

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01818510. X

[45] 授权公告日 2007 年 3 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1306271C

[22] 申请日 2001.10.31 [21] 申请号 01818510. X
[30] 优先权

[32] 2000.11.1 [33] JP [31] 335077/00

[86] 国际申请 PCT/JP2001/009561 2001.10.31

[87] 国际公布 WO2002/037114 日 2002.5.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.5.6

[73] 专利权人 株式会社嘉尔药物

地址 日本香川县

[72] 发明人 平岛光臣 山内清明 影下登志郎

中村隆范 西 望

[56] 参考文献

WO9815624A1 1998.4.16

WO9822139A1 1998.5.28

审查员 邢维玲

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 陈 昕

权利要求书 4 页 说明书 52 页 附图 7 页

[54] 发明名称

癌转移能力检测剂

[57] 摘要

通过阐明癌细胞的部分转移机制，对癌细胞的转移能力进行判断成为可能。含有抗半乳凝素 9 抗体等作为有效成分，通过检测癌细胞中半乳凝素 9 (galectin 9) 的表达量，检测该癌细胞转移能力的检测剂。

1. 癌转移能力检测剂,其特征在于含有针对半乳凝素 9 的抗半乳凝素 9 抗体作为有效成分。

2. 权利要求 1 记载的癌转移能力检测剂,其特征在于上述癌选自包括上皮性恶性肿瘤和非上皮性恶性肿瘤的脏器、组织以及血液的恶性肿瘤。

3. 权利要求 2 记载的癌转移能力检测剂,所述的上皮性恶性肿瘤和非上皮性恶性肿瘤包括肿瘤形成性的肿瘤和非形成性的肿瘤。

4. 权利要求 1 记载的癌转移能力检测剂,其特征在于上述癌至少选自皮肤癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、睾丸恶性肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、甲状腺癌、咽头和喉头癌、舌癌、上颌癌、食道癌、胃癌、结肠·直肠癌、肺·支气管癌、肝癌、肝外胆管·胆囊癌、胰腺癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、恶性血管瘤、恶性血管内皮瘤、脑肿瘤。

5. 权利要求 4 记载的癌转移能力检测剂,所述皮肤癌包括黑素瘤。

6. 权利要求 4 记载的癌转移能力检测剂,所述肝癌包括肝细胞癌、肝内胆管癌。

7. 权利要求 4 记载的癌转移能力检测剂,所述脑肿瘤包括脑脊膜瘤、神经胶质瘤、星形细胞瘤。

8. 权利要求 1 记载的癌转移能力检测剂,所述其特征在于所述癌的细胞是乳腺癌细胞或黑素癌细胞。

9. 权利要求 1~8 任一项记载的癌转移能力检测剂,其特征在于利用免疫学方法对被检测样品中的半乳凝素 9 进行定量,利用其结果检测癌转移能力。

10. 权利要求 9 记载的癌转移能力检测剂,其特征在于免疫学方法选自包括组织或细胞染色的免疫染色、免疫电子显微镜、RIA、EIA、FIA、LIA 以及夹心分析,而且包括竞争型免疫分析或非竞争型免疫分

析的免疫分析。

11. 权利要求 1~8 任一项记载的癌转移能力检测剂,其特征是含有固定化的抗半乳凝素 9 抗体作为有效成分。

12. 权利要求 9 记载的癌转移能力检测剂,其特征是含有固定化的抗半乳凝素 9 抗体作为有效成分。

13. 权利要求 10 记载的癌转移能力检测剂,其特征是含有固定化的抗半乳凝素 9 抗体作为有效成分。

14. 权利要求 1~8 任一项记载的癌转移能力检测剂,其特征是含有标记抗半乳凝素 9 抗体作为有效成分。

15. 权利要求 9 记载的癌转移能力检测剂,其特征是含有标记抗半乳凝素 9 抗体作为有效成分。

16. 权利要求 10 记载的癌转移能力检测剂,其特征是含有标记抗半乳凝素 9 抗体作为有效成分。

17. 癌转移能力检测剂,其特征是含有与编码半乳凝素 9 或其组成结构域的核酸进行杂交的核酸作为有效成分。

18. 权利要求 17 记载的癌转移能力检测剂,其特征是该核酸是能够以被标记而且与编码半乳凝素 9 或其组成结构域的核酸进行杂交的探针。

19. 权利要求 17 记载的癌转移能力检测剂,其特征是该核酸可以通过聚合酶链式反应 PCR 可以对编码半乳凝素 9 或其组成结构域的核酸进行扩增的引物。

20. 权利要求 17~19 任一项记载的癌转移能力检测剂,其特征是用选自原位杂交、Northern 印迹、Dot 印迹、RNase 保护分析、RT-PCR、Real-Time PCR、DNA 阵列解析法中的方法测定和/或检测半乳凝素 9 表达基因。

21. 癌转移能力检测法,其特征是使用权利要求 1-20 记载的癌转移能力检测剂,利用选自包括免疫学方法,原位杂交、Northern 印迹、Dot 印迹、RNase 保护分析、RT-PCR、Real-Time PCR、DNA 阵列解析法中的方法,对来自生物体样品进行测定。

22. 癌转移能力检测法,其特征是利用选自包括免疫学方法,原位杂交、Northern印迹、Dot印迹、RNase保护分析、RT-PCR、Real-Time PCR、DNA阵列解析法中的方法,对被检测样品中的半乳凝素 9 或半乳凝素 9 表达基因进行测定、检测或定量,利用其结果检测癌转移能力。

23. 权利要求 21 或 22 记载的方法,其特征是对检体样品中的半乳凝素 9 表达量或半乳凝素 9 表达基因量进行测定,比较通过该测定的表达量或表达基因量的值是否低于一定的阈值,以及

使用(1)含有针对半乳凝素 9 的抗半乳凝素 9 抗体作为有效成分或(2)含有与编码半乳凝素 9 或其组成结构域的核酸杂交的核酸作为有效成分的组合物进行该半乳凝素 9 表达量或半乳凝素 9 表达基因量的测定。

24. 权利要求 21~23 任一项记载的癌转移能力检测方法中使用的试剂盒或系统,其特征是含有(1)针对半乳凝素 9 的抗半乳凝素 9 抗体或(2)与编码半乳凝素 9 或其组成结构域的核酸杂交的核酸作为有效成分。

25. 癌转移能力检测剂或肿瘤检测和/或测定剂,其特征是使用半乳凝素 9 和半乳凝素 9 表达基因作为癌转移能力标志物或肿瘤标志物。

26. 权利要求 25 记载的癌转移能力检测剂或肿瘤检测和/或测定剂,其特征是使用半乳凝素 9 和半乳凝素 9 表达基因作为预后的癌转移能力标志物或肿瘤标志物。

27. 癌转移能力检测法或肿瘤检测和/或测定法,其特征是利用选自包括免疫学方法,原位杂交、Northern印迹、Dot印迹、RNase保护分析、RT-PCR、Real-Time PCR、DNA阵列解析法中的方法,使用半乳凝素 9 和半乳凝素 9 表达基因作为癌转移能力标志物或肿瘤标志物。

28. 权利要求 27 记载的癌转移能力检测法或肿瘤检测和/或测定法,其特征是使用半乳凝素 9 和半乳凝素 9 表达基因作为预后的癌转移能力标志物或肿瘤标志物。

29. 癌转移能力检测或肿瘤检测和/或测定试剂盒或系统,其特征是使用半乳凝素 9 和半乳凝素 9 表达基因作为癌转移能力标志物或肿瘤标志物。

30. 权利要求 29 记载的癌转移能力检测或肿瘤检测和/或测定试剂盒或系统,其特征是使用半乳凝素 9 和半乳凝素 9 表达基因作为预后的癌转移能力标志物或肿瘤标志物。

癌转移能力检测剂

技术领域

本发明涉及使对癌细胞是否具有转移能力，以及该癌细胞转移能力的程度进行评价成为可能的癌转移能力检测剂、癌转移能力检测法以及检测法中利用的系统。

另外本发明也涉及使用半乳凝素 9 以及半乳凝素 9 表达基因作为癌转移能力的标志物或肿瘤标志物，以及与此有关的测定·检测试剂、测定·检测方法以及方法中利用的系统。

背景技术

癌细胞不仅具有旺盛的增殖能力，而且还具有破坏自身组织，浸润相邻组织，以及浸润血管或淋巴管的浸润能力。而且癌细胞还具有随着血液或淋巴液转移到离得较远的其他组织的转移能力。这样的癌细胞的转移最终成了引起预后不良的重要因素。因此，有关癌的转移的研究一直在进行。在癌转移的研究中从 1992 年至 1993 年有报道作为细胞粘着因子的钙依粘连蛋白的低表达或无活性与高转移性有关系。在钙依粘连蛋白中 E-钙依粘连蛋白作为出现在上皮系细胞的 Ca 依赖性细胞间粘着分子已为人们所知，并被解析，目的是阐明癌转移机制。但是有关癌转移的机制仅通过 E-钙依粘连蛋白不能充分说明，这表明癌转移还与其他因素有密切关系。可是有关癌转移的具体的因素的报告还没有，处于对癌转移进行可靠预见还很困难的状况。换言之，问题是到目前为止对癌转移不能高精度地进行判断。

发明的公开

本发明的目的在于通过阐明癌细胞的部分转移机制，提供对癌细胞的转移能力进行判断成为可能的癌转移能力检测剂、癌转移能力检

测法以及检测法中利用的系统。为了达到上述目的，本发明人进行了深入研究，结果发现半乳凝素 9 (galectin-9) 与癌细胞的转移能力有密切关系，通过对癌细胞中半乳凝素 9 的表达进行测定，可以高精度地对该癌细胞的转移能力进行检测，从而完成本发明。

既，本发明涉及的癌转移能力检测剂，其特征为含有 (1) 抗半乳凝素 9 抗体或 (2) 与编码半乳凝素 9 或其组成结构域的核酸杂交的核酸作为有效成分。至于癌细胞只要是能够检测出半乳凝素 9 或半乳凝素 9 表达基因，阐明与该癌转移能力的相关关系的癌细胞，没有特别限定，如各种脏器·组织的恶性肿瘤，例如乳腺癌细胞或黑色素瘤细胞。本发明所述的癌转移能力检测剂特别适合用于检测乳腺癌细胞或黑色素瘤细胞的转移能力。另外本发明提供癌转移能力检测法以及该检测法中使用的系统 (包括试剂盒)，其特征为对被检测样品中的半乳凝素 9 或半乳凝素 9 表达基因进行测定，检测出或进行定量，利用检测结果检测癌转移能力。至于该系统可以是包括癌转移能力检测所必需的试剂的一部分或全部的试剂盒，可以是附带对该程序进行说明的文档，可以是 DNA 阵列等设备、仪器等，在本发明说明书中都可以理解为同样的意思。本发明的癌转移能力检测剂、癌转移能力检测法以及检测法中利用的系统应当理解为作为预后的癌转移能力检测剂、癌转移能力检测法以及检测法中利用的系统也有用。

本发明提供癌转移能力检测剂或肿瘤检测和/或测定剂、癌转移能力检测法或肿瘤检测和/或测定法、以及癌转移能力检测或肿瘤检测和/或测定试剂盒或系统，其特征是使用半乳凝素 9 以及半乳凝素 9 表达基因作为癌转移能力的标志物或肿瘤标志物。另外本发明提供癌转移能力检测剂或肿瘤检测和/或测定剂、癌转移能力检测法或肿瘤检测和/或测定法、以及癌转移能力检测或肿瘤检测和/或测定试剂盒或系统，其特征是使用半乳凝素 9 以及半乳凝素 9 表达基因作为预后的癌转移能力的标志物或肿瘤标志物。

本发明的其他目的、特征、优点及其观点本领域技术人员从以下记载可以明白。然而，包括以下记载以及具体实施例等记载在内的本

说明书的记载给出了本发明的优选实施方式，但应理解为这只是为了说明所给出的例子。在本说明书中公布的意图以及范围内进行的种种变化以及/或改变（或修饰），通过以下记载以及本说明书的其他部分的知识，本领域技术人员应当容易明白。本说明书中引用的所有专利文献和参考文献是为了说明的目的引用的，这些都应当解释为作为本说明书的一部分其内容也包括在此。

附图简单说明

图 1 是表示对半乳凝素 9 的表达和淋巴结转移之间的关系进行统计学研究的差异的条件及其结果图。

图 2 是表示对半乳凝素 9 的表达和手术后复发之间的关系进行统计学研究的差异的条件及其结果图。

图 3 是表示对半乳凝素 9 的表达和死亡例之间的关系进行统计学研究的差异的条件及其结果图。

图 4 是表示半乳凝素 9 的表达和非转移性累积生存率之间的关系特性图。

图 5 是表示对在半乳凝素 9 高表达株和半乳凝素 9 低表达株中半乳凝素 9 的表达进行检测的 Western 印迹法的结果的电泳照片。

图 6 是表示对半乳凝素 9 高表达株进行培养的状态的显微镜照片。

图 7 是表示对半乳凝素 9 低表达株进行培养的状态的显微镜照片。

实施发明的最佳方式

以下就本发明涉及到的癌转移能力检测剂、癌转移能力检测法以及检测法中利用的系统，以及使用半乳凝素 9 以及半乳凝素 9 表达基因作为癌转移能力的标志物或肿瘤标志物的技术进行详细地说明。

进行转移的肿瘤是恶性肿瘤，一般来说，恶性肿瘤有上皮性和非上皮性恶性肿瘤，有时也将他们划分为癌、肉瘤、白血病等，单独称

为“癌”，在一般人来看多指恶性肿瘤。在本说明书中所谓“癌”应当以广义来进行解释，而不应当单解释为上皮性恶性肿瘤。本说明书中的所谓“癌”包括上皮性恶性肿瘤和非上皮性恶性肿瘤（既包括肿瘤成形性的肿瘤也包括非成形性的肿瘤），如皮肤癌（包括黑素瘤）、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、睾丸恶性肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、甲状腺癌、咽·喉癌、舌癌、上颌癌、食道癌、胃癌、结肠·直肠癌、肺·支气管癌、肝癌（包括肝细胞癌、肝内胆管癌）、肝外胆管·胆囊癌、胰腺癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、恶性血管瘤、恶性血管内皮瘤、脑肿瘤（包括脑（脊）膜瘤、神经胶质瘤、星形细胞瘤等），但不限于这些肿瘤，应当理解为只要是能够检测出半乳凝素 9，明确半乳凝素 9 与该癌转移能力的相关关系的肿瘤，并没有特别限定。

作为本发明的一种方案，本发明涉及到的癌转移能力检测剂是作为有效成分含有抗半乳凝素 9 抗体的检测剂。其中抗半乳凝素 9 抗体可以利用众所周知的手段得到的多克隆抗体或单克隆抗体。

