



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102597772 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201080048601. X

(22) 申请日 2010. 10. 13

(30) 优先权数据

2009-247332 2009. 10. 28 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2010/067956 2010. 10. 13

(87) PCT申请的公布数据

W02011/052380 JA 2011. 05. 05

(83) 生物保藏信息

NITE BP-797 2009. 08. 19

NITE BP-798 2009. 08. 19

(71) 申请人 日东纺绩株式会社

地址 日本福岛县

(72) 发明人 菊地涉 佐藤百惠 野田健太

清川严 三浦俊英 小岛良

野村文夫 曾川一幸

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 17 页

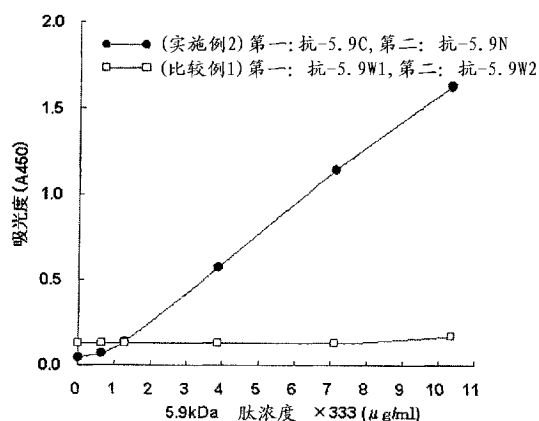
序列表 1 页 附图 2 页

(54) 发明名称

5. 9kDa 肽的免疫学测定方法

(57) 摘要

通过使识别肽标记物的 N 末端的抗体和识别肽标记物的 C 末端的抗体与疑似在含有混杂肽的活体来源样品中存在的作为人纤维蛋白原 α -E 链或 α 链的分解产物的分子量 5. 9kDa 的肝脏疾病诊断用肽标记物接触而形成该肽标记物和 2 种抗体的免疫复合物, 以及免疫学测定得到的免疫复合物来可特异性地测定该肽标记物。



1. 5.9kDa 肽的免疫学测定方法,其特征在于,

使识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体或其抗体片段,以及识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体或其抗体片段与待测样品中的有 SEQID NO:1 所示的氨基酸序列的分子量 5,900 的肽(5.9kDa 肽)接触而生成 5.9kDa 肽和该 2 种抗体或它们的抗体片段的免疫复合物,以及

测定得到的免疫复合物。

2. 权利要求 1 所述的免疫学测定方法,其中,

识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体是识别在 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 1 ~ 39 的氨基酸区域中存在的任何表位的抗体,

识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体是识别在 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 18 ~ 54 的氨基酸区域中存在、并且相比识别上述 N 末端区域的抗体所识别的表位位于更 C 末端侧的任何表位的抗体,且

这 2 种抗体所识别的表位不互相重复,并且,这 2 种抗体不互相妨碍与 5.9kDa 肽的结合。

3. 权利要求 1 或 2 所述的免疫学测定方法,其中识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体是识别在 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 1 ~ 17 的氨基酸区域中存在的表位的抗体。

4. 权利要求 1 ~ 3 之任一项所述的免疫学测定方法,其中识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体是识别在 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 40 ~ 54 的氨基酸区域中存在的表位的抗体。

5. 权利要求 1 ~ 4 之任一项所述的免疫学测定方法,其中通过夹心 ELISA 法测定免疫复合物。

6. 权利要求 1 ~ 4 之任一项所述的免疫学测定方法,其中通过乳胶免疫凝集测定法测定免疫复合物。

7. 权利要求 1 ~ 6 之任一项所述的免疫学测定方法,其中待测样品

是全血、血清、血浆、尿、唾液、脑脊髓液、胸水、腹水、心囊水、关节液、或者,淋巴液,且有包含 5.9kDa 肽的可能性。

8. 5.9kDa 肽的免疫学测定用试剂盒,其包含:

识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体或其抗体片段、和
识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体或其抗体片段。

9. 权利要求 8 所述的免疫学测定用试剂盒,

其包含:

识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体或其抗体片段、和
识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体或其抗体片段,且

任何一方的抗体或其抗体片段是被标记的标记抗体或标记抗体片段,

另一方的抗体或其抗体片段是结合到固相的固相结合抗体或固相结合抗体片段,且其用于由夹心 ELISA 法测定 5.9kDa 肽。

10. 权利要求 8 所述的免疫学测定用试剂盒,

其包含:

致敏不溶性载体粒子的识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体或其抗体片段,和
致敏不溶性载体粒子的识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体或其抗体片段,且

其用于由乳胶免疫凝集测定法测定 5.9kDa 肽。

11. 权利要求 10 所述的免疫学测定用试剂盒,其包含:

用识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体或其抗体片段,以及识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体或其抗体片段的 2 种抗体或它们的抗体片段的两方致敏 1 个不溶性载体粒子而得到的 1 种不溶性载体粒子;

用该 2 种抗体或其抗体片段分别致敏不同的不溶性载体粒子而得到的 2 种不溶性载体粒子;或者

这 3 种不溶性载体粒子的混合物。

12. 抗体或其抗体片段,其识别在 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 1 ~ 17 的氨基酸区域中存在的表位。

13. 抗体或其抗体片段,其识别在 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 40 ~ 54 的氨基酸区域中存在的表位。

5. 9kDa 肽的免疫学测定方法

【技术领域】

[0001] 本发明涉及用于从待测样品检测通过蛋白质组解析发现可作为肝脏疾病用肽标记物利用的,人纤维蛋白原 α -E 链、或者,是人纤维蛋白原 α 链的分解产物,有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的分子量 5,900 的肽(以下,称之为 5.9kDa 肽)、或者,定量待测样品中的 5.9kDa 肽浓度的免疫学测定方法、及,免疫学测定用试剂盒。另外,本发明涉及 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中使用的,识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体及识别 C 末端区域的抗体。

【背景技术】

[0002] 近年,在世界规模进行一并进行蛋白质组解析,也广泛进行使用蛋白质组解析的疾病标记物的探索(专利文献 1~2、非专利文献 1~3)。在蛋白质组解析中,一般而言,各自分离作为活体来源样品中包含的蛋白质或其分解产物的肽,用质谱分析装置解析分离的蛋白质或肽的氨基酸序列,核对得到的氨基酸序列和数据库中的氨基酸序列,由此鉴定样品中包含的蛋白质或肽。由于根据疾病的有无而在活体内表达的蛋白质不同,通过蛋白质组解析而有可将发现疾病特异性地表达量增减的蛋白质或肽作为其疾病标记物利用的可能性。

[0003] 通过蛋白质组解析,本发明人从在以戒酒为目的住院的酒精依赖症患者中经时采集的血清待测样品,作为伴随习惯饮酒而增减的新颖的血清肽之一鉴定了 5.9kDa 肽,发现可将这作为肝脏疾病诊断标记物利用(专利文献 1、非专利文献 1-2)。

[0004] 另外,本发明人发现,使用由 54 个残基组成的 5.9kDa 肽的全长肽作为抗原而得到的两种类型的单克隆抗体,使单离的 5.9kDa 肽的免疫学测定成为可能(专利文献 1)。

【现有技术文献】

【专利文献】

[0007] 专利文献 1:国际公开第 2004/058966 号

[0008] 专利文献 2:国际公开第 2004/090550 号

【非专利文献】

[0010] 非专利文献 1:Nomura, F. et al., Proteomics, 4, 1187-1194, 2004

[0011] 非专利文献 2:Nomura, F. et al., J. Chromatogr. B., 855, 35-41, 2007

[0012] 非专利文献 3:Hanash, S. M. et al., Nature, 452, 571-579, 2008

【发明内容】

【发明要解决的技术课题】

[0014] 至今,使用蛋白质组解析报告了几种临床上有用的肽。但是,在本发明人所知的范围内几乎未见到使用在临床诊断的领域广泛一般地使用的免疫学的检测方法而定量测定这些的疾病标记物候选肽的报告。此免疫学测定方法的确立困难的点妨碍通过蛋白质组解析发现的肽标记物的普及。

[0015] 作为免疫学测定方法的确立困难的原因,第一,可举出对肽的特异性抗体的制备困难。第二,可举出通过蛋白质组解析发现的肽也多为活体来源样品中存在的成熟的蛋白质的分解产物,包含作为目的的肽的序列的目的肽以外的多种分解产物混在于样品中。这时,即便将作为目的的肽作为免疫原制出抗体,也发生与混在的分解产物的非特异性的反应,无法正确地定量分析目的肽。

[0016] 特别是,通过分解作为本发明的测定对象的 5.9kDa 肽而产生的人纤维蛋白原是与凝固-纤溶系统无关的蛋白质,活体内大量存在其分解物。具体而言,纤维蛋白原在凝固系统中被凝血酶分解而产生纤维蛋白单体。在纤溶系统中,由于由纤维蛋白单体构成的纤维蛋白聚合物由纤溶酶在多个部位被分解,必然产生多个纤维蛋白原分解产物。

