



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107002065 A

(43)申请公布日 2017.08.01

(21)申请号 201580051031.2

(22)申请日 2015.08.07

(30)优先权数据

2014-168934 2014.08.22 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.03.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2015/072468 2015.08.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/027697 JA 2016.02.25

(83)生物保藏信息

NITE BP-01866 2014.06.06

NITE BP-01867 2014.06.06

(71)申请人 日东纺绩株式会社

地址 日本福岛县

(72)发明人 菊地涉 笹川久美子 野田健太

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 郑天松

(51)Int.Cl.

C12N 15/00(2006.01)

C07K 16/40(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/02(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/545(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

C12N 9/16(2006.01)

C12P 21/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书13页

序列表13页

PCT/R0/134表2页 附图8页

(54)发明名称

对TRACP-5b(酒石酸抵抗性酸性磷酸酶5b)具有特异性的蛋白定量法

(57)摘要

本发明旨在提供对于特异性测定酒石酸抵抗性酸性磷酸酶5b有用的单克隆抗体。以从蚕绢丝腺纯化的人重组酒石酸抵抗性酸性磷酸酶5b(TRACP-5b)作为抗原,由细胞融合,得到了产生有对TRACP-5b的反应性高于对酒石酸抵抗性酸性磷酸酶5a(TRACP-5a)的反应性的特异性的针对TRACP-5b的单克隆抗体的杂交瘤。通过使用此单克隆抗体,可高灵敏度并且特异性检测待测样品中的TRACP-5b。

1. 单克隆抗体, 其识别依赖于TRACP-5b的立体结构的表位, 由其线状排列的一级结构形成的什么样的表位均不识别。
2. 保藏号NITE BP-01866的杂交瘤TrK-126。
3. 保藏号NITE BP-01867的杂交瘤TrK-127。
4. 权利要求1所述的单克隆抗体, 其由权利要求2所述的杂交瘤产生。
5. 权利要求1所述的单克隆抗体, 其由权利要求3所述的杂交瘤产生。
6. TRACP-5b的检测方法, 其由使用1个或多个权利要求1所述的单克隆抗体的免疫测定法检测待测样品中的TRACP-5b。
7. 权利要求6所述的TRACP-5b的检测方法, 其由使用权利要求4及5所述的单克隆抗体的免疫测定法检测待测样品中的TRACP-5b。
8. 权利要求7所述的检测方法, 其由使用权利要求4及5所述的单克隆抗体的夹心测定ELISA检测待测样品中的TRACP-5b。
9. 权利要求7所述的检测方法, 其由使用权利要求4所述的单克隆抗体及权利要求5所述的单克隆抗体的化学发光酶联免疫测定法 (CLEIA法) 检测待测样品中的TRACP-5b。
10. 权利要求7所述的检测方法, 其由使用权利要求4所述的单克隆抗体及权利要求5所述的单克隆抗体的乳胶凝集法 (比浊法) 检测待测样品中的TRACP-5b。
11. 权利要求6~10之任一项所述的检测方法, 其中作为骨吸收的标志物在骨疾病的临床检查中使用。
12. 用于在TRACP-5b的检测中使用的试剂盒, 其含1个或多个权利要求1所述的单克隆抗体作为构成成分。
13. 用于在TRACP-5b的检测中使用的试剂盒, 其含权利要求4所述的单克隆抗体及权利要求5所述的单克隆抗体作为构成成分。
14. 用于在权利要求8所述的检测方法中使用的试剂盒, 其含下列作为构成成分:
 - (1) 固相支持体;
 - (2) 权利要求4所述的单克隆抗体及被标记的权利要求5所述的单克隆抗体、或者权利要求5所述的单克隆抗体及被标记的权利要求4所述的单克隆抗体; 及
 - (3) 用于检测标记的成分。
15. 用于在权利要求9所述的检测方法中使用的试剂盒, 其含下列作为构成成分:
 - (1) 磁珠;
 - (2) 权利要求4所述的单克隆抗体及被标记的权利要求5所述的单克隆抗体、或者权利要求5所述的单克隆抗体及被标记的权利要求4所述的单克隆抗体; 及
 - (3) 用于检测标记的成分。
16. 用于在权利要求10所述的检测方法中使用的试剂盒, 其含下列作为构成成分:
 - (1) 乳胶粒子; 及
 - (2) 权利要求4所述的单克隆抗体及权利要求5所述的单克隆抗体。

对TRACP-5b (酒石酸抵抗性酸性磷酸酶5b) 具有特异性的蛋白 定量法

【技术领域】

[0001] 本发明涉及产生对于酒石酸抵抗性酸性磷酸酶5b (TRACP-5b: 别名、破骨细胞来源酒石酸抵抗性酸性磷酸酶) 特异性的单克隆抗体、该单克隆抗体的杂交瘤、使用该单克隆抗体的TRACP-5b的检测方法、以及在其中使用的试剂盒。

[0002] 本发明的单克隆抗体作为骨吸收的标志物, 在骨疾病的医学治疗或临床检查的领域中极有效。

【背景技术】

[0003] 血清中的酒石酸抵抗性酸性磷酸酶 (TRACP: Tartrate Resistant acid Phosphatase EC3.1.3.2) 其大部分是破骨细胞来源的酸性磷酸酶, 其测定作为评价破骨细胞的功能的指标有用, 作为骨吸收标志物被感兴趣 (非专利文献1)。一方面, 血清中的酸性磷酸酶由聚丙烯酰胺凝胶电泳, 从原点起分为0~5的6个条带, 在其中, 第5是酒石酸抵抗性, 从而被称为Band5酒石酸抵抗性酸性磷酸酶 (TRACP5)。这还由电泳分为与糖链的唾液酸键合多的5a和几乎无唾液酸键合的5b。进而, 5a是来自血小板或其他的酶而血中值不变动, 与此相对, 由于仅5b伴随骨吸收而变动, 5b被认为是破骨细胞来源酒石酸抵抗性酸性磷酸酶的本体 (专利文献1)。

[0004] 再者, Clinical Chemistry志 (非专利文献2) 中也提议将破骨细胞来源的ACP简称为TRACP-5b。从而, 在本说明书中也将破骨细胞来源、且表示成为骨吸收的指标的ACP表示为TRACP-5b, 破骨细胞来源酒石酸抵抗性酸性磷酸酶和酒石酸抵抗性酸性磷酸酶5b作为同义表示为TRACP-5b。

[0005] 作为表示破骨细胞的活性的酸性磷酸酶的指标求出TRACP活性的以往的活性测定法在特异性、灵敏度、测定的复杂性及测定时间的方面有问题。

[0006] 一般而言, 由活性测定法的TRACP-5b的测定通过在酒石酸的存在下作为合成底物使用磷酸酯而对由酶反应发生的反应生成物 (醇或苯酚类) 进行比色定量求出酶活性。此时, 酒石酸抑制前列腺来源酸性磷酸酶, 通过将残留的酸性磷酸酶活性用底物测定, 将TRACP活性看作TRACP-5b活性而求出。但是, 由于也测定了在待测样品中存在的破骨细胞来源以外的红细胞来源或血小板来源的酒石酸抵抗性酸性磷酸酶, 在特异性的方面有问题。作为上述方法的改善法, 将血清稀释5倍的液于37℃温育1小时的预处理之后, 已知将其余的TRACP活性在酒石酸存在下、作为底物使用p-硝基苯基磷酸 (pNPP) 而测定的方法 (非专利文献3及非专利文献4)。此方法可回避红细胞来源酸性磷酸酶的影响, 但无法排除血小板来源酸性磷酸酶的影响。再者, 作为更特异性的活性测定法, 本发明人报告了利用TRACP-5b和红细胞或血小板来源酒石酸抵抗性酸性磷酸酶活性对于氟的感受性有差异的TRACP-5b测定法 (专利文献2)。但是, 尽管无红细胞及血小板来源酒石酸抵抗性酸性磷酸酶的影响, 但无法排除TRACP-5a的影响, 另外, 通过从总酒石酸抵抗性酸性磷酸酶活性减去在氟存在下不被抑制的活性而求出TRACP-5b活性, 在精度的方面要求进一步的改良。再者, 报告有通过

在上述利用氟的方法中组合TRACP-5a的抑制物质而使用,更特异性地测定TRACP-5b活性的方法(专利文献3)。但是,尽管比仅使用氟的方法更有特异性,但由于仍然由减法求出破骨细胞来源TRACP-5b活性,同样地在精度的方面留有问題。

[0007] 人TRACP-5a和TRACP-5b均是由325个氨基酸构成的人ACP5基因(<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACP5>)产物(SEQ ID NO:1)来源的同种型,至第1~21的分泌信号序列被切除,形成了TRACP-5a,与此相对,TRACP-5b还有由组织蛋白酶K切除至第162~181的肽,第161半胱氨酸和第219半胱氨酸经SS键结合的约16kDa和约23kDa的亚基结构。

[0008] 作为由免疫学测定法的TRACP-5b的测定方法,也已知使用多克隆抗体或单克隆抗体的免疫测定法(非专利文献5、非专利文献6、非专利文献7、非专利文献8、非专利文献9及非专利文献10)。这些方法由于测定了TRACP-5a及TRACP-5b的两者,从而无法忽略TRACP-5a的影响(非专利文献11)。再者,报告有更特异性地测定TRACP-5b的免疫学测定法(专利文献4)。此方法对TRACP-5b活性更具有特异性,但由于在测定中使用的抗体对于TRACP-5b不是特异性的,也与TRACP-5a反应,利用TRACP-5a和TRACP-5b的最适pH的差而在活性测定中算出测定值。因此,担心末期肾疾病等的TRACP-5a亢进的患者待测样品的影响,另外,健康者待测样品和骨吸收亢进的患者待测样品的差异小,作为骨吸收标志物,灵敏度说不上充分(非专利文献12)。

[0009] 本申请发明人从前也试过可识别TRACP-5a和TRACP-5b的单克隆抗体的制成(专利文献6)。结果,尽管成功制成有一定的选择性的抗体,但对于其选择性有改良的余地,为了在临床试验中使用,有必要进一步的改良。

[0010] 现有技术文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献1:特表2002-510050号公报

