

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680014735.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[43] 公开日 2008年4月23日

[11] 公开号 CN 101166977A

[22] 申请日 2006.4.27

[21] 申请号 200680014735.3

[30] 优先权

[32] 2005.4.28 [33] JP [31] 132444/2005

[86] 国际申请 PCT/JP2006/308840 2006.4.27

[87] 国际公布 WO2006/118195 日 2006.11.9

[85] 进入国家阶段日期 2007.10.29

[71] 申请人 株式会社三菱化学药得论

地址 日本东京都

[72] 发明人 松屋毅

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 孙秀武 刘玥

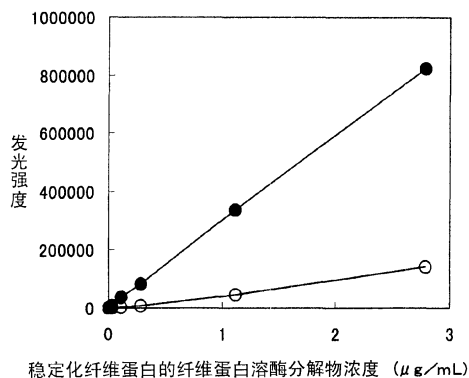
权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 1 页

[54] 发明名称

稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的免疫学分析方法

[57] 摘要

本发明公开了对稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物进行免疫学分析的方法，其特征在于，使用(a)与稳定化纤维蛋白、纤维蛋白原、和纤维蛋白原的纤维蛋白溶酶分解物不反应、但与因稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解而出现的D结构域的新抗原反应的单克隆抗体、和(b)通过与上述单克隆抗体(a)相比识别不同的部位、而与稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物发生特异性反应的单克隆抗体的组合，其中上述单克隆抗体(a)或者(b)的一方结合在磁性粒子上，另一方单克隆抗体被酶标记，使用化学发光底物作为上述酶的底物。



1. 对稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物进行免疫学分析的方法，其特征在于，使用(a)与稳定化纤维蛋白、纤维蛋白原、和纤维蛋白原的纤维蛋白溶酶分解物不反应而与因稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解而出现的D结构域的新抗原反应的单克隆抗体、和(b)通过识别与上述单克隆抗体(a)相比不同的部位、而与稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物发生特异性反应的单克隆抗体的组合，其中上述单克隆抗体(a)或者(b)的一方结合在磁性粒子上，另一方单克隆抗体被酶标记，并且使用化学发光底物作为上述酶的底物。

2. 如权利要求1所述的免疫学分析方法，上述单克隆抗体(b)与稳定化纤维蛋白、纤维蛋白原、和纤维蛋白原的纤维蛋白溶酶分解物不反应而与因稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解而出现的E结构域的新抗原反应。

3. 如权利要求1或者2所述的免疫学分析方法，含有下述的工序：

(1)使可能含有稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的检验样品、与上述单克隆抗体(a)、上述单克隆抗体(b)接触的工序、

(2)将通过稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物与磁性粒子结合单克隆抗体形成了免疫复合物的酶标记单克隆抗体、与不形成上述免疫复合物的酶标记单克隆抗体进行分离的工序、

(3)在用上述工序分离的磁性粒子结合单克隆抗体-稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物-酶标记单克隆抗体免疫复合物中，添加化学发光底物、使其发光的工序、和

(4)对得到的发光信号进行分析的工序。

4. 如权利要求1~3中任意一项所述的免疫学分析方法，化学发光底物是1,2-二氧环丁烷。

5. 如权利要求1~4中任意一项所述的免疫学分析方法，标记酶是碱性磷酸酶。

6. 稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的免疫学分析用试剂盒，其特征在于，含有(a)与稳定化纤维蛋白、纤维蛋白原、和纤维蛋白原的纤维蛋白溶酶分解物不反应而与因稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解而出现的D结构域的新抗原反应的单克隆抗体、

(b)通过识别与上述单克隆抗体(a)相比不同的部位、而与稳定化纤维

蛋白的纤维蛋白溶酶分解物发生特异性反应的单克隆抗体、以及
(c)化学发光底物，

其中上述单克隆抗体(a)或者(b)的一方结合在磁性粒子上，另一方单克隆抗体用以上述化学发光底物作为底物的酶标记。

7. 下肢深部静脉血栓症和/或肺栓塞症的检测方法，其特征在于，利用如权利要求 1~5 中任意一项所述的免疫学分析方法、或者如权利要求 6 所述的免疫学分析用试剂盒，对在检验样品中含有的稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物进行分析。

稳定化纤维蛋白的纤维蛋白 溶酶分解物的免疫学分析方法

技术领域

本发明涉及稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的免疫学分析方法，更具体地，涉及利用化学发光进行的稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的高灵敏度测定方法。

对于本说明书中的用语“分析”，包含判断有无分析对象物质存在的“检测”、和定量或半定量地决定分析对象物质的量或活性的“测定”。

背景技术

人稳定化纤维蛋白利用各种蛋白酶分解的分解物在临床诊断法中作为诊断标记来使用。例如，人稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物、即、作为基本单元的 p-DD/E、以及其聚合物或者低聚物（作为别称，例如称作“D-D 二聚物”或者“DD/E 复合物”）被广泛用于播散性血管内凝血综合征（DIC）的诊断标记。对于在生物样品中含有的稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的测定，一般使用由敏化胶乳引起的凝聚反应来进行，所述敏化胶乳使用了对于稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物是特异性的单克隆抗体。

