

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 12 月 4 日(04.12.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/192202 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/18 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/001219
- (22) 国際出願日: 2014 年 3 月 5 日(05.03.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-112605 2013 年 5 月 29 日(29.05.2013) JP
- (71) 出願人: パナソニックヘルスケア株式会社
(PANASONIC HEALTHCARE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒
7910395 愛媛県東温市南方 2 1 3 1 番地 1 Ehime
(JP).
- (72) 発明者: 福永 淳(FUKUNAGA, Atsushi).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.);
〒5300017 大阪府大阪市北区角田町 8 番 1 号梅
田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所
Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): 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, 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, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, 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, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(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), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: RECOMBINANT PROTEIN CAPABLE OF BONDING SPECIFICALLY AND QUICKLY TO TROPONIN I FROM HUMAN MYOCARDIUM

(54) 発明の名称: ヒト心筋由来トロポニン I に特異的にかつ速やかに結合できる組み換えタンパク質

(57) Abstract: Provided is a recombinant protein which is capable of bonding specifically and quickly to troponin I from human myocardium. In particular, the present invention provides a recombinant protein which is capable of bonding specifically and quickly to troponin I from human myocardium, the recombinant protein comprising a light chain variable region composed of an amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 63 and a heavy chain variable region composed of an amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 65. The present invention also provides a method for bonding this recombinant protein to troponin I from human myocardium, the method comprising a step (a) of preparing the recombinant protein and a step (b) of bringing the troponin I from human myocardium in contact with the recombinant protein and bonding the recombinant protein to the troponin I from human myocardium.

(57) 要約: 本発明は、ヒト心筋由来トロポニン I に特異的にかつ速やかに結合できる組み換えタンパク質を提供する。特に、本発明は、ヒト心筋由来トロポニン I に特異的にかつ速やかに結合できる組み換えタンパク質であって、配列番号: 63 によって表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域; および配列番号: 65 によって表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む、組み換えタンパク質を提供する。本発明はまた、本発明の組み換えタンパク質をヒト心筋由来のトロポニン I に結合させる方法であって、前記組み換えタンパク質を用意する工程 (a); および前記組み換えタンパク質に前記ヒト心筋由来のトロポニン I を接触させ、前記組み換えタンパク質を前記ヒト心筋由来のトロポニン I に結合させる工程 (b) を含む方法を提供する。

WO 2014/192202 A1

明 細 書

発明の名称：

ヒト心筋由来トロポニンⅠに特異的にかつ速やかに結合できる組み換えタンパク質

技術分野

[0001] 本発明は、ヒト心筋由来トロポニンⅠに特異的にかつ速やかに結合できる組み換えタンパク質に関する。

背景技術

[0002] 非特許文献1および非特許文献2は、心筋由来トロポニンⅠの濃度が、急性心筋梗塞に罹患した患者の血液中で急速に高くなることを開示している。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1: Aleksei G. Katrukha et. al.,
"Troponin I is released in blood stream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex", Clinical Chemistry, Vol. 43, Issue 8, p. p. 1379-1385 (1997)

非特許文献2: Till Keller et. al., "Sensitive Troponin I Assay in Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction", The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE, Vol. 361, pages 868-877 (2009)

非特許文献3: Jun Kamishikiryo et. al., "Molecular Basis for LIT1 Protein Re

cognition by Human CD161 Protein (NKRP1A/KLRB1)", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 286, NO. 27, p. p. 23823-23830.

非特許文献4: G. Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明の目的は、ヒト心筋由来トロポニンIに特異的かつ速やかに結合できる組み換えタンパク質を提供することである。

課題を解決するための手段

[0005] 以下の項目A1～B6は、上記課題を解決する。

A1. ヒト心筋由来のトロポニンIに特異的に結合する組み換えタンパク質であって、

配列番号：63によって表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；および

配列番号：65によって表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む、組み換えタンパク質。

A2. 前記項目A1に記載の組み換えタンパク質であって、前記組み換えタンパク質が抗体である、組み換えタンパク質。

A3. 前記項目A1に記載の組み換えタンパク質であって、前記組み換えタンパク質が抗体フラグメントである、組み換えタンパク質。

A4. 前記項目A3に記載の組み換えタンパク質であって、前記抗体フラグメントがFab抗体フラグメントである、組み換えタンパク質。

A5. 前記項目A3に記載の組み換えタンパク質であって、前記抗体フラグメントがF(ab')₂抗体フラグメントである、組み換えタンパク質。

A6. 前記項目A3に記載の組み換えタンパク質であって、前記抗体フラグメントがscFv抗体フラグメントである、組み換えタンパク質。

B 1. 組み換えタンパク質をヒト心筋由来のトロポニン I に結合させる方法であって、

前記組み換えタンパク質を用意する工程 (a) ; ここで

前記組み換えタンパク質は、

配列番号 : 63 によって表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域 ;
および

配列番号 : 65 によって表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
を含む ; ならびに

前記組み換えタンパク質に前記ヒト心筋由来のトロポニン I を接触させ、
前記組み換えタンパク質を前記ヒト心筋由来のトロポニン I に結合させる工程 (b)

を含む、方法。

B 2. 前記項目 B 1 に記載の方法であって、前記組み換えタンパク質が抗体である、方法。

B 3. 前記項目 B 1 に記載の方法であって、前記組み換えタンパク質が抗体フラグメントである、方法。

B 4. 前記項目 B 3 に記載の方法であって、前記抗体フラグメントが F a b 抗体フラグメントである、方法。

B 5. 前記項目 B 3 に記載の方法であって、前記抗体フラグメントが F (a b ')₂ 抗体フラグメントである、方法。

B 6. 前記項目 B 3 に記載の方法であって、前記抗体フラグメントが s c F v 抗体フラグメントである、方法。

発明の効果

[0006] 本発明は、ヒト心筋由来トロポニン I に特異的かつ速やかに結合できる組み換えタンパク質を提供する。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]図 1 は抗体を示す。

[図2]図 2 は、工程 (c - 2) における P C R 法を示す。

発明を実施するための形態

[0008] 以下、本発明の実施形態が説明される。

[0009] (用語の説明)