[0013] 专利文献2:特开平10-37198号公报

[0014] 专利文献3:特开2001-231595号公报

[0015] 专利文献4:W099/50662号公报

[0016] 专利文献5:特表2002-510050号公报

[0017] 专利文献6:专利第4164804号公报

[0018] 非专利文献

[0019] 非专利文献1:骨代谢标志物,福永仁夫,中村利孝,松本俊夫编,Medical Review公司,1995

[0020] 非专利文献2:Clin.Chem.47:1497.2001

[0021] 非专利文献3:日大医志.49:904-911.1990

[0022] 非专利文献4:Clin.Chem.33:458-462.1987

[0023] 非专利文献5:J Clin Endocrinol Metab.71:442-451.1990

[0024] 非专利文献6:J Bone Miner Res.13:683-687.1998

[0025] 非专利文献7:Immunol Lett.70:143-149.1999

[0026] 非专利文献8:J Bone Miner Res.14:464-469.1999

[0027] 非专利文献9:Clin Chem.45:2150-2157.1999

- [0028] 非专利文献10: Clin Chem.46:1751-1754.2000
[0029] 非专利文献11: Calcif Tissue Int, on line 14, September, 2009
[0030] 非专利文献12: Clin. Chim. Acta 301:147-158, 2000

【发明内容】

【发明要解决的技术课题】

[0032] 鉴于涉及的问题, 本发明旨在提供对于作为骨吸收标志物的破骨细胞来源酒石酸抵抗性酸性磷酸酶 (TRACP-5b), 再者特异性和亲和性高的单克隆抗体、产生所述抗体的杂交瘤、使用该单克隆抗体的TRACP-5b的检测方法及在其中使用的试剂盒。

【解决课题的技术方案】

[0034] 为了解决识别含上述糖链修饰的不同的TRACP-5同种型的课题, 本申请发明人使用不是人来源的TRACP-5b, 在必须与人糖链修饰不同的蚕中在绢丝腺中产生的重组体人TRACP-5b而取得特异性和亲和性高的单克隆抗体, 对于该抗体进行解析。

[0035] 即, 本发明的构成如下[1]~[28]。

[0036] [1] 识别依赖于TRACP-5b的立体结构的表位, 由该线状排列一级结构形成的什么样的表位均不识别的单克隆抗体;

[0037] [2] 保藏号NITE BP-01866的杂交瘤TrK-126;

[0038] [3] 保藏号NITE BP-01867的杂交瘤TrK-127;

[0039] [4] 由[2]所述的杂交瘤产生的[1]所述的单克隆抗体;

[0040] [5] 由[3]所述的杂交瘤产生的[1]所述的单克隆抗体;

[0041] [6] 通过使用1个或多个[1]所述的单克隆抗体的免疫测定法检测待测样品中的TRACP-5b的TRACP-5b的检测方法;

[0042] [7] 通过使用[4]及[5]所述的单克隆抗体的免疫测定法, 检测待测样品中的TRACP-5b的[6]所述的TRACP-5b的检测方法;

[0043] [8] 通过使用[4]所述的单克隆抗体及[5]所述的单克隆抗体的夹心测定ELISA, 检测待测样品中的TRACP-5b的, [7]所述的检测方法;

[0044] [9] 通过使用[4]所述的单克隆抗体及[5]所述的单克隆抗体的化学发光酶联免疫测定法(CLEIA法), 检测待测样品中的TRACP-5b的, [7]所述的检测方法;

[0045] [10] 通过使用[4]所述的单克隆抗体及[5]所述的单克隆抗体的乳胶凝集法(比浊法), 检测待测样品中的TRACP-5b的, [7]所述的检测方法;

[0046] [11] 作为骨吸收的标志物在骨疾病的临床检查中使用的, [6]~[10]之任一项所述的检测方法。

[0047] [12] 含1个或多个[1]所述的单克隆抗体作为构成成分的, 用于在TRACP-5b的检测中使用的试剂盒;

[0048] [13] 含[4]所述的单克隆抗体及[5]所述的单克隆抗体作为构成成分的, 用于在TRACP-5b的检测中使用的试剂盒;

[0049] [14] 用于在[8]所述的检测方法中使用的试剂盒, 其含下列作为构成成分:

[0050] (1) 固相支持体;

[0051] (2) [4]所述的单克隆抗体及被标记的[5]所述的单克隆抗体、或者[5]所述的单克

隆抗体及被标记的[4]所述的单克隆抗体;及

[0052] (3) 用于检测标记的成分;

[0053] [15] 用于在[9]所述的检测方法中使用的试剂盒,其含下列作为构成成分:

[0054] (1) 磁珠、

[0055] (2) [4]所述的单克隆抗体及被标记的[5]所述的单克隆抗体、或者[5]所述的单克隆抗体及被标记的[4]所述的单克隆抗体;及

[0056] (3) 用于检测标记的成分;

[0057] [16] 用于在[10]所述的检测方法中使用的试剂盒,其含下列作为构成成分:

[0058] (1) 乳胶粒子;及

[0059] (2) [4]所述的单克隆抗体及[5]所述的单克隆抗体。

[0060] [17] 在蚕绢丝腺中产生,以受蚕特异性的糖链修饰的重组体人TRACP-5b作为抗原的抗体,识别依赖于TRACP-5b的立体结构的表位,由该线状排列的一级结构形成的什么样的表位均不识别的单克隆抗体;

[0061] [18] 由[2]或[3]所述的杂交瘤产生的,[17]所述的抗体;

[0062] [19] 对于红细胞、血小板、嗜中性粒细胞及前列腺来源的酸性磷酸酶基本上不显示交叉反应性的,[17]或[18]之任一项所述的单克隆抗体。

[0063] [20] 使用[17]~[19]之任一项所述的单克隆抗体由免疫测定法检测待测样品中的TRACP-5b的TRACP-5b的检测方法;

[0064] [21] 通过使用[17]~[19]之任一项所述的单克隆抗体的夹心测定ELISA,检测待测样品中的TRACP-5b的,[20]所述的检测方法;

[0065] [22] 通过使用[17]~[19]之任一项所述的单克隆抗体的化学发光酶联免疫测定法(CLEIA法),检测待测样品中的TRACP-5b的,[20]所述的检测方法;

[0066] [23] 通过使用[17]~[19]之任一项所述的单克隆抗体的乳胶凝集法(比浊法),检测待测样品中的TRACP-5b的,[20]所述的检测方法;

[0067] [24] 作为骨吸收的标志物在骨疾病的临床检查中使用的,[20]~[23]之任一项所述的检测方法。

[0068] [25] 含[17]~[19]之任一项所述的单克隆抗体作为构成成分的,用于在TRACP-5b的检测中使用的试剂盒;

[0069] [26] 用于在[21]所述的检测方法中使用的试剂盒,其含固相支持体、[17]~[19]之任一项所述的单克隆抗体、被标记的其他不同的针对TRACP-5b的抗体、及用于检测标记的成分作为构成成分;

[0070] [27] 用于在[22]所述的检测方法中使用的试剂盒,其含磁珠、[17]~[19]之任一项所述的单克隆抗体、及被标记的其他不同的针对TRACP-5b的抗体、及用于检测标记的成分作为构成成分;

[0071] [28] 用于在[23]所述的检测方法中使用的试剂盒,其含乳胶粒子及[17]~[19]之任一项所述的单克隆抗体作为构成成分。

[0072] **【发明效果】**

[0073] 由本发明,能比以往方法更有效检测定量生物体试样中的TRACP-5b,可辅助各种各样的疾病的诊断。

【附图说明】

[0074] 【图1】由ELISA测定法的TRACP-5b测定

[0075] 【图2】在ELISA测定法中的特异性检验

[0076] 【图3】由CLEIA法的TRACP-5b测定

[0077] 【图4】在CLEIA法中的特异性检验

[0078] 【图5】由乳胶凝集法的TRACP-5b测定

[0079] 【图6】ACP5 (TRACP-5) 氨基酸序列、及各种修饰预计部位

[0080] 【图7】<比较例>Trk-62和Trk-49的表位定位

[0081] 【图8】<比较例>Trk-62和Trk-49的表位部位

[0082] 【图9】Trk-126和Trk-127的表位定位

[0083] 【图10】使用Trk-126和Trk-127的TRACP-5b的点印迹和蛋白印记

【实施方式】

[0085] 本发明的单克隆抗体可通过以重组人TRACP-5b作为免疫原使用而得到。在本说明书的之后记载的实施例中从基因重组蚕纯化是培养细胞、大肠杆菌等，只要可表达人TRACP-5b的宿主，就不限定。

[0086] 本发明的单克隆抗体，例如，由通过以纯化人TRACP-5b作为免疫原免疫动物，使该动物产生的产生抗人TRACP-5b抗体的细胞和骨髓瘤细胞融合而得到的杂交瘤产生。

[0087] 上述杂交瘤可由以下的方法得到。即，通过将如上所述得到的人TRACP-5b使用弗氏的完全、不完全佐剂、氢氧化铝佐剂、百日咳佐剂等的已经公知的一同混合，制作致敏用佐剂液，分数次向小鼠、大鼠等的动物每隔1~3周腹腔内皮下、或者尾静脉施用而进行免疫。致敏抗原量设为1 μ g~100mg之间，但一般而言，优选50 μ g左右。在各种各样的方法中知，免疫次数一般是2~7次。接下来，将来源于脾脏等的产生抗体的细胞和骨髓瘤细胞(骨髓瘤细胞)等在试管内有增殖能力的细胞融合。产生抗体的细胞可从小鼠、裸鼠、大鼠等的脾脏等得到。

[0088] 作为上述融合法，可由已公知的Kohler和Milstein的定法(Nature.256, 495.1975)使用聚乙二醇(PEG)融合。也可由仙台病毒、电融合法进行融合。

[0089] 作为从上述融合的细胞选择产生识别人TRACP-5b的抗体的杂交瘤的方法，可如以下一样进行。即，从上述融合的细胞从由有限稀释法由在HAT培养基及HT培养基中生存的细胞制作的集落选择杂交瘤。在从放在96孔等的融合细胞得到的集落培养上清中含针对人TRACP-5b的抗体时，可选择由向将人TRACP-5b固定化到板上的测定板上荷载上清，反应后与抗小鼠免疫球蛋白-HRP标记抗体等的第2标记抗体反应的ELISA法，对于人TRACP-5b的产生单克隆抗体的克隆。在标记抗体的标记物质中，除了HRP之外，可使用碱性磷酸酶等的酶、荧光物质、放射性物质等。另外，作为对照，同时进行由仅结合作为封闭剂的BSA的测定板的ELISA而可进行人TRACP-5b特异性抗体的筛选。即在人TRACP-5b板上是阳性，可利用由BSA的ELISA进行选择阴性的克隆。

