



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112334768 A

(43) 申请公布日 2021.02.05

(21) 申请号 201980040776.7

(22) 申请日 2019.06.18

(30) 优先权数据

2018-116611 2018.06.20 JP

2019-015596 2019.01.31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/024160 2019.06.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/244901 JA 2019.12.26

(71) 申请人 东曹株式会社

地址 日本山口县

(72) 发明人 寺尾阳介 秋山泰之 远藤谕

渡边辽子

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int.Cl.

G01N 30/88 (2006.01)

B01J 20/26 (2006.01)

B01J 20/281 (2006.01)

B01J 20/30 (2006.01)

B01J 20/34 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12Q 1/686 (2006.01)

C12Q 1/6876 (2006.01)

权利要求书2页 说明书29页

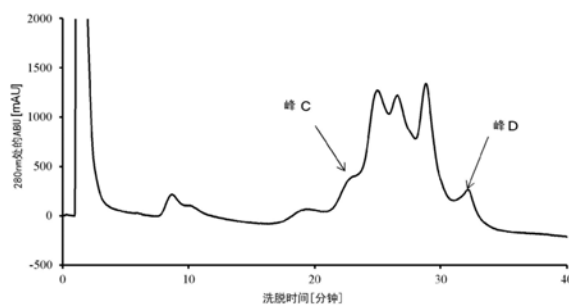
序列表10页 附图9页

(54) 发明名称

抗体的分离方法和疾病的检查方法

(57) 摘要

课题在于,提供检测被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度的方法。通过包括下述工序(a)~(c)的方法来解决课题:(a)向填充有固定有Fc结合性蛋白质的不溶性载体的柱中添加含有由被检者得到的抗体的溶液,使该抗体吸附于该载体的工序;(b)使用洗脱液洗脱吸附于上述载体的抗体,得到抗体的分离图谱的相关数据的工序;(c)以上述数据为指标,检测上述被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度的工序。



1. 一种有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度的检测方法,其包括下述工序(c):

(c) 以抗体的分离图谱的相关数据为指标,检测被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度的工序,

所述数据为抗体的分离图谱的特征,

所述数据是通过下述工序(a)和(b)得到的:

(a) 向填充有固定有Fc结合性蛋白质的不溶性载体的柱中添加含有由所述被检者得到的抗体的溶液,使该抗体吸附于该载体的工序;

(b) 使用洗脱液洗脱吸附于所述载体的抗体,得到所述数据的工序。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,在所述工序(c)之前包括所述工序(a)和(b)。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,在所述工序(a)之前,包括向所述柱中添加平衡液而对该柱进行平衡的工序。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,其中,所述数据的取得包括:得到抗体的分离图谱的工序;和、从该分离图谱提取所述特征的工序。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的方法,其中,所述特征为峰面积和/或峰高度。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的方法,其中,所述特征为峰面积%和/或峰高度%。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的方法,其中,所述特征为选自第1峰、第2峰和第3峰中的1种或1种以上的峰的特征。

8. 根据权利要求1~7中任一项所述的方法,其中,所述特征为第1峰的特征。

9. 根据权利要求1~8中任一项所述的方法,其中,所述工序(c)包括将所述数据与由对照被检者得到的抗体的分离图谱的相关数据进行比较的工序。

10. 根据权利要求1~9中任一项所述的方法,其中,所述疾病为选自癌症、自身免疫疾病、感染症、变态反应、炎症疾病、恶病质、和衰老相关疾病中的1种或1种以上的疾病。

11. 根据权利要求1~10中任一项所述的方法,其中,其中,所述疾病为选自胰腺癌、胃癌、乳癌、大肠癌、肾癌、风湿病、干燥综合征和胰腺炎中的1种或1种以上的疾病。

12. 根据权利要求1~11中任一项所述的方法,其中,Fc结合性蛋白质为下述(1)~(4)中的任意多肽:

(1) 含有序列号1记载的氨基酸序列的第17位至第192位为止的氨基酸残基、其中该第17位至第192位为止的氨基酸残基中至少第176位的缬氨酸被置换为苯丙氨酸的多肽;

(2) 含有序列号1记载的氨基酸序列的第17位至第192位为止的氨基酸残基、其中该第17位至第192位为止的氨基酸残基中至少第27位的缬氨酸被置换为谷氨酸、第29位的苯丙氨酸被置换为异亮氨酸、第35位的酪氨酸被置换为天冬酰胺、第48位的谷氨酰胺被置换为精氨酸、第75位的苯丙氨酸被置换为亮氨酸、第92位的天冬酰胺被置换为丝氨酸、第117位的缬氨酸被置换为谷氨酸、第121位的谷氨酸被置换为甘氨酸、第171位的苯丙氨酸被置换为丝氨酸、和第176位的缬氨酸被置换为苯丙氨酸的多肽;

(3) 含有序列号1记载的氨基酸序列的第17位至第192位为止的氨基酸残基、其中该第17位至第192位为止的氨基酸残基中至少第27位的缬氨酸被置换为谷氨酸、第29位的苯丙氨酸被置换为异亮氨酸、第35位的酪氨酸被置换为天冬酰胺、第48位的谷氨酰胺被置换为

精氨酸、第75位的苯丙氨酸被置换为亮氨酸、第92位的天冬酰胺被置换为丝氨酸、第117位的缬氨酸被置换为谷氨酸、第121位的谷氨酸被置换为甘氨酸、和第171位的苯丙氨酸被置换为丝氨酸的多肽；

(4) 含有上述(1)～(3)中的任意多肽的氨基酸序列、其中在该氨基酸序列中在上述置换以外的位置含有1～10个氨基酸突变的多肽。

13. 一种组合物,其含有两种或两种以上的抗体且对应于下述I至IX中的2个以上项目:

I. 具有G1Fa的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.4以下;

II. 具有G2F的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.2以下;

III. 具有G2F+2SA的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.03以下;

IV. 具有G1Fb的抗体的含量除以具有G1Fa的抗体的含量而得的值以重量比计为0.5以上;

V. 具有G2F的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.6以下;

VI. 具有G2F+SA的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.3以下;

VII. 具有G2F+2SA的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.12以下;

VIII. 具有G2+SA的抗体的含量相对于抗体的总含量的比率以重量比计为0.2%以下;

IX. 具有G2+2SA的抗体的含量相对于抗体的总含量的比率以重量比计为0.2%以下。

14. 一种组合物,其含有两种或两种以上的抗体且对应于下述I至IX中的2个以上项目:

I. 具有G1Fa的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为1.8以上;

II. 具有G2F的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.6以上;

III. 具有G2F+2SA的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.06以上;

IV. 具有G1Fb的抗体的含量除以具有G1Fa的抗体的含量而得的值以重量比计为0.3以下;

V. 具有G2F的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为3.0以上;

VI. 具有G2F+SA的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.6以上;

VII. 具有G2F+2SA的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.3以上;

VIII. 具有G2+SA的抗体的含量相对于抗体的总含量的比率以重量比计为2%以上;

IX. 具有G2+2SA的抗体的含量相对于抗体的总含量的比率以重量比计为0.6%以上。

抗体的分离方法和疾病的检查方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体的分离方法及其应用。具体而言,本发明例如涉及以分离由被检者得到的抗体时的分离图谱的特征为指标来检测被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度的方法。

背景技术

[0002] 近年来,在癌症、免疫疾病等的治疗中使用含有抗体的药品(抗体药品)。用作抗体药品的抗体可通过基因工程学方法得到,可在培养能够表达该抗体的细胞(例如,中华仓鼠卵巢(CHO)细胞等)之后使用柱色谱等纯化至高纯度而制造。但是,近年的研究表明,由此而制造的抗体由于受到氧化、还原、异构化、糖链添加等修饰而成为多种分子的集合体,这对药效和安全性的影响令人担忧。特别地,据报道结合在抗体上的糖链结构会对抗体药品的活性、动力学和安全性造成较大影响,需要详细地分析糖链结构(非专利文献1)。另外,对于风湿病等疾病而言,添加到血液中的抗体上的糖链结构的变化是已知的(非专利文献2和3),有可能可以通过分析添加到抗体上的糖链结构来诊断疾病。

[0003] 作为分析用于抗体药物的抗体的糖链结构的方法,主要实施的是包括切断糖链的LC-MS分析(专利文献1和专利文献2)。但是,上述分析方法伴随着非常复杂的操作,需要非常多的时间。作为相对简便的抗体分子结构的分析方法,可列举利用色谱的分析。具体而言,通过使用凝胶过滤色谱将抗体基于分子量而分离,从而能够对聚集体和分解物进行分离和定量。另外,可以利用离子交换色谱对抗体分子所具有的电荷的差异进行分离。但是,上述的利用色谱的分析无法识别糖链结构等抗体分子的微小的结构变化,因此得到的分析结果有局限。

[0004] 另一方面,报道了利用基于固定于不溶性载体的亲和配体与抗体的亲和性的分析能够对抗体的性能进行测定、判断(专利文献3)。但是,尚未进行过根据糖链结构的差异来分离抗体、特别是根据糖链结构的差异来分离人源抗体。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本特开2016-194500号公报

[0008] 专利文献2:日本特开2016-099304号公报

[0009] 专利文献3:W02013/120929号公报

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:CHROMATOGRAPHY,34(2),83-88(2013)

[0012] 非专利文献2:Science、320、373(2008)

[0013] 非专利文献3:Nature Communication、7、11205(2016)

发明内容

[0014] 发明要解决的问题

[0015] 本发明的课题在于,提供抗体的分离方法。本发明的一方式中,课题在于提供检测被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度的方法。

[0016] 用于解决问题的方案

[0017] 本发明人们为了解决上述课题进行了深入研究,结果发现,利用Fc结合性蛋白质则可以基于糖链结构的差异来分离抗体、以及以利用Fc结合性蛋白质分离由被检者得到的抗体时的分离图谱的特征为指标可以检测被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度,从而完成了本发明。

[0018] 即,本发明可以例示如下。

[0019] [1]一种有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度的检测方法,其包括下述工序(c):

[0020] (c)以抗体的分离图谱的相关数据为指标,检测被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度的工序,

[0021] 上述数据为抗体的分离图谱的特征,

[0022] 上述数据是通过下述工序(a)和(b)得到的:

[0023] (a)向填充有固定有Fc结合性蛋白质的不溶性载体的柱中添加含有由上述被检者得到的抗体的溶液,使该抗体吸附于该载体的工序;

[0024] (b)使用洗脱液洗脱吸附于上述载体的抗体,得到上述数据的工序。

[0025] [2]根据上述方法,其中,在上述工序(c)之前包括上述工序(a)和(b)。

[0026] [3]根据上述方法,其中,在上述工序(a)之前,包括向上述柱中添加平衡液而对该柱进行平衡的工序。

[0027] [4]根据上述方法,其中,上述数据的取得包括:得到抗体的分离图谱的工序;和、从该分离图谱提取上述特征的工序。

[0028] [5]根据上述方法,其中,上述特征为峰面积和/或峰高度。

[0029] [6]根据上述方法,其中,上述特征为峰面积%和/或峰高度%。

[0030] [7]根据上述方法,其中,上述特征为选自第1峰、第2峰和第3峰中的1种或1种以上的峰的特征。

[0031] [8]根据上述方法,其中,上述特征为第1峰的特征。

[0032] [9]根据上述方法,其中,上述工序(c)包括将上述数据与由对照被检者得到的抗体的分离图谱的相关数据进行比较的工序。

[0033] [10]根据上述方法,其中,上述疾病为选自癌症、自身免疫疾病、感染症、变态反应、炎症疾病、恶病质、和衰老相关疾病中的1种或1种以上的疾病。

[0034] [11]根据上述方法,其中,上述疾病为选自胰腺癌、胃癌、乳癌、大肠癌、肾癌、风湿病、干燥综合征和胰腺炎中的1种或1种以上的疾病。

[0035] [12]根据上述方法,其中,Fc结合性蛋白质为下述(1)~(4)中的任意多肽:

[0036] (1)含有序列号1记载的氨基酸序列的第17位至第192位为止的氨基酸残基、其中该第17位至第192位为止的氨基酸残基中至少第176位的缬氨酸被置换为苯丙氨酸的多肽;

[0037] (2)含有序列号1记载的氨基酸序列的第17位至第192位为止的氨基酸残基、其中该第17位至第192位为止的氨基酸残基中至少第27位的缬氨酸被置换为谷氨酸、第29位的苯丙氨酸被置换为异亮氨酸、第35位的酪氨酸被置换为天冬酰胺、第48位的谷氨酰胺被置

换为精氨酸、第75位的苯丙氨酸被置换为亮氨酸、第92位的天冬酰胺被置换为丝氨酸、第117位的缬氨酸被置换为谷氨酸、第121位的谷氨酸被置换为甘氨酸、第171位的苯丙氨酸被置换为丝氨酸、和第176位的缬氨酸被置换为苯丙氨酸的多肽；

[0038] (3) 含有序列号1记载的氨基酸序列的第17位至第192位为止的氨基酸残基、其中该第17位至第192位为止的氨基酸残基中至少第27位的缬氨酸被置换为谷氨酸、第29位的苯丙氨酸被置换为异亮氨酸、第35位的酪氨酸被置换为天冬酰胺、第48位的谷氨酰胺被置换为精氨酸、第75位的苯丙氨酸被置换为亮氨酸、第92位的天冬酰胺被置换为丝氨酸、第117位的缬氨酸被置换为谷氨酸、第121位的谷氨酸被置换为甘氨酸、和第171位的苯丙氨酸被置换为丝氨酸的多肽；

[0039] (4) 含有上述(1)～(3)中的任意多肽的氨基酸序列、其中在该氨基酸序列中在上述置换以外的位置含有1～10个氨基酸突变的多肽。

[0040] [13] 一种组合物，其含有两种或两种以上的抗体且对应于下述I至IX中的2个以上项目：

[0041] I. 具有G1Fa的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.4以下；

[0042] II. 具有G2F的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.2以下；

[0043] III. 具有G2F+2SA的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.03以下；

[0044] IV. 具有G1Fb的抗体的含量除以具有G1Fa的抗体的含量而得的值以重量比计为0.5以上；

[0045] V. 具有G2F的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.6以下；

[0046] VI. 具有G2F+SA的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.3以下；

[0047] VII. 具有G2F+2SA的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.12以下；

[0048] VIII. 具有G2+SA的抗体的含量相对于抗体的总含量的比率以重量比计为0.2%以下；

[0049] IX. 具有G2+2SA的抗体的含量相对于抗体的总含量的比率以重量比计为0.2%以下。

[0050] [14] 一种组合物，其含有两种或两种以上的抗体且对应于下述I至IX中的2个以上项目：

[0051] I. 具有G1Fa的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为1.8以上；

[0052] II. 具有G2F的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.6以上；

[0053] III. 具有G2F+2SA的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.06以上；

- [0054] IV. 具有G1Fb的抗体的含量除以具有G1Fa的抗体的含量而得的值以重量比计为0.3以下;
- [0055] V. 具有G2F的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为3.0以上;
- [0056] VI. 具有G2F+SA的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.6以上;
- [0057] VII. 具有G2F+2SA的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.3以上;
- [0058] VIII. 具有G2+SA的抗体的含量相对于抗体的总含量的比率以重量比计为2%以上;
- [0059] IX. 具有G2+2SA的抗体的含量相对于抗体的总含量的比率以重量比计为0.6%以上。

附图说明

- [0060] 图1为示出用填充有固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的柱分析单克隆抗体时的分离图谱的图。
- [0061] 图2为示出用填充有固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的柱分析人源 γ 球蛋白时的分离图谱的图。
- [0062] 图3为示出用填充有固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的柱分离、制备单克隆抗体而得的级分所含的抗体的糖链结构的图。
- [0063] 图4为示出用填充有固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的柱分离、制备人源 γ 球蛋白而得的级分所含的抗体的糖链结构的图。
- [0064] 图5为示出用填充有固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的柱分析源自不同年龄的人源 γ 球蛋白时的分离图谱的图。
- [0065] 图6为示出用填充有固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的柱分析源自不同年龄的人源 γ 球蛋白时的第1峰面积%值的作图的图。
- [0066] 图7为示出用填充有固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的柱分析源自癌症患者的 γ 球蛋白时的第1峰面积%值的作图的图。
- [0067] 图8为示出用填充有固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的柱分析源自自身免疫疾病患者的 γ 球蛋白时的第1峰面积%值的作图的图。
- [0068] 图9为示出用填充有固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的柱分析源自癌症患者的 γ 球蛋白时的校正第1峰面积%值的作图的图。
- [0069] 图10为示出用填充有固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的柱分析源自胰腺癌和胰腺炎患者的 γ 球蛋白时的校正第1峰面积%值和第3峰面积的作图和相对于胰腺癌和胰腺炎的ROC曲线的图。
- [0070] 图11为示出用填充有固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的柱分析源自吸烟和不吸烟的健康人 γ 球蛋白时的校正第1峰面积%值的作图的图。
- [0071] 图12为示出用填充有固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的FcR9_F柱或FcR9_V柱分析源自不同年龄的人源 γ 球蛋白时的第1峰高度%和第1峰面积%值的作图的图。

具体实施方式

[0072] 以下对本发明进行详细说明。

[0073] <1>方法

[0074] 本发明提供利用Fc结合性蛋白质分离抗体的方法。也将该方法称为“本发明的分离方法”。

[0075] 本发明的分离方法具体而言可以为分离抗体的方法,其包括下述工序(a)和(b):

[0076] (a)向填充有固定有Fc结合性蛋白质的不溶性载体的柱中添加含有抗体的溶液,使该抗体吸附于该载体的工序;

[0077] (b)使用洗脱液洗脱吸附于上述载体的抗体的工序。

[0078] 也将工序(a)和(b)分别称为“吸附工序”和“洗脱工序”。

[0079] 利用本发明的分离方法,可以得到分离后的抗体。即,本发明的分离方法的一种方式可以为:通过利用Fc结合性蛋白质分离抗体,来制造分离后的抗体的方法。即,洗脱工序的一种方式可以为:用洗脱液洗脱吸附于载体的抗体,得到洗脱出的抗体的工序。换言之,洗脱工序的一种方式可以包括:用洗脱液洗脱吸附于载体的抗体的工序、和得到洗脱出的抗体的工序。也将该方法称为“本发明的抗体制造方法”。

[0080] 本发明的抗体制造方法具体而言可以为制造分离后的抗体的方法,其包括下述工序(a)和(b):

[0081] (a)向填充有固定有Fc结合性蛋白质的不溶性载体的柱中添加含有抗体的溶液,使该抗体吸附于该载体的工序;