[0017] 例如,根据数据库 PeptideAtlas (<http://www.peptideatlas.org/>) 中的 build Human Plasma PeptideAtlas 2009-05,作为人纤维蛋白原 α -E 链(数据库内蛋白质名: ENSP00000306361)的分解产物观测到 239 种的肽。

[0018] 如前所述,本发明人成功进行了,对将由 54 个残基组成的 5.9kDa 肽的全长肽作为抗原的 5.9kDa 肽的两种类型的单克隆抗体的制成、及,单离的 5.9kDa 肽的免疫学测定(专利文献 1)。但是,即便使用这些单克隆抗体,在充分地正确地测定有包含多个人纤维蛋白原分解产物的可能性的待测样品中的 5.9kDa 肽的定量中也有再改良的余地。

[0019] 鉴于此实状,本发明的课题在于提供从有包含多个人纤维蛋白原 α -E 链/ α 链分解产物的可能性的待测样品特异性地检测 5.9kDa 肽而定量的免疫学测定方法。而且,本发明的课题旨在提供用于在该免疫学测定方法中使用的试剂盒以及该免疫学测定方法及该试剂盒中使用的识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体及识别 C 末端区域的抗体。

[0020] 【解决课题的技术方案】

[0021] 已知 2 种含 5.9kDa 肽的氨基酸序列的纤维蛋白原链。即为,人纤维蛋白原 α -E 链(以下,也称之为 F α -E 链)和人纤维蛋白原 α 链(以下,也称之为 F α 链)。F α -E 链和 F α 链以 5.9kDa 肽的序列作为基准, N 末端侧上游区域的氨基酸序列完全地一致,但 C 末端侧下游区域的氨基酸序列不同。F α -E 链和 F α 链的分解产物,如前所述,除了 5.9kDa 以外,在血液样品中存在至少 200 种以上的混杂肽。

[0022] 因此,本发明人当初制备了有 F α -E 链和 F α 链中的几个氨基酸序列的多种肽作为抗原的多种抗体,在它们之中将以 5.9kDa 肽的序列的最近傍区域作为抗原的抗体作为混杂肽除去用抗体,将其余作为 5.9kDa 肽测定用抗体使用,尝试了测定 5.9kDa 肽。即,在使用多种混杂肽除去用抗体除去混杂肽的操作之后,尝试了使用 5.9kDa 肽测定用抗体测定样品中的 5.9kDa 肽。

[0023] 具体而言,为了制成混杂肽除去用抗体而使用的抗原肽作为:(a1)F α -E 链或 F α 链中的 5.9kDa 肽的 N 末端侧上游区域 7 个的氨基酸序列(氨基酸序列 EFPSRGK)、(a2) 识别 F α -E 链中的 5.9kDa 肽区域的 C 末端侧下游区域的 13 个的氨基酸序列(氨基酸序列 RDCDDVLQTHPSG)的抗体、及,(a3)F α 链中的 5.9kDa 肽区域的 C 末端侧下游区域 13 个的氨基酸序列(氨基酸序列 RGIHTSPLGKPSL)。另外,作为 5.9kDa 肽测定用抗体,最终,以使用(b1)识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体、(b2)识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体为良好。

[0024] 但是,令人惊讶地,本发明人发现,不经前述的混杂肽的除去操作,通过仅免疫学

测定使 5.9kDa 肽与识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体和识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体接触而得到的 5.9kDa 肽和两种抗体的免疫复合物,尽管通过通常的蛋白印迹法在待测样品中检测到这两种抗体结合的混杂肽,但也不受要通过前述的混杂肽除去操作除去的混杂肽的影响,可从有含多种人纤维蛋白原 α -E 链/ α 链分解产物的可能性的待测样品基本上仅测定 5.9kDa 肽,从而完成本发明。

[0025] 从而,本发明涉及接下来举的待测样品中的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法、免疫学测定用试剂盒及它们中使用的抗体。

[0026] [1]5.9kDa 肽的免疫学测定方法,其特征在于,使识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体或其抗体片段,以及识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体或其抗体片段与待测样品中的有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列的分子量 5,900 的肽(5.9kDa 肽)接触而生成 5.9kDa 肽和该 2 种抗体或它们的抗体片段的免疫复合物,以及测定得到的免疫复合物。

[0027] [2] 上述 [1] 所述的免疫学测定方法,其中,

[0028] 识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体是识别在 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 1 ~ 39 的氨基酸区域中存在的任何表位的抗体,

[0029] 识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体是识别在 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 18 ~ 54 的氨基酸区域中存在、并且相比识别上述 N 末端区域的抗体所识别的表位位于更 C 末端侧的任何表位的抗体,

[0030] 这 2 种抗体所识别的表位不互相重复,并且,

[0031] 这 2 种抗体不互相妨碍与 5.9kDa 肽的结合。

[0032] [3] 上述 [1] 或 [2] 所述的免疫学测定方法,其中识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体是识别在 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 1 ~ 17 的氨基酸区域中存在的表位的抗体。

[0033] [4] 上述 [1] ~ [3] 之任一项所述的免疫学测定方法,其中识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体是识别在 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 40 ~ 54 的氨基酸区域中存在的表位的抗体。

[0034] [5] 上述 [1] ~ [4] 之任一项所述的免疫学测定方法,其中通过夹心 ELISA 法测定免疫复合物。

[0035] [6] 上述 [1] ~ [4] 之任一项所述的免疫学测定方法,其中通过乳胶免疫凝集测定法测定免疫复合物。

[0036] [7] 上述 [1] ~ [6] 之任一项所述的免疫学测定方法,其中待测样品

[0037] 是全血、血清、血浆、尿、唾液、脑脊髓液、胸水、腹水、心囊水、关节液、或者,淋巴液,且

[0038] 有包含 5.9kDa 肽的可能性。

[0039] [8]5.9kDa 肽的免疫学测定用试剂盒,其包含:

[0040] 识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体或其抗体片段、和

[0041] 识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体或其抗体片段。

[0042] [9] 上述 [8] 所述的免疫学测定用试剂盒,

[0043] 其包含:

[0044] 识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体或其抗体片段、和

[0045] 识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体或其抗体片段,

- [0046] 任何一方的抗体或其抗体片段是被标记的标记抗体或标记抗体片段，
- [0047] 另一方的抗体或其抗体片段是结合到固相的固相结合抗体或固相结合抗体片段，且
- [0048] 用于由夹心 ELISA 法的测定 5.9kDa 肽。
- [0049] [10] 上述 [8] 所述的免疫学测定用试剂盒，
- [0050] 其包含：
- [0051] 致敏不溶性载体粒子的识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体或其抗体片段，和
- [0052] 致敏不溶性载体粒子的识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体或其抗体片段，且
- [0053] 用于由乳胶免疫凝集测定法的测定 5.9kDa 肽。
- [0054] [11] 上述 [10] 所述的免疫学测定用试剂盒，其含：
- [0055] 用识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体或其抗体片段，以及识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体或其抗体片段的 2 种抗体或它们的抗体片段的双方致敏 1 个不溶性载体粒子而得到的 1 种不溶性载体粒子；
- [0056] 用该 2 种抗体或它们的抗体片段分别致敏不同的不溶性载体粒子而得到的 2 种不溶性载体粒子；或者，
- [0057] 这 3 种不溶性载体粒子的混合物。
- [0058] [12] 抗体或其抗体片段，其识别 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 1 ~ 17 的氨基酸区域中存在的表位。
- [0059] [13] 抗体或其抗体片段，其识别 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 40 ~ 54 的氨基酸区域中存在的表位。

[0060] 【发明效果】

[0061] 通过本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法，从有含多种混杂肽的可能性的待测样品，可简便并且正确地特异性地测定 5.9kDa 肽。虽然使用质谱分析装置的 5.9kDa 肽的定量测定也可能，通过使用更简便地有同等的精度，并且，通量高的本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法，定量作为肝脏疾病诊断用肽标记物的 5.9kDa 肽，使容易地进行习惯饮酒者或问题饮酒者发症肝脏疾病的可能性或，饮酒以外的原因的肝脏疾病、例如，肝炎、肝硬变、或者，脂肪肝的诊断变得可能。

【附图说明】

[0062] 【图 1】是示使用实施例 2 中制成的，作为第一抗体使用抗 -5.9C，作为第二抗体使用抗 -5.9N 的本发明的夹心 ELISA 测定系统，和比较例 1 中制成的，作为第一抗体使用抗 -5.9W1，作为第二抗体使用抗 -5.9W2 的夹心 ELISA 测定系统，测定血清中的 5.9kDa 肽浓度之时的标准曲线的图。纵轴表示在波长 450nm 处的吸光度，横轴表示将样品 1/333 稀释之前的 5.9kDa 肽浓度 ($\mu\text{g/ml}$)。

