

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/152280

発行日 平成29年4月13日 (2017. 4. 13)

(43) 国際公開日 平成27年10月8日 (2015. 10. 8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/44 (2006.01)	C O 7 K 16/44	4 B O 6 4
C12N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B O 6 5
C12P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 H O 4 5
GO1N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	S

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

出願番号 特願2016-511954 (P2016-511954)	(71) 出願人 000195524 生化学工業株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/060226	
(22) 国際出願日 平成27年3月31日 (2015. 3. 31)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-72431 (P2014-72431)	(74) 代理人 100100549 弁理士 川口 嘉之
(32) 優先日 平成26年3月31日 (2014. 3. 31)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100126505 弁理士 佐貫 伸一
(31) 優先権主張番号 特願2014-162968 (P2014-162968)	(74) 代理人 100131392 弁理士 丹羽 武司
(32) 優先日 平成26年8月8日 (2014. 8. 8)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 渡邊 一平 日本国東京都千代田区丸の内一丁目6番1号 生化学工業株式会社内
	Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13 4B065 AA90X AA90Y AB01 AB02 AC14 BA01 BA08 CA25 CA46 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗コンドロイチン硫酸E抗体

(57) 【要約】

本発明はコンドロイチン硫酸Eに対して高い特異性をもって反応し、特定の硫酸化多糖の検出や単離等に用いることができる抗体を提供する。本発明はコンドロイチン硫酸Eに反応し、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B及びコンドロイチン硫酸Dに反応しない、新規な抗コンドロイチン硫酸E抗体に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

コンドロイチン硫酸 E に反応し、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 B 及びコンドロイチン硫酸 D に反応しない抗体。

【請求項 2】

コンドロイチン硫酸 C、完全脱硫酸化コンドロイチン硫酸 C、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ヘパロサン、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸及び 6 - O - 脱硫酸化コンドロイチン硫酸 E のいずれにも反応しない、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

脂質とコンドロイチン硫酸 E とが結合してなる物質を抗原として免疫することによって得られる請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

脂質がジパルミトイル - L - (- ホスファチジル) エタノールアミンである、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 6】

受領番号が N I T E A B P - 0 1 8 0 8 又は N I T E A B P - 0 1 8 0 9 であ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。

【請求項 7】

請求項 5 に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

20

【請求項 8】

脂質とコンドロイチン硫酸 E とが結合してなる物質を抗原として免疫した動物由来の抗体産生細胞と腫瘍細胞との細胞融合により作製される請求項 7 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 9】

脂質がジパルミトイル - L - (- ホスファチジル) エタノールアミンである、請求項 8 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 10】

受領番号が N I T E A B P - 0 1 8 0 8 又は N I T E A B P - 0 1 8 0 9 であるハイブリドーマ。

30

【請求項 11】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体を試料に接触させる工程を少なくとも含むことを特徴とする、当該試料中に存在するコンドロイチン硫酸 E の検出方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体を少なくとも含む、コンドロイチン硫酸 E の検出キット。

【請求項 13】

脂質とコンドロイチン硫酸 E とが結合してなる物質を抗原として免疫する工程を少なくとも含むことを特徴とする、コンドロイチン硫酸 E に反応し、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 B 及びコンドロイチン硫酸 D に反応しない抗体の製造方法。

40

【請求項 14】

脂質がジパルミトイル - L - (- ホスファチジル) エタノールアミンである、請求項 13 に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明はコンドロイチン硫酸 E に反応し、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 B 及びコンドロイチン硫酸 D に反応しない、新規な抗コンドロイチン硫酸 E 抗体に関する。

【背景技術】

50

【0002】

本出願書類中で使用する略号は以下の通りである。

C S A : コンドロイチン硫酸 A

C S B : コンドロイチン硫酸 B

C S C : コンドロイチン硫酸 C

C S D : コンドロイチン硫酸 D

C S E : コンドロイチン硫酸 E

D S : デルマタン硫酸

H e p : ヘパリン

H S : ヘパラン硫酸

H P N : ヘパロサン

K S : ケラタン硫酸

H A : ヒアルロン酸

d e S - C S C : 完全脱硫酸化コンドロイチン硫酸 C

d e 6 S - C S E : 6 - O - 脱硫酸化コンドロイチン硫酸 E

C S : コンドロイチン硫酸

G A G : グリコサミノグリカン

G l c A : グルクロン酸

I d o A : イズロン酸

G a l N A c : N - アセチルガラクトサミン

P E : ジパルミトイル - L - (- ホスファチジル) エタノールアミン

C - A B C : コンドロイチナーゼ A B C

P B S : リン酸緩衝生理食塩水

C S E - P E : ジパルミトイル - L - (- ホスファチジル) エタノールアミン結合コンドロイチン硫酸 E

【0003】

C S は G A G の一種で、G l c A と G a l N A c の二糖の繰り返し構造からなる直鎖状高分子多糖である。二糖単位に結合した硫酸基の数とその結合位置の違い及びウロン酸異性体の存在が、C S の構造を多様化させる。C S の異性体として C S A 、 C S B (D S とも称される) 、 C S C 、 C S D 、 C S E 等が存在する。

【0004】

C S E は、G l c A と G a l N A c の 4 位と 6 位が硫酸化修飾を受けた基本二糖単位 [G l c A 1 - 3 G a l N A c (4 S 、 6 S)] の繰り返し構造を有する硫酸化多糖である。

【0005】

C S E に対する抗体として、C S E 及び基本二糖単位 [I d o A 1 - 3 G a l N A c (4 S)] の繰り返し構造を有する C S B に反応することが報告されている C h - 1 抗体や C h - 3 抗体 (特許文献 1) 、 C S D の基本二糖単位である D 構造 [G l c A (2 S) 1 - 3 G a l N A c (6 S)] を主に認識するが、C S E にも反応することが報告されている M O - 2 2 5 抗体 (非特許文献 1 、 2 、 3) 、 C S E 、 サメ皮膚由来 D S 、 及び C S A に反応することが報告されている G D 3 G 7 抗体 (非特許文献 4) 等が知られている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】特開 2 0 0 6 - 1 2 9 7 0 1 号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献 1】山形方人著、「ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー (Journal of Biological Chemistry) 」、262 巻、9 号、1987 年 3 月 25 日、p. 4146 - 4152

10

20

30

40

50

【非特許文献2】Ito Yumi著、「グライコバイオロジー (Glycobiology)」、15巻、6号、2005年、p. 593-603

【非特許文献3】福井成行著、「ネイチャー バイオテクノロジー (Nature Biotechnology)」、20号、2002年、p. 1011-1017

【非特許文献4】Gerdy B. ten Dam著、「アメリカンジャーナルオブパソロジー (The American Journal of Pathology)」、171巻、4号、2007年10月、p. 1324 - 1333

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明はCSEに高い特異性をもって反応し、特定の硫酸化多糖の検出や単離等に用いることができる抗体を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は上記課題の解決を目指し、脂質とCSEとを結合させた物質を抗原として新規抗CSE抗体の作製を試みた。

本発明者は鋭意検討の結果、得られた抗体がCSEに反応し、CSA、CSB及びCSDに反応しないことを見出し、CSEと特異的に反応する抗CSE抗体を発明するに至った。

【0010】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1)コンドロイチン硫酸Eに反応し、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B及びコンドロイチン硫酸Dに反応しない抗体。

(2)コンドロイチン硫酸C、完全脱硫酸化コンドロイチン硫酸C、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ヘパロサン、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸及び6-O-脱硫酸化コンドロイチン硫酸Eのいずれにも反応しない、(1)に記載の抗体。

(3)硫酸化コンドロイチン硫酸Bに反応しない、(1)又は(2)に記載の抗体。

(4)脂質とコンドロイチン硫酸Eとが結合してなる物質を抗原として免疫することによって得られる(1)~(3)のいずれかに記載の抗体。

(5)脂質がジパルミトイル-L-(-ホスファチジル)エタノールアミンである、(4)に記載の抗体。

(6)モノクローナル抗体である、(1)~(5)のいずれかに記載の抗体。

(7)受領番号がNITE ABP-01808又はNITE ABP-01809であ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。

(8)(6)に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

(9)脂質とコンドロイチン硫酸Eとが結合してなる物質を抗原として免疫した動物由来の抗体産生細胞と腫瘍細胞との細胞融合により形成される(8)に記載のハイブリドーマ。

(10)脂質がジパルミトイル-L-(-ホスファチジル)エタノールアミンである、(9)に記載のハイブリドーマ。

(11)受領番号がNITE ABP-01808又はNITE ABP-01809であるハイブリドーマ。

(12)(1)~(7)のいずれかに記載の抗体を試料に接触させる工程を少なくとも含むことを特徴とする、当該試料中に存在するコンドロイチン硫酸Eの検出方法。

(13)(1)~(7)のいずれかに記載の抗体を少なくとも含む、コンドロイチン硫酸Eの検出キット。

(14)脂質とコンドロイチン硫酸Eとが結合してなる物質を抗原として免疫する工程を少なくとも含むことを特徴とする、コンドロイチン硫酸Eに反応し、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B及びコンドロイチン硫酸Dに反応しない抗体の製造方法。

(15)脂質がジパルミトイル-L-(-ホスファチジル)エタノールアミンである、(14)に記載の製造方法。

10

20

30

40

50

【発明の効果】**【0011】**

本発明抗体は、CSEに特異的に反応するため、CSEの検出に好適に用いることができる。また、本発明ハイブリドーマを用いることにより、本発明抗体を効率的に産生させることができる。また、本発明CSE検出方法により、CSEを高精度に検出することができる。また、本発明CSE検出キットを用いることにより、本発明CSE検出方法によるCSEの検出をより効率的且つ簡便に行うことができる。

