



(21)申請案號：111127964

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 07 月 26 日

(51)Int. Cl. : G01N33/53 (2006.01)

(30)優先權：2021/07/26 日本

2021-121812

(71)申請人：日商電化股份有限公司(日本) DENKA COMPANY LIMITED (JP)

日本

(72)發明人：石川晴登 ISHIKAWA, HARUTO (JP)；山本公隆 YAMAMOTO, KIMITAKA (JP)；

泉谷憲幸 IZUTANI, NORIYUKI (JP)；小笠原大輔 OGASAWARA, DAISUKE

(JP)；若林雪 WAKABAYASHI, YUKI (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：1 共 23 頁

(54)名稱

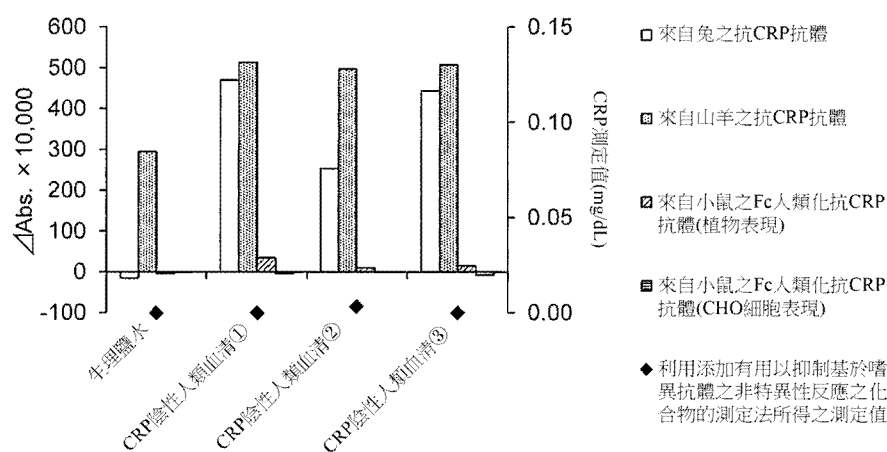
包含人類化抗體之試劑

(57)摘要

本發明提供一種使用能夠減少非特異性反應之抗體之試劑、抗原測定用套組及抗原之測定方法。

本發明之免疫學測定用試劑包含針對被測定物質之人類化抗體。

指定代表圖：



【圖1】



【發明摘要】

【中文發明名稱】

包含人類化抗體之試劑

【中文】

本發明提供一種使用能夠減少非特異性反應之抗體之試劑、抗原測定用套組及抗原之測定方法。

本發明之免疫學測定用試劑包含針對被測定物質之人類化抗體。

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

包含人類化抗體之試劑

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種人類化抗體、其片段(例如可變區及scFv等)、包含該人類化抗體或片段之偶聯物(融合蛋白等)、以及該人類化抗體或片段在診斷性及治療性預定位方法及組合物中之用途。本發明進而例如係關於一種該人類化抗體在用於疾病之處置及成像之慣用免疫治療及免疫診斷方法及組合物中的用途。

【先前技術】

【0002】 來自非人類動物之單株抗體對人類檢體中所含之免疫細胞或抗體具有免疫原性，故而有產生起因於此之非特異性反應之問題。

【0003】 此處，將人類血液中所存在之針對非人類動物抗體之抗體稱為嗜異抗體(嗜異性抗體)(Heterophilic antibodies)。於免疫學測定法中，多使用來自小鼠之單株抗體，因此確認到大量基於人類抗小鼠抗體(human anti-mouse antibodies: HAMA)之非特異性反應。人類檢體之10%左右包含HAMA。

【0004】 先前，於分析(assay)系統中添加有用以抑制基於嗜異抗體之非特異性反應之化合物(參照專利文獻1)。

先前技術文獻

專利文獻

【0005】 專利文獻1：日本專利特開2008-249738號公報

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0006】 鑒於上述情況，本發明提供一種使用能夠減少非特異性反應之抗體之試劑、抗原測定用套組及抗原之測定方法。

[解決問題之技術手段]

