

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-11583

(P2018-11583A)

(43) 公開日 平成30年1月25日(2018.1.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A C	4 B O 6 4
C O 7 K 16/44 (2006.01)	C O 7 K 16/44	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-144924 (P2016-144924)	(71) 出願人	304027349
(22) 出願日	平成28年7月22日 (2016.7.22)		国立大学法人豊橋技術科学大学
			愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘1-1
		(71) 出願人	500254354
			公益財団法人科学技術交流財団
			愛知県豊田市八草町秋合1267番1
		(71) 出願人	591148093
			公益財団法人京都高度技術研究所
			京都府京都市下京区中堂寺南町134番地
		(71) 出願人	000155023
			株式会社堀場製作所
			京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地
		(74) 代理人	100080791
			弁理士 高島 一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗メパニピリム抗体および該抗体を用いたメパニピリム測定方法

(57) 【要約】

【課題】メパニピリムに代表されるアニリノピリミジン系殺菌剤に対する抗体を誘起する化合物、およびそのような化合物によって誘起される抗体またはその断片の提供。該抗体またはその断片を使用した、試料中のメパニピリムに代表されるアニリノピリミジン系殺菌剤を測定する方法、およびそのような測定に用いることができる測定キットの提供。

【解決手段】 構造式



(式中、Rは、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n$ -または $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_n$ -を表し、nは、1～7の整数を表す。)であるメパニピリム誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体に対する抗体またはその断片。

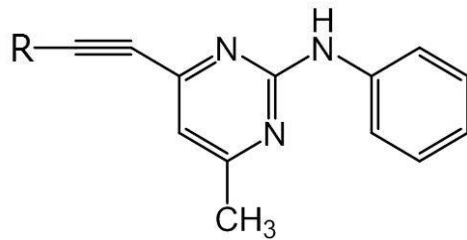
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

構造式

【化 1】



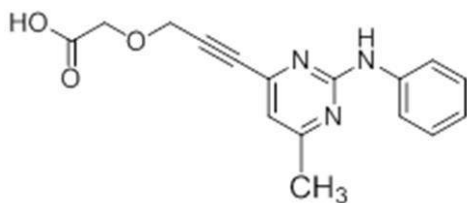
10

(式中、Rは、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-$ または $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ を表し、nは、1～7の整数を表す。)であるメパニピリム誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体に対する抗体またはその断片。

【請求項 2】

構造式

【化 2】



20

であるメパニピリム誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体に対する抗体またはその断片。

【請求項 3】

免疫学上許容される担体がKLHである、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその断片

。

【請求項 4】

以下の (a) または (b) から選択される軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその断片：

30

(a) 配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(b) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の抗体またはその断片の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の抗体またはその断片の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含む、ポリヌクレオチド。

40

【請求項 7】

以下の (a) または (b) から選択される発現ベクター：

(a) 請求項 5 に記載のポリヌクレオチドおよび請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

(b) 請求項 5 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターおよび請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の発現ベクターが導入された宿主細胞。

【請求項 9】

50

請求項 8 に記載の宿主細胞を培養し、抗体またはその断片を発現させる工程を含む、抗体またはその断片を生産する方法。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体を産生する、受託番号NITE P-02218のハイブリドーマ。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその断片を試料に接触させる工程を含む、メパニピリム、メパニピリム代謝産物、シプロジニルまたはピリメタニルの測定方法。

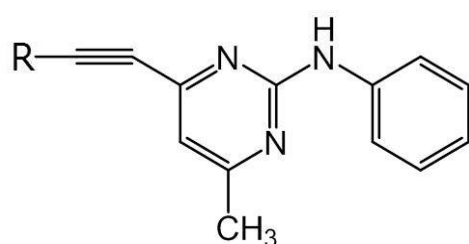
【請求項 12】

請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその断片を含む、メパニピリム、メパニピリム代謝産物、シプロジニルまたはピリメタニルの測定キット。

【請求項 13】

構造式

【化 3】



(式中、Rは、 $\text{HOO}(\text{C})-(\text{CH}_2)_n-$ または $\text{HOO}(\text{C})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ を表し、nは、1 ～ 7 の整数を表す。)であるメパニピリム誘導体。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のメパニピリム誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、メパニピリム誘導体によって得られる抗体またはその断片に関する。さらに本発明は、該抗体またはその断片を含むメパニピリムの測定キット、ならびに該抗体またはその断片を用いたメパニピリムの測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アニリノピリミジン系化合物の殺菌剤であるメパニピリム (IUPAC: N-(4-メチル-6-プロパ-1-イニルピリミジン-2-イル)アニリン) は、クミアイ化学工業株式会社によって開発されたアニリノピリミジン系抗菌剤 (特許文献 1) であり、胞子の発芽管伸長を阻害し、その後の付着器の形成、宿主への侵入に至る病原菌の感染行動を阻害し、灰色かび病、りんご黒星病等に効果を示す。日本国内では、1995年に初回農薬登録されており、諸外国では米国及びEUで登録されている。

【0003】

一方、残留農薬の基準値について、厚生労働省によって定められたポジティブリスト制が施行されており、全ての農薬や抗生物質・合成抗菌剤等について、加工食品を含む全ての食品が規制の対象となり、基準値を超えた食品の販売等は原則禁止されている状況である。メパニピリムについても、各食品別に残留農薬の基準値が規定されており、精度の高い分析を行う必要がある。

【0004】

メパニピリムの検出においては、検出対象由来の試料を粉碎あるいは細切後有機溶媒で抽出し、その抽出液を、濃縮した上で、NPD検出器付GCやGC/MSなどで分析する手法がある

。しかしながら、該方法では、分析を精密に行うには熟練した技術を要し、大掛かりな測定装置や設備が必要で、それに伴う測定の様々な制約がある。

【0005】

一方、臨床診断の分野で用いられてきた免疫学的測定法による、環境負荷化学物質の測定への適用が進んでいる。免疫学的測定法は、抗原抗体反応を利用して抗原の測定を行うもので、測定精度が優れているばかりでなく、迅速、簡便かつ経済的な測定法である。また、農産物中の残留農薬分析においてスクリーニング的な使用方法を想定した場合は、1度の測定において多種類の農薬が検出可能なことが望ましい。しかし、メパニピリムのみの特異的に反応する抗体と、その抗体を用いたメパニピリムの測定方法は開発されているが、メパニピリムに代表されるアニリノピリミジン系殺菌剤を広く検出可能な抗体と、その測定方法は存在しなかった。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特公平6-29263号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、メパニピリムに代表されるアニリノピリミジン系殺菌剤に対する抗体を誘起しうる化合物、およびそのような化合物によって誘起される抗体またはその断片を提供することを目的とする。本発明はまた、そのような抗体またはその断片を使用した、試料中のメパニピリムに代表されるアニリノピリミジン系殺菌剤を測定する方法、およびそのような測定に用いることができる測定キットを提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、メパニピリムに代表される微量のアニリノピリミジン系殺菌剤を正確に検出し測定できるような方法を提供すべく鋭意研究を行った結果、アニリノピリミジン系殺菌剤に対する特異性の高い抗体を誘起し得る化合物を見出し、以って該化合物によって誘起される抗体またはその断片、それらを用いた測定方法または測定キット等を完成した。

30

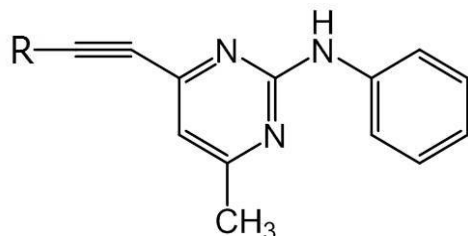
【0009】

すなわち、本発明は、

〔1〕構造式

【0010】

【化1】



40

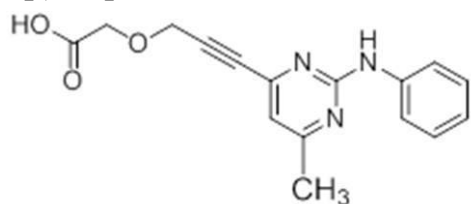
【0011】

(式中、Rは、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n$ -または $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_n$ -を表し、nは、1～7の整数を表す。)であるメパニピリム誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体に対する抗体またはその断片；

〔2〕構造式

【0012】

【化 2】



【0013】

であるメパニピリム誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体に対する抗体またはその断片；

〔3〕免疫学上許容される担体がKLHである、〔1〕または〔2〕に記載の抗体またはその断片；

〔4〕以下の（a）または（b）から選択される軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む、〔1〕～〔3〕のいずれか1つに記載の抗体またはその断片；

（a）配列番号5に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

（b）配列番号7に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域；

〔5〕〔4〕に記載の抗体またはその断片の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含む、ポリヌクレオチド；

〔6〕〔4〕に記載の抗体またはその断片の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含む、ポリヌクレオチド；

〔7〕以下の（a）または（b）から選択される発現ベクター；

（a）〔5〕に記載のポリヌクレオチドおよび〔6〕に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

（b）〔5〕に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターおよび〔6〕に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター；

〔8〕〔7〕に記載の発現ベクターが導入された宿主細胞；

〔9〕〔8〕に記載の宿主細胞を培養し、抗体またはその断片を発現させる工程を含む、抗体またはその断片を生産する方法；

〔10〕〔1〕～〔3〕のいずれか1つに記載の抗体を産生する、受託番号NITE P-02218のハイブリドーマ；

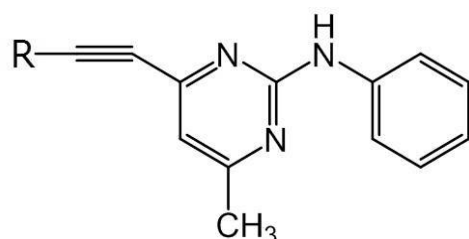
〔11〕〔1〕～〔4〕のいずれか1つに記載の抗体またはその断片を試料に接触させる工程を含む、メパニピリム、メパニピリム代謝産物、シプロジニルまたはピリメタニルの測定方法；

〔12〕〔1〕～〔4〕のいずれか1つに記載の抗体またはその断片を含む、メパニピリム、メパニピリム代謝産物、シプロジニルまたはピリメタニルの測定キット；

〔13〕構造式

【0014】

【化 3】



【0015】

（式中、Rは、 $\text{HOOCC}-(\text{CH}_2)_n-$ または $\text{HOOCC}-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ を表し、nは、1～7の整数を表す。）であるメパニピリム誘導体；

10

20

30

40

50

〔１４〕〔１３〕に記載のメパニピリム誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体；
を提供する。