まず、本明細書において用いられる用語が説明される。

図1は、抗体を示す。広く知られているように、抗体1は「Y」文字の形状を有する。抗体1は2つのF a b領域および1つのF c領域からなる。抗体1は、2本の重鎖2および2本の軽鎖3からなる。各重鎖2は、重鎖定常領域1（参照符号：22）、重鎖定常領域2（参照符号：23）、重鎖定常領域3（参照符号：24）、および重鎖可変領域21からなる。各軽鎖3は、軽鎖可変領域31および軽鎖定常領域32からなる。

[0010] 各F a b領域は、1つの重鎖可変領域21、1つの重鎖定常領域1（参照符号：22）、1つの軽鎖可変領域31、および1つの軽鎖定常領域32からなる。軽鎖3はリンカ4により重鎖2に連結されている。重鎖2は先端に重鎖可変領域21を有している。軽鎖3は先端に軽鎖可変領域31を有している。抗体1には抗原が特異的に結合する。より詳細には、抗原は重鎖可変領域21および軽鎖可変領域31からなるF v領域に特異的に結合する。本明細書においては、抗原はヒト心筋由来のトロポニンIである。

[0011] 本実施形態に係る組み換えタンパク質は、配列番号：63によって表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域31および配列番号：65によって表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域21を含む。本組み換えタンパク質は、ヒト心筋由来のトロポニンIに特異的にかつ速やかに結合する。

[0012] 本組み換えタンパク質は、抗体または抗体フラグメントのいずれかである。

[0013] 抗体は、図1に示される「Y」文字状の形状を有する。抗体に含まれる軽鎖可変領域31および重鎖可変領域21は、それぞれ、配列番号63および配列番号65によって表されるアミノ酸配列からなる。図1に示されるように、軽鎖可変領域31は重鎖可変領域21にリンカ4を介して連結している。

[0014] 抗体フラグメントの例は、F a b抗体フラグメント、F (a b')₂抗体フラグメント、またはs c F v抗体フラグメントである。

[0015] F a b抗体フラグメントは、1つのF a b領域からなる。言い換えれば、F a b抗体フラグメントは、1つの軽鎖可変領域3 1（配列番号：6 3）、1つの重鎖可変領域2 1（配列番号：6 5）、1つの軽鎖定常領域3 2、1つの重鎖定常領域1（参照符号：2 2）、およびリンカ4からなる。軽鎖定常領域3 2は、リンカ4を介して重鎖定常領域1（参照番号：2 2）に連結している。

[0016] F (a b')₂抗体フラグメントは、2つのF a b領域からなる。上記の通り、各F a b領域は、1つの軽鎖可変領域3 1（配列番号：6 3）、1つの重鎖可変領域2 1（配列番号：6 5）、1つの軽鎖定常領域3 2、1つの重鎖定常領域1（参照符号：2 2）、およびリンカ4からなる。これらの2つのF a b領域は、別のリンカ（図示せず）を介して互いに連結されている。好ましくは、一方の重鎖定常領域1（参照番号：2 2）が、別のリンカ（図示せず）を介して他方の重鎖定常領域1（参照番号：2 2）に連結している。

[0017] s c F v抗体フラグメントは、軽鎖可変領域3 1（配列番号：6 3）、重鎖可変領域2 1（配列番号：6 5）、およびリンカからなる。軽鎖可変領域3 1（配列番号：6 3）は、リンカ（図示せず）を介して重鎖可変領域2 1（配列番号：6 5）に連結している。

[0018] 組み換えタンパク質がヒト心筋由来トロポニンIに特異的かつ速やかに結合できる限り、リンカは特に限定されない。リンカの例は5～20のアミノ酸からなるペプチドである。より具体的には、リンカの例は、G G G G S G G G S G G G S（配列番号：6 4）により表されるアミノ酸配列である。リンカの別の例は、ジスルフィド結合（—硫黄原子（S）—硫黄原子（S）—）である。

[0019] 組み換えタンパク質がヒト心筋由来トロポニンIに特異的かつ速やかに結合できる限り、軽鎖可変領域3 1（配列番号：6 3）のN末端はアミノ酸配

列によって修飾され得る。C末端もまた、修飾され得る。

[0020] 組み換えタンパク質がヒト心筋由来トロポニンIに特異的かつ速やかに結合できる限り、重鎖可変領域21（配列番号：65）のN末端はアミノ酸配列によって修飾され得る。C末端もまた、修飾され得る。重鎖可変領域21（配列番号：65）のC末端を修飾するアミノ酸配列の例は、A A A L E H H H H H（配列番号：66）である。

[0021] 本組み換えタンパク質はヒト心筋由来トロポニンIに接触されると、速やかに本組み換えタンパク質はヒト心筋由来トロポニンIに特異的にかつ速やかに結合する。より具体的には、本組み換えタンパク質がヒト心筋由来トロポニンIと混合されると、速やかに本組み換えタンパク質はヒト心筋由来トロポニンIに特異的にかつ速やかに結合する。

[0022] 本組み換えタンパク質は、一般的なタンパク質発現技術を用いて産生され得る。より具体的には、まず、本組み換えタンパク質をコードする遺伝子配列を含むベクターを用意する。ベクターの例は、プラスミドである。次に、このベクターを用いて細胞（例えば、大腸菌）が形質転換される。この細胞は培養され、本組み換えタンパク質を産生する。

[0023] s c F v抗体フラグメントを効率的に得るためには、本組み換えタンパク質は、リフォールディング法により産生されることが好ましい。非特許文献3は、リフォールディング法を開示している。

[0024] （実施例）

以下、本実施形態を裏付ける実施例が説明される。

[0025] （実施例1）

表1、表2、表3、および表4は、実施例1において用いられたプライマーを示す。

表1は、軽鎖可変領域を増幅させるためのフォワードミックスプライマー（プライマー1～21、配列番号：02～22）を示す。

表2は、重鎖可変領域を増幅させるためのフォワードミックスプライマー（プライマー22～44、配列番号：23～45）を示す。

表 3 は、軽鎖可変領域を増幅させるためのリバースミックスプライマー（プライマー 45 ～ 49、配列番号：46 ～ 50）を示す。

表 4 は、重鎖可変領域を増幅させるためのリバースミックスプライマー（プライマー 50 ～ 55、配列番号：51 ～ 56）を示す。

[0026]

