



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102421799 B

(45) 授权公告日 2015.02.18

(21) 申请号 201080020026.2	G01N 33/543(2006.01)
(22) 申请日 2010.05.06	G01N 33/577(2006.01)
(30) 优先权数据 2009-112624 2009.05.07 JP	G01N 33/545(2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2011.11.07	(56) 对比文件 WO 2004086040 A1, 2004.10.07, Yasuko Nakano 等. A novel enzyme-linked immunosorbent assay specific for high-molecular-weight adiponectin. 《Journal of Lipid Research》. 2006, 第 47 卷
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/JP2010/057747 2010.05.06	Yasuko Nakano 等. A novel enzyme-linked immunosorbent assay specific for high-molecular-weight adiponectin. 《Journal of Lipid Research》. 2006, 第 47 卷
(87) PCT国际申请的公布数据 W02010/128657 JA 2010.11.11	Ayako Nishimura 等. Determination of adiponectin in serum using a latex particle-enhanced turbidimetric immunoassay with an automated analyzer. 《Clinica Chimica Acta》. 2006, 第 371 卷
(83) 生物保藏信息 FERM BP-11106 2009.03.05	Toshimi Tanita 等. Performance of ELISA for specific measurement of High-Molecular-Weight (HMW) adiponectin. 《Journal of Immunological Methods》. 2008, 第 333 卷
(73) 专利权人 美迪恩斯生命科技株式会社 地址 日本东京都 专利权人 大塚制药株式会社	审查员 王翔宇
(72) 发明人 赤松优 葛城肃典 大西英晃 M. 阿部 波多间彻 西村文子 大口未央	
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001 代理人 孙秀武 高旭轶	
(51) Int. Cl. C07K 16/18(2006.01) C12P 21/08(2006.01) G01N 33/53(2006.01)	

权利要求书1页 说明书10页 附图6页

(54) 发明名称
用于高分子脂联素分析的新型单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了与中分子(MMW)脂联素不表现出交叉性、仅与高分子(HMW)脂联素特异性反应的单克隆抗体。本发明的单克隆抗体可使用HMW脂联素作为抗原来制作。根据本发明的单克隆抗体,可以提供简便、高精度且通用性高的HMW脂联素分析用试剂。

1. 单克隆抗体,其特征在于,与高分子脂联素特异性地反应,但与三聚体脂联素不反应、实质上与六聚体脂联素不反应,所述单克隆抗体是由保藏号 FERMBP-11106 的小鼠-小鼠杂交瘤 Clone8D 产生的单克隆抗体。
2. 权利要求 1 所述的单克隆抗体的制造方法,其特征不在于,使用高分子脂联素作为抗原。
3. 高分子脂联素的免疫学分析方法,其特征不在于,采用权利要求 1 所述的单克隆抗体。
4. 权利要求 3 所述的免疫学分析方法,其是乳胶凝集法。
5. 高分子脂联素的免疫学分析用试剂,其含有权利要求 1 所述的单克隆抗体。
6. 权利要求 5 所述的免疫学分析用试剂,其含有搭载了权利要求 1 所述的单克隆抗体的乳胶颗粒。

用于高分子脂联素分析的新型单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及新型高分子脂联素(アディポネクチン)特异性单克隆抗体、以及使用其的高分子脂联素的选择性分析(特别是测定)方法。

背景技术

[0002] 脂联素是在脂肪细胞中特异性表达的分泌蛋白,已报道了其抗动脉硬化作用、胰岛素抗性改善作用。近年来认为其还显示与癌症、炎症、代谢综合征的相关性,发挥生物体的防御因子的作用。已知人脂联素由 244 个氨基酸残基形成,单体的分子量约为 28 kDa。另一方面,已经确认血液中的脂联素是以三聚体(LMW:低分子量)为基本骨架,以其聚合而成的六聚体(MMW:中分子量)、以及它们进一步多个聚合而成的多聚体(HMW:高分子量)的形式存在。

[0003] 这些脂联素的各分子量体所具有的生理活性也不同。例如有报道称,C2C12 细胞株中的 NF- κ B 的活化能力在 HMW 和 MMW 中观察到,在 LMW 中未观察到。另外,有报道称,脂联素分泌具有变异的人无法形成 HMW 脂联素,发生低脂联素血症和糖尿病,与健康人相比,在冠状动脉疾病患者中,多聚体脂联素的存在比例降低。进一步还有报导称,节食前后在血液中浓度发生变动的是 HMW。因此,只检出 HMW 脂联素对于脂联素的研究以及各种疾病的研究是重要的。

[0004] 通常,蛋白质分子可以通过以该蛋白质作为抗原而特异性识别的单克隆抗体来分离。但是,如脂联素那样,抗原是由相同单体构成的各种形态的多聚体混合存在时,很难发现只特异性地针对特定尺寸的分子的抗体。多数情况下抗体识别抗原的初级氨基酸序列,因此,抗原为多聚体时,抗体通常识别构成该多聚体的单体的初级氨基酸序列。另一方面,脂联素由相同的单体构成,因此识别脂联素单体的抗体可以同时识别所有形态的脂联素多聚体。另外,即使在单克隆抗体识别立体结构的情况下,在如 HMW 脂联素这样基本骨架大量聚合的分子中难以避免与其它分子的交叉。

[0005] 因此,利用常规抗体时,难以只检测出特定尺寸的脂联素分子。

[0006] 为了将特定分子尺寸的脂联素进行定量,以往常规方法是通过凝胶过滤等预处理,按照分子量分级,并检出各峰的方法;或者用特定的蛋白酶消化特定分子,然后进行检出的方法。还开发了不需要凝胶过滤或蛋白酶等预处理的 ELISA 技术,但仍可见与 MMW 的交叉,很难说是 HMW 特异性的。因此,人们要求通过简易的预处理方法或者无预处理,可以只检出特定分子尺寸的脂联素的方法。

[0007] 作为公知的特定分子尺寸的脂联素的测定方法,除上述的凝胶过滤法之外,还已知以下两种方法。

[0008] (1) 用分解 LMW 和 MMW 的酶进行预处理,测定不被酶解而残留的脂联素,由此只检出 HMW 的方法(专利文献 1)。

[0009] (2) 使用不与脂联素单体反应、但识别三聚体和 / 或具有其凝集而成的结构的高分子脂联素的抗体,只检出该高分子脂联素抗原的方法(专利文献 2)。

[0010] 但是,用酶进行预处理时需要数十分钟的酶解处理时间,且在进行超过最佳时间的长时间孵育时,存在靶分子本身被混合存在的蛋白酶分解的危险,因此必须严格规定孵育的时间。并且酶解处理必须根据目标抗原的类型选择最佳种类的分解酶,因此很难说是通用的方法。

[0011] 另一方面,利用公知的识别高分子脂联素的抗体时,与高分子体(HMW)一起,同时也一起识别了其他多聚体结构(LMW或MMW),因此很难说是可纯粹地只检出HMW的方法。目前尚未知特异性地只识别HMW脂联素的抗体。

[0012] 专利文献1:国际公开第W02005/038457号小册子

[0013] 专利文献2:日本特许第3624216号说明书。

发明内容

[0014] 在以往的无预处理型的HMW检出用ELISA中,对于大量含有MMW的标本,存在与MMW显示交叉性的问题,因此难以真实地进行HMW特异性的测定,并且在ELISA中,即使是HMW选择性强的抗体,也会由于乳胶标记而失去HMW选择性,极难通过乳胶简单地测定HMW脂联素。因此,本发明的课题在于:提供与MMW脂联素不显示交叉性、只选择性地检出或定量HMW脂联素的单克隆抗体,以及简便、高精度且通用性高的高分子脂联素分析用试剂。

