



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101523213 B

(45)授权公告日 2017.03.08

(21)申请号 200780036898.6

(22)申请日 2007.08.02

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 101523213 A

(43)申请公布日 2009.09.02

(30)优先权数据
212275/2006 2006.08.03 JP
092412/2007 2007.03.30 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2009.04.02

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2007/065573 2007.08.02

(87)PCT国际申请的公布数据
W02008/016186 JA 2008.02.07

(73)专利权人 国立大学法人东京大学
地址 日本东京都
专利权人 东曹株式会社

(72)发明人 青木淳贤 新井洋由 矢富裕
池田均 中村和宏 五十嵐浩二
井手和史

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 黄革生 林柏楠

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G07K 16/18(2006.01)

(56)对比文件

US 5731167 A,1998.03.24,

CN 1421531 A,2003.06.04,

Karl R. N. Baumforth.Induction of autotaxin by the Epstein-Barr virus promotes the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells.《Blood》.2005,第106卷(第6期),2138-2146.

张军.自分泌因子及其受体与肿瘤转移.《国外医学 肿瘤学分册》.1999,第26卷(第6期),341-343.

AI KUSHIDA.Screening Of Hybridoma Clones Producing Antibodies Against Plasma Membrane-Associated Materials.《HYBRIDOMA》.1998,第17卷(第2期),209-213.

审查员 李有朝

权利要求书1页 说明书22页

序列表2页 附图18页

(54)发明名称

天然形式人自分泌运动因子特异的抗体、其筛选方法、以及通过测定自分泌运动因子而检测恶性淋巴瘤的方法和检测试剂

(57)摘要

本发明提供了特异性识别未受到变性的、在生物体内的存在状态中的天然形式人自分泌运动因子的抗体的筛选方法,该方法包括以下步骤:将能够捕获该抗体的候选抗体的结合因子结合在固相上;将该抗体的候选抗体与所述结合因子结合;使天然形式人自分泌运动因子在已经使所述候选抗体作用的体系中作用;和以天然形式

人自分泌运动因子对所述抗体的结合力作为指标,选择特异性识别该天然形式人自分泌运动因子的抗体。本发明还提供了恶性淋巴瘤的检测方法,其包括:测定人样品中自分泌运动因子的浓度并且在所述测定值显示比由源自正常健康受试者的测定值组成的正常值显著更高值的情况下判定是恶性淋巴瘤。

1. 用于测定人样品中自分泌运动因子的浓度的试剂在制备用于滤泡性淋巴瘤的检查和测定试剂中的用途,其中在所述测定值显示比由源自正常健康受试者的测定值组成的正常值显著更高值的情况下判定是滤泡性淋巴瘤,其中人样品是人血清。

2. 权利要求1所述的用途,其中根据权利要求1的自分泌运动因子是全长自分泌运动因子、部分切割的自分泌运动因子或部分基因突变的自分泌运动因子。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述试剂是抗体,并且使用抗体的免疫化学测定法测定自分泌运动因子浓度。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中根据权利要求3的抗体是单克隆抗体。

5. 根据权利要求3所述的用途,其中通过使权利要求3的抗体与该样品接触并且检测与该样品结合或不结合的抗体而测定自分泌运动因子在所述样品中的浓度。

6. 根据权利要求3所述的用途,其中通过使权利要求3的抗体与该样品接触并且检测与该抗体结合或不结合的自分泌运动因子而测定自分泌运动因子在所述样品中的浓度。

7. 根据权利要求3-6任一项中所述的用途,其中根据权利要求3中所述的免疫化学测定法是利用酶标记物、同位素标记物、荧光标记物的竞争性方法;或是利用夹心法或荧光偏振法的均相测定方法;或是利用表面等离子体共振分析法的结合作用测定方法。

8. 测定自分泌运动因子所具有的溶血磷脂酶D活性的试剂在制备用于滤泡性淋巴瘤的检查和测定试剂中的用途。

天然形式人自分泌运动因子特异的抗体、其筛选方法、以及通过测定自分泌运动因子而检测恶性淋巴瘤的方法和检测试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及特异性识别并结合天然形式人自分泌运动因子(*autotaxin*)的抗体、其筛选方法、以及通过测定人样品中的自分泌运动因子浓度而检测恶性淋巴瘤的方法和检测试剂。

背景技术

[0002] 人自分泌运动因子是具有约125kDa分子量的糖蛋白,该蛋白质在1992年首次由M.L.Stracke等从A2058人黑素瘤细胞的培养基中作为诱导细胞运动性的物质分离(J.Biol.Chem.,256,2524,1992)。随后,1994年J.Murata等使用cDNA克隆分析其结构,明确了该蛋白质在氨基末端侧具有单一跨膜部分,在胞外结构域中包含2个生长调节素B区、1型磷酸二酯酶活性区、和EF手型的环区,具有磷酸二酯酶活性(J.Biol.Chem.,269,30479,1994)。然而,仍没有获得任何明确的涉及自分泌运动因子诱导细胞运动性的功能的证据。2002年,在人(A.Tokumura等,J.Biol.Chem.,277,39436,2002)和牛血清(M.Umezū-Goto等,J.Cell Biol.,158,227,2002)中鉴定到新的溶血磷脂酶D,从而首次证实由这种酶活性所产生的溶血磷脂酸诱导细胞运动性。

[0003] 基于自分泌运动因子运动性诱导功能的推断,Stracke等在美国专利号5,499,753(1995)中描述使用自分泌运动因子作为人癌浸润能力的标志物。此外,Stracke等也在美国专利号5,731,167(1998)中提出通过施用与毒素结合的抗自分泌运动因子抗体的癌症疗法。这样就需要特异性识别人自分泌运动因子的抗体,但由于自分泌运动因子相对大量地以多种形式含于动物血清中,故认为极难获得针对通常存在于血清中的没有经历突变的自分泌运动因子(天然形式的自分泌运动因子)具有特异性和强大结合力的抗体。实际上,没有用于定量自分泌运动因子本身的方法,并且目前通过评价其具有的溶血磷脂酶D活性间接地定量自分泌运动因子。用于测定这种酶的活性的方法是复杂的并且通常需要几个小时与底物的孵育时间以使此酶发挥酶活性。此外,还存在干扰性因素,如可能在人样品中存在与自分泌运动因子不同的具有溶血磷脂酶D活性的其它酶、在人样品中存在因酶活性测定期间溶血磷脂酰胆碱底物分解而产生的溶血磷脂酸和胆碱。这些内在因素至少对酶活性测定中人自分泌运动因子的特异性定量产生一些影响,不是用于定量人自分泌运动因子的高精度方法。实际上,胆碱以约数十mM的浓度含于人精浆中,并且若没有进行胆碱去除的预处理,则难以基于使用溶血磷脂酰胆碱作为底物所生成的胆碱量而测定精浆中的活性。

[0004] 为数众多的单克隆抗体已经由几个研究组(包括我们的研究组)通过用大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达人自分泌运动因子的合成的部分肽或部分序列、免疫可溶性人自分泌运动因子而建立(Journal of Biological Chemistry,269,30479-30484,1994,FEBS Letters,571,197-204,2004)。然而,尽管人自分泌运动因子可以通过使用这些抗体的蛋白质印迹法检测,然而这些抗体对人样品中存在的天然形式人自分泌运动因子不表现任何反应性或仅表现极低水平的反应性。因此,极难将这些抗体应用于以人样品为对象的ELISA测

定法等免疫学测定法中,并且它们仍没有实际使用。

[0005] 根据本发明,可以极高效地建立与人样品中天然形式的人自分泌运动因子特异性反应的单克隆抗体。也就是说,在通过抗原免疫、细胞融合而制备单克隆抗体时的筛选方法中,通过选择以与溶液中存在的天然形式抗原的反应性作为指标的抗体,可以建立基于通用方法如ELISA的人自分泌运动因子定量测定体系。此外,由所述方法获得的抗体是高性能抗体,其通过能够高效结合并捕获含于血液等中的人自分泌运动因子,不仅能够自样品除去抗原,还能够纯化抗原。

[0006] 发明公开

[0007] 尽管已有教导自分泌运动因子在人组织或体液中存在的浓度因各种疾病而变动的报道,由于迄今不存在用于定量自分泌运动因子的方法,故没有对其开展详细分析。尽管已经对在变性条件下如在还原剂存在下的自分泌运动因子的有无和存在比等实施了定性分析,由于仍没有能够高效识别并结合以保留其结构和功能的形式而通常存在于身体中的天然形式人自分泌运动因子的抗体,仍没有建立用于定量人自分泌运动因子的通用方法。此外,虽然通过以自分泌运动因子所具有的溶血磷脂酶D活性作为指标而测定该酶活性,将溶血磷脂酶D活性的变化与疾病之间的因果关系进行了分析,但是由于在这样的酶活性测定中获得的测定值包括除人样品中所含自分泌运动因子的溶血磷脂酶D活性以外的其它的溶血磷脂酶D活性,并且在活性测定时使用的溶血磷脂酰胆碱底物以及在酶活性测定时形成的胆碱内在地含于样品中等等,因此将所述方法用作特异性定量自分泌运动因子的标准方法没有足够的可靠性。

[0008] 我们找到了用于高效获得针对天然形式人自分泌运动因子的抗体的方法,并且使用以这种方法所获得的针对天然形式人自分泌运动因子的抗体成功地提供了能够精确定量人自分泌运动因子的测定方法和定量试剂,其中所述的测定方法和定量试剂不受活性测定时成为问题的内在物质影响、并且不需要致使样本变性如通过用还原处理法变性或使用蛋白质变性剂如盐酸胍或脲变性的预处理。

[0009] 具体地,本申请包括以下发明:

[0010] (1)特异性识别未受到变性的、在生物体内的存在状态中的天然形式人自分泌运动因子的抗体的筛选方法,该方法包括以下步骤:

[0011] 将能够捕获该抗体的候选抗体的结合因子结合在固相上;

[0012] 将该抗体的候选抗体与所述结合因子结合;

[0013] 使天然形式人自分泌运动因子在已经使所述候选抗体作用的体系中作用;和

[0014] 以天然形式人自分泌运动因子对所述抗体的结合力作为指标,选择特异性识别该天然形式人自分泌运动因子的抗体。

[0015] (2)(1)的方法,其中所述结合因子是抗体;

[0016] (3)(1)或(2)的方法,其中所述天然形式人自分泌运动因子是具有多聚组氨酸标签的重组人自分泌运动因子抗原;

[0017] (4)(3)的方法,其中所述天然形式人自分泌运动因子对所述抗体的结合力通过利用特异性结合具有多聚组氨酸标签的所述重组人自分泌运动因子抗原的经标记的抗多聚组氨酸抗体而测定;

[0018] (5)(4)的方法,其中所述经标记的抗多聚组氨酸抗体是酶标记的抗多聚组氨酸抗

体。

[0019] (6)特异性识别未受到变性的、在生物体内的存在状态中的天然形式人自分泌运动因子的抗体,所述抗体能够通过包括以下步骤的方法取得:

[0020] 将能够捕获该抗体的候选抗体的结合因子结合在固相上;

[0021] 将该抗体的候选抗体与所述结合因子结合;

[0022] 使天然形式人自分泌运动因子在已经使所述候选抗体作用的体系中作用;和

[0023] 以天然形式人自分泌运动因子对所述抗体的结合力作为指标,选择特异性识别该天然形式人自分泌运动因子的抗体。

[0024] (7)(6)的抗体,其中所述结合因子是抗体。

[0025] (8)(6)或(7)抗体,其中所述天然形式人自分泌运动因子是具有多聚组氨酸标签的重组人自分泌运动因子抗原;

[0026] (9)(8)的抗体,其中所述天然形式人自分泌运动因子对所述抗体的结合力通过利用特异性结合具有多聚组氨酸标签的所述重组人自分泌运动因子抗原的经标记的抗多聚组氨酸抗体而测定。

[0027] (10)(9)的抗体,其中所述经标记的抗多聚组氨酸抗体是酶标记的抗多聚组氨酸抗体。

[0028] 根据如上所述的本发明,可以高效地获得能够特异性识别并结合天然形式人自分泌运动因子的单克隆抗体,并且可以建立能够使用这种抗体定量无需预处理等的人样品中自分泌运动因子的测定方法。使用根据前述发明获得的天然形式人自分泌运动因子的测定试剂测定人血清则能够诊断癌症或诊断慢性肝病。此外,根据前述方法,可以提供能够这样的定量人自分泌运动因子的方法和检测试剂,所述方法和检测试剂允许在短时间内实施定量并且不受在基于溶血磷脂酶D酶活性而估计自分泌运动因子量中总是造成问题的内在性干扰测定因素或竞争性酶的影响。

[0029] 此外,本发明的发明人也发现:含于血液等中的人自分泌运动因子可以通过使用通用性人自分泌运动因子定量测定体系如ELISA,使用与人样品中的天然形式人自分泌运动因子特异性反应的单克隆抗体而容易地且短时间内定量。而且,使用这种测定体系进行了深入的研究,发现在淋巴瘤患者并且尤其是在滤泡性淋巴瘤患者中,血清中的自分泌运动因子浓度显示为高值。恶性淋巴瘤大致地分成由霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤这两种类型,并且在日本大约90%的淋巴瘤分类为非霍奇金淋巴瘤。非霍奇金淋巴瘤基于形态学特征(病理学的分类)、细胞性状的特征(B细胞样、T细胞样或NK细胞样)、染色体信息和/或遗传学信息进行分类,并且根据WHO分类分成非常多样的分类。据报道作为非霍奇金淋巴瘤的分类之一的滤泡性淋巴瘤在日本占10-15%恶性淋巴瘤,并且已经证实近年来该数字具有递增趋势。恶性淋巴瘤的诊断通过淋巴结活组织检查法、胸部X线检查法、计算机化断层显像术(CT)、核磁共振成像检查法(MRI)、镓(Ga)闪烁照相术或正电子成像术(PET)等评估该疾病的进展而进行。虽然也使用血液检查法,如测定乳糖脱氢酶(LDH)、C反应蛋白(CRP)或可溶性白介素-2(IL-2)受体,不过这些物质均不是对恶性淋巴瘤特异的诊断标志物,因而需要对恶性淋巴瘤特异的诊断标志物。

[0030] 尽管已经存在说明自分泌运动因子在人组织或体液中存在的浓度因各种疾病而变动的报道,但没有对人自分泌运动因子与多种疾病的因果关系进行详细分析,原因是

存在对人自分泌运动因子定量的方法。根据本发明,血清等的人样本中自分泌运动因子的浓度能够容易地在短时间内且以高可靠性定量。这种测定方法通过使用测定试剂而有可能确定迄今仍未确定的自分泌运动因子浓度与各种疾病之间的关系。此外,由于使用这种测定体系进行反复深入研究,发现也已经有可能会检测恶性淋巴瘤并且尤其检测滤泡性淋巴瘤,其中对所述的恶性淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤的诊断在以往因缺乏血清标志物是复杂且困难的。

[0031] 本发明的发明人通过建立使用针对人自分泌运动因子的抗体的免疫化学测定方法,使得不受在酶活性测定时造成问题的内在物质影响、且不需要样品预处理而能够精确定量人自分泌运动因子。由于使用这种测定试剂进行反复深入研究,发现在恶性淋巴瘤患者并且尤其在滤泡性淋巴瘤患者中血清中的自分泌运动因子浓度显示为高值,因而可能提供能够检查或辅助检查滤泡性淋巴瘤的试剂。此外,这种试剂也能够通过测定自分泌运动因子所具有的溶血磷脂酶D酶活性而检查或辅助检查滤泡性淋巴瘤,尽管所述测定在复杂性和精度方面略次。

[0032] 因此,本申请还包括以下发明:

[0033] (11)用于检查恶性淋巴瘤的方法,包括:测定人样品中的自分泌运动因子的浓度并且在所述测定值显示比由正常健康受试者的测定值组成的正常值显著更高值的情况下判定是恶性淋巴瘤。

[0034] (12)(11)的方法,其中所述的恶性淋巴瘤是滤泡性淋巴瘤。

[0035] (13)(11)或(12)的方法,其中(11)的自分泌运动因子是全长自分泌运动因子、部分切割的自分泌运动因子或部分基因突变的自分泌运动因子。

[0036] (14)(11)-(13)任一项中所述的方法,其中(11)的样品是全血、血细胞、血清、血浆等的人血液成分、或人细胞或组织的提取液;

[0037] (15)(11)-(14)任一项中所述的方法,其中(11)的用于测定自分泌运动因子浓度的方法是使用抗体的免疫化学测定法;

[0038] (16)(11)-(15)任一项中所述的方法,其中(15)的抗体是单克隆抗体;

[0039] (17)(11)-(16)任一项中所述的方法,其中自分泌运动因子在所述样品中的浓度通过使(15)的抗体与该样品接触并且检测与该样品结合或不结合的抗体而测定。

[0040] (18)(11)-(16)任一项中所述的方法,其中自分泌运动因子在所述样品中的浓度通过使(14)的抗体与该样品接触并且检测与该抗体结合或不结合的自分泌运动因子而测定。

[0041] (19)(11)-(18)任一项中所述的方法,其中(15)-(18)任一项所述的方法是使用酶标记物、同位素标记物或荧光标记物等的竞争性方法、使用夹心法或荧光偏振法等均相测定方法或使用表面等离子体共振分析法(surface plasmon resonance analysis method)的结合测定方法等。

[0042] (20)恶性淋巴瘤检测试剂,使用(11)-(19)任一项中所述的测定方法作为其原理。

[0043] (21)检测方法,包括使用(11)-(14)任一项中所述的方法测定自分泌运动因子所具有的溶血磷脂酶D活性、并且在所述测定值显示比由正常健康受试者的测定值组成的正常值显著更高的值情况下判定是恶性淋巴瘤。

[0044] (22)用于检查恶性淋巴瘤的方法,其特征在于以(21)的检测方法作为原理。

[0045] 根据前述发明,恶性淋巴瘤并且尤其滤泡性淋巴瘤可以通过用定量试剂定量人样品中自分泌运动因子的浓度而检测,无需预处理人样品中的自分泌运动因子等,其中所述的定量试剂使用对人自分泌运动因子特异的单克隆抗体。使用这种免疫学定量试剂有可能提供这样的检测试剂,其能够在短时间内定量人自分泌运动因子并且不受含于样品中的妨碍测定的内在因素或竞争性酶影响。此外,尽管通过上述发明测定溶血磷脂酶D酶活性对所述免疫化学的定量方法就复杂性和精度而言略次,然而也能够判断恶性淋巴瘤,并且能够提供用于该目的的检测试剂。

[0046] 附图简述

[0047] 图1显示多聚组氨酸标签标记的人自分泌运动因子纯化产物的SDS-PAGE、和使用抗自分泌运动因子肽抗体的蛋白质印迹的结果。

[0048] 图2显示使人自分泌运动因子直接结合至免疫板时的抗体的反应性。

[0049] 图3显示通过抗大鼠IgG抗体结合至免疫板的抗人自分泌运动因子抗体与溶液中存在的人自分泌运动因子的反应性。

[0050] 图4显示由抗体所致的对血清中人自分泌运动因子的溶血磷脂酶D活性的吸收性能。

[0051] 图5显示由抗体所致的对动物血清中自分泌运动因子的溶血磷脂酶D活性的吸收性能。

[0052] 图6显示全长人自分泌运动因子纯化产物的SDS-PAGE、和使用抗自分泌运动因子肽抗体的蛋白质印迹结果。

[0053] 图7显示使用双抗体夹心法,抗人自分泌运动因子单克隆抗体与人自分泌运动因子的反应性。

[0054] 图8显示使用获得的抗人自分泌运动因子抗体群,通过组合评价在夹心ELISA测定体系中的反应性。

[0055] 图9是显示用两步骤双抗体夹心ELISA法测定具有已知浓度的人自分泌运动因子(0、0.34、0.675、1.35、2.70和5.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的6个标准品时,在450nm处的吸光度与自分泌运动因子浓度之间关系的图。

