 ] 抗テトラヒドロカンナビノール (THC)ハイブリドーマの製造

1 . ハイブリドーマの製造

マウス系統 (BALB/c) にBSA結合THC抗原 (Genway Biotech社製) をアジュバンドと共に免疫し、血清力価が上昇後脾臓を摘出し、ミエローマ細胞NS-1株 (P3.NS-1/1.Ag4.1) とのPEG法 (40%) による細胞融合を実施した。さらにHAT培地による選択後、ELISAによる選抜を実施することで (2 に詳細を示す)、抗THC抗体 (IgG1, kappa) 産生ハイブリドーマを得た。得られたハイブリドーマA-04は、2014年11月20日付で、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) 特許微生物寄託センター (NITE Patent Microorganisms Depository) (日本国 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室) に受託番号NITE BP-01970 (「識別の表示」は、「A-04」) で国際寄託した。

【 0 0 6 1 】

2 . ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の検定

抗THC抗体の反応性を競合ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) により測定した。

(i) 96ウェルELISA用プレートに、THC-BSAの0.10M炭酸緩衝溶液 (pH 8.6) (100 ng/mL) を分注 (100  $\mu$ L/ウェル) して、室温で一夜放置した。

(ii) 溶液を吸引除去してプレートをPBSで3回洗浄し、2%スキムミルクを含むPBSを分注 (300  $\mu$ L/ウェル) して37 °Cで1時間放置した。

(iii) 溶液を吸引除去してプレートを0.05% (v/v) Tween 20を含むPBSで3回洗浄し、抗原固定化プレートを得た。

(iv) (iii)のプレートに、テトラヒドロカンナビノール(THC)又はその類似化合物(テトラヒドロカンナビノール酸 (THC-A) 又はカンナビノール(CBN))の50% (v/v)エタノール溶液 (25  $\mu$ L/ウェル) を分注した後、0.10%ゼラチンを含むPBSで適宜希釈したハイブリドーマA-04の培養上清 (100  $\mu$ L/ウェル) を混和し、37 °Cで1時間インキュベートした。

(v) 溶液を吸引除去してプレートをT-PBSで3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG (Fc特異的) 抗体 (1.6  $\mu$ g/100  $\mu$ L/ウェル) を添加し、37 °Cで30分間インキュベートした。

(vi) 再びプレートを0.05% (v/v) Tween 20を含むPBSで3回洗浄し、基質溶液 { o-PD (0.04%) 及びH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [0.06% (v/v)] を含むクエン酸・リン酸緩衝液 (pH 5.0) } (100  $\mu$ L/ウェル) を加えて室温で30分インキュベートした。

(vii) 酵素反応停止液 (1.0 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (100  $\mu$ L/ウェル) を加えて混和した後、490 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で測定した。

【 0 0 6 2 】

結果を図2に示す。図2に示すように、得られた抗体は、THCA、THC及びCBNに対して親和性を示した。

【 0 0 6 3 】

[ 実施例 2 ] scFv型抗原結合タンパク質を用いた測定

抗原タンパク質の作製法はW02011/061944に記載されており、該公報の記載に基づいて作製することが可能である。

【 0 0 6 4 】

1 . scFv型抗原結合タンパク質の作製

(発現ベクターの構築)

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1) をコードするDNA配列とBGPに対する抗体の重鎖可変領域 (VH; 配列番号2) を配列番号3のリンカーで連結したDNA配列の、N末端にアンバーコドンを含むProXタグ (翻訳されるとMSKQIEVNXSNET (配列番号3)) のDNA配列を付与し、さらに、C末端に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。構築した発現ベクターは、scFvのN末端にProXタグ (アンバー) が、C末端にHisタグが、それぞれ付加されるよう設計されている。

【 0 0 6 5 】

10

20

30

40

50

( scFv抗体の合成 )

RYTS ( 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 6 6 】

標識に用いて蛍光色素は、Cy3及びEvoBlue10であった。

得られた蛍光標識scFv型抗原結合タンパク質は図1のD-1に示す構造を有している。

【 0 0 6 7 】

## 2 . 抗原の測定

1 . で得られた蛍光標識scFv型抗原結合タンパク質 ( 320 n M , 1.25 μ L ) と、抗原であるBGP ( 0 , 0.11 , 1.1 , 11 , 110 , 1100 , 11000 n M ) とを、1 % BSAを含むPBS ( + 0.05 % Tween20 ) で計50 μ L になるように調製した。これらの溶液を蛍光プレートリーダー ( SpectraMax Paradigm ; モレキュラーデバイス社製 ) を用いて蛍光強度測定を行った。Cy3標識scFvを使用した場合は、励起波長 ( Ex ) は530nmにセットし、蛍光波長 ( Em ) 580nmでの蛍光強度を測定した。EvoBlue10標識scFvを使用した場合は、励起波長 ( Ex ) は630nmにセットし、蛍光波長 ( Em ) 680nmでの蛍光強度を測定した。

