



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03808036.2

[43] 公开日 2005 年 7 月 27 日

[11] 公开号 CN 1646910A

[22] 申请日 2003.4.9 [21] 申请号 03808036.2

[30] 优先权

[32] 2002.4.9 [33] JP [31] 106786/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/004531 2003.4.9

[87] 国际公布 WO2003/085399 日 2003.10.16

[85] 进入国家阶段日期 2004.10.9

[71] 申请人 学校法人东海大学

地址 日本东京都

共同申请人 协和发酵工业株式会社

协和梅迪克斯株式会社

[72] 发明人 安藤洁 堀田知光 伊东千绘

佐藤秀尚 古谷安希子 设乐研也

杉本整治 河野弘明

[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

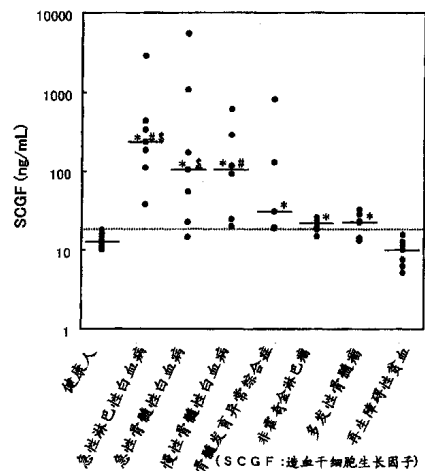
代理人 陈 昕

权利要求书 2 页 说明书 41 页 序列表 8 页
附图 11 页

[54] 发明名称 白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病的判定方法以及诊断药

[57] 摘要

本发明涉及以对造血干细胞生长因子(SCGF)进行定量为特征的对白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病进行判定的方法、对白血病与前白血病或非白血病性恶性血液疾病进行区别的方法、对再生障碍性贫血和骨髓发育异常综合征进行区别的方法、对造血干细胞移植后的造血干细胞的存活的状态进行判定的方法、或对移植物抗宿主病进行判定的方法。还涉及作为有效成分含有与造血干细胞生长因子(SCGF)反应的抗体的白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病的诊断药、造血干细胞移植后的造血干细胞的存活延迟或移植物抗宿主病(GVHD)的诊断药。



1. 对白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病进行判定的方法，其特征在于测定机体样品中造血干细胞生长因子 SCGF。
2. 对白血病和、前白血病或非白血病性恶性血液疾病进行区别的方法，其特征在于测定机体样品中造血干细胞生长因子 SCGF。
3. 对再生障碍性贫血和骨髓发育异常综合征进行区别的方法，其特征在于测定机体样品中造血干细胞生长因子 SCGF。
4. 对造血干细胞移植后的造血干细胞的存活状态进行判定的方法，其特征在于测定机体样品中造血干细胞生长因子 SCGF。
5. 对移植物抗宿主病进行判定的方法，其特征在于测定机体样品中造血干细胞生长因子 SCGF。
6. 权利要求 1~5 中任一项所述的方法，其中判定或区别方法是免疫学的测定方法。
7. 权利要求 6 所述的方法，其中免疫学的测定方法是夹层法。
8. 权利要求 7 所述的方法，其特征是：夹层法使用与造血干细胞生长因子 SCGF 的不同抗原表位反应的 2 种抗体。
9. 权利要求 8 所述的方法，其中抗体是选自多克隆抗体和单克隆抗体的抗体。
10. 权利要求 9 所述的方法，其中单克隆抗体是选自可识别以序列 1 的 6~28 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体、识别以 29~59 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体以及 60~302 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体的单克隆抗体。
11. 白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病的诊断药，含有与造血干细胞生长因子 SCGF 反应的抗体作为有效成分。
12. 造血干细胞移植后的造血干细胞的存活状态的诊断药，含有与造血干细胞生长因子 SCGF 反应的抗体作为有效成分。
13. 移植物抗宿主病的诊断药，含有与造血干细胞生长因子 SCGF 反应的抗体作为有效成分。

14. 权利要求 11~13 中任一项中所述的诊断药, 其中抗体是选自多克隆抗体和单克隆抗体的抗体。

15. 权利要求 14 所述的诊断药, 其中单克隆抗体是选自可识别以序列 1 的 6~28 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体、识别以 29~59 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体以及以 60~302 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体的单克隆抗体。

16. 白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病、造血干细胞移植后的造血干细胞的存活状态或移植物抗宿主病的诊断用试剂盒, 含有与造血干细胞生长因子 SCGF 反应的抗体。

17. 权利要求 16 所述的诊断用试剂盒, 含有造血干细胞生长因子 SCGF。

18. 识别序列 1 的 29~59 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体。

19. 识别序列 1 所述的 60~302 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体。

20. 生产权利要求 18 或 19 所述单克隆抗体的杂交瘤。

白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病的 判定方法以及诊断药

技术领域

本发明涉及以测定造血干细胞生长因子（SCGF）为特征的对白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病进行判定的方法、对白血病与前白血病或非白血病性恶性血液疾病进行区别的方法、对再生障碍性贫血与骨髓发育异常综合征进行区别的方法、对造血干细胞移植后的造血干细胞的存活状态进行判定的方法、或对移植物抗宿主病进行判定的方法。另外，还涉及含有以与造血干细胞生长因子（SCGF）反应的抗体为有效成分的白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病、造血干细胞移植后的造血干细胞的存活状态或移植物抗宿主病的诊断药以及诊断试剂盒。

背景技术

白血病、前白血病和非白血病性恶性血液疾病的诊断、或白血病、前白血病和非白血病性恶性血液疾病治疗后的诊断对于决定对白血病、前白血病和非白血病性恶性血液疾病进行治疗的方针是很重要的。

作为白血病初发的诊断，有测定患者末梢血中的白细胞数，计测值超过正常值时，怀疑白血病发生的方法。然而，即使是感冒等白血病以外的疾病，由于体内免疫反应的亢进，白细胞数也会增大，所以仅凭白细胞数的测定，存在假阳性的可能性。另外，末梢血中白细胞数的正常值为 4,000 ~ 8,000 个/ μ L，范围很宽，也存在假阴性的可能性。因此，需要准确度更高的白血病的诊断方法。

作为白血病复发的诊断方法有通过 WT-1 基因的 RT-PCR 进行的检测 [（日本）临床病理 48,155(2000); Blood, 84, 3071 (1994); 日本专利第 3122771 号]。然而该诊断方法不仅操作烦杂，而且需要特殊

的装置。

而作为上述的白血病、前白血病以及非白血病性恶性血液疾病、先天性代谢疾病、实体瘤等的治疗方法之一，有造血干细胞移植疗法。有关造血干细胞移植疗法的问题方面，如由于供者的造血干细胞与患者的造血干细胞的 HLA 配型不相合、患者一方的身体条件或感染症等，出现移植的造血干细胞不能存活的造血干细胞的存活延迟的移植抗宿主病（以下称为 GVHD）等，有时不能充分获得造血干细胞移植治疗的效果，最坏的时候还会出现死亡的危象。

对于造血干细胞的存活延迟，可以通过向机体内给予 G-CSF，促进造血干细胞的存活。另外对于 GVHD，可以通过向机体内给予免疫抑制剂，抑制对提供的造血干细胞的排斥反应。然而，无论哪一种药剂过量给予时，都有副作用的危险。因此，对造血干细胞的存活状态、出现的 GVHD 症状进行诊断或预知对于治疗方针的决定是重要的。

作为确认造血干细胞移植后的造血干细胞存活的方法，可以测定末梢血中的白细胞数或血小板数，如果这些测定值上升，可以诊断为造血干细胞存活。然而，由于造血干细胞的存活需要从移植后 10 日至 1 个月以上时间，通过测定末梢血中的白细胞数或血小板数不能在早期对造血干细胞的存活进行判断。

作为 GVHD 发病的判定方法，有观察在造血干细胞移植后的恢复期出现的皮疹等。然而，简便、而且准确度高的 GVHD 发病的判定方法还没有。另外在 GVHD 发病以前预知 GVHD 发病的方法也没有。

人造造血干细胞生长因子（Stem Cell Growth Factor；以下、简记为 SCGF）是具有序列 1 或序列 2 的氨基酸序列的蛋白质 [WO98/08859; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 7577 (1997); Biochem. Biophys. Res. Comm., 249, 124 (1998)] 。

作为识别 SCGF 的抗体，已知有可以通过使用基因重组法得到的 SCGF、以及以从 SCGF 的 N 末端开始的第 6 位残基到第 25 位残基的部分肽作为免疫原制备的多克隆抗体以及从细胞培养上清进行部分纯化的 SCGF 或以通过基因重组法得到的 SCGF 作为免疫原制备的单克

隆抗体 [WO98/08859]。据报道该单克隆抗体具有中和活性，以通过基因重组法得到的 SCGF 作为免疫原制备的多克隆抗体在 ELISA 中可以与通过基因重组法得到的 SCGF 反应，通过使用以从 SCGF 的 N 末端开始的第 6 位残基至第 25 位残基的部分肽作为免疫原制备的多克隆抗体的 Western 印迹 (blotting) 可以检测通过基因重组法得到的 SCGF。

另外，以从 SCGF 的 N 末端开始的第 6 位残基至第 25 位残基的部分肽作为免疫原的抗 SCGF 单克隆抗体 KM2142 已有报道 [*The Hematology Journal*, **2**, 307 (2001)]。

据报道对人正常组织进行 Northern 印迹 (blotting)，结果发现 SCGF 基因的表达在肾脏多，而在心脏少，而在脑、胎盘、肺、肝脏、骨骼肌、胰脏中没有表达 [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7577 (1997)]，在脾脏、胸腺、盲肠、骨髓、胎儿肝中表达多，而在末梢血表达少 [*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **249**, 124 (1998)]。另外据报道对正常新生小鼠进行原位杂交，结果发现 SCGF 在骨髓、增殖软骨、骨膜附近表达 [*The Hematology Journal*, **2**, 307 (2001)]。

另外，据报道在骨髓细胞株 (HT60、KPB-M15)、单核细胞株 (THP-1、U-937)、成红细胞株 (HEL)、成纤维细胞株 (NHF) 中发现了 SCGF 基因的表达，但在 B 细胞株 (U266B1、IM-9)、T 细胞株 (MOLT-4)、成红细胞株 (K562)、上皮系癌细胞株 (HeLaS3、A431)、黑色素瘤细胞株 (Bowes)、腺病毒转化胚胎性肾脏细胞株 (293)、成纤维细胞株 (CCD-8Lu) 中没有发现 SCGF 基因的表达 [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7577 (1997)]。

然而、有关正常的和血液疾病的、或接受造血干细胞移植的包括人在内的动物的末梢血、骨髓中的血细胞的 SCGF 的 mRNA 量的差异还没有报道。

组织或细胞的 mRNA 与编码的蛋白质的量的相关性低 (相关系数 = 0.48) [*Electrophoresis*, **18**, 533 (1997)]，所以由 SCGF 的 mRNA 量推定 SCGF 蛋白质量是困难的。

如上所述,有关包括人在内的动物的血清、血浆等体液和组织中的 SCGF 蛋白质的存在、功能、与疾病的关系还没有被阐明。

本发明的目的在于提供白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病的判定、白血病与前白血病或非白血病性恶性血液疾病的区别、再生障碍性贫血与骨髓发育异常综合征的区别、造血干细胞移植后的造血干细胞的存活状态以及 GVHD 的判定的方法、以及白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病、造血干细胞移植后的造血干细胞的存活状态和 GVHD 的诊断药以及诊断试剂盒。

发明内容

本发明涉及以下(1)~(20)内容。

(1)以测定机体样品中造血干细胞生长因子(SCGF)为特征的对白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病进行判定的方法。

(2)以测定机体样品中造血干细胞生长因子(SCGF)为特征的对白血病和、前白血病或非白血病性恶性血液疾病进行区别的方法。

(3)以测定机体样品中造血干细胞生长因子(SCGF)为特征的对再生障碍性贫血和骨髓发育异常综合征进行区别的方法。

(4)以测定机体样品中造血干细胞生长因子(SCGF)为特征的对造血干细胞移植后的造血干细胞的存活状态进行判定的方法。

(5)以对机体样品中造血干细胞生长因子(SCGF)进行定量为特征的对移植物抗宿主病进行判定的方法。

(6)上述(1)~(5)任一项所述的方法,其中判定或区别方法是免疫学的测定方法。

(7)上述(6)所述的方法,其中免疫学的测定方法是夹层法(三明治法)。

(8)上述(7)所述的方法,其特征是:夹层法使用与造血干细胞生长因子(SCGF)的不同抗原表位反应的2种抗体。

(9)上述(8)所述的方法,其中抗体是从多克隆抗体和单克隆抗体选出来的抗体。

(10) 上述(9)所述的方法, 其中单克隆抗体是从可识别以序列1的6~28位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体、识别以29~59位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体以及60~302位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体选出来的单克隆抗体。

(11) 含有以与造血干细胞生长因子(SCGF)反应的抗体作为有效成分的白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病的诊断药。

(12) 含有以与造血干细胞生长因子(SCGF)反应的抗体作为有效成分的造血干细胞移植后的造血干细胞的存活状态的诊断药。

(13) 含有以与造血干细胞生长因子(SCGF)反应的抗体作为有效成分的移植物抗宿主病的诊断药。

(14) 上述(11)~(13)任一项中所述的诊断药, 其中抗体是从多克隆抗体和单克隆抗体选出来的抗体。

(15) 上述(14)所述的诊断药, 其中单克隆抗体是从可识别以序列1的6~28位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体、识别以29~59位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体以及识别以60~302位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体选出来的单克隆抗体。

(16) 含有与造血干细胞生长因子(SCGF)反应的抗体的白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病、造血干细胞移植后的造血干细胞的存活状态或移植物抗宿主病的诊断用试剂盒。

(17) 含有造血干细胞生长因子(SCGF)的上述(16)所述的诊断用试剂盒。

(18) 识别以序列1的29~59位氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体。

(19) 识别以序列1所述的60~302位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体。

(20) 生产上述(18)或(19)所述单克隆抗体的杂交瘤。

附图的简单说明

图1是表示单克隆抗体对人SCGF部分肽(化合物1)反应性的

图（结合 ELISA）。

图 2 表示纯化人 SCGF 蛋白质的 SDS-PAGE 和 Western 印迹结果。带 1 和 2 分别表示分子量标记物和纯化人 SCGF 蛋白质的 SDS-PAGE 图。带 3、4、5 分别表示使用 KM2142、KM2804、KM2945 的纯化人 SCGF 蛋白质的 Western 印迹结果的图。

1:分子量标记物的带

2:对纯化 SCGF 进行解析，银染色的带

3:使用抗 SCGF 抗体 KM2142 进行了 Western 印迹的带

4:使用抗 SCGF 抗体 KM2804 进行了 Western 印迹的带

5:使用抗 SCGF 抗体 KM2945 进行了 Western 印迹的带

A:表示 SCGF 蛋白质的分子量。

B:表示缺失 N 末端 28 个残基的 SCGF 蛋白质 $\Delta 28$ 体的分子量。

C:表示缺失 N 末端 59 个残基的 SCGF 蛋白质 $\Delta 59$ 体的分子量。

图 3 是表示单克隆抗体对 CHO 细胞表达人 SCGF 蛋白反应性的图（结合 ELISA）。

图 4 是表示单克隆抗体对 SDS 变性人 SCGF 蛋白（CHO 细胞表达）反应性的图（结合 ELISA）。

图 5 表示单克隆抗体对人以及小鼠 SCGF 蛋白（CHO 细胞表达）的反应性的图。（结合 ELISA）

图 6 是表示通过使用单克隆抗体的夹层 ELISA 对人 SCGF 蛋白进行定量的定量曲线的图。

图 7 表示各种血液疾病患者血清中 SCGF 浓度。横实线表示各种血液疾病组的中央值，横点线表示由健康人组求得的临界值 (18.2ng/mL)。

*: 与 Normal（健康人组）或 AA（再生障碍性贫血组）的显著性差异 $p < 0.05$ 、

#: 与 NHL（非霍奇金淋巴瘤）的显著性差异 $P < 0.05$ 、

\$: 与 MM（多发性骨髓瘤）的显著性差异 $p < 0.05$

图 8 是表示由于造血干细胞移植患者血清中 SCGF 浓度不同引起

的 GVHD 发病和非发病的差别的图。横实线表示各组的中央值。

*：与 GVHD 非发病例的显著性差异 $p < 0.05$ 、

#：与预处理期的显著性差异 $p < 0.05$ 、

\$：与再生障碍期的显著性差异 $p < 0.05$ 、

&：与恢复期的显著性差异 $p < 0.05$

图 9 是表示造血干细胞移植患者血清中 SCGF 浓度与 GVHD 发病患者的检测灵敏度、非发病患者的特异度的关系的图。●：灵敏度、○：特异度、纵点线表示假定的临界值。

