(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
2012 年 6 月 28 日(28.06.2012)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/086750 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/00 (2006.01) *G01N 33/531* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/079799

(22) 国際出願日: 2011 年 12 月 22 日(22.12.2011)

(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 2010-286462 2010 年 12 月 22 日(22.12.2010) JP
特願 2011-270273 2011 年 12 月 9 日(09.12.2011) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東ソー株式会社(TOSOH CORPORATION) [JP/JP]; 〒7468501 山口県周南市開成町４５６０番地 Yamaguchi (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小崎 慎矢(KOZAKI, Shinya) [JP/JP]; 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川２７４３番地１ 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP). 新谷 晃司(SHINTANI, Koji) [JP/JP]; 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川２７４３番地１ 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平川 明, 外(HIRAKAWA, Akira et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋３丁目４番１０号 アクロポリス２１ビル６階 Tokyo (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, 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, IS, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

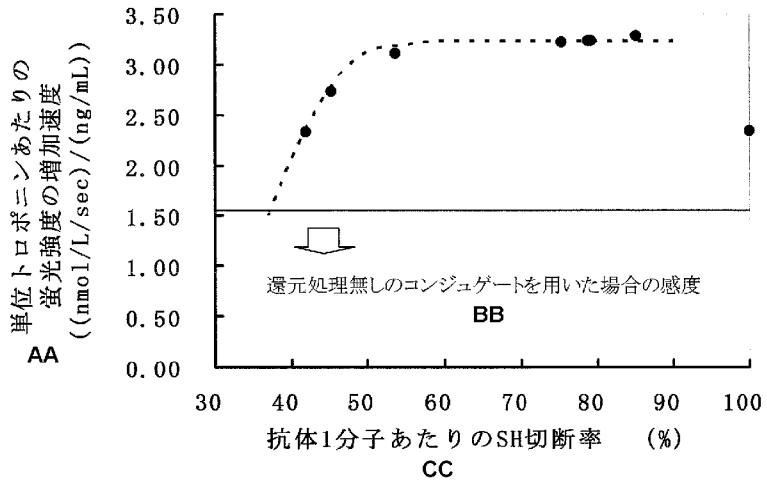
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[続葉有]

(54) **Title**: ANTIBODY

(54) 発明の名称 : 抗体

[図3]



AA Rate of increase in fluorescence intensity per unit troponin ((nmol/L/sec)/(ng/mL))
BB Sensitivity when conjugate that has not been reduced is used
CC SH cleavage ratio per molecule of antibody (%)

(57) **Abstract**: [Problem] To provide an antibody to which a labeling substance or the like can be bound without deteriorating or losing an antigen-binding capability of the antibody. [Solution] An IgG antibody having the following characteristic properties: (1) some of disulfide bonds in the molecule are cleaved and reduced into thiol groups; (2) the molecular weight is not reduced by the cleavage of the disulfide bonds; and (3) the antigen-binding capability is retained.

(57) 要約: 抗原結合能の低下又は喪失を招くことなく、標識物質等を結合することが可能な抗体を提供すること。（１）分子中の一部のジスルフィド結合が切断され、チオール基に還元されている、（２）ジスルフィド結合の切断によって低分子化していない、及び、（３）抗原結合能を保持している、との特徴を有する、ＩｇＧ型抗体により課題を解決する。

WO 2012/086750 A1

MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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

発明の名称 ： 抗体

技術分野

[0001] 本発明は、抗体に関するものである。

背景技術

[0002] 抗体（抗体分子）は、種々の分野で使用されている。例えば液体クロマトグラフィーの分野では、血中の有用なタンパク質を特異的に認識する抗体を結合した担体がアフィニティークロマトグラフィーに使用されている。また免疫測定の分野では、抗体を検出可能な標識物質に結合した標識抗体や、抗体を水不溶性の担体に結合した固相化抗体が使用されている。

[0003] 免疫測定は、一般的に抗原抗体反応を利用して測定対象となる抗原（抗体により特異的に認識される物質）を検出又は定量する方法であり、臨床診断の分野で広く使用されている。免疫測定の一種である、いわゆるサンドイッチ法では、抗体に酵素や化学物質等の検出可能な標識物質を結合した標識抗体と、抗体を水不溶性の担体に固定化した固相（固相化抗体）を使用して、「固相化抗体－測定対象抗原－標識抗体」という免疫複合体を形成させ、いわゆるＢ／Ｆ（Ｂｏｕｎｄ／Ｆｒｅｅ）分離操作によって固相を液相と分離し、その後に固相又は液相中の標識物質の量を検出し、検出値に基づいて測定対象抗原の存在及び／又は存在量を測定する。また免疫測定においては、アビジンやビオチン等の特異的結合ペアの一方を抗体に結合し、他方を担体に結合して固相化抗体を製造することもある。

[0004] 免疫測定において使用する標識抗体は、通常、抗体（例えばＩｇＧ型の抗体）をＳ－アセチルメルカプト無水コハク酸（ＳＭＣＣ）で処理することで、抗体を形成するペプチド鎖中のアミノ基にチオール基（ＳＨ基）を導入し、これを予め活性ジスルフィド基を導入した標識物質と反応させることで製造する。しかしこの方法では、ＳＨ基導入の過程で、ＳＭＣＣが抗体を形成するペプチド鎖中のアミノ基に対してランダムに反応するため、抗体の抗原