[0056] 图10显示通过两步骤双抗体夹心ELISA法在42份人血清样品中所测定的人自分泌运动因子浓度与溶血磷脂酶D活性之间的相关性。

[0057] 图11是显示用一步骤双抗体夹心ELISA法测定具有已知浓度的人自分泌运动因子(0、0.34、0.675、1.35、2.70和5.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的6个标准品时,在450nm处的吸光度与自分泌运动因子浓度之间关系的图。

[0058] 图12显示通过一步骤双抗体夹心ELISA法在42份人血清样品中所测定的人自分泌运动因子浓度与溶血磷脂酶D活性之间的相关性。

[0059] 图13显示使用一步骤双抗体夹心ELISA法,使用PSA、CA19-9、CA153和CA125测定值超过截止值(cut-off)的样品,检测相对于正常健康受试者的自分泌运动因子浓度的结果。任一样品组相对于正常健康受试者均显示为显著性差异 $P < 0.001$ 。

[0060] 图14显示使用一步骤双抗体夹心ELISA法测定慢性肝病患者和正常健康受试者的血清中人自分泌运动因子浓度的结果。

[0061] 图15显示测定精浆中溶血磷脂酶D活性的结果。

[0062] 图16显示使用6个浓度标准品时所获得的校准曲线。回归方程表述为 $\text{Log}(\text{速率}) = a \text{Log}(\text{浓度})^3 + b\text{Log}(\text{浓度})^2 + c\text{Log}(\text{浓度}) + d$, 并且所示标准曲线的相应常数为 $a = -0.12278770$ 、 $b = -0.30068255$ 、 $c = 1.26861618$ 和 $d = 1.56201600$ 。速率表示单位时间生成的4-甲基伞形酮的量($\text{nmol/L} \cdot \text{秒}$)。

[0063] 图17显示测定男性的血清自分泌运动因子浓度并根据白血病和恶性淋巴瘤类型作出分类的结果。纵轴表示自分泌运动因子(ATX)浓度、横轴表示每种疾病的分类。NHS表示正常健康受试者,AL表示急性白血病,CL表示慢性白血病,HD表示霍奇金淋巴瘤,NHL表示非霍奇金淋巴瘤,其它表示其它白血病和淋巴瘤。

[0064] 图18显示测定女性血清的自分泌运动因子浓度并根据白血病和恶性淋巴瘤类型作出分类的结果。纵轴表示自分泌运动因子(ATX)浓度、横轴表示每种疾病的分类。NHS表示正常健康受试者,AL表示急性白血病,CL表示慢性白血病,HD表示霍奇金淋巴瘤,NHL表示非霍奇金淋巴瘤,其它表示其它白血病和淋巴瘤。

[0065] 图19显示测定男性血清的自分泌运动因子浓度并根据非霍奇金淋巴瘤类型作出分类的结果。纵轴表示自分泌运动因子(ATX)浓度、横轴表示每种型的非霍奇金淋巴瘤。NHS表示正常健康受试者,Burkitt表示伯基特淋巴瘤,LBL表示淋巴母细胞性淋巴瘤,NHL(MCL)表示套细胞淋巴瘤,NHL(DLBC)表示弥漫性大B细胞淋巴瘤并且NHL(FL)表示滤泡性淋巴瘤。

[0066] 图20显示测定女性血清的自分泌运动因子浓度并根据非霍奇金淋巴瘤类型作出分类的结果。纵轴表示自分泌运动因子(ATX)浓度、横轴表示每种型的非霍奇金淋巴瘤。NHS表示正常健康受试者,Burkitt表示伯基特淋巴瘤,LBL表示淋巴母细胞性淋巴瘤,NHL(MCL)表示套细胞淋巴瘤,NHL(DLBC)表示弥漫性大B细胞淋巴瘤并且NHL(FL)表示滤泡性淋巴瘤。

[0067] 图21显示自分泌运动因子(ATX)浓度与溶血磷脂酸(LPA)浓度之间相关性试验的结果。

[0068] 实施本发明的最佳方案

[0069] 为了制备免疫抗原,基于人自分泌运动因子的基因信息,通过使用多核苷酸探针筛选cDNA文库或基因组文库而获得编码人自分泌运动因子基因的核酸分子。cDNA文库可以容易地通过使用已知方法从组织中分离RNA而制备,或可以使用市售cDNA文库。使用所得的人自分泌运动因子cDNA通过重组入表达载体中,可以在多种表达系统中表达抗原。此外,导入通常使用的标记标签如多聚组氨酸标签或Myc标签至人自分泌运动因子基因的末端也有效地用于简化后续抗原纯化操作。尽管蛋白质表达系统可以是大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或动物细胞等,优选昆虫细胞-杆状病毒系统,因为该系统能够大规模地表达并且表达出与天然形式人自分泌运动因子具有相似结构(如糖链添加)的蛋白质。在表达具有多聚组氨酸标签的自分泌运动因子的情况下,所述自分泌运动因子可以容易地用金属螯合柱等纯化。此外,c-myc标签等允许以抗c-myc抗体亲和柱纯化。这些方法是其技术已经充分建立的标准方法。

[0070] 可以采用任何方法进行本发明中所用的抗原免疫以产生抗体,如通过用纯化抗原免疫动物,只要所述方法的技术已经建立。对所用动物没有特别的限制,只要它具有抗体产生能力即可。所述动物的实例包括通常使用的哺乳动物如小鼠、大鼠或兔等,使用鸡等也可以。例如,在使用小鼠的情况下,通过施用纯化的人自分泌运动因子抗原和弗氏完全佐剂形成的乳剂至皮下、至足垫或至腹腔而实施免疫。有时还存在需要通过用纯化抗原和弗

氏不完全佐剂反复追加免疫以提高抗体滴度的情况。在细胞融合前数日,作为最终免疫,仅对动物施用抗原,而不施用佐剂和形成乳剂。虽然所施用的抗原量可以在约0.4 $\mu\text{g/g}$ 动物体重的级别上,然而只要该抗原量是不发生由抗原不足或过量引起的免疫耐受的量就没有问题。

[0071] 可以采用任意方法制备本发明中所用的杂交瘤细胞,只要所述方法的技术已经被建立,并且融合方法可以是使用电融合法或使用聚乙二醇等试剂的任何方法。例如,可以如此获得杂交瘤细胞,即通过在聚乙二醇存在下对经免疫动物的B细胞和骨髓瘤细胞实施细胞融合,随后从HAT培养基中选出抗体产生细胞。所选的杂交瘤细胞可以用来通过使用有限稀释法进行单克隆化而建立产生单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0072] 用于选择本发明中所用杂交瘤的方法以不实施在常规ELISA法中所开展的选择为特征,其中在常规ELISA法中将免疫抗原结合至固相并且随后基于与该固相的表面所结合的抗原的反应性开展选择。其原因在于虽然使用其中抗原结合在固相上的ELISA的筛选方法可以获得具有反应性的众多抗体,然而所有这些抗体几乎都不能够高效地捕获血清中存在的人自分泌运动因子。在本发明中所用的抗体筛选方法中,将能够捕获杂交瘤细胞培养上清液中所含抗体的1次抗体或其它抗体结合因子如蛋白A或蛋白C与免疫板结合。例如,在目的是获得大鼠抗体的情况下,将抗大鼠免疫球蛋白抗体与免疫板结合。在实施封闭处理以防止非特异性结合,如通过用牛血清白蛋白等处理其中1次抗体等所结合的所述免疫板表面后,添加通过细胞融合获得的杂交瘤细胞的培养上清液至免疫板以捕获1次抗体。用缓冲液如磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤该免疫板以除去未反应的物质后,添加具有多聚组氨酸标签的重组人自分泌运动因子抗原(带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子)。所述带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子已经证实优选地具有溶血磷脂酶D活性。通过使反应持续一定时间量,这种带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子被杂交瘤培养上清液中的抗体捕获。此时,可以推定捕获的带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子反映这样的状态,其以如身体内的相同方式维持溶液中的天然形式,并且杂交瘤培养上清液中因这种反应而能捕获带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子的抗体预期能够捕获人样品中的人自分泌运动因子。继而,对抗体捕获的带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子的检测用针对所捕获的带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子中多聚组氨酸标签的酶标记抗多聚组氨酸抗体或形式为His探针-HRP(Pierce Biotechnology, Inc. 目录号15165)的酶标记探针实施。最终检测可以利用所述酶的显色底物、荧光底物或化学发光底物显像而实施,并且例如,可以通过使用作为过氧化物酶底物的四甲基联苯胺(TMB),通过450nm波长处的吸光度而检测发色。用这种方法获得的全部抗体群在人自分泌运动因子与免疫板直接结合的常规ELISA法中几乎均不显示反应性。此外,不能构建出使用对结合抗原直接显示反应性的抗体的双抗体夹心免疫测定体系。也就是说,这表明通过其中人自分泌运动因子与免疫板直接结合的常规ELISA法极难获得能够有效捕获天然形式人自分泌运动因子的抗体。

[0073] 对本发明中所用的抗体纯化方法没有特别的限制,只要它是其技术已经建立的方法。例如,在选择产生目的抗体的杂交瘤后,通过有限稀释法建立产生单克隆抗体的杂交瘤,随后回收细胞培养上清液。在根据需要通过硫酸铵沉淀法浓缩抗体后,此单克隆抗体可以使用固定有蛋白A或蛋白G的固相支持物,通过亲和层析法纯化。此外,纯化的抗体可以通过以生物素或酶如碱性磷酸酶标记而用来验证人自分泌运动因子双抗体夹心免疫测定体

系的建立。这些方法是其技术已经充分建立的标准方法。

[0074] 用于测定本发明中公开的天然形式人自分泌运动因子的方法可以是任何方法,只要它允许特异性地捕获天然形式人自分泌运动因子并且其结果是能够检测纯化抗体-天然形式人自分泌运动因子的复合物。所述方法优选地是如免疫测定法通常使用的利用标记抗原和天然形式人自分泌运动因子竞争抗体的竞争法,或使用不同表位的两种抗体与天然形式人自分泌运动因子之间形成三组分复合物的夹心法,原因是这些方法简单并且容易广泛使用。在抗体结合于支持物的情况下,对支持物没有特别的限制,只要它用在免疫测定法中,支持物的实例包括免疫板、乳胶粒子、磁性微粒子、硝酸纤维素膜、PVDF膜。在使用支持物的情况下,可以通过这样的方法检测人自分泌运动因子,所述的方法是包括检测由固定于该支持物上的抗体捕获的人自分泌运动因子的酶活性的方法,或使样品与已经在其表面固定有抗体的芯片接触,随后检测天然形式人自分泌运动因子结合依赖性信号的方法,如表面等离子体共振法。此外,人自分泌运动因子也可以用均相测定法如通过检测因荧光标记抗体与天然形式人自分泌运动因子之间结合所产生的荧光进行定量。已经充分建立了用于这些试剂和装置的技术。

[0075] 在前述测定方法中,就特异性、灵敏度和通用性而言,使用不同表位的双抗体夹心免疫测定方法是优异的。通过使用纯化的抗体群和标记抗体群,验证是否可以建立以重组人自分泌运动因子作为样品的夹心测定体系,从而选择测定体系的能够构建抗人自分泌运动因子单克隆抗体的组合。具体地,将纯化的非标记的抗天然形式人自分泌运动因子单克隆抗体与免疫板结合,随后用牛血清白蛋白等在免疫板的表面实施封闭处理。随后将重组人自分泌运动因子添加至该免疫板并用固相抗体捕获。用缓冲液如PBS洗涤该免疫板以除去未反应的物质后,使针对标记的天然形式人自分泌运动因子的抗体反应以形成天然形式人自分泌运动因子与两种类型抗体的夹心复合物。用缓冲液如PBS洗涤该免疫板以除去未反应的物质后,在已经对抗体实施酶标记的情况下添加底物,并且在需要其它反应如生物素标记的情况下,促使酶标记的链霉抗生物素蛋白等反应。使用针对所述标记酶的显色底物、荧光底物或化学发光底物实施对重组人自分泌运动因子的检测,其中所述的重组人自分泌运动因子被两种抗天然形式人自分泌运动因子抗体捕获。同样地在不含重组人自分泌运动因子的缓冲液中实施上述实验,用作背景值。不使用重组人自分泌运动因子的测定值是背景低值,且以测定值显著高的组合作为人自分泌运动因子免疫测定体系候选物。

[0076] 为验证以上文所述方式选择的人自分泌运动因子双抗体夹心免疫测定体系候选物的可靠性,制备重组人自分泌运动因子和人血清的连续稀释样品,并且验证这些样品是否显示稀释倍数依赖的反应性。在对抗体组合已经观察到这种依赖性的情况下,通过使用具有已知溶血磷脂酶D酶活性的人血清样品定量人自分泌运动因子而进一步实施验证。也就是说,如此选择免疫测定体系作为用于测定天然形式人自分泌运动因子的方法,即通过验证溶血磷脂酶D酶活性与人自分泌运动因子浓度之间的相关性,并且选择其中观察到溶血磷脂酶D酶活性与人自分泌运动因子浓度之间相关性的免疫测定体系。

[0077] 使用所选的两种抗体组合制备天然形式人自分泌运动因子的测定试剂。在两步骤夹心测定试剂的情况下,将两种抗体之一与能够B/F分离的支持物如免疫板或磁粒子结合。结合方法可以是利用疏水键的物理结合法或使用能够使两种物质间交联的接头试剂等的化学结合法。使用牛血清白蛋白、脱脂乳或市售的免疫测定封闭剂等在该支持物的表面上

实施旨在避免非特异性结合的封闭处理以获得第一试剂。随后制备含有识别不同表位的另一种抗体的溶液,其中所述的另一种抗体已经被标记用作第二试剂。抗体标记物优选地例如是酶如过氧化物酶或碱性磷酸酶、可检测物质如荧光物质、化学发光物质或放射性同位素、或存在特异的结合配偶体(如生物素或抗生物素蛋白)的物质。此外,所述第二试剂溶液优选地是其中可以有利实施抗原-抗体反应的缓冲液,如磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液。对实际样品的测定包括使第一试剂与样品在恒定温度上接触持续恒定时间。反应条件优选地包括在温度4至40℃反应5分钟至3小时。未反应的物质通过B/F分离除去,接下来与第二试剂在恒定温度上接触持续恒定时间,形成夹心复合体。反应条件优选地包括在温度4至40℃反应5分钟至3小时。未反应的物质通过B/F分离除去,随后从使用人自分泌运动因子已知浓度作为标准所制备的校准曲线中定量标记抗体的标记物并定量样品中人自分泌运动因子的浓度。在一步骤夹心测定试剂的情况下,制备这样的试剂,其中以与两步骤夹心测定试剂相同的方式进行抗体与支持物结合、封闭处理。将含有标记抗体的缓冲溶液添加至已固定有抗体的固相支持物以获得试剂。根据需要,该试剂也可以是冻干产物形式。在一步骤试剂的情况下,存在因根据一步骤试剂中所用抗原量与抗体量之间平衡造成抗原或抗体过剩或缺乏而发生而难以构建测定体系的众多情况。在本发明中,在ELISA法的情况下,通过96孔免疫板中每孔使用5至500ng并优选100ng抗体结合的支持物以及1至100ng并优选10ng标记抗体而获得良好的结果。虽然用于测定的人样品可以是血清、血浆、尿、精浆或脑脊液等,所用样品的稀释倍数优选地是0(未稀释)-100,并且在血清或血浆的情况下通过使用五倍稀释的100 μ L样品并且在精浆的情况下使用未稀释的100 μ L样品获得良好结果。

[0078] 通过本发明的测定试剂定量的样品中人自分泌运动因子浓度与自分泌运动因子所具有的溶血磷脂酶D活性显示良好相关性。

[0079] 可以通过使用本发明的测定试剂测定患者血清中的人自分泌运动因子而诊断癌症。在样品的自分泌运动因子浓度之间的比较中,前列腺癌标志物PSA、消化道癌标志物CA19-9、乳腺癌标志物CA153、卵巢癌标志物CA125测定值超过截止值的自分泌运动因子浓度,特别地与不呈现临床症状的正常健康受试者的自分泌运动因子浓度比较,任一癌症患者样品相对于正常健康受试者组显示显著差异 $p < 0.001$,因而证实这样的结果,其说明诊断癌症或辅助诊断癌症的可能性。尤其在乳腺癌和卵巢癌中,相对于正常健康受试者显示显著高的值,并且获得了表明这种测定试剂有效用于诊断癌症或辅助诊断癌症的结果。

[0080] 尤其,可以通过使用这种测定试剂测定患者样品中的人自分泌运动因子而检测出恶性淋巴瘤并且尤其滤泡性淋巴瘤。比较在诊断患有白血病或恶性淋巴瘤的患者样品中的自分泌运动因子浓度与无任何特殊临床症状的正常健康受试者中的自分泌运动因子浓度,表明非霍奇金淋巴瘤患者显示显著较高的值,此外,滤泡性淋巴瘤尤其显示显著高的值,并且获得这样的结果,其表明这种测定试剂有效用于检测癌症或辅助检测恶性淋巴瘤、尤其非霍奇金淋巴瘤并且更具体地是滤泡性淋巴瘤。

[0081] 也可以通过使用本发明的测定试剂测定慢性肝病患者的血清中的人自分泌运动因子而诊断慢性肝病。测定了慢性肝病患者样品和正常健康受试者中的人自分泌运动因子浓度,获得这样的结果,其表明自分泌运动因子浓度在慢性肝病患者的血清中高,显著性差异 $p < 0.0001$,因此表明这种测定试剂可用于诊断或辅助诊断慢性肝病。此外,作为验证人自分泌运动因子浓度与其它慢性肝病标志物之间相关性的结果,观察到人自分泌运动因子

浓度与透明质酸浓度、血清白蛋白浓度、总胆红素浓度、血小板计数及凝血酶原时间之间的相关性,并且反映了慢性肝病的程度,因此表明对人自分泌运动因子血清浓度的测定极其有效地用于诊断慢性肝病。

[0082] 实施例

[0083] 尽管下文给出了本发明的实施例,不过本发明不限于这些实施例。

[0084] 实施例1:重组人自分泌运动因子的表达

[0085] 根据常用方法,使用RT-PCR从人肝cDNA文库中克隆自分泌运动因子-t(GenBank登录号L46720)的第1-2589位核苷酸(SEQ 1D NO:1)。将此cDNA插入杆状病毒转移载体pFASTBac-1(Invitrogen),并且使用Bac-to-Bac系统(Invitrogen),根据操作手册制备用于表达全长人自分泌运动因子的杆状病毒。将终止密码子(TAA,核苷酸序列第2590-2592位)从克隆的全长人自分泌运动因子cDNA中除去,随后根据操作手册添加6个组氨酸残基以制备用于表达具有多聚组氨酸的多聚组氨酸标签化人自分泌运动因子的杆状病毒。含有已表达的全长人自分泌运动因子和带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子的培养上清液能够通过使用这些杆状病毒,根据常用方法感染sf9或sf21等进行制备。

