



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102037359 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 27

(21) 申请号 200980118794. 9 *C12Q 1/02* (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 05. 22 *G01N 33/15* (2006. 01)

(30) 优先权数据 *G01N 33/50* (2006. 01)
2008-135966 2008. 05. 23 JP *G01N 33/68* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日
2010. 11. 23

(86) PCT申请的申请数据
PCT/JP2009/059453 2009. 05. 22

(87) PCT申请的公布数据
W02009/142303 JA 2009. 11. 26

(71) 申请人 持田制药株式会社
地址 日本东京都

(72) 发明人 内藤克纪

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 庞立志 郭文洁

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006. 01)
C07K 14/705 (2006. 01)

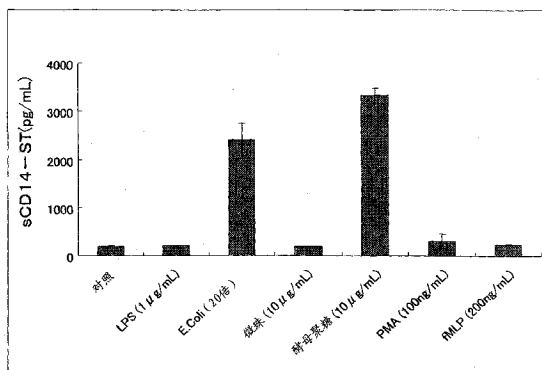
权利要求书 2 页 说明书 16 页 序列表 10 页
附图 9 页

(54) 发明名称

吞噬细胞的功能评价方法

(57) 摘要

提供测定因吞噬细胞引起的吞噬活动而特异性产生的、具有适于测定的稳定性的液性因子 sCD14-ST 的、新颖且简便的吞噬细胞功能评价方法以及与吞噬细胞引起的吞噬相关联的疾病的检测方法。



1. 吞噬细胞的功能评价方法,其特征在于,包含下述工序:
 - 1) 使吞噬细胞与吞噬物质接触的工序,
 - 2) 对由吞噬细胞产生的 sCD14-ST 进行测定的工序,和
 - 3) 将试样的测定值与标准值比较,而对吞噬细胞的吞噬活动的有无和 / 或程度进行判定的工序。
2. 方法,其是利用对吞噬细胞的功能进行评价的伴随吞噬细胞功能异常的疾病的检测方法,其特征在于,包含:
 - 1) 通过权利要求 1 所述的方法而对来自受试体的吞噬细胞的功能进行评价的工序,
 - 2) 将评价的结果与正常值进行比较的工序,和
 - 3) 根据来自受试体的吞噬细胞的功能与正常值相比为高值或低值而对疾病的有无和 / 或程度进行判定的工序。
3. 方法,其是利用对吞噬细胞的功能进行评价的免疫功能的评价方法,其特征在于,包含:
 - 1) 通过权利要求 1 所述的方法而对来自受试体的吞噬细胞的功能进行评价的工序,
 - 2) 将评价的结果与正常值进行比较的工序,和
 - 3) 根据来自受试体的吞噬细胞的功能与正常值相比为高值或低值而对免疫功能的程度进行判定的工序。
4. 方法,其是利用对吞噬细胞的功能进行评价的药剂效果的评价方法,其特征在于,包含:
 - 1) 通过权利要求 1 所述的方法而对药剂给予中和 / 或药剂给予后的来自受试体的吞噬细胞的功能进行评价的工序,
 - 2) 将评价的结果与正常值和 / 或药剂给予前的评价结果进行比较的工序,和
 - 3) 对药剂的给予所致的来自受试体的吞噬细胞的功能的变化的有无和 / 或程度进行判定的工序。
5. 吞噬功能调节物质的筛选方法,其特征在于,包含下述工序:
 - 1) 使吞噬细胞与待检物质接触的工序,
 - 2) 对由吞噬细胞产生的 sCD14-ST 进行测定的工序,和
 - 3) 评价待检物质对吞噬细胞的吞噬能力的效果的工序。
6. 如权利要求 5 所述的方法,其特征在于,在吞噬物质的存在下,使吞噬细胞与待检物质接触。
7. 与吞噬细胞引起的吞噬相关联的疾病的检测方法,其特征在于,包含下述工序:
 - 1) 对来自受试体的试样(血液除外)中所包含的 sCD14-ST 进行测定的工序,
 - 2) 将测定的值与正常值进行比较的工序,和
 - 3) 对试样中的 sCD14-ST 的量与正常值相比是否为高值进行判定的工序。
8. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,在试样中添加吞噬物质后,对 sCD14-ST 进行测定。
9. 如权利要求 7 或 8 所述的方法,其中,与吞噬细胞引起的吞噬相关联的疾病为风湿性关节炎,试样为关节液。
10. 如权利要求 7 或 8 所述的方法,其中,与吞噬细胞引起的吞噬相关联的疾病为乳腺

炎,试样为乳汁。

11. 用于评价含有 sCD14-ST 的吞噬细胞的功能的标记物。

吞噬细胞的功能评价方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于吞噬细胞功能评价的新方法、与吞噬细胞引起的吞噬相关联的疾病的检测方法。

背景技术

[0002] 吞噬细胞是具有吞噬活性的细胞的总称。大致分为在生物体内主要发挥吞噬作用的嗜中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞之类的专职吞噬细胞 (professional phagocyte) 和根据情况发挥吞噬活性的非专职吞噬细胞 (amateur phagocyte)。非专职吞噬细胞包括脑的小胶质细胞、肝脏的枯否氏细胞、精巢的塞尔托利细胞等。

[0003] 白细胞是指血液中包含的细胞成分, 主要由粒细胞 (约 60%)、淋巴细胞 (约 25%)、单核细胞 (约 5%) 构成。粒细胞进一步分类为嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞, 数量上嗜中性粒细胞最多, 嗜中性粒细胞占白细胞的几乎一半。另外, 单核细胞在各组织中游走成为巨噬细胞。白细胞包含大量的吞噬细胞, 因为分离容易, 所以适合用作吞噬细胞源。

[0004] 吞噬是针对细菌·真菌等微生物的进入而最早启动的重要生物体防御机制之一。吞噬经过吞噬细胞引起的异物的识别、异物的摄入、吞噬体的形成、吞噬体内的异物消化、消化后的物质的吸收或排出这样连续的阶段。吞噬不仅针对细菌·真菌等外来异物而发生, 也与炎症部位的自身组织残渣或代谢的自身细胞之类来自自身的无用物质的除去有关。吞噬细胞不只是将吞噬的物质在细胞内消化, 有时也随着吞噬, 将活性氧或蛋白质分解酶释放到细胞外。由此能够在局部有效地杀菌或组织消化, 另一方面, 有时自身组织也会被过度的吞噬反应破坏。例如在风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis: RA) 的病变部确认了过度吞噬自身免疫复合体的细胞 (RA 细胞), 已知由 RA 细胞释放出的蛋白质分解酶破坏组织, 参与关节炎的进行。

[0005] 作为测定吞噬细胞的吞噬功能的方法, 已知下述方法: 使吞噬细胞与胶乳粒子接触, 通过血细胞计数器或显微镜计数被摄入细胞内的胶乳粒子的方法; 使吞噬细胞吞噬施加了荧光标记的吞噬物质 (大肠杆菌、酵母聚糖等), 检测被摄入细胞内的量的方法; 使其吞噬活菌, 然后通过培养确认残留的活菌数的方法; 检测吞噬时释放的活性氧引起的发光的方法等。

[0006] 已知 CD14 分子是被鉴定为在单核细胞的膜上表达的分化标记物之一的糖蛋白质, 具有作为 LPS (脂多糖) 的受体的功能 (非专利文献 1)。CD14 分子中存在表达于细胞表面的膜结合型 CD14 (mCD14) 和可溶型 CD14 (sCD14) 2 种。作为 sCD14, 已知具有约 55kDa、约 49kDa 分子量的分子种类的存在, 认为是随着由肝脏的分泌和单核细胞的活化 mCD14 被酶切断而产生的 (非专利文献 2 ~ 4)。

[0007] 报道了下述情况, 即分子量约 55kDa 和约 49kDa 的 sCD14 (以下称为“高分子量 sCD14”) 在败血症 (SEPSIS)、获得性免疫缺陷综合征 (AIDS)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、全身性红斑狼疮 (SLE) 等多种疾病的患者血中显示高值。因此, 认为上述 sCD14 不是疾病

特异性的标记物（非专利文献 5～6）。

[0008] 另一方面,作为在败血症患者中血中浓度特征性上升的、新 sCD14 的分子种类,报道了存在 sCD14-ST(可溶性 CD14 抗原亚型)。

[0009] sCD14-ST 特征为在 sCD14 中于非还原条件下在 SDS-PAGE 中泳动至分子量 13 ± 2 kDa,且保持 CD14 的 N 端部。与高分子量 sCD14 相比,具有 C 端侧大量缺失的氨基酸序列,与高分子量 sCD14 不同,不具有 LPS 结合能力。另外,因为 sCD14-ST 显示与高分子量 sCD14 不同的免疫原性,所以可以使用抗体区分两者。sCD14-ST 在败血症患者中血中浓度特异性上升(专利文献 1)。另外,有报告称即使与难以与败血症相区分的、显示全身性炎症反应(SIRS)的患者进行比较,在败血症患者的血中也显示高值,认为 sCD14-ST 是败血症的特异性诊断标记物(非专利文献 7)。

[0010] 现有技术文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献 1:国际公开 W02005/108429 号公报

[0013] 非专利文献

[0014] 非专利文献 1:Wright 等, Science, 249 :1431-1433, 1990 年

[0015] 非专利文献 2:Bazil 及 Strominger, Journal of Immunology, 147 :1567-1574, 1991 年

[0016] 非专利文献 3:Bufler 等, European Journal of Immunology, 25 :604-610, 1995 年

[0017] 非专利文献 4:Su 等, Journal of Hepatology, 31 :435-442, 1999 年

[0018] 非专利文献 5:Hayashi 等, Infection and Immunity, 67 :417-420, 1999 年

[0019] 非专利文献 6:Lawn 等, Clinical & Experimental Immunology, 120 :483-487, 2000 年

[0020] 非专利文献 7:Yaegashi 等, Journal of Infection and Chemotherapy 11 : 234-238, 2005 年

发明内容

[0021] 发明所要解决的课题

[0022] 现有的吞噬细胞的吞噬能力的测定方法需要吞噬物质的事前标记操作、用于确认吞噬后残留的活菌的培养、用显微镜检测等费时费工的操作以及血细胞计数器、显微镜之类专门的装置,希望开发出更简便的新测定方法。虽然只要能够测定随着吞噬而由吞噬细胞释放出的液性因子,就能够得到更简便并且定量的测定法,但因为细胞因子也因吞噬刺激以外的各种免疫激活刺激而产生,所以不合作为吞噬特异性的标记物。另外,考虑到活性氧也因各种刺激而产生、并且在短时间内消失,因而也不合作为吞噬特异性的标记物,有必须即时进行测定的限制。

[0023] 在与局部的吞噬反应相关联的疾病(例如风湿性关节炎等)中,只要能够通过测定体液等试样中的标记物分子来测算吞噬反应的程度,就有助于疾病的诊断。此时,测定试样中的液性因子是简便的,但吞噬特异性并且具有适于测定的稳定性的液性因子目前尚属未知。

[0024] 用于解决课题的手段

[0025] 公知 sCD14-ST 是在败血症患者血浆中上升的疾病标记物,但其产生机制尚不明了。在这种状况下,本发明人发现内毒素引发兔败血症模型动物的血中 sCD14-ST 不上升,但在通过活菌感染制作的兔败血症模型动物 (CLP (盲肠浆膜剥离) 模型) 中却上升。由该实验事实,得知对 sCD14-ST 的产生来说,仅内毒素导致的白细胞活化并不充分,重要的是白细胞引起的细菌的吞噬过程。因此,在体外详细研究各种白细胞刺激物质和 sCD14-ST 产生量的关联性时,发现 sCD14-ST 只在添加使白细胞发生吞噬活动的物质时产生,其通过添加阻碍吞噬的物质而降低。进而,发明人发现在兔关节炎模型动物中随着关节炎的发病,关节液中的 sCD14-ST 上升。

[0026] 因此,sCD14-ST 是对吞噬反应为特异性、并且具有适于测定的稳定性的液性因子。

[0027] 即,本发明提供吞噬细胞功能评价的新方法。

[0028] (1-1) 吞噬细胞的功能评价方法,其特征在于,测定由吞噬细胞产生的 sCD14-ST。

[0029] (1-2) 如上述 (1-1) 所述的方法,其中,吞噬细胞的功能为吞噬能力。

[0030] (1-3) 如上述 (1-1) 或 (1-2) 所述的方法,其特征在于,包含使吞噬物质接触吞噬细胞的工序。

[0031] (1-4) 吞噬细胞的功能评价方法,其特征在于,包含下述工序:

[0032] 1) 使吞噬细胞与吞噬物质接触的工序,

[0033] 2) 对由吞噬细胞产生的 sCD14-ST 进行测定的工序,和

[0034] 3) 将测定值与标准值比较,而对吞噬细胞的吞噬活动的有无和 / 或程度进行判定的工序。

[0035] (1-5) 如上述 (1-1) ~ (1-4) 中的任一项所述的方法,其中,吞噬细胞是嗜中性粒细胞、粒细胞和 / 或白细胞。

[0036] (1-6) 如上述 (1-1) ~ (1-4) 中的任一项所述的方法,其中,吞噬细胞是粒细胞,吞噬细胞的功能是吞噬能力。

[0037] 另外,本发明是用于评价含有 sCD14-ST 的吞噬细胞的功能的标记物。

[0038] 另外,本发明提供利用对来自受试体的吞噬细胞的功能进行评价的、各种检测・评价方法。

[0039] (2-1) 方法,其是利用对吞噬细胞的功能进行评价的伴随吞噬细胞功能异常的疾病的检测方法,其特征在于,包含:

