

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480000251.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 15/02 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 1 月 18 日

[11] 公开号 CN 1723391A

[22] 申请日 2004.1.7

[21] 申请号 200480000251.4

[30] 优先权

[32] 2003. 1. 8 [33] JP [31] 001891/2003

[86] 国际申请 PCT/JP2004/000030 2004.1.7

[87] 国际公布 WO2004/063750 日 2004.7.29

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.22

[71] 申请人 住友电气工业株式会社

地址 日本大阪府大阪市

[72] 发明人 武部京子 平井洋平

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 曹 雯 王景朝

权利要求书 1 页 说明书 15 页 序列表 11 页  
附图 2 页

[54] 发明名称

毛发生长促进活性的评价方法

[57] 摘要

本发明的目的在于提供毛发生长促进活性评价的方法,该方法使用在评价毛发生长促进活性时有用、可特异性识别存在于上皮新生毛囊中的抗原的抗体;还提供含有上述抗体的毛发生长促进活性评价试剂盒。本发明提供使用对含有序列表中 SEQ ID No. 1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的抗体或其片段进行毛发生长促进活性评价的方法。

1. 毛发生长促进活性的评价方法，该方法采用对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的抗体或其片段。

2. 权利要求 1 的毛发生长促进活性的评价方法，该方法使用将  
5 含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质对除人以外的动物进行免疫而得到的抗体或其片段。

3. 权利要求 1 的毛发生长促进活性的评价方法，该方法包括：  
在受试物质存在下培养来自生物体的皮肤组织片的步骤；  
回收该皮肤组织片，使其与对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基  
10 酸序列的蛋白质进行识别的抗体或其片段反应的步骤；以及  
检出或测定与皮肤组织片反应的该抗体或其片段的步骤。

4. 权利要求 3 的毛发生长促进活性的评价方法，该方法使用将  
含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质对除人以外的动物进行免疫而获得的抗体或其片段。

15 5. 毛发生长促进活性评价试剂盒，该试剂盒包含对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的抗体或其片段。

6. 权利要求 5 的毛发生长促进活性评价试剂盒，该试剂盒包含  
将含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质对除人以外的动物进行免疫而获得的抗体或其片段。

## 毛发生长促进活性的评价方法

## 技术领域

5 本发明涉及使用上皮新生毛囊特异性抗体进行毛发生长促进活性评价的方法，以及含有该抗体的毛发生长促进活性评价试剂盒。

## 背景技术

有证据显示上皮组织正常形态的形成，受到来自存在于上皮组织周围的间充质细胞的因子控制，另外，因上皮组织形态形成的异常而产生的疾病大多起因于间充质细胞的异常，因此，人们对阐明间充质细胞控制上皮组织的形态形成的机理产生了很大兴趣。但是，与上皮组织形态形成的控制有关的物质群在复杂的系统中，受时间上和空间上的控制而表达，分离这些物质并分析其机能是极为困难的，另外，将上皮组织的形态形成构建成单纯的模型试验系统也是很难的，因此，该领域的研究至今未见有大的进展。为了阐明起因于上皮组织的形态形成的疾病的发病机理、以及确立这些疾病的治疗方法等，人们急切盼望能够阐明上皮组织形态形成的控制机理。

在这种状况下，人们分离并纯化了与上皮组织形态形成的控制有关的上皮形成素（EP0562123 号公报）。明确了该物质是以由 277-289 个氨基酸构成的蛋白质为核心蛋白的生理活性物质，主要由间充质细胞生物合成获得。另外还阐明了：上皮形成素具有作用于上皮细胞，促进上皮组织的形态形成的作用，以及上皮形成素不发挥作用时，则不进行正常的组织形成。

关于上皮形成素的结构，发现上皮形成素分子在结构上分成 4 个大的片段（欧洲专利公开第 0698666 号）。即，构成上皮形成素全长的多肽由 N 末端一侧起可分为卷曲螺旋区（1）、功能域（2）、卷曲螺旋区（3）、以及 C 末端的疏水区。这些片段中，关于功能域（人上皮形成素中由 N 末端起第 104 号至第 187 号氨基酸所特定的区），显示该区与细胞粘着有关，与上皮形成素的生理活性的表达有密切关系（上述欧洲专利公开）。

上皮形成素具有促进正常的形态形成的作用，因此该物质有望用作预防或治疗起因于形态形成异常的疾病等的药物、或毛发生长促进

剂等药物的活性组分。

但是，由哺乳动物得到的天然型上皮形成素难溶于生理盐水等水性介质中，难以作为药物实际应用。因此，人们尝试制备实质上保持有天然上皮形成素的形态形成促进作用，且溶解性优异的上皮形成素衍生物。例如国际公开 WO 01/94382 公开了 pep7 作为具有上述毛发生长促进活性的肽。在尝试制备这样新型的上皮形成素衍生物过程中，对于毛发生长促进活性的评价是不可或缺的。

用于评价毛发生长促进活性的具体的方法有以下方法。已知 C3H 或 C57BL/6 小鼠在出生后 45 天至 95 天前后有持续约 50 天的毛发生长终期。皮肤的颜色在毛发生长终期为粉红色，在生长期为灰色或黑色，因此容易判定毛发周期。使用该小鼠，给予受试物质，评价其是否促进了向生长期的转变，由此可以评价毛发生长促进活性。但是，人们希望开发一种体外更简便且迅速地评价毛发生长促进活性的方法。

#### 15 发明内容

本发明的课题在于提供毛发生长促进活性评价的方法，该方法采用了在评价毛发生长促进活性时有用、可特异性识别存在于上皮新生毛囊中的蛋白质的抗体；以及含有上述抗体的毛发生长促进活性评价试剂盒。

20 本发明人为解决上述课题进行了深入地研究，成功地鉴定出在毛周期的生长期强烈表达、可用于判定毛发生长诱导活性的蛋白质的氨基酸序列，并通过使用该蛋白质的抗体，简便且迅速地评价毛发生长促进活性，从而完成了本发明。

25 即，本发明提供毛发生长促进活性评价的方法，该方法采用了对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的抗体或其片段。上述抗体中包含用含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质对除人以外的动物进行免疫而获得的抗体。

优选提供包括下述步骤的毛发生长促进活性评价方法：

在受试物质存在下培养来自生物体的皮肤组织片；

30 回收该皮肤组织片，使其与对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的抗体或其片段反应的步骤；以及

检出或测定与皮肤组织片反应的该抗体或其片段的步骤。上述抗

体中包含用含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质对除人以外的动物进行免疫而获得的抗体。

本发明的另一方面提供毛发生长促进活性评价试剂盒，该试剂盒包含对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的抗体或其片段。上述抗体中包含用含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质对除人以外的动物进行免疫而获得的抗体。

附图简述

图 1 表示本发明中使用的抗体所识别的抗原的部分序列。

图 2 表示用本发明的方法评价毛发生长促进活性的结果。

#### 10 实施发明的最佳方式

以下对本发明的实施方式进行详细说明。

(1) 使用对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的抗体或其片段进行的毛发生长促进活性评价的方法

本发明的毛发生长促进活性的评价方法是使用对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的抗体或其片段的方法，更具体地说，在受试物质存在下培养来自生物体的皮肤组织片，回收该皮肤组织片，使其与对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的抗体或其片段反应，检出或测定与皮肤组织片反应的该抗体或其片段，由此评价毛发生长促进活性。

具有有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质在数据库 (NCIB (GeneBank)) 中以登记号 XM\_177952 (小鼠，与毛透明蛋白相似) 登记，与人毛囊的毛根鞘蛋白毛透明蛋白具有一些同源性。该蛋白质的功能、表达至今尚未为人知，不过本发明证实其在生长期的毛囊中，表达特异性高。已知在生长期的毛囊中有高表达的其它蛋白质有毛发角蛋白、Hac1-1 等，将具有毛发生长诱导活性的物质加入皮肤组织的培养系统中，使用抗体研究它们的表达升高情况，发现培养系统中，通过添加毛发生长诱导物质，本发明的蛋白质的表达反应最为敏感(表达升高)。

本发明中使用的抗体的特征是：对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别。上述抗体中包含用含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质对除人以外的动物进行免疫而获得的抗体。

本发明中使用的抗体可以是单克隆抗体，也可以是多克隆抗体。本说明书中所述抗体，不仅指全长的抗体，也包括抗体的片段，抗体的片段优选功能性片断，例如有  $F(ab')_2$ 、 $Fab'$  等。