[0063] 【图 2】是示将同一血清样品中的 5.9kDa 肽浓度用本发明的 ELISA 测定定量的结果与使用 SI-MS 法定量的结果的相关的图。纵轴表示用本发明的 ELISA 测定测定的 5.9kDa 肽浓度 ($\mu\text{g/ml}$)、横轴表示通过 SI-MS 法算出的 5.9kDa 肽浓度 ($\mu\text{g/ml}$)。白色圆点表示从健康者得到的血清 8 个待测样品、黑色圆点表示从酒精依赖症患者得到的血清 8 个待测样品。

[0064] 【图 3】是示将同一血清样品中的 5.9kDa 肽浓度用本发明的乳胶免疫凝集测定 (LATEX 测定) 定量的结果与通过本发明的 ELISA 测定定量的结果的相关的图。纵轴表示通过本发明的 LATEX 测定测定的 5.9kDa 肽浓度 ($\mu\text{g/ml}$)、横轴表示通过本发明的 ELISA 测定测定的 5.9kDa 肽浓度 ($\mu\text{g/ml}$)。

[0065] 【实施方式】

[0066] 通过本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒测定的 5.9kDa 肽是有 SEQ ID NO :1 所示的由 54 个氨基酸残基组成的氨基酸序列,其理论分子量是 5904.2 的肽。该肽在人纤维蛋白原 α -E 链及人纤维蛋白原 α 链的从 N 末端起第 576 ~ 629 的氨基酸区域中存在,通过人纤维蛋白原 α -E 链及人纤维蛋白原 α 链分解而产生。

[0067] 通过本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒测定的 5.9kDa 肽是伴随习惯饮酒等的要因而从活体来源样品的检测量减少的肝脏疾病诊断用肽标记物。

[0068] 成为本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法的对象的待测样品而言,只要是有包含 5.9kDa 肽的可能性的活体来源样品就不特别限制,可举出各种体液或细胞组织提取液等,从作为 5.9kD 的临床标记物的功能及样品采集的简便性的观点,优选从疑似患肝脏疾病的患者采集的体液。其中,体液而言,可举出全血、血清、血浆、尿、唾液、淋巴液、脑脊髓液、或者,含腹水-胸水-心囊水-关节液的穿刺液等,在其中也是,特别优选含有凝固纤溶系统中涉及的纤维蛋白原及纤维蛋白,和含由这些产生的 5.9kDa 肽的多种的分解产物的可能性高的血液来源样品、即,全血、血浆、血清。尤其是,由本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法测定的待测样品而言,适宜是从疑似患肝脏疾病的患者采集的血清。

[0069] 本发明的 5.9kD 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体及识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体是,可在 5.9kDa 肽中存在的几个表位之中,识别不互相重复的表位,并且,不互相妨碍与 5.9kDa 肽的结合的抗体。其中,本发明中使用的识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体所识别的表位相比本发明中使用的识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体所识别的表位存在于更 N 末端侧。

[0070] 其中,本发明的 5.9kDa 肽免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体及识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体只要是可进行对于 5.9kDa 肽特异性的免疫学测定,则是单克隆抗体也可,是多克隆抗体也可。另外,该抗体的同种型不特别限定,例如,可举出 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgM 的同种型的抗体,从抗体纯化的容易度的观点来看,优选 IgG 型的抗体。然后,对于用于得到该抗体的制备方法-产生生物也不特别限定,例如,可举出使用小鼠来源杂交瘤细胞株的该抗体的制备。

[0071] 关于本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体及识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体,表位通常是指,由 6 ~ 11 个左右的氨基酸残基组成的抗原的分子表面中存在的氨基酸区域,抗体所识别而结合的抗原的特定的结构单位。通常,1 个抗原有多个表位。

[0072] 关于本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体及识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体,2 种抗体不互相妨碍与 5.9kDa 肽的结合是指,例如,另一方的抗体识别 5.9kDa 肽中的表位而结合之时,其抗体将另一方的抗体所识别的表位的全部或一部分立体覆盖而抑制另一方的抗体的表位识别,

或者,另一方的抗体识别表位而结合之时通过 2 个抗体接触等的实施方式,无另一方的抗体的向 5.9kDa 肽的结合被另一方的抗体的结合阻碍。

[0073] 其中,为了使识别抗原中的不重复的表位的抗体不妨碍互相与一方的抗原的结合,2 个不重复的表位要有的间隔,依赖于抗原可取的立体结构,但优选为在 2 个表位间存在 6 个残基以上的氨基酸区域、更优选为 20 个残基以上的氨基酸区域,再者优选为在 2 个表位间的氨基酸区域中含取 β 转角结构的氨基酸区域。通过在 2 个表位间存在某种程度的间隔,2 种抗体互相成立体障碍的可能性减少。再者,通过在不重复的 2 个表位间存在由 4 个氨基酸残基形成的肽链急剧地转折的 β 转角结构,识别各自的表位的抗体互相接触的可能性减少。

[0074] 实施例中详述,通过确认表位存在于 SEQ ID NO:1 所示的 5.9kDa 肽的氨基酸序列的从 N 末端起第 1 ~ 17 或第 40 ~ 54 的氨基酸区域,本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体优选为识别 SEQ ID NO:1 所示的 5.9kDa 肽的氨基酸序列的从 N 末端起第 1 ~ 39 的氨基酸区域中存在的任何表位的抗体,更优选为识别 SEQ ID NO:1 所示的 5.9kDa 肽的氨基酸序列的从 N 末端起第 1 ~ 17 的氨基酸区域中存在的表位的抗体。

[0075] 另一方面,本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体,优选为识别在 SEQ ID NO:1 所示的 5.9kDa 肽的氨基酸序列的从 N 末端起第 18 ~ 54 的氨基酸区域中存在的任何中存在,并且,相比上述识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体所识别的表位位于更 C 末端侧的表位的抗体,更优选为识别在 SEQ ID NO:1 所示的 5.9kDa 肽的氨基酸序列的从 N 末端起第 40 ~ 54 的氨基酸区域中存在的表位的抗体。

[0076] 本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 1 ~ 17 或第 40 ~ 54 的氨基酸区域中存在的表位的抗体而言,可举出:将含 SEQ ID NO:1 所示的 5.9kDa 肽的氨基酸序列的从 N 末端起第 1 ~ 17 或第 40 ~ 54 的氨基酸序列的肽、或者,该氨基酸序列中有 1 到数个氨基酸的选自缺失、取代、附加或插入的至少 1 种的变异,并且,有含该氨基酸序列的连续的 90% 以上的氨基酸序列的肽作为抗原而得到的抗体、或者,将作为该抗原的肽和载体结合而得到的复合物作为免疫原而得到的抗体。

[0077] 其中,作为抗原的肽,例如,可使用公知的肽合成技术化学合成而得到。

[0078] 另外,上述载体而言,可使用作为匙孔青贝的血蓝蛋白 (KLH)、牛血清白蛋白 (BSA)、人血清白蛋白 (HSA)、鸡血清白蛋白、聚-L-赖氨酸、聚丙氨酰赖氨酸、二棕榈基赖氨酸、破伤风类病毒或多糖类等的载体而公知的载体。其中,使载体和作为抗原的肽结合的方法而言,可举出例如,作为抗原的肽中包含的,或者,利用人工地导入作为抗原的肽的 Cys 残基的 SH 基而使载体和作为抗原的肽结合的 MBS(马来酰亚胺苯甲酰氧基琥珀酸亚胺)法。

[0079] 本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 1 ~ 17 及第 40 ~ 54 的氨基酸区域中存在的表位的抗体是单克隆抗体也可,是多克隆抗体也可。

[0080] 作为本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或

者,本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 1~17 的氨基酸区域中存在的表位的抗体,可举出,优选为,将在含 SEQ ID NO:1 所示的 5.9kDa 肽的氨基酸序列的从 N 末端起第 1~17 的氨基酸序列的抗原肽的 N 末端或 C 末端导入为了使抗原肽和上述载体结合而使用的 Cys 残基的肽和上述载体的复合物作为免疫原而得到的抗体、更优选为,将在其抗原肽的 C 末端导入为了使抗原肽和载体结合而使用的 Cys 残基的肽、即有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的肽和作为载体的 KLH 的复合物作为免疫原而得到的抗体、特别是优选为,由本发明人建立的杂交瘤 5.9N-06(国际保藏号:NITEBP-797)产生的单克隆抗体。

[0081] 另一方面,作为本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 40~54 的氨基酸区域中存在的表位的抗体,可举出,优选为,将在含 SEQ ID NO:1 所示的 5.9kDa 肽的氨基酸序列的从 N 末端起第 40~54 的氨基酸序列的抗原肽的 N 末端或 C 末端导入为了使抗原肽和上述载体结合而使用的 Cys 残基的肽和上述载体的复合物作为免疫原而得到的抗体、更优选为,将在其抗原肽的 N 末端导入为了使抗原肽和载体结合而使用的 Cys 残基的肽、即有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列的肽和作为载体的 KLH 的复合物作为免疫原而得到的抗体、特别是优选为,由本发明人建立的杂交瘤 5.9C-02(国际保藏号:NITEBP-798)产生的单克隆抗体。

