

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-292087

(P2005-292087A)

(43) 公開日 平成17年10月20日(2005.10.20)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 S	2 GO 4 5
CO 7 H 19/16	GO 1 N 33/53 U	2 GO 5 4
CO 7 K 16/44	CO 7 H 19/16	4 BO 2 4
C 1 2 N 5/10	CO 7 K 16/44	4 BO 6 4
C 1 2 N 15/02	GO 1 N 21/78 C	4 BO 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 26 O L (全 28 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-111373 (P2004-111373)	(71) 出願人	000001926
(22) 出願日	平成16年4月5日(2004.4.5)		塩野義製薬株式会社
			大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
		(71) 出願人	502337583
			クアーク・バイオテック・インコーポレイテッド
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
			555 フリーモント カイザードライブ
			6536
		(74) 代理人	100077012
			弁理士 岩谷 龍
		(72) 発明者	沼田 義人
			大阪府大阪市福島区鷺洲5丁目12番4号
			塩野義製薬株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンに対する抗体

## (57) 【要約】

【課題】 従来は5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン(MTA)を特異的に認識する抗体、特にモノクロナル抗体が存在しなかった。またスベルミジンシンターゼの活性を高感度で測定できるアッセイ法が存在しなかった。

【解決手段】 新規な免疫原を作製し、これを用いることにより非常に特異性の高い抗体を作製することができた。この抗体を用いることにより高感度でスベルミジンシンターゼの測定も可能となった。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンと特異的に結合するモノクロナル抗体。

## 【請求項 2】

5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンに対する反応性を100%とした場合に、脱炭酸化 S-アデノシルメチオニンに対する交差反応性が0.1%以下である請求項 1 記載のモノクロナル抗体。

## 【請求項 3】

該交差反応性が0.01%以下である請求項 1 記載のモノクロナル抗体。

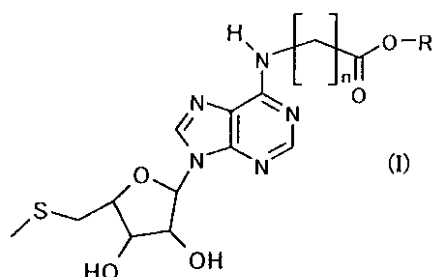
## 【請求項 4】

5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンに対する反応性を100%とした場合に、脱炭酸化 S-アデノシルメチオニンに対する交差反応性が0.1%以下であるポリクロナル抗体。

## 【請求項 5】

一般式 (I) :

## 【化 1】



(式中、nは1以上の整数、-C(=O)-ORは活性エステルである)で表される化合物。

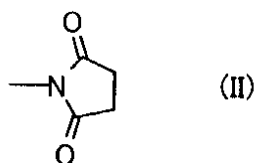
## 【請求項 6】

一般式 (I) で表される化合物においてnが5である請求項 5 記載の化合物。

## 【請求項 7】

Rが以下の式 (II) :

## 【化 2】



で表される請求項 6 記載の化合物。

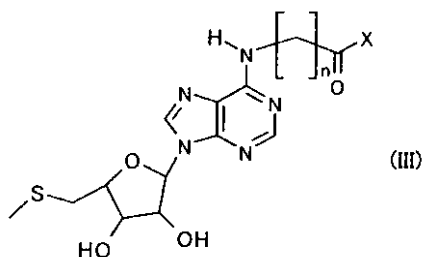
## 【請求項 8】

5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンのプリン基にキャリアタンパクを結合させることを特徴とする免疫原。

## 【請求項 9】

一般式 (III) :

## 【化 3】



(式中、nは1以上の整数、Xはキャリアタンパクである)で表される請求項 8 記載の免疫原

。

【請求項 10】

一般式(III)で表される化合物においてnが5である請求項9記載の免疫原。

【請求項 11】

Xがカギアナカサガイのヘモシアニンである請求項10記載の免疫原。

【請求項 12】

請求項8から10のいずれかに記載の免疫原に対する請求項4記載のポリクロナル抗体。

【請求項 13】

請求項8から10のいずれかに記載の免疫原に対する請求項1から3のいずれかに記載のモノクロナル抗体。

10

【請求項 14】

5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンと特異的に結合するモノクロナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 15】

受託番号がFERM P-19707である請求項14記載のハイブリドーマ。

【請求項 16】

請求項15に記載のハイブリドーマによって産生される請求項1から3のいずれかに記載のモノクロナル抗体。

【請求項 17】

標識されたものである請求項1から4のいずれかに記載の抗体。

20

【請求項 18】

該標識が、酵素、蛍光物質、着色ビーズ、放射性同位元素、金属類、またはビオチンである請求項17記載の抗体。

【請求項 19】

標識がペルオキシダーゼである請求項18記載の抗体。

【請求項 20】

標識がユウロピウムクリプテートである請求項18記載の抗体。

【請求項 21】

請求項1から4のいずれかに記載の抗体を用いたアッセイ法。

【請求項 22】

抗体を用いたアッセイ法がELISA法である請求項21記載の方法。

30

【請求項 23】

抗体を用いたアッセイ法がホモジニアスアッセイ法である請求項21記載の方法。

【請求項 24】

該ホモジニアスアッセイ法が蛍光共鳴エネルギー転移を用いたアッセイ法である請求項23記載の方法。

【請求項 25】

スペルミジンシンターゼの活性を測定するものである請求項21から24のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

変形性関節症の治療・予防剤を探索するものである請求項21から25のいずれかに記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン(以下MTAともいう。)に対する特異性の高い抗体を提供する。さらに、この抗体を用いたアッセイ法を提供する。

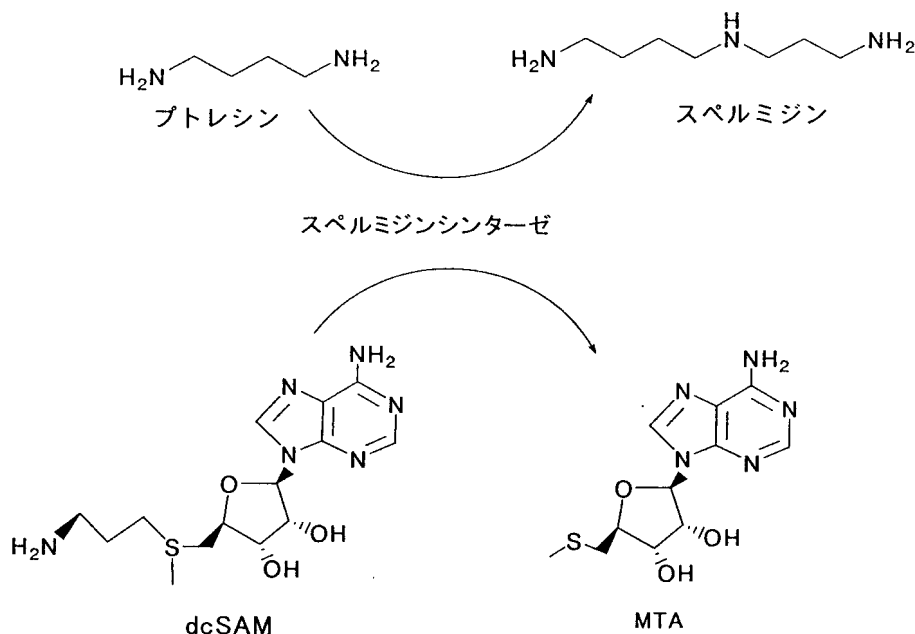
【背景技術】

【0002】

50

スperlミジンシンターゼ(以下SPDSともいう。)は、以下に示す反応式によりスperlミジンを合成する。スperlミジンは塩基性低分子有機化合物であるポリアミンの1種であり、タンパク質及び核酸合成の盛んな組織中に多く含まれている。スperlミジンは核酸との相互作用による核酸の安定化と構造変化に関っており、種々の核酸合成系への促進作用を有し、タンパク質合成系の活性化等の多岐にわたる生理的作用を示す物質として知られている。そのため、動物組織におけるスperlミジンシンターゼの活性測定方法の研究が行われてきた。

#### 【化1】



10

20

#### 【0003】

スperlミジンシンターゼの活性を測定する手法としては、基質であるブトレシンや脱炭酸化S-アデノシルメチオニン(以下dcSAMともいう。)を $^{14}\text{C}$ で標識してイオン交換クロマトグラフィー(非特許文献1)、ペーパー電気泳動法(非特許文献2)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等により測定する方法(非特許文献3)が報告されている。しかし、これらの方法はいずれも反応後に測定対象を分離する工程を要するために非効率的であり時間を要していた。

30

#### 【0004】

また、放射線免疫測定法(RIA)によりSPDSの酵素活性を測定する方法が報告されている(非特許文献4,5,6)。一般的にこのような免疫学的手法により検出を行うには特異性の高い抗体が必要である。先行技術は反応副産物の5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンに対する抗体を用いているが、いずれもポリクロナル抗体であり、しかもその抗体価(titer)は2,000倍程度と低かった。また5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンと類似構造を有する脱炭酸化S-アデノシルメチオニンとの交差反応性は約1%であり特異性も低かった。このような抗体では固相酵素免疫測定法(以下ELISAともいう)を始めとする免疫学的検出方法への適用が難しく、その検出能を十分に引き出せない場合がありその改善が望まれていた。

40

【非特許文献1】J.Biol.Chem 1969年、第244巻、p682

【非特許文献2】Biochem.J 1978年、第169巻、p709

【非特許文献3】Journal of Chromatography 1981年、第226巻、p208

【非特許文献4】Journal of Chromatography 1988年、第440巻、p141

【非特許文献5】J.Biochem.Mol.Biol.1997年、第30巻、p403

【非特許文献6】J.Biochem.Mol.Biol.1997年、第30巻、p443

【発明の開示】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の課題は、MTAと特異的に結合するポリクロナル抗体及びモノクロナル抗体およびこれらを利用した高感度のアッセイ法を提供することである。

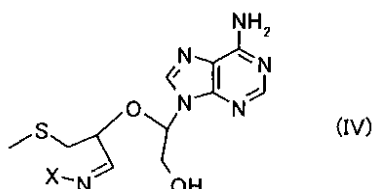
【課題を解決するための手段】

【0006】

従来は、過ヨウ素酸酸化法（Erlangerら、1964）によりMTAの糖部分を開環してキャリアタンパクを結合した一般式(IV)で示される免疫原により抗体を作製していた。しかし本発明者らは鋭意工夫を重ねてMTAの塩基部分にリンカーを導入した一般式(III)で示される免疫原を用いることによりMTAを特異的に認識する抗体を作製することができることを見出した。

10

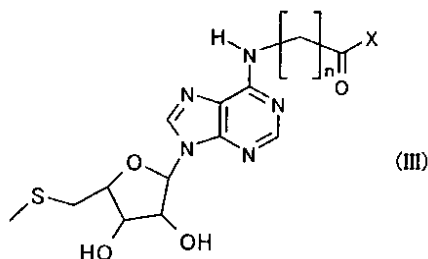
【化2】



(式中、Xはキャリアタンパクである)

【化3】

20



(式中、nは1以上の整数、Xはキャリアタンパクである)

【0007】

30

すなわち本発明は、以下の発明を包含するものである。

[1]

5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンと特異的に結合するモノクロナル抗体。

[2]

5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンに対する反応性を100%とした場合に、脱炭酸化S-アデノシルメチオニンに対する交差反応性が0.1%以下である上記[1]記載のモノクロナル抗体。

[3]

該交差反応性が0.01%以下である上記[1]記載のモノクロナル抗体。

[4]

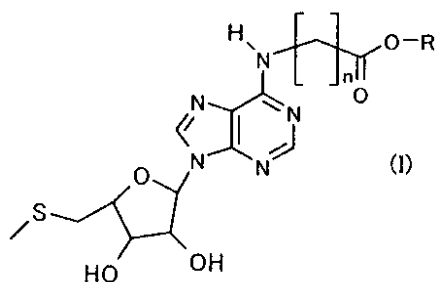
5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンに対する反応性を100%とした場合に、脱炭酸化S-アデノシルメチオニンに対する交差反応性が0.1%以下であるポリクロナル抗体。

40

[5]

一般式(I)：

## 【化 4】



(式中、 $n$ は1以上の整数、 $-C(=O)-OR$ は活性エステルである)で表される化合物。

10

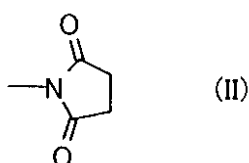
[ 6 ]

一般式 (I) で表される化合物において  $n$  が 5 である [ 5 ] 記載の化合物。

[ 7 ]

$R$  が以下の式 (II) :