[0086] 实施例2:带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子的纯化

[0087] 1升昆虫细胞系sf21细胞(5×10^5 个细胞/mL)以用于表达带多聚组氨酸标签的自分泌运动因子的杆状病毒感染,随后在28°C培养4日。培养结束后,将细胞通过离心分离法(10分钟,3000转/分钟)分离,随后用0.45 μ m滤器除去细胞碎片等沉淀物。回收的培养上清液用TBS(Tris-缓冲盐水:10mM Tris-HCl),150mM NaCl,pH 7.4)透析后,使用BD-TALON金属亲和树脂(BD Biosciences,目录号63501)装填的金属螯合柱,根据所提供的手册进行纯化。具体地,将该柱用5mL体积的树脂装填。添加50mL的50mM CoCl₂溶液至该柱以结合钴。用含有300mM NaCl的水溶洗涤该柱后,用50mM磷酸钠和300mM NaCl的pH 7.7水溶液(洗涤缓冲液)平衡所述柱。随后添加含有带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子的50mL样品。用100mL洗涤缓冲液从该柱中洗去未结合的物质,并且证实通过该柱的溶液在280nm处的吸光度变为0.01或更小。用约15mL含有10mM咪唑的洗涤缓冲液、并随后用含有100mM咪唑的洗涤缓冲液从该柱中洗脱目的物质。以1mL级分回收洗脱的样品,并且通过SDS-PAGE验证带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子在每个级分中的纯度。不回收初始级分,因其含有多的杂质,回收并混合那些主要含有目的的带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子的级分并且将它们用作纯化的带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子抗原。图1显示带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子纯化产物的SDS-PAGE图像、和使用抗自分泌运动因子肽抗体的蛋白质印迹的结果。泳道M表示分子量标记。泳道1显示在还原条件下以1 μ g/泳道对纯化抗原实施SDS-PAGE,随后用CBB染色的结果。泳道2-5显示蛋白质印迹法的结果。在还原条件下以0.25 μ g/泳道对纯化抗原实施SDS-PAGE后,将蛋白质转移至PVDF膜,此后对所述PVDF膜以含有3%脱脂乳的TBS封闭处理过夜。用TBS洗涤后,将此膜浸泡在含有1%Block Ace(大日本制药公司制)和0.05%吐温20的TBS中。添加1 μ g/mL大鼠抗自分泌运动因子肽的单克隆抗体(识别氨基酸序列第49-59位(SEQ1D NO:2))至泳道2,同时添加1 μ g/mL兔抗自分泌运动因子肽的多克隆抗体(识别氨基酸序列第671-686位(SEQ 1D NO:3))至泳道4,随后使其反应2小时。(对泳道3和泳道5的样品不添加抗体)。用含有0.05%吐温20的TBS(TBST)洗涤后,添加含有0.3 μ g/mL碱性磷酸酶标记的抗大鼠IgG抗体(American Qualex,目录号A103AT)和1%

Block Ace的TBST至泳道2和泳道3的样品,而添加含有0.3 μ g/mL碱性磷酸酶标记的抗兔IgG抗体(Zymed)和1%Block Ace的TBST至泳道4和泳道5的样品。使其反应后2小时后,将此膜用TBST充分洗涤并且使用CDP-STAR(Perkin Elmer),以感光胶片检测化学发光。如泳道1中所示,在CBB染色后显示单一条带。此外,根据使用抗肽抗体的蛋白质印迹法的结果,由于使用识别氨基酸序列第49-59位(SEQ 1D NO:2)和氨基酸序列第652-666位(SEQ 1D NO:3)的两种抗体检测纯化的抗原,故证实该抗原是作为目的的带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子。在蛋白质印迹法中检测到两条带,能够获得说明糖链差异和在培养或纯化步骤中存在分解的结果。

[0088] 实施例3:制备单克隆抗体

[0089] 7周龄雌性Wistar-Lewis大鼠在醚麻醉下用与弗氏完全佐剂混合的250 μ g抗原对后足免疫。1个月后,从大鼠中取下腹股沟淋巴结和髂淋巴结,随后回收B细胞。细胞融合根据常规方法在聚乙二醇存在下以小鼠骨髓瘤细胞系PA1实施,使用HAT培养基实施选择约10日,并且目的抗体通过实施例4的抗体产生性杂交瘤筛选法而选出。在筛选呈阳性的那些孔中的细胞通过使用有限稀释法的单克隆过程而确立作为杂交瘤。在使用HT培养基培养约10日后,培养过程最终用杂交瘤培养基继续进行,并且回收上清液以回收抗体。使用在500ml G1T培养基(大日本住友制药)中添加有经过滤除菌的27.5mL NCTC-109培养基(Invitrogen)、5.5mL非必需氨基酸(Invitrogen)、5.5mL青霉素/链霉素/谷氨酸(Invitrogen)的培养基作为杂交瘤细胞培养用培养基。使用向该培养基中添加HAT(Sigma-Aldrich Co., HYBRYMAX, 目录号H0262)的培养基作为HAT培养基,而使用向其中添加HT(Sigma-Aldrich Co., HYBRYMAX, 目录号H0137)的培养基作为HT培养基。

[0090] 实施例4:杂交瘤筛选法

[0091] 将抗大鼠免疫球蛋白抗体(American Qualex, 目录号A103UT)以250ng/孔包被到96孔免疫板上(MaxiSorp;Nalge,NUNC International, 目录号430341)。更具体地,抗大鼠免疫球蛋白抗体用TBS稀释以制备5 μ g/mL溶液。随后以50 μ L/孔添加这种溶液至所述免疫板并在4 $^{\circ}$ C过夜保存。继而,用TBS洗涤3次后,以250 μ L/孔添加含有3%牛血清白蛋白(BSA)的TBS溶液至各孔,随后使其在室温放置2小时。用TBS洗涤3次后,以50 μ L/孔添加杂交瘤细胞的培养上清液并且使其在室温放置2小时。用TBST洗涤6次后,以50 μ L/孔添加含有0.6 μ g/mL带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子、0.1%吐温20和1%BSA的TBS并且在室温放置2小时。用TBST洗涤6次后,以50 μ L/孔添加含有1 μ g/mL His探针-HRP(PierceBiotechnology Inc., 目录号15165)、0.1%吐温20和1%BSA的TBS,随后使其在室温放置30分钟,用TBST洗涤6次后,以50 μ L/孔添加TMB底物(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., 目录号50-76-00)并且使其在室温放置30分钟。用1N磷酸终止反应,随后测定在OD 450处的吸光度。此时,获得作为对照数据的除不含带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子外,同时实施相同过程的结果用作背景。选择在带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子存在下相对于对照数据显示出反应性的那些克隆作为阳性克隆,并且通过有限稀释法建立产生单克隆抗体的细胞系。

[0092] 实施例5:抗体纯化和生物素标记

[0093] 回收单克隆化的抗体产生细胞的培养上清液并且用HiTrap蛋白GHP(GE Healthcare Bioscience Inc., 目录号17-0405-01)进行抗体纯化。对用磷酸盐缓冲盐水

(PBS, 10mM磷酸, 150mM NaCl, pH 7.4)进行了缓冲液替换的前述柱, 使此培养上清液以流速20mL/分钟通过。该柱用体积等于5倍或更多倍数柱体积的PBS充分洗涤以除去未结合的蛋白质。此时, 可以通过证实已经通过该柱的缓冲液在OD 280处的吸光度为0.01或更小而证实未结合的蛋白质不再残留。在洗涤该柱后, 结合的抗体用100mM甘氨酸, pH 2.5的洗脱液洗脱。迅速添加洗脱的抗体至pH 8的1/10体积1M Tris以中和, 并迅速用TBS透析。利用评价抗体的EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-biotin (Pierce Biotechnology, Inc., 目录号21338), 对一部分纯化的抗体用生物素进行标记。

[0094] 实施例6: 评价单克隆抗体针对人自分泌运动因子的反应性

[0095] 使用两种方法验证根据实施例5所纯化的单克隆抗体针对人自分泌运动因子的反应性, 其中所述的方法包括评价在用人自分泌运动因子直接包被免疫板时的反应性和评价对溶液中存在的人自分泌运动因子的反应性。首先说明用人自分泌运动因子包被免疫板的实施例。以50ng/孔(1 μ g/mL溶液, 50 μ L/孔)添加纯化的重组全长人自分泌运动因子至96孔免疫板(MaxiSorp, Nalge NUNC International, 目录号430341), 随后在4 $^{\circ}$ C贮存过夜以包被该免疫板。然后, 用TBS洗涤3次后, 以250 μ L/孔添加含有3% BSA的TBS溶液至各孔并且使其在室温放置2小时以实施封闭。用TBS洗涤3次后, 以50 μ L/孔添加含有1 μ g/mL纯化抗体和1% BSA的TBST并且使其在室温放置2小时。用TBST洗涤6次后, 以50 μ L/孔添加含有0.3 μ g/mL HRP-标记的山羊抗大鼠IgG抗体和1% BSA的TBST并且使其在室温放置2小时。用TBST洗涤6次后, 以50 μ L/孔添加TMB底物, 随后使其在室温放置30分钟。用1N磷酸终止反应, 并且测定的在OD450处吸光度的结果示于图2。纵轴表示单克隆抗体的种类, 横轴表示OD450nm处的吸光度。

[0096] 随后, 显示以实施例4的方式验证对溶液中人自分泌运动因子的反应性的结果。抗大鼠免疫球蛋白抗体以250ng/孔包被96孔免疫板(MaxiSorp)上。用TBS洗涤3次后, 以250 μ L/孔添加含有3% BSA的TBS溶液至各孔, 随后使其在室温放置2小时以进行封闭。用TBS洗涤3次后, 以50 μ L/孔添加具有浓度10 μ g/mL的纯化抗体并且使其在室温放置2小时。用TBST洗涤6次后, 以50 μ L/孔添加含有0.6 μ g/mL带多聚组氨酸标签的人自分泌运动因子、0.1%吐温20和1% BSA的TBS并且使其在室温放置2小时。用TBST洗涤6次后, 以50 μ L/孔添加含有1 μ g/mL His探针-HRP、0.1%吐温20和1% BSA的TBS并且使其在室温放置30分钟。用TBST洗涤6次后, 以50 μ L/孔添加TMB底物, 随后使其在室温放置30分钟。用1N磷酸终止反应, 并且测定的在OD450处吸光度的结果示于图3。纵轴表示单克隆抗体的种类, 横轴表示OD450nm处的吸光度。此外, 显示不含抗人自分泌运动因子抗体的缓冲液的反应性用作背景。

[0097] 图2和图3的结果说明, 在制备单克隆抗体时所用的常规筛选方法为使抗原结合的ELISA法, 在该方法中, 极难获得能够高效捕获所得到的血清中存在的天然形式人自分泌运动因子的抗体群。

[0098] 实施例7: 由单克隆抗体所致的对血清溶血磷脂酶D活性的吸收

[0099] 通过血清溶血磷脂酶D活性的吸收验证由抗体所致的对血清中人自分泌运动因子的吸收。添加10 μ g纯化的抗人自分泌运动因子抗体至50 μ L(50%悬液)固定有抗大鼠IgG抗体的磁性微粒子BioMag山羊抗大鼠IgGfc(Qiagen, 目录号310144), 制备抗人自分泌运动因子固定化磁性微粒子。用TBST洗掉未反应的抗体后, 添加200 μ L用TBST四倍稀释的人血清并且使其反应2小时。在反应后, 用磁石除去所述磁性微粒子, 随后测定上清液中的溶血磷脂

酶D活性。在图4中显示了相对于使用未添加抗人自分泌运动因子抗体的抗大鼠IgG抗体固定化磁性微粒子处理后的人血清中溶血磷脂酶D活性而言,验证活性抑制率的结果。纵轴表示单克隆抗体的种类,横轴表示活性抑制率(吸收率)。活性吸收率表示相对于不含抗人自分泌运动因子抗体的缓冲液中残留活性的抑制活性。使用对FEBS Letters,571,197-204,2004中所述方法进行了若干改变的方法实施对溶血磷脂酶D活性的测定。更具体地,将20 μ L样品与含有2mM溶血磷脂酰胆碱(14:0-溶血磷脂酰胆碱),100mM Tris-HCl,500mM NaCl,5mM MgCl₂和0.05% Triton X-100(pH 9.0)的20 μ L底物溶液混合,随后允许在37 $^{\circ}$ C反应6小时至过夜。随后,为了定量这种酶反应形成的胆碱,添加包含0.5mM T00S(N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺),10单位/mL辣根过氧化物酶,0.01% Triton X-100和100mM Tris-HCl(pH 8.0)的150 μ L R1溶液,5分钟后,添加包含1mM 4-氨基安替比林,10单位/mL胆碱氧化酶,0.01% Triton X-100和100mM Tris-HCl(pH 8.0)的50 μ L R2溶液。30分钟后,基于已知浓度的氯化胆碱测定在550nm处的吸光度并将该吸光度用作活性值。证实除抗体R10.30和抗体R10.31外的所有抗体均发挥吸收性能(absorbance performance)并且显示反映使用实施例6中的His探针的天然形式人自分泌运动因子在溶液中的结合性能,同时,该结果不反映抗原与免疫板直接结合的结果。在抗体R10.30和R10.31的情况下,推测来自血清的吸收性能与使用His探针-HRP所获得的测定值之间的差是因重组人自分泌运动因子与血清中存在的人自分泌运动因子之间的结构或存在形式差异所致,从而导致这些抗体不能够识别血清中的人自分泌运动因子。

[0100] 实施例8:确认单克隆抗体对其它动物物种的自分泌运动因子的反应性

[0101] 通过血清溶血磷脂酶D活性的吸收验证实施例5所纯化的代表性抗体针对动物血清中自分泌运动因子的反应性。添加10 μ g在实施例5中制备的生物素标记的抗人自分泌运动因子抗体至20 μ L固定有链霉抗生物素蛋白的磁性微粒子BioMag链霉抗生物素蛋白(Qiagen,目录号311711)(50%悬液)以制备固定有抗人自分泌运动因子的磁性微粒子。用TBST洗掉未反应的抗体后,添加用TBST稀释2.5倍的125 μ L动物血清并且使其反应2小时。在反应后,用磁石除去所述磁性微粒子,随后测定上清液中的溶血磷脂酶D活性。在图5和表1中显示相对于用未添加抗人自分泌运动因子抗体的固定有链霉抗生物素蛋白的磁性微粒处理的动物血清的溶血磷脂酶D活性验证活性抑制率的结果。纵轴表示动物血清的种类,而横轴表示活性抑制率(吸收率)。活性吸收率显示了对不含抗人自分泌运动因子抗体的缓冲液中残留活性的抑制活性。如抗体R10.23所列举,能够从针对人自分泌运动因子特异的抗体中获得与几种类型动物自分泌运动因子显示交叉反应性的多样性丰富的抗体群。尽管已经尝试了使用在大肠杆菌中表达自分泌运动因子片段而获得的抗原来详细分析表位的位置,几乎没有任何抗体显示与可溶性自分泌运动因子片段的反应性,因而妨碍了表位的鉴定。然而,因为预计所获得的单克隆抗体由识别人自分泌运动因子上不同表位的抗体群构成,故所得结果提示有可能使用两种抗体来建立夹心免疫测定法。

[0102] 表1显示了抗体所致的对动物血清中自分泌运动因子的溶血磷脂酶D活性的吸收性能;小于10%表示为-、10-50%表示为+、大于50%表示为++

[0103]

	R 10. 1	R 10. 7	R 10. 8	R 10. 16	R 10. 17	R 10. 20	R 10. 21	R 10. 23	R 10. 30	R 10. 48	R 10. 49
人	++	++	+	+	++	++	+	++	+	++	++
马	++	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
兔	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
大鼠	+	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-
小鼠	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0104] 实施例9:人自分泌运动因子标准品的制备

[0105] 使用实施例5中纯化的抗体制备固定有抗体的支持物,随后纯化抗原并制备其中已经从人血清中除去抗原的人自分泌运动因子零浓度血清。使用这些材料制备在人自分泌运动因子免疫测定中使用的标准品(人自分泌运动因子浓度已知的样品)。具体地,将根据实施例5纯化的25mg单克隆抗体R10.23与HiTrap-NHS-活化的5mL柱(GE Healthcare Bioscience Inc., 目录号17-0717-01)根据手册进行结合。使用这种R10.23结合的柱,用0.8 μ m滤器除去杂质的200mL人血清以流速1mL/分钟通过该柱,随后回收洗脱物级分。证实这种洗脱物级分中的人自分泌运动因子在实施例6中所述的ELISA测定法中不显示反应性。这种产物随后用作制备标准品的基本血清并且还用作零浓度标准品。通过使用昆虫细胞-杆状病毒系统中表达的全长人自分泌运动因子作为原材料,实施纯化抗原的制备。使1L培养上清液以流速1mL/分钟通过R10.23结合的柱子,随后以PBS洗掉未结合的蛋白质。证实通过该柱的PBS在280nm处的吸光度是0.01或更小后,使用具有pH 3.5的100mM甘氨酸缓冲液洗脱结合的蛋白质。通过添加1/10体积的1M Tris(pH 8.0)中和该洗脱液后,用TBS迅速透析该洗脱液。图6显示全长人自分泌运动因子纯化产物的SDS-PAGE图像和使用抗自分泌运动因子肽抗体进行蛋白质印迹的结果。在该图中,泳道M表示分子量标记。泳道1显示在还原条件下对纯化抗原以1 μ g/泳道实施SDS-PAGE,随后用CBB染色的结果。泳道2-5显示蛋白质印迹法的结果。也就是说,在还原条件下对纯化抗原以0.25 μ g/泳道实施SDS-PAGE后,将蛋白质转移至PVDF膜,在封闭处理后,泳道2为小鼠抗自分泌运动因子肽的单克隆抗体(识别氨基酸序列第49-59位(SEQ 1D NO:2)),泳道4为兔抗自分泌运动因子肽的多克隆抗体(识别氨基酸序列第671-686位(SEQ 1D NO:2))并且泳道3和泳道5被检测为背景,以检测不含抗人自分泌运动因子的非特异性结合。作为CBB染色法的结果,证实两条带是纯化的抗原,并且以与实施例2相同的方式在使用抗肽抗体的蛋白质印迹法中检测到分子量105kDa附近的两条或两条以上的条带。因此,获得这样的结果,其说明糖链差异或在培养或纯化步骤中存在分解。用BCA蛋白定量试剂盒(Pierce Biotechnology, Inc., 目录号23225)测定纯化的全长人自分泌运动因子的浓度,并且使用这种浓度作为人自分泌运动因子浓度。随后添加这种纯化的人自分泌运动因子抗原至上述不含人自分泌运动因子的人血清以制备浓度已知的标准品。

[0106] 实施例10:选择用于夹心ELISA测定体系的抗体组合

[0107] 使用纯化的抗原和生物素标记的抗体评价能够建立夹心ELISA测定体系的抗体组合。以50 μ L/孔添加含有2 μ g/mL纯化抗体的TBS溶液至96孔免疫板(Nunc)以使纯化的抗体与