[0040] 1) 通过上述 (1-1) ~ (1-6) 中的任一项所述的方法,而对来自受试体的吞噬细胞的功能进行评价的工序,

[0041] 2) 将评价的结果与正常值进行比较的工序,和

[0042] 3) 根据来自受试体的吞噬细胞的功能与正常值相比为高值或低值而对疾病的有无和 / 或程度进行判定的工序。

[0043] (2-2) 方法,其是利用对吞噬细胞的功能进行评价的免疫功能的评价方法,其特征在于,包含:

[0044] 1) 通过上述 (1-1) ~ (1-6) 中的任一项所述的方法而对来自受试体的吞噬细胞的功能进行评价的工序,

[0045] 2) 将评价的结果与正常值进行比较的工序,和

[0046] 3) 根据来自受试体的吞噬细胞的功能与正常值相比为高值或低值而对免疫功能的程度进行判定的工序。

[0047] (2-3) 方法,其是利用对吞噬细胞的功能进行评价的药剂效果的评价方法,其特征在于,包含:

[0048] 1) 通过上述(1-1)~(1-6)中的任一项所述的方法而对药剂给予中和/或药剂给予后的来自受试体的吞噬细胞的功能进行评价的工序,

[0049] 2) 将评价的结果与正常值和/或药剂给予前的评价结果进行比较的工序,和

[0050] 3) 对药剂的给予所致的来自受试体的吞噬细胞的功能的变化的有无和/或程度进行判定的工序。

[0051] (2-4) 方法,其是评价移植用吞噬细胞的品质的方法,其特征在于,包含:

[0052] 1) 通过上述(1-1)~(1-6)中的任一项所述的方法而对移植用吞噬细胞的功能进行评价的工序,

[0053] 2) 将评价的结果与基准值进行比较的工序,和

[0054] 3) 对移植用吞噬细胞的功能是否满足基准值进行判定的工序。

[0055] (2-5) 如上述(2-1)~(2-4)中的任一项所述的方法,其中,吞噬细胞是嗜中性粒细胞、粒细胞和/或白细胞。

[0056] (2-6) 如上述(2-1)~(2-5)中的任一项所述的方法,其中,吞噬细胞的功能是吞噬能力。

[0057] (2-7) 如上述(2-1)~(2-4)中的任一项所述的方法,其中,吞噬细胞是粒细胞,吞噬细胞的功能是吞噬能力。

[0058] 另外,本发明提供吞噬功能调节物质的筛选方法。

[0059] (3-1) 吞噬功能调节物质的筛选方法,其特征在于,包含下述工序:

[0060] 1) 使吞噬细胞与待检物质接触的工序,

[0061] 2) 对由吞噬细胞产生的 sCD14-ST 进行测定的工序,和

[0062] 3) 评价待检物质对吞噬细胞引起的吞噬能力的效果的工序。

[0063] (3-2) 如上述(3-1)所述的方法,其特征在于,在吞噬物质的存在下使吞噬细胞与待检物质接触。

[0064] (3-3) 如上述(3-1)~(3-2)中的任一项所述的方法,其中,吞噬细胞是嗜中性粒细胞、粒细胞和/或白细胞。

[0065] 另外,本发明提供与吞噬细胞引起的吞噬相关联的疾病的检测方法。

[0066] (4-1) 与吞噬细胞引起的吞噬相关联的疾病的检测方法,其特征在于,包含下述工序:

[0067] 1) 对来自受试体的试样(血液除外)中所包含的 sCD14-ST 进行测定的工序,

[0068] 2) 将测定的值与正常值进行比较的工序,和

[0069] 3) 对试样中的 sCD14-ST 的量与正常值相比是否为高值进行判定的工序。

[0070] (4-2) 如上述(4-1)所述的方法,其特征在于,在试样中添加吞噬物质后,对 sCD14-ST 进行测定。

[0071] (4-3) 如上述(4-1)或(4-2)所述的方法,其中,与吞噬细胞引起的吞噬相关联的疾病为风湿性关节炎,试样为关节液。

[0072] (4-4) 如上述 (4-1) 或 (4-2) 所述的方法, 其中, 与吞噬细胞引起的吞噬相关联的疾病为乳腺炎, 试样为乳汁。

[0073] (4-5) 如上述 (4-1) ~ (4-4) 中的任一项所述的方法, 其中, 吞噬细胞为嗜中性粒细胞、粒细胞和 / 或白细胞。

[0074] 发明效果

[0075] 根据本发明, 通过对伴随吞噬而从吞噬细胞中释放出的液性因子即 sCD14-ST 进行测定, 能够特异性并且简便地测定吞噬细胞的功能。另外, 可以使用该测定体系进行吞噬功能调节物质的筛选。进而, 可以特异性并且简便地检测与吞噬细胞引起的吞噬相关的疾病。

附图说明

[0076] [图 1] 表示实施例 3 所述的 sCD14-ST 测定体系中的、重组体兔 sCD14-ST 的用量依赖性的反应性。横轴表示重组体 sCD14-ST 浓度 (pg/mL), 纵轴表示吸光度。

[0077] [图 2] 表示实施例 4 所述的 LPS 负荷兔败血症模型中的、LPS 给予前后的血中 sCD14-ST 的测定结果。纵轴表示血中 sCD14-ST 浓度 (pg/mL)。

[0078] [图 3] 表示实施例 4 所述的利用活菌感染制作的兔败血症模型中的、手术前后的血中 sCD14-ST 的测定结果。纵轴表示血中 sCD14-ST 浓度 (pg/mL)。

[0079] [图 4] 表示实施例 5 所述的、将兔粒细胞用各种白细胞刺激剂刺激时的 sCD14-ST 产生情况。

[0080] [图 5] 表示实施例 5 所述的、将兔粒细胞用各种白细胞刺激剂刺激时的高分子量 sCD14 产生情况。

[0081] [图 6] 表示实施例 5 所述的、吞噬抑制剂对将兔粒细胞用吞噬物质刺激时的 sCD14-ST 产生的效果。

[0082] [图 7] 表示实施例 6 所述的、兔关节炎模型的关节清洗液中的 sCD14-ST 的测定结果。

[0083] [图 8] 表示实施例 7 所述的、将人粒细胞用各种白细胞刺激剂刺激时的 sCD14-ST 产生情况。

[0084] [图 9] 表示实施例 7 所述的、吞噬抑制剂对将人粒细胞用吞噬物质刺激时的 sCD14-ST 产生的效果。

具体实施方式

[0085] 1. sCD14-ST (可溶性 CD14 抗原亚型)

[0086] 本发明基于吞噬细胞在吞噬外来微生物或异物、进行消化的过程中产生 sCD14-ST 的发现。sCD14-ST 的特征在于, 在 sCD14 中于非还原条件下在 SDS-PAGE 中泳动至分子量 13 ± 2 kDa 处, 且保持 CD14 的 N 端部的氨基酸序列。另外, sCD14-ST 显示与高分子量 sCD14 不同的免疫原性。例如人高分子量 sCD14 被 3C10 抗体 (ATCC TIB-228) 所识别, 但人 sCD14-ST 不与 3C10 抗体结合。

[0087] 另一方面, 也存在特异性识别 sCD14-ST、不识别高分子量 sCD14 的抗体。这类抗体是以 sCD14-ST 的特定部位的肽为抗原决定部位的肽抗体。特定部位是 CD14 的二次结构中

的 $\beta 3$ 和 $\beta 4$ 之间的区域 (Kim 等, Journal of Biological Chemistry, 280 :11347-11351, 2005 年)。具体而言,在人 CD14(序列编号 1) 中为第 36 ~ 79 的氨基酸序列,在兔 CD14(序列编号 2) 中为第 38 ~ 81 的氨基酸序列,在小鼠 CD14(序列编号 3) 中为第 36 ~ 79 的氨基酸序列,在牛 CD14(序列编号 4) 中为第 36 ~ 77 的氨基酸序列。以该区域中的、包含连续的 8 个以上氨基酸的序列的肽为抗原,制作抗体。包含人 CD14 的第 53 ~ 68 的 16 个氨基酸的肽、包含兔 CD14 的第 40 ~ 59 的 20 个氨基酸的肽为适宜的例子。高分子量 sCD14 在 $\beta 3 \sim \beta 4$ 的区域 (包含 $\beta 3-\alpha 2-\alpha 3-\beta 4$) 中具有 β 折叠结构或 α 螺旋结构,但 sCD14-ST 与高分子量 sCD14 相比具有 C 端侧大量缺失的序列,所以在 $\beta 3 \sim \beta 4$ 的区域无法维持本来的立体结构,认为两者立体结构不同使得抗体的识别性产生不同。

[0088] 因此, sCD14-ST 的特征在于,在非还原条件下在 SDS-PAGE 中泳动至分子量 $13 \pm 2\text{kDa}$ 处,且保持 CD14 的 N 端部的氨基酸序列,此外还可以通过特定的免疫原性而具有特征。特定的免疫原性是指能够被以包含 CD14 的 $\beta 3 \sim \beta 4$ 区域中的连续的 8 个以上氨基酸的序列的肽为抗原制作的抗体所识别。另外, sCD14-ST 是在活菌感染导致的败血症或败血症模型中血中浓度特异性上升的因子。例如人 sCD14-ST 的特征在于,在非还原条件下在 SDS-PAGE 中泳动至分子量 $13 \pm 2\text{kDa}$ 处,在 N 末端序列具有序列号 1 所述的氨基酸序列的第 1 ~ 第 8 的序列,且特异性结合在与包含序列号 1 所述的氨基酸序列的第 53 ~ 第 68 的 16 个氨基酸残基的肽结合的抗体上。进而,能够使其具有以下特征中的任意一个以上:特异性结合在与包含序列号 1 所述的氨基酸序列的第 17 ~ 第 26 的肽结合的抗体上、不结合在 3C10 抗体上、不结合在 MEM-18 抗体上、不具有 LPS 结合能力、可以由人血清得到、以及、是在败血症患者中血中浓度特异性上升的因子。

[0089] 因为 sCD14-ST 保持 CD14 的 N 端部的氨基酸序列,所以分离 sCD14-ST 而解析 N 端的氨基酸序列时,可以确认具有与 CD14 的 N 端部相同的氨基酸序列。只要至少从 N 端开始第 1 ~ 第 8 的氨基酸序列相同即可。例如,如果为人则可以确认在 N 端保有序列号 1 的氨基酸序列的第 1 ~ 第 8 的序列。如果是兔,则在 N 端保有序列号 2 的氨基酸序列的第 1 ~ 第 8 的序列,如果是小鼠,则在 N 端保有序列号 3 的氨基酸序列的第 1 ~ 第 8 的序列,如果是牛,则在 N 端保有序列号 4 的氨基酸序列的第 1 ~ 第 8 的序列。

[0090] 2. 吞噬细胞的功能评价方法

[0091] 本发明中的吞噬细胞只要是来自哺乳类的、具有吞噬活性的细胞,就没有特别限定,适宜的是嗜中性粒细胞。从制备的容易性方面考虑,作为包含嗜中性粒细胞的试样,可以使用白细胞或粒细胞。也可以是具有分化成粒细胞的功能的经分离的细胞株,作为例子,可以举出 HL-60。作为哺乳类,可以举出人、兔、小鼠、大鼠、猴、牛、猪、绵羊、山羊、马、狗、猫等。

[0092] 吞噬细胞可以由血液、组织液、淋巴液、关节液、乳汁、脑脊髓液、脓、唾液、泪液、粘液、鼻涕、痰、尿、腹水、羊水、精液等体液等制备。另外,还可以由将鼻腔、支气管、肺、皮肤、腹腔、各种脏器、关节、骨等清洗后得到的清洗液制备。此外,也可以由皮肤、肺、肾、粘膜等组织制备吞噬细胞。

[0093] 由生物体制备吞噬细胞时,可以仅严密地分离吞噬细胞进行使用,也可以制备含吞噬细胞的馏分进行使用。例如将由血液制备的白细胞、由血液制备的粒细胞、由腹腔清洗液制备的粒细胞等用作本发明的方法中使用的吞噬细胞。

[0094] 吞噬细胞的功能是吞噬细胞保有的生理功能。本发明中,以吞噬能力为吞噬细胞的活性指标,而对吞噬细胞的功能进行评价。吞噬细胞除吞噬能力以外,还兼具细胞因子产生能力或游走能力等各种功能,但吞噬细胞共通的功能为吞噬能力。因此,吞噬细胞作为细胞是否具有正常的功能优选以吞噬能力为指标。另外,因为吞噬细胞在多数情况下作为免疫细胞在生物体内发挥免疫功能,所以评价吞噬细胞的吞噬能力与评价吞噬细胞的免疫功能相关联。

[0095] 即,本发明的优选方式之一是嗜中性粒细胞、粒细胞和 / 或白细胞的吞噬能力的测定方法。另外,本发明的其他优选方式之一为利用嗜中性粒细胞、粒细胞和 / 或白细胞的吞噬能力的测定的免疫功能的评价方法。

[0096] 本发明的吞噬细胞的功能评价方法的特征在于,对由吞噬细胞产生的 sCD14-ST 进行测定。sCD14-ST 作为用于评价吞噬细胞的功能的标记物有用。吞噬细胞随着吞噬活动而产生 sCD14-ST。吞噬细胞的吞噬活动从吞噬细胞接触吞噬物质开始。吞噬物质使吞噬细胞发生吞噬活动,此处所称吞噬活动至少包含吞噬细胞引起的吞噬物质的摄入(吞噬作用)、以及、被摄入的物质在细胞内的消化过程。作为被吞噬细胞摄入·消化的吞噬物质的具体例,可以举出细菌·真菌等菌体、酵母聚糖等。另一方面,微珠·胶乳珠之类即使被摄入也不被消化的物质不属于本发明中的吞噬物质。