5  $F(ab')_2$ 、 $Fab'$  是将免疫球蛋白用蛋白质分解酶（例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶等）处理来制备，是对存在于铰链区中的 2 条 H 链之间的二硫键的前后进行消化而生成的抗体片段。并且，本说明书中所述的抗体片段也包括含有来自编码该抗体的基因的抗原结合部位的蛋白质。

例如，用木瓜蛋白酶处理 IgG1，则存在于铰链区中的 2 条 H 链之间的二硫键的上游被切断，由 VL（L 链的可变区）和 CL（L 链的恒定区）构成的 L 链、以及由 VH（H 链的可变区）和 CH $\gamma$ 1（L 链的恒定区中的  $\gamma$ 1 区）构成的 H 链片段，它们可以制备在 C 末端区通过二硫键结合的同源的 2 个抗体片段。这 2 个同源抗体片段分别称为  $Fab'$ 。另外，用胃蛋白酶处理 IgG，则存在于铰链区中的 2 条 H 链之间的二硫键的下游被切断，可制备比上述 2 个  $Fab'$  经铰链区连接的片段稍大的抗体片段。该抗体片段称为  $F(ab')_2$ 。

本发明中，上述抗体可以作为固定于固相载体等不溶性载体上的固定化抗体使用，也可以作为用标记物标记的标记抗体使用。固定化抗体是指通过物理吸附或化学键等，担载于不溶性载体上的状态的抗体。20 这些固定化抗体可用于检出、定量、分离或纯化试样（例如体毛、毛囊或它们的提取物等）中含有的抗原（含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质）。可用于固定抗体的不溶性载体例如有（1）由聚苯乙烯树脂、聚碳酸酯树脂、硅树脂或尼龙树脂等构成的塑料、或玻璃等所代表的、有水不溶性物质构成的板、试管或管子等具有内25 容积的载体，珠，球，滤器或膜等，以及（2）纤维素类载体、琼脂糖类载体、聚丙烯酰胺类载体、葡聚糖类载体、聚苯乙烯类载体、聚乙烯醇类载体、聚氨基酸类载体或多孔性二氧化硅系载体等可用于亲和层析的不溶性载体。

标记抗体是指用标记物标记的抗体，这些标记抗体可用于检出获30 定量试样（例如体毛、毛囊或它们的提取物等）中含有的抗原（含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质）。可用于本发明的标记物只要是通过物理结合或化学键合等结合在抗体上，可以检测它们

的存在物质即可，并没有特别限定。标记物的具体例子有酶、荧光物质、化学发光物质、生物素、抗生物素蛋白或放射性同位素等，更具体地说，有过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、葡糖氧化酶、葡糖-6-磷酸脱氢酶、醇脱氢酶、苹果酸脱氢酶、青霉素酶、过氧化氢酶、脱辅基葡糖氧化酶、脲酶、萤光素酶或乙酰胆碱酯酶等酶；  
5 异硫氰酸荧光素、藻胆蛋白、稀土类金属螯合剂、丹磺酰氯或四甲基罗丹明异氰酸酯等荧光物质； $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$  或  $^{131}\text{I}$  等放射性同位素；生物素；抗生物素蛋白；或化学发光物质。标记物与抗体的结合方法可以采用戊二醛法、马来酰亚胺法、吡啶二硫化物法或高碘酸法等公  
10 知的方法。

这里，放射性同位素和荧光物质可以产生可单独检测的信号，但酶、化学发光物质、生物素和抗生物素蛋白不会产生可单独检测的信号，因此通过与另一种或以上的物质反应，来产生可检测的信号。例如，当使用酶时，至少需要底物，根据测定酶活性的方法（比色法、  
15 荧光法或化学发光法等），可使用各种底物。另外，当使用生物素时，通常至少与抗生物素蛋白或酶修饰的抗生物素蛋白反应。根据需要，还可以根据该底物使用各种显色物质。

本发明中使用的抗体为单克隆抗体时，可使用杂交瘤制备该单克隆抗体。杂交瘤可通过如下所述的常规方法制备。

20 首先，以具有序列表中 SEQ ID No. 1 的氨基酸序列的蛋白质或含有该蛋白质的试样（由生长期的皮肤采集毛，由其中提取蛋白质和/或生长期的触须毛囊等）作为免疫原，免疫哺乳动物，由此在动物体内制备抗体生成细胞。对于哺乳动物的种类没有特别限定，通常有小鼠、大鼠、牛、兔、山羊、绵羊等，优选小鼠、大鼠、兔等啮齿类，  
25 更优选小鼠或大鼠。小鼠的例子有 A/J 系统、BALB/C 系统、DBA/2 系统、C57BL/6 系统、C3H/He 系统、SJL 系统、NZB 系统、CBA/JNCrj 系统的小鼠。BALB/C 系统的小鼠在制备杂交瘤时，可构建来自同一系统的骨髓瘤的细胞株，因而优选。

30 免疫前，为了增强免疫应答，免疫原可以与佐剂混合。佐剂的例子有油包水型乳剂（例如不完全弗氏佐剂）、水包油包水型乳剂、水包油型乳剂、脂质体、氢氧化铝凝胶、二氧化硅佐剂、粉末皂土和木薯粉佐剂；除此之外还有 BCG、疮疱丙酸杆菌（propionibacterium

acnes)等菌体、细胞壁以及海藻糖二分支菌酸(TDM)等菌体成分;革兰阴性细菌的内毒素——脂多糖(LPS)和脂质A组分; $\beta$ -葡聚糖(多糖体);胞壁酰二肽(MDP);苯丁抑制素;左旋咪唑等合成化合物;胸腺激素、胸腺激素液性因子和 taftsin 等来自生物体成分的蛋白质或肽类物质;以及它们的混合物(例如完全弗氏佐剂)等。这些佐剂根据给予途径、给予量、给予时间等而显示对免疫应答的增强或抑制效果。并已证实:根据佐剂种类的不同,血液中相对于抗原的抗体生成、细胞免疫的诱导、免疫球蛋白的分类等有差异。因此,优选根据目标免疫应答来适当选择佐剂。通过佐剂进行处理的方法是本领域公知的。

哺乳动物的免疫按照本领域公知的方法进行。例如抗原注射于哺乳动物的皮下、皮内、静脉或腹腔。免疫应答根据接受免疫的哺乳动物的种类和系统而不同,因此免疫时间表可结合所用动物适当设定。抗原的给予要在初次免疫后反复进行几次。追加免疫例如可在初次免疫的4周后、6周后和半年后进行。

免疫后,由哺乳动物采血,对得到的血液进行测定,确定其毛囊结合活性的存在,由此确认在哺乳动物体内生成了毛囊抗体。测定方法有酶联免疫测定法(ELISA法)、放射免疫测定法(RIA)、荧光抗体法等公知的方法。

确认生成了毛囊结合性抗体后,为了使具有特异抗体生成能力的免疫细胞处于适合细胞融合的状态,可以进行加强(追加注射免疫原)。对于加强给予的免疫原的量没有特别限定,优选为初次免疫量的约4-5倍。通常可以使用免疫原和不完全弗氏佐剂的乳液进行加强。给予途径可从皮下、皮内、静脉或腹腔内适当选择。

最终免疫后,从接受了免疫的哺乳动物体内摘除脾细胞,使其与来自骨髓瘤的细胞株进行细胞融合。细胞融合时,优选使用繁殖能力高的细胞株,另外优选来自骨髓瘤的细胞株与来自要融合的脾细胞的哺乳动物具有适应性。来自小鼠骨髓瘤的细胞株有P3U1、P3X63-Ag8.653、Sp2/O-Ag14、FO.1、S194/5.XX0BU.1、P3/NS1/1-Ag4-1等。

细胞融合可按照本领域公知的方法进行。细胞融合的例子有聚乙二醇法、使用仙台病毒的方法、利用电流的方法等。

所得融合细胞可以按照本领域公知的条件使其繁殖。根据生成的

抗体的结合力来选择所希望的融合细胞。

由融合细胞产生的抗体的结合力可按照本领域公知的方法测定。本发明中，为了获得生成具有毛囊特异性且高结合力的抗体的融合细胞，根据与毛囊的结合力进行选择，克隆目标细胞株。抗体的结合力的测定与上述关于抗体生成的确认的方法一样，可使用 ELISA 法、RIA 法、荧光抗体法等方法进行测定。ELISA 法简便且灵敏度高，因而优选。