该板在4℃结合过夜。用TBS洗涤3次后,根据实施例9纯化的重组全长人自分泌运动因子用ELISA测定缓冲液(含有3%BSA,10mM MgCl₂和0.1%吐温20的TBS)稀释至100ng/mL纯化的人自分泌运动因子并且以50μL/孔添加。在使其在室温放置2小时后,将板用TBST洗涤四次,随后以50μL/孔添加含有0.8μg/mL生物素标记抗体的ELISA测定缓冲液。在使其在室温放置2小时后,将板用TBST洗涤四次,随后以50μL/孔添加稀释1000倍的含有HRP标记的链霉抗生物素蛋白(Zymed)的ELISA测定缓冲液。使其在室温放置1小时后,将板用TBST洗涤6次,随后以50μL/孔添加TMB底物。使其在室温放置10分钟,用1N磷酸终止反应,随后测定在OD 450处的吸光度。在图7中显示了代表性结果。在抗体R10.21和R10.23的情况下,在本图的上半部分显示这样的结果,即,将每种抗体包被在免疫板上作为1次抗体,随后使其与人自分泌运动因子反应并且随后使用其它的抗体群通过双抗体夹心ELISA检测反应性(当包被R10.21时,在该上半部分的左边显示结果,并且当包被R10.23时,在该上半部分的右边显示结果)。此外,在本图的下半部分显示将获得的抗体群类似地包被在免疫板上作为1次抗体,随后使用R10.21和R10.23作为2次抗体而检测反应性的结果(当使用R10.21作为检测用2次抗体时,在下半部分的左边显示结果,并且当使用R10.23作为检测用2次抗体时,在下半部分的右边显示结果)。在本图中,横轴表示所用的抗体(上半部分:2次抗体;下半部分:1次抗体),同时纵轴表示通过OD450nm处的吸光度而确定的反应性。作为比较该图上半部分和下半部分的结果,证实存在这样的情况,其中根据使用1次抗体和2次抗体的方式,反应性展现或未展现,即便对于相同的抗体组合也是如此。图8显示在使用所获得的抗人自分泌运动因子单克隆抗体进行夹心ELISA中的反应性总览。根据这些结果,那些不显示反应性的抗体组合表示不能用来构建夹心ELISA体系的组合,而那些显示反应性的组合表示这些组合可以用来构建这种体系。在水平方向上标出的是与免疫板结合的1次抗体的名称,而在垂直方向上标出的是2次抗体的名称。此外,表中的数值表示在450nm处的吸光度,而符号“-”表示0.5或更低的吸光度。在评价的总计529个组合中,存在16个显示0.5或更高反应性的组合,占总数的约3%。此外,使用三种单克隆抗体R10.16、R10.48或R10.49的组合不能构建夹心ELISA体系,其中所述的三种单克隆抗体在与实施例6相关的图2中所示的将人自分泌运动因子直接结合免疫板的ELISA中显示反应性。也就是说,表明通过其中人自分泌运动因子与免疫板直接结合的常规筛选方法所获得的抗体不能构建夹心ELISA体系或极难构建这种体系,因而表示根据本发明技术的抗体筛选方法是极有效的技术。

[0108] 实施例11:通过两步骤夹心ELISA测定法定量人自分泌运动因子

[0109] 使用在实施例9中显示反应性的抗人自分泌运动因子抗体组合构建用于通过两步骤双抗体夹心ELISA法测定血清中人自分泌运动因子的体系。使用R10.23作为固相抗体和R10.21作为2次抗体验证该测定体系。R10.23固相抗体在此抗体通过胃蛋白酶消化转化成F(ab)₂后使用。使用与实施例9相同的方法,将2μg/mL浓度的R10.23以50μL/孔添加至96孔免疫板(Nunc),随后使该抗体与此板在4℃结合过夜。用TBS洗涤3次后,以250μL/孔添加含有3%BSA的TBS,随后封闭处理2小时。用TBS洗涤3次后,用ELISA测定缓冲液分别1:5稀释在实施例10中制备的标准品和自分泌运动因子浓度未知的人血清并且以50μL/孔添加至该板。在室温使其反应2小时后,该板用TBST洗涤四次,随后以50μL/孔添加含有0.8μg/mL生物素标记的R10.21的ELISA测定缓冲液。在使其在室温放置2小时,将板用TBST洗涤四次,随后以50μL/孔添加含有1000倍稀释的HRP标记的链霉抗生物素蛋白(Zymed)的ELISA测定缓冲液。

使其在室温放置1小时后,将板用TBST洗涤6次,随后以50 μ L/孔添加TMB底物。在使其在室温放置30分钟后,用1N磷酸终止反应,随后测定在450nm处的吸光度。图9显示了使用具有已知浓度的人自分泌运动因子标准品的6个浓度(0、0.34、0.675、1.35、2.70和5.40 μ g/mL)所制备的校准曲线。通过三阶回归法进行校准曲线的回归。证实在450nm处的吸光度根据人自分泌运动因子浓度而增加。根据使用这种校准曲线从具有未知自分泌运动因子浓度的人血清中获得的在OD450nm处的吸光度,计算样品中人自分泌运动因子的浓度。此外,根据实施例7确定用于测定的人血清中的溶血磷脂酶D活性,并且验证其与人自分泌运动因子浓度的相关性。图10显示42份人血清样品的结果。横轴表示溶血磷脂酶D活性,而纵轴表示人自分泌运动因子浓度。证实了人自分泌运动因子血清浓度和溶血磷脂酶D酶活性的良好相关性,相关系数 $r=0.8934$,因而表明血清中的自分泌运动因子浓度可以通过前述夹心ELISA法定量。

[0110] 实施例12:通过一步骤夹心ELISA测定法定量人自分泌运动因子

[0111] 使用在实施例10中显示反应性的抗人自分泌运动因子抗体组合构建用于通过一步骤双抗体夹心ELISA法测定血清中人自分泌运动因子的体系。使用R10.23作为固相抗体和R10.21作为2次抗体验证该测定体系。R10.23固相抗体在此抗体转化成F(ab)₂后使用。作为2次抗体的R10.21使用碱性磷酸酶和磺基-SMCC进行酶标记。使用与实施例9相同的方法,将2 μ g/mL R10.23添加至96孔免疫板(Nunc),随后使该抗体与此板在4 $^{\circ}$ C结合过夜。用TBS洗涤3次后,以250 μ L/孔添加含有3%BSA的TBS,随后封闭处理2小时。以50 μ L/孔添加含有0.57 μ g/mL碱性磷酸酶标记的R10.21的ELISA测定缓冲液并将其迅速冷冻至-40 $^{\circ}$ C。通过使之在减压下放置过夜而获得冻干产物以制备一步骤夹心ELISA测定试剂。通过添加以0.125%吐温20水溶液1/5倍稀释的在实施例10中制备的标准品和具有未知自分泌运动因子浓度的人血清并以50 μ L/孔添加而实施测定。在室温使其反应后2小时后,将板用TBST洗涤四次,随后以50 μ L/孔添加TMB底物。在使其在室温放置30分钟后,反应用1N磷酸终止,随后测定在450nm处的吸光度。图11显示了使用具有已知浓度的人自分泌运动因子标准品的6个浓度(0、0.34、0.675、1.35、2.70和5.40 μ g/mL)所制备的校准曲线。通过三阶回归法进行校准曲线的回归。证实在450nm处的吸光度根据人自分泌运动因子浓度而增加。根据使用这种校准曲线从具有未知自分泌运动因子浓度的人血清中获得的在OD450nm处的吸光度,计算样品中人自分泌运动因子的浓度。此外,根据实施例7确定用于测定的人血清中的溶血磷脂酶D活性,并且验证其与人自分泌运动因子浓度的相关性。图12显示横轴表示的溶血磷脂酶D活性、纵轴表示的人自分泌运动因子浓度。血清中的人自分泌运动因子浓度和溶血磷脂酶D酶活性证实有良好的相关性,相关系数 $r=0.9185$,因而表明血清中的自分泌运动因子浓度可以通过前述夹心ELISA法定量。

[0112] 实施例13:通过一步骤夹心ELISA测定法定量和诊断癌症患者样品中的人自分泌运动因子

[0113] 定量来自正常健康受试者和癌症患者的血清样品中的人自分泌运动因子浓度,随后验证与正常健康受试者相比的显著性差异。对于癌症患者血清,使用其中前列腺癌标志物PSA(前列腺特异性抗原)、消化器癌标志物CA19-9、乳腺癌标志物CA153和卵巢癌标志物CA125的测定值超过截止水平(cut-off)的样品,并且根据实施例12实施一步骤夹心ELISA。使用全自动酶免疫测试装置A1A-60011(Tosoh Corp.),采用已经获得制造商批准用作体外

诊断剂的相应的标志物测定试剂测定每种癌标志物的水平,对癌症患者血清的阳性判断确定为PSA大于10ng/mL,CA19-9大于38ng/mL,CA153大于23ng/mL,CA125大于32ng/mL。结果示于图13和表2。证实在每种癌样品组中的血清自分泌运动因子浓度是比正常健康受试者的血清自分泌运动因子浓度显著更高的值($p < 0.001$)。基于这些结果,表明对血清中自分泌运动因子浓度的定量有效用于诊断癌症。

[0114] 表2使用PSA、CA19-9、CA153和CA125测定值超过截止值的样品,利用一步骤双抗体夹心ELISA法验证相对于正常健康受试者的自分泌运动因子浓度的结果。对每个样品组在下表中显示测定数目、平均测定值和标准偏差。

[0115]

	正常健康受试者	PSA	CA19-9	CA153	CA125
数目	40	21	25	17	25
平均值	0.73	1.01	0.97	1.68	1.75
SD	0.13	0.20	0.18	0.49	0.83

[0116] 实施例14:通过一步骤夹心ELISA测定法对慢性肝病患者样品中人自分泌运动因子的定量和诊断

[0117] 定量来自正常健康受试者的146份样品和来自慢性肝病(CLD)患者的29份血清样品中的人自分泌运动因子浓度,随后验证与正常健康受试者相比的显著性差异。根据实施例12实施一步骤夹心ELISA。结果示于图14。正常健康受试者(149份样品)和慢性肝病组(27份样品)的平均测定值±标准偏差分别是 0.756 ± 0.045 和 0.1866 ± 1.244 ng/mL,并且观察到显著差异($p < 0.0001$)。使用来自慢性肝病患者的17份样品,在表3中显示自分泌运动因子浓度与将已知肝病标志物的透明质酸、血清白蛋白、总胆红素浓度、血小板计数及凝血酶原时间作为测定值之间的关系。证实人自分泌运动因子浓度与所述已知标志物具有相关性。根据这些结果,表明对血清中自分泌运动因子浓度的定量有效用于诊断或辅助诊断慢性肝病,同时反映该疾病的程度。

[0118] 表3测定17位慢性肝病患者中透明质酸浓度、血清白蛋白浓度、总胆红素浓度、血小板计数、和凝血酶原时间的结果,以及与每种样品的人自分泌运动因子浓度的比较。

[0119]

项目	线性回归		斯皮尔曼等级	
	相关系数(r)	可靠性(p)	相关系数(ρ)	可靠性(p)
透明质酸	0.764	0.0004	0.362	0.1539
白蛋白	-0.776	0.0003	-0.718	0.0012
总胆红素	0.821	0.0001	0.657	0.0042
血小板计数	-0.661	0.0039	-0.582	0.0143
凝血酶原时间	-0.727	0.0010	-0.715	0.0013

[0120] 实施例15:对人精浆的测定

[0121] 在正常健康受试者中实施自分泌运动因子的定量和溶血磷脂酶D活性的测定。使用全自动酶免疫测定装置A1A-60011(批准文号:13B3X90002000003)实施自分泌运动因子的定量。一步骤双抗体夹心测定试剂与实施例12同样地使用1.2 μ g转化成F(ab)₂后用作固

相抗体的R10.23、0.57 μg 用作2次抗体的碱性磷酸酶标记的R10.21,将含有5%明胶和10mM MgCl_2 的50 μL ELISA测定缓冲液添加至测定杯中,随后冻干过夜。使用这些测定试剂,以自动化装置实施测定。测定条件包括分配20 μL 样品和130 μL 的0.1% Triton X-100溶液至测定杯中并在37 $^\circ\text{C}$ 使其反应10分钟。在使其反应并用琥珀酸缓冲液洗涤后,添加4-甲基伞形酮酰磷酸盐(4-methylumbelliferyl phosphate),随后通过碱性磷酸酶分解并且测定每单位时间形成的4-甲基伞形酮的浓度以实施对自分泌运动因子的定量。使用具有已知浓度的人自分泌运动因子标准品的6个浓度(0、0.34、0.675、1.35、2.70和5.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)所制备的校准曲线时,正常健康受试者的自分泌运动因子浓度是0.164 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。另一方面,作为实施例7测定精浆中溶血磷脂酶D活性的结果,如图15的左侧图中所示,未观察到在底物溶血磷脂酰胆碱存在或不存在下所形成的胆碱量之间存在大的差异,并且甚至在稀释10倍的精浆中显示极高的值。因为在底物不存在下显示高值,故推定测定了内在的胆碱。因为正常健康受试者精浆中的胆碱浓度基于这些测定值是极高的,约40mM,并且因为底物浓度在根据实施例7的溶血磷脂酶D活性测定是2mM,故为了排除所述胆碱浓度,需要稀释此精浆样品约1000倍来实施测定。因为自分泌运动因子由于这种稀释方法的实施而同时被稀释,预计需要长时间来测定酶活性。为了证实精浆中溶血磷脂酶D活性的高水平是内在的胆碱所致,通过用TBS充分透析精浆样品8小时而除去低分子量物质后,溶血磷脂酶D活性在图15的中间图中显示。作为透析的结果,作为显示为高值的溶血磷脂酶D活性的胆碱生成量下降至先前水平的约1/100。此外,作为透析后测定精浆中溶血磷脂酶D活性的结果,如在图15的右图中显示,能够相对于底物不存在下而证实在底物存在下的酶活性。在底物不存在下,酶活性值等于通过终止并控制反应温度在4 $^\circ\text{C}$ 的酶反应所获得的测定值。根据这些结果,因为极高浓度的胆碱存在于精浆中,故难以利用胆碱的形成作为溶血磷脂酶D活性的指标并且这些结果证实仅通过使用本发明的免疫测定法才可能进行这种测定。

[0122] 实施例16:自分泌运动因子测定试剂的制备

[0123] 将抗人自分泌运动因子单克隆抗体(R10.23)在37 $^\circ\text{C}$ 物理地过夜吸附于非水溶性支持物(内部掺入有铁氧体的粒径约1.5mm的乙烯-乙醇支持物)至抗体浓度100ng/支持物,随后在40 $^\circ\text{C}$ 用含有1%BSA的100mM Tris缓冲液(pH 8.0)封闭4小时,以获得固定有抗体的支持物。如此制备标记抗体,即通过胃蛋白酶处理而将抗人自分泌运动因子单克隆抗体(R10.21)转化成F(ab)₂,随后使用SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯)结合碱性磷酸酶以获得酶标记的抗体。将12个固定有抗体的支持物置于可透磁的容器内(容量:1.2mL),随后添加含有1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标记抗体的50 μL 缓冲液(含有3%BSA的Tris缓冲液,pH 8.0)至该容器并且冻干以获得自分泌运动因子测定试剂。此自分泌运动因子测定试剂在该容器充氮气后被密封并贮存在4 $^\circ\text{C}$ 直至测定。

[0124] 实施例17:人自分泌运动因子标准品的制备

[0125] 使用抗人自分泌运动因子单克隆抗体(R10.23)制备固定有抗体的支持物,随后纯化抗原并制备已经从人血清中除去抗原的人自分泌运动因子零浓度血清。使用这些材料制备在人自分泌运动因子免疫测定中使用的标准品(人自分泌运动因子浓度已知的样品)。具体地,将25mg单克隆抗体R10.23与HiTrap-NHS-活化5mL柱(GE Healthcare Bioscience Inc., 目录号17-0717-01)根据该柱附带的说明书进行结合。使用这种R10.23结合的柱,以0.8 μm 滤器除去杂质的200mL人血清以流速1mL/分钟通过该柱,随后回收洗脱物级分。证实

在这种洗脱物级分中的人自分泌运动因子与实施例16中所述的测定试剂不显示反应性。这种产物随后用作制备标准品的基本血清并且还用作零浓度标准品。通过使用昆虫细胞-杆状病毒系统中表达的全长人自分泌运动因子作为原材料,实施纯化抗原的制备。使1L培养上清液以流速1mL/分钟通过R10.23-结合的柱子,随后以PBS洗掉未结合的蛋白质。在证实通过该柱的PBS在280nm处的吸光度是0.01或更小后,使用具有pH 3.5的100mM甘氨酸缓冲液洗脱结合的蛋白质。在通过添加1/10体积1M Tris(pH 8.0)中和该洗脱物后,用TBS迅速透析该洗脱物。用BCA蛋白定量试剂盒(Pierce Biotechnology, Inc., 目录号23225)测定纯化的全长人自分泌运动因子的浓度,并且使用这种浓度作为人自分泌运动因子浓度。随后添加这种纯化的人自分泌运动因子抗原至不含前述人自分泌运动因子的人血清以制备浓度已知的标准品。

[0126] 实施例18:对自分泌运动因子测定试剂的评估

[0127] 使用实施例16中制备的自分泌运动因子测定试剂和实施例17中制备的标准品评价试剂性能。作为评价用装置,使用全自动酶免疫测定装置A1A-1800(东曹株式会社制,制造出售编号13B3X90002000002)以评价该设备。使用具有0、0.313、0.625、1.25、2.5和5.0 μ g/mL浓度的标准品的6个浓度。全自动酶免疫测定装置A1A-1800的测定原理包括自动分配20 μ L标准品或人血清样品和含有表面活性剂的130 μ L稀释剂至实施例16中制备的自分泌运动因子测定试剂的容器内。在37 $^{\circ}$ C恒温进行抗原抗体反应10分钟并且用含有表面活性剂的缓冲液洗涤8次后,添加4-甲基伞形酮酞磷酸盐旨在获得每单位时间形成的4-甲基伞形酮浓度的测定值(nmol/L \cdot 秒)。当测定所述标准品时,在表4中显示测定值,而在图16中显示使用这些测定值的校准曲线。此外,从校准曲线和零浓度标准品的(平均值+2 \times 标准偏差)计算出的最小可检测浓度是110ng/mL。

[0128] 表4

[0129]

测定值 (nM/秒)	标准品浓度					
	0 μ g/mL	0.313 μ g/mL	0.625 μ g/mL	1.25 μ g/mL	2.5 μ g/mL	5.0 μ g/mL
1	0.038	7.444	19.937	49.888	101.739	190.031
2	0.041	7.473	19.026	45.471	107.094	177.043
3	0.040	6.942	19.241	47.992	103.751	175.219
4	0.040	6.325	19.850	50.465	101.417	186.175
5	0.039	8.248	20.577	46.465	97.992	182.891
平均值	0.040	7.286	19.726	48.056	102.399	182.272
%CV	2.879	9.770	3.114	4.460	3.264	3.392

[0130] 实施例19:自分泌运动因子测定试剂的再现性试验

[0131] 为了验证用自分泌运动因子测定试剂所获得结果的再现性,使用实施例18中制备的校准曲线,以3个对照样品实施再现性试验。通过反复测定所述样品10次,随后计算变异系数(%CV=标准偏差/平均值 \times 100)评估同时再现性。结果示于表5。此外,所述样品还隔

数日进行测定,随后计算自第0日所获得的测定值的变动以及全部测定值的变异系数。这些结果示于表6。

[0132] 表5同时再现性试验结果($\mu\text{g}/\text{mL}$)

[0133]

