

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/183711

発行日 平成31年2月28日 (2019. 2. 28)

(43) 国際公開日 平成29年10月26日 (2017. 10. 26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	S
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/53	V
	GO 1 N 33/53	N
	GO 1 N 33/569	L
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2018-513225 (P2018-513225)	(71) 出願人	306008724
(21) 国際出願番号	PCT/JP2017/015991		富士レビオ株式会社
(22) 国際出願日	平成29年4月21日 (2017. 4. 21)		東京都新宿区西新宿二丁目 1 番 1 号
(31) 優先権主張番号	特願2016-86214 (P2016-86214)	(74) 代理人	110002147
(32) 優先日	平成28年4月22日 (2016. 4. 22)		特許業務法人酒井国際特許事務所
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	内藤 郁恵
			東京都新宿区西新宿二丁目 1 番 1 号 富士
			レビオ株式会社内
		(72) 発明者	豊永 将也
			東京都新宿区西新宿二丁目 1 番 1 号 富士
			レビオ株式会社内
		(72) 発明者	佐藤 英雄
			東京都新宿区西新宿二丁目 1 番 1 号 富士
			レビオ株式会社内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 レクチン標的分子の捕捉方法

(57) 【要約】

本発明は、レクチンを用いたレクチン標的分子（例、AFP-L3、PSA、ヘモペキン、およびトランスフェリン）の測定を改善することを提供する。具体的には、本発明は、レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下において、レクチンをレクチン標的分子に結合させることを含む、レクチン標的分子の捕捉方法；レクチン標的分子、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を含む複合体；レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を混合形態で含む、レクチン標的分子の捕捉用試薬；ならびに、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を含む、レクチン標的分子の捕捉用キットを提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下において、レクチンをレクチン標的分子に結合させることを含む、レクチン標的分子の捕捉方法。

【請求項 2】

レクチンがマメ科レクチンまたはキノコレクチンである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

レクチンがフコース特異的レクチンである、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

レクチンが、レンズマメアグルチニン (LCA)、コンカナバリン A (ConA) またはヒロチャワンタケレクチン (AAL) である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 5】

レクチン標的分子が糖タンパク質である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

糖タンパク質が AFP - L3 または PSA である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

糖タンパク質がヘモペキシン (HPX) またはトランスフェリン (TF) である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

前記実体が N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有する糖タンパク質である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 9】

N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有する糖タンパク質が N 型糖鎖結合コンセンサス配列を可変領域に有する免疫グロブリンである、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

前記実体が、B 型肝炎ウイルス表面抗原 (HBs 抗原)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン α 鎖 (hCG α) または黄体形成ホルモン (LH) である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

レクチンのレクチン標的分子への結合後にレクチン標的分子を測定することを含むレクチン標的分子の測定方法である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 12】

レクチン標的分子に特異的な親和性物質をさらに用いる、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

以下を含む方法である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項記載の方法：

(1) レクチン標的分子を、レクチン標的分子に特異的な親和性物質に結合させて、レクチン標的分子およびレクチン標的分子に特異的な親和性物質を含む第 1 複合体を得ること；

(2) レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下においてレクチンを第 1 複合体と結合させて、レクチン標的分子、レクチン標的分子に特異的な親和性物質、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を含む第 2 複合体を得ること；ならびに

40

(3) 第 2 複合体に含まれるレクチン標的分子の量を測定すること。

【請求項 14】

レクチン標的分子、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を含む複合体。

【請求項 15】

レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を混合形態で含む、レクチン標的分子の捕捉用試薬。

【請求項 16】

レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を含む、レクチン標的分子の捕捉用キット

50

。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、レクチン標的分子の捕捉方法、レクチン標的分子を含む複合体、レクチン標的分子の捕捉用試薬およびキットなどに関する。

【背景技術】

【0002】

α -フェトプロテイン(AFP)は、レンズマメアグルチニン(Lens culinaris agglutinin: LCA)との結合性によって非結合画分(L1)、弱結合性画分(L2)、結合性画分(L3)の3画分に分類される。このうちAFP-L3は、肝癌マーカーとして利用されている。肝癌の診断のためAFP-L3の優れた測定法の開発が求められている。

10

【0003】

また、前立腺特異抗原(Prostate-specific antigen: PSA)は、前立腺癌マーカーとして利用されている。しかし、前立腺肥大や前立腺炎においてもPSA測定値が上昇するため、特異性が低いことが課題となっている。近年、前立腺癌においてPSAの糖鎖修飾変化が報告されており、この糖鎖修飾の変化を捉えることで癌診断の精度を向上させることが期待されている。

20

【0004】

特許文献1は、レクチンを用いたフコシル化AFPの測定法を開示している。

特許文献2は、レクチンを用いた β -N-アセチルガラクトサミン残基を含有する糖鎖をもつPSAの測定法を開示している。

非特許文献1は、レクチンを用いたAFP-L3の測定法を開示している。

非特許文献2は、フコシル化PSA量を測定することで前立腺癌の悪性度を判定できることを開示している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開第99/39209号

30

【特許文献2】国際公開第2010/90264号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Tamano et al., Biosci Biotechnol Biochem. 2005 Aug; 69(8): 1616-9

【非特許文献2】Li et al., Theranostics. 2015 Jan; 5(3): 267-76

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、レクチンを用いたレクチン標的分子(例、AFP-L3およびPSA)の測定を改善することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、鋭意検討した結果、レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下においてレクチンを用いると、レクチンのレクチン標的分子への結合が増強することなどを見出した。本知見は、レクチンによるレクチン標的分子の測定をはじめとする、レクチン標的分子の捕捉方法全般に応用することができる。本発明者らは、かかる知見に基づき、本発明を完成するに至った。上記特許文献および非特許文献は、レクチンとレクチン標的分子(AFP-L3およびPSA)との結合を増強する方法を記載も示唆もしていない。

50

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

〔 1 〕 レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下において、レクチンをレクチン標的分子に結合させることを含む、レクチン標的分子の捕捉方法。

〔 2 〕 レクチンがマメ科レクチンまたはキノコレクチンである、〔 1 〕の方法。

〔 3 〕 レクチンがフコース特異的レクチンである、〔 1 〕又は〔 2 〕の方法。

〔 4 〕 レクチンが、レンズマメアグルチニン（ L C A ）、コンカナバリン A（ C o n A ）またはヒヨロチャワントケレクチン（ A A L ）である、〔 1 〕～〔 3 〕のいずれかの方法。

〔 5 〕 レクチン標的分子が糖タンパク質である、〔 1 〕～〔 4 〕のいずれかの方法。

10

〔 6 〕 糖タンパク質が A F P - L 3 または P S A である、〔 5 〕の方法。

〔 7 〕 糖タンパク質がヘモベキシン（ H P X ）またはトランスフェリン（ T F ）である、〔 5 〕の方法。

〔 8 〕 前記実体が N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有する糖タンパク質である、〔 1 〕～〔 7 〕のいずれかの方法。

〔 9 〕 N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有する糖タンパク質が N 型糖鎖結合コンセンサス配列を可変領域に有する免疫グロブリンである、〔 8 〕の方法。

〔 1 0 〕 前記実体が、 B 型肝炎ウイルス表面抗原（ H B s 抗原）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン α 鎖（ h C G α ）または黄体形成ホルモン（ L H ）である、〔 1 〕～〔 8 〕のいずれかの方法。

20

〔 1 1 〕 レクチンのレクチン標的分子への結合後にレクチン標的分子を測定することを含むレクチン標的分子の測定方法である、〔 1 〕～〔 1 0 〕のいずれかの方法。

〔 1 2 〕 レクチン標的分子に特異的な親和性物質をさらに用いる、〔 1 1 〕の方法。

〔 1 3 〕 以下を含む方法である、〔 1 〕～〔 1 2 〕のいずれかの方法：

（ 1 ） レクチン標的分子を、レクチン標的分子に特異的な親和性物質に結合させて、レクチン標的分子およびレクチン標的分子に特異的な親和性物質を含む第 1 複合体を得ること；

（ 2 ） レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下においてレクチンを第 1 複合体と結合させて、レクチン標的分子、レクチン標的分子に特異的な親和性物質、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を含む第 2 複合体を得ること；ならびに

30

（ 3 ） 第 2 複合体に含まれるレクチン標的分子の量を測定すること。

〔 1 4 〕 レクチン標的分子、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を含む複合体。

〔 1 5 〕 レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を混合形態で含む、レクチン標的分子の捕捉用試薬。

〔 1 6 〕 レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を含む、レクチン標的分子の捕捉用キット。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明の方法は、レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下においてレクチンを使用することにより、レクチンのレクチン標的分子への結合を増強できる。したがって、本発明の方法は、例えば、レクチン標的分子の測定、抽出、濃縮、精製、検出、定量に有用である。より具体的には、レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下でレクチンを使用する本発明の方法をレクチン標的分子の測定に利用した場合、レクチン単独の使用に比し、高感度かつ安定的にレクチン標的分子を測定することができる。

40

本発明の複合体は、例えば、本発明の捕捉方法の実施に有用である。

本発明の試薬およびキットは、例えば、本発明の捕捉方法の簡便な実施に有用である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】図 1 は、精製マウス I g G F（ a b ' ）₂ フラグメント抗体 A、B、C および D について、S D S - P A G E による分子量、およびレクチンプロットによる L C A 反応

50

性の確認を示す図である。

【図 2】図 2 は、精製マウス IgG F (a b ')₂ フラグメント抗体 A、B、C および D について、E L I S A による L C A 反応性の確認を示す図である。

【図 3】図 3 は、L C A 反応性 F (a b ')₂ フラグメント抗体 A の存在下における L C A による A F P - L 3 の特異的な検出を示す図である。

【図 4】図 4 は、L C A 反応性 F (a b ')₂ フラグメント抗体 B の存在下における L C A による A F P - L 3 の特異的な検出を示す図である。

【図 5】図 5 は、L C A 非反応性 F (a b ')₂ フラグメント抗体 C の存在下における L C A による A F P - L 3 および A F P - L 1 の検出の結果を示す図である。

【図 6】図 6 は、L C A 非反応性 F (a b ')₂ フラグメント抗体 D の存在下における L C A による A F P - L 3 および A F P - L 1 の検出の結果を示す図である。

【図 7】図 7 は、糖鎖除去マウス IgG F (a b ')₂ フラグメントについて、S D S - P A G E による分子量、およびレクチンプロットによる L C A 反応性の確認を示す図である。

【図 8】図 8 は、糖鎖含有マウス IgG F (a b ')₂ フラグメントおよび糖鎖除去マウス IgG F (a b ')₂ フラグメントについて、E L I S A による L C A 反応性の確認を示す図である。

【図 9】図 9 は、L C A 反応性を示す糖鎖含有マウス IgG F (a b ')₂ - H R P、または L C A 反応性を示さない糖鎖除去マウス IgG F (a b ')₂ - H R P の存在下における L C A による A F P - L 3 および A F P - L 1 の検出結果を示す図である。

