

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3845796号
(P3845796)

(45) 発行日 平成18年11月15日(2006.11.15)

(24) 登録日 平成18年9月1日(2006.9.1)

(51) Int. Cl.	F I	
C O 7 D 493/22 (2006.01)	C O 7 D 493/22	
C O 7 K 16/44 (2006.01)	C O 7 K 16/44	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

請求項の数 7 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-66754 (P2002-66754)	(73) 特許権者	503360115
(22) 出願日	平成14年3月12日 (2002.3.12)		独立行政法人科学技術振興機構
(65) 公開番号	特開2003-267978 (P2003-267978A)		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(43) 公開日	平成15年9月25日 (2003.9.25)	(74) 代理人	100110168
審査請求日	平成14年3月12日 (2002.3.12)		弁理士 宮本 晴祝
		(72) 発明者	平間 正博
			宮城県仙台市青葉区国見ヶ丘5-43-3
			0-205
		(72) 発明者	大栗 博毅
			宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉417コー
			ポしんし105
		(72) 発明者	藤井 郁雄
			大阪府吹田市五月が丘東10-8-201
		(72) 発明者	円谷 健
			大阪府千里山西6-14-3-D203
			最終頁に続く

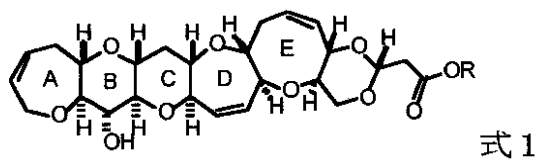
(54) 【発明の名称】 C T X 3 C の A - E 環部を持つハプテン部を有するタンパク質コンジュゲートで免疫して得られるシガトキシン C T X 3 C 抗体およびその作製方法

(57) 【特許請求の範囲】

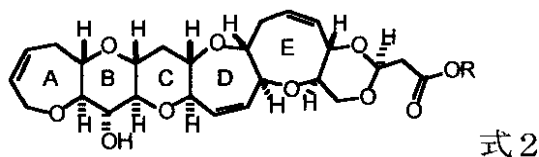
【請求項 1】

式 1 および 2 のジアステレオマー混合物からなる新規化合物。

【化 1】



【化 2】



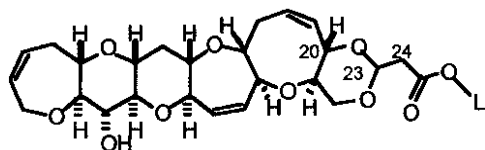
式中 R は H またはメチル基。

【請求項 2】

式 3 からなる、キャリアタンパク質と結合した化合物で免疫してシガトキシン C T X 3

Cと特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得るためのタンパクコンジュゲートを形成する残基を有する新規化合物。

【化3】



式3

式中 - O - L は合成ハプテン部とキャリアータンパク質とが結合する際除去される基である。

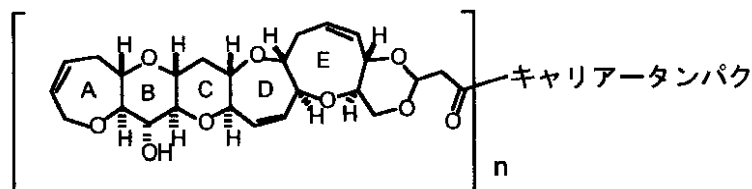
【請求項3】

請求項2に記載の式3の新規化合物における - O - L がオキシカルボジイミド又はオキシ - N - ヒドロキシルスクシンイミドである請求項2に記載の新規化合物。

【請求項4】

式3で表される - O - L 基を取り除いた残基をキャリアータンパク質と結合させた一般式1で表されるタンパク質コンジュゲート化合物。

【化4】



一般式1

式中nは1以上の正の整数

【請求項5】

キャリアータンパク質が牛血清アルブミン (BSA)、キーホールリムペットヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanine, KLM) またはオボアルブミン (egg albumin, OVA) であることを特徴とする請求項4にタンパク質コンジュゲート化合物。

【請求項6】

請求項4または5に記載のタンパク質コンジュゲートで免疫して得られるシガトキシン CTX3C と特異的に反応するモノクローナル抗体。

【請求項7】

受託番号 FERM BP - 8292 として受託されたシガトキシン CTX3C と特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 10C9。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、シガトキシン類、特にシガトキシン CTX3C を検出することが可能な抗原決定基 (エピトープ) を有する CTX3C の A - E 5 環を有する新規なハプテン部構成化合物、該ハプテン部構成化合物をキャリアータンパク質に結合したハプテンコンジュゲート化合物、該ハプテン部コンジュゲート化合物で免疫して得られる前記シガトキシン類に対し抗体として機能するモノクローナル抗体、および該ハプテンコンジュゲート化合物を用いて得られた受託番号 FERM BP - 8292 として受託された (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に平成14年3月5日に受託番号 FERM P - 18749 として原寄託され、平成15年2月13日に前記原寄託よりブタペスト条約に基づく寄託への移管申請により受託番号 FERM PB - 8292 として受託された。) ハイブリドーマ 10C9 に関する。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