另一方面，下肢深部静脉血栓症（DVT）近年来受到重视。这种病症在日本国内不太受到重视，但随着生活方式的欧美化，其成为逐渐增多的疾病。诊断或者预测血栓症的状态或血栓的有无是极其困难的，在 DVT 诊断中最可靠的方法是检查稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物（非专利文献 1 和 2）。通过凝固过程而得到的交联（crosslink）的稳定化纤维蛋白在受到纤维蛋白溶酶分解时，形成以 p-DD/E 作为基本单元的 p-DD/E 的聚合物或低聚物、进而形成 p-DD/E，因此通过检测 p-DD/E 或者其聚合物或低聚物，可以知道血栓形成和二次纤溶的动态过程。因此，测定稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物在确认血栓存在方面是极其有用的。

近年来，作为经济舱综合征所知的肺血栓栓塞症（PE）正在接近人们的生活。PE 大多由于深部静脉血栓（DVT）通过下大静脉、心脏右

心系统到达肺动脉、使血流阻断而导致发病。测定稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物在对包括 DVT 的 PE 患者进行评价时是有用的(非专利文献 3, 4)。

作为可特异性检测稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的公知的单克隆抗体, 已知有单克隆抗体 JIF-23 (非专利文献 5)。已知该抗体可以识别 D₁ 结构域 (domain) 的 N 末端的立体结构, 所述 D₁ 结构域是当在人稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的 D_{1A} 结构域中的 γ 链 N 末端的氨基酸序列 63-85 游离时所暴露出的区域。通过使用该 JIF-23 抗体、和可对在生物样品中存在的稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物进行特异性分析的测定方法, 能够容易地知道血栓形成和二次纤溶的动态过程。这样的测定方法没有特别地限定, 可以列举例如胶乳凝聚法或 ELISA 法。

作为使用了目前在临床上广泛使用的 JIF-23 抗体的、测定稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的方法, 已知有胶乳凝聚法。对于稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的值, 根据非专利文献 6, 健康人为 0.4 $\mu\text{g/mL}$ FEU, 根据非专利文献 7, DIC 患者为 $15.2 \pm 18.5 \mu\text{g/mL}$ 。因此, 即使对于使用了 JIF-23 抗体的胶乳凝聚反应 (检测灵敏度=约 45ng/mL), 也能充分地进行检测, 从而在实际临床上被普遍应用。另一方面, DVT 情况下的临床截断值在非专利文献 8 中报道为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ FEU。因此, 与 DIC 诊断相比, 需要识别与健康人的值相比所具有的微小变动, 期望开发一种具有更高灵敏度的测定法, 其可以正确地对正常值域的稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物进行定量。

作为使用抗体的 ELISA 法, 例如有公知的ミニヴァイダス (ビメリユ一社), 所述抗体可识别稳定化纤维蛋白分解物的 D 结构域的新抗原 (非专利文献 8, 11)。根据非专利文献 9, 报道了 ELISA 的灵敏度比胶乳凝聚法高, 因此在 DVT 诊断中是有用的。作为稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的测定方法, 可进行高灵敏度测定的 ELISA 法正在被人们接受。例如, 上述ミニヴァイダスの检测灵敏度约为 45ng/mL FEU。

并且, 上述各数值和单位是基于各非专利文献的记述的数值和单位, 单位 “ $\mu\text{g/mL}$ FEU” 和 “ $\mu\text{g/mL}$ ” 可以利用下述换算式:

$$1 \mu\text{g/mL} = 2 \mu\text{g/mL FEU}$$

相互变换（但是，上述数值“2”为估算值）（非专利文献10）。

非专利文献1: Thrombosis and Haemostasis, 德国, 1994年, 71卷, p.1-6

非专利文献2: Quality Journal of Medicine, 英国, 1997年, 90卷, p.437-442

非专利文献3: Thrombosis and Haemostasis, 德国, 1999年, 81卷, p.493-497

非专利文献4: Thrombosis and Haemostasis, 德国, 2000年, 83卷, 191-198

非专利文献5: Excepta Medica, Amsterdam, オランダ, 1990年, p.43-48

非专利文献6: U.K.National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation, Report on Survey 142, 英国, 2004年5月

非专利文献7: ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE, 法国, 1988年, 46卷, p.730-733

非专利文献8: Biomerieux Vidas D-Dimer Package Insert, 美国, 2003年9月, 008120-4

非专利文献9: Annals of Internal Medicine, 美国, 2004年, p.589-602

非专利文献10: Journal of Thrombosis and Haemostasis, 英国, 2005年, p.377-384

非专利文献11: British Journal of Haematology, 英国, 2004年, p.15-25

发明内容

本发明的课题在于提供更高灵敏度的、稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的分析方法。通过与目前的高灵敏度分析法相比进而高灵敏度化，也可以缩短分析时间。

根据本发明，上述课题可以利用对稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物进行免疫学分析的方法来解决，所述方法的特征在于，使用(a)与稳定化纤维蛋白、纤维蛋白原、和纤维蛋白原的纤维蛋白溶酶分解物不反应、但与因稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解而出现的D结构域的新抗原反应的单克隆抗体、和(b)通过与上述单克隆抗体(a)相比识别不

