



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103408663 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201310360511. X

(22) 申请日 2009. 10. 29

(30) 优先权数据

2008-281908 2008. 10. 31 JP

2009-039411 2009. 02. 23 JP

(62) 分案原申请数据

200980149563. 4 2009. 10. 29

(73) 专利权人 东丽株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 金森智子 郑基晚 田中祥德

高山爱子

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 杨宏军 王大方

(51) Int. Cl.

C07K 16/24(2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2007026895 A1, 2007. 03. 08, 说明书第
23-25 页第 125-130 段, 第 19 页第 111 和第 113

权利要求书1页 说明书26页

序列表14页 附图7页

(54) 发明名称

抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段

(57) 摘要

本发明涉及一种抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段, 特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区, 在轻链上, CDR1 含有序列号 20 表示的氨基酸序列, CDR2 含有序列号 21 表示的氨基酸序列, 及 CDR3 含有序列号 22 表示的氨基酸序列, 在重链上, CDR1 含有序列号 23 表示的氨基酸序列, CDR2 含有序列号 24 表示的氨基酸序列, 及 CDR3 含有序列号 25 表示的氨基酸序列。

1. 一种抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,所述抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段包含轻链和重链,并且特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区,

所述轻链包含 CDR1、CDR2 和 CDR3,

所述轻链的 CDR1 的氨基酸序列如序列号 20 所示,

所述轻链的 CDR2 的氨基酸序列如序列号 21 所示,及

所述轻链的 CDR3 的氨基酸序列如序列号 22 所示;

所述重链包含 CDR1、CDR2 和 CDR3,

所述重链的 CDR1 的氨基酸序列如序列号 23 所示,

所述重链的 CDR2 的氨基酸序列如序列号 24 所示,及

所述重链的 CDR3 的氨基酸序列如序列号 25 所示。

2. 如权利要求 1 所述的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,其中,轻链可变区的氨基酸序列如序列号 26 所示,重链可变区的氨基酸序列如序列号 27 所示。

抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段

[0001] 本申请是申请日为 2009 年 10 月 29 日、申请号为 200980149563.4 (国际申请号为 PCT / JP2009 / 068587)、发明名称为“人 CXCL1 蛋白质的免疫学测定方法”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种测定人 CXCL1 蛋白质 (以下记作人 CXCL1) 的方法。更详细而言, 本发明涉及一种测定人 CXCL1 的免疫学测定方法, 所述免疫学测定方法组合使用单克隆抗体或其片段, 所述单克隆抗体或其片段与构成人 CXCL1 的氨基酸序列上的特定 3 处的部分序列区中的任一个特异性结合。另外, 本发明涉及可以在上述测定人 CXCL1 蛋白质的方法中使用的、与人 CXCL1 特异性结合的单克隆抗体或其片段。

背景技术

[0003] 人 CXCL1 是属于 CXC 家族的趋化因子的一种。已知该蛋白质在血液中存在与血小板内, 与其他 CXC 家族同样地在炎症反应时过量表达。

[0004] 近年来, 有报道称上述人 CXCL1 作为肿瘤相关因子发挥作用。因此, 人们期待通过从尿中定量地检测可以成为尿路上皮癌的标记物 (非专利文献 1、专利文献 1)。进而, 有报道指出在大肠癌、卵巢癌、恶性黑色素瘤等其他恶性肿瘤患者的组织或血液中, 人 CXCL1 在基因水平、蛋白质水平上发生变化 (非专利文献 2、非专利文献 3、非专利文献 4), 潜在地可以极早期及 / 或早期检测出尿路上皮癌及上述癌。

[0005] 然而, 在使用现有的酶免疫学测定法的测定法中, 检测上述癌所需要的灵敏度不足。例如, 专利文献 1 中记载的 R & D SYSTEMS 公司 (以下 R&D SYSTEMS 公司) 制的人 CXCL1 测定用试剂盒的检出限浓度为 20pg / mL 左右, 而健康人的尿中的人 CXCL1 浓度达不到上述检出限。因此, 期待更高灵敏度的人 CXCL1 的测定法。

[0006] 专利文献 1: W02007 / 026895

[0007] 非专利文献 1: Hiroaki Kawanishi et al, 2008, Clinical Cancer Research, vol. 14, No. 9, 2579—2587

[0008] 非专利文献 2: Gong Yang et al, 2006, PNAS, vol. 103, No. 44, 16472—16477

[0009] 非专利文献 3: Yu Wen et al, 2006, Clinical Cancer Research, vol. 12, No. 20, 5951—5959

[0010] 非专利文献 4: Jing Luan et al, 1997, Journal of Leukocyte Biology, vol. 62, No. 5, 588—597

发明内容

[0011] 因此, 本发明的一个方案的目的在于提供一种以更高灵敏度检测人 CXCL1 的免疫学测定法。更具体而言, 本发明的目的在于, 通过组合抗体或抗原识别部分的免疫学测定法, 获得以更高灵敏度检测人 CXCL1 的方法, 所述抗体或抗原识别部分与构成人 CXCL1 的氨

基酸序列中的特定 3 处的序列中的任一个特异性结合。

[0012] 另外,本发明的另一个方案的目的在于提供特异性识别人 CXCL1 的单克隆抗体或其片段。更具体而言,本发明的另一个目的在于提供一种单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段可以用于上述以更高灵敏度检测人 CXCL1 的方法、且含有特异性识别人 CXCL1 的新氨基酸序列、并且与现有抗体相比具有较高亲和性。

[0013] 本发明人等为了解决上述课题进行了深入研究,结果发现通过组合单克隆抗体或抗原识别部分进行免疫学测定,能够以比现有技术更高的灵敏度检测人 CXCL1,所述单克隆抗体或抗原识别部分与构成人 CXCL1 的氨基酸序列中的特定 3 处的部分序列区特异性结合。另外,成功地制备了含有与上述人 CXCL1 上的 3 处部分序列特异性结合的新氨基酸序列的单克隆抗体、及产生该抗体的杂交瘤。进而,分离了编码构成该抗体的氨基酸序列的基因,确定其碱基序列。由此,可以制备重组抗体及其重组片段。本发明是基于上述发现而完成的,即,提供以下 (1) ~ (15)。

[0014] (1) 一种人 CXCL1 蛋白质的免疫学测定方法,其特征在于,使用 2 种以上的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,测定样品中的人 CXCL1 或其片段,所述 2 种以上的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段特异性识别构成人 CXCL1 蛋白质的氨基酸序列的部分序列即序列号 1 ~ 3 表示的氨基酸序列中的任一序列区、且特异性识别各个不同的序列区。

[0015] (2) 如 (1) 所述的人 CXCL1 蛋白质的免疫学测定方法,其特征在于,使用特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,测定样品中的人 CXCL1 蛋白质或其片段。

[0016] (3) 如 (1) 或 (2) 所述的人 CXCL1 蛋白质的免疫学测定方法,其特征在于,使用特异性识别序列号 1 表示的氨基酸序列区的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段及特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,测定样品中的人 CXCL1 蛋白质或其片段。

[0017] (4) 如 (1) 或 (2) 所述的人 CXCL1 蛋白质的免疫学测定方法,其特征在于,使用特异性识别序列号 2 表示的氨基酸序列区的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段及特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,测定样品中的人 CXCL1 蛋白质或其片段。

[0018] (5) 如 (1) ~ (4) 中任一项所述的人 CXCL1 蛋白质的免疫学测定方法,其中,所述样品为术后收集的组织、血液、血清、血浆、尿、脊髓液、唾液、淋巴液、泪液或精液。

[0019] (6) 一种抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,是特异性识别序列号 3 表示的构成人 CXCL1 蛋白质的氨基酸序列的部分序列的单克隆抗体或其片段,在其轻链上,CDR1 含有序列号 4 表示的氨基酸序列,CDR2 含有序列号 5 表示的氨基酸序列,及 CDR3 含有序列号 6 表示的氨基酸序列,在重链上,CDR1 含有序列号 7 表示的氨基酸序列,CDR2 含有序列号 8 表示的氨基酸序列,及 CDR3 含有序列号 9 表示的氨基酸序列。

[0020] (7) 如 (6) 所述的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,其中,轻链可变区含有序列号 10 表示的氨基酸序列,重链可变区含有序列号 11 表示的氨基酸序列。

[0021] (8) 一种抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,是特异性识别序列号 1 表示的构成人 CXCL1 蛋白质的氨基酸序列的部分序列的单克隆抗体或其片段,在其轻链上,CDR1 含有序列号 12 表示的氨基酸序列,CDR2 含有序列号 13 表示的氨基酸序列,及 CDR3 含有序列号 14

表示的氨基酸序列,在重链上,CDR1 含有序列号 15 表示的氨基酸序列,CDR2 含有序列号 16 表示的氨基酸序列,及 CDR3 含有序列号 17 表示的氨基酸序列。

[0022] (9) 如 (8) 所述的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,其中,轻链可变区含有序列号 18 表示的氨基酸序列,重链可变区含有序列号 19 表示的氨基酸序列。

[0023] (10) 一种抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,是特异性识别序列号 3 表示的构成人 CXCL1 蛋白质的氨基酸序列的部分序列的单克隆抗体或其片段,在其轻链上,CDR1 含有序列号 20 表示的氨基酸序列,CDR2 含有序列号 21 表示的氨基酸序列,及 CDR3 含有序列号 22 表示的氨基酸序列,在重链上,CDR1 含有序列号 23 表示的氨基酸序列,CDR2 含有序列号 24 表示的氨基酸序列,及 CDR3 含有序列号 25 表示的氨基酸序列。

[0024] (11) 如 (10) 所述的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,其中,轻链可变区含有序列号 26 表示的氨基酸序列,重链可变区含有序列号 27 表示的氨基酸序列。

[0025] (12) 一种抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,是特异性识别序列号 2 表示的构成人 CXCL1 蛋白质的氨基酸序列的部分序列的单克隆抗体或其片段,在其轻链上,CDR1 含有序列号 28 表示的氨基酸序列,CDR2 含有序列号 29 表示的氨基酸序列,及 CDR3 含有序列号 30 表示的氨基酸序列,在重链上,CDR1 含有序列号 31 表示的氨基酸序列,CDR2 含有序列号 32 表示的氨基酸序列,及 CDR3 含有序列号 33 表示的氨基酸序列。

[0026] (13) 如 (12) 所述的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,其中,轻链可变区含有序列号 34 表示的氨基酸序列,重链可变区含有序列号 35 表示的氨基酸序列。

[0027] (14) 一种抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,是特异性识别序列号 3 表示的构成人 CXCL1 蛋白质的氨基酸序列的部分序列的单克隆抗体或其片段,在其轻链上,CDR1 含有序列号 36 表示的氨基酸序列,CDR2 含有序列号 37 表示的氨基酸序列,及 CDR3 含有序列号 38 表示的氨基酸序列,在重链上,CDR1 含有序列号 39 表示的氨基酸序列,CDR2 含有序列号 40 表示的氨基酸序列,及 CDR3 含有序列号 41 表示的氨基酸序列。

[0028] (15) 如 (14) 所述的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段,其中,轻链可变区含有序列号 42 表示的氨基酸序列,重链可变区含有序列号 43 表示的氨基酸序列。

[0029] 根据本发明,能够以比现有技术更高的灵敏度测定人 CXCL1 的浓度。另外,可以提供一种特异性识别人 CXCL1 的高亲和性的抗人 CXCL1 单克隆抗体或其片段。

附图说明

[0030] [图 1] 表示采用现有方法进行的免疫学测定,所述现有方法使用夹心 ELISA 法和市售试剂盒,所述夹心 ELISA 法使用特异性识别序列号 1 ~ 3 表示的氨基酸序列中的任一个的单克隆抗体。

[0031] [图 2] 使用特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列的单克隆抗体作为标记抗体的夹心 ELISA。

[0032] [图 3] 使用特异性识别序列号 1、或 2 表示的氨基酸序列的单克隆抗体、及特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列的单克隆抗体、检测尿中人 CXCL1 的夹心 ELISA。

[0033] [图 4] 检测缓冲液中的人 CXCL1 的曲线图,在该检测中将特异性识别序列号 2 表示的氨基酸序列的市售抗体固相化,并采用夹心 ELISA 法,该夹心 ELISA 法使用生物素标记的识别序列号 3 表示的氨基酸序列的本发明的抗体、或市售的生物素标记抗人 CXCL1 多克

隆抗体。

[0034] [图 5] 检测缓冲液中的人 CXCL1 的曲线图,在该检测中将本发明的 5 种抗体 (IgG1-1、IgG1-3、IgG1-10、IgG1-14、IgG2b-1)、及市售抗体固相化,并采用使用生物素标记抗人 CXCL1 多克隆抗体的夹心 ELISA 法。

[0035] [图 6] 检测血浆中的人 CXCL1 的曲线图,在该检测中将本发明的 5 种抗体及市售抗体固相化,并采用使用生物素标记抗人 CXCL1 多克隆抗体的夹心 ELISA 法。

[0036] [图 7] 检测尿中的人 CXCL1 的曲线图,在该检测中将本发明的 5 种抗体及市售抗体固相化,并采用使用生物素标记抗人 CXCL1 多克隆抗体的夹心 ELISA 法。

[0037] [图 8] 表示本发明的 5 种抗体及市售抗体的膀胱癌细胞侵袭 (invasion) 抑制能的图 (1)。

[0038] [图 9] 表示本发明的 4 种抗体及市售抗体的膀胱癌细胞侵袭抑制能的图 (2)。

具体实施方式

[0039] 以下,详细地说明本发明的实施方式。

[0040] 1. 抗人 CXCL1 单克隆抗体及其片段

[0041] 本说明书中使用的术语“人 CXCL1”,是指含有 GenbankNM_001511 中记载的氨基酸序列的蛋白质或其天然突变体。此处所谓的“天然突变体”是自然界存在的突变体,例如,是指在上述氨基酸序列中缺失、取代、或添加 1 个或多个氨基酸的突变体,与上述氨基酸序列具有 95% 以上、优选 98% 以上、较优选 99% 以上的同源性的突变体等。此处所谓“同源性”,是指在 2 个氨基酸序列中引入空位或不引入空位的状态下,进行整列 (排列整齐) 使其一致度达到最高时,包含上述空位数在内的、相对于一个氨基酸序列的全部氨基酸残基数、另一个氨基酸序列的相同氨基酸残基数的比例 (%)。另外,所谓“多个”是指 2 ~ 10 的整数,例如 2 ~ 7、2 ~ 5、2 ~ 4、2 ~ 3 的整数。作为天然突变体的具体例子,可以举出 SNP (单核苷酸多态性) 等基于多型的突变体和剪接突变体等。上述取代优选为保守的氨基酸取代。其原因是如果为保守的氨基酸取代,则可以使其具有与具有上述氨基酸序列的人 CXCL1 实质上同等的结构或性质。所谓保守的氨基酸,已知相互为非极性氨基酸 (甘氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、脯氨酸、色氨酸) 及极性氨基酸 (除非极性氨基酸之外的氨基酸)、带电荷的氨基酸 (酸性氨基酸 (天门冬氨酸、谷氨酸) 及碱性氨基酸 (精氨酸、组氨酸、赖氨酸)) 及不带电荷的氨基酸 (除带电荷的氨基酸之外的氨基酸)、芳香族氨基酸 (苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸)、支链氨基酸 (亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸)、以及脂肪族氨基酸 (甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸) 等。

[0042] 本说明书中使用的所谓“单克隆抗体”,是指含有来自免疫球蛋白或其片段的构架区 (FR:Frame work region) 及互补决定区 (CDR:Complementarity determining region)、能够与抗原特异性结合且识别抗原的多肽。因此,本发明的所谓“抗人 CXCL1 单克隆抗体”,是指能够与人 CXCL1 或其片段特异性结合、且识别人 CXCL1 或其片段的多肽。所谓“特异性结合”,是指只与靶抗原 (本发明中的人 CXCL1 或其片段) 结合。

[0043] 典型的免疫球蛋白分子形成四聚体结构,其中称作重链及轻链的 2 条多肽链形成的组通过二硫键 2 组相互连接。重链含有 N 末端的重链可变区 (V_H) 和 C 末端的重链恒定区 (C_H),轻链含有 N 末端的轻链可变区 (V_L) 和 C 末端的轻链恒定区 (C_L)。其中,从干预与

抗体的结合特异性的方面考虑, V_H 及 V_L 特别重要。所述 V_H 及 v_L 均由约 110 个氨基酸残基构成,其内部具有直接干预与抗原的结合特异性的 3 个互补决定区 (CDR1、CDR2、CDR3)、及作为可变区的骨架结构发挥作用的 4 个构架区 (FR1、FR2、FR3、FR4)。已知互补决定区形成与抗原分子互补的立体结构,决定抗体的特异性 (E. A. Kabat et al., 1991, Sequences of proteins of immunological interest, Vol. 1, eds. 5, NIH publication)。恒定区的氨基酸序列在种内抗体间几乎不变,而互补链决定区的氨基酸序列在各抗体间变异性很高,因此,也称作超可变区 (Hypervariable region)。在可变区中,上述互补决定区与构架区在从氨基酸末端至羧基末端的方向上以 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 的顺序进行排列。在免疫球蛋白分子内, V_L 及 V_H 通过相互形成二聚体形成抗原结合部位。免疫球蛋白已知有 IgG、IgM、IgA、IgE、及 IgD 各类,本发明的抗体可以为任一类,优选为 IgG。

