

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成18年5月18日(2006.5.18)

【公開番号】特開2000-302750(P2000-302750A)

【公開日】平成12年10月31日(2000.10.31)

【出願番号】特願平11-111004

【国際特許分類】

C 07 C 333/20	(2006.01)
C 07 K 16/00	(2006.01)
C 12 P 21/08	(2006.01)
G 01 N 33/53	(2006.01)
G 01 N 33/577	(2006.01)

【F I】

C 07 C 333/20	
C 07 K 16/00	
C 12 P 21/08	
G 01 N 33/53	G
G 01 N 33/577	B

【手続補正書】

【提出日】平成18年3月17日(2006.3.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

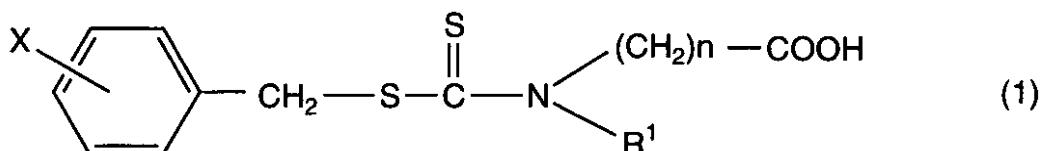
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の式(1)：

【化1】



[式(1)中、

Xは、無置換であるか、又は、ハロゲン原子であり；

R<sup>1</sup>は、枝分かれしていてもよい炭素数1ないし5のアルキル基であり；そして、

nは、1ないし10の整数である]

で表される構造を有する化合物。

【請求項2】

Xが4-クロロであり、R<sup>1</sup>がエチル基であり、そして、nが3である、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

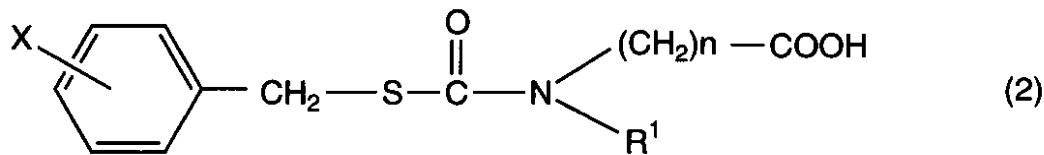
請求項1又は2に記載された化合物と高分子化合物又は標識物質との結合体。

【請求項4】

以下のi)及びii)

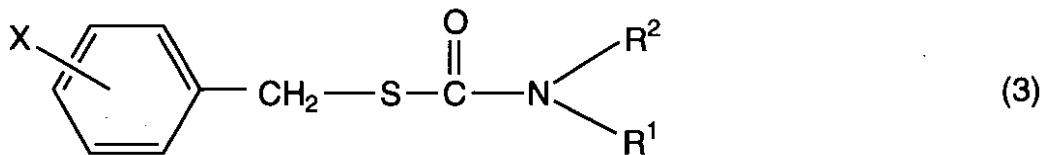
i ) 以下の式(2) :

【化2】



[式(2)中、X、R<sup>1</sup>及びnは、式(1)について先に定義した通りである]で表される構造を有する化合物と高分子化合物との結合体を抗原として用いることにより製造された、以下の式(3) :

【化3】



[式(3)中、

R<sup>2</sup>は、枝分かれしていてよい炭素数1ないし5のアルキル基であって、R<sup>1</sup>と同一であっても異なっていてもよく；

X及びR<sup>1</sup>は式(1)について先に定義した通りである]で表される構造を有する化合物に反応性を示す抗体又は抗原と結合可能なそのフラグメント；

i i ) 請求項3に記載の結合体を用いること特徴とする、式(3)の化合物の免疫学的測定方法。

【請求項5】

さらに、式(2)に記載の化合物を用いることを含む、請求項4に記載の免疫学的測定方法。

【請求項6】

i ) 式(2)及び式(3)の化合物において、XがC1であり、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>がともにエチル基であり、かつ、nが3であり；そして