【図 10】図 10 は、N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有する抗体の存在下における L C A による A F P - L 3 および A F P - L 1 の検出結果を示す図である。抗 T N F α 抗体 (P) : N 型糖鎖結合コンセンサス配列を可変領域に有する抗 T N F α 抗体 ; 抗 T N F α 抗体 (N) : N 型糖鎖結合コンセンサス配列を可変領域に有しない抗 T N F α 抗体 ; 抗 I L - 10 抗体 (P ') : N 型糖鎖結合コンセンサス配列を可変領域に有する抗 I L - 10 抗体 ; 抗 I L - 10 抗体 (N ') : N 型糖鎖結合コンセンサス配列を可変領域に有しない抗 I L - 10 抗体。

【図 11】図 11 は、レクチン反応性抗原 (H B s 抗原) の存在下における L C A による A F P - L 3 の特異的な検出を示す図である。

【図 12】図 12 は、糖鎖除去 H B s 抗原について、S D S - P A G E による分子量、およびレクチンプロットによる L C A 反応性の確認を示す図である。

【図 13】図 13 は、糖鎖含有 H B s 抗原および糖鎖除去 H B s 抗原について、E L I S A による L C A 反応性の確認を示す図である。

【図 14】図 14 は、L C A 反応性を示す糖鎖含有 H B s 抗原 - H R P、または L C A 反応性を示さない糖鎖除去 H B s 抗原 - H R P の存在下における L C A による A F P - L 3 および A F P - L 1 の検出結果を示す図である。

【図 15】図 15 は、N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウス IgG F (a b ')₂ - H R P または H B s 抗原 - H R P の存在下におけるヒヨロチャワンタケレクチン (A l e u r i a a u r a n t i a L e c t i n : A A L) による A F P 結合糖鎖の検出を示す図である。

【図 16】図 16 は、N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウス IgG F (a b ')₂ - H R P または H B s 抗原 - H R P の存在下におけるコンカナバリン A (C o n A) による A F P 結合糖鎖の検出を示す図である。

【図 17】図 17 は、N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウス IgG F (a b ')₂ - H R P または H B s 抗原 - H R P の存在下における A A L による P S A 結合糖鎖の検出を示す図である。

【図 18】図 18 は、N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウス IgG F (a b ')₂ - H R P の存在下における L C A による A F P - L 3 の特異的な検出を示す図である。同時添加条件 : A F P 捕捉ウェルにおいて L C A およびマウス IgG F (a b ')₂ 抗体 A - H R P を含む溶液をインキュベートした ; 洗浄条件 : A F P 捕捉ウェルにおいて

10

20

30

40

50

L C Aを含む溶液をインキュベートした後に洗浄して未反応 L C Aを除去した。次いで、未反応 L C Aが除去された A F P 捕捉ウェルに、マウス I g G F (a b ')₂ 抗体 A - H R P を添加した後にインキュベートした。

【図 1 9】図 1 9 は、H B s 抗原 - H R P の存在下における L C A による A F P - L 3 の特異的な検出を示す図である。同時添加条件：A F P 捕捉ウェルにおいて L C A および H B s 抗原 - H R P を含む溶液をインキュベートした；洗浄条件：A F P 捕捉ウェルにおいて L C A を含む溶液をインキュベートした後に洗浄して、A F P 捕捉ウェルから未反応 L C A を除去した。次いで、未反応 L C A が除去された A F P 捕捉ウェルにおいて、H B s 抗原 - H R P を含む溶液を添加した後にインキュベートした。

【図 2 0】図 2 0 は、H B s 抗原 - H R P の存在下における A A L による A F P - L 3 の特異的な検出を示す図である。同時添加条件：A F P 捕捉ウェルにおいて A A L および H B s 抗原 - H R P を含む溶液をインキュベートした；洗浄条件：A F P 捕捉ウェルにおいて A A L を含む溶液をインキュベートした後に洗浄して、A F P 捕捉ウェルから未反応 A A L を除去した。次いで、未反応 A A L が除去された A F P 捕捉ウェルに、H B s 抗原 - H R P を添加した後にインキュベートした。

【図 2 1】図 2 1 は、L C A 反応性抗体フラグメント A または B を固相とした条件下における L C A による A F P - L 3 の特異的な検出を示す図である。(+)：L C A 反応性；(-)：L C A 非反応性

【図 2 2】図 2 2 は、A A L の存在下における N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウス I g G F (a b ')₂ - H R P による肝臓癌患者血清中のヘモペキシン (H P X) 結合 A A L 反応性フコシル化糖鎖の検出を示す図である。1 % B S A - P B S：対照；H C C - 1、H C C - 2：肝臓癌患者血清 2 例；N H S - 1、N H S - 2：健常人血清 2 例。

【図 2 3】図 2 3 は、A A L の存在下における N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウス I g G F (a b ')₂ - H R P による肝臓癌患者血清中のトランスフェリン (T F) 結合 A A L 反応性フコシル化糖鎖の検出を示す図である。1 % B S A - P B S：対照；H C C - 1、H C C - 2：肝臓癌患者血清 2 例；N H S - 1、N H S - 2：健常人血清 2 例。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下において、レクチンをレクチン標的分子に結合させることを含む、レクチン標的分子の捕捉方法を提供する。

【0013】

レクチンは、特定の糖鎖構造を認識して結合活性を示すタンパク質である。レクチンとしては、例えば、動物（例、脊椎動物、無脊椎動物）、植物（例、マメ科、イネ科）、菌類（例、キノコ、麹）由来のものが知られている。マメ科レクチンとしては、例えば、ナタマメレクチン (C o n c a n a v a l i n A : C o n A)、レンズマメアグルチニン (L e n s c u l i n a r i s a g g l u t i n i n : L C A)、エンドウマメレクチン (P i s u m s a t i v u m) などが挙げられる。キノコレクチンとしては、例えば、ヒイロチャワンタケレクチン (A l e u r i a a u r a n t i a L e c t i n : A A L) などが挙げられる。

【0014】

本発明で用いられるレクチンはまた、レクチン標的分子の糖鎖構造に応じて適宜選択することができる。本発明で用いられるレクチンとしては、例えば、フコースに対する親和性を有するフコース特異的レクチン、ガラクトースに対する親和性を有するガレクチン、シアル酸反応性レクチンなどが挙げられるが、フコース特異的レクチンが好ましい。フコース特異的レクチンとしては、例えば、N 型糖鎖の根本の G l c N A c にフコースが α 1 , 6 付加した糖鎖構造（コアフコース構造）を認識するレクチン〔例、L C A、エンドウマメレクチン (P i s u m s a t i v u m : P S A) 〕、並びに N 型糖鎖、O 型糖鎖及び糖脂質糖鎖の G l c N A c にフコースを α 1 , 2、α 1 , 3、α 1 , 4、α 1 , 6 のい

10

20

30

40

50

ずれかで付加した糖鎖構造を認識するレクチン〔例、AAL、麹菌レクチン（*Aspergillus oryzae* Lectin: AOL）〕が挙げられる。

【0015】

レクチン標的分子とは、レクチンと結合する能力を有する、本発明において捕捉されるべき標的分子をいう。標的分子は、レクチンが結合する特定の糖鎖からなる、又は当該特定の糖鎖を含有する分子である。

【0016】

好ましくは、レクチン標的分子は、糖タンパク質である。レクチン標的分子としての糖タンパク質としては、例えば、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、植物、昆虫、微生物、またはウイルス由来の糖タンパク質が挙げられる。レクチン標的分子としての糖タンパク質は、測定、抽出、濃縮または精製が所望される糖タンパク質であってもよい。具体的には、糖タンパク質は、N型糖鎖結合コンセンサス配列を有するタンパク質である。N型糖鎖結合コンセンサス配列は、Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrのアミノ酸残基（Xはプロリン以外のアミノ酸残基）から構成されるアミノ酸配列である。N型糖鎖は、N型糖鎖結合コンセンサス配列中のアスパラギン（Asn）残基に結合することが知られている。より具体的には、レクチン標的分子としては、例えば、AFP-L3、PSA、ヘモペキシン（HPX）、およびトランスフェリン（TF）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。PSAは、N型糖鎖等の糖鎖の修飾タンパク質として知られている。

10

【0017】

レクチン反応性糖鎖含有実体とは、レクチン反応性糖鎖を含有する分子、またはレクチン反応性糖鎖が付加されている固相をいう。レクチン反応性糖鎖含有実体は、本発明の方法で捕捉されるべきレクチン標的分子とは異なる。レクチン反応性糖鎖含有実体は、その糖鎖がレクチンと反応するのであって、レクチンまたはレクチン標的分子を抗原とする抗体ではない。レクチン反応性糖鎖を含有する分子としては、例えば、生体分子、および人工合成物（例、人工合成高分子等の人工合成分子）が挙げられる。固相としては、例えば、粒子（例、磁性粒子）；メンブレン（例、ニトロセルロース膜、ろ紙）、カラム等の支持体；並びにプレート（例、マルチウェルプレート）、チューブ等の容器が挙げられる。固相の材料としては、例えば、ガラス、プラスチック、多糖体のマトリックス、および金属が挙げられる。レクチン反応性糖鎖含有実体は、用いられるレクチンの種類に応じて適宜選択することができる。例えば、このような選択は、レクチンとの糖鎖または糖鎖含有実体の結合能力を評価することにより行うことができる（例、実施例2を参照）。

20

30

【0018】

好ましくは、レクチン反応性糖鎖含有実体は、レクチン反応性糖鎖を含有する生体分子である。生体分子としては、例えば、ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。より好ましくは、レクチン反応性糖鎖含有実体は、糖タンパク質である。レクチン反応性糖鎖含有実体としての糖タンパク質としては、例えば、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、植物、昆虫、微生物、またはウイルス由来の糖タンパク質が挙げられる。レクチン反応性糖鎖含有実体としての糖タンパク質としてはまた、例えば、免疫グロブリン（例、抗体）、分泌型タンパク質、膜結合型タンパク質、ホルモン、サイトカイン、ケモカイン、ウイルス由来抗原、酵素、細胞外マトリックス、細胞外小胞膜タンパク質、腫瘍特異抗原、及びそれらの部分ペプチドが挙げられる。

40

【0019】

好ましくは、レクチン反応性糖鎖含有実体としての糖タンパク質は、N型糖鎖結合コンセンサス配列を有するタンパク質である。N型糖鎖結合コンセンサス配列は、Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrのアミノ酸残基（Xはプロリン以外のアミノ酸残基）から構成されるアミノ酸配列である。N型糖鎖は、N型糖鎖結合コンセンサス配列中のアスパラギン（Asn）残基に結合することが知られている。より具体的には、N型糖鎖結合コンセンサス配列を有するタンパク質としては、例えば、B型肝炎ウイルス表面抗原、ヒト絨毛性ゴナドトロピンα鎖、黄体形成ホルモン、PSA抗原、HE4抗原、MUC1

