



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110198956 A

(43)申请公布日 2019.09.03

(21)申请号 201880008054.9

(22)申请日 2018.01.22

(30)优先权数据

2017-009349 2017.01.23 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/001730 2018.01.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/135653 JA 2018.07.26

(71)申请人 学校法人东洋大学

地址 日本东京都

(72)发明人 加藤和则 我妻利纪 长谷川纯

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 李敏春 郑霞

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

C12P 21/08(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

C12N 15/09(2006.01)

权利要求书2页 说明书20页

序列表15页 附图12页

(54)发明名称

抗EPHA2抗体和使用该抗EPHA2抗体的EPHA2
免疫检测

(57)摘要

本发明提供一种EPHA2特异性抗体。一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,其含有由SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:22所示的轻链可变区;以及一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,其含有由SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:18所示的轻链可变区。

1. 一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,含有:

- (a) 由SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列组成的重链CDRH1;
- (b) 由SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列组成的重链CDRH2;
- (c) 由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列组成的重链CDRH3;
- (d) 由SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列组成的轻链CDRL1;
- (e) 由SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列组成的轻链CDRL2;以及
- (f) 由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列组成的轻链CDRL3。

2. 一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,含有由SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:22所示的轻链可变区。

3. 一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,含有如下所示的重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区由与SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列具有95%以上序列同一性的氨基酸序列组成,且具有结合人EPHA2的活性;所述轻链可变区由与SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列具有95%以上序列同一性的氨基酸序列组成,且具有结合人EPHA2的活性。

4. 一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,含有:

- (a) 由SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列组成的重链CDRH1;
- (b) 由SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列组成的重链CDRH2;
- (c) 由SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列组成的重链CDRH3;
- (d) 由SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列组成的轻链CDRL1;
- (e) 由SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列组成的轻链CDRL2;以及
- (f) 由SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列组成的轻链CDRL3。

5. 一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,含有由SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:18所示的轻链可变区。

6. 一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,含有如下所示的重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区由与SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列具有95%以上序列同一性的氨基酸序列组成,且具有结合人EPHA2的活性;所述轻链可变区由与SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列具有95%以上序列同一性的氨基酸序列组成,且具有结合人EPHA2的活性。

7. 两种单克隆抗体的组合,其中,所述两种单克隆抗体分别为权利要求1~3中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,以及权利要求4~6中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段。

8. 根据权利要求7所述的组合,所述组合用于生物样品中的EPHA2的检测或测定方法。

9. 一种利用免疫测定法特异性检测生物样品中所含的EPHA2的方法,使用权利要求1~6中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗

体的功能性片段。

10. 一种利用夹心免疫测定法特异性检测生物样品中所含的EPHA2的方法,使用以下两种单克隆抗体,所述两种单克隆抗体分别为权利要求1~3中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,以及权利要求4~6中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中,所述夹心免疫测定法为ELISA。

12. 一种癌症检测方法,使用权利要求1~6中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,并利用免疫测定法测定受试对象血液中的EPHA2浓度,当受试对象血液中的所述EPHA2浓度高于健康者血液中的EPHA2浓度时,则评价为受试对象患有癌症。

13. 一种癌症检测方法,使用权利要求1~3中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,以及权利要求4~6中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段这两种单克隆抗体,并利用夹心免疫测定法测定受试对象血液中的EPHA2浓度,当受试对象血液中的所述EPHA2浓度高于健康者血液中的EPHA2浓度时,则评价为受试对象患有癌症。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中,所述夹心免疫测定法为ELISA。

15. 根据权利要求12~14中任一项所述的方法,其中,所述癌症选自于由以下癌症组成的组:胃癌、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、大肠癌、胰腺癌、肝癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫体癌、肾癌、脑肿瘤、恶性黑色素瘤和头颈癌。

16. 一种用于测定EPHA2的试剂盒,含有以下两种单克隆抗体或功能性片段,所述两种单克隆抗体或功能性片段分别为权利要求1~3中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,以及权利要求4~6中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段。

17. 一种用于检测癌症的试剂盒,含有以下两种单克隆抗体或功能性片段,所述两种单克隆抗体或功能性片段分别为权利要求1~3中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,以及权利要求4~6中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段。

18. 根据权利要求16所述的试剂盒,其中,所述癌症选自于由以下癌症组成的组:胃癌、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、大肠癌、胰腺癌、肝癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫体癌、肾癌、脑肿瘤、恶性黑色素瘤和头颈癌。

抗EPHA2抗体和使用该抗EPHA2抗体的EPHA2免疫检测

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型抗体、该抗体的功能片段、该抗体的修饰物、含有编码该抗体所具有的氨基酸序列的碱基序列的核苷酸、插入有该核苷酸的载体、导入有该核苷酸或载体的细胞、包括培养该细胞的步骤的该抗体的制造方法、药物组合物、用于诊断或用于检查的组合物等。

背景技术

[0002] EPHA2是分子量为130kDa且具有一次跨膜结构的受体型酪氨酸激酶(非专利文献1)。在EPHA2的N末端侧的胞外结构域,存在配体结合区域和两处III型纤连蛋白结构域;在C末端侧的胞内结构域,存在酪氨酸激酶结构域和不育- α -基序(Sterile α -motif, SAM)结构域。

[0003] 作为EPHA2的配体,已知有GPI锚定蛋白Ephrin-A1~A5(非专利文献2)。通过配体结合引起的EPHA2的酪氨酸激酶结构域的活化,使存在于EPHA2的胞内结构域的酪氨酸残基发生自我磷酸化,诱导细胞内信号的传递。此外,还报告了与配体结合后,EPHA2通过内吞作用被摄入到细胞内,最终被蛋白酶体降解(非专利文献3)。

[0004] 有报告称,EPHA2在临床上在多种癌,尤其是乳腺癌、食道癌、前列腺癌、胃癌、非小细胞肺癌、大肠癌、多形性胶质母细胞瘤中高表达(非专利文献4、5、6、7、8、9、10、11)。而且,有报告称,在食道癌中,观察到EPHA2表达与局部淋巴结转移、淋巴结转移数量和癌分化程度的低程度之间存在显著相关,EPHA2阳性患者的存活率低于EPHA2阴性患者(非专利文献5)。有报告称,在非小细胞肺癌中,与无病生存期间高于5年的患者相比,低于5年的患者的EPHA2表达水平高;与未复发患者相比,复发患者的EPHA2表达水平高;与未复发患者或转移局限于对侧的肺的患者相比,向脑转移发展患者的EPHA2表达水平高(非专利文献9)。有报告称,在大肠癌中,EPHA2表达水平也明显与肝转移、淋巴管浸润和临床分期有关(非专利文献10)。

[0005] 另外,有报告称,将EPHA2基因导入到细胞,使非癌细胞获得锚定非依赖性生长能力和在细胞外基质上的管状形态形成能力、体内的肿瘤增殖能力等癌性状(非专利文献4);癌细胞对细胞外基质的浸润性增强(非专利文献12、13)。与此相反,有报告称,如果用siRNA抑制EPHA2的表达,则癌细胞的浸润性和锚定非依赖性生长、体内的肿瘤增殖受到抑制(非专利文献13、14);以及使用配体Ephrin-A1和人IgG的Fc区域的融合蛋白使EPHA2活化,诱导内吞作用引起的EPHA2降解,由此,癌细胞的浸润性和锚定非依赖性生长、管状形态形成能力受到抑制(非专利文献4、11、12)。

[0006] 另一方面,有报告称,EPHA2不仅在癌细胞中表达,也在肿瘤内或肿瘤周围的血管中表达(非专利文献15)。有报告称,在小鼠中,EPHA2信号参与由Ephrin-A1诱导的血管新生,尤其是在血管内皮细胞表达的EPHA2是血管内皮细胞的管腔形成和存活所必需的(非专利文献16);还有报告称,EPHA2的胞外结构域和人IgG的Fc区域的融合蛋白在体内抑制血管新生,显示出抗肿瘤效果(非专利文献17)。

[0007] 最近有报告称,膜型基质金属蛋白酶-1 (MT1-MMP) 在胞外结构域将EPAH2切断,结果是残留在膜上的EPAH2片段有助于原癌信号(非专利文献18、19)。

[0008] 还有报告称,与健康者相比,肺癌、前列腺癌患者的可溶性EPAH2在血清中的浓度高(非专利文献20、21)。

[0009] 根据上述内容,提示EPAH2有可能成为针对癌症的优异治疗靶点,实际上以EPAH2为靶点的药物的临床试验也正在实施(专利文献1~3)。

[0010] 由上述可知,提供能够一种检测EPAH2表达的方法,对于癌症等与EPAH2相关的疾病、EPAH2表达的检查或诊断十分有效。作为来自受试者的样品中的EPAH2的测定方法,有免疫测定法,其中,ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay:酶联免疫吸附测定) 法作为简便且快速的测定方法而被广泛使用。到目前,报告了使用抗EPAH2抗体测定待测样品中所含的EPAH2的方法 (ELISA法) (专利文献4、5、非专利文献20~27),但是仅使用抗EPAH2单克隆抗体的方法尚未建立。

[0011] 现有技术文献

[0012] 专利文献

[0013] 专利文献1:国际公布W0 2003/094859号

[0014] 专利文献2:国际公布W0 2006/084226号

[0015] 专利文献3:国际公布W0 2009/028639号

[0016] 专利文献4:国际公布W0 2009/085805号

[0017] 专利文献5:国际公布W0 2014/126160号

[0018] 非专利文献

[0019] 非专利文献1:Moecular and Cellular Biology,1990年,第10卷,p.6316-6324

[0020] 非专利文献2:Annual Review of Neuroscience,1998年,第21卷,p.309-345

[0021] 非专利文献3:Molecular Cancer Research,2002年,第1卷,p.79-87

[0022] 非专利文献4:Cancer Research,2001年,第61卷,p.2301-2306

[0023] 非专利文献5:International Journal of Cancer,2003年,第103卷,p.657-663

[0024] 非专利文献6:The Prostate,1999年,第41卷,p.275-280

[0025] 非专利文献7:American Journal of Pathology,2003年,第163卷,p.2271-2276

[0026] 非专利文献8:Cancer Science,2005年,第96卷,p.42-47

[0027] 非专利文献9:Clinical Cancer Research,2003年,第9卷,p.613-618

[0028] 非专利文献10:Oncology Reports,2004年,第11卷,p.605-611

[0029] 非专利文献11:Molecular Cancer Research,2005年,第3卷,p.541-551

[0030] 非专利文献12:Biochemical and Biophysical Research Communications,2004年,第320卷,p.1096-1102

[0031] 非专利文献13:Oncogene,2004年,第23卷,p.1448-1456

[0032] 非专利文献14:Cancer Research,2002年,第62卷,p.2840-2847

[0033] 非专利文献15:Oncogene,2000年,第19卷,p.6043-6052

[0034] 非专利文献16:Journal of Cell Science,2004年,第117卷,p.2037-2049

[0035] 非专利文献17:Oncogene,2002年,第21卷,p.7011-7026

[0036] 非专利文献18:The Journal of Cell Biology,2013年,第201卷,p.467-484

- [0037] 非专利文献19:Cancer Research,2015年,第75卷,p.3327-3339
- [0038] 非专利文献20:Proceedings:AACR 106th Annual Meeting 2015;April 18-22, 2015;Philadelphia,PA Cancer Research 2015;75 (15Suppl):Abstract nr 546.
- [0039] 非专利文献21:第74届日本癌症学会学术总会P15-8P-3321
- [0040] 非专利文献22:RayBiotech,Human EphA2 ELISA (ELH-EPHA2-1), <URL:http://www.raybiotech.com/epha2-elisa.html>
- [0041] 非专利文献23:CUSABIO,Human Ephrin type-A receptor 2 (EPHA2) ELISA kit (CSB-EL007722HU), <http://www.cusabio.com/ELISA-Kit/Human-Ephrin-type-A-receptor-2EPHA2-ELISA-kit-76651.html>
- [0042] 非专利文献24:LSBio,Human EPHA2/EPH Receptor A2 ELISA Kit (Sandwich ELISA) (LS-F23977), <https://www.lsbio.com/elisakits/human-epha2-eph-receptor-a2-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-f23977/23977?trid=119>
- [0043] 非专利文献25:Abnova,EPHA2 (Human) Matched Antibody Pair (H00001969-AP21), <http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=H00001969-AP21>
- [0044] 非专利文献26:Abnova,EPHA2 (Human) Matched Antibody Pair (H00001969-AP11), <http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=H00001969-AP11>
- [0045] 非专利文献27:Abnova,EPHA2 (Human) Matched Antibody Pair (H00001969-AP51), <http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=H00001969-AP51>

发明内容

- [0046] 发明所要解决的问题
- [0047] 本发明的一个要解决的问题是提供一种EPHA2特异性抗体。
- [0048] 本发明的另一个要解决的问题是提供一种含有抗EPHA2抗体的免疫诊断用组合物,以及用于该免疫诊断用组合物的抗EPHA2抗体或其组合。
- [0049] 另外,本发明的又一个要解决的问题是提供一种使用抗EPHA2抗体或其组合检测EPHA2的方法,以及含有该抗体或其组合的检测用或诊断用试剂盒。
- [0050] 解决问题的技术方案
- [0051] 为了简便且高灵敏度地测定EPHA2并提高癌症诊断的精度,本发明人制作了多种抗EPHA2单克隆抗体用于根据利用夹心免疫测定法测定EPHA2,选择特别适于夹心免疫测定法的单克隆抗体,确定重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列和碱基序列,而且分析了6个CDR序列。
- [0052] 通过使用本发明人所开发的两种抗体,确认到能够以高灵敏度测定生物样品中的EPHA2,也能够以高灵敏度且高特异性实现癌症的检测,从而完成了本发明。
- [0053] 即,本发明如下所述:
- [0054] [1]一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,含有:

- [0055] (a) 由SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列组成的重链CDRH1;
- [0056] (b) 由SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列组成的重链CDRH2;
- [0057] (c) 由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列组成的重链CDRH3;
- [0058] (d) 由SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列组成的轻链CDRL1;
- [0059] (e) 由SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列组成的轻链CDRL2;以及
- [0060] (f) 由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列组成的轻链CDRL3。
- [0061] [2] 一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,含有由SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:22所示的轻链可变区。
- [0062] [3] 一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,含有如下所示的重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区由与SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列具有95%以上序列同一性的氨基酸序列组成,且具有结合人EPHA2的活性;所述轻链可变区由与SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列具有95%以上序列同一性的氨基酸序列组成,且具有结合人EPHA2的活性。
- [0063] [4] 一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,含有:
- [0064] (a) 由SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列组成的重链CDRH1;
- [0065] (b) 由SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列组成的重链CDRH2;
- [0066] (c) 由SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列组成的重链CDRH3;
- [0067] (d) 由SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列组成的轻链CDRL1;
- [0068] (e) 由SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列组成的轻链CDRL2;以及
- [0069] (f) 由SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列组成的轻链CDRL3。
- [0070] [5] 一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,其含有由SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:18所示的轻链可变区。
- [0071] [6] 一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,含有如下所示的重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区由与SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列具有95%以上序列同一性的氨基酸序列组成,且具有结合人EPHA2的活性;所述轻链可变区由与SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列具有95%以上序列同一性的氨基酸序列组成,且具有结合人EPHA2的活性。
- [0072] [7] 两种单克隆抗体的组合,其中,所述两种单克隆抗体分别为[1]~[3]中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,以及[4]~[6]中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段。
- [0073] [8] 根据[7]所述的组合,所述组合用于生物样品中的EPHA2的检测或测定方法。
- [0074] [9] 一种利用免疫测定法特异性检测生物样品中所含的EPHA2的方法,使用[1]~[6]中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段。
- [0075] [10] 一种利用夹心免疫测定法特异性检测生物样品中所含的EPHA2的方法,使用

