

(19)日本国特許庁 ( J P )

# (12) 公開特許公報 ( A )

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 268

( P2002 - 268A )

(43)公開日 平成14年1月8日 (2002.1.8)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード ( 参考 )
C 1 2 N 15/02	ZNA	C 0 7 K 14/805	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/805		16/18	4 B 0 6 4
16/18		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/53	K 4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08		33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L ( 全 16数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 194075(P2000 - 194075)

(22)出願日 平成12年6月28日(2000.6.28)

(71)出願人 000003182

株式会社トクヤマ

山口県徳山市御影町1番1号

(71)出願人 591258484

株式会社エイアンドティー

東京都日野市日野320番地の11

(72)発明者 三浦 圭介

東京都日野市日野320番地の11 株式会社エ

イアンドティー内

(72)発明者 岩本 久彦

東京都日野市日野320番地の11 株式会社エ

イアンドティー内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体

(57)【要約】 ( 修正有 )

【課題】 体液中の A G E のひとつであるカルボキシメチル化ヘモグロビン、特に腎症との関連性が確認されているリジン残基の側鎖アミノ基がカルボキシメチル化されたヘモグロビンを、高感度・高精度で再現性良く測定することの出来る免疫学的定量方法の提供。

【解決手段】 例えば、ハイブリドーマ 9 H 6 ( 生命研菌寄第 7 7 3 号 )、又はハイブリドーマ 7 B 8 ( 生命研菌寄第 7 7 4 号 ) によって産生される、特定な配列のアミノ酸配列を有し、N末端から 5 番目のリジン残基の側鎖アミノ基がカルボキシメチル化されたペプチド、又は別の特定な配列のアミノ酸配列を有し、N末端から 5 番目のリジン残基の側鎖アミノ基がカルボキシメチル化されたペプチドに対する解離定数が  $10^{-8}$  M 以下で、且つ解離速度定数が  $10^{-2}$  s<sup>-1</sup> 以下であるモノクローナル抗体を含んでなる免疫学的測定試薬を使用して、体液中のカルボキシメチル化ヘモグロビンを測定する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1のアミノ酸配列を有し、N末端から5番目のリジン残基の側鎖アミノ基がカルボキシメチル化されたペプチド、又は配列番号2のアミノ酸配列を有し、N末端から5番目のリジン残基の側鎖アミノ基がカルボキシメチル化されたペプチドに対する解離定数が $10^{-8}$ M以下で、且つ解離速度定数が $10^{-2}$ s<sup>-1</sup>以下であることを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項2】 請求項1記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項3】 請求項1記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とするカルボキシメチル化ヘモグロビンの免疫学的測定方法。

【請求項4】 請求項1記載のモノクローナル抗体を含んでなるカルボキシメチル化ヘモグロビン測定用免疫学的測定試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、カルボキシメチル化ヘモグロビンを特異的に認識し、且つ特定の解離定数及び特定の解離速度定数をもつモノクローナル抗体、該抗体産生細胞、該抗体を用いるカルボキシメチル化ヘモグロビンの免疫学的測定方法、並びに免疫学的測定試薬に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年、AGE（終末糖化産物）は、糖尿病性合併症の重篤度（Brownlee, M., et al, 1988, N. Engl. J. Med., 318: 1315-1321）や老化（Araki, N. et al, 1992, J. Biol. Chem., 267: 10211-10214）、慢性腎疾患（Miyata, T. et al, 1996, J. Am. Soc. Nephrol., 7: 1198-1206）、アルツハイマー病（Smith, M. A., et al, 1994, Prox. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 5710）等と関連があることが明らかになってきている。

【0003】AGE主要成分は、リジン残基の側鎖アミノ基がカルボキシメチル化されたカルボキシメチル化タンパク質（以下、カルボキシメチル化を単に「CM化」と称し、該タンパク質を「CM化タンパク」と略記することもある。）であり、CM化タンパクを構成するカルボキシメチル化リジン（以下、「CML」と略記することもある。）がAGEの主要エピトープであると考えられている（Ikeda, K., et al., 1996, Biochemistry, 35: 8075-8083）ことから、AGEの測定は、主にCMLを定量することにより行なわれている。

【0004】従来、CM化タンパクを構成するCMLの定量には高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィー/質量分析といった機器分析が用いられてきたが、操作が煩雑であり感度が低いという問題があった。そのため、最近では操作が簡便で感度も高い、ELISA法（酵素標識免疫測定法）やドットプロット法等の免疫学的測定方法を用いた手法が多用されている。

【0005】ところで、近年、AGEの一つであるカルボキシメチル化ヘモグロビン（以下、ヘモグロビンを単に「Hb」と略記し、カルボキシメチル化ヘモグロビンを「CM-Hb」と略記することもある。）は、糖尿病性合併症の進展との関連性（特開平10-185917号公報）や透析アミロイドーシスとの関連性（Motomiya, Y. et al, 1998, Kidney Int. 54: 1357-1366）が判明したことから、糖尿病性合併症、或いは透析アミロイドーシスの診断、治療、予防、或いはその薬効評価に有用な指標として注目されている。

【0006】該CM化ヘモグロビン（CM-Hb）の測定もELISA法やドットプロット法（Motomiya, Y. et al, 1998, Kidney Int. 54: 1357-1366）のような免疫学的測定方法を用いて測定することができるが、従来のCML測定で用いられている抗CM化タンパクポリクローナル抗体を使用した場合には、CM化タンパクの全てを認識することもあって特異性が低く、更に感度が低く測定精度も悪いという問題点があった。

【0007】このような問題は、特開平11-236399号公報に開示されているようなCM化ヘモグロビンに特異的に反応するモノクローナル抗体を使用することにより一応解決されている。

【0008】ところが、測定対象となるCM-Hbには、CM化される部位が異なる複数の種類、具体的には、ヘモグロビンの鎖N末端のバリン残基がCM化されたもの（以下、のタイプのもをCMV-Hbともいう。）、ヘモグロビン鎖のリジン残基がCM化されたもの、及びヘモグロビン鎖のリジン残基がCM化されたもの（及びのタイプのもを総称してCML-Hbともいう。）等があり、上記のタイプのCM-Hbの測定については上記公報に開示されているモノクローナル抗体を用いて特に問題なく測定できるものの、上記及びのタイプのCM-Hb（CML-Hb）の測定に関しては測定の再現性に問題があり、その結果として十分な測定感度や測定精度が得られないといった問題があることが判明した。

【0009】上記のタイプのCM-Hb（CMV-Hb）は、糖の自動酸化により生成するもので、糖尿病との関連性が確認されているのに対し、上記及びのタイプのCM-Hb（CML-Hb）は、脂質（不飽和脂肪酸）の過酸化により生成するもので腎症等との関連性が確認されているものであり、CML-Hb量を精度よく、高感度で測定することの意義は大きい。

## 【0010】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明は、CM化ヘモグロビンの中でも、特にCML-Hbを精度よく高感度で検出できるモノクローナル抗体を提供し、該モノクローナル抗体を使用してCML-Hbを高精度、高感度で測定する方法、及び測定試薬を提供することを目的とする。

## 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有し、N末端から5番目のリジン残基の側鎖アミノ基がCM化されたペプチド、又は配列番号2で示されるアミノ酸配列を有し、N末端から5番目のリジン残基の側鎖アミノ基がCM化されたペプチドに対して特定の解離定数及び特定の解離速度定数で反応する新規なモノクローナル抗体を得ることに成功し、該モノクローナル抗体を使用することによって、CML-Hbを精度良く高感度で測定することが可能になることを見出し本発明を完成させるに至った。

【0012】即ち、第一の本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を有し、N末端から5番目のリジン残基の側鎖アミノ基がカルボキシメチル化されたペプチド、又は配列番号2のアミノ酸配列を有し、N末端から5番目のリジン残基の側鎖アミノ基がカルボキシメチル化されたペプチドに対する解離定数が $10^{-8}$ M以下、且つ解離速度定数が $10^{-2}$ s $^{-1}$ 以下であることを特徴とするモノクローナル抗体である。

【0013】上記本発明のモノクローナル抗体は、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されたハイブリドーマMb66-9H6(FERM P-17900)又はハイブリドーマMb68-7B8(FERM P-17901)によって産生される。

【0014】また、第二の本発明は、上記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である。

【0015】また、第三の本発明は、上記本発明のモノクローナル抗体を用いることを特徴とするカルボキシメチル化ヘモグロビンの免疫学的測定方法であり、該測定方法は、例えば、第四の本発明である「上記本発明のモノクローナル抗体を含んでなるカルボキシメチル化ヘモグロビン測定用免疫学的測定試薬」を用いることにより好適に行なうことができる。

【0016】上記本発明の測定方法によれば、溶血試料等の検体中に存在するCM-Hb、特にCML-Hbを容易に、高感度・高精度で測定することができる。該方法では、被測定物である抗原に対し、解離定数だけでなく解離速度定数も特定の低い値を示す本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、このような優れた効果が発現するものである。