[0044] 本发明中有用的抗体,可以来自于包含鸟及哺乳动物在内的所有动物源。例如可以举出小鼠、大鼠、豚鼠、兔子、山羊、驴、绵羊、骆驼、马、鸡或人等。另外,本发明的“单克隆抗体”可以化学合成或通过使用重组 DNA 法合成。例如,嵌合抗体及人源化抗体之类的重组抗体也包含在本发明中。

[0045] 所谓嵌合抗体是某抗体的恒定区被其他抗体的恒定区取代的抗体。例如,在抗人 CXCL1 小鼠单克隆抗体中其恒定区被人抗体的恒定区替换的抗体。作为更具体的例子,可以举出下述抗体: V_L 含有各个序列号 10、18、26、34 或 42 中的任一个表示的抗人 CXCL1 小鼠单克隆抗体的 V_L 中的氨基酸序列、且 C_L 含有任意人抗体的 C_L 中的氨基酸序列、及 / 或 V_H 含有各个序列号 11、19、27、35 或 43 中的任一个表示的抗人 CXCL1 小鼠单克隆抗体的 V_H 中的氨基酸序列、且 C_H 含有任意人抗体的 C_H 中的氨基酸序列。

[0046] 所谓人源化抗体,是将来自某抗体 (通常为非人抗体、例如小鼠抗体) 的 CDR 组与人抗体的 FR 及恒定区人为地组合而形成的嵌合体抗体 (mosaic antibody)。例如,将抗人 CXCL1 小鼠单克隆抗体的各 CDR、任意的人抗体的各 FR 和恒定区进行组合得到的抗体。由于抗体的抗原结合特异性主要由可变区中的 CDR 组担负,所以在制备与上述某抗体具有同样的结合特性的重组抗体时,不需要得到某抗体的全氨基酸序列。即,使用现有的重组 DNA 技术,制备嵌合体抗体,使其表达,所述嵌合体抗体中将编码来自某抗体的各 CDR 的 DNA 序列分别取代为编码来自人抗体的对应的 CDR 的 DNA 序列,由此可以得到与某抗体的性质相似的重组抗体。上述技术称作 CDR 移植抗体 (Nature, 1986, Vol. 321, 522)。需要说明的是,本发明的抗人 CXCL1 抗体或其片段用于人 CXCL1 或其片段的检测时,不必一定是人源化抗体,使用上述移植抗体技术,FR 及恒定区也可以来自除人之外的任意动物的抗体。

[0047] 进而,本发明中的“抗体”可以为多重特异性抗体。所谓多重特异性抗体,是指多价抗体,即在一分子内具有多个抗原结合部位的抗体中各个抗原结合部位与不同的表位结合的抗体。例如,可以举出在 IgG 之类的具有 2 个抗原结合部位的抗体中各个抗原结合部位与不同的表位结合的双特异性抗体 (Bispecific 抗体)。在本发明中,上述多重特异性抗体优选各个抗原结合部位可以与人 CXCL1 上存在的不同表位结合。可以使用重组 DNA 技术,根据公知方法,通过人工改变 IgG 等得到上述抗体。

[0048] 在本说明书中使用时,“单克隆抗体或其片段”中的“其片段”,是指上述抗体的部分区域,即,具有与该抗体具有的抗原特异性结合活性实质上同等的活性的多肽链或其复合体。例如,包含至少一个上述抗原结合部位的抗体部分,即具有至少 1 个 V_L 和至少一个 V_H

的多肽链或其复合体。作为具体例,可以举出通过用各种肽酶切断免疫球蛋白产生的多个被充分付与特征的抗体片段等。作为更具体的例子,可以举出 Fab、F(ab')₂、Fab' 等。Fab 是通过用木瓜蛋白酶在比较合部的二硫键更接近 N 末端侧切断 IgG 分子而产生的片段,由多肽和轻链构成,所述多肽含有 V_H 及构成 C_H 的 3 个结构域 (C_H1、C_H2、C_H3) 中与 V_H 相邻的 C_H1。F(ab')₂ 是通过由胃蛋白酶在比较合部的二硫键更接近 C 末端侧切断 IgG 分子产生的 Fab' 的二聚体。与 Fab 相比, Fab' 含有铰合部,所以 Fab' 的 H 链稍长,但实质上 Fab' 具有与 Fab 同等的结构 (Fundamental Immunology, Paul ed., 3d ed., 1993)。Fab' 可以通过在温和的条件下还原 F(ab')₂、切断铰链区的二硫键而得到。上述抗体片段均包含抗原结合部位,具有与抗原 (即本发明中的人 CXCL1 或其片段) 特异性结合的能力。

[0049] 本发明的上述“其片段”可以通过化学合成或使用重组 DNA 法合成。例如,可以举出使用重组 DNA 法新合成的抗体片段。虽然没有限定,但具体而言可以举出:通过具有适当长度及序列的连接肽等使本发明抗体的一个以上 V_L 及一个以上 V_H 人工连接形成的单体多肽分子、或其多聚体多肽。作为上述多肽的例子,可以举出单链 Fv (scFv: single chain Fragment of variable region) (参见 Pierce catalog and Handbook, 1994—1995, Pierce Chemical co., Rockford, IL)、双抗体 (diabody)、三链抗体 (triabody) 或四链抗体 (tetrabody) 等合成抗体等。在免疫球蛋白分子中, V_L 及 V_H 通常分别位于多肽链 (轻链和重链) 上。单链 Fv 为具有下述结构的合成抗体片段,所述结构为上述可变区通过具有足够长度的柔性连接体进行连接,包含在 1 条多肽链中。在单链 Fv 内,两可变区可以相互之间自组装,形成 1 个功能性的抗原结合部位。单链 Fv 可以通过使用公知技术将编码单链 Fv 的重组 DNA 参入噬菌体基因组,使其表达而得到。双抗体是具有以单链 Fv 的二聚体结构为基础的结构的分子 (Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444—6448)。例如,上述连接体的长度约短于 12 个氨基酸残基时,单链 Fv 内的 2 个可变部位不能自组装,但是通过形成双抗体,即,通过使 2 个单链 Fv 相互作用,一条 Fv 链的 V_L 与另一条 Fv 链的 V_H 能够组装,可以形成 2 个功能性的抗原结合部位 (Marvin et al., 2005, Acta Pharmacol. Sin., 26: 649—658)。进而,通过向单链 Fv 的 C 末端添加半胱氨酸残基,2 条 Fv 链之间的二硫键可以形成,也可以形成稳定的双抗体 (Olafsen et al., 2004, Prot., Engr, Des. Sel., 17: 21—27)。如上所述,双抗体为二价的抗体片段,但不需要各个抗原结合部位与同一表位结合,可以具有双特异性,即识别且特异性结合分别不同表位。例如,一个抗原结合部位可以含有 V_L 及 V_H, 所述 V_L 包含含有序列号 36、37、38 表示的氨基酸序列的 CDR (分别相当于 CDR1、CDR2、CDR3), 所述 V_H 包含含有序列号 39、40、41 表示的氨基酸序列的 CDR (分别相当于 CDR1、CDR2、CDR3), 另一个抗原结合部位可以含有 V_L 及 V_H, 所述 V_L 包含含有序列号 28、29、30 表示的氨基酸序列的 CDR (分别相当于 CDR1、CDR2、CDR3), 所述 V_H 包含含有序列号 31、32、33 表示的氨基酸序列的 CDR (分别相当于 CDR1、CDR2、CDR3)。三链抗体及四链抗体与双抗体同样地具有以单链 Fv 结构为基础的二聚体及四聚体结构。分别可以为三价及四价抗体片段、或双重特异性抗体。

[0050] 进而,上述“其片段”是使用噬菌体展示文库鉴定的抗体片段 (例如,参见 McCafferty et al., 1990, Nature, Vol. 348, 522—554), 并且含有具有抗原结合能力的物质。此外,也可以参见例如 Kubly, J. Immunology, 3rd Ed., 1998, W. H. Freeman & Co., New York。

[0051] 本发明提供了具有下述氨基酸序列的抗体或其片段,所述氨基酸序列构成对人

CXCL1 具备期望结合活性的可变区及其 CDR。即,本发明提供了含有下述免疫球蛋白可变区的抗体或其片段,所述免疫球蛋白可变区含有序列号 4~43 中的任一个表示的氨基酸序列。

[0052] 对于本发明的抗体或其片段,在其轻链上,CDR1、CDR2、CDR3 可以分别含有序列号 4、5、6 表示的氨基酸序列,在其重链上,CDR1、CDR2、CDR3 可以分别含有序列号 7、8、9 表示的氨基酸序列。

[0053] 另外,在本发明的抗体或其片段中, V_L 及 V_H 可以分别含有序列号 10、序列号 11 表示的氨基酸序列。

[0054] 对于本发明的抗体或其片段,在其轻链上,CDR1、CDR2、CDR3 可以分别含有序列号 12、13、14 表示的氨基酸序列,在其重链上,CDR1、CDR2、CDR3 可以分别含有序列号 15、16、17 表示的氨基酸序列。

[0055] 另外,在本发明的抗体或其片段上, V_L 及 V_H 可以分别含有序列号 18、序列号 19 表示的氨基酸序列。

[0056] 对于本发明的抗体或其片段,在其轻链上,CDR1、CDR2、CDR3 可以分别含有序列号 20、21、22 表示的氨基酸序列,在其重链上,CDR1、CDR2、CDR3 可以分别含有序列号 23、24、25 表示的氨基酸序列。

[0057] 另外,在本发明的抗体或其片段上, V_L 及 V_H 可以分别含有序列号 26、序列号 27 表示的氨基酸序列。

[0058] 对于本发明的抗体或其片段,在其轻链上,CDR1、CDR2、CDR3 可以分别含有序列号 28、29、30 表示的氨基酸序列,在其重链上,CDR1、CDR2、CDR3 可以分别含有序列号 31、32、33 表示的氨基酸序列。

[0059] 另外,在本发明的抗体或其片段上, V_L 及 V_H 可以分别含有序列号 34、序列号 35 表示的氨基酸序列。

[0060] 对于本发明的抗体或其片段,在其轻链上,CDR1、CDR2、CDR3 可以分别含有序列号 36、37、38 表示的氨基酸序列,在其重链上,CDR1、CDR2、CDR3 可以分别含有序列号 39、40、41 表示的氨基酸序列。

[0061] 另外,在本发明的抗体或其片段上, V_L 及 V_H 可以分别含有序列号 42、序列号 43 表示的氨基酸序列。

[0062] 本发明的抗体或其片段可以进行修饰。此处所述的“修饰”,包括下述任一种:在本发明的抗体或其片段具有与人 CXCL1 的特异性结合活性的方面所需要的功能上的修饰(例如糖基化)、及在检测本发明的抗体或其片段方面所需要的标记。上述抗体标记中,例如可以举出采用荧光染料(FITC、罗丹明、德克萨斯红、Cy3、Cy5)、荧光蛋白质(例如 PE、APC、GFP)、酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶)、生物素或(链霉)抗生物素的标记。另外,为了调节抗体对靶抗原的亲合性,可以改变本发明的抗体的糖基化。上述改变例如可以通过变更抗体序列内的一个以上的糖基化部位而达成。更具体地进行说明,例如向构成 FR 内的一个以上糖基化部位的氨基酸序列中导入一个以上的氨基酸取代,除去该糖基化部位,由此可以使所述部位的糖基化丧失。上述脱糖基化在增加抗体对抗原的亲合性的方面有效(美国专利第 5714350 号及美国专利第 6350861 号)。

[0063] 对于本发明的测定方法中使用的单克隆抗体或其片段,为了确保针对人 CXCL1 或

其片段的特异性结合活性,优选在使用前事先验证与其他抗原(蛋白质或其片段)的交叉反应性。在本发明的抗体或其片段中,应确认交叉性的抗原可以举出属于 CXC 家族的蛋白质、特别是与人 CXCL1 结构上类似的人 CXCL2 蛋白质、人 CXCL3 蛋白质。另外,除上述蛋白质之外,对于部分结构与人 CXCL1 共通的其他蛋白质,也较优选事先确认在本发明的测定方法中使用的抗体或其片段的交叉反应性。交叉反应的确认中,可以使用以人 CXCL1 作为抗原的 ELISA 法。应试验反应特异性的抗体,即抗人 CXCL1 单克隆抗体及其片段与人 CXCL1 的反应时,如果使应确认交叉性的其他抗原蛋白质共存,则通过观察两者的竞争状态可以进行交叉性的确认。利用竞争抑制原理的上述交叉性的确认方法,不需要针对所有的抗原制备反应体系,因此可以迅速进行筛选。

[0064] 2. 单克隆抗体及杂交瘤制备方法

[0065] 本发明的抗人 CXCL1 单克隆抗体或产生其抗体的杂交瘤可以通过以下记载的方法进行制备。但并不限于所述方法,也可以使用本技术领域公知的其他任何方法制备。

[0066] A. 抗人 CXCL1 单克隆抗体制备方法

[0067] 为了制备与构成人 CXCL1 的氨基酸序列中的序列号 1~3 中的任一个氨基酸部分序列区特异性结合的抗人 CXCL1 单克隆抗体,存在下述方法:以人 CXCL1 的全长作为免疫原制备单克隆抗体,之后,筛选与序列号 1~3 中的任一个氨基酸部分序列区特异性结合的抗体的方法;事先以序列号 1、2 或 3 表示的人 CXCL1 的部分序列作为免疫原,制备单克隆抗体的方法。

[0068] A1. 人 CXCL1 的制备

[0069] 首先,制备用作免疫原(抗原)的人 CXCL1。人 CXCL1 可以为天然型、重组型、或肽合成等化学合成氨基酸序列的全部或一部分得到的人 CXCL1 中的任一种。

[0070] 天然型人 CXCL1 可以从血液或尿等人体液为代表的人样品、或人培养细胞的培养上清中,使用凝胶色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法等公知的蛋白质分离·纯化技术进行回收。

[0071] 重组型人 CXCL1 可以在导入编码该蛋白质的 DNA 的微生物、昆虫细胞、或动物细胞中使 DNA 表达后,使用公知的蛋白质分离·纯化技术从该细胞中进行回收。

[0072] 合成人 CXCL1 例如可以利用公开的人 CXCL1 氨基酸序列信息,通过本技术领域公知的手法例如固相肽合成法等进行合成。需要说明的是,人 CXCL1 的 cDNA 序列在 GenBank 中以登记号 X12510 公开。使上述合成人 CXCL1 与 KLH(匙孔血蓝蛋白)、OVA(卵清蛋白)、BSA(牛血清白蛋白)等载体蛋白质连接进行使用。

[0073] 另外,最初以序列号 1~3 表示的人 CXCL1 的部分序列作为免疫原时,免疫原与免疫全长序列时同样地,也可以为天然型、重组型、或化学合成的免疫原。

[0074] 例如,使用天然型人 CXCL1 的部分序列作为免疫原时,首先,将经纯化的人 CXCL1 用胰蛋白酶等适当的蛋白酶进行处理后,用反相柱分离得到峰产物。分离得到的各峰中含有的肽的氨基酸序列通过质谱仪进行确定,可以使用序列号 1、2 或 3 表示的部分序列或其一部分的峰产物作为免疫原。

[0075] 另外,使用重组型人 CXCL1 的氨基酸部分序列作为免疫原时,将编码上述人 CXCL1 的 DNA 序列中的序列号 1~3 表示的氨基酸部分序列、或进而编码上述人 CXCL1 的一部分的 DNA 序列部分,与制备全长人 CXCL1 时同样地插入表达用载体中,导入各种细胞中,由此

可以得到序列号 1 ~ 3 表示的氨基酸部分序列或其一部分的重组型人 CXCL1。

[0076] 以下,针对序列号 1 ~ 3 表示的重组型人 CXCL1 的氨基酸部分序列(以下称作人 CXCL1 部分序列)的制备进行详细说明。

[0077] (a) 编码重组型人 CXCL1 部分序列的多核苷酸的制备

[0078] 关于所述多核苷酸的制备方法,在下述实施例 1 中详细说明,故在此处省略。

[0079] 作为人 CXCL1 部分序列的表达中使用的载体,可以使用宿主微生物中能够自主增殖的噬菌体或质粒。例如,作为质粒,可以举出来自大肠杆菌的质粒(pET16b、pGEX6p、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19 等)、来自枯草菌的质粒(pUB110、pTP5 等)、来自酵母的质粒(YEp13、YEp24、YCp50 等)等。另外,作为噬菌体,可以举出 λ 噬菌体(λ gt11、 λ ZAP 等)。进而,也可以使用疫苗病毒等动物病毒、杆状病毒等昆虫病毒载体。