同的部位、而与稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物发生特异性反应的单克隆抗体的组合,上述单克隆抗体(a)或者(b)的一方结合在磁性粒子上,另一方单克隆抗体被酶标记,且使用化学发光底物作为上述酶的底物。

根据本发明的免疫学分析方法优选的方式,上述单克隆抗体(b)是与稳定化纤维蛋白、纤维蛋白原、和纤维蛋白原的纤维蛋白溶酶分解物不反应、但与因稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解而出现的E结构域的新抗原反应的单克隆抗体。

根据本发明的免疫学分析方法的其它优选方式,包含以下的工序,即,(1)使可能含有稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的检验样品、与上述单克隆抗体(a)、上述单克隆抗体(b)接触的工序、(2)将通过稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物与磁性粒子结合单克隆抗体形成了免疫复合物的酶标记单克隆抗体、与不形成上述免疫复合物的酶标记单克隆抗体进行分离的工序、(3)在用上述工序分离的磁性粒子结合单克隆抗体-稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物-酶标记单克隆抗体免疫复合物中,添加化学发光底物、使其发光的工序、以及(4)对得到的发光信号进行分析的工序。

根据本发明的免疫学分析方法的进而其它的优选方式,化学发光底物是1,2-二氧环丁烷。

根据本发明的免疫学分析方法的进而其它的优选方式,标记酶是碱性磷酸酶。

本发明涉及稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的免疫学分析用试剂盒,其特征在于,含有(a)与稳定化纤维蛋白、纤维蛋白原、和纤维蛋白原的纤维蛋白溶酶分解物不反应、但与因稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解而出现的D结构域的新抗原反应的单克隆抗体、(b)通过与上述单克隆抗体(a)相比识别不同的部位、而与稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物发生特异性反应的单克隆抗体、以及(c)化学发光底物,上述单克隆抗体(a)或者(b)的一方结合在磁性粒子上,另一方单克隆抗体用以上述化学发光底物为底物的酶进行标记。

本发明涉及下肢深部静脉血栓症和/或肺栓塞症的检测方法(诊断方法),其特征在于,通过上述免疫学分析方法、或者上述免疫学分析用试剂盒,来分析在检验样品中含有的稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分

解物。

发明效果

根据本发明的免疫学分析方法，可以高灵敏度以及高特异性地分析稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物，不仅可适用于目前的 DIC 的诊断，还适用于 DVT 和/或肺栓塞症的诊断。

附图的简单说明

[图 1]是表示在 2 种测定体系中测定稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的一系列稀释液的结果的曲线图，所述 2 种测定体系包括利用了 JIF-23 抗体固定化磁性粒子与碱性磷酸酶标记 No. 36-1 抗体的组合的本申请发明的测定方法（黑圆）、和利用了 JIF-23 抗体固定化磁性粒子与碱性磷酸酶标记 JIF-23 抗体的组合的比较用测定方法（白圆）。

[图 2] 是表示在 3 种测定体系中测定稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的一系列稀释液的结果的曲线图，所述 3 种测定体系包括利用了 JIF-23 抗体固定化磁性粒子与碱性磷酸酶标记 No. 36-1 抗体的组合的本申请发明的测定方法（黑圆）、利用了 JIF-23 抗体固定化磁性粒子与碱性磷酸酶标记 No.1-1 抗体的组合的本申请发明的测定方法（白方块）、和利用了 JIF-23 抗体固定化磁性粒子与碱性磷酸酶标记 No.5-4 抗体的组合的本申请发明的测定方法（白三角）。

具体实施方式

在本说明书中，用语“稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物”是指通过使用纤维蛋白溶酶将稳定化纤维蛋白进行消化而生成的分解物，是基本上由 1 个或者多个基本单元“p-DD/E”形成的分解物。在“稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物”中，例如包含由 1 个上述基本单元构成的 p-DD/E、或者由多个上述基本单元构成的 p-DD/E 的聚合物或低聚物。作为“稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物”的别称，例如可以使用“D-D 二聚物”或者“DD/E 复合物”

并且，在本说明书中，对于利用纤维蛋白溶酶消化而生成的分解物，通过在该分解物的名称前面附加“p-”来表示。同样，对于利用颗粒球弹性蛋白酶消化而生成的分解物，通过在该分解物的名称前面附加

“e-”来表示。

在本发明(含有本发明的免疫学分析方法和本发明的免疫学分析用试剂盒)中,作为单克隆抗体,使用抗原决定部位(表位)不同的2种单克隆抗体。并且,在本说明书的用语“抗体”中,不仅包含抗体自身,还包含其抗体片断。上述抗体片断可以使用例如Fab、Fab'、F(ab')₂、或者Fv。作为用于通过夹心免疫测定来特异性检测稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的抗体,具有下述的特征是必须的条件,所述特征包括与稳定化纤维蛋白、纤维蛋白原、或者纤维蛋白原的纤维蛋白溶酶分解产物不形成夹心免疫复合物,但以在稳定化纤维蛋白通过纤维蛋白溶酶消化而成的纤维蛋白分解产物中出现的部位(即、新抗原)作为抗原决定部位,可以形成夹心免疫复合物。