【発明の効果】

【００１６】

本発明の抗体またはその断片は、メパニピリムのみならず、メパニピリムに類似した構造を有する複数のアニリノピリミジン系殺菌剤にも結合能を有するため、試料中の複数のアニリノピリミジン系殺菌剤に対して個別に抗体を用意することなく、本発明の抗体またはその断片のみを用いて、１回の測定で複数のアニリノピリミジン系殺菌剤の有無を検出することができるため、測定が迅速かつ経済的である。

10

【図面の簡単な説明】

【００１７】

【図１】間接競合ELISAを用いた、マウス抗血清、MPP8抗体、MPP107抗体のメパニピリムに対する阻害曲線を示す図である。縦軸：阻害率（メパニピリム添加／メパニピリム無添加）、横軸：メパニピリム濃度

【図２】直接競合ELISAを用いた、MPP8抗体、MPP107抗体のメパニピリムに対する阻害曲線を示す図である。縦軸：阻害率（メパニピリム添加／メパニピリム無添加）、横軸：メパニピリム濃度

【発明を実施するための形態】

【００１８】

20

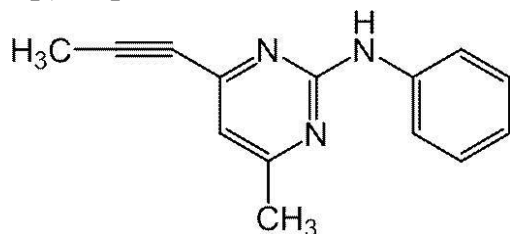
本発明は、メパニピリム誘導体および免疫学上許容される担体を含む、免疫原性を有する複合体を提供する。

【００１９】

本明細書においてメパニピリムとは、下記の式

【００２０】

【化４】



30

【００２１】

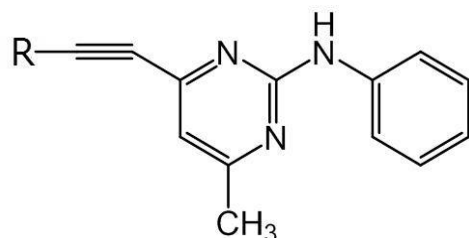
で表される化合物である。

【００２２】

また、本明細書においてメパニピリム誘導体とは、下記の式

【００２３】

【化５】



40

【００２４】

（式中、Rは、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n$ -または $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_n$ -を表し、nは、１～７の整数を表す。）で表される化合物である。

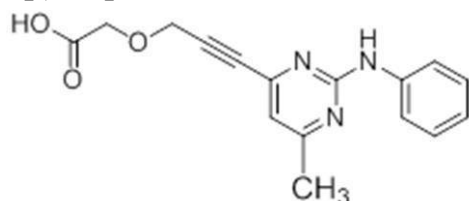
【００２５】

このうち、好ましいメパニピリム誘導体とは、下記の式

50

【0026】

【化6】



【0027】

で表される化合物である。

10

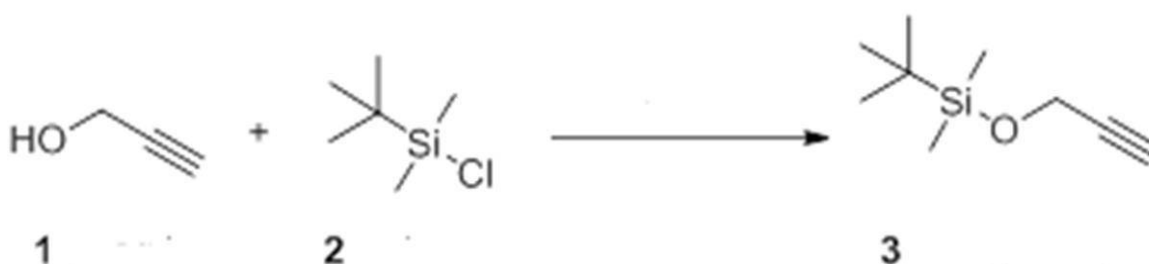
【0028】

前記メパニピリム誘導体の製造は、様々な合成方法により行なうことができ、特に限定されるものではない。たとえば、好ましいメパニピリム誘導体の場合、下記反応式の通り、2-Propyn-1-ol (化合物1)およびTBDMS (tert-Butyldimethylsilyl chloride) (化合物2)を出発原料として、溶媒下、塩基と共に反応時間30分～10時間、反応温度0℃～30℃で攪拌し、反応させた後、反応液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することによって、tert-Butyldimethyl(prop-2-yn-1-yloxy)silane (化合物3)を得る。ここで、反応で用いられる塩基は、特に限定されないが、イミダゾールなどが好ましく用いられる。また、溶媒としては、無水ジクロロメタンが好ましく用いられる。

20

【0029】

【化7】



【0030】

30

さらに、前記反応式で得られたtert-Butyldimethyl(prop-2-yn-1-yloxy)silane (化合物3)を、溶媒下、パラジウム触媒、銅触媒および塩基と共に、2,4-Dichloro-6-methylpyrimidine (化合物4)と反応時間30分～10時間、反応温度0℃～100℃で攪拌し、反応させ、反応液を濃縮、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、4-(3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)-2-chloro-6-methylpyrimidine (化合物5)を得る。ここで、反応で用いられる塩基は、特に限定されないが、N,N-diisopropylethylamineが好ましく用いられる。また、パラジウム触媒として、(PPh₃)₂PdCl₂が好ましく用いられる。銅触媒としては、ハロゲン化銅が挙げられ、例えばcopper(I) iodideが好ましく用いられる。溶媒としては、THFが好ましく用いられる。

40

【0031】

【化8】



【0032】

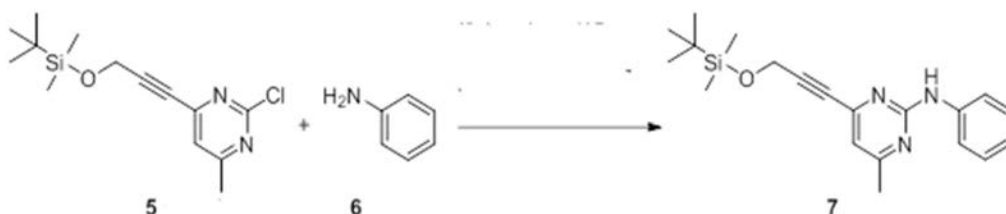
さらに、前記反応式で得られた4-(3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)-2-chloro-6-methylpyrimidine (化合物5)を、溶媒下、パラジウム触媒、炭酸カリウム

50

(K_2CO_3)と共に、アニリン(化合物6)と反応時間30分～10時間、加熱反応させ、反応液をろ過、濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、4-(3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)-6-methyl-N-phenylpyrimidin-2-amine(化合物7)を得る。ここで、パラジウム触媒として、 $Pd(PPh_3)_4$ が好ましく用いられる。また、溶媒としては、無水ジオキサンが好ましく用いられる。

【0033】

【化9】



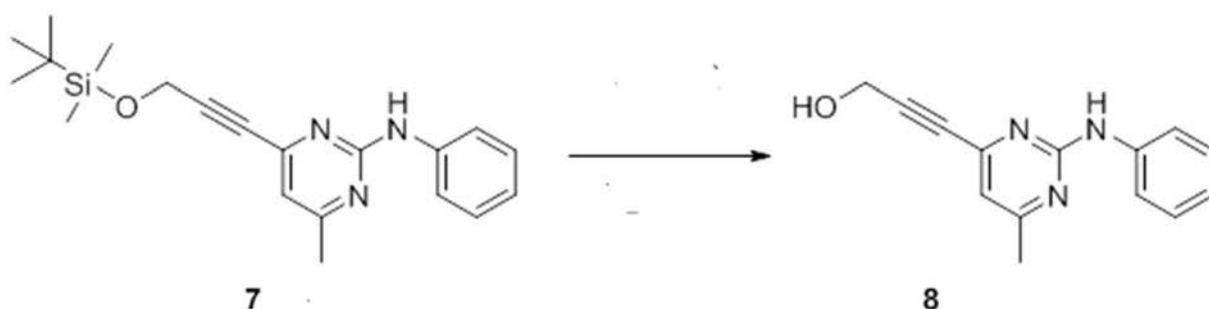
10

【0034】

さらに、前記反応式で得られた4-(3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)-6-methyl-N-phenylpyrimidin-2-amine(化合物7)を、溶媒下、塩酸と共に、反応時間30分～10時間、反応温度0℃～100℃で反応させ、反応液を中和後、濃縮、乾燥させ、3-(6-Methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)prop-2-yn-1-ol(化合物8)を得る。ここで、溶媒としては、THFが好ましく用いられる。

【0035】

【化10】



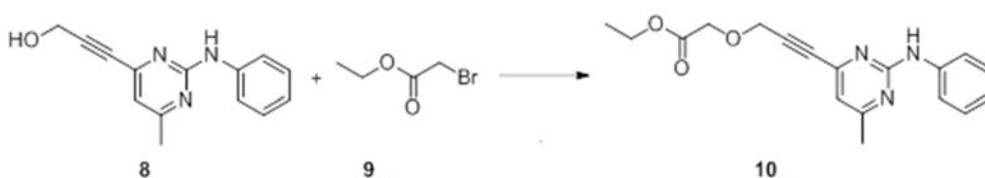
30

【0036】

さらに、前記反応式で得られた3-(6-Methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)prop-2-yn-1-ol(化合物8)を、溶媒下、水素化ナトリウムと共に、ethyl 2-bromoacetate(化合物9)と反応時間30分～10時間、反応温度0℃～100℃で反応させ、反応液をpH6～7に調整後、濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、Ethyl 2-((3-(6-methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)prop-2-yn-1-yl)oxy)acetate(化合物10)を得る。ここで、溶媒としては、THFが好ましく用いられる。

【0037】

【化11】



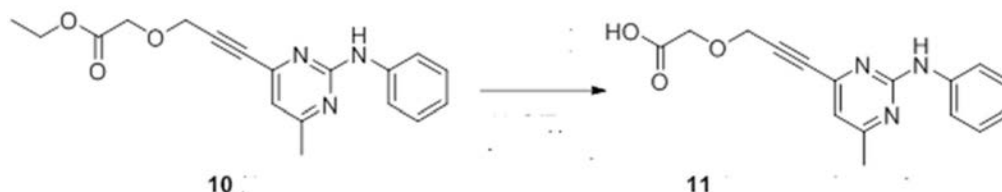
40

【0038】

さらに、前記反応式で得られたEthyl 2-((3-(6-methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)prop-2-yn-1-yl)oxy)acetate(化合物10)を、溶媒下、水酸化リチウムと共に、反応時間30分～10時間、反応温度0℃～100℃で反応させ、反応液をpH5付近に調整後、濃縮し、メパニピリム誘導体である2-((3-(6-Methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)prop-2-yn-1-yl)oxy)acetic acid(化合物11)を得る。溶媒としては、THFが挙げられ