結合能が低下し、又、希ではあるが抗体の抗原結合能が失われることがある。

[0005] 従来、上記のような課題が発生する場合には、抗体をペプシンやパパイン等の消化酵素で処理して低分子化し、生じたＦａｂフラグメント又はＦ（ａｂ’）２フラグメント中に残存するジスルフィド結合（ＳＳ結合）を還元処理することでＳＨ基を生じさせ、これを予めマレイミドと結合した標識物質と反応させることが行われている（マレイミド・ヒンジ法）。しかしこの方法でも、ＩｇＧ型抗体の場合、Ｈ鎖やＬ鎖を連結しているＳＳ結合の切断により抗体のコンフォーメーションの変化が引き起こされ、抗体の抗原結合能が低下し、又、希ではあるが抗体の抗原結合能が失われることもある。

[0006] 上記のような課題は抗体に標識物質を結合する場合に限られず、抗体を担体に結合する場合や、抗体にアビジンやビオチンといった結合ペアの一方を結合する場合にも同様である。

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、抗原結合能の低下又は喪失を招くことなく、標識物質等を結合することが可能な抗体を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、鋭意検討の末、抗体を低分子化させずに一部のジスルフィド結合（ＳＳ結合）を切断することで、抗原結合能を保持し、且つ、標識物質等を結合することが可能な抗体を製造できることを見出し、本発明を完成させた。

[0009] すなわち、本発明は以下の態様を包含する。

[0010] [１]

以下（１）から（３）の特徴を有するＩｇＧ型抗体。

（１）分子中の一部のジスルフィド結合（ＳＳ結合）が切断され、チオール基（ＳＨ基）に還元されている、

（２）ＳＳ結合の切断によって低分子化していない、及び、

（３）抗原結合能を保持している。

［２］

以下（１）から（３）の特徴を有するＩｇＧ型抗体。

（１）分子中の一部のＳＳ結合が切断され、この切断されて生じたＳＨ基を利用して他の物質が結合されている、

（２）ＳＳ結合の切断によって低分子化していない、及び、

（３）抗原結合能を保持している。

［３］

ＳＳ結合切断率が４０％以上１００％未満である、前記ＩｇＧ型抗体。

発明の効果

［0011］ 本発明によれば、

（１）分子中の一部のジスルフィド結合（ＳＳ結合）が切断され、チオール基（ＳＨ基）に還元されている、

（２）ＳＳ結合の切断によって低分子化していない、及び、

（３）抗原結合能を保持している、

という特徴を有する抗体が提供される。この抗体は、ＳＳ結合の一部が切断されているとはいえ、ＳＳ結合が切断される前と比較して低分子化していない、すなわち、ＳＳ結合が切断される前と同様の多量体構造を維持している。そのため、この抗体は、抗原結合能を失っておらず、かつ、標識物質等を結合することが可能なＳＨ基を有している。従って本発明の抗体は、免疫測定で使用する標識抗体を製造する材料として特に有利なものである。加えて本発明の抗体は、広く一般に入手可能な還元剤を使用して安価かつ短時間で製造することが可能であり、しかも、還元処理の操作自体も還元剤を使用する等により簡便に実施可能である。

図面の簡単な説明

［0012］［図1］実施例１の方法で還元処理した抗体とインタクト抗体をゲルろ過クロマトグラフィーに供した際のクロマトグラムである。本図から、実施例１で採用した条件での還元処理では、インタクト抗体と比較して、低分子化がほと

んど生じていないことが分かる。

[図2]ジスルフィド結合（ＳＳ結合）を完全に還元した抗体とＳＳ結合の一部を還元した抗体をゲルろ過クロマトグラフィーに供した際のクロマトグラムである。本図から、ＳＳ結合を完全に還元した抗体は、インタクト抗体と比較して、低分子化により溶出時間が変化していることが分かる。

[図3]ＳＳ結合の一部を還元した抗体およびＳＳ結合を完全に還元した抗体の測定感度を比較した結果を示す図である。本図から、ＳＳ結合の一部を還元した抗体から作製した標識抗体（コンジュゲート）を用いた免疫反応試薬の感度が、インタクト抗体から作製した標識抗体（コンジュゲート）を用いた免疫反応試薬の感度よりも高値を示すことが分かる。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0014] 本発明の抗体は、以下（１）から（３）の特徴を有するＩｇＧ型抗体である。

（１）分子中の一部のジスルフィド結合（ＳＳ結合）が切断され、チオール基（ＳＨ基）に還元されている、

（２）ＳＳ結合の切断によって低分子化していない、及び、

（３）抗原結合能を保持している。

[0015] 本発明の抗体は、ＩｇＧ型抗体に対してゆるやかな還元処理をして製造し得る。ＩｇＧ型抗体は、ラクダＩｇＧ抗体等、特殊なものを除き、二本のＨ鎖（重鎖）と二本のＬ鎖（軽鎖）からなり、Ｈ鎖－Ｌ鎖間がそれぞれ１個以上のＳＳ結合で連結される一方、Ｈ鎖同士もまた複数のＳＳ結合によって連結されている（以下、天然形態のＩｇＧ型抗体を、「インタクト抗体」という）。よって、インタクト抗体を後述するような手法で還元処理することにより、抗体分子中の一部のジスルフィド結合（ＳＳ結合）が切断され、チオール基（ＳＨ基）に還元される。