50

抗原、サイログロブリン、ならびにN型糖鎖結合コンセンサス配列を可変領域に有する抗体が挙げられる。

【0020】

より好ましくは、レクチン反応性糖鎖含有実体としての糖タンパク質は、N型糖鎖結合コンセンサス配列を可変領域に有する抗体である。N型糖鎖結合コンセンサス配列を可変領域に有する抗体としては、例えば、天然の全長抗体および改変抗体が挙げられる。改変抗体としては、例えば、可変領域を有する抗体フラグメント（例、Fab、Fab₂）、および単鎖抗体が挙げられる。また、N型糖鎖結合コンセンサス配列を可変領域に有する抗体としては、例えば、IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、およびIgYが挙げられる。N型糖鎖結合コンセンサス配列を可変領域に有する抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。

10

【0021】

本発明の方法は、レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下において、レクチンがレクチン標的分子に結合される。換言すれば、本発明の方法は、レクチン標的分子、ならびにレクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体という少なくとも三成分を含む系において行われ、レクチン標的分子の捕捉手段としてレクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体が併用される。レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下においてレクチンを使用することにより、レクチンのレクチン標的分子への結合を増強できる。したがって、本発明の方法は、例えば、レクチン標的分子の測定、抽出、濃縮、精製、定量、検出に有用である。

20

【0022】

レクチン標的分子は、液体サンプルに含まれるものが使用される。換言すれば、本発明の方法は、レクチン標的分子を含む液体サンプルに、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を加えた系において行われる。液体サンプルの由来は特に限定されず、生物由来の生物学的サンプルであってもよく、または環境サンプルなどであってもよい。生物学的サンプルが由来する生物としては、例えば、哺乳動物（例、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ）、鳥類（例、ニワトリ）等の動物、昆虫、微生物、植物、菌類、魚類が挙げられるが、好ましくは哺乳動物、菌類、魚類であり、より好ましくは哺乳動物であり、さらにより好ましくはヒトである。生物学的サンプルはまた、血液自体または血液に由来するサンプルである血液関連サンプル（例、全血、血清、血漿）、唾液、尿、乳汁、組織または細胞抽出液、あるいはこれらの混合物であってもよい。環境サンプルとしては、土壌、海水、淡水由来のサンプルが挙げられる。液体サンプルは、予備処理に付されたものを用いてもよい。このような予備処理としては、例えば、遠心分離、分画、抽出、ろ過、沈殿、加熱、凍結、冷蔵、及び攪拌が挙げられる。

30

【0023】

本発明の方法において用いられるレクチンの量は、レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下で標的レクチンを捕捉できる量である限り特に限定されないが、例えば、0.1 μg/mL ~ 100 mg/mLである。レクチンの量は、好ましくは1 μg/mL以上、より好ましくは5 μg/mL以上、さらにより好ましくは10 μg/mL以上である。レクチンの量はまた、好ましくは20 mg/mL以下、より好ましくは10 mg/mL以下、さらにより好ましくは2 mg/mL以下である。このような量のレクチンが、液体サンプルに添加されてもよい。

40

【0024】

本発明の方法において用いられるレクチン反応性糖鎖含有実体の量は、レクチンによるレクチン標的分子の捕捉を支援できる量である限り特に限定されないが、例えば、0.001 μg/mL ~ 100 mg/mLである。レクチン反応性糖鎖含有実体の量は、好ましくは0.005 μg/mL以上、より好ましくは0.02 μg/mL以上、さらにより好ましくは0.1 μg/mL以上である。レクチン反応性糖鎖含有実体の量はまた、好ましくは20 mg/mL以下、より好ましくは5 mg/mL以下、さらにより好ましくは1 mg/mL以下である。このような量のレクチン反応性糖鎖含有実体が、液体サンプルに添

50

加されてもよい。

【0025】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、レクチン標的分子の測定方法である。本発明の測定方法では、レクチンのレクチン標的分子への結合後にレクチン標的分子を測定することができる。本発明の測定方法は、免疫学的手法に準じて行うことができ、抗体の代わりにレクチン反応性糖鎖含有実体およびレクチンを併用することにより、免疫学的手法と同様の手法により行うことができる。本発明の測定方法が準じる免疫学的手法としては、例えば、酵素免疫測定法（EIA）（例、化学発光EIA（CLEIA）、酵素吸着EIA（ELISA））、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法、電気化学発光免疫測定法、凝集法、免疫染色、フローメトリー法、バイオレイヤー干渉法、In Situ PLA法、化学増幅型ルミネッセンス・プロキシミティ・ホモジニアス・アッセイ、ラインプロット法、ウェスタンプロット法が挙げられる。本発明の測定方法は、定性的または定量的に行われ、レクチン標的分子の有無または量を評価することができる。

10

【0026】

本発明の方法では、レクチン標的分子に特異的な親和性物質がさらに用いられてもよい。本発明の方法で用いられるレクチン標的分子に特異的な親和性物質は、レクチン標的分子中のレクチン結合部位（糖鎖）とは異なる部位（例、ペプチド領域）でレクチン標的分子に結合する。レクチン標的分子に特異的な親和性物質としては、例えば、抗体およびアプタマーが挙げられるが、抗体が好ましい。

20

【0027】

本発明の方法において用いられるレクチン標的分子に特異的な親和性物質の量は、レクチン標的分子を十分に結合できる量である限り特に限定されないが、例えば、 $0.0001 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 10 \text{mg}/\text{mL}$ である。親和性物質の量は、好ましくは $0.001 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、より好ましくは $0.005 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、さらにより好ましくは $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上である。親和性物質の量はまた、好ましくは $2 \text{mg}/\text{mL}$ 以下、より好ましくは $0.5 \text{mg}/\text{mL}$ 以下、さらにより好ましくは $0.1 \text{mg}/\text{mL}$ 以下である。このような量の親和性物質が、液体サンプルに添加されてもよい。

30

【0028】

レクチン標的分子に特異的な親和性物質がさらに用いられる場合、本発明の測定方法は、サンドイッチ様式で行われてもよい。例えば、固相化手段として、レクチン標的分子に特異的な親和性物質が用いられ、検出手段として、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体が併用されてもよい。あるいは、固相化手段として、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体が併用され、検出手段として、レクチン標的分子に特異的な親和性物質が用いられてもよい。

40

【0029】

本発明の測定方法では、レクチン反応性糖鎖含有実体もしくはレクチン、またはレクチン標的分子に特異的な親和性物質が標識物質で標識されていてもよい。標識物質としては、例えば、酵素（例、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、 β ガラクトシダーゼ）、親和性物質（例、ストレプトアビジンおよびビオチンのうちの一方、互いに相補的なセンス鎖およびアンチセンス鎖の核酸のうちの一方）、蛍光物質またはタンパク質（例、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質）、発光物質（例、ルシフェリン、エクオリン、アクリジニウムエステル、トリス（ $2, 2'$ -ビピリジル）ルテニウム、ルミノール）、放射性物質（例、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I ）が挙げられる。好ましくは、レクチン反応性糖鎖含有実体、またはレクチン反応性糖鎖含有実体に特異的な親和性物質が標識される。

【0030】

より具体的には、本発明の測定方法は、サンドイッチ様式で行われる場合、以下の工程により行うことができる：

（１）レクチン標的分子を、レクチン標的分子に特異的な親和性物質に結合させて、レク

50

チン標的分子およびレクチン標的分子に特異的な親和性物質を含む第1複合体を得ること；

(2) レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下においてレクチンを第1複合体と結合させて、レクチン標的分子、レクチン標的分子に特異的な親和性物質、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を含む第2複合体を得ること；ならびに

(3) 第2複合体に含まれるレクチン標的分子の量を測定すること。

【0031】

工程(1)では、レクチン標的分子は、上述したような液体サンプルに含まれるものを使用することができる。したがって、工程(1)の具体的な実施形態として、レクチン標的分子を含む液体サンプルに、レクチン標的分子に特異的な親和性物質を添加することにより、工程(1)が行われてもよい。工程(1)では、上述したような量のレクチン標的分子に特異的な親和性物質を用いることができるが、好ましくは、予想されるレクチン標的分子に対して、過剰当量のレクチン標的分子に特異的な親和性物質を用いてもよい。レクチン標的分子に特異的な親和性物質としては、上述したような固相に固定されたものを用いるのが好ましい。レクチン標的分子とレクチン標的分子に特異的な親和性物質との結合は、両者を溶液(例、緩衝液)中でインキュベートすることにより達成することができ、これによりレクチン標的分子およびレクチン標的分子に特異的な親和性物質を含む第1複合体が得られる。

10

【0032】

工程(2)では、第2複合体が得られる。工程(1)の具体的な実施形態として、工程(1)で得られた上記第1複合体を含む溶液に、レクチン、およびレクチン反応性糖鎖含有実体を添加することにより、工程(2)が行われてもよい。工程(2)では、上述したような量のレクチン、および上述したような量のレクチン反応性糖鎖含有実体を用いることができるが、好ましくは、予想されるレクチン標的分子に対して、過剰当量のレクチンおよび過剰当量のレクチン反応性糖鎖含有実体を用いてもよい。レクチンまたはレクチン反応性糖鎖含有実体のいずれかが標識物質で標識されていてもよいが、好ましくはレクチン反応性糖鎖含有実体が標識物質で標識されていてもよい。レクチン反応性糖鎖含有実体の存在下におけるレクチンの第1複合体への結合は、三者を溶液(例、緩衝液)中でインキュベートすることにより達成することができ、これによりレクチン標的分子、レクチン標的分子に特異的な親和性物質、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を含む第2複合体が得られる。レクチン標的分子に特異的な親和性物質として固相に固定されたものを用いた場合、第2複合体は固相に固定されている。この場合、工程(2)の後に、液相の除去および添加から構成される洗浄工程が設けられてもよい。

20

30

【0033】

工程(3)では、第2複合体における標識物質からのシグナルを指標に、レクチン標的分子の量を測定することができる。

【0034】

本発明はまた、レクチン標的分子、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を含む複合体を提供する。本発明の複合体は、レクチン標的分子に特異的な親和性物質をさらに含んでいてもよい。本発明の複合体は、これらの構成因子を溶液中でインキュベートして結合させることにより、作製することができる。

40

【0035】

本発明の複合体において、レクチン標的分子、レクチン、レクチン反応性糖鎖含有実体、およびレクチン標的分子に特異的な親和性物質の定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。

【0036】

本発明の複合体は、例えば、本発明の捕捉方法の実施に有用である。

【0037】

本発明はさらに、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を混合形態で含む、レクチン標的分子の捕捉用試薬を提供する。換言すれば、本発明の捕捉用試薬は、レクチンお

50

よびレクチン反応性糖鎖含有実体の組成物を含む。本発明の試薬に含まれるレクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体は混合形態にあることから、本発明の捕捉用試薬ではレクチンとレクチン反応性糖鎖含有実体との間で複合体が形成されていてもよい。

【0038】

本発明の試薬がレクチン標的分子の測定に用いられる場合、レクチンまたはレクチン反応性糖鎖含有実体のいずれかが標識物質で標識されていてもよいが、好ましくはレクチン反応性糖鎖含有実体が標識物質で標識されていてもよい。あるいは、レクチンまたはレクチン反応性糖鎖含有実体のいずれも標識物質で標識されていない場合、本発明の試薬は、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体と非混合形態で標識物質を含んでいてもよい。