【 従来 の 技 術 】

免疫的手法を用いて、海毒、特にシガトキシン類 (C T X) を調査する研究は、ラジオイムノアッセイの発展に伴って 1 9 7 7 年頃から始まった。

シガテラ毒は、天然からごく微量しか採集されず (8 5 0 匹、4 t の毒ウツボから毒本体のシガトキシンは僅か 0 . 3 5 m g)、培養による生産も困難なことが抗体調製の障害となっている。ハワイ大学ホカマらは、貴重な毒本体シガトキシン (1 μ g) をヒト血清アルブミンにカルボジイミド法で連結したコンジュゲートを作製、これを抗原としてマウスに免疫、モノクローナル抗体を調製した (Toxicon 第 1 5 巻、(1977 年)、第 317 頁)。この抗体は、シガトキシンに結合するが、オカダ酸とも強い交差活性を示し、その親和性の差は 5 倍程度しかない (Journal of Clinical Laboratory Analysis 第 6 巻、(1992 年)、第 54 頁)。また、プレベトキシン、マイトトキシン、パリトキシン等にも交差活性を示すことが分かっているが (Journal of AOAC International 第 81 巻、(1998 年)、第 727 頁)、詳しいデータは発表されていない。このホカマらの抗体を用いて、シガトキシン類に汚染された魚類を免疫的手法によりモニターのため試薬、キット (Cigua Check TM) などが開発されている。

10

【 0 0 0 3 】

本発明者らは、以前シガトキシンの左側 A B C 環部を化学合成し、これを合成ハプテンとしたタンパク質コンジュゲートを用いて、三種のモノクローナル抗体を調製しているが、これらはいずれもシガトキシンに非常に弱いアフィニティーしか示さなかった (Synthesis (1999 年)、第 1431 頁)。また、他のグループも、合成ハプテン (J K L M 環部) のコンジュゲートの免疫を試みているが、モノクローナル抗体の調製には至っていない [Toxicon 第 38 巻 (2000 年) 第 6 6 9 頁]。

20

【 0 0 0 4 】

このような状況の中で、本発明者らは、シガトキシン類の右末端の部分構造である I J K L M 環部をハプテンとして設計、合成し、この合成ハプテンのタンパク質コンジュゲートをマウスに免疫して、シガトキシン類に特異性の高いモノクローナル抗体の調製に成功している (特願 2 0 0 1 - 2 4 7 1 2 0)。得られたモノクローナル抗体 3 D 1 1 の C T X 3 C に対しての結合解離定数 (K d) は、1 2 2 n M であった。また、シガトキシンに構造の類似した海産ポリエーテル系毒素とこの抗体の交差活性を測定したところ、赤潮毒プレベトキシン類と交差活性が確認されたが、この交差活性は、シガトキシン類との結合と比べると 3 5 0 分の 1 以下の非常に弱いものであった。

30

【 0 0 0 5 】

また、シガトキシン類のモノクローナル抗体を得ることを目的とする合成ハプテンとして、シガトキシンの A B C 環部の C₁₆ 位にカルボン酸リンカーを導入した誘導体とキャリアー蛋白質である B S A または K L H とからコンジュゲートを合成し、これを R I B I アジュバント中に乳化し、5 匹の B a l b / c マウスに 3 週間間隔で 4 回注射して免疫し、該マウスから脾臓を取り出し、該脾臓細胞をミエローマ細胞 (P 3 X 6 3 - A g 8 . 6 5 3) と融合し、前記抗体を得、前記抗体の前記合成ハプテンに対する反応特異性を評価している [Synthesis 1999, No. SI. 1431-1436 ISSN 0039-7881,]。すなわち、シガトキシン類、特にシガトキシン C T X 3 C の部分構造を用いて、免疫化学的手法でシガトキシン類 (C T X) を調査するのに有用なモノクローナル抗体を製造するのに有用な合成シガトキシン類の検討がなされている。

40

【 0 0 0 6 】

本発明者らは、前記検討に対し更に検出限界を改善したモノクローナル抗体を得ることができる合成ハプテンを設計してきた。また、シガトキシンは分子長約 3 ナノメートルの巨大分子なので、すでにモノクローナル抗体 3 D 1 1 が調製されている I J K L M 環以外の部分構造も抗原決定基となる可能性がある。そこで、シガトキシンの左末端の部分構造である A B C D E 環部をハプテンとして設計、合成するアプローチを検討した。

【 0 0 0 7 】

50

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、基本的にはシガトキシン類、特にシガトキシン C T X 3 C の検出限界を改善したモノクローナル抗体を得ることができる合成ハプテンを提供することであり、更に、当該合成ハプテンを用いて、前記モノクローナル抗体を得ることができる人工抗原を得、これを用いてモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得、該ハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を産生させ、得られたモノクローナル抗体の性能を検証することである。

前記課題を解決すべく、C T X 3 C の A - E 5 環の E 環の部分にリンカーを導入し、キャリアタンパク質と連結可能な前記式 3 の化合物を合成した。そして、前記式 3 の化合物を用いて、人工抗原を得、これを用いてモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得、モノクローナル抗体を作製し、得られたモノクローナル抗体が、前記ハプテン部およびシガトキシン C T X 3 C 類を特異的および効率的に検出できることを見出し、前記課題を解決することができた。

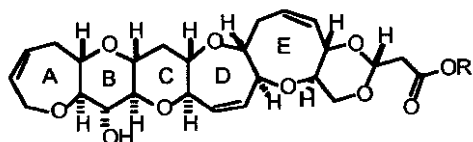
【0008】

【課題を解決するための手段】

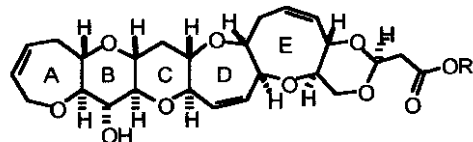
本発明の第 1 は、式 1 および 2 のジアステレオマー混合物からなる新規化合物である。