	对照血清L	对照血清M	对照血清H
测定值1	0.589	1.223	4.058
测定值2	0.619	1.261	4.18
测定值3	0.594	1.276	3.997
测定值4	0.592	1.204	4.08
测定值5	0.581	1.244	4.156
测定值6	0.574	1.211	4.083
测定值7	0.557	1.289	4.166
测定值8	0.588	1.204	4.09
测定值9	0.567	1.258	4.137
测定值10	0.596	1.232	4.029
测定值11	0.556	1.259	4.124
测定值12	0.596	1.271	4.269
测定值13	0.589	1.297	4.053
测定值14	0.577	1.264	4.186
测定值15	0.614	1.231	4.082
测定值16	0.59	1.313	4.25
测定值17	0.571	1.255	3.928
测定值18	0.588	1.313	4.049
测定值19	0.583	1.234	4.385
测定值20	0.613	1.25	4.059
平均值	0.59	1.25	4.12
标准偏差	0.02	0.03	0.10
%CV	2.91	2.61	2.51

[0134] 表6日间再现性试验结果($\mu\text{g}/\text{mL}$,4个测定值的平均值)

[0135]

	对照血清L	对照血清M	对照血清H
第0日	0.779	0.804	0.975
第3日	0.972	0.882	1.057
第6日	0.885	0.812	1.018

[0136]

第13日	1.186	0.908	1.052
第17日	1.033	0.938	1.071
第25日	1.017	0.904	1.077
平均值	0.98	0.87	1.04

标准偏差	0.14	0.05	0.04
%CV	14.16	6.27	3.70

[0137] 因为全部变异系数均是10%以下,故证实用所述自分泌运动因子测定试剂获得的结果是可靠的。

[0138] 实施例20:对白血病样品和恶性淋巴瘤样品的测定

[0139] 使用全自动酶免疫测定装置A1A-60011,用自分泌运动因子测定试剂测定来自120位正常健康受试者和215位白血病和恶性淋巴瘤患者的血清样品。结果示于表7。

[0140] 表7

[0141]

	NHS	AL	CL	HD	NHL	其它
男性	74	19	21	4	47	9
女性	45	33	7	4	20	6

[0142] NHS:正常健康受试者

[0143] AL:急性白血病

[0144] CL:慢性白血病

[0145] HD:霍奇金淋巴瘤

[0146] NHL:非霍奇金淋巴瘤

[0147] 其它:其它白血病和恶性淋巴瘤

[0148] 74例正常健康男性的测定值产生平均值0.656 $\mu\text{g}/\text{mL}$,标准偏差0.121 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最小值0.401 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最大值1.088 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。此外,46例正常健康女性的测定值产生平均值0.852 $\mu\text{g}/\text{mL}$,标准偏差0.184 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最小值0.621 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最大值1.590 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对215位白血病患者和恶性淋巴瘤患者实施测定。对象样品包括正常健康受试者、急性白血病(急性淋巴性白血病、急性骨髓性白血病)、慢性白血病(慢性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、幼淋巴细胞性白血病)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、淋巴母细胞性淋巴瘤)和其它白血病和恶性淋巴瘤(慢性活动性EBV感染、骨髓增生异常综合征、多发性骨髓瘤),分别的样品数示于表7。测定结果如图17和图18中所示,并且对于非霍奇金淋巴瘤,证实男性和女性均是高值,显著性差异 $P < 0.01$ 。

[0149] 实施例21:对非霍奇金淋巴瘤的详细评价

[0150] 在更详细地分类后,评价在实施例20中测定的非霍奇金淋巴瘤。结果示于表8及图19和图20中。对于滤泡性淋巴瘤,证实男性和女性均是高值,显著性差异分别是 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$ 。

[0151] 表8

[0152]

	NHS	Burkitt	LBL	MCL	DLBCL	FL
男性	74	7	1	3	23	13
女性	45	0	0	0	6	14

[0153] NHS:正常健康受试者

[0154] Burkitt:伯基特淋巴瘤

[0155] LBL:淋巴母细胞性淋巴瘤

[0156] MCL:套细胞淋巴瘤

[0157] DLBCL:弥漫性大B细胞淋巴瘤

[0158] FL:滤泡性淋巴瘤

[0159] 实施例22:自分泌运动因子浓度和溶血磷脂酸浓度的相关性试验

[0160] 已经明白了自分泌运动因子通过产生生理活性脂类的溶血磷脂酸(LPA)而参与癌浸润和转移。因此,测定血清中的自分泌运动因子浓度来评估它们与LPA浓度的相关性。根据Clin.Chim.Acta.,333,59-67,2003测定LPA。具体地,制备含有以下组分的100mM HEPES缓冲液(pH 7.6)用作测定试剂。

[0161] (测定试剂的组分)

[0162] 20kU/L溶血磷脂酶(EC 3.1.1.5)

[0163] 1.3kU/L过氧化物酶

[0164] 100kU/L甘油-3-磷酸氧化酶(G3PO:EC 1.1.3.21)

[0165] 10kU/L甘油-3-磷酸脱氢酶(G3PDH:EC 1.1.1.8)

[0166] 10kU/L α -羟基类固醇脱氢酶(HSD:EC 1.1.1.50)

[0167] 10 μ M烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)

[0168] 1mM胆酸

[0169] 0.5mM TOS

[0170] 1mM 4-氨基安替比林

[0171] 0.01%Triton X-100

[0172] 如此实施测定,即通过将9 μ L血清和具有已知LPA浓度的标准品与240 μ L前述测定试剂混合,随后在37 $^{\circ}$ C孵育并且在7分钟和9分钟后测定在570nm处的吸光度。计算测定值从7分钟至9分钟的增加量(速率值=吸光度/分钟),并且使用校准曲线计算血清样品中的LPA浓度,其中所述的校准曲线通过测定所述标准品所获得的值制备。作为验证所测定样品中的自分泌运动因子抗原浓度与LPA浓度之间相关性的结果,观察到具有相关系数 $r=0.621$ 的良好相关性,如图21中所示。(此外,一般来讲,相关系数 $r=0.5$ 或更高则能够判定指示极高相关性)。

[0173] LPA浓度的现有测定因LPA本身的不稳定性以及因样品收集后在血清中自发形成,所以在临床上的测定是困难的,但是根据本发明对分泌运动因子的测定是容易的,并且获得与LPA浓度的良好相关。

[0174] 工业可利用性

[0175] 本发明涉及针对人样品中所含天然形式人自分泌运动因子的抗体、使用这种抗体的人自分泌运动因子定量方法和定量试剂。使用它们有可能诊断癌症和肝病。此外,通过免疫学定量方法测定人样品中所含人自分泌运动因子的浓度,本发明可以检测或辅助检测至今尚无明确的血清诊断标志物的恶性淋巴瘤、尤其是日本人占多数的非霍奇金淋巴瘤、进一步地滤泡性淋巴瘤。

[0001]	<110>东曹株式会社	
[0002]	<120>天然形式人自分泌运动因子特异的抗体、其筛选方法、以及通过测定自分泌运动因子	
[0003]	而检测恶性淋巴瘤的方法和检测试剂	
[0004]	<130>TYS-T804	
[0005]	<150>JP 2006-212275	
[0006]	<151>2006-08-03	
[0007]	<150>JP 2007-092412	
[0008]	<151>2007-03-30	
[0009]	<160>3	
[0010]	<170>PatentIn版本3.1	
[0011]	<210>1	
[0012]	<211>2589	
[0013]	<212>DNA	
[0014]	<213>人	
[0015]	<400>1	
[0016]	atggcaagga ggagctcggt ccagtcgtgt cagataatat ccctgttcac ttttgccggt	60
[0017]	ggagtcaata tctgcttagg attcactgca catcgaatta agagagcaga aggatgggag	120
[0018]	gaaggtctct ctacagtgt atcagactcc ccctggacca acatctccgg atcttgcaag	180
[0019]	ggcaggtgct ttgaacttca agaggctgga cctcctgatt gtcgctgtga caacttgtgt	240
[0020]	aagagctata ccagttgctg ccatgacttt gatgagctgt gtttgaagac agcccgtgcg	300
[0021]	tgggagtgta ctaaggacag atgtggggaa gtcagaaatg aagaaaatgc ctgtcactgc	360
[0022]	tcagaggact gcttggccag gggagactgc tgtaccaatt accaagtggg ttgcaaagga	420
[0023]	gagtcgcatt gggttgatga tgactgtgag gaaataaagg ccgcagaatg ccctgcaggg	480
[0024]	tttgttgcc ctccattaat catcttctcc gtggatggct tccgtgcatc atacatgaag	540
[0025]	aaaggcagca aagtcatgcc taatattgaa aaactaaggc cttgtggcac aactctccc	600
[0026]	tacatgagge cgggtgaccc aactaaaacc tttcctaact tatacacttt ggccactggg	660
[0027]	ctataccag aatcacatgg aattgttggc aattcaatgt atgatcctgt atttgatgcc	720
[0028]	acttttcate tgcgagggcg agagaaattt aatcatagat ggtggggagg tcaaccgcta	780
[0029]	tggattacag ccaccaagca aggggtgaaa gctggaacat tcttttggtc tgttgtcatc	840
[0030]	cctcagage ggagaatatt aaccatattg cagtggctca ccctgccaga tcatgagagg	900
[0031]	cctteggctt atgccttcta ttctgagcaa cctgatttct ctggacacaa atatggcct	960
[0032]	ttcggcctg agatgacaaa tctctgagg gaaatcgaca aaattgtggg gcaattaatg	1020
[0033]	gatggactga aacaactaaa actgcatcgg tgtgtcaacg tcatctttgt cggagacat	1080
[0034]	ggaatggaag atgtcacatg tgatagaact gatttettga gtaattacct aactaatgtg	1140
[0035]	gatgatatta ctttagtgcc tggaaactcta ggaagaatc gatccaaatt tagcaacaat	1200
[0036]	gctaaatatg accccaaage cattattgcc aatctcacgt gtaaaaaacc agatcagcac	1260
[0037]	tttaagcett acttgaacaa gcaccttccc aaacgtttgc actatgcca caacagaaga	1320

序 列 表

[0038]	attgaggata tccatttatt ggtggaacgc agatggcatg ttgcaaggaa acctttggat	1380
[0039]	gtttataaga aaccatcagg aaaatgcttt ttccaggag accacggatt tgataacaag	1440
[0040]	gtcaacagca tgcagactgt ttttgtaggt tatggcccaa catttaagta caagactaaa	1500
[0041]	gtgcctccat ttgaaaacat tgaactttac aatgttatgt gtgatctect gggattgaag	1560
[0042]	ccagctccta ataatgggac ccatggaagt ttgaatcatic tcttgcgcac taataccttc	1620
[0043]	aggccaacca tgccagagga agttaccaga cccaattatic cagggattat gtaccttcag	1680
[0044]	tctgattttg acctgggctg cactttgtgat gataaggtag agccaaagaa caagttggat	1740
[0045]	gaactcaaca aacggcttca tacaaaaggg tctacagaag agagacacct cctctatggg	1800
[0046]	cgacctgcag tgctttatcg gactagatat gatattctat atcacactga ctttgaaagt	1860
[0047]	ggttatagtg aaatattcct aatgccactc tggacatcat ataactgtttc caaacaggct	1920
[0048]	gaggtttcca gegtctctga ccatctgacc agttgcgtcc ggcctgatgt cegtgtttct	1980
[0049]	ccgagtttca gtcagaactg tttggcctac aaaaatgata agcagatgtc ctacggattc	2040
[0050]	ctctttctc cttatctgag ctcttcacca gaggetaaat atgatgcatt ccttgtaacc	2100
[0051]	aatatggttc caatgtatcc tgctttcaaa cgggtctgga attatttcca aagggtattg	2160
[0052]	gtgaagaaat atgcttcgga aagaaatgga gttaacgtga taagtgacc aatcttcgac	2220
[0053]	tatgactatg atggcttaca tgacacagaa gacaaaataa aacagtacgt ggaaggcagt	2280
[0054]	tccattctg ttccaactca ctactacagc atcatcacca gctgtctgga tttcactcag	2340
[0055]	cctgccgaca agtgtgacgg cctctctct gtgtctcct tcatctgcc tcaccggcct	2400
[0056]	gacaacgagg agagctgcaa tagctcagag gacgaatcaa aatgggtaga agaactcatg	2460
[0057]	aagatgcaca cagctagggt gcgtgacatt gaacatctca ccagcctgga cttcttccga	2520
[0058]	aagaccagcc gcagctacce agaaatctg aactcaaga catacctgca tacatatgag	2580
[0059]	agcgagatt	2589
[0060]	<210>2	
[0061]	<211>11	
[0062]	<212>PRT	
[0063]	<213>人	
[0064]	<400>2	
[0065]	Asp Ser Pro Trp Thr Asn Ile Ser Gly Ser Cys	
[0066]	1 5 10	
[0067]	<210>3	
[0068]	<211>15	
[0069]	<212>PRT	
[0070]	<213>人	
[0071]	<400>3	
[0072]	Cys Val Arg Pro Asp Val Arg Val Ser Pro Ser Phe Ser Gln Asn	
[0073]	1 5 10 15	

