

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 530089

(P2003 - 530089A)

(43)公表日 平成15年10月14日(2003.10.14)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 1/22	4 B 0 2 4
C 0 7 K 1/22		14/47	4 B 0 6 4
14/47		16/18	4 H 0 4 5
16/18		C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/02		G 0 1 N 30/26	A

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 50数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 564241(P2001 - 564241)

(86)(22)出願日 平成13年3月1日(2001.3.1)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月30日(2002.8.30)

(86)国際出願番号 PCT/SE01/00430

(87)国際公開番号 W001/064748

(87)国際公開日 平成13年9月7日(2001.9.7)

(31)優先権主張番号 0000675 - 9

(32)優先日 平成12年3月2日(2000.3.2)

(33)優先権主張国 スウェーデン(SE)

(71)出願人 プロテアーゼ・エービー  
スウェーデン国、エス - 216 20 マルメ、  
エルトホルムスベージェン 196、ヨハン・ス  
テンフロ方

(72)発明者 ステンフロ、ヨハン  
スウェーデン国、216 20 マルメ、エルト  
ホルムスベージェン 196

(72)発明者 ステンバーグ、ライサ・メアリー  
スウェーデン国、217 45 マルメ、ダムフ  
リガンゲン 4シー

(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦 ( 外 3 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 カルボキシグルタミン酸を提示するエピトープを結合する抗体

(57)【要約】

- カルボキシグルタミン酸 ( G l a ) の同定に適した抗体であって、タンパク質及び/又はペプチド中の G l a 残基を同定することができる、対応するタンパク質及び/又はペプチド中のグルタミン酸 ( G l u ) 残基とは反応しない抗体が記載されている。該抗体を調製する方法及び同定する方法、並びに生物の体液、組織抽出物、組織試料中の G l a を検出する方法であって、前記抗体が使用される方法も記載されている。例えば、免疫沈降又は免疫アフィニティークロマトグラフィーによって、G l a 含有タンパク質又はペプチドを免疫精製するための前記抗体の使用も記載されている。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 - カルボキシグルタミン酸 (G l a) の同定に適した抗体であって、タンパク質及び/又はペプチド中のG l a残基を同定することができ、対応するタンパク質及び/又はペプチド中のグルタミン酸 (G l u) 残基とは反応しない抗体。

【請求項2】 単一のG l a残基、G l a残基の対、又は複数のG l a残基を同定する能力を有する、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の抗体であって、それぞれが1以上のG l a残基を含有するペプチドの複合体で動物を免疫した後に、若しくはペプチド、タンパク質、若しくは他のポリマーに付着された1以上のG l a残基若しくは他のマロン酸誘導体で動物を免疫した後に、又は組換えDNA技術によるd e n o v o設計と生成の後に、前記抗体を単離するためにスクリーニングすることによって得ることができる抗体。

【請求項4】 前記組換えDNA技術が、ファージ、細菌、又はリボソームディスプレイ法を含む群から選択される請求項3に記載の抗体。

【請求項5】 F a b又は単鎖F v抗体である請求項4に記載の抗体。

【請求項6】 前記動物が、マウス(好ましくは、B a l b / cマウス)、ラット、ウサギ、ウマ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、及びヒツジを含む群から選択される請求項3に記載の抗体。

【請求項7】 請求項1～6の何れか1項に記載の抗体を調製する方法であって、各ペプチドが1以上のG l a残基を含有するペプチドの複合体で動物を免疫した後に、又はペプチド、タンパク質、若しくは他のポリマーに付着された1以上のG l a残基若しくは他のマロン酸誘導体で動物を免疫した後に、前記抗体を単離するためにスクリーニングする方法。

【請求項8】 前記動物が、マウス(好ましくは、B a l b / cマウス)、ラット、ウサギ、ウマ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、及びヒツジを含む群から選択される請求項7に記載の方法。

【請求項9】 請求項1～6の何れか1項に記載の抗体を調製する方法であって、組換えDNA技術によるd e n o v o設計と生成の後に、前記抗体を単

離するためにスクリーニングすることを備えた方法。

【請求項10】 前記組換えDNA技術が、ファージ、細菌、又はリボソームディスプレイ法を含む群から選択される請求項9に記載の方法。

【請求項11】 生物の体液又は組織抽出物中のG1a含有タンパク質又はペプチドを同定する方法であって、請求項1～6の何れか1項に記載の抗体がブロッキング技術で使用される方法。

【請求項12】 前記ブロッキング技術がウェスタンブロッキングである請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記抗体に標識が共有結合で付着している請求項11に記載の方法。

【請求項14】 標識が共有結合で連結されている所謂二次抗体が使用される請求項11に記載の方法。

【請求項15】 前記標識が、酵素、蛍光性又は放射性化合物を含む群から選択される請求項13又は14に記載の方法。

【請求項16】 前記G1a含有タンパク質又はペプチドが、現存する任意の種に由来する請求項11に記載の方法。

【請求項17】 前記G1a含有タンパク質又はペプチドが、G1aドメイン含有凝固因子、又は相同なG1aドメインを有するタンパク質又はペプチドである請求項11に記載の方法。

【請求項18】 前記G1a含有タンパク質又はペプチドが、骨G1aタンパク質又はペプチドである請求項11に記載の方法。

【請求項19】 前記G1a含有タンパク質又はペプチドが、マトリックスタンパク質又はペプチドである請求項11に記載の方法。

【請求項20】 前記G1a含有タンパク質又はペプチドが、イモガイ属の軟体動物の毒に含有される請求項11に記載の方法。

【請求項21】 組織切片中のG1a含有タンパク質又はペプチドを同定する方法であって、請求項1～6の何れか1項に記載の抗体が、免疫組織化学技術で使用される方法。

【請求項22】 培養細胞中のG1a含有タンパク質若しくはペプチド、内

在性膜タンパク質若しくはペプチド、又は細胞内タンパク質若しくはペプチドを  
同定する方法であって、請求項1～6の何れか1項に記載の抗体が、免疫組織化  
学又はFACS can技術で使用される方法。

【請求項23】 前記抗体に標識が共有結合で付着している請求項21又は  
22に記載の方法。

【請求項24】 標識が共有結合で連結されている所謂二次抗体が使用され  
る請求項21又は22に記載の方法。

【請求項25】 前記標識が、酵素、蛍光性又は放射性化合物を含む群から  
選択される請求項21又は22に記載の方法。

【請求項26】 G1a含有タンパク質又はペプチドを定量測定する方法で  
あって、請求項1～6の何れか1項に記載の抗体が、イムノアッセイで使用され  
る方法。

【請求項27】 前記イムノアッセイがELISA又はDELFLIA(R)  
型である請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記タンパク質又はペプチドのカルボキシル化の程度が測  
定される請求項26又は27に記載の方法。

【請求項29】 前記タンパク質がビタミンK依存性凝固因子である請求項  
28に記載の方法。

【請求項30】 前記ビタミンK依存性凝固因子が、第VII因子、第IX  
因子、第X因子、プロテインC、プロテインZ、プロトロンビン、プロテインS  
、及びGas6、又は構造的に関連するタンパク質を含む群から選択される請求  
項29に記載の方法。

【請求項31】 前記ビタミンK依存性凝固因子のカルボキシル化の程度が  
、ビタミンK拮抗薬で患者を治療している間に、エキソビボ(ex vivo)  
でモニターされる請求項30に記載の方法。

【請求項32】 生物の体液又は組織抽出物から得られるG1a含有タンパ  
ク質又はペプチドを精製する方法であって、請求項1～6の何れか1項に記載の  
抗体が、免疫アフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降技術で使用される  
方法。

【請求項33】 溶解された細胞又は細胞培養培地から得られる組換えG1a含有タンパク質又はペプチドを精製する方法であって、請求項1～6の何れか1項に記載の抗体が、免疫アフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降技術で使用される方法。

【請求項34】 組換えG1a含有タンパク質又はペプチドを分画する方法であって、前記タンパク質又はペプチドのG1a含量に従って、前記タンパク質又はペプチドを分離するために請求項1～6の何れか1項に記載の抗体が免疫アフィニティークロマトグラフィー技術で使用される方法。

【請求項35】 前記クロマトグラフィー中に吸着したタンパク質又はペプチドの溶出が、金属イオンを加えられている緩衝液の使用によって行われる請求項34に記載の方法。

【請求項36】 前記金属イオンがカルシウムイオンである請求項35に記載の方法。

【請求項37】 前記クロマトグラフィー中に吸着したタンパク質又はペプチドの溶出が、pH値を変化させることによって、又はカオトロピック試薬を添加することによって行われる請求項35に記載の方法。

【請求項38】 G1a含有タンパク質又はペプチドのG1aドメインのコンフォメーションをプローブする方法であって、請求項1～6の何れか1項に記載の抗体がプローブとして使用される方法。

【請求項39】 G1a含有タンパク質又はペプチドのG1aドメインのコンフォメーションに対するカルシウム及び他の陽イオンの影響を調べる方法であって、請求項1～6の何れか1項に記載の抗体がプローブとして使用される方法。

。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の分野】**

本発明は、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) を検出するための抗体、該抗体を調製及び同定する方法、並びに生物の体液、組織抽出物、組織試料等を検出する方法であって、前記抗体が使用される方法に関する。本発明は、例えば、免疫沈降又はイムノアフィニティークロマトグラフィーによってGla含有タンパク質を免疫精製するためのこの種の抗体の使用にも関する。

**【0002】****【発明の背景】**

Glaは、ある種のタンパク質中に存在する限られた数のグルタミン酸 (Glu) 残基がカルボキシル化されることによって形成される非典型アミノ酸である。カルボキシル化 (翻訳後の初期に起こる現象) はビタミンKを必要とし、これまでのところ、タンパク質/ペプチド中のGlaの存在には、ビタミンKの作用が常に関わっている (Furie et al., 1999; Suttie, 1985)。

**【0003】**

カルボキシル化は、既に精製、クローニングされている酵素であるビタミンK依存性カルボキシラーゼによって触媒される。相補性DNAを発現させて、組換えタンパク質が完全に活性であることが明らかとされている。ある種のペプチドに結合したGlu残基の炭素原子からプロトンを引き抜き、続いてCO<sub>2</sub>を取り込んで、マロン酸の誘導体であるGlaを形成するのに、ヒドロキノン型のビタミンKから得られるビタミンKの不安定な代謝物が関与している。典型的には、Gla含有タンパク質は、前記カルボキシラーゼによって認識される、プロペプチドと称されるN末端部分を有している。カルボキシル化と前記酵素からの被修飾タンパク質の遊離を経て、前記プロペプチドは、タンパク質限定加水分解によって除去される。

**【0004】**

Glaを含有するタンパク質は、「ビタミンK依存性タンパク質」と総称され

ることが多い(Stenflo and Dahlback, 1994)。これらのタンパク質のうち、正常な合成にビタミンKを要する止血因子が最も詳細に研究されている。これらには、プロトロンビン(第II因子)、第VII因子、第IX因子、第X因子、及び2つの制御タンパク質(プロテインCとその補因子であるプロテインS)が含まれる。

#### 【0005】

最近の研究によれば、第VII、IX、X因子、及びプロテインCと構造的に関連があるのはプロテインZであり、血液凝固の調節に関わっている可能性がある。

#### 【0006】

このタンパク質群の相同物が、ヘビを含む多数の脊椎動物中に見出されている。例えば、*Tropidochis carinatus*という毒ヘビの毒は構造と生物活性がともに第X因子と類似するタンパク質を含有している(Joseph et al, 1999)。成長停止特異的タンパク質6(Gas6、Growth arrest-specific protein 6)は、アポトーシスに関与していると思われるプロテインSの相同物である。

#### 【0007】

G1aを含有する止血因子とそれらの相同物は全て、アミノ末端(N末端)に約45アミノ酸残基のG1aドメインを有しており、このドメインに含有される9~12個のG1u残基は、通常全てカルボキシ化されてG1aになっている。G1aドメインのN末端部分と同一のエキソン上にコードされているプロペプチドは、ビタミンK依存性カルボキシラーゼによって認識され、該酵素を活性化する。その基質を結合した後に、カルボキシラーゼは、周囲のアミノ酸配列にかかわらず、プロペプチドの近傍にあるG1u残基を全て(すなわち、ビタミンK依存性止血因子中の約+45残基まで)カルボキシル化するらしい。

#### 【0008】

ビタミンK依存性の凝固因子は、主として肝臓で合成され、それらのドメイン構造に応じて、3つのグループに分類することができる。第VII、IX、及びX因子、並びにプロテインCは、上皮成長因子(EGF)と相同な2つのドメイ

