

(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2007-277263****(P2007-277263A)**

(43) 公開日 平成19年10月25日(2007.10.25)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>CO7K 16/40 (2006.01)</b>		CO7K 16/40		4B064
<b>CO7K 16/06 (2006.01)</b>		CO7K 16/06		4H045
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>		GO1N 33/53	D	
<b>GO1N 33/577 (2006.01)</b>		GO1N 33/577	B	
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>		C12P 21/08		
審査請求 有 請求項の数 11 O L (全 14 頁)				

(21) 出願番号	特願2007-183987 (P2007-183987)	(71) 出願人	598081621
(22) 出願日	平成19年7月13日 (2007.7.13)		株式会社トランスジェニック
(62) 分割の表示	特願平11-20108の分割		熊本県熊本市南熊本3-14-3
原出願日	平成11年1月28日 (1999.1.28)	(74) 代理人	100092783
			弁理士 小林 浩
		(74) 代理人	100095360
			弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(72) 発明者	堀内 正公
			熊本県熊本市本荘2-2-1 熊本大学医学部内
		(72) 発明者	永井 電児
			熊本県熊本市本荘2-2-1 熊本大学医学部内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 カルボキシメチル化タンパク質に対する抗体

(57) 【要約】

【課題】カルボキシメチル化タンパク質に対する抗体の提供。

【解決手段】タンパク質又はペプチド中に存在する、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸と反応し、側鎖のアミノ基がカルボキシエチル化されたアミノ酸と反応しない抗体。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

タンパク質又はペプチド中に存在する、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸と反応し、側鎖のアミノ基がカルボキシエチル化されたアミノ酸と反応しない抗体。

**【請求項 2】**

カルボキシメチル化されたアミノ酸がN- -カルボキシメチルリシンである請求項 1 記載の抗体。

**【請求項 3】**

抗体がポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体である請求項 1 又は 2 記載の抗体。

10

**【請求項 4】**

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体と、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸を少なくとも一部に含むタンパク質又はペプチドとを反応させることを特徴とする前記タンパク質又はペプチドの測定方法。

**【請求項 5】**

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体と、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸を少なくとも一部に含むタンパク質又はペプチドとを反応させることを特徴とする糖尿病合併症の検出方法。

**【請求項 6】**

糖尿病合併症が糖尿病性細血管合併症又は糖尿病大血管合併症である請求項 5 記載の検出方法。

20

**【請求項 7】**

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体と、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸を少なくとも一部に含むタンパク質又はペプチドとを反応させ、得られる反応産物から前記タンパク質又はペプチドを採取することを特徴とする前記タンパク質又はペプチドの製造方法。

**【請求項 8】**

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸を少なくとも一部に含むタンパク質又はペプチドの検出用試薬。

**【請求項 9】**

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、糖尿病合併症検出用試薬。

30

**【請求項 10】**

糖尿病合併症が糖尿病性細血管合併症又は糖尿病大血管合併症である請求項 9 記載の試薬。

**【請求項 11】**

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、免疫組織染色用試薬。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、タンパク質又はペプチド中に存在する、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸と反応し、側鎖のアミノ基がカルボキシエチル化されたアミノ酸と反応しない抗体、該抗体を用いた糖尿病合併症の検出方法、及び前記抗体の用途に関する。

40

**【背景技術】****【0002】**

生体中のタンパク質は還元糖と非酵素的に反応して糖化される。この反応は、一般的にメイラード反応と呼ばれており、前期段階及び後期段階の反応から構成される。メイラード反応の前期段階は、タンパク質を構成するアミノ酸の側鎖アミノ基やN末端アミノ基が糖のカルボニル基と反応し、シッフ塩基を経由してアマドリ転位化合物を生成するというものである。この反応の生成物として、ヘモグロビンA1Cや糖化アルブミンが知られており、該生成物は糖尿病の臨床マーカーとして広く用いられている。基本的には、現在では

50

生体内のすべてのタンパク質が糖化されると考えられており、その結果としてのタンパク質の機能障害が数多く報告されている。

#### 【0003】

メイラード反応の後期段階は、前期段階により生成したアマドリ転位化合物が、脱水、酸化、縮合といった複雑な不可逆的反応を経て、蛍光性、褐色変化あるいは分子内・分子間架橋形成を特徴とするメイラード反応の最終生成物を生じる段階である。そして、後期段階の最終生成物はAGE(Advanced Glycation End products)と呼ばれる。AGEは、複数の構造体の集合であると考えられており、その定量は蛍光強度の測定、機器分析、抗原抗体反応などにより行われている。現在までにAGEの構造体として、ピラリン、ペントシジン、クロスリン、カルボキシメチルリシン(CML)などが提唱されている(Biochemistry vol. 35, No.24, 8075-8083, 1996他)が、反応経路や構造体の存在意義に関しては未だに詳細になっていない。