[0015] 本发明人进行了可以更简便地、只选择性地检出或定量HMW脂联素的高分子脂联素分析用乳胶试剂的构建,以及其中所使用的单克隆抗体的筛选。结果确认,即使是在夹心ELISA体系中HMW特异性较强的抗体,以乳胶试剂的形式进行评价时也完全不显示HMW特异性,因此只使用人血液中的脂联素HMW级分,重新制作单克隆抗体。发现:本单克隆抗体与由其他大肠杆菌重组脂联素制作的单克隆抗体相比,在蛋白质印迹分析中即使具有同等的反应性,如果用夹心ELISA体系评价,则HMW特异性极强。并且,构建使用该单克隆抗体的脂联素分析用乳胶试剂时,结果发现本试剂与MMW不显示交叉性,可选择性地测定HMW脂联素,从而完成了本发明。

[0016] 本发明涉及以下内容:

[0017] [1] 单克隆抗体,其特征在于:其与高分子脂联素特异性地反应。

[0018] [2] [1]的单克隆抗体的制造方法,其特征在于:使用高分子脂联素作为抗原。

[0019] [3] 高分子脂联素的免疫学分析方法,其特征在于:采用[1]的单克隆抗体。

[0020] [4] [3]的免疫学分析方法,其是乳胶凝集法。

[0021] [5] 高分子脂联素的免疫学分析用试剂,其含有[1]的单克隆抗体。

[0022] [6] [5]的免疫学分析用试剂,其含有搭载了[1]的单克隆抗体的乳胶颗粒。

[0023] 根据本发明的新型的单克隆抗体,可以提供更简便且准确、可只选择性地分析(检出或定量)高分子(HMW)脂联素的高分子脂联素分析用试剂(特别是乳胶试剂)和分析方法。

附图说明

[0024] 图1是表示使用采用公知的单克隆抗体的各种ELISA试剂盒,测定人血清(MMW低值标本)的凝胶过滤级分中的脂联素量的结果的曲线图。

[0025] 图2是表示使用与图1相同的ELISA试剂盒测定人血清(MMW高值标本)的凝胶

过滤级分中的脂联素量的结果的曲线图。

[0026] 图 3 是表示通过使用公知单克隆抗体 ANOC9121 制作的乳胶试剂来测定人血清的凝胶过滤级分中的脂联素量的结果的曲线图。

[0027] 图 4 是表示除了与图 1 相同的 ELISA 试剂盒之外还使用本发明的 ELISA 试剂盒来测定人血清 (MMW 低值标本) 的凝胶过滤级分中的脂联素量的结果的曲线图。

[0028] 图 5 是表示使用与图 4 相同的 ELISA 试剂盒测定人血清 (MMW 高值标本) 的凝胶过滤级分中的脂联素量的结果的曲线图。

[0029] 图 6 是表示通过使用本发明的单克隆抗体 Clone8D 制作的本发明的乳胶试剂, 测定人血清的凝胶过滤级分中的脂联素量的结果的曲线图。

具体实施方式

[0030] 本发明的单克隆抗体与高分子脂联素特异性地反应。本说明书中, “与高分子脂联素特异性地反应” 是指与高分子脂联素反应但与三聚体脂联素不反应、实质上与六聚体脂联素不反应。应予说明, 本说明书中, 有时分别将高分子脂联素、六聚体脂联素、三聚体脂联素称为 HMW 脂联素、MMW 脂联素、LMW 脂联素 (或简称为 HMW、MMW、LMW)。

[0031] 另外, 本说明书中, “高分子脂联素” 是以 LMW 和 / 或 MMW 的聚合物作为基本骨架的多聚体, 是指在非改性下进行分级时, 被分级为约 440 kDa 以上 (即, HMW 与 MMW 的分界为约 440 kDa)、在 670 kDa 附近具有峰的上述多聚体。

[0032] 应予说明, 上述分子量是由后述比较例和实施例中的实施的凝胶过滤确定的值, 该凝胶过滤条件如下。

[0033] 柱: Superdex 200 prep grade (GE ヘルスケア バイオサイエンス)

[0034] 移动相 (溶剂): D-PBS

[0035] 给液速度: 1 mL/ 分钟

[0036] 分子量标记:

[0037] (1) 牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin): 67, 000 (Da)

[0038] (2) 醛缩酶 (Aldolase): 158, 000

[0039] (3) 过氧化酶 (Catalase): 232, 000

[0040] (4) 铁蛋白 (Ferritin): 440, 000

[0041] (5) 甲状腺球蛋白 (Thyroglobulin): 669, 000

[0042] (6) 蓝葡聚糖 2000 (Blue Dextran 2000): 2, 000, 000

[0043] 本说明书中, “实质上与六聚体脂联素 (MMW) 不反应” 是指在非改性下对人血清进行分级时, 与在 400 kDa 附近具有峰、在约 250-440 kDa 处洗脱的分子不显示反应性。

[0044] 作为本发明的 HMW 脂联素特异性抗体的制作方法, 使用直接由生物体采集、分级为 HMW 的脂联素作为免疫原, 除此之外, 可以按照以往的单克隆抗体的制作方法进行。

[0045] 作为免疫原使用的生物体试样只要是可能含有 HMW 脂联素的生物学液体即可, 没有特别限定, 例如可举出: 直接由生物体采集得到的生物体液 [例如血液 (即全血)、血清、血浆、尿液、脊髓液或分泌液等], 或者将由生物体采集的生物体材料 (例如器官、组织或细胞等) 进行处理得到的来自生物体材料的液体 (例如器官、组织或细胞的各种提取液、或者组织或细胞的各种培养液等) 等。

[0046] 作为免疫原的HMW脂联素级分可如下制备：使用上述生物体试样，分取含有HMW脂联素的各种分子量的脂联素，然后通过凝胶过滤色谱分取HMW。对于含有HMW脂联素的各种分子量的脂联素的采集，可以采用将识别HMW脂联素的抗体进行固定的亲和层析。固定的抗体只要是至少可识别HMW脂联素的抗体即可，也可以识别MMW或LMW脂联素。亲和层析或凝胶过滤色谱的具体方法可以根据所使用的抗体或生物体试样的量等适当实施。另外，通过凝胶过滤色谱分取后还可以通过亲和层析分取。

[0047] 这样制作的HMW脂联素单克隆抗体除免疫球蛋白分子本身之外，还可以按照公知的方法制备抗体片段，例如Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv等，可以在HMW脂联素的选择性测定方法中使用。

[0048] 可通过本发明进行分析的被检试样只要是可能含有HMW脂联素的生物学液体即可，没有特别限定，例如可举出：直接由生物体采集得到的生物体液[例如血液(即全血)、血清、血浆、尿液、脊髓液或分泌液等]，或者将由生物体采集的生物体材料(例如器官、组织或细胞等)进行处理得到的来自生物体材料的液体(例如器官、组织或细胞的各种提取液、或者组织或细胞的各种培养液等)等。

[0049] HMW脂联素例如在正常人血液中以数 $\mu\text{g/mL}$ -数十 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度存在。或者可通过预实验等适当选择处理液(例如提取用溶液或培养用溶液)的量，使所得的来自生物体材料的液体中HMW脂联素浓度为数 $\mu\text{g/mL}$ -数十 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0050] 这样，可由本发明进行分析的生物学液体(特别是血液)以数 $\mu\text{g/mL}$ -数十 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度含有HMW脂联素，通过本发明的HMW脂联素分析用试剂，可以无需预稀释，即可进行分析。

