



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102227639 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 02

(21) 申请号 200980148172. 0

(22) 申请日 2009. 12. 03

(30) 优先权数据

2008-309369 2008. 12. 04 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 05. 31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2009/006590 2009. 12. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/064435 JA 2010. 06. 10

(83) 生物保藏信息

FERM BP-11186 2008. 11. 20

(73) 专利权人 积水医疗株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 中山真也 高桥弘至 中村靖

清水知

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 苗堃 金世煜

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2008142057 A1, 2008. 11. 27,

US 6248597 B1, 2001. 06. 19, 全文.

WO 2006028132 A1, 2006. 03. 16, 全文.

CN 101377492 A, 2009. 03. 04, 全文.

CN 101356438 A, 2009. 01. 28, 权利要求

1-10, 说明书第 15、22-23 页、第 17 页最后 1 行至第 18 页第 6 行第 20 页第 8-23 行.

审查员 周洋

权利要求书1页 说明书10页 附图4页

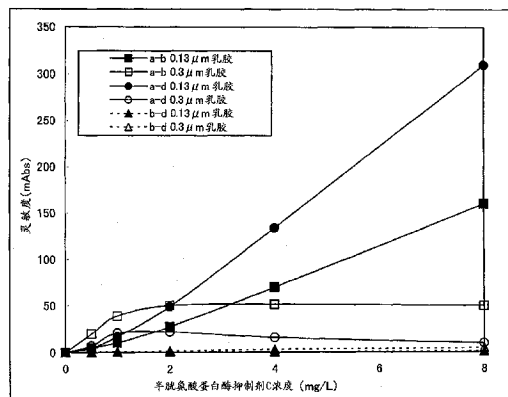
(54) 发明名称

人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定方法

(57) 摘要

本发明针对大量使用特异性低的多克隆抗体、或特异性高但凝集性弱的单克隆抗体的以往的测定方法, 提供了特异性高、成本低且容易实现自动化的人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的颗粒增强免疫测定方法。所述人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 特异性的测定方法是组合了抗体致敏粒子的颗粒增强免疫测定方法, 所述抗体致敏粒子是使高亲和性的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体、和与其识别位点不同且亲和力相对弱的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体分别独立地结合于不溶性载体粒子而得到的, 相对于各种抗体致敏粒子的重量的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的结合量为小于 5 重量%。

CN 102227639 B



1. 一种人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定方法,其特征在于,是使用了抗体致敏粒子的颗粒增强免疫测定方法,所述抗体致敏粒子是使高亲和性的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体、和与其识别位点不同且亲和力相对弱的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体分别独立地结合于不溶性载体粒子而得到的,该不溶性载体粒子的平均粒径为 $0.1 \sim 0.4 \mu\text{m}$,抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的结合量相对于各种抗体致敏粒子的总重量为 1 重量%以上且小于 4 重量%,

其中,高亲和性的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的解离常数 k_d 值为小于 1nM ,用该解离常数除亲和力相对弱的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的解离常数的比为 2 以上。

2. 根据权利要求 1 所述的人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定方法,其中,所述抗体致敏粒子是使高亲和性的 1 种抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体、和与其识别位点不同且亲和力相对弱的 1 种抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体分别独立地结合于不溶性载体粒子而得到的。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定方法,其中,抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体是含有功能部位的抗体片段或重组抗体。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定方法,其中,人体液为血清、血浆、滑液、乳、唾液、脑脊髓液、精浆、羊水、尿或泪液。

5. 根据权利要求 3 所述的人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定方法,其中,人体液为血清、血浆、滑液、乳、唾液、脑脊髓液、精浆、羊水、尿或泪液。

6. 一种人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的颗粒增强免疫测定试剂,其特征不在于,含有抗体致敏粒子,所述抗体致敏粒子是使高亲和性的人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体、和与其识别位点不同且亲和力相对弱的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体分别独立地结合于不溶性载体粒子而得到的,该不溶性载体粒子的平均粒径为 $0.1 \sim 0.4 \mu\text{m}$,抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的结合量相对于各种抗体致敏粒子的总重量为 1 重量%以上且小于 4 重量%,

其中,高亲和性的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的解离常数 k_d 值为小于 1nM ,用该解离常数除亲和力相对弱的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的解离常数的比为 2 以上。

7. 根据权利要求 6 所述的测定试剂,其中,所述抗体致敏粒子是使高亲和性的 1 种抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体、和与其识别位点不同且亲和力相对弱的 1 种抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体分别独立地结合于不溶性载体粒子而得到的。

人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的颗粒增强免疫测定方法及颗粒增强免疫测定试剂。

背景技术

[0002] 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 是分子量为 13kDa 的碱性低分子蛋白质 (等电点 pH9.3), 在全身的有核细胞中不断地产生, 不受环境变化的影响而将一定量分泌到细胞外。因此, 血中浓度保持一定水平而不受其他的疾病导致的炎症等的影响或年龄、性别、运动、饮食等的影响。另外, 已知半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 不与其他的血浆蛋白质形成复合体, 在肾小球过滤并在近曲小管重吸收, 因此, 如果肾小球滤过率 (GFR) 降低, 则血中浓度上升, 从而作为代替肌酐来表示 GFR 的指标而受到关注。另外, 由于在肾功能检查中, 成为早期肾病的诊断指标, 因此在门诊、健康诊断等领域中也广泛使用。

[0003] 作为半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定方法, 报道了自动化的人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的颗粒增强免疫测定方法 (非专利文献 1~3、专利文献 1)。例如, 在非专利文献 1 记载的方法中, 凝集力强的抗半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 多克隆抗体以 5% 的重量比与载体粒子结合来利用, 但是如非专利文献 4 所示, 由于对于半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C, 存在结构类似的半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族群, 且分布随着各种人体液的不同而不同, 所以如果是特异性低的多克隆抗体, 则由于人体液的种类 (例如, 唾液、泪液) 而得不到正确的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定值的可能性极高。另一方面, 在专利文献 1 中记载了一般而言, 使用多克隆抗体容易形成免疫凝集体的内容 (第 20 页第 21-27 行)。另外, 虽然启示了特异性高的抗半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的利用, 但记载了将半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 之类的单体且低分子量的蛋白质作为测定对象时, 通过利用很多不同单克隆抗体的混合物可以得到良好结果的内容 (第 21 页第 5-10 行), 实质上相当于利用了多克隆抗体。进而, 如果为了提高性能而使抗体的结合量相对于抗体致敏粒子的总重量为大于 5 重量% 且小于等于 35 重量%, 则需要使明显大量的抗体结合。