在本说明书中，“抗体”用语可以以广义的意义使用，可以是针对所期望的半乳凝素 9 多肽以及相关肽片段的单克隆抗体的单一抗体和对各种决定簇有特异性的抗体组合物，可以是包括 1 价抗体或多价抗体以及多克隆抗体和单克隆抗体的抗体，另外包括天然型（intact）分子以及以这些分子的片段和衍生物出现的，所谓的 F(ab')₂，Fab' 以及 Fab 片段，至少含有两个抗原或[抗原]表位（epitope）结合部位的嵌合抗体或杂种抗体，或例如四杂瘤（quadrome），三杂瘤（triome）等二重特异性重组抗体，种间杂种抗体，抗独特型（イデオタイプ，idiotypic）抗体，以及经化学修饰或加工的上述抗体的衍生物，或使用众所周知的细胞融合或杂交瘤技术和抗体工程、或使用合成或半合成技术得到的抗体，使用从抗体生成观点已经众所周知的现有技术、用 DNA 重组技术制备的抗体，也包括对本说明书中记载的且定义的靶抗原物质或靶[抗原]表位具有中和特性的抗体或具有结合特性的抗体。特别优选的本发明抗体是能够特异识别天然型的 M 型半乳凝素 9

(galectin 9 medium isoform or medium type galectin - 9) 多肽或天然型 L 型半乳凝素 9 (galectin 9 long isoform or long type galectin - 9) 多肽的抗体, 例如能够区别和识别 L 型半乳凝素 9 多肽或 M 型半乳凝素 9 多肽与 S 型半乳凝素 9 (galectin 9 short isoform or short type galectin - 9) 多肽的抗体。

为了得到多克隆形式的抗半乳凝素 9 抗体, 将作为免疫原的半乳凝素 9 或其片段、半乳凝素 9 序列的一部分的肽对哺乳动物、鸟类等进行免疫, 从这些哺乳动物、鸟类等采取抗血清。然后可以使用包含在该抗血清中的多克隆抗体。

用半乳凝素 9 作为致敏抗原被免疫的哺乳动物没有特别限定, 一般来说可以使用啮齿类动物, 例如小鼠、大鼠、仓鼠等, 以及兔、绵羊、山羊、牛、马、猪、狗、猫, 猴等灵长类动物, 鸡等鸟类等。另外, 有时也优选考虑到与细胞融合使用的亲本细胞的适合性后进行选择。

在用致敏抗原免疫动物时, 按照众所周知的方法进行。例如, 一般的方法是将致敏抗原注射到哺乳动物等的腹腔内或皮下。另外在致敏抗原免疫时也可以使用适当的载体。

含有多克隆抗体的抗血清, 是在对免疫的动物按照预定期间饲养后, 可以从该动物采取的血液中制备。得到的抗血清在确认是可以特异识别半乳凝素 9 的抗血清后, 作为癌转移能力检测剂用。

首先, 作为为获得抗体用致敏抗原使用的半乳凝素 9 可以通过众所周知的对半乳凝素 9 基因/氨基酸序列进行表达手法获得。序列 1 表示 L 型半乳凝素 9 的氨基酸序列, 而序列 2 表示 M 型半乳凝素 9 的氨基酸序列, 序列 3 表示 S 型半乳凝素 9 的氨基酸序列。即, 将编码半乳凝素 9 或具有其一部分的结构域、半乳凝素 9 的一部分蛋白质或多肽片段、相当于编码半乳凝素 9 氨基酸序列的一部分氨基酸的多肽的基因序列插入到众所周知的表达载体系统, 转化适当的宿主细胞后, 利用众所周知的方法从该宿主细胞或培养上清中纯化目的半乳凝素 9 蛋白质或具有其一部分的结构域的蛋白质、半乳凝素 9 的一部分

蛋白质或多肽片段、具有相当于半乳凝素 9 氨基酸序列的一部分氨基酸的多肽。

基因重组技术（包括重组 DNA 技术）可以按照例如 J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, 《分子克隆实验指南》“Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第 2 版）”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover 等 ed., “DNA Cloning”, 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 日本生化学会编, 《续生化学实验讲座 I、基因研究法 II》、东京化学同人 (1986); 日本生化学会编, 《新生化学实验讲座 2、核酸 III (重组 DNA 技术)》、东京化学同人 (1992); R. Wu ed., Methods in Enzymology, Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu 等 ed., Methods in Enzymology, Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu 等 ed., Methods in Enzymology, Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987); J. H. Miller ed., Methods in Enzymology, Vol. 204, Academic Press, New York (1991); R. Wu ed., Methods in Enzymology, Vol. 218, Academic Press, New York (1993); S. Weissman 编, Methods in Enzymology, Vol. 303, Academic Press, New York (1999); J. C. Glorioso 等编, Methods in Enzymology, Vol. 306, Academic Press, New York (1999) 等记载的方法或其中引用文献或者实质上与上述方法同样的方法或改变的方法进行（这些方法中的记载都包括在本说明书的公开中作为参考）[以下将这些通称为“基因重组技术”]。作为编码半乳凝素 9 或其组成结构域、其片段的核酸只要是与编码与半乳凝素 9 具有同等抗原性等的肽和实质上具有同等生物学活性的肽的核酸具有同等效果的碱基序列的核酸无论什么样的都可以。编码该半乳凝素 9 的核酸可以

是单链 DNA、双链 DNA、RNA、DNA:RNA 杂化体、合成 DNA 等核酸，也可以是人基因组 DNA、人基因 DNA 文库、来自人组织·细胞的 cDNA、合成 DNA 中的任一种。编码该半乳凝素 9 的核酸的碱基序列可以被修饰（例如附加、缺失、置换等），这样修饰的核酸也包括在内。另外也可以是天然产生的变异体。这些核酸可以是编码 L 型半乳凝素 9 或其一部分的核酸，优选的可举出 DNA。而上述所谓“同等效果的碱基序列”如在严格条件下与编码序列 1 氨基酸序列的碱基序列中的连续 5 个以上的碱基序列、优选的是 10 个以上的碱基序列、更优选的是 15 个以上的碱基序列、再优选的是 20 个以上的碱基序列进行杂交、编码实质上与该半乳凝素 9 同等氨基酸序列的核酸或其互补链等。

另外本发明中作为抗半乳凝素 9 抗体也可以使用来自哺乳动物的单克隆抗体。

针对抗原物质制作的单克隆抗体可以使用能够通过培养的一系列细胞株产生抗体分子的任意方法生产。修饰语“单克隆”是表示所谓从实质上均一抗体集团得到的该抗体的特性，不能看作是必须通过某个特定方法使该抗体产生。各个单克隆抗体也许是自然产生的，也许只是存在微量的变异体，之外还包括看起来是同一的那样的抗体的集团。单克隆抗体具有高度特异性，是针对具有单一抗原性表位的抗体。与典型的包含针对不同抗原表位的各种抗体的通常的（多克隆）抗体制备物相比，各个单克隆抗体是针对该抗原上的单一的[抗原]表位的抗体。除了其特异性以外，单克隆抗体由于是通过杂交瘤培养合成的，其优点是没有夹杂其他免疫球蛋白或夹杂的很少。单克隆抗体包括杂交抗体和重组抗体。这些抗体只要是表现出所期望的生物活性，与其来源或免疫球蛋白类别和亚类别无关，可以通过用恒定区置换可变区（例如人源化抗体），或用重链置换轻链，或者用别的链置换某种链，或者与异质蛋白质融合得到（例如，美国专利第 4816567 号；Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,（《单克隆抗体制造技术及其应用》）pp. 79-97, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987 等）。

适合制造单克隆抗体的方法的例子中例如有杂交瘤法 (G. Kohler and C. Milstein, *Nature*, 256, pp. 495 - 497 (1975)) ; 人 B 细胞杂交瘤法 (Kozbor 等, *Immunology Today*, 4, pp. 72-79 (1983); Kozbor 等, *Immunol.*, 133, pp. 3001 (1984); Brodeur 等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, (《单克隆抗体制造技术及其应用》) pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987)) ; 三杂瘤 (triome) 法; EBV - 杂交瘤法 (Cole 等, *Monoclonal Antibody and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)) (用于产生人单克隆抗体的方法); 美国专利第 4946778 号 (产生单链抗体的技术), 此外以下列举了有关抗体的文献: S. Biocca 等, *EMBO J*, 9, pp. 101-108 (1990); R. E. Bird 等, *Science*, 242, pp. 423 - 426 (1988); M. A. Boss 等, *Nucl. Acids Res.*, 12, pp. 3791 - 3806 (1984); J. Bukovsky 等, *Hybridoma*, 6, pp. 219-228 (1987); M. DAINO 等, *Anal. Biochem.*, 166, pp. 223-229 (1987); J. S. Huston 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, pp. 5879 - 5883 (1988); P. T. Jones 等, *Nature*, 321, pp. 522 - 525 (1986); J. J. Langone 等编, "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part 1: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies [免疫化学技术, 第 1 部分, 杂交瘤技术和单克隆抗体]), Academic Press, New York (1986); S. Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, pp. 6851-6855 (1984); V. T. Oi 等, *BioTechniques*, 4, pp. 214-221 (1986); L. Riechmann 等, *Nature*, 332, pp. 323-327 (1988), A. Tramontano 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, pp. 6736-6740 (1986); C. Wood 等, *Nature*, 314 pp. 446-449 (1985); *Nature*, 314, pp. 452-454 (1985) 或其中引用的文献 (这些文献中的记载都包括在本说明书的公开中作为参考)。

本发明涉及到的单克隆抗体只要是表现出所期望的生物活性, 重链和/或轻链的一部分是由特定的种诱导的或是与属于特定抗体类或

亚类的抗体的对应序列相同或同源，而链的其余部分是由别的种诱导的或是与属于别的抗体类或亚类的抗体的对应序列相同或同源，尤其包含“嵌合”抗体（免疫球蛋白）（美国专利第 4816567 号说明书；Morrison 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp. 6851-6855 (1984)）。

本发明涉及到的单克隆抗体可以通过来自哺乳动物的杂交瘤产生，以及通过基因工程手法利用含有抗体基因的表达载体转化的宿主产生。

产生抗半乳凝素 9 抗体的产生单克隆抗体杂交瘤可以象以下那样利用骨髓瘤细胞的细胞融合技术制作。

即，用半乳凝素 9 或其片段作为致敏抗原，按照通常的免疫方法进行免疫，通过通常的细胞融合法将得到的免疫细胞与众所周知的亲本细胞融合，利用通常的筛选方法经筛选产生单克隆抗体细胞可以制作。关于半乳凝素 9 或其片段的制备方法和对哺乳动物的免疫方法等可以按照上述制备含有多克隆抗体的抗血清的手法进行。此时，特别是在对哺乳动物进行免疫后，从确认血清中所期望的抗体水平上升的哺乳动物采取免疫细胞，用于细胞融合，理想的免疫细胞是脾细胞。

作为与免疫细胞融合的另一方的亲本细胞用哺乳动物的骨髓瘤细胞。该骨髓瘤细胞可以使用众所周知的各种细胞株。免疫细胞和骨髓瘤的细胞融合等基本上是按照众所周知的方法进行，如 Kohler 和 Milstein 方法（Kohler, G. 和 Milstein, C. Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46）等。

以下以单克隆抗体为例就抗体的制备进行详细地说明。

本发明的抗体可以是利用骨髓瘤细胞的细胞融合技术得到的单克隆抗体，例如通过以下的工序可以制作。

(1) 免疫原性抗原的制备，(2) 用免疫原性抗原对动物进行免疫，(3) 骨髓瘤细胞（骨髓肿瘤细胞）的制备，(4) 产生抗体细胞与骨髓瘤细胞的细胞融合，(5) 杂交瘤（融合细胞）的选择和单克隆化，以及(6) 单克隆抗体的制造

(1) 免疫原性抗原制备如下。作为抗原可以象上述记载的那样使用对天然型的 L 型半乳凝素 9 多肽或从其衍生的片段 (一部分结构域多肽, 连接多肽, 片段, 一部分多肽, 可以包括合成多肽, 也可以是天然型的 M 型半乳凝素 9 多肽) 进行分离的抗原, 也可以利用以确定的半乳凝素 9 的氨基酸序列为基础化学合成的适当的寡肽作为抗原。作为代表性的抗原如 (1) 序列表中序列 1 和序列 2 的氨基酸序列或其一部分的结构域的氨基酸序列; (2) 序列 3 的一部分的结构域的氨基酸序列; (3) 序列表中的序列 4, 5, 7, 8 和 9 的氨基酸序列; (4) 构成连接在序列表序列 1 中相当于序列 4 的氨基酸序列后的 C 末端一侧结构域的氨基酸序列或其一部分片段; (5) 含有从构成连接在由序列表序列 1 中相当于序列 4 的氨基酸序列前的 N 端一侧结构域的氨基酸序列或其一部分片段选出的区域中存在的氨基酸残基中至少连续 5 个氨基酸的肽。

抗原可以直接与适当的佐剂混合后免疫动物, 也可以作成免疫原性缀合物。例如用作免疫原的抗原可以是将半乳凝素 9 分段后的片段, 或者根据其氨基酸序列选择特征序列区, 设计多肽通过化学合成得到的合成多肽片段。另外也可以使用将该片段借助适当的缩合剂与各种载体蛋白质类结合, 作成如半抗原-蛋白质那样的免疫原性缀合物, 用于设计利用该缀合物只与特定序列反应 (或只识别特定序列) 的单克隆抗体。在设计的多肽中预先加上半胱氨酸残基等可以很容易地制备免疫原性缀合物。当与载体蛋白质结合时, 载体蛋白质类可以首先被活化。在进行活化时例如可以导入活化结合基。

作为活化结合基如 (1) 活化酯或活化羧基, 例如硝基苯基酯基、五氟苯基酯基、1-苯并三唑酯基、N-琥珀酰亚胺酯基等, (2) 活化二硫基, 例如 2-吡啶二硫基等。作为载体蛋白质类如钥孔蠊血蓝蛋白 (keyhole limpet haemocyanin, KLH)、牛血清清蛋白 (BSA)、卵清白蛋白、球蛋白、聚赖氨酸等多肽、细菌菌体成分、例如 BCG 等。

(2) 用免疫原性抗原免疫动物可以象以下那样实施。免疫可以利用本领域技术人员公知的方法进行, 例如可以按照以下文献记载的方法

实施免疫：村松繁等编、《实验生物学讲座 14、免疫生物学》、丸善株式会社、昭和 60 年、日本生化学会编、《续生化学实验讲座 5、免疫生化学研究法》、东京化学同人、1986 年、日本生化学会编、《新生化学实验讲座 12、分子免疫学 III、抗原·抗体·补体》、东京化学同人、1992 年等记载的方法。通过将免疫化剂（根据需要可以与佐剂一起）一次或一次以上数次注射动物，对动物进行免疫。典型的免疫方式是通过将该免疫化剂和/或佐剂数次对动物进行皮下注射或腹腔注射。免疫化剂例如是含有上述抗原肽或其相关肽段者。也可以使用免疫化剂与已知经免疫处理的哺乳动物中为免疫原性的蛋白质（例如上述载体蛋白质等）形成的缀合物。作为佐剂，例如弗氏完全佐剂、Ribi 佐剂、百日咳疫苗、BCG、类脂 A、脂质体、氢氧化铝、二氧化硅等。免疫可以使用 BALB/c 等小鼠、仓鼠、以及其他合适的动物进行。抗原的给予量例如对小鼠大约 $1 \sim 400 \mu\text{g}/\text{动物}$ ，一般都是注射到宿主动物的腹腔内或皮下，以后过 $1 \sim 4$ 周、优选每 $1 \sim 2$ 周反复进行 $2 \sim 10$ 次左右的追加免疫。作为免疫用的小鼠除了 BALB/c 系小鼠外，也可以用 BALB/c 系小鼠与其他系小鼠的 F1 代小鼠等。根据需要，建立抗体效价测定体系，测定抗体效价后可以确认动物免疫的程度。本发明的抗体可以是上述被免疫动物得到的抗体，例如包括抗血清、多克隆抗体等。