10

【0039】

本発明の試薬は、レクチン標的分子に特異的な親和性物質をさらに含んでいてもよい。レクチン標的分子に特異的な親和性物質は、標識物質で標識されていてもよい。また、レクチン標的分子に特異的な親和性物質は、上述したような固相に固定されていてもよい。この場合、本発明の試薬は、サンドイッチ様式においてレクチン標的分子を測定するために好適に用いることができる。本発明の試薬は、レクチン標的分子に特異的な親和性物質を、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体と混合形態または非混合形態のいずれかで含むが、非混合形態で含むことが好ましい。

【0040】

本発明の試薬において、レクチン標的分子、レクチン、レクチン反応性糖鎖含有実体、およびレクチン標的分子に特異的な親和性物質の定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。

20

【0041】

本発明の試薬は、例えば、本発明の捕捉方法の簡便な実施に有用であり、例えば、本発明の測定方法に好適に用いることができる。

【0042】

本発明はまた、レクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体を含む、レクチン標的分子の捕捉用キットを提供する。本発明のキットに含まれるレクチンおよびレクチン反応性糖鎖含有実体は、混合形態（すなわち、組成物の形態）にあるか、または非混合形態（すなわち、互いに隔離された形態）にある。よって、本発明のキットに含まれる構成成分は、それぞれ異なる容器（例、チューブ、プレート）に収容された形態、または同一容器の異なる区画に収容された形態で提供される。

30

【0043】

本発明のキットがレクチン標的分子の測定に用いられる場合、レクチンまたはレクチン反応性糖鎖含有実体のいずれかが標識物質で標識されていてもよいが、好ましくはレクチン反応性糖鎖含有実体が標識物質で標識されていてもよい。あるいは、レクチンまたはレクチン反応性糖鎖含有実体のいずれも標識物質で標識されていない場合、本発明のキットは、標識物質および/またはレクチン標的分子に特異的な親和性物質（標識物質で標識されていてもよい）を含んでいてもよい。

【0044】

本発明のキットは、レクチン標的分子に特異的な親和性物質をさらに含んでいてもよい。この場合、本発明のキットは、サンドイッチ様式においてレクチン標的分子を測定するために好適に用いることができる。レクチン標的分子に特異的な親和性物質は、上述したような固相に固定されていてもよい。

40

【0045】

本発明のキットにおいて、レクチン標的分子、レクチン、レクチン反応性糖鎖含有実体、およびレクチン標的分子に特異的な親和性物質の定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。

【0046】

本発明のキットは、例えば、本発明の捕捉方法の簡便な実施に有用であり、例えば、本

50

発明の測定方法に好適に用いることができる。

【実施例】

【0047】

以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

【0048】

実施例1：抗体フラグメントの調製、及び抗体フラグメント - HRPの調製

抗LCA抗体ではないマウスIgG1をペプシンで消化し、LCA反応性マウスIgG F(ab')₂フラグメントとLCA非反応性マウスIgG F(ab')₂フラグメントを調製した。

10

【0049】

具体的には、調製は、以下のとおり行った。

(1) 抗LCA抗体ではないマウスIgG1抗体A、B、CおよびDをペプシンで消化した。消化は、クエン酸緩衝液にバッファー交換したマウスIgG1抗体A、B、CおよびDにペプシン(SIGMA)を添加し、37℃1時間反応させ、トリス緩衝液の添加により反応停止させることにより行った。

(2) PBSで平衡化したSuperdex200 increase 10/300GLでゲルろ過を行い、4種の精製マウスIgG F(ab')₂フラグメントを得た。

(3) 精製マウスIgG F(ab')₂フラグメント抗体A、B、CおよびDを、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)で標識した。HRPの標識は、Peroxidase Labeling Kit - NH₂(同仁化学研究所)を用いて、添付のプロトコールに従って行い、4種の精製抗体フラグメント - HRP(マウスIgG F(ab')₂ - HRP)を得た。

20

【0050】

実施例2：抗体フラグメントの精製度、分子量およびレクチン反応性の確認

実施例1で調製した4種の抗体フラグメントについて、精製度、分子量およびレクチン反応性を確認した。

【0051】

具体的には、確認は、以下のとおり行った。

(1) 精製マウスIgG F(ab')₂フラグメント抗体A、B、CおよびDの分子量をSDS-PAGEにて確認した(図1左)。

30

(2) 精製マウスIgG F(ab')₂フラグメント抗体A、B、CおよびDのLCA反応性をレクチンプロットにて確認した(図1右)。

(3) 精製マウスIgG F(ab')₂フラグメント抗体A、B、CおよびDのLCA反応性をELISAにて確認した。精製マウスIgG F(ab')₂フラグメント抗体A、B、CおよびDを各5μg/mLとなるようにPBSで希釈した。U96 Maxi Sorp Nunc - Immuno Plate (Thermo)において、希釈された溶液50μLを4×24時間インキュベートして、上記抗体を固相化した。抗体固相化ウェルを、PBST 250μLで3回洗浄した後、10%ブロッキング試薬(Carbo free blocking solution; Vector)150μLで37℃1時間ブロッキングした。抗体固相化ウェルをPBST 250μLで3回洗浄した。次いで、10%ブロッキング試薬でLCA-HRP(J-オイルミルズ)を5μg/mLとなるように希釈した溶液50μLを加え、抗体固相化ウェルにおいて溶液を37℃1時間インキュベートした。PBST 250μLでウェルを3回洗浄した。洗浄後のウェルに50μLのTMB基質溶液(Dako)を加え室温で5分反応を行った。1N硫酸で反応停止後、450nmで吸光度を測定した(図2)。

40

【0052】

その結果、抗体フラグメントAおよびBはLCA反応性であるが、抗体フラグメントCおよびDはLCA非反応性であることが確認された(表1、図1、2)。

【0053】

50

【表 1】

表 1. レクチンによるレクチン反応性糖鎖含有タンパク質（抗体）の検出

番号	抗体	レクチン	検出
1	マウス IgG F (a b') ₂	抗体 A	+
2		抗体 B	+
3		抗体 C	—
4		抗体 D	—

【0054】

用いた抗体を解析した。

抗体 A は、N 型糖鎖結合コンセンサス配列を抗体可変領域の重鎖に有していた。このことは、F (a b')₂ フラグメントが N 型糖鎖で修飾されていることを示す。よって、F (a b')₂ フラグメント抗体 A は、N 型糖鎖を介してレクチン反応性を示すと考えられる。

10

抗体 B は、抗体 A と同様である。

抗体 C は、N 型糖鎖結合コンセンサス配列を抗体可変領域の重鎖にも軽鎖にも有していなかった。このことは、F (a b')₂ フラグメントは N 型糖鎖で修飾されていないことを示す。よって、F (a b')₂ フラグメント抗体 C は、レクチン反応性を示さないと考えられる。

抗体 D は、抗体 C と同様である。

20

【0055】

実施例 3：レクチン反応性抗体フラグメントの存在下におけるレクチンによる AFP - L 3 測定系の構築

実施例 1 で調製したマウス IgG F (a b')₂ - HRP を用いて、AFP - L 3 の免疫学的測定系を構築した。

【0056】

具体的には、構築は、以下のとおり行った。

(1) anti - AFP F (a b')₂ を 10 μg / mL となるように PBS で希釈した。U96 MaxiSorp Nunc - Immuno Plate において、希釈された溶液 50 μL を 4 × 24 時間インキュベートして、上記抗体を固相化した。

(2) 抗体固相化ウェルを、PBST 250 μL で 3 回洗浄した後、10% ブロッキング試薬 150 μL で 37 × 1 時間ブロッキングした。

30

(3) 抗体固相化ウェルを、PBST 250 μL で 3 回洗浄した。次いで、ミュータスワコー AFP - L 3 (和光純薬工業) の測定値から濃度を換算した AFP - L 3 溶液と AFP - L 1 溶液を、それぞれ 10% ブロッキング試薬で、1000 ng / mL から 2 n 希釈した溶液 50 μL を抗体固相化ウェルに加え 37 × 1 時間インキュベートした。

(4) 抗体固相化ウェルを、PBST 250 μL で 3 回洗浄した。次いで、実施例 1 で調製したマウス IgG F (a b')₂ - HRP をそれぞれ 10% ブロッキング試薬で 5 μg / mL となるように希釈し、さらに LCA (Vector) を 100 μg / mL となるように加えた混合液を調製し、その混合液を抗体固相化ウェルに加え 37 × 1 時間インキュベートした。

40

(5) 抗体固相化ウェルを、PBST 250 μL で 3 回洗浄した。次いで、50 μL の TMB 基質溶液 (Dako) を加え室温で 5 分反応させた。1 N 硫酸で反応停止後、450 nm で吸光度を測定した。

【0057】

その結果、LCA は、LCA 反応性抗体フラグメント A または B の存在下で AFP - L 3 を特異的に検出することができた (表 2、図 3 ~ 6)。

【0058】

【表 2】

表 2. AFP-L3 測定系の構成及び検出結果

番号	固相化手段	検出手段			AFP 検出	
		レクチン	標識抗体 (レクチン反応性)		L3	L1
1	抗 AFP 抗体 [anti-AFP F(ab') ₂]	LCA	抗体 A (+)		+	—
2			抗体 B (+)		+	—
3			抗体 C (—)		—	—
4			抗体 D (—)		—	—

【0059】

10

以上より、レクチンは、標識されたレクチン反応性抗体フラグメントの存在下で AFP-L3 を特異的に検出できることが示された。

【0060】

実施例 4：AFP-L3 検出における、レクチン反応性抗体フラグメント中のレクチン反応性糖鎖の関与の確認

実施例 1 で調製したマウス IgG F(ab')₂ 抗体 B の糖鎖を N-グリコシダーゼ F で除去することにより、糖鎖除去マウス IgG F(ab')₂ 抗体 B が LCA 共存下での AFP-L3 反応性を維持しているか否かを確認した。

【0061】

20

具体的には、確認は、以下のとおり行った。

(1) 実施例 1 で調製したマウス IgG F(ab')₂ 抗体 B の N-グリコシダーゼ F 処理を実施した。N-グリコシダーゼ F 処理は、トリス塩酸緩衝液にバッファー交換したマウス IgG F(ab')₂ 抗体 B に N-グリコシダーゼ F (ROCHE) を添加し、37℃ 24 時間反応させた。N-グリコシダーゼ F は、N 結合型糖鎖とタンパク質との GlcNAc-Asn 結合を特異的に切断する酵素である。

(2) PBS で平衡化した Superdex 200 increase 10/300 GL でゲルろ過を行い、糖鎖除去マウス IgG F(ab')₂ フラグメントを得た。

(3) 糖鎖除去マウス IgG F(ab')₂-HRP を、実施例 1 と同様に調製した。

(4) 実施例 2 と同様に、精製度、分子量および LCA 反応性を確認した (図 7、8)。

(5) 実施例 3 と同様に、標識抗体の存在下における LCA の AFP-L3 反応性を確認した (図 9、表 3)。AFP 濃度は 1 μg/mL で検討した。