[0082] (b)使用洗脱液洗脱吸附于上述载体的抗体,得到洗脱出的抗体的工序。

[0083] 利用本发明的分离方法可以得到抗体的分离图谱的相关数据。即,本发明的分离方法的一种方式可以为通过利用Fc结合性蛋白质分离抗体、从而制造抗体的分离图谱的相关数据的方法。即,洗脱工序的一种方式可以为用洗脱液洗脱吸附于载体的抗体而得到抗体的分离图谱的相关数据的工序。换言之,洗脱工序的一种方式可以包括:用洗脱液洗脱吸附于载体的抗体的工序、和得到抗体的分离图谱的相关数据的工序。也将该方法称为“本发明的数据制造方法”。也将抗体的分离图谱的相关数据称为“分离数据”。“数据的测定”、“数据的取得”、和“数据的制造”可以以相同的含义来使用。

[0084] 本发明的数据制造方法具体而言可以为制造分离数据的方法,其包括下述工序(a)和(b):

[0085] (a)向填充有固定有Fc结合性蛋白质的不溶性载体的柱中添加含有抗体的溶液,使该抗体吸附于该载体的工序;

[0086] (b)使用洗脱液洗脱吸附于上述载体的抗体,得到分离数据的工序。

[0087] 可以以分离数据为指标来检测被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度。即,分离数据可以视为:作为用于检测被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度的指标使用的数据。具体而言,可以将利用Fc结合性蛋白质分离由被检者得到的抗体、从而得到的分离数据作为指标来检测该被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度。即,本发明提供一种方法,其以利用Fc结合性蛋白质分离由被检者得到的抗体、从而得到的分离数据为指标来检测该被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度。也将

该方法称为“本发明的检测方法”。也将有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度统称为“风险”。“风险的检测”、“风险的评价”、和“风险的判定”以相同的含义来使用。

[0088] 本发明的检测方法具体而言可以为有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度的检测方法,其包括下述工序(c):

[0089] (c) 以分离数据为指标来检测被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度工序,其中,上述数据为通过下述工序(a)和(b)得到的:

[0090] (a) 向填充有固定有Fc结合性蛋白质的不溶性载体的柱中添加含有由上述被检者得到的抗体的溶液,使该抗体吸附于该载体的工序;

[0091] (b) 使用洗脱液洗脱吸附于上述载体的抗体,得到上述数据的工序。

[0092] 本发明的检测方法可以包括工序(a)和(b)。即,本发明的检测方法更具体而言可以为有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度的检测方法,其包括下述工序(a)~(c):

[0093] (a) 向填充有固定有Fc结合性蛋白质的不溶性载体的柱中添加含有由被检者得到的抗体的溶液,使该抗体吸附于该载体的工序;

[0094] (b) 使用洗脱液洗脱吸附于上述载体的抗体,得到分离数据的工序;

[0095] (c) 以上述数据为指标,检测上述被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度的工序。

[0096] 也将工序(c)称为“检测工序”。

[0097] 也将这些方法统称为“本发明的方法”。

[0098] <吸附工序>

[0099] 吸附工序为向填充有固定有Fc结合性蛋白质的不溶性载体的柱中添加含有抗体的溶液,使该抗体吸附于该载体的工序。

[0100] “抗体”是指含有Fc区的分子。抗体可以由Fc区构成,也可以除了含有Fc区以外还含有其他区域。作为Fc区,可列举免疫球蛋白的Fc区。抗体可以添加有糖链。抗体例如可以至少在其Fc区添加有糖链。抗体可以为单克隆抗体,也可以为多克隆抗体。抗体的来源没有特别限制。抗体可以源自一种生物,也可以源自两种或两种以上生物的组合。抗体例如可以为嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、或这些的突变体(例如氨基酸置换体)。作为抗体,可列举免疫球蛋白。作为免疫球蛋白,可列举IgG、IgM、IgA、IgD、IgE。作为免疫球蛋白,可特别列举IgG。作为IgG,可列举IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。另外,作为抗体,还可列举双特异性抗体(Bispecific antibody)、Fc区与其他蛋白质的融合抗体、Fc区与药物的复合物(ADC)等进行了人工结构修饰的抗体。抗体例如可以为抗体药物。作为抗体药物,可列举作为抗TNF- α 抗体的英夫利昔单抗(infliximab)和作为抗IL-6抗体的托珠单抗(Tocilizumab)、作为针对癌基因HER2的抗体的曲妥珠单抗(Trastuzumab)。抗体例如可以由CHO细胞、Sp2/0细胞、NS0细胞、杂交瘤细胞等生产细胞来生产。

[0101] 作为糖链,可列举图3和图4记载的糖链结构。特别地,作为能有助于抗体分离的糖链,可列举G0、G0F、G1、G0F+GN、G1Fa、G1Fb、G1F+GN、G2、G2F、G1F+SA、G2F+SA、G2F+2SA、G2F+GN、G2+SA、G2+2SA、S1、S2、S3。

[0102] 人源抗体通常含有具有唾液酸的抗体。人源抗体中的具有唾液酸的抗体的含量例

如相对于抗体的总含量以重量比计可以为0.1~20%左右。人源抗体中,在糖链末端结合2个唾液酸的情况较多。而且,人源抗体通常相对于抗体的总含量以重量比计可含有1~20%左右的平分GlcNAc(表5中的“+GN”的符号)。另一方面,源自仓鼠和小鼠的抗体中通常不存在平分GlcNAc,糖链末端的唾液酸结合数为0~1个。

[0103] 供于吸附工序的抗体可以为含有多种抗体分子的混合物。供于吸附工序的抗体具体而言可以为含有糖链结构不同的多种抗体分子的混合物。供于吸附工序的抗体更具体而言可以为含有Fc区所添加的糖链结构不同的多种抗体分子的混合物。

[0104] 在以风险检测为目标时,可以使用由被检者得到的抗体实施本发明的方法。

[0105] “被检者”是指作为风险检测的对象的人类个体。也将这里所述的被检者称为“目标被检者”,以区别于后述的对照被检者。被检者只要是可利用源自其的抗体试样的生物、即可以取得抗体试样或已经取得了抗体试样的生物就没有特别限制。被检者可以为男性也可以为女性。被检者可以为儿童、青年、中年、老年人等任意年龄的个体。被检者可以是健康人,也可以是不健康的人。

[0106] “抗体试样”是指:含有抗体的试样。作为抗体试样,可列举:血液(全血)、稀释血液、血清、血浆、脊髓液、脐带血、成分血等血液试样;尿、唾液、精液、粪便、痰、羊水、腹水等可能含有血液来源成分的试样;肝脏、肺、脾脏、肾脏、皮肤、肿瘤、淋巴结等组织的碎片(组织片)或细胞;由这些中分离出的抗体。抗体试样可以直接或适宜地供于前处理后用于吸附工序。前处理例如可以通过常规方法来实施。作为前处理,可列举离心分离和利用柱的纯化。具体而言,例如可以对 γ 球蛋白进行纯化并用于吸附工序。抗体试样可以以含有抗体的溶液形态用于吸附工序。即,抗体试样可以适宜地制备成含有抗体的溶液形态并用于吸附工序。例如,可以将如上述所例示的抗体试样或其前处理物适宜地用液体介质溶解、悬浮、分散或进行溶剂交换等,以含有抗体的溶液形式用于吸附工序。关于这样的液体介质,例如可以援用后述的关于平衡液的记载。液体介质可以与平衡液相同或不同。

[0107] 关于由被检者得到的抗体的记载,也可以援用于其他抗体的利用。例如,由被检者得到的抗体以外的任意抗体也同样地可以直接或适宜地供于前处理后以含有抗体的溶液形态用于吸附工序。

[0108] “Fc结合性蛋白质”是指:具有与抗体的Fc区结合的能力的蛋白质。只要可得到所期望的抗体分离图谱,对Fc结合性蛋白质就没有特别限制。例如,可以基于由抗体的糖链结构(例如Fc区的糖链结构)的差异带来的、与Fc结合性蛋白质的亲和性差异来分离抗体。抗体与Fc结合性蛋白质的亲和性(具体而言,抗体的糖链结构)例如可能与抗体的药效等功能相关。另外,抗体与Fc结合性蛋白质的亲和性(具体而言,抗体的糖链结构)例如可能与被检者的风险相关。即,Fc结合性蛋白质例如优选为具有对抗体的Fc区的结合能力、且能够识别抗体的糖链结构(例如Fc区的糖链结构)的差的蛋白质。作为Fc结合性蛋白质,可列举人Fc结合性蛋白质。作为人Fc结合性蛋白质,可列举在人类中发现的Fc结合性蛋白质和其突变体。作为人Fc结合性蛋白质,具体而言可列举含有人Fc γ R111a的胞外区域的氨基酸序列的全长序列或部分序列的蛋白质。作为人Fc γ R111a的胞外区域的氨基酸序列,在天然型人Fc γ R111a的情况下可列举:序列号1记载的氨基酸序列中第17位的甘氨酸至第192位为止的谷氨酰胺的区域。作为人Fc γ R111a的胞外区域的氨基酸序列的部分序列,可列举人Fc γ R111a的胞外区域中的、能够表现出至少与Fc区(例如人IgG的Fc区)结合的功能的区域的氨

基酸序列。作为人Fc结合性蛋白质的一例，可列举下述(i)和(ii)的多肽。

[0109] (i)至少含有序列号1记载的氨基酸序列中第17位至第192位为止的氨基酸残基的多肽；

[0110] (ii)至少含有序列号1记载的氨基酸序列中第17位至第192位为止的氨基酸残基、且在上述氨基酸残基中含有1个以上的氨基酸残基的置换、插入或缺失的多肽。

[0111] 作为上述(ii)的一方式，可列举含有序列号1记载的氨基酸序列中第17位至第192位为止的氨基酸残基、且在该第17位至第192位为止的氨基酸残基中发生了下述(1)至(40)中的至少任一氨基酸置换的多肽(日本特开2015-086216)。

[0112] (1)序列号1的第18位的甲硫氨酸被置换为精氨酸

[0113] (2)序列号1的第27位的缬氨酸被置换为谷氨酸

[0114] (3)序列号1的第29位的苯丙氨酸被置换为亮氨酸或丝氨酸

[0115] (4)序列号1的第30位的亮氨酸被置换为谷氨酰胺

[0116] (5)序列号1的第35位的酪氨酸被置换为天冬氨酸、甘氨酸、赖氨酸、亮氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸或组氨酸

[0117] (6)序列号1的第46位的赖氨酸被置换为异亮氨酸或苏氨酸

[0118] (7)序列号1的第48位的谷氨酰胺被置换为组氨酸或亮氨酸

[0119] (8)序列号1的第50位的丙氨酸被置换为组氨酸

[0120] (9)序列号1的第51位的酪氨酸被置换为天冬氨酸或组氨酸

[0121] (10)序列号1的第54位的谷氨酸被置换为天冬氨酸或甘氨酸

[0122] (11)序列号1的第56位的天冬酰胺被置换为苏氨酸

[0123] (12)序列号1的第59位的谷氨酰胺被置换为精氨酸

[0124] (13)序列号1的第61位的苯丙氨酸被置换为酪氨酸

[0125] (14)序列号1的第64位的谷氨酸被置换为天冬氨酸

[0126] (15)序列号1的第65位的丝氨酸被置换为精氨酸

[0127] (16)序列号1的第71位的丙氨酸被置换为天冬氨酸

[0128] (17)序列号1的第75位的苯丙氨酸被置换为亮氨酸、丝氨酸或酪氨酸(18)序列号1的第77位的天冬氨酸被置换为天冬酰胺

[0129] (19)序列号1的第78位的丙氨酸被置换为丝氨酸

[0130] (20)序列号1的第82位的天冬氨酸被置换为谷氨酸或缬氨酸

[0131] (21)序列号1的第90位的谷氨酰胺被置换为精氨酸

[0132] (22)序列号1的第92位的天冬酰胺被置换为丝氨酸

[0133] (23)序列号1的第93位的亮氨酸被置换为精氨酸或甲硫氨酸

[0134] (24)序列号1的第95位的苏氨酸被置换为丙氨酸或丝氨酸

[0135] (25)序列号1的第110位的亮氨酸被置换为谷氨酰胺

[0136] (26)序列号1的第115位的精氨酸被置换为谷氨酰胺

[0137] (27)序列号1的第116位的色氨酸被置换为亮氨酸

[0138] (28)序列号1的第118位的苯丙氨酸被置换为酪氨酸

[0139] (29)序列号1的第119位的赖氨酸被置换为谷氨酸

[0140] (30)序列号1的第120位的谷氨酸被置换为缬氨酸

- [0141] (31) 序列号1的第121位的谷氨酸被置换为天冬氨酸或甘氨酸
- [0142] (32) 序列号1的第151位的苯丙氨酸被置换为丝氨酸或酪氨酸
- [0143] (33) 序列号1的第155位的丝氨酸被置换为苏氨酸
- [0144] (34) 序列号1的第163位的苏氨酸被置换为丝氨酸
- [0145] (35) 序列号1的第167位的丝氨酸被置换为甘氨酸
- [0146] (36) 序列号1的第169位的丝氨酸被置换为甘氨酸
- [0147] (37) 序列号1的第171位的苯丙氨酸被置换为酪氨酸
- [0148] (38) 序列号1的第180位的天冬酰胺被置换为赖氨酸、丝氨酸或异亮氨酸
- [0149] (39) 序列号1的第185位的苏氨酸被置换为丝氨酸
- [0150] (40) 序列号1的第192位的谷氨酰胺被置换为赖氨酸
- [0151] 另外,作为上述(ii)的另一方式,可列举含有序列号1记载的氨基酸序列中第17位至第192位为止的氨基酸残基、且在该第17位至第192位为止的氨基酸残基中发生了下述(41)至(57)中的至少任一氨基酸置换的多肽(日本特开2016-169197)。
- [0152] (41) 序列号1的第29位的苯丙氨酸被置换为异亮氨酸或亮氨酸
- [0153] (42) 序列号1的第39位的谷氨酸被置换为甘氨酸
- [0154] (43) 序列号1的第48位的谷氨酰胺被置换为精氨酸
- [0155] (44) 序列号1的第51位的酪氨酸被置换为丝氨酸
- [0156] (45) 序列号1的第61位的苯丙氨酸被置换为酪氨酸
- [0157] (46) 序列号1的第77位的天冬氨酸被置换为甘氨酸
- [0158] (47) 序列号1的第82位的天冬氨酸被置换为谷氨酸
- [0159] (48) 序列号1的第90位的谷氨酰胺被置换为精氨酸
- [0160] (49) 序列号1的第112位的谷氨酰胺被置换为亮氨酸
- [0161] (50) 序列号1的第117位的缬氨酸被置换为谷氨酸
- [0162] (51) 序列号1的第119位的赖氨酸被置换为天冬酰胺或谷氨酸
- [0163] (52) 序列号1的第140位的苏氨酸被置换为异亮氨酸
- [0164] (53) 序列号1的第142位的亮氨酸被置换为谷氨酰胺
- [0165] (54) 序列号1的第171位的苯丙氨酸被置换为丝氨酸
- [0166] (55) 序列号1的第175位的亮氨酸被置换为精氨酸
- [0167] (56) 序列号1的第180位的天冬酰胺被置换为丝氨酸
- [0168] (57) 序列号1的第188位的异亮氨酸被置换为缬氨酸
- [0169] 另外,作为上述(ii)的又一方式,可列举含有序列号1记载的氨基酸序列中第17位至第192位为止的氨基酸残基、且在该第17位至第192位为止的氨基酸残基中发生了下述(58)至(61)中的至少任一氨基酸置换的多肽(日本特开2016-169197)。
- [0170] (58) 序列号1的第66位的亮氨酸被置换为组氨酸或精氨酸
- [0171] (59) 序列号1的第147位的甘氨酸被置换为天冬氨酸
- [0172] (60) 序列号1的第158位的酪氨酸被置换为组氨酸
- [0173] (61) 序列号1的第176位的缬氨酸被置换为苯丙氨酸
- [0174] 另外,作为上述(ii)的又一方式,可列举含有序列号1记载的氨基酸序列中第17位至第192位为止的氨基酸残基、且在该第17位至第192位为止的氨基酸残基中发生了上述

(1) 至 (61) 中至少任一氨基酸置换的多肽。

[0175] 作为上述 (ii), 特别列举下述 (ii-1) ~ (ii-3) 的多肽。

[0176] (ii-1) 含有序列号1记载的氨基酸序列的第17位至第192位为止的氨基酸残基、其中该第17位至第192位为止的氨基酸残基中至少176位的缬氨酸被置换为苯丙氨酸的多肽;

[0177] (ii-2) 含有序列号1记载的氨基酸序列的第17位至第192位为止的氨基酸残基、其中该第17位至第192位为止的氨基酸残基中至少第27位的缬氨酸被置换为谷氨酸、第29位的苯丙氨酸被置换为异亮氨酸、第35位的酪氨酸被置换为天冬酰胺、第48位的谷氨酰胺被置换为精氨酸、第75位的苯丙氨酸被置换为亮氨酸、第92位的天冬酰胺被置换为丝氨酸、第117位的缬氨酸被置换为谷氨酸、第121位的谷氨酸被置换为甘氨酸、第171位的苯丙氨酸被置换为丝氨酸、和第176位的缬氨酸被置换为苯丙氨酸的多肽;

[0178] (ii-3) 含有序列号1记载的氨基酸序列的第17位至第192位为止的氨基酸残基、其中该第17位至第192位为止的氨基酸残基中至少第27位的缬氨酸被置换为谷氨酸、第29位的苯丙氨酸被置换为异亮氨酸、第35位的酪氨酸被置换为天冬酰胺、第48位的谷氨酰胺被置换为精氨酸、第75位的苯丙氨酸被置换为亮氨酸、第92位的天冬酰胺被置换为丝氨酸、第117位的缬氨酸被置换为谷氨酸、第121位的谷氨酸被置换为甘氨酸、和第171位的苯丙氨酸被置换为丝氨酸的多肽。

[0179] Fc结合性蛋白质只要具有与Fc区(例如人IgG的Fc区)结合的功能则也可以为在上述例示的Fc结合性蛋白质(例如上述(i)或(ii)的多肽)的氨基酸序列中含有“一或多个”氨基酸突变(例如置换、插入或缺失)的多肽。“一或多个”例如可以为1~50个、优选1~40个、更优选1~30个、进一步优选1~20个、特别优选1~10个。例如,可以以保持了选自上述(1)至(61)的氨基酸置换的、上述例示的Fc结合性蛋白质所具有的氨基酸置换的方式来产生“一或多个”氨基酸突变。换言之,“一或多个”的氨基酸突变例如可以发生在选自上述(1)至(61)的氨基酸置换中的、上述例示的Fc结合性蛋白质所具有的氨基酸置换以外的位置。

