

(19) 日本国特許庁 (JP)

再 公 表 特 許 (A1)

(11) 国際公開番号

W02018/052041

発行日 令和1年7月25日 (2019.7.25)

(43) 国際公開日 平成30年3月22日 (2018.3.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/06 (2006.01)	C 1 2 N 15/06 1 0 0	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/42 (2006.01)	C 0 7 K 16/42 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/16 (2006.01)	C 1 2 N 5/16	
C 0 7 K 17/00 (2006.01)	C 0 7 K 17/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2018-539760 (P2018-539760)	(71) 出願人	503359821
(21) 国際出願番号	PCT/JP2017/033126		国立研究開発法人理化学研究所
(22) 国際出願日	平成29年9月13日 (2017.9.13)		埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
(31) 優先権主張番号	特願2016-179944 (P2016-179944)	(71) 出願人	000162478
(32) 優先日	平成28年9月14日 (2016.9.14)		協和メデックス株式会社
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		東京都中央区晴海一丁目 8 番 1 0 号
		(74) 代理人	100106909
			弁理士 棚井 澄雄
		(74) 代理人	100188558
			弁理士 飯田 雅人
		(74) 代理人	100147267
			弁理士 大槻 真紀子
		(74) 代理人	100181722
			弁理士 春田 洋孝
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリンG抗体

(57) 【要約】

コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合し、コアフコースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒト免疫グロブリンG (ヒトIgG) には結合しないことを特徴とする、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片、該抗体又は該抗体断片を用いる、コアフコシル化ヒトIgGの精製方法、該抗体又は該抗体断片を用いる、測定方法、及び、該抗体又は該抗体断片を用いる、測定試薬を提供する。

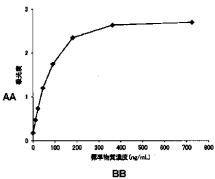


FIG. 14:
AA Light absorbance
BB Standard substance concentration (ng/mL)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コアフコースが結合している N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト免疫グロブリン G に結合し、コアフコースが結合していない N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト免疫グロブリン G には結合しないことを特徴とする、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片。

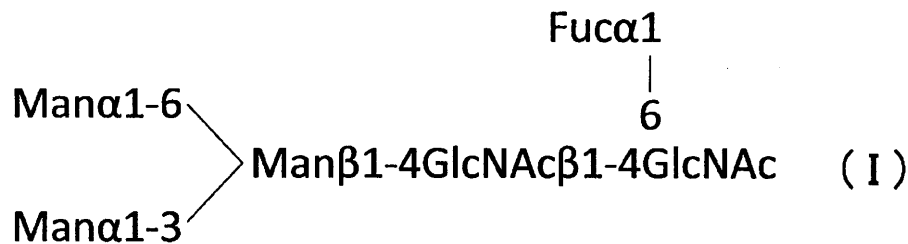
【請求項 2】

コアフコースが結合している N 結合型糖鎖が、フコースが還元末端 GlcNAc と α 1 - 6 結合している N 結合型糖鎖である、請求項 1 に記載の抗体又は該抗体断片。

【請求項 3】

コアフコースが結合している N 結合型糖鎖が、下記一般式 (I) で表される糖鎖を含む N 結合型糖鎖である、請求項 1 又は 2 に記載の抗体又は該抗体断片。

【化 1】



【請求項 4】

コアフコースが結合している N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト免疫グロブリン G が、自己抗原、同種抗原、ウイルス由来抗原、及び、細菌由来抗原からなる群より選ばれる少なくとも一種の抗原と結合するヒト免疫グロブリン G である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体又は該抗体断片。

【請求項 5】

抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体又は該抗体断片。

【請求項 6】

受託番号 N I T E B P - 0 2 3 4 2 として寄託されているハイブリドーマにより産生される、請求項 5 に記載の抗体又は該抗体断片。

【請求項 7】

請求項 5 に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 8】

受託番号 N I T E B P - 0 2 3 4 2 として寄託されているハイブリドーマ。

【請求項 9】

以下の工程を含有することを特徴とする、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体の製造方法。

(1) コアフコースが結合している N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト免疫グロブリン G 又はその F c 領域断片を免疫原として用いて、非ヒト動物に免疫する工程；

(2) 工程 (1) で免疫した非ヒト動物より得られる抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合し、ハイブリドーマを得る工程；

(3) 工程 (2) で得られるハイブリドーマを培養する工程；

(4) 工程 (3) で得られた培養物から、コアフコースが結合している N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト免疫グロブリン G に結合し、コアフコースが結合していない N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト免疫グロブリン G には結合しない、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程；

(5) 工程 (4) で選択されたハイブリドーマを培養し、当該培養物から、コアフコースが結合している N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト免疫グロブリン G に結合し、コアフコ

10

20

30

40

50

ースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒト免疫グロブリンGには結合しない、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリンG抗体を採取する工程。

【請求項10】

非ヒト動物が、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子が欠損した非ヒト動物である、請求項9に記載の製造方法。

【請求項11】

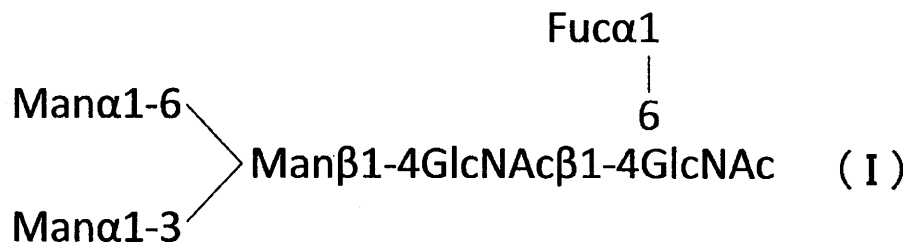
コアフコースが結合しているN結合型糖鎖が、フコースが還元末端GlcNAcと $\alpha 1-6$ 結合しているN結合型糖鎖である、請求項9又は10に記載の製造方法。

【請求項12】

コアフコースが結合しているN結合型糖鎖が、下記一般式(I)で表される糖鎖を含むN結合型糖鎖である、請求項9～11のいずれか一項に記載の製造方法。

10

【化2】



20

【請求項13】

請求項1～6のいずれか一項に記載の抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリンG抗体又は該抗体断片を用いることを特徴とする、試料中のコアフコシル化ヒト免疫グロブリンGの測定方法。

【請求項14】

以下の工程を含有する、請求項13に記載の測定方法。

(1) 試料と、請求項1～6のいずれか一項に記載の抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリンG抗体又は該抗体断片とを反応させて、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリンG抗体又は該抗体断片とコアフコシル化ヒト免疫グロブリンGの免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程(1)で生成した免疫複合体と、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒト免疫グロブリンGに結合する抗体とを反応させて、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリンG抗体又は該抗体断片、コアフコシル化ヒト免疫グロブリンG、及び、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒト免疫グロブリンGに結合する抗体の免疫複合体を生成させる工程；

30

(3) 工程(2)で生成した免疫複合体を測定する工程。

【請求項15】

以下の工程を含有する、請求項13に記載の測定方法。

(1) 試料と、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒト免疫グロブリンGに結合する抗体とを反応させて、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒト免疫グロブリンGに結合する抗体とコアフコシル化ヒト免疫グロブリンGの免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程(1)で生成した免疫複合体と、請求項1～6のいずれか一項に記載の抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリンG抗体又は該抗体断片とを反応させて、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒト免疫グロブリンGに結合する抗体、コアフコシル化ヒト免疫グロブリンG、及び、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリンG抗体又は該抗体断片の免疫複合体を生成させる工程；

40

(3) 工程(2)で生成した免疫複合体を測定する工程。

【請求項16】

以下の工程を含有する、請求項13に記載の測定方法。

(1) 試料を、コアフコシル化ヒト免疫グロブリンGの競合物質に標識が結合した標識化競合物質、及び、不溶性担体上に固定化された請求項1～6のいずれか一項に記載の抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリンG抗体又は該抗体断片と反応させ、該不溶性担体上に、

50

抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片と標識化競合物質との免疫複合体、及び、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片とコアフコシル化ヒト免疫グロブリン G との免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程(1)で該不溶性担体上に生成した、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片と標識化競合物質の免疫複合体における標識化競合物質を測定する工程。

【請求項 17】

以下の工程を含有する、請求項 13 に記載の測定方法。

(1) 試料を、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体、又は該抗体断片及び、不溶性担体上に固定化された、コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G の競合物質と反応させ、該不溶性担体上に、競合物質と抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片との免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程(1)で該不溶性担体上に生成した免疫複合体を測定する工程。

【請求項 18】

以下の工程を含有する、請求項 13 に記載の測定方法。

(1) 試料と、コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G が反応する抗原とを反応させて、抗原とコアフコシル化ヒト免疫グロブリン G の免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程(1)で生成した免疫複合体と、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片とを反応させて、抗原、コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G、及び、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片の免疫複合体を生成させる工程；

(3) 工程(2)で生成した免疫複合体を測定する工程。

【請求項 19】

以下の工程を含有する、請求項 13 に記載の測定方法。

(1) 試料と、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片とを反応させて、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片とコアフコシル化ヒト免疫グロブリン G との免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程(1)で生成した免疫複合体と、コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G が反応する抗原とを反応させて、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片、コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G、及び、抗原の免疫複合体を生成させる工程；

(3) 工程(2)で生成した免疫複合体を測定する工程。

【請求項 20】

コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G が反応する抗原が、自己抗原、同種抗原、ウイルス由来抗原、及び、細菌由来抗原からなる群より選ばれる少なくとも一種の抗原である、請求項 18 又は 19 に記載の測定方法。

【請求項 21】

請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体または該抗体断片を含むことを特徴とする、試料中のコアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 測定試薬。

【請求項 22】

さらに、N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト免疫グロブリン G に結合する抗体を含む、請求項 21 に記載の測定試薬。

【請求項 23】

不溶性担体上に固定化された請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片、及び、コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G の競合物質に標識が結合した標識化競合物質を含むことを特徴とする、試料中のコアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 測定試薬。

【請求項 24】

不溶性担体上に固定化されたコアフコシル化ヒト免疫グロブリン G の競合物質、及び、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該

10

20

30

40

50

抗体断片を含むことを特徴とする、試料中のコアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 測定試薬。

【請求項 25】

さらに、コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G が反応する抗原を含む、請求項 21 に記載の測定試薬。

【請求項 26】

コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G が反応する抗原が、自己抗原、同種抗原、ウイルス由来抗原、及び、細菌由来抗原からなる群より選ばれる少なくとも一種の抗原である、請求項 25 に記載の測定試薬。

【請求項 27】

請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片を用いることを特徴とする、試料中のコアフコシル化ヒト免疫グロブリン G の精製方法。

【請求項 28】

以下の工程を含む、請求項 27 に記載の精製方法。

- (1) 試料と、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片とを反応させて、コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G と抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片との免疫複合体を生成させる工程；
- (2) 工程 (1) で生成した免疫複合体から、コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G を遊離させる工程；
- (3) 工程 (2) で遊離したコアフコシル化ヒト免疫グロブリン G を回収する工程。

【請求項 29】

抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片が不溶性担体上に固定化されている、請求項 27 又は 28 に記載の精製方法。

【請求項 30】

請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体の製造方法、コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G の測定方法、コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 測定試薬、コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G の精製方法、及び、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体に関する。

本願は、2016 年 9 月 14 日に、日本に出願された特願 2016 - 179944 号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

ヒトの免疫グロブリン G (以下、IgG と記載する) は、獲得免疫機構において成熟した B 細胞が血液中に分泌する糖蛋白質である。ヒト IgG は 2 本の軽鎖 (L 鎖) と 2 本の重鎖 (H 鎖) からなる 4 量体で、4 種類のサブクラス (IgG 1、2、3、4) が存在する。2 本の重鎖の C 末端側ドメイン (C_H2 ドメイン及び C_H3 ドメイン) が構成する Fc 領域 (定常領域とも呼ぶ) に含まれる重鎖 297 番目のアスパラギン (N) には、いずれのサブクラスにおいても翻訳後修飾として糖鎖が付加される (図 1)。この IgG の Fc 領域に含まれる重鎖 297 番目のアスパラギン (N) に結合した糖鎖を N 結合型糖鎖という。ヒト IgG Fc 領域の N 結合型糖鎖は、2 個の N - アセチルグルコサミンと 3 個のマンノースからなる 5 糖構造を核とし、これに N - アセチルグルコサミン、ガラクトース、シアル酸、フコースが付加される複合型 2 分岐糖鎖であり、各単糖の付加の有無や付

10

20

30

40

50

加数、付加される位置の違いによって構造的多様性を示す（非特許文献 1 参照）。

【0003】

Fc 領域に存在する N 結合型糖鎖の構造は、IgG の機能に重要な影響を与えることが知られている。例えば、ヒト IgG Fc 領域の N 結合型糖鎖には、297 番目のアスパラギンに直接結合している N - アセチルグルコサミン（還元末端 GlcNAc）の 6 位と、フコースの 1 位とが α 1 - 6 結合した糖鎖構造が存在する（このフコースをコアフコースと呼ぶ）。このコアフコースが失われると、細胞傷害性リンパ球の 1 種であるナチュラルキラー細胞が細胞表面に発現する Fc γ レセプター III（別名 CD16）と、IgG Fc 領域との相互作用が強くなる（非特許文献 2 参照）。その結果、ヒト IgG が結合した標的（がん細胞、ウイルス感染細胞など）に対して、このヒト IgG Fc 領域に結合したナチュラルキラー細胞が発揮する抗体依存性細胞傷害（Antibody - dependent cell - mediated cytotoxicity、以下、ADCC と記載する）活性が劇的に増強される（非特許文献 3、4 参照）。

10

【0004】

この現象は ADCC 活性を薬効機序とした抗体医薬の開発に利用されており、コアフコースを持たないヒト IgG（以下、非コアフコシル化ヒト IgG と記載する。）の様々な生産方法が報告されている。例えば、コアフコースの付加に関与する酵素である α 1 - 6 フコシルトランスフェラーゼ（以下、Fut8 と記載する。）をコードするすべての遺伝子を破壊した細胞を抗体生産細胞として利用する方法（非特許文献 5 参照）、Fut8 をコードするメッセンジャー RNA を small interfering RNA（siRNA）で破壊する方法（非特許文献 6 参照）、抗体産生細胞を糖鎖修飾酵素（ α マンノシダーゼ I）の阻害剤存在下で培養し、結果的に非コアフコシル化ヒト IgG を得る方法（非特許文献 7 参照）、パイセクティング N - アセチルグルコサミンの付加を促進する酵素（ β 1 - 4 N - アセチルグルコサミンルトランスフェラーゼ）を抗体産生細胞に人工的に発現させ、非コアフコシル化ヒト IgG を得る方法（非特許文献 8 参照）などが挙げられる。

20

【0005】

一方、コアフコシル化ヒト IgG の量が、疾患の有無やその病態の度合いに伴い変動する事が知られている。例えば Kratz らは、男性不妊を呈する膿精子症（leukocytospermia）の患者において、精漿中に存在するコアフコシル化ヒト IgG 量が減少していることを報告し、この変化が膿精子症の診断に有用である可能性を示唆している（非特許文献 9 参照）。また Kodar らは、胃がん患者のがん進行度（がんステージ）に応じたコアフコシル化ヒト IgG 量の変動を見出し、コアフコースを含むヒト IgG の糖鎖構造の変化が、胃がんの悪性度や予後を予測する指標として有用である可能性を示唆している（非特許文献 10 参照）。さらに Kapur らは、妊娠中の母体由来の抗体が胎児に移行し、胎児が提示する同種抗原（alloantigen）に反応することで発症する新生児同種免疫性血小板減少症（Neonatal alloimmune thrombocytopenia、NAIT）、及び新生児溶血性疾患（Hemolytic disease of the newborn、HDN）において、同種抗原を認識する母体由来の IgG のコアフコースが特異的かつ顕著に減少していること、またこのコアフコース減少の程度が病態の重篤度と相関することを見出し、各疾患の発症予測や重篤度を予測する指標として有用であることを報告している（非特許文献 11、12 参照）。

30

40

【0006】

現在、研究及び臨床の現場において、コアフコシル化ヒト IgG の測定は、質量分析機や高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた方法（特許文献 1、2 参照）、あるいはコアフコースに親和性を示すレクチンを用いた方法（特許文献 3、4 参照）によって行われている。しかしながら、前者では、高額な測定機を準備する必要があり、また、糖鎖分解酵素や蛋白質分解酵素による試料中のコアフコシル化ヒト IgG の分解等の試料の前処理が必要であり、かつ、操作が非常に煩雑であり、効率性に欠けるという問題があり

50

、後者では、レクチンのコアフコースに対する特異性が低いため、コアフコシル化ヒト Ig G の高感度測定、及び、効率的精製は難しいという問題がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第2011/026640号

【特許文献2】国際公開第2011/039150号

【特許文献3】国際公開第2010/010674号

【特許文献4】特開2007-161633号公報

【非特許文献】

10

【0008】

【非特許文献1】Journal of Immunological Methods, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2014.12.004>

【非特許文献2】Proceedings of the National Academy of Sciences, vol.108, p.12669~12674 (2011)

【非特許文献3】Journal of Biological Chemistry, vol.277, p.26733~26740 (2002)

【非特許文献4】Journal of Biological Chemistry, vol.278, p.3466~3473 (2003)

【非特許文献5】Biotechnology and Bioengineering, vol.87, p.614~622 (2004)

【非特許文献6】Biotechnology and Bioengineering, vol.88, p.901~908 (2004)

【非特許文献7】Biotechnology and Bioengineering, vol.99, p.652~665 (2008)

20

【非特許文献8】Nature Biotechnology, vol.17, p.176~180 (1999)

【非特許文献9】Glycoconjugate Journal, DOI 10.1007/s10719-013-9501-y (2013)

【非特許文献10】Glycoconjugate Journal, DOI 10.1007/s10719-011-9364-z (2012)

【非特許文献11】Blood, vol.123, p.471~480 (2014)

【非特許文献12】British Journal of Haematology, vol.166, p.936~945 (2014)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合するが、コアフコースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGには結合しない、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を提供することにある。また、本発明の目的は、抗コアフコシル化ヒトIgGモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体の製造方法、コアフコシル化ヒトIgGの測定方法、コアフコシル化ヒトIgG測定試薬、コアフコシル化ヒトIgGの精製方法、及び、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体を提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討した結果、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合するが、コアフコースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGには結合しない、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片の取得に成功し、本発明を完成した。すなわち、本発明は、以下の[1]~[30]に関する。

40

【0011】

[1] コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合し、コアフコースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGには結合しないことを特徴とする、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片。

[2] コアフコースが結合しているN結合型糖鎖が、フコースが還元末端GlcNAcと α 1-6結合しているN結合型糖鎖である、[1]に記載の抗体又は該抗体断片。

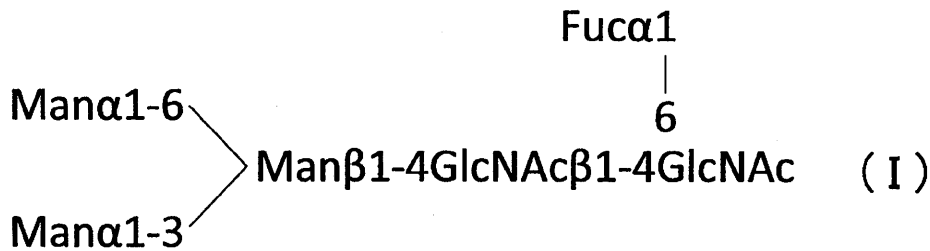
[3] コアフコースが結合しているN結合型糖鎖が、下記一般式(I)で表される糖鎖

50

を含むN結合型糖鎖である、[1]又は[2]に記載の抗体又は該抗体断片。

【 0 0 1 2 】

【 化 1 】



10

【 0 0 1 3 】

[4] コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGが、自己抗原、同種抗原、ウイルス由来抗原、及び、細菌由来抗原からなる群より選ばれる少なくとも一種の抗原と結合するヒトIgGである、[1] ~ [3]のいずれかに記載の抗体又は該抗体断片。

[5] 抗体が、モノクローナル抗体である、[1] ~ [4]のいずれかに記載の抗体又は該抗体断片。

[6] 受託番号NITE BP - 02342として寄託されているハイブリドーマにより産生される、[5]に記載の抗体又は該抗体断片。

20

[7] [5]に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

[8] 受託番号NITE BP - 02342として寄託されているハイブリドーマ。

[9] 以下の工程を含有することを特徴とする、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体の製造方法。

(1) コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgG又はそのFc領域断片を免疫原として用いて、非ヒト動物に免疫する工程；

(2) 工程(1)で免疫した非ヒト動物より得られる抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合し、ハイブリドーマを得る工程；

(3) 工程(2)で得られるハイブリドーマを培養する工程；

(4) 工程(3)で得られた培養物から、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合し、コアフコースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGには結合しない、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程；

30

(5) 工程(4)で選択されたハイブリドーマを培養し、該培養物から、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合し、コアフコースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGには結合しない、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体を採取する工程。

[1 0] 非ヒト動物が、 $\alpha 1 - 6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子が欠損した非ヒト動物である、[9]に記載の製造方法。

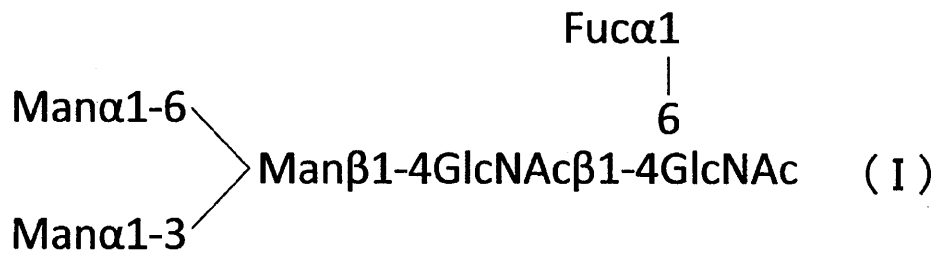
[1 1] コアフコースが結合しているN結合型糖鎖が、フコースが還元末端GlcNAcと $\alpha 1 - 6$ 結合しているN結合型糖鎖である、[9]又は[1 0]に記載の製造方法。

40

[1 2] コアフコースが結合しているN結合型糖鎖が、下記一般式(I)で表される糖鎖を含むN結合型糖鎖である、[9] ~ [1 1]のいずれかに記載の製造方法。

【 0 0 1 4 】

【化 2】



10

【0015】

[1 3] [1] ~ [6] のいずれかに記載の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片を用いることを特徴とする、試料中のコアフコシル化ヒト I g G の測定方法。

[1 4] 以下の工程を含有する、[1 3] に記載の測定方法。

(1) 試料と、[1] ~ [6] のいずれかに記載の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片とを反応させて、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片とコアフコシル化ヒト I g G の免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程 (1) で生成した免疫複合体と、N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体とを反応させて、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片、コアフコシル化ヒト I g G、及び、N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体の免疫複合体を生成させる工程；

20

(3) 工程 (2) で生成した免疫複合体を測定する工程。

[1 5] 以下の工程を含有する、[1 3] に記載の測定方法。

(1) 試料と、N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体とを反応させて、N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体とコアフコシル化ヒト I g G の免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程 (1) で生成した免疫複合体と、[1] ~ [6] のいずれかに記載の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片とを反応させて、N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体、コアフコシル化ヒト I g G、及び、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片の免疫複合体を生成させる工程；

30

(3) 工程 (2) で生成した免疫複合体を測定する工程。

[1 6] 以下の工程を含有する、[1 3] に記載の測定方法。

(1) 試料を、コアフコシル化ヒト I g G の競合物質に標識が結合した標識化競合物質、及び、不溶性担体上に固定化された [1] ~ [6] のいずれかに記載の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片と反応させ、該不溶性担体上に、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片と標識化競合物質との免疫複合体、及び、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片とコアフコシル化ヒト I g G との免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程 (1) で該不溶性担体上に生成した、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片と標識化競合物質との免疫複合体における標識化競合物質を測定する工程。

40

[1 7] 以下の工程を含有する、[1 3] に記載の測定方法。

(1) 試料を、[1] ~ [6] のいずれかに記載の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片、及び、不溶性担体上に固定化されたコアフコシル化ヒト I g G の競合物質と反応させ、該不溶性担体上に、競合物質と抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片との免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程 (1) で該不溶性担体上に生成した免疫複合体を測定する工程。

[1 8] 以下の工程を含有する、[1 3] に記載の測定方法。

(1) 試料と、コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原とを反応させて、抗原とコアフコシル化ヒト I g G の免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程 (1) で生成した免疫複合体と、[1] ~ [6] のいずれかに記載の抗コアフ

50

コシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片とを反応させて、抗原、コアフコシル化ヒト I g G、及び、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片の免疫複合体を生成させる工程；