[0097] sCD14-ST 的测定针对含有吞噬细胞的溶液或该溶液的上清液进行。此处所称溶液是指培养基、细胞分馏液、细胞分析用溶液、生理盐水、体液等。在由生物体制备吞噬细胞的过程中,吞噬细胞已经对内源性的吞噬物质进行吞噬活动的情况下,可以通过对制备的含吞噬细胞的溶液或其上清液进行直接测定来评价吞噬细胞的功能。

[0098] 使吞噬物质与吞噬细胞接触时,只要在含有吞噬细胞的溶液中添加吞噬物质即可。或者也可以在表面结合了吞噬物质的容器中,添加含有吞噬细胞的溶液。从操作的容易性方面考虑,吞噬物质优选使用酵母聚糖。

[0099] sCD14-ST 的测定只要是能够检测 sCD14-ST 的体系即可,没有特别限定,优选通过使用了与 sCD14-ST 特异性结合的抗体的免疫学测定体系进行测定。免疫学测定体系优选从直接吸附法、夹层法、凝集法、固相结合法或溶液反应法等中选择。特别优选的方法为夹层法(夹层免疫测定法)。

[0100] 夹层免疫测定法是通过使用识别测定蛋白质的不同部位的 2 种以上抗体,形成抗体-抗原-抗体复合体来进行测定的方法。夹层免疫测定法可以利用公知技术。对于测定法的原理、应用及改良方法,例如记载在石川荣治著《超高感度酵素免疫测定法》、学会出版中心(1993 年)、松桥直等编著《免疫测定法の新しい活用事例と診断試薬・治療薬開発への応用》、经营教育出版(1985 年)、石川荣治等编《酵素免疫测定法》(第 3 版)、医学书院(1987 年)中。

[0101] 与 sCD14-ST 特异性结合的抗体是与包含 CD14 的二次结构中的 $\beta 3$ 和 $\beta 4$ 之间的区域中的、连续的 8 个以上氨基酸的序列的肽结合的抗体。这类抗体的例子可以举出国际公开 W02005/108429 号公报中记载的 S68 抗体、本说明书实施例 1 中记载的 F1301-9-1 抗体等。使用夹层免疫测定法时,还需要另一种抗体,但只要是与 sCD14-ST 结合的抗体即可,不特别要求有特异性。也可以使用识别高分子量 sCD14 和 sCD14-ST 两者的抗体。这类抗体的例子可以举出国际公开 W02005/108429 号公报中记载的 F1106-13-3 抗体或 F1031-8-3

抗体、本说明书实施例 2 中记载的 F1258-7-2 抗体等。这些抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,没有特别限定。使用夹层免疫测定法时,优选单克隆抗体。另外,也可以是该单克隆抗体的片段。此处所称抗体的片段是该单克隆抗体的 Fab、Fab' 或 F(ab')₂ 中的任一者。

[0102] 在免疫学测定体系中,形成 sCD14-ST 和抗体的复合体后,根据标记检测所形成的复合体,由此测定 sCD14-ST 的存在。标记只要使用过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、β-D-半乳糖苷酶、氧化酶或尿酸酶等酶、吖啶酮或其衍生物、水母发光蛋白或其变异体等化学发光物质、FITC、铕 (Eu) 或钐 (Sm) 等镧系元素等荧光物质、色素、胶体金、着色胶乳或同位素即可。将化学发光物质、荧光物质、着色标记或同位素用作标记时,可以通过对应于该标记的测定机器进行光学测定。将色素、胶体金或着色胶乳用作标记,以利用免疫色谱法或直流法的试剂盒进行测定时,可以通过目测进行测定。

[0103] 免疫学测定体系也可以以试剂盒的形态提供。试剂盒以特异性结合在 sCD14-ST 上的抗体为必需要素,此外还包含在形成 sCD14-ST 和抗体的复合体后用于根据标记检测所形成的复合体的构成要素。例如,可以包含使抗体固相化的不溶性载体(塑料板、胶乳粒子等)、过氧化物酶等标记酶、胶体金等标记物质、四甲基联苯胺(TMB)等发色物质、用于提高检测灵敏度的生物素-链霉素抗生物素蛋白等特异结合物质、封闭剂、稀释液、清洗液、标准物质等。

[0104] 定性和/或定量测定含有吞噬细胞的溶液或该溶液的上清液中的 sCD14-ST。将测定的结果与标准值比较,而对 sCD14-ST 的存在的有无和/或量进行判断。根据 sCD14-ST 存在的有无和/或量,而对吞噬细胞的吞噬活动的有无和/或程度进行判定。标准值可以根据测定目的适当确定,例如以不含吞噬细胞的溶液、接触吞噬物质前的溶液或这些溶液的上清液的测定值为阴性标准值。判定试样的测定值是否比阴性标准值高,而对吞噬细胞的吞噬能力进行评价。另外,作为标准值,也可以使用由 sCD14-ST 的标准物质的测定值求出的标准曲线。通过将试样的测定值与标准曲线进行比较,定量试样中的 sCD14-ST 来评价吞噬细胞的吞噬能力。可以以供分析的吞噬细胞的数量和/或每单位时间的 sCD14-ST 产生量的标准值为指标,对试样中的吞噬细胞的功能的高低、活化的程度等进行评价。sCD14-ST 的标准物质可以使用由血液精制的 sCD14-ST、将吞噬细胞因吞噬刺激而产生的 sCD14-ST 精制得到的物质、重组体 sCD14-ST、肽合成的 sCD14-ST 等。sCD14-ST 的精制法、重组体的制造法记载在国际公开 W02005/108429 号公报中。

[0105] 3. 利用对来自受试体的吞噬细胞的功能进行评价的、各种检测·评价方法

[0106] 使用上述“2. 吞噬细胞的功能评价方法”的项目中说明的方法,对来自受试体的吞噬细胞的功能进行评价,由此能够进行以下检测·评价。

[0107] A) 可以检测·评价受试体是否罹患伴随吞噬细胞功能异常的疾病、疾病的进行度和/或疾病的严重程度。

[0108] B) 可以检测·评价受试体的免疫功能的降低、亢进等变化或异常的有无和/或程度。

[0109] C) 可以通过评价药剂给予中和/或药剂给予后来自受试体的吞噬细胞的功能来检测·评价药剂的效果。

[0110] D) 将吞噬细胞用于再生医疗时,可以作为细胞的品质评价的指标。

[0111] 进行伴随吞噬细胞功能异常的疾病的检测·评价时,只要至少包含使用上述“2. 吞噬细胞的功能评价方法”的项目中说明的方法,而对来自受试体的吞噬细胞的功能进行评价的工序即可,可以进一步包含将评价的结果与正常值进行比较的工序以及根据来自受试体的吞噬细胞的功能与正常值相比为高值或低值而对疾病的有无和 / 或程度进行判定的工序。

[0112] 此处,正常值可以使用通过预先求出来自没有罹患疾病的受试体、即正常受试体的吞噬细胞的功能的测定结果,取该测定结果的平均值或范围等进行了标准化的值。比较试样的测定值和正常值时,可以仅直接比较高低,也可以以正常受试体的平均值 $\pm 2SD$ 或 $\pm 3SD$ 为临界值,试样的测定值比临界值高或低时,判断存在吞噬细胞功能异常。另外,也可以根据测定值的大·小的程度评价疾病的进行度和 / 或疾病的重症度。

[0113] 作为伴随吞噬细胞功能异常的疾病,例如可以举出尿毒症、血清调理素活性降低、补体缺乏症、先天性吞噬能力无能综合症、慢性肉芽肿、髓过氧化物酶缺乏症、白血病、恶性淋巴瘤、细菌性心内膜炎、糖尿病、肝硬化等。例如慢性肉芽肿是在嗜中性粒细胞的活性氧的产生方面具有缺陷,因此是反复发生严重的细菌或真菌感染的先天性吞噬细胞功能异常症。来自慢性肉芽肿患者的嗜中性粒细胞具有吞噬作用(异物摄入),但不具有消化功能。因此,通过利用胶乳珠摄入的检测无法检测出异常,但如果是以 sCD14-ST 产生为指标的吞噬能力评价,则能够检测吞噬细胞功能异常。

[0114] 进行免疫功能的评价方法时,以进行前述伴随吞噬细胞功能异常的疾病的检测·评价的情况为基准。吞噬细胞的功能、特别是吞噬是在生物体的免疫应答中最早启动的重要生物体防御机制,吞噬细胞的功能异常即与免疫功能的异常相关。吞噬细胞的功能异常也可以换言之为免疫功能。

[0115] 进行药剂效果的检测·评价时,只要至少包含对于药剂给予中和 / 或药剂给予后的来自受试体的吞噬细胞,使用上述“2. 吞噬细胞的功能评价方法”中的项目中说明的方法,对吞噬细胞的功能进行评价的工序即可,进而可以包含将评价的结果与正常值和 / 或药剂给予前的评价结果进行比较的工序、以及对药剂的给予所致的来自受试体的吞噬细胞功能变化的有无和 / 或程度进行判定的工序。此处所称正常值是测定来自正常受试体的吞噬细胞的功能的结果,如上述说明所述。

[0116] 给予免疫抑制剂、免疫激活剂、抗癌剂等时,可以通过检测药剂给予中和 / 或药剂给予后的吞噬细胞功能的变化,来确认药剂是否有效地发挥作用、或药剂导致的副作用以何种程度发生,能够得到对药剂选择或给予量的有用指标。另外,也可以以吞噬细胞的功能变化的程度、即 sCD14-ST 产生量的变化的大·小为指标,评价药剂效果的程度。例如可以在给予 G-CSF 前后,比较末梢血中的嗜中性粒细胞的吞噬能力,而对正常功能的嗜中性粒细胞因给予 G-CSF 增加了何种程度进行评价。

[0117] 将吞噬细胞用于再生医疗时,进行细胞的品质评价的情况下,可以通过以 sCD14-ST 产生为指标测定所用吞噬细胞的吞噬能力,而对作为细胞是否具有正常的功能、和 / 或、细胞的活性进行评价。此处所称再生医疗可以举出将来自自身的白细胞等在体外培养·处理后,返回本人的自体细胞移植;以及将来自正常人志愿者的白细胞等移植给患者的异体细胞移植等。制备移植用细胞后,为了检测该细胞是否保有一定的品质,可以使用“2. 吞噬细胞的功能评价方法”的项目中说明的方法。将制备的细胞的功能与基准值比较,

如果满足基准值,则判断为能够使用的品质。基准值可以根据再生医疗的目的进行适当设定,通常只要与正常吞噬细胞的吞噬能力进行比较即可。比基准值低时,可以判断在制备的过程中丧失吞噬细胞的功能或细胞的活性,所以是不适合移植的品质。

[0118] 4. 吞噬功能调节物质的筛选方法

[0119] 可以使用上述“2. 吞噬细胞的功能评价方法”的项目中说明的方法,进行吞噬功能调节物质的筛选。即,本发明提供特征在于包含下述工序的、吞噬功能调节物质的筛选方法。

[0120] 1) 使吞噬细胞与待检物质接触的工序、

[0121] 2) 对由吞噬细胞产生的 sCD14-ST 进行测定的工序、以及

[0122] 3) 评价待检物质对吞噬细胞的吞噬能力的效果的工序。

[0123] 需要说明的是,1) 使吞噬细胞与待检物质接触的工序时,可以在吞噬物质的存在下,使吞噬细胞与待检物质接触。

[0124] 吞噬功能调节物质是促进或抑制吞噬细胞的吞噬活动的物质。例如以已知的吞噬功能抑制物质、即渥曼青霉素(Wortomanin)或细胞松弛素D(Cytochalasin D)为待检物质,使其与吞噬细胞接触,测定由吞噬细胞产生的 sCD14-ST 时, sCD14-ST 的产生量因待检物质的添加而减少,可以确认吞噬抑制效果。同样地,可以以希望检验吞噬功能调节活性的物质为待检物质,使其与吞噬细胞接触,以 sCD14-ST 的产生量为指标,评价对吞噬能力的效果。

[0125] 5. 与吞噬关联的疾病的检测方法

[0126] 本发明还提供与吞噬细胞引起的吞噬相关联的疾病的检测方法。该检测方法测定来自受试体的试样中包含的 sCD14-ST,将该测定值与正常值进行比较,判定该试样中的 sCD14-ST 的量与正常值相比是否为高值,可以检测受试体是否罹患与吞噬细胞引起的吞噬相关联的疾病、疾病的进行度和 / 或疾病的严重程度。

[0127] 作为受试体,只要是哺乳类即可,没有特别限定,可以以人、猴、大鼠、小鼠、兔、牛、猪、绵羊、山羊、马、狗或猫等哺乳类为对象。

[0128] 与吞噬细胞引起的吞噬相关联的疾病是在患部发生由吞噬细胞引起的吞噬活动的疾病。特别是发生伴随局部自身免疫反应或感染的吞噬的疾病。例如,作为例子,可以举出自身免疫疾病、风湿性关节炎、乳腺炎、痛风、肾小球肾炎、溃疡性大肠炎、地中海热、中耳炎、鼻炎、肺炎、结核、膀胱炎、羊水感染症或脓精液症等局部疾病。但本发明中排除伴随全身性感染的疾病、败血症。

[0129] 作为试样,可以使用组织液、淋巴液、关节液、乳汁、脑脊髓液、脓、唾液、泪液、粘液、鼻涕、痰、尿、腹水、羊水、精液等体液、以及将鼻腔、支气管、肺、皮肤、腹腔、各种脏器、关节、骨等清洗后的清洗液。但本发明中血液除外。

