

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5817720号  
(P5817720)

(45) 発行日 平成27年11月18日(2015.11.18)

(24) 登録日 平成27年10月9日(2015.10.9)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	J
GO 1 N 33/532	(2006.01)	GO 1 N 33/532	A
GO 1 N 33/566	(2006.01)	GO 1 N 33/566	
CO 7 K 16/44	(2006.01)	CO 7 K 16/44	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	

請求項の数 13 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2012-515915 (P2012-515915)	(73) 特許権者	000000066
(86) (22) 出願日	平成23年5月18日 (2011.5.18)		味の素株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/061460		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(87) 国際公開番号	W02011/145664	(74) 代理人	100080791
(87) 国際公開日	平成23年11月24日 (2011.11.24)		弁理士 高島 一
審査請求日	平成26年5月14日 (2014.5.14)	(74) 代理人	100125070
(31) 優先権主張番号	特願2010-114616 (P2010-114616)		弁理士 土井 京子
(32) 優先日	平成22年5月18日 (2010.5.18)	(74) 代理人	100136629
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 鎌田 光宜
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100122688
			弁理士 山本 健二
		(74) 代理人	100117743
			弁理士 村田 美由紀

最終頁に続く

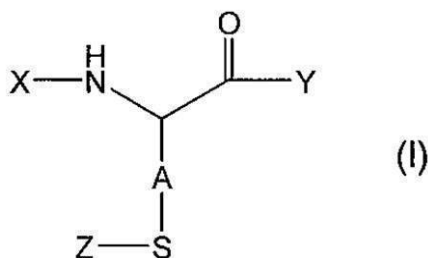
(54) 【発明の名称】 含硫黄アミノ酸誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記一般式(I)：

【化1】



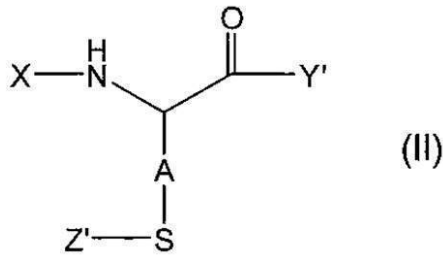
(式中、Xは免疫応答性疎水基、Yは内因性低分子化合物反応活性基又は内因性低分子化合物が結合した基、Zは水素原子、高分子量付与基又は標識化合物修飾基、Aは単結合又は炭素数1～6のアルキレン基である。)

で表される構造を有することを特徴とする、含硫黄アミノ酸誘導体。

【請求項2】

一般式(I)が下記一般式(II)：

## 【化 2】



10

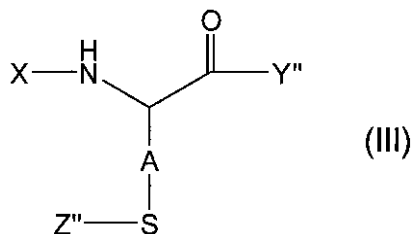
(式中、Xは免疫応答性疎水基、Y'は内因性低分子化合物が結合した基、Z'は水素原子又は高分子量付与基、Aは単結合又は炭素数1～6のアルキレン基である。)

で表される構造を有することを特徴とする、請求項1に記載の含硫黄アミノ酸誘導体。

## 【請求項3】

一般式(I)が下記一般式(III)：

## 【化 3】



20

(式中、Xは免疫応答性疎水基、Y''は内因性低分子化合物反応活性基、Z''は標識化合物修飾基、Aは単結合又は炭素数1～6のアルキレン基である。)

で表される構造を有することを特徴とする、請求項1に記載の含硫黄アミノ酸誘導体。

## 【請求項4】

免疫応答性疎水基が環状構造を有することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の含硫黄アミノ酸誘導体。

30

## 【請求項5】

免疫応答性疎水基が、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基又はキノリニルアミノカルボニル基であることを特徴とする、請求項4に記載の含硫黄アミノ酸誘導体。

## 【請求項6】

内因性低分子化合物反応活性基が、アルデヒド基、N-スクシンイミジル基、ハロゲン基、イソチオシアネート基又はマレイミド基を含有することを特徴とする、請求項1又は3に記載の含硫黄アミノ酸誘導体。

## 【請求項7】

高分子量付与基又は標識化合物修飾基がリンカーを介して結合されていることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の含硫黄アミノ酸誘導体。

40

## 【請求項8】

請求項1～7のいずれか1項に記載の含硫黄アミノ酸誘導体を含むことを特徴とする、内因性低分子化合物を測定するための試薬。

## 【請求項9】

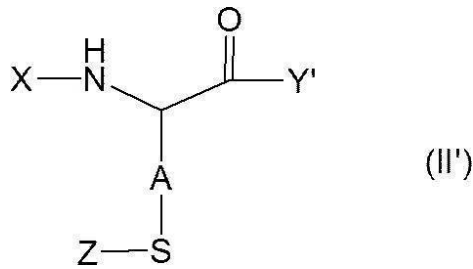
内因性低分子化合物がアミノ酸であることを特徴とする、請求項8に記載の試薬。

## 【請求項10】

請求項2に記載の含硫黄アミノ酸誘導体を抗原として用いて動物を免疫する工程を含む、下記一般式(III')：

50

【化 4】



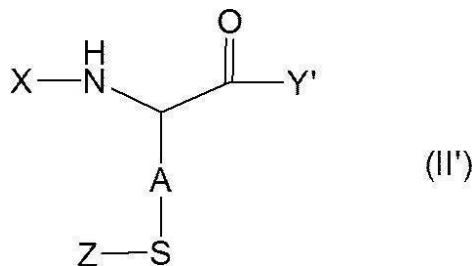
10

(式中、Xは免疫応答性疎水基、Y'は内因性低分子化合物が結合した基、Zは水素原子又は高分子量付与基、Aは単結合又は炭素数1～6のアルキレン基である。)で表される含硫黄アミノ酸誘導体を認識し得る抗体の製造方法。

【請求項 1 1】

請求項 2 に記載の含硫黄アミノ酸誘導体を抗原として用いることにより得られることを特徴とする、下記一般式 (II') :

【化 4】



20

(式中、Xは免疫応答性疎水基、Y'は内因性低分子化合物が結合した基、Zは水素原子又は高分子量付与基、Aは単結合又は炭素数1～6のアルキレン基である。)で表される含硫黄アミノ酸誘導体を認識し得る抗体。

【請求項 1 2】

前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の抗体。

【請求項 1 3】

以下の工程 (A) ~ (C) を含むことを特徴とする、内因性低分子化合物の測定方法：  
 (A) 請求項 3 に記載の含硫黄アミノ酸誘導体と被験試料とを反応させ、該含硫黄アミノ酸誘導体と被験試料中に存在する内因性低分子化合物との複合体を形成させる工程、  
 (B) 工程 (A) により形成した複合体と、請求項 1 1 又は 1 2 に記載の抗体とを接触させる工程、  
 (C) 前記抗体に結合した複合体の標識を測定する工程。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、特定の含硫黄アミノ酸誘導体に関する。更に、該含硫黄アミノ酸誘導体含有試薬、該含硫黄アミノ酸誘導体を用いた内因性低分子化合物認識抗体及びその製造方法、並びに含硫黄アミノ酸誘導体を用いた内因性低分子化合物の測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、低分子化合物に対する非競合型の免疫学的測定法が報告されている (特許文献 1)。該報告によれば、ハプテン (抗原) と抗ハプテン抗体 (第 1 抗体) とからなる抗原 - 抗体複合体を免疫原として動物免疫し、該複合体を認識し得る新たな第 2 抗体を獲得している。測定方法としては、第 1 抗体を担体上に固相化し、ハプテンとの抗原抗体反応を成

50

立させ、次いで、標識された第2抗体を結合させるという原理である。しかしながら該方法を用いるには少なくとも2種類の抗体が必要となり、測定法の構築に至るまでの時間とコスト増大を招くことになる。また、抗原に対して選択性の高い抗体を少なくとも2つ作製する必要がある。その他にも低分子化合物を検出又は測定するための報告はなされているが(特許文献2、非特許文献1~3)、上記と同様に複数種類の抗体が必要であったり、低分子化合物を定量できる程度の感度が得られなかったりしている。

#### 【0003】

低分子化合物(特に、内因性低分子化合物)に対して十分な親和性を有する抗体を得られない要因は2つあげられる。一つは抗原決定基のサイズである。一般に、抗原決定基のサイズは、提示された分子の大きさとしてアミノ酸3~8残基程度といわれている。したがって、低分子化合物がアミノ酸である場合、例えば1残基のアミノ酸を認識するような抗アミノ酸抗体を獲得することは困難であり、仮に獲得できたとしても、その親和性は低いと考えられる。もう一つは、アミノ酸をはじめとした生体内の化合物に対しては、一般に、免疫応答が生じにくいという点である。

#### 【0004】

抗原抗体反応を調べるイムノアッセイは、通常、競合型イムノアッセイと非競合型イムノアッセイの2つに大別される。競合型イムノアッセイでは、担体上に一定量固相化された抗体に対して試料中の抗原と一定量の標識抗原とが競合する。即ち、試料中の抗原量が少ない場合は、標識抗原と抗体との結合量が多くなり、シグナル強度は高く観測されるのに対して、試料中の抗原量が多い場合は逆にシグナル強度は低く観測される。他方、非競合型イムノアッセイとしてはサンドイッチ型イムノアッセイが知られている。サンドイッチ型イムノアッセイでは、担体上に固相化された過剰量の抗体(第1抗体)に抗原含有試料が添加され、次いで標識抗体(第2抗体)が添加される。第2抗体は第1抗体と同じ抗原を認識するが、それぞれの抗原表面の認識部位が異なるため、1つの抗原を2つの抗体で挟み込むサンドイッチ型の結合様式となる。結果として、抗原量に応じたシグナル増大が誘起され抗原量の定量分析が可能となる。

#### 【0005】

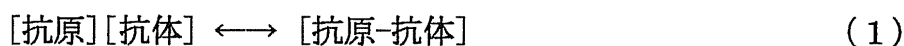
一般に、競合型イムノアッセイでは、結合型(B)と遊離型(F)とが抗原抗体反応において平衡状態に達するまで数時間から終夜にかけて反応時間を必要とする。また競合型イムノアッセイでは、非標識抗原と標識抗原との間で抗体に対する親和性に差異があった場合、分析値の正確度の低下を招くおそれがある。

#### 【0006】

これに対し、非競合型イムノアッセイでは反応時間の短時間化が可能となり、また抗原量は標識抗体量に対応するため、測定濃度範囲の広い測定法が構築できる。また、抗原抗体反応時には2つの抗体は抗原量に対して過剰量存在するため、下式(1)の平衡状態が複合体生成方向に傾くことから、微量の抗原量であっても複合体を形成し易い環境となる。結果として、非競合型イムノアッセイは競合型イムノアッセイに比べて高感度測定が可能となる。

#### 【0007】

##### 【数1】



#### 【0008】

しかしながら、上述の通り、サンドイッチ型のような非競合型イムノアッセイでは一つの抗原に対して2種類の抗体が必要となる。また、これらの抗体はそれぞれ抗原の別々の領域を認識するものでなければならない。そのため、抗原が低分子化合物である場合には、分子サイズが小さく、認識部位の異なる2つの抗体を獲得することは困難であることから、低分子化合物の測定において非競合型イムノアッセイを用いることは容易ではなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開平8 - 211054号公報

【特許文献2】特開2000 - 55917号公報

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】J. Immunological. Met. 272, 1-10 (2003)

【非特許文献2】Histochemistry 90, 427-445 (1989)

【非特許文献3】Clin. Chem. Lab. Med. 42, 1377-1383 (2004)

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の課題は、内因性低分子化合物を高感度で特異的且つ簡便に測定する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、特定の含硫黄アミノ酸誘導体を用いることにより上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】

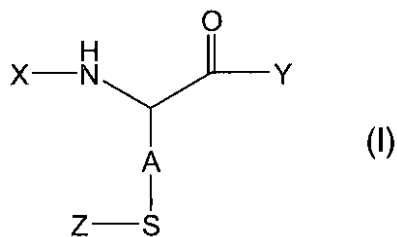
20

即ち、本発明は以下の通りである。

(1) 下記一般式(I)：

【0014】

【化1】



30

【0015】

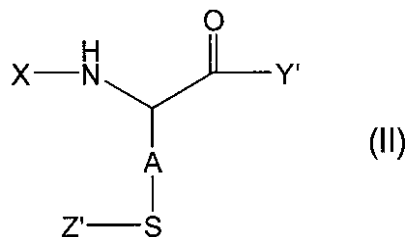
(式中、Xは免疫応答性疎水基、Yは内因性低分子化合物反応活性基又は内因性低分子化合物が結合した基、Zは水素原子、高分子量付与基又は標識化合物修飾基、Aは単結合又は炭素数1～6のアルキレン基である。)

で表される構造を有することを特徴とする、含硫黄アミノ酸誘導体。

(2) 一般式(I)が下記一般式(II)：

【0016】

【化2】



40

【0017】

(式中、Xは免疫応答性疎水基、Y'は内因性低分子化合物が結合した基、Z'は水素原子又は高分子量付与基、Aは単結合又は炭素数1～6のアルキレン基である。)

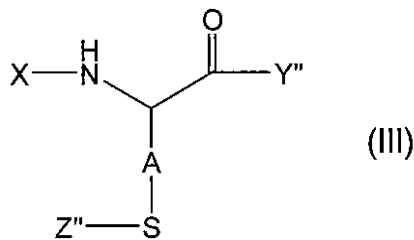
で表される構造を有することを特徴とする、(1)に記載の含硫黄アミノ酸誘導体。

50

(3) 一般式 (I) が下記一般式 (III) :

【0018】

【化3】



10

【0019】

(式中、Xは免疫応答性疎水基、Y''は内因性低分子化合物反応活性基、Z''は標識化合物修飾基、Aは単結合又は炭素数1~6のアルキレン基である。)

で表される構造を有することを特徴とする、(1)に記載の含硫黄アミノ酸誘導体。

(4) 免疫応答性疎水基が環状構造を有することを特徴とする、(1)~(3)のいずれかに記載の含硫黄アミノ酸誘導体。

(5) 免疫応答性疎水基が、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基又はキノリニルアミノカルボニル基であることを特徴とする、(4)に記載の含硫黄アミノ酸誘導体。

(6) 内因性低分子化合物反応活性基が、アルデヒド基、N-スクシンイミジル基、ハロゲン基、イソチオシアネート基又はマレイミド基を含有することを特徴とする、(1)又は(3)に記載の含硫黄アミノ酸誘導体。

20

(7) 高分子量付与基又は標識化合物修飾基がリンカーを介して結合されていることを特徴とする、(1)~(3)のいずれかに記載の含硫黄アミノ酸誘導体。

(8) (1)~(7)のいずれかに記載の含硫黄アミノ酸誘導体を含むことを特徴とする、内因性低分子化合物を測定するための試薬。

(9) 内因性低分子化合物がアミノ酸であることを特徴とする、(8)に記載の試薬。

(10) (2)に記載の含硫黄アミノ酸誘導体を抗原として用いて動物を免疫する工程を含む、内因性低分子化合物認識抗体の製造方法。

(11) (2)に記載の含硫黄アミノ酸誘導体を抗原として用いることにより得られることを特徴とする、内因性低分子化合物認識抗体。

30

(12) 前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする、(11)に記載の内因性低分子化合物認識抗体。

(13) 以下の工程(A)~(C)を含むことを特徴とする、内因性低分子化合物の測定方法：

(A) (3)に記載の含硫黄アミノ酸誘導体と被験試料とを反応させ、該含硫黄アミノ酸誘導体と被験試料中に存在する内因性低分子化合物との複合体を形成させる工程、

(B) 工程(A)により形成した複合体と、(11)又は(12)に記載の内因性低分子化合物認識抗体とを接触させる工程、

(C) 前記内因性低分子化合物認識抗体に結合した複合体の標識を測定する工程。

40

【発明の効果】

【0020】

本発明における特定の含硫黄アミノ酸誘導体により、内因性低分子化合物を高感度で特異的且つ簡便に測定する方法を提供できるようになった。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】 図1は、BSA又は各種ハプテンとBSAとの結合体におけるMALDI-TOF MSスペクトルを示す図である。1は非化学修飾BSA、2はマレイミド活性化BSA、3はマレイミド活性化BSAとFmoc-Cys[H]-Glyとの結合体のスペクトルをそれぞれ示す。