【0007】 本發明者等人發現，藉由使用人類化抗體，會使抗原抗體反應中之非特異性反應減少，從而完成了本發明。

【0008】 即，本發明如下所述。

[1] 一種免疫學測定用試劑，其包含針對被測定物質之人類化抗體。

[2] 如[1]之試劑，其中藉由人類化抗體抑制非特異性反應。

[3] 如[1]或[2]之試劑，其中人類化抗體為IgG。

[4] 如[1]或[2]之試劑，其中使用植物表現系製造人類化抗體。

[5] 如[1]至[4]中任一項之試劑，其用於診斷。

[6] 如[1]至[5]中任一項之試劑，其用於研究。

[7] 一種套組，其包含如[1]至[6]中任一項之試劑。

[8] 一種免疫學測定方法，其包括使針對被測定物質之人類化抗體與被測定物質接觸。

[9] 如[8]之免疫學測定方法，其中藉由人類化抗體抑制非特異性反應。

[10] 如[8]或[9]之免疫學測定方法，其中人類化抗體為IgG。

[11] 如[8]或[9]之免疫學測定方法，其中使用植物表現系製造人類化抗體。

[12] 一種抑制非特異性反應之方法，其係抑制免疫學測定法中之抗原抗體反應之非特異性反應之方法，使用針對被測定物質之人類化抗體。

[13] 如[12]之抑制非特異性反應之方法，其中藉由人類化抗體抑制非特異性反應。

[14] 如[12]或[13]之抑制非特異性反應之方法，其中人類化抗體為IgG。

[15] 如[12]或[13]之抑制非特異性反應之方法，其中使用植物表現系製造人類化抗體。

本說明書包含成為本案之優先權之基礎之日本專利申請編號2021-121812號的揭示內容。

[發明之效果]

【0009】 根據本發明，可提供一種藉由使用人類化抗體而能夠抑制非特異性反應之試劑。

【圖式簡單說明】

【0010】

圖1係表示使用添加有用以抑制基於嗜異抗體之非特異性反應之化合物之測定法及不添加用以抑制基於嗜異抗體之非特異性反應之化合物之測定法，利用使用來自兔之抗CRP抗體、來自山羊之抗CRP抗體或來自小鼠之人類化抗CRP抗體之試劑，測定生理鹽水及CRP陰性血清所得之結果的圖。

【實施方式】

【0011】 以下，詳細地說明本發明。

【0012】 於本發明中，於使用抗原抗體反應之免疫學測定法中，作為與被測定物質結合之抗體，使用人類化抗體。其結果為，能夠抑制因使用來自非人類動物之抗體所產生之基於針對非人類動物抗體之抗體的非特

異性反應。

【0013】 (試劑)

於第一實施方式中，本發明提供一種包含人類化抗體之試劑。

抗體具有如下結構，即包含2條相同重鏈及2條相同輕鏈之合計4條多肽鏈藉由雙硫鍵結合且配置為Y字型之結構。

【0014】 於本發明中使用之情形時，「抗體」只要為能夠與靶抗原特異性結合者，則並無特別限制，可為IgG、IgM、IgA、IgE、IgD之任一同型。作為人類之免疫球蛋白，已知有IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgM之9種4類之類型(同型)。本說明書中之IgG抗體之定義廣義上包括駱馬或駝羊等駱駝科動物中可見之僅包含重鏈之重鏈抗體(HCAb)。

【0015】 IgG包含2條重鏈(H鏈)及2條輕鏈(L鏈)。重鏈自N末端起依序包含可變區(VH)、第一恆定區(CH1)、第二恆定區(CH2)及第三恆定區(CH3)。輕鏈自N末端起依序包含可變區(VL)及恆定區(CL)。包含CH2及CH3之部分為Fc區。1條重鏈與1條輕鏈係藉由存在於CH1之半胱胺酸殘基及存在於CL之半胱胺酸殘基之雙硫鍵而結合。又，重鏈彼此係藉由存在於位於CH1與CH2之間之鉸鏈區之半胱胺酸殘基彼此之雙硫鍵而結合。

【0016】 抗體可為存在重鏈之IgG之片段，亦可為包含1條重鏈及1條輕鏈之rIgG(還原型IgG)，亦可為包含2條重鏈之片段，亦可為包含1條重鏈之片段。於存在2條重鏈之抗體中，至少一重鏈上結合有糖鏈即可，亦可兩重鏈上均結合有糖鏈。又，IgG之片段包含Fab、F(ab')₂、scFv、Fab'、單鏈免疫球蛋白等。IgG之片段係與作為靶抗原之被測出物質結合之片段，被稱為IgG之功能性片段。