在本发明中,作为一方单克隆抗体,使用与稳定化纤维蛋白、纤维蛋白原、和纤维蛋白原的纤维蛋白溶酶分解物不反应、但与因稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解而出现的D结构域的新抗原反应的单克隆抗体(以下,称作第1抗体或者抗D结构域新抗原抗体),作为另一方单克隆抗体,使用通过与上述第1抗体相比识别不同的部位、而与稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物发生特异性反应的单克隆抗体(以下,称作第2抗体)。

在本发明中使用的第1抗体、即、抗D结构域新抗原抗体,只要是可识别通过稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解而出现的D结构域的新抗原的单克隆抗体即可,没有特别地限定,例如可以使用识别当通过稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解、使包含由 γ 链的N末端起第63号~第85号的氨基酸序列的片断从 γ 链游离时所出现的D结构域的新抗原的单克隆抗体(例如单克隆抗体JIF-23)。

JIF-23是众所周知的可对稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物进行特异性检测的单克隆抗体(例如, Matsuda,M., Terukina,S., Yamazumi,K., Maekawa, H., Soe,G., A monoclonal antibody that recognizes the NH₂-terminal conformation of fragment D, Excerpta Medica, Amsterdam; 1990, 43-38)。另外, JIF-23抗体不仅与稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物反应,还与稳定化纤维蛋白的颗粒球弹性蛋白酶分解物(即、作为基本单元的e-DD/E、以及其聚合物或者低聚物)反应。在作为稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物基本单元的p-DD/E的分子

内，存在2处JIF-23抗体的抗原决定部位，因此单独使用JIF-23抗体可特异性地检测稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物，使用了JIF-23抗体的稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物测定用胶乳试剂在临床上被广泛应用。

在本发明中，将与第1抗体（例如，JIF-23抗体）相比识别不同部位的第2抗体、与第1抗体组合来构建稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的检测体系。作为上述第2抗体，只要是特异性识别通过稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶消化而新暴露出的氨基酸序列或者其立体结构的抗体即可，没有特别地限定，可以使用例如，特异性识别E结构域的新抗原的抗体（例如，单克隆抗体No. 36-1、No. 1-1、No. 5-4）、单克隆抗体DD3B6/22（American Diagnostica; Thrombosis Research, 1983年,31卷, p87-96或者Drug Coagulation & Fibrinolysis, 1979年, 8卷, p87-96）、单克隆抗体MA8D3（IL等; Thrombosis and Haemostasis, 1989年, 58卷, p.1024-1029）、单克隆抗体P10B5E12C9（Biomerieux; Clinical Chemistry, 1996年, 42卷, p410-415）、单克隆抗体P2C5A10（Biomerieux; Clinical Chemistry, 1996年, 42卷, p410-415）。

可作为第2抗体使用的、特异性识别E结构域的新抗原的抗体（以下，称作抗E结构域新抗原抗体），只要是与稳定化纤维蛋白、纤维蛋白原、和纤维蛋白原的纤维蛋白溶酶分解物不反应、但与因稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解而出现的E结构域的新抗原反应的单克隆抗体即可，没有特别地限定，例如可以使用在参考实施例1的表1中记述的具有反应特异性的抗体（例如，单克隆抗体No. 36-1、No. 1-1、No. 5-4）。No. 36-1抗体与稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物反应，但与稳定化纤维蛋白的颗粒球弹性蛋白酶分解物不反应。

在本发明中，以与磁性粒子结合的状态使用单克隆抗体的一方，另一方的单克隆抗体以酶标记的状态使用。在本发明中使用的磁性粒子只要具有磁力、可作为免疫反应的固相载体使用即可，没有特别地限定，可以使用例如以下的磁性粒子。粒子的组成可以由浸渍了可磁化物质的聚合物来构成。对于粒子的表面结构，只要可使抗体固定化即可，没有特别地限定，当通过物理吸附使抗体固定化时，优选粒子表面的特性为疏水性，当通过化学键使抗体固定化时，优选在粒子表面引入官能团（例如，羧基、琥珀酰亚氨基、异硫氰酸酯基、氯磺酰基、马来酰亚氨基、

酰肼基、氨基、或者 SH 基等) 的结构。磁性粒子的粒径可以使用例如 0.1 ~ 10 μm , 优选使用 1 ~ 5 μm 。

将抗体结合在磁性粒子上的方法可以应用公知的技术。例如可以通过利用了疏水性相互作用的物理吸附法或者化学结合法来进行。当通过化学结合法结合抗体时, 可以利用例如羧基、琥珀酰亚氨基、异硫氰酸酯基、氯磺酰基、马来酰亚氨基、酰肼基、或者氨基。对于上述羧基的情况, 可以使用碳二亚胺使羧基活化、并使其与抗体的氨基结合。上述琥珀酰亚氨基、异硫氰酸酯基、或者氯磺酰基可以与抗体的氨基直接反应。上述马来酰亚氨基例如可以与 SH 基反应, 可以使用 SH 基引入试剂将 SH 基引入抗体、或者将抗体还原而利用其较合部位的 SH 基而使其结合。上述的酰肼基可以与抗体的糖链反应。上述氨基可以使用戊二醛将粒子上的氨基变换为醛基, 从而使其与抗体的氨基反应。