以下两种单克隆抗体,所述两种单克隆抗体分别为[1]~[3]中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,以及[4]~[6]中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段。

[0076] [11]根据[10]所述的方法,其中,所述夹心免疫测定法为ELISA。

[0077] [12]一种癌症检测方法,其使用[1]~[6]中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体,或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,并利用免疫测定法测定受试对象血液中的EPHA2浓度,当受试对象血液中的所述EPHA2浓度高于健康者血液中的EPHA2浓度时,则评价为受试对象患有癌症。

[0078] [13]一种癌症检测方法,其使用[1]~[3]中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,以及[4]~[6]中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段这两种单克隆抗体,并利用夹心免疫测定法测定受试对象血液中的EPHA2浓度,当受试对象血液中的EPHA2浓度高于健康者血液中的EPHA2浓度时,则评价为受试对象患有癌症。

[0079] [14]根据[13]所述的方法,其中,所述夹心免疫测定法为ELISA。

[0080] [15]根据[12]~[14]中任一项所述的方法,其中,所述癌症选自于由以下癌症组成的组:胃癌、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、大肠癌、胰腺癌、肝癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫体癌、肾癌、脑肿瘤、恶性黑色素瘤和头颈癌。

[0081] [16]一种用于测定EPHA2的试剂盒,含有以下两种单克隆抗体或功能性片段,所述两种单克隆抗体或功能性片段分别为[1]~[3]中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,以及[4]~[6]中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段。

[0082] [17]一种用于检测癌症的试剂盒,含有以下两种单克隆抗体或功能性片段,所述两种单克隆抗体或功能性片段分别为[1]~[3]中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段,以及[4]~[6]中任一项所述的特异性结合EPHA2的单克隆抗体或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段。

[0083] [18]根据[17]所述的试剂盒,其中,所述癌症选自于由以下癌症组成的组:胃癌、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、大肠癌、胰腺癌、肝癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫体癌、肾癌、脑肿瘤、恶性黑色素瘤和头颈癌。

[0084] 本说明书包含了作为本申请的优先权基础的日本专利申请号2017-009349号的公开内容。

[0085] 发明效果

[0086] 本发明人制作的多种抗EPHA2单克隆抗体中,与使用其他单克隆抗体时相比,当组合使用57-1抗体和230-1抗体作为固相抗体和检测抗体时,能够以高灵敏度检测生物样品中的EPHA2。而且,当通过组合使用上述两种单克隆抗体的夹心免疫测定法测定EPHA2并检测癌症时,能够以高灵敏度且高特异性地检测癌症。

[0087] 另外,与使用其他单克隆抗体时相比,通过使用了57-1抗体或230-1抗体的免疫测定法,能够以高灵敏度检测生物样品中的EPHA2。而且,当通过使用了上述单克隆抗体的免疫测定法测定EPHA2并检测癌症时,能够以高灵敏度且高特异性地检测癌症。

附图说明

[0088] 图1是表示实施例2)-1的13种抗EPHA2单克隆抗体(SHM41、57-1、80-21、83-21、113-1、119-1、131-1、141-21、148-1、151-4、230-1、240-4、245-21)对EPHA2的反应性的图。

[0089] 图2是表示实施例2)-2中使用抗EPHA2单克隆抗体230-1作为生物素标记的抗体,使用11种抗EPHA2单克隆抗体57-1、80-21、83-21、113-1、119-1、131-1、141-21、148-1、151-4、240-4、245-21作为捕获抗体时的反应性的图。

[0090] 图3是表示实施例2)-3中使用SHM41、57-1或230-1作为捕获抗体,使用生物素标记的57-1或230-1作为检测抗体时的反应性的图。

[0091] 图4是表示实施例2)-4的ELISA系统(捕获抗体230-1和检测抗体生物素标记的57-1、捕获抗体57-1和检测抗体生物素标记的230-1)对EPHA2的反应性的图。

[0092] 图5是表示实施例2)-5的ELISA系统(捕获抗体230-1和检测抗体生物素标记的57-1)的标准曲线的图。

[0093] 图6是表示实施例2)-6的ELISA系统(捕获抗体230-1、检测抗体生物素标记的57-1)的EPHA2特异性的图。

[0094] 图7-1是使用ELISA系统(捕获抗体230-1、检测抗体生物素标记的57-1)测定健康者、胃癌和卵巢癌患者的血清中的EPHA2浓度的图。

[0095] 图7-2是使用ELISA系统(捕获抗体230-1、检测抗体生物素标记的57-1)测定健康者和非小细胞肺癌患者的血清中的EPHA2浓度的图。

[0096] 图8是表示对小鼠抗EPHA2单克隆抗体57-1的重链可变区进行编码的cDNA核苷酸序列(SEQ ID NO:14)的图。

[0097] 图9是表示小鼠抗EPHA2单克隆抗体57-1重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:15)的图。

[0098] 图10是表示对小鼠抗EPHA2单克隆抗体57-1的轻链可变区进行编码的cDNA核苷酸序列(SEQ ID NO:17)的图。

[0099] 图11是表示小鼠抗EPHA2单克隆抗体57-1轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:18)的图。

[0100] 图12是表示对小鼠抗EPHA2单克隆抗体230-1的重链可变区进行编码的cDNA核苷酸序列(SEQ ID NO:19)的图。

[0101] 图13是表示小鼠抗EPHA2单克隆抗体230-1重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:20)的图。

[0102] 图14是表示对小鼠抗EPHA2单克隆抗体230-1的轻链可变区进行编码的cDNA核苷酸序列(SEQ ID NO:21)的图。

[0103] 图15是表示小鼠抗EPHA2单克隆抗体230-1轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:22)的图。

[0104] 图16是表示小鼠抗EPHA2单克隆抗体57-1所具有的CDR的氨基酸序列(SEQ ID NO:23~SEQ ID NO:28)的图。

[0105] 图17是表示小鼠抗EPHA2单克隆抗体230-1所具有的CDR的氨基酸序列(SEQ ID NO:29~SEQ ID NO:34)的图。

具体实施方式

[0106] 下面详细地说明本发明。

[0107] 本发明是利用免疫测定方法对受试对象生物样品中的EPHA2进行测定的方法,以及用于测定的试剂或试剂盒,其中,所述免疫测定方法使用了特异性结合EPHA2的特定单克隆抗体。

[0108] 另外,本发明是利用夹心免疫测定方法对受试对象生物样品中的EPHA2进行测定的方法,以及用于测定的试剂或试剂盒,其中,所述夹心免疫测定方法使用了特异性结合EPHA2的特定的两种单克隆抗体。

[0109] 另外,本发明是适于利用夹心免疫测定方法测定EPHA2的抗EPHA2单克隆抗体,以及两种抗EPHA2单克隆抗体的组合。

[0110] 而且,本发明是利用免疫测定方法测定受试对象生物样品中(优选为血液中)的EPHA2,并以生物样品中(优选为血液中)的EPHA2浓度为指标,检测受试对象是否患有癌症的方法,以及以生物样品中(优选为血液中)的EPHA2浓度为指标,用于检测受试对象是否患有癌症的试剂或试剂盒,其中,所述免疫测定方法使用了特定的抗EPHA2单克隆抗体。本发明的方法也是利用免疫测定方法测定受试对象生物样品中(优选为血液中)的EPHA2,并以生物样品中(优选为血液中)的EPHA2浓度为指标,获得用于判定受试对象是否患有癌症的辅助数据的方法,其中,所述免疫测定方法使用了特定的抗EPHA2单克隆抗体。

[0111] 而且,本发明是利用夹心免疫测定方法测定受试对象生物样品中(优选为血液中)的EPHA2,并以生物样品中(优选为血液中)的EPHA2浓度为指标,检测受试对象是否患有癌症的方法,以及以生物样品中(优选为血液中)的EPHA2浓度为指标,用于检测受试对象是否患有癌症的试剂或试剂盒,其中,所述夹心免疫测定方法使用了特定的两种抗EPHA2单克隆抗体。本发明的方法也是利用夹心免疫测定方法测定受试对象生物样品中(优选为血液中)的EPHA2,并以生物样品中(优选为血液中)的EPHA2浓度为指标,获得用于判定受试对象是否患有癌症的辅助数据的方法,其中,所述夹心免疫测定方法使用了特定的两种抗EPHA2单克隆抗体。

[0112] 作为生物样品,使用血液(全血、血清或血浆)、淋巴液、尿、组织匀浆、细胞培养上清液或细胞裂解液。优选可以使用血液,更优选可以使用血清。

[0113] 关于本发明所使用的单克隆抗体,可以将EPHA2或其片段作为免疫原,对马、猴、狗、猪、牛、山羊、绵羊、兔、大鼠、豚鼠、仓鼠、小鼠等哺乳动物进行免疫,将脾细胞等和骨髓瘤融合,制作杂交瘤,作为杂交瘤产生分泌的抗体而得到。杂交瘤可以通过公知方法制作。

[0114] 作为免疫原的EPHA2也可以根据序列信息进行化学合成,还可以根据编码蛋白质的DNA序列信息,通过公知方法作为重组蛋白而得到。

[0115] 筛选抗体可以通过任意方法进行,优选能够通过细胞ELISA(Cell-ELISA)进行筛选,其中细胞ELISA使用了利用编码EPHA2的DNA进行转染的动物细胞。EPHA2的碱基序列如SEQ ID NO:5所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。而且,可以通过流式细胞仪分析等确认所选择的抗体是否特异性结合EPHA2。

[0116] 本发明的方法所使用的单克隆抗体是抗体230-1和抗体57-1中的任一种或两种。抗体230-1是制作的13种单克隆抗体中与EPHA2的反应性最高的单克隆抗体,抗体57-1是最适合与抗体230-1组合并利用夹心免疫测定方法测定EPHA2的抗体。

[0117] 编码抗体57-1重链可变区的cDNA序列如SEQ ID NO:14(图8)所示,抗体57-1重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15(图9)所示。此外,编码抗体57-1轻链可变区的cDNA序列如SEQ ID NO:17(图10)所示,抗体57-1轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:18(图11)所示。

[0118] 即,本发明的抗EPA2抗体是结合人EPA2的抗人EPA2单克隆抗体,其含有由SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列组成的轻链可变区。

[0119] 另外,当使用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information:美国国家生物技术信息中心的基本局部比对搜索工具)等(例如默认即初始设置的参数)进行计算时,是由与上述由SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17所示的序列组成的碱基序列至少具有85%以上、优选90%以上、更优选95%以上、特别优选97%以上、98%以上或99%以上的序列同一性的碱基序列组成的DNA,且编码具有抗体重链可变区或轻链可变区的活性即具有结合人EPA2活性的蛋白质的DNA,也包括在编码本发明抗体的重链可变区或轻链可变区的DNA中。

[0120] 另外,能够与由上述由SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17所示的序列组成的DNA互补的序列组成的DNA在严格条件下杂交的DNA,且编码具有抗体重链可变区或轻链可变区的活性即具有结合人EPA2活性的蛋白质的DNA,也包括在编码本发明的重链可变区或轻链可变区的DNA中。

[0121] 另外,上述重链可变区或轻链可变区不仅包括由SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列组成的重链可变区或轻链可变区,还包括由在该氨基酸序列中缺失、置换、增添1个或数个,例如1~10个、优选1~5个、更优选1个或2个、进一步优选1个氨基酸而形成的氨基酸序列组成,且由具有抗体重链可变区或轻链可变区的活性即具有结合人EPA2活性的蛋白质组成的重链可变区或轻链可变区。

[0122] 作为这种在SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列中缺失、置换或增添1个或数个氨基酸而形成的氨基酸序列,可举出:当使用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information:美国国家生物技术信息中心的基本局部比对搜索工具)等(例如默认即初始设置的参数)进行计算时,是与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列至少具有85%以上、优选90%以上、更优选95%以上、特别优选97%以上、98%以上或99%以上的序列同一性的氨基酸序列。

[0123] 具有这种在SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列中缺失、置换或增添1个或数个氨基酸而形成的氨基酸序列的蛋白质,与具有SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的蛋白质实质上相同。

[0124] 编码抗体230-1重链可变区的cDNA序列如SEQ ID NO:19(图12)所示,抗体230-1重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:20(图13)所示。此外,编码抗体230-1轻链可变区的cDNA序列如SEQ ID NO:21(图14)所示,抗体230-1轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:22(图15)所示。

[0125] 即,本发明的抗EPA2抗体是结合人EPA2的抗人EPA2单克隆抗体,其含有由SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列组成的轻链可变区。

[0126] 另外,当使用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information:美国国家生物技术信息中心的基本局部比对搜索工具)等(例如默认即初始设置的参数)进行计算时,是由与上述由SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:21所示的序列组成的碱基序列至少具有85%以上、优选90%以上、更优选95%以上、特别优选97%以上、98%以上或99%以上的序列同一性的碱基序列组成的DNA,且编码具有抗体重链可变区或轻链可变区的活性即具有结合人EPHA2活性的蛋白质的DNA,也包括在编码本发明抗体的重链可变区或轻链可变区的DNA中。

[0127] 另外,能够与由与上述由SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:21所示的序列组成的DNA互补的序列组成的DNA在严格条件下杂交的DNA,且编码具有抗体重链可变区或轻链可变区的活性即具有结合人EPHA2活性的蛋白质的DNA,也包括在编码本发明的重链可变区或轻链可变区的DNA中。

[0128] 另外,上述重链可变区或轻链可变区不仅包括由SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列组成的重链可变区或轻链可变区,还包括由在该氨基酸序列中缺失、置换、增添1个或数个,例如1~10个、优选1~5个、更优选1个或2个、进一步优选1个氨基酸而形成的氨基酸序列组成,且由具有抗体重链可变区的活性即具有结合人EPHA2活性的蛋白质组成的重链可变区。

[0129] 作为这种在SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列中缺失、置换或增添1个或数个氨基酸而形成的氨基酸序列,可举出:当使用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information:美国国家生物技术信息中心的基本局部比对搜索工具)等(例如默认即初始设置的参数)进行计算时,是与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列至少具有85%以上、优选90%以上、更优选95%以上、特别优选97%以上、98%以上或99%以上的序列同一性的氨基酸序列。

[0130] 具有这种在SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列中缺失、置换或增添1个或数个氨基酸而形成的氨基酸序列的蛋白质,与具有SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的蛋白质实质上相同。

[0131] 而且,抗体57-1含有由SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列(NYGMN)组成的CDRH1、由SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列(WINTDTGEPIFVEEFKG)组成的CDRH2、由SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列(SMGGFAN)组成的CDRH3作为重链可变区的CDR(互补决定区);而且,含有由SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列(RASQNISDYLIH)组成的CDRL1、由SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列(YASQSIS)组成的CDRL2、由SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列(QNGHTFPT)组成的CDRL3作为轻链可变区的CDR(图16)。

[0132] 即,本发明的抗EPHA2抗体是含有由SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列组成的重链可变区CDRH1、由SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列组成的重链可变区CDRH2、由SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列组成的重链可变区CDRH3、由SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列组成的轻链可变区CDRL1、由SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列组成的轻链可变区CDRL2,以及由SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列组成的轻链可变区CDRL3的抗体。

[0133] 而且,抗体230-1含有由SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列(DYYMY)组成的CDRH1、由SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列(TISDDGSFTHYLDSEVKG)组成的CDRH2、由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列(DGYRYDRPFAY)组成的CDRH3作为重链可变区的CDR(互补决定区);而且,含有

由SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列(KASQDVNTAVA)组成的CDRL1、由SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列(WASTRHT)组成的CDRL2、由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列(QQHYPSTPYT)组成的CDRL3作为轻链可变区的CDR(图17)。