图 10 是表示由于造血干细胞移植患者血清中 SCGF 浓度引起的存活延迟以及非延迟的差别的图。横实线表示各组的中央值。

#：与预处理期的显著性差异 $p < 0.05$ 、

\$：与再生障碍期的显著性差异 $p < 0.05$ 、

&：与恢复期的显著性差异 $p < 0.05$

图 11 是表示造血干细胞移植患者血清中 SCGF 浓度与造血干细胞存活延迟例的检测灵敏度、非延迟例的特异度的关系的图。●：灵敏度、○：特异度、纵点线表示假定的临界值。

具体实施方式

本发明涉及对白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病进行判定的方法。

作为白血病只要是造血系统细胞中造血细胞等未成熟的细胞被肿瘤化的无论哪一种都包括在内，如急性淋巴性白血病（以下称为 ALL）、急性骨髓性白血病（以下称为 AML）、慢性骨髓性白血病（以下称为 CML）等。

作为前白血病只要是造血系统细胞中淋巴细胞等成熟的细胞被肿瘤化的无论哪一种都包括在内，如骨髓发育异常综合征（以下称为 MDS）等。

作为非白血病性恶性血液疾病如淋巴瘤或骨髓瘤等。

作为淋巴瘤如霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤（以下称为 NHL）

等。

作为骨髓瘤如多发性骨髓瘤（以下称为 MM）等。

在白血病、前白血病和非白血病性恶性血液疾病患者的机体样品中含有的 SCGF 浓度比健康人的机体样品中含有的 SCGF 浓度显著上升。因此、对 SCGF 浓度设置临界值，对采取的机体样品中的 SCGF 进行定量，当 SCGF 浓度比临界值高时，可以判定是白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病。

所谓临界值指的是针对某一物质，在对作为目的的疾病组与非疾病组进行判定时所定下的值。在对作为目的的疾病组与非疾病组进行判定时，临界值以下作为阴性、临界值以上作为阳性，或者临界值以下为阳性、临界值以上作为阴性，可以对疾病进行判定（金井正光编、临床检查法提要 金原出版株式会社）。

作为以对临界值的临床的有用性进行评价为目的使用的指标，有灵敏度和特异度。

用临界值对某一总体进行判定，当疾病患者中，判定为阳性的表示为 a（真阳性）、虽为疾病患者，但判定为阴性的表示为 b（假阴性）、尽管不是疾病患者但判定为阳性的表示为 c（假阳性）、不是疾病患者而判定为阴性的表示为 d（真阴性）时，可以将用 $a/(a+b)$ 表示的值表示为灵敏度（真阳性率）、用 $d/(c+d)$ 表示的值表示为特异度（真阴性率）。

作为目的的疾病组与非疾病组的测定值的分布通常有一部分重复。因此，通过使临界值升降，可以使灵敏度与特异度发生变化。通过降低临界值虽然可以提高灵敏度，但特异度降低，通过提高临界值，灵敏度降低，可是特异度上升。作为判定方法，灵敏度和特异度两者的值都越高越好。而灵敏度和特异度的值不超过 50% 的判定方法被认为没用。

作为设定临界值的方法，如将从包含非疾病组的分布的 95% 的中央开始的两端中任一端的值设定为临界值的方法，非疾病组的分布表现为正态分布时，将平均值 + 2 倍的标准偏差（SD）或平均值 - 2SD

设定为临界值的方法等。

当判定是否是白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病时，对于将临界值设定为 15.0ng/mL 时，可以以灵敏度 89.5%、特异度 70% 进行判定，对于将临界值设定为 13.0ng/mL 时，可以以灵敏度 100%、特异度 60% 进行判定。如果将来自健康人的 SCGF 浓度的临界值设定为平均值 + 2SD 的 18.2ng/mL，可以以灵敏度 89.5%、特异度 100% 进行判定。而在该临界值，可以以灵敏度 95%、特异度 100% 判定是否是白血病，以灵敏度 76.9%、特异度 100% 判定是否是非白血病性恶性血液疾病，另外可以以灵敏度 100%、特异度 100% 判定是否是前白血病。

作为机体样品可以是血液、尿、髓液、穿刺液等任一种，最好是血液。作为血液如全血、血浆、血清、血细胞溶血液、血细胞内液等，最好是血清或血浆。

本发明涉及白血病与前白血病或非白血病性恶性血液疾病进行区别的方法。

白血病患者的机体样品中含有的 SCGF 浓度比前白血病或非白血病性恶性血液患者的机体样品中含有的 SCGF 浓度显著上升。因此，用上述方法判定为白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病后，设置判定为白血病的临界值，当采取的机体样品中的 SCGF 浓度比该临界值还高时，可以判断为白血病，比临界值低时判断为前白血病或非白血病性恶性血液疾病。

对白血病与前白血病或非白血病性恶性血液疾病进行区别时，在将临界值设定为 23.8ng/mL 时，可以以灵敏度 85%、特异度 69.2% 进行区别。另外将临界值设定为非白血病性恶性血液疾病患者的平均值 + 2SD 的 32.8ng/mL 时，可以以灵敏度 80%、特异度 100% 进行区别。

本发明涉及对再生障碍性贫血与骨髓发育异常综合征进行区别的方法。

再生障碍性贫血和骨髓发育异常综合征是以在骨髓以及末梢血中白细胞的数目或形态发生异常为特征的病态，两种疾病的区别一直很

难。

骨髓发育异常综合征患者的 SCGF 浓度比健康人血液中含有的 SCGF 浓度显著上升，但再生障碍性贫血患者血液中 SCGF 浓度与健康人一样没有变化。骨髓发育异常综合征患者血中 SCGF 浓度比再生障碍性贫血患者的血中 SCGF 浓度显著高，通过测定两者血中 SCGF 浓度，可以区别是再生障碍性贫血还是骨髓发育异常综合征。

因此，对白细胞表现异常的患者中再生障碍性贫血患者和骨髓发育异常综合征患者进行区别时，由再生障碍性贫血患者的 SCGF 浓度设定临界值（平均值 + 2SD=16.6ng/mL），如果通过该临界值进行判断，可以以灵敏度 100%、特异度 100%对再生障碍性贫血患者和骨髓发育异常综合征患者进行区别。再将基准值设定为 15.6ng/mL ~ 18.6ng/mL，可以以灵敏度 100%、特异度 100%对再生障碍性贫血患者和骨髓发育异常综合征患者进行区别。

另外本发明涉及对造血干细胞移植后的造血干细胞的存活延迟进行判定的方法。

作为造血干细胞移植，只要是移植造血干细胞的方法无论哪一种都可以，如骨髓移植、脐带血移植、末梢血干细胞移植等。

从造血干细胞移植开始一直到造血干细胞存活为止的期间，以患者末梢血的血细胞数作为基准，可以分为以下给出的 4 个时期。即、在移植前的处于大量投给抗癌剂等状态的预处理期、处于移植后血细胞数减少状态的再生障碍期、处于移植后血细胞数恢复状态的恢复期、以及移植后造血干细胞存活的稳定期。

在进行造血干细胞移植的患者的预处理期以及再生障碍期的机体样品中含有的 SCGF 浓度，其中造血干细胞存活延迟患者的机体样品中含有的 SCGF 浓度比造血干细胞存活没有延迟的患者的机体样品中含有的 SCGF 浓度高。因此，测定各个时期的 SCGF 浓度，将被判断为担心存在造血干细胞存活延迟的 SCGF 浓度定为临界值，如果 SCGF 浓度比临界值低时，判定为没有出现存活的延迟，对于 SCGF 浓度比临界值高时，可以判定为发生了存活的延迟。

为了判定造血干细胞的存活延迟，在预处理期时，例如可以通过将临界值定为 9.5ng/mL，以灵敏度 75%、特异度 67%进行判定，而在再生障碍期时，可以通过将临界值定为 12ng/mL，以灵敏度 75%、特异度 63%进行判定。

另外本发明还涉及对 GVHD 的发病进行判定的方法。

进行造血干细胞移植的患者处于再生障碍期以及恢复期的机体样品中含有的 SCGF 浓度，GVHD 发病的患者比 GVHD 不发病的患者高。因此，测定各个时期的 SCGF 浓度，定下判定在各个时期担心 GVHD 发病的临界值，SCGF 浓度比临界值低时，不用担心 GVHD 发病，而当 SCGF 浓度比临界值高时，可以判断为 GVHD 有发病危险。

为了对造血干细胞移植后的 GVHD 的发病进行判定，可以通过在预处理期将临界值定为例如 5ng/mL，以灵敏度 87%、特异度 57%，在再生障碍期将临界值定为例如 10ng/mL，以灵敏度 87%、特异度 63%，在恢复期通过将临界值定为例如 15ng/mL，以灵敏度 87%、特异度 63%对 GVHD 发病患者与非发病患者进行判定。

作为测定机体样品中造血干细胞生长因子（以下称为 SCGF）的方法，免疫学的测定法、分子生物学的测定法等哪一种方法都可以，优选有免疫学的测定法。

作为免疫学的测定法只要是免疫测定法、免疫印迹法、凝集反应、补体结合反应、溶血反应、沉降反应、胶体金法、色谱法、免疫染色法等利用抗原抗体反应的方法，无论哪一种都包括在内，优选有免疫测定法。

作为分子生物学的测定法如 RT-PCR 法、Northern 印迹 (blotting) 法、原位杂交法等。

免疫测定法是使用实施了各种标记的抗原或抗体，对抗体或抗原进行检测或定量的方法，根据抗原或抗体的标记方法不同有放射免疫检测法 (RIA)、酶免疫检测法 (EIA 或 ELISA)、荧光免疫检测法 (FIA)、发光免疫检测法 (luminescent immunoassay)、物理化学检测法 (TIA, LAPIA, PCIA)、流式细胞测量法等，优选酶免疫检

测法。

作为在放射免疫检测法中使用的放射性标记体，可以使用任意的众所周知（石川荣次等人编、《酵素免疫测定法》、医学书院）的放射性同位元素。例如可以使用 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I 等。

作为酶免疫检测法中使用的酶标记体可以使用任意众所周知（石川荣次等人编、《酵素免疫测定法》、医学书院）的酶。例如、可以使用碱性磷酸酶、过氧化物酶、虫荧光素酶等。

另外酶免疫测定法通过测定由于酶的作用生成的物质进行检测，可以采取对在紫外区或可见区具有极大吸收的物质的吸光度进行测定的方法、测定生成的荧光物质的荧光强度的方法、测定生成的物质的发光强度的方法等各式各样的测定方法。例如作为酶标记体使用碱性磷酸酶时，作为由于碱性磷酸酶作用生成在紫外区或可见区具有极大吸收那样物质的碱性磷酸酶的底物，例如 4-硝基苯基磷酸等。4-硝基苯基磷酸由于碱性磷酸酶作用变换为 4-硝基苯酚。作为通过碱性磷酸酶作用生成发光那样的碱性磷酸酶的底物，例如 3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酸氧基(オキシシン))苯基-1, 2-二氧杂环丁烷·二钠盐 (AMPPD)、2-氯-5-{4-甲氧基螺[1, 2-二氧杂环丁烷-3, 2'-(5'-氯)三环[3.3.1^{3,7}]癸烷]-4-基}苯基磷酸酯·二钠盐 (CDP-StarTM)、3-{4-甲氧基螺[1, 2-二氧杂环丁烷-3, 2'-(5'-氯)三环[3.3.1^{3,7}]癸烷]-4-基}苯基磷酸酯·二钠盐 (CSPDTM)、[10-甲基-9(10H)-吡啶叉基(アクリジニルイデン)]苯氧基甲基磷酸·二钠盐 (LumigenTM APS-5) 等。另外，作为通过碱性磷酸酶的作用生成色素的试剂，如作为碱性磷酸酶的底物的含有 NADPH 的酶循环反应试剂 AmpliQ (DAKO 公司生产)。

作为发光免疫检测法中使用的发光标记体，可以使用任意的众所周知 [今井一洋编、生物发光和化学发光、广川书店；临床检查 42(1998)] 的发光体。例如可以使用吡啶鎘酯、洛粉碱 (2,4,5-三苯基咪唑) 等。

作为在荧光免疫检测法中使用的荧光标记体，可以使用任意的众所周知（川生明著、荧光抗体法、软科学（ソフトサイエンス）公司生产）的荧光。例如可以使用 FITC、RITC 等。

作为免疫测定法中的测定方法，如竞争法、夹层法〔免疫学解说（イラストレイテッド）第5版（南光堂）〕等，优选夹层法。

夹层法是使第二抗体（二次抗体）同时或分别与在抗原抗体反应中结合的样品中的目的物质和第一抗体反应，对样品中的目的物质用同一或各自的抗体进行检测或定量的方法。多数情况下，在测定操作中包括对样品中的没有反应的样品成分或测定系成分进行清洗的工序。例如，将第一抗体（一次抗体）固定于固相后、使希望测定的样品与第一样品接触。对样品中的没有反应的样品成分进行清洗，从反应系除去后，再使第二抗体（二次抗体）与在抗原抗体反应中结合的样品中的目的物质和第一抗体的复合体反应，将测定体系中与反应无关的第二次抗体等成分洗净除去后，对反应系中存在的样品中的目的物质进行检测或定量的方法。

作为夹层法中使用的固相，如聚氯乙烯制微量滴定板、聚苯乙烯制微量滴定板等。

作为夹层法中使用的抗体，可以使用多克隆抗体、单克隆抗体中的任一种，也可以使用 Fab、Fab'、F(ab)₂ 的抗体片段。

作为在夹层法使用的一次抗体和二次抗体的组合，只要是识别不同抗原表位的抗体的组合，无论哪一种都可以，但至少有一个是单克隆抗体最好。

作为在本发明的夹层法中使用的单克隆抗体，如识别序列 1 记载的 6~28 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体、识别序列 1 记载的 29~59 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体以及识别序列 1 记载的 60~302 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体等。

作为识别序列 1 记载的 6~28 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体，如杂交瘤 KM2142 [The Hematology Journal, 2, 307 (2001)] 生产的单克隆抗体 KM2142。作为识别序列 1 记载的 29~59 位的氨基

酸序列表示的区域的单克隆抗体，如杂交瘤 KM2804(FERM BP-7923)生产的单克隆抗体 KM2804。作为识别用序列 1 记载的 60~302 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体，如杂交瘤 KM2945 生产的单克隆抗体 KM2945。

生产单克隆抗体 KM2142 的杂交瘤 KM2142、生产单克隆抗体 KM2804 的杂交瘤 KM2804、生产单克隆抗体 KM2945 的杂交瘤 KM2945 已于平成 14 年 2 月 26 日分别以 FERM BP-7922、FERM BP-7923 和 FERM BP-7924 保藏在独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心（茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 中央第 6）。

由于上述的单克隆抗体识别 SCGF 的部位各不相同，将这些单克隆抗体组合可以实施夹层法。作为优选的单克隆抗体的组合，如识别用序列 1 的 6~28 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体、具体的如杂交瘤 KM2142 [*The Hematology Journal*, 2, 307 (2001)] 生产的单克隆抗体 KM2142 和识别用序列 1 记载的 29~59 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体、具体的如杂交瘤 KM2804(FERM BP-7923)生产的单克隆抗体 KM2804 的组合。