【図面の簡単な説明】**【0012】**

【図1】各種GAGへのE-12C抗体およびE-18H抗体の反応性を示す図である。 10

【図2】硫酸化CSAや硫酸化CSB等の各種GAGへのE-12C抗体およびE-18H抗体の反応性を示す図である。

【図3】E-12C抗体およびE-18H抗体を用いた凍結切片組織染色の図（写真）である。

【図4】E-12C抗体およびE-18H抗体を用いたパラフィン切片組織染色の図（写真）である。

【図5】C-ABCで処理した組織に対するE-12C抗体の染色性を示した図（写真）である。

【発明を実施するための形態】**【0013】**

以下、本発明を更に詳細に説明する。 20

本発明はCSEに反応し、CSA、CSB及びCSDに反応しない抗体を提供する。

【0014】

CSEは、GlcAとGalNAcの4位と6位が硫酸化修飾を受けた基本二糖単位[GlcA 1-3GalNAc(4S, 6S)]の繰り返し構造を有する硫酸化多糖である。本発明抗体が反応するCSEは、このような硫酸化多糖であれば、天然のものであっても、化学的に合成されたものであってもよい。天然のものとしては、例えばイカ由来のものが挙げられる。化学的に合成されたものとしては、例えば、後述する実施例6(1)に記載の方法によりCSAから化学的に合成されたもの（以下、硫酸化CSAともいう）が挙げられる。このようなCSEにおける当該基本二糖単位の存在比は、15%以上であることが好ましく、30%以上であることがより好ましく、40%以上であることがさらに好ましく、50%以上であることが極めて好ましく、60%以上であることが特に好ましく、70%以上であることが最も好ましい。基本二糖単位の存在比は後述する実施例に記載の方法により求めることができる。 30

【0015】

本発明において、特に断らない限り抗体の「反応」とは免疫学的反応又は抗原抗体反応を意味し、抗原との結合により評価することができる。抗体と抗原との結合は、常法であるELISA法、RIA法、ブランク法、凝集反応法、フローサイトメトリー法、組織染色法、ウェスタンブロット法、表面プラズモン共鳴法等によって調べることができる。ELISA法としては、例えば、後述する実施例3(2)に記載の方法を挙げることができる。例えば、抗体を用いてELISA法を行ったときに、抗原の濃度の増加に比例して反応シグナルが増強される場合に、当該抗体は当該抗原に反応するということができる。 40

【0016】

また、抗原に対する本発明抗体の反応性は、例えば、後述する実施例3(2)に記載の方法により測定される本発明抗体のCSEに対する反応性を基準とした、相対的な反応性とすることができる。

【0017】

本願明細書において、「反応しない」とは、抗原と抗体の反応性が、陰性対照又はブランクと同程度であることを意味する。例えば、上記反応性を測定する方法において、CSEに対する反応性を100%とした場合に、抗原と抗体の反応性と陰性対照又はブランク 50

との差が、10%未満であるとき、好ましくは5%未満、より好ましくは4%未満、さらに好ましくは3%未満、極めて好ましくは2%未満、特に好ましくは1%未満、最も好ましくは0.5%未満であるときは、「反応しない」と判断することができる。

【0018】

本発明の抗体は、CSEに反応し、CSA、CSB及びCSDに反応しない抗体であれば特に限定されないが、CSC、deS-CSC、Hep、HS、HPN、KS、HA、de6S-CSEにも反応しない抗体であることが好ましく、硫酸化CSBにも反応しない抗体であることがより好ましい。

ここで、硫酸化CSBとは、後述する実施例6(1)に記載の方法により得られたものを指す。

【0019】

本発明の抗体のクラスは、特に制限されないが、IgMであることが好ましく、IgM鎖であることがより好ましい。

【0020】

本発明の抗体の種類は、特に限定されず、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いが、モノクローナル抗体が好ましい。モノクローナル抗体は、抗体の一部、すなわち、抗体断片であってもよい。前記抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv等が挙げられる。かかる抗体断片は、例えば、ペプチダーゼ等により、モノクローナル抗体を消化することにより得られうる。例えば、Fabフラグメントは、本発明のモノクローナル抗体をパインで処理することにより得られ、F(ab')₂フラグメントは、本発明のモノクローナル抗体をペプシンで処理することにより得られうる。

【0021】

本発明の抗体を得るための方法について、下記の項目に分けて説明する。ただし、本発明の抗体を得る方法は、以下のものには限定されない。

1. 抗原の調製
2. 免疫方法
3. ポリクローナル抗体の取得
4. モノクローナル抗体の取得
5. ハイブリドーマの作製
6. ハイブリドーマの選択とクローニング

【0022】

< 1. 抗原の調製 >

本発明の抗体は、例えば、CSEの抗原性を高めるために、脂質とCSEとが結合してなる物質を抗原として抗体を産生しうる動物を免疫することにより得ることができる。CSEは特に限定されないが、イカ由来であるものが好ましい。脂質は、CSEと結合するものであれば特に限定されないが、リン脂質が好ましく、PEであることがさらに好ましい。脂質とCSEとの結合は特に限定されないが、化学的な結合であることが好ましく、共有結合であることがより好ましく、アミノアルキル結合であることがさらに好ましい。CSEとPEの結合に用いることができるGAGとPEの結合方法は、特開平4-80201に記載の還元末端をラクトン化する方法、特開平4-80202に記載の還元末端の限定酸化方法、特開2003-335801に記載のGAG-テトラブチルアンモニウム(GAG-Bu₄N⁺)塩の中間体を経た調製方法等が挙げられる。

【0023】

< 2. 免疫方法 >

免疫される動物は、CSEに反応する抗体を産生しうる動物であれば特に限定されないが、ブタ、ウシ、ウサギ、ヒツジ、ニワトリ、ラット、マウス等の動物であることが好ましく、マウスであることが好ましい。

免疫のアジュバントは、特に使用しなくてもよいが、使用する場合は、ミョウバン、グラム陽性菌、グラム陰性菌、核酸等、アジュバント効果が期待されるものが好ましく、サ

10

20

30

40

50

ルモネラ菌体膜がより好ましい。

免疫は、例えば、抗原とアジュバントを動物に静脈注射することで行うことができる。注射方法は、これに限らず、皮下注射、腹腔内注射でもよい。通常、投与は数回に分けて実施する。

【0024】

< 3 . ポリクローナル抗体の取得 >

ポリクローナル抗体は、免疫した動物より、血液を採取することで取得することができる。採取した血液中にポリクローナル抗体が存在するか否かは、抗体反応を指標に評価することができる。抗体反応の測定方法としては、ELISA法、RIA法、ブランク法、凝集反応法、フローサイトメトリー法、組織染色法、ウェスタンブロット法等が挙げられる。ポリクローナル抗体は採取された血液そのものでもよく、遠心分離によって得られる血清でもよく、精製されたものでもよい。抗体の精製は、塩析、イオン交換、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動等、生化学的手法を適宜組み合わせることにより達成することができる。

10

【0025】

< 4 . モノクローナル抗体の取得 >

モノクローナル抗体を取得する方法としては、得られたハイブリドーマを、*in vitro*あるいは*in vivo*で培養する方法が挙げられ、目的に応じて選択できる。*in vitro*の場合、ハイブリドーマを培養した際の細胞培養液を回収することで得られ、*in vivo*の場合、ハイブリドーマを移植したマウスの腹水から得ることができる。

20

モノクローナル抗体は、細胞培養液や腹水をそのまま使用してもよく、遠心分離し細胞等を除いたものを使用してもよく、精製したものを使用してもよい。

抗体の精製は、塩析、イオン交換、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動等、生化学的手法を適宜組み合わせることにより達成することができる。

【0026】

CSEに反応するモノクローナル抗体としては、E - 12CおよびE - 18Hと名付けられたハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体（以下、E - 12C抗体、E - 18H抗体という）を挙げることができる。

E - 12C抗体およびE - 18H抗体は、CSEに反応し、他の各種GAG（CSA、CSB、CSC、CSD、deS - CSC、Hep、HS、HPN、KS、HA、de6S - CSE、硫酸化CSB）には反応しない特徴を有する。

30

【0027】

< 5 . ハイブリドーマの作製 >

ハイブリドーマは免疫した動物から、リンパ節又は脾臓を摘出することで得られる抗体産生細胞と腫瘍細胞とを細胞融合することにより作製される。抗体産生細胞はリンパ球が好ましい。腫瘍細胞はミエローマ細胞が好ましく、由来は哺乳動物由来が好ましく、マウス由来がより好ましい。

【0028】

< 6 . ハイブリドーマの選択とクローニング >

ハイブリドーマの選択は、例えば、ハイブリドーマの増殖速度と抗体反応を指標に行うことができる。抗体反応の測定方法としては、ELISA法、RIA法、ブランク法、凝集反応法、フローサイトメトリー法、組織染色法、ウェスタンブロット法、表面プラズモン共鳴法等が挙げられる。

40

【0029】

上記方法によりCSEに反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択し、得られたハイブリドーマについてクローニングを実施する。クローニングの方法としては、限界希釈法等が挙げられる。限界希釈法では、96ウェルプレートに1ウェルあたりの細胞数を1個/ウェル（5.0 cells/ml）又は0.5個/ウェル（2.5 cells/ml）となるように播種するのが好ましい。クローニング操作は2回以上繰り返すことが好

