



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108139392 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680058383.5

(22)申请日 2016.10.06

(30)优先权数据

2015-199319 2015.10.07 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.04.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/079801 2016.10.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/061546 JA 2017.04.13

(71)申请人 富士瑞必欧株式会社

地址 日本东京都

申请人 积水医疗株式会社

(72)发明人 北村由之 青柳克己

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

C07K 16/36(2006.01)

C07K 16/40(2006.01)

C12N 15/02(2006.01)

C12P 21/08(2006.01)

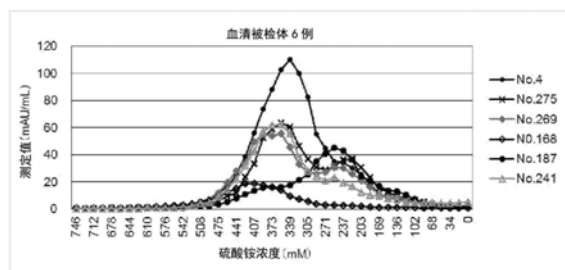
权利要求书2页 说明书12页  
序列表6页 附图5页

## (54)发明名称

PIVKA-II的测定方法及PIVKA-II免疫测定试剂或试剂盒的制造方法

## (57)摘要

公开一种能够构建使用针对人凝血酶原的单克隆抗体的、精度更高的PIVKA-II的免疫学测定体系的手段。本发明的PIVKA-II的测定方法包含利用免疫测定来测定被检体中的PIVKA-II。所述免疫测定使用了识别亲水性的PIVKA-II分子的第1抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段与识别疏水性的PIVKA-II分子的第2抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段的混合物、以及与PIVKA-II特异性结合的抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段。



1. 一种PIVKA-II的测定方法,其包含利用免疫测定来测定被检体中的PIVKA-II,所述免疫测定使用识别亲水性的PIVKA-II分子的至少1种第1抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段与识别疏水性的PIVKA-II分子的至少1种第2抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段的混合物、以及与PIVKA-II特异性结合的抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段。

2. 根据权利要求1所述的测定方法,其中,

亲水性的PIVKA-II分子是用疏水性相互作用色谱将包含PIVKA-II的试样分级而得到的洗脱级分中的、包含在规定的硫酸铵浓度以上的级分中的PIVKA-II分子;疏水性的PIVKA-II分子是所述洗脱级分中的、包含在低于规定的硫酸铵浓度的级分中的PIVKA-II分子,

所述疏水性相互作用色谱使用了以苯基为官能团的疏水性相互作用色谱柱和硫酸铵线性浓度梯度,

所述规定的硫酸铵浓度为选自270mM~370mM的范围中的浓度。

3. 根据权利要求2所述的测定方法,其中,

所述规定的硫酸铵浓度为选自290mM~350mM的范围中的浓度。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的测定方法,其中,

所述第1抗凝血酶原抗体、所述第2抗凝血酶原抗体、和所述抗PIVKA-II抗体为单克隆抗体。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的测定方法,其中,所述免疫测定通过夹心法来进行,

所述夹心法将所述混合物作为标记抗体、将所述PIVKA-II或其抗原结合性片段作为固相抗体使用。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的测定方法,其中,

所述混合物中的、至少1种第1抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段与至少1种第2抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段的混合比率被设定为如下范围:

将含有PIVKA-II的试样的用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分作为测定试样进行免疫测定时,得到的测定值的峰高度或峰面积的比率达到1:10~10:1的范围。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的测定方法,其中,

所述被检体为血清或血浆。

8. 一种PIVKA-II的免疫测定试剂或试剂盒的制造方法,其包含:

对于与PIVKA-II和凝血酶原两者结合但与凝血酶不显示反应性的抗体或其抗原结合性片段,调查其对PIVKA-II的亲水性级分和疏水性级分的反应性的工序;以及

将与亲水性级分反应的至少1种抗体或其抗原结合性片段和与疏水性级分反应的至少1种抗体或其抗原结合性片段进行混合的工序。

9. 根据权利要求8所述的制造方法,其中,

PIVKA-II的亲水性级分是洗脱级分中的规定的硫酸铵浓度以上的级分;PIVKA-II的疏水性级分是所述洗脱级分中的小于规定的硫酸铵浓度的级分,

所述洗脱级分是使用以苯基为官能团的疏水性相互作用色谱柱和硫酸铵线性浓度梯度对包含PIVKA-II的试样进行分级而得到的,

所述规定的硫酸铵浓度为选自270mM~370mM的范围中的浓度。

10. 根据权利要求9所述的制造方法,其中,

所述规定的硫酸铵浓度为选自290mM~350mM的范围中的浓度。

11. 根据权利要求8~10中任一项所述的制造方法,其中,

与PIVKA-II和凝血酶原两者结合的所述抗体为单克隆抗体。

12. 根据权利要求8~11中任一项所述的制造方法,其中,

与亲水性级分反应的至少1种抗体或其抗原结合性片段和与疏水性级分反应的至少1种抗体或其抗原结合性片段的混合比率被设定为如下范围:

将含有PIVKA-II的试样的用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分作为测定试样进行免疫测定时,得到的测定值的峰高度或峰面积的比率达到1:10~10:1的范围。

## PIVKA-II的测定方法及PIVKA-II免疫测定试剂或试剂盒的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及能够无遗漏地检测被检体中所含的PIVKA-II分子组的PIVKA-II测定方法、及PIVKA-II测定试剂或试剂盒的制备方法。

### 背景技术

[0002] PIVKA-II (Protein induced by vitamin K absence-II, 维生素K缺乏诱导的蛋白-II) 是具有类似于与血液凝固相关的凝血酶原的结构的糖蛋白。凝血酶原是579个残基的蛋白质, 位于N末端附近的10个谷氨酸 (Glu) 残基受到 $\gamma$ -羧基化而形成 $\gamma$ -羧基谷氨酸 (Gla) 残基。将该N末端的区域称为Glu-Gla区域。已知凝血酶原在生物体内产生时, 会由于维生素K的缺乏, 肝功能衰竭、维生素K拮抗剂的给药、肝细胞损伤等,  $\gamma$ -羧基化不完全, 在血液中会出现10个残基中的全部或部分形成了Glu残基的糖蛋白。该蛋白质是也被称为异常凝血酶原的PIVKA-II。近年来, 有报道称在肝细胞癌患者血浆中高浓度地检测出PIVKA-II, 其已经作为肝细胞癌的标志物被用于诊断的监测中。需要说明的是, 除了Glu-Gla区域以外, 凝血酶原与PIVKA-II在结构上并无不同, 任一蛋白质均在中央区域具有2个三环域 (kringle domain) (凝血酶原片段1 (F1) 区域、凝血酶原片段2 (F2) 区域) 且在C末端具有凝血酶区域。

[0003] 作为特异性检测被检体中的PIVKA-II的方法, 已报道了如下免疫测定法: 使用特异性识别PIVKA-II的单克隆抗体和针对凝血酶原的多克隆抗体两者, 将其中一者作为固定化抗体、将另一者作为标记抗体而进行测定 (专利文献1)。但是, 多克隆抗体会由于批次差异而在针对凝血酶原的特异性、亲和性方面产生偏差。为了避免该情况。需要对多个批次的特异性和亲和性进行评价, 为了保证更高的特异性, 更期望利用单克隆抗体而不是多克隆抗体。

[0004] 另外, 在利用ELISA法的PIVKA-II的测定中, 在将特异性识别PIVKA-II的单克隆抗体作为固相抗体、将针对凝血酶原的多克隆抗体作为二抗使用时, 已知由于二抗中包含与凝血酶显示反应性的抗体而对血清被检体的测定体系带来不良影响, 得不到稳定的测定值 (专利文献2)。专利文献2中报道了: 为了解决该问题, 使用与人凝血酶不反应而与人凝血酶原特异性反应的抗体作为二抗, 由此能够使血清被检体保持稳定, 从而能够测定PIVKA-II。但是, 该方法也使用多克隆抗体, 因此与专利文献1存在相同问题。进而, 在专利文献2的方法中, 为了从针对人凝血酶原的多克隆抗体中除去针对凝血酶的抗体, 需要使用人凝血酶原亲和柱取得与凝血酶原反应的抗体后进行透析、进而使用人凝血酶亲和柱取得与凝血酶不反应的抗体并进行透析, 抗体的纯化工序非常烦杂。

[0005] 作为利用ELISA法的PIVKA-II测定技术的另一例子, 报道了如下技术: 作为固相抗体使用抗PIVKA-II单克隆抗体、作为标记抗体使用PIVKA-II的抗F1单克隆抗体与抗F2单克隆抗体的混合物, 来测定PIVKA-II (专利文献3)。根据该技术, 能够改善从同一患者中几乎同时采集的血清和血浆的成对被检体的血清、血浆相关性。但是, 专利文献3中, 并未将

PIVKA-II的检测精度本身的提高作为技术问题。

[0006] 进而,对于血中PIVKA-II的Glu-G1a区域,截至目前已经以脱羧基化部位为中心进行了详细的分析,并提示富于分子多样性。但是,对于除该Glu-G1a区域以外的从三环结构域起至C末侧的PIVKA-II的分子多样性,截至目前尚未进行研究,在上述专利文献1~3中也没有任何记载。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本特开昭60-60557公报

