

[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 200480020217.3

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月23日

[11] 公开号 CN 1823274A

[22] 申请日 2004.1.13
[21] 申请号 200480020217.3
[30] 优先权
 [32] 2003. 7. 14 [33] JP [31] 196459/2003
[86] 国际申请 PCT/JP2004/000160 2004. 1. 13
[87] 国际公布 WO2005/005984 日 2005. 1. 20
[85] 进入国家阶段日期 2006. 1. 13
[71] 申请人 株式会社白丽高科
 地址 日本东京
[72] 发明人 小杉好纪 黑田雅彦 及川恒辅
 大林彻也

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
 标事务所
 代理人 陈 昕

权利要求书 2 页 说明书 35 页 序列表 5 页
附图 4 页

[54] 发明名称

子宫内膜异位相关疾病的诊断方法

[57] 摘要

本发明通过测定受试者机体试样中的组胺释放因子(HRF)蛋白质的存在量,将该 HRF 蛋白质的量与正常机体试样中的量相比较,将与正常机体试样相比有意义地高的 HRF 蛋白质的量作为子宫内膜异位相关疾病或者其风险程度的指标。

1. 子宫内膜异位相关疾病的诊断方法，其特征在于，测定受检者机体试样中组胺释放因子（HRF 蛋白质）的存在量，将 HRF 蛋白质的量与正常机体试样中的量相比较，与正常机体试样相比而 HRF 蛋白质的量表现出有意义地高的受检者被判定为患有子宫内膜异位相关疾病的患者或者具有患该疾病的高风险者。

2. 识别 HRF 蛋白质的抗体。

3. 与所述权利要求 2 的抗体不同的表位结合的抗体。

4. 权利要求 2 或者 3 的抗体，是用具有从序列表序列号 2 的氨基酸序列的第 90~130 位选出的连续的 5~20 个氨基酸残基的肽作为免疫抗原而获得的抗体。

5. 权利要求 2 或者 3 的抗体，是用具有从序列表序列号 2 的氨基酸序列的第 1~95 位选出的连续的 5~20 个氨基酸残基的肽作为免疫抗原而获得的抗体。

6. 权利要求 2 或者 3 的抗体，是用具有从序列表序列号 2 的氨基酸序列的第 115~172 位选出的连续的 5~20 个氨基酸残基的肽作为免疫抗原而获得的抗体。

7. 子宫内膜异位相关疾病的诊断方法，其特征在于，其中至少包括下述工序：

(a) 使受检者的机体试样与固定有上述权利要求 2 的抗体的载体接触的工序；

(b) 洗涤在工序 (a) 中与机体试样接触的载体的工序；

(c) 使标记的上述权利要求 3 的抗体接触经过工序 (b) 的洗涤的载体的工序；

(d) 测定载体上的结合标记或者游离的标记的工序；

(e) 以在工序 (d) 中测定的标记量作为 HRF 蛋白质的量的指标，与正常机体试样的结果进行比较的工序；以及，

(f) 将与正常机体试样进行比较而表现出有意义地高的 HRF 蛋白

质的量作为表示与子宫内膜异位相关疾病或者该病的患病风险程度的指标的工序。

8. 子宫内膜异位相关疾病的诊断方法，其特征在于，其中至少包括下述工序：

(a) 对受检者的机体试样进行组织固定化处理的工序；

(b) 将工序(a)中制备的组织固定化标本制成切片的工序；

(c) 以上述权利要求2的抗体对在工序(b)中得到的切片组织进行免疫组织染色的工序；

(d) 以在工序(c)中得到的免疫组织染色的程度作为HRF蛋白质的量的指标，与正常机体试样的结果进行比较的工序；以及，

(e) 将与正常机体试样进行比较而表现出有意义地高的HRF蛋白质的量作为表示与子宫内膜异位相关疾病或者该病的患病风险程度的指标的工序。

9. 子宫内膜异位相关疾病诊断试剂盒，其特征在于，至少含有标记了的上述权利要求2的抗体。

10. 子宫内膜异位相关疾病诊断试剂盒，其特征在于，其中至少含有下述要素：

(a) 上述权利要求2的抗体；以及，

(b) 标记了的上述权利要求3的抗体。

11. 子宫内膜异位诊断试剂盒，其特征在于，其中至少含有下述要素：

(a) 固定有上述权利要求2的抗体的载体；以及，

(b) 标记了的上述权利要求3的抗体。

12. 抗体，其可识别HRF蛋白质，并且可中和HRF蛋白质的活性。

13. 子宫内膜异位相关疾病的治疗药物，其特征在于，其中含有权利要求12的抗体。

14. 子宫内膜异位相关疾病的治疗方法，其特征在于向体内给予权利要求12的抗体或者权利要求13的治疗药物。

子宫内膜异位相关疾病的诊断方法

技术领域

本发明涉及子宫内膜异位(endometriosis)相关疾病的分子生物学的诊断方法。此外,本发明涉及利用了子宫内膜异位的分子机制的该疾病的治疗药物以及治疗方法。

背景技术

子宫内膜异位通常为妇科疾病,该疾病对10%处于生育年龄的女性群体有影响(非专利文献1)。子宫内膜异位的组织与正常的子宫内膜一样,经历周期性的增殖和破坏,导致了周期性的痛经、性交疼痛症、骨盆痛以及月经时发生血尿。此外,据报道30~40%的不孕患者患有该疾病(非专利文献2)。尚且不清楚在部分患者中出现的子宫内膜细胞转移、在其它位置增殖时的机制,不过炎症细胞因子的脱离调控有可能导致了子宫内膜异位的发展(非专利文献3、4)。事实上,单细胞的激活和向腹腔内的移动在子宫内膜异位中是最常见报道的成为免疫学异常之一(非专利文献5~8)。

二噁英(Dioxin)是扰乱内分泌的物质中的一种,其普遍存在于环境中。3,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD, Dioxin)是在二噁英类之中毒性最强的物质,其具有各种毒性效果(例如:免疫毒性、血液毒性、致畸毒性以及致癌性等)(非专利文献9、10)、TCDD以及相关化合物所诱导的基因表达的变化是从毒素与芳香烃受体(AhR)(Aryl hydrocarbon receptor)结合的时间点开始的,然后芳香烃受体与芳香烃受体核转位子(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT)形成二聚体,形成与含有XRE(异物应答序列)基序的基因调控元件相互作用的复合体(非专利文献11、12)。将猴子慢性暴露在TCDD中,剂量依赖性地发生了从轻度到重度

的子宫内膜异位（非专利文献 13），对二噁英与子宫内膜异位的相关性进行了几个研究（非专利文献 14~18）。不过，最近的报告指出了暴露于 TCDD 与子宫内膜异位无关的结果（非专利文献 19、20），导致暴露于二噁英与子宫内膜异位的相关性至今不明。

本发明人等鉴定了含有 IgE 依赖性组胺释放因子（Histamine Releasing Factor: HRF）的 TCDD 目的基因（非专利文献 21~23）。不过，对于作为这种 TCDD 目的基因产物的 HRF 与子宫内膜异位的关系一无所知。

非专利文献 1: Wheeler J.M. J. Reprod Med. 1989, 34 (1) 41-6

非专利文献 2: Candiani G.B. et al, Obstet Gynecol. Surv. 1991, 46 (6): 374-82

非专利文献 3: Garcia-Velasco J.A. and Arici A. Fertil Steril. 1999, 71 (6): 983-93

非专利文献 4: Barcz et al. Med. Sci. Monit. 2000, 6 (5): 1042-6

非专利文献 5: Jolicoeur C. et al. Am. J. Pathol. 1998, 152 (1): 125-33

非专利文献 6: Lebovic D.I. et al. Fertil Steril 2001, 75 (1): 1-10

非专利文献 7: Hornung D. et al. Am. J. Pathol. 2001, 158 (6): 1949-54

非专利文献 8: Blumenthal R.D. et al. Am. J. Pathol. 2000, 156 (5): 1581-8

非专利文献 9: Chapman D.E. and Schiller C.M. Toxicol Appl. Pharmacol. 1985, 78 (1): 147-57

非专利文献 10: McGregor D.B. et al. Environ Health Perspect. 1998, 106 Suppl 2: 755-60

非专利文献 11: Sagawa K. and Fujii-Kuriyama T. J. Biochem. (Tokyo) 1997, 122 (6): 1075-9

非专利文献 12: Nebert D.W. Crit. Rev. Toxicol. 1989, 20

(3): 153-74

非专利文献 13: Rier S.E. et al. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1993, 21(4): 433-41

非专利文献 14: Gibbons A. *Science* 1993, 262(5183): 1373

非专利文献 15: Obsteen K.G. and Sierra-Rivera E. *Endocrinol.* 1997, 15(3): 301-8

非专利文献 16: Bruner-Tran K.L. et al. *Gynecol. Obstet. Invest.* 1999, 48 Suppl. 1: 45-56

非专利文献 17: Johnson K. L. et al. *Environ Health Perspect* 1997, 105(7): 750-5

非专利文献 18: Yang J. Z. and Foster W. G. *Toxicol. Ind. Health* 1997, 13(1): 15-25

非专利文献 19: Igarashi T. et al. *Endocr. J.* 1999, 46(6): 765-72

非专利文献 20: Pauwels A. et al. *Hum. Reprod.* 2001, 16(10): 2050-5

非专利文献 21: Oikawa K. et al. *Cancer Res.* 2001, 61(15): 5707-9

非专利文献 22: Oikawa K. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 290(3): 984-7

非专利文献 23: Ohbayashi et al. *FEBS Lett.* 2001, 508(3): 341-4

发明内容

以往除了用腹腔内视镜看血的方法诊断子宫内膜异位之外, 还没有其他有效的方法。

一方面针对各种人类疾病, 以该疾病特异的标记物蛋白质或者其基因表达为指标的分子生物学诊断不断普及。这种方法不需要太大的设备, 对受检者造成的负担很少, 即使对多数无自我感觉症状的受检

者也可以大范围地实施。不过，对于子宫内膜异位而言，尚且不知道用于进行这种分子生物学的诊断方法的有效的标记物蛋白质或者其基因。

本发明鉴于上述情况，以提供利用了与子宫内膜异位密切相关的标记物的分子生物学的诊断/治疗方法为课题。

此外，本发明还以提供用于该诊断/治疗方法的各种材料为课题。

本申请作为解决上述的课题，提供了以下(1)~(17)的发明：

(1) 子宫内膜异位相关疾病的诊断方法，其特征在于，测定受检者机体试样中组胺释放因子(HRF蛋白质)的存在量，将HRF蛋白质的量与正常机体试样(或称“生物试样”)中的量相比较，与正常机体试样相比而HRF蛋白质的量表现出有意义地高的受检者被判定为患有子宫内膜异位相关疾病的患者或者具有患该疾病的高风险者。