【0017】 (本發明之人類化抗體)

本發明之人類化抗體係來自非人類動物抗體(典型地為小鼠)或來自嵌合抗體之抗體，其意指保持或實質上保持親抗體之抗原結合特性，但於人類中之免疫原性較弱之抗體。此處，所謂嵌合抗體，係指包含來自非人類動物抗體之可變區及人類抗體之恆定區之抗體。於本發明中，「人類化抗體」包含「嵌合抗體」。於本發明之人類化抗體中，重鏈恆定區包含CH1、CH2及CH3，輕鏈恆定區係 κ 或 λ 恆定區。

【0018】 例如，人類化抗體可藉由如下方式潛在地製造：(a)僅使非人類CDR(complementarity determining region，互補決定區)接枝於人類架構及恆定區(Jones等人，Nature 321: 522-25 (1986)； Verhoeyen等人，Science 239: 1534-1536 (1988))；或(b)為了將非人類可變域整體進行移植(為了保留配體結合特性)，且抑制免疫原性，藉由露出殘基之置換而使類人類表層「覆著」於此等(亦稱為「鑲飾」抗體(veneered antibodies))(Padlan, Molec. Immun. 28: 489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31 (3): 169-217 (1994))。將利用(a)之方法所製造之抗體稱為CDR移植抗體。

【0019】 本發明之又一特徵在於，將抗體之Fc部分人類化而製造。構成Fc部分之重鏈恆定區之例示序列如下所述。

【0020】 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR

EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK(序列編號1)

【0021】 本發明之人類化抗體只要與被測定物質結合即可，可於CDR以外之胺基酸序列、例如上述重鏈恆定區之胺基酸序列中，置換、缺失、附加及/或插入複數個胺基酸，例如可置換、缺失、附加及/或插入1個、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下、10個以下、15個以下、20個以下之胺基酸。此種人類化抗體之胺基酸序列與無置換、缺失、附加及/或插入之原本之胺基酸序列具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%以上相同之胺基酸序列。

【0022】 本發明之人類化抗體之來源並無限定，可為任意之哺乳類、例如人類、或小鼠、兔、大鼠、豚鼠、倉鼠、山羊、綿羊、駱駝等非人類動物。不僅可使用人類抗體，亦可使用人類化抗體、嵌合抗體等重組抗體。抗體可為多株抗體，亦可為單株抗體。

【0023】 本發明之人類化抗體例如可將編碼重鏈可變區之DNA、編碼重鏈恆定區之DNA、編碼輕鏈可變區之DNA及/或編碼輕鏈恆定區之DNA組入至表現載體，使用該載體將宿主細胞進行轉形並培養宿主細胞，藉此作為重組抗體進行製造。可將上述之編碼重鏈之DNA及編碼輕鏈之DNA導入至相同表現載體，使用該載體將宿主細胞進行轉形，亦可將編碼重鏈之DNA與編碼輕鏈之DNA插入至不同載體，使用2個載體將宿主細胞進行轉形。此時，亦可與啟動子、強化子、多聚腺苷酸化訊息等因子功能性連結。此處，所謂功能性連結，係指因子以發揮其功能之方式連

結。上述載體亦可包含編碼促進抗體自宿主細胞分泌之訊息肽之DNA，可於抗體產生後將訊息肽切斷而去除，從而作為成熟蛋白進行製造。作為宿主細胞，可使用動物細胞、細菌、酵母等，表現載體可使用各宿主細胞用之公知之表現載體。

【0024】 又，人類化抗體可藉由使用植物表現系而製作，亦可藉由使用基因重組植物而製作。作為植物瞬時表現系統，可藉由公知之方法進行。作為此種方法，例如可例舉：農桿菌滲入法、植物病毒載體法、magnICON(註冊商標)系統、及粒子槍法，並無特別限定。

【0025】 於使用農桿菌滲入法之情形時，利用上述載體將農桿菌進行轉形，使植物體感染該農桿菌，藉此可獲得表現上述蛋白質之植物體。

【0026】 於使用植物表現系之情形時，可以如下方式獲得表現人類化抗體之植物體。首先，由插入有編碼人類化抗體之DNA之植物病毒基因組之cDNA獲得RNA。繼而，將該RNA作為載體接種至植物體而使其感染。作為此種病毒載體，例如可例舉：菸草嵌紋病毒(TMV)載體、李痘病毒(PPV)載體、馬鈴薯X病毒(PVX)載體、紫花苜蓿嵌紋病毒(AIMV)載體、胡瓜嵌紋病毒(CMV)載體、豇豆嵌紋病毒(CPMV)載體、及筍瓜黃化嵌紋病毒(ZYMV)載體等。