(3) 骨髓瘤细胞的制备象下述那样进行。作为细胞融合使用的可无限增殖的细胞株（肿瘤细胞株）可以从不产生免疫球蛋白的细胞株中选择，例如可以用 P3-NS-1-Ag4-1 (NS-1, Eur. J. Immunol., 6: 511-519, 1976)、SP-2/0-Ag14 (SP-2, Nature, 276: 269~270, 1978)、来自小鼠骨髓瘤 MOPC-21 细胞株的 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1, Curr. topics Microbiol. Immunol., 81: 1-7, 1978)、P3-X63-Ag8 (X63, Nature, 256: 495~497, 1975)、P3-X63-Ag8-653 (653, J. Immunol., 123: 1548-1550, 1979) 等。8-氮杂鸟嘌呤抗性的小鼠骨髓瘤细胞株可以在 Dulbecco MEM 培养基 (DMEM 培养基)、RPMI-1640 培养基等细胞培养基中加入例如青霉素、丁胺卡那霉素 (amikacin) 等抗生素、

胎牛血清 (FCS) 等之后再加入 8-氮杂鸟嘌呤 (例如 5~45 μg) 后的培养基中进行传代培养, 然后在细胞融合之前的 2~5 天于正常培养基中进行传代, 准备所需数量的细胞株。而使用细胞株也可以将冷冻保存的细胞株于大约 37 $^{\circ}\text{C}$ 下完全解冻之后, 用 RPMI-1640 培养基等正常培养基洗 3 次以上, 在正常培养基中进行培养, 准备所需数量的细胞株。

(4) 产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞的细胞融合象下述那样进行。按照上述 (2) 步骤免疫的动物、例如小鼠在最终免疫后 2~5 日后摘出小鼠的脾脏, 从脾脏中得到脾细胞悬浮液。除了脾细胞外, 得到生物体各处的淋巴节细胞, 也可用于细胞融合。更具体来说, 细胞融合可以在例如细胞融合促进剂存在下于通常的营养培养液中进行。作为上述细胞融合用的培养液可以使用例如适于上述骨髓瘤细胞株的增殖的 RPMI 1640 培养液、MEM 培养液、此外也可以使用该种细胞培养用的通常培养液, 另外也可以与胎牛血清 (FCS) 等血清补液并用。将上述得到的脾细胞悬浮液与按照上述 (3) 工序得到的骨髓瘤细胞株置于诸如最小必需培养基 (MEM 培养基)、DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基等细胞培养基中, 添加细胞融合促进剂, 例如聚乙二醇。细胞融合促进剂可以使用其他各种本技术领域领域都知道的促进剂, 这样的例子如灭活仙台病毒 (HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan) 等。理想的是添加例如可以添加 0.5~2ml 的 30~60% 聚乙二醇, 可以使用分子量为 1,000~8,000 的聚乙二醇, 最好使用分子量为 1,000~4,000 的聚乙二醇。融合培养基中的聚乙二醇的浓度最好是配成例如 30~60% 那样的浓度。根据需要, 例如可以添加少量的二甲基亚砜等辅助剂, 提高融合效率。免疫细胞和骨髓瘤细胞的使用比例, 即融合时使用的脾细胞 (淋巴细胞): 骨髓瘤细胞株的比例可以任意设定, 例如 1:1~20:1, 最好设定为 4:1~10:1。

细胞融合可以通过将所设定量的免疫细胞和骨髓瘤细胞于培养液中充分混合, 然后添加预先加温到 37 $^{\circ}\text{C}$ 左右的 PEG 溶液 (例如平均分子量 1000-6000 左右), 通常以 30-60% (w/v) 的浓度添加, 经混

合后可以形成目的融合细胞（杂交瘤）。然后通过反复逐次添加适当培养液，离心除去上清操作，除去在杂交瘤生长中不希望的细胞融合剂。

融合反应进行1~10分钟，然后加入RPMI-1640培养基等细胞培养基。融合反应处理也可以进行数次。融合反应处理后通过离心等将细胞分离后移到选择用培养基。

(5) 杂交瘤（融合细胞）的选择以及单克隆化象下面那样进行。作为选择用培养基如通常的选择培养液，例如含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的、含FCS MEM培养基、RPMI-1640培养基等培养基，即所谓的HAT培养基。用上述HAT培养液进行培养为了使目的杂交瘤以外的细胞（非融合细胞）死掉，需要充分的时间（通常需要数日~数周）。选择培养基交换的方法一般是第二天加入与原容量等容量的培养基，以后每隔1~3日用HAT培养基各进行一半容量的交换，也可以适当地进行变更。融合后第8~16天，用除去氨基蝶呤的，所谓的HT培养基每隔1~4日进行培养基交换。作为滋养细胞例如也可以使用小鼠胸腺细胞，有时还比较令人满意。

对杂交瘤增殖旺盛的培养孔的培养上清可以通过例如放射免疫分析（RIA）、酶免疫分析（ELISA）、荧光免疫分析（FIA）、发光免疫分析（LIA）、Western印迹等测定体系，或者用荧光激活细胞分选仪（FACS）等，使用所设定的肽段作为抗原，或标记抗鼠抗体测定目的抗体等，进行筛选。对产生目的抗体的杂交瘤进行克隆。克隆可以于琼脂培养基中挑选，或通过有限稀释法实施。用有限稀释法可以更好进行。克隆最好要进行多次。这样制备的产生单克隆的杂交瘤可以在通常的培养液中进行传代培养，另外可以在液氮中长期保存。

(6) 单克隆抗体的制造可以象下面那样进行。为了从该杂交瘤获得单克隆抗体，可以采用按照通常的方法对上述杂交瘤进行培养，得到培养上清的方法，或者将杂交瘤注入到与杂交瘤适合的哺乳动物，使其增殖，获得腹水的方法。前一种方法适于获得高纯度的抗体，而后者适合抗体的大量生产。

上述得到的杂交瘤株可以在含 FCS 的 MEM 培养基、RPMI-1640 培养基等适于增殖用的培养基中进行培养，可以从其培养上清中得到所期望的单克隆抗体。要获得大量的抗体，可以将杂交瘤进行腹水化。此时可以将各个杂交瘤移植到与骨髓瘤来源的动物同系的组织适合性动物的腹腔内，使其增殖，或者将各个杂交瘤移植到裸鼠等动物中，使其增殖，从该动物的腹水中回收产生的抗体。在向动物移植杂交瘤之前，可以预先向腹腔内注入降植烷（2, 6, 10, 14-四甲基十五烷）等矿物油，这样处理后，也可以使杂交瘤增殖，采取腹水。腹水液可以直接用作单克隆抗体，或者通过以往的众所周知的方法，例如硫酸铵沉淀法等盐析、Sephadex 等凝胶过滤法、离子交换层析法、电泳法、透析、超滤法、亲和层析法、高效液相层析法等纯化后用作单克隆抗体。理想的作法是含有单克隆抗体的腹水经硫酸铵分级后，可以用诸如 DEAE - Sepharose 那样的阴离子交换凝胶和诸如蛋白 A 柱那样的亲和柱进行处理、纯化分离。最好是通过固定了抗原和抗原片段（例如合成肽、重组抗原蛋白质或肽、抗体特异识别部位等）的亲和层析、固定了蛋白 A 的亲和层析、羟磷灰石层析等进行纯化。

另外转基因小鼠或其他生物、例如其他哺乳动物可以用于针对本发明的免疫原多肽产物的人源化抗体等抗体的表达。

对上述那样大量得到的抗体的序列进行确定，利用从杂交瘤株得到的编码抗体的核酸序列，通过基因重组技术也可以制作抗体。编码该单克隆抗体的核酸可以通过诸如使用能够特异与编码小鼠抗体的重链或轻链的基因结合的寡核苷酸探针等惯用的手法分离、确定序列。一旦分离到的 DNA 整合到表达载体中，可以整合到 CHO, COS 等宿主细胞中。该 DNA 例如进行代替同源的鼠的序列，置换成编码人的重链或轻链的恒定区结构域的序列等的修饰是有可能的（Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp.6851 (1984)）。这样一来具有所期望结合特异性的嵌合抗体和杂交抗体也都有可能制备了。另外抗体进行应用包括使用下述那样缩合剂的化学方式的蛋白质合成技术，制备嵌合抗体或杂交抗体等修饰也是有可能的。

人源化抗体可以通过本领域已知的技术制作（例如，Jones 等，Nature, 321, pp. 522-525(1986); Riechmann 等，Nature, 332, pp. 323-327 (1988); Verhoeyen 等，Science, 239: pp. 1534-1536 (1988)）。人单克隆抗体也可以通过本领域已知的技术制作，用于生产人单克隆抗体的人骨髓瘤细胞和人·鼠杂骨髓瘤细胞本领域是已知的（Kozbor 等，J. Immunol., 133, pp. 3001 (1984); Brodeur 等，《单克隆抗体制造技术和应用》Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York(1987)）。制造双特异性抗体方法也为本领域所掌握（Millstein 等，Nature, 305: pp. 537-539 (1983); W093/08829; Traunecker 等，EMBO J., 10: pp. 3655-3659 (1991); Suresh 等，Methods in Enzymology”, Vol. 121, pp. 210 (1986)）。

另外这样的抗体经胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶等酶处理，按照情况不同还原得到所谓 Fab、Fab'、F(ab')₂ 的抗体片段之后也可以使用。

抗体可以在已知的任意检定法、例如竞争结合检定、直接和间接夹心检定、以及免疫沉淀检定中使用（Zola, 《单克隆抗体：技术手册》Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)）。

为了将抗体分别缀合到可检测的原子团，可以使用本领域已知的任意方法，例如，David 等，Biochemistry, 13 卷, 1014-1021 页 (1974); Pain 等，J. Immunol. Meth., 40: pp. 219-231 (1981); 以及“Methods in Enzymology”, Vol. 184, pp. 138-163 (1990) 记载的方法。作为带有标记物的抗体可以使用 IgG 级分、进一步经胃蛋白酶消化后还原得到的特异结合部位 Fab'。作为这种情况下的标记物的例子如象下述那样的酶（过氧化物酶、碱性磷酸酶或 β -D-半乳糖苷酶等）、化学物质、荧光物质或放射性同位素等。

本发明中的检测·测定可以通过免疫染色、例如组织或细胞染色、免疫电子显微镜、免疫分析、例如竞争型免疫分析或非竞争型免疫分

析进行, 可以利用放射免疫测定法 (RIA), FIA, LIA, EIA, ELISA 等, 也可以进行 B-F 分离, 或不进行 B-F 分离进行测定。优选的方法是 RIA, FIA, LIA, EIA, 还有夹心型分析。例如如果用夹心型分析, 一方作为针对本发明的 L 型半乳凝素 9 多肽的抗体或针对 L 型半乳凝素 9 的相关肽段的抗体, 另一方作为针对半乳凝素 9 的 C 末端残基的抗体, 然后对一方进行可检测标记 (当然也可以与其他的组合, 根据目的可以适当设计)。将可识别同样抗原的其他抗体固定于固相。为了根据需要使检测样品和标记抗体以及固相化抗体依次进行反应, 进行温育处理, 分离非结合抗体后, 对标记物进行测定。被测定的标记的量与抗原、即 L 型半乳凝素 9 多肽抗原的量成比例。这样的分析被称之为按照不溶性抗体以及标记化抗体的添加顺序同时进行夹心型分析、正向夹心型分析和逆向夹心型分析。另外在上述测定工序中于特定状况下可以适当采用例如洗净、搅拌、振荡、过滤或抗原的预备提取等。特定试剂、缓冲液等的浓度、温度或温育处理时间等其他的测定条件可以根据检测样品中的抗原的浓度、检测样品的性质等因素进行改变。本领域技术人员可以使用通常的实验法, 适当选择对各个测定有效的最适条件进行测定。

已知有很多可使抗原或抗体固相化的载体, 在本发明中可以从这些载体中适当地选择利用。作为载体, 已知有各种可在抗原抗体反应等中使用的载体, 在本发明中当然也可以从中选择使用。作为特别适于使用的载体如玻璃、例如氨基烷基甲硅烷基玻璃等活化的玻璃、多孔质玻璃、硅胶、二氧化硅-氧化铝、氧化铝、磁化铁、磁化合金等无机材料、聚乙烯、聚丙烯、聚氯乙烯、聚偏氟乙烯、聚乙烯、聚乙酸乙烯、聚碳酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物、聚丙烯酰胺、交联聚丙烯酰胺、苯乙烯-甲基丙烯酸酯共聚物、聚甲基丙烯酸缩水甘油酯、丙烯醛-乙烯醇二甲基丙烯酸酯共聚物等、交联白蛋白、胶原、明胶、葡聚糖、琼脂糖、交联琼脂糖、纤维素、微晶纤维素、羧甲基纤维素、纤维素乙酸酯等天然或改性纤维素、交联葡聚糖、尼龙等聚酰胺、聚氨酯、聚环氧树脂等有机高分子物质、

以及使这些乳液聚合得到的物质，在硅橡胶等、细胞、红细胞等中根据需要利用硅烷偶联剂导入官能团后做成的载体。

另外，如滤纸、（有孔）玻璃球、试管、小容器、实验容器的内壁、例如试管、滴定板、滴定杯、微量培养板、玻璃槽、合成树脂槽等合成材料做成的槽、玻璃棒、由合成材料做成的棒、末端变粗或变细的棒、末端带有球形突起或带有扁平突起的棒、作成薄板状的棒等固体物质（物体）的表面等。

可以使抗体结合到上述那些载体上，最好是将本发明得到的对抗原可进行特异反应的抗半乳凝素 9 抗体（包括抗血清和纯化抗体）或抗半乳凝素 9 单克隆抗体结合到载体上。载体和与这些抗体抗原反应有关的物质的结合可以通过吸附等物理手法、或使用缩合剂、或使用可活化的物质等化学上的方法，以及利用相互的结合反应的手法等进行。作为标记，例如酶、酶底物、酶抑制剂、辅助分子类、辅酶、酶前体、脱辅基酶蛋白（apoenzyme）、荧光物质、色素物质、化学发光化合物、发光物质、发色物质、磁物质、金属粒子、例如金胶体等、非金属元素粒子、例如硒胶体等、放射性物质等。作为酶如脱氢酶、还原酶、氧化酶等氧化还原酶，例如催化氨基、羧基、甲基、酰基、磷酸基等转移的转移酶、例如水解酯键、糖苷键、醚键、肽键等的水解酶，裂解酶、异构酶、连接酶等。酶也可以多个联合用于检测。例如也可以利用酶的循环。作为代表性放射性物质的标记用同位素如 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ 等。作为代表性的酶标记如辣根过氧化物酶等过氧化物酶、大肠杆菌 β -D-半乳糖苷酶等半乳糖苷酶、马来酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖淀粉酶、乙酰胆碱酯酶、过氧化氢酶、牛小肠碱性磷酸酶、大肠杆菌碱性磷酸酶等碱性磷酸酶等。使用碱性磷酸酶时，可以使用磷酸 4-甲基伞形酮酯（4-methylumbelliferylphosphate）等伞形酮衍生物、磷酸硝基苯酯等磷酸化酚衍生物、利用 NADP 的酶的循环体系、虫荧光素衍生物、二氧环烷（dioxetane）衍生物等底物，通过产生的荧光、发光等进行测定。也可以利用虫荧光素、虫荧光素酶系。使用过氧化氢