(2) 识别HRF蛋白质的抗体。

(3) 可与所述发明(2)的抗体不同的表位结合的抗体。

(4) 上述发明(2)或者(3)的抗体，是用具有从序列表序列号2的氨基酸序列的第90~130位选出的连续的5~20个氨基酸残基的肽作为免疫抗原而获得的抗体。

(5) 上述发明(2)或者(3)的抗体，是用具有从序列表序列号2的氨基酸序列的第1~95位选出的连续的5~20个氨基酸残基的肽作为免疫抗原而获得的抗体。

(6) 上述发明(2)或者(3)的抗体，是用具有从序列表序列号2的氨基酸序列的第115~172位选出的连续的5~20个氨基酸残基的肽作为免疫抗原而获得的抗体。

(7) 子宫内膜异位相关疾病的诊断方法，其特征在于，其中至少包括下述工序：

(a) 使受检者的机体试样与固定有上述发明(2)的抗体的载体接触的工序；

(b) 洗涤在工序(a)中与机体试样接触的载体的工序；

(c) 使标记的上述发明(3)的抗体接触经过工序(b)的洗涤后

的载体的工序；

(d) 测定载体上的结合标记或者游离标记的工序；

(e) 以在工序(d)中测定的标记量作为HRF蛋白质的量的指标，与正常机体试样的结果进行比较的工序；以及，

(f) 将与正常机体试样进行比较而表现出有意义地高的HRF蛋白质的量作为表示与子宫内膜异位相关疾病或者该病的患病风险程度的指标的工序。

(8) 子宫内膜异位相关疾病的诊断方法，其特征在于，其中至少包括下述工序：

(a) 对受检者的机体试样进行组织固定化处理的工序；

(b) 将工序(a)中制备的组织固定化标本制成切片的工序；

(c) 以上述发明(2)的抗体对在工序(b)中得到的切片组织进行免疫组织染色的工序；

(d) 以在工序(c)中得到的免疫组织染色的程度作为HRF蛋白质的量的指标，与正常机体试样的结果进行比较的工序；以及

(e) 将与正常机体试样进行比较而表现出有意义地高的HRF蛋白质的量作为表示与子宫内膜异位相关疾病或者该病的患病风险程度的指标的工序。

(9) 子宫内膜异位相关疾病诊断试剂盒，其特征不在于，含有至少标记了的上述发明(2)的抗体。

(10) 子宫内膜异位相关疾病诊断试剂盒，其特征不在于，其中至少含有下述要素：

(a) 上述发明(2)的抗体；以及，

(b) 标记了的上述发明(3)的抗体。

(11) 子宫内膜异位诊断试剂盒，其特征不在于，其中至少含有下述要素：

(a) 固定有上述发明(2)的抗体的载体；以及，

(b) 标记了的上述发明(3)的抗体。

(12) 一种抗体，其可识别HRF蛋白质，并且可中和HRF蛋白质

的活性。

(13) 子宫内膜异位相关疾病的治疗药物,其特征在于,其中含有权利要求12的抗体。

(14) 子宫内膜异位相关疾病的治疗方法,其特征在于向体内给予权利要求12的抗体或者权利要求13的治疗药物。

即,本发明人等调查在子宫内膜组织和子宫内膜异位移植物中的TCDD目的基因(HRF, CYP1A1)的表达,结果发现子宫内膜异位的发展与HRF的表达水平之间具有很高的相关性关系,至此完成本发明。

在本发明中,“子宫内膜异位相关疾病”指的是子宫内膜异位以及由于子宫内膜异位导致的月经困难症、不孕症以及子宫腺肌病等。

“诊断”指的是对受检者是否患有子宫内膜异位相关疾病的判定、对是否存在将来患有子宫内膜异位的危险性的判定以及对是否存在在治疗后子宫内膜异位相关疾病再复发的危险性的判定。此外,在诊断中也包括对所患有的子宫内膜异位或者其患病的危险性达到何种程度的测定。

并且,在发明中,“HRF多聚寡核苷酸”指的是编码HRF蛋白质的多聚寡核苷酸(嘌呤或者嘧啶在糖上以 β -N-糖苷键结合后形成的核苷酸的磷酸酯(ATP、GTP、CTP、UTP;或者dATP、dGTP、dCTP、dTTP)结合的分子。具体而言,是指编码HRF蛋白质的基因组DNA、从基因组DNA转录得到的mRNA、从mRNA合成的cDNA。此外,可以是双链,也可以是单链。另外,还包括这些基因组DNA或者mRNA、cDNA的正义链以及反义链。此外,所说的“多聚寡核苷酸”指的是结合有不少于100个核苷酸的分子,“寡核苷酸”指的是连接有2~99个的分子。此外,“蛋白质”和“肽”指的是由通过酰胺键(肽键)相互结合的多个氨基酸残基构成的分子。特别是将具有2~33个氨基酸残基的物质称为“寡肽”,将具有不少于34个氨基酸残基的物质称为“多肽”。

此外还包括对序列表所示的碱基序列以及氨基酸序列进行1个以上碱基的添加、缺失、向其他碱基的置换、或者以这些碱基突变为基础的1个以上氨基酸残基的添加、缺失以及向其它氨基酸的置换。

在发明的实施方式的说明或者在实施例中对在本发明中的其他的用语或者概念进行了详细的规定。用语基本上以 IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature 为依据, 或者以本领域中惯用的用语的含义为依据。此外, 为了实施本发明而使用的各种技术, 除了特别明示有出处技术之外, 均为根据公知的文献等本领域的技术人员可以容易并且确实地实施的技术。可以根据下述中记载的方法或者其中引用的文献记载的方法或者与之本质上相同的方法或者其改良方法实施(其中的某些内容可以作为参考也包括在本说明书的内容中): 例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 中记载的药剂的制备; J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning" 2nd ed., Vol 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N. Y., 1995; 日本生化学会编 "续生化学实验讲座 I、基因研究方法 II"、东京化学同人 (1986); 日本生化学会编、"新生化实验讲座 2、核酸 III (重组 DNA 技术)"、东京化学同人 (1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987); J. H. Miller ed., "Methods in Enzymology", Vol. 204, Academic Press, New York (1991); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 218, Academic Press, New York (1993); S. Weissman (ed.),

“Methods in Enzymology”, Vol. 303, Academic Press, New York (1999); J. C. Glorioso et al. (ed.), “Methods in Enzymology”, Vol. 306, Academic Press, New York (1999) 等中记载的基因工程学以及分子生物学技术。

附图说明

图 1 表示调查来自正常组织子宫内膜组织、子宫内膜异位患者的正常子宫内膜组织以及子宫内膜异位移植植物上的 HRF 与 CYP1A1 的表达的结果。(A) 通过 Northern 印迹分析对 HRF mRNA 水平进行调查。用人 β 肌动蛋白探针进行印迹的再次探测, 测定总 RNA 水平。通过用于分析 Southern 印迹的定量 RT-PCR 来测定由 Northern 印迹所检查的试样中的 CYP1A1 的 mRNA 水平。为了确认定量的精度, 将 5 倍不同浓度的 cDNA 试样 (1 \times 以及 5 \times) 作为 PCR 的模板, 以相同的配置进行检查。将 β 肌动蛋白作为 mRNA 量的内部对照。(B) 展示的是同样表示对应于 HRF 以及 CYP1A1 的 mRNA 水平的图。使用 densitometry (MOLECULAR IMAGER, Nippon Bio-Rad) 将 mRNA 水平相对 β 肌动蛋白信号进行标准化处理。试样 11-2A 表示 HRF 的 mRNA 水平, 10-2A 表示 CYP1A1 的 mRNA 水平, 任意地设定为 10。当多个试样来自一个人时, 通过计算用平均值表示。误差线 (Error Bar) 表示多个试样的最大值。12-1、7-1、8-1 以及 6B 为正常子宫内膜组织, 标有星号的 1C 为子宫内膜异位患者的正常部位的子宫内膜。

图 2 是调查子宫内膜异位移植植物中的 HRF 表达的结果。(A) 是用 Northern 印迹分析正常子宫内膜组织、子宫内膜异位患者的正常部位的子宫内膜组织以及子宫内膜异位移植植物中的 HRF 的表达的结果。在印迹中使用 β 肌动蛋白探针进行再探测, 测定总的 RNA 水平。柱条上的 N、Eu 以及 En 分别表示正常子宫内膜组织、子宫内膜异位患者的正常部位的子宫内膜组织以及子宫内膜异位移植植物。(B) 表示的是对于图 1A 以及图 2A 中调查的试样, 通过 Northern 分析测定得到的表示 HRF mRNA 水平的柱图。使用 densitometry (MOLECULAR IMAGER, Nippon

Bio-Rad) 将 HRF mRNA 水平相对 β 肌动蛋白信号进行标准化处理。将试样 6B 的 mRNA 水平任意设定为 1。当多个试样来自 1 个人的时候, 经计算用平均值表示。误差线表示多个试样的最大值。

图 3 是免疫组织化学分析 HRF 以及 CD68 的表达的结果。用茶色的染色使阳性部分可见。用苏木素进行逆染。检测 (A) 以及 (B) 的正常子宫内膜组织中的 HRF 蛋白质 (A: 增殖期, B: 分泌期, 原图放大倍率 $\times 200$)。 (C) 检测在卵巢子宫内膜异位移植植物内部的 HRF 蛋白质 (原图放大倍率 $\times 200$)。 (D) 表示子宫内膜异位移植植物的形态的连续切片的 H&E 染色结果 (原图放大倍率 $\times 200$)。 (E) 以更高倍率检测与 (C) 相同视野的 HRF 蛋白质 (原图放大倍率 $\times 400$)。 (F) 在子宫内膜异位移植植物的连续切片上的 CD68 阳性巨噬细胞的免疫组织化学分析的局部图 (原图放大倍率 $\times 400$)。

图 4 是移植分析的结果。 (A) NIH3T3 细胞内的 HRF 蛋白质的 western 印迹分析的结果。 wt: 亲本 NIH3T3 细胞, HRF: 含有 HRF 的逆转录病毒载体感染后稳定表达 HRF 的细胞株 (pMSCV-HRF-3T3)、vector: 用空载体感染的对照细胞 (pMSCV-3T3)。 (B) 表示表现出 HRF 过表达的细胞在裸鼠中具有高的移植效率。纵轴上的标记表示如下的状态。 + + +: 观察到无数的移植克隆的状态; + +: 观察到数十个移植克隆的状态; +: 观察到几个移植克隆的状态; - 未观察到移植克隆的状态。分别用白色圆形或黑色圆形表示用对照细胞或者 HRF 过表达细胞注射过的小鼠。

具体实施方式

本申请发明 (1) 的诊断方法为测定在受检者的机体试样中的组胺释放因子 (HRF 蛋白质) 的存在量, 将 HRF 蛋白质的量作为指标诊断子宫内膜异位相关疾病的方法。即, 将与正常机体试样相比, HRF 蛋白质的量有意义地多的受检者判定为患有子宫内膜异位相关疾病的患者或者具有患该病风险的人。即, 将 HRF 蛋白质的存在量有意义地多的受检者判定为患有子宫内膜异位相关疾病的患者或者具有患有该病

风险的人。因为由 HRF 基因表达的 HRF 蛋白质的存在量与子宫内膜异位相关疾病具有密切关系，所以可以以受检者的机体试样（例如：子宫内膜组织等）中的 HRF 蛋白质的量作为指标，对子宫内膜异位进行诊断。此外，HR 蛋白质的量“有意义地多”指的是将受检者的 HRF 蛋白质的量与在正常机体试样（即，健康的正常人的机体试样）中测定的 HRF 蛋白质的量相比较，其为 10% 以上，优选 30% 以上，更优选 70% 以上，最优选 100% 以上的情况。此外，该“有意义地多”还指例如：对于同一个受检者的多个试样的 HRF 多聚核苷酸表达量的平均值与多个在正常试样中的相同的平均值进行统计学的检测的时候，前者比后者更有意义地多的情况。

如上所述的以 HRF 蛋白质的量为指标的发明（1）的诊断方法，可以按照公知的基因工程学以及分子生物学技术，通过本领域用于测定检验中特定的蛋白质的量的已知方法，例如：原位杂交、Western 印迹、各种免疫组织学方法等检验、测定 HRF 蛋白质的量。利用这种技术的 HRF 蛋白质的量测定体系、子宫内膜异位相关疾病的检测体系、子宫内膜异位相关疾病的风险检测体系、所述体系中利用的试剂、方法、工艺、解析程序等全部包括在本发明的技术以及利用该技术的系统中。