50

ましく、単一クローンとすることが好ましい。

【0030】

具体的なハイブリドーマとしては、E-12CおよびE-18Hと名付けられたハイブリドーマを挙げることができる。

【0031】

上記ハイブリドーマは2014年2月26日（寄託日）、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（NPMD）（〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8-122号室）に寄託し、それぞれ受託番号NITE P-01809、NITE P-01808が付与された。また、平成27年2月17日付で、国際寄託に移管されている（受領番号NITE ABP-01809、NITE ABP-01808）。

10

【0032】

本発明のCSE検出方法は、本発明抗体を試料に接触させる工程が含まれている限り、特に限定されない。

上記の「試料」とは、CSEを含むか、含む可能性を有する試料であれば特に限定されないが、試料の由来となるものとしては、例えば、尿、血液、血漿、血清、関節液、髄液等の体液、分泌物、動物細胞若しくは植物細胞等の細胞、組織、臓器、又は細胞若しくは微生物の培養物等が例示される。

【0033】

本発明のCSE検出方法において、試料中に存在するCSEの検出における具体的方法としては、特に限定されないが、ELISA法、RIA法、ブランク法、凝集反応法、フローサイトメトリー法、組織染色法、ウェスタンブロット法、表面プラズモン共鳴法等が挙げられる。

20

【0034】

本発明のCSE検出方法における検出は、定量的な検出であってもよく、定性的な検出であってもよい。定量的な検出である場合、試料中に存在するCSE濃度は、例えば、予め既知濃度のCSE標準溶液を用いてCSE濃度と検出結果との関係について検量線を作成し、CSE濃度が未知の試料についての検出結果と前記検量線とを照らし合わせるにより行うことができる。

【0035】

本発明CSE検出キットは、本発明抗体を少なくとも含んでいれば、特に限定されない。本発明CSE検出キットによれば、本発明CSE検出方法をより簡便に行うことができる。上記において、「本発明抗体を少なくとも含むキット」は、例えば本発明抗体そのもの（例えば、溶液に溶解した本発明抗体等も含む）を構成成分として含むキット、本発明抗体を固着させた固相を構成成分として含むキット、酵素等により標識した本発明抗体を構成成分として含むキット等が挙げられる。また本発明CSE検出キットの構成成分には、本発明抗体に加えて、例えば2次抗体、反応バッファー、洗浄液、反応基質、CSE標準液などを含むものであってもよい。

30

【0036】

本発明抗体の製造方法は、脂質とコンドロイチン硫酸Eとが結合してなる物質を抗原として免疫する工程を少なくとも含んでいれば、特に限定されない。抗体の具体的な製造方法は、上記1.~6.に記載した方法や後述する実施例に記載の方法を用いることができる。

40

【実施例】

【0037】

以下、本発明を参考例、実施例を挙げて具体的に説明する。なお、本発明は本参考例、実施例に限定されるものではない。

【0038】

（参考例1）CSEの調製

CSEは、イカ軟骨よりプロテアーゼ処理、アルコール沈殿を経て抽出され（J. Bi

50

ochem. 60, 317-321 (1966)、酵素処理、カラムクロマトグラフィ法により調製することができる(J. Biol. Chem. 236, 983-987 (1961)、J. Biol. Chem. 252, 4570-4576 (1977))。

【0039】

上記工程を経て、重量平均分子量14.6 kDa、硫黄含量10.0%、E構造含有率70%以上のCSEを得た(CSEの分析方法は以下の通りである)。当該CSEを抗原CSEとした。

【0040】

(参考例2) CSEの分子量および二糖組成の解析

(1) 分子量解析

10

抗原CSEの分子量は、CSEの0.2%溶液50 μ lをHPLC (HLC-8220 GPC, 東ソー)によるゲルろ過で分析した。ゲルろ過カラムは、TSK gel PWXL G4000 (0008020, 7.8 mm I.D. x 30 cm, 東ソー)、TSK gel PWXL G3000 (0008021, 7.8 mm I.D. x 30 cm, 東ソー)、TSK gel PWXL G2500 (0008022, 7.8 mm I.D. x 30 cm, 東ソー)を連結させて用いた。移動相に0.2 M NaClを使用して、カラム温度40、流速0.6 ml/minの条件で展開した。CSEの検出には示唆屈折計を用いた。平均分子量はCSの分子量標準品を対照にして求めた。尚、標準CSの分子量は光散乱法により測定した。当該標準品を対照として、算出されたCSEの重量平均分子量(Mw)と数平均分子量(Mn)はそれぞれ、14.6 kDaと7.7 kDaで、分子量分散度(Mw/Mn)は1.8であった。

20

【0041】

(2) 二糖組成解析

抗原CSEにおける硫酸基の置換位置を確認する二糖分析は、C-ABCにより分解された二糖画分を、ポストカラム微量蛍光二糖分析HPLCシステム(Toyoda H, et al., J. Biol. Chem. (2000) 275, 2269-2275)を用い定量した。

【0042】

二糖組成はHPLC (Waters)を用いて分析した。逆相カラム (Senshu Pak DOCOSIL SP100, DC-A151-SP, 1 mm ID x 15 cm, センシュー科学)を使用し、励起波長346 nm、測定波長410 nmでの蛍光波長を測定した。溶離液は、A) DW (グラジエント)、B) 0.2 M NaCl (グラジエント)、C) 10 mM Tetra-n-butylammonium hydrogen sulfate 12% (常時)、D) 50% Acetonitrile 17% (常時)を流速1.1 ml/min (Alliance 2695)で流し、0.5% 2-シアノアセトアミド及び0.25 M 水酸化ナトリウムを0.7 ml/min (600E)で流した。カラム温度が55の条件で展開した。

30

【0043】

二糖組成の解析は酵素消化による二糖分析で得られた特定が可能な不飽和二糖の量 (Di-0S、Di-4S、Di-6S、Di-2S、Di-(4,6)S、Di-(2,4)S、Di-(2,6)S、Di-(2,4,6)Sのモル%の合計)を100%として、特定の構造を持つ二糖の割合を示したものであり、当該数値は酵素消化前の硫酸化多糖の硫酸化を反映するものである。標準物質は、CSA、CSC、CSD、DS及びHAの酵素分解物を分離、精製した不飽和二糖を用いた(J. Biol. Chem. 234, 1543-1550 (1968)、Anal. Biochem. 146, 327-335 (1985))。

40

上記手法により算出された二糖組成を次の表1に示す。

【0044】

【表 1】

表 1

試料	ΔDi-								S含量 (%)
	0S	4S	6S	2S	(4,6)S (%)	(2,4)S	(2,6)S	(2,4,6)S	
抗原CSE	6.4	17.5	5.7	0.0	70.4	0.0	0.0	0.0	10.0

上記略語の示す構造は以下の通り表記される。

Di-0S: HexA1-3HexNAc

Di-4S: HexA1-3HexNAc(4S)

Di-6S: HexA1-3HexNAc(6S)

Di-2S: HexA(2S)1-3HexNAc

Di-(4,6)S: HexA1-3HexNAc(4S,6S)

Di-(2,4)S: HexA(2S)1-3HexNAc(4S)

Di-(2,6)S: HexA(2S)1-3HexNAc(6S)

Di-(2,4,6)S: HexA(2S)1-3HexNAc(4S,6S)

上記の HexA は不飽和ウロン酸、HexNAc は N-アセチルヘキサミン、括弧内は硫酸基の結合位置を示す。

【0045】

(参考例 3) 6-O-脱硫酸化 CSE (de6S-CSE) の調製

上記により得られた CSE の 6 位硫酸基を選択的に脱硫酸化し、de6S-CSE を調製した。以下に工程を記す。プロトンフォームとした CSE を無水ピリジンで中和し、CSE ピリジニウム塩を得た。50 mg の CSE ピリジニウム塩と [ビス(トリエチルシリル)アセトアミド] (BTSA) を無水ピリジン中で 60℃、2 時間反応させた。反応液に蒸留水を加え反応を停止させてから、透析により塩を除去した。透析後、溶液を 30 分間煮沸し、室温に戻してから 0.5 M NaOH で pH を 9.5 に調整した。再び透析した溶液を凍結乾燥させ、粉体として、40 mg 回収した。

【0046】

当該粉体を上記の (1) 分子量解析および (2) 二糖組成解析に従って分析した。重量平均分子量 (Mw) と数平均分子量 (Mn) はそれぞれ、12.7 kDa と 6.5 kDa で、分子量分散度 (Mw/Mn) は 1.9 であった。二糖組成は、Di-0S 18.0%、Di-4S 82.0%、Di-6S 0%、Di-2S 0%、Di-(4,6)S 0%、Di-(2,4)S 0%、Di-(2,6)S 0%、Di-(2,4,6)S 0% であり、選択的に 6 位硫酸基が脱硫酸化されたことを確認した。

【0047】

(参考例 4) 完全脱硫酸化 CSC (deS-CSC) の調製

CSC をメタノール/塩化アセチル中で反応させ、脱硫酸化させる方法 (Thomas G. Kantor, Maxwell Schubert. (1957) J. Am. Chem. Soc. 79, 152-153) に従い deS-CSC を調製した。

【0048】

CSC 粉体を上記の (1) 分子量解析及び (2) 二糖組成解析に従って分析した。脱硫酸化前の CSC の二糖組成は、Di-0S 1.9%、Di-4S 17.8%、Di-6S 68.2%、Di-2S 0%、Di-(4,6)S 1.3%、Di-(2,4)S 0%、Di-(2,6)S 10.8%、Di-(2,4,6)S 0% であった。上記調製工程を経て、重量平均分子量 (Mw) と数平均分子量 (Mn) はそれぞれ 5.9 kDa と 3.9 kDa、分子量分散度 (Mw/Mn) は 1.5 となった。二糖組成は、Di-0S 91.2%、Di-4S 0%、Di-6S 8.7%、Di-2S 0