时，由于与过氧化氢反应生成氧，所以也可以用电极等检测生成的氧气。至于电极也可以是玻璃电极、难溶性盐膜的离子电极、液膜型电极、高分子膜电极等电极。

酶标记也可以置换为生物素标记物和酶标记抗生物素蛋白（链球菌抗生物素蛋白）。因此可以使用生物素-抗生物素蛋白体系，可以使用抗半乳凝素 9 抗体等二次抗体等，可以适当采用在该领域中众所周知的增强灵敏度的方法。标记也可以使用多个不同种类的标记。这样的情况下，有可能可以连续地或非连续地、而且可以同时或分别进行多个样品的测定。

在本发明中下列物质可以用于信号的形成，这些物质有 4-羟基苯乙酸、间苯二胺（OPD）、N,N'-四甲基联苯胺（TMB）、5-氨基水杨酸、3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐（DAB）、3-氨基-9-乙基吡唑（AEC）、酪胺、鲁米诺、萤火虫荧光素及其衍生物、Pholad 荧光素等和辣根过氧化物酶等过氧化物酶、lumigen PPD、磷酸（4-甲基）伞形酮酯、磷酸对硝基苯酚酯、磷酸苯酚酯、溴氯吲哚磷酸（BCIP）、AMPAK™（DAKO）、AmpliQ™（DAKO）等和碱性磷酸酶、称之为 4-甲基伞形酮基-β-D-半乳糖苷的伞形酮基半乳糖苷、称之为间硝基苯酚 β-D-半乳糖苷的硝基苯半乳糖苷等和 β-D-半乳糖苷酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、ABTS 等和葡萄糖氧化酶等酶试剂组合也可以利用，在酶等作用下可以形成对苯二酚、羟对苯醌、羟蒽醌等醌醇化合物、硫辛酸、谷胱甘肽等巯基化合物、苯酚衍生物、二茂（合）铁衍生物的也可以利用。

作为荧光物质或化学发光物质如异硫氰酸荧光素、例如若丹明 B 异硫氰酸酯、四甲基若丹明异硫氰酸酯（RITC）、四甲基若丹明异硫氰酸酯异构物 R（TRITC）等若丹明衍生物、7-氨基-4-香豆素-3-乙酸、丹酰氯、丹酰氟、荧光胺、藻胆蛋白、吡啶鎓盐，发光素、荧光素酶、水母发光蛋白等鲁米诺、咪唑、草酸酯、稀土类螯合化合物、香豆素衍生物等。为了对包括发色、荧光等生成的信号等进行检测，可以通过目视，也可以使用众所周知的仪器，例如也可以使用荧光光度计、平板读出仪等。另外为了对放射性同位素等发出的信号进行检测，可

以使用众所周知的仪器，例如 γ 计数器、闪烁仪等。

为了进行标记，可以利用巯基和马来酰亚胺基的反应、吡啶二硫化物与巯基的反应、氨基和醛基的反应等进行，可以使用众所周知的方法和该领域技术人员容易进行的方法、以及从对这些方法进行修饰后的方法中选择合用的。另外可以使用上述免疫原性复合物制作中可以使用的缩合剂、与载体结合使用的缩合剂等。作为缩合剂如甲醛、戊二醛、六甲撑二异氰酸酯、六甲撑二异硫氰酸酯、N,N-多甲撑二碘乙酰胺、N,N-亚乙基双马来酰亚胺、乙二醇双琥珀酰亚胺基琥珀酸酯、双重氮联苯胺、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺、N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)-丙酸酯、N-琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、N-磺基琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰)氨基苯甲酸酯、N-琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺苯基)丁酸酯、N-(ϵ -马来酰亚胺己酰氧基)琥珀酸亚胺(EMCS)、亚氨基四氢噻吩(iminothiolane)、S-乙酰巯基琥珀酸酐、3-(4'-二硫吡啶基)亚胺代丙酸甲酯、4-巯基亚胺代丁酸甲酯、3-巯基亚胺代丙酸甲酯、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰巯基乙酸酯等。

通过本发明的测定法可以依次使要测定物质与用酶等标记的抗血清、纯化的抗体和单克隆抗体等标记抗体试剂、结合于载体的抗体反应，也可以同时使他们反应。加试剂的顺序因选择的载体体系不同而不同。在使用致敏的塑料等(有孔)球(珠)时，开始可以将标记的抗血清、纯化的抗体或单克隆抗体等标记抗体试剂与含有要测定的物质的检测样品一起加入到适当的试管中，然后通过加入致敏的塑料等(有孔)球(珠)进行测定。

在本发明的测定法中，可以用免疫学测定法，此时用的固相载体可以任意选择使用能很好吸附抗体等蛋白质的聚苯乙烯制的、聚碳酸酯制的、聚丙烯制的或聚乙烯制的球、微量培养板、棒、微粒子或试管等种种材料和形状。

测定时可以在保持在最适 pH、例如 pH 约 4~约 9 那样的适当的缓

冲液体系中进行。作为特别合适的缓冲剂如醋酸缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、Tris 缓冲剂、三乙醇胺缓冲剂、硼酸盐缓冲剂、甘氨酸缓冲剂、碳酸盐缓冲剂、Tris-盐酸缓冲剂、巴比妥缓冲剂等。缓冲剂相互可以以任意比例混合使用。抗原抗体反应最好是在约 0℃ ~ 约 60℃ 之间的温度下进行。

用酶等标记的抗血清、纯化的抗体和单克隆抗体等抗体试剂以及结合于载体的抗体试剂以及要测定物质的温育处理可以一直进行到平衡之前，但是在抗原抗体反应达到平衡之前很早的时候，在有限的温育处理后，固相和液相进行分离之后，反应就可能终止，可以测定液相或固相任一相中酶等标记的存在程度。测定操作可以用自动化测定装置进行，也可以使用发光检测器、照相检测器等检测底物在酶作用下转换生成的表现信号进行测定。在抗原抗体反应中，有时为使所使用的各个试剂、待测定物质、以及酶等的标记稳定、使抗原抗体反应本身稳定可以采取适当的手段。另外为了除去非特异性反应、降低抑制作用的影响、或为使测定反应活化，也可以将蛋白质、稳定剂、象下述那样的表面活性剂、螯合剂等加到温育溶液中。作为螯合剂，乙二胺四乙酸（EDTA）最好。也可以实施本领域通常采用的或本领域技术人员都知道的为防止非特异性反应的封闭处理，例如可以用哺乳动物等的正常血清蛋白或白蛋白、血红蛋白、卵清白蛋白（OVA）、脱脂乳、乳发酵物质、胶原、明胶等进行处理。只要目的是防止非特异性结合反应，这些方法都可以不限定地使用。另外在样品和固相的洗净中可以从上述缓冲液体系和盐水中选择使用适当的液体，另外可以添加选自 Tween 20（商品名）、Tween 80（商品名）、NP-40（商品名）、Triton X100（商品名）、Brij（商品名）等非离子表面活性剂、CHAPS 等两性表面活性剂以及阳离子表面活性剂、阴离子表面活性剂等物质后使用。

作为用本发明测定方法进行测定的样品可以用任何形态的溶液和胶体溶液、非流体样品等，最好是来自生物体的样品，例如胸腺、睾丸、

肠、肾脏、脑、乳房组织、卵巢、子宫、前列腺、结肠·直肠、胃、肺、支气管、胰腺癌、肝脏等所有脏器和组织、以及脏器和组织的恶性肿瘤、白血病细胞、血液、血清、血浆、关节液、脑脊液、胰液、胆汁液、唾液、羊水、尿、其他体液、细胞培养液、组织培养液、组织匀浆液、活检样品、组织、细胞等。

当将包括各个免疫学测定法的各种分析和定量法应用于本发明的测定方法时不必进行特别条件、操作等的设定。在各种方法中通常条件、操作法中加入本领域技术人员通常的技术考虑之后，可以建立与本发明的测定对象物质和实质上与其具有同等化学性质的物质有关的测定体系。

使用本发明的抗半乳凝素 9 抗体、特别是单克隆抗体，也可以进行[抗原]表位图绘制，如果利用识别各个表位的抗体可以检测·测定各个半乳凝素 9 及其相关肽段等。

象上述那样含有以多克隆抗体（包括抗血清）或单克隆抗体形式得到的抗半乳凝素 9 抗体的癌转移检测剂可以将正在癌化的组织提取的癌细胞作为标本从免疫组织学角度对半乳凝素 9 进行解析。即，通过对对象细胞中的半乳凝素 9 量进行解析，可以检测该细胞的转移能力。

这里的癌转移能力检测剂是含有抗半乳凝素 9 抗体作为有效成分的检测剂。所谓“作为有效成分含有”意味着含有可检测癌转移能力的浓度的抗半乳凝素 9 抗体。而抗半乳凝素 9 抗体可以识别半乳凝素 9 蛋白质中任意区域，对[抗原]表位没有限定。

作为天然型半乳凝素 9 已报道了 L 型半乳凝素 9、M 型半乳凝素 9 以及 S 型半乳凝素 9，L 型半乳凝素 9 是通过序列 4 的推定连接肽将 N 末端结构域和 C 末端结构域连接后的片段，M 型半乳凝素 9 是通过序列 5 的推定连接肽将 N 末端结构域和 C 末端结构域连接后的片段，S 型半乳凝素 9 是通过序列 6 的推定连接肽将 N 末端结构域和 C 末端结构域连接后的片段，就 M 型半乳凝素 9 来说，在从 L 型半乳凝素 9 的该连接肽区域缺失序列 7 的氨基酸残基这一点上与 L 型半乳凝素 9

不同；而就 S 型半乳凝素 9 来说，在从 M 型半乳凝素 9 的该连接肽区域缺失序列 8 的氨基酸残基这一点上与 M 型半乳凝素 9 不同；即就 S 型半乳凝素 9 来说，在从 L 型半乳凝素 9 推定的连接肽区域缺失序列 9 的氨基酸残基这一点上与 L 型半乳凝素 9 不同。因此提供能够识别这样差别的抗半乳凝素 9 抗体也是本发明的目的。

在本说明书中，半乳凝素 9 可以认为是包括上述 L 型半乳凝素 9、M 型半乳凝素 9 和 S 型半乳凝素 9，此外还包括这些半乳凝素 9 家族天然产生的变异体、以及对该家族实施人工变异（即、对一个以上的氨基酸进行缺失、附加、修饰、插入等）的产物或含有其中一部分结构域或一部分肽段的产物。

作为代表性的抗半乳凝素 9 抗体如可以与 L，M 以及 S 型半乳凝素 9 都结合的抗体、与 L 和 M 型半乳凝素 9 两者结合，但不与 S 型半乳凝素 9 反应的抗体、与 L 型半乳凝素 9 结合，但不与 M 和 S 型半乳凝素 9 反应的抗体、分别对 L，M 以及 S 型半乳凝素 9 特异的抗体、对半乳凝素 9 的 C 末端 CRD 和其肽段特异的抗体、对半乳凝素 9 的 N 末端 CRD 和其肽段特异的抗体、对各个连接肽或其肽段特异的抗体。

作为半乳凝素 9 的测定体系，可以有效利用例如对组织进行免疫染色（METHODS, 24, 289-296(2001); J Immunol Methods, 47(2), 129-144 (1981); *ibid.*, 150(1-2), 5021, 23-32 & 151-158 (1992); Cancer J, 7(1), 24 - 31 (2001)等）、免疫电子显微镜(Mol Biotechnol, 7(2), 145-151 (1997); J Electron Microsc Tech., 19(1), 57-63 & 64-79(1991); *ibid.*, 19(3), 305 - 315 (1991) 等)的蛋白测定体系、所谓的原位杂交的表达基因测定体系，对组织提取物可以有效利用 EIA, RIA, FIA, LIA、Western 印迹(J Electron Microsc (Tokyo), 45 (2), 119-127 (1996); Methods Biochem Anal., 33, 1-58 (1988); Methods Enzymol., 271, 177-203(1996); *ibid.*, 305, 333 - 345 (2000); J Immunol Methods, 152(2), 227-236 (1992); *ibid.*, 170(2), 177-184 (1994); *ibid.*, 195(1-2), 149-152 (1996); 口野嘉幸等编、“基因和蛋白质、实验操作 印迹法”、株式会社软科学社、昭和

62年11月10日发行等)的蛋白测定体系、Northern印迹、Dot印迹、RNase 保护分析、RT-PCR(逆转录聚合酶链反应, reverse transcription polymerase chain reaction)、实时(Real-Time)PCR(Clinical Chemistry, 46:11, 1738-1743 (2000))的表达基因测定体系、而对于血中、体液等可以有效利用EIA, RIA, FIA, LIA、Western印迹的蛋白测定体系。

在EIA测定体系中,至于竞争法,用抗半乳凝素9抗体作为固定化抗体,使用标记抗原以及非标记抗原(作为抗原可以是半乳凝素9和其肽段等),就非竞争法来说,如夹心法,除了可以使用固相化抗半乳凝素9抗体或标记抗半乳凝素9抗体之外,也可以对抗半乳凝素9抗体直接进行标记,或不固相化对抗半乳凝素9抗体的抗体进行标记,也可以进行固相化。作为灵敏度扩增法,就与非酶标记一次抗体的组合来说,例如可以利用高分子聚合物和酶以及一次抗体的组合(应用Envision试剂的组合;Enhanced polymer one-step staining (EPOS)),至于与非酶标记二次抗体的组合,如PAP(peroxidase-antiperoxidase)法等的酶和抗酶抗体复合物的组合、SABC(avidin-biotinylated peroxidase complex)法等的生物素标记二次抗体和生物素标记酶-抗生物素蛋白复合物的组合、ABC(streptavidin-biotin complex)法、LSAB(labeled streptavidin-biotin)法等的生物素标记二次抗体和生物素标记酶-链球菌抗生物素蛋白复合物组合、CSA(catalyzed signal amplification)法等的SABC和生物素标记酪胺酰胺(tyramide)以及酶标记链球菌抗生物素蛋白的组合、用高分子聚合物对二次抗体和酶进行标记的产物等。

有关这些一般的技术手段的详细说明可以参照综述、书籍等[例如,入江宽编,《放射免疫分析》,讲谈社,昭和49年发行;入江宽编,《续放射免疫分析》,讲谈社,昭和54年发行;石川荣治等编《酶免疫测定法》,医学书院,昭和53年发行;石川荣治等编《酶免疫测定法》(第2版),医学书院,昭和57年发行;石川荣治等编《酶免疫测定法》(第3版),医学书院,昭和62年发行;H. V. Vunakis

等编, "Methods in Enzymology", Vol. 70 (免疫化学技术, A 部). Academic Press, New York (1980); J. J. Langone 等编, "Methods in Enzymology", Vol. 73 (免疫化学技术, B 部) Academic Press, New York (1981); J. J. Langone 等编, "Methods in Enzymology", Vol. 74 (免疫化学技术, C 部) Academic Press, New York (1981); J. J. Langone 等编, "Methods in Enzymology", Vol. 84 (免疫化学技术, D 部:选择性免疫分析), Academic Press, New York (1982); J. J. Langone 等编, "Methods in Enzymology", Vol. 92 (免疫化学技术, E 部:单克隆抗体和常规免疫分析方法), Academic Press, New York (1983); J. J. Langone 等编, "Methods in Enzymology", Vol. 121 (免疫化学技术, I 部:杂交瘤技术和单克隆抗体), Academic Press, New York (1986); J. J. Langone 等编, "Methods in Enzymology", Vol. 178 (抗体, 抗原和分子模拟), Academic Press, New York (1989); M. Wilchek 等编, "Methods in Enzymology", Vol. 184 (抗生物素蛋白 - 生物素技术), Academic Press, New York (1990); J. J. Langone 等编, "Methods in Enzymology", Vol. 203 (分子设计和建模: 概念和应用, B 部: 抗体和抗原, 核酸, 多糖, 和药物), Academic Press, New York (1991) 等或其中引用的文献(这些文献中的记载作为参考都包括在本说明书的公开内容中)。