[0016] 本発明の抗体を製造するのに用いるインタクト抗体としては、ヒト、サル、ウサギ、イヌ、ヒツジ、マウス、ラット、ラクダ等、由来する動物種の区

別無く、またそのサブクラスの制限無く使用することができる。また抗体の種類としてはモノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であっても良く、また更には遺伝子組換え（リコンビナント）の手法により製造されたＩｇＧ型抗体（本明細書においては、便宜上、当該抗体もインタクト抗体と記載する）であっても良い。インタクト抗体は、例えば、公知の手法により製造できる。また、インタクト抗体としては、市販品を用いてもよい。なお、後述する還元処理の前に、適切な精製操作を行なって夾雑物を除去しておくことが好ましい。

[0017] 還元処理は、インタクト抗体の一部のＳＳ結合を切断し、その切断によってインタクト抗体を低分子化することがなく、かつ処理後の抗体が抗原結合能を維持する、即ち、インタクト抗体の二本のＨ鎖間の全ＳＳ結合を切断することのなく、Ｈ鎖とＬ鎖間の全ＳＳ結合を切断することのなく、かつ処理後の抗体が抗原結合能を維持するものであれば良い。本発明において、「ＳＳ結合の切断によって低分子化していない」とは、ＳＳ結合の切断後の抗体がインタクト抗体と同等の分子量を有することをいい、言い換えれば、ＳＳ結合の切断後の抗体がＨ鎖２分子およびＬ鎖２分子からなる４量体構造を維持していることをいう。例えばＨ鎖間の全ＳＳ結合が切断されればＨ鎖間の連結が解かれ、インタクト抗体は２分子化し、各分子はなお抗原結合能を保持するとしても、その分子量は１／２になり、低分子化してしまう。またいずれかのＨ鎖とＬ鎖間の全ＳＳ結合が切断されれば鎖間の連結は解かれ、いずれか一方の分子はなお抗原結合能を保持するとしても、分子量は低分子化してしまう。なお、このような低分子化した抗体を総称して、以下、「低分子抗体」と記載する場合がある。

[0018] 本発明の抗体を製造するための方法としては、還元剤を用いた還元処理が例示できる。還元剤としては、２－メルカプトエチルアミン、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、β－メルカプトエタノール、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ）等、一般に入手可能な還元剤を使用することができる。還元剤による還元処理は、抗体の抗原結合能を低下せず、

かつ、還元処理を阻害しない緩衝剤によって適切なｐＨに調製した緩衝液中で実施すれば良い。そのような緩衝液として例えば、リン酸緩衝液、トリスヒドロキシメチルアミノメタン（Ｔｒｉｓ）緩衝液、グリシン緩衝液であって、ｐＨがｐＨ６．０からｐＨ７．５、好ましくはｐＨ６．５から７．０の緩衝液があげられる。特に、本発明の抗体を製造した後、引き続き後述するような標識物質の結合を行なう場合であって、その際にマレイミドを使用する場合には、マレイミドの加水分解を防止するためにｐＨを中性付近、具体的にはｐＨ６．０からｐＨ７．０とすると好ましい。上記緩衝液には、ＳＨ基の酸化を抑制するため、ＥＤＴＡやＥＧＴＡ等の酸化防止剤を更に添加すると好ましい。

[0019] 本発明の抗体を前記したような還元剤を用いた還元処理によって製造する場合、温度条件として４℃から４０℃、好ましくは３５℃から３７℃の範囲を選択する。還元反応時間としては温度条件によって異なるが、４℃から８℃の場合、８時間から３６時間、好ましくは１２時間から２４時間の範囲を選択し、３５℃から３７℃の場合、６０分から２４０分、好ましくは９０分から１８０分の範囲を選択し、かつ、単に溶液を室温放置して処理する方法等が例示できる。また還元剤を用いる場合、還元処理温度や処理時間のみならず、処理されるべきインタクト抗体と還元剤のモル比の制御も重要である。上記例示した還元剤のうち、例えば、２－メルカプトエチルアミンを用いる場合であって、上記例示したｐＨ、温度及び反応時間で処理を行なう場合、インタクト抗体のモル濃度１に対し、還元剤のモル濃度は３０，０００から１，５００，０００とすると好ましい。

[0020] 本発明の抗体の具体的な形態は、インタクト抗体としてマウス由来の抗体を例に説明すれば、少なくともＨ鎖とＬ鎖間のＳＳ結合の一部が切断されたものと、少なくともＨ鎖同士のＳＳ結合の一部が切断されたものの二種類である。いずれのものも、低分子化（インタクト抗体からの、当該抗体を構成するペプチド鎖の脱離）が生じていないため、例えば上記還元処理を行なった後にゲルろ過クロマトグラフィーに供する等して、インタクト抗体と同様

の溶出時間で溶出するピークを取得する等することで回収できる。

[0021] すなわち、本発明において、例えば、ＳＳ結合の切断によりインタクト抗体の一部の分子が低分子化した場合、必要により、低分子化していない抗体分子を処理物から適宜精製することができる。精製は、例えば、ゲルろ過クロマトグラフィー等の公知の手法により行うことができる。具体的には、例えば、精製物中の全抗体分子の内、８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、特に好ましくは９９％以上の抗体分子が、低分子化していない抗体分子となるように精製してもよい。なお、例えば、８０％以上の抗体分子が低分子化していない抗体分子であるとは、言い換えれば、精製物中の全抗体分子の内、インタクト抗体に換算して２０％未満の抗体分子が低分子抗体でありうることを意味する。