## 【0017】

【発明の実施の形態】本発明のモノクローナル抗体は、配列番号1のアミノ酸配列を有し、N末端から5番目のリジン残基の側鎖アミノ基がCM化されたペプチド(以下、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチドを「ペプチド66」といい、CM化された該ペプチドを「CM-ペプチド66」ともいう)、又は配列番号2のアミノ酸配列を有し、N末端から5番目のリジン残基の側鎖アミノ基がCM化されたペプチド(以下、配列番号2

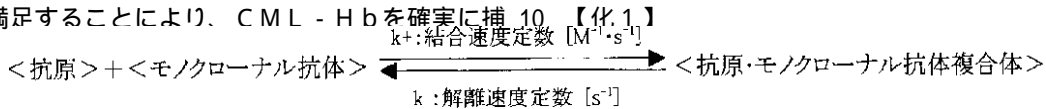
のアミノ酸配列を有するペプチドを「ペプチド61」といい、CM化された該ペプチドを「CM-ペプチド61」ともいう)に対して特異的に結合する。

【0018】前記配列番号1のアミノ酸配列は、ヘモグロビン(Hb)の鎖のN末端から62番目~73番目のアミノ酸配列に相当するもので、CM-ペプチド66においてはHbの鎖のN末端から66番目に相当する位置のリジン残基の側鎖アミノ基がCM化されている。また、前記配列番号2のアミノ酸配列は、Hbの鎖のN末端から57番目~68番目のアミノ酸配列に相当するもので、CM-ペプチド61においてはHbの鎖のN末端から61番目に相当する位置のリジン残基の側鎖アミノ基がCM化されている。

【0019】上記CM-ペプチド66及びCM-ペプチド61は、アミノ酸等から化学的に合成されたものでもよいし、タンパク質やより長鎖のペプチド由来の断片でもよい。これらペプチドを化学的に合成する場合は、例えば、固相法や液相等の公知の方法を用いて合成することが可能である。また、これらペプチドを化学的に合成する場合、予めCMLを用いてペプチドの伸長反応を行なってもよいし、アミノ酸を原料にしてペプチドの伸長反応を行なった後、CM-ペプチド66ではN末端から5番目、CM-ペプチド61ではN末端から5番目のリジン側鎖をCM化してもよい。なお、CMLを合成する方法は特に制限されないが、例えば、リジンをグリオキシル酸と反応させた後、水素化ホウ素ナトリウムや水素化シアノホウ素ナトリウム等の還元剤で還元してCMLを合成し、次いで陽イオン交換クロマトグラフィーにより側鎖アミノ基がCM化されたCMLを分離することができる。また、アミノ酸を原料にしてペプチドの伸長反応を行なった後に上記の特定のリジン残基をCM化する場合は、ペプチド66及びペプチド61は何れも2つのリジン残基を含むため、そのうちの1つを選択的にCM化するための工夫が必要である。例えば、固相法により合成する場合には、ペプチドの伸長反応に使用するリジンについて、CM化するリジンとして - アミノ基にピペリジン等の塩基で脱保護可能な9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基等を導入したものを用い、CM化しないリジンとして - アミノ基にフッ化水素酸等の強酸で脱保護可能な2-クロロベンジルオキシカルボニル(CI Z)基等を導入したものを用い、更にリジンの - アミノ基にはt-ブトキシカルボニル(Boc)基等の弱酸で脱保護可能な保護基を導入し、また、リジン以外のアミノ酸は、必要に応じて側鎖官能基には塩基で脱保護されない適当な保護基を導入し、 - アミノ基にはリジンと同様にt-ブトキシカルボニル(Boc)基等の弱酸で脱保護可能な保護基を導入する等して反応条件に応じて特定のアミノ基が保護されるようにする等の工夫が必要である。これらの保護基を導入したアミノ酸を使用して公知の方法でペプチ

ドの伸長反応を行なった後、ピペリジン等の塩基を使用してCM化するリジン残基における - アミノ基の保護基を脱保護する。次いで、上記の方法で脱保護したリジンの - アミノ基をCM化した後、フッ化水素酸等の強酸を使用して最終脱保護を行なえばよい。

【0020】本発明のモノクローナル抗体の前記CM-ペプチド 66又はCM-ペプチド 61に対する解離定数(K)が $10^{-8}$ M以下であり、且つ解離速度定数( $k_{-}$ )が $10^{-2} s^{-1}$ 以下である必要がある。このよう



【0023】で示される平衡反応における平衡定数であり、結合速度定数( $k_{+}$ )と解離速度定数( $k_{-}$ )を用いて、下記式

$$K = k_{+} / k_{-} \quad (M)$$

で定義されるもので、抗体と抗原の結合のし易さを相対的に示す指標である。

【0024】例えば、CM-ペプチド 66とモノクローナル抗体との抗原抗体反応により複合体が形成される反応について、CM-ペプチド 66、モノクローナル抗体、及び複合体の濃度をそれぞれ[P e]、[MA b]、及び[MA b · P e]とすると、ミカエリス-メンテン式により、解離定数Kは、次式

$$K = k_{-} / k_{+} = [P e] \times [MA b] / [MA b \cdot P e]$$

で表すことができ、新化学実験講座1・タンパク質V(東京化学同人、第1版、1991、p280-282)に記載されているスキャッチャードプロットやヒルプロット等の方法で求めることができる。最近、BIA-core(アマシャムファルマシア社)等の表面プラズモン共鳴(以下、「SPR」と表記することもある。SPR: surface plasmon resonance)の原理を応用した分子間相互作用解析装置等を用いることにより比較的簡単な操作で解離速度定数( $k_{-}$ )、及び結合速度定数( $k_{+}$ )を測定することが出来るようになり、上記式に基づき容易に解離定数(K)を求めることも可能となっている。以下に、SPRの原理を応用した該分子間相互作用解析装置について説明する。ガラスの三角プリズムに入射した光が界面で全反射する時反射面に金属薄膜が接触していると、表面プラズモン共鳴(SPR)によりある角度の入射光が吸収され、これに対応する反射光の強度が減衰する。減衰する反射光の反射角は、金属薄膜の外側に接している媒質層の屈折率に依存する。該分子間相互作用解析装置では、センサーチップ上に上記金属薄膜-媒質層に相当する金属薄膜-デキストラン薄層を持つが、該金属薄膜-デキストラン薄層に固定化されたりガンドに対してアナライトが結合するとデキストラン薄層-リガンド層の屈折率が変化する。該デキストラン薄層-リガンド層の屈折率は、該リガンドに対するアナライトの結合量に依存

捉することができるようになり、CML-Hbを高感度で再現性良く測定することが可能になる。なお、ここで、CML-Hbは、リジン残基の側鎖アミノ酸がCM化されていればよく、当該CML-Hbのバリン残基がCM化されていてもよい。

【0021】ここで、解離定数(K)とは、抗原とモノクローナル抗体とが結合して複合体を形成する下記反応式

【0022】

するため、該リガンドに対するアナライトの結合量は、センサーチップに隣接したガラスの三角プリズムに入射した光に対する減衰反射光の反射角に反映される。即ち、該減衰反射光の反射角をセンシングすることにより、リガンドとアナライトの結合量を測定することができる。従って、該分子間相互作用解析装置により、リガンドを固定化したセンサーチップに対してアナライトを反応させ結合量をリアルタイムで測定することにより、リガンドとアナライトの結合速度定数( $k_{+}$ )を求めることができる。更に、リガンドとアナライトの結合後、リガンド-アナライト複合体に対してアナライトを含まない緩衝液と接触させリガンドとアナライトの解離量をリアルタイムで測定することにより解離速度定数( $k_{-}$ )も求めることが出来る。BIA-core(アマシャムファルマシア)等の市販されている分子間相互作用解析装置では、プロトコルがほぼ自動化され、結合速度定数( $k_{+}$ )、及び解離速度定数( $k_{-}$ )も専用ソフトウェアによって容易に算出することが可能である。本発明においては、該リガンドとしてペプチドCM- 66、或いはCM-ペプチド 61等のペプチドを用いてセンサーチップに固定化し、該アナライトに本発明のモノクローナル抗体を用いることで、本発明のモノクローナル抗体の結合速度定数( $k_{+}$ )、及び解離速度定数( $k_{-}$ )を容易に求めることが出来る。

【0025】モノクローナル抗体のCM-ペプチド 66及びCM-ペプチド 61に対する解離定数Kが $10^{-8}$ Mを越える場合、又は解離速度定数 $k_{-}$ が $10^{-2} s^{-1}$ を越える場合には、抗体とこれらペプチドとの結合が不安定となるために上記CML-Hbを再現性良く測定することが困難になる。特に、解離定数Kが $10^{-8}$ Mを越える場合は、該モノクローナル抗体と該ペプチドの結合能が低下するため測定感度が低下する。効果の観点からCM-ペプチド 66又はCM-ペプチド 61に対する解離定数K、及び解離速度定数 $k_{-}$ はそれぞれ $6 \times 10^{-9}$ M以下、及び $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以下であるのが好適である。