[表1]

プライマー 1	配列番号：02	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTGTWCTCWCCARTC
プライマー 2	配列番号：03	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTSTGMTSACYCAGTC
プライマー 3	配列番号：04	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTGTGMTMACTCAGTC
プライマー 4	配列番号：05	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTGTGHTRWCACAGTC
プライマー 5	配列番号：06	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTGTRATGACMCAGTC
プライマー 6	配列番号：07	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTMAGATRAMCCAGTC
プライマー 7	配列番号：08	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTCAGATGAYDCAGTC
プライマー 8	配列番号：09	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTTTGCTGACTCAGTC
プライマー 9	配列番号：10	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTGTTCTCAWCCAGTC
プライマー 10	配列番号：11	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTGWGCTSACCCAATC
プライマー 11	配列番号：12	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTSTRATGACCCARTC
プライマー 12	配列番号：13	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYRTTKTGATGACCCAVAC
プライマー 13	配列番号：14	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATYCAGATGACACAGAC
プライマー 14	配列番号：15	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTGTGATGACACAACC
プライマー 15	配列番号：16	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATCCAGCTGACTCAGCC
プライマー 16	配列番号：17	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTGTGATGACBCAGKC
プライマー 17	配列番号：18	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTGTGATAACYCAGGA
プライマー 18	配列番号：19	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTGTGATGACCCAGWT
プライマー 19	配列番号：20	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYGTGSTMTSACYCAGTC
プライマー 20	配列番号：21	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYGCTGTTGTA CT CAGGAATC
プライマー 21	配列番号：22	CCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAYATTGTDHTVWCHCAGTC

[0027] [表2]

プライマー 22	配列番号: 2 3	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAKGTRMAGCTTCAGGAGYC
プライマー 23	配列番号: 2 4	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAGGTNCAGCTBCAGCAGTC
プライマー 24	配列番号: 2 5	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCAGGTGCAGCTGAAGSASTC
プライマー 25	配列番号: 2 6	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCAGSTBCAGCTGCAGCAGTC
プライマー 26	配列番号: 2 7	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAGGTYCAGCTYCAGCAGTC
プライマー 27	配列番号: 2 8	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGARGTCCARCTGCAACARTC
プライマー 28	配列番号: 2 9	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCAGGTYCAGCTBCAGCARTC
プライマー 29	配列番号: 3 0	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCAGGTTCARCTKCAGCAGTC
プライマー 30	配列番号: 3 1	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCAGGTCCACGTGAAGCAGTC
プライマー 31	配列番号: 3 2	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGAASSTGGTGGARTC
プライマー 32	配列番号: 3 3	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAVGTGAWGYTGGTGGAGTC
プライマー 33	配列番号: 3 4	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGAAGGTCATCGAGTC
プライマー 34	配列番号: 3 5	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCSAGGTGCAGSKGGTGGAGTC
プライマー 35	配列番号: 3 6	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAKGTGCAMCTGGTGGAGTC
プライマー 36	配列番号: 3 7	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAAGTGCACVCTGGTGGAGTC
プライマー 37	配列番号: 3 8	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGAAGCTGATGGARTC
プライマー 38	配列番号: 3 9	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGCARCTTGTTGAGTC
プライマー 39	配列番号: 4 0	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGARGTRAAGCTTCTCGAGTC
プライマー 40	配列番号: 4 1	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAAGTGAARSTTGAGGAGTC
プライマー 41	配列番号: 4 2	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAAGTGATGCTGGTGGAGTC
プライマー 42	配列番号: 4 3	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCAGGTTACTCTRAAAGWGTS TG
プライマー	配列番号: 4	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCAGGTCCAAYTVCAGCARCC

[0028] [表3]

プライマー ー45	配列番号 : 46	ACCAGAGCCGCGCGCGCGCTACCACCACCACCCCGTTTGATTCCARCTTKG
プライマー ー46	配列番号 : 47	ACCAGAGCCGCGCGCGCGCTACCACCACCACCCCGTTTATTTCCAGCTTGG
プライマー ー47	配列番号 : 48	ACCAGAGCCGCGCGCGCGCTACCACCACCACCCCGTTTSAGCTCCAGCTTGG
プライマー ー48	配列番号 : 49	ACCAGAGCCGCGCGCGCGCTACCACCACCACCCCGTTYWATTTCCTCACTTGC
プライマー ー49	配列番号 : 50	ACCAGAGCCGCGCGCGCGCTACCACCACCACCCCGCTAGGACAGTCAGTTTGC

[0029] [表4]

プライマー 50	配列番号: 5 1	CGGCACCGGCGCACCTGCGGCCGCGAGGAAACGGTGACCGTGGT
プライマー 51	配列番号: 5 2	CGGCACCGGCGCACCTGCGGCCGCGAGGAGACTGTGAGACTGGT
プライマー 52	配列番号: 5 3	CGGCACCGGCGCACCTGCGGCCGCGAGGAGACGGTGACTGAGRT
プライマー 53	配列番号: 5 4	CGGCACCGGCGCACCTGCGGCCGCGAGGAAGACTGTAGACTGGT
プライマー 54	配列番号: 5 5	CGGCACCGGCGCACCTGCGGCCGCGGAGACASTGACCAGAGT
プライマー 55	配列番号: 5 6	CGGCACCGGCGCACCTGCGGCCGCGGAGACASTGACCAGAGT

[0030] 工程 (a 1) ヒト心筋由来トロポニン I に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生可能なハイブリドーマ (マウス脾臓由来) の調製

ヒト心筋由来のトロポニン I に含有されるアミノ酸 (配列番号: 01、シグマアルドリッチジャパン株式会社より購入、QPLELAGLGFAELQDL) が、sulfosuccinyl crosslinker (サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社より購入) を用いて、ヒト血清アルブミン (シグマ・アルドリッチより購入) に連結された。