(3) 工程(2)で生成した免疫複合体を測定する工程。

[19] 以下の工程を含有する、[13]に記載の測定方法。

(1) 試料と、[1]～[6]のいずれかに記載の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片とを反応させて、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片とコアフコシル化ヒト I g G との免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程(1)で生成した免疫複合体と、コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原とを反応させて、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片、コアフコシル化ヒト I g G、及び、抗原の免疫複合体を生成させる工程；

(3) 工程(2)で生成した免疫複合体を測定する工程。

[20] コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原が、自己抗原、同種抗原、ウイルス由来抗原、及び、細菌由来抗原からなる群より選ばれる少なくとも一種の抗原である、[18]又は[19]に記載の測定方法。

[21] [1]～[6]のいずれかに記載の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片を含むことを特徴とする、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 測定試薬。

[22] さらに、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒト I g G に結合する抗体を含む、[21]に記載の測定試薬。

[23] 不溶性担体上に固定化された[1]～[6]のいずれかに記載の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片、及び、コアフコシル化ヒト I g G の競合物質に標識が結合した標識化競合物質を含むことを特徴とする、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 測定試薬。

[24] 不溶性担体上に固定化されたコアフコシル化ヒト I g G の競合物質、及び、[1]～[6]のいずれかに記載の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片を含むことを特徴とする、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 測定試薬。

[25] さらに、コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原を含む、[21]に記載の測定試薬。

[26] コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原が、自己抗原、同種抗原、ウイルス由来抗原、及び、細菌由来抗原からなる群より選ばれる少なくとも一種の抗原である、[25]に記載の測定試薬。

[27] [1]～[6]のいずれかに記載の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片を用いることを特徴とする、試料中のコアフコシル化ヒト I g G の精製方法。

[28] 以下の工程を含む、[27]に記載の精製方法。

(1) 試料と、[1]～[6]のいずれかに記載の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片とを反応させて、コアフコシル化ヒト I g G と抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片との免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程(1)で生成した免疫複合体から、コアフコシル化ヒト I g G を遊離させる工程；

(3) 工程(2)で遊離したコアフコシル化ヒト I g G を回収する工程。

[29] 抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体が不溶性担体上に固定化されている、[27]又は[28]に記載の精製方法。

[30] [1]～[6]のいずれかに記載の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒト I g G に結合するが、コアフコースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒト I g G には結合しない、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片が提供される。また、抗コアフコシル化ヒト I g G モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、抗コアフコ

10

20

30

40

50

シル化ヒト I g G 抗体の製造方法、コアフコシル化ヒト I g G の測定方法、コアフコシル化ヒト I g G 測定試薬、コアフコシル化ヒト I g G の精製方法、及び、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体が提供される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 】

【図 1】ヒト I g G の構造を模式的に示す。

【図 2】ヒト I g G 4 F c 領域 - F L A G 融合蛋白質（以下、h I g G 4 F c - F L A G と記載する）を哺乳類培養細胞で発現させるためのベクターの構造を示す。

【図 3】還元、非還元状態における h I g G 4 F c - F L A G の S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動像を示す。

【図 4】抗原固相 E L I S A によって評価した、各レクチン及び抗 F L A G 抗体の、h I g G 4 F c - F L A G に対する反応性を示す。図 4 において、「C H O 細胞由来」とは C H O 細胞由来 h I g G 4 F c - F L A G を示し、「F u t 8 K O C H O 細胞由来」とは F u t 8 K O C H O 細胞由来 h I g G 4 F c - F L A G を示している。

【図 5】抗原固相 E L I S A によって評価した、取得したハイブリドーマ株が分泌するモノクローナル抗体の、h I g G 4 F c - F L A G に対する反応性を示す。図 5 において、「+」とは、コアフコシル化 h I g G 4 F c - F L A G を示し、「-」とは、非コアフコシル化 h I g G 4 F c - F L A G を示している。

【図 6】ピアコアによって評価した、取得したハイブリドーマ株が分泌するモノクローナル抗体の、h I g G 4 F c - F L A G に対する反応性を示す。図 6 において、実線は、コアフコシル化 h I g G 4 F c - F L A G に対する反応性を示し、破線は、非コアフコシル化 h I g G 4 F c - F L A G に対する反応性を示している。なお、右下の“抗ヒト I g G 抗体と h I g G 4 F c - F L A G との反応”は、ピアコアによって評価した、センサーチップ上に固定化された抗ヒト I g G 抗体の、コアフコシル化 h I g G 4 F c - F L A G および非コアフコシル化 h I g G 4 F c - F L A G に対する反応性を示す。

【図 7】抗原固相 E L I S A によって評価した、取得したハイブリドーマ株が分泌するモノクローナル抗体の、天然コアフコシル化抗原に対する反応性を示す。

【図 8】抗原固相 E L I S A によって評価した、取得したハイブリドーマ株が分泌するモノクローナル抗体の、ヒト I g G、ヒト免疫グロブリン A、ヒト免疫グロブリン M、ウサギ I g G に対する反応性を示す。

【図 9】ピアコアによって評価した、取得したハイブリドーマ株が分泌するモノクローナル抗体の、ヒト I g G サブクラスに対する反応性を示す。なお、右下の“抗ヒト I g G 抗体と各サブクラスヒト I g G との反応”は、ピアコアによって評価した、センサーチップ上に固定化された抗ヒト I g G 抗体の、各サブクラスのヒト I g G に対する反応性を示す。

【図 10】抗原固相 E L I S A によって評価した、L C A レクチン及び抗ヒト I g G 抗体の、過ヨウ素酸処理した各サブクラスのヒト I g G（図において「+」と表示）、及び、過ヨウ素酸処理していない各サブクラスのヒト I g G（図において「-」と表示）に対する反応性を示す。

【図 11】ピアコアによって評価した、取得したハイブリドーマ株が分泌するモノクローナル抗体の、過ヨウ素酸処理した各サブクラスのヒト I g G（破線）、及び、過ヨウ素酸処理していない各サブクラスのヒト I g G（実線）に対する反応性を示す。なお、最下段の 3 つの図は、ピアコアによって評価した、センサーチップ上に固定化された抗ヒト I g G 抗体の、各サブクラスのヒト I g G に対する反応性を示す。

【図 12】抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体が固定化された不溶性担体を含有するカラムで精製した、ヒト I g G 由来の N 結合型糖鎖の M S スペクトルを示す。

【図 13】抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体カラムが固定化された不溶性担体を含有するカラムで精製する前の、ヒト I g G 由来の N 結合型糖鎖の M S スペクトルのスペクトラムを示す。

【図 14】コアフコシル化ヒト I g G 測定系の標準曲線を示す。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0018】

[1] 抗コアフコシル化ヒトIgG抗体

本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体とは、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合し、コアフコースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGには結合しない抗体である。

【0019】

本発明におけるコアフコースとは、ヒトIgGの2つのFc領域の297番目のアスパラギン(N)に結合しているN結合型糖鎖のうち該アスパラギンに直接結合しているN-アセチルグルコサミン、すなわち、還元末端N-アセチルグルコサミンの6位の炭素と、 α 1-6結合したフコースをいう。

10

【0020】

本発明における糖鎖とは、各種の単糖がグリコシド結合によって繋がった化合物をいう。単糖としては、例えばグルコース、ガラクトース、マンノース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、フコース、キシロース、シアル酸等が挙げられる。グリコシド結合とは、単糖のヘミアセタールと他の単糖のヒドロキシル基との間の結合をいい、例えば、2つのN-アセチルグルコサミンの間の結合、2つのマンノースの間の結合、マンノースとN-アセチルグルコサミンとの間の結合、N-アセチルグルコサミンとフコースとの間の結合等が挙げられ、これらの結合様式として α 1-3結合、 α 1-6結合、 β 1-4結合等が挙げられる。具体的には、2つのN-アセチルグルコサミンの間の β 1-4結合等が挙げられる。

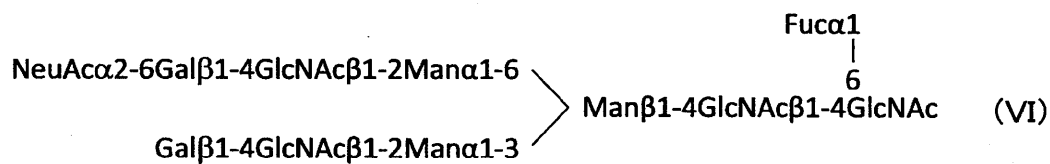
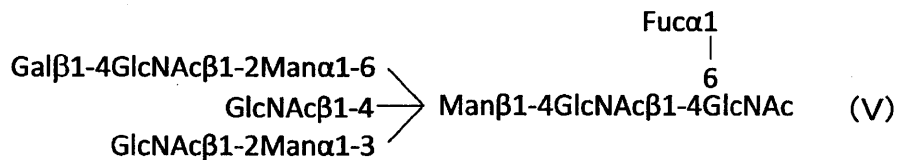
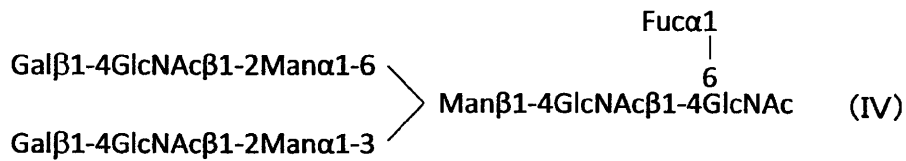
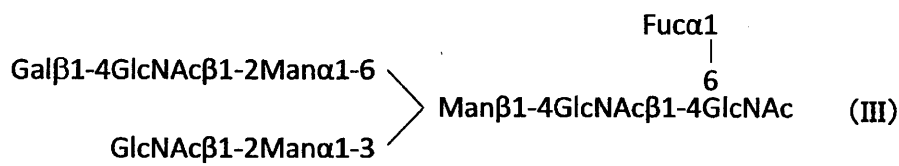
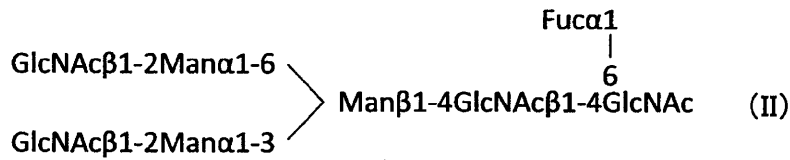
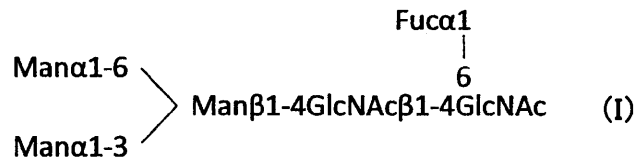
20

【0021】

本発明におけるコアフコースが結合しているN結合型糖鎖とは、例えば、下記に示される式(I)~(VII)の構造で表されるN結合型糖鎖等が挙げられる。

【0022】

【化 3】



【 0 0 2 3 】

本発明におけるコアフコースが結合していないN結合型糖鎖とは、ヒトIgGの2つのFc領域の297番目のアスパラギン(N)に糖鎖が結合したN結合型糖鎖であって、アスパラギンに直接結合しているN-アセチルグルコサミン、すなわち、還元末端N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖であり、例えば、下記に示される式(V

10

20

30

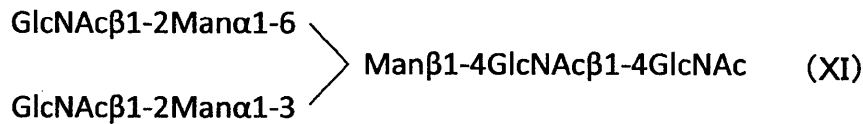
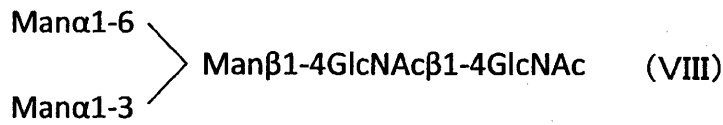
40

50

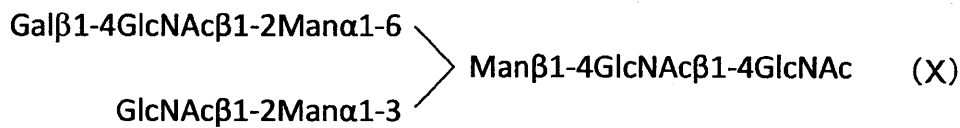
III) ~ (XIV) の構造で表される N 結合型糖鎖等が挙げられる。

【 0 0 2 4 】

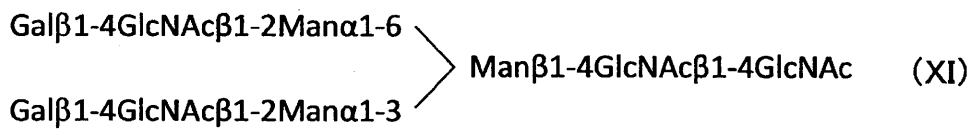
【 化 4 】



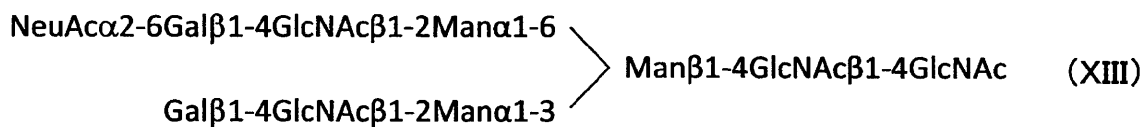
10



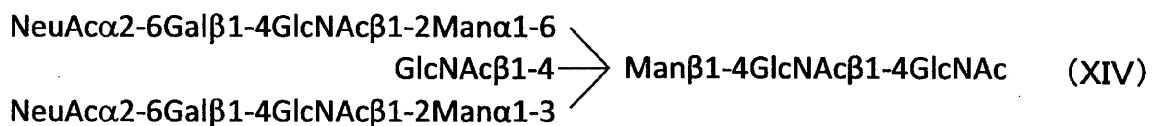
20



30



40



【 0 0 2 5 】

本発明におけるコアフコシル化ヒト IgG は、コアフコースが結合している N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG であり、例えば図 1 に示すヒト IgG 等が挙げられる。

【 0 0 2 6 】

本発明におけるコアフコースが結合している N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG

50

が結合する抗原としては、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGが結合する抗原であれば特に制限はなく、例えば、自己抗原、同種抗原(alloantigen)、ウイルス由来抗原、及び、細菌由来抗原等が挙げられる。自己抗原としては細胞核内抗原等が挙げられ、同種抗原としては主要組織適合遺伝子複合体抗原(MHC抗原)等が挙げられ、ウイルス由来抗原としてはB型肝炎ウイルスのHBs抗原、C型肝炎ウイルスのコア抗原等が挙げられ、細菌由来抗原としてはグラム陰性菌外膜のO抗原、百日咳菌の百日咳毒素等が挙げられる。

【0027】

本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産されるモノクローナル抗体、抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換えモノクローナル抗体等が挙げられる。ハイブリドーマにより生産されるモノクローナル抗体としては、例えば、受託番号NITE BP-02342として寄託されているハイブリドーマにより生産されるモノクローナル抗体等が挙げられる。

10

【0028】

本発明のハイブリドーマとしては、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgGモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマであれば特に制限はなく、例えば、受託番号NITE BP-02342として寄託されているハイブリドーマが挙げられる。

20

【0029】

本発明のハイブリドーマは、公知の方法、例えば、「モノクローナル抗体」(羊土社、1996年)等に記載されている方法等で製造することができる。

【0030】

また、本発明における抗コアフコシル化ヒトIgG抗体の断片としては、例えば、抗体をパブリン処理することにより得られるFab、抗体をペプシン処理することにより得られるF(ab')₂、抗体をペプシン処理-還元処理することにより得られるFab'、抗体軽鎖の可変領域(V_L領域)と抗体重鎖の可変領域(V_H領域)を人工的に1本のポリペプチドとして繋いだ1本鎖抗体(scFv)、ラクダ科動物等が保有する抗体軽鎖を持たない1本鎖抗体の抗体重鎖の可変領域(V_HH領域)断片等が挙げられる。

30

【0031】

本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体の製造方法としては、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体を製造し得る方法であれば特に制限はなく、例えば以下の工程を含む製造方法等が挙げられる。

[i] コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgG又はそのFc領域断片を免疫原として用いて、非ヒト動物に免疫する工程；

[ii] 工程[i]で免疫した非ヒト動物より得られる抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合し、ハイブリドーマを得る工程；

[iii] 工程[ii]で得られるハイブリドーマを培養する工程；

[iv] 工程[iii]で得られた培養物から、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合し、コアフコースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGには結合しない、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体を生産するハイブリドーマを選択する工程；

40

[v] 工程[iv]で選択されたハイブリドーマを培養し、該培養物から、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合し、コアフコースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGには結合しない、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体を採取する工程。

【0032】

(工程[i])

工程[i]は、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgG又はそのFc領域断片を免疫原として用いて、非ヒト動物に免疫する工程であり、非ヒト動

50

物に免疫する方法としては、調製した免疫原を、例えば、非ヒト動物の皮下あるいは静脈内あるいは腹腔内に、適当なアジュバントとともに抗原を投与する方法等が挙げられる。

【 0 0 3 3 】

免疫原としては、非ヒト動物に本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体を生成し得る免疫原であれば特に制限はなく、例えばコアフコシル化ヒト I g G、又はコアフコシル化ヒト I g G の F c 領域断片等が挙げられ、コアフコシル化ヒト I g G、又はコアフコシル化ヒト I g G の F c 領域断片に K L H (Keyhole limpet hemocyanin) やアルブミン等のキャリア蛋白質を結合させたものを用いてもよい。アルブミンとしては、例えば、牛血清アルブミン (B S A)、卵白アルブミン等が挙げられる。

【 0 0 3 4 】

非ヒト動物としては、本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体を生体内に生成し得るヒト以外の動物であれば特に制限はなく、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ラクダ、アルパカ等が挙げられ、特に、コアフコースを含むエプトープに対する抗体が生じ易いことが期待される、 $\alpha 1 - 6$ フコシルトランスフェラーゼ (以下、F u t 8 と記載する) をコードする遺伝子が欠損した F u t 8 ノックアウトマウス (以下、F u t 8 K O マウスと記載する) [Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. , vol.102 , p.15791 (2005)] が好的に用いられる。

【 0 0 3 5 】

アジュバントとしては、非ヒト動物に本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体を生成し得るアジュバントであれば特に制限はなく、例えば、Freund ' s Complete Adjuvant (F C A)、Freund ' s Incomplete Adjuvant (F I A)、R i b i アジュバント等が挙げられる。

【 0 0 3 6 】

免疫原の調製方法は、本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又はその F c 領域断片を調製し得る方法であれば特に制限はなく、例えば、下記に示す、(a) コアフコシル化ヒト I g G 若しくはその F c 領域断片を遺伝子工学的に製造する方法、(b) ヒト血液試料等からコアフコシル化ヒト I g G を調製する方法、(c) ヒト血液試料等から精製したコアフコシル化ヒト I g G をプロテアーゼ処理することでコアフコシル化ヒト I g G の F c 領域断片を得る方法、(d) 試験管内でコアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を人工的に合成する方法等が挙げられる。

【 0 0 3 7 】

(a) コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を遺伝子工学的に製造する方法

コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片は、例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に記載された方法等に従い、ヒト I g G 又はその F c 領域断片をコードする c D N A を挿入した発現ベクター (以下、組換えベクターという) を作製した後、該組換えベクターを宿主細胞に導入することで形質転換体を作製し、該形質転換体にヒト I g G 又はその F c 領域断片を発現させることにより、製造することができる。具体的には以下の (a - 1) ~ (a - 3) の手順で行うことができる。

【 0 0 3 8 】

(a - 1) ヒト I g G 又はその F c 領域断片を発現させるための組換えベクターの作製

ヒト I g G 又はその F c 領域断片を発現させるための組換えベクターは、ヒト I g G 又はその F c 領域断片をコードする c D N A 断片を、適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより作製することができる。

【 0 0 3 9 】

ヒト I g G 又はその F c 領域断片をコードする c D N A は、以下の方法により取得することができる。

ヒト末梢血から単離した白血球から全 R N A を調製し、該全 R N A から m R N A を抽出した後、該 m R N A から c D N A を合成する。該 c D N A を鋳型として、ヒト I g G 又はその F c 領域断片をコードする c D N A を増幅するように設計したプライマーを用いて po

10

20

30

40

50

lymerase chain reaction (PCR) を行い、ヒト IgG 又はその Fc 領域断片をコードする cDNA を増幅する。cDNA 断片がコードするヒト IgG 又はその Fc 領域断片のサブクラスは、IgG 1 ~ 4 のいずれでもよい。また該 cDNA 断片に必要な応じて His、Myc、FLAG 等のエピトプタグをコードする配列を付加してもよい。

【0040】

全 RNA からの mRNA の調製は、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]、又は Oligo-dT30<Super> mRNA Purification Kit (タカラバイオ社製) 等のキットを用いて行うことができる。また、Fast Track mRNA Isolation Kit (インビトロジェン社製)、又は QuickPrep mRNA Purification Kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) 等のキットを用いてハイブリドーマ細胞から mRNA を調製することもできる。

10

【0041】

mRNA からの cDNA の合成は、PrimeScript (登録商標) II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ社製) 等のキットを用いて行うことができる。

【0042】

(a-2) 形質転換体の作製

(a-1) で作製した組換えベクターを、発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ヒト IgG 又はその Fc 領域断片を生産する形質転換体を得ることができる。

組換えベクターの宿主細胞への導入方法としては、宿主細胞に DNA を導入し得る方法であれば特に制限はなく、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, vol.3, p.133(1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2 - 227075 号公報)、リポフェクション法 [Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., vol.84, p.7413 (1987)] などが挙げられる。

20

【0043】

コアフコシル化ヒト IgG 又はその Fc 領域断片を得るための宿主細胞としては、導入した発現ベクターがコードするヒト IgG 又はその Fc 領域断片を発現できる動物細胞、酵母、昆虫細胞等であって、コアフコースが結合している N 結合型糖鎖を付加する能力を有するものであればいずれをも用いることができる。なお、該宿主細胞には、遺伝子改変によりコアフコースが結合している N 結合型糖鎖を付加する能力を獲得した宿主細胞も含まれる。

30

【0044】

動物細胞としては、例えば ナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 細胞 (特開昭 63 - 299 号公報) 等が挙げられる。酵母としては、例えば サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイペロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物等が挙げられる。具体的には、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomycetes alluvius 等がそれぞれ挙げられる。昆虫細胞としては、例えば Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9 細胞、Sf21 細胞 [Current Protocols in Molecular Biology, Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992)] 及び Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (インビトロジェン社製) 等が挙げられる。

40

【0045】

発現ベクターとしては、使用する宿主細胞において自律複製可能又は染色体中への組込が可能で、ヒト IgG 又はその Fc 領域断片をコードする cDNA を転写できる位置に適切なプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0046】

動物細胞を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、ヒト IgG 又はその Fc 領

50

域断片を発現し得る発現ベクターであれば特に制限はなく、例えば、p c D N A I、p c D M 8 (フナコシ社より市販)、p A G E 1 0 7 [特開平 3 - 2 2 9 7 9 号公報; Cytotechnology, vol.3, p.133 (1990)]、p A S 3 - 3 (特開平 2 - 2 2 7 0 7 5 号公報)、p C D M 8 [Nature, vol.329, p.840 (1987)]、p c D N A I / A m p (インビトロジェン社製)、p c D N A 3 . 1 (インビトロジェン社製)、p R E P 4 (インビトロジェン社製)、p A G E 1 0 3 [J.Biochemistry, vol.101, p.1307 (1987)]、p A G E 2 1 0、p M E 1 8 S F L 3、p K A N T E X 9 3 [国際公開第 1 9 9 7 / 1 0 3 5 4 号]等が挙げられる。

【 0 0 4 7 】

酵母を宿主として用いる場合の発現ベクターとして、ヒト I g G 又はその F c 領域断片を発現し得る発現ベクターであれば特に制限はなく、例えば、Y E P 1 3 (A T C C 3 7 1 1 5)、Y C p 5 0 (A T C C 3 7 4 1 9) 等が挙げられる。

10

【 0 0 4 8 】

昆虫細胞を宿主として用いる場合の発現ベクターとして、ヒト I g G 又はその F c 領域断片を発現し得る発現ベクターであれば特に制限はなく、例えば、p V L 1 3 9 2、p B l u e B a c I I I (ともにインビトロジェン社製)等が挙げられる。

【 0 0 4 9 】

動物細胞用の発現ベクターにおけるプロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮し得るものであれば特に制限はなく、例えば、サイトメガロウイルス (C M V) の I E (i m m e d i a t e e a r l y) 遺伝子のプロモーター、S V 4 0 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、S R α プロモーター、モロニー Maus 白血病ウイルス (m o l o n e y m u r i n e l e u k e m i a v i r u s) のプロモーター及びエンハンサー等が挙げられる。また、ヒト C M V の I E 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