i i ) 請求項3に記載の結合体を構成する式(1)の化合物において、XがC1であり、R<sup>1</sup>がエチル基であり、かつ、nが3である

請求項4又は5に記載の免疫学的測定方法。

【請求項7】

i ) 式(2)の化合物と高分子化合物又は標識物質との結合体を抗原として用いることにより製造された、式(3)の化合物に反応性を示す抗体又は抗原と結合可能なそのフラグメント；及び

i i ) 式(2)の化合物に含まれるが、i)の抗体作製に使用した化合物とは異なる化合物と、高分子化合物又は標識物質との結合体

を用いること特徴とする、式(3)の化合物の免疫学的測定方法。

【請求項8】

i ) の抗体作製に用いる化合物は、式(2)においてXがC1であり；そして

i i ) の結合体を構成する化合物は、式(2)において、Xが無置換である

請求項7に記載の免疫学的測定方法。

【請求項9】

寄託番号F E R M P - 1 5 9 0 5 で寄託されているハイブリドーマから產生される、

式(3)の化合物に反応性を示す抗体又は抗原と結合可能なそのフラグメントを用いることを特徴とする、請求項4ないし8のいずれか1項に記載の免疫学的測定方法。

【請求項10】

モノクローナル抗体TBC7-2を用いることを特徴とする、請求項9に記載の免疫学的測定方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

しかし、低分子化合物を高分子化合物と結合させたものを抗原としても、得られた抗体は望む分子を認識しないか、あるいはごく低い親和性しかもたない場合がしばしばある。そのため、一般に低分子化合物そのものではなく、結合に利用できる官能基と共にスペーサーアーム(結合手)を導入したものをハプテンとして使用する必要がある。しかしその場合に、結合手/官能基の配置、結合手の大きさ等の全ての問題を考慮して導入が適切に行われたものを使用しないと、好ましい抗体は得られない。適切な導入は個々の分子に応じて工夫しなければならない。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

ELISA法(Engvall, E., Meth. Enzymol., 70, 419-439 (1980))等の免疫学的測定方法において、抗体作製に用いた免疫用ハプテンと、固相化用抗原又は標識用抗原に用いるハプテン化合物とが異なる測定系をヘテロガスな系という。ヘテロガスな系では測定感度が上昇する可能性があることが示唆されている。しかしながら、一般論として知られているだけで、個別の対象化合物について、固相化用抗原又は標識用抗原としてどのような構造のハプテンを用いれば有効に測定感度が上昇するか、個別具体的な研究を必要とする。また、ヘテロガスな系は選択性を低下させる可能性があるとの指摘もされている。チオカルバマート系化合物については、ヘテロガスな測定系は知られていなかった。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0031】

[式(Z2)中、

Mはアルカリ金属を表し；そして

R<sup>1</sup>及びnは式(1)で先に定義した通りである]

で表されるジチオカルバミン酸塩を合成する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

更にこのジチオカルバミン酸塩を単離することなしに式(Z3)：

**【手続補正6】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0046**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0046】**

チオカルバマート系化合物のハプテン化合物と高分子化合物との結合は、例えば、活性化エステル法 (A . E . K A R U e t a l . : J . Agric . Food Chem ., 42, 301 - 309 (1994))、又は混合酸無水物法 (B . F . E r l a n g e r e t a l . : J . Biol . Chem ., 234, 1090 - 1094 (1954)) 等の公知の方法によって行うことができる。

**【手続補正7】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0060**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0060】**

固相化用抗原を担体に固相化させるには、例えば、固相化用抗原を含む緩衝液を担体上に載せ、インキュベーションすればよい。緩衝液としては公知のものが使用でき、例えば、リン酸緩衝液 (P B S)を挙げることができる。緩衝液中の抗原の濃度は広い範囲から選択できるが、通常  $0.01 \mu\text{g} / \text{ml}$  から  $100 \mu\text{g} / \text{ml}$  程度、好ましくは  $0.05 \mu\text{g} / \text{ml}$  から  $5 \mu\text{g} / \text{ml}$  が適している。また、担体として 96 ウェルのマイクロタイプレートを使用する場合には、 $300 \mu\text{l} / \text{ウェル}$  以下で  $20 \mu\text{l} / \text{ウェル}$  から  $150 \mu\text{l} / \text{ウェル}$  程度が望ましい。更に、インキュベーションの条件にも特に制限はないが、通常 4 程度で一晩インキュベーションが適している。