10

20

30

40

50

%、Di-(4,6)S 0%、Di-(2,4)S 0%、Di-(2,6)S 0%、Di-(2,4,6)S 0%となり、脱硫酸化されていることを確認した。

【0049】

(参考例5) ビオチン標識化GAGの調製

各種GAG(CSE、CSA、CSB、CSC、CSD、deS-CSC、Hep、HS、HPN、KS、HA、de6S-CSE) 5 mgを2M NH₄Cl溶液 1 mlに溶解した。その溶液にNaCNBH₃ 50 mgを添加し、70 で48時間反応させた。更に、NaCNBH₃ 25 mg加え、70 で48時間反応させた。反応溶液の塩を除去するため、透析膜(MWCO 12000~14000)で一晩透析した。透析後の溶液を凍結乾燥し、粉体として回収した。

10

【0050】

凍結乾燥させた粉体をPBS 450 μlに溶解させ、ビオチン溶液(Biotin 10 mg/222 μl in DMF)を50 μl添加し、室温で30分間反応させた。反応後、透析膜(MWCO 12000~14000)で一晩透析し、その溶液を凍結乾燥し、ビオチン標識化GAG(CSE、CSA、CSB、CSC、CSD、deS-CSC、Hep、HS、HPN、KS、HA、de6S-CSE)の粉体として回収した。

【0051】

(実施例1)

CSE抗原の調製

(1) CSEテトラブチルアンモニウム塩(以下「CSE-But₄N⁺塩」)の調製

20

参考例1で調製したCSE 1.0 gを蒸留水50 mlに溶解し、Dowex 50W-X8 H⁺ form(217514-500 g, SIGMA)カラム(2.5 cm x 6.5 cm)にアプライした。溶出した溶液の酸性画分としてナトリウム塩フリーとなったCSEを回収した。当該集積通過液にテトラブチルアンモニウム(10% in Water)(T0955, 東京化成工業)を添加し、pHを酸性から中性に調整した(pH 7.15)。溶液を室温で3日間凍結乾燥して、CSE-But₄N⁺塩を乾燥粉末として1.85 g回収した。

【0052】

(2) CSE-PEの調製

30

CSE-But₄N⁺乾燥粉末1.85 gを脱水メタノール25 mlに溶解し、PE(163-161193, Wako)104 mg(150 μmol)を添加した。アルゴンガス雰囲気下、50 で1時間攪拌した後、トリメチルアミンボラン(T1181, 東京化成工業)を36 mg加え、継続して24時間、50 で攪拌した。更に、トリメチルアミンボラン 36 mgを24時間おきに2回に分けて添加し、50 で反応させ、CSE-PE反応溶液を得た。

【0053】

(3) CSE-PEの精製

40

上記(2)記載の反応溶液を減圧濃縮後、メタノールを加え減圧濃縮を繰り返し、トリメチルアミンボランをメタノールとの共沸で除去した。その残渣に0.2 M 酢酸ナトリウム40 mlを加え、室温で2時間攪拌した後、遠心分離(6000 rpm、30分間)により不溶物を除去した。その上清に酢酸ナトリウム飽和エタノールを3倍量(120 ml)加えて目的物を沈殿させた。生成した沈殿を蒸留水に溶解し凍結乾燥により、0.83 gの粉体を回収した。

【0054】

0.8 gの粉体のうち0.7 gを水25 mlおよびメタノール25 mlに溶解させ、セルファインブチル(19905, JNC)ゲルを20 g添加し、懸濁液を攪拌しながら、1 M NaCl 10 mlを滴下し、4 で2時間攪拌した。そして、懸濁液をカラム(2.5 cm x 25 cm)に充填した。

【0055】

カラムの溶液を抜き、0.2 M NaCl 200 mlで洗浄した後、蒸留水50 m

50

1及び30% (v/v) メタノール - 蒸留水混液200 mlで溶出した(メタノール溶出画分)。メタノール溶出画分を減圧濃縮で乾固し蒸留水で再溶解した後、MWC0 12000~14000の透析膜で流水透析後に凍結乾燥により粉体を回収した。回収したCSE-PEの粉体の重量は、50mgであった。

【0056】

(実施例2)

CSE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の取得

(1) 免疫用抗原の調製

実施例1で調製したCSE-PEを最終濃度2 mg/mlとなるようPBSに溶解させ、超音波処理後、最終濃度0.1 mg/mlとして、37℃に加熱した。これに酸処理したSalmonella minnesota菌体膜をPBSで予め1 mg/mlに懸濁した溶液を1136 µl加え、37℃、10分間静置させた。この混合溶液を200 µlに分注し、-20℃に保存した。

10

【0057】

(2) マウス免疫

上記(1)で作製した分注液を0、4、7、11、21、25日目にC3H/HeNマウス3匹(6週齢)に200 µlずつ尾静注より注入した。また、抗体価をELISAにより確認するため、29日目に眼底採血をし、これを4℃、一晩静置後、5000 rpm、10分間遠心した後、血清を回収し、-80℃で保存した。

【0058】

20

(3) ELISA法による抗体反応測定

実施例1で調製したCSE-PEを70% EtOHで2.5 µg/50 µlに溶解し、F底96穴マイクロタイタープレート(3355, サーマフィッシャーサイエンティフィック)に該溶液を50 µl/well加えた。

【0059】

減圧乾燥下で溶液を蒸発させ固相化後、ブロッキング溶液として1% human serum albumin-PBSを200 µl/wellとなるように加え、室温で1時間放置した。ブロッキング溶液を除去後、PBS 200 µl/wellで1回洗浄した。

【0060】

30

PBSで希釈した、上記(1)で作製したマウス血清を50 µl/well加え、室温にて1時間反応させた。血清を除去し、PBS 200 µl/wellで3回洗浄した。2次抗体として、1% human serum albumin-PBSで2000倍に希釈したHorse-radish peroxidase 標識goat anti-mouse IgG+IgMを50 µl/wellとなるように加え、室温で1時間反応させた。2次抗体溶液を除去後、PBS 200 µl/wellで3回洗浄した。

【0061】

発色及び測定は、発色溶液[80 mM クエン酸-リン酸緩衝液(pH 5.6) 5 mlにo-Phenylenediamine 2mgを溶解させた後、30% 過酸化水素水2 µlを加えて調製した溶液]を100 µl/well添加した。遮光放置して発色が見られたところで1 N HCl 溶液100 µl/wellで発色を停止させた。測定波長 $\lambda_1=492$ nm、対照波長 $\lambda_2=630$ nmに設定したマイクロプレートリーダー(SK603)で吸光度を測定した。

40

【0062】

3匹のマウスの血清が、濃度依存的にCSE-PEに反応したため、抗原により免疫されたことを確認した。

【0063】

(4) マウス骨髄腫細胞由来PAI細胞の培養

PAI細胞(JCRB細胞バンク, JCRB0113)を10% FBS-RPMI [培地終濃度10% FBS, 1% PSG, 10mM HEPES, 1 mM sodium

50

m p y r u v a t e 含有]で37、5%CO₂存在下において培養した。

【0064】

(5) マウス脾臓細胞の調製

免疫開始後32日目(最終免疫7日後)のマウスから脾臓を無菌的に取り出し、10% FBS-RPMI培地を入れたシャーレ上で脾臓をほぐした。これを1300rpm、5分間遠心後、10%FBS-RPMI培地で再懸濁し、懸濁液中の組織をセレストレーナーで取り除いた。1300rpm、5分間遠心した沈殿を10%FBS-RPMI培地20mlで再懸濁し、脾臓細胞を回収した。

【0065】

(6) ハイブリドーマの作製

上記で調製したPAI細胞と脾臓細胞をPAI細胞:脾臓細胞=1:5 cell/cellの比率で混合し、ポリエチレングリコール#4000にて融合させた。細胞融合の培養にはHATサプリメント(Gibco)を100倍希釈で加えた10%FBS-RPMI培地を使用した。HAT耐性コロニーの出現が観察できるまで、マウス1匹あたり2枚の96ウェルプレートで10~14日間培養した。

10

【0066】

培養上清が陽性であり、増殖が速いコロニーは、ウェル面積を変更し、6ウェルプレートで培養させた。6ウェルプレートまでに、4回のスクリーニング試験を実施して、抗体価を測定した。

【0067】

(7) クローニング

前述(6)で培養上清が陽性であった細胞を限界希釈法によりクローニング操作した。クローニング操作では、クローニングメディウムCM-B(410022517, エーディア)を使用した。細胞数をそれぞれ1個/well(5.0 cells/ml)、0.5個/well(2.5 cells/ml)となるように希釈し、96穴マイクロプレートに播種し、1クローンあたり2枚の96穴プレートで10~14日間培養した。前述(5)と同様に、4回のスクリーニング試験を経て陽性であったクローンを選択した。

20

【0068】

続いて、一次クローニングで得られたクローンをを用い、2回目のクローニング操作を実施した。上述と同様の操作で、陽性であったクローンを選択した。

30

【0069】

(8) ハイブリドーマの選択

前述(7)で選択したクローンのCSEに対する特異性を評価し、2つのクローンを得た。この2つのクローン名をそれぞれE-12C、E-18Hとした。上記のハイブリドーマクローンは、2014年2月26日(寄託日)、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター(NPMD)に寄託し、それぞれ受託番号NITE P-01809、NITE P-01808が付与された。また、平成27年2月17日付で、国際寄託に移管されている(受領番号NITE ABP-01809、NITE ABP-01808)。