[0134] 即,本发明的抗EPHA2抗体是含有由SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列组成的重链可变区CDRH1、由SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列组成的重链可变区CDRH2、由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列组成的重链可变区CDRH3、由SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列组成的轻链可变区CDRL1、由SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列组成的轻链可变区CDRL2,以及由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列组成的轻链可变区CDRL3的抗体。

[0135] 上述各CDR也包括由在各自所示的氨基酸序列中缺失、置换、增添1个或数个、优选1个或2个、更优选1个氨基酸而形成的氨基酸序列组成的氨基酸序列所组成的CDR。

[0136] 含有上述重链可变区和轻链可变区的抗EPHA2单克隆抗体由上述重链可变区和重链恒定区以及上述轻链可变区和轻链恒定区组成。重链恒定区由3个结构域CH1、CH2和CH3组成。重链恒定区也可以为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,优选为IgG1或IgG2恒定区,最优选为IgG1恒定区。轻链恒定区由1个结构域CL组成。轻链恒定区为 κ 或 λ 恒定区。

[0137] 本发明的抗体也包括抗体功能性片段或其修饰物。例如,抗体功能性片段是抗体的片段,且是能够特异性结合抗原的片段。作为功能性片段,可举出:Fab、Fab'、F(ab')₂、二硫键Fv(dsFv)、二聚体化V区域(Diabody:双价抗体(Diabody))、单链Fv(scFv)等。

[0138] 本发明的抗体也可以使用产生抗体的杂交瘤来产生,可以通过将编码重链可变区的DNA或编码轻链可变区的DNA插入到表达载体,使用该载体转化用于表达的宿主细胞,培养宿主细胞,从而使细胞产生本发明的抗体作为重组抗体。

[0139] 本发明的抗体也包括与结合上述抗体的表位相结合的抗体,或者在与EPHA2的结合中与上述抗体竞争的抗体。

[0140] 本发明使用抗人EPHA2单克隆抗体构建免疫测定系统。作为免疫测定法,可举出:免疫印迹法、酶免疫测定法(EIA、ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、荧光抗体法、利用凝集反应的方法、免疫色谱法等。

[0141] 另外,本发明使用抗人EPHA2单克隆抗体构建免疫测定法中的夹心免疫测定系统。作为夹心免疫测定法,可举出:夹心放射免疫测定法(RIA法)夹心酶免疫测定法(EIA法)、夹心荧光免疫测定法(FIA法)、夹心发光免疫测定法(CLIA法)、夹心发光酶免疫测定法(CLEIA法)、基于夹心法的免疫色谱法等所有夹心免疫测定法。其中,优选EIA法即ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay:酶联免疫吸附法)。下面对ELISA进行说明,而其他夹心免疫测定法在使用两种抗体“夹持”要测定的抗原这一点上来看与该方法相同,本领域技术人员可以构建其他夹心免疫测定法。将未标记的抗人EPHA2单克隆抗体固定在96孔微量滴定板和聚苯乙烯珠等载体上,作为捕捉抗体(一抗)。此外,检测抗体(二抗)使用用辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(ALP)等酶、FITC等荧光物质或者生物素等标记的抗人EPHA2单克隆抗体。这种情况下,也可以将酶等标记到使用胃蛋白酶消化抗体分子而得到的Fab'片段上。或者,还可以在使未标记的二抗发生反应,然后将用酶和荧光物质等对特异性结合该二抗的抗体进行标记的所得物用作检测用三抗并进行反应。此外,此时也可以用生物素标记的二抗,使标记的抗生物素蛋白或链霉亲和素与生物素结合并显色。抗原抗体反应可以在4℃

~45℃、更优选在20℃~40℃、进一步优选在25℃~38℃进行,此外,反应时间为10分钟~18小时、更优选10分钟~1小时、进一步优选30分钟~1小时左右。可以根据标准曲线计算出样品中的EPHA2浓度,其中,所述标准曲线预先制定了显色程度,或者是在测定从受试对象采集的样品的同时制成的。在夹心免疫测定法中,将抗体57-1和抗体230-1之一固定在ELISA用微量滴定板等载体上,用作固相抗体;标记另一个抗体,用作检测抗体。可以将抗体57-1用作固相抗体,将抗体230-1用作检测抗体,此外,也可以将抗体57-1用作检测抗体,将抗体230-1用作固相抗体。使用这些单克隆抗体的方法的特异性高,只检测EPHA2,在EPHA1、EPHA3、EPHA4中不显示出交叉反应性。

[0142] 本发明包括用于测定EPHA2的至少含有抗体57-1和抗体230-1这两种抗体的检查用试剂盒,或者免疫诊断用组合物。可以将抗体57-1和抗体230-1中的一个抗体固定在ELISA用微量滴定板上,将另一种抗体进行标记。上述检查用试剂盒可以包括标本采集器具、标本处理液、显色底物等试剂,还可以包括试验所需的器具等。

[0143] 通过测定受试对象血液中的EPHA2,可以判定受试对象是否患有癌症。即,如果受试对象血液中的EPHA2浓度高于健康者血液中的EPHA2浓度,则可以判断为受试对象患有癌症。此外,也可以事先测定健康者的生物样品中的EPHA2浓度,根据该测定值对EPHA2的浓度测定值确定临界值(cut-off值)。以该临界值为基准,当超过临界值时,则可判断为患有癌症。

[0144] 癌症优选为胃癌、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、大肠癌、胰腺癌、肝癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫体癌、肾癌、脑肿瘤、恶性黑色素瘤、头颈癌等。

[0145] 本发明包括以血液中的EPHA2浓度为指标检测癌症的方法。该方法也是以血液中的EPHA2浓度为指标,获得用于检测癌症的辅助数据的方法。

[0146] 本发明包括用于对至少含有抗体57-1或抗体230-1的EPHA2进行测定来检测癌症的检查用试剂盒,或者免疫诊断用组合物。上述检查用试剂盒可以包括标本采集器具、标本处理液、显色底物等试剂,还可以包括试验所需的器具等。

[0147] 而且,本发明包括用于对至少含有抗体57-1和抗体230-1这两种抗体的EPHA2进行测定来检测癌症的检查用试剂盒,或者免疫诊断用组合物。上述检查用试剂盒可以包括标本采集器具、标本处理液、显色底物等试剂,还可以包括试验所需的器具等。

[0148] 实施例

[0149] 下面通过实施例对本发明进行具体说明,但本发明并不受这些实施例限制。此外,以下实施例中关于基因操作的各操作,如无特别说明,则是按照《分子克隆(Molecular Cloning)》(Sambrook,J.,Fritsch,E.F.和Maniatis,T.著,冷泉港实验室出版社于1989年出版)记载的方法进行;或者,当使用市售试剂和试剂盒时,则按照市售品的说明书进行使用。

[0150] [实施例1]

[0151] 制作抗人EPHA2单克隆抗体

[0152] 1)-1制作编码人EPHA2的质粒

[0153] 1)-1-1制作编码全长人EPHA2的质粒

[0154] 通过使用了由SK-OV-3细胞总RNA合成的cDNA作为模板和以下引物组的PCR反应,扩增编码人EPHA2的cDNA。

[0155] 引物1:

[0156] 5'-ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcggggatcggaccgagagcgagaag-3' (序列表的SEQ ID NO:1), 以及

[0157] 引物2:

[0158] 5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctagatggggatccccacagtgttcacctgggtcctt-3' (序列表的SEQ ID NO:2)

[0159] 使用BP克隆酶 (Invitrogen公司、赛默飞世尔科技公司) 将PCR片段克隆到pDONR221 (Invitrogen公司、赛默飞世尔科技公司)。使用GeneTailor定点诱变系统 (Invitrogen公司、赛默飞世尔科技公司) 和以下引物组, 从克隆的EPHA2基因中除去终止密码子。

[0160] 引物3: 5'-ctgtggggatccccatcgaccagctttc-3' (序列表的SEQ ID NO:3), 以及

[0161] 引物4: 5'-gatggggatccccacagtgttcacctgggtc-3' (序列表的SEQ ID NO:4)

[0162] 使用LR克隆酶 (Invitrogen公司、赛默飞世尔科技公司), 将该EPHA2基因片段移接到pcDNA-DEST40Gateway Vectors (Invitrogen公司、赛默飞世尔科技公司)。下面, 将该质粒记作pcDNA-DEST40-EPHA2 (该质粒在attB1和attB2序列之间具有序列表的SEQ ID NO:5所示的核苷酸序列)。此外, 克隆到该质粒的EPHA2基因的编码序列由序列表的SEQ ID NO:5的核苷酸编号33~2960所示。另外, EPHA2的氨基酸序列由序列表的SEQ ID NO:6所示。

[0163] 1)-1-2制作编码EPHA2胞外结构域的质粒

[0164] 使用以下引物组, 利用PCR反应, 将编码人EPHA2胞外结构域 (由序列表的SEQ ID NO:6的氨基酸编号1~534所示的氨基酸序列组成。以下记作“EPHA2 (ECR)”) 的基因扩增。

[0165] 引物5: 5'-aaaaagcttatggagctccaggcagcccg-3' (序列表的SEQ ID NO:7), 以及

[0166] 引物6: 5'-aaagggccctcagttgccagatccctccgg-3' (序列表的SEQ ID NO:8)

[0167] 用HindIII和ApaI将该PCR片段切断, 克隆到pcDNA3.1的HindIII/ApaI位点 (以下记作“pcDNA3.1-EPHA2 (ECR)”)。此外, 以下将通过pcDNA3.1-EPHA2 (ECR) 表达的重组蛋白记作“EPHA2 (ECR)”)。

[0168] 1)-2制作编码人ERBB2的质粒

[0169] 将人克隆集合 (Human clone collection) (STRATAGENE公司#C33830、Agilent Technologies公司) 作为模板, 使用以下引物组进行PCR反应。

[0170] 引物7: 5'-caccatggagctggcggccttg-3' (序列表的SEQ ID NO:9), 以及

[0171] 引物8: 5'-tcccactggcagctccagacc-3' (序列表的SEQ ID NO:10)

[0172] 使用pENTR定向TOPO克隆试剂盒 (Invitrogen公司、赛默飞世尔科技公司) 将得到的PCR片段克隆到pENTR/D-TOPO (Invitrogen公司、赛默飞世尔科技公司)。为了修复伴有氨基酸置换的突变, 对该质粒进行EcoRI处理, 将得到的片段中含有来自pENTR/D-TOPO序列的片段与将人克隆集合 (STRATAGENE公司#C14640、Agilent Technologies公司) 进行EcoRI处理而得到的片段中的第二大片段 (约1.6kbp) 进行连接。使用LR克隆酶将该质粒中的ERBB2基因片段移接到pcDNA-DEST40Gateway载体。下面, 将该质粒记作pcDNA-DEST40-ERBB2 (在attB1和attB2序列之间具有序列表的SEQ ID NO:11所示的核苷酸序列)。

[0173] 1)-3制备抗原蛋白

[0174] 为了表达EPHA2 (ECR), 使用293fectin (Invitrogen公司、赛默飞世尔科技公司) 将

pcDNA3.1-EPHA2 (ECR) 转染到FreeStyle 293-F细胞 (Invitrogen公司、赛默飞世尔科技公司), 在37℃、8%CO₂中培养5天。通过离心分离回收培养上清液, 使用分子量截留15000的透析管在20mM Tris-HCl pH7.5中透析。通过过滤器(0.45μm, PES)后, 将培养上清液加到利用20mM Tris-HCl pH7.5平衡的HiPrep 16/10Q XL (GE Healthcare公司) 中。以NaCl的线性浓度梯度(20mM Tris-HCl pH7.5、0-1M NaCl) 洗脱结合蛋白。然后收集含有EPHA2 (ECR) 的级分, 加到用PBS平衡的HiLoad 26/60Superdex 200pg (GE Healthcare公司) 中。用PBS洗脱蛋白质。收集含有EPHA2 (ECR) 的级分, 用做免疫用抗原。蛋白质浓度使用BCA蛋白质分析试剂 (PIERCE公司、赛默飞世尔科技公司) 进行测定。

[0175] 1)-4免疫

[0176] 作为初次免疫, 向BALB/cAnNCr1Cr1j小鼠 (日本Charles River公司) 的背部皮下给予与弗氏完全佐剂 (Adjuvant Complete Freund) H37Rv (和光纯药株式会社) 或TiterMax 金佐剂 (Gold Adjuvant) (SIGMA公司) 混合的50μg的EPHA2 (ECR)。作为第二次、第三次免疫, 向小鼠的背部皮下给予与弗氏完全佐剂 (Adjuvant Incomplete Freund) (和光纯药株式会社) 混合的50μg的EPHA2 (ECR)。用50μg的EPHA2 (ECR) 对这些小鼠进行加强免疫 (boost), 3天后采集脾脏。将该脾脏用于制作杂交瘤。

[0177] 1)-5制作杂交瘤

[0178] 使用PEG4000 (IBL公司) 将脾细胞与小鼠骨髓瘤P3X63Ag8U.1细胞进行细胞融合, 制作杂交瘤。使用杂交瘤的培养上清液, 筛选产生抗EPHA2抗体的杂交瘤。

[0179] 1)-6抗体筛选

[0180] 1)-6-1制备抗原表达细胞

[0181] 以 5×10^4 细胞/cm², 将293T细胞接种到I型胶原蛋白涂布的烧瓶 (IWAKI公司), 在含有10%FBS的DMEM中在37℃、5%CO₂的加湿气氛中培养过夜。次日, 使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen公司、赛默飞世尔科技公司), 分别用pcDNA-DEST40-EPHA2和pcDNA-DEST40-ERBB2 (阴性对照) 转染293T细胞, 在37℃、5%CO₂的加湿气氛中再培养过夜。次日, 对转染的细胞进行胰蛋白酶处理, 用含有10%FBS的DMEM洗涤细胞, 然后悬浮于含有5%FBS的PBS中。将该细胞用于细胞ELISA、流式细胞仪分析。

[0182] 1)-6-2细胞ELISA

[0183] 将在1)-6-1中制备的细胞与杂交瘤培养上清液混合, 在4℃孵育1小时。用含有5%FBS的PBS洗涤细胞两次, 然后在用含有5%FBS的PBS稀释了500倍的偶联有过氧化物酶的山羊抗小鼠IgG (Goat anti-Mouse IgG, Peroxidase Conjugated) (Millipore (Chemicon) 公司#AP181P) 中在4℃染色1小时。用含有5%FBS的PBS洗涤细胞两次, 然后以100μl/孔的量加入OPD显色液 (在OPD溶解液 (0.05M柠檬酸三钠、0.1M十二水磷酸氢二钠pH4.5) 中分别以0.4mg/ml、0.6% (v/v) 的形式溶解邻苯二胺二盐酸盐 (和光纯药株式会社)、H₂O₂)。一边搅拌一边进行显色反应, 以100μl/孔的量加入1M HCl, 使显色反应停止。离心后, 将上清液转移到新的96孔平底微孔板, 用读板机 (ARVO; PerkinElmer公司) 测定在490nm处的吸光度。为了选择产生特异性结合EPHA2的抗体的杂交瘤, 选择对表达EPHA2的293T细胞显示出高于对表达ERBB2的293T细胞 (阴性对照) 的吸光度的杂交瘤。1)-6-3流式细胞仪分析

[0184] 为了除去细胞ELISA中的假阳性, 通过流式细胞仪分析来确认用细胞ELISA判定为阳性的杂交瘤产生的抗体是否特异性结合EPHA2。将在1)-6-1中制备的细胞与杂交瘤培养