[0022] 本発明において、「抗原結合能を保持している」とは、本発明の抗体が抗原と結合できる限り特に制限されないが、例えば、インタクト抗体と同等以上の抗原結合能を有していることであってもよい。「インタクト抗体と同等以上の抗原結合能を有している」とは、具体的には、例えば、インタクト抗体と比較して、８０％以上、好ましくは１００％以上、より好ましくは１５０％以上の抗原結合能を有していることであってもよい。抗体が抗原結合能を保持しているか否かは、例えば抗体と抗原とを混合した後にゲルろ過クロマトグラフィーに供する等して抗原と免疫複合体を形成したことを試験すれば確認できる。

[0023] 本発明において、ＳＳ結合切断率は、分子中の一部のＳＳ結合が切断されている限り特に制限されないが、本発明の抗体の好ましい態様として、ＳＳ結合切断率が４０％以上１００％未満の抗体があげられる。なお本明細書において、ＳＳ結合の切断率とは、１分子のインタクト抗体のうち還元処理によって切断されたＳＳ結合数を、１分子のインタクト抗体に存在するＳＳ結合の総数で除した値である。ＳＳ結合の切断率は、例えば、ＳＨ基を検出する公知の手法を利用して算出することができる。具体的には、例えば、ＳＳ結合の切断率は、５，５－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）（ＤＴＮＢ）

等ＳＨ基に反応する試薬を用いて定量することができる。

[0024] 以上に説明した本発明の抗体は、その分子中の一部のＳＳ結合が切断されているが、本発明者らの知見によれば、インタクト抗体と比較して抗原との結合能が向上する場合がある。これは、インタクト抗体のＦｃ部分に存在するＳＳ結合の一部が切断された結果、インタクト抗体が有する２つの抗原結合部位の立体構造上の自由度が増し、より自由に抗原と反応可能になったからと推測される。なお、還元処理を行なった抗体に関しては、後述する他の物質を結合する操作に供する場合を除き、還元処理により切断されたＳＨ基のＳＳ再結合を防止するための処理（キャッピング）を行なうと好ましい。キャッピングは、例えばＮ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）等を使用することにより容易に行なうことができる。

[0025] 本発明の抗体は、以上に説明した還元処理によって分子中の一部のＳＳ結合が切断され、ＳＨ基を露出している。そこで本発明では、このＳＨ基を利用して、他の物質、例えば標識物質等を本発明の抗体に結合させることが可能である。結合させる物質としては、後述するＳＨ基との結合性を有する結合剤に結合可能なものであれば制限はない。結合させる物質としては、例えば、免疫測定で標識物質として使用されている酵素、化学発光物質、蛍光物質、および呈色物質等、免疫測定で使用される担体、アビジンやビオチン等の特異的な結合ペアの一方、そして液体クロマトグラフィー用担体等が例示できる。中でも、抗原との高い反応性が要求される免疫測定を実施するため、本発明の抗体に上記標識物質を結合させて標識抗体とすると特に好ましい。

[0026] ＳＨ基を利用して、還元処理した抗体と上記物質とを結合することは、例えば、公知の手法により行うことができる。具体的には、例えば、還元処理した抗体と上記物質とを結合するためには、ＳＨ基と特異的に結合する結合試薬として、マレイミド基を有する試薬やブロモアセトアミド基を有する試薬等を使用すれば良い。マレイミド系試薬としては、例えば入手の容易性等の観点から、Ｎ－スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シク

ロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）が特に好ましい結合試薬としてあげられる。このようにして標識物質等を結合させた後には、還元処理により切断されたＳＨ基であって、かつ結合剤が結合しなかったＳＨ基のジスルフィド再結合を防止するため、キャッピングを行なうことが好ましい。

[0027] 標識物質等を結合した抗体を得るには、例えばゲルろ過クロマトグラフィーに供する等して、結合の操作に供する前の抗体と比較してより高分子化したピークを取得する等すれば良い。またそのようにして得た抗体が抗原との反応性を保持しているか否かは、例えば標識物質を結合した場合には免疫測定における標識抗体として使用し、既知量の抗原をサンプルとして免疫測定を実施すれば、抗原と免疫複合体を形成することを通じて確認できる。

実施例

[0028] 以下実施例により本発明の一実施形態を説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0029] 実施例１　還元処理酵素標識抗体を用いた心筋トロポニンＩ測定用免疫反応試薬の評価

（１）標識抗体の製造

ウシ小腸由来アルカリ性ホスファターゼ（ＡＬＰ）１５ｍｇを、１ｍＭ塩化マグネシウムおよび０．１ｍＭ塩化亜鉛を含むｐＨ７．６の５０ｍＭほう酸緩衝液にて一晩透析した。Ｎ－スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミドで２．８５ｍＭになるよう溶解し、前記透析したＡＬＰ溶液に１０ｖｏｌ％になるように添加した後、３０℃で９０分間反応させた。反応後、ゲルろ過用カラム（ＴＳＫ－ＧＥＬ　Ｇ２０００ＳＷ、東ソー株式会社製）にてＳＭＣＣが導入されたＡＬＰ（「ＳＭＣＣ導入ＡＬＰ」ともいう）を分取した。

[0030] 抗心筋トロポニンＩ　マウスモノクローナル抗体（「ＩｇＧ型インタクト抗体」ともいう；Ｈｙｔｅｓｔ社製）５ｍｇを、５ｍＭ　ＥＤＴＡを含むｐＨ６．０の１００ｍＭリン酸緩衝液にて一晩透析した。２－メルカプトエチ