以下给出了通过本发明的夹层法对 SCGF 进行检测或定量的方法的具体例子。

首先将上述抗 SCGF 抗体（一次抗体）吸附固定于适当的固定载体的表面。一次抗体的固定可以通过例如将该抗体在适当的缓冲液、例如磷酸缓冲液、硼酸缓冲液、碳酸缓冲液等稀释后、使稀释后溶液与固定载体的表面接触，然后于 4~37℃ 下反应 30 分钟以上来进行。

接下来对固定载体表面的蛋白质结合能力进行封闭。例如，使固定载体表面上的游离结合基与封闭缓冲液接触。

作为封闭缓冲液，例如含有 1~10% 的牛血清白蛋白、10~30% ブロックス（雪印乳业公司生产）的缓冲液、例如磷酸缓冲液、硼酸缓冲液、碳酸缓冲液等。

封闭处理可以通过在 4~37℃ 下反应 30 分钟以上进行。

然后使一次抗体与机体样品接触。机体样品根据需要，也可以用

含有例如 0.01 ~ 1% 的牛血清白蛋白等蛋白质的缓冲液、磷酸缓冲液、硼酸缓冲液、碳酸缓冲液等进行稀释。

一次抗体和机体样品的接触通过在 4 ~ 37°C 下反应 30 分钟以上进行。

接触后, 根据需要, 用含有 Tween 20 等表面活性剂的缓冲液、例如磷酸缓冲液、硼酸缓冲液、碳酸缓冲液等洗几次。

此时、机体样品中存在的 SCGF 通过与预先固定的抗 SCGF 抗体进行特异结合, 通过抗 SCGF 抗体被固定在固定载体。

然后使固定了 SCGF 的上述载体与含有二次抗体的溶液接触。

作为二次抗体, 只要是与一次抗体抗原表位不同的抗 SCGF 抗体, 可以使用任一种。另外, 二次抗体根据需要, 可以用上述的标记体进行预先标记。

为了除去未吸附的二次抗体, 根据需要, 可以使用含有 Tween20 等表面活性剂的缓冲液、例如磷酸缓冲液、硼酸缓冲液、碳酸缓冲液等, 对载体进行多次清洗。通过这样操作, 该二次抗体借助于预先结合的一次抗体和 SCGF, 与固定载体结合, 二次抗体的结合量应当反映出机体样品中的 SCGF 量。

象上述那样被固定的二次抗体可以根据二次抗体的标记体进行测定。另外使用对二次抗体特异的三次抗体, 通过各种方法预先对该三次抗体进行标记, 也可以对三次抗体的标记进行检测或测定。

象上述那样, 测定结合的二次抗体的量, 使用标准物质做成标准曲线, 可以测定机体样品中的 SCGF 量。

标准曲线可以通过准备对含有作为标准物质浓度已知的人 SCGF 蛋白质的溶液进行数点梯度稀释的样品, 与机体样品一起实施上述夹层法来制作。

作为本发明的白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病的诊断药、造血干细胞移植后造血干细胞的存活延迟的诊断药、以及 GVHD 发病的诊断药中含有的针对 SCGF 的抗体, 只要是与 SCGF 反应的抗体, 可以使用多克隆抗体、单克隆抗体或抗体片段等任一种, 最好使

用单克隆抗体。

作为单克隆抗体，如识别用序列 1 记载的 6~28 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体、识别用序列 1 记载的 29~59 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体以及识别用序列 1 记载的 60~302 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体。

作为识别用序列 1 记载的 6~28 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体，如杂交瘤 KM2142(FERM BP-7922)生产的单克隆抗体 KM2142。作为识别用序列 1 记载的 29~59 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体，如杂交瘤 KM2804(FERM BP-7923)生产的单克隆抗体 KM2804。作为识别用序列 1 记载的 60~302 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体，如杂交瘤 KM2945(FERM BP-7924)生产的单克隆抗体 KM2945。

作为本发明的试剂盒，可以由仪器或试剂的组合构成，只要是含有与以下所述各构成要素本质上同一、或与其一部分本质上同一的物质，即使构成或形态不同，也包括在本发明的试剂盒内。

作为试剂，包括与 SCGF 反应的抗体，另外根据需要，也可含有机体样品的稀释液、抗体固定化固相、反应缓冲液、洗净液、标记了的二次抗体或其抗体片段、标记体的检测用试剂、SCGF 等的标准物质等。

作为机体样品的稀释液如在表面活性剂、缓冲剂等中含有 BSA 或酪蛋白等蛋白质的水溶液等。

作为抗体固定化固相可以使用在进行整形使得各种高分子素材符合用途的那样原材料上进行了本发明的抗体或抗体片段固相化的抗体固定化固相。作为形状如管、珠、板、胶乳等微粒子、棒等，作为原材料如聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚乙烯基甲苯、聚丙烯、聚乙烯、聚氯乙烯、尼龙、聚甲基丙烯酸酯、明胶、琼脂糖、纤维素、聚对苯二甲酸乙二醇酯等高分子原材料、玻璃、陶瓷或金属等。可以通过作为抗体固相化方法的物理方法和化学方法或这些方法并用等众所周知的方法制备。例如、在聚苯乙烯制 96 孔的免疫测定用微量滴定板对抗体

等进行疏水固相化的抗体固相化固相。

反应缓冲液只要是提供抗体固定化固相的抗体和机体样品中的抗原进行结合反应时的溶剂环境的缓冲液无论哪一种都可以，如表面活性剂、缓冲剂、BSA 或酪蛋白等蛋白质、防腐剂、稳定剂、反应促进剂等。

作为洗涤液，在磷酸或 Tris（三羟甲基氨基甲烷）、HEPES 或 MOPS 等 Good 缓冲液类等的缓冲剂等至少含有一种 Tween20、Tween40、Tween60、Tween80、Triton™ X-705 等表面活性剂、NaCl、KCl 或硫酸铵等盐、BSA 或酪蛋白等蛋白质、叠氮钠等防腐剂、盐酸胍、尿素或十二烷基硫酸钠等变性剂、聚乙二醇、羧甲基纤维素、硫酸葡聚糖、硫酸软骨素等安定化剂的溶液。具体来说，如由 0.15mol/L 氯化钠、0.05% Tween20 和 pH7.4 的 10mmol/L 磷酸缓冲液构成的 TweenPBS；由 0.15mol/L 氯化钠、0.05% Tween20 和 pH7.4 的 10mmol/L Tris - 盐酸缓冲液（pH7.4）构成的 TweenTBS 等。

作为被标记的二次抗体或其抗体片段，可以使用混合有对本发明的抗体或抗体片段用辣根过氧化物酶（HRP）、牛小肠碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶等标记用酶进行了标记的产物、缓冲剂、BSA 或酪蛋白等蛋白质、防腐剂等的标记抗体混合物。

作为标记体的检测用试剂根据上述的标记用酶，例如如果是辣根过氧化物酶，可以是四甲基联苯胺或正苯二胺等吸光测定用底物、羧基苯基丙酸或羧基苯乙酸等荧光底物、氨基苯二酰肼等发光底物，如果是碱性磷酸酶可以使用如 4-硝基苯磷酸盐等吸光度测定用底物、4-甲基伞形酸基磷酸盐等荧光底物等。

作为标准物质如通过 WO98/08869 记载的方法可以制备的 SCGF、试剂盒中使用的含有 2 种抗体的抗原表位的肽等。

另外本发明涉及识别用序列 1 记载的 29~59 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体以及识别用序列 1 记载的 60~302 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体。

识别用序列 1 记载的 29~59 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆

抗体,如杂交瘤 KM2804(FERM BP-7923)生产的单克隆抗体 KM2804。识别用序列 1 记载的 60~302 位的氨基酸序列表示的区域的单克隆抗体,如杂交瘤 KM2945(FERM BP-7924)生产的单克隆抗体 KM2945。

作为本发明中使用的单克隆抗体的制造方法可以使用众所周知的单克隆抗体的制造方法制造。

以下对本发明中使用的单克隆抗体的制造方法进行详细说明。

(1) 抗原的制备

作为抗原如可以将含有编码人 SCGF 的 cDNA 的表达载体导入到大肠杆菌、酵母、昆虫细胞、动物细胞等得到的人 SCGF 蛋白质、通过肽合成得到的含有人 SCGF 部分序列的合成肽等。

作为抗原用部分肽可以选择 5~30 个残基左右的蛋白质部分序列。为了获得识别没有变性的具有天然构造状态的该蛋白质的抗体,需要选择在立体结构上存在于蛋白质表面的部分序列作为抗原肽。通过 Kyte 和 Doolittle 的方法 (Journal of Molecular Biology, 157, 105-132 (1982)) 等对亲水性高的部分序列进行预测,可以推测在立体构造上存在于蛋白质表面的部分。即,一般来说,亲水性低的部分往往在立体构造上存在于蛋白质的内部,而亲水性高的部分大多存在于蛋白质表面。另外,蛋白质的 N 末端、C 末端往往存在于蛋白质表面。还可以参考蛋白质的二级结构信息。通过 Chou-Fasman 的方法 [Advances in Enzymology, 47, 45-147 (1978)] 等,在由氨基酸序列预测蛋白质二级结构中,也可以考虑将含有回转构造或无规卷曲构造的部分作为抗原用肽使用。然而,这样选择的部分肽不一定能成为确立目的抗体的抗原。

在部分肽中为了与蛋白质交联可以在末端附加半胱氨酸。当选择蛋白质的内部序列时,根据需要,肽的 N 末端可以进行乙酰化、C 末端进行酰胺化。

部分肽可以通过一般的液相、固相肽合成法以及将他们适当组合的方法、或源于这些方法的方法进行合成 [International Journal of Peptide Protein Research, 35, 161-214 (1990)、Solid-Phase Peptide

Synthesis, Methods in Enzymology, vol 289 , Gregg B. Fields 编, Academic Press, (1997)、Peptide Synthesis Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 35 , Michael W. Pennington , Ben M. Dunn 编, Humana Press, (1994)]。

另外也可以使用自动肽合成仪。通过肽合成仪进行肽的合成可以在岛津制作所生产的肽合成仪、Advanced ChemTech Inc., USA (以后简称为 ACT 公司) 制造的肽合成仪等市售的肽合成仪上, 使用对侧链进行适当保护的 $N\alpha$ -Fmoc-氨基酸或 $N\alpha$ -Boc-氨基酸等, 按照各个仪器的合成程序实施。作为原料的保护氨基酸和载体树脂可以从 ABI 公司、岛津制作所、国产化学(株)、NovaBiochem、渡边化学(株)、ACT 公司、AnaSpec Inc.、或肽研究所(株) 等获得。

(2) 动物的免疫和抗体产生细胞的制备

用(1)中制备的抗原对 3~20 周龄的小鼠、大鼠或仓鼠进行免疫, 采取该动物的脾、淋巴结、末梢血中的抗体产生细胞。

通过将抗原与适当的佐剂 [例如、弗氏完全佐剂 (complete freund's adjuvant) 或氢氧化铝凝胶和百日咳菌疫苗等] 注射到动物的皮下或静脉内或腹腔内进行免疫。抗原为部分肽时, 制作与 BSA(牛血清白蛋白) 或 KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) 等载体蛋白质的缀合物, 将他们作为免疫原使用。

抗原的投给, 第 1 次投给后, 每隔 1~2 周期间进行一次, 进行 3~10 次。每次投给后第 3~7 天从眼底静脉丛进行采血, 通过酶免疫测定法 [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] 等研究该血清与抗原的反应。将该血清对免疫使用的抗原表现出充分抗体效价的小鼠、大鼠或仓鼠作为抗体产生细胞的供给源。

当要进行抗体产生细胞和骨髓瘤细胞的融合时, 在抗原物质最终投给后第 3~7 天内, 从免疫的小鼠、大鼠或仓鼠摘出脾脏, 采取脾细胞。将脾脏于 MEM 培养基 (日水制药公司生产) 中切成薄片, 用镊子拨开, 进行离心分离 (1,200rpm、5 分钟) 后、弃去上清, 用 Tris-

氯化铵缓冲液(pH 7.65)处理 1~2 分钟, 除去红细胞, 用 MEM 培养基洗 3 次后, 用作融合用脾细胞。

(3) 骨髓瘤细胞的制备

作为骨髓瘤细胞, 使用从小鼠获得的株化细胞。例如, 使用 8-氮杂鸟嘌呤抗性小鼠 (BALB/c 由来) 骨髓瘤细胞株 P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [*Current Topics in Microbiology and Immunology*, 18:1-7 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41 (NS-1) [*European J. Immunology*, 6: 511-519 (1976)]、SP2/O-Ag14(SP-2) [*Nature*, 276: 269-270 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [*J. Immunology*, 123:1548-1550 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [*Nature*, 256:495-497 (1975)] 等。这些细胞株用 8-氮杂鸟嘌呤培养基 [向 RPMI - 1640 培养基中加有谷氨酰胺 (1.5mmol/L)、2-巯基乙醇 (5×10^{-5} mol/L)、庆大霉素 (10 μ g/mL) 以及胎牛血清(FCS)的培养基 (以下称为正常培养基。) 中再加入 8-氮杂鸟嘌呤 (15 μ g/mL) 的培养基] 可以进行传代, 但要在细胞融合的 3~4 天前于正常培养基中进行传代, 确保在融合当日有 2×10^7 个以上的细胞数。

(4) 细胞融合

用 MEM 培养基或 PBS (磷酸氢二钠 1.83g、磷酸二氢钾 0.21g、食盐 7.65g、蒸馏水 1 升、pH 7.2) 充分清洗在 (2) 中免疫的抗体产生细胞和 (3) 中得到的骨髓瘤细胞, 然后混合使抗体产生细胞细胞数: 骨髓瘤细胞细胞数 = 5~10:1, 离心分离 (1,200rpm、5 分钟) 后、弃去上清, 将沉淀的细胞组充分拨开后, 一边搅拌, 一边于 37°C 下加聚乙二醇-1,000 (PEG-1,000) 2g、MEM 2mL 和二甲基亚砷 0.7mL 的混合液 0.2~1mL/ 10^8 抗体产生细胞, 每 1~2 分钟加几次 MEM 培养基 1~2mL 后、加 MEM 培养基使得全量达到 50mL。离心分离 (900rpm、5 分钟) 后、弃去上清, 慢慢地将细胞拨开后、通过刻度吸管吸入、吹出那样将细胞悬浮于 HAT 培养基 [正常培养基中加了次黄嘌呤 (10^{-4} mol/L)、胸腺嘧啶脱氧核苷 (1.5×10^{-5} mol/L) 和氨基蝶呤 (4×10^{-7} mol/L) 的培养基] 100mL 中。将该悬浮液注入到 96 孔

培养用板中，每孔 100 μ L，在 5% CO₂ 培养箱中、于 37℃ 下培养 7~14 天。

培养后、取培养上清的一部分，通过下述的酶免疫测定法等，选择与人 SCGF 反应，而与不含有 SCGF 的抗原不反应的上清的细胞。然后通过有限稀释法反复进行 2 次克隆 [第 1 次使用 HT 培养基（从 HAT 培养基中除去氨基蝶呤的培养基）、第 2 次使用正常培养基]，选择稳定、而且确认强抗体效价的细胞作为抗人 SCGF 单克隆抗体产生杂交瘤株。

酶免疫测定法

将抗原或表达抗原的细胞等铺在 96 孔板中，使作为第一抗体的杂交瘤培养上清或通过上述方法的纯化抗体反应。

第一抗体反应后、将板洗净后添加第二抗体。

所谓第二抗体是可以识别第一抗体免疫球蛋白的抗体经生物素、酶、化学发光物质或放射线化合物等标记的抗体。具体来说，在杂交瘤制作时如果使用小鼠，作为第二抗体使用能够识别小鼠免疫球蛋白的抗体。