[0082] 在本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中,只要可识别各自的抗体所识别的表位,可同样地使用识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体的抗体片段、及,识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体的抗体片段。另外,对于本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 1~17 的氨基酸区域中存在的表位的抗体或识别 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 40~54 的氨基酸区域中存在的表位的抗体,只要可识别各自的抗体所识别的表位,也同样地提供它们的抗体片段。

[0083] 这些的抗体片段而言,不特别限定。具体而言,可举出 Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Diabody、dsFv、含互补决定区域(以下,也称之为 CDR)的肽。

[0084] Fab 是在将 IgG 型抗体用蛋白质分解酶木瓜蛋白酶处理而得到的片段之中,H 链的 N 末端侧约一半和 L 链全体通过二硫(S-S)键结合的分子量约 5 万 Da 的有对抗原的特异性结合能力的抗体片段。在本发明中,Fab,例如,可将本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 1~17 的氨基酸区域中存在的表位的抗体或识别 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 40~54 的氨基酸区域中存在的表位的抗体用蛋白质分解酶木瓜蛋白酶处理而得到。

[0085] F(ab')₂ 是在将 IgG 型抗体用蛋白质分解酶胃蛋白酶处理而得到的片段之中,相比 Fab 经铰链区域的 S-S 键结合的略大的,分子量约 10 万 Da 的有对抗原的特异性结合能力的抗体片段。在本发明中,F(ab')₂,例如,可将本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 1~17 的氨基酸区域中存在的表位的抗体或识别 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 40~54 的氨基酸区域中存在的表位的抗体用蛋白质分解酶胃蛋白酶处理而得到。或者,可通过将下述的 Fab' 硫醚键合或 S-S 键合而制成。

[0086] Fab' 是切断上述 F(ab')₂ 的铰链区域的 S-S 键的分子量约 5 万 Da 的有对抗原的特异性结合能力的抗体片段。在本发明中,可将 F(ab')₂ 用还原剂二硫苏糖醇处理而得到。

[0087] scFv 是将 1 条 H 链可变区域(VH)和 1 条 L 链可变区域(VL)用 12 个残基以上的适当的肽接头(P)连结的 VH-P-VL 乃至 VL-P-VH 多肽,且有对抗原的特异性结合能力的抗体片段。

[0088] 双抗体是抗原结合特异性的相同或不同的 scFv 形成 2 聚体的抗体片段,对相同的抗原高于 scFv 的反应性的,或者,对不同的抗原同样的特异性结合能力的抗体片段。


[0089] dsFv 是将 H 链可变区域及 L 链可变区域中的各自 1 个氨基酸残基用 Cys 残基取代的多肽经该 Cys 残基间的 S-S 键结合的抗体片段。

[0090] 含 CDR 的肽是含 H 链可变区域或 L 链可变区域的 CDR 的至少 1 个区域以上而构成。含多个 CDR 的肽可通过直接或经适当的肽接头结合而制备。

[0091] 本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的各种的抗体是,将含各自的抗原、例如,各自的抗体所识别的表位的 5.9kDa 肽片段、其变体、5.9kDa 肽的全长肽、5.9kDa 肽的全长肽的变体、或者这些的肽和上述载体的复合物作为免疫原而免疫动物之后,关于多克隆抗体,从其动物的血清可通过公知的方法制备,关于单克隆抗体,可从通过将由其动物的脾脏等来源的产生抗体的细胞和骨髓瘤细胞融合而得到的杂交瘤经回收及纯化而得到。

[0092] 其中,作为免疫原的肽从人血液等的活体来源样品纯化而得到也可,使用公知的肽合成技术化学合成而得到也可。不限于此,由重组体产生的肽也可作为抗原使用。

[0093] 产生本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的各种的抗体的杂交瘤可根据公知的方法、例如, Kohler 和 Milstein 的方法 (Kohler, G. & Milstein, C. Nature, 256, 495-497, 1975) 制成。即,将上述免疫原与公知的佐剂一同混和之后,将制成的佐剂液向小鼠、大鼠、仓鼠、山羊等的各种免疫动物间隔时间免疫必要次数,确认抗体价的升高后,将由其动物的脾脏等来源的产生抗体的细胞和小鼠、大鼠等的哺乳动物的骨髓瘤细胞进行细胞融合而制成杂交瘤。

[0094] 本发明人制成并建立的,产生前述的本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的从 N 末端起第 1 ~ 17 的氨基酸区域中存在的表位的抗体的杂交瘤 5.9N-06、及,产生前述的本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的从 C 末端起第 40 ~ 54 的氨基酸区域中存在的表位的抗体的杂交瘤 5.9C-02 在 2009 年 8 月 19 日国内保藏到  292-0818 日本国千叶县木更津市上总镰足 2-5-8 独立行政法人制品评价技术基盘机构 (NITE) 专利微生物保藏中心 (NPMD), 作为保藏号,各自赋予 NITE P-797 及 NITE P-798。其后,将这些的国内保藏,在 2010 年 8 月 20 日基于布达佩斯条约进行向国际保藏的移管请求,在 2010 年 9 月 13 日,作为国际保藏号,各自赋予 NITE BP-797 及 NITE BP-798。

[0095] 为了从杂交瘤获得本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的各种的单克隆抗体,首先,对制成的杂交瘤使用选择培养基进行选择,将选择的杂交瘤的培养上清用如 ELISA 法一样的适当的免疫测定法分析,选择产生目的的单克隆抗体的杂交瘤。接下来,将选择的克隆用如有限稀释法等一样的方法进行克隆而单克隆化。接下来,将克隆的杂交瘤用通常细胞培养中使用的培养基、例如 α -MEM、RPMI1640、ASF、S-clone 等进行培养,可由其培养上清回收单克隆抗体。将作为杂交瘤的来源的动物、裸鼠预先用姥鲛烷处理,通过向该动物腹腔内注射细胞而贮留腹水,从其腹水回收单克隆抗体也可。最后,由上清、腹水回收单克隆抗体的方法而言,可使用通常的方法。例如,可举出由硫酸铵、硫酸钠等的盐析法或层析、离子交换层析、一般而言,由蛋

白 G 等的亲和层析等。

[0096] 本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的各种的抗体或其抗体片段也可通过将编码这些的 DNA 序列通过公知的方法解析之后,制成含其 DNA 序列的基因重组载体,将制成的基因重组载体导入适当的宿主、例如,大肠杆菌或酵母,由得到的基因重组体回收该抗体或其抗体片段,纯化而得到。

[0097] 本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中生成的免疫复合物是,通过将前述的本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的 N 末端的抗体或其抗体片段及识别 5.9kDa 肽的 C 末端的抗体或其抗体片段分别同时与 5.9kDa 肽接触-结合,或者,通过一方的抗体或其抗体片段与 5.9kDa 肽接触-结合而形成的 5.9kDa 肽和抗体或其抗体片段的复合物上再接触-结合另一方的抗体或其抗体片段而形成的,5.9kDa 肽和 2 种抗体或它们的抗体片段的复合物。其中,形成的复合物是 3 聚体也可,是其以上的多聚体也可。

[0098] 在本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中生成的免疫复合物中,形成复合物的前述的本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的 N 末端的抗体或其抗体片段及识别 5.9kDa 肽的 C 末端的抗体或其抗体片段之中一方维持其抗原识别能力的实施方式中,将固相、即,聚苯乙烯、聚丙烯、聚碳酸酯、聚乙烯、尼龙、聚甲基丙烯酸酯等向作为原料的基材、例如,塑料管或微滴定板直接或间接物理结合或化学结合、利用亲和性等结合也可。另外,在不结合于上述固相的另一方的抗体或其抗体片段维持其抗原识别能力的实施方式中,用标记物质、例如,HRP 等的标记酶、胶体金、钨等的标记金属、FTTC、若丹明、德克萨斯红、Alexa、GFP 等的化学、生物性各种荧光物质、³²P、⁵¹Cr 等的放射性物质等标记也可。

[0099] 或者,在本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中生成的免疫复合物中,在前述的本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的 N 末端的抗体或其抗体片段及识别 5.9kDa 肽的 C 末端的抗体或其抗体片段的双方维持其抗原识别能力的实施方式中,将不溶性载体粒子、例如,如聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物一样的有机高分子向如乳胶或氧化硅、氧化铝一样的无机氧化物等直接或间接物理结合或化学结合、利用亲和性等结合也可。

[0100] 测定本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中生成的免疫复合物的手段而言,可例示酶联免疫测定法(ELISA 法)、免疫比浊测定法(TIA 法)、乳胶免疫凝集测定法(LATEX 法)、电化学发光法、荧光法等。另外免疫层析法、利用试验纸的方法也有效。