[0051] 作为本发明的HMW脂联素分析方法，可以采用公知的免疫学测定方法。免疫学测定方法可举出：ELISA法或RIA法、免疫凝集法或免疫色谱法等。更具体地记载使用乳胶的免疫凝集法。

[0052] 本发明中使用的乳胶颗粒可举出公知的乳胶颗粒，例如由聚苯乙烯、或苯乙烯-苯乙烯磺酸盐共聚物等制成的乳胶颗粒。担载针对HMW脂联素的特异性抗体的乳胶的平均粒径例如可根据作为被检试样的生物学液体的种类、HMW脂联素的含有浓度或测定仪器等，通常在 $0.05\text{--}1.0\ \mu\text{m}$ 的范围内适当选择。

[0053] 例如，在分析血液中HMW脂联素时，在正常人标本中是以数 μg -数十 $\mu\text{g/mL}$ 这样的高浓度存在HMW脂联素，因此通过适当选择上述乳胶粒径，可以保证血液中HMW脂联素测定体系的测定范围。例如，粒径为 $0.1\ \mu\text{m}$ 以下时，有时不能保证临床上高的 $5\ \mu\text{g/mL}$ 以下的测定正确性，粒径为 $0.5\ \mu\text{m}$ 以上时，有时无法测定正常高值标本。因此，作为血液中HMW脂联素的测定体系，优选平均粒径 $0.1\text{--}0.5\ \mu\text{m}$ 的乳胶颗粒。

[0054] 本发明的HMW脂联素分析用乳胶试剂只要含有担载了针对HMW脂联素的特异性的单克隆抗体的乳胶颗粒悬浮液即可，其形态没有特别限定，例如可以是：含有用HMW脂联素特异性抗体致敏的乳胶颗粒和缓冲液两者的单液系的试剂；或者由作为缓冲液的第1试剂、和含有用HMW脂联素特异性抗体致敏的乳胶颗粒的第2试剂构成的双液系的试剂等的各种形态。

[0055] 本发明的HMW脂联素分析方法为，在取得可能含有脂联素的生物学液体后，无需对取得的上述生物学液体进行预稀释和/或预处理，而是直接以取得的状态或者根据需要

在实施适当的处理后,与搭载了本发明的针对 HMW 脂联素的特异性抗体的乳胶颗粒悬浮液(优选本发明的 HMW 脂联素分析用乳胶试剂)接触。

[0056] 例如,作为本发明方法的优选方案之一的、使用自动分析测定装置的 HMW 脂联素分析方法包含以下步骤:(1)取得可能含有脂联素的生物学液体的步骤;以及(2)将上述步骤中取得的生物学液体直接以上述步骤中取得的状态或者在实施适当的预稀释和/或预处理后,在自动分析测定装置内与搭载了针对 HMW 脂联素的特异性抗体的乳胶颗粒悬浮液接触,光学分析乳胶颗粒的凝集程度的步骤。

[0057] 各种生物学液体例如血液中的 HMW 脂联素测定采用以往的测定方法——放射免疫测定或酶免疫测定时,例如必须有将标本稀释至 500-5000 倍的步骤。与此相对,本发明的 HMW 脂联素分析方法中,例如通过适当选择乳胶颗粒的粒径(例如在血液中 HMW 脂联素的情况下,优选 0.1-0.5 μm 的粒径),无需对标本进行预稀释或预处理,可以以原液作为试样实施乳胶凝集反应。

[0058] 本发明的 HMW 脂联素分析方法中,使用搭载了针对 HMW 脂联素的特异性抗体的乳胶颗粒(例如本发明的 HMW 脂联素分析用乳胶试剂)进行凝集反应,通过光学分析(特别是测定)生成的凝集的程度(凝集度),可以对生物学液体中(例如血液中)的 HMW 脂联素的量进行分析(特别是测定)。对乳胶颗粒的凝集度进行光学分析的具体方法例如可以是目视观察,或者使用测定散射光强度、吸光度或透射光强度的光学仪器进行测定。优选的测定波长为 300-800 nm。测定方法可按照公知的方法,通过所使用的乳胶颗粒的大小(平均粒径)或浓度的选择、或反应时间的设定,通过测定散射光强度、吸光度或透射光强度的增加或减少来进行。另外,也可以将这些方法结合使用。

[0059] 通常,存在于乳胶凝集反应的测定体系中的针对 HMW 脂联素的特异性抗体致敏乳胶的浓度例如可根据所共存的盐、蛋白质或糖类等添加物的浓度适当选择。通常,作为反应体系的最终液量的浓度,可制备为:针对 HMW 脂联素的特异性抗体致敏乳胶优选 0.05-10 mg/mL,更优选 0.1-2 mg/mL。如果针对 HMW 脂联素的特异性抗体致敏乳胶的浓度过低,则凝集反应的低浓度测定有时不充分,如果过高则凝集反应的高浓度测定有时不充分,重现性变差。

[0060] 本发明中,通过调节影响针对 HMW 脂联素的特异性抗体致敏乳胶的凝集反应的其它因素,可以更精密地测定乳胶颗粒的凝集反应,可以使低浓度区域和高浓度区域的可定量的范围进一步扩大。对乳胶凝集反应有影响的其它因素例如可举出:乳胶颗粒的浓度、乳胶颗粒上的抗体致敏量或乳胶颗粒的粒径等。

[0061] 本发明的 HMW 脂联素分析方法中的乳胶凝集反应的条件可以与常规条件相同,反应介质可以适当地选择与各种生物学液体中的 HMW 脂联素分析相适应的各种缓冲液。对血液中 HMW 脂联素进行分析时,只要该缓冲液具有不会使血液中 HMW 脂联素失活、并且不阻碍乳胶凝集反应的离子强度、pH 即可,没有特别限定。例如可以使用顾德缓冲液(Good's buffer)、甘氨酸缓冲液或 Tris 缓冲液等。反应的 pH 为 5-10,特别优选 6-8。反应温度为 0-50 $^{\circ}\text{C}$,特别优选 20-40 $^{\circ}\text{C}$ 。反应时间可适当确定。

实施例

[0062] 以下,通过实施例具体说明本发明,但它们并不限定本发明的范围。

[0063] 比较例 1

[0064] 公知的单克隆抗体

[0065] 为了与本发明的单克隆抗体进行比较,作为公知的单克隆抗体使用将大肠杆菌重组脂联素抗原对小鼠致敏而制作的两种单克隆抗体 ANOC9121、Clone5A。将两种单克隆抗体与人血液中脂联素的反应性汇总于表 1。在非还原条件下的蛋白质印迹法中,两种抗体均可同等地检出血液中的 MMW、HMW。但是,在同一抗体之间的夹心 ELISA 中,Clone5A 识别血液中所有的分子,而在 ANOC9121 之间的夹心 ELISA 中,可见与 MMW 的微弱的交叉。

[0066] [表 1]

[0067]

抗体名	蛋白质印迹法		同一抗体之间的夹心 ELISA
	还原条件下	非还原条件下	
ANOC9121	检出单体	检出 MMW 以上的分子	HMW 特异性高与 MMW 稍有交叉
Clone5A	无反应性	检出 MMW 以上的分子	检出所有分子

[0068] 公知单克隆抗体的问题 -1 :与 MMW 的交叉反应性

[0069] 使用之前制作的 ANOC9121 的夹心 ELISA 试剂盒、和无需预处理的市售的高分子脂联素 ELISA 试剂盒 (富士レビオ),测定两种人血清的凝胶过滤级分。另外,总脂联素的测定使用人脂联素 ELISA 试剂盒 (大塚制药株式会社)。