[0130] sCD14-ST 的测定方法以前述 2. 吞噬细胞的功能评价方法中记载的方法为基准。

[0131] 作为正常值,可以使用通过预先求出来自没有罹患疾病的受试体、即正常受试体的试样的测定结果,取该测定结果的平均值或范围等进行了标准化的值。来自正常受试体的试样的测定值与测定体系的背景值大致同等时,可以使用通过设定测定体系中的背景值的平均值或范围等进行了标准化的值。测定体系中的背景值是指不将试样而是将缓冲液或分析溶液等添加到测定体系中时的测定值。比较试样的测定值和正常值时,可以直接比较

高低,也可以以正常受试体的平均值 +2SD 或 +3SD 为临界值,试样的测定值比临界值高时,判断为阳性。另外,测定值越大,判断疾病的进行度和 / 或疾病的严重程度越高。

[0132] 试样中可以包含也可以不包含吞噬细胞。可以直接测定试样中的 sCD14-ST,评价生物体内的吞噬程度、即疾病的有无和 / 或程度。理由之一是,在生物体内吞噬细胞进行吞噬活动结果产生的 sCD14-ST 存在于试样中。例如在关节炎模型动物中,可以通过测定关节液或关节清洗液中的 sCD14-ST,而诊断伴随关节处的炎症的疾病,具体为风湿性关节炎、变形性关节炎、肩周炎等。理由之一是能够检测关节液或关节清洗液中的 sCD14-ST 浓度上升。

[0133] 另一方面,也可以检测作为试样的体液或组织清洗液中的吞噬细胞的有无和 / 或量而对疾病的有无和 / 或程度进行评价。此时,只要在试样中添加吞噬物质,测定所产生的 sCD14-ST 即可。例如可以在乳汁中添加吞噬物质,测定所产生的 sCD14-ST,进行乳腺炎的诊断。特别是对牛乳腺炎的检测有用。

[0134] 以上列举适宜的实施方式进行了说明,但本发明并不限于上述实施方式,当然可以在不脱离本发明主旨的范围内由具有本发明所属技术领域的常识的人进行各种变更及修正。

[0135] 实施例

[0136] (实施例 1) 制作以合成肽为抗原的 F1301-9-1 抗体

[0137] 1-(1) 制备作为抗原的肽

[0138] 为了使包含序列号 5 中记载的序列(相当于兔 CD14 氨基酸序列的从 40 位~59 位的序列)的肽在 N 末端介由 SH 基而与载体蛋白结合,故在 N 末端插入半胱氨酸,使用肽合成机 ABI433A(Applied Biosystems) 进行合成。通过常规方法进行精制,得到 2 ~ 3mg 精制肽。

[0139] 1-(2) 使用合成肽制备肽载体蛋白

[0140] 将 1-(1) 中制备的肽用蒸馏水溶解成 10mg/mL,与 10mg/mL 的 Imject Maleimide Activated Keyhole Limpet Hemocyanin(KLH) (PIERCE) 等量混合,在室温下反应 2 小时,由此将肽和载体蛋白结合(以下记为序列号 5 的肽 -KLH)。另外,将 1-(1) 中制备的肽用蒸馏水溶解成 10mg/mL,与 10mg/mL 的 Imject Maleimide Activated Bovine Serum Albumin(BSA) (PIERCE) 等量混合,在室温下反应 2 小时,由此将肽和载体蛋白结合(记为序列号 5 的肽 -BSA)。

[0141] 1-(3) 制作以合成肽为抗原的杂交瘤克隆

[0142] 为了制作对 1-(1) 中制备的肽的单克隆抗体,使用序列号 5 的肽 -KLH 将大鼠免疫。即,将序列号 5 的肽 -KLH 各 100 μ g 用 100 μ L 的生理盐水稀释后,与 100 μ L 的弗氏完全佐剂(DIFCO) 等量混合。以每只各 100 μ L 将其给予 8 周龄雌性 Wistar rat(日本 SLC) 的足垫内。11 日后,将 100 μ g 序列号 5 的肽 -KLH 用 200 μ L 的生理盐水稀释,再次给予足垫内。进而,在 3 日后,由肠骨淋巴结分离淋巴细胞,将得到的淋巴细胞与 Sp2/0-Ag14(ATCC CRL-1581) 混合后,使用聚乙二醇,按安东民卫·千叶丈 / 著《单クローン抗体実験操作入門》(讲谈社) 中记载的方法进行细胞融合。由 HAT 培养基选择杂交瘤,1 周后用 ELISA 法选定产生目标抗体的杂交瘤。即,用 0.076M 磷酸缓冲液(pH7.4)(以下记载为 D-PBS) 将序列号 5 的肽 -BSA 稀释至 10 μ g/mL,以 50 μ L/孔添加到酶标板(Maxisorb、Nunc) 中。在

4℃下反应一夜后,用离子交换水清洗 5 次。在各孔中添加 100 μL 包含 2% Stabilgard 的 D-PBS(pH7.4),进行封闭。然后,在各孔中添加杂交瘤的培养上清液,使其在 37℃下反应 1 小时后,用含 0.05% Tween20 的生理盐水清洗 3 次。将过氧化物酶标记抗大鼠免疫球蛋白抗体(DAKO)用含 10%兔血清的 D-PBS(pH7.4)稀释至 1000 倍,在各孔中添加 50 μL。在 37℃下反应 1 小时后,同样地清洗 3 次。将 TMB 溶液(BioFX)添加到各孔中,在室温下反应 10 分钟后,用 0.5M 硫酸溶液终止反应。用平板分光光度计(NJ-2100、日本 Intermed)测定 450nm 的吸光度。选择确认了吸光度上升的孔的细胞,通过极限稀释法进行克隆。11 日后同样地进行筛选,得到产生与序列号 5 的肽反应的抗体的克隆 F1301-9-1。

[0143] 1-(4) 由杂交瘤培养上清液精制抗体

[0144] 将 1-(3) 中得到的克隆 F1301-9-1 用 SFM 培养基(GIBCO)以 3L 规模进行培养。将该培养上清液供于 0.45 μm 的过滤器,除去细胞后,供于 Protein G 柱。然后,将吸附馏分用酸洗脱,立刻添加 1/10 倍量的 1M Tris-HCl(pH8.0),由此进行中和。将洗脱液用超滤膜在生理盐水中进行缓冲液交换,得到精制抗体。

[0145] (实施例 2) 以合成肽为抗原制作 F1258-7-2 抗体

[0146] 2-(1) 制备作为抗原的肽

[0147] 为了使包含序列号 6 中记载的序列(相当于兔 CD14 氨基酸序列的 1 位~30 位的序列)的肽在 N 末端介由 SH 基而与载体蛋白结合,故在 N 末端插入半胱氨酸,使用肽合成机 ABI433A(Applied Biosystems)进行合成。通过常规方法进行精制,得到 2~3mg 精制肽。

[0148] 2-(2) 使用合成肽制备肽载体蛋白

[0149] 基于 1-(2) 中记载的方法,制备序列号 6 的肽-KLH 及序列号 6 的肽-BSA。

[0150] 2-(3) 以合成肽为抗原制作杂交瘤克隆

[0151] 基于 1-(3) 中记载的方法,得到产生对 2-(2) 中制备的序列号 6 的肽的单克隆抗体的克隆 F1258-7-2。

[0152] 2-(4) 由杂交瘤培养上清液精制抗体

[0153] 基于 1-(4) 中记载的方法,由对 2-(3) 中制备的序列号 6 的肽的杂交瘤克隆的培养上清液精制单克隆抗体。

[0154] (实施例 3) 制作兔 sCD14-ST 测定体系

[0155] 为了制作能够特异性检测兔 sCD14-ST 的体系,使用实施例 1-(4)、2-(4) 中记载的抗体制作夹层 ELISA 体系。

[0156] 3-(1) 制作 F1258-7-2 的 Fab' -HRP

[0157] 为了制作 F1258-7-2 抗体的 F(ab')₂,将实施例 2-(4) 中得到的精制 F1258-7-2 抗体用 Pepsin 处理。即,将精制 F1258-7-2 抗体在包含 2M 尿素的 100mM 乙酸缓冲液(pH4.4)中进行缓冲液交换后,添加 Pepsin(Boehringer)至抗体:酶=30:1(重量比),在 37℃下反应 6 小时。在反应结束时添加 1M Tris 缓冲液(pH8.0),使 pH 恢复至中性附近。然后,进行 F(ab')₂ 的精制。即,为了除去 Fc 部位和 Pepsin 的目的,将经 Pepsin 处理的抗体供于 Prosep G(Millipore),将吸附馏分进行酸洗脱。进而,通过将该吸附馏分供于 Superdex200(Amersham),除去未切断的抗体,得到 F1258-7-2 的 F(ab')₂。将精制后的 F(ab')₂ 供于 SDS-PAGE 以确认纯度,使用以牛血清 IgG 为标准品的 Protein Assay

Dye Reagent (Bio-Rad) 进行蛋白定量。接下来将得到的 F1258-7-2F(ab')₂ 抗体使用 Peroxidase Labeling Kit SH(同仁化学) 进行部分还原,将存在于铰链部分的半胱氨酸残基进行 Peroxidase 标记,由此制作 F1258-7-2Fab'-HRP。

[0158] 3-(2) 制作兔 sCD14-ST 夹层 ELISA 体系

[0159] 制作作为固相抗体使用实施例 1-(4) 中得到的 F1301-9-1 抗体、作为标记抗体使用实施例 3-(1) 中制作的 F1258-7-2 Fab'-HRP 抗体的 2 步夹层 ELISA 体系。即,将 F1301-9-1 抗体用 D-PBS(pH7.4) 稀释至 10 μg/mL,在酶标板 (Maxisorb、Nunc) 的各孔内添加 50 μL。在 4℃ 下反应一夜后,用离子交换水清洗 5 次。在各孔中添加 200 μL 包含 5% StabilGuard(SurModics) 和 0.1% Tween20 的 D-PBS(pH7.4) 进行封闭。然后,将包含 5% 的正常兔血清(使用兔 CD14 亲和抗体柱除去了可溶性 CD14 抗原的血清)、1% BSA、0.1% Tween20 的 150mM 磷酸缓冲液 (pH6.0) 作为稀释液,将试样进行稀释制备,每孔添加 50 μL,在 25℃ 下反应 3 小时。反应结束后,用包含 0.05% Tween20 的生理盐水清洗 5 次。用包含 4% 大鼠血清、0.05% Tween20 的 75mM 磷酸缓冲液 (pH6.4) 稀释 F1258-7-2 Fab'-HRP,在各孔中添加 50 μL。在 25℃ 下反应 2 小时后,同样地清洗 5 次。将四甲基联苯胺溶液 (TMB、BioFX) 添加到各孔中,室温下反应 15 分钟。用 0.5M 硫酸溶液终止反应,用平板分光光度计 (NJ-2100、日本 Intermed) 测定 450nm 的吸光度。

[0160] 作为标准物质,使用重组体兔 sCD14-ST。重组体兔 sCD14-ST 的制作基于国际公开 W02005/108429 号公报中记载的方法进行。即,制作在兔 CD14 的第 66 个氨基酸序列后导入了凝血酶切断位点的质粒,使用 COS 细胞,使其一过性地表达于培养上清液中。精制培养上清液中的 sCD14 后,用凝血酶切断,用凝胶过滤色谱精制重组体兔 sCD14-ST。

[0161] 制作的夹层 ELISA 体系如图 1 所示用量依赖性地检测重组体 sCD14-ST。

[0162] (实施例 4) 用兔动物模型研究 sCD14-ST 的产生

[0163] 4-(1) 制作 LPS 负荷兔败血症模型

[0164] LPS 负荷兔败血症模型通过以 10 μg/kg 的用量对新西兰白兔 (1.8-2.6kg、北山 labes) 耳静脉内给予 LPS(Salmoella Minnesota Re595、SIGMA) 进行制作。在 LPS 给予前及给予 1.5 小时后由耳廓动脉进行采血(加柠檬酸的血液)。

[0165] 4-(2) 制作兔活菌感染模型 (CLP 模型)

[0166] 兔 CLP(盲肠结扎穿孔,cecal ligation and puncture) 模型是对新西兰白兔 (1.8-2.6kg、北山 labes) 进行外科手术制作的。即,将禁食一夜的动物耳静脉内给予 0.35mg/kg Domitor(盐酸美托咪啶、明治制果) 及 5mg/kg 动物用 Ketalar(氯胺酮、三共),进行全身麻醉。切开腹部,将盲肠取出腹腔外后,将回盲部的下游用缝合线阻断,用眼科剪切开约 2cm 宽的 2 处。边将盲肠用镊子压着,确认盲肠内容物从穿刺孔出来后,将盲肠放回腹腔内,将腹膜及皮肤用缝合线缝合。合腹后,皮下给予 50mL/kg 生理盐水。另外,以 0.35mg/kg 耳静脉内给予 Antisedan(盐酸阿替美唑、明治制果),完成手术。在 CLP 模型制作的手术前及手术 2 小时后由耳廓动脉进行采血(加柠檬酸的血液)。

[0167] 4-(3) 测定兔败血症模型的血液中 sCD14-ST

[0168] 通过离心由实施例 4-(1) 和 4-(2) 中采集的血液制备血浆,基于实施例 3-(2) 所述的方法测定 sCD14-ST。结果示于图 2 及图 3。LPS 负荷败血症模型没有确认血中 sCD14-ST 的上升(图 2)。另一方面,活菌感染导致的败血症模型中观察到血中 sCD14-ST 的上升(图

3)。另外,活菌感染导致的败血症模型的血中 sCD14-ST 的上升能在手术(感染)后 2 小时检测到,确认了与 IL-6 或 d-二聚体等其他标记物相比,是在感染早期能够检测到的标记物。由此,对于 sCD14-ST 产生,认为仅内毒素所致的白细胞活化并不充分,必要的是作为对感染的最早免疫应答的白细胞导致的细菌的吞噬活动。