[0080] 向上述载体中插入编码人 CXCL1 部分序列的多核苷酸时,有下述方法:例如,用适当的限制酶切断经纯化的该多核苷酸,使用 DNA 连接酶将其连接到用适当的限制酶切断的载体内部。

[0081] (b) 人 CXCL1 部分序列表达载体向宿主内的导入

[0082] 将得到的人 CXCL1 部分序列表达载体导入能够表达人 CXCL1 蛋白质的宿主中,可以得到人 CXCL1 部分序列表达转化体。使用的宿主是与所使载体相适合的宿主,只要是能够表达人 CXCL1 的宿主即可,没有特别限定。例如,优选使用细菌(大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草菌(例如 *Bacillus subtilis* 等)、酵母、昆虫细胞、动物细胞(COS 细胞、CHO 细胞(Journal of immunology,1998,Vol.160,3393—3402)等。向细菌中导入上述载体的方法,只要是向细菌中导入该载体的公知的方法即可,没有特别限定。例如,可以举出热休克法、使用钙离子的方法、电穿孔法等。上述技术均在本领域公知,且记载于各种文献中。例如请参见 Sambrook J. et al.1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York。另外,动物细胞的转化中,优选使用脂质转染法(PNAS,1989,Vol.86,6077)、(PNAS,1987,Vol.84,7413)、电穿孔法、磷酸钙法(Virology,1973,Vol.52,456—467)、DEAE—Dextran 法等。

[0083] 以细菌作为宿主时,优选人 CXCL1 部分序列表达载体在该细菌中能够自主复制,同时由启动子序列、核糖体结合序列、编码人 CXCL1 部分序列的 DNA 序列及转录终止序列构成。另外,也可以含有编码控制启动子的调节因子的基因。启动子只要能够在大肠杆菌等宿主中发挥作用即可,可以使用任何启动子。

[0084] 以酵母、动物细胞、昆虫细胞等真核细胞作为宿主时,同样地按照本领域公知的方法,也可以得到人 CXCL1 部分序列表达转化体。在真核细胞中使用的人 CXCL1 部分序列表达载体中,除启动子序列、编码人 CXCL1 部分序列的 DNA 序列之外,根据期望也可以连接增强子等顺式作用元件、剪接信号(供体部位、接受位点、分支点等)、加 polyA 信号(polyA addition signal)、选择标记物序列、核糖体结合序列(SD 序列)等。

[0085] (c) 转化体的培养及重组型人 CXCL1 部分序列的表达

[0086] 接着,培养上述制备的转化体。在培养基中培养转化体的方法按照宿主的培养中使用的通常方法进行。例如,以微生物作为宿主时,培养基没有特别限定,只要含有微生物可同化的碳源、氮源、无机盐类等、且能够生长、增殖即可。可以使用天然培养基、合成培养基中的任一种。作为更具体的例子,可以举出 LB 培养基,当然并不限于此。另外,为了选

择性地进行转化体的培养,根据需要,可以向培养基中添加氨苄青霉素或四环素等抗生素。培养通常在通气搅拌培养等需气的条件下、在 37℃ 下进行 6 ~ 24 小时。培养期间中,pH 优选保持在中性附近。pH 的调节使用无机或有机酸、碱性溶液等进行。转化体为 CHO 细胞等动物细胞时,可以将宿主细胞以 1×10^5 细胞 / mL 接种在 Gibco 公司制 DMEM 培养基中,在 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱中培养。培养中根据需要,可以向培养基中添加氨苄青霉素或四环素等抗生素。

[0087] 上述人 CXCL1 部分序列表达载体为含有蛋白质表达控制系统(例如宿主为微生物时,相当于阻遏基因及操纵基因等)的蛋白质表达诱导型载体时,必需对上述转化体进行规定的处理,诱导人 CXCL1 部分序列的表达。表达诱导的方法根据载体中所含的蛋白质表达控制系统而不同,因此只要进行适应其系统的诱导处理即可。例如,在以细菌作为宿主的蛋白质表达诱导型载体中,最常利用的蛋白质表达控制系统是含有 lac 阻遏基因及 lac 操纵基因的系统。该系统可以通过 IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-Galactoside) 处理来诱导表达。在具有含有上述系统的人 CXCL1 表达载体的转化体中,为了使作为目标的人 CXCL1 表达,可以向培养基中添加适当量(例如终浓度 1mM)的 IPTG。

[0088] (d) 重组型人 CXCL1 部分序列的提取及 / 或回收

[0089] 培养后,人 CXCL1 部分序列在菌体内或细胞内产生时,通过回收菌体或细胞进行破碎,可以提取蛋白质。另外,人 CXCL1 部分序列在菌体外或细胞外产生时,可以直接使用培养液,或可以通过离心分离等除去菌体或细胞、使用上清。之后,通过单独或适当组合使用例如硫酸铵沉淀、凝胶色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法等一般的蛋白质的纯化方法,可以从上述培养物中分离纯化人 CXCL1。可以通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳等确认是否得到人 CXCL1 部分序列。

[0090] A2. 抗人 CXCL1 部分序列抗体的产生细胞的制备

[0091] 将 A1 中得到的免疫原溶解在缓冲液中,制备免疫原溶液。此时,为了有效地进行免疫,如果需要可以添加佐剂。作为佐剂的例子,可以举出市售的完全弗氏佐剂(FCA)、不完全弗氏佐剂(FIA)等,上述佐剂可以单独使用或混合使用。

[0092] 接着,对哺乳动物、例如大鼠、小鼠(例如近交系小鼠的 BALB / c)、兔子等给与上述制备的免疫原溶液,进行免疫。作为免疫原的给与方法,例如可以举出使用 FIA 或 FCA 的皮下注射、使用 FIA 的腹腔内注射、或使用 0.15mol / L 氯化钠的静脉注射,但不限于此。免疫原的 1 次给与量,根据免疫动物的种类、给与途径等适当确定,每只动物约为 30 ~ 200 μg。另外,免疫的间隔没有特别限定,初次免疫后,以数日至数周的间隔进行追加免疫,优选在 1 ~ 4 周的间隔内进行 2 ~ 6 次、优选进行 3 ~ 4 次追加免疫。从初次免疫后,通过 ELISA(酶联免疫吸附测定(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay))法等测定免疫动物的血清中的抗体价,当抗体价达到平台期时,向静脉内或腹腔内注射免疫原,作为最终免疫。从最终免疫日开始 2 ~ 5 天后、优选在 3 天后,收集抗体产生细胞。

[0093] B. 产生抗人 CXCL1 部分序列单克隆抗体的杂交瘤制备方法

[0094] B1. 从免疫动物回收抗体产生细胞及细胞融合

[0095] 通过将免疫动物得到的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合,可以制备产生特异性识别抗人 CXCL1 部分序列的单克隆抗体的杂交瘤。作为抗体产生细胞,可以举出脾细胞、淋巴结细胞、末梢血细胞等,但优选脾细胞或局部淋巴结细胞。作为与抗体产生细

胞融合的骨髓瘤细胞,可以使用通常可购买的来自小鼠等的细胞系。作为使用的细胞株,优选具有下述性质:具有药剂选择性,在未融合的状态下不能在 HAT 选择培养基(含有次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶脱氧核苷)中生存,只能在与抗体产生细胞融合的状态下生长。另外,细胞系优选来自于免疫动物同种系的动物。作为骨髓瘤细胞的具体例子,可以举出 BALB / c 小鼠的次黄嘌呤·鸟嘌呤·磷酸核糖·转移酶(HGPRT)缺陷细胞株的、P3×62-Ag. 8 株(ATCCTIB9)、P3×63-Ag. 8. U1 株(JCRB9085)、P3 / NSI / 1-Ag4—1 株(JCRB0009)、P3×63Ag8. 653 株(JCRB0028)或 Sp2 / 0-Ag14 株(JCRB0029)等。

[0096] 为了使上述骨髓瘤细胞与抗体产生细胞融合,在不含血清的 DMEM、RPMI1640 培养基等动物细胞培养用培养基中,以约 1:1 ~ 20:1 的比例混合抗体产生细胞与骨髓瘤细胞,在细胞融合促进剂的存在下进行融合反应。作为细胞融合促进剂,可以以约 10 ~ 80% 的浓度使用平均分子量为 1,500 ~ 4,000Da 的聚乙二醇等。另外,根据情况,为了提高融合效率,可以联用二甲基亚砷等助剂。进而,也可以使用利用电刺激(例如电穿孔)的市售细胞融合装置使抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合(Nature, 1977, Vol. 266, 550-552)。

[0097] B2. 目标杂交瘤的选择

[0098] 作为从细胞融合处理后的细胞中选择目标杂交瘤、即产生抗人 CXCL1 部分序列单克隆抗体的杂交瘤的方法,例如,在含有胎牛血清的 RPMI1640 培养基等中将细胞悬浮液适当稀释后,以约 2×10^6 个/孔的程度接种在 96 孔微量滴定板上,各孔中加入选择培养基,之后适当地交换选择培养基进行培养。培养温度为 20 ~ 40℃,优选约为 37℃。骨髓瘤细胞为 HGPRT 缺陷株或胸腺嘧啶胸苷激酶(TK)缺陷株时,通过使用含有次黄嘌呤·氨基蝶呤·胸腺嘧啶脱氧核苷的选择培养基(HAT 培养基),可以仅选择性地使抗体产生细胞和骨髓瘤细胞的杂交瘤生长、增殖,因此,可以选择在选择培养基中培养开始后约 10 日开始生长的细胞作为杂交瘤。

[0099] 对于在 HAT 培养基中选择的杂交瘤,首先,以针对天然型或重组型人 CXCL1、或序列号 1 ~ 3 表示的氨基酸序列的结合活性作为指标进行筛选。接着,针对产生与人 CXCL1 具有结合活性的抗体的杂交瘤,进行交叉性的试验。即,验证与其他 CXC 家族等的结合活性,选择可允许的杂交瘤。所谓“可允许的交叉性”是指在目标抗体的用途中,可忽视程度的交叉性。例如,是用于免疫学测定的单克隆抗体时,如果在最终测定体系中由交叉反应产生的信号强度被控制在小于背景水平中因特异性反应产生的信号强度的 1%,则可以认为事实上没有交叉反应。

[0100] 为了确认与人 CXCL1 的反应性、或与其他 CXC 家族的交叉反应性,例如可以利用 ELISA 法。ELISA 法中,准备微孔板,在该微孔板中将作为抗原的人 CXCL1 或其片段固相化,之后向该微孔板中加入样品使其反应,该样品是适当稀释上述杂交瘤的培养上清而得到的。充分反应后,清洗孔,加入针对免疫球蛋白的 2 次抗体的标记体,进一步使其反应。再次清洗孔,最终利用与孔结合的 2 次抗体的标记进行测定时,可以定量地知晓培养上清中存在的抗体对抗原的结合活性。

[0101] B3. 使用杂交瘤产生抗体

[0102] 本发明中的杂交瘤可以通过使用小鼠进行腹水化,而用于抗体生产。具体而言,向制备杂交瘤时使用的融合伴侣所用的细胞的来源的小鼠、或裸鼠的腹腔内接种杂交瘤,适当收集腹水,由此可以回收含有抗体的腹水液。更具体而言,将以 Sp / 0 细胞作为融合伴

倡的杂交瘤接种在姥蛟烷接种后经过 10 天的 BALB / c 小鼠的腹腔中,由此可以回收含有抗体的腹水液。

[0103] 另外,本发明的杂交瘤通过使用适合的培养基进行培养,可以用于抗体生产。具体而言,向 Gibco 公司制的杂交瘤 SFM 培养基中以 1×10^5 细胞 / mL 接种杂交瘤,在 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱中培养至杂交瘤死亡,由此可以得到含有抗体的培养液上清,但并不限于此。

[0104] 3. 重组抗人 CXCL1 部分序列单克隆抗体的制备方法

[0105] 本发明的抗体或其片段也可以如下得到:利用编码单克隆抗体的氨基酸序列的 cDNA 序列,通过重组 DNA 操作得到,所述单克隆抗体特异性识别本发明中公开的人 CXCL1 部分序列。

[0106] 例如,使用编码氨基酸序列的 DNA 序列,所述氨基酸序列编码来自用 B2. 方法取得的抗人 CXCL1 部分序列单克隆抗体产生杂交瘤的该抗体的可变区, V_H 及 V_L 的碱基序列分别与编码任意的 C_L 及 C_H 的碱基序列连接,将各个多核苷酸参入适当的表达载体中,导入宿主细胞后,也可以使其表达为完全的免疫球蛋白分子。另外,使用 CDR 移植抗体技术,编码用 B2. 方法取得的可变区内的 CDR 的氨基酸序列的多核苷酸与编码任意的免疫球蛋白的各 FR 的多核苷酸连接,参入适当的表达载体,导入宿主细胞后,也可以表达为完全的免疫球蛋白分子。各多核苷酸可以化学合成,也可以采用作为长链 DNA 的合成法已知的藤本等的方法(藤本英也,合成基因的制备法,植物细胞工程系列 7,植物 PCR 实验说明书,1997,秀润社, p95—100) 合成。另外,本发明中公开的 CDR 原本来自小鼠的免疫球蛋白,因此,连接的 C_L、C_H 及 FR 区的序列优选来自小鼠,但也可以来自人等其他任意动物。此时,重链与轻链在同一宿主细胞内表达,以由重链 / 轻链构成的二聚体形式生成,十分便利。具体而言,例如利用轻链表达载体及重链表达载体共转化细胞,从所述转化细胞也可以得到本发明的抗体。或者,也可以将编码上述氨基酸序列的多核苷酸直接参入适当的表达载体中,导入宿主细胞后,以免疫球蛋白分子的片段的形式进行表达。或者,如上所述,利用适当的连接体连接分别编码含有上述氨基酸序列的 V_L 及 V_H、或轻链及重链的多核苷酸,参入噬菌体,形成单链 Fv,也可以以该单链 Fv 或双抗体等的合成抗体片段的形式进行表达。另外,通过利用近年来开发的基因工程技术使重组抗体在噬菌体表面表达的噬菌体展示抗体技术(Brinkmann et al,1995, J Immunol Methods,182,41—50,国际公开 W097 / 13844 号,国际公开 W090-02809 号),人工地改组编码重链、轻链的基因,多样化的单链 Fv 抗体以噬菌体融合蛋白的形式表达,由此也可以得到特异抗体。

[0107] 编码重组抗人 CXCL1 部分序列单克隆抗体或其片段的多核苷酸的制备,参入该多核苷酸的载体、该载体的宿导入法,可以使用上述“A. 人 CXCL1 抗体制备方法”中记载的本领域中公知的重组 DNA 技术。目标重组抗人 CXCL1 抗体或其片段可以从转化细胞的培养液中或该细胞内得到。

[0108] 作为免疫球蛋白表达载体,例如可以使用质粒、噬菌粒、黏粒、病毒载体(例如 SV40 病毒表达载体、EB 病毒表达载体、BPV 表达载体)等,但并不限于此。例如,作为 BPV 表达载体之一的 BCMGS Neo 载体,是通过转化为 COS7 细胞等有效表达外来基因的优选载体(鸟山一“牛乳头瘤病毒载体”、村松正实及冈山博人编,实验医学分册:基因工程手册,1991,羊土公司(日本),297—299)。

[0109] 除编码抗体或其片段的多核苷酸之外,上述载体还可以含有表达上述抗体或其片段所需要的调控元件(例如启动子、增强子、终止子、聚腺苷酸化位点、剪接位点)、或根据需要还可以含有选择标记物。

[0110] 作为转化的宿主,除上述“A. 抗人 CXCL1 单克隆抗体制备方法”中记载的宿主之外,还可以优选使用 Sp2 / 0(小鼠骨髓瘤)细胞(European Journal of Cancer Research Preview(1996)Vol. 5, 512—519 ;Cancer Research(1990)Vol. 50, 1495—1502)。

[0111] 本发明中,含有表达抗体或其片段的载体的宿主细胞通过按照通常方法进行培养,可以使其培养液上清或宿主细胞内产生抗体。具体而言,以 CHO 细胞作为宿主时,将宿主细胞以 1×10^5 细胞 / mL 接种在 Gibco 公司制 DMEM 培养基中,在 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱中培养,由此可以得到含有抗体的培养液上清。另外,例如宿主细胞为大肠杆菌时,通过接种在 LB 培养基等大肠杆菌培养中使用的一般的培养基中进行培养,诱导蛋白质的表达,可以使培养液上清或宿主细胞内产生抗体。

