

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680053176.7

[51] Int. Cl.

C07F 5/02 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 3 月 25 日

[11] 公开号 CN 101395162A

[22] 申请日 2006.10.5

[21] 申请号 200680053176.7

[30] 优先权

[32] 2006. 2. 23 [33] JP [31] 046950/2006

[86] 国际申请 PCT/JP2006/319977 2006.10.5

[87] 国际公布 WO2007/097065 日 2007.8.30

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.21

[71] 申请人 独立行政法人科学技术振兴机构

地址 日本埼玉县

共同申请人 公立大学法人大阪府立大学

斯特拉化工公司

[72] 发明人 切畑光统 浅野智之 上原幸树

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 李贵亮

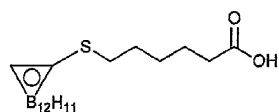
权利要求书 1 页 说明书 18 页 序列表 7 页
附图 1 页

[54] 发明名称

半抗原化合物以及抗体

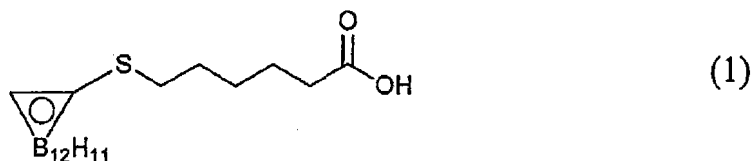
[57] 摘要

本发明是一种具有由右式(1)表示的结构的化合物, 通过以所述化合物为半抗原、将该半抗原与高分子化合物的复合体用作抗原得到的抗 BSH 的抗体。通过使用本发明, 可以提供用于制作高灵敏度而且高选择性地识别 BSH 的抗体的半抗原化合物, 抗 BSH 的抗体, 以及使用该抗体的高灵敏度且定量性出色的 BSH 测定用试剂盒以及免疫学测定方法。



(1)

1. 一种化合物，其具有下式 (1)



表示的结构。

2. 一种抗体，其是通过以权利要求 1 所述的化合物为半抗原，将该半抗原与高分子化合物的复合体用作抗原而得到的抗巯基十一氢十二硼酸盐 (BSH) 的抗体。

3. 根据权利要求 2 所述的抗体，其中，
所述抗体为单克隆抗体。

4. 一种杂交瘤，其产生权利要求 3 所述的单克隆抗体。

5. 根据权利要求 4 所述的杂交瘤，其中，
所述杂交瘤为 Hybridoma BSF-2 (保藏编号 ABP-10689)。

6. 一种巯基十一氢十二硼酸盐 (BSH) 的测定试剂盒，其含有权利要求 3 所述的单克隆抗体。

7. 一种巯基十一氢十二硼酸盐 (BSH) 的测定方法，其特征在于，
使用权利要求 3 所述的单克隆抗体。

8. 一种巯基十一氢十二硼酸盐 (BSH) 的测定方法，其特征在于，
使用权利要求 6 所述的试剂盒。

半抗原化合物以及抗体

技术领域

本发明涉及一种巯基十一氢十二硼酸盐（日文：メルカプトウンデカハイドロドデカボレート，英文：mercaptoundecaphydrododecaborate）（BSH）的半抗原化合物、BSH 的抗体以及使用其的免疫学测定方法等，在硼中子俘获疗法（BNCT）中使用中子俘获疗法剂的检测、定量中尤其有用。

背景技术

近年来，作为利用放射性同位素的新的癌的治疗方法，硼中子俘获疗法（BNCT）备受瞩目。硼中子俘获疗法是将内含硼 10 同位素（ ^{10}B ）的硼化合物被摄入到癌细胞中，照射低能量的中子束（例如热中子），利用在细胞内发生的核反应，局部地破坏癌细胞的治疗方法。在该治疗方法中，使内含 ^{10}B 的硼化合物选择性地蓄积于癌组织的细胞中对于提高治疗效果很重要，所以必须开发出被选择性地摄入到癌细胞中的硼化合物。

过去，作为在 BNCT 中使用的药剂，合成有向基本骨架导入硼原子或硼原子团的含硼化合物。作为在实际的临床上使用的药剂，包括对位一硼苯丙氨酸（p-boronophenylalanine）（BPA）或巯基十一氢十二硼酸盐（BSH）。其中，BSH 以钠盐的形式主要被用于脑肿瘤的治疗，其有用性正在得到确认（例如参照非专利文献 1～8）。

非专利文献 1：I.M.Wyzlic 等，Tetrahedron Lett.,1992,33,7489—7490

非专利文献 2：W.Tjark,J.Organomet.Chem.,2000,614—615,37—47

非专利文献 3：K.Imamura 等，Bull.Chem.Soc.Jpn.,1997,70,3103—3110

非专利文献 4：A.S.Al-Madhorn 等，J.Med.Chem.,2002,45,4018—4028

非专利文献 5：F.Compostella 等，Res.Develop.Neutron Capture Ther.,2002,81—84

非专利文献 6: S.B.Kahl 等, 对癌症的中子俘获疗法的进展 (Progress in Neutron Capture Therapy for Cancer), Plenum Press, New York 1992, 223

非专利文献 7: J.Cai 等, J.Med.Chem., 1997, 40, 3887—3896

非专利文献 8: H.Lim 等, Res.Develop.Neutron Capture Ther., 2002, 37—42

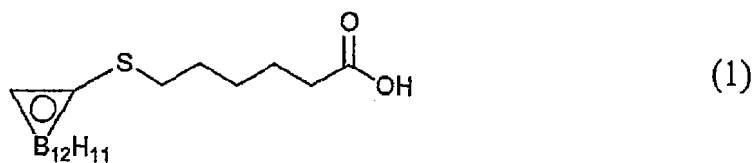
但是, 对伴随 BNCT 的 BSH 的生物体内举动尤其对细胞表层或细胞的微观分布的具体情况尚不清楚, 强烈需要开发出能够简便且迅速地对 BSH 的生物体内举动进行定性、定量的方法。作为 BSH 的检测、定量方法, 有望利用免疫学测定方法, 但 BSH 之类的低分子无机化合物的分子量·体积小或者容易离子化, 所以抗原性低, 目前尚不能获得能够高灵敏度地检测 BSH 的抗体。

发明内容

因此, 本发明的目的在于提供一种用于制作高灵敏度而且高选择性地识别 BSH 的抗体的半抗原化合物, BSH 的抗体, 以及使用该抗体的高灵敏度且定量性出色的 BSH 测定用试剂盒以及免疫学测定方法。