【0009】

【化 5】



式 1



式 2

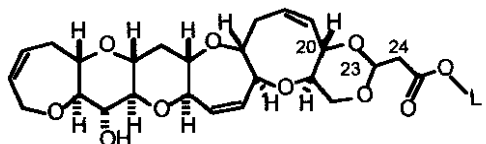
【0010】

式中 R は H またはメチル基である。

本発明の第 2 は、式 3 からなる、キャリアタンパク質と結合した一般式 1 の化合物で免疫してシガトキシン C T X 3 C と特異的に反応するモノクローナル抗体を生成させるキャリアーコンジュゲートを形成する残基を生成する新規化合物である。

【0011】

【化 6】



式 3

【0012】

式 3 中 - O - L は合成ハプテン部とキャリアタンパク質とが結合する際除去される基であり C₂₃ は光学活性中心であり、好ましくは、前記 - O - L はオキシカルボジイミド又はオキシ - N - ヒドロキシスクシンイミド である前記キャリアーコンジュゲートを形成する残基を生成する新規化合物である。

【0013】

本発明の第 3 は、前記式 3 で表される - O - L 基を取り除いた残基をキャリアタンパク

10

20

30

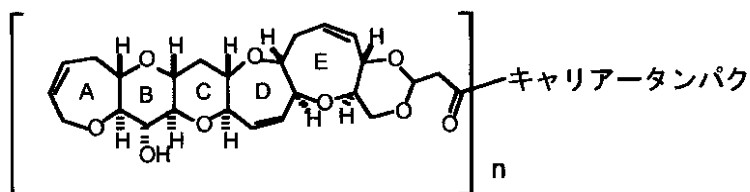
40

50

質と結合させた一般式 1 で表されるタンパク質コンジュゲート化合物である。

【 0 0 1 4 】

【 化 7 】



一般式 1

10

【 0 0 1 5 】

式中 n は正の整数であり、好ましくは、前記キャリアータンパク質が牛血清アルブミン (B S A)、キーホールリムベットヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanine, K L M) またはオボアルブミン (egg albumin, O V A) であることを特徴とする前記タンパク質コンジュゲート化合物である。

本発明の第 4 は、前記タンパク質コンジュゲート類で免疫して得られるシガトキシン C T X 3 C と特異的に反応するモノクローナル抗体である。

本発明の第 5 は、前記ハブテンコンジュゲート化合物を用いて得られた 受託番号 F E R M B P - 8 2 9 2 として受託されたシガトキシン C T X 3 C と特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 1 0 C 9 である。

20

【 0 0 1 6 】

【 本発明の実施の態様 】

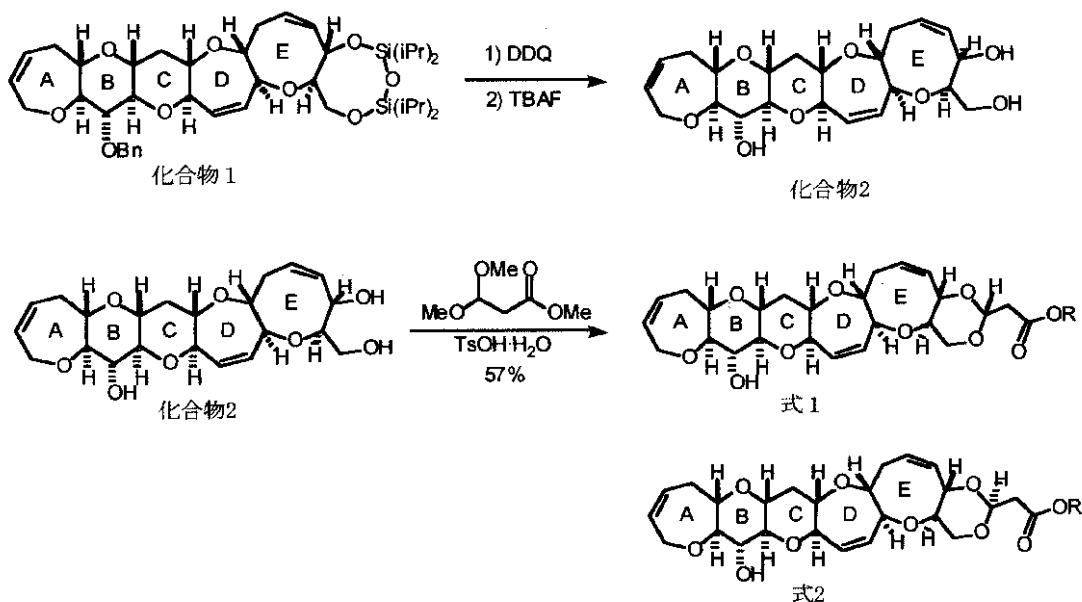
本発明をより詳細に説明する。

A . 本発明の前記ジアステレオマー混合物の合成。

下記の工程 1 により得られる。

【 0 0 1 7 】

【 化 8 】



30

40

工程 1

【 0 0 1 8 】

50

化合物 1 の OH をベンジル基 (B n) 保護基で保護した化合物の合成方法は、M. Maruyama et al, Heterocycles, 2001, 54, 93-99. に記載されている。化合物 1 は前記文献 2 に記載の化合物の B n を D D Q (2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン) を用いて脱保護することにより得られる。化合物 1 のアルコール (4.0 mg, 6.0 μ mol) を T H F (テトラヒドロフラン) (2 mL) に溶かし、室温でテトラブチルアンモニウムフルオリド (T B A F , 1 M T H F 溶液 : 18 μ L, 18 μ mol) を加えた。30 分後、反応溶液を濃縮して、シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、化合物 2 (2.5 mg, 5.9 μ mol, 98%) を得た。