反应后、选择进行对应于标记第二抗体的物质的反应，生产与抗原进行特异反应的单克隆抗体的杂交瘤。

(5) 单克隆抗体的制备

向降植烷处理 [腹腔内注射 2,6,10,14-四甲基十五烷 (Pristane) 0.5mL，饲养 2 周] 的 8~10 周龄小鼠或裸鼠腹腔内注射 (4) 得到的抗人 SCGF 单克隆抗体产生杂交瘤细胞 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 细胞/只。经 10~21 日，杂交瘤进行癌性腹水化。从该小鼠采取腹水，离心分离 (3,000rpm、5 分钟) 后，除去固体成分后，用 40~50% 硫酸铵盐析后，通过辛酸沉淀法、DEAE-琼脂糖柱、蛋白 A-柱或凝胶过滤柱进行纯化，收集 IgG 或 IgM 级分，作为纯化单克隆抗体。

使用亚类分型试剂盒利用酶免疫测定法决定抗体亚类。蛋白量的定量通过 Lowry 法和 280nm 的吸光度算出。

[实施例]

实施例 1. 用人 SCGF 部分肽制作抗人 SCGF 单克隆抗体

(1) 人 SCGF 部分肽的合成

对人 SCGF 蛋白序列进行解析, 从亲水性高的部分、N 末端、C 末端、含有二级结构上旋转结构、无规卷曲结构的部分中, 选择作为抗原认为合适的部分序列, 化合物 1(SCGF-1)。

(关于简写)

有关本发明中使用的氨基酸以及其保护基的简写来自于参与生物化学命名的 IUPAC-IUB 委员会 (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature) 的推荐 [European Journal of Biochemistry, 138 卷, 9 页 (1984 年)]。

以下的简写只要没有特别说明, 都是表示对应的下述氨基酸。

Ala: L-丙氨酸

Arg: L-精氨酸

Cys: L-半胱氨酸

Gln: L-谷氨酰胺

Glu: L-谷氨酸

Glx: L-谷氨酸

Gly: 甘氨酸

Leu: L-亮氨酸

Trp: L-色氨酸

以下简写表示对应的下述氨基酸的保护基和侧链保护氨基酸。

Fmoc: 9-芴甲氧羰基

tBu: 叔丁基

Trt: 三苯甲基

Boc: 叔丁氧羰基

Pmc: 2, 2, 5, 7, 8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基

Fmoc-Arg(Pmc)-OH: N^{α} -9-芴甲氧羰基- N^{ϵ} -2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基-L-精氨酸、

Fmoc-Gln(Trt)-OH: N^{α} -9-芴甲氧羰基- N^{ϵ} -三苯甲基-L-谷氨酰

胺

Fmoc-Glu(OtBu)-OH: N α -9-芴甲氧羰基-L-谷氨酰胺酸- γ -t-丁酯

Fmoc-Trp(Boc)-OH: N α -9-芴甲氧羰基-N^{ind}-t-丁氧羰基-L-色氨酸

以下简写表示对应的下述的反应溶剂、反应试剂等。

PyBOP: 苯并三唑-1-基氧基三吡咯烷基鏽六氟磷酸盐

HOBt: N-羟基苯并三唑

NMM: N-甲基吗啉

DMF: N,N-二甲基甲酰胺

TFA: 三氟乙酸

在以下实施例中，化合物的理化性质通过如下方法测定。

用日本电子 JMS-HX110A 通过 FAB-MS 法，或用 Bruker 公司生产的质量分析装置 REFLEX 通过 MALDI-TOFMS 法进行质谱分析。根据 Cohen, S. A. 等人的方法 [Analytical Biochemistry, 222, 19 (1994)] 进行氨基酸分析。在盐酸蒸气中于 110℃ 下水解 20 小时，水解物的氨基酸组成用 Waters AccQ-Tag 氨基酸分析仪 (Waters 公司生产) 进行分析。

① 化合物 1(SCGF-1) (序列 4) (Ac-Arg-Glu-Trp-Glu-Gly-Gly-Trp-Gly-Gly-Ala-Gln-Glu-Glu-Glu-Arg-Glu-Arg-Glu-Ala-Leu-Cys-OH) 的合成

将结合了 Fmoc-Cys(Trt) 14.1 μ mol 的载体树脂 (H-Cys(Trt)-2-Cl Trt resin 树脂、ノババイオケム公司生产) 30mg 加到自动合成仪 (岛津制作所) 反应容器中，然后加 600 μ L 的 DMF，搅拌 3 分钟，排出溶液后，按照岛津制作所的合成程序进行以下操作。

(a) 加 30% 哌啶-DMF 溶液 900 μ L，将混合物搅拌 4 分钟，排出该溶液，再重复进行一次该操作。

(b) 用 900 μ L 的 DMF 将载体树脂洗 1 分钟，排出该溶液，将该操作

重复 5 次。

(c)将 Fmoc-Leu-OH (141 μ mol)、PyBOP (141 μ mol)、HOBt1 水合物 (141 μ mol)和 NMM(212 μ mol)在 DMF (494 μ L)中搅拌 3 分钟,将得到的溶液加到树脂中,将混合物搅拌 30 分钟,排出溶液。

(d)用 900 μ L 的 DMF 将载体树脂清洗 1 分钟后,排出溶液,将该操作重复 5 次。

经这样操作,在载体上合成了 Fmoc-Leu-Cys(Trt)。

接下来,在(a) (b) 工序后的(c) 工序中,用 Fmoc-Ala-OH 进行缩合反应,经(d) 的清洗工序,在载体上合成了 Fmoc-Ala-Leu-Cys (Trt)。

以下、在工序 (c) 中,依次使用 Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Trp-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH, 反复进行(a)~(d)后、经(a) (b) 的脱保护、清洗工序,用甲醇、丁醚依次进行清洗,减压下干燥 12 小时,得到 N 末端无保护,侧链被保护的结合肽的载体树脂。然后对得到的载体树脂进行如下的 (e)~(g) 操作。
(e)用 800 μ L 的 DMF 将载体树脂清洗 1 分钟,排出该溶液,将该操作重复进行 3 回。

(f)将乙酸酐 (282 μ mol) 和 DMF(500 μ L) 加到树脂中,将混合物搅拌 2 小时,排出溶液。

(g)用 800 μ L 的 DMF 将载体树脂清洗 1 分钟,排出该溶液,将该操作重复进行 3 回。

然后,用甲醇、丁醚依次进行清洗,于减压下干燥 12 小时,得到了结合了 N 末端乙酰化的侧链保护肽的载体树脂。然后向载体树脂中加入 5mg/mL 浓度的由含有 2-甲基咪唑的 TFA (82.5%)、茴香硫醚 (5%)、水 (5%)、乙基甲基硫醚 (3%)、1,2-乙二硫醇 (2.5%)

和苯硫酚 (2%) 构成的混合溶液 1mL, 于室温下放置 6 小时, 在除去侧链保护基的同时将肽从树脂上切下。将树脂过滤后, 向得到的溶液中加入醚约 10mL, 通过离心分离和透析回收生成的沉淀, 得到作为粗肽的样品 44.6mg。将该粗生成物全量溶解于由二硫苏糖醇和 DMF 构成的混合溶液, 通过使用反相柱 (资生堂生产、CAPCELL PAK C18 30mmI.D. X 250mm) 的 HPLC 进行纯化。通过将含有 TFA 0.1% 的 90% 乙腈水溶液加向 0.1% TFA 水溶液的直线浓度梯度法进行洗脱, 在 220nm 下进行检测, 得到含有化合物 1 的级分。将该级分冷冻干燥后得到 1.6mg 化合物 1。

质谱分析 [TOFMS] ; $m/z = 2520.7 (M+H^+)$

氨基酸分析; Glx 76 (8), Gly 4.0 (4), Arg 2.9 (3), Ala 2.2 (2), Leu 1.2 (1), Cys 1.7 (1)

(2) 免疫原的制备

实施例 1 (1) 得到的人 SCGF 部分肽以提高免疫原性为目的通过以下方法制作与 KLH (Calbiochem 公司生产) 的缀合物, 作为免疫原。即、将 KLH 溶解于 PBS 中, 调整到 10mg/mL, 滴下 1/10 容量的 25mg/mL MBS (Nacalai Tesque 公司生产), 进行 30 分钟搅拌反应。与通过预先用 PBS 平衡的 Sephadex G-25 柱等凝胶过滤柱除去游离的 MBS 得到的 KLH-MB 2.5mg 溶解于 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 的肽 1mg 进行混合, 于室温下进行 3 小时搅拌反应。反应后、用 PBS 进行透析。

(3) 动物的免疫和抗体产生细胞的制备

将实施例 1 (2) 制备的肽-KLH 缀合物 100 μ g 与铝凝胶 2mg 以及百日咳疫苗 (千叶县血清研究所生产) 1×10^9 细胞一起注入到 5 周龄雌性大鼠 (SD) 体内, 2 周以后, 每隔 1 周注入 100 μ g 的缀合物, 共计注入 4 次。由眼底静脉丛采血, 通过以下 (4) 所示的酶免疫测定法研究该血清抗体效价, 在最终免疫 3 天后从表现出充分抗体效价的大鼠摘出脾脏。

将脾脏于 MEM 培养基 (日水制药公司生产) 中切成薄片, 用镊

子拨开，进行离心分离（1,200rpm、5分钟）后、弃去上清，用 Tris-氯化铵缓冲液(pH 7.65)处理 1~2 分钟，除去红细胞，用 MEM 培养基洗 3 次后，用于细胞融合。

(4) 酶免疫测定法（结合 ELISA）

对于分析用的抗原使用实施例 1(1) 得到的人 SCGF 部分肽与甲状腺球蛋白（以下、略称为 THY）的缀合物。制作方法如实施例 1(2) 所述，但对于交联剂，使用 SMCC（Sigma 公司生产）代替 MBS。向 96 孔 EIA 用板（Greiner 公司生产）按照 $10\ \mu\text{g/mL}$ ， $50\ \mu\text{L/孔}$ 分别注入象上述那样制备的缀合物，于 4°C 下放置过夜，使其吸附。洗净后、按照 $100\ \mu\text{L/孔}$ 加 1% BSA-PBS，于室温下反应 1 小时，对残余的活性基进行封闭。倒掉 1% BSA-PBS，按照 $50\ \mu\text{L/孔}$ 分别注入被免疫小鼠的抗血清、抗人 SCGF 单克隆抗体的培养上清或纯化单克隆抗体，反应 2 小时。用 Tween-PBS 洗后，按照 $50\ \mu\text{L/孔}$ 加过氧化物酶标记兔抗大鼠免疫球蛋白（DAKO 公司生产），于室温、反应 1 小时，用 Tween-PBS 洗净后，用 ABTS 底物液[2,2-连氮二(3-乙基苄基噻唑-6-磺酸)铵]，使其发色，通过酶标板比色仪（E-max;Molecular Devices 公司生产）测定 OD415nm 的吸光度。

(5) 小鼠骨髓瘤细胞的制备

用正常培养基培养 8-氮杂鸟嘌呤抗性小鼠骨髓瘤细胞株 P3-U1，在细胞融合时确保 2×10^7 以上的细胞，作为亲本细胞株供细胞融合用。

(6) 杂交瘤的制作

将实施例 1(3) 得到的大鼠脾细胞和 (5) 中得到的骨髓瘤细胞按照 10:1 进行混合，离心分离（1,200rpm、5分钟）后、弃去上清，将沉淀的细胞组充分拨开后，边搅拌，边于 37°C 下加聚乙二醇-1,000（PEG-1,000）2g、MEM 培养基 2mL 和二甲基亚砷 0.7mL 的混合液 $0.2 \sim 1\text{mL}/10^8$ 大鼠脾细胞，每 1~2 分钟加几次 MEM 培养基 1~2mL 后、加 MEM 培养基使得全量变成 50mL。离心分离（900rpm、5分钟）后、弃去上清，慢慢将细胞拨开后，通过刻度吸管吸入、吐出，将细胞温和地悬浮于 HAT 培养基 100mL 中。

按照 100 μ L/孔，将该悬浮液分注于 96 孔培养用板，在 5% CO₂ 培养箱中、于 37℃ 培养 10~14 日。用实施例 1 (4) 所述的酶免疫测定法研究该培养上清，选择与人 SCGF 部分肽 (化合物 1) 反应，而与其它的 SCGF 部分肽的序列 1 的 140~156 位氨基酸序列构成的肽不反应的孔，再换成 HT 培养基和正常培养基，重复进行 2 次克隆，确立了抗人 SCGF 单克隆抗体产生杂交瘤 KM2141、KM2142、KM2143、KM2144、KM2145。

(7) 单克隆抗体的纯化

按照 5~20 $\times 10^6$ 细胞/只将实施例 1 (6) 中得到的杂交瘤株分别注射到降植烷处理的 8 周龄裸雌小鼠 (Balb/c) 腹腔内。于 10~21 日后，杂交瘤进行癌性腹水化。从积存腹水的小鼠采取腹水 (1~8mL/只)，离心分离 (3,000rpm、5 分钟) 后除去固体成分。单克隆抗体为 IgM 时，用 50% 硫酸铵进行盐析，用添加了氯化钠 0.5M 的 PBS 透析后、以流速 15mL/时通过 Cellulofine GSL2000 (生化学工业公司生产) (柱体积 750mL) 柱，收集 IgM 级分，作为纯化单克隆抗体。单克隆抗体为 IgG 时，通过辛酸沉淀法 [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] 进行纯化，作为纯化单克隆抗体。

抗体的亚类使用亚类分型试剂盒通过酶免疫测定法决定 (表 1)。

(表 1)

抗体名	抗体类型
KM2141	G2a
KM2142	G2a
KM2143	G2a
KM2144	G2a
KM2145	G1

(8) 与人 SCGF 部分肽的反应性 (酶免疫测定法)

通过(4)所示的酶免疫测定法研究实施例1(6)中选择的抗人 SCGF 单克隆抗体与人 SCGF 部分肽(化合物1)的反应性。作为对照肽使用与化合物1不同的 SCGF 部分肽 - 由序列1的140~156位的氨基酸序列构成的肽。就象图1所表示的那样,抗人 SCGF 单克隆抗体(KM2141~2145)与化合物1特异反应,而与对照肽不反应。

实施例2.利用动物细胞的人 SCGF 的表达和纯化

(1)人 SCGF 表达用质粒 pAGE-SCGF α 的构建和人 SCGF 在动物细胞中的表达

通过将动物细胞用表达载体 pAGE210(WO96/34016)的 HindIII/KpnI 处理片段与编码 SCGF 蛋白质的 DNA [Mio et.al., BBRC 249, 124-130 (1998)] 连接,构建人 SCGF 表达载体 pAGE-SCGF α 。

质粒向动物细胞的导入按照宫地等人方法通过电穿孔法 [Miyaji et al., Cytotechnology, 3, 133-140 (1990)] 进行。将 4 μ g 的 pAGE-SCGF-a 导入到 4×10^6 个的 dhfr 基因缺损的 CHO 细胞株 [Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220 (1980)]。将该细胞悬浮于 10mL 的 MEMa2000-dFCS(5)培养基[含有 5% dFCS、1/40 量的 7.5% NaHCO₃、3% 的 200mL 谷氨酰胺溶液 (GIBCO/BRL 公司生产)、0.5% 青霉素·链霉素溶液 (GIBCO/BRL 公司生产、含有 5,000 单位/mL 青霉素和 5,000 mg/mL 链霉素)的 MEM a2000 培养基 (GIBCO/BRL 公司生产)] 中,加入到 10cm 板 (IWAKI 公司生产)中,在 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱中培养 24 小时。按照终浓度 0.3 mg/mL 添加潮霉素 (GIBCO/BRL 公司生产),再培养 1~2 周。转化细胞达到铺满时回收,悬浮于含有 0.3mg/mL 潮霉素、50nmol/L methotrexate (MTX) 的 MEMa2000-dFCS(5)培养基,使得细胞数为 $1 \sim 2 \times 10^6$ 细胞/mL,然后将 2 mL 分注到 F75 烧瓶 (Greiner 公司生产)。培养 1~2 周后、按照 $1 \sim 2 \times 10^5$ 细胞/mL 将 50nmol/L MTX 抗性的细胞悬浮于含有 0.3 mg/mL 潮霉素、200nmol/L MTX 的 MEMa2000-dFCS(5)培养基,然后将 2 mL 分注到 F75 烧瓶 (Greiner 公司生产)。培养 1~2 周后、得到 200nmol/L MTX 抗性的细胞。使用下面给出的培养基 1)

