

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-168470

(P2019-168470A)

(43) 公開日 令和1年10月3日(2019.10.3)

(51) Int.Cl.

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

F 1

G 0 1 N 33/53

D

テーマコード (参考)

審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2019-110119 (P2019-110119)
 (22) 出願日 令和1年6月13日 (2019.6.13)
 (62) 分割の表示 特願2017-124364 (P2017-124364)
 の分割
 原出願日 平成24年7月17日 (2012.7.17)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(71) 出願人 000001993
 株式会社島津製作所
 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
 (71) 出願人 509125589
 ダニエル・ジェイ・カボン
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9401
 O, ヒルズボロー, ウッドリッジ・ロード
 90
 (74) 代理人 100100561
 弁理士 岡田 正広
 (72) 発明者 金子 直樹
 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
 株式会社島津製作所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アフィニティ支持体及びそれを用いた物質の捕捉方法

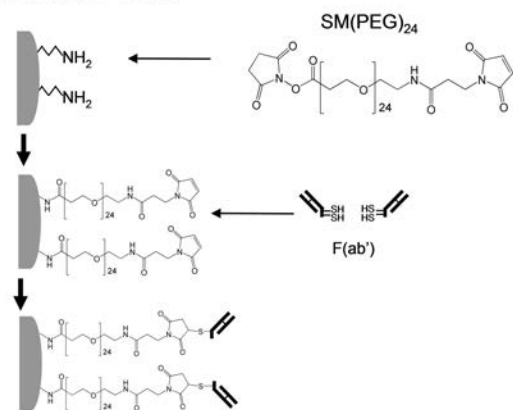
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】抗体以外の分子であっても解離させにくいコーポレイティブ結合による捕捉が可能なアフィニティ支持体及びそれを用いた捕捉方法を提供する。

【解決手段】支持体と、前記支持体に結合したスパーサと、前記スパーサに結合したアフィニティ物質とを含むアフィニティ支持体に、捕捉されるべき対象を接触させることにより、前記アフィニティ物質と前記捕捉されるべき物質とを結合させる工程を含み、前記捕捉されるべき対象1個に複数のアフィニティ部位が存在し、前記アフィニティ物質が前記複数のアフィニティ部位の少なくとも2つの部位に同時に結合する、物質の捕捉方法。

【選択図】図1

アミン磁気ビーズ表面



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

アミロイド β の捕捉方法であって、

支持体と、前記支持体に直接的に結合した複数のスペーサと、前記スペーサに各々直接的に結合した複数の免疫グロブリンとを含むアフィニティ支持体に、アミロイド β を含む試料を接触させることにより、前記免疫グロブリンと前記アミロイド β とを結合させる工程を含み、

前記スペーサの長さが 1 ~ 100 nm であり、

前記免疫グロブリンが結合している前記スペーサの前記支持体上における固定位置間距離が 1 ~ 1000 オングストロームであり、

前記アミロイド β は複数のアフィニティ部位を有し、前記免疫グロブリンが前記複数のアフィニティ部位の少なくとも 2 つの部位に同時に結合し、前記アミロイド β が前記免疫グロブリンとコーポレイティブ結合により捕捉される、アミロイド β の捕捉方法。

【請求項 2】

前記アフィニティ支持体上において、前記スペーサに結合した免疫グロブリンが 1 種類存在する、請求項 1 のアミロイド β の捕捉方法。

【請求項 3】

前記アフィニティ支持体上において、前記スペーサに結合した前記免疫グロブリンが 2 種類以上、混合状態で存在する、請求項 1 のアミロイド β の捕捉方法。

【請求項 4】

前記スペーサがオキシアルキレン基を含有する、請求項 1 ~ 3 のいずれかのアミロイド β の捕捉方法。

【請求項 5】

前記スペーサが、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリサッカライド、生分解性高分子、脂質重合体、及びポリペプチドからなる群から選ばれる 1 つ又はいずれか 2 つ以上を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかのアミロイド β の捕捉方法。

【請求項 6】

前記アミロイド β が複数の分子の多量体又は凝集体として存在し、前記複数のアフィニティ部位が、多量体又は凝集体それぞれに存在する、請求項 1 ~ 5 のいずれかのアミロイド β の捕捉方法。

【請求項 7】

前記スペーサが分岐しており、前記スペーサの主鎖側に前記支持体が結合し、前記スペーサの分岐鎖側に前記免疫グロブリンが結合している、請求項 1 ~ 6 のいずれかのアミロイド β の捕捉方法。

【請求項 8】

前記支持体が、アガロース、セファロース、デキストラン、シリカゲル、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、(メタ)アクリル酸系ポリマー、フッ素樹脂、金属錯体樹脂、ガラス、金属及び磁性体からなる群から選ばれる素材からなるものである、請求項 1 ~ 7 のいずれかのアミロイド β の捕捉方法。

【請求項 9】

前記免疫グロブリンが、

(a) アミロイド β の第 3 - 8 アミノ酸残基を含むエピトープ、及び

(b) アミロイド β の第 18 - 22 アミノ酸残基を含むエピトープ

からなる群から選ばれるアミロイド β のエピトープに結合する免疫グロブリンである、請求項 1 ~ 8 のいずれかのアミロイド β の捕捉方法。

【請求項 10】

前記免疫グロブリンが、6E10 及び 4G8 からなる群から選ばれる、請求項 1 ~ 9 のいずれかのアミロイド β の捕捉方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記免疫グロブリンが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、及びI g G 4からなる群から選ばれる、請求項 1 ~ 9 のいずれかのアミロイド β の捕捉方法。

【請求項 1 2】

アミロイド β の捕捉及び解析方法であって、
請求項 1 ~ 1 1 のいずれかの方法によりアミロイド β を捕捉し、
前記アフィニティ支持体の表面を洗浄し、前記支持体に非特異的に吸着した成分を除去し、
前記免疫グロブリンと結合した前記アミロイド β を前記支持体から溶出させ、
溶出されたアミロイド β を回収し、
回収されたアミロイド β を表面プラズモン共鳴 (SPR) 又は質量分析にて解析する、アミロイド β の捕捉及び解析方法。

10

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、生物学的試料等に含まれている分子の高感度測定及び / 又は構造解析に関する。本発明は、疾病の初期診断、経過観察及び / 又は化学療法の感受性の評価技術に関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

細胞又は組織からの抽出液、並びに血液、尿又は髄液等の体液といった生体試料から、特定のポリペプチド (ペプチド又はタンパク質) を単離する方法として、クロマトグラフィを用いる方法や、特異的結合能を有する分子すなわちアフィニティ分子を用いる方法が行われている。

20

【0 0 0 3】

クロマトグラフィを用いる方法としては、逆相クロマトグラフィやイオン交換クロマトグラフィなどを用いるものが挙げられる。

【0 0 0 4】

アフィニティ分子を用いる方法としては、アフィニティ担体を用いるものが挙げられる。

30

例えば、特許文献 1 (特開平 0 7 - 2 6 8 0 0 0 号公報) には、担体と、担体に結合した抗体とから構成される免疫吸着体が開示されており、免疫吸着体の調製時において、抗体としてポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を用いることができ、抗体を担体に結合するために N, N' - ヘキサメチレンビスマレイミドなどの架橋剤を用いることができることが記載されている。

【0 0 0 5】

一般的には、生体試料中から目的のタンパク質を単離する方法としてプロテイン A / G ビーズを用いた免疫沈降法が使用されている。例えば、非特許文献 1 (Analytical Biochemistry 1999 Nov 15;275(2):262-5.) には、免疫沈降法と M A L D I 質量分析法とを組み合わせたアミロイド β ペプチドの半定量的分析が開示されている。

40

【0 0 0 6】

また例えば、非特許文献 2 (Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences 2011;87(9):603-16.) には、抗体 F c 断片と、抗体 F c 断片に結合した、ポリエチレングリコールを有するヒンジ部と、ヒンジ部に結合したアミロイド β とから構成されるフレキシブル抗体様分子を調製したことが記載されている。この調製において、アミロイド β を 2 つ有する (Two-Handed) 分子と 1 つ有する (One-Handed) 分子とが得られたことが記載されている。そして、抗アミロイド β 抗体を捕捉対象とした場合に、Two-Handed分子と抗アミロイド β 抗体との結合が、One-Handed分子と抗アミロイド β 抗体との結合に比べて小さい解離定数 K_D を達成したことが記載されている。

【0 0 0 7】

50

なお、担体への非特異的な吸着を低減させるため、特許文献2（国際公開第2005/037881号パンフレット）に、親水性スパーサを組み込んだモノマー成分を重合させた樹脂にリガンドを固定化した担体の使用が記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開平07-268000号公報

【特許文献2】国際公開第2005/037881号パンフレット

【非特許文献】

【0009】

10

【非特許文献1】Analytical Biochemistry 1999 Nov 15;275(2):262-5.

【非特許文献2】Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences 2011;87(9):603-16.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

クロマトグラフィを用いる方法においては、数種類の担体を用いて段階的に目的のポリペプチドの分離及び濃縮を行うため、必要となる生体試料量が必然的に多くなる。

【0011】

アフィニティ分子を用いる方法は、分子間のアフィニティによって特異的結合を生じさせることから、一回の処理で目的のポリペプチドの単離が可能であり、従ってこのような方法において必要となる生体試料量は微量であってもよい。この観点から、アフィニティ分子を用いる方法は、クロマトグラフィを用いる方法における生体試料量に関する欠点を補うものである。且つ、所要時間も短く汎用的である。

20

【0012】

しかしながら、アフィニティ分子を用いる方法のうち、特許文献1や非特許文献1による方法においては、目的分子（たとえばポリペプチド）の回収率や不純物の混入量は、アフィニティ担体（免疫吸着体やプロテインA/Gビーズ）の物性に依存する。例えばアフィニティ担体が抗体を使用するものである場合、抗体の抗体価に依存して目的の分子の捕捉効率や不純物の非特異的吸着量が左右される。このような物性が必然的に有する限界は、アフィニティ担体によって回収された目的分子の質量分析装置やSDS-PAGEにおける分析感度や特異性に限界を招来する。このような問題は、特に微量な生体分子を対象とする研究において、解析の困難性に帰結することが多い。

30

特許文献2による方法は、リガンドを用いた用途に限定されており、非特異的な吸着を低減させるに過ぎない。このため、特定の目的分子を特異的に捕捉することはできない。

【0013】

アフィニティ分子を用いる方法のうち、非特許文献2の方法は、抗体のヒンジ部にPEGを挿入することで二つのアミロイド・ベータ(1-15)ペプチド間に適度な距離を生じさせ、その二つのアミロイド・ベータ(1-15)ペプチドそれぞれが6E10の二つのF(ab)領域それぞれと同時に結合することが可能にしたと考えられる。このように、1分子のTwo-Handed分子が、2本の手の両方を介して1分子に結合（本明細書においては、コーボレイティブ結合と呼称する）したことで、1分子のOne-Handed分子が1本の手のみを介して結合する場合に比べて解離しにくい結合（100～100,000倍小さい解離定数 K_D ）を達成したと考えられる。1分子のOne-Handed分子が1本の手のみを介して結合する態様は、通常の抗体とその捕捉対象とが結合する態様と同様である。この観点から、非特許文献2の方法による小さい解離定数 K_D での結合すなわちコーボレイティブ結合は、特許文献1や非特許文献1の方法における抗体価に関する欠点を補うものであると予想される。

40

しかしながら、非特許文献2の方法においては、抗体様分子によるコーボレイティブ結合が可能となった捕捉対象は、抗体様分子と同様の大きさ及び形状を有する抗体分子（抗アミロイドβ抗体分子(6E10)）のみである。つまり、一般的にアフィニティ担体の捕捉対

50

象となりうる、多種多様の大きさ及び形状を有する抗体以外の分子、特にポリペプチドについて、抗体様分子によるコーポレイティブ結合の可能性は示唆されていない。

【 0 0 1 4 】

質量分析装置は生体分子の構造解析に強力なツールである。しかし、生体試料に含まれる分子を質量分析装置で構造解析するためには、解析対象とする生体分子を生体試料中から濃縮する必要がある。その理由は、質量分析装置が検出できる量には限界があることから、質量分析に供される試料中の解析対象の量は検出できる量にまで濃縮されていなければならないからである。さらに、解析対象の濃縮だけでなく、解析対象以外の不純物は排除される必要がある。その理由は、質量分析に供される試料中に不純物が含まれると、解析対象の検出の支障となる、データのバックグラウンドの上昇やイオンサプレッションを引き起こしてしまうからである。