[0180] Fc结合性蛋白质只要具有与Fc区(例如人IgG的Fc区)结合的功能则也可以为含有相对于上述例示的Fc结合性蛋白质(例如上述(i)或(ii)的多肽)的氨基酸序列具有高同源性的氨基酸序列的多肽。“高同源性”可以是指70%以上、80%以上、90%以上或95%以上的同源性。“同源性”可以是指类似性(similarity)或同一性(identity)。“同源性”可以特别指同一性(identity)。氨基酸序列的同源性可以利用BLAST等比对程序来确定。例如,“氨基酸序列的同一性”可以指使用blastp计算出的氨基酸序列间的同一性,具体而言,可以指在默认参数下使用blastp计算出的氨基酸序列间的同一性。在上述那样的同源性范围内,氨基酸序列的变化例如可以以保持了选自上述(1)至(61)的氨基酸置换中的、上述例示的Fc结合性蛋白质所具有的氨基酸置换的方式发生。换言之,在上述那样的同源性范围内的氨基酸序列的变化例如可以发生在选自上述(1)至(61)的氨基酸置换中的、上述例示的Fc结合性蛋白质所具有的氨基酸置换以外的位置。

[0181] Fc结合性蛋白质例如可以通过使具有编码Fc结合性蛋白质的基因的宿主表达该基因来制造。编码Fc结合性蛋白质的基因例如可以通过克隆、化学合成、突变导入、或这些的组合来取得。宿主只要可以表达Fc结合性蛋白质就没有特别限制。作为宿主,可列举动物细胞、昆虫细胞、微生物。作为动物细胞,可列举COS细胞、CHO细胞、HeLa细胞、NIH3T3细胞、HEK293细胞。作为昆虫细胞,可列举Sf9、BTI-TN-5B1-4。作为微生物,可列举酵母和细菌。作

为酵母,可列举酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等酵母菌属酵母、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia Pastoris*) 等毕赤酵母属酵母、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 等裂殖酵母属酵母。作为细菌,可列举大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 等埃希氏菌属细菌。作为大肠埃希氏菌,可列举W3110株、JM109株、BL21 (DE3) 株。另外,例如也可以通过用无细胞蛋白质合成系统表达编码Fc结合性蛋白质的基因来制造Fc结合性蛋白质。

[0182] “不溶性载体”是指:在本发明的方法中,相对于被通入柱中的液体(例如平衡液和洗脱液等在抗体的吸附或洗脱中使用的液体)为不溶性的载体。不溶性载体可以具有用于以共价键固定Fc结合性蛋白质的官能团(例如羟基)。作为不溶性载体,可列举:氧化锆、沸石、二氧化硅、覆膜二氧化硅等源自无机系物质的载体;纤维素、琼脂糖、葡聚糖等源自天然有机高分子物质的载体;聚丙烯酸、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酰胺、聚甲基丙烯酸酯、乙烯基聚合物等源自合成有机高分子物质的载体。

[0183] Fc结合性蛋白质可以适宜地固定于不溶性载体。例如,可以利用不溶性载体所具有的、用于以共价键固定Fc结合性蛋白质的官能团(例如羟基)通过共价键将Fc结合性蛋白质固定于不溶性载体。例如,在不溶性载体于表面具有羟基的情况下,可以使用活化剂由该羟基形成能够与Fc结合性蛋白质共价键合的活化基团,使该活化基团与Fc结合性蛋白质共价键合。作为针对羟基的活化剂的具体例子,可列举表氯醇(形成环氧基作为活化基团)、1,4-丁二醇二缩水甘油醚(形成环氧基作为活化基团)、三氟乙磺酰氯(形成三氟乙磺酰基作为活化基团)、溴乙烯(形成乙烯基作为活化基团)。另外,也可以将羟基转变为氨基、羧基等之后使活化剂起作用而进行活化。作为针对氨基、羧基等的活化剂的具体例,可列举3-马来酰亚胺丙酸N-琥珀酰亚胺酯(形成马来酰亚胺基作为活化基团)、1,1'-羰基二咪唑(形成羰基咪唑基作为活化基团)、卤代乙酸(形成卤代乙酰基作为活化基团)。

[0184] 通过向填充有固定有Fc结合性蛋白质的不溶性载体的柱中添加含有抗体的溶液,可以使抗体吸附于载体。含有抗体的溶液例如可以使用泵等液体供应单元向柱中添加。也将向柱中添加液体称为“向柱中送入液体”。含有抗体的溶液的添加量、液相的种类、液相的送液速度、柱温度等吸附工序的实施条件只要抗体会吸附于载体就没有特别限制。吸附工序的实施条件可以根据抗体的种类、Fc结合性蛋白质的种类、不溶性载体的种类、柱的规模等各条件来适宜设定。作为液相,可列举后述的平衡液。例如在柱的内径为4.6mm的情况下,送液速度可以为0.1mL/分钟~1.5mL/分钟、0.2mL/分钟~1.0mL/分钟、或0.4mL/分钟~0.8mL/分钟。例如,可以按照与柱内径的平方成比例的方式来设定送液速度。柱温度可以为例如0~50℃。

[0185] 在向柱中添加含有抗体的溶液之前,可以使用平衡液对柱进行平衡。即,本发明的方法可以在吸附工序之前包括向柱中添加平衡液而对柱进行平衡的工序。作为平衡液,可列举水性缓冲液。作为平衡液,具体而言,可列举pH4.0至6.9的弱酸性缓冲液。缓冲液的成分可根据缓冲液的pH等各条件来适宜选择。作为缓冲液的成分,可列举磷酸、乙酸、甲酸、MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid, 2-吗啉代乙磺酸)、MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid, 3-吗啉代丙磺酸)、柠檬酸、琥珀酸、甘氨酸、哌嗪。

[0186] <洗脱工序>

[0187] 洗脱工序为用洗脱液洗脱吸附于载体的抗体的工序。

[0188] 即,可以通过向柱中添加洗脱液来洗脱吸附于载体的抗体。洗脱液的种类、洗脱液

的送液形式、液相的送液速度、柱温度等洗脱工序的实施条件只要抗体会以所期望的方式分离、例如只要可得到所期望的分离数据就没有特别限制。洗脱工序的实施条件可根据抗体的种类、Fc结合性蛋白质的种类、不溶性载体的种类、柱的规模等各条件适宜设定。作为洗脱液,可以使用会减弱抗体与Fc结合性蛋白质的亲和性的液体。作为洗脱液,可列举pH低于洗脱前的液相(例如平衡液)的水性缓冲液。作为洗脱液,具体而言可列举pH2.5至4.5的酸性缓冲液。例如,在洗脱前的液相(例如平衡液)为pH4.0至6.9的弱酸性缓冲液的情况下,洗脱液可以为pH2.5至4.5的酸性缓冲液。缓冲液的成分可根据缓冲液的pH等各条件适宜选择。作为缓冲液的成分,可列举磷酸、乙酸、甲酸、MES(2-吗啉代乙磺酸)、MOPS(3-吗啉代丙磺酸)、柠檬酸、琥珀酸、甘氨酸、哌嗪。洗脱液的送液形式例如可以为梯度式,也可以为等度式。洗脱液的送液形式尤其可以为梯度式。即,尤其可以通过增大液相中的洗脱液的比率来实施洗脱。梯度例如可以为线性梯度,也可以为分级式(stepwise)梯度,还可以为这些的组合。具体而言,例如可以以液相中的洗脱液的比率在10~60分钟、15~50分钟或20~40分钟内由0%(v/v)增加至100%(v/v)方式来设定梯度。例如,在柱的内径为4.6mm的情况下,送液速度可以为0.1mL/分钟~1.5mL/分钟、0.2mL/分钟~1.0mL/分钟或0.4mL/分钟~0.8mL/分钟。例如,可以以与柱的内径的平方成比例的方式来设定送液速度。柱温度可以为例如0~50℃。

[0189] 通过洗脱工序可以得到分离后的抗体。例如,可以以含有该抗体的洗脱级分的形式得到分离后的抗体。即,通过制备含有分离后的抗体的洗脱级分,可得到分离后的抗体。例如,可以通过常规方法来制备洗脱级分。具体而言,例如可以通过自动采样器等自动级分收集器等制备洗脱级分。另外,还可以从洗脱级分中回收分离后的抗体。例如,可以通过常规方法从洗脱级分中回收分离后的抗体。具体而言,例如可以利用用于蛋白质的分离纯化的公知方法从洗脱级分中回收分离后的抗体。

[0190] 通过洗脱工序,可以得到分离数据(即,抗体的分离图谱的相关数据)。分离数据只要是可作为用于检测被检者的风险的指标使用的数据、即只要与被检者的风险相关则没有特别限制。作为分离数据,可列举抗体的分离图谱的特征。也将抗体的分离图谱的特征简称为“特征”。即,得到分离数据的工序例如可包括得到抗体的分离图谱的工序、和提取抗体的分离图谱的特征(即,从抗体的分离图谱中提取其特征)的工序。通过用检测器对抗体进行检测,可得到抗体的分离图谱。作为检测器,可列举UV检测器、质谱检测器。作为抗体的分离图谱,可列举抗体洗脱时的色谱图。作为特征,可列举由抗体的分离图谱得到的、与被检者的风险相关的参数。作为特征,具体而言可列举洗脱峰(即,洗脱出的抗体的峰)的特征。作为洗脱峰的特征,具体而言可列举峰面积、出峰时间、峰宽度、峰检测数、峰高度。也将成为峰面积、峰高度等特征的提取对象的洗脱峰称为“对象峰”。作为洗脱峰的特征,尤其可列举峰面积、峰高度。抗体的分离图谱可以直接地或适宜实施基线校正等校正后用于特征的提取。特征可以为绝对值,也可以为相对值。作为相对值,可列举与其他洗脱峰(即,对象峰以外的任意洗脱峰)的值的比率或差值、或与全部洗脱峰(即包括对象峰在内的全部洗脱峰)的值的合计的比率或差值。作为相对值,尤其可列举与其他洗脱峰的值的比率、与全部洗脱峰的值的合计的比率。作为其他洗脱峰,可以使用1个洗脱峰,也可以将2个或2个以上洗脱峰组合使用。例如,作为峰面积,具体而言可列举峰面积%。“峰面积%”是指:对象峰的面积相对于全部洗脱峰的面积合计值的比率(%)。另外,例如,作为峰高度,具体而言可列举峰

高度%。“峰高度%”是指：对象峰的高度相对于全部洗脱峰的高度合计值的比率(%)。对于特征，可以进行基于由内标得到的峰的校正、基于被检者的性质的校正等校正。例如，可以基于被检者的年龄对特征进行校正。即，例如在特征会受到被检者的年龄的影响的情况下，可以在基于被检者的年龄对提取的特征进行校正后用于检测工序。基于被检者的年龄进行了校正的特征例如可用于检测关于衰老以外的症状的风险。

[0191] 可根据风险的种类等各条件适宜选择对象峰。作为对象峰，可列举第1～第4峰。作为对象峰，尤其可列举第1峰、第2峰、第3峰。作为对象峰，还尤其可列举第1峰。第1峰例如可优选用于评价关于胰腺炎以外的症状的风险。第2峰例如可优选用于评价关于衰老的风险。第3峰例如可优选用于评价关于胰腺炎的风险。第3峰具体而言例如可优选用于区别胰腺炎与胰腺癌。作为对象峰，可以使用1个洗脱峰，也可以将2个或2个以上洗脱峰组合使用。只要没有特别声明，则“第1～第4峰”可以分别表示开始洗脱后(例如梯度开始后)在第1～4位洗脱出来的峰。需要说明的是，对象峰尤其可以为峰面积%为1%以上的峰。换言之，“第1～第4峰”尤其可以分别表示在开始洗脱后在第1～4位洗脱出来的、峰面积%为1%以上的峰。另外，在通过梯度洗脱实施洗脱工序的情况下，“第1峰”例如可以表示在液相的pH达到5.4以下、5.2以下、5.0以下或4.8以下时首先洗脱出来的峰。另外，在通过梯度洗脱实施洗脱工序的情况下，“第1峰”例如可以表示在液相的pH达到5.4～4.4、5.2～4.5或5.0～4.6期间洗脱出来的峰。需要说明的是，在开始洗脱前的液相(例如平衡液)的pH为X、洗脱液的pH为Y、液相中的洗脱液的比率为Z%的情况下，液相的pH为通过下述式(I)计算而得的。另外，考虑柱容积等流路容积来适宜校正出峰时的pH。

[0192] 液相的 $pH = X - ((X - Y) \times Z / 100) \cdots (I)$

[0193] <检测工序>

[0194] 检测工序是以分离数据(即，抗体的分离图谱的相关数据)为指标来检测被检者的风险(即，有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度)的工序。

[0195] 作为疾病，可列举免疫细胞的活性(例如损伤作用、吞噬作用)受到影响的疾病。作为免疫细胞，可列举自然杀伤细胞、单核细胞、巨噬细胞。

[0196] 作为疾病，具体而言可列举癌症、自身免疫疾病、感染症、变态反应、炎症疾病。这些疾病均可以为免疫细胞的活性受到影响的疾病。

[0197] 作为癌症，可列举脑瘤、乳癌、子宫体癌、子宫颈癌、卵巢癌、食道癌、胃癌、阑尾癌、大肠癌、肝癌、胆囊癌、胆管癌、胰腺癌、肾上腺癌、胃肠道间质瘤(GIST)、间皮瘤、头颈癌、肾癌、肺癌、骨肉瘤、尤因肉瘤、软骨肉瘤、前列腺癌、睾丸瘤、肾细胞癌、膀胱癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、肛门癌。作为癌症，尤其可列举胰腺癌、胃癌、乳癌、大肠癌、肾癌。

[0198] 作为自身免疫疾病，可列举格林-巴利综合征、重症肌无力、多发性硬化症、慢性胃炎、慢性萎缩性胃炎、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性胆管炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、原发性胆汁性胆管炎、自身免疫性胰腺炎、高安动脉炎、肺出血-肾炎综合征、急进性肾小球肾炎、巨幼细胞性贫血、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性中性粒细胞减少症、特发性血小板减少性紫癜、巴塞杜氏病、桥本病、原发性甲状腺功能减退症、原发性慢性肾上腺皮质功能减退症、1型糖尿病、慢性盘状红斑狼疮、局限性硬皮病、天胞疮、脓疱性银屑病、寻常型银屑病、类天胞疮、妊娠疱疹、线状IgA大疱性皮肤病、获得性大疱性表皮松解、斑秃、寻常型白癜风、晕痣/sutton's母斑、原田病、自身免疫性视神经病变、自身免疫性内耳病、特发性无

精症、习惯性流产、风湿病、系统性红斑狼疮、抗磷脂抗体综合征、多发性肌炎、皮炎、硬皮病、干燥综合征、IgG4相关性疾病、血管炎综合征、混合性结缔组织病。作为自身免疫疾病，尤其可列举风湿病、干燥综合征。

[0199] 作为感染症，可列举细菌感染症、真菌感染症、寄生性原虫感染症、寄生性蠕虫感染症、病毒感染症。作为细菌感染症，可列举由链球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、肠球菌、李斯特菌病、脑膜炎球菌、淋球菌、肠致病性大肠杆菌、克雷伯杆菌、变形杆菌、百日咳杆菌、绿脓杆菌、沙雷菌、柠檬酸杆菌、不动杆菌、肠杆菌、支原体、梭状杆菌、立克次氏体、衣原体等各种细菌引起的感染症；结核、非结核性抗酸菌症、霍乱、鼠疫、白喉、痢疾、猩红热、炭疽病、梅毒、破伤风、麻风、军团菌肺炎、钩端螺旋体病、莱姆病 (Lyme disease)、兔热病、Q热。作为真菌感染症，可列举曲霉菌病、念珠菌病、隐球菌病、癣菌疹、组织胞浆菌病、卡氏肺孢菌肺炎 (卡氏肺囊虫肺炎)。作为寄生性原虫感染症，可列举阿米巴痢疾、疟疾、弓形虫病、利士曼原虫病、隐孢子虫病。作为寄生性蠕虫感染症，可列举包虫病、日本血吸虫病、丝虫病、蛔虫病、裂头绦虫病。作为病毒感染症，可列举流感、病毒性肝炎、病毒性脑膜炎、病毒性胃肠炎、病毒性结膜炎、获得性免疫缺陷综合征 (AIDS)、成人T细胞白血病、埃博拉出血热、黄热病、感冒综合征、狂犬病、巨细胞病毒感染症、严重急性呼吸综合征 (SARS)、中东呼吸综合征 (MERS)、进行性多灶性白质脑病、水痘/带状疱疹、单纯疱疹、手足口病、登革热、日本脑炎、传染性红斑、传染性单核细胞增多症、天花、风疹、脊髓灰质炎 (polio)、麻疹、咽结膜热 (Bell热)、马尔堡出血热、肾综合征出血热、拉萨热、流行性腮腺炎、西尼罗热、疱疹性咽峡炎、奇昆古尼亚 (chikungunya) 热。感染症例如可以为机会性感染。

[0200] 作为变态反应，可列举变态反应性休克、变态反应性鼻炎、结膜炎、支气管哮喘、荨麻疹、特应性皮炎、溶血性贫血、特发性血小板减少性紫癜、药物性溶血性贫血、粒细胞减少、血小板减少、肺出血-肾炎综合征、血清病、系统性红斑狼疮 (SLE)、风湿病、肾小球肾炎、变态反应性肺炎、变态反应性支气管肺曲霉病 (ABPA)、接触性皮炎、变态反应性脑炎、移植排斥、结核空洞、上皮样肉芽肿。

[0201] 作为炎症疾病，可列举由炎性细胞因子诱导的疾病。作为炎性细胞因子，可列举IL-6、TNF- α 。作为炎症疾病，具体而言可列举脑炎、骨髓炎、脑膜炎、神经炎、眼部炎症 (泪腺炎、巩膜炎、巩膜外层炎、角膜炎、脉络膜视网膜炎、视网膜炎、脉络膜视网膜炎、睑缘炎、结膜炎、葡萄膜炎等)、耳部炎症 (外耳炎、中耳炎、内耳炎等)、乳腺炎、心炎 (心内膜炎、心肌炎、心膜炎等)、血管炎 (动脉炎、静脉炎、毛细血管炎等)、呼吸系统炎症 (鼻窦炎、鼻炎、咽喉炎、气管炎、支气管炎、细支气管炎、肺炎、胸膜炎、纵隔炎等)、口腔炎症 (口腔炎、牙龈炎、龈口炎、舌炎、扁桃体炎、涎腺炎、腮腺炎、唇炎、牙髓炎、鼻炎等)、消化系统炎症 (食道炎、胃炎、胃肠炎、肠炎、小肠炎、大肠炎、十二指肠炎、回肠炎、阑尾炎、直肠炎等)、皮炎、蜂窝织炎、汗腺炎、关节炎、皮炎、肌炎、滑膜炎、腱炎、脂膜炎、骨炎、骨髓炎、骨膜炎、肾炎、输尿管炎、膀胱炎、输尿管炎、卵巢炎、输卵管炎、子宫内膜炎、宫颈管炎、阴道炎、外阴炎、睾丸炎、附睾炎、前列腺炎、精囊膀胱炎、龟头炎、包皮龟头炎、绒毛膜羊膜炎、脐带炎、脐炎、肝炎、上行性胆管炎、胆囊炎、胰腺炎、腹膜炎、垂体炎、甲状腺炎、甲状旁腺炎、肾上腺炎、淋巴管炎、淋巴结炎。作为炎症疾病，尤其可列举胰腺炎。