[0031] より具体的には、sulfosuccinyl crosslinker (0.5 mg) が、100 マイクロリットルのリン酸緩衝生理食塩水に溶解され、第1水溶液を得た。この第1水溶液は、50℃の温度下で10分、放置された。

[0032] ヒト血清アルブミン (10 mg) が1ミリリットルのリン酸緩衝生理食塩

水に溶解され、第2水溶液を得た。

[0033] 第1水溶液は第2水溶液と混合され、混合物を得た。混合物は、30分間、静置された。このようにして、sulfosuccinylクロスリンカーがヒト血清アルブミンに結合された。

[0034] 混合物は、カラム（GEヘルスケア社より購入、商品名：PD10）に通され、未反応のsulfosuccinylクロスリンカーを除去した。

[0035] 上記アミノ酸（配列番号：01、1.5mg）がジメチルスルホキシド（以下、「DMSO」という）に溶解され、DMSO溶液を得た。2mg/mLの濃度を有する混合物（1mL）にDMSO溶液（100マイクロリットル）が添加された。その後、一晩、混合物は放置され、sulfosuccinylクロスリンカーがアミノ酸（配列番号：01）に結合された。

[0036] このようにして、トロポニンIに含まれるアミノ酸配列（配列番号：01）で修飾されたヒト血清アルブミンが得られた。以下、このヒト血清アルブミンは「トロポニン修飾HSA」という。

[0037] 完全フロイトアジュバント（和光純薬工業株式会社より購入）およびトロポニン修飾HSAが混合され、混合物を得た。この混合物がBALB/cマウスに注入された。BALB/cマウスとは、アルビノマウスの一種である。

[0038] 2週間後、リン酸緩衝生理食塩水（以下、「PBS」という）およびトロポニン修飾HSAの混合物がBALB/cマウスに注入された。これをもう一度繰り返した。このようにして、1ヶ月かけて、BALB/cマウスはトロポニン修飾HSAにより免疫された。言い換えれば、上記混合物をBALB/cマウスに与えることによって、BALB/cマウスの体内において、トロポニン修飾HSAに対する抗体が産生された。

[0039] 免疫されたBALB/cマウスの脾臓が摘出された。非特許文献4に記載された細胞融合法に従って、ハイブリドーマを得た。その後、ハイブリドーマは培養液中で培養された。培養の後のハイブリドーマ（細胞）の数は、およそ 5×10^6 であった。このようにして得られたハイブリドーマは、ヒト心

筋由来トロポニンIに特異的に結合するモノクローナル抗体を産生可能であった。

[0040] 工程 (a 2) ハイブリドーマ細胞からの全マウスRNAの抽出

培養されたハイブリドーマの細胞膜を破壊するために、1 mLのTRIzol (インビトロジェン株式会社より購入) が、ハイブリドーマを含有する培養液に添加され、そして十分に培養液は攪拌された。

[0041] 次に、0.2 mLの容積を有するクロロホルム液 (純度: 99.9%) が培養液に添加され、そして再度、十分に培養液は攪拌された。

[0042] 培養液は、 117600 m/s^2 の重力加速度で、 4°C の温度下、15分間、遠心分離に供された。上清 ($500\text{ }\mu\text{L}$) が取得された。得られた上清にイソプロパノール ($500\text{ }\mu\text{L}$) を添加し、室温下で10分間、静置した。

[0043] 培養液を、上記の条件と同一の条件を有する遠心分離に供した。得られた沈殿物に75%エタノール水溶液 (1 mL) を添加し、エタノール溶液を得た。

[0044] エタノール溶液は、 73500 m/s^2 の重力加速度で、5分間、遠心分離に供された。沈殿物を乾燥させた。このようにして、全マウスRNAが得られた。

[0045] 工程 (b-1) 全マウスRNAからのmRNAの抽出

Oligotex^{商標}-dT30<Super>mRNA Purification kit (タカラバイオ株式会社より購入) を用いて、工程 (a 2) において得られた全マウスRNAからmRNAが抽出された。

[0046] RNaseフリーの水 ($100\text{ }\mu\text{L}$) が1本のマイクロチューブに注入された。このマイクロチューブは、ブロックインキュベーター (アステック株式会社より購入) にセットされ、1時間、 70°C に加温された。

[0047] 全マウスRNAが、RNaseフリーの水 ($100\text{ }\mu\text{L}$) に溶解された。

[0048] キットに含まれている2×バインディングバッファー ($100\text{ }\mu\text{L}$) およびキットに含まれているオリゴテックス ($10\text{ }\mu\text{L}$) がRNaseフリーの水 ($100\text{ }\mu\text{L}$) と混合された。その後、混合物は 70°C の温度下で3分間

、静置された。さらに室温で10分間、混合物は静置された。

[0049] 混合物は、 147000 m/s^2 の重力加速度で、5分間、遠心分離に供された。上清が除去され、キットに含まれている洗浄バッファー（ $350\text{ }\mu\text{L}$ ）に沈殿物が懸濁された。懸濁液は、キットに含まれているカラムに供給された。カラムは、 147000 m/s^2 の重力加速度で、30秒間、遠心分離に供された。

[0050] カラムを洗浄するために、カラムに洗浄バッファー（ $350\text{ }\mu\text{L}$ ）が供給された。再度、カラムは、 147000 m/s^2 の重力加速度で、30秒間、遠心分離に供された。

[0051] カラムの底部にサンプル採取用のマイクロチューブが装着された。

[0052] カラムに含有されているmRNAを抽出するために、マイクロチューブに含有されているRNaseフリーの水（ $20\text{ }\mu\text{L}$ ）がカラムに供給された。その後、カラムは、 147000 m/s^2 の重力加速度で、3分間、遠心分離に供された。再度、RNaseフリーの水（ $20\text{ }\mu\text{L}$ ）がカラムに供給され、カラムは、 147000 m/s^2 の重力加速度で、3分間、遠心分離に供された。