上清液混合,在4℃孵育1小时。用含有5%FBS的PBS洗涤两次,然后在用含有5%FBS的PBS稀释了1000倍的偶联有荧光素的山羊IgG组分抗小鼠IgG (Fluorescein-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG) (全分子) (ICN Pharmaceuticals公司#55493) 中在4℃染色1小时。用含有5%FBS的PBS洗涤两次,然后再悬浮于含有2μg/ml 7-氨基放线菌素D (Invitrogen (Molecular Probes) 公司、赛默飞世尔科技公司) 的含5%FBS的PBS中,用流式细胞仪 (FC500:BeckmanCoulter公司) 进行分析。数据分析使用Flowjo (Tree Star公司) 进行。将7-氨基放线菌素D阳性的死细胞通过设门 (gate) 排除后,绘制活细胞的FITC荧光强度的直方图。选择产生对表达EPHA2的293T细胞显示出高于在直方图中作为对照的表达ERBB2的293T细胞的结合性的抗体的杂交瘤。

[0185] 1)-7杂交瘤的单克隆化。

[0186] 产生抗EPHA2抗体的杂交瘤使用ClonaCell-HY选择培养基D (StemCell Technologies公司#03804) 来培养,回收出现的集落,从而进行单克隆化。使用单克隆化的细胞的培养上清液,通过与1)-6-3相同的方法确认对EPHA2的结合性。其结果是建立了产生抗EPHA2单克隆抗体 (57-1、80-21、83-21、113-1、119-1、131-1、141-21、148-1、151-4、230-1、240-4和245-21) 的杂交瘤。

[0187] 1)-8单克隆抗体的同种型确定

[0188] 单克隆抗体的同种型通过小鼠单克隆同种型鉴定试剂盒 (Serotec公司) 来确定。其结果为IgG1 (57-1、113-1、119-1、131-1、141-21、230-1)、IgG2a (80-21、83-21、148-1、151-4、240-4)、IgG2b (245-21)。

[0189] [实施例2]

[0190] EPHA2测定法的开发

[0191] 2)-1筛选ELISA用单克隆抗体

[0192] 2)-1-1抗EPHA2单克隆抗体的包被

[0193] 为了筛选能够用于测定EPHA2的夹心ELISA的抗EPHA2单克隆抗体,在包被前将抗EPHA2单克隆抗体SHM41 (东洋大学、非专利文献19、20)、57-1、80-21、83-21、113-1、119-1、131-1、141-21、148-1、151-4、230-1、240-4、245-21用PBS稀释制备成5μg/ml的浓度,各以100μl/孔的量加入到EIA/RIA孔板高结合型平底96孔板 (Costar公司:No.9018)。贴上封板膜,在4℃在孔板上吸附16小时以上,然后进行封闭处理。封闭使用用去离子水稀释5倍的检测溶液 (测定稀释液:BIOLEGEND公司),在4℃静置过夜。

[0194] 2)-1-2标准蛋白质

[0195] 人EPHA2标准蛋白质使用从R&D公司购买的人重组EphA2-(x6His)。稀释浓度设定为2000pg/ml、500pg/ml、125pg/ml、31.3pg/ml、0pg/ml这五级别。除去2)-1-1的孔板的封闭溶液,然后以100μl/孔的量加入各浓度的EPHA2标准蛋白溶液,在室温反应2小时。

[0196] 2)-1-3生物素标记的检测抗体

[0197] 从反应结束的2)-1-2的孔板中除去溶液,以200μl/孔的量加入ELISA洗涤溶液 (含有0.05%Tween20的PBS溶液)。用孔板混匀仪 (日本AS ONE株式会社) 搅拌15秒,然后除去洗涤液。重复三次该洗涤操作,然后以100μl/孔的量加入用检测溶液稀释1000倍的生物素标记的抗EPHA2多克隆抗体 (R&D公司:BAF3035),在室温反应1小时。

[0198] 2)-1-4抗生物素蛋白酶溶液

[0199] 从反应结束的2)-1-3的孔板中除去生物素抗体溶液,用ELISA洗涤溶液重复四次洗涤操作。然后以100 μ l/孔的量加入用检测溶液稀释4000倍的链霉亲和素-HRP (BD Bioscience公司),在室温反应45分钟。

[0200] 2)-1-5底物溶液

[0201] 从反应结束的2)-1-4的孔板中除去生物素抗体溶液,用ELISA洗涤溶液重复五次洗涤操作。然后以100 μ l/孔的量加入TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 溶液 (KPL公司),在室温反应15分钟,显色为蓝色。

[0202] 2)-1-6反应停止

[0203] 以100 μ l/孔的量加入2N (2规定) 硫酸溶液 (和光纯药株式会社),停止反应使溶液变成黄色,然后用微孔板读板机iMark (BIO-RAD公司) 测定在450nm处的吸光度 (参考波长570nm)。

[0204] 2)-1-7结果

[0205] 在SHM41、230-1、57-1、141-21、151-4中确认到反应,其中230-1的反应性最高 (图1)。

[0206] 2)-2使用抗EPHA2单克隆抗体230-1的夹心ELISA

[0207] 2)-2-1抗EPHA2单克隆抗体的包被

[0208] 为了选择与抗EPHA2单克隆抗体230-1组合的抗EPHA2单克隆抗体,用生物素标记的230-1,用作检测抗体。作为捕获抗体,在包被前将57-1、80-21、83-21、113-1、119-1、131-1、141-21、148-1、151-4、240-4、245-21和同种型IgG1用PBS稀释调节成5 μ g/ml的浓度,各以100 μ l/孔的量加入到EIA/RIA孔板高结合型平底96孔板。贴上封板膜,在4 $^{\circ}$ C在孔板上吸附16小时以上,然后进行封闭处理。封闭使用用去离子水稀释5倍的检测溶液,在4 $^{\circ}$ C静置过夜。

[0209] 2)-2-2标准蛋白质

[0210] 按照2000pg/ml、500pg/ml、125pg/ml、0pg/ml这四个稀释浓度级别来稀释人EPHA2标准蛋白质。除去2)-2-1的孔板的封闭溶液,然后以100 μ l/孔的量加入各浓度的EPHA2标准蛋白溶液,在室温反应2小时。

[0211] 2)-2-3生物素化标记

[0212] 使用生物素标记试剂盒 (同仁化学研究所),按照实验步骤对单克隆抗体230-1进行生物素化标记。

[0213] 2)-2-4生物素标记的检测抗体

[0214] 从反应结束的2)-2-2的孔板中除去溶液,以200 μ l/孔的量加入ELISA洗涤溶液。用孔板混匀仪搅拌15秒,然后除去洗涤液。重复三次该洗涤操作,然后以100 μ l/孔的量加入用检测溶液稀释1000倍的生物素标记的抗EPHA2单克隆抗体230-1,在室温反应1小时。

[0215] 2)-2-5抗生物素蛋白酶溶液

[0216] 从反应结束的2)-2-4的孔板中除去生物素抗体溶液,用ELISA洗涤溶液重复四次洗涤操作。然后以100 μ l/孔的量加入用检测溶液稀释2000倍的链霉亲和素-HRP (BIOLEGEND公司),在室温反应45分钟。

[0217] 2)-2-6底物溶液

[0218] 从反应结束的2)-2-5的孔板中除去生物素抗体溶液,用ELISA洗涤溶液重复五次

洗涤操作。然后以100 μ l/孔的量加入TMB溶液,在室温反应15分钟,显色为蓝色。

[0219] 2)-2-7反应停止

[0220] 以100 μ l/孔的量加入2N硫酸溶液,停止反应使溶液变成黄色,然后用微孔板读板机测定在450nm处的吸光度(参考波长570nm)。

[0221] 2)-2-8结果

[0222] 当使用生物素标记的230-1时,考察的11种抗EPHA2单克隆抗体中,与57-1组合的反应性最高(图2)。

[0223] 2)-3使用抗EPHA2抗体230-1、57-1和SHM41的夹心ELISA

[0224] 2)-3-1抗EPHA2单克隆抗体的包被

[0225] 作为EPHA2检测的夹心ELISA的包被抗体,将57-1、230-1或SHM41抗体用PBS稀释调节成5 μ g/ml的浓度,各以100 μ l/孔的量加入到EIA/RIA孔板高结合型平底96孔板。贴上封板膜,在4 $^{\circ}$ C在孔板上吸附16小时以上,然后进行封闭处理。封闭使用用去离子水稀释5倍的检测溶液,在4 $^{\circ}$ C静置过夜。

[0226] 2)-3-2标准蛋白质

[0227] 从稀释浓度2000pg/ml起,将人EPHA2标准蛋白质每次2倍逐级稀释8级(最小浓度7.8pg/ml),除去2)-3-1的孔板的封闭溶液,然后以100 μ l/孔的量加入各浓度的EPHA2标准蛋白溶液,在室温反应2小时。

[0228] 2)-3-3生物素标记的检测抗体

[0229] 从反应结束的2)-3-2的孔板中除去溶液,以200 μ l/孔的量加入ELISA洗涤溶液。用孔板混匀仪搅拌15秒,然后除去洗涤液。重复三次该洗涤操作,然后以100 μ l/孔的量加入用检测溶液稀释1000倍的生物素标记的抗EPHA2单克隆抗体(57-1或230-1),在室温反应1小时。

[0230] 2)-3-4抗生物素蛋白酶溶液

[0231] 从反应结束的2)-3-3的孔板中除去生物素抗体溶液,用ELISA洗涤溶液重复四次洗涤操作。然后以100 μ l/孔的量加入用检测溶液稀释2000倍的链霉亲和素-HRP,在室温反应45分钟。

[0232] 2)-3-5底物溶液

[0233] 从反应结束的2)-3-4的孔板中除去生物素抗体溶液,用ELISA洗涤溶液重复五次洗涤操作。然后以100 μ l/孔的量加入TMB溶液,在室温反应15分钟,显色为蓝色。

[0234] 2)-3-6反应停止

[0235] 以100 μ l/孔的量加入2N硫酸溶液,停止反应使溶液变成黄色,然后用微孔板读板机测定在450nm处的吸光度(参考波长570nm)。

[0236] 2)-3-7结果

[0237] 在使用SHM41作为捕获抗体,使用生物素标记的57-1作为检测抗体的系统中,几乎检测不到EPHA2。此外,在使用SHM41作为捕获抗体,使用生物素标记230-1作为检测抗体的系统中,即使检测到EPHA2,背景也较高。而在使用57-1或230-1作为捕获抗体,使用生物素标记的57-1或生物素标记的230-1作为检测抗体的系统中,则可以检测到EPHA2,背景也较低。以上结果表明,57-1和230-1的组合有望用于EPHA2的检测(图3)。

[0238] 2)-4EPHA2夹心ELISA系统的构建

[0239] 为了优化使用57-1和230-1的ELISA系统,改变封闭溶液、标准蛋白质稀释溶液和生物素标记的抗体的稀释溶液。

[0240] 2)-4-1抗EPA2单克隆抗体的包被

[0241] 作为EPA2检测的夹心ELISA的包被抗体,将57-1或230-1抗体用PBS稀释调节成5 μ g/ml的浓度,各以100 μ l/孔的量加入到EIA/RIA孔板高结合型平底96孔板。贴上封板膜,在4 $^{\circ}$ C在孔板上吸附16小时以上,然后进行封闭处理。封闭使用SuperBlock封闭溶液 (THERMO SCIENTIFIC公司),在4 $^{\circ}$ C静置过夜。

[0242] 2)-4-2标准蛋白质

[0243] 使用Can Get Signal溶液#1 (东洋纺生命科学公司),从稀释浓度2000pg/ml起,将人EPA2标准蛋白质每次2倍逐级稀释8级(最小浓度7.8pg/ml),除去2)-4-1的孔板的封闭溶液,然后以100 μ l/孔的量加入各浓度的EPA2标准蛋白溶液,在室温反应2小时。

[0244] 2)-4-3生物素标记的检测抗体

[0245] 从反应结束的2)-4-2的孔板中除去溶液,以200 μ l/孔的量加入ELISA洗涤溶液。用孔板混匀仪搅拌15秒,然后除去洗涤液。重复三次该洗涤操作,然后以100 μ l/孔的量加入用Can Get Signal溶液#2 (东洋纺生命科学公司) 稀释1000倍的生物素标记的抗EPA2单克隆抗体 (57-1或230-1),在室温反应1小时。

[0246] 2)-4-4抗生物素蛋白酶溶液

[0247] 从反应结束的2)-4-3的孔板中除去生物素抗体溶液,用ELISA洗涤溶液重复四次洗涤操作。然后以100 μ l/孔的量加入用检测溶液稀释2000倍的链霉亲和素-HRP,在室温反应45分钟。

[0248] 2)-4-5底物溶液

[0249] 从反应结束的2)-4-4的孔板中除去生物素抗体溶液,用ELISA洗涤溶液重复五次洗涤操作。然后以100 μ l/孔的量加入TMB溶液,在室温反应15分钟,显色为蓝色。

[0250] 2)-4-6反应停止

[0251] 以100 μ l/孔的量加入2N硫酸溶液,停止反应使溶液变成黄色,然后用微孔板读板机测定在450nm处的吸光度(参考波长570nm)。

[0252] 2)-4-7结果

[0253] 在使用57-1作为捕获抗体、使用生物素标记的230-1作为检测抗体的系统,以及使用230-1作为捕获抗体、使用生物素标记的57-1作为检测抗体的系统这两个系统中,这些ELISA系统可以检测到EPA2,而且背景值较低。此外,使用230-1作为捕获抗体,使用生物素标记的57-1作为检测抗体的系统中,在高浓度区域显示出更高的吸光度值(图4)。

[0254] 2)-5标准曲线

[0255] 按照实施例2)-4的方法,将230-1抗体用作夹心ELISA的包被用抗体(捕获抗体),将生物素标记的57-1抗体用作检测抗体,测定从2000pg/ml逐级稀释到7.8pg/ml的人EPA2标准蛋白质。标准曲线使用Prism 4(4.03版,GraphPad Software公司)的三阶多项式模型绘制。结果是 R^2 值为0.9998,标准曲线在7.8pg/ml至2000pg/ml的范围内显示出良好的普适性(图5)。

[0256] 2)-6检测特异性

[0257] 使用实施例2)-4的方法,除了EPA2蛋白以外,将EPA1、EPA3、EPA4蛋白(北京义

翹神州科技有限公司)同样地稀释为2000pg/ml、1000pg/ml、500pg/ml、250pg/ml,并利用夹心ELISA测定。结果是该方法只检测到EPA2,未在EPA1、EPA3、EPA4中显示出交叉反应性(图6)。该结果表明,该ELISA系统对EPA2具有高特异性。

[0258] 2)-7人血清中的EPA2值的测定

[0259] 2)-7-1来自癌症患者的血清

[0260] 来自胃癌患者的冷冻保存血清(10例)、来自卵巢癌患者的冷冻保存血清(10例)和健康者冷冻保存血清(10例)从BIOERVE公司(代理商:REPROCELL公司)获得。所有血清均使用具有获得所提供患者同意的IRB证明书的血清。

[0261] 来自非小细胞肺癌患者的冷冻保存血清(10例)和健康者冷冻保存血清(10例)从ProteoGenex公司(代理商:BizCom Japan公司)获得。所有血清均使用具有获得提供患者同意的IRB证明书的血清。

[0262] 2)-7-2血清中的EPA2值的测定

[0263] 按照实施例2)-4的方法,用Can Get Signal溶液#1将各种血清(健康者、胃癌患者和卵巢癌患者)稀释5倍,并利用夹心ELISA测定。

[0264] 2)-7-3统计分析

[0265] 统计分析使用Steel检验(SAS System Release 9.2、SAS Institute公司)来进行。

[0266] 2)-7-4结果

[0267] 健康者、胃癌和卵巢癌患者血清中的EPA2浓度的中位值为372pg/ml、647pg/ml、600pg/ml。与健康者相比,胃癌患者血液中的EPA2显著增高($P=0.0142$) (图7-1)。

[0268] 健康者和非小细胞肺癌患者血清中的EPA2浓度的中位值为232pg/ml、645pg/ml。此外,平均值为231pg/ml、1,031pg/ml。与健康者相比,非小细胞肺癌患者血液中的EPA2显著增高($P=0.0024$) (图7-2)。