【0027】 於使用magnICON(註冊商標)系統之情形時，可以如下方式獲得表現人類化抗體之植物體。首先，將插入有編碼人類化抗體之DNA之TMV或PVX基因組之cDNA導入至T-DNA載體內。繼而，使植物體感染所獲得之經T-DNA載體轉形後之農桿菌。

【0028】 所產生之抗體可藉由通常之蛋白質所使用之分離、純化方法進行純化。作為此種方法，可例舉：親和層析法、離子交換層析法或其

他層析法、超濾、鹽析、透析等。

【0029】 本發明包括免疫學測定法中所使用之試劑，其係體外診斷用醫藥品之類的診斷藥或檢查藥。試劑亦可包含用以穩定地保持抗體之緩衝液等。其他成分可由業者根據所使用之免疫學測定法適當決定。

【0030】 作為免疫學測定法，例如可例舉：免疫染色法(包含螢光抗體法、酵素抗體法、重金屬標記抗體法、放射性同位素標記抗體法)、將利用電泳法之分離與利用螢光、酵素、放射性同位素等之檢測方法組合而成之方法(包含西方墨點法、螢光二維電泳法)、酵素免疫測定吸附法(ELISA)、點漬墨法、乳膠凝集法(LA：Latex Agglutination-TurbidimetricImmunoassay)、免疫層析法等。

【0031】 作為要利用試劑進行檢測、定量之被測定物質，只要為蛋白質或多糖等抗原、或包含單糖、寡糖、胺基酸、肽、具有類固醇骨架之物質等低分子生理活性物質之半抗原、以及包含該等之細菌、病毒、寄生蟲等病原菌等與Fc缺損抗體結合之物質，則無任何限定。例如，於被測定物質為抗原之情形時，例如可例舉：CRP(C-反應蛋白)、前列腺特異抗原、鐵蛋白、 β -2微球蛋白、肌血球素、血紅蛋白、白蛋白、肌酐等蛋白質標記物；IgG、IgA、IgM等免疫球蛋白；各種腫瘤標記物；LDL(low density lipoprotein，低密度脂蛋白)、HDL(high density lipoprotein，高密度脂蛋白)、TG(thyroglobulin，甲狀腺球蛋白)等脂蛋白；A型流行性感感冒病毒、B型流行性感感冒病毒、RS病毒(RSV(respiratory syncytial virus，呼吸道融合性病毒))、鼻病毒、輪狀病毒、諾羅病毒、腺病毒、星狀病毒、HAV(Hepatitis A Virus，甲型肝炎病毒)、HBs(Hepatitis B surface，乙型肝炎表面抗原)、HCV(Hepatitis C Virus，丙型肝炎病毒)、

HIV(Human Immunodeficiency Virus，人類免疫缺陷病毒)、EBV(Epstein-Barr Virus，E-B病毒)等病毒抗原；沙眼披衣菌、溶血性鏈球菌、百日咳菌、幽門螺桿菌、鉤端螺旋體、梅毒螺旋體、弓形蟲、疏螺旋體、退伍軍人症嗜肺桿菌、炭疽菌、MRSA(methicillin-resistant staphylococcus aureus，耐甲氧苯青黴素金黃色葡萄球菌)等細菌抗原；細菌等所產生之毒素；黴漿菌脂質抗原；人類絨毛膜促性腺激素等肽激素；類固醇激素等類固醇；腎上腺素或嗎啡等生理活性胺；維生素類；前列腺素類；四環素等抗生素；農藥；環境激素等；但並不限定於該等。作為較佳例，可例舉：CRP、前列腺特異抗原、鐵蛋白、 β -2微球蛋白及血紅蛋白等抗原。

【0032】又，作為被測定物質，可例舉與如下抗原特異性反應之抗體等：上述之蛋白質標記物、各種腫瘤標記物、脂蛋白、病毒抗原、細菌抗原、細菌等所產生之毒素、肽激素、類固醇、生理活性胺類、維生素類、抗生素、農藥、環境激素等。又，作為被測定物質，亦可例舉生物體內所存在之IgE抗體等。該情形時，作為人類化抗體，使用針對上述抗體之抗體即可。