**【手続補正8】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0061**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0061】**

(b) 工程のブロッキングは、抗原 (チオカルバマート系化合物のハプテン化合物と高分子化合物との結合体) を固相化した担体において、チオカルバマート系化合物のハプテン化合物部分以外に後で添加する抗体が吸着され得る部分が存在する場合があり、もっぱらそれを防ぐ目的で行われる。ブロッキング剤として、例えば、BSA やスキムミルク溶液を使用できる。あるいは、ブロックエース (「Block Ace」、大日本製薬社製、コード No . UK - 25B) 等のブロッキング剤として市販されているものを使用することもできる。具体的には、限定されるわけではないが、例えば抗原を固相化した部分にブロッキング剤を含む緩衝液 (例えば、1% BSA を含む P B S (リン酸緩衝液)) を適量加え、約 4 で、一晩インキュベーションした後、洗浄液で洗浄することにより行われる。洗浄液としては特に制限はないが、例えば、150 mM NaCl を添加した 85 mM ホウ酸緩衝液を用いることができる。

**【手続補正9】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0070**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0070】**

好ましくは、式 (1) 及び (2) の化合物において、X が C 1 であり、R<sup>1</sup> がエチル基であり、かつ、n が 3 である。

また、固相化用抗原として、式(2)の化合物に含まれるが、i)の抗体作製に使用した化合物とは異なる化合物と、高分子化合物又は標識物質との結合体を用いることができる。例えば、免疫用ハプテンでは、式(2)においてXがC1であるが、固相化用ハプテンではXが無置換のものを用いることができる。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0081

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0081】

具体的には、免疫用ハプテンとして式(2)の化合物を用い、標識用抗原として式(1)の化合物を用いる。

好ましくは、式(1)及び(2)の化合物において、XがC1であり、R<sup>1</sup>がエチル基であり、かつ、nが3である。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0083】

例えば、上述したチオカルバマート系化合物に対するモノクローナル抗体TBC7-2は、図1に示されており、かつ式(2)の範囲に含まれる化合物を免疫用ハプテンとして得られた抗体である。標識用抗原として免疫用ハプテン/HRPを用いた直接競合ELISA法では、チオベンカルブの測定範囲が約0.5ng/mlないし約70ng/mlであり、IC<sub>50</sub>が約3.7ng/mlであった。これに対し、標識用抗原として図1の標識用ハプテン-1/HRP及び標識用ハプテン-2/HRPを用いた場合には、測定範囲が共に約0.1ng/mlないし約70ng/mlであり、IC<sub>50</sub>が各々約1.7ng/ml及び約2.1ng/mlである(実施例4、図2)。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0086

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0086】

例えば、チオカルバマート系化合物に対するモノクローナル抗体TBC7-2について、直接競合ELISA法において本発明のヘテロガスな系を採用する場合の交差反応性について調べた。その結果、TBC7-2はチオベンカルブの代謝分解物-6が65%、代謝分解物-3が33%、代謝分解物-2が5.2%、そして代謝分解物-1が4.4%の交差反応性を示したものの、他の代謝物や類縁化合物とは1%以下の交差反応性しか示さなかった(実施例5、表3)。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0090

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0090】

4-エチルアミノブタン酸の塩酸塩1.7g(10mmol)及び水酸化ナトリウム1.2g(30mmol)を水15mlに溶解した。この溶液に氷水冷却下5ないし10で、50%硫酸10mlに室温下でチオシアン酸アンモニウム1.2g(15mmol)の飽和水溶液を徐々に滴下することにより得られたCO<sub>2</sub>ガスを30分かけて吹き込ん

だ。次に、この溶液にベンジルクロリド1.3 g (10 mmol) の10 ml アセトン溶液を室温下に加え、50で1時間攪拌した。反応混合物からアセトンを減圧下に留去し、1Nの塩酸で酸性にした後、酢酸エチル50 mlで3回抽出した。酢酸エチル層を水洗い後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下に濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー( n - ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 2 )で精製し、0.40 g (収率14%) の4-( N - ベンジルチオカルボニル - N - エチルアミノ )ブタン酸(1)を無色透明の液体として得た。