[0112] 需要说明的是,作为表达产物的抗体或其片段含有恒定区时,使用蛋白 A 柱、蛋白 G 柱、抗免疫球蛋白抗体亲和柱等,可以从培养液上清、细胞破碎液中纯化・回收。另一方面,以只由可变区构成、不含有恒定区的状态表达时,上述纯化方法不适用,因此应用其他适当的纯化方法。例如,以在 C 末端融合有组氨酸标签等有利于纯化的标签序列的结构进行表达时,可以通过利用对应配体的亲和色谱法进行纯化。不是标签融合蛋白质时,可以按照硫酸铵沉淀、离子交换色谱法、反相色谱法、凝胶过滤色谱法、羟磷灰石色谱法等蛋白质纯化的通常方法进行纯化。

[0113] 4. 得到的抗人 CXCL1 单克隆抗体识别的人 CXCL1 上的表位的确认

[0114] 得到的抗人 CXCL1 单克隆抗体识别的人 CXCL1 上的表位,通过如下所述的方法进行确认。

[0115] 首先,使还原烷基化的人 CXCL1 与抗人 CXCL1 单克隆抗体反应,形成抗原抗体复合体后,使用胰蛋白酶等适当的蛋白酶进行分解处理。即使经过分解处理,抗体也难以被胰蛋白酶消化,因此,可以使用 ProteinG 琼脂糖等回收抗原抗体复合体。此时,抗原通过蛋白酶处理,除与抗体结合被保护的部分之外,其余部分被消化,因此,回收的抗原抗体复合体通过使用 LC—MS 进行分析,可以鉴定与抗体结合被保护的部分、即抗体识别的人 CXCL1 上的表位。

[0116] 另外,抗人 CXCL1 单克隆抗体识别的人 CXCL1 上的表位,例如也可以通过使用合成肽的竞争法进行确认。首先,通过构成人 CXCL1 的氨基酸序列中的每 4~8 氨基酸的固相合成法等制备合成肽。在利用上述 ELISA 法确认针对人 CXCL1 的结合性的实验中,在使抗人 CXCL1 单克隆抗体与固相人 CXCL1 反应时,使所述合成肽作用,如果确认抑制了抗人 CXCL1 单克隆抗体的结合,则可以判断该合成肽的氨基酸序列为抗人 CXCL1 单克隆抗体识别的表位。

[0117] 5. 人 CXCL1 检测方法

[0118] 本发明中,通过使用如上所述得到的单克隆抗体或其片段,可以获得人 CXCL1 的免疫学测定方法。本发明的测定方法针对人 CXCL1 的特异性优异,可以提供人 CXCL1 理想的免疫学测定方法。

[0119] 本发明的测定方法中使用的所谓“样品”,是指含有人 CXCL1 的各种样品。例如,

为含有编码人 CXCL1 的 DNA 或其片段的培养细胞、培养细胞破碎液、培养液上清或人样品。所谓人样品是从人体内收集的组织（例如术后收集的组织）、血液、血清、血浆、尿、脊髓液、唾液、淋巴液、泪液、精液等体液等所有来自人的生物样品，优选为血液、血清、血浆或尿。另外，本发明中的样品不仅可以为液体样品，也可以为固体样品。例如，可以使用组织切片样本等。对组织切片样本进行本发明的人 CXCL1 测定方法时，可以在原位观察人 CXCL1 的有无或局部存在，因此很方便。

[0120] 本发明的特征在于，组合 2 种以上的上述抗人 CXCL1 部分序列单克隆抗体或其片段，该 2 种以上的抗人 CXCL1 部分序列单克隆抗体或其片段特异性识别构成人 CXCL1 的氨基酸序列的部分序列即序列号 1 ~ 3 表示的氨基酸序列中的任一序列区、且特异性识别各个不同的序列区，优选组合 2 种上述抗人 CXCL1 部分序列单克隆抗体或其片段，较优选以含有特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的抗人 CXCL1 单克隆抗体的组合进行使用。通过组合分别识别人 CXCL1 不同的氨基酸序列区的抗人 CXCL1 部分序列单克隆抗体或其片段，有助于提高人 CXCL1 的检测灵敏度。

[0121] 本发明的免疫学的测定可以通过使用 ELISA 法、EIA 法、荧光免疫测定法、放射免疫测定法或放射免疫测定法等标记抗体的公知的免疫学的测定法、或表面等离子体共振法（SPR 法）、石英晶体微天平测定法（QCM 法）实施，优选适于使用标记抗体的免疫学的测定法。

[0122] ELISA 法也称作酶联免疫吸附分析法，是使用酶标记的抗体或抗原、利用所述酶的作用，在抗原抗体反应中以显色浓度或荧光强度的形式检测样品中含有的微量的靶抗原，定量靶抗原的方法。即，将本发明的抗体或其片段、或者人 CXCL1 或其片段固定在固相载体中，酶检测与该抗体等及人 CXCL1 等的免疫学反应的方法。有直接法、间接法、夹心法等方法，本发明应用于夹心法。关于 ELISA 法的测定方法，请参照公知的方法（日本临床病理学会编“临床病理临时增刊特集第 53 号用于临床检查的免疫测定技术及应用”，临床病理刊行会，1983 年；石川荣治等编“酶免疫测定法”，第 3 版，医学书院，1987 年；北川常广等编“蛋白质核酸酶分册 No. 31 酶免疫测定法”，共立出版，1987 年，入江宝编“放射免疫测定法”，讲谈社 Scientific，1974 年；入江宝编“放射免疫测定法续”，讲谈社 Scientific，1979 年）。作为上述固相载体，可以使用聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚甲苯、聚丙烯、聚乙烯、聚氯乙烯、尼龙、聚甲基丙烯酸酯、乳胶、明胶、琼脂糖、纤维素、琼脂糖、玻璃、金属、陶瓷或磁性体等材料形成的微珠、微孔板、试管、棒或试验片等形状的不溶性载体。本发明的抗体或其片段、或者人 CXCL1 或其片段在固相载体上的固定，可以通过按照物理吸附法、化学结合法或上述方法的联用等公知的方法使其结合而达成。

[0123] 作为上述标记物质，例如在 ELISA 法的情况，可以使用过氧化物酶（POD）、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖氧化酶、乳酸脱氢酶、淀粉酶或生物素-抗生物素复合体等；在荧光免疫测定法的情况，可以使用异硫氰酸荧光素、四甲基罗丹明异硫氰酸酯、取代罗丹明异硫氰酸酯、二氯三嗪异硫氰酸酯（dichlorotriazine isothiocyanate）、Alexa480 或 AlexaFluor488 等；在放射免疫测定法的情况，可以使用氚、碘 125 或碘 131 等，但并不限于此。

[0124] 另外，发光免疫测定法可以使用 NADH—FMNH₂—荧光素酶系统、氨基苯二酰肼—过氧化氢—POD 系统、吖啶酯（acridinium ester）系统或二氧杂环丁烷化合物系统等。标记

抗原与抗体的结合法,在 ELISA 法的情况,可以使用戊二醛法、马来酰亚胺法、吡啶二硫醚(pyridyl disulfide) 法或高碘酸法等公知的方法,在放射免疫测定法的情况,可以使用氯胺 T 法、Bolton—Hunter 法等公知的方法。

[0125] 进而,本发明的免疫学测定方法,也可以如下进行:对由免疫比浊法、乳胶凝集反应、乳胶比浊法、红细胞凝集反应或粒子凝集反应等的免疫复合体凝集物的生成,可以通过光学方法或目视测定其透射光或散射光。这种情况下,作为溶剂,可以使用磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris 缓冲液或 Good's 缓冲液等,进而,也可含有聚乙二醇等反应促进剂或非特异性反应抑制剂。

[0126] 本发明的免疫学测定方法中,优选从 3 种上述抗人 CXCL1 部分序列单克隆抗体或其片段中选择 2 种使用。关于具体的方法,作为例子,举出了使用特异性识别序列号 1 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体、和特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体的情况,但本发明的实施方式并不限于此。

[0127] 例如,应用于 ELISA 法的夹心法时,首先,将特异性识别序列号 1 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体固相化在不溶性的载体上。固相化的抗体为特异性识别序列号 1 表示的氨基酸序列区的抗体时,可以为 1 种,也可以为多种。接着,在抗体的固相化表面上,使含有人 CXCL1 的样品作用,在载体的表面形成固相化抗体与人 CXCL1 的复合体。之后,通过使用洗涤液充分清洗,除去样品中存在的除人 CXCL1 之外的未结合物质。进而,制备特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体的标记体,使该标记抗体与结合有固相化抗体与人 CXCL1 的复合体的载体发生作用,使用洗涤液充分清洗后,利用标记进行检测,由此可以检测样品中存在的人 CXCL1。此时,标记抗体为特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体时,可以为 1 种,也可以为多种,但优选使用 2 种以上,较优选使用 2 种。另外,特异性识别序列号 1 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体与特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体的来源动物种类不同时,即使不对特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体进行标记,使用识别特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的抗体的标记二次抗体,也可以检测。

[0128] 使用特异性识别序列号 2 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体时,与上述相同。另外,固相化中使用的抗体与标记中使用的抗体,也可以分别相反地用于标记和固相化。

[0129] 另外,预先将标记抗体与含有人 CXCL1 的样品混合,形成抗原抗体复合体后,也可以在固相化抗体上作用。对固相化的抗体进行生物素标记时,将生物素化固相化抗体、含有人 CXCL1 的样品、实施除生物素之外的标记的抗体全部混合,形成抗原抗体复合体后,通过与将抗生物素固相化的载体作用,利用除生物素化之外的标记可以检测抗原抗体复合体。

[0130] 进而,本发明的免疫学测定方法,也可以使用免疫色谱法用试验条带。所谓免疫色谱法用试验条带,例如包括:由易于吸收样品的材料形成的样品接受部、含有标记的本发明的诊断剂的试剂部、样品与诊断剂的反应物移动的展开部、捕捉展开的反应物进行显色的显示部等。市售的妊娠诊断剂等具有与上述相同的形态。本测定方法的原理如下所述。首先,将样品供给样品接受部,样品接受部吸收样品,使样品到达试剂部。接着,试剂部中,样品中的人 CXCL1 与标记的上述抗人 CXCL1 部分序列单克隆抗体或其片段发生抗原抗体反应,形成的反应复合体在展开部中移动,到达显示部。在显示部中,上述反应复合体和另一种抗人 CXCL1 部分序列单克隆抗体发生反应,所述另一种抗人 CXCL1 部分序列单克隆抗体

与标记的单克隆抗体不同且识别 CXCL1 部分序列,之后所得的反应复合体被捕捉,可以呈现出由反应复合体的标记产生的显色。上述免疫色谱法用试验条带,侵袭性极低,不会对使用者造成痛苦或因使用试剂产生危险,因此,可以用于家庭监测,基于其结果能够以各医疗机构的水平进行细查・治疗(外科的切除等),可以用于预防转移・复发。另外,目前对于上述试验条带,例如通过如日本特开平 10—54830 号公报中记载的制造方法可以低成本大量生产。

[0131] 举例说明使用特异性识别序列号 1 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体、及特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体的情况时,首先,将含有人 CXCL1 的样品给予样品接受部,样品接受部吸收该样品使该样品达到试剂部。接着,在试剂部中,样品中的来自尿路上皮癌细胞的人 CXCL1 与特异性识别标记的本发明的序列号 1 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体发生反应,反应的复合体在展开部移动,到达显示部。在显示部中,上述反应复合体与特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体发生反应,从而见到显色。

[0132] 另外,本发明的测定方法也可以使用表面等离子体共振法(SPR 法)。所谓表面等离子体共振现象,是指以特定的入射角度(共振角)向金属薄膜照射激光时反射光强度显著衰减的现象。利用 SPR 现象原理的 SPR 传感器,可以以高灵敏度测定金属薄膜表面上的吸附物。因此,在该金属薄膜表面上事先将抗体及/或靶抗原固相化,通过使样品在该金属薄膜表面上通过,可以检测抗原抗体反应的结果产生的样品通过前后的金属表面上的吸附物的差。已知取代法、间接竞争法等,可以使用任一种。本技术在本领域公知。例如,请参照永田和弘、半田宏,生物物质相互作用的实时分析实验法, Springer・Verlag 东京,东京, 2000。

[0133] 进而,本发明的测定方法也可以使用石英晶体微天平测定法(QCM 法)。所述方法利用下述现象:物质吸附在安装在石英振荡器上的电极表面时,根据其质量石英振荡器的共振频率减少。使用该方法的 QCM 传感器,是根据水共振频率的变化量,定量地捕捉极微量的吸附物的质量测定传感器。本技术在本领域公知。例如,参见 J.Christopher Love, L.A.Estroff, J.K.Kriebel, R.G.Nuzzo, G.M.Whitesides, 2005, Self—Assembled, Monolayers of a Form of Nanotechnology, Chemical Review, 105:1103—1169;森泉丰荣、中本高道, 1997, 传感器工程, 昭晃堂, 等。

[0134] 6. 人 CXCL1 检测试剂盒

[0135] 另外,本发明可以作为用于实施上述免疫学的测定方法的试剂盒使用。即,以本发明的抗体或其片段为代表,可以将该抗体或该片段、标记二次抗体、以及标记的检测需要的基质、阳性对照或阴性对照、或样品的稀释和清洗中使用的缓冲液等组合,制成试剂盒。

[0136] 实施例

[0137] 以下,利用实施例具体地说明本发明,但本发明并不限定于所述实施例。

[0138] (实施例 1) 使用大肠杆菌制备重组型人 CXCL1

[0139] (人 CXCL1 基因的制备)

[0140] 为了制备用作抗体的免疫原的重组型人 CXCL1,首先,使用 HEK293 细胞制备人 CXCL1mRNA。mRNA 的制备使用 Qiashredder 及 RNeasy mini kit(Qiagen 公司制),按照附带的操作说明进行详细操作。

[0141] 然后,使用逆转录酶 SuperscriptII(invitrogen 公司制),以得到的总 mRNA 为模板合成 cDNA,制备人 cDNA 文库。逆转录反应按照上述酶附带的操作说明进行操作。

[0142] 接着,以得到的人 cDNA 文库为模板,使用由序列号 44 及 45 表示的碱基序列构成的引物集进行 PCR。序列号 44 表示的碱基序列含有人 CXCL1 基因的 5' 末端区的一部分及在其上游的 NdeI 识别序列。序列号 45 表示的碱基序列含有人 CXCL1 基因的 3' 末端区的一部分和在其下游的 BamHI 识别序列。使用 KOD(东洋纺公司制)作为 DNA 聚合酶,按照 KOD 附带的操作说明制备 PCR 的反应液,使其含有 10ng cDNA 文库及 10pmol 各引物。反应条件为在 94℃ 的温度下加热 10 分钟后,在 94℃ 下保持 30 秒、在 55℃ 下保持 30 秒、在 72℃ 下保持 1 分钟,将上述循环重复 30 次后,最后在 72℃ 下保温 4 分钟。扩增的 DNA 片段使用 Quantum prep PCR Kleen Spin Columns(Bio-rad 公司制)进行纯化。通过上述反应得到全长约 300bp 的 PCR 产物。

[0143] 为了将得到的 DNA 片段参入经过 HincII 切断及 BAP 处理的开环 pUC118(Takara Bio 公司制)内,而进行连接反应。使用 Ligation High(东洋纺公司制)作为 DNA 连接酶,按照附带的操作说明进行反应。接着,使用连接反应后的溶液,进行感受态细胞的转化。作为感受态细胞,使用大肠杆菌株 DH5 α (Takara Bio 公司制),详细操作按照附带的操作说明进行。将转化处理后的菌体涂布在含有 100 μ g / mL 抗生素氨苄青霉素的 LB 平板上,在 37℃ 下培养一夜。所得的转化体在含有 100 μ g / mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中于 37℃ 下培养一夜,通过小量制备(mini-prep)得到目标 pUC118_CXCL1。

[0144] 然后,使用限制酶 NdeI 及 BamHI 切断 pUC118_CXCL1,进行反应溶液的琼脂糖电泳。电泳后,从凝胶切出通过紫外线照射确认的约 300bp 的片段,进行 DNA 片段的提取。使用 PCR GFX Column(GE Healthcare Bio-Sciences 公司制)进行提取。为了将提取的 DNA 片段参入经过 NdeI / BamHI 切断处理的表达载体 pET16b(Novagen 公司制)(约 6kb 片段)内,进行连接反应。接着,使用连接反应后的溶液进行 DH5 α 的转化、转化体的培养、及小量制备,得到目标 pET16b_CXCL1。各个步骤按照上述方法进行。

[0145] (重组型人 CXCL1 的制备)

[0146] 为了制备重组型人 CXCL1,使用 pET16b_CXCL1 进行大肠杆菌株 Rosetta-Gami2(Novagen 公司制)的转化。将得到的转化体在 30mL 含有氨苄青霉素及氯霉素的 LB 培养基中、37℃ 下进行一夜前培养。然后,将前培养的转化体接种在 3L 相同培养基中,在 37℃ 下培养 3 小时,添加终浓度 1mM 的 IPTG,在 32℃ 下培养 6 小时,诱导目标重组型人 CXCL1 的表达后,通过离心分离回收菌体。