【0033】試劑係添加至來自需要確認被測定物質之有無等之受驗者之檢體。檢體只要為包含被測定物質者，則並無特別限定，可例舉：血液、血清、血漿、尿液、糞便、唾液、組織液、脊髓液、拭子液等體液等或其稀釋物，較佳為血液、血清、血漿、尿液、糞便、脊髓液或該等之稀釋物。

【0034】(套組)

於第二實施方式中，本發明提供一種包含上述試劑之套組。

套組可用於診斷、研究等。根據其使用目的，套組亦可不僅包含作為試劑之抗體，而且亦包含用以將人類化抗體固定之載體、或二級抗體。作為此種載體，較佳為不溶性載體，作為其例，例如可例舉：聚乙烯或聚苯乙烯等乳膠粒子、氧化鋁粒子、二氧化矽粒子、金膠體、磁性粒子等粒子。更具體而言，當為ELISA法(直接法、間接法、三明治法等)時，可使用微量盤作為不溶性載體，當為乳膠凝集法時，可使用乳膠等作為不溶性載體。就防止抗體與抗原之非特異性反應之觀點而言，較佳為於套組中包含阻斷劑。

【0035】 人類化抗體可藉由物理吸附等直接固定於載體，亦可經由化學交聯、例如連接子等間接固定。

【0036】 於直接法所使用之套組中，例如包含：作為包含人類化抗體之試劑之與抗原結合之酵素標記用抗體、用於酵素反應之受質、用於校準曲線製作或對照實驗之標準抗原等。

【0037】 於間接法所使用之套組中，例如包含：作為包含人類化抗體之試劑之與抗原結合之一級抗體、與一級抗體結合之二級抗體、用於酵素反應之受質、用於校準曲線製作或對照實驗之標準抗原等。二級抗體亦可被標記以便檢測。

【0038】 於三明治法所使用之套組中，例如包含：作為包含人類化抗體之試劑之與固相結合之抗體、酵素標記用抗體、用於酵素反應之受質、用於校準曲線製作或對照實驗之標準抗原等。酵素標記用抗體亦可為人類化抗體。

【0039】 於乳膠凝集法所使用之套組中，例如包含：作為包含人類化抗體之試劑之進行結合之檢測用抗體、用於校準曲線製作或對照實驗之

標準抗原、用以防止抗體與抗原之非特異性反應之阻斷劑等。

【0040】 (測定方法)

於第三實施方式中，本發明提供一種利用使用人類化抗體之抗原抗體反應的被測定物質之測定方法。

該方法可使用上述試劑或套組來進行，係基於上述免疫學方法之測定方法。

【0041】 (非特異性反應抑制方法)

於第四實施方式中，本發明提供一種使用人類化抗體之抑制抗原抗體反應之非特異性反應之方法。

【0042】 藉由使用人類化抗體，能夠抑制基於補體(C1q)、Fc受體、類風濕因子、嗜異抗體等非特異性反應因子之非特異性反應。基於Fc受體之非特異性反應係於檢體中包含針對抗體之Fc部位之受體之情形時出現之非特異性反應，基於類風濕因子之非特異性反應係基於針對抗體之Fc部位所出現之抗體之非特異性反應，基於嗜異抗體之非特異性反應係基於人類血液中所存在之針對非人類動物抗體之抗體的非特異性反應。此外，非特異性反應有時亦會因與所需抗原抗體反應無關之物質形成抗原抗體反應物或顯示交叉反應而產生，因此較佳為與業者公知之非特異性反應抑制方法併用。

【0043】 非特異性反應抑制方法包括使人類化抗體與檢體接觸之步驟。亦可於接觸步驟之前後包括任意之步驟。

【0044】 藉由使用人類化抗體，能夠抑制抗原抗體反應之非特異性反應，從而能夠準確地測定被測定物質。

實施例

【0045】 藉由以下之實施例具體地說明本發明，但本發明並不受該等實施例之限定。

【0046】 <抗CRP(C-反應蛋白)人類化抗體(植物表現)之製作>

1.載體製作及蛋白表現

作為將Fc區人類化而成之抗體，選擇來自小鼠之人類化抗CRP單株抗體(IgG)。

IgG之重鏈選殖於菸草嵌紋病毒(TMV)載體(Icon Genetics公司製造)，輕鏈選殖於馬鈴薯病毒X(PVX)載體(Icon Genetics公司製造)。將該等載體分別導入至不同之農桿菌進行轉形並培養後，使培養液之混合液浸潤至本生菸(Nicotiana Benthamian)之葉，約1週左右收穫。將所收穫之葉(感染葉)加以冷凍。