[0101] 从有优良的灵敏度及定量性的方面,测定本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中生成的免疫复合物的手段而言,优选 ELISA 法,更优选夹心 ELISA 法。

[0102] 另外,从测定简便并且迅速的方面来看,测定本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中生成的免疫复合物的手段而言,优选乳胶免疫凝集测定法。

[0103] 本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中进行的由夹心 ELISA 法的测定是,在前述的本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的 N 末端的抗体或其抗体片段及识别 5.9kDa 肽的 C 末端的抗体或其抗体片段之中一方维持其抗原识别能力的实施方式中,使用由标记物质、例如,HRP 等的标记酶、胶体金、钨等的标记金属、FTTC、若丹明、德克萨斯红、Alexa、GFP 等的化学、生物学的

各种荧光物质、 ^{32}P 、 ^{51}Cr 等的放射性物质等标记的标记抗体或标记抗体片段。再者,本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中进行的由夹心 ELISA 法的测定是,在上述标记抗体或标记抗体片段中未使用的另一方的抗体或其抗体片段维持其抗原识别能力的实施方式中,使用将固相、即,聚苯乙烯、聚丙烯、聚碳酸酯、聚乙烯、尼龙、聚甲基丙烯酸酯等向作为原料的基材、例如,塑料管或微滴定板直接或间接物理结合或化学结合、利用亲和性等结合的固相结合抗体或固相结合抗体片段。

[0104] 本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中进行的由夹心 ELISA 法的测定可使用上述标记抗体或标记抗体片段和固相结合抗体或固相结合抗体片段,通过公知的方法进行。即,首先,向固相结合抗体或固相结合抗体片段加待测样品而使反应,反应一定时间之后,清洗固相,加标记抗体或标记抗体片段而再反应 2 次。接下来,再度清洗固相,加发色底物等而进行反应。其中,发色底物而言,作为标记抗体或标记抗体片段的标记物质使用 HRP 时,可使用已知的 DAB、TMB 等。

[0105] 本发明中提供的由夹心 ELISA 法的 5.9kDa 肽免疫学测定用试剂盒具备前述的本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中进行的由夹心 ELISA 法的测定中使用的标记抗体或标记抗体片段及固相结合抗体或固相结合抗体片段。再者,本发明中提供的由夹心 ELISA 法的 5.9kDa 肽免疫学测定用试剂盒可含底物、待测样品稀释液、清洗液、阳性对照、阴性对照等。其中,为了简便并且迅速地测定多个待测样品,优选以用自动 ELISA 装置测定可能的免疫学测定试剂盒构成。

[0106] 本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中进行的由乳胶免疫凝集测定法的测定使用致敏不溶性载体粒子的前述的本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法及免疫学测定用试剂盒中使用的,或者,本发明中提供的识别 5.9kDa 肽的 N 末端的抗体或其抗体片段和识别 5.9kDa 肽的 C 末端的抗体或其抗体片段。其中,向不溶性载体粒子的抗体或其抗体片段的致敏是指,在维持其抗原识别能力的实施方式中,直接或间接物理结合或化学结合、利用亲和性等而向不溶性载体粒子结合抗体或其抗体片段。不溶性载体粒子而言,可举出例如,如聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物一样的有机高分子的如乳胶或氧化硅、氧化铝一样的无机氧化物等。

[0107] 致敏不溶性载体粒子的上述 2 种抗体或它们的抗体片段的使用实施方式而言,使用由上述 2 种抗体或它们的抗体片段的两方致敏 1 个不溶性载体粒子而得到的仅 1 种不溶性载体粒子也可,将由上述 2 种抗体或它们的抗体片段分别致敏不同的不溶性载体粒子而得到的 2 种不溶性载体粒子混合而使用也可,将这 3 种不溶性载体粒子混合而使用也可。

[0108] 本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中进行的由乳胶免疫凝集测定法的测定可使用上述 2 种不溶性载体粒子,通过公知的方法进行。即,向待测样品加上上述 2 种不溶性载体粒子而进行反应,反应一定时间之后,测定形成的凝集。

[0109] 本发明中提供的由乳胶免疫凝集测定法的 5.9kDa 肽免疫学测定用试剂盒具备致敏前述的本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法中进行的由乳胶免疫凝集测定法的测定中使用的不溶性载体粒子的识别 5.9kDa 肽的 N 末端的抗体或其抗体片段和识别 5.9kDa 肽的 C 末端的抗体或其抗体片段。再者,本发明中提供的由乳胶免疫凝集测定法的 5.9kDa 肽免疫学测定试剂盒可含待测样品稀释液、阳性对照、阴性对照等。其中,为了简便并且迅速地测定多个待测样品,优选作为用自动乳胶免疫凝集测定装置测定可能的免疫学测定试剂盒

而构成。

[0110] 接下来举实施例更详细地说明本发明,但本发明不受这些实施例的任何限定。

【实施例】

[0111] 【实施例 1】

[0112] 【识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体、及,识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体的制成及其特性的鉴定】

[0113] 【(1) 免疫原的制成】

[0114] 为了制成识别 5.9kDa 肽的 N 末端区域的抗体、及,识别 5.9kDa 肽的 C 末端区域的抗体,制成包含含有 5.9kDa 肽的 N 末端或 C 末端的氨基酸序列的肽的免疫原。

[0115] 具体而言,首先,合成在由 SEQ ID NO:1 所示的 5.9kDa 肽的氨基酸序列的从 N 末端起第 1~17 的 17 个氨基酸残基组成的抗原肽(以下,也称之为 5.9N)的 C 末端导入为了结合抗原肽和载体而使用的 Cys 残基的肽、即有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的肽。另外,合成 5.9kDa 肽的 C 末端起的 15 个残基、即,在由 SEQ ID NO:1 所示的 5.9kDa 肽的氨基酸序列的从 N 末端起第 40~54 的 15 个氨基酸残基组成的抗原肽(以下,也称之为 5.9C)的 N 末端导入为了结合抗原肽和载体而使用的 Cys 残基的肽、即有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列的肽。

[0116] 接下来,向这些的肽的 N 末端 Cys 残基或 C 末端 Cys 残基通过 MBS(马来酰亚胺苯甲酰氧基琥珀酸亚胺)法缀合作为载体的匙孔青贝血蓝蛋白(KLH),制成作为免疫原使用的复合物。

[0117] 【(2) 向小鼠的免疫】

[0118] 上述(1)中得到的免疫原施用给小鼠,得到免疫小鼠。

[0119] 具体而言,首先,将上述(1)中制成的含 5.9N、或者,5.9C 的免疫原分别用 PBS 溶解至达到 1mg/ml。接下来,取 50 μ l (50 μ g) 与弗罗因德完全佐剂(和光纯药工业)50 μ l 充分混和至乳化。接下来,将制备的悬浮液向 Balb/c6 周龄雌小鼠(日本 Clea)在二乙基醚麻醉下各自腹腔内施用。2 周后,将含同量的 5.9N、或者,5.9C 的免疫原与弗罗因德不完全佐剂(和光纯药工业)混和,通过与弗罗因德完全佐剂之时完全同样的操作,作为乳化悬浮液,各自施用到小鼠。往后每 2 周进行同样的操作,在第 4 次,作为最终免疫将含 5.9N、或者,5.9C 的免疫原 50 μ l (50 μ g) 通过小鼠尾静脉注射施用。

[0120] 【(3) 杂交瘤的确立】

[0121] 将上述(2)中得到的免疫小鼠的脾脏细胞和骨髓瘤细胞融合而制成杂交瘤。

[0122] 具体而言,首先,最终免疫含 5.9N、或者,5.9C 的免疫原的 3 天后,将由各自的小鼠在二乙基醚麻醉下外科摘出的脾脏无菌分散,制备脾脏细胞。细胞融合根据 Kohler 和 Milstein 的方法(Kohler, G. & Milstein, C. Nature, 256, 495-497, 1975) 进行,使用聚乙二醇(PEG4000)(Merck) 将脾脏细胞和骨髓瘤细胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) 融合。融合比率是相对于脾脏细胞数 8×10^7 个而骨髓瘤细胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) 2×10^7 个,是约 4:1。将融合细胞分散到 10% FCS (INVITROGEN) α -MEM (IRVINE) HAT (Cosmo Bio) 培养基而分注到 96 孔微滴定培养板(住友 Bakelite),在 37°C、5% CO₂ 条件下培养。