【 0 0 6 8 】

Cy3標識scFvを使用した場合の結果を図3に、EvoBlue10標識scFvを使用した場合の結果を図4に示す。図3及び4に示すように、抗原 ( BGP ) の非存在下では、蛍光色素はクエンチされておらず、蛍光を発していたが、抗原濃度が高くなるにつれ、蛍光色素がクエンチされ、蛍光強度は低下した。図に示すように、抗原濃度と蛍光強度の間には負の相関関係が認められた。

【 0 0 6 9 】

[ 実施例 3 ] Fab型抗原結合タンパク質を用いた測定

## 1 . Fab型抗原結合タンパク質

( 発現ベクターの構築 )

テトラヒドロカンナビノール ( THC ) に対する抗体の軽鎖可変領域 ( VL ; 配列番号 4 ) と抗体軽鎖定常領域 ( C ; 配列番号 5 ) 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 ( 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MSKQIEVNFSNET ; 配列番号 6 ) のDNA配列を付与し、さらに、C末端にリンカー ( 配列番号 7 ) 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THCに対する抗体の重鎖可変領域 ( VH ; 配列番号 8 ) と抗体重鎖定常領域 ( CH1 ; 配列番号 9 ) 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MSKQIEVNXSNET ( X は蛍光標識アミノ酸 ) ; 配列番号 1 0 ) のDNA配列を付与し、さらに、C末端にリンカー ( 配列番号 7 ) 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。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。

【 0 0 7 0 】

( Fab型抗原結合タンパク質の合成 )

反応液 ( 60 μ L ) は、3 μ LのEnzyme Mix、0.6 μ LのMethionine、30 μ Lの2 × Reaction Mix、20 μ LのE-coli Lysate、2 μ Lの2種類のplasmid DNA ( 各200ng ) 、3 μ Lの蛍光標識アミノアシル - tRNAamber ( 480pmol ) 、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 - tRNA ( TAMRA-X-AF-tRNAamber、CR110-X-AF-tRNAamber、及びATTO655-X-AF-tRNAamber ) 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、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.

10

20

30

40

50

5  $\mu$ L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) で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。

#### 【0071】

( 蛍光標識Fab型抗原結合タンパク質の精製 )

合成した蛍光標識Fab型抗原結合タンパク質は、抗FLAG M2アフィニティゲル (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 (60  $\mu$ L) を、抗FLAG M2アフィニティゲルを入れたカラムヘアプライし、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200  $\mu$ LのElute buffer (20mM Phosphate buffer (pH7.4) /0.5M NaCl/100  $\mu$ g 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200  $\mu$ L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。

#### 【0072】

得られた蛍光標識Fab型抗原結合タンパク質は以下の4種類であった。最初のアルファベット4文字表記はそれぞれの略称である。

##### (i) HTLAタイプ

TAMRAで標識された抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドとATTO655で標識された抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗原結合タンパク質 (異色ダブルラベル)

##### (ii) HALTタイプ

ATTO655で標識された抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドとTAMRAで標識された抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗原結合タンパク質 (異色ダブルラベル)

##### (iii) HTLCタイプ

TAMRAで標識された抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドとCR110で標識された抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗原結合タンパク質 (異色ダブルラベル)

##### (iv) HCLTタイプ

CR110で標識された抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドとTAMRAで標識された抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗原結合タンパク質 (異色ダブルラベル)

#### 【0073】

### 2. 抗原の測定

1. で得られた蛍光標識Fab型抗原結合タンパク質 (320 nM、1.25  $\mu$ L) と、抗原であるテトラヒドロカンナビノール (THC) 又はその類似化合物であるカンナビノール (CBN) (0、0.01、0.1、1、10、100  $\mu$ g/mL) とを、1%BSAを含むPBS (+0.05%Tween20) で計50  $\mu$ Lになるように調製した。これらの溶液を蛍光プレートリーダー (SpectraMax Paradigm; モレキュラーデバイス社製) を用いて蛍光強度測定を行った。CR110蛍光標識抗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蛍光色素標識抗体を使用した場合は、励起波長 (Ex) は530nmにセットし、蛍光波長 (Em) 580nmでの蛍光強度を測定した。ATTO655蛍光色素標識抗体を使用した場合は、励起波長 (Ex) は630nmにセットし、蛍光波長 (Em) 680nmでの蛍光強度を測定した。