20

【 0 0 5 0 】

酵母用の発現ベクターにおけるプロモーターとしては、酵母中で機能を発揮し得るものであれば特に制限はなく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、P H O 5 プロモーター、P G K プロモーター、G A P プロモーター、A D H プロモーター、g a l 1 プロモーター、g a l 1 0 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、M F α 1 プロモーター及び C U P 1 プロモーター等が挙げられる。

30

【 0 0 5 1 】

昆虫細胞用の発現ベクターにおけるプロモーターとしては、昆虫細胞中で機能を発揮し得るものであれば特に制限はなく、例えば、ポリヘドリンプロモーター、p 1 0 プロモーター等が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

(a - 3) 形質転換体からコアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を製造する方法 (a - 2) で得られる形質転換体を培地で培養し、培養物中にコアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を生産させ、該培養物から採取することにより、コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を製造することができる。

培養は、通常 p H 6 ~ 8、3 0 ~ 4 0、5 % C O ₂ 存在下等の条件下で 1 ~ 7 日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

40

【 0 0 5 3 】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば、R P M I 1 6 4 0 培地 [The Journal of the American Medical Association, vol.199, p.519 (1967)]、E a g l e の M E M 培地 [Science, vol.122, p.501 (1952)]、ダルベッコ改変 M E M 培地 [Virology, vol.8, p.396 (1959)]、1 9 9 培地 [Proc.Soc.Exp.Biol.Med., vol.73, p.1 (1950)] 又はこれら培地にウシ胎児血清 (F C S) 等を添加した培地等を用いることができる。酵母を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば Y P D 培地等が挙げられる。昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培

50

地としては、例えばグレース昆虫培地等が挙げられる。

【0054】

形質転換体を用いてコアフコシル化ヒトIgG又はそのFc領域断片を生産する方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、及び宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

【0055】

コアフコシル化ヒトIgG又はそのFc領域断片の生産方法として、宿主細胞内に生産させる方法としては、例えばポールソンらの方法[J.Biol.Chem., vol.264, p.17619 (1989)]、ロウらの方法[Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., vol.86, p.8227 (1989); Genes Development, vol.4, p.1288 (1990)]等が挙げられ、宿主細胞外膜上に生産させる方法としては、例えばポールソンらの方法[J.Biol.Chem., vol.264, p.17619 (1989)]、ロウらの方法[Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., vol.86, p.8227 (1989); Genes Development, vol.4, p.1288 (1990)]等が挙げられ、宿主細胞外に分泌させる方法としては、例えば特開平5-336963号公報、国際公開第1994/23021号等に記載の方法等が挙げられる。

【0056】

宿主細胞から生産されたコアフコシル化ヒトIgG又はそのFc領域断片は、例えば、以下のようにして、調製することができる。

コアフコシル化ヒトIgG又はそのFc領域断片が細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常のタンパク質の単離精製法、すなわち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAION HP-75(三菱化学社製)等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(GEヘルスケア・ジャパン社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独又は組み合わせて用い、精製品を得ることができる。

【0057】

コアフコシル化ヒトIgG又はそのFc領域断片が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分としてコアフコシル化ヒトIgG又はそのFc領域断片の不溶体を回収する。回収したコアフコシル化ヒトIgG又はそのFc領域断片の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈又は透析することにより、コアフコシル化ヒトIgG又はそのFc領域断片を正常な立体構造に戻した後、前記と同様の調製法によりコアフコシル化ヒトIgG又はそのFc領域断片を得ることができる。

【0058】

(b) ヒト血液試料等からコアフコシル化ヒトIgGを調製する方法 40

ヒト血液試料等からコアフコシル化ヒトIgGを調製する方法としては、例えば、ヒトから採取した血液を遠心分離することによって得られる血清から、前述の(a-3)に記載の通常のタンパク質の単離精製法を用いて、コアフコシル化ヒトIgGを調製する方法等が挙げられる。

【0059】

(c) ヒト血液試料等から調製したコアフコシル化ヒトIgGをプロテアーゼ処理することによりコアフコシル化ヒトIgGのFc領域断片を得る方法

ヒト血液試料等から調製したコアフコシル化ヒトIgGをプロテアーゼ処理することによりコアフコシル化ヒトIgGのFc領域断片を得る方法としては、例えば、前述(b)記載の方法により調製したコアフコシル化ヒトIgGを、プロテアーゼにより可変領域と 50

F c 領域とに切断した後、前述の (a - 3) に記載の通常のタンパク質の単離精製法を用いて、該 F c 領域断片を調製する方法等が挙げられる。プロテアーゼとしては、例えばペプシン、パパイン等が挙げられる。コアフコシル化ヒト I g G をプロテアーゼ処理する時間としては、コアフコシル化ヒト I g G の F c 領域断片を得ることができる時間であれば特に制限はなく、通常、1 ~ 48 時間であり、2 ~ 24 時間が好ましい。コアフコシル化ヒト I g G をプロテアーゼ処理する温度は、コアフコシル化ヒト I g G の F c 領域断片を得ることができる温度であれば特に制限はなく、通常、0 ~ 50 °C であり、5 ~ 45 °C が好ましく、20 ~ 40 °C が特に好ましい。

【0060】

(d) 試験管内でコアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を人工的に合成する方法

試験管内でコアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を人工的に合成する方法としては、例えば、コアフコースが結合している N 結合型糖鎖が結合したアスパラギンを用いたペプチドの固相合成法 [J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, vol.3, p.549 (1998)] 等により作製したコアフコースが結合した N 結合型糖鎖が結合したヒト I g G 又はその F c 領域のペプチド断片と、それ以外の部分のヒト I g G 又はその F c 領域のペプチド断片とをネイティブケミカルライゲーション法 [Science, vol.226, p.5186 (1994)] 等を用いて連結する方法等が挙げられる。

【0061】

(工程 [ii])

工程 [ii] は、工程 [i] で免疫した非ヒト動物より得られる抗体産生細胞と、ミエローマ細胞とを融合し、ハイブリドーマを作製する工程である。

【0062】

抗体産生細胞としては、本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体を生成し得る抗体産生細胞であれば特に制限はなく、例えば、免疫原を免疫した非ヒト動物の脾臓、リンパ節、又は末梢血から得られる B 細胞等が挙げられる。

【0063】

ミエローマ細胞としては、本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体を生成し得るミエローマ細胞であれば特に制限はなく、例えば、8 - アザグアニン耐性マウス (BALB / c 由来) 骨髄腫細胞株 P 3 - X 6 3 A g 8 - U 1 (P 3 - U 1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, vol.18, p.1 (1978)]、P 3 - N S 1 / 1 - A g 4 1 (N S - 1) [European J. Immunology, vol.6, p.511 (1976)]、S P 2 / O - A g 1 4 (S P - 2) [Nature, vol.276, p.269 (1978)]、P 3 - X 6 3 - A g 8 6 5 3 (6 5 3) [J. Immunology, vol.123, p.1548 (1979)]、P 3 - X 6 3 - A g 8 (X 6 3) [Nature, vol.256, p.495 (1975)] 等が挙げられる。

【0064】

細胞の融合方法としては、抗体産生細胞とミエローマ細胞を融合できる方法であれば特に制限はなく、例えば、ポリエチレングリコール (P E G) を用いる方法、電気パルス法等が挙げられる。

【0065】

(工程 [iii])

工程 [iii] は、工程 [ii] で作製したハイブリドーマを培養する工程であり、ハイブリドーマを培養する方法としては、例えば、選択培地 [10 % (v / v) B M - c o n d i m e d H 1、2 % (v / v) H A T s u p p l e m e n t を含む G I T 培地 (和光純薬工業社製)] を用い、37 °C、5 % C O ₂ インキュベーター内で培養する方法等が挙げられる。

【0066】

(工程 [iv])

工程 [iv] は、コアフコースが結合している N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合し、コアフコースが結合していない N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G には結

10

20

30

40

50

合しない、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体を産生するハイブリドーマのみを選択する工程であり、当該ハイブリドーマのみを選択する方法としては、例えば、以下の方法等が挙げられる。

【 0 0 6 7 】

コアフコシル化ヒト I g G 又は非コアフコシル化ヒト I g G を固相化したマイクロタイタープレートの各ウェルに、工程 [i i i] 記載のハイブリドーマの培養方法によって得られる培養上清を分注し 2 5 で反応させる。各ウェルを洗浄液 [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 を含む P B S 緩衝液] で洗浄した後、酵素等で標識した抗 I g G 抗体を分注して反応させる。各ウェルを洗浄液で洗浄後、各ウェルの標識量を測定することにより、コアフコシル化ヒト I g G 、培養上清中の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体、及び標識化抗 I g G 抗体からなる免疫複合体 A 、又は、非コアフコシル化ヒト I g G 、培養上清中の抗非コアフコシル化ヒト I g G 抗体、及び標識化抗 I g G 抗体からなる免疫複合体 B が形成したウェルを検出することができ、培養上清に含まれるモノクローナル抗体が、コアフコシル化ヒト I g G 又は非コアフコシル化ヒト I g G に結合するか否かを判定することができる。この結果から、コアフコースが結合している N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合し、コアフコースが結合していない N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G には結合しない、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体を産生するハイブリドーマのみを選択することができる。

10

【 0 0 6 8 】

ハイブリドーマの選択に用いるコアフコシル化ヒト I g G は、コアフコースが結合している N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G であり、例えば、前述の工程 (i) の (a) ~ (d) の方法等により製造することができる。

20

【 0 0 6 9 】

ハイブリドーマの選択に用いる非コアフコシル化ヒト I g G は、コアフコースが結合していない N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G であり、例えば、下記に示す、(e) 遺伝子工学的に非コアフコシル化ヒト I g G を製造する方法、(f) 化学合成法等の方法により製造することができる。

【 0 0 7 0 】

(e) 遺伝子工学的に非コアフコシル化ヒト I g G を製造する方法

非コアフコシル化ヒト I g G は、例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に記載された方法等に従い、非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を発現させるための組換えベクターを作製した後、該組換えベクターを宿主細胞に導入した形質転換体を作製し、該形質転換体に非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を発現させることにより、製造することができる。具体的には、以下の (e - 1) ~ (e - 3) の手順で行うことができる。

30

【 0 0 7 1 】

(e - 1) 非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を発現させるための組換えベクターの作製

非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を発現させるための組換えベクターは、前述の (a - 1) の方法により作製することができる。

40

【 0 0 7 2 】

(e - 2) 形質転換体の作製

(e - 1) で得られた組換えベクターを、発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を生産する形質転換体を得ることができる。

【 0 0 7 3 】

組換えベクターを宿主細胞へ導入する方法としては、組換えベクターを宿主細胞へ導入し得る方法であれば特に制限はなく、例えば、前述の (a - 2) に記載の方法等が挙げられる。

【 0 0 7 4 】

50

宿主細胞としては、非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を生産し得る宿主細胞であれば特に制限はなく、例えば、N 結合型糖鎖にコアフコースを結合させる酵素の活性を低下又は欠損させた動物細胞、糖鎖付加能のない原核細胞等が挙げられる。

【 0 0 7 5 】

N 結合型糖鎖にコアフコースを結合させる酵素としては、例えば、F u t 8 等が挙げられる。

【 0 0 7 6 】

N 結合型糖鎖にコアフコースを結合させる酵素の活性を低下又は欠損させた動物細胞としては、N 結合型糖鎖にコアフコースを結合させる酵素の活性が低下又は欠損した動物細胞であれば特に制限はなく、例えば、F u t 8 活性が低下又は欠損したナマルバ (N a m a l w a) 細胞、F u t 8 活性が低下又は欠損した C O S 細胞、F u t 8 活性が低下又は欠損した C H O 細胞、F u t 8 活性が低下又は欠損した H B T 5 6 3 7 細胞等が挙げられる。

10

【 0 0 7 7 】

F u t 8 活性を低下又は欠損させる方法としては、アンチセンス法、リボザイム法 [Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., vol.96, p.1886 (1999)]、相同組換え法 [Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)]、RNA-DNA oligonucleotide (R D O) 法、RNA interference (R N A i) 法 [Nature, vol.391, p.806 (1998); Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., vol.95, p.15502 (1998); Nature, vol.395, p.854 (1998); Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., vol.96, p.5049 (1999); Cell, vol.95, p.1017 (1998); Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., vol.96, p.1451 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol.95, p.13959 (1998); Nature Cell Biol., vol.2, p.70 (2000)]、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法 [Nature Genetics, vol.25, p.35 (2000)]等が挙げられる。

20

【 0 0 7 8 】

糖鎖付加能のない原核細胞を有する原核生物としては、例えばエシェリヒア属等に属する微生物等が挙げられ、エシェリヒア属等に属する微生物としては、例えば、大腸菌 X L 1 - B l u e、大腸菌 X L 2 - B l u e、大腸菌 D H 1、大腸菌 M C 1 0 0 0、大腸菌 K Y 3 2 7 6、大腸菌 W 1 4 8 5、大腸菌 J M 1 0 9、大腸菌 H B 1 0 1、大腸菌 N o . 4 9、大腸菌 W 3 1 1 0、大腸菌 N Y 4 9、大腸菌 D H 5 α 等が挙げられる。

30

【 0 0 7 9 】

動物細胞を宿主として用いる場合の発現ベクターは、使用する宿主細胞において自律複製可能又は染色体中への組込が可能で、ヒト I g G 又はその F c 領域断片をコードする c D N A を転写できる位置に適当なプロモーターを含有しているものを用いることができる。

【 0 0 8 0 】

動物細胞を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、ヒト I g G 又はその F c 領域断片を発現し得る発現ベクターであれば特に制限はなく、例えば、前述の (a - 2) に記載の発現ベクター等が挙げられる。

40

【 0 0 8 1 】

動物細胞を宿主として用いる場合の発現ベクターにおけるプロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮し得るものであれば特に制限はなく、例えば、前述の (a - 2) に記載のプロモーター等が挙げられる。

【 0 0 8 2 】

動物細胞を宿主として用いる場合の組換えベクターにおけるヒト I g G 又はその F c 領域断片をコードする c D N A の塩基配列においては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより、目的とするヒト I g G 又はその F c 領域断片の生産率を向上させることができる。さらに、前記組換えベクターにおける遺伝子の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を

50

配置することが好ましい。

【0083】

糖鎖付加能のない原核細胞を宿主細胞として用いる場合の発現ベクターは、原核生物中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列を含む発現ベクターを用いることができる。リボソーム結合配列としては、例えばシャイン・ダルガルノ (Shine-Dalgarno) 配列等が挙げられる。また、該発現ベクターは、さらに、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

【0084】

糖鎖付加能のない原核細胞を宿主細胞として用いる場合の発現ベクターとしては、ヒト I g G 又はその F c 領域断片を発現し得る発現ベクターであれば特に制限はなく、例えば、p B T r p 2、p B T a c 1、p B T a c 2 (いずれもロシュ社製)、p K K 2 3 3 - 2 (ファルマシア社製)、p S E 2 8 0 (インビトロジェン社製)、p G E M E X - 1 (プロメガ社製)、p Q E - 8 (キアゲン社製)、p K Y P 1 0 (特開昭 5 8 - 1 1 0 6 0 0 号公報)、p K Y P 2 0 0 [Agricultural Biological Chemistry, vol.48, p.669 (1984)]、p L S A 1 [Agric.Biol.Chem., vol.53, p.277 (1989)]、p G E L 1 [Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., vol.82, p.4306 (1985)]、p B l u e s c r i p t I I S K (-) (アジレント・テクノロジ社製)、p T r s 3 0 [大腸菌 J M 1 0 9 / p T r S 3 0 (F E R M B P - 5 4 0 7) より調製]、p T r s 3 2 [大腸菌 J M 1 0 9 / p T r S 3 2 (F E R M B P - 5 4 0 8) より調製]、p G H A 2 [大腸菌 I G H A 2 (F E R M B P - 4 0 0) より調製、特開昭 6 0 - 2 2 1 0 9 1 号公報]、p G K A 2 [大腸菌 I G K A 2 (F E R M B P - 6 7 9 8) より調製、特開昭 6 0 - 2 2 1 0 9 1 号公報]、p T e r m 2 (米国特許第 4 6 8 6 1 9 1 号明細書、米国特許第 4 9 3 9 0 9 4 号明細書、米国特許第 5 1 6 0 7 3 5 号明細書)、p S u p e x、p U B 1 1 0、p T P 5、p C 1 9 4、p E G 4 0 0 [J.Bacteriol., vol.172, p.2392 (1990)]、p G E X (G E ヘルスケアバイオサイエンス社製)、p E T システム (ノバジェン社製)、p M E 1 8 S F L 3 (東洋紡社製) 等が挙げられる。

【0085】

糖鎖付加能のない原核細胞を宿主細胞として用いる場合の発現ベクターにおけるプロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮し得るものであれば特に制限はなく、例えば、t r p プロモーター (P t r p)、l a c プロモーター、P L プロモーター、P R プロモーター、T 7 プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが挙げられる。また、P t r p を 2 つ直列させたタンデムプロモーター、t a c プロモーター、l a c T 7 プロモーター、l e t I プロモーター等のように、人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0086】

糖鎖付加能のない原核細胞を宿主細胞として用いる場合の組換えベクターにおいて、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば 6 ~ 1 8 塩基) に調節したものをを用いることが好ましい。

【0087】

前記組換えベクターにおけるヒト I g G 又はその F c 領域断片をコードする c D N A の塩基配列においては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより、目的とする非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片の生産率を向上させることができる。さらに、前記組換えベクターにおける遺伝子の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0088】

(e-3) 形質転換体から非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を製造する方法

(e-2) で得られる形質転換体を培地で培養し、培養物中に非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を生産させ、該培養物から採取することにより、非コアフコシル

化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を製造することができる。

【0089】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば、前述の (a - 3) に記載の培地等が挙げられる。

【0090】

糖鎖付加能のない原核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば、LB 培地等が挙げられる。

【0091】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した該原核生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lac プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した該原核生物を培養するときにはイソプロピル - β - D - チオガラクトピラノシド等を、trp プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した該原核生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

10

【0092】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

【0093】

非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、及び宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

20

【0094】

非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片の生産方法として、宿主細胞内に生産させる方法としては、例えばポールソンらの方法[J. Biol. Chem., vol. 264, p. 17619 (1989)]、ロウらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 86, p. 8227 (1989); Genes Develop., vol. 4, p. 1288 (1990)]等が挙げられ、宿主細胞外膜上に生産させる方法としては、例えばポールソンらの方法[J. Biol. Chem., vol. 264, p. 17619 (1989)]、ロウらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 86, p. 8227 (1989); Genes Develop., vol. 4, p. 1288 (1990)]等が挙げられ、宿主細胞外に分泌させる方法としては、例えば特開平 5 - 336963 号公報、国際公開第 1994 / 23021 号等に記載の方法等が挙げられる。

30

【0095】

形質転換体を用いて、非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片を生産する方法としては、例えば、以下の方法が挙げられる。

【0096】

非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片が細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、すなわち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) - セファロース、D I A I O N H P A - 75 (三菱化学社製) 等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S - S e p h a r o s e F F (GEヘルスケア・ジャパン社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独又は組み合わせて用い、精製品を得ることができる。

40

【0097】

非コアフコシル化ヒト I g G 又はその F c 領域断片が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として非コ

50

アフコシル化ヒト IgG 又はその Fc 領域断片の不溶体を回収する。回収した非コアフコシル化ヒト IgG 又はその Fc 領域断片の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈又は透析することにより、非コアフコシル化ヒト IgG 又はその Fc 領域断片を正常な立体構造に戻した後、前記と同様の単離精製法により非コアフコシル化ヒト IgG 又はその Fc 領域断片の精製標品を得ることができる。

【0098】

(f) 非コアフコシル化ヒト IgG の化学合成法

非コアフコシル化ヒト IgG の化学合成法としては、例えば、コアフコースが結合していない N 結合型糖鎖が結合したアスパラギンを用いたペプチドの固相合成法 [J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, vol.3, p.549 (1998)] 等により作製したコアフコースが結合していない N 結合型糖鎖が結合したヒト IgG 又はその Fc 領域のペプチド断片と、それ以外の部分のヒト IgG 又はその Fc 領域のペプチド断片とをネイティブケミカルライゲーション法 [Science, vol.226, p.5186 (1994)] 等を用いて連結する方法等が挙げられる。

10

【0099】

(工程[v])

工程[v]は、本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体を採取する工程である。

抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体を採取する方法としては、例えば、前述の工程[iv]の方法で選択されたハイブリドーマを工程[iii]の方法で培養し、得られる培養上清中から、抗体に結合する分子を用いて、該抗体を採取する方法等が挙げられる。

20

【0100】

工程[v]における抗体に結合する分子としては、抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体に結合できる分子であれば特に制限はなく、例えば、プロテイン A、プロテイン G、ヒト IgG の Fc 領域に結合する抗体等が挙げられる。

【0101】

[2] コアフコシル化ヒト IgG の測定方法

本発明のコアフコシル化ヒト IgG の測定方法は、本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片を用いるコアフコシル化ヒト IgG の測定方法である。本発明の測定方法の具体的態様を以下に示す。

【0102】

30

・測定方法 1 (サンドイッチ法 1)

以下の工程を含有する、試料中のコアフコシル化ヒト IgG の測定方法。

(1) 試料と、本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片とを反応させて、抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片とコアフコシル化ヒト IgG の免疫複合体 1 を生成させる工程；

(2) 工程(1)で生成した免疫複合体 1 と、N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体とを反応させて、抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片、コアフコシル化ヒト IgG、及び、N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体の免疫複合体 2 を生成させる工程；

40

(3) 工程(2)で生成した免疫複合体 2 を測定する工程；

(4) 試料の代わりに既知濃度のコアフコシル化ヒト IgG を用いて前記工程(1)～(3)を行い、コアフコシル化ヒト IgG 濃度と免疫複合体 2 の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

(5) 工程(4)で作成された検量線と、工程(3)で測定された免疫複合体 2 の測定値とから、試料中のコアフコシル化ヒト IgG 濃度を決定する工程。

【0103】

工程(1)及び工程(2)は順次行っても、同時に行ってもよい。工程(1)と工程(2)の間に洗浄工程を挿入してもよい。また、工程(2)と工程(3)の間に洗浄工程を挿入してもよい。工程(1)において、抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片は、不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されてい

50

ることが好ましい。N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体は、標識物質で標識化されていても、標識化されていなくてもよいが、標識化されていることが好ましい。標識化された、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体を用いる場合には、工程(3)において、免疫複合体2の標識物質を測定すればよい。

【0104】

抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片が不溶性担体に固定化されている場合、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体は抗原抗体反応の反応液中で生成されてもよく、この場合、一組の親和性物質の片方(A)が結合した抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片と、一組の親和性物質のもう一方(a)が結合した不溶性担体とを抗原抗体反応の反応液中で反応させることにより、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体を抗原抗体反応の反応液中で生成させることができる。A-aの組み合わせとしては、例えば以下の組み合わせ等が挙げられる。

- ・ビオチン-アビジン類(アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等)；
- ・アビジン類(アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等)-ビオチン；
- ・抗コアフコシル化ヒトIgG抗体のFc領域-Fc領域と結合する抗体。

【0105】

- ・測定方法2(サンドイッチ法2)

以下の工程を含有する、試料中のコアフコシル化ヒトIgGの測定方法。

(1) 試料と、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体とを反応させて、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体とコアフコシル化ヒトIgGの免疫複合体3を生成させる工程；

(2) 工程(1)で生成した免疫複合体3と、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片とを反応させて、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体、コアフコシル化ヒトIgG、及び、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片の免疫複合体4を生成させる工程；

(3) 工程(2)で生成した免疫複合体4を測定する工程；

(4) 試料の代わりに既知濃度のコアフコシル化ヒトIgGを用いて前記工程(1)~(3)を行い、コアフコシル化ヒトIgG濃度と免疫複合体4の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

(5) 工程(4)で作成された検量線と、工程(3)で測定された免疫複合体4の測定値とから、試料中のコアフコシル化ヒトIgG濃度を決定する工程。

【0106】

工程(1)及び工程(2)は順次行っても、同時に行ってもよい。工程(1)と工程(2)の間に洗浄工程を挿入してもよい。また、工程(2)と工程(3)の間に洗浄工程を挿入してもよい。工程(1)において、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体は、不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片は、標識物質で標識化されていても、標識化されていなくてもよいが、標識化されていることが好ましい。標識化された抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を用いる場合には、工程(3)において、免疫複合体4の標識物質を測定すればよい。

【0107】

N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体が不溶性担体に固定化されている場合、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体が固定化された不溶性担体は抗原抗体反応の反応液中で生成されてもよく、この場合、一組の親和性物質の片方(B)が結合した、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体と、一組の親和性物質のもう一方(b)が結合した不溶性担体とを抗原抗体反応の反応液中で反応させることにより、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体が固定化された不溶性担体を抗原抗体反応の反応液中で生成させることができる。B-bの組み合わせとしては、例えば以下の組み合わせ等が挙げられる。