40

【0070】

(実施例3)

モノクローナル抗体の特徴

(1) モノクローナル抗体の生産

目的のCSEに反応するモノクローナル抗体は、上記ハイブリドーマを培養し、その培養液から遠心分離により細胞を除去し取得した(培養上清)。ハイブリドーマE-12CよりE-12C抗体、ハイブリドーマE-18HよりE-18H抗体をそれぞれ取得した。

【0071】

(2) 各種GAGによるELISA試験

E-12C抗体及びE-18H抗体について、各種GAG(CSE、CSA、CSB、

50

CSC、CSD、deS-CSC、Hep、HS、HPN、KS、HA、de6S-CSE) に対する反応性をビオチン標識化GAG固相化プレートによるELISA法で検討した。CSEはイカ由来、CSAはクジラ由来、CSBはブタ由来、CSCはサメ由来、CSDはサメ由来、Hepはウシ由来、HSはブタ由来、HPNはE. coli K5株由来、KSはサメ由来、HAは鶏由来のものを使用した。以下の表2に使用した各種GAGの分子量、分散値及び硫黄含量を示す。

【表2】

表2

GAG	Mw (kDa)	Mw/Mn	S含量 (%)
CSA	16.9	1.2	6.8
CSB	16.4	1.0	7.0
CSC	42.1	1.5	7.4
CSD	31.7	1.1	8.1
CSE	14.6	1.8	10.0
de6S-CSE	12.7	1.9	5.7
deS-CSC	7.5	1.3	0.6
Hep	8.2	1.3	15.5
HS	17.8	1.3	-
HPN	40.8	1.3	0
KS	12.9	1.2	-
HA	18.7	1.6	0

— : 未測定

【0072】

ストレプトアビジンコートプレートであるBioBind ストリップアセンブリ (95029 293, サーマフィッシャーサイエンティフィック) にPBSで希釈した各種ビオチン標識化GAG 1 µg/mlを加え、室温で1時間放置することで固相化した。同様に、同濃度のBiotin溶液とPBSを各々50 µl/wellとなるようにプレートに加え、陰性対照及びブランクとした。

【0073】

固相化に用いた溶液を除去後、ブロッキング溶液として1% human serum albumin - PBSを200 µl/wellとなるように加え、室温で1時間放置した。ブロッキング溶液を除去後、PBS 200 µl/wellで1回洗浄し、培養上清を50 µl/well加え、室温にて1時間反応させた。以降の二次抗体からの工程は実施例2(3)に記載のELISA法による抗体反応測定と同様の方法で吸光度を測定した(図1)。得られた吸光度の値から、抗体のCSEに対する反応性(吸光度の値)を100%とし、抗体と各固相化物質との相対的な反応性(%)を算出した。結果を次の表3に示す。

【0074】

【表 3】

表 3

固相化物質	反応性(%)	
	E-12C	E-18H
CSA	0.8	1.0
CSB	1.3	1.4
CSC	0.9	1.1
CSD	0.8	1.2
CSE	100	100
de6S-CSE	1.4	1.8
deS-CSC	1.0	1.6
Hep	1.4	1.7
HS	1.2	1.7
HPN	0.5	0.8
HA	0.7	1.1
KS	1.6	1.0
Biotin	1.4	1.6
PBS	1.4	1.4

10

20

【0075】

CSEと、E-12C抗体及びE-18H抗体との反応性から陰性対照を差し引いた値はいずれも98%以上であり、E-12C抗体及びE-18H抗体がいずれも強力にCSEと反応することが示された。

30

【0076】

CSE以外のGAG(CSA、CSB、CSC、CSD、Hep、HS、HPN、KS、HA、deS-CSC、de6S-CSE)に対する吸光度はPBSやBiotinを固相化したブランク及び陰性対照の吸光度と同程度であった(図1)。CSE以外のGAGと抗体の反応性から、陰性対照を差し引くと、いずれも0.5%未満であった。これにより、E-12C抗体とE-18H抗体は、共にCSE以外のGAGとは反応せず、CSEと特異的に反応することが示された。

【0077】

(実施例4)

抗体のサブタイプの測定

IsoQuick(TM)マウスモノクローナル抗体アイソタイプ判定キット(IsoQuick5, シグマ)およびIsoQuick(TM)マウスモノクローナル抗体アイソタイプ判定用ストリップ(i9410-25EA, シグマ)を用い、E-12C抗体及びE-18H抗体のサブタイプを判定した。

40

【0078】

実施例3(1)より得られるE-12C抗体及びE-18H抗体(培養上清)にIsoQuick kitの先端を5分間浸し、バンドが確認できたところで終了した。出現したバンドの位置から抗体が属するタイプを判定した。その結果、E-12C抗体及びE-18H抗体は共にIgMの単一バンドであり、L鎖は鎖であった。

【0079】

50

(実施例5)

CSE検出キットの作製

以下の構成からなるCSE検出キットを作製した。

1. 実施例3(1)より得られるモノクローナル抗体
2. 2次抗体(Horse-radish peroxidase 標識goat anti-mouse IgG+IgM)
3. 用時調製 発色溶液セット(80 mM クエン酸-リン酸緩衝液(pH 5.6)、o-Phenylenediamine、30% 過酸化水素水)
4. 反応停止液(1 N HCl)

【0080】

10

(実施例6)

硫酸化CSA及び硫酸化CSBに対するE-12C抗体及びE-18H抗体の反応性

(1) 硫酸化CSA及び硫酸化CSBの調製

CSA 100 mgを蒸留水50 mlに溶解し、陽イオン交換樹脂ダイヤイオン(PK220、三菱化学)(2.5 cm x 6.5 cm)にアプライした。溶出した溶液の酸性画分としてナトリウム塩フリーとなったCSAを回収した。当該集積通過液にテトラブチルアミン(TBA)を添加し、pHを酸性から中性に調整した。溶液を室温で凍結乾燥して、CSA-TBA塩を得た。

当該CSA-TBA塩をホルムアミド/ジメチルホルムアミドを1:4で混合させた溶媒に溶解させ、硫酸化剤である三酸化硫黄ピリジンコンプレックスを添加した。硫酸化剤の添加量は、二糖ユニット当たり8当量となるよう添加した。硫酸化反応後の溶液に、蒸留水を添加し反応を停止させ、水酸化ナトリウムで中和させた。この溶液をMWCO12000から14000の透析膜で一晩透析させた後に、凍結乾燥により160 mgの硫酸化CSAを得た。このようにしてCSAのGalNAcの6位に硫酸基を導入することで硫酸化CSAを調製することが可能である(Carbohydr. Res. 158, 183-190(1986))。CSBも同様に硫酸化させ、160 mgの硫酸化CSBを得た。

20

【0081】

(2) 硫酸化CSA及び硫酸化CSBの分子量および二糖組成の解析

解析は「(参考例2)の(1)分子量解析、(2)二糖組成解析」に記載の方法で実施した。結果を表4に示す。表中では、硫酸化剤を8当量添加した硫酸化CSAをCSA-8S、同様に硫酸化剤を8当量添加した硫酸化CSBをCSB-8Sとしている。

30

【0082】

【表4】

表4

GAG	MW (kDa)	ΔDi-								S含量 (%)
		0S	4S	6S	2S (%)	(4,6)S	(2,4)S	(2,6)S	(2,4,6)S	
CSA	16.9	2.2	97.8	0	0	0	0	0	0	6.8
CSA-8S	20.1	0.1	3.6	27.6	0	59.4	0	4.7	4.6	10.6
CSB	16.4	5.9	75.6	8.4	0	1.1	8.0	1.0	0	7.0
CSB-8S	20.8	2.5	8.0	8.9	0	66.0	2.9	1.7	10.0	10.9

40

上記略語の示す構造は以下の通り表記される。

Di-0S: HexA1-3HexNAc

50

Di-4S : HexA1-3HexNAc(4S)
 Di-6S : HexA1-3HexNAc(6S)
 Di-2S : HexA(2S)1-3HexNAc
 Di-(4,6)S : HexA1-3HexNAc(4S,6S)
 Di-(2,4)S : HexA(2S)1-3HexNAc(4S)
 Di-(2,6)S : HexA(2S)1-3HexNAc(6S)
 Di-(2,4,6)S : HexA(2S)1-3HexNAc(4S,6S)

上記の HexA は不飽和ウロン酸、HexNAc は N-アセチルヘキソサミン、括弧内は硫酸基の結合位置を示す。

【0083】

基本二糖単位が [GlcA1-3GalNAc(4S)] である CSA の 6 位が硫酸化された CSA-8S の Di-(4,6)S 構造の含有率は 59.4% であった。これにより、CSE の基本二糖単位 [GlcA1-3GalNAc(4S,6S)] (以下、E 構造ともいう) を主に含有する硫酸化 CSA が調製されたことを確認した。また、基本二糖単位が [IdoA1-3GalNAc(4S)] である CSB の 6 位が硫酸化された CSB-8S の Di-(4,6)S 構造の含有率は 66.0% であった。これにより、基本二糖単位 [IdoA1-3GalNAc(4S,6S)] を主に含有する硫酸化 CSB が調製されたことを確認した。

【0084】

上記で調製した硫酸化 CSA 及び硫酸化 CSB を「参考例 5 のビオチン標識化 GAG の調製」に記載の方法によりビオチン化し、ビオチン化硫酸化 CSA 及びビオチン化硫酸化 CSB を調製した。