[0123] 【(4) 集落的筛选】

[0124] 在确立上述 (3) 的杂交瘤的约 2 周后, 确认集落的生长, 筛选产生抗体的杂交瘤。

[0125] 具体而言, 首先, 为了制成筛选用板而将上述 (1) 中合成的 5.9N、或者, 5.9C 溶解到 PBS 中, 分注到 96 孔微滴定板 (Nunc) 至达到 $2 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ / 孔。接下来, 将板于 4°C 静置 2 晚之后, 用含 0.05% Tween20 (PBS-T) (和光纯药工业) 的 PBS 清洗 3 次, 为了抑制非特异性反应而分注 $200 \mu\text{l}$ 用 PBS 稀释 4 倍的 N-102 (日本油脂) 溶液, 再于 4°C 静置 1 晚。接下来, 将完成的板用 PBS-T 清洗 1 次之后, 使与上述 (3) 中得到的杂交瘤的培养上清 $100 \mu\text{l}$ 反应, 再进行清洗之后, 加作为第二抗体的 HRP 标记抗小鼠免疫球蛋白抗体 (Zymed) 而进行反应。清洗后, 加 $100 \mu\text{l}$ 作为 HRP 的发色底物的, TMB 溶液 (Kainos) 而发色一定时间之后, 再添加 $100 \mu\text{l}$ 作为停止液的 1N 硫酸 (和光纯药工业), 对测定波长 450nm 处的吸光度进行测定。

[0126] 通过上述筛选, 对于判断为阳性的克隆, 通过有限稀释法进行再克隆, 再度确认上清。

[0127] 作为结果, 得到与致敏 5.9N 的板反应的杂交瘤 5.9N-06、及, 与致敏 5.9C 的板反应的杂交瘤 5.9C-02。再有, 得到的杂交瘤的培养上清与对照的 BSA 板完全不反应。

[0128] 杂交瘤 5.9N-06 及 5.9C-02 在 2009 年 8 月 19 日国内保藏到 $\overline{\text{F}}$ 292-0818 本国千叶县木更津市上总镰足 2-5-8 独立行政法人制品评价技术基盘机构 (NITE) 专利微生物保藏中心 (NPMD), 作为保藏号, 各自赋予 NITE P-797 及 NITE P-798。其后, 将这些的国内保藏在 2010 年 8 月 20 日, 基于布达佩斯条约进行向国际保藏的移管请求, 在 2010 年 9 月 13 日作为国际保藏号, 各自赋予 NITE BP-797 及 NITEBP-798。

[0129] 【(5) 抗体的同种型鉴定】

[0130] 鉴定上述 (4) 中得到的杂交瘤 5.9N-06、及, 杂交瘤 5.9C-02 各自产生的单克隆抗体抗 -5.9N、及, 抗 -5.9C 的同种型。

[0131] 具体而言, 使用单克隆抗体分型试剂盒 (Amersham Pharmacia), 根据附带的使用说明书, 检验各自的杂交瘤产生的抗体的同种型。

[0132] 作为结果, 确认单克隆抗体抗 -5.9N、及, 抗 -5.9C 属于表 1 所示的同种型。

[0133] 【表 1】单克隆抗体的同种型

[0134]

单克隆抗体名	抗体类	抗体亚类	轻链类型
抗 -5.9N	IgG	IgG1	κ
抗 -5.9C	IgG	IgG1	κ

[0135] 【(6) 抗体的纯化】

[0136] 将杂交瘤 5.9N-06、及, 杂交瘤 5.9C-02 的培养上清, 使用蛋白 G 琼脂糖 Fast Flow (GE HEALTHCARE), 根据附带的使用说明书纯化, 得到单克隆抗体抗 -5.9N、及, 抗 -5.9C。

[0137] 【实施例 2】

[0138] 【使用 ELISA 法的 5.9kDa 肽测定系统的构建和待测样品中的 5.9kDa 肽测定】

[0139] 【(1) 由蛋白印迹法的抗体的与 5.9kDa 肽的反应性确认】

[0140] 使用蛋白印迹法,通过接下来具体记载的方法确认结合到实施例 1 中制成的 2 种的 5.9kDa 肽的 N 末端或 C 末端的抗体结合到 5.9kDa 肽的全长肽。

[0141] 【(1-1)SDS-PAGE- 印迹】

[0142] 将各 0.5 μ g 合成的 5.9kDa 肽在非还原下进行 SDS-PAGE。其后,转移到 PVDF 膜 (Millipore),进行 1 小时封闭。

[0143] 【(1-2) 第一抗体反应】

[0144] 将实施例 1 的 (6) 中纯化的 2 种的抗体 (含 0.05mg/ml 的抗 -5.9N 的 PBS-T、含 0.005mg/ml 的抗 -5.9C 的 PBS-T) 分别与转移了上述 (1-1) 中制成的 5.9kDa 肽的膜反应 1 小时。

[0145] 【(1-3) 第二抗体反应】

[0146] 将膜用 PBS-T 清洗后,与作为第二抗体的 HRP 标记抗小鼠免疫球蛋白抗体 (Zymed) 分别反应 30 分钟。

[0147] 【(1-4) 发色】

[0148] 用 PBS-T 清洗后,利用膜用 TMB 溶液 (和光纯药工业) 进行检测。

[0149] 【(1-5) 结果】

[0150] 制成的 2 种抗体均被确认识别 5.9kDa 肽。

[0151] 【(2) 使用 ELISA 法的 5.9kDa 肽测定系统的构建】

[0152] 制成使用实施例 1 中制成的抗体的夹心 ELISA 测定系统,通过接下来具体记载的方法确认在制成的 ELISA 测定系统中浓度依赖性地测定到抗原抗体反应。

[0153] 【(2-1) 抗体结合板的制成】

[0154] 将实施例 1 的 (6) 中纯化的单克隆抗体抗 -5.9C 以 0.5 μ g/100 μ l/ 孔的浓度对 MaxiSorp 板 (Nunc) 致敏一晚。用 PBS 清洗 3 次后,利用用蒸馏水稀释 5 倍的 N-102 (日本油脂) 进行封闭。

[0155] 【(2-2)HRP 标记抗体的制成】

[0156] 对实施例 1 的 (6) 中纯化的单克隆抗体抗 -5.9N,使用过氧化物酶标记试剂盒 -NH₂(Dojindo Molecular Technologies) 进行 HRP 标记。其中,标记抗体浓度作为 1 μ g/ μ l。

[0157] 【(2-3)ELISA 测定系统的评价】

[0158] 使用上述 (2-2) 中制成的板和标记抗体,评价夹心 ELISA 测定系统的有效性。

[0159] 再有,作为样品使用的血清在得到知情同意之后,连结不可能匿名化而使用。另外,样品中的 5.9kDa 肽浓度通过接下来示的 SI-MS 法算出。

[0160] 将使用 SI-MS 法算出含有 5.9kDa 肽浓度的血清作为样品,使用夹心测定系统测定时,确认吸光度 5.9kDa 肽的浓度依赖性地升高。

[0161] 【SI-MS 法】

[0162] 使用组合磁性珠和 MALDI-TOF/TOF MS 的 ClinProt™ 系统 (Bruker Daltonics) 算出样品中的 5.9kDa 肽浓度。

[0163] 具体而言,首先,向血清添加一定量对 5.9kDa 肽的稳定同位素肽 (SI-5.9kDa) 作为内部标准。接下来,结合到阳离子交换磁珠 (WCX) (Bruker Daltonics) 而溶出。接下来,将溶出的样品直接调节到 AnchorChip (Bruker Daltonics) 后,用 AutoFlex (注册商标)

II (MALDI-TOF/TOF) 进行测定。

[0164] 其中,解析是使用 FlexAnalysis™ 软件 2.4 (Bruker Daltonics) 进行基线校准和平滑处理,从对应于 SI-5.9kDa 的峰强度和对应于血清中的 5.9kDa 肽的峰强度的比,以添加的 SI-5.9kDa 量为基准算出血清中的 5.9kDa 肽浓度。

[0165] 【(3) 人血清中的 5.9kDa 肽的测定】

[0166] 使用上述 (2) 中制成的夹心 ELISA 测定系统,测定人血清中的 5.9kDa 肽,通过接下来具体记载的方法确认 5.9kDa 肽浓度依赖性地观测到抗原抗体反应。

[0167] 再有,使用的血清在得到知情同意之后,连结不可能匿名化而使用。

[0168] 【(3-1) 第一抗体反应】

[0169] 用 PBS 稀释使用 SI-MS 法算出含有 5.9kDa 肽浓度的人血清,制备 5.9kDa 肽浓度分别是 $0 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.65 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.30 \mu\text{g/ml}$ 、 $3.89 \mu\text{g/ml}$ 、 $7.12 \mu\text{g/ml}$ 、 $10.36 \mu\text{g/ml}$ 的样品。将这些的样品用 PBS 以 1/333 稀释,使各 $100 \mu\text{l}$ 与上述 (2-1) 中制成的抗体结合板反应 1 小时。

[0170] 【(3-2) 第二抗体反应】

[0171] 将板用 PBS-T 清洗 3 次之后,与上述 (2-2) 中制成的 HRP 标记抗体 (使用 PBS-T 以 1/4000 稀释的) 反应 30 分钟。

[0172] 【(3-3) 发色】

[0173] 板的清洗后, $100 \mu\text{l}$ 作为 HRP 的发色底物的, TMB 溶液 (Kainos) 而发色一定时间后,再添加 $100 \mu\text{l}$ 作为停止液的 1N 硫酸 (和光纯药工业),用测定波长 450nm 来测定吸光度。