- ・ ビオチン - アビジン類 (アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等；
- ・ アビジン類 (アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等) - ビオチン；
- ・ N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体の F c 領域 - N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体の F c 領域と結合する抗体。

【 0 1 0 8 】

- ・ 測定方法 3 (競合法 1)

以下の工程を含有する、試料中のコアフコシル化ヒト I g G の測定方法。

(1) 試料と、コアフコシル化ヒト I g G の競合物質に標識物質が結合した標識化競合物質、及び、不溶性担体上に固定化された本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片とを反応させ、不溶性担体上に、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片と標識化競合物質の免疫複合体 5、及び、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片とコアフコシル化ヒト I g G の免疫複合体 6 を生成させる工程；

(2) 工程 (1) で不溶性担体上に生成した、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片と標識化競合物質の免疫複合体 5 における標識物質を測定する工程；

(3) 試料の代わりに既知濃度のコアフコシル化ヒト I g G を用いて前記工程 (1) ~ (2) を行い、コアフコシル化ヒト I g G 濃度と標識物質の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

(4) 工程 (3) で作成された検量線と、工程 (2) で測定された標識物質の測定値とから、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 濃度を決定する工程。

【 0 1 0 9 】

工程 (1) と工程 (2) の間に洗浄工程を挿入してもよい。

工程 (1) において、試料と、不溶性担体上に固定化された抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片とを反応させた後、該反応の反応液に該標識化競合物質を添加してもよい。また、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体は抗原抗体反応の反応液中で生成されてもよく、この場合、一組の親和性物質の片方 (C) が結合した抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片と、一組の親和性物質のもう一方 (c) が結合した不溶性担体とを抗原抗体反応の反応液中で反応させることにより、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体を抗原抗体反応の反応液中で生成させることができる。C - c の組み合わせとしては、例えば以下の組み合わせ等が挙げられる。

- ・ ビオチン - アビジン類 (アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等)；
- ・ アビジン類 (アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等) - ビオチン；
- ・ 抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体の F c 領域 - 抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体の F c 領域と結合する抗体。

【 0 1 1 0 】

- ・ 測定方法 4 (競合法 2)

以下の工程を含有する、試料中のコアフコシル化ヒト I g G の測定方法。

(1) 試料を、本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片、及び、不溶性担体上に固定化された、コアフコシル化ヒト I g G の競合物質と反応させ、不溶性担体上に、競合物質と抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片の免疫複合体 7 を生成させる工程；

(2) 工程 (1) で不溶性担体上に生成した免疫複合体 7 を測定する工程；

(3) 試料の代わりに既知濃度のコアフコシル化ヒト I g G を用いて前記工程 (1) ~ (2) を行い、コアフコシル化ヒト I g G 濃度と免疫複合体 7 の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

(4) 工程 (3) で作成された検量線と、工程 (2) で測定された免疫複合体 7 の測定値とから、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 濃度を決定する工程。

【 0 1 1 1 】

工程 (1) と工程 (2) の間に洗浄工程を挿入してもよい。また、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片は、標識物質で標識化されていてもよい。標識化された抗コ

アフコシル化ヒト Ig G 抗体又は該抗体断片を用いる場合には、工程（２）において、免疫複合体 7 の標識物質を測定すればよい。

【 0 1 1 2 】

工程（１）において、試料と、抗コアフコシル化ヒト Ig G 抗体又は該抗体断片とを反応させた後、該反応の反応液に、不溶性担体上に固定化された、コアフコシル化ヒト Ig G の競合物質を添加してもよい。また、コアフコシル化ヒト Ig G の競合物質が固定化された不溶性担体は抗原抗体反応の反応液中で生成されてもよく、この場合、一組の親和性物質の片方（D）が結合した、コアフコシル化ヒト Ig G の競合物質と、一組の親和性物質のもう一方（d）が結合した不溶性担体とを抗原抗体反応の反応液中で反応させることにより、コアフコシル化ヒト Ig G の競合物質が固定化された不溶性担体を抗原抗体反応の反応液中で生成させることができる。D - d の組み合わせとしては、例えば以下の組み合わせ等が挙げられる。

- ・ ビオチン - アビジン類（アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等）；
- ・ アビジン類（アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等） - ビオチン。

【 0 1 1 3 】

- ・ 測定方法 5（抗原特異的なコアフコシル化ヒト Ig G の測定方法 1）

以下の工程を含有する、試料中のコアフコシル化ヒト Ig G の測定方法。

- （１）試料と、コアフコシル化ヒト Ig G が反応する抗原とを反応させて、抗原と試料中のコアフコシル化ヒト Ig G の免疫複合体 8 を生成させる工程；
- （２）工程（１）で生成した免疫複合体 8 と、本発明の抗コアフコシル化ヒト Ig G 抗体又は該抗体断片とを反応させて、抗原、コアフコシル化ヒト Ig G、及び、抗コアフコシル化ヒト Ig G 抗体又は該抗体断片の免疫複合体 9 を生成させる工程；
- （３）工程（２）で生成した免疫複合体 9 を測定する工程；
- （４）試料の代わりに既知濃度のコアフコシル化ヒト Ig G を用いて前記工程（１）～（３）を行い、コアフコシル化ヒト Ig G 濃度と免疫複合体 9 の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；
- （５）工程（４）で作成された検量線と、工程（３）で測定された免疫複合体 9 の測定値とから、試料中のコアフコシル化ヒト Ig G 濃度を決定する工程。

【 0 1 1 4 】

工程（１）及び工程（２）は順次行っても、同時に行ってもよい。工程（１）と工程（２）の間に洗浄工程を挿入してもよい。また、工程（２）と工程（３）の間に洗浄工程を挿入してもよい。工程（１）において、コアフコシル化ヒト Ig G が反応する抗原は、不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。抗コアフコシル化ヒト Ig G 抗体又は該抗体断片は、標識物質で標識化されていても、標識化されていなくてもよいが、標識化されていることが好ましい。標識化された抗コアフコシル化ヒト Ig G 抗体又は該抗体断片を用いる場合には、工程（３）において、免疫複合体 9 の標識物質を測定すればよい。

【 0 1 1 5 】

コアフコシル化ヒト Ig G が反応する抗原が不溶性担体に固定化されている場合、コアフコシル化ヒト Ig G が反応する抗原が固定化された不溶性担体は抗原抗体反応の反応液中で生成されてもよく、この場合、一組の親和性物質の片方（E）が結合したコアフコシル化ヒト Ig G が反応する抗原と、一組の親和性物質のもう一方（e）が結合した不溶性担体とを抗原抗体反応の反応液中で反応させることにより、コアフコシル化ヒト Ig G が反応する抗原が固定化された不溶性担体を抗原抗体反応の反応液中で生成させることができる。E - e の組み合わせとしては、例えば以下の組み合わせ等が挙げられる。

- ・ ビオチン - アビジン類（アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等）；
- ・ アビジン類（アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等） - ビオチン。

【 0 1 1 6 】

- ・ 測定方法 6（抗原特異的なコアフコシル化ヒト Ig G の測定方法 2）

以下の工程を含有する、試料中のコアフコシル化ヒト Ig G の測定方法。

(1) 試料と、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片とを反応させて、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片と試料中のコアフコシル化ヒトIgGの免疫複合体10を生成させる工程；

(2) 工程(1)で生成した免疫複合体10と、コアフコシル化ヒトIgGが反応する抗原とを反応させて、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片、コアフコシル化ヒトIgG、及び、抗原の免疫複合体11を生成させる工程；

(3) 工程(2)で生成した免疫複合体11を測定する工程；

(4) 試料の代わりに既知濃度のコアフコシル化ヒトIgGを用いて前記工程(1)～(3)を行い、コアフコシル化ヒトIgG濃度と免疫複合体11の測定値との関係を表す検量線を作成する工程；

(5) 工程(4)で作成された検量線と、工程(3)で測定された免疫複合体11の測定値とから、試料中のコアフコシル化ヒトIgG濃度を決定する工程。

【0117】

工程(1)及び工程(2)は順次行っても、同時に行ってもよい。工程(1)と工程(2)の間に洗浄工程を挿入してもよい。また、工程(2)と工程(3)の間に洗浄工程を挿入してもよい。工程(1)において、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片は、不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、固定化されていることが好ましい。コアフコシル化ヒトIgGが反応する抗原は、標識物質で標識化されていても、標識化されていなくてもよいが、標識化されていることが好ましい。標識化された、コアフコシル化ヒトIgGが反応する抗原を用いる場合には、工程(3)において、免疫複合体11の標識物質を測定すればよい。

【0118】

抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片が不溶性担体に固定化されている場合、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体は抗原抗体反応の反応液中で生成されてもよく、この場合、一組の親和性物質の片方(F)が結合した抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片と、一組の親和性物質のもう一方(f)が結合した不溶性担体とを抗原抗体反応の反応液中で反応させることにより、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体を抗原抗体反応の反応液中で生成させることができる。F-fの組み合わせとしては、例えば以下の組み合わせ等が挙げられる。

- ・ ビオチン-アビジン類(アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等)；
- ・ アビジン類(アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等)-ビオチン；
- ・ 抗コアフコシル化ヒトIgG抗体のFc領域-Fc領域と結合する抗体。

【0119】

本発明の測定方法における試料としては、本発明の測定方法を可能とする試料であれば特に制限はなく、例えば全血(血液)、血球、血清、血漿、髄液、尿、精漿、羊水、唾液、組織、培養細胞が挙げられ、血清及び血漿が好ましい。

【0120】

本発明における、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGとしては、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGであれば特に制限はなく、例えばコアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgG、及び、コアフコースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGが含まれる。

【0121】

本発明における、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体は、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGのいずれかの部分と結合する抗体であれば特に制限はなく、例えばコアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体、コアフコースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体、抗ヒトIgG抗体、抗N結合型糖鎖抗体等が挙げられる。

【0122】

本発明における、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIg

10

20

30

40

50

Gの競合物質としては、本発明の前記競合法1又は2による測定方法を可能とする競合物質であれば特に制限はなく、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体が認識するエピトープの構造と同じ構造を有している物質が好ましく、さらに本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体に対する結合の強さが、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体に対するコアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGの結合の強さと同程度であるものが好ましい。このような競合物質としては、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGそのものが例示される。

【0123】

コアフコシル化ヒトIgGが反応する抗原としては、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGが結合し得る抗原であれば特に制限はなく、例えば、前述の抗原等が挙げられる。

10

【0124】

本発明の測定方法は、ドライケミストリーでも溶液中の反応でも適用可能である。本発明の測定方法において、抗原抗体反応、すなわち、測定方法1、2、5、6における工程(1)及び工程(2)、並びに、測定方法3、4における工程(1)における反応温度としては、本発明の測定方法を可能とする反応温度であれば特に制限はなく、通常、0～50であり、4～40が好ましい。反応時間としては、本発明の測定方法を可能とする反応時間であれば特に制限はなく、通常、1分間～72時間であり、5分間～20時間が好ましい。

【0125】

20

洗浄工程において使用される洗浄液としては、本発明における抗原抗体反応の反応液を除去し得る洗浄液であれば特に制限はなく、例えばリン酸緩衝化生理食塩水[0.15mol/L塩化ナトリウムを含有する10mmol/Lリン酸緩衝液、pH7.2(以下、PBSと記す。)]、界面活性剤を含有するPBS、後述の水性媒体等を挙げることができる。該界面活性剤としては、例えばTween20等の非イオン性界面活性剤等が挙げられる。

【0126】

本発明の測定方法における不溶性担体としては、本発明の測定方法を可能とする不溶性担体であれば特に制限はない。不溶性担体の好ましい素材としてはポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ゼラチン、アガロース、セルロース、ニトロセルロース、セルロースアセテート、酢酸セルロース、ポリエチレンテレフタレート等の高分子素材、ガラス、セラミックス、磁性粒子や金属等が挙げられる。不溶性担体の好ましい形状としてはチューブ、ビーズ、プレート、ラテックス等の微粒子、スティック等が挙げられ、96ウェル/枚のポリスチレン製マイクロタイタープレート等が好ましい。

30

【0127】

本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片の不溶性担体との結合、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体と不溶性担体との結合、コアフコシル化ヒトIgGが反応する抗原と不溶性担体との結合、及び、コアフコシル化ヒトIgGの競合物質と不溶性担体との結合としては、物理吸着、化学結合等が挙げられる。物理吸着としては、例えば静電的結合、水素結合、疎水結合等が挙げられる。化学結合としては、例えば共有結合、配位結合等が挙げられる。

40

【0128】

本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体、コアフコシル化ヒトIgGが反応する抗原、又は、コアフコシル化ヒトIgGの競合物質は、前述の物理吸着及び/又は化学結合を利用して、直接、不溶性担体に固定化してもよく、間接的に不溶性担体に固定化してもよい。

【0129】

本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体、コアフコシル化ヒトIgGが反応する抗原、又は、コア

50

フコシル化ヒト IgG の競合物質を直接、不溶性担体に固定化する方法としては、例えば本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片、N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原、又は、コアフコシル化ヒト IgG の競合物質の溶液を、不溶性担体であるポリスチレン製マイクロタイタプレートに具備されているウェルに添加して、1 時間から 1 日間、4 ~ 30 でインキュベートすることにより、本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片、N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原、又は、コアフコシル化ヒト IgG の競合物質をウェルに物理吸着させて固定化する方法等が挙げられる。

【0130】

本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片、N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原、又は、コアフコシル化ヒト IgG の競合物質を、間接的に不溶性担体に固定化する方法としては、例えばビオチンとアビジン類（アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン等）との特異的結合を介して、本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片、N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原、又は、コアフコシル化ヒト IgG の競合物質を不溶性担体に固定化する方法等が挙げられる。また、本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片、N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原、又は、コアフコシル化ヒト IgG の競合物質は、リンカーを介した共有結合により不溶性担体に固定化してもよい。

【0131】

リンカーとしては、例えば、不溶性担体表面の官能基と、本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片、N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原、又は、コアフコシル化ヒト IgG の競合物質が有する官能基の両者を共有結合できる分子であれば特に制限はなく、例えば、本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片、N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原、又は、コアフコシル化ヒト IgG の競合物質が有する官能基と反応することができる第 1 の反応活性基と、不溶性担体表面の官能基と反応することができる第 2 の反応活性基とを同時に持つ分子であり、第 1 の反応活性基と第 2 の反応活性基が異なる基であることが好ましい。本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片、N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原、又は、コアフコシル化ヒト IgG の競合物質の官能基及び不溶性担体はその表面に保持している官能基としては、例えばカルボキシル基、アミノ基、グリシジル基、スルフヒドリル基、水酸基、アミド基、イミノ基、N - ヒドロキシスクシンイミド基（NHS 基）、マレイミド基等が挙げられる。リンカーにおける反応活性基としては、例えばアリルアジド、カルボジイミド、ヒドラジド、アルデヒド、ヒドロキシメチルホスフィン、イミドエステル、イソシアネート、マレイミド、N - ヒドロキシスクシンイミド（NHS）エステル、ペンタフルオロフェニル（PF₅）エステル、ソラレン、ピリジルジスルフィド、ビニルスルホン等の基が挙げられる。

【0132】

測定方法 1、2、5 及び 6 における工程（3）において、各測定方法における工程（2）で生成した各免疫複合体（免疫複合体 2；免疫複合体 4；免疫複合体 9；免疫複合体 11）を測定する方法は、各測定方法における工程（2）で生成した各免疫複合体を測定し得る方法であれば特に制限はなく、例えば、水晶振動子を用いる方法、電極を用いる方法、凝集を測定する方法等が挙げられる。また、測定方法 1 の工程（2）における N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体が、標識物質で標識化された N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体である場合、測定方法 2 及び測定方法 5 の工程（2）における本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片が、標識物

質で標識化された抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片である場合、及び、測定方法 6 の工程 (2) におけるコアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原が、標識物質で標識化されたコアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原である場合、工程 (3) において、各測定方法における工程 (2) で生成した免疫複合体を測定する方法としては、各測定方法における工程 (2) で生成した各免疫複合体中の標識物質を測定する方法等が挙げられる。

【 0 1 3 3 】

測定方法 3 における工程 (2) において、工程 (1) で生成した免疫複合体 5 を測定する方法は、工程 (1) で生成した免疫複合体 5 を測定し得る方法であれば特に制限はなく、例えば、水晶振動子を用いる方法、電極を用いる方法、凝集を測定する方法、標識物質を測定する方法等が挙げられる。

10

【 0 1 3 4 】

測定方法 4 における工程 (2) において、工程 (1) で生成した免疫複合体 7 を測定する方法は、工程 (1) で生成した免疫複合体 7 を測定し得る方法であれば特に制限はなく、例えば、水晶振動子を用いる方法、電極を用いる方法、凝集を測定する方法等が挙げられる。また、工程 (1) における本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片が、標識物質で標識化された抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片である場合、工程 (2) において、工程 (1) で生成した免疫複合体 7 を測定する方法としては、工程 (1) で生成した免疫複合体中の標識物質を測定する方法等が挙げられる。

20

【 0 1 3 5 】

標識物質としては酵素、蛍光物質、発光物質、放射性同位元素、ビオチン、ジゴキシゲニン、タグ配列を含むポリペプチド、金属コロイド粒子、着色ラテックス粒子等が挙げられる。酵素としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ等が挙げられる。蛍光物質としては、例えば、FITC (フルオレッセイン イソチオシアナート)、R I T C (ローダミン B - イソチオシアナート) 等が挙げられる。その他の蛍光物質として、例えば *quantum dot* [Science , vol.281 , p.2016-2018 (1998)]、フィコエリスリン等のフィコビリ蛋白質、G F P (Green fluorescent Protein)、R F P (Red fluorescent Protein)、Y F P (Yellow fluorescent Protein)、B F P (Blue fluorescent Protein) 等の蛍光を発する蛋白質が挙げられる。発光物質としては、例えば、アクリジニウム及びその誘導体、ルテニウム錯体化合物、ロフィン等が挙げられる。またルテニウム錯体化合物としては、電子供与体と共に電気化学的に発光する、Clin. Chem. , vol.37(9) , p.1534-1539 (1991) に示されたものが好ましい。放射性同位元素としては、例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I 等が挙げられる。

30

【 0 1 3 6 】

タグ配列を含むポリペプチドとしては、F L A G ペプチド (F L A G タグ、Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys)、ポリヒスチジン (H i s タグ、His His His His His His)、m y c エピトープペプチド (m y c タグ、Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu)、ヘマグルチニンエピトープペプチド (H A タグ、Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala) 等が挙げられる。

40

【 0 1 3 7 】

N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片、コアフコースが結合している N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G の競合物質、及び、コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原の各物質の標識物質による標識化は、該各物質の官能基と標識物質の官能基との間で、リンカーを介して又は介さず共有結合を生じる反応によって行うことができる。官能基としては、カルボキシル基やアミノ基、グリシジル基、スルフヒドリル基、水酸基、アミド基、イミノ基、ヒドロキシサクシニルエステル基、マレイミド基、イソチオシアナート基等が挙げられる。この官能基同士の間で縮合反応を行わせることが可能である。

【 0 1 3 8 】

50

リンカーを介さない結合方法としては例えば、EDC等のカルボジイミド化合物を用いる方法等が挙げられる。この場合、NHS又はその誘導体等の活性エステルを使用することも可能である。イソチオシアナート基とアミノ基の間の縮合反応は、他の試薬を必要とせず、中性～弱アルカリ性の条件で混合するだけで進行するため、好ましい。

【0139】

リンカーとしては、例えば、該各物質の官能基に反応する官能基と、標識物質の官能基に反応する官能基の両方の官能基を分子内に有するものが挙げられ、第2抗体のアミノ酸残基と反応することができる第1の官能基と、標識物質の官能基と反応することができる第2の官能基とを同一分子内に有する分子が好ましく、その中でも、第1の官能基と第2の官能基とが異なる基である分子が特に好ましい。リンカーの官能基としては、例えば前述の官能基が挙げられる。

10

【0140】

放射性同位元素を化学的に結合させる方法としては、例えば文献[Antibody Immunoconjug. Radiopharm., vol.3, p.60 (1990)]記載の方法が挙げられる。

【0141】

標識物質が酵素、アビジン、蛍光を発する蛋白質、フィコビリ蛋白質、タグ配列を含むポリペプチド等のポリペプチドである場合には、公知の遺伝子組換え技術[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)]に従って、標識物質と抗体の融合蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクターを作製し、発現ベクターを適当な宿主に導入して、宿主を培養することにより製造することができる。融合蛋白質をコードするDNAは、抗体及び標識物質をそれぞれコードするDNAをPCR等でクローニングし、それぞれのDNAをリガーゼ反応で連結することにより得ることができる。

20

【0142】

検出工程、すなわち、測定方法1、2、5及び6の工程(3)、及び、測定方法3及び4の工程(2)において、測定方法1、2、5及び6の工程(2)で生成した免疫複合体中の標識物質の量、及び、測定方法3及び4の工程(1)で生成した免疫複合体中の標識物質の量を測定する場合、標識物質の量の測定は、標識物質に応じて適切な方法を選択することができる。標識物質が発色物質、すなわち、ある波長の光を吸収する物質の場合には、分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等を用いることができる。標識物質が蛍光物質の場合には、蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等を用いることができる。標識物質が発光物質の場合には、発光光度計や発光マルチウェルプレートリーダー等を用いることができる。標識物質が放射性同位元素である場合、放射性同位元素の量は、放射活性をシンチレーションカウンター、 γ -ウェルカウンター等により測定することができる。

30

【0143】

標識物質が酵素である場合、標識物質の量の測定とは、酵素活性を測定することを意味する。酵素の基質を該酵素と反応させ、生成した物質を測定することにより、酵素活性、すなわち、標識物質の量を測定することができる。酵素がペルオキシダーゼである場合には、例えば吸光度法、蛍光法、発光法等によりペルオキシダーゼ活性を測定することができる。吸光度法によりペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼとその基質である過酸化水素及び酸化発色型色原体の組み合わせとを反応させ、反応液の吸光度を分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。酸化発色型色原体としては、例えばロイコ型色原体、酸化カップリング発色型色原体等が挙げられる。

40

【0144】

ロイコ型色原体は、過酸化水素及びペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、単独で色素へ変換される物質である。具体的には、テトラメチルベンジジン、o-フェニレンジアミン、10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(CCAP)、10-N-メチルカルバモイル-3,7-ピ

50

ス（ジメチルアミノ）- 10H - フェノチアジン（MCDP）、N - （カルボキシメチルアミノカルボニル）- 4, 4' - ビス（ジメチルアミノ）ジフェニルアミン ナトリウム塩（DA-64）、4, 4' - ビス（ジメチルアミノ）ジフェニルアミン、ビス〔3 - ビス（4 - クロロフェニル）メチル - 4 - ジメチルアミノフェニル〕アミン（BCMA）等が挙げられる。

【0145】

酸化カップリング発色型色原体は、過酸化水素及びペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、2つの化合物が酸化的カップリングして色素を生成する物質である。2つの化合物の組み合わせとしては、カブラーとアニリン類（トリンダー試薬）との組み合わせ、カブラーとフェノール類との組み合わせ等が挙げられる。カブラーとしては、例えば4 - アミノアンチピリン（4-AA）、3 - メチル - 2 - ベンゾチアゾリノンヒドラジン等が挙げられる。アニリン類としては、N - （3 - スルホプロピル）アニリン、N - エチル - N - （2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル） - 3 - メチルアニリン（TOOS）、N - エチル - N - （2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル） - 3, 5 - ジメチルアニリン（MAOS）、N - エチル - N - （2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル） - 3, 5 - ジメトキシアニリン（DAOS）、N - エチル - N - （3 - スルホプロピル） - 3 - メチルアニリン（TOPS）、N - （2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル） - 3, 5 - ジメトキシアニリン（HDAOS）、N, N - ジメチル - 3 - メチルアニリン、N, N - ジ（3 - スルホプロピル） - 3, 5 - ジメトキシアニリン、N - エチル - N - （3 - スルホプロピル） - 3 - メトキシアニリン、N - エチル - N - （3 - スルホプロピル）アニリン、N - エチル - N - （3 - スルホプロピル） - 3, 5 - ジメトキシアニリン、N - （3 - スルホプロピル） - 3, 5 - ジメチルアニリン、N - エチル - N - （2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル） - 3 - メトキシアニリン、N - エチル - N - （2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル）アニリン、N - エチル - N - （3 - メチルフェニル） - N' - サクシニルエチレンジアミン（EMSE）、N - エチル - N - （3 - メチルフェニル） - N' - アセチルエチレンジアミン、N - エチル - N - （2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル） - 4 - フルオロ - 3, 5 - ジメトキシアニリン（F-DAOS）等が挙げられる。フェノール類としては、フェノール、4 - クロロフェノール、3 - メチルフェノール、3 - ヒドロキシ - 2, 4, 6 - トリヨード安息香酸（HTIB）等が挙げられる。