【図2】 図2は、内因性低分子化合物を測定するELISAの一例を示す図である。1はマイ

50

クロプレート、2はプロテインA/G、3は抗ハプテン抗体、4はハプテン、5はビオチン、6はアビジン又はストレプトアビジン、7は西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)をそれぞれ示す。

【図3】図3は、抗Fmoc-Cys-Gly抗体の反応性を調べた結果を示す図である。Aは、biotin-[Fmoc-Cys-Gly]標準液に対する反応性を示す用量作用曲線である。グラフの横軸は標準液の濃度を示し、縦軸は測定波長492nmにおける相対吸光度を示す。Bは、抗Fmoc-Cys-Gly抗体の各種アミノ酸の標準液に対する交差反応性を示すグラフである。グラフの横軸は各種アミノ酸標準液の濃度を示し、縦軸は測定波長492nmにおける相対吸光度を示す。

【図4】図4は、実試料におけるGly濃度の測定評価を行った結果を示す図である。Aは、日本酒(四角)、FCS(三角)及びラット血漿サンプル(丸)におけるGly濃度を測定したグラフであり、横軸は図2に示した原理に基づくELISAにより測定されるGly濃度を示し、縦軸は高速液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)により測定されるGly濃度を示す。両者の測定法により得られたGly濃度の近似曲線に基づく $R^2$ 値は、0.9945であった。Bは、ラット血漿サンプルにおけるGly濃度を測定したグラフであり、横軸はAと同様にELISAにより測定されるGly濃度を示し、縦軸はLC-MSにより測定されるGly濃度を示す。両測定法により得られた近似曲線に基づく $R^2$ 値は、0.9642であった。

【図5】図5は、内因性低分子化合物を測定するELISAの別の一例を示す図である。1はマイクロプレート、2はアビジン又はストレプトアビジン、3はビオチン、4はハプテン、5は抗ハプテン抗体、6は抗ハプテン抗体を認識する抗体、7は標識化合物をそれぞれ示す。

【図6】図6は、実試料におけるPhe濃度の測定評価を行った結果を示す図である。ELISAにより測定されるPhe濃度を白い棒で、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)により測定されるPhe濃度を黒い棒でそれぞれ表す。縦軸はPhe濃度を表す。

【発明を実施するための形態】

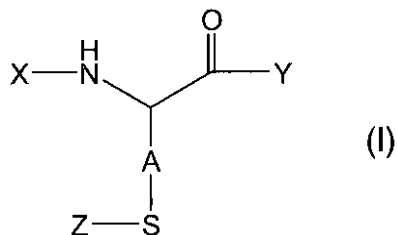
【0022】

< 1. 含硫黄アミノ酸誘導体 >

本発明は、新規化合物、特に内因性低分子化合物を測定するために利用され得る化合物として含硫黄アミノ酸誘導体を提供するものである。本発明の含硫黄アミノ酸誘導体は、硫黄原子を含有するアミノ酸を母体として、該母体の構造や性質を大幅に変えない程度に官能基の導入や原子の置き換え等の改変がなされた化合物であり、より詳細には、下記一般式(I)：

【0023】

【化4】



【0024】

(式中、Xは免疫応答性疎水基、Yは内因性低分子化合物反応活性基又は内因性低分子化合物が結合した基、Zは水素原子、高分子量付与基又は標識化合物修飾基を表し、Aは単結合又は炭素数1~6、好ましくは1~5、より好ましくは1~4、さらにより好ましくは1~3、最も好ましくは1又は2のアルキレン基である。)

で表される構造を有する化合物である。

【0025】

また、上記一般式(I)で表される構造は、下記一般式(II)：

【0026】

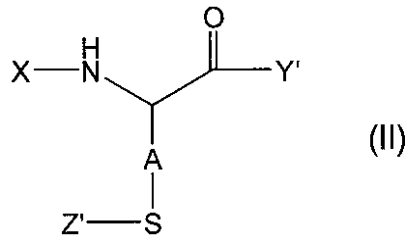
10

20

30

40

【化5】



【0027】

(式中、Xは免疫応答性疎水基、Y'は内因性低分子化合物が結合した基、Z'は水素原子又は高分子量付与基であり、Aは単結合又は炭素数1~6、好ましくは1~5、より好ましくは1~4、さらにより好ましくは1~3、最も好ましくは1又は2のアルキレン基である。)

で表される構造とすることもできる。

【0028】

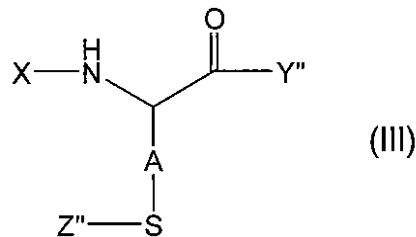
上記一般式(II)で表される構造を有する化合物は、Z'が水素原子の場合、内因性低分子化合物を認識する抗体に結合するハプテン又は抗原として使用することができ、Z'が高分子量付与基の場合、該抗体を作製するための抗原(免疫原)として使用することができる。

【0029】

さらに、上記一般式(I)で表される構造は、下記一般式(III)：

【0030】

【化6】



【0031】

(式中、Xは免疫応答性疎水基、Y''は内因性低分子化合物反応活性基、Z''は標識化合物修飾基であり、Aは単結合又は炭素数1~6、好ましくは1~5、より好ましくは1~4、さらにより好ましくは1~3、最も好ましくは1又は2のアルキレン基である。)

で表される構造とすることもできる。

【0032】

上記一般式(III)で表される構造を有する化合物は、測定対象とする内因性低分子化合物と結合体を構築することができ、さらに該内因性低分子化合物を検出することができるシグナルプローブとして使用することができる。該化合物は、後述する内因性低分子化合物の測定方法に主に用いることができる。

【0033】

上記一般式(I)、一般式(II)及び一般式(III)で表される構造を有する本発明の含硫黄アミノ酸誘導体は、上述の通り、内因性低分子化合物の測定、特に免疫学的測定に用いる試薬として有用であり、本発明はこのような試薬もまた提供する。

【0034】

上記式(I)~(III)の中には、不斉炭素による(R)-体及び(S)-体の光学異性体が存在しており、本発明の化合物には、考えられるすべての光学活性体及びその混合物(例えば、ラセミ体、エナンチオマー混合物、ジアステレオマー混合物等)が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 5 】

上記式 ( I ) ~ ( I I I ) において、X は免疫応答性疎水基であり、外因性化合物に由来する構造として免疫応答性を向上させることができる疎水基である。本明細書において、疎水基とは、極性が小さく、水分子との親和性が小さい基を意味し、具体的には、アルキル基等の炭化水素基である。本発明において、免疫応答性疎水基を導入する目的は3点ある。まず1点目は、本発明の含硫黄アミノ酸誘導体の分子量を増大させることである。ハプテンが単独のアミノ酸である場合、抗原決定基としての大きさが充分ではなく親和性の高い抗体作製が期待できないからである。本発明において増大される分子量としては、特に限定されないが、例えば70以上であり、好ましくは120以上である。次に2点目は、抗原抗体反応の親和性を向上させることである。Xの部位に導入される免疫応答性疎水基が芳香環あるいはアルキル基等を有している場合、抗体がX部分を含めて認識したとき、疎水性相互作用効果により抗原抗体反応の親和性が増大され得る。そして3点目は、免疫応答を増大させることである。内因性化合物は元来生体内に存在している物質であるため、当該化合物に対する免疫応答性は一般に低い。これに対し、外因性化合物としての構造を有する免疫応答性疎水基を付加させると、免疫原性が高まり、免疫応答を促進して抗体産生能を向上させることができる。

## 【 0 0 3 6 】

免疫応答性疎水基としては、本発明の含硫黄アミノ酸誘導体の分子量を増大させ、抗原抗体反応の親和性を向上させ、且つ本発明の含硫黄アミノ酸誘導体を抗原として投与された被験動物の免疫応答性を向上させるものであれば特に制限されないが、環状構造を有する基であることが好ましい。環状構造を有する基としては、炭化水素環含有基が挙げられる。炭化水素環含有基とは、炭素原子が環状に結合している構造を含有する基であって、該構造は単環系炭化水素であってもよく、また縮合多環炭化水素であってもよい。単環系炭化水素としては、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロヘキサン、シクロブテン、シクロペンタ-2,4-ジエン等が、縮合多環炭化水素としてはペンタレン、インデン、ナフタレン、アズレン、ピフェニレン、フルオレン、アントラセン、テトラセン、トリフェニレン等が挙げられる。また、環状構造を有する基としては、ヘテロ原子を含むもの(複素環)であってもよい。複素環としては、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、ピラゾール、イソオキサゾール、イソチアゾール、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、ピペリジン、モルホリン等の単環の複素環、イソベンゾフラン、1,3-ジヒドロイソベンゾフラン、フタラン、フタリド、フタリジル、ベンゾフラン、イソクロメン、イソクロメニリウム、2H-クロメン、9H-キサンテン、キサンチリウム、オキサトレン等の縮合複素環が挙げられる。当該環状構造を有する基は、芳香環あるいは炭素数1~10のアルキル基等を含む基であることがより好ましい。芳香環としてはベンゼン、ナフタレン、アントラセン、フラン、ベンゾフラン等が挙げられる。炭素数1~10のアルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デカニル基等が挙げられる。上記アルキル基は、直鎖状であっても分岐鎖状であってもよく、好ましくは炭素数3~10、より好ましくは炭素数5~10のアルキル基である。本発明では、分子量を増大させ、抗原抗体反応の親和性を向上させ、且つ被験動物の免疫応答性を向上させるという観点から、免疫応答性疎水基は縮合環を有することが好ましい。免疫応答性疎水基としては、例えば、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基、キノリニルアミノカルボニル基、4-N,N-dimethylaminosulfonyl-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazole(DBD-PZ基)、4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole(NBD-F基)、5-N,N-dimethylaminonaphthalenesulfonyl chloride(DNS-Cl基)、o-phthalaldehyde(OPA基)及び4-phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dione(fluorescamine基)、N,N,N-trimethylammonioanilyl N'-hydroxysuccinimidyl carbamate iodide(TAHS基)、フルオレセイン基、ダンシルクロライド基等を挙げることができる。これらのうち本発明では、Fmoc基、キノリニルアミノカルボニル基が好ましい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 7 】

上記式 ( I ) ~ ( I I I ) における Y、Y'、Y'' は内因性低分子化合物反応活性基 (以下、「y 1 基」と称する場合がある) 又は内因性低分子化合物が結合した基 (以下、「y 2 基」と称する場合がある) であり、このうち内因性低分子化合物反応活性基 (y 1 基) は、測定対象である内因性低分子化合物と反応し得る活性基が導入される基を示す。特に限定されないが、y 1 基が、例えばアルデヒド基、N - スクシンイミジル基、ハロゲン基 (例えば、F、Cl、Br 等)、イソチオシアネート基等を含有していれば、アミノ基反応活性基として、アミノ基を含有する内因性低分子化合物と容易に反応し、該内因性低分子化合物を本発明の含硫黄アミノ酸誘導体に結合させることができる。また、y 1 基が、例えばアミノ基 ( - NH<sub>2</sub> ) を含有していれば、カルボキシル基反応活性基として、カルボン酸 (カルボキシル基) を含有する内因性低分子化合物と容易に反応し、該内因性低分子化合物を本発明の含硫黄アミノ酸誘導体に結合させることが可能となる。また、y 1 基が、例えばマレイミド基を含有していれば、チオール基反応活性基として、チオール基を含有する内因性低分子化合物と容易に反応し、該内因性低分子化合物を本発明の含硫黄アミノ酸誘導体に結合させることができる。また、y 1 基が、例えばヒドラジン基を含有していれば、糖構造含有内因性低分子化合物と容易に反応し、該内因性低分子化合物を本発明の含硫黄アミノ酸誘導体に結合させることができる。結果として、本発明の含硫黄アミノ酸誘導体における y 1 基の部位にはアミノ酸、ペプチド、有機酸、遊離脂肪酸、糖、糖リン酸、核酸等の多様な内因性低分子化合物の導入が可能となる。本発明における y 2 基とは、上記の通り y 1 基と内因性低分子化合物とが反応することによって形成された基を示し、測定対象とする内因性低分子化合物を化学構造として含有させたものである。これにより、該内因性低分子化合物に対する抗体の作製に利用することができる。

10

20

## 【 0 0 3 8 】

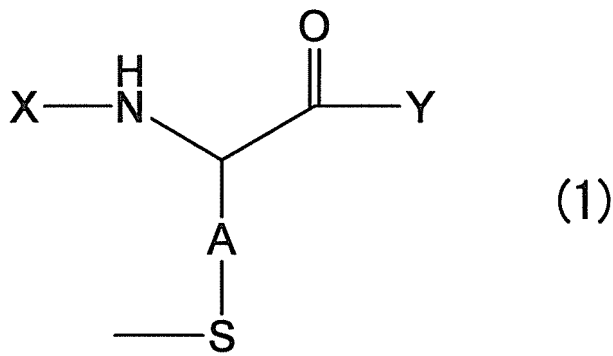
上記式 ( I ) ~ ( I I I ) における Z、Z'、Z'' は、水素原子、高分子量付与基又は標識化合物修飾基である。高分子量付与基は上記式 ( I ) 又は ( I I ) の分子量を増加させるために導入される基であり、免疫対象の動物にとって免疫原性が低いものが好ましい。標識化合物修飾基は上記式 ( I ) 又は ( I I I ) を標識するために導入される基である。Z 又は Z' が水素原子である場合は、本発明の含硫黄アミノ酸誘導体自体がハプテンとなり得る。また、Z 又は Z' が高分子量付与基である場合は、かかる含硫黄アミノ酸誘導体は抗体作製のための免疫原として使用することができる。調製した該免疫原をマウス、モルモット、ラット、ヤギ、サル、アカゲザル、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ネコ、ハムスター、ヒツジ、ブタ、ラクダ等の動物に定期的に複数回投与することにより免疫応答が発生し、免疫原の立体構造上表面にある分子領域の一部、即ち、本発明の含硫黄アミノ酸誘導体における免疫応答性疎水基及び内因性低分子化合物の部分に認識する抗体を産生することができる。高分子量付与基として用いられる物質は、いわゆるキャリアタンパク質と呼ばれるものを用いることができ、例えば、ウシ血清アルブミン ( B S A )、ウサギ血清アルブミン ( R S A )、オボアルブミン ( O V A )、スカシ貝ヘモシアニン ( K L H )、チログロブリン ( T G )、免疫グロブリン等を挙げることができる。これらの物質を用いた場合、本発明における高分子量付与基は「キャリアタンパク質結合基」とも言うことができる。また、高分子量付与基として合成高分子を用いることも可能であり、例えば、ポリアミノ酸類、ポリスチレン類、ポリアクリル類、ポリビニル類、ポリプロピレン類等の重合物又は共重合物等の各種ラテックス等が挙げられる。これらの物質を用いた場合、本発明における高分子量付与基は「合成高分子結合基」とも言うことができる。1 つの高分子量付与基 ( Z 又は Z' ) には、下記一般式 ( 1 ) :