【0085】

E-12C 抗体及び E-18H 抗体の硫酸化 CSA と硫酸化 CSB に対する反応性を ELISA により評価するため、「実施例 3 のモノクローナル抗体の特徴」に記載の方法に従い試験した。結果を表 5 及び図 2 に示す。

【0086】

【表 5】

表 5

固定化物質	反応性 (%)	
	E-12C	E-18H
CSA	0.9	0.2
硫酸化CSA	97.8	98.9
CSB	0.6	0.7
硫酸化CSB	0.6	0.7
CSE	100	100
Biotin	1.3	1.2
PBS	1.2	1.0

【0087】

硫酸化 CSA と、E-12C 抗体及び E-18H 抗体との反応性から陰性対照を差し引いた値はいずれも 96% 以上であり、その反応性は CSE とほぼ同等であった。E-12C 抗体及び E-18H 抗体はいずれも強力に硫酸化 CSA と反応した。

【0088】

E-12C 抗体及び E-18H 抗体は、イカ由来の CSE のみではなく、CSA より化

10

20

30

40

50

学的に合成されたCSE（硫酸化CSA）にも反応することが確認された。

【0089】

CSA、CSB、硫酸化CSBの吸光度はブランク及び陰性対照の吸光度と同程度であった。これにより、E-12C抗体及びE-18H抗体は、CSA、CSB、硫酸化CSBには反応しないことが確認された。

【0090】

（実施例7）

表面プラズモン共鳴法による相互作用解析

（1）アミンカップリング法によるリガンドGAGの固定化

センサーチップCM5表面にコーティングされている直鎖デキストランには負に帯電したカルボキシル基が導入されている。カルボキシル基をNHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）により活性化し、pH5.5の10mM酢酸緩衝液に溶解させた50μg/mlのストレプトアビジンを固定化した。固定化後に残った活性NHS基をエタノールアミンによりブロックした。ブロック後、50RU（レゾナンスユニット）以上の固定化量が得られるようリガンドとなるビオチン化GAGを添加した。リファレンスセルも同様にビオチンを固定化させネガティブコントロールセルとした。ランニング緩衝液としてPBSを流速10μl/minで流し、温度25℃の条件で実施した。

10

【0091】

（2）相互作用測定

0.22μmフィルターで透過させたE-12C抗体及びE-18H抗体の培養上清をアナライトとして、相互作用解析した。抗体培養上清はPBSにより希釈して、IgM濃度として2nMとなるように調製した。流速20μl/minで注入し、リガンドと相互作用させた。リファレンスセルのレスポンスを差し引いたセンサーグラムを表示させ、レスポンスがない場合は検出されないもの（ND）とした。解析可能なレスポンスが得られた場合は、1:1 binding modelにより、結合速度定数（ka）、解離速度定数（kd）の値から解離定数（KD）値を算出した。KD値は、kd/kaにより求めることができる。

20

【0092】

（3）分子量の異なるCSEの調製

分子量の異なるCSEは、酵素処理、カラムクロマトグラフィ法により調製することができる（J. Biol. Chem. 236, 983-987（1961）、J. Biol. Chem. 252, 4570-4576（1977））。当該文献を参考に分子量が異なる5種類のCSEを調製した。

30

【0093】

調製した5種類の分子量が異なるCSEについて解析した。解析は「参考例2（1）分子量解析、（2）二糖組成解析」に記載の方法で実施した。結果を表6に示す。

【0094】

【表6】

表6

CSE	MW (kDa)	ΔDi-								S含量 (%)
		0S	4S	6S	2S (%)	(4,6)S	(2,4)S	(2,6)S	(2,4,6)S	
CSE-68K	68.0	9.3	23.8	5.5	0.0	61.4	0.0	0.0	0.0	9.3
CSE-56K	56.7	8.0	25.2	5.8	0.0	61.0	0.0	0.0	0.0	9.4
CSE-24K	24.1	8.1	23.1	5.7	0.0	63.0	0.0	0.0	0.0	9.5
CSE-14K	14.6	6.4	17.5	5.7	0.0	70.4	0.0	0.0	0.0	10.0
CSE-8K	8.7	9.3	19.5	4.5	0.0	66.7	0.0	0.0	0.0	9.6

40

50

上記略語の示す構造は以下の通り表記される。

Di-0S: HexA1-3HexNAc
 Di-4S: HexA1-3HexNAc(4S)
 Di-6S: HexA1-3HexNAc(6S)
 Di-2S: HexA(2S)1-3HexNAc
 Di-(4,6): HexA1-3HexNAc(4S,6S)
 Di-(2,4): HexA(2S)1-3HexNAc(4S)
 Di-(2,6): HexA(2S)1-3HexNAc(6S)
 Di-(2,4,6)S: HexA(2S)1-3HexNAc(4S,6S)

上記の HexA は不飽和ウロン酸、HexNAc は N-アセチルヘキソサミン、括弧内は硫酸基の結合位置を示す。

【0095】

重量平均分子量 (Mw) が 68.0 kDa、E 構造含有率が 61.4% の CSE を CSE-68K とした。重量平均分子量 (Mw) が 56.7 kDa、E 構造含有率が 61.0% の CSE を CSE-56K とした。重量平均分子量 (Mw) が 24.1 kDa、E 構造含有率が 63.0% の CSE を CSE-24K とした。重量平均分子量 (Mw) が 14.6 kDa、E 構造含有率が 70.4% の CSE を CSE-14K とした。この CSE-14K は抗体作製の免疫抗原に使用したものと同一である。重量平均分子量 (Mw) が 8.7 kDa、E 構造含有率が 66.7% の CSE を CSE-8K とした。これら上記 5 種類の CSE を使用した。

【0096】

(4) 分子量の異なる CSE に対する相互作用解析

上記表 6 に記載の 5 種類の CSE と de6S-CSE をセンサーチップに固定化させて相互作用解析した。試験は、「実施例 7 の (1) アミンカップリング法によるリガンドの固定化、(2) 相互作用測定」に記載の方法で実施した。結果を表 7 に示す。

【0097】

【表 7】

表 7

抗体	リガンド CSE	MW (kDa)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
E-12C	CSE-68K	68.0	3.5×10^7	5.5×10^{-4}	1.7×10^{-11}
	CSE-56K	56.7	3.0×10^7	1.0×10^{-3}	3.4×10^{-11}
	CSE-24K	24.1	3.8×10^6	8.2×10^{-4}	2.3×10^{-10}
	CSE-14K	14.6	5.7×10^6	2.0×10^{-3}	3.6×10^{-10}
	CSE-8K	8.7	3.7×10^6	1.4×10^{-3}	3.7×10^{-10}
抗体	リガンド CSE	MW (kDa)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
E-18H	CSE-68K	68.0	2.9×10^7	3.8×10^{-4}	1.5×10^{-11}
	CSE-56K	56.7	3.4×10^7	8.5×10^{-4}	2.5×10^{-11}
	CSE-24K	24.1	6.3×10^6	7.6×10^{-4}	1.2×10^{-10}
	CSE-14K	14.6	7.3×10^6	1.8×10^{-3}	2.5×10^{-10}
	CSE-8K	8.7	4.3×10^6	1.2×10^{-3}	2.9×10^{-10}

【0098】

CSE-14KとE-12C抗体及びE-18H抗体とのKD値はそれぞれ 3.6×10^{-10} (M)、 2.5×10^{-10} (M)となり、抗原抗体反応として強い相互作用を示した。E-12C抗体及びE-18H抗体と抗原CSEの6位を選択的に脱硫酸化したde6S-CSEとの反応性は検出されなかった(ND)。

【0099】

E-12C抗体とCSE-68KとのKD値は 1.7×10^{-11} (M)、CSE-56Kでは 3.4×10^{-11} (M)、CSE-24Kでは 2.3×10^{-10} (M)、CSE-14Kでは 3.6×10^{-10} (M)、CSE-8Kでは 3.7×10^{-10} (M)となった。E-18H抗体とCSE-68KとのKD値は 1.5×10^{-11} (M)、CSE-56Kでは 2.5×10^{-11} (M)、CSE-24Kでは 1.2×10^{-10} (M)、CSE-14Kでは 2.6×10^{-10} (M)、CSE-8Kでは 2.9×10^{-10} (M)となった。いずれのKD値も 1×10^{-9} (M)以下であり、強力な相互作用を示すことが確認された。

10

【0100】

(5) E構造含有率の異なる硫酸化CSAに対する相互作用解析

CSA-TBA塩に対して硫酸化剤である三酸化硫黄ピリジンコンプレックスを2、4、6当量添加して反応させた。以降の工程は実施例6(1)硫酸化CSA及びCSBの調製に記載の方法に従い調製した。調製された硫酸化CSAの分子量および二糖組成解析を参考例2(1)分子量解析、(2)二糖組成解析に記載の方法で実施した。結果を表8に示す。

20

【0101】

【表8】

表8

GAG	MW (kDa)	ADI								S含量 (%)
		0S	4S	6S	2S (%)	(4,6)S	(2,4)S	(2,6)S	(2,4,6)S	
CSA	16.9	2.2	97.8	0	0	0	0	0	0	6.8
CSA-2S	19.0	1.4	50.1	32.0	0	14.1	0	2.3	0.1	8.0
CSA-4S	19.6	0.8	34.4	28.4	0	32.7	0	3.1	0.6	8.7
CSA-6S	18.0	0.8	15.2	30.2	0	45.9	0	4.7	3.2	9.7
CSA-8S	20.1	0.1	3.6	27.6	0	59.4	0	4.7	4.6	10.5
CSB	16.4	5.9	75.6	8.4	0	1.1	8.0	1.0	0	7.0
CSB-8S	20.8	2.5	8.0	8.9	0	66.0	2.9	1.7	10.0	10.9