## 【化 5】



20

で表される [ 6 ] 記載の化合物。

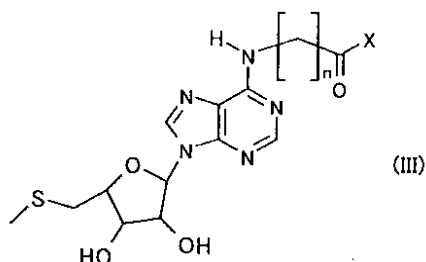
[ 8 ]

5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンのプリン基にキャリアタンパクを結合させることを特徴とする免疫原。

[ 9 ]

一般式 (III) :

## 【化 6】



30

(式中、 $n$ は1以上の整数、 $X$ はキャリアタンパクである)で表される上記 [ 8 ] 記載の免疫原。

[ 1 0 ]

一般式 (III) で表される化合物において  $n$  が 5 である上記 [ 9 ] 記載の免疫原。

[ 1 1 ]

40

$X$  がカギアナカサガイのヘモシアニンである上記 [ 1 0 ] 記載の免疫原。

[ 1 2 ]

上記 [ 8 ] から [ 1 0 ] のいずれかに記載の免疫原に対する上記 [ 4 ] 記載のポリクロナル抗体。

[ 1 3 ]

上記 [ 8 ] から [ 1 0 ] のいずれかに記載の免疫原に対する上記 [ 1 ] から [ 3 ] のいずれかに記載のモノクロナル抗体。

[ 1 4 ]

5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンと特異的に結合するモノクロナル抗体を産生するハイブリドーマ。

50

[ 1 5 ]

受託番号がFERM P-19707である上記[ 1 4 ]記載のハイブリドーマ。

[ 1 6 ]

上記[ 1 5 ]に記載のハイブリドーマによって産生される上記[ 1 ]から[ 3 ]のいずれかに記載のモノクロナル抗体。

[ 1 7 ]

標識されたものである上記[ 1 ]から[ 4 ]のいずれかに記載の抗体。

[ 1 8 ]

該標識が、酵素、蛍光物質、着色ビーズ、放射性同位元素、金属類、またはビオチンである上記[ 1 7 ]記載の抗体。

10

[ 1 9 ]

標識がペルオキシダーゼである上記[ 1 8 ]記載の抗体。

[ 2 0 ]

標識がユウロピウムクリプテートである上記[ 1 8 ]記載の抗体。

[ 2 1 ]

上記[ 1 ]から[ 4 ]のいずれかに記載の抗体を用いたアッセイ法。

[ 2 2 ]

抗体を用いたアッセイ法がELISA法である上記[ 2 1 ]記載の方法。

[ 2 3 ]

抗体を用いたアッセイ法がホモジニアスアッセイ法である上記[ 2 1 ]記載の方法。

20

[ 2 4 ]

該ホモジニアスアッセイ法が蛍光共鳴エネルギー転移を用いたアッセイ法である上記[ 2 3 ]記載の方法。

[ 2 5 ]

スperlミジンシンターゼの活性を測定するものである上記[ 2 1 ]から[ 2 4 ]のいずれかに記載の方法。

[ 2 6 ]

変形性関節症の治療・予防剤を探索するものである上記[ 2 1 ]から[ 2 5 ]のいずれかに記載の方法。

【発明の効果】

30

【 0 0 0 8 】

本発明の抗体を用いることによって5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンを高感度で検出することが可能となり、ELISA法やホモジニアスアッセイなど迅速、簡便で高感度なアッセイが可能となった。また本発明の抗体はスperlミジンシンターゼの活性の測定、さらには変形性関節症の治療・予防剤の探索に利用できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 0 9 】

「5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン」は、スperlミジンまたはスperlミンなどのポリアミンが生合成される過程において、脱炭酸化S-アデノシルメチオニン等から産生される。5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンは各臓器におけるポリアミンシンターゼの活性測定のほか、腫瘍のマーカーとしても用いられる。

40

【 0 0 1 0 】

「脱炭酸化S-アデノシルメチオニン」は、ポリアミン生合成過程でスperlミジンシンターゼもしくはスperlミンシンターゼの基質として、スperlミジンやスperlミン等の合成にアミノプロピル基供与体として利用される。なお、脱炭酸化S-アデノシルメチオニンは、S-アデノシルメチオニン(SAM)から脱炭酸化酵素による脱炭酸反応によって生成する。

【 0 0 1 1 】

「交差反応性(以下、cross reactivityともいう。)」は、免疫交差反応性のことをいう。ある抗原で免疫することにより得られた抗体が別の抗原(関連抗原)とも結合反応を示すときに、この反応を交差反応という。目的とする抗原とその抗体の反応量を基準とした

50

場合に関連抗原とその抗体との反応量の程度を交差反応性として示すことができる。本明細書中においてはMTAとdcSAMの親和性の相対値(%)で示した。値が低いほど交差反応性が低く、目的の抗原に対して特異性を有することを示す。主に目的抗原と関連抗原の構造が非常に類似しているために起こることが多い。

#### 【0012】

本発明抗体においても、5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンと脱炭酸化S-アデノシルメチオニンはその構造が類似していることにより交差反応が起きると考えられる。その測定法の一例を実施例に示す。本発明にかかるポリクロナル抗体は5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンに対する反応性を100%とした場合に、脱炭酸化S-アデノシルメチオニンに対する交差反応性が0.1%以下であるポリクロナル抗体である。また本発明にか  
10  
かかるモノクロナル抗体は5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンと特異的に結合するモノクロナル抗体であり、好ましくは5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンに対する反応性を100%とした場合、脱炭酸化S-アデノシルメチオニンに対する交差反応性が0.1%以下であるモノクロナル抗体であり、さらに好ましくは該交差反応性が0.01%以下であるモノクロナル抗体である。

#### 【0013】

「抗体価(titer)」とは、血清反応において、抗血清の単位容量中に含まれている、抗原に対して結合する抗体量をいう。実際の測定は抗血清の希釈系列に対して一定量の抗原を加えて行い、測定値は反応の生じる終末点における希釈倍数であらわす。

#### 【0014】

「親和性(affinity)」とは抗原抗体間の結合力をいう。本明細書中においては、抗体に対する標識MTAの結合量を50%阻害するMTAもしくはdcSAMの濃度(IC50値)を指標として親和性を示した。IC50値はlogistic曲線による回帰モデル(Rodbardら、Symposium on RIA and related procedures in medicine, P165, Int. Atomic Energy Agency, 1974)で算出した。  
20

#### 【0015】

「ハプテン」とは、部分的な、または不完全な抗原である。ハプテンは主として低分子量の物質であり、単独では抗体の産生を刺激する能力はないが、化学的方法や架橋剤によりキャリアタンパクと結合させて人工抗原として免疫するとハプテンに対する抗体を得ることができる。本発明においては5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンは低分子化合  
30  
物であるため単独で抗体を産生することは難しいと考えられることから通常は異種のタンパク質や合成ポリペプチドなどのキャリアタンパクとの複合体を調製して免疫原に用いた。

#### 【0016】

ハプテンをキャリアタンパクと結合させる場合、通常は反応性官能基を導入したハプテンの誘導体を作製する。この誘導体を本明細書中では「活性化ハプテン」という。活性化ハプテンには特異性の高い抗体を作製するために適当な長さのリンカー(架橋)を用いることができる。また、抗体が認識するのはハプテンの部分構造であるが、この認識部位は反応性官能基の導入位置により影響を受けるので、目的とする抗体に応じて、反応性官能基の導入部位を適切に選択することが重要である。  
40

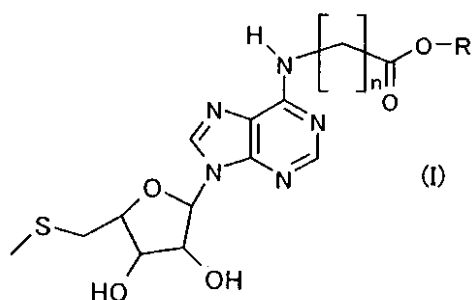
#### 【0017】

本発明にかかる「活性化ハプテン」は、従来のようにヌクレオチド体の糖部分について反応性を高めたものではなく塩基部分のプリン基に反応性官能基を導入したことを特徴とするものであり、好ましくは一般式(I)で示される化合物のように6位のNH基に反応性官能基を導入したものである。また反応性官能基とハプテンを架橋するリンカーはいずれの長さでも良いが、例えば直鎖状アルキレン鎖であれば、好ましくは炭素数1以上の長さを有するものであり、さらに好ましくは1~10の長さを有するものであり、特に好ましくは炭素数5を有するものである。また反応性官能基はキャリアタンパクのアミノ残基と結合する反応性が高いものであればよく、好ましくは活性エステル体(例えば、コハク酸イミド体、フタルイミド体、マレイミド体など)であるが、特に好ましくは、式(V)で表される  
50



化合物である。

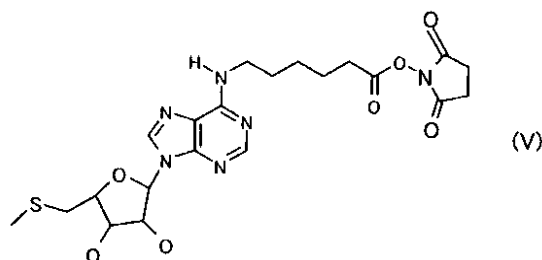
【化 7】



10

(式中、nは1以上の整数、 $-C(=O)-OR$ は活性エステルである)

【化 8】



20

【0018】

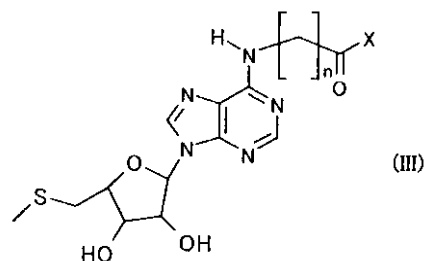
「キャリアタンパク」には、抗原性を高めることが知られている各種のタンパクをいずれも使用できる。その例としては、例えばウシ血清アルブミン (BSA)、ウシチオグロブリン (BTG)、カギアナカサガイのヘモシアニン (KLH) などの高分子物質のほかに合成ポリペプチドなどを例示できる。

【0019】

「免疫原」とは、本明細書で使用される場合、生物において免疫応答を生じる、または引き起こす能力を有する物質を表す。本発明の免疫原としては5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの抗原決定基になりうる部分構造を有する活性化ハプテンとキャリアタンパクとを連結してなり、好ましくは5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンのプリン基にキャリアタンパクを結合させたものであり、より好ましくは一般式 (III) :

30

【化 9】



40

(式中、nは1以上の整数、Xはキャリアタンパクである)で表される免疫原であり、さらに好ましくはnが1~10である免疫原であり、特に好ましくはnが5である免疫原である。またXはカギアナカサガイのヘモシアニンが好ましい。

【0020】

本発明の抗体の製造に用いられる免疫原は、活性化ハプテンとキャリアタンパクを用いて、Antibodies: A Laboratory Manual, (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 等に記載されている活性エステル法により作製することができる。またAntibodies: A Laboratory Manual, (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 等に記載のその他の方法、例えば、カルボジイミド法やグルタルアルデヒド法やジアゾ法によっても作製で

50

きる。

【0021】

ポリクロナル抗体は、例えば免疫原で免疫した哺乳動物から採血することにより得られる。該方法において、免疫原で免疫される哺乳動物としては、一般には、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラットなどが用いられる。今回はモノクロナル抗体とポリクロナル抗体の性能を同一種で比較するために、マウスを被免疫動物として用いた。

【0022】

免疫方法は一般的方法により、例えば免疫原を哺乳動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射などにより投与することにより行い得る。より具体的には、例えば免疫原を生理食塩水含有リン酸緩衝液(PBS)、生理食塩水などで適当濃度に希釈し、所望により通常のアジュバントと併用して、供試動物に2~3週間間隔で数回投与する。マウスを用いる場合は、一回の投与量を一匹あたり50~100 $\mu$ g程度とする。ここで前記アジュバントとは抗原と共に投与したとき、非特異的に抗原に対する免疫反応を増強する物質をいう。通常用いられるアジュバントとしては、百日咳ワクチン、フロインドアジュバントなどを例示できる。最終免疫後3~10日目に哺乳動物の採血を行うことによって、抗血清を得ることができる。抗血清についてはそのままでも、また精製してポリクロナル抗体としても使用できる。

10

【0023】

ポリクロナル抗体の精製方法としては非特異的精製法と特異的精製法が挙げられる。非特異的精製法とは塩析法やイオン交換クロマトグラフィ法などにより主にイムノグロブリン画分を取得することを目的とする。特異的精製法としては固定化抗原によるアフィニティクロマトグラフィー法などが挙げられる。