[0090] 作为本发明的杂交瘤，产生识别人TRACP-5b的单克隆抗体的杂交瘤之中，优选产生特别与人TRACP-5b反应、并且不与红细胞、血小板、嗜中性粒细胞、前列腺来源的酸性磷酸酶交叉反应的单克隆抗体的。

[0091] 特别是,为了作为本发明的单克隆抗体,在临床检查中使用时,其检查结果更明确地反映骨吸收,优选在检测系统中不与人TRACP-5a结合、仅识别结合TRACP-5b的单克隆抗体。

[0092] 其中“与人TRACP-5b结合,不与人TRACP-5a结合”表示,在现有技术领域中的检测系统(例如,夹心测定ELISA)中,相比人TRACP-5a,对于人TRACP-5b在检测系统中,显示约100倍以上、更优选为约500倍以上的反应性。

[0093] 上述杂交瘤可用通常在细胞培养中使用的培养基、例如 α -MEM、RPMI1640、ASF、S-c1one等培养,从该培养上清回收单克隆抗体。另外,将杂交瘤所来源的动物、裸鼠预先用姥蛟烷处理,通过向该动物腹腔内注射细胞使腹水贮留,也可从该腹水回收单克隆抗体。

[0094] 作为从上述的上清、腹水回收单克隆抗体的方法,可使用通常的方法。例如,可举出由硫酸铵、硫酸钠等的盐析法或层析、离子交换层析、由蛋白A、蛋白G等的亲和层析等。

[0095] 可由使用本发明的单克隆抗体的免疫测定法高灵敏度并且特异性检测待测样品中的TRACP-5b。作为成为对象的待测样品,可举出从待测样品采集、单离的血液、血清、血浆、骨等的组织等。

[0096] 作为由使用本发明的单克隆抗体的免疫测定法的检测方法,可举出夹心测定ELISA法、化学发光酶联免疫测定法(CLEIA法)、乳胶凝集法(比浊法)、组织免疫染色法等。

[0097] 作为利用TRACP-5b的酶活性的测定的免疫测定法,例如,可举出使待测样品、例如血清中的TRACP-5b与本发明的单克隆抗体结合,对于结合的TRACP-5b与TRACP-5b的酶底物、例如p-硝基苯基磷酸或其盐进行酶反应,可通过测定其酶活性来免疫测定待测样品中的TRACP-5b的方法。在该方法中,具体而言,TRACP-5b可如以下一样测定。首先,向吸附到固相支持体上的本发明的单克隆抗体加要测定的待测样品,使待测样品中的TRACP-5b和抗体抗原抗体反应而使TRACP-5b与抗体结合。接下来,将该固相支持体用清洗液清洗,除去未吸附到抗体上的待测样品来源的成分之后,向反应系统加TRACP-5b的酶底物、例如p-硝基苯基磷酸或其盐,使与抗体结合的TRACP-5b和底物反应。用反应停止液停止酶反应之后,由反应生成的苯酚类、例如,p-硝基苯酚,通常在390nm~450nm、优选为400~430nm的波长测定吸光度。由于其吸光度的大小反映TRACP-5b酶活性,从而可从该值测定待测样品中的TRACP-5b。

[0098] 在本发明中,如从上述的测定法明了,抗体优选与固相支持体结合而使用,作为固相支持体,通常,使用在ELISA法等的固相免疫测定法中使用的固相支持体,但不特别限定。例如,作为固相支持体的材料,可举出,聚苯乙烯、聚丙烯、聚碳酸酯、聚乙烯、尼龙、甲基丙烯酸树脂等。作为固相支持体的形状,可举出板、(磁)珠、乳胶粒子等。

[0099] 为了调制吸附到固相支持体上的抗体,利用直接或间接物理结合或化学结合、亲和性而使对于TRACP-5b的抗体结合于固相支持体。致敏抗体量多是1ng~100mg/ml的范围。

[0100] 作为固相支持体,使用(磁)珠进行化学发光酶联免疫测定法(CLEIA法)时,可使用在通常的化学发光酶联免疫测定法(CLEIA法)中使用的试剂、试剂盒等。

[0101] 当使用作为固相支持体的乳胶粒子进行乳胶凝集法时,可使用在通常的乳胶凝集法中使用的试剂、试剂盒等。

[0102] 实施本发明的测定方法之时是用于对TRACP-5b进行免疫测定的试剂盒,使用含(i)固相支持体、(ii)本发明抗体的试剂盒进行。

[0103] 在此试剂盒中,关于(i)固相支持体、(ii)本发明抗体,分别制作固相支持体和抗体溶液,在测定TRACP-5b时,可使抗体吸附到固相支持体上,也可预先在将抗体吸附到固相支持体上的状态下提供。在此试剂盒中,使待测样品中的TRACP-5b与抗体结合之后,为了除去未吸附到固相支持体上的成分,优选含清洗液。作为清洗液,例如,可使用含表面活性剂的Tris缓冲液。

[0104] 再者,在本发明的试剂盒中,根据需要,也可加待测样品稀释液而含有。作为待测样品稀释液,例如,可使用Tris等的缓冲液。在该缓冲液中,也可根据需要,加EDTA·2Na等的螯合剂、食盐等的无机盐。

[0105] 在本发明中,也可由使用本发明的单克隆抗体的夹心测定ELISA法测定TRACP-5b。此时,作为单克隆抗体,除了本发明抗体以外,也可使用其他对于TRACP-5b的不同的抗体实施。由夹心测定来测定TRACP-5b的方法的具体例如下所述。通过首先,作为第一抗体,将本发明抗体吸附到固相支持体、例如,板上,待测样品、例如,与血清中的TRACP-5b反应,清洗固相支持体,接下来,使吸附的TRACP-5b和生物素化的第2抗体、例如生物素化的不同的针对TRACP-5b的单克隆抗体或多克隆抗体反应,与过氧化物酶标记链霉亲和素反应之后,过氧化物酶反应、接下来,进行显色反应,可检测TRACP-5b。另外,通过使用将第2抗体直接由过氧化物酶或碱性磷酸酶等酶标记,可进行同样的测定。另外,与第2标记抗体结合的物质随测定方法而也可不限于酶,放射线同位元素、荧光物质、磁性物质、胶体等。

[0106] 在本发明中,当进行使用本发明抗体的夹心测定ELISA之时,可使用夹心测定ELISA用的试剂盒实施。

[0107] 在用夹心测定ELISA法实施本发明的测定方法之时,例如,作为用于对TRACP-5b进行免疫测定的试剂盒,通过使用含(i)固相支持体、(ii)本发明抗体、(iii)被标记的,不同的对于TRACP-5b的抗体、及(iv)用于检测标记的成分的试剂盒,也可测定TRACP-5b。

[0108] 用于检测标记的成分是用于测定抗体被标记的成分,在标记是生物素时,是含过氧化物酶标记链霉亲和素、四甲基联苯胺的过氧化物酶底物、及过氧化氢的试剂,在标记是碱性磷酸酶时,是含p-硝基苯基磷酸的试剂。在此试剂盒中,根据需要,也可含清洗液。

[0109] 在本发明中,当使用此试剂盒之时,使待测样品中的TRACP-5b与抗体结合之后,为了除去未吸附到固相支持体上的成分,优选含清洗液。作为清洗液,例如,可使用含表面活性剂的Tris缓冲液。再者,在本发明的试剂盒中,也可根据需要,加待测样品稀释液而含有。作为待测样品稀释液,例如,可使用Tris等的缓冲液。在该缓冲液中,也可根据需要,加EDTA·2Na等的螯合剂、食盐等的无机盐。

[0110] 再者,在本发明中,也可将待测样品中的TRACP-5b的存在由利用本发明的单克隆抗体的组织免疫染色法检测。即,例如,通过从人的破骨细胞组织等由通常的方法调制例如冷冻切片,使本发明的单克隆抗体与其反应,接下来,例如,与用过氧化物酶或碱性磷酸酶等的酶标记的第二抗体反应,接下来显色,可特异性检测TRACP-5b的存在。

[0111] 由这样的组织免疫染色法的检测可使用含(i)本发明的单克隆抗体、(ii)被标记的第二抗体及(iii)显色试剂作为构成成分的试剂盒实施。作为被标记的第二抗体,例如,可举出用过氧化物酶或碱性磷酸酶等的酶标记的,动物来源的抗IgG抗血清、抗IgG多克隆抗体等,作为显色试剂,使用用于使标记中使用的酶显色的通常使用的显色底物等的试剂。

[0112] 在本发明中,进行使用本发明抗体的化学发光酶联免疫测定法(CLEIA法)或乳胶

凝集法时,可使用公知的化学发光酶联免疫测定法(CLEIA法)用试剂盒或乳胶凝集法用的试剂盒实施。

[0113] 表位(epitope)是指抗体识别的抗原的一部分。完全长TRACP-5本身由325个氨基酸形成,但抗体并不识别其整体,仅识别抗原的较小的一部分而结合。为了作为表位发挥功能,有必要是至少10个氨基酸残基、更优选为5个氨基酸残基的长度。此抗体结合部分也称为“表位”或“抗原决定基(antigenic determinant)”。

[0114] 识别“表位”是指在含该表位的抗原保持立体结构、或者立体结构解开的任何的条件下,可结合对应于该表位部分的抗体。另外,不识别“表位”是指,在抗原保持立体结构的,及立体结构解开的任何的条件下,对应的抗体也基本上不结合。

[0115] 在本发明中的立体结构是指表示氨基酸序列的一级结构、含其折叠而形成的螺旋或 β -片等的二级结构、具有二级结构的多肽进一步折叠而成的三级结构、及在具有三级结构的多个多肽间缔合而形成空间配置而成的四级结构,优选是指在认为该抗原通常存在的生物体内环境或与其类似的环境中可取该抗原的结构。