ンが後置されたN末端G1aドメインを有するのに対して、該分子のC末端部分は、セリンプロテイナーゼドメインで占められている。別の相同物であるプロテインZも、このドメイン構造を有している。しかしながら、プロテインZ遺伝子中の天然の突然変異によって、該タンパク質の活性部位の残基が変化を受けているため、プロテインZはプロテイナーゼ活性を有していない。プロトロンビンも、特徴的なループ(2つのいわゆるクリングルドメイン)が後置されたN末端G1aドメインとセリンプロテイナーゼドメインとを有している。プロテインSとGas6は相同物である。プロテインSでは、G1aドメインに続く領域は、トロンビンに対して非常に鋭敏な1又は2のペプチド結合を含有している。該領域の後には4つのEGF様ドメインが続いているのに対して、該分子のC末端側の半分は、ヒトの血漿中に存在する性ステロイド結合タンパク質と相同である。

#### 【0009】

血液凝固とその調節に関与するビタミンK依存性のタンパク質は、プロテインSとプロテインZを除いて、セリンプロテイナーゼのプロ酵素である。該酵素は、分子量が小さな基質(例えば、短いペプチド)に対しては完全な活性を有しているが、それらの適切な膜結合型補因子と複合体を成し、酵素的に活性な膜結合型巨大分子複合体を形成しなければ、それらの生理的な基質[第VIIa因子の場合には第IX因子と第X因子、第IXa因子の場合には第X因子、第Xa因子の場合にはプロトロンビン(VIIaなどの中の「a」とは、当該タンパク質の酵素的に活性な型を表している)]に対する酵素活性は非常に低い。複合体中の酵素(例えば、補因子であるVa因子と複合体を形成したXa因子)(ここで、「a」とは、不活性なプロ補因子と区別するために、補因子の活性型を表す)は、タンパク質限定加水分解によって、その基質であるプロトロンビンを活性化させる。

#### 【0010】

G1aドメイン中の9乃至12のG1a残基は、G1aドメインを、生物活性に必要な(従って、G1aドメインが生体膜と相互作用するのに必要な)コンフォメーションに保つために必須である7~10個のカルシウムイオンの結合を媒介する。

## 【0011】

ワルファリン(R)のような臨床で使用されている抗凝固薬は、ビタミンK依存性タンパク質中のG1aの形成を阻害して、タンパク質のカルシウム親和性と生体膜への親和性を低下させることによって機能する。このような薬物は、例えば、静脈の血栓及び肺塞栓の治療に使用されている。

## 【0012】

G1aは、石化(mineralized)した組織中の2つのタンパク質(骨G1aタンパク質(又はオステオカルシン)とマトリックスG1aタンパク質)にも見出されている。これらのタンパク質は前記凝固因子よりも小さく、含有するG1a残基も少ない。しかしながら、それらはビタミンK依存性カルボキシラーゼによる基質の認識に必須であるプロペプチドと似通った構造を有している。これらのカルボキシル化は、ビタミンKを絶対的に必要とすることが示されている。骨G1aタンパク質は、石化細胞外マトリックスの石灰化(calcification)の制御に関わっており、マトリックスG1aタンパク質は、カルシウムの恒常性に広範な役割を有しているらしい。

## 【0013】

凝固因子と石化組織中に見出される前記2つのタンパク質に加え、尿、腎臓、胎盤、ニワトリ卵の絨毛尿膜などのいくつかのタンパク質中に、G1aが存在することが報告されているが、多くの場合、これらのタンパク質の分子的な詳細は決定されていない(Vermeer and De Boer - Van den Berg, 1985)。

## 【0014】

より最近になって、典型的なG1aドメインを有する(従って、凝固因子に似ている)膜タンパク質と思われる2つのタンパク質のcDNAがクローニングされた(Kulman et al., 1997)。これらのタンパク質の機能は、いまのところ不明であり、タンパク質レベルでも性質決定されていない。

## 【0015】

肉食性の巻貝であるイモガイ(Conus)属の毒の中にG1aが発見されたこと、及びこれらの軟体動物でのG1aの生合成にビタミンKが関わっているこ

とが見出されたことは、ビタミンKが、これまでに考えられていたより、さらに多くの生物系において重要な機能を果たしている可能性があることを示している (Olivera et al., 1990)。さらに、イモガイ由来の毒の生物活性は、G1aの存在に依存していること、すなわち、G1aがG1uで置き換えられていることを除いて同一の構造を有する合成毒は生物的に不活性であることが示された。

#### 【0016】

以上より、タンパク質中のG1aを同定することは非常に興味深いことであり、この興味は、重要な生物機能を有する新規タンパク質の機能にG1aが関わっていることを示唆する近年の発見により急速に増大しているとは明らかなはずである。タンパク質中のG1aを同定するための迅速で、簡易な信頼できる安価な方法が存在すれば、この研究分野は、ずっと簡略化されるであろう。

#### 【0017】

アミノ酸を同定し、定量するための標準的な方法は、酸加水分解後にアミノ酸を分析することであった。しかしながら、G1aがマロン酸誘導体であるために、酸加水分解によって脱カルボキシル化されてG1uになってしまうので、この方法は、G1aの同定には適していない。従って、タンパク質中のG1aの定量にはアルカリ加水分解が使用されてきた。該方法は精製タンパク質中のG1aの定量には適しているが、生物の体液又は組織抽出物中に存在するG1a含有タンパク質の同定には、あまり役に立たない。

#### 【0018】

詳細に研究されているG1a含有タンパク質はカルシウムを結合することが分かっているため、G1a含有タンパク質を同定するために、「カルシウムプロットティング」が使用されることもある。該方法は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に、適切な膜（例えば、ニトロセルロース膜）に転写し、次いで、放射性カルシウム同位体 ( $^{45}\text{Ca}$ ) を含有する緩衝液中で該膜をインキュベートすることを必要とする。膜を乾燥させ、適切なフィルム又は検出器に暴露させると、多くの場合、カルシウム結合タンパク質を同定することができる。該方法の弱点は、G1a含有タンパク質と他のカルシウム結合タンパク質とを識別でき

ず、且つ定量的でないということである。さらに、タンパク質を検出するためには、高いカルシウム親和性が必要とされる。最後に、該方法は、SDSに暴露されるにもかかわらず、タンパク質がネイティブなカルシウム結合性のコンフォメーションを保持することを必要とする。

【0019】

G1a含有タンパク質を検出するための比色分析が考案されているが、広く使用されているわけではない(Jie et al., 1995; Nishimoto, 1990)。

【0020】

(エドマン化学を用いた)タンパク質/ペプチドの配列決定の間、化学修飾の後に、G1aは容易に同定される(Cairns et al., 1991)。しかしながら、これには均一なタンパク質が必要であり、タンパク質のアルカリ加水分解物のG1aを先に定量測定しなければならない。

【0021】

質量分析は、均一なG1a含有タンパク質/ペプチドの性質を決定するのに不可欠な方法である(例えば、Rigby et al., 1999)。しかしながら、その長所にもかかわらず、生物の体液又は組織抽出物中のG1a含有タンパク質を検出するには適していない。

【0022】

生物の体液又は組織試料中に存在するG1aを検出するための簡易な免疫化学的方法、並びにG1a含有タンパク質のアフィニティー精製のための簡易な方法が必要とされている。このような方法は、ビタミンK依存性タンパク質に関連する研究に新たな進歩をもたらし、凝固タンパク質などの治療に有用な組換えビタミンK依存性タンパク質の精製においても非常に有用であろう。リン酸化されたチロシン、セリン、及びトレオニン残基を含有するタンパク質を簡易に同定し、精製するためのかかる方法は既に考案されており、極めて有用であることが分かっている(例えば、Frackelton et al., 1983)。

【0023】

【発明の記載】

本発明は、タンパク質及び/又はペプチド中のG1aの同定に適した一群の抗体(モノクローナルとポリクローナルの両者)に関する。該抗体の特徴的な性質は、

\*タンパク質及びペプチド中のG1a残基(単一の残基、G1a残基の対、又は複数のG1a残基の何れも)を同定することができる。

【0024】

\*該抗体は、G1aではなくG1uを含む対応するタンパク質/ペプチドとは反応しない。

【0025】

本発明の抗体は、公表されている手順(Tam, 1988)に従って合成された合成ペプチド複合体を用いて動物を免疫することによって得ることができる。該ペプチドは、その他はランダムである配列中に単一のG1a残基及びG1a残基の対を含有する(表1)。

【0026】

前記抗体は、ペプチド、タンパク質、又は他のポリマーに付着された1以上のG1a残基又は他のマロン酸誘導体を用いて動物を免疫することによって得ることもできる。

【0027】

上記の免疫法に適した動物は、マウス(好ましくはBalb/cマウス)、ラット、ウサギ、ウマ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、ヒツジ、及びその他の種である。

【0028】

さらなる調製法は、ファージ、細菌、又はリボソームディスプレイ法を含む組換えDNA技術による、抗体(例えば、Fab又は単鎖Fv抗体)のde novo設計及び生成によるものである。

【0029】

全ての調製法は、前記抗体のスクリーニングと単離を含む。

【0030】

モノクローナル抗体は、標準的な方法(Borreback and Eylar, 1981)を用いて作製される。抗体を産生する細胞クローンを調べるた

めには、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) タイプのアッセイが使用される。これらのアッセイは、所望の特性を有するクローンを選択するために、G1a又はG1uのうち何れかを含有する合成ペプチドを利用する(表1)。さらに、適切な抗体産生クローンを同定するために、ビタミンK依存性の凝固因子が使用される。所望の特性を有する抗体を産生するクローンを増殖させ、マウスの腹水として、又は組織培養によって抗体が産生される。

#### 【0031】

ポリクローナル抗血清は、周知の方法を用いて、動物中に産生させ得る。例えば、G1a又はG1uの何れかを含有する固定化されたペプチド上に抗血清を逐次吸着させることによって、目的の抗体を単離する。プロトロンビン、第IX因子及び第X因子により、ウェスタンブロッティングを用いて、単離された抗体を試験する。

#### 【0032】

本発明に従って生成された抗体は、

- 1) 例えば、ウェスタンブロッティングによる、生物の体液 (biological fluid) 又は組織抽出物中に存在するG1a含有タンパク質の同定
- 2) 免疫組織化学による、組織切片中のG1a含有タンパク質の同定
- 3) 例えば、ELISA又はDELFA (R) タイプの所謂サンドイッチアッセイにおける、G1a含有タンパク質/ペプチドの定量的測定
- 4) ワルファリン (R) のようなビタミンK拮抗薬による患者の治療中に、例えば、ビタミンK依存性の凝固因子 (例えば第X因子) のカルボキシル化の程度をモニターするためのG1a含有タンパク質の定量的測定
- 5) 例えば、免疫アフィニティークロマトグラフィ - 又は免疫沈降による、生物の体液又は組織抽出物から得られるG1a含有タンパク質の精製
- 6) 例えば、免疫アフィニティークロマトグラフィ - 又は免疫沈降による、溶解された細胞 (lysed cell) 又は細胞培地 (cell culture media) から得られる組換えG1a含有タンパク質の精製
- 7) 免疫アフィニティークロマトグラフィによる、G1a含有タンパク質のG

1 a 含量に応じた、組換え G 1 a 含有タンパク質の分画。典型的には、生理的 pH 又は生理的 pH に近い T r i s 緩衝液中の免疫アフィニティーカラムから、吸着されたタンパク質を溶出するには、カルシウムイオン（例えば、C a C l<sub>2</sub> の形で加えられる）のような金属イオンを前記緩衝液に加えることによって行われる例もあるし、例えば、pH の変化又はカオトロピック試薬の使用などの他の溶出手段が必要とされる場合もある。

【0033】

8) G 1 a ドメインのコンフォメーション、並びに該コンフォメーションに対するカルシウム及び他のイオンの影響の探索 ( p r o b i n g ) に適している。

【0034】

適用 1) ウェスタンブロッティング実験では、生物の体液又は組織抽出物中の G 1 a 含有タンパク質 / ペプチドの検出は、一次抗体に共有結合で付着された標識（酵素又は蛍光若しくは放射性化合物など）を用いて、又は酵素若しくは他の標識が共有結合で連結された所謂二次抗体を使用することによって行うことができる。適切な酵素には、アルカリホスファターゼ又は西洋ワサビペルオキシダーゼが含まれる。検出は、化学発光又は類似の方法によっても行い得る。凝固因子の所謂 G 1 a ドメイン中に存在する G 1 a、及び相同する G 1 a ドメインを有するタンパク質中に存在する G 1 a を同定するためにウェスタンブロッティングを使用することができる。G 1 a が脱炭酸されて G 1 u になった後には、前記抗体はタンパク質と反応しない。該方法は、典型的な所謂 G 1 a ドメインを有しない G 1 a 含有タンパク質又はペプチド中の G 1 a を同定することもできる。このようなタンパク質の例は、所謂骨 G 1 a タンパク質（オステオカルシン）及びマトリックス G 1 a タンパク質並びにイモガイ属の軟体動物の毒から得られる G 1 a 含有タンパク質 / ペプチドである。