10

【 0 0 1 5 】

そこで本発明の目的は、試料中の目的とする対象が抗体以外の分子であっても、コーポレイティブ結合による捕捉によって単離及び濃縮（すなわち、目的とする対象を濃縮された状態で試料中から単離すること）が可能なアフィニティ支持体、及びそれを用いた捕捉方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 6 】

本発明は、以下の発明を含む。

(1)

20

支持体と、前記支持体に結合したスペーサと、前記スペーサに結合したアフィニティ物質とを含み、且つ、前記スペーサに結合したアフィニティ物質が 2 ～ 5 種類、混合状態で存在している、アフィニティ支持体。

上記 (1) のアフィニティ支持体の具体的態様の一例は、実施例 2 に示される。

【 0 0 1 7 】

(2)

前記スペーサの長さが 1 ～ 1 0 0 n m である、(1) のアフィニティ支持体。

(3)

前記スペーサがオキシアルキレン基を含有する、(1) 又は (2) のアフィニティ支持体。

30

(4)

前記スペーサが、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリサッカライド、生分解性高分子、及び脂質重合体からなる群から選ばれる、(1) 又は (2) のアフィニティ支持体。

(5)

前記スペーサが分岐しており、前記スペーサの主鎖側に前記支持体が結合し、分岐鎖側に前記アフィニティ物質が結合している、(1) ～ (4) のいずれかのアフィニティ支持体。

【 0 0 1 8 】

(6)

40

前記アフィニティ物質が結合している前記スペーサの前記支持体上における固定位置間距離が 1 ～ 5 0 オングストローム (angstrom) である、(1) ～ (5) のいずれかのアフィニティ支持体。

【 0 0 1 9 】

(7)

前記支持体が、アガロース、セファロース、デキストラン、シリカゲル、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、(メタ)アクリル酸系ポリマー、フッ素樹脂、金属錯体樹脂、ガラス、金属及び磁性体からなる群から選ばれる素材からなるものである、(1) ～ (6) のいずれかのアフィニティ支持体。

50

【 0 0 2 0 】

前記アフィニティ物質が、アミノ酸又は2～50個のアミノ酸残基から構成されるペプチドである、上記のアフィニティ支持体。

【 0 0 2 1 】

(8)

前記アフィニティ物質が、免疫グロブリン、免疫グロブリンF (a b ') 断片、免疫グロブリンF (a b) 断片、免疫グロブリンF v 断片、核酸アプタマー、ペプチドアプタマー、受容体タンパク質及び生理活性物質からなる群から選ばれる、(1) ～ (7) のいずれかのアフィニティ支持体。

【 0 0 2 2 】

(9)

支持体と、前記支持体に結合したスペーサと、前記スペーサに結合したアフィニティ物質とを含むアフィニティ支持体に、捕捉されるべき対象を接触させることにより、前記アフィニティ物質と前記捕捉されるべき物質とを結合させる工程を含み、

前記捕捉されるべき対象1個に複数のアフィニティ部位が存在し、前記アフィニティ物質が前記複数のアフィニティ部位の少なくとも2つの部位に同時に結合する、物質の捕捉方法。

【 0 0 2 3 】

本明細書においては、少なくとも2個のアフィニティ物質が、捕捉されるべき物質に存在するアフィニティ部位（アフィニティ物質が特異的に結合する部位）の少なくとも2つの部位に同時に結合することができる態様を、コーボレイティブ結合と記載する。コーボレイティブ結合においては、その結合の間に、少なくとも2つの部位への同時結合が常になされていることは要求されず、例えば少なくとも2つの部位のうち1つの部位のみに結合している瞬間があることも許容する。すなわち、コーボレイティブ結合においては、補足されるべき物質の複数のアフィニティ部位のいずれかが実質的に常にアフィニティ物質に結合していることにより、捕捉されるべき物質とアフィニティ物質との完全な解離が起きにくい状態となっている。

【 0 0 2 4 】

前記アフィニティ物質と前記捕捉されるべき物質とが結合した前記支持体の表面を、0.1～200MPaの流体圧によって洗浄する工程をさらに含む、上記の物質の捕捉方法。

【 0 0 2 5 】

解離定数 K_D が最大 10^{-7} Mである、上記の物質の捕捉方法。

【 0 0 2 6 】

(1 0)

前記アフィニティ支持体上において、前記スペーサに結合したアフィニティ物質が1種類存在する、(9) の物質の捕捉方法。

上記(1 0) の方法の具体的態様の一例は、実施例1に示される。

(1 1)

前記アフィニティ支持体上において、前記スペーサに結合したアフィニティ物質が2～5種類、混合状態で存在する、(9) の物質の捕捉方法。

上記(1 1) の方法の具体的態様の一例は、実施例2に示される。

【 0 0 2 7 】

前記スペーサの長さが1～100nmである、上記の物質の捕捉方法。

(1 2)

前記スペーサがオキシアルキレン基を含有する、(9) ～ (1 1) のいずれかの物質の捕捉方法。

(1 3)

前記スペーサが、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリサッカライド、生分解性高分子、

10

20

30

40

50

及び脂質重合体からなる群から選ばれる、(9)～(11)のいずれかの物質の捕捉方法。

前記スペーサが分岐しており、前記スペーサの主鎖側に前記支持体が結合し、分岐鎖側に前記アフィニティ物質が結合している、上記の物質の捕捉方法。

【0028】

前記アフィニティ物質が結合している前記スペーサの前記支持体上における固定間距離が1～50オングストローム(angstrom)である、上記の物質の捕捉方法。

【0029】

前記支持体が、アガロース、セファロース、デキストラン、シリカゲル、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、(メタ)アクリル酸系ポリマー、フッ素樹脂、金属錯体樹脂、ガラス、金属及び磁性体からなる群から選ばれる素材からなるものである、上記の物質の捕捉方法。

10

【0030】

前記アフィニティ物質が、アミノ酸又は2～50個のアミノ酸残基から構成されるペプチドである、上記の物質の捕捉方法。

前記アフィニティ物質が、免疫グロブリン、免疫グロブリンF(a b')断片、免疫グロブリンF(a b)断片、免疫グロブリンFv断片、核酸アプタマー、ペプチドアプタマー、受容体タンパク質及び生理活性物質からなる群から選ばれる、上記の物質の捕捉方法。

【0031】

20

(14)

1個の前記捕捉されるべき対象が複数の分子からなる1個の多量体又は1個の凝集体であり、前記複数のアフィニティ部位のそれぞれが、前記複数の分子のそれぞれに存在する、(9)～(13)のいずれかの物質の捕捉方法。

(15)

1個の前記捕捉されるべき対象が1個の分子である、(9)及び(11)～(13)のいずれかの物質の捕捉方法。

(16)

前記捕捉されるべき対象が生体物質又は非生体物質である、(9)～(15)のいずれかの物質の捕捉方法。

30

(17)

前記生体物質が、バイオマーカー、バイオマーカー候補分子、及びバイオマーカー又はバイオマーカー候補からスプライシングにより生じる断片からなる群から選ばれる、(16)の物質の捕捉方法。

(18)

前記バイオマーカーが、癌、脳疾患、心疾患、免疫疾患、肝疾患、腎疾患及び眼病からなる群から選ばれる疾病に関連するものである、(17)の物質の捕捉方法。

(19)

前記生体物質がウイルス又は細菌である、(16)の物質の捕捉方法。

(20)

40

前記非生体物質が環境有害物質である、(16)の物質の捕捉方法。

【0032】

上記の物質の捕捉方法によって、捕捉されるべき対象をアフィニティ支持体に結合させる工程と、結合した前記対象を、アフィニティ支持体から溶出する工程と、溶出した前記対象を質量分析に供する、微量質量分析法。

【発明の効果】

【0033】

本発明によって、抗体以外の分子であっても解離させにくいコーポレイティブ結合による捕捉が可能なアフィニティ支持体及びそれを用いた捕捉方法が提供される。

本発明によって、従来のアフィニティ支持体に比べて100～100,000倍小さい

50

解離定数 K_D を達成する。このため、従来のアフィニティ支持体に比べて効率よい試料中の目的分子の単離及び濃縮（すなわち、目的分子をアフィニティ支持体に結合させることにより、濃縮された状態で試料中から単離すること）を達成する。例えば、従来の免疫沈降法に比べて約 5 . 6 ~ 8 . 5 倍（モル基準）の捕捉率を達成し、捕捉された物質の質量分析装置での感度は10倍に向上する。また、解離定数 K_D が小さいことにより、洗浄条件の拡大及び / 又は非特異吸着の抑制も可能となる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 4 】

【図 1】本発明のアフィニティ支持体の一態様である F(ab')-PEG ビーズの作製方法の概略図である。

10

【図 2】6E10 の Ficin 消化物のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 3】6E10 消化物の還元 SDS-PAGE (A) 及び非還元 SDS-PAGE (B) によるクロマトグラフィで得られたゲル画像である。

【図 4】6E10 F(ab')₂ 画分の還元処理による 6E10 F(ab') 断片生成の確認のための、還元処理前 (A) と還元処理後 (B) におけるサイズ排除クロマトグラムである。

【図 5】アミロイド・ベータ (1-42) の凝集体の確認のための、SDS-PAGE によるクロマトグラフィで得られたゲル画像である。

【図 6】一定量 (100 ng) のアミロイド・ベータ (1-42) を含有し且つ液量が異なる (10, 100 及び 1000 μ l) 各反応溶液を、各アフィニティ支持体 (6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ、6E10 F(ab')-PEG₂ ビーズ、及び 6E10 IgG-プロテイン G ビーズ) に供した場合のアミロイド・ベータ (1-42) 捕捉量を示したグラフである。

20

【図 7】各アフィニティ支持体 (6E10 IgG-プロテイン G ビーズ、6E10 F(ab')-PEG₂ ビーズ及び 6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ) を用いて異なる量のアミロイド・ベータ (1-42) を捕捉した場合に得られた MALDI-TOF MS スペクトル (それぞれ (A)、(B) 及び (C)) を、純品のアミロイド・ベータ (1-42) の MALDI-TOF MS スペクトル (D) と比較して示したものである。

【図 8】4G8 の LysC 消化物のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 9】4G8 消化物の還元 SDS-PAGE (A) 及び非還元 SDS-PAGE (B) によるクロマトグラフィで得られたゲル画像である。

【図 10】各アフィニティ支持体 (6E10 IgG-プロテイン G ビーズ、4G8 IgG-プロテイン G ビーズ、6E10/4G8 IgG-プロテイン G ビーズ、6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ、4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ、及び 6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ) を用いて異なる量のアミロイド・ベータ (1-28) を捕捉した場合に得られた MALDI-TOF MS スペクトル (それぞれ (A)、(B)、(C)、(D)、(E) 及び (F)) を、純品のアミロイド・ベータ (1-28) の MALDI-TOF MS スペクトル (G) と比較して示したものである。

30

【図 11】アミロイド・ベータ (1-28) をスパイクしたヒト血漿をアフィニティ支持体 (6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ) に供した場合に得られたマスマスペクトルである。

【図 12】各アフィニティ支持体 (6E10 IgG-プロテイン G ビーズ、4G8 IgG-プロテイン G ビーズ、6E10/4G8 IgG-プロテイン G ビーズ、6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ、4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ、及び 6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ) を捕捉した場合に得られた MALDI-TOF MS スペクトル (それぞれ (A)、(B)、(C)、(D)、(E) 及び (F)) を、純品のアミロイド・ベータ (1-28) の MALDI-TOF MS スペクトル (G) と比較して示したものである。

40

【図 13】アフィニティ支持体 (6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ) を用いて捕捉された、ヒト血漿にスパイクされた 1pg (307amol) のアミロイド・ベータ (1-28) のマスマスペクトルである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 5 】

[1 . アフィニティ支持体]

本発明のアフィニティ支持体は、支持体と、支持体に結合したスパーサと、スパーサに結合したアフィニティ物質とを含む。結合には、直接的結合及び間接的結合が含まれる。

50

【 0 0 3 6 】

[1 - 1 . 支持体]

支持体の素材は、アガロース、セファロース、デキストラン、シリカゲル、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、(メタ)アクリル酸系ポリマー、フッ素樹脂、金属錯体樹脂、ガラス、金属及び磁性体からなる群から選ばれてよい。

支持体の形状は、平面状、球状及びその他の形状を問わない。例えば、支持体は、目的物質の分離及び/又は濃縮に用いられるチップ、ビーズ又はマイクロデバイス内の流路壁を構成するものであってよい。