【实施例】

[0116] 由以下的实施例、比较例及参考例还详细地说明本发明,但本发明不限于这些实施例。

[0117] 【实施例1】

[0118] (1) 单克隆抗体制作用抗原的选择和准备

[0119] 作为用于制成抗人TRACP单克隆抗体的抗原,准备在基因重组蚕绢丝腺中产生的重组体TRACP-5b。重组体TRACP-5b的调制法用专利5177431号公报中记载的方法制作。

[0120] 从含人重组体TRACP-5b的基因重组蚕摘出绢丝腺,得到300g的绢丝腺。使绢丝腺悬浮于缓冲液(50mM Tris-HCl, pH7.5) 5600mL中,由转子定子型均浆器均化。其后10,000rpm,离心20分钟分离,将该上清应用于CM-Sephrose柱(ϕ 40mm \times 40cm)(GE Healthcare),将吸附的蛋白质用含NaCl的上述Tris缓冲液的直线浓度梯度(0-1.0M NaCl)溶出。酒石酸抗性酸性磷酸酶活性使用底物对硝基苯基磷酸进行测定,合并活性高的部分。对其进行浓缩后,在含0.7M NaCl的20mMTris缓冲液pH7.2中透析,应用于Superdex S200柱(ϕ 16mm \times 60cm)(GE Healthcare),测定同样地溶出的级分的酒石酸抗性酸性磷酸酶活性,合并活性部分。将其用20mMTris缓冲液pH7.2稀释2倍,应用于HiTrap Heparin HP柱(5mL)(GE Healthcare),将吸附的蛋白质经含NaCl的上述20mMTris缓冲液pH7.2的直线浓度梯度(0.35M-1M NaCl)盐浓度梯度溶出。通过将酒石酸抗性酸性磷酸酶高活性级分合并、浓缩,得到1.2mg纯化人重组体TRACP-5b。

[0121] 再者,蛋白量由A₂₈₀确认,纯度则通过进行SDS-PAGE而由银染色的结果,在分子量35,000附近有单条带确认。将变成单一条带的酶作为纯化TRACP-5b而作为免疫抗原。

[0122] (2) 免疫

[0123] 将纯化人重组TRACP-5b用20mM Tris-HCl, pH7.2稀释至成1mg/ml,取50 μ g(50 μ l)而与弗氏完全佐剂(WAKO) 50 μ l充分混合至乳化。将调制的悬浮液在二乙基醚麻醉下腹腔内施用于Ba1b/c 6周龄雌小鼠(日本CLEA)。在2周后使同量的TRACP-5b(50 μ g/ml)与弗氏不完

全佐剂(WAKO)混合而由与弗氏完全佐剂之时完全同样的操作制作为乳化悬浮液,各自向小鼠致敏。在往后2周后进行同样的操作,在第4次,作为最终免疫,将TRACP-5b 50 μ g/ml用20mM Tris-HCl, pH7.2调制,由小鼠尾静脉注射施用。

[0124] (3) 杂交瘤的确立

[0125] 在最终免疫起3天后,将从由TRACP-5b致敏结束的小鼠在二乙基醚麻醉下外科的摘出的脾脏无菌分散而调制脾脏细胞。融合根据Kohler和Milstein的方法(Nature.256, 495.1975)进行,使用聚乙二醇(PEG4000)(MERK)而融合脾细胞和骨髓瘤细胞P3-X63-Ag8-U1(P3U1)。其融合比率是相对于脾脏细胞数 8×10^7 个而骨髓瘤细胞P3-X63-Ag8-U1(P3U1) 2×10^7 个,是4:1。融合细胞分散到10%FCS(INVITROGEN) α -MEM(GIBCO)HAT(Cosmo Bio)培养基而分注到48孔微滴定培养板(住友Bakelite)中,用37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件培养。在以下的探讨中使用的杂交瘤数是3000。

[0126] (4) 筛选

[0127] 在约2周后确认集落的生长而实施筛选。接下来叙述筛选的实施法。

[0128] 为了制作筛选用板,将在上述(1)中纯化的TRACP-5b在20mM Tris-HCl, pH7.2缓冲液中溶解,分注到96孔板(Nunc)中至成0.5 μ g/100 μ l/孔。在将板于4 $^{\circ}$ C2晚静置之后用含0.05%Tween-20的Tris缓冲液清洗3次,为了抑制非特异性反应,分注200 μ l的1.5%BSA溶液,再于4 $^{\circ}$ C1晚静置。在将完成的板用含0.05%Tween 20的Tris缓冲液清洗3次之后使与培养上清100 μ l反应,在再进行清洗之后加作为第2抗体的HRP标记抗小鼠免疫球蛋白抗体(INVITROGEN)而使反应。在清洗后加100 μ l作为HRP的显色底物的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)(Kainos)而显色一定时间后,还添加100 μ l的1N硫酸作为停止液在,测定波长450nm处测定吸光度。如上所述成为阳性的克隆(29克隆)由有限稀释法再克隆,再次核对上清。

[0129] (5) 抗体的确认

[0130] 由ELISA确认与纯化TRACP-5b的反应性,则在上述29克隆中克隆TrK-126、TrK-127中亲和性有差异,但与板高灵敏度反应。结果,选择克隆TrK-126、TrK-127作为识别TRACP-5b的克隆。将得到的抗体用单克隆抗体分型试剂盒(ROCHE)检验的结果,是以下的如表1一样的结果。

[0131] 【表1】克隆的特性

[0132]

克隆名	类	轻链
TrK-126	IgG1	κ
TrK-127	IgG1	κ

[0133] 上述杂交瘤TrK-126及TrK-127于2014年6月6日,以NITE ABP-01866(TrK-126)及NITE ABP-01867(TrK-127)被独立行政法人制品评价技术基盘机构内专利微生物保藏中心接收,于2014年6月23日生存确认后,被赋予保藏号NITE BP-01866(TrK-126)及NITE BP-01867(TrK-127)(保藏证2014年6月30日发行)。

[0134] 接下来,记载特别指定保藏的内容。

[0135] [1]保藏机关的名称—地址

[0136] 名称:独立行政法人制品评价技术基盘机构专利微生物保藏中心

[0137] 地址:日本国千叶县木更津市上总镰足2-5-8(邮政编码292-0818)

[0138] [2]保藏日:2014年6月6日

[0139] [3]保藏号NITE BP-01866(杂交瘤TrK-126)

[0140] NITE BP-01867(杂交瘤TrK-127)

[0141] (6)单克隆抗体的制作及纯化

[0142] 向姥鲛烷(Sigma-Aldrich)0.5ml施用后2周的,10周龄、Balb/c雌小鼠(日本CLEA)腹腔内施用在上述(5)中得到的杂交瘤TrK-126、TrK-127 1×10^7 细胞个,在约2周后在二乙基醚麻醉下外科采集贮留在小鼠腹腔内的腹水。由在上述(4)的筛选中进行的ELISA法,以腹水作为样品阶段稀释而进行确认,则含高浓度的单克隆抗体。将此腹水用硫酸铵40%处理,在PBS中透析之后,由蛋白G柱(GE Healthcare)纯化,由SDS-PAGE确认。则TrK-126、TrK-127均在非还原时确认分子量约150,000的单一的条带,在巯基乙醇还原时确认了分子量约50,000的条带和25,000这2条条带。纯化的抗体TrK-126、TrK-127均是小鼠每1只约10mg或其以上,对于工业上利用是充分的量。

[0143] (7)由夹心ELISA测定法的TRACP-5b测定和特异性检验

[0144] 使用单克隆抗体TrK-126,TrK-127而制作由夹心ELISA测定法的TRACP-5b测定试剂。另外,为了研究本测定法的特异性使用Native-TRACP-5b、TRACP-5a进行下述的实验,与使用公知的单克隆抗体TrK-62及TrK-49的TRACP-5b夹心ELISA测定法比较(日本专利第4164804号公报)。测定方法如下。

[0145] 将利用Protein G纯化的单克隆抗体TrK-126分注在固相板(Nunc)上至成2 μ g/孔,于4 $^{\circ}$ C静置2天。用含0.05%Tween 20的20mM Tris(pH7.5)清洗液清洗3次之后,加200 μ L而1.5%BSA Tris(pH7.5)于4 $^{\circ}$ C封闭一晚。标记抗体用与前述同样的方法将纯化的单克隆抗体TrK-127使用HRP Labeling Kit-NH2(同仁化学),ALP标记。其中,标记抗体浓度设为1 μ g/ μ l。

[0146] 使用这样制作的板和标记抗体,由夹心ELISA测定法评价TRACP-5b测定的有用性。具体而言,向抗体结合板上加算出含有TRACP-5b的人血清来源的TRACP-5b试样50 μ l。于室温反应1小时,反应结束后,用前出的清洗液清洗3次而加100 μ l的辣根过氧化物酶(HRP)标记的第二抗体。再者于室温反应1小时,反应结束后,用前出的清洗液清洗3次,加100 μ l的100 μ l的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)(Kainos)而显色一定时间后,还添加100 μ l的1N硫酸作为停止液,在测定波长450nm处测定吸光度。

[0147] 测定的结果,确认在使用在本发明中得到的抗体的测定系统中吸光度以TRACP-5b的浓度依赖性地升高(图1)。

[0148] 同样地,向抗体结合板上加仅人血清来源的TRACP-5b终浓度在25ng/mL的试样、或者使TRACP-5b及TRACP-5a各自达终浓度25ng/mL的试样50 μ l。于室温反应1小时,反应结束后,用前出的清洗液清洗3次而加100 μ l的辣根过氧化物酶(HRP)标记的第二抗体。再于室温反应1小时,反应结束后,用前出的清洗液清洗3次,加100 μ l的100 μ l的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)(Kainos)而显色一定时间后,还添加100 μ l的1N硫酸作为停止液,在测定波长450nm处测定吸光度。

[0149] 测定的结果确认,公知的TRACP-5b夹心ELISA测定法(专利第416804号公报)是Native-TRACP-5b、TRACP-5a均显示反应性,但由TrK-126、TrK-127的夹心ELISA测定法是TRACP-5b特异性地显示反应性(图2)。

[0150] (8)由化学发光酶联免疫测定法(CLEIA法)的TRACP-5b测定

[0151] 使用单克隆抗体TrK-126,TrK-127而制作使用磁珠的TRACP-5b测定试剂。另外,为了研究本测定法的特异性,将在公知的方法(专利第416804号公报)中使用的抗体制作同样的测定试剂,对对于Native-TRACP-5b、TRACP-5a的反应性进行比较。测定方法如下。