ルアミン塩酸塩（２－ＭＥＡ）をｐＨ６．０の１００ｍＭリン酸緩衝液で２００ｍＭになるように溶解し、透析後の抗体に５ｖｏｌ％になるように添加して、３７℃で２４０分間、還元処理を行なった。還元処理後の抗体（「還元処理抗体」ともいう）を前記ゲルろ過用カラムに供し、インタクト抗体と同一の溶出時間に出現したピーク画分を分取した。この時のクロマトグラムを図１に示す。図１に示されるように、還元処理抗体がインタクト抗体と同一の溶出時間（９．６分）で溶出することから、還元処理による低分子量化が生じていないことが分かる。

[0031] 以上のようにして取得した還元処理抗体１ｍｇに対し、ＳＭＣＣ導入ＡＬＰ２．５ｍｇを混合し、４℃で一晩反応させた。反応後、ゲルろ過用カラム（ＴＳＫ－ＧＥＬ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ、東ソー株式会社製）にてＳＭＣＣ導入ＡＬＰが結合した還元処理抗体を取得した。

[0032] 比較のため、還元処理していないインタクトの抗心筋トロポニンＩ抗体を用いて、同様の手法でアルカリ性ホスファターゼ標識抗心筋トロポニンＩ抗体（「比較抗体」ともいう）を得た。

[0033] （２）心筋トロポニンＩ測定試薬の作製

上記（１）で使用したインタクト抗体とは異なる部位で心筋トロポニンＩと結合する市販の抗体を水不溶性担体に結合し、上記（１）で製造したＳＭＣＣ導入ＡＬＰが結合した還元処理抗体を加えて凍結乾燥し、心筋トロポニンＩ測定試薬を作製した。同様にして、比較抗体を加えて凍結乾燥し、比較試薬を製造した。

[0034] （３）心筋トロポニンＩ測定試薬の評価

上記（２）で製造した心筋トロポニンＩ測定試薬と比較試薬を、免疫測定装置（ＡＩＡ－１８００、東ソー株式会社製）に供して免疫測定を行なった。測定サンプルとして、既知量の心筋トロポニンＩを含む標準品セット（Ｅテスト「ＴＯＳＯＨ」ＩＩ（ｃＴｎＩ３）、東ソー株式会社製）を用い、３７℃で１０分間反応させた。Ｂ／Ｆ分離操作の後、ＡＬＰの基質である４－メチルウンベリフェリルリン酸（４ＭＵＰ）を加え、ＡＬＰによって４ＭＵ

Ｐが分解されて生成する４－メチルウンベリフェロン（４ＭＵ）の増加速度（ｎｍｏｌ／秒）を、４ＭＵからの蛍光強度を測定して算出した。この増加速度は試薬中の抗体とサンプル中の心筋トロポニンＩの反応性及びサンプル中の心筋トロポニンＩの量に比例している。また、サンプルは既知濃度の心筋トロポニンＩを含んでいるため、任意の２点の濃度における蛍光強度の増加速度の差を心筋トロポニンＩの濃度の差で割ることで、単位心筋トロポニンＩあたりの蛍光強度の増加速度を算出することができる。算出された数値は感度と同義であるため、２種類の試薬の数値を比較することで、感度の比較を行なった。

[0035] 結果を表１及び表２に示す。表１は各心筋トロポニンＩ濃度における蛍光強度の増加速度を、表２は表１から算出した単位心筋トロポニンＩあたり蛍光強度の増加速度、すなわち感度をそれぞれ示す。表２から分かるように、本発明の抗体（還元処理抗体）を標識抗体とした試薬は、インタクト抗体を標識抗体とした試薬と比較して約２倍の感度を有していた。

[0036] [表1]

表1

標準品	心筋トロポニンI 濃度 [ng/mL]	蛍光強度の増加速度 [nmol/L/sec]	
		インタクト抗体	還元処理抗体
(1)	0	0.0768	0.1338
(2)	0.188	0.3675	0.7190
(3)	1.047	1.624	3.218
(4)	4.92	7.869	15.06
(5)	19.4	34.00	63.59
(6)	57.5	113.7	205.0

[0037]

[表2]

表2

標準品	心筋トロポニンI濃度 [ng/mL]	単位トロポニンあたりの蛍光強度の増加速度 [(nmol/L/sec)/(ng/mL)]		還元処理抗体/インタクト抗体（感度比）[%]
		インタクト抗体	還元処理抗体	
(2)	0.188	1.55	3.11	201
(3)	1.047	1.48	2.95	199
(4)	4.92	1.58	3.03	192
(5)	19.4	1.75	3.27	187
(6)	57.5	1.98	3.56	180

[0038] 実施例２　心筋トロポニンＩ測定用免疫反応試薬を用いたＳＳ結合切断率の評価

（１）還元処理抗体の作製

まず、以下の手順で、インタクト抗体中のＳＳ結合を完全に還元（切断）した抗体を作製した。抗心筋トロポニンＩ　マウスモノクローナル抗体（実施例１（１）で用いたものと同じＩｇＧ型インタクト抗体）５ｍｇを、５ｍＭ　ＥＤＴＡを含むｐＨ６．０の１００ｍＭリン酸緩衝液にて一晩透析した。２－メルカプトエチルアミン塩酸塩（２－ＭＥＡ）をｐＨ６．０の１００ｍＭリン酸緩衝液で２Ｍになるように溶解し、透析後の抗体に５ｖｏｌ％になるように添加して、３７℃で２４時間、還元処理を行ない、ＳＳ結合を完全に還元した。還元処理後の抗体を前記ゲルろ過用カラムに供し、ピーク画分を分取した。この時のクロマトグラムを図２に示す。図２に示されるように、インタクト抗体と同じ溶出時間（９．６分）を示すＳＳ結合の一部を還元した処理抗体（実施例１（１）で取得した還元処理抗体）と比較して、ＳＳ結合を完全に還元した処理抗体は遅い溶出時間（１０．４分）で溶出することから、還元処理により抗体が低分子量化していることが分かる。