本发明人等为了实现所述目的而着眼于在 BSH 的侧链 SH 基上结合连接序列 (linker) 的半抗原化合物, 进行了潜心研究, 结果发现, 以下所示的半抗原化合物、抗体、杂交瘤等能够实现所述目的, 以至完成本发明。

即, 本发明涉及一种化合物, 其是具有由下式 (1)



表示的结构的化合物。

本发明还涉及一种抗体, 其是通过以所述化合物为半抗原, 将该半抗原与高分子化合物的复合体用作抗原得到的抗巯基十一氢十二硼酸盐 (BSH) 的抗体。所述抗体优选为单克隆抗体。

本发明还涉及一种产生所述单克隆抗体的杂交瘤。所述杂交瘤优选为 Hybridoma BSF-2 (保藏编号 ABP-10689)。

本发明还涉及一种含有所述单克隆抗体的巯基十一氢十二硼酸盐 (BSH) 的测定试剂盒。

另外, 本发明还涉及一种巯基十一氢十二硼酸盐 (BSH) 的测定方法, 其特征在于, 使用所述单克隆抗体或所述试剂盒。

本发明的化合物优选用作 BSH 半抗原。通过将该半抗原与高分子化合物的复合体用作抗原, 可以良好地在动物中引起抗 BSH 的免疫应答, 可以得到特异且高灵敏度的 BSH 抗体。

本发明的抗体可以特异且高灵敏度地检测 BSH。在该抗体为单克隆抗体的情况下, 对 BSH 尤其为高灵敏度, 交叉反应性也低。本发明的杂交瘤可以稳定地在短时间内生产所述单克隆抗体, 通过培养该杂交瘤, 可以制造大量的单克隆抗体。

另外, 本发明的试剂盒通过含有本发明的单克隆抗体, 可以提供在 BSH 的免疫学测定方法中优选使用的能够特异、高灵敏度以及简便地测定 BSH 的手段。

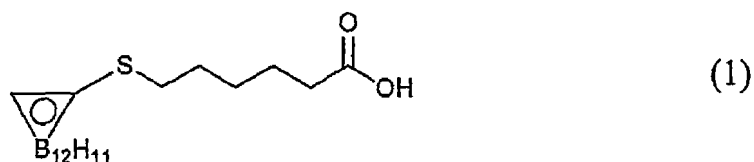
本发明的 BSH 的测定方法通过使用本发明的单克隆抗体或试剂盒, 来实现特异性及操作的简便性出色的效果。

附图说明

图 1 是表示使用本发明的单克隆抗体的直接竞争 ELISA 法中的 BSH 浓度与吸光度的关系的曲线图。

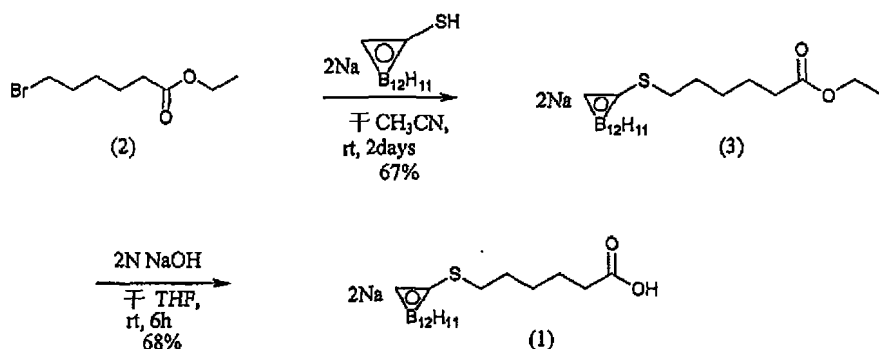
具体实施方式

本发明提供一种具有由下式 (1)



表示的结构的化合物。所述化合物为 6-S-十一氢十二硼基己酸 (6-s-ウンデカハイドロドデカボリルヘキサン酸), 优选用作 BSH 半抗原。在所述式 (1) 中, 通过羧基与后述的高分子化合物共价结合, 形成复合体 (接合体)。

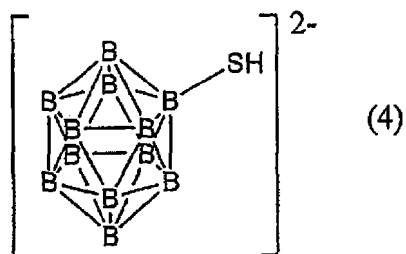
所述 BSH 半抗原的制造可以利用公知的合成方法进行, 没有特别限定, 例如由下述反应式:



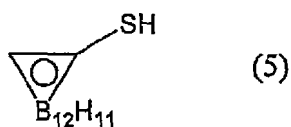
表示的方法在各工序中以高收率得到化合物, 所以优选使用。在所述反应式中, 式 (2)、BSH 等原料化合物均为容易获得的化合物。

另外, 在所述各工序中的详细合成方法记载于实施例 1。

所述巯基十一氢十二硼酸盐 (BSH) 具有由硼、氢及硫原子构成的 20 面体的硼簇结构。BSH 不仅为无机低分子化合物, 而且体积大于苯环, 具有 3 个硼原子共有 2 个电子的所谓三中心键 (three center bond) 结构, 具有电子定域化的特异结构。在本发明中, BSH 由下式 (4)



或下式 (5)



表示。

所述 BSH 半抗原在形成与牛血清白蛋白 (BSA)、兔血清白蛋白 (RSA)、卵白蛋白 (OVA)、钉形贝血蓝蛋白 (KLH)、甲状腺球蛋白 (TG)、免疫球蛋白等高分子化合物 (蛋白质) 的复合体之后, 用作免疫原。

复合体的形成方法可以利用公知的方法进行, 没有特别限定。例如可

以利用混合酸酐法或活性酯法等使所述 BSH 半抗原的羧基与所述高分子化合物的官能团（例如氨基等）反应，形成复合体。

本发明通过将所述半抗原与高分子化合物的复合体用作抗原，提供得到的抗 BSH 的抗体。

在本发明所述的“抗体”包括多克隆抗体或单克隆抗体，也包括 Fab 片断或 F(ab')₂ 片断等之类的具有抗原结合性的抗体的一部分。在这些抗体中，优选单克隆抗体。