【0146】

蛍光法によりペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼとその基質である過酸化水素及び蛍光物質の組み合わせとを反応させ、蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等で生成した蛍光の強度を測定する方法等が挙げられる。該蛍光物質としては、例えば4 - ヒドロキシフェニル酢酸、3 - （4 - ヒドロキシフェニル）プロピオン酸、クマリン等が挙げられる。

【0147】

発光法によるペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼとその基質である過酸化水素及び発光物質の組み合わせとを反応させ、発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で生成した発光の強度を測定する方法等が挙げられる。該発光物質としては、例えばルミノール化合物、ルシゲニン化合物等が挙げられる。

【0148】

酵素がアルカリホスファターゼである場合には、例えば発光法等によりアルカリホスファターゼ活性を測定することができる。発光法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する方法としては、例えばアルカリホスファターゼとその基質とを反応させ、生成した発光の発光強度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。アルカリホスファターゼの基質としては、例えば3 - （2' - スピロアダマンタン） - 4 - メトキシ - 4 - （3' - ホスホリルオキシ）フェニル - 1, 2 - ジオキセタン・二ナトリウム塩（AMPPD）、2 - クロロ - 5 - {4 - メトキシスピロ[1, 2 - ジオキセタン - 3, 2' - （5' - クロロ）トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン]

- 4 - イル } フェニルホスフェート・二ナトリウム塩 (C D P - S t a r (登録商標)) 、 3 - { 4 - メトキシスピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - (5 ' - クロロ) トリシクロ [3 . 3 . 1 . 1 ³ , 7] デカン] - 4 - イル } フェニルホスフェート・二ナトリウム塩 (C S P D (登録商標)) 、 9 - [(フェニルオキシ) (ホスホリルオキシ) メチリデン] - 10 - メチルアクリダン・二ナトリウム、 9 - [(4 - クロロフェニルチオ) (ホスホリルオキシ) メチリデン] - 10 - メチルアクリダン・二ナトリウム (L u m i g e n (登録商標) A P S - 5) 等が挙げられる。

【 0 1 4 9 】

酵素が β - D - ガラクトシダーゼである場合には、例えば吸光度法 (比色法) 、 発光法又は蛍光法等により β - D - ガラクトシダーゼ活性を測定することができる。吸光度法 (比色法) により β - D - ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えば、 β - D - ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の吸光度を分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。 β - D - ガラクトシダーゼの基質としては、例えば、*o* - ニトロフェニル - β - D - ガラクトピラノシド等が挙げられる。発光法により β - D - ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えば β - D - ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の発光強度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。 β - D - ガラクトシダーゼの基質としては、例えばガラクトン - プラス [Galacton-Plus、アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製] 又はその類似化合物等が挙げられる。蛍光法により β - D - ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えば β - D - ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の蛍光度を蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。 β - D - ガラクトシダーゼの基質としては、例えば 4 - メチルウンベリフェリル - β - D - ガラクトピラノシド等が挙げられる。

【 0 1 5 0 】

酵素がルシフェラーゼである場合には、例えば発光法等によりルシフェラーゼ活性を測定することができる。発光法によりルシフェラーゼ活性を測定する方法としては、例えばルシフェラーゼとその基質とを反応させ、反応液の発光強度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。ルシフェラーゼの基質としては、例えばルシフェリン、セレンテラジン等が挙げられる。

【 0 1 5 1 】

標識物質が蛍光物質、発光物質、放射性同位元素及び酵素以外の物質 (物質 A とする) である場合は、物質 A に特異的に結合する物質 (物質 B) を蛍光物質、発光物質、放射性同位元素、酵素等で標識した標識化物質 B と、検出工程で生成した物質 A を含有する免疫複合体とを反応させて、物質 A 及び標識化物質 B を含有する免疫複合体を生成させて、生成したこの免疫複合体中の標識化物質 B の量を前述の方法により測定することにより、試料中の測定対象成分を測定することができる。物質 B としては、例えば物質 A に対する抗体、アビジン (物質 A が、ビオチンの場合) 、ストレプトアビジン (物質 A が、ビオチンの場合) 、ビオチン (物質 A が、アビジン、ストレプトアビジンの場合) 等が挙げられる。物質 A に対する抗体としては、抗体フラグメントでもよく、抗体フラグメントとしては、例えば前述の F a b 、 F (a b ') ₂ 、 F a b ' 等が挙げられる。

【 0 1 5 2 】

本発明の測定方法において、抗原抗体反応、すなわち、測定方法 1 、 2 、 5 及び 6 の工程 (1) 及び工程 (2) 、 及び、測定方法 3 及び 4 の工程 (1) は水性媒体中で行われてもよい。また、本発明の測定方法において、検出工程は水性媒体中で行われてもよい。本発明の測定方法において使用される水性媒体としては、本発明の測定方法を可能とする水性媒体であれば特に制限はなく、例えば脱イオン水、蒸留水、緩衝液等が挙げられ、緩衝液が好ましい。緩衝液の調製に使用される緩衝剤としては、緩衝能を有するものならば特に限定されないが、pH 1 ~ 11 の例えば乳酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、コハク酸緩衝剤、フタル酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ジエタノールアミン緩衝剤、リジン緩衝剤、バルビツール緩衝剤、イミダゾール緩衝剤、リンゴ酸

10

20

30

40

50

緩衝剤、シュウ酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、炭酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、トリス緩衝剤、グッド緩衝剤等が挙げられる。

【0153】

グッド緩衝剤としては、例えば2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)緩衝剤、ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)緩衝剤、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)緩衝剤、N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)緩衝剤、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)緩衝剤、2-[N-(2-アセトアミド)アミノ]エタンスルホン酸(ACES)緩衝剤、3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(MOPSO)緩衝剤、2-[N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]エタンスルホン酸(BES)緩衝剤、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)緩衝剤、2-{N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ}エタンスルホン酸(TES)緩衝剤、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(2-スルホエチル)ピペラジン(HEPES)緩衝剤、3-[N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIPSO)緩衝剤、2-ヒドロキシ-3-{[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ}プロパンスルホン酸(TAPSO)緩衝剤、ピペラジン-N,N'-ビス(2-ヒドロキシプロパン-3-スルホン酸)(POPSO)緩衝剤、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)ピペラジン(HEPPSO)緩衝剤、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(3-スルホプロピル)ピペラジン(EPPS)緩衝剤、トリシン[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン]緩衝剤、ピシン[N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン]緩衝剤、3-[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノプロパンスルホン酸(TAPS)緩衝剤、2-(N-シクロヘキシルアミノ)エタンスルホン酸(CHES)緩衝剤、3-(N-シクロヘキシルアミノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(CAPSO)緩衝剤、3-(N-シクロヘキシルアミノ)プロパンスルホン酸(CAPS)緩衝剤等が挙げられる。

【0154】

緩衝液の濃度は測定に適した濃度であれば特に制限はされないが、0.001~2.0 mol/Lが好ましく、0.005~1.0 mol/Lがより好ましく、0.01~0.1 mol/Lが特に好ましい。

【0155】

本発明の測定方法においては、金属イオン、塩類、糖類、防腐剤、蛋白質、蛋白質安定化剤等を共存させることができる。金属イオンとしては、例えばマグネシウムイオン、マンガンイオン、亜鉛イオン等が挙げられる。塩類としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム等が挙げられる。糖類としては、例えばマンニトール、ソルビトール等が挙げられる。防腐剤としては、例えばアジ化ナトリウム、抗生物質(ストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等)、バイオエース、プロクリン300、プロキセル(Proxel)GXL等が挙げられる。蛋白質としては、例えばウシ血清アルブミン(BSA)、ウシ胎児血清(FBS)、カゼイン、ブロックエース(大日本製薬社製)等が挙げられる。蛋白質安定化剤としては、例えばペルオキシダーゼ安定化緩衝液[Peroxidase Stabilizing Buffer、ダコサイトメーション(DakoCytomation)社製]等が挙げられる。

【0156】

[3] コアフコシル化ヒトIgG測定試薬

本発明のコアフコシル化ヒトIgG測定試薬は、本発明のコアフコシル化ヒトIgGの測定方法に用いられる試薬であり、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を含有することを特徴とする試薬である。本発明の測定試薬の具体的態様を以下に示す。

【0157】

・測定試薬1

本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を含む、試料中のコアフコシ

ル化ヒト I g G 測定試薬。

【0158】

・測定試薬2

不溶性担体に固定化された、本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片を含む、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 測定試薬。

抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体は、試料と抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体との反応の反応液中で生成されてもよい。この場合、本発明の測定試薬には、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体の代わりに、一組の親和性物質の片方 (G) が結合した抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片と、一組の親和性物質のもう一方 (g) が結合した不溶性担体とが含まれる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、G と g の組み合わせとしては、例えば以下の組み合わせ等が挙げられる。

- ・ビオチン - アビジン類 (アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等) ;
- ・アビジン類 (アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン等) - ビオチン ;
- ・抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体の F c 領域 - F c 領域と結合する抗体。

【0159】

・測定試薬3

本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片、及び、N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体を含む、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 測定試薬。

【0160】

・測定試薬4

不溶性担体に固定化された、本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片、及び、N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体を含む、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 測定試薬。

N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体は、標識物質により標識化されていることが好ましい。また、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体は、試料と抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片との反応の反応液中で生成されてもよい。この場合、本発明の測定試薬には、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体の代わりに、一組の親和性物質の片方 (A) が結合した抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片と、一組の親和性物質のもう一方 (a) が結合した不溶性担体とが含まれる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、A と a の組み合わせとしては、例えば前述の A と a の組み合わせ等が挙げられる。

【0161】

・測定試薬5

不溶性担体に固定化された、N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体、及び、本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片を含む、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 測定試薬。

抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片は、標識物質により標識化されていることが好ましい。また、N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体が固定化された不溶性担体は、試料と、N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体との反応の反応液中で生成されてもよい。この場合、本発明の測定試薬には、N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体が固定化された不溶性担体の代わりに、一組の親和性物質の片方 (B) が結合した、N 結合型糖鎖を F c 領域に含むヒト I g G に結合する抗体と、一組の親和性物質のもう一方 (b) が結合した不溶性担体とが含まれる。

一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、B と b の組み合わせとしては、例えば前述の B と b の組み合わせ等が挙げられる。

【0162】

・測定試薬 6

不溶性担体上に固定化された、本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片、及び、コアフコシル化ヒト I g G の競合物質に標識物質が結合した標識化競合物質を含む、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 測定試薬。

抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体は、試料と抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片との反応の反応液中で生成されてもよい。この場合、本発明の測定試薬には、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体の代わりに、一組の親和性物質の片方 (C) が結合した抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片と、一組の親和性物質のもう一方 (c) が結合した不溶性担体とが含まれる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、C と c の組み合わせとしては、例えば前述の C と c の組み合わせ等が挙げられる。

10

【0163】

・測定試薬 7

不溶性担体上に固定化された、コアフコシル化ヒト I g G の競合物質、及び、本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片を含む、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 測定試薬。

抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片は、標識物質により標識化されていてもよい。また、コアフコシル化ヒト I g G の競合物質が固定化された不溶性担体は、コアフコシル化ヒト I g G の競合物質と抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片との反応の反応液中で生成されてもよい。この場合、本発明の測定試薬には、コアフコシル化ヒト I g G の競合物質が固定化された不溶性担体の代わりに、一組の親和性物質の片方 (D) が結合したコアフコシル化ヒト I g G の競合物質と、一組の親和性物質のもう一方 (d) が結合した不溶性担体とが含まれる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、D と d の組み合わせとしては、例えば前述の D と d の組み合わせ等が挙げられる。

20

【0164】

・測定試薬 8

本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片、及び、コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原を含む、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 測定試薬。

【0165】

・測定試薬 9

不溶性担体上に固定化された、コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原、及び、本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片を含む、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 測定試薬。

30

抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片は、標識物質で標識化されていることが好ましい。また、コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原が固定化された不溶性担体は、試料と、コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原との反応の反応液中で生成されてもよい。この場合、本発明の測定試薬には、コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原が固定化された不溶性担体の代わりに、一組の親和性物質の片方 (E) が結合した、コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原と、一組の親和性物質のもう一方 (e) が結合した不溶性担体とが含まれる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、E と e の組み合わせとしては、例えば前述の E と e の組み合わせ等が挙げられる。

40

【0166】

・測定試薬 10

不溶性担体上に固定化された、本発明の抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片、及び、コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原を含む、試料中のコアフコシル化ヒト I g G 測定試薬。

コアフコシル化ヒト I g G が反応する抗原は、標識物質で標識化されていることが好ましい。また、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体は、試料と抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該抗体断片との反応の反応液中で生成されてもよい。この場合、本発明の測定試薬には、抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体又は該

50

抗体断片が固定化された不溶性担体の代わりに、一組の親和性物質の片方（F）が結合した抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片と、一組の親和性物質のもう一方（f）が結合した不溶性担体とが含まれる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Fとfの組み合わせとしては、例えば前述のFとfの組み合わせ等が挙げられる。

【0167】

本発明の測定試薬は、保存、運搬、流通等の観点から、キットの形態を取ることでもできる。キットの形態としては、例えば2試薬系キット、3試薬系キット等が挙げられる。本発明の測定キットの具体的態様を以下に示す。

【0168】

・測定キット1

本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を含有する第1試薬と、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体を含有する第2試薬とを含むキット。

【0169】

・測定キット2

不溶性担体に固定化された、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を含有する第1試薬と、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体を含有する第2試薬とを含むキット。

N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体は、標識物質により標識化されていることが好ましい。抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体は、試料と抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片との反応の反応液中で生成されてもよい。この場合、本発明の測定キットには、一組の親和性物質の片方（A）が結合した抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片と、一組の親和性物質のもう一方（a）が結合した不溶性担体とがそれぞれ別の試薬に含まれることが好ましく、例えば測定キット3の態様が挙げられる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Aとaの組み合わせとしては、例えば前述のAとaの組み合わせ等が挙げられる。

【0170】

・測定キット3

一組の親和性物質の片方（A）が結合した抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を含有する第1試薬と、一組の親和性物質のもう一方（a）が結合した不溶性担体を含有する第2試薬と、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体を含有する第3試薬とを含むキット。

一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Aとaの組み合わせとしては、例えば前述のAとaの組み合わせ等が挙げられる。

【0171】

・測定キット4

不溶性担体に固定化された、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体を含有する第1試薬と、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を含有する第2試薬とを含むキット。

抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片は、標識物質により標識化されていることが好ましい。N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体が固定化された不溶性担体は、試料と、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体との反応の反応液中で生成されてもよい。この場合、本発明の測定キットには、一組の親和性物質の片方（B）が結合した、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体と、一組の親和性物質のもう一方（b）が結合した不溶性担体とがそれぞれ別の試薬に含まれることが好ましく、例えば測定キット5の態様が挙げられる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Bとbの組み合わせとしては、例えば前述のBとbの組み合わせ等が挙げられる。

【0172】

・測定キット5

一組の親和性物質の片方（B）が結合した、N結合型糖鎖をFc領域に含むヒトIgGに結合する抗体を含有する第1試薬と、一組の親和性物質のもう一方（b）が結合した不溶性担体を含有する第2試薬と、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を含有する第3試薬とを含むキット。

一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Bとbの組み合わせとしては、例えば前述のBとbの組み合わせ等が挙げられる。

【0173】

・測定キット6

不溶性担体に固定化された、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を含有する第1試薬と、コアフコシル化ヒトIgGの競合物質に標識物質が結合した標識化競合物質を含む第2試薬とを含有するキット。

抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体は、試料と抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片との反応の反応液中で生成されてもよい。この場合、本発明の測定キットには、一組の親和性物質の片方（C）が結合した抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片と、一組の親和性物質のもう一方（c）が結合した不溶性担体とがそれぞれ別の試薬に含まれることが好ましく、例えば測定キット7の態様が挙げられる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Cとcの組み合わせとしては、例えば前述のCとcの組み合わせ等が挙げられる。

【0174】

・測定キット7

一組の親和性物質の片方（C）が結合した抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を含有する第1試薬と、一組の親和性物質のもう一方（c）が結合した不溶性担体を含有する第2試薬と、コアフコシル化ヒトIgGの競合物質に標識物質が結合した標識化競合物質を含有する第3試薬とを含むキット。

一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Cとcの組み合わせとしては、例えば前述のCとcの組み合わせ等が挙げられる。

【0175】

・測定キット8

不溶性担体に固定化された、コアフコシル化ヒトIgGの競合物質を含有する第1試薬と、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を含有する第2試薬とを含むキット。

抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片は、標識物質により標識化されていてもよい。また、コアフコシル化ヒトIgGの競合物質が固定化された不溶性担体は、コアフコシル化ヒトIgGの競合物質と抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片との反応の反応液中で生成されてもよい。この場合、本発明の測定キットには、一組の親和性物質の片方（D）が結合したコアフコシル化ヒトIgGの競合物質と、一組の親和性物質のもう一方（d）が結合した不溶性担体とがそれぞれ別の試薬に含まれることが好ましく、例えば測定キット9の態様が挙げられる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Dとdの組み合わせとしては、例えば前述のDとdの組み合わせ等が挙げられる。

【0176】

・測定キット9

一組の親和性物質の片方（D）が結合した、コアフコシル化ヒトIgGの競合物質を含有する第1試薬と、一組の親和性物質のもう一方（d）が結合した不溶性担体を含有する第2試薬と、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を含有する第3試薬とを含むキット。

一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、Dとdの組み合わせとしては、例えば前述のDとdの組み合わせ等が挙げられる。

【0177】

・測定キット10

本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を含有する第1試薬と、コア

10

20

30

40

50

フコシル化ヒト IgG が反応する抗原を含有する第 2 試薬とを含むキット。

【0178】

・測定キット 11

不溶性担体上に固定化された、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原を含有する第 1 試薬と、本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片を含有する第 2 試薬とを含むキット。

抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片は、標識物質で標識化されていることが好ましい。また、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原が固定化された不溶性担体は、試料とコアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原との反応の反応液中で生成されてもよい。この場合、本発明の測定キットには、一組の親和性物質の片方 (E) が結合した、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原と、一組の親和性物質のもう一方 (e) が結合した不溶性担体とがそれぞれ別の試薬に含まれることが好ましく、例えば測定キット 12 の態様が挙げられる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、E と e の組み合わせとしては、例えば前述の E と e の組み合わせ等が挙げられる。

10

【0179】

・測定キット 12

一組の親和性物質の片方 (E) が結合した、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原を含有する第 1 試薬と、一組の親和性物質のもう一方 (e) が結合した不溶性担体を含有する第 2 試薬と、抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片を含有する第 3 試薬とを含むキット。

20

一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、E と e の組み合わせとしては、例えば前述の E と e の組み合わせ等が挙げられる。

【0180】

・測定キット 13

不溶性担体上に固定化された、本発明の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片を含有する第 1 試薬と、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原を含有する第 2 試薬とを含有するキット。

コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原は、標識物質で標識化されていることが好ましい。また、抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片が固定化された不溶性担体は、試料と抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片との反応の反応液中で生成されてもよい。この場合、本発明の測定キットには、一組の親和性物質の片方 (F) が結合した抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片と、一組の親和性物質のもう一方 (f) が結合した不溶性担体とがそれぞれ別の試薬に含まれることが好ましく、例えば測定キット 14 の態様が挙げられる。一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、F と f の組み合わせとしては、例えば前述の F と f の組み合わせ等が挙げられる。

30

【0181】

・測定キット 14

一組の親和性物質の片方 (F) が結合した抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片を含有する第 1 試薬と、一組の親和性物質のもう一方 (f) が結合した不溶性担体を含有する第 2 試薬と、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原を含有する第 3 試薬とを含むキット。

40

一組の親和性物質の組み合わせ、すなわち、F と f の組み合わせとしては、例えば前述の F と f の組み合わせ等が挙げられる。

本発明の測定試薬及び測定キットにおける抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片、N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体、コアフコシル化ヒト IgG の競合物質、標識物質、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原、不溶性担体としては、例えば前述の抗コアフコシル化ヒト IgG 抗体又は該抗体断片、N 結合型糖鎖を Fc 領域に含むヒト IgG に結合する抗体、コアフコシル化ヒト IgG の競合物質、標識物質、コアフコシル化ヒト IgG が反応する抗原、不溶性担体がそれぞれ挙げられる。

【0182】

50

本発明の測定試薬及び測定キットは、必要に応じて、水性媒体、金属イオン、塩類、糖類、防腐剤、蛋白質、蛋白質安定化剤等を含むことができる。水性媒体、金属イオン、塩類、糖類、防腐剤、蛋白質、蛋白質安定化剤としては、例えば前述の水性媒体、金属イオン、塩類、糖類、防腐剤、蛋白質、蛋白質安定化剤等がそれぞれ挙げられる。本発明の測定試薬及び測定キットの形態としては、本発明の測定方法を可能とする形態であれば特に制限はなく、例えば溶液形態、凍結乾燥形態等の形態を取ることができる。

【0183】

[4] コアフコシル化ヒトIgGの精製方法

本発明のコアフコシル化ヒトIgGの精製方法は、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を用いる精製方法である。本発明のコアフコシル化ヒトIgGの精製方法は、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片を用いて、試料中のコアフコシル化ヒトIgGを精製できれば特に制限はなく、例えば以下の工程を含む精製方法等が挙げられる。

(1) 試料と、本発明の抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片とを反応させて、試料中のコアフコシル化ヒトIgGと抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片の免疫複合体を生成させる工程；

(2) 工程(1)で生成した免疫複合体から、コアフコシル化ヒトIgGを遊離させる工程；

(3) 工程(2)で遊離したコアフコシル化ヒトIgGを回収する工程。

【0184】

抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片は、不溶性担体に固定化されていても、固定化されていなくてもよいが、不溶性担体に固定化されていることが好ましい。すなわち、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片が固定化されている不溶性担体は、試料中のコアフコシル化ヒトIgGの精製に好適に使用される。試料としては、例えば前述の試料等が挙げられる。不溶性担体としては、例えば前述の不溶性担体等が挙げられる。

【0185】

抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片が不溶性担体に固定化されている場合、工程(1)と工程(2)の間に、抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片が固定化されている不溶性担体に結合した試料中のコアフコシル化ヒトIgG以外の物質を洗浄液で洗い流す工程が含まれていてもよい。洗浄液としては、不溶性担体上に生成した、コアフコシル化ヒトIgGと抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片の免疫複合体を安定に保持し、不溶性担体から該免疫複合体を遊離させることなく、試料中のコアフコシル化ヒトIgG以外の物質を洗い流すことができる洗浄液であれば特に制限はなく、例えばPBS緩衝液等が挙げられる。

【0186】

抗コアフコシル化ヒトIgG抗体又は該抗体断片が不溶性担体に固定化されている場合、工程(2)において、工程(1)で生成した免疫複合体からコアフコシル化ヒトIgGを遊離させるために溶離液が使用される。溶離液としては、工程(1)で生成した免疫複合体を遊離させることなく、該免疫複合体からコアフコシル化ヒトIgGを遊離させる溶液であれば特に制限はなく、例えばグリシン-塩酸溶液等が挙げられる。

【0187】

工程(3)において、遊離したコアフコシル化ヒトIgGを回収し、精製されたコアフコシル化ヒトIgGを得ることができる。

【実施例】

【0188】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。尚、以下の実施例においては、次のメーカーの試薬類を使用した。

【0189】

Tris(和光純薬工業社製)、EDTA(同仁化学研究所社製)、塩化カリウム(和

10

20

30

40

50

光純薬工業社製)、塩化ナトリウム(和光純薬工業社製)、リン酸水素二ナトリウム(関東化学社製)、リン酸二水素ナトリウム(関東化学社製)、リン酸二水素カリウム(和光純薬工業社製)、塩化マグネシウム(和光純薬工業社製)、クマシー・プリリアント・ブルー(ナカライテスク社製)、BSA(プロライアント社製)、Tween 20(ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート; 関東化学社製)、TMB-ONE(主成分: 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン; ケム・エン・テック社製)、0.5 mol/L 硫酸(和光純薬工業社製)、過ヨウ素酸ナトリウム(和光純薬工業社製)、エチレングリコール(和光純薬工業社製)、グリシン(関東化学社製)、炭酸水素ナトリウム(和光純薬工業社製)、クエン酸(和光純薬工業社製)、クエン酸ナトリウム(和光純薬工業社製)、重炭酸アンモニウム(和光純薬工業社製)、DTT(ジチオトレイトール; シグマアルドリッチ社製)、ヨードアセトアミド(和光純薬工業社製)、塩酸(和光純薬工業社製)、酢酸(和光純薬工業社製)、アセトニトリル(和光純薬工業社製)、グアニジン(和光純薬工業社製)、トリエチルアミン(和光純薬工業社製)、メタノール(和光純薬工業社製)、無水酢酸(和光純薬工業社製)、DMSO(和光純薬工業社製)、MTT(1-メチル-3-p-トリルトリアゼン、東京化成工業社製)。