[0004] 专利文献

[0005] 专利文献 1: 国际公开第 2007/102054 号小册子

[0006] 非专利文献

[0007] 非专利文献 1: CLINICAL CHEMISTRY, Vol. 40, No. 10, (1994), 1921-1926

[0008] 非专利文献 2: KIDNEY INTERNATIONAL, Vol. 47, (1995), 312-318

[0009] 非专利文献 3: CLINICAL CHEMISTRY, Vol. 43, No. 6, (1997), 1016-1022

[0010] 非专利文献 4: METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 244, (1994), 685-700

发明内容

[0011] 在人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的颗粒增强免疫测定方法中通用的多克隆抗体存在特异性低、由于试样的种类而不能进行半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 特异性测定的问题。作

为其对策研究了单克隆抗体的利用,但由于凝集力弱,所以需要在不溶性载体粒子上大量结合由多种单克隆抗体组成的混合物,从而产生需要庞大的工作量和成本这样的新课题。因此,目前仅由单克隆抗体组成的人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的颗粒增强免疫测定方法尚没有被实用化。另外,在以往的人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的颗粒增强免疫测定方法中,为了得到实用的性能,需要相对于抗体致敏粒子的总重量的结合量为大于 5 重量%且小于等于 35 重量%这样大量的抗体。

[0012] 因此,本发明的课题是提供特异性高、成本低且容易自动化的人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的颗粒增强免疫测定方法。

[0013] 本发明的发明人为了解决上述问题而进行了锐意研究,结果发现即便是在以往认为不适合半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定的单克隆抗体中,如果使高亲和性的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体、和与其识别位点不同的亲和力相对弱的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体,以相对于抗体致敏粒子的总重量小于 5 重量%的结合量比例分别独立结合,将所得的抗体致敏粒子进行组合,则可以进行半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 特异性的颗粒增强免疫测定,从而完成了本发明。

[0014] 即,本发明提供一种人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定方法,其是组合了抗体致敏粒子的颗粒增强免疫测定方法,所述抗体致敏粒子是使高亲和性的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体、和与其识别位点不同且亲和力相对弱的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体分别独立地结合于不溶性载体粒子而得到,相对于各种抗体致敏粒子的总重量的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的结合量为小于 5 重量%。

[0015] 另外,本发明提供人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 特异性的颗粒增强免疫测定试剂,其是使高亲和性的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体、和与其识别位点不同且亲和力相对弱的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体分别独立地结合于不溶性载体粒子而得到的抗体致敏粒子的组合,含有相对于各种抗体致敏粒子的总重量的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的结合量为小于 5 重量%的抗体致敏粒子。

[0016] 根据本发明,可以提供比以往特异性高、成本低且容易适应自动分析装置的人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的颗粒增强免疫测定方法及试剂。

附图说明

[0017] 图 1 是表示按照 a-b、a-d、b-d 将同一粒径的抗体致敏乳胶粒子彼此组合来测定半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 时,伴随颗粒增强免疫凝集的灵敏度的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度 - 灵敏度曲线,所述抗体致敏乳胶粒子是将抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体 a、b、d 分别结合于粒径为 0.13 μm 、0.30 μm 的乳胶粒子而得到的。

[0018] 图 2 是表示以 ELISA 法确认的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体、以及作为对照的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 多克隆抗体的特异性的图。

[0019] 图 3 是本发明试剂与对照试剂的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定相关图 (样本数 N = 50)。

[0020] 图 4 是表示本发明试剂与对照试剂的检测限浓度的图。

具体实施方式

[0021] 本发明中使用的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体是 2 种以上, 含有与人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 特异性地反应且高亲和性的单克隆抗体和与其识别位点不同且亲和力相对弱的单克隆抗体各 1 种以上。此外, 上述抗体还包括含功能部位的抗体片段 (即, 含有人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 识别位点 Fab 的抗体片段)、重组抗体 (即, 重组了 Fab 以外的结构的抗体)。

[0022] 对于获得上述高亲和性的单克隆抗体的方法没有进行特别的限定, 但是对免疫部位或融合细胞的选择、免疫的人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的增加量、免疫期间的延长等对获得高亲和性的抗体有效。在此, 所谓的与人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 特异性地反应是指与人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 发生抗原抗体反应, 但是与其他的半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族 (例如人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 A、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 B、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 D、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E/M、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 F、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 S、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 SA、激肽原等) 实质上不发生抗原抗体反应。

[0023] 在本发明使用的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体中, 高亲和性的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体, 例如根据“商品名: BIACore (注册商标, GE Healthcare 公司制)”装置上的滴度测定算出的解离常数 (kd 值) 小于 1nM、优选为 0.5nM 以下。需要说明的是, 在利用 BIACore 装置的解析中, 一般亲和力的单克隆抗体的解离常数为 1nM 以上。作为解离常数的确定方法, 只要是在该领域中公知的通常使用的方法就没有特别的限定, 但是由于测定原理或测定条件的不同, 会存在解离常数发生一些变动的可能性。

[0024] 作为这样的高亲和性单克隆抗体的例子, 如后述实施例所示, 可以举出杂交瘤细胞 75202 (FERM BP-11186) 产生的单克隆抗体。

[0025] 在本发明中, 只要至少使用 1 种上述高亲和性单克隆抗体, 其他的亲和力相对弱的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体就可以是一般亲和力。在这样的组合中, 优选高亲和性单克隆抗体的解离常数除其他的亲和力相对弱的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的解离常数的比为 2 以上的组合。这样的单克隆抗体可以根据常规方法制造。此外, 如果亲和力 (解离常数的相对比) 存在 2 倍以上的差, 则还可以将解离常数小于 1nM 的高亲和性单克隆抗体彼此组合使用。

[0026] 另外, 本发明中使用的 2 种以上的单克隆抗体, 是各个单克隆抗体识别人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的不同部位的单克隆抗体的组合。该识别位点的不同可以通过例如夹心 ELISA 法等来进行确认。