所述抗体的制造方法为公知的，本发明的抗体也可以按照常规方法制造（Current Protocol in Molecular Biology, Chapter 11.12~11.13 (2000)）。具体而言，在本发明的抗体为多克隆抗体的情况下，可以按照常规方法形成所述 BSH 半抗原与高分子化合物的复合体，然后向家兔等非人动物免疫该复合体，从该免疫动物的血清，按照常规方法获得。

另一方面，在为单克隆抗体的情况下可如下得到：通过按照常规方法向小鼠等非人动物免疫所述复合体，对使得到的脾脏细胞和骨髓瘤细胞发生细胞融合从而配制而成的杂交瘤细胞进行筛选，培养单克隆抗体产生杂交瘤（Current Protocols in Molecular Biology 编者：Ausubel 等（1987）出版：John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11）。

抗体的配制可以适当地组合超滤、硫酸铵分离、离子交换层析、凝胶过滤层析、亲和层析等浓缩·纯化法来进行。

另外，作为所述抗体，更具体而言，例如可以举出如下所示的具有在本发明的实施例中得到的单克隆抗体的重链及轻链的核苷酸序列或在本发明的实施例中得到的单克隆抗体的重链及轻链的氨基酸序列的抗体。另外，所述核苷酸序列或氨基酸序列只要起到本发明的效果，也包括具有所述序列的一部分发生缺损、附加、修饰、置换、变异的序列的序列。进而，在这种情况下，优选所述序列的一部分发生缺损、附加、修饰、置换、变异的序列与所述序列的相同性为 70% 以上，更优选为 80% 以上，进而优选为 90% 以上，特别优选为 95% 以上。

重链的序列

(5' -)CTCGAGTCTGGCCCTGGAATATTGCAGCGCTCCCAGACCC
TCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGG
TATGGGTGTTGGCTGGTTTCGTCAGCCTTCAACAAAGGGTCTAGA
GTGGCTGGCAGACATTTGGTGGAATGACAATAAATACTATAATCC
ATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAAAAA
CCAGGTATTCCTCAAGATCGCCAGTGTGGACACTATAGATACTGC
CACTTACTACTGTTCTCTAAGAAATAGTGCCGAAAAGACAAACAC
CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGAC
ACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAAC
TAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCC
TGAGCCAGTGACAGTGACCTGGA ACTCTGGATCCCTGTCCAGCGG
TGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCT
GAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGAC
CGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGA
CAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTACTAGT

轻链的序列

(5' -)GAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCAC
CTGGTGAAACAGTCACACTCACTTGTCGCTCAAGTACTGGGGCTG
TTACA ACTAGTAACTATGTCAATTGGGTCCAAGAAAAACCAGATC
ATTTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAG
GTGTTCCCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTG
CCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGATGAGGCAATATATT
TCTGTGGTCTATGGTACAGCAACCATTTGGGTGTTTCGGTGGAGGAA
CCAAACTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCA
CCCTGTTTCCACCTTCCTCTGAAGAGCTCGAGACTAACAAGGCCA

CACTGGTGTGTACGATCACTGATTTCTACCCAGGTGTGGTGACAG
TGGACTGGAAGGTAGATGGTACCCCTGTCACTCAGGGTATGGAGA
CAACCCAGCCTTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACATGGCTAGC
AGCTACCTGACCCTGACAGCAAGAGCATGGGAAAGGCATAGCAG
TTACAGCTGCCAGGTCACTCATGAAGGTCACACTGTGGAGAAGAG
TTTGTCCCGTGCTGAGTGTTCTAATTCTAGA

重链的氨基酸序列

(N-)LESGPGILQRSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVWFRQPSTKGL
EWLADIWWNDNKYYNPSLKSRLTISKDTSKNQVFLKIASVDTIDTAT
YYCSLRNSAEKTNTWGQGTTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNS
MVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS
VTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCTS

轻链的氨基酸序列

(N-)ELVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYVNWVQKEP
DHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC
GLWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEELETNKATLV
CTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNNKYMASSYL
TLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRAECS

另外，本发明还提供产生所述单克隆抗体的杂交瘤。以下对在小鼠中制作杂交瘤的方法进行详细说明。

以下以 Balb/c 小鼠为例进行说明。将如上所述地配制而成的抗原（免疫原）溶解于生理磷酸缓冲液中，使其成为 2mg/ml 左右，与佐剂等量混合，然后向 Balb/c 小鼠的腹腔内给药。然后，在每约 2 周进行追加免疫。

摘出从尾血管采集的血液的血清中的抗体效价变高的所述小鼠的脾脏，在已加入 DMEM 培养基（Dulbecco 改良 Eagle 培养基）的细胞培养皿内，从所述脾脏取出细胞。将培养基移至离心沉淀管中，使大的组织片

沉淀,轻轻地取出脾脏细胞浮游的上清,以低速离心分离单细胞的悬浮液,收集细胞,配制脾脏细胞。

以细胞数的比 5: 1 (骨髓瘤 (myeloma) 细胞: 脾脏细胞), 混合小鼠的骨髓瘤细胞 (P3×63Ag8.653), 以低速离心分离, 收集细胞。在解开沉淀细胞之后, 缓慢地加入保温于 37℃ 的 50% 聚乙二醇 (分子量 1500) 溶液 1ml, 进行细胞融合。

在细胞融合之后, 加入 DMEM 培养基 9ml, 进而添加 40ml 含胎牛血清 DMEM 培养基。向利用离心分离收集的细胞中, 加入 HAT 培养基, 使细胞数以 5×10^5 个/ml 悬浮, 在 96 孔塑料板中, 以 250 μ l/孔的量分注细胞悬浮液, 在 37℃、5% 二氧化碳、加湿条件下的孵箱中进行培养。

1 周后, 用 HAT 培养基置换孔中的培养基的一半量, 培养 10~14 天。用 ELISA 检测培养液中的抗体的活性, 对产生目的抗体的孔的细胞, 利用极限稀释法, 进行杂交瘤的克隆形成。利用形成克隆, 得到产生抗 BSH 抗体的稳定的杂交瘤株。