30

40

## 【 0 0 3 9 】

【化 7】



10

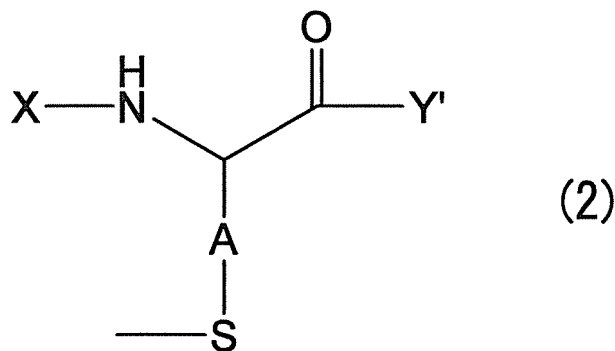
【 0 0 4 0 】

(式中、Xは免疫応答性疎水基、Yは内因性低分子化合物反応活性基又は内因性低分子化合物が結合した基、Aは単結合又は炭素数1～6のアルキレン基である。)

で表される部分、又は下記一般式(2)：

【 0 0 4 1 】

【化 8】



20

【 0 0 4 2 】

(式中、Xは免疫応答性疎水基、Y'は内因性低分子化合物が結合した基、Aは単結合又は炭素数1～6のアルキレン基である。)

で表される部分と結合し得る部位が1又は2以上存在する。2以上の上記部分と結合するような態様も本発明に包含される。

【 0 0 4 3 】

また、高分子量付与基は上記式(I)又は(II)において、リンカーを介して硫黄原子に結合されていることが好ましい。リンカーを介して高分子量付与基を結合させることによって、高分子化合物と硫黄原子とを直接結合させた場合よりも抗原部分の表面提示能が高まり、より特異性の高い抗体を作製することができる。本発明におけるリンカーとしては、抗原提示能の向上に利用され得るものであれば特に限定されないが、例えば、アミノ基と硫黄原子を架橋するものが好ましい。例えば、マレイミドブチリルスクシンイミド(MBS)、マレイミドカプロイルスクシンイミド(MCS)、マレイミドウンデカノイルスクシンイミド(MUS)、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(sulfo-SMCC)等が知られる。

40

【 0 0 4 4 】

一方、Z又はZ'が標識化合物修飾基である場合は、本発明の含硫黄アミノ酸誘導体は内因性低分子化合物の存在を検出し得るシグナルプローブとして利用することができる。標識化合物修飾基は、上記式(I)又は(III)において、上記高分子量付与基と同

50

様にリンカーを介して結合されていてもよい。標識化合物修飾基とは、酵素（西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（AP）、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等）、蛍光物質（フルオレスカミン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、フィコエリスリン（PE）、アロフィコシアニン（APC）、緑色蛍光タンパク質（GFP）等）、放射性同位体（ $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 等）、安定同位体、色素、金属、コロイド、磁性物質等の標識化合物を上記式（I）又は（III）に導入するための基である。また本発明では、標識化合物修飾基を直接導入する代わりにビオチン又はレクチン等を介して導入するようにしてもよい。ビオチンはアビジン又はストレプトアビジンと選択的に反応を起こす分子であるため、ビオチンを導入した場合、アビジン又はストレプトアビジンを事前に標識しておけばよい。レクチンの場合も選択的に反応する糖類を事前に標識することで同様な効果を得ることができる。

10

## 【0045】

上記式（I）～（III）におけるAは、単結合又は炭素数1～6のアルキレン基である。炭素数1～6のアルキレン基は、直鎖状又は分岐鎖状の炭素数1～6のアルキレン基であり、好ましくは炭素数1～5、より好ましくは1～4、さらにより好ましくは1～3、最も好ましくは1又は2のアルキレン基である。具体的にはメチレン、エチレン、トリメチレン、プロピレン、イソプロピレン、ブチレン、イソブチレン、ペンチレン、n-ヘキシレン等が挙げられる。

## 【0046】

本発明の測定対象となる内因性低分子化合物は、生体に由来する低分子化合物であって、通常、分子量が1000以下の化合物を示す。なお、本発明でいう内因性低分子化合物とは、生体内に存在する低分子化合物であればよく、例えば合成法等で人工的に製造された低分子化合物であっても、その低分子化合物が生体内に存在しているものであれば、本発明における内因性低分子化合物に包含される。内因性低分子化合物としては、例えば、アミノ酸、有機酸、糖、糖リン酸、核酸、遊離脂肪酸、オリゴペプチド（ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド等）等が挙げられる。

20

## 【0047】

アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニン、バリン、ノルバリン、ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、フェニルグリシン、フェニルアラニン、メチオニン、システイン、シスチン、ホモシステイン、ホモシスチン、グルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸、リジン、オルニチン、ヒドロキシリジン、アルギニン、ヒスチジン、1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジン、プロリン、ヒドロキシプロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、シトルリン、 $\alpha$ -アラニン、チロキシン、サルコシン、クレアチニン、 $\gamma$ -アミノ酪酸又はこれらの誘導体等が挙げられる。

30

## 【0048】

有機酸としては、例えば、乳酸、クエン酸、cis-アコニチン酸、イソクエン酸、2-オキソグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸、マレイン酸、無水マレイン酸、又はこれらの誘導体等が挙げられる。

## 【0049】

糖としては、例えば、グルコース、スクロース、フルクトース、ラクトース、マルトース、トレハロース、N-アセチルグルコサミン、ラフィノース、アカルボース等が挙げられる。

40

## 【0050】

糖リン酸としては、例えば、グルコース-1-リン酸、グルコース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸、1,3-ビスホスホグリセリン酸、フルクトース-1,6-ビスリン酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸、ジヒドロキシアセトンリン酸、3-ホスホグリセリン酸、2-ホスホグリセリン酸、ホスホエノールピルビン酸等が挙げられる。

## 【0051】

核酸としては、例えば、アデニン、アデノシン、アデノシンーリン酸、アデノシンニリン酸、アデノシン三リン酸、デオキシアデノシンーリン酸、デオキシアデノシンニリン酸

50

、デオキシアデノシン三リン酸、グアニン、グアノシン、グアノシンーリン酸、グアノシンニリン酸、グアノシン三リン酸、デオキシグアノシンーリン酸、デオキシグアノシンニリン酸、デオキシグアノシン三リン酸、チミン、チミジン、5 - メチルウリジンーリン酸、5 - メチルウリジンニリン酸、5 - メチルウリジン三リン酸、チミジンーリン酸、チミジンニリン酸、チミジン三リン酸、シトシン、シチジン、シチジンーリン酸、シチジンニリン酸、シチジン三リン酸、デオキシシチジンーリン酸、デオキシシチジンニリン酸、デオキシシチジン三リン酸、ウラシル、ウリジン、ウリジンーリン酸、ウリジンニリン酸、ウリジン三リン酸、デオキシウリジンーリン酸、デオキシウリジンニリン酸、デオキシウリジン三リン酸等が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

遊離脂肪酸としては、例えば、酪酸、吉草酸、カプロン酸、エナント酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、オレイン酸、バクセン酸、リノール酸、リノレン酸、エレオステアリン酸、ツベルクロステアリン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、ネルボン酸、セロチン酸、モンタン酸、メリシン酸、又はこれらの誘導体等が挙げられる。

【 0 0 5 3 】

オリゴペプチドとしては、例えば、カルノシン ( -アラニル-L-ヒスチジン )、アンセリン ( -アラニル-N-メチルヒスチジン )、ホモアンセリン ( N - ( 4 - アミノブチリル ) - L - ヒスチジン ) 等が挙げられる。

【 0 0 5 4 】

これらの内因性低分子化合物のうち、動物の健康状態を簡便に把握し得る材料になるという観点からアミノ酸が好ましい。アミノ酸としては、中性アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸が挙げられるが、動物の健康指標になるという観点から中性アミノ酸が好ましく、分岐鎖アミノ酸 ( ロイシン、イソロイシン若しくはバリン ) 又は芳香族アミノ酸 ( フェニルアラニン又はチロシン ) がより好ましく、芳香族アミノ酸 ( フェニルアラニン又はチロシン ) がさらに好ましい。なお、アミノ酸は L 体、D 体及び D L 体を包含するものであり、またアミノ酸の不斉中心は R 配置、S 配置又は R S 配置のいずれであってもよい。

【 0 0 5 5 】

本発明の含硫黄アミノ酸誘導体の製造方法は、特に制限されず、出発物質ごとに製造方法が異なり得る。本発明の含硫黄アミノ酸誘導体の合成における基本化合物は、アミノ基、カルボキシル基、チオール基を有するものであれば特に限定されず、例えばシステイン又はシステインに類する化合物を用いることができる。出発物質としては、例えば、( A ) 基本化合物のカルボキシル基に内因性低分子化合物が既に結合されているもの、( B ) 基本化合物のアミノ基に免疫応答性疎水基が既に結合されているもの、( C ) 基本化合物のアミノ基、カルボキシル基、チオール基のいずれも未修飾のもの、のいずれかとすることができる。

【 0 0 5 6 】

( A ) を出発物質とした場合、例えば、アミノ基と容易に反応する反応活性基を有する炭酸 9 - フルオレニルメチル N - スクシンイミジルや 6 - アミノキノリル - N - ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート等の化合物 ( 以下、免疫応答性疎水基含有化合物という ) を、中性 ~ 塩基性 ( pH 7 ~ 11 ) の条件下、4 ~ 80 で混合し、1 分間 ~ 24 時間反応させる。これにより、免疫応答性疎水基を出発物質に導入することができる。

【 0 0 5 7 】

( B ) を出発物質とした場合、例えば、該出発物質を水又は有機溶媒に溶解した後、検出対象の内因性低分子化合物を結合し得る N - ハイドロキシスクシンイミド ( N H S ) 等を、非水溶媒下で混合し、D C C、D I C、E D C、D I P C D I、H A T U、H B T U、D M T - M M 等の縮合剤存在下で、4 ~ 60、30 ~ 240 分間の縮合反応を行う。これにより、出発物質のカルボキシル基に、内因性低分子化合物反応活性基 ( y 1 基 ) と

10

20

30

40

50

してN - スクシンイミジル基を導入することができる。その後、アミノ基を含む内因性低分子化合物を、中性～塩基性（pH 7～11）条件下、4～80 で混合し、1分間～24時間反応させる。これにより、内因性低分子化合物が結合した基（y 2基）を出発物質のカルボキシル基に導入することができる。N - スクシンイミジル基以外として、アルデヒド基、ハロゲン基（例えば、F、Cl、Br等）、イソチオシアネート基等をy 1基の部分に導入する場合は、例えば、アルデヒド基、ハロゲン基、イソチオシアネート基等を含む化合物を出発物質に反応させればよい。また、y 1基にアミノ基（-NH<sub>2</sub>）を導入する場合は、例えば、エチレンジアミンのようなアミノ基を2個保有する化合物を反応させて、2個のアミノ基のうち一方を出発物質のカルボキシル基に結合させればよい。そうすることにより、もう一方の遊離な状態にあるアミノ基がカルボン酸を含有する内因性低分子化合物と反応することとなる。また、例えば、アミノ基及びマレイミド基を保有する化合物を出発物質に反応させれば、y 1基はマレイミド基を含有するようになる。また、例えば、アミノ基及びヒドラジン基を保有する化合物を出発物質に反応させれば、y 1基はヒドラジン基を含有するようになる。上記の各種化合物と出発物質との反応は、上記N - ハイドロキシスクシンイミドの場合と同様な条件で行うことができる。そして、各種y 1基に対応した、アミノ基、カルボキシル基又はチオール基等を含有する内因性低分子化合物を上記と同様な条件で反応させることにより、出発物質に種々のy 2基を導入することができる。

10

## 【0058】

（C）を出発物質とした場合、例えば、アミノ基と容易に反応する反応活性基を有する免疫応答性疎水基含有化合物を、中性～塩基性（pH 7～11）条件下、4～80 で混合し、1分間～24時間反応させる。その後の反応は（B）を出発物質とした場合と同様である。

20

## 【0059】

（A）～（C）の化学反応後の目的化合物はクロマトグラフィー等により分離及び分取して精製することができる。分取した溶液は凍結乾燥処理又はエバポレーション処理等により溶液を揮発した後、目的化合物を取得する。なお、目的化合物の取得に際しては、酸化反応が進行してジスルフィド結合の形成によりチオール基が消失してしまうことがあるため、ジチオスレイトール（DTT）等を用いて、室温下で30～360分間の還元処理を行うことが好ましい。

30

## 【0060】

高分子量付与基又は標識化合物修飾基を付する場合は、例えば上記化合物を、EDTAを含む中性～塩基性（pH 7～11）の緩衝液に再溶解した後、高分子化合物又は標識化合物（いずれも架橋剤により化学修飾されたものを含む）を含有する溶液を、4～60で5～240分間反応させる。高分子化合物は、上記した高分子量付与基（キャリアタンパク質結合基、合成高分子結合基等）を提供し得る化合物であり、分子量10000以上のタンパク質又はポリマーであることが好ましい。標識化合物は、上記した標識化合物修飾基を提供し得る化合物である。架橋剤は、チオール基及びアミノ基と結合し得る活性基を有するものが好ましい。当該反応が終了した後、限外ろ過法（分子量サイズ10000カットオフ）又はゲルろ過クロマトグラフィー等により、チオール基に高分子量付与基又は標識化合物修飾基（架橋剤を介したものを含む）を結合した化合物を精製することができる。

40

## 【0061】

< 2 . 内因性低分子化合物認識抗体の製造方法 >

本発明はまた、高分子量付与基と内因性低分子化合物とを有する含硫黄アミノ酸誘導体を抗原とする、内因性低分子化合物認識抗体の製造方法を提供する。

## 【0062】

（a）抗原の作製

内因性低分子化合物を認識し得る抗体を作製するために、該抗体の抗原（免疫原）が作製される必要がある。該抗原としては、主に上記一般式（I I）で表される構造を有する

50

化合物を用いることができ、上述の方法又は後述の実施例の通り製造することができる。

【0063】

該抗原を用いて得られる抗体は、測定対象の内因性低分子化合物を認識し得る抗体であれば特に制限されないが、特に該抗原の立体構造の表面分子の一部を認識するものが好ましく、本発明の含硫黄アミノ酸誘導体における免疫応答性疎水基及び内因性低分子化合物の部分を認識するものがより好ましい。また、得られた抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体の何れであってもよい。ポリクローナル抗体としては、目的とするハプテン部位を認識する抗体に加えて、ハプテン及びタンパク質のそれぞれ一部を認識する抗体のような様々な種類のものを用いることができる。また、モノクローナル抗体としては、ハプテンを認識する選択性、感度、再現性の点において良好なものを用いることができる。これらのモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体は、特に限定されないが、例えば以下のようにして製造することができる。

10

【0064】

(b)モノクローナル抗体の製造方法

上記抗原を、動物に対して、それ自体又は希釈剤若しくはアジュバントとともに抗体産生が可能な部位に投与することができる。希釈剤としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝液等が用いられる。抗体産生能を高めるアジュバントとしては、フロイント完全アジュバントやフロイント不完全アジュバント等が用いられる。投与は通常1～6週毎に1回ずつ、計2～10回行われる。用いられる動物としては、例えば、マウス、モルモット、ラット、ヤギ、サル、アカゲザル、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ネコ、ハムスター、ヒツジ、ブタ、ラクダ等が挙げられ、本発明ではマウス及びラットが好ましい。

20

【0065】

例えば、抗原で免疫された動物、その中でも抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓又はリンパ節を採取し、それらに含まれる細胞を同種又は異種動物の骨髄腫細胞(ミエローマ細胞)と融合させることにより、ハイブリドーマを調製することができる。融合操作は、既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法[Nature, 256:495(1975)]に従って実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウイルス等が挙げられ、好ましくはPEGが用いられる。

30

【0066】

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3、P3U1、SP2/0、AP-1、MPC-11等が挙げられ、P3が好ましく用いられる。用いられる細胞(脾臓細胞)の数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は、1:1～20:1であり、PEG(好ましくはPEG1000～PEG6000)が10～80%の濃度で添加され、20～40、好ましくは30～37で1～20分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0067】