[0010] 专利文献2:日本特开平5-249108公报

[0011] 专利文献3:日本特开2014-35278公报

## 发明内容

[0012] 发明要解决的问题

[0013] 本发明的目的在于,提供一种能够构建使用了针对人凝血酶原的单克隆抗体的、精度更高的PIVKA-II的免疫学测定体系的手段。

[0014] 用于解决问题的方案

[0015] 本发明人们对使用了抗人凝血酶原单克隆抗体的PIVKA-II的免疫测定体系进行了深入研究,结果发现,根据被检体和抗人凝血酶原单克隆抗体的组合而存在测定结果得不到整合性的情况,认为有可能存在不能利用现有技术准确测定PIVKA-II的被检体(患者)。

[0016] 进一步进行了深入研究,结果发现,PIVKA-II分子除了Glu-G1a区域的分子多样性以外,还存在疏水性程度不同的多个分子种类。疏水性程度不同的多种PIVKA-II分子的含有比例不因被检体的种类(血浆还是血清)而在每一被检体中不同,例如即使是血清被检体之间,疏水性不同的PIVKA-II分子种类的含有比例也不同。进而已经明确:公知的抗人凝血酶原单克隆抗体存在多种,但这些单克隆抗体对疏水性程度不同的PIVKA-II分子种类的亲和性不同,从而存在有对疏水性高的分子种类的亲和性高的抗体、对疏水性低的分子种类的亲和性高的抗体。例如已经明确:在将识别疏水性高的分子种类的抗体用于PIVKA-II的免疫学测定方法时,则在含有较多的亲水性高的分子种类的被检体中被检体中所含的PIVKA-II的大部分是检测不到的,不能准确地测定血中PIVKA-II。

[0017] 在此,本发明人们发现,在构建使用了识别凝血酶原区域的单克隆抗体的PIVKA-II测定体系时,通过使用对疏水性高的PIVKA-II分子种类具有亲和性的抗体与对疏水性低的PIVKA-II分子种类具有亲和性的抗体的混合物来测定PIVKA-II,从而能够精度非常良好地测定PIVKA-II,并完成了本发明。

[0018] 即,本发明提供PIVKA-II的测定方法,其包含利用免疫测定来测定被检体中的PIVKA-II,所述免疫测定使用识别亲水性的PIVKA-II分子的至少1种第1抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段与识别疏水性的PIVKA-II分子的至少1种第2抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段的混合物、以及与PIVKA-II特异性结合的抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段。另外,本发明提供一种PIVKA-II的免疫测定试剂或试剂盒的制造方法,其包含:对于与PIVKA-II和凝血酶原两者结合但与凝血酶不显示反应性的抗体或其抗原结合性片段,调查

其对PIVKA-II的亲水性级分和疏水性级分的反应性的工序;以及,将与亲水性级分反应的至少1种抗体或其抗原结合性片段和与疏水性级分反应的至少1种抗体或其抗原结合性片段进行混合的工序。

#### [0019] 发明的效果

[0020] 根据本发明,能够以高精度来测定血液被检体中所含的PIVKA-II分子组。本发明人等首次发现,血中PIVKA-II分子为疏水性程度不同的分子的集合,在每一被检体中,疏水性高的PIVKA-II分子和疏水性低的PIVKA-II分子的存在比例不同。未仔细调查血中PIVKA-II分子的疏水性/亲水性水平的以往的使用抗凝血酶原单克隆抗体的免疫测定方法,会由于所使用的抗体的性质而不能精度良好地检测血中PIVKA-II分子组。根据本发明的方法,能够以高精度检测出在以往方法中可能漏检的多个PIVKA-II分子种类,因此PIVKA-II的测定精度可飞跃性提高。

#### 附图说明

[0021] 图1是以将来自肝细胞癌患者的血清被检体6例分别用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分作为测定用试样,使用ALP标记抗凝血酶原多克隆抗体作为酶标记抗体测定试样中PIVKA-II分子的结果。

[0022] 图2-1是以将来自肝细胞癌患者的血清被检体(No.4)用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分作为测定用试样,使用标记抗体A~D测定试样中PIVKA-II分子的结果。

[0023] 图2-2是以将来自肝细胞癌患者的血清被检体(No.269)用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分作为测定用试样,使用标记抗体A~D测定试样中PIVKA-II分子的结果。

[0024] 图2-3是以将来自肝细胞癌患者的血清被检体(No.275)用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分作为测定用试样,使用标记抗体A~D测定试样中PIVKA-II分子的结果。

[0025] 图3-1是以将来自肝细胞癌患者的血清被检体(No.4)用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分作为测定用试样,使用抗体混合物(抗体C/A、抗体C/B、抗体C/D)作为标记抗体测定试样中PIVKA-II的结果。

[0026] 图3-2是以将来自肝细胞癌患者的血清被检体(No.269)用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分作为测定用试样,使用抗体混合物(抗体C/A、抗体C/B、抗体C/D)作为标记抗体测定试样中PIVKA-II的结果。

[0027] 图3-3是以将来自肝细胞癌患者的血清被检体(No.275)用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分作为测定用试样,使用抗体混合物(抗体C/A、抗体C/B、抗体C/D)作为标记抗体测定试样中PIVKA-II的结果。

[0028] 图4-1是以将来自肝细胞癌患者的血清被检体(No.275)用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分作为测定用试样,使用将抗体C/A按照各种重量比率(A:C=1:1~30:1)混合而得的抗体混合物作为标记抗体测定试样中PIVKA-II的结果。

[0029] 图4-2是以将来自肝细胞癌患者的血清被检体(No.275)用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分作为测定用试样,使用将抗体C/A按照各种重量比率(A:C=3:1~0.03:1)混合而得的抗体混合物作为标记抗体测定试样中PIVKA-II的结果。

#### 具体实施方式

[0030] 本发明的PIVKA-II测定方法是使用与PIVKA-II结合的抗体或其抗原结合性片段利用免疫学方法测定PIVKA-II的方法,作为抗体或其抗原结合性片段之一,使用识别亲水性的(疏水性低的)PIVKA-II分子的至少1种抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段、与识别疏水性的(疏水性高的)PIVKA-II分子的至少1种抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段的混合物。在本发明中,为了方便而将前者的识别亲水性PIVKA-II分子的抗体称为第1抗体、将后者的识别疏水性PIVKA-II分子的抗体称为第2抗体。

[0031] 在被检体中疏水性程度不同的PIVKA-II分子混杂存在这一点是本发明人们首次发现的。我们推测,PIVKA-II分子的疏水性差异并非是由Glu-Gla区域中的 $\gamma$ -羧基化程度而带来的,分子中央的三环结构域和位于其后的C末侧的结构存在多样性,是由该结构多样性带来的。

[0032] 抗凝血酶原抗体是指:识别并结合PIVKA-II和凝血酶原两者但与凝血酶不显示反应性的抗体。这里所谓的“不显示反应性”是指:不以能检测出的水平与凝血酶结合(即,与凝血酶的结合为本底以下);或者,即使以能检测出的水平结合但其结合程度明显低于与PIVKA-II和凝血酶原的结合,仅以本领域技术人员能够判定为不与凝血酶结合的程度进行结合。抗凝血酶原抗体本身是公知的,也存在市售品。本发明中使用的第1抗凝血酶原抗体和第2抗凝血酶原抗体既可以从公知的抗凝血酶原抗体中选择,也可以重新制作抗凝血酶原抗体并从其中选择。第1和第2抗凝血酶原抗体的选择方法的具体内容将在后文叙述。

[0033] 进而,作为另一种抗体或其抗原结合性片段,使用将PIVKA-II与凝血酶原区别开并特异性结合PIVKA-II的抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段。抗PIVKA-II抗体的特异性可表现为“仅与PIVKA-II结合而与凝血酶原不显示反应性”。“不显示反应性”的意思如上所述。该抗PIVKA-II抗体是识别在凝血酶原中没有的、PIVKA-II中的特征性区域、即Glu-Gla区域的抗体,不论疏水性还是亲水性,均与PIVKA-II分子结合。

[0034] 这种抗PIVKA-II抗体也是公知的(例如专利文献1),也存在市售品。另外,也可以使用重新制作的抗PIVKA-II抗体。

[0035] 第1和第2抗凝血酶原抗体、以及抗PIVKA-II抗体可以是多克隆抗体也可以是单克隆抗体,从免疫测定的再现性等观点出发,优选单克隆抗体。

[0036] 抗体和其抗原结合性片段的制作方法本身是熟知的常规方法。抗凝血酶原多克隆抗体例如可以如下得到:将凝血酶原或其部分片段(除Glu-Gla区域以外的部分片段)与适宜的佐剂一起对动物(人除外)进行免疫,由采自该动物的血液得到抗血清,对该抗血清中的多克隆抗体进行纯化,从而得到。为了使被免疫动物中的抗体效价上升,免疫通常需要在数周内多次进行。抗血清中的抗体的纯化例如可以通过硫酸铵沉淀、利用阴离子色谱的分级、亲和柱纯化等来进行。