#### 【0074】

HTLAタイプ、HALTタイプ、HTLCタイプ及びHCLTタイプの抗原結合タンパク質を用いたテトラヒドロカンナビノール (THC) の測定結果を図5に、カンナビノール (CBN) の測定結

果を図6に示す。

【0075】

図5及び6に示すように、抗原の非存在下では、蛍光色素はクエンチされておらず、蛍光を発していたが、抗原濃度が高くなるにつれ、蛍光色素がクエンチされ、蛍光強度は低下した。図に示すように、抗原濃度と蛍光強度の間には負の相関関係が認められた。HTLA、HALT、HTLC及びHCLTの中では、抗原非存在下での蛍光強度と抗原が高濃度で存在するときの蛍光強度の差が大きいHTLA及びHCLTが良好であった。

【0076】

[実施例4] Fab型抗原結合タンパク質を用いた測定

1. Fab型抗原結合タンパク質

(発現ベクターの構築)

テトラヒドロカンナビノール(THC)に対する抗体の軽鎖可変領域(国際寄託「A-04」)と抗体軽鎖定常領域(C ; 配列番号5)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(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MSKQIEVNFNET; 配列番号6)のDNA配列を付与し、さらに、C末端にリンカー(配列番号7)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THCに対する抗体の重鎖可変領域(国際寄託「A-04」)と抗体重鎖定常領域(CH1; 配列番号9)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MSKQIEVNXNET(Xは蛍光標識アミノ酸); 配列番号10)のDNA配列を付与し、さらに、C末端にリンカー(配列番号7)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。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。

【0077】

(Fab型抗原結合タンパク質の合成)

反応液(60µL)は、3µLのEnzyme Mix、0.6µLのMethionine、30µLの2×Reaction Mix、20µLのE-coli Lysate、2µLの2種類のplasmid DNA(各200ng)、3µLの蛍光標識アミノアシル-tRNA<sup>amber</sup>(480pmol)、1.4µL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-tRNA(TAMRA-X-AF-tRNA<sup>amber</sup>)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、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)で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。

【0078】

(蛍光標識Fab型抗原結合タンパク質の精製)

合成した蛍光標識Fab型抗原結合タンパク質は、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へアプライし、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へアプライした。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

10

20

30

40

50

.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。

【0079】

得られた蛍光標識 Fab 型抗原結合タンパク質は以下のものであった。最初のアルファベット4文字表記はそれぞれの略称である。

(v) HTLTタイプ

TAMRAで標識された抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドとTAMRAで標識された抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗原結合タンパク質 (同色ダブルラベル)

10

【0080】

得られた蛍光標識Fab型抗原結合タンパク質は図1のD-2に示す構造を有している。

また、図7にHTLTタイプの抗原結合タンパク質を用いて、テトラヒドロカンナビノール (THC)、テトラヒドロカンナビノール酸 (THC-A) 及びカンナビノール (CBN) を測定した結果を示す。

【0081】

図7に示すように、テトラヒドロカンナビノール (THC)、テトラヒドロカンナビノール酸 (THC-A) 及びカンナビノール (CBN) のいずれの抗原とも反応性が認められた。また、抗原の非存在下では、蛍光色素はクエンチされておらず、蛍光を発していたが、抗原濃度が高くなるにつれ、蛍光色素がクエンチされ、蛍光強度は低下した。図に示すように、抗原濃度と蛍光強度の間には負の相関関係が認められた。

20

【産業上の利用可能性】

【0082】

本発明の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り、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抗原結合タンパク質を含む、抗原濃度測定又は検出用キットを用いることにより、低分子化合物等の抗原を固相化工程や洗浄工程を必要とすることなく、高感度で検出することができる。