作为用于上述发明（1）的诊断方法中使用的材料，本申请特别提供了下述发明（2）和（3）的抗体。

发明（2）的抗体是能够特异性识别 HRF 蛋白质的抗体（抗 HRF 抗体）。并且此处所说的“抗体”既可以是在广义含义下使用的抗体，也可以是针对目的 HRF 多肽以及相关肽片断的单克隆抗体的单一物质或者是具有针对各种表位的特异性的抗体组合物，此外，也包括一价抗体或者多价抗体以及多克隆抗体和单克隆抗体，而且，还包含完整（intact）分子、其片段及其衍生物，所谓的 $F(ab')_2$ 、 Fab' 以及 Fab 片段，此外，还包括至少具有 2 个抗原或者表位（epitope）结合部位的嵌和抗体或者杂和抗体，此外，还包含例如：四聚物（quadrome）、三聚物（Triome）等双特异型的重组抗体、种间杂和抗体、抗独特型

抗体，以及经过化学修饰或者加工等的这些抗体的衍生物，可以是应用公知的细胞融合或者杂交瘤技术或者抗体工程，或使用合成或者半合成技术得到的抗体，从生成抗体的角度出发，可以是采用公知的以往技术或者使用 DNA 重组技术制备的抗体，具有对本说明书中记载并且定义的目的抗原物质或者目的表位的中和特性的抗体或者结合特性的抗体。特别优选的抗体为完整的能特异地识别 HRF 蛋白质（多肽）的抗体，例如：上述发明（4）～（6）的抗体等。

即，发明（4）～（6）的抗体分别为用序列号 2 的氨基酸序列组成的 HRF 蛋白质的部分肽作为抗原制备得到的抗体，分别为识别 HRF 蛋白质的不同部位的抗体。例如使用肽合成仪诸如以 Fmoc - bop 法合成用于制备这种抗体的 HRF 肽。也可以在 HRF 肽的 N 末端导入组氨酸。可以通过使用 μ Bondasphere、C18 柱（Waters）等高效液相层析柱等进行纯化，作为免疫抗原使用。

发明（3）的抗体为结合到与上述发明（2）的抗体不同的表位的抗体。这种抗体是通过将与用于制备上述发明（2）的抗体的寡肽不同的片断作为免疫原制备得到的。例如：上述发明（4）～（6）的抗体中的任何一个均可以作为发明（2）的抗体，其他可以作为发明（3）的抗体。

当这种抗体例如为多克隆抗体时，可用 HRF 蛋白质或者其片断（寡肽）作为免疫原免疫动物然后，从血清得到。或者通过注射 HRF 蛋白质多核苷酸的重组载体或者通过基因枪将其导入到动物的肌肉或者皮肤然后，通过获取血清的方法进行制备。作为动物可以使用小鼠、大鼠、豚鼠、山羊、绵羊、牛、马、猪、狗、猫、猴、鸡等。此外，优选考虑到与用于适合于细胞融合的亲本细胞的动物。

将致敏抗原免疫动物时，可以按照公知的方法例如：村松繁等编、试验生物学讲座 14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和 60 年，日本生化学会编、续生化学试验讲座 5、免疫生化学研究法、东京化学同人、1986 年，日本生化学会编、新生化学试验讲座 12、分子免疫学 III、抗原/抗体/补体，东京化学同人，1992 年等中记载的方法进行。

例如：作为常规的方法，通过将致敏抗原向哺乳动物等的腹腔内或者皮下注射等。此外，也可以在致敏抗原免疫时使用适当的载体。可以通过将用于免疫的制剂（根据需要可以和佐剂一起）一次或者多次注射到哺乳动物中进行免疫。代表性的有将该用于免疫的制剂以及/或者佐剂向哺乳动物中进行多次皮下注射或者腹腔内注射。用于免疫的制剂例如可以是含有上述抗原肽或者其相关肽片断。用于免疫的制剂，也可以使用与已知在哺乳动物体内具有免疫原性的蛋白质（例如：上述载体蛋白质类等）形成的偶联物。作为佐剂，可以列举：弗氏完全佐剂、Ribi 佐剂、百日咳疫苗、BCG、脂质 A、脂质体、氢氧化铝、二氧化硅等。

将免疫后的动物饲养一定的时间后，可以从由该动物获取的血液中制备含有多克隆抗体的血清。确认所得到的抗血清能识别 HRF 后，就可以将其作为本发明特定的活性成分。

在该发明中，作为抗 HRF 抗体，也可以使用作为来自哺乳动物的单克隆抗体而获得的抗体，可以使用任何方法使培养的一系列细胞系产生抗体分子。修饰语“单克隆抗体”指的是从实质上为均质的抗体的团体中得到的具有其抗体特性的抗体。只要是能使该抗体产生所需要的，可以采用任何特定的方法，没有限制。多种单克隆抗体可以是自然产生的，也可以可以是仅以少量存在的突变体，除此之外，可以含有相同抗体的集合。单克隆抗体具有高特异性，其针对的是具有单一的抗原性的位点。与常规的典型地含有针对不同抗原决定簇（表位）的多种抗体的抗体制备物相比较，各单克隆抗体针对的是该抗原上的单一的抗原决定簇。除了其特异性之外，单克隆抗体是通过培养的杂交瘤合成的，具有在不夹杂有或者少夹杂其他免疫球蛋白类方面的优点。单克隆抗体包括杂交瘤抗体以及重组抗体。这些抗体只要具有所期望的生物活性，不限制其来源或者免疫球蛋白的类型或者亚型的种类，可以用恒定区置换可变区或者用重链置换轻链，用其他种类的链置换某种的链，或者使之与异种蛋白质融合得到的抗体（例如：美国专利 4816567 号：Monoclonal Antibody Production Techniques and

Applications, pp. 79-97, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987 等)。

此外, 单克隆抗体可以按照公知的单克隆抗体的制备方法(《单克隆抗体》、长宗香明、寺田弘共著, 广川书店, 1990年, “Monoclonal Antibody” James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996)。

用于制备这种抗体的 HRF 蛋白质或者 HRF 肽可以是例如: 使用含有 HRF 多聚核苷酸的重组表达载体的公知的体外转录、翻译方法或者适当的宿主(大肠杆菌、枯草杆菌等原核细胞、或者酵母、昆虫细胞、动植物细胞等(例如: 也包括蚕等昆虫)) - 载体系统(例如: 也包括杆状病毒载体系统)通过基因重组技术得到的。例如: 根据序列表序列号 1 的 HRF 基因/氨基酸序列, 将编码具有 HRF 或者其一部分的区域、HRF 的部分蛋白质或者多肽片段、相当于 HRF 的氨基酸序列的一部分的氨基酸序列的肽的核酸序列插入到公知的表达载体中, 转化到适当的宿主细胞后, 用公知的方法从该宿主细胞或者其培养上清中纯化具有目的 HRF 蛋白质或者其一部分的区域的蛋白质、HRF 的一部分的蛋白质或者多肽片段、相当于 HRF 氨基酸序列的一部分的氨基酸序列的肽。此外, 特别是可以用固相法等公知的方法通过化学合成的方法合成寡肽。

并且, HRF 多核苷酸已知各种突变体(例如: GenBank/XM-294045、XM-038391、XM-293291、XM-209741、XM-210566、XM-066706、XM-066675、XM-071321 等), 作为优选例, 可列举 SEQ ID: 1 (碱基序列) 所示的 HRF cDNA (或者 TPT-1: GenBank/NM-003295)。这种多肽可以通过各种公知的方法简单地得到。例如: 为 cDNA 的情况下, 可以使用公知的方法 (Mol. Cell Biol. 2, 161-170, 1982; J. Gene 25, 263-269, 1983; Gene, 150, 243-250, 1994) 合成 cDNA, 使用分别以公知的碱基序列为基准而制备的探针 DNA, 通过分离各 cDNA 的方法得到 cDNA。可以将得到的 cDNA 通过例如: PCR (Polymerase Chain Reaction) 法、NASBN (Nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (Transcription-mediated amplification) 法以及 SDA (Strand Displacement Amplification) 法等常规的基因扩增方法

进行扩增。此外，使用根据本发明提供的引物组，以从人的细胞中分离的 mRNA 为模板，通过 RT-PCR 法得到必要量的各 cDNA。

此外，可以通过用适当的限制性酶切断上述的多核苷酸 (cDNA)，得到编码特定的 HRF 肽的 HRF 多核苷酸。或者根据 Carruthers(1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 411-418; Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105: 661; Belousov (1997) Nucleic Acid Res. 25: 3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19: 373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33: 7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68: 90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68: 109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22: 1859; 美国专利 4458066 号中记载的公知的化学合成技术，在体外进行合成。

发明 (2) 和 (3) 的抗体根据需要可以以从其中纯化后的形态供给使用。作为纯化、分离抗体的方法，可以使用公知的方法，例如：硫酸铵沉淀法等盐析、葡聚糖等凝胶过滤法、离子交换层析法、电泳法、透析、超滤法、亲和层析法、高效液相层析法等进行纯化后使用。优选将含有抗血清、单克隆抗体的腹水等经过硫酸铵分级后，用诸如 DEAE-琼脂糖的阴离子交换凝胶以及诸如蛋白 A 柱的亲和柱等处理，进行纯化分离。特别优选的可列举：固定有抗原或者抗原片断（例如合成肽、重组抗体蛋白质或者肽、抗体特异性识别的部位等）的亲和层析、固定有蛋白 A 的亲和层析、羟基磷灰石层析等。

也可以使用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶等酶处理这些抗体，根据情况经过还原后得到的所谓 Fab、Fab'、F(ab')₂ 的抗体片断。可以使用已知的任意的检测方法、例如竞争性结合测定、直接以及间接夹心测定以及免疫沉降测定对抗体进行检测 (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。

可以使用本领域中已知的各种方法向抗体上偶联各种可以检测的原子团，例如：David et al., Biochemistry, 13 卷, 1014-1021 页 (1974); Pain et al, J. Immunol. Meth., 40: pp. 219-231 (1981);

以及“Methods in Enzymology”，Vol.184, pp. 138-163(1990)中记载的方法。作为添加了标记物的抗体，可以使用 IgG 级分，此外，可以使用胃蛋白酶消化还原后得到的特异结合部 Fab'。

已知有很多能够固定抗原或者抗体的载体，在本发明中，可以从适当加以选择。作为载体，已知有多种用于抗原抗体反应等的载体，在本发明中当然也可以使用选自这些公知的载体。作为特别适合的载体，例如玻璃，例如：氨基烷基硅烷玻璃等活化玻璃、多孔玻璃、硅胶、二氧化硅-氧化铝、氧化铝、磁化铁、磁化合金等无机材料、聚乙烯(Polyethylene)、聚丙烯、聚氯乙烯、聚偏氟乙烯、聚乙烯(poly vinyl)、聚醋酸乙烯、聚碳酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物、聚丙烯酰胺、交联聚丙烯酰胺、苯乙烯-甲基丙烯酸酯、聚缩水甘油甲基丙烯酸酯、丙烯醛-乙二醇丙烯酸二酯共聚物等、交联的白蛋白、胶原、明胶、糊精、琼脂、交联琼脂、纤维素、结晶纤维素、羧甲基纤维素、纤维素乙酸酯等天然或者合成的纤维素、交联糊精、尼龙等聚酰胺、聚氨基甲酸乙酯、聚环氧树脂等有机高分子物质，此外，将其乳化聚合得到物质，硅橡胶等、细胞、红细胞等根据需要，通过硅烷偶合剂等导入官能基团。

作为载体，可列举：粒子、微粒、微小粒子、膜、滤纸、珠子、试管、管子、试验容器的内壁，例如：试管、滴定板(titer plate)、滴度孔、微孔、玻璃池、合成树脂的小池等由合成材料构成的小池、玻璃棒、由合成材料构成的棒、使末端加粗或者变细的棒、使末端具有圆形突起或者具有扁平突起的棒、制成平板状的棒等的固体物质(物体)的表面等。