和培养基 2) 用 2 L 的摇瓶 (Greiner 公司生产) 于 37°C、80 转/分下对该 200 nmol/L MTX 抗性细胞进行培养。

培养基 1) 无血清 Ex-cell 301 培养基 (JRH Biosciences 公司生产)
培养基 2) 含有 10mg/L 的 aprotinin (Sigma 公司生产) 的无血清 Ex-cell 301 培养基

培养约 5 日后, 对细胞进行离心分离, 得到培养上清样品。

(2) 通过使用单克隆抗体 KM2142 的 Western 印迹确认培养上清中的 SCGF 蛋白质的存在

通过使用实施例 1 得到的抗人 SCGF 单克隆抗体 KM2142 的 Western 印迹, 利用以下方法确认上述 (1) 得到的培养上清中 SCGF 蛋白质的存在。

通过 SDS-PAGE 对下面叙述的 (3) 和 (4) 的 SCGF 蛋白质的经层析纯化的各纯化级分进行分离后, 按照 P. Matsudaira 的方法 [J.B.C. 262, 10035-10038 (1987)] 电转移到 PVDF 膜 (Immobilon Transfer Membranes, Millipore 公司生产)。转印膜于封闭溶液 [含有 1% BSA 的 PBS 缓冲液 (137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 9.6 mmol/L Na₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 7.2))] 中振荡 30 分钟后, 在含有用封闭溶液稀释到 1mg/mL 的抗 SCGF 单克隆抗体的溶液中于室温振荡 60 分钟。该转印膜再用含有 0.05% Tween20 的 PBS 缓冲液清洗 2 次 (每次 5 分钟), 用 PBS 缓冲液实施 1 次 5 分钟清洗后, 在用 PBS 将过氧化物酶标记的抗大鼠 IgG 抗体 (anti-rat immunoglobulin 1.3g/L, DAKO 公司生产) 稀释到 1/1,000 的溶液中, 于室温振荡 60 分钟。用含有 0.05% Tween20 的 PBS 缓冲液清洗 2 次 (每次 5 分钟), 用 PBS 缓冲液实施 1 次 5 分钟清洗后, 通过发光法 (ECL Western blotting detection reagents, Amersham Pharmacia Biotech 公司生产) 进行检测。

(3) 从 CHO 细胞培养上清纯化人 SCGF 蛋白质

为了制作实施例 3 所述的抗人 SCGF 单克隆抗体, 通过以下 2 阶段的层析从上述 (1) 的培养基 1) 的培养条件下得到的 CHO 细胞培养上清取得纯化人 SCGF 蛋白质。

第 1 阶段：锌螯合层析

将用 Zn^{2+} 离子饱和的 Chelating Sepharose Fast Flow 载体 (Amersham Pharmacia Biotech 公司生产) 充填到 2.5 cm ϕ \times 20 cm 柱 (BioRad 公司生产), 直至 11 cm 的高度, 用含有 0.5mol/L 氯化钠的 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.1) 平衡。然后将上述 (1) 得到的 CHO 细胞培养上清 2.4L 添加到平衡后的柱子上, 用同一缓冲液充分清洗后, 用 0~100 mmol/L 组氨酸直线浓度梯度进行洗脱。用洗脱级分的一部分进行 SDS-PAGE, 回收含有通过利用上述 (2) 所示的单克隆抗体 KM2142 的 Western 印迹交叉的约 45kDa 带的级分。

第 2 阶段：MonoQ 阴离子交换层析

向上述锌螯合层析粗纯化级分添加终浓度达到 65% 的硫酸铵, 搅拌后、于 4℃ 下放置 2 小时。将经 18,800 \times g、30 分钟离心分离得到的沉淀溶解于 10mmol/L Tris 盐酸缓冲液 (pH 7.0) 中, 添加到用同一 Tris 盐酸缓冲液平衡的 MonoQ HR 5/5 柱 (Amersham Pharmacia Biotech 公司生产) 上。用同一缓冲液充分清洗后, 用 0~1 mol/L 氯化钠直线浓度梯度进行洗脱。用洗脱级分的一部分进行 SDS-PAGE, 回收通过利用上述 (2) 所示的单克隆抗体 KM2142 的 Western blotting 交叉的约 45kDa 带的级分 (图 2 的带 2)。

(4) 从 CHO 培养上清进行人 SCGF 蛋白质的高纯度纯化

通过以下 3 个阶段的层析由上述 (1) 的培养基 2) 培养条件下得到的 CHO 细胞培养上清纯化, 取得在实施例 6 所述的人 SCGF 定量体系中使用的人 SCGF 蛋白质标准品。

第 1 阶段：锌螯合层析

将被 Zn^{2+} 离子饱和的 Chelating Sepharose Fast Flow 载体 (Amersham Pharmacia Biotech 公司生产) 充填到 5.0cm ϕ \times 20cm 柱 (BioRad 公司生产), 直至达到 14.5cm 的高度, 用含有 0.5mol/L 氯化钠的 20mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.1) 平衡。将上述 (1) 得到的 CHO 细胞培养上清 12L 添加到柱上, 用同一缓冲液充分清洗后、用 0~100mmol/L 组氨酸直线浓度梯度进行洗脱。用洗脱级分的一部分进行

SDS-PAGE, 回收通过利用上述(2)所示的 KM2142 的 Western 印迹交叉的约 45kDa 带级分。

第 2 阶段: MonoQ 阴离子交换层析

向上述锌螯合层析粗纯化级分添加使终浓度达到 65% 的硫酸铵, 搅拌后、于 4℃ 下放置 2 小时。将经 18,800 × g、30 分钟离心分离得到的沉淀溶解于 10mmol/L Tris 盐酸缓冲液(pH 7.0)中, 添加到用同一 Tris 盐酸缓冲液平衡的 MonoQ HR 10/10 柱 (Amersham Pharmacia Biotech 公司生产) 上。用同一缓冲液充分清洗后, 用 0~1 mol/L 氯化钠直线浓度梯度进行洗脱。用洗脱级分的一部分进行 SDS-PAGE, 回收通过利用上述(2)所示的单克隆抗体 KM2142 的 Western blotting 交叉的约 45kDa 带的级分。

第 3 阶段: S-400 凝胶过滤层析

将 Sephacryl S-400 HR 载体 (Amersham Pharmacia Biotech 公司生产) 充填到 XK50/60 柱 (Amersham Pharmacia Biotech 公司生产), 充填高度达到 51.5cm 的柱和充填达到 XK50/100 柱 (Amersham Pharmacia Biotech 公司生产), 充填高度达到 93cm 的柱串联连结, 用 PBS 缓冲液充分平衡。将上述 MonoQ 阴离子交换层析纯化级分 28mL 添加到串联柱, 以 6mL/分的流速通过 PBS 缓冲液进行洗脱。用洗脱级分的一部分进行 SDS-PAGE, 回收通过利用上述(2)所示单克隆抗体 KM2142 的 Western blotting 交叉的约 45kDa 的带的级分。

(5) 人 SCGF 蛋白质的 N 末端氨基酸序列解析

实施例 2(3) 得到的纯化人 SCGF 蛋白质的 N 末端氨基酸序列可以根据蛋白质化学的常规方法决定。将含有纯化人 SCGF 蛋白质的级分进行 SDS-PAGE 后、通过银染色 (图 2 带 2) 或 P. Matsudaira 的方法电转印到 PVDF 膜 (ProBlott, Applied Biosystems 公司生产)。转印的膜进行考马斯亮蓝染色, 切下看到的分子量为 45kDa (图 2 带 2、带 A)、41kDa (图 2 带 2、带 B)、34kDa (图 2 带 2、带 C) 的各个带, 用气相蛋白测序仪 (PPSQ-10、岛津制作所) 通过制造商推荐的方法确定氨基酸序列。得到的氨基酸序列就象序列 5、6、7 所记

载的那样,分别与从序列 1 记载的 SCGF 的氨基酸序列的 N 末端起第 1 个氨基酸残基、第 29 个氨基酸残基、第 60 个氨基酸残基开始的氨基酸序列一致。以下,将图 2 带 2 所示的看到的分子量约 41kDa 的 N 末端 28 残基缺失 SCGF 蛋白质称为 $\Delta 28$ 体、约 34kDa 的 N 末端 59 残基缺失 SCGF 蛋白质称为 $\Delta 59$ 体。

实施例 3.使用 CHO 细胞表达人 SCGF 蛋白质制作抗人 SCGF 单克隆抗体

(1) 动物的免疫和抗体产生细胞的制备

将实施例 2 (3) 得到的 CHO 细胞表达人 SCGF 蛋白质 (SCGF、 $\Delta 28$ 体、 $\Delta 59$ 体的 SCGF 混合物) 100 μ g 与铝凝胶 2mg 以及百日咳疫苗 (千叶县血清研究所生产) 1×10^9 细胞一起注入到 6 周龄雌小鼠 (Balb/c) 体内, 2 周以后, 每隔 1 周注入 100 μ g 的人 SCGF 蛋白, 共计注入 3 次。由眼底静脉丛采血, 通过实施例 1 (4) 所示的酶免疫测定法 (但对于分析用的抗原使用 CHO 细胞表达人 SCGF 蛋白质、作为对照抗原使用 1% BSA - PBS。) 以及以下给出的夹层 ELISA 法研究该血清抗体效价, 在最终免疫 3 天后从表现出充分抗体效价的小鼠摘出脾脏。

抗体产生细胞的制备与实施例 1 (3) 同样进行。

(2) 夹层 ELISA 法

将实施例 1 得到的抗人 SCGF 单克隆抗体 KM214296 (10 μ g/mL) 按照 50 μ L/孔分注于 96 孔 EIA 板 (Greiner 公司生产), 于 4 $^{\circ}$ C 下放置过夜, 使其吸附。洗净后, 按照 100 μ L/孔加 1% BSA-PBS, 于室温下反应 1 小时, 对残余的活性基进行封闭。弃去 1% BSA-PBS, 按照 50 μ L/孔分注用 1% BSA-PBS 稀释的 CHO 细胞表达人 SCGF 蛋白质 (5 μ g/mL), 于室温下反应 2 小时。作为对照按照 50 μ L/孔分注 1% BSA-PBS, 同样使其反应。用 Tween-PBS 洗净后, 按照 50 μ L/孔分注上述 (1) 得到的被免疫小鼠抗血清的培养上清, 反应 2 小时。用 Tween-PBS 洗净后、按照 50 μ L/孔加注过氧化物酶标记抗小鼠免疫球蛋白 (大鼠血清蛋白吸收过; CALTAG 公司生产), 于室温下反应 1

小时。用 Tween-PBS 洗净后、用 ABTS 底物液 [2,2-连氮二 (3-乙基苄基噻唑-6-磺酸) 铵] 使其发色, 通过酶标板比色仪 (Emax; Molecular Devices 公司生产) 测定 OD415nm 的吸光度。

(3) 小鼠骨髓瘤细胞的制备

象实施例 1 (5) 那样进行制备。

(4) 杂交瘤的制作

与实施例 1 (6) 同样进行实施例 3 (1) 得到的小鼠脾细胞和 (3) 得到的骨髓瘤细胞的细胞融合。

按照 100 μ L/孔将得到的细胞悬浊液分注到 96 孔培养用板, 在 5%CO₂ 培养箱中、于 37℃ 下培养 10~14 日。通过实施例 3 (2) 所述的夹层 ELISA 法研究该培养上清, 选择与人 SCGF 蛋白质反应, 而与作为对照的 1%BSA-PBS 不反应的孔, 再换成 HT 培养基和正常培养基, 重复 2 次克隆, 确立抗人 SCGF 单克隆抗体产生杂交瘤 KM2801、KM2802、KM2803 和 KM2804。

(5) 单克隆抗体的纯化

与实施例 1 (7) 同样, 将实施例 3 (4) 得到的杂交瘤株注射到裸雌小鼠腹腔内, 从得到的腹水取得纯化单克隆抗体。

抗体的亚类使用亚类分型试剂盒通过酶免疫测定法决定。表 2 给出了该结果。

(表 2)

抗体名	抗体种类
KM2801	G1
KM2802	G1
KM2803	G1
KM2804	G1

(6) 与 CHO 细胞表达人 SCGF 蛋白质的反应性 (酶免疫测定法)

通过实施例 1 (4) 给出的酶免疫测定法研究实施例 3 (4) 得到的

抗人 SCGF 单克隆抗体与 CHO 细胞表达人 SCGF 蛋白质的反应性。就象图 3 所示的那样，抗人 SCGF 单克隆抗体（KM2801、KM2802、KM2803 和 KM2804）与 CHO 细胞表达人 SCGF 蛋白质特异反应，而与对照 1% BSA-PBS 不反应。

实施例 4. 使用 SDS 变性人 SCGF 蛋白质（CHO 细胞表达）制作抗人 SCGF 单克隆抗体。

使用实施例 3 记载的未变性人 SCGF 蛋白质作为免疫原时，不能得到与 $\Delta 59$ 体反应的单克隆抗体。因此为了制作与 $\Delta 59$ 体反应的单克隆抗体，尝试用 SDS 变性 SCGF 作为免疫原制作杂交瘤。

（1）免疫原的制备

制作加 SDS（十二烷基硫酸钠；Nacalai Tesque 公司生产）使实施例 2（3）得到的 CHO 细胞表达人 SCGF 蛋白质变性的人 SCGF 蛋白质，作为免疫原。即制备 5% SDS - PBS，向 CHO 细胞表达人 SCGF 蛋白质中加入其 9 分之一量，将于 100℃ 下煮沸 5 分钟后的变性蛋白作为 SDS 变性人 SCGF 蛋白质。

（2）动物的免疫和抗体产生细胞的制备

将实施例 4（1）得到的 SDS 变性的人 SCGF 蛋白质 100 μ g 与铝凝胶 2mg 以及百日咳疫苗（千叶县血清研究所生产） 1×10^9 细胞一起注入到 6 周龄雌小鼠（Balb/c）体内，2 周以后，每隔 1 周注入 100 μ g 的 SDS 变性的人 SCGF 蛋白，共计注入 3 次。由眼底静脉丛采血，通过实施例 1（4）所示的酶免疫测定法（应予说明，对于分析用的抗原使用 SDS 变性的人 SCGF 蛋白质、作为对照抗原使用 1% BSA - PBS）研究该血清抗体效价，在最终免疫 3 天后从表现出充分抗体效价的小鼠摘出脾脏。

抗体产生细胞的制备与实施例 1（3）同样进行。

（3）小鼠骨髓瘤细胞的制备

用与实施例 1（5）记载方法同样的方法进行制备。

（4）杂交瘤的制作

与实施例 1（6）同样进行实施例 4（2）得到的小鼠脾细胞和（3）

得到的骨髓瘤细胞的细胞融合。

按照 100 μ L/孔将得到的细胞悬浊液分注到 96 孔培养用板，在 5%CO₂ 培养箱中、于 37℃ 下培养 10~14 日。通过实施例 1(4) 所述的夹层 ELISA 法研究该培养上清，选择与 SDS 变性的人 SCGF 蛋白质反应，而与作为对照的 1%BSA-PBS 不反应的孔，再换成 HT 培养基和正常培养基，重复 2 次克隆，确立抗人 SCGF 单克隆抗体产生杂交瘤 KM2941、KM2942、KM2943、KM2944 和 KM2945。

(5) 单克隆抗体的纯化

与实施例 1(7) 同样将实施例 4(4) 中得到的杂交瘤株注入到裸雌小鼠的腹腔内，从得到的腹水中取得纯化单克隆抗体。

抗体的亚类用亚类分型试剂盒通过酶免疫测定法决定。该结果表示在表 3 中。

(表 3)