【 0 0 1 9 】

20 mL ナス型フラスコに化合物 2 (2.8 mg, 6.6 μ mol) , C H ₂ C l ₂ (300 μ L) , (M e O) ₂ C H C H ₂ C O O M e (10 μ L, 70 μ mol) , T s O H \cdot H ₂ O (0.5 mg, 3 μ mol) を加えた。室温で 1.5 時間攪拌した後、トルエン (1 mL) を加えて、ロータリーエバポレーターで減圧 (120 mbar/hPa) し、1 時間後に大気圧に戻した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して、アセタール位に関するジアステレオマー混合物 (式 1 : 式 2 = 2 : 1) を (1.9 mg, 3.8 μ mol, 57%) 得た。式 1 の化合物の物性を表 1 に示す。

【 0 0 2 0 】

【 表 1 】

式 1 の化合物の物性 ;

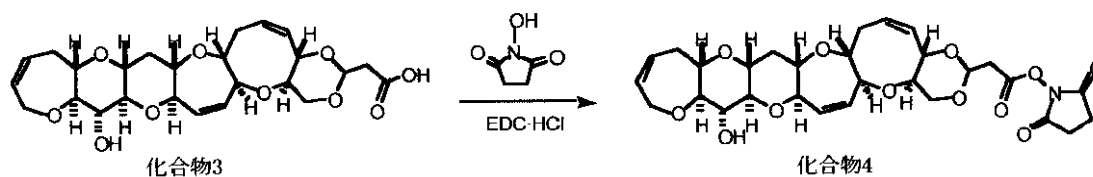
¹H-NMR (500 MHz, C D C l ₃) δ 1.53 (1H, m, H10ax), 2.28 (1H, dt, *J* = 12.0, 4.5 Hz, H10eq), 2.32 (1H, m, H17), 2.37 (1H, m, H4), 2.62 (1H, m, H4), 2.64 (1H, m, H17), 2.67 (1H, dd, *J* = 15.5, 5.5 Hz, H24), 2.69 (1H, dd, *J* = 15.5, 5.5 Hz, H24), 3.01 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, H8), 3.11 (1H, ddd, *J* = 11.0, 9.0, 4.5 Hz, H9), 3.22-3.26 (2H, m, H5, H11), 3.34 (1H, m, H21), 3.43 (1H, t, *J* = 10.5 Hz, H22), 3.58-3.64 (3H, m, H16, H7, H6), 3.70 (3H, s, OMe), 3.80 (1H, ddd, *J* = 9.0, 4.0, 2.5 Hz, H12), 4.02 (1H, ddt, *J* = 15.0, 4.0, 2.5 Hz, H1), 4.11 (1H, dd, *J* = 10.5, 5.5 Hz, H22), 4.12 (1H, m, H15), 4.24 (1H, m, H20), 4.32 (1H, dd, *J* = 15.0, 6.0 Hz, H1), 4.93 (1H, t, *J* = 5.5 Hz, H23), 5.63 (1H, brdt, *J* = 12.5, 2.5 Hz, H14), 5.70 (1H, m, H13), 5.73 (1H, dd, *J* = 10.5, 5.0 Hz, H19), 5.80 (1H, m, H18), 5.83 (1H, m, H3), 5.92 (1H, m, H2). MALDI-TOF MS: Calcd for C₂₆H₃₄O₁₀Na 529.205 (M + Na⁺); Found 529.185.

【 0 0 2 1 】

式 1 および 2 の R を H にした化合物 3 は、式 1 および 2 の化合物を L i O H で処理して得られる。式 3 において L がスクシンイミドの化合物 4 は工程 2 で得られる。

【 0 0 2 2 】

【 化 9 】



工程 2

【 0 0 2 3 】

20 mL ナス型フラスコに式 1 および 2 の混合物 (2.5 mg, 4.9 μ mol) , t - B u O H (0.5 mL) , 水 (125 μ L) , L i O H \cdot H ₂ O (2.8 mg, 68 μ mol) を加えて、室温で 1 時間攪拌

した。KHSO₄ (18.6 mg, 136 μmol) を加え、溶液のpH (3-4程度)を確認した後、酢酸エチル (40 mL) で希釈した。無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、濃縮し、粗化合物3を得た。これにDMF (DMF = N, N - ジメチルホルムアミド、200 μL)、N - ヒドロキシスクシンイミド (5.6 mg, 49 μmol)、EDC - HCl (EDC = 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド、4.8 mg, 25 μmol) を加えて、室温で12時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチル(40 mL)で希釈し、有機層を水で3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濃縮し、活性化エステルである化合物4を得た。これにDMF (100 μL) を加えた溶液を作製し、コンジュゲートの調製に使用した。

【0024】

B . タンパクコンジュゲートの製造。

10

K L Hコンジュゲートの調製；

K L H (5.0 mg) の P B S バッファー溶液 (1.0 mL) に活性化エステルである化合物4 (約2.4 μmol) の DMF 溶液 (50 μL) を加えて10分間攪拌した。一日静置した後、4 で透析した。この後、5.9時間後にP B S バッファー (700 mL) を交換し、12時間後に透析膜からエッペンドルフチューブに移し換えて、-78 で保存した。

【0025】

B S Aコンジュゲートの調製；

B S A (7.0 mg) の P B S バッファー溶液 (2.0 mL) に活性化エステルである化合物4 (約2.4 μmol) の DMF 溶液 (50 μL) を加えて10分間攪拌した。一日静置した後、4 で透析した。この後、5.9時間後にP B S バッファー (700 mL) を交換し、12時間後に透析膜からエッペンドルフチューブに移し換えて、-78 で保存した。