[0202] 作为疾病，具体而言还可列举恶病质、衰老相关疾病。作为衰老相关疾病，可列举衰弱 (虚弱)、肌肉减少、运动障碍综合征 (locomotive syndrome)。恶病质、上述衰老相关疾

病也都可以为炎症疾病。

[0203] 作为被检者的风险的检测,可列举判定被检者有无风险、判定被检者的风险高或低。

[0204] 作为有无疾病的检测,可列举:判定被检者目前有无已罹患疾病的可能性、判定被检者目前已罹患疾病的可能性是高还是低。另外,作为疾病的发病风险的检测,可列举:判定被检者将来有无罹患疾病的可能性或在已罹患的情况下判定有无重症化的可能性、判定被检者将来罹患疾病的可能性是高还是低或在已罹患的情况下判定重症化的可能性是高还是低。另外,作为疾病的进展程度的检测,可列举:判定被检者目前的疾病进展程度(例如重症度)是大还是小。另外,作为衰老的进展程度的检测,可列举:判定被检者目前的衰老进展程度(例如重症度)是大还是小。

[0205] 即,“被检者有风险”可以是指:例如,被检者目前有已罹患疾病的可能性、被检者将来有罹患疾病的可能性、和/或在已罹患疾病的情况下被检者将来有重症化的可能性。“被检者无风险”可以是指例如:被检者目前没有已罹患疾病的可能性、被检者将来没有罹患疾病的可能性、和/或在已罹患疾病的情况下被检者将来没有重症化的可能性。“被检者的风险高”可以是指例如:被检者目前已罹患疾病的可能性高、被检者将来罹患疾病的可能性高、在已罹患疾病的情况下被检者将来重症化的可能性高、被检者目前的疾病进展程度大、和/或被检者目前的衰老进展程度大。“被检者的风险低”可以是指例如:被检者目前已罹患疾病的可能性低、被检者将来罹患疾病的可能性低、在已罹患疾病的情况下被检者将来重症化的可能性低、被检者目前的疾病进展程度小、和/或被检者目前的衰老进展程度小。

[0206] 例如可以以分离数据的值的高低(即,分离数据的值是高还是低)为指标来实施检测工序。分离数据的值的高低例如可以通过将分离数据的值与规定的阈值进行比较来确定。换言之,检测工序例如可以包括将分离数据的值与阈值进行比较的工序。即,“分离数据的值高”可以是指例如:将阈值作为基准,分离数据的值高。“将阈值作为基准,分离数据的值高”可以是指例如:分离数据的值大于等于阈值、分离数据的值超过阈值、或分离数据的值在统计学上显著高于阈值。具体而言,“将阈值作为基准,分离数据的值高”可以是指例如:分离数据的值为阈值的1.01倍以上、1.02倍以上、1.03倍以上、1.05倍以上、1.07倍以上、1.1倍以上、1.2倍以上、1.3倍以上、1.5倍以上、1.7倍以上、2倍以上、2.5倍以上、或3倍以上。另外,“分离数据的值低”可以是指例如:将阈值作为基准,分离数据的值低。“将阈值作为基准,分离数据的值低”可以是指例如:分离数据的值小于等于阈值、分离数据的值低于阈值、或分离数据的值在统计学上显著低于阈值。更具体而言,“将阈值作为基准,分离数据的值低”可以是指例如:分离数据的值为阈值的0.99倍以下、0.98倍以下、0.97倍以下、0.95倍以下、0.93倍以下、0.9倍以下、0.85倍以下、0.8倍以下、0.7倍以下、0.6倍以下、0.5倍以下、0.4倍以下、或0.3倍以下。

[0207] 例如,可以以阈值为基准而将分离数据的值分类到危险范围中。例如,可以以阈值为基准而将分离数据的值分类到非危险范围。具体而言,例如,可以以阈值为基准而将分离数据的值分类到危险范围和非危险范围中。“危险范围”可以是指:关于分离数据的值,被检者有风险的可能性高的范围。“非危险范围”可以是指:关于分离数据的值,被检者没有风险的可能性高的范围。即,若分离数据的值处于危险范围,则可以判定被检者有风险或风险

高。另一方面,若分离数据的值处于非危险范围,则可以判定被检者无风险或风险低。

[0208] 例如,在第1峰和/或第2峰的峰面积(例如峰面积%)和/或峰高度(例如峰高度%)的值高的情况下,可以判定为被检者有风险或风险高。具体而言,例如,在将阈值作为基准而第1峰和/或第2峰的峰面积(例如峰面积%)和/或峰高度(例如峰高度%)的值高的情况下,则可以判定被检者有风险或风险高。这种情况下,可视为高于作为基准的阈值的范围可以为危险范围。更具体而言,例如,在第1峰面积%为14%以上、15%以上、16%以上、17%以上、18%以上、19%以上、20%以上、21%以上、22%以上、23%以上、24%以上、25%以上、26%以上、27%以上、28%以上、29%以上、或30%以上的情况下,可以判定为被检者有风险或风险高。另外,第1峰和/或第2峰的峰面积(例如峰面积%)和/或峰高度(例如峰高度%)的值越高,越可以判定为被检者的风险高。

[0209] 例如,在第1峰和/或第2峰的峰面积(例如峰面积%)和/或峰高度(例如峰高度%)的值低的情况下,可以判定为被检者无风险或风险低。具体而言,例如,在将阈值作为基准而第1峰和/或第2峰的峰面积(例如峰面积%)和/或峰高度(例如峰高度%)的值低的情况下,可以判定为被检者无风险或风险低。这种情况下,可视为低于作为基准的阈值的范围可以为非危险范围。更具体而言,例如,在第1峰面积%为25%以下、24%以下、23%以下、22%以下、21%以下、20%以下、19%以下、18%以下、17%以下、16%以下、15%以下、14%以下、13%以下、12%以下、11%以下、10%以下、或9%以下的情况下,可以判定为被检者无风险或风险低。另外,第1峰和/或第2峰的峰面积(例如峰面积%)和/或峰高度(例如峰高度%)的值越低,则越可以判定为被检者的风险低。

[0210] 例如,在第3峰的峰面积(例如峰面积%)和/或峰高度(例如峰高度%)的值低的情况下,可以判定为被检者有风险或风险高。具体而言,例如,在将阈值作为基准而第3峰的峰面积(例如峰面积%)和/或峰高度(例如峰高度%)的值低的情况下,可以判定为被检者有风险或风险高。这种情况下,可视为低于作为基准的阈值的范围可以为危险范围。另外,第3峰的峰面积(例如峰面积%)和/或峰高度(例如峰高度%)的值越低,则越可以判定为被检者的风险高。

[0211] 例如,在第3峰的峰面积(例如峰面积%)和/或峰高度(例如峰高度%)的值高的情况下,可以判定为被检者无风险或风险低。具体而言,例如,在将阈值作为基准而第3峰的峰面积(例如峰面积%)和/或峰高度(例如峰高度%)的值高的情况下,可以判定为被检者无风险或风险低。这种情况下,可视为高于作为基准的阈值的范围可以为非危险范围。另外,第3峰的峰面积(例如峰面积%)和/或峰高度(例如峰高度%)的值越高则越可以判定为被检者的风险低。

[0212] 在以将第1峰作为对象峰的分离数据为指标时,风险例如可以从关于胰腺炎以外的症状的风险中选择。在以将第2峰作为对象峰的分离数据为指标时,风险例如可以从关于衰老的风险中选择。在以将第3峰为对象峰的分离数据为指标时,风险例如可以从关于胰腺炎的风险中选择。

[0213] 需要说明的是,“在某一分离数据满足某一基准(例如低或高、或者处于某一范围)的情况下,判定为被检者有风险、无风险、风险高、或风险低”是指:至少在满足该基准的范围内可判定为被检者有风险、无风险、风险高、或风险低,在不满足该基准的范围内不要求进行被检者的风险判定。但是,一方式中,“在某一分离数据满足某一基准(例如低或高、或

者处于某一范围)的情况下,判定为被检者有风险、无风险、风险高、或风险低”的情况下,在不满足该基准的范围内可以分别判定为被检者无风险、有风险、风险低、或风险高。

[0214] 例如,本领域技术人员可根据分离数据的种类、所期望的判定精度等各条件适宜地设定阈值。例如,可以对疾病、衰老等判定对象的症状逐个设定阈值。确定阈值的手段没有特别限制。例如,可以按照用于将总体分为两组的、数据分析中所利用的公知方法来确定阈值。

[0215] 例如,可以基于由对照被检者得到的抗体试样的分离数据的值确定阈值。也将由对照被检者得到的抗体试样的分离数据称为“对照分离数据”。对照分离数据可以通过被用于阈值的确定而被用于检测工序。具体而言,对照分离数据可以通过被用于阈值的确定而被用于与分离数据的比较。换言之,检测工序例如可以包括将分离数据与对照分离数据进行比较的工序。

[0216] 作为对照被检者,可列举阳性对照、阴性对照。“阳性对照”可以是指可被判定为有风险或风险高的被检者。“阴性对照”可以是指可被判定为无风险或风险低的被检者。作为阳性对照,可列举患有或患过上述例示那样的疾病(特别是与成为风险的检测对象的疾病相同的疾病)的个体、已经发生衰老的个体、具有两者的综合性质的个体。作为阴性对照,可列举未患或未患过上述例示那样的疾病(特别是与成为风险的检测对象的疾病相同的疾病)的个体、尚未发生衰老的个体、具有两者的综合性质的个体。阈值既可以仅基于对阳性对照进行测定而得的分离数据的值来确定,也可以仅基于对阴性对照进行测定而得的分离数据的值来确定,还可以基于对阳性对照和阴性对照两者进行测定而得的分离数据的值来确定。通常可以基于对阳性对照和阴性对照两者进行测定而得的分离数据的值来确定阈值。关于阳性对照和阴性对照的人数,只要可得到能够以期望的精度进行风险判定的阈值就没有特别限制。阳性对照和阴性对照的人数可以分别为1人,也可以分别为2人或2人以上。阳性对照和阴性对照的人数通常分别为多人。阳性对照和阴性对照的人数例如可以分别为5人以上、10人以上、20人以上、或50人以上。阳性对照和阴性对照的人数例如可以分别为10000人以下、1000人以下、或100人以下。

[0217] 在仅基于对阳性对照进行测定而得的分离数据的值来确定阈值时,例如,可以将选自自由阳性对照的多个个体测定的分离数据的值的上限至下限的范围内的值、例如平均值设定为阈值。另外,例如,可以按照使由阳性对照的多个个体测定的分离数据的值的分布中的、阳性对照的规定比例被包含在危险范围内的方式来确定阈值。规定比例可以为例如70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、97%以上、或100%。

[0218] 在仅基于对阴性对照进行测定而得的分离数据的值来确定阈值时,例如,可以将选自自由阴性对照的多个个体测定的分离数据的值的上限至下限的范围内的值、例如平均值设定为阈值。另外,例如,可以按照使由阴性对照的多个个体测定的分离数据的值的分布中的、阴性对照的规定比例被包含在非危险范围的方式来设定阈值。规定比例可以为例如70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、97%以上、或100%。

[0219] 在基于对阳性对照测定而得的分离数据的值和对阴性对照进行测定而得的分离数据的值这两者来确定阈值时,例如,可以按照使阳性对照的规定比例被包含在危险范围内、且使阴性对照的规定比例被包含在非危险范围内的方式来确定阈值。阳性对照的包含在危险范围内的比例、和阴性对照的包含在非危险范围内的比例均优选为较高。这些比例

例如可以分别为70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、97%以上、或100%。在难以提高这两种比例的情况下,例如,可以根据利用本发明方法得到的判定结果的利用目的等各条件、并且按照优先提高某一者的比例的方式来设定阈值。例如,为了降低假阴性率,可以按照优先提高阳性对照的包含在危险范围内的比例的方式来设定阈值。

[0220] 例如,可以使用软件来实施阈值的确定。例如,可以使用统计分析软件来确定能够对阴性对照和阳性对照在统计学上以最佳的方式进行判别的阈值。作为这类软件,可列举“R”等统计分析软件。

[0221] 另外,作为对照被检者,也可列举目标被检者本身。即,例如也可以以被检者的分离数据的变动为指标来判断被检者的风险。“分离数据的值高”可以包括分离数据的值增大的情况。“分离数据的值增大”具体而言可以是指分离数据的值与过去的值相比增大。另外,“分离数据的值低”可以包括分离数据的值降低的情况。“分离数据的值降低”具体而言可以是指分离数据的值与过去的值相比降低。即,作为阈值,也可列举过去的值。“过去的值”是指:由目标被检者在过去的某一时刻得到的抗体试样的分离数据的值。过去的某一时刻的目标被检者例如既可以为阳性对照也可以为阴性对照。

[0222] 在以被检者的分离数据的变动为指标时,可以对被检者的风险的增减进行判定。“有风险或风险高”中可以包括风险增大的情况。“风险增大”具体而言可以是指风险与过去的某一时刻相比增大。另外,“无风险或风险低”可以包括风险降低的情况。“风险降低”具体而言可以是指风险与过去的某一时刻相比降低。

[0223] 需要说明的是,“得到某一分离数据,将其作为风险检测的指标”不仅包括得到该分离数据的值本身且将其作为风险检测的指标的情况,还包括得到反映该分离数据的值的其他值并将其作为检测指标的情况。例如,在洗脱峰包含第1~第4峰的情况下,“得到第1峰的峰面积%,将其作为风险检测的指标”不仅包括得到第1峰的峰面积%的值本身并将其作为风险检测的指标的情况,还包括得到第2~第4峰的峰面积%的合计值等反映第1峰的峰面积%的值的其他值并将其作为检测的指标的情况。在任一情况下,用于风险的检测的测定值、阈值等数值均可以在根据分离数据的种类进行适宜校正后使用。例如,在洗脱峰包含第1~第4峰的情况下,若将第1峰的峰面积%的值设为X、将第2~第4峰的峰面积%的合计值设为Y,则满足“ $X=100\%-Y$ ”的关系。因此,在将第2~第4峰的峰面积%的合计值(即,“Y”)作为检测的指标以代替第1峰的峰面积%的值本身(即,“X”)时,“X满足某一基准(例如低或高、或者处于某一范围)”也可以记作“Y的校正值(即,“ $100\%-Y$ ”)满足该基准”。

[0224] 风险的检测结果可以作为用于确定是否对被检者实施用于降低风险的处置(以下也称为“风险减轻处置”)的指标来使用。换言之,通过实施本发明的检测方法,可得到用于确定是否对被检者实施风险减轻处置的指标。即,例如,在通过本发明的检测方法判定被检者有风险或风险高的情况下,可以决定对被检者实施风险减轻处置。本发明的检测方法例如可以单独或其他手段组合地作为用于确定是否对被检者实施风险减轻处置的指标来使用。例如,对于通过本发明的检测方法被判定为被检者有风险或风险高的症状,可以在通过其他手段实施明确诊断后决定对被检者实施风险减轻处置。风险减轻处置可以是医疗行为,也可以是非医疗行为。作为风险减轻处置,可列举上述例示那样的疾病、衰老的预防、治疗。即,本发明例如可以提供疾病、衰老等症状的预防或治疗方法。预防或治疗方法例如可以为疾病、衰老等症状的预防或治疗方法,其包括:实施本发明的检测方法的工序、和在通

过本发明的检测方法判定被检者有风险或风险高的情况下对被检者实施预防或治疗的工序。具体而言,对于通过本发明的检测方法而判定为被检者有风险或风险高的症状,可以实施预防或治疗。预防或治疗例如可以通过针对各症状的常规手段(例如给药、外科手术)来实施。

[0225] 以下记载具体例。

[0226] 通过本发明的方法,例如可以基于关于特定疾病、衰老等症状的风险的特征性糖链结构来分离被检者的抗体、取得分离数据,通过与作为基准的分离数据进行比较,从而能够简便地检测这样的风险。另外,通过在对疾病进行某些处置(给药、手术等)之前和/或之后取得分离数据并且与作为基准的分离数据进行比较,则能够监控疾病的治疗经过、确定对该处置的策略。作为成为基准的分离数据,可列举对照被检者的分离数据。作为成为基准的分离数据,具体而言可列举:同一被检者的其它时刻(例如健康时、罹患同一疾病的时刻)的分离数据、健康人的分离数据、罹患同一疾病的不同患者的分离数据、成为分为对上述处置得到不同奏效性的2组或更多组时的基准的分离数据。

[0227] 例如,将健康人(模型)的分离数据作为模型分离数据,将受试者的分离数据与模型分离数据进行比较,从而能够对具有某种疾病的风险、罹患疾病的风险等风险进行评价。进一步地,通过制备导致模型与受试者的分离数据的差异的峰的级分,可提取健康人(模型)与受试者的抗体的糖链图谱的差异。另外,将患者本人的某时刻的分离数据作为模型分离数据,将同一患者的其它时刻的分离数据与模型分离数据进行比较,从而还可进行该患者的疾病的监控。需要说明的是,在对2个不同受试组进行比较时,可以使用统计概率(P值)来评价由2个不同受试组得到的上述分离数据之差是否为显著性差异。P值若减小则上述评价结果变显著,P值低于显著水平时,可以说上述评价结果在统计学上有显著差异。显著水平通常为5%。

[0228] 作为与特定疾病相关的糖链结构特征,可列举是否添加了唾液酸、唾液酸的添加量差异等。特别地,已知风湿病患者中添加于抗体的唾液酸和半乳糖的量减少,通过与Fc结合性蛋白质的相互作用的差异能够简便地评价唾液酸和半乳糖的有无、含量、以及与健康人的差别。另外,根据本发明的方法,可以在不鉴定各糖链结构的情况下、作为基于Fc结合性这一功能的糖链结构总体来分离抗体。即,根据本发明的方法,可以基于唾液酸和半乳糖的结合量与疾病的已知的相关性尚未被阐明的、糖链结构总体的Fc结合性这一功能而以分离数据形式来提取特征,因此可以高精度地评价有无疾病、疾病的发病风险等风险。