[0174] 【(3-4) 测定】

[0175] 用测定酶标仪进行波长 450nm 的吸光度测定。图 1 示通过吸光度测定得到的标准曲线。

[0176] 如图 1 所示,使用抗 -5.9N、及,抗 -5.9C 的夹心 ELISA 测定系统高灵敏度检测血清中包含的 5.9kDa 肽,确认 5.9kDa 肽浓度依赖性的吸光度升高。

[0177] 【比较例 1:通过使用识别 5.9kDa 肽的全长肽的抗体的 ELISA 测定系统的人血清中的 5.9kDa 肽的测定】

[0178] 使用实施例 2 的 (2-1) 中代替抗 -5.9C 而使用识别 5.9kDa 肽的全长肽的抗体抗 -5.9W1 (由国际公开第 2004/058966 号所述的杂交瘤 CN-2 (保藏号: IPOD FERM BP-08565) 提取纯化), 实施例 2 的 (2-2) 中代替抗 -5.9N 而使用识别 5.9kDa 肽的全长肽的抗体抗 -5.9W2 (由国际公开第 2004/058966 号所述的杂交瘤 CN-1 (保藏号: IPOD FERM BP-08564) 提取纯化) 而构建的夹心 ELISA 测定系统,进行与实施例 2 的 (3) 同样的测定。图 1 示通过测定得到的标准曲线。

[0179] 如图 1 所示,作为第一抗体使用抗 -5.9W1、作为第二抗体使用抗 -5.9W2 的夹心 ELISA 测定系统不示在血清中低浓度含的 5.9kDa 肽浓度依赖性的吸光度升高。

[0180] 再者,在作为第一抗体使用抗 -5.9W1、作为第二抗体使用本发明的单克隆抗体抗 -5.9C 的夹心 ELISA 测定系统、作为第一抗体使用抗 -5.9W1、作为第二抗体使用本发明的单克隆抗体抗 -5.9N 的夹心 ELISA 测定系统、及,作为第一抗体使用本发明的单克隆抗体抗 -5.9C、作为第二抗体使用 5.9W2 的夹心 ELISA 测定系统中也确认同样的现象。

[0181] 【实施例 3】**[0182] 【SI-MS 法和 ELISA 测定的相关性的确认】**

[0183] 确认通过使用 SI-MS 法的定量测定法的人血清中的 5.9kDa 肽浓度测定结果与使用实施例 2 中制成的 ELISA 测定系统时的定量测定结果的相关性, 确认 ELISA 测定系统在血清中多含的纤维蛋白原关联肽之中特异性地定量 5.9kDa 肽的全长肽。

[0184] 再有, 使用的样品是从健康者得到的血清 8 个待测样品和从酒精依赖症患者得到的血清 8 个待测样品, 在得到知情同意之后, 连结不可能匿名化而使用。

[0185] 具体而言, 基于用实施例 2 的 (3) 的测定结果制成的标准曲线, 使用实施例 2 的 (3) 中制成的 ELISA 测定系统, 通过 SI-MS 法定量算出含有 5.9kDa 肽浓度的血清 16 个待测样品中的 5.9kDa 肽浓度。

[0186] 图 2 示将基于对同一样品的 SI-MS 法的 5.9kDa 肽定量结果和基于 ELISA 测定的定量结果比较的结果。

[0187] 如图 2 所示, 由 SI-MS 法的定量结果和由 ELISA 测定的定量结果示明确的相关性。结果提示, 实施例 2 中制成的夹心 ELISA 系在血清中大量存在的肽之中特异性地定量 5.9kDa 肽。

[0188] 从健康者得到的血清 8 个待测样品和从酒精依赖症患者得到的血清 8 个待测样品, 相对于由 ELISA 测定的 5.9kDa 肽定量结果, 通过适用阈值 $6.8 \mu\text{g/ml}$ 而可完全地分离。另外, 由从健康者得到的血清 8 个待测样品组成的组和由从酒精依赖症患者得到的血清 8 个待测样品组成的组关于由 ELISA 测定的 5.9kDa 肽定量结果, 示由分散分析的危险率 1% 以下的显著差异。

[0189] 【实施例 4】**[0190] 【使用乳胶粒子的 5.9kDa 肽测定系统的构建和待测样品中的 5.9kDa 肽测定】****[0191] 【(1) 抗 5.9kDa 抗体致敏乳胶粒子的制备】**

[0192] 制成实施例 1 中制成的两种单克隆抗体 (抗 -5.9N、及, 抗 -5.9C) 分别结合的两种乳胶粒子, 通过接下来具体记载的方法制成将这些混合的抗 5.9kDa 抗体致敏乳胶粒子。

[0193] 再有, 其中使用的试剂组成如下。

[0194] BSA 包被溶液:

[0195]

HEPES 2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸	25mM pH7.5
氯化钠	150mM
乙二胺四醋酸·2 钠	1.0mM
叠氮化钠	0.05%
牛血清白蛋白 (BSA)	1.0%

[0196] 稀释用缓冲液:

[0197]

HEPES	25mM pH7.5
-------	------------

乙二胺四醋酸·2 钠	1.0mM
叠氮化钠	0.05%

[0198] 分散用缓冲液：

[0199]

HEPES	25mM pH7.5
氯化钠	150mM
乙二胺四醋酸·2 钠	1.0mM
叠氮化钠	0.05%

[0200] 【(1-1) 抗 -5.9N 致敏乳胶粒子的制备】

[0201] 向用稀释用缓冲液调节到 1% 浓度的, 粒径 120nm 的乳胶粒子溶液 100ml 加将抗 -5.9N 溶解到稀释用缓冲液达 3mg/ml 的溶液 100ml, 于室温搅拌 1 小时。其后, 于 20,000rpm 进行 1 小时离心分离, 废弃上清而回收沉淀物。向此沉淀物加 100ml 的 BSA 包被溶液而将沉淀物悬浮, 进行超声波处理而完全地分散之后, 于室温搅拌 1 小时。接下来向进行离心分离而得到的沉淀物加 500ml 分散用缓冲液而悬浮, 进行超声波处理而完全地分散而得到 0.2% 浓度抗 -5.9N 致敏乳胶粒子。

[0202] 【(1-2) 抗 -5.9C 致敏乳胶粒子的制备】

[0203] 向用稀释用缓冲液调节到 1% 浓度的, 粒径 120nm 的乳胶粒子溶液 100ml 加将抗 -5.9C 溶解到稀释用缓冲液达到 3mg/ml 的溶液 100ml, 以室温搅拌 1 小时。其后, 于 20,000rpm 进行 1 小时离心分离, 废弃上清而回收沉淀物。向此沉淀物加 100ml 的 BSA 包被溶液而将沉淀物悬浮, 进行超声波处理而完全地分散之后, 于室温搅拌 1 小时。接下来向进行离心分离而得到的沉淀物加 500ml 分散用缓冲液而悬浮, 进行超声波处理而完全地分散而得到 0.2% 浓度抗 -5.9C 致敏乳胶粒子。

[0204] 【(1-3) 抗 5.9kDa 抗体致敏乳胶粒子 (LA 试剂) 的制备】

[0205] 将上述 (1-1) 及 (1-2) 中制备的乳胶粒子溶液以 1 : 1 的比例混合的作为乳胶法的第二试剂来制备。

[0206] 再有, 作为乳胶法的第一试剂使用分散用缓冲液。

[0207] 【(2) 人血清中的 5.9kDa 肽的测定】

[0208] 使用上述 (1-3) 中制备的 LA 试剂, 通过乳胶免疫凝集测定 (LATEX 测定) 确认可定量人血清中的 5.9kDa 肽。

[0209] 具体而言, 对于使用 SI-MS 法算出含有 5.9kDa 肽浓度的人血清样品 10 μ l 反应第一试剂 100 μ l、第二试剂 100 μ l, 使用日立 7180 型自动分析装置, 用主波长 570nm、副波长 800nm, 在 19-34 测光点间 (相当于第二试剂添加后约 1 分钟后~5 分钟后), 测定由 2 端点法的吸光度变化量。

[0210] 作为结果, 如表 2 所示, 确认 5.9kDa 肽浓度依赖性的吸光度升高。

[0211] 【表 2】

[0212]

5.9kDa 肽浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	吸光度
0.00	-0.0080
2.59	0.0112
5.18	0.0393
10.36	0.1582

[0213] 【(3)ELISA 测定和 LATEX 测定的相关性的确认】

[0214] 由与在实施例 3 中的 SI-MS 法的相关性确认提示特异性地检测血清中的 5.9kDa 肽的 ELISA 测定和 LATEX 测定的相关性,确认 LATEX 测定特异性地检测血清中的 5.9kDa 肽。