20

【0026】

ハプテン価の解析

透析して得た B S Aコンジュゲートを、MALDI - TOF - MSで分析した。B S Aコンジュゲートの平均分子量は約70200であった (B S Aの分子量約66400)。ハプテン部分の分子量が (476) であるので、B S Aコンジュゲートには平均8個のハプテンが連結されていることが分かった。

【0027】

モノクローナル抗体の作製；

前項で得たA B C D E - K L H (100 μg) にR I B I アジュバンド (RIBI Immunol. Res. Inst.社製) を加え、良く攪拌してエマルジョンとしたのち、これをB a l b / c マウス (5匹) に二週間毎に3回、腹腔内投与した。初回免疫から39日目にマウスの血清を採取し、A B C D E - B S Aを用い、E L I S A法で血清の抗体価を測定した。

30

【0028】

E L I S A法；

96ウエルE L I S A用プレート (ファルコン社製、3910) の各ウエルに50 μLのA B C D E - B S A溶液を入れ、室温で2時間放置後、4 で一晩放置して、プレートにコンジュゲートを吸着させた。プレートをP B S - T w e e n [P B S バッファーに5% T w e e n 20 [和光純薬製 ポリオキシエチレン (polyoxyethylene) (20) ソルビタン モノラウレート (Sorbitan Monolaurate) I C I 社 商標 T w e e n - 20 相当品 No. 167-11515]] を含むもので3回洗浄後、M I L L I - Q 水 (Millipore 社製の複数段階の樹脂やフィルターを用いて、精製水を脱イオン化もの) で一度洗浄し、吸着しなかったコンジュゲートを除去した。ハイブリドーマ培養上清 (もしくは抗血清、精製抗体溶液) を加え、室温で1時間放置後、P B S - T w e e n と、M I L L I - Q 水で順次洗浄した。50 μLの酵素標識二次抗体 (ヤギ抗マウスIgG-西洋わさびペルオキシダーゼ) (Z Y M E D 社製、62-6520 1000倍希釈) を各ウエルに入れ、室温で1時間放置後、P B S - T w e e n と、M I L L I - Q 水で順次洗浄した。100 μLの基質溶液 [基質溶液の組成: 1,2-phenylenediamine 4.0 mg、過酸化水素水 10 μL、0.1 M クエン酸 バッファー (pH 5.0) 10 ml] を加え、5分間呈色反応を進行させた後、2規定硫酸 (50 μL) で反応を停止した。マイクロプレート吸光度測定装置 (B I O - R A D , B e n c h m

40

50

ark 170-6850) を用いて、450 nm の吸光度を測定し、陽性のクローンを判別した。

【0029】

血清中の抗体価の測定

ハプテン (ABCDEあるいはIJKLM) - BSA 溶液を吸着した96ウエルELISA用プレートの最上段に、50 μ L のPBSバッファーを入れた。200倍に希釈したマウスの抗血清(50 μ L) を最上段のウエル(A1)に加え、この溶液を順次2倍希釈した(縦列A1 - A8に400倍から51,000倍の希釈系列を作製)。プレートを室温で1時間放置後、上述の方法で450 nm の吸光度を測定した(図1参照)。血清希釈率の対数と吸光度をプロットすると、血清濃度依存的に、血清中の抗体がABCDE - BSAコンジュゲートと結合することが分かった(図1参照)。

10

【0030】

抗体価の高いマウスからの脾臓の摘出、培養

5匹の中で、最も高い抗体価を示したマウスに、腹腔内にABCDE - KLH (100 μ g) を追加免疫し、3日後に脾臓を摘出した。脾臓に付着している組織や臓器の断片をピンセットで取り除いた後、基本培地 [RPMI Medium 1640 (GIBCO社製、一袋、炭酸水素ナトリウム2g, ペニシリン-ストレプトマイシン (GIBCO社製) 20 mg, 200 mM-グルタミン20 mLを蒸留水に溶かして1000 mlとしてpHを7.2に調製したもの] 入りのシャーレに移し、ピンセットで脾臓内の細胞を浮遊させた。脾細胞浮遊液を濾過後、50 ml遠心管に移した。さらに、基本培地15 mlを加え、良くピペティングして濾過し、全量を30 mlとした。800 rpmで5分間、室温で遠心分離し、上清を除去、タッピングした。HT・BC培地 [牛胎児血清 (FCS) 200 ml, HTコスモバイオ社製HT液 (50倍濃縮) 20 ml, BC (Bioresearch island社製 Briclone) 50 mL, 基本培地 730 mLを混合したもの] を30 mL加え、細胞を浮遊させた。

20

【0031】

冷凍庫から(-130 $^{\circ}$ C) からミエローマ細胞P3X63 - Ag 8.653 (大日本製薬社製) を凍結したチューブを取り出し、37 $^{\circ}$ C 恒温槽中で速やかに解凍した。チューブをアルコール綿でよく消毒したのち、チューブ内の細胞浮遊液を基本培地30 mLに移した。800 rpm (回転/分) で5分間、室温で遠心分離し、上清を除去した。タッピング後、10% FCS (基本培地に10%のFCSを添加) を10 mL加え、細胞を浮遊させ、50 mL培養フラスコに移した。フラスコの栓をゆるめ、炭酸ガス培養装置にいった。1 - 2日毎に継代し、250 mLフラスコ2本分 (90-100 ml) にした。