[0147] 将得到的菌体用 PBS 清洗后,使用 B-PER(PIERCE 公司制)以沉淀的形成制备得到不溶性级分。具体操作按照附带的操作说明进行。然后,使用包涵体溶解试剂(Inclusion body solubilization Reagent)(PIERCE 公司制)将不溶性级分可溶化后,使用 TALON 金属亲和性树脂(TALON Metal Affinity Resin)(CLONETECH 公司制)使组氨酸标签融合人 CXCL1 吸附。将蛋白质吸附的树脂用含有 10mM 咪唑的 PBS 进行清洗后,使用 1M 咪唑溶液溶出。

[0148] 接着,利用得到的溶出级分进行蛋白质的重折叠。首先,在加入 6M 尿素的 PBS 溶液中透析一夜后,向透析液中分步地加入 PBS 直至透析液中的尿素终浓度为 1M,进行稀释。最后,在新配制的 PBS 溶液中透析一夜,对得到的重折叠溶液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,利

用考马斯亮蓝染色确认分子量约 10,000Da 的组氨酸标签融合人 CXCL1 的纯化。

[0149] (实施例 2) 针对人 CXCL1 的小鼠单克隆抗体的制备及选择

[0150] (抗人 CXCL1 抗体产生小鼠的制作)

[0151] 将实施例 1 得到的 100 μ L 0.3mg / mL 人 CXCL1 溶液与 100 μ L MPL+TDM Emulsion(Corixa 公司制)混合,将其全部腹腔给与 7 周龄的 BALB / c 小鼠。在 2 周后及 4 周后,给与相同量的同样配制的人 CXCL1 溶液。接着,从小鼠尾部静脉采集 100 μ L 血液,静置一夜后,以 5000 $\times$ g 离心 5 分钟,回收上清作为血浆。

[0152] 向 96 孔聚苯乙烯平板(Greiner 公司制)的孔中加入 100 μ L 的 1 μ g / mL 人 CXCL1 溶液,固相化一夜。弃去孔中的蛋白溶液后,注入 200 μ L 稀释至 4 倍的 BlockAce 溶液(大日本住友制药公司制),在室温下静置 1 小时。之后,用 PBS-T 清洗,制成人 CXCL1 固相化平板。将上述得到的血浆稀释 100 倍,向上述人 CXCL1 固相化平板的孔中加入 100 μ L,在室温下静置 1 小时。之后,弃去孔中的溶液,用 PBS-T 清洗后,加入 100 μ L HRP 标记抗小鼠 IgG 溶液(Dako 公司制),进而在室温下静置 1 小时。弃去孔中的溶液,用 PBS-T 清洗后,加入 100 μ L TMB 溶液,使其反应 15 分钟。在 450nm 的吸光度下确认由反应产生的显色,判断在显色的血液样品中产生了针对人 CXCL1 的抗体。

[0153] (抗人 CXCL1 单克隆抗体的制备)

[0154] 对于已经确认产生了针对人 CXCL1 的抗体的小鼠,腹腔给与与上述同样配制的人 CXCL1 溶液,3 天后摘出脾。用注射器在摘出的脾上开个孔,注入 RPMI1640 培养基(GIBCO 公司制)挤压脾细胞,得到脾细胞液。得到的脾细胞液在 1200rpm 下离心 7 分钟后除去上清,在 RPMI1640 培养基中清洗。再次混悬于 RPMI1640 培养基中,计算细胞数,配制脾细胞数 1 / 10 量的 SP2 / 0 骨髓瘤细胞液。将两细胞液混合,在 2200rpm 下离心 10 分钟,弃去上清。用穿刺术(tapping)使细胞松散,添加将 PEG(ROCHE 公司制)和 HBSS(GIBCO 公司制)以 5 : 1 的比例混合得到的溶液 1mL,并搅拌。以后的操作中,除非另作说明,使用的溶液或培养基均在 37 $^{\circ}$ C 下保温。

[0155] 向加入了 PEG 和 HBSS 的细胞溶液中,经 5 分钟添加 9mLRPMI1640 培养基,慢慢混合后,在 2200rpm 下离心 10 分钟,除去上清。将得到的沉淀细胞混悬在添加有 15% FCS 及 HAT(ROCHE 公司制)的 RPMI1640 培养基中,以每孔 200 μ L 注入 96 孔细胞培养平板(Greiner 公司制)中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的条件下培养 1 周。

[0156] 将在添加 HAT 条件下生长的菌群判断为脾细胞与骨髓瘤细胞融合的杂交瘤,将生长有菌群的孔中的上清稀释 5 倍,向上述人 CXCL1 固相化平板的孔中添加 100 μ L 稀释液,用与上述同样的方法确认有无抗体产生。以确认到抗体产生的孔作为阳性。将阳性孔的菌群混悬在含有 15% FCS 和 HT(invitrogen 公司制)的 RPMI 培养基中,利用有限稀释法进行阳性克隆的克隆。将克隆的结果得到的 75 种杂交瘤在 SFM 培养基(GIBCO 公司制)中驯化,产生抗体。在 60mL100% SFM 培养基中以 1 $\times$ 10⁵细胞 / mL 接种杂交瘤,培养 10 天直到细胞死亡,之后将培养液在 3000rpm 下离心分离 15 分钟除去细胞。所得的培养上清用 Mab Trap Kit(GE HEALTHCARE BIOSCIENCE 公司制)纯化所含的抗体。

[0157] (抗人 CXCL1 单克隆抗体的筛选)

[0158] 对于上述 75 种纯化抗体,用如下所述的方法筛选与人 CXCL1 亲和性高的抗体。首先,将各纯化抗体分别制备 10 μ g / mL 溶液,分别以每孔 100 μ L 加入 96 孔聚苯乙烯平板

(Greiner 公司制) 的孔中,固相化一夜。弃去孔内的纯化抗体溶液后,注入 200 μ g 稀释至 4 倍的 BlockAce 溶液(大日本住友制药公司制),在室温下静置 1 小时。之后,弃去溶液,将经过用 PBS—T 清洗的平板作为纯化抗体固相化平板。接着,将从 1000pg / mL 至 15pg / mL 阶段稀释重组型人 CXCL1 的抗原溶液添加到上述纯化抗体固相化平板的各孔中,每孔 100 μ L,在室温下反应 1 小时。接着,弃去抗原溶液,用 PBS—T 清洗后,向孔中加入 100 μ L 的 50 μ g / mL 生物素标记抗人 CXCL1 多克隆抗体(R & D SYSTEMS 公司制),在室温下反应 1 小时。弃去孔内的溶液,用 PBS—T 清洗后,使 100 μ L avidin—HRP 溶液(R & D SYSTEMS 公司制)在室温下反应 30 分钟。进而,弃去 avidin—HRP 溶液,用 PBS—T 清洗后,加入 100 μ L TMB 溶液使其反应 15 分钟。通过添加 100 μ L 2N 硫酸溶液,使反应停止。通过在 450nm 处测定吸光度确认显色。将显色反应强的孔中的纯化抗体判断为与人 CXCL1 亲和性高的抗体。其结果,筛选出 5 种抗体: IgG1—1、IgG1—3、IgG1—10、IgG1—14、IgG2b—1。

[0159] (使用杂交瘤确定单克隆抗体的轻链及重链 cDNA 序列和氨基酸序列)

[0160] 对于筛选出的 5 种抗体,确定其轻链及重链的 cDNA 序列和氨基酸序列。首先,使用添加了 15% FCS 的 RPMI1640 培养基,在 37℃、5% CO₂ 的条件下对产生各个抗体的杂交瘤进行培养至 1×10⁶ 细胞 / mL。之后,培养液在 1200rpm 离心分离 5 分钟,回收细胞。用回收的杂交瘤制备 mRNA。制备中使用 Qiashredder 及 RNeasy mini kit(Qiagen 公司制),按照附带的操作说明进行详细操作。接着,使用逆转录酶 SuperscriptII(invitrogen 公司制),以得到的 Total mRNA 为模板、使用 Oligo dT 引物合成 cDNA,制作 cDNA 文库。

[0161] 然后,以各杂交瘤得到的 cDNA 文库为模板,使用 Mouse Ig Primer(Novagen 公司制)进行 PCR,将扩增产物(小鼠免疫球蛋白可变区 cDNA)插入 Invitrogen 公司提供的 ZERO BLUNT PCR TOPO Vector 的 EcoRI 部位进行连接。连接使用 Ligation High(东洋纺公司制),按照附带的操作说明进行。使用连接反应液进行感受态细胞的转化。感受态细胞使用 DH5 α (Takara Bio 公司制),按照附带的操作说明进行详细操作。将转化处理后的菌体涂布在含有 100 μ g / mL 的氨苄青霉素的 LB 平板上,在 37℃ 下培养一夜。将来自各扩增产物的转化体接种在含有 100 μ g / mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,分别为 4 个克隆,在 37℃ 下培养一夜。通过小量制备利用各培养液制备载体 DNA 溶液,结果对于各扩增产物,得到 4 种参入编码单克隆抗体的 DNA 的载体溶液。

[0162] 对于得到的载体溶液,使用 M13 引物进行编码单克隆抗体的区域 DNA 序列分析。分析使用 3130×1 遗传分析仪(Applied Biosystems 公司制)进行。将在插入区没有终止密码子的克隆判断为编码目标单克隆抗体的 DNA 序列,确定上述 5 个抗体(IgG1—1、IgG1—3、IgG1—10、IgG1—14、IgG2b—1)的轻链、重链的 DNA 序列。对于经过确定的 DNA 序列,根据大肠杆菌的密码子使用频度,确定编码的氨基酸序列,可以得到序列号 4 ~ 43 所示的序列。

[0163] 作为编码 IgG1—1 的氨基酸序列,得到序列号 36 ~ 43 表示的氨基酸序列。更详细而言,序列号 36、37、38 分别编码 IgG1—1 的轻链 CDR1、CDR2、CDR3。另外,序列号 39、40、41 分别编码相同 IgG1—1 的重链 CDR1、CDR2、CDR3。另外,序列号 42、43 分别编码 IgG1—1 的轻链可变区全长、重链可变区全长。

[0164] 作为编码 IgG1—3 的氨基酸序列,得到序列号 28 ~ 35 表示的氨基酸序列。更详细而言,序列号 28 ~ 33 依次编码 IgG1—3 的轻链 CDR1 ~ 3、重链 CDR1 ~ 3。另外,序列号 34、35 分别编码 IgG1—3 的轻链可变区全长、重链可变区全长。

[0165] 作为编码 IgG1—10 的氨基酸序列,得到序列号 4~11 表示的氨基酸序列。更详细而言,序列号 4~9 依次编码 IgG1—10 的轻链 CDR1~3、重链 CDR1~3。序列号 10、11 分别编码 IgG1—10 的轻链可变区全长、重链可变区全长。

[0166] 作为编码 IgG1—14 的氨基酸序列,得到序列号 20~27 表示的氨基酸序列。更详细而言,序列号 20~25 依次编码 IgG1—14 的轻链 CDR1~3、重链 CDR1~3。序列号 26、27 分别编码 IgG1—14 的轻链可变区全长、重链可变区全长。

[0167] 作为编码 IgG2b—1 的氨基酸序列,得到序列号 12~19 表示的氨基酸序列。更详细而言,序列号 12~17 依次编码 IgG2b—1 的轻链 CDR1~3、重链 CDR1~3。序列号 18、19 分别编码 IgG2b—1 的轻链可变区全长、重链可变区全长。

[0168] (实施例 3) 筛选出的抗体识别的人 CXCL1 部分序列的分析

[0169] 针对实施例 2 中筛选出的 5 个抗体,进行识别的人 CXCL1 氨基酸序列上的表位分析。

[0170] 首先,向 100 μ L 的 1 μ g / μ L 人 CXCL1 溶液中添加 DTT,使终浓度为 10mM,在 95℃下反应 5 分钟,进行 CXCL1 内的二硫键的还原,接着添加终浓度 20mM 的碘乙酰胺,在 37℃、避光条件下进行 30 分钟硫醇基的烷基化反应。向得到的 12 μ g 还原烷基化人 CXCL1 中分别添加 20 μ g 实施例 2 中筛选出的各个抗体,添加 100mM Tris—HCl 缓冲液 (pH8.0) 至 100 μ L,一边搅拌混合一边在室温下反应 1 小时。

[0171] 接着,添加胰蛋白酶 (Promega 公司制)、氨肽酶 M (ROCHE 公司制)、羧肽酶 Y (ROCHE 公司制) 使终浓度分别为 0.2 μ g、0.5 μ U、0.02 μ g,在 37℃下使其反应 2 小时以上,然后在事先用 1% BSA—PBS 封闭、用 PBS 清洗的 ProteinA—玻璃微珠 (GE HEALTHCARE BIO—SCIENCES 公司制) 和 NP-40 缓冲液 (100mM Tris—HCl 缓冲液 (pH8.0) 5mM EDTA、150mM NaCl、1% NP-40) 中混合,在 4℃下反应 30 分钟。

[0172] 反应液用 25mM 碳酸铵缓冲液 (pH8.0) 清洗后,使用 100 μ L 的 0.1% 甲酸溶出抗原抗体复合物,溶出液使用 Q—TOF Premier (Waters—MicroMass 公司制) 进行 LC—MS 分析。按照机器附带的操作说明进行分析。

[0173] 其结果,判明了实施例 2 中得到的各抗体识别的人 CXCL1 部分序列,示于表 1。

[0174] (参考例 1) 市售抗体识别的人 CXCL1 部分序列的分析

[0175] 对于在市售的人 CXCL1 检测试剂盒即 Human CXCL1 / GRO α DuoSet (R&DSYSTEMS 公司制) 中作为固相化用抗体添加的单克隆抗体,与实施例 3 同样地对识别的人 CXCL1 氨基酸序列上的表位进行分析。

[0176] 其结果,明确了市售抗体识别的人 CXCL1 部分序列,示于表 1。

[0177] [表 1]

[0178]

抗体名	序列	序列号
IgG1—1 (实施例 3)	NGRKACLNPA SPIVKKIIEKMLNSDKSN	3
IgG1—3 (实施例 3)	SPGP HCAQTEVIATLK	2

IgG1—10(实施例 3)	NGRKACLNPA SPIVKKIIEKMLNSDKSN	3
IgG1—14(实施例 3)	NGRKACLNPA SPIVKKIIEKMLNSDKSN	3
IgG2b—1(实施例 3)	RCQCLQTLQG IHPKNIQSVNVK	1
市售抗体 (参考例 1)	SPGPHCAQTEVIATLK	2

[0179] (实施例 4) 使用单克隆抗体 IgG2b-1 及单克隆抗体 IgG1—10 通过夹心 ELISA 法检测人 CXCL1

[0180] 使用由实施例 3 判明特异性识别序列号 1 表示的氨基酸序列区的抗体 IgG2b-1、及判明特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的抗体 IgG1—10 的生物素标记体,通过夹心 ELISA 法进行人 CXCL1 的测定。IgG1—10 的生物素化使用 Sulfo-NHS Biotin(PIERCE 公司制) 进行,按照附带的操作说明进行详细操作。首先,配制 IgG2b-1 的 10 μ g / mL 的 PBS 溶液后,加入 96 孔聚苯乙烯平板 (Greiner 公司制) 的孔中,每孔 100 μ L,固相化一夜。次日,弃去上述溶液,注入 200 μ L 1% BSA—PBS 溶液 (SIGMA 公司制),在室温下静置 1 小时。之后,用 PBS—T 清洗,制成纯化抗体固相化平板。然后,向各孔中分别添加 100 μ L 使用 1% BSA—PBS 将重组型人 CXCL1 从 500pg / mL 至 7.8pg / mL 进行阶段稀释得到的抗原溶液,在室温下反应 1 小时。然后,弃去孔内的抗原溶液,用 PBS—T 清洗后,在室温下使经过 1% BSA—PBS 稀释的 100 μ L 1 μ g / mL 生物素标记 IgG1—10 反应 1 小时。清洗后,使 100 μ L avidin—HRP 溶液 (R&DSYSTEMS 公司制) 在室温下反应 30 分钟。Avidin—HRP 的稀释也使用 1% BSA—PBS 进行。用 PBS—T 清洗后,加入 100 μ L TMB 溶液,使其反应 15 分钟后,添加 100 μ L 的 2N 硫酸溶液使反应停止,测定 450nm 的吸光度。结果示于图 1。

[0181] (实施例 5) 使用单克隆抗体 IgG2b-1 及单克隆抗体 IgG1—14 通过夹心 ELISA 法检测人 CXCL1

[0182] 使用由实施例 3 判明特异性识别序列号 1 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体 IgG2b-1、及判明特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体 IgG1—14 的生物素标记体,通过夹心 ELISA 法测定人 CXCL1。与实施例 4 同样地实施 IgG1—14 的生物素化及夹心 ELISA。结果示于图 1。