【0026】本発明のモノクローナル抗体は、CM-ペ

プチド 66又はCM-ペプチド 61に特異的に反応するものであれば、そのタイプ(グロブリンクラス)は特に限定されず、現在知られているどのようなグロブリンクラスのものも含まれる。また、本発明でいうモノクローナル抗体とは、通常モノクローナル抗体のみならず、該抗体の部分分解物(Fab、Fab'、Fab'2等)、及び該抗体の活性フラグメント(抗体の抗原認識部位)が存在する部分構造等も含むものである。

【0027】本発明のモノクローナル抗体の製造方法は特に限定されないが、免疫用の抗原(以下、単に「免疫原」ともいう。)を動物に免疫した後に、免疫動物からCM-ペプチド 66或いはCM-ペプチド 61に対する特異抗体を産生する細胞を選択分取し、分取した細胞を好適な培地で培養して製造する方法;又は分取した上記の抗体産生細胞を形質細胞腫細胞と融合させてハイブリドーマとし、該ハイブリドーマを培養したり或いは動物体内に移植して増幅させて製造する方法等により好適に製造することが出来る。

【0028】この時、免疫原としては、CM-Hb、又はCM-ペプチド 66、或いはCM-ペプチド 61とハプテンの複合体等を使用することができる。この時使用されるハプテンを例示すると、ヒト血清アルブミン、或いは牛血清アルブミン等のタンパク質等が好適に使用される。CM-Hbは、Hbのアミノ酸側鎖アミノ基又はN末端アミノ基の水素をカルボキシメチル基に置換することにより得ることができる。このCM化の方法としては公知の方法が何ら制限なく使用でき、例えば「新化学講座1、タンパク質4」(日本生化学会編、1991、東京化学同人、p13-p16)に記載されている還元アルキル化法により行うことが出来る。即ち、アルデヒド化合物とHbをホウ酸緩衝液やリン酸緩衝液等の水溶液に溶解し、水素化ホウ素ナトリウムや水素化シアノホウ素ナトリウム等の水素化物還元剤の存在下でpH8~10の条件で反応させることによりCM化することができる。これより高いpH条件下であるとタンパク質等が変性する恐れがあり、これより低いpH条件下であると水素化物還元剤が不安定になる。該反応を特異的且つ定量的に進行させるために、反応温度は室温以下が好ましいが、さらに好ましくは0~10で行うのが良い。得られたCM-Hb溶液は透析や限外濾過を行い、未反応の還元剤やアルデヒド化合物を除去して用いられる。

【0029】以下に、本発明のモノクローナル抗体を製造することが出来るハイブリドーマ(以下、「本発明のハイブリドーマ」ともいう。)を用いて本発明のモノクローナル抗体を製造する方法について具体的に説明する。ここで、ハイブリドーマとは種類の異なる二つの細胞(親株)を人工的に融合させてできる雑種細胞のことで、例えば、培養できるように樹立してある形質細胞腫細胞と、生体からとった抗体産生細胞とを融合させることにより作ることが出来る。該ハイブリドーマは培養可

能であり、しかも抗体産生能を持つ。

【0030】本発明のハイブリドーマは、一般に動物の免疫、細胞融合、融合細胞の選択、特異抗体産生細胞の選択、及びクローニング等の一連の工程を経て調製することができる。

【0031】動物の免疫は、上記のようにして得られたCM-Hb等を免疫原として動物に免疫することにより行われる。免疫に際して使用される免疫原の形態は特に制限されないが、免疫効果を高めるためにフロイントの完全アジュバントと混合したものをを用いるのが好適である。免疫動物としては、哺乳動物が好ましく、例えばマウス、モルモット、ラット、ウサギ、ヒツジ、ニワトリ等があげられるが、扱いやすさの点からマウスが特に好ましい。免疫方法は、周知の適当な方法を適宜組み合わせ実施できる。通常は、動物の皮下、筋肉内、腹腔内の少なくとも1箇所以上に免疫原を注射することによって行われるが、形質細胞腫細胞と抗体産生細胞を高い確率で融合させるためには皮下、特に四肢のリンパ節に免疫原を注射することがより好ましい。初回免疫から約1~2週間毎に数回免疫を行い、最終免疫より約3~5日後に免疫動物から抗体産生細胞を分取する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞やリンパ節B細胞等の抗体産生能を有する細胞を摘出すればよい。

【0032】次に、細胞融合以降の工程について説明する。細胞融合することによりハイブリドーマを作製する際に必要なもう一方の親株である形質細胞腫細胞としては、一般に骨髓腫(ミエローマ)細胞が用いられる。骨髓腫細胞としては、例えばマウス由来のP3U1、653、SP2、X63-Ag8、NS-1、MPC-11等、ラット由来のAG1、AG2、AG3、RCY3、210等、ヒト由来のSKO-007等が使用できるが、マウス由来のものが好ましく、入手の容易さや実績等から特にP3U1、653が好ましい。さらには、抗体産生細胞と骨髓腫細胞とは同種動物由来であることが好ましい。

【0033】細胞融合は、ポリエチレングリコールを用いる方法、センダイウイルスを用いる方法、電気融合等が使用できるが、KohlerとMilsteinの方法(1975、Nature、256:495-497)、又はこれに準じるポリエチレングリコールを用いた方法は操作が簡便であり好ましい。該方法は、30~50%ポリエチレングリコール(平均分子量1,000~4,000)を用いて30~40の温度で、抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを1~10分間混合することによって行われる。細胞融合により得られるハイブリドーマの選択は、ハイブリドーマのみが生育できる選択培地中で培養することにより行うことができる。例えばHAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)培地、Haz(ヒポキサンチン-アザセリン)培地が好ましいものとして挙げられる。例えばHAT選択方法は、細胞融合に前記のようなHGPRT(ヒ

ポキサンチン - グアニン ホスホリボシル トランスフェラーゼ) 欠損株であるミエローマ細胞を用いた場合に有効である。細胞融合後HAT培地で培養することにより、HGPRト欠損株のミエローマ細胞はアミノプテリンで生育が阻害され、アミノプテリンに耐性のハイブリドーマのみを選択的に増殖させることができる。

【0034】このようにして得られたハイブリドーマの中から、CM-ペプチド66、或いはCM-ペプチド61に対し特異的に反応し、解離定数(K)が $10^{-8}$ M以下、且つ解離速度定数( $k_{-1}$ )が $10^{-2} s^{-1}$ 以下のモノクローナル抗体を産生しているものを選択する。この選択は以下に行なう。CM-ペプチド66、或いはCM-ペプチド61に対する特異性については、上記培養によりハイブリドーマの増殖が認められたウェルの培養上清中を採取し、CM-ペプチド66或いはCM-ペプチド61に対する抗体の有無を、例えば、ELISA法のような酵素免疫測定法等によって調べればよい。また、解離定数(K)、及び解離速度定数( $k_{-1}$ )については、CM-ペプチド66、或いはCM-ペプチド61に対する反応性が確認されたハイブリドーマ株のウェルの培養上清を用いて、前述したようなBIA-core等の分子間相互作用解析装置を用いて測定を行なえばよい。続いて、CM-ペプチド66或いはCM-ペプチド61に対する抗体が存在しているウェル中のハイブリドーマをクローニングすればよい。クローニングとは、上記特異抗体産生細胞をひとつのクローンに由来する均一な細胞集団にすることであり、例えば限界希釈法、ソフトアガロース上のコロニーを拾い上げる方法、シングルセルマニピュレーション法、FACS法等が挙げられるが、限界希釈法が簡便で好ましい。

【0035】以上の方法により単一なモノクローナル抗体産生細胞を選択することができる。選択されたハイブリドーマ細胞株は、2~10mlの培地で増殖させ液体窒素中で凍結保存しておくことができる。尚、本発明のハイブリドーマのひとつであり、CM-ペプチド66に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ9H6は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託され、2000年6月14日に「ハイブリドーマ Mb66-9H6」{寄託番号：生命研菌寄第773号(FERM P-17900)}として受託された。又、本発明のハイブリドーマのひとつであり、CM-ペプチド61に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ7B8は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託され、2000年6月14日に「ハイブリドーマ Mb68-7B8」{寄託番号：生命研菌寄第774号(FERM P-17901)}として受託された。

【0036】本発明のハイブリドーマを用いた本発明のモノクローナル抗体の作製方法としては、ハイブリドーマを用いた抗体の作製方法として従来公知の方法が何ら制限なく使用できる。例えば、ハイブリドーマを動物の