30

【0062】

その結果、LCA 反応性を消失した糖鎖除去標識抗体フラグメント (図 7、8) の存在下では、LCA は AFP-L3 を検出できなかった (表 3、図 9)。

【0063】

【表 3】

表 3. AFP-L3 測定系の構成及び検出結果

番号	固相化手段 (実施例 3 と同様)	検出手段			AFP 検出	
		レクチン	標識抗体 (レクチン反応性)	糖鎖除去処理	L3	L1
1	抗 AFP 抗体 [anti-AFP F(ab') ₂]	LCA	抗体 B (+)	—	+	—
2			抗体 B (—)	+	—	—

40

【0064】

以上より、抗体の可変領域中の糖鎖が、レクチンによる AFP-L3 の検出に重要であることが示された。

【0065】

実施例 5：可変領域中に N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウス IgG の存在下におけるレクチンによる AFP-L3 検出

抗体の可変領域中の N 型糖鎖結合コンセンサス配列の有無が AFP-L3 検出に影響す

50

るか否かを検討した。

【0066】

具体的には、検討は、以下のとおり行った。

(1) 可変領域にN型糖鎖結合コンセンサス配列 (A s n - S e r - S e r) を有する抗 T N F α 抗体 (P) と有さない抗 T N F α 抗体 (N)、可変領域にN型糖鎖結合コンセンサス配列 (A s n - A s p - T h r) を有する抗 I L - 1 0 抗体 (P') と有さない抗 I L - 1 0 抗体 (N') を、それぞれ実施例1と同様にH R P 標識を行った。

(2) 実施例3と同様に、L C A 共存下でのA F P - L 3 反応性を確認した。A F P 濃度は5 μ g / m L で検討した。

【0067】

10

その結果、L C A は、N型糖鎖結合コンセンサス配列を有する抗体の存在下で、A F P - L 3 を特異的に検出することができた (表4、図10)。

【0068】

【表4】

表4. A F P - L 3 測定系の構成及び検出結果

番号	固相化手段 (実施例3と同様)	検出手段		A F P 検出	
		レクチン	標識抗体 (糖鎖結合配列)	L 3	L 1
1	抗A F P 抗体 [a n t i - A F P F (a b ') ₂]	L C A	抗T N F α 抗体 (+)	+	-
2			抗T N F α 抗体 (-)	-	-
3			抗I L - 1 0 抗体 (+)	+	-
4			抗I L - 1 0 抗体 (-)	-	-

20

【0069】

以上より、レクチンは、N型糖鎖結合コンセンサス配列を可変領域に有する抗体 (本抗体が結合する抗原の種類を問わない) の存在下でA F P - L 3 を特異的に検出できることが示された。

【0070】

実施例6: レクチン反応性抗原の存在下におけるレクチンによるA F P - L 3 測定系の構築

マウスI g G以外のN型糖鎖結合コンセンサス配列を有する糖タンパク質であるH B s 抗原 (B型肝炎ウイルス表面抗原) を用いて、A F P - L 3 の免疫学的測定系を構築した。

30

【0071】

具体的には、構築は、以下のとおり行った。

(1) N型糖鎖結合コンセンサス配列を有するH B s 抗原を、それぞれ実施例1と同様にH R P 標識を行った。

(2) 実施例3と同様に、L C A 共存下でのA F P - L 3 反応性を確認した。A F P 濃度は1 0 0 0 n g / m L から2 n 希釈して検討した。H B s 抗原 - H R P は2 μ g / m L で反応させた。

【0072】

40

その結果、L C A は、N型糖鎖結合コンセンサス配列を有するH B s 抗原の共存下で、A F P - L 3 を特異的に検出することができた (表5、図11)。

【0073】

【表 5】

表 5. AFP-L3 測定系の構成及び検出結果

番号	固相化手段 (実施例 3 と同様)	検出手段		AFP 検出	
		レクチン	標識タンパク質 (糖鎖結合配列)	L3	L1
1	抗 AFP 抗体 [anti-AFP F(ab') ₂]	LCA	HBs 抗原 (+)	+	-
2					

【0074】

以上より、レクチンは、抗体のみならず、レクチン反応性抗原の存在下でも、AFP-L3 を特異的に検出できることが示された。

10

【0075】

実施例 7: AFP-L3 検出における、抗原中のレクチン反応性糖鎖の関与の確認

HBs 抗原の糖鎖を N-グリコシダーゼ F で除去することにより、糖鎖除去 HBs 抗原が LCA 共存下での AFP-L3 反応性を維持するか確認した。

【0076】

具体的には、確認は、以下のとおり行った。

(1) HBs 抗原の N-グリコシダーゼ F 処理を実施した。N-グリコシダーゼ F 処理は、N-グリコシダーゼ F と PNGase F (New England Biolabs) 付属の反応溶液を用いて、PNGase F 添付のプロトコールに従って行い、糖鎖除去を行った。

20

(2) 糖鎖除去 HBs 抗原を、実施例 1 と同様に HRP で標識した。

(3) 実施例 2 と同様に、精製度、分子量および LCA 反応性を確認した。

(4) 実施例 6 と同様に、LCA 共存下での AFP-L3 反応性を確認した。AFP 濃度は 1 µg/mL で検討した。HBs 抗原-HRP は、1 µg/mL で添加した。

【0077】

その結果、LCA は、LCA 反応性を消失した糖鎖除去標識抗原 (図 12、13) の存在下では、AFP-L3 を検出できなかった (表 6、図 14)。

【0078】

【表 6】

表 6. AFP-L3 測定系の構成及び検出結果

番号	固相化手段 (実施例 6 と同様)	レクチン	検出手段		AFP 検出	
			標識タンパク質 (レクチン反応性)	糖鎖除去処理	L3	L1
1	抗 AFP 抗体 [anti-AFP F(ab') ₂]	LCA	HBs 抗原 (+)	-	+	-
2			HBs 抗原 (-)	+	-	-

【0079】

以上より、糖タンパク質抗原中の糖鎖が、レクチンによる AFP-L3 の検出に重要であることが示された。

40

【0080】

実施例 8: レクチン反応性糖タンパク質の存在下におけるレクチンによる AFP-L3 検出

抗体のみならず抗原の存在下においても、LCA は AFP-L3 を検出することが可能であった (実施例 7)。そこで、アミノ酸配列に N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有する他の糖タンパク質を HRP 標識し、他の糖タンパク質の存在下において LCA が AFP-L3 を検出できるか確認した。

【0081】

具体的には、確認は、以下のとおり行った。

(1) アミノ酸配列中に N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有する hCG α (ヒト絨毛性ゴ

50

ナドトロピン α 鎖)とLH(黄体形成ホルモン)を、それぞれ実施例1と同様にHRP標識を行った。

(2)実施例3と同様に、LCAのAFP-L3反応性を確認した。AFP濃度は1 μ g/mLで検討した。

【0082】

その結果、LCAは、hCG α またはLHの存在下で、AFP-L3を特異的に検出することができた(表7、8)。

【0083】

【表7】

表7. AFPの測定結果

	hCG α -HRP	LH-HRP
AFP-L3 1 μ g/mL	0.882	3.181
AFP-L1 1 μ g/mL	0.216	0.295
AFP 0 μ g/mL	0.259	0.421

数値は、OD450の測定値を示す。

数値は、OD450の測定値を示す。

【0084】

【表8】

表8. AFP-L3測定系の構成及び検出結果

番号	固相化手段 (実施例3と同様)	検出手段		AFP検出	
		レクチン	標識糖タンパク質 (レクチン反応性)	L3	L1
1	抗AFP抗体	LCA	hCG α (+)	+	-
2	[anti-AFP F(ab') ₂]		LH (+)	+	-

【0085】

以上より、レクチンは、レクチン反応性糖タンパク質の存在下で、AFP-L3を特異的に検出できることが示された。

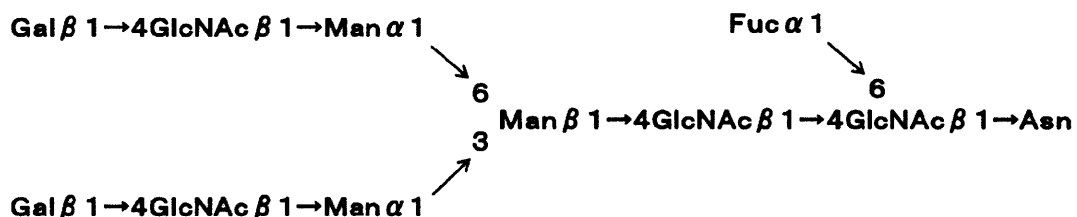
【0086】

実施例9:レクチン反応性標識抗体またはレクチン反応性標識抗原の存在下における各種レクチンによるAFP結合糖鎖の検出系の構築

N型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウスIgG F(ab')₂-HRPまたはHBs抗原-HRPの存在下で、ヒロチャワンタケレクチン(Aleuria aurantia Lectin: AAL)とコンカナバリンA(ConA)をレクチンとして用いることにより、下記構造式を有するAFP結合糖鎖の検出系を構築した。

【0087】

【化1】



【0088】

上記構造式については、既報(Nakagawa et al., J Proteome Res. 2008 Jun; 7(6): 2222-33)により、培養細胞(Huh7)と肝細胞癌検体中に60%以上含まれると報告されている構造式を代表例として示

10

20

30

40

50

ogy. 2008 Jan; 18(1): 2-8)により、前立腺癌検3例を解析し、Relative abundanceが共通して最も高いと報告されている構造式を代表例として示した。

【0096】

具体的には、構築は、以下のとおり行った。

(1) anti-PSA F(ab')₂を10μg/mLとなるようにPBSで希釈した。U96 MaxiSorp Nunc-Immuno Plateにおいて、希釈された溶液 50μLを4 24時間インキュベートして、上記抗体を固相化した。

(2) 抗体固相化ウェルを、PBST 250μLで3回洗浄した後、10%ブロッキング試薬 150μLで37 1時間ブロッキングした。

(3) 抗体固相化ウェルを、PBST 250μLのPBSTで3回洗浄し、ルミパルスPSA-N標準PSA溶液(富士レビオ)100ng/mL、40ng/mL、5ng/mL、0.5ng/mL、0ng/mLを抗体固相化ウェルに50μL加え、37 1時間インキュベートした。

(4) 抗体固相化ウェルを、PBST 250μLで3回洗浄した。実施例1で調製したN型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウスIgG F(ab')₂-HRPと実施例6で調製したHBs抗原-HRPを、10%ブロッキング試薬でそれぞれ1μg/mLとなるように希釈し、さらにAALを10μg/mLとなるようにそれぞれ加えた。その溶液を抗体固相化ウェルに加えて37 1時間インキュベートした。

(5) 抗体固相化ウェルを、PBST 250μLで3回洗浄した。洗浄後のウェルに50μLのTMB基質溶液を加え室温で5分反応を行った。1N硫酸で反応停止後、450nmで吸光度を測定した。

【0097】

その結果、AALは、N型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウスIgG F(ab')₂-HRPまたはHBs抗原-HRPの存在下で、PSA結合AAL反応性糖鎖を濃度依存的に検出することができた(表10、図17)。