[0215] 具体而言,基于由上述 (2) 的测定结果制成的标准曲线,定量血清中的 5.9kDa 肽浓度。对于同一样品,与实施例 3 的 (2-3) 同样地通过 ELISA 测定来定量 5.9kDa 肽浓度,图 3 示与由 LATEX 测定的定量结果的相关性。

[0216] 作为结果,如图 3 所示,LATEX 测定和 ELISA 测定示高的相关性,提示通过 LATEX 测定也可特异性地检测血清中的 5.9kDa 肽。

[0217] 【工业实用性】

[0218] 本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法使得作为肝脏疾病诊断用肽标记物的 5.9kDa 肽的简便并且正确的从待测样品的定量成为可能。5.9kDa 肽可在习惯饮酒者或问题饮酒者发生肝脏疾病的可能性的诊断或,饮酒以外的原因的肝脏疾病、例如,肝炎、肝硬化、脂肪肝等的肝脏疾病的诊断中利用,本发明的 5.9kDa 肽的免疫学测定方法,作为这些的疾病的临床诊断方法,无论从现在的肝疾病人口考虑,还是从今后的预防医学见地考虑,都具有大的意义。

[0219] SEQ ID NO :2- 人工序列的说明 :合成肽

[0220] SEQ ID NO :3- 人工序列的说明 :合成肽

[0001]

序列表

<110> Nitto Boseki Co., Ltd.
 <120> 5.9kDa肽的免疫学测定方法
 <130> W5787-00000
 <150> JP 2009-247332
 <151> 2009-10-28
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 1
 Ser Ser Ser Tyr Ser Lys Gln Phe Thr Ser Ser Thr Ser Tyr Asn Arg
 1 5 10 15
 Gly Asp Ser Thr Phe Glu Ser Lys Ser Tyr Lys Met Ala Asp Glu Ala
 20 25 30
 Gly Ser Glu Ala Asp His Glu Gly Thr His Ser Thr Lys Arg Gly His
 35 40 45
 Ala Lys Ser Arg Pro Val
 50
 <210> 2
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 2
 Ser Ser Ser Tyr Ser Lys Gln Phe Thr Ser Ser Thr Ser Tyr Asn Arg
 1 5 10 15
 Gly Cys
 <210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 3
 Cys Gly Thr His Ser Thr Lys Arg Gly His Ala Lys Ser Arg Pro Val
 1 5 10 15

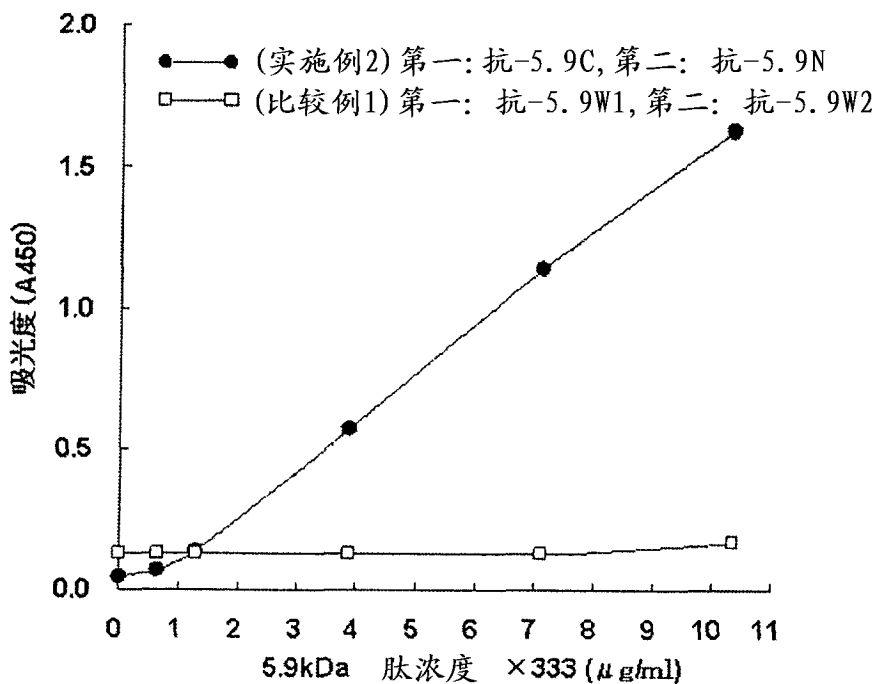


图 1

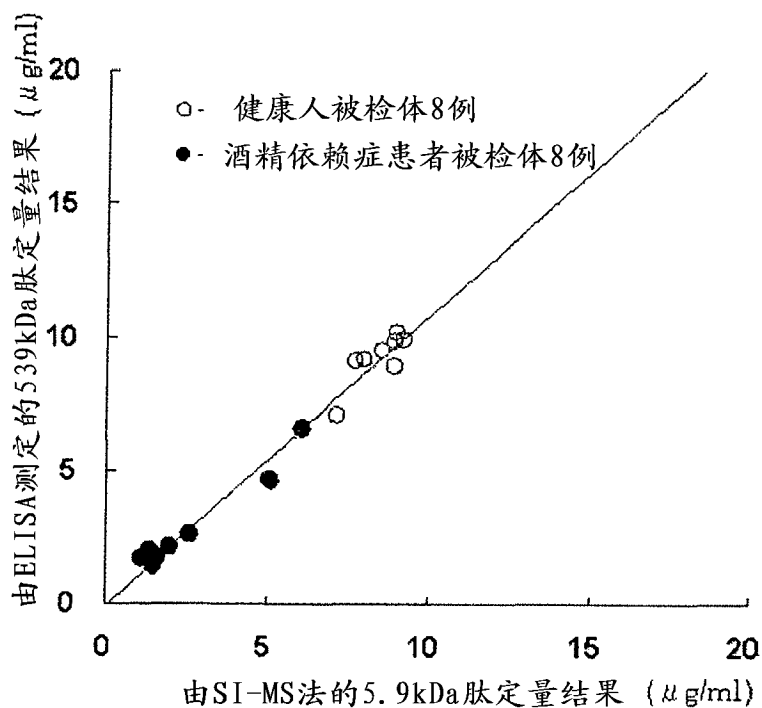


图 2

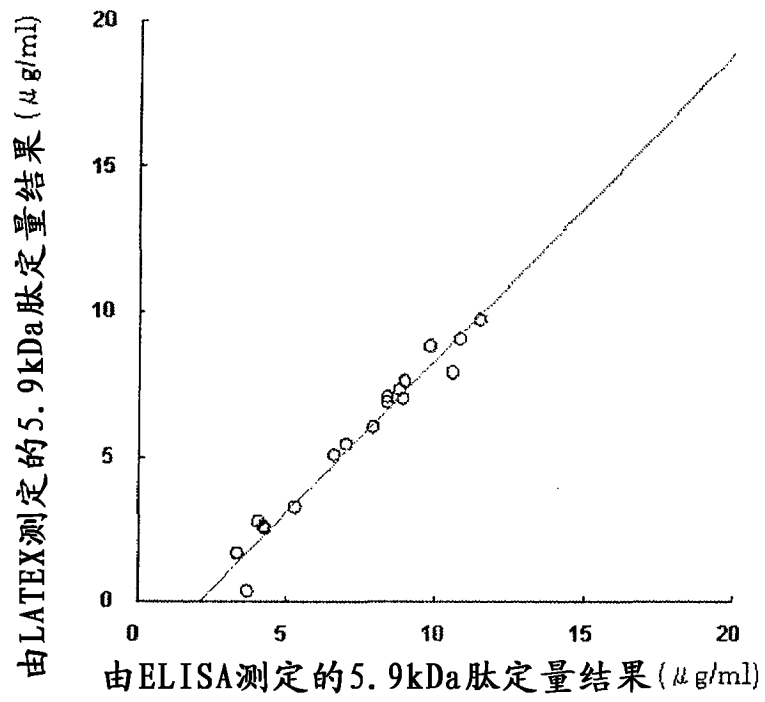


图 3

专利名称(译)	5.9kDa肽的免疫学测定方法		
公开(公告)号	CN102597772A	公开(公告)日	2012-07-18
申请号	CN201080048601.X	申请日	2010-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
[标]发明人	菊地涉 佐藤百惠 野田健太 清川严 三浦俊英 小岛良 野村文夫 曾川一幸		
发明人	菊地涉 佐藤百惠 野田健太 清川严 三浦俊英 小岛良 野村文夫 曾川一幸		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/5308 C07K2317/34 G01N2800/08 G01N33/6893 C07K16/36 G01N2333/75		
优先权	2009247332 2009-10-28 JP		
其他公开文献	CN102597772B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

通过使识别肽标记物的N末端的抗体和识别肽标记物的C末端的抗体与疑似在含有混杂肽的活体来源样品中存在的作为人纤维蛋白原 α -E链或 α 链的分解产物的分子量5.9kDa的肝脏疾病诊断用肽标记物接触而形成该肽标记物和2种抗体的免疫复合物，以及免疫学测定得到的免疫复合物来可特异性地测定该肽标记物。