20

【0024】

モノクロナル抗体の製造方法は、免疫原で免疫した哺乳動物の形質細胞(免疫細胞)と哺乳動物の形質細胞腫細胞(ミエローマ細胞)との融合細胞(ハイブリドーマ、hybridoma)を作製し、これより所望の5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンを認識するモノクロナル抗体を産生するクローンを選択し、該クローンを培養することにより実施できる。このモノクロナル抗体の製造は、基本的には常法に従うことができる(Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497.(1975) 参照)。

【0025】

該方法において、免疫原で免疫される哺乳動物は、細胞融合に使用する形質細胞腫細胞との適合性を考慮して選択するのが望ましく、マウス、ラットなどが用いられる。免疫方法についてはポリクロナル抗体の作製の場合と同様とする。但し最終免疫後3~10日目に免疫動物から脾臓細胞を採取する。

30

【0026】

得られた免疫細胞からハイブリドーマを得るには、例えば、「分子細胞生物学基礎実験法」(南江堂 堀江武一ら 1994)等に記載されている方法により、継体培養可能な細胞とすることを目的として、例えば、センダイウイルスやポリエチレングリコール存在下、形質細胞腫細胞と抗体を産生する免疫細胞とを融合させて、ハイブリドーマを得ることができる。ここで用いられる形質細胞腫細胞は、同じ恒温動物でも同種の恒温動物由来の形質細胞腫細胞を用いることが望ましく、例えばマウスを免疫動物として得られた脾臓細胞と融合させる場合、マウスミエローマ細胞を用いることが好ましい。形質細胞腫細胞はp3x63-Ag8.U1などの公知のものを利用できる。

40

【0027】

ハイブリドーマは、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン添加培地)により選択し、コロニーが確認された段階で、培養上清に分泌される抗体と抗原との結合を調べる(スクリーニングする)ことにより目的の抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

【0028】

スクリーニングする方法としては、例えば、スポット法、凝集反応法、ウエスタンブロット法、ELISA法などの一般に抗体の検出に用いられている種々の方法が挙げられるが、

50

好ましくは、例えば後記実施例に詳述するように、ハイブリドーマの培養上清について、5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンとの反応性を指標とするELISA法に従い実施される。このスクリーニングによって、5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンと特異的に反応する目的抗体産生株をスクリーニングすることができる。

#### 【0029】

スクリーニングの結果得た目的抗体産生株のクローニングは、通常の限界希釈法、軟寒天法などにより実施できる。クローニングされたハイブリドーマは、必要に応じて、血清培地または無血清培地で大量培養することができる。この培養によれば、比較的高純度の所望抗体を培養上清として得ることができる。また、ハイブリドーマと適合性のある哺乳動物、例えばマウスなどの腹腔に、ハイブリドーマを接種して、所望抗体をマウス腹水として大量に回収することもできる。

10

#### 【0030】

上記ハイブリドーマの一具体例としては、常法に従って得られるハイブリドーマ(クローンMTA-7H8)、即ち、後記実施例記載の6-[5-(2,5-ジオキシピロリジン-1-イルオキシ)ペンチル]-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンとKLHからなる免疫原により作製されたハイブリドーマを例示することができる。このハイブリドーマは、平成16年3月2日に、独立行政法人 産業技術総合研究所内 特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1-1-1 中央第6)に、「Mouse hybridoma MTA-7H8」なる表示で寄託されており、その受託番号は FERM P-19707である。本発明の抗体産生ハイブリドーマの培養上清およびマウスなどの腹水は、そのまま粗製抗体液として用いることができる。またこれらは常法に従って、硫酸アンモニウム分画、塩析、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどにより精製して、精製抗体とすることができる。

20

#### 【0031】

本発明抗体は、以下の理化学的および免疫学的性質を有している。

(1)特異性：脱炭酸化S-アデノシルメチオニンとの交差反応性が0.1%以下、さらには0.01%以下を示す。

(2)免疫グロブリンクラス：IgG<sub>1</sub>(k)に属する。

(3)分子量：重鎖 50kDa、軽鎖 27kDa

#### 【0032】

上記のように抗体を用いてアッセイを行うにあたって、通常は抗体の挙動を検出可能とするため抗体そのものが種々の物質で標識されうる。抗体を標識するには、例えば「分子細胞生物学基礎実験法」(南江堂 堀江武一ら1994年)等に記載されている常法を用いることにより行うことができる。種々の物質としては化学発光物質、酵素、蛍光物質、着色ビーズ、放射性同位元素、元素、金属類、ビオチンが挙げられる。以下に具体例を示すがこれらに限定されるものではない。化学発光物質とは例えばルミノールやアクリジニウムエステルなどをさす。酵素とは例えば  $\alpha$ -ガラクトシダーゼやアルカリホスファターゼやペルオキシダーゼなどをさす。蛍光物質とは例えばユウロピウムクリプテートやFITC (fluorescein isothiocyanate) やRITC (tetramethylrhodamin isothiocyanate) などをさす。着色ビーズとは例えばプロテイン Aビーズ、wheat germ agglutinin (WGA) ビーズ、ストレプトアビジンビーズなどをさす。放射性同位元素とは例えば<sup>14</sup>Cや<sup>125</sup>Iや<sup>3</sup>Hなどをさす。元素とは例えばユウロピウムなどのランタニド元素をさす。金属類とは例えばフェリチンや金コロイドなどをさす。特に本発明において好ましい標識の形態はユウロピウムクリプテートである。

30

40

#### 【0033】

ユウロピウムクリプテートは、希土類元素のユウロピウムイオンをトリスビピリジンの環状構造(クリプテート)の中央部に配座した蛍光物質である。クリプテートがなす特徴的な「籠」状構造が水分子からユウロピウムイオンを保護するとともに、クリプテートが吸収した励起光エネルギーを効率よくユウロピウムイオンに転移する。

#### 【0034】

本発明には上記のように標識したものであってもなくても、5'-デオキシ-5'-メチル

50

チオアデノシンの抗体を用いたアッセイを含むものとする。抗体を用いたアッセイには競合的な測定でも非競合的な測定でも良い。また、ホモジニアスアッセイ法（均一系による測定）でもヘテロジニアスアッセイ法（不均一系による測定）でもよい。具体的には、例えば、酵素免疫測定法(EIA)、固相酵素免疫測定法(ELISA)、蛍光免疫測定法(FIA)、放射線免疫測定法(RIA)、時間分解蛍光免疫測定（TR-FIA）、化学発光免疫測定法、イムノブロット法、ウエスタンブロット法、免疫染色法などの常法に従うことができる。なお、アッセイには治療剤・予防剤の開発を目的とする薬物スクリーニングを含むものとする。また疾患の診断に関するものも含むものとする。

#### 【0035】

本発明抗体を用いるアッセイの好ましい具体的方法としては、ELISA法が挙げられる。ELISA法とは、酵素で標識された抗体または抗原を用い、抗体または抗原の量を標識酵素の活性度により定量する方法である。酵素で標識された抗原抗体結合物と遊離型の標識抗原、または抗体を分離するのに固相化された抗体や抗原が用いられる。固相はアガロース、マイクロタイタープレートの内面、ラテックス粒子等が利用できる。ELISA法として具体的には競合法イムノアッセイや2抗体サンドイッチイムノアッセイなどが挙げられる。また標識酵素としては西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ(以下HRPともいう)やアルカリフォスファターゼ等が挙げられるが好ましくは西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼである。

#### 【0036】

本発明抗体を用いるアッセイの好ましいその他の具体的方法としては、ホモジニアスアッセイ法が挙げられる。ホモジニアスアッセイ法とは、測定が終始溶液状態（均一系）で行われる測定法をさす。洗浄工程を一切必要としないにもかかわらず精度の高いデータを得ることができるアッセイ法である。また、固相を必要としないのでアッセイのミニチュア化が容易であり、貴重な試薬の節約及びコスト、労力の削減に威力を発揮するのでハイスループットスクリーニング法にも応用できる。代表的なものとしてSPA法(Scintillation Proximity Assay)、蛍光偏光測定法(fluorescence polarization; FP)、蛍光共鳴エネルギー転移(fluorescence resonance energy transfer; 以下FRETともいう)を用いたアッセイ法などがあげられる。

#### 【0037】

ホモジニアスアッセイ法の好ましい一例としてはFRETを用いたアッセイ法が挙げられる。FRETとはドナーおよびアクセプターと称される2種類の蛍光物質間のエネルギー転移を利用した手法である。

#### 【0038】

FRETを用いたアッセイ法のうち、好ましい実施形態としてホモジニアス時間分解蛍光法(Homogeneous Time-Resolved Fluorescence; 以下、HTRF法ともいう、登録商標)が挙げられる。HTRF法はユウロピウムクリプテートとXL665(藍藻由来蛍光性タンパクであるアロフィコシアニンの誘導体)からなる2種類の蛍光標識物質を用いた、FRETの原理を利用した測定方法である。HTRFでは、ユウロピウムクリプテートに337nmの励起光を照射すると620nmの長寿命蛍光を発するが、免疫複合体の形成などで近傍にXL665が存在する場合、ユウロピウムクリプテートからXL665へ蛍光共鳴エネルギー転移が起こり、エネルギーを吸収したXL665から665nmの長寿命蛍光が生ずる原理に基づいて測定を行う。蛍光測定と二波長測定(620・665nm)の組み合わせにより擬陽性をもたらすカラークエンチング(インナーフィルター効果)の影響やバックグラウンド蛍光の影響を受けにくく、完全な均一系の測定を可能とする。

#### 【0039】

ホモジニアスアッセイ法の好ましいその他の一例としては、SPA法(登録商標)が挙げられる。SPA法は、SPAビーズに結合させた抗体と、RI標識した抗原を用いる。該抗体が抗原に結合するとSPAビーズに近接するため抗原により放射される線がSPAビーズ内のシンチレーターに到達し発光するのでこれを測定する。結合していない抗原は測定に影響がないので、抗体と結合していない抗原を除去することなく測定することが可能である。

#### 【0040】

スベルミジンシンターゼ (SPDS) は、脱炭酸化S-アデノシルメチオニンのアミノプロピル基をブトレシンへ転移してスベルミジンに変換する反応を触媒する。このとき反応副産物として5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンが生じる。よって5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンを特異的、高感度に検出できる本発明のアッセイ法はスベルミジンシンターゼの活性測定に有用である。

#### 【0041】

さらに本発明のアッセイ法はスベルミジンシンターゼの活性を阻害するような被験物質のスクリーニングに使用することができる。かかるスクリーニングは被験物質の存在下、発現ベクターなどにより調製したリコンビナントスベルミジンシンターゼ (精製または部分精製品) を、該酵素の基質 (dcSAMやブトレシンなど) との結合を可能にする条件下 (例えば0.1Mリン酸緩衝液pH7.4、室温) に維持し、被験物質が該酵素の基質の結合を阻害するかどうかを調べること、すなわち副生産物である5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの生産量を評価する。このとき被験物質は、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物 (低分子化合物等)、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などのいずれであってもよい。またこれらを含む試料であってもよい。

10

#### 【0042】

またスクリーニング方法に従う候補物質の選別は、被験物質を添加した例えばアッセイプレートのウエルにおける5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの検出値が被験物質を添加しないウエルにおける5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの検出値に比して変動することをもって、当該被験物質を候補物質として選別することができる。例えば、5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの検出値の抑制・減少の程度としては、被験物質を添加したウエルにおける5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの検出値が被験物質を添加しないウエルにおける5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの検出値と比較して例えば10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上の減少または増加を示す場合、当該被験物質を候補物質として選別することができる。

20

#### 【0043】

スクリーニングにより選別された候補物質はスベルミジンシンターゼが関与することが知られている疾患、例えば変形性関節症、ガンを始めとする増殖性疾患、骨粗鬆症、アルツハイマー病、高血圧症の予防・治療剤になりうるものである。本発明のアッセイ法は好ましい実施形態は変形性関節症の治療・予防剤を探索するのに利用するものである。

30

#### 【0044】

変形性関節症とは慢性の関節炎を伴う関節疾患で、関節の構成要素の退行変性により、軟骨の破壊と骨、軟骨の増殖性変化を来す疾患である。一次性的なものとは外傷や疾患による二次性的なものがある。主に荷重関節を侵し、高齢者によく見られる。最近、ヒトの関節軟骨前駆細胞 (HMSC) の遺伝子プロファイリングがなされ、骨形成因子 (osteogenic factors) であるbasic fibroblast growth factor 2 (bFGF-2) がスベルミジンシンターゼをコードする遺伝子の転写を活性化することが報告されている。これは、ポリアミン生合成経路、特にスベルミジンの生合成、より具体的にはスベルミジンシンターゼが、変形性関節症 (以下OAともいう。) と潜在的に関与していることを示している。よってスベルミジンシンターゼの反応を制御することはOAの疾患の治療・予防に役立つことが推察され、さらにこの酵素の阻害剤は上記の疾患の治療薬・予防薬として有用であると考えられる (WO 02/058623)。