[0027] 对于本发明的颗粒增强免疫测定方法及试剂而言, 作为不溶性载体粒子使用的原料只要是能够作为检验试剂的成分来利用的物质, 就没有特别的限定, 具体可以举出乳胶、金属胶体、二氧化硅、碳等。不溶性载体粒子的尺寸可以根据本发明的颗粒增强免疫测定方法及试剂的检测原理适当选择 0.05 ~ 0.5 μm , 但是自动分析装置的光学测定中常用平均粒径为 0.1 ~ 0.4 μm 、优选为 0.1 ~ 0.2 μm 。不溶性载体粒子的平均粒径可以用粒度分布计、电子显微镜图像等确认。

[0028] 根据本发明的单克隆抗体组合, 即使相对于各个抗体致敏粒子的总重量的抗体的结合量小于 5 重量% 也可以测定人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C, 优选抗体量为 1 重量% 以上且小于 4 重量%。

[0029] 单克隆抗体与不溶性载体粒子的结合 (致敏) 例如可以通过物理吸附法、化学结

合法之类的常规方法来进行。

[0030] 本发明的颗粒增强免疫测定方法、试剂及试剂盒的测定对象试样只要是各种人体液且是含有人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的试样就没有特别的限定,例如是血清、血浆、滑液、乳液、唾液、脑脊髓液、精浆、羊水、尿、泪液等人体液。

[0031] 本发明的颗粒增强免疫测定方法、试剂及试剂盒可以适用于在日立公司制及东芝公司制、日本电子公司制、Olympus 公司制、Sekisui Medical 公司制的通用自动分析装置,或者将近红外线作为测定波长的专用自动分析装置 LPIA(注册商标)(Mitsubishi Chemical IATRON 公司制)上的浊度法,在测定散射光强度的装置(DADE BEHRING 公司制)上的比浊法,因此,容易自动化。

[0032] 本发明的颗粒增强免疫凝集测定试剂除了主成分以外,作为对试样的离子强度、渗透压等进行缓冲的成分,还可以含有例如醋酸、柠檬酸、磷酸、Tris、甘氨酸、硼酸、碳酸、以及 Good 缓冲液,或者它们的钠盐、钾盐、钙盐等。另外,作为增强免疫学凝集的成分,还可以含有聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、磷脂聚合物等高分子。另外,作为控制免疫学凝集的形成成分,还可以含有蛋白质、氨基酸、糖类、金属盐类、表面活性剂类、还原性物质、促溶物质等颗粒增强免疫凝集测定中通用的成分中的 1 种或多种成分的组合。进而,可以将这些成分组合成试剂盒。

[0033] 本发明的人体半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的颗粒增强免疫测定方法以及颗粒增强免疫测定试剂及试剂盒可适用于高精度且特异性地测定试样中的人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 方面的任意用途。

[0034] 实施例

[0035] 以下,举出制作例、评价例以及实施例来详细说明本发明的一部分,但本发明不限于这些。

[0036] (制作例)

[0037] 高亲和性抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的制作

[0038] 将提纯的人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(SCIPAC 公司)100 μ g 用于 1 次免疫。初次免疫是使用等量混合人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 与弗氏完全佐剂而制备的乳液 200 μ L,将其注射到 BALB/c 小鼠的腹腔中。追加免疫中利用使用弗氏不完全佐剂同样制备的乳液 200 μ L,为了获得高亲和性的抗体,进行以 2 周间隔重复 6 次追加免疫的长期免疫。通过 ELISA 法测定从小鼠眼底静脉进行采血所得的血液中的抗体效价,选择抗体效价高的小鼠供给细胞融合。从第 7 次免疫起 2 周后,将人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 100 μ g 溶解于生理食盐水 200 μ L 中的溶液注射到小鼠腹腔中,3 天后摘出脾脏。将脾脏于 RPMI1640 培养基中弄碎后,以 1500rpm 离心分离来回收脾细胞。将其用无胎牛血清的 RPMI1640 培养基洗净 3 次以上后,加入含有 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基 2mL 进行混悬制成脾细胞混悬液。将脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0-AG14 以 6 比 1 的比例进行混合后,在 50% 聚乙二醇的存在下进行细胞融合,得到了杂交瘤细胞(融合细胞)。以 1500rpm 的离心分离收集沉淀部分,并通过在 GKN 液(将葡萄糖 2g、氯化钾 0.4g、氯化钠 8g、磷酸氢二钠 1.41g 和二水合磷酸二氢钠 0.78g 溶于纯净水并定容到 1 升的液体)中混悬、离心分离而洗净后,回收沉淀部分。将其混悬于含有 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基 30mL 中后,将得到的液体按照每孔 100 μ L、以及将含有 2.5×10^6 个/mL 作为饲养细胞的 BALB/c 小鼠胸腺细胞的 HAT 培养基按照每孔

200 μ L 分别注入 3 块 96 孔微孔板中,在 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳气体培养容器中培养杂交瘤细胞。

[0039] 利用将人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 固相化的 ELISA 法来确认培养上清中的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 抗体的存在,10 天后,在全部的孔中确认了杂交瘤细胞的增殖。详细地,将含有 10 μ g/mL 的人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 和 150mM 氯化钠的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.2;以下简称为 PBS)100 μ L 分别注入到确认了上述杂交瘤细胞的增殖的 96 孔微孔板中,在 4 $^{\circ}$ C 放置一晚。接着,将该 96 孔微孔板用含有 0.05% Tween20 和 1% 牛血清白蛋白 (以下 BSA) 的 PBS 300 μ L 洗净 3 次后,按照 50 μ L/ 孔加入各孔的培养上清,在室温下放置 1 小时。然后,将该板用含有 0.05% Tween20 的 PBS 洗净 3 次后,按照 50 μ L/ 孔加入过氧化物酶标记抗小鼠抗体 (Sekisui Medical 株式会社制),在室温下放置 1 小时。然后,将该板用含有 0.05% Tween20 的 PBS 洗净 3 次后,按照 50 μ L/ 孔加入含有 0.2% 邻苯二胺和 0.02% 过氧化氢的柠檬酸缓冲液 (pH5),在室温下放置 15 分钟后,按照 50 μ L/ 孔加入 4.5N 硫酸来停止反应,测定各孔的波长 492nm 下的吸光度,选择吸光度高的孔作为阳性孔。