[0152] 将5mg的TrK-126或TrK-62由Dynabeads Antibody Coupling Kit(INVITROGEN)致敏磁珠。作为标记抗体,将200 μ g的TrK-127或TrK-49使用Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH2(同仁化学),ALP标记。其中,标记抗体浓度设为1 μ g/ μ l。

[0153] 使用上述制成的磁珠和标记抗体,由化学发光酶联免疫测定法(CLEIA法)评价TRACP-5b测定的有用性。具体而言,向2 μ g的抗体致敏磁珠加算出含有TRACP-5b的人血清试样30 μ l,约搅拌20分钟。一边由磁铁蓄积磁珠,一边用含0.05%Tween 20的20mM Tris(pH7.5)清洗液清洗3次之后,加包含含有1 μ g的ALP标记抗体的0.05%Tween 20的20mM Tris(pH7.5)而约搅拌20分钟。一边由磁铁蓄积磁珠,一边用含0.05%Tween 20的20mM Tris(pH7.5)清洗液清洗3次之后,加100 μ l作为ALP的基质的AMPPD(和光纯药)。于室温约搅拌5分钟,测定在波长477nm处具有发光极大的光的发光量。

[0154] 测定的结果,确认在使用在本发明中得到的抗体的测定系统中发光计数以TRACP-5b的浓度依赖性地升高(图3)。

[0155] 同样地,向2 μ g的抗体致敏磁珠加仅人血清来源的TRACP-5b达终浓度25ng/mL的试样、或者TRACP-5b及TRACP-5a各自达终浓度25ng/mL的试样30 μ l,约搅拌20分钟。一边由磁铁蓄积磁珠,一边用含0.05%Tween 20的20mM Tris(pH7.5)清洗液清洗3次之后,加包含含有1 μ g的ALP标记抗体的0.05%Tween 20的20mM Tris(pH7.5)而约搅拌20分钟。一边由磁铁蓄积磁珠,一边用含0.05%Tween 20的20mM Tris(pH7.5)清洗液清洗3次之后,加100 μ l作为ALP的基质的AMPPD(和光纯药)。于室温约搅拌5分钟,测定在波长477nm处具有发光极大的光的发光量。

[0156] 测定的结果确认,公知的测定法(日本专利注册编号416804)是Native-TRACP-5b、TRACP-5a均显示反应性,但由TrK-126、TrK-127的夹心ELISA测定法是TRACP-5b特异性地显示反应性(图4)。

[0157] (9)由乳胶凝集法的TRACP-5b测定

[0158] 使用单克隆抗体TrK-126、TrK-127,向乳胶致敏2种单克隆抗体,制作乳胶试剂。乳胶试剂制作如下述一样进行。

[0159] 将1%乳胶悬浮液2mL和0.1mg/mL TrK-126及TrK-127抗体溶液2mL混合,约1小时搅拌。离心后,使沉淀悬浮于1%BSA溶液中,再次搅拌约1小时。再离心后,将沉淀在PBS溶液中悬浮,得到乳胶试剂。

[0160] 使用上述调制的乳胶试剂而确认由乳胶免疫凝集测定(LATEX测定)能定量人血清中的TRACP-5b。

[0161] 具体而言,使算出含有TRACP-5b的人血清试样35 μ l与含Tris缓冲液的第一试剂100 μ l、含制作的乳胶试剂的第二试剂100 μ l反应,使用日立7180型自动分析装置,在主波长570nm、副波长800nm处,在19-34测光点间(相当于第二试剂添加后约1分钟后~5分钟后),测定由2端点法的吸光度变化量。作为结果,如图5所示,确认了TRACP-5b浓度依赖性的吸光度升高。

[0162] 【比较例1】

[0163] TrK-62、TrK-49的表位的鉴定

[0164] (1) 肽载玻片的制成 (Replitope)

[0165] 从NCBI数据库取得的ACP5 (TRACP-5) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 及文献中报告的各种修饰预计部位如图6所示。

[0166] 对于20~325A.A, 用JPT公司肽载玻片服务 (Replitope, 船越http://www.funakoshi.co.jp/news/071201spdf/071201s_p24.pdf), 分为每10A.A.的肽而依赖斑 (表2; SEQ ID NO:2~61)。

[0167] 【表2】制成的肽组

[0168]

01) DGATPALRFV	03) AVGDWGGVPN	05) APFHTAREMA	07) NAKEIARTVQ	09) ILGADFILSL
02) ALRFVAVGDW	04) GGVPNAPFHT	06) AREMANAKEI	08) ARTVQILGAD	10) FILSLGDNFY
11) GDNFYFTGVQ	13) DINDKRFQET	15) FEDVFSDRSL	17) RKVPWYVLAG	19) NHDHLGNVSA
12) FTGVQDINDK	14) RFQETFEDVF	16) SDRSLRKVPW	18) YVLAGNHDHL	20) GNVSAQIAYS
21) QIAYSKISKR	23) WNFSPPFYRL	25) HFKIPQTNVS	27) VAIFMLDTVT	29) LCGNSDDFLS
22) KISKRWNFPS	24) PFYRLHFKIP	26) QTNVSVAIFM	28) LDTVTLCGNS	30) DDFLSQOPER
31) QOPERPRDVK	33) LARTQLSWLK	35) KQLAAAREDY	37) VLVAGHYVPVW	39) SIAEHGPTHC
32) PRDVKLARTQ	34) LSWLKKQLAA	36) AREDYVLVAG	38) HYPVWSIAEH	40) GPTHCLVKQL
41) LVKQLRPLLA	43) TYGVTAYLCG	45) HDHNLQYLQD	47) ENGVGYVLSG	49) AGNFMDPSCR
42) RPLLATYGVV	44) AYLCGHHDNL	46) QYLQDENGVG	48) YVLSGAGNFM	50) DPSKRHRQKV
51) HQRKVPNGYL	53) RFHYGTEDSL	55) GGFAYVEISS	57) KEMTVTYIEA	59) SGKSLFKTRL
52) PNGYLRFHYG	54) TEDSLGGFAY	56) VEISSKEMTV	58) TYIEASGKSL	60) FKTRLPRRARP

[0169] (2) 由Replitope的TrK-62及TrK-49的表位解析

[0170] 将制成的肽载玻片使用TrK-62, TrK-49进行表位定位, 由显色法解析 (图7)。

[0171] 具体而言, 对上述肽载玻片使用SuperBlock (PIERCE) 而于室温进行60分钟封闭处理。其后, 作为第一抗体, 将TrK-62或TrK-49以1 μ g/mL的浓度, 于室温反应60分钟。用PBS-T清洗3次后, 将兔抗小鼠IgG-HRP (DAKO) 以0.5 μ g/mL的浓度, 于室温反应60分钟。再次用PBS-T清洗3次后, 加作为HRP的显色底物的3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) (Kainos)。一定时间的温育之后, 由显微镜观察确认斑的显色的程度。

[0172] 解析的结果, 判断在TrK-62、TrK-49均特异性地存在于TRACP-5b中的糖链的结合位置附近有表位, 由此认为, 提高对TRACP-5b的反应特异性 (图8)。

[0173] 【实施例2】

[0174] TrK-126、TrK-127的表位解析

[0175] (1) 由Replitope的TrK-126及TrK-127的表位解析

[0176] 根据以上的结果, 由发光法进行TrK-126及TrK-127的表位解析。

[0177] 具体而言, 将上述肽载玻片使用SuperBlock (PIERCE) 于室温进行60分钟封闭处理。其后, 作为第一抗体, 将TrK-126或TrK-127以1 μ g/mL的浓度, 于室温反应60分钟。用PBS-T清洗3次后, 添加Amersham ECL Prime (GE Healthcare) 附属的第二抗体, 于室温反应60分钟。再次用PBS-T清洗3次后, 加试剂盒附属的检测试剂。一定时间的温育之后, 由ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare) 确认斑的发光程度。

[0178] 解析的结果, TrK-126及TrK-127均不显示与各序列肽的反应性 (图9)。从而接下来, 使用这2种抗体进行点印迹解析及蛋白印迹解析。

[0179] (2) 由蛋白印迹法、点印迹法的反应性确认

[0180] (2-1) 由点印迹法的反应性确认

[0181] 将纯化的TRACP-5b滴到1.0 μ gPVDF膜(Millipore),进行1小时封闭。接下来,在各自转印TrK-126及TrK-127(以5 μ g/ml浓度含抗体的PBS-T)的膜上反应1小时。反应后,将膜用PBS-T清洗,作为第二抗体,使HRP标记抗小鼠免疫球蛋白抗体(Zymed)各自反应30分钟。用PBS-T清洗后,用膜用TMB溶液(和光纯药工业)进行检测(图10)。

[0182] (2-2)由蛋白印迹法的反应性确认

[0183] 将1.0 μ g、2.0 μ g的纯化的TRACP-5b在非还原下进行SDS-PAGE。其后,转印到PVDF膜(Millipore),进行1小时封闭。其后,用(2-1)中记载的同样的方法进行反应、检测(图11)。

[0184] 解析的结果,TrK-126及TrK-127均确认了由点印迹法的与TRACP-5b的反应性,而在蛋白印迹法中均检测不到。从这些的结果认为,TrK-126及TrK-127是识别TRACP-5b的天然立体结构,识别其表位不是由线状排列的一级结构形成的表位,依赖于TRACP-5b的立体结构的表位的抗体。

[0185] 虽然是一级结构上相同性高的TRACP-5a和TRACP-5b,但其立体结构大不同。从而认为,识别依赖于TRACP-5b的立体结构的表位的抗体与公知的测定法(日本专利注册编号416804)记载的TrK-62、TrK-49(其表位的一级结构在TRACP-5a上也存在)相比,TRACP-5b特异性结合性增加。

[0186] **【工业实用性】**

[0187] 以上详细地说明了在本发明的免疫测定法中,对于测定对象目的物质(TRACP-5b),通过组合使用反应性及选择性高的抗体而除去反应系中的竞争结合物质的影响,可特异性精密测定目的物质。

<211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 5
 Gly Gly Val Pro Asn Ala Pro Phe His Thr
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 6
 Ala Pro Phe His Thr Ala Arg Glu Met Ala
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 7
 Ala Arg Glu Met Ala Asn Ala Lys Glu Ile
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 8
 Asn Ala Lys Glu Ile Ala Arg Thr Val Gln
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 9
 Ala Arg Thr Val Gln Ile Leu Gly Ala Asp
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 10