10

#### 【0004】

AGEに関する上記物理化学的な特色に加え、AGEはマクロファージの細胞膜レセプターによって特異的に認識されるという生物学的な特色を持ち、大いに注目されている。さらに、糖尿病や老化現象にみられる細小血管障害(腎症、網膜症、末梢神経障害など)、動脈硬化、白内障、皮膚・血管・関節の結合組織の硬化・肥厚など種々の組織障害部位にAGEの存在が確認されている(Horiuchi S. et al., Nephrol. Dial. Transplant. 11(5)(1996))。従って、AGEはこれらの組織障害の発症に深く関与していると考えられ、AGEに関し、医学研究や臨床検査の分野での重要性が増している。

20

#### 【0005】

ところで、ブドウ糖由来アマドリ転位化合物の酸化的開裂による代表的な生成物であるカルボキシメチルリシン(CML)は、1986年に同定されて以来(Ahmed MU et al., J. Biol. Chem. 261, 4889-94(1986))、上述したような糖尿病や老化現象との関連で注目を集めてきた。ヒト皮膚コラーゲン中のCML濃度が、糖尿病患者で有意に高いとの報告(Dyer DG et al., J. Clin. Invest. 91(6), 2463-9(1993))をはじめとし、組織中のCML濃度が糖尿病の進行や加齢により有意に増加するという報告が多くなされてきた。また、AGEに対する抗体のエピトープに関する研究により、CMLはAGEの主要な構造体であることが明らかにされてきた(Ikeda K. et al., Biochem. 35, 8075-83(1996))。

30

#### 【0006】

一方、近年、AGEの新たな構造体として、CMLに酷似した構造のカルボキシエチルリシン(CEL)が見出され、ガスクロマトグラフィー/質量分析法によりヒトのレンズ蛋白質中の濃度が加齢に伴い増加することが明らかとなった(Ahmed MU et al., Biochem Journal, 324, 565-570(1997))。CELは、タンパク質中のリシンの側鎖がメチルグリオキサル(MGO)によりカルボキシエチル化(CE化)されると考えられている。MGOは、解糖系におけるトリオースリン酸の分解産物やアセトールの代謝産物として存在し、糖尿病患者の血液中で増加しているという報告がある(McLellan AC et al., Clinical Science 87, 21-29 (1994))。また、in vitroでも、高濃度の糖を含む培地で赤血球を培養すると細胞中のMGO濃度が上昇することが知られている。

40

#### 【0007】

上述したように、CMLおよびCELは、AGE構造体として重要であることが示されつつある。しかしながら、両者の構造が炭素数で1つ異なるのみという非常に類似しているものであるため、簡便に両者を識別して測定する方法がなく、糖尿病合併症や老化に関連した種々の生理学的側面について明確になっていない。

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

本発明は、タンパク質又はペプチド中に存在する、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸と反応し、側鎖のアミノ基がカルボキシエチル化されたアミノ酸と反応しない抗体、該抗体を用いた糖尿病合併症の検出方法、及び前記抗体の用途を提供するこ

50

とを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究行った結果、アミノ酸側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたタンパク質又はペプチドを抗原として用い、さらに、カルボキシエチル化されたタンパク質又はペプチドをスクリーニングに用いることにより、タンパク質又はペプチド中に存在する、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸と反応し、側鎖のアミノ基がカルボキシエチル化されたアミノ酸と反応しない抗体、すなわち、カルボキシエチル化されたタンパク質又はペプチドとの識別が可能な抗体の作製に成功し、本発明を完成するに至った。

10

【0010】

すなわち、本発明は、タンパク質又はペプチド中に存在する、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸と反応し、側鎖のアミノ基がカルボキシエチル化されたアミノ酸と反応しない抗体である。カルボキシメチル化されたアミノ酸としては、例えばN-カルボキシメチルリシンが挙げられる。また、前記抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。モノクローナル抗体としては、例えば受託番号がFERM P-17153であるハイブリドーマにより産生されるものが挙げられる。

【0011】

さらに、本発明は、前記抗体と、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸を少なくとも一部に含むタンパク質又はペプチドとを反応させることを特徴とする前記タンパク質又はペプチドの測定方法である。さらに、本発明は、前記抗体と、前記タンパク質又はペプチドとを反応させることを特徴とする糖尿病合併症の検出方法である。糖尿病合併症としては、糖尿病性腎症、網膜症、神経障害などの糖尿病性細血管合併症、あるいは動脈硬化症に代表される糖尿病大血管合併症等が挙げられる。

20

【0012】

さらに、本発明は、前記抗体と、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸を少なくとも一部に含むタンパク質又はペプチドとを反応させ、得られる反応産物から前記タンパク質又はペプチドを採取することを特徴とする前記タンパク質又はペプチドの製造方法である。さらに、本発明は、前記抗体を含む、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸を少なくとも一部に含むタンパク質又はペプチドの検出用試薬である。さらに、本発明は、前記抗体を含む、糖尿病合併症検出用試薬又は免疫組織染色用試薬である。以下、本発明を詳細に説明する。