抗体名	抗体类型
KM2941	G1
KM2942	G1
KM2943	G1
KM2944	G1
KM2945	G1

(6) 与 SDS 变性人 SCGF 蛋白质的反应性 (酶免疫测定法)

通过实施例 1(4) 给出的酶免疫测定法研究实施例 4(4) 得到的抗人 SCGF 单克隆抗体与 SDS 变性人 SCGF 蛋白质的反应性。就象图 4 所示的那样，抗人 SCGF 单克隆抗体 (KM2941、KM2942、KM2943、KM2944 和 KM2945) 与 SDS 变性人 SCGF 蛋白质特异反应，而与作为对照的 1%BSA-PBS 不反应。

实施例 5. 抗人 SCGF 单克隆抗体的反应性的研究

(1) 对人和小鼠 SCGF 蛋白质的反应性

用酶免疫测定法（结合 ELISA）研究实施例 1、3 和 4 制作的抗人 SCGF 单克隆抗体对人和小鼠 SCGF 蛋白质的反应性。小鼠 SCGF 蛋白质参照实施例 2 记载的方法制作。

作为分析用的抗原使用 CHO 细胞表达的人和小鼠 SCGF 蛋白质，按照实施例 1（4）记载的方法进行。结果如图 5 所示。

抗 SCGF 单克隆抗体 KM2142 是使用来自相当于序列 1 所示的 SCGF 的氨基酸序列的 N 末端的第 6 个残基直至第 25 个残基的部分肽（化合物 1）作为抗原制作的杂交瘤的抗体。抗 SCGF 单克隆抗体 KM2142 对 SCGF 蛋白质也表现出反应性。而且，抗 SCGF 单克隆抗体 KM2142 对人和小鼠 SCGF 蛋白质两方都具有反应性。

抗 SCGF 单克隆抗体 KM2804 是来自用 CHO 细胞表达人 SCGF 作为抗原制作的杂交瘤的抗体。抗 SCGF 单克隆抗体 KM2804 只与人 SCGF 反应，而对小鼠 SCGF 没有表现出交叉反应性。

抗 SCGF 单克隆抗体 KM2945 是来自用 SDS 变性 SCGF 蛋白质（CHO 细胞表达）作为抗原制作的杂交瘤的抗体。抗 SCGF 单克隆抗体 KM2945 对未变性的 SCGF 蛋白质也表现出反应性。但抗 SCGF 单克隆抗体 KM2945 对小鼠 SCGF 没有表现出交叉反应性。

（2）Western blotting

使用实施例 2（3）得到的 CHO 细胞表达人 SCGF 蛋白质，对实施例 3 和 4 制作的抗人 SCGF 单克隆抗体 KM2804 以及 KM2945 在 Western 印迹中的反应性进行研究。

与实施例 2（2）同样将转印到 PVDF 膜的样品在封闭溶液中于室温下振荡 30 分钟后，在用封闭溶液稀释到 1mg/mL 的抗 SCGF 单克隆抗体中于室温下振荡 60 分钟。转印膜再用含有 0.05% Tween20 的 PBS 缓冲液洗 2 次（每次 5 分钟），用 PBS 缓冲液洗 1 次（5 分钟）后，再于用 PBS 稀释到 1/1,000 的过氧化物酶标记抗小鼠 IgG 抗体（Amersham Pharmacia Biotech 公司生产）溶液中于室温下振荡 60 分钟。用含有 0.05% Tween20 的 PBS 缓冲液洗 2 次（每次 5 分钟），用 PBS 缓冲液洗 1 次（5 分钟）后，通过上述的 ECL 发光法进行检测。

图 2 中的带 3、4、5 分别表示使用 KM2142、KM2804、KM2945 的纯化人 SCGF 蛋白质的 Western blotting 结果。KM2804 虽然对 N 末端缺失 59 个残基的 SCGF 蛋白质 $\Delta 59$ 体没有反应性，但对全长 SCGF 以及 N 末端缺失 28 个残基的 SCGF 蛋白质 $\Delta 28$ 体有反应性。而 KM2945 对全长 SCGF 和各缺失体都有反应性。

实施例 6.人 SCGF 定量体系

通过以下方法对实施例 1 得到的抗人 SCGF 单克隆抗体 KM2142 进行生物素标记。用 PBS 将实施例 1 得到的 KM2142 纯化抗体稀释到 1mg/mL，加 1/4 容量的 0.5mol/L 碳酸缓冲液 (pH 9.2)。再于搅拌下滴加与缓冲液同量的 NHS-Lc-Biotin (用二甲基甲酰胺溶解成 1mg/mL; Pierce 公司生产)。于室温下进行 3 小时搅拌反应后，将用 PBS 透析过夜的溶液用作生物素标记 KM2142。

按照 50 μ L/孔向 96 孔的 EIA 用板 (Greiner 公司生产) 分注实施例 3 得到的 5 μ g/mL 的抗人 SCGF 单克隆抗体 KM2804，于 4 $^{\circ}$ C 下放置过夜使其吸附。洗涤后、按照 100 μ L/孔加 1%BSA-PBS，于室温下反应 1 小时，对残留的活性基进行封闭。弃去 1%BSA-PBS，按照 50 μ L/孔，将用血清稀释液 (协和 Medex 公司生产) 以从 17.5ng/mL 开始 2 倍稀释系列对实施例 2 (4) 得到的 CHO 细胞表达人 SCGF 蛋白质稀释 14 点后的样品进行分注，于室温下反应 2 小时。用 Tween-PBS 洗涤后，按照 50 μ L/孔加上述得到的生物素标记 KM2142 (用 BSA-PBS 稀释到 0.2 μ g/mL)，于室温下反应 2 小时，用 Tween-PBS 洗涤后、再按照 50 μ L/孔加稀释了 32,000 倍的碱性磷酸酶标记抗生物素蛋白 (ザイメッド公司生产)，于室温反应 1 小时。用 Tween-PBS 洗涤后，用 AmpliQ (DAKO 公司生产) 发色，通过酶标板比色仪 (E-max; Molecular Devices 公司生产) 测定 OD490nm 的吸光度。测定结果就象图 6 所示那样，通过本定量体系可以在 0.04 ~ 2.0ng/mL 范围对人 SCGF 蛋白质进行定量。

实施例 7.白血病、前白血病患者以及非白血病性恶性血液疾病的血清 SCGF 浓度

通过实施例 6 的方法对获得同意书的白血病、前白血病患者以及非白血病性恶性血液疾病患者的血清中的 SCGF 浓度进行测定。另外，将血细胞检查值表现出正常值的男女 10 名健康人作为对照例同样进行血清中 SCGF 浓度的测定。图 7 给出了测定结果。

确认健康人的值的分布表现出正态分布后，从该组计算与平均值的标准偏差 (SD)，将平均值 + 2SD 的值设定为区别正常和异常的基准值。以该基准值为基础，将白血病、前白血病患者以及非白血病性恶性血液疾病的值分为正常·异常，确认能否用 SCGF 测定值检测白血病、前白血病患者以及非白血病性恶性血液疾病。表 4 给出了确认的结果。

(表 4)

	患者数	阳性者数	阳性率(%)
ALL	7	7	100.0
AML	7	6	85.7
CML	6	6	100.0
MDS	5	5	100.0
NHL	7	6	85.7
MM	6	4	66.7
AA	7	0	0.0

临界值为健康人的平均值+2SD=18.2ng/mL。

与健康人组比较，表明急性骨髓性白血病 (AML)、急性淋巴性白血病 (ALL)、慢性骨髓性白血病 (CML)、骨髓发育异常综合征 (MDS)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、多发性骨髓瘤 (MM) 患者的中央值有显著意义的高，SCGF 测定值在这些疾病中有显著意义地上升 (图 7)。

另外表明用由健康人的值确定的临界值可以高灵敏度地检测白血

病、前白血病患者以及非白血病性恶性血液疾病（表4）。另一方面，虽然都是血液疾病，再生障碍性贫血（AA）患者的值观察不到与健康人的显著性差异，即使用临界值也检测不出该疾病。

如果对伴随血液细胞数异常的疾病非霍奇金淋巴瘤（NHL）、多发性骨髓瘤（MM）、骨髓发育异常综合征（MDS）、急性骨髓性白血病（AML）、急性淋巴性白血病（ALL）、慢性骨髓性白血病（CML）进行比较，急性骨髓性白血病（AML）、急性淋巴性白血病（ALL）、慢性骨髓性白血病（CML）等白血病患者血液中的 SCGF 浓度比非霍奇金淋巴瘤（NHL）、多发性骨髓瘤（MM）、骨髓发育异常综合征（MDS）等其它的前白血病和非白血病性恶性血液疾病患者的血液中的 SCGF 浓度有显著意义的高，血液中的 SCGF 浓度可以用于白血病与前白血病或非白血病性恶性血液疾病的区别。另外如果对难以区别诊断的 AA 患者和 MDS 患者进行比较的话，MDS 患者血中的 SCGF 浓度比 AA 患者的 SCGF 浓度有显著意义的高，可以通过血中的 SCGF 浓度对两者进行区别诊断。

实施例 8.造血干细胞移植后 GVHD 发病和 SCGF 浓度

通过实施例 6 的方法在每个时期都对在取得同意书的白血病和前白血病患者中接受造血干细胞移植的 23 例内 GVHD 发病例 15 例、没有发病的 8 例血清中的 SCGF 浓度进行测定。图 8 给出了测定结果。

接受造血干细胞移植的患者的 SCGF 浓度与预处理期或再生障碍期相比，恢复期或稳定期表现出有显著意义的高值。

在接受造血干细胞移植的患者中，GVHD 发病的病例与没有发病的例子相比，由于在再生障碍期以及恢复期血清中的 SCGF 浓度有显著意义的高，所以通过测定血清中的 SCGF 浓度，可以判定 GVHD 发病。

另外对在确定临界值之后，能否判定 GVHD 发病例和非发病例进行了研究。研究结果如图 9 所示。分别测定 SCGF 浓度，通过在预处理期将临界值定为例如 5ng/mL，可以以灵敏度 87%、特异度 57%，在再生障碍期将临界值定为 10ng/mL，可以以灵敏度 87%、特异度 63%，在恢复期将临界值定为 15ng/mL，可以以灵敏度 87%、特异度

63%，与在诊断中不能使用 SCGF 时相比，可以对 GVHD 发病例和非发病例进行有显著意义($p<0.05$)地区别。

实施例 9.移植造血干细胞的存活和血清 SCGF 浓度

用实施例 6 的方法在各个时期对取得同意书的血液疾病患者中接受造血干细胞移植的 23 例中，存活延迟的 4 例、没有延迟的 19 例的血清中 SCGF 浓度进行测定。图 10 给出了测定结果。

在存活没有延迟例中，恢复期以及稳定期的 SCGF 浓度与预处理期相比有显著上升。另一方面，在存活延迟例中，在这些时期都没有观察到有显著上升。

因此，测定造血干细胞移植患者的 SCGF 浓度，对定下该临界值通过该值与各个患者的值比较能否判定造血干细胞存活延迟例和非延迟例进行了研究。图 11 给出了研究结果。在预处理期，通过将临界值定为例如 9.5ng/mL，可以以灵敏度 75%、特异度 67%，在再生障碍期通过将临界值定为 12ng/mL 可以以灵敏度 75%、特异度 63%对造血干细胞存活延迟例和非延迟例进行区别。

实施例 10.SCGF 在白血病患者末梢血细胞中的表达

用 RNeasy Mini Kit (Qiagen 公司生产) 按照程序从取得同意书的各种白血病患者末梢血细胞提取总 RNA，将总 RNA 1 μ g 用 DNaseI (GIBCO 公司生产)处理，通过 SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (GIBCO 公司生产)进行逆转录，制备 First-Strand DNA。以用 Taq Polymerase (TaKaRa 公司生产)制备的 First-Strand DNA 作为模板，将具有序列 8 和 9 以及序列 10 和 11 的碱基序列的寡 DNA 作为引物，分别对人 G3PDH、SCGF 基因的检测进行研究时，在 G3PDH 的检测量大致同等的条件下，在健康人中有 1 例没有检测到 SCGF 的表达，但在 2 例急性淋巴性白血病 (ALL) 中有 1 例、在 2 例急性骨髓性白血病 (AML) 中有 2 例检测到 SCGF 的表达。

产业上利用的可能性

本发明提供使用与 SCGF 反应的抗体对白血病、前白血病或非白

血病性恶性血液疾病进行判定的方法、对造血干细胞移植后的造血干细胞存活延迟以及移植物抗宿主病进行判定的方法、以及这些疾病的诊断药以及诊断试剂盒。

Val Glu Gly Lys Glu Asp Trp Glu Met Glu Glu Asp Gln Gly Glu Glu
 50 55 60

Glu Glu Glu Glu Ala Thr Pro Thr Pro Ser Ser Gly Pro Ser Pro Ser
 65 70 75 80

Pro Thr Pro Glu Asp Ile Val Thr Tyr Ile Leu Gly Arg Leu Ala Gly
 85 90 95

Leu Asp Ala Gly Leu His Gln Leu His Val Arg Leu His Ala Leu Asp
 100 105 110

Thr Arg Val Val Glu Leu Thr Gln Gly Leu Arg Gln Leu Arg Asn Ala
 115 120 125

Ala Gly Asp Thr Arg Asp Ala Val Gln Ala Leu Gln Glu Ala Gln Gly
 130 135 140

Arg Ala Glu Arg Glu His Gly Arg Leu Glu Gly Cys Leu Lys Gly Leu
 145 150 155 160

Arg Leu Gly His Lys Cys Phe Leu Leu Ser Arg Asp Phe Glu Ala Gln
 165 170 175

Ala Ala Ala Gln Ala Arg Cys Thr Ala Arg Gly Gly Ser Leu Ala Gln
 180 185 190

Pro Ala Asp Arg Gln Gln Met Glu Ala Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ala
 195 200 205

Ala Leu Ala Pro Tyr Asn Trp Pro Val Trp Leu Gly Val His Asp Arg
 210 215 220

Arg Ala Glu Gly Leu Tyr Leu Phe Glu Asn Gly Gln Arg Val Ser Phe
 225 230 235 240

Phe Ala Trp His Arg Ser Pro Arg Pro Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ser
 245 250 255

Ala Ser Pro His Pro Leu Ser Pro Asp Gln Pro Asn Gly Gly Thr Leu
 260 265 270

Glu Asn Cys Val Ala Gln Ala Ser Asp Asp Gly Ser Trp Trp Asp His
 275 280 285

Asp Cys Gln Arg Arg Leu Tyr Tyr Val Cys Glu Phe Pro Phe
 290 295 300

<210> 2

<211> 224

<212> PRT

<213> 人 Homo sapiens

<400> 2

Ala Arg Gly Ala Glu Arg Glu Trp Glu Gly Gly Trp Gly Gly Ala Gln
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Arg Glu Arg Glu Ala Leu Met Leu Lys His Leu Gln Glu
 20 25 30

Ala Leu Gly Leu Pro Ala Gly Arg Gly Asp Glu Asn Pro Ala Gly Thr
 35 40 45

Val Glu Gly Lys Glu Asp Trp Glu Met Glu Glu Asp Gln Gly Glu Glu
 50 55 60

Glu Glu Glu Glu Ala Thr Pro Thr Pro Ser Ser Gly Pro Ser Pro Ser
 65 70 75 80

Pro Thr Pro Glu Asp Ile Val Thr Tyr Ile Leu Gly Arg Leu Ala Gly
85 90 95

Leu Asp Ala Gly Leu His Gln Leu His Val Arg Leu His Ala Leu Asp
100 105 110

Thr Arg Val Val Glu Leu Thr Gln Gly Leu Arg Gln Leu Arg Asn Ala
115 120 125

Ala Gly Asp Thr Arg Asp Ala Val Gln Ala Leu Gln Glu Ala Gln Gly
130 135 140

Arg Ala Glu Arg Glu His Gly Arg Leu Glu Gly Cys Leu Lys Gly Leu
145 150 155 160

Arg Leu Gly His Lys Cys Phe Leu Leu Ser Arg Asp Phe Glu Ala Gln
165 170 175

Pro Ser Ala Ser Pro His Pro Leu Ser Pro Asp Gln Pro Asn Gly Gly
180 185 190

Thr Leu Glu Asn Cys Val Ala Gln Ala Ser Asp Asp Gly Ser Trp Trp
195 200 205

Asp His Asp Cys Gln Arg Arg Leu Tyr Tyr Val Cys Glu Phe Pro Phe
210 215 220

<210> 3

<211> 248

<212> PRT

<213> 人 *Homo sapiens*

<400> 3

Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val Thr
 1 5 10 15

Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys Tyr
 20 25 30

Val Pro Gly Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu Met
 35 40 45

Val Val Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe Ser
 50 55 60

Asn Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val
 65 70 75 80

Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser Lys
 85 90 95

Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe Thr Pro
 100 105 110

Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe Lys Asp
 115 120 125

Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr Leu
 130 135 140

Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met Leu
 145 150 155 160

Pro Pro Val Ala Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn
 165 170 175