在本发明中, 利用所述方法制作杂交瘤, 建立 BSF-2 等多个杂交瘤株。其中, 对于 Hybridoma BSF-2, 在保藏编号 ABP-10689 下, 在 2006 年 10 月 2 日, 被独立行政法人 产业技术综合研究所, 专利生物委托保管中心 (邮政编码 305-8566, 茨城县筑波市东 1 丁目 1 番 1 号) 国际委托保管。另外, 对于 BSF-2, 在保藏编号 FERM AP-20805 下, 在 2006 年 2 月 22 日, 被独立行政法人 产业技术综合研究所, 专利生物委托保管中心 (邮政编码 305-8566, 茨城县筑波市东 1 丁目 1 番 1 号) 国内委托保管。

本发明的杂交瘤可以使用培养基 (例如内含 10% 胎牛血清的 DMEM) 培养, 将该培养液的离心上清作为单克隆抗体溶液。另外, 可以通过向来源该杂交瘤的动物的腹腔内注入, 生成腹水, 将得到腹水作为单克隆抗体溶液。这些抗体溶液可以进而如上所述地纯化・浓缩。

另外, 本发明还涉及内含所述抗体的 BSH 的测定试剂盒。本发明的测定试剂盒可以通过含有对 BSH 特异结合的抗体, 而简便地测定 BSH, 可以在后述的 BSH 的测定方法中优选地使用。所述试剂盒根据测定法, 还可以含有标记的二次抗体或标记的 BSH 半抗原 (抗原)、缓冲液、检测

试剂及/或 BSH 标准溶液等。

优选的试剂盒可以被用于如下所示的间接竞争 ELISA 法或直接竞争 ELISA 法。在直接竞争 ELISA 法中使用的情况下，本试剂盒优选进而含有固相化本发明的单克隆抗体的载体。这种情况下，可以省略下述直接竞争 ELISA 法的工序（1）。

在间接竞争 ELISA 法中使用的情况下，本试剂盒优选进而含有固相化抗原，优选含有固相化该固相化抗原的载体。这种情况下，可以省略下述间接竞争 ELISA 法的工序（1）。

所述固相化抗原包括与为了制造本发明的抗体而使用的半抗原不同的半抗原。所述固相化抗原的半抗原部分优选为 BSH-己酸。

另外，所述固相化抗原可以通过形成所述固相化抗原用半抗原与牛血清白蛋白（BSA）、兔血清白蛋白（RSA）、卵白蛋白（OVA）、钉形贝血蓝蛋白（KLH）、甲状腺球蛋白（TG）、免疫球蛋白等高分子化合物（蛋白质）的复合体来得到。

所述固相化抗原用的半抗原可以利用公知的方法合成，也可以利用市售品。复合体的形成方法可以利用公知的方法进行，但没有特别限定。例如，可以利用混合酸酐法或活性酯法等使所述固相化抗原用半抗原的羧基与所述高分子化合物的官能团（例如氨基）反应，形成复合体。

本发明的试剂盒在下述间接竞争 ELISA 法的情况下，含有所述固相化抗原、保持固相化抗原的载体、BSH 抗体、酶标记的二次抗体及检测试剂等。

进而，本发明还涉及一种 BSH 测定方法，其中，使用所述抗体或试剂盒。作为测定方法，只要是利用通常的抗原-抗体反应的方法即可，没有特别限制，可以举出放射线同位素免疫测定法（RIA）、酶免疫测定法（ELISA）、荧光或发光测定法、凝集法、免疫印迹法、免疫色谱（immunochromato）法等（Meth.Enzymol.,92,147-523（1983），Antibodies Vol.II IRL Press Oxford（1989）），但从灵敏度或简便性等点出发，优选 ELISA。作为在 ELISA 中使用的酶，可以举出过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、虫荧光素酶等。

利用 ELISA 的测定法可以举出间接竞争 ELISA 或直接竞争 ELISA

等。例如间接竞争 ELISA 可以利用如下所述的顺序进行。

(1) 向载体固相化固相化抗原

使用的载体只要是通常的 ELISA 中使用的载体即可，没有特别限制，优选 96 孔、48 孔、192 孔等微孔板。固相化只要例如在载体上放置内含固相化用抗原的缓冲液，进行孵育即可。缓冲液中的抗原的浓度通常为 0.01~100 μ g/ml 左右。作为缓冲液，可以对应检测手段使用公知的缓冲液。

(2) 为了防止蛋白质向载体的固相表面的非特异性的吸附，利用与抗原无关的蛋白质等封闭没有吸附固相化用抗原的固相表面部分。

作为封闭剂，可以使用 BSA 或脱脂奶 (skimmed milk) 溶液或者市售的 Block Ace (大日本制药公司制) 等。封闭通过向载体添加所述封闭剂，例如在约 4℃ 下孵育一晚，然后用洗涤液清洗来进行。作为洗涤液，没有特别限制，可以使用与所述 (1) 相同的缓冲液。

(3) 向在所述 (1) 及 (2) 中处理的固相表面加入内含各种浓度的 BSH 的样本及本发明的单克隆抗体溶液，使该抗体与所述固相化抗原及 BSH 竞争地反应，产生固相化抗原-抗体复合体及 BSH-抗体复合体。

反应通常可以在 4~37℃ 下进行 1~2 小时左右。

(4) 抗原通过测定固相化抗原-抗体复合体的量，从预先作成的标准曲线决定样本中的 BSH 的量。

固相化抗原-抗体复合体的量可以添加识别酶标记的二次抗体 (识别 BSH 抗体的抗体) 来测定。例如在使用小鼠单克隆抗体作为 BSH 抗体的情况下，优选使用酶标记 (例如过氧化物酶或碱性磷酸酶等) 的抗小鼠-山羊抗体，使其与结合于载体的 BSH 抗体反应。反应只要在与所述 (3) 相同的条件下进行即可。反应后，用缓冲液清洗。

(5) 可以加入与结合于载体的二次抗体的标记酶反应的显色基质溶液，测定吸光度，由此从标准曲线算出 BSH 的量。

作为结合于二次抗体的酶，使用过氧化物酶的情况下，例如可以使用内含过氧化氢和 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺或邻苯二胺的显色基质溶液。通常在加入显色基质溶液，使其在室温下反应约 10 分钟左右之后，通过加入硫酸使酶反应停止。在使用 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺的情况下，测定 450nm 的吸光度。在使用邻苯二胺的情况下，测定 490nm 的吸光度。

此外，为了校正背景值，优选也同时测定 630nm 的吸光度。

在使用碱性磷酸酶作为结合于二次抗体的酶的情况下，例如可以举出将对硝基苯基磷酸作为基质使其显色，加入 NaOH 溶液，停止酶反应，测定在 415nm 下的吸光度的方法。