[0169] (实施例 5) 使用兔腹腔渗出粒细胞的吞噬实验

[0170] 5-(1) 采集兔腹腔渗出粒细胞

[0171] 将糖原用生理盐水溶解至 0.1%。将其 150mL 给予 1.64-1.92kg 雄性新西兰白色兔(北山 labes) 的腹腔内。在给予 16 小时后,通过过度麻醉将兔安乐死后,用生理盐水清洗腹腔内,采集粒细胞。

[0172] 5-(2) 通过各种刺激剂产生 sCD14-ST

[0173] 在粒细胞内添加各种白细胞刺激剂,评价 sCD14-ST 的产生量。即将实施例 5-(1) 中采集的兔腹腔渗出粒细胞混悬在包含 2% 正常兔血清、2mM Glutamin、10mM HEPES 的 HBSS 缓冲液(GIBCO 14025)(以下称为细胞分析缓冲液)中使细胞浓度为 1×10^7 Cells/mL,在 96 孔培养平板(Nunclon Surface、Nunc)的各孔中添加 100 μ L。然后将各种刺激剂用细胞分析缓冲液制备成目标浓度的 3 倍,在各孔中添加 50 μ L。在 37°C 下培养 2 小时后,通过离心采集上清液,在实施例 3-(2) 的测定体系中测定 sCD14-ST。结果示于图 4。引发白细胞所致的吞噬·消化的刺激剂(大肠杆菌菌体或酵母聚糖)确认了 sCD14-ST 的上升。另一方面,LPS、PMA(佛波醇肉豆蔻酯乙酸酯、phorbol myristate acetate)、fMLP(甲酰甲硫氨酰亮氨酸苯丙氨酸、formyl methionyl leucyl phenylalanine)等不引起吞噬的刺激剂没有确认 sCD14-ST 的上升。另外,发生吞噬但不被消化的微珠也没有确认 sCD14-ST 的上升。进而,使用高分子量 sCD14 测定用试剂盒(R&D)测定高分子量 sCD14 的产生时,如图 5 所示,确认了 LPS 或 PMA 所致的刺激使得高分子量 sCD14 的产生上升。这表示 sCD14-ST 和高分子量 sCD14 产生机制不同。

[0174] 5-(3) 各种抑制剂对产生 sCD14-ST 的作用

[0175] 实施例 5-(2) 中暗示兔 sCD14-ST 的产生与粒细胞的吞噬活动有关。因此使用各种吞噬抑制剂研究 sCD14-ST 的产生和吞噬的关系。即,将实施例 5-(1) 中采集的兔腹腔渗出粒细胞悬浮在细胞分析缓冲液中使细胞浓度为 1×10^7 Cells/mL,在 48 孔培养平板(48 Well Cell Culture cluster、Corning)的各孔内添加 200 μ L。然后在各孔中添加 100 μ L 将各种抑制剂用细胞分析缓冲液制备成目标浓度的 3 倍得到的液体。在 37°C 下反应 30 分钟后,添加大肠杆菌至粒细胞的 20 倍量(大肠杆菌以 1 菌落形成单元为 1 个进行添加)。在 37°C 下培养 2 小时后,通过离心采集上清液,使用实施例 3-(2) 的测定体系测定 sCD14-ST。结果示于图 6。抑制吞噬中的膜交通的 PI3 激酶抑制剂 Wortomanin、通过使细胞骨架改性抑制吞噬的肌动蛋白的脱聚合剂 Cytochalasin D 抑制了兔 sCD14-ST 的产生。

[0176] (实施例 6) 测定兔关节炎模型的关节液中的 sCD14-ST

[0177] 6-(1) 甲基化 BSA 的制备

[0178] 将 1g BSA(SIGMA)溶解在 100mL 含 4% Paraformaldehyde 的 D-PBS(pH7.4)中,使用碱将 pH 调整为 8.5 后,在室温下反应 1 小时。然后,添加 80mg 硼氢化钠,在 4°C 下进行 2 小时还原反应后,使用超滤膜,在 D-PBS(pH7.4)中进行缓冲液交换。

[0179] 6-(2) 用 ELISA 确认免疫反应

[0180] 采用 ELISA 法进行对抗原的免疫反应的确认。即,将甲基化 BSA 用 D-PBS(pH7.4) 稀释至 $10 \mu\text{g/mL}$,以 $50 \mu\text{L}$ /孔添加到酶标板 (Maxisorp、Nunc) 中。在 37°C 下反应 1 小时后,用离子交换水清洗 5 次,在各孔中添加 $100 \mu\text{L}$ 包含 5% StabilGuard (SurModics) 的 D-PBS(pH7.4),进行封闭。然后,将供于实施例 6-(3) 的试验的各兔的血液样品(血清)用包含 1% StabilGuard (SurModics) 的 D-PBS(pH7.4) 稀释,在各 Well 中添加 $100 \mu\text{L}$ 。使其在室温下反应 1 小时后,用包含 0.05% Tween20 的生理盐水清洗 5 次。然后,将过氧化物酶标记抗兔免疫球蛋白抗体 (DAKO、P448) 用含 5% 山羊血清的 D-PBS 稀释至 1000 倍,在各孔中添加 $50 \mu\text{L}$ 。室温下反应 1 小时后,同样地清洗 5 次,将 TMB 溶液 (BioFX) 添加到各孔中。室温下反应 10 分钟后,用 0.5M 硫酸溶液终止反应,用平板分光光度计 (MultiScan JX、大日本制药) 测定 450nm 的吸光度。

[0181] 6-(3) 测定兔关节炎模型中的 sCD14-ST

[0182] 将 $500 \mu\text{L}$ (5mg) 实施例 6-(1) 中制备的甲基化 BSA 和 $500 \mu\text{L}$ 弗氏完全佐剂 (DIFCO) 混合,将其给予 10-11 周龄雄性新西兰白色兔 (北山 labes) 的背部皮下、后肢足底部、大腿部肌肉内 (以下记为抗原致敏组)。另外,同时对相同数量的兔给予没有加入甲基化 BSA 的溶剂 (以下记为溶剂对照组)。2 周后,将 $500 \mu\text{L}$ (5mg) 甲基化 BSA 和 $500 \mu\text{L}$ 弗氏不完全佐剂 (DIFCO) 混合,对抗原致敏组进行再致敏。需要说明的是,对溶剂对照组同样地给予没有添加甲基化 BSA 的溶剂。进而,在 1 周后由兔耳动脉采血,通过实施例 6-(2) 的 ELISA 法测定血中抗体效价,确认抗原致敏组中致敏成立。然后,将甲基化 BSA 用 D-PBS(pH7.4) 制备成 5mg/mL ,将 1mL 给予抗原致敏组的膝关节腔内,诱发关节炎。同时对溶剂对照组将 1mL D-PBS(pH7.4) 给予膝关节腔内。在诱发 4 日后和 10 日后采集两组的膝关节腔内清洗液,进行 sCD14-ST 的测定,通过涂片分析血球组分。同时由耳廓动脉进行采血 (加柠檬酸的血液),测定血中的 sCD14-ST。在涂片试样中,确认了抗原致敏组中大量粒细胞的聚集。另外,将膝关节腔内清洗液供于实施例 3-(2) 所述的 sCD14-ST 测定体系时,如图 7 所示,抗原致敏组在抗原致敏后的 4 日后及 10 日后确认了 sCD14-ST 的上升。需要说明的是,10 日后也显示高值意味 sCD14-ST 因伴随关节炎的对自身组织的过度免疫反应导致的吞噬活动而产生。另一方面,两组均没有确认血中 sCD14-ST 的上升。

[0183] (实施例 7) 伴随来自人的吞噬细胞的吞噬活动的 sCD14-ST 产生

[0184] 7-(1) 制备人末梢血粒细胞

[0185] 利用由正常人采集的末梢血,通过使用比重 $d = 1.077$ 和 $d = 1.119$ 二层的比重离心法制备粒细胞馏分。

[0186] 7-(2) 通过粒细胞的吞噬活动产生 sCD14-ST

[0187] 在粒细胞中添加各种白细胞刺激剂,评价 sCD14-ST 的产生量。即,将实施例 7-(1) 中采集的人末梢血粒细胞悬浮在包含 10% 正常人血清、2mM Glutamin、10mM HEPES、10ng/ml G-CSF 的 RPMI1640 培养基 (SIGMA R8758) 中,使细胞浓度为 $0.5 \times 10^7 \text{Cells/mL}$ 。以 $100 \mu\text{L}$ 将其添加到 96 孔培养平板 (Nunc) 的各孔中,在 5% 二氧化碳存在下于 37°C 培养一夜。然后,将各种刺激剂用包含 10% 正常人血清、2mM Glutamin、10mM HEPES 的 HBSS 缓冲液制备成 1.5 倍浓度,以 $200 \mu\text{L}$ 添加到各孔中。在 37°C 下培养 2 小时后,通过离心采集上清液,测定人 sCD14-ST。人 sCD14-ST 的测定使用国际公开 W02005/108429 号公报的实施例 7-(3) 中记载的测定试剂盒。即,特异性识别人 sCD14-ST 的、包含与包含

人 CD14 的第 53 ~ 68 的氨基酸序列的肽结合的抗体 (S68 抗体) 的夹层测定试剂盒。为了制成夹层测定体系,作为另一种抗体,使用将与包含人 CD14 的第 17 ~ 26 的氨基酸序列的肽结合的抗体 (F1106-13-3) 进行了过氧化物酶标记得到的抗体。如图 8 所示,与实施例 5 同样地用吞噬刺激剂 (大肠杆菌菌体或酵母聚糖) 时确认了 sCD14-ST 的上升,而用 LPS 或微珠时没有确认到 sCD14-ST 的上升。

[0188] 7-(3) 吞噬抑制剂对产生 sCD14-ST 的作用

[0189] 研究吞噬抑制剂对人粒细胞导致的 sCD14-ST 产生的作用。即,与实施例 7-(2) 同样地将人末梢血粒细胞用 96 孔培养平板培养一夜。然后,将各种吞噬抑制剂用包含 10% 正常人血清、2mM Glutamin、10mM HEPES 的 HBSS 缓冲液制备成 3 倍浓度,以 100 μ L 添加到各孔中。在 37°C 下培养 1 小时后,添加大肠杆菌至粒细胞的 30 倍量 (大肠杆菌以 1 菌落形成单元为 1 个进行添加)。在 37°C 下培养 2 小时后,通过离心采集上清液,使用国际公开 W02005/108429 号公报的实施例 7-(3) 中记载的测定试剂盒,测定人 sCD14-ST。结果,如图 9 所示,与实施例 5-(3) 同样地, Wortomanin、Cytochalasin D 抑制了 sCD14-ST 的产生。

[0190] 7-(4) 使用 HL-60 细胞的吞噬实验

[0191] 将 HL-60 细胞在 DMSO 存在下进行培养,使其分化成粒细胞,供于与实施例 7-(2) 同样的实验。与实施例 7-(2) 同样地添加酵母聚糖或大肠杆菌时确认了 sCD14-ST 的产生。

[0192] 需要说明的是,上述实施例为本发明的一个适宜的实施例,但并不限定其范围,在不脱离本发明的主旨的范围内可以实施各种变形。

[0001]

序列表

<110> Mochida Pharmaceutical Co., LTD.

<120> 吞噬细胞的功能评价方法

<130> MD0845

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 356

<212> PRT

<213> 人类

<400> 1

Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val
 1 5 10 15

Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys
 20 25 30

Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu
 35 40 45

Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala
 50 55 60

Asp Thr Val Lys Ala Leu Arg Val Arg Arg Leu Thr Val Gly Ala Ala
 65 70 75 80

Gln Val Pro Ala Gln Leu Leu Val Gly Ala Leu Arg Val Leu Ala Tyr
 85 90 95

Ser Arg Leu Lys Glu Leu Thr Leu Glu Asp Leu Lys Ile Thr Gly Thr
 100 105 110

[0002]

Met Pro Pro Leu Pro Leu Glu Ala Thr Gly Leu Ala Leu Ser Ser Leu
 115 120 125

Arg Leu Arg Asn Val Ser Trp Ala Thr Gly Arg Ser Trp Leu Ala Glu
 130 135 140

Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Ala Gln
 145 150 155 160

Ala His Ser Pro Ala Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Ala Phe Pro Ala
 165 170 175

Leu Thr Ser Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Gly Leu Gly Glu Arg Gly
 180 185 190

Leu Met Ala Ala Leu Cys Pro His Lys Phe Pro Ala Ile Gln Asn Leu
 195 200 205

Ala Leu Arg Asn Thr Gly Met Glu Thr Pro Thr Gly Val Cys Ala Ala
 210 215 220

Leu Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro His Ser Leu Asp Leu Ser His Asn
 225 230 235 240

Ser Leu Arg Ala Thr Val Asn Pro Ser Ala Pro Arg Cys Met Trp Ser
 245 250 255

Ser Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu Gln Val
 260 265 270

Pro Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser Cys Asn
 275 280 285

[0003]

Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro Glu Val Asp Asn
 290 295 300

Leu Thr Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Thr Ala Leu Pro
 305 310 315 320

His Glu Gly Ser Met Asn Ser Gly Val Val Pro Ala Cys Ala Arg Ser
 325 330 335

Thr Leu Ser Val Gly Val Ser Gly Thr Leu Val Leu Leu Gln Gly Ala
 340 345 350

Arg Gly Phe Ala
 355

<210> 2

<211> 355

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 2

Ser Thr Asp Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Asp Asp Ile Arg
 1 5 10 15

Cys Val Cys Asn Phe Ser Asp Pro Gln Pro Asp Trp Ser Ser Ala Leu
 20 25 30

Gln Cys Met Pro Ala Val Gln Val Glu Met Trp Gly Gly Gly His Ser
 35 40 45

Leu Glu Gln Phe Leu Arg Gln Ala Asp Leu Tyr Thr Asp Gln Arg Arg
 50 55 60

[0004]