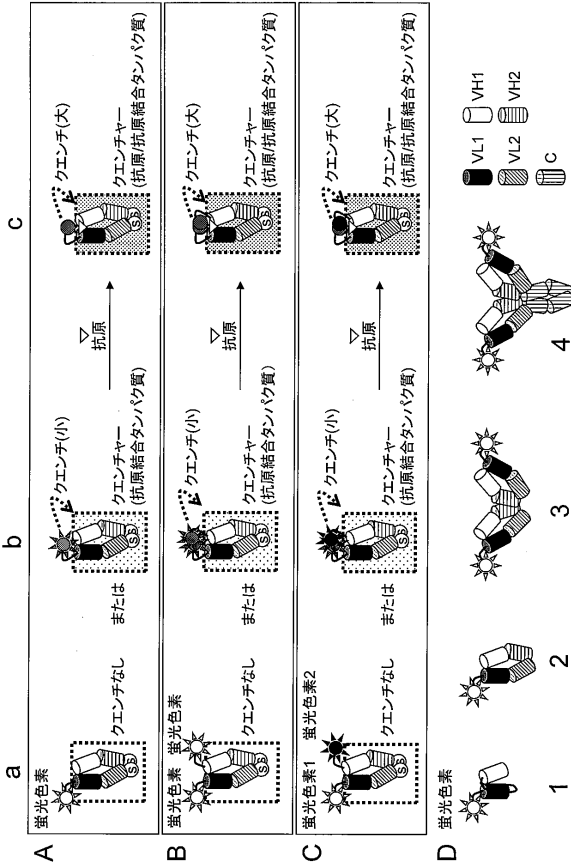
【配列表フリーテキスト】

30

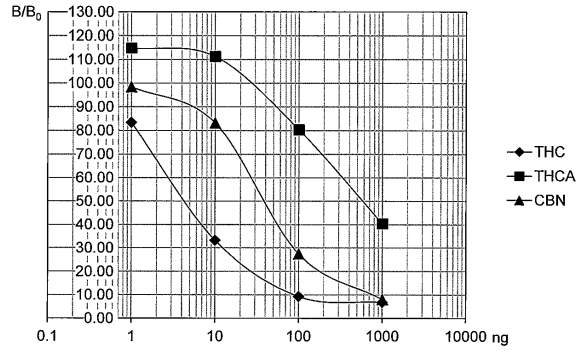
【0083】

配列番号1~10 合成

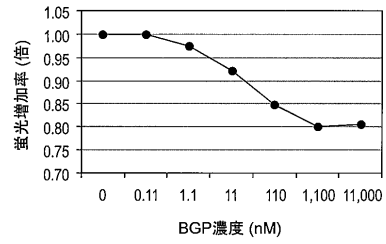
【 図 1 】



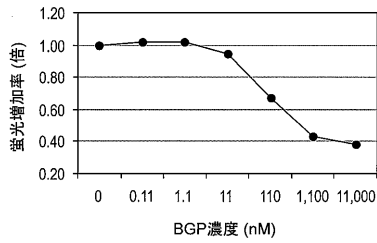
【 図 2 】



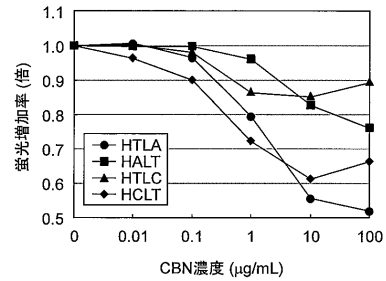
【 図 3 】



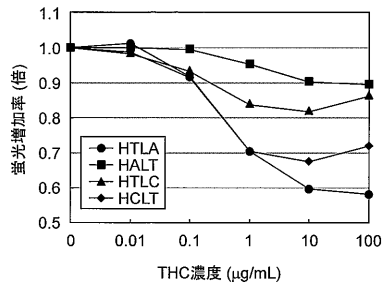
【 図 4 】



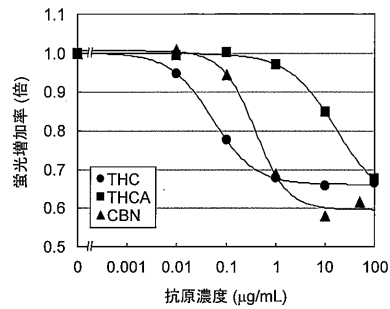
【 図 6 】



【 図 5 】



【 図 7 】



【配列表】

0005949890000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 21/64 C

- (72)発明者 齋木 富士男  
神奈川県川崎市川崎区南渡田町1番12号 THINK研究C棟5階 ウシオ電機株式会社内
- (72)発明者 小林 典裕  
兵庫県神戸市東灘区本山北町四丁目19番1号 神戸薬科大学生命分析化学研究室内
- (72)発明者 山根 亨介  
神奈川県川崎市川崎区南渡田町1番12号 THINK研究C棟5階 ウシオ電機株式会社内