对于没有添加 BSH 的反应溶液的吸光度，将添加 BSH 并使其与抗体反应而成的溶液的吸光度的减少率作为抑制率，来计算。可以使用预先利用添加已知浓度的 BSH 的反应液的抑制率作成的标准曲线，算出样本中的 BSH 的浓度。

作为其他方式，BSH 的测定例如也可以利用如下所述的使用本发明的单克隆抗体的直接竞争 ELISA 进行。

(1) 向载体固相化本发明的单克隆抗体

使用的载体优选 96 孔、48 孔、192 孔等微孔板。固相化只要例如在载体上放置内含固相化用抗体的缓冲液，进行孵育即可。缓冲液中的抗体的浓度通常为 0.01~100 μ g/ml 左右。作为缓冲液，可以对应检测手段使用公知的缓冲液。

(2) 为了防止蛋白质向载体的固相表面的非特异性的吸附，利用与抗原无关的蛋白质等封闭没有吸附固相化用抗体的固相表面部分。

作为封闭剂，可以使用 BSA 或脱脂奶溶液或者市售的 Block Ace（大日本制药公司制）等。封闭通过向载体添加所述封闭剂，例如在约 4℃ 下孵育一晚，然后用洗涤液清洗来进行。作为洗涤液，没有特别限制，可以使用与所述（1）相同的缓冲液。

(3) 向内含各种浓度的 BSH 的样本，加入使 BSH 半抗原与酶结合而成的酶结合半抗原，配制混合物。

酶结合半抗原的配制只要是使 BSH 半抗原与酶结合的方法即可，没有特别限制，可以用任意方法进行。

(4) 使工序（3）的混合物与在工序（2）中得到的抗体固相化载体反应。

利用 BSH 与酶结合半抗原的竞争抑制反应，生成它们与固相化载体的复合体。反应例如在约 25℃ 下约进行 1 小时。反应结束后，用缓冲液清洗载体，除去没有与固相化抗体结合的酶结合半抗原。

通过测定固相化抗体—酶结合半抗原复合体的量，从预先作成的标准曲线，决定样本中的 BSH 的量。

在本工序中，可以与所述的间接竞争抑制 ELISA 法同样地加入与酶结合半抗原的酶反应的显色基质溶液，通过测定吸光度，从标准曲线算出 BSH 的量。

在所述本发明的测定方法中，根据测定对象物进行前处理成为样本，然后提供到所述间接竞争 ELISA 或直接竞争 ELISA 的工序（3）。

可以使用从本发明的杂交瘤 BSF-2 产生的单克隆抗体，实施 BSH 的测定方法。通过使用该抗体，可以实施目前利用免疫分析法的测定法没有的 BSH 的特异且高灵敏度测定。

作为本发明的另一个方式，可以在免疫染色法中使用本发明的单克隆抗体，检测伴随 BNCT 的 BSH 的生物体内举动、特别是细胞表层或细胞的微观分布。

另外，本发明的杂交瘤可以稳定地在短时间内产生所述单克隆抗体，通过培养该杂交瘤，可以制造高灵敏度地分子识别 BSH 的单克隆抗体。

实施例

以下利用实施例具体地说明本发明。从业者可以基于本说明书的记载容易地在本发明中加入修饰、变更，这些均被包括在本发明的技术范围内。

在下述实施例中，使用以下机种或试剂进行化合物的分析及分离纯化。

- NMR 光谱：日本电子 JMTC-400/54/SS 400 MHz（日本电子公司制）。只要没有特别记载，使用 TMS 作为内部标准。另外，下述化学位移用 δ 值表示。

- 柱色谱用硅胶：BW-200（富士シリシア公司制）

[实施例 1（BSH 半抗原的合成）]

（a）BSH—己酸乙酯（3）的合成

将 BSH（101mg，0.46mmol）溶解于乙腈（10mL），然后在室温下搅拌并同时缓慢地滴注溴己酸乙酯（0.2mL，1.12mmol），在室温下搅拌 2 天。然后，利用减压浓缩除去乙腈，利用硅胶柱色谱（氯仿：甲醇=9：1）纯化浓缩残余物，得到黄色的油状物（101mg，收率 67.4%）。

• TLC: $R_f=0.58$ (氯仿: 甲醇=3: 1)

• $^1\text{H-NMR(DMSO)}$ δ (ppm): 0.60–2.10 (m)、1.08 (t, 3H, $J=7.08\text{Hz}$)、1.34–1.42 (m, 2H)、1.52–1.59 (m, 2H)、1.63–1.70 (m, 2H)、2.19 (t, 2H, $J=7.32\text{Hz}$)、2.77 (m, 2H)、3.95 (q, 2H, $J=7.08\text{Hz}$)。

(b) BSH-己酸(4)的合成

将在所述(a)中得到的化合物(113.7mg, 0.31mmol)溶解于甲醇(2.0mL), 滴注 2N 氢氧化钠(0.63mL), 在室温下搅拌 6 小时。使用醋酸乙酯清洗反应液, 然后加入 1N 盐酸, 直至成为 pH3, 用醋酸乙酯抽提。然后, 用水及饱和盐水清洗, 使硫酸镁干燥, 利用减压浓缩除去醋酸乙酯, 利用硅胶柱色谱(氯仿: 甲醇=4: 1)纯化浓缩残余物, 得到黄色的油状物(69.9mg, 收率 67.4%)。

• TLC: $R_f=0.30$ (氯仿: 甲醇=2: 1)

• $^1\text{H-NMR(DMSO)}$ δ (ppm): 0.60–2.10 (m)、1.30–1.37 (m, 2H)、1.45–1.53 (m, 2H)、1.63–1.73 (m, 2H)、2.20 (t, 2H, $J=7.32\text{Hz}$)、2.85 (m, 2H)。

[实施例 2 (免疫原的调整)]

(c) BSH-己酸-BSA 复合体(使用 BSA 的免疫原)的合成

在离心管中加入 760 μL 牛血清白蛋白(11mg, 164nmol)及 pH9.4 的硼酸盐缓冲液(四硼酸钠 50mmol、氯化钠 15.4mmol、叠氮化钠 0.3mmol/纯水 100mL), 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 1 晚, 然后加入 DMF(40 μL)(I 液)。