[0039] 一方で還元処理時間（還元処理条件）を変えた抗体の作製を行なった。２－メルカプトエチルアミン塩酸塩（２－ＭＥＡ）をｐＨ６．０の１００ｍＭリン酸緩衝液で２００ｍＭになるように溶解し、透析後の抗体に５ｖｏｌ％になるように添加して、３７℃で３０分から２４０分間、還元処理を行なっ

た。同様に、還元処理後の各抗体を前記ゲルろ過用カラムに供した結果、還元処理後の各抗体がインタクト抗体と同じ溶出時間（９．６分）で溶出しており、還元処理による低分子量化が生じていないことを確認した。

[0040] （２）ＳＳ結合切断率の算出

サンプル用およびブランク用に試験管を用意し、これらに５ｍＭのＥＤＴＡを添加した０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ８．０）８００μＬを注入した。各サンプル用試験管に上記（１）で取得した還元処理後の各抗体溶液を２００μＬ、ブランク用試験管に０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）を２００μＬ加え、ボルテックスミキサーで撹拌した。一方、５，５－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）（ＤＴＮＢ）を０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）に溶解し、１ｍＭのＤＴＮＢ溶液を調製した。１ｍＭのＤＴＮＢ溶液をそれぞれの試験管に２０μＬ加え、撹拌の後、ブランク用試料を分光光度計にセットし、測定波長４１２ｎｍで測定を行なった。吸光度から計算によりＳＳ結合切断数（個／分子）を算出した。

[0041] 還元処理による低分子量化が生じていた場合、還元処理が完全に進行しているといえ、その時のＳＳ結合切断数は６．１３（個／分子）であった。上記（１）で還元処理時間を変えて作製した還元抗体のＳＳ結合切断数も同様に算出し、還元が完全に進行した際のＳＳ結合切断数（６．１３）で除することで、ＳＳ結合切断率（％）を算出した。

[0042] （３）標識抗体の作製

上記（１）で取得した、それぞれの条件の還元処理抗体１ｍｇに対し、実施例１（１）で作製したＳＭＣＣ導入ＡＬＰ２．５ｍｇを混合し、４℃で一晩反応させた。反応後、ゲルろ過用カラム（ＴＳＫ－ＧＥＬ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ、東ソー株式会社製）にてＳＭＣＣ導入ＡＬＰが結合した還元処理抗体を取得した。

[0043] 比較のため、還元処理していないインタクトの抗心筋トロポニンＩ抗体を用いて、同様の手法でアルカリ性ホスファターゼ標識抗心筋トロポニンＩ抗体（「比較抗体」ともいう）を得た。

[0044] （４）心筋トロポニンＩ測定試薬の作製

上記（１）で使用したインタクト抗体とは異なる部位で心筋トロポニンＩと結合する抗体（実施例１（２）で用いたものと同じ市販の抗体）を水不溶性担体に結合し、上記（３）で製造したＳＭＣＣ導入ＡＬＰが結合した還元処理抗体を加えて凍結乾燥し、心筋トロポニンＩ測定試薬を作製した。同様にして、比較抗体を加えて凍結乾燥し、比較試薬を製造した。

[0045] （５）心筋トロポニンＩ測定試薬の評価

上記（４）で製造した心筋トロポニンＩ測定試薬と比較試薬を、実施例１（３）と同様の方法で免疫測定を行ない、感度の比較を行なった。

[0046] 上記（２）で算出したＳＳ結合切断率と感度を比較した結果を表３及び図３に示す。表３及び図３から分かるように、ＳＳ結合切断率の上昇にしたがって感度が上昇し、ＳＳ結合切断率が４０％以上の時に、インタクト抗体を標識抗体とした場合よりも高い感度が認められた。また、ＳＳ結合切断率が５０％程度から感度が最大になり、以降、切断率が上昇しても一定の感度を保っていたが、ＳＳ結合切断率が１００％になる（抗体自体が低分子化される）と感度の低下が認められた。このことから、ＳＳ結合切断率は４０％以上１００％未満が好ましく、５０％以上９０％以下が特に好ましいことがわかる。

[0047]

[表3]

表3

SS結合切断数 [個/分子]	SS結合切断率 [%]	単位トロポニンあたりの蛍光強度の増加速度 [(nmol/L/sec)/(ng/mL)]
還元処理なし	0	1.55
2.57	41.9	2.34
2.77	45.2	2.74
3.29	53.7	3.11
4.62	75.4	3.22
4.83	78.8	3.23
4.86	79.3	3.24
5.21	85.0	3.29
6.13	100	2.35

産業上の利用可能性

[0048] 本発明により、抗原結合能を維持しており、且つ、標識物質等を結合することが可能な抗体を提供できる。当該抗体は、例えば、免疫測定で利用する標識抗体の材料として有用である。