融合细胞的克隆可以适用本领域公知的方法进行。克隆方法有有限稀释法、软琼脂法等，有限稀释法操作简便、再现性高，因而优选。为了有效地从细胞融合得到的很多融合细胞中选择高效的有用的细胞，优选细胞的筛选在克隆初期阶段进行。这样，可以最终筛选出生成具有所希望的结合力的抗体的融合细胞株。

如上所述，通过大量培养筛选出的单克隆抗体生成细胞株，可以大量生成本发明中使用的单克隆抗体。单克隆抗体生成细胞株的大量培养的方法有体内或体外培养。在体内的大量培养的例子有：将融合细胞注射到哺乳动物的腹腔内，使其繁殖，在腹水中生成抗体的方法。体外培养时，将融合细胞在培养基中培养，在培养基中生成抗体。

可使用本领域公知的方法，由大量培养得到的腹水或培养上清中纯化本发明的单克隆抗体。为了纯化，可以将 DEAE 阴离子交换层析、亲和层析、硫酸铵分级分离法、PEG 分级分离法、乙醇分级分离法等适当组合使用。本发明的抗体可以纯化为约 90% 的纯度、优选约 95% 的纯度、更优选约 98% 的纯度。

使用对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的多克隆抗体时，该多克隆抗体的制备可以按照规定的方法进行。

例如多克隆抗体可如下获得：以具有有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质或含有该蛋白质的试样（由生长期的皮肤采集毛，由其中提取蛋白质和/或生长期的触须毛囊等）作为免疫原，免疫哺乳动物，使其致敏，由该哺乳动物采血，由采集的血液中分离、纯化抗体。例如：可以免疫小鼠、仓鼠、豚鼠、鸡、大鼠、兔、狗、山羊、绵羊、牛等哺乳动物。免疫致敏的方法是本行业人员所公知的，例如可通过给予 1 次或以上的抗原来进行。抗原的给予例如可以是间隔 7-30 天给予 2-3 次。给予量可以为每次给予约 0.05-2 mg 左右。给予途

径并没有特别限定，可以适当选择皮下给予、皮内给予、腹膜腔内给予、静脉内给予或肌内给予等，优选通过静脉、腹腔内或皮下注射给予。另外，抗原可以溶解于适当的缓冲液、例如含有完全弗氏佐剂或氢氧化铝等通常使用的佐剂的适当的缓冲液中，但根据给予途径、条件等，也可以不使用佐剂。

将免疫致敏的哺乳动物饲养一定期间，然后取该哺乳动物的血清，测定抗体滴度。如果抗体滴度升高，则例如使用 10  $\mu\text{g}$ -1000  $\mu\text{g}$  的抗原进行追加免疫。最终给予 1-2 个月后，由免疫致敏的哺乳动物中采血，将该血液通过离心，使用硫酸铵或聚乙二醇的沉淀，凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析等层析等常规方法进行分离纯化，可以多克隆抗血清的形式得到本发明的识别蛋白质的多克隆抗体。例如对血清在 56℃ 处理 30 分钟，可以使其补体系统失活。

本发明的毛发生长促进活性评价方法只要是使用上述抗体进行测定、即免疫测定即可，可以是任意的方法，例如有蛋白质印迹法、酶联免疫测定法 (ELISA)、荧光免疫测定法、放射免疫测定法 (RIA)、发光免疫测定法、免疫酶法、免疫荧光法、免疫比浊度法、乳胶凝集反应、乳胶比浊度法、红细胞凝集反应或颗粒凝集反应等。

接受本发明的评价方法的受试物质的种类并没有特别限定，可以是寡肽，也可以是低分子有机化合物。例如可以使用具有已证实具有毛发生长促进活性的上皮形成素的部分氨基酸序列的寡肽等。

通过酶联免疫测定法、荧光免疫测定法、放射免疫测定法或发光免疫测定法等使用标记抗体的免疫测定法而实施本发明的毛发生长促进活性的评价方法时，可通过夹心法或竞争法进行，通过夹心法进行时，只要固相抗体或标记抗体中的至少一种为本发明的抗体即可。

固相载体与固相抗体相关，可以使用本说明书中作为不溶性载体的具体例子而记载的载体。另外标记物与标记抗体相关，可以使用本说明书中记载的物质。

测定的操作方法可通过公知的方法 (北川常广等人编《蛋白质核酸酶另册 No. 31 酶联免疫测定法》，共立出版，1987 年等)。

例如，可使固相抗体与试样反应，同时与标记抗体反应，或洗涤后与标记抗体反应，形成固相抗体-抗原-标记抗体的复合物。然后洗涤分离未结合的标记抗体，由结合的标记抗体的量测定试样中的抗原

量。具体来说,采用酶联免疫测定法(ELISA)时,在最佳条件下使底物与标记酶反应,通过光学方法测定该反应产物的量。采用荧光免疫测定法时,测定荧光标记物产生的荧光强度;采用放射免疫测定法时,测定放射性标记物产生的放射线的量。采用发光免疫测定法时,测定发光反应系统产生的发光量。

通过用光学方法或用目视的测定方法对免疫比浊度法、乳胶凝集反应、乳胶比浊度法、红细胞凝集反应或颗粒凝集反应等生成的免疫复合物凝集物进行其透射光和散射光的测定,从而实施本发明的检出和/或定量方法时,采用目视测定方法时,可以使用磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris 缓冲液或 Good 缓冲液等作为溶剂,还可以使其含有聚乙二醇等反应促进剂或非特异性反应抑制剂。

使固相载体致敏来使用抗体时,固相载体可以使用由聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物、(甲基)丙烯酸酯类聚合物、乳胶、明胶、脂质体、微胶囊、红细胞、二氧化硅、氧化铝、碳黑、金属化合物、金属、陶瓷或磁性体等材质构成的颗粒。

该致敏方法可以使用物理吸附法、化学结合法或将这些方法联合使用等公知的方法。测定的操作法可通过公知的方法进行,例如通过光学方法进行测定时,使试样与抗体、或使试样与致敏了固相载体的抗体反应,通过终点法或比例法测定透射光或散射光。

另外,目视测定时,在孔板或微量滴定板等容器中,使试样与致敏固相载体的抗体反应,目视判定凝集的状态。也可以使用微量滴定板读数仪等机器测定,以代替目视测定。

## (2) 包含对含有序列表 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的抗体或其片段的毛发生长促进活性评价试剂盒

本发明的试剂盒含有对含有序列表 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的抗体或其片段。这里所述的单克隆抗体、多克隆抗体或其片段也可以是本说明书中所述的固定抗体或标记抗体。

例如,将含有本发明提供的对含有序列表 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的抗体作为初次抗体使用时,本发明的试剂盒中可以含有用于检出抗原抗体结合反应形成的复合物的二次抗体。为了可以高效且简便地利用,本发明的试剂盒中还可以含有除这些抗体

以外的各种助剂。助剂例如有溶解固体状二次抗体的溶解剂、用于洗涤不溶载体的洗涤剂、使用酶作为抗体的标记物时用于测定酶活性的底物、其反应终止剂等免疫学测定试剂盒中通常所使用的试剂。本发明的试剂盒还可以含有用于进行毛发生长促进活性评价的说明书。

5

## 实施例

以下，通过实施例进一步具体说明本发明，但本发明的范围并不受实施例限定。

### 实施例 1：在毛发周期的生长期中强烈表达的蛋白质

10

#### (1) 表达文库的构建

按照 TRIZOL (GIBCO15596-018) 所附的手册，使用 TRIZOL，从处于毛发周期生长期（出生后 35 天）的 C57BL 小鼠背上制备总 RNA。使用 Amersham Pharmacia 制造的 Quick Prep™ 微量 mRNA 纯化试剂盒，由制备的总 RNA 中制备 mRNA (20 µg)。使用 5 µg mRNA，使用 Amersham Pharmacia 制造的 Time Saver cDNA 合成试剂盒 27-9262-01 中的随机引物合成 cDNA。由于使用了试剂盒所附的连接物，因此制备的 cDNA 的两端具有 EcoRI 和 NotI 位点。将所得 cDNA 插入 Amersham Pharmacia 制造的 λExCell EcoRI/CIP (27-5011-01)，构建表达文库。

用上述制备的表达文库感染大肠杆菌 MN522，撒入 LB 板上，获得 2 万噬菌斑/板。将 LB 板浸渍于 10 mM 的 IPTG 溶液中，使其风干。其上覆盖硝基纤维素，静置过夜。