【 0 0 3 7 】

10

[1 - 2 . スペース]

スペースは、好ましくは一方の末端が支持体に、他方の末端がアフィニティ物質に結合している。スペースは、支持体とアフィニティ物質との間に適切な間隔を保ち、自身に柔軟性又は柔軟性及び伸長性を確保することによって、コーポレイティブ結合を可能にする一因として機能しうる。好ましくは、スペースは鎖状(スペース鎖)の構造を有する。鎖状のスペースの存在により、非存在の場合に比べ捕捉されるべき対象がアフィニティ物質と結合する時の支持体における立体障害が少なくなり、その結果、アフィニティ物質と捕捉されるべき対象との結合力を上げることができる。

【 0 0 3 8 】

20

スペースの長さは、例えば1~100nm、好ましくは1~20nm、さらに好ましくは5~10nmである。上記範囲を下回ると、スペースが短すぎるため2以上のアフィニティ物質が対象物質の2以上のアフィニティ部位に同時に結合するためのリーチが足りず、コーポレイティブ結合しにくい傾向にある。上記範囲を上回ると、スペースが長すぎるためアフィニティ物質の可動範囲の自由度がかえって制限され、コーポレイティブ結合しにくい傾向にある。

【 0 0 3 9 】

スペースは、例えば高分子重合体でありうる。本発明におけるスペースとしての高分子重合体は、通常鎖状のものである。

【 0 0 4 0 】

30

スペースは、非ペプチド性であることが好ましい。非ペプチド性とは、ペプチド結合を含まないことである。

例えば、非ペプチド性スペースはオキシアルキレン基を含有してよい。オキシアルキレン基含有基は2価の基であり、例えば炭素数2~6のオキシアルキレン基含有基でありうる。より具体的には、オキシアルキレン基含有基におけるオキシアルキレンは、エチレンオキシド又はプロピレンオキシドである。オキシアルキレン基含有基は、好ましくは有機高分子重合体、すなわちポリオキシアルキレン基含有基である。ポリオキシアルキレン基含有基は、炭素数2~6のアルキレングリコールの重合(例えば重合度2~40)によって生じさるポリアルキレングリコール基であることが好ましい。例えば、ポリエチレングリコール基(エチレングリコールの重合によって生じる基)及びポリプロピレングリコール基(1,2-プロパンジオール又は1,3-プロパンジオールの重合によって生じる基)からなる群から選ばれうる。

40

本発明においては、オキシアルキレン基含有基として、特に、エチレングリコール基、又は重合度2~40好ましくは12~36のポリエチレングリコール基が選択されうる。

【 0 0 4 1 】

また例えば、非ペプチド性スペースは、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリサッカライド、生分解性高分子、及び脂質重合体からなる群から選ばれる有機高分子重合体であってよい。ポリオキシアルキル化ポリオール及びポリビニルアルキルエーテルにおけるアルキル基は、例えば炭素数1~6、好ましくは1~3でありうる。ポリサッカライドの例としては、デキストラン、ムコ多糖、及びキチン類が挙げられる。ムコ多糖の例としては、ヒアルロン酸が挙げられる。生

50

分解性高分子の例としては、P L A（ポリ乳酸；poly(lactic acid)）及びP L G A（ポリ乳酸 - グリコール酸；poly(lactic-glycolic acid)）が挙げられる。

これら有機高分子重合体の重合度は、例えば2～40、好ましくは12～36でありうる。

【0042】

本発明の一態様（具体的には、アフィニティ物質が2種以上混合状態で支持体に固定されている態様）においては、スペーサはポリペプチドであってもよい。本明細書において、ポリペプチドは、ペプチド（例えばアミノ酸残基数2以上100以下）及びタンパク質（例えばアミノ酸残基数100超）の総称として用いる。スペーサとしてのポリペプチドには、定常部位に対して親和性を持つリガンドを用いることができる。そのようなリガンドの例として、プロテインA及びプロテインGが挙げられる。

10

【0043】

本発明におけるスペーサは、上述の例示の1種を含むものであってもよいし、上述の例示から任意に選択される2種以上を含むものであってもよい。

【0044】

スペーサは直鎖であってもよいし、分岐していてもよい。スペーサが分岐している場合、主鎖側すなわち一方の末端側に支持体が結合し、分岐鎖側すなわち他方の末端側にアフィニティ物質が結合している。分岐鎖の数は特に限定されず、例えば2～10でありうる。スペーサが分岐であることによって、スペーサが直鎖である場合に比べてアフィニティ支持体上のアフィニティ物質の密度を高くすることができる。

20

【0045】

[1-3. アフィニティ物質]

アフィニティ物質は、一般的に分子認識系を構築することができる、非共有結合によって相互作用可能なゲスト物質及びホスト物質の一方であってよい。より好ましくは、アフィニティ物質は、ホスト物質である。

本発明における分子認識における相互作用は、アフィニティ物質が捕捉対象のアフィニティ部位を認識し非共有結合によって相互作用することであり、例えば結合速度定数 k_a （単位 $1/\text{Ms}$ ）が少なくとも 10^3 又は 10^4 、例えば $10^3 \sim 10^5$ 又は $10^4 \sim 10^5$ の親和性で特異的結合することでありうる。アフィニティ物質1個当たりが有する特異的結合可能な場所は、1個であってもよいし、2個以上（例えば5個以下）であってもよい。

30

【0046】

アフィニティ物質は、天然由来構造を有するものであるか否かを問わない。

アフィニティ物質の例としては、アミノ酸及びポリペプチドが挙げられる。より具体的には、アフィニティ物質は、アミノ酸又は2～50アミノ酸残基からなるポリペプチドでありうる。

アフィニティ物質の他の例としては、免疫グロブリン及び免疫グロブリン断片からなる群から選ばれるものが挙げられる。免疫グロブリン断片としては、抗原結合能を有する断片であれば特に限定されない。例えば、 $F(a b')$ ₂、 $F(a b')$ 、 $F a b$ 、 $F d$ 、 $F v$ 、L鎖、及びH鎖からなる群から選ばれることができる。これらの中でも、 $F c$ 領域を有しない、免疫グロブリン $F(a b')$ 断片、免疫グロブリン $(a b)$ 断片、及び $F v$ 断片からなる群から選ばれることが、非特異的吸着を抑制する観点から好ましい。免疫グロブリンとしては、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4等が挙げられる。免疫グロブリンは、いかなる動物由来であってもよいが、特にヒト由来である。

40

アフィニティ物質のさらなる他の例としては、核酸アプタマー、ペプチドアプタマー、受容体タンパク質及び生理活性物質からなる群から選ばれるものが挙げられる。生理活性物質の例としては、サイトカイン、ホルモン及び神経伝達物質が挙げられる。

【0047】

アフィニティ物質が結合しているスペーサが固定されている支持体上の位置の間の距離、すなわちアフィニティ物質の固定位置間距離は特に限定されないが、好ましくはアフィニティ物質が可能な限り密に存在するよう、当業者が適宜決定することができる。より具

50

体的な上記固定間距離は、アフィニティ物質のサイズ等によって異なりうるが、例えば 1 ~ 1000 オングストローム、好ましくは 1 ~ 100 オングストローム、さらに好ましくは 1 ~ 50 オングストローム、さらに好ましくは 1 . 5 ~ 30 オングストロームでありうる。この範囲の下限値は、アフィニティ物質同士の近接のおおよそ物理的限界に相当する。一方、この範囲を上回ると、アフィニティ物質同士が疎になり、コーポレイティブ結合しにくくなる傾向にある。

【0048】

本発明の態様の一例において、スペーサを介して支持体上に結合したアフィニティ物質は、支持体上に（より具体的には支持体の特定領域に）、1 種類のアフィニティ物質が存在する。

本発明の態様の他の一例において、スペーサを介して支持体上に結合したアフィニティ物質は、支持体上に（より具体的には支持体上の特定領域に）、複数種のアフィニティ物質が存在する。この態様におけるアフィニティ物質の種類数は複数であるものの、例えば一般的なポリクローナル抗体を構成する抗体の種類数ほど多くない。2 ~ 5 種のアフィニティ物質それぞれの量は、互いに同量又は同量に近いことが好ましい。より具体的には、2 ~ 5 種から選ばれる任意の 2 種のアフィニティ物質の間の量の差が、20 % 以内、好ましくは 10 % 以内、より好ましくは 5 % 以内（モル基準）に収まるように、それぞれのアフィニティ物質を用いることができる。さらにこの態様においては、異なる種類のアフィニティ物質が、同一支持体上において混合状態で存在する。異なるアフィニティ物質が同一支持体上で混在している態様は、異なる種類のアフィニティ物質が互いに識別可能な状態で固定されている態様（例えばマイクロアレイ）と明確に区別される。

【0049】

支持体上の特定領域においては、固定されているアフィニティ物質の種類又は種類の組み合わせに応じた処理が行われることができる。さらに、同一支持体上に複数の領域を設け、複数の領域の間で種類又は種類の組み合わせが異なるアフィニティ物質を固定することによって、同一支持体上の異なる領域それぞれに対し異なる処理を行うこともできる。

【0050】

[2 . アフィニティ支持体の調製]

本発明のアフィニティ支持体は、結合性官能基を表面に有する支持体と、結合性官能基を有するアフィニティ物質とを、支持体の結合性官能基に対応する結合性官能基及びアフィニティ物質の結合性官能基に対応する結合性官能基の両方を同時に有する（すなわち二官能型の）又は逐次的に有する（すなわち単官能型の）スペーサ物質を介して結合させることで調製することができる。

【0051】

支持体、スペーサ物質及びアフィニティ物質それぞれの要素が有する結合性官能基は、共有結合性官能基、イオン結合性官能基及び水素結合性官能基からなる群から選ばれてよい。特に、共有結合性官能基であることが好ましい。

それぞれの要素間の互いに対応する結合性官能基の組み合わせは、共有結合、イオン結合及び水素結合からなる群から選ばれる結合、好ましくは共有結合が可能な組み合わせを、当業者が容易に決定することができる。

【0052】

例えば、一方の要素における結合性官能基がアミノ基である場合、それに対応する他方の要素における結合性官能基としては、例えば、カルボキシル基、活性エステル基（例えば、N - ヒドロキシスクシニミド(NHS)エステル基及びN - ヒドロキシスルホスクシニミド(Sulfo-NHS)エステル基）、エポキシ基、アルデヒド基、イソシアナート基、及びイソチオシアナート基が挙げられる。一方の要素における結合性官能基がチオール基である場合、それに対応する他方の要素における結合性官能基としては、例えば、マレイミド基、ピリジルジスルフィド基、ビニルスルホン基、及びプロモアセチル基が挙げられる。一方の要素における結合性官能基が水酸基である場合、それに対応する他方の要素における結合性官能基としては、例えばエポキシ基及びシリルクロライド基が挙げられる。

【0053】

結合性官能基を表面に有する支持体は、支持体表面に結合性官能基を有する分子を整列させる自己組織化表面の方法、結合性官能基を有する物質を支持体表面にコーティングさせる方法、及び結合性官能基と支持体へ共有結合可能な官能基とを有する物質を支持体表面に共有結合させる方法等によって調製することができる。この中でも、共有結合による方法で調製することが好ましい。上記例示した結合性官能基のうち、支持体が有する結合性官能基の特に好ましい例として、アミノ基が挙げられる。

支持体上の結合性官能基の密度は、例えば $0.001 \sim 0.5 \text{ mmol} / \text{m}^2$ 、好ましくは $0.01 \sim 0.1 \text{ mmol} / \text{m}^2$ である。

【0054】

スぺーサ物質が有する結合性官能基は、生体分子が生来的に有しているもの、又は有機高分子重合体が既に有しているものであってもよいし、分解、合成又は修飾によって人工的に生じさせたものであってもよい。結合性官能基を生じさせる方法は、当業者によって容易に選択される。スぺーサ物質において、支持体の結合性官能基に対応する結合性官能基と、アフィニティ物質の結合性官能基に対応する結合性官能基とは、同一であってもよいし、異なってもよい。上記例示した結合性官能基のうち、スぺーサ物質が有する結合性官能基の特に好ましい組み合わせの例として、活性エステル基及びマレイミド基の組み合わせが挙げられる。