[0269] [实施例3]

[0270] 确定对小鼠抗EPA2单克隆抗体的可变区进行编码的cDNA核苷酸序列

[0271] 3)-1确定对小鼠抗EPA2抗体57-1的可变区进行编码的cDNA核苷酸序列

[0272] 3)-1-1制备来自产生57-1的杂交瘤的总RNA

[0273] 使用TRIzol试剂(Ambion公司),从产生57-1的杂交瘤制备总RNA。

[0274] 3)-1-2合成cDNA(5'-RACE-Ready cDNA)

[0275] 使用在实施例3)-1-1中制备的1 μ g总RNA和SMARTer RACE 5'/3'试剂盒(Clontech公司),合成cDNA(5'-RACE-Ready cDNA)。

[0276] 3)-1-3利用5'-RACE PCR扩增编码57-1重链可变区的cDNA和确定核苷酸序列

[0277] 作为用于利用PCR扩增编码57-1重链可变区的cDNA的引物,使用UPM(Universal Primer A Mix:SMARTer RACE 5'/3'试剂盒附带)和5'-CATCCCAGGGTCACCATGGAGTTAGTTTGG-3'(mG1VR1:SEQ ID NO:12)。mG1VR1根据数据库中的小鼠重链(IgG1)恒定区的序列来设计。

[0278] 使用这些引物和实施例3)-1-2中合成的cDNA(5'-RACE-Ready cDNA)作为模板,利用5'-RACE PCR扩增编码57-1重链可变区的cDNA。该PCR使用KOD-Plus-(东洋纺公司)作为聚合酶,并按照SMARTer RACE5'/3'试剂盒的使用手册所记载的降落PCR(touch down

PCR) 操作步骤进行。

[0279] 使用MinElute PCR纯化试剂盒(QIAGEN公司)纯化扩增的cDNA片段,然后使用Zero Blunt TOPO PCR克隆试剂盒(Invitrogen公司、赛默飞世尔科技公司)进行克隆。

[0280] 为了确定克隆的cDNA片段的核苷酸序列,使用以下测序引物。

[0281] 5'-CATCCCAGGGTCACCATGGAGTTAGTTTGG-3' (mG1VR1:SEQ ID NO:12),以及

[0282] 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (NUP:SEQ ID NO:13)

[0283] 测序反应使用GeneAmp 9700 (Applied Biosystems公司、赛默飞世尔科技公司) 进行,DNA的序列确定使用ABI PRISM 3700DNA分析仪 (Applied Biosystems公司、赛默飞世尔科技公司) 或Applied Biosystems3730xl分析仪 (Applied Biosystems公司、赛默飞世尔科技公司) 进行。

[0284] 确定的编码57-1重链可变区的cDNA核苷酸序列如SEQ ID NO:14 (图8) 所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:15 (图9) 所示。

[0285] 3)-1-4利用5'-RACE PCR扩增编码57-1轻链可变区的cDNA和确定核苷酸序列

[0286] 作为用于利用PCR扩增编码57-1可变区的cDNA的引物,使用UPM (Universal Primer A Mix:SMARTer RACE 5' / 3' 试剂盒附带) 和5'-AGTCCAAGTGTTCAGGACGCCATTTTGTCTG-3' (mKVR2:SEQ ID NO:16)。mKVR2根据数据库中的小鼠轻链恒定区的序列来设计。

[0287] 使用这些引物和实施例3)-1-2中合成的cDNA (5'-RACE-Ready cDNA) 作为模板,利用5'-RACE PCR扩增编码57-1轻链可变区的cDNA。该PCR使用KOD-Plus- (东洋纺公司) 作为聚合酶,并按照SMARTer RACE5' / 3' 试剂盒的使用手册所记载的降落PCR(touch down PCR) 操作步骤进行。

[0288] 使用MinElute PCR纯化试剂盒(QIAGEN公司)纯化扩增的cDNA片段,然后使用Zero Blunt TOPO PCR克隆试剂盒(Invitrogen公司、赛默飞世尔科技公司)进行克隆。

[0289] 为了确定克隆的cDNA片段的核苷酸序列,使用以下测序引物。

[0290] 5'-AGTCCAAGTGTTCAGGACGCCATTTTGTCTG-3' (mKVR2:SEQ ID NO:16),以及

[0291] 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (NUP:SEQ ID NO:13)

[0292] 测序反应使用GeneAmp 9700 (Applied Biosystems公司、赛默飞世尔科技公司) 进行,DNA的序列确定使用ABI PRISM 3700DNA分析仪 (Applied Biosystems公司、赛默飞世尔科技公司) 或Applied Biosystems3730xl分析仪 (Applied Biosystems公司、赛默飞世尔科技公司) 进行。

[0293] 确定的编码57-1轻链可变区的cDNA核苷酸序列如序列表的SEQ ID NO:17 (图10) 所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:18 (图11) 所示。

[0294] 3)-2确定对小鼠抗EPHA2抗体230-1的可变区进行编码的cDNA核苷酸序列

[0295] 3)-2-1制备来自产生230-1的杂交瘤的总RNA

[0296] 使用与实施例3)-1-1相同的方法,从产生230-1的杂交瘤制备总RNA。

[0297] 3)-2-2合成cDNA (5'-RACE-Ready cDNA)

[0298] 使用实施例3)-2-1中制备的1 μ g总RNA,按照与实施例3)-1-2相同的方法合成cDNA (5'-RACE-Ready cDNA)。

[0299] 3)-2-3利用5'-RACE PCR扩增编码230-1重链可变区的cDNA和确定核苷酸序列

[0300] 将实施例3)-2-2中合成的cDNA (5' -RACE-Ready cDNA) 用作模板,按照与实施例3)-1-3相同的方法扩增编码230-1重链可变区的cDNA,并确定核苷酸序列。

[0301] 确定的编码230-1重链可变区的cDNA核苷酸序列如序列表的SEQ ID NO:19 (图12)所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:20 (图13)所示。

[0302] 3)-2-4利用5' -RACE PCR扩增编码230-1轻链可变区的cDNA和确定核苷酸序列

[0303] 将实施例3)-2-2中合成的cDNA (5' -RACE-Ready cDNA) 用作模板,按照与实施例3)-1-4相同的方法扩增编码抗体230-1轻链可变区的cDNA,并确定核苷酸序列。

[0304] 确定的编码230-1轻链可变区的cDNA核苷酸序列如序列表的SEQ ID NO:21 (图14)所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:22 (图15)所示。

[0305] 工业实用性

[0306] 本发明的抗体适合利用夹心免疫测定法测定生物样品中的EPHA2,能够用于癌症检测等。

[0307] 序列表自由文本

[0308] SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7~SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16引物

[0309] 本说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请均通过直接引用而并入本说明书中。

序列表

<110> 学校法人东洋大学

<120> 抗EPA2抗体和使用该抗EPA2抗体的EPA2免疫检测

<130> PH-7210-PCT

<150> JP 2017-009349

<151> 2017-01-23

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 1

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cggggatcgg accgagagcg agaag 55

<210> 2

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 2

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctagatgggg atccccacag tgttcacctg 60
gtcctt 66

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 3

ctgtggggat ccccatcgac ccagctttc 29

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 4

gatggggatc cccacagtgt tcacctggtc 30

<210> 5

<211> 2961

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 5

tcggggatcg gaccgagagc gagaagcgcg gcatggagct ccaggcagcc cgcgccctgct 60
 tcgccctgct gtggggctgt gcgctggccg cggccgcggc ggcgccagggc aaggaagtgg 120
 tactgctgga ctttctgca gctggagggg agctcggtg gctcacacac ccgtatggca 180
 aagggtggga cctgatgcag aacatcatga atgacatgcc gatctacatg tactccgtgt 240
 gcaacgtgat gtctggcgac caggacaact ggctccgcac caactgggtg taccgaggag 300
 aggctgagcg tatcttcatt gagctcaagt ttactgtacg tgactgcaac agcttccctg 360
 gtggcgccag ctctgcaag gagactttca accttacta tgccgagtcg gacctggact 420
 acggcaccaa ctccagaag cgcctgttca ccaagattga caccattgcg ccgatgaga 480
 tcaccgtcag cagcgacttc gaggcacgcc acgtgaagct gaacgtggag gacgctccg 540
 tggggccgct caccgcgaaa ggcttctacc tggccttcca ggatatacgt gcctgtgtgg 600
 cactactctc cgtccgtgtc tactacaaga agtgccccga gctgctgcag ggctggccc 660
 acttccctga gaccatcgcc ggctctgatg cacttccct ggccactgtg gccggcacct 720
 gtgtggacca tgccgtgggt ccaccggggg gtgaagagcc ccgtatgcac tgtgcagtgg 780
 atggcgagtg gctgggtgcc attgggcagt gcctgtgcca ggcaggctac gagaaggtgg 840
 aggatgcctg ccaggcctgc tcgcctggat tttttaagtt tgaggcatct gagagcccct 900
 gcttggagtg ccctgagcac acgctgccat cccctgaggg tgccacctcc tgcgagtgtg 960
 aggaaggctt ctccgggca cctcaggacc cagcgtcgat gccttgaca cgaccccctt 1020
 ccgccccaca ctacctaca gccgtgggca tgggtgccaa ggtggagctg cgctggacgc 1080
 cccctcagga cagcgggggc cgcgaggaca ttgtctacag cgtcacctgc gaacagtgt 1140
 ggcccagatc tggggaatgc gggccgtgtg aggccagtgt gcgctactcg gacccctctc 1200
 acggactgac ccgcaccagt gtgacagtga gcgacctgga gcccacatg aactacacct 1260
 tcaccgtgga ggcccgaat ggcgctctcag gcctggtaac cagccgcagc ttccgtactg 1320
 ccagtgtcag catcaaccag acagagcccc ccaaggtgag gctggagggc cgcagcacca 1380
 cctcgcttag cgtctcctgg agcatcccc cgccgcagca gagccgagtg tggaagtacg 1440
 aggtcactta ccgcaagaag ggagactcca acagctacaa tgtgcgccgc accgagggtt 1500
 tctccgtgac cctggacgac ctggccccag acaccaccta cctgggtccag gtgcaggcac 1560
 tgacgcagga gggccagggg gccggcagca aggtgcacga attccagacg ctgtccccgg 1620
 aggatctgg caacttggcg gtgattggcg gcgtggctgt cggtgtggtc ctgttcttgg 1680
 tgctggcagg agttggcttc ttatccacc gcaggaggaa gaaccagcgt gcccgccagt 1740
 ccccgaggga cgtttacttc tccaagtcag aacaactgaa gccctgaag acatacgtgg 1800
 acccccacac atatgaggac cccaaccagg ctgtgttgaa gttcactacc gagatccatc 1860

catcctgtgt cactcggcag aaggtgatcg gagcaggaga gtttggggag gtgtacaagg 1920
 gcatgctgaa gacatcctcg gggaagaagg aggtgccggt ggccatcaag acgctgaaag 1980
 ccggctacac agagaagcag cgagtggact tcctcggcga ggccggcatc atgggccagt 2040
 tcagccacca caacatcatc cgcctagagg gcgtcatctc caaatacaag cccatgatga 2100
 tcatcactga gtacatggag aatggggccc tggacaagtt ctttcgggag aaggatggcg 2160
 agttcagcgt gctgcagctg gtgggcatgc tgcggggcat cgcagctggc atgaagtacc 2220
 tggccaacat gaactatgtg caccgtgacc tggctgcccc caacatcctc gtcaacagca 2280
 acctgggtctg caaggtgtct gactttggcc tgtcccgcgt gctggaggac gaccccgagg 2340
 ccacctacac caccagtggc ggcaagatcc ccatccgctg gaccgccccg gaggccattt 2400
 cctaccggaa gttcacctct gccagcgacg tgtggagctt tggcattgtc atgtgggagg 2460
 tgatgacctg tggcgagcgg ccctactggg agttgtccaa ccacgaggtg atgaaagcca 2520
 tcaatgatgg cttccggtc cccacacca tggactgccc ctccgccatc taccagctca 2580
 tgatgcagtg ctggcagcag gagcgtgccc gccgccccaa gttcgtgac atcgtcagca 2640
 tcctggacaa gctcattcgt gcccctgact ccctcaagac cctggctgac tttagacccc 2700
 gcgtgtctat ccggctcccc agcacgagcg gctcggaggg ggtgcccttc cgcacggtgt 2760
 ccgagtggct ggagtccatc aagatgcagc agtatacgga gcacttcatg gcggccggct 2820
 aactgccat cgagaaggtg gtgcagatga ccaacgacga catcaagagg attggggtgc 2880
 ggctgccccg ccaccagaag cgcacgcct acagcctgct gggactcaag gaccaggtga 2940
 aactgtggg gatccccatc g 2961

<210> 6

<211> 976

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6

Met	Glu	Leu	Gln	Ala	Ala	Arg	Ala	Cys	Phe	Ala	Leu	Leu	Trp	Gly	Cys
1				5					10					15	
Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gln	Gly	Lys	Glu	Val	Val	Leu	Leu
				20				25						30	
Asp	Phe	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Glu	Leu	Gly	Trp	Leu	Thr	His	Pro	Tyr
				35				40						45	
Gly	Lys	Gly	Trp	Asp	Leu	Met	Gln	Asn	Ile	Met	Asn	Asp	Met	Pro	Ile
				50				55						60	
Tyr	Met	Tyr	Ser	Val	Cys	Asn	Val	Met	Ser	Gly	Asp	Gln	Asp	Asn	Trp
65				70				75						80	
Leu	Arg	Thr	Asn	Trp	Val	Tyr	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Arg	Ile	Phe	Ile
				85				90						95	
Glu	Leu	Lys	Phe	Thr	Val	Arg	Asp	Cys	Asn	Ser	Phe	Pro	Gly	Gly	Ala
				100				105						110	
Ser	Ser	Cys	Lys	Glu	Thr	Phe	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Ser	Asp	Leu

115	120	125
Asp Tyr Gly Thr Asn Phe Gln Lys Arg Leu Phe Thr Lys Ile Asp Thr		
130	135	140
Ile Ala Pro Asp Glu Ile Thr Val Ser Ser Asp Phe Glu Ala Arg His		
145	150	155
Val Lys Leu Asn Val Glu Glu Arg Ser Val Gly Pro Leu Thr Arg Lys		
165	170	175
Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Ile Gly Ala Cys Val Ala Leu Leu		
180	185	190
Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Lys Cys Pro Glu Leu Leu Gln Gly Leu		
195	200	205
Ala His Phe Pro Glu Thr Ile Ala Gly Ser Asp Ala Pro Ser Leu Ala		
210	215	220
Thr Val Ala Gly Thr Cys Val Asp His Ala Val Val Pro Pro Gly Gly		
225	230	235
Glu Glu Pro Arg Met His Cys Ala Val Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro		
245	250	255
Ile Gly Gln Cys Leu Cys Gln Ala Gly Tyr Glu Lys Val Glu Asp Ala		
260	265	270
Cys Gln Ala Cys Ser Pro Gly Phe Phe Lys Phe Glu Ala Ser Glu Ser		
275	280	285
Pro Cys Leu Glu Cys Pro Glu His Thr Leu Pro Ser Pro Glu Gly Ala		
290	295	300
Thr Ser Cys Glu Cys Glu Glu Gly Phe Phe Arg Ala Pro Gln Asp Pro		
305	310	315
Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro His Tyr Leu Thr		
325	330	335
Ala Val Gly Met Gly Ala Lys Val Glu Leu Arg Trp Thr Pro Pro Gln		
340	345	350
Asp Ser Gly Gly Arg Glu Asp Ile Val Tyr Ser Val Thr Cys Glu Gln		
355	360	365
Cys Trp Pro Glu Ser Gly Glu Cys Gly Pro Cys Glu Ala Ser Val Arg		
370	375	380
Tyr Ser Glu Pro Pro His Gly Leu Thr Arg Thr Ser Val Thr Val Ser		
385	390	395
Asp Leu Glu Pro His Met Asn Tyr Thr Phe Thr Val Glu Ala Arg Asn		
405	410	415
Gly Val Ser Gly Leu Val Thr Ser Arg Ser Phe Arg Thr Ala Ser Val		
420	425	430