50

【化 1 2】



10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

【 0 0 4 4 】

また、本発明のモノクローナル抗体は、通常細胞融合によって製造されるハイブリドーマ（融合細胞）から取得することができる。すなわち、上記ポリクローナル抗体の場合と同様、本発明の複合体を免疫感作した哺乳動物から抗体産生細胞を単離し、これと骨髄腫細胞とを融合させてハイブリドーマを形成させ、当該ハイブリドーマをクローン化し、メパニピリムあるいは本発明のメパニピリム誘導体をマーカー抗原（あるいはマーカーハプテン）として、それに対して特異的な親和性を示す抗体を生産するクローンを選択することによって製造される。また、あらかじめ単離された脾細胞あるいはリンパ球等に培養液中で上記の複合体を作用させて生じる抗体産生細胞も使用することができる。この場合に

はヒト由来の抗体産生細胞も調製可能である。

【0045】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製はケーラーおよびミルシュタインの方法 (Nature, Vol. 256, pp. 495-497, 1975) およびその変法に従って行うことができる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、前述のごとく免疫感作された動物から取得される脾細胞、リンパ節細胞、末梢リンパ球、骨髄腫細胞あるいは扁桃細胞等、好ましくは脾細胞に含まれる抗体産生細胞と、好ましくは同種のマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒトの骨髄腫細胞 (ミエローマ) との融合により得られるハイブリドーマを培養することにより調製される。培養は、インビトロまたはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹腔内等でのインビボで行うことができ、抗体はそれぞれ培養上清あるいは哺乳動物の腹水から取得することができる。

10

【0046】

細胞融合に用いられる骨髄腫細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-AG8, P3/NSI/1-Ag4-1, P3/X63-Ag8.U1, SP2/0-Ag14, F0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag1.2.3., ヒト由来ミエローマU-266AR1, GML500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, DIR11あるいはCEM-T15等が挙げられる。

【0047】

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖のみられたウェル中の培養上清の、マーカー抗原 (またはハプテン) に対する反応性を、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ等によって測定することにより行うことができる。

20

【0048】

後述する実施例に記載の通り、メバニピリムに高い反応性を示す抗体を産生したハイブリドーマを、限界希釈法によって細胞クローニングし、モノクローナル抗体産生細胞 (MP P8とMPP107) として取得した。これらのうちMPP107を平成28年3月14日に、受託番号NITE P-02218として独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室) に寄託した。

30

【0049】

モノクローナル抗体の単離精製は、上述のような方法によって製造される該抗体含有培養上清あるいは腹水を、イオン交換クロマトグラフィー、抗イムノグロブリンカラムまたはプロテインGカラム等のアフィニティークラムクロマトグラフィーに付すことにより行うことができる。

【0050】

本発明のモノクローナル抗体は、上述の製造方法に限定されることなく、いかなる方法で得られたものであってもよい。また、通常モノクローナル抗体は免疫感作を施す哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる構造の糖鎖を有するが、本発明におけるモノクローナル抗体は、該糖鎖の構造差異により限定されるものではなく、あらゆる哺乳動物由来のモノクローナル抗体をも包含するものである。さらに、例えばヒト免疫グロブリン遺伝子を組み込まれたトランスジェニック動物から得られる組換えヒト型モノクローナル抗体、あるいはある哺乳動物由来のモノクローナル抗体の定常領域 (Fc) をヒト由来モノクローナル抗体のFc領域と組換えたキメラモノクローナル抗体、さらには抗原と相補的に直接結合し得る相補性決定部位 (CDR) 以外の全領域をヒト由来モノクローナル抗体の対応領域と組換えたキメラモノクローナル抗体も本発明のモノクローナル抗体に包含される。

40

【0051】

また、本発明の抗体には、前記のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体 (mAb) 等の天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体や一本鎖抗体に加えて、これらの抗体の断片が含まれる。抗体の断片とは、特異的結合活性を有す

50

る前述の抗体の一部分の領域を意味し、具体的にはFab、Fab'、F(ab')₂、scAb、scFv、またはscFv-Fc等を包含する。

【0052】

また、当業者であれば、本発明の抗体または断片と他のペプチドやタンパク質との融合抗体を作製することや、修飾剤を結合させた修飾抗体を作製することも可能である。融合に用いられる他のペプチドやタンパク質は、抗体の結合活性を低下させないものである限り特に限定されず、例えば、ヒト血清アルブミン、各種tagペプチド、人工ヘリックスモチーフペプチド、マルトース結合タンパク質、グルタチオンSトランスフェラーゼ、各種毒素、その他多量体化を促進しうるペプチドまたはタンパク質等が挙げられる。修飾に用いられる修飾剤は、抗体の結合活性を低下させないものである限り特に限定されず、例え

10

【0053】

また、後述する実施例の通り、本発明の抗体（モノクローナル抗体）を分泌するハイブリドーマMPP8およびMPP107からそれぞれmRNAを抽出し、軽鎖および重鎖の遺伝子(DNA)断片を増幅し、そのアミノ酸配列を決定した。その結果、ハイブリドーマMPP8から分泌される抗体の軽鎖可変領域は配列番号5に示されるアミノ酸配列からなり、かつ重鎖可変領域は配列番号6に示されるアミノ酸配列からなることが分かった。同様に、ハイブリドーマMPP107から分泌される抗体の軽鎖可変領域は配列番号7に示されるアミノ酸配列からなり、かつ重鎖可変領域は配列番号8に示されるアミノ酸配列からなることが分かった。

20

従って、本発明は、以下の(a)または(b)から選択される軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む、抗体またはその断片を提供する。

(a) 配列番号5に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(b) 配列番号7に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域。

【0054】

上記の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む本発明の抗体またはその断片は、本願明細書に開示される軽鎖可変領域及び重鎖可変領域の配列情報に基づいて、当該分野で公知の方法を使用して、当業者によって容易に作製され得る。具体的には、本発明の抗体またはその断片の軽鎖可変領域アミノ酸をコードする塩基配列を含む軽鎖可変領域遺伝子断片、及び、本発明の抗体またはその断片の重鎖可変領域アミノ酸をコードする塩基配列を含む重鎖可変領域遺伝子断片を作製する。

30

【0055】

上記の本発明の抗体またはその断片の軽鎖及び重鎖可変領域アミノ酸をコードする各可変領域遺伝子断片は、例えば、該軽鎖及び重鎖可変領域の塩基配列（例えば、配列番号5に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列としては配列番号9に示される塩基配列、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列としては配列番号10に示される塩基配列、配列番号7に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列としては配列番号11に示される塩基配列、および配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列としては配列番号12に示される塩基配列がそれぞれ挙げられる）又は該軽鎖及び重鎖可変領域のアミノ酸配列に基づいてデザインされた塩基配列に基づき、当該分野で公知の遺伝子合成方法を利用して合成することが可能である。このような遺伝子合成方法としては、WO90/07861に記載の抗体遺伝子の合成方法等の当業者に公知の種々の方法が使用され得る。

40

【0056】

次いで、上記の可変領域遺伝子断片と抗体の定常領域遺伝子とを連結させて抗体遺伝子を作製する。使用される抗体の定常領域は、どのようなサブクラスの定常領域（例えば、ヒト抗体の場合、重鎖としてγ1、γ2、γ3またはγ4鎖、軽鎖としてλまたはκ鎖の

50

定常領域)も選択可能であり得る。

また、上記の可変領域遺伝子断片を抗体の断片として発現させる場合は、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を直接連結し、抗体遺伝子として作製しうる。例えば、本発明の抗体の断片としてscFvを作製する場合、軽鎖可変領域アミノ酸をコードする塩基配列を含む軽鎖可変領域遺伝子断片と重鎖可変領域アミノ酸をコードする塩基配列を含む重鎖可変領域遺伝子断片とをリンカーを介して連結させて、抗体遺伝子を作製することができる。リンカーとしては、本発明の抗体の断片がメバニピリムに結合する特性を有し得る限り特に限定されないが、例えばペプチドリinker (Gly₄Ser)₃で表されるアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

【0057】

上記のようにして得られた抗体遺伝子を発現ベクターに連結し、抗体発現ベクターを作製する。発現ベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で本発明の抗体又はその断片をコードする遺伝子を発現し、これらポリペプチドを産生できるものであれば特に制限されない。例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）等を挙げることができる。

【0058】

本発明の発現ベクターは、本発明の抗体遺伝子、及び当該遺伝子に機能可能に連結されたプロモーターを含み得る。細菌中で本発明のポリペプチドを発現させるためのプロモーターとしては、宿主がエシェリキア属菌の場合、例えば、Trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λ PLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどが挙げられる。酵母中で本発明の抗体又はその断片を発現させるためのプロモーターとしては、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、SL01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、βアクチンプロモーター、CAGプロモーター (Niwa H. et al., Gene, 108, 193-200, 1991)、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。

【0059】

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、本発明の発現ベクターは、開始コドン、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位をさらに含み得る。一方、宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、本発明の発現ベクターは、開始コドン、終止コドンを含み得る。また、この場合、エンハンサー配列、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、または複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる選択マーカー（例えば、テトラサイクリン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子）を含んでいてもよい。また、必要に応じて、シグナル配列をコードする塩基配列（シグナルコドン）を、上記の抗体遺伝子の5'末端側に付加（またはネイティブなシグナルコドンと置換）してもよい。例えば、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが用いられる。

【0060】

本発明はまた、本発明の抗体遺伝子が導入された形質転換体を提供する。このような形質転換体は、例えば、本発明の発現ベクターで宿主細胞を形質転換することにより作製できる。形質転換体の作製に用いられる宿主細胞としては、前記の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞または昆虫細胞（例えば、Sf9）など）が例示される。形質転換は、自体公知の方法により行われ得る。

【0061】

本発明はまた、本発明の抗体遺伝子を宿主細胞に発現させること、即ち、このような形質転換体を用いることを含む、本発明の抗体又はその断片の生産方法を提供する。好ましくは、該方法で使用される宿主細胞は、本発明の発現ベクターが導入されており、本発明の抗体またはその断片の重鎖および軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは別々の発現ベクターに含まれてもよいし、同一の発現ベクターに含まれてもよい。