作为本发明的另一种样式, 本发明提供特征为作为有效成分含有与编码半乳凝素 9 或其组成结构域的核酸杂交的核酸的癌转移能力检测剂、癌转移能力检测法以及利用这些方法的系统。作为进行杂交的该核酸如探针和引物等。只要是与半乳凝素 9 基因或其产物杂交的探针, 只要符合其目的, 可以无限制使用。该核酸可以通过从上述的“基因重组技术”获得, 例如利用公知的半乳凝素 9 的碱基序列的信息, 设计多个引物, 进行合成, 进行 PCR (聚合酶链反应 polymerase chain reaction) 等也可很简单地获得。引物的制作可以利用本领域已知的方法进行, 代表性的方法如磷酸二酯法、磷酸三酯法、磷酸酰胺 (phosphoamidite) 法等合成, 例如利用自动 DNA 合成仪、例如, model

381A DNA synthesizer (Applied Biosystems)等可以合成。使用 cDNA 文库和有意引物以及反意引物进行 PCR, 可以扩增 cDNA。得到的核酸可以用作特异性杂交探针。为了用放射性同位素等对探针进行标记, 可以使用市售的标记试剂盒、例如随机初级 (Prime) DNA 标记试剂盒 (Boehringer Mannheim) 等进行。例如作为 random-priming 试剂盒 (Pharmacia LKB, Uppsala) 等, 用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]\text{dCTP}$ (Amersham) 等对探针用 DNA 进行标记, 可以得到带有放射性的探针。另外作为探针的标记可以使用本领域已知的标记, 另外也可以从在抗体部分说明的标记中适当选择利用。

杂交可以通过将带有所期望的 DNA 等样品转移到尼龙膜上, 根据需要实施变性处理、固定化处理、洗净处理等后, 于杂交用缓冲液中使转移到膜上的 DNA 等与根据需要变性的标记探针 DNA 片段反应来进行。杂交处理通常于约 35°C ~ 约 80°C 下, 最合适的是在约 50°C ~ 约 65°C , 进行约 15 分钟 ~ 约 36 小时, 最好是进行约 1 小时 ~ 约 24 小时反应, 可以选择最适条件进行。例如杂交处理于约 55°C 下进行约 18 小时。作为杂交用缓冲液可以选择使用本领域中常用的缓冲液, 例如, 可以使用 Rapid hybridization buffer (Amersham)。作为转移膜的变性处理如使用碱性变性液的方法, 处理后最好用中和液或缓冲液进行处理。另外作为膜的固定化处理通常都是在约 40°C ~ 约 100°C , 最好是在约 70°C ~ 约 90°C 温度下处理约 15 分钟 ~ 约 24 小时, 最好通过约 1 小时 ~ 约 4 小时的热烘进行, 可以选择合适的理想的条件进行。例如, 将膜于约 80°C 下热烘约 2 小时进行固定化。作为转移后膜的清洗可以通过本领域通常使用的洗净液、例如含有 1M NaCl、1mM EDTA 和 0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 的 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH8.0 等进行清洗。作为尼龙膜等膜可以选择使用本领域通常使用的膜, 例如尼龙膜 [Hybond-N, Amersham]。

作为上述碱性变性液、中和液、缓冲液可以选择使用本领域中通常使用的, 作为碱性变性液, 如含有 0.5M NaOH 和 1.5M NaCl 的溶液, 作为中和液, 如含有 1.5M NaCl 的 0.5M Tris-HCl 缓冲液, pH8.0 等,

作为缓冲液如 $2 \times \text{SSPE}$ (0.36M NaCl 、 $20\text{mM NaH}_2\text{PO}_4$ 和 2mM EDTA) 等。在进行杂交处理之前, 为了防止非特异性的杂交反应, 根据需要, 转移后的膜最好进行预杂交处理。这种预杂交处理可以通过例如将膜浸入预杂交溶液 [50% 甲酰胺、 $5 \times \text{Dehardt}$ 溶液 (0.2% 牛血清白蛋白, 0.2% 聚乙烯吡咯烷酮)、 $5 \times \text{SSPE}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ 热变性鲑精 DNA] 等, 于约 35°C ~ 约 50°C 下, 最好在约 42°C , 进行约 4 ~ 约 24 分钟, 最好是进行约 6 小时 ~ 约 8 小时反应来进行, 这样的条件作为本领域技术人员重复进行适当实验, 确定最适合的条件。杂交用标记探针 DNA 片段的变性可以于例如约 70°C ~ 约 100°C 下, 最好是在约 100°C , 进行约 1 分钟 ~ 约 60 分钟, 最好是进行约 5 分钟加热等条件下进行。而杂交可以利用众所周知的方法或以这些方法为标准的方法进行, 本说明书中所谓的严格条件指的是, 例如对钠浓度, 为约 15 ~ 约 50mM 、较好是约 19 ~ 约 40mM , 最好是在约 19 ~ 约 20mM , 至于温度约 35 ~ 约 85°C , 较好是在约 50 ~ 约 70°C , 最好是在约 60 ~ 约 65°C 。

杂交结束后将膜充分洗净, 将进行特异杂交反应的标记探针 DNA 片段以外的标记探针除去。膜的清洗处理可以选择使用本领域中通常使用的溶液, 例如可以用含有 $0.1\% \text{SDS}$ 的 0.5SSC (0.15M NaCl 、 15mM 柠檬酸) 溶液等进行清洗。

进行杂交的部位可以通过有代表性的放射自显影检测, 也可以从本领域中使用的方法中选择用于检测。

对半乳凝素 9 表达基因 (包括 cDNA 等 DNA 和 mRNA 等 RNA) 抗原通过根据上述的“基因重组技术”, 本领域中用于检测特定的基因表达所掌握的手法, 例如原位杂交、Northern 印迹、Dot 印迹、RNase 保护分析、RT-PCR、Real-Time PCR (Journal of Molecular Endocrinology, 25, 169 - 193 (2000)) 以及其中引用的文献)、DNA 分析解析法 (Mark Shena 编, “Microarray Biochip Technology”, Eaton Publishing (2000 年 3 月)) 等进行检测·测定, 可以检测癌转移能力。利用这样技术的半乳凝素 9 表达基因测定体系、其中利用的试剂、方法、程序等都包括在本发明的癌转移能力检测剂、

癌转移能力检测法以及方法中利用的系统中。在该原位杂交中例如可以包括非 RI 原位杂交，其中也包括例如直接法和间接法。该直接法是使用可以检测的分子（报告因子）直接结合于核酸探针，该间接法是使用例如针对报告因子的抗体等使信号放大。在核酸探针中的寡核苷酸中导入官能团（例如脂肪族伯氨基、SH 基等），也可以使半抗原、荧光色素、酶等结合于这样的官能团。作为核酸探针的标记，代表性的有洋地黄毒苷原（DIG）、生物素、荧光素等，也可以象上述那样适当选择使用在抗体部分说明的标记，也可以利用多重标记，另外也可以利用标记抗体。作为核酸探针的标记法可以选择使用本领域中已知的方法，例如随机引物法、切口平移法、利用 PCR 的 DNA 扩增、标记/加尾法、体外转录法等。对处理的样品进行观察可以适当选择使用本领域了解的方法，例如也可以使用暗视野显微镜、相差显微镜、反射反差显微镜、荧光显微镜、数字成像显微镜、电子显微镜等，以及流式细胞仪等。在本发明中可以使用半乳凝素 9 和半乳凝素 9 表达基因作为癌转移能力标志物或肿瘤标志物，由此可以制作各种各样形态的癌转移能力检测剂或肿瘤检测和/或测定剂、癌转移能力检测法或肿瘤检测和/或测定法、以及癌转移能力检测或肿瘤检测和/或测定试剂盒或系统，不仅在癌的诊断、预防、治疗中 useful，而且更具有优越性。而且在癌治疗后，即预后，它们也可以作为预后的癌转移能力检测剂或肿瘤检测和/或测定剂、癌转移能力检测法或肿瘤检测和/或测定法、以及癌转移能力检测或肿瘤检测和/或测定试剂盒或系统，预期用于预后也会发挥非常好的功能、作用效果。

至于本说明书中“标志”可以指使该“转移能力”或“肿瘤”的识别或鉴定成为可能的物质，另外也可以表示作为该“转移能力”的程度和“肿瘤”恶性程度的尺度的作用，通过该标志存在与否和/或量的差异可以认为是表示上述功能的意思。

在说明书和附图中，用语或来自 IUPAC-IUB 生化术语委员会（Commission on Biochemical Nomenclature），或是具有来源于该领域中惯用的用语的含义。

实施例

以下举出实施例，对本发明进行具体说明，但本发明不限于这些实施例，应当理解为是基于本说明书的思想可能的各种各样的实施状态。

所有的实施例除了另外详细记载的以外，都是利用标准技术实施的例子，或可以实施的例子，这些技术都是本领域技术人员周知而惯用的技术。

在以下的实施例中如果没有特别指出时，具体的操作和处理条件等如DNA克隆是根据 J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, 《分子克隆实验指南》 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版)”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York (1989); D. M. Glover 等编, 《DNA克隆》 DNA Cloning”, 第2版, Vol. 1 至 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995)记载的方法进行的, 而使用PCR法时是按照 H. A. Brlich 编, 《PCR技术》 PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover 等编, 《DNA克隆》 DNA Cloning”, 第2版, Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995)以及 M. A. Innis 等编, 《PCR指南》 PCR Protocols”, Academic Press, New York (1990)记载的方法进行, 而使用市售的试剂或试剂盒上使用附带的指示书(流程)和附带的药品等。

实施例 1

含有抗半乳凝素 9 抗体的抗血清的制备和抗半乳凝素 9 抗体的纯化

作为致敏抗原制备半乳凝素 9 的两个糖识别结构域(CRD)中 C 末端一侧的 CRD(具有对应于 L 型半乳凝素 9[序列 1]的第 192~第 355 号氨基酸残基的序列的蛋白质)。首先将编码 C 末端一侧的 CRD 的碱基序列整合到载体(pGEX-4T-2, Amersham Pharmacia Biotech 公司生产)中, 制备产生谷胱甘肽 S-转移酶(GST)与 C 末端一侧的 CRD

融合的融合蛋白质的表达载体。用该表达载体转化大肠杆菌（BL21，Amersham Pharmacia Biotech 公司生产），在该大肠杆菌中使上述融合蛋白质表达。然后将该大肠杆菌破碎，得到的上清用谷胱甘肽 Sepharose 柱（Amersham Pharmacia Biotech 公司生产）进行分级。通过这样操作可以对包含在上清中的融合蛋白质进行纯化。

接下来，含有纯化的融合蛋白质的溶液与凝血酶（Amersham Pharmacia Biotech 公司生产）反应，将 C 末端的 CRD 和 GST 之间连接切断。C 末端 CRD 用乳糖柱（株式会社 Honen 公司生产）的亲和层析进行纯化。

将纯化的 C 末端 CRD 200 μ g 与弗氏完全佐剂（Difco 公司生产）1ml 混合，制备含有致敏抗原的溶液。将该溶液经皮下注射入体重 3~4kg 的家兔（日本家兔，日本 SLC 公司生产），每隔 2 周注射 1ml 量的溶液（5 次）。

经 5 次皮下注射后的一周后从兔中采血，制备血清。确认得到的血清中含有的抗体特异识别半乳凝素 9，该血清作为含有抗半乳凝素 9 抗体的抗血清。

另外，为了比较，作为抗原使用半乳凝素 1 和半乳凝素 3 的分子全体与上述手法同样制备含有抗半乳凝素 1 抗体的抗血清和含有抗半乳凝素 3 抗体的抗血清。抗半乳凝素 1 抗体和抗半乳凝素 3 抗体分别特异识别半乳凝素 1 和半乳凝素 3。而且在抗半乳凝素 9 抗体、抗半乳凝素 1 抗体和抗半乳凝素 3 抗体中看不到相互的交叉反应。

纯化抗半乳凝素 9 抗体的制备是通过使用将纯化半乳凝素 9 C 末端 CRD 固定于亲和胶（Affigel）（Bio-Rad 公司生产）柱子的亲和层析实施的。将纯化半乳凝素 9 C 末端 CRD 10mg 与 10ml 的亲和胶-10（Bio-Rad 公司生产）混合，于 4℃ 下反应过夜后，亲和胶用 20mM 磷酸缓冲液 - 生理盐水（PBS）充分洗净，亲和胶中未反应的官能团于含有 100mM 的单乙醇胺的 PBS 中封闭过夜，最后再用 PBS 洗净，制备半乳凝素 9 C 末端 CRD 固定化柱。向该固定化柱中加入含有抗半乳凝素 9 抗体的兔抗血清 10ml，用 PBS 充分洗净后，用 20mM 甘氨酸 - 盐酸缓

冲液 (pH4.0) 将吸附的抗半乳凝素 9 抗体洗脱下来。洗脱出的抗半乳凝素 9 抗体溶液立刻用 200mM Tris-盐酸缓冲液中和, 用 PBS 透析过夜后, 冷冻保存于 -80°C 下。

实施例 2

使用黑素瘤细胞检测转移能力

使用实施例 1 制备的含有抗半乳凝素 9 抗体的抗血清检测黑素瘤的转移能力。

本例中使用的黑素瘤如表 1 表示的那样使用了来自于原发组织 (原发病灶) 75 例、转移性 (转移灶) 33 例, 色素性痣 28 例的切除标本。

表 1

	原发性	转移性	色素性痣
数	75	33	28
男/女	33/42	13/9	7/21
平均年龄	64.9	64.5	21.2
病期	21-90	22-90	8-55
0/I/II/III/IV	4/22/20/25/4		
组织型			
Melanoma in situ	4	Junctional type	2
Acral lentiginous melanoma	37	Compound type	1
Superficial spreading melanoma	35	Intradermal type	25
Nodular melanoma	7		
Mucous melanoma	5		
Lentigo maligna melanoma	7		
平均厚度 (mm)	3.2+/-2.6		
(范围)	(0.1-10)		

使用实施例 1 的含有抗半乳凝素 9 抗体的抗血清对这些黑素瘤细

胞中的半乳凝素 9 的表达进行测定。通过抗血清中含有的抗半乳凝素 9 抗体确认半乳凝素 9 表达的细胞定为阳性，而通过抗血清中含有的抗半乳凝素 9 抗体没有确认半乳凝素 9 表达的细胞定为阴性，确认半乳凝素 9 只有少量表达的定为弱阳性。表 2 给出了确认结果。

表 2

	半乳凝素 9	
	强阳性 (%)	弱阳性和阴性 (%)
色素性痣	20 (71)	8 (29)
原发性恶性黑 (素) 痣	29 (39)	46 (61)
转移性恶性黑 (素) 痣	10 (30)	23 (70)