40

#### 【0045】

以下において、実施例および実験例により本発明をより具体的に示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【実施例1】

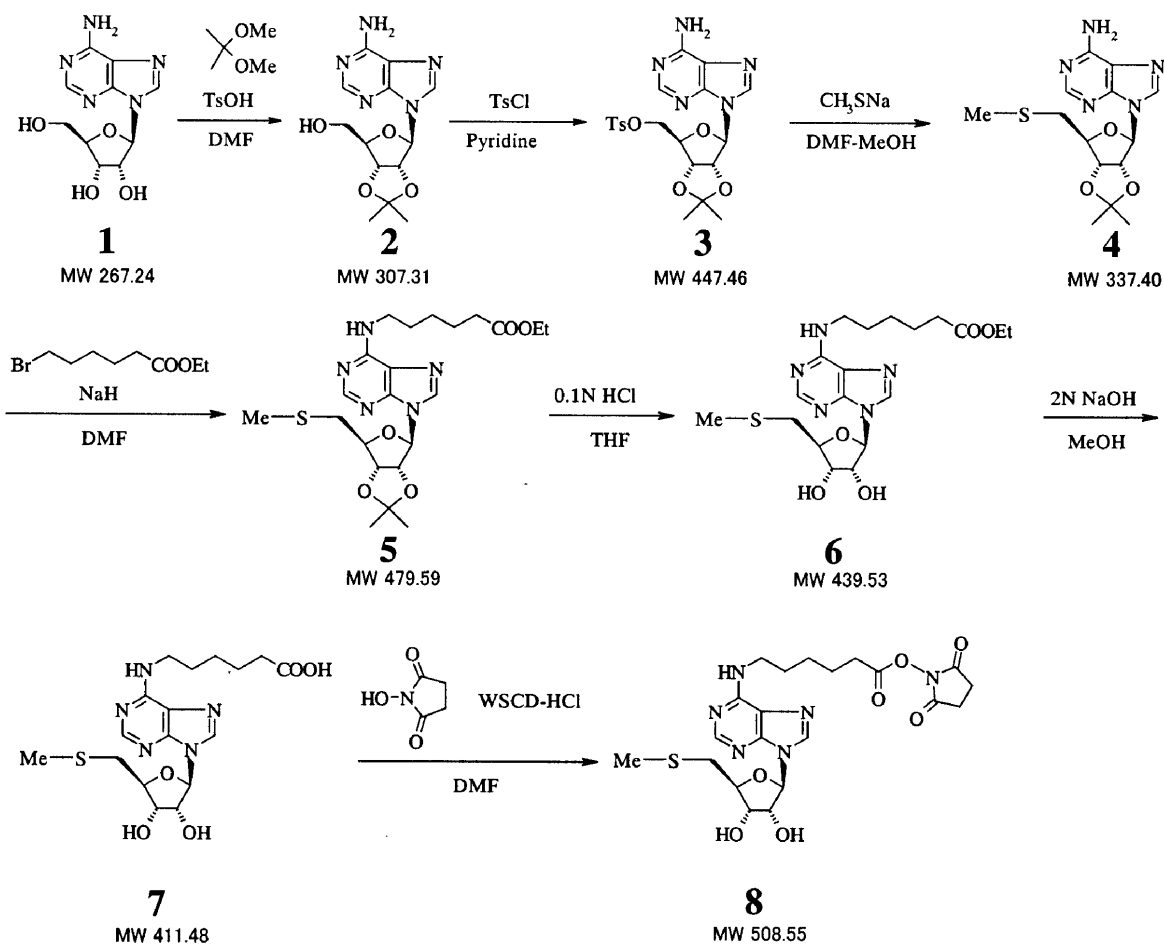
#### 【0046】

以下の合成スキームに従って活性化ハプテンである6-[5-(2,5-ジオキシピロリジン-1-イルオキシ)ペンチル]-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン (化合物8) を合成した。

50

## 合成スキーム 1

## 【化10】



10

20

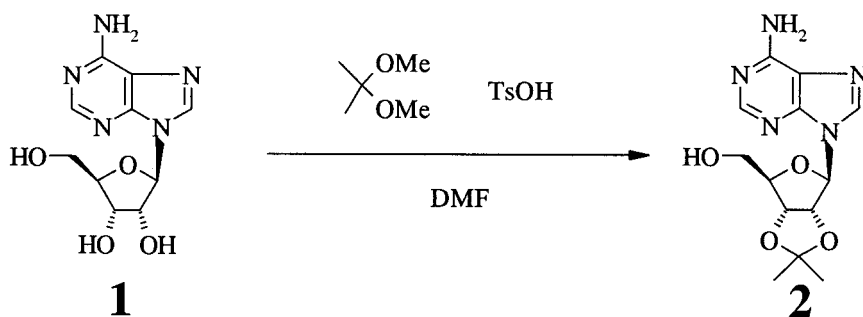
30

40

## 【0047】

## 2',3'-イソプロピリデンアデノシンの合成

## 【化11】



9-D-リボフラノシルアデノシン (アデノシン) (1) (6.68 g, 25 mmol) の無水ジメチルホルムアミド (100 ml) 溶液に、2,2-ジメトキシプロパン (13 g, 125 mmol, 5 mol eq.) 及び無水p-トルエンスルホン酸 (1.19 g, 6.26 mmol) を加えた。この反応混合物を窒素気流下70°Cで7時間加熱攪拌し、40°Cにて約30 mlまで減圧濃縮した。この濃縮液を5%炭酸水素ナトリウム水溶液 (125 ml) に注ぎ入れ、150 mlの酢酸エチルで2回抽出した。有機層を50 mlの水で2回、50 mlの飽和食塩水で洗浄後、抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して溶媒を除去した。この黄色油状残渣 (ca. 8 g) を150 mlの酢酸エチルに加熱して溶かし、この溶液を室温で5時間さらに0°Cで30分間攪拌し析出した結晶を濾過、析出晶を酢酸エチル及びジエチルエーテルで洗浄し、化合物2 (4.1 g, 13.3 mmol, 53%

50

)を得た。

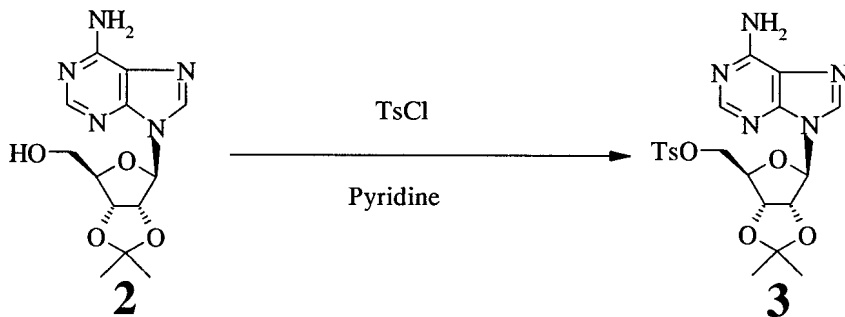
IR (Nujol,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3350 (sh), 3240, 3180, 1685 (s).

$^1\text{H}$  NMR (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 1.38 (3H, s), 1.65 (3H, s), 3.72 - 3.86 (1H, m), 3.95 - 4.02 (1H, m), 4.55 (1H, s), 5.10 - 5.25 (2H, m), 5.86 (3H, d,  $J = 4.8$  Hz), 6.57 (1H, dd,  $J = 1.8, 11.4$  Hz), 7.84 (1H, s), 8.32 (1H, s).

【 0 0 4 8 】

2',3'-イソプロピリデン-5'-(p-トルエンシルホニル)アデノシンの合成

【 化 1 2 】



10

2',3'-イソプロピリデンアデノシン (2) (4.0 g, 13 mmol)の無水ピリジン40 ml溶液に、窒素気流下 $-20^\circ\text{C}$ でp-トルエンシルホニルクロリド (2.97 g, ca. 15.6 mmol, 1.2 mol eq.)の無水ピリジン6 ml溶液を滴下して加えた後、この混合物を遮光下4日間放置した。この反応混合物に、未反応の試薬を処理する為、水 (4.0 ml) を $-20^\circ\text{C}$ で加え15分間攪拌後、更に水 (200 ml) を注ぎ入れ80 mlの酢酸エチルで2回抽出した。有機層を50 mlの水で2回、80 mlの5% 硫酸で2回、次いで50 mlの飽和食塩水で3回洗浄後、抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して溶媒を除去した。この黄色油状残渣をカラムクロマトグラフィー (Merck silica gel No. 9385, 230-400 mesh: 50 g) に付し、酢酸エチルで溶出することにより結晶性残渣 (ca. 6g) を得、次いでジエチルエーテルで洗浄し、化合物3 (4.49 g, 9.75 mmol, 75%)を得た。

20

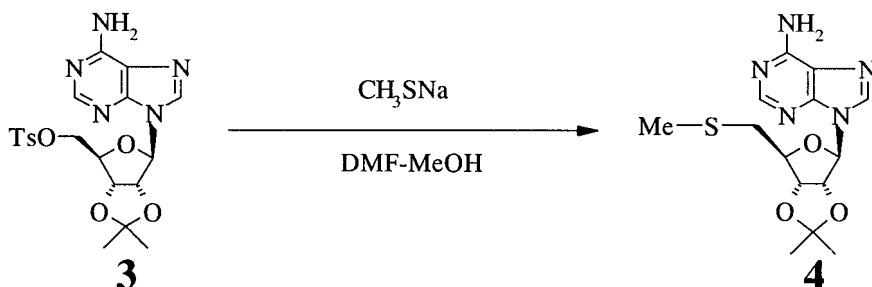
$^1\text{H}$  NMR (200MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$ ) : 1.37 (3H, s), 1.59 (3H, s), 2.40 (3H, s), 4.20 - 4.36 (2H, m), 4.44 - 4.53 (1H, m), 5.05 (1H, dd,  $J=3.4, 6.2$  Hz), 5.34 (1H, dd,  $J = 1.8, 6.2$  Hz), 6.05 (1H, d,  $J = 18$  Hz), 7.19 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.63 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.84 (1H, s), 8.23 (1H, s).

30

【 0 0 4 9 】

2',3'-イソプロピリデン-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの合成

【 化 1 3 】



40

ナトリウムチオメトキシド (5.0 g, 71.4 mmol, 8.24 mol eq.) のジメチルホルムアミド-メタノール (2 : 1, 35 ml) 溶液に、窒素気流下 $0^\circ\text{C}$ で2',3'-イソプロピリデン-5'-(p-トルエンシルホニル)アデノシン (3) (4 g, 8.67 mmol) を加えた後、この混合溶液を遮光下 $5^\circ\text{C}$ で3日間放置した。この反応液を $30^\circ\text{C}$ 以下で約20 mlまで減圧濃縮し、この濃縮液を250 mlの冷水へ注ぎ入れ100 mlの酢酸エチルで2回抽出した。有機層を50 mlの冷水で3回、50 mlの飽和食塩水で2回洗浄後、抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して溶媒を除去し結晶性残渣を得、酢酸エチルより再結晶し化合物4 (2.8 g, ca. 8. 50

50

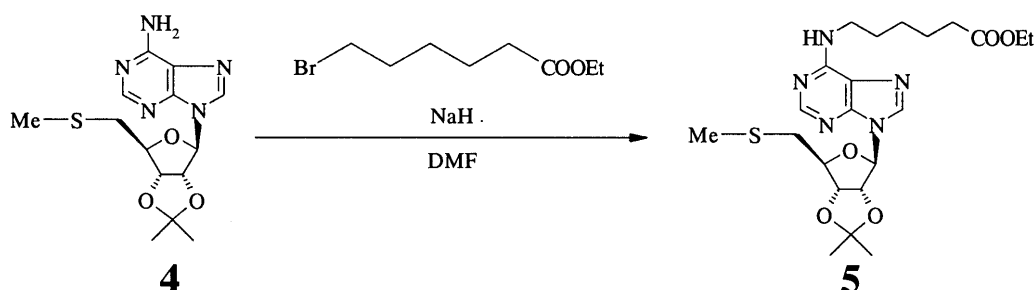
3 mmol, 95%) を得た。

$^1\text{H}$  NMR (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.41 (3H, s), 1.62 (3H, s), 2.11 (3H, s), 2.67 - 2.91 (2H, m), 4.36 - 4.48 (1H, m), 5.07 (1H, dd,  $J = 2.2, 3.4$  Hz), 5.52 (1H, dd,  $J = 2.2, 6.2$  Hz), 5.64 (2H, br), 6.09 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz), 7.93 (1H, s), 8.36 (1H, s).