【0098】

【表10】

表10. PSA測定系の構成及び検出結果

番号	固相化手段 (実施例3と同様)	検出手段		PSA検出
		レクチン	標識糖タンパク質	
1	抗PSA抗体 [anti-PSA F(ab') ₂]	AAL	N型糖鎖結合コンセンサス 配列含有F(ab') ₂	+
2			HBs抗原	+

【0099】

以上より、レクチンは、レクチン反応性標識抗体またはレクチン反応性標識抗原の存在下で、AFP-L3のみならず、PSA等の他のレクチン反応性糖タンパク質を検出できることが示された。

【0100】

実施例11: 糖タンパク質によるレクチンと標的分子との結合力の増強(1)

本実施例は、糖タンパク質によるレクチンと標的分子との結合力の増強について証明するため行った。標的分子(AFP-L3)とレクチン(LCA)の反応後に洗浄し、糖タンパク質(N型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウスIgG F(ab')₂-HRPまたはHBs抗原-HRP)で検出した条件(洗浄条件)と、標的分子(AFP-L3)を糖タンパク質(N型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウスIgG F(ab')₂-HRPまたはHBs抗原-HRP)の存在下でレクチン(LCA)と反応させた条件(同時添加条件)で、標的分子の検出能に差があるか検討した。洗浄回数は、条件間でそろえた。

【0101】

具体的には、検討は、以下のとおり行った。

(1) anti-AFP F(ab')₂ を 10 μg/mL となるように PBS で希釈した。F16 MaxiSorp Nunc-Immuno Plate (Thermo) において、希釈された溶液 100 μL を 4 × 24 時間インキュベートして、上記抗体を固相化した。

(2) 抗体固相化ウェルを、PBST 300 μL で 3 回洗浄した後、10% ブロッキング試薬 200 μL で 37 °C 1 時間ブロッキングした。

(3) 抗体固相化ウェルを、PBST 300 μL で 3 回洗浄した。その後、ミュータスワコー AFP-L3 の測定値から濃度を換算した AFP-L3 溶液と AFP-L1 溶液をそれぞれ 10% ブロッキング試薬で 500 ng/mL となるように希釈した。その希釈された溶液 100 μL を加え 37 °C 1 時間インキュベートした。

(4) 抗体固相化ウェルを、PBST 300 μL で 3 回洗浄した。洗浄条件では、LCA を 100 μg/mL となるように 10% ブロッキング試薬で希釈し、その希釈溶液 100 μL を抗体固相化ウェルに加えて 37 °C 1 時間インキュベートした。同時添加条件では、10% ブロッキング試薬のみを抗体固相化ウェルに 100 μL 加えて、37 °C 1 時間インキュベートした。

(5) 抗体固相化ウェルを、PBST 300 μL で 3 回洗浄した。洗浄条件では、実施例 1 で調製したマウス IgG F(ab')₂ 抗体 A-HRP 5 μg/mL または実施例 6 で調製した HBs 抗原-HRP を 2 μg/mL となるように 10% ブロッキング試薬で希釈し、その希釈溶液 100 μL を抗体固相化ウェルに加えて 37 °C 1 時間インキュベートした。同時添加条件では、実施例 1 で調製したマウス IgG F(ab')₂ 抗体 A-HRP 5 μg/mL または HBs 抗原-HRP を 2 μg/mL となるように 10% ブロッキング試薬で希釈し、さらに LCA を 100 μg/mL となるようにそれぞれ添加した。その希釈された溶液 100 μL を抗体固相化ウェルに加えて、37 °C 1 時間インキュベートした。

(6) 抗体固相化ウェルを、PBST 300 μL で 3 回洗浄した。洗浄後のウェルに TMB 基質溶液 100 μL を加えて室温で 5 分反応を行った。1 N 硫酸で反応停止後、450 nm で吸光度を測定した。

【0102】

その結果、AFP-L3 とレクチン (LCA) との反応後に洗浄ステップを入れることで、AFP-L3 に対する反応性は著しく減弱した (図 18、19)。AFP-L3 を、標識糖タンパク質 (N 型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウス IgG F(ab')₂-HRP または HBs 抗原-HRP) の存在下でレクチン (LCA) と反応させた同時添加条件でのみ、AFP-L3 を特異的に検出することができた (図 18、19)。

【0103】

以上より、レクチン (LCA) を糖タンパク質の存在下で標的分子 (AFP-L3) と反応させることにより、レクチンと標的分子との結合力が増強することが示された。

【0104】

実施例 12：糖タンパク質によるレクチンと標的分子との結合力の増強 (2)

本実施例は、糖タンパク質によるレクチンと標的分子との結合力の増強について証明するために行った。標的分子 (AFP 結合フコシル化糖鎖) とレクチン (AAL) の反応後に洗浄し、糖タンパク質 (HBs 抗原-HRP) で検出した条件 (洗浄条件) と、標的分子 (AFP 結合フコシル化糖鎖) を糖タンパク質 (HBs 抗原-HRP) の存在下でレクチン (AAL) と反応させた条件 (同時添加条件) で、標的分子の検出能に差があるか検討した。洗浄回数は、条件間でそろえた。

【0105】

具体的には、検討は、以下のとおり行った。

(1) 実施例 11 と同様に、anti-AFP F(ab')₂ を固相化したウェルにそれぞれ 500 ng/mL となるように希釈した AFP-L3 と AFP-L1 を 100 μL 加えて、37 °C 1 時間インキュベートした。

(2) 抗体固相化ウェルを300 μ LのPBSTで3回洗浄した。洗浄条件では、AALを10 μ g/mLとなるように10%ブロッキング試薬で希釈し、希釈されたAAL溶液100 μ Lを抗体固相化ウェルに加え、得られた溶液を37 1時間インキュベートした。同時添加条件では、抗体固相化ウェルに10%ブロッキング試薬のみを100 μ Lに加え、得られた溶液を37 1時間インキュベートした。

(3) 抗体固相化ウェルをPBST 300 μ Lで3回洗浄した。洗浄条件では、実施例6で調製したHBs抗原-HRPを2 μ g/mLとなるように10%ブロッキング試薬で希釈し、希釈された溶液100 μ Lを37 1時間インキュベートした。同時添加条件では、実施例6で調製したHBs抗原-HRPを2 μ g/mLとなるように10%ブロッキング試薬で希釈し、希釈されたHBs抗原-HRP溶液に、さらにAALを10 μ g/mLとなるようにそれぞれ添加し、抗体固相化ウェルに希釈された溶液100 μ Lを加え37 1時間インキュベートした。

(4) (3)で得られた溶液を300 μ LのPBSTで3回洗浄した。洗浄後のウェルに100 μ LのTMB基質溶液を加え室温で5分反応させた。1N硫酸で反応停止後、450 nmで吸光度を測定した。

【0106】

その結果、AFP結合フコシル化糖鎖とレクチン(AAL)との反応後に洗浄ステップを入れることで、AFP結合フコシル化糖鎖に対する反応性は著しく減弱した(図20)。AFP結合フコシル化糖鎖を、標識糖タンパク質(HBs抗原-HRP)の存在下でレクチン(AAL)と反応させた同時添加条件でのみ、AFP結合フコシル化糖鎖を検出することができた(図20)。

【0107】

以上より、レクチン(AAL)を糖タンパク質の存在下で標的分子(AFP結合フコシル化糖鎖)と反応させることにより、レクチンとその標的分子との結合力が増強することが示された。

【0108】

実施例13: N型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウスIgG F(ab')₂を固相に用いた、AFP-L3の検出系の構築

本実験は、実施例1で調製したマウスIgG F(ab')₂が固相上でAFP-L3を捕捉できるかどうかを証明するため行った。N型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウスIgG F(ab')₂フラグメント抗体AおよびB、ならびにN型糖鎖結合コンセンサス配列を有しないマウスIgG F(ab')₂フラグメント抗体CおよびDを固相化し、次いでAFP-L3およびAFP-L1をLCA共存下でこれらの固相化抗体と反応させることにより、マウスIgG F(ab')₂がAFP-L3を特異的に捕捉できるかどうか検討した。

【0109】

具体的には、検討は以下のとおり行った。

(1) 実施例1で調製した精製マウスIgG F(ab')₂フラグメント抗体A、B、CおよびDを10 μ g/mLとなるようにPBSで希釈した。U96 MaxiSorp Nunc-Immuno Plateにおいて、希釈された溶液50 μ Lを37 1時間インキュベートして固相化した。

(2) 抗体固相化ウェルをPBST 250 μ Lで3回洗浄し、10%ブロッキング試薬150 μ Lで37 24時間ブロッキングした。

(3) 抗体固相化ウェルをPBST 250 μ Lで3回洗浄し、ミュータスワコーAFP-L3の測定値から濃度を換算したAFP-L3溶液とAFP-L1溶液をそれぞれ10%ブロッキング試薬で5 μ g/mLとなるように希釈し、さらにLCAを100 μ g/mLとanti-AFP F(ab')₂-HRPを1 μ g/mLとなるように添加して溶液を調製した。調製された溶液50 μ Lを抗体固相化ウェルに加え37 1時間インキュベートした。

(4) 抗体固相化ウェルをPBST 250 μ Lで3回洗浄した。次いで、TMB基質溶

10

20

30

40

50

液 50 μ L を加え室温で5分反応させた。1 N 硫酸で反応停止後、450 nm で吸光度を測定した。

【0110】

その結果、LCA は、LCA 反応性抗体フラグメントAまたはBを固相とした条件下でAFP-L3を特異的に検出することができた(図21)。

【0111】

以上より、固相化されたレクチン反応性糖鎖含有実体をレクチンと併用することによりレクチン標的分子を捕捉できることが示された。

【0112】

実施例14：可変領域にN型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウスIgG-HRPを用いた、ヘモペキシン(HPX)結合糖鎖とトランスフェリン(TF)結合糖鎖の検出系の構築

10

可変領域にN型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウスIgGを用いて、AALと共存下で反応させ、肝臓癌患者血清中のHPX結合AAL反応性フコシル化糖鎖とTF結合AAL反応性フコシル化糖鎖を検出できるかどうか検討した。

【0113】

具体的には、検討は以下のとおり行った。

(1) 可変領域のアミノ酸配列中にN型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウスIgGを、実施例1と同様にHRP標識を行った。

(2) 抗HPX抗体(R&D SYSTEMS Clone # 698813)と抗TF抗体(abcam Clone # 2A2)のNグリコシダーゼ処理を実施した。Nグリコシダーゼ処理は、トリス酸緩衝液にバッファー交換した抗HPX抗体に、NグリコシダーゼF(ROCHE社)を添加し、37 24時間反応させた。その後、100 kDaの限界ろ過を実施し、Nグリコシダーゼを除去した。

20

(3) Nグリコシダーゼ処理を実施した抗HPX抗体と抗TF抗体を2 μ g/mLとなるようにPBSで希釈し、C96 Maxi Soup Nunc-Immuno Plate(Thermo社)に50 μ L/wellで分注し、4 24時間固相化した。

(4) 250 μ Lの1%BSA-PBSを200 μ L添加し、4 24時間ブロッキングした。

(5) 300 μ LのPBSTで3回洗浄し、1%BSA-PBSで500倍希釈した肝臓癌患者血清2例(HCC-1, HCC-2)と健常人血清2例(NHS-1, NHS-2)を、50 μ L加え37 1時間インキュベートした。