[0183] (实施例 6) 使用单克隆抗体 IgG1—3 及单克隆抗体 IgG1—14、通过夹心 ELISA 法检测人 CXCL1

[0184] 使用由实施例 3 判明特异性识别序列号 2 表示的氨基酸序列区的抗体 IgG1—3、及判明特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的抗体 IgG1—14 的生物素标记体,通过夹心 ELISA 法进行人 CXCL1 的测定。与实施例 4 同样地实施 IgG1—14 的生物素化及夹心 ELISA。结果示于图 1。

[0185] (比较例 1) 使用市售试剂盒通过夹心 ELISA 法检测人 CXCL1

[0186] 使用市售的人 CXCL1 检测试剂盒即 Human CXCL1 / GRO α DuoSet(R & DSYSTEMS 公司制) 测定重组型人 CXCL1。所述试剂盒将抗人 CXCL1 小鼠单克隆抗体 (识别序列号 2 表示的氨基酸序列) 固相化,检测使用生物素化标记山羊多克隆抗体。在 Greiner 公司制的 96 孔聚苯乙烯平板上进行固相化,详细的实验操作按照附带的操作说明进行。结

果示于图 1、图 4 及图 5。

[0187] 根据实施例 4 ~ 6、比较例 1 判明：与现有方法的市售人 CXCL1 检测试剂盒比较，采用本发明的免疫学的测定法能够检测 7.8pg / mL 的人 CXCL1，测定灵敏度提高。

[0188] (实施例 7) 使用单克隆抗体 IgG2b-1、单克隆抗体 IgG1—10 及 IgG1—14 的混合液通过夹心 ELISA 法检测人 CXCL1

[0189] 使用由实施例 3 判明特异性识别序列号 1 表示的氨基酸序列区的抗体 IgG2b-1、及判明特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的抗体 IgG1-10 的生物素标记体、或将 IgG-10 和 IgG1—14 分别进行生物素标记得到的生物素标记体的混合液，通过夹心 ELISA 法测定人 CXCL1。与实施例 4 同样地实施抗体的生物素化及夹心 ELISA。其结果示于图 2。

[0190] 通过使用 2 种特异性识别相同的序列号 3 表示的氨基酸序列区的单克隆抗体作为标记抗体，与相同浓度的 1 种抗体相比，各浓度的信号强度提高，判明与使用 1 种识别相同序列的标记抗体相比，使用 2 种的标记抗体时人 CXCL1 的测定灵敏度提高。

[0191] (实施例 8) 使用单克隆抗体 IgG2b-1、及单克隆抗体 IgG1—10 或 IgG1—14 通过夹心 ELISA 法检测尿中添加的人 CXCL1

[0192] 使用由实施例 3 判明的特异性识别序列号 1 表示的氨基酸序列区的抗体 IgG2b-1、及判明特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的抗体 IgG1—10 的生物素标记体、或使用 IgG1—14 的生物素标记体，通过夹心 ELISA 法测定尿中添加的人 CXCL1。使用 Sulfo-NHS Biotin(PIERCE 公司制) 进行 IgG1-10 及 IgG1—14 的生物素化，按照附带的操作说明进行详细操作。首先，配制 IgG2b-1 的 10 μ g / mL 的 PBS 溶液后，加入 96 孔聚苯乙烯平板(Greiner 公司制) 的孔中，每孔 100 μ L，固相化一夜。次日，弃去上述溶液，注入 200 μ L 1% BSA—PBS 溶液(SIGMA 公司制)，在室温下静置 1 小时。之后，用 PBS—T 清洗，制成纯化抗体固相化平板。然后，向当日采集的人尿中加入重组型人 CXCL1 使其浓度为 250pg / mL，将使用相同人尿阶段性稀释至 3.9pg / mL 得到的抗原添加尿添加到各孔中，每孔 100 μ L，在室温下使其反应 1 小时。然后，弃去孔内的抗原溶液，用 PBS—T 清洗后，使用 1% BSA—PBS 稀释使 100 μ L 所得的 1 μ g / mL 生物素标记 IgG1—10 在室温下反应 1 小时。清洗后，使 100 μ L avidin—HRP 溶液(R & D SYSTEMS 公司制) 在室温下反应 30 分钟。Avidin—HRP 也使用 1% BSA—PBS 进行稀释。用 PBS—T 清洗后，加入 100 μ L TMB 溶液使其反应 15 分钟后，添加 100 μ L 2N 硫酸溶液使反应停止，测定 450nm 的吸光度。结果示于图 3。

[0193] (实施例 9) 使用单克隆抗体 IgG1—3 及单克隆抗体 IgG1—14 通过夹心 ELISA 法检测尿中添加的人 CXCL1

[0194] 使用由实施例 3 判明特异性识别序列号 2 表示的氨基酸序列区的抗体 IgG1—3、及判明特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的抗体 IgG1-14 的生物素标记体，通过夹心 ELISA 法测定尿中添加的人 CXCL1。与实施例 8 同样地实施抗体的生物素化及夹心 ELISA。结果示于图 3。

[0195] (比较例 2) 使用市售试剂盒通过夹心 ELISA 法检测尿中人 CXCL1

[0196] 使用市售的人 CXCL1 检测试剂盒即 Human CXCL1 / GRO α DuoSet(R & D SYSTEMS 公司制) 测定尿中添加的重组型人 CXCL1。按照附带的操作说明进行详细操作，与实施例 8 同样地配制人尿中添加的 CXCL1 溶液。结果示于图 3。

[0197] 根据实施例 8 ~ 9、比较例 2 判明：与现有方法的市售人 CXCL1 检测试剂盒比较，

采用本发明的免疫学的测定法甚至可以检测在尿中为 31.25pg / mL 的人 CXCL1,测定灵敏度提高。

[0198] (实施例 10) 使用市售试剂盒单克隆抗体及单克隆抗体 IgG1—10、通过夹心 ELISA 法检测 CXCL1

[0199] 使用实施例 3 中判明特异性识别序列号 2 表示的氨基酸序列区的市售试剂盒 Human CXCL1 / GRO alpha DuoSet(R & DSYSTEMS 公司制) 附带的小鼠单克隆抗体、及判明特异性识别序列号 3 表示的氨基酸序列区的抗体 IgG1—10 的生物素标记体,通过夹心 ELISA 法测定缓冲液中添加的人 CXCL1。使用 Sulfo-NHS Biotin(PIERCE 公司制) 进行 IgG1—10 的生物素化,按照附带的操作说明进行详细操作。首先,配制市售试剂盒附带的小鼠单克隆抗体的 4 μg/mL 的 PBS 溶液后,加入 96 孔聚苯乙烯平板(Greiner 公司制) 的孔中,每孔 100 μL,固相化一夜。次日,弃去上述溶液,注入 200 μL 1% BSA—PBS 溶液(SIGMA 公司制),在室温下静置 1 小时。之后,用 PBS—T 清洗,制成纯化抗体固相化平板。然后,使用 1% BSA—PBS 将重组型人 CXCL1 从 500pg / mL 阶段稀释至 7.8pg / mL,将所得的抗原溶液添加到各孔中,每孔 100 μL,在室温下使其反应 1 小时。然后,弃去孔内的抗原溶液,用 PBS—T 清洗后,使用 1% BSA—PBS 稀释,使 100 μL 所得的 1 μg / mL 生物素标记 IgG1—10 在室温下反应 1 小时。清洗后,使 100 μL avidin—HRP 溶液(R & DSYSTEMS 公司制) 在室温下反应 30 分钟。Avidin—HRP 也使用 1% BSA—PBS 进行稀释。用 PBS—T 清洗后,加入 100 μL TMB 溶液使其反应 15 分钟后,添加 100 μL 2N 硫酸溶液使反应停止,测定 450nm 的吸光度。结果示于图 4。

[0200] 由此可以判明:即使在使用市售试剂盒附带的单克隆抗体作为识别序列号 2 的抗体时,在与识别序列号 3 的抗体组合的夹心 ELISA 法中,也能够检测 7.8pg / mL 的人 CXCL1。另外,判明了在将市售试剂盒附带的单克隆抗体与识别序列号 3 的抗体组合进行夹心 ELISA 法时,与用市售试剂盒测定的情况(比较例 1) 相比,测定灵敏度提高。

[0201] (实施例 11) 使用取得的抗体通过 ELISA 法检测人 CXCL1

[0202] 对于实施例 2 中筛选出的 5 种抗体 IgG1—1、IgG1—3、IgG1—10、IgG1—14、IgG2b—1,分别制备它们的 10 μg / mL 的 PBS 溶液,之后,以每孔 100 μL 加入到 96 孔聚苯乙烯平板(Greiner 公司制) 的孔中,固相化一夜。次日,弃去上述溶液,注入 200 μL 1% BSA—PBS 溶液(SIGMA 公司制),在室温下静置 1 小时。之后,用 PBS—T 清洗,制成纯化抗体固相化平板。然后,使用 1% BSA—PBS 将重组型人 CXCL1 蛋白质从 125pg / mL 阶段性稀释至 15pg / mL,将由此所得的抗原溶液添加到各孔中,每孔 100 μL,在室温下使其反应 1 小时。然后,弃去孔内的抗原溶液,用 PBS—T 清洗后,使用 1% BSA—PBS 稀释得到 50ng / mL 生物素标记抗人 CXCL1 多克隆抗体(R&DSYSTEMS 公司制),将 100 μL 所得的生物素标记抗人 CXCL1 多克隆抗体在室温下反应 1 小时。清洗后,使 100 μL avidin—HRP 溶液(R & DSYSTEMS 公司制) 在室温下反应 30 分钟。Avidin—HRP 也使用 1% BSA—PBS 进行稀释。用 PBS—T 清洗后,加入 100 μL TMB 溶液反应 15 分钟后,添加 100 μL 2N 硫酸溶液使反应停止,测定 450nm 的吸光度。结果示于图 5。

[0203] 根据实施例 10、11 及比较例 1 可以判明:本发明的抗体 IgG1—1、IgG1—3、IgG1—10、IgG1—14、IgG2b—1 信号均强于市售抗体,人 CXCL1 的检测能力高。

[0204] (实施例 12) 使用取得的抗体检测血浆中的人 CXCL1

[0205] 使用实施例 2 中筛选出的 5 种抗体 IgG1—1、IgG1—3、IgG1—10、IgG1—14、IgG2b-1, 进行血浆中溶解的人 CXCL1 的检测。

[0206] 首先, 将各抗体分别配制成 $10\ \mu\text{g} / \text{mL}$ 的 PBS 溶液后, 加入 96 孔聚苯乙烯平板 (Greiner 公司制) 的孔中, 每孔 $100\ \mu\text{L}$, 固相化一夜。次日, 弃去上述溶液, 注入 $200\ \mu\text{L}$ 稀释至 4 倍的 1% BSA—PBS 溶液 (SIGMA 公司制), 在室温下静置 1 小时。之后, 用 PBS—T 清洗, 制成纯化抗体固相化平板。

[0207] 然后, 配制 $500\text{pg} / \text{mL}$ 重组型人 CXCL1 蛋白质的血浆溶液, 用相同血浆阶段稀释至 $125\text{pg} / \text{mL}$ 制成抗原血浆溶液的稀释系列。将抗原血浆溶液以每孔 $100\ \mu\text{L}$ 添加到各孔中, 在室温下反应 1 小时后, 弃去抗原溶液, 用 PBS—T 清洗。

[0208] 接着, 添加 $100\ \mu\text{L}$ 用 1% BSA—PBS 稀释的 $50\text{ng} / \text{mL}$ 生物素标记抗人 CXCL1 多克隆抗体 (R & D SYSTEMS 公司制), 在室温下反应 1 小时。清洗后, 使 $100\ \mu\text{L}$ 经过用 1% BSA—PBS 稀释的 avidin—HRP 溶液 (R & D SYSTEMS 公司制) 在室温下反应 30 分钟。用 PBS—T 清洗后, 加入 $100\ \mu\text{L}$ TMB 溶液反应 15 分钟后, 添加 $100\ \mu\text{L}$ 2N 硫酸溶液使反应停止, 测定 450nm 的吸光度。结果如图 6 所示。

[0209] (比较例 3) 使用市售抗体检测血浆中的人 CXCL1

[0210] 使用市售的抗人 CXCL1 单克隆抗体即 MAB275 (R & D SYSTEMS 公司制), 检测血浆中溶解的人 CXCL1。配制用 PBS 稀释的 $10\ \mu\text{g} / \text{mL}$ 的 MAB275 溶液, 分别以每孔 $100\ \mu\text{L}$ 加入 96 孔聚苯乙烯平板 (Greiner 公司制) 的孔中, 固相化一夜。之后用与实施例 6 同样的方法进行。结果示于图 6。

[0211] 由实施例 12、比较例 3 可知本发明的 5 种抗体均能够检测血浆中溶解的人 CXCL1。

[0212] (实施例 13) 使用取得的抗体检测尿中的人 CXCL1

[0213] 使用实施例 2 中筛选出的 5 种抗体 IgG1—1、IgG1—3、IgG1—10、IgG1—14、IgG2b-1, 检测尿中溶解的人 CXCL1。

[0214] 首先, 将各抗体分别配制成 $10\ \mu\text{g} / \text{mL}$ 的 PBS 溶液后, 以每孔 $100\ \mu\text{L}$ 加入 96 孔聚苯乙烯平板 (Greiner 公司制) 的孔中, 固相化一夜。次日, 弃去上述溶液, 注入 $200\ \mu\text{L}$ 稀释至 4 倍的 1% BSA—PBS 溶液 (SIGMA 公司制), 在室温下静置 1 小时。之后, 用 PBS—T 清洗, 制成纯化抗体固相化平板。

[0215] 然后, 配制 $500\text{pg} / \text{mL}$ 重组型人 CXCL1 蛋白质的尿溶液, 用相同的尿阶段稀释至 $125\text{pg} / \text{mL}$ 制成抗原尿溶液的稀释系列。将上述溶液以每孔 $100\ \mu\text{L}$ 添加到各孔中, 在室温下反应 1 小时, 之后弃去抗原溶液, 用 PBS—T 清洗。

[0216] 接着, 添加 $100\ \mu\text{L}$ 用 1% BSA—PBS 稀释的 $50\text{ng} / \text{mL}$ 生物素标记抗人 CXCL1 多克隆抗体 (R&D SYSTEMS 公司制), 在室温下反应 1 小时。清洗后, 使 $100\ \mu\text{L}$ 经过用 1% BSA—PBS 稀释的 avidin—HRP 溶液 (R & D SYSTEMS 公司制) 在室温下反应 30 分钟。用 PBS—T 清洗后, 加入 $100\ \mu\text{L}$ TMB 溶液使其反应 15 分钟, 添加 $100\ \mu\text{L}$ 2N 硫酸溶液使反应停止, 测定 450nm 的吸收。结果示于图 7。

[0217] (比较例 4) 使用市售抗体检测尿中的人 CXCL1

[0218] 使用市售的抗人 CXCL1 单克隆抗体即 MAB275 (R & D SYSTEMS 公司制), 检测尿中溶解的人 CXCL1。配制用 PBS 稀释的 $10\ \mu\text{g} / \text{mL}$ 的 MAB275 溶液, 分别以每孔 $100\ \mu\text{L}$ 加入 96 孔聚苯乙烯平板 (Greiner 公司制) 的孔中, 固相化一夜。之后用与实施例 13 同样的方

法进行。结果示于图 7。

[0219] 由实施例 13、比较例 4 可知本发明的 5 种抗体中有 4 种抗体也能够检测尿中溶解的人 CXCL1。

[0220] (实施例 14) 使用单克隆抗体 IgG1—1、IgG1—3、IgG1—10、IgG1—14、IgG2b-1 的膀胱癌细胞进行的侵袭能力的中和活性测定实验

[0221] 对于实施例 2 中筛选出的 5 种抗体 IgG1—1、IgG1—3、IgG1—10、IgG1—14、IgG2b-1, 进行抑制膀胱癌细胞的侵袭能力的中和活性的测定。

[0222] 首先, 将膀胱癌细胞 T24 细胞接种在添加了 10% FCS、12.5mMHEPES 的 RPMI1640 培养基中, 使浓度为 1.0×10^5 细胞 / mL, 进行 40 小时前培养。培养后回收细胞, 对于与各抗体混合的细胞溶液, 使用 Matrigel 侵袭室 (Matrigel Invasion Chamber) (BD Falcon) 测定侵袭能力。按照附带的操作说明进行详细操作。向 Matrigel 侵袭室中添加 100 μ L 的 2.0×10^5 细胞 / mL 的 PBS 悬浮液及终浓度为 10 μ g / mL 的各抗体, 在 37℃、5% 二氧化碳的条件下, 进行侵袭培养 5 小时。培养后, 用快速染色 (Diff-Quick) 试剂 (Sysmex 公司制) 将小室下部染色, 计算侵袭至小室下部的膀胱癌细胞数。用显微镜进行计数, 以 0.8cm $\times$ 0.6cm 作为 1 个视野, 测量 5 个视野并合计。测定进行 2 次 (n=2), 将合计值平均, 将所得结果示于图 8。