【0035】

適用 2) 前記抗体は、例えば、免疫組織化学によって、組織切片中の G 1 a を同定するために使用することができる。前記抗体は、免疫組織化学又は F A C S c a n 法によって、培養細胞中の G 1 a を含有するタンパク質、内在性膜タンパ

ク質、又は細胞内タンパク質を同定するためにも使用することができる。これらの方法は、一次抗体に付着された標識（酵素又は蛍光化合物若しくは放射性化合物などの）、又は所謂二次抗体を使用することによって実施することができる。

#### 【0036】

図面と合わせて、以下の非限定的な例により、本発明をさらに説明する。

#### 【0037】

##### 【実施例】

<ペプチド合成及びウシ血清アルブミンへのペプチドの結合：>

ペプチドは、Milligen 9050 Plus ペプチド合成機（Perkin Elmer Corp., Stockholm, Sweden）により合成した。ペプチド合成は、PerSeptive Biosystems（Framingham, MA, USA）から得たDPfp Fmocアミノ酸を用いて行った。Tamの複抗原ペプチド（MAP）システム（1988）を用いて免疫用ペプチド複合体を合成し、G1a残基周囲のアミノ酸残基を様々に変化させた（表1のJS30を参照）。

#### 【0038】

免疫化は以下に記載するように行った。C末端にシステイン残基を有する抗体検査用ペプチドを合成し、既定の方法を用いて、該システイン残基を介してウシ血清アルブミンに結合させた。

#### 【0039】

<G1a特異的ウサギポリクローナル抗体の作製：>

標準的な方法に従って、ウサギを免疫化することにより、合成JS30ペプチド複合体（表1）のG1a特異的ポリクローナル抗体の産生誘導能を検査した。1回につきフロイント完全アジュバント中に乳化した1mgのペプチド複合体を4ヶ月にわたって投与し、4回の皮下免疫化を行った。プロトロンビン、第IX因子、及び第X因子に対する交差反応性を調べるためのウェスタンブロッティングにより、検査用の採血から得た血清を分析した。十分な免疫反応を得た後、154mMのNaClで血清を1：1に希釈し、45%飽和濃度にまで硫酸アンモニウムを加えることにより、免疫グロブリン画分を沈殿させた。該沈殿物を遠心

分離法により単離し、50mM Tris-HCl / 0.1M NaCl、pH 7.5 に対して透析した。次に、対応する位置に単一又は対を成したGla残基 (JS31 ペプチド) 又はGlu残基 (JS32) を含有する合成ペプチドを用いたペプチドのアフィニティークロマトグラフィーによりGla特異的抗体を単離した(表1)。樹脂製造業者の指示に従い、C端のシステイン残基を介して、各ペプチドをチオプロピル-セファロース (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) に共有結合で付着させた。JS32 抱合樹脂から成るカラムで、透析した免疫グロブリン調製物のクロマトグラフィーを行って、Glu含有ペプチドに結合する抗体を除去した。次に、JS31 抱合樹脂から成るカラムで、フロースルー画分 (flow through fraction) (前記カラムに結合しなかったタンパク質) のクロマトグラフィーを行い、Gla特異的な抗体を単離した。前記カラムを洗浄し、低pHの緩衝液で結合した抗体を溶出し、50mM Tris-HCl / 0.1M NaCl、pH7.5により透析し、-20 で保存した。

#### 【0040】

単離した抗体をウエスタンブロッティングにより検査し、第IX因子、第X因子、プロトロンビン及びプロトロンビン断片1 (Glaドメインを含む1~156残基を含む断片) に対する交差反応性を評価した。前記抗体は4つのタンパク質を全て認識し、明らかにGla特異的ポリクローナル抗体が産生されたことが実証された。電気泳動を行うに先立って、抗原内のジスルフィド結合を還元し、さらにGlaドメインの天然構造を破壊すると、交差反応性の程度は著しく増大した。これらの抗体はそれ以上詳細には検査しなかった。

#### 【0041】

<モノクローナル抗体の作製:>

合成ペプチド複合体を用いてBalb/cマウスを免疫化した(表1)。各回毎に10µgの前記ペプチド複合体を用いて各マウスを免疫化した。フロイント完全アジュバント (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 中に乳化した前記ペプチドを皮内投与し、第一の免疫化を行った。第二、第三の免疫化はフロイント不完全アジュバントを皮下投与することに

よって行った。免疫反応を調べた後、各回毎に、マウス当り50 $\mu$ gのペプチド複合体（フロイント不完全アジュバント中）を用いて、さらに2回免疫化を行った。

#### 【0042】

ウシ血清アルブミンに抱合した適切なペプチド（表1）を用いたELISAを利用して、マウスの血漿を検査した。N末端のEGF様ドメイン（Persson et al., 1989）に連結されたGlaドメインから成るウシ第X因子のタンパク分解性断片及びウシプロトロンビンを用いた検査も行った。タンパク質及びペプチド抱合体を96ウェルのマイクロタイタープレートにコートした。4、5ヶ月の後、良好な抗体反応を得た。細胞融合の4、3、2、1日前に、約200 $\mu$ gの同抗原（アジュバントなし）を各マウスの腹腔内に注入した。細胞融合のため、前記細胞を抽出し、標準的な条件下で（Borreback and Eylar, 1981）、45%ポリエチレングリコール1540と7% DMSO（ジメチルスルフォキシド）を用いてミエローマ細胞株SP2/-AG14を前記細胞と融合した。約10<sup>5</sup>細胞/ウェルの細胞密度で、約10<sup>4</sup>細胞/ウェルのフィーダー細胞と共に、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を補充したDMEM培地中の前記融合細胞を96ウェルマイクロタイタープレートの中に播種した。約10日後、抗体産生について、ハイブリドーマの上清をスクリーニングした。

#### 【0043】

以下に記載されているように、目的の性質を有する抗体を産生するクローンを同定した。マウスの腹膜のマクロファージをフィーダー細胞として利用し、96ウェルプレートを用いた限界希釈法により（0.5～1.0細胞/ウェル）、ハイブリドーマを2度サブクロニングした。目的のモノクローナル抗体を産生する安定なクローンを高い細胞密度になるまで増殖させ、抗体を産生させるためにプリスタチンを準備刺激したマウスに腹腔内注射（マウス当たり0.2mL）した。Technomouse 装置（Integra Biosciences）を用いた組織培養によって、調製用の規模でも抗体を作製した。95%ウシ胎児血清と5%DMSOにより、液体窒素中に細胞株を凍結保存した。

## 【0044】

G1a含有ペプチド/タンパク質に特異的な抗体を産生するクローンの同定方法は入念に設定した。pH9.6の0.1M炭酸緩衝液中で適切なタンパク質、タンパク質断片、又はペプチド-ウシ血清アルブミン抱合体でマイクロタイタープレートに被覆した(0.5µg/ウェル)。検査で使用したペプチドを表1に示す。洗浄後、50mM Tris-HCl/0.1M NaCl、pH7.4中にウシ血清アルブミン溶液(10mg/mL、100µg/ウェル)を加え、プレートを15分間インキュベートすることによって、前記ウェル中の非占有結合部位を「ブロック」した。洗浄後に、培養液を加え、抗体産生クローンを同定した。再度ウェルを洗浄し、ペルオキシダーゼ抱合ウサギ抗マウス免疫グロブリン(DAKO A/S, Glostrup)を加えた。G1aを含有するペプチドを用いて観察した抗体反応と、G1aではなくG1uを含有する相同的なペプチドを用いて観察した反応とを比較することによって(何れの場合においても、前記ペプチドはウシ血清アルブミンと抱合された)、対象のクローンを同定した。

## 【0045】

<抗G1aモノクローナル抗体の精製:>

プロテインGを結合した樹脂によるアフィニティークロマトグラフィーを使用して、マウスの腹水又はマウスのハイブリドーマ細胞馴化培養液から、16種の各抗G1aモノクローナル抗体を精製した。全ての溶液は高度に純化した試薬及び水を用いて調製した。抗体含有溶液約50mLを0.45µmフィルターにかけた後、IgG結合用緩衝液(0.1M酢酸ナトリウム緩衝液/150mM NaCl、pH5.0)を用いて1:1に希釈し、IgG結合用緩衝液であらかじめ平衡化した5mLのHiTrap™ プロテインGカラム(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)に流速1mL/分でロードした。ロードした後、280nmにおける吸光度がベースラインのレベルに近接するまで、3mL/分の流速で、IgG結合用緩衝液を用いて該カラムを洗浄した。カラムに結合した抗体は、3mL/分の流速で、0.1Mグリシン-HCl、pH2.7を用いて溶出し、1M T

ris-HCl緩衝液、pH9.0(各9mLの溶出液につき1mLの緩衝液)を含有するチューブの中に、溶出液を集めた。最終濃度が0.5Mとなるように前記溶出液にNaClを加え、20mM Tris-HCl/0.5M NaCl、pH7.4中で前記抗体を透析し、濃縮した。EASY TITER(R) MOUSE IgGアッセイキット(Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA)、及び標準タンパク質としてImmuno Pure(R)マウス免疫グロブリンG(IgG)(Pierce)を製造業者の指示に従って使用することにより、前記精製抗体の濃度を決定した。Laemmli法(1970)に従い、不連続SDS-PAGEにより分離すると、前記16種の精製モノクローナル抗体は各々均一であることが明白となった。精製モノクローナル抗体は、使用するまで-20℃で保存した。

#### 【0046】

16種の各精製抗Gla抗体の特性をいくつかの方法により検討し、これらの解析に基づいて、前記抗体を7種の異なる群に分類することができた(表2)。

#### 【0047】

<モノクローナル抗体のウエスタンブロット分析:>

全ての溶液は高度に精製した試薬及び超純水を用いて調製した。ヒト第VII因子(hfVII)、ヒト第IX因子(hfIX)、活性化ヒト第IX因子(hIXa)、ヒト第X因子(hfX)、ヒトプロテインC(hPC)、ヒトプロテインS(hPS)、及びウシ骨Glaタンパク質(bBGP)の精製(血漿由来)サンプルは、Haematologic Technologies, Inc (Essex Junction, VT, USA)から購入した。タイガースネーク(*Notechis scutatus scutatus*)、タイパンスネーク(*Oxyuranus scutellatus*)、及びレッドベリッドブラックスネーク(*Pseudechis porphyriacus*)由来の凍結乾燥毒は、Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)から購入した。精製組換え活性化ヒトfVII(rhfVIIa)は、Novo Nordisk (Copenhagen, Denmark)から頂いた。hfIX、hPC、ヒトプロトロンビン(hPT)、hPT断片1、及び

脱炭酸化hPT断片1の精製サンプルは、標準的な方法によって実験室で調製した(Bajaj and Birktoft, 1993; Bajaj et al., 1982; Price 1984)。~5 µg/mLの組換えヒト成長停止特異的タンパク質6(rhGas6)を含有した馴化細胞培養液を、20 mM Tris-HCl/154 mM NaCl、pH7.4(すなわち、Tris緩衝化生理食塩水; TBS)中に透析し、使用前に濃縮した。場合によっては、標準的操作を用いたアミノ酸分析によってタンパク質濃度を決定し、さもなければ、分光測定により決定するか、又は製造業者が記載した濃度を使用した。BENCHMARK™ Prestained Protein Ladderは、Life Technologies, Inc(Taby, Sweden)から購入した。ニトロブルーテトラゾリウム(2', 2'-ジ-p-ニトロフェニル-5, 5'-ジフェニル-3, 3'-[3, 3'-ジメトキシ-4, 4'-ジフェニレン]ジテトラゾリウム クロライド)(すなわち、NBT)と5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸(BCIP)とは、Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)から購入した。

#### 【0048】

Laemmli法(1970)により、タンパク質サンプルを変性及び還元し、SDS/12%又は15%(w/v)ポリアクリルアミドゲル中で分離した。電気泳動後、前記ゲルを転写用緩衝液(10 mM 3-(シクロヘキシルアミノ)-1-プロパン-スルホン酸、pH11/10%(v/v)メタノール)中で10分間平衡化し、50Vの定電圧下で90~120分間、転写用緩衝液中でProblott™膜(Applied Biosystems, Inc., Stockholm, Sweden)に前記タンパク質を電気ブロッティングした。10%(w/v)スキムミルクパウダーを含有するTBS中で、穏やかに振盪させながら、前記膜を2時間インキュベートすることによって、非占有結合部位をブロックした。次に、膜を0.2%(v/v) Tween 20を含有するTBS(すなわち、TBS/T)で短時間リンスし、60分間室温で穏やかに振盪させながら、精製モノクローナル抗体(TBS/T中に5 µg/mL)とともにインキュベートした。前記膜をTBS/Tで洗浄し(各回につき1分間の洗浄を2回