30

上記略語の示す構造は以下の通り表記される。

Di-0S: HexA1-3HexNAc

Di-4S: HexA1-3HexNAc(4S)

Di-6S: HexA1-3HexNAc(6S)

Di-2S: HexA(2S)1-3HexNAc

Di-(4,6): HexA1-3HexNAc(4S,6S)

Di-(2,4): HexA(2S)1-3HexNAc(4S)

Di-(2,6): HexA(2S)1-3HexNAc(6S)

Di-(2,4,6)S: HexA(2S)1-3HexNAc(4S,6S)

40

上記のHexAは不飽和ウロン酸、HexNAcはN-アセチルヘキサミン、括弧内は硫酸基の結合位置を示す。

【0102】

硫酸化剤である三酸化硫黄ピリジンコンプレックスを2当量添加して調製した生成物をCSA-2S、4当量添加して調製した生成物をCSA-4S、6当量添加して調製した

50

生成物をCSA-6Sと表記した。CSA-2SのE構造含有率は14.1%、CSA-4SのE構造含有率は32.7%、CSA-6SのE構造含有率は45.9%となり、添加した硫酸化剤の当量に応じて、E構造が生成された。「実施例6の表4」に記載したCSA、CSA-8S、CSB、CSB-8Sの結果を合わせて、表9に表記した。

【0103】

【表9】

表9

抗体	リガンド GAG	E構造含有率 (%)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
E-12C	CSA	0.6	ND	ND	ND
	CSA-2S	14.1	ND	ND	ND
	CSA-4S	32.7	8.0×10^5	8.4×10^3	1.0×10^{-8}
	CSA-6S	45.9	4.0×10^5	1.4×10^3	3.5×10^{-9}
	CSA-8S	59.4	1.0×10^6	7.4×10^4	7.8×10^{-10}
抗体	リガンド GAG	E構造含有率 (%)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
E-18H	CSA	0.6	ND	ND	ND
	CSA-2S	14.1	ND	ND	ND
	CSA-4S	32.7	9.6×10^5	9.0×10^3	9.4×10^{-9}
	CSA-6S	45.9	7.1×10^5	1.2×10^3	1.8×10^{-9}
	CSA-8S	59.4	1.4×10^6	6.0×10^3	4.3×10^{-10}

【0104】

E-12C抗体とCSA及びCSA-2Sとの反応性は検出されなかった。E-12C抗体とCSA-4SとのKD値は 1.0×10^{-8} (M)、CSA-6Sでは 3.5×10^{-9} (M)、CSA-8Sでは 7.8×10^{-10} (M)となった。E-18H抗体とCSA及びCSA-2Sとの反応性は検出されなかった。E-18H抗体とCSA-4SとのKD値は 9.4×10^{-9} (M)、CSA-6Sでは 1.8×10^{-9} (M)、CSA-8Sでは 4.3×10^{-10} (M)となった。

【0105】

E-12C抗体及びE-18H抗体のCSB、硫酸化CSBに対する反応性は検出されなかった。

【0106】

(実施例8)

抗CSE抗体の組織染色性を以下の通り検討した。

(1)凍結切片における免疫組織染色

イカ軟骨を小片化し、ティシュー・テックO.C.T.コンパウンド(サクラファインテックジャパン株式会社)に組織片を埋め、液体窒素で凍らせて凍結切片を作製した。

【0107】

作製した切片を、10%中性緩衝ホルマリン液により室温で10分間固定後、50mmol/Lトリス塩酸緩衝液で2回洗浄した。

【0108】

10

20

30

40

50

0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄し、0.3%過酸化水素加メタノールでブロッキングを室温で10分間行った。0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄し、0.1%カゼイン溶液(和光純薬工業株式会社)でブロッキングを室温で60分間行った。

【0109】

0.1%カゼイン溶液で12 µg/mlに希釈した抗CSE抗体(E-12C又はE-18H)を37℃で60分間反応させた。この際、陰性対照として、mouse IgM(シグマ)を使用した。

【0110】

0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄後、ビオチン標識抗マウスIgG + IgA + IgM抗体(ヒストファイン SAB-PO(M)キット、株式会社ニチレイバイオサイエンス)を室温にて10分間反応させた。0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ヒストファイン SAB-PO(M)キット、株式会社ニチレイバイオサイエンス)を室温にて5分間反応させた。0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄後し、50 mmol/Lトリス塩酸緩衝液に5分間浸漬した後、5分間DAB(同仁化学研究所)で発色させた。超純水で洗浄後、常法に従い、脱水、透徹操作を行い、封入した。

10

【0111】

得られた染色像を図3に示す。E-12C抗体及びE-18H抗体いずれでも染色が見られた。陰性対照として用いたmouse IgMでは染色は見られなかった。

20

【0112】

(2) パラフィン切片における免疫組織染色

イカ軟骨を小片化し、10%中性緩衝ホルマリン液に固定後、パラフィン包埋し、パラフィン切片を作製した。

【0113】

作製した切片を、脱パラフィン処理(キシレン)、親水化処理(アルコール下降系列: 99.9%、95%、80%、70%エタノール)した後、50 mmol/Lトリス塩酸緩衝液で2回洗浄した。

【0114】

0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄し、0.3%過酸化水素加メタノールでブロッキングを室温で10分間行った。0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄し、アビジン溶液(ヒストファイン 内因性アビジン・ビオチンブロッキングキット、株式会社ニチレイバイオサイエンス)でブロッキングを室温で10分間行った。0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄し、ビオチン溶液(ヒストファイン 内因性アビジン・ビオチンブロッキングキット、株式会社ニチレイバイオサイエンス)でブロッキングを室温で10分間行った。0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄し、0.1%カゼイン溶液(和光純薬工業株式会社)でブロッキングを室温で60分間行った。

30

【0115】

0.1%カゼイン溶液で12 µg/mlに希釈した抗CSE抗体(E-12C又はE-18H)を37℃で60分間反応させた。この際、陰性対照として、mouse IgM(シグマ)を使用した。

40

【0116】

0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄後、ビオチン標識抗マウスIgG + IgA + IgM抗体を室温にて10分間反応させた。0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを室温にて5分間反応させた。0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄後し、50 mmol/Lトリス塩酸緩衝液に5分間浸漬した後、5分間DAB(同仁化学研究所)で発色させた。超純水で洗浄後、常法に従い、脱水、透徹操作を行い、封入した。

【0117】

50

得られた染色像を図4に示す。E-12C抗体及びE-18H抗体のいずれでも染色が見られた。陰性対照として用いたmouse IgMでは染色は見られなかった。

【0118】

(3) C-ABC処理した凍結切片の免疫組織染色

C-ABC処理し、CSE等のコンドロイチン硫酸が除去された組織の染色性を検討した。

【0119】

イカ軟骨を小片化し、ティシュー・テックO.C.T.コンパウンド(サクラファインテックジャパン株式会社)に組織片を埋め、液体窒素で凍らせて凍結切片を作成した。

【0120】

作製した切片を、10%中性緩衝ホルマリン液により室温で10分間固定後、50 mmol/Lトリス塩酸緩衝液で2回洗浄し、その後50 mmol/Lトリス塩酸緩衝液で250 mU/mlに希釈したC-ABCで37℃にて120~180分間消化した。C-ABC未処理の対照切片は、50 mmol/Lトリス塩酸緩衝液で37℃にて120~180分間浸漬させた。0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄し、0.3%過酸化水素加メタノールでブロッキングを室温にて10分間行った。0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄し、0.1%カゼイン溶液(和光純薬工業株式会社)でブロッキングを室温にて60分間行った。

10

【0121】

0.1%カゼイン溶液で12 µg/mlに希釈した抗CSE抗体(E-12C)を37℃で60分間反応させた。この際、陰性対照として、mouse IgM(シグマ)を使用した。

20

【0122】

0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄後、ビオチン標識抗マウスIgG + IgA + IgM抗体(ヒストファイン SAB-PO(M)キット、株式会社ニチレイバイオサイエンス)を室温にて10分間反応させた。0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ヒストファイン SAB-PO(M)キット、株式会社ニチレイバイオサイエンス)を室温にて5分間反応させた。0.01 mol/Lリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄後、50 mmol/Lトリス塩酸緩衝液に5分間浸漬した後、5分間DAB(同仁化学研究所)で発色させた。超純水で洗浄後、常法に従い、脱水、透徹操作を行い、封入した。

30

【0123】

得られた染色像を図5に示す。C-ABC未処理の切片は染色が見られたが、C-ABC処理した切片では、染色性は完全に消失した。なお、E-18H抗体についても同様の結果が得られた。

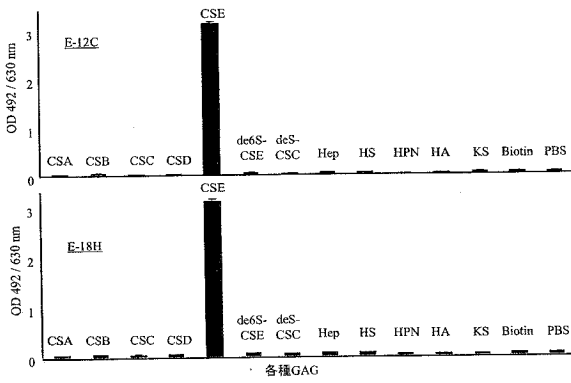
【0124】

日本特許出願2014-072431号(出願日:2014年3月31日)及び日本特許出願2014-162968号(出願日;2014年8月8日)の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