Ser His Asn Ser Leu Arg Ala Asp Thr Gln Arg Cys Ile Trp Pro Ser
 245 250 255

Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Thr Gly Leu Gln Gln Val Pro
 260 265 270

Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Asn Val Leu Asp Leu Ser Cys Asn Lys
 275 280 285

Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Gly Glu Leu Pro Lys Val Val Asn Leu
 290 295 300

Ser Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Ala Ser Lys Leu Gln
 305 310 315 320

Glu Asp Leu Thr Asn Ser Gly Val Phe Pro Ala Cys Pro Pro Ser Pro
 325 330 335

Leu Ala Met Gly Met Ser Gly Thr Leu Ala Leu Leu Gln Gly Ala Arg
 340 345 350

Gly Phe Ile
 355

<210> 3

<211> 351

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Ser Pro Ala Pro Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Glu Glu Ser Cys Ser
 1 5 10 15

[0006]

Cys Asn Phe Ser Asp Pro Lys Pro Asp Trp Ser Ser Ala Phe Asn Cys
 20 25 30

Leu Gly Ala Ala Asp Val Glu Leu Tyr Gly Gly Gly Arg Ser Leu Glu
 35 40 45

Tyr Leu Leu Lys Arg Val Asp Thr Glu Ala Asp Leu Gly Gln Phe Thr
 50 55 60

Asp Ile Ile Lys Ser Leu Ser Leu Lys Arg Leu Thr Val Arg Ala Ala
 65 70 75 80

Arg Ile Pro Ser Arg Ile Leu Phe Gly Ala Leu Arg Val Leu Gly Ile
 85 90 95

Ser Gly Leu Gln Glu Leu Thr Leu Glu Asn Leu Glu Val Thr Gly Thr
 100 105 110

Ala Pro Pro Pro Leu Leu Glu Ala Thr Gly Pro Asp Leu Asn Ile Leu
 115 120 125

Asn Leu Arg Asn Val Ser Trp Ala Thr Arg Asp Ala Trp Leu Ala Glu
 130 135 140

Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Ala Gln
 145 150 155 160

Ala His Ser Leu Asn Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Val Phe Pro Ala
 165 170 175

Leu Ser Thr Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Glu Leu Gly Glu Arg Gly
 180 185 190

[0007]

Leu Ile Ser Ala Leu Cys Pro Leu Lys Phe Pro Thr Leu Gln Val Leu
 195 200 205

Ala Leu Arg Asn Ala Gly Met Glu Thr Pro Ser Gly Val Cys Ser Ala
 210 215 220

Leu Ala Ala Ala Arg Val Gln Leu Gln Gly Leu Asp Leu Ser His Asn
 225 230 235 240

Ser Leu Arg Asp Ala Ala Gly Ala Pro Ser Cys Asp Trp Pro Ser Gln
 245 250 255

Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Thr Gly Leu Lys Gln Val Pro Lys
 260 265 270

Gly Leu Pro Ala Lys Leu Ser Val Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Arg Leu
 275 280 285

Asp Arg Asn Pro Ser Pro Asp Glu Leu Pro Gln Val Gly Asn Leu Ser
 290 295 300

Leu Lys Gly Asn Pro Phe Leu Asp Ser Glu Ser His Ser Glu Lys Phe
 305 310 315 320

Asn Ser Gly Val Val Thr Ala Gly Ala Pro Ser Ser Gln Ala Val Ala
 325 330 335

Leu Ser Gly Thr Leu Ala Leu Leu Leu Gly Asp Arg Leu Phe Val
 340 345 350

<210> 4
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> 牛

[0008]

<400> 4

Asp Thr Thr Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Asp Asp Phe Arg Cys Val
1 5 10 15

Cys Asn Phe Thr Asp Pro Lys Pro Asp Trp Ser Ser Ala Val Gln Cys
20 25 30

Met Val Ala Val Glu Val Glu Ile Ser Ala Gly Gly Arg Ser Leu Glu
35 40 45

Gln Phe Leu Lys Gly Ala Asp Thr Asn Pro Lys Gln Tyr Ala Asp Thr
50 55 60

Ile Lys Ala Leu Arg Val Arg Arg Leu Lys Leu Gly Ala Ala Gln Val
65 70 75 80

Pro Ala Gln Leu Leu Val Ala Val Leu Arg Ala Leu Gly Tyr Ser Arg
85 90 95

Leu Lys Glu Leu Thr Leu Glu Asp Leu Glu Val Thr Gly Pro Thr Pro
100 105 110

Pro Thr Pro Leu Glu Ala Ala Gly Pro Ala Leu Thr Thr Leu Ser Leu
115 120 125

Arg Asn Val Ser Trp Thr Thr Gly Gly Ala Trp Leu Gly Glu Leu Gln
130 135 140

Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Arg Val Leu Asn Ile Ala Gln Ala His
145 150 155 160

Ser Leu Ala Phe Pro Cys Ala Gly Leu Ser Thr Phe Glu Ala Leu Thr

[0009]

	165	170	175
Thr Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Ser Leu Gly Asp Ser Gly Leu Met	180	185	190
Ala Ala Leu Cys Pro Asn Lys Phe Pro Ala Leu Gln Tyr Leu Ala Leu	195	200	205
Arg Asn Ala Gly Met Glu Thr Pro Ser Gly Val Cys Ala Ala Leu Ala	210	215	220
Ala Ala Arg Val Gln Pro Gln Ser Leu Asp Leu Ser His Asn Ser Leu	225	230	235
Arg Val Thr Ala Pro Gly Ala Thr Arg Cys Val Trp Pro Ser Ala Leu	245	250	255
Arg Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu Gln Val Pro Lys Gly	260	265	270
Leu Pro Pro Lys Leu Ser Val Leu Asp Leu Ser Cys Asn Lys Leu Ser	275	280	285
Arg Glu Pro Arg Arg Asp Glu Leu Pro Glu Val Asn Asp Leu Thr Leu	290	295	300
Asp Gly Asn Pro Phe Leu Asp Pro Gly Ala Leu Gln His Gln Asn Asp	305	310	315
Pro Met Ile Ser Gly Val Val Pro Ala Cys Ala Arg Ser Ala Leu Thr	325	330	335
Met Gly Val Ser Gly Ala Leu Ala Leu Leu Gln Gly Ala Arg Gly Phe			

[0010]