#### (2) 新生毛囊特异性单克隆抗体的制备

从 B57BL 小鼠的生长期（第 48 天至第 50 天）的皮肤上取毛，在含有 8 M 尿素、2% SDS、100 mM DTT 的 PBS 中、在 37℃ 孵育过夜，提取蛋白质。另外，通过实体显微镜采集 B57BL 小鼠触须毛囊（毛球部附着色素的部分；生长期），在 PBS 中匀浆。将上述 2 种试样（蛋白质质量为 0.5 mg）混合，再与等量的完全佐剂混合，制备胶团。

将上述得到的胶团 (0.2 mg) 分开给予大鼠 (Wister) 的皮下 (3 处)，进行免疫。初次免疫 1 个月后，与上述同样地进行追加免疫。再在 2 周后与上述同样地进行第 2 次追加免疫。第 2 次追加免疫 3 天后，取出免疫大鼠的脾，用筛孔回收血细胞成分。该血细胞成分中含

有抗体生成细胞。用聚乙二醇 1500 将上述回收的血细胞成分（总量）和小鼠骨髓瘤 P3U1（Dulbecco/Hum F12 混合培养基）混合，悬浮于 Dulbecco/Hum F12 混合培养基中（ $10^7$  细胞/ml），铺于 96 孔板，使每孔为 100  $\mu$ l。第二天，向各孔中加入等量（100  $\mu$ l）的 HAT 培养基（Sigma）。2 天后由各孔中分别吸取 150  $\mu$ l 并舍弃，向各孔中加入 150  $\mu$ l 新培养基。将 96 孔板在 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 培养箱内静置。

使用超声波粉碎机，将生长期的 B57BL 小鼠触须毛囊溶解于 8 M 尿素中。将硝基纤维素膜浸渍该溶液中 5 分钟，用 PBS 充分洗涤，将其装入 Biorad 斑点印迹仪，使用该膜，对由上述 96 孔板的各孔中回收的杂交瘤上清进行初次筛选。首先，将上述制备的装入 Biorad 斑点印迹仪的硝基纤维素膜用溶解了 5% 脱脂乳的 Tris 缓冲液（TBST）进行阻断，然后向 96 孔板的各孔中添加 100  $\mu$ l 杂交瘤上清。培养 1 小时后，用 Tris 缓冲液洗涤，添加二次抗体——辣根过氧化物酶标记抗大鼠 IgG（以 1 mg/ml 溶解于 TBST 中）。添加显色底物 ECL 试剂，通过有无显色来筛选与生长期的触须毛囊反应的抗体（共 50 种）（初次筛选）。

使用生长期触须毛囊的冷冻切片（10  $\mu$ m），从由上述初次筛选选出的抗体（50 种）中选出有特异性反应的抗体（二次筛选）。具体来说，将生长期触须毛囊的冷冻切片置于载玻片上，添加由初次筛选选出的杂交瘤上清，用二次抗体使其显色。具体讲，将由恒冷箱切片机（Bright）制备的生长期触须毛囊的冷冻切片在 -20℃ 用甲醇处理，用 TBST 进行 1 小时的阻断，然后与杂交瘤上清反应 1 小时。用 Tris 缓冲液洗涤，然后与 FITC 标记抗大鼠 IgG（以 100  $\mu$ g/ml 溶解于 TBST 中）反应。用 Tris 缓冲液洗涤，然后盖上盖玻片，用荧光显微镜进行观察。

二次筛选的结果，共选出了 8 种抗体。这些抗体不与表皮进行反应，与毛囊特异性反应。用有限稀释法克隆这 8 种抗体。

以生长期触须毛囊或终止期触须毛囊为样品，通过蛋白质印迹法对这 8 种抗体的反应性进行了研究，并使用正在形成毛囊的 14 日龄小鼠胎儿皮肤的切片试样对这 8 种抗体的反应性进行了研究。结果获得了与生长期毛囊和正在形成的毛囊（新生毛囊）特异性反应，与终止期触须毛囊不反应的单克隆抗体——mAb27。生成单克隆抗体 mAb27

的杂交瘤于 2001 年 11 月 2 日保藏于独立行政法人产业技术综合研究所 特许生物保藏中心（日本国茨城县筑波市东一丁目 1 番地 1 中央第 6），保藏号 FERM P-18578；于 2002 年 7 月 22 日转为国际保藏，保藏号 FERM BP-8121。

5

### （3）免疫筛选

使用上述（2）中制备的单克隆抗体 mAb27，对上述（1）中构建的大肠杆菌的表达文库进行免疫筛选。具体说，展开 30 万个文库（2 万噬菌斑/板），使渗入了 IPTG 的硝基纤维素紧密贴附于噬菌斑，转印表达基因产物。用 1%脱脂乳/TBS（STBS）阻断该硝基纤维素，然后与 10 μg/ml 的 mAb27、HRP 标记抗大鼠 IgG（Amersham）一起培养，用 ECL（Amersham）检出。

10

回收 6 个所得阳性克隆，确定其核苷酸序列，结果 6 个克隆全部含有共有序列（图 1）。

15

### 实施例 2：数据库检索

对实施例 1 中鉴定出的共有序列（图 1）进行数据库检索（NCIB（GeneBank）），结果符合检索号 XM-177952（小鼠，与毛透明蛋白相似）。检索号 XM-177952 的氨基酸序列以 SEQ ID No.1 表示，核苷酸序列以 SEQ ID No.2 表示。图 1 中的氨基酸序列与 SEQ ID No.1 中的氨基酸序列第 800 个-第 1135 个相对应。只是，SEQ ID No.1 中的氨基酸序列第 1133 个的 Leu 在图 1 中为 Gln，SEQ ID No.1 中的氨基酸序列第 1135 个的 Arg 在图 1 中为 His。

20

### 实施例 3：重组蛋白的制备

#### （1）通过 PCR 制备全长 cDNA

使用寡聚 dT 引物和逆转录酶，由生长期皮肤的 mRNA 构建 cDNA 文库。以该 cDNA 文库为模板，使用 2 种引物 5'-atgtctccacttataagaagcattgtagat-3'（SEQ ID No.3）和 5'-ttaagggcggtattgagacctctgctcctg-3'（SEQ ID No.4）进行 PCR，由此克隆全长 cDNA。使用 LA Taq™（Takara）试剂盒，PCR 反应条件为 94℃1 分钟、94℃30 秒、60℃30 秒、72℃2 分钟，将目标 cDNA 扩增

30

30 个循环。

所得克隆含有编码 SEQ ID No.1 所示的氨基酸序列的全长 cDNA。

## (2) 转化

5 将上述 (1) 中得到的 PCR 产物插入 pTarget vector (Promega), 构建重组表达载体, 转染宿主细胞 COS-1 细胞。使用脂转染胺试剂 (GIBCO), 按照所附说明书进行转染。COS-1 细胞在添加了 10%FCS 的 Dalbecco's Ham F12 培养基中培养。

## 10 (3) 重组蛋白的提取

### (a) 亲和柱的制备

将 Afigel 10 (Biorad) 置于 4℃, 使凝胶均匀, 装入布氏漏斗进行过滤。用凝胶的 3 倍量、4℃的脱离子水洗涤。洗涤后将凝胶装入烧瓶, 加入溶解于 PBS 的单克隆抗体 mAb27 的溶液 (相对于 1 ml  
15 凝胶, 使用 0.5 ml 抗体溶液)。充分搅拌, 使其悬浮, 一边直接用振荡机缓慢搅拌一边在室温下反应 1 小时。离心舍去上清, 用 PBS 调节为 10 ml。每 1ml 凝胶中加入 0.1 ml 1M 甘氨酸乙酯 (pH 8), 反应 1 小时。反应后, 将凝胶填充 Ecopac 柱 (Biorad、最大 20 ml), 用蒸馏水洗涤, 直至 OD<sub>260</sub> 不能检出反应物。最后, 用洗脱液 (10 mM  
20 Tris-HCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA、蛋白质抑制混合剂 (Roche、商品名: CompleteMini)、0.15 M NaCl、0.5% TritonX-100, 用 HCl 调节为 pH 3.0) 洗涤。

### (b) 抗原的纯化

在转染的第 3 天, 将表达实施例 2 中制备的全长 cDNA 的 COS-1  
25 细胞的转化体回收, 用 PBS 洗涤, 然后加入到 100 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA 和蛋白质抑制混合剂 (Roche、商品名: CompleteMini) 的混合液中, 用匀浆器充分粉碎。接着添加 NaCl, 使终浓度为 0.15 M; 添加 TritonX-100, 使终浓度为 0.5%, 用搅拌器在 4℃搅拌 3 小时。以 25000rpm 离心 10 分钟, 回收上清, 由  
30 细胞中提取蛋白质。将 100 ml 所得提取液过上述 (1) 中制备的亲和柱。