[0223] (比较例 5) 使用市售抗体的膀胱癌细胞的侵袭能力的中和活性测定实验

[0224] 对于市售的抗人 CXCL1 单克隆抗体即 MAB275 (R & D SYSTEMS 公司制), 进行抑制膀胱癌细胞的侵袭能力的中和活性的测定。方法与实施例 14 同样地进行。结果示于图 8。

[0225] 由实施例 14 及比较例 5 可知: 本发明的 5 个抗体显示与市售抗体同等或更高的中和活性, 特别是 IgG1—1、IgG1—10、IgG1—14、IgG2b-1 显示出高活性。

[0226] (实施例 15) 使用单克隆抗体 IgG1—3、IgG1—10、IgG1—14、IgG2b-1 进行的膀胱癌细胞的侵袭能力的中和活性测定实验 2

[0227] 对于实施例 2 中筛选出的 5 种抗体中的 IgG1—3、IgG1—10、IgG1—14、IgG2b-1 的 4 种, 进行抑制膀胱癌细胞的侵袭能力的中和活性的测定。需要说明的是, 与实施例 14 不同, 抗体不是在即将测定侵袭能力之前混合, 而是从前培养的阶段开始混合。

[0228] 首先, 将膀胱癌细胞 T24 细胞接种在添加了 10% FCS、12.5mMHEPES 的 RPMI1640 培养基中, 使浓度为 1.0×10^5 细胞 / mL, 添加各抗体使终浓度为 10 μ g / mL 后, 进行培养 40 小时。培养后回收细胞, 对于与各抗体混合的细胞溶液, 使用 Matrigel 侵袭室 (BD Falcon) 测定侵袭能力。之后进行与实施例 14 同样的实验, 只是将侵袭培养时间变更为 6.5 小时。侵袭的细胞数的测量也与实施例 14 同样地进行, 结果示于图 8。

[0229] (比较例 6) 使用市售抗体的膀胱癌细胞的侵袭能力的中和活性测定实验 2

[0230] 对于市售的抗人 CXCL1 单克隆抗体即 MAB275 (R & D SYSTEMS 公司制), 进行抑制膀胱癌细胞的侵袭能力的中和活性的测定。与比较例 5 不同, 抗体不是在即将测定侵袭能力前混合、而是从前培养的阶段开始混合。方法与实施例 15 同样地进行。结果示于图 9。

[0231] 由实施例 15、比较例 6 可知, 本发明所含的 4 个抗体均显示出比市售抗体更高的中和活性。

[0232] 产业上的可利用性

[0233] 根据本发明, 能够以比现有技术更高的灵敏度测定人 CXCL1 的浓度, 因此, 本发明

可以用于尿路上皮癌等癌症的检测。

[0001]

序列表

<110> 东丽株式会社

<120> 抗人CXCL1单克隆抗体或其片段

<130> PH-4128-PCT

<150> JP 2008-281908

<151> 2008-10-31

<150> JP 2009-039411

<151> 2009-02-23

<160> 45

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 表位

<400> 1

Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln Gly Ile His Pro Lys Asn Ile
1 5 10 15

Gln Ser Val Asn Val Lys
20

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 表位

<400> 2

Ser Pro Gly Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys
1 5 10 15

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 表位

<400> 3

Asn Gly Arg Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Ile Val Lys Lys
1 5 10 15

Ile Ile Glu Lys Met Leu Asn Ser Asp Lys Ser Asn
20 25

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 可变区序列

[0002]

<400> 4

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Phe Gly Asp Ser Leu Met His
1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 可变区序列

<400> 5

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Pro
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 可变区序列

<400> 6

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr
1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 可变区序列

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Asp Thr Tyr Ala Met Asn
1 5 10

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 可变区序列

<400> 8

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Ala

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 可变区序列

<400> 9

[0003]

Gly Gly Phe Ala Asp
 1 5

<210> 10
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 可变区序列

<400> 10

Glu Phe Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Ser
 20 25 30

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Glu Ser Val Asp Ser Phe Gly Asp Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu
 65 70 75 80

Glu Pro Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe
 130 135 140

Pro Pro Ser Ser Lys Leu Gly
 145 150

<210> 11
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 可变区序列

<400> 11

Glu Phe Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Phe Val Val Phe Tyr
 1 5 10 15

Gln Gly Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45

[0004]

Thr Phe Asp Thr Tyr Ala Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Val Thr Arg Ile Arg Ser Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala
 65 70 75 80
 Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys Ala Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 85 90 95
 Asp Ser Gln Asn Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu
 100 105 110
 Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg Gly Gly Phe Ala Asp Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Pro Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 130 135 140
 Val Tyr Pro Leu Val Pro Gly Ser Leu
 145 150

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 可变区序列

<400> 12

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 可变区序列

<400> 13

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 可变区序列

<400> 14

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

[0005]

<223> 可变区序列

<400> 15

Asn Tyr Trp Ile Asn
1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 可变区序列

<400> 16

Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Asn Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 可变区序列

<400> 17

Gly Gly Tyr Gly Arg Glu Gly Ala Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 18

<211> 150

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 可变区序列

<400> 18

Glu Phe Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
20 25 30

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
100 105 110

[0006]

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 115 120 125
 Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe
 130 135 140
 His His Pro Val Ser Leu
 145 150
 <210> 19
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 可变区序列
 <400> 19
 Glu Phe Met Glu Cys Ser Trp Val Ile Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr
 1 5 10 15
 Ala Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
 20 25 30
 Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr
 35 40 45
 Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Asn Thr
 65 70 75 80
 Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser
 85 90 95
 Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
 100 105 110
 Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Tyr Gly Arg Glu Gly Ala Val
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 130 135 140
 Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Leu
 145 150 155
 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 可变区序列
 <400> 20
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Phe Tyr Gly Asn Arg Leu Leu His
 1 5 10 15

[0007]

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 21

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 22

Gln Gln Ser Asn Lys Asp Pro Phe
1 5

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 23

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn
1 5 10

<210> 24
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 24

Arg Ile Arg Ser Glu Ser Tyr Asp Phe Ala Thr Phe Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 25

Gly Gly Phe Asp Cys
1 5

[0008]

<210> 26
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> 可变区序列

 <400> 26
 Glu Phe Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

 Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
 20 25 30

 Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

 Glu Ser Val Asp Phe Tyr Gly Asn Arg Leu Leu His Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

 Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu
 65 70 75 80

 Glu Ser Gly Phe Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp
 85 90 95

 Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Ser Tyr
 100 105 110

 Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Lys Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125

 Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe
 130 135 140

 Pro Pro Ser Ser Lys Leu Gly
 145 150

 <210> 27
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> 可变区序列

 <400> 27
 Glu Phe Met Asn Leu Trp Phe Asn Trp Ile Phe Phe Val Val Phe Tyr
 1 5 10 15

 Gln Gly Val Leu Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu
 20 25 30

 Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe
 35 40 45

 Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60

[0009]

Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Glu Ser Tyr Asp Phe Ala
65 70 75 80

Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
85 90 95

Asp Ser Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu
100 105 110

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg Gly Gly Phe Asp Cys Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Pro Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
130 135 140

Val Tyr Pro Leu Val Pro Gly Ser Leu
145 150

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 28

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 29

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 30

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Phe Thr
1 5

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 31

[0010]

Gly Phe Asn Ile Glu Asp Thr Phe Ile His
1 5 10

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 32

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 33

Gly Arg Tyr Gly Val Ala Tyr
1 5

<210> 34
<211> 147
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 34

Glu Phe Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Val Pro Gly Ser Thr Gly Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
20 25 30

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
115 120 125

[0011]

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe
 130 135 140

His Ile Gln
 145

<210> 35
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 可变区序列

<400> 35

Glu Phe Met Lys Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Met Ala Val Val
 1 5 10 15

Thr Gly Val Asn Ser Glu Leu Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
 20 25 30

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe
 35 40 45

Asn Ile Glu Asp Thr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys
 65 70 75 80

Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser
 85 90 95

Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Glu Glu Gly Arg Tyr Gly Val Ala Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 130 135 140

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Leu
 145 150

<210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 可变区序列

<400> 36

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15

<210> 37
 <211> 7

[0012]

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 37

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 38

Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 39

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Met His
1 5 10

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 40

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 可变区序列

<400> 41

Gly Gly Val Tyr Arg Tyr Asp Glu Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 42
<211> 151
<212> PRT
<213> 人工

[0013]

<220>

<223> 可变区序列

<400> 42

Val Asp Met Val Leu Ile Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
20 25 30

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ile Pro Ala Thr Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Ser Lys Leu Gly -
145 150

<210> 43

<211> 159

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 可变区序列

<400> 43

Leu Val Asp Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala
1 5 10 15

Ala Gln Ser Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
20 25 30

Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly
35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro
65 70 75 80

[0014]

Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
85 90 95
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp
100 105 110
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Val Tyr Arg Tyr Asp Glu
115 120 125
Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ala Ala
130 135 140
Lys Thr Thr Pro Pro Pro Val Tyr Pro Leu Val Pro Gly Ser Leu
145 150 155

<210> 44
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 44
catatggcgt ccgtggccac tgaactgcgc tgccag

36

<210> 45
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 45
ggatccaagc ttttagttgg atttgtcact gttca

35

1/25

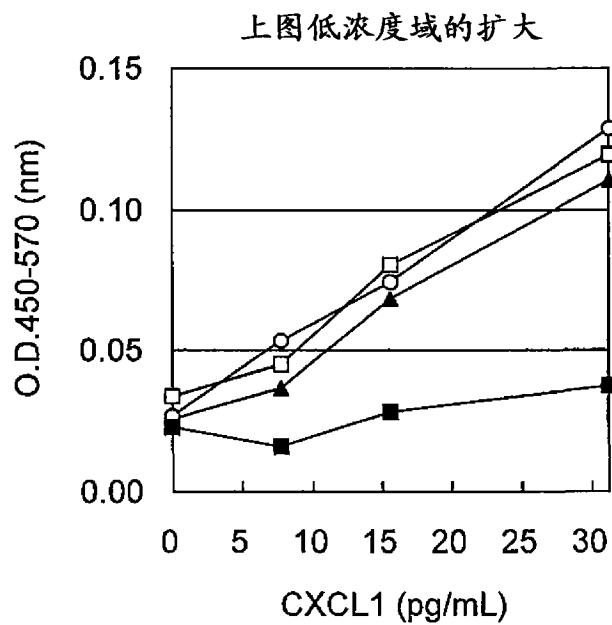
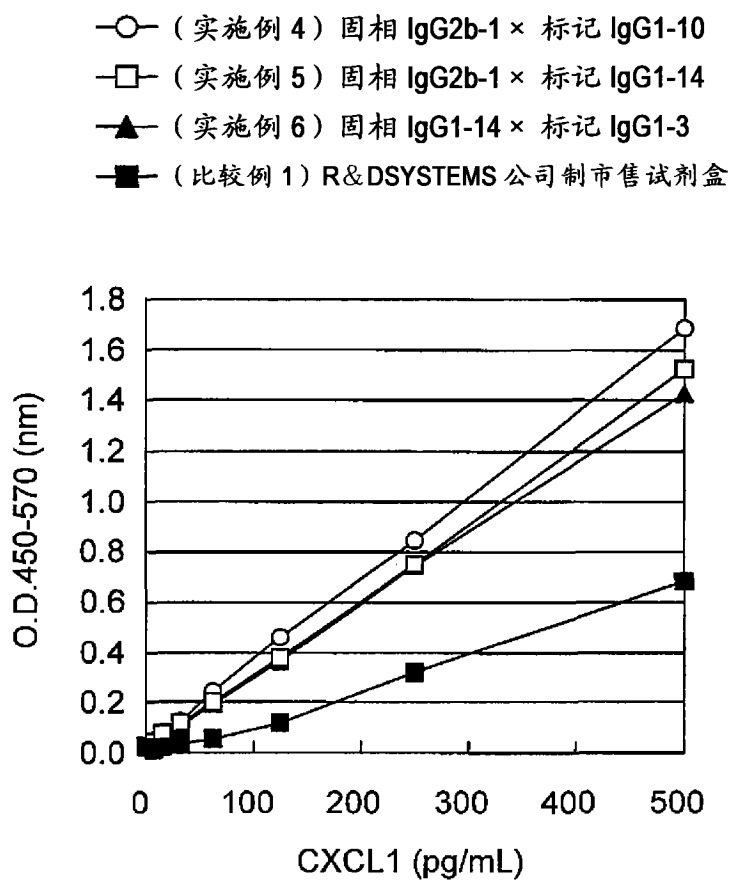
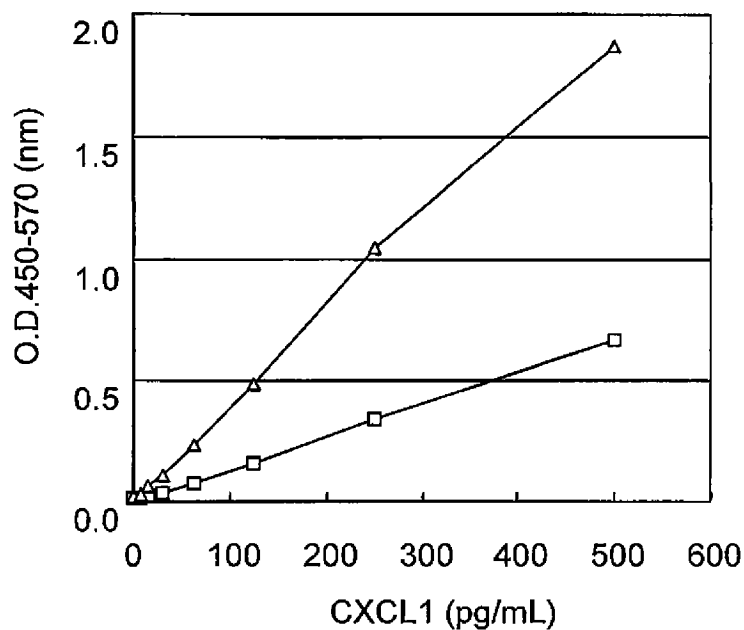


图 1

—□— 固相 IgG2b-1 × 标记 IgG1-10 (0.6 μg/mL)

—△— 固相 IgG2b-1 × 标记 IgG1-10 (0.3 μg/mL) + IgG1-14 (0.3 μg/mL)