[0053] このようにして、mRNAを含有する抽出液がマイクロチューブ内に得られた。

[0054] 工程（b-2） mRNAからcDNAへの逆転写

得られた抽出液に含まれるmRNAが、逆転写酵素（タカラバイオ株式会社より購入、商品名：PrimeScript、タカラバイオ株式会社より購入）を用いて逆転写され、cDNAを含む溶液を得た。

[0055] 工程（b-3-1） cDNAを用いた、軽鎖可変領域をコードする遺伝子の増幅

溶液に含まれるcDNA、フォワードプライマー1～21（配列番号：02～22）、およびリバースプライマー45～49（配列番号：46～50）を用いるPCR法により、上記モノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードする遺伝子断片（配列番号：58、以下、「VL遺伝子断片」という）が

増幅された。このPCR法において用いられるポリメラーゼは、商品名：T a K a R a E x T a q H o t s t a r t V e r s i o nとしてタカラバイオ株式会社から購入された。

[0056] このPCR法のプロトコールは表5の通り。

[表5]

1 サイクル	9 6 ° C	3 0 秒
	5 2 ° C	1 分
	6 8 ° C	1 分

サイクル回数：35回。

[0057] 最後に溶液は68℃で4分間放置された。このようにして、PCR溶液が得られた。このPCR溶液は、増幅されたVL遺伝子断片（配列番号：58）を含有していた。

[0058] 増幅されたVL遺伝子断片の確認および精製のために、得られたPCR溶液は、2重量%の濃度を有するアガロースを含有するゲルを用いた電気泳動に供された。

[0059] 工程（b-3-2） cDNAを用いた、重鎖可変領域をコードする遺伝子の増幅

溶液に含まれるcDNA、フォワードプライマー22～44（配列番号：23～45）、およびリバースプライマー50～55（配列番号：51～56）を用いるPCR法により、上記モノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードする遺伝子断片（配列番号：57、以下、「VH遺伝子断片」という）が増幅された。このPCR法において用いられるポリメラーゼは、商品名：T a K a R a E x T a q H o t s t a r t V e r s i o nとしてタカラバイオ株式会社から購入された。

[0060] このPCR法のプロトコールは、VL遺伝子断片のプロトコールと同一であった。

[0061] 最後に溶液は68℃で4分間放置された。このようにして、PCR溶液が得られた。このPCR溶液は、増幅されたVH遺伝子断片（配列番号：57

)を含有していた。

[0062] V H 遺伝子断片の生成の確認のため、かつ V H 遺伝子断片の精製のために、得られた P C R 溶液は、2 重量%の濃度を有するアガロースを含有するゲルを用いた電気泳動に供された。

[0063] 工程 (b-4) V L 遺伝子断片および V H 遺伝子断片の連結

精製された V H 遺伝子断片 (配列番号: 57) は、精製された V L 遺伝子断片 (配列番号: 58) にオーバーラップエクステンション P C R 法によって連結された。このようにして、上記モノクローナル抗体の s c F v 抗体フラグメントをコードする遺伝子断片 (配列番号: 59、以下、「s c F v 遺伝子フラグメント」という) を得た。得られた遺伝子断片 (配列番号: 59) は、その 5' 末端および 3' 末端で、制限酵素サイト N c o I および N o t I によってそれぞれ修飾されていた。

[0064] 工程 (c-1) 遺伝子のベクターへの導入

s c F v 遺伝子断片は、タンパク質発現用ベクター (タカラバイオ株式会社より購入、商品名: p E T 2 2 b (+)) にライゲーションされた。ライゲーションの詳細は以下に記述される。

[0065] 最初に、s c F v 遺伝子断片は、制限酵素 N c o I および N o t I (いずれもタカラバイオ株式会社より購入) によって処理された。s c F v 遺伝子断片は、電気泳動法により精製され、s c F v 遺伝子断片を含有する水溶液を得た。

[0066] タンパク質発現用ベクターもまた、制限酵素 N c o I および N o t I (いずれもタカラバイオ株式会社より購入) によって処理された。タンパク質発現用ベクターは、電気泳動により精製され、タンパク質発現用ベクターを含有する水溶液を得た。

[0067] これら2つの水溶液が混合され、混合液を得た。

[0068] 混合液に、酵素 (東洋紡株式会社より購入、商品名: L i g a t i o n H i g h v e r. 2) が添加され、そして混合液は 16℃ の温度下で2時間放置された。このようにして、s c F v 遺伝子断片がタンパク質発現用ベ

クターにライゲーションされた。

[0069] このようにして s c F v 遺伝子断片がライゲーションされたタンパク質発現ベクターを用いて、大腸菌（タカラバイオ株式会社より購入、商品名：D H 5 α コンピテントセル）が形質転換された。

[0070] その後、大腸菌は、100 μ g / mL の濃度を有するアンピシリンを含有する L B プレート培地上で 16 時間、インキュベートされた。インキュベートの後、L B プレート培地上に形成されたシングルコロニーがピックアップされた。シングルコロニーは、100 μ g / mL の濃度を有するアンピシリンを含有する L B 液体培地（5 mL）に供給され、そして 16 時間インキュベートされた。

[0071] タンパク質発現ベクター p E T 2 2 b（+）に含まれる不要な遺伝子配列を除去するために、この L B 液体培地からタンパク質発現ベクター p E T 2 2 b（+）がキット（株式会社キアゲン、商品名：Q I A p r e p s p i n m i n i p r e p k i t）を用いて抽出された。抽出されたタンパク質発現ベクター p E T 2 2 b（+）、プライマー 56（配列番号：67）、およびプライマー 57（配列番号：68）を用いた P C R 法により、タンパク質発現ベクター p E T 2 2 b（+）のシグナル配列（D N A 配列、配列番号：60）が除去された。このようにして、野生型 s c F v 抗体フラグメントをコードする発現ベクターを得た。