【0062】

本発明の抗体又はその断片の生産において、形質転換体は、栄養培地中で培養され得る。栄養培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素（例えば、無機塩（例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えば、テトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。

【0063】

形質転換体の培養は自体公知の方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpHおよび培養時間は、適宜選択される。例えば、宿主が動物細胞の場合、培地としては、約5～20%の牛胎児血清を含むMEM培地(Science, Vol.122, p.501, 1952)、DMEM培地(Virology, Vol.8, p.396, 1959)、RPMI1640培地(J. Am. Med. Assoc., Vol.199, p.519, 1967)、199培地(Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol.73, p.1, 1950)等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～72時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。宿主が昆虫細胞の場合、例えば牛胎児血清を含むGrace's培地(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.82, p.8404, 1985)等が挙げられ、そのpHは約5～8であるのが好ましい。培養は通常約20～40℃で15～100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5～8である培地である。宿主がE.coliの場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地(Millerら、Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, p.431, 1972)等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14～43℃、約3～24時間行うことができる。宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30～40℃、約16～96時間行うことができる。宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培地(Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, p.4505, 1980)が挙げられ、pHは5～8であることが望ましい。培養は通常約20～35℃で約14～144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0064】

本発明の抗体又はその断片は、上述のような形質転換体を培養し、該形質転換体から回収、好ましくは単離、精製することができる。単離、精製方法としては、例えば塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

【0065】

また、当業者であれば、本発明に基づいて、本発明の抗体またはその断片と他のペプチドやタンパク質との融合抗体を作製することや、修飾剤を結合させた修飾抗体を作製することも可能である。融合に用いられる他のペプチドやタンパク質は、抗体のメパニピリム結合活性を低下させないものである限り特に限定されず、例えば、ヒト血清アルブミン、

各種 tag ペプチド、人工ヘリックスモチーフペプチド、マルトース結合タンパク質、グルタチオンSトランスフェラーゼ、各種毒素、その他多量体化を促進しうるペプチドまたはタンパク質等が挙げられる。修飾に用いられる修飾剤は、抗体のメパニピリム結合活性を低下させないものである限り特に限定されず、例えば、ポリエチレングリコール、糖鎖、リン脂質、リボソーム、低分子化合物等が挙げられる。

【0066】

上記のようにして得られる本発明の抗体またはその断片は、メパニピリムのみならず、メパニピリムに類似した構造を有する複数のアニリノピリミジン系殺菌剤にも結合能を維持する。通常、抗体の結合能は、抗原の構造に大きく依存し、認識できる抗原の構造が少しでも異なれば、その抗原を認識できなくなる場合が多い。従って、構造の異なる複数の抗原を検出するためには、それぞれの抗原に対応した抗体を用いて、個々の抗原ごとに検出しなければならない。しかし、本発明の抗体またはその断片は、メパニピリムに代表される複数のアニリノピリミジン系殺菌剤に対する広い結合能を保持しているため、互いに構造が異なるアニリノピリミジン系殺菌剤であっても、本発明の抗体またはその断片を用いることで検出することが可能となる。結果として、対応する個別の抗体を用意する必要がないため経済的である。

従って、本発明はまた、上記のようにして取得される本発明の抗体またはその断片を用いて、アニリノピリミジン系殺菌剤を測定することの特徴とする、試料中のアニリノピリミジン系殺菌剤の測定方法を提供する。

【0067】

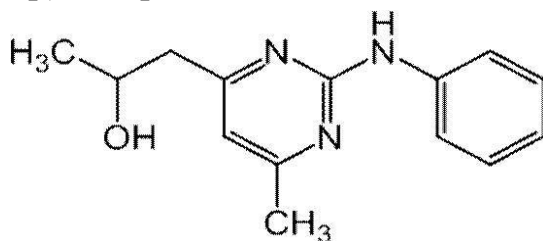
本発明の測定方法で測定されるアニリノピリミジン系殺菌剤とは、限定されるわけではないが、メパニピリム、メパニピリム代謝産物、シプロジニルおよびピリメタニルが挙げられる。

【0068】

本明細書においてメパニピリム代謝産物とは、下記の式

【0069】

【化13】



【0070】

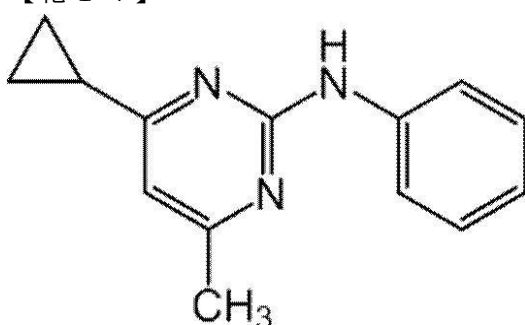
で表される化合物である。

【0071】

本明細書においてシプロジニルとは、下記の式

【0072】

【化14】



【0073】

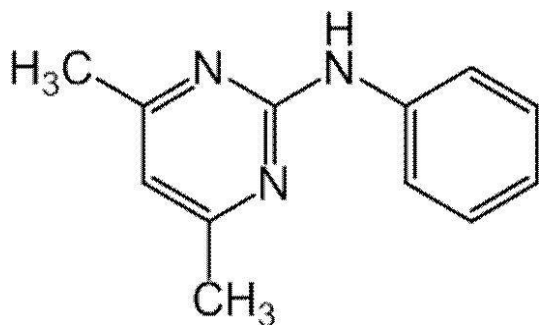
で表される化合物である。

【0074】

本明細書においてピリメタニルとは、下記の式

【0075】

【化15】



10

【0076】

で表される化合物である。

【0077】

本発明の抗体またはその断片のうち、配列番号5に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む抗体またはその断片は、アニリノピリミジン系殺菌剤のうちシプロジニルに最も結合能が高い。また、本発明の抗体またはその断片のうち、配列番号7に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む抗体またはその断片は、アニリノピリミジン系殺菌剤のうちメパニピリムに最も結合能が高い。

20

【0078】

本発明の測定方法に供試される試料の原材料としては、特に制限されないが、野菜、穀物、果物などが挙げられる。野菜としては、例えば、小豆、インゲン、レタス、ねぎ、トマト、ミニトマト、ピーマン、なす、きゅうり、かぼちゃ、ホウレンソウなどが挙げられる。穀物としては、米、小麦、大麦などが挙げられる。果物としては、すいか、メロン、みかん、ゆず、かぼす、りんご、なし、びわ、桃、いちご、ラズベリー、ぶどう、かき、マンゴーなどが挙げられる。試料は、例えば、上記原材料を破碎し、有機溶媒と混合した後、遠心分離や濾過などによって有機溶媒層を分離することによって得ることができる。使用される有機溶媒としては、特に限定されないが、メタノール、エタノール、アセトニトリルなどが用いられうる。

30

【0079】

本発明の測定方法としては、通常の抗原-抗体反応を利用する方法であれば特に制限されず、放射性同位元素免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA)、蛍光もしくは発光検出法、凝集法、イムノプロット法、イムノクロマト法等(Meth. Enzymol., 92, 147-523 (1983), Antibodies Vol.II IRL Press Oxford (1989))が挙げられる。標識の手段としては、酵素、金コロイド、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質などがある。放射性同位元素としては、特に限定されるものではないが、例えば $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが好ましい。酵素としては、特に限定されるものではないが、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えばβ-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが挙げられる。蛍光物質としては、特に限定されるものではないが、例えばフルオレスカミン、フルオレセインイソチオシアネートなどが挙げられる。発光物質としては、特に限定されるものではないが、例えばミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが挙げられる。これらのうち、特に感度や簡便性等の点から、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素を用いるELISA、あるいは金コロイドを用いたイムノクロマトが好ましい。

40

50

【0080】

代表的なELISAによる検出法は、間接競合阻害ELISAまたは直接競合阻害ELISAなどが挙げられる。例えば以下に述べるような本発明の抗体（またはその断片、以下同様）を用いた直接競合阻害ELISAによって代表的なアニリノピリミジン系殺菌剤であるメパニピリムの検出を行うことができる。

【0081】

（１）本発明の抗体を、支持体に固相化する。用いる支持体は、９６穴、４８穴、１９２穴等のマイクロタイタープレートが好ましい。固相化は、例えば、固相化用抗体を含む緩衝液を支持体上に載せ、インキュベーションすればよい。緩衝液中の抗体の濃度は、通常０．０１μg/mLから１０μg/mL程度である。緩衝液としては、検出手段に応じて公知のものを使用することができる。

10

【0082】

（２）支持体の固相表面へのタンパク質の非特異的吸着を防止するため、固相化用抗体が吸着していない固相表面部分を、該抗体と無関係なタンパク質等によりブロッキングする。ブロッキング剤としては、BSAもしくはスキムミルク溶液、または市販のブロッキング剤（大日本住友製薬社製）等を使用することができる。ブロッキングは、前記ブロッキング剤を支持体に添加し、例えば、約４℃で一晩インキュベーションした後、洗浄液で洗浄することにより行われる。洗浄液としては特に制限はないが、前記（１）と同じ緩衝液を使用することができる。

20

【0083】

（３）各種濃度のメパニピリムを含む試料に、メパニピリム（または本発明のメパニピリム誘導体、以下同様）と酵素を結合させた酵素結合メパニピリムを加えた混合物を調製する。酵素結合メパニピリムの調製は、メパニピリムを酵素に結合する方法であれば特に制限なく、いかなる方法で行ってもよい。

【0084】

（４）工程（３）の混合物を工程（２）で得られた抗体固相化支持体と反応させる。メパニピリムと酵素結合メパニピリムとの競合阻害反応により、これらと固相化抗体との複合体が生成する。反応は例えば、約２５℃で約１時間行う。メパニピリムは、水に不溶性であるため、反応溶液中には各種有機溶媒を含有することができる。前記有機溶媒としては、メパニピリムを溶解させ、かつ抗原－抗体反応を阻害しない範囲で有機溶媒およびその含有量を選択すればよい。具体的には、メタノール、アセトニトリル、エタノールなどがあげられる。反応終了後、緩衝液で支持体を洗浄し、固相化抗体と結合しなかった酵素結合メパニピリムを除去する。固相化抗体－酵素結合メパニピリムの複合体の量を検出することにより、予め作成した検量線から試料中のメパニピリムの量を決定する。