30

(6) 300 μ LのPBSTで3回洗浄し、可変領域にN型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウスIgG-HRPを2 μ g/mLとなるように、希釈液(自社製)で希釈し、さらにAAL(Vector社)を20 μ g/mLとなるようにそれぞれ加え、37 1時間インキュベートした。

(7) 300 μ LのPBSTで3回洗浄し、50 μ LのTMB基質溶液(Thermo社)を加え室温で2分反応させ、1 N 硫酸で反応停止後、450 nm で吸光度を測定した。

【0114】

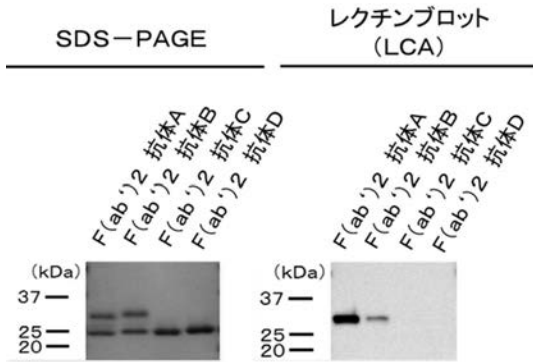
その結果、可変領域にN型糖鎖結合コンセンサス配列を有するマウスIgGを用いて、AALと共存下、肝臓癌患者血清中のHPX結合AAL反応性フコシル化糖鎖(図22)とTF結合AAL反応性フコシル化糖鎖(図23)を検出できた。