ハイブリドーマの培養は、例えば、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行うことができる。培地としては、例えば、1～20%、好ましくは10～20%のウシ胎仔血清を含むRPMI1640培地、1～10%のウシ胎仔血清を含むGIT培地(和光純薬工業社製)あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日水製薬社製)等を用いることができる。培養温度は、通常20～40、好ましくは約37である。培養時間は、通常5日間～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行うことができる。

40

【0068】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、培養上清の抗体価を自体公知の方法で測定することによりスクリーニングすることができる。例えば、抗原又はハプテンを吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素等で標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)又は所定のタンパク質(プロテインA、

50

プロテインG、プロテインL、プロテインA/G等)を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出又は定量する方法；抗免疫グロブリン抗体又はプロテインA等を吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識した抗原を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出又は定量する方法；等によりスクリーニングすることができる。

【0069】

モノクローナル抗体は、スクリーニングされたハイブリドーマの培養上清から取得することができる。また、該ハイブリドーマを用いて、動物の腹水からモノクローナル抗体を取得することもできる。例えばマウスを用いて、その腹水を取得する場合、通常、予めプリスタン(2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン)等の免疫抑制作用を有する物質を投与したマウス(例えば、BALB/cマウス等)の腹腔内へハイブリドーマ(例えば、 $10^6$ 個以上)を移植し、約1~3週間後に貯留した腹水を採取すればよい。

10

【0070】

ハイブリドーマの培養上清又は腹水からのモノクローナル抗体の精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法(例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例えば、DEAE等)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相、又はプロテインA、プロテインGもしくはプロテインL等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法)に従って行うことができる。

【0071】

20

本発明におけるモノクローナル抗体の製造方法の好ましい態様としては、例えば、以下の工程を含む製造方法を挙げることができる。

[a]測定対象の内因性低分子化合物に対応する上記一般式(II)の抗原を動物に免疫処理する工程、

[b]測定対象の内因性低分子化合物に対応する上記一般式(II)のハプテンをプレートに固相化し、抗体価評価用プレートを作製する工程、

[c]工程[a]により免疫処理した動物から血清を採取し、該血清を上記抗体価評価用プレートに添加し、抗原抗体反応を測定する工程、

[d]工程[c]の反応結果が陽性である動物から細胞を採取し、該細胞とミエローマ細胞とを混合し、細胞融合させてハイブリドーマを作製する工程、

30

[e]工程[d]により得られたハイブリドーマのうち、上記一般式(II)のハプテンを認識する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングする工程、

[f]工程[e]により選別されたハイブリドーマをクローニングする工程。

【0072】

上記工程[e]においては、工程[b]により作製された抗体価評価用プレートを用いてスクリーニングを行うことができ、該スクリーニングにより抗体産生能の高いハイブリドーマを選別することができる。選別されたハイブリドーマを用いて、上記のとおりハイブリドーマの培養上清又は動物の腹水から所望のモノクローナル抗体を取得することができる。

【0073】

40

本発明においては、上記[a]~[f]の工程に加え、さらに以下の工程を含むモノクローナル抗体の製造方法であることが好ましい。

[g]得られた2種類以上のモノクローナル抗体に対し、非測定対象の内因性低分子化合物に対応する上記一般式(II)のハプテンを反応させる工程、

[h]工程[g]の反応結果が陰性であるモノクローナル抗体を選別する工程。

【0074】

上記工程[g]においては、非測定対象の内因性低分子化合物として、測定対象の内因性低分子化合物とは官能基や構造が相違する化合物を用いて、モノクローナル抗体の選別の程度を調整することができる。即ち、測定対象の内因性低分子化合物と官能基や構造が近似している化合物であるほど、より抗原認識特異性の高いモノクローナル抗体を選別す

50

ることができる。例えば、測定対象の内因性低分子化合物がグリシンである場合は、非測定対象の内因性低分子化合物としてフェニルアラニンよりもアラニンを用いた方がより抗原認識特異性の高いモノクローナル抗体を選別することができる。本発明では、非測定対象の内因性低分子化合物を使い分けながら、より抗原認識特異性の高いモノクローナル抗体を入手することが好ましい。ただし、使用状況に応じて、抗原認識特異性が調整されたモノクローナル抗体を採用することもできる。

【 0 0 7 5 】

本発明のモノクローナル抗体としては、例えば、測定対象がグリシンの場合は、受託番号 F E R M P - 2 1 9 4 7 で寄託されているハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を用いることができる。また、例えば、測定対象がフェニルアラニンの場合は、受託番号 F E R M P - 2 1 9 4 8 で寄託されているハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を用いることができる。また、これらのハイブリドーマはいずれも国際寄託へ移管申請されており、受領番号 F E R M A B P - 1 1 3 8 4 及び受領番号 F E R M A B P - 1 1 3 8 5 がそれぞれ付与されている。

【 0 0 7 6 】

( c ) ポリクローナル抗体の製造方法

上記抗原に対するポリクローナル抗体は、当業者に公知の方法により製造することができる。例えば、上記のモノクローナル抗体の製造方法と同様に動物に免疫を行い、該免疫動物から所望の抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。本発明におけるポリクローナル抗体の製造方法は、特に限定されないが、より詳細には以下の通り説明することができる。

【 0 0 7 7 】

免疫方法としては、動物に対して、抗体産生が可能な部位に抗原自体又は希釈剤若しくはアジュバントとともに投与される。希釈剤及びアジュバントは、上記 ( b ) モノクローナル抗体の製造方法で用いるものと同様なものが挙げられる。投与は、通常 1 ~ 6 週毎に 1 回ずつ、計 3 ~ 1 0 回程度行われる。

【 0 0 7 8 】

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された動物の血液を採取して抗血清として得られる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定方法は、上記 ( b ) モノクローナル抗体の抗体価の測定方法と同様である。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

【 0 0 7 9 】

< 3 . 内因性低分子化合物の測定方法 >

上記 1 に示した含硫黄アミノ酸誘導体及び上記 2 により得られた抗体を用いることにより、被験試料中の内因性低分子化合物を測定することができる。即ち、本発明は、以下の工程 ( A ) ~ ( C ) :

( A ) 上記 1 の含硫黄アミノ酸誘導体と被験試料とを反応させ、該含硫黄アミノ酸誘導体と被験試料中に存在する内因性低分子化合物との複合体を形成させる工程、

( B ) 工程 ( A ) により得られた複合体と、上記 2 により得られた内因性低分子化合物認識抗体とを接触させる工程、

( C ) 前記内因性低分子化合物認識抗体に結合した複合体の標識を測定する工程、を含む、内因性低分子化合物を測定し得る方法を提供することができる。

【 0 0 8 0 】

内因性低分子化合物の測定を行うためには、その測定用試料として、標識化合物修飾基を有する本発明の含硫黄アミノ酸誘導体 ( 主に、上記一般式 ( I I I ) で表される構造を有する化合物が用いられる ) と、測定対象の内因性低分子化合物との複合体を調製する。該複合体は、該内因性低分子化合物を含む被験試料と本発明の含硫黄アミノ酸誘導体とを接触させることにより得ることができる。両者の接触は、内因性低分子化合物が本発明の含硫黄アミノ酸誘導体と複合体を形成し得る条件であれば特に制限されないが、 1 5 ~ 4 0 において 1 ~ 1 2 0 分間接触 ( 反応 ) をさせておけばよい。その際に使用される溶液

10

20

30

40

50

としては、例えば、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液等が挙げられ、測定手段に応じて公知のものを用いることができる。また、本発明の含硫黄アミノ酸誘導体は内因性低分子化合物に比して過剰量としておけばよく、例えば濃度として $1 \sim 100 \mu\text{mol/mL}$ の溶液を被験試料に加えればよい。なお、上記複合体には両者が結合していないものも含まれるが、実際には結合しているものが好ましい。

#### 【0081】

本発明に用いられる被験試料は、内因性低分子化合物を含有しているか、あるいはその内因性低分子化合物の測定が求められるものであれば特に限定されないが、抗体作製が困難である生体内の低分子化合物を測定対象とするという観点から生体由来の試料であることが好ましい。生体由来の試料としては、動物由来の試料であっても植物由来の試料であつてもよく、また動物及び/又は植物由来の試料の加工品（食品、飲料等）であつてもよい。動物由来の試料の具体的な例としては、例えば、血液、血漿、血清、血管外液、間質液、脳脊髄液、滑液、胸膜液、リンパ液、唾液、精液、涙、尿等を挙げることができる。これらのうち本発明においては、動物への侵襲が少ないという観点から、血液、血清、血漿、唾液、精液、涙、尿が好ましく、血液、血清、血漿がより好ましく、血漿又は血清がさらに好ましい。植物由来の試料としては、例えば、果汁、糖蜜等が挙げられる。

10

#### 【0082】

本発明においては、標識化合物修飾基を有する本発明の含硫黄アミノ酸誘導体と内因性低分子化合物との複合体に対し、上記2により得られた抗体を用いることにより該内因性低分子化合物を測定することができる。該測定方法の実施態様は特に限定されないが、例えば、まず、上記の通り標識付与された測定用試料を準備する。次に、上記2により得られた抗体を担体上に固相化する。このとき、該抗体は上記複合体の構造の一部（免疫応答性疎水基及び内因性低分子化合物の部分）を認識することができる。そして、固相化した抗体で該複合体を捕捉する。最後に、捕捉された複合体に含まれる標識量を計測し、内因性低分子化合物の測定を行う。シグナルプローブとしては、上記の通り、酵素、放射性同位体、蛍光物質、色素、磁性素子等を採用することにより、測定対象物の量に応じてシグナルが検出される。本原理によれば、測定対象物が内因性低分子化合物であっても単一の抗体で非競合法のイムノアッセイを行うことが可能となり、競合法に比べて短時間での測定が可能となる。獲得した抗体を活用して内因性低分子化合物を測定する方法としては、感度、迅速性、正確性、安全性、自動化等の観点から、イムノアッセイの中でも、特にE L I S Aが好ましい。上記の内因性低分子化合物の測定方法は、より詳細には以下の通り説明することができる。

20

30

#### 【0083】

##### (a) 抗体の固相化

上記2により得られた内因性低分子化合物認識抗体を、担体に固相化する。使用する担体は、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリジビニルベンゼン、シリコン等の合成樹脂又はガラス等が挙げられ、具体的には、合成樹脂で成形された48穴、96穴、192穴、384穴等のマイクロタイタープレートが好ましい。抗体の固相化は、例えば、固相化用抗体を含む緩衝液を担体上に乗せ、インキュベーションすればよい。好ましくは、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、プロテインL、又は当該抗体を獲得するために免疫した動物種由来の抗体を認識する抗体、例えば、当該抗体がマウスから得たものであれば、ウサギ又はヤギ由来の抗マウス抗体を事前に担体に吸着及びコーティングさせた後、当該抗体を添加すれば固相化効率が增大する。また、抗体はアミノ基を含む分子であるため、N-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルが固相化されている担体を用いることで、抗体を直接担体に固相化することが可能になる。緩衝液中の抗体濃度は、通常 $0.01 \mu\text{g/mL}$ から $100 \mu\text{g/mL}$ であり、緩衝液としては、測定手段に応じて公知のものを使用することができる。

40

#### 【0084】

また、固相化に用いられる抗体は、上記2に示された方法により作製された抗体であれば如何なるものであつてもよいが、本発明の含硫黄アミノ酸誘導体における免疫応答性疎

50

水基及び内因性低分子化合物の構造部分を認識し得る抗体であることが好ましい。該抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよく、またF a b フラグメントやF ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメント、当該抗体の変部だけを遺伝子発現させたポリペプチド( s c F v ( シングル鎖可変部 ) 又は超可変部 ( C D R ) 等) のように抗原結合性を有する抗体の一部であってもよい。

#### 【 0 0 8 5 】

##### ( b ) ブロッキング

担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、抗体とは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、ウシ血清アルブミン( B S A ) もしくはスキムミルク溶液、又は市販のブロックエース( D S ファーマバイオメディカル社製 )、Applie Block ( 生化学工業社製 )、N 1 0 1 / N 1 0 2 ( 日本油脂社製 ) 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担体に添加し、例えば、約 4 時間で1時間 ~ 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、上記( a ) と同じ緩衝液を使用することができる。

10

#### 【 0 0 8 6 】

##### ( c ) 抗原抗体反応

上記( a ) 及び( b ) で処理された固相表面に、標識化合物修飾基を有する本発明の含硫黄アミノ酸誘導体と内因性低分子化合物との複合体を含有する試料( 測定用試料 ) を加え、担体に固相化された抗体と該複合体との抗原抗体反応を行う。また、測定用試料とは別に、標識化合物修飾基を有する本発明の含硫黄アミノ酸誘導体と内因性低分子化合物との複合体を標準試料として予め調製しておき、測定用試料と並行して各種濃度の標準試料を加え、同様に抗原抗体反応を行う。いずれも抗原抗体反応は、通常 1 0 ~ 4 0 、好ましくは 2 5 ~ 3 7 において、1分間 ~ 数時間で行うことができる。

20

#### 【 0 0 8 7 】

##### ( d ) B / F 分離

上記( c ) の抗原抗体反応を行った後、固相化抗体と結合した該複合体( B ) 及び該抗体に結合していない未反応の該複合体( F ) を分離させる。分離自体は、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、上記( a ) と同じ緩衝液を使用することができる。

30

#### 【 0 0 8 8 】

##### ( e ) 内因性低分子化合物の測定

上記( d ) の処理の後、固相化抗体に結合した該複合体が有する標識化合物の量を調べることにより、対象とする内因性低分子化合物を測定することができる。ここで、上記( c ) において並行して抗原抗体反応を行った各種濃度の標準試料を利用して、検量線を予め作成することができる。該検量線を用いることによって、被験試料に含まれる内因性低分子化合物の量を決定することができる。

#### 【 0 0 8 9 】

標識化合物として酵素を用いた場合は、該酵素と反応する発色基質溶液を加え、その後に所定の吸光度を測定することによって標識化合物の量を調べることができる。該酵素として西洋ワサビ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又は o - 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 5 ~ 3 0 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、4 5 0 n m の吸光度を測定する。また、o - フェニレンジアミンを使用する場合は、4 9 2 n m の吸光度を測定する。なお、バックグラウンド値を補正するため、6 3 0 n m の吸光度も同時に測定することが望ましい。

40

#### 【 0 0 9 0 】

該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 - ニトロフェニリン酸を基質として発色させ、N a O H 溶液を加えて酵素反応を停止させ、4 1 5 n m で

50

の吸光度を測定する方法が挙げられる。また、該酵素としてガラクトシダーゼを使用する場合には、例えば4-メチルウンベリフェリル-D-ガラクトピラノシドを基質として発色させ、0.1Mグリシン-NaOH緩衝液(pH10.3)溶液を加えて酵素反応を停止させ、励起波長360nm、検出波長450nmでの蛍光検出強度を測定する方法があげられる。

#### 【0091】

標識化合物として放射性物質を用いた場合であれば、オートラジオグラフィやシンチレーション計測器等を用いて、その放射線量を測定することができる。また、標識化合物に代えてビオチン又はレクチン等の結合分子を用いた場合は、ビオチンであれば標識化アビジン又は標識化ストレプトアビジンと反応をさせて、レクチンであれば標識化糖類を反応させて、その後の標識化合物の量を上記と同様に調べることができる。なお、結合分子の反応は当業者に公知の方法により行うことができる。

10

#### 【0092】

また、本発明において内因性低分子化合物を測定する別の実施態様としては、図5に示した構成を用いることもできる。ここでは、標識化合物修飾基を持たない上記1の含硫黄アミノ酸誘導体を用いて目的の内因性低分子化合物を測定することができる。具体的には、アビジン又はストレプトアビジン等が固相化されたプレートに、ビオチン等が付された含硫黄アミノ酸誘導体と内因性低分子化合物との複合体を含有する試料を加え、アビジン又はストレプトアビジンとビオチン等の結合分子とを介して、プレート上に該複合体を固相化させる。その後、該複合体を認識する抗体を添加して所定の条件下で抗原抗体反応を行い、さらに該抗体を認識する標識付与抗体(HRP抗マウスIgG抗体等)を添加して、標識量の計測により目的の内因性低分子化合物を測定することができる。なお、上記の方法においては、各工程の間に洗浄液を用いて適宜洗浄を行うことができる。