用洗涤液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA、

蛋白质抑制混合剂 (Roche、商品名: CompleteMini)、0.15 M NaCl、0.5% TritonX-100)洗涤,然后将洗脱液(将洗涤液用 HCl 调节至 pH 3.0 的液体)加到柱中,各回收 2 ml 洗涤液,回收含有蛋白质的流分,其在 OD280 nm 处有吸收。

5 (c) 通过纯化抗原的电泳测定分子量

将上述 (b) 中回收的含蛋白质流分在 SDS-PAGE 上进行电泳,进行使用单克隆抗体 mAb27 的蛋白质印迹分析,结果,在 220kDa 的位置检出带。另外,将上述 (b) 中回收的含蛋白质流分在 SDS-PAGE 上进行电泳,将电泳凝胶用考马斯蓝染色,切出 220kDa 带,由此制备  
10 纯化抗原。

实施例 4: 对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的多克隆抗体的制备

将实施例 3 中制备的纯化抗原 (即包含含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质的切出的凝胶)回收得到 20%乙醇中,放置过夜。回收凝胶,将最高含有约 100 µg 蛋白质的试样与 Titer Max Gold (CytRX 制佐剂)混合,制备乳液,在 2 个月内对大鼠进行免疫 (共 3 次)。初次免疫的 2 个月后,从大鼠采血,按照规定的方法制备血清,可以获得对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的多克隆抗体。  
20

实施例 5: 使用对含有序列表中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质进行识别的多克隆抗体进行毛发生长促进活性的评价

评价人的角质形成细胞的分化。由 SankoJunyaku 购入人角质形成细胞 (为皮肤的细胞,混有表皮角化细胞和来自毛囊的细胞等)。细胞存放于培养液中,向细胞培养液中添加 ssb7 (Ser-Ile-Glu-Gln-Ser-Cys-Asp-Gln-Asp-Glu (SEQ ID No.5) 的 N 末端生物素化 (NHS-生物素, Pierce),将其进行 s-s 交联而形成的肽),使其浓度为 20 µM,在 96 孔板培养 1 周。由孔中回收细胞,回收得到 100 µl SDS 样品缓冲液 (0.02 g/ml SDS、0.2 g/ml 甘油、pH 6.8),通过超声波粉碎机进行溶解。对对照 (未添加 ssb7 培养 1 周的人角质形成细胞)也同样处理。将上述处理得到的溶液进行 SDS-PAGE (丙烯酰胺 4-20%)电泳  
30

(35 mA、1.5 小时), 然后转印 PVDF 膜, 在含 5%脱脂乳的 Tris 缓冲液 (TBST) 中孵育 1 小时。与 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的部分长、即具有图 1 的氨基酸序列的蛋白质的单克隆抗体(将血清稀释为 1/100 所得)反应 1 小时, 然后用 TBS 充分洗涤, 用 TBST 将过氧化物酶标及抗大鼠 IgG (Amersham) 稀释为 1/1000, 以此作为二次抗体反应, 充分洗涤, 然后用 ECL 试剂盒 (Amersham) 研究多克隆抗体的反应强度。

5 所的结果如图 2 的右图所示。

图 2 的右图中, 右边的泳道表示对照的结果, 右边的泳道表示添加了毛发生长促进剂 EPM (ssb7) 的结果。图中的 AHF 表示含有序列表 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质。由图 2 的结果可知: 在添加了毛发生长促进剂 EPM (ssb7) 的样品中, 检出了比对照强的条带。这反映出含有序列表 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质的表达量增加。

10 与上述同样地, 通过 RNA 印迹, 对含有序列表 SEQ ID No.1 的氨基酸序列的蛋白质在 RNA 水平的表达。具体来说, 首先从背部皮肤中制备总 RNA, 将 10  $\mu$ g 总 RNA 在琼脂糖凝胶中进行电泳, 转印到尼龙膜上 (HibondN+) (Amersham)。接着, 通过 DIG (Roche) 向 AHFcDNA 的翻译区引入标志, 准备好后, 以其为探针, 检测转移到上述尼龙膜上的 AHFmRNA。

15 所的结果如图 2 的左图所示。与图 2 的右图同样, 在添加了毛发生长促进剂 EPM (ssb7) 的样品中, 检出了比对照强的条带。

产业实用性

25 可以通过本发明的方法对受试物质的毛发生长促进活性进行有效的评价。

<110> 住友电气工业株式会社

<120> 毛发生长促进活性的评价方法

<130> A31583A

<160> 5

<210> 1

<211> 1439

<212> PRT

<213> 小鼠（饲养小鼠）

<400> 1

Met Ser Pro Leu Ile Arg Ser Ile Val Asp Ile Thr Glu Val Phe Asn

1 5 10 15

Gln Tyr Ala Ser Gln Ser Cys Asp Gly Ala Ser Leu Ser Lys Lys Asp

20 25 30

Leu Lys Asn Leu Leu Glu Arg Glu Leu Gly Asp Val Leu Gln Arg Pro

35 40 45

His Asp Pro Glu Thr Ile Asp Leu Thr Leu Glu Leu Leu Asp Arg Asp

50 55 60

Cys Asn Gly Arg Val Asp Phe Asn Glu Phe Leu Leu Phe Leu Phe Lys

65 70 75 80

Ile Ala Gln Ala Cys Tyr Tyr Ala Leu Asp Gln Ala Ala Glu Leu Gly

85 90 95

Glu Lys Arg Ala Leu Pro Asn Glu Lys Arg Asn Leu Ser Gln Asp Arg

100 105 110

Arg Gln Glu Asp Gln Arg Arg Phe Glu Pro Arg Ser Arg Gln Leu Asp

115 120 125

Glu Glu Pro Gly Arg Arg Ser Trp Gln Lys Arg Arg Glu Gln Glu Glu

---

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| Arg Ala Glu Glu Gln Arg Leu Glu Gln Arg Tyr Arg Gln His Arg Asp |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Glu Glu Gln Arg Leu Gln Arg Arg Glu Leu Gln Glu Leu Glu Glu Arg |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| Leu Ala Glu Lys Glu Pro Leu Gly Trp Ser Lys Gly Arg Asp Ala Glu |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| Glu Phe Ser Glu Val Glu Glu Gln Gln Arg Gln Glu Arg Gln Glu Leu |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| Lys Gly Lys Gly Gln Thr Glu Glu Arg Arg Leu Gln Lys Arg Arg Gln |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| Glu Glu Leu Arg Glu Pro Leu Leu Arg Arg Asp Leu Glu Leu Arg Arg |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Glu Gln Glu Leu Arg Arg Glu Gln Glu Leu Arg Gln Glu Gln Arg Arg |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| Glu Gln Glu Leu Arg Arg Glu Gln Glu Leu Arg Gln Glu Leu Arg Arg |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| Glu Gln Glu Leu Asn Arg Arg Gln Glu Leu Arg Arg Glu Gln Glu Leu |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| Arg Arg Glu Gln Glu Leu Arg Gln Glu Leu Arg Arg Glu Gln Glu Leu |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |
| Arg Arg Glu Gln Glu Leu Arg Gln Glu Leu Arg Arg Glu Gln Glu Leu |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Arg Arg Glu Gln Glu Leu Arg Gln Glu Leu Arg Arg Glu Gln Glu Leu |     |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |     |
| Arg Arg Glu Gln Glu Leu Arg Gln Glu Leu Arg Arg Glu Gln Glu Leu |     |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |     |