【0055】

アフィニティ物質が有する結合性官能基は、天然由来構造に生来的に含まれているものであってもよいし、分解、合成又は修飾によって人工的に生じさせたものであってもよい。つまり、結合性官能基を有するアフィニティ物質は、例えば、生物の生体内からの単離、生体内からの単離物の分解、遺伝子工学的合成、生化学的合成及び修飾、有機化学的合成及び修飾等の手法が当業者によって適宜選択される。上記例示した結合性官能基のうち、アフィニティ物質の結合性官能基の特に好ましい例として、チオール基が挙げられる。例えばアフィニティ物質が免疫グロブリン断片の場合、免疫グロブリン断片は、酵素（例えば、パパイン、ペプシン、及びフィシン等）を用いた消化及び／又は還元剤を用いたジスルフィド結合の切断によって調製することができる。

【0056】

それぞれの要素を結合させる順番は特に限定されない。従って、支持体及びスぺーサ物質を結合させた後に、スぺーサ物質及びアフィニティ物質間の結合を生じさせてもよいし、アフィニティ物質及びスぺーサ物質を結合させた後に、スぺーサ物質及び支持体間の結合を生じさせてもよい。これらのように逐次的にそれぞれの要素を結合させる場合、スぺーサ物質は単官能性及び二官能性であることを問わない。単官能性のスぺーサ物質を用いる場合、例えば、結合性官能基を有する支持体と、支持体の結合性官能基に対応する結合性官能基を有する単官能性スぺーサ物質とを結合させた後、スぺーサ物質において、さらにアフィニティ支持体の結合性官能基に対応する結合性官能基を生じさせ、その後、生じさせた結合性官能基を介して、スぺーサ物質及びアフィニティ支持体間の結合を生じさせることができる。

一方、二官能性スぺーサ物質を用い、支持体、二官能性スぺーサ物質及びアフィニティ物質を同一反応系に供することで、それぞれの要素間の結合を一度に生じさせてもよい。

【0057】

また、それぞれの要素は、固定されるアフィニティ物質が可能な限り密になるような量で使用される。すなわち、スぺーサ物質は、支持体上の固定すべき領域に存在する結合性官能基の $10 \sim 5000$ 倍（モル基準）、アフィニティ物質は、支持体上の固定すべき領域に存在する結合性官能基の $0.1 \sim 10$ 倍（モル基準）の量で使用することができる。

【0058】

[3. アフィニティ支持体の使用]

本発明のアフィニティ支持体は、固定されたアフィニティ物質に応じて当業者によって選択された分子認識系に供することによって使用することができる。具体的には、捕捉さ

10

20

30

40

50

れるべき物質を含む試料と、アフィニティ支持体とを接触させることによって、試料中の捕捉されるべき物質とアフィニティ支持体上のアフィニティ物質とを結合させる。

【 0 0 5 9 】

[3 - 1 . 捕捉されるべき対象とコーポレイティブ結合]

本発明の一態様において、1個の捕捉されるべき対象は、1個の分子である。本発明の他の一態様において、1個の捕捉されるべき対象は、2個以上の分子からなる1個の2量体以上の多量体又は1個の凝集体である。

捕捉されるべき対象1個には、アフィニティ部位、すなわちアフィニティ物質と特異的に結合する部位が複数存在する。本発明のアフィニティ支持体の使用においては、少なくとも2個のアフィニティ物質が、捕捉されるべき対象1個に存在する複数のアフィニティ部位のうち少なくとも2つの部位に同時に結合する（すなわちコーポレイティブ結合する）ことができる。コーポレイティブ結合においては、少なくとも2つのアフィニティ部位への同時結合が、常になされていることは要求されない。例えば、少なくとも2つのアフィニティ部位のうち1つの部位のみに結合している瞬間があることも許容する。すなわち、コーポレイティブ結合においては、捕捉されるべき物質の複数のアフィニティ部位のいずれかが常にアフィニティ物質に結合していることにより、捕捉されるべき物質をとらえた状態を維持しやすい。言い換えれば、捕捉されるべき物質とアフィニティ物質との完全な解離が起きにくい。

【 0 0 6 0 】

本発明におけるアフィニティ物質による結合速度定数 k_a （単位 $1/\text{Ms}$ ）は上記項目1 - 3で述べた通りで、従来の一般的な分子認識系における場合の結合速度定数 k_a と同等である一方、解離速度定数 k_d （単位 $1/\text{s}$ ）は当該従来における場合に比べて小さい。そのため、本発明においては解離定数 K_D （単位 M ）が当該場合に比べて小さく、例えば最大 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、又は 10^{-12} であり、例えば $10^{-13} \sim 10^{-7}$ でありうる。

【 0 0 6 1 】

例えば、1個の捕捉されるべき対象が1個の分子である場合、1個の分子に複数のアフィニティ部位が存在する。さらにこの場合、1個の分子に存在する複数のアフィニティ部位は一般的には互いに異なるものである。このため、少なくとも2つの部位に同時に結合可能なように、アフィニティ支持体上に固定されたアフィニティ物質の種類は異なる2以上が必要である。

【 0 0 6 2 】

また例えば、1個の捕捉されるべき対象が2個以上の分子からなる場合、それぞれの分子に少なくとも1のアフィニティ部位が存在していればよい。さらにこの場合、1個の捕捉されるべき対象を構成する2個以上の分子は一般的には同一であるため、それぞれの分子に存在する少なくとも1のアフィニティ部位は互いに同じものである。このため、アフィニティ支持体上に固定されたアフィニティ物質の種類は1種類でよい。しかしながら、この場合において、アフィニティ支持体上に固定されたアフィニティ物質の種類が2以上であることを特別除外するものではない。

【 0 0 6 3 】

[3 - 2 . 捕捉されるべき対象を含む試料]

本発明のアフィニティ支持体によって捕捉されるべき対象は、固定されたアフィニティ物質の種類又は種類の組み合わせに応じて当業者により容易に決定することができる。

捕捉されるべき対象は、天然由来構造を有するものであるか否かを問わない。

【 0 0 6 4 】

捕捉されるべき対象の具体例として、生体物質、特に、ポリペプチド、糖鎖、核酸、及びそれらの結合体（例えば、糖ペプチド及びペプチド核酸等、任意の組合せによる結合体）等が挙げられる。これらの生体物質の分子量は、例えば $200 \sim 1,000,000$ 、好ましくは $1,000 \sim 200,000$ でありうる。

【 0 0 6 5 】

捕捉されるべき対象のより具体的な例として、バイオマーカー、バイオマーカー候補分子、及びバイオマーカー又はバイオマーカー候補からスプライシングにより生じる断片からなる群から選ばれる生体物質が挙げられる。さらに、バイオマーカーは、癌、脳疾患（例えばアルツハイマー）、心疾患免疫疾患、肝疾患、腎疾患及び眼病からなる群から選ばれる疾病に関連するものでありうる。このような生体物質を捕捉されるべき対象とする場合、本発明によって、疾病の初期診断、経過観察、及び／又は疾病に対する化学療法の感受性の評価を行うことができる。

【0066】

捕捉されるべき対象のより具体的な他の例として、ウイルスが挙げられる。この場合、アフィニティ支持体は、ウイルスの表面抗原を捕捉することができる。本発明の一態様である2～5種のアフィニティ物質を固定したアフィニティ支持体は、表面抗原が様々な変換により生じうるウイルスのバリエーションに容易に対応することができる。

捕捉されるべき対象のより具体的な他の例として、細菌細胞、動物細胞、及び植物細胞からなる群から選ばれる細胞類が挙げられる。この場合、アフィニティ支持体は、例えば、血管内皮細胞増殖因子受容体（VEGFR）、上皮成長因子受容体（EGFR）、腫瘍壊死因子受容体（TNFR）等の、2量体以上の多量体を構成しているレセプタを捕捉することができる。

【0067】

捕捉されるべき対象の他の具体例として、非生体物質、特に環境有害物質が挙げられる。環境有害物質の例としては、ダイオキシン、エストロゲン及びポリ塩化ビフェニル等の化合物が挙げられる。その他、非生体物質は、分子量100～1,000、好ましくは200～700の低分子量化合物であってよい。

【0068】

捕捉されるべき対象のさらなる他の具体例として、薬剤分子の多量体又は凝集体が挙げられる。本発明は、薬剤調製において薬剤分子の会合や凝集が問題になる場合にも有用である。このような問題を招来するおそれのある薬剤分子は、ほとんどの場合ポリペプチド製剤分子である。従って薬剤分子の例としては、特にポリペプチド製剤分子、より具体的な例としてインシュリン及び副甲状腺ホルモン等が挙げられる。

【0069】

アフィニティ支持体に供される試料は、上述の捕捉されるべき対象を含むものであれば特に限定されない。試料は、通常、液体状態のものとして用意される。捕捉されるべき対象は試料中で精製されたものとして用意されていることは必須ではない。精製がされている場合においては、精製の程度は問わない。本発明においては、捕捉されるべき対象の微量分析の観点等から、試料中の捕捉されるべき対象に対してなされた精製等の処理の程度が低いものが好ましい場合がある。

【0070】

アフィニティ支持体に供される試料の例としては、生物の細胞、組織、体液、分泌物及び排泄物等から調製された生物試料が挙げられる。体液から調製されるものの代表として、血液に由来する試料が挙げられる。血液に由来する試料の例としては、全血、血漿及び血清が挙げられる。体液から血液由来試料の調製の際に行われてよい操作の例としては、血液に、抗血液凝固因子（例えば、エチレンジアミン四酢酸、クエン酸及びヘパリン等が挙げられる。）を添加し、遠心分離で血液細胞（具体的には、赤血球、白血球、及び／又は血小板である。）を除去することが挙げられる。調製の際に行われてよい操作の他の例としては、血液を凝固させ、遠心に供した後、血液凝固因子と血液細胞とを除去することが挙げられる。血液は、病気の発生に伴い血中成分がダイナミックに変化することがよく知られている。このため、血液に由来する試料は、血中で変動する分子をバイオマーカーとして、多くの疾病の早期診断、経過観察及び／又は治療後の経過観察のために用いることができる。また、将来的にも、血中の新規マーカー分子は、早期診断や正診率の高い診断を実現する可能性を秘めている。このため、血液に由来する試料は、新たな診断方法を開発する目的で、血中の新規マーカー分子の探索に用いることもできる。

10

20

30

40

50

このような生体試料をアフィニティ支持体に供することによって、試料中に含まれる目的物質を捕捉し、捕捉した目的物質を検査することができる。

【0071】

アフィニティ支持体に供される試料の他の例としては、環境物質から調製された環境試料が挙げられる。環境物質としては、土壌、地質、水、及び空気等が挙げられる。環境物質から環境試料の調製の際に行われてよい操作の例としては、有機溶媒（例えば、アセトン及びトルエン等が挙げられる。）を用いた抽出が挙げられる。

このような環境試料をアフィニティ支持体に供することによって、試料中に含まれる目的物質を捕捉し、捕捉した目的物質を検査することができる。

【0072】

アフィニティ支持体に供される試料のさらなる他の例としては、未精製の医薬品試料が挙げられる。このような医薬品試料をアフィニティ支持体に供することによって、試料中に含まれる不要物質（医薬品分子の多量体及び凝集体）を除去し、精製された医薬品を得ることができる。

【0073】

試料中における捕捉されるべき対象の濃度は、例えば、 $1 \sim 10^{12} \text{ a mol/ml}$ 、好ましくは $100 \sim 10^9 \text{ a mol/ml}$ でありうる。試料は、捕捉されるべき対象の量が、支持体表面 1 cm^2 当たり $0.1 \sim 500 \text{ pmol}$ 、好ましくは $1 \sim 100 \text{ pmol}$ となるように、アフィニティ支持体へ供することができる。

【0074】

[3-3. 洗浄]

支持体に固定されたアフィニティ物質と捕捉されるべき対象とを結合させた後、支持体表面を洗浄工程に供することができる。洗浄工程においては、支持体表面を $0.01 \sim 500 \text{ MPa}$ 、好ましくは $0.05 \sim 300 \text{ MPa}$ 、さらに好ましくは $0.1 \sim 200 \text{ MPa}$ の流体圧に供することによって、不要な成分を除去することができる。上記範囲を下回ると、所望の洗浄効果が得られない傾向にある。上記範囲を上回ると、アフィニティ物質と捕捉された対象との結合が切断されるおそれがある。本発明のアフィニティ支持体は、コーポレイティブ結合によって捕捉すべき対象を保持することができるため、従来のアフィニティ支持体を用いた場合に比べて高圧条件での洗浄が可能である。このような洗浄条件の拡大は、アフィニティ支持体への非特異吸着物質の除去効率を向上させ、その結果、捕捉された対象の分析の感度向上に資することとなる。