20

#### 【0093】

また、内因性低分子化合物を測定する更なる別の実施態様としては、例えば、次の方法が挙げられる。なお、本実施態様でも、標識化合物修飾基を持たずに代わりにビオチン等が付された本発明の含硫黄アミノ酸誘導体を用いて目的の内因性低分子化合物を測定することができる。具体的には、測定対象である内因性低分子化合物に本発明の含硫黄アミノ酸誘導体を結合させた後、上記2により得られた抗体を同一容器内で接触させて抗原抗体反応を成立させる。該反応により得られた抗原抗体複合体をプレート等の担体上に固相化させ、標識付与されたアビジン又はストレプトアビジンをその上に添加する。そうすると、固相化された抗原抗体複合体に含まれるビオチン等によりアビジン又はストレプトアビジンが捕捉されることになり、捕捉されたアビジン等に付されている標識の量を測定することにより、目的の内因性低分子化合物を測定することができる。上記の実施態様においても、各工程の間に洗浄液を用いて適宜洗浄を行うことができ、また固相化に際してブロッキングの処理も適宜行うことができる。

30

#### 【実施例】

#### 【0094】

以下に実施例を示し本発明の詳細な説明を行うが、本発明はこれにより限定されるものではなく、本技術分野において行われるこれらに対する通常の変改及び修飾を含むものとする。

40

#### 【0095】

##### [1. 免疫原の調製]

抗体作製用の抗原(免疫原)は、合成したハプテンに架橋剤を介してキャリアタンパク質を結合したものを使用した。一般式(I)のX部分に導入した免疫応答性疎水基は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基又はキノリニルアミノカルボニル基、Y部分に導入した測定対象抗原(内因性低分子化合物)はグリシン(Gly)、フェニルアラニン(Phe)又はイソロイシン(Ile)、Z部分に導入した高分子化合物であるキャリアタンパク質はウシ血清アルブミン(BSA)を採用し、架橋剤としてスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(sulfo-SMCC)を適用した。

50

## 【 0 0 9 6 】

## 1 - 1 . ハプテン合成法 1 : Fmoc-Cys[H]-Gly

出発物質(Cys-Gly)<sub>2</sub> (BACHEM社製) を20mmol/Lとなるようにジメチルスルホキシド (DM SO) に溶解した。この溶液を50%アセトニトリル溶液で10倍希釈し、2mmol/L (Cys-Gly)<sub>2</sub> 溶液を5mL調製した。また、9-Fluorenylmethyl Succinimidyl Carbonate (Fmoc-OSu) (和光純薬社製) を0.25mol/Lとなるようにアセトニトリルに溶解した。

## 【 0 0 9 7 】

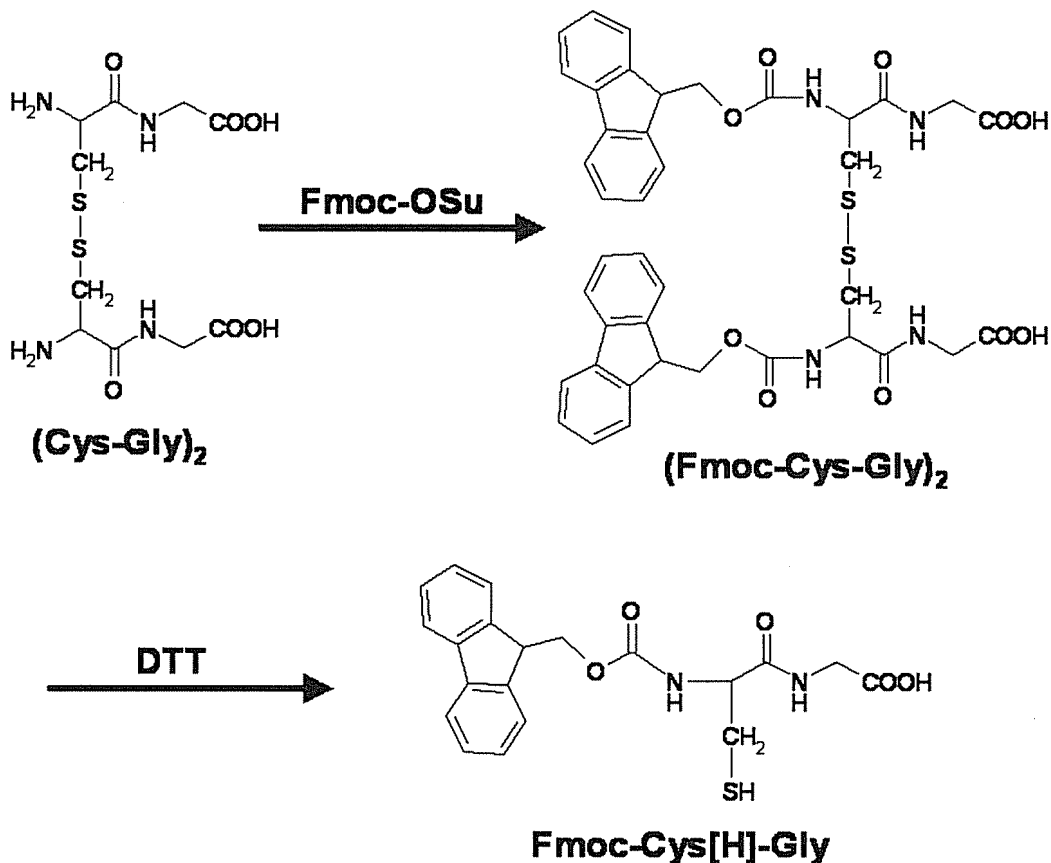
2mmol/L (Cys-Gly)<sub>2</sub> 溶液5mLと0.25mol/L Fmoc-OSu溶液0.5mLを混合し、55℃で30分間放置した。次いで、還元剤として(±)ジチオスレイトール (DTT) (和光純薬社製) を3mol/Lとなるようにイオン交換水に溶解し、3mol/L DTT溶液1mLを上記反応溶液中に添加した。該反応溶液を55℃で2時間以上放置した後、HPLCにより目的化合物Fmoc-Cys[H]-Glyを分離及び分取した。

## 【 0 0 9 8 】

HPLC装置は島津製作所製CLASS-VPシリーズ、カラムは逆相系カラムであるCadenza (内径4.6mm x 長さ250mm、インタクト社製) を使用し、分析条件は、移動相A: 水/アセトニトリル (95/5) に0.1%ギ酸を加えたもの、移動相B: 水/アセトニトリル (10/90) に0.1%ギ酸を加えたもの、流速: 1mL/min、カラムオープン: 40分、UV検出波長: 265nm、溶出条件: 移動相B 45%一定 (測定開始時間0-10分)、移動相B 45-100% (10-30分)、とした。

## 【 0 0 9 9 】

## 【 化 9 】



## 【 0 1 0 0 】

Fmoc-Cys[H]-Glyを含む反応溶液をHPLCに導入し、クロマトグラムをモニタリングしながら、Fmoc-Cys[H]-Glyに由来するピークを回収した。サンプル注入量は1回あたり400μLとしたため、上述の反応溶液 (計6.5mL) について回収作業を繰り返した。回収した画分は同一容器に集めて液体窒素下において凍結し、凍結乾燥機により乾燥した。凍結乾燥に

よって得られた粉末を秤量した結果、4.79mg (収率49%)であった。凍結乾燥した化合物は一部を再溶解し、残りは必要時まで-20 で保存した。再溶解した化合物を質量分析計により質量測定を実施した結果、Fmoc-Cys[H]-Glyに相当する質量が得られ、合成したハプテンが目的化合物であることが示された。

【0101】

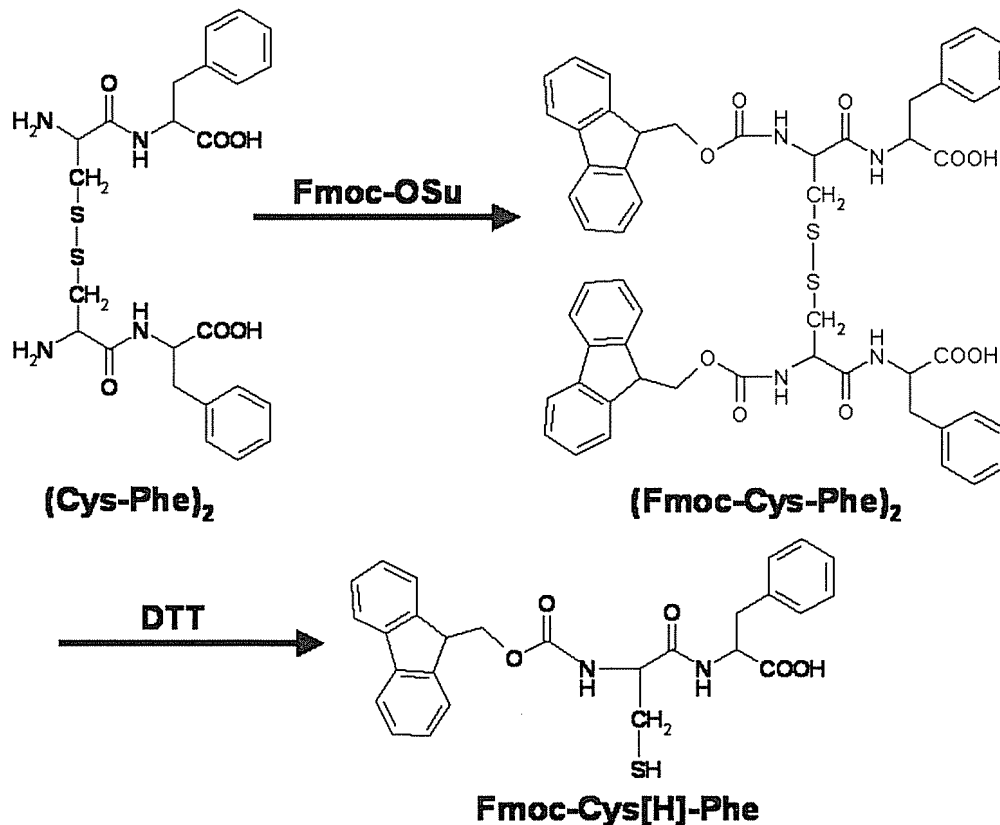
1 - 2 . ハプテン合成法 2 : Fmoc-Cys[H]-Phe

出発物質(Cys-Phe)<sub>2</sub> (BACHEM社製)を20mmol/Lとなるようにジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した。溶解以降の操作、Fmoc-OSu試薬との反応、DTTによる還元処理条件及び目的化合物Fmoc-Cys[H]-PheのHPLC分離条件は上述のFmoc-Cys[H]-Glyと同じ条件で実施した。目的化合物Fmoc-Cys[H]-Pheを回収し、凍結乾燥により必要時まで-20 で保存した。再溶解した化合物を質量分析計により質量測定を実施した結果、Fmoc-Cys[H]-Pheに相当する質量が得られ、合成したハプテンが目的化合物であることが示された。

10

【0102】

【化10】



20

30

【0103】

1 - 3 . ハプテン合成法 3 : Fmoc-Cys[H]-Ile

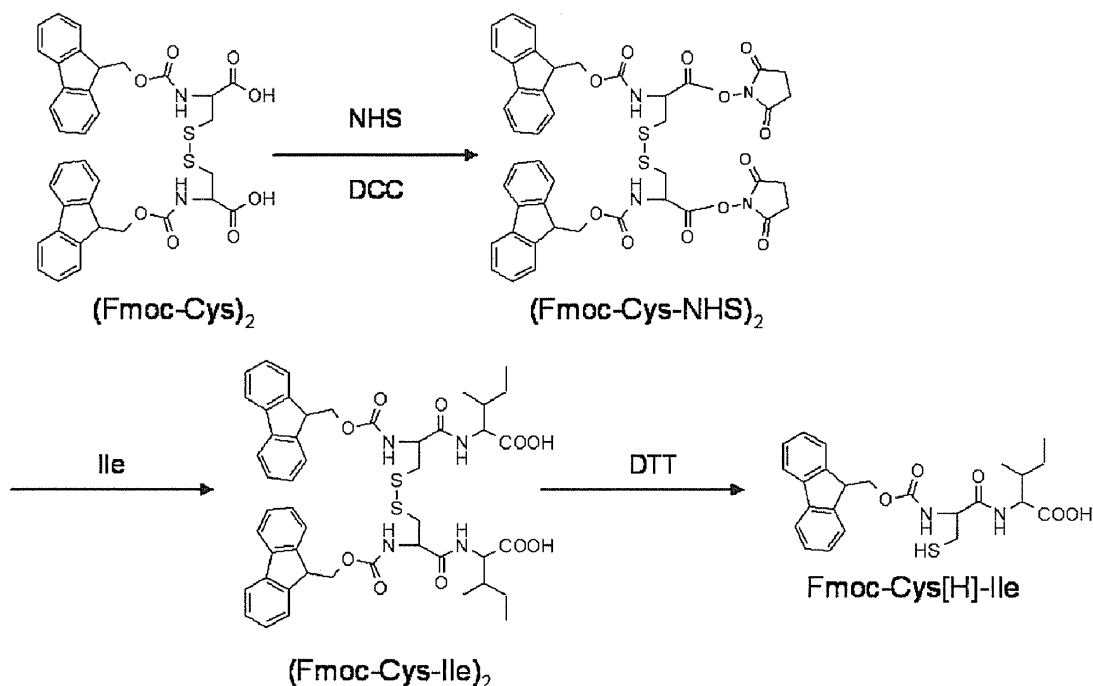
出発物質(Fmoc-Cys)<sub>2</sub> (BACHEM社製)を200mmol/LとなるようにDMSOに溶解した。また、縮合剤N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC、東京化成社製)を500mmol/LとなるようにDMSOに溶解した。さらにN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS、東京化成社製)を500mmol/LとなるようにDMSOに溶解した。3種の溶液について各1mLずつ混合し(計3mL)、室温振盪下で120分間反応させた。反応中は時間経過とともに反応物の一部が析出した。また、Ileを200mmol/Lとなるように0.1N塩酸/ホウ酸緩衝液(pH11.0)(50/50)混合液に溶解した。反応終了後にDMSO 1mLを加え、Ile溶液1mLを少量ずつ添加した。反応溶液を室温下で15分放置した後、5%酢酸を0.5mL添加した。析出した化合物は0.45µmフィルターにより限外ろ過し、ろ過液をHPLCに導入して(Fmoc-Cys-Ile)<sub>2</sub>を分離及び分取した。HPLC

50

装置は島津製作所製CLASS-VPシリーズ、カラムは逆相系カラムであるCadenza（内径4.6mm x 長さ250mm、インタクト社製）を使用した。

【 0 1 0 4 】

【 化 1 1 】



10

20

【 0 1 0 5 】

HPLC装置及び分離用カラムは上記と同様のものを使用し、 $(\text{Fmoc-Cys-Ile})_2$ の分析条件は、移動相A：水/アセトニトリル（95/5）に0.1%ギ酸を加えたもの、移動相B：水/アセトニトリル（10/90）に0.1%ギ酸を加えたもの、流速：0.9-1.0mL/min（測定開始0-5分）、1.0-1.0mL/min（5-25分）、カラムオープン：40、UV検出波長：265nm、送液条件：移動相B 72%一定、とした。