行った後、各回につき5分間の洗浄を4回行った)、室温で30分間穏やかに振盪させながら、TBS/T中に1:1000に希釈したアルカリホスファターゼ抱合ウサギ抗マウスIgG(DAKO A/S, Glostrup, Denmark)とともにインキュベートした。前記膜をTBS/Tで洗浄し(各回につき1分間の洗浄を2回行った後、各回につき5分間の洗浄を4回行った)、66 $\mu$ LのNBT溶液(70%(v/v)ジメチルホルムアミド中に50mg/mL)と33 $\mu$ LのBCIP溶液(ジメチルホルムアミド中に50mg/mL)を添加した10mLの100mM Tris-HCl、pH9.5/100mM NaCl/5mM MgCl<sub>2</sub>中でインキュベートすることによって発色させた。pH7.4の0.25M エチレンジアミン4酢酸(EDTA)で膜をリンスすることによって発色を停止させた。実例として、モノクローナル抗体M3Bを用いて得られた結果が図1に示されており、ウエスタンブロッティング条件下で、前記抗体が広範な固定化Gla含有ポリペプチドに結合し得ることを実証している。7グループの各抗Glaモノクローナル抗体についての結果が表3に示されている。

#### 【0049】

<時間分解(time-resolved)免疫蛍光アッセイ:>

アッセイに用いる緩衝液とその他の溶液は、Wallac, Oy (Turku, Finland)から購入するか、又はWallacが推奨する手法に従い、純度の高い試薬から作製した。このように、アッセイ用緩衝液は、50mM Tris-HCl/154mM NaCl/20 $\mu$ Mジエチレントリアミンペンタ酢酸/0.01%(w/v) Tween 40/0.5%(w/v) BSA/0.05%(w/v) NaN<sub>3</sub>、pH7.8を含む溶液として作製するか、又はWallacから購入し、洗浄用緩衝液は、5mM Tris-HCl/154mM NaCl/0.005%(w/v) Tween 20/0.1% Germall II、pH7.8を含む溶液として作製するか、又はWallacから購入した。安定化溶液及び増強用溶液(Enhancement Solution)は、Wallacから購入した。吸引及び洗浄のステップでは、DELFI A (R) Researchのモデル1296-024プレート洗浄機

(Wallac)を用いて行い、蛍光測定は、DELFLIA(R) Research モデル1234 蛍光測定機(Wallac)を用い、1000/秒のパルス速度、320nmでの励起及び615nmでの発光によって行った。400 $\mu$ sの遅延後、フラッシュの間の400 $\mu$ 秒間に蛍光を測定した。用いたマイクロタイタープレートは96ウェル形式のMaxiSorp FluoroNunc™ brand(Nunc A/S, Roskilde, Denmark)の物であった。精製ポリクローナルマウスIgGは、Pierce Chemical Co.(Rockford, IL, USA)から購入した。DELFLIA(R) Eu-標識キット(Wallac)及び前記製造業者の支持に従って精製された標識タンパク質を用いて、N<sup>1</sup>-(p-イソチオシアノトベンジル)-ジエチレントリアミン-N<sup>1</sup>, N<sup>2</sup>, N<sup>3</sup>, N<sup>3</sup>-4酢酸(DTTA)のユーロピウム(Eu<sup>3+</sup>)キレートを用いて、精製ヒトプロトンビン(1mg)を標識した。標識化したヒトプロトンビン(Eu-hPT)は、安定化溶液中に-70で保存した。滴定実験に基づいて、コーティング工程用の抗体濃度を20 $\mu$ g/mL、Eu-hPTの濃度を1.5nMと選択し、アッセイでは(拮抗物質の非存在下で)最大約450,000cpsの蛍光強度が得られた。精製ポリクローナルマウスIgG(ImmunoPure(R) マウス IgG; Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA)でコートした対照ウェルについて測定したバックグラウンドの蛍光は、常に2000cps未満であった。データをプロットする前にバックグラウンドの数値を差し引いた。アッセイの標識結合工程のために、Eu標識タンパク質のストック溶液、拮抗タンパク質、抗体、及び血漿サンプル、並びに馴化細胞培養液をアッセイ用緩衝液中に希釈した。

#### 【0050】

<競争的免疫蛍光抗体アッセイ:>

溶液内に存在するタンパク質に対し、固定化抗G1aモノクローナル抗体の交差反応性を計測するために競争的免疫蛍光抗体アッセイを使用した。精製拮抗タンパク質は、「ウエスタンブロット分析」で既述した。精製抗G1aモノクローナル抗体又はポリクローナルマウスIgGを、TBS中に20 $\mu$ g/mLの濃度

になるように希釈し、マイクロタイタープレートに加えた(50 µL/ウェル)。4 で一晩プレートをインキュベートした後、溶液をウェルから除去し、アッセイ用緩衝液(300 µL/ウェル)を加えることによって、非占有結合部位をブロックし、2時間室温で該プレートを穏やかに振盪した。アッセイ用緩衝液を吸引により除去し、洗浄用緩衝液でプレートを2回洗浄した後、様々な濃度の拮抗タンパク質、又は様々な希釈度のヒト血漿若しくは馴化細胞培養液を予め混合した100 µL/ウェルの1.5 nM Eu-hPTをプレートに加えた。対照ウェルには、拮抗物質の非存在下で、1.5 nMのEu-hPTを100 µL加えた。室温で1時間、プレートを穏やかに振盪し、溶液を吸引除去し、プレートを4度洗浄し、増強用溶液を加えた(200 µL/ウェル)。5分間穏やかに、該プレートをボルテックスにかけ、サンプルの蛍光強度を計測した。実例として、モノクローナル抗体M3Bで得られた結果が図2に示されており、前記抗体が広範なG1a含有タンパク質及びペプチドに結合することを実証している。さらに、ワルファリン(R)( -カルボキシル化を抑制するビタミンKアンタゴニスト)による治療を受ける患者由来の血漿及び肝疾患を有する患者由来の血漿について観察された阻害度は、通常のヒト血漿で観察されるよりも著しく低下していた。

#### 【0051】

これ故、前記抗G1a抗体は血漿サンプル中におけるタンパク質のカルボキシル化の状態を評価するのに有益である可能性がある。7つのグループの各抗G1aモノクローナル抗体についての結果を表3に示す。

#### 【0052】

前記アッセイはG1a含有タンパク質を検出する感度のよい方法であることが判明した。図2で実証されているように、哺乳類のG1a含有タンパク質で調べた最少量(1.3~1.9 pmol es)でも、該アッセイによって容易に検出することができるので、前記感度は恐らくこれよりも相当に高い。それでも、前記アッセイは、(少なくとも50倍は)標準的なアミノ酸配列分析よりも高い感度を有する。

#### 【0053】

## &lt;非競争的免疫蛍光アッセイ：&gt;

非競合免疫蛍光アッセイを利用することによって、ヒトプロトロンビンの抗G1a抗体への結合を、 $Ca^{2+}$ イオンが強く阻害することが示された。20  $\mu$ g/mLの濃度になるように、精製抗G1aモノクローナル抗体、精製マウスモノクローナル抗ヒトプロテインC阻害因子抗体、及びポリクローナルマウスIgGをそれぞれTBS中に希釈し、マイクロタイタープレート(50  $\mu$ L/ウェル)に加えた。4で一晚プレートをインキュベートした後、前記溶液をウェルから除去し、非占有結合部位をアッセイ用緩衝液(300  $\mu$ L/ウェル)を加えてブロックし、室温で5時間、該プレートを穏やかに振盪した。アッセイ用緩衝液を吸引除去し、洗浄用緩衝液でプレートを2回洗浄した後、1.5 nMのEu-hPT又は1.5 nMのEu標識ヒトプロテインC阻害因子を適切なウェル(100  $\mu$ L/well)に加えた。(同等のイオン強度を維持するため)5 mM  $CaCl_2$ 又は15 mM NaClのいずれかを補充したアッセイ用緩衝液において、各標識タンパク質を調製した。

## 【0054】

前記プレートを室温で2時間穏やかに振盪し、前記溶液を吸引除去し、プレートを4度洗浄して、増強用溶液を加えた(200  $\mu$ L/ウェル)。前記プレートを5分間穏やかにボルテックスにかけ、サンプルの蛍光強度を計測した。7つのグループの各抗G1aモノクローナル抗体の結果を図3に示す。5 mMの $CaCl_2$ の存在下で強い結合の阻害が観察されたことは、 $Ca^{2+}$ イオンの存在下では、G1a残基がG1aドメインの内側に折り畳まれるコンフォメーションをプロトロンビンが採るために、大部分が溶媒から隔絶されることを実証した研究(Soriano-Garcia et al., 1992; Sunnerhagen et al., 1995)に合致している。

## 【0055】

## &lt;クロスオーバー免疫蛍光アッセイ：&gt;

20  $\mu$ g/mLの濃度になるように、精製抗G1aモノクローナル抗体及びポリクローナルマウスIgGをTBS中に希釈し、マイクロタイタープレートに加えた(50  $\mu$ L/ウェル)。プレートを4で一晚インキュベートした後、溶液

をウェルから除去し、非占有結合部位をアッセイ用緩衝液(300 µL/ウェル)を加えてブロックし、室温で2時間穏やかにプレートを振盪した。アッセイ用緩衝液を吸引除去し、前記プレートを洗浄用緩衝液で2回洗浄し、50 µg/mLの拮抗抗体と共に30分間ブレインキュベートした100 µL/ウェルの1.5 nM Eu-hPTをプレートに加えた。拮抗抗体の非存在下で100 µLの1.5 nM Eu-hPT、又は50 µg/mLのポリクローナルマウスIgGと共に30分間ブレインキュベートした100 µLの1.5 nM Eu-hPTをコントロールのウェルに注入した。プレートを室温で穏やかに1時間振盪し、前記溶液を吸引除去しプレートを4回洗浄し、増強用溶液を加えた(200 µL/ウェル)。前記プレートを5分間穏やかにボルテックスにかけ、サンプルの蛍光強度を測定した。該アッセイの結果に基づいて、前記抗Glaモノクローナル抗体に対して7種の異なる阻害パターンを観察した(表2)。

#### 【0056】

< Gla含有タンパク質の免疫沈降 : >

タイガースネーク(*Notechis scutatus scutatus*)の毒から得られる第X<sub>2</sub>因子様タンパク質の免疫沈降によって実証されたように、複雑な生物学的試料から免疫沈降によりGla含有タンパク質を単離するのに、モノクローナル抗体M3Bが有効な試薬であることが示された(図4)。N. s. scutatus (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)から得た凍結乾燥した毒物を、20 mM Tris-HCl / 154 mM NaCl、pH 7.4 (Tris緩衝化生理食塩水; TBS)に溶解させて、最終濃度1 mg/mLの毒液を得た。溶解した毒液(25 µg)のうち25 µLの分取試料を5 µL (5 µg)の精製モノクローナル抗体M3B (TBS中に1 mg/mL)とチューブ内で混合した。ネガティブコントロールとして、25 µLの分量の毒液(25 µg)に、抗体ではなく5 µLのTBSを加えた。対照として、TBS、TBS / 10 mM CaCl<sub>2</sub>、又はTBS / 10 mM EDTA (全量30 µL)のいずれかを含む溶液中、別個のチューブの中で、精製ヒトプロトロンビン (~ 2.2 µg)を5 µgの精製モノクローナル抗体M3Bと混合した。抗体なしのネガティブコントロールでは、TBS (全