[0072] 工程（c-2）ベクターへの変異の導入

工程（c-1）において得られた発現ベクターは、s c F v 遺伝子断片（配列番号：59）を含む。この発現ベクターに含まれる s c F v 遺伝子断片（配列番号：59）からなる 747 塩基のうち、14 個の塩基が置換された。より詳細には、196 番目のグアニン（G）、197 番目のアデニン（A）、198 番目のチミン（T）、205 番目のアデニン（A）、206 番目のチミン（T）、207 番目のアデニン（A）、211 番目のアデニン（A）、213 番目の T（チミン）、217 番目の T（チミン）、218 番目の C（シトシン）、219 番目の T（チミン）、226 番目の G（グアニン）

、 2 2 7 番目の A（アデニン）、および 2 2 8 番目の T（チミン）が、それぞれ、C（シトシン）、G（グアニン）、C（シトシン）、C（シトシン）、G（グアニン）、C（シトシン）、C（シトシン）、C（シトシン）、C（シトシン）、G（グアニン）、C（シトシン）、C（シトシン）、G（グアニン）、C（シトシン）に置換された。

[0073] より具体的には、図 2 に示されるように、プライマー 5 8（配列番号：6 9）、プライマー 5 9（配列番号：7 0）、および工程（c-1）において得られた発現ベクターを用いる PCR 法が実施された。プライマー 5 8（配列番号：6 9）は、置換される 1 4 塩基を除き、s c F v 遺伝子断片（配列番号：5 9）に含まれる 1 8 7 番目の塩基から 2 3 1 番目の塩基までの遺伝子配列に相補的であった。プライマー 5 9（配列番号：7 0）は、置換される 1 4 塩基を除き、s c F v 遺伝子断片（配列番号：5 9）に相補的な遺伝子断片に含まれる 1 8 7 番目の塩基から 2 3 1 番目の塩基までの遺伝子配列に相補的であった。図 2 に示される PCR 法により、野生型 s c F v 抗体フラグメントをコードする発現ベクターに含まれる 1 4 塩基（G A T、A T A、A、T、T C T、G A T）が、他の 1 4 塩基（C G C、C G C、C、C、C G C、C G C）に置換された。このようにして、変異型 s c F v をコードする遺伝子配列（配列番号：7 1）を含有する発現ベクターが得られた。

[0074] 工程（c-3）ベクターを用いたタンパク質の取得

工程（c-2）において得られたベクターを用いて、大腸菌（タカラバイオ株式会社より購入、商品名：B L 2 1（D E 3））が形質転換された。その後、この大腸菌は、1 0 0 μ g / m L の濃度を有するアンピシリンを含有する L B プレート培地上で 3 7 $^{\circ}$ C の温度下、1 6 時間インキュベートされた。

[0075] インキュベートの後、L B プレート培地上に形成されたシングルコロニーがピックアップされた。シングルコロニーは、1 0 0 μ g / m L の濃度を有するアンピシリンを含有する L B 液体培地（5 0 0 m L）に供給された。その後、6 0 0 ナノメートルの波長での L B 液体培地の吸光度が 0. 5 に調整

されるように、シングルコロニーに含有される大腸菌が増殖された。

[0076] さらに、1 Mの濃度を有するイソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド (0.5 mL) の水溶液がLB液体培地に添加された。その後、37℃の温度下で5時間、振盪させながら、大腸菌をインキュベートした。このようにして、培養液が得られた。

[0077] 得られた培養液は、49000 m/s²の重力加速度、4℃の温度下、5分間、遠心分離に供された。大腸菌を含有する沈殿は、リン酸緩衝生理食塩水 (50 mL) に再度、懸濁された。

[0078] 懸濁液は超音波処理に供され、大腸菌を破砕した。破砕された大腸菌物を含有する溶液は、98000 m/s²の重力加速度、4℃の温度下、30分間、遠心分離に供された。このようにして、沈殿物が得られた。

[0079] この沈殿物は、4%の濃度を有する界面活性剤 (和光純薬工業株式会社より購入、商品名: Triton X-100) を含有するリン酸緩衝生理食塩水を用いて2回、洗浄された。さらに、沈殿物は界面活性剤を含有しないリン酸緩衝生理食塩水を用いて洗浄された。

[0080] 沈殿物に、表5に示される試薬を含有する水溶液A (10 mL) が添加された。

[0081] [表6]

試薬	濃度
グアニジン塩酸塩	6 M
塩化ナトリウム	0.1 M
MES緩衝液	50 mM
エチレンジアミン四酢酸	10 mM

[0082] 水溶液Aは6のpHを有していた。

[0083] その後、水溶液Aは4℃の温度下で18時間放置された。このようにして、沈殿物は溶解された。

[0084] 水溶液Aは、0.45 μ mのメッシュサイズを有するフィルター (Sartoriusより購入、商品名: Minisart) に通され、残渣を除去した。このようにして、濾液を得た。

[0085] 濾液（1 mL）に、表6に示される試薬を含有する水溶液B（2 mL）が滴下により添加された。

[0086] [表7]

試薬	濃度
Tris-HCl	0.1 M
エチレンジアミン四酢酸	2 mM
アルギニン塩酸塩	1.0 M
シスタミン	3.73 mM
システアミン塩酸塩	6.73 mM

[0087] 水溶液Bは8.0のpHを有していた。このようにして、3 mLの容積を有する水溶液を得た。

[0088] 水溶液（3 mL）は、1リットルの溶液を有する水溶液Bに滴下により添加された。その後、得られた水溶液は、4℃の温度下で96時間、攪拌された。このようにして、変異体scFv抗体フラグメント（配列番号：61）が得られた。

[0089] その後、濾過ユニット（VIVAFLOW50、Sartoriusより購入）を用いて、溶液が10 mLの容積を有するように濃縮された。カラム（GEヘルスケア社より購入、商品名：HiLoad 26/60 Superdex 75 pg）を用いて、溶液に含まれる変異体scFv抗体フラグメントが精製された。

[0090] 変異体scFv抗体フラグメントのアミノ酸配列（配列番号：61）の詳細は以下に記述される。

軽鎖可変領域（配列番号：63）：

D I V M T Q S P S S L A M S V G Q K V T M S C K S S Q S L L N S S N
Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L V Y F A S T R E S G V P R R F
R G R G R G T R F T L T I S S V Q A E D L A D Y F C Q Q H Y S T P L
T F G A G T K L E L K R