30

【 0 1 0 6 】

$(\text{Fmoc-Cys-Ile})_2$ を含む反応溶液をHPLCに導入することにより得られたクロマトグラムを調べたところ、試料導入点から12～14分付近に観測されたピークが $(\text{Fmoc-Cys-Ile} / \text{Fmoc-Cys-OH})$ に由来し、27分付近に観測されたピークが $(\text{Fmoc-Cys-Ile})_2$ に由来するものであった。クロマトグラムをモニタリングしながら、溶出される両画分をそれぞれ回収した。サンプル注入量は1回あたり400  $\mu\text{L}$ としたため、上述の反応溶液（計5.5mL）について回収作業を繰り返した。回収した画分は同一容器に集めて液体窒素下において凍結し、凍結乾燥機により乾燥した。凍結乾燥によって得られた粉末を秤量した結果、15.5mg（収率13%）であった。凍結乾燥した化合物をDMSO 1mLにより再溶解し、3mol/L DTT溶液1.8mLを少量ずつ添加した。添加終了後、40 で1時間以上放置し、HPLCにより目的化合物 $\text{Fmoc-Cys}[\text{H}]\text{-Ile}$ を分離及び分取した。

40

【 0 1 0 7 】

HPLC装置は島津製作所製CLASS-VPシリーズ、カラムはCadenza（内径4.6mm x 長さ75mm、インタクト社製）を使用し、分析条件は、移動相A：水/アセトニトリル（95/5）に0.1%ギ酸を加えたもの、移動相B：水/アセトニトリル（10/90）に0.1%ギ酸を加えたもの、流速：1mL/min、カラムオープン：40、UV検出波長：265nm、送液条件：移動相B 40-100%（0-30分）、とした。

【 0 1 0 8 】

$\text{Fmoc-Cys}[\text{H}]\text{-Ile}$ を含む反応溶液をHPLCに導入することにより得られたクロマトグラム

50

を調べたところ、試料導入点から10.5分付近に観測されたピークがFmoc-Cys[H]-Ileに由来するものであった。クロマトグラムをモニタリングしながら、溶出されるこの画分を回収した。サンプル注入量は1回あたり400  $\mu$ Lとしたため、上述の反応溶液（計2.6mL）について回収作業を繰り返した。回収した画分は同一容器に集めて液体窒素下において凍結し、凍結乾燥機により乾燥した。凍結乾燥によって得られた粉末を秤量した結果、1.8mg（収率24%）であった。

【 0 1 0 9 】

1 - 4 . ハプテン合成法 4 : AQC-Cys[H]-Phe

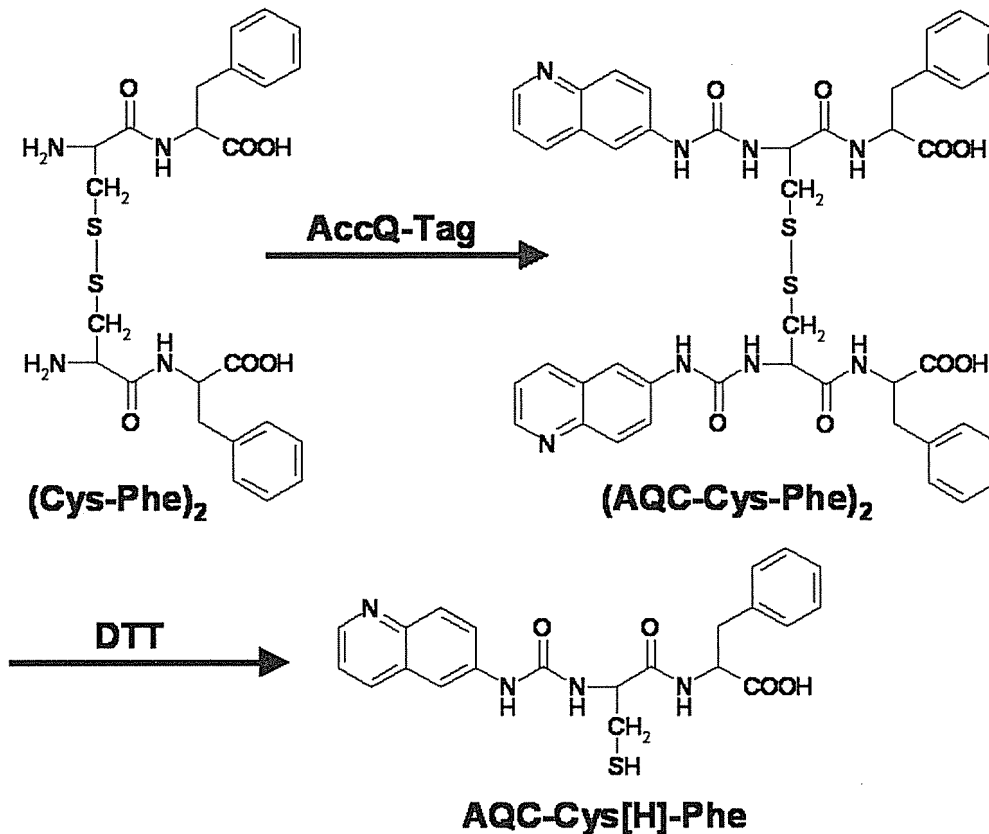
出発物質(Cys-Phe)<sub>2</sub> (BACHEM社製) を10mmol/Lとなるように0.1M塩酸に溶解した。また、AccQ・Tag Ultra Derivatization Kit (ウォーターズ社製) のAccQ・Ultra Derivatization Reagentをアセトニトリルによって100mmol/Lに調製した(AQC試薬)。調製した(Cys-Phe)<sub>2</sub>溶液500  $\mu$ L、AQC試薬1000  $\mu$ L、0.1mol/Lのホウ酸緩衝液1000  $\mu$ Lを混合し、55  $^{\circ}$ Cで20分間加熱した。次いで、2mol/L DTT水溶液を250  $\mu$ L加えて40  $^{\circ}$ Cで2時間反応した。その後、0.2%の酢酸を2.25mL加えて反応を停止させ、HPLCにより目的化合物AQC-Cys[H]-Pheを分離及び分取した。なお、本ハプテンはキノリニルアミノカルボニル基が付与されているが、AQCに由来する基であるため上記名称を用いた。

【 0 1 1 0 】

HPLC装置は島津製作所製CLASS-VPシリーズ、分離用カラムは逆相系カラムであるCadenz a (内径4.6mm x 長さ250mm、インタクト社製) を使用し、AQC-Cys[H]-Pheの分析条件は、移動相A: 水/アセトニトリル (95/5) に0.1%ギ酸を加えたもの、移動相B: 水/アセトニトリル (10/90) に0.1%ギ酸を加えたもの、流速: 1mL/min、カラムオープン: 40 分、UV検出波長: 265nm、送液条件: 移動相B 15-60% (0-10分)、とした。

【 0 1 1 1 】

【 化 1 2 】



【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

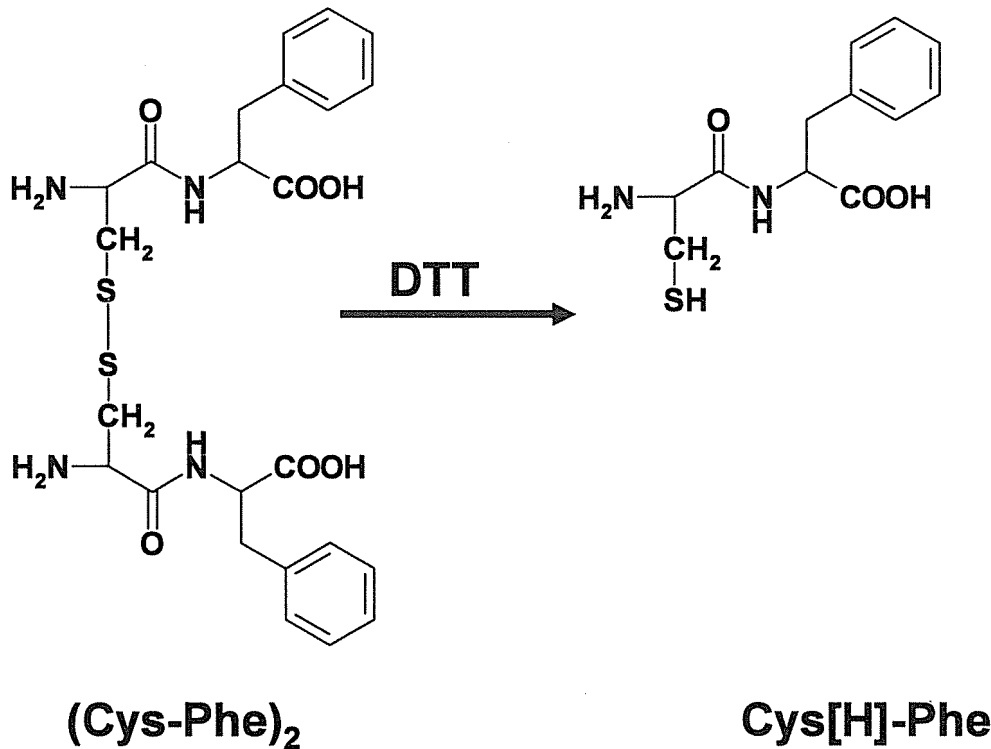
50

## 1 - 5 . ハプテン合成法 5 : Cys[H]-Phe

出発物質(Cys-Phe)<sub>2</sub> (BACHEM社製) を10mmol/Lとなるように0.1M塩酸に溶解した。次いで、2mol/L DTT水溶液を250 μL加えて40 で2時間反応した。その後、HPLCにより目的化合物Cys[H]-Pheを分離及び分取した。

【 0 1 1 3 】

【 化 1 3 】



10

20

【 0 1 1 4 】

30

## 1 - 6 . ハプテンとキャリアタンパク質の結合

合成したハプテンFmoc-Cys[H]-Gly、Fmoc-Cys[H]-Phe、Fmoc-Cys[H]-Ile、AQC-Cys[H]-Phe及びCys[H]-PheとBSAをそれぞれ結合させるため、Imject (登録商標) Maleimide Activated BSA (ピアス社製) を用いた。このマレイミド活性化BSAは既にBSAの表面上のLys残基由来のアミノ( -NH<sub>2</sub>) 基を介して架橋剤Sulfo-SMCC - マレイミド基が導入されたBSAである。2mgのマレイミド活性化BSAを50mM リン酸緩衝液 (pH7.3) (0.1M エチレンジアミン-N,N,N',N'-テトラ酢酸4ナトリウム塩4水和物を含む) (同仁化学社製) 1mLに加えて溶解した。合成した0.5mgの各種ハプテンを200 μLのジメチルスルホキシドに溶解し、マレイミド活性化BSA溶液にゆっくりと滴下した。滴下後は室温下で2時間静置した。反応終了後、Amicon (登録商標) Ultra-4 (分子量10,000 Da cut-off、ミリポア社製) を用いて遠心による限外ろ過を行った。遠心処理後、50mM リン酸緩衝液 (pH7.3) を6~7回程度繰り返し継ぎ足し、過剰のEDTAをできる限り除去した。その後、Bradford法によるタンパク質定量を行い、各ハプテン - BSA結合体の濃度を求めたところ、0.50-0.92mg/mLであった。

40

【 0 1 1 5 】

1分子のマレイミド活性化BSAに結合したハプテンの量を確認するためにハプテン - BSA結合体を質量分析計マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 - 飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) により測定した。図1は、非化学修飾BSA、マレイミド活性化BSA及びFmoc-Cys[H]-Gly/BSA結合体のMALDI-TOF MSスペクトルを示す。非化学修飾BSAとマレイミド活性化BSAの質量差は8186であった。ひとつのマレイミド活性基がBSA分子に導入されると22

50

0の分子量が増大することから、マレイミド活性化BSAは1分子あたり平均37残基のマレイミド基が導入されたものであることがわかった。また、マレイミド活性化BSAに各ハプテンを結合させた試料からは更に分子量が増加したピークが観測された。Fmoc-Cys[H]-Gly/BSA結合体については、マレイミド活性化BSAとの質量差は10248であった。Fmoc-Cys[H]-Glyは分子量386であることから、1分子のマレイミド活性化BSAにつき平均26残基のFmoc-Cys[H]-Glyが導入されていることがわかった。また、Fmoc-Cys[H]-Phe、Fmoc-Cys[H]-Ile、AQC-Cys[H]-Phe、及びCys[H]-Pheをマレイミド活性化BSAと反応させた場合も同様に質量増大が観測され、1分子のマレイミド活性化BSAにつき10残基以上のハプテンがそれぞれ導入されたことがわかった。

【 0 1 1 6 】

[ 2 . 抗体の作製 ]

### 2 - 1 . 免疫作業から抗血清評価まで

免疫処理を行う前に、BALB/cマウス(メス4週齢)を1週間予備飼育しておいた。調製したFmoc-Cys[H]-Gly/BSA結合体溶液(50 $\mu$ g/100 $\mu$ L/匹)をフロイント完全アジュバント(DIFCO社製)と等量混合し、エマルジョンを形成させた。この懸濁液を、毛刈りしたマウスの背中に数箇所皮下投与し、これを初回免疫とした。その2週間後に2回目の免疫処理として、フロイント完全アジュバントに代えてフロイント不完全アジュバント(DIFCO社製)を用いて同様な操作を行った。さらに2週間後に3回目の免疫処理として、2回目の免疫処理と同様な操作を行った。3回目の免疫処理から1週間後、マウス部分採血を行い、酵素免疫測定法(ELISA)により抗体価を測定して該マウスが抗体産生を行っていることを確認した上で、その翌日に、2回目の免疫処理と同様な方法で最終の免疫処理を行った。最終の免疫処理から3日後、該マウスより脾臓を無菌的に摘出し、脾臓細胞を調製し、該脾臓細胞を細胞融合に供した。なお、他のハプテン-BSA結合体についても同様な処理を行った。

【 0 1 1 7 】

### 2 - 2 . 抗体価評価用プレート作製

Reacti-Bind(商標) Maleimide Activated Plates(ピアス社製)の96ウェルマイクロプレート上にFmoc-Cys[H]-Glyを固相化した。Fmoc-Cys[H]-Glyは50mMリン酸緩衝液(10mM EDTAを含む)を用いて2 $\mu$ g/mLに調製し、該溶液を上記プレートの各ウェルに100 $\mu$ Lずつ添加し、4 $^{\circ}$ Cで終夜放置した。次いで、PBS(0.05% Tween20を含む)によりウェル内を3回洗淨した。洗淨後、10 $\mu$ g/mLシステイン溶液を各ウェルに200 $\mu$ Lずつ加えて、室温にて1時間放置し、プレート上の未反応マレイミド基のクエンチング処理を行った。続けて、PBS(0.05% Tween20を含む)によりウェル内を3回洗淨して、Fmoc-Cys[H]-Gly固相化プレートを作製した。該プレートは4 $^{\circ}$ Cにて必要時まで保管した。なお、他のハプテンについても同様な処理を行い、抗体価評価用プレートを作製した。

【 0 1 1 8 】

### 2 - 3 . 抗体価評価

免疫処理したマウスから部分採血した血液を室温にて1時間以上放置した後、パストゥールピペット等で凝固した血液をほぐし、遠心処理(3000rpm、15分間)をして血清を得た。得られた血清は、0.1%ゼラチン(ナカライテスク社製)を含むPBS緩衝液により段階希釈した(10<sup>3</sup>~10<sup>6</sup>倍希釈)。段階希釈した血清を上記抗体価評価用プレートの所定のウェルに100 $\mu$ Lずつ添加し、室温下で1時間放置した。次いでPBS(0.05% Tween20を含む)によりウェル内を3回洗淨した後、Peroxidase Conjugated Affinity Purified Anti-Mouse IgG Fc specific antibody(Goat)(Jackson Immuno Research社製)を添加し、室温下で1時間放置した。その後、PBS(0.05% Tween20を含む)によりウェル内を3回洗淨した。抗原抗体反応は、OPD溶液(0.04%[w/v]オルトフェニレンジアミンを含む20mMクエン酸緩衝液(pH5.0)に0.018%[v/v]の過酸化水素液を反応直前に加えたもの)又はTMB one solution(プロメガ社製)を用いて確認した。各種溶液を各ウェルに100 $\mu$ Lずつ添加して発色反応を10分間行い、1N硫酸溶液により発色反応を停止した。発色反応停止後、OPD発色では波長492nm、TMB発色では波長450nmによる吸光度をマイクロプレートリーダーSpectraMax