【0047】 2.純化

利用切碎攪拌機將經冷凍之感染葉進行破碎，添加重量比等量之緩衝液(100 mM Tris、250 mM NaCl、5 mM EDTA(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid，乙二胺四乙酸)、40 mM抗壞血酸鈉)，進而進行破碎。自切碎攪拌機回收感染葉破碎液，進行離心分離(5℃、15,000×g、30分鐘)並回收上清液。將該上清液利用0.45 μm過濾器進行過濾，利用蛋白A管柱層析法(Global Life Science Technology公司製造，MabSelect, SuRepcc)進行處理，藉此將來自植物之雜質及來自抗體之雜質分離去除。

【0048】 3.表現試驗

向感染葉添加3倍量之提取緩衝液(100 mM Tris、250 mM NaCl、5 mM EDTA)並利用珠磨機進行破碎，於冰上放置30 min後，進行離心分離(8,000×g、4℃、10分鐘)並回收上清液，利用SDS-PAGE(Sodium

Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis，十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳)進行分析。其結果為，作為將Fc區人類化而成之抗體，確認到來自小鼠之抗CRP抗體之表現。

【0049】 <抗CRP(C-反應蛋白)人類化抗體(CHO(Chinese Hamster Ovary，中國倉鼠卵巢)細胞表現)之製作>

1.載體製作及蛋白表現

作為將Fc區人類化而成之抗體，選擇來自小鼠之人類化抗CRP單株抗體(IgG)。

將IgG之重鏈及輕鏈選殖於pCHO1.0載體(Thermo Fisher Scientific股份有限公司製造)。藉由限制酶將該載體線性化後，轉染至Freedom™ CHO-S™(Thermo Fisher Scientific股份有限公司製造)。其後，依據Freedom™ CHO-S™ Kit USER GUIDE(Thermo Fisher Scientific股份有限公司製造)，獲得產生來自小鼠之人類化抗CRP單株抗體之CHO穩定表現純系。使用該純系以分批補料(Fed-batch)培養之方式培養14天，回收自該培養液去除細胞後之液體。

【0050】 2.純化

將去除細胞後之液體進行離心分離(4℃、15,000×g、10分鐘)並回收上清液。將該上清液利用0.22 μm過濾器進行過濾，利用蛋白A管柱層析法(Global Life Science Technology 公司製造，HiTrap™ MabSelect SuRe™)進行處理，藉此將來自CHO細胞之雜質分離去除。

【0051】 3.表現試驗

將去除細胞後之液體利用0.22 μm過濾器進行過濾，並利用SDS-PAGE進行分析。

其結果為，作為將Fc區人類化而成之抗體，確認到來自小鼠之人類化抗CRP抗體之表現。

【0052】 <利用添加有用以抑制基於嗜異抗體之非特異性反應之化合物之測定法的CRP陰性人類血清之測定>

(1)試劑之製備

使用針對CRP之抗體，以如下方式製備基於免疫凝集法之測定試劑。

i)使來自兔之抗CRP多株抗體相對於聚苯乙烯乳膠懸浮液1 mL擔載0.26 mg而製成致敏粒子，使該致敏粒子以成為0.18(w/v)%之方式懸浮於緩衝液(甘胺酸、pH值7.3)，製備乳膠懸浮液。

ii)準備緩衝液(甘胺酸、pH值7.0)。

【0053】 (2)標準液之製備

使用CRP，製備用於製作校準曲線之標準液。

【0054】 (3)利用自動分析裝置之測定

自動分析裝置係藉由日立公司7180型自動分析裝置利用終點法進行自動測定。

【0055】 使用上述試劑，進行生理鹽水及3個檢體之CRP陰性人類血清(由Golden West Biologicals市售)之測定。於檢體溶液2.5 μ L中添加緩衝液(甘胺酸、pH值7.0)125 μ L，將該混合液於37°C下攪拌混合。放置5分鐘後，添加乳膠懸浮液125 μ L，進而於37°C下攪拌混合。測定約3分鐘之凝集反應作為吸光度變化量，根據使用標準液所製作之校準曲線算出各檢體之CRP濃度(表1、圖1)。