Arg Arg Glu Gln Glu Leu Arg Gln Glu Leu Ala Glu Glu Asp Glu Leu

355 360 365

Thr Arg Ile Arg Glu Pro Asp Glu Ser Ile Thr Gln Arg Trp Gln Trp

370 375 380

Gln Leu Glu Asn Glu Ala Asp Ala Arg Gln Asn Lys Val Tyr Ser Arg

385 390 395 400

Pro Ser Arg Gln Glu Gln Arg Leu Arg Gln Glu Leu Gly Glu Arg Gln

405 410 415

Leu Arg Glu Gln Glu Glu Gln Arg Arg Asp Leu Gln Gln Glu Arg Pro

420 425 430

Ala Glu Glu Ala Arg Gln Arg Asn Gln Trp Glu Arg Pro Gln Arg Ala

435 440 445

Glu Glu Arg Leu Glu Gln Glu Gln Arg Phe Arg Asp Arg Glu Glu Gln

450 455 460

Arg Phe Arg Glu Glu Lys Leu Gln Arg Ala Glu Leu Gln Asp Ser Leu

465 470 475 480

Leu Asp Glu Glu Gln Arg Arg Leu Gln Glu Glu Arg Arg Glu Pro Asn

485 490 495

Arg Ser Arg Gln Leu Arg Glu Glu Ser Gln Arg Arg Arg Thr Leu Tyr

500 505 510

Ala Lys Pro Ser Gln Arg Gln Gln Arg Arg Arg Leu Gln Gln Glu Arg

515 520 525

Gln Tyr Gln Glu Glu Asp Leu Gln Arg Leu Arg Asp Glu Asp Gln Arg

530 535 540

Arg Asp Leu Lys Trp Gln Trp Gln Pro Arg Lys Glu Asn Glu Val Arg

545 550 555 560

Ser Asn Arg Leu Phe Thr Lys Arg Arg Gly Asp Glu Glu Pro Ile Gln

---

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 565                                                             | 570 | 575 |     |
| Gln Leu Glu Asp Ser Gln Glu Arg Glu Arg Arg Gln Asp Arg Arg Pro |     |     |     |
| 580                                                             | 585 | 590 |     |
| Leu Gln Asp Glu Glu Glu Glu Lys Arg Glu Leu Glu Gln Glu Arg Arg |     |     |     |
| 595                                                             | 600 | 605 |     |
| Arg Arg Gln Gln Arg Asp Arg Gln Ile Leu Glu Glu Glu Gln Phe Gln |     |     |     |
| 610                                                             | 615 | 620 |     |
| Arg Glu His Gln Arg Glu Ala Arg Arg Arg Asp Glu Thr Phe Gln Glu |     |     |     |
| 625                                                             | 630 | 635 | 640 |
| Glu Glu Gln Leu Gln Gly Glu Ser Arg Arg Arg Gln Gln Glu Arg Glu |     |     |     |
| 645                                                             | 650 | 655 |     |
| Gly Lys Phe Leu Glu Glu Glu Arg Gln Leu Arg Thr Glu Arg Glu Glu |     |     |     |
| 660                                                             | 665 | 670 |     |
| Gln Arg Arg Arg Gln Glu Gln Glu Arg Glu Phe Gln Glu Glu Glu     |     |     |     |
| 675                                                             | 680 | 685 |     |
| His Leu Gln Glu Arg Glu Lys Glu Leu Arg Gln Glu Cys Asp Arg Lys |     |     |     |
| 690                                                             | 695 | 700 |     |
| Ser Arg Glu Gln Glu Arg Arg Gln Gln Arg Glu Glu Glu Gln Leu Arg |     |     |     |
| 705                                                             | 710 | 715 | 720 |
| Arg Gln Glu Arg Asp Gln Arg Phe Arg Arg Glu Gln Glu Arg His Leu |     |     |     |
| 725                                                             | 730 | 735 |     |
| Glu Arg Glu Glu Glu Gln Leu Arg Asp Arg Pro Ser Arg Arg Glu Gln |     |     |     |
| 740                                                             | 745 | 750 |     |
| Glu Arg His Gln Glu Arg Glu Glu Glu Gln Leu Arg Asp Arg Pro Ser |     |     |     |
| 755                                                             | 760 | 765 |     |
| Arg Arg Glu Gln Glu Arg His Gln Glu Arg Glu Glu Glu Gln Leu Arg |     |     |     |
| 770                                                             | 775 | 780 |     |

Asp Arg Pro Ser Arg Arg Glu Gln Glu Arg His Gln Glu Arg Glu Glu  
 785                790                795                800  
 Glu Gln Leu Arg Asp Arg Pro Phe Arg Arg Glu Gln Glu Arg Arg Leu  
                   805                810                815  
 Glu Arg Glu Glu Glu Gln Leu Arg Asp Arg Pro Ser Arg Arg Glu Gln  
                   820                825                830  
 Glu Arg His Gln Glu Arg Glu Glu Glu Gln Leu Arg Asp Arg Pro Ser  
                   835                840                845  
 Arg Arg Glu Gln Glu Arg Arg Leu Glu Arg Glu Glu Glu Gln Leu Arg  
                   850                855                860  
 Asp Arg Ser Phe Arg Arg Glu Gln Glu Leu Arg Arg Asp Arg Lys Phe  
 865                870                875                880  
 His Glu Glu Glu Glu Arg Arg Glu Glu Leu Glu Glu Glu Gln Arg Gly  
                   885                890                895  
 Gln Glu Arg Asp Arg Leu Arg Val Glu Glu Gln Leu Arg Gly Gln Arg  
                   900                905                910  
 Glu Glu Glu Gln Arg Arg Arg Gln Glu Cys Asp Arg Lys Leu His Arg  
                   915                920                925  
 Glu Leu Glu Val Arg Gln Glu Leu Glu Glu Glu Arg Leu Arg Asp Arg  
                   930                935                940  
 Lys Leu Arg Arg Glu Gln Glu Leu Arg Arg Asp Arg Lys Phe His Glu  
 945                950                955                960  
 Glu Glu Glu Arg Arg His Glu Glu Phe Glu Glu Lys Gln Leu Arg Leu  
                   965                970                975  
 Gln Glu Pro Asp Arg Arg Phe Arg Arg Glu Gln Glu Leu Arg Gln Glu  
                   980                985                990  
 Cys Val Glu Glu Glu Arg Leu Arg Asp Ser Lys Ile Arg Arg Glu Gln

|                                                                 |      |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|------|
| 995                                                             | 1000 | 1005 |      |
| Glu Leu Arg Arg Glu Arg Glu Glu Glu Arg Leu Arg Asp Arg Lys Ile |      |      |      |
| 1010                                                            | 1015 | 1020 |      |
| Arg Arg Asp Gln Glu Leu Arg Gln Gly Leu Glu Glu Glu Gln Leu Arg |      |      |      |
| 1025                                                            | 1030 | 1035 | 1040 |
| Arg Gln Glu Leu Asp Arg Lys Phe Arg Glu Glu Gln Glu Leu Asp Gln |      |      |      |
| 1045                                                            | 1050 | 1055 |      |
| Glu Leu Glu Glu Glu Arg Leu Arg Asp Arg Lys Ile Arg Arg Glu Gln |      |      |      |
| 1060                                                            | 1065 | 1070 |      |
| Glu Leu Arg Arg Glu Gln Glu Leu Arg Arg Glu Gln Glu Phe Arg Arg |      |      |      |
| 1075                                                            | 1080 | 1085 |      |
| Glu Gln Glu Leu Arg Arg Glu Gln Glu Phe Arg Arg Glu Gln Glu Leu |      |      |      |
| 1090                                                            | 1095 | 1100 |      |
| Arg Gln Glu Arg Glu Glu Glu Arg Leu Arg Asp Arg Lys Ile Arg Arg |      |      |      |
| 1105                                                            | 1110 | 1115 | 1120 |
| Asp Gln Glu Leu Arg Gln Gly Leu Glu Glu Glu Gln Leu Arg Arg Gln |      |      |      |
| 1125                                                            | 1130 | 1135 |      |
| Glu Arg Asp Arg Lys Phe Arg Glu Glu Gln Glu Leu Gly Gln Glu Leu |      |      |      |
| 1140                                                            | 1145 | 1150 |      |
| Glu Glu Glu Arg Leu Arg Asp Arg Lys Ile Arg Arg Glu Gln Glu Leu |      |      |      |
| 1155                                                            | 1160 | 1165 |      |
| Arg Arg Glu Arg Glu Gln Glu Gln Arg Arg Arg Leu Glu Arg Glu Glu |      |      |      |
| 1170                                                            | 1175 | 1180 |      |
| Glu Gln Gln Arg Leu His Glu Arg Glu Glu Glu Gln Arg Arg Arg Gln |      |      |      |
| 1185                                                            | 1190 | 1195 | 1200 |
| Glu Arg Glu Gln Glu Gln Gln Arg Cys Leu Glu Arg Glu Glu Glu Gln |      |      |      |
| 1205                                                            | 1210 | 1215 |      |