Ser Ile Asn Gln Thr Glu Pro Pro Lys Val Arg Leu Glu Gly Arg Ser		
435	440	445
Thr Thr Ser Leu Ser Val Ser Trp Ser Ile Pro Pro Pro Gln Gln Ser		
450	455	460
Arg Val Trp Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Arg Lys Lys Gly Asp Ser Asn		
465	470	475 480
Ser Tyr Asn Val Arg Arg Thr Glu Gly Phe Ser Val Thr Leu Asp Asp		
	485	490 495
Leu Ala Pro Asp Thr Thr Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Leu Thr Gln		
	500	505 510
Glu Gly Gln Gly Ala Gly Ser Lys Val His Glu Phe Gln Thr Leu Ser		
	515	520 525
Pro Glu Gly Ser Gly Asn Leu Ala Val Ile Gly Gly Val Ala Val Gly		
	530	535 540
Val Val Leu Leu Leu Val Leu Ala Gly Val Gly Phe Phe Ile His Arg		
545	550	555 560
Arg Arg Lys Asn Gln Arg Ala Arg Gln Ser Pro Glu Asp Val Tyr Phe		
	565	570 575
Ser Lys Ser Glu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Thr Tyr Val Asp Pro His		
	580	585 590
Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala Val Leu Lys Phe Thr Thr Glu Ile		
	595	600 605
His Pro Ser Cys Val Thr Arg Gln Lys Val Ile Gly Ala Gly Glu Phe		
610	615	620
Gly Glu Val Tyr Lys Gly Met Leu Lys Thr Ser Ser Gly Lys Lys Glu		
625	630	635 640
Val Pro Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Ala Gly Tyr Thr Glu Lys Gln		
	645	650 655
Arg Val Asp Phe Leu Gly Glu Ala Gly Ile Met Gly Gln Phe Ser His		
	660	665 670
His Asn Ile Ile Arg Leu Glu Gly Val Ile Ser Lys Tyr Lys Pro Met		
	675	680 685
Met Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn Gly Ala Leu Asp Lys Phe Leu		
	690	695 700
Arg Glu Lys Asp Gly Glu Phe Ser Val Leu Gln Leu Val Gly Met Leu		
705	710	715 720
Arg Gly Ile Ala Ala Gly Met Lys Tyr Leu Ala Asn Met Asn Tyr Val		
	725	730 735
His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Asn Ser Asn Leu Val		

740	745	750
Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg Val Leu Glu Asp Asp Pro		
755	760	765
Glu Ala Thr Tyr Thr Thr Ser Gly Gly Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr		
770	775	780
Ala Pro Glu Ala Ile Ser Tyr Arg Lys Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val		
785	790	795
Trp Ser Phe Gly Ile Val Met Trp Glu Val Met Thr Tyr Gly Glu Arg		
805	810	815
Pro Tyr Trp Glu Leu Ser Asn His Glu Val Met Lys Ala Ile Asn Asp		
820	825	830
Gly Phe Arg Leu Pro Thr Pro Met Asp Cys Pro Ser Ala Ile Tyr Gln		
835	840	845
Leu Met Met Gln Cys Trp Gln Gln Glu Arg Ala Arg Arg Pro Lys Phe		
850	855	860
Ala Asp Ile Val Ser Ile Leu Asp Lys Leu Ile Arg Ala Pro Asp Ser		
865	870	875
Leu Lys Thr Leu Ala Asp Phe Asp Pro Arg Val Ser Ile Arg Leu Pro		
885	890	895
Ser Thr Ser Gly Ser Glu Gly Val Pro Phe Arg Thr Val Ser Glu Trp		
900	905	910
Leu Glu Ser Ile Lys Met Gln Gln Tyr Thr Glu His Phe Met Ala Ala		
915	920	925
Gly Tyr Thr Ala Ile Glu Lys Val Val Gln Met Thr Asn Asp Asp Ile		
930	935	940
Lys Arg Ile Gly Val Arg Leu Pro Gly His Gln Lys Arg Ile Ala Tyr		
945	950	955
Ser Leu Leu Gly Leu Lys Asp Gln Val Asn Thr Val Gly Ile Pro Ile		
965	970	975

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 7

aaaaagctta tggagctcca ggcagcccg 30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 8

aaagggccct cagttgccag atccctccgg 30

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 9

caccatggag ctggcggcct tg 22

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 10

tcccactggc acgtccagac c 21

<210> 11

<211> 3804

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 11

ccgcggccgc ccccttcacc atggagctgg cggccttggtg ccgctggggg ctctctctcg 60
ccctcttgcc ccccgagacc gcgagcacc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc 120
ggctccctgc cagtcccag acccacctgg acatgtctcg ccacctctac cagggctgcc 180
aggtgggtgca gggaaacctg gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc 240
tgcaggatat ccaggaggtg cagggtctacg tgctcatcgc tcacaaccaa gtgaggcagg 300
tcccactgca gaggtgcgg attgtgcgag gcaccagct ctttgaggac aactatgccc 360
tggccgtgct agacaatgga gaccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc 420
caggaggcct gcgggagctg cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaag ggaggggtct 480
tgatccagcg gaacccccag ctctgtctacc aggacacgat tttgtggaag gacatcttcc 540
acaagaacaa ccagctggct ctcaactga tagacaccaa ccgctctcgg gcctgccacc 600
cctgttctcc gatgtgtaag ggctcccgt gctggggaga gagttctgag gattgtcaga 660
gcctgacgcg cactgtctgt gccggtggct gtgcccgtg caaggggcca ctgcccactg 720

actgctgcca tgagcagtgt gctgccggct gcacggggccc caagcactct gactgcctgg 780
 cctgcctcca cttcaaccac agtggcatct gtgagctgca ctgcccagcc ctggtcacct 840
 acaacacaga cacgtttgag tccatgcccc atcccaggagg ccggtataca ttcggcgcca 900
 gctgtgtgac tgccgtgtccc tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc tgcaccctcg 960
 tctgccccct gcacaaccaa gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt 1020
 gcagcaagcc ctgtgcccga gtgtgctatg gtctggggcat ggagcacttg cgagaggtga 1080
 gggcagttac cagtgccaat atccaggagt ttgctggctg caagaagatc tttgggagcc 1140
 tggcattttct gccggagagc tttgatgggg acccagcctc caacactgcc ccgctccagc 1200
 cagagcagct ccaagtgttt gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag 1260
 catggccgga cagcctgcct gacctcagcg tcttcagaa cctgcaagta atccggggac 1320
 gaattctgca caatggcgcc tactcgtgta ccctgcaagg gctgggcatac agctggctgg 1380
 ggctgcgctc actgagggaa ctgggcagtg gactggccct catccaccat aacaccacc 1440
 tctgcttcgt gcacacggtg ccctgggacc agctctttcg gaaccgcac caagctctgc 1500
 tccacactgc caaccggcca gaggacgagt gtgtgggcga gggcctggcc tgccaccagc 1560
 tgtgcgcccc agggcactgc tgggggtccag ggcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt 1620
 tccttcgggg ccaggagtgc gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc cccaggagct 1680
 atgtgaatgc caggcactgt ttgccgtgcc accctgagtgc tcagccccag aatggctcag 1740
 tgacctgttt tggaccggag gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc 1800
 ccttctgcgt ggcccgtgc cccagcggtg tgaacctga cctctcctac atgcccactc 1860
 ggaagtttcc agatgaggag ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct 1920
 gtgtggacct ggatgacaag ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca 1980
 tcatctctgc ggtgggtggc attctgctgg tcgtggtctt ggggggtggtc tttgggatcc 2040
 tcatcaagcg acggcagcag aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa 2100
 cggagctggg ggagccgctg acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga 2160
 tcctgaaaga gacggagctg aggaaggtga aggtgcttgg atctggcgct tttggcacag 2220
 tctacaaggg catctggatc cctgatgggg agaattgtgaa aattccagtg gccatcaaag 2280
 tgttgaggga aaacacatcc cccaaagcca acaaagaaat cttagacgaa gcatacgtga 2340
 tggctggtgt gggctcccca tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg 2400
 tgcagctggg gacacagctt atgccctatg gctgcctctt agaccatgtc cgggaaaacc 2460
 gcggacgcct gggctcccag gacctgctga actggtgtat gcagattgcc aaggggatga 2520
 gctacctgga ggatgtgcgg ctcgtacaca gggacttggc cgctcggaac gtgctggtca 2580
 agagtcccaa ccatgtcaaa attacagact tcgggctggc tcggctgctg gacattgacg 2640
 agacagagta ccatgcagat gggggcaagg tgcccatcaa gtggatggcg ctggagtcca 2700
 ttctccgccg gcggttcacc caccagagtg atgtgtggag ttatggtgtg actgtgtggg 2760
 agctgatgac ttttggggcc aaaccttacg atgggatccc agcccgggag atccctgacc 2820
 tgctggaaaa gggggagcgg ctgccccagc ccccatctg caccattgat gtctacatga 2880
 tcatggtcaa atgttgatg attgactctg aatgtcgcc aagattccgg gagttggtgt 2940
 ctgaattctc ccgcatggcc agggaccccc agcgtttgt ggtcatccag aatgaggact 3000
 tgggcccagc cagtcccttg gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca 3060

tgggggacct ggtggatgct gaggagtatc tggtacccca gcagggttc ttctgtccag 3120
 accctgcccc gggcgctggg ggcatggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga 3180
 gtggcggtgg ggacctgaca ctagggctgg agccctctga agaggaggcc cccaggtctc 3240
 cactggcacc ctccgaagg gctggctccg atgtatttga tggtagacctg ggaatggggg 3300
 cagccaagg gctgcaaagc ctccccacac atgaccccag ccctctacag cggtacagtg 3360
 aggaccccac agtaccctg ccctctgaga ctgatggcta cgttgcccc ctgacctgca 3420
 gccccagcc tgaatatgtg aaccagccag atgttcggcc ccagccccct tcgccccgag 3480
 agggccctct gcctgctgcc cgacctgctg gtgccactct ggaaagggcc aagactctct 3540
 ccccaggga gaatggggtc gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc 3600
 ccgagtactt gacaccccag ggaggagctg cccctcagcc ccacctcct cctgccttca 3660
 gccagcctt cgacaacctc tattactggg accaggacce accagagcgg ggggctccac 3720
 ccagcacctt caaagggaca cctacggcag agaaccaga gtacctgggt ctggacgtgc 3780
 cagtgggaaa gggtagggcg gccg 3804

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 12

catccaggg tcacatgga gttagtttg 30

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 13

aagcagtgg atcaacgcag agt 23

<210> 14

<211> 348

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 14

cagatccagt tggtagcagc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
 tcttgcaagg gttctgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct 120
 ccaggaaagg gtttaaagt gatggcctgg ataaacaccg aactggaga gccaatatct 180
 gttgaagagt tcaaggacg gtttgcttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240
 ttgcagatca acaacctcac aaatgaggac acggctacat atttctgtgc aagatctatg 300

gggggctttg ctaactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 348

<210> 15

<211> 116

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 15

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Ala Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Ile Phe Val Glu Glu Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Met Gly Gly Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ala

115

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 16

agtccaactg ttcaggacgc cattttgtcg 30

<210> 17

<211> 324

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 17

gacattgtga tgactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtctct 60

ctttcctgca gggccagcca gaatattagc gactacttac actggtatca acaaaaatca 120

catgaatctc caaggcttct catcaaatat gcttcccaat ccatctctgg gatccctcc 180

aggttcagtg gcagtggatc agggtcagat ttcactctca ctatcaacag tgtggaacct 240

gaagatgttg caatgtatta ctgtcaaaat ggtcacacct ttcccacgtt cgggtgctggg 300
 accaagctgg agctgaaacg ggct 324

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 18

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Ser	Asp	Tyr
			20					25						30	
Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	His	Glu	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35				40						45		
Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Val	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Gly	His	Thr	Phe	Pro	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Ala				
			100						105						

<210> 19

<211> 360

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 19

gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc ccttaaactc 60
 tcctgtgaag cctctggatt cactttcagt gactattaca tgtattgggt tcggcagact 120
 ccggaaaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgatg atggtagttt caccactat 180
 ctagacagtg tgaaggggcg attcaccatc tccagagaca atgcccagaa caacctgtac 240
 ctccaaatga gtagtctgaa gtctgacgac acagccatgt attactgtgc aagagacggc 300
 tataggtacg acaggccggt tgcttactgg ggccaaggga ctctgggtcac tgtctctgca 360

<210> 20

<211> 120

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 20

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asp Asp Gly Ser Phe Thr His Tyr Leu Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Asn Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Tyr Arg Tyr Asp Arg Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 21

<211> 327

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 21

gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtccgc 60
 atcacctgca aggccagtca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca acaaaaacca 120
 gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtcctgat 180
 cgattcacag gcagtggatc tgggacagat tattctctca ccatcagcag tgtgcaggct 240
 gaagacctgg cactttatta ctgtcaacaa cattatagca ctccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggagataaa acgggct 327

<210> 22

<211> 109

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 22

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Arg Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65	70	75	80
Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Tyr			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala			
100	105		

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 23

Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 24

Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Ile Phe Val Glu Glu Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 25

Ser Met Gly Gly Phe Ala Asn

1 5

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 26

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ser Asp Tyr Leu His

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 27

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1 5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 28

Gln Asn Gly His Thr Phe Pro Thr

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 29

Asp Tyr Tyr Met Tyr

1 5

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 30

Thr Ile Ser Asp Asp Gly Ser Phe Thr His Tyr Leu Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 31

Asp Gly Tyr Arg Tyr Asp Arg Pro Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 32