[0040] 单克隆化是根据极限稀释法进行。即,在每孔分别注入 10^6 个作为饲养细胞的 BALB/c 小鼠的胸腺细胞的 96 孔微孔板中,分别注入 0.1mL 的将上述阳性孔中的杂交瘤细胞稀释到 10 个 /mL 的液体。关于培养基,初次使用 HT 培养基、第 2 次以后使用含有 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养容器中培养 10 天。将根据 ELISA 法的阳性孔的选择和根据极限稀释法的单克隆化操作各重复 3 次,得到了产生反应性高的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的杂交瘤细胞。将约 10^5 个各杂交瘤细胞对姥鲛烷预处理过的小鼠腹腔进行给药,分别取得生成的腹水。通过离心分离从所取得的各腹水中除去不溶物,加入等量的饱和硫酸铵溶液,边搅拌边放置一晚后,通过离心分离回收沉淀。将回收的沉淀溶解于 20mM Tris 缓冲液 (pH8) 中,并用相同的缓冲液进行透析。将各个透析内容物分别吸附于用相同的缓冲液进行了平衡化的 DEAE- 琼脂糖柱后,分别用相同缓冲液中的氯化钠为 0 ~ 300mM 的浓度梯度溶出,得到了各种提纯的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体。

[0041] (评价例 1)

[0042] 识别位点不同的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的选择

[0043] 以夹心 ELISA 法中的反应性作为指标,进行了所制作的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体之间识别位点不同的组合的探索。具体的,按照 50 μ L/ 孔加入含有各抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体各 1 μ g/mL 的 PBS,在室温下静置 2 小时,在板上进行固相化后,用含有 0.05% Tween20 的 PBS 300 μ L 洗净 3 次,按照 300 μ L/ 孔加入含有 0.05% Tween20 和 1% BSA 的 PBS,在室温下静置 1 小时。然后,用含有 0.05% Tween20 的 PBS 洗净 3 次后,按照 50 μ L/ 孔加入含有 10ng/mL 人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的 PBS,在室温下静置 1 小时来进行反应,用含有 0.05% Tween20 的 PBS 洗净 3 次后,按照 50 μ L/ 孔加入含有检测用的生物素化的各抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体 1 μ g/mL 的 PBS,在室温下静置 1 小时。用含有 0.05% Tween20 的 PBS 洗净 3 次后,按照 50 μ L/ 孔加入稀释 5000 倍的过氧化物酶标记抗生蛋白链菌素 (ZYMED 公司),在室温下静置 1 小时,将该板用含有 0.05% Tween20 的 PBS 洗净 3 次后,按照 50 μ L/ 孔加入含有 0.2% 邻苯二胺和 0.02% 过氧化氢的柠檬酸缓冲液 (pH5),在室温下反应 15 分钟后,按照 50 μ L/ 孔加入 4.5N 硫酸来

停止反应,测定各孔的波长 492nm 下的吸光度,将确认了反应性的组合作为识别位点不同的单克隆抗体。其结果,确认了对 4 种抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体 a ~ d 可以进行表 1 所示的组合。

[0044] 表 1

[0045]

		固相化抗体			
		a	b	c	d
生物素化抗体	a	—	++	—	+
	b	++	—	—	++
	c	+	—	—	+
	d	++	++	—	—

[0046] ++:具有强反应性 +:具有反应性 -:无反应性

[0047] 关于抗体 a,确认了与抗体 b ~ d 的任一个均可以进行组合。另外,关于抗体 c,在固相化的状态下,无论组合的抗体如何,均不显示反应性,因此认为不能与不溶性载体结合,即,不能在需要固相化的颗粒增强免疫测定方法中利用。

[0048] (评价例 2)

[0049] 识别位点不同的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体组合中的颗粒增强免疫凝集的确证

[0050] 制备分别独立地少量结合有抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体 a、b、d 的抗体致敏乳胶粒子,通过识别位点不同的组合来确认人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度依赖的颗粒增强免疫凝集的形成。

[0051] (抗体致敏乳胶粒子的制备)

[0052] 在平均粒径为 0.13 μm 或 0.3 μm (SEKISUI MEDICAL 制) 的 0.5% 乳胶溶液 (30mM Tris-HCl, pH8.5 ~ 9.0) 中等量添加 0.2mg/mL 的各半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体溶液 (30mM Tris-HCl, pH8.5 ~ 9.0), 在 4°C 搅拌 1 小时后, 添加等量的 1% BSA 溶液 (30mM Tris-HCl, pH8.5 ~ 9.0), 在 4°C 搅拌 30 分钟, 离心除去上清后, 将沉淀用纯净水再混悬而制成抗体致敏乳胶粒子溶液。此时, 抗体的结合量相对于抗体致敏粒子的总重量为约 3.8 重量%。

[0053] (第一试剂的制备)

[0054] 制备含有 750mM 的氯化钾、1% BSA 的 30mM CHES 缓冲液 (pH8.75) 作为第一试剂。

[0055] (第二试剂的制备)

[0056] 等量混合 2 种抗体致敏乳胶粒子溶液, 用 5mM MOPS 缓冲液 (pH7.0) 稀释成最终吸光度为 2.00D, 作为第二试剂。试剂是将在评价例 1 的结果中确认有强反应性的 a-b、a-d、b-d 的各抗体致敏乳胶粒子以相同的粒径彼此进行组合而制备的。

[0057] (测定方法)

[0058] 组合第一试剂和第二试剂, 用日立 7170 型自动分析装置来确认人半胱氨酸蛋白

酶抑制剂 C 浓度依赖的颗粒增强免疫凝集的形成。具体的,在浓度为 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0mg/L 的人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 溶液 2.5 μ L 中加入第一试剂 100 μ L,在 37 $^{\circ}$ C 下加热 5 分钟后,加入第二试剂 100 μ L 进行搅拌。然后,测定 5 分钟的伴随凝集形成的吸光度变化,作为主波长 570nm、副波长 800nm 下的灵敏度。

[0059] (结果)

[0060] 用组合了抗体 a 致敏乳胶粒子与抗体 b 致敏乳胶粒子的试剂测定各浓度的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 溶液,其结果是,如图 1 记载的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度 - 灵敏度曲线所示,确认了所有粒子均有半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度依赖的灵敏度的提高,能够进行测定。对于 0.13 μ m 粒子(黑四方块),虽然低浓度域的灵敏度略低,但高浓度域的灵敏度延伸良好;对于 0.3 μ m 粒子(白四方块),虽然低浓度域是高灵敏度,但高浓度域的灵敏度延伸(感度伸長)不良。另外,组合了抗体 a 致敏乳胶粒子与抗体 d 致敏乳胶粒子的试剂中,0.13 μ m 粒子(黑圆圈)与 0.3 μ m 粒子(白圆圈)的低浓度域的灵敏度相同,对于 0.13 μ m 粒子直到高浓度域灵敏度仍上升,而对于 0.3 μ m 粒子几乎没有发现灵敏度延伸。因此,认为虽然有不能被组合利用的粒子,但是还有两个组合均能够适用于免疫凝集测定方法。另一方面,在组合了以虚线表示的抗体 b 致敏乳胶粒子与抗体 d 致敏乳胶粒子的试剂中,对于 0.13 μ m 粒子(黑三角)、0.3 μ m 粒子(白三角),几乎都看不到半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度依赖的灵敏度上升,认为难以用于颗粒增强免疫测定方法。