---

Phe Arg Phe Glu Glu Gln Gln Arg Arg Arg Gln Glu Arg Glu Gln Gln  
 1220 1225 1230  
 Leu Arg Gln Glu Arg Asp Arg Arg Val Leu Glu Glu Glu Glu Leu Arg  
 1235 1240 1245  
 Gln Glu Arg Glu Glu Leu Leu His Arg Gln Val Gly Gly Arg Lys Phe  
 1250 1255 1260  
 Arg Glu Glu Glu Arg Leu Arg Leu Glu Arg Glu Glu Gln Gln Arg Arg  
 1265 1270 1275 1280  
 Leu Gln Glu Arg Asp Asn Arg Arg Phe Arg Glu Glu Val Glu Leu Arg  
 1285 1290 1295  
 Gln Glu Arg Glu Gly Gln Gln Leu Arg Gln Glu Arg Asp Arg Lys Phe  
 1300 1305 1310  
 Arg Glu Val Glu Glu Leu Arg Gln Glu Glu Gln Arg Arg Arg Gln Glu  
 1315 1320 1325  
 Arg Asp Arg Lys Phe Arg Glu Glu Lys His Pro Arg Glu Glu Arg Glu  
 1330 1335 1340  
 Glu Gln Gln Leu Arg Arg Glu Lys Arg Asp Gly Gln Tyr Leu Ala Glu  
 1345 1350 1355 1360  
 Glu Gln Phe Ala Arg Asp Thr Ile Arg Arg Gln Glu Gln Glu Leu Arg  
 1365 1370 1375  
 Gln Glu Glu Glu Gln Arg Arg Arg Gln Glu Arg Glu Arg Lys Phe Gln  
 1380 1385 1390  
 Glu Glu Gln Ile Arg Arg Arg Gln Glu Glu Gln Arg Arg Arg Gln Ile  
 1395 1400 1405  
 Leu Glu Pro Gly Thr Arg Gln Phe Ala Asn Val Pro Val Arg Ser Ser  
 1410 1415 1420  
 Pro Leu Tyr Glu Tyr Ile Gln Glu Gln Arg Ser Gln Tyr Arg Pro

1425                      1430                      1435

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 4320

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 小鼠 (饲养小鼠)

&lt;400&gt; 2

atgtctccac ttataagaag cattgtcgat atcactgaag tttcaatca atatgcatca 60  
 caaagttgtg atggagcatc acttagcaag aaagacctga aaaacctcct tgagagagaa 120  
 ctggagatg tccttcagag accacatgac cctgagacga tagacctgac cctagaactt 180  
 ctggatcgcg actgcaacgg gcgtgttgat ttcaacgaat tcctcctgtt ccttttcaag 240  
 attgctcaag ctgctatta tgctctcgat caggccgcag agctaggcga gaagagagcc 300  
 ctgcccattg aaaagaggaa cctgtcacia gatcgaggc aagaagacca aaggagattc 360  
 gagccccgaa gcagacaact ggacgaagaa cctgggcgcc gaagctggca gaagagacgt 420  
 gagcaggagg agcgcgctga ggagcagcgg ctggagcagc gctacaggca gcaccgcgat 480  
 gaagagcaga gactgcaaag gcgagaactg caagaactgg aggaacgcct tgcagagaaa 540  
 gagccgcttg gctggagtaa gggtcgtgac gcggaggagt tttctgaggt agaggaacag 600  
 caaaggcaag agaggcagga actcaagggc aagggccaaa cagaagagag aaggctgcag 660  
 aagcgcaggc aagaagagct acgcgaaccc ctgctaaggc gcgatctgga gttgaggcgc 720  
 gaacaagagc taaggcgcga gcaggagttg aggcaggaac agaggcgcga gcaggagcta 780  
 aggcgcgagc aggagctgag gcaagagctg aggcgcgagc aggagctgaa tcgaaggcag 840  
 gagctgaggc gcgaacaaga gctaaggcgc gagcaggagc tgaggcagga gctgaggcgc 900  
 gagcaggagc taaggcgcga gcaggagttg aggcaggaac tgaggcgcga gcaagagcta 960  
 aggcgcgagc aggagttgag gcaggaactg aggcgcgagc aagagctaag gcgcgagcag 1020  
 gaggtaggc aggaactgag gcgtgagcaa gagctaagac gcgagcaaga gctgaggcag 1080  
 gagctggctg aggaggacga gctgacgcgg atccgggaac ccgacgagag cattaccag 1140  
 aggtggcagt ggcagctcga aaacgaggca gacgccgctc agaacaaggt ctactctagg 1200  
 cctagcaggc aggagcagag gcttcgccag gagctggggg agcgtcagct ccgggagcag 1260

gaggagcagc gccgcgacct ccaacaggag cgtcccgtg aggaggcgcg ccagcgcaac 1320  
 cagtgggaga ggccgcagcg ggcgaggag cgcttgagc aggagcagcg gttccgcgac 1380  
 agggaggagc agcgcttccg ggaggagaag ctgcaacgag cagagctcca ggacagcctc 1440  
 ctagatgaag aacagaggcg actccaggag gaacgccgag agccaaacag gagccggcaa 1500  
 ctgagggaag aaagccagag gcgccgcaca ctgtacgcca aaccagcca gaggcagcaa 1560  
 agaaggcgcc tgcagcagga aaggcagtat caggaggagg acctgcagcg gctgcgggat 1620  
 gaagatcagc gcagggatct gaaatggcag tggcaaccaa ggaaagaaaa tgaagttcgt 1680  
 agtaacaggc tcttcaccaa acgcagaggg gatgaggaac ccatccagca gctggaagat 1740  
 tctcaggagc gagagagacg tcaggatcgg cggcctctgc aagacgaaga ggaagagaag 1800  
 agagagctgg agcaggagag gaggcgtcga cagcagcgcg accgtcagat cctagaggaa 1860  
 gagcagtttc agcgagagca ccaacgggaa gccagaagac gagatgagac gttccaggag 1920  
 gaagaacagc tccagggaga atcgagaaga cggcaacagg agagagaggg caagttcctt 1980  
 gaggaggaaa ggcagctgcg gacagaacgg gaagagcaga ggcggcgtca agaacaagag 2040  
 agagaattcc aagaggagga ggagcacctc caagaacgag agaaagaact tcggcaggaa 2100  
 tgcgacagaa aatctcgtga acaagagcgc cgccagcagc gtgaggaaga gcagctgagg 2160  
 cgtcaggagc gggaccagag attccgtcgg gaacaagaac gccacctgga acgtgaggaa 2220  
 gagcagctgc gggacagacc atcccgccgg gaacaagaac gccaccagga acgtgaggaa 2280  
 gagcagctgc gggacagacc atcccgccgg gaacaagaac gccaccagga acgtgaggaa 2340  
 gagcagctgc gggacagacc atcccgccgg gaacaagaac gccaccagga acgtgaggaa 2400  
 gagcagctgc gggacagacc attccgccgg gaacaagaac gccgcctgga gcgtgaggaa 2460  
 gagcagctgc gggacagacc atcccgccgg gaacaagaac gccaccagga acgtgaggaa 2520  
 gagcagctgc gggacagacc atcccgccgg gaacaagaac gccgcctgga gcgtgaggaa 2580  
 gagcagctgc gggacagatc attccgccgg gagcaagagc tcagacggga cagaaaattc 2640  
 catgaggaag aagagcgccg cgaggaactg gaggaagagc agcgtggcca agagcgggac 2700  
 cgtttgaggg tggaggagca gtttcgagg cagcgagagg aagagcagcg ccgccgccag 2760  
 gaatgtgaca gaaaattaca ccgggaacta gaggtccgcc aggaactgga ggaagagcgg 2820  
 ctgcgggaca gaaagctccg cagggaacaa gagctcaggc gcgacagaaa attccatgag 2880