就像表 2 所表明的那样，在良性的色素性痣中，阳性与阴性比较，表现出显著的多。而在恶性色素性痣中阳性与阴性比较，表现出显著的少。而在原发病灶以及转移灶中，阴性虽然比较多，但没有看到统计学上显著性差别。

以下就原发病灶的 75 例对肿瘤的厚度与半乳凝素 9 的表达量之间的关系进行测定。肿瘤厚度在 1.5mm 以下的作为 A 组，大于 1.5mm 而不到 4mm 的作为 B 组，4mm 以上的作为 C 组。而黑 (素) 痣细胞病灶中 80% 以上为阳性的情形作为强阳性组，除此以外的作为阴性组。

A 组：强阳性组 2 例，阴性组 25 例

B 组：强阳性组 10 例，阴性组 12 例

C 组：强阳性组 17 例，阴性组 9 例

从该结果可以判断癌化时半乳凝素 9 首先消失，然后伴随着黑 (素) 痣细胞的增殖 (即，肿瘤厚度的增加) 更多地表达。

而这些原发病灶 75 例中，有 15 例初诊时被确定淋巴结转移。对这 15 例的半乳凝素 9 表达量与肿瘤厚度的关系进行测定，结果如下所示。

A 组：强阳性组 0 例，阴性组 1 例

B组: 强阳性组 1例, 阴性组 1例

C组: 强阳性组 3例, 阴性组 9例

根据这一结果, 将原发病灶 75 例中肿瘤厚度超过 1.5mm 的 48 例 (B 组和 C 组) 作为一组进行统计学研究。图 1 给出了统计学研究的条件及结果。就像图 1 所表明的那样, 可以确认在肿瘤厚度超过 1.5mm 的原发病灶组中半乳凝素 9 的表达和淋巴结转移之间有相关性。即在肿瘤厚度超过 1.5mm 的原发病灶组中发生淋巴结转移的 14 例中, 与强阳性组相比, 阴性组显著性的多。

另外, 就原发病灶 75 例中的 12 例可以看到手术后的复发。就这 12 例中半乳凝素 9 的表达和肿瘤厚度的关系进行了测定, 结果如下所示。

A组: 强阳性组 0例, 阴性组 1例

B组: 强阳性组 0例, 阴性组 0例

C组: 强阳性组 2例, 阴性组 9例

根据这一结果, 将原发病灶 75 例中肿瘤厚度超过 1.5mm 的 48 例 (B 组和 C 组) 作为一组进行统计学研究。统计学研究的条件及结果如图 2 所示。就像图 2 所表明的那样, 可以确认在肿瘤厚度超过 1.5mm 的原发病灶组中半乳凝素 9 的表达和术后复发之间有相关性。即在肿瘤厚度超过 1.5mm 的原发病灶组中手术后复发的 11 例中, 与强阳性组相比, 阴性组有显著意义的多。

另外, 原发病灶 75 例中有 13 例是死亡的例子。就这 13 例中半乳凝素 9 的表达和肿瘤厚度的关系进行了测定, 结果如下所示。

A组: 强阳性组 0例, 阴性组 1例

B组: 强阳性组 0例, 阴性组 1例

C组: 强阳性组 3例, 阴性组 8例

根据这一结果, 将原发病灶 75 例中肿瘤厚度超过 1.5mm 的 48 例 (B 组和 C 组) 作为一组进行统计学研究。统计学研究的条件及结果如图 3 所示。就像图 3 所表明的那样, 可以确认在肿瘤厚度超过 1.5mm 的原发病灶组中半乳凝素 9 的表达和死亡病例之间有相关性。即在肿

瘤厚度超过 1.5mm 的原发病灶组中死亡 12 例中，与强阳性组相比，阴性组有显著意义的多。

由图 1~3 的结果可知半乳凝素 9 表达阳性的黑（素）癌细胞转移能力低。因此含有抗半乳凝素 9 抗体的抗血清能够检测癌细胞的转移能力，表明可以作为癌细胞转移能力检测剂使用。

实施例 3

乳腺癌细胞的转移能力的检测

使用实施例 1 制备的含有抗半乳凝素 9 抗体的抗血清对乳腺癌细胞的转移能力进行测定。

在本实施例中使用从 67 名乳腺癌患者得到的乳腺癌细胞。当对这些乳腺癌细胞的病理组织型进行区别时，结果有乳头腺管癌 20 例、充实腺管癌 25 例和硬癌 22 例。就得到的乳腺癌细胞使用实施例 1 得到的含有抗半乳凝素 9 抗体的抗血清对半乳凝素 9 的表达进行了确认。结果如图 3 所示。

表 3

半乳凝素 9	阳性	阴性	阳性率
乳头腺管癌	13	7	65%
充实腺管癌	11	14	44%
硬癌	6	16	27%
合计	45%	55%	100%

由表 3 可知，定为预后良好的乳头腺管癌中半乳凝素 9 阳性率也表现出最高值。

另外乳腺癌细胞 32 例中达到远距转移的 16 例中有 14 例是半乳凝素 9 阴性。而对半乳凝素 9 阳性组和阴性组之间非转移性累积生存率进行测定的结果如图 4 所示。就像图 4 表明的那样，可以看到半乳凝素 9 阳性组和阴性组之间非转移性累积生存率存在显著差别。

进一步对半乳凝素 9 阳性组和阴性组中的淋巴结转移、雌激素受体表达率和远距转移的关系进行了研究。结果如表 4 所示。表 4 中淋巴结转移用“n(+)”表示，雌激素受体表达率用“ER”表示，远距转移用“meta”表示。

表 4

	n(+)	ER	meta
阳性	43%	50%	6%
阴性	41%	76%	38%
显著性差异	无	无	0.003

就像表 4 表明的那样，在淋巴结转移和雌激素受体表达率与半乳凝素 9 表达率之间确认无显著性差异，没有发现相关关系。然而在远距转移与半乳凝素 9 表达之间存在显著性差异，确认有相关关系。

另外，根据以往众所周知的的亚克隆法对半乳凝素 9 高表达株和半乳凝素 9 低表达株进行了克隆。结果就像图 5 所示那样，得到了 5 株半乳凝素 9 高表达株和 2 株半乳凝素 9 低表达株。而图 5 是通过 Western 印迹法表示半乳凝素 9 表达的电泳照片。图 5 中“parent”带是表示半乳凝素 9 的对照。

在对半乳凝素 9 高表达株（图 5 中用 K4 表示的带）进行培养时，就像图 6 所示那样可以确认许多细胞粘接的细胞块。与此对应的对半乳凝素 9 低表达株（图 5 中用 K10 表示的带）进行培养时，就像图 7 所示那样可以确认许多细胞以分散状态增殖。

这些结果表明半乳凝素 9 有可能强烈地维持着乳腺癌细胞的细胞间粘接，抑制乳腺癌细胞从细胞块（肿瘤块）脱落。换言之，结果显示半乳凝素 9 低表达株容易从细胞块脱落，引起癌的转移。由这些结果表明通过利用含有高半乳凝素 9 抗体的抗血清测定乳腺癌细胞中半乳凝素 9 的表达可以检测作为对象的乳腺癌细胞的转移能力。

实施例 4

利用免疫组织染色检测半乳凝素 9

石蜡包埋切片进行以下那样的处理之后，利用免疫组织染色对半乳凝素 9 进行检测，研究癌转移能力。

用二甲苯 3 次（各 10 分钟），然后用 100% 酒精、90% 酒精和 75% 酒精（各 2 分钟）进行脱石蜡处理。微波（MW）处理是将 10mM 柠檬酸缓冲液（pH6.0）分别注入两个耐热药瓶中，MW 照射使其沸腾。一个药瓶作切片用，另一个作为追加缓冲液。将切片浸入沸腾的缓冲液中，照射 MW（用 500W 微波炉，5 分钟 ×2 次，共计 10 分钟）。操作过程中为了补充蒸发部分的缓冲液，每 5 分钟追加一次沸腾的缓冲液，进行加热。处理后的切片于室温放置 10 分钟，慢慢冷却。

为了对内源性过氧化物酶进行封闭，使用时制备 0.3% 过氧化氢 - 甲醇，然后将切片于该试剂中室温浸渍 30 分钟。用 PBS（磷酸盐缓冲生理盐水，phosphate-buffered saline）洗 4 次（第 4 次浸渍 10 分钟）。洗净后用滤纸将组织周边的水分擦去，放入湿润箱中。加 6 滴含有 5% BSA（牛血清白蛋白，bovine serum albumin）的 PBS（含有 0.2% 叠氮化钠），于室温下在湿润箱中放置 1 小时，进行封闭。

组织样品不洗直接放到 BSA 上加 6 滴一次抗体（抗半乳凝素 9 抗体，10 μg/ml）的 2% BSA-PBS 液，于室温下在湿润箱中放置过夜，使组织样品与一次抗体反应。然后用 PBS 洗 4 次（第 4 次浸渍 10 分钟）。洗净后用滤纸将组织周边的水分擦去，放入湿润箱中。作为二次抗体使用用辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗兔抗体（DACO ENCISION, K4001），向组织样品加 6 滴该抗体，于室温下在湿润箱中放置 1 小时后，用 PBS 洗 4 次。用 DAB（3, 3'-二氨基联苯胺四盐酸盐）试剂（DAB + PBS + 30% 过氧化氢）使其发色。一边观察发色的过程，在对照即将发色时停止，用水洗 8 次终止反应。

核染色用 Mayer 苏木精染剂进行。脱水、透析、封入按照 75% 酒精、90% 酒精和 100 酒精（各 2 分钟）、二甲苯 3 次（各 3 分钟）、封入过程进行。

制备抗半乳凝素 9 抗体和正常兔 IgG (normal rabbit IgG: 对照抗体) 的 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 溶液, 对乳腺癌的 2 病例 [乳头腺管癌的癌组织 (比较预后良好)] 以及硬癌 (比较预后不良) 的切片进行染色。

使用 5 $\mu\text{g/ml}$ 溶液时可以判断出利用对照抗体的染色性低, 在抗半乳凝素 9 抗体中其染色性也低。使用 10 $\mu\text{g/ml}$ 溶液时利用对照抗体的染色性都没有, 与利用抗半乳凝素 9 抗体的染色性的差别十分大, 获得了特异染色。使用 20 $\mu\text{g/ml}$ 溶液时, 利用抗半乳凝素 9 抗体的染色性非常高, 但利用对照抗体的染色性也高。

表明使用抗半乳凝素 9 抗体可以通过癌组织的免疫组织染色检测半乳凝素 9 表达组织, 而且可以知道其表达程度 (半乳凝素 9 量多少的分别评价)。

实施例 5

单克隆抗体的制作

(a) 免疫原

免疫用的抗原可以使用重组 L 型和 M 型半乳凝素 9, 以及以从序列表中序列 1, 4, 5, 6, 7, 8 和 9 中选择的氨基酸序列为基础设计合成的肽。另外免疫用的抗原也可以使用将得到的 cDNA 与动物细胞表达载体连接, 通过 CHO 细胞、COS 细胞等使其表达得到的重组蛋白质。这些抗原蛋白质可以通过离子交换、凝胶过滤、亲和层析和其他各种层析纯化。

将纯化的免疫用抗原用一般的方法进行免疫, 产生抗体的细胞进行诱导、通过细胞融合可以得到产生抗体的细胞。根据对纯化的免疫用抗原的反应性可以进行克隆、产生单克隆抗体的杂交瘤的株化。

作为为获得 L, M 和/S 型半乳凝素 9 特异的单克隆抗体的免疫原, 可以使用具有半乳凝素 9 的各个特征的氨基酸序列的半抗原化合物肽。例如从来自序列表中序列 2 的 Met¹ 至 Thr¹⁶⁷、序列 1 的 Ile¹⁹² 至 Thr³²³、推定的连接肽部分的 Asn-Pro-Arg-Thr-Val-Pro-Val-Gln-Pro-Ala-Phe-Ser-Thr-Val-Pro-Phe-Ser-Gln-Pro-Val-Cys-

Phe-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Gly-Arg-Arg-Gln-Lys-Pro-Pro-Gly-Val-Trp-Pro-Ala-Asn-Pro-Ala-Pro-Ile-Thr-Gln-Thr-Val-Ile-His-Thr-Val-Gln-Ser-Ala-Pro-Gly-Gln-Met-Phe-Ser [序列 4] 以及 Asn-Pro-Arg-Thr-Val-Pro-Val-Gln-Pro-Ala-Phe-Ser-Thr-Val-Pro-Phe-Ser-Gln-Pro-Val-Cys-Phe-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Gly-Arg-Arg-Gln-Lys-Pro-Pro-Gly-Val-Trp-Pro-Ala-Asn-Pro-Aln-Pro-Ile [序列 9] 选择出的含有连续的至少 3 个以上、最好是含有 5 个以上的连续肽序列。

(b) 抗原多肽的制备

从序列 1 记载的人半乳凝素 9 的氨基酸序列中选择特征序列，进行合成。实施例 1 的 C 末端的 CRD 以外的其他肽使用肽合成仪（肽合成仪 9600、Milligen/Biosearch）通过 Fmoc-bop 法合成。在多肽的 N 末端导入半胱氨酸。合成的肽通过使用 μ Bondasphere, C18 柱（Waters）的高效液相色谱等进行纯化。

(c) 多肽和 BSA 复合物的制备

使多肽借助于半胱氨酸与牛血清清蛋白（BSA）结合，作成抗原缀合物。将 10.1mg 的 BSA 溶解在 1mL 的 0.1M pH7.0 磷酸缓冲液后的溶液与将 1.14mg 的 EMCS（N-(ϵ -马来酰亚胺己酰氧基)琥珀酸亚胺）溶解在 24.9 μ L 的二甲基甲酰胺后的溶液混合，于 30 $^{\circ}$ C 下反应 30 分钟，然后将上述混合溶液通过用 0.1M pH7.0 磷酸缓冲液平衡的 Sephadex G-25（Pharmacia）凝胶柱（直径 13mm，长 120mm）进行凝胶过滤。将上述（b）中合成的多肽溶解在 0.1M pH7.0 磷酸缓冲液中，相对于结合马来酰亚胺，BSA 为大约 50 倍摩尔量进行混合。即将结合马来酰亚胺 BSA 与多肽混合，于 4 $^{\circ}$ C 下温育 20 小时，制备 BSA-多肽复合物。将得到的 BSA-多肽复合物用 0.1M pH7.0 磷酸缓冲液稀释后以 150 μ L 进行分装后于 -30 $^{\circ}$ C 下冷冻保存。

(d) 产生抗体细胞的制备

将上述（c）制备的 BSA-多肽复合物与弗氏完全佐剂一起注入 8 周龄 Balb/c 雌性小鼠腹腔内，进行初次免疫。大约于第 18 天将溶解

于 0.1M pH 7.5 磷酸缓冲液的 BSA - 多肽复合物与弗氏不完全佐剂一起注入已进行初次免疫的小鼠腹腔内, 进行追加免疫。在大约第 52 天将溶解于 0.1M pH7.5 磷酸缓冲液的 BSA - 多肽复合物对鼠进行静脉注射或腹腔注射, 作为最终免疫。最终免疫 4 天以后, 将脾脏摘出, 制备脾细胞悬浮液。实施例 1 的 C 末端 CRD 也可以同样进行免疫。