腹腔内に移植し増幅させ、腹水を回収することによってモノクローナル抗体を作製することができる。このようにして得られた抗体は、必要に応じて精製して使用することができる。精製法としては、例えば硫酸アンモニウム分画法、ポリエチレングリコール分画法、エタノール分画法、プロテインAカラムあるいはプロテインGカラム等を用いたアフィニティークロマトグラフィー法、イオン交換カラムクロマトグラフィー法、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー法、電気泳動法等の常法を用いることにより精製することができる。これらの中でアフィニティークロマトグラフィー法が好ましく、特にプロテインAカラムを用いる方法が好ましい。

【0037】このようにして得られた本発明のモノクローナル抗体を用い、抗原抗体反応を利用して体液等の検体中のCM-Hb、特にCML-Hbを高感度・高精度で測定することができる。本発明のモノクローナル抗体を用いてこれらCM-Hbを測定する方法は、特に限定されないが、本発明のモノクローナル抗体を含んでなるCM-Hb測定用免疫学的測定試薬(以下、本発明の免疫学的測定試薬ともいう。)を用いることにより好適に行なうことができる。

【0038】本発明の免疫学的測定試薬は、本発明のモノクローナル抗体を含み、該抗体と検体中のCML-Hbとの抗原抗体反応を利用して検体中のCML-Hbを定性的、又は定量的に測定できるものであれば特に限定されず、各種免疫学的測定方法に応じて様々な形態のものが挙げられるが、通常は、(i)本発明のモノクローナル抗体或いは放射性物質、各種色素類、コロイド類、酵素等の標識物質で標識した本発明のモノクローナル抗体を不溶性担体に担持したものの、(ii)本発明のモノクローナル抗体と反応する抗原或いは標識した該抗原を不溶性担体に担持したものと本発明のモノクローナル抗体或いは標識した本発明のモノクローナル抗体との組み合わせからなるもの、(iii)標識した本発明のモノクローナル抗体、又は(iv)本発明のモノクローナル抗体と標識した二次抗体との組み合わせからなるもの等である。

【0039】例えば、抗原抗体反応に基づく不溶性担体の凝集反応を利用して検体中のCML-Hbを検出する所謂免疫凝集法を採用する場合には、上記(i)又は(ii)の本発明の免疫学的測定試薬を用いて行なうことができる。また、抗原抗体反応を行った後に標識物質に由来する放射性、酵素活性等の物性を測定することによって、検体中のCML-Hbを検出する所謂標識免疫測定法を採用する場合には、上記(ii)~(iv)の本発明の免疫学的測定試薬を用いて行なうことができる。

【0040】なお、上記不溶性担体としては、通常の免疫測定用の担体として用いられるガラス；多糖類或いはその誘導体；シリカゲル；多孔性セラミックス；金属酸化物；赤血球；ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル等の合成樹脂；又

はこれらに公知の方法によりスルホン基、アミノ基等の反応性官能基を導入したものが挙げられ、その形状としてはビーズ状、テストプレート状、球状、ディスク状、チューブ状、フィルター状等が例示できる。一般に、免疫凝集法で使用する試薬においては、凝集の起こりやすさや凝集の判別のしやすさなどの観点から、平均粒径が0.05~10 $\mu\text{m}$ の不溶性担体が使用される。

【0041】これら不溶性担体に本発明のモノクローナル抗体又はその抗原を担持（固定化）する方法としては、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法、架橋法等の公知の方法が何ら制限なく使用できる。例えば不溶性担体（固相）としてマイクロプレートを用いた場合、モノクローナル抗体の溶液をマイクロプレートのウェルに注入し1~48時間反応させることによって吸着により担持させることができる。

【0042】不溶性担体に担持する、本発明のモノクローナル抗体等の被担持物質の量は、試薬の形態によって若干異なる。例えば、免疫凝集法で使用する試薬においては、通常、不溶性担体1gに対して、本発明のモノクローナル抗体を0.001~100mg担持される。また、標識免疫測定試薬においては、一般に不溶性担体の表面積当たり0.01~1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の割合で、試薬形態に応じた被担持物質が担持される。

【0043】また、本発明の免疫測定試薬において使用される標識物質としては、放射性物質としては放射性ヨード、放射性炭素等が使用でき；色素としてはフルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミン等の蛍光色素類が使用でき；コロイドとしては金コロイド等が使用でき；更に酵素としてはペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等が使用できる。かかる標識物質は、それぞれの種類に応じて、放射能、比色、蛍光、発光等を利用して検出される。

【0044】なお、これら標識物質で標識する方法は抗原抗体反応に悪影響を与えない方法であれば特に限定されず、公知の方法が制限無く採用できる。たとえば、ペプチドやタンパクを直接酵素標識したり、ビオチン化抗Hb抗体でCML-Hbを認識・結合させ、次いでアビジンを介して酵素標識する等の方法が採用される。

【0045】本発明の免疫学的測定試薬の種類を具体的に例示すれば、定性試薬としてはラテックス凝集試薬、マイクロタイター試薬等が、定量試薬としてはラジオイムノアッセイ試薬、エンザイムイムノアッセイ試薬、蛍光イムノアッセイ試薬、化学発光イムノアッセイ試薬、ラテックス定量試薬等が挙げられる。

【0046】これら本発明の免疫学的測定試薬を用いて検体中のCML-Hbを測定する方法は、測定試薬として本発明の免疫学的測定試薬を用いる点、及び検体として血液等のCML-Hbを含み得るものを用いる点以外は、従来の免疫学的測定方法と特に変わる点はない。

【0047】例えば、免疫凝集法を採用する場合には、

目的に応じて、定性分析の場合にはラテックス凝集法、マイクロタイター法等の一般的手順に従い、定量分析の場合にはラテックス定量法等の一般的手順に従い行なえばよい。すなわち、その基本操作は、通常の検定法、例えば赤血球凝集反応法、受身凝集反応法、免疫比濁法、免疫比濁法等に従い、不溶性担体に本発明のモノクローナル抗体を担持した感作粒子が0.001~15重量%となるように水性媒体に分散させたものを有効成分とする試薬を検体と接触させた後に該感作粒子の凝集の度合を目視、光学的測定等により測定すればよい。

【0048】また、標識免疫測定法についても、定量分析を行なう場合には、ラジオイムノアッセイ法（RIA法）、エンザイムイムノアッセイ法、蛍光イムノアッセイ法、化学発光イムノアッセイ法等の一般的手順に従い、半定量分析を行なう場合にはウエスタンブロットティング法、ドットブロットティング法等の一般的手順に従い、それぞれ公知の非競合法や競合法、サンドイッチ法等に準じて行なえばよい。

【0049】例えば標識免疫測定法における非競合法を例示すると、既知量のHbを含む検体由来のHb成分を固定化した固相に対し、標識された本発明のモノクローナル抗体を反応させ、洗浄した後、固相に結合した標識物質に由来する物性を測定する方法を例示することができる。該方法では、固定化されたHb成分の中で、CML-ペプチド66或いはCML-ペプチド61の配列を含むCML-Hb、即ちCML-Hbのみが本発明のモノクローナル抗体と反応するので、反応及び洗浄後の上記物性値が大きいほど、固相に結合した本発明のモノクローナル抗体の量が多いことになり、該残存活性等を測定することにより検体中のCML-Hb量を測定することができる。

【0050】また、競合法を例示すると、本発明のモノクローナル抗体を固定化した固相に対し、既知量の人工的に作製した標識されたCML-Hb（以下標準CML-Hbともいう。）と検体とを競合的に反応させ、洗浄した後、固相について酵素活性、放射活性等の標識物質に由来する物性を測定する方法を例示することができる。該方法では、測定されるこれら物性値の値が低いほど、検体中のCML-Hbによって上記標準CML-Hbの結合が競合的に阻害されたことになり、検体中に多くのCML-Hbが含まれていることになる。

【0051】更にサンドイッチ法を例示すると、本発明のモノクローナル抗体等の抗CML-Hb抗体（抗CML-Hb抗体1ともいう。）を既知量固定化した固相と検体とを接触させた後、さらに標識された抗CML-Hb抗体（抗CML-Hb抗体2ともいう。）と接触させ、標識物質に由来する物性を測定する方法が例示できる。該方法では、検体中のCML-Hb量に対応する量の抗CML-Hb抗体2が固定化されるので、上記物性値を測定することによりが検体中のCML-Hb量を知

ることができる。なお、該方法では、抗CML-Hb抗体1又は2のいずれか一方が本発明のモノクローナル抗体であればよいが、測定精度・測定感度の点から両方が本発明のモノクローナル抗体であるのが好適である。

#### 【0052】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明について具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0053】実施例1〔CM-ペプチド66に対する解離定数が $10^{-8}$ M以下で且つ解離速度定数が $10^{-2}$ s $^{-1}$ 以下である本発明のモノクローナル抗体〕