在本发明中, 对于标记单克隆抗体所使用的酶, 只要是可应用化学发光的酶即可, 没有特别地限定, 可以进行高灵敏度的分析。例如, 当底物为鲁米诺时, 可以使用过氧化物酶作为标记酶, 当底物为ルミゲン PPD 时, 可以使用碱性磷酸酶作为标记酶。特别地, 当使用碱性磷酸酶作为酶、使用 1,2-二氧环丁烷[更具体地, CDP-Star(トロピックス社)]作为底物时, 从 S/N 比的方面考虑是有用的, 因而是优选的。报道了 CDP-Star 与 AMPPD 或 CSPD 同样、利用碱性磷酸酶进行水解, 通过中间体发光, 但其发光强度与 AMPPD 或 CSPD 相比非常强 [Bronstein, I., Edwards, B., Voyta, J.C., 1,2-Dioxetanes: Novel

Chemiluminescent Enzyme Substrates. Application to Immunoassays, Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence; **4**, 99-111 (1989); Beck, S., Koster, H., Applications of Dioxetane Chemiluminescent Probes to Molecular Biology, Analytical Chemistry; **62**, 2258-2270 (1990); Tizard, R., Cate, R.L., Ramachandran, K.L., Wysk, M., Voyta, J.C., Murphy, O.J., Bronstein, I., Imaging of DNA Sequences with Chemiluminescence, Proc. Natl. Acad. Sci. USA.; **87**, 4514-4518 (1990); 或 Bronstein, I., Voyta, J.C., Lazzari, K.G., Murphy, O., Edwards, B., Kricka, L.J., Rapid and Sensitive Detection of DNA in Southern Blots with Chemiluminescence, BioTechniques; **8**, 310-314 (1990)]。

另外，由 CDP-Star 引起的化学发光的上升比 AMPPD 或 CSPD 快，且该发光持续 24 小时以上，因此优选作为使用了碱性磷酸酶的高灵敏度分析法的底物。

对抗体的酶标记可以使用公知的方法。可以列举例如，使用戊二醛将酶的氨基与抗体的氨基进行交联的方法、通过酶的氨基引入可与氨基结合的官能团（例如琥珀酰亚氨基、异硫氰酸酯基等）、使其与抗体的氨基结合的方法、通过酶的氨基引入马来酰亚氨基、利用抗体铰合部位的 SH 基等使其结合的方法、当酶是西洋芥末过氧化物酶等的糖蛋白时、利用高碘酸将糖链变换为醛基，使其与抗体的氨基结合的方法等。

本发明的免疫学分析方法除了使用特定的单克隆抗体的组合以外，可以与目前公知的免疫学分析方法一样、使用例如人工（手动）或者自动化系统来进行。例如，使检验样品或者标准样品、与结合在磁性粒子上的单克隆抗体、酶标记了的单克隆抗体在反应管内接触，接着在规定的温度下（例如 30 ~ 40℃）进行温育。通过使磁铁与上述反应管的外壁接触，而将抗体结合磁性粒子捕获在反应管的内壁上，在该状态下对反应管内进行任选的洗涤，接着，在反应管内添加化学发光底物使其发光。检测得到的信号，分析在检验样品或者标准样品中存在的稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的量。通过使用磁性粒子，在温育后使用磁铁准确地进行其与样品液的分离、以及与洗涤液的分离，因此在空白的降低等方面也是有利的。作为利用本发明可进行分析的检验样品，可以列举有可能含有稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的生物样品，例如有血液、血浆、血清、或者尿等。

本发明人分别使用 JIF-23 抗体作为第 1 抗体、No.36-1 抗体（识别通过纤维蛋白溶酶消化而暴露出的 E 结构域的结构抗体）作为第 2 抗体，通过人血浆中稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的测定来评价其与目前的胶乳试剂的相关性。对于(1)“单独用 JIF-23 抗体构建的胶乳凝聚法”和“使用了单独用 JIF-23 抗体构建的抗体固定化磁性粒子和碱性磷酸酶标记抗体的测定体系”、以及(2)“单独用 JIF-23 抗体构建的胶乳凝聚法”和“使用了 JIF-23 抗体固定化磁性粒子和识别纤维蛋白溶酶消化后的 E 结构域的单克隆抗体的碱性磷酸酶标记物的测定体系”，在使用含有稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的人血浆（50 个样本）作为样本组的相关试验中，回归直线的斜率、截距、和相关系数没有发

现明显的差异，因此，对于将识别通过纤维蛋白溶酶消化暴露出的 E 结构域结构的抗体与 JIF-23 抗体进行组合而构建的测定体系，其特异性相对于单独用 JIF-23 抗体构建的测定体系，在测定血浆中的稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物方面没有差异。

根据 Francis 等的报道，推测在体内，由于血流和 α_2 纤维蛋白溶酶抑制剂的作用，稳定化纤维蛋白利用纤维蛋白溶酶的分解没有进行至阶段 4[分解进行至基本单元 DD/E、或者片断 D 二聚体 (DD) 和片断 E 的状态]、而止于阶段 3 (基本单元 DD/E 的聚合物或者低聚物)，徐等报道了证实该推测的数据 [Francis, C.W., Marder, V.J., Barlow, G.H., Plasmic degradation of crosslinked fibrin, Journal of Clinical investigation; 66, 1033-1043, 1980; 徐吉夫、河野功、樱井锭治、松田道生，使用了识别片断 D 的氨基末端结构的单克隆抗体 (JIF-23) 的纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解产物的解析，血栓止血学会志，5, 105-113, 1994]。这些报道强烈暗示了上述相关试验(1)和(2)的相关性没有差异这一结果。