(e) 细胞融合

在细胞融合中使用以下材料和方法。向 RPMI - 1640 和杂交瘤用培养基中加入碳酸氢钠 (24mM)、丙酮酸钠 (1 mM)、抗生素 (选自青霉素 G 钾 (50U/ml)、硫酸丁胺卡那霉素 (100 μ g/ml)、链霉素 (10 μ g/ml) 和二性霉素 B (0.25 μ g/ml)), 于干冰中将 pH 调到 7.2, 用 0.2 μ m 东洋膜滤器过滤除菌。也可以使用市售的杂交瘤用培养基。向 NS - 1 培养基: 上述 RPMI - 1640 培养基加入过滤除菌的胎牛血清 (FCS, M. A. Bioproducts), 终浓度为 15% (v/v)。向 PEG - 4000 溶液: RPMI - 1640 培养基中加入聚乙烯醇 - 4000 (PEG - 4000, Merk & Co.), 使其终浓度为 50% (w/w), 制备无血清培养基。

与 8-氮杂鸟嘌呤抗性骨髓瘤细胞 P3U1 (P3 \times 63-Ag. 8U.1) 或 \times 63 (P3 \times 63Ag8) 的融合按照将《培养免疫学选择方法》Selected Method in culture immunology p351 ~ 372 (B. B. Mishell 和 S. N. Shiigi 编), W. H. Freeman and Company (1980) 记载的方法进行若干改变后的方法进行。

将上述 (d) 制备的有核脾细胞 (活细胞率 100%) 与骨髓瘤细胞 (活细胞率 100%) 以大约 5:1 ~ 10:1 比率按照以下顺序进行融合。免疫脾细胞和骨髓瘤细胞分别用 RPMI1640 培养基洗净。然后悬浮于同样的培养基中, 为了使他们融合将有核脾细胞和骨髓瘤细胞进行混合。即将大约 4.0×10^8 个有核脾细胞与相应的大约 8.0×10^7 个骨髓瘤细胞进行混合。

接下来, 将各个细胞混合液通过离心分离使细胞沉淀, 将上清完全吸除掉。向沉淀的细胞中滴入于 37 $^{\circ}$ C 下加温的含有 50% PEG - 4000 的 RPMI-1640 培养基 (骨髓瘤细胞为大约 3×10^7 个/ml 那样的体积),

搅拌使细胞再悬浮、分散。然后滴下含有添加 50% PEG-4000 的 RPMI-1640 培养基的 2 倍体积的于 37℃ 下加温的 RPMI-1640 培养基。再一边搅拌一边滴下含有添加的 50% PEG-4000 的 RPMI-1640 培养基的 7 倍体积的于 37℃ 下加温的 RPMI-1640 培养基，使细胞分散。进行离心，将上清完全吸除掉。然后将于 37℃ 下加温的 NS-1 培养基快速加入到沉淀的细胞中，使得骨髓瘤细胞密度大约为 3×10^6 个/ml，用移液管吹打将大的细胞块分散。再加入同样的培养基进行稀释，将该骨髓瘤细胞接种到聚乙烯制 96 孔微孔板中，每孔接种大约 6.0×10^5 个细胞。分别加了细胞的上述微孔板于 7% 二氧化碳/93% 空气中、温度为 37℃、湿度 100% 条件下进行培养。

(f) 利用选择培养基对杂交瘤进行有选择增殖

(1) 使用的培养基如下。

向 HAT 培养基:上述 (e) 中叙述的 RPMI1640 和杂交瘤用培养基再加入次黄嘌呤 ($100 \mu\text{M}$)、氨基蝶呤 ($0.4 \mu\text{M}$) 和胸腺嘧啶核苷 ($16 \mu\text{M}$)。HT 培养基:除了氨基蝶呤以外是与上述 HAT 培养基同一组成的培养基。

(2) 在上述 (e) 培养开始后第 1 天，用巴斯德吸管向细胞中加 2 滴 HAT 培养基 (大约 0.1ml)。于第 2、3、5、8 天用新的 HAT 培养基置换原有培养基的一半 (大约 0.1ml)、于第 10 天用新的 HT 培养基置换原有培养基的一半。通过肉眼确认杂交瘤的增殖铺满整个孔后，通过固相-抗体结合测试法 (ELISA 法) 挑阳性孔。首先，用 20mM 碳酸缓冲液稀释后的抗原多肽包被聚乙烯制 96 孔板 (100ng/孔)，然后用含有 0.02% Tween 20 的 PBS 洗净，除去未吸附的肽。向各个孔添加杂交瘤增殖被确认的孔的培养上清 0.1ml，于室温下静置大约 1 小时。洗净后，加入作为二次抗体的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗小鼠免疫球蛋白 (Cappel)，再于室温下静置大约 1 小时。洗净后，加入作为底物的过氧化氢和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)，使其发色。向各个孔加入 2N 硫酸停止发色，用微量培养板用吸光度测定仪 (MRP-A4, 东曹) 测定 450nm 的吸光度。上述操作也可以使用重组蛋

白质抗原进行。

(g) 杂交瘤的克隆

对上述(f)中得到的抗原肽和蛋白质呈阳性孔中的杂交瘤用有限稀释法进行单克隆化。即制备每1ml NS-1培养基含有作为滋养细胞的大约 10^7 个的小鼠胸腺细胞的克隆培养基,将96孔中的杂交瘤稀释为每孔5个、1个、0.5个,分别加到36孔、36孔和24孔中。于第5天、第12天向所有孔追加0.1ml NS-1培养基。克隆开始后在用肉眼确认杂交瘤充分增殖,菌落形成阴性孔在50%以上组进行(f)中记载的ELISA。调查的所有的孔不是阳性时,选择4~6个抗体阳性孔中的菌落数为1个的孔再进行克隆。最终得到产生针对各个多肽的单克隆抗体的杂交瘤。

(h) 单克隆抗体类、亚类的确定

按照上述ELISA,向各个被多肽包被的聚乙烯制96孔板中加入上述(g)中得到的杂交瘤的上清。然后用PBS洗净后,加入同种型特异的兔抗鼠IgG抗体(Zymed Lab.)。用PBS洗净后,加入辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG(H+L),作为底物使用过氧化氢和2,2'-连氮-二(3-乙基苯并噻唑啉酸),确定类、亚类。同样操作也可以使用重组蛋白抗原进行。

(i) 杂交瘤培养和单克隆抗体的纯化

将得到的杂交瘤细胞于NS-1培养基中进行培养,从其上清中可以得到单克隆抗体。另外将得到的杂交瘤 10^7 个注射到提前一周经腹腔注入降植烷的小鼠(Balb/c系、雌性、6周龄)的腹腔内,1~2周后,从腹水中可以得到含有4~7mg/ml的单克隆抗体的腹水。得到的腹水经40%饱和硫酸铵盐析后,使IgG类抗体吸附于蛋白A亲和胶(Bio-Rad),通过用0.1M pH5.0柠檬酸缓冲液洗脱进行纯化。

实施例6

夹心EIA

按照下述方法,从实施例1中制备的抗半乳凝素9抗体和实施例5制备的抗半乳凝素9抗体中至少选择一种,可以建立通过2种抗半

乳凝素 9 抗体的适当组合对人半乳凝素 9 进行特异检测的夹心 EIA 体系。EIA 体系无论是一步法，还是两步法都可以，标记抗体不限定于 Fab'-HRP。各个反应缓冲液的组成和反应条件根据测定目的，可以进行缩短、延长等调整。而作为标准样品的人半乳凝素 9 可以从组织培养上清、细胞培养上清和实施例 1 记载和用其他方法表达的重组体中纯化。纯化可以通过离子交换、凝胶过滤、使用抗半乳凝素 9 抗体的亲和层析或其他各种亲和层析的组合来实现。

(a) 标记抗体的制备

抗人半乳凝素 9 单克隆抗体于含有 0.1M NaCl pH4.2 0.1M 醋酸缓冲液中加入抗体量的 2% (w/w) 的胃蛋白酶，37℃下消化 24 小时。向消化物中添加 3M pH7.5 Tris-HCl 终止反应。通过用 pH7.0 0.1M 磷酸盐缓冲液平衡后的超凝胶 (UltrageI) AcA54 柱的凝胶过滤分离收集 F(ab')₂ 级分。向该 F(ab')₂ 级分加入半胱胺盐酸盐，终浓度为 0.01M，于 37℃下还原 1.5 小时，然后经用含有 5mMEDTA 的 pH6.0 0.1M 磷酸缓冲液平衡后的超凝胶 AcA54 柱的凝胶过滤分离收集 Fab' 级分。

与上述操作不同，另外将 HRP 溶解于 pH7.0 0.1M 磷酸缓冲液，将 25 倍 HRP 摩尔量的 EMCS 作为 DMF 溶液加入，于 30℃下反应 30 分钟。通过将该反应液用 pH6.0 0.1M 磷酸缓冲液平衡后的 NICK-5 柱 (Pharmacia) 进行凝胶过滤，分离收集马来酰亚胺标记 HRP 级分。

将 Fab' 级分和马来酰亚胺标记 HRP 等摩尔混合，于 4℃下反应 20 小时后，用 10 倍 Fab' 摩尔量的 N-乙基马来酰亚胺封闭未反应的巯基。将该封闭后的溶液通过用 pH6.5 0.1M 磷酸缓冲液平衡后的超凝胶 AcA54 柱进行凝胶过滤，分离收集 Fab'-HRP。向 Fab'-HRP 中添加 0.1%BSA 和 0.001%氯己定，于 4℃下保存。使用实施例 1 的抗半乳凝素 9 抗体也可以进行同样处理。

(b) 结合抗体载体的制备

抗人半乳凝素 9 单克隆抗体溶解于 pH7.5 0.1M 磷酸缓冲液，配成 50 μg/ml 的浓度。将该单克隆抗体溶液加入到 96 孔微量培养板中，

每孔 $100\ \mu\text{l}$ ，于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下静置 18 小时。除去单克隆抗体溶液，用生理盐水洗 1 次，用含有 0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl_2 的 pH8.0 Tris-HCl 缓冲液洗 3 次后，加入含有 0.1% BSA、0.1M NaCl、5mM CaCl_2 的 pH8.0 Tris-HCl 缓冲液进行封闭。使用实施例 1 的抗半乳凝素 9 抗体也可以进行同样处理，制备固相抗体。

(c) 一步夹心 EIA 法

用纯化的人半乳凝素 9 级分作为标准抗原作成人半乳凝素 9 定量用的标准曲线。分别注入用含有 1% BSA、0.05%Brij35、0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl_2 的 pH8.0 Tris-HCl 缓冲液阶段稀释的标准人半乳凝素 9，然后分别添加用含有 1% BSA、0.05%Brij35、0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl_2 的 pH8.0 Tris-HCl 缓冲液制备的标记抗体 $\text{Fab}^2\text{-HRP}$ ，充分混合。用含有 0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl_2 的 pH8.0 Tris-HCl 缓冲液将结合制备抗体的微量培养板洗 3 次后，添加标准抗原和标记抗体混合液。于室温下反应 1 小时后，用含有 0.05% Tween 20、0.1M NaCl、5mM CaCl_2 的 pH8.0 Tris-HCl 缓冲液洗 3 次。然后向孔中添加溶解于含有 6% 二甲基甲酰胺、0.005% 过氧化氢的 0.1M 醋酸缓冲液 (pH5.5) 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺，于室温下反应 20 分钟后，添加 2N 硫酸，终止反应。对 450ml 的该反应混合液用微量培养板读取仪进行测定，求标准曲线。

测定检体可以由人血清、脊髓液、血浆、关节液、尿和唾液等来自人体液的成分、各种人组织提取液、来自人和重组体等各种培养细胞的细胞提取液、培养上清等制备。各个测定检体取代标准人半乳凝素 9 进行上述的一步夹心 EIA，同时与标准人半乳凝素 9 进行反应。从测定检体得到的吸光度套用标准曲线，算出测定检体中含有的人半乳凝素 9 的量。

除了上述操作以外，使用实施例 1 的抗半乳凝素 9 抗体，根据瓜谷郁三等编《生物化学实验法 27》，石川荣治著，《酶标记法》，株式会社学会出版中心（1991 年 6 月 20 日发行）和日本生化学学会编，《续生化学实验讲座 5，免疫生化学研究法》，p107-112，东京化学

同人，1986年3月14日发行记载的方法（也包括这些文献中引用的文献记载的方法）可以制备酶标记抗体，标记抗体可以在测定中使用。

实施例 7

Western 印迹

表达人半乳凝素 9 的细胞的培养上清、纯化重组人半乳凝素 9 和人黑（素）癌提取蛋白在还原条件下经 10-15% SDS-PAGE 分离后，转移到聚偏氟乙烯（PVDF）膜（MILLIPORE）上。然后用含有 5%BSA 和 5% 脱脂乳和 0.05%叠氮化钠的 TBS（封闭缓冲液）于室温下进行 0.5-1 小时封闭后，用人半乳凝素 9 特异抗体进行处理，于 25℃ 下温育 6 小时以下。将各个膜用含有 0.1%Tween 20 的 TBS（含有 0.05%叠氮化钠）洗 4 次，使结合的抗体与用封闭缓冲液稀释成 1:100 的结合 HRP 的驴抗兔免疫球蛋白抗体或结合 HRP 的兔抗鼠免疫球蛋白抗体于 25℃ 下反应 1 小时。反应后，将膜用含有 0.1%Tween 20 的 TBS（含有 0.05%叠氮化钠）洗 4 次，结合的抗体用增强化学发光（Enhanced chemiluminescence）（ECL, Amersham Pharmacia）进行检测。

除了上述操作以外，使用实施例 1 的抗半乳凝素 9 抗体，根据口野嘉幸等编《基因·蛋白质、实验操作 封闭法》，p212-241，株式会社软科学社、昭和 62 年 11 月 10 日发行记载的方法（也包括这些文献中引用文献记载的方法）可以实施 Western 印迹。

产业上利用可能性

就像以上详细说明的那样，本发明可以提供可以检测癌细胞是否具有转移能力以及该癌细胞转移能力的程度的癌转移能力检测剂。本发明涉及到的癌转移检测剂由于含有作为有效成分的抗半乳凝素 9 抗体，非常简便而且确实能够检测癌细胞的转移能力。利用本发明也可以建立半乳凝素 9 表达基因测定体系，非常简便而且确实能够检测癌细胞的转移能力。

另外通过使用半乳凝素 9 以及半乳凝素 9 表达基因作为癌转移

能力的标志物或肿瘤标志物，可以作成各种形态的癌转移能力检测剂或肿瘤检测和/或测定剂、癌转移能力检测法或肿瘤检测和/或测定法、以及癌转移能力检测或肿瘤检测和/或测定试剂盒或系统，不仅在癌的诊断、预防、治疗中发挥作用，而且效果很好。

很清楚，本发明除了上述的说明和实施例特别记载的以外的例子也可以实行。借鉴上述示范，可对本发明进行很多改变和变形，因此这些也都是本说明书附上的权利要求范围内的内容。

序列表

<110> 株式会社嘉尔药物

<120> 癌转移能力检测剂

<130> GL-01PCT

<140>

<141>

<150> JP 2000-335077

<151> 2000-11-01

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 355

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro
1 5 10 15

Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr
20 25 30

Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn
35 40 45

Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro
50 55 60

Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly
65 70 75 80

Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly
85 90 95

Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val
100 105 110

Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe
 115 120 125

His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly Ser Val Gln Leu Ser Tyr
 130 135 140