可以通过使用吸附等物理方法或者缩合剂等、或采用活化后的物质等的化学性方法、以及利用相互的化学性结合反应的方法等向这些载体上结合 HRF 抗体。

发明(2)和(3)的抗体中还包括通过分别以标记物进行标记的抗体。作为标记，可列举：酶、酶底物、酶抑制剂、辅因子类、辅酶、酶前体、辅基酶蛋白、荧光物质、色素物质、化学发光化合物、发光

物质、发色物质、磁物质、金属粒子，例如：金胶体等、非金属元素粒子、例如：胶体银等、放射性物质等。优选的标记物质可以使用包括酶、放射性同位素或者荧光色素的化学物质。酶只要能够满足单位时间内每摩尔酶所能催化的基质数（turn over number）越大，与抗体结合越稳定，可使基质特异性地着色等的条件即可，没有特别的限制，可以使用通常在 EIA 中使用的酶。作为酶，有脱氢酶、还原酶、氧化酶等氧化还原酶，例如：催化氨基酸、羧基、甲基、酰基、磷酸基等转移的转移酶，例如：水解酯键、糖键、醚键、肽键等的水解酶、裂合酶、异构酶、连接酶等。可以将多个酶联合使用进行检测。例如：可以利用酶循环。酶标记等可以置换成生物素标记物和亲和酶标亲和素（链霉亲和素）。这样，使用生物素-亲和素系统，或者使用针对抗 HRF 抗体的抗体等的二抗等，可以适当采用本领域内公知的能增加敏感度的方法。可以使用多种不同种类的标记进行标记。这种情况下，可以连续地或者非连续地、同时或者分别地进行多个测定。

作为代表性的酶标记，可列举：辣根过氧化物酶等过氧化物酶、大肠杆菌 β -D-半乳糖苷酶等半乳糖苷酶，苹果酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡萄糖氧化酶、糖化酶、乙酰胆碱酯酶、过氧化氢酶、牛小肠碱性磷酸酶、大肠杆菌碱性磷酸酶等碱性磷酸酶等。

可以用马来酰亚胺化合物等交联剂按照公知的方法使这些酶与抗体结合。作为底物，可以使用与所用的酶的种类相对应的公知的物质。例如：4-甲基伞形花磷酸酯（umbelliferone phosphate）等羟基香豆素衍生物、硝基苯基磷酸酯等磷酸化酚衍生物等。例如：可以在用过氧化物酶作为酶时，使用 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺，或作为酶用碱性磷酸酶时，可以使用对硝基苯酚等。在本发明中，在形成信号时，也可以组合使用 4-羟基苯基醋酸、o-苯二胺（OPD）、四甲基联苯胺（TMB）、5-氨基水杨酸、3, 3'-二氨基联苯胺四氢氯化物（DAB）、3-氨基 9-乙基卡巴唑（AEC）、酪胺、发光氨、光泽精虫荧光素（Lucigenin Luciferin）及其衍生物；Pholad luciferin 等和辣根过氧化物酶等的过氧化物酶；Lumigen PPD、（4-甲基）伞形酮内酯

- 磷酸、p-硝基酚-磷酸、酚-磷酸、5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸(BCIP)、AMPAK™(DAKO)、AmpliQ™(DAKO)等和碱性磷酸酶; 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷这种伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷、o-硝基酚-β-D-葡萄糖醛酸苷等硝基酚葡萄糖醛酸苷等与基β-D-葡萄糖醛酸苷酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、TBTS等与葡萄糖氧化酶等酶试剂。可以使用对苯二酚、羟基苯醌、羟基蒽醌等对苯二酚化合物、硫辛酸、谷胱甘肽等的硫醇类化合物、酚衍生物等在酶等作用下形成的物质。

作为放射性同位素, 可以使用常规在RIA中使用的³²P、¹²⁵I、¹⁴C、³⁵S、³H等。作为荧光物质或者化学发光化合物, 可列举: 异硫氰酸荧光素(FITC), 例如: 异硫氰基罗丹明B、四甲基异硫氰基罗丹明(RITC)、四甲基异硫氰基罗丹明异构体R(TRITC)等罗丹明衍生物、7-氨基-4-香豆素-3-醋酸、丹磺酰氯、丹磺酰氟、荧光胺、藻胆素、吡啶酯盐、光藻素、荧光素酶、雌马酚等发光胺、咪唑、草酸酯、稀土类螯合化合物、香豆素衍生物等。作为荧光色素, 可以使用通常在荧光抗体法中使用的物质。在对包括发色、荧光等生成的信号等进行检测时, 既可以通过目测, 也可以使用公知的装置, 例如: 也可以使用荧光光度计、读板仪等。此外, 在对放射性同位素等发出的信号进行检测时, 也可以使用公知的装置, 例如也可以使用γ计数器、液闪计数器等。

在标记抗体时, 可以利用硫醇基和马来酰亚胺基的反应、吡啶基双硫基和硫醇基的反应、氨基和醛基的反应等, 也可以从公知的方法或者本领域的技术人员容易得到的方法, 还有对这些进行修饰后的方法中加以适当选择。可以使用能在制备免疫原性复合物中使用的缩合剂、能在与载体的结合中使用的缩合剂等。作为缩合剂, 可以列举: 甲醛、戊二醛、六甲撑二异氰酸酯、六甲撑二异硫氰酸酯、N,N'-聚甲撑二碘乙酰胺、N,N'-乙撑二马来酰亚胺、聚乙二醇二丁二酰琥珀酸酯、二重氮苯氟、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺、琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶乙基)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺

-4-(N-甲基马来酰亚胺)环己烷-1-碳酸酯(SMCC)、N-磺酸琥珀酰亚胺基-4-(N-甲基马来酰亚胺)环己烷-1-碳酸酯、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰)氨基苯甲酸酯、N-琥珀酰亚胺基4-(苯基马来酰亚胺)丁酯、N-(ε-羧己酰马来酰亚胺)琥珀酰亚胺(EMCS)、亚氨基四氢噻吩、S-乙酰基巯基琥珀酸酐、甲基-3-(4'-二巯基吡啶)丙酰胺酯、甲基-4-巯基丁酰亚胺酯、甲基-3-巯基丁酰亚胺酯、N-马来酰胺-S-乙酰丁酰乙酯等。

作为在诊断方法中使用这种抗体的一种实施形式,是在液相体系中检测抗体与HRF蛋白质的结合。例如:将发明(2)的抗体进行标记,将标记了的抗体与机体试样接触使标记的抗体与HRF蛋白质结合,分离该结合物。可以用公知的分离方法(层析法、固相等)作为分离方法等分离HRF蛋白质+标记抗体的结合物。此外,可以使用以公知的Western印迹为基准的方法。在测定标记的信号时,当用酶作为标记的情况下,加入在酶的作用下可分解显色的底物,通过测定光学测定底物的分解量计算酶的活性,将其换算成结合的抗体量,与标准值进行比较计算出抗体量。当使用的是放射性同位素的情况下,用液闪计数器等测定放射性同位素发出的放射线量。此外,使用的是荧光色素的情况下,可以通过组装有荧光显微镜的测定装置测定荧光量。

作为在液相体系进行诊断的以外的方法,可使发明(2)的抗体(一抗)与机体试样接触,使一抗与HRF蛋白质结合,使标记的发明(2)的抗体(二抗)与该结合物结合,检测该三者结合物上的标记信号。或者,为了进一步增强信号,也可以首先将未标记的二抗与抗体+抗原肽结合物结合,然后向该二抗上结合标记物质。进行这种向二抗上结合标记物质时,例如:可以将二抗进行生物素化,将标记物质进行亲和素化。或者也可以标记可识别二抗的部分区域(例如:Fc区域)的抗体(三抗),使该三抗与二抗结合。并且,可以一抗和二抗二者都可以使用单克隆抗体,或者,也可以在一抗和二抗中的任何一方使用多克隆抗体。从液相中分离结合物或者检测信号与上述相同。此外,作为可使该诊断方法简便并且大范围地实施的方式,提供发明(10)

的诊断试剂盒。

使用抗体的其他的诊断方法是在固相体系中使抗体和 HRF 蛋白质结合的实验方法。在该固相体系的方法中，优选的方法可进行极其微量的 HRF 蛋白质的检测和简便地操作的方法。即，该固相体系的方法是如下的方法：将发明（2）的抗体固定到树脂板上或者膜上等，使 HRF 蛋白质与该固定化的抗体结合，洗涤去除未结合的蛋白质后，使经标记了的发明（3）抗体的标记化抗体与板上残留的抗体 + HRF 蛋白质结合物相结合，检测该标记抗体的信号。该方法是称为“夹心法”的方法，使用酶作为标记物的情况下，ELISA（enzyme linked immunosorbent assay）是广泛使用的方法。其中的两类抗体二者均可以使用单克隆抗体，或者其中的任何一方使用多克隆抗体。

在本发明中的诊断是通过免疫染色，例如：组织或者细胞染色、免疫电子显微镜、免疫分析，可以进行例如：竞争型免疫分析或者非竞争型免疫分析、放射免疫测定法（RIA）、荧光免疫测定法（FIA）、发光免疫测定法（LIA）、酶免疫测定法（EIA）、ELISA 等，在可以进行或者不进行 B-F 分离的情况下，对其进行测定。优选 RIA、EIA、FIA、LIA，此外，可列举夹心法分析。在夹心法测定中还可以包括同时夹心分析、正向（forward）夹心分析或者反向夹心分析等。

在本发明中，作为测定 HRF 蛋白质的量的系统，例如：针对组织的免疫染色、免疫电泳等的蛋白质测定体系；针对组织抽提物、血液、体液等的 EIA、RIA、FIA、LIA、Western 印迹等蛋白质测定体系。

在 EIA 测定体系中，例如：在竞争法中将抗 HRF 抗体用作固定化抗体使用，使用标记抗原以及未标记抗原（作为抗原，可列举 HRF 蛋白质或者其片段肽等），此外，在非竞争法中，例如：在夹心法中，可以利用固定化的抗 HRF 抗体或者标记的抗 HRF 抗体之外，可以直接标记抗 HRF 抗体，或者不进行固定化，针对抗 HRF 抗体进行抗体标记，来进行固定化。作为增加敏感度的方法，例如：与非酶标记的一抗的组合可列举：利用高分子聚合物和酶以及一抗（例如：使用 Envision 试剂；Enhanced polymer one-step staining（EPOS）等）；与非

酶标记二抗的组合可列举: PAP (peroxidase-antiperoxidase) 法等酶与抗酶抗体复合物的组合, SABC(avidin-biotinylated peroxidase complex) 法等生物素标记二抗和亲和素复合物的组合、ABC (Streptavidin-biotin complex) 法、LSAB (labeled streptavidin-biotin) 法等生物素标记二抗以及生物素标记酶-链霉亲和素复合物的组合、CSA (catalyzed signal amplification) 法等 SABC 和生物素标记酪胺与酶标记链霉亲和素的组合, 用高分子聚合物标记二抗和酶等。

对于上述的常规的技术方法的详细介绍可以参见综述、书籍等, [例如: 入江宽编, “放射免疫分析”, 讲谈社, 昭和 49 年发行; 入江宽编, “续放射免疫分析”, 讲谈社, 昭和 54 年发行; 石川荣治等编, “酶免疫测定法”, 医学书院, 昭和 53 年发行; 石川荣治等编, “酶免疫测定法”(第 2 版), 医学书院, 昭和 57 年发行; 石川荣治等编, “酶免疫测定法”(第 3 版), 医学书院, 昭和 62 年发行; H. V. Vunakis et al. (ed.), “Methods in Enzymology”, Vol. 70 (Immunochemical Techniques, Part A), Academic Press, New York (1980); J. J. Langone et al. (ed.), “Methods in Enzymology”, Vol. 73 (Immunochemical Techniques, Part B)” Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), “Methods in Enzymology”, Vol. 74 (Immunochemical Techniques, Part C), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), “Methods in Enzymology”, Vol. 84 (Immunochemical Techniques, Part D: Selected Immunoassays), Academic Press, New York (1982); J. J. Langone et al. (ed.), “Methods in Enzymology”, Vol. 92 (Immunochemical Techniques, Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), Academic Press, New York (1983); J. J. Langone et al. (ed.), “Methods in Enzymology”, Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986);