实施例

以下，通过实施例具体地说明本发明，但这些实施例不限定本发明的范围。

《实施例 1: 利用自动化系统进行的稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的测定》

(1) 抗 D 结构域新抗原单克隆抗体 JIF-23 固定化磁性粒子的制作

JIF-23 抗体利用胃蛋白酶消化的 F(ab')₂ 组分的制作按照松屋等的报道 (Matsuya, T., Tashiro, S., Hoshino, N., Shibata, N., Nagasaki, Y., Kataoka, K., A core-shell-type fluorescent nanosphere possessing reactive PEG tethered chains on the surface for zeptomole detection of protein in time-resolved fluorometric immunoassay; Anal. Chem., 75, 6124-6132, 2003) 来进行。

向悬浊液 (10mL) 中添加 100mg/mL 的碳二亚胺水溶液 (1mL)，在室温下颠倒混合 1 小时，所述悬浊液是 JSR 社制的引入羧基的磁性粒子 (粒径 2.5 μ M) 在 50mmol/L-MES 缓冲液 (pH6.5) 中的 1% 悬浊液。在 14000rpm 的转速下进行 15 分钟离心分离来回收磁性粒子，用 50mmol/L-MES 缓冲液 (pH6.5) 洗涤 2 次。将用 50mmol/L-MES 缓冲液

(pH6.5) 制备的 JIF-23 抗体 $F(ab')_2$ 溶液 (200 μ g/10mL)、与上述磁性粒子混合, 在室温下颠倒混合 1 小时。之后, 在 14000rpm 的转速下进行 15 分钟离心分离来除去未反应的抗体溶液, 添加使用 0.1mol/L-Tris-HCl(pH8.0)制备的 0.3%牛血清白蛋白溶液 (10mL), 在室温下颠倒混合 30 分钟。在 14000rpm 的转速下进行 15 分钟离心分离来除去牛血清白蛋白溶液, 用含有 0.01%吐温-20 的 10mmol/L-Tris-HCl(pH8.0)缓冲液将抗体固定化磁性粒子进行洗涤后, 供以后的实验使用。

(2) 抗 E 结构域新抗原单克隆抗体 No.36-1、No.1-1、或者 No.5-4 的碱性磷酸酶标记物的制作

识别胃蛋白酶消化后的 E 结构域的 No.36-1 抗体、No.1-1 抗体、或者 No.5-4 抗体的 Fab'组分的制作, 按照松屋等的报道 (Matsuya, T., Tashiro, S., Hoshino, N., Shibata, N., Nagasaki, Y., Kataoka, K., A core-shell-type fluorescent nanosphere possessing reactive PEG tethered chains on the surface for zeptomole detection of protein in time-resolved fluorometric immunoassay; Anal. Chem., 75,6124-6132,2003) 来进行。单克隆抗体 No.36-1、No.1-1、No.5-4 的反应性如下述参考实施例 1 所示的那样。

对得到的单克隆抗体 No.36-1、No.1-1、或者 No.5-4 的 Fab'组分用碱性磷酸酶进行标记按照石川等的报道 (Ishikawa, E., Imagawa, M., Hashida, S., Yoshitake, S., Hamaguchi, Y., & Ueno, T., Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining; J. Immunoassay, 4, 209-327, 1983 和 Ishikawa, E., Hashida, S., Kohno, T. & Tanaka, K., Methods for enzyme-labeling of antigens, antibodies and their fragments; In: Nonisotopic Immunoassay, T.T.Ngo(ed.), p27-55, Plenum Publishing Corporation, New York, 1988) 来进行。

另外, 作为比较用的碱性磷酸酶标记抗体, 除了使用 JIF-23 抗体以外, 通过重复上述操作, 制备单克隆抗体 JIF-23 的 Fab'组分的碱性磷酸酶标记物。

(3) 稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的制备

稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的制备按照 Olexa 等的报道 [Olexa, S.A., Budzynski, A.Z., Primary soluble plasminic degradation product of human cross-linked fibrin. Isolation and stoichiometry of the (DD)E

complex; Biochemistry, 18, 991-995,1979]来进行。另外, 稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物进而分解生成的片断D和片断E按照 Masci 等的报道[Masci, P.P., Whitaker, A.N. Winzor, D.J., A simple chromatographic procedure for the purification of the D dimer fragment from crosslinked fibrin; Analytical Biochemistry, 147,128-135,1985]来进行制备。

(4)使用了抗体固定化磁性粒子和碱性磷酸酶标记抗体的稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的测定