[0037] 抗凝血酶原单克隆抗体例如可以利用熟知的杂交瘤法制作。具体而言,将凝血酶原或其部分片段(Glu-Gla区域以外的部分片段)与适宜佐剂一起免疫动物(人除外),由该动物采集脾细胞、淋巴细胞之类的抗体产生细胞,使其与骨髓瘤细胞融合而制备杂交瘤,选择产生与凝血酶原结合的抗体的杂交瘤,使其增殖,从培养上清中可以得到抗凝血酶原单克隆抗体。在杂交瘤的选择中,可以使用PIVKA-II作为抗原,也可以对于与凝血酶原和PIVKA-II两者结合进行确认。

[0038] 抗PIVKA-II抗体可使用羧基化不完全的Glu-Gla区域部分片段作为免疫原来制

作,在本发明中,需要对PIVKA-II具有足够的特异性,因此通常使用单克隆抗体。关于PIVKA-II单克隆抗体,可以使用PIVKA-II或其部分片段(包含受到羧基化的Glu-Gla区域的10个残基中的至少一部分的部分片段)作为免疫原制备杂交瘤后,选择产生与PIVKA-II结合但不与凝血酶原结合的抗体的杂交瘤,回收抗体。作为抗PIVKA-II抗体的制备方法的具体例子,可列举日本特开昭60-60557号公报、日本特开平9-249699号公报中记载的方法。

[0039] “抗原性结合性片段”只要维持了原本抗体的与对应抗原的结合性(抗原抗体反应性)则可以为任意抗体片段。作为具体例子,可列举Fab、F(ab')<sub>2</sub>、scFv等,但并不限于这些。众所周知,Fab或F(ab')<sub>2</sub>可通过将单克隆抗体用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶之类的蛋白水解酶处理来得到。scFv(single chain fragment of variable region,单链抗体)的制作方法也是周知的,例如可提取如上所述制作的杂交瘤的mRNA而制备单链cDNA,使用对免疫球蛋白H链和L链为特异性的引物进行PCR而扩增免疫球蛋白H链基因和L链基因,将它们用接头连接,对其赋予适当的限制酶位点,导入质粒载体中,用该载体转化大肠杆菌,使scFv表达,将其从大肠杆菌中回收,由此可以得到scFv。

[0040] 作为免疫原使用的多肽或其部分片段可通过化学合成、遗传工程学方法等常规方法制作。或者,还可以从新鲜的人血浆等中提取凝血酶原、PIVKA-II并纯化而得到(参照Thromb.Diath.Haemorph.1966;16:469-90等)。

[0041] 序列表的序列号1所示的氨基酸序列为在凝血酶原和PIVKA-II的序列上添加有信号序列的氨基酸序列,其中的第44位~第622位的氨基酸区域相当于凝血酶原和PIVKA-II的氨基酸序列。第44位~第84位的氨基酸区域为Glu-Gla区域,在凝血酶原中,该区域中的10个“Xaa”全部为 $\gamma$ -羧基谷氨酸(Gla)残基。该凝血酶原序列以登录号NP\_000497登记在GenBank中。序列号2所示的碱基序列为编码序列号1的氨基酸序列的序列,以登录号NM\_000506登记在GenBank中。序列号2中的第44位~第1912位碱基的区域为编码区。

[0042] 作为化学合成法的具体例子,可列举例如:Fmoc法(苄氧羰基法)、tBoc法(叔丁氧羰基法)等。另外,还可以利用各种市售的肽合成仪,通过常规方法合成。在化学合成时,可以仅基于氨基酸序列来合成期望的多肽。

[0043] 通过遗传工程学方法制作多肽的方法也是熟知的。当制作抗凝血酶原抗体时,在利用遗传工程学方法制作作为免疫原使用的多肽时,例如可以如下进行。首先,由来自人的培养细胞等中提取RNA,通过反转录反应由mRNA合成cDNA。以该cDNA为模板,使用基于人凝血酶原的mRNA序列信息设计的引物进行PCR,制备编码凝血酶原全长或期望的部分的多核苷酸。PCR中使用的引物可以根据序列号2所示的碱基序列或GenBank等数据库中登记的人凝血酶原序列信息等适当设计。或者,编码期望多肽的多核苷酸也可以通过使用市售的核酸合成仪的常规方法来制备。编码各氨基酸的密码子是公知的,因此只要能够确定氨基酸序列,则编码该氨基酸序列的多核苷酸的碱基序列也能够确定。然后,将制备的多核苷酸重组到适当的载体中,通过适当的表达系统使多肽表达,回收该多肽,由此可以得到期望的多肽。所使用的载体或各种表达系统(细菌表达系统、酵母细胞表达系统、哺乳动物细胞表达系统、昆虫细胞表达系统、无细胞表达系统等)也是熟知的,各种载体或宿主细胞、试剂类、试剂盒均有市售,因此本领域技术人员可以适当选择使用。来自人的培养细胞也有市售、转让,容易得到。

[0044] 在本发明中,PIVKA-II的免疫测定典型情况下可通过夹心法来进行。夹心免疫测

定本身是熟知的常规方法。如果列举具体例子,则可列举化学发光酶免疫测定法(chemiluminescent enzyme immunoassay;CLEIA)、酶联免疫吸附法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay;ELISA)、放射免疫测定、电化学发光免疫测定法等各种方法,本发明中可以采用任意方法。

[0045] 在夹心测定体系中,通常将2种抗体或其抗原结合性片段中的一种作为固定化于固相的固相抗体、将另一方作为用标记物质标记的标记抗体使用。在本发明中,将第1抗凝血酶原抗体与第2抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段的混合物作为1种抗体、将抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段作为另1种抗体使用,可以将任一种作为固相抗体使用。在下述实施例中,将抗PIVKA-II抗体作为固相抗体、将抗体混合物作为标记抗体使用,但不限于该方式。

[0046] 以将第1抗凝血酶原抗体与第2抗凝血酶原抗体的混合物作为标记抗体使用的情况为例,来具体说明本发明的PIVKA-II测定方法。当然,也可以将该混合物作为固相抗体、将抗PIVKA-II抗体作为标记抗体使用,因此本发明的范围不限于下述具体例子。另外,也可以使用各抗体的抗原结合性片段来代替抗体。

[0047] 首先,将PIVKA-II抗体(固相抗体)固相化在载体上。通过使固相化的PIVKA-II抗体与被检体中所含的PIVKA-II接触,从而使固相抗体与PIVKA-II特异性结合。然后,例如用适当的缓冲液清洗载体而除去未结合的被检体中的成分后,使被标记物质标记后的第1抗凝血酶原抗体与第2抗凝血酶原抗体的混合物(即被标记的至少1种第1抗凝血酶原抗体与被标记的至少1种第2抗凝血酶原抗体的混合物)与结合在固相抗体上的PIVKA-II结合。反应结束后,为了除去未反应的成分,例如在用适当的缓冲液清洗载体后,用适当的方法检测来自标记物质的信号,从而能够测定被检体中所含的PIVKA-II。

[0048] 对固相没有特别限定,可以与在公知的夹心免疫测定系统中使用的固相相同。作为固相材质的具体例子,可列举:聚苯乙烯、聚乙烯、琼脂糖等,但并不限于这些。固相的物理形状本质上并不重要。所使用的固相优选为抗体向该固相表面的固定容易且可以容易地将测定中形成的免疫复合物与未反应的成分分离的材料。特别优选在常规免疫测定法中使用的塑料板或磁性粒子。从操作、保存和分离的容易性等观点出发,最优选使用如上所述材质的磁性粒子。抗体向这些固相的结合可以通过本领域技术人员熟知的常规方法进行。抗体向固相的结合既可以通过物理性吸附来进行,也可以使用共价键。例如,可以使用戊二醛法、高碘酸法、马来酰亚胺法、和二吡啶基二硫法等。或者,向在缓冲液中添加、分散有磁性粒子的粒子悬浮液中加入适量抗体,在20~37℃下搅拌1小时左右,然后通过磁力收集磁性粒子,用适当缓冲液清洗粒子,可以得到抗体结合粒子。所使用的缓冲液的组成为用于抗体的固定化的常规组成即可,pH为抗体稳定地存在、不妨碍向固相的固定化的范围即可。

[0049] 对标记物质也没有特别限定,可以使用与在公知的免疫测定系统中使用的标记物质同样的物质。作为具体例子,可列举:酶、荧光物质、化学发光物质、染色物质、放射性物质等。作为酶,可以使用碱性磷酸酶(ALP)、过氧化物酶、β半乳糖苷酶等公知的酶,但并不限于这些。为了提供高检测灵敏度的测定系统,优选使用ALP。抗体向这些标记物质的结合可以通过本领域技术人员熟知的常规方法进行。抗体向标记物质的结合优选为共价键,可以使用戊二醛法、过碘酸法、马来酰亚胺法和二吡啶基二硫法等。例如,将对抗体进行胃蛋白酶处理和还原处理而得到的抗体片段与马来酰亚胺化的ALP混合,从而可以制备被标记物质

标记的抗体。

[0050] 在使用酶作为标记物质时,通过使与该酶对应的显色底物、荧光底物或发光底物等底物与该酶反应并测定由此产生的信号,从而求出酶活性来实现对测定对象物的测定。例如,在使用ALP作为标记物质时,可以使用3-(4-甲氧基螺(1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-三环[3.3.1.1.1<sup>3,7</sup>]癸烷)-4-基)苯基磷酸二钠(例如商品名AMPPD)等发光底物。