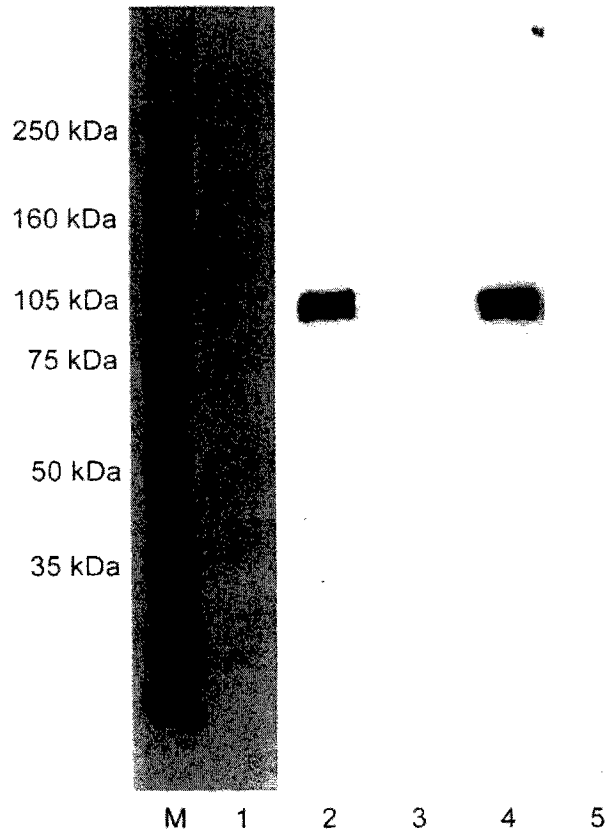


图1

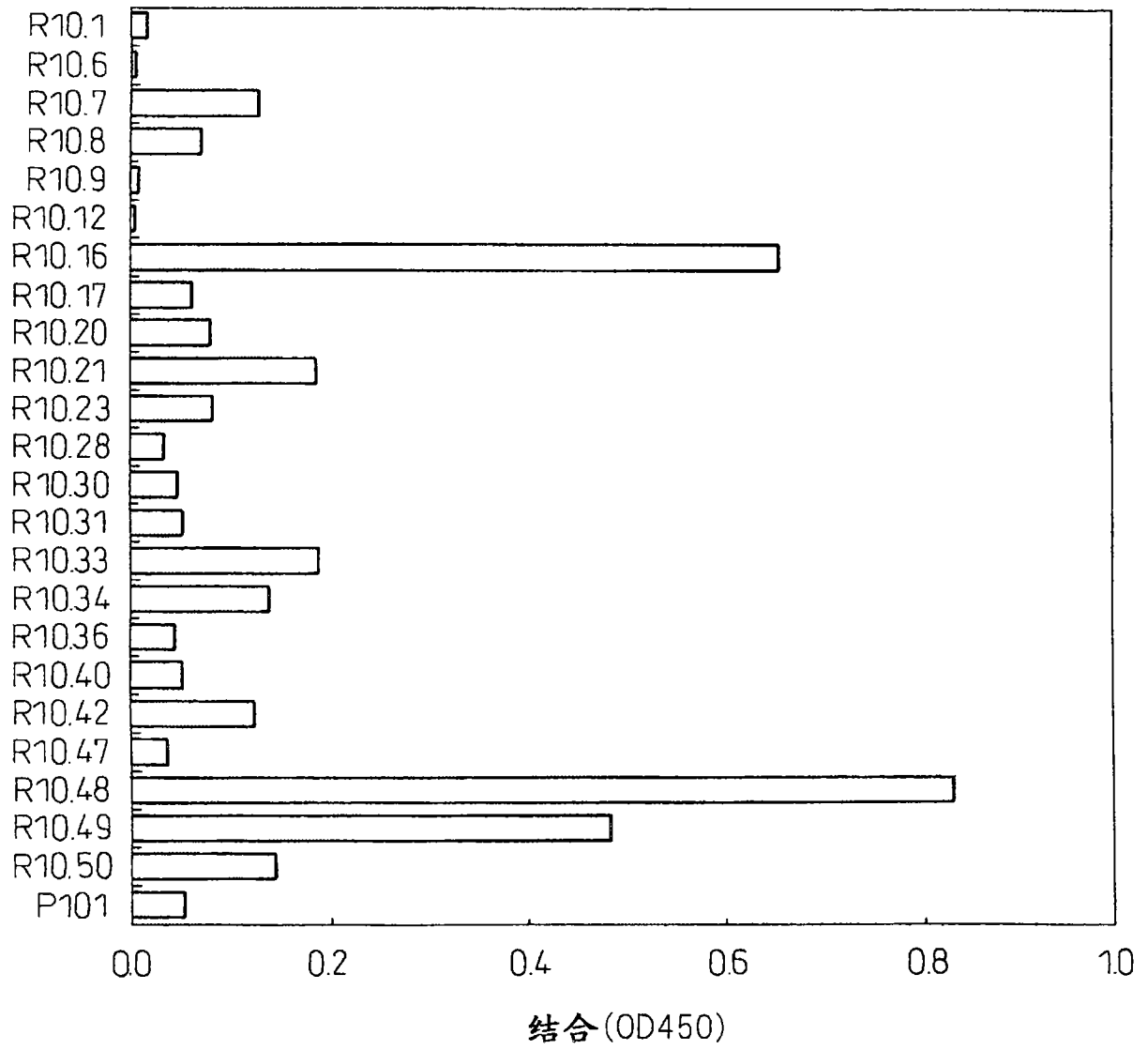


图2

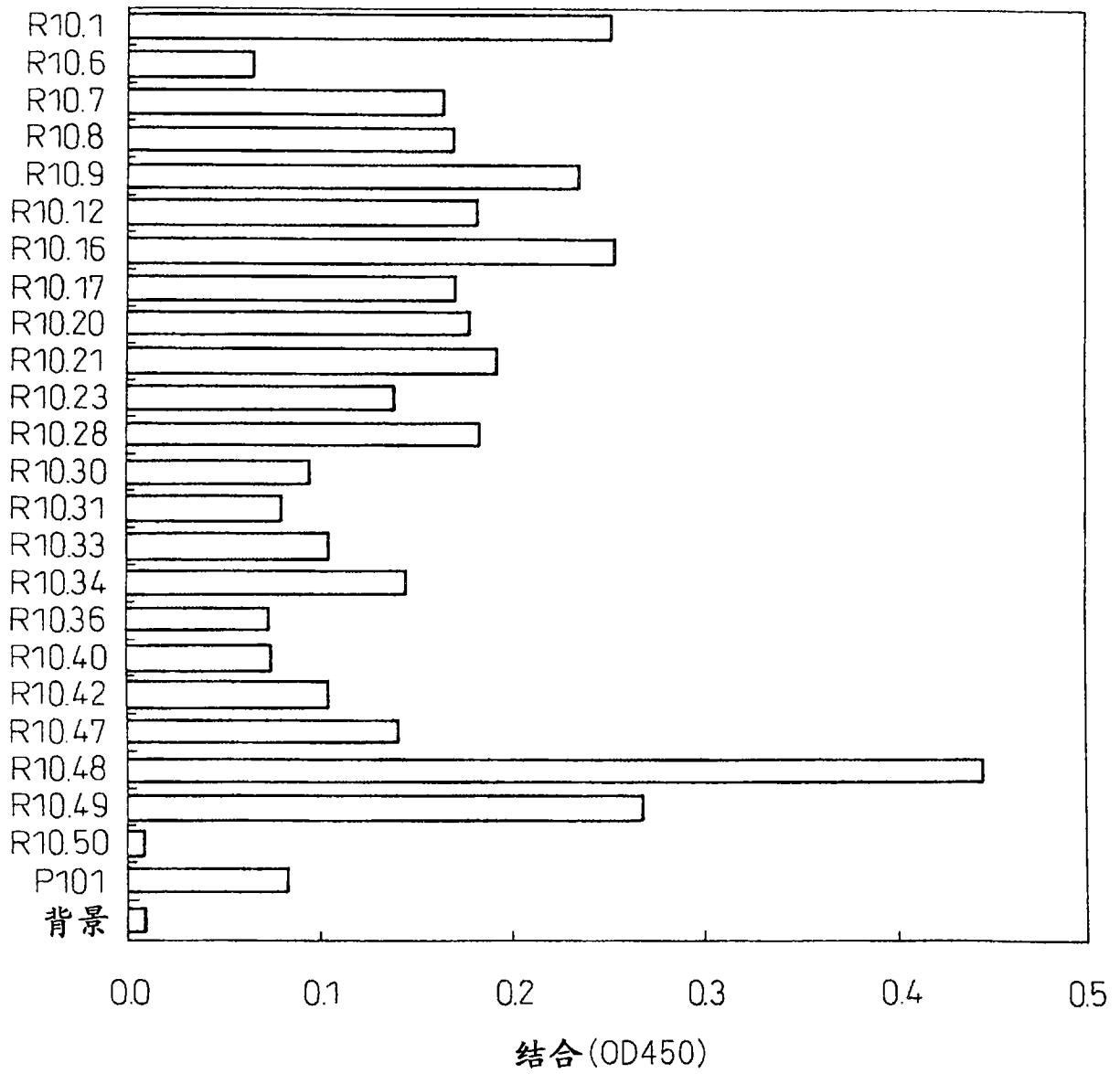


图3

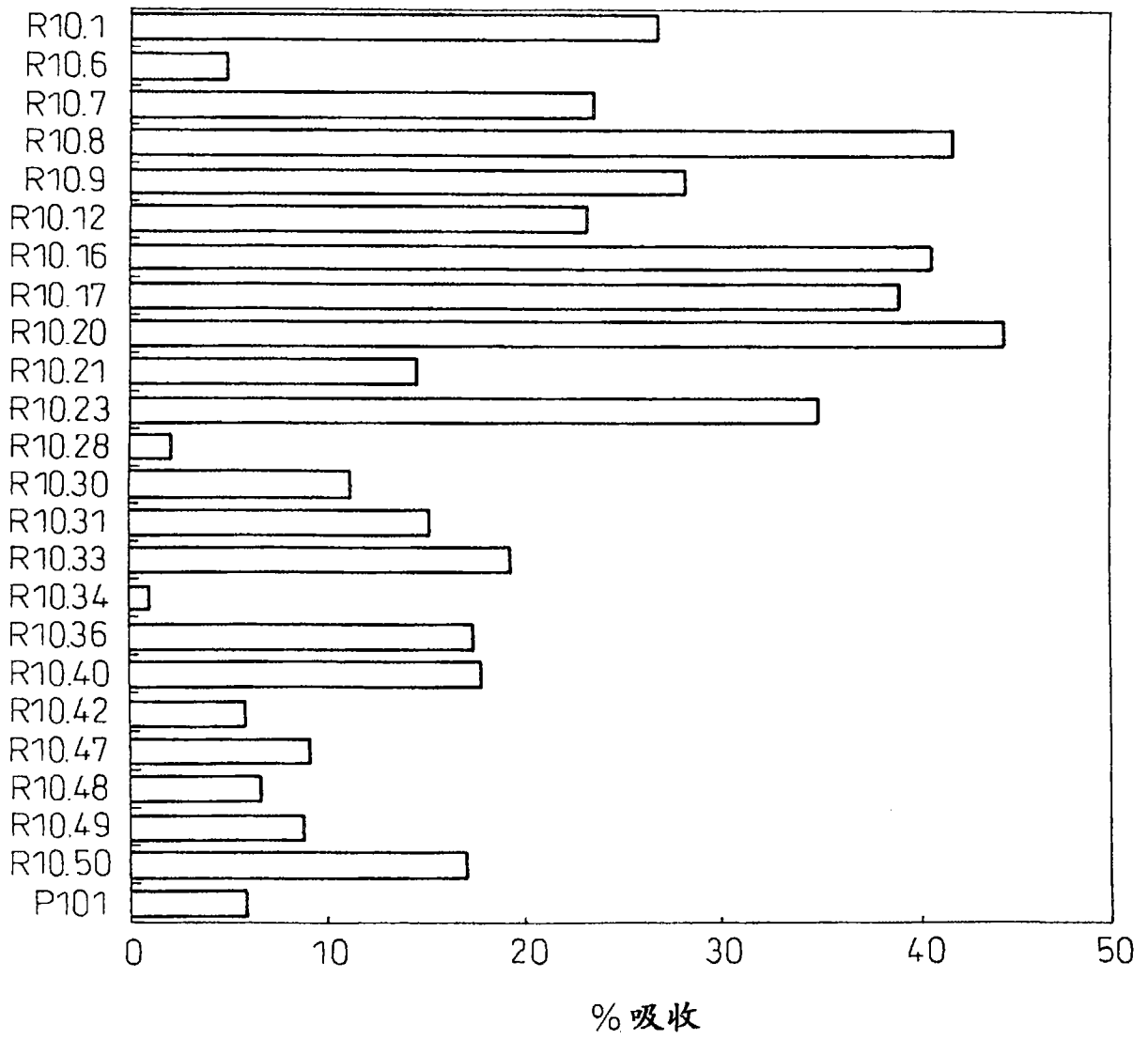


图4

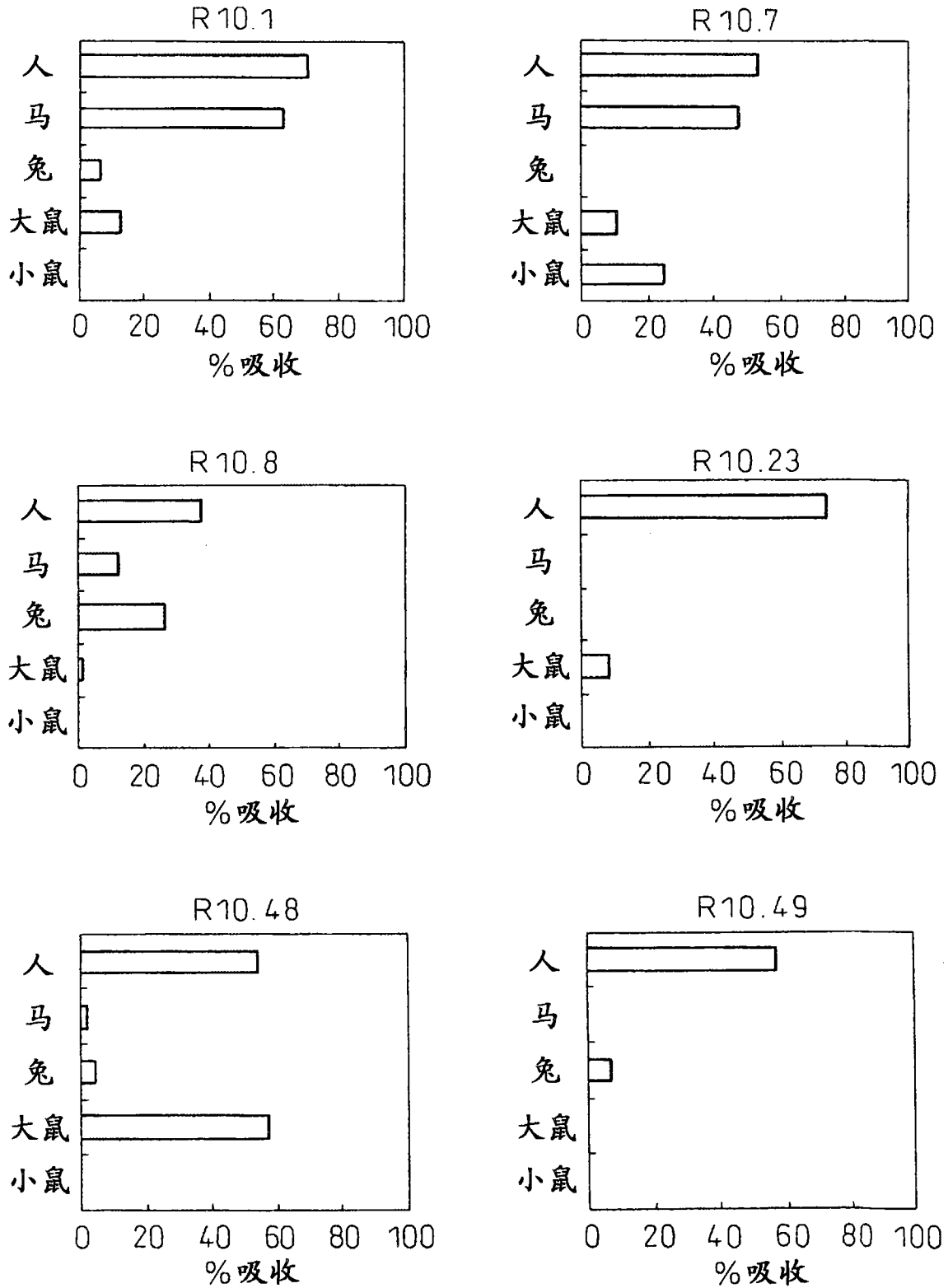


图5

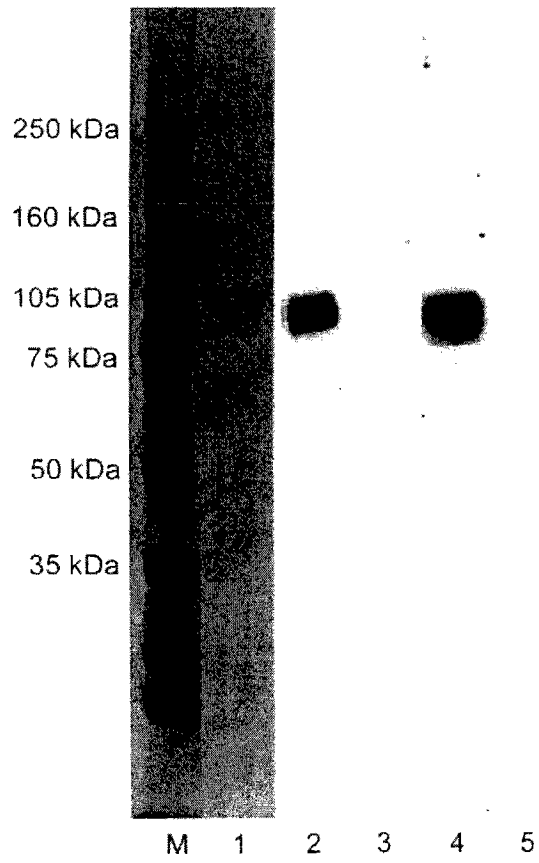


图6

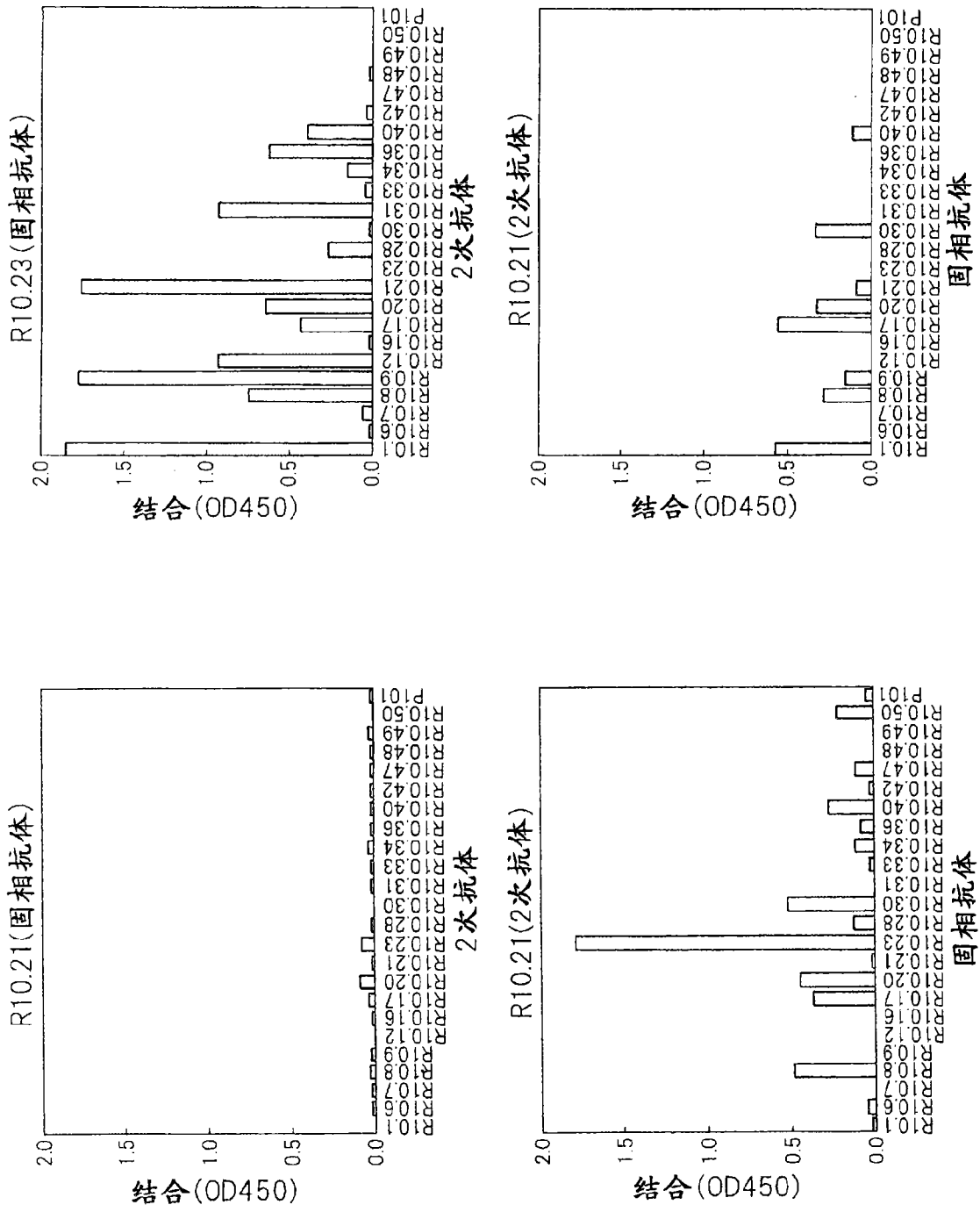


图 7

固相化抗体

	R10.1	-	-	R10.6	R10.7	R10.8	R10.9	R10.12	R10.16	R10.17	R10.20	R10.21	R10.23	R10.28	R10.30	R10.31	R10.33	R10.34	R10.36	R10.40	R10.42	R10.47	R10.48	R10.49	R10.50	P101	
R10.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2次抗体