使用稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的一系列稀释液作为样品, 所述稀释液使用含有 3%牛血清白蛋白的 20mmol/L-Tris-HCl (pH7.0)的缓冲液来配制。首先, 将样品(50 μ L)、No.36-1 抗体、No.1-1 抗体、或者 No.5-4 抗体 Fab'组分的碱性磷酸酶标记物(50 μ L)、和 JIF-23 抗体 F(ab')₂ 组分固定化磁性粒子(1%磁性粒子、50 μ L)进行混合, 在 37°C下使其反应 5 分钟。接着, 使用以 Triton X-100 作为主成分的洗涤液, 除去无助于免疫反应的样品成分、或剩余的标记抗体后, 将结合了免疫复合物的磁性粒子与作为化学发光底物的 CDP-Star(トロピックス社)(100 μ L)混合, 利用光电倍增管计测 1 分钟后的发光。

另外, 作为比较例, 除了使用 JIF-23 抗体 Fab'组分的碱性磷酸酶标记物来代替 No.36-抗体 Fab'组分的碱性磷酸酶标记物以外, 其他重复上述操作。

(5) 稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的测定结果

图 1 表示在 2 种测定体系中, 对稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的一系列稀释液进行测定的结果, 所述 2 种测定体系包括利用了 JIF-23 抗体固定化磁性粒子与碱性磷酸酶标记 No. 36-1 抗体的组合的本申请发明的测定方法(图 1 中的黑圆)、和利用了 JIF-23 抗体固定化磁性粒子与碱性磷酸酶标记 JIF-23 抗体的组合的比较用测定方法(图 1 中的白圆)。

通过使用识别的抗原决定部位不同的 2 种单克隆抗体(JIF-23 抗体和 No. 36-1 抗体), 与单独用 JIF-23 抗体构建的测定体系相比, 对于稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的反应性提高约 6 倍。其检测灵敏度在约 17 分钟的分析时间下为 0.005 μ g/mL FEU, 相对于使用了识别稳定化纤维蛋白分解物的 D 结构域的新抗原的抗体的目前的 ELISA 法(ビメリュー社ミニヴァイダス: 大约 35 分钟的分析时间)(非专利文献 8,

11) 的检测灵敏度 45ng/mL FEU, 提高约 9 倍, 通过高灵敏度化、同时实现了分析时间的缩短。

图 2 表示在本发明 3 种测定方法中, 对稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的一系列稀释浓度进行测定的结果, 包括利用了 JIF-23 抗体固定化磁性粒子与碱性磷酸酶标记 No. 36-1 抗体的组合的本申请发明的测定方法(图 2 中的黑圆)、利用了 JIF-23 抗体固定化磁性粒子与碱性磷酸酶标记 No.1-1 抗体的组合的本申请发明的测定方法(图 2 中的白方块)、和利用了 JIF-23 抗体固定化磁性粒子与碱性磷酸酶标记 No.5-4 抗体的组合的本申请发明的测定方法(图 2 中的白三角)。

对于任何一种抗体的组合, 通过对碱性磷酸酶标记抗体使用识别稳定化纤维蛋白的 E 结构域的新抗原的抗体, 可以得到与 No. 36-1 同等程度的反应性, 对于用于碱性磷酸酶标记抗体的、识别稳定化纤维蛋白分解物 E 结构域的新抗原的抗体的使用, 显示高的普遍性。

《参考实施例 1: 单克隆抗体 No. 36-1、No. 1-1、和 No. 5-4 的识别部位的确定》

单克隆抗体 No. 36-1、No. 1-1、和 No. 5-4 的反应特异性通过如特公平 5-48119 号公报的实施 5 中所述的方法来确定。即, 根据バイオラツド社の Zeta-Probe Blotting Mewbraues Instruction Manual, 利用蛋白质印迹法来确定。

其大致内容是在 Ca^{2+} 或者 EGTA 的存在下对纤维蛋白原进行纤维蛋白溶酶处理, 将 30 分钟、60 分钟、和 24 小时反应后的纤维蛋白原分解物在二硫苏糖醇 (DTT) 存在下或不存在下进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 实施使用了 No. 36-1 抗体的蛋白质印迹法。另外, 代替上述纤维蛋白原分解物, 对于稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物、片段 D 和片段 E 重复上述操作。

结果示于表 1。在表 1 中, 记号“(-)”表示没有结合反应性, 记号“(+)”表示具有结合反应性。根据表 1 的结果, 判明 No. 36-1 抗体、No. 1-1 抗体、和 No. 5-4 抗体与利用稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解而出现的 E 结构域的新抗原进行反应。

[表 1]

| 抗原 | 反应性 |
|-------------------|-----|
| 纤维蛋白原 | (-) |
| X | (-) |
| Y | (+) |
| 片断D二聚体 | (-) |
| (DD) E | (+) |
| early D | (-) |
| D cate | (-) |
| D eg t a | (-) |
| A α | (-) |
| B β | (-) |
| γ | (-) |
| $\gamma - \gamma$ | (-) |
| 1 γ 5 | (-) |
| E 1, E 2 | (+) |
| E 3 | (+) |