Arg Lys Ala Lys Asn Pro Pro Gly Asp Ser Ser Leu His Trp Ala Ala
 180 185 190

Met Ala Leu Pro Ala Leu Phe Ser Leu Ile Ile Gly Phe Ala Phe Gly
 195 200 205

Ala Leu Tyr Trp Lys Lys Arg Gln Pro Ser Leu Thr Arg Ala Val Glu
 210 215 220

Asn Ile Gln Ile Asn Glu Glu Asp Asn Glu Ile Ser Met Leu Gln Glu
 225 230 235 240

Lys Glu Arg Glu Phe Gln Glu Val
 245

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> 人 Homo sapiens

<400> 4

Arg Glu Trp Glu Gly Gly Gly Trp Gly Gly Ala Gln Glu Glu Glu Arg
 1 5 10 15

Glu Arg Glu Ala Leu Cys
 20

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 人 Homo sapiens

<400> 5

Ala Arg Gly Ala Glu Arg Glu Trp Glu Gly
 1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人 Homo sapiens

<220>

<221> 不确定

<222> (1)

<223> Xaa 为不确定

<400> 6

Xaa Leu Gln Glu Ala Leu Gly Leu Pro Ala

1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人 Homo sapiens

<400> 7

Asp Gln Gly Glu Glu Glu Glu Glu Ala

1 5 10

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<400> 8

cccatcacca tcttccagga gc

22

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<400> 9

ttcaccacct tcttgatgtc atcata

26

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<400> 10

gtcctctttt ccctcaaca

19

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<400> 11

ttttgggggc tttggtgg

18

图1

(SCGF; 造血干细胞生长因子)