量30 $\mu$ L)中に精製ヒトプロトンビン(2.2 $\mu$ g)が含まれていた。振盪台の台の上で、室温で90分間、サンプルをインキュベートした。この時間中に、ImmunoSorba(R)プロテインA結合ビーズ(Excorin(R)KB, Lund, Sweden)を調製した。穏やかにボルテックスすることによってビーズを再懸濁し、100 $\mu$ Lの分量を500 $\mu$ LのTBS/T(0.2%Tween 20を含有したTBS)と混合して、短時間遠心分離し、上清を廃棄した。このステップを繰り返し、最終的に600 $\mu$ LのTBS/Tの中にビーズを再懸濁した。90分後に、サンプルのインキュベーションを終了し、100 $\mu$ Lの前記再懸濁したビーズを上記の各反応物に加え、サンプルを3時間穏やかに室温で振盪してインキュベートした。次に、前記反応物を5分間、10,000gで遠心分離し、上清を吸引除去し、廃棄した。400 $\mu$ LのTBS/T中に再懸濁することにより前記ビーズを洗浄し、サンプルを5分間10,000gで遠心分離して上清を廃棄した。前記洗浄ステップをさらに2回繰り返した。なおビーズに結合しているタンパク質を、1.25%(v/v)-メルカプトエタノール及び0.0003%(w/v)プロモフェノールブルーを含有する25 $\mu$ Lの15.6mM Tris-HCl/0.5%(w/v)SDS/2.5%(v/v)グリセロール、pH6.8を加え、サンプルを85 $^{\circ}$ Cで10分間加熱することによって解離させた。続いて、10分間、20,000gでサンプルを遠心分離し、Laemmliの不連続系(1970)を用いたSDS/12%(w/v)ポリアクリルアミドゲル中での電気泳動によって、上清のタンパク質を分離した。参照タンパク質(Kaleidoscope Prestained Standards; Bio-Rad Laboratories AB, Sundbyberg, Sweden)も電気泳動した。「ウエスタンブロット分析」で既述したように、前記タンパク質をImmobilon<sup>TM</sup>-P膜(Millipore AB, Sundbyberg, Sweden)に電気ブロッキングし、モノクローナル抗体M3B及びアルカリホスフェターゼ抱合ウサギ抗マウスIgG(DAKO A/S, Glostrup, Denmark)を用いたウエスタンブロットングによって、Gla含有ポリペプチドを検出した。

【0057】

<免疫アフィニティークロマトグラフィーによるタイガースネーク (N. s. scutatus) 第Xa因子様タンパク質の精製:>

50 mMのCaCl<sub>2</sub>を溶出ステップに用いたモノクローナルM3B結合樹脂上でのクロマトグラフィーにより、N. s. scutatusの毒から第Xa因子様タンパク質を単離することによって実証したように、クロマトグラフィー用の樹脂に結合された抗Glaモノクローナル抗体を用いる免疫クロマトグラフィーは複雑な生物の体液からGla含有タンパク質を単離するのに、選択性のある、迅速で穏やかな方法であることを見出した。

#### 【0058】

特に記述しない限り、全ての操作は室温で行った。免疫アフィニティー樹脂を調製するため、モノクローナル抗体M3B (100 mg) を酸化的緩衝液 (Oxidation Buffer) (20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 / 0.5 M NaCl、pH 5) の中に透析して、2.5 mLの体積に濃縮した。(抗体上の糖質部を酸化するために) 50 µLの0.5 M メタ過ヨウ素酸ナトリウムをサンプルに加え、遮光して室温で1時間溶液を穏やかに振盪した。125 µLのグリセロールを加えることによって酸化反応を終了させ、PD-10ゲル濾過カラム (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) でクロマトグラフィーを行うことによって、カップリング緩衝液 (0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 / 1 M NaCl、pH 4.9) に前記サンプルを入れ替えた。9 mL (排液したベッド容積) のUltraLink Immobilized Hydrazide樹脂 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) にサンプル (体積3.5 mL) を加え、4 で14時間インキュベートした。30 mLの酸化的緩衝液で前記樹脂を洗浄し、樹脂の製造業者の指示に従って、分光測定法によりカップリング効率を推定するのに該樹脂を使用した。カップリング効率は97%と推定された。使用するまで0.05% (w/v) NaN<sub>3</sub>を含有する20 mM Tris-HCl / 0.5 M NaCl、pH 7.4中に、4 で樹脂を保存した。

#### 【0059】

3.5 mLの一定したベッド容量を有する免疫アフィニティークラムを調製す

るために、モノクローナル抗体M3B結合樹脂の一部を使用し、結合用緩衝液 (Binding Buffer) (19mM Tris-HCl / 146mM NaCl / 10mM EDTA, pH7.4) で該カラムを平衡化した。凍結乾燥したタイガースネーク (N. S. Scutatus) の毒 (10mg; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を2.5 mLの結合用緩衝液に溶解させ、結合用緩衝液であらかじめ平衡化したPD-10ゲル濾過カラム (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) でクロマトグラフィーを行った。0.5 mL / 分の流速で、該毒調製物を免疫アフィニティーカラムにかけて、流出液の280nmでの吸光度 ( $A_{280}$ ) をモニターした。 $A_{280}$  がベースラインレベル近辺まで減少した後、2 mL / 分の流速で、19mM Tris-HCl / 354mM NaCl / 10mM EDTA、pH7.4で該カラムを洗浄した。19mM Tris-HCl / 146mM NaCl / 50mM  $CaCl_2$ 、pH7.4を用いて、カラムに結合したタンパク質を溶出した (図5A)。前記 $Ca^{2+}$ で溶出された画分をTBSで透析し、 $-20^{\circ}C$  で保存した。

#### 【0060】

フロースルー画分 (ロード中に、前記樹脂に結合しなかったタンパク質) 及び $Ca^{2+}$ で溶出された画分をSDS-PAGEとウエスタンブロット分析 (図5B及びC) によって調べた。還元状態下でのSDS-PAGE (図5B) により判断すれば、精製タンパク質は、(「軽鎖」及び「重鎖」と称される) 2つのサブユニットを含んでいた (図5B)。第X因子等の哺乳類の止血性タンパク質のG1aドメインと類似のドメインを含有すると予想される軽鎖のみが、モノクローナル抗体M3B (図5C) 及びその他の抗G1aモノクローナル抗体によって認識された (表3)。フロースルー画分は、ウエスタンブロットではモノクローナル抗体M3Bと交差反応せず (図5C)、カラムを一回通過する間に、第Xa因子様タンパク質の大部分又は全てが、免疫アフィニティー樹脂によって高い効率で結合されてしまったことを示唆している。N. s. scutatusの毒から免疫アフィニティークロマトグラフィーによって単離された前記タンパク質は、結論的には、以下の基準によって、G1a含有するタンパク質 (N. s. sc

utatusの第Xa因子様タンパク質)であると同定された。

【0061】

1. 他の研究者によって、別の方法(サイズ排除クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィー)(Tans et al., 1985)を用いて精製されたGla含有N. s. scutatus第Xa因子様タンパク質に関して報告された構造と、単離されたタンパク質のサブユニット構造(すなわち、軽鎖と重鎖を含む)とが合致した(図5B)。

【0062】

2. 単離したタンパク質の軽鎖(10残基)に関するN末端のアミノ酸配列分析によって、2つのGla残基を含むS-N-S-L-F- - -I-R-P(はGla残基を意味する)配列であることが判明した。他の近縁のコブラ科のヘビ、Tropidechis carinatus(Joseph et al., 1999)の毒から単離した第Xa因子様タンパク質(プロトロンピン活性化因子)の軽鎖のN末端についての報告と前記配列は同一であった。

【0063】

N末端のアミノ酸配列分析のために、免疫アフィニティーで精製したタンパク質をジチオスレイトールで還元し、標準的操作を用い、ヨードアセトアミドでアルキル化した。重鎖及び軽鎖のポリペプチドをSDS-PAGEによって分離し、ProBlott™膜(Applied Biosystems, Inc., Stockholm, Sweden)に電気ブロッティングし、クマシーブルーR-250で染色して、ポリペプチドを検出した。軽鎖のポリペプチドに相当するバンドを膜から切除し、半切した。一方は、それ以上修飾せずに、エドマン分解化学とABIタンパク質配列決定装置(Perkin-Elmer Corp., Stockholm, Sweden)を用いて、N末端の配列分析に使用した。これにより、配列S-N-S-L-F-X-X-I-R-P(翻訳後調節を受けるGla等のアミノ酸がこれらの位置に存在する場合に予測されるように、Xは明瞭なシグナルが観察されなかったことを示す)が判明した。

【0064】

もう一方の膜を用いて配列分析を開始する前に、インシチュでGla残基をメ

チルエステル化するために、まずアミノ酸配列決定装置の中でメタノール塩酸 (methanolic HCl) により膜を処理して、配列分析中にそれらを検出できるようにした。この処理後、配列 S - X - X - L - F - - - I ( は Gl a 残基を意味する ) を得た。

【0065】

【表1】

表1. 合成ペプチド

ペプチド	アミノ酸配列 <sup>1</sup>
JS30	NH <sub>2</sub> - K A D γ D A F A γ A A L A γ γ A D A - COOH G I F G G D G D Q G D G K K G K Q I H G S H I L L L I L S K K I V K Q Q T L L T V T P N Y L S V T S Y T Y V V
JS31	NH <sub>2</sub> - K A A γ A A A A γ A A A A γ γ A A A K K C-COOH
JS32	NH <sub>2</sub> - K A A E A A A A E A A A A E E A A A K K C-COOH
JS44 (γ)	NH <sub>2</sub> - L T G K γ L T G D C - COOH
JS44 (E)	NH <sub>2</sub> - L T G K E L T G D C - COOH
JS44 (γγ)	NH <sub>2</sub> - L T G K γ γ L T G D C - COOH
JS45 (γ)	NH <sub>2</sub> - A S R V γ T A F G C - COOH
JS45 (E)	NH <sub>2</sub> - A S R V E T A F G C - COOH
JS45 (γγ)	NH <sub>2</sub> - A S R V γ γ T A F G C - COOH

<sup>1</sup>アミノ酸配列は一文字コードで表されている。γ - カルボキシグルタミル残基は γ で表記されている。

【表2】

表 2

## 様々な方法によるモノクローナル抗体の分類

方法	抗体						
	M3B	M5	M12B	M17	M27	M42	M24
		M5B		M22B	M52		M47
		M76					M54
							M55
							M57
							M69
方法	グループ						
IgGサブクラスの分析	2k	1k	1k	1k	1k	3k	1k
アガロースゲル電気泳動	A	b	c	d	e	f	E
SDS-PAGE	A	A	A	A	B	A	A
ウェスタンブロット	I	ii	ii	ii	iii	ii	Iv
拮抗イムノアッセイ	I	II	III	IV	V	VI	VII
クロスオーバーイムノアッセイ	I	II	III	IV	V	VI	VII
総合的グループ	1	2	3	4	5	6	7

IgGサブクラス、アガロース及びSDS-ポリアクリルアミドゲル中での移動度、及びウェスタンブロット分析で決定した交叉反応性、並びに拮抗及びクロスオーバーイムノアッセイに従って、16のモノクローナル抗体をグループ分けした。これらの特性に基づいて、7つのグループが区別された。

【表3】

表 3

## モノクローナル抗体の交叉反応性

抗原	抗体 (グループ)						
	M3B (1)	M5 (2)	M12B (3)	M22B (4)	M27 (5)	M42 (6)	M55 (7)
ウェスタンブロット分析							
hPT	+	+	+	+	+	+	+
hPT F1	+	+	+	+	+	+	+
hPTFI (脱炭酸)	-	-	-	-	-	-	-
hFVII	+	+	+	+	+	+	+
rhFVIIa	+	+	+	+	+	+	+
hFIX	+	+	+	+	+	+	+
hFIXa	+	+	+	+	+	+	+
hFX	+	+	+	+	+	+	+
hPC	+	-	-	-	+	-	+/-
hPS	+	+	+	+	+	+	+
rhGas6	+	+	+	+	+	+	+
クロヘビのFX <sub>a</sub> -LP	+	+	+	+	+	+	+
タイパンのFX <sub>a</sub> -LP	+	+	+	+	+	+	+
トラヘビのFX <sub>a</sub> -LP	+	+	+	+	+	+	+
bBGP	+	-	-	-	-	-	-
JS44 (γ) -BSA	+	+	+	+	-	+	-
JS44 (E) -BSA	-	-	-	-	-	-	-
JS44 (γγ) -BSA	+	+	+	+	-	+	-
JS45 (γ) -BSA	+	+	+	+	-	+	-
JS45 (E) -BSA	-	-	-	-	-	-	-
JS45 (γγ) -BSA	+	+	+	+	-	+	-

(つづく)

表3(つづき)

## モノクローナル抗体の交叉反応性

抗原	抗体 (グループ)						
	M3B (1)	M5 (2)	M12B (3)	M22B (4)	M27 (5)	M42 (6)	M55 (7)
	免疫蛍光アッセイ						
hPT	+	+	+	+	+	+	+
hPT F1	+	+	+/-	+	+	+	+
hPT F1 (脱炭酸)	-	-	-	-	-	-	-
rhFVIIa	+	+	+	+	+	+	+
hFIX	+	+	+	+	+	+	+
hFX	+	+	+	+	+		+
hPC	+	+	+/-	+	+	+/-	+
hPS	+	+	+	+	+	+	+
rhGas6	+	+	+	+	+	+	+
bBGP	+	-	-	-	-	-	+/-
コナントキング	+/-	+	+/-	-	+	n.d.	+
JS44 (γ) -BSA	+	+	+	+	+/-	+	-
JS44 (E) -BSA	-	-	-	-	-	-	-
JS44 (γγ) -BSA	+	+	+	+	-	+	-
JS45 (γ) -BSA	+	+	+	+	-	+	-
JS45 (E) -BSA	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
JS45 (γγ) -BSA	+	+	+	+	+/-	+	-