J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 178 (Antibodies, Antigens, and Molecular Mimicry), Academic Press, New York (1989); M. Wilchek et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 184 (Avidin-Biotin Technology), Academic Press, New York (1990); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 203 (Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs), Academic Press, New York (1991) 等中的内容或者其中所引用文献的内容。

本申请提供了作为在该固相体系中的细胞抽提物或者血液中测定蛋白质的量的诊断方法的发明(7)。即,该发明(7)是一种子宫内膜异位相关疾病的诊断方法,其特征为其中至少包括下述工序:

- (a) 使受检者的机体试样与固定有上述发明(2)的抗体的载体接触的工序;
- (b) 洗涤在工序(a)中与机体试样接触的载体的工序;
- (c) 使标记的上述发明(3)的抗体接触经过工序(b)中洗涤后的载体的工序;
- (d) 测定载体上的结合标记或者游离标记的工序;
- (e) 以在工序(d)测定的标记量作为HRF蛋白质的量的指标,与正常机体试样的结果进行比较的工序,以及
- (f) 将与正常机体试样进行比较而表现出有意义地高的HRF蛋白质的量作为表示患有子宫内膜异位相关疾病或者其风险程度的指标的工序。

此外,作为可使该诊断方法简便并且在范围地实施的方式,提供了发明(11)的诊断试剂盒。

此外,本申请提供了用作在固相体系中测定组织或者细胞的HRF蛋白质的量的方法的发明(8)的诊断方法。即,该方法是一种子宫内膜异位相关疾病的诊断方法,其特征为其中至少包括下述工序:

- (a) 使受检者的机体试样进行组织固定化处理的工序;

- (b) 将在工序(a)中制备的组织固定化标本制成切片的工序;
- (c) 通过上述发明(2)的抗体对在工序(b)中得到的组织切片进行免疫组织染色的工序;
- (d) 以通过工序(c)测定的免疫组织染色的程度作为HRF蛋白质的量的指标,与正常机体试样的结果进行比较的工序,以及
- (e) 将与正常机体试样进行比较而表现出有意义地高的HRF蛋白质的量作为表示患有子宫内膜异位相关疾病或者其风险程度的指标的工序。

在该发明(8)的方法中,可以使用1种抗体或者2种抗体(例如:发明(2)的抗体和标记的抗Ig抗体等)进行通过抗体的免疫组织染色。

作为可有效地进行如发明(8)等的诊断的手段,提供了发明(9)的诊断试剂盒。

发明(9)~(11)的诊断试剂盒是为了进行上述各诊断方法的试剂盒。这些试剂盒可以根据被检成分的种类存在各种市售的,本发明的诊断试剂盒除了可以使用由本发明提供的抗体和/或标记抗体之外,也可以使用公知公用的试剂盒中所用的各要素构成的试剂盒。

并且,通过本申请提供的诊断方法,可以将2种以上前述的各种方法相组合,或者可以例如:并用以公知的方法(例如:Northern印迹法、RT-PCR法、DNA微阵列法等)进行测定方法。

发明(12)是一种可识别HRF蛋白质,并且能中和HRF蛋白质的活性的抗体,发明(13)是含有该抗体的子宫内膜异位相关疾病的治疗药物。此外,发明(14)是一种治疗子宫内膜异位相关疾病的方法,其特征在于,向体内给予上述抗体或者治疗药物。

发明(12)的抗体是具有中和HRF蛋白质的活性(即,妨碍或者抑制HRF蛋白质的活性)的抗体,其对子宫内膜异位相关疾病的治疗有效。如下面的实施例所示,HRF蛋白质产生过剩的细胞在体内增殖活跃,据此认为细胞内HRF蛋白质的过剩活性导致了子宫内膜组织的移植或者增殖。因此,通过中和该HRF蛋白质的活性,有可能治疗子

宫内膜异位或者至少停止或者抑制该病的发展、恶化。

将可使 HRF 强制表达的细胞置于小鼠等的动物体内，如注入到腹腔内，结果发现在腹腔内引起子宫内膜异位样病变，据此阐明可以利用上述可中和 HRF 的抗体，抑制 HRF 的影响等，将其应用到治疗中。

发明(12)的抗体，优选单克隆抗体，进一步优选人源化的单克隆抗体。将非人抗体进行人源化的方法是公知的，例如：用人抗体的相应序列置换来自啮齿动物的抗体的互补决定区(CDR)(例如：Jones et al., Nature, 1986, 321: 522-525; Riechmann et al., Nature, 1988, 332: 323-327; Verhoeyen et al., Science, 1988, 239: 1534-1536)。这种“人源化”抗体是用自非人种的相对应的序列置换无伤的人的可变区域的1个或者多个氨基酸残基得到的嵌合抗体(例如：美国专利4816567)。实际上，人源化抗体典型的是用几个CDR残基以及根据不同情况的几个FR残基置换啮齿类抗体对应部位的残基而得到的抗体。此外，除此之外可以按照几个公知的方法(例如：Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227: 381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222: 581; Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss. p. 77; Boerner et al., 1991, J. Immunol., 147(1): 86-95)制备人源化抗体。此外，可以通过转基因有人免疫球蛋白基因座的动物，例如：将内源性免疫球蛋白基因导入到部分或者完全失活的小鼠中使之产生人源化抗体(例如：美国专利5545807号、美国专利5569425号、美国专利5625126号、美国专利5633425号、美国专利5661016号, Marks et al., 1992, Bio/Technology 10, 779-783; Lonberg et al., 1994, Nature, 368: 856-859; Morrison, 1994, Nature, 368: 812-13; Fishwild et al., 1996, Nature Biotechnology, 14: 845-51; Neuberger, 1996, Nature Biotechnology, 14: 826; Lonberg and Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93)。

将发明(13)的药剂制备成含有上述抗体的制剂。即，将具有所期望程度的纯度的抗体以亲油性制剂或者水性溶液的形态，与任意在

制剂上允许的载体、赋形剂或者稳定剂相混合，制备并加以保存（Remington's Pharmaceutical Science 18th edition 1990）。所允许的载体、赋形剂或者稳定剂的用量以及浓度以不对患者产生毒性为条件，可以根据剂型或者给药途径加以适当选择。例如：磷酸、柠檬酸以及其他的有机酸等缓冲液；含有抗坏血酸以及蛋氨酸的抗氧化剂；防腐剂（十八烷基二甲基苄基铵氯化物、六水氯化镁、ベンズアルコニウムクロライド、ベンズエトニウムクロライド、酚、丁基或者苄醇、对羟基苯甲酸甲酯或者丙酯等羟基苯甲酸的烷基酯、邻苯二酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇以及m-甲酚等），低分子量（约不足10个残基）多肽、血清白蛋白、明胶或者免疫球蛋白等蛋白质，聚乙烯吡咯烷酮等亲水性聚合物、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或者赖氨酸等氨基酸；含有甘油、甘露糖、或者糊精的单糖、双糖以及其他碳水化合物 EDTA 等的螯合剂、蔗糖、鼠李糖醇、海藻糖、山梨醇等糖，钠等盐成对离子，金属络合物（例如：Zn-蛋白质络合物）或者吐温（TWEEN）（商品名）、PLURONICS（商品名）、以及聚乙二醇（PEG）等的非离子表面活性剂。

本发明的试剂可以含有细胞毒性制剂、细胞因子或生长抑制剂等活性成分。这些成分也可以包含在例如通过凝聚技术或者表面聚合制备的微囊（例如：各种羟甲基纤维素或者明胶微囊以及多聚（甲基丙烯酸甲酯）微囊）中、或者胶体状药物递送体系BR（例如：脂质体、白蛋白小球、微乳液、纳米粒子以及纳米囊）中（参见 Remington's Pharmaceutical Science 18th edition, 1990）。

此外，向体内给药的制剂必需是无菌的。使之通过灭菌过滤膜的过滤很容易实现这点。制成缓释制剂也可以。缓释制剂的优选例是含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质（例如：膜或者微囊的形状）。缓释性制剂的例子为：聚酯水凝胶（例如：聚（2-羟乙基-甲基丙烯酸酯）或者聚（乙烯醇））、ポリアクチド（美国专利 3773919 号）、L-谷氨酸以及 γ -乙基-L 谷氨酸酯、非分解性的乙烯-醋酸乙烯、LUPRON DEPOT（商品名）（乳酸-甘油酸共聚物与醋酸罗沙替丁的可以

注射的小球)等分解性乳酸-甘油酸共聚物、聚-(D)-3-羟基丁酸等。此外, 乙烯-醋酸乙烯以及乳酸-甘油酸等的聚合物可以历时 100 天释放出分子。

可以通过向生物体内给予上述抗体或者药物制剂来实施发明(14)的治疗方法。例如: 将药物制剂局部给药到子宫内膜处或者通过静脉给药到全身的方法。抗体的给药量对应于患者的体重、症状等, 可以是每天大约 $100 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重 $\sim 10\text{mg}/\text{Kg}$ 体重左右。

实施例

以下, 通过示出实施例, 对本发明进行更详细的说明, 本发明并不受到下述例子的限制。

试验例 1

1. 材料和方法

1-1. 组织材料

为了制备 RNA, 从 18 例患者中得到以下的试样。1) 子宫内膜异位移植物 ($n=21$)、2) 来自子宫内膜异位患者的正常部位的子宫内膜组织 (通过搔爬得到的, $n=4$)、3) 来自未患子宫内膜异位的患者的正常子宫内膜组织 ($n=6$)。几种试样来自同一个人的不同部位。将试样在液氮中冷冻, 储存在 -80°C , 准备用于制备 RNA。从卵巢得到子宫内膜异位的移植物。所用的试样是将用于制备 RNA 的正常子宫内膜组织、和从患者的平滑肌肿块或者子宫脱落物中得到的能正常地增殖和分泌的子宫内膜组织在福尔马林中固定、石蜡包埋后得到的。病理标本是通过组织学实验进行阶段区分, 其结果将子宫内膜异位分成第 III 直到 IV 阶段 (t-ASRM: revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis “修订版美国生殖医学学会子宫内膜异位分类”, 1996)。此外, 该研究的女性受检者未表现出子宫内膜的过形成或者肿瘤形成, 在手术前未接受抗炎药物或者激素药物给药。手术前获得书面同意, 按照东京医科

大学医院的人体调查相关设施内部监察委员会所确认的程序进行。

1-2. Northern 印迹分析

根据文献 (Oikawa K. et al. Cancer Res. 2001, 61 (15): 5707-9) 的内容进行 Northern 印迹。按照文献 (Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290 (3) : 984-7) 的内容制备 HRF 探针。以人 β 肌动蛋白 cDNA 对照探针 (CLONTECH Laboratories Inc.) 为标准。

1-3. 用于 Southern 印迹分析的 RT-PCR

根据文献 (Kubota M. et al. Am. J. Pathol. 1997, 151 (3): 735-44) 的内容, 使用寡核苷酸 dT 引物, 从总 RNA 合成第一链的 cDNA。然后, 将得到的第 1 链 cDNA 溶液 $2\mu\text{l}$ ($1\times$) 和 $10\mu\text{l}$ ($5\times$) 用作模板, 进行 PCR。在添加下述 4 种引物后, 在初期于 95°C 变性 2 分钟, (于 95°C 下, 0.5 分钟, 于 65°C 下, 0.5 分钟, 于 72°C 下, 1 分钟) 进行 $\times 22$ 循环的条件下, PCR 扩增 CYP1A1 和 β 肌动蛋白的 cDNA 片段。

用于扩增 CYP1A1 的引物:

5'-ccacaaccaccaagaactgcttag-3' (SEQ ID: 3)