【 0 0 5 0 】

6-(5-エトキシカルボニルペンチル)-2',3'-イソプロピリデン-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの合成

【 化 1 4 】



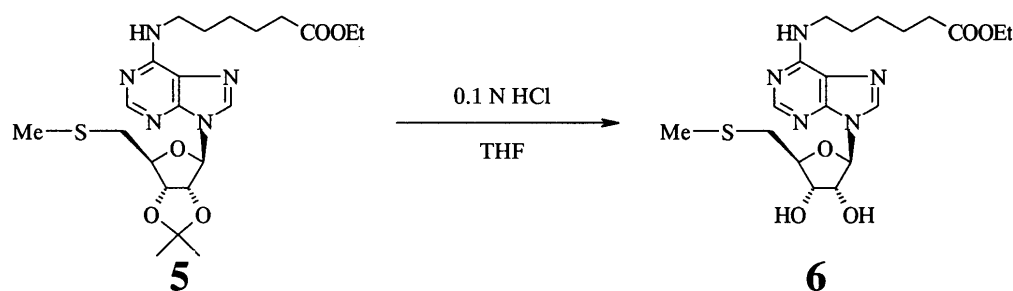
2',3'-イソプロピリデン-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン (4) (1.50 g, 4.45 mmol) の無水ジメチルホルムアミド (10 ml) に、窒素気流下室温で水素化ナトリウム (112 mg, 4.67 mmol) を徐々に加えた後、2時間撹拌した。次いで、この混合物に6-ブロムヘキサン酸エチル (1.04 g, 4.67 mmol) の無水ジメチルホルムアミド (3 ml) を滴下して加え、この反応混合物を室温で1時間、さらに60°Cで2時間撹拌した反応液は、60 mlの冷水へ注ぎ入れ40 mlの酢酸エチルで2回抽出した。有機層を30 mlの冷水で3回、30 mlの飽和食塩水で2回洗浄後、抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して溶媒を除去して得た油状残渣をカラムクロマトグラフィー (Merck silica gel, Lobar column size B) に付し、n-ヘキサン - 酢酸エチル (1 : 1) で溶出することにより無色油状の化合物5 (1.4 g, 2.92 mmol, 62.5%)を得た。

$^1\text{H}$  NMR (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.25 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz), 1.40 (3H, s), 1.45 - 1.53 (2H, m), 1.62 (3H, s), 1.64 - 1.79 (4H, m), 2.10 (3H, s), 2.31 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 2.68 - 2.90 (2H, m), 3.56 - 3.76 (2H, m), 4.09 (2H, q,  $J = 7.0$  Hz), 4.36 - 4.45 (1H, m), 5.08 (1H, dd,  $J = 3.2, 6.6$  Hz), 5.53 (1H, dd,  $J = 1.8, 6.2$  Hz), 5.86 (1H, br), 6.07 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz), 7.86 (1H, s), 8.36 (1H, s).

【 0 0 5 1 】

6-(5-エトキシカルボニルペンチル)-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの合成

【 化 1 5 】



6-(5-エトキシカルボニルペンチル)-2',3'-イソプロピリデン-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン (5) (700 mg, 1.46 mmol)、0.1N塩酸 (5 ml) とテトラヒドロフラン (10 ml) の溶液をTLCで原料がなくなるまで 50°C で反応させた。この反応液を50°Cで約1 mlまで減圧濃縮し、この濃縮液に5% 炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 ml)を加え、20 mlの酢酸エチルで抽出した。有機層を10 mlの水で2回、5 mlの飽和食塩水で洗浄後、抽出



液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して溶媒を除去した。抽出残渣をカラムクロマトグラフィー (Merck silica gel, Lobar column size A x 2) に付し、酢酸エチル-アセトン (3 : 1) で溶出することにより無色結晶性の化合物6 (250 mg, 0.569 mmol, 39%)を得た。

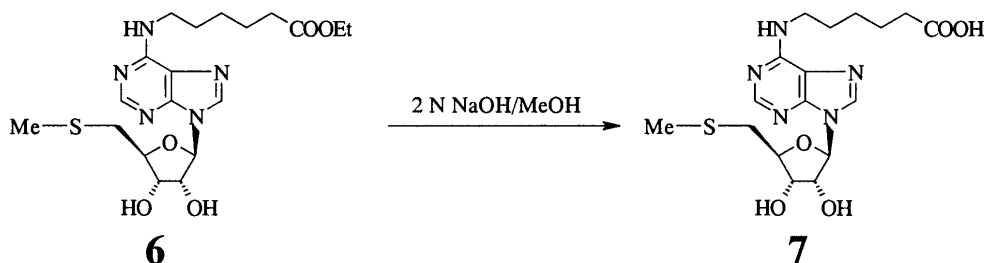
$^1\text{H}$  NMR (200MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$ ) : 1.25 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz), 1.38 - 1.56 (2H, m), 1.59 - 1.81 (4H, m), 2.18 (3H, s), 2.31 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 2.85 (2H, d,  $J = 5.4$  Hz), 3.53 - 3.78 (2H, m), 4.12 (2H, q,  $J = 7.2$  Hz), 4.32 - 4.45 (2H, m), 4.54 (1H, t,  $J = 5.2$  Hz), 5.94 (1H, d,  $J = 4.8$  Hz), 8.00 (1H, s), 8.29 (1H, s).

【0052】

6-(5-カルボキシルペンチル)-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの合成

10

【化16】



6-(5-エトキシカルボニルペンチル)-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン (6) (250 mg, 0.569 mmol)、2 N 水酸化ナトリウム (1 ml)とメタノール (5 ml) の溶液を窒素気流下60°Cで1時間撹拌した。この反応液を30°C以下で約1 mlまで減圧濃縮後、3 mlの水で希釈した水溶性溶液を酸性 (pH 3) になるまで酢酸 (240 mg, 4 mmol)を加え析出した結晶を濾過し、化合物7 (223 mg, 0.541 mmol, 95%)を得た。

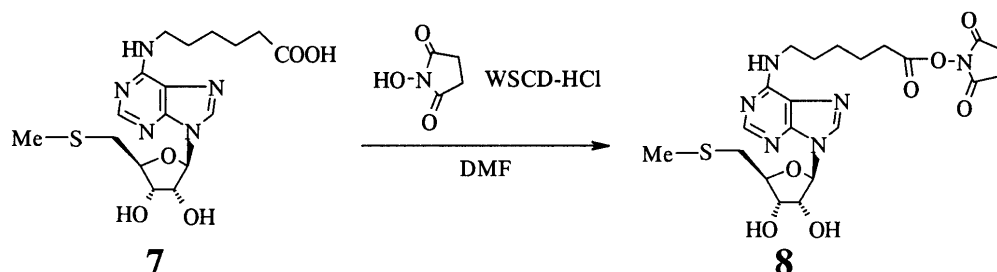
$^1\text{H}$  NMR (200MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) : 1.23 - 1.41 (2H, m), 1.44 - 1.68 (4H, m), 2.06 (3H, s), 2.20 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 2.47 - 2.58 (2H, m), 2.72 - 2.94 (2H, m), 3.98 - 4.08 (1H, m), 4.13 (1H, t,  $J = 5.4$  Hz), 4.75 (1H, t,  $J = 5.4$  Hz), 5.50 (3H, br), 5.90 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz), 7.82 (1H, br), 8.21 (1H, s), 8.36 (1H, s).

【0053】

6-[5-(2,5-ジオキシピロリジン-1-イルオキシ)ペンチル]-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの合成

30

【化17】



N-ヒドロキシコハク酸イミド (125 mg, 1.08 mmol)、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (WSCD・HCl, 207 mg, 1.08 mmol) の無水ジメチルホルムアミド (2 ml) 溶液に、6-(5-カルボキシルペンチル)-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン (7) (223 mg, 0.541 mmol) の無水ジメチルホルムアミド (2 ml) 溶液を、窒素気流下室温で30分間で滴下して加えた後、40°Cで3時間30分間撹拌した。この反応混合物を25 mlの冷水へ注ぎ入れ25 mlの酢酸エチルで2回抽出し、有機層を10 mlの冷水で2回、5 mlの飽和食塩水で洗浄後、抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して溶媒を除去して得た油状残渣をカラムクロマトグラフィー (Merck silica gel, Lobar column size A x 2) に付し、酢酸エチル-アセトン (3 : 1) で溶出することにより無色油状の化合物8 (231 mg, 0.455 mmol, 80%)を得た。

40

50

$^1\text{H}$  NMR (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.50 - 1.64 (2H, m), 1.68 - 1.90 (4H, m), 2.18 (3H, s), 2.63 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 2.77 - 2.89 (6H, m), 3.47 (1H, br), 3.68 (2H, br), 4.35 - 4.51 (2H, m), 4.57 (1H, t,  $J = 5.4$  Hz), 5.91 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz), 6.01 (1H, br), 6.46 (1H, br), 7.97 (1H, s), 8.29 (1H, s).

【実施例 2】

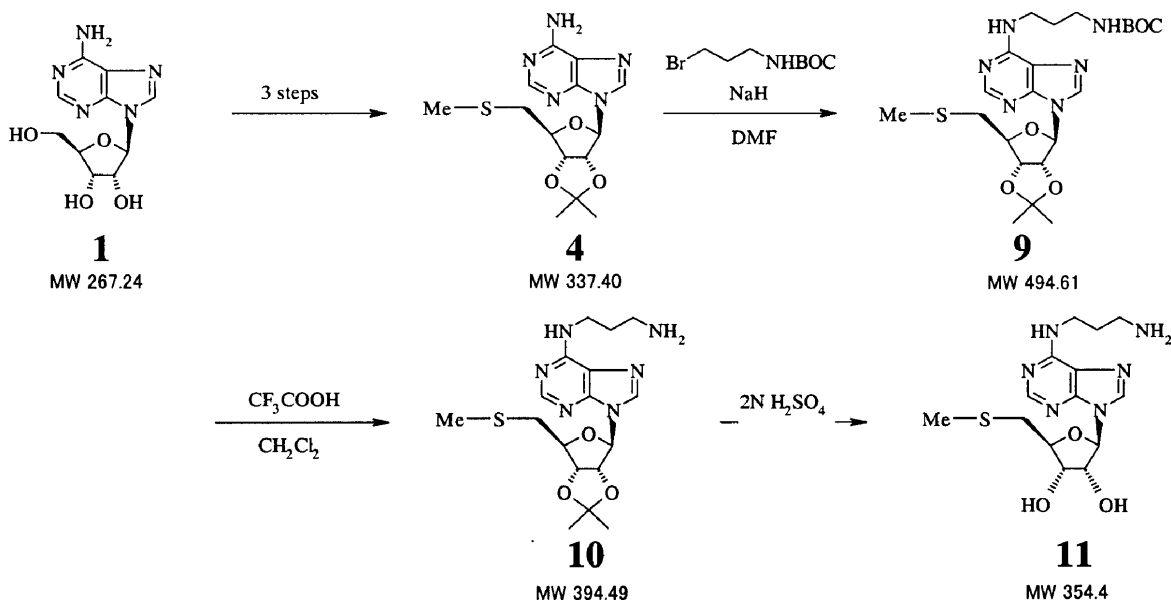
【0054】

6-(3-アミノ)プロピル-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの合成法

合成スキーム2

【化18】

10



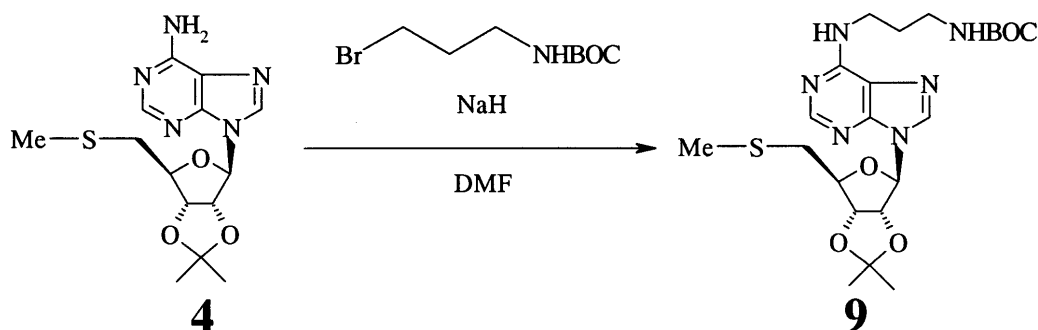
20

【0055】

6-(3-tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロピル-2',3'-イソプロピリデン-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの合成