[0051] 在使用生物素或半抗原作为标记物质时,可以使用结合有酶、荧光物质、化学发光物质、染色物质或放射性物质等的链霉亲和素或半抗原抗体等进行测定。

[0052] 信号的检测可根据标记物质的种类适当选择。例如,信号如果是显色,则可以使用比色计或吸光光度计,如果是荧光则可以使用荧光光度计,如果是发光则可以使用光子计数器,如果是放射线则可以使用放射线测定装置。对于以各种浓度含有PIVKA-II的浓度已知的标准试样,利用本发明的方法测定PIVKA-II,由来自标记的信号值与标准样品中的PIVKA-II的浓度的相关关系绘图,制成标准曲线,对PIVKA-II浓度未知的被检体进行同样的测定操作,测定来自标记的信号值,将测定而得的信号值代入该标准曲线,由此能够对被检体中的PIVKA-II进行定量。

[0053] 本发明的测定方法所应用的被检体是由受试者分离的被检体,优选为血液被检体,特别优选为血浆或血清。被检体可以根据需要适当稀释后使用。

[0054] 受试者只要为哺乳动物则没有特别限定,通常为人,例如可以为肝细胞癌患者或肝细胞癌疑似患者。

[0055] 如上所述,本发明的PIVKA-II的免疫测定中使用的第1抗凝血酶原抗体和第2抗凝血酶原抗体分别为识别亲水性PIVKA-II分子的至少1种抗凝血酶原抗体和识别疏水性PIVKA-II分子的至少1种抗凝血酶原抗体。为了调查公知的抗凝血酶原抗体或重新制备的抗凝血酶原抗体对亲水性PIVKA-II分子和疏水性PIVKA-II分子中的哪一种具有亲和性,将含有PIVKA-II的试样的用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分组作为测定用试样,使用了抗凝血酶原抗体和抗PIVKA-II抗体进行了夹心免疫测定,即可调查与哪种级分的反应性高。

[0056] 作为测定用试样的制备中使用的含有PIVKA-II的试样,可以使用例如来自肝细胞癌患者的血清等。在疏水性相互作用色谱中,使用以苯基为官能团的疏水性色谱柱,使用硫酸铵线性浓度梯度(例如1.0M→0M)进行洗脱即可。分取20~30个左右的洗脱级分,将得到的1组洗脱级分作为测定用试样即可。作为含有PIVKA-II的试样,使用多个来自患者的血清时,既可以分别上样到色谱中制备多组测定用试样,或者也可以将多个血清被检体混合而得的混合物上样到色谱中来制备测定用试样。

[0057] 利用使用了要调查与疏水性和亲水性PIVKA-II分子的亲和性的抗凝血酶原抗体和抗PIVKA-II抗体的夹心免疫测定,对上述制备的测定用试样的各个级分进行测定操作。此时的夹心免疫测定体系可以与最终构建PIVKA-II免疫测定体系时同样进行构建。即,如果构建将第1抗凝血酶原抗体与第2抗凝血酶原抗体的混合物作为标记抗体、将抗PIVKA-II抗体作为固相抗体的PIVKA-II免疫测定体系,则可以将要调查与疏水性和亲水性PIVKA-II分子的亲和性的抗凝血酶原抗体作为标记抗体、将抗PIVKA-II抗体作为固相抗体,进行上述测定用试样的测定。

[0058] 在硫酸铵浓度高的洗脱级分中包含有疏水性低的(亲水性的)PIVKA-II分子,在硫

酸铵浓度低的洗脱级分中包含有疏水性高的(疏水性的)PIVKA-II分子。在本发明中,将前一洗脱级分称为PIVKA-II的亲水性级分,将后一洗脱级分称为PIVKA-II的疏水性级分。通过调查这些洗脱级分与抗凝血酶原抗体的反应性,可以调查抗凝血酶原抗体与亲水性PIVKA-II分子和疏水性PIVKA-II分子中的哪一种具有亲和性(识别哪一种)。

[0059] 区分PIVKA-II的亲水性级分和疏水性级分的酸铵浓度通常从270mM~370mM的范围中选择,例如可从290mM~350mM、300mM~340mM、310mM~330mM、280mM~330mM、或290mM~330mM的范围中选择。可以将从这些范围中选择的硫酸铵浓度以上的洗脱级分设为PIVKA-II的亲水性级分、将低于该硫酸铵浓度的洗脱级分设为PIVKA-II的疏水性级分使用。

[0060] 需要说明的是,为了制备在调查抗凝血酶原抗体的亲和性时使用的PIVKA-II的亲水性级分和疏水性级分,需要包含亲水性PIVKA-II分子和疏水性PIVKA-II分子两者的至少1个被检体、或者包括至少包含亲水性PIVKA-II分子的至少1个被检体和至少包含疏水性PIVKA-II分子的至少1个被检体的至少2个被检体。任意被检体包含的是亲水性PIVKA-II分子和疏水性PIVKA-II分子中的哪一种这一点,例如可以利用使用了抗PIVKA-II抗体和抗凝血酶原多克隆抗体的夹心免疫测定来进行调查。在无法获得适度包含亲水性PIVKA-II分子和疏水性PIVKA-II分子两者的被检体时,可以如上述那样使用多个被检体来制备测定用试样。

[0061] 在调查了与亲水性级分和疏水性级分的反应性后,将横轴设为硫酸铵浓度、将纵轴设为利用免疫测定得到的信号值,对与各级分的反应性(所检测出的信号的强度)进行作图。既可以将信号值直接作图,也可以算出各洗脱级分相对于总活性的信号强度比例再进行作图。当与亲水性级分的反应性高时,将该抗凝血酶原抗体判断为与亲水性PIVKA-II分子具有亲和性的抗体。当与疏水性级分的反应性高时,将该抗凝血酶原抗体判断为与疏水性PIVKA-II分子具有亲和性的抗体。

[0062] 第1抗体与第2抗体的混合比率只要在能够测定被检体中的疏水性PIVKA-II分子和亲水性PIVKA-II分子两者的范围内即可,没有特别限定,可以设为使如上作图而得的、关于含有PIVKA-II试样的各级分的信号值或各洗脱级分相对于总活性的信号强度的比例的峰高度或峰面积在1:10~10:1的范围、例如1:5~5:1的范围、1:3~3:1、或1:2~2:1的范围。第1抗体与第2抗体的混合重量比率(在分别使用多种抗体时,是第1抗体的合计重量与第2抗体的合计重量的比率)可以根据各抗体对PIVKA-II的亲和性,设定在能够测定被检体中的疏水性PIVKA-II分子和亲水性PIVKA-II分子两者的范围内。第1抗体与第2抗体的优选的混合重量比率可能会根据第1抗体对于亲水性PIVKA-II分子的亲和性的高度、以及第2抗体对于疏水性PIVKA-II分子的亲和性的高度而改变,因此没有特别限定,多数情况下,可以通过将抗体的混合重量比率设为0.03:1~30:1的范围、例如,0.05:1~20:1的范围、0.1:1~10:1的范围、或0.3:1~3:1的范围而实现上述范围的峰高或峰面积。将对亲水性PIVKA-II分子具有亲和性且识别该分子的至少1种抗凝血酶原抗体(第1抗体)与对疏水性PIVKA-II分子具有亲和性且识别该分子的至少1种抗凝血酶原抗体(第2抗体)组合,将两者的混合物作为固相抗体或标记抗体使用,从而能够以高精度测定存在于被检体中的PIVKA-II的各种分子种类。

[0063] 用于实施本发明的PIVKA-II测定方法的PIVKA-II的免疫测定试剂或试剂盒可以

通过以下的工序制造。

[0064] (工序1) 对于与PIVKA-II和凝血酶原两者结合但与凝血酶不显示反应性的抗体(抗凝血酶原抗体)或其抗原结合性片段,调查其对PIVKA-II的亲水性级分和疏水性级分的反应性。

[0065] (工序2) 将与亲水性级分反应的至少1种抗体或其抗原结合性片段和与疏水性级分反应的至少1种抗体或其抗原结合性片段进行混合。

[0066] 供于工序1的抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段既可以是公知的抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段,也可以是作为与PIVKA-II和凝血酶原两者结合但与凝血酶不显示反应性的抗体而重新制备的抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段。调查对PIVKA-II的亲水性级分和疏水性级分的反应性的方法如上所述。

[0067] 与PIVKA-II的亲水性级分反应的抗体、和与PIVKA-II的疏水性级分反应的抗体分别相当于本说明书中称为第1抗凝血酶原抗体和第2抗凝血酶原抗体的抗体。至少1种第1抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段与至少1种第2抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段的混合物可以以结合有标记物质的形态、或者以固定化于塑料板或磁性粒子之类的固相上的形态制成免疫测定试剂或试剂盒来提供。因此,该免疫测定试剂或试剂盒的制造方法可进一步包含:将抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段在供于工序1之前或在工序1之后、或者在工序2中,与第1抗体和第2抗体或其抗原结合性片段进行混合后,用标记物质进行标记的工序;或者,在工序2之后固定化于固相上的工序。在将抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段固定化于作为固相的磁性粒子等粒子时,可以在供于工序1之前或工序1之后实施固定化于固相上的工序,在工序2中将固定化有各抗体的粒子进行混合。

[0068] 通过上述方法制造的免疫测定试剂既可以仅包含第1抗体和第2抗体或其抗原结合性片段的混合物,也可以是在适当的缓冲液中溶解有该混合物的形态,还可以进一步包含对抗体的稳定化等有用的成分。