[0070] 只要无特别说明,本说明书的比较例和实施例中实施的凝胶过滤按以下条件实施。

[0071] 柱:Superdex 200 prep grade (GE ヘルステア バイオサイエンス)

[0072] 移动相 (溶剂):D-PBS

[0073] 给液速度:1 mL/分钟

[0074] 分子量标记:

[0075] (1) 牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin):67,000 (Da)

[0076] (2) 醛缩酶 (Aldolase):158,000

[0077] (3) 过氧化酶 (Catalase):232,000

[0078] (4) 铁蛋白 (Ferritin):440,000

[0079] (5) 甲状腺球蛋白 (Thyroglobulin):669,000

[0080] (6) 蓝葡聚糖 2000 (Blue Dextran 2000):2,000,000

[0081] 使用 MMW 的含有比不高的血清样品时的结果如图 1 所示,使用 MMW 的含有比高的血清样品时的结果如图 2 所示。图 1 和图 2 中,A 表示使用 ANOC9121 的夹心 ELISA 的结果,B 表示市售的高分子脂联素 ELISA 试剂盒 (富士レビオ) 的结果,C 表示总脂联素测定用人脂联素 ELISA 试剂盒 (大塚制药株式会社) 的结果。

[0082] 结果如图 1 所示,在 MMW 不高的样品中,ANOC9121 ELISA 试剂盒、市售的高分子脂联素 ELISA 试剂盒均可特异性测定高分子 (H)。另一方面,图 2 所示的 MMW 高值的样品中,两种试剂盒均可确认与 MMW 的交叉反应性,因此难以特异性测定 HMW。

[0083] 应予说明,上述凝胶过滤条件中,HMW 级分、MMW 级分和 LMW 级分分别是分子量 > 约 440 kDa、约 250-440 kDa、< 约 250 kDa 的级分。

[0084] 比较例 2

[0085] 公知单克隆抗体的问题-2:乳胶试剂化的问题

[0086] 使用在 ELISA 中具有 MMW 反应性但 HMW 的特异性高的 ANOC9121 单克隆抗体尝试制备乳胶试剂。

[0087] (1) ANOC9121 单克隆抗体致敏乳胶试剂的制备

[0088] 将 ANOC9121 单克隆抗体以 0.5 mg/mL 的浓度溶解于 0.01 mol/L Tris 缓冲液 (pH 8.0), 在 9 mL 该所得液体中添加 1 mL 平均粒径 0.2 μm 的聚苯乙烯乳胶 (固形成分 10% 重量), 在室温下搅拌 60 分钟。接着向该液体中添加含有 0.5% 重量牛血清白蛋白的 Tris 缓冲液 (pH 8.0), 在室温下搅拌 60 分钟, 然后将该混合液以 20000 rpm 离心分离。在所得沉淀物中添加 10 mL Tris 缓冲液 (pH8.0), 使乳胶悬浮, 制备 ANOC9121 单克隆抗体致敏乳胶液。

[0089] (2) 缓冲液的制备

[0090] 在含有 0.5% (% 重量) 的浓度的牛血清白蛋白的 0.1 mol/L Tris 缓冲液 (pH8.0) 中添加 0.9% (% 重量) 浓度的氯化钠, 制成缓冲液。

[0091] (3) HMW 脂联素分析用乳胶试剂

[0092] 本比较例中使用的人脂联素抗原测定试剂是以双液系试剂的形式构成的, 该双液系试剂由在 (2) 中制备的缓冲液作为第 1 试剂、和在 (1) 中制备的 ANOC9121 单克隆抗体致敏乳胶作为第 2 试剂构成。

[0093] 脂联素的测定

[0094] (1) 脂联素级分的测定

[0095] 在 35 μL 人血清中的脂联素级分 (MMW 低值样品) 中混合 90 μL 在脂联素测定用试剂的制备 (2) 中制备的缓冲液, 在 37°C 下保持适当时间, 然后添加 90 μL 在脂联素测定用试剂的制备 (1) 中制备的 ANOC9121 单克隆抗体致敏乳胶液, 搅拌, 然后测定 5 分钟后在波长 570 nm 处的吸光度。以该期间的吸光度的变化量作为吸光度变化量 (ΔAbs)。根据由标准脂联素抗原液得到的 ΔAbs 和该抗原浓度制作标准曲线。使用该标准曲线, 由被检样品的 ΔAbs 计算脂联素值。测定使用日立自动分析装置 7170 型进行。

[0096] 此时, 使用市售的人脂联素乳胶试剂盒 (三菱化学ヤトロン), 同时进行总脂联素测定。为了比较两种试剂的峰, 对于测定得到的吸光度, 校正 ANOC9121 抗体致敏乳胶试剂中的测定吸光度, 使第 109 号级分的吸光度一致。

[0097] 图 3 示出了使用这样制作的 ANOC9121 而制备的 HMW 脂联素分析用乳胶试剂, 对人血清中的脂联素级分进行评价的结果 (图 3E)。

[0098] 与已有市售的总脂联素分析用乳胶试剂的结果 (图 3D) 比较可知, 使用 ANOC9121 的脂联素分析用乳胶试剂未表现出与相当于 LMW 的级分的反应性, 但对于 HMW、MMW, 与总脂联素分析用乳胶试剂同样地检出, 对于 MMW 低值样品也检出 MMW, 无法重现 ELISA 性能。

[0099] ELISA 的结果未被反映于乳胶试剂中, 认为其原因是: 与和一次抗体反应、接着和二次抗体反应的 ELISA 相比, 乳胶试剂中同时开始凝集等, 由反应机理不同引起的, 不过, 认为也可能是对 HMW 的特异性或亲和性低引起的。

[0100] 实施例 1

[0101] (1) 免疫原的制备和新型单克隆抗体的制作

[0102] 在已经尝试了的通过大肠杆菌重组脂联素制作抗体中,判断 HMW 特异性高的单克隆抗体的制作困难,只由人血液中脂联素提取 HMW 级分,进行单克隆抗体的制作。人血液中总脂联素的纯化中使用上述的 ANOC9121 结合柱。该柱通过将 3-10 mg/mL 的纯化 ANOC9121 与 4 g CNBr-活化琼脂糖 4B 偶联来制作,在用磷酸缓冲液洗涤后的该柱中施用 5-20 mL 的人血清。用磷酸缓冲液洗涤除去多余的血清成分,然后用洗脱液洗脱人血液中的脂联素。洗脱液可使用数 mol/L 尿素等的蛋白改性剂、离子序列高的离子、或数 mol/L 氯化钠溶液,本实施例中使用 6 mol/L 尿素。并且,洗脱的脂联素通过凝胶过滤纯化,仅回收 HMW 级分中比 HMW 的峰更高分子量一侧的级分,由此来纯化人血液中的脂联素的 HMW。

[0103] 纯化的人血液中 HMW 脂联素与弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂一起,对小鼠 Balb/C 以 1-10 μ g/个体隔周免疫数次,免疫多次。由小鼠摘出脾脏,然后按照常规方法使用小鼠骨髓瘤细胞株 P3U1 与聚乙二醇法使其融合,制作杂交瘤。