[0061] (评价例 3)

[0062] 利用 BIAcore 确认抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的解离常数

[0063] 利用 BIAcore 装置(GE Healthcare 公司),根据常规方法算出提纯的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体 a、b 和 d 的解离常数。具体的,用 Mouse Antibody Capture Kit(GE Healthcare 公司),使抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体分别固定化在传感器芯片上,从与浓度 0 μ g/mL 和 0.0625、0.125、0.25、0.5、至 1.0 μ g/mL 的人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(R & D Systems 公司)的反应性来算出解离常数(表 2)。在评价例 2 中认为能够适用于颗粒增强免疫测定的组合 a-b、a-d 是由高亲和性的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体 a(解离常数:0.29nM)与通常亲和力的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体 b(解离常数:1.32nM)或 d(解离常数:2.30nM)组合构成,解离常数之比分别是:b/a(1.32/0.29)为约 4.6,d/a(2.30/0.29)为约 7.9,在组合的抗体之间看到了明确的亲和性的差异。另一方面,被认为不适合颗粒增强免疫凝集的 b-d 是一般亲和力的抗体彼此的组合,另外,解离常数之比 d/b(2.30/1.32)为约 1.7,没有看到明确的亲和力的差异。其中,选择了产生被认为具有高亲和性且通用性最高的单克隆抗体 a 的杂交瘤细胞 75202。该杂交瘤细胞于 2008 年 11 月 20 日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(日本茨城县筑波市东 1-1-1 中央第 6,邮编 305-8566),保藏编号(FERM BP-11186)。

[0064] 表 2

[0065]

抗体	解离常数 KD值(nM)
a	0.29
b	1.32
d	2.30

[0066] (评价例 4)

[0067] 利用 ELISA 法确认抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体特异性

[0068] 利用 ELISA 法,对此次制作的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体 a、b、d 的特异性进行评价。详细的是将含有 1 μ g/mL 的人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 以及属于半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族的人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 A、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 B、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 D、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E/M、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 F、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 S、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 SA、激肽原(均是 R & D Systems 公司)的 PBS 50 μ L 分别注入 96 孔微孔板,4 $^{\circ}$ C 下静置一晚在板上进行固相化。接着,将该 96 孔微孔板用 300 μ L 的含有 0.05% Tween20 的 PBS 洗净 3 次后,按照 300 μ L/孔加入含有 0.05% Tween20 和 1% BSA 的 PBS,在室温下静置 1 小时。然后,按照 50 μ L/孔加入含有所制作的各抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体 1 μ g/mL 的 PBS,在室温下静置 1 小时,用含有 0.05% Tween20 的 PBS 洗净 3 次后,按照 50 μ L/孔加入用 PBS 稀释 5000 倍的过氧化物酶标记抗小鼠抗体(Biosource 公司),在室温下静置 1 小时。然后,将该板用含有 0.05% Tween20 的 PBS 洗净 3 次,按照 50 μ L/孔加入含有 0.2% 邻苯二胺和 0.02% 过氧化氢的柠檬酸缓冲液(pH5),在室温下反应 15 分钟后,按照 50 μ L/孔加入 4.5N 硫酸来停止反应,测定各孔在波长 492nm 下的吸光度。

[0069] 作为对照,使用抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 兔多克隆抗体(BioVendor 公司)来代替抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体,使用过氧化物酶标记抗兔抗体(CAPPEL 公司)来代替过氧化物酶标记抗小鼠抗体,比较特异性。

[0070] 如图 2 所示,确认了单克隆抗体 a、b、d 中的任意单克隆抗体都仅与人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 特异性地反应,因此,认为可以通过利用这些抗体来特异性地测定人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C。另一方面,作为对照的多克隆抗体,对半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C、还有半胱氨酸蛋白酶抑制剂 B、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 D、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E/M、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 S、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 SA、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 SN 显示了相同程度的强反应性,另外,对半胱氨酸蛋白酶抑制剂 A、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 F、激肽原也显示了弱反应性,因此,可以预料到在利用了抗半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 多克隆抗体的测定中,对这些半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族分子共存的试样而言,不可能正确测定半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C。

[0071] 重复评价例 1-4,结果还发现了认为能够适用于颗粒增强免疫测定的使用了抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体 e、f、g 的组合 1 和 2。均是至少含有 1 种解离常数小于 1nM 的高亲和性抗体的组合,组合 1 是高亲和性抗体彼此的组合,解离常数之比为约 2.1;组合 2 是高亲和性抗体与一般亲和力的抗体的组合,解离常数之比为约 15.4(表 3)。

[0072] 表 3

[0073]

组合	抗体	解离常数	
		KD值 (nM)	比
1	a	0.29	2.07 (a/e)
	e	0.14	
2	f	0.54	15.37 (g/f)
	g	8.30	

[0074] (实施例)

[0075] 使用抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体 a 和 b, 制备乳胶粒径以及其他各条件最适合日立 7170 型自动分析装置测定的本发明的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定试剂, 实施与使用了抗半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 多克隆抗体的已有的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定试剂 (DADE BEHRING 公司, N- 乳胶半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 试剂盒) 的性能比较。需要说明的是, 无法获得使用了抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的通用的自动分析装置用测定试剂。

[0076] (抗体致敏乳胶粒子的制备)

[0077] 在平均粒径为 0.15 μm 的 0.5% 乳胶溶液 (30mM Tris-HCl pH8.5) 中添加等量的 0.15mg/mL 抗体 a 或 b 溶液 (30mM Tris-HCl pH8.5), 在 4°C 搅拌 1 小时后, 添加等量的 1% BSA 溶液 (30mM Tris-HCl pH8.5) 并在 4°C 搅拌 30 分钟, 离心除去上清后, 用纯净水再混悬沉淀, 作为抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体 a 和 b 致敏乳胶粒子溶液。此时, 抗体的结合量相对于抗体致敏粒子的总重量为约 2.9 重量%。