【0075】

なお、洗浄の具体的手法は特に限定されるものではない。例えば球状支持体の場合は、洗浄液内で激しく攪拌することによって洗浄することができる。平面支持体の場合は、洗浄ノズルから高圧洗浄液を噴射することによって洗浄することができる。より具体的には、平面支持体上における特定の領域を高圧洗浄するために、当該領域の面積に応じた内径を有する洗浄ノズルを用いることができる。このノズルは、例えば二重管で構成され、内管は支持体表面へ洗浄液を噴射する注水専用として、外管は支持体表面へ噴射した洗浄液を吸引する排水専用として機能させることができる。

【0076】

[3-4. 捕捉された対象の分析]

捕捉された対象は、アフィニティ支持体に結合させたまま、又は、アフィニティ支持体から溶出させて（すなわち捕捉された対象とアフィニティ物質との結合を切断し、捕捉された対象を遊離させて）得られた回収物の状態で、適当な検出系によって分析されることができる。捕捉された対象をアフィニティ支持体から溶出させる方法は、捕捉された対象が結合したアフィニティ支持体を、捕捉された対象とアフィニティ物質との組み合わせに応じて当業者により容易に選択される溶出液に供することによって行うことができる。

【0077】

本発明においては、検出系の例としての、放射活性測定、酵素活性測定、蛍光強度測定、及び発光強度測定による検出系を用いることができる。

10

20

30

40

50

例えば、アフィニティ支持体が供される分子認識系が免疫系である場合、いかなる固相免疫測定法による検出系が選択されてもよい。例えば、ラジオイムノアッセイ (RIA)、エンザイムイムノアッセイ (EIA, ELISA)、蛍光イムノアッセイ (FIA)、化学発光イムノアッセイ (CLIA) 等による検出系が選択される。当業者はこれらの検出系に応じた標識 (放射性同位元素、酵素、蛍光物質及び化学発光物質からなる群から選ばれる) を、適宜、アフィニティ物質及び / 又は捕捉されるべき対象に結合させておくことができる。

また例えば、アフィニティ支持体が供される分子認識系がアプタマー - 受容体タンパク質系である場合、用いられる検出系は、上記免疫系において用いられる検出法に準じることができる。アプタマー - 受容体タンパク質系を用いる場合は、特異的結合能及びアプタマー調製の簡便さにおいて上記免疫系を用いる場合より優れている点で好ましい。

10

【0078】

本発明においては、上述の検出系以外の例としての、表面プラズモン共鳴 (SPR)、和周波発生 (SFG)、局在プラズモン共鳴 (LPR) 及びエリブソメトリ等の光学的検出系を用いることが好ましい。このような光学的検出系を用いる場合、上述の検出系とは異なり、標識を必要としない。

【0079】

本発明においては、上述の検出系以外のさらなる例としての質量分析による検出系を用いることも好ましい。この場合に用いられる質量分析法は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 質量分析法であることが好ましい。例えば、MALDI-TOF (マトリックス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間) 型質量分析装置、MALDI-IT (マトリックス支援レーザー脱離イオン化 - イオントラップ) 型質量分析装置、MALDI-IT-TOF (マトリックス支援レーザー脱離イオン化 - イオントラップ - 飛行時間) 型質量分析装置、MALDI-FTICR (マトリックス支援レーザー脱離イオン化 - フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴) 型質量分析装置等を用いることができる。

20

【0080】

マトリックス及びマトリックス溶媒は、分析対象 (すなわちアフィニティ支持体に捕捉された対象) に応じて当業者が容易に決定することができる。

マトリックスとしては、例えば、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸、2,5-ジヒドロキシ安息香酸、シナピン酸、3-アミノキノリン等を用いることができる。

マトリックス溶媒としては、例えば、アセトニトリル (ACN)、トリフルオロ酢酸 (TFA)、メタノール、エタノール及び水からなる群から選択して用いることができる。より具体的には、ACN-TFA水溶液、ACN水溶液、メタノール-TFA水溶液、メタノール水溶液、エタノール-TFA水溶液、エタノール溶液などを用いることができる。ACN-TFA水溶液におけるACNの濃度は例えば10~90体積%であり、TFAの濃度は例えば0.05~1体積%、好ましくは0.05~0.1体積%でありうる。

30

マトリックス濃度は、例えば0.1~50mg/ml、好ましくは0.3~20mg/ml、さらに好ましくは0.5~20mg/mlでありうる。

【0081】

MALDI質量分析による検出系を用いる場合、マトリックス添加剤 (コマトリックス) が併用されることが好ましい。マトリックス添加剤は、分析対象及び / 又はマトリックスに応じて当業者が適宜選択することができる。例えば、マトリックス添加剤として、ホスホン酸基含有化合物を用いることができる。具体的には、ホスホン酸基を1個含む化合物として、ホスホン酸 (Phosphonic acid)、メチルホスホン酸 (Methylphosphonic acid)、フェニルホスホン酸 (Phenylphosphonic acid)、及び1-ナフチルメチルホスホン酸 (1-Naphthylmethylphosphonic acid) 等が挙げられる。また、ホスホン酸基を2個以上含む化合物として、メチレンジホスホン酸 (Methylenediphosphonic acid)、エチレンジホスホン酸 (Ethylenediphosphonic acid)、エタン-1-ヒドロキシ-1,1-ジホスホン酸 (Ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonic acid)、ニトリロトリホスホン酸 (Nitrilotriphosphonic acid)、及びエチレンジアミノテトラホスホン酸 (Ethylenediaminetetraphosphonic acid) 等が挙げられる。上記のホスホン酸基含有化合物の中でも、1分子中に2以上、好ま

40

50

しくは2～4個のホスホン酸基を有する化合物が好ましい。

【0082】

ホスホン酸基含有化合物の使用は、例えばスペーサとしてオキシアルキレン基含有基が用いられた場合に有用である。オキシアルキレン基含有基は、酸素原子の周りに、プラス電荷を帯びた金属イオンを取り込む性質があり、この金属イオンに起因して質量分析においてバックグラウンドへ悪影響を与える。ホスホン酸基含有化合物の使用には、このような悪影響を抑制する効果がある。

【0083】

なお、上記マトリックス添加剤以外にも、より一般的な添加剤、例えばアンモニウム塩及び有機塩基からなる群から選ばれる物質が使用されても良い。

10

【0084】

マトリックス添加剤は、水中又はマトリックス溶媒中0.1～10w/v%、好ましくは0.2～4w/v%の溶液に調製することができる。マトリックス添加剤溶液及びマトリックス溶液は、例えば、1:100～100:1、好ましくは1:10～10:1の体積比で混合することができる。

【実施例】

【0085】

以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。以下において%で示される物の量は、特に断りがない場合は、その物が固体である場合は重量基準、液体である場合は体積基準で示されている。

20

【0086】

[実施例1:1種類の抗体断片を用いたF(ab')₂-PEGnビーズによるアミロイド・ベータ(1-42)の捕捉]

(1) 6E10 F(ab')₂-PEGnビーズの作製

6E10 F(ab')₂-PEGnビーズを作製するための手順の概略を図1に示した。

まず、抗体F(ab')₂断片を調製した。より具体的には、アミロイド・ベータの第3-8残基をエピトープとする抗アミロイド・ベータ抗体(6E10)250μgをFicinアガロースビーズ(Thermo)1250μl(33%スラリー)により消化し、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて分離した。図2に、サイズ排除クロマトグラフィーによる6E10のFicin消化物の分離結果を示す。さらに、図3に、分画した6E10消化物の還元SDS-PAGE(図3A)及び非還元SDS-PAGE(図3B)クロマトグラフィーで得られたゲル画像を示す。F(ab')₂の性質上、非還元状態ではおよそ100kDa、還元状態ではH鎖及びL鎖間のジスルフィド結合が開裂して25kDaとなる。還元状態(図3A)で25kDaの位置、及び非還元状態(図3B)でおよそ100kDaの位置にバンドが確認されたフラクション(Frac.)24-29の分画を確認することによって、6E10 F(ab')₂が精製できたと判断した。このフラクション24-29を集めてF(ab')₂画分とした。この6E10 F(ab')₂画分を30mM 2-メルカプトエチルアミン(MEA)水溶液で還元した。図4に、還元処理前(図4A)と還元処理後(図4B)におけるサイズ排除クロマトグラムを示す。図4により、6E10 F(ab')₂画分の還元によって6E10 F(ab')が生成したことを確認した。

30

【0087】

次に、アミノ磁気ビーズ(Dynabeads M-270 Amine: Invitrogen) 5μl(33%スラリー)を用意し、ビーズ表面のアミノ基に、SM(PEG)_n(_n=2, 24)のNHS基を30分間、室温で反応させることでPEGとビーズとを共有結合させた。(なお、図1には、_n=24の場合を挙げて示している。)磁気ビーズに結合されたSM(PEG)_nのマレイミド基に、F(ab')₂を30分間、室温で反応させて共有結合させた。

40

【0088】

(2) 6E10 IgG-プロテインGビーズの作製

対照実験用として、プロテインG磁気ビーズ(Dynabeads Protein G: Invitrogen) 5μl(33%スラリー)に6E10 IgG 0.75μgをアフィニティ結合させ、IgG-プロテインGビーズを作製した。

50

【 0 0 8 9 】

(3) 抗原としてのアミロイド・ベータ(1-42)

抗原にはアミロイド・ベータ(1-42)を用いた。アミロイド・ベータ(1-42)はC末端側が凝集して多量体を形成することが知られている。そのため、1個の凝集体アミロイド・ベータ(1-42)には6E10のエピト・プが複数存在することになり、コーボレイティブ結合を利用した結合能力評価に適した材料になりうる。なお、本実施例で用いたアミロイド・ベータ(1-42)が凝集していることは、SDS-PAGEにて確認した。3-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のアミロイド・ベータ(1-42)をSDS-PAGEで分離し、銀染色によって染めたゲルの画像を図5に示す。図5に示されるように、アミロイド・ベータ(1-42)の二量体(Dimers)、三量体(Trimers)、四量体(Tetramers)が確認された。

10

【 0 0 9 0 】

(4) ビーズを用いたアミロイド・ベータ(1-42)の捕捉方法

6E10 F(ab')-PEGnビーズ ($n=2, 24$) 及び6E10 IgG-プロテインGビーズの3種類のビーズを、それぞれ、TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4)-1% n-オクチル- β -D-チオグリコシド(OTG) で三回洗浄した後、凝集形成しているアミロイド・ベータ(1-42)と1時間、室温で転倒混和させながら反応させた。その後、ビーズをTBS-1%OTG で3回洗浄、及び H_2O で1回洗浄した。さらにその後、3 mM HCl 5 μl で2回溶出を行った。このように、捕捉すべき対象の単離及び濃縮を行った。溶出液は、後述のようにサンドウィッチELISA及びMALDI-TOF MSで測定した。

20

【 0 0 9 1 】

(5) サンドウィッチELISAによるアミロイド・ベータ(1-42)の定量

炭酸バッファー(15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 , pH 9.6)に0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で溶解している抗アミロイド・ベータ抗体(4G8)の溶液を、96ウェルプレートに100 μl ずつ入れて、4、オーバーナイトで静置した。その後、ウェルに入っている抗体溶液を除去し、さらに20%ブロッキングバッファー(ナカライテスク)を200 μl ずつ入れて2時間、室温で静置した。ウェルを洗浄バッファー(10 mM Na_2HPO_4 、1.76 mM KH_2PO_4 、137 mM NaCl、2.7 mM KCl、0.1% Tween) 300 μl で3回洗浄した。

【 0 0 9 2 】

反応バッファー(10 mM Na_2HPO_4 、1.76 mM KH_2PO_4 、137 mM NaCl、2.7 mM KCl、0.1% Tween、5%ブロッキングバッファー(ナカライテスク))に既知濃度で溶解しているアミロイド・ベータ(1-42)の溶液と、上記項目4で得られた溶出液を上記の反応バッファーで100倍希釈したサンプルとを、100 μl ずつ別々のウェルに入れて、1時間、室温で振盪させた。ウェルを洗浄バッファー300 μl で5回洗浄した後、HPR標識抗アミロイド・ベータ抗体(6E10-HPR) 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を100 μl ずつ入れて、1時間、室温で振盪させた。ウェルを洗浄バッファー(PBS-0.1% Tween) 300 μl で5回洗浄した後、TMBを100 μl ずつ入れて15分間、室温で振盪させた。1N H_2SO_4 を100 μl ずつ加えた後、プレートリーダーにより吸光度450nm/650nmを測定した。