[0069] 另外,该免疫测定试剂可以以与抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段组合而制成免疫测定试剂或试剂盒来提供。例如,可以将标记后的第1和第2抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段的混合物与固定化有抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段的固相(也可以是抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段和用于将其固定化的固相的组件)组合而制成PIVKA-II的免疫测定试剂盒来提供。标记抗体和固相化抗体也可以与上述相反。免疫测定试剂盒中可以进一步包含用于标记物质的底物、被检体稀释液、清洗液等。

[0070] 实施例

[0071] 以下基于实施例更具体地说明本发明。当然,本发明不受下述实施例限定。

[0072] 1. 疏水性相互作用色谱

[0073] 将血清被检体25~50 $\mu$ L与500 $\mu$ L的含有2M硫酸铵的0.1M磷酸缓冲液(PB) pH7.0(磷酸一氢钾5.00g/L、磷酸二氢钠(12水盐)22.6g/L、硫酸铵264g/L;通过添加适量的4N氢氧化钠而调节为pH 7.0)、450 $\mu$ L~475 $\mu$ L的0.1M PB pH7.0(磷酸一氢钾5.00g/L、磷酸二氢钠(12水盐)22.6g/L;通过添加适量4N氢氧化钠而调整为pH 7.0)混合而成的总计1.0mL的样品供于色谱分离。

[0074] 疏水性相互作用色谱中使用的柱为HiTrap Phenyl HP(GE HEALTHCARE公司:单个容量1mL),装置使用AKTA FPLC UPC900(GE HEALTHCARE公司)进行分级。

[0075] 将柱用10倍柱容量以上的含有1M硫酸铵的0.1M PB pH7.0平衡化后,将上述样品1.0mL注入到柱中,以流速0.5mL进行分级。每0.5mL回收一次洗脱级分。关于洗脱,以使用含有1M硫酸铵的0.1M PB pH7.0(磷酸一氢钾5.00g/L、磷酸二氢钠(12水盐)22.6g/L、硫酸铵132g/L;添加适量的4N氢氧化钠而调节为pH 7.0)和0.1M PB pH7.0(磷酸一氢钾5.00g/L、磷酸二氢钠(12水盐)22.6g/L;pH的调节与上述相同)这2种液体的盐浓度线性梯度来进行,在洗脱30mL期间使硫酸铵浓度从1.0M变化为0M。

[0076] 2. 标记抗体的制作

[0077] 使用4种与PIVKA-II和凝血酶原两者结合的单克隆抗体(抗体A、抗体B、抗体C、抗体D)制作标记抗体。

[0078] 取3mg/mL的抗体A溶液6mL,添加到用0.1M柠檬酸缓冲液(pH3.5)平衡化的G-25柱(法玛西亚公司制造)中,进行抗体溶液的缓冲液置换。向其中加入1mg/mL胃蛋白酶溶液约100 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C放置1小时,用Tris缓冲液将pH调至中性附近,然后添加到Superdex200柱(法玛西亚制造)中,进行抗体的凝胶过滤纯化。合并所得级分中的在吸光度280nm下的单峰,作为抗体A的F(ab')<sub>2</sub>片段。在该F(ab')<sub>2</sub>片段溶液4mL中添加0.2M 2-巯基乙胺(以下记为2-MEA)溶液200 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C放置2小时,进行还原处理。将其添加到G-25柱中,除去2-MEA,作为抗体A的Fab'片段。

[0079] 将10mg/mL的高比活性ALP溶液1.5mL添加到用0.1M磷酸缓冲液(pH7.0)平衡化的G-25柱中,进行ALP溶液的缓冲液置换。向其中添加10mg/mL N-(4-马来酰亚胺基丁基氧基)-琥珀酰亚胺(以下记为GMBS)的二甲基甲酰胺溶液70 $\mu$ L,在30 $^{\circ}$ C放置1小时以进行反应。将该溶液添加到用0.1M磷酸缓冲液(pH6.3)平衡化的G-25柱中,除去过量的GMBS,制作马来酰亚胺化ALP。将之前制作的抗体A的Fab'片段溶液4mL、马来酰亚胺化ALP溶液3mL和0.1M磷酸缓冲液(pH6.3)13mL混合,在室温下放置1小时,由此制作ALP标记抗体。向其中加入2M 2-MEA溶液1mL,在室温下放置30分钟,将多余的马来酰亚胺基封闭,然后添加到Superdex200柱中,进行纯化。将吸光度280nm的几个峰中Fab'与ALP为1:1的分子量的峰合并,作为纯化ALP标记抗体A。

[0080] 对于抗体B、抗体C和抗体D,也同样制作各标记抗体。

[0081] 3. PIVKA-II的测定

[0082] 将含有PIVKA-II的试样(血清被检体等)按照上述1记载那样利用疏水性相互作用色谱进行分级,将所得各级分作为测定用试样。测定中,除了酶标记抗体以外,使用了Lumipulse presto(注册商标)PIVKA-II Eisai(Fujirebio公司制)附带的试剂(抗体结合粒子、PIVKA-IIキャリブレーションセット)和Lumipulse presto用试剂(底物液、清洗液等)(Fujirebio公司制)。

[0083] 首先,向Lumipulse presto PIVKA-II Eisai附带的、结合有与PIVKA-II特异性结合的抗PIVKA-II单克隆抗体(小鼠)的抗体结合粒子(抗PIVKA-II单克隆抗体(小鼠)结合铁素体粒子)50 $\mu$ L中添加测定用试样20 $\mu$ L并搅拌后,在37 $^{\circ}$ C反应8分钟。利用磁力从磁性粒子分离除去反应残液,用清洗液进行清洗。向清洗后的粒子添加ALP标记的抗体A(终浓度0.36 $\mu$ g/mL)、抗体B(终浓度0.5 $\mu$ g/mL)、抗体C(终浓度0.12 $\mu$ g/mL)和抗体D(终浓度0.5 $\mu$ g/mL)、或Lumipulse presto PIVKA-II Eisai附带的ALP标记抗凝血酶原多克隆抗体,搅拌后在37 $^{\circ}$ C反应8分钟。再次用磁力将磁性粒子和反应残液分离并除去反应残液,用清洗液清洗。向该

粒子添加含有作为碱性磷酸酶的化学发光底物的3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷二钠盐 (AMPPD) 的底物液200 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C反应4分钟。用照度计测定反应后的化学发光量(波长463nm)。测定中使用了全自动化学发光免疫测定装置 Lumipulse prestoII (Fujirebio公司制)。

[0084] 图1中示出以将来自肝细胞癌患者的血清被检体6例分别用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分作为测定用试样、使用Lumipulse presto PIVKA-II Eisai附带的ALP标记抗凝血酶原多克隆抗体作为酶标记抗体进行测定而得的结果。由各级分的信号值按照 Lumipulse presto PIVKA-II Eisai的附带说明中记载的方法算出活性值(mAU/mL),将该值图表化。某些被检体存在形成双峰的被检体和形成单峰的被检体,峰图案有各种。这表明:血中的PIVKA-II是亲水性更高的分子、疏水性更高的分子这些性质各异的多种分子混杂状态,各分子的存在比例根据血液被检体的不同而不同。这些亲水性级分和疏水性级分均为PIVKA-II分子,因此表明:为了再现性良好地准确测定血中的PIVKA-II,需要选择能够与两者反应的单克隆抗体。

[0085] 图2-1~图2-3中示出以将来自肝细胞癌患者的血清被检体3例(被检体No.4, No.269, No.275)分别用疏水性相互作用色谱分级而得的各级分作为测定用试样,使用标记抗体A~D进行测定而得的结果。由各级分的信号值算出各级分相对于所检测的总活性(总信号值)的信号强度的比例,将该值图表化。抗体A和抗体B与亲水性级分反应,抗体C与疏水性级分反应。抗体D主要与亲水性级分反应,与疏水性级分也能反应。这些结果提示,通过将亲水性级分反应的抗体和与疏水性级分反应的抗体组合,能够准确地测定血中PIVKA-II。

[0086] 因此,实际地,将与PIVKA-II的亲水性级分反应的抗体(抗体A、抗体B、抗体D)和与疏水性级分反应的抗体(抗体C)的混合物制成标记抗体并使用,对由上述血清被检体3例制备的测定用试样进行了测定。由各级分的信号值算出各级分相对于检测出的总活性的信号强度的比例,将该值图表化。分别向ALP标记的抗体A(终浓度0.36 $\mu$ g/mL)、抗体B(终浓度0.5 $\mu$ g/mL)、抗体D(终浓度0.5 $\mu$ g/mL)中混合ALP标记的抗体C(终浓度0.12 $\mu$ g/mL),制备标记抗体。将测定结果示于图3-1~图3-3。确认了:通过使用与亲水性级分反应的抗体和与疏水性级分反应的抗体这2种抗体,与抗凝血酶原多克隆抗体同样地能够与亲水性级分和疏水性级分两者反应。

[0087] 4. 抗体的混合比率的研究

[0088] 然后,对与PIVKA-II的亲水性级分反应的抗体(抗体A)和与疏水性级分反应的抗体(抗体C)的混合比进行了研究。将ALP标记的抗体A和ALP标记的抗体C按照下述表1和表2的比率进行混合,除此以外,与“3. PIVKA-II的测定”中记载的方法同样地测定PIVKA-II。被检体使用来自肝细胞癌患者的血清被检体(No.275)。被检体No.275是由与抗凝血酶原多克隆抗体的反应性(图1)而确认包含亲水性PIVKA-II分子和疏水性PIVKA-II分子两者的被检体。