[0229] IgG上所结合的糖链的种类部分地受到产生抗体的B细胞的控制,据非专利文献(Mol.Cell.Proteom.,10,M110.004655(2011))报道,糖链修饰根据细胞因子而改变,因此还可以基于IgG上所结合的糖链图谱来评价该细胞因子的分泌。细胞因子为由细胞释放出的物质,与各种疾病有相关性。例如,已知IL-6、TNF- α 之类的炎性细胞因子的分泌会随着衰老而增加,导致衰弱(虚弱)、肌肉减少之类的运动和认知功能的降低,根据本发明的方法,还能够评价这些衰老相关疾病的发病风险。另外,由于恶性肿瘤而释放的炎性细胞因子会导致癌症患者的体重减少之类的衰弱状态(恶病质),因此本发明的方法在评价恶病质方面也是有用的方法。

[0230] 本发明的抗体对Fc结合性蛋白质的亲和性的强弱会影响到与该抗体结合的结合性物质具有损伤或吞噬作用的自然杀伤细胞和单核细胞、巨噬细胞等免疫细胞的活性,

因此通过检测该亲和性的差异,能够评价受自然杀伤细胞和单核细胞、巨噬细胞的损伤或吞噬作用的影响的疾病的发病风险。作为该疾病,可列举癌症、自身免疫疾病、感染症、变态反应、炎症疾病。作为感染症,可列举机会性感染。机会性感染是指:在健康状态下不会引起感染症的病原体由于某些契机而发病的感染症。作为病原体,可列举病毒、细菌、真菌、原虫。另外,还能够根据抗体对Fc结合性蛋白质的亲和性的强弱来评价由于接种疫苗、患病而获得的抗体对免疫细胞的活化效果。除了测定该获得的抗体在血液中的量以外,还可以通过测定该抗体对Fc结合性蛋白质的亲和性的强弱来高精度地预测感染症的发病风险。

[0231] <2>抗体混合物

[0232] 本发明提供特定组成的抗体混合物。也将该混合物称为本发明的抗体混合物。本发明的抗体混合物例如可通过本发明的抗体制造方法来制造。本发明的抗体混合物例如可以作为含有抗体的洗脱级分来制造。

[0233] 作为本发明的抗体混合物,可列举含有两种或两种以上抗体且对应于下述I至IX中的2个以上(例如2、3、4、5、6、7、8、或9个)项目的抗体混合物:

[0234] I.具有G1Fa的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.4以下;

[0235] II.具有G2F的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.2以下;

[0236] III.具有G2F+2SA的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.03以下;

[0237] IV.具有G1Fb的抗体的含量除以具有G1Fa的抗体的含量而得的值以重量比计为0.5以上;

[0238] V.具有G2F的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.6以下;

[0239] VI.具有G2F+SA的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.3以下;

[0240] VII.具有G2F+2SA的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.12以下;

[0241] VIII.具有G2+SA的抗体的含量相对于抗体的总含量的比率以重量比计为0.2%以下;

[0242] IX.具有G2+2SA的抗体的含量相对于抗体的总含量的比率以重量比计为0.2%以下。

[0243] 作为本发明的抗体混合物,还可列举含有两种或两种以上抗体且对应于下述I至IX中的2个以上(例如2、3、4、5、6、7、8、或9个)项目的抗体组合物:

[0244] I.具有G1Fa的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为1.8以上;

[0245] II.具有G2F的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.6以上;

[0246] III.具有G2F+2SA的抗体的含量除以具有G0F的抗体的含量而得的值以重量比计为0.06以上;

[0247] IV. 具有G1Fb的抗体的含量除以具有G1Fa的抗体的含量而得的值以重量比计为0.3以下;

[0248] V. 具有G2F的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为3.0以上;

[0249] VI. 具有G2F+SA的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.6以上;

[0250] VII. 具有G2F+2SA的抗体的含量除以具有G1Fb的抗体的含量而得的值以重量比计为0.3以上;

[0251] VIII. 具有G2+SA的抗体的含量相对于抗体的总含量的比率以重量比计为2%以上;

[0252] IX. 具有G2+2SA的抗体的含量相对于抗体的总含量的比率以重量比计为0.6%以上。

[0253] 上述项目中的糖链结构的描述如图3和图4的记载。

[0254] 本发明的抗体混合物的用途没有特别限制。本发明的抗体混合物例如可以用于诊断用途。作为诊断用途,可列举被检者的风险(即,有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度)的检测。即,在本发明的抗体混合物为通过利用本发明的分离方法等对由被检者得到的抗体进行分离而得的混合物的情况下,可以以得到本发明的抗体混合物时的抗体分离图谱的相关数据为指标来检测被检者的风险。另外,也可以将本发明的抗体混合物的糖链结构图谱作为指标来检测被检者的风险。

[0255] 实施例

[0256] 以下参照非限定性实施例来更具体地说明本发明。

[0257] 固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的制备

[0258] 实施例1FcR9的Val176氨基酸置换体的制作

[0259] 制作Fc结合性蛋白质,所述Fc结合性蛋白质相对于用W02015/199154号记载的方法制作的FcR9(序列号2)将Fc结合性蛋白质的第176位的缬氨酸(序列号1记载的氨基酸序号中第176位的Val)置换成了苯丙氨酸。具体而言,用PCR对含有编码FcR9的多核苷酸(序列号3)的质粒pET-FcR9(W02015/199154号)进行氨基酸置换,制作将FcR9中的Val176置换为苯丙氨酸的Fc结合性蛋白质。

[0260] 需要说明的是,FcR9(序列号2)为将序列号4所示的含有野生型Fc γ RIII胞外区域的Fc结合性蛋白质中第43位的Val置换为Glu(相当于序列号1中第27位)、将第45位的Phe置换为Ile(相当于序列号1中第29位)、将第51位的Tyr置换为Asn(相当于序列号1中第35位)、将第64位的Gln置换为Arg(相当于序列号1中第48位)、将第91位的Phe置换为Leu(相当于序列号1中第75位)、将第108位的Asn置换为Ser(相当于序列号1中第92位)、将第133位的Val置换为Glu(相当于序列号1中第117位)、将第137位的Glu置换为Gly(相当于序列号1中第121位)和将第187位的Phe置换为Ser(相当于序列号1中第171位)而成的Fc结合性蛋白质。

[0261] 以下对各Fc结合性蛋白质的制作方法进行详细说明。

[0262] (1) 为了将Fc结合性蛋白质的第176位的缬氨酸(序列号1记载的氨基酸序号中第176位的Val)置换为苯丙氨酸,以用W02015/199154号记载的方法制作的含有编码FcR9(序列号2)的多核苷酸(序列号3)的质粒pET-FcR9(W02015/199154号记载)为模板,使用由序列

号5 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') 和序列号6 (5'-CATTTTGTCTGCCGAACAGCCCACGGCAGG-3') 记载的序列构成的寡核苷酸引物制备与表1所示的组成相同的反应液后,将该反应液在95℃下热处理2分钟,将以95℃下30秒钟的第1步骤、50℃下30秒钟的第2步骤、72℃下90秒钟的第3步骤为1个循环的反应进行30个循环,最后在72℃下热处理7分钟,由此进行PCR。将得到的PCR产物设为V176p1。

[0263] [表1]

[0264] 表1

[0265]

组成	体积
模板DNA	2μL
10μM正向引物	1μL
10μM反向引物	1μL
5×PrimeSTAR缓冲液(宝生物制)	4μL
2.5mM dNTPs	2μL
2.5U/μL PrimeSTAR HS(宝生物制)	0.5μL
H ₂ O	定容至20μL

[0266] (2) 以用W02015/199154号记载的方法制作的含有编码FcR9(序列号2)的多核苷酸(序列号3)的质粒pET-FcR9(W02015/199154号中记载)为模板,使用由序列号7(5'-TATGCTAGTTATTGCTCAG-3')和序列号8(5'-cctgccgtgggctgTTCGGCAGCAAAAATG-3')记载的序列构成的寡核苷酸引物制备与表1所示的组成相同的反应液后,将该反应液在95℃下热处理2分钟,将以95℃下30秒钟的第1步骤、50℃下30秒钟的第2步骤、72℃下90秒钟的第3步骤为1个循环的反应进行30个循环,最后在72℃下热处理7分钟,由此进行PCR。将得到的PCR产物设为V176p2。

[0267] (3) 将(1)和(2)中得到的两种PCR产物(V176p1、V176p2)混合,制备表2所示的组成的反应液。将该反应液在98℃下热处理5分钟后,将以98℃下10秒钟的第1步骤、55℃下5秒钟的第2步骤、72℃下1分钟的第3步骤为1个循环的反应进行5个循环而进行PCR,得到V176p1和V176p2连接而成的PCR产物V176p。

[0268] [表2]

[0269] 表2

[0270]

组成	体积
PCR产物	各2μL
2.5U/μL PrimeSTAR HS(宝生物制)	0.5μL
5×PrimeSTAR缓冲液(宝生物制)	4μL
2.5mM dNTPs	2μL
H ₂ O	定容至20μL

[0271] (4) 以(3)中得到的PCR产物V176p为模板,将由序列号5和7记载的序列构成的寡核苷酸作为PCR引物而进行PCR。PCR中,在制备表3所示的组成的反应液后,将该反应液在98℃下热处理5分钟,将以98℃下10秒钟的第1步骤、55℃下5秒钟的第2步骤、72℃下1分钟的第3步骤为1个循环的反应进行30个循环。由此得到编码Fc结合性蛋白质(FcR9)的第176位的氨基酸被置换为苯丙氨酸的Fc结合性蛋白质的多核苷酸。将得到的多核苷酸设为V176p3。

[0272] [表3]

[0273] 表3

[0274]	组成	体积
	PCR产物	2 μ L
	10 μ M正向引物	2 μ L
	10 μ M反向引物	2 μ L
	5 $\times$ PrimeSTAR缓冲液(宝生物制)	10 μ L
	2.5mM dNTPs	4 μ L
	2.5U/ μ L PrimeSTAR HS(宝生物制)	1 μ L
	H ₂ O	定容至50 μ L

[0275] (5) 将(4)中得到的多核苷酸纯化后,用限制性内切酶NcoI和HindIII消化,连接于预先用限制性内切酶NcoI和HindIII消化过的表达载体pETMalE(日本特开2011-206046号公报),使用其转化大肠杆菌BL21(DE3)株(NIPPON GENE制)。

[0276] (6) 在添加有50 μ g/mL的卡那霉素的LB培养基中培养所得到的转化体。从回收的菌体(转化体)中提取质粒。

[0277] (7) 对于所得到的质粒的编码人Fc γ RIIIa的多核苷酸及其周边的区域,使用基于链终止子法的BigDye Terminator v3.1循环测序试剂盒(Life Technologies制)供于循环测序反应,利用全自动DNA测序仪Applied Biosystems 3130Genetic Analyzer(Life Technologies制)分析核苷酸序列。需要说明的是,在该分析时,使用由序列号5(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')或序列号7(5'-TATGCTAGTTATTGCTCAG-3')记载的序列构成的寡核苷酸作为测序用引物。序列分析的结果是,得到表达将Fc结合性蛋白质FcR9的Val176置换为Phe的Fc结合性蛋白质(序列号9)的转化体。

[0278] 实施例2添加有半胱氨酸标签的Fc结合性蛋白质(FcR9_F_Cys)的制作

[0279] (1) 将实施例1中制作的、含有编码序列号9记载的氨基酸序列的序列号10记载的多核苷酸的表达载体pET-FcR9_F作为模板来实施PCR。该PCR中的引物使用了由序列号11(5'-TAGCCATGGGCATGCGTACCGAAGATCTGCCGAAAGC-3')和序列号12(5'-CCCAAGCTTATCCGCAGGTATCGTTGCGGCACCCTTGGGTAATGGTAATATTCACGGTCTCGCTGC-3')记载的序列构成的寡核苷酸。如下所述地实施PCR:制备表3所示的组成的反应液后,将该反应液在98 $^{\circ}$ C下热处理5分钟,将以98 $^{\circ}$ C下10秒钟的第1步骤、55 $^{\circ}$ C下5秒钟的第2步骤、72 $^{\circ}$ C下1分钟的第3步骤为1个循环的反应重复进行30个循环,从而实施。

[0280] (2) 将(1)中得到的多核苷酸纯化,用限制性内切酶NcoI和HindIII消化后,连接于预先用限制性内切酶NcoI和HindIII消化过的通过W02015/199154号记载的方法制作的表达载体pTrc-PelBV3,使用该连接产物转化大肠杆菌W3110株。

[0281] (3) 在含有100 μ g/mL的羧苄青霉素的LB培养基中培养所得到的转化体后,用QIAprep Spin Miniprep kit(QIAGEN制)得到表达载体pTrc-FcR9_F_Cys。

[0282] (4) 关于pTrc-FcR9_F_Cys的核苷酸序列的分析,除了使用由序列号13(5'-TGTGGTATGGCTGTGCAGG-3')或序列号14(5'-TCGGCATGGGGTCAGGTG-3')记载的序列构成的寡核苷酸作为测序用引物以外通过与实施例1(7)相同的方法来进行。分别将表达载体pTrc-FcR9_F_Cys所表达的多肽的氨基酸序列示于序列号15,将编码该多肽的多核苷酸的序列示

于序列号16。需要说明的是,在序列号15中,第1位的甲硫氨酸(Met)至第22位的丙氨酸(Ala)为止为改良PelB信号肽,第24位的甘氨酸(Gly)至第199位的谷氨酰胺(Gln)为止为Fc结合性蛋白质的氨基酸序列(对应于序列号1的第17位至第192位为止的区域),第200位的甘氨酸(Gly)至第207位的甘氨酸(Gly)为止为半胱氨酸标签序列。

[0283] 实施例3FcR9_F_Cys的制备

[0284] (1) 将实施例2中制作的表达FcR9_F_Cys的转化体接种于添加到2L可拆式烧瓶的且含有100 μ g/mL的羧苄青霉素的400mL 2YT液体培养基(蛋白胨16g/L、酵母提取物10g/L、氯化钠5g/L),在37 $^{\circ}$ C下需氧振荡培养一晚,由此进行预培养。

[0285] (2) 向含有葡萄糖10g/L、酵母提取物20g/L、磷酸三钠十二水合物3g/L、磷酸氢二钠十二水合物9g/L、氯化铵1g/L和羧苄青霉素100mg/L的液体培养基1.8L中接种(1)的培养液180mL,用3L发酵罐(biot制)进行主培养。设定为温度30 $^{\circ}$ C、pH6.9至7.1、通气量1VVM、溶解氧浓度为30%饱和浓度的条件而开始主培养。pH控制中分别使用50%磷酸作为酸、使用14%氨水作为碱,溶解氧的控制通过改变搅拌速度来进行控制,搅拌转速的下限设为500rpm、上限设为1000rpm。培养开始后,在测不到葡萄糖浓度的时刻一边通过溶解氧(DO)进行控制一边加入流加培养基(葡萄糖248.9g/L、酵母提取物83.3g/L、硫酸镁七水合物7.2g/L)。

[0286] (3) 在作为菌体量的目标的、600nm的吸光度(OD600nm)达到约150时,将培养温度降低到25 $^{\circ}$ C,在确认达到设定温度后,添加IPTG且使终浓度达到0.5mM,接着继续在25 $^{\circ}$ C下培养。

[0287] (4) 在培养开始起约48小时后停止培养,对于培养液,通过在4 $^{\circ}$ C下以8000rpm离心分离20分钟而回收菌体。

[0288] (5) 将回收的菌体悬浮于20mM的Tris盐酸缓冲液(pH7.0)中且达到5mL/1g(菌体),使用超声波发生装置(Insonator 201M(商品名)、久保田商事制)在4 $^{\circ}$ C下以约150W的输出功率进行约10分钟的菌体破碎。将菌体破碎液进行2次在4 $^{\circ}$ C下、20分钟、8000rpm条件下的离心分离,回收上清。

[0289] (6) 将(5)中得到的上清以流速5mL/分钟上样到预先用20mM磷酸缓冲液(8mM磷酸二氢钠、12mM磷酸氢二钠)(pH7.0)平衡后的填充有140mL的TOYOPEARL CM-650M(东曹制)的VL32 $\times$ 250柱(默克密理博制)。以用于平衡的缓冲液洗涤后,用含有0.5M氯化钠的20mM的磷酸缓冲液(pH7.0)洗脱。

[0290] (7) 将(6)中得到的洗脱液上样到预先用含有150mM氯化钠的20mM的Tris盐酸缓冲液(pH7.4)平衡后的填充有IgG Sepharose(GE Healthcare制)90mL的XK26/20柱(GE Healthcare制)。以用于平衡的缓冲液洗涤后,用0.1M的甘氨酸盐酸缓冲液(pH3.0)洗脱。需要说明的是,通过加入洗脱液量的1/4量的1M Tris盐酸缓冲液(pH8.0)而使洗脱液的pH恢复到中性附近。

[0291] 通过上述纯化,得到高纯度的FcR9_F_Cys约20mg。

[0292] 实施例4固定有Fc结合性蛋白质(FcR9_F)的凝胶的制作和抗体的分离

[0293] (1) 将2mL的用作分离剂的亲水性乙烯基聚合物(东曹制:液相色谱用充填剂)表面的羟基用乙酰基碘活化后,使4mg实施例3中制备的FcR9_F_Cys进行反应,得到固定有FcR9_F的凝胶。

[0294] (2) 将(1)中制作的固定有FcR9_F的凝胶1.2mL填充于 $\phi 4.6\text{mm} \times 75\text{mm}$ 的不锈钢柱,制作FcR9_F柱。

[0295] (3) 将(2)中制作的FcR9_F柱连接于高效液相色谱装置(东曹制),用含有50mM氯化钠的20mM乙酸缓冲液(pH5.5)的平衡缓冲液进行平衡。

[0296] (4) 以流速0.6mL/分钟添加5 μL 用PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH7.4) 稀释为1.0mg/mL的单克隆抗体(利妥昔、全药工业制、小鼠与人的嵌合抗体)。

[0297] (5) 以保持流速0.6mL/分钟状态用平衡缓冲液洗涤2分钟后,用由10mM的甘氨酸盐酸缓冲液(pH3.0)形成的pH梯度(用28分钟使10mM的甘氨酸盐酸缓冲液(pH3.0)达到100%的梯度)洗脱所吸附的单克隆抗体。

[0298] 将结果(洗脱图谱)示于图1。单克隆抗体与Fc结合性蛋白质相互作用,因此不是如凝胶过滤色谱那样的单个峰,而是分离为多个峰。将洗脱时间最短的峰设为峰A,将洗脱时间第3慢的峰设为峰B。

[0299] 实施例5使用固定有Fc结合性蛋白质(FcR9_F)的凝胶分离人源抗体

[0300] 使用人源 γ 球蛋白制剂(化学及血清疗法研究所制)作为抗体,除此以外与实施例4同样地实施,将人源 γ 球蛋白制剂的分离图谱示于图2。得到了不同于实施例4的单克隆抗体(利妥昔)的分离结果(图1)的分离图谱。