<212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 16
 Phe Glu Asp Val Phe Ser Asp Arg Ser Leu
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 17
 Ser Asp Arg Ser Leu Arg Lys Val Pro Trp
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 18
 Arg Lys Val Pro Trp Tyr Val Leu Ala Gly
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 19
 Tyr Val Leu Ala Gly Asn His Asp His Leu
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 20
 Asn His Asp His Leu Gly Asn Val Ser Ala
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 21
 Gly Asn Val Ser Ala Gln Ile Ala Tyr Ser

<213> 部分ACP5
 <400> 27
 Gln Thr Asn Val Ser Val Ala Ile Phe Met
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 28
 Val Ala Ile Phe Met Leu Asp Thr Val Thr
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 29
 Leu Asp Thr Val Thr Leu Cys Gly Asn Ser
 1 5 10
 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 30
 Leu Cys Gly Asn Ser Asp Asp Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 31
 Asp Asp Phe Leu Ser Gln Gln Pro Glu Arg
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 32
 Gln Gln Pro Glu Arg Pro Arg Asp Val Lys
 1 5 10

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 33
 Pro Arg Asp Val Lys Leu Ala Arg Thr Gln
 1 5 10
 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 34
 Leu Ala Arg Thr Gln Leu Ser Trp Leu Lys
 1 5 10
 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 35
 Leu Ser Trp Leu Lys Lys Gln Leu Ala Ala
 1 5 10
 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 36
 Lys Gln Leu Ala Ala Ala Arg Glu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 37
 Ala Arg Glu Asp Tyr Val Leu Val Ala Gly
 1 5 10
 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5

<400> 38
 Val Leu Val Ala Gly His Tyr Pro Val Trp
 1 5 10
 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 39
 His Tyr Pro Val Trp Ser Ile Ala Glu His
 1 5 10
 <210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 40
 Ser Ile Ala Glu His Gly Pro Thr His Cys
 1 5 10
 <210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 41
 Gly Pro Thr His Cys Leu Val Lys Gln Leu
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 42
 Leu Val Lys Gln Leu Arg Pro Leu Leu Ala
 1 5 10
 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 43
 Arg Pro Leu Leu Ala Thr Tyr Gly Val Thr
 1 5 10
 <210> 44

<211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 44
 Thr Tyr Gly Val Thr Ala Tyr Leu Cys Gly
 1 5 10
 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 45
 Ala Tyr Leu Cys Gly His Asp His Asn Leu
 1 5 10
 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 46
 His Asp His Asn Leu Gln Tyr Leu Gln Asp
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 47
 Gln Tyr Leu Gln Asp Glu Asn Gly Val Gly
 1 5 10
 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 48
 Glu Asn Gly Val Gly Tyr Val Leu Ser Gly
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 49

Tyr Val Leu Ser Gly Ala Gly Asn Phe Met
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 50
 Ala Gly Asn Phe Met Asp Pro Ser Lys Arg
 1 5 10
 <210> 51
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 51
 Asp Pro Ser Lys Arg His Gln Arg Lys Val
 1 5 10
 <210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 52
 His Gln Arg Lys Val Pro Asn Gly Tyr Leu
 1 5 10
 <210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 53
 Pro Asn Gly Tyr Leu Arg Phe His Tyr Gly
 1 5 10
 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 54
 Arg Phe His Tyr Gly Thr Glu Asp Ser Leu
 1 5 10
 <210> 55
 <211> 10

<212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 55
 Thr Glu Asp Ser Leu Gly Gly Phe Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 56
 Gly Gly Phe Ala Tyr Val Glu Ile Ser Ser
 1 5 10
 <210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 57
 Val Glu Ile Ser Ser Lys Glu Met Thr Val
 1 5 10
 <210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 58
 Lys Glu Met Thr Val Thr Tyr Ile Glu Ala
 1 5 10
 <210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 59
 Thr Tyr Ile Glu Ala Ser Gly Lys Ser Leu
 1 5 10
 <210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 部分ACP5
 <400> 60
 Ser Gly Lys Ser Leu Phe Lys Thr Arg Leu

1	5	10
<210> 61		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 部分ACP5		
<400> 61		
Phe Lys Thr Arg Leu Pro Arg Arg Ala Arg Pro		
1	5	10

[0001]

关于微生物保藏的说明

申请人或代理人档案号 IIC170361	国际申请号 PCT/JP2015/072468
----------------------	-------------------------

关于微生物保藏的说明

(专利合作条约实施细则 13 之 2)

微生物保藏的说明	
A. 对说明书第 15 页, 第 15 页 15-26 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/>
保藏单位名称 NPMD-国家技术评估学会, 专利微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 日本	
保藏日期 2014-06-06	保藏号 NITE BP-01866
C. 补充说明 (必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
无	
D. 本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的)	
E. 补充说明 (必要时)	
下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”)	
无	

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
授权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
授权官员

[0002]

微生物保藏(2)	
A.对说明书第 15 页, 第 15 页 15-26 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/>
保藏单位名称NPMD-国家技术评估学会, 专利微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 日本	
保藏日期 2014-06-06	保藏号 NITE BP-01867
C.补充说明(必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
无	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”) 无	