[0104] 为了由制作的杂交瘤中筛选对天然型的脂联素特异性更高的单克隆抗体,利用血液中的脂联素作为完全未发生改性的脂联素。具体来说,制作将 Fc 部分消化得到的 ANOC9121 F(ab')₂,制作 ANOC9121 F(ab')₂ 固相板。使适当稀释的人血清与该 F(ab')₂ 板反应,接着使杂交瘤的培养上清液反应。进一步添加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记得到的抗小鼠 IgG Fc 抗体,孵育,然后测定 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的显色强度,由此筛选生成对天然型脂联素的特异性、亲和性均高的单克隆抗体 clone8D 的 Mouse-Mouse hybridoma Clone8D (小鼠-小鼠杂交瘤 Clone8D)。

[0105] (2) 新制作的单克隆抗体利用蛋白质印迹法进行的评价

[0106] 使用利用由血液中纯化的 HMW 脂联素级分而制作的、抗人脂联素单克隆抗体 Clone8D,通过蛋白质印迹法对人血液中的脂联素分子进行分析。作为样品,在非还原非加热条件下以及利用 2-巯基乙醇的还原条件下对人血液进行电泳,使上述 ANOC9121、Clone5A 和 Clone8D 三种抗体与其反应并染色。人血液中脂联素在非还原非加热条件下以 HMW 或 MMW、LMW 等多种形态存在,而在还原条件下,三聚体以上的形态消失,只以作为单体的约 28,000 Da 的形态或相当于二聚体的分子形式存在。单克隆抗体 ANOC9121 在非还原非加热条件下和还原下识别所有的分子量体。另一方面,单克隆抗体 Clone5A 和本次使用人血液中的脂联素而制作的 Clone8D 表现出不识别被还原改性的单体,而识别非还原非加热条件下的高分子量体,仅通过蛋白质印迹法评价,并未见到与高分子量体反应性在三者之间有很大差异。

[0107] 实施例 2

[0108] 新制作的单克隆抗体利用 ELISA 进行的评价

[0109] 构建使用 Clone8D 而成的夹心 ELISA,与以往的夹心 ELISA 就 HMW 特异性进行比较。具体来说,将以 5-10 μ g/mL 浓度在磷酸缓冲液中稀释得到的 Clone8D 添加到市售的 96 孔 ELISA 板中,进行固相反应过夜。接着用含有 0.1-1% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液进行封闭操作。将使用 Superdex200 柱 (GE ヘルスクエア) 进行 HPLC 分级得到的人血清与该抗体固相板反应,洗涤后使生物素标记的 Clone8D 反应。进一步添加 HRP 结合链霉亲和素,孵育后洗涤过量的 HRP 结合链霉亲和素。测定由 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的添加得到的显色强度,由此确定各级分的脂联素的量。

[0110] 进一步通过比较例 1 中使用的 ANOC9121 之间的夹心 ELISA 试剂盒、无需预处理的

市售高分子脂联素 ELISA 试剂盒（富士レビオ）测定同一级分，确认与 MMW 的交叉性。另外，总脂联素的测定中使用人脂联素 ELISA 试剂盒（大塚制药株式会社）。其结果如图 4 和图 5 所示。使用 Clone8D 的夹心 ELISA（图 4 和图 5 的 F）与其他测定方法相比，不仅在如图 4 所示的 MMW 低值标本，而且在如图 5 所示的大量含有 MMW 的标本中也未显示与 MMW 的交叉性，可特异性测定 HMW。

[0111] 实施例 3

[0112] 使用新型单克隆抗体的高分子脂联素分析用乳胶试剂的制备

[0113] (1) Clone8D 单克隆抗体致敏乳胶试剂的制备

[0114] 以 0.5 mg/mL 的浓度将 Clone8D 单克隆抗体溶解于 0.01 mol/L Tris 缓冲液 (pH 8.0)，在 9 mL 所得液体中添加 1 mL 平均粒径 0.2 μm 的聚苯乙烯乳胶（固形成分 10% 重量），在室温下搅拌 60 分钟。接着，向该液体中添加含有 0.5% 重量牛血清白蛋白的 Tris 缓冲液 (pH 8.0)，在室温下搅拌 60 分钟，然后将该混合液以 20000 rpm 离心分离。向所得沉淀物中添加 10 mL Tris 缓冲液 (pH 8.0)，使乳胶悬浮，制备 Clone8D 单克隆抗体致敏乳胶液。

[0115] (2) 缓冲液的制备

[0116] 在含有 0.5%（% 重量）浓度的牛血清白蛋白的 0.1 mol/L Tris 缓冲液 (pH 8.0) 中添加 0.9%（% 重量）浓度的氯化钠，制成缓冲液。

[0117] (3) HMW 脂联素分析用乳胶试剂

[0118] 本实施例中使用的人脂联素抗原测定试剂是以双液系试剂的形式构成的，该双液系试剂由在 (2) 中制备的缓冲液作为第 1 试剂、和在 (1) 中制备的 Clone8D 单克隆抗体致敏乳胶作为第 2 试剂构成。

[0119] 脂联素的测定

[0120] (1) 脂联素级分的测定

[0121] 在 35 μL 人血清中的脂联素级分中混合 90 μL 在脂联素测定用试剂的制备 (2) 中制备的缓冲液，在 37°C 下保持适当时间，然后添加 90 μL 在脂联素测定用试剂的制备 (1) 中制备的 Clone8D 单克隆抗体致敏乳胶液，搅拌，然后测定 5 分钟后的波长 570 nm 处的吸光度。以该期间的吸光度的变化量作为吸光度变化量 (ΔAbs)。根据由标准脂联素抗原液得到的 ΔAbs 和该抗原浓度制作标准曲线。使用该标准曲线，由被检样品的 ΔAbs 计算脂联素值。测定使用日立自动分析装置 7170 型进行。

[0122] 此时，使用市售的人脂联素乳胶试剂盒（三菱化学ヤトロン），同时进行总脂联素测定。为了比较两种试剂的峰，对于测定得到的吸光度，校正 Clone8D 抗体致敏乳胶试剂中的测定吸光度，使第 109 号级分的吸光度一致。

[0123] 结果如图 6 所示。图 6 中，D 表示市售的人脂联素乳胶试剂盒（三菱化学ヤトロン）的结果，G 表示本发明的 Clone8D 抗体致敏乳胶试剂的结果。使用本试剂测定人血清脂联素的凝胶过滤级分，结果可见 HMW 特异性乳胶凝集反应。

[0124] 产业实用性

[0125] 本发明的单克隆抗体可用于脂联素分析的用途。

[0126] 以上按照特定的方案说明了本发明，但对本领域技术人员来说显而易见的变形或改良也包含在本发明的范围内。

[0127] 保藏号

[0128] Mouse-Mouse hybridoma Clone8D 于平成 21 年(2009 年)3 月 5 日保藏于作为国际保藏机构的独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心(〒305-8566 日本国茨城县つくば市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6)(保藏号 FERM BP-11106)。