30

【 0 0 9 3 】

(6) MALDI-TOF MS

MALDIプレート上に、上記項目4で得られた溶出液1 μl と、0.1%トリフルオロ酢酸を含む50%アセトニトリル水溶液中0.5 mg/mlの α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(CHCA) 1 μl とを滴下し混合した。それをAXIMA performance(島津製作所)のリニアモードで計測した。各サンプル間の比較をするため、計測は全てプロファイル数;500、1プロファイルにおけるショット数;5、ラスターモード、レーザー照射点の数;100ポイントで一定にした。ピーク検出の基準はS/N比3以上とした。

40

【 0 0 9 4 】

(7) 6E10 F(ab')-PEGnビーズによるアミロイド・ベータ(1-42)の捕捉量評価

抗原となるアミロイド・ベータ(1-42)量を100 ngで一定にし、且つ各種ビーズの量を 10^7 個で一定にし、反応溶液の液量をそれぞれ10, 100, 及び1000 μl として(つまり抗体濃度と抗原濃度とをそれぞれ1, 10, 及び100倍にふった条件で)、各種ビーズ(6E10 F(

50

ab')-PEG₂₄ ビーズ、6E10 F(ab')-PEG₂ ビーズ、及び6E10 IgG-プロテインGビーズ)を用いたアミロイド・ベータ(1-42)の単離及び濃縮を行った。単離及び濃縮における抗原捕捉量をELISA法にて測定した。アミロイド・ベータ(1-42)の捕捉量のグラフを図6に示す。6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズは、6E10 IgG-プロテインGビーズと比べて5.9~8.5倍、6E10 F(ab')-PEG₂ ビーズは6E10 IgG-プロテインGビーズと比べて5.6~6.9倍量の抗原を捕捉できた。

【0095】

全てのビーズにおいて、反応溶液を増加させるにつれて捕捉量は減少する傾向がみられたが、その減少幅は6E10 F(ab')-PEG₂ ビーズに比べて6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズの方が小さい。反応溶液1000 μ l では、6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズの捕捉量が最も多かった。ここで、抗原が抗体に結合する割合は、抗体と抗原それぞれのモル濃度と抗体の会合速度定数(k_a)及び解離速度定数(k_d)に依存して変化する。非特許文献2(Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences 2011;87(9):603-16.)におけるSPRの結果では、コーポレイティブ結合を形成している場合の抗体抗原反応の速度定数は、コーポレイティブ結合を形成していない場合と比べ、 k_a が同等である一方、 k_d が小さくなっていた。

F(ab')-PEG₂₄ ビーズを用いた場合の捕捉量がF(ab')-PEG₂ ビーズの場合を上回っていることは、F(ab')-PEG₂₄ ビーズが抗原と結合する時により好ましい(すなわちより k_d が小さい)コーポレイティブ結合を形成していると考えられる。そして、このことは生体試料中で濃度のより低い分子を捕捉することに対してF(ab')-PEG₂₄ ビーズがより有効な手段となりえることを示している。

【0096】

(8) 質量分析装置による検出限界の評価

本発明の方法を用いた場合に、質量分析装置で検出できる抗原量が、従来の免疫沈降法を用いた場合(すなわち6E10 IgG-プロテインGビーズを使用した場合)に比べて少なくなることが調べた。図7に、6E10 IgG-プロテインGビーズ(図7A)、6E10 F(ab')-PEG₂ ビーズ(図7B)及び6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ(図7C)を用いた場合に得られたアミロイド・ベータ(1-42)溶出液のMALDI-TOF MSスペクトルと、ビーズに捕捉させず純品のまま(図7D) MALDIプレートにスポットされた(直接スポッティングされた)アミロイド・ベータ(1-42)のMALDI-TOF MSスペクトルとを示す。それぞれの場合のアミロイド・ベータ(1-42)の検出限界を表1にまとめた。

【0097】

【表1】

検出限界(S/N $\geq$ 3)			
6E10 IgG- プロテイン G	6E10 F(ab')-PEG ₂	6E10 F(ab')-PEG ₂₄	直接スポッティング
100 pg (22.2 fmol)	25 pg (5.54 fmol)	25 pg (5.54 fmol)	25 pg (5.54 fmol)

【0098】

従来の免疫沈降法を用いた場合、すなわち6E10 IgG-プロテインGビーズを使用した場合に、MALDI-TOF MSの検出に必要なアミロイド・ベータ(1-42)の量が100 pgであった。これに対して、本発明の方法を用いた場合、すなわち6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ及び6E10 F(ab')-PEG₂ ビーズを使用した場合はいずれも、MALDI-TOF MSの検出に必要なアミロイド・ベータ(1-42)の量がわずかに25 pgであった。すなわち、質量分析装置で検出できる抗原量が、従来の免疫沈降法を用いた場合に比べて少なくなることが示された。しかも、本発明の

方法による検出レベルは、アミロイド・ベータ(1-42)を直接MALDIプレートにスポットした検出限界と同等のレベルである。つまり、本発明の方法により、試料中から100%に近い割合でアミロイド・ベータ(1-42)を回収できることが示された。

【0099】

[実施例2: 2種類の抗体断片を用いた6E10/4G8 F(ab')-PEGnビーズによるアミロイド・ベータ(1-28)の捕捉]

実施例1の1種類の抗体由来の6E10 F(ab')-PEGnビーズを用いて、6E10 IgG-プロテインGビーズを用いた場合より捕捉量を増加させることができる捕捉対象は、ホモ多量体を形成しているアミロイド・ベータ(1-42)のような分子である。

一方、本実施例では、抗原1分子に対して同様の捕捉量増加を図るために、抗原分子1分子における複数の部位を認識する少なくとも2種類の抗体由来F(ab')が必要であることを前提とし、2種類のF(ab')を有するビーズを作製した。

【0100】

(1) 各種F(ab')-PEG₂₄ビーズの作製

(1-1) 6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄ビーズの作製

2種類のF(ab')のうち一方は、実施例1と同様にアミロイド・ベータの第3-8残基をエピトープとする抗アミロイド・ベータ抗体6E10から調製し、他方は、アミロイド・ベータの第18-22残基をエピトープとする抗アミロイド・ベータ抗体4G8から調製した。4G8はIgG2bのため、FicinやPepsinによってはF(ab')₂を生成できない。そこで、リシルエンドペプチダーゼ(LysC)を用いてF(ab')₂を生成させた。具体的には、LysC 500 ng を4G8 100 μg に2.5時間作用させた後、サイズ排除クロマトグラフィを用いて分離した。

【0101】

図8に、サイズ排除クロマトグラフィによる4G8のLysC消化物の分離結果を示す。さらに、図9に、分画した4G8消化物の還元SDS-PAGE(図9A)及び非還元SDS-PAGE(図9B)クロマトグラフィで得られたゲル画像を示す。非還元状態でおよそ100kDa、還元状態で25kDaのバンドが確認されているFrac. 16-29を4G8 F(ab')₂画分とし分取した。4G8 F(ab')₂画分の還元によって生成する4G8 F(ab')を得た。

【0102】

F(ab')画分として、4G8 F(ab')画分と、実施例1の項目1で得られた6E10 F(ab')画分とを1:1(モル比)で用いたことを除き実施例1の項目1と同様の方法によって、2種類のF(ab')がPEGを介して同じビーズに結合させたもの、すなわち6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄を作製した。

【0103】

(1-2) 6E10 F(ab')-PEG₂₄ビーズ及び4G8 F(ab')-PEG₂₄ビーズの作製

参考実験用として、実施例1と同じ6E10 F(ab')-PEG₂₄ビーズと、F(ab')画分として、4G8 F(ab')画分を用いたことを除き実施例1の項目1と同様の方法によって作製した4G8 F(ab')-PEG₂₄ビーズとを用意した。

【0104】

(2) 各種IgG-プロテインGビーズの作製

(2-1) 6E10/4G8 IgG-プロテインGビーズの作製

4G8 F(ab')画分と6E10 F(ab')画分とを1:1(モル比)で用いたことを除き、実施例1の項目2と同様の方法によって、2種の抗体を同じプロテインGビーズに結合させたもの、すなわち6E10/4G8 IgG-プロテインGビーズを作製した。

【0105】

(2-2) 6E10 IgG-プロテインGビーズ及び4G8 IgG-プロテインGビーズの作製

対照実験用として、実施例1と同じ6E10 IgG-プロテインGビーズと、抗体として4G8 IgGを用いたことを除き実施例1の項目2と同様の方法によって作製した4G8 IgG-プロテインGビーズとを用意した。

【0106】

(3) 抗原としてのアミロイド・ベータ(1-28)

抗原にはアミロイド・ベータ(1-28)を用いた。アミロイド・ベータ(1-28)は実施例 1 におけるアミロイド・ベータ(1-42)と異なって凝集することはない、溶液中で単体として存在する。

【 0 1 0 7 】

(4) 6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズによるアミロイド・ベータ(1-28)の捕捉量評価

上述のアフィニティビーズ (6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄、6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ、4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ、6E10/4G8 IgG-プロテインGビーズ、6E10 IgG-プロテインGビーズ及び4G8 IgG-プロテインGビーズ)を用いて、実施例 1 の項目 4 と同様にアミロイド・ベータ(1-28)を捕捉した。さらに、実施例 1 の項目 6 と同様に質量分析装置で計測し、検出限界を調べた。図 1 0 に、6E10 IgG-プロテインGビーズ (図 1 0 A)、4G8 IgG-プロテインGビーズ (図 1 0 B)、6E10/4G8 IgG-プロテインGビーズ (図 1 0 C)、6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ (図 1 0 D)、4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ (図 1 0 E)、及び6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ (図 1 0 F) を用いた場合に得られたアミロイド・ベータ (1-28) 溶出液のMALDI-TOF MSスペクトルと、ビーズに捕捉させず純品のまま (図 1 0 G) MALDIプレートにスポットされた (直接スポットティングされた) アミロイド・ベータ(1-28)のMALDI-TOF MSスペクトルとを示す。また、それぞれの場合における検出限界 (S/N 3) を表 2 に示す。

10

【 0 1 0 8 】

【表 2】

検出限界(S/N ≥ 3)			
	IgG-プロテイン G	F(ab')-PEG ₂₄	直接スポットティング
6E10	25 pg (7.67 fmol)	5 pg (1.53 fmol)	2.5 pg (767 amol)
4G8	25 pg (7.67 fmol)	25 pg (7.67 fmol)	
6E10/4G8	25 pg (7.67 fmol)	2.5 pg (767 amol)	

20

30

【 0 1 0 9 】

3種類のIgG-プロテインGビーズ(6E10/4G8 IgG-プロテインGビーズ、6E10 IgG -プロテインGビーズ及び4G8 IgG-プロテインGビーズ)を用いた場合の検出限界は全て25 pgだったのに対して、6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズを用いた場合は5 pgであった。すなわち6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズを用いた場合、各種IgG-プロテインGビーズを用いた場合の5倍の感度向上が示された。これは、PEG挿入によりビーズ-F(ab')間でのスペースが生まれた結果、立体障害が少なくなり抗原抗体反応の結合力が上がったためであると考えられる。

40

【 0 1 1 0 】

一方、4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズの場合の検出限界は、4G8 IgG-プロテインGビーズの場合と同じ25 pgであった。IgGをF(ab')化すると抗原抗体結合力が低下する場合があるが、PEG挿入による抗原抗体結合能力上昇の効果は、このF(ab')化による抗原抗体結合力の低下を相殺することができることが分かった。

【 0 1 1 1 】

6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズの場合の検出限界は2.5 pgであり、アミロイド・ベータ(1-28)を直接MALDIプレートにスポットした場合の検出限界と同等のレベルを示した。

ここで、6E10 F(ab')と4G8 F(ab')とのそれぞれの結合力を単純に計算すれば、6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズの検出限界5 pgと4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズの検出限界25 pgとを平均し

50

た15 pg程度の検出限界が予想される。しかしながら、6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズによる検出限界は、予想された検出限界の1/6である2.5 pgであった。これは、ビーズ上の互いに異なるエピトープをもつ2種類の抗体断片(6E10 F(ab')と4G8 F(ab'))がコーボレイティブ結合を形成して、結合力を高めたと考えられる。一方、S/N比を比較すると、6E10 F(ab')-PEG₂₄を用いた場合は純品のアミロイド・ベータ(1-28)の場合よりも低い値を示したことから、微量な夾雑物(低分子化合物、金属イオン等)が混じっていることが考えられる。