10

20

30

40

50

M2e (モレキュラーデバイス社製) を用いて測定した。

【0119】

#### 2-4. 細胞融合

上記の通り、マウスから無菌的に摘出した脾臓を、セルストレイナー (ファルコン社製) によりMEM- 培地 (Gibco社製) 内でほぐした。マウスミエローマ細胞株P3-Ag-X3細胞は事前に充分量を培養しておき、回収したのち、細胞数をカウントした。脾臓1個あたりに含まれる細胞数を $1 \times 10^8$ 個として、細胞数が脾細胞 : ミエローマ細胞 = 5 : 1となるように両者を混合した。遠心分離により培養上清を除去し、細胞ペレットをほぐした。細胞ペレットの容器は37℃水浴下に浸し容器を回転させながら、PEG1500 (ロシュダイアグノスティックス社製) 溶液1mLを1分間かけて少しずつ加えて細胞融合を開始した。PEG溶液添加1分後からの1分間は激しくピペティングした。次いで、それから4分間、MEM- 培地を合計4mL添加した。さらにそれから2分間、MEM- 培地を10mL添加した。室温下で5分間放置した後、遠心分離により上清を除去した融合細胞をHAT培地 (0.01mMヒポキサンチン、0.04  $\mu$ Mアミノプテリン、1.6  $\mu$ Mチミジンを含むMEM- 培地に10% FCS液を加えたもの) 160mLにより懸濁した。最後に、この懸濁液を96ウェルマイクロプレートの各ウェルに200  $\mu$ Lずつまきこみ、5% CO<sub>2</sub>下37℃で培養した。以降3日毎に各ウェルの培地を半分量除去し、新たにHAT培地を半分量加えた。細胞融合後10日目以降、HT培地 (0.01mMヒポキサンチン、1.6  $\mu$ Mチミジンを含むMEM- 培地に10% FCS液を加えたもの) によってHAT培地と同様な培地交換を行った。

10

【0120】

#### 2-5. スクリーニング

細胞融合後、成育したハイブリドーマから目的抗体が分泌されているかどうかを判断するためにスクリーニングを行った。細胞融合後10日目乃至16日目の培養上清を各ウェルから50  $\mu$ Lずつ採取した後、該上清を上記抗体価評価用プレートに添加し、1時間放置した。PBS (0.05% Tween20を含む) によりウェル内を3回洗浄後、Peroxidase Conjugated Affinity Purified Anti-Mouse IgG Fc specific antibody (Goat) (Jackson Immuno Research社製) を添加し、室温下で1時間放置した。その後、PBS (0.05% Tween20を含む) によりウェル内を3回洗浄した。抗原抗体反応はOPD溶液 (0.04% [w/v] オルトフェニレンジアミンを含む20mMクエン酸緩衝液 (pH5.0) に0.018% [v/v] の過酸化水素液を反応直前に加えたもの) を各ウェルに100  $\mu$ Lずつ添加して吸光度測定 (測定波長492nm) を行った。吸光度0.5以上を示したウェルを陽性ウェルと判定し、陽性ウェル内の細胞培養液を別の96ウェルマイクロプレートに移して培養を継続した。1次スクリーニングで陽性と判定されたウェルは疑陽性も含まれるため、1週間培養継続後、同様な操作で培養上清を2次スクリーニングに供して、吸光度3.0以上を示したウェルを陽性ウェルとした。

20

30

【0121】

#### 2-6. クローニング

細胞のモノクローン化は以下の限界希釈法により行った。2次スクリーニング後、陽性判定されたウェル内の細胞懸濁液を、10% [v/v] のBM condemned H1 (Roche社製) を含む完全培地 (BM培地) により100倍、1000倍、10000倍と段階希釈した。それぞれの希釈率で希釈した細胞懸濁液は32ウェルずつ1枚の96ウェルマイクロプレートに添加し、培養を継続した。培養は6日ごとにBM培地で半量を交換した。培養開始から10~15日後、顕微鏡によるコロニー観察を行った。1ウェル内に単コロニーが観察されたウェルの上清サンプルについて、抗体活性の有無を調べた。モノクローン化されたハイブリドーマを含む培養上清が陽性判定を示した後、再び限界希釈法によりクローニングした (リクローニング)。リクローニング後、同様に顕微鏡により単コロニーが観測されたウェルを限定し、培養上清が陽性判定を示すことを確認して、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た。なお、得られたハイブリドーマは、2010年4月1日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (茨城県つくば市東1-1-1つくばセンター中央第6) に寄託しており、Fmoc-Cys-Glyに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマには受託番号FERM P-21947が付与され、Fmoc-Cys-Pheに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマには

40

50

受託番号FERM P-21948が付与されている。また、これらのハイブリドーマはいずれも同センターにおいて国際寄託へ移管申請されており、Fmoc-Cys-Glyに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマには受領番号FERM ABP-11384が付与され、Fmoc-Cys-Pheに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマには受領番号FERM ABP-11385が付与されている（受領書の通知年月日：2011年5月16日）。

【 0 1 2 2 】

### 2 - 7 . 各種免疫原に対するモノクローナル抗体の獲得性

以下の表1は免疫原ごとのモノクローナル抗体作製工程での陽性ウェル数又はハイブリドーマ株数を示した結果である。これより、Fmoc-Cys-Gly、Fmoc-Cys-Phe、Fmoc-Cys-Ile及びAQC-Cys-Pheについては最終的にモノクローナル抗体産生細胞株が5乃至10株樹立できた。一方、Cys-Pheを免疫原としたデザインでは1次スクリーニングの段階で陽性と判定されたウェル数が少なく、抗体作製工程を進めていくにつれ、細胞がドロップアウトしてしまった。この結果より、Cysのアミノ基部分にFmocやAQC構造をもった生体内に存在しない構造が導入されることで、免疫応答が高まり、抗体が得られやすくなったと考えられた。

【 0 1 2 3 】

【表1】

モノクローナル抗体作製工程	作業内容	免疫原				
		Fmoc-Cys-Gly	Fmoc-Cys-Ile	Fmoc-Cys-Phe	AQC -Cys-Phe	Cys-Phe
工程1	1次スクリーニング (陽性ウェル数)	32	136	96	96	9
工程2	2次スクリーニング (陽性ウェル数)	10	10	14	12	実施せず
工程3	クローニング (細胞株数)	8	8	11	11	3
工程4	リクローニング (細胞株数)	8	8	10	9	0
工程5	最終 陽性確認	8	8	10	6	0
工程6	樹立した抗体産生 細胞株数	8	8	10	5	0

【 0 1 2 4 】

### 2 - 8 . モノクローナル抗体の大量化及び精製

培養上清由来の抗体量では十分な評価を行うことができないため、腹水による抗体の大量生成を行った。樹立したハイブリドーマ株を完全培地で培養し、MEM- 培地で $1 \times 10^7$ 個/mLの濃度に懸濁した。該懸濁液を、7日前に予めプリスタン投与したBALB/cマウスの腹腔内に投与した(0.5mL/匹)。7~14日後、該マウスより腹水を採取し、遠心分離により細胞を除去した。

得られた腹水はProtein Gカラム (GEヘルスケア社製)により精製した。Protein Gカラムは20mMリン酸緩衝液 (pH7.0)で平衡化した後、該腹水を20mMリン酸緩衝液 (pH7.0)を用いて10倍希釈後、Protein Gカラムに添加し、腹水中の抗体成分(免疫グロブリンG)を吸着させた。20mMリン酸緩衝液 (pH7.0)溶液によりカラム内に残存している夾雑成分を洗浄除去後、グリシン緩衝液で抗体成分を溶出した。溶出した抗体成分は、1Mトリス緩衝液 (pH9.0)により直ちに溶出液を中和した。精製した抗体溶液は必要時まで-20 で凍結保存した。

【 0 1 2 5 】

[ 3 . 誘導体化試薬の調製 ]

#### 3 - 1 . 誘導体化試薬の調製 : biotin-[Fmoc-Cys]

(Fmoc-Cys)<sub>2</sub> (BACHEM社製)を20 μMとなるようにアセトニトリルに溶解した後、3mol/Lジチオスレイトールを添加し、40 で1時間放置した。HPLC装置によりFmoc-Cys[H]画分を分取し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、該画分を50mMリン酸緩衝液 (pH6.0)に溶解させ、Fmoc-Cys[H]溶液とした。Maleimide-PEG2-Biotin (PIERCE社製)を0.1% EDTA含有50mMリン酸緩衝液 (pH7.3)に溶解し、Fmoc-Cys[H]溶液と混合し、室温下で2時間放置した。反応液をHPLCに導入し、biotin-[Fmoc-Cys]画分を分取後、凍結乾燥した。

10

20

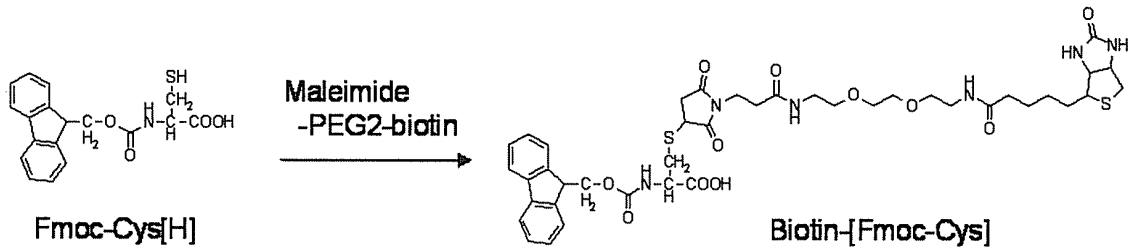
30

40

50

【 0 1 2 6 】

【 化 1 4 】



10

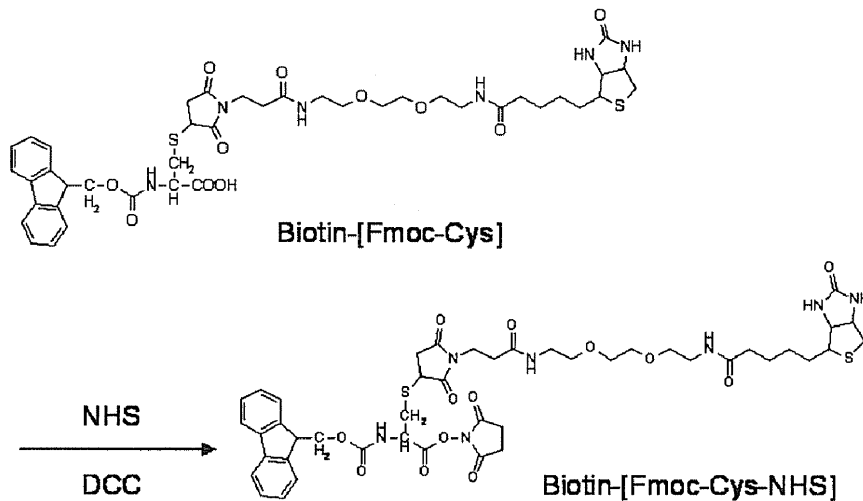
【 0 1 2 7 】

### 3 - 2 . 誘導体化試薬の調製 : biotin-[Fmoc-Cys-NHS]

N,N-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 及びN-ヒドロキシスクシニルイミド (NHS) を0.1mol/Lとなるようにアセトニトリルにそれぞれ溶解させた。また上述で調製した biotin-[Fmoc-Cys]凍結乾燥品を1 $\mu$ g秤量し、56 $\mu$ Lのアセトニトリルに溶解させ、この溶液に0.1mol/L DCC液12 $\mu$ L及び0.1mol/L NHS液12 $\mu$ Lを加えて室温下で2時間放置した。

【 0 1 2 8 】

【 化 1 5 】



20

30

【 0 1 2 9 】

### 3 - 3 . 誘導体化反応 : biotin-[Fmoc-Cys-NHS]によるアミノ酸誘導体化

調製したbiotin-[Fmoc-Cys-NHS]にアミノ酸溶液及び0.1Mホウ酸緩衝液 (pH9.0) を添加し、室温下で15分間放置した。その後、0.2%酢酸を添加し、誘導体化反応を停止した。本反応液は測定時まで4 $\times$ で保存した。

40

【 0 1 3 0 】

### [ 4 . 抗体評価 : ELISA ]

ELISAによる測定原理を図2に示す。Fmoc-Cys-Glyを認識する抗体の溶液は、0.9%塩化ナトリウムを含む50mMリン酸緩衝液 (pH7.3) (PBS) により0.1 $\mu$ g/mLに希釈した。この溶液をReacti-Bind (商標) Protein A/G Coated Plate (サーモサイエンティフィック社製) の各ウェルに100 $\mu$ Lずつ添加し、室温下で2時間放置した。次いで0.05% Tween20含有リン酸緩衝液 (PBST) でウェル内を3回洗浄した。biotin-[Fmoc-Cys-Gly]化合物を0.1%ゼラチン含有PBS液 (GPB) により段階的に希釈し、該希釈液を各ウェルに100 $\mu$ Lずつ添加し、抗原抗体反応を行った。室温下で60分間放置した後、PBST液によりウェル内を3回洗浄した。洗浄後、1 $\mu$ g/mL HRP標識ストレプトアビジン結合体溶液を各ウェルに100 $\mu$ Lずつ

50

添加し、室温下で60分放置した。さらに、PBSTによりウェル内を3回洗浄した後、OPD溶液（25mMクエン酸 / 50mMリン酸水素二ナトリウム（pH5.0）溶液10mLにオルトフェニレンジアミン4mg及び過酸化水素6 $\mu$ Lを添加したものを）をHRP基質溶液として各ウェルに100 $\mu$ Lずつ加えて呈色反応を行った。反応開始から10分後、1M硫酸を反応停止液として各ウェルに100 $\mu$ Lずつ添加し、各ウェルの吸光度を測定波長492nmで測定した。

#### 【0131】

上記の通り得られた抗Fmoc-Cys-Gly抗体について、図2のELISA原理の成立可否を抗原標準液であるbiotin-[Fmoc-Cys-Gly]標準液を用いて確認した。その結果、抗原標準液の濃度に応じて吸光度も増大する用量作用曲線が得られた（図3A）。これにより、抗Fmoc-Cys-Gly抗体によるELISA原理は成立していることが確認できた。

10

#### 【0132】

ついで、抗Fmoc-Cys-Gly抗体の特異性を評価するためにGly以外の各アミノ酸に対する応答性を評価した。各アミノ酸は、グリシン、サルコシン、アラニン、~~アラニン~~、~~アミノ酪酸（GABA）~~、セリン、プロリン、バリン、タウリン、スレオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、メチオニン、ヒスチジン、フェニルアラニン、アルギニン、トリプトファンを適用した。アミノ酸誘導体化試薬であるbiotin-[Fmoc-Cys-NHS]と1~1000 $\mu$ mol/Lの各アミノ酸を室温下で15分間反応させた後、0.2%酢酸を加えて反応を停止した。誘導体化反応液は0.1%ゼラチンを含むPBS溶液で1000倍希釈して、ELISA測定用サンプルとした。ELISA測定用プレート、としてProtein A/G Coated plate（サーモサイエンティフィック社製）を使用し、抗Fmoc-Cys-Gly抗体溶液（濃度0.1 $\mu$ g/mL）を各ウェルに100 $\mu$ Lずつ添加した。室温で2時間静置して抗体の固相化を行った。次いで、PBSTにより各ウェル内を3回洗浄し、ELISA測定用サンプルを各ウェルに100 $\mu$ Lずつ添加し、室温で1時間静置した。次いで、各ウェルを洗浄し、1 $\mu$ g/mLのストレプトアビジン-HRP結合体（Jackson Immuno Research社製）溶液（5%[v/v] Apply Block（生化学工業社製）を含むGPB溶液により1000倍希釈したものを）を各ウェルに100 $\mu$ Lずつ添加し、室温で1時間静置した。その後、各ウェルを洗浄し、OPD溶液により呈色反応を行った。