#### (1)〔抗原の作製〕

以下の方法によりCML-Hbの生成及び精製を行った。Hb(SIGMA社)をホウ酸緩衝液(0.1M、pH9.0)中1mg/mlとなるように調製し、この溶液200mlを室温で2時間、1Mグリオキシル酸溶液180mlと共に攪拌後、さらに室温で2時間、10mg/ml水素化シアノホウ素ナトリウム溶液20mlと共に攪拌することでCML-Hbを生成した。さらにリン酸緩衝液(3.3mM、pH7.4)中で透析膜を用いて20時間透析後、限外濾過を行い精製CML-Hbを得た。

#### 【0054】(2)〔CM化ペプチドの作製〕

ペプチド66、ペプチド61は、ペプチド合成装置を用いて固相法により合成した。アミノ酸のアミノ基の保護はt-ブトキシカルボニル基(Boc)を用い、C末端の保護基として不溶性の高分子担体であるプラリドキシムレジン(Pam resin)を用いた。アミノ酸の側鎖官能基にはそれぞれの官能基に準じて適当な保護基を導入した。尚、後にCM化を施すHb鎖66番目(本発明の30アミノ酸配列1のN末端から5番目)に相当する、或いはHb鎖61番目(本発明のアミノ酸配列2のN末端から5番目)に相当するリジンの-アミノ基の保護には9-フルオレニルメトカルボニル基(Fmoc)を、CM化を施さないリジンの-アミノ基の保護には2-クロロベンジルオキシカルボニル基(CIZ)を使用した。0で1.5時間、20%ピペリジン/ジクロロメタン溶液で処理することで9-フルオレニルメトカルボニル基(Fmoc)を除去した後、0で1.5時間フッ化水素処理することで固相樹脂よりペプチドを切り離すと同時に40残りの保護基を除去し、次いで、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製してペプチド66、ペプチド61を得た。

【0055】CM-ペプチド66は、ペプチド66と同様に適当な保護基を導入したアミノ酸を用いてペプチドの伸長反応を行なった後、0で1.5時間、20%ピペリジン/ジクロロメタン溶液で処理することで9-フルオレニルメトカルボニル基(Fmoc)を除去した。次いで、ジクロロメタン中0で2時間グリオキシル酸と反応後、さらに2時間水素化シアノホウ素ナトリウム

と反応することで、該ペプチドのHb鎖66番目のリジン残基の-アミノ基に相当する部位だけをCM化した。0で1.5時間フッ化水素処理することで固相樹脂よりペプチドを切り離すと同時に保護基を除去して、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製し、CM-ペプチド66を得た。CM-ペプチド66の純度は質量分析及びアミノ酸分析により確認した。

【0056】CM-ペプチド61については、CM-ペプチド66と同様にして該ペプチドのHb鎖61番目のリジン残基の-アミノ基に相当する部位だけをCM化したCM-ペプチド61を得た。

【0057】Hbの鎖N末端のバリン残基を含むペプチド(アミノ酸配列:Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys、以下「ペプチドN」と表記することもある)も、ペプチド合成装置を用いて固相法により合成した。アミノ酸のアミノ基の保護はt-ブトキシカルボニル基(Boc)を用い、C末端の保護基として不溶性の高分子担体であるプラリドキシムレジン(Pam resin)を用いた。アミノ酸の側鎖官能基にはそれぞれの官能基に準じて適当な保護基を導入した。尚、Hbの鎖N末端に相当するバリンには-アミノ基をt-ブトキシカルボニル基(Boc)で保護していないものを使用した。ペプチドの伸長反応の後、0で1.5時間フッ化水素処理することで固相樹脂よりペプチドを切り離すと同時に残りの保護基を除去し、次いで、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製してペプチドNを得た。

【0058】HbのN末端のバリン残基だけがCM化されたペプチド(アミノ酸配列:(CM)Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys、以下「CM-ペプチドN」ともいう)は、ペプチドNと同様にペプチドの伸長反応を行なった後、CM-ペプチド66、及びCM-ペプチド61と同様にしてCM化を行ない、該ペプチドのHbN末端バリン残基の-アミノ基に相当する部位だけをCM化したCM-ペプチドNを得た。

#### 【0059】(3)〔マウスの免疫〕

上記の方法で精製されたCML-Hbを、リン酸緩衝生理食塩水(以下「PBS」と略記することもある)に0.2mg/mlとなるよう希釈後、フロイントの完全アジュバントと等量混合し、BALB/c(雌、5週令)一匹当り0.2mlを腹腔内投与することによって初回免疫した。以後2週間間隔で3回、CML-HbのPBS溶液をフロイントの不完全アジュバントと等量混合した溶液を、マウス1匹当り0.2ml腹腔内投与し追加免疫を行った。最後の追加免疫の2週間後、CML-HbのPBS溶液0.1mlを静脈内投与することにより最終免疫した。

#### 【0060】(4)〔細胞融合〕

上記の方法で最終免疫を行った3日後に免疫マウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞を10%ウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI-1640培地に懸濁した。一方、

マウスミエローマ細胞P3U1を10%FCS含むRPMI-1640培地で培養し、対数増殖期で細胞を集め細胞融合に用いた。マウス脾臓細胞とP3U1をそれぞれ血清を含まないRPMI-1640培地で3回洗浄した後、5:1の比率で混合し、1,500rpmで5分間遠心して培地を除去した。細胞沈殿物に50%ポリエチレングリコール1500を0.5ml徐々に加え、1,800rpmで8分遠心した。次に血清を含まないRPMI-1640培地20mlを徐々に加えた後、1,500rpmで5分間遠心して上清を除去した。沈殿した細胞をHAT培地(1×10<sup>-4</sup>Mヒポキサンチン、4×10<sup>-7</sup>Mアミノプテリン、1.5×10<sup>-5</sup>Mチミジン、20%FCSを含むRPMI-1640培地)50mlに懸濁し、96ウェルマイクロプレートの各ウェルに0.1mlずつ分注した。この融合細胞を5%CO<sub>2</sub>、37℃で培養した。細胞融合の1日後に各ウェルに0.1mlずつHAT培地を加えた。7~10日後に増殖したハイブリドーマのコロニーが観察された。ハイブリドーマが増殖してきたウェルは全部で235ウェル(53%)であった。

#### 【0061】(5)〔スクリーニング〕

ハイブリドーマが十分増殖したウェルの上清を採取し、以下のようにしてELISA法を行うことにより、CM-ペプチド66に対する抗体を産生しているハイブリドーマを選択した。

【0062】上記の方法で得られたCM-ペプチド66をPBSで5μg/mlの濃度に希釈し、96ウェルのEIA用マイクロプレートに1ウェル当たり50μlずつ分注し、4℃で一晩インキュベーションした。マイクロプレートからCML-Hb溶液を除去し、0.05% Tween 80を含むPBS(以下「T-PBS」と略記することもある)で3回洗浄した後、各ウェルに1%ウシ血清アルブミンを含むPBS(以下「B-PBS」と略記することもある)を250μl加え4℃に保存し抗原吸着プレートとして以後の操作に用いた。抗原吸着プレートをT-PBSで3回洗浄し、ハイブリドーマ培地上清をそれぞれのウェルに100μlずつ加え37℃で1時間インキュベーションした。その後培地上清を除去し、T-PBSで3回洗浄した後、二次抗体溶液を各ウェルに100μlずつ加え37℃で1時間インキュベーションした。二次抗体としては、ペルオキシダゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体(カッセル社)をB-PBSで500倍希釈して用いた。二次抗体溶液を除去し、T-PBSで3回洗浄した後、発色基質溶液を各ウェルに100μlずつ加え室温で30分間インキュベーションした。発色基質溶液は、0.01%過酸化水素、0.3mg/ml ABTS、[2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)二アンモニウム]、を含む0.1Mクエン酸緩衝液(pH5.0)を用いた。適当量の発色を確認後に1%SDSを各

ウェルに加え反応を停止し、波長410nmでの吸光度を測定した。

【0063】(6)〔ハイブリドーマのクローニング〕上記の方法のスクリーニングによってCM-ペプチド66と強く反応するハイブリドーマを選択し、限界希釈法によりクローニングを行った。ハイブリドーマを20%FCSを含むRPMI-1640培地で0.5個/0.1mlの濃度となるように希釈し、96ウェルマイクロプレートの各ウェルに0.1mlずつ分注した。この細胞を5%CO<sub>2</sub>、37℃で培養した。ハイブリドーマが単一のコロニーで増殖してきたウェルの培養上清について、上記の方法と同様にしてELISA法を行い、CM-ペプチド66に対する抗体を産生しているハイブリドーマを選択した。その中でCM-ペプチド66と最も強く反応するモノクローナル抗体を安定的に産生するハイブリドーマとして9H6を得た。得られたハイブリドーマ9H6は、「ハイブリドーマMb66-9H6」として工業技術院生命工学工業技術研究所へ寄託した(寄託番号:生命研菌寄第773号(FERM P-17900))。