向另一个离心管中加入在所述(b)中得到的化合物(6.0mg, 18 μmol) N-羟基琥珀酰亚胺(1.5mg, 13.3 μmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐(2.5mg, 13.3 μmol)、DMF(200 μL), 在室温下搅拌一晚(II 液)。

在室温下, 向 I 液中滴注 II 液(10 μL /5 分), 在室温下搅拌 2.5 小时, 然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌一晚。用 10% 异丙醇-磷酸缓冲液对其进行透析约 60 小时(更换 6 次缓冲液), 得到 BSH-己酸-BSA 复合体(结合体)。利用 ICP 分析测定其硼浓度, 然后移至 1.5mL 的 eppendorf 管, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

(c) BSH-己酸-KLH 复合体(使用 KLH 的免疫原)的合成

作为免疫原, 与所述(c)同样地进行, 制作 KLH 与本发明 BSH 半

抗原的结合体。

[实施例 3（多克隆抗体的制作）]

用磷酸缓冲液（pH7.4），将在实施例 2 中调整的 BSH 半抗原—KLH 结合体稀释至 1mg/mL。将该抗原溶液 600 μ L 与等量的 RIBI 佐剂（MPL +TDM Adjuvant System, SIGMA M6536）混合，用涡旋 2~3 分钟充分地混合。利用腹腔内注射，将其免疫（50 μ g/dose）5 只 Balb/c 小鼠（8 周龄，雄性）。每 2 周进行，在第 3 次免疫之后，从各免疫 1 周后采血（眼窝采血）。

用 PBS（pH7.4）将在实施例 2 中调整的抗原（BSH 半抗原—BSA 结合体）稀释至 5.0 μ g/mL，在 ELISA 用微孔板中分注 100 μ L，在 37 $^{\circ}$ C 下静置 1 小时，将抗原固定于板表面。

然后，用 PBS—Tween 溶液（磷酸缓冲液 pH7.4，0.05% Tween20）清洗，为了防止非特异性吸附，每孔加入 200 μ L 封闭溶液（磷酸缓冲液 pH7.4，4.1% Block Ace），在 37 $^{\circ}$ C 下静置 1 小时，进行封闭。接着，用 PBS—Tween 溶液清洗，然后加入 50 μ L 二次抗体，在 37 $^{\circ}$ C 下静置 1 小时，使其与二次抗体（HRP 标记山羊抗小鼠 IgG（ γ 链特异））反应。

用 PBS—Tween 溶液清洗之后，在事先调整的基质溶液（磷酸柠檬酸缓冲液（pH5.0）、0.04%—苯二胺）中加入 200 μ L 过氧化氢水，使其成为 0.02%。在 37 $^{\circ}$ C 下静置 30 分钟，使其显色，然后使用酶标仪[Microplate Reader]（BIO—RAD/Model550），测定吸光度。

[实施例 4（杂交瘤以及单克隆抗体的制作）]

（a）动物的免疫和抗体产生细胞的配制

用磷酸缓冲液 pH7.4（PBS）（NaCl 137mM、NaHPO₄ ·12H₂O 8.10mM、KH₂PO₄ 1.47mM）稀释合成的 BSH 半抗原—KLH 结合体（实施例 2），稀释至 500 μ g/mL。将在 40 $^{\circ}$ C 下加温 10 分钟后的 RIBI 佐剂系统（RIBI/MPL（注册商标）+TDM 乳剂，R—700）与该抗原溶液 2mL 混合，涡旋 2~3 分钟，充分地混合。

利用皮下注射，将其免疫（50 μ g/dose）5 只 Balb/c 小鼠（8 周龄，雄性）。每 2 周进行，在第 2 次免疫之后，从各免疫 1 周后采血（眼窝采血）。将采血的血液收集于 1.5mL 中，在 37 $^{\circ}$ C 下 1 小时孵育，然后，在 4 $^{\circ}$ C 下静

置一晚。

(b) 细胞融合

(b-1) DMEM 培养基的配制

向 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (IWAKI DME/LOW, Lot.99562013) 1 包、硫酸庆大霉素 (庆大霉素 642 μ g/mL, SIGMA Lot.105H0457) 78.4mg、碳酸氢钠 (关东化学, Lot302F1378) 2.2g 中加入 MilliQ, 成为 1L, 然后, 用 0.22 μ m 过滤器 (MILLIPORE MILLEX (注册商标) -GV, 0.22 μ m 过滤器 SLGV1352) 灭菌, 配制 DMEM 培养基。

(b-2) HAT 培养基及 HT 培养基的配制

在 HAT supplement (SIGMA, Lot#61K8934) 一瓶中加入 10mL 已灭菌的 MilliQ, 使瓶内的试剂完全溶解。向该溶液中加入 DMEM 培养基 (15%FCS) 的 1/50 量, 混合, 成为 HAT 培养基。在 HT supplement (SIGMA, Lot#32K8928) 一瓶中加入 10mL 已灭菌的 MilliQ, 使瓶内的试剂完全溶解, 向该溶液中加入 DMEM 培养基 (15%FCS) 的 1/50 量, 混合, 成为 HT 培养基。

(b-3) 50%PEG 培养基的配制

在 20mL 的 DMEM 培养基中加入 20g 的 PEG6000 (PEG # 6000 (M.W.7300-9000), ナカライテスク, Lot M8H2950), 利用加热型搅拌器 (hot stirrer) 搅拌 2 小时, 完全溶解。然后, 定容 (mess up) 到 40mL, 在超净工作台中, 使用 0.20 μ m 过滤器, 灭菌。然后, 分注为各 1.8mL, 冷冻, 在使用前溶解, 加入 200 μ L 的 DMSO (SIGMA, Lot # 42K2401), 制作 50%PEG (10%DMSO) 溶液。

(b-4) ACK lysis 缓冲液的配制

在 90mL MilliQ 中加入 802.3mg 氯化铵、10.01mg 碳酸氢钾、3.72mg EDTA, 调节至 pH7.2~7.4, 定容到 100mL。将其加入培养基瓶中, 在 121 $^{\circ}$ C 下高压 20 分钟, 灭菌, 成为 ACK lysis 缓冲液 (0.15M 氯化铵, 1.0mM 碳酸氢钾, 0.1M EDTA, pH7.2~7.4)。