30

【0032】

マウスから取り出した脾細胞 (2×10^8 個) とミエローマ細胞 (5×10^7 個) を混合し、遠心 (800 rpm、5分間、室温) し、上清を除去、タッピングした。この後、ECFバッファー [マンニトール 45.5 g, 10 mM 塩化カルシウム (10 ml), 10 mM 塩化マグネシウム (10 ml), 20 mM Tris buffer pH 7.2 を蒸留水で溶かして、1000 mlにしたもの] を30 mLを加え、遠心 (800 rpm、5分間、室温)、上清除去、タッピングする操作を2回繰り返した後、ECFバッファー (4.8 ml) を加えた。これを6ウエルプレート (SUMIRON製) に、1.2 mLずつ分注し、島津社製SSH - 10細胞融合装置を用い、以下の条件で細胞融合した [[電極間距離: 1.0 mm; 交流周波数: 1 MHz; 交流初期印加電圧: 80 V; 交流初期印加時間: 10秒 (s); パルス幅: 40 (マイクロ秒 (μ s)); パルス電圧: 920 V; パルス電界強度: 2.30 kV/cm; 交流2次印加電圧: 80 V; パルス印加間隔: 1.0秒; 印加パルス数: 1; パルス電圧変化: +0 V; 交流最終印加時間: 10秒; 交流電圧減衰率: 0%; 接触強化: off]]。

40

【0033】

調製したハイブリドーマ細胞 (Mouse-Mouse hybridoma) を、各ウエルにHAT培地 [HAT-RPMI 1640, 20% FCS, 5% Briclone (BioResearch Ireland社製)含有] 100 μ Lを加えた96ウエルプレート10枚に移した。2週間後、ハプテンとしたABCDE環部に結合する抗体を産生するハイブリドーマ (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託

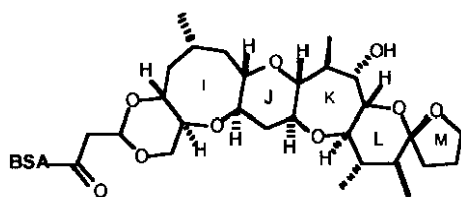
50

センターに平成14年3月5日に受託番号FERM P - 18749として原寄託され、平成15年2月13日に前記原寄託よりブタベスト条約に基づく寄託への移管申請により受託番号FERM PB - 8292として受託された。本明細書では前記寄託ハイブリドーマを抗体と同じ名称10C9と表示する。)をABCDE-BSAを用い、ELISA法でスクリーニングした。陽性のウエルを選択し、2回クローニング後に、再度ELISA陽性となった抗体を産生するモノクローンを順次培養し、それぞれ約200mLまで増殖させた。この結果、6種のモノクローナル抗体を調製することができた(表2)。得られたモノクローナル抗体の結合試験をELISA法で検討した。抗原として、シガトキシン類の部分構造を連結したBSAコンジュゲートを用いた。その結果、ABCDE-KLH環部を免疫して得られたIgG抗体は、ABCDE-BSA(化学式)へ強く結合し、IJKLM-BSA(化合物5)とは結合しないことがわかった。

10

【0034】

【化10】



化合物5

20

【0035】

モノクローナル抗体の調製の評価

抗体の精製及びサブクラスの決定

上清を抗マウスIgG+IgMアフィニティーカラム(NGK Industries, Ltd.社製)で精製した(結合用リン酸バッファー(pH 7.0)、溶出用バッファー(0.2 M Glycine-HCl, pH 2.5)。精製した抗体をSDS-PAGEで分析し、>95%の純度であることを確認した。PIERCE社製タイピングキット(37501)を用いて、それぞれの抗体のサブクラスを決定した。

【0036】

抗体の親和性解析(競争阻害実験)

次に、選別した6種のモノクローナル抗体を精製し、ハプテンとの解離定数(Kd)を求めた。ELISA用プレートに順次2倍希釈した競合阻害剤(PBS溶液 各30 ml)の溶液を調製した。これに抗体溶液(30 ml)を加え、室温で二時間放置した。抗体と阻害剤の混合溶液50 μLを、ハプテン-BSA溶液(0.625 μ/mL)を吸着した96ウエルELISA用プレート(ファルコン社製、3910)に加え、室温で15分間放置した。プレートを洗浄後、吸光度を測定し、滴定曲線を得た。Friguetらの方法[Journal of Immunological Method, 第77巻(1985年), 第305頁]を参考に、Klotzプロットして得られた直線の傾きから阻害剤のKd値を求めた(図2b)。

30

この結果、6種のモノクローナル抗体はいずれもABCDE(AEと略す場合がある。化合物6の上部)環部、及びCTX3C(化合物6の下部)に強く結合することが分かった(Kd < 27 nM)。また、6種の抗体の中では10C9が、ABCDE環部(Kd = 0.8 nM),CTX3C(Kd = 2.8 nM)共に最も親和性が高いことが分かった。それぞれのモノクローナル抗体のKd値を表2に示す。

40

【0037】

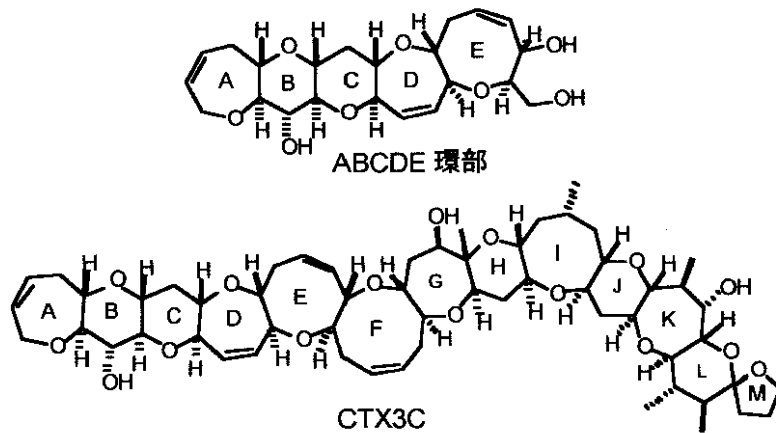
【表2】

モノクローナル抗体	Kd (nM) 対AEハプテン	Kd (nM) 対CTX3C
1C5	3.1	3.1
2G5	7.3	23.2
5E6	10.8	19.8
6D5	10.0	16.2
10C6	10.8	26.7
10C9	0.8	2.8