30

【0085】

（５）支持体に結合した標識酵素と反応する発色基質溶液を加え、吸光度を検出することによって検量線からメパニピリムの量を算出することができる。標識酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、例えば、過酸化水素と、３，３′，５，５′-テトラメチルベンジジンまたはオ-フェニレンジアミンを含む発色基質溶液を使用することができる。通常、発色基質溶液を加えて室温で約１０分程度反応させた後、硫酸を加えることにより酵素反応を停止させる。３，３′，５，５′-テトラメチルベンジジンを使用する場合、４５０nmの吸光度を検出する。オ-フェニレンジアミンを使用する場合、４９２nmの吸光度を検出する。なお、バックグランド値を補正するため、６３０nmの吸光度も同時に検出することが望ましい。

40

【0086】

標識酵素としてアルカリホスファターゼを使用する場合には、例えばp-ニトロフェニルリン酸を基質として発色させ、NaOH溶液を加えて酵素反応を止め、４１５nmでの吸光度を検出する方法があげられる。

【0087】

メパニピリムを添加しない反応溶液の吸光度に対して、メパニピリムを添加して本発明

50

の抗体と反応させた溶液の吸光度の減少率を阻害率として計算する。既知の濃度のメパニピリムを添加した反応液の阻害率により予め作成しておいた検量線を用いて、試料中のメパニピリムの濃度を算出することができる。

【0088】

別の態様としてメパニピリムの検出は以下のような手順により間接競合阻害ELISAによって行うことができる。

(1) 前述のメパニピリムに対する人工抗原を支持体に固相化する。用いる支持体は、通常のELISAに用いる支持体であれば特に制限されないが、96穴、48穴、192穴等のマイクロタイタープレートが好ましい。固相化は、例えば、固相化用メパニピリム（または本発明のメパニピリム誘導体、以下同様）を含む緩衝液を支持体上に載せ、インキュベーションすればよい。緩衝液中のメパニピリムの濃度は、通常0.01 µg/mLから100 µg/mL程度である。緩衝液としては、検出手段に応じて公知のものを使用することができる。

10

【0089】

(2) 支持体の固相表面へのタンパク質の非特異的吸着を防止するため、固相化用抗原が吸着していない固相表面部分を、メパニピリムと無関係なタンパク質等によりブロッキングする。ブロッキング剤としては、BSAもしくはスキムミルク溶液、または市販のブロックエース（大日本住友製薬社製）等を使用することができる。ブロッキングは、前記ブロッキング剤を支持体に添加し、例えば、約4℃で一晩インキュベーションした後、洗浄液で洗浄することにより行われる。洗浄液としては特に制限はないが、前記(1)と同じ緩衝液を使用することができる。

20

【0090】

(3) 前記(1)および(2)で処理された固相表面にメパニピリムを含む試料および本発明の抗体溶液を加え、該抗体を前記固相化メパニピリムおよびメパニピリムに競合的に反応させて、固相化メパニピリム抗体複合体およびメパニピリムに対する抗体複合体を生成させる。反応は、通常室温、1時間程度で行うことができる。メパニピリムは、水に不溶性であるため、反応溶液中には各種有機溶媒を含有することが必要である。前記有機溶媒としては、メパニピリムを溶解させ、かつ抗原-抗体反応を阻害しない範囲で有機溶媒およびその含有量を選択すればよい。具体的には、メタノール、アセトニトリル、エタノールなどがあげられる。

30

【0091】

(4) 固相化メパニピリム抗体複合体の量は、酵素標識した二次抗体（例えば、マウス抗体を認識する抗体）を添加して検出することができる。例えばメパニピリムに対する抗体としてマウスモノクローナル抗体を用いる場合、酵素標識（例えば、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ等）した抗マウス抗体-ヤギ抗体を用いて、支持体に結合したメパニピリムに対する本発明の抗体と反応させるのが望ましい。反応は、前記(3)と同様の条件下で行えばよい。反応後、緩衝液で洗浄する。

【0092】

(5) 支持体に結合した二次抗体の標識酵素と反応する発色基質溶液を加え、二次抗体に結合させた酵素に反応する発色基質溶液を前述の直接競合阻害ELISA法と同様に加え、吸光度を検出することによりあらかじめ作成した検量線からメパニピリムの量を算出することができる。

40

【0093】

前記本発明の測定方法においては、検出対象物に応じた前処理により試料を調製した後、直接競合阻害ELISAまたは間接競合阻害ELISAに供することができる。検出対象物が食品（野菜、果物、穀物など）の場合、アニリノピリミジン系殺菌剤が抽出できる全ての方法を用いることができる。アニリノピリミジン系殺菌剤を含む食品からの抽出物は、メタノール、エタノールあるいはアセトニトリルで抽出し緩衝液で希釈したものをそのまま試料とする。

【0094】

50

また、本発明は前記のアニリノピリミジン系殺菌剤測定方法を実施するためのアニリノピリミジン系殺菌剤測定キットを提供する。本発明の測定キットは、このような測定方法を好適に行い得るように、本発明の抗体またはその断片を含む。さらに、該キットは、本発明の測定方法を実施する際に使用される周知の試薬類（例えば、反応緩衝液、ブロッキング液、洗浄液、標識検出試薬等）および器具類（例えば、反応容器等）を含んでいてもよい。

【実施例】

【0095】

以下において、実施例により本発明をより具体的にするが、この発明はこれらに限定されるものではない。

【0096】

実施例1 メパニピリム誘導体の合成

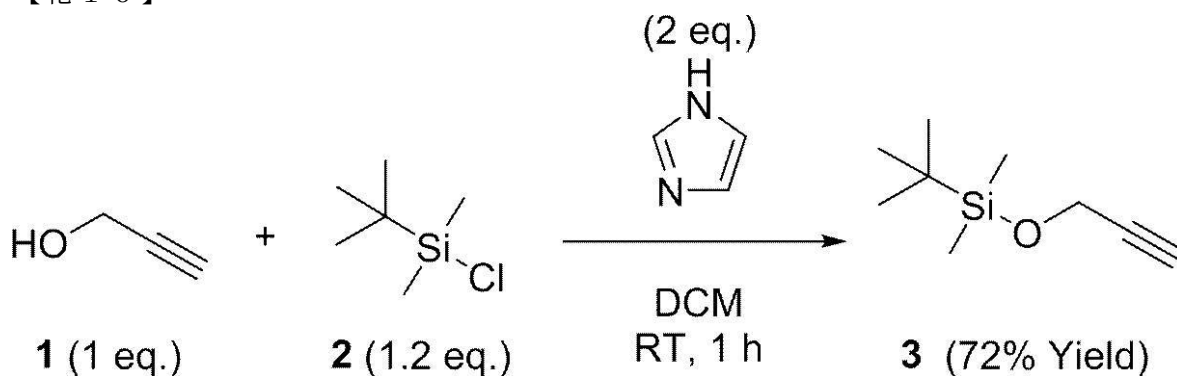
メパニピリム誘導体を、以下の反応を経て合成した。

【0097】

(1) *tert*-Butyldimethyl(prop-2-yn-1-yloxy)silaneの合成

【0098】

【化16】



【0099】

三方コックを付け、撹拌子を入れた100 mL二口フラスコに、2-propyn-1-ol (化合物1) (448.5 mg, 8.0 mmol)をいれ、脱気、Ar置換した。そこへ無水ジクロロメタン(22 mL)を加えて溶解させ、イミダゾール(1.089 g, 16.0 mmol)とTBDMS (*tert*-butyldimethylsilyl chloride)(化合物2)(1.447 g, 9.6 mmol)を加えて室温で1時間撹拌した。水を加えてジクロロメタンで二回分液抽出を行った後、ジクロロメタン層を水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。抽出液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate=15/1)で精製し、*tert*-Butyldimethyl(prop-2-yn-1-yloxy)silane (目的化合物3) (981.2 mg, 収率72%)を得た。本合成反応は、Perreault, Stephane; Spino, Claude, Organic Letters 2006, 8, 4385-4388に記載されている。

3 : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 4.32 (d, 2H, $J = 2.29$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.39 (t, 1H, $J = 2.29$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 0.91 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$), 0.13 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$) ppm.

【0100】

(2) 4-(3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)-2-chloro-6-methylpyrimidineの合成

【0101】

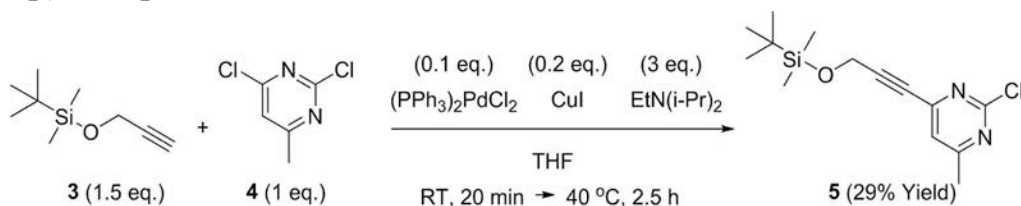
10

20

30

40

【化 17】



【0102】

三方コックとジムロートを付け、撹拌子を入れた100 mL二口フラスコに、2,4-dichloro-6-methylpyrimidine (化合物 4) (472.7 mg, 2.9 mmol)、Bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride (203.6 mg, 0.29 mmol)、copper(I) iodide (110.5 mg, 0.58 mmol) を入れ、脱気、Ar 置換した。そこへ無水THF (14.5 mL)を入れて懸濁させ、N,N-diisopropylethylamine (1.519 mL, 8.70 mmol, d=0.74)を加えてから、無水THF (4.4 mL)に溶解させたtert-Butyldimethyl(prop-2-yn-1-yloxy)silane (化合物 3) (740.9 mg, 4.35 mmol)を徐々に滴下し、室温で20分間、40 °Cで2.5時間撹拌した。反応液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(Hexane/Ether=10/1→6/1)で精製し、4-(3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)-2-chloro-6-methylpyrimidine (目的化合物 5) (247.2 mg, 収率29%)を得た。本合成反応は、Berg, Tom Christian; Gundersen, Lise-Lotte; Eriksen, Aud Berglen; Malterud, Karl E., European Journal of Organic Chemistry 2005, 23, 4988-4994に記載されている。

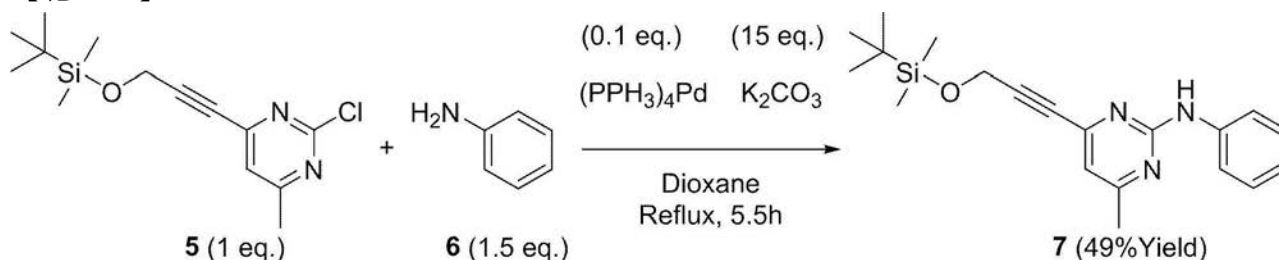
5 : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.16 (s, 1H, H-5 Pyr), 4.55 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$), 2.53 (s, 3H, $-\text{PyrCH}_3$), 0.93 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$), 0.15 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.8, 161.0, 152.2, 121.2, 94.3, 81.3, 51.9, 25.7, 23.9, 18.3, -5.2 ppm. HRMS(DART) m/z : Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{ClN}_2\text{OSi}$ ($\text{M}+1^+$) 297.1190, Found 297.1188. IR (neat) 2929, 2857, 2243, 1577, 1253, 1097, 836 cm^{-1} .