图8

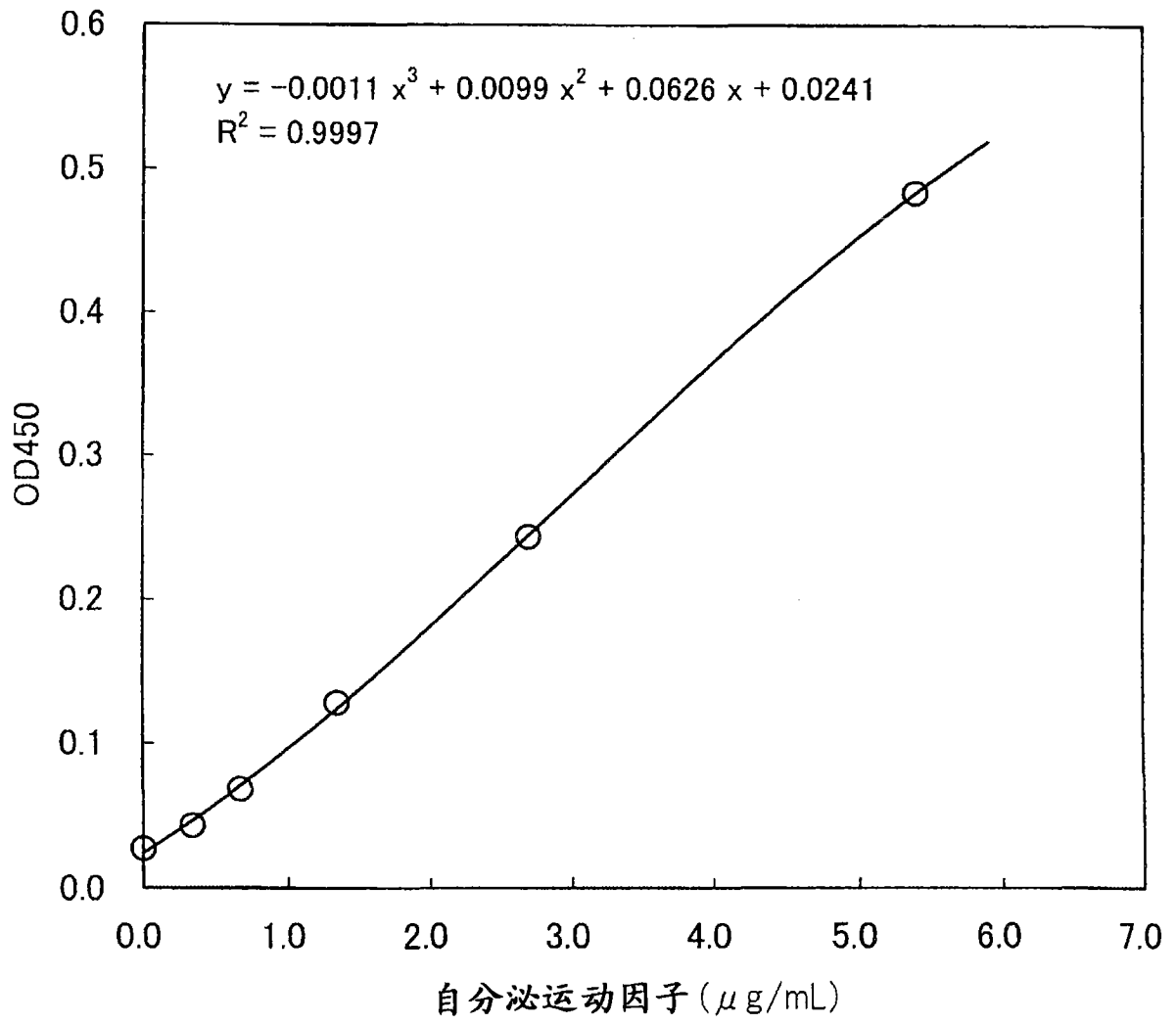


图9

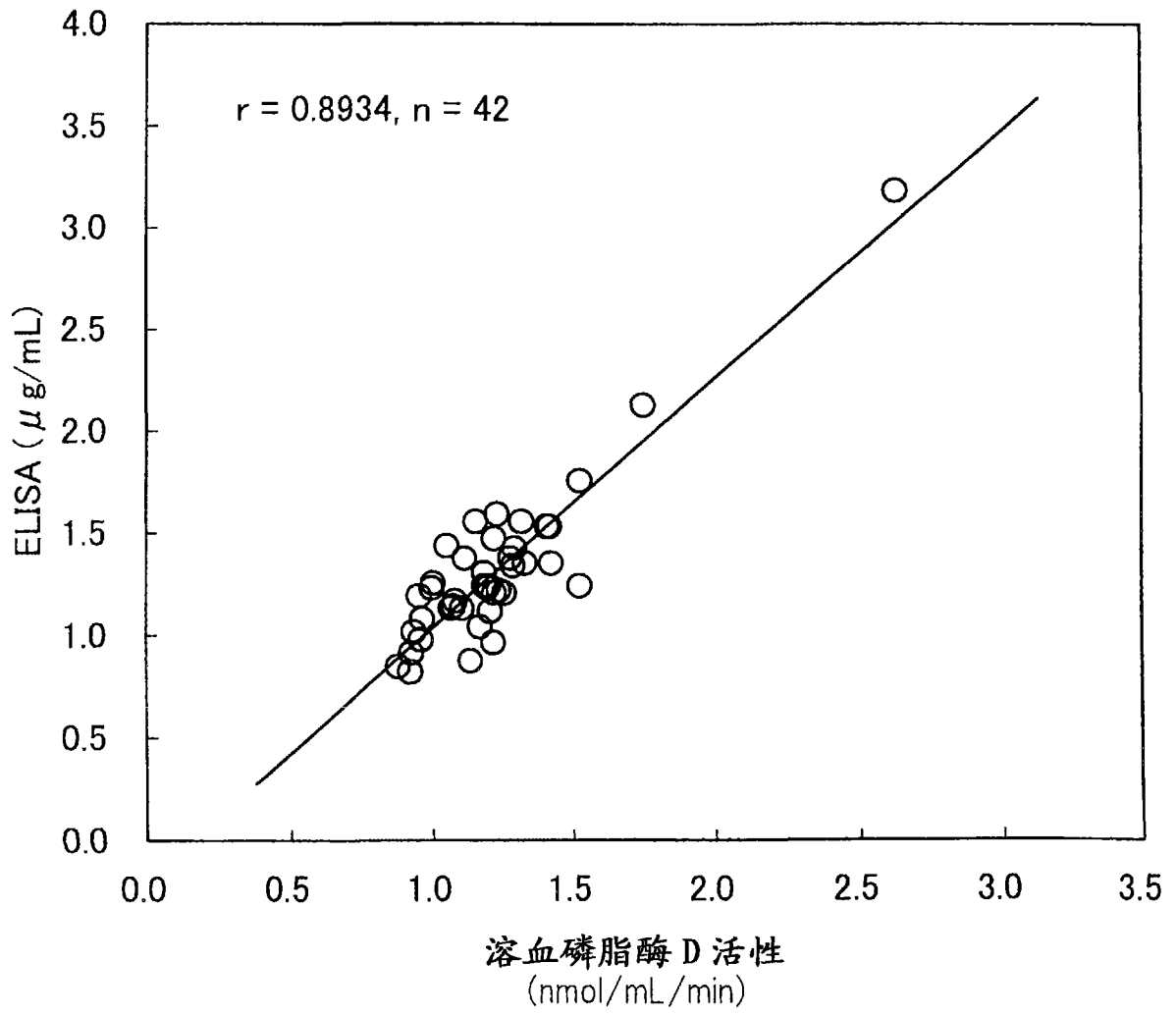


图10

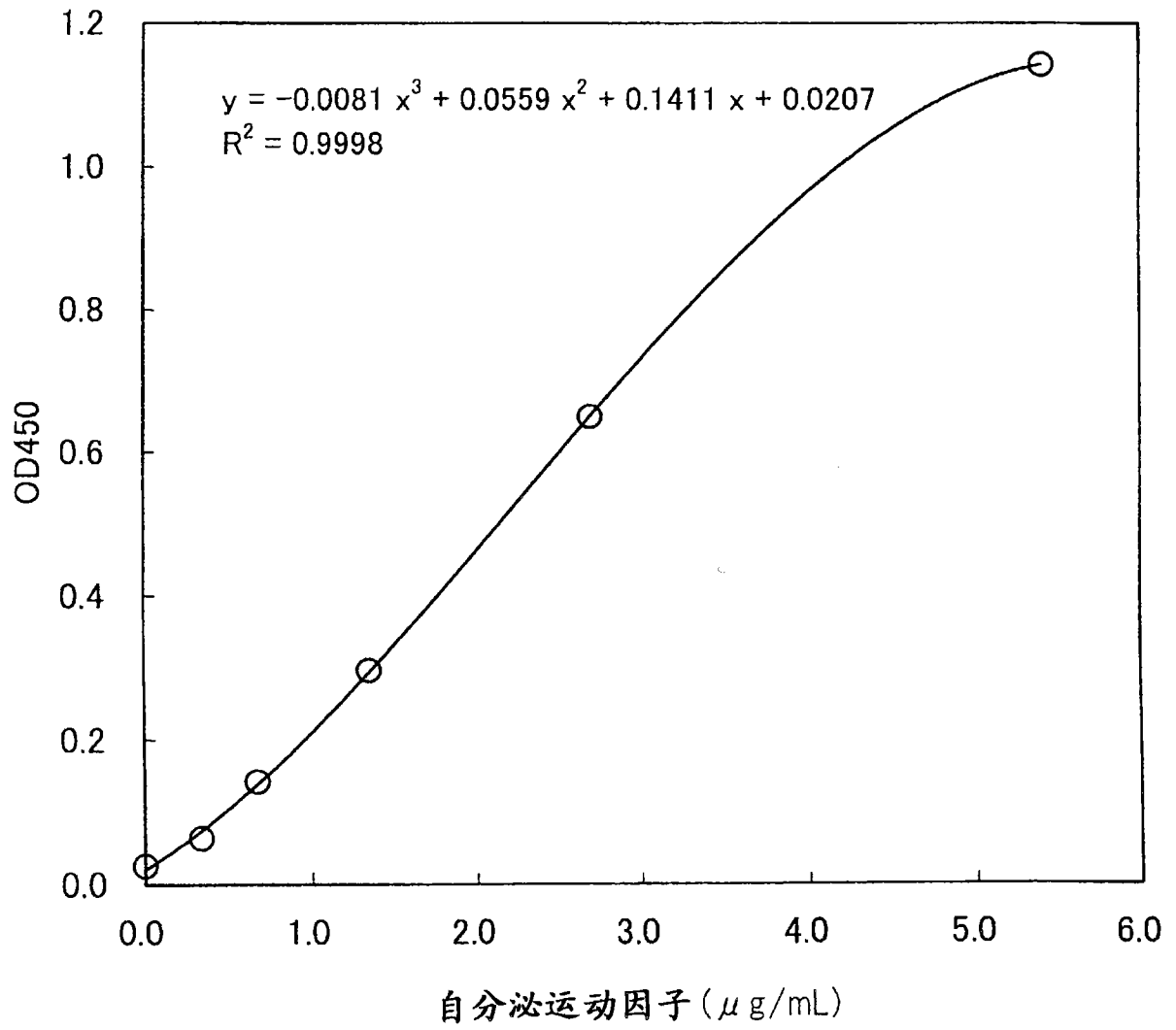


图11

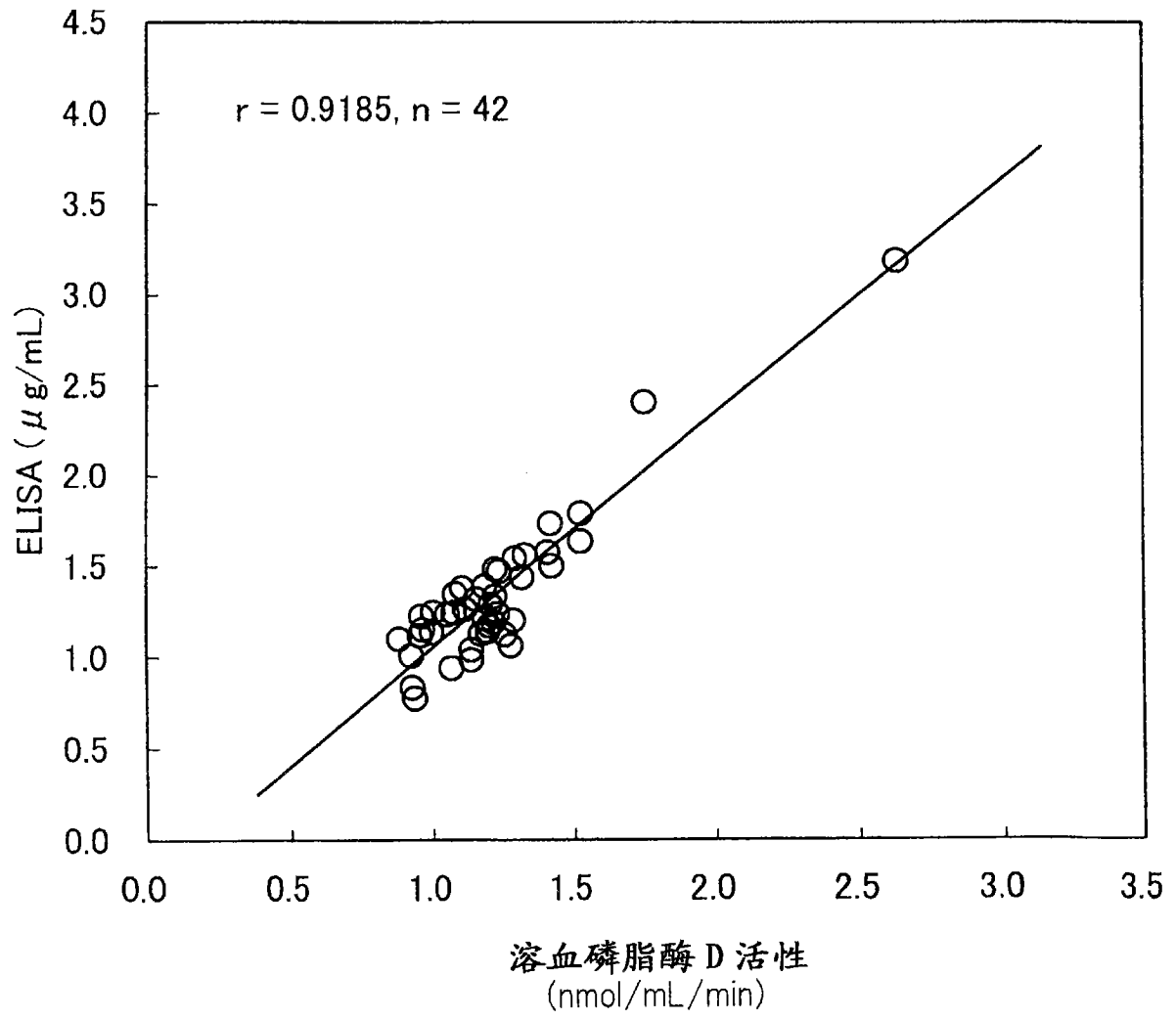


图12

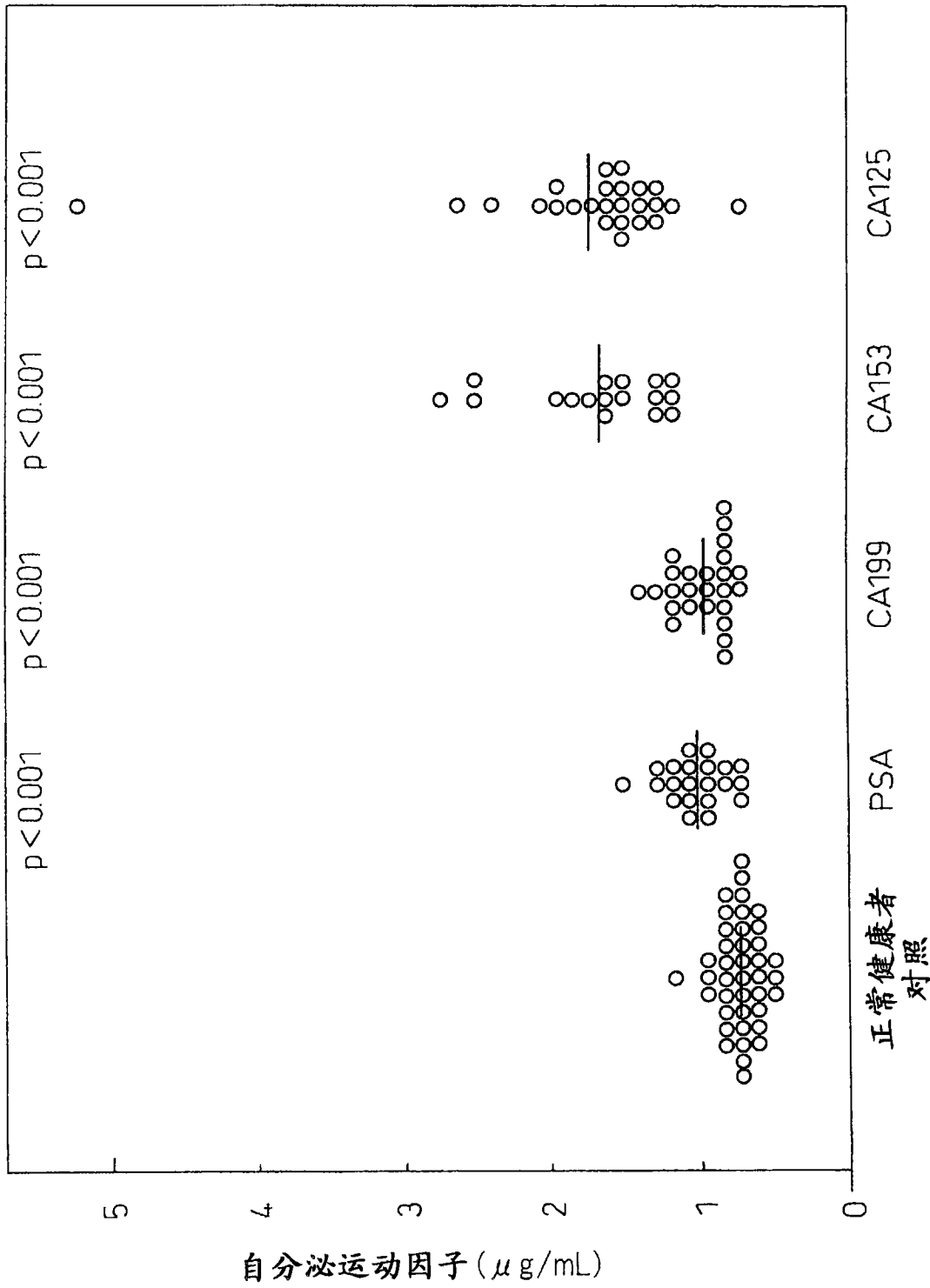


图 13

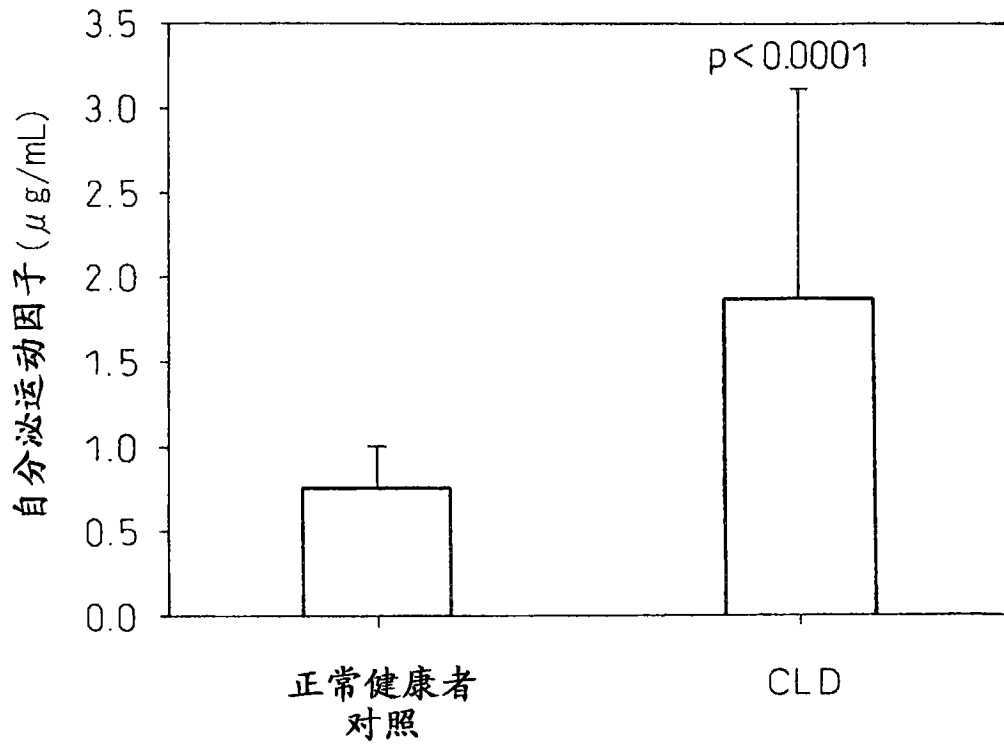


图14

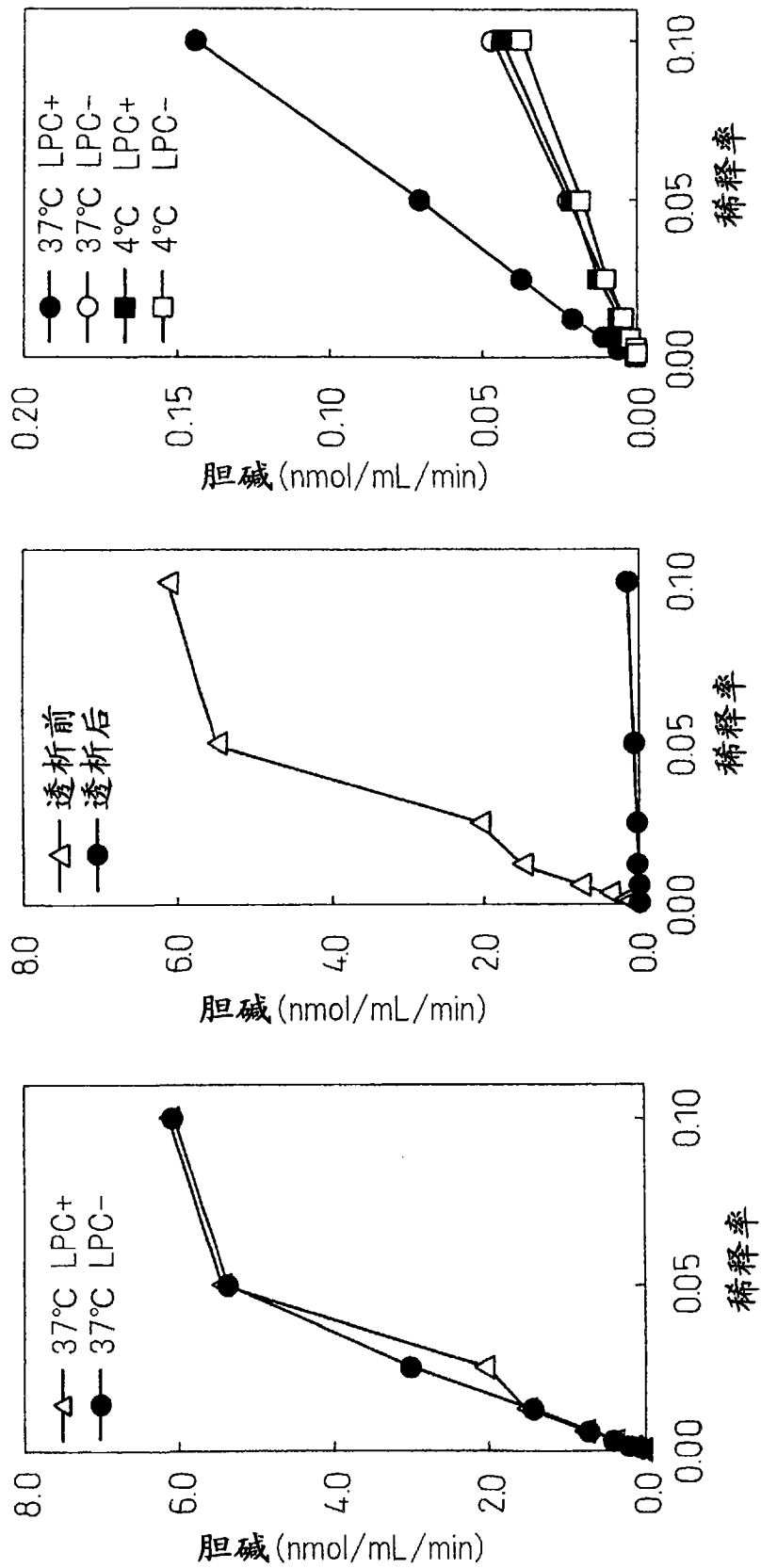