10

【0038】

【化11】



化合物6

20

【0039】

また、A B C D 環部、A B C 環部と分子サイズが小さくなるにつれて（化合物7）、抗体の結合親和性は、著しく低下することが分かった。（結合解離定数 K d の値は大きくなる。）結果を表3に示す。

30

【0040】

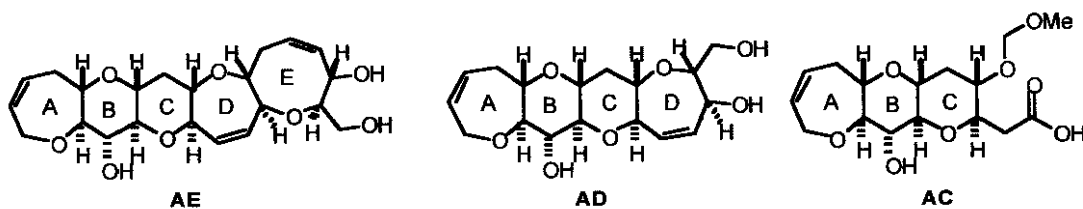
【表3】

モノクローナル抗体	Kd (nM) 対AEハプテン	Kd (μ M) 対ADハプテン	Kd (μ M) 対ACハプテン
1C5	3.1	0.68	42.4
2G5	7.3	0.67	11.1
5E6	10.8	0.75	53.6
6D5	10.0	0.84	10.0
10C6	10.8	1.1	64.6
10C9	0.8	1.8	73.6

40

【0041】

【化12】



化合物 7

【 0 0 4 2 】

さらに、構造の類似した海産ポリエーテル毒素との結合試験を検討したところ、赤潮毒〔プレベトキシン A (BTX A)、及びプレベトキシン B (BTX B)〕、オカダ酸や、マイトトキシン（これらの化学構造については、化合物 8 参照）とはほとんど結合しなかった。結果を表 4 に示す。

10

【 0 0 4 3 】

【表 4】

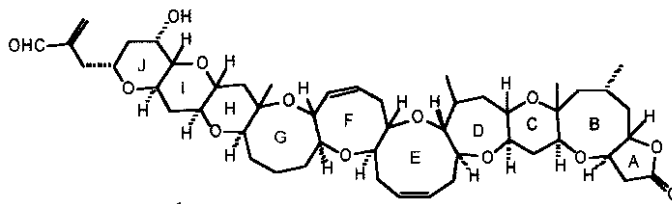
モノクローナル抗体	BTX A	BTX B	オカダ酸	マイトトキシン
1 C 5	>100 μ M	>50 μ M	>100 μ M	>25 μ M
2 C 5	>100 μ M	>50 μ M	>100 μ M	>25 μ M
5 E 6	>100 μ M	>50 μ M	>100 μ M	>25 μ M
6 D 5	>100 μ M	>50 μ M	>100 μ M	>25 μ M
1 0 C 6	>100 μ M	>50 μ M	>100 μ M	>25 μ M
1 0 C 9	>100 μ M	>50 μ M	>100 μ M	>25 μ M

20

【 0 0 4 4 】

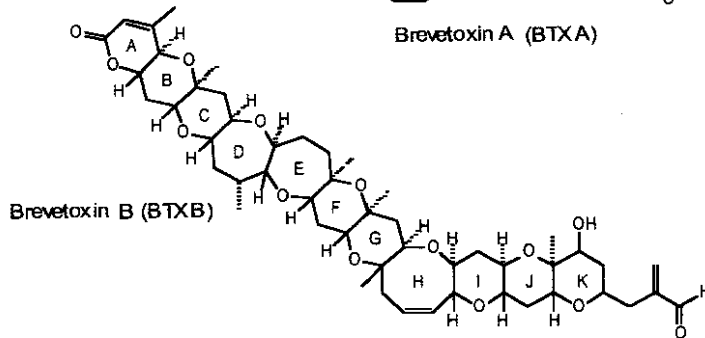
【化 1 3】

ポリ環状ポリエーテル海産毒の構造構造

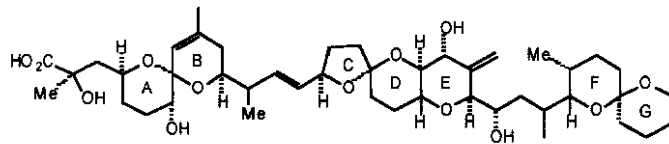


Brevetoxin A (BTXA)

10

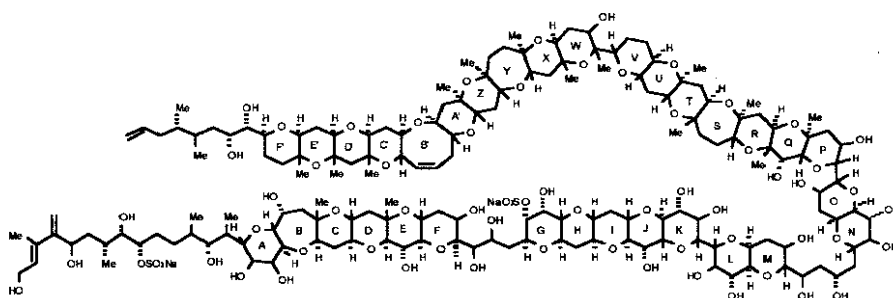


Brevetoxin B (BTXB)