【0056】 [表1]

檢體	CRP濃度(mg/mL)
生理鹽水	0.00
CRP陰性人類血清①	0.00
CRP陰性人類血清②	0.00
CRP陰性人類血清③	0.00

【0057】 <利用不添加用以抑制基於嗜異抗體之非特異性反應之化合物之測定法的CRP陰性人類血清之測定>

(1)試劑之製備

使用針對CRP之抗體，以如下方式製備基於免疫凝集法之測定試劑。

i)使來自兔之抗CRP多株抗體相對於聚苯乙烯乳膠懸浮液1 mL擔載0.26 mg而製成致敏粒子，使該致敏粒子以成為0.18(w/v)%之方式懸浮於緩衝液(甘胺酸、pH值7.3)，製備乳膠懸浮液。

ii)準備使用有來自山羊之抗CRP多株抗體之「N-Assay LA CRP-T Nittobo」(Nittobo Medical股份有限公司)之乳膠試液(抗人類CRP山羊多株抗體致敏乳膠粒子)。

iii)使來自小鼠之人類化抗CRP抗體(植物表現)相對於聚苯乙烯乳膠懸浮液1 mL擔載0.11 mg而製成致敏粒子，使該致敏粒子以成為0.15(w/v)%之方式懸浮於緩衝液(甘胺酸、pH值7.3)，製備乳膠懸浮液。

iv)使來自小鼠之人類化抗CRP抗體(CHO細胞表現)相對於聚苯乙烯乳膠懸浮液1 mL擔載0.11 mg而製成致敏粒子，使該致敏粒子以成為0.16(w/v)%之方式懸浮於緩衝液(甘胺酸、pH值7.3)，製備乳膠懸浮液。

v)準備緩衝液(磷酸、pH值7.4)。

【0058】 (2)利用自動分析裝置之測定

自動分析裝置係藉由日立公司7180型自動分析裝置利用終點法進行

自動測定。

【0059】 使用上述試劑，進行生理鹽水及3個檢體之CRP陰性人類血清(由Golden West Biologicals市售)之測定。於檢體溶液3.0 μ L中添加緩衝液(磷酸、pH值7.4)240 μ L，將該混合液於37°C下攪拌混合。放置5分鐘後，添加乳膠懸浮液36 μ L，進而於37°C下攪拌混合。測定約90秒之凝集反應作為吸光度變化量(圖1)。

【0060】 如圖1所示，若利用不添加用以抑制基於嗜異抗體之非特異性反應之化合物之測定法來測定如下檢體，即於利用添加有用以抑制基於嗜異抗體之非特異性反應之化合物之測定法進行測定時，CRP測定值為0.00 mg/mL之檢體，則利用使用來自兔之抗CRP抗體及來自山羊之抗CRP抗體之試劑，相對於生理鹽水獲得較大之吸光度變化量。另一方面，來自小鼠之人類化抗CRP抗體獲得了與生理鹽水接近之吸光度變化量。由於認為若CRP測定值為0.00 mg/mL，則吸光度變化量取與生理鹽水接近之值，故而判斷使用來自兔之抗CRP抗體之試劑於檢體測定時產生了非特異凝集。相對於此，由於來自小鼠之人類化抗CRP抗體獲得了與生理鹽水接近之吸光度變化量，故而認為使用來自小鼠之人類化抗CRP抗體及來自山羊之抗CRP抗體之試劑於利用不添加用以抑制基於嗜異抗體之非特異性反應之化合物之測定法來測定檢體時不易產生非特異凝集。

[產業上之可利用性]

【0061】 藉由本發明之方法，能夠準確地測定人類血液中之被測定物質。

本說明書中所引用之所有刊物、專利及專利申請均直接藉由引用而併入至本說明書中。

【序列表】

<110> 日商電化股份有限公司(Denka Company Limited)

<120> 包含人類化抗體之試劑

<130> PU006805W001

<150> JP 2021-121812

<151> 2021-07-26

<160> 1

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
115				120				125							
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
130				135				140							
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145				150				155				160			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
165				170				175							
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
180				185				190							
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
195				200				205							
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
210				215				220							
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225				230				235				240			
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
245				250				255							
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
260				265				270							
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
275				280				285							
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
290				295				300							
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種免疫學測定用試劑，其包含針對被測定物質之人類化抗體。