ウェスタンブロット及び拮抗免疫蛍光アッセイ中で、モノクローナル抗体によって示された交叉反応性の程度が、強(+)、弱(+/-)、又は検出不能(-)の何れかのスコアで示されている。  
n.d.、測定せず。

【0066】

【参考文献】

- Bajaj, S. P. and Birktoft, J. J. (1993) Human factor IX and factor IXa. *Methods in Enzymology* 222, 96-128
- Bajaj, S. P., Price, P. A. and Russell, W. A. (1982) Decarboxylation of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid residues in human prothrombin: stoichiometry of calcium binding to  $\gamma$ -carboxyglutamic acid in prothrombin. *Journal of Biological Chemistry* 257, 3726-3731
- Borrebäck, C. A. K. and Eylar, M. E. (1981) Production and characterisation of a monoclonal antibody against the second seed lectin of the *Dolichos biflorus* plant. *Journal of Biological Chemistry* 256, 4723-4725
- Cairns, J. R., Williamson, M. K. and Price, P. A. (1991) Direct identification of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid in the sequencing of vitamin K-dependent proteins. *Analytical Biochemistry* 199, 93-97
- Frackelton, A. R., Jr., Ross, A. H. and Eisen, H. N. (1983) Characterization and use of monoclonal antibodies for isolation of phosphotyrosyl proteins from retrovirus transformed cells and growth factor-stimulated cells. *Molecular and Cellular Biology* 3, 1343-1352
- Furie, B., Bouchard, B. A. and Furie, B. C. (1999) Vitamin K-dependent biosynthesis of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid. *Blood* 93, 1798-1808
- Jie, K.-S. G., Gijsbers, B. L. M. G. and Vermeer, C. (1995) A specific colorimetric staining method for  $\gamma$ -carboxyglutamic acid-containing proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 224, 163-165
- Joseph, J. S., Chung, M. C. M., Jeyaseelan, K. and Kini, R. M. (1999) Amino acid sequence of Trocarin, a prothrombin activator from *Tropidechis carinatus* venom: its structural similarity to coagulation factor Xa. *Blood* 94, 621-631
- Kulman, J. D., Harris, J. E., Haldeman, B. A. and Davie, E. W. (1997) Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich  $\gamma$ -carboxyglutamic acid

- proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 9058-9062
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685
  - Nishimoto, S. K. (1990) A colorimetric assay specific for  $\gamma$ -carboxyglutamic acid-containing proteins: its utility in protein purification procedures. Analytical Biochemistry 186, 273-279
  - Olivera, B. M., Rivier, J., Clark, C., Ramilo, C. A., Corpuz, G. P., Abogadie, F. C., Mena, E. E., Woodward, S. R., Hillyard, D. R. and Cruz, L. J. (1990) Diversity of *Conus* neuropeptides. Science 249, 257-263
  - Persson, E., Selander, M., Linse, S., Drakenberg, T., Ohlin, A. K. and Stenflo, J. (1989) Calcium binding to the isolated  $\beta$ -hydroxyaspartic acid-containing epidermal growth factor-like domain of bovine factor X. Journal of Biological Chemistry 264, 16897-16904
  - Price, P. A. (1984) Decarboxylation of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid residues in proteins. Methods in Enzymology 107, 548-551
  - Rigby, A. C., Lucas-Meunier, E., Kalume, D. E., Czerwiec, E., Hambe, B., Dahlqvist, I., Fossier, P., Baux, G., Roepstorff, P., Baleja, J. D., Furie, B. C., Furie, B. and Stenflo, J. (1999) A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 5758-5763
  - Soriano-Garcia, M., Padmanabhan, K., de Vos, A. M. and Tulinsky, A. (1992) The  $\text{Ca}^{2+}$  ion and membrane binding structure of the Gla domain of Ca-prothrombin fragment 1. Biochemistry 31, 2554-2566
  - Stenflo, J. and Dahlbäck, B. (1994) Vitamin K-dependent proteins. In The Molecular Basis of Blood Diseases, Stamatoyannopoulos, G., Nienhuis, A. W., Majerus, P. W.

- and Varmus, H., ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 565-598
- Stocker, K., Hauer, H., Möller, C. and Triplett, D. A. (1994) Isolation and characterization of Textarin®, a prothrombin activator from eastern brown snake (*Pseudonaja textilis*) venom. *Toxicon* 32, 1227-1236
  - Sunnerhagen, M., Forsén, S., Hoffrén, A. M., Drakenberg, T., Teleman, O. and Stenflo, J. (1995) Structure of the Ca<sup>2+</sup>-free Gla domain sheds light on membrane binding of blood coagulation proteins. *Nature Structural Biology* 2, 504-509
  - Suttie, J. W. (1985) Vitamin K-dependent carboxylase. *Annual Review of Biochemistry* 54, 459-477
  - Tam, J. P. (1988) Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5409-5413
  - Tans, G., Govers-Riemslog, J. W. P., van Rijn, J. L. M. L. and Rosing, J. (1985) Purification and properties of a prothrombin activator from the venom of *Notechis scutatus scutatus*. *Journal of Biological Chemistry* 260, 9366-9372
  - Vermeer, C. and De Boer-Van den Berg, M. A. (1985) Vitamin K-dependent carboxylase. *Haematologia* 18, 71-97

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

ウェスタンブロットされたタンパク質に対するモノクローナル抗体M3Bの交叉反応性。SDS/12%(w/v)ポリアクリルアミドゲル(分子量(5.8kDa)が小さいために、3μgのタンパク質と15%のゲルを用いたウシの骨Glaタンパク質を除く)中で、変性、還元されたタンパク質試料(それぞれ~0.5μg)を電気泳動した。該タンパク質をProBlot™膜に電気ブロッキングし、順次、モノクローナル抗体M3Bとアルカリホスファターゼ抱合ウサギ抗マウスIgGとともにインキュベートした。BCIP/NBT基質溶液を用いて、前記ウェスタンブロットを発色した。図で用いられている略号は、以

下のとおりである。h P T、ヒトのプロトンビン ( 1 0 個の G l a 残基を含有している ) ; h P T 断片 1、成熟タンパク質の残基 1 ~ 1 5 6 を含むヒトのプロトンビンの断片 ( 1 0 個の G l a ) ; h P T 断片 1 ( 脱炭酸 )、熱処理して G l a 残基を G l u に変換した h P T 断片 1 ; h f V I I、ヒトの第 V I I 因子 ( 1 0 個の G l a ) ; h f I X、ヒトの第 I X 因子 ( 1 2 個の G l a ) ; h f X、ヒトの第 X 因子 ( 1 1 個の G l a ) ; h P C、ヒトのプロテイン C ( 9 個の G l a ) ; h P S、ヒトのプロテイン S ( 1 1 個の G l a ) ; r h G a s 6、組換えヒト成長停止特異的タンパク質 6 を含有する馴化細胞培地 ( 血漿由来の h G a s 6 は、1 1 個の G l a 残基を含有する ) ; J S 4 4 ( ) - B S A、J S 4 5 ( ) - B S A、J S 4 4 ( E ) - B S A、及び J S 4 5 ( E ) - B S A、対応する位置に単一の G l a ( ) 残基又は G l u ( E ) 残基を含有する B S A 抱合合成ペプチド ( 表 1 参照 )。ウシの骨 G l a タンパク質又はオステオカルシン ( b B G P ) は、3 つの G l a 残基を含有しており、図の一番右側に示されている。モノクローナル M 3 B は、G l a 含有タンパク質及びペプチドのみと交差反応し、脱炭酸された h P T 断片 1、J S 4 4 ( E ) - B S A 又は J S 4 5 ( E ) - B S A とは交差反応しない。サブユニットを 2 つ含むタンパク質 ( 重鎖と軽鎖、すなわち h f X と h P C ) の場合、G l a ドメインを含有する軽鎖のみが認識された。

## 【図 2】

溶液中のタンパク質に対する固定化されたモノクローナル抗体 M 3 B の交差反応性を実証する拮抗免疫蛍光アッセイ。2 0  $\mu$  g / m L ( 5 0  $\mu$  L / ウェル ) の濃度、4 で一晩、マイクロタイタープレートのウェル上に、精製したモノクローナル抗体 M 3 B をコートした。アッセイ用緩衝液 ( 3 0 0  $\mu$  L / ウェル ) を加え、室温で 2 時間、前記プレートを穏やかに揺動させることによって、ウェル中の占有されていない結合部位をブロックした。吸引により前記アッセイ用緩衝液を除去し、洗浄用緩衝液で前記プレートを 2 度洗浄し、様々な濃度の拮抗タンパク質又は様々な希釈率のヒト血漿又は馴化細胞培養培地を予め混合した 1 0 0  $\mu$  L / ウェルの 1 . 5 n M E u - h P T を前記プレートに加えた。対照ウェルには、拮抗物質の非存在下で、1 0 0  $\mu$  L の 1 . 5 n M E u - h P T を与えた。

穏やかに振盪させながら、室温で1時間インキュベートした後に、吸引により溶液を除去し、前記プレートに4度洗浄し、増強用溶液を加えた(200 µL/ウェル)。前記プレートを5分間穏やかにボルテックスし、前記試料の蛍光強度(カウント/秒、cps)を測定した。拮抗物質の非存在下で測定したcps値を100%とした。データ値は、二組の試料から得られた平均である。図の脚注に列記されているタンパク質とペプチドは以下のとおりである：脱炭酸されたhPT断片1(熱処理を施して、G1a残基の大部分を破壊された、ヒトのプロトロンピン(hPT)の残基1~156を含む断片)、コナントキンG(5個のG1a残基を含有する円錐状巻貝の毒から得られる17アミノ酸ペプチド)、bBGP(ウシ骨G1aタンパク質又はオステオカルシン、3個のG1a残基)、hPT断片1(10個のG1a残基)、hPT(完全長hPT、10個のG1a残基)、rhfVIIa(活性化された組換えヒト第VII因子、血漿由来のhfVIIには、10個のG1a残基が存在する)、hfIX(ヒト第IX因子、12個のG1a残基)、hfX(ヒト第X因子、11個のG1a残基)、hPC(ヒトのプロテインC、9個のG1a残基)、hPS(ヒトのプロテインS、11個のG1a残基)、rhGas6(組換えヒト成長停止特異的タンパク質6を含有する馴化細胞培養培地、血漿由来のGas6には11個のG1a残基が存在する)。表1には、対応する位置に1及び2個のG1a残基又はG1uを含有する、BSAに結合された6つのペプチド(JS44とJS45系列)が記載されている。

### 【図3】

固定化された抗G1aモノクローナル抗体へのヒトプロトロンピンの結合に対するCa<sup>2+</sup>の阻害的效果。20 µg/mLの濃度(50 µL/ウェル)、4で一晩、マイクロタイタープレートのウェル上に、精製した抗G1aモノクローナル抗体と精製したマウスの抗ヒトプロテインC阻害剤モノクローナル抗体をコートした。アッセイ用緩衝液(300 µL/ウェル)を加え、室温で5時間、前記プレートを穏やかに揺動させることによって、ウェル中の占有されていない結合部位をブロックした。吸引により前記アッセイ用緩衝液を除去し、洗浄用緩衝液で前記プレートを2度洗浄し、1.5 nM Eu-hPT又は1.5 nM Eu

標識されたヒトプロテインC阻害剤を適切なウェルに加えた(100 $\mu$ /ウェル)。(等しいイオン強度を維持するために)5mM CaCl<sub>2</sub>又は15mM NaClの何れかを補充したアッセイ用緩衝液中に、各標識タンパク質を調製した。前記プレート室温で2時間穏やかに揺動させた後に、吸引により溶液を除去し、前記プレートを4度洗浄し、増強用溶液を加えた(200 $\mu$ L/ウェル)。前記プレートを5分間穏やかにボルテックスし、前記試料の蛍光強度(カウント/秒、cps)を測定した。Ca<sup>2+</sup>の非存在下で測定したcps値に任意の値100を与え、Ca<sup>2+</sup>の存在下で測定した蛍光をこの値に対してプロットした。データ値は、二組の試料から得られた平均である。

