



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102245637 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 16

- (21) 申请号 200980149839. 9
(22) 申请日 2009. 12. 10
(30) 优先权数据
2008-316173 2008. 12. 11 JP
(85) PCT申请进入国家阶段日
2011. 06. 10
(86) PCT申请的申请数据
PCT/JP2009/006768 2009. 12. 10
(87) PCT申请的公布数据
W02010/067611 JA 2010. 06. 17
(83) 生物保藏信息
FERM BP-11190 2008. 11. 28
FERM BP-11191 2008. 11. 28
FERM BP-11189 2008. 11. 28
FERM BP-11187 2008. 11. 28
FERM BP-11188 2008. 11. 28
(71) 申请人 积水医疗株式会社
地址 日本东京都
(72) 发明人 宫崎修 田久保耕平 藏下俊祐
(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.
C07K 16/18 (2006. 01)
C12N 15/02 (2006. 01)
C12P 21/08 (2006. 01)
G01N 33/53 (2006. 01)
C07K 7/06 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 11 页
序列表 2 页 附图 8 页

(54) 发明名称

对血红蛋白 β 链的 N 末端区域的抗体

(57) 摘要

本发明提供能够测定与 IFCC 参照法相同的 HbA1c 含有率的通用的方法。本发明提供一种抗体, 该抗体与 N 末端具有氨基酸序列 VHLTPE (序列号 1)、且 N 末端缬氨酸未被修饰的肽或蛋白质反应, 与该多肽或蛋白质的 N 末端缬氨酸被修饰的肽或蛋白质不反应。

1. 一种抗体,其特征在于,与N末端具有由序列号1表示的氨基酸序列VHLTPE、且N末端缬氨酸未被修饰的肽或蛋白质反应,与该肽或蛋白质的N末端缬氨酸被修饰的肽或蛋白质不反应。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中,与N末端具有由序列号1表示的氨基酸序列VHLTPE、且N末端缬氨酸未被修饰的血红蛋白反应,与该血红蛋白的N末端缬氨酸被修饰的血红蛋白不反应。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中,与血红蛋白A0反应,与血红蛋白A1c不反应。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的抗体,其中,与N末端不具有由序列号1表示的氨基酸序列VHLTPE的血红蛋白不反应。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的抗体,其是单克隆抗体。

6. 一种权利要求1~5中任一项所述的抗体的制造方法,其特征在于,将N末端具有由序列号2表示的氨基酸序列VHL、且N末端缬氨酸未被修饰的肽或蛋白质用作免疫原。

7. 一种试样中的血红蛋白A1c含有率的测定方法,其特征在于,使用权利要求1~5中任一项所述的抗体测定试样中的血红蛋白A0量,使用抗血红蛋白A1c抗体测定所述试样中的血红蛋白A1c量,由下式(1)算出试样中的血红蛋白A1c含有率(%),

血红蛋白A1c含有率(%) = (血红蛋白A1c量 / (血红蛋白A1c量 + 血红蛋白A0量)) × 100。

对血红蛋白 β 链的 N 末端区域的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及识别未修饰的血红蛋白 β 链的 N 末端区域的抗体和使用该抗体的血红蛋白 A1c 的测定方法。

背景技术

[0002] 血中的血红蛋白（以下称为“Hb”）结合有糖的糖化血红蛋白中，血红蛋白 β 链的 N 末端缬氨酸残基由葡萄糖糖化的血红蛋白 A1c（以下称为“HbA1c”）由于在临床上反映过去 1～2 个月的平均血糖值，因此作为适合糖尿病的诊断、糖尿病病程观察的指标而广泛使用。

[0003] 作为 HbA1c 的测定方法，使用 HPLC 法和免疫学测定方法，但是根据 HPLC 柱的种类、试剂厂商，测定对象有微妙的不同，而要求测定的标准化。从该观点出发，IFCC(International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine)（国际临床化学与检验医学联合会）的 HbA1c 标准化的工作组，制定了基准测定方法（以下称为“IFCC 参照法”）（非专利文献 1）。该方法如下，将红血球溶血液用蛋白酶消化而提取血红蛋白 β 链的 N 末端六肽（VHLTPE）（序列号 1），求出该提取物中的 HbA1c 的 β 链 N 末端的糖化六肽（f-VHLTPE）、和血红蛋白 A0（以下称为“HbA0”）的 β 链 N 末端的未被修饰的六肽（VHLTPE）（序列号 1）的量，利用下述式算出 HbA1c 含有率（%）。

[0004]
$$\text{HbA1c 含有率 (\%)} = (\text{f-VHLTPE 量} / (\text{f-VHLTPE 量} + \text{VHLTPE 量})) \times 100 = (\text{HbA1c 量} / (\text{HbA1c 量} + \text{HbA0 量})) \times 100$$

[0005] 但是，该方法中的糖化六肽含量的测定方法由于使用 HPLC-MS 或 HPLC-毛细管电泳，需要昂贵的装置，并且只能用特定的设施进行测定。另外，存在其测定值与以往的方法的 HbA1c 值相比发生很大变化的问题（非专利文献 2）。

[0006] 非专利文献

[0007] 非专利文献 1 : Clin. Chem. Lab. Med. 2002 ; 40 (1) : 78-89

[0008] 非专利文献 2 : 糖尿病 46 卷 9 号 (2003), 775 ~ 778 页

发明内容

[0009] 因此，本发明的课题是提供能够测定与 IFCC 参照法相同的 HbA1c 含有率（%）的通用的方法。

[0010] 在这里，本发明的发明人为了开发代替 HPLC-MS、HPLC-毛细管电泳法的 IFCC 参照法而进行研究的结果，首次成功制成了与 Hb β 链 N 末端的六肽 VHLTPE（序列号 1）特异性地反应、且与该六肽被修饰的肽不反应的抗体。并发现使用该抗体与 HbA1c 抗体，可以正确且简便地定量 HbA1c 与 HbA0，可以利用简便的免疫学方法测定 IFCC 参照法的 HbA1c 含有率（%），从而完成了本发明。

[0011] 即，本发明提供一种抗体，该抗体与 N 末端具有氨基酸序列 VHLTPE（序列号 1）的肽或蛋白质反应，与该肽或蛋白质的 N 末端缬氨酸被修饰的肽或蛋白质不反应。

[0012] 另外,本发明提供一种试样中的 HbA1c 含有率的测定方法,其特征在于,使用上述抗体测定试样中的 HbA0 量,使用抗 HbA1c 抗体测定上述试样中的 HbA1c 量,由下式 (1) 算出试样中的 HbA1c 含有率 (%)。

[0013]
$$\text{HbA1c 含有率 (\%)} = (\text{HbA1c 量} / (\text{HbA1c 量} + \text{HbA0 量})) \times 100 (1)$$

[0014] 使用本发明的抗体可以正确且简便地测定试样中的 HbA0 量,因此,能够简便且正确地测定利用将试样中的 HbA0 量与 HbA1c 量作为基准的 IFCC 参照法的 HbA1c 含有率 (%)。

附图说明

[0015] 图 1 表示利用免疫层析法的 HbA1c 的测定方法示意图。

[0016] 图 2 表示利用免疫层析法的 HbA1c 的测定方法示意图。

[0017] 图 3 表示用抗原固相化 ELISA 法测定小鼠抗血清中的抗体效价的结果。

[0018] 图 4 表示用竞争性 ELISA 法检验本发明抗体对血红蛋白 β 链 N 末端肽 (VHLTPE) (序列号 1) 及其糖化肽 (f-VHLTPE) 的反应性的结果。

[0019] 图 5 表示用竞争性 ELISA 法检验本发明抗体