5'-gaaggggacgaaggaagagtg-3' (SEQ ID: 4)

用于扩增 β 肌动蛋白的引物:

5'-gggaaatcgtgcgtgacgttaag-3' (SEQ ID : 5)

5'-tgtgttggcgtacaggtctttg-3' (SEQ ID: 6)

通过琼脂糖电泳分离扩增的产物后, 进行印迹和杂交。通过使用上述的引物对的逆转录 PCR 得到 CYP1A1 cDNA 探针。将人 β 肌动蛋白 cDNA 探针 (CLONTECH) 作为对照。使用 Rediprime II random trime labeling system (Amersham Pharmacia Biotech), 用 ^{32}P 标记这些 cDNA 探针。

1-4. 制备抗体和免疫组织化学方法

使用兔子, 按照标准方法制备针对来自人 HRF 的寡肽 (GKLEEQRPERVKPFMT: SEQ ID: 2 的 101-116) 的肽抗体, 将其命名为 HRF-GKL。免疫组织化学分析是在抗 HRF 抗体、HRF-TPY (Oikawa K. et

a1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290(3): 984-7) 以及 HRF-GKL (按照 1: 100 稀释) 或者抗人 CD68 抗体 (1: 100 稀释, Dako 公司) 的混合液存在的情况下, 将脱腊的切片温育 1 夜。进行抗 HRF 染色时, 使用压力灭菌器对脱腊的切片进行热诱导性的抗原恢复。使用 LSABC (Dako) 进行检测, 此处将 3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 用作显色物质。使用苏木素进行逆染。

1-5. Western 印迹分析

可以按照文献 (Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290(3): 984-7) 的内容进行 Western 印迹分析。使用抗 HRF (HRF-GKL 或者 HRF-TPY) 进行膜的探针处理, 按照 1: 2000 的稀释比例进行。使用 ECL plus Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech) 进行信号检测。

1-6. 细胞培养和逆转录病毒感染

从美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 得到 NIH3T3 细胞。将细胞保持在 37 °C 的条件下、于添加了 10 % DMEM (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc.) 中, 在 5 % CO₂ 的环境下。使用下述引物通过 PCR 扩增含有全长 ORF 的小鼠 HRF cDNA:

5'-ttggatccatgatcatctaccgggacctg-3' (SEQ ID: 7)

5'-ttgaattcttaacatttctccatctctaa-3' (SEQ ID: 8)

将得到的片段用 BamHI 以及 EcoRI 消化, 克隆到逆转录表达载体 MSCV-puro (CLONTECH) 的 BglIII-EcoRI 部位。重组逆转录病毒的制备和感染流程可以按照文献 (Kuroda > et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96(9): 5025-30) 的内容。感染 24 小时后, 使用 1 μg/ml 嘌呤霉素 (CLONTECH) 历时 2 周对感染细胞进行筛选。

1-7: 动物和处置

将 5×10^5 个细胞的部分样品注射到 6 周龄的雌性 BALB/C 裸鼠的腹腔内, 进行移植分析。2 周后处死动物, 测定移植物克隆数。

2. 结果

2-1. 在子宫内膜异位中 TCDD 诱导性基因 HRF 的表达模式

通过 Northern 印迹分析, 测定子宫内膜异位时的 HRF 表达模式。其结果, 在经确认从 5 例患者中的 3 例中得到的子宫内膜异位移植组织中有 HRF 的高水平表达 (图 1A 以及 1B)。为了通过二噁英诱导人的细胞色素 p450 基因超家族的一部分 (例如: CYP1A1、CYP1A2 以及 CYP1B1), 针对二噁英依赖性的基因表达调节的基本目标是诱导 CYP1A1。为此, 为了调查暴露于二噁英与 HRF 表达的关系, 在此通过 Southern 分析使用 RT-PCR 调查 CYP1A1 的表达 (Trifa Y. et al. J. Biol. Chem. 1998, 273 (7): 3980-5; Oikawa K. et al. Gene 2000, 261 (2): 221-8)。其结果, CYP1A1 并未在全部例中表现出高的 HRF 表达 (图 1A 以及 1B)。所以, 在几种情况下, HRF 表达可能与 TCDD 的诱导无关, 由此确认在子宫内膜异位中的 HRF 的诱导与 TCDD 暴露无关。

2-2. 在子宫内膜异位移植植物中的 HRF 过表达

经确认在子宫内膜异位再次复发的患者的子宫内膜异位移植植物中存在 HRF 的过表达。即, 针对 7 例子官内膜异位患者进行了 Northern 印迹分析 (图 2A)。比较正常的子宫内膜组织以及患有子宫内膜异位的患者的正常部位的子宫内膜, 观察到在子宫内膜移植植物上存在 HRF 的高度表达。

2-3. 在正常子宫内膜和子宫内膜异位移植植物上的 HRF 的免疫组织化学

通过使用抗 HRF 多克隆抗体的免疫组织化学测定表达 HRF 的子宫内膜细胞的类型。其结果, 发现 HRF 共存于子宫内膜腺与正常组织的间质细胞中, 与间质细胞相比, 子宫内膜腺表现出更强的表达 (图 3A 和 3B)。表达模式在分泌与增殖相之间没有显著变化。进一步对在子宫内膜异位移植植物上的 HRF 表达进行了调查。其结果, 在卵巢子宫内膜异位移植植物的间质以及上皮成分两处均存在 HRF (图 3C 和 3E)。在正常的子宫内膜的间质细胞上 HRF 表达较弱, 与此相对, 在卵巢的子宫内膜异位移植植物上, 子宫内膜腺与间质细胞的任何一方均表现出同样的高水平的 HRF 表达。在用免疫前的血清作对照的情况下没有观察到这些与 HRF 相对的特异性的信号 (未出示数据)。可是, 在子宫内

膜异位移植上诱导 HRF 的机制尚不清楚。据报道通过 M-CSF 而使之处于活化阶段的巨噬细胞能诱导 HRF (Teshima S. et al. J. Immunol. 1998, 161(11): 6353-66), 与此一致的是在子宫内膜异位移植中观察到与 CD68 阳性巨噬细胞的相关性 (Hornung D. et al. Am. J. Pathol. 2001, 158(6): 1949-54)。所以, 利用对移植物的连续切片的 CD68 染色, 鉴定发现在 HRF 过表达区域内部有 CD68 阳性的巨噬细胞 (图 3F)。使用苏木素-伊红染色后的对照切片表现了子宫内膜异位移植物的整体性的形态。根据这些结果, 可以认为在子宫内膜异位移植上的 HRF 的产生与巨噬细胞相关。

2-4. HRF 对 NIH3T3 细胞的腹腔内移植的效果

对 HRF 表达增加所造成的生理学影响进行调查。子宫内膜异位的原因尚不明确 (Klinckx R. P. et al. Gynecol Obstet Invest. 1999, 47 Suppl 1: 3-9, discussion 9-10; van der Linden P. J. Q. Front Biosci. 1997, 2: c48-52)。如果遵照主要的假说, 子宫内膜组织通过输卵管逆流达到腹腔 (逆行性月经) 后的移植以及增殖导致发生子宫内膜异位。在这里关于 HRF 针对该移植的影响进行研究。最初, 制备 HRF 过表达的 NIH3T3 细胞的稳定转化体。用表达 HRF 的逆转录病毒载体 (pMSCV-HRF) 感染后, 确认 HRF 高表达 (图 4A)。然后, 将这些细胞 (pMSCV-HRF-3T3 细胞) 注射到裸鼠的腹腔内。与用对照载体 (pMSC-3T3) 感染的细胞相比较, pMSCV-HRF-3T3 细胞具有高的移植能力 (图 4B)。从这些数据可知 HRF 不仅与免疫学功能不全有关, 而且在子宫内膜异位移植物的初期发展时也发挥着重要的作用。

实施例 2

多克隆抗体的制备

制备含有抗 HRF 抗体的抗血清, 从该血清中纯化抗 HRF 抗体。

作为致敏抗原可以选择合成人 HRF 蛋白质(序列号 2)中 101-116 位的肽。将合成的肽以 HLA 为载体, 使其结合, 然后与 KLH 混合 (相对 50 μ g 的肽加入 50 μ g 的 KLH)。将由此得到的抗原液与弗氏完全佐剂混合, 制备含有致敏抗原的溶液。将该溶液按照每 2 周每次 1ml

的量皮下注射（5次）到体重3~4kg的兔子（SPF Japanese White Rabbit）中。

然后，在第5次皮下注射后，间隔1周后从兔子采取血液，制备血清。确认得到的血清中所含有的抗体能特异性地识别HRF蛋白质，将其作为抗HRF抗体。

通过ELISA法确认抗血清为抗HRF抗体（HRF-GKL）。

首先，用20mM碳酸缓冲液（pH9.6）稀释的抗原多肽包被聚乙烯制成的96孔平板（100ng/孔），然后，用含有0.05%Tween20的PBS洗涤，去除未吸附的肽。向各孔中加入从免疫的兔子中采取得到的血液中的血清，在室温下静置约1小时。洗涤后，添加辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗兔免疫球蛋白作为二抗，然后再于室温下静置约1小时。洗涤后，添加底物过氧化氢和3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）使之显色。向各孔中加入2N硫酸中止显色反应，使用用于微孔板的吸光度测定仪测定450nm的吸光度，据此测定显色程度。作为比较，与免疫前采取的血清相比较，确认血清中所含有的抗体确实能特异性地识别HRF蛋白质。上述操作可以使用重组蛋白质作为抗原。

将10 μg NIH3T3的全细胞裂解物添加到14%的SDS-PAGE上，用2000倍稀释的抗血清在Western印迹中进行检测，将得到的含有抗HRF抗体的血清加到信号条带上，以此确认其纯度。该抗体能在小鼠和人细胞中检测出相同大小的蛋白质。

可以使用将上述HRF蛋白质的101-116位肽固定到亲和凝胶（BIO-RAD公司制造）后的柱子通过亲和层析进行纯化的抗HRF抗体的制备。将纯化的HRF肽与亲和凝胶-10（BIO-RAD公司制造）混合，在4℃下反应过夜后，用20mM磷酸缓冲液-生理盐水（PBS）充分洗涤亲和凝胶，在含有100mM单乙醇胺的PBS中对亲和凝胶上未反应的官能基团进行过夜封闭，最后用PBS再次洗涤，制备肽固定化柱。向该固定化柱上添加含有抗HRF抗体的兔血清，用PBS充分洗涤后，用20mM甘氨酸-盐酸缓冲液（pH4.0）洗脱吸附的抗HRF抗体。用200mM Tris-盐酸缓冲液立即中和洗脱的抗HRF抗体，用PBS透析1晚后，冻存

在 -80°C 。

实施例 3

夹心 EIA

按照下述的方法,从实施例 2 制备的抗 HRF 抗体以及公知的抗 HRF 抗体中至少选出 1 种,通过 2 种抗 HRF 抗体的适当组合特异性地检测、测定 HRF 蛋白质,由此构成夹心 EIA 系统。EIA 系统可以是一步法也可以是两步法,标记的抗体不限定于 Fab'-HRP。根据测定的目的,可以缩短、延长等调整各反应缓冲液的组成或者反应条件。此外,作为标准品的人 HRF 可以从组织培养上清、细胞培养上清或者以实施例 1 记载的内容或者其它的方法使之表达的重组体中进行纯化。可以将离子交换、凝胶过滤、使用抗人 HRF 抗体的亲和层析或者除此以外的各种亲和层析的组合实现纯化。