30

【発明の効果】

【0013】

本発明により、CM化タンパク質に反応するがCE化タンパク質に反応しないモノクローナル抗体、糖尿病合併症の検出方法、及び前記抗体の用途が提供される。CM化タンパク質は、糖尿病合併症にみられる組織障害の発症と進展に深く関連していることから、医学研究や臨床検査の領域で、糖尿病合併症などの臨床マーカーとして使用可能である。また、本発明の抗体の使用により、CM化タンパク質をCE化タンパク質と区別して簡便に測定することができる。これにより、糖尿病合併症又は老化現象とCM化されたタンパク質等との関連について、より詳細に検討することができる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明者は、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸を少なくとも一部に含むタンパク質又はペプチド（以下、「カルボキシメチル化タンパク質」又は「CM化タンパク質」という）が糖尿病合併症の発症や老化現象に深く関与していることに着目した。一方、別のAGE構造体の一つとして、側鎖のアミノ基がカルボキシエチル化(CE化)されたアミノ酸が挙げられるが、CM化されたアミノ酸とCE化されたアミノ酸との構造は非常に酷似している。

【0015】

50

そこで、本発明者は、CM化タンパク質が糖尿病合併症の発症や老化現象に与える生理学的な機能を明らかにするには、CM化タンパク質を、CE化タンパク質と識別して検出、測定する方法が必要であると考えた。従って、本発明は、CM化タンパク質と特異的に反応するが、CE化タンパク質とは反応しない抗体を提供するものであり、この抗体によって非常に酷似した構造であるCE化タンパク質との分別又は識別することを可能とする手法を提供するものである。

#### 【0016】

本発明において「カルボキシメチル化タンパク質」又は「CM化タンパク質」とは、タンパク質又はペプチドを構成するアミノ酸において、側鎖のアミノ基がカルボキシメチル化されたアミノ酸を少なくとも一部に含むものを意味する。「少なくとも一部」とは、当該タンパク質又はペプチドを構成するアミノ酸であって側鎖にアミノ基を有するアミノ酸全体のうち、アミノ基が1個CM化されている限り個数に制限はないことを意味する。従って、1個のアミノ基がCM化されているものでもよく、全部のアミノ基がCM化されているものでもよく、CM化されたものとCE化されたものとが混在してもよい。少なくとも1個のアミノ基がCM化されたアミノ酸がペプチド又はタンパク質中に存在する限り、残りのアミノ基がCE化されたアミノ酸が含まれていても、そのようなペプチド又はタンパク質は本発明におけるCM化タンパク質に含まれる。この場合、本発明の抗体は当該ペプチド又はタンパク質中に存在するアミノ酸のうち、側鎖のアミノ基がCM化されたアミノ酸と反応することができる。また、側鎖にアミノ基を有するアミノ酸の種類は特に限定されるものではなく、例えばリシン、アルギニン、アスパラギン、グルタミンが挙げられるが、リシン（例えばN-カルボキシメチル化リシン）が好ましい。

#### 【0017】

一方、本発明において「CE化タンパク質」とは、少なくとも一部の側鎖のアミノ基がカルボキシエチル化されているアミノ酸を含むタンパク質又はペプチドであって、カルボキシメチル化されたアミノ酸を含まないタンパク質又はペプチドをいう（「カルボキシエチル化タンパク質」ともいう）。

#### 【0018】

##### 1. CM化タンパク質の調製

CM化する対象となるタンパク質は特に限定されるものではなく、複合タンパク質、単純タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質などいずれのものでもよい。これらのタンパク質としては、例えばアルブミン（BSA等）、ヘモグロビン、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、リボヌクレアーゼ（RNase）、<sub>2</sub>マイクログロブリン、ヒストン、コラーゲン、血球膜タンパク質、又は低密度若しくは高密度リポタンパク質などが挙げられる。また、タンパク質に限らずペプチド、例えばオリゴペプチドでもポリペプチドでも良く、タンパク質から修飾や分解を受けて合成されたものも使用可能である。

#### 【0019】

これらのタンパク質又はペプチドをCM化するには、BSAなどのタンパク質数十mg/ml（例えば10～80 mg/ml）と数十mM（例えば10～80 mg/ml）のグリオキシル酸をリン酸緩衝液中（グリオキシル酸の5倍のモル量のNaCNBH<sub>3</sub>を含む、pH 7.4）で、37℃の条件下、24時間程度反応させる方法などが採用される。上記方法によって得られたCM化タンパク質は、透析、液体カラムクロマトグラフィーなどによって精製された後、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の作製に供される。

#### 【0020】

##### 2. CM化タンパク質に対する抗体

本発明において「抗体」とは、抗原である前記CM化タンパク質に結合し得る抗体分子全体またはその断片（例えば、Fab又はF(ab')<sub>2</sub>断片）を意味し、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。本発明の抗体（ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体）は、種々の方法のいずれかによって製造することができる。このような抗体の製造法は当該分野で周知である[例えばSambrook, J et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)を参照]。

## 【0021】

## (1) CM化タンパク質に対するモノクローナル抗体の作製

## (i) 抗体産生細胞の採取

前記のようにして作製したCM化タンパク質又はその断片を抗原として、哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは0.1~100mgであり、アジュバントを用いるときは1~100 $\mu$ gである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2~5週間間隔で、1~10回、好ましくは2~5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から1~60日後、好ましくは1~14日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。