【0112】

[実施例3: ヒト血漿にスパイクされたアミロイド・ベータ(1-28)の捕捉]

生体試料から目的の生体分子を質量分析装置で測定するためには、目的分子を単離及び濃縮することで、他の夾雑物を排除することが重要である。本実施例では、F(ab')-PEGn ビーズの、捕捉すべき対象の単離及び濃縮による他の夾雑物の排除能力を調べた。生体試料としてヒト血漿を用いた。

10

【0113】

ヒト血漿50 µlをTBS-1%OTGで1/20に希釈した血漿にアミロイド・ベータ(1-28)を1 ng (307 fmol)スパイクしたサンプル1 mlに対して、実施例1の項目4と同様の操作を行い、アミロイド・ベータ(1-28)の単離及び濃縮を行った。ただし、本実施例においては、非特異的にビーズに吸着した夾雑物を取り除くために、ビーズとサンプルを反応させた後のTBS-1%OTGでの洗浄は実施例1における3回でなく、5回行った。

20

【0114】

参考実験用として、6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズでアミロイド・ベータ(1-28)を単離及び濃縮し、その後、実施例1の項目6と同様に、質量分析装置で解析した。得られたマスペクトルを図11(A)に示す。図11(A)に示されるように、アミロイド・ベータ(1-28)以外のピークが多く検出された。

ヒトの血液にはヒト抗マウス抗体(HAMA)が存在することが知られている。6E10及び4G8はマウス由来のIgGであるため、このような分子が結合してしまう。そのような結合を防ぐため、アミロイド・ベータ(1-28)がスパイクされた血漿サンプルとビーズとを混合する前に、血漿サンプルをプロテインGアガロース 50 µlと混ぜ、30分4 インキュベーションすることにより、血漿中に含まれているヒト抗マウス抗体を取り除いた。その後、同様に質量分析を行った。これにより得られたマスペクトルを図11(B)に示す。図11(B)が示すように、ヒト抗マウス抗体の除去によって、アミロイド・ベータ(1-28)以外のピークの多くは取り除かれた。その一方、高いバックグラウンドスペクトルが観察された。

30

【0115】

PEGはマイナスイオンを帯びた酸素原子の周りにプラス電荷を帯びた金属イオンを取り込む性質がある。反応バッファー及び血漿に含まれる金属イオンは、PEGに取り込まれた後、HClによる溶出操作と共にPEGから解離した場合、質量分析装置での解析時に影響を与えてしまう。この影響が、マスペクトルのバックグラウンドが高くなった原因と考えられる。そこで、金属イオンによるバックグラウンドを抑制する効果を持つ2% Methanediphosphonic acid(MDPNA)水溶液 1 µlをコマトリックスとしてMALDIプレート上で混ぜ、質量分析を行った。これにより得られたマスペクトルを図11(C)に示す。図11(C)が示すように、S/N比の良いスペクトルが得られた。なお、2% MDPNAを併用する場合にCHCAの濃度を検討したところ、CHCAの濃度が5 mg/mlである場合に一番良いシグナルが得られた。

40

【0116】

上記の条件下で、血漿にスパイクされたアミロイド・ベータ(1-28)をF(ab')-PEG₂₄ ビーズにより単離及び濃縮し、質量分析装置で検出できる限界値を調べた。図12に、6E10 IgG-プロテインGビーズ(図12A)、4G8 IgG-プロテインGビーズ(図12B)、6E10/4G8 IgG-プロテインGビーズ(図12C)、6E10 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ(図12D)、4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ(図12E)、及び6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄ ビーズ(図12F)を用い

50

た場合に得られたアミロイド・ベータ(1-28)溶出液のMALDI-TOF-MSスペクトルと、ビーズに捕捉させず純品のまま(図12G)MALDIプレートにスポットされた(直接スポットティングされた)アミロイド・ベータ(1-28)のMALDI-TOF MSスペクトルとを示す。また、それぞれの場合における検出限界(S/N 3)を表3に示す。

【0117】

【表3】

検出限界(S/N ≥ 3)			
	IgG-プロテイン G	F(ab')-PEG ₂₄	直接スポットティング
6E10	50 pg (15.3 fmol)	2.5 pg (767 amol)	1 pg (307 amol)
4G8	25 pg (7.67 fmol)	10 pg (3.07 fmol)	
6E10/4G8	5 pg (1.53 fmol)	1 pg (307 amol)	

10

20

【0118】

アミロイド・ベータ(1-28)をビーズに捕捉させず純品のまま質量分析装置で検出した場合の検出限界は、1 pg (307 amol)であった(図12G)。本実施例における評価ポイントは、F(ab')-PEG₂₄ビーズにより単離及び濃縮した血漿中アミロイド・ベータ(1-28)を質量分析装置で検出できるレベルを1 pg (307 amol)に近づけることである。なお、本実施例における検出限界1 pg (307 amol)は、実施例2におけるマトリックスCHCAのみを使用した場合の検出限界よりも低い。これは、コマトリックスMDPNAを併用したことによりバックグラウンドが下がり、その結果としてS/N比が大きくなったからである。

【0119】

30

3種類のF(ab')-PEG₂₄ビーズ(6E10 F(ab')-PEG₂₄ビーズ, 4G8 F(ab')-PEG₂₄ビーズ, 6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄ビーズ)と3種類のIgG-プロテインGビーズ(6E10-プロテインGビーズ, 4G8-プロテインGビーズ, 6E10/4G8-プロテインGビーズ)とをそれぞれ用いて血漿にスパイクされたアミロイド・ベータ(1-28)を単離及び濃縮したところ、6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄ビーズを用いた場合に最も低濃度のアミロイド・ベータ(1-28)1 pgを検出することができた。この場合における検出レベルは、アミロイド・ベータ(1-28)を純品のまま質量分析装置で検出した時と同等であった。しかし、本実施例においてもS/N比では純品のアミロイド・ベータ(1-28)よりも低い値を示したことから、微量な夾雑物が混じっていることが考えられる。

【0120】

40

3種類のIgG-プロテインGビーズ間でも検出限界に差があり、その中では6E10/4G8 IgG-プロテインGビーズが最も低濃度のアミロイド・ベータ(1-28)5 pgを検出した。一方、実施例2においては3種類のIgG-プロテインGビーズ間で検出限界の差はなかったが、S/N比を比較すると6E10/4G8 IgG-プロテインGビーズの場合が最も高かったことが確認されている。6E10/4G8 IgG-プロテインGビーズによって低濃度のアミロイド・ベータ(1-28)を検出できた理由は、2種類の抗体を結合させたプロテインGビーズにおいても、それぞれの抗体のF(ab')同士がコーポレイティブ結合を形成しているからであるという可能性が高い。

【0121】

実際、非特許文献2(Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences 2011;87(9):603-16.)において、PEGをヒンジ部に挿入していないアミ

50

ロイド・ベータ(1-15)-Fc6抗体様分子の K_D 値が、アミロイド・ベータ(1-15)ペプチドのみの K_D 値と比べて低下していることが示されている。すなわち、PEGをヒンジ部に挿入していないアミロイド・ベータ(1-15)-Fc6抗体様分子が、アミロイド・ベータ(1-15)ペプチドのみよりも、抗体アミロイド・ベータ抗体を解離させにくいことが示されている。このように非特許文献2においては、抗体様分子のヒンジ部がIgG本来の(PEGが挿入されていない)ヒンジ部である場合でもコーポレイティブ結合が可能であることが示唆されている。そのことは、SPRの結果においても示唆されている。

【0122】

それに加えて、PEGが挿入されていないヒンジ部を有する抗体様分子より、PEGが挿入されたヒンジ部を有する抗体様分子の方で、 K_D 値が低下するということも示されている。PEG挿入による K_D 値の低下の傾向は、本実施例において、6E10/4G8 IgGプロテインGビーズよりも6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄ビーズの方で補足量が多いという結果にも表れている。

10

【0123】

また、非特許文献2のSPRの結果においてアミロイド・ベータ(1-15)-Fc6抗体様分子の最大結合量(R_{max})が34.9である時のアミロイド・ベータ(1-15)-PEG₂₄-Fc6抗体様分子の R_{max} は40であることが示されている。PEG挿入による結合量上昇の傾向も、本実施例と一致している。

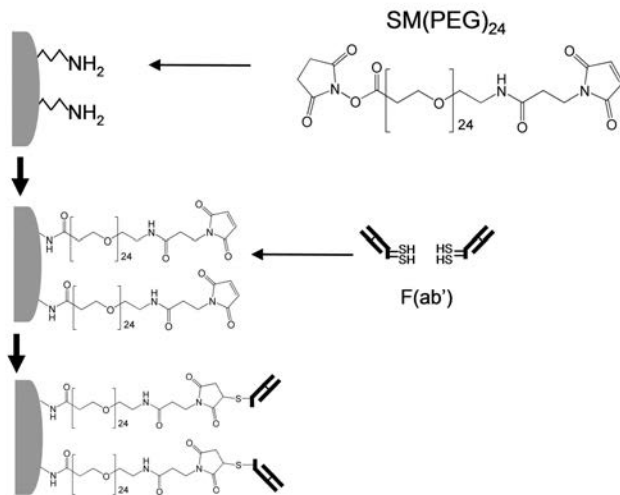
【0124】

一方、目的のアミロイド・ベータ(1-28)以外にもビーズに吸着しているかどうかを調べた。図13に、血漿にスパイクされたアミロイド・ベータ(1-28)の1pg (307amol)を6E10/4G8 F(ab')-PEG24ビーズで単離及び濃縮後、質量分析装置で測定して得られたマスペクトルを示す。図13に示されるように、6E10/4G8 F(ab')-PEG₂₄ビーズにおいて m/z 1500-5000の範囲内にアミロイド・ベータ(1-28)以外で検出されたピーク(S/N 3)は無かった。これは、親水性の高いPEGをビーズに結合させていることや、抗体のFc領域を欠損させることにより、非特異的に吸着する夾雑物を抑制していると考えられる。このように、F(ab')-PEG₂₄ビーズは特異性においても優れていると言える。

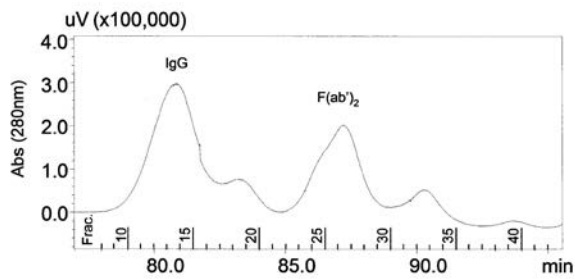
20

【図 1】

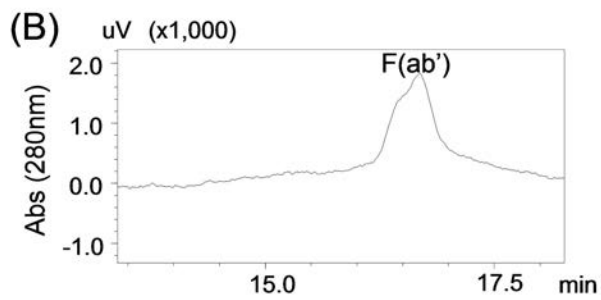
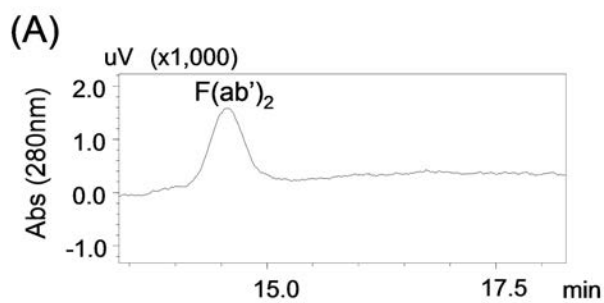
アミン磁気ビーズ表面