[0301] 另外,通过对作为人源抗体的特征性分离峰的、图2的峰C和峰D进行反复制备,从而制备了各级分所含的人源抗体。

[0302] 实施例6单克隆抗体的糖链结构分析

[0303] 通过与日本特开2016-169197号记载的方法相同的方法,对实施例4中分离出的峰A和峰B级分中所含的抗体所具有的糖链实施结构分析。将结果示于图3和表4。Man表示甘露糖,GlcNAc表示N-乙酰基葡萄糖胺,Gal表示半乳糖,Fuc表示岩藻糖、NeuAc表示N-乙酰基神经氨酸。

[0304] [表4]

[0305] 表4

[0306]	图3中的缩写	峰 A (组成比例 %)	峰 B (组成比例 %)
	Man5	1.2	未检出
	G0	5.9	3.0
	G0F	64.2	16.4
	G1Fa	15.4	57.6
	G1Fb	9.9	3.6
	G2F	1.7	12.7
	G1F+SA	0.2	0.9
	G2F+SA	0.3	2.9
	G2F+2SA	未检出	1.6

[0307] 实施例7人源抗体的糖链结构分析

[0308] 与实施例6同样地对实施例5中制备的峰C和峰D的级分所含的抗体所具有的糖链实施结构分析,将峰C和峰D的级分所含的抗体所具有的糖链的结构分析结果示于图4和表5。

[0309] [表5]

[0310] 表5

[0311]

图4中的缩写	峰 C (组成比例 %)	峰 D (组成比例 %)
G0	0.4	0.6
G0F	48.4	8.1
G1/G0F+GN	8.2	3.6
G1Fa	9.9	17.5
G1Fb	12.7	3.6
G1F+GN	2.1	4.1
G2	未检出	2.9
G2F	5.8	18.1
G1F+SA	1.2	1.9
G2F+SA	2.6	23.6
G2F+2SA	1.2	3.2
G2F+GN	0.9	1.8
S1	0.8	未检出
S2	2.5	2.3
S3	1.5	2.4
G2+SA	未检出	3.2
G2+2SA	未检出	0.8

[0312] 由实施例6和实施例7的结果可知,通过使用填充有固定有Fc结合性蛋白质的凝胶的FcR柱,半乳糖的有无有助于抗体的分离(表3的关于G0F的峰A和B的组成比例的比较,同样地G1F与G2F的比较。缩写G与F之间的数字表示半乳糖的数量),另外,同样地通过唾液酸的有无而分离了抗体。而且,由图3与图4的比较可知,人源 γ 球蛋白与作为市售抗体药品的小鼠嵌合抗体的利妥昔不同,其具有人特有的糖链结构。这些人特有的糖链结构中,具有添加了唾液酸的糖链结构的抗体可成为特定疾病的指标,因此通过利用本发明的方法能够实现疾病的简便测定、基于与健康人的比较而在早期发现异常、罹患患者的预后管理等。

[0313] 实施例8使用固定有Fc结合性蛋白质(FcR9_F)的凝胶对源自不同年龄的人源抗体进行分离

[0314] (1) 从得到知情同意的健康人采集血液。将健康人的年龄和性别示于以下。

[0315] (A被检体) 36岁、女性

[0316] (B被检体) 44岁、女性

[0317] (C被检体) 55岁、女性

[0318] (2) 对于将(1)中采集的血液离心而得到的血清,用在固相上固定有蛋白G的 γ 球蛋白G纯化试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司制)纯化 γ 球蛋白。

[0319] (3) 使用(2)中得到的 γ 球蛋白,作为洗脱条件在保持流速为0.6mL/分钟状态下用平衡缓冲液洗涤5分钟后,用由10mM的甘氨酸盐酸缓冲液(pH3.0)形成的pH梯度(用30分钟使10mM的甘氨酸盐酸缓冲液(pH3.0)达到100%的梯度)将吸附的 γ 球蛋白洗脱,除此之外通过与实施例4相同的方法得到 γ 球蛋白的分离图谱。

[0320] (4) 对于(3)中得到的分离图谱,按照从施加pH梯度起洗脱时间短的峰顺序而定义为第1峰、第2峰、第3峰、第4峰,将该第3峰的检测值设为1而标准化。

[0321] 将实施例8的结果示于图5。可知:由于与A被检体相比B被检体和C被检体的年龄依次增加,早洗脱出的 γ 球蛋白的比例也增加。可知与A被检体和B被检体相比,C被检体中第1峰和第2峰的峰面积%尤其增大。洗脱时间长的 γ 球蛋白的比例多这一点意味着该 γ 球蛋白与自然杀伤细胞和单核细胞、巨噬细胞的结合能力强,可以促进该细胞的活化。另一方面,洗脱时间短的 γ 球蛋白的比例多的情况下,上述细胞得不到充分活化,受上述细胞活性的影响的疾病的发病风险提高。作为这样的疾病,可列举例如由病毒、细菌等引起的感染症、癌症、变态反应、炎症疾病等。从实施例8的 γ 球蛋白的分离图谱的变动可知,该发病风险会随着年龄的增加而提高。

[0322] 实施例9使用固定有Fc结合性蛋白质的凝胶对源自不同年龄的人源抗体进行分离

[0323] (1) 从得到知情同意的健康人采集血液。将健康人的年龄阶段和被检体数示于以下。

[0324] 18-29岁:23个被检体

[0325] 30-39岁:21个被检体

[0326] 40-49岁:21个被检体

[0327] 50-59岁:24个被检体

[0328] 60-75岁:15个被检体

[0329] (2) 将对(1)中采集的血液进行离心而得到的血清用PBS稀释10倍后,使其通过孔径 $0.2\mu\text{m}$ 的过滤器(Merck Millipore公司制),从而制备测定样品。

[0330] (3) 以流速 0.6mL/分钟 添加 $10\mu\text{L}$ 的(2)中得到的测定样品,除此以外通过与实施例8的(3)相同的方法得到 γ 球蛋白的分离图谱。

[0331] (4) 对于(3)中得到的分离图谱,按照从施加pH梯度起洗脱时间短的峰顺序而定义为第1峰、第2峰、第3峰、第4峰,将该第1峰的面积值除以从施加pH梯度起至施加结束为止的总面积值而得到的值作为第1峰面积%。

[0332] 将实施例9的结果示于图6。可知:第1峰面积%的值随着与小于50岁的被检体相比50多岁的被检体和60岁以上的被检体的年龄依次增加这一点而显著提高,越早洗脱的 γ 球蛋白的比例越增加。另外还获知,在小于50岁的被检体中,虽然比例低但也存在第1峰面积%的值高的被检体。整体评价的情况下,该结果意味着免疫活性随着衰老而降低,另外对于个体进行评价的情况下,表示即使是年轻人免疫活性也可能降低。

[0333] 实施例10源自癌症患者的 γ 球蛋白的分离

[0334] 使用从得到知情同意的健康人和胰腺癌、胃癌、乳癌患者中采集的血液,除此以外通过与实施例9相同的方法分离 γ 球蛋白,求出第1峰面积%。

[0335] 实施例11源自自身免疫疾病患者的 γ 球蛋白的分离

[0336] 使用从得到知情同意的风湿病、干燥综合征患者采集的血液,除此以外通过与实施例9相同的方法分离 γ 球蛋白,求出第1峰面积%。

[0337] 将实施例10、11的结果分别示于图7、8。与健康人的被检体相比,胰腺癌(图7的图片a)、胃癌(图7的图片b)、乳癌(图7的图片c)、风湿病(图8的图片a)、干燥综合征(图8的图片b)的患者的第1峰面积%的值显著提高。另外获知,对于癌症疾病而言,第1峰面积%的值

还随着疾病分期而提高。需要说明的是,上述病期是指抗癌联盟(UICC)所规定的疾病分期。该结果意味着:癌症疾病和自身免疫疾病患者的、与Fc结合性蛋白质有关的免疫活性是降低的,特别是癌症疾病,第1峰面积%显著提高,可知免疫活性大幅降低。我们认为,对于癌症疾病或自身免疫疾病而言,上述免疫活性的降低或者为发病的原因,或者是由于发病而使上述免疫活性降低。由于被检体的第1峰面积%的值在健康人与疾病被检体之间是不同的,因此能够用于疾病的诊断,另外,在癌症疾病中第1峰面积%的值还根据疾病分期而变化,因此也可以用于癌症的进展、恶性度的评价。

[0338] 实施例12用年龄进行了校正的、源自癌症患者的 γ 球蛋白的分离评价

[0339] (1) 使用从得到了知情同意的肾癌、大肠癌患者采集的血液,除此以外通过与实施例9相同的方法分离 γ 球蛋白,求出第1峰面积%。

[0340] (2) 通过多项式近似求出在实施例9的健康人被检体的测定中得到的第1峰面积%与年龄的相关曲线,将被检体的各年龄导入到该相关曲线的该式子中,计算由此而导出的值,作为校正值。

[0341] (3) 从实施例9的健康人、实施例10的胰腺癌和通过(1)而求出的第1峰面积%减去通过(2)而算出的值,从而求出校正第1峰面积%。

[0342] 将实施例12的结果示于图9。以校正第1峰面积%为基础对健康人的被检体与胰腺癌、肾癌、大肠癌进行比较,则与健康人相比,校正第1峰面积%显著增加,其中,所述校正第1峰面积%为对随着衰老而增加的第1峰面积%进行校正而得到的。与以未经校正的第1峰面积%为基础比较健康人的被检体与胰腺癌的实施例10所观察到的、第1峰面积%显著增加同样地,利用校正第1峰面积%时也确认到增加,因此可知,即使不进行考虑了年龄的校正,健康人与癌症患者之间也可以确认到IgG分离图谱的差异。

[0343] 实施例13源自胰腺癌和胰腺炎患者的 γ 球蛋白的分离评价

[0344] (1) 使用由得到了知情同意的胰腺癌、胰腺炎患者采集的血液,除此以外通过与实施例9的(2)和(3)相同的方法分离 γ 球蛋白。

[0345] (2) 对于(1)中得到的分离图谱,按照从施加pH梯度起洗脱时间短的峰顺序而定义为第1峰、第2峰、第3峰,将该第1峰的面积值除以从施加pH梯度起至施加结束为止的总面积值而得到的值作为第1峰面积%,通过与实施例12的(2)和(3)相同的方法求出校正第1峰面积%,另外还求出第3峰的面积。

[0346] 将实施例13的结果示于图10。图10的框(a)中,与胰腺癌患者被检体相比,胰腺炎患者的校正第1峰面积%的值显著降低。另外,与实施例12的健康人被检体相比,胰腺炎患者的校正第1峰面积%为几乎相同的值,可知健康人在仅达到胰腺炎程度时校正第1峰面积%的值没有变化。通过校正第1峰面积%以由ROC曲线求出的AUC值评价胰腺癌与胰腺炎的识别性,为0.83。另一方面,图10的框(b)中,若比较第3峰面积,则与胰腺癌患者被检体相比,胰腺炎患者的值显著增加。通过第3峰面积以由ROC曲线求出的AUC值评价胰腺癌与胰腺炎的识别性时,为1.00,与利用校正第1峰面积%进行的评价来识别胰脏病变时,能够高精度地区分是否为恶性肿瘤。

[0347] 实施例14源自吸烟·不吸烟的健康人的 γ 球蛋白的分离评价

[0348] 使用由得到了知情同意的吸烟和不吸烟的健康人采集的血液,除此以外通过与实施例12相同的方法分离 γ 球蛋白,求出校正第1峰面积%。

[0349] 将实施例14的结果示于图11。与不吸烟的健康人相比,吸烟的健康人的校正第1峰面积%的值显著增加。校正第1峰面积%的值的增加与实施例12中由癌症患者检测到的倾向相同,可知吸烟提高了罹患癌症的风险。

[0350] 实施例15使用固定有不同的Fc结合性蛋白质(FcR9_F或FcR9_V)的凝胶的、源自不同年龄的人的抗体的分离

[0351] (1) 使用分别将表达的多肽的氨基酸序列示于序列号17、将编码该多肽的多核苷酸的序列示于序列号18的表达载体,除此以外使用与实施例3相同的方法来制备添加了半胱氨酸标签的Fc结合性蛋白质(FcR9_V_Cys)。

[0352] (2) 使用(1)中制备的Fc结合性蛋白质,除此以外通过与实施例4的(1)至(2)相同的方法制作FcR9_V柱。

[0353] (3) 从得到了知情同意的健康人采集血液。将健康人的年龄和性别示于以下。

[0354] (健康人A) 21岁、男性

[0355] (健康人B) 26岁、男性

[0356] (健康人C) 36岁、男性

[0357] (健康人D) 47岁、男性

[0358] (4) 使用FcR9_F柱或FcR9_V柱作为柱,除此以外通过与实施例8的(2)和(3)相同的方法得到 γ 球蛋白的分离图谱。

[0359] (5) 对于(4)中得到的分离图谱,按照从施加pH梯度起洗脱时间短的峰顺序而定义为第1峰、第2峰、第3峰,将该第1峰的面积值除以从施加pH梯度起至施加结束为止的总面积值而得到的值作为第1峰面积%。另外,将该第1峰的高度除以各峰的高度的合计值而得到的值作为第1峰高度%。

[0360] 将实施例15的结果示于图12。图12的框(a)为示出用FcR9_F柱或FcR9_V柱测定的健康人被检体的测定值的图。由该图可知,随着衰老,第1峰高度%的值会逐渐增加,另外,即使使用填充有固定有氨基酸序列不同的两种Fc结合性蛋白质的不溶性载体的柱,也得到了随着衰老的、第1峰高度%逐渐增加的相同倾向。由该结果可知,即使不是所规定的氨基酸序列,只要为Fc结合性蛋白质就能够检测疾病、疾病的发病风险和/或疾病的进展程度、衰老的进展程度。另外,图12的框(b)分别示出了作为用FcR9_V柱测定而得的健康人被检体的测定值的第1峰面积%和第1峰高度%。若分别比较该面积%和该高度%,则两者的值都随着衰老而增加,可知使用任一值都能够正确地进行评价。

[0361] 产业上的可利用性

[0362] 根据本发明,可以基于糖链结构的差异来分离抗体。另外,根据本发明的一方式,可以以抗体的分离图谱的特征为指标来检测被检者有无疾病、疾病的发病风险、疾病的进展程度、和/或衰老的进展程度。

序列表

<110> 东曹株式会社 (TOSOH corporation)