10

【0190】

[参考例1] 抗原の調製

(1) 抗原発現ベクターの調製

(1-1) 変異型ヒトIgG4Fc領域を有するベクターpBSHCy4SPの構築

国際公開第1997/10354号に記載の野生型ヒトIgG4サブクラスの定常領域をコードするcDNAを有するプラスミドpBSHCy4を用いて、野生型ヒトIgG4サブクラスの定常領域(ヒンジ領域)の108番目のSerがProに置換された変異型ヒトIgG4サブクラスの定常領域を有するプラスミドpBSHCy4SPを構築した。本改変を行うことによりIgGヒンジ領域を介した2量体形成が安定化することが知られている(モレキュラー・イムノロジー、30, 105, 1993)。

20

【0191】

鋳型としてプラスミドpBSHCy4の1ngを含む50μLの反応液[10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM 塩化カリウム、1.5mM 塩化マグネシウム、0.001% ゼラチン、200μM dNTPs、0.5μM Primer 1、0.5μM Primer 2及び2unitsのTakara Ex Taq DNA polymerase]を調製し、GeneAmp PCR system 9700(パーキンエルマー社製)を用いて94℃にて2分間、55℃にて2分間、72℃にて2分間のサイクルを30サイクル行った。

30

【0192】

該反応液をQIAquick PCR Purification Kit(キアゲン社製)を用いて添付の使用説明書に従い精製した後、制限酵素EcoT14I(タカラバイオ社製)で処理し、0.8%アガロースゲル電気泳動にて分離後、QIAquick Gel Extraction Kit(キアゲン社製)を用いて添付の使用説明書に従い、増幅断片を回収した。

40

【0193】

プラスミドpBSHCy4を制限酵素EcoT14Iで切断後、Alkaline phosphatase(タカラバイオ社製)処理により5'末端のリン酸を除去し、同様に0.8%アガロースゲル電気泳動にて分離後、QIAquick Gel Extraction Kitを用いて添付の使用説明書に従い、プラスミド断片を回収した。前記で回収した増幅断片とプラスミドpBSHCy4由来のプラスミド断片を連結し、目的のcDNAを含むプラスミドpBSHCy4SPを構築した。

【0194】

(1-2) ヒトIgG4Fc領域の部分配列を含むcDNAのクローニング

以下に示すPCRを行うことにより、5'末端に制限酵素NotIサイト、3'末端にBamHI制限酵素サイトを有するヒトIgG4Fc領域をコードするDNA断片を増幅

50

した。0.2 mmol/L dNTPs、1 mmol/L 塩化マグネシウムを含む反応液に、前記(1-1)で構築したpBS hCy4SP 25 ng、1 μmol/L 前記の制限酵素サイトを有するヒトIgG4Fc領域をコードするDNA断片を特異的に増幅する2種類のプライマー、及び2.5単位のKOD polymerase(東洋紡社製)を用いて、合計50 μLとし、PCRを行った。

【0195】

反応条件は98℃ 15秒間、68℃ 30秒間のサイクルを25サイクルで行った。該反応液を2%アガロースゲル電気泳動で分離後、約700 bpのPCR産物をZero Blunt PCR Cloning Kit(インビトロジェン社製)を用いて添付の使用説明書に従ってPCR-Bluntベクターに導入した。本プラスミドをPCR IgG4FcNotIBamHIとした。

10

【0196】

(1-3) FLAGタグをコードするDNAの合成

5'末端に制限酵素BamHIサイト、3'末端にSalI制限酵素サイトを有するFLAGタグをコードするDNA断片を、固相合成法により合成した。

【0197】

(1-4) 動物細胞用発現ベクターpKANTEX XhoI/SalIの構築

国際公開第1997/10354号に記載されているヒト化抗体発現ベクターpKANTEX93を制限酵素XhoI(タカラバイオ社製)及び制限酵素SalI(タカラバイオ社製)で消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動で分離後、Gel Extract 20
ion Kit(キアゲン社製)を用いて約9.8 kbpのプラスミド断片を回収した。回収したDNA断片の5'及び3'末端をDNA Ligation Kit(タカラバイオ社製)を用いて連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5α株(東洋紡社製)を形質転換した。

【0198】

得られた複数のアンピシリン耐性コロニーより、QIAprep Spin Miniprep Kit(キアゲン社製)を用いて組換えプラスミドDNAを単離し、抗体軽鎖の発現ユニットが除かれていることを制限酵素NotI(タカラバイオ社製)及びKpnI(タカラバイオ社製)消化により確認した。該プラスミドをpKANTEX XhoI/SalIと命名した。

30

【0199】

(1-5) ヒトIgG4 Fc領域発現プラスミドpKANTEX hIgG4Fc-FLAGの作製

前記(1-2)で作製したPCR IgG4FcNotIBamHIを、NotI及びBamHIを用いて消化することにより得られる断片、及び、前記(1-3)で作製した、5'末端に制限酵素BamHIサイト、3'末端にSalI制限酵素サイトを有するFLAGタグをコードするDNA断片を、前記(1-4)で得られたpKANTEX XhoI/SalIをNotI及びSalI消化して得られる約8.8 kbpのDNA断片に連結することにより、ヒトIgG4のFc領域に、該ヒトIgG4のFc領域のC末端にFLAGタグを付加した融合蛋白質を発現するためのプラスミドpKANTEX hIgG4Fc-FLAGを得た(図2)。

40

【0200】

該pKANTEX hIgG4Fc-FLAGを、公知の方法(Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Edition published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)で大腸菌DH5αに導入した。アンピシリン耐性を獲得した大腸菌DH5αを100 mLのLB培地(ベクトン・ディッキンソン・バイオサイエンス社製)に播種し、37℃で12時間培養を行った後に菌体を回収し、Qiafilter Plasmid Midi Kit(キアゲン社製)を用いてプラスミドDNAを精製した。該プラスミドDNA 30 μgを、制限酵素BspEI(ニュー・イングランド・

50

バイオラボ社製)を用いて37℃で12時間反応させ、線状化した。線状化後、フェノール・クロロフォルム抽出処理及びエタノール沈殿を行い、回収した該線状化DNAを、プラスミド溶解液[1mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、0.1mmol/L EDTA]に溶解し、抗原発現ベクターを調製した。

【0201】

(2) 抗原hIgG4Fc-FLAGの発現

BIO TECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 87, 614 (2004)に記載の方法に従い、CHO細胞のゲノム上のすべてのFut8をコードする遺伝子をすべて破壊したFut8ノックアウトCHO細胞(以下、Fut8KO CHO細胞と記載する)を樹立した。樹立したFut8KO CHO細胞及びその親株であるCHO細胞に、エレクトポレーション法により(1)で調製した抗原発現ベクター、すなわち、線状化プラスミドDNA pKANTE X hIgG4Fc-FLAGを導入した。エレクトポレーション法による遺伝子導入は以下の手順で行った。基本培地[10%(v/v) ウシ胎児血清(インビトロジェン社製)、50µg/mL Gentamycin(ナカライテスク社製)を添加したIscove's Modified Dulbecco's Medium(インビトロジェン社製)]で継代した各CHO細胞を、K-PBS緩衝液[137mmol/L 塩化カリウム、2.7mmol/L 塩化ナトリウム、8.1mmol/L リン酸水素二ナトリウム、1.5mmol/L リン酸二水素カリウム、4mmol/L 塩化マグネシウム]に懸濁して 8×10^6 個/mLとし、細胞懸濁液を調製した。調製した細胞懸濁液200µL(1.8×10^6 個)を前記(1)で調製した線状化プラスミドDNA pKANTE X hIgG4Fc-FLAG 10µgと混合した。この細胞-DNA混合液を電極間距離が2mmであるGene Pulser Cuvette(バイオラッド社製)へ移した後、遺伝子導入装置Gene Pulser II(バイオラッド社製)を用いて、パルス電圧0.35kV、電気容量250µFの条件で遺伝子導入を行った。この細胞懸濁液を基本培地10mLに混和し、75cm²接着細胞用フラスコ(グライナー社製)に播種し、37℃、5% CO₂インキュベーター内で培養を行った。3日間培養した後、G418(シグマアルドリッチ社製)を最終濃度が0.5mg/mLになるように添加して、さらに10日間培養した。10日後、182cm²接着細胞用フラスコ(グライナー社製)に継代し、コンフルエントになるまで培養を続けた。コンフルエントになった時点で、CHO細胞用無血清培地Hyclone CDM4CHO(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)に培地交換を行い、1週間培養後に培養上清を回収した。

【0202】

(3) 抗原hIgG4Fc-FLAGの精製

(2)で培養を行った培養上清を、3000rpm、4℃の条件で10分間遠心分離し、上清を回収した後、0.22µm孔径セルロースアセテートメンブレン(コーニング社製)を用いて上清を濾過した。rProtein A GraviTrapカラム(GEヘルスケア・ジャパン社製)をPBS緩衝液[150mmol/L 塩化ナトリウムを含有する、10mmol/L リン酸緩衝液(pH7.4)]で平衡化後、濾過済み培養上清をカラムに通塔し、PBS緩衝液で洗浄後、rProtein Aに結合したhIgG4Fc-FLAGを0.1mol/L グリシン-HCl溶液(pH2.7)で溶出した。hIgG4Fc-FLAGを含む溶出液の溶媒を、PD-10カラム(GEヘルスケア・ジャパン社製)でPBS緩衝液に置換後、280nmの吸光度を測定し、hIgG4Fc-FLAGのアミノ酸配列から導かれるモル吸光係数を用いてhIgG4Fc-FLAG濃度を算出した。CHO細胞及びFut8KO CHO細胞の約300mLの培養上清から、それぞれ約5mgのhIgG4Fc-FLAGを得た。精製したhIgG4Fc-FLAG 2.5µgをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動し、クマシー・ブリーアント・ブルーで染色した結果を図3に示す。いずれの細胞由来のhIgG4Fc-FLAGも、還元条件下においては分子量約30kDaの位置にバンドが観察された。また非還元条件下においては、還元条件でみられたバンドの約2倍の分子量を示す位置にバンドが観

察されたことから、h I g G 4 F c - F L A G は 2 量体として存在していることがわかった。

【 0 2 0 3 】

(4) 精製 h I g G 4 F c - F L A G の レクチン 反 応 性

前記 (3) で精製した、C H O 細胞由来の h I g G 4 F c - F L A G 及び F u t 8 K O C H O 細胞由来の h I g G 4 F c - F L A G における N 結合型糖鎖及びコアフコースの有無を確認するため、h I g G 4 F c - F L A G に対する各種レクチンの反応性を解析した。それぞれの h I g G 4 F c - F L A G を P B S 緩衝液で $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ に調製し、96 ウェルの E I A 用プレート (ヌンク社製) に該 h I g G 4 F c - F L A G を $50 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ ずつ分注し、25 で 12 時間静置し、C H O 細胞由来の h I g G 4 F c - F L A G が固相化されたウェル、又は F u t 8 K O C H O 細胞由来の h I g G 4 F c - F L A G が固相化されたウェルを作製した。この際、P B S 緩衝液のみを $50 \mu\text{L}$ 分注したウェルを用意し、ブランク用ウェルとした。ついで、各ウェルにブロッキング液 [1 % (w / v) B S A 、 0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 、 1 5 0 m m o l / L 塩化ナトリウムを含有する、10 m m o l / L リン酸緩衝液 (p H 7 . 4)] を $200 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ 分注し、25 で 2 時間静置してプレートをブロッキングした。その後ブロッキング液を捨て、 $350 \mu\text{L}$ の洗浄液 [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 、 1 5 0 m m o l / L 塩化ナトリウムを含有する、10 m m o l / L リン酸緩衝液 (p H 7 . 4)] で 3 回洗浄した後、試料希釈液 [ブロッキング液を洗浄液で 10 倍に希釈した溶液] で 5 , 0 0 0 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識レンズマメレクチン (以下、L C A レクチンと記載する。J - オイルミルズ社製) 、又は 5 , 0 0 0 倍希釈したビオチン標識ヒヨロチャワンタケレクチン (以下、A A L レクチンと記載する。J - オイルミルズ社製) 、又は 2 , 0 0 0 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識コンカナバリン A レクチン (以下、C o n A レクチンと記載する。J - オイルミルズ社製) 、又は 1 , 0 0 0 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗 F L A G 抗体 (シグマアルドリッチ社製) を $50 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ ずつ分注し、25 で 1 時間静置した。ビオチン標識 A A L レクチンを分注したウェルについてのみ、 $350 \mu\text{L}$ の洗浄液で 3 回洗浄した後、試料希釈液で 10 , 0 0 0 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (サーマフィッシューサイエンティフィック社製) を $50 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ ずつ分注し、25 で 1 時間静置した。その後、全てのウェルを $350 \mu\text{L}$ の洗浄液で 3 回洗浄した後、T M B - O N E を $50 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ で添加し、25 で 2 0 分間静置した。停止液として 0 . 5 m o l / L 硫酸を $50 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ 添加し、プレートリーダー (E m a x 、モレキュラーデバイス社製) を用いて反応の吸光度を主波長 4 5 0 n m 、副波長 6 5 0 n m で測定した。結果を図 4 に示す。本実験で使用した L C A レクチン及び A A L レクチンはコアフコースが結合している N 結合型糖鎖に結合する性質を有し、C o n A レクチンはコアフコースの有無に関わらず N 結合型糖鎖に結合する性質を有する。図 4 において、C o n A レクチンはいずれの h I g G 4 F c - F L A G にも反応し、L C A レクチン、A A L レクチンは C H O 細胞由来の h I g G 4 F c - F L A G にのみ反応したことから、いずれの h I g G 4 F c - F L A G にも N 結合型糖鎖は存在するが、コアフコースは C H O 細胞由来の h I g G 4 F c - F L A G にのみ存在し、F u t 8 K O C H O 細胞由来の h I g G 4 F c - F L A G には存在しない事がわかった。すなわち、C H O 細胞由来の h I g G 4 F c - F L A G は、コアフコースが結合している N 結合型糖鎖を持ち、F u t 8 K O C H O 細胞由来の h I g G 4 F c - F L A G はコアフコースが結合していない N 結合型糖鎖を持つことが判明した。以下、C H O 細胞由来の h I g G 4 F c - F L A G をコアフコシル化 h I g G 4 F c - F L A G 、F u t 8 K O C H O 細胞由来の h I g G 4 F c - F L A G を非コアフコシル化 h I g G 4 F c - F L A G と称する。

【 0 2 0 4 】

[実施例 1] 抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体の産生

(1) 動物への免疫と抗体産生細胞の調製

Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. , vol.102 , p.15791 (2005) に記載の方法に従い、ゲノム

10

20

30

40

50

上のすべてのF u t 8をコードする遺伝子を破壊したF u t 8 K Oマウスを作出し、このF u t 8 K Oマウスを免疫対象動物として使用した。参考例1で調製したコアフコシル化h I g G 4 F c - F L A G 50 μ gを、2 m gのアルミニウムゲル(コスモ・バイオ社製)及び百日咳ワクチン(千葉県血清研究所製) 1×10^9 細胞とともに、作出した6週齢のF u t 8 K Oマウスに投与し、さらに2週間後、3週間後、4週間後に50 μ gのコアフコシル化h I g G 4 F c - F L A Gを1回ずつ投与した(計4回投与)。免疫を終了したマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。脾臓をR P M I培地(ギブコ社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、1200 r p m、5分間、25 で遠心分離した後、上清を捨て、赤血球溶解バッファー(シグマアルドリッチ社製)で1~2分間処理して赤血球を除去し、R P M I培地で3回洗浄して脾臓細胞を取得し、細胞融合に用いた。

10

【0205】

(2) マウス骨髄腫細胞の調製

マウス骨髄腫細胞として8 - アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株P 3 - U 1を用意し、G I T培地(和光純薬工業社製)を用いて 2×10^7 個以上の細胞が得られるまで培養した。

【0206】

(3) 細胞融合

前記(1)で得られた脾臓細胞と前記(2)で得られた骨髄腫細胞とを、10:1の細胞数の比になるよう混合した後、該細胞混合液を1200 r p m、5分間、25 で遠心分離した。該細胞混合液から上清を除去し、沈澱した細胞群をよくほぐした。この細胞混合液を25 で攪拌しながら、該細胞混合液に1 m LのP E G 1500(ロシュ社製)を1分間かけて添加した。その後、1分間毎にR P M I培地1~2 m Lを4回加えた後、全量が50 m LになるようにR P M I培地を加えた。該細胞液を900 r p m、5分間、25 で遠心分離した後、上清を捨て、細胞を37 に温めた選択培地[10%(v/v) B M - c o n d i m e d H 1(ロシュ社製)、2%(v/v) H A T s u p p l e m e n t(50 $\times$ 、ギブコ社製)を含むG I T培地(和光純薬工業社製)]100 m L中で穏やかに懸濁した。この懸濁液を96ウェル培養用プレートに100 μ L/ウェルずつ分注し、5% C O₂ インキュベーター中、37 で10~14日間培養した。

20

【0207】

(4) ハイブリドーマ株の選択

参考例1で取得したコアフコシル化h I g G 4 F c - F L A G及び非コアフコシル化h I g G 4 F c - F L A Gを参考例1(3)記載のP B S緩衝液で各5 μ g / m Lに調製し、96ウェルE I A用プレートに50 μ L/ウェルずつ分注した。25 で12時間静置し、コアフコシル化h I g G 4 F c - F L A Gが固相化されたウェル、及び非コアフコシル化h I g G 4 F c - F L A Gが固相されたウェルを作製した。この際、P B S緩衝液のみを50 μ L分注したウェルを用意し、ブランク用ウェルとした。抗原溶液を除去した後、参考例1(4)記載のブロッキング液を200 μ L/ウェルで分注し、25 で2時間静置してプレートをブロッキングした。ブロッキング液を除去した後、参考例1(4)記載の試料希釈液で100倍に希釈したハイブリドーマ培養上清を50 μ L/ウェルで分注し、25 で1時間静置した。希釈ハイブリドーマ培養上清を除去し、350 μ Lの参考例1(4)記載の洗浄液で3回洗浄した後、試料希釈液で10,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスI g G抗体(サーモフィッシューサイエンティフィック社製)を50 μ L/ウェルで分注し、25 で1時間静置した。標識抗体希釈液を除去し、350 μ Lの洗浄液で3回洗浄した後、T M B - O N Eを50 μ L/ウェルで添加し、25 で20分間静置した。停止液として0.5 m o l / L 硫酸を50 μ L/ウェル添加した後、プレートリーダーを用いて反応液の吸光度を主波長450 n m、副波長650 n mで測定した。コアフコシル化h I g G 4 F c - F L A Gを固相したウェルで強く発色し、非コアフコシル化h I g G 4 F c - F L A Gを固相したウェルで弱く、あるいは発色しないハイブリドーマ株を選択し、限界希釈法により2回のクローニングを繰り返した。その結果、ハイブリドーマ株18 - 2 D 3、18 - 3 D 1 1、18 - 4 E 1 1、18 - 4 F 1

30

40

50

1、18-6A7、18-6D4、18-6F9、18-9E10、18-10G1、18-11E5、18-12F7、25-4F5、25-4H7、25-4H8の14株を得た。ハイブリドーマ株18-3D11は、2016年8月30日付で、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に、受領番号NITE AP-02342として寄託され、2017年8月4日付で受託番号NITE BP-02342として受託されている。プレートに固相したコアフコシル化hIgG4Fc-FLAG、非コアフコシル化hIgG4Fc-FLAGに対する各ハイブリドーマ株培養上清の反応性を図5に示す。なお、図5に示した「抗FLAG抗体」のグラフは、ハイブリドーマ株上清及びペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体の代わりに、ペルオキシダーゼ標識抗FLAG抗体を用いた結果を示したグラフであり、コアフコシル化hIgG4Fc-FLAG、非コアフコシル化hIgG4Fc-FLAGがほぼ同量プレートに固相されていることを示している。

10

【0208】

(5) 抗体クラス・サブタイプ・軽鎖タイプの同定

(4) で取得したハイブリドーマ株の培養上清を用いて、各ハイブリドーマ株が産出する抗体の抗体クラス（アイソタイプ）、サブクラス、軽鎖タイプを、IsoQuickモノクローナル抗体アイソタイプ判定キット マウス用（シグマアルドリッチ社製）を用いて判定した。判定結果を表1に示す。

【0209】

【表1】

20

クローン名	クラス	サブクラス	軽鎖
18-2D3	IgG	1	κ
18-3D11	IgG	1	κ
18-4E11	IgG	1	κ
18-4F11	IgG	1	κ
18-6A7	IgG	1	κ
18-6D4	IgG	2b	κ
18-6F9	IgG	1	κ
18-9E10	IgG	1	κ
18-10G1	IgG	1	κ
18-11E5	IgG	1	κ
18-12F7	IgG	1	κ
25-4F5	IgG	2a	κ
25-4H7	IgG	1	κ
25-4H8	IgG	1	κ

30

【0210】

[実施例2] 抗コアフコシル化ヒトIgG抗体の反応性解析

40

(1) ピアコアによるhIgG4Fc-FLAGに対する反応性解析

蛋白質は、プレートに固相することで変性し、特殊な立体構造をとることが一般的に知られている。そのため、プレートに固相した抗原には反応するものの、非固相状態の抗原（すなわち、プレートに固相化せずに、溶液中に存在する抗原）には反応しない抗体を取得してしまうことが度々生じる。実施例1で取得したハイブリドーマ株が産生する抗体が、非固相状態のコアフコシル化hIgG4Fc-FLAGにも反応するか、加えて非固相状態においてもコアフコシル化hIgG4Fc-FLAGと非コアフコシル化hIgG4Fc-FLAGを明確に区別する抗体であるか、Biacore 2000（GEヘルスケア・ジャパン社製）を使用し、表面プラズモン共鳴法（SPR法）により解析した。

【0211】

50

Human Antibody Capture Kit (GEヘルスケア・ジャパン社製)に同封のAnti-human IgG (Fc) antibodyを、添付のプロトコルに従い、アミンカップリング法によりCM5センサーチップ (GEヘルスケア・ジャパン社製)に固定化した。参考例1で取得したコアフコシル化hIgG4Fc-FLAG、又は非コアフコシル化hIgG4Fc-FLAGを、固定化したAnti-human IgG (Fc) antibodyに捕捉させた後、ハイブリドーマ株の培養上清をセンサーチップ上に流し、センサーチップ上に捕捉された各hIgG4Fc-FLAGに対する反応性を評価した。結果を図6に示す。(4)の結果と同様に、いずれのハイブリドーマ株由来の抗体も、コアフコシル化hIgG4Fc-FLAG (実線)に反応するが、非コアフコシル化hIgG4Fc-FLAG (破線)には反応しないことが判明した。なお、図6の右下に示した「抗ヒトIgG抗体とhIgG4Fc-FLAGとの反応」のグラフは、センサーチップ上に固定化したヒトIgGのFc領域に対する抗体に捕捉されたコアフコシル化hIgG4Fc-FLAG量及び非コアフコシル化hIgG4Fc-FLAG量がほぼ同量であることを示している。

10

20

30

40

50

【0212】

(2) 天然コアフコシル化抗原に対する反応性

実施例1で取得したハイブリドーマ株の培養上清を用いて、各ハイブリドーマ株が産生する抗体の、天然コアフコシル化抗原に対する反応性を抗原固相ELISAで評価した。

天然コアフコシル化抗原として、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖で修飾されていることが公知である、ヒト母乳由来ラクトフェリン (シグマアルドリッチ社製)、ウシ血液由来サイログロブリン (シグマアルドリッチ社製)、ヒト血液由来IgG (イノベティブリサーチ社製)を用いた。該天然コアフコシル化抗原を、参考例1(3)記載のPBS緩衝液で5 µg/mLに調製し、参考例1と同様の方法で、各抗原が固相化されたウェルを作製した。参考例1(4)記載の試料希釈液で100倍希釈したハイブリドーマ株の培養上清を50 µL/ウェル分注し、25℃で1時間静置した。希釈されたハイブリドーマ培養上清を除去し、350 µLの参考例1(4)記載の洗浄液で3回洗浄した後、試料希釈液で10,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を50 µL/ウェル分注し、25℃で1時間静置した。標識抗体希釈液を除去し、350 µLの洗浄液で3回洗浄した後、TMB-ONEを50 µL/ウェルで添加し、25℃で20分間静置した。停止液として0.5 mol/L 硫酸を50 µL/ウェルで添加し、プレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度を主波長450 nm、副波長650 nmで測定した。結果を図7に示す。取得したハイブリドーマ株が生産する抗体は、天然ヒトIgGのコアフコースには反応するが、ヒトラクトフェリン、ウシサイログロブリンのコアフコースには反応しないことが判明した。なお、図7に示した「LCAレクチン」のグラフは、ペルオキシダーゼ標識LCAレクチンをハイブリドーマ培養上清及びペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体の代わりに用いた結果を示す。