#### 【0064】(7)〔モノクローナル抗体の免疫グロブリンクラス〕

ELISA法によるモノクローナル抗体タイピングキット(アメリカン・コ・レックス社)を用い、ハイブリドーマ培養上清中の抗体の免疫グロブリンクラスを調べた。このキットはマウス免疫グロブリンの各クラス、サブクラスに特異的なウサギIgG抗体を用いて、上記のようなELISA法に準じた方法で免疫グロブリンクラスを調べるものである。ハイブリドーマ9H6が産生するモノクローナル抗体の免疫グロブリンクラスはIgGであった。

#### 【0065】(8)〔モノクローナル抗体の調製〕

ハイブリドーマ9H6株、10%FCSを含むRPMI-1640培地で培養した。ハイブリドーマの培養上清に等量の飽和硫酸アンモニウムを加え、遠心分離し沈殿を分取した。この沈殿を少量の10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)に溶解させ、同じ緩衝液に対して透析した。透析後遠心分離し不溶物を除き、これをDEAE-セルロースカラムにかけた。緩衝液で洗浄後、食塩濃度勾配により溶出しIgG画分を分取した。この画分をゲル濾過HPLCカラム(バイオラッド社、Bio-Sil TSK 250)にかけ、クロマトグラフィーを行うことにより精製モノクローナル抗体を得た。

#### 【0066】(9)〔モノクローナル抗体の性質〕

BIA-core(アマシャムファルマシア社)のセンサーチップ上に、前記方法で作製した各種ペプチド(ペプチド66、ペプチド61、ペプチドN)、およびこれらをCM化して得られた各種CM化ペプチド(CM-ペプチド66、CM-ペプチド61、及びCM-ペプチドN)を、C末端システイン残基を利用してチオールカッ

ブリッジ法により固定した。チオールカップリングに用いる試薬及び操作はBIA-core用キット及び通常の操作手順に従った。センサーチップ表面に固定されたペプチド量は5 ~ 6 ng / mm<sup>2</sup>であった。ハイブリドーマ9 H 6 が産生するモノクローナル抗体をH E P E S 緩衝液 (pH 7 . 4、0 . 15 M NaCl) に50 μg / ml となるよう溶解し、10 μl / min . の流速で30 μl の\*

\*該抗体溶液をセンサーチップに注入し、センサーチップに固定化したそれぞれのペプチドと該モノクローナル抗体との解離速度定数、及び解離定数を調べた。測定及び解析はBIA-coreでの通常の操作手順に従った。結果を表1に示す。

【0067】

【表1】

ペプチド	解離定数	解離速度定数
ペプチドβ66	> 1 x 10 <sup>-3</sup> M	> 1 x 10 <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
ペプチドα61	> 1 x 10 <sup>-3</sup> M	> 1 x 10 <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
ペプチドβN	> 1 x 10 <sup>-3</sup> M	> 1 x 10 <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
CM-ペプチドβ66	5.46 x 10 <sup>-9</sup> M	2.37 x 10 <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup>
CM-ペプチドα61	> 1 x 10 <sup>-3</sup> M	> 1 x 10 <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
CM-ペプチドβN	> 1 x 10 <sup>-3</sup> M	> 1 x 10 <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>

【0068】表1に示されるようにハイブリドーマ9 H 6 が産生するモノクローナル抗体は、CM - ペプチド 66 と特異的に反応し、その解離定数Kは5 . 46 x 10<sup>-9</sup> M、解離速度定数k<sub>1</sub>は2 . 37 x 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>であった。他のCM化 (CM - ペプチド 61、CM - ペプチド N) 及びCM化していないペプチド (ペプチド 66、ペプチド 61、ペプチド N) とは反応しなかった (解離定数: 何れも1 x 10<sup>-3</sup> M以上、解離速度定数: 何れも1 x 10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>以上)。

【0069】実施例2 [実施例1で得たモノクローナル抗体を含むラテックス凝集試薬を用いた検体中のCM - H bの測定]

(1) 実施例1で得たモノクローナル抗体担持ラテックス懸濁液(甲剤)の調製

平均粒径0 . 32 μm、ラテックス濃度1% (w / v) となるように、pH7 . 2の20 mMリン酸緩衝液にポリスチレン粒子 (藤倉化成 (株) 製) を懸濁した。この粒子懸濁液1 ml とpH7 . 2の20 mMリン酸緩衝液で0 . 3 mg / ml となるように希釈した、実施例1で得たモノクローナル抗体 (9 H 6) 溶液1 ml とを混合し、37 °Cで1時間振とうした。その後、0 . 3% (w / v) の牛血清アルブミン(オリエンタル酵母 (株) 製: fraction V) を含むpH7 . 2の20 mMリン酸緩衝液2 ml を添加し、更に37 °Cで2時間振とうした。次いで、遠心分離により得られた沈さに、100 mM塩化ナトリウムと0 . 1% アジ化ナトリウムを含むpH7 . 5の100 mMトリス緩衝液 (以下、この混合溶液をTB\*

\*Sと略す。) 4 ml を加えて懸濁し、甲剤を調製した。

【0070】(2) 検体 (溶血試料) の調製

糖尿病患者より採血し、CML - H bを含む全血20 μl に、2% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む精製水980 μlを加えて溶血し、次いで精製水で更に100倍に希釈して、5000倍の溶血試料を調製した。本溶血試料を検体として以下の測定に使用した。

【0071】(3) 検体希釈液 (乙剤) の調製

1 . 7% (w / v) ポリエチレングリコール、100 mM塩化ナトリウム、6% 塩化コリン、0 . 1% (w / v) アジ化ナトリウムを含む0 . 1 Mトリス緩衝液 (pH 7 . 5) を調製し、乙剤を調製した。

【0072】(4) 検体中のCM - H bの測定

30 検体 (溶血試料) 6 μl を220 μlの乙剤とガラスセル中で混合、攪拌することにより、溶血試料を更に3 / 113に希釈した。37 °Cで5分間静置した後、甲剤を100 μl添加攪拌し、10秒後から200秒までの波長804 nmにおける光学密度変化量 (感度、OD 804 nm) を測定した。以上の操作には、検体をサンプル、乙剤をR 1、甲剤をR 2として自動分析装置TBA - 30 R (東芝メディカル (株) 製) に適用し測定した。検体の測定はn = 10で同時測定を行なって同時再現性を、更に、n = 5で日差再現性を測定した。この結果を表2に示した。なお、本実施例で測定されるCM - H bは、CML - H bである。

【0073】

【表2】

抗体				測定		
クローン	特異性	解離定数	解離速度定数	同時再現性 (C.V.値)	日差再現性 (C.V.値)	感度 (ΔOD 804nm)
9H6	CM-ペプチドβ66	5.46 x 10 <sup>-9</sup> M	2.37 x 10 <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup>	2.97%	2.53%	0.1326

【0074】表2に示されるように、ハイブリドーマ9 H 6の産生するモノクローナル抗体を用いた測定では、

同時再現性、日差再現性共にC.V.値が5%以下と非常に良好な結果を示した。また、感度(OD 804nm)も良好であった。

【0075】比較例1〔CM-ペプチド66に対するに解離定数が $10^{-8}$ M以下、解離速度定数 $k_d$ が $10^{-2}$ s $^{-1}$ を越えるモノクローナル抗体を含むラテックス凝集試薬を用いた検体中のCM-Hbの測定〕

実施例1と同様にしてCM-ペプチド66に反応性を示すハイブリドーマ11B9を得、該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を得た。尚、該ハイブリドーマ11B9は特開平11-236399号公報に開示されて\*

ペプチド	解離定数	解離速度定数
ペプチドβ66	$> 1 \times 10^{-3}$ M	$> 1 \times 10^{-1}$ s $^{-1}$
ペプチドα61	$> 1 \times 10^{-3}$ M	$> 1 \times 10^{-1}$ s $^{-1}$
ペプチドβN	$> 1 \times 10^{-3}$ M	$> 1 \times 10^{-1}$ s $^{-1}$
CM-ペプチドβ66	$8.06 \times 10^{-9}$ M	$3.28 \times 10^{-2}$ s $^{-1}$
CM-ペプチドα61	$> 1 \times 10^{-3}$ M	$> 1 \times 10^{-1}$ s $^{-1}$
CM-ペプチドβN	$> 1 \times 10^{-3}$ M	$> 1 \times 10^{-1}$ s $^{-1}$

【0078】表3に示されるように本比較例で使用するモノクローナル抗体はCM-ペプチド66と特異的に反応し、解離定数は $8.06 \times 10^{-9}$ Mと $10^{-8}$ M以下であったが、解離速度定数 $k_d$ は $3.28 \times 10^{-2}$ s $^{-1}$ であり $10^{-2}$ s $^{-1}$ を越えていた。