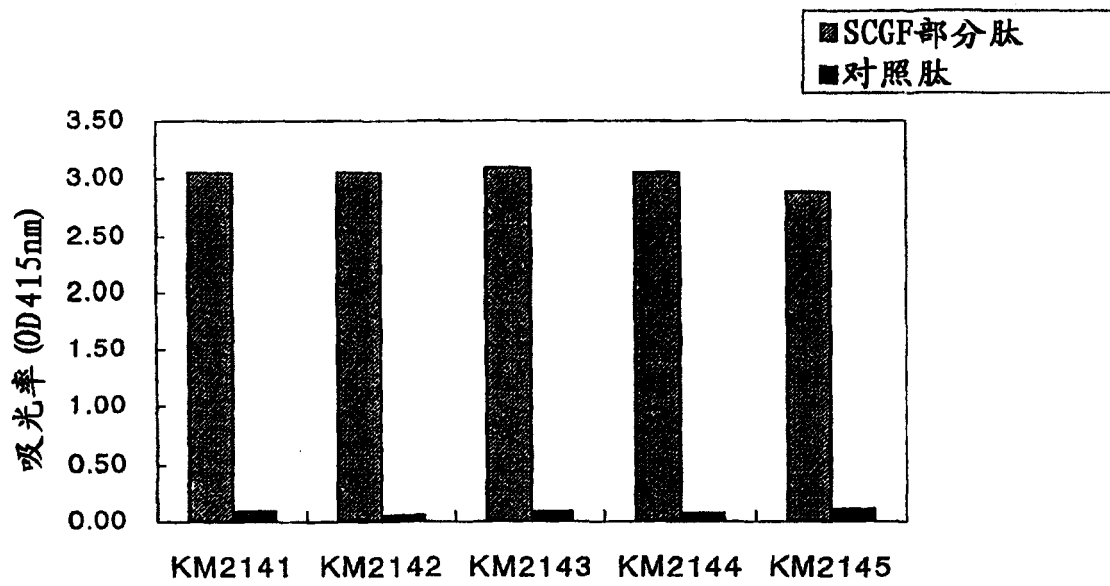


图2

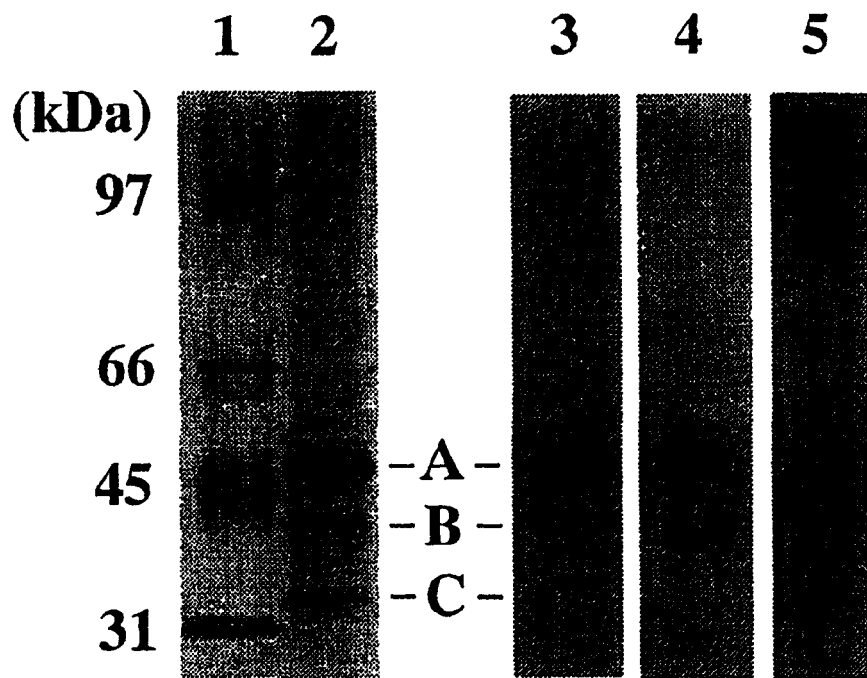


图3

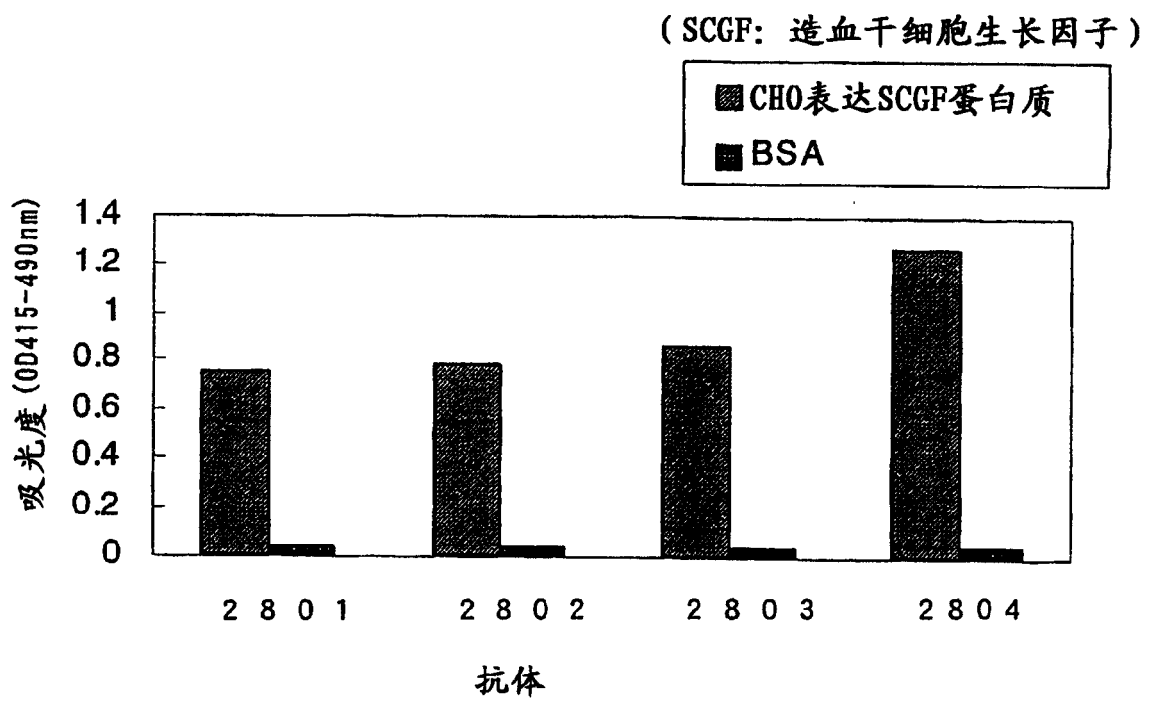


图4

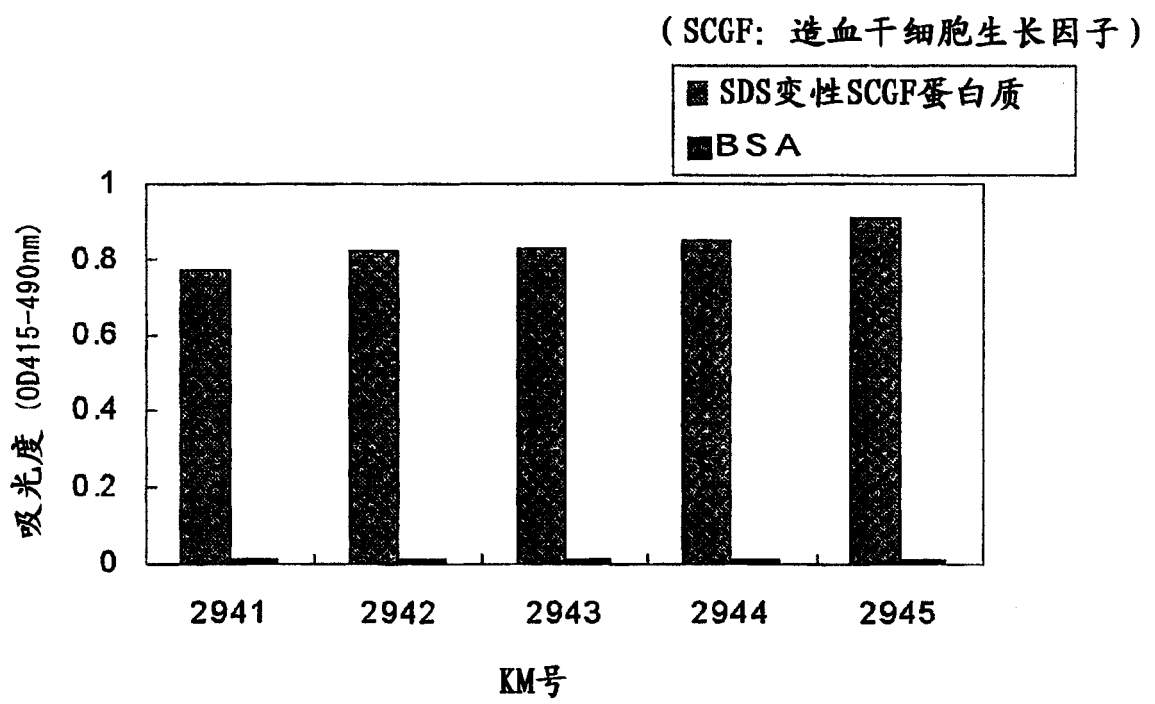


图5

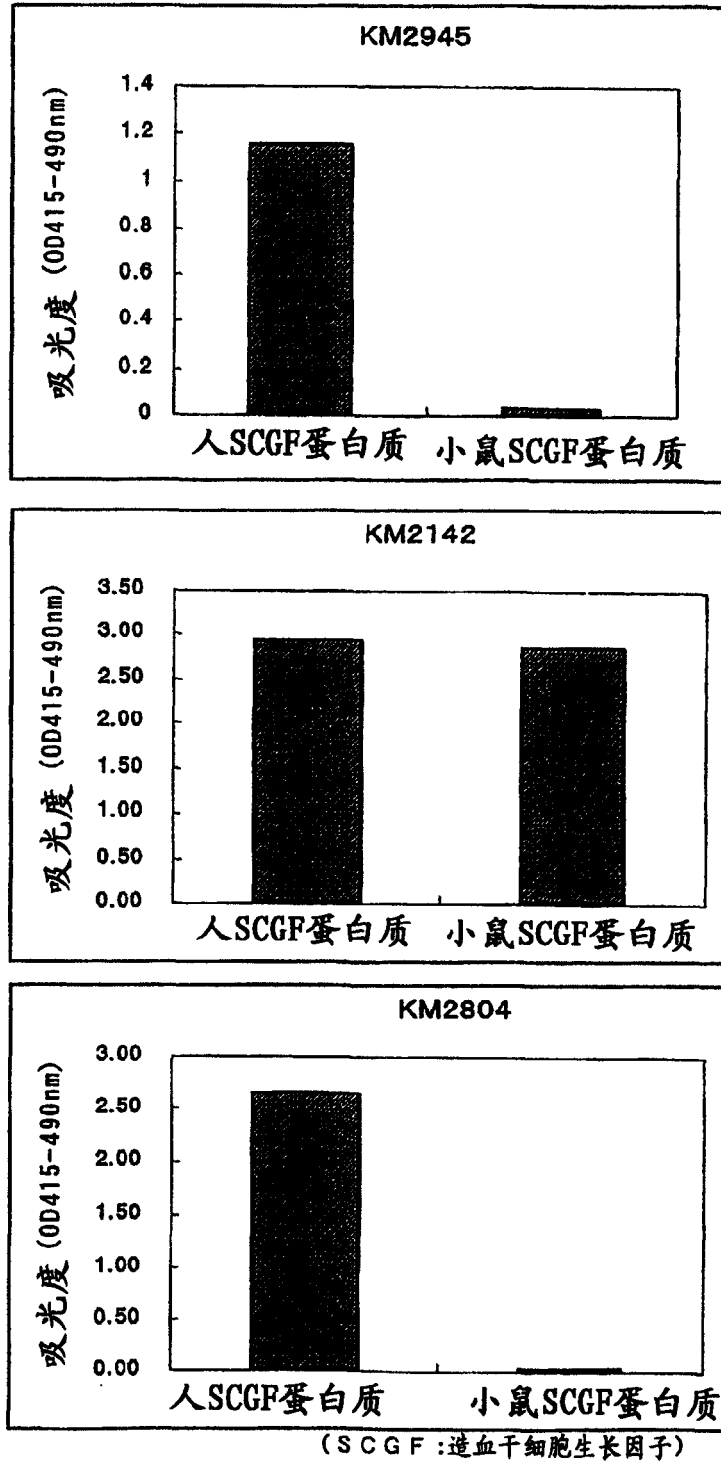


图6

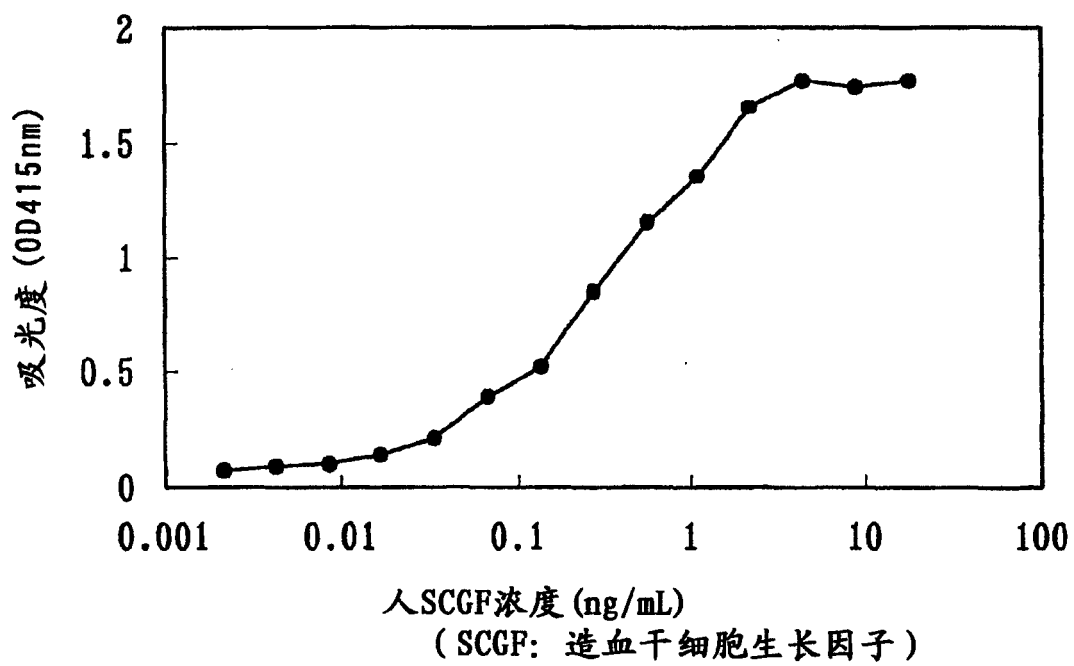


图7

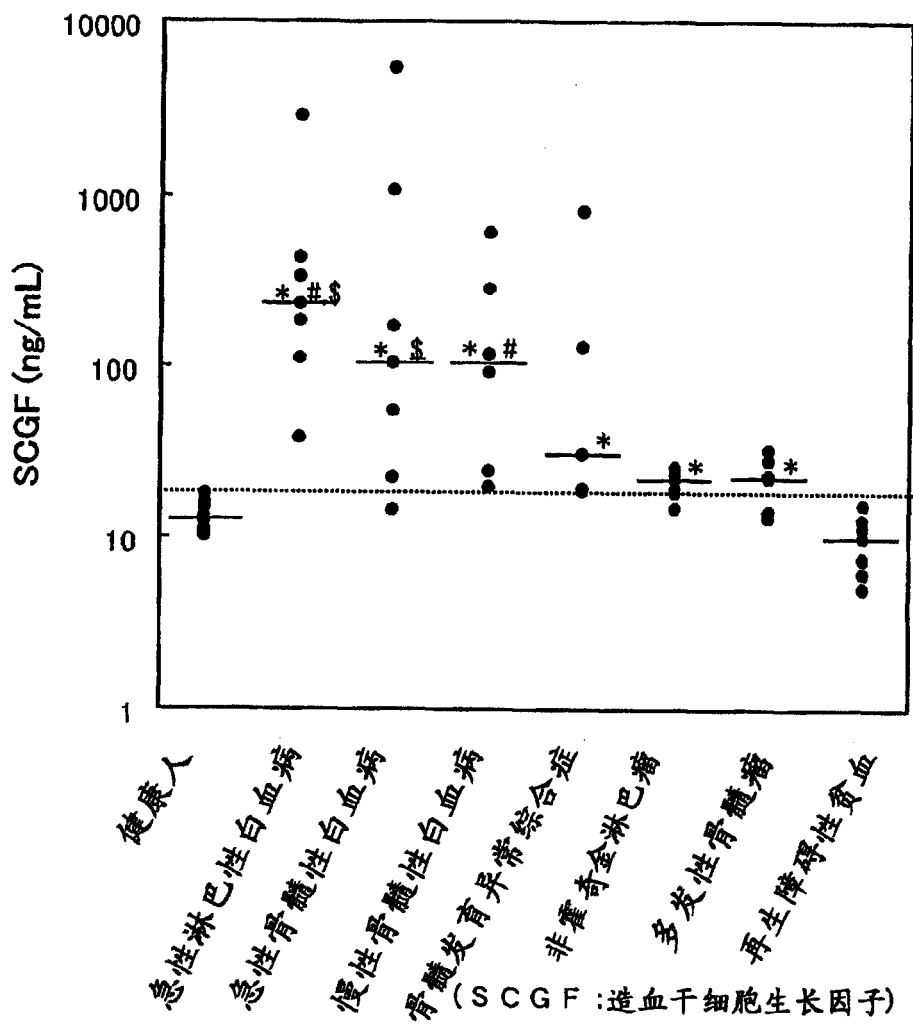
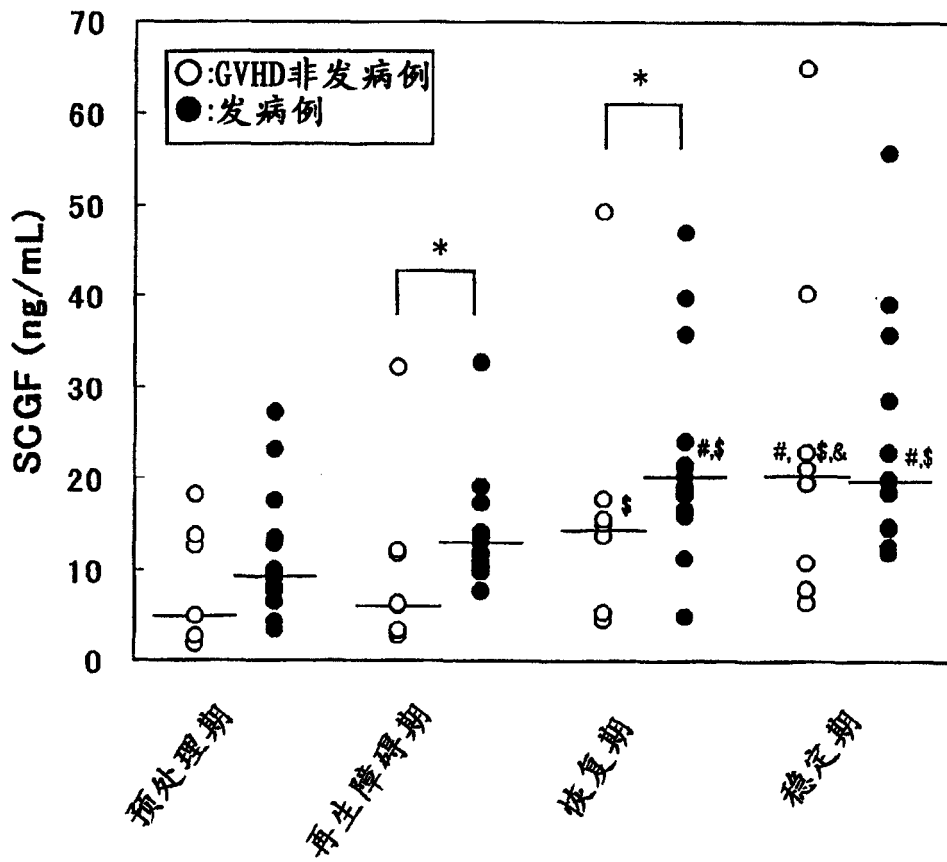
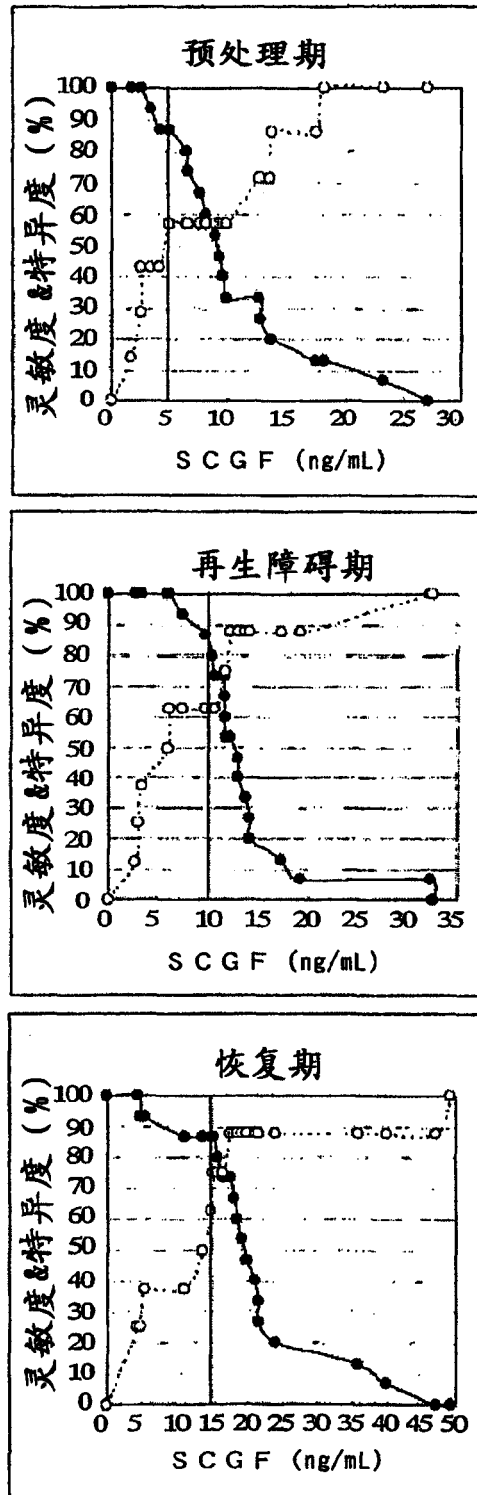


图 8



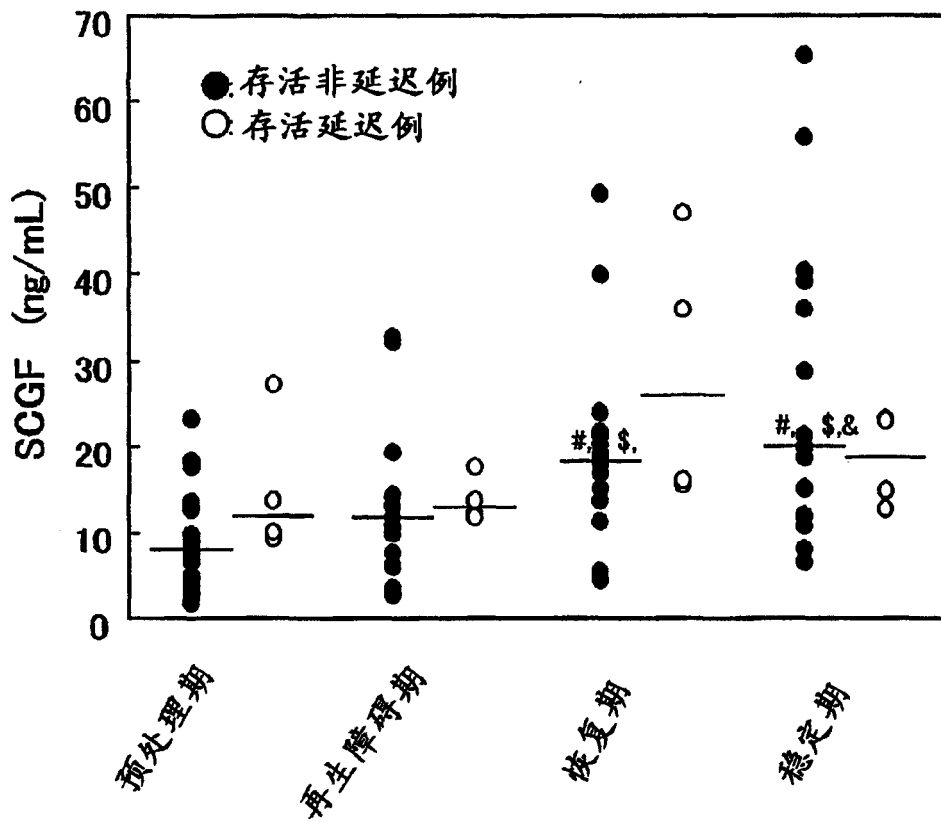
(GVHD: 移植物抗宿主反应病)
(SCGF: 造血干细胞生长因子)

图9



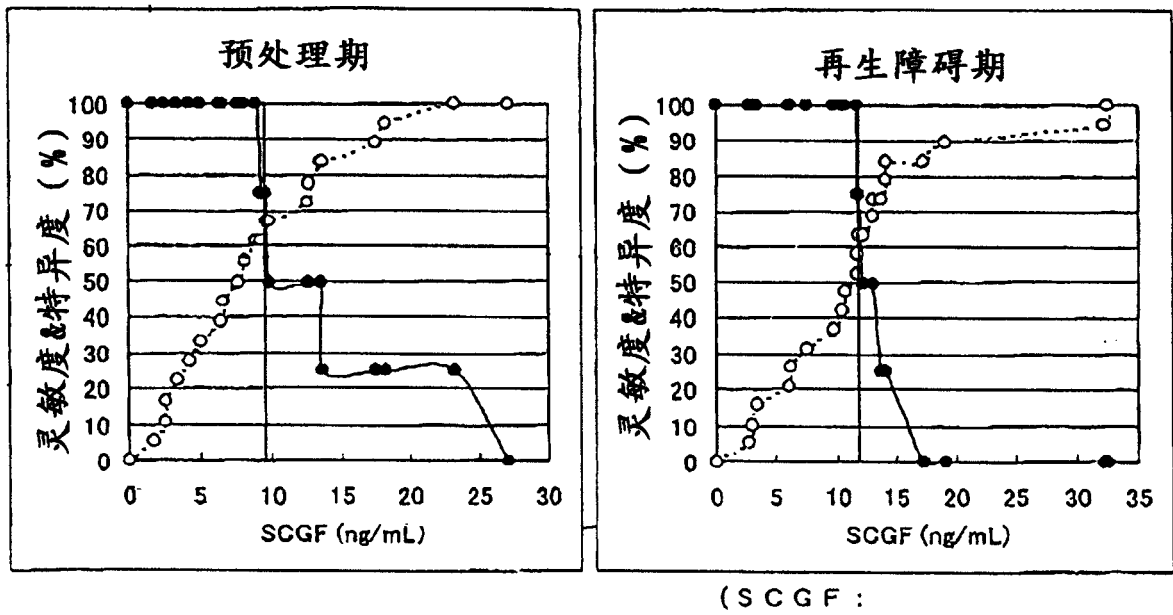
(SCGF:造血干细胞生长因子)

图10



(SCGF:造血干细胞生长因子)

图11



专利名称(译)	白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病的判定方法以及诊断药		
公开(公告)号	CN1646910A	公开(公告)日	2005-07-27
申请号	CN03808036.2	申请日	2003-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人东海大学 协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	学校法人东海大学 协和发酵工业株式会社 协和梅迪克斯株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人东海大学 协和发酵工业株式会社 协和梅迪克斯株式会社		
[标]发明人	安藤洁 堀田知光 伊东千绘 佐藤秀尚 古谷安希子 设乐研也 杉本整治 河野弘明		
发明人	安藤洁 堀田知光 伊东千绘 佐藤秀尚 古谷安希子 设乐研也 杉本整治 河野弘明		
IPC分类号	C07K16/22 G01N33/574 G01N33/53 C12N5/16		
CPC分类号	C07K16/22 G01N33/57426 G01N2333/475		
代理人(译)	陈昕		
优先权	2002106786 2002-04-09 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及以对造血干细胞生长因子(SCGF)进行定量为特征的对白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病进行判定的方法、对白血病与前白血病或非白血病性恶性血液疾病进行区别的方法、对再生障碍性贫血和骨髓发育异常综合征进行区别的方法、对造血干细胞移植后的造血干细胞的存活的状态进行判定的方法、或对移植抗宿主病进行判定的方法。还涉及作为有效成分含有与造血干细胞生长因子(SCGF)反应的抗体的白血病、前白血病或非白血病性恶性血液疾病的诊断药、造血干细胞移植后的造血干细胞的存活延迟或移植抗宿主病(GVHD)的诊断药。