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 33

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

1

5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 34

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr

1

5

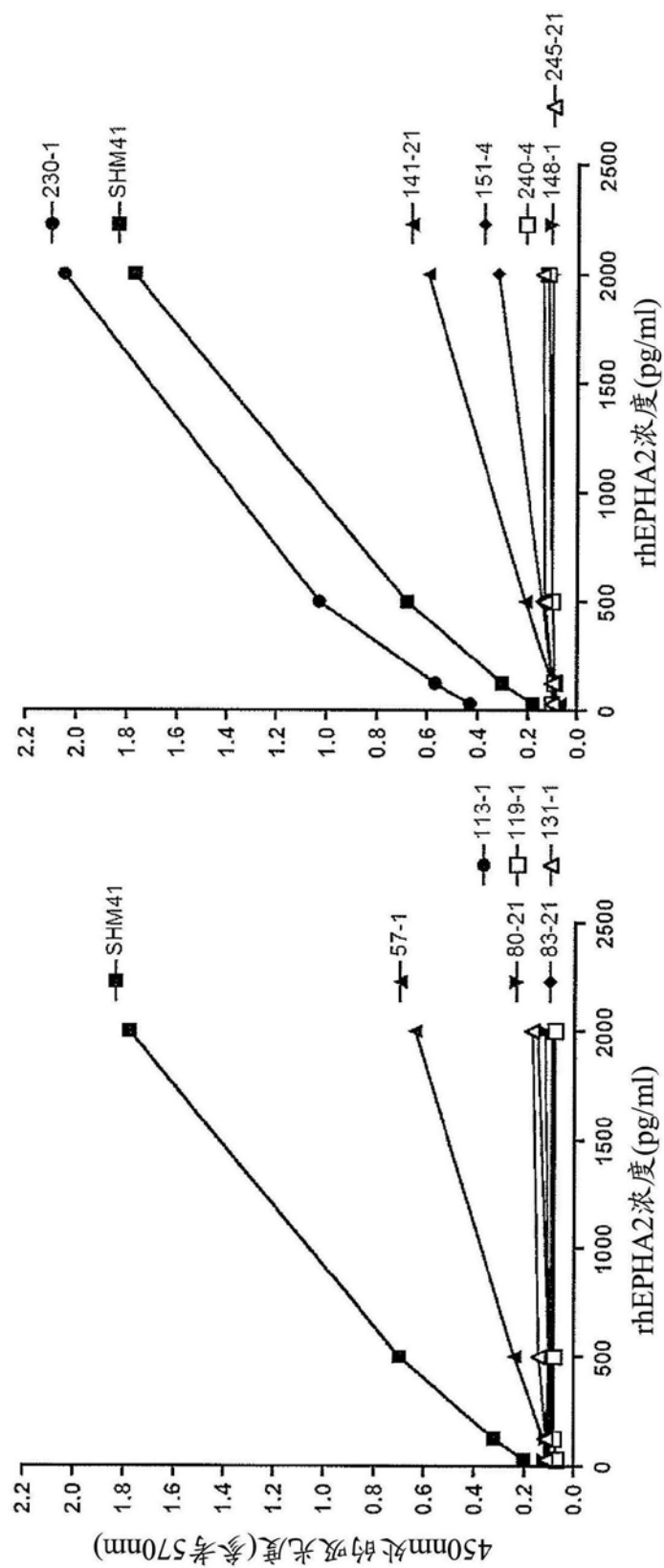


图1

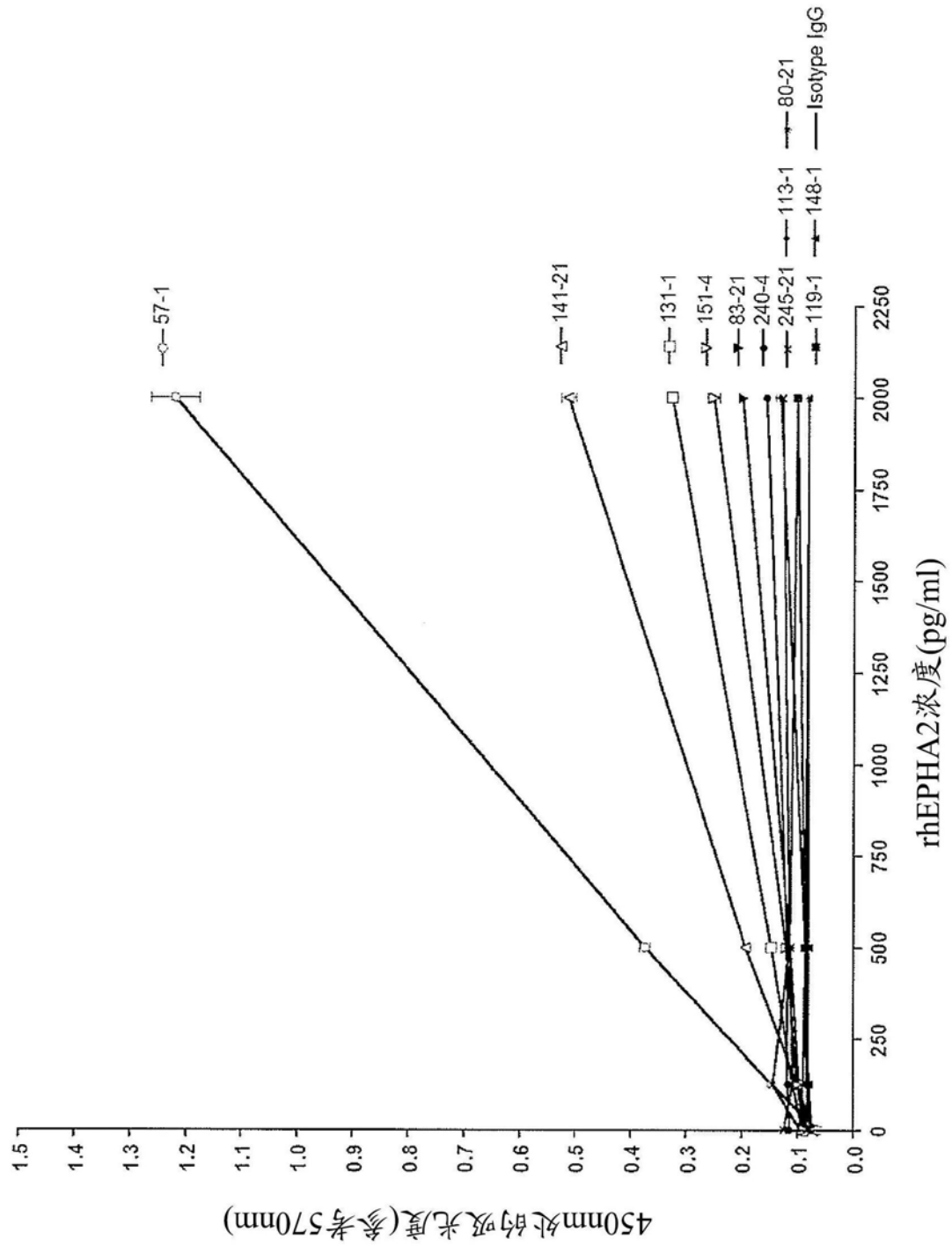


图2

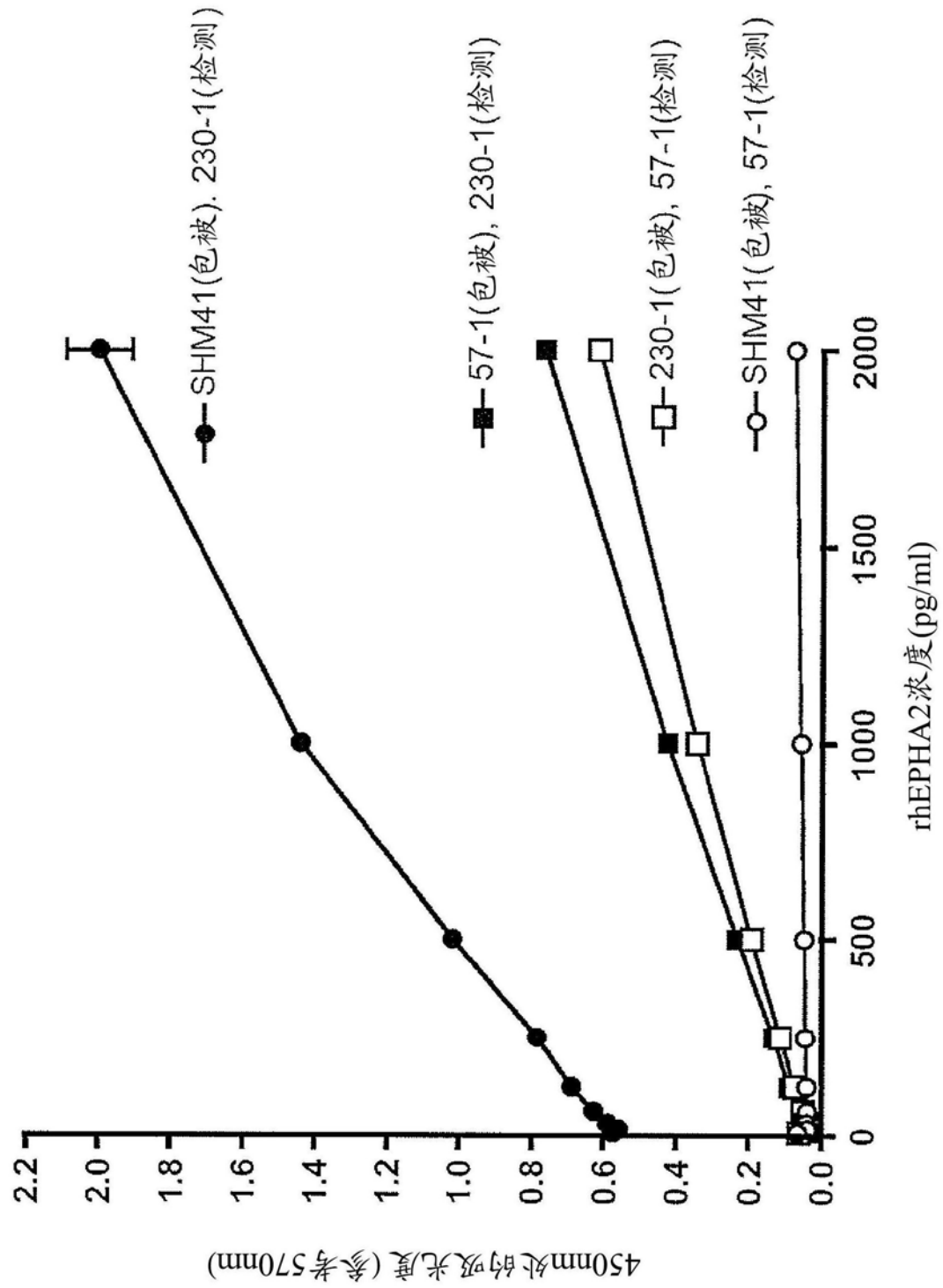


图3

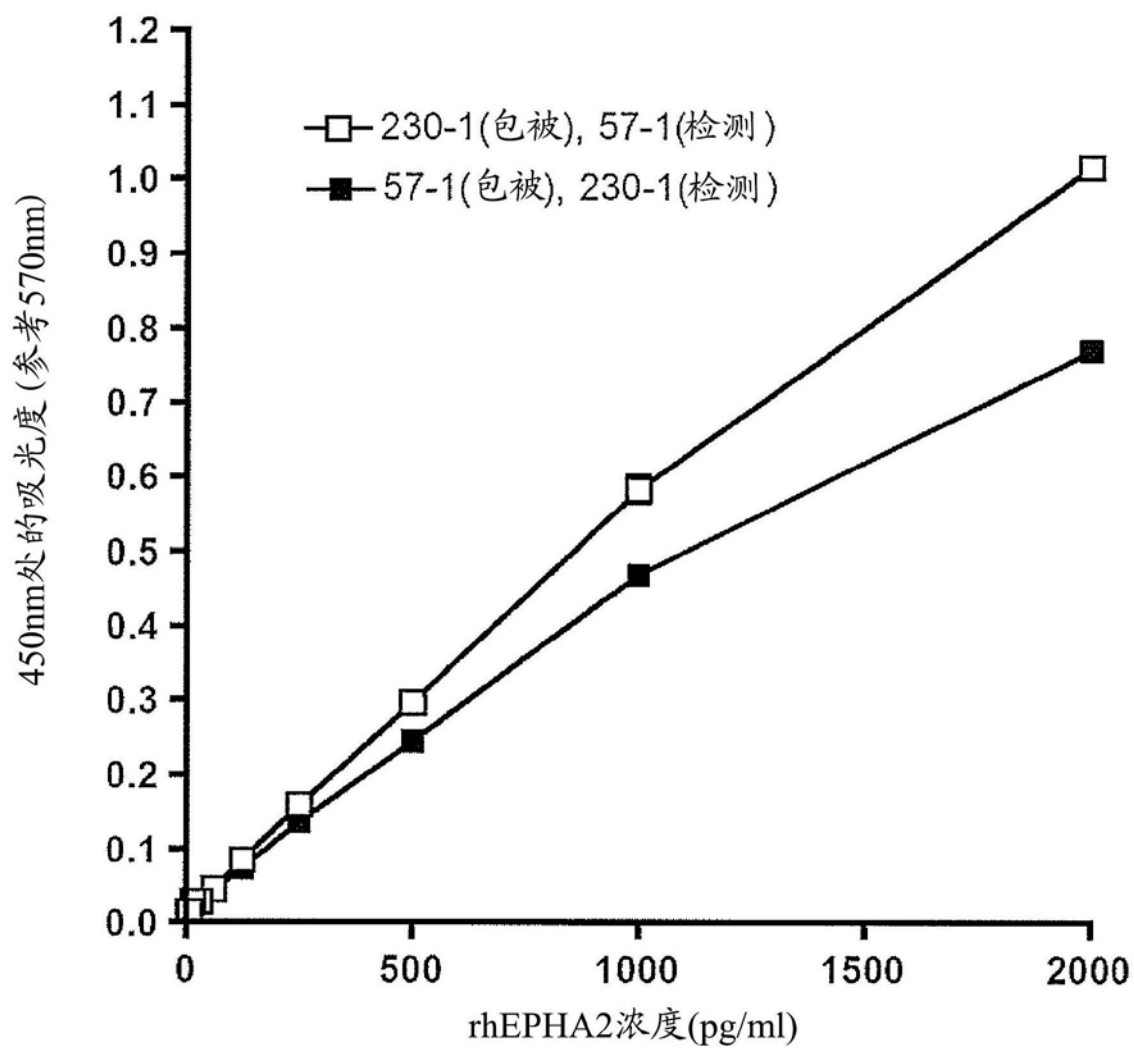


图4

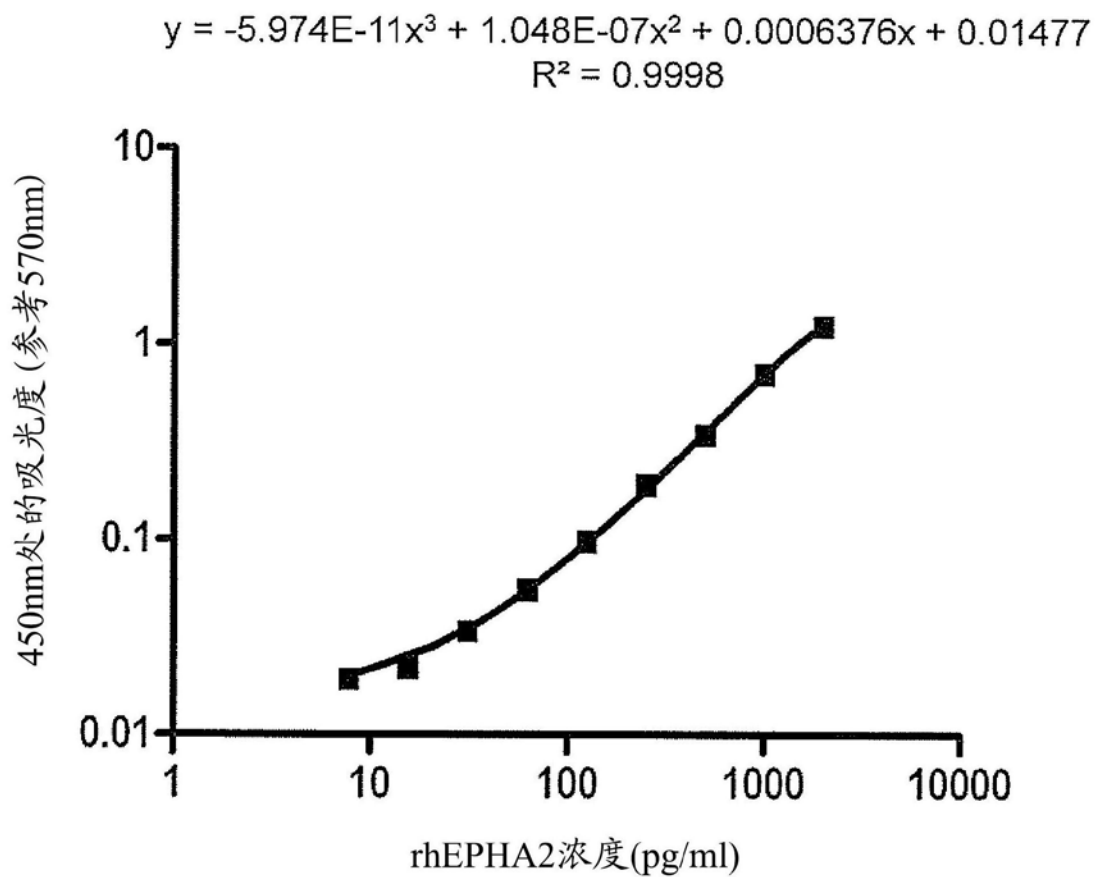


图5

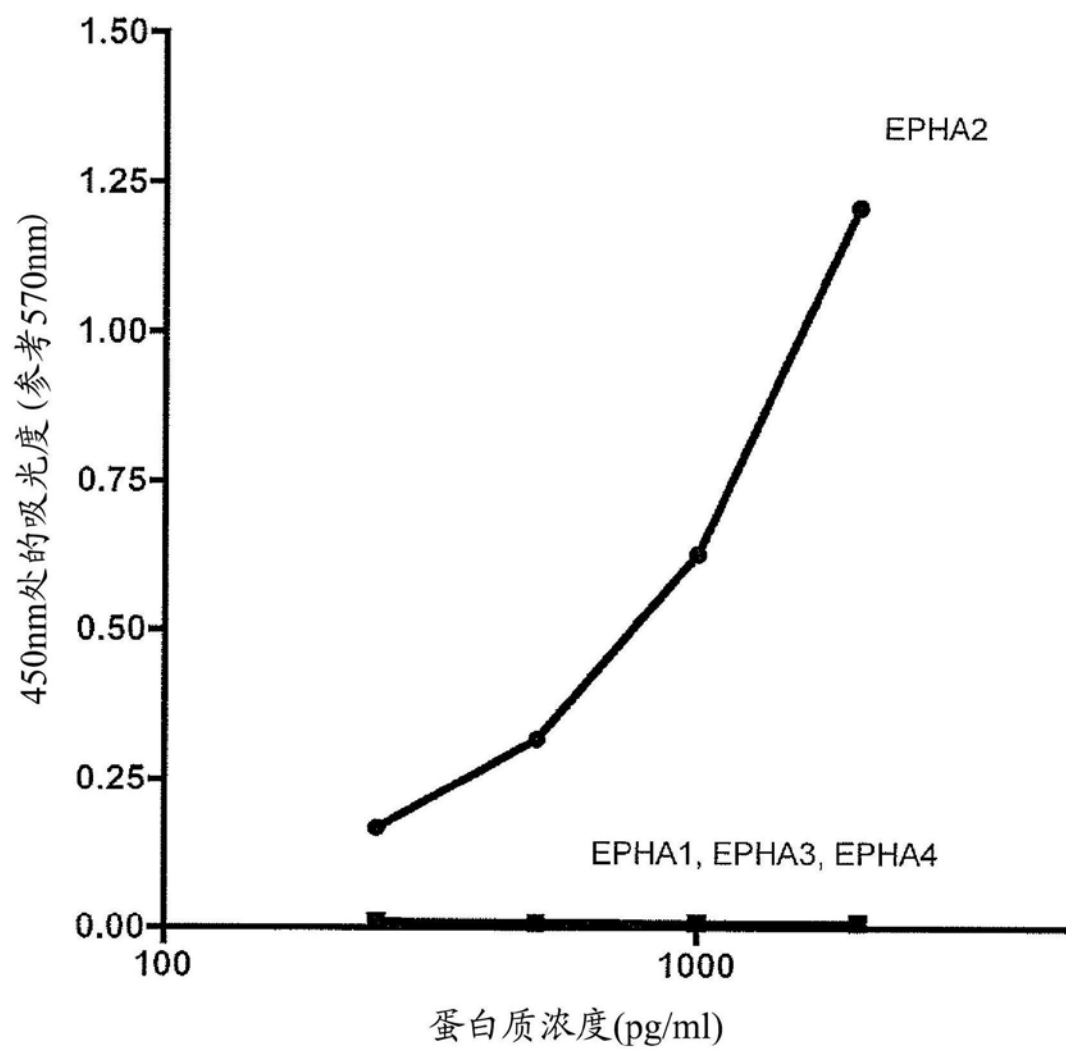


图6

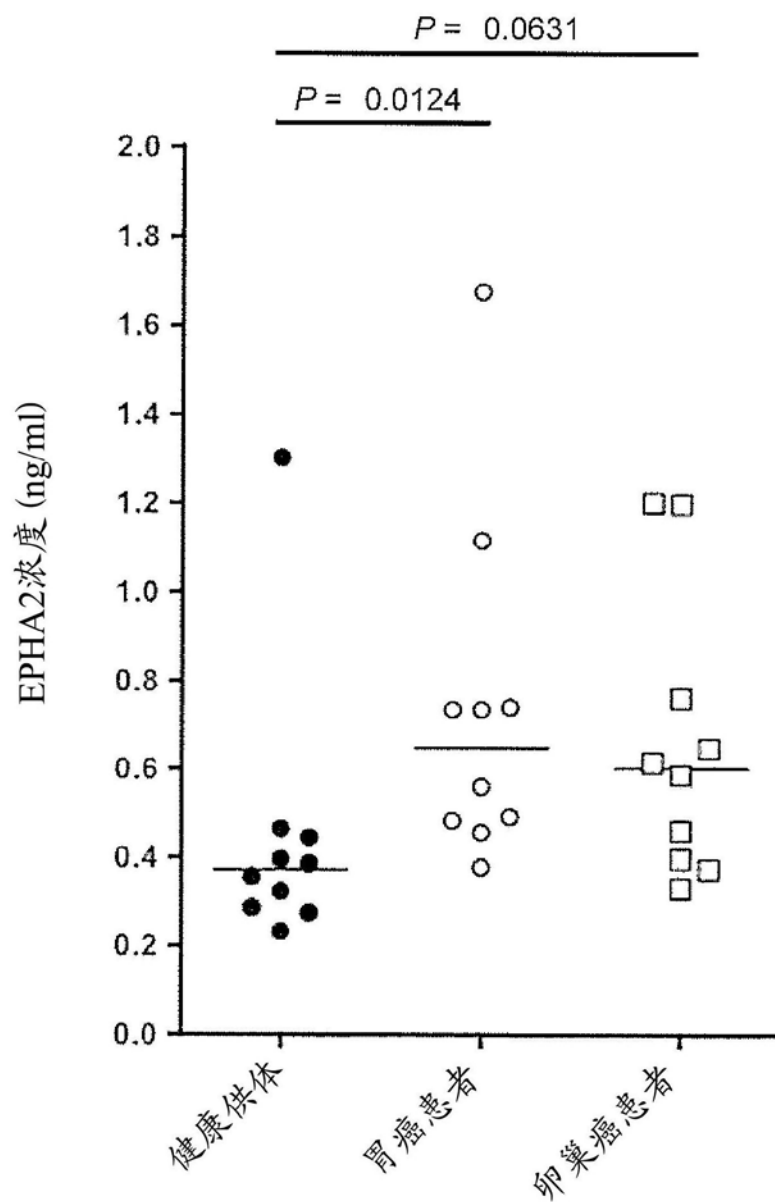


图7-1

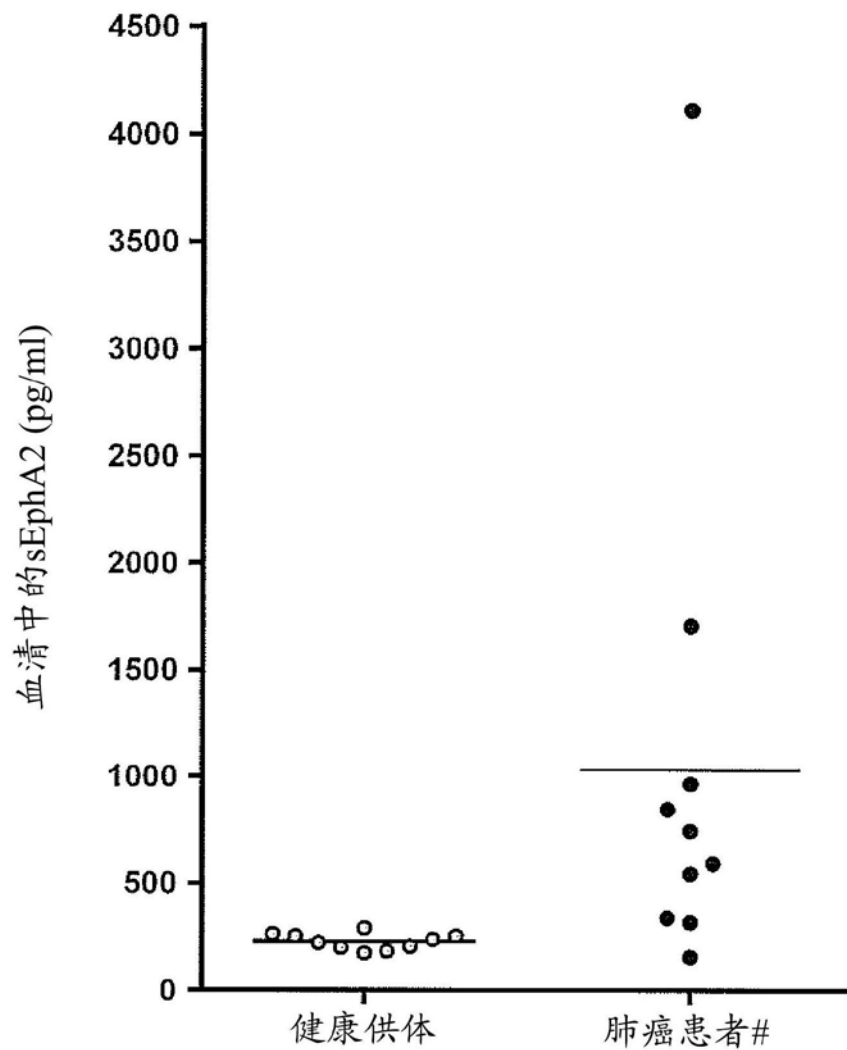


图7-2

编码小鼠抗EPhA2抗体57-1重链可变区的cDNA核苷酸序列
(SEQ ID NO: 14)

```

cagatccagttggtgcagtcctggacctgagctgaagaagcctggagagacagtcaagatc
tcctgcaaggggttctgggtataccttcacaaactatggaatgaactgggtgaagcaggct
ccaggaaaggggtttaaagtggatggcctggataaacacgacactggagagccaatatatt
gttgaagagttcaagggacggtttgccttctctttggaaacctctgccagcactgcctat
ttgcagatcaacaacctcacaatgaggacacggctacatatctgtgtgcaagatctatg
gggggctttgctaactggggccaagggaactctggtcactgtctctgca

```

图8

小鼠抗EPHA2抗体57-1重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO: 15)

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKGSGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMWINTDTGEPIF
VEEFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLTNEDTATYFCARSMGGFANWGQGLVTVSA

图9

编码小鼠抗EPHA2抗体57-1轻链可变区的cDNA核苷酸序列
(SEQ ID NO: 17)

gacattgtgatgactcagtcctccagccaccctgtctgtgactccaggagatagagtctct
ctttcctgcagggccagccagaatattagcgactacttacactgggtatcaacaaaaatca
catgaatctccaaggcttctcatcaaatatgcttcccaatccatctctgggatcccctcc
aggttcagtggtcagtggtcagggtcagatttcactctcactatcaacagtggtggaacct
gaagatgttgcaatgtattactgtcaaaatggtcacacctttcccacgttcggtgctggg
accaagctggagctgaaacgggct

图10

小鼠抗EPHA2抗体57-1轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO: 18)

DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNI SDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPS
RFSGSGSGSDFTLTINSVEPEDVAMYQCNGHTFPTFGAGTKLELKRA

图11

编码小鼠抗EPHA2抗体230-1重链可变区的cDNA核苷酸序列
(SEQ ID NO: 19)

gaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggaggggtcccttaaactc
tcctgtgaagcctctggattcactttcagtgactattacatgtattgggttcggcagact
ccggaaaagaggctggagtgggtcgcaaccattagtgatgatggtagtttcaccactat
ctagacagtgtgaaggggcgattcaccatctccagagacaatgccagaacaacctgtac
ctccaaatgagtagtctgaagtctgacgacacagccatgtattactgtgcaagagacggc
tatagggtacgacaggccgtttgcttactggggccaagggactctgggtcactgtctctgca