【0079】次に、上記モノクローナル抗体を使用した

抗体				測定		
クローン	特異性	解離定数	解離速度定数	同時再現性 (C.V.値)	日差再現性 (C.V.値)	感度 (ΔOD 804nm)
11B9	CM-ペプチドβ66	$8.06 \times 10^{-9}$ M	$3.28 \times 10^{-2}$ s $^{-1}$	12.31%	13.76%	0.1159

【0081】表4に示されるように、上記モノクローナル抗体を用いた測定では、感度は良好であったが、同時再現性、日差再現性共にC.V.値が10%以上と悪く、検体中のCM-Hbを再現性良く測定することができなかった。

【0082】比較例2〔CM-ペプチド66に対するに解離定数が $10^{-8}$ Mを越え、解離速度定数 $k_d$ が $10^{-2}$ s $^{-1}$ 以下のモノクローナル抗体を含むラテックス凝集試薬を用いた検体中のCM-Hbの測定〕  
実施例1のハイブリドーマのクローニングで、CM-ペプチド66に弱く反応するハイブリドーマを選択した

\*いるハイブリドーマ11B9と同じものである。

【0076】得られたモノクローナル抗体について実施例1(7)と同様にして該抗体の免疫グロブリンクラスを調べた結果、その免疫グロブリンクラスはIgGであった。また、実施例1(9)と同様にして各種CM化ペプチドおよびCM化前のペプチドとの相互作用をBIA-coreを用いて調べたところ、解離定数及び解離速度定数は表3に示す値となった。

【0077】

【表3】

以外は実施例2と同様にして、検体中のCM-Hbを測定した。そのときの感度、同時再現性、及び日差再現性を表4に示す。

【0080】

【表4】

【0083】また、実施例1(9)と同様にして各種CM化ペプチドおよびCM化前のペプチドとの相互作用をBIA-coreを用いて調べたところ、解離定数及び解離速度定数は表5に示す値となった。

【0084】

【表5】

ペプチド	解離定数	解離速度定数
ペプチドβ66	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
ペプチドα61	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
ペプチドβN	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
CM-ペプチドβ66	$5.72 \times 10^{-8} \text{ M}$	$7.24 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
CM-ペプチドα61	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
CM-ペプチドβN	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$

【0085】表5に示されるように上記モノクローナル抗体は、CM-ペプチド66と特異的に反応したが、解離定数Kは $5.72 \times 10^{-8} \text{ M}$ と $10^{-8} \text{ M}$ を越えていた。なお、解離速度定数kは $7.24 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ であり、 $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 以下であった。

【0086】次いで、該モノクローナル抗体を使用した\*

抗体				測定		
クローン	特異性	解離定数	解離速度定数	同時再現性 (C.V.値)	日差再現性 (C.V.値)	感度 ( $\Delta \text{OD} 804\text{nm}$ )
11G2	CM-ペプチドβ66	$5.72 \times 10^{-8} \text{ M}$	$7.24 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	16.47%	17.22%	0.0218

【0088】表6に示されるように、上記モノクローナル抗体を用いた測定では、同時再現性、日差再現性共にC.V.値が10%以上と悪く、CM-Hbを再現性良く測定することができなかった。また、感度も低かった。

【0089】比較例3〔CM-ペプチド66に対するに解離定数が $10^{-8} \text{ M}$ を越え、解離速度定数kが $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ を越えるモノクローナル抗体を含むラテックス凝集試薬を用いた検体中のCM-Hbの測定〕  
実施例1のハイブリドーマのクローニングでCM-ペプ\*

\*以外は実施例2と同様にして、検体中のCM-Hbを測定し、感度、同時再現性、及び日差再現性を求めた。その結果を表6に示す。

【0087】

【表6】

\*チド66に弱く反応するハイブリドーマを選択した以外は、同様にしてハイブリドーマ16B4を得、該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を得た。なお、該抗体の免疫グロブリンクラスはIgGであった。

【0090】次いで、実施例1(9)と同様にして各種CM化ペプチドおよびCM化前のペプチドとの相互作用をBIA-coreを用いて調べたところ、解離定数及び解離速度定数は表7に示す値となった。

【0091】

【表7】

ペプチド	解離定数	解離速度定数
ペプチドβ66	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
ペプチドα61	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
ペプチドβN	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
CM-ペプチドβ66	$7.19 \times 10^{-7} \text{ M}$	$8.35 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
CM-ペプチドα61	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
CM-ペプチドβN	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$

【0092】表7に示されるように上記モノクローナル抗体は、CM-ペプチド66と特異的に反応したが、解離定数Kは $7.19 \times 10^{-7} \text{ M}$ と $10^{-8} \text{ M}$ を越えて、また、解離速度定数kも $8.35 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ と $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ を越えていた。

【0093】次いで、該モノクローナル抗体を使用した

以外は実施例2と同様にして、検体中のCM-Hbを測定し、感度、同時再現性、及び日差再現性を求めた。その結果を表8に示す。

【0094】

【表8】

抗体				測定		
クローン	特異性	解離定数	解離速度定数	同時再現性 (C. V. 値)	日差再現性 (C. V. 値)	感度 ( $\Delta OD$ 804nm)
16B4	CM-ペプチド $\beta$ 66	$7.19 \times 10^{-7} M$	$8.35 \times 10^{-2} s^{-1}$	19.52%	21.01%	0.0095

【0095】表8に示されるように、上記モノクローナル抗体を用いた測定では、同時再現性、日差再現性共にC. V. 値が10%以上と悪く、CM-Hbを再現性良く測定することができなかった。更に、感度も低かった。

【0096】実施例3〔CM-ペプチド61に対する解離定数が $10^{-8} M$ 以下で且つ解離速度定数が $10^{-2} s^{-1}$ 以下である本発明のモノクローナル抗体〕

実施例1(2)で作製した、CM-ペプチド61を用いて、実施例1と同様の方法でマウスの免疫、細胞融10合、融合細胞の選択、特異抗体産生細胞の選択、クローニング等を行い、CM-ペプチド61と最も強く反応するモノクローナル抗体を安定的に産生するハイブリドーマとして7B8を得、該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を得た。なお、ハイブリドーマ7B8は、「ハイブリドーマMb68-7B8」として工業技術院生命工学工業技術研究所へ寄託した〔寄託番号：生命研菌寄第774号(FERM p-17901)〕。また、上記抗体の免疫グロブリンクラスは、IgGであった。

【0097】上記モノクローナル抗体について、実施例1(9)と同様にして各種CM化ペプチドおよびCM化前のペプチドとの相互作用をBIA-coreを用いて調べたところ、解離定数及び解離速度定数は表9に示す値となった。

【0098】

【表9】

【表9】

ペプチド	解離定数	解離速度定数
ペプチド $\beta$ 66	$> 1 \times 10^{-3} M$	$> 1 \times 10^{-1} s^{-1}$
ペプチド $\alpha$ 61	$> 1 \times 10^{-3} M$	$> 1 \times 10^{-1} s^{-1}$
ペプチド $\beta$ N	$> 1 \times 10^{-3} M$	$> 1 \times 10^{-1} s^{-1}$
CM-ペプチド $\beta$ 66	$> 1 \times 10^{-3} M$	$> 1 \times 10^{-1} s^{-1}$
CM-ペプチド $\alpha$ 61	$1.26 \times 10^{-9} M$	$1.34 \times 10^{-3} s^{-1}$
CM-ペプチド $\beta$ N	$> 1 \times 10^{-3} M$	$> 1 \times 10^{-1} s^{-1}$

【0099】表9に示されるようにハイブリドーマ7B8が産生するモノクローナル抗体は、CM-ペプチド61と特異的に反応し、その解離定数Kは $1.26 \times 10^{-9} M$ で解離速度定数kは $1.34 \times 10^{-3} s^{-1}$ であった。

【0100】実施例4〔実施例3で得たモノクローナル抗体を含むラテックス凝集試薬を用いた検体中のCM-30

Hbの測定〕

実施例3で得たモノクローナル抗体を使用した以外は実施例2と同様にして、検体中のCM-Hbを測定し、感度、同時再現性、及び日差再現性を求めた。その結果を表10に示す。

【0101】

【表10】

抗体				測定		
クローン	特異性	解離定数	解離速度定数	同時再現性 (C. V. 値)	日差再現性 (C. V. 値)	感度 ( $\Delta OD$ 804nm)
7B8	CM-ペプチド $\alpha$ 61	$1.26 \times 10^{-9} M$	$1.34 \times 10^{-3} s^{-1}$	2.39%	2.16%	0.1425

【0102】表10に示されるように、上記モノクローナル抗体を用いた測定では、同時再現性、日差再現性共にC. V. 値が5%以下と非常に良好であり、感度(OD 804nm)も良好であった。