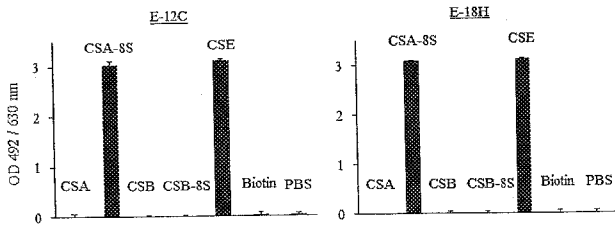
本明細書に記載された全ての文献、特許出願、及び技術規格は、個々の文献、特許出願、及び技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書に参照により取り込まれる。

40

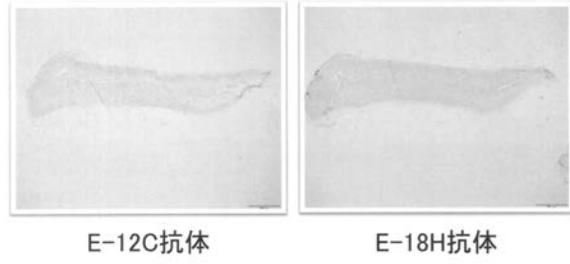
【 図 1 】



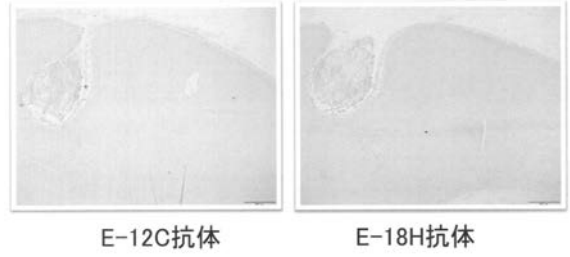
【 図 2 】



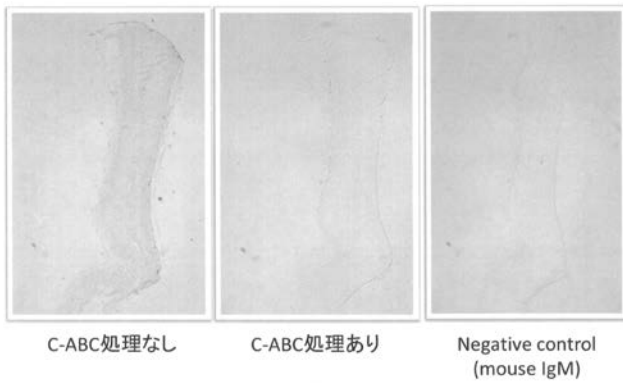
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/060226
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/44(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/44, C12N5/10, C12N15/02, G01N33/53, G01N33/577, C12P21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAPLUS (STN), JSTPLUS (JDreamIII), JMEDPLUS (JDreamIII), JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 90/06954 A1 (THE UNIVERSITY OF SYDNEY), 28 June 1990 (28.06.1990), pages 13 to 14, 20 & CA 2005794 A1	1, 3-5, 7-9, 11, 12 3-5, 7-9, 11-14 2, 6, 10
Y		
A		
X	US 2008/0009607 A1 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY), 10 January 2008 (10.01.2008), paragraphs [0108] to [0110]; fig. 2 (Family: none)	1, 3-5, 7-9, 11, 12 3-5, 7-9, 11-14 2, 6, 10
Y		
A		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 June 2015 (17.06.15)		Date of mailing of the international search report 30 June 2015 (30.06.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/060226

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	SMETSERS, T. F. C. M. et al., Human single-chain antibodies reactive with native chondroitin sulfate detect chondroitin sulfate alterations in melanoma and psoriasis, Journal of Investigative Dermatology, 2004, Vol.122, p.707-716	1,3-5,11,12 3-5,7-9, 11-14 2,6,10
X Y A	SUGAHARA, K. and MIZUMOTO, S., Chapter 3 ISCSM2011 Chondroitin sulfate E-type structure at tumor cell surface is involved in experimental metastasis, Advances in Experimental Medicine and Biology, 2012, Vol.749, p.33-45	1,3-5,11,12 3-5,7-9, 11-14 2,6,10
Y A	JP 2006-507233 A (Sloan Kettering Institute for Cancer Research), 02 March 2006 (02.03.2006), claims & US 2003/0153492 A1 & WO 2004/011476 A1 & EP 1527081 A1	3-5,7-9, 11-14 1,2,6,10
Y A	JP 2007-306828 A (Tokai University), 29 November 2007 (29.11.2007), paragraph [0006] & US 2010/0324271 A1 & WO 2007/132917 A1 & EP 2022854 A1	3-5,7-9, 11-14 1,2,6,10
Y A	JP 9-12600 A (Shiseido Co., Ltd.), 14 January 1997 (14.01.1997), claims (Family: none)	3-5,7-9, 11-14 1,2,6,10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 0 2 2 6	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/44(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/44, C12N5/10, C12N15/02, G01N33/53, G01N33/577, C12P21/08			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAplus (STN), JSTPlus (JDreamIII), JMEDPlus (JDreamIII), JST7580 (JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X Y A	WO 90/06954 A1 (THE UNIVERSITY OF SYDNEY) 1990.06.28, 第13頁～第14頁、第20頁 & CA 2005794 A1	1, 3-5, 7-9, 11, 12 3-5, 7-9, 11-14 2, 6, 10	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 17.06.2015		国際調査報告の発送日 30.06.2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 上村 直子	4 B 4 5 0 8
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 0 2 2 6
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	US 2008/0009607 A1 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2008.01.10, [0108] ~ [0110] 段落、FIG. 2 (ファミリーなし)	1, 3-5, 7-9, 11, 12 3-5, 7-9, 11-14 2, 6, 10
X Y A	SMETSERS, T. F. C. M. et al., Human single-chain antibodies reactive with native chondroitin sulfate detect chondroitin sulfate alterations in melanoma and psoriasis, Journal of Investigative Dermatology, 2004, Vol.122, p.707-716	1, 3-5, 11, 12 3-5, 7-9, 11-14 2, 6, 10
X Y A	SUGAHARA, K. and MIZUMOTO, S., Chapter 3 ISCSM2011 Chondroitin sulfate E-type structure at tumor cell surface is involved in experimental metastasis, Advances in Experimental Medicine and Biology, 2012, Vol.749, p.33-45	1, 3-5, 11, 12 3-5, 7-9, 11-14 2, 6, 10
Y A	JP 2006-507233 A (スローン-ケッタリング インスティテュート フォー キャンサー リサーチ) 2006.03.02, 特許請求の範囲 & US 2003/0153492 A1 & WO 2004/011476 A1 & EP 1527081 A1	3-5, 7-9, 11-14 1, 2, 6, 10
Y A	JP 2007-306828 A (学校法人東海大学) 2007.11.29, [0006] 段落 & US 2010/0324271 A1 & WO 2007/132917 A1 & EP 2022854 A1	3-5, 7-9, 11-14 1, 2, 6, 10
Y A	JP 9-12600 A (株式会社資生堂) 1997.01.14, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	3-5, 7-9, 11-14 1, 2, 6, 10

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA20 BA10 CA40 DA76 EA50

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	抗硫酸软骨素E抗体		
公开(公告)号	JPWO2015152280A1	公开(公告)日	2017-04-13
申请号	JP2016511954	申请日	2015-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	生化学工業株式会社		
申请(专利权)人(译)	生化学工業株式会社		
[标]发明人	渡邊 一平		
发明人	渡邊 一平		
IPC分类号	C07K16/44 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/44 C07K2317/92 C12N5/12 C12N2510/04 C12N15/02 G01N2400/40 C07K2317/14 G01N33/5308		
FI分类号	C07K16/44 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53.S		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50		
代理人(译)	川口 义行		
优先权	2014072431 2014-03-31 JP 2014162968 2014-08-08 JP		
其他公开文献	JP6659024B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供一种抗体，其能够以高特异性与硫酸软骨素E反应，并且可以用于例如特定硫酸化多糖的检测，分离等。本发明涉及一种新型硫酸软骨素E抗体，其与硫酸软骨素E反应，不与硫酸软骨素A反应，不与硫酸软骨素B反应，不与硫酸软骨素D反应。

(19) 日本国特許庁 (JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号 WO2015/152280
発行日 平成29年4月13日 (2017. 4. 13)	(43) 国際公開日 平成27年10月8日 (2015. 10. 8)	
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/44 (2006.01)	C07K 16/44	4B064
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4B065
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4H045
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	S
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)		
出願番号 特願2016-511954 (P2016-511954)	(71) 出願人 000195524 生化学工業株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/060226		
(22) 国際出願日 平成27年3月31日 (2015. 3. 31)		
(31) 優先権主張番号 特願2014-72431 (P2014-72431)	(74) 代理人 100100549 弁理士 川口 嘉之	
(32) 優先日 平成26年3月31日 (2014. 3. 31)	(74) 代理人 100126505 弁理士 佐實 伸一	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100131392 弁理士 丹羽 武司	
(31) 優先権主張番号 特願2014-162968 (P2014-162968)	(72) 発明者 渡邊 一平 日本国東京都千代田区丸の内一丁目6番1号 生化学工業株式会社内	
(32) 優先日 平成26年8月8日 (2014. 8. 8)	Fターム(参考) 4B064 AC27 CA10 CA20 CC24 DA13 4B065 AA90X AA90Y AB01 AB02 AC14 BA01 BA08 CA25 CA46	最終頁に続く
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		

(54) 【発明の名称】 抗コンドロイチン硫酸E抗体