(c) 脾脏细胞的调整

向抗体价达到饱和的小鼠进行最终免疫 (尾静脉注射), 3 天后摘出脾脏。将摘出的脾脏放入冰上的已加入 DMEM 的细胞培养皿中, 放入超

在 37℃ 下放置 1 周。然后，加入 100 μ L 的 HAT 培养基。然后，将阳性的孔的杂交瘤细胞转移至 24 孔板，使用 HT 培养基，使总量成为 1mL。3 天后，进行 2 次筛选，利用极限稀释法对为阳性的孔进行克隆形成。

(g) 使用极限稀释法的克隆形成

使用血细胞计算盘 (Erma Tokyo4062)，计数在 2 次筛选中为阳性的孔的杂交瘤细胞的细胞数，求浓度，使用克隆形成用的培养基 (DMEM (15%FCS) 培养基 20mL, Briclone 1mL)，通过梯度稀释，调整成 10g/mL、5 个/mL。向 96 孔板中分注各 10 μ L，每 1 孔中细胞成为 1 个或 0.5 个。

在 37℃ 下将其静置 1 周，然后向各孔中加入各 100 μ L 的克隆阳的培养基，进而在 37℃ 下静置 1 周。将为阳性的孔的细胞移至 48 孔板，同样地进行第 2 次克隆形成，最终得到单一的杂交瘤细胞。

(h) 从无血清培养基的抗体的纯化

以 1000rpm、10 分钟离心用无血清培养基培养的杂交瘤细胞 BSF-2 培养液，对细胞上清，加入硫酸铵，使其成为 60% 硫酸铵浓度，使抗体蛋白沉淀。在 4℃ 下对其搅拌 2 小时，进而放置一晚。然后，在 4℃ 下，以 13500rpm 离心 20 分钟，使其溶解于结合缓冲液中，用结合缓冲液透析。

透析后，以 8000rpm 离心 10 分钟，用 0.45 μ m 过滤器过滤上清，成为样本。以流速 1 滴/秒 (1~2mL/分) 向柱中送液 5mL 的超纯水，然后以流速 1 滴/秒 (1~2mL/分) 送液 3~5mL 的结合缓冲液，进行柱的平衡化。然后，以流速 1 滴/2 秒 (1~2mL/分) 送液已调整的样本，使抗体吸附于柱上。

以流速 1 滴/秒送液 3~5mL 的结合缓冲液 (20mM 磷酸钠，0.8M 硫酸铵，pH7.5)，由此除去非吸附成分，然后以流速 1 滴/秒 (1~2mL/分) 送液 5mL 洗脱缓冲液 (20mL 磷酸钠，pH7.5)，使抗体洗脱。回收洗脱液各 0.5mL。

测定全部的组分的吸光度 (OD=280nm)，利用 Bradford 法，对内含抗体蛋白的组分测定抗体蛋白浓度。然后，用 SDS-PAGE 确认单克隆抗体的纯度。另外，得到的单克隆抗体的核苷酸序列及氨基酸序列如上所述。

(i) 抗体的灵敏度测定和标准曲线的作成 (直接竞争 ELISA 法)

将使用 PBS 溶液 (磷酸缓冲液 pH7.4) 配制成 5 μ g/mL 的单克隆抗体

(骨髓瘤株(从BSF-2配制))溶液分注于96孔ELISA用板各100 μ L, 通过在37 $^{\circ}$ C下静置1小时, 在板上固相化抗体。反应后, 用PBS-Tween溶液(磷酸缓冲液(pH7.4), 0.05% Tween20)清洗, 为了防止非特异性吸附, 向板中加封闭溶液(磷酸缓冲液(pH7.4), 1% BSA), 在室温下使其反应1小时或在4 $^{\circ}$ C下使其反应一晚, 进行封闭。

用PBS-Tween溶液清洗之后, 在HRP标记的竞争剂(HRP结合BSH-己酸)的PBS溶液(0.5 μ g/mL)中, 将样本调整成BSH分别成为100~0.001ppm的浓度。

向96孔ELISA用板(IWAKI 3801-096)中分别加入各100 μ L配制的样本, 使其在37 $^{\circ}$ C下反应1小时。然后, 按照常规方法, 进行ELISA(基础溶液(50mmol 磷酸柠檬酸缓冲溶液(pH5.0), 0.04% 邻苯二胺)), 使用酶标仪(BIO-RAD/Model550), 测定490nm下的吸光度。

测定结果如图1所示。X轴表示BSH浓度, Y轴表示吸光度。如图1所示, 使用从骨髓瘤株BSF-2配制而成的单克隆抗体, 可以特异性地检测出BSH, 在BSH浓度为0.001~1 μ M的宽幅范围内利用测定吸光度的BSH的浓度测定成为可能。这样, 通过使用本发明的杂交瘤及抗体, 以BSH的宽幅浓度范围的灵敏度非常高的定量评价及定性评价等成为可能。

<110> 独立行政法人科学技术振兴机构
公立大学法人大阪府立大学
斯特拉化工公司

<120> 半抗原化合物以及抗体

<130> PCT06036SF

<150> JP 2006-046950

<151> 2006-02-23

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 657

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 1

ctcgagtctg gccctggaat attgcagcgc tcccagaccc tcagtctgac ttgttctttc 60

tctgggtttt cactgagcac ttctggtatg ggtgttggct ggtttcgtca gccttcaaca 120

aagggctctag agtggctggc agacatttgg tggaatgaca ataaatacta taatccatcc 180

ctgaagagcc ggctcacaat ctccaaggat acctccaaaa accaggtatt cctcaagatc	240
gccagtgtgg acactataga tactgccact tactactggt ctctaagaaa tagtgccgaa	300
aagacaaaca cctggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcagccaa aacgacaccc	360
ccatctgtct atccactggc ccctggatct gctgccc aaa ctaactccat ggtgaccctg	420
ggatgcctgg tcaagggeta tttccctgag ccagtgcacg tgacctggaa ctctggatcc	480
ctgtccagcg gtgtgcacac ctccccagct gtctgcagt ctgacctcta cactctgagc	540
agctcagtga ctgtcccctc cagcacctgg ccagcgaga ccgtcacctg caacgttgcc	600
cacccggcca gcagcaccaa ggtggacaag aaaattgtgc ccagggattg tactagt	657
<210> 2	
<211> 655	
<212> DNA	
<213> 小鼠	
<400> 2	
gagctcggtg tgactcagga atctgcactc accacatcac ctggtgaaac agtcacactc	60
acttgctgct caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgtcaattg ggtccaagaa	120
aaaccagatc atttattcac tggctctaata ggtggtacca acaaccgagc tccaggtgtt	180
cctgccagat tctcaggctc cctgattgga gacaaggctg ccctcaccat cacaggggca	240