20

#### 【0133】

各アミノ酸の濃度に対応する吸光度をプロットしたものを図3Bに示す。これにより、抗Fmoc-Cys-Gly抗体はGlyに対してのみ選択的に応答し、その他のアミノ酸に対して応答性がほとんどないことが示された。

30

#### 【0134】

同様に作製した抗Fmoc-Cys-Phe抗体及び抗Fmoc-Cys-Ile抗体についてもPhe及びIle以外のアミノ酸に対する交差反応性を調べた。その結果、抗Fmoc-Cys-Phe抗体では、交差反応性としてPheに対する応答性を100%としたときの他のアミノ酸の割合を求めたところ、Tyrが11%、Leuが10%であり、その他のアミノ酸は0.1%以下であった。また抗Fmoc-Cys-Ile抗体では、Ileに対する応答性を100%としたとき、Leuが16%、Pheが13%であり、その他のアミノ酸は1%以下であった。これらの結果により、抗Fmoc-Cys-Phe抗体及び抗Fmoc-Cys-Ile抗体も測定対象を選択的に検出するツールとして活用することができる抗体であることが示された。

40

#### 【0135】

##### [5. 実試料を用いたアミノ酸の定量]

##### 5-1. グリシン (Gly) の定量

実試料として日本酒（益荒男、鹿野酒造社製）、ウシ胎児血清（FCS）（Fetal Bovine Serum、インビトロジェン社製）及びラット血漿サンプル（SD系、メス、20週齢、日本チャールズリバー社製）を用いて、抗Fmoc-Cys-Gly抗体及びアミノ酸誘導体化試薬による試料中のGly測定評価を行った。その評価は、図2の原理に基づいたELISAによって算出されたGly測定値と高速液体クロマトグラフィー-質量分析計（LC-MS；高速液体クロマトグラフィー装置；1100シリーズ（アジレントテクノロジー社製）、質量分析計；API3000（アプライドバイオシステムズ社製））から得られたGly測定値とを比較することにより行っ

50

た。

【0136】

それぞれの実試料はアセトニトリルと1:1で混合させることにより試料中のタンパク質を沈殿させた。混合はボルテックス攪拌により15~30秒程度行い、遠心操作によりタンパク質を沈殿させた。処理後の上澄み液をPBS溶液により1~100倍に希釈後、biotin-[Fmoc-Cys-NHS]試薬による誘導体化反応に供した。誘導体化反応は、アセトニトリル11 $\mu$ L、0.1Mホウ酸緩衝液(pH9)4 $\mu$ L、上記タンパク質サンプル4 $\mu$ L、及び誘導体化試薬biotin-[Fmoc-Cys-NHS]を1 $\mu$ L混合した。混合はボルテックス攪拌により15~30秒程度行い、室温下で15分間放置した。次いで、0.2%酢酸溶液を20 $\mu$ L添加し誘導体化反応を停止させた。

【0137】

別途、検量線に用いるGly標準溶液についても0.1~1000 $\mu$ Mの濃度範囲をPBSにより段階希釈により調製後、各濃度のGly標準溶液とアセトニトリルを1:1で混合させた。アセトニトリル混合後のGly標準溶液は、biotin-[Fmoc-Cys-NHS]試薬による誘導体化反応に処した。誘導体化反応は、アセトニトリル11 $\mu$ L、0.1Mホウ酸緩衝液(pH9)4 $\mu$ L、上記アセトニトリル混合Gly標準溶液4 $\mu$ L、及び誘導体化試薬biotin-[Fmoc-Cys-NHS]を1 $\mu$ L混合した。混合はボルテックス攪拌により15~30秒程度行い、室温下で15分間放置した。次いで、0.2%酢酸溶液を20 $\mu$ L添加し、誘導体化反応を停止させた。誘導体化反応後の実試料及びGly標準溶液は、0.1%ゼラチン含有PBS溶液により2000倍希釈した後、ELISA測定に供した。

【0138】

ELISA測定によるGly定量は以下の手順に従い実施した。まず、濃度0.1 $\mu$ g/mLの抗Fmoc-Cys-Gly抗体をProtein A/Gコーティングプレートの各ウェルに100 $\mu$ Lずつ添加し、室温下で2時間放置した。次いで、PBST溶液によりウェル内を3回洗浄し、抗Fmoc-Cys-Gly抗体固相化プレートとした。本プレートの各ウェルに、誘導体化反応及び希釈処理済みの実試料又はGly標準溶液を100 $\mu$ Lずつ添加し、室温下で1時間放置した。この間、プレートシールで全ウェルを密封状態とした。次いで、PBST溶液によりウェル内の洗浄を3回行い、Apply Block/GPB(5/95)混合液により濃度1 $\mu$ g/mLに希釈調製したストレプトアビジン-HRP結合体溶液を各ウェルに100 $\mu$ Lずつ添加した。室温下で1時間放置した後(この間、プレートシールにより全ウェルを密封状態とした)、PBST溶液によりウェル内の洗浄を3回行った。その後、各ウェルを洗浄し、OPD溶液により呈色反応を行った。

【0139】

図4Aに、日本酒、FCS及びラット血漿サンプルのGly濃度についてELISA及びLC-MSにより求めたそれぞれの測定値をプロットした結果を示す。また、図4Bにはラット血漿サンプルに限定してELISA及びLC-MSにより算出したGly測定値をプロットした結果を示す。これらの結果より、ELISAにより求めた実試料中のGly測定値はLC-MSにより求めたGly測定値とほぼ同一の値を示すことがわかり、さらに各種実試料に対する直線近似を調べたところ、図4A及び図4Bの両方において正の相関性が示された(図4A:  $R^2$ 値=0.9945、図4B:  $R^2$ 値=0.9642)。この結果からもELISAによるGly定量値は正確性が高いことが示された。

【0140】

5-2. フェニルアラニン(Phe)の定量

実試料としてウシ胎児血清(FCS)(Fetal Bovine Serum、インビトロジェン社製)及びラット血漿サンプル(SD系、メス、20週齢、日本チャールズリパー製)を用いて、抗Fmoc-Cys-Phe抗体及びアミノ酸誘導体化試薬による試料中のPhe測定評価を行った。その評価は、図2の原理に基づいたELISAによって算出されたPhe測定値と高速液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS; 高速液体クロマトグラフィー装置; 1100シリーズ(アジレントテクノロジー社製)、質量分析計; API3000(アプライドバイオシステムズ社製))から得られたPhe測定値とを比較することにより行った。

【0141】

それぞれの実試料はアセトニトリルと1:1で混合させることにより試料中のタンパク質を沈殿させた。混合はボルテックス攪拌により15~30秒程度行い、遠心操作によりタンバ

10

20

30

40

50

物質を沈殿させた。処理後の上澄み液をPBS溶液により1~100倍に希釈後、biotin-[Fmoc-Cys-NHS]試薬による誘導体化反応に供した。誘導体化反応は、アセトニトリル11 $\mu$ L、0.1Mホウ酸緩衝液(pH9)4 $\mu$ L、上記タンパク質サンプル4 $\mu$ L、及び誘導体化試薬biotin-[Fmoc-Cys-NHS]を1 $\mu$ L混合した。混合はボルテックス攪拌により15~30秒程度行い、室温下で15分間放置した。次いで、0.2%酢酸溶液を20 $\mu$ L添加し誘導体化反応を停止させた。

#### 【0142】

別途、検量線に用いるPhe標準溶液についても0.1~1000 $\mu$ Mの濃度範囲をPBSにより段階希釈により調製後、各濃度のPhe標準溶液とアセトニトリルを1:1で混合させた。アセトニトリル混合後のPhe標準溶液は、biotin-[Fmoc-Cys-NHS]試薬による誘導体化反応に処した。誘導体化反応は、アセトニトリル11 $\mu$ L、0.1Mホウ酸緩衝液(pH9)4 $\mu$ L、上記アセトニトリル混合Phe標準溶液4 $\mu$ L、及び誘導体化試薬biotin-[Fmoc-Cys-NHS]1 $\mu$ Lを混合して行った。混合はボルテックス攪拌により15~30秒程度行い、室温下で15分間放置した。次いで、0.2%酢酸溶液を20 $\mu$ L添加し、誘導体化反応を停止させた。誘導体化反応後の実試料及びPhe標準溶液は、0.1%ゼラチン含有PBS溶液により2000倍希釈した後、ELISA測定に供した。

10

#### 【0143】

ELISA測定によるPhe定量は以下の手順に従い実施した。まず、濃度0.1 $\mu$ g/mLの抗Fmoc-Cys-Phe抗体をProtein A/Gコーティングプレートの各ウェルに100 $\mu$ Lずつ添加し、室温下で2時間放置した。次いで、PBST溶液によりウェル内を3回洗浄し、抗Fmoc-Cys-Phe抗体固相化プレートとした。本プレートの各ウェルに、誘導体化反応及び希釈処理済みの実試料又はPhe標準溶液を100 $\mu$ Lずつ添加し、室温下で1時間放置した。この間、プレートシールで全ウェルを密封状態とした。次いで、PBST溶液によりウェル内の洗浄を3回行い、Apply Block/GPB(5/95)混合液により濃度1 $\mu$ g/mLに希釈調製したストレプトアビジン-HRP結合体溶液を各ウェルに100 $\mu$ Lずつ添加した。室温下で1時間放置した後(この間、プレートシールにより全ウェルを密封状態とした)、PBST溶液によりウェル内の洗浄を3回行った。その後、各ウェルを洗浄し、OPD溶液により呈色反応を行った。

20

#### 【0144】

図6に、FCS及びラット血漿サンプルのPhe濃度についてELISA及びLC-MSにより求めたそれぞれの測定値を比較したグラフを示す。この結果より、ELISAにより求めた実試料中のPhe測定値はLC-MSにより求めたPhe測定値とほぼ同一の値を示すことがわかった。

30

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0145】

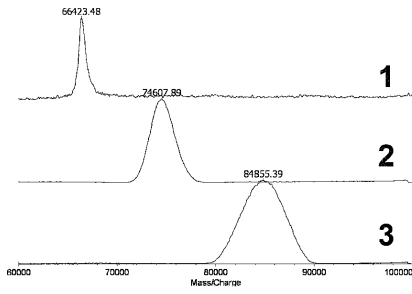
本発明の含硫黄アミノ酸誘導体により、内因性低分子化合物を高感度で特異的且つ簡便に測定する方法を提供できるようになった。本発明の含硫黄アミノ酸誘導体を用いた測定方法は、検査、診断等に利用することができ、医療、食品、環境等の分野において有用である。特に、内因性低分子化合物であるアミノ酸は動物の健康指標でもあり、体内アミノ酸を測定することで健康状態の管理を行うことができる。また、体内アミノ酸のバランスを調べれば肝障害をも見出せる可能性がある。このように体内アミノ酸の測定を行うことによって、予防医学あるいは病気の早期発見、早期治療につなげることができる。

#### 【0146】

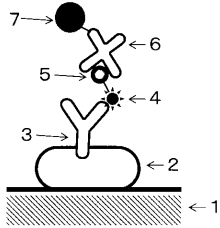
40

本出願は、日本で出願された特願2010-114616(出願日:2010年5月18日)を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

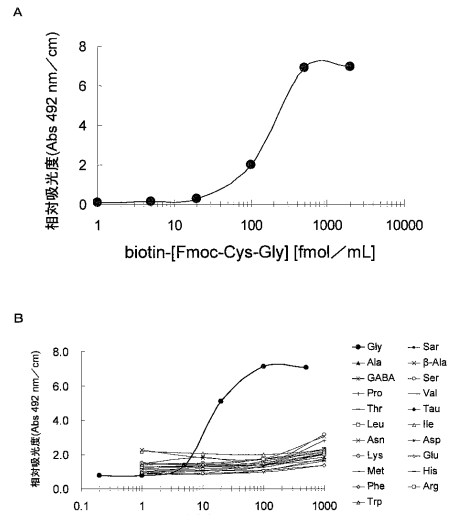
【 図 1 】



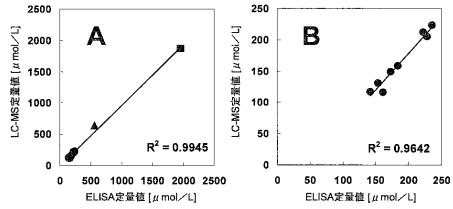
【 図 2 】



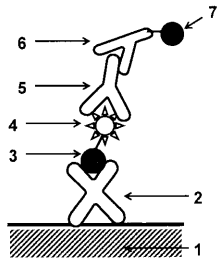
【 図 3 】



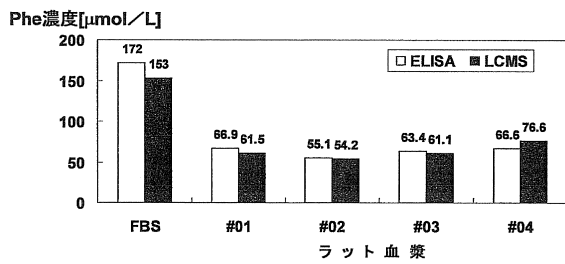
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



## フロントページの続き

- (74)代理人 100163658  
弁理士 小池 順造
- (74)代理人 100174296  
弁理士 當麻 博文
- (72)発明者 窪田 和幸  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
- (72)発明者 水越 利巳  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特開2004-279412(JP,A)  
特開2001-272401(JP,A)  
特開昭61-034466(JP,A)  
特開平02-138293(JP,A)  
特開平07-107992(JP,A)  
特開平07-260784(JP,A)  
特開2001-255324(JP,A)  
西道隆臣, タンパク質の限定分解反応を補足する抗ペプチド抗体 抗原の調製、免疫、抗体の  
フィニティー精製について, 実験医学, 1997年 6月, Vol.15, No.8, P.927-931  
大海忍, ラボラトリーひとくちメモ(27) みじかいペプチド、免疫するときどうしてますか?  
, 細胞工学, 1997年 9月, Vol.16, No.9, P.1378-1380

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48-33/98  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	含硫氨基酸衍生物		
公开(公告)号	<a href="#">JP5817720B2</a>	公开(公告)日	2015-11-18
申请号	JP2012515915	申请日	2011-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	味之素株式会社		
申请(专利权)人(译)	味之素株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	味之素株式会社		
[标]发明人	窪田和幸 水越利巳		
发明人	窪田 和幸 水越 利巳		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/566 C07K16/44 C12P21/08		
CPC分类号	C07K5/06026 C07K5/06034 C07K5/0606 C07K5/06078 C07K16/44 C07K16/468 C12N5/16 G01N33/68 G01N33/6806 G01N33/6812 G01N33/6815		
FI分类号	G01N33/53.J G01N33/532.A G01N33/566 C07K16/44 C12P21/08		
代理人(译)	高岛肇 山本健二 当麻 博文		
优先权	2010114616 2010-05-18 JP		
其他公开文献	JPWO2011145664A5 JPWO2011145664A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种以高灵敏度特异且方便地测定内源性低分子量化合物的方法。使用特定的含硫氨基酸衍生物，可以提供以高灵敏度特异且方便地测量内源性低分子量化合物的方法。

(21) 出願番号	特願2012-515915 (P2012-515915)	(73) 特許権者	00000066
(86) (22) 出願日	平成23年5月18日 (2011. 5. 18)		味の素株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/061460		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(87) 国際公開番号	W02011/145664	(74) 代理人	100080791
(87) 国際公開日	平成23年11月24日 (2011. 11. 24)		弁理士 高島 一
審査請求日	平成26年5月14日 (2014. 5. 14)	(74) 代理人	100125070
(31) 優先権主張番号	特願2010-114616 (P2010-114616)		弁理士 土井 京子
(32) 優先日	平成22年5月18日 (2010. 5. 18)	(74) 代理人	100136629
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 鎌田 光直
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100122688
			弁理士 山本 健二
		(74) 代理人	100117743
			弁理士 村田 美由紀