10

## 【0022】

## (ii) 細胞融合

ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む)で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞としては、例えばP3X63-Ag.8.U1(P3U1)、NS-1などのマウスミエローマ細胞株が挙げられる。

20

## 【0023】

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まないDMEM、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中で、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個/mlの抗体産生細胞と $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個/mlのミエローマ細胞とを混合し(抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞比5:1が好ましい)、細胞融合促進剤存在のもとで融合反応を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量1000~6000ダルトンのポリエチレングリコール等を使用することができる。また、電気刺激(例えばエレクトロポレーション)を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

30

## 【0024】

## (iii) ハイブリドーマの選別及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、細胞懸濁液を例えばウシ胎児血清含有RPMI-1640培地などで適当に希釈後、マイクロタイタープレート上に $3 \times 10^5$ 個/well程度まき、各ウェルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、14日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

## 【0025】

次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、CM化タンパク質に反応する抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法等によってスクリーニングすることができる。

40

## 【0026】

前述の通り、CMLとCELとは構造が非常に類似したものである。従って、CMLと反応するモノクローナル抗体をスクリーニングしたとしても、得られるモノクローナル抗体はCE化タンパク質と反応してしまう可能性が高い。そこで、本発明においては、CM化タンパク質に反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択した後、CE化タンパク質には反応しない抗体を産生するものをさらに選択する。

## 【0027】

50

すなわち、CM化およびCE化タンパク質（BSAなど）を用い、ELISA法などでハイブリドーマの培養上清中のモノクローナル抗体の反応性を測定する。この中から、CM化タンパク質に強い反応性を示し、かつ、CE化タンパク質には反応性を示さないものを選択する。この際、CM化およびCE化された数種のタンパク質を用いて反応性を検討するのが好ましい。

#### 【0028】

融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行う。そして、最終的に、CM化タンパク質とは反応するがCE化タンパク質とは反応しないモノクローナル抗体を産生する細胞であるハイブリドーマを樹立する。なお、本発明において、上記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマCMS-10及びCMS-96が得られ、このうちCMS-10（「Mouse-Mouse hybrid oma CMS-10」と称する）は、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成11年1月20日付でFERM P-17153として寄託されている。

10

#### 【0029】

##### (iv)モノクローナル抗体の採取

樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法又は腹水形成法等を採用することができる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば37℃、5% CO<sub>2</sub>濃度）で7～14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。

#### 【0030】

腹水形成法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内にハイブリドーマを約  $1 \times 10^7$  個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1～2週間後に腹水を採集する。上記抗体の採取方法において抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

20

#### 【0031】

##### (2) CM化タンパク質に対するポリクローナル抗体の作製

前記CM化タンパク質又はその断片を抗原として、これを哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは0.1～100mgであり、アジュバントを用いるときは1～100μgである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内等に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2～5週間間隔で、1～10回、好ましくは2～5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から6～60日後に、酵素免疫測定法(ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)又はEIA(enzyme immunoassay))、放射性免疫測定法(RIA; radioimmuno assay)等で抗体価を測定し、最大の抗体価を示した日に採血し、抗血清を得る。

30

#### 【0032】

その後は、CM化およびCE化タンパク質（BSAなど）を用い、これらタンパク質に対する抗血清中のポリクローナル抗体の反応性をELISA法などで測定する。そして、CM化タンパク質に強い反応性を示し、かつ、CE化タンパク質には反応性を示さないものを選択する。この際、CM化およびCE化された数種のタンパク質を用いて反応性を検討するのが好ましい。例えば、まず、抗血清中のポリクローナル抗体を、CM化タンパク質で固定されたアフィニティカラムにかけてCM化タンパク質と反応する抗体（カラム吸着画分）を採取する。次に、得られた抗体を、CE化タンパク質で固定されたアフィニティカラムにかけて、吸着せずに溶出する抗体を採取する。そして、最終的に得られた抗体がCM化タンパク質とは反応するがCE化タンパク質とは反応しないことを、ELISA等により確認する。

40

#### 【0033】

##### 3. CM化タンパク質の製造

以上のようにして本発明の抗体が得られた後は、これをリガンドとして、CE化タンパク

50

質と反応させることなくCM化タンパク質を精製することができる。すなわち、まず、固体担体に本発明の抗体を結合させることにより抗体アフィニティークロマトグラフィーカラムを作製し、目的タンパク質のCM化反応混合物を供する。次に、反応混合物中のCM化タンパク質と本発明の抗体との反応を行わせた後、不要成分をカラムから除去する。最後に、目的とするCM化タンパク質溶出画分を得るため溶離液をカラムにかけることにより、目的のCM化タンパク質をCE化タンパク質と区別して採取することができる。なお、本発明の抗体は、CM化タンパク質を検出するためにウエスタンブロッティング、組織免疫染色、免疫沈降等に用いることもできる。

#### 【0034】

#### 4. CM化タンパク質の測定方法

10

本発明においては、前記抗体を用いてCM化タンパク質を測定（例えば定量）することができる。例えば、本発明のモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体とCM化タンパク質とを反応させ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)などで標識した抗マウスIgG抗体を用いることにより、CM化タンパク質を定量することが可能である。