(a) 标记抗体的制备

向含有抗 HRF 抗体 (HRF-GKL) 的 0.1M NaCl 的 0.1M 醋酸缓冲液, pH4.2 中添加抗体量的 2% (W/W) 的胃蛋白酶,在 37°C 消化 24 小时。向消化物中添加 3M Tris-HCl、pH7.5,使反应中止。通过以 0.1M 磷酸缓冲液、pH7.0 平衡的超凝胶 Aca54 柱进行凝胶过滤,分离得到 F(ab')₂ 级分。在该 F(ab')₂ 级分中使终浓度为 0.01M 地添加半胱胺盐酸盐,于 37°C 还原 1.5 小时,通过以含 5mM EDTA 的 0.1M 磷酸缓冲液、pH6.0 平衡的超凝胶 Aca54 柱进行凝胶过滤,分离得到 F(ab')₂ 级分。

除了上述操作之外,可以将 HRP 溶解到 0.1M 磷酸缓冲液、pH7.0 中,将 HRP 的 25 倍摩尔量的 EMCS 作为 DMF 添加到其中,在 30°C 使之反应 30 分钟。将其以用 0.1M 磷酸缓冲液、pH6.0 平衡的 NICK-5 柱 (Pharmacia) 进行凝胶过滤,分离得到马来酰亚胺标记的 HRP 级分。

使等摩尔地将 Fab'组分与马来酰亚胺标记的 HPR 混合两种级分,使之在 4°C 反应 20 小时后,以 Fab'10 倍摩尔量的 N-乙基马来酰亚胺封闭未反应的巯基。将其用以 0.1M 磷酸缓冲液、pH6.5 平衡的超凝胶 Aca54 柱进行凝胶过滤,分离得到 F(ab')-HRP 标记抗体。向其中添加 0.1% BSA 以及 0.001% 氯己定 (Chlorhexidine),保存在 4°C 。对

使用其他的抗人 HRF 抗体进行同样的处理。

(b) 抗体结合载体的制备

将抗 HRF 抗体 (HRF-TPY) 溶解到 0.1M 磷酸缓冲液、pH7.5 中,使之浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将该抗体溶液按照每孔 100 μL 添加到 96 孔板中,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 18 小时。去除抗体溶液,用生理盐水洗涤 1 次,用含有 0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl_2 的 Tris-HCl 缓冲液,在 pH8.0 洗涤 3 次后,添加含有 1% BSA、0.1M NaCl、5mM CaCl_2 的 Tris-HCl 缓冲液, pH8.0 进行封闭。对使用的其他的抗人 HRF 抗体进行同样的处理,制备固定化抗体。

(c) 分步夹心 EIA 法

将纯化的人 HRF 级分作为标准抗原,制成用于定量人 HRF 的标准曲线。含有 1% BSA、0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl_2 的 Tris-HCl 缓冲液,在 pH8.0 梯度稀释的标准人 HRF,将其分装,向其中分别加入用含有 1% BSA、0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl_2 的 Tris-HCl 缓冲液,在 pH8.0 制备的标记抗体 Fab'-HRP,充分混合。将制备的抗体结合微孔板用含有 0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl_2 的 Tris-HCl 缓冲液,在 pH8.0 洗涤 3 次,添加标准抗原和标记抗体混合液。在室温反应 1 小时后,用含有 0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl_2 的 Tris-HCl 缓冲液,在 pH8.0 洗涤 3 次。然后,在含有 6% 二甲基甲酰胺、0.005%g 过氧化氢的 0.1M 醋酸缓冲液 (pH5.5) 中溶解 0.01%3,3',5,5'-四甲基联苯胺,将其加入到向各孔中,在室温下反应 20 分钟后,添加 2N 硫酸,中止反应。用微孔板读板仪测定该反应混合液在 450nm 的吸收,算出标准曲线。

可以从来自人的体液成分、各种人组织的抽提液、来自人或者重组体等的各种培养细胞的细胞提取液、培养上清等中制备待测样品。代替标准人 HRF,将各种待测样品供给上述的一步夹心 EIA,与标准人 HRH 同时进行反应。将有待检样品得到吸光度与保准曲线对比,计算出待检样品中含有的 HRF 的量。

除了上述之外,使用市售的抗人 HRF 抗体,按照瓜谷郁等编、“生

物化学试验法 27、石川荣治著、酶标记法”，株式会社学会出版中心（1991年6月20日发行）以及日本生化学会编、“续生化学试验讲座 5”、免疫生化学研究法”、p107-112，东京化学同人，1986年3月14日发行中记载的方法（也包括这些方法中引用的文献中记载的方法），制备酶标记抗体，再将其用于测定。

实施例 4

Western 印迹

表达人 HRF 的细胞或者组织的培养上清以及纯化的重组人 HRF 在还原条件下，用 10% - 15% 的 SDS-PAGE 分离后，转移到 polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (MILLIPORE)。然后用含有 5% 的 BSA 或者 5% 脱脂奶粉以及 0.05% 叠氮钠的 TBS (封闭缓冲液) 在室温条件下封闭 0.5-1 小时后，用 HRF-GKL 处理，在 25℃ 下，温育 6 小时以下。用含有 0.1% Tween 20 的 TBS (含有 0.05% 叠氮钠) 洗涤各膜 4 次，将结合的抗体与用封闭缓冲液按照 1: 1000 稀释的 HRP 结合抗兔免疫球蛋白抗体在 25℃ 下，反应 1 小时。反应后，用含有 0.1% Tween 20 的 TBS (含有 0.05% 叠氮钠) 洗涤膜 4 次，通过 Enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia) 检测结合的抗体。

除此之外，使用 HRF-TPY，按照口野嘉幸等编，“基因/蛋白质、试验操作，封闭方法”、p212-241、Softscience 公司、昭和 62 年 11 月 10 日发行中记载的方法（也包括这些文献中引用的文献中记载的方法），进行 Western 印迹。

实施例 5

单克隆抗体的制备

从患者中获取的人子宫内膜异位病变部位组织的细胞中制备总 RNA，据此进行 RT-PCR，分离人全长 HRF cDNA。根据人 HRF cDNA 全长序列 (SEQ ID: 1)，用下述的寡核苷酸作为 PCR 引物：

5'引物 (Bgl II) gcgcatctATGATTATCTACCGGGAC (SEQ ID: 9)

3'引物 (Eco RI) ggccgaattcAGATCCAAAATAATTGCC (SEQ ID: 10)

然后，将得到 PCR 产物克隆到杆状病毒载体 pYNG HisA 中，使之

感染蚕后，从蚕的体液中提取人 HRF 蛋白质。然后，使用镍柱通过组氨酸 Tag 纯化蛋白质。之后将 100 μg 纯化的蛋白质分 3 次免疫到雌性 Balb/C 小鼠中，此后，切取回肠淋巴结，使之与小鼠的骨髓瘤细胞 P3U1 融合，得到杂交瘤。将能产生 HRF 抗体的杂交瘤进行 2 次极限稀释，最终得到杂交瘤 HRF25、HRF26、HRF28。用 ELISA 法进行杂交瘤的筛选。具体而言，将 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗原（由杆状病毒制备的 HRF 蛋白质）吸附到 ELISA 平板 3912（Falcon 公司制造）上。使之与杂交瘤上清反应，再次与作为二抗的山羊抗小鼠 IgG（Zymed 81-6522）反应。添加 ALP Rose（Shino-test 制造）作为底物，测定 A660nm 的吸光度。结果得到克隆 No. 4、18、25、26、28、46、51、54、55、56。吸光度的测定结果如表 1 所示。

表 1

克隆 No.	OD
4	0.15
18	0.55
25	0.08
26	0.57
28	0.29
46	0.11
51	0.56
54	0.74
55	0.43
56	0.86

此外，进行使用这些培养上清的 Western 印迹。具体而言，从确认表达 HRF 的 BJAB 中提取总蛋白质，按照 Laemmili 方法进行 SDS-PAGE，进行硝基纤维素膜的封闭。然后，使之与作为一抗的 5 倍稀释的杂交瘤上清反应，进行研究。结果确认克隆 No. 25（HRF25）、26（HRF26）、28（HRF28）能检测出 HRF 蛋白质的单一条带。并且，该 3 个抗体均为

IgG 抗体。

此外，以上的结果表明抗 HRF 抗体能非常特异性地识别人 HRF。

抗原使用实施例 1 的 2-4 中的强制表达 HRF 的 NIH3T3 细胞，在体内和体外筛选上述得到的单克隆抗体的活性，经确认具有活性的抗体可以判定其有望作为子宫内膜异位的诊断药物、治疗药物。

产业上的可利用性

通过以上的详细说明，根据本发明，可以提供简便并且确实地诊断子宫内膜异位相关疾病以及患病风险的方法和为实现该目的而采用的材料。据此，可以使早期发现子宫内膜异位相关疾病、选择更确切的治疗方法、防止再发等成为可能。

<110> 白麗高科

<120> 子宫内膜异位相关疾病的诊断方法

<130> 03-F-104PCT

<150> JP2003-196459

<151> 2003-07-14

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 830

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (95)..(613)

<223>

<400> 1

ccccccgag cgccgctccg gctgcaccgc gctcgtccg agtttcaggc tcgtgctaag 60

ctagcgccgt cgctgctccc cttcagtcgc catc atg att atc tac cgg gac ctc 115

Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu

1 5

atc agc cac gat gag atg ttc tcc gac atc tac aag atc cgg gag atc 163

Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp Ile Tyr Lys Ile Arg Glu Ile

10 15 20

gcg gac ggg ttg tgc ctg gag gtg gag ggg aag atg gtc agt agg aca 211

Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu Gly Lys Met Val Ser Arg Thr

25 30 35

gaa ggt aac att gat gac tcg ctc att ggt gga aat gcc tcc gct gaa 259

Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Ile Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu

40 45 50 55

ggc ccc gag ggc gaa ggt acc gaa agc aca gta atc act ggt gtc gat 307

Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Ser Thr Val Ile Thr Gly Val Asp

60 65 70

att gtc atg aac cat cac ctg cag gaa aca agt ttc aca aaa gaa gcc Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala 75 80 85	355
tac aag aag tac atc aaa gat tac atg aaa tca atc aaa ggg aaa ctt Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met Lys Ser Ile Lys Gly Lys Leu 90 95 100	403
gaa gaa cag aga cca gaa aga gta aaa cct ttt atg aca ggg gct gca Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala 105 110 115	451
gaa caa atc aag cac atc ctt gct aat ttc aaa aac tac cag ttc ttt Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe 120 125 130 135	499
att ggt gaa aac atg aat cca gat ggc atg gtt gct cta ttg gac tac Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr 140 145 150	547
cgt gag gat ggt gtg acc cca tat atg att ttc ttt aag gat ggt tta Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu 155 160 165	595
gaa atg gaa aaa tgt taa caaatgtggc aattattttg gatctatcac Glu Met Glu Lys Cys 170	643
ctgtcatcat aactggcttc tgcttgcac ccacacaaca ccaggactta agacaaatgg	703
gactgatgtc atcttgagct cttcatttat tttgactgtg atttatttgg agtggaggca	763
ttgttttttaa gaaaaacatg tcatgtaggt tgtctaaaaa taaaatgcat ttaaactcat	823
ttgagag	830
<210> 2	
<211> 172	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 2	
Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp 1 5 10 15	

Ile Tyr Lys Ile Arg Glu Ile Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu
 20 25 30
 Gly Lys Met Val Ser Arg Thr Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Ile
 35 40 45
 Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Ser
 50 55 60
 Thr Val Ile Thr Gly Val Asp Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu
 65 70 75 80
 Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met
 85 90 95
 Lys Ser Ile Lys Gly Lys Leu Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys
 100 105 110
 Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn
 115 120 125
 Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly
 130 135 140
 Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met
 145 150 155 160
 Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu Glu Met Glu Lys Cys
 165 170

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 3
 ccacaaccac caagaactgc ttag 24

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 4
 gaaggggacg aaggaagagt g 21

<210> 5

<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 5
gggaaatcgt gcgtgacgtt aag 23

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 6
tgtgttggcg tacaggtcct tg 22

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 7
ttggatccat gatcatctac cgggacctg 29

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 8
ttgaattcct aacatttctc catctctaa 29