30

【化19】



40

2',3'-イソプロピリデン-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン (4) (338 mg, 1 mmol) の無水ジメチルホルムアミド (2 ml) に、窒素気流下室温で水素化ナトリウム (31 mg, 1.28 mmol) を徐々に加えた後、2時間攪拌した混合物に、3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロピルブロマイド (310 mg, 1.3 mmol) と無水ジメチルホルムアミド (0.3 ml) の溶液を滴下して加えた。この反応混合物を室温で1時間、さらに60°Cで2時間攪拌した反応液は、20 mlの冷水へ注ぎ入れ20 mlの酢酸エチルで2回抽出した。有機層を10 mlの冷水で3回、10 mlの飽和食塩水で洗浄後、抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して溶媒を除去して得る油状残渣をカラムクロマトグラフィー (Merck silica gel, Lobar column size A) に付し、n-ヘキサン-酢酸エチル (2 : 3) で溶出することにより

50

無色油状の化合物9 (242 mg, 0.5 mmol, 50%)を得た。

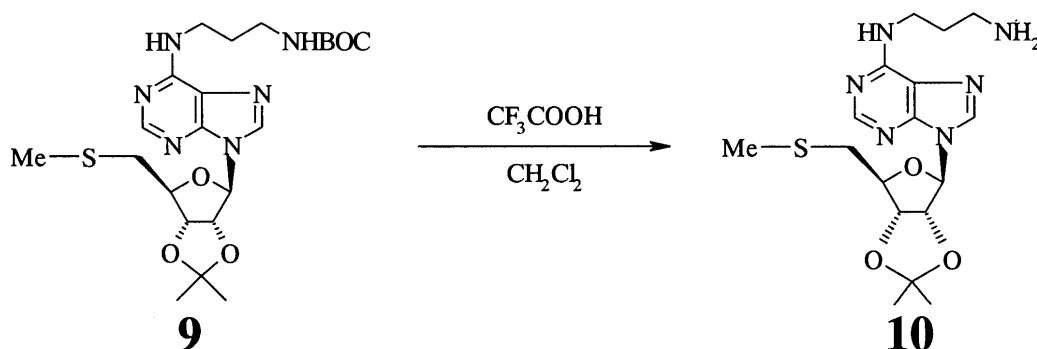
$^1\text{H}$  NMR (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.40 (3H, s), 1.46 (9H, s), 1.62 (3H, s), 1.75 - 1.90 (2H, m), 2.11 (3H, s), 2.67 - 2.91 (2H, m), 3.22 (2H, dd,  $J = 6.0, 12.2$  Hz), 3.73 (2H, br), 4.35 - 4.46 (1H, m), 5.08 (1H, dd,  $J = 3.0, 6.2$  Hz), 5.26 (1H, br), 5.52 (1H, dd,  $J = 2.2, 6.2$  Hz), 6.07 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz), 6.18 (1H, br), 7.87 (1H, s), 8.36 (1H, s).

【0056】

6-(3-アミノ)プロピル-2',3'-イソプロピリデン-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの合成

【化20】

10



20

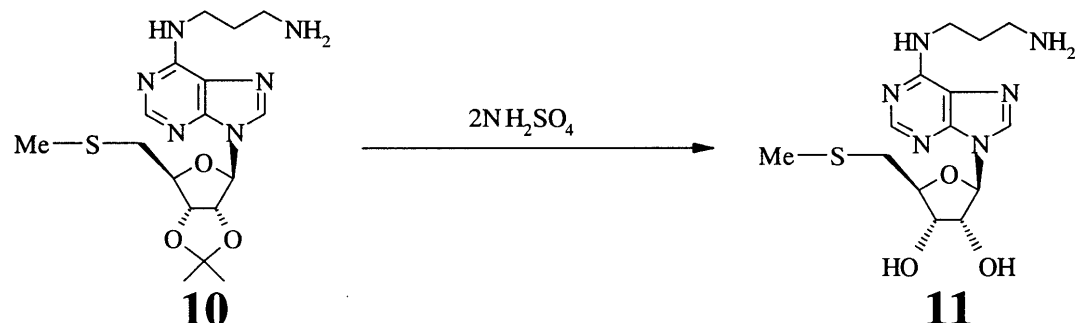
6-(3-tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロピル-2',3'-イソプロピリデン-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン (9) (242 mg, 0.5 mmol)、トリフルオロ酢酸 (0.5 ml) とジクロロメタン (2.5 ml) の溶液をTLCで原料がなくなるまで  $40^\circ\text{C}$  で反応させた。この反応液を  $25^\circ\text{C}$  以下で減圧留去し、この残渣に飽和炭酸カリウム水溶液 (10 ml) を加え、20 ml の酢酸エチルで抽出した。有機層を5 ml の水で2回、5 ml の飽和食塩水で洗浄後、抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して溶媒を除去した。抽出残渣を分取薄層クロマトグラフィー (Merck silica gel, thin layer plates KGF 254; 0.5 mm, 20 cm  $\times$  20 cm, development and elution solvent; ethyl acetate-acetic acid-water = 3 : 1 : 1) によって、無色粉末の化合物10 (180 mg, 0.47 mmol, 94%)を得た。

【0057】

30

6-(3-アミノ)プロピル-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシンの合成

【化21】



40

6-(3-アミノ)プロピル-2',3'-イソプロピリデン-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン (10) (180 mg, 0.47 mmol) と 2 N 硫酸 (5 ml) の溶液を室温で終夜放置した。この反応液に5%炭酸カリウム水溶液を加えpH 9 に調整後、減圧留去して結晶性残渣を得、20 ml の無水エタノールで抽出した。この抽出液を減圧濃縮して溶媒を除去して得た抽出残渣 (140 mg) を分取薄層クロマトグラフィー (Merck silica gel, thin layer plates KGF 254; 0.5 mm, 20 cm  $\times$  20 cm, development and elution solvent; ethyl acetate-acetic acid-water = 3 : 1 : 1) ならびに HP-20 カラムクロマトグラフィー (Mitsubishi i Kasei; 75 - 150  $\mu\text{m}$ , 5 g) に付し、エタノール - 水 - 28%アンモニア水 (10 : 9 : 1) で溶出することにより無色油状の化合物11 (ca. 40 mg)を得た。

50

$^1\text{H}$  NMR (200MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 1.80 - 1.95 (2H, m), 2.12 (3H, s), 2.80 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz), 2.91 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz), 3.70 (2H, br), 4.23 (1H, dd,  $J = 5.8, 10.2$  Hz), 4.33 (1H, t,  $J = 4.8$  Hz), 4.68 - 5.00 (6H, m), 6.00 (1H, d,  $J = 5.2$  Hz), 8.26 (1H, s), 8.28 (1H, s).

#### 【実施例 3】

##### 【0058】

MTAの西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識

実施例 2 に従って合成した 6-(3-アミノ)プロピル-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン 0.63 mg ( $1.8\mu\text{mol}$ ) に蒸留水 0.05 ml 及び 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.1 ml を加えて溶解し、これにスルフォスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート (sulfo-SMCC、ピラス社製) 1.19 mg ( $2.7\mu\text{mol}$ ) を含む水溶液 0.2 ml を加えて、室温で 2 時間反応した。逆相 HPLC (カラム: YMC-Pack ODS-A、6.0 I.D.  $\times$  150 mm, 溶離条件: アセトニトリル/0.1 % トリフルオロ酢酸、0 ~ 50 %, 20 min、リニアグラディエント、流速: 1 ml/min、検出波長: 260 nm) を行って、マレイミド化 MTA 画分 (14.7 分) を分取し、減圧下に溶媒を留去したのち 20 % メタノール/蒸留水 0.4 ml に溶解した。一方、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP、ロシュ社製) 1.1 mg ( $27\text{nmol}$ ) を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.2 ml にスルフォスクシンイミジル 6-[3'-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート (sulfo-LC-SPDP、ピラス社製) 0.43 mg ( $810\text{nmol}$ ) を含む水溶液 0.05 ml を加え、室温で 2 時間反応させた。0.1 M メルカプトエチルアミン溶液 0.05 ml を加えて室温で 1 時間静置した後、5 mM エチレンジアミン四酢酸含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した PD-10 (アマシャムファルマシアバイオテック社製) に反応液を通して低分子物質を除去した。HRP 0.115  $\mu\text{g}$  ( $2.9\text{nmol}$ ) を含む画分 0.2 ml に上記のマレイミド化 MTA 28  $\mu\text{g}$  ( $49\text{nmol}$ ) を加え、4 °C で 3 日間反応した。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した PD-10 (アマシャムファルマシアバイオテック社製) に反応液を通して低分子物質を除去し、HRP 標識 MTA を得た。

#### 【実施例 4】

##### 【0059】

MTA を認識するモノクロナル抗体および該抗体を産生するハイブリドーマの作製

#### (1) 免疫原の調製および免疫

キャリアタンパクとしてカギアナカサガイのヘモシアニン (KLH、ピラス社製) を用いた。KLH 20 mg のバイアルに蒸留水を 2 ml 加え、リン酸塩緩衝化生理食塩水 (pH 7.2) 溶液とした。これに実施例 1 に従って合成した 6-[5-(2,5-ジオキシピロリジン-1-イルオキシ)ペンチル]-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン 3.8 mg ( $7.5\mu\text{mol}$ ) を含む DMF 溶液 0.19 ml を滴加し、室温で 2 時間反応させてコンジュゲートを調製した。反応液を蒸留水に対して 4 度で透析し、次いで凍結乾燥した。乾燥重量 18.4 mg のコンジュゲートを得、これを免疫原とした。

##### 【0060】

免疫原 1.3 mg を生理食塩水 0.5 ml に溶かし、フロイントの完全アジュバント (ディフコ社製) 0.8 ml を加えてエマルジョンとした。その 0.1 ml (0.1 mg) を A/J jms Slc マウス (6 週齢、雌) に、3 週間隔で 5 回腹腔内投与して免疫した。細胞融合に供したマウスはその 3 日前に免疫原 0.1 mg を含む生理食塩水 0.1 ml を腹腔内にブースター投与した。

##### 【0061】

#### (2) 抗体を産生するハイブリドーマおよび該ハイブリドーマを用いた MTA-7H8 抗体の作製

上記 (1) の手法に従って免疫したマウスから最終投与 3 日後にマウスの脾臓を摘出して脾臓細胞を回収した。脾臓細胞  $1.0 \times 10^8$  個とマウスミエローマ細胞 (p3  $\times$  63-Ag8.U1、東京腫瘍研究所)  $2 \times 10^7$  個を 50 % のポリエチレングリコール 4000 を用いて融合させ、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む培地で選択した。細胞融合 10 日目に特異抗体産生細胞のスクリーニングを行った。スクリーニングに用いた ELISA は次の通りである: 96 穴マイクロタイタープレート (ヌンク社製) の各ウェルに、1  $\mu\text{g}$  の抗マウス IgG 抗体 (シバヤギ社製) を含む PBS (0.15M NaCl を含むリン酸緩衝液 (pH 7.4)) を 100  $\mu\text{l}$  加え

て4 で16時間固定した。これらのウェルをPBS 200  $\mu$  lで1回洗浄した後、ブロックエース（大日本製薬社製）を200  $\mu$  l加えて4 で16時間放置してブロッキングを行った（抗マウスIgG抗体固相化プレート）。各ウェルを緩衝液A（0.01 % Tween20、0.05 % Proclin150、0.15 M NaClを含む50 mMトリス緩衝液（pH7.4））300  $\mu$  lで1回洗浄した後、緩衝液B（0.5 % ウシ血清アルブミン、0.01 % Tween20、0.05 % Proclin150、0.15 M NaClを含む50 mMトリス緩衝液（pH7.4））50  $\mu$  lとハイブリドーマ培養上清50  $\mu$  lを加えて室温で3時間反応させた。次いで、各ウェルを緩衝液A 300  $\mu$  lで3回洗浄し、緩衝液Bで20 ng/mlとしたHRP標識MTAを100  $\mu$  l添加して4 で16時間反応させた。各ウェルを再度洗浄後、TMB+ Substrate- Chromogen（ダコ社製）を100  $\mu$  l添加して室温で30分間発色させた。次いで、1規定硫酸を100  $\mu$  l添加して反応を停止し、1420 ARVO SXマルチラベルカウンタ（パーキンエルマーライフサイエンス社製）を用いて、各ウェルの450 nmにおける吸光度を測定した。

10

#### 【0062】

特異抗体の産生が陽性を示したウェルのハイブリドーマを、限界希釈法により2回クローニングして、MTAを認識するモノクロナル抗体を産生するハイブリドーマのクローンを獲得した。

得られたハイブリドーマの培養上清について、マウスモノクロナル抗体アイソタイプイングELISAキット（BD バイオサイエンス社製）を用いて、ハイブリドーマが産生する抗体のサブクラスを決定した。新たに得られたモノクロナル抗体は、MTA-7H8と命名し、そのアイソタイプはIgG<sub>1</sub>（k）であった。