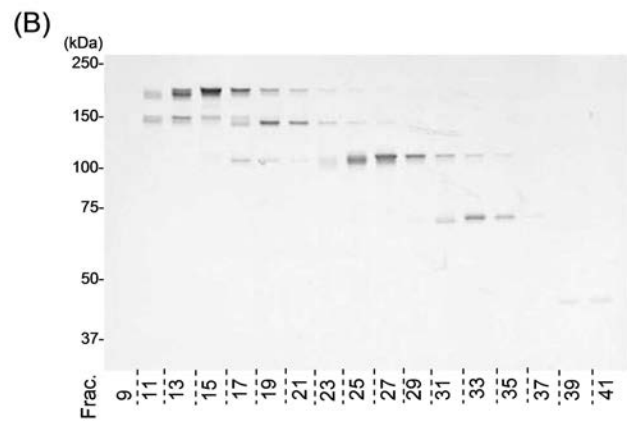
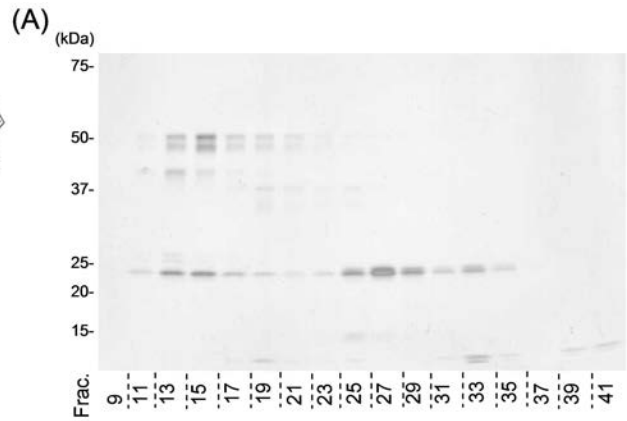
【図 2】



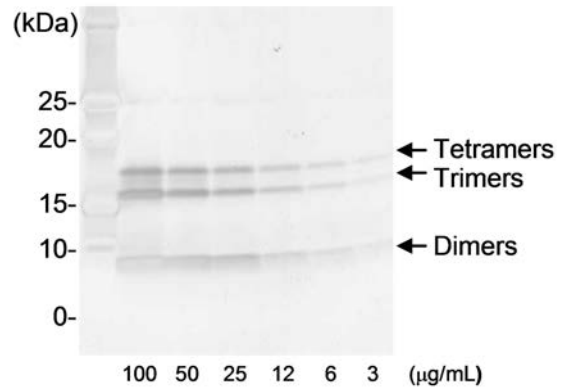
【図 4】



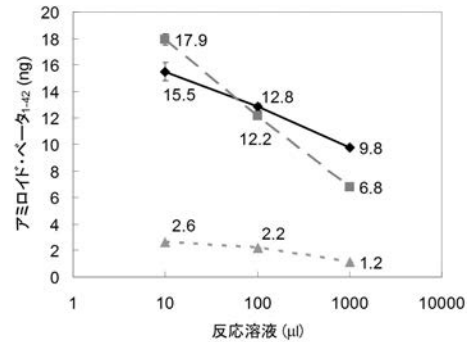
【図 3】



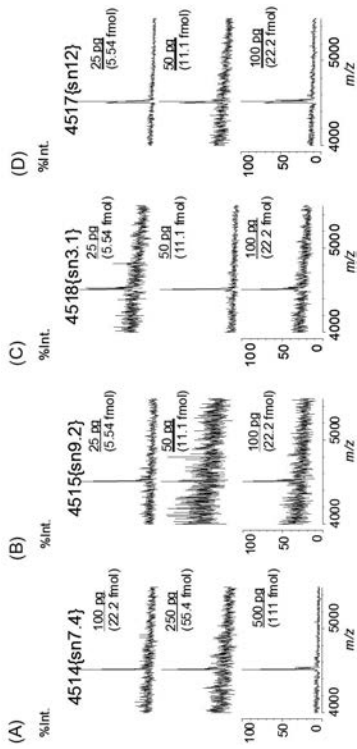
【図 5】



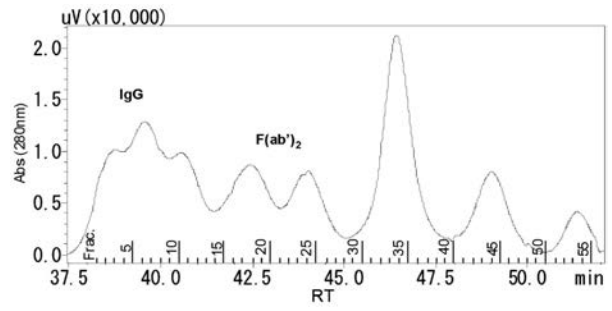
【図 6】



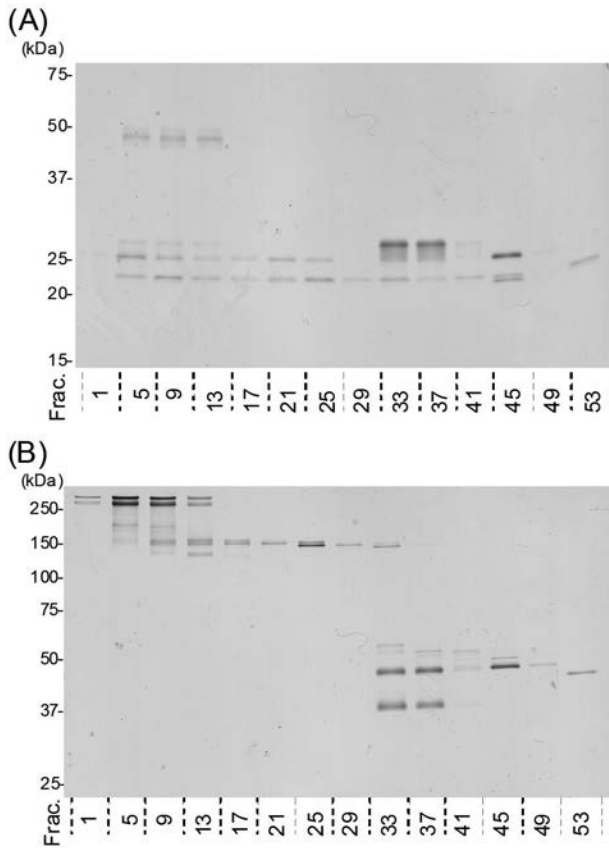
【 図 7 】



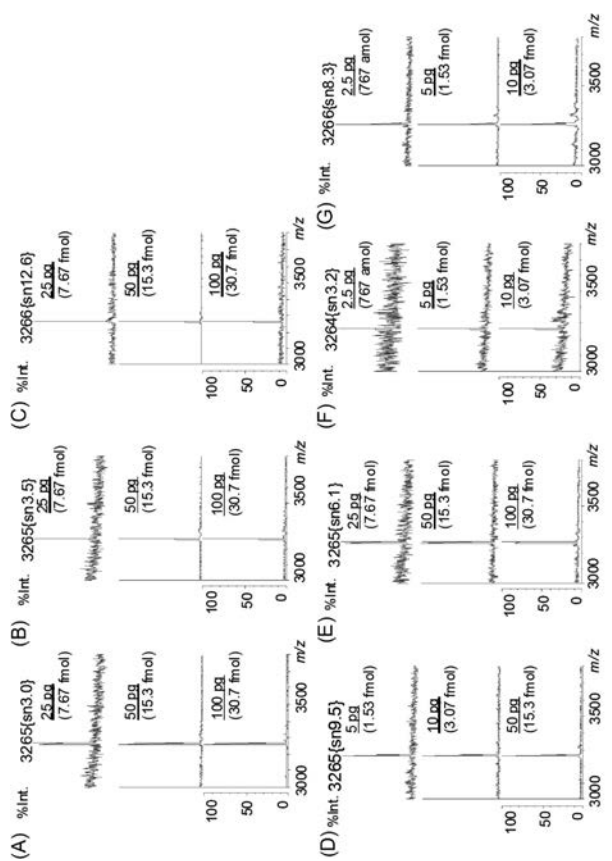
【 図 8 】



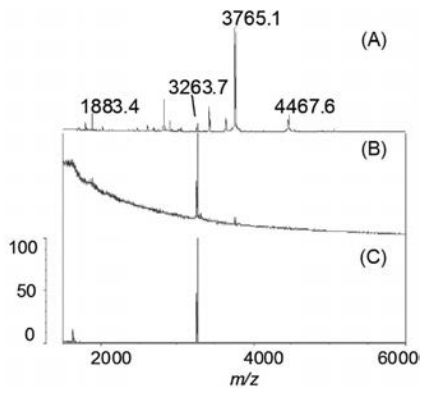
【 図 9 】



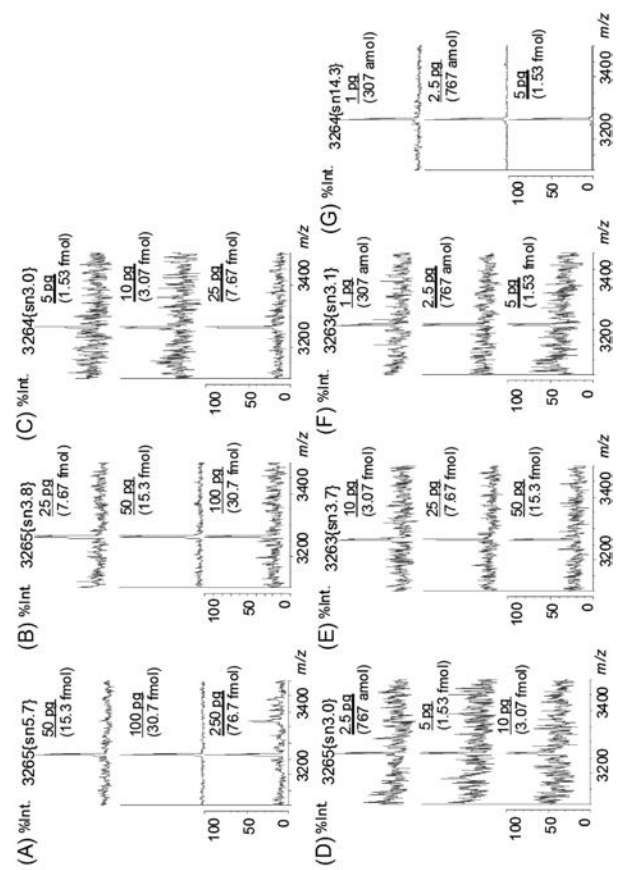
【 図 10 】



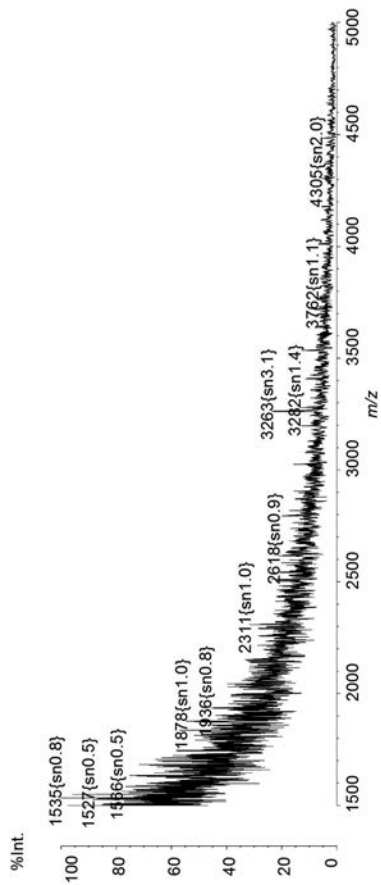
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



フロントページの続き

- (72)発明者 吉森 孝行
京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 田中 耕一
京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 佐藤 孝明
京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 嶋田 崇史
京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 ダニエル・ジェイ・カポン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州ヒルズボロー, ウッドリッジ・ロード 90

专利名称(译)	亲和支持体和使用该亲和支持体捕获物质的方法		
公开(公告)号	JP2019168470A	公开(公告)日	2019-10-03
申请号	JP2019110119	申请日	2019-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社岛津制作所 CAPON丹尼尔·J·		
申请(专利权)人(译)	株式会社岛津制作所 丹尼尔·杰伊·卡彭		
[标]发明人	金子直樹 吉森孝行 田中耕一 佐藤孝明 嶋田崇史 ダニエルジェイカポン		
发明人	金子 直樹 吉森 孝行 田中 耕一 佐藤 孝明 嶋田 崇史 ダニエル・ジェイ・カポン		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	冈田雅博		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

为了提供一种亲和性支持体，该亲和性支持体能够通过即使不抗体以外的分子也难以解离的协作键来捕获，并且提供了一种使用该亲和性支持体的捕获方法。解决方案：一种捕获物质的方法包括使物体成为物体的步骤。捕获物与亲和性支持物接触，该亲和性支持物包含支持体，与该支持体结合的间隔物以及与该间隔物结合的亲和性物质，以将该亲和性物质结合至要捕获的物质，其中存在多个亲和性位点。一个被捕获物体，亲和物质同时与多个亲和位点中的至少两个位点结合。

アミン磁気ビーズ表面