審査官 大瀧 真理

- (56)参考文献 特開平2 - 195256 (JP, A)  
国際公開第2013/065314 (WO, A1)  
国際公開第2015/122484 (WO, A1)  
UEDA Hiroshi, DONG Jinhua, From fluorescence polarization to Quenchbody: Recent progresses in fluorescent reagentless biosensors, Biochimica et Biophysica Acta, 2014年6月13日, Vol.1844, p.1951-1959  
NIEMI Merja H. et al., A Structural Insight into the Molecular Recognition of a (-)-9-Tetrahydrocannabinol and the Develo, Journal of Molecular Biology, 2010年5月26日, Vol.400, p.803-814  
TAN Chongxiao et al., Direct detection of 9-tetrahydrocannabinol in saliva using a novel homogeneous competitive immunoassay, Analytica Chimica Acta, 2009年11月14日, Vol.658, p.187-192  
LI Taihua et al., Label-free homogeneous FRET immunoassay for the detection of mycotoxins that utilizes quenching of t, Biosensors and Bioelectronics, 2012年11月2日, vol.42, p.403-408

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 33/48 - 33/98

G 0 1 N 21/64

G 0 1 N 21/78

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 使用含有含有荧光标记的抗体可变区的多肽的抗原结合蛋白的荧光免疫测定   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP5949890B2</a>   | 公开(公告)日 | 2016-07-13 |
| 申请号            | JP2014261183  | 申请日     | 2014-12-24 |
| [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         | 阿部亮二<br>斎木富士男<br>小林典裕<br>山根亨介   |         |            |
| 发明人            | 阿部 亮二<br>斎木 富士男<br>小林 典裕<br>山根 亨介   |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/542 G01N33/53 G01N33/577 G01N21/78 G01N21/64   |         |            |
| CPC分类号         | G01N21/64 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/542 G01N33/577   |         |            |
| FI分类号          | G01N33/542.A G01N33/53.J G01N33/53.G G01N33/577.B G01N21/78.C G01N21/64.C   |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/BA17 2G043/CA04 2G043/DA05 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/FA06 2G043/KA02 2G043/LA01 2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/CA23 2G054/CA30 2G054/EA03 2G054/EA07 2G054/EB02 2G054/GA03 2G054/GB02 |         |            |
| 其他公开文献         | JP2016121919A   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

|   |           |                               |                       |                   |           |
|---|-----------|-------------------------------|-----------------------|-------------------|-----------|
| <b>摘要(译)</b><br>A作为一个指标, 该荧光染料的荧光强度和抗原浓度在负相关, 抗原测量或检测试剂盒允许抗原浓度和抗原测量或检测方法的使用该试剂盒的测定提供。 它包括多肽, 其包含一种多肽和包含A抗体轻链可变区的抗体重链可变区, 无论是包含多肽和包含所述抗体的轻链可变区的抗体重链可变区的多肽中的一个或两者含有标记有荧光染料, 抗原浓度测量或检测试剂盒的抗原结合蛋白, 当待检测的抗原结合蛋白, 以形成与抗原结合的复合物, 抗原和抗原结合蛋白的复合物是荧光染料的猝灭剂, 有抗原的浓度和在负相关的液相中的荧光染料的荧光强度, 荧光强度通过如下事实减少了所述荧光染料更强烈猝灭时所形成的抗原与抗原-结合蛋白的复合物并且, 其特征在于所述抗原的浓度和在液相中的荧光染料作为指示其处于负相关, 以允许基于测量或检测荧光测定或抗原的抗原浓度的可视化的荧光强度抗原浓度测量或检测试剂盒。 【选择图】无 | (21) 出願番号 | 特願2014-261183 (P2014-261183)  | (73) 特許権者             | 000102212         |           |
|   | (22) 出願日  | 平成26年12月24日 (2014.12.24)      |                       | ウシオ電機株式会社         |           |
|   | (65) 公開番号 | 特開2016-121919 (P2016-121919A) |                       | 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 |           |
|   | (43) 公開日  | 平成28年7月7日 (2016.7.7)          |                       | (74) 代理人          | 100091096 |
|   | 審査請求日     | 平成28年3月28日 (2016.3.28)        |                       | 弁理士 平木 祐輔         |           |
|   | 微生物の受託番号  | NITE BP-01970                 |                       | (74) 代理人          | 100118773 |
|   |           |                               |                       | 弁理士 藤田 節          |           |
|   | 早期審査対象出願  |                               |                       | (74) 代理人          | 100111741 |
|   |           |                               |                       | 弁理士 田中 夏夫         |           |
|   |           |                               |                       | (72) 発明者          | 阿部 亮二     |
|   |           |                               | 神奈川県川崎市川崎区南渡田町1番12号   |                   |           |
|   |           |                               | THINK研究棟5階 ウシオ電機株式会社内 |                   |           |