#### 【図4】

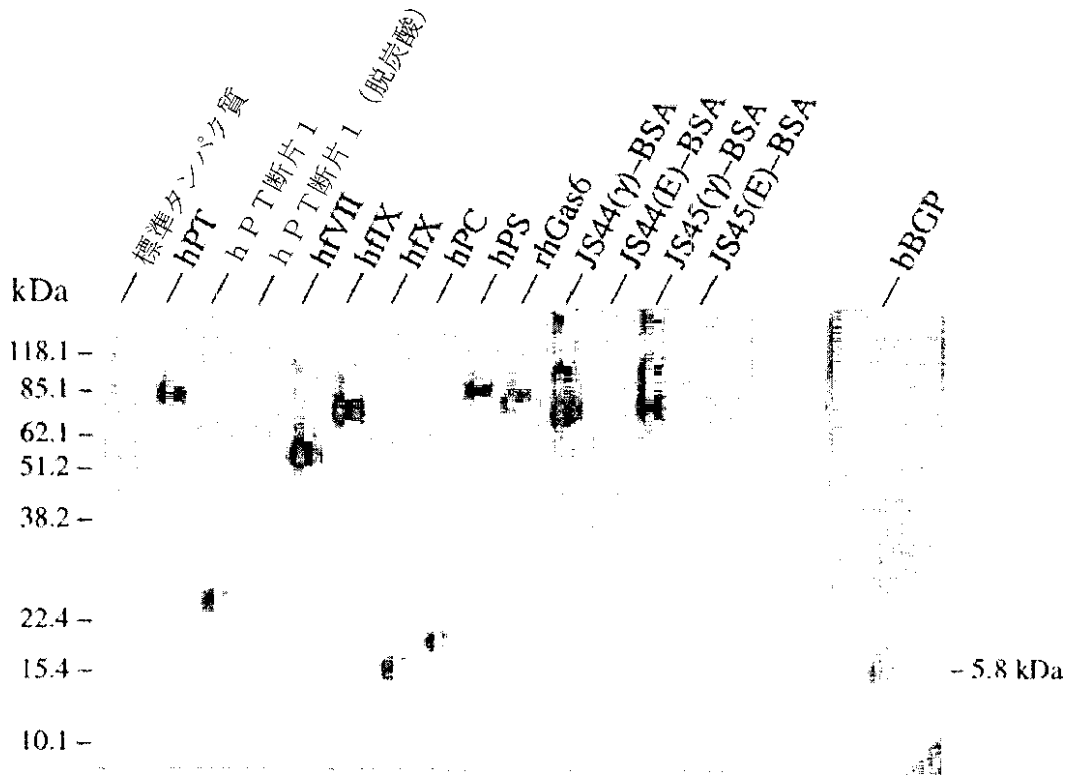
モノクローナル抗体M3BによるG1a含有タンパク質の免疫沈降。様々な緩衝溶液(TBS、10mM CaCl<sub>2</sub>を含有するTBS、又は10mM EDTAを含有するTBS)中の5 $\mu$ gのモノクローナル抗体M3Bとともに(+M3Bと表記されているレーン参照)、タイガースネーク(Tiger snake)(*Notechis scutatus scutatus*)の毒(25 $\mu$ g)又はヒトプロトロンビン(hPT、2.2 $\mu$ g)を90分間インキュベートした。抗体なしの対照も実施した(-M3Bと表記されているレーン参照)。プロテインAを結合したビーズを試料に加え、3時間のインキュベート後に、ビーズを完全に洗浄した。ビーズに結合した抗体抗原複合体を溶出し、モノクローナル抗体M3Bとアルカリホスファターゼ抱合ウサギ抗マウスIgGとを用いたウェスタンブロット分析によってG1a含有ポリペプチドを検出した。図の一番右側のレーンは、標準的な手順(Stocker et al., 1994)に従ったバリウム-クエン酸沈降によって単離された*N. s. scutatus*の第X<sub>3</sub>因子様タンパク質(fX<sub>3</sub>-LP)を含む対照試料を含んでいた。免疫沈降された試料中には、hPTとヘビのfX<sub>3</sub>-LPタンパク質の軽鎖に対応するバンドが明瞭に認められた。予想どおり、hPTの免疫沈降は、CaCl<sub>2</sub>の添加によって阻害された。

#### 【図5】

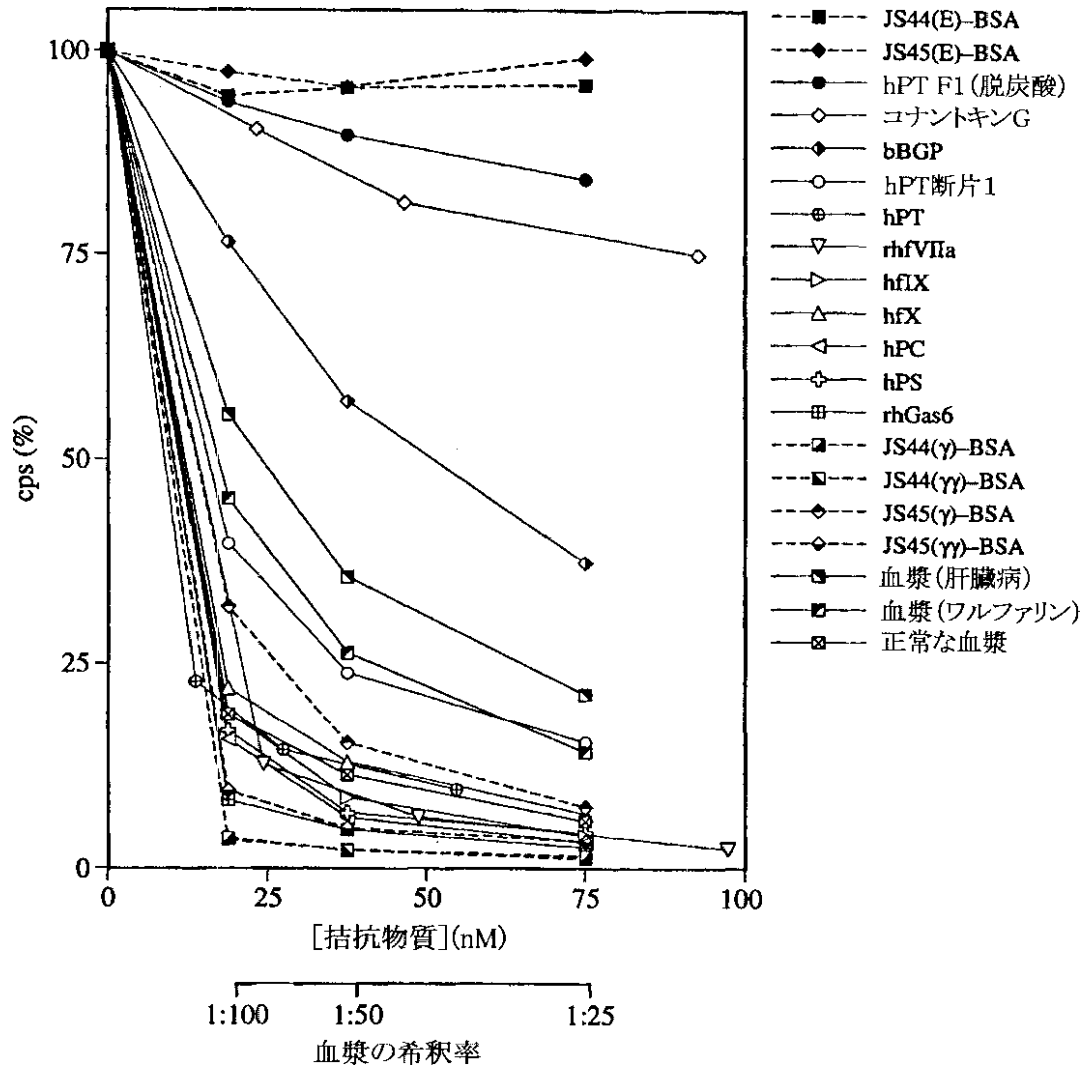
免疫アフィニティークロマトグラフィーによるタイガースネークの第X<sub>3</sub>様タ

ンパク質の精製。UltraLink Immobilised Hydrazideレジンにモノクローナル抗体M3Bを共有結合で付着させ、3.5mLの一定したベッド容量を有するカラムを調製し、結合用緩衝液(19mM Tris-HCl / 146mM NaCl / 10mM EDTA, pH 7.4)中で平衡化させた。2.5mLの結合用緩衝液中に凍結乾燥したタイガースネーク(*Notechis scutatus scutatus*)の毒(10mg、Sigma Chemical Co.)を溶解し、調製物中のCa<sup>2+</sup>濃度を減らすために、PD-10ゲルろ過カラムでのクロマトグラフィーを行った。0.5mL/分の流速で免疫アフィニティークラム(A)に、毒調製物をロードし、A<sub>280nm</sub>がほぼベースラインレベルに戻った時点で、2mL/分の流速で、19mM Tris-HCl / 354mM NaCl / 10mM EDTA, pH 7.4を用いて前記カラムを洗浄した。19mM Tris-HCl / 146mM NaCl / 50mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4を用いて、カラムに結合したタンパク質を溶出させた。分析のために、フロースルーとCa<sup>2+</sup>で溶出した画分(バーによって示されている)とを別々に収集した。ゲルろ過した毒調製物、並びに免疫アフィニティークロマトグラフィーの間に収集されたフロースルー及びCa<sup>2+</sup>で溶出した画分の分取試料を変性、還元し、SDS / 12% (w/v) ポリアクリルアミドゲル中で二組のサンプルを電気泳動した。電気泳動後に、ゲルを2片に切断し、一方の切片中のタンパク質をクマシーブルーR-250色素で染色することによって検出した(B)。ProBlot<sup>TM</sup>膜に、他方のゲル切片中のタンパク質を電気プロットし、モノクローナル抗体M3B、そしてアルカリホスファターゼ抱合ウサギ抗マウスIgGで順次インキュベートした。BCIP / NBT基質溶液を用いて、ウェスタンブロット(C)を発色した。