[0078] (第一试剂的制备)

[0079] 制备含有 750mM 的氯化钾、1% BSA 的 pH8.0 的 30mM Tris-HCl 来作为第一试剂。

[0080] (第二试剂的制备)

[0081] 将抗体 a 致敏乳胶粒子溶液与抗体 b 致敏乳胶粒子溶液等量混合, 用 5mM MOPS 缓冲液 (pH7.0) 稀释成最终吸光度为 1.50D, 将其作为第二试剂。

[0082] (测定试样)

[0083] 人血清样品

[0084] (测定条件)

[0085] 日立 7170 型自动分析装置: 参数条件

[0086] • 样品 - 第一试剂 - 第二试剂: 2.4 μL - 120 μL - 120 μL

[0087] • 分析法: 二点终点法 (测定点 18-34)

[0088] • 测定波长: 主波长 570nm/ 副波长 800nm

[0089] • 校准: 样条函数

[0090] (测定方法)

[0091] 由浓度为 0、0.5、1.0、2.0、4.0、10.0mg/L 的人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 溶液的测

定灵敏度来制作标准曲线,以该标准曲线为基础来测定各试样中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度,与对照试剂比较相关性 (样本数 N = 50)、同时重现性 (连续测定次数 n = 10)、检测限浓度 (将半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度为 0 的试样的测定平均灵敏度 +2SD 与半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度已知试样的测定平均灵敏度 -2SD 的误差范围不重叠的浓度作为检测限浓度)。

[0092] (对照试剂及分析装置)

[0093] 对照试剂 :N- 乳胶半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 试剂盒

[0094] 分析装置 :BN Prospec

[0095] 以上由 DADE BEHRING 公司制造

[0096] (结果)

[0097] 本发明的试剂与对照试剂的样品测定值的相关性良好 (图 3)。另外,关于重现性,本发明的试剂的变动系数小至已有试剂的 1/5 以下,重现性优异 (表 4)。另外,关于检测限浓度,还确认了对照试剂的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度为 0.2mg/L,而本发明的试剂为 0.05mg/L,可以检测到 1/4 以下的低浓度 (图 4)。

[0098] 将高亲和性的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体、和与其识别位点不同且亲和力相对弱的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体分别独立地结合于不溶性载体粒子而得到抗体致敏粒子,根据使用了该抗体致敏粒子的本发明的颗粒增强免疫测定方法,相对于抗体致敏粒子的总重量的抗体的结合量少于以往的试剂中所利用的大于 5 重量%且小于等于 35 重量%,从而所达成的人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定方法不仅成本低,而且具有高性能以及高特异性。

[0099] 表 4

[0100]

	本发明试剂		对照试剂	
	试样1	试样2	试样1	试样2
	0.49	1.99	0.379	1.64
	0.49	2.00	0.397	1.69
	0.49	2.01	0.401	1.66
	0.49	2.01	0.406	1.64
	0.48	2.01	0.424	1.75
	0.48	2.01	0.408	1.71
	0.49	2.01	0.379	1.75
	0.48	2.01	0.447	1.75
	0.49	2.01	0.428	1.71
	0.50	1.99	0.383	1.72
平均值 (mg/L)	0.49	2.01	0.41	1.70
标准偏差	0.006	0.008	0.023	0.043
变动系数 (%)	1.30	0.42	5.57	2.55

[0101] 产业上的利用可能性

[0102] 根据本发明的颗粒增强免疫测定方法、试剂及试剂盒,提供了高性能、便宜且简便的人体液中的人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的检测、测定方法。