【0103】

(3) 4-(3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)-6-methyl-N-phenylpyrimidin-2-amineの合成

【0104】

【化 18】



【0105】

三方コックとジムロートを付け、撹拌子を入れた50 mLナスフラスコに、4-(3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)-2-chloro-6-methylpyrimidine (化合物 5) (386.0 mg, 1.3 mmol)、Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (150.2 mg, 0.13 mmol)、 K_2CO_3 (2.695 g, 19.5 mmol)を入れ、脱気、Ar 置換した。そこへ無水ジオキサン(8 mL)を入れて懸濁し、aniline (化合物 6) (178 μl , 1.95 mmol, d=1.02)を加えて、5.5時間加熱還流した。反応懸濁液は吸引ろ過し、濃縮して、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(Hexane/Ethyl Acetate=10/1)で精製し、4-(3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)-6-methyl-N-phenylpyrimidin-2-amine (目的化合物 7) (223.7 mg, 収率49%)を得た。

7 : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.63-7.65 (m, 2H, H-2 and H-6 Ph), 7.30-7.34 (m, 2H, H-3 and H-5 Ph), 7.13 (bs, 1H, $-\text{NH}-$), 7.01-7.04 (m, 1H, H-4 Ph), 6.69 (s, 1H

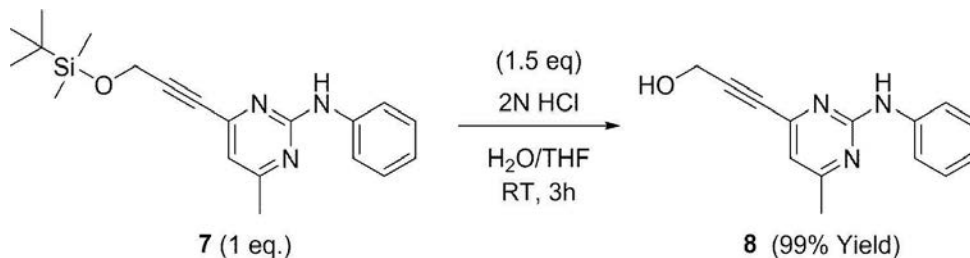
, H-5 Pyr), 4.56 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$), 2.41 (s, 3H, $-\text{PyrCH}_3$), 0.95 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$), 0.18 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 168.3, 159.7, 150.4, 139.4, 128.7, 122.3, 119.0, 114.1, 90.6, 82.9, 51.9, 25.7, 24.0, 18.2, -5.2 ppm. HRMS(DART) m/z : Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{OSi}$ ($\text{M}+1^+$) 354.2002, Found 354.2001. IR (neat) 3271, 2928, 2856, 2237, 1548, 1252, 1100, 836 cm^{-1} .

【0106】

(4) 3-(6-Methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)prop-2-yn-1-olの合成

【0107】

【化19】



【0108】

三方コックを付け、撹拌子を入れた50 mLナスフラスコに、4-(3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)-6-methyl-N-phenylpyrimidin-2-amine (化合物7) (221.8 mg, 0.63 mmol)を入れ、THF (3.2 mL)を入れて溶解させた。そこへ2N塩酸 (0.47 mL, 0.94 mmol) 加え、室温で3時間撹拌した。1M炭酸カリウム水溶液でpH7に調整し、濃縮して水を加え、ジクロロメタンで2回分液抽出した。得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、3-(6-Methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)prop-2-yn-1-ol (目的化合物8) (148.4 mg, 収率99%)を得た。

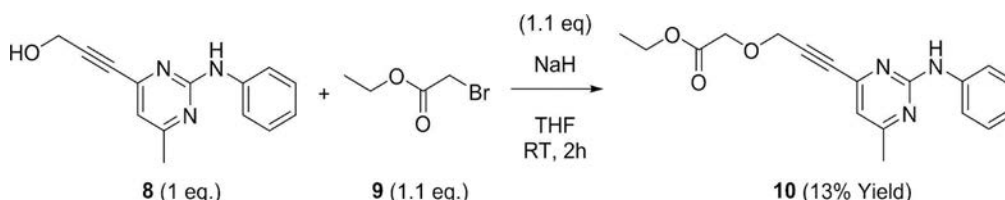
8: ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.62-7.64 (m, 2H, H-2 and H-6 Ph), 7.31-7.35 (d, 2H, H-3 and H-5 Ph), 7.11 (bs, 1H, $-\text{NH}-$), 7.02-7.05 (m, 1H, H-4 Ph), 6.70 (s, 1H, H-5 Pyr), 4.52 (d, 2H, $J = 5.73$ Hz, $\text{HOCH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$), 2.42 (s, 3H, $-\text{PyrCH}_3$), 1.84 (bs, 1H, OH) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 168.8, 159.8, 150.3, 139.4, 129.0, 122.7, 119.5, 114.4, 90.7, 83.4, 51.0, 24.2 ppm. HRMS(DART) m/z : Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}$ ($\text{M}+1^+$) 240.1137, Found 240.1137. IR (neat) 3290, 3060, 2920, 2237, 1545, 1442, 1343 cm^{-1} .

【0109】

(5) Ethyl 2-((3-(6-methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)prop-2-yn-1-yl)oxy)acetateの合成

【0110】

【化20】



【0111】

三方コックを付け、撹拌子を入れた20 mLナスフラスコに、水素化ナトリウム (14.8 mg, 0.37 mmol, 60%鉱物油)を入れ、ヘキサンで2回洗浄した後、脱気、Ar置換した。そこへ無水THF (2.3 mL)に溶解させた3-(6-Methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)prop-2-yn-1-ol (化合物8) (81.4 mg, 0.34 mmol)を加えて、室温で10分間撹拌後、ethyl 2-bromoacetate (化合物9) (0.37 mmol, $d=1.51$)を添加し、室温で2時間撹拌した。得られた反応混合液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えてpH 6-7に調整し、濃縮してシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane/ethyl acetate = 6/1 $\rightarrow$ 4/1 $\rightarrow$ 3/1)で精製し、Ethyl 2-((3-(6-methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)prop-2-yn-1-yl)oxy)acetate (目的

化合物 10) (14.5 mg, 収率13%)を得た。

10 : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.63-7.64 (m, 2H, H-2 and H-6 Ph), 7.30-7.35 (m, 2H, H-3 and H-5 Ph), 7.26 (bs, 1H, -NH-), 7.01-7.05 (m, 1H, H-4 Ph), 6.71 (s, 1H, H-5 Pyr), 4.55 or 4.25 (s, 2H, -COCH₂OCH₂C $\equiv$ C- or -COCH₂OCH₂C $\equiv$ C-), 4.25 (q, 2H, J = 7.26 Hz, -OCH₂CH₃), 2.41 (s, 3H, -PyrCH₃), 1.30 (t, 3H, J = 7.26 Hz, -OCH₂CH₃) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 169.7, 168.7, 159.7, 149.9, 139.3, 128.9, 122.5, 119.0, 114.4, 86.5, 85.1, 66.5, 61.1, 58.7, 24.1, 14.2 ppm. HRMS(DART) m/z : Calcd for C₁₈H₂₀N₃O₃ (M+1⁺) 326.1505, Found 326.1505. IR (neat) 3355, 2981, 2238, 1749, 1542, 1442, 1341, 1209, 1121 cm⁻¹.

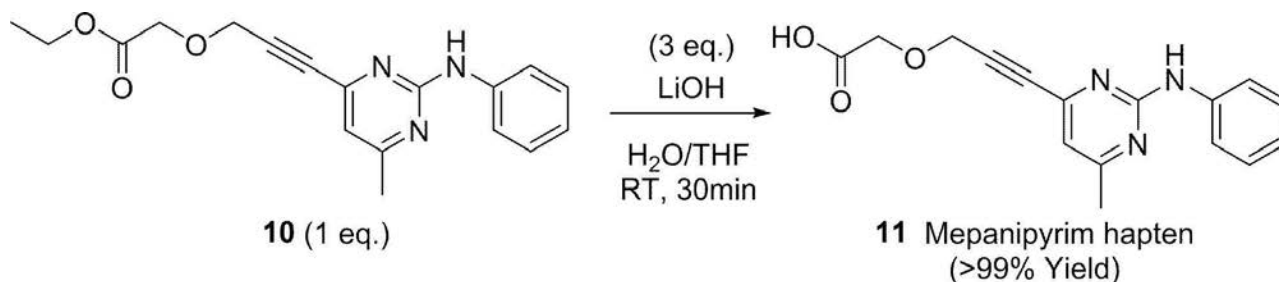
【0112】

10

(6) 2-((3-(6-Methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)prop-2-yn-1-yl)oxy)acetic acid (メパニピリム誘導体) の合成

【0113】

【化21】



20

【0114】

三方コックを付け、攪拌子を入れた30mlナスフラスコに、Ethyl 2-((3-(6-methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)prop-2-yn-1-yl)oxy)acetate (化合物 10) (49.4 mg, 0.15 mmol) を入れ、無水THF (2.5 mL) を入れて溶解させた。そこへ水 (0.5 mL) に溶解させたLiOH (10.8 mg, 0.45 mmol)を加えて、室温で30分間攪拌した。得られた反応混合液を1N塩酸でpH5付近に調整し、濃縮して目的化合物 11 であるメパニピリム誘導体とLiClの混合物を得た。

11 : ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.68 (bs, 1H, -NH-), 7.79 (d, 2H, J = 7.63 Hz, H-2 and H-6 Ph), 7.32 (t, 2H, J = 7.63 Hz, H-3 and H-5 Ph), 7.05 (t, 1H, J = 7.63 Hz, H-4 Ph), 6.64 (s, 1H, H-5 Pyr), 4.61 or 4.60 (s, 2H, -COCH₂OCH₂C $\equiv$ C- or -COCH₂OCH₂C $\equiv$ C-), 2.46 (s, 3H, -PyrCH₃) ppm. HRMS(DART) m/z : Calcd for C₁₆H₁₆N₃O₃ (M+1⁺) 298.1192, Found 298.1193. IR (neat) 3296, 2923, 2236, 1719, 1546, 1442, 1341 cm⁻¹.