【0213】

(3) 抗体クラス (アイソタイプ) に対する反応性

ヒトの抗体クラス (アイソタイプ)、ウサギIgGに対する反応性を抗原固相ELISAで評価した。ヒトIgG (イノベティブリサーチ社製)、ヒト免疫グロブリンA (リーバイオソリューションズ社製)、ヒト免疫グロブリンM (イムノリージェント社製)、ウサギIgG (ダコ社製)を参考例1(3)記載のPBS緩衝液で5 µg/mLに調整した。この各抗原溶液を96ウェルのEIA用プレートに50 µL/ウェルずつ分注し、25℃で12時間静置して抗原をプレートに固相した。抗原溶液を除去し、次いで参考例1(4)記載のブロッキング液を200 µL/ウェル分注し、25℃で2時間静置してプレートをブロッキングした。ブロッキング液を除去した後、参考例1(4)記載の試料希釈液で10倍希釈したハイブリドーマ株18-2D3、18-3D11、18-12F7の培養上清を50 µL/ウェル分注し、25℃で1時間静置した。希釈したハイブリドーマ培養上清を除去し、350 µLの参考例1(4)記載の洗浄液で3回洗浄した後、試料希釈液で10,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を50 µL/

ウェル分注し、25 で1時間静置した。標識抗体希釈液を除去し、350 μ Lの洗浄液で3回洗浄した後、TMB-ONEを50 μ L/ウェルで添加し、25 で20分間静置した。停止液として0.5 mol/L 硫酸を50 μ L/ウェル添加し、プレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度を主波長450 nm、副波長650 nmで測定した。結果を図8に示す。評価したハイブリドーマ株が生産する抗体は、ヒトIgGのコアフコースには反応するが、ヒト免疫グロブリンA、ヒト免疫グロブリンM、ウサギIgGのコアフコースには反応しないことが判明した。なお、図8に示した「LCAレクチン」のグラフは、ペルオキシダーゼ標識LCAレクチンをハイブリドーマ培養上清及びペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体の代わりに用いた結果を示す。

【0214】

(4) ヒトIgGサブクラスに対する反応性

ヒトIgGの各サブクラスに対する反応性を、Biacore 2000を使用し、表面プラズモン共鳴法にて解析した。Human Antibody Capture Kitに同封のAnti-human IgG (Fc) antibodyを添付プロトコールに従い、アミンカップリング法によりCM5センサーチップに固定化した。ヒトIgG1 (フィッツジェラルド社製)、ヒトIgG2 (フィッツジェラルド社製)、ヒトIgG3 (フィッツジェラルド社製)、ヒトIgG4 (フィッツジェラルド社製)をセンサーチップ上に固定化したマウス抗ヒトIgG (Fc) モノクローナル抗体に捕捉させた後、ハイブリドーマ株18-2D3、18-3D11、18-12F7の培養上清をセンサーチップ上に流し、各ヒトIgGサブクラスに対する反応性を評価した。結果を図9に示す。いずれのハイブリドーマ株由来の抗体も、すべてのヒトIgGサブクラスに結合することが判明した。なお、図9に示した「抗ヒトIgG抗体と各サブクラスヒトIgGとの反応」のグラフは、センサーチップ上に固定化したヒトIgGのFc領域に対する抗体に捕捉された各ヒトIgGサブクラス抗原量を示している。

【0215】

(5) 過ヨウ素酸ナトリウムによる、コアフコースを変性させたヒトIgGの調製

前記(2)、(3)、(4)で明らかになった、天然ヒトIgGに対する反応性が、コアフコースに依存したものであるかを確認するため、以下のようにして過ヨウ素酸ナトリウム処理によりコアフコースのジオール構造を酸化開裂し、コアフコースを変性させたヒトIgGを調製した。

【0216】

参考例1(3)記載のPBS緩衝液で調製した2 mg/mLの各サブクラスのヒトIgG (ヒトIgG1、ヒトIgG3、ヒトIgG4) 溶液100 μ Lに、200 mmol/L 過ヨウ素酸ナトリウム溶液を10 μ L、PBS緩衝液を90 μ L加え、4 で12時間インキュベートした。その後、エチレングリコール溶液を200 μ L加えて反応を停止した。過ヨウ素酸ナトリウム処理によるコアフコースの変性を確認するため、LCAレクチンの反応性を評価した。過ヨウ素酸ナトリウム処理した各サブクラスのヒトIgGをPBS緩衝液で5 μ g/mLに希釈し、96ウェルのEIA用プレートに50 μ L/ウェルずつ分注し、25 で12時間静置して抗原をプレートに固相した。抗原溶液を除去し、次いで参考例1(4)記載のブロッキング液を200 μ L/ウェル分注し、25 で2時間静置してプレートをブロッキングした。ブロッキング液を除去した後、参考例1(4)記載の試料希釈液で1000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識LCAレクチン、あるいは試料希釈液で10,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)を50 μ L/ウェル分注し、25 で1時間静置した。希釈標識レクチン、抗体溶液を除去し、350 μ Lの参考例1(4)記載の洗浄液で3回洗浄した後、TMB-ONEを50 μ L/ウェルで添加し、25 で20分間静置した。停止液として0.5 mol/L 硫酸を50 μ L/ウェル添加し、プレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度を主波長450 nm、副波長650 nmで測定した。得られた結果を図10に示す。過ヨウ素酸ナトリウム処理により、ヒトIgG1、ヒトIgG3、ヒトIgG4へのLCAレクチン反応性がほぼ消失したことがわかった。これによ

り、過ヨウ素酸ナトリウム処理により、コアフコースが変性したヒト I g G が調製されたことが確認された。

【0217】

(6) 過ヨウ素酸ナトリウム処理したヒト I g G に対する反応性

前記(5)で調製した過ヨウ素酸ナトリウム処理した各ヒト I g G 各サブクラス抗原、すなわちコアフコースが変性したヒト I g G を用いて、実施例1で取得したハイブリドーマ株が産生する抗体のヒト I g G に対する反応性が、コアフコース依存的であるかを、B i a c o r e 2000を使用し、表面プラズモン共鳴法により解析した。H u m a n A n t i b o d y C a p t u r e K i t に同封のマウス抗ヒト I g G (F c) モノクローナル抗体を添付プロトコールに従い、アミンカップリング法により C M 5 センサーチップに固定化した。過ヨウ素酸ナトリウム処理した、あるいは処理していないヒト I g G 1、ヒト I g G 3、ヒト I g G 4 を、センサーチップ上に固定化したマウス抗ヒト I g G (F c) モノクローナル抗体に捕捉させた後、ハイブリドーマ株 18 - 2 D 3、18 - 3 D 1 1、18 - 1 2 F 7 の培養上清をセンサーチップ上に流し、過ヨウ素酸ナトリウム処理された、あるいはされていない各ヒト I g G サブクラス抗原に対する反応性を評価した。結果を図 1 1 に示す。いずれのハイブリドーマ株由来の抗体においても、コアフコースが変性したヒト I g G に対する反応性はほぼ消失、あるいは大きく減衰した。なお、図 1 1 の最下段に示した「抗ヒト I g G 抗体と各サブクラスヒト I g G との反応」のグラフは、センサーチップ上に固定化したヒト I g G の F c 領域に対する抗体に捕捉された、過ヨウ素酸ナトリウム処理された各サブクラスのヒト I g G、及び、過ヨウ素酸ナトリウム処理されていない各サブクラスのヒト I g G の量を示す。これにより、実施例1で取得したハイブリドーマ株が産生するモノクローナル抗体が、コアフコース依存的にヒト I g G に反応する抗体であることが確認された。

【0218】

[実施例 3] コアフコシル化ヒト I g G の精製

(1) 抗コアフコシル化ヒト I g G 抗体の精製

実施例1で取得したハイブリドーマ株の内、18 - 3 D 1 1 株を 5 2 0 m L のハイブリドーマ用無血清培地 H y c l o n e S F M 4 M A b - U t i l i t y (サーモフィッシュャーサイエンティフィック社製)で培養し、培養上清を回収した。3 0 0 0 r p m、1 0 分間、2 5 で遠心分離を行い、上清を回収した後、0 . 2 2 μ m 孔径セルロースアセテートメンブレンを用いて上清を濾過し、最終濃度 3 m o l / L となる様に塩化ナトリウム(和光純薬工業社製)を添加し、p H 8 . 9 に調整した。r P r o t e i n A G r a v i T r a p カラム(GEヘルスケア・ジャパン社製)を参考例1(3)記載の P B S 緩衝液で平衡化した後、濾過済みの前記上清をカラムに通塔した。その後、P B S 緩衝液でカラムを洗浄し、r P r o t e i n A に結合した 18 - 3 D 1 1 株由来の抗体(以下、18 - 3 D 1 1 抗体と記載する)を、0 . 1 m o l / L グリシン - H C l 溶液(p H 2 . 7)を通過させることによりで溶出した。その後、P D - 1 0 カラム(GEヘルスケア・ジャパン社製)を用いて、18 - 3 D 1 1 抗体を含む溶出液の溶媒を P B S 緩衝液に置換した後、P B S 緩衝液に置換された 18 - 3 D 1 1 抗体溶液の 2 8 0 n m の吸光度を吸光度計(U - 3 0 0 0、日立製作所社製)で測定し、モル吸光係数 1 . 4 として 18 - 3 D 1 1 抗体濃度を算出し、約 2 . 5 m g の 18 - 3 D 1 1 抗体を得た。

【0219】

(2) コアフコシル化ヒト I g G 親和性精製カラムの調製

コアフコシル化ヒト I g G 測定系の標準物質として用いるコアフコシル化ヒト I g G を精製するための親和性カラムを以下のようにして調製した。前記(1)で精製した 18 - 3 D 1 1 抗体 2 m g を、P D - 1 0 カラムを用いてカップリング溶液[0 . 2 m o l / L 炭酸水素ナトリウム、0 . 5 m o l / L 塩化ナトリウム、p H 8 . 3]に置換し、1 . 6 8 m g / m L の抗体溶液を調製した。「はじめでのリガンドカップリングハンドブック」(GEヘルスケア・ジャパン社製)に記載の方法に従い、この抗体溶液 1 m L を H i T r a p N H S - a c t i v a t e d H P カラム(GEヘルスケア・ジャパン社製)

にカップリングした。算出したカップリング効率は90.3%であった。

【0220】

(3) コアフコシル化ヒトIgGの精製

前記(2)で調製したアフィニティークラムを用いて、ヒト血液から精製されたヒトIgG(イノベティブリサーチ社製)から、以下のようにしてコアフコシル化ヒトIgGを精製した。アフィニティークラムを10mLの参考例1(3)記載のPBS緩衝液で平衡化し、PBS緩衝液で1.5mg/mLの濃度に調整したヒトIgG6mLをカラムに添加した。10mLのPBS緩衝液でカラムを洗浄後、5mLのクエン酸緩衝液[0.1mol/L クエン酸(和光純薬工業社製)溶液と0.1mol/L クエン酸ナトリウム(和光純薬工業社製)溶液をpH3.7になる様に混合した緩衝液]をカラムに添加し、カラムに結合したコアフコシル化ヒトIgGを溶出した。この操作を複数回繰り返し、最終的に約280μgのコアフコシル化ヒトIgGを精製した。

10

【0221】

[実施例4] コアフコシル化ヒトIgGの糖鎖構造解析

(1) コアフコシル化ヒトIgGからのN結合型糖鎖の分離

実施例3で精製したコアフコシル化ヒトIgGの溶媒を、PD-10カラムを用いて参考例1(3)記載のPBS緩衝液に置換した後、限外濾過により濃縮して2.1mg/mLのコアフコシル化ヒトIgG溶液を調製した。このコアフコシル化ヒトIgG試料50μLに、5μLの1mol/L 重炭酸アンモニウム水溶液、5μLの120mmol/L DTT水溶液を添加してよく撹拌した後、60℃で30分間インキュベートした。その後、10μLの123mmol/L ヨードアセトアミド水溶液を添加し、遮光下、25℃で1時間インキュベートした。その後、1mmol/L 塩酸で40ユニット/μLに調整した蛋白質分解酵素トリプシン(シグマアルドリッチ社製)を10μL添加し、37℃、1時間反応させ、コアフコシル化ヒトIgGをペプチドに消化した。反応終了後、90℃、5分間の熱処理によりトリプシンを失活させた後、N結合型糖鎖の還元末端を切断するN-グリコシダーゼF(ロシュ社製)を5ユニット添加し、37℃、12時間反応させることでペプチドからN結合型糖鎖を遊離させた。

20

【0222】

(2) N結合型糖鎖の捕捉とシアル酸の保護

糖鎖精製標識化キットBiot Glyco(住友ベークライト社製)を用い、キットに付属の糖鎖結合性ポリマービーズに純水500μLを加え、よく撹拌した後、50μLのポリマービーズ分散液を分取し、キットに付属の反応チューブの底部に注入した。卓上遠心機で数秒間遠心分離して水を排出し、白色に乾いたポリマービーズに180μLの2% 酢酸/アセトニトリル溶液[2%(v/v) 酢酸、98%(v/v) アセトニトリル]と、前記(1)の反応液20μLを添加し、チューブの蓋をあけた状態で80℃、1時間インキュベートし、N結合型糖鎖をポリマービーズに結合させた。溶媒が完全に蒸発し、ポリマービーズが乾燥していることを確認後、200μLの2mol/L グアニジンで2回、200μLの純水で2回、200μLの1% トリエチルアミン/メタノール溶液[1%(v/v) トリエチルアミン、99%(v/v) メタノール]で2回、ポリマービーズを洗浄した。次に100μLの10% 無水酢酸/メタノール溶液[10%(v/v) 無水酢酸、90%(v/v) メタノール]を加え、25℃で30分間インキュベートして、ポリマービーズ上の官能基をキャッピングした。卓上遠心機で数秒間遠心分離して10% 無水酢酸/メタノール溶液を排出した後、200μLの10mmol/L 塩酸で2回、200μLのメタノールで2回、200μLのDMSOで2回洗浄した。次に100μLのMTT/DMSO溶液[MTT 74.6mgを1mLのDMSOで溶解]を添加し、チューブの蓋をあけた状態で60℃、1時間インキュベートし、N結合型糖鎖に存在するシアル酸をメチルエステル化して保護した。卓上遠心機で数秒間遠心分離してMTT/ジメチルスルホキシド溶液を排出した後、200μLのメタノールで2回、200μLの純水で2回、ポリマービーズを洗浄した。

30

40

【0223】

50

(3) N結合型糖鎖の高感度MALDI-TOF MS測定用標識化

次に、前記(2)で得られたポリマービーズに、20 μ LのMALDI-TOF MS用標識化合物溶液[20 mmol/L Labeling reagent for MALDI-TOF MS (住友ベークライト社製、Biot Glycoキットに付属)]を添加し、続いて180 μ Lの2% 酢酸/アセトニトリル溶液を添加して、チューブの蓋をあけた状態で80、1時間インキュベートした。これによりポリマービーズから糖鎖を遊離させ、その還元末端をMALDI-TOF MS用標識化合物で標識化した。溶媒が完全に蒸発し、ポリマービーズが乾燥していることを確認後、50 μ Lの純水を加え、卓上遠心機で数秒間遠心分離して標識化N結合型糖鎖を回収した。

【0224】

10

(4) 未反応のMALDI-TOF MS用標識化合物の除去

キットに付属のクリーンアップカラム(未反応のMALDI-TOF MS用標識化合物除去用カラム)を200 μ Lの純水で1回、200 μ Lのアセトニトリルで2回洗浄後、回収した標識化N結合型糖鎖溶液50 μ Lに950 μ Lのアセトニトリルを加えた試料を全量添加し、10分間自然落下によりクリーンアップカラムを通過させた。卓上遠心機で数秒間遠心分離して残りの溶液を通過させた後、300 μ Lのアセトニトリルで2回クリーンアップカラムを洗浄した。卓上遠心機で数秒間遠心分離し、クリーンアップカラムからアセトニトリルを完全に除去した後、純水50 μ Lを添加し、さらに数秒間遠心分離して標識化N結合型糖鎖溶液を回収した。

【0225】

20

(5) MALDI-TOF MS解析

MALDIマトリックスグレードの2, 5-ジヒドロキシ安息香酸(和光純薬工業社製)10 mgに、300 μ Lのアセトニトリル、700 μ Lの純水を加えて溶解し、マトリックス溶液を調製した。このマトリックス溶液1 μ Lに、(4)で回収した標識化N結合型糖鎖溶液1 μ Lを混合した。MALDIターゲットプレートにこの混合液1 μ Lをスポットし、静置して乾燥させた後、MALDI-TOF MS Autoflex II Ismarte beam(ブルカー・ダルトニクス社製)でMALDI-TOF MS解析を行った。得られたMSスペクトルを図12に示す。また糖鎖構造推定ソフトGlycoMod Tool [Proteomics, vol.1, p.340 (2001)]を用いて各質量ピークに推定された糖鎖構造を表2に示す。一方、比較対象として同様に分析した、実施例1で得られた抗コアフコシル化IgG抗体(18-3D11)で精製する前のヒトIgG(イノベティブリサーチ社製)から得られたMSスペクトルを図13に、推定されたN結合型糖鎖構造を表3に示す。表中、質量電荷比(m/z)はピーク毎の実測イオン質量、「 $dmass$ 」は推定されたN結合型糖鎖構造の理論イオン質量と実測イオン質量の差を示す。また推定糖鎖構造において、「 $GlNAc$ 」はN-アセチルグルコサミン、「 Man 」はマンノース、「 $NeuAc$ 」はN-アセチルノイラミン酸、「 $Deoxyhexose$ 」はフコース、「 $HexNAc$ 」はN-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン、「 Hex 」はマンノース又はガラクトースを示す。抗コアフコシル化IgG抗体(18-3D11)で精製する前のヒトIgG(イノベティブリサーチ社製)においては、実測イオン質量(m/z)1746.692、1908.756、2070.818、2375.940、2681.026にフコース($Deoxyhexose$)を含まないN結合型糖鎖構造による微小ピークが検出されたのに対し、抗コアフコシル化IgG抗体(18-3D11)で精製した後のヒトIgGではこれらのピークが消失し、推定されたN結合型糖鎖構造すべてがフコース($Deoxyhexose$)を持つことが判明した。このことから、抗コアフコシル化IgG抗体(18-3D11)を用いた精製により取得したヒトIgGは、ほぼ100%コアフコシル化ヒトIgGであり、コアフコシル化ヒトIgG測定系の標準物質として適当であることが判明した。

30

40

【0226】

【表 2】

質量電荷比 (m/z)	S/N 比	シグナル 強度	ピーク 面積	dmass	推定糖鎖構造
1207.527	51	1396	1709	-	N/A
1338.649	14	370	250	-	N/A
1892.748	322	6992	7326	-0.013	(HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2054.798	510	9715	11436	-0.016	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2095.818	45	835	960	-0.022	(HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2216.854	213	3661	4413	-0.013	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2257.878	57	949	1184	-0.015	(Hex) ₁ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2359.908	14	210	328	-0.021	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2419.926	9	135	226	-0.02	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2521.951	63	908	1303	-0.031	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2725.014	11	138	262	-0.047	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2827.072	8	93	197	-0.025	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
3030.114	8	94.5	224	0.929	(Hex) ₂ (HexNAc) ₆ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
				-0.063	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂

【 0 2 2 7 】

10

20

30

40

【表 3】

質量電荷比 (m/z)	S/N 比	シグナル 強度	ピーク 面積	dmass	推定糖鎖構造
1746.692	10	272	301	-0.011	(HexNAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
1892.759	393	10171	11712	-0.002	(HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
1908.756	25	652	755	0	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
1934.813	7	184	299	-	N/A
2054.816	663	15548	20445	0.001	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2070.818	19	430	589	0.008	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2095.848	70	1602	2032	0.007	(HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2216.878	332	7138	9659	0.01	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2257.908	105	2196	2934	0.014	(Hex) ₁ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2359.940	24	478	718	0.01	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2375.940	24	462	692	0.015	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2419.964	19	368	568	0.017	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2521.996	177	3191	4911	0.013	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2562.997	9	139	297	-0.012	(Hex) ₁ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2579.008	8	135	248	0.004	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2681.026	11	180	347	-0.013	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2725.072	39	629	1095	0.01	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2827.098	32	489	911	0	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
3030.159	31	421	886	0.974	(Hex) ₂ (HexNAc) ₆ (Deoxyhexose) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
				-0.018	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂

【0228】

【実施例 5】コアフコシル化ヒト IgG 測定系の構築

(1) 抗ヒト IgG ポリクローナル抗体固相化プレートの調製

96 ウェルの EIA 用プレートに、参考例 1 (3) 記載の PBS 緩衝液で 5 μ g/mL に希釈した抗ヒト IgG ポリクローナル抗体 (サーモフィッシャーサイエンティフィック

10

20

30

40

50

社製)を50 μ L/ウェルずつ分注し、25 $^{\circ}$ Cで12時間静置して抗体をプレートに固相した。抗体溶液を除去後、参考例1(4)記載のブロッキング液を200 μ L/ウェルで分注し、25 $^{\circ}$ Cで2時間静置してプレートをブロッキングした。ブロッキング液を除去後、コアフコシル化ヒトIgGの測定に使用した。

【0229】

(2) ペルオキシダーゼ標識抗コアフコシル化ヒトIgG抗体の調製

実施例3(1)で精製した200 μ gの18-3D11抗体を、Peroxidase Labeling Kit-NH₂(同仁化学研究所社製)を用いて、添付マニュアルに従いペルオキシダーゼで標識した。キットに付属のStorage Bufferでペルオキシダーゼ標識18-3D11抗体を懸濁し、これをペルオキシダーゼ標識抗コアフコシル化ヒトIgG抗体溶液とした。

10

【0230】

(3) 標準物質の調製

実施例3(3)で精製したコアフコシル化ヒトIgGを、参考例1(4)記載の試料希釈液で725.5ng/mL、362.8ng/mL、181.4ng/mL、90.7ng/mL、45.4ng/mL、22.7ng/mL、11.3ng/mLの各濃度に調整した。この2倍希釈系列を標準曲線を得るための標準物質とし、コアフコシル化ヒトIgGの測定に使用した。

【0231】

(4) コアフコシル化ヒトIgGの測定

前記(1)で調製した抗ヒトIgGポリクローナル抗体固相化プレートに、前記(3)で調製した標準物質、あるいは参考例1(4)記載の試料希釈液で100,000倍あるいは200,000倍に希釈したヒト血清検体を50 μ L/ウェルずつ分注した。25 $^{\circ}$ Cで1時間静置した後、試料を除去し、350 μ Lの参考例1(4)記載の洗浄液で3回ウェルを洗浄した。次に(2)で調製したペルオキシダーゼ標識抗コアフコシル化ヒトIgG抗体溶液を試料希釈液で10,000倍に希釈し、この溶液を50 μ L/ウェルずつ分注した。25 $^{\circ}$ Cで1時間静置した後、標識抗体溶液を除去し、350 μ Lの洗浄液で3回ウェルを洗浄した。TMB-ONEを50 μ L/ウェルで添加し、25 $^{\circ}$ Cで20分間静置した。停止液として0.5mol/L 硫酸を50 μ L/ウェル添加し、プレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度を主波長450nm、副波長650nmで測定した。得られた標準曲線を図14に示す。ヒト血清検体中のコアフコシル化ヒトIgG濃度は、得られた吸光度を標準曲線で換算し、検体希釈液による希釈率を補正して算出した。

20

30

【0232】

[実施例6] コアフコシル化ヒトIgG測定系の性能評価

(1) 希釈直線性試験

実施例5で構築したコアフコシル化ヒトIgG測定系の希釈直線性試験を実施した。3種類の健常人血清検体(検体I~III)(アリエス社製)を準備し、各々を参考例1(4)記載の試料希釈液で100,000倍希釈した。この希釈検体と試料希釈液を、その混合比が10容:0容(希釈率:10/10)、9容:1容(希釈率:9/10)、8容:2容(希釈率:8/10)、7容:3容(希釈率:7/10)、6容:4容(希釈率:6/10)、5容:5容(希釈率:5/10)、4容:6容(希釈率:4/10)、3容:7容(希釈率:3/10)、2容:8容(希釈率:2/10)、1容:9容(希釈率:1/10)となるように混合し、10段階希釈系列を調製した。これらのコアフコシル化ヒトIgG濃度を実施例5(4)記載の方法で測定し、100,000倍希釈検体のコアフコシル化ヒトIgG濃度の実測値と、希釈倍率から理論的に算出される理論濃度とから対理論率[対理論率(%)=実測値(ng/mL)/理論値(ng/mL) $\times$ 100]を算出した。結果を表4に示す。いずれの検体、いずれの希釈率においても対理論率は90~110%の範囲内であり、本測定系は良好な希釈直線性を示した。希釈直線性は、検体中のコアフコシル化ヒトIgG以外の物質を非特異的に測り込む等により不良となることから本測定系はコアフコシル化ヒトIgGを特異的に測定することができることが判明した。