Ile Ser Phe Gln Asn Pro Arg Thr Val Pro Val Gln Pro Ala Phe Ser
 145 150 155 160

Thr Val Pro Phe Ser Gln Pro Val Cys Phe Pro Pro Arg Pro Arg Gly
 165 170 175

Arg Arg Gln Lys Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile
 180 185 190

Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe
 195 200 205

Ser Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro His Pro Ala Tyr Pro
 210 215 220

Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser
 225 230 235 240

Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala Gln Arg Phe His Ile
 245 250 255

Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe
 260 265 270

Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asp Asn Ser Trp Gly
 275 280 285

Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro Phe Val Arg Gly Gln
 290 295 300

Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His Cys Leu Lys Val Ala
 305 310 315 320

Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His Arg Leu Arg Asn Leu
 325 330 335

Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp Ile Gln Leu Thr His
 340 345 350

Val Gln Thr
355

<210> 2

<211> 323

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Phe Ser Ser Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro
1 5 10 15

Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr
20 25 30

Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn
35 40 45

Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro
50 55 60

Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly
65 70 75 80

Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly
85 90 95

Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val
100 105 110

Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe
115 120 125

His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly Ser Val Gln Leu Ser Tyr
130 135 140

Ile Ser Phe Gln Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile
145 150 155 160

Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe
165 170 175

Ser Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro His Pro Ala Tyr Pro
180 185 190

Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser
 195 200 205

Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala Gln Arg Phe His Ile
 210 215 220

Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe
 225 230 235 240

Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asp Asn Ser Trp Gly
 245 250 255

Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro Phe Val Arg Gly Gln
 260 265 270

Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His Cys Leu Lys Val Ala
 275 280 285

Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His Arg Leu Arg Asn Leu
 290 295 300

Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp Ile Gln Leu Thr His
 305 310 315 320

Val Gln Thr

<210> 3

<211> 311

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Phe Ser Ser Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro
 1 5 10 15

Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr
 20 25 30

Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn
 35 40 45

Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro

35

40

图1

列联表分析统计量：半乳凝素，转移

欠测值数	0
自由度	1
χ^2 值	8.381
χ^2 p值	.0038
G^2 值	8.393
G^2 p值	.0038
列联表分析系数	.386
ϕ	.418
χ^2 值 (Yates 校正)	6.607
χ^2 p值 (Yates 校正)	.0102
Fisher 直接法p值	.0080

观测度数：半乳凝素，转移

	+	-	合计
阳性	4	25	29
阴性	10	9	19
合计	14	34	48

图 2

列联表分析统计量：半乳凝素，复发

欠测值数	0
自由度	1
χ^2 值	10.644
χ^2 p值	.0011
G^2 值	10.831
G^2 p值	.0010
列联表分析系数	.426
ϕ	.471
χ^2 值 (Yates 校正)	8.476
χ^2 p值 (Yates 校正)	.0036
Fisher 直接法p值	.0033

观测度数：半乳凝素，复发

	+	-	合计
阳性	2	27	29
阴性	9	10	19
合计	11	37	48

图 3

列联表分析统计量：半乳凝素，生死

欠测值数	. 0
自由度	1
χ^2 值	8.392
χ^2 p值	.0038
G^2 值	8.407
G^2 p值	.0037
列联表分析系数	.386
ϕ	.418
χ^2 值 (Yates 校正)	6.534
χ^2 p值 (Yates 校正)	.0106
Fisher 直接法p值	.0062

观测度数：半乳凝素，生死

	生	死	合计
阳性	26	3	29
阴性	10	9	19
合计	36	12	48

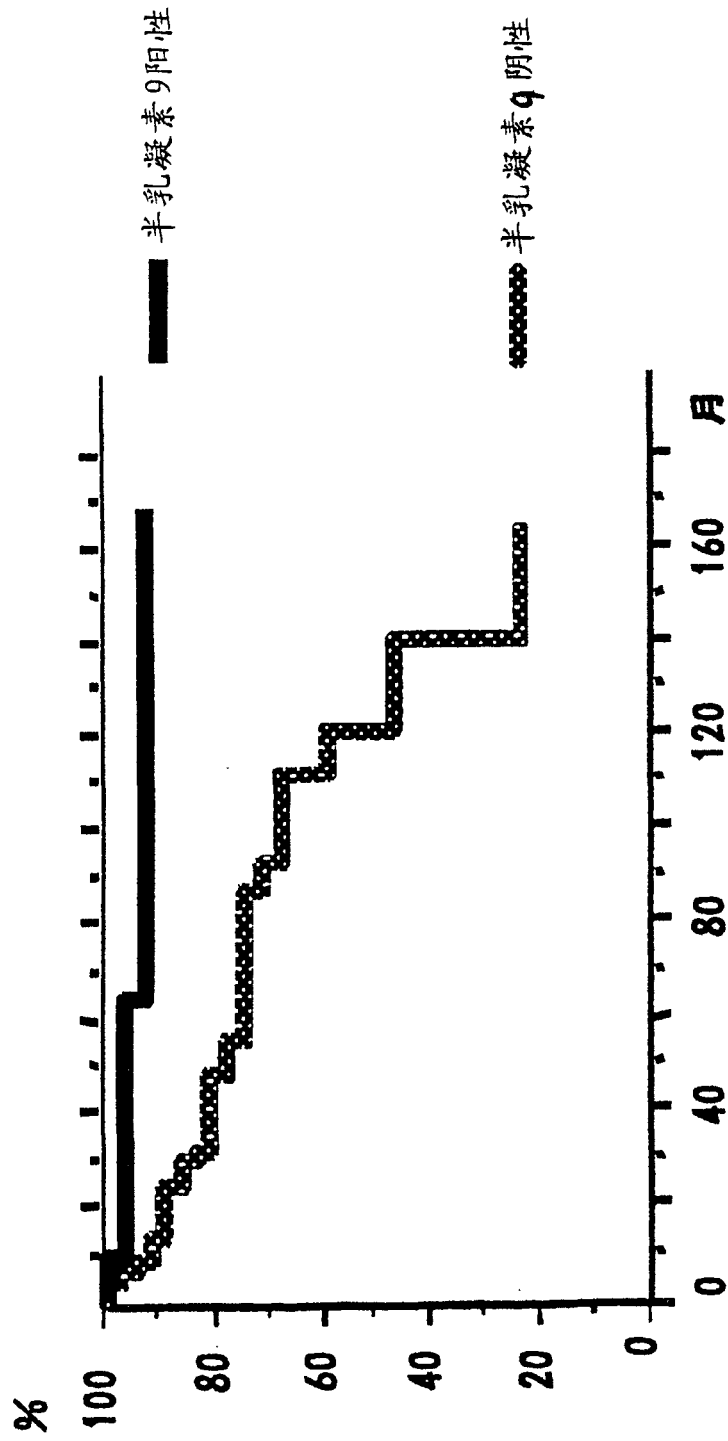


图4

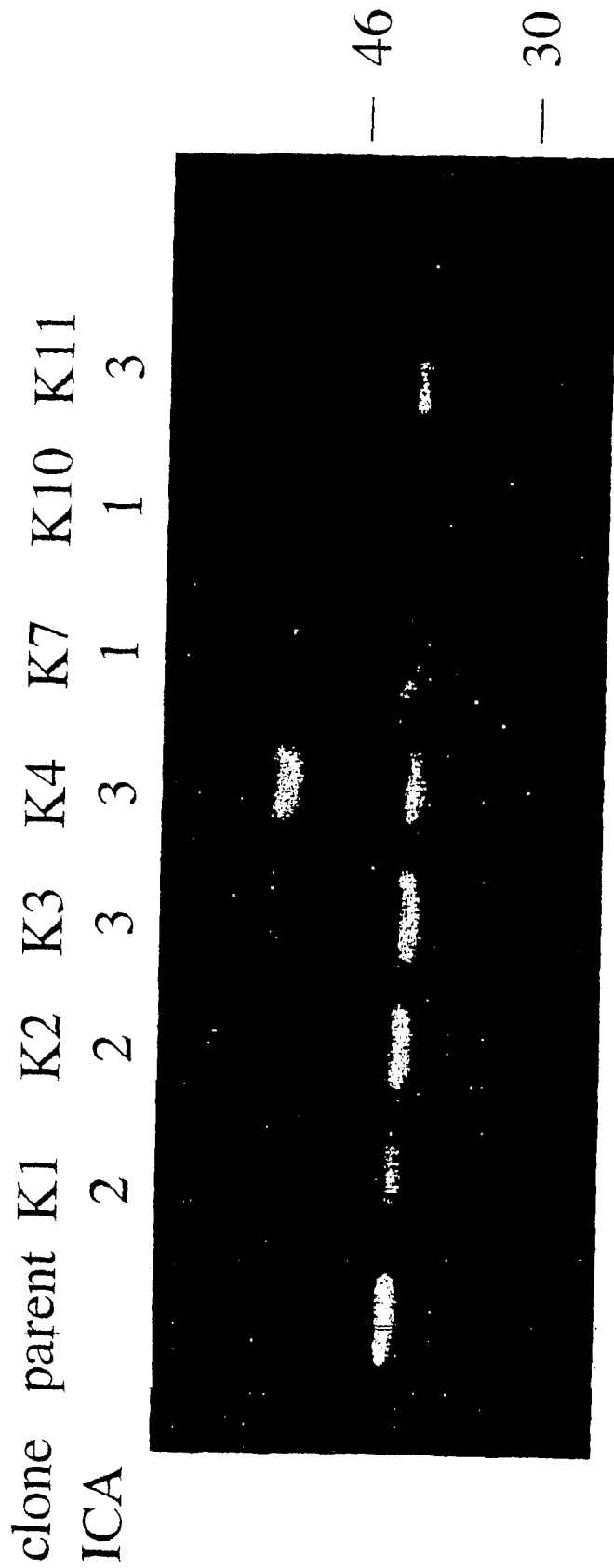


图5

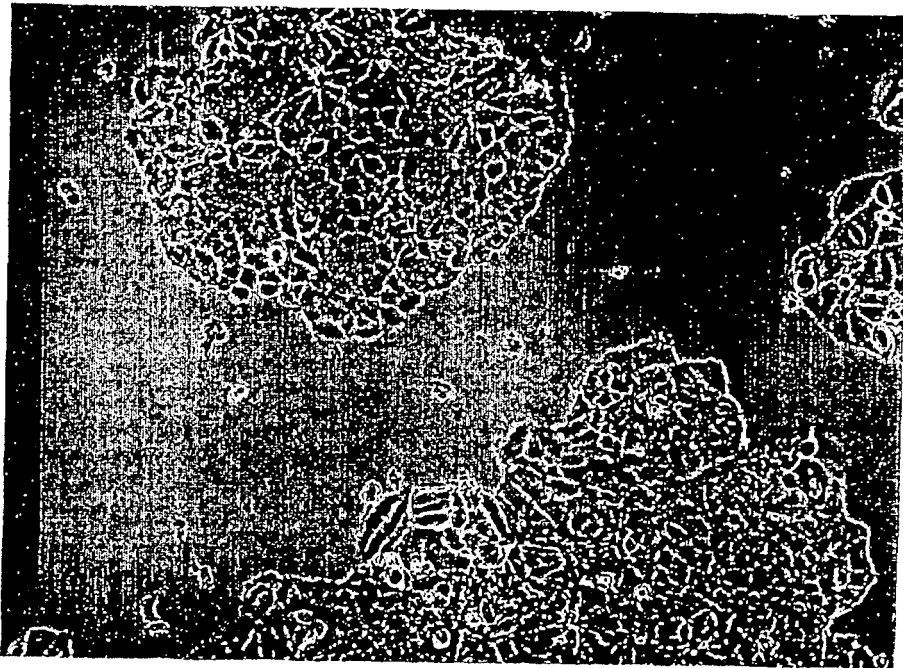


图6

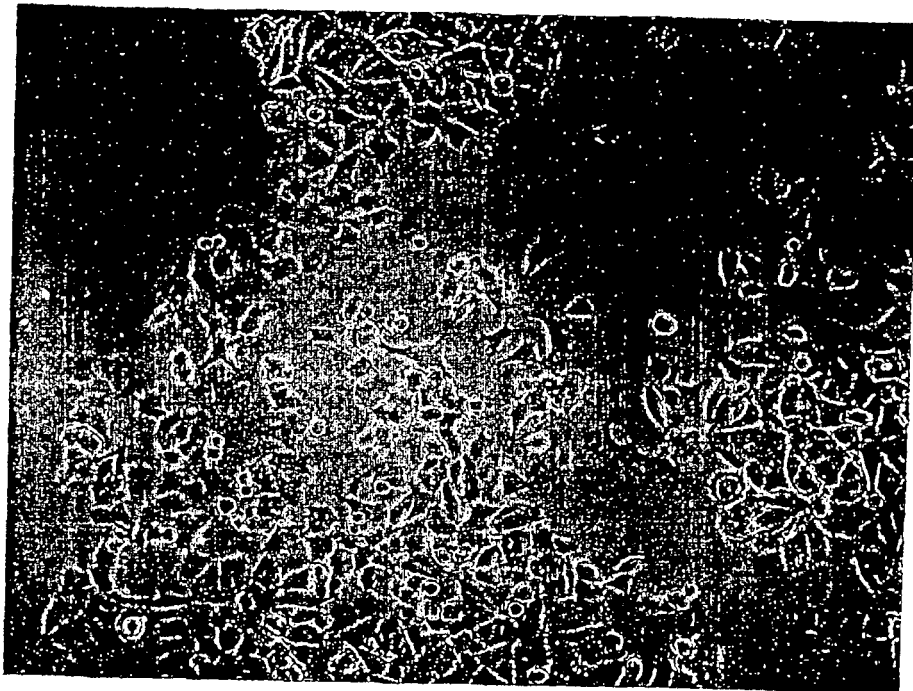


图7

专利名称(译)	癌转移能力检测剂		
公开(公告)号	CN1306271C	公开(公告)日	2007-03-21
申请号	CN01818510.X	申请日	2001-10-31
[标]发明人	平岛光臣 山内清明 影下登志郎 中村隆范 西望		
发明人	平岛光臣 山内清明 影下登志郎 中村隆范 西望		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C07K16/18 C07K16/26 C12Q1/68 G01N33/50		
CPC分类号	C07K16/26 C12Q1/6886 G01N2333/4724 G01N33/5011 C12Q2600/158 G01N33/57484 G01N33/574 C07K16/18		
代理人(译)	陈昕		
优先权	2000335077 2000-11-01 JP		
其他公开文献	CN1473271A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

通过阐明癌细胞的部分转移机制，对癌细胞的转移能力进行判断成为可能。含有抗半乳凝素9抗体等作为有效成分，通过检测癌细胞中半乳凝素9(galectin 9)的表达量，检测该癌细胞转移能力的检测剂。

图 1

列联表分析统计量：半乳凝素，转移

欠测值数	0
自由度	1
χ^2 值	8.381
χ^2 p值	.0038
G ² 值	8.393
G ² p值	.0038
列联表分析系数	.386
ϕ	.418
χ^2 值 (Yates 校正)	6.607
χ^2 p值 (Yates 校正)	.0102
Fisher 直接法 p值	.0080

观测度数：半乳凝素，转移

	+	-	合计
阳性	4	25	29
阴性	10	9	19
合计	14	34	48