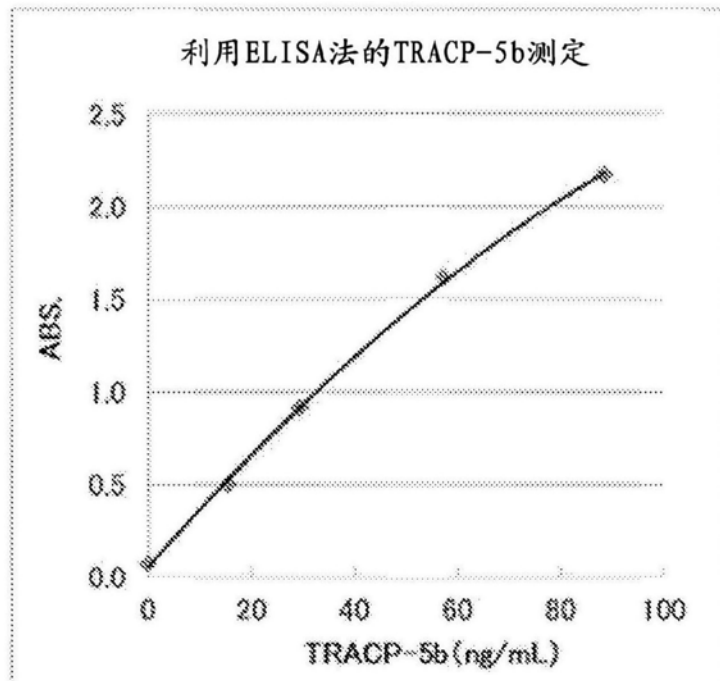


图1

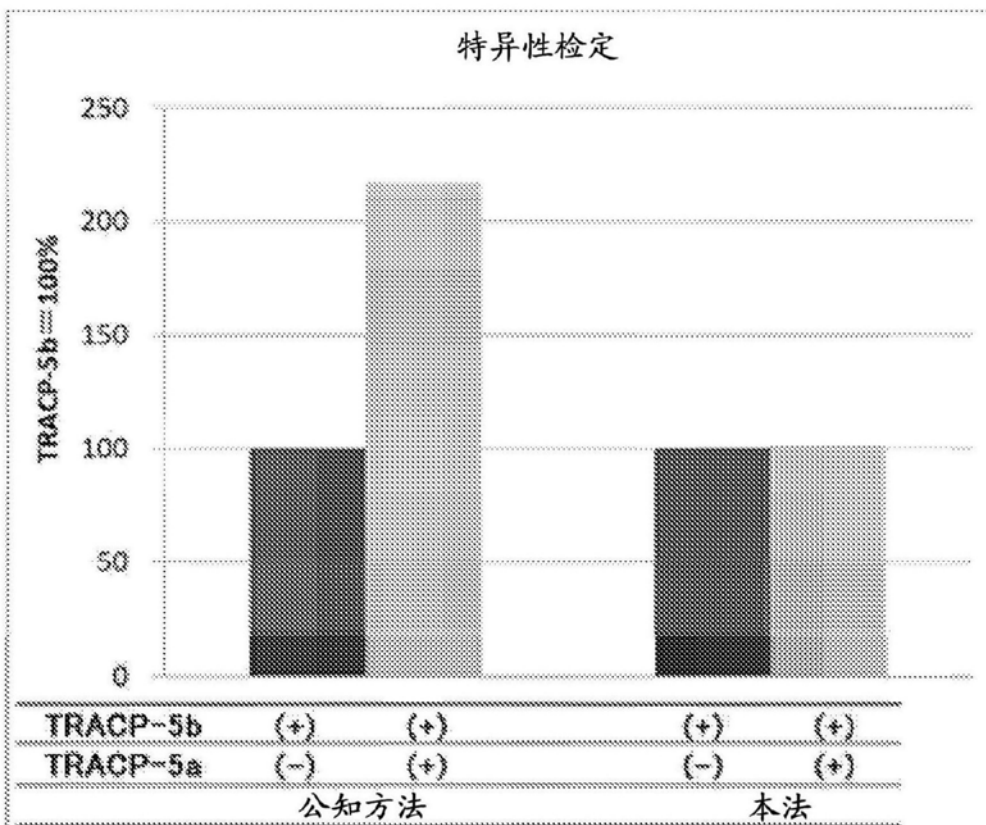


图2

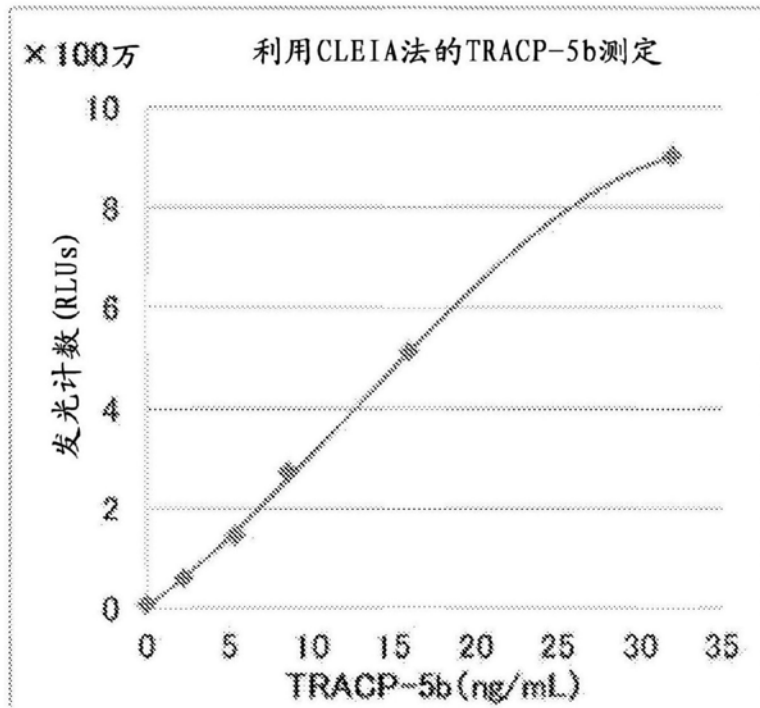


图3

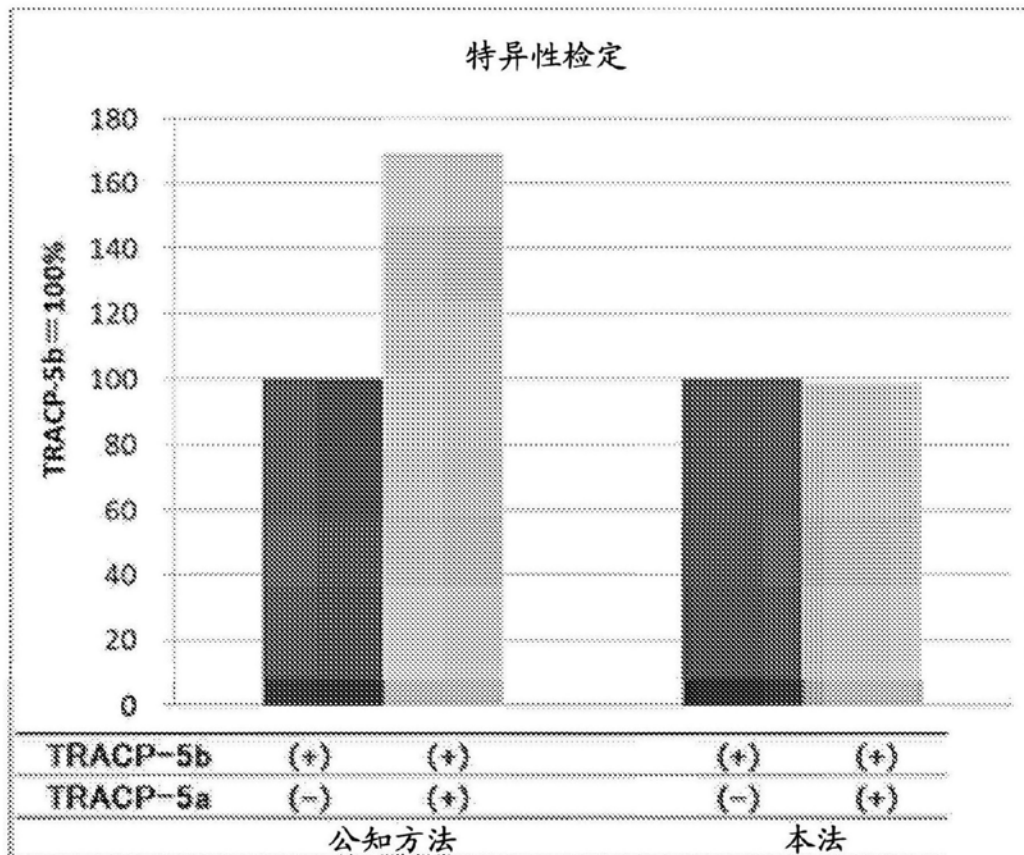


图4

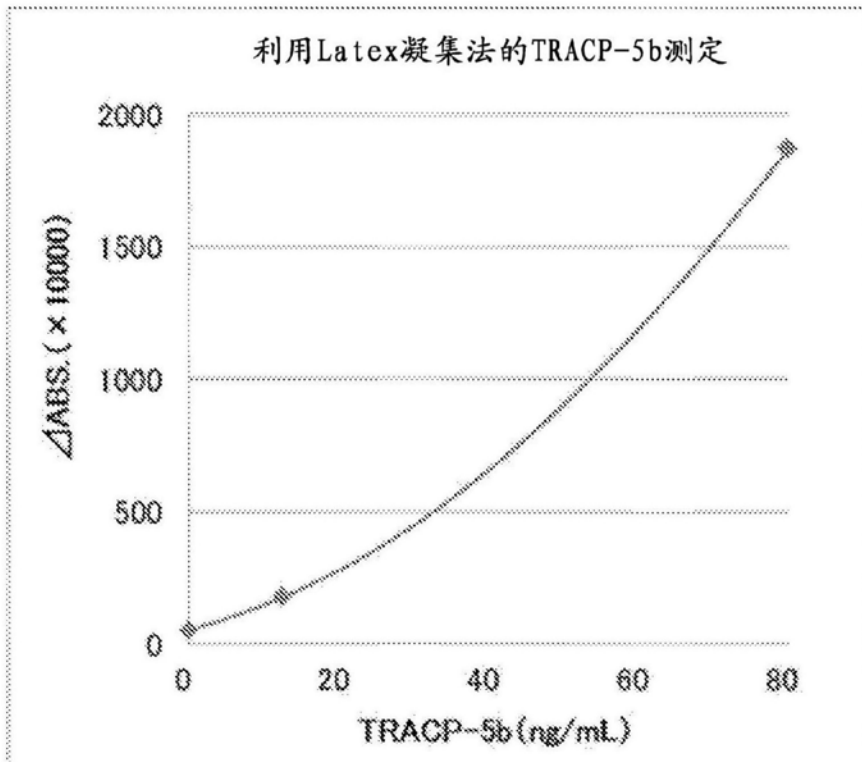


图5

ACP5 翻译 (325 aa)		
1-	MDHNTALLIL QALLP SLAD EA T PA LRFVA VGDWGGVPNA PFHTAREMAN	-50
51-	AKELARTVQI LGADFILSLG DNFYFTGVQD INDKRFQEIF EDVFSDRSLR	-100
101-	KVPWYVLGN HDHLGNVSAQ IAYSKI SKRW NFSPFYRLH FKIPQT NWSV	-150
151-	AIFMLDTVTL C GN SDDFLSQ OPERPRDVKI ART QLSWLKK QLAARE DYV	-200
201-	LVAGHPVWS IAEHGPTHCL VKQLRPLLAT YGVTAYLCGH DHNLQYLQDE	-250
251-	NGVGYVLSGA GNFMDPSKRH QRKVPNGYLR FHYGTEDSLG GFAYVEISSK	-300
301-	EMTVTYIEAS GKSLFKTRLP RRARP	

信号序列、糖链结合预期位点、组织蛋白酶K切断区域

图6

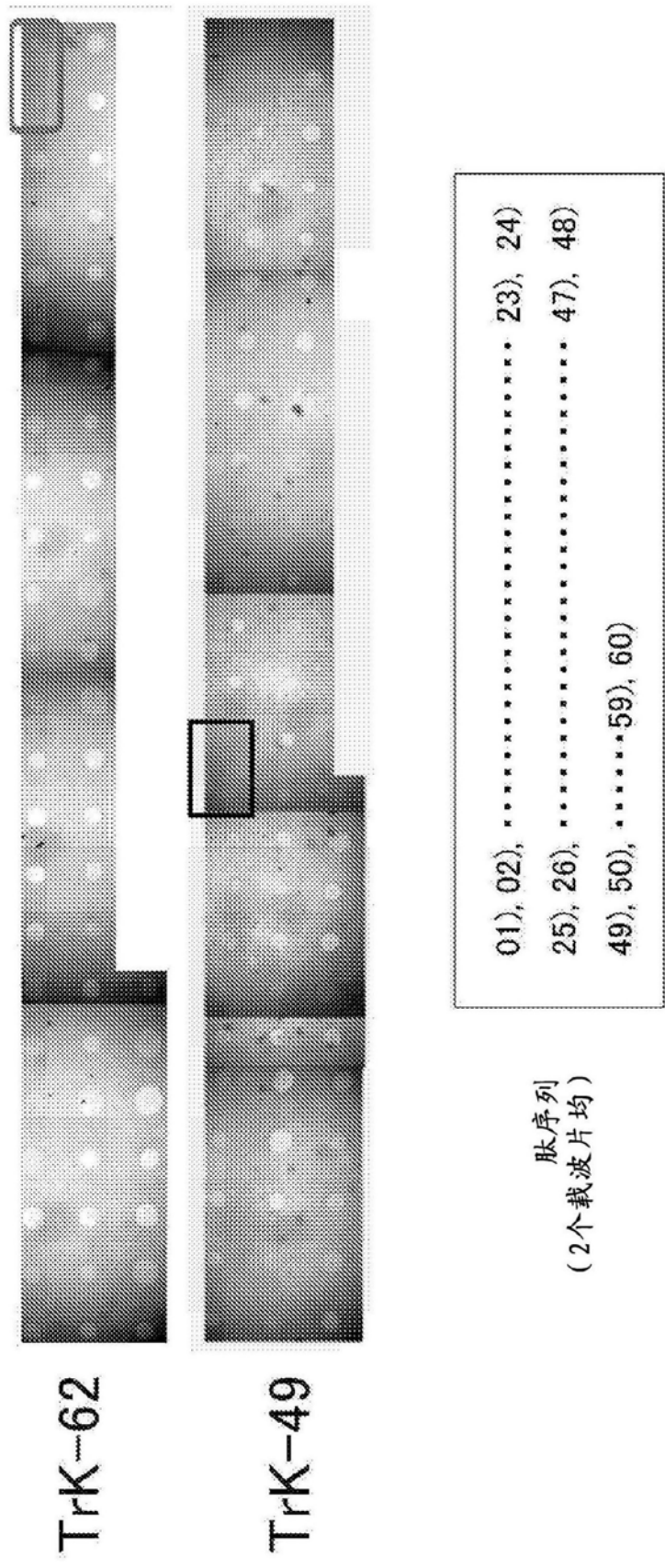


图7

1-	MDMWTALLIL	QALLLP SLAD	GATPALRFVA	VGDWGGVPNA	PFHTAREMAN	-50
51-	AKEIARTVQI	LGADFILSLG	DNFYFTGVOD	INDKRFQETF	EDVFSDRSLR	-100
101-	KVPWYVLAGN	HDHILGNVSAQ	IAYSKISKRW	NFPSPFYRLH	FKIPQTINVSV	-150
151-	AIFMLDVTYL	CCNSDDFLSQ	OPERPRDVKI	ARTQLSWLKK	QLAAAREDYV	-200
201-	LVACHYPVWS	IAEHGPTHCL	VKOLRPLLAT	YGV TAYLGGH	DHNLOYLODE	-250
251-	NGVGYVLSGA	GNFMDPSKRH	QRKVPNGYLR	FHYGTEDSLG	GFAYVEISSK	-300
301-	EMTVTYIEAS	GKSLFKTRLP	RRARP			