軽鎖可変領域のN末端に修飾されたアミノ酸配列：なし

軽鎖可変領域のC末端に修飾されたアミノ酸配列：なし

リンカ（配列番号：64）：

GGGGSGGGGSGGGGS

重鎖可変領域（配列番号：65）：

E V K L E E S G G G L V K P G G T L K L S C A A S G F T F S S Y A M
S W V R Q T P E K R L D W V A T I S S G G S Y I F Y P D S V K G R F
T I S R D N A R N T L Y L Q M N S L R S E D T A M Y Y C A R H H N P
D K S G F A Y W G Q G T L V T V S A

重鎖可変領域のN末端に修飾されたアミノ酸配列：なし

重鎖可変領域のC末端に修飾されたアミノ酸配列：A A A L E H H H H H H
（配列番号：66）

[0091] 工程（d） 結合速度定数および解離速度定数の算出

分子間相互作用解析装置B i a c o r e T 1 0 0（GEヘルスケア社より購入）を用いて、変異体s c F v抗体フラグメントの親和性が、分子間相互作用解析装置B i a c o r e T 1 0 0に添付されているマニュアルに従って算出された。

[0092] およそ500のRU（Resonance Unit）を有するヒト心筋由来トロポニンI（フナコシより購入）がCM5チップ（GEヘルスケア社より購入）上に固定された。このCM5チップはB i a c o r e T 1 0 0内にセットされた。次に、変異体s c F v抗体フラグメントを含有する水溶液（濃度：100nM、50nM、25nM、12.5nM、および6.25nM、容量：150マイクロリットル）をB i a c o r e T 1 0 0内に流した。分子間相互作用解析装置B i a c o r e T 1 0 0によって測定された解離定数は、表8に示される。

[0093] （比較例1）

比較例1では、工程（c-2）が行われなかったこと以外は、実施例1と同様の実験が行われた。このようにして、配列番号：62によって表されるアミノ酸配列からなる野生型s c F v抗体フラグメントを得た。実施例1と同様に、野生型s c F v抗体フラグメントの解離定数（KD）が測定された

。結果は、表 8 に示される。

[0094] 野生型 s c F v 抗体フラグメント（配列番号：6 2）および変異型 s c F v 抗体フラグメント（配列番号：6 1）の間の相違点は表 7 に記載される。

[0095] [表8]

	野生型 s c F v 抗体フラグメント (配列番号：6 2)	変異型 s c F v 抗体フラグメント (配列番号：6 1)
s c F v 抗体フラグメントにおける 6 6 番目のアミノ酸	D	R
s c F v 抗体フラグメントにおける 6 9 番目のアミノ酸	I	R
s c F v 抗体フラグメントにおける 7 1 番目のアミノ酸	S	R
s c F v 抗体フラグメントにおける 7 3 番目のアミノ酸	S	R
s c F v 抗体フラグメントにおける 7 6 番目のアミノ酸	D	R

[0096] [表9]

	比較例 1	実施例 1
解離定数 (KD)	6.71×10^{-10}	2.38×10^{-14}

[0097] 表 8 から明らかなように、実施例 1 による変異型 s c F v 抗体フラグメントは、比較例 1 による野生 s c F v 抗体フラグメントよりも高い親和性を有する。これは、変異型 s c F v 抗体フラグメントは、野生 s c F v 抗体フラグメントよりも速やかにヒト心筋由来トロポニン I に特異的に結合することを意味する。

産業上の利用可能性

[0098] 本発明による方法は、急性心筋梗塞を検出するためのセンサに用いられ得

る。

符号の説明

- [0099] 1 : 抗体
- 2 : 重鎖
- 2 1 : 重鎖可変領域
- 2 2 : 重鎖定常領域 1
- 2 3 : 重鎖定常領域 2
- 2 4 : 重鎖定常領域 3
- 3 : 軽鎖
- 3 1 : 軽鎖可変領域
- 3 2 : 軽鎖定常領域 3 2
- 4 : リンカ

請求の範囲

- [請求項1] ヒト心筋由来のトロポニン I に特異的に結合する組み換えタンパク質であって、
配列番号：63によって表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；および
配列番号：65によって表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む、組み換えタンパク質。
- [請求項2] 請求項1に記載の組み換えタンパク質であって、前記組み換えタンパク質が抗体である、組み換えタンパク質。
- [請求項3] 請求項1に記載の組み換えタンパク質であって、前記組み換えタンパク質が抗体フラグメントである、組み換えタンパク質。
- [請求項4] 請求項3に記載の組み換えタンパク質であって、前記抗体フラグメントがFab抗体フラグメントである、組み換えタンパク質。
- [請求項5] 請求項3に記載の組み換えタンパク質であって、前記抗体フラグメントがF(ab')₂抗体フラグメントである、組み換えタンパク質。
- [請求項6] 請求項3に記載の組み換えタンパク質であって、前記抗体フラグメントがscFv抗体フラグメントである、組み換えタンパク質。
- [請求項7] 組み換えタンパク質をヒト心筋由来のトロポニン I に結合させる方法であって、
前記組み換えタンパク質を用意する工程（a）；ここで
前記組み換えタンパク質は、
配列番号：63によって表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；および
配列番号：65によって表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
を含む；ならびに

前記組み換えタンパク質に前記ヒト心筋由来のトロポニン I を接触させ、前記組み換えタンパク質を前記ヒト心筋由来のトロポニン I に結合させる工程 (b)