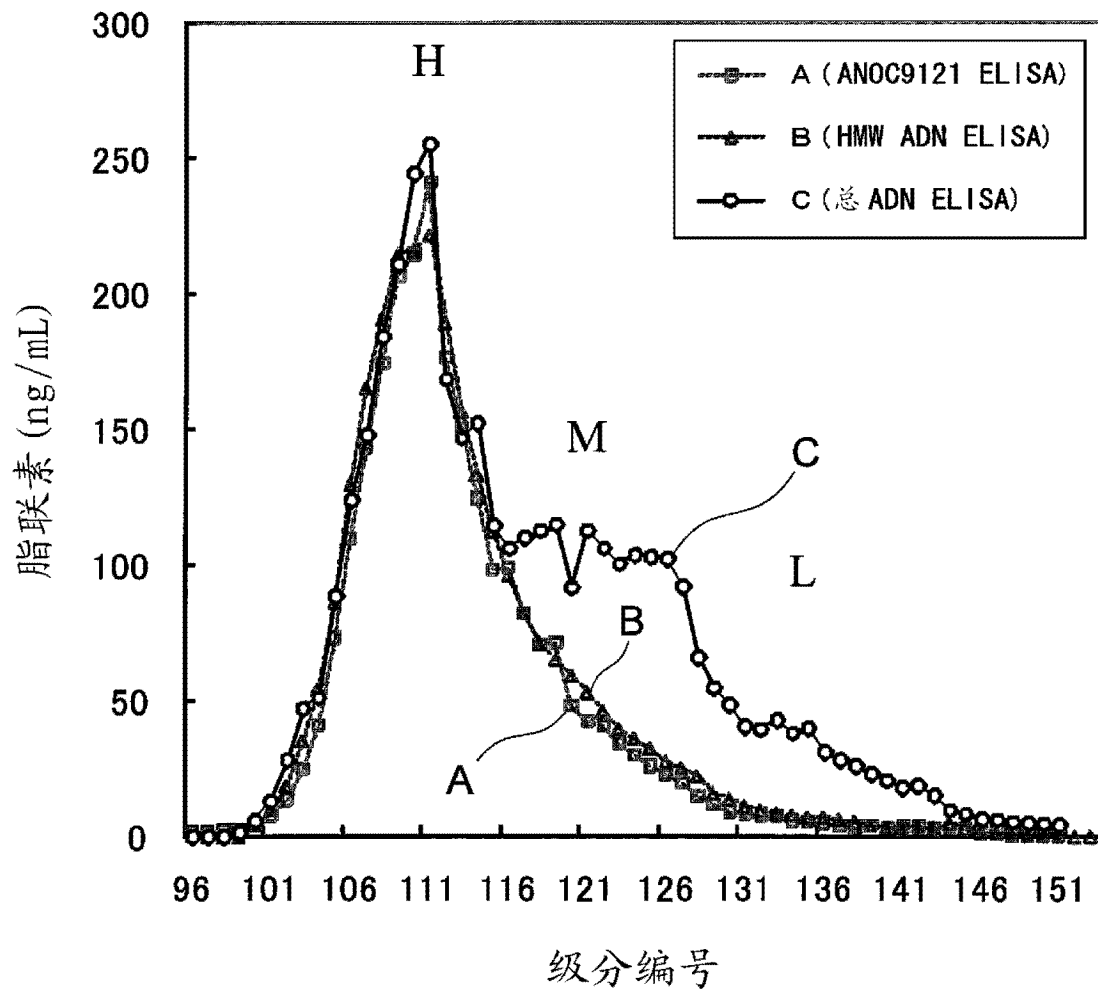


图 1

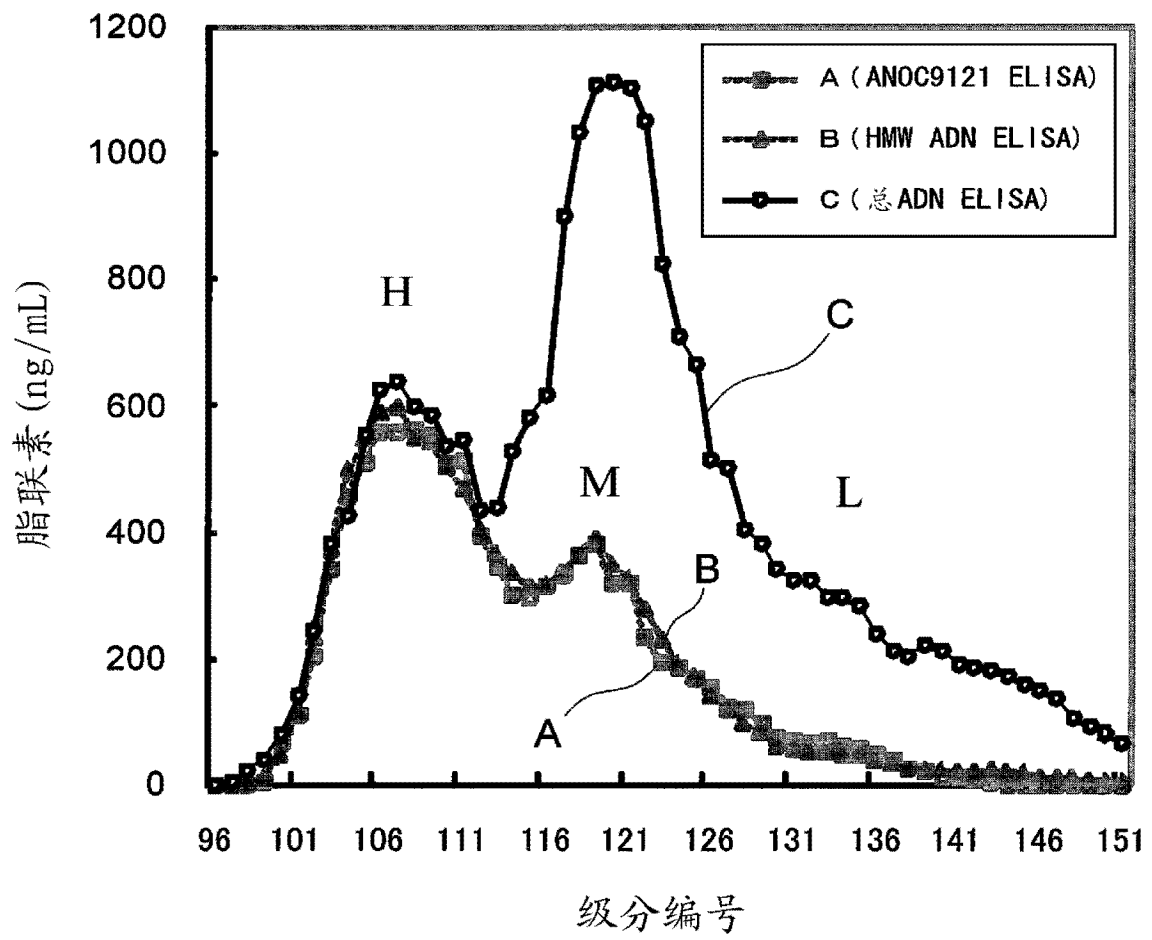


图 2

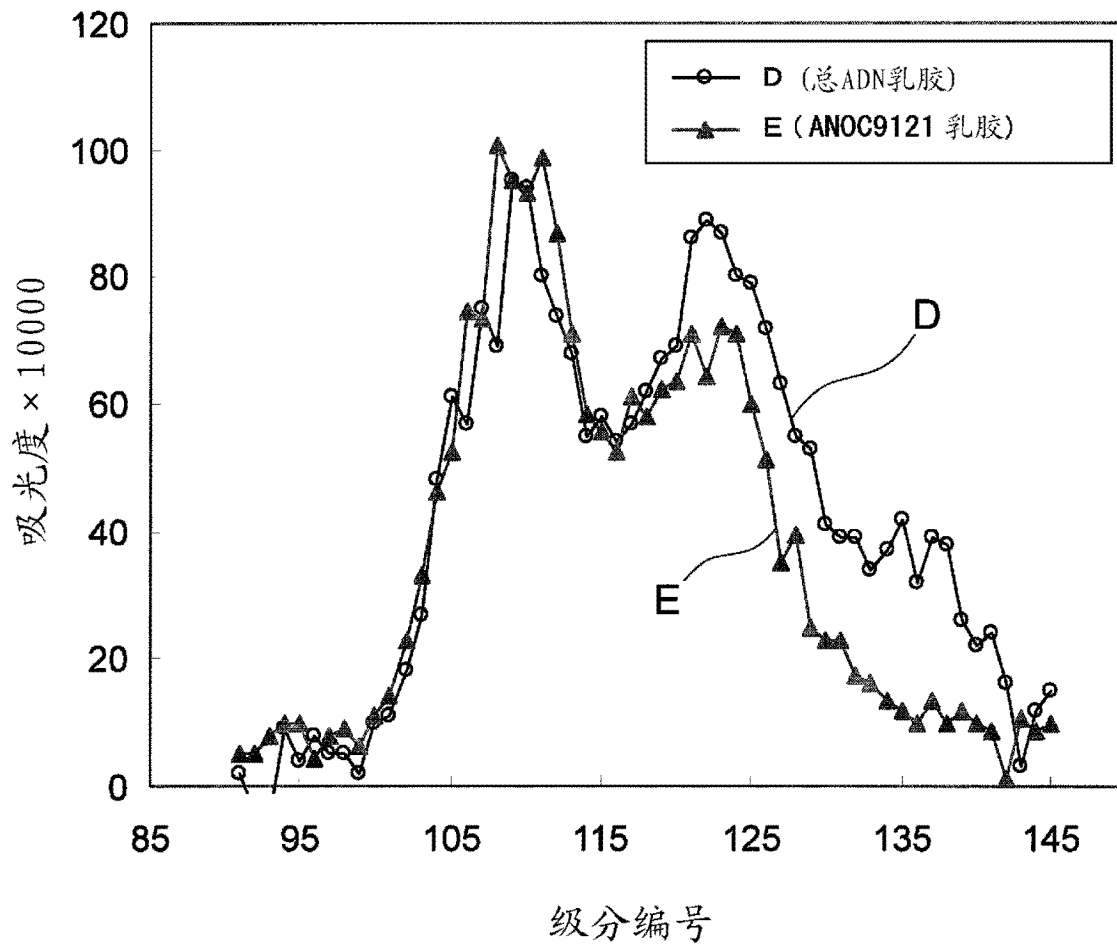


图 3

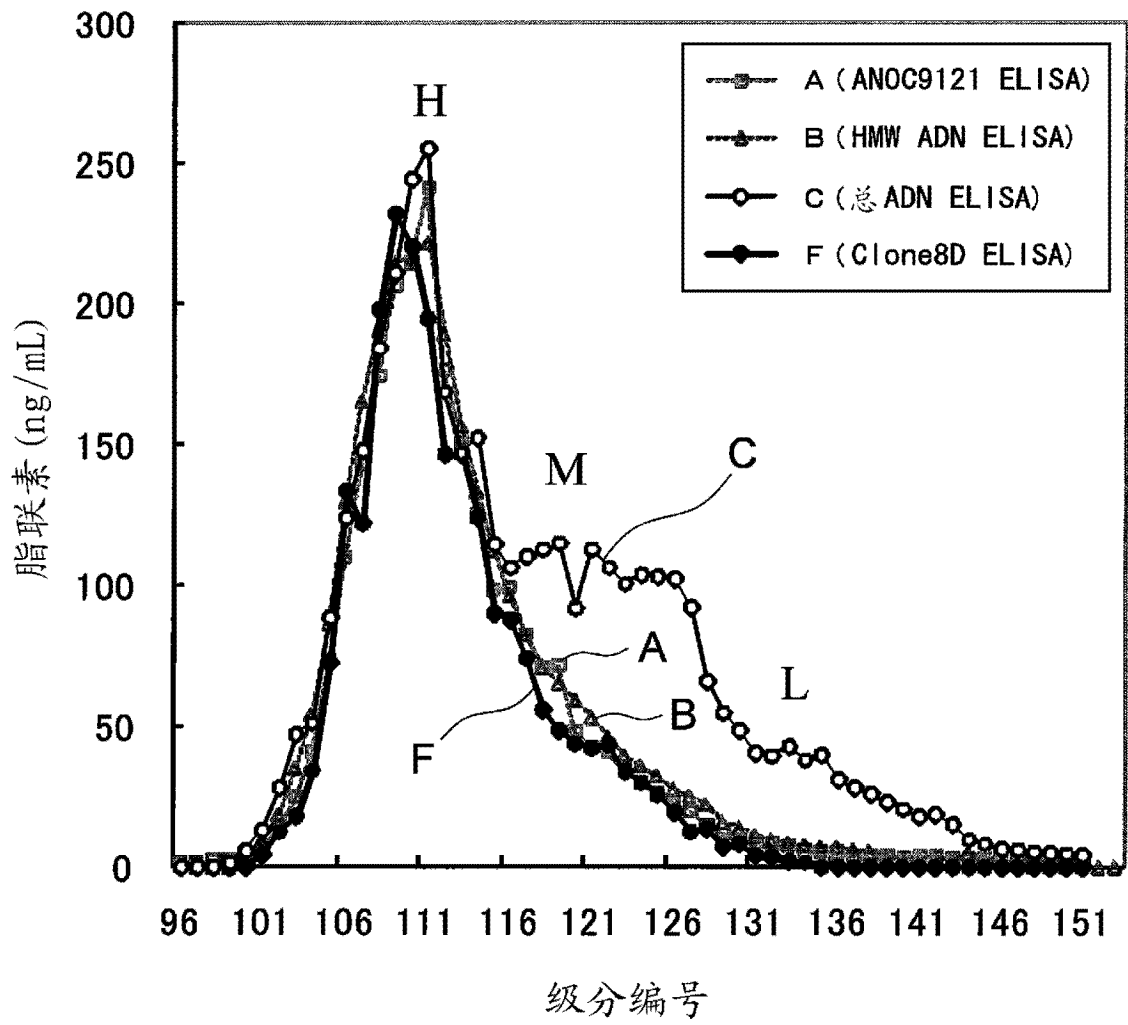


图 4

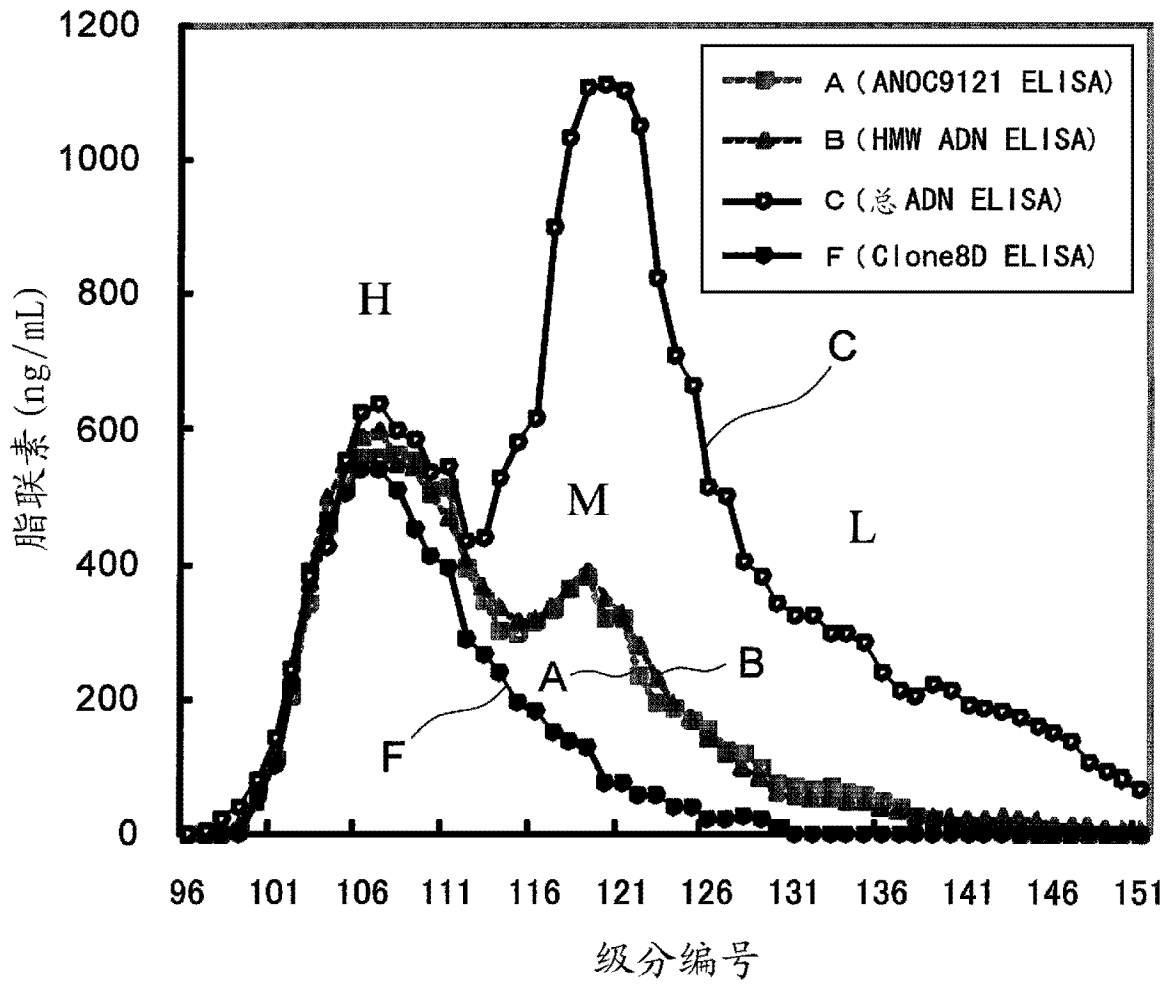


图 5

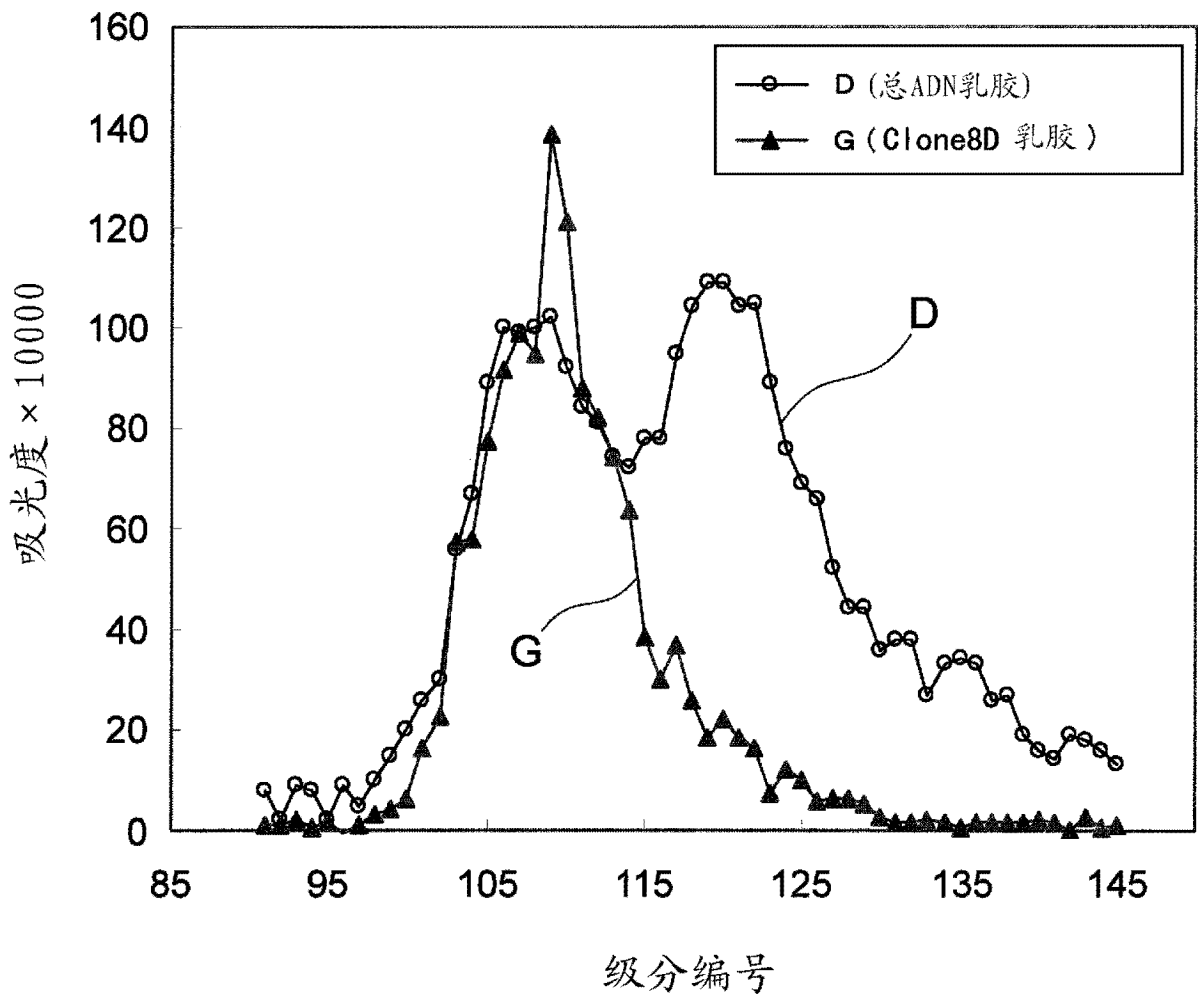


图 6

专利名称(译)	用于高分子脂联素分析的新型单克隆抗体及其应用		
公开(公告)号	CN102421799B	公开(公告)日	2015-02-18