<120> 抗体的分离方法和疾病的检查方法

<130> 2180038-9203

<150> JP2019-015596

<151> 2019-01-31

<150> JP2018-116611

<151> 2018-06-20

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 254

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Trp Gln Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1           5           10           15
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
          20           25           30
Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
          35           40           45
Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
          50           55           60
Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65           70           75           80
Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
          85           90           95
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
          100          105          110
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
          115          120          125
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
          130          135          140
Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
145          150          155          160
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
          165          170          175
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln

```

			180				185				190					
Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Phe	Phe	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln	
			195				200				205					
Val	Ser	Phe	Cys	Leu	Val	Met	Val	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Thr	Gly	
			210				215				220					
Leu	Tyr	Phe	Ser	Val	Lys	Thr	Asn	Ile	Arg	Ser	Ser	Thr	Arg	Asp	Trp	
225							230				235				240	
Lys	Asp	His	Lys	Phe	Lys	Trp	Arg	Lys	Asp	Pro	Gln	Asp	Lys			
			245				250									
<210> 2																
<211> 216																
<212> PRT																
<213> 人工序列(Artificial sequence)																
<220>																
<223> FcR9																
<400> 2																
Met	Lys	Ile	Lys	Thr	Gly	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Thr	
1				5				10				15				
Thr	Met	Met	Phe	Ser	Ala	Ser	Ala	Leu	Ala	Lys	Ile	Glu	Glu	Ala	Met	
			20				25				30					
Gly	Met	Arg	Thr	Glu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Ile	Leu	Glu	Pro	
			35				40				45					
Gln	Trp	Asn	Arg	Val	Leu	Glu	Lys	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Lys	Cys	Arg	
			50				55				60					
Gly	Ala	Tyr	Ser	Pro	Glu	Asp	Asn	Ser	Thr	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Glu	
65				70				75				80				
Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ile	Asp	Ala	Ala	Thr	
			85				90				95					
Val	Asp	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Thr	Ser	Leu	Ser	Thr	Leu	
			100				105				110					
Ser	Asp	Pro	Val	Gln	Leu	Glu	Val	His	Ile	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Gln	
			115				120				125					
Ala	Pro	Arg	Trp	Glu	Phe	Lys	Glu	Gly	Asp	Pro	Ile	His	Leu	Arg	Cys	
130							135				140					
His	Ser	Trp	Lys	Asn	Thr	Ala	Leu	His	Lys	Val	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asn	
145			150				155				160					
Gly	Lys	Gly	Arg	Lys	Tyr	Phe	His	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Tyr	Ile	Pro	
			165				170				175					
Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Ser	Cys	Arg	Gly	Leu	Val	

	180		185		190	
Gly	Ser	Lys	Asn	Val	Ser	Ser
			Glu	Thr	Val	Asn
				Ile	Thr	Ile
					Thr	Gln
	195		200		205	
Gly	Gly	His	His	His	His	His
	210		215			
<210> 3						
<211> 648						
<212> DNA						
<213> 人工序列 (Artificial sequence)						
<220>						
<223> 编码 FcR9的多核苷酸						
<400> 3						
atgaaaataa	aaacaggtgc	acgcatactc	gcattatccg	cattaacgac	gatgatgttt	60
tccgcctcgg	ctctcgccaa	aatcgaagaa	gccatgggca	tgcgtaccga	agatctgccg	120
aaagcggagg	tgattctgga	accgcagtgg	aatcgcgtgc	tggagaaaga	ttctgtgacc	180
cttaaagtcc	ggggcgcgta	tagccccgaa	gataacagca	cccagtgggt	ccacaatgaa	240
agcctgattt	ccagccaggc	gagcagctac	cttattgatg	cggcgacggt	ggatgatagc	300
ggcgaatatc	gttgccagac	cagcctgagc	accctgagcg	atccggtgca	gctggaggtg	360
cacatcggtt	ggcttctgtt	acaggctcca	cgggtgggagt	tcaaagaggg	ggatccgatt	420
catctgcggt	gtcactcctg	gaagaatacc	gccctgcata	aagtgacctt	cctgcaaaac	480
ggcaagggcc	gcaagtattt	ccaccacaac	tccgacttct	atattcccaa	agcgacgctg	540
aaggacagcg	gcagctattc	ctgccgtggg	ctgggtgggca	gcaaaaatgt	gagcagcgag	600
accgtgaata	ttaccattac	ccaagggggc	catcatcatc	atcatcat		648
<210> 4						
<211> 216						
<212> PRT						
<213> 人工序列 (Artificial sequence)						
<220>						
<223> MalE-CD16a-6His						
<400> 4						
Met	Lys	Ile	Lys	Thr	Gly	Ala
					Arg	Ile
					Leu	Ala
					Leu	Ser
					Ala	Leu
					Thr	
1			5			10
						15
Thr	Met	Met	Phe	Ser	Ala	Ser
					Ala	Leu
					Ala	Lys
					Ile	Glu
					Glu	Ala
					Met	
			20			25
						30
Gly	Met	Arg	Thr	Glu	Asp	Leu
					Pro	Lys
					Ala	Val
					Val	Phe
					Leu	Glu
					Pro	
			35			40
						45
Gln	Trp	Tyr	Arg	Val	Leu	Glu
					Lys	Asp
					Ser	Val
					Thr	Leu
					Lys	Cys
					Gln	
			50			55
						60
Gly	Ala	Tyr	Ser	Pro	Glu	Asp
					Asn	Ser
					Thr	Gln
					Trp	Phe
					His	Asn
					Glu	

65	70	75	80
Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr			
	85	90	95
Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu			
	100	105	110
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln			
	115	120	125
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys			
	130	135	140
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn			
145	150	155	160
Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro			
	165	170	175
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val			
	180	185	190
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln			
	195	200	205
Gly Gly His His His His His His			
	210	215	

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 5

taatacgact cactataggg 20

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 6

catttttgcg gccgaacagc ccacggcagg 30

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 7

tatgctagtt attgctcag 19

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 8

cctgccgtgg gctgttcggc agcaaaaatg 30

<210> 9

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> FcR9_F

<400> 9

Met	Lys	Ile	Lys	Thr	Gly	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Thr
1				5					10					15	
Thr	Met	Met	Phe	Ser	Ala	Ser	Ala	Leu	Ala	Lys	Ile	Glu	Glu	Ala	Met
			20					25						30	
Gly	Met	Arg	Thr	Glu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Ile	Leu	Glu	Pro
			35					40						45	
Gln	Trp	Asn	Arg	Val	Leu	Glu	Lys	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Lys	Cys	Arg
			50					55						60	
Gly	Ala	Tyr	Ser	Pro	Glu	Asp	Asn	Ser	Thr	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Glu
65					70					75					80
Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ile	Asp	Ala	Ala	Thr
					85					90					95
Val	Asp	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Thr	Ser	Leu	Ser	Thr	Leu
					100					105					110
Ser	Asp	Pro	Val	Gln	Leu	Glu	Val	His	Ile	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Gln
					115					120					125
Ala	Pro	Arg	Trp	Glu	Phe	Lys	Glu	Gly	Asp	Pro	Ile	His	Leu	Arg	Cys
					130					135					140
His	Ser	Trp	Lys	Asn	Thr	Ala	Leu	His	Lys	Val	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asn
145						150									160

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
 165 170 175
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Ser Cys Arg Gly Leu Phe
 180 185 190
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 195 200 205
 Gly Gly His His His His His His
 210 215

<210> 10

<211> 648

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 编码FcR9_F的多核苷酸

<400> 10

atgaaaataa aaacaggtgc acgcatcctc gcattatccg cattaacgac gatgatgttt 60
 tccgcctcgg ctctcgccaa aatcgaagaa gccatgggca tgcgtaccga agatctgccg 120
 aaagcggagg tgattctgga accgcagtgg aatcgcgtgc tggagaaaga ttctgtgacc 180
 cttaaagtcc ggggcgcgta tagcccgga gataacagca cccagtgggt ccacaatgaa 240
 agcctgattt ccagccaggc gagcagctac cttattgatg cggcgacggg ggatgatagc 300
 ggcgaatata gttgccagac cagcctgagc accctgagcg atccggtgca gctggaggtg 360
 cacatcgggg ggcttctgtt acaggctcca cgggtgggagt tcaaagaggg ggatccgatt 420
 catctgcggg gtcactcctg gaagaatacc gccctgcata aagtgacct cctgcaaaac 480
 ggcaagggcc gcaagtattt ccaccacaac tccgacttct atattcccaa agcgacgctg 540
 aaggacagcg gcagctattc ctgccgtggg ctgttcggca gcaaaaatgt gagcagcgag 600
 accgtgaata ttaccattac ccaagggggc catcatcatc atcatcat 648

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 11

tagccatggg catgcgtacc gaagatctgc cgaaagc 37

<210> 12

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 12

cccaagctta tccgcaggta tcgttgccgc acccttgggt aatggtaata ttcacgtct 60
cgctgc 66

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 13

tgtggatatgg ctgtgcagg 19

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 14

tcggcatggg gtcagggtg 18

<210> 15

<211> 207

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> FcR9_F_Cys

<400> 15

Met	Lys	Tyr	Leu	Leu	Ser	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala
1				5					10				15	
Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Met	Gly	Met	Arg	Thr	Glu	Asp	Leu	Pro
			20				25						30	
Ala	Glu	Val	Ile	Leu	Glu	Pro	Gln	Trp	Asn	Arg	Val	Leu	Glu	Lys
			35				40						45	
Ser	Val	Thr	Leu	Lys	Cys	Arg	Gly	Ala	Tyr	Ser	Pro	Glu	Asp	Asn
			50				55						60	
Thr	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Glu	Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser
65					70					75				80
Tyr	Leu	Ile	Asp	Ala	Ala	Thr	Val	Asp	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg
					85					90				95

Gln Thr Ser Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His		
100	105	110
Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Glu Phe Lys Glu Gly		
115	120	125
Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His		
130	135	140
Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His		
145	150	155
Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser		
165	170	175
Tyr Ser Cys Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr		
180	185	190
Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Cys Arg Asn Asp Thr Cys Gly		
195	200	205

<210> 16

<211> 621

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 编码FcR9_F_Cys的多核苷酸

<400> 16

```

atgaaatacc tgctgtcgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60
atggccatgg gcatgcgtac cgaagatctg ccgaaagcgg aggtgattct ggaaccgcag 120
tggaatcgcg tgctggagaa agattctgtg acccttaaat gccggggcgc gtatagccccg 180
gaagataaca gcacccagtg gttccacaat gaaagcctga tttccagcca ggcgagcagc 240
taccttattg atgcggcgac ggtggatgat agcggcgaat atcgttgccg gaccagcctg 300
agcaccctga gcatccggt gcagctggag gtgcacatcg ggtggcttct gttacaggct 360
ccacgggtggg agttcaaaga gggggatccg attcatctgc ggtgtcactc ctggaagaat 420
accgccctgc ataaagtac ctacctgcaa aacggcaagg gccgcaagta tttccaccac 480
aactccgact tctatatattcc caaagcgacg ctgaaggaca gcggcagcta ttctgccgt 540
gggctgttcg gcagcaaaaa tgtgagcagc gagaccgtga atattacat tacccaaggg 600
tgccgcaacg atacttgagg a 621

```

<210> 17

<211> 207

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> FcR9_V_Cys

<400> 17

Met Lys Tyr Leu Leu Ser Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys
 20 25 30
 Ala Glu Val Ile Leu Glu Pro Gln Trp Asn Arg Val Leu Glu Lys Asp
 35 40 45
 Ser Val Thr Leu Lys Cys Arg Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser
 50 55 60
 Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser
 65 70 75 80
 Tyr Leu Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys
 85 90 95
 Gln Thr Ser Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His
 100 105 110
 Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Glu Phe Lys Glu Gly
 115 120 125
 Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His
 130 135 140
 Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His
 145 150 155 160
 Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser
 165 170 175
 Tyr Ser Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr
 180 185 190
 Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Cys Arg Asn Asp Thr Cys Gly
 195 200 205

<210> 18

<211> 621

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 编码FcR9_V_Cys的多核苷酸

<400> 18

atgaaataacc tgctgtcgac cgtgtgtgt ggtctgtgtc tcctcgctgc ccagccggcg 60
 atggccatgg gcatgcgtac cgaagatctg ccgaaagcgg aggtgattct ggaaccgcag 120
 tggaatcgcg tgctggagaa agattctgtg acccttaaat gccggggcgc gtatagcccc 180
 gaagataaca gcacccagtg gttccacaat gaaagcctga tttccagcca ggcgagcagc 240
 taccttattg atgcggcgac ggtggatgat agcggcgaat atcgttgcca gaccagcctg 300
 agcaccctga gcgatccggt gcagctggag gtgcacatcg ggtggcttct gttacaggct 360