40

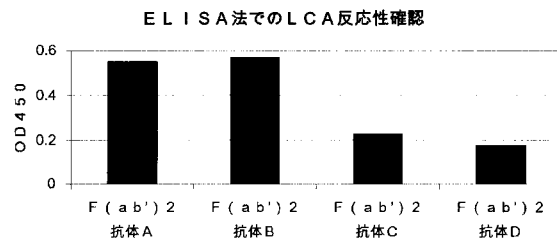
【0115】

以上より、固相化されたレクチン反応性糖鎖含有実体をレクチンと併用することによりレクチン標的分子を捕捉できることが示された。

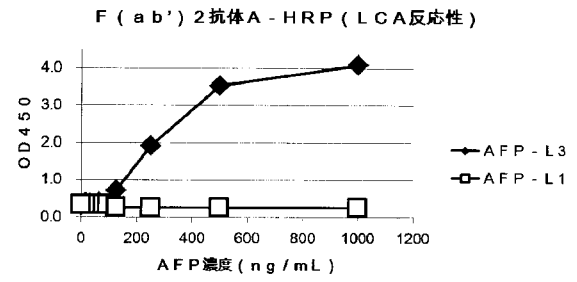
【図 1】



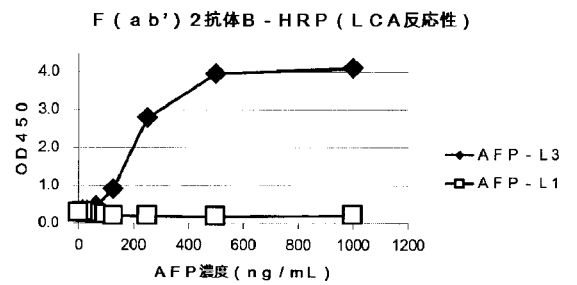
【図 2】



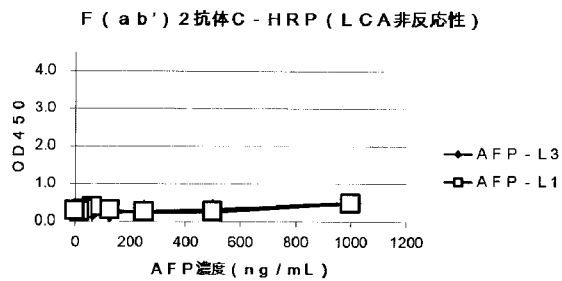
【図 3】



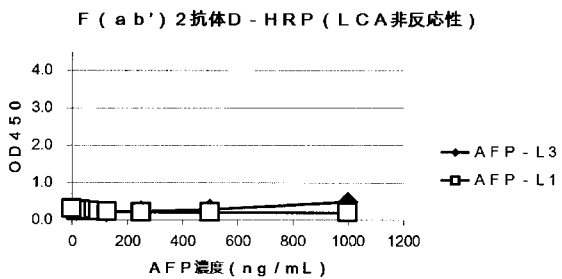
【図 4】



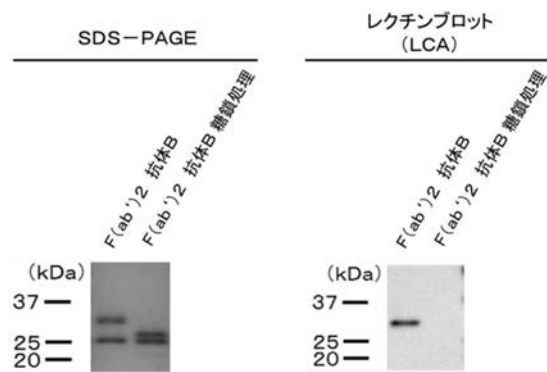
【図 5】



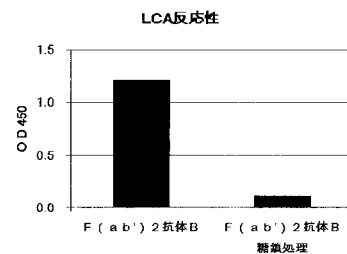
【図 6】



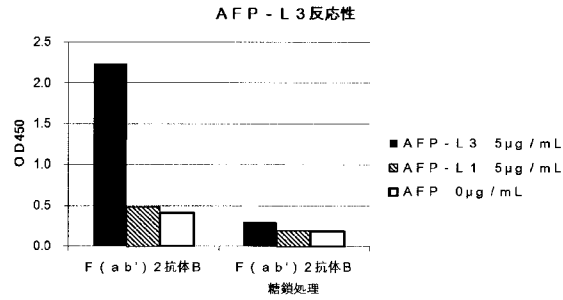
【図 7】



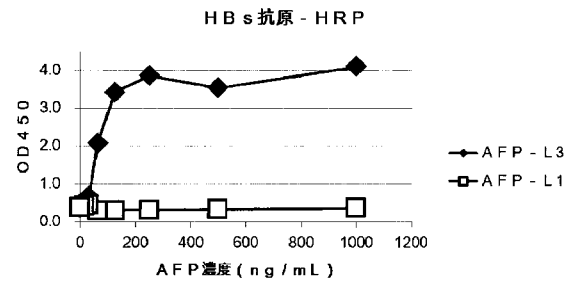
【図 8】



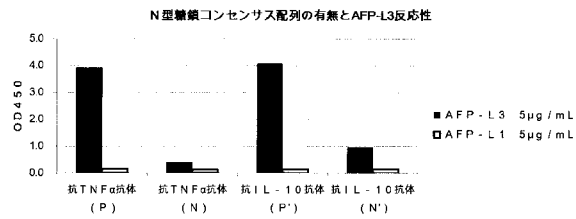
【図 9】



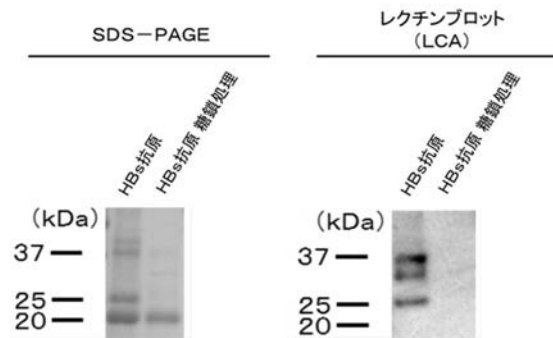
【図 11】



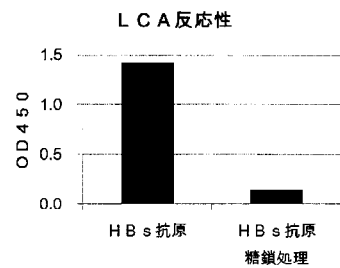
【図 10】



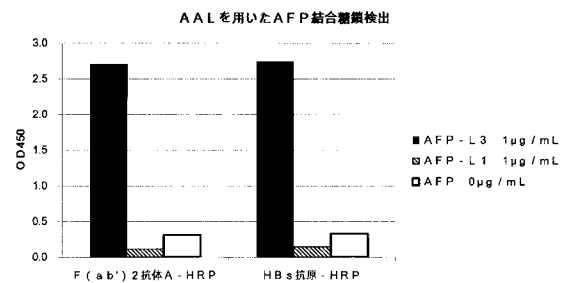
【図 12】



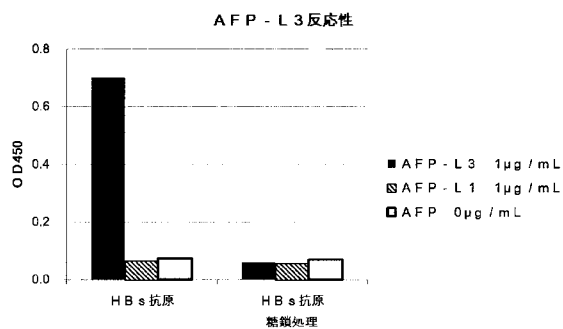
【図 13】



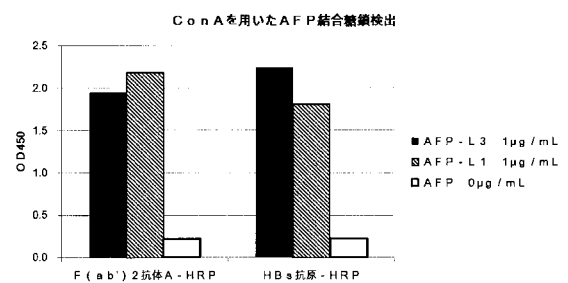
【図 15】



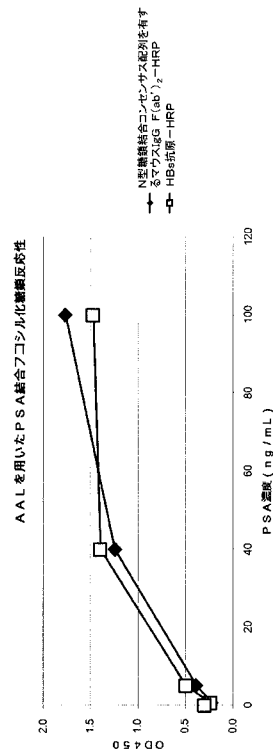
【図 14】



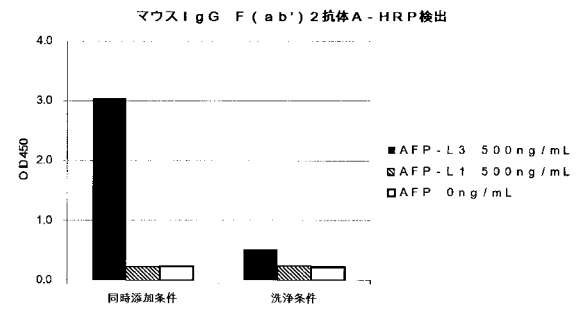
【図 16】



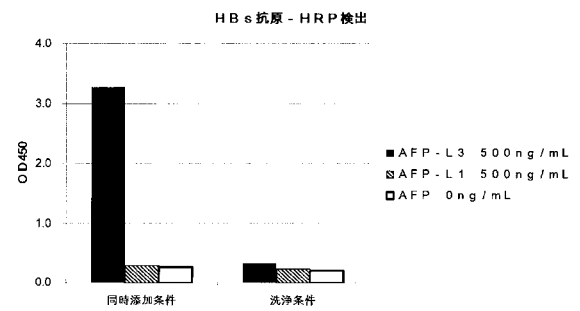
【図 17】



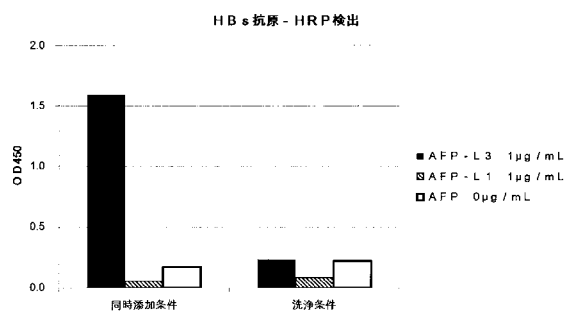
【図 18】



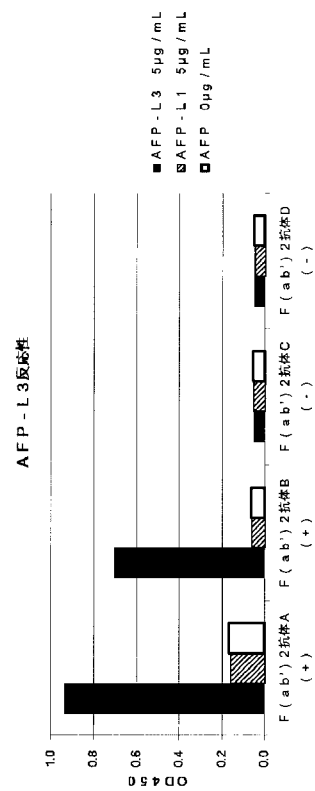
【図 19】



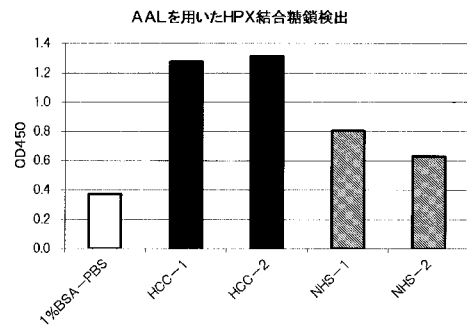
【図 20】



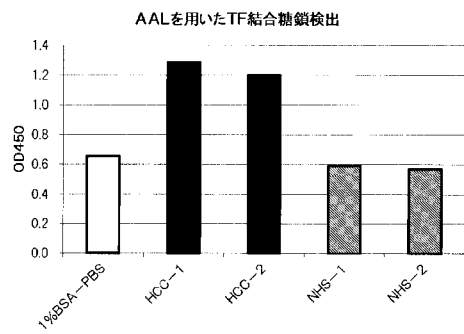
【図 21】



【図 2 2】



【図 2 3】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015991

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/566(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, G01N33/576(2006.01)i, C07K14/42(2006.01)n

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)

G01N33/566, C07K1/22, G01N33/53, G01N33/574, G01N33/576, C07K14/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-256457 A (Olympus Corp.), 23 October 2008 (23.10.2008), paragraph [0046] (Family: none)	14
Y	WO 2013/038914 A1 (Konica Minolta, Inc.), 21 March 2013 (21.03.2013), claims 1, 5; paragraph [0005] (Family: none)	1-8, 11-16
Y	JP 2568424 B2 (Nitto Denko Corp.), 08 January 1997 (08.01.1997), claim 3 & JP 1-311274 A	1-8, 11-16

☒ 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
03 July 2017 (03.07.17)Date of mailing of the international search report
18 July 2017 (18.07.17)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015991

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 1-245155 A (International Institute of Cellular & Molecular Pathology, Catholic University of Louvain), 29 September 1989 (29.09.1989), page 2, upper left column, lines 11 to 14 & EP 323909 A1 column 1, lines 5 to 8	1-8, 11-16
Y	WO 2008/029886 A1 (Tottori University), 13 March 2008 (13.03.2008), claims & JP 5207469 B2 & US 2011/0065197 A1 claims	7
A	US 2007/0099820 A1 (LANCASTER et al.), 03 May 2007 (03.05.2007), & US 2012/0135919 A1 & US 2007/0110811 A1 & US 2010/0130726 A1 & WO 2007/047922 A2 & WO 2007/047997 A2	1-16
A	US 2008/0199399 A1 (CHEN et al.), 21 August 2008 (21.08.2008), (Family: none)	1-16
A	JP 2012-255736 A (J-Oil Mills Inc.), 27 December 2012 (27.12.2012), (Family: none)	1-16
A	JP 3-167475 A (Hitachi, Ltd.), 19 July 1991 (19.07.1991), & DE 4036288 A1	1-16
A	MITCHELL D A, A Novel Mechanism of Carbohydrate Recognition by the C-type Lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit Organization and Binding to Multivalent Ligands, J Biol Chem, 2001, Vol.276 No.31, Page.28939-28945	1-16
A	LIGEOUR Caroline, Importance of topology for glycocluster binding to Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia ambifaria bacterial lectins, Org Biomol Chem, 2015.12.14, Vol.13 No.46, Page.11244-11254	1-16
A	JP 2012-516338 A (Smartcells, Inc.), 19 July 2012 (19.07.2012), & US 2012/0014908 A1 & WO 2010/088261 A1	1-16

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 5 9 9 1	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/566(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, G01N33/576(2006.01)i, C07K14/42(2006.01)n			
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. G01N33/566, C07K1/22, G01N33/53, G01N33/574, G01N33/576, C07K14/42			
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), CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (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	JP 2008-256457 A (オリンパス株式会社) 2008.10.23, [0046] (ファミリーなし)	14	
Y	WO 2013/038914 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2013.03.21, [請求 項1][請求項5][0005] (ファミリーなし)	1-8、11 -16	
Y	JP 2568424 B2 (日東電工株式会社) 1997.01.08, [請求項3] & JP 1-311274 A	1-8、11 -16	
☒ 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 03.07.2017		国際調査報告の発送日 18.07.2017	
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) 三木 隆 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 5 9 9 1
C (続き) . 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
Y	JP 1-245155 A (インターナショナル・インスティテュート・オブ・セリュラー・アンド・モレキュラー・パソロジー・カソリック・ユニバーシティ・オブ・ルーヴァン) 1989.09.29, 2 ページ左上欄 1 1 行～1 4 行 & EP 323909 A1 (1 欄 5 行～8 行)	1-8、1 1 - 1 6
Y	WO 2008/029886 A1 (国立大学法人鳥取大学) 2008.03.13, [特許請求の範囲] & JP 5207469 B2 & US 2011/0065197 A1(Claims)	7
A	US 2007/0099820 A1 (LANCASTER et al.) 2007.05.03, & US 2012/0135919 A1 & US 2007/0110811 A1 & US 2010/0130726 A1 & WO 2007/047922 A2 & WO 2007/047997 A2	1-1 6
A	US 2008/0199399 A1 (CHEN et al.) 2008.08.21, (ファミリーなし)	1-1 6
A	JP 2012-255736 A (株式会社 J-オイルミルズ) 2012.12.27, (ファミリーなし)	1-1 6
A	JP 3-167475 A (株式会社日立製作所) 1991.07.19, & DE 4036288 A1	1-1 6
A	MITCHELL D A, A Novel Mechanism of Carbohydrate Recognition by the C-type Lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit Organization and Binding to Multivalent Ligands, J Biol Chem, 2001, Vol.276 No.31, Page.28939-28945	1-1 6
A	LIGEOUR Caroline, Importance of topology for glycocluster binding to Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia ambifaria bacterial lectins, Org Biomol Chem, 2015.12.14, Vol.13 No.46, Page.11244-11254	1-1 6
A	JP 2012-516338 A (スマートセルズ・インコーポレイテッド) 2012.07.19, & US 2012/0014908 A1 & WO 2010/088261 A1	1-1 6

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 B

(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, 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, TZ

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1 . S u p e r d e x

(72)発明者 伊勢 伸之

東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士レビオ株式会社内

(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)	捕获凝集素靶分子的方法		
公开(公告)号	JPWO2017183711A1	公开(公告)日	2019-02-28
申请号	JP2018513225	申请日	2017-04-21
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	佐藤英雄 伊勢伸之		
发明人	内藤 郁恵 豊永 将也 佐藤 英雄 伊勢 伸之		
IPC分类号	G01N33/566 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	C07K1/22 C07K14/42 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/576		
FI分类号	G01N33/566 G01N33/53.S G01N33/53.V G01N33/53.N G01N33/569.L G01N33/53.B		
优先权	2016086214 2016-04-22 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了使用凝集素的凝集素靶分子 (例如, AFP-L3, PSA, 血红蛋白和转铁蛋白) 的改进的测量。具体地, 本发明包括一种用于捕获凝集素靶分子的方法, 该方法包括在具有凝集素反应性糖链的实体, 凝集素靶分子, 凝集素和凝集素反应性糖的存在下将凝集素与凝集素靶分子结合。含有复合物的含有链的实体; 用于捕获凝集素目标分子的试剂, 其以混合形式包含凝集素和含有凝集素的反应性糖链实体; 以及捕获含有凝集素和含有凝集素的反应性糖链实体的凝集素靶分子 使用套件。

(19) 日本国特許庁 (JP)	再 公 表 特 許 (A1)	(11) 国際公開番号 WO2017/183711
発行日 平成31年2月28日 (2019. 2. 28)	(43) 国際公開日 平成29年10月26日 (2017. 10. 26)	
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/566 (2006. 01)	GO 1 N 33/566	
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	S
GO 1 N 33/569 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	V
	GO 1 N 33/53	N
	GO 1 N 33/569	L
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く		
出願番号 特願2018-513225 (P2018-513225)	(71) 出願人 306008724	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/015991	富士レバイオ株式会社	
(22) 国際出願日 平成29年4月21日 (2017. 4. 21)	東京都新宿区西新宿二丁目1番1号	
(31) 優先権主張番号 特願2016-86214 (P2016-86214)	(74) 代理人 110002147	
(32) 優先日 平成28年4月22日 (2016. 4. 22)	特許業務法人清井国際特許事務所	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 内藤 郁恵	
	東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士	
	レバイオ株式会社内	
	(72) 発明者 豊永 将也	
	東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士	
	レバイオ株式会社内	
	(72) 発明者 佐藤 英雄	
	東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士	
	レバイオ株式会社内	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 レクチン標的分子の捕捉方法		