cagactgagg atgaggcaat atatttctgt ggtctatggt acagcaacca ttgggtgttc 300
 ggtggaggaa ccaaactgac tgcctagga cagccaagt ctgcgcac agtcaccctg 360
 ttccacctt cctctgaaga gtcgagact aacaaggcca cactggtgtg tacgatcact 420
 gatttctacc caggtgtggt gacagtggac tggaaggtag atggtacccc tgcactcag 480
 ggtatggaga caaccagcc ttccaaacag agcaacaaca agtacatggc tagcagctac 540
 ctgaccctga cagcaagagc atgggaaagg catagcagtt acagctgcca ggtcactcat 600
 gaaggtcaca ctgtggagaa gagtttgtcc cgtgctgagt gttcctaatt ctaga 655

<210> 3
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 3

Leu Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Arg Ser Gln Thr Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val
 20 25 30

Gly Trp Phe Arg Gln Pro Ser Thr Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala Asp
 35 40 45

Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg
 50 55 60

Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ala Ser Val Asp Thr Ile Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Leu Arg
 85 90 95

Asn Ser Ala Glu Lys Thr Asn Thr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser
145 150 155 160

Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu
165 170 175

Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser
180 185 190

Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Thr Ser
210 215

<210> 4

<211> 215

<212> PRT

〈213〉 小鼠

 $\langle 400 \rangle$ 4

Glu Leu Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Gly Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 100 105 110

Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 115 120 125

Glu	Thr	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Thr	Ile	Thr	Asp	Phe	Tyr	Pro
130				135				140							

Gly	Val	Val	Thr	Val	Asp	Trp	Lys	Val	Asp	Gly	Thr	Pro	Val	Thr	Gln
145				150				155				160			

Gly	Met	Glu	Thr	Thr	Gln	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Met
				165				170				175			

Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ala	Arg	Ala	Trp	Glu	Arg	His	Ser
				180				185				190			

Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	His	Thr	Val	Glu	Lys	Ser
195								200				205			

Leu	Ser	Arg	Ala	Glu	Cys	Ser
210			215			

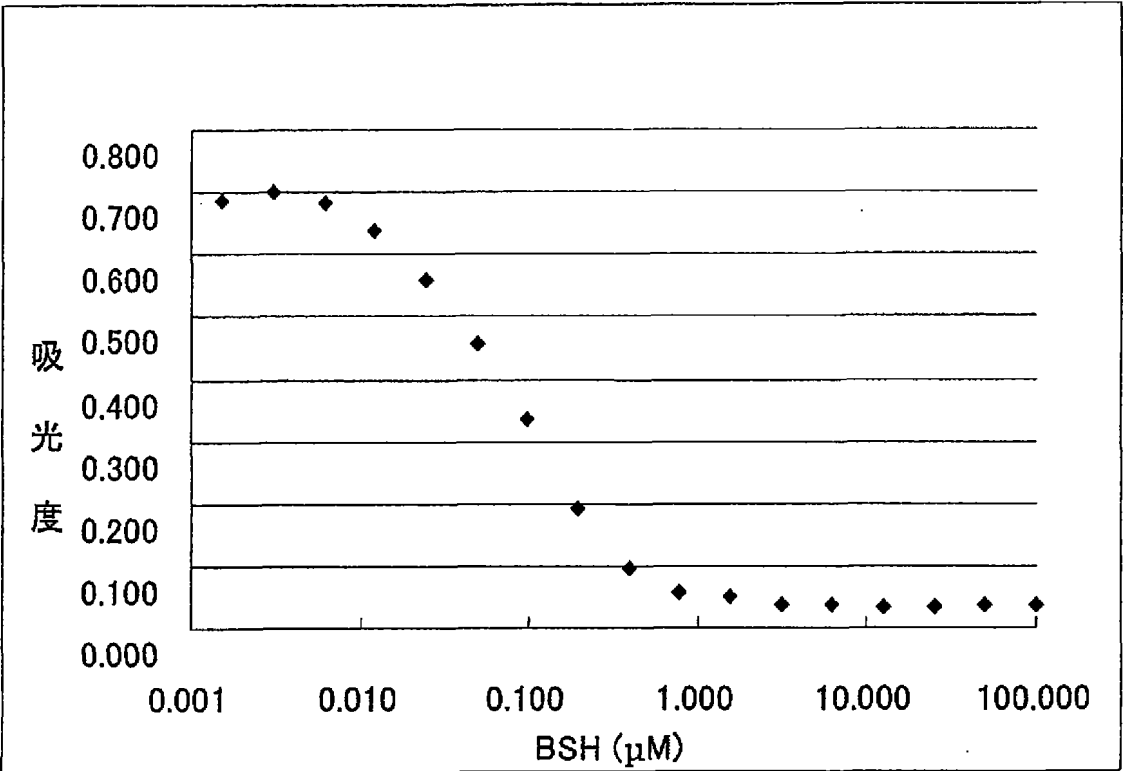


图 1

专利名称(译)	半抗原化合物以及抗体		
公开(公告)号	CN101395162A	公开(公告)日	2009-03-25
申请号	CN200680053176.7	申请日	2006-10-05
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 公立大学法人大阪府立大学 斯泰拉化工公司		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 公立大学法人大阪府立大学 斯泰拉化工公司		
当前申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 公立大学法人大阪府立大学 斯泰拉化工公司		
[标]发明人	切畑光统 浅野智之 上原幸树		
发明人	切畑光统 浅野智之 上原幸树		
IPC分类号	C07F5/02 C07K16/00 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/84 G01N33/94 G01N33/5308 C07K16/44 C07F5/027		
代理人(译)	李贵亮		
优先权	2006046950 2006-02-23 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是一种具有由右式(1)表示的结构的化合物，通过以所述化合物为半抗原、将该半抗原与高分子化合物的复合体用作抗原得到的抗BSH的抗体。通过使用本发明，可以提供用于制作高灵敏度而且高选择性地识别BSH的抗体的半抗原化合物，抗BSH的抗体，以及使用该抗体的高灵敏度且定量性出色的BSH测定用试剂盒以及免疫学测定方法。