图 15

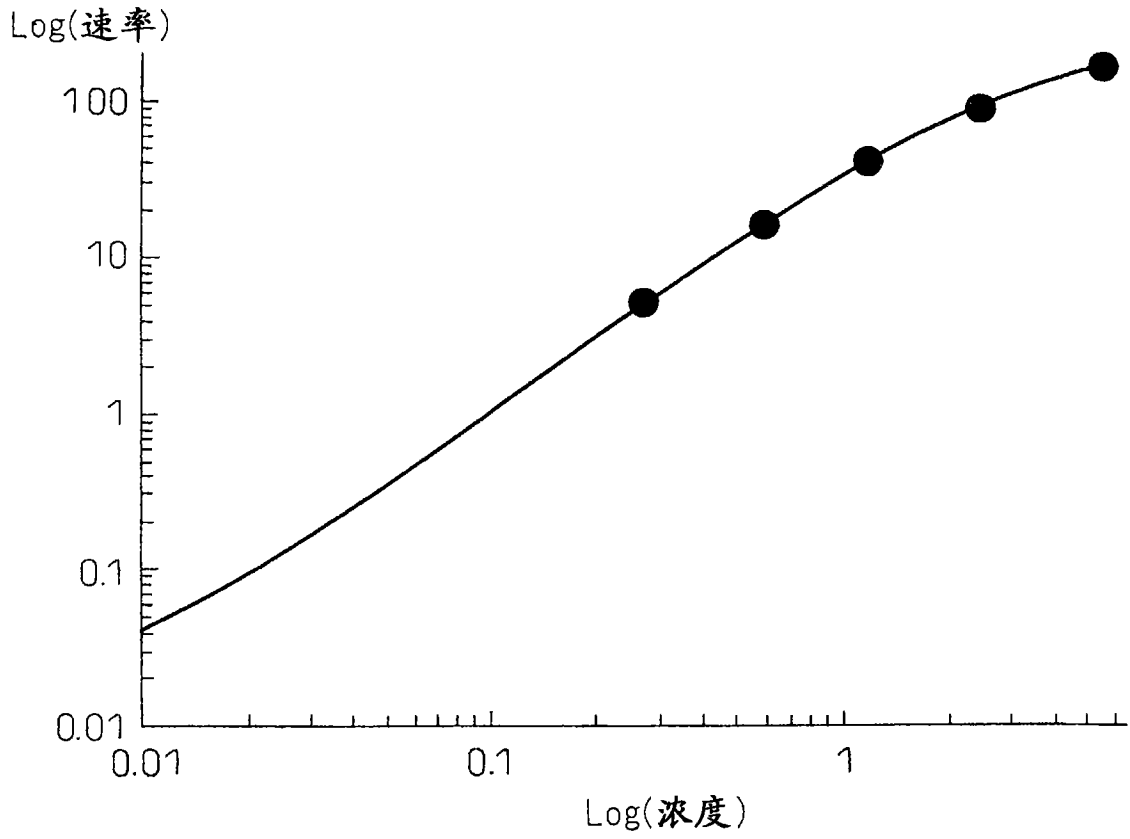


图16

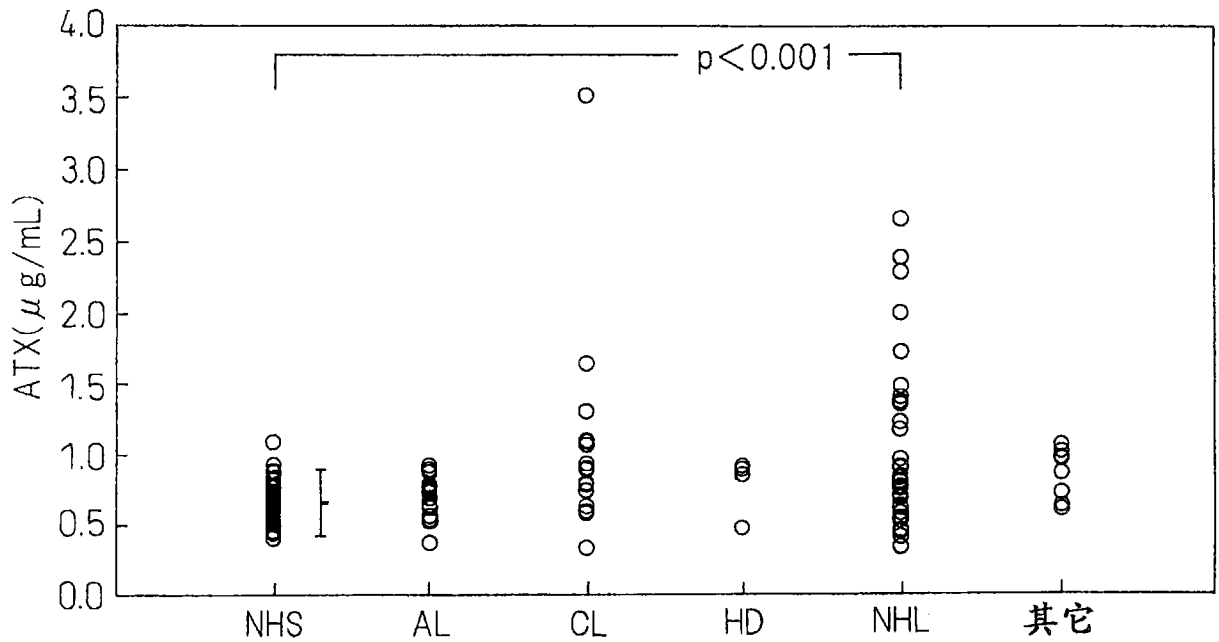


图17

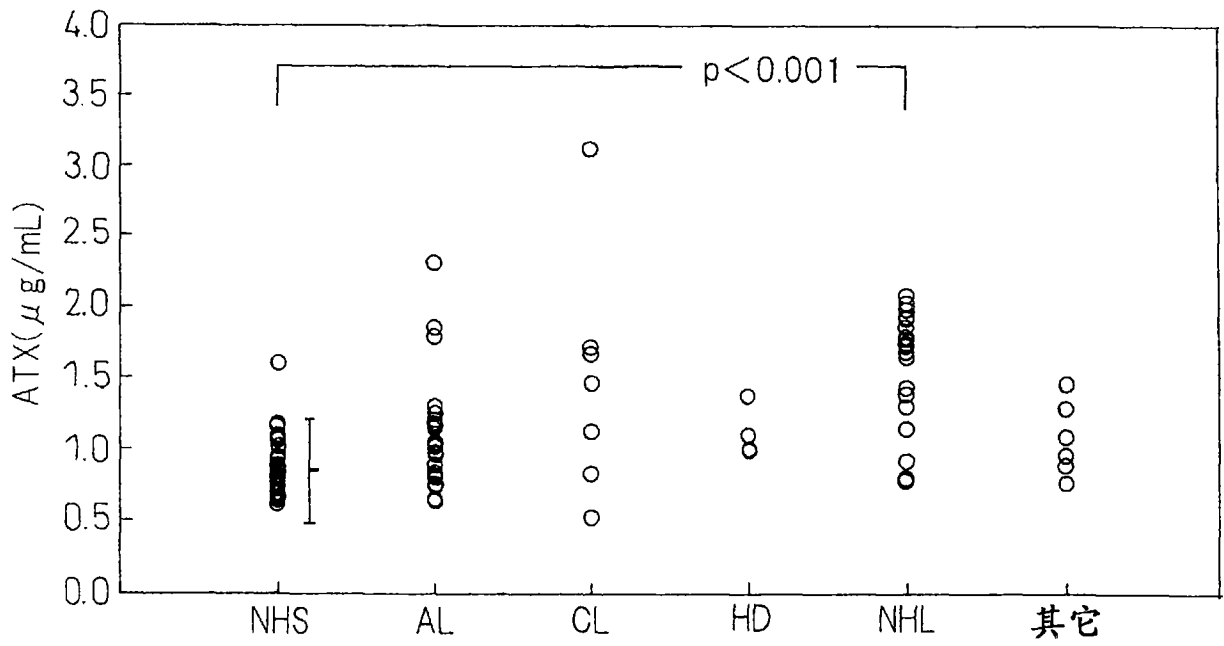


图18

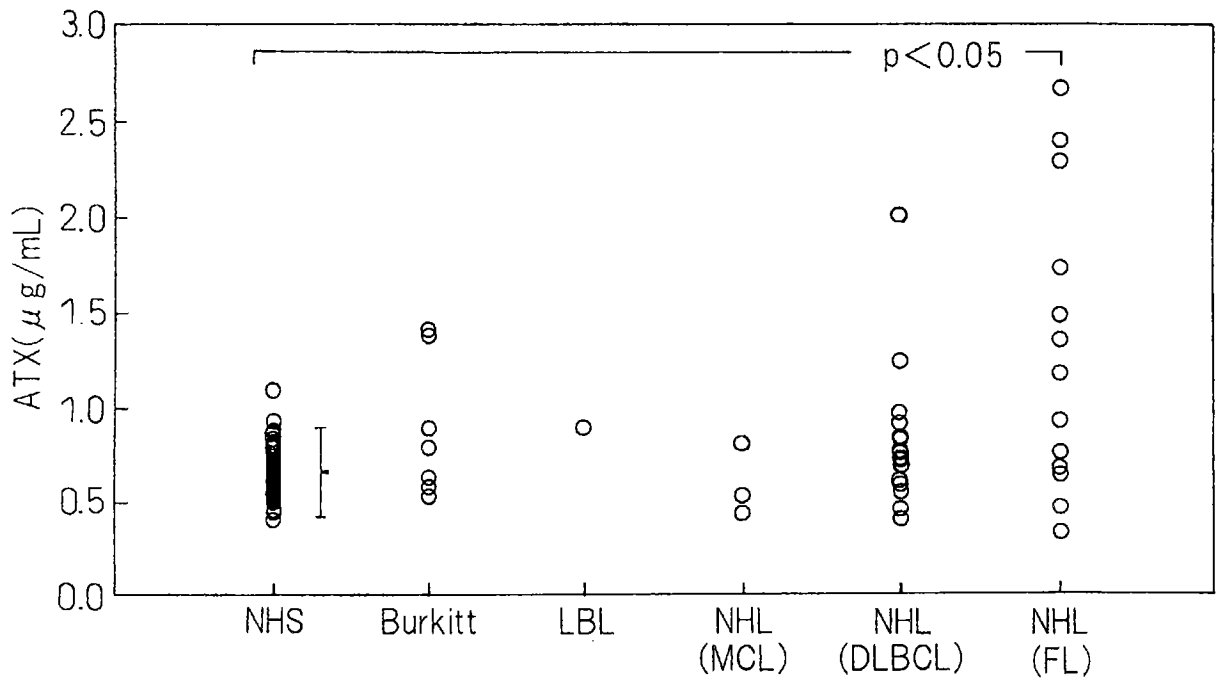


图19

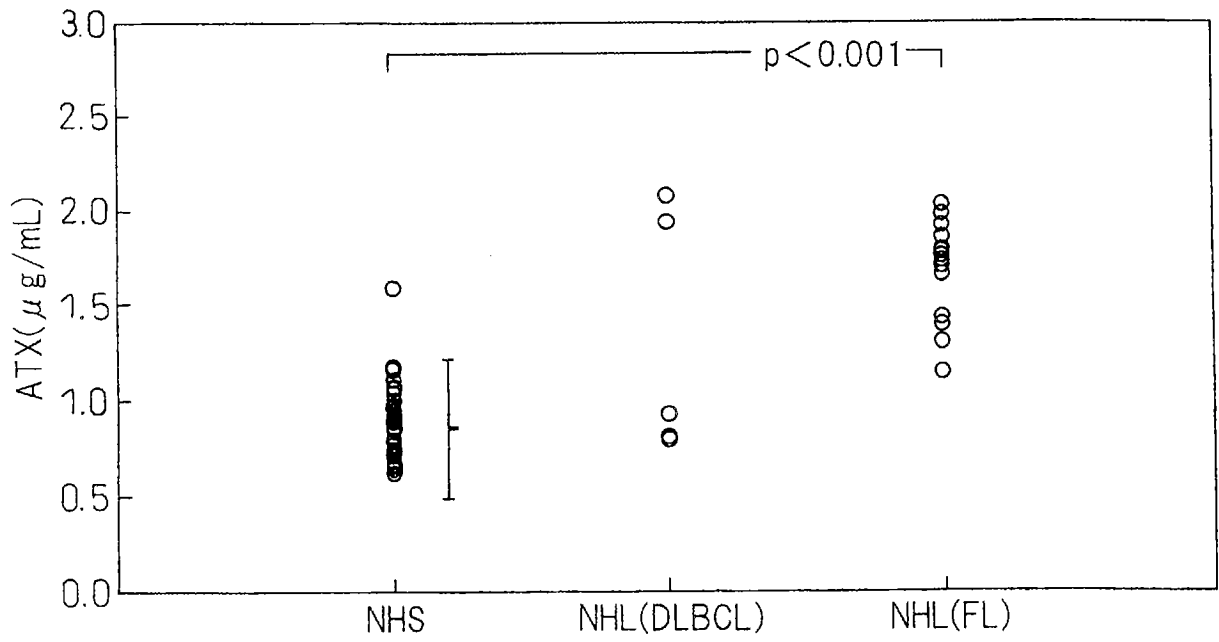


图20

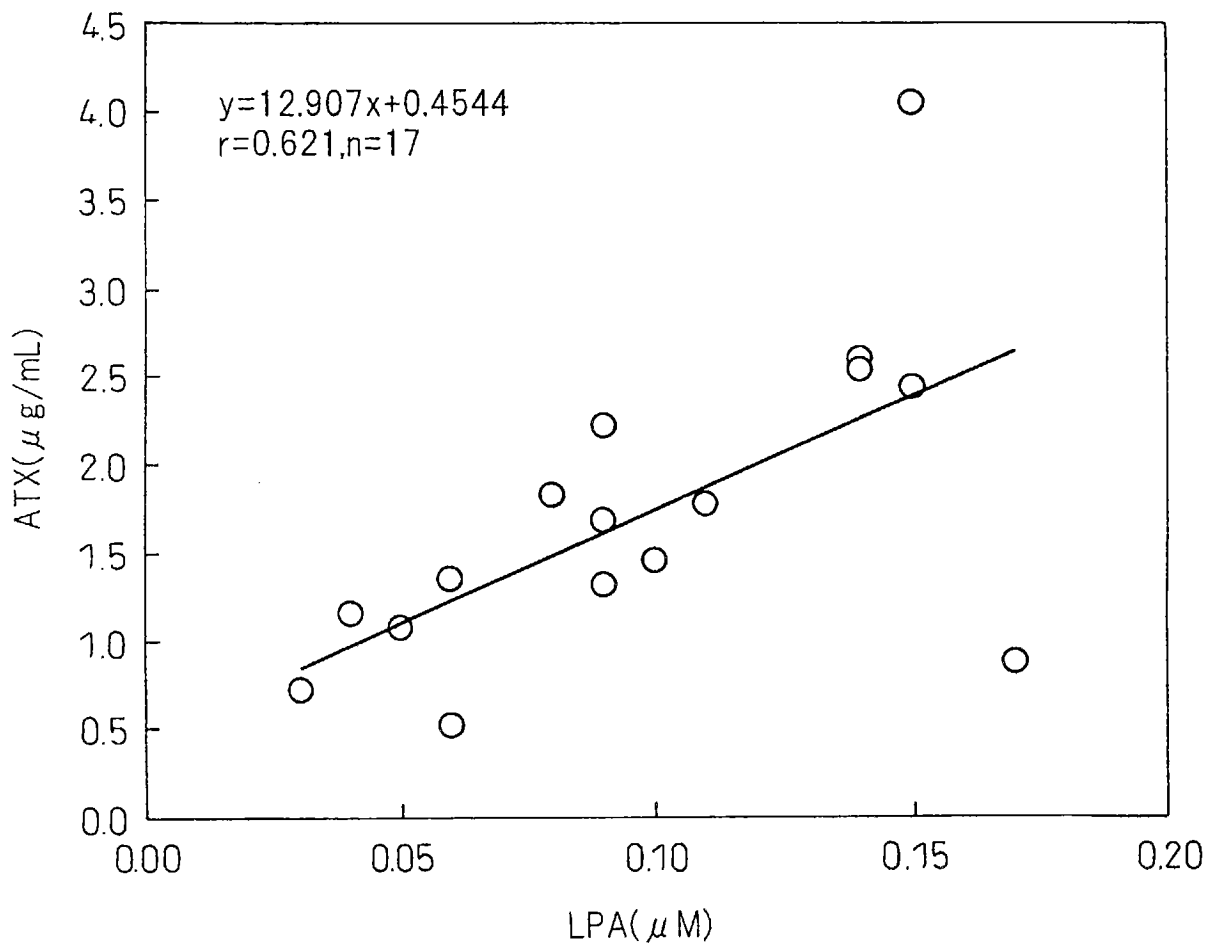


图21