30

【0115】

実施例 2 免疫原、間接競合ELISA用抗原、直接競合ELISA用標識抗原の作製

実施例 1 において合成したメパニピリム誘導体は、活性化エステル法によりスカシ貝ヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン (BSA)、および西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) と結合し、免疫原およびELISA抗原とした。

40

まず、メパニピリム誘導体5.0 μmol をDMSO 100 μL に溶解した。次にこれらの溶液にN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS) 6.0 μmol をDMSO 5 μL に溶解し添加後、さらに1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC) 6.0 μmol をDMSO 10 μL に溶解し添加した。室温にて1.5時間反応させた後、この反応溶液に10 mmol/Lリン酸緩衝液(pH 7.0) 1 mLに溶解したKLH, BSA, HRP各々10 mgを添加し、再び室温にて1.5時間反応させた。反応終了後、150 mmol/Lの塩化ナトリウムを添加した上記のリン酸緩衝液(PBS)に対して透析し、メパニピリム-KLH結合体とメパニピリム-BSA結合体を調製した。一方、メパニピリム-HRP結合体 (HRP標識メパニピリム) においては、ゲル濾過 (セファデックス G-25, fineグレード, GE社製) により精製した。

【0116】

50

実施例 3 メパニピリム-KLH結合体の免疫

実施例 2 において調製したメパニピリム-KLH結合体100 μg を、PBS 50 μL に溶解し、等量のプロイント完全アジュバントと乳化混合した後、Balb/cマウスの腹腔内に接種した。その後2週間ごとに2回、初回免疫量の1/4量を追加免疫し、さらに追加免疫と同量を最終免疫した。追加免疫の1週間後に部分採血し、抗体価の上昇を確認した。

【0117】

実施例 4 間接ELISAによる抗体の反応性の確認

免疫により上昇した抗体価は、間接ELISAを用いて確認した。すなわち、メパニピリム-BSA結合体をPBSで1 $\mu\text{g/mL}$ に調製し、96ウェルのマイクロタイタープレートに100 μL /ウェルの量で添加した後、4 $^{\circ}\text{C}$ で1晩静置することにより固相化した。液を吸引除去後、0.4% BSAを添加したPBS（以下、ブロッキング緩衝液という）300 μL /ウェルを加えて室温で1時間ブロッキングした。このウェルを0.02% tween-20を添加したPBS（以下、洗浄液という）で洗浄後、マウスの抗血清を0.2% のBSAを添加したPBS（以下、抗体希釈液という）で希釈して50 μL /ウェルの量で加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で3回洗浄した後、抗体希釈液で2000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG (H+L) ウサギ抗体（invitrogen社製）を100 μL /ウェルの量で加え、1時間反応させた。再び洗浄液で3回洗浄した後、100 $\mu\text{g/mL}$ のTMBZと0.006%の過酸化水素を加えた0.1 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)（以下、発色基質液という）を100 μL /ウェル添加し10分間で発色反応させた。0.5 mol/L 硫酸を100 μL /ウェル添加し反応停止させ450 nmの吸光度を測定した。

【0118】

実施例 5 間接競合ELISAによる抗血清のメパニピリムとの反応性の確認

メパニピリムとの反応性は、間接競合ELISAを用いて確認した。すなわち、前記の間接ELISAと同様にメパニピリム-BSA結合体を固相化し、ブロッキングした。このウェルに、10%メタノールによって適当な濃度に希釈したメパニピリム溶液（丁度阻害がかかる濃度に希釈）と抗体希釈液で希釈した抗血清（前記の間接ELISAにおいて、生じた吸光度が飽和している領域の50%の吸光度を示すように希釈）とを等量ずつ加えて混合したものを100 μL /ウェルの量で加え、室温で1時間反応させた。洗浄した後、前記の間接ELISAと同様に、HRP標識抗体と反応させ、吸光度を測定した。

間接競合ELISAによる抗血清とメパニピリムとの反応性を、図1に示した。結果から明らかのように、抗血清は5.3~10,000 ng/mLの濃度範囲でメパニピリムと反応した。

【0119】

実施例 6 メパニピリムと反応するマウスモノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体の作製は、常法により行った。まず細胞融合には、最終免疫後3日目のマウスから取り出した脾臓細胞を用いた。メッシュで大きな固形物を除去しながら、RPMI1640培地中に取り出した脾臓細胞をRPMI1640培地にて3回洗浄した後、マウスのミエローマ細胞P3-X63-Ag8.653と細胞数の比で5:1（脾臓細胞：ミエローマ細胞）になるように混合し、遠心（1300 rpm、5分間）して細胞沈渣を集めた。この細胞沈渣に予め37 $^{\circ}\text{C}$ に加温しておいた50%ポリエチレングリコール（分子量1500）1 mLを加え、細胞を融合した。細胞融合は、RPMI1640培地10 mLを徐々に添加し、牛胎児血清（以下、FBSという）1 mLを更に添加することにより、停止した。融合した細胞は、10%のFBSを添加したRPMI1640培地（以下「RPMI1640/10% FBS培地」という）に100 $\mu\text{mol/L}$ のヒポキサンチン、0.4 $\mu\text{mol/L}$ のアミノプテリン、および16 $\mu\text{mol/L}$ のチミジンを添加したHAT培地に懸濁後、96ウェルのポリスチレンプレートに5 $\times$ 10⁴細胞/ウェルで分注し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二酸化炭素存在下で10日間-14日間培養した。培養後、コロニーの生じたウェル中の抗体活性の有無を、上記の間接ELISAと間接競合ELISAを用いて、スクリーニングした。

メパニピリムに高い反応性を示す抗体を産生したウェル中のハイブリドーマは、限界希釈法によって細胞クローニングし、モノクローナル抗体産生細胞（MPP8とMPP107）とした。これらのうちMPP107を平成28年3月14日に、寄託番号NITE P-02218として独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に寄託した。

10

20

30

40

50

これらの細胞の培養上清は、MPP8由来のモノクローナル抗体（以下、MPP8抗体という）およびMPP107由来のモノクローナル抗体（以下、MPP107抗体という）として使用した。MPP8抗体のサブクラスはIgG_{2b} κ、MPP107抗体のサブクラスはIgG₁ κだった。

間接競合ELISAを用いて、MPP8抗体とMPP107抗体のメパニピリムとの反応性を調べた。結果は図1に示した通り、両抗体ともに抗血清と比較してメパニピリムと高い反応性を示した。特に、MPP107抗体は反応性が高く、0.13~14 ng/mLの測定範囲でメパニピリムと反応した。

【0120】

実施例7 モノクローナル抗体を用いたメパニピリムを測定するための直接競合ELISAの構築

MPP8抗体およびMPP107抗体を用いた直接競合ELISAを以下のように構築した。PBSで5 μg/mLに希釈した抗マウスIgGヤギ抗体（Thermo Fisher Scientific社製）を、96ウェルのマイクロタイタープレートの各ウェルに100 μL/ウェルで添加した後、4℃で1晩静置することにより固相化した。次に、ブロッキング緩衝液に置き換え、室温で1時間ブロッキングした。洗浄液で1回洗浄した後、MPP8抗体およびMPP107抗体を抗体希釈液によって希釈し、100 μL/ウェルで添加した後、室温で1時間反応させた。このウェルに、10%メタノールによって適当な濃度に希釈したメパニピリム溶液と、MPP8抗体を用いたELISAでは400 ng/mL、MPP107抗体を用いたELISAでは200 ng/mLに緩衝液によって希釈したHRP標識メパニピリムを等量ずつ加えて混合したものを100 μL/ウェルに加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で3回洗浄した後、発色基質液を100 μL/ウェル加えて10分間発色反応させた。0.5 mol/L 硫酸を100 μL/ウェル添加し反応停止させ450 nmの吸光度を測定した。その結果を図2に示す。図2から、MPP8抗体を用いた直接競合ELISAでは、間接競合ELISAと同様に5~190 ng/mLの濃度範囲でメパニピリムと反応し、MPP107抗体を用いた直接競合ELISAでは、0.12~1.8 ng/mLの濃度範囲でメパニピリムと反応した。

【0121】

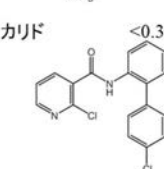
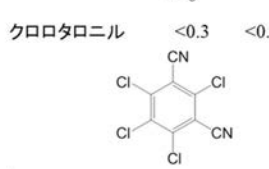
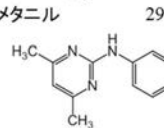
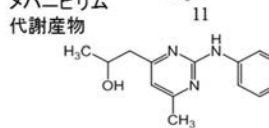
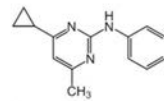
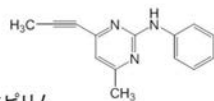
実施例8 作製したモノクローナル抗体の交差反応性

直接競合ELISAにおいて、メパニピリム代謝産物と2種類のメパニピリム関連化合物であるアニリノピリミジン系殺菌剤であるシプロジニル、ピリメタニルおよび汎用される殺菌剤であるクロロタロニル、ボスカリドとMPP8抗体およびMPP107抗体との交差反応性(CR%)を調べた。その結果は、表1に記載した通り、MPP8抗体はメパニピリム代謝産物に11%、シプロジニルに152%、ピリメタニルに29%、MPP107抗体はメパニピリム代謝産物に3%、シプロジニルに41%、ピリメタニルに21%の交差反応性を示したが、両抗体ともクロロタロニル、ボスカリドとは全く反応しなかった。

【0122】

【表1】

殺菌剤	交差反応性(%)		殺菌剤	交差反応性(%)	
	MPP8	MPP107		MPP8	MPP107
メパニピリム	100	100	シプロジニル	152	41
メパニピリム代謝産物	11	3	ピリメタニル	29	21
クロロタロニル	<0.3	<0.005	ボスカリド	<0.3	<0.005