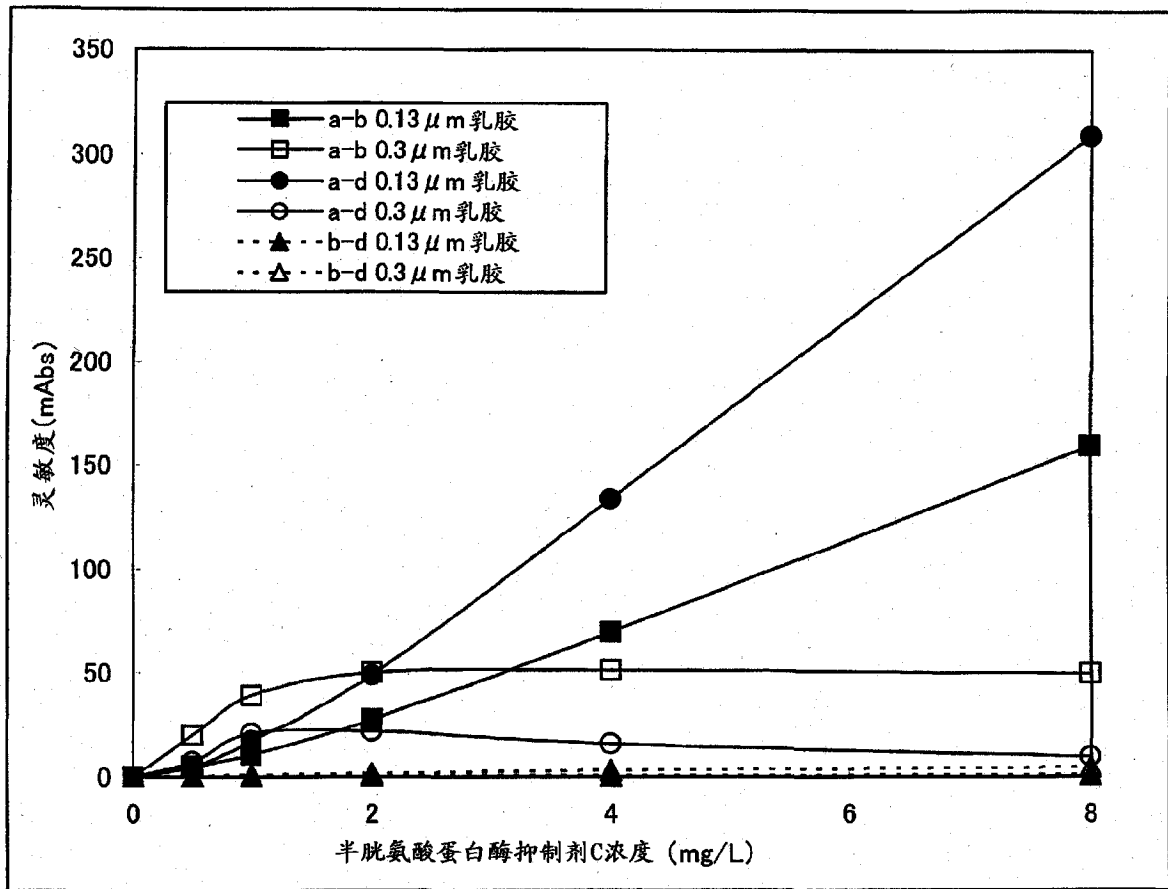


图 1

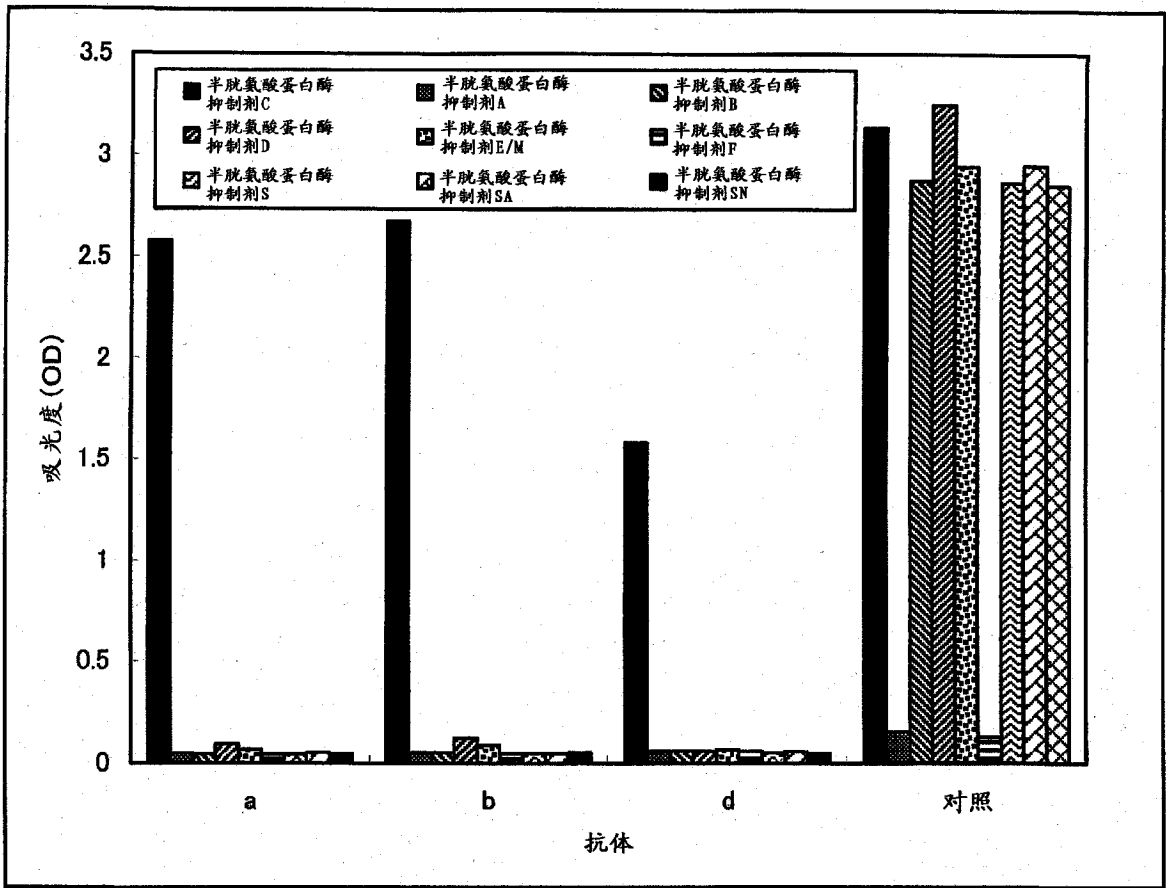


图 2

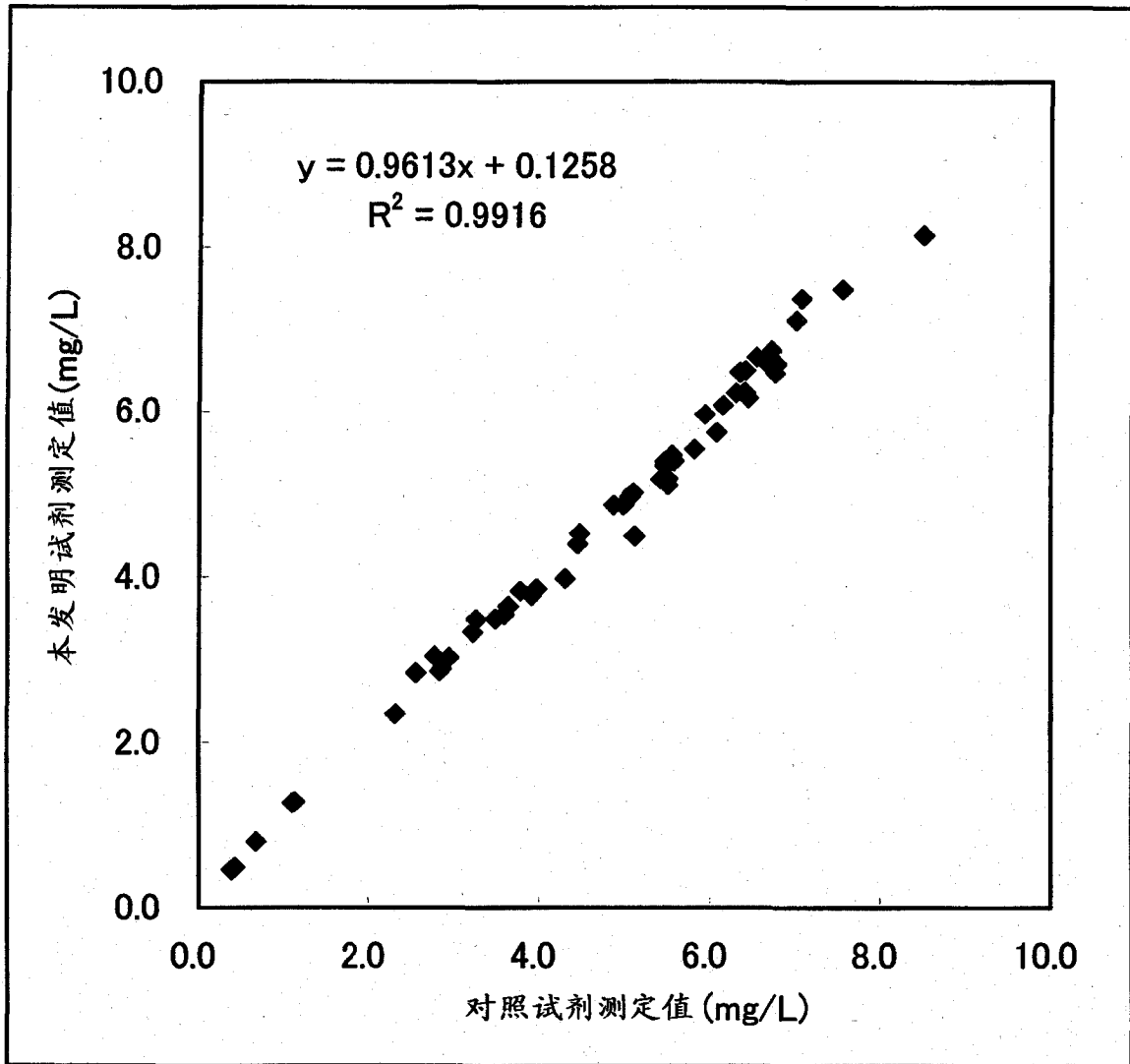


图 3

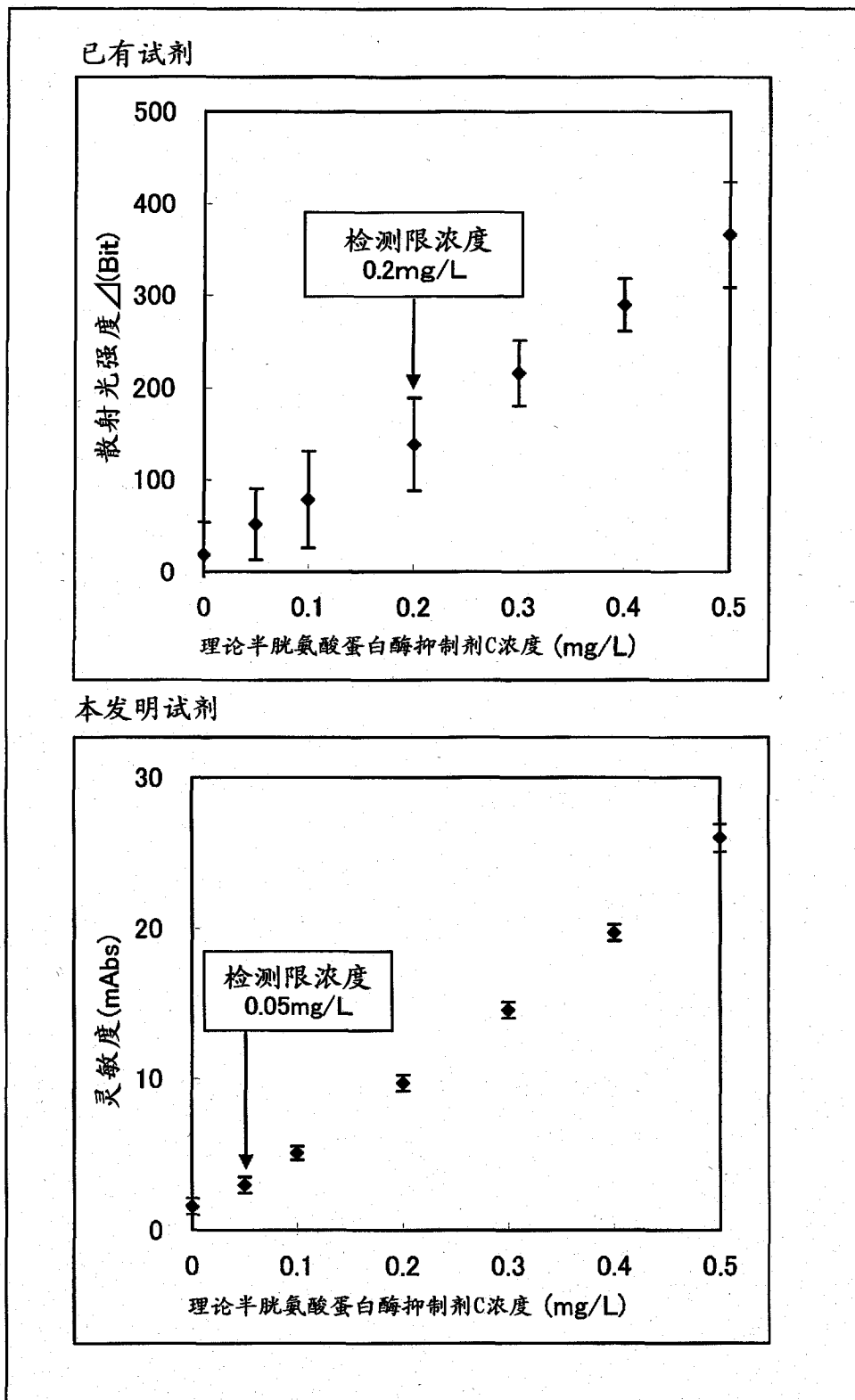


图 4

专利名称(译)	人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂C的测定方法		
公开(公告)号	CN102227639B	公开(公告)日	2015-12-02
申请号	CN200980148172.0	申请日	2009-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
[标]发明人	中山真也 高桥弘至 中村靖 清水知		
发明人	中山真也 高桥弘至 中村靖 清水知		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/6893 G01N2333/8139 G01N33/577 G01N33/68		
代理人(译)	苗堃		
审查员(译)	周洋		
优先权	2008309369 2008-12-04 JP		
其他公开文献	CN102227639A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明针对大量使用特异性低的多克隆抗体、或特异性高但凝集性弱的单克隆抗体的以往的测定方法，提供了特异性高、成本低且容易实现自动化的人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂C的颗粒增强免疫测定方法。所述人体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂C特异性的测定方法是组合了抗体致敏粒子的颗粒增强免疫测定方法，所述抗体致敏粒子是使高亲和性的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂C单克隆抗体、和与其识别位点不同且亲和力相对弱的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂C单克隆抗体分别独立地结合于不溶性载体粒子而得到的，相对于各种抗体致敏粒子的重量的抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂C单克隆抗体的结合量为小于5重量%。