【請求項2】

如請求項1之試劑，其中藉由人類化抗體抑制非特異性反應。

【請求項3】

如請求項1或2之試劑，其中人類化抗體為IgG。

【請求項4】

如請求項1或2之試劑，其中使用植物表現系製造人類化抗體。

【請求項5】

如請求項1或2之試劑，其用於診斷。

【請求項6】

如請求項1或2之試劑，其用於研究。

【請求項7】

一種套組，其包含如請求項1至6中任一項之試劑。

【請求項8】

一種免疫學測定方法，其包括使針對被測定物質之人類化抗體與被測定物質接觸。

【請求項9】

如請求項8之免疫學測定方法，其中藉由人類化抗體抑制非特異性反應。

【請求項10】

如請求項8或9之免疫學測定方法，其中人類化抗體為IgG。

【請求項11】

如請求項8或9之免疫學測定方法，其中使用植物表現系製造人類化抗體。

【請求項12】

一種抑制非特異性反應之方法，其係抑制免疫學測定法中之抗原抗體反應之非特異性反應之方法，使用針對被測定物質之人類化抗體。

【請求項13】

如請求項12之抑制非特異性反應之方法，其中藉由人類化抗體抑制非特異性反應。

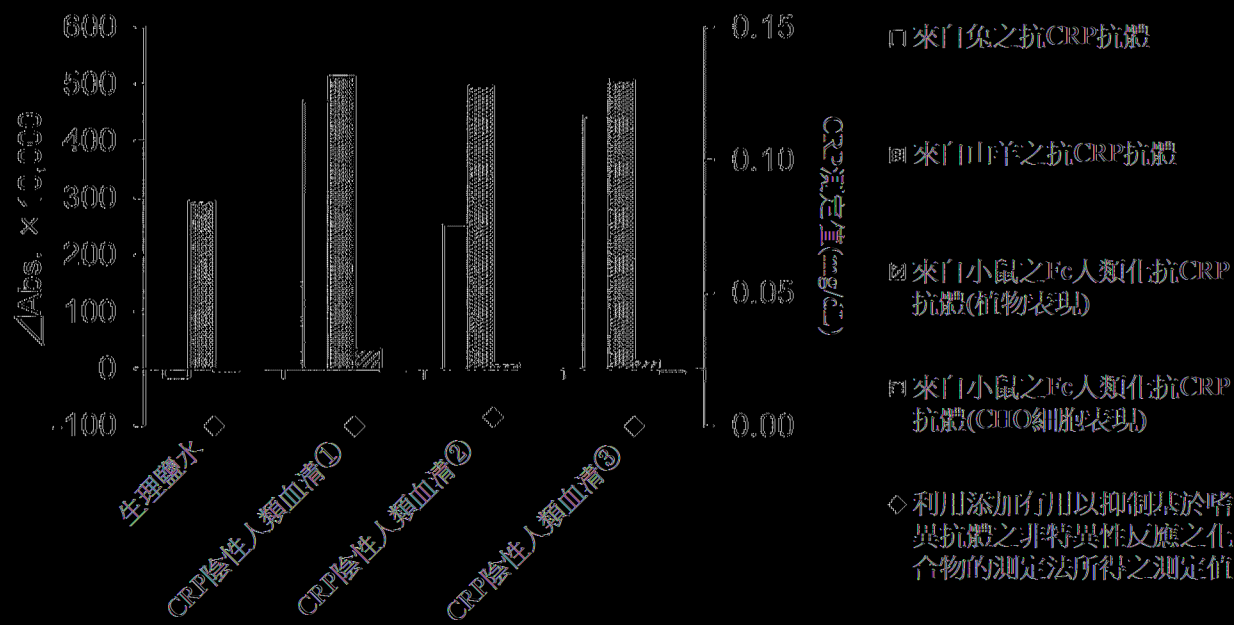
【請求項14】

如請求項12或13之抑制非特異性反應之方法，其中人類化抗體為IgG。

【請求項15】

如請求項12或13之抑制非特異性反應之方法，其中使用植物表現系製造人類化抗體。

|(發明圖式)|



|(圖1)|