#### 【0063】

20

本発明のモノクロナル抗体MTA-7H8を産生するハイブリドーマは、独立行政法人 産業技術総合研究所内 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1 中央第6）に、平成16年3月2日付けで受託番号FERM P-19707として、ブダペスト条約に基づいて寄託されている。

#### 【0064】

マウス抗血清の抗体価

免疫マウスより採取した抗血清を緩衝液Bで10倍に薄める操作を繰り返し、1,000-1,000,0000倍の希釈系列を調製した。上記抗マウスIgG抗体固相化プレートを300  $\mu$  lの緩衝液Aで1回洗浄した後、抗血清希釈液を100  $\mu$  l加えて室温で3時間反応させた。次いで、各ウェルを300  $\mu$  lの緩衝液Aで3回洗浄し、緩衝液Bで20 ng/mlとしたHRP標識MTAを100  $\mu$  l添加して4で一晩反応させた。各ウェルを300  $\mu$  lの緩衝液Aで3回洗浄した後、TMB+ Substrate- Chromogen（ダコ社製）を100  $\mu$  l添加して室温で30分間発色させた。次いで、1規定硫酸を100  $\mu$  l添加して反応を停止し、1420 ARVO SXマルチラベルカウンタ（パーキンエルマーライフサイエンス社製）を用いて、各ウェルの450 nmにおける吸光度を測定した。吸光度が1.0となる抗血清の希釈倍率を抗体価とした。測定の結果、本発明のポリクロナル抗体（抗血清）の抗体価は1000,000倍と従来技術の500倍の値を示した。

30

#### 【0065】

抗MTA抗体のMTAおよびdcSAMに対する反応性

緩衝液Bを用いて、MTAについては0.2- 200 pmol/mlの10倍希釈系列を、dcSAMについては2- 2,000 pmol/mlの10倍希釈系列を調製した。上記抗マウスIgG抗体固相化プレートの各ウェルを300  $\mu$  lの緩衝液Aで1回洗浄した後、緩衝液Bで10 ng/mlとしたMTA-7H8、または1,000,000倍に薄めたマウス抗血清を100  $\mu$  l加えて室温で3時間反応させた。次いで、各ウェルを300  $\mu$  lの緩衝液Aで3回洗浄し、MTAまたはdcSAMの希釈液50  $\mu$  lと、緩衝液Bで40 ng/mlとしたHRP標識MTAを50  $\mu$  l添加して4で一晩反応させた。各ウェルを300  $\mu$  lの緩衝液Aで3回洗浄した後、TMB+ Substrate- Chromogen（ダコ社製）を100  $\mu$  l添加して室温で30分間発色させた。次いで、1規定硫酸を100  $\mu$  l添加して反応を停止し、1420 ARVO SXマルチラベルカウンタ（パーキンエルマーライフサイエンス社製）を用いて、各ウェルの450 nmにおける吸光度を測定した。

40

#### 【0066】

MTA-7H8の反応性の結果を図1に示した。縦軸には各濃度ポイントにおける吸光度（B値）のゼロ濃度における吸光度（B<sub>0</sub>値）に対する割合（B値/B<sub>0</sub>値（%））を算出したものを

50

、横軸にMTAあるいはdcSAMの濃度をプロットした競合曲線を作成した。図中の白丸はdcSAMに対する反応性を、黒丸はMTAに対する反応性を示す。MTAおよびdcSAMの競合曲線における親和性（IC<sub>50</sub>値）はそれぞれ0.4 nM、50 μMであった。このようにMTA-7H8はMTAに対して高い反応性を示すばかりでなく、前駆体であるdcSAMに対する交差反応性も0.0008%と極めて小さいことから、本抗体を用いてMTAを特異的に検出できることを確認した。また、本発明のポリクロナル抗体（抗血清）のMTAおよびdcSAMの競合曲線における親和性（IC<sub>50</sub>値）はそれぞれ4 nM、300 μMであり、交差反応性は0.001%であることから従来技術のポリクロナル抗体（1%）よりも大きく優れていた。以上の結果は従来技術（非特許文献5）とともに表1にまとめた。

【0067】

10

【表1】

実施例	種類	抗体価	親和性(IC <sub>50</sub> )	交差反応性 (dcSAM)
実施例4	モノクロナル		0.4nM	0.0008%
実施例4	ポリクロナル	1000000	4nM	0.001%
非特許文献5	ポリクロナル	2000	10nM	1%

【実施例5】

20

【0068】

モノクロナル抗体MTA-7H8の精製

Balb/cマウス1匹あたり、 $1 \times 10^7$ 個の実施例4で得たハイブリドーマをラボプロダクツ社へ供与して腹水化を委託した。得られた腹水を10,000×gで20分間遠心分離してその上清をPBSで2倍に希釈した後、プロテインGセファロースカラム（アマシャムファルマシアバイオテック社製）に通した。PBSでカラムを十分に洗浄後、0.2Mグリシン塩酸緩衝液（pH 2.7）で抗体を溶出し、直ちに1Mトリス緩衝液を加えて中和した。得られた溶出液に等量の飽和硫酸アンモニウムを加えて4℃で30分間放置することで塩析した。塩析物を10,000×gで20分間遠心分離して回収した。得られた沈殿をPBSに溶解し、さらにPBSに対して4℃で一晩透析して精製モノクロナル抗体とした。

30

【実施例6】

【0069】

マウス抗MTAポリクロナル抗体の精製

実施例2に従って合成した6-(3-アミノ)プロピル-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン 0.63 mg (1.8 μmol)を含む0.1 Mリン酸塩緩衝液（pH 7.4）1.5 mlをAminoLink固定化キット（ピラス社製）のカップリングゲル1.5 mlに加え、以下キットの手順書に従ってMTA固定化ゲルを含むカラムを調製した。予め0.1 Mリン酸塩緩衝液（pH 7.4）で平衡化したカラムに、前述の免疫マウスの血清を0.1 Mリン酸塩緩衝液（pH 7.4）で3倍に薄めたものを加えた。同緩衝液で十分にカラムを洗浄した後、6 mM塩酸で抗体を溶出させて、0.1 Mリン酸塩緩衝液（pH 8.0）に対して4℃で透析し、ポリクロナル抗体を精製した。

40

【実施例7】

【0070】

リコンビナントヒトスベルミジンシンターゼの調製

発現ベクターの構築にはインビトロジェン社のGatewayテクノロジーを利用した。ヒトS PDS遺伝子をPCRで増幅し、制限酵素サイトSacIとNotIを介してエントリーベクターpENTR11に挿入し、エントリークローンを得た。3×FLAGタグ（シグマ社製）とGateway Vector Conversion Systemの Reading Frame Cassette Aを連結した遺伝子をPCRで増幅し、NheIとKpnIの制限酵素サイトを介してpShuttleベクター（クロンテック社製）に挿入し、デスティネーションベクターとした。エントリークローンとデスティネーションベクターをClonase存在下混合してattサイト間の部位特異的組み換えを誘導することにより、N末に3×F

50

LAGタグを繋いだヒトSPDSの発現ベクターをクローニングした。発現ベクターはEndoFree Plasmid Maxi kit (キアゲン社製)を用いて精製した。

#### 【0071】

リポフェクトアミン2000 (インビトロジェン社製)と発現ベクターを用いて、手順書に従ってHEK293細胞 (ヒト胎児腎臓由来、アメリカンタイプカルチャーコレクション社より入手)をトランスフェクトした。3日間培養した後、細胞を回収して少量のTBS (0.15 M NaClを含む50mMトリス緩衝液 (pH7.4))に懸濁させ、超音波で破碎した。TBSで平衡化した抗FLAG抗体 (M2) アガロースカラム (シグマ社製)に細胞破碎液を通し、TBSで十分に洗浄した。次いで、0.1 mg/mlの3 × FLAGペプチド (シグマ社製)を含むTBSをカラムに通して溶離液を1 mlごとに分取した。各画分1 µlの活性を後述のHTRF法で測定して活性のある画分を混合し、1 mM DTT、10 %グリセロール、0.05 mM dcSAMを添加して-80 °Cで保存した。SDS-PAGEおよび抗MTA抗体を用いたウエスタンブロット法により、精製したSPDSの純度を確認した。

10

#### 【実施例8】

#### 【0072】

##### ELISA法によるスベルミジンシンターゼの活性測定

上述のリコンビナントヒトスベルミジンシンターゼを緩衝液C (0.1 % ウシ血清アルブミンを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH7.4))で希釈し、96ウェルアッセイプレート (コーニング社製)へ50 µl添加した。さらに基質混合液 (0.4 mM ジチオトレイトール、0.1 mM dcSAM、1.3 mM プトレシン、0.4 mM アデニン、0.1 % ウシ血清アルブミンを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH7.4)) 50 µlを加えて室温で反応させた。反応後、20 mM 4 -メチルシクロヘキシルアミン (東京化成工業社製)を含む緩衝液Cを100 µl各ウェルへ添加して反応を停止した。反応液10 µlを、上述の抗マウスIgG抗体を固相化したマイクロタイタープレートへ移し、緩衝液Bで50 ng/mlとしたHRP標識MTA 40 µlと緩衝液Bで40 ng/mlとしたMTA-7H8モノクロナル抗体 50 µlを加えて室温で一晩反応させた。反応後、各ウェルを緩衝液A 300 µlで3回洗浄し、TMB+ Substrate- Chromogen (ダコ社製)を0.1 ml添加して室温で30分間発色させた。次いで、1規定硫酸100 µlを添加して反応を停止し、1420 ARVO SXマルチラベルカウンタ (パーキンエルマーライフサイエンス社製)で各ウェルの450 nmにおける吸光度を測定した。各ウェルのMTA量を上記競合曲線より算出し、酵素量、反応時間あたりのMTA産生量を酵素活性とした。

30

#### 【0073】

(結果) ELISAによるスベルミジンシンターゼの活性測定の結果を図2に示す。スベルミジンシンターゼの濃度と反応時間に依存してMTA産生量は増加していることが確認された。また、スベルミジンシンターゼの既知阻害剤である4 -メチルシクロヘキシルアミンを酵素反応時添加したときの測定結果を図3に示す。4 -メチルシクロヘキシルアミンの濃度に依存してMTAの産生は阻害され、IC50値は文献値1.7 µM (Shirahata et al., Biochem. Pharmacol., 1991.) と同等な1.0 µMであった。すなわち、本法で検出されるMTAは、スベルミジンシンターゼによりプトレシンがスベルミジンに変換された結果を反映しており、本法でスベルミジンシンターゼの活性を測定できることが確認された。またスベルミジンシンターゼの阻害剤の探索を実施する場合は10%DMSOに溶解した被験物質1 µlを予めプレートのウェルに添加しておき、上記の反応を行った。本法によりMTA産生量を検出することによって被験物質の阻害活性を測定した。

40

#### 【実施例9】

#### 【0074】

##### HTRF法によるスベルミジンシンターゼの活性測定

##### (1) 新規モノクロナル抗体MTA-7H8のユウロピウムクリプテート標識

MTA-7H8モノクロナル抗体690 µg (4.6 nmol)を0.1 Mリン酸塩緩衝液 (pH8.0) 770 µlに溶かし、クリプテートTBPモノスベレート (CIS バイオインターナショナル社製) 100 µg (68 nmol)を加えて室温で1時間反応させた。反応液につき、PBSで平衡化したPD- 10 (アマシャムファルマシアバイオテック社製)に通して低分子物質を除去し、ユウロピウム

50

クリプテート標識MTA-7H8モノクローナル抗体を得た。

【0075】

(2) MTAの クロスリンクドアロフィコシアニン (XL665) 標識

XL665 (CIS バイオインターナショナル社製) 7.7mg (74 nmol) を0.1 Mリン酸塩緩衝液 (pH7.0) 1.1mlに溶かし、N- スクシンイミジル 3- (2- ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP、ピアス社製) 140 μg (443 nmol) を添加して室温で20分間反応させ、さらに終濃度10 mMのジチオトレイトールを加えて10分間反応させることによりXL665にシステイン基を導入した。10 mM EDTA含有0.1 Mリン酸塩緩衝液 (pH7.0) で平衡化したPD-10 (アマシャムファルマシアバイオテック社製) に反応液を通して低分子物質を除去し、XL665を3.4 mg (33 nmol) 含む画分1.3 mlへ上述のマレイミド化MTA溶液を660 nmol加えて4 で一晩反応させた。反応液に300 μg (2.4 μmol) のN-エチルマレイミドを加え、室温で10分間放置した後、0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) で平衡化したPD-10 (アマシャムファルマシアバイオテック社製) に通して低分子物質を除去し、XL665標識MTAを得た。