10

20

30

40

50

【 0 1 2 3 】

実施例 9 MPP8抗体およびMPP107抗体のアミノ酸配列の決定

MPP8抗体およびMPP107抗体について、その重鎖および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列を調べた。即ち、Dynabeads mRNA DIRECT Micro Kit (Life Technologies社)を使用し、MPP8および MPP107からmRNAを抽出した。その後、5' / 3' RACE Kit, 2nd generation version 10 (Roche社製) を使用して、5' RACE法により軽鎖および重鎖の遺伝子(DNA)断片を増幅した。5' RACE法で使用したプライマー(配列番号1~4)を表2に記載した。次に、増幅したこれらのDNA断片をpGEM-T Easy Vector (Promega社)のTA-クローニングサイトに挿入して クローニングした。その後、そのDNA断片の塩基配列を公知のシークエンサーで調べた。得られた塩基配列は表3に記載した。また塩基配列から得られたアミノ酸配列は、表4に記載した。

10

【 0 1 2 4 】

【表2】

配列番号	塩基配列 (5' → 3')	用途
1	TATGCAAGGCTTACAAYCMCW ^{*1}	重鎖、SP1 ^{*2}
2	CWCAAKTTTTYTTGTCCACCKTGGTGC ^{*1}	重鎖、SP2 ^{*2}
3	ACACTCWYYCCTGTWGAAGCTCTT ^{*1}	軽鎖、SP1
4	ACACTCWYYCCTGTWGAAGCTCTTGAC ^{*1}	軽鎖、SP2

20

^{*1} Y = C, T; M = A, C; W = A, T; K = G, T

^{*2} SP1, 2は、5' / 3' RACE Kit, 2nd generation version 10 の記載用語

【 0 1 2 5 】

【表 3】

配列 番号	塩基配列 (5' 末端→3' 末端)	抗体の領 域
9	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAG CGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGTACTGATGTAGCCTGGTATCAACAGAAAC CAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCT GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCA GTCTGAAGACTTGGCAGAGTTTTTCTGTCAACAATATAACAGCTATCCGCTCACGTTCG GTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCT	MPP8 軽鎖可変 領域
10	GAGGTTGAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTTGTGAGGCCAGGGGCCTTAGTCAAGTT GTCCTGCAAAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTACTATATGCACTGGGTGAAGCAGA GGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAATGGTAATAATAGA TATGATCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCAGTATAACAGCAGACACATCCTCCAAGACAGC CTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTACTACTGTGTCTCGC TGACACACTATGGTAGTAGCTGGATTTCTCACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTC TCTGCA	MPP8 重鎖可変 領域
11	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAG CGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAAC CAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCTTCCTCCCGGTACAGTGGAGTCCCT GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCA GTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTGCAAGATATGATAGGTATCCTCTCACGTTCG GTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCT	MPP107 軽鎖可変 領域
12	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGAT ATCCTGCAAGACTTCTGGAGACGCATTCAGTGAATACACCATTACGGGGTGAAGCAGA GCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCCTCACAGTGGTGGAACTATC TACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAGGTCTCCAGCACAGC CTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTGTAAGAC TAGATCCCTATGGTAGTAGCTACCGGAGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTC TCCTCA	MPP107 重鎖可変 領域

10

20

30

【 0 1 2 6 】

【表 4】

配列 番号	アミノ酸配列 (N 末端→C 末端)	抗体の領 域
5	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTDVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSQVDP RFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEFFCQQYNSYPLTFGAGTKLELKRA	MPP8 軽鎖可変 領域
6	EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIMHWVKRPEQGLEWIGWIDPENGNNRY DPKFQGKASITADTSSKTAYLQLSSLTSEDVAVYYCVSLTHYGSSWISHWGQGTLLTVSA	MPP8 重鎖可変 領域
7	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVVTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASSRYSGVDP RFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYDRYPLTFGAGTKLELKRA	MPP107 軽鎖可変 領域
8	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGDAFTEYTIHGKQSHGKSLEWIGGINPHSGGTIY NQKFQKATLTVDRSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCVRLDPYGSSYRSYWGQGTLLTVSS	MPP107 重鎖可変 領域

10

20

【0127】

実施例 10 野菜中に残留するメパニピリムの測定

直接競合ELISAが構築できたことから、野菜中に残留するメパニピリムが測定可能なことを添加回収試験によって確認した。まず、野菜を摩砕均一化して5 g分取し、所定の濃度でメパニピリムを添加した。30分間静置後、25 mLのメタノールを添加して30分間激しく振とうした。遠心して残渣を除去し、上清1 mLを7.5 mLの蒸留水で希釈し、10%メタノール相当の測定試料を得た。この試料を用いて上記のMPP107抗体を用いた直接競合ELISAを行い、検量線から元のメパニピリム添加濃度を測定値として算出し、回収率を求めた。結果は、表2に示した通り、いずれも良好な回収率を得た。このように、今回作製した一連の抗メパニピリム抗体は、新規であるばかりでなく実用性が高く、アニリノピリミジン系殺菌剤の測定に大きな力を発揮することが期待される。

30

【0128】

【表 5】

ナス			キュウリ		ホウレンソウ		レタス		ネギ	
添加濃度	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
(mg/kg)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	85.4	5.84	94.4	4.42	89.3	7.96	88.0	11.48	137.7	3.83
2	63.8	5.84	79.1	5.84	68.9	3.83	75.2	2.21	95.6	16.67
5	85.7	4.08	83.0	6.23	84.3	9.42	88.4	6.23	72.1	6.23

40

【産業上の利用可能性】

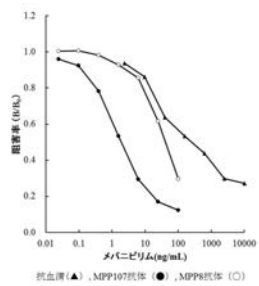
【0129】

本発明の抗体またはその断片は、メパニピリムのみならず、メパニピリムに類似した構造を有する複数のアニリノピリミジン系殺菌剤にも結合能を有するため、試料中のアニリノピリミジン系殺菌剤に対して個別に抗体を用意することなく、本発明の抗体またはその断片のみを用いて、1回の測定で複数のアニリノピリミジン系殺菌剤の有無を検出するこ

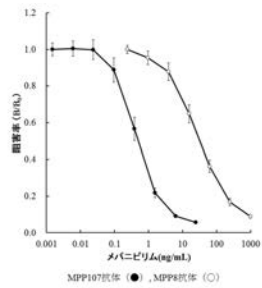
50

とができるため、測定が迅速かつ経済的である。

【図 1】



【図 2】



【配列表】

2018011583000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 J
G 0 1 N	33/531	(2006.01)	G 0 1 N 33/531 A
C 0 7 D	239/42	(2006.01)	C 0 7 D 239/42 C S P Z
A 6 1 K	31/505	(2006.01)	A 6 1 K 31/505
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04

(74)代理人 100125070
弁理士 土井 京子

(74)代理人 100136629
弁理士 鎌田 光宜

(74)代理人 100121212
弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100163658
弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 岩佐 精二
愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1 国立大学法人豊橋技術科学大学内

(72)発明者 岩佐 香代
愛知県豊田市八草町秋合 1 2 6 7 番 公益財団法人科学技術交流財団内

(72)発明者 平川 由紀
京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 番地 公益財団法人京都高度技術研究所内

(72)発明者 山▲崎▼ 朋美
京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 番地 公益財団法人京都高度技術研究所内

(72)発明者 三宅 司郎
京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 番地 公益財団法人京都高度技術研究所内

F ターム (参考) 4B064 AG26 AG27 CA19 CA20 CC24 DA13
4B065 AA01X AA57X AA83X AA86X AA87X AA90X AA90Y AB01 AB02 AC14
BA01 BA08 CA24 CA25 CA46
4C086 AA01 AA02 AA03 BC42 MA02 MA05 NA14 ZB09
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	抗Mepanipyrim抗体和使用该抗体测量Mepanipyrim的方法		
公开(公告)号	JP2018011583A	公开(公告)日	2018-01-25
申请号	JP2016144924	申请日	2016-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人豊桥技术科学大学 株式会社堀场制作所		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人豊桥技术科学大学 公益财団法人科学技术交流财团 公益财団法人京都高度技术研究所 株式会社堀场制作所		
[标]发明人	岩佐精二 岩佐香代 平川由紀 三宅司郎		
发明人	岩佐 精二 岩佐 香代 平川 由紀 山▲崎▼ 朋美 三宅 司郎		
IPC分类号	C12N15/02 C07K16/44 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/531 C07D239/42 A61K31/505 A61P37/04		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.C C07K16/44 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53.J G01N33/531.A C07D239/42.CSP.Z A61K31/505 A61P37/04 C07D239/42.ZCS.P C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA83X 4B065/AA86X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/BC42 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZB09 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	高岛肇 当麻 博文		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种能够诱导针对以甲吡嘧啶为代表的苯胺嘧啶杀真菌剂的抗体的化合物，以及由该化合物诱导的抗体或其片段。一种使用抗体或其片段测定样品中以甲吡嘧啶为代表的苯胺嘧啶杀真菌剂的方法，以及可用于该测定的测定试剂盒。解决方案：结构式（式中，R表示HOOC-（CH₂）ⁿ或HOOC-CH₂-O-（CH₂）ⁿ，n为1〜7的整数。免疫原性复合物的抗体或其片段，所述免疫原性复合物包含（是）甲吡嘧啶衍生物和免疫学上可接受的载体。[选择图]无

(51) Int. Cl.		F 1		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/02 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A C	4 B 0 6 4
C O 7 K	16/44 (2006.01)	C O 7 K	16/44		4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 6
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
		審査請求	未請求	請求項の数 14	O L (全 29 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2016-144924 (P2016-144924)	(71) 出願人	304027349	最終頁に続く	
(22) 出願日	平成28年7月22日 (2016. 7. 22)		国立大学法人豊橋技術科学大学		
			愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1 - 1		
		(71) 出願人	500254354		
			公益財団法人科学技術交流財団		
			愛知県豊田市八草町秋合 1 2 6 7 番 1		
		(71) 出願人	591148093		
			公益財団法人京都高度技術研究所		
			京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 番地		
		(71) 出願人	000155023		
			株式会社堀場製作所		
			京都府京都市南区吉祥院宮の東町 2 番地		
		(74) 代理人	100080791		
		弁理士	高島 一		
(54) 【発明の名称】 抗メバニビリム抗体および該抗体を用いたメバニビリム測定方法					