#### 【0035】

#### 5. 糖尿病合併症の検出方法

本発明の抗体を生体試料中のCM化タンパク質と反応させることにより、糖尿病合併症を検出することができる。糖尿病合併症としては、糖尿病性腎症、網膜症、神経障害などの糖尿病性細血管合併症、あるいは動脈硬化症に代表される糖尿病大血管合併症等が挙げられる。本発明において、これらの合併症の検出となる疾患は、1種類でもよく2種類以上が併発したものでよい。

20

#### 【0036】

糖尿病合併症患者、例えば糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症などであると疑われる患者から血液、尿、組織等を採用し、適切な前処理を施してCM化タンパク質測定試料を調製する。なお、CM化タンパク質測定試料は、糖尿病合併症の臨床マーカーとして利用することができる。次いで、前記測定試料と前記抗体とを反応させる。反応後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)などで標識した抗マウスIgG抗体を用いて常法によりCM化タンパク質を検出、定量する。検出結果が陽性である場合又は定量値が高い場合には、何らかの糖尿病合併症を有しているか否かを検出するための判断資料（例えば合併症の進行度の指標）とすることができる。

30

#### 【0037】

#### 6. 本発明の抗体を含む試薬

本発明においては、CM化タンパク質に対する抗体を、各種試薬として使用することができる。例えば、CM化タンパク質検出用試薬として使用する場合は、前記4.に記載の測定方法を用いて検出が行われ、糖尿病合併症検出用試薬として使用する場合は、前記5.に記載の方法により検出が行われる。また、本発明の抗体を免疫組織染色用試薬として用いる場合は、通常の免疫組織染色法に従って検出が行われる。

#### 【0038】

例えば、糖尿病患者のバイオプシーから得られる種々の組織切片を常法により調製し、本発明の抗体を結合させる。西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識した抗マウスIgG抗体を二次抗体として本発明の抗体に結合させ、3,3'-ジアミノベンジジン(3,3'-diaminobenzidine)処理を施して染色する。染色後顕微鏡観察を行い、褐色に染色された領域がCM化を受けたものと判断することができる。

40

#### 【実施例】

#### 【0039】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

#### 〔実施例1〕モノクローナル抗体の調製

##### (1) 抗原の調製

##### (i) カルボキシメチル化タンパク質

50



本実施例においては、カルボキシメチル化タンパク質としてカルボキシメチル化ウシ血清アルブミン(以下「CML-BSA」という)、カルボキシメチル化キーホールリンペットヘモシアニン(以下「CML-KLH」という)及びカルボキシメチル化リボヌクレアーゼ(以下「CML-RNase」という)を用いた。

#### 【0040】

175 mgの各タンパク質(BSA、KLH及びRNase)を、それぞれ0.15 Mグリオキシル酸及び0.45 MのNaCNBH<sub>3</sub>を含む0.2 Mリン酸緩衝液(pH7.8)中、37℃で24時間反応させた後、PBSにて透析し、CM化タンパク質を得た(Reddy S et al., Biochemistry 1995, 34, 10872-10878)。生成したCM化タンパク質について、アミノ酸分析を行った結果より、所望のタンパク質(CML-BSA、CML-KLH及びCML-RNase)であることを確認した。

10

#### 【0041】

##### (ii)カルボキシエチル化タンパク質

40 mgの各タンパク質(BSA、KLH及びRNase)を、それぞれ0.2 Mピルビン酸及び0.3 M NaCNBH<sub>3</sub>を含むPBS中で24時間反応させた後、PBSにて透析し、CE化タンパク質を得た(Ahmed MU et al., Biochem J 1997, 324, 565-570)。生成したCE化タンパク質についてアミノ酸分析を行った結果、BSA、KLH及びRNaseがそれぞれカルボキシエチル化された所望のタンパク質であることを確認した(それぞれ「CEL-BSA」、「CEL-KLH」及び「CEL-RNase」という)。

#### 【0042】

##### (2)動物の免疫

1 mg/mlの抗原(CML-KLH)を、等量のフロイントアジュバントと混合してエマルジョンを作製したのち、200 µl/匹ずつ、Balb/cマウスの背中皮内に免疫した。2週間おきに追加免疫を行い、初回免疫から4回免疫した後に尾静脈より採血を行い、抗体価の確認を行った。

20

#### 【0043】

##### (3)抗体価の測定

抗体価はELISA法を用いて測定した。すなわち、抗原としてCML-BSA、CML-RNase及びCML-KLHを各5 µg/mlの濃度で50 µl/wellずつ、一晚4℃でプレートにコーティングした。0.05% Tween 20を含むPBS(PBS-T)で3回洗浄後、0.5%ゼラチンを含む炭酸緩衝液(pH 9.5)で1時間ブロッキングした。洗浄後、PBS-Tで段階希釈したマウス血清を50 µl/wellずつ入れて1時間静置した。洗浄後、PBS-Tで2500倍に希釈した2次抗体(西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウスIgG)を50 µl/wellずつ入れて1時間静置した。洗浄後、5.5 mg/10mlのOPD(o-フェニレンジアミン)を含むクエン酸緩衝液(pH5.0)を100 µl/wellずつ入れ、10分間反応させた。反応後、1N硫酸を添加して反応を止め、492nmの吸光度を測定した。その結果、抗血清の1万倍希釈溶液において、抗原と有意な反応性を示した。