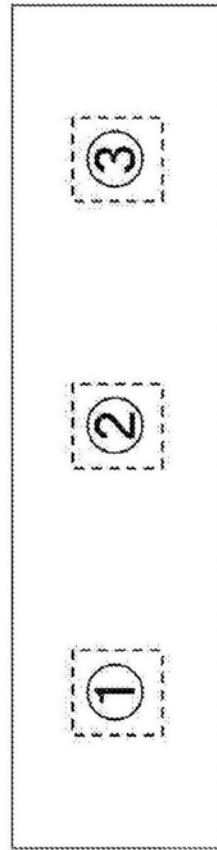
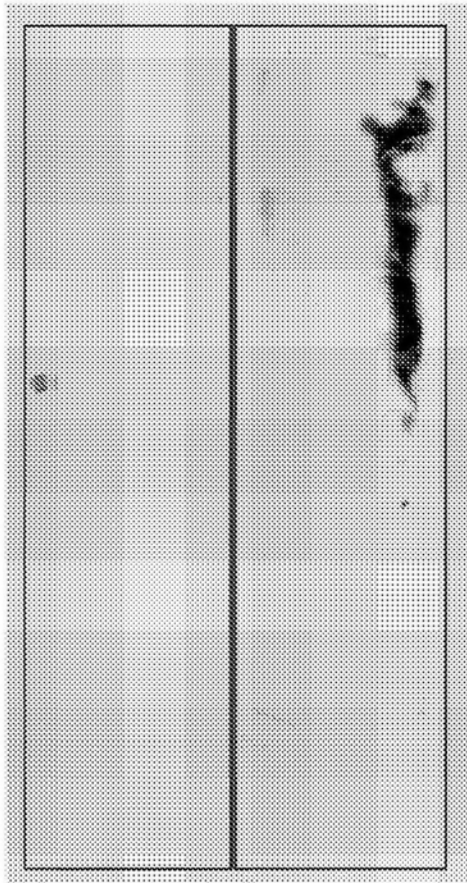
* 糖链结合预期位点、组织蛋白酶K切断区域

* TrK-62表位、TrK-49表位

图8

TrK-126

TrK-127



肽段配置
(2个载波片均)

段内的序列

(①、②、③均、序列号对应于000)

01), 02),	08), 09)
10), 11),	17), 18)
19), 20),	26), 27)
28), 29),	35), 36)
37), 38),	44), 45)
46), 47),	53), 54)
55), 56),	59), 60)

图9

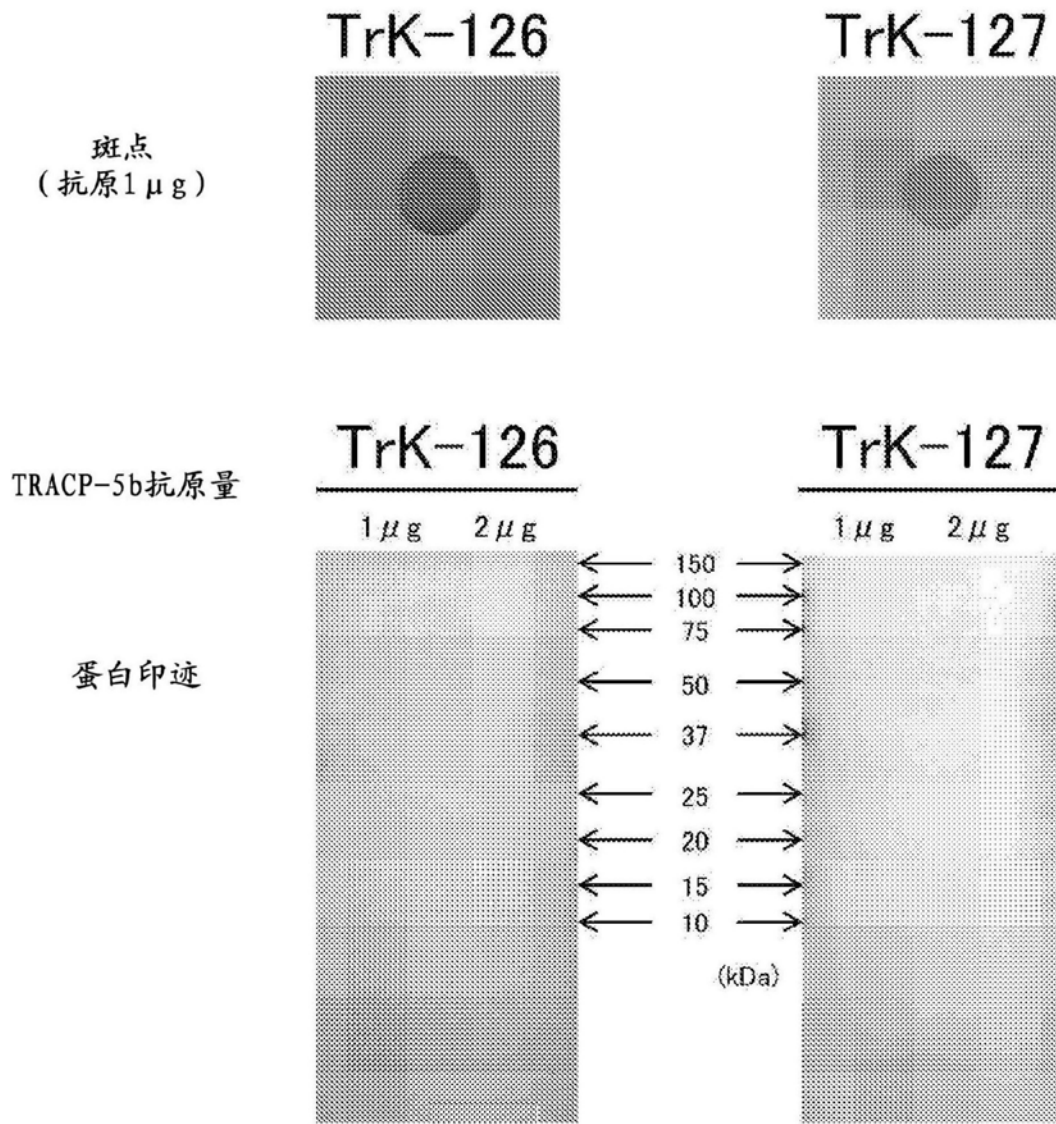


图10

专利名称(译)	对TRACP-5b (酒石酸抵抗性酸性磷酸酶5b) 具有特异性的蛋白定量法		
公开(公告)号	CN107002065A	公开(公告)日	2017-08-01
申请号	CN201580051031.2	申请日	2015-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
[标]发明人	菊地涉 笹川久美子 野田健太		
发明人	菊地涉 笹川久美子 野田健太		
IPC分类号	C12N15/00 C07K16/40 C12N5/10 C12N15/02 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/553 G01N33/577 C12N9/16 C12P21/08		
优先权	2014168934 2014-08-22 JP		
其他公开文献	CN107002065B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明旨在提供对于特异性测定酒石酸抵抗性酸性磷酸酶5b有用的单克隆抗体。以从蚕绢丝腺纯化的人重组酒石酸抵抗性酸性磷酸酶5b (TRACP-5b)作为抗原，由细胞融合，得到了产生有对TRACP-5b的反应性高于对酒石酸抵抗性酸性磷酸酶5a(TRACP-5a)的反应性的特异性的针对TRACP-5b的单克隆抗体的杂交瘤。通过使用此单克隆抗体，可高灵敏度并且特异性检测待测样品中的TRACP-5b。

01) DGATPALRFV	03) AVGDWGGVFN	05) APFHAREMA	07) NAKELARTVQ	09) ILCADFILSL
02) ALRFVAVGDW	04) GGVNAPFHT	06) AREMANAKEI	08) ARTVQILGAD	10) FILSLGDNEY
11) GDNFYFTGVQ	13) DINDKRFQET	15) FEDVFSRSL	17) RKPVPWYLAG	19) NHDHLGNVSA
12) FTGVQDINDK	14) RFQETFEDVF	16) SDRSLRKPVPW	18) YVLAGNHDHL	20) GNVSAQIAYS
21) QIAYSKISKR	23) WNFPSPFYRL	25) HFKIPQTNVS	27) VAIFMLDTVT	29) LCGNSDDFLS
22) KISKRWNFPS	24) PFYRLHFKIP	26) QTNVSVAFIM	28) LDTVTLCGNS	30) DDFLSQQPER
31) QQPERPRDVK	33) LARTQLSWLK	35) KQLAAAREDY	37) VLVAGHYVPW	39) SIAEHGPTHG
32) PRDVKLARTQ	34) LSWLKKQLAA	36) AREDYVLVAG	38) HYPVWSIAEH	40) GPTHCLVKQL
41) LVKQLRPLLA	43) TYGVTAYLCG	45) HDHNLQYLQD	47) ENGVGVVLSG	49) AGNFMDPSCR
42) RPLLATVGVT	44) AYLCHDHNL	46) QYLQDENGVC	48) YVLSGAGNFM	50) DPSKRHRQKV
51) HQRKVPNGYL	53) RFHYGTEDSL	55) GGFAYVEISS	57) KEMTVTYIEA	59) SGKSLFKTRL
52) PNGYLRPHYG	54) TEDSLGGFAY	56) VEISSKEMTV	58) TYIEASGKSL	60) FKTRLPRRARP