```
ccacggtggg agttcaaaga gggggatccg attcatctgc ggtgtcactc ctggaagaat 420
accgccctgc ataaagtgac ctacctgcaa aacggcaagg gccgcaagta tttccaccac 480
aactccgact tctatattcc caaagcgacg ctgaaggaca gcggcagcta ttcctgccgt 540
gggctggtgg gcagcaaaaa tgtgagcagc gagaccgtga atattacat tacccaagg 600
tgccgcaacg atacttgcgg a 621
```

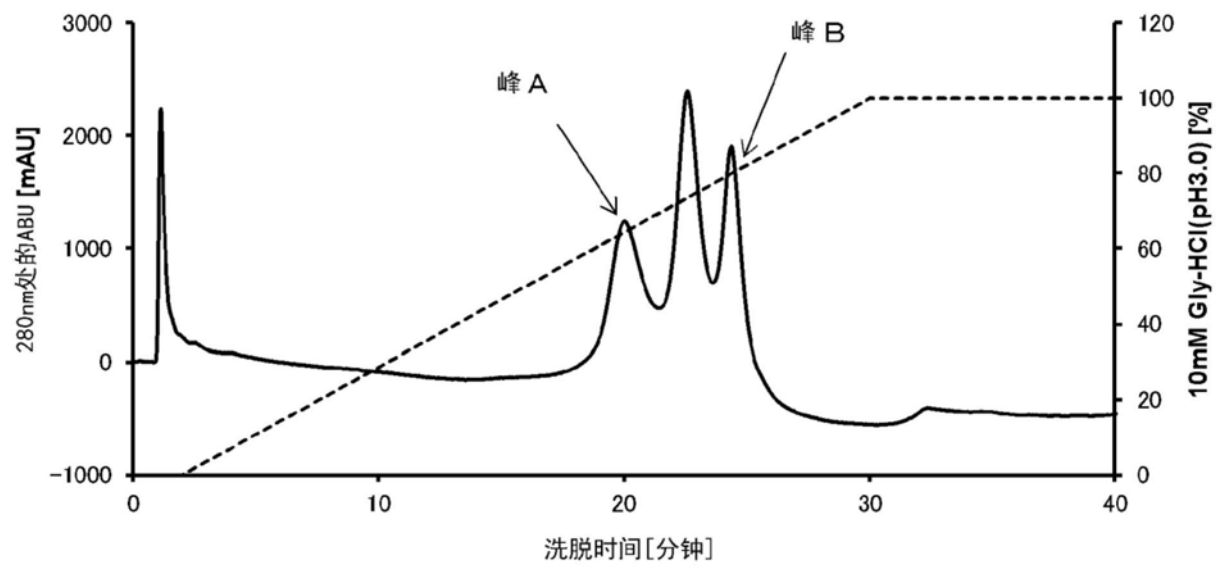


图1

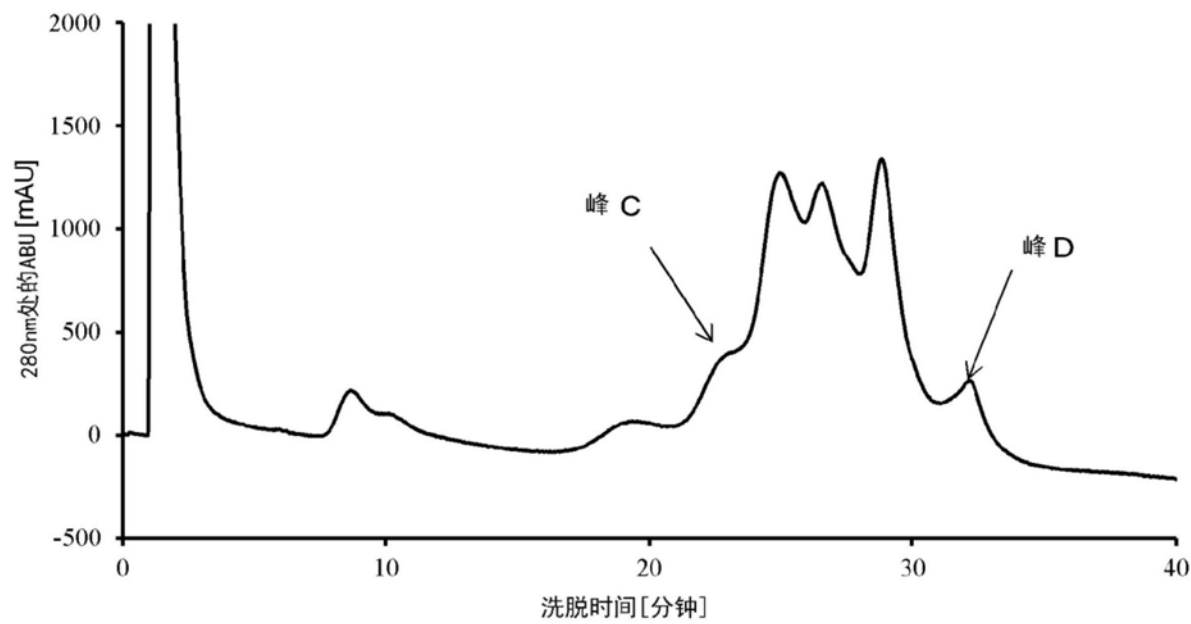


图2

缩写	糖链结构
Man5	
G0	
G0F	
G1Fa	
G1Fb	
G2F	
G1F+SA	
G2F+SA	
G2F+2SA	

图3

缩写	糖链结构	缩写	糖链结构
G0		G1F+ SA	
G0F		G2F+ SA	
G1		G2F+ 2SA	
G0F+ GN		G2F+ GN	
G1Fa		S1	
G1Fb		S2	
G1F+ GN		S3	
G2		G2+ SA	
G2F		G2+ 2SA	

图4

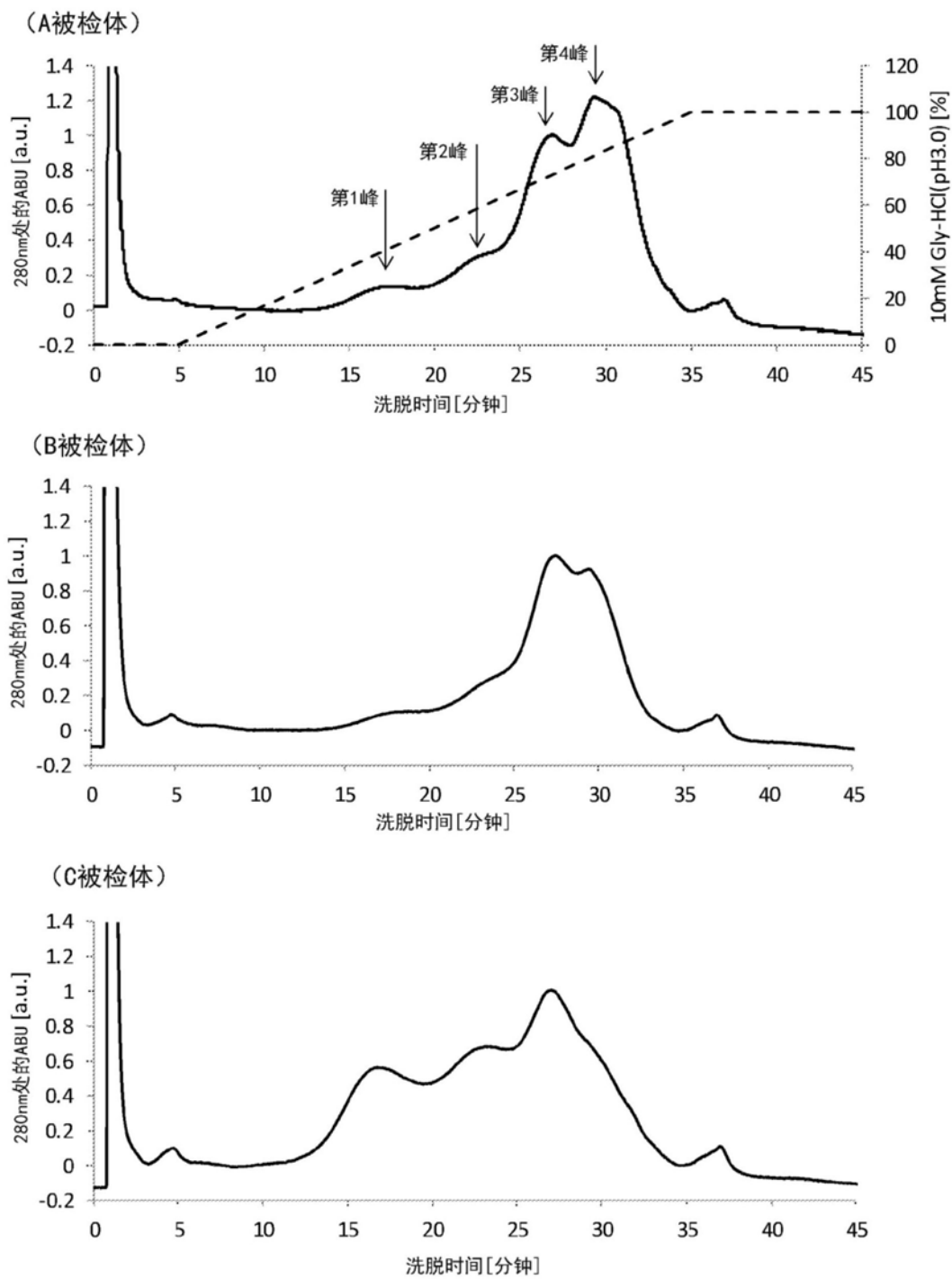


图5

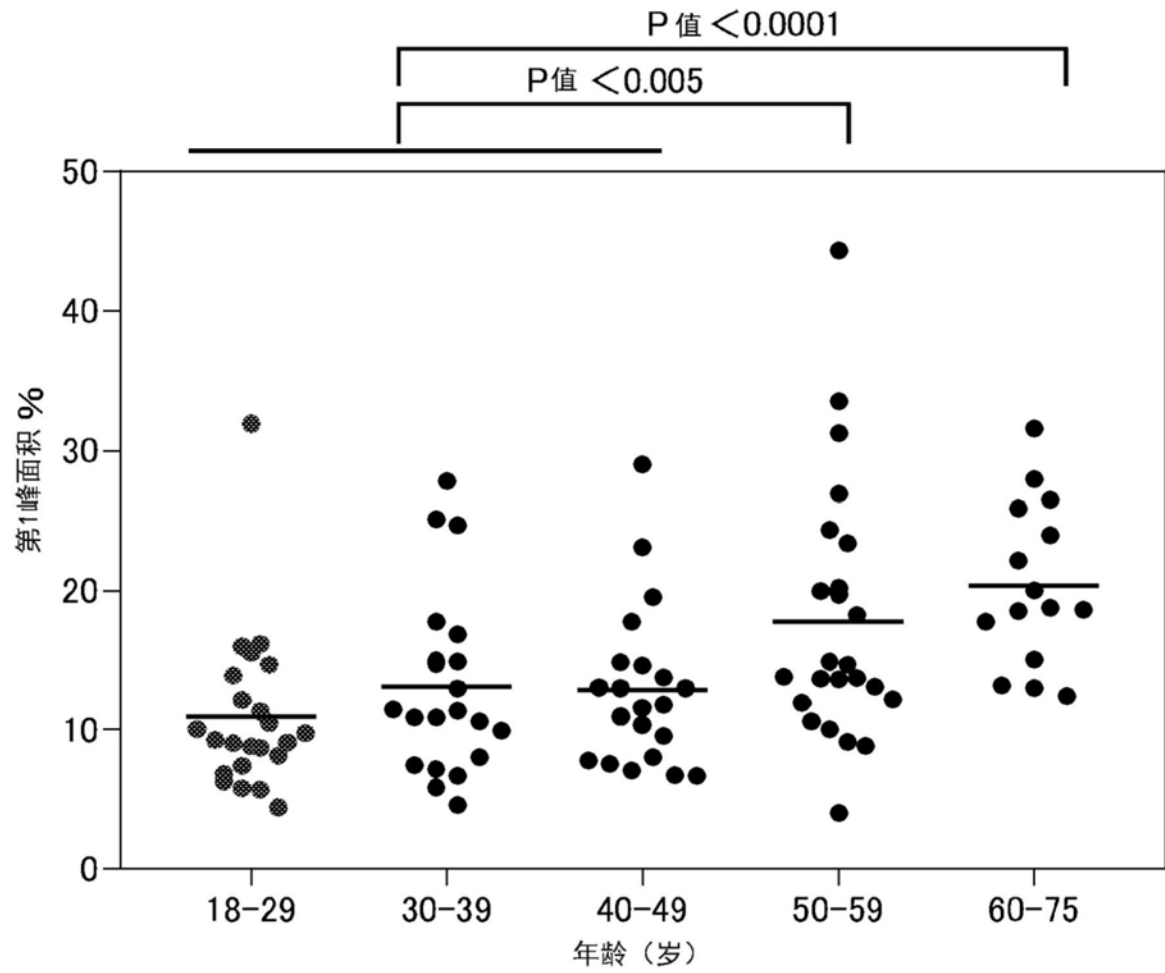


图6

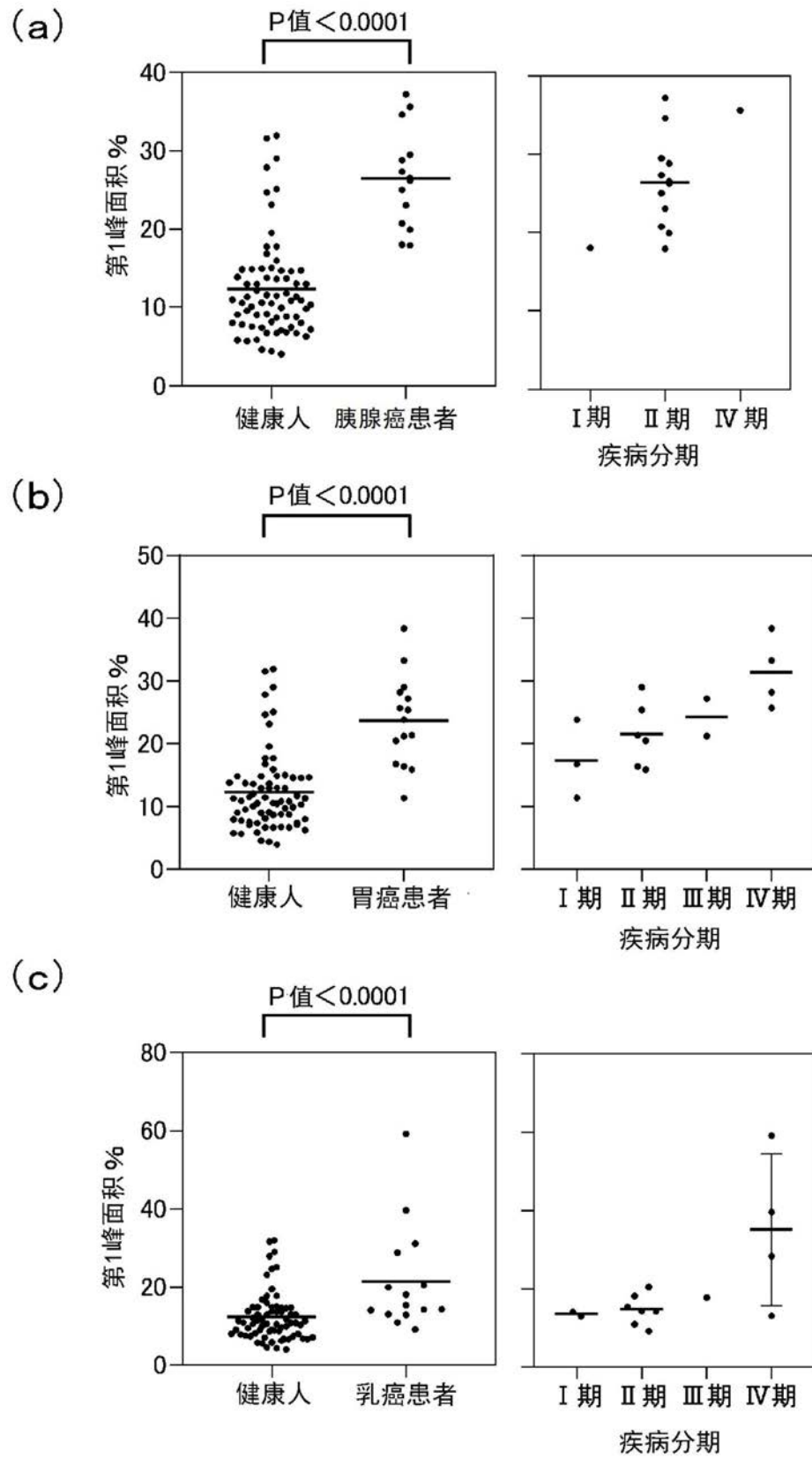


图7

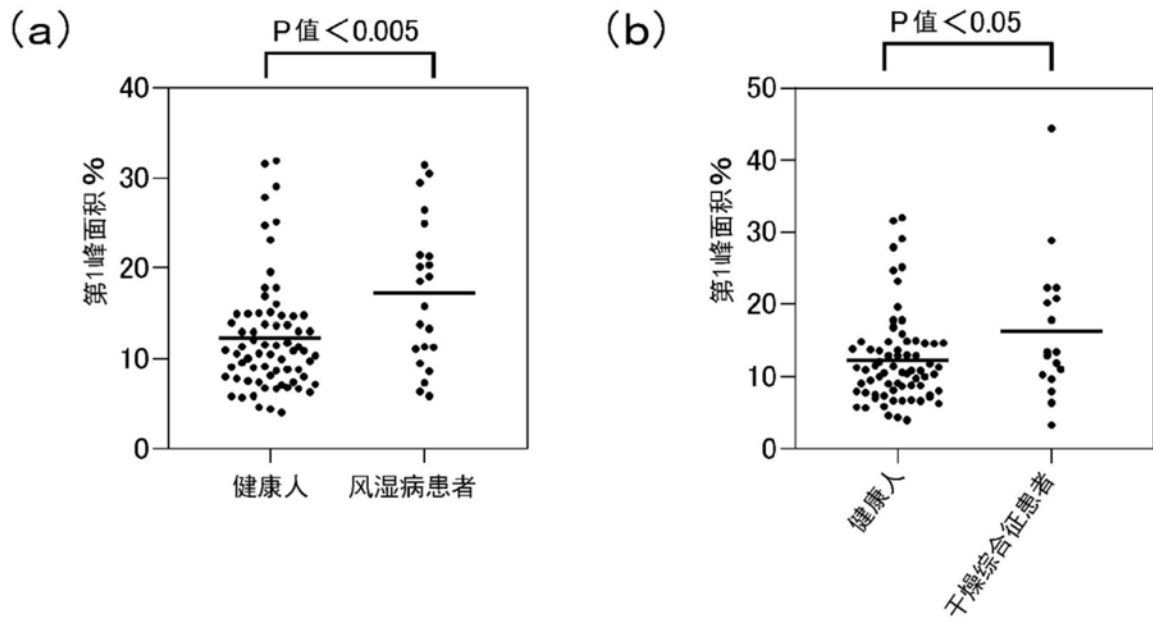


图8

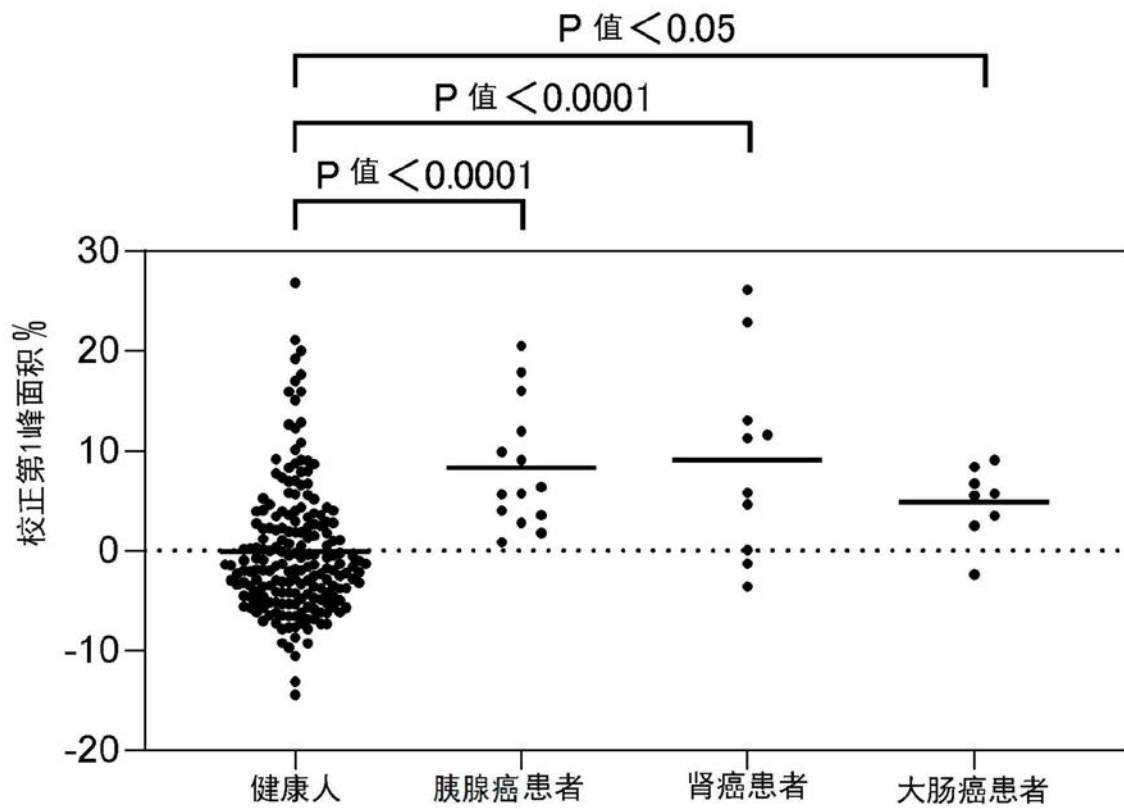


图9

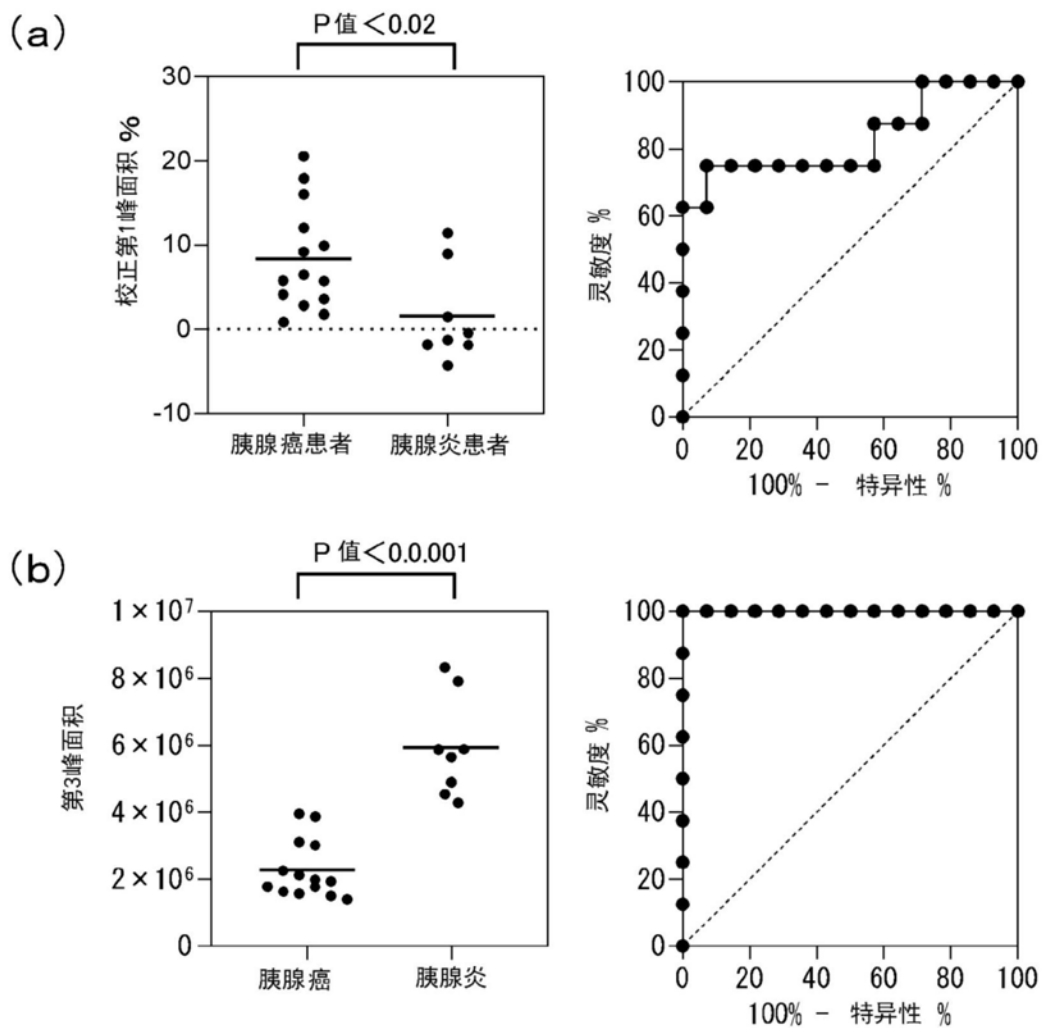


图10

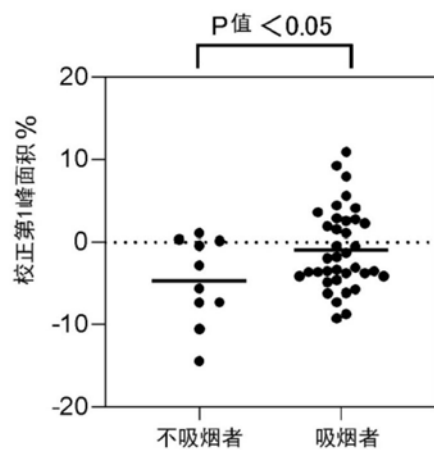
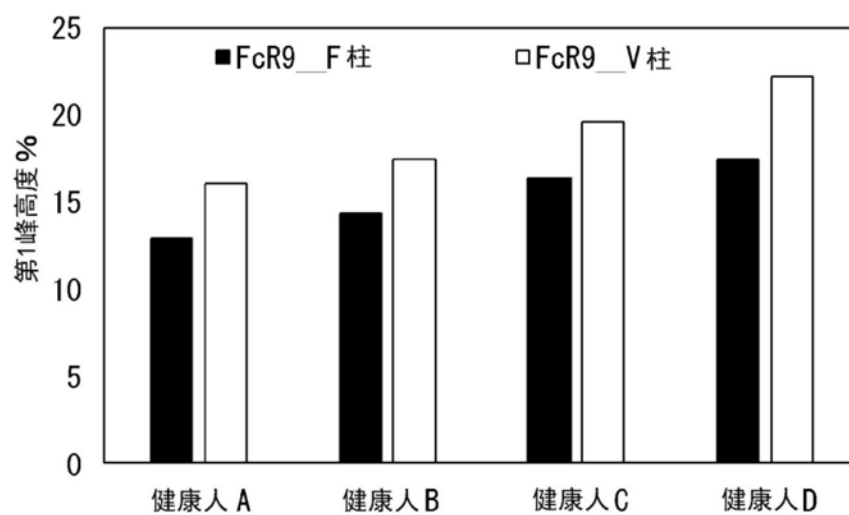


图11

(a)



(b)

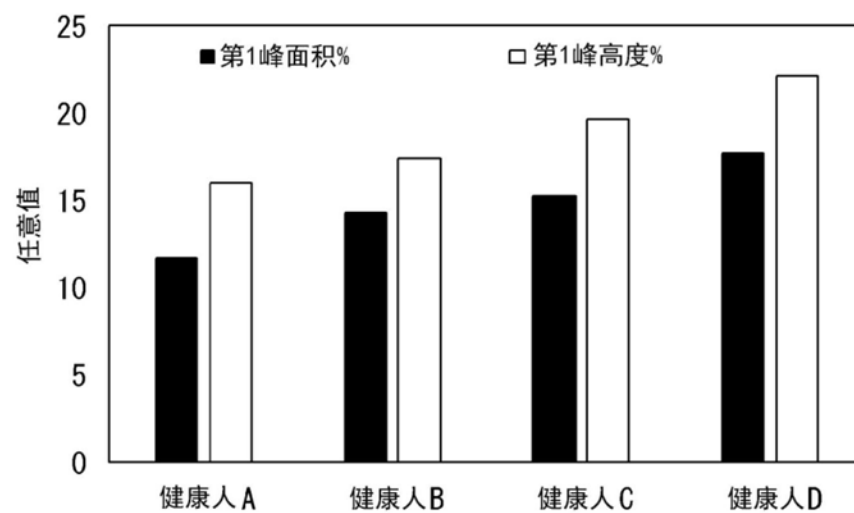


图12