30

#### 【0044】

##### (4)細胞融合および抗体産生ハイブリドーマのクローニング

抗体価の上昇が確認されたマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞P3U1とを、5:1の割合でポリエチレングリコール法により細胞融合し、HAT選択培地で、ハイブリドーマの選択培養を行った。細胞融合10日目にハイブリドーマ培養上清を回収し、抗体価の測定を行った手法(前記(3)参照)と同様の手法でELISAを行い、CML-BSAとの反応性が陽性であり、CEL-BSAとの反応性が陰性である株のスクリーニングを行った。上記スクリーニングで陽性となったハイブリドーマの細胞数を測定後、1個/wellとなるように96ウェルプレートにまきこみ(サブクローニング)、10日後にシングルコロニーのウェルのみ再度スクリーニングを行った。同様にして、スクリーニングで陽性となったハイブリドーマについて再度サブクローニングを行い、性質が100%一致するまでスクリーニング操作を続けた。

40

#### 【0045】

その結果、CM化タンパク質と反応するがCE化タンパク質と反応しないモノクローナル抗体の産生細胞株2株(CMS-10, CMS-96)を得た。なお、ハイブリドーマCMS-10(名称:「Mouse-Mouse hybridoma CMS-10」)は、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば

50

市東1丁目1番3号)に、平成11年1月20日付でFERM P-17153として寄託されている。

【0046】

〔実施例2〕本発明のモノクローナル抗体の性質(CML及びCELの識別性)の検討

本実施例では、CMLに特異的なモノクローナル抗体産生細胞株CMS-10に関してCML及びCELに対する反応性の差を検討した。モノクローナル抗体産生細胞株に関してCMLとCELの反応性の相違を以下の方法で検討した。すなわち、実施例1の方法と同様の方法で作製したCML-BSA及びCEL-BSAをそれぞれ5 $\mu$ g/mlの濃度で炭酸緩衝液(pH 9.5)に溶解し、50 $\mu$ l/wellずつELISAプレートにコーティングした。その後、炭酸緩衝液(pH 9.5)に溶解した0.5%ゼラチン(200 $\mu$ l/well)でブロッキングした。CMS-10の細胞培養上清を50 $\mu$ l/well添加して1時間反応させたのち、HRP標識抗マウスIgG抗体を50 $\mu$ l/well添加して1時間反応させた。次に、1,2-フェニレンジアミンジヒドロクロライド(1,2-phenylenediamine dihydrochloride)を添加して発色反応を行い、492nmの吸光度をELISAリーダーによって測定した。

10

【0047】

この際、対照として、既存の抗CMLモノクローナル抗体である6D12(和光純薬工業)の培養上清を用いた。その結果、本発明のモノクローナル抗体(CMS-10)は、CML-BSAとは反応するが、CEL-BSAとは反応性を示さないことを確認した。一方、6D12は、CML-BSAおよびCEL-BSAとほぼ同等に反応し、両者を区別できないことが明らかとなった。従って、本発明のモノクローナル抗体は、明らかに既存の抗AGEモノクローナル抗体とは異なり、CMLにのみ特異的に反応し、CELとは反応しないことが分かった(図1)。なお、本発明のモノクローナル抗体のサブタイプは、市販のタイピングキットによりIgG1であることを確認した。

20

【0048】

〔実施例3〕既存の抗CMLポリクローナル抗体のCML及びCELに対する反応性

(1)免疫

1 mgの抗原(CML-KLH)を、50%のフロイントアジュバントと混合してエマルジョンを作製し、日本白兔の背中皮内に免疫した。2週間おきに4回追加免疫を行い、最終免疫の10日後、耳静脈より採血を行い、抗体価の確認を行った。その後、耳静脈より50ml採血を行い、血清を得た。

【0049】

(2)抗体の精製

BSAをホルミルセルロファイン(生化学工業)にカップリングさせ、BSAアフィニティークラム(2.0 $\times$ 12cm)を作製した。PBSで2倍に希釈したCML-BSA抗血清10mlを該カラムに供与し、その非吸着画分を、上記と同様に作製したCML-BSAアフィニティークラム(2.0 $\times$ 12cm)カラムに吸着させた。続いて、この吸着画分を0.1Mクエン酸(pH 3)で溶出し、溶出画分を1M TrisでpH 7.2に調製した後、PBSで24時間透析を行った。