[0089] 将测定结果示于图4-1和图4-2。纵轴表示实际测定的计数值。结果可确认:在所研究的所有混合重量比率(0.03:1~30:1)下,均能够检测亲水性级分和疏水性级分两者。

[0090] 进而,对亲水性级分和疏水性级分的峰面积的比率进行了评价。在本实施例中,将亲水性级分和疏水性级分的边界设定在硫酸铵浓度288mM和305mM之间,对各峰中所含的级

分的计数值进行累计,分别求出亲水性级分和疏水性级分的峰面积。峰面积使用峰的上升沿之前的525mM~和直至~68mM为止的值,对于亲水性级分和疏水性级分均累计14个级分。作为计数值,为了除去本底而使用从各计数值中减去峰外的级分的计数值而得的值。

[0091] 将对于各混合比率算出的峰面积比率示于表1和表2。关于亲水性级分与疏水性级分的峰面积比率,在抗体混合比率(重量比)为0.03:1~30:1的范围内为1:2.1~2.8:1、在抗体混合比率为0.05:1~20:1的范围内为1:2.1~2.5:1、在抗体混合比率为0.1:1~10:1的范围内为1:1.9~1.8:1、在抗体混合比率为0.3:1~3:1的范围内为1:1.7~1.2:1。由以上可确认,通过将抗体A和抗体C混合使用,能够精度良好地检测亲水性级分和疏水性级分两者。

[0092] [表1]

抗体浓度( $\mu\text{g/mL}$ )		抗体混合比率 (重量比)	峰面积比率 (亲水性级分:疏水性级分)
抗体 A	抗体 C		
<b>0.36</b>	<b>0.36</b>	<b>1:1</b>	<b>1.09:1</b>
<b>0.36</b>	<b>0.12</b>	<b>3:1</b>	<b>1.19:1</b>
<b>0.36</b>	<b>0.036</b>	<b>10:1</b>	<b>1.78:1</b>
<b>0.36</b>	<b>0.018</b>	<b>20:1</b>	<b>2.46:1</b>
<b>0.36</b>	<b>0.012</b>	<b>30:1</b>	<b>2.84:1</b>

[0094] [表2]

抗体浓度( $\mu\text{g/mL}$ )		混合重量比率 (重量比)	峰面积比率 (亲水性级分:疏水性级分)
抗体 A	抗体 C		
<b>0.36</b>	<b>0.12</b>	<b>3:1</b>	<b>1.19:1</b>
<b>0.12</b>	<b>0.12</b>	<b>1:1</b>	<b>1:1.23</b>
<b>0.036</b>	<b>0.12</b>	<b>0.3:1</b>	<b>1:1.70</b>
<b>0.012</b>	<b>0.12</b>	<b>0.1:1</b>	<b>1:1.88</b>
<b>0.006</b>	<b>0.12</b>	<b>0.05:1</b>	<b>1:2.07</b>
<b>0.0036</b>	<b>0.12</b>	<b>0.03:1</b>	<b>1:2.05</b>

## 序列表

<110> 富士瑞必欧株式会社 (FUJIREBIO Inc.)

爱代尔株式会社 (EIDIA Co., Ltd.)

<120> PIVKA-II的测定方法及PIVKA-II免疫测定试剂或试剂盒的制造方法

<130> PF577-PCT

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 622

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (49) .. (49)

<223> Gla or Glu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (50) .. (50)

<223> Gla or Glu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (57) .. (57)

<223> Gla or Glu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (59) .. (59)

<223> Gla or Glu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (62) .. (62)

<223> Gla or Glu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (63) .. (63)

<223> Gla or Glu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (68) .. (68)

<223> Gla or Glu  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (69) .. (69)  
<223> Gla or Glu  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (72) .. (72)  
<223> Gla or Glu  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (75) .. (75)  
<223> Gla or Glu  
<220>  
<221> UNSURE  
<222> (49) .. (49)  
<223> The 'Xaa' at location 49 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.  
<220>  
<221> UNSURE  
<222> (50) .. (50)  
<223> The 'Xaa' at location 50 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.  
<220>  
<221> UNSURE  
<222> (57) .. (57)  
<223> The 'Xaa' at location 57 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.  
<220>  
<221> UNSURE  
<222> (59) .. (59)  
<223> The 'Xaa' at location 59 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.  
<220>  
<221> UNSURE  
<222> (62) .. (62)  
<223> The 'Xaa' at location 62 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.  
<220>  
<221> UNSURE  
<222> (63) .. (63)  
<223> The 'Xaa' at location 63 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.  
<220>  
<221> UNSURE

<222> (68) .. (68)  
 <223> The 'Xaa' at location 68 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.  
 <220>  
 <221> UNSURE  
 <222> (69) .. (69)  
 <223> The 'Xaa' at location 69 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.  
 <220>  
 <221> UNSURE  
 <222> (72) .. (72)  
 <223> The 'Xaa' at location 72 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.  
 <220>  
 <221> UNSURE  
 <222> (75) .. (75)  
 <223> The 'Xaa' at location 75 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.  
 <400> 1  
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln  
                   20                    25                    30  
 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Ala Asn Thr Phe Leu  
                   35                    40                    45  
 Xaa Xaa Val Arg Lys Gly Asn Leu Xaa Arg Xaa Cys Val Xaa Xaa Thr  
                   50                    55                    60  
 Cys Ser Tyr Xaa Xaa Ala Phe Xaa Ala Leu Xaa Ser Ser Thr Ala Thr  
 65                    70                    75                    80  
 Asp Val Phe Trp Ala Lys Tyr Thr Ala Cys Glu Thr Ala Arg Thr Pro  
                   85                    90                    95  
 Arg Asp Lys Leu Ala Ala Cys Leu Glu Gly Asn Cys Ala Glu Gly Leu  
                   100                    105                    110  
 Gly Thr Asn Tyr Arg Gly His Val Asn Ile Thr Arg Ser Gly Ile Glu  
                   115                    120                    125  
 Cys Gln Leu Trp Arg Ser Arg Tyr Pro His Lys Pro Glu Ile Asn Ser  
                   130                    135                    140  
 Thr Thr His Pro Gly Ala Asp Leu Gln Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro  
 145                    150                    155                    160  
 Asp Ser Ser Thr Thr Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Thr Val  
                   165                    170                    175  
 Arg Arg Gln Glu Cys Ser Ile Pro Val Cys Gly Gln Asp Gln Val Thr  
                   180                    185                    190

Val Ala Met Thr Pro Arg Ser Glu Gly Ser Ser Val Asn Leu Ser Pro  
 195 200 205  
 Pro Leu Glu Gln Cys Val Pro Asp Arg Gly Gln Gln Tyr Gln Gly Arg  
 210 215 220  
 Leu Ala Val Thr Thr His Gly Leu Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ser Ala  
 225 230 235 240  
 Gln Ala Lys Ala Leu Ser Lys His Gln Asp Phe Asn Ser Ala Val Gln  
 245 250 255  
 Leu Val Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Glu Glu Gly Val  
 260 265 270  
 Trp Cys Tyr Val Ala Gly Lys Pro Gly Asp Phe Gly Tyr Cys Asp Leu  
 275 280 285  
 Asn Tyr Cys Glu Glu Ala Val Glu Glu Glu Thr Gly Asp Gly Leu Asp  
 290 295 300  
 Glu Asp Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly Arg Thr Ala Thr Ser Glu Tyr  
 305 310 315 320  
 Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys  
 325 330 335  
 Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr Glu  
 340 345 350  
 Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly Ser  
 355 360 365  
 Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg Lys  
 370 375 380  
 Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg Trp  
 385 390 395 400  
 Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys Asn  
 405 410 415  
 Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg Thr  
 420 425 430  
 Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile Tyr  
 435 440 445  
 Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile Ala  
 450 455 460  
 Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His Pro  
 465 470 475 480  
 Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala Gly  
 485 490 495  
 Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp Thr

500	505	510
Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn Leu		
515	520	525
Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg Ile		
530	535	540
Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg		
545	550	555
Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser		
565	570	575
Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu		
580	585	590
Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe Arg		
595	600	605
Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu		
610	615	620