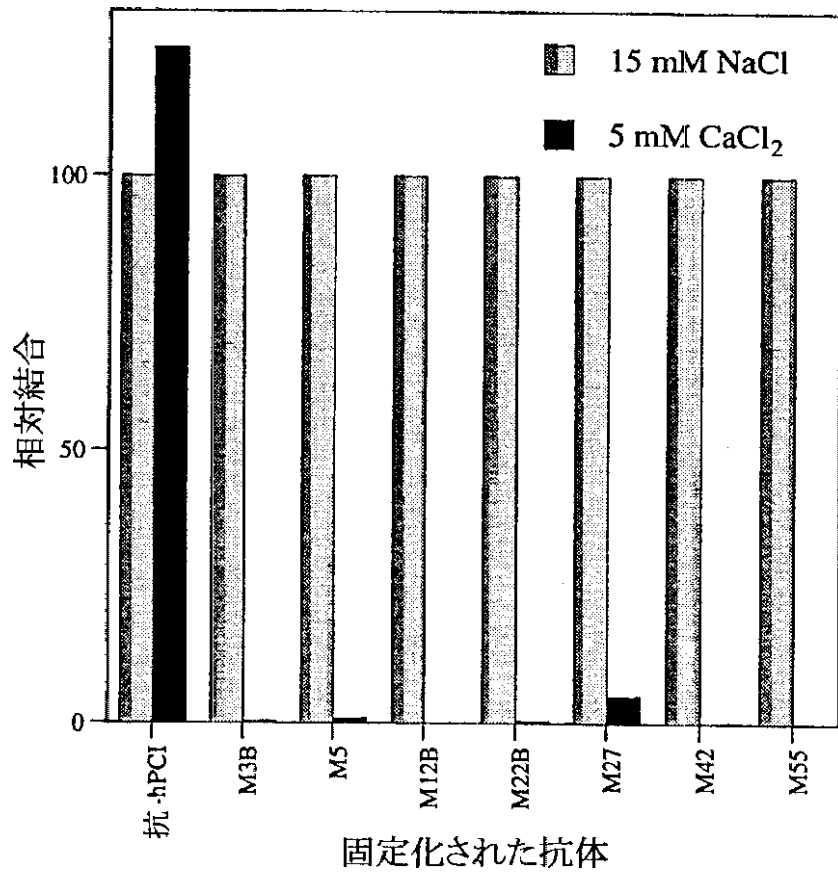
【図1】



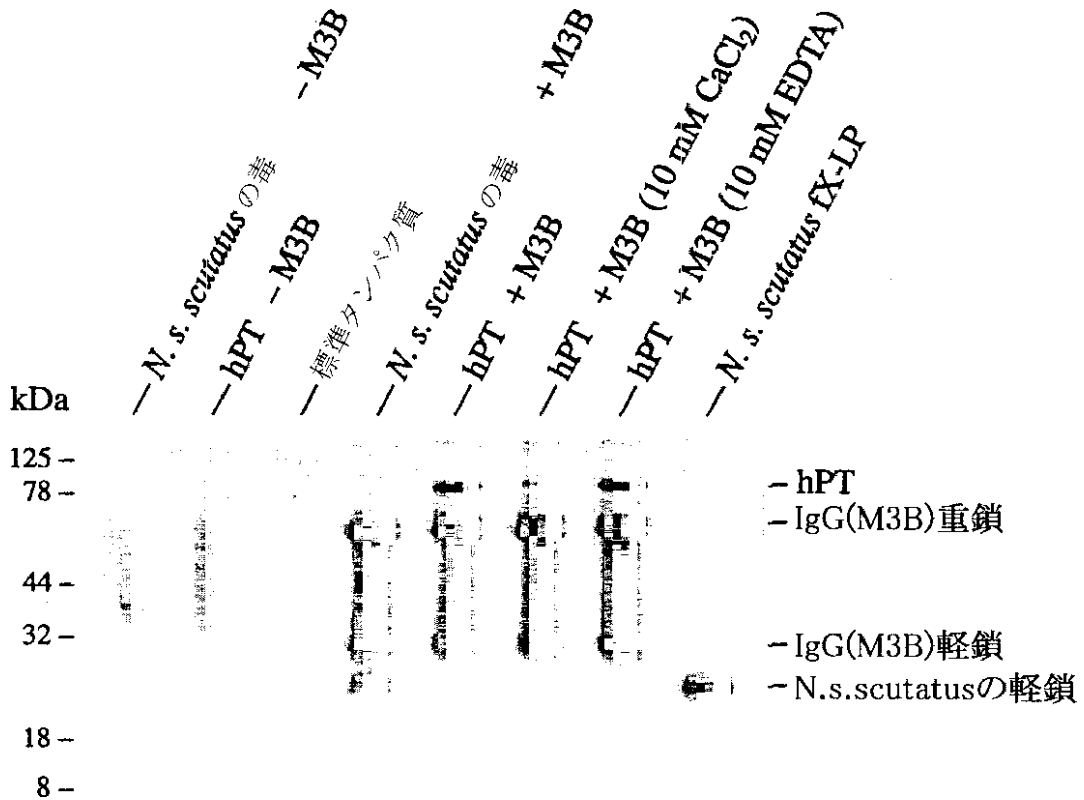
【図2】



【図3】

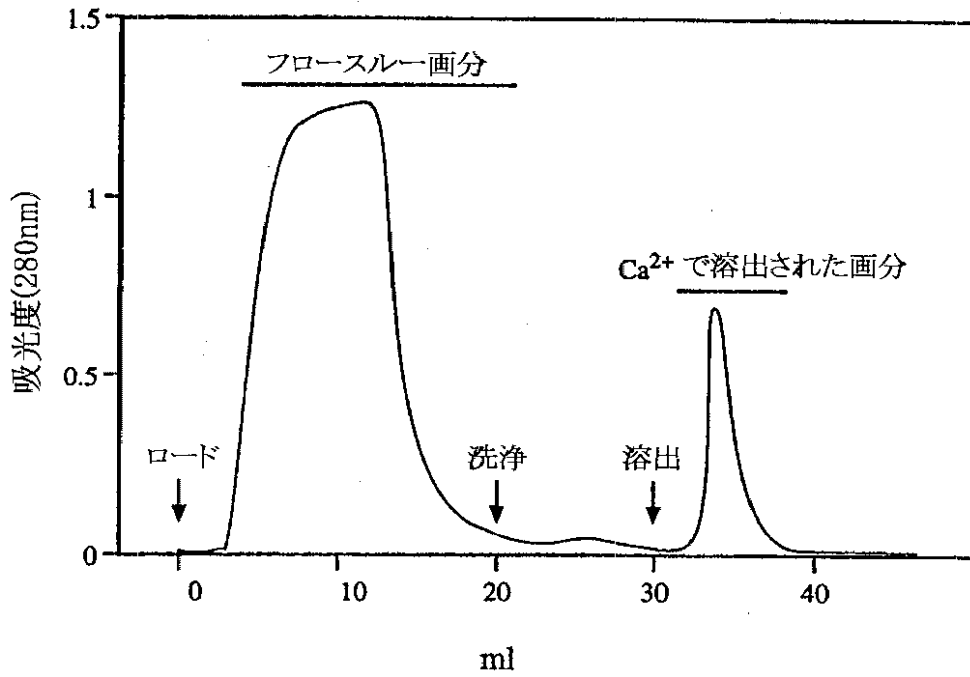


【図4】

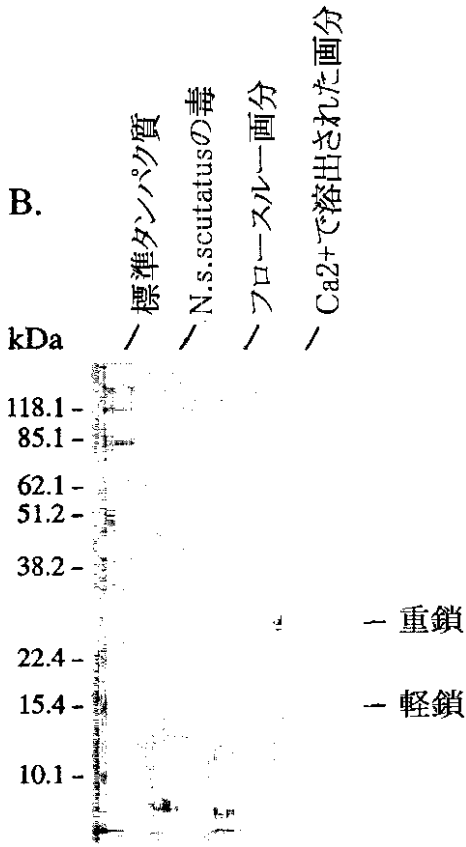


【図5】

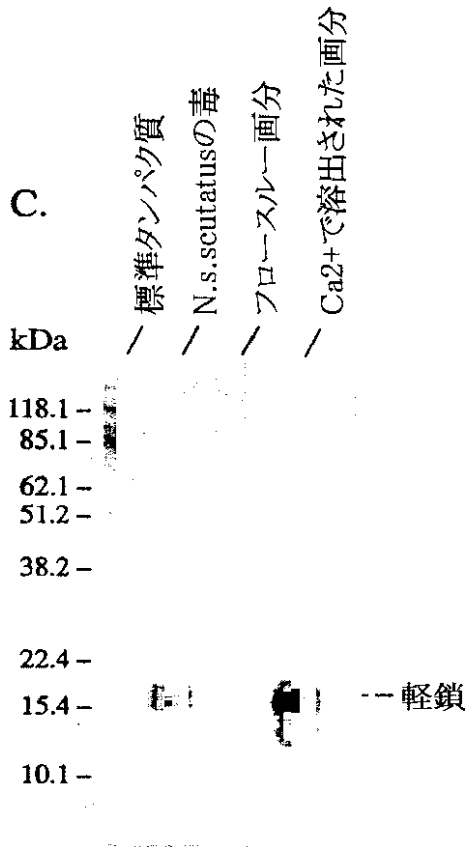
A.



B.



C.



## 【国際調査報告】

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 01/00430

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: C07K 16/00, G01N 33/86, G01N 33/53 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)		
IPC7: C07K, G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO INTERNAL, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,T	The Journal of Biological Chemistry, Volume 275, No 26, June 2000, M. A. Brown et al, "Identification and Purification of Vitamin K-dependent Proteins and Peptides with Monoclonal Antibodies Specific for gamma-Carboxyglutamyl (Gla) Residues", page 19795 - page 19802; see page 19802 --	1
X	WO 9408615 *A1 (LOMA LINDA UNIVERSITY MEDICAL CENTER), 28 April 1994 (28.04.94), see pages 22-25 --	3,7
X	EP 0645630 A2 (EISAICO., LTD.), 29 March 1995 (29.03.95), see table 1 and examples --	1-19,21-39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
13 July 2001	19-07-2001	
Name and mailing address of the ISA:	Authorized officer	
Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Carl-Olof Gustafsson/EÖ Telephone No. +46 8 752 25 00	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE 01/00430
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9909058 A1 (HELLMAN, JUKKA), 25 February 1999 (25.02.99), see figures 3 and 5E, table 1 and page 20  --	1-19,21-39
X	Journal of Immunological Methods, Volume 184, 1995, H. Eguchi et al, "Sandwich immunoassay specific for the N-terminal sequence of osteocalcin" page 231 - page 240  -- -----	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE01/00430

<b>Box I</b> Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 1-3 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: <b>see next sheet</b>
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II</b> Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/SE01/00430**

The vague wordings "suitable for identification of... (Gla)", "having an ability of identifying Gla residues" and "have the ability of identifying a single Gla residue.." and "Antibodies ... obtainable by immunisation of an animal with ...peptide containing one or more Gla residues, ... followed by screening.." do not exclude indirect identification by antibodies that bind other epitopes than Gla produced as a result of a gamma carboxylation event. The search has been focused on antibodies binding to Gla displaying epitopes.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

02/07/01

International application No.  
PCT/SE 01/00430

Patent document cited in search report			Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO	9408615	A1	28/04/94	AU	2861092 A	09/05/94
				US	4252993 A	24/02/81
EP	0645630	A2	29/03/95	CA	2121927 A	08/11/94
				JP	7020127 A	24/01/95
				KR	148619 B	01/12/98
				US	5516640 A	14/05/96
WO	9909058	A1	25/02/99	EP	1003778 A	31/05/00
				FI	973371 D	00/00/00

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト <sup>*</sup> (参考)	
C 1 2 P	21/08	G 0 1 N	30/48	R
G 0 1 N	30/26		30/88	J
	30/48		33/53	D
	30/88	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/53			C

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ブラウン、マーク・アラン  
スウェーデン国、217 45 マルメ、ダム  
フリガンゲン 4シー

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA04 CA05  
DA02 EA04 GA03 GA11 HA01  
HA15  
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA13  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40  
DA76 EA54 FA74 GA26

专利名称(译)	结合呈现γ-羧基谷氨酸的表位的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003530089A</a>	公开(公告)日	2003-10-14
申请号	JP2001564241	申请日	2001-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	蛋白酶AB		
申请(专利权)人(译)	蛋白酶AB		
[标]发明人	ステンフロヨハン ステンバーグライサメアリー ブラウンマークアラン		
发明人	ステンフロ、ヨハン ステンバーグ、ライサメアリー ブラウン、マークアラン		
IPC分类号	G01N33/53 B01J20/281 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 G01N30/26 G01N30/88 G01N33/86 G01N30/48		
CPC分类号	G01N33/86 C07K16/18		
FI分类号	C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C12P21/08 G01N30/26.A G01N30/48.R G01N30/88.J G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA54 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	0000675 2000-03-02 SE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

适用于鉴定γ-羧基谷氨酸 (Gla) 的抗体，可以识别蛋白质和/或肽中的Gla残基，以及蛋白质和/或肽中的相应谷氨酸 (Glu) 残基，以及描述不反应的抗体。还描述了用于制备和鉴定所述抗体的方法，以及用于检测生物液，组织提取物，生物组织样品中Gla的方法，其中使用了所述抗体。还已经描述了所述抗体用于例如通过免疫沉淀或免疫亲和色谱法免疫纯化含Gla的蛋白质或肽的用途。

(32) 特表20

表 3

モノクローナル抗体の交叉反応性

抗原	抗体 (グループ)						
	M3B (1)	M5 (2)	M12B (3)	M22B (4)	M27 (5)	M42 (6)	M55 (7)
ウェスタンブロット分析							
bPT	+	+	+	+	+	+	+
bPT F1	+	+	+	+	+	+	+
bPTFI (脱炭酸)	-	-	-	-	-	-	-
bFVII	+	+	+	+	+	+	+
bFVIIa	+	+	+	+	+	+	+
bFIX	+	+	+	+	+	+	+
bFIXa	+	+	+	+	+	+	+
bFX	+	+	+	+	+	+	+
bPC	+	-	-	-	+	-	+/-
bPS	+	+	+	+	+	+	+
bGase6	+	+	+	+	+	+	+
クロヘビのFX <sub>a</sub> -LP	+	+	+	+	+	+	+
タイパンのFX <sub>a</sub> -LP	+	+	+	+	+	+	+
トラヘビのFX <sub>a</sub> -LP	+	+	+	+	+	+	+
bBGP	+	-	-	-	-	-	-
JS44 (γ) -BSA	+	+	+	+	-	+	-
JS44 (E) -BSA	-	-	-	-	-	-	-
JS44 (γγ) -BSA	+	+	+	+	-	+	-
JS45 (γ) -BSA	+	+	+	+	-	+	-
JS45 (E) -BSA	-	-	-	-	-	-	-
JS45 (γγ) -BSA	+	+	+	+	-	+	-

(つづく)