30

【0050】

(3)ポリクローナル抗体の反応性

実施例1と同様の方法で得られたCML-BSAを0.1mM炭酸バッファー(pH9.6)に溶解し、1 $\mu$ g/mlとした。これを100 $\mu$ l/wellずつELISAプレートに加え、コーティングした。60分放置し、0.1% Tween 20を含むPBS(PBS-T)で3回洗浄した後、炭酸バッファー(pH9.6)に溶解した0.5%ゼラチン(200 $\mu$ l/well)でブロッキングした。再びPBS-Tで3回洗浄した後、各濃度の阻害物質(CML-BSAおよびCEL-BSA)50 $\mu$ lと5 $\mu$ g/mlのポリクローナル抗体を50 $\mu$ l/well添加して1時間反応させた。PBS-Tで3回洗浄した後、HRP標識抗ウサギIgG抗体を100 $\mu$ l/well添加して1時間反応させた。続いて1,2-フェニレンジアミンジヒドロクロライドを添加して発色反応を行い、O.D. 492nmをELISAリーダーによって測定した。その結果、既存の抗CMLポリクローナル抗体のCML-BSAに対する反応は、CEL-BSAによって強く阻害された。従って、既存のポリクローナル抗体は、CMLだけでなくCELをも認識してしまうことが判明した(図2)。

40

【0051】

〔実施例4〕抗CMLポリクローナル抗体の精製と各画分の反応性

50

## (1) 抗体の精製

CML-BSAをホルミルセルロファイン（生化学工業）にカップリングさせ、CML-BSAアフィニティーカラム（ $2.0 \times 12\text{cm}$ ）を作製した。PBSで2倍に希釈したCML-KLH抗血清10mlを該カラムに供与し、その吸着画分を0.1Mクエン酸（pH3）で溶出し、さらに溶出画分を1M TrisでpH 7.2に調製して抗CMLポリクローナル抗体を得た。次に、得られた抗CMLポリクローナル抗体（ $1530 \mu\text{g/ml}$ ）5mlを、CML-BSAアフィニティーカラムを作製したときと同様に作製されたCEL-BSAアフィニティーカラム（ $2.0 \times 12\text{cm}$ ）に供与した（図3）。その非吸着画分（画分番号12～35）、及び0.1Mクエン酸（pH 3）で溶出した溶出画分（画分番号50～65）を1M TrisでpH7.2に調製した後、PBSで24時間透析を行った。

【0052】

10

## (2) 各画分の反応性

吸着画分および非吸着画分に関してCML及びCELとの反応性の相違を以下の方法で検討した。すなわち、実施例1の方法と同様の方法で作製したCML-RNase及びCEL-RNaseおよび非修飾RNaseをそれぞれ $5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で炭酸緩衝液（pH 9.5）に溶解し、 $50 \mu\text{l/well}$ ずつELISAプレートにコーティングした。その後、炭酸緩衝液（pH 9.5）に溶解した0.5%ゼラチン（ $200 \mu\text{l/well}$ ）でブロッキングした。両画分を段階希釈し、 $50 \mu\text{l/well}$ 添加して1時間反応させたのち、HRP標識抗ウサギIgG抗体を $50 \mu\text{l/well}$ 添加して1時間反応させた。次に、1,2-フェニレンジアミンジヒドロクロライドを添加して発色反応を行い、492nmの吸光度をELISAリーダーによって測定した（図4および5）。その結果、CEL-アフィニティーカラム吸着画分はCML-RNase及びCEL-RNaseのいずれにも反応するのに対し（図4）、CEL-アフィニティーカラム非吸着画分はCML-RNaseとは反応するがCEL-RNaseと反応しないことから（図5）、非吸着画分に含まれている抗体は目的のものであることが分かった。

20

【0053】

## 〔実施例5〕抗CMLモノクローナル抗体の反応性

既存の抗CMLモノクローナル抗体である6D12（和光純薬工業）の反応性を以下の方法で検討した。実施例1と同様の方法で得られたCML-BSAを0.1mM炭酸バッファー（pH9.6）に溶解し、 $1 \mu\text{g/ml}$ とした。これを $100 \mu\text{l/well}$ ずつELISAプレートに加え、コーティングした。60分放置し、0.1% Tween 20を含むPBS（PBS-T）で3回洗浄した後、炭酸バッファー（pH9.6）に溶解した0.5%ゼラチン（ $200 \mu\text{l/well}$ ）でブロッキングした。再びPBS-Tで3回洗浄した後、各濃度の阻害物質（CML-BSAおよびCEL-BSA） $50 \mu\text{l}$ と $2 \mu\text{g/ml}$ の既存の抗CMLモノクローナル抗体（6D12、和光純薬工業）を $50 \mu\text{l/well}$ 添加して1時間反応させた。PBS-Tで3回洗浄した後、HRP標識抗マウスIgG抗体を $100 \mu\text{l/well}$ 添加して1時間反応させた。続いて1,2-フェニレンジアミンジヒドロクロライドを添加して発色反応を行い、O.D. 492nmをELISAリーダーによって測定した。その結果、既存の抗CMLモノクローナル抗体のCML-BSAに対する反応は、CEL-BSAによって濃度依存的に阻害された。従って、既存のモノクローナル抗体は、CMLだけでなくCELをも認識してしまうことが判明した（図6）。

30

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】本発明のモノクローナル抗体のCML-BSA又はCEL-BSAに対する反応性を示す図である。