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2018

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人类(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 2

```

gtcaggacag acaattcctc agtgaccag gagctgacac actatggcgc acgtccgagg 60
cttgcagctg cctggctgcc tggccctggc tgccctgtgt agccttgtgc acagccagca 120
tgtgttcctg gctcctcagc aagcacggtc gctgctccag cgggtccggc gagccaacac 180
cttcttggag gaggtgcgca agggcaacct ggagcgagag tgcgtggagg agacgtgcag 240
ctacgaggag gccttcgagg ctctggagtc ctccacggct acggatgtgt tctgggcca 300
gtacacagct tgtgagacag cgaggacgcc tcgagataag cttgctgcat gtctggaagg 360
taactgtgct gagggctctgg gtacgaacta ccgagggcat gtgaacatca cccggtcagg 420
cattgagtgc cagctatgga ggagtcgcta cccacataag cctgaaatca actccactac 480
ccatcctggg gccgacctac aggagaattt ctgccgcaac cccgacagca gcaccacggg 540
accctggtgc tacactacag accccaccgt gaggaggcag gaatgcagca tcctgtctg 600
tggccaggat caagtcaact tagcgatgac tccacgctcc gaaggctcca gtgtgaatct 660
gtcacctcca ttggagcagt gtgtccctga tcgggggcag cagtaccagg ggcgcctggc 720
ggtgaccaca catgggctcc cctgcttggc ctgggcccag gcacaggcca aggccctgag 780
caagcaccag gacttcaact cagctgtgca gctggtggag aacttctgcc gcaaccaga 840
cggggatgag gagggcgtgt ggtgctatgt ggccgggaag cctggcgact ttgggtactg 900
cgacctaac tattgtgagg aggccgtgga ggaggagaca ggagatgggc tggatgagga 960
ctcagacagg gccatcgaag ggcgtaccgc caccagttag taccagactt tcttcaatcc 1020
gaggaccttt ggctcgggag aggcagactg tgggctgcga cctctgttcg agaagaagtc 1080
gctggaggac aaaaccgaaa gagagctcct ggaatcctac atcgacgggc gcattgtgga 1140

```

gggctcggat gcagagatcg gcatgtcacc ttggcaggtg atgcttttcc ggaagagtcc 1200  
ccaggagctg ctgtgtgggg ccagcctcat cagtgaccgc tgggtcctca ccgccgcca 1260  
ctgcctcctg tacccgccct gggacaagaa cttcaccgag aatgacctt tggtgcgcat 1320  
tggcaagcac tcccgacca ggtacgagcg aaacattgaa aagatatcca tgttgaaaa 1380  
gatctacatc caccacaggt acaactggcg ggagaacctg gaccgggaca ttgccctgat 1440  
gaagctgaag aagcctgttg cttcagtgta ctacattcac cctgtgtgtc tgccccgacag 1500  
ggagacggca gccagcttgc tccaggctgg atacaagggg cgggtgacag gctggggcaa 1560  
cctgaaggag acgtggacag ccaacgttgg taaggggcag cccagtgctc tgcaggtggt 1620  
gaacctgccc attgtggagc ggccggtctg caaggactcc acccgatcc gcatcactga 1680  
caacatgttc tgtgctggtt acaagcctga tgaagggaaa cgaggggatg cctgtgaagg 1740  
tgacagtggg ggaccctttg tcatgaagag cccctttaac aaccgctggt atcaaatggg 1800  
catcgtctca tggggtgaag gctgtgaccg ggatgggaaa tatggcttct acacacatgt 1860  
gttccgcctg aagaagtgga tacagaaggt cattgatcag tttggagagt agggggccac 1920  
tcatattctg ggctcctgga accaatcccg tgaagaatt atttttgtgt ttctaaaact 1980  
atggttcca ataaaagtga ctctcagcga aaaaaaaaa 2018