图12

小鼠抗EPHA2抗体230-1重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO: 20)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCEASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATISDDGSFTHY
LDSVKGRFTISRDNQNNLYLQMSSLKSDDTAMYICARDGYRYDRPFAYWGQGTLLVTVSA

图13

编码小鼠抗EPHA2抗体230-1轻链可变区的cDNA核苷酸序列
(SEQ ID NO: 21)

gacattgtgatgacccagtcctcacaattcatgtccacatcagtaggagacaggggccgc
atcacctgcaaggccagtcaggatgtgaatactgctgtagcctggtatcaacaaaaacca
gggcaatctcctaaactactgatttactgggcatccaccggcacactggagtcctgat
cgattcacaggcagtggtatctgggacagattattctctcaccatcagcagtggtgcaggct
gaagacctggcactttattactgtcaacaacattatagcactccgtacacgttcggaggg
gggaccaagctggagataaaaacgggct

图14

小鼠抗EPHA2抗体230-1轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO: 22)

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVRITCKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPD
RFTGSGSGTDYSLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPYTFGGGTKLEIKRA

图15

SEQ ID NO: 23: 小鼠抗EPHA2抗体57-1的CDRH1的氨基酸序列
NYGMN

SEQ ID NO: 24: 小鼠抗EPHA2抗体57-1的CDRH2的氨基酸序列
WINTDTGEPIFVEEFKG

SEQ ID NO: 25: 小鼠抗EPHA2抗体57-1的CDRH3的氨基酸序列
SMGGFAN

SEQ ID NO: 26: 小鼠抗EPHA2抗体57-1的CDRL1的氨基酸序列
RASQNISDYLH

SEQ ID NO: 27: 小鼠抗EPHA2抗体57-1的CDRL2的氨基酸序列
YASQSI

SEQ ID NO: 28: 小鼠抗EPHA2抗体57-1的CDRL3的氨基酸序列
QNGHTFPT

图16

SEQ ID NO: 29: 小鼠抗EPHA2抗体230-1的CDRH1的氨基酸序列
DYMY

SEQ ID NO: 30: 小鼠抗EPHA2抗体230-1的CDRH2的氨基酸序列
TISDDGSFTHYLDVKG

SEQ ID NO: 31: 小鼠抗EPHA2抗体230-1的CDRH3的氨基酸序列
DGYRYDRPFAY

SEQ ID NO: 32: 小鼠抗EPHA2抗体230-1的CDRL1的氨基酸序列
KASQDVNTAVA

SEQ ID NO: 33: 小鼠抗EPHA2抗体230-1的CDRL2的氨基酸序列
WASTRHT

SEQ ID NO: 34: 小鼠抗EPHA2抗体230-1的CDRL3的氨基酸序列
QQHYSTPYT

图17

专利名称(译)	抗EPHA2抗体和使用该抗EPHA2抗体的EPHA2免疫检测		
公开(公告)号	CN110198956A	公开(公告)日	2019-09-03
申请号	CN201880008054.9	申请日	2018-01-22
[标]发明人	加藤和则 我妻利纪 长谷川纯		
发明人	加藤和则 我妻利纪 长谷川纯		
IPC分类号	C07K16/28 C07K16/46 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/574 C12N15/09		
CPC分类号	C07K16/28 C07K16/46 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/574 C07K16/2866 G01N33/563		
代理人(译)	李敏春 郑霞		
优先权	2017009349 2017-01-23 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种EPHA2特异性抗体。一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体，或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段，其含有由SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:22所示的轻链可变区；以及一种特异性结合EPHA2的单克隆抗体，或者特异性结合EPHA2的所述单克隆抗体的功能性片段，其含有由SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:18所示的轻链可变区。