340

345

350

Ala

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 兔 CD14 的 40-59 位

<400> 5

Val Glu Met Trp Gly Gly Gly His Ser Leu Glu Gln Phe Leu Arg Gln

1

5

10

15

Ala Asp Leu Tyr

20

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 兔 CD14 的 1-30 位

<400> 6

Ser Thr Asp Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Asp Asp Ile Arg

1

5

10

15

Cys Val Cys Asn Phe Ser Asp Pro Gln Pro Asp Trp Ser Ser

20

25

30

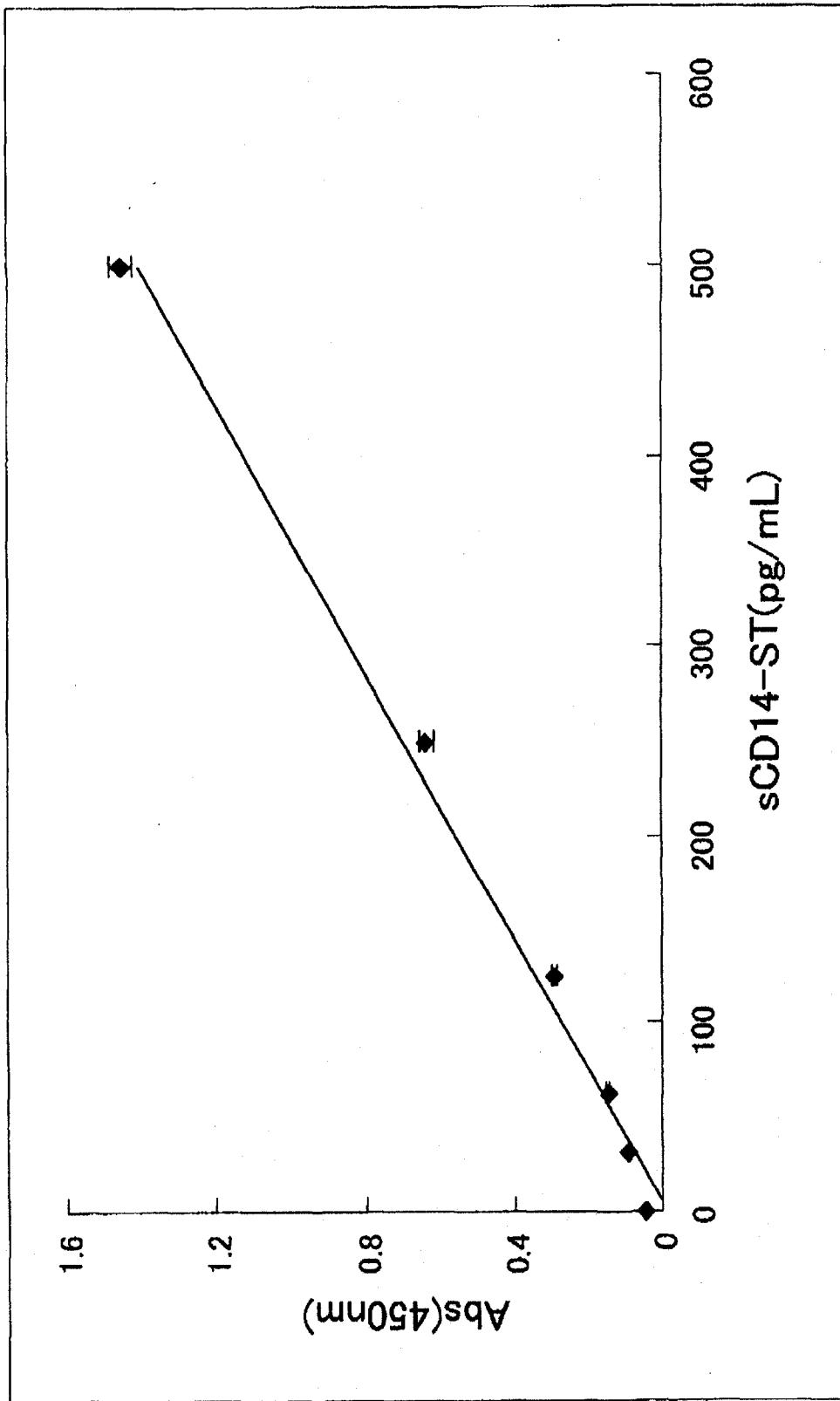


图 1

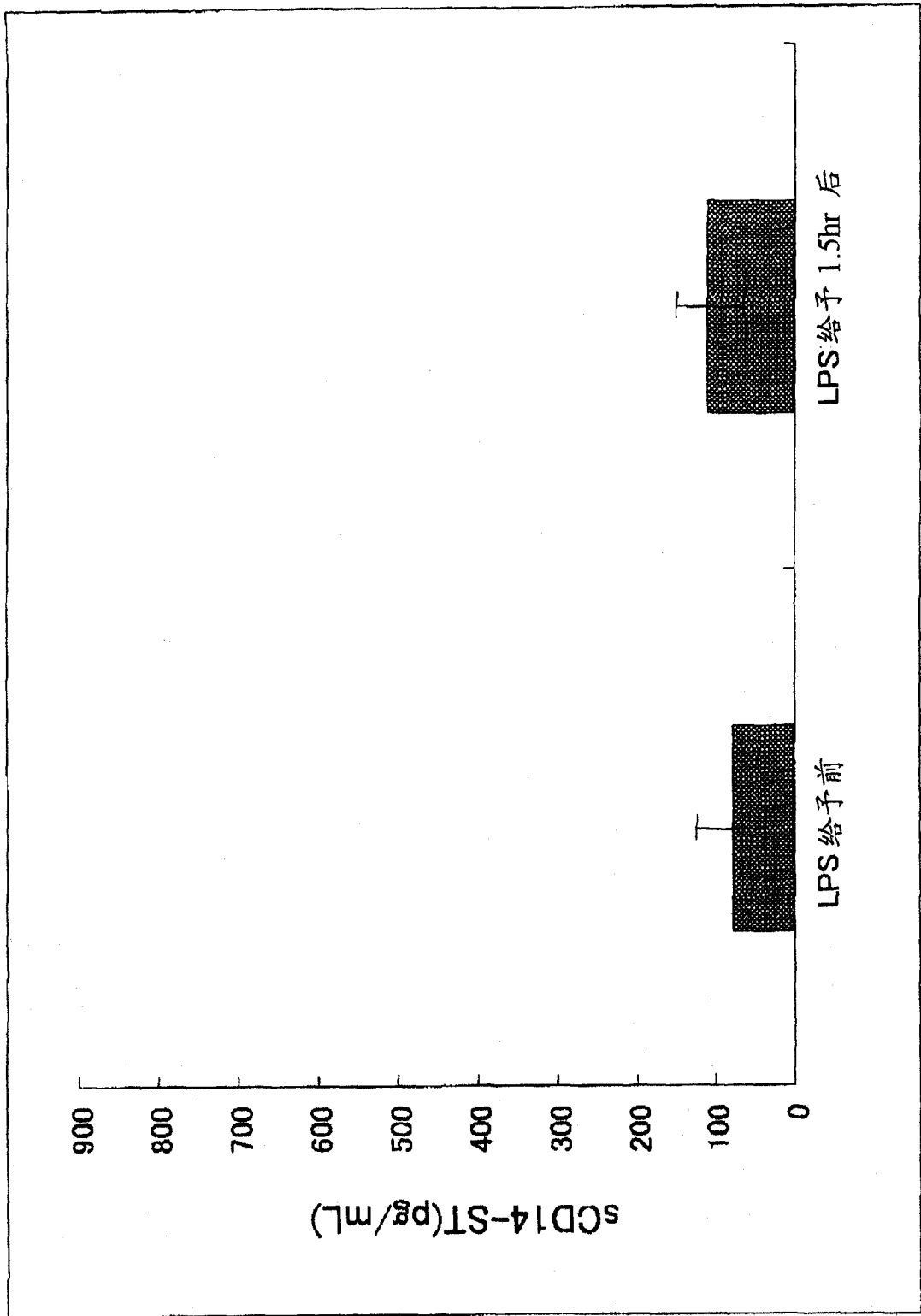


图 2

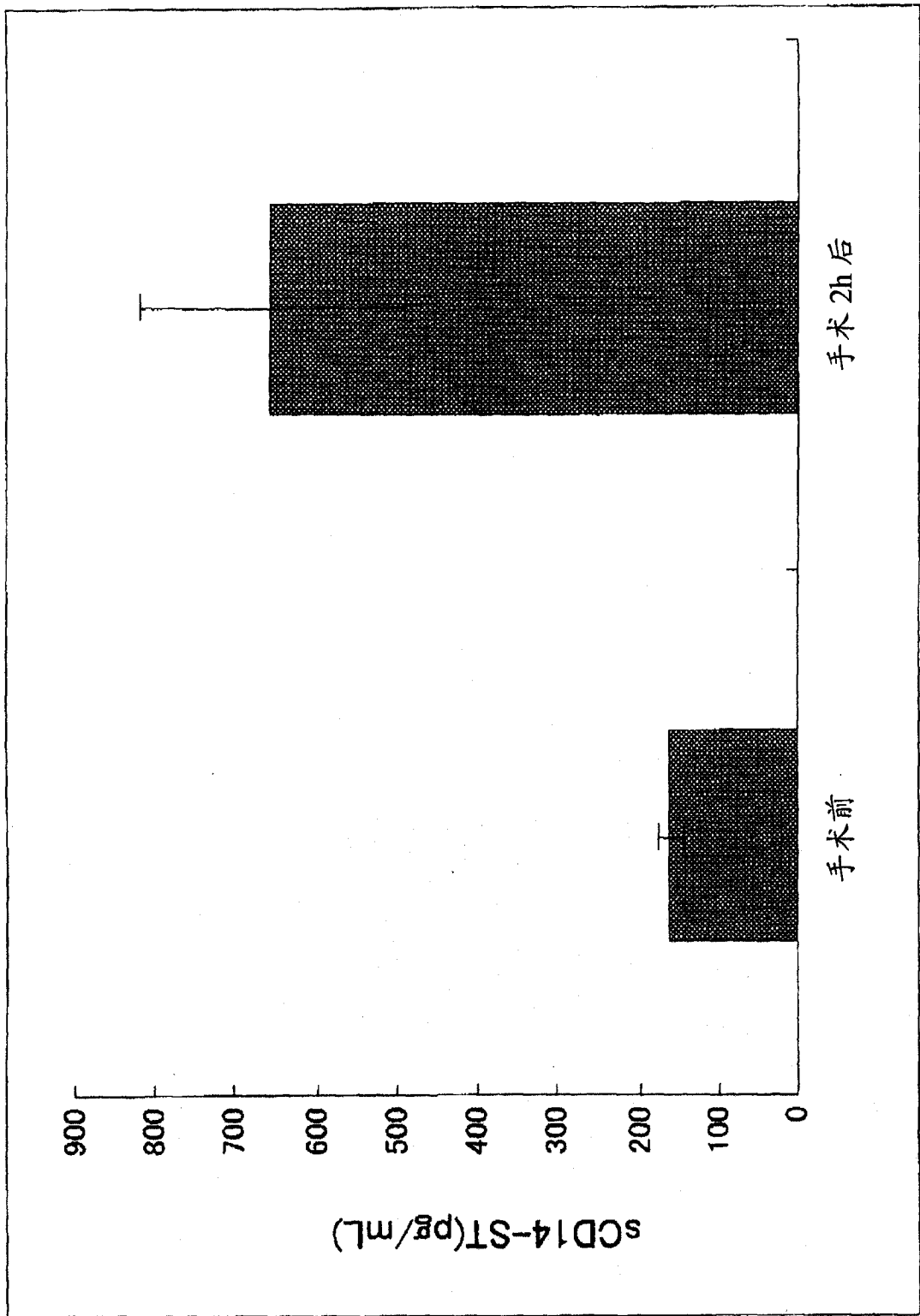


图 3

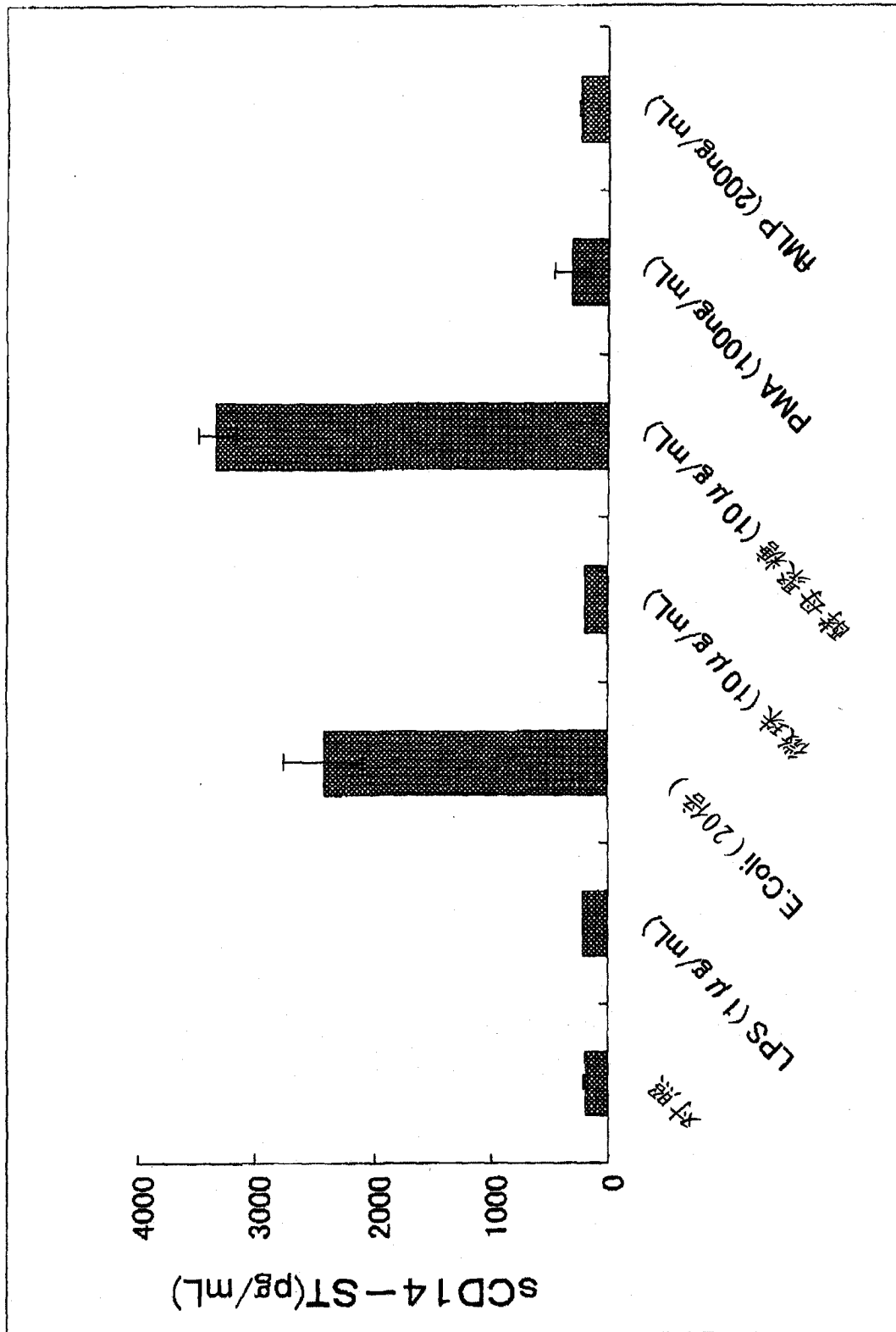


图 4

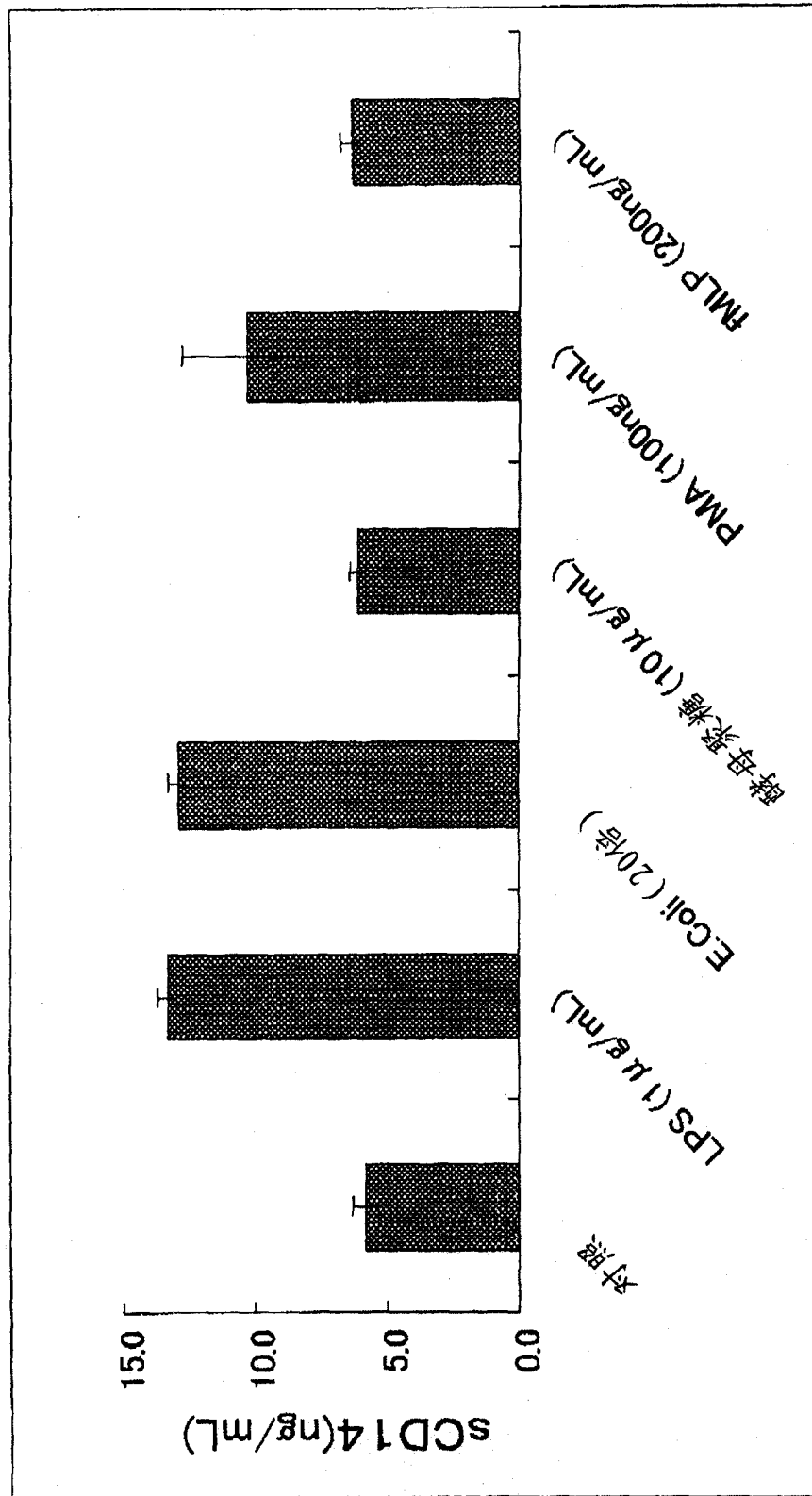


图 5

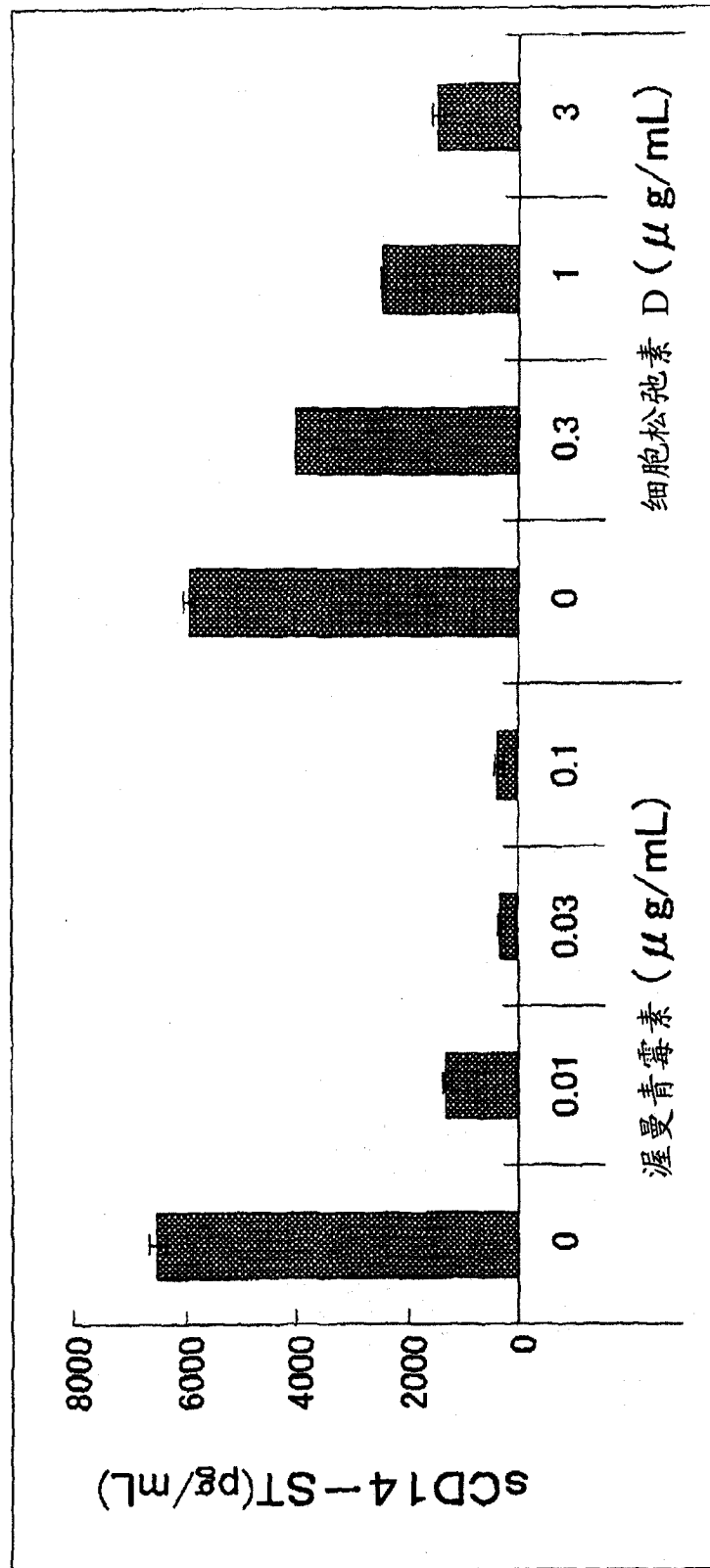


图 6