【0103】比較例4〔CM-ペプチド61に対する解離定数が $10^{-8} M$ 以下、解離速度定数kが $10^{-2} s^{-1}$ を越えるモノクローナル抗体を含むラテックス凝集試薬を用いた検体中のCM-Hbの測定〕

実施例3と同様にしてCM-ペプチド61に反応性を示すハイブリドーマ1A5を得、該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体(免疫グロブリンクラス：IgG)を得た。

【0104】次いで、実施例1(9)と同様にして各種CM化ペプチドおよびCM化前のペプチドとの相互作用をBIA-coreを用いて調べたところ、解離定数及び解離速度定数は表11に示す値となった。

【0105】

\* \* 【表11】

ペプチド	解離定数	解離速度定数
ペプチドβ66	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
ペプチドα61	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
ペプチドβN	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
CM-ペプチドβ66	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
CM-ペプチドα61	$9.21 \times 10^{-9} \text{ M}$	$2.42 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
CM-ペプチドβN	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$

【0106】表11に示されるように上記モノクローナル抗体は、CM-ペプチド61と特異的に反応し、解離定数Kは $9.21 \times 10^{-9} \text{ M}$ であったが、解離速度定数 $k_d$ は $2.42 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ と $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ を越えていた。

【0107】次いで、該モノクローナル抗体を使用した\*

抗体				測定		
クローン	特異性	解離定数	解離速度定数	同時再現性 (C.V.値)	日差再現性 (C.V.値)	感度 ( $\Delta\text{OD } 804\text{nm}$ )
1A5	CM-ペプチドα61	$9.21 \times 10^{-9} \text{ M}$	$2.42 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	11.59%	16.34%	0.1148

【0109】表12に示されるように、上記モノクローナル抗体を用いた測定では、感度は良好であったが、同時再現性、日差再現性共にC.V.値が10%以上と悪く、CM-Hbを再現性良く測定することができなかった。

【0110】比較例5〔CM-ペプチド66に対する解離定数が $10^{-8} \text{ M}$ を越え、解離速度定数 $k_d$ が $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ を越えるモノクローナル抗体を含むラテックス凝集試薬を用いた検体中のCM-Hbの測定〕  
実施例1のハイブリドーマのクローニングでCM-ペプチド61に弱く反応するハイブリドーマを選択した以\*

\*以外は実施例2と同様にして、検体中のCM-Hbを測定し、感度、同時再現性、及び日差再現性を求めた。その結果を表12に示す。

【0108】

【表12】

\*外は、同様にしてハイブリドーマ7F9を得、該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体(免疫グロブリンクラスはIgG)を得た。なお、該ハイブリドーマ7F9は特開平11-236399号公報に開示されているハイブリドーマ7F9と同じものである。

【0111】次いで、実施例1(9)と同様にして各種CM化ペプチドおよびCM化前のペプチドとの相互作用をBIA-coreを用いて調べたところ、解離定数及び解離速度定数は表13に示す値となった。

【0112】

【表13】

ペプチド	解離定数	解離速度定数
ペプチドβ66	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
ペプチドα61	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
ペプチドβN	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
CM-ペプチドβ66	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
CM-ペプチドα61	$3.91 \times 10^{-8} \text{ M}$	$3.62 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
CM-ペプチドβN	$> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$> 1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$

【0113】表13に示されるように上記モノクローナル抗体は、CM-ペプチド61と特異的に反応したが、解離定数Kは $3.91 \times 10^{-8} \text{ M}$ と $10^{-8} \text{ M}$ を越え、解離速度定数 $k_d$ も $3.62 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ と $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ を越えていた。

【0114】次いで、該モノクローナル抗体を使用した

【0115】  
【表14】  
\*以外は実施例2と同様にして、検体中のCM-Hbを測定し、感度、同時再現性、及び日差再現性を求めた。その結果を表14に示す。

抗体				測定		
クローン	特異性	解離定数	解離速度定数	同時再現性 (C. V.値)	日差再現性 (C. V.値)	感度 ( $\Delta OD 804nm$ )
7F9	CM-ヘプチド $\alpha 6i$	$3.91 \times 10^{-8} M$	$3.62 \times 10^{-2} s^{-1}$	17.92%	19.34%	0.0142

【0116】表14に示されるように、上記モノクローナル抗体を用いた測定では、同時再現性、日差再現性共にC.V.値が10%以上と悪く、CM-Hbを再現性良く測定することができなかった。更に、感度も十分とは言えなかった。

【0117】

【発明の効果】本発明のモノクローナル抗体を使用することにより、従来、高感度で精度良く測定することが困難であったCML-Hbを操作が簡便な免疫学的測定方法により高感度・高精度で再現性良く測定することが可能になった。

【0118】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

\*トロポジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド配列

Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Ala-Phe-Ser-Cys

1

5

10

配列番号：2

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トロポジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド配列

Gly-His-Gly-Lys-Lys-Val-Ala-Asp-Ala-Leu-Thr-Cys

1

5

10

\*

【手続補正書】

【提出日】平成13年2月8日(2001.2.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正内容】

【0018】配列表フリーテキスト

前記配列番号1のアミノ酸配列は、ヘモグロビン(Hb)の鎖のN末端から62番目~73番目のアミノ酸配列に相当するもので、CM-ペプチド66においてはHbの鎖のN末端から66番目に相当する位置のリジン残基の側鎖アミノ基がCM化されている。また、前

<110> TOKUYAMA CORPORATION ; A&

amp;T CORPORATION

<120> Monoclonal Antibody

<140> JP/2000-194075

<141> 2000-06-28

<160> 2

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The amino acid sequence wh

ich correspond to between 62th and 73t

h

from N-terminal on hemoglobin beta-ch

ain

記配列番号2のアミノ酸配列は、Hbの鎖のN末端から57番目~68番目のアミノ酸配列に相当するもので、CM-ペプチド61においてはHbの鎖のN末端から61番目に相当する位置のリジン残基の側鎖アミノ基がCM化されている。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0118

【補正方法】変更

【補正内容】

【0118】

【配列表】

Ala His Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe  
Ser Cys

1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The amino acid sequence wh  
ich correspond to between 57th and 68t  
h

from N-terminal on hemoglobin beta-ch  
ain

<400> 2

Gly His Gly Lys Lys Val Ala Asp Ala Leu  
Thr Cys

1 5 10

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 33/53  
33/577

識別記号

F I

C 1 2 N 15/00  
5/00

テ-マコ-ト' (参考)

Z N A C  
B

(72)発明者 平田 広一郎  
山口県徳山市御影町 1 番 1 号 株式会社ト  
クヤマ内

F タ-ム(参考) 4B024 AA11 BA44 GA03 GA18 HA15  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13  
4B065 AA91X AA92X AC14 BA08  
CA25 CA46  
4H045 AA11 AA30 BA16 CA40 DA76  
DA86 EA50 FA72 GA06 GA10  
GA22 GA23

专利名称(译)	单克隆抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002000268A</a>	公开(公告)日	2002-01-08
申请号	JP2000194075	申请日	2000-06-28
申请(专利权)人(译)	德山公司 株式会社エイアンドティー		
[标]发明人	三浦圭介 岩本久彦 平田広一郎		
发明人	三浦 圭介 岩本 久彦 平田 広一郎		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/805 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K14/805 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53.K G01N33/577.B C12N15/00.ZNA.C C12N5/00.B C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A C12N5/00.102 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/GA03 4B024/GA18 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA06 4H045/GA10 4H045/GA22 4H045/GA23		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

(带更正) 解决的问题: 为了获得体液中AGE之一的羧甲基化血红蛋白, 特别是其中已证实与肾病有关的赖氨酸残基的侧链氨基被羧甲基化的血红蛋白, 具有高灵敏度和准确性。提供一种可以定量重现的免疫定量方法。SOLUTION: 例如, 它具有杂交瘤9H6(生命研究所773号)或杂交瘤7B8(生命研究所774号)产生的特定序列的氨基酸序列, 并且位于N末端第5位。赖氨酸残基具有被羧甲基化的侧链氨基或具有其他特定序列的氨基酸序列, 并且来自N末端的第5个赖氨酸残基的侧链氨基被羧甲基化了。使用含有对肽的解离常数为 $10^{-8}$ M或更小且解离速率常数为 $10^{-2}$ s $^{-1}$ 或更小的单克隆抗体的免疫测定试剂, 在体液中使用羧甲基测定脱氧血红蛋白。

表1 抗体特性及解离常数、解离速度定数

抗体	抗体			測定		
	特異性	解離定数	解離速度定数	同時再現性 (C.V.値)	日常再現性 (C.V.値)	感度 ( $\Delta$ OD 804nm)
9H6	CM- $\alpha$ -741866	$5.46 \times 10^{-8}$ M	$2.37 \times 10^{-3}$ s $^{-1}$	2.97%	2.53%	0.1925