申请号	CN201080020026.2	申请日	2010-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社 大冢制药株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	美迪恩斯生命科技株式会社 大冢制药株式会社		
[标]发明人	赤松优 葛城肃典 大西英晃 M 阿部 波多间彻 西村文子 大口未央		
发明人	赤松优 葛城肃典 大西英晃 M.阿部 波多间彻 西村文子 大口未央		
IPC分类号	C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/545		
CPC分类号	G01N2800/042 G01N33/543 G01N33/74 C07K16/26 G01N33/54313 G01N33/82		
代理人(译)	孙秀武		
审查员(译)	王翔宇		
优先权	2009112624 2009-05-07 JP		
其他公开文献	CN102421799A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了与中分子(MMW)脂联素不表现出交叉性、仅与高分子(HMW)脂联素特异性反应的单克隆抗体。本发明的单克隆抗体可使用HMW脂联素作为抗原来制作。根据本发明的单克隆抗体，可以提供简便、高精度且通用性高的HMW脂联素分析用试剂。

抗体名	蛋白质印迹法		同一抗体之间的夹心 ELISA
	还原条件下	非还原条件下	
ANQC9121	检出单体	检出MMW 以上的分子	HMW 特异性高与MMW 稍有交叉
Clone5A	无反应性	检出MMW 以上的分子	检出所有分子