40

【図2】既存の抗CMLポリクローナル抗体の反応性を示す図である。

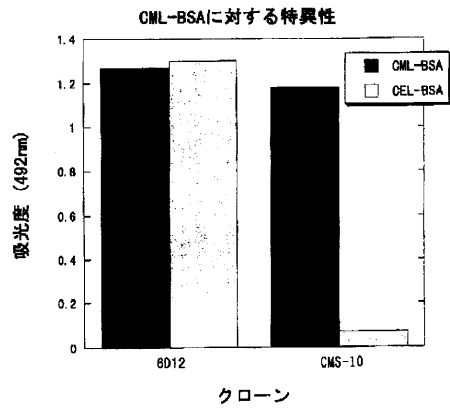
【図3】抗CMLポリクローナル抗体のCELアフィニティーカラムによる精製結果を示す図である。

【図4】CELアフィニティーカラム吸着画分の反応性を示す図である。

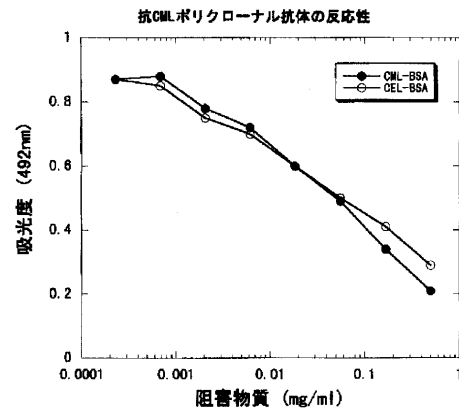
【図5】CELアフィニティーカラム非吸着画分の反応性を示す図である。

【図6】既存の抗CMLモノクローナル抗体の反応性を示す図である。

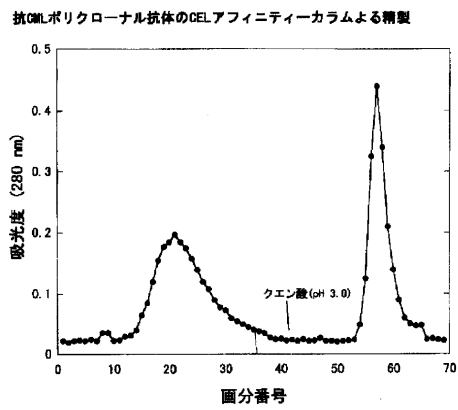
【図 1】



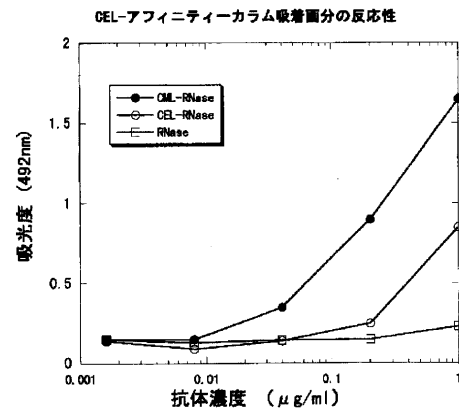
【図 2】



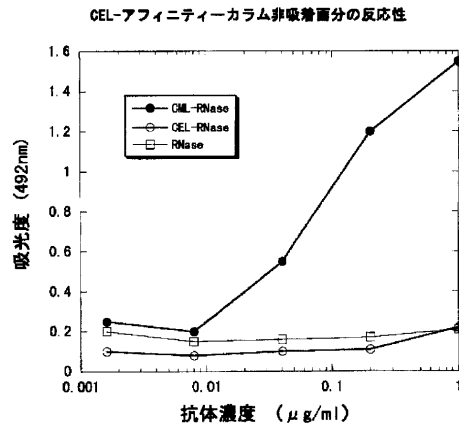
【図 3】



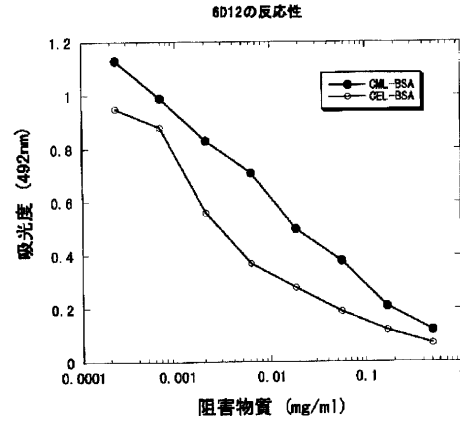
【図 4】



【 図 5 】



【 図 6 】



---

フロントページの続き

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA20 CC24 DA13  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA42 DA76 EA50

专利名称(译)	抗羧甲基化蛋白抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007277263A</a>	公开(公告)日	2007-10-25
申请号	JP2007183987	申请日	2007-07-13
申请(专利权)人(译)	转基因公司		
[标]发明人	堀内正公 永井竜児		
发明人	堀内 正公 永井 竜児		
IPC分类号	C07K16/40 C07K16/06 G01N33/53 G01N33/577 C12P21/08		
FI分类号	C07K16/40 C07K16/06 G01N33/53.D G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA50		
代理人(译)	小林 浩 片山英二		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供羧甲基化蛋白的抗体。解决方案：抗体与蛋白质或肽中存在的氨基酸反应，侧链上具有羧甲基化氨基，并且与侧链上具有羧乙基化氨基的氨基酸不反应。 Z

#### 【 図 2 】