Okadaic acid

20



Maitotoxin

30

化合物 8

【0045】

以上のように、以前調製したモノクローナル抗体 3D11 よりも、強く CTX3C に結合し、かつ特異性も高いモノクローナル抗体 6 種の調製に成功した。

【0046】

40

【発明の効果】

以上述べたように、本発明において設計した合成ハプテン(A B C D E 環部)を用いることにより、前記合成ハプテンおよびシガトキシン CTX3C を特異的に検出限界を改善して検出できるモノクローナル抗体を得ることができる。また、本発明は、危険な毒素の部分構造(無毒)を化学合成し、これを用いて、毒素本体に結合するモノクローナル抗体を調製する新しい抗体調製法を提供するものである。

【0047】

本明細書で使用の略号表

BSA: bovine serum albumin

CTX: ciguatoxin

50

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay HRP: Horseradish Peroxidase (西洋わさびペルオキシダーゼ)

O.D.: Optical Density

OPD: o-Phenylene Diamine

PBS: Phosphate Buffered Saline

Bn: benzyl

DDQ: 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone EDC ; 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride FCS: fetal calf serum

Ig: Immunoglobulin

KLH: keyhole limpet hemocyanine

TBAF: tetra-n-butylammonium fluoride Ts: p-tolenesulfonyl

THF: tetrahydrofuran

OVA: ovalbumin

【図面の簡単な説明】

【図1】 1 - 5はシガトキシンのA ~ E環部を含むBSAとのコンジュゲートAE - BSAに対する抗体価、(1) - (5)はシガトキシンのI ~ M環部を含むBSAとのコンジュゲートIM - BSAに対する抗体価

【図2】 ハイブリドーマ10C9を用いて産生した抗体のA ~ E環部との結合および結合解離定数Kdの算出

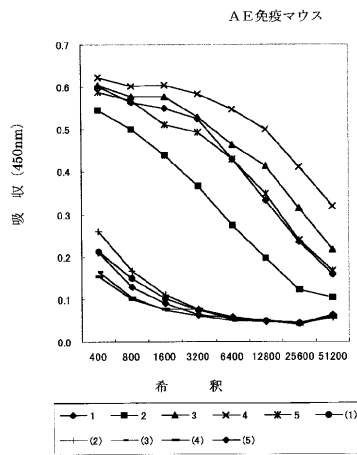
(a) 10C9とABCDE - BSAの結合をCTX3Cを添加して阻害する実験

(b) Klotzプロット

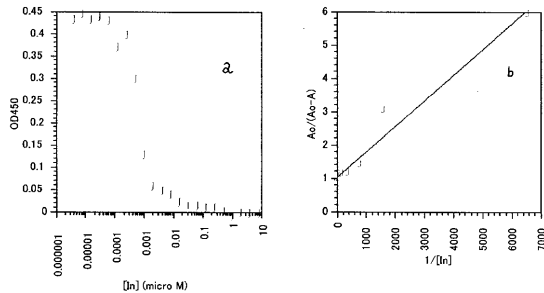
10

20

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 S

審査官 宮澤 浩

(56) 参考文献 特開平 8 - 2 0 1 3 9 2 (J P , A)
特開 2 0 0 3 - 5 5 4 0 0 (J P , A)
Toxicon , 2 0 0 1 年 , vol.39, no.6, p.869-878
天然有機化合物討論会講演要旨集 , 日本 , 1 9 9 6 年 , 38th , p.703-708
Journal of Organic Chemistry , 1 9 9 9 年 , vol.64, no.26 , p.9399-9415
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters , 2 0 0 1 年 8 月 6 日 , vol.11 , p.2037-2040

(58) 調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C07D493/22
C07K 16/44
C12N 5/10
C12N 15/02
C12P 21/08
G01N 33/53

专利名称(译)	通过用具有具有CTX3C的AE环的半抗原部分的蛋白质缀合物免疫获得的雪卡毒素CTX3C抗体及其制备方法		
公开(公告)号	JP3845796B2	公开(公告)日	2006-11-15
申请号	JP2002066754	申请日	2002-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	科学技术振兴事业团		
当前申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
[标]发明人	平間正博 大栗博毅 藤井郁雄 円谷健		
发明人	平間 正博 大栗 博毅 藤井 郁雄 円谷 健		
IPC分类号	C07D493/22 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/53		
FI分类号	C07D493/22 C07K16/44 C12N5/00.B C12N15/00.C C12P21/08 G01N33/53.S C07M9/00 C12N5/00.102 C12N5/12		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4C071/AA01 4C071/BB03 4C071/CC15 4C071/DD31 4C071/EE06 4C071/FF17 4C071/GG06 4C071/HH05 4C071/LL10 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
审查员(译)	宫泽浩		
其他公开文献	JP2003267978A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：获得一种化合物成为合成半抗原，获得一种特异性检测雪卡毒素CTX3C的单克隆抗体，其检测限提高。溶解度：去除-OL后其中式3所示残基的蛋白质结合物-基团与载体蛋白组合，由通式1表示（n是≥1的正整数）。在蛋白质缀合物化合物中，特别是载体蛋白质是牛血清白蛋白（BSA），匙孔血蓝蛋白（KLM）或卵白蛋白（OVA）。

化 3]