40

50

【 0 2 3 3 】

【 表 4 】

希釈率		10/10	9/10	8/10	7/10	6/10	5/10	4/10	3/10	2/10	1/10
検体 I	実 測 値 (ng/mL)	118.3	107.6	96.5	84.9	73.7	61.4	49.0	36.7	23.3	11.6
	理 論 値 (ng/mL)	118.3	106.5	94.7	82.8	71.0	59.2	47.3	35.5	23.7	11.8
	対 理 論 率 (%)	100.0	101.0	101.9	102.5	103.8	103.7	103.6	103.3	98.3	98.3
検体 II	実 測 値 (ng/mL)	81.0	70.8	64.4	57.0	48.7	38.6	30.3	22.6	15.1	7.7
	理 論 値 (ng/mL)	81.0	72.9	64.8	56.7	48.6	40.5	32.4	24.3	16.2	8.1
	対 理 論 率 (%)	100.0	97.1	99.4	100.6	100.2	95.4	93.6	92.9	93.4	95.6
検体 III	実 測 値 (ng/mL)	97.0	87.7	75.9	66.6	58.1	50.2	38.3	28.5	18.7	9.7
	理 論 値 (ng/mL)	97.0	87.3	77.6	67.9	58.2	48.5	38.8	29.1	19.4	9.7
	対 理 論 率 (%)	100.0	100.4	97.7	98.1	99.8	103.5	98.7	98.0	96.2	100.0

10

20

【 0 2 3 4 】

(2) 添加回収試験

実施例 5 で構築したコアフコシル化ヒト I g G 測定系の添加回収率を評価するため、3 種類の検体に、それぞれ 2 種類の標準物質（標準物質 a、標準物質 b）を添加した検体を調製し、該検体を用いて添加回収試験を実施した。本試験において、標準物質（a）として 7 2 5 . 5 n g / m L のコアフコシル化ヒト I g G 溶液、標準物質（b）として 1 8 1 . 4 n g / m L のコアフコシル化ヒト I g G 溶液を用いた。

【 0 2 3 5 】

30

3 種類の健常人血清検体（検体 I ~ III）（アリエス社製）を準備し、各々を参考例 1（4）記載の試料希釈液で 2 0 0 , 0 0 0 倍希釈した。この 2 0 0 , 0 0 0 倍希釈検体 9 容に試料希釈液 1 容を混合した検体試料（以下、A と記載する）を調製した。標準物質（a）又は標準物質（b）の標準物質溶液 1 容に試料希釈液 9 容を混合した標準物質試料（以下、B と記載する）を調製した。さらに 2 0 0 , 0 0 0 倍希釈検体 9 容に標準物質（a）又は標準物質（b）の標準物質溶液 1 容を混合した添加検体試料（以下、C と記載する）を調整した。これら試料のコアフコシル化ヒト I g G 濃度を実施例 5（4）記載の方法で測定し、検体に添加した標準物質の回収率 [添加回収率 (%) = C (n g / m L) / { A (n g / m L) + B (n g / m L) } × 1 0 0] を算出した。結果を表 5 に示す。いずれの検体、いずれの標準物質添加量においても添加回収率は 9 0 ~ 1 1 0 % の範囲内に収束しており、本測定系は良好な添加回収率を示した。添加回収率は、検体中に含まれる多様な成分（マトリックス）の影響を測定系が受けると不良となることから、本測定系は検体成分の影響を受けずに、コアフコシル化ヒト I g G を正確に測定することができることが判明した。

40

【 0 2 3 6 】

【表 5】

	検体試料(A) (ng/mL)	標準物質試料(B) (ng/mL)	添加検体試料(C) (ng/mL)	添加回収率 (%)
検体 I	55.7	69.3	131.2	109.1
		18.1	75.2	108.1
検体 II	45.5	69.3	121.2	109.2
		18.1	63.4	98.7
検体 III	46.5	69.3	120.0	106.1
		18.1	64.2	97.9

10

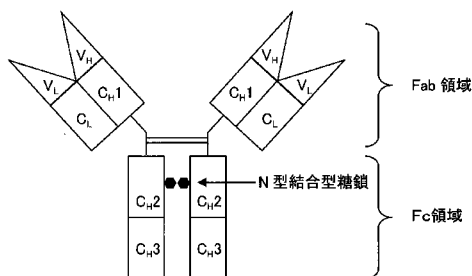
【産業上の利用可能性】

【0237】

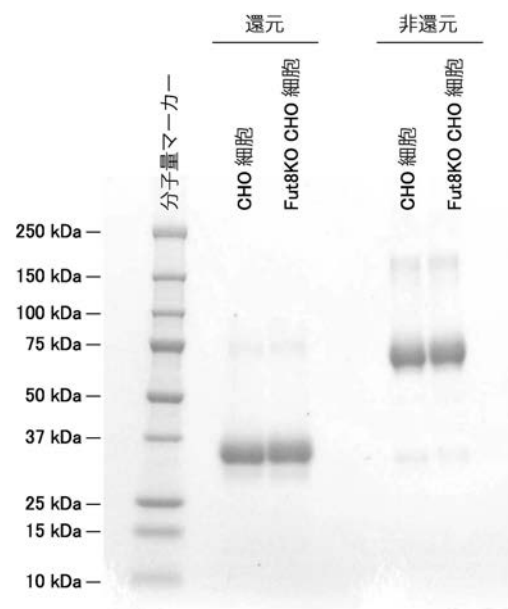
本発明により、コアフコースが結合しているN結合型糖鎖をFc領域に含むヒト免疫グロブリンGに結合し、コアフコースが結合していないN結合型糖鎖をFc領域に含むヒト免疫グロブリンGには結合しない、抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリンG抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体の製造方法、該抗体を用いるコアフコシル化ヒト免疫グロブリンGの測定方法、該抗体を含有するコアフコシル化ヒト免疫グロブリンG測定試薬、該抗体を用いるコアフコシル化ヒト免疫グロブリンGの精製方法、及び、該抗体が固定化された不溶性担体が提供される。これらは、臨床診断において有用である。

20

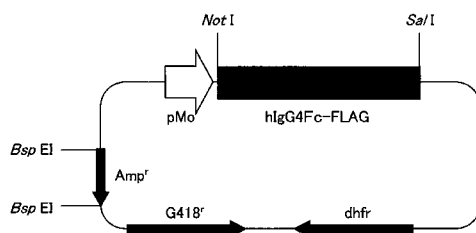
【図 1】



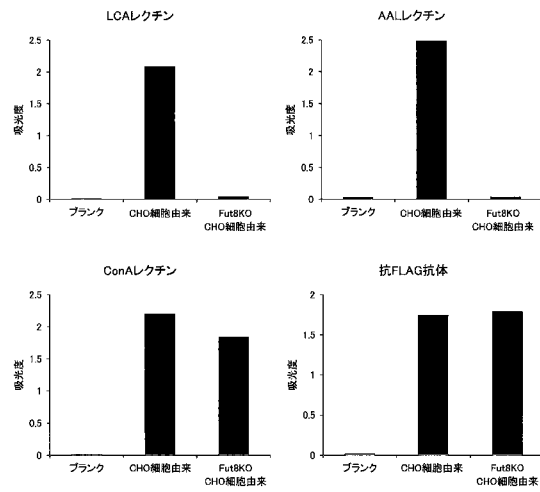
【図 3】



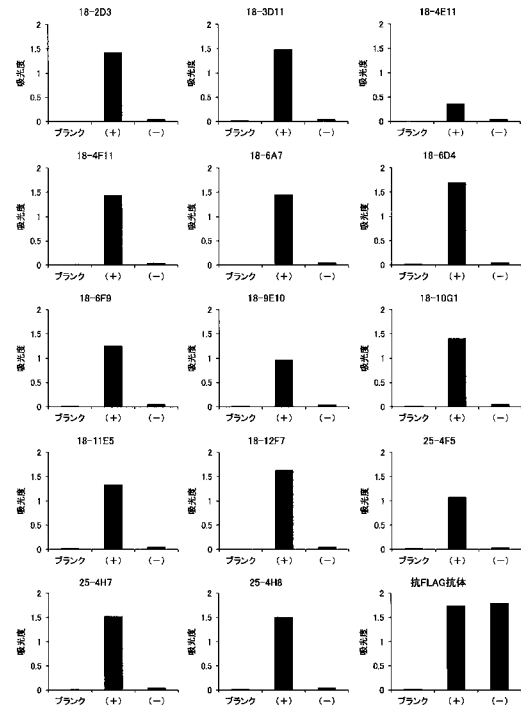
【図 2】



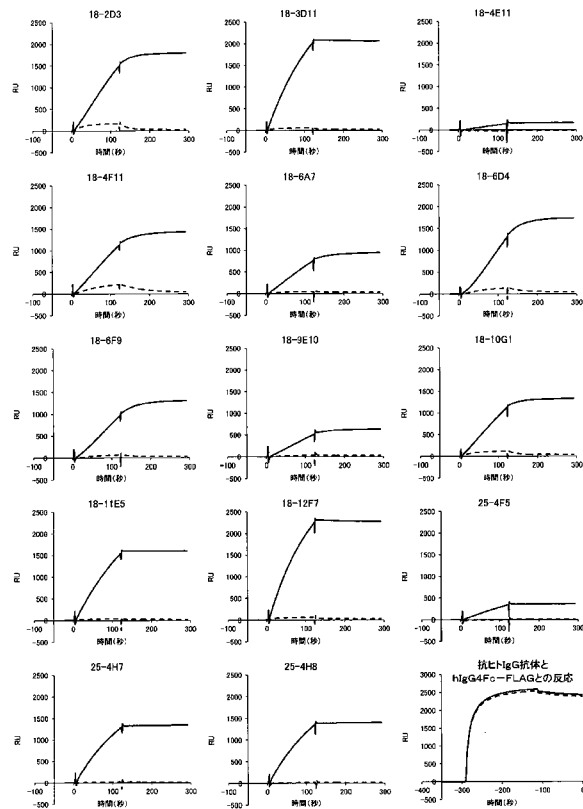
【図 4】



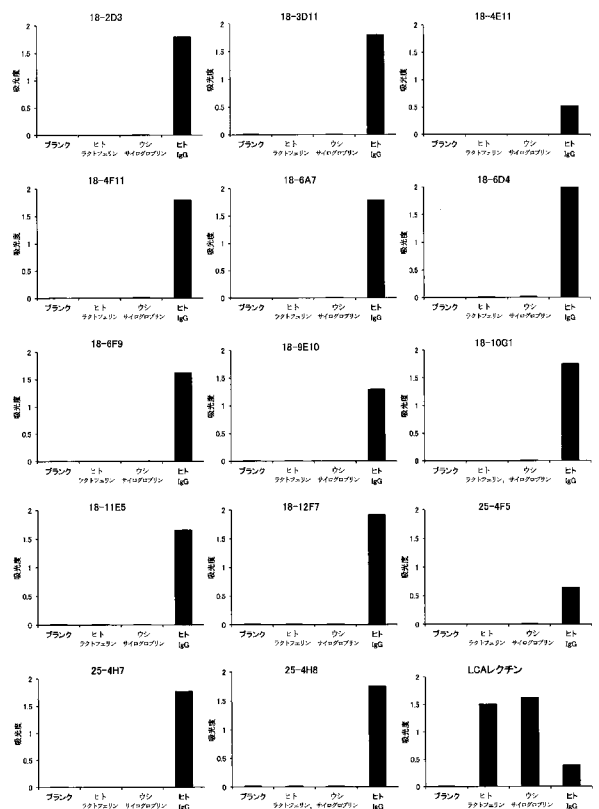
【図 5】



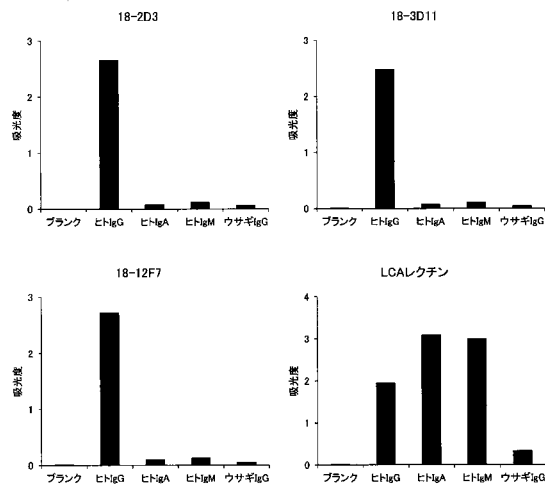
【図 6】



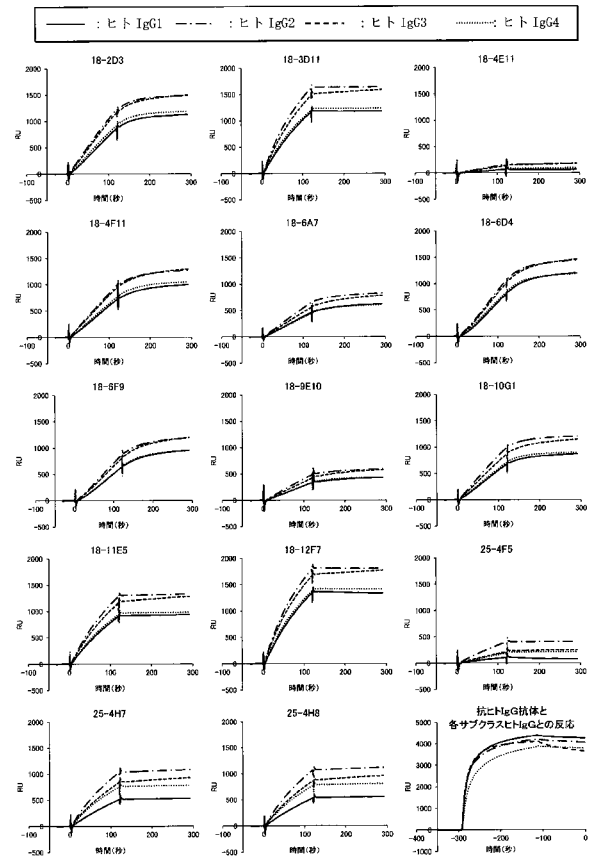
【図 7】



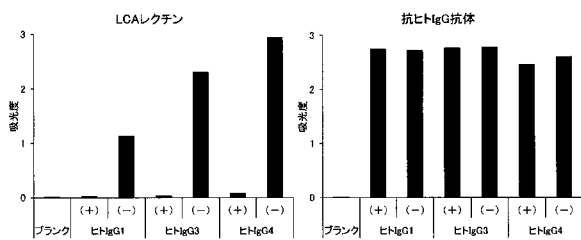
【図 8】



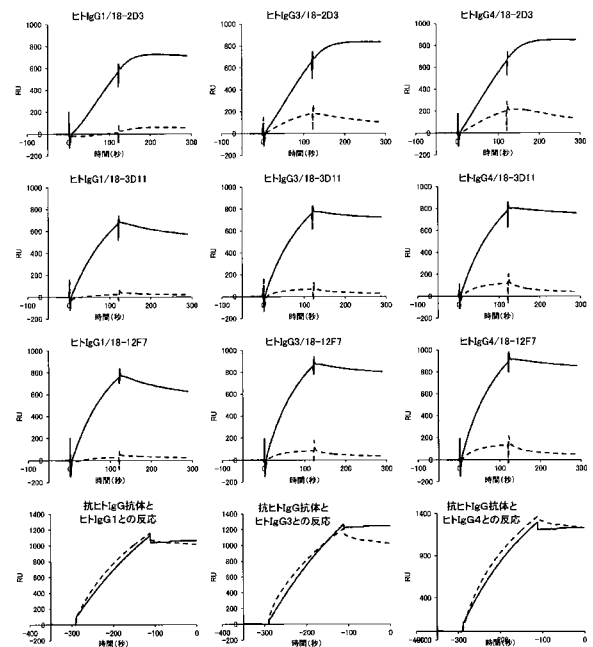
【図 9】



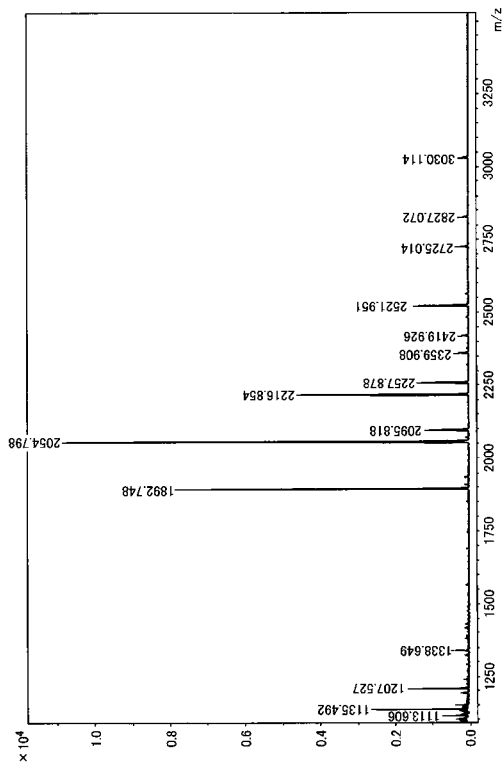
【図 10】



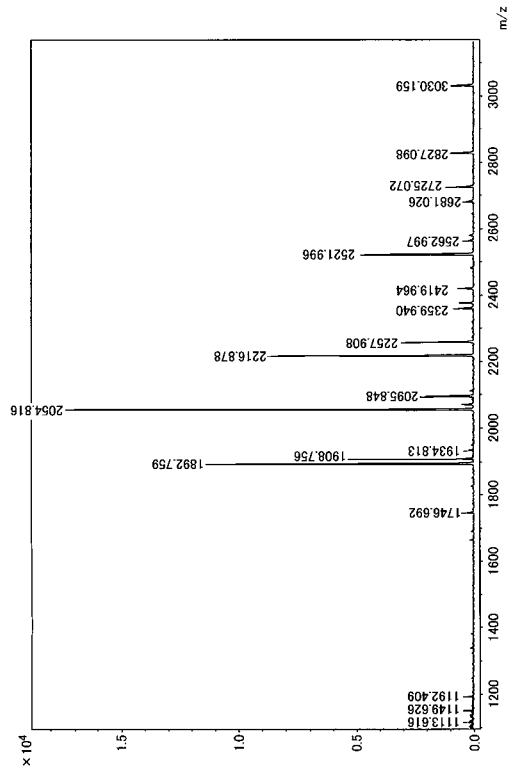
【図 11】



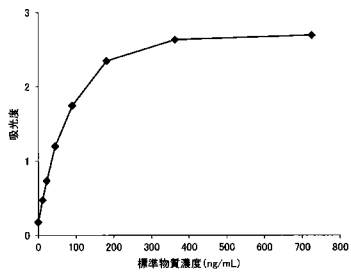
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



【配列表】

2018052041000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/033126
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. C07K16/42 (2006.01)i, C07K1/22 (2006.01)i, C07K17/00 (2006.01)i, C12N5/12 (2006.01)i, C12N15/02 (2006.01)i, C12N15/09 (2006.01)i, C12P21/08 (2006.01)i, G01N33/53 (2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. C07K16/42, C07K1/22, C07K17/00, C12N5/12, C12N15/02, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Japanese Published Examined Utility Model Applications 1922-1996 Japanese Published Unexamined Utility Model Applications 1971-2017 Japanese Examined Utility Model Registrations 1996-2017 Japanese Registered Utility Model Specifications 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	JP 2010-534318 A (NATIONAL INSTITUTE FOR BIOPROCESSING RESEARCH AND TRAINING LIMITED) 04 November 2010, claims, paragraphs [0071]-[0074], [0202], [0203], fig. 17, table 6 & US 2011/0143351 A1, claims, paragraphs [0136]-[0140], [0347]-[0348], fig. 17, table 6 & EP 2174132 A2	1-5, 13-30/1-5, 7, 9-30/6, 8
Y/A	JP 2008-209261 A (J-OIL MILLS, INC.) 11 September 2008, claims, paragraphs [0002]-[0004] (Family: none)	1-5, 7, 9-30/6, 8
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 November 2017 (28.11.2017)		Date of mailing of the international search report 12 December 2017 (12.12.2017)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 3 3 1 2 6	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/42(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, C07K17/00(2006.01)i, C12N5/12(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/42, C07K1/22, C07K17/00, C12N5/12, C12N15/02, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2017年 日本国実用新案登録公報 1996-2017年 日本国登録実用新案公報 1994-2017年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X/Y/A	JP 2010-534318 A (ナショナル インスティテュート フォー バイオプロセッシング リサーチ アンド トレーニング リミテッド) 2010.11.04, 特許請求の範囲、[0071] - [0074]、[0202]、[0203]、図17、表6 & US 2011/0143351 A1, Claims, [0136]-[0140], [0347]-[0348], Figure17, Table6 & EP 2174132 A2	1-5, 13-30/1-5, 7, 9-30/6, 8	
Y/A	JP 2008-209261 A (株式会社 J-オイルミルズ) 2008.09.11, 特許請求の範囲、[0002] - [0004] (ファミリーなし)	1-5, 7, 9-30/6, 8	
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 28.11.2017		国際調査報告の発送日 12.12.2017	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 北田 祐介 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
C 0 7 K 16/08 (2006.01)	C 0 7 K 16/08	
C 0 7 K 16/12 (2006.01)	C 0 7 K 16/12	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54	
C 0 7 K 1/22 (2006.01)	C 0 7 K 1/22	
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
C 1 2 N 15/01 (2006.01)	C 1 2 N 15/01	Z

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

(74) 代理人 100106574

弁理士 岩橋 和幸

(72) 発明者 谷口 直之

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内

(72) 発明者 顧 建国

宮城県仙台市青葉区小松島 4 丁目 4 番 1 号 東北医科薬科大学内

(72) 発明者 小野 達也

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 6 0 0 番 1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内

(72) 発明者 椎田 真史

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 6 0 0 番 1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内

(72) 発明者 真木 賢太郎

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 6 0 0 番 1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内

F ターム(参考) 4B064 AG27 AG31 CA10 CA20 CE12 CE13 DA13

4B065 AA90X AA92X AB04 AC14 BA08 CA25 CA46

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 CA11 CA40 DA76 DA86

EA50 FA72 FA74 GA20 GA26

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

专利名称(译)	抗核心岩藻糖基化的人免疫球蛋白G抗体		
公开(公告)号	JPWO2018052041A1	公开(公告)日	2019-07-25
申请号	JP2018539760	申请日	2017-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所 协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	国立研究开发法人理化学研究所 协和メデックス株式会社		
[标]发明人	谷口直之 顧建国 小野達也		
发明人	谷口 直之 顧 建国 小野 達也 椎田 真史 真木 賢太郎		
IPC分类号	C12N15/06 C07K16/42 C12P21/08 C12N5/16 C07K17/00 G01N33/53 C07K16/08 C07K16/12 C07K16/18 C12N15/54 C07K1/22 A01K67/027 C12N15/01		
CPC分类号	C07K1/22 C07K16/42 C07K17/00 C12N5/12 C12N15/02 C12N15/09 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/06.100 C07K16/42.ZNA C12P21/08 C12N5/16 C07K17/00 G01N33/53.N C07K16/08 C07K16/12 C07K16/18 C12N15/54 C07K1/22 A01K67/027 C12N15/01.Z		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CE12 4B064/CE13 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA20 4H045/GA26		
代理人(译)	塔奈澄夫 饭田正人 春田广隆 岩桥幸		
优先权	2016179944 2016-09-14 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

将与核心岩藻糖结合的N-连接糖链与包含Fc区的人IgG结合，但不与未与Fc区核心岩藻糖结合的含N-连接糖链的人免疫球蛋白G（人IgG）结合 其特征在于，抗核心岩藻糖基化人IgG抗体或抗体片段，使用该抗体或抗体片段的方法，纯化核心岩藻糖基化人IgG的方法，使用该抗体或抗体片段的方法以及该抗体 或者，提供使用抗体片段的测量试剂。

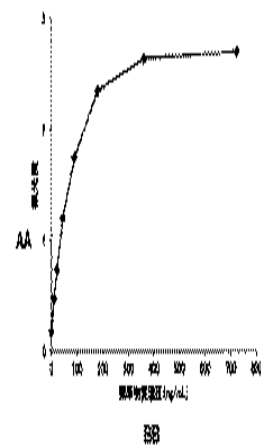


FIG. 14:
 AA Light absorbance
 BB Standard substance concentration (ng/mL)