請求の範囲

［請求項1］ 以下（１）から（３）の特徴を有する、ＩｇＧ型抗体。

（１）分子中の一部のジスルフィド結合が切断され、チオール基に還元されている、

（２）ジスルフィド結合の切断によって低分子化していない、及び、

（３）抗原結合能を保持している。

［請求項2］ 以下（１）から（３）の特徴を有する、ＩｇＧ型抗体。

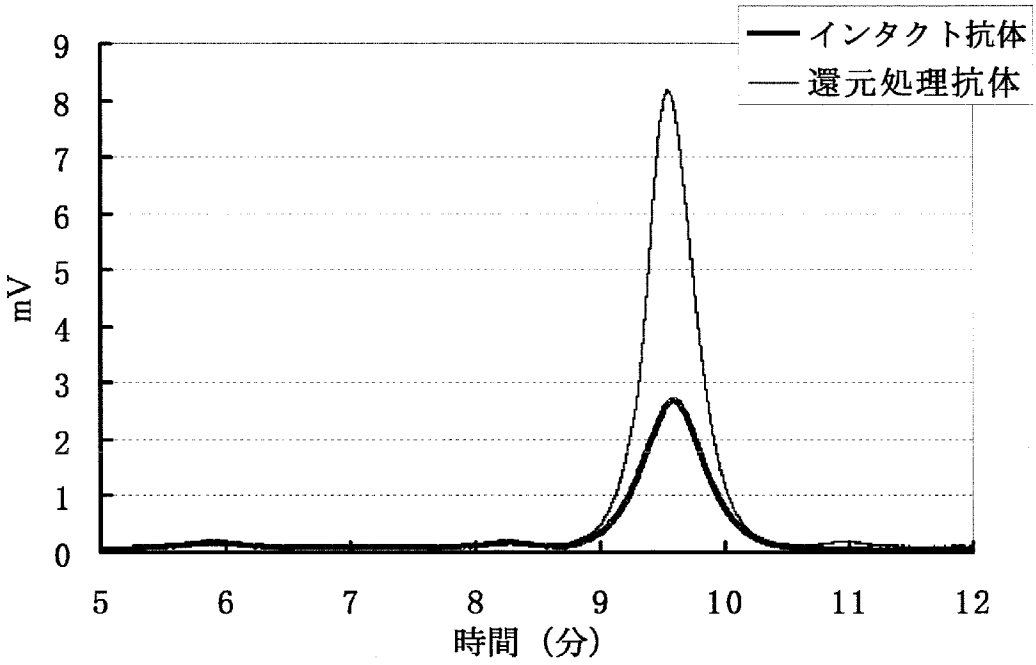
（１）分子中の一部のジスルフィド結合が切断され、この切断されて生じたチオール基を利用して他の物質が結合されている、