产业利用可能性

本发明的免疫学分析方法可以适用于各种诊断、例如 DIC、DVT、肺栓塞症的诊断的用途。

以上，通过特定的方式说明本发明，但对于本行业者是显而易见的变形或改良也包含在本发明的范围内。

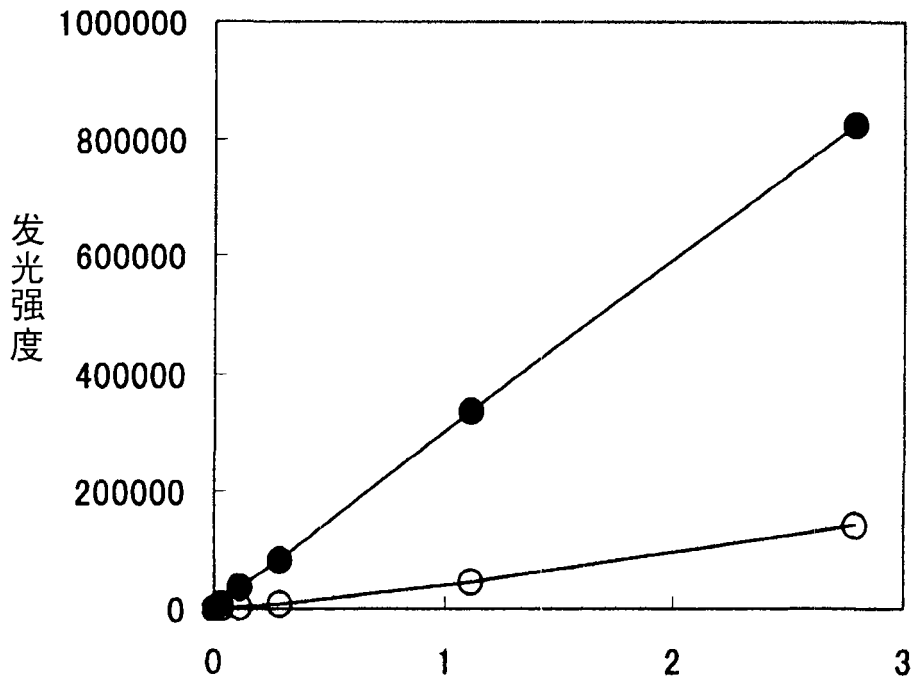


图 1

稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物浓度 ($\mu\text{g/mL}$)

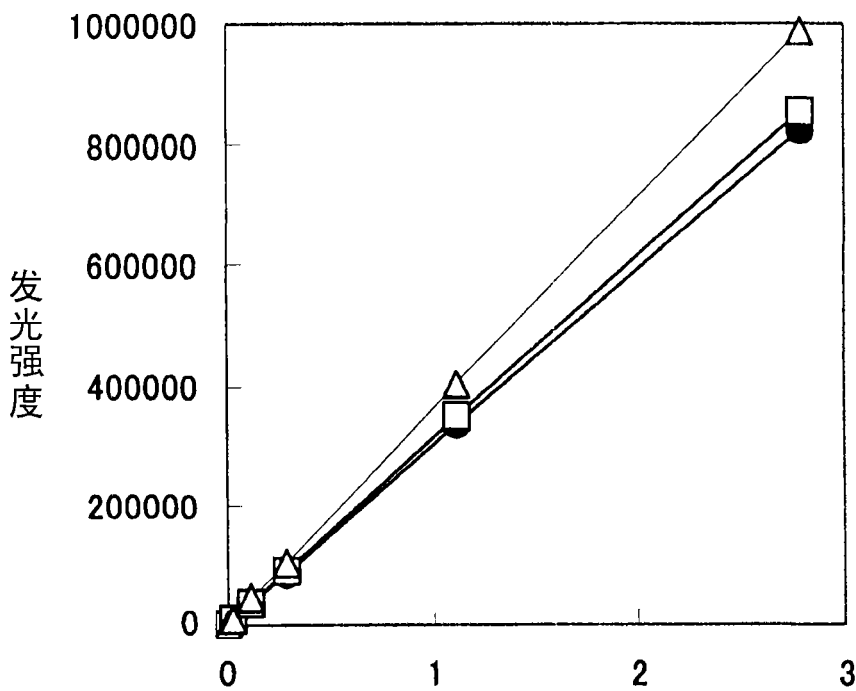


图 2

稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物浓度 ($\mu\text{g/mL}$)

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物的免疫学分析方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN101166977A | 公开(公告)日 | 2008-04-23 |
| 申请号 | CN200680014735.3 | 申请日 | 2006-04-27 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 株式会社三菱化学药得论 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 株式会社三菱化学药得论 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 株式会社三菱化学药得论 | | |
| [标]发明人 | 松屋毅 | | |
| 发明人 | 松屋毅 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N21/78 G01N21/76 G01N33/543 | | |
| CPC分类号 | G01N2800/226 G01N33/86 G01N2333/968 G01N21/76 G01N2800/12 G01N33/54326 G01N2333/75 Y10S435/81 Y10S435/975 | | |
| 代理人(译) | 孙秀武 刘玥 | | |
| 优先权 | 2005132444 2005-04-28 JP | | |
| 其他公开文献 | CN101166977B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了对稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物进行免疫学分析的方法，其特征在于，使用(a)与稳定化纤维蛋白、纤维蛋白原、和纤维蛋白原的纤维蛋白溶酶分解物不反应、但与因稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解而出现的D结构域的新抗原反应的单克隆抗体、和(b)通过与上述单克隆抗体(a)相比识别不同的部位、而与稳定化纤维蛋白的纤维蛋白溶酶分解物发生特异性反应的单克隆抗体的组合，其中上述单克隆抗体(a)或者(b)的一方结合在磁性粒子上，另一方单克隆抗体被酶标记，使用化学发光底物作为上述酶的底物。