を含む、方法。

[請求項8] 請求項7に記載の方法であって、前記組み換えタンパク質が抗体である、方法。

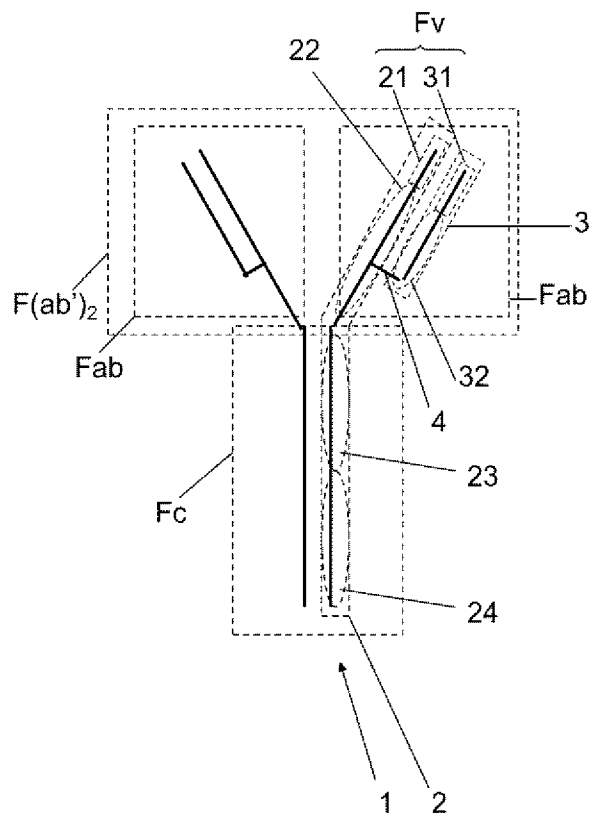
[請求項9] 請求項7に記載の方法であって、前記組み換えタンパク質が抗体フラグメントである、方法。

[請求項10] 請求項9に記載の方法であって、前記抗体フラグメントがF a b 抗体フラグメントである、方法。

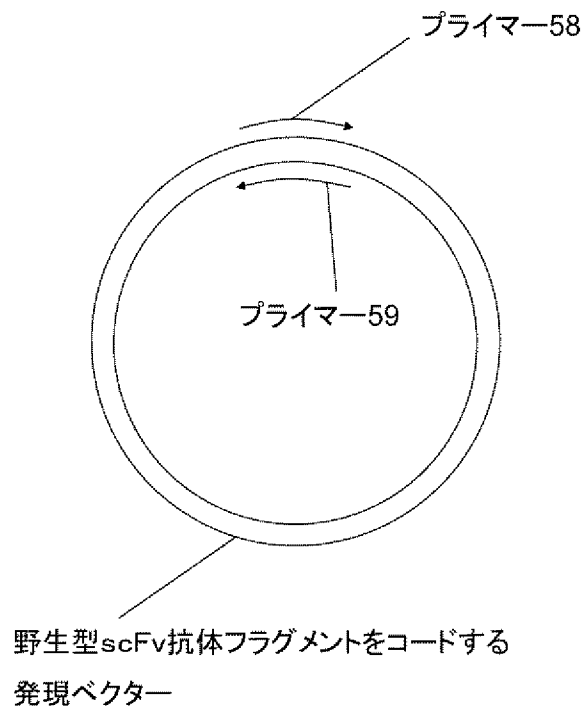
[請求項11] 請求項9に記載の方法であって、前記抗体フラグメントがF (a b ')₂ 抗体フラグメントである、方法。

[請求項12] 請求項9に記載の方法であって、前記抗体フラグメントがs c F v 抗体フラグメントである、方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/001219

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/18(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12N15/09(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)

C07K16/18, G01N33/53, C12N15/09

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-029441 A (Panasonic Corp.), 07 February 2013 (07.02.2013) (Family: none)	1-12
A	JP 2012-518418 A (Abbot Laboratories), 16 August 2012 (16.08.2012), & US 2010/0216720 A1 & EP 2401292 A & WO 2010/099079 A1 & CN 102421795 A	1-12
A	ALTSHULER E., Comparison of biochemical and immunochemical properties of the recombinant scFv and Fab fragments of antibodies TnIMAB specific to human cardiac troponin I, FEBS Journal, 2012, Vol.279, Suppl.1, p.335, P14-20	1-12

☒ 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
30 May, 2014 (30.05.14)

Date of mailing of the international search report
10 June, 2014 (10.06.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/001219

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	FUKUNAGA A. et al., Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions, Protein Engineering, 2013.11.07, Vol.26, No.12, p.773-780	1-12
P,A	WO 2013/175678 A1 (Panasonic Corp.), 28 November 2013 (28.11.2013), (Family: none)	1-12
P,A	WO 2013/099043 A1 (Panasonic Corp.), 04 July 2013 (04.07.2013), & US 2013/0178606 A1	1-12
P,A	WO 2013/094080 A1 (Panasonic Corp.), 27 June 2013 (27.06.2013), & US 2013/0157296 A1	1-12

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12N15/09(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（I P C））

Int.Cl. C07K16/18, G01N33/53, C12N15/09

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 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）

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N) , J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I) , U n i P r o t / G e n e S e q

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
A	JP 2013-029441 A（パナソニック株式会社）2013.02.07,（ファミリーなし）	1-12
A	JP 2012-518418 A（アボット・ラボラトリーズ）2012.08.16, & US 2010/0216720 A1 & EP 2401292 A & WO 2010/099079 A1 & CN 102421795 A	1-12

☒ 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

の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

3 0 . 0 5 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

1 0 . 0 6 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

北村 悠美子

4 N

4 5 0 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

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
A	ALTSHULER E., Comparison of biochemical and immunochemical properties of the recombinant scFv and Fab fragments of antibodies ThIMAB specific to human cardiac troponin I, FEBS Journal, 2012, Vol.279, Suppl.1, p.335, P14-20	1-12
P, X	FUKUNAGA A. et al., Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions, Protein Engineering, 2013.11.07, Vol.26, No.12, p.773-780	1-12
P, A	WO 2013/175678 A1 (パナソニック株式会社) 2013.11.28, (ファミリーなし)	1-12
P, A	WO 2013/099043 A1 (パナソニック株式会社) 2013.07.04, & US 2013/0178606 A1	1-12
P, A	WO 2013/094080 A1 (パナソニック株式会社) 2013.06.27, & US 2013/0157296 A1	1-12