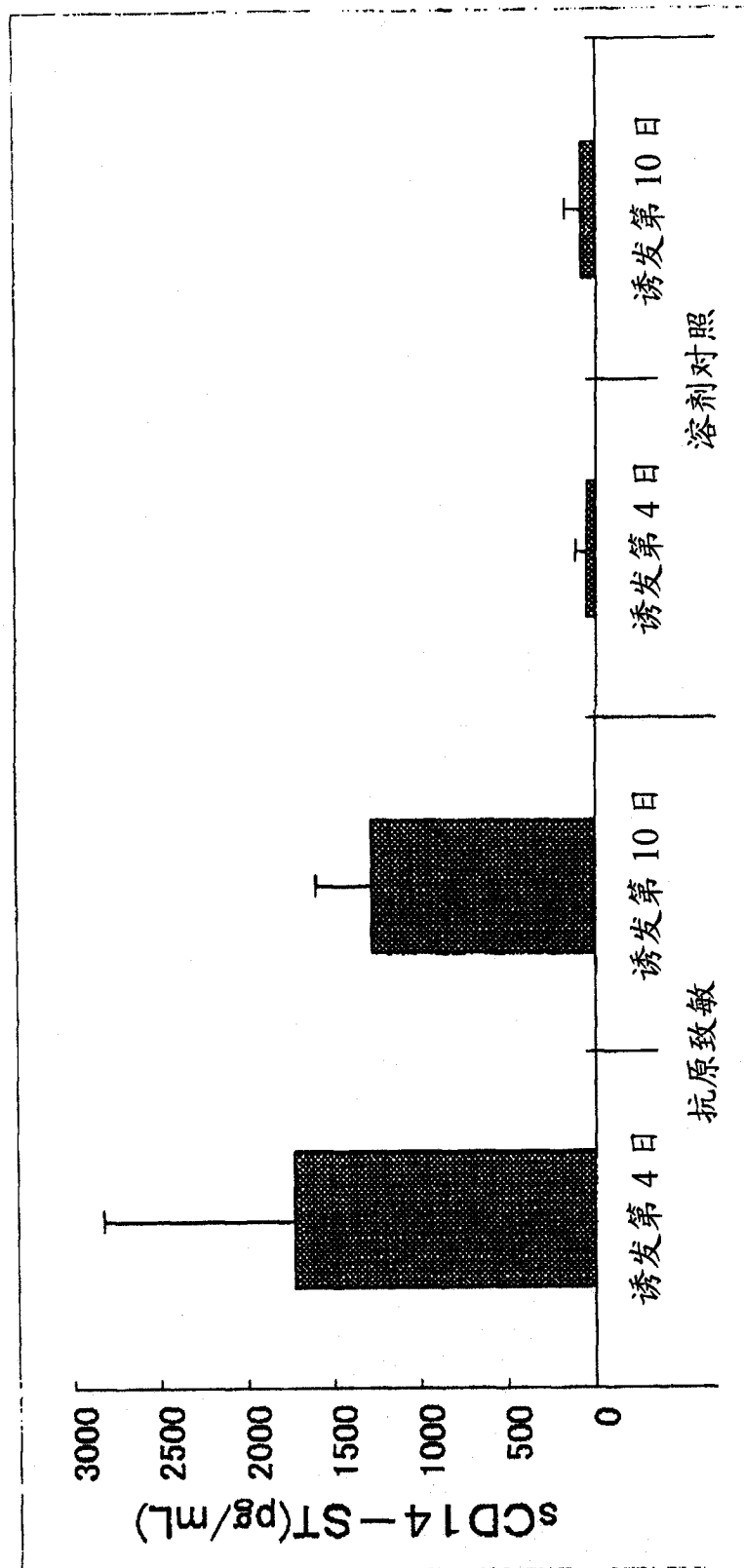


图 7

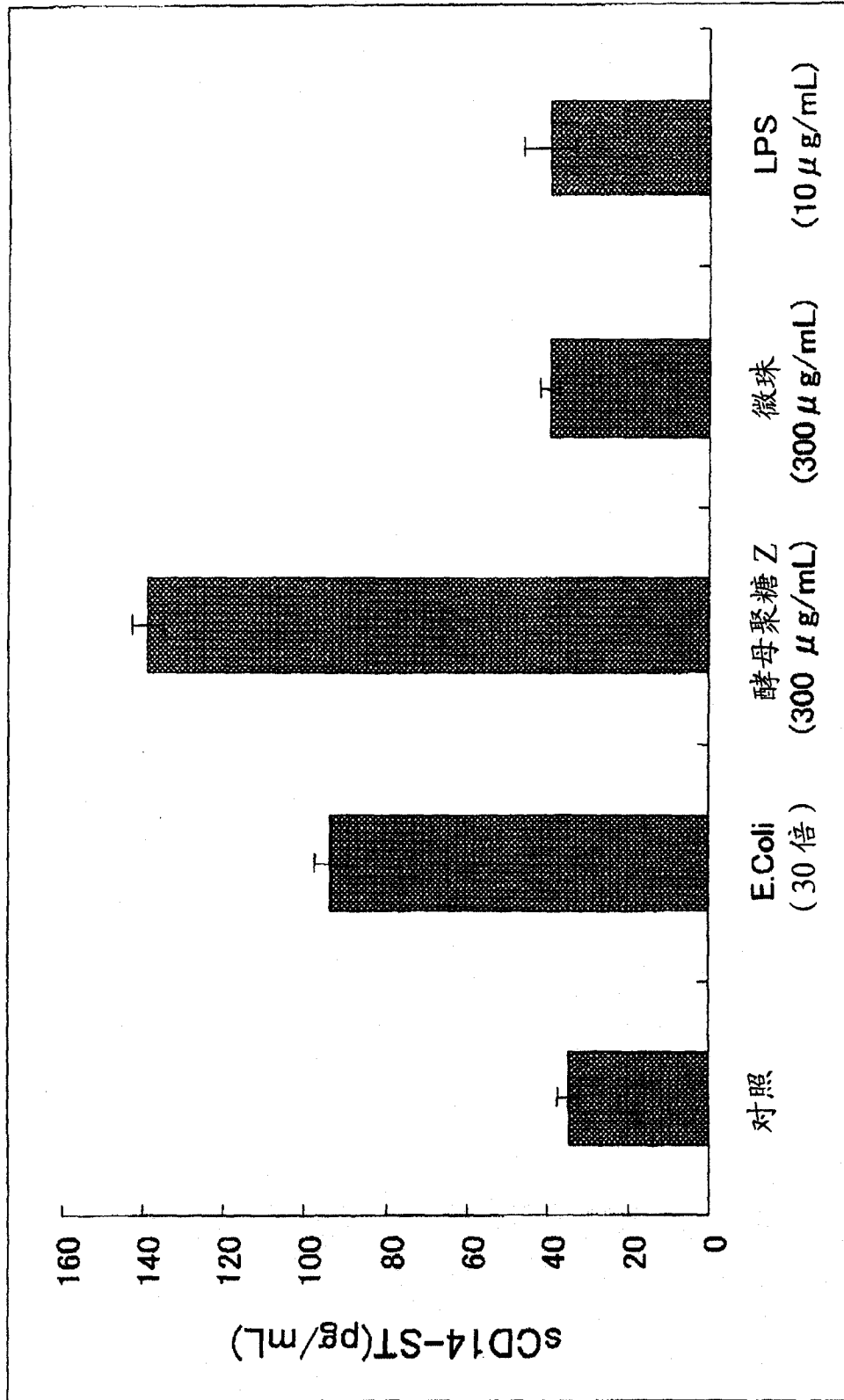


图 8

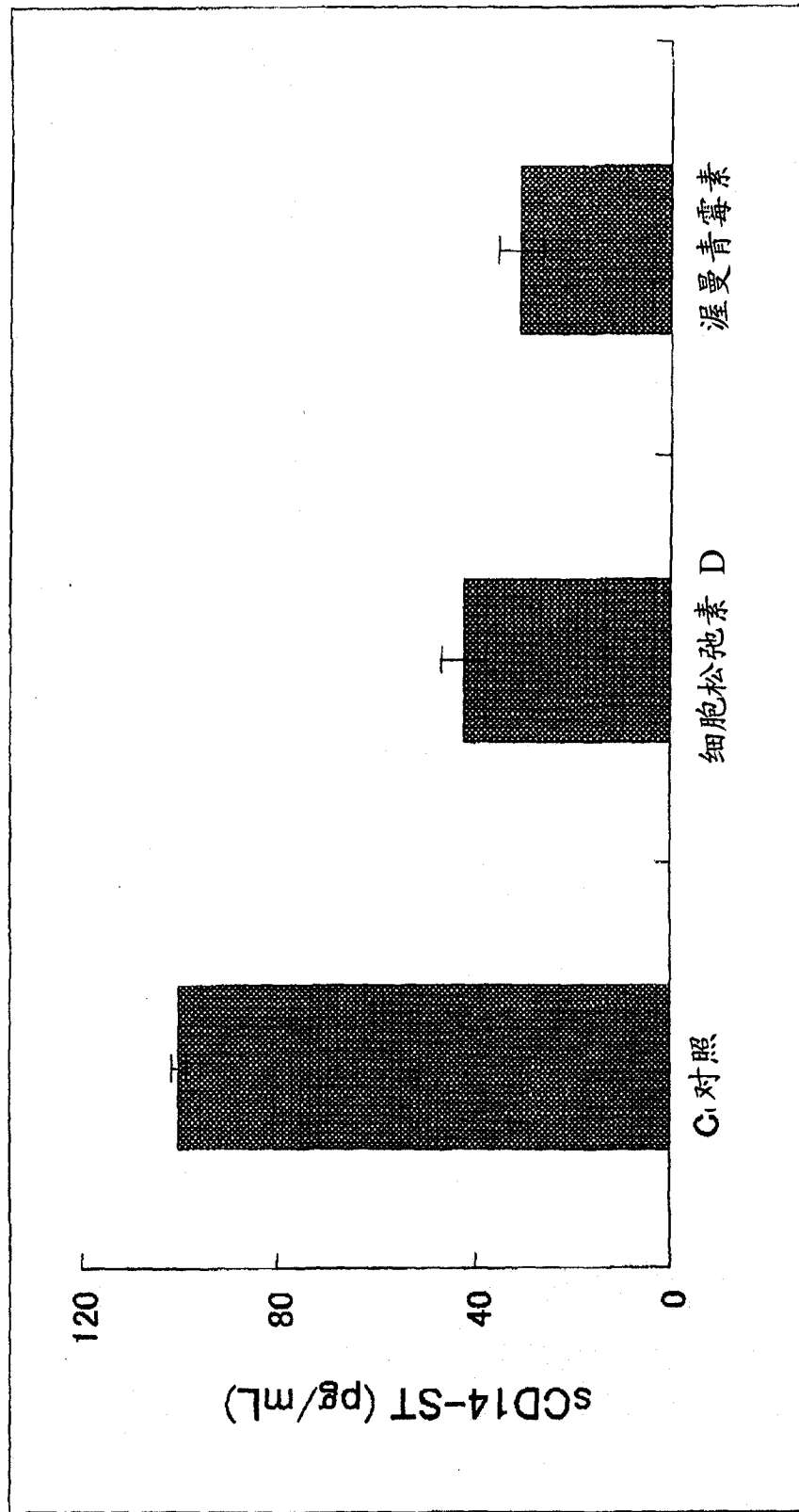


图 9

专利名称(译)	吞噬细胞的功能评价方法		
公开(公告)号	CN102037359A	公开(公告)日	2011-04-27
申请号	CN200980118794.9	申请日	2009-05-22
申请(专利权)人(译)	持田制药株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	持田制药株式会社		
[标]发明人	内藤克纪		
发明人	内藤克纪		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/705 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/5091 G01N2333/70596 C07K14/70596 G01N33/56972 C07K16/2896 G01N33/5047 G01N2800/00		
代理人(译)	庞立志 郭文洁		
优先权	2008135966 2008-05-23 JP		
其他公开文献	CN102037359B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供测定因吞噬细胞引起的吞噬活动而特异性产生的、具有适于测定的稳定性的液性因子sCD14-ST的、新颖且简便的吞噬细胞功能评价方法以及及与吞噬细胞引起的吞噬相关联的疾病的检测方法。