上图低浓度域的扩大

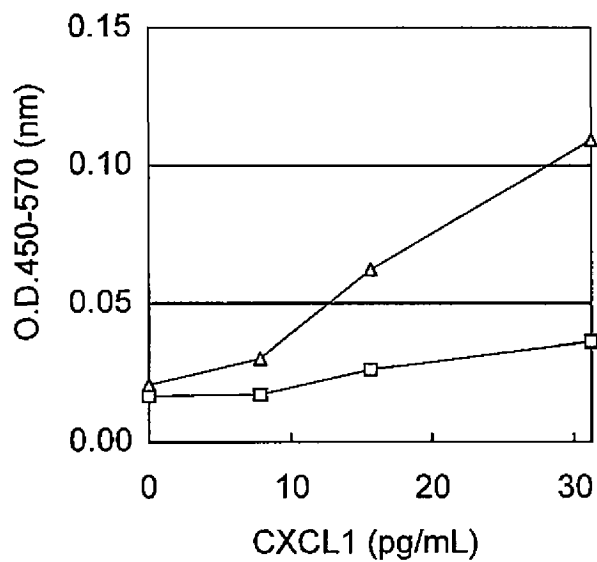


图 2

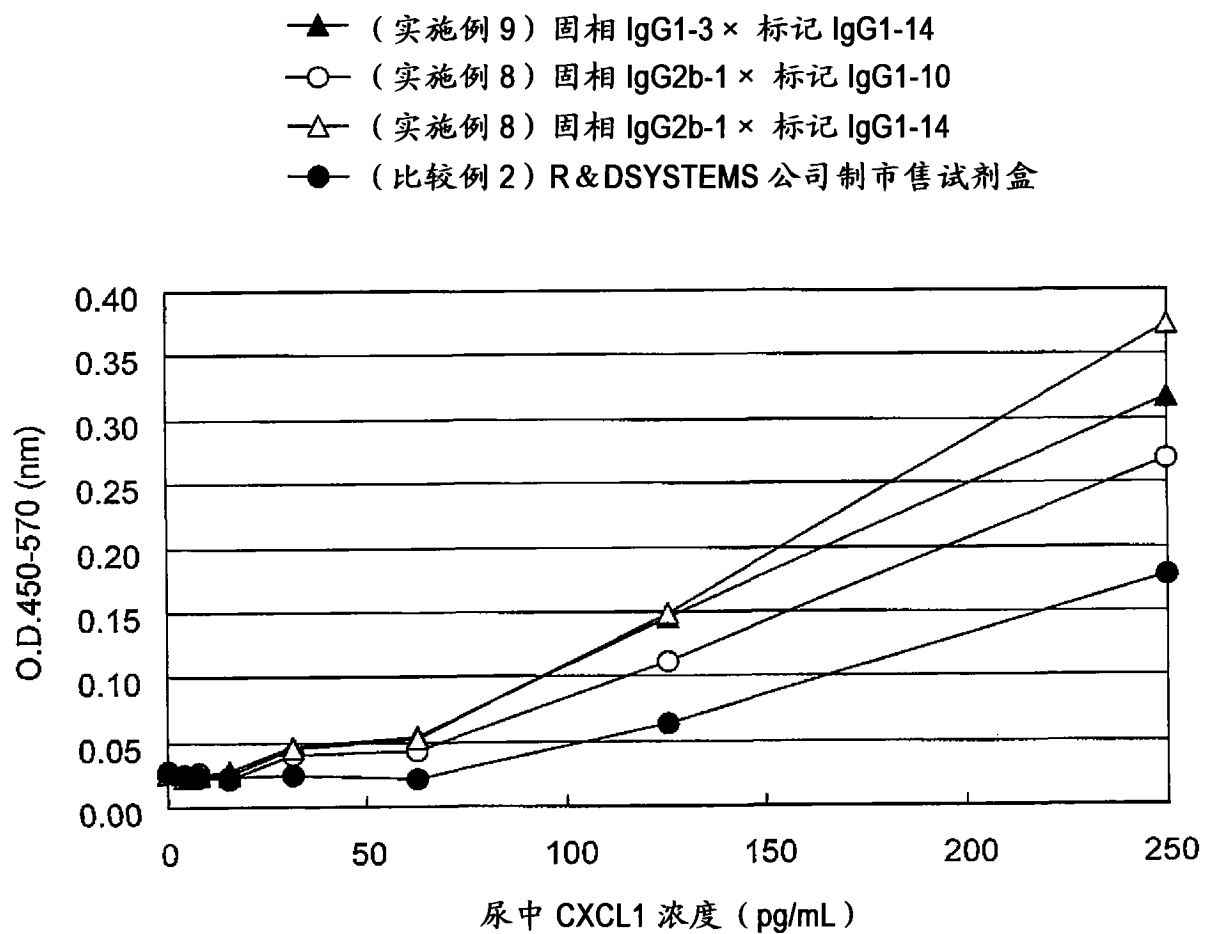
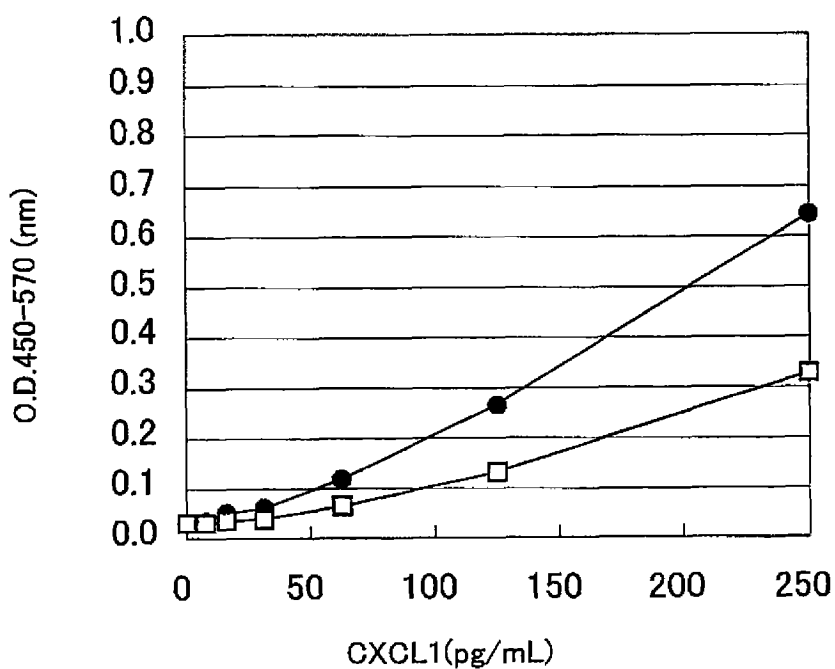


图 3

- (实施例 10) 固相 R&DSYSTEMS 公司制市售单克隆抗体
× 标记 IgG1-10
- (比较例 1) R&DSYSTEMS 公司制市售试剂盒



上图低浓度域的扩大

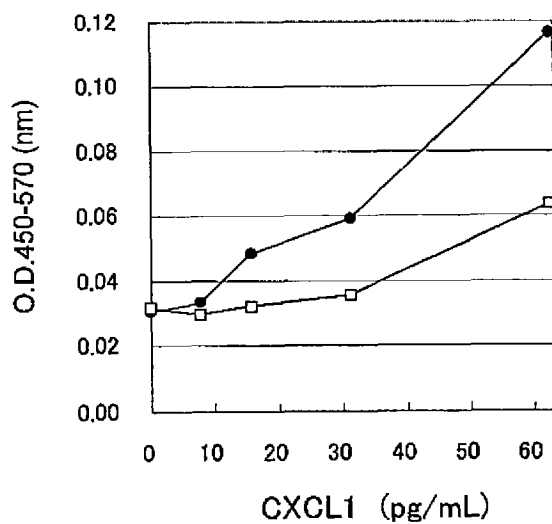


图 4

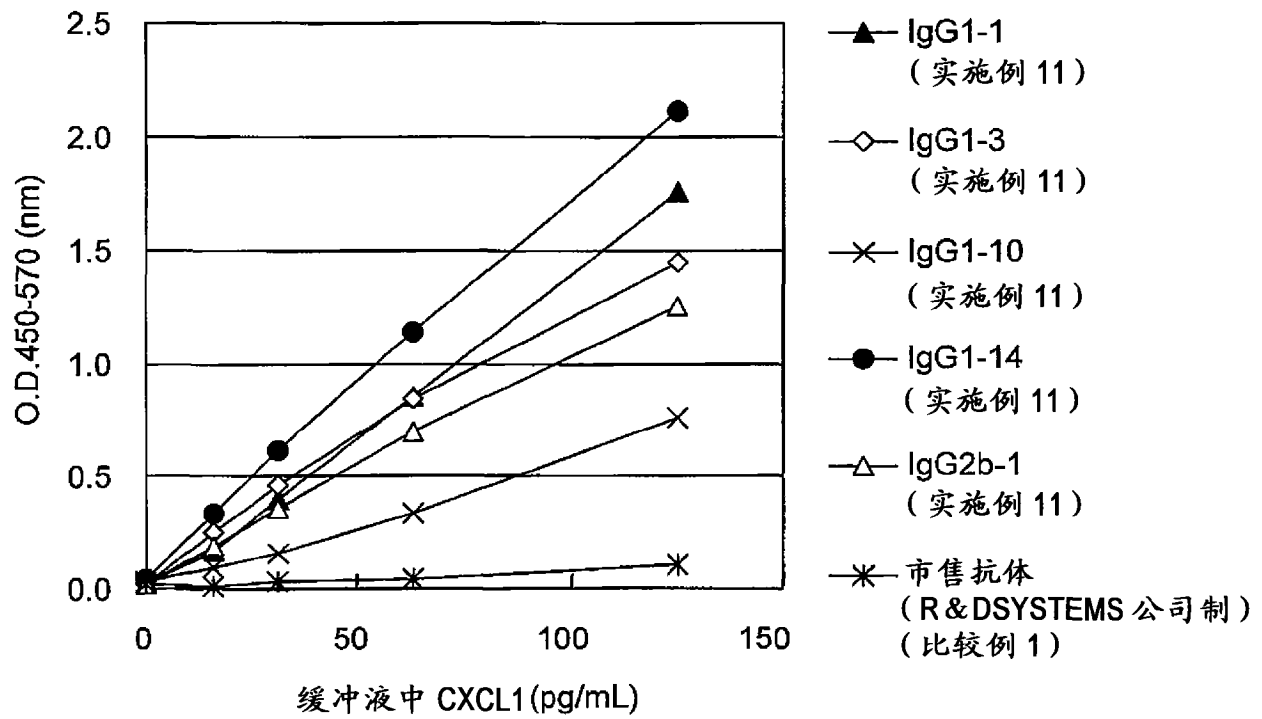


图 5

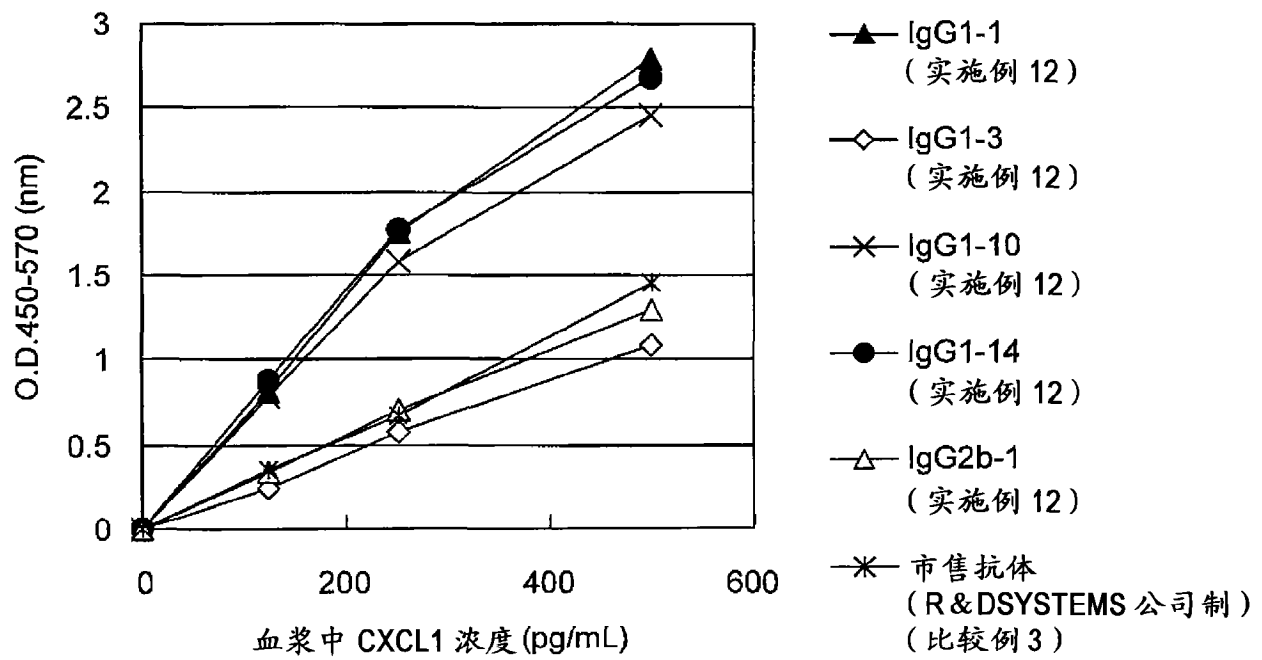


图 6

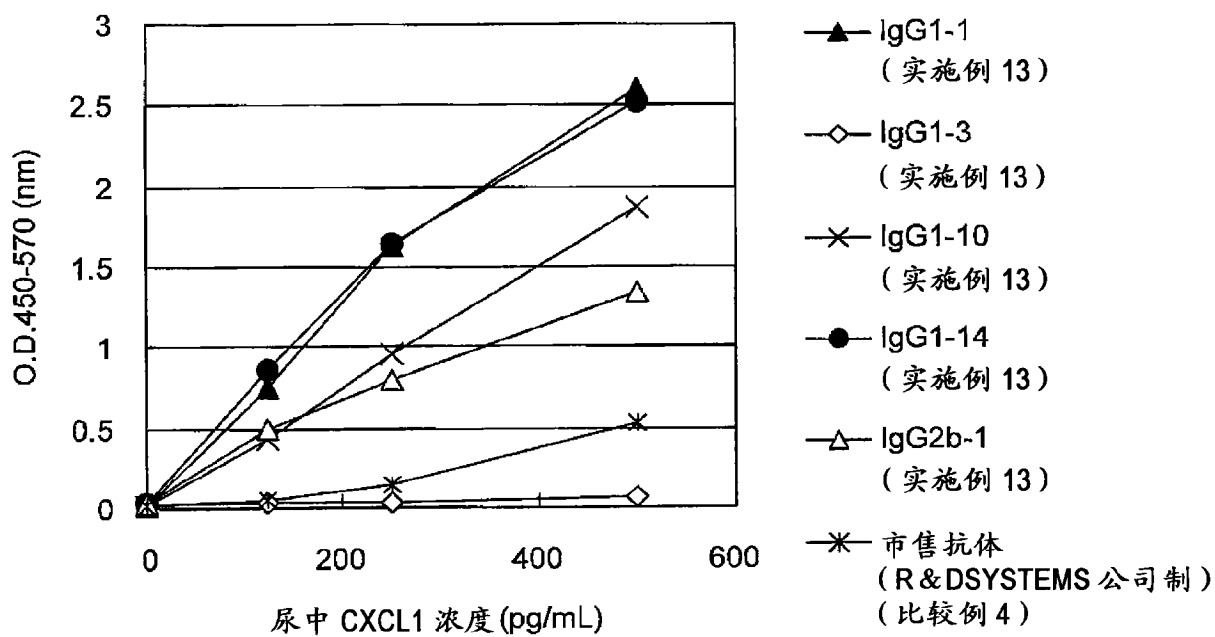


图 7

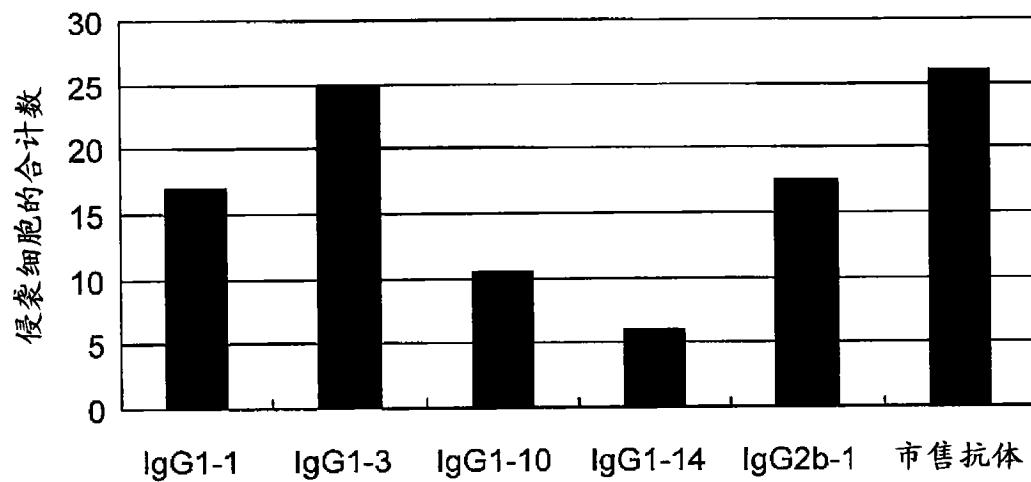


图 8

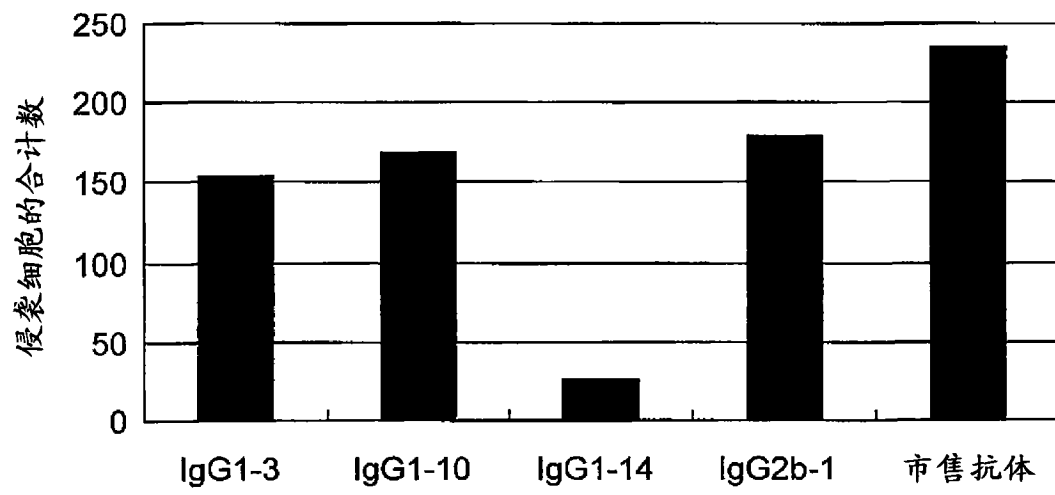


图 9