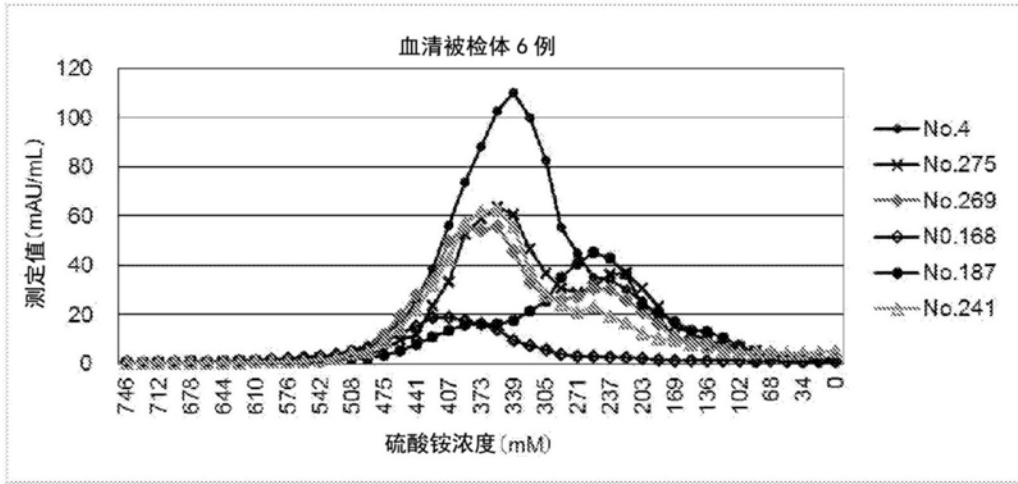


图1

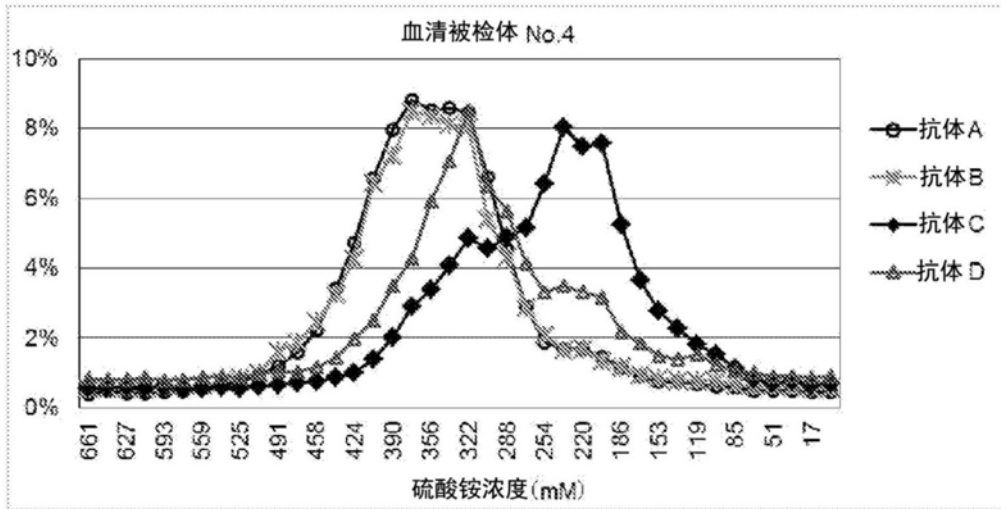


图2-1

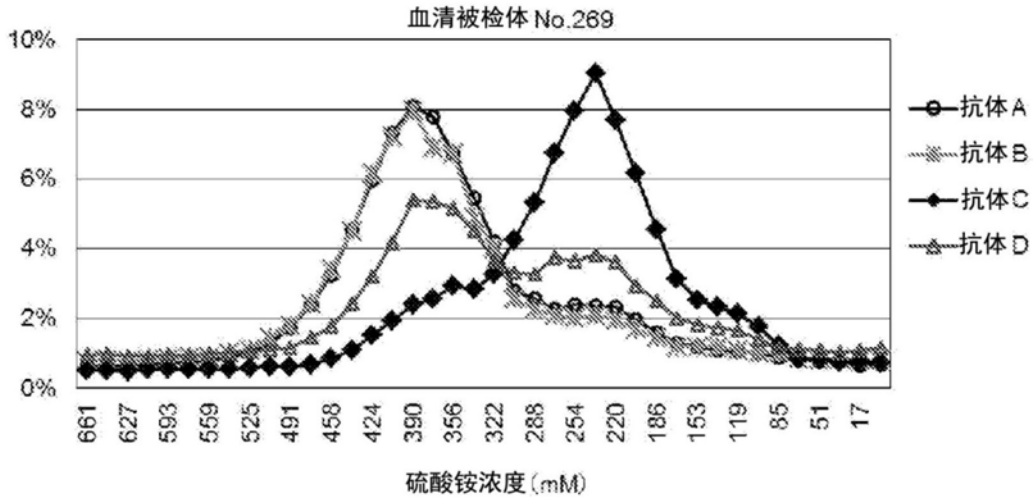


图2-2

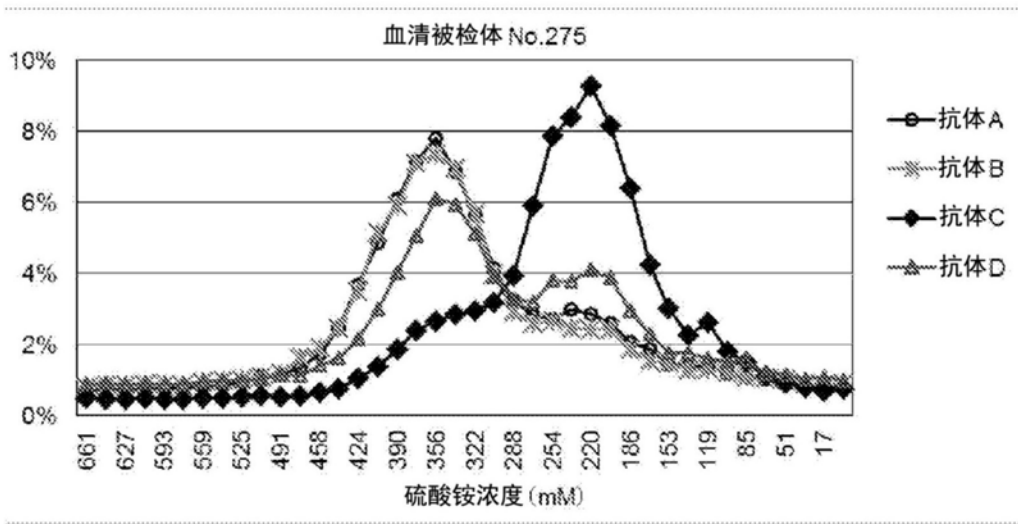


图2-3

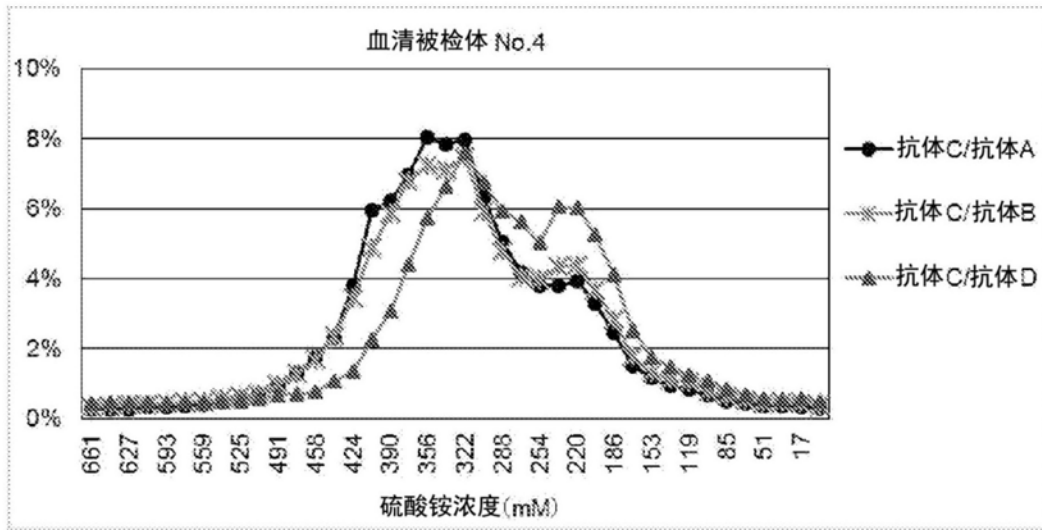


图3-1

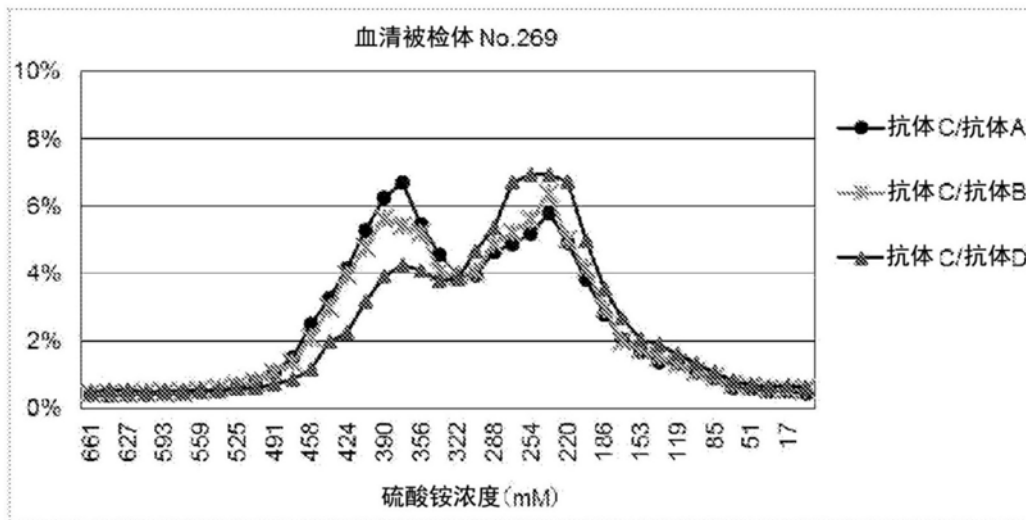


图3-2

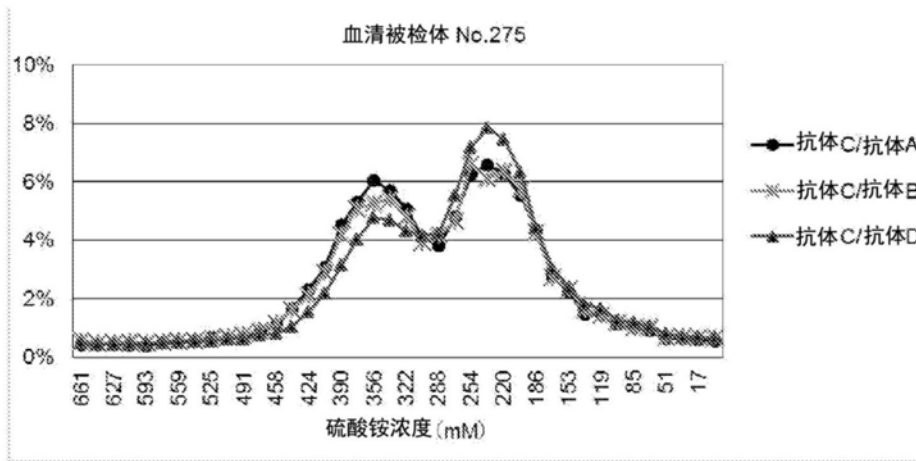


图3-3

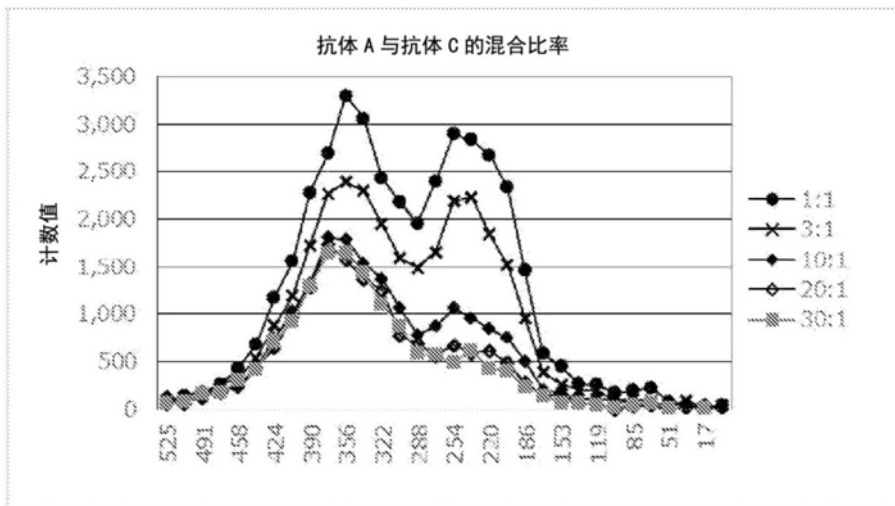


图4-1

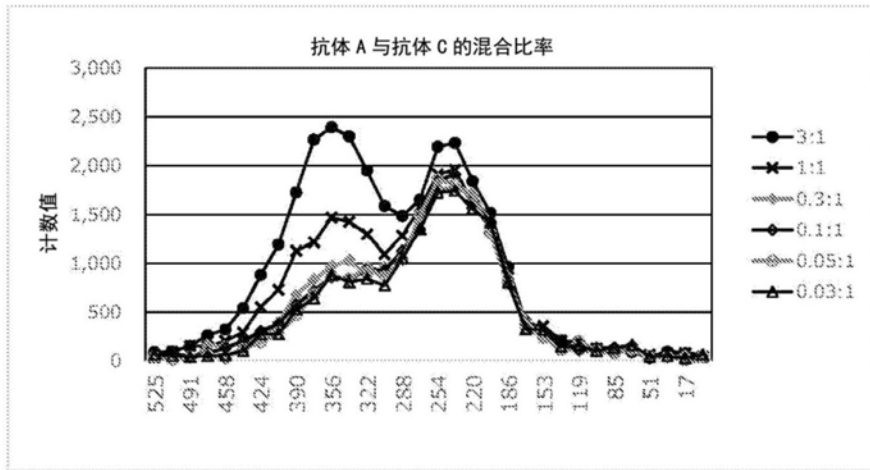


图4-2

专利名称(译)	PIVKA-II的测定方法及PIVKA-II免疫测定试剂或试剂盒的制造方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108139392A</a>	公开(公告)日	2018-06-08
申请号	CN201680058383.5	申请日	2016-10-06
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社 积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社 积水医疗株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社 积水医疗株式会社		
[标]发明人	北村由之 青柳克己		
发明人	北村由之 青柳克己		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/36 C07K16/40 C12N15/02 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/36 C07K16/40 C12N15/02 G01N33/53 G01N33/86 G01N33/573 G01N2333/96433		
代理人(译)	刘新宇		
优先权	2015199319 2015-10-07 JP		
其他公开文献	CN108139392B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

公开一种能够构建使用针对人凝血酶原的单克隆抗体的、精度更高的PIVKA-II的免疫学测定体系的手段。本发明的PIVKA-II的测定方法包含利用免疫测定来测定被检体中的PIVKA-II。所述免疫测定使用了识别亲水性的PIVKA-II分子的第1抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段与识别疏水性的PIVKA-II分子的第2抗凝血酶原抗体或其抗原结合性片段的混合物、以及与PIVKA-II特异性结合的抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段。