10

【0076】

(3) スペルミジンシンターゼの活性測定

緩衝液Cで希釈したスペルミジンシンターゼを384ウェルアッセイプレート (黒色、コーニング社製) へ10 μl添加した。次いで、上記基質混合液10 μlを加え、室温で反応させた。30 mMの4-メチルシクロヘキシルアミンと260 ng/ml のXL665標識MTAを含む緩衝液D (0.5 % ウシ血清アルブミン、0.6 Mフッ化カリウムを含む0.1 Mリン酸カリウム緩衝液pH7.4) を各ウェルへ20 μl添加して反応を停止した。さらに、緩衝液Dで288 ng/mlとしたコウロピウムクリプテート標識抗MTA-7H8抗体を各ウェルへ20 μl添加し、室温で16時間反応させた後、Rbystar (BMG Labtechnologies社製) で各ウェルの蛍光測定した。各ウェルのMTA量を標準曲線から算出し、酵素量、反応時間あたりのMTA産生量を酵素活性とした。

20

【0077】

(結果) HTRF法における標準曲線を図4に示す。図中の白丸はdcSAMに対する反応性を、黒丸はMTAに対する反応性を示す。MTAのIC<sub>50</sub>値は20 nMでELISAと比べると感度が低下するものの高感度を維持し、尚且つ、基質dcSAMに対する交差反応は0.02%以下と極めて小さいため、本法によりスペルミジンシンターゼの活性測定が可能であった。HTRF法によるスペルミジンシンターゼの活性測定の結果を図5に示す。スペルミジンシンターゼの濃度と反応時間に依存してMTA産生量は増加していることが確認された。また、既知阻害剤である4-メチルシクロヘキシルアミンを酵素反応時添加して測定した結果を図6に示す。4-メチルシクロヘキシルアミンの濃度に依存してMTA産生は阻害され、IC<sub>50</sub>値は1.1 μMで、ELISAの結果と同等の値を示した。すなわち、本法で検出されるMTAは、スペルミジンシンターゼによりブトレシンがスペルミジンに変換された結果を反映しており、本法でスペルミジンシンターゼの活性を測定できることが確認された。またスペルミジンシンターゼの阻害剤の探索を実施する場合は10%DMSOに溶解した被験物質1 μlを予めプレートのウェルに添加しておき、上記の反応を行った。本法によりMTA産生量を検出することによって被験物質の阻害活性を測定した。

30

【実施例10】

【0078】

40

SPA法を利用したMTAの定量

(1) MTAの<sup>125</sup>I標識

放射性ヨウ素 [<sup>125</sup>I] - ボルトン - ハンター 試薬 (パーキンエルマーライフサイエンス社製) 9 × 10<sup>6</sup> Bqについて溶媒を減圧下に留去し、これに実施例2に従って合成した6-(3-アミノ)プロピル-5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン13 μgを含む20 %メタノール水10 μl及び25 mmol/Lリン酸塩緩衝液 (pH 7.1) 30 μlを加えて4 で一晩反応させた。反応液につき逆相高速液体クロマトグラフィー (装置: 島津社製LC-6A、カラム: YMC-Pack ODS-A 6.0 I.D. × 150 mm (YMC社製)、溶離液: A; 10 %アセトニトリル / 0.1 %トリフルオロ酢酸、B; 60 %アセトニトリル / 0.1 %トリフルオロ酢酸、A B、リニアグラデーション (25 min)、流速: 1 ml/min) を行って16 分付近に溶出する<sup>125</sup>I標識MTA (約2. 50



$6 \times 10^6$  Bq) を分取した。

【 0 0 7 9 】

( 2 ) MTAの定量

マイクロタイタープレート ( IsoPlate-96、白色、パーキンエルマーライフサイエンス社製 ) に、測定緩衝液 E ( 0.5 % ウシ血清アルブミンを含む 0.1M リン酸カリウム緩衝液 ( pH 7.4 ) ) で 20 mg/ml とした抗マウス抗体結合 SPA PVT ビーズ ( アマシャムファルマシアバイオテック社製 ) 50  $\mu$  l、MTA 標準液 50  $\mu$  l、測定緩衝液 E で 12,000 Bq/ml とした  $^{125}$ I 標識 MTA 50  $\mu$  l を連続して添加し、最後に 1,000 ng/ml マウスポリクロナル抗体を含む測定緩衝液 E 50  $\mu$  l を添加して室温で一晩反応させた。反応後、各ウェルの放射能をマイクロプレートシンチレーションカウンタ ( Top Count NXT、パーキンエルマーライフサイエンス社製 ) で測定し、標準曲線を作成した。

10

【 0 0 8 0 】

( 結果 ) SPA 法で得られた標準曲線を図 7 に示す。MTA の IC<sub>50</sub> 値は 10  $\mu$  M と上述の ELISA や HTRF 法と比べて劣るものの、dcSAM との交差反応は 0.1% 以下と小さく、本法により MTA の定量が可能であることが確認された。本法を利用することによりスペルミジンシンターゼの活性が測定できる。またスペルミジンシンターゼの阻害剤の探索を実施する場合は 10% DMSO に溶解した被験物質 1  $\mu$  l を予めプレートのウェルに添加しておき、上記の反応を行った。本法により MTA 産生量を検出することによって被験物質の阻害活性を測定した。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 8 1 】

20

【 図 1 】 本発明のモノクロナル抗体 MTA-7H8 の MTA およびその前駆体 dcSAM に対する反応性を示すグラフである。

【 図 2 】 本発明の ELISA で SPDS の活性を測定した結果を示したグラフである。A は MTA の標準曲線、B は各酵素量で反応した結果得た ELISA の測定値を標識 MTA の結合率に換算して表したグラフ、C は、各酵素量における MTA 産生量を A と B の結果を基に算出した結果を示すグラフである。

【 図 3 】 本発明の ELISA により 4 - メチルシクロヘキシルアミンの SPDS に対する阻害活性を測定した結果を示したグラフである。

【 図 4 】 本発明のモノクロナル抗体 MTA-7H8 の HTRF 法における MTA およびその前駆体 dcSAM に対する反応性を示すグラフである。

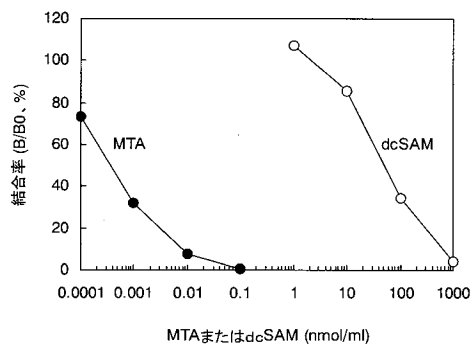
30

【 図 5 】 本発明の HTRF 法で SPDS の活性を測定した結果を示したグラフである。A は MTA の標準曲線、B は各酵素量で反応した結果得た HTRF 測定値を標識 MTA の結合率に換算して表したグラフ、C は各酵素量における MTA 産生量を A と B の結果を基に算出した結果を示すグラフである。

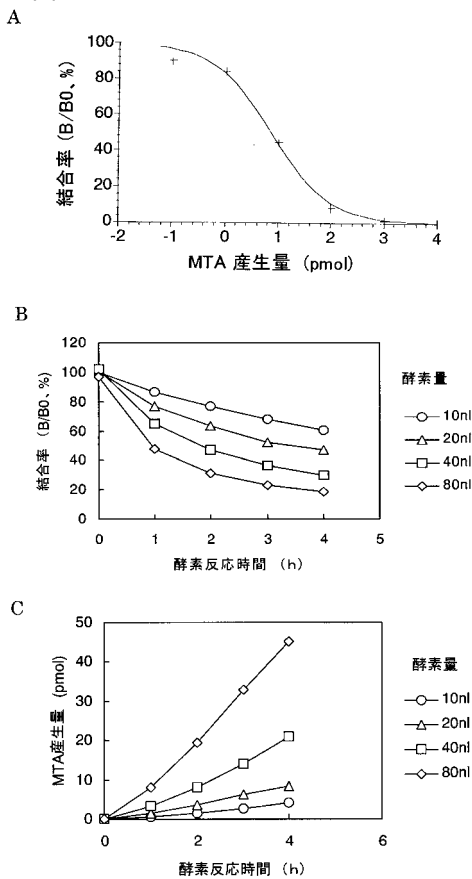
【 図 6 】 本発明の HTRF 法により 4 - メチルシクロヘキシルアミンの SPDS に対する阻害活性を測定した結果を示したグラフである。

【 図 7 】 本発明のモノクロナル抗体 MTA-7H8 の SPA 法における MTA およびその前駆体 dcSAM に対する反応性を示すグラフである。

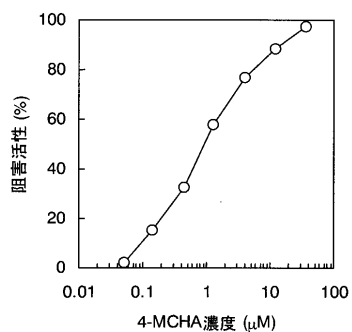
【図 1】



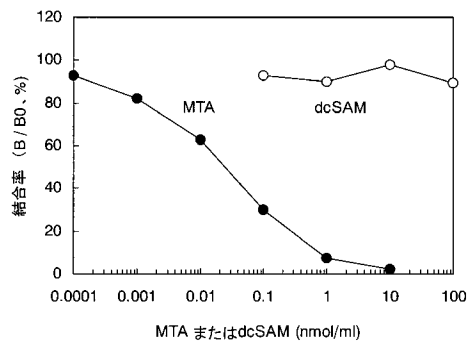
【図 2】



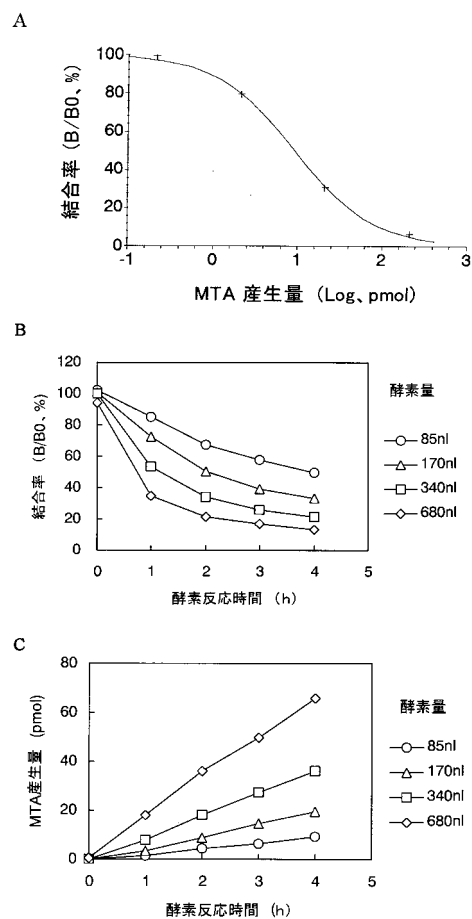
【図 3】



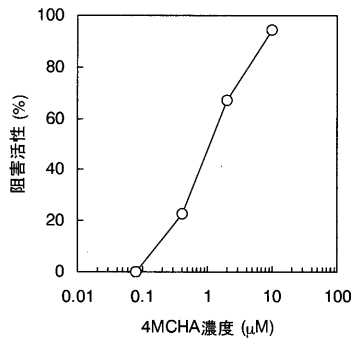
【図 4】



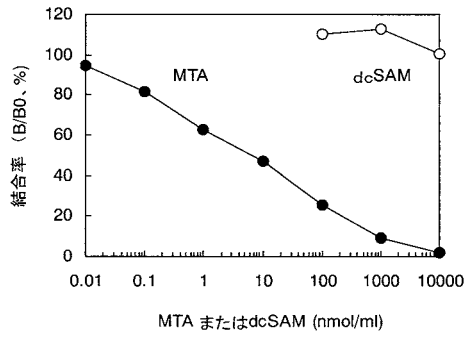
【図 5】



【 図 6 】



【 図 7 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 33/15 Z	4 C 0 5 7
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50 Z	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/543 5 4 1 B	
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543 5 4 5 Z	
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/543 5 7 5	
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/577 B	
	C 1 2 N 15/00 C	
	C 1 2 N 5/00 B	
	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 榎本 興二

大阪府大阪市福島区鷺洲5丁目12番4号 塩野義製薬株式会社内

(72)発明者 山内 晃

大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野義製薬株式会社内

Fターム(参考) 2G045 DA80 FB01 FB03 FB08 FB12 GC15  
 2G054 AB03 AB04 CA30 CE02 EA03  
 4B024 AA11 BA61 GA03  
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13  
 4B065 AA92X AA92Y AB05 BA08 CA25 CA46  
 4C057 BB02 CC05 DD01 LL31  
 4H045 AA11 AA30 DA75 DA76 EA50 FA74 GA06 GA26