（２）ジスルフィド結合の切断によって低分子化していない、及び、

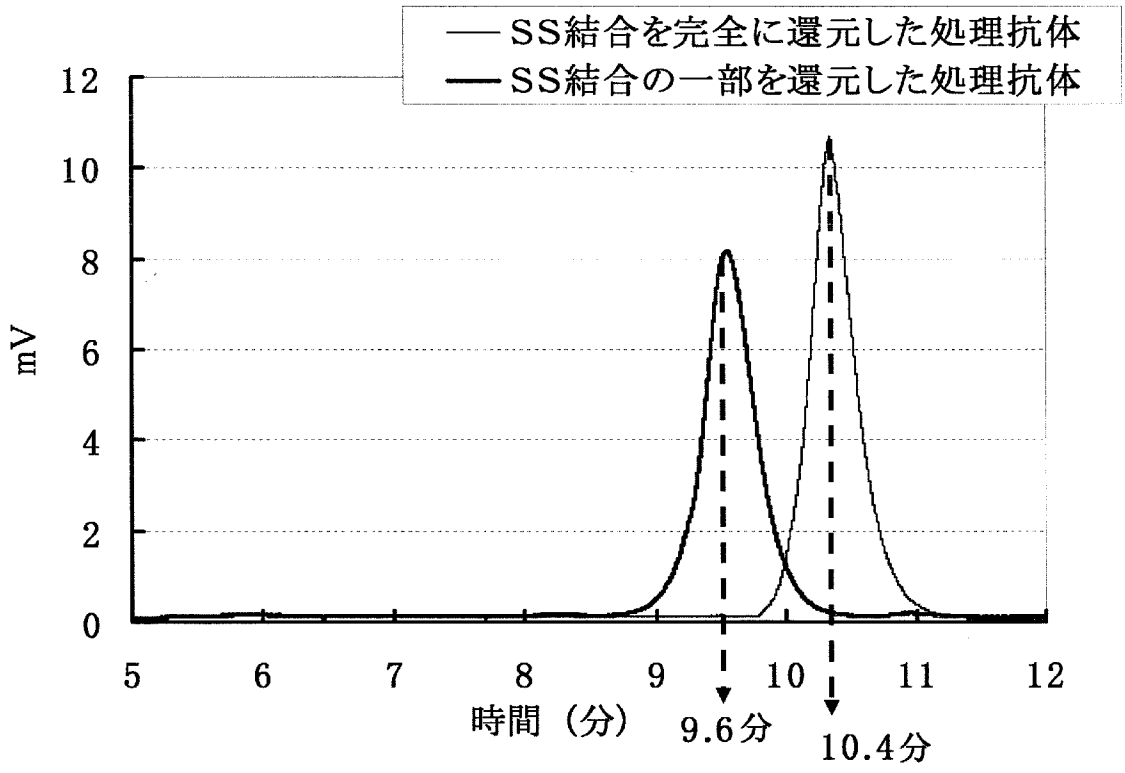
（３）抗原結合能を保持している。

［請求項3］ ジスルフィド結合切断率が４０％以上１００％未満である、請求項１又は２に記載の抗体。

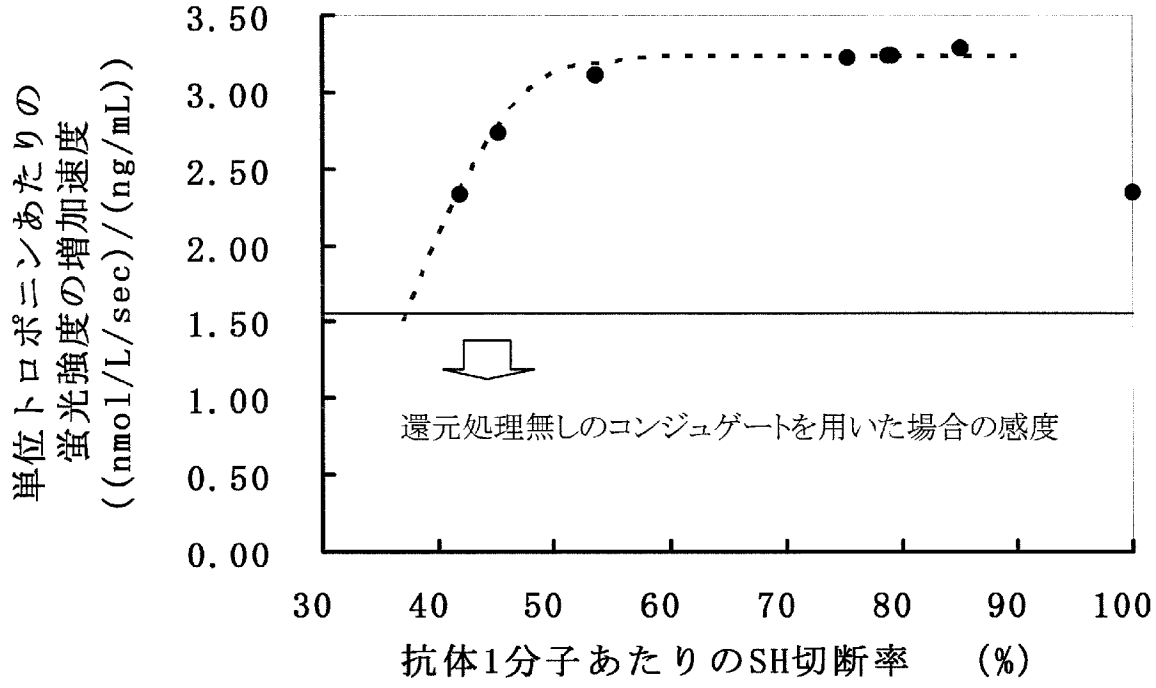
[図1]


インタクト抗体
還元処理抗体
mV
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
5
6
7
8
9
10
11
12
時間（分）

[図2]


SS結合を完全に還元した処理抗体
SS結合の一部を還元した処理抗体
mV
0
2
4
6
8
10
12
5
6
7
8
9
10
11
12
時間（分）
9.6分
10.4分

[図3]


単位トロポニンあたりの
蛍光強度の増加速度
((nmol/L/sec)/(ng/mL))
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
30
40
50
60
70
80
90
100
還元処理無しのコンジュゲートを用いた場合の感度
抗体1分子あたりのSH切断率 (%)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/079799

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/00(2006.01)i, *G01N33/531*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K16/00, G01N33/531

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 1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-194821 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 09 July 2003 (09.07.2003), claim 9; example 10 (Family: none)	1-3
A	ROGERS, A.B. et al, Thiol-reactive compounds prevent nonspecific antibody binding in immunohistochemistry, Laboratory Investigation, 2006, Vol.86, No.5, p.526-533	1-3
A	BIEWENGA, J. et al, Effects of limited reduction on disulfide bonds in human IgA1 and IgA1 fragments, Molecular Immunology, 1992, Vol. 29, No.3, p.327-34	1-3

☒ 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	Date of mailing of the international search report
17 January, 2012 (17.01.12)	24 January, 2012 (24.01.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/079799

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	WO 2011/129357 A1 (Eiken Chemical Co., Ltd.), 20 October 2011 (20.10.2011), example 1 (Family: none)	1-3

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１１／０７９７９９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/00(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/00, G01N33/531

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	１９７１－２０１２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１２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）

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, Thomson Innovation

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 2003-194821 A（栄研化学株式会社）2003.07.09, 請求項９、実施例１０（ファミリーなし）	1-3
A	ROGERS,A.B. et al, Thiol-reactive compounds prevent nonspecific antibody binding in immunohistochemistry, Laboratory Investigation, 2006, Vol.86, No.5, p.526-533	1-3

☑　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 １７．０１．２０１２	国際調査報告の発送日 ２４．０１．２０１２
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 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）　４Ｂ　３０３７ 佐久　敬 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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	BIEWENGA,J. et al, Effects of limited reduction on disulfide bonds in human IgA1 and IgA1 fragments, Molecular Immunology, 1992, Vol.29, No.3, p.327-34	1-3
P,X	WO 2011/129357 A1 (栄研化学株式会社) 2011.10.20, 実施例１（ファミリーなし)	1-3