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 9
gCgcagatct atgattatct accgggac 28

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 10
ggccgaattc agatccaaaa taattgcc 28

图1

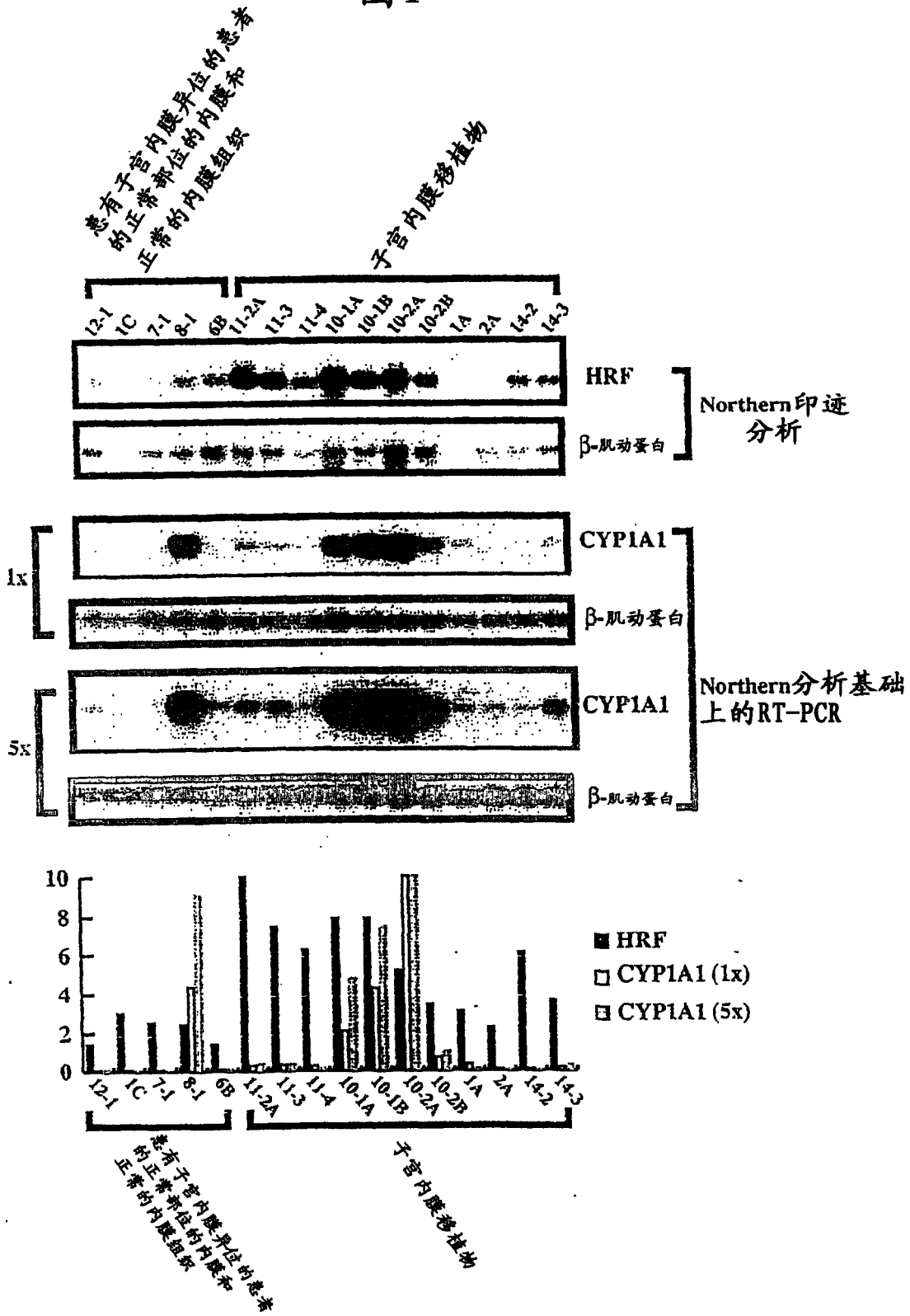


图2

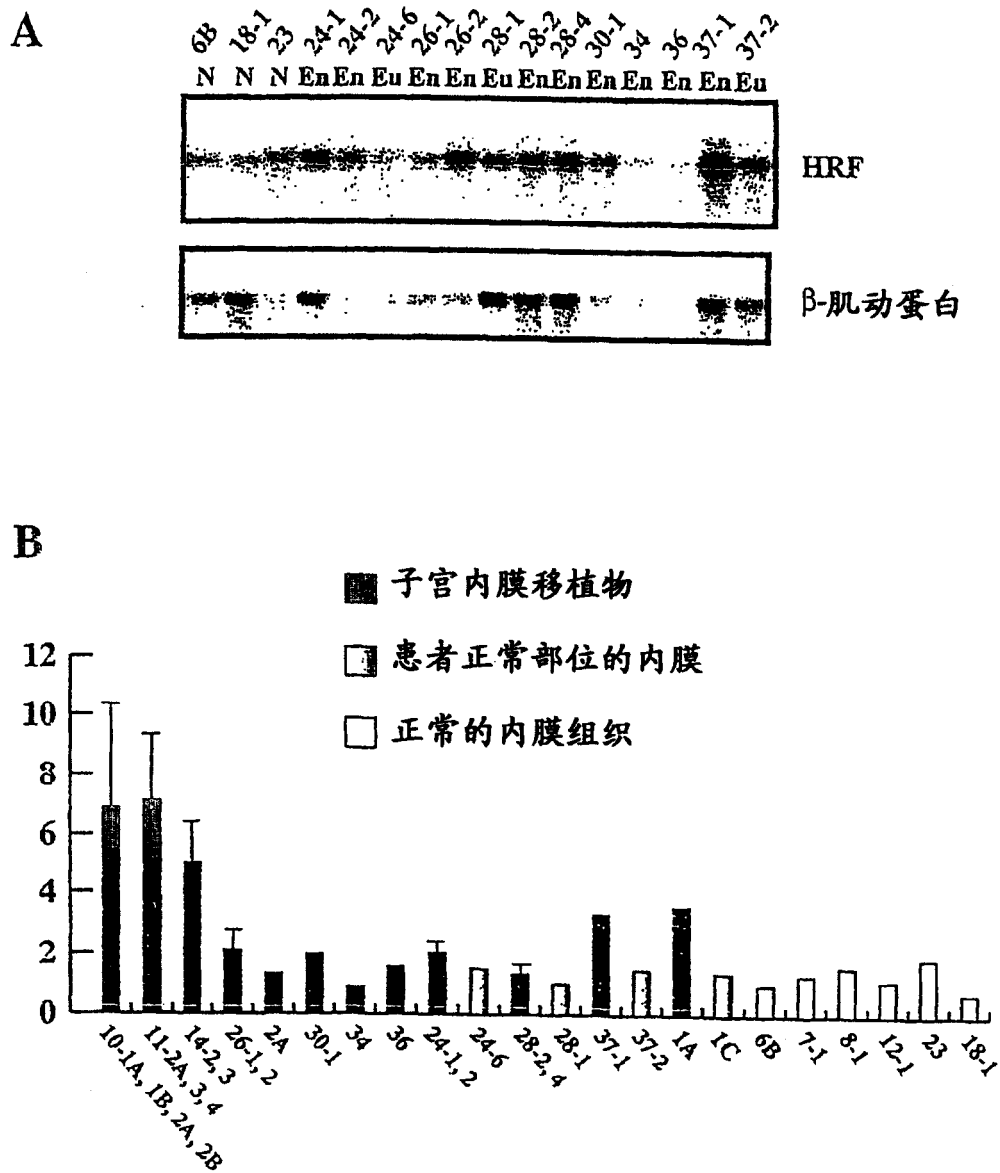


图3

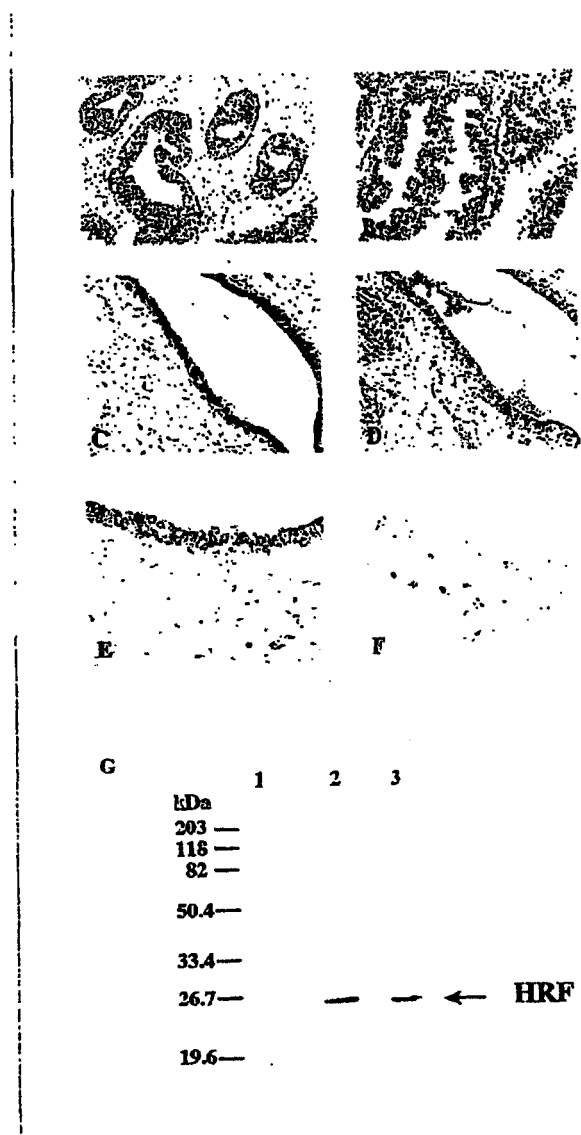
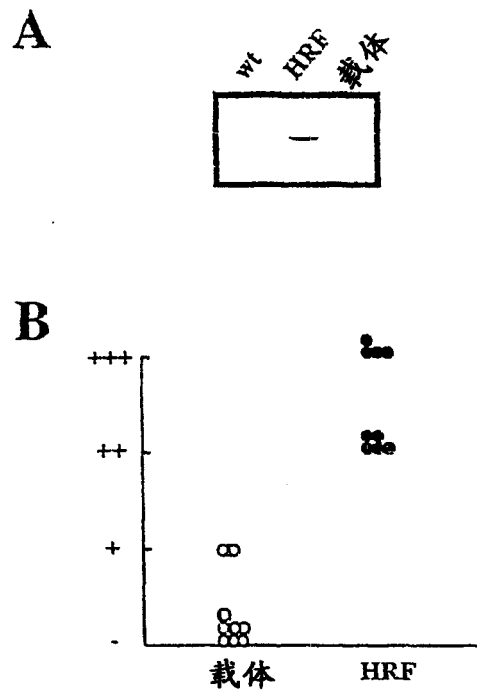


图4



专利名称(译)	子宫内膜异位相关疾病的诊断方法		
公开(公告)号	CN1823274A	公开(公告)日	2006-08-23
申请号	CN200480020217.3	申请日	2004-01-13
[标]发明人	小杉好纪 黑田雅彦 及川恒辅 大林彻也		
发明人	小杉好纪 黑田雅彦 及川恒辅 大林彻也		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 A61K48/00 C07K14/52 G01N33/68		
CPC分类号	C12N2799/027 G01N33/6893 C07K14/52 A61K48/00 C07K16/18 G01N33/6863		
代理人(译)	陈昕		
优先权	2003196459 2003-07-14 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明通过测定受试者机体试样中的组胺释放因子(HRF)蛋白质的存在量，将该HRF蛋白质的量与正常机体试样中的量相比较，将与正常机体试样相比有意义地高的HRF蛋白质的量作为子宫内膜异位相关疾病或者其风险程度的指标。