gaagaagagc gccgtcatga ggagttcgag gaaaagcagc tgcgcctcca ggaaccggac 2940  
 agaagattcc gccgggaaca agagctccgt caggaatgcg tcgaggaaga gcggctgcgg 3000  
 gacagtaaga tccgccggga gcaagagctc cgccgggagc gcgaagaaga gcggctgagg 3060  
 gacagaaaga tccgccggga ccaagaactc cgccaggagc tggaggaaga gcagctgagg 3120  
 cgccaggaaac ttgacagaaa attccgtgag gaacaagagc tcgaccaaga actggaggaa 3180  
 gagcgggtgc gggacagaaa gatccgccgg gagcaagagc tccgccggga gcaagagctc 3240  
 cgccgggagc aagagtccg ccgggagcaa gagctccgcc gggagcaaga gttccgccgg 3300  
 gagcaagagc tccgccagga gcgcgaggaa gagcggctga gggacagaaa gatccgccgg 3360  
 gaccaagaac tccgccaggg actggaggaa gagcagctga ggccagga acgtgacaga 3420  
 aaattccgtg aggaacaaga gctcgccaa gaactggagg aagagcggct gcgggacaga 3480  
 aagatccgcc gggagcaaga gtcgcccg gaacgcgagc aagagcagcg gcgccgctg 3540  
 gagcgtgagg aagagcagca gcgtctccat gagcgtgagg aagagcagcg gcgccgccag 3600  
 gagcgcgagc aagagcagca gcggtgcctg gagcgtgagg aggaacaatt tcgctttgag 3660  
 gagcagcagc gccgccgcca ggaacgcgag caacagttga gacaggagcg cgacagaaga 3720  
 gtccttgagg aagaagagct tcgtcaggaa agggaggagc tgctgcaccg ccaggtgggt 3780  
 ggcaggaaat tccgggaaga ggagcgactc cgctggaaa gagaggaaca gcagcgtcgt 3840  
 ctccaggagc gtgacaacag aagattccgc gaggaagtag agtcaggca agaaaggga 3900  
 gggcagcagc ttcgccaaga gcgtgacaga aaattccgtg aggtagaaga gttcgccag 3960  
 gaagaacagc gccgccgcca ggagcgtgac aggaattcc gggaagagaa acaccacgc 4020  
 gaggaacgcg aggaacagca gttgcgcagg gagaagcgag atggtaata cctggctgag 4080  
 gagcagtttg ccagggatac gattcgtcg caggaacaag aactacgtca agaagaggaa 4140  
 caaagacgtc gccaaagagc ggagagaaaa ttccaagaag agcaaatccg tcgtaggcaa 4200  
 gaggagcaga ggcccgcca aatcctggag cctggtacac gccagtttg caatgtcca 4260  
 gtgcgttcca gccctctcta tgagtacatc caggagcaga ggtctcaata ccgcccttaa 4320

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

---

<213> 合成 DNA

<400> 3

atgtctccac ttataagaag cattgtagat 30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 合成 DNA

<400> 4

ttaagggcgg tattgagacc tctgctcctg 30

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 合成肽

<400> 5

Ser Ile Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu

1 5 10

```

GAA GAG CAG CTG CGG GAC AGA CCA TTC CGC CGG GAA CAA GAA CGC CGC CTG GAG CGT GAG
E E Q L R D R P F R R E Q E R R L E R E
GAA GAG CAG CTG CGG GAC AGA CCA TCC CGC CGG GAA CAA GAA CGC CAC CAG GAA CGT GAG
E E Q L R D R P S R R E Q E R H Q E R E
GAA GAG CAG CTG CGG GAC AGA CCA TCC CGC CGG GAA CAA GAA CGC CGC CTG GAG CGT GAG
E E Q L R D R P S R R E Q E R R L E R E
GAA GAG CAG CTG CGG GAC AGA TCA TTC CGC CGG GAG CAA GAG CTC AGA CGG GAC AGA AAA
E E Q L R D R S F R R E Q E L R R D R K
TTC CAT GAG GAA GAA GAG CGC CGC GAG GAA CTG GAG GAA GAG CAG CGT GGC CAA GAG CGG
F H E E E E R R E E L E E E Q R G Q E R
GAC CGT TTG AGG GTG GAG GAG CAG CTT CGC GGA CAG CGA GAG GAA GAG CAG CGC CGC CGC
D R L R V E E Q L R G Q R E E E Q R R R
CAG GAA TGT GAC AGA AAA TTA CAC CGG GAA CTA GAG GTC CGC CAG GAA CTG GAG GAA GAG
Q E C D R K L H R E L E V R Q E L E E E
CGG CTG CGG GAC AGA AAG CTC CGC AGG GAA CAA GAG CTC AGG CGC GAC AGA AAA TTC CAT
R L R D R K L R R E Q E L R R D R K F H
GAG GAA GAA GAG CGC CGT CAT GAG GAG TTC GAG GAA AAG CAG CTG CGC CTC CAG GAA CCG
E E E E R R H E E F E E K Q L R L Q E P
GAC AGA AGA TTC CGC CGG GAA CAA GAG CTC CGT CAG GAA TGC GTC GAG GAA GAG CGG CTG
D R R F R R E Q E L R Q E C V E E E E R L
CGG GAC AGT AAG ATC CGC CGG GAG CAA GAG CTC CGC CGG GAG CGC GAA GAA GAG CGG CTG
R D S K I R R E Q E L R R E R E E E E R L
AGG GAC AGA AAG ATC CGC CGG GAC CAA GAA CTC CGC CAG GGA CTG GAG GAA GAG CAG CTG
R D R K I R R D Q E L R Q G L E E E E Q L
AGG CGC CAG GAA CTT GAC AGA AAA TTC CGT GAG GAA CAA GAG CTC GAC CAA GAA CTG GAG
R R Q E L D R K F R E E Q E L D Q E L E
GAA GAG CGG CTG CGG GAC AGA AAG ATC CGC CGG GAG CAA GAG CTC CGC CGG GAG CAA GAG
E E R L R D R K I R R E Q E L R R E Q E
CTC CGC CGG GAG CAA GAG TTC CGC CGG GAG CAA GAG CTC CGC CGG GAG CAA GAG TTC CGC
L R R E Q E F R R E Q E L R R E Q E F R
CGG GAG CAA GAG CTC CGC CAG GAG CGC GAG GAA GAG CGG CTG AGG GAC AGA AAG ATC CGC
R E Q E L R Q E R E E E R L R D R K I R
CGG GAC CAA GAA CTC CGC CAG GGA CTG GAG GAA GAG CAG CAG AGG CAC
R D Q E L R Q G L E E E Q Q R H

```

图 1

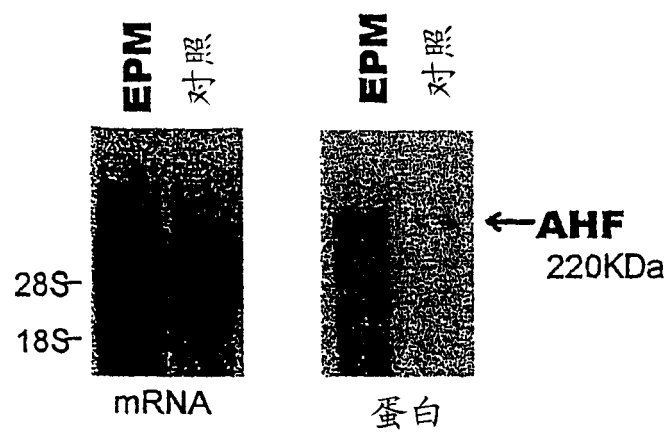


图 2

|               |                                                                                |         |            |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)       | 毛发生长促进活性的评价方法                                                                  |         |            |
| 公开(公告)号       | <a href="#">CN1723391A</a>                                                     | 公开(公告)日 | 2006-01-18 |
| 申请号           | CN200480000251.4                                                               | 申请日     | 2004-01-07 |
| 申请(专利权)人(译)   | 住友电气工业株式会社                                                                     |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译) | 住友电气工业株式会社                                                                     |         |            |
| [标]发明人        | 武部京子<br>平井洋平                                                                   |         |            |
| 发明人           | 武部京子<br>平井洋平                                                                   |         |            |
| IPC分类号        | G01N33/53 C12N15/02 C12N5/10 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 G01N33/50 G01N33/68 |         |            |
| CPC分类号        | G01N2800/20 G01N33/6881 C07K16/18                                              |         |            |
| 代理人(译)        | 曹雯<br>王景朝                                                                      |         |            |
| 优先权           | 2003001891 2003-01-08 JP                                                       |         |            |
| 其他公开文献        | CN100381820C                                                                   |         |            |
| 外部链接          | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                 |         |            |

#### 摘要(译)

本发明的目的在于提供毛发生长促进活性评价的方法，该方法使用在评价毛发生长促进活性时有用、可特异性识别存在于上皮新生毛囊中的抗原的抗体；还提供含有上述抗体的毛发生长促进活性评价试剂盒。本发明提供使用对含有序列表中SEQ ID No.1的氨基酸序列的蛋白质进行识别的抗体或其片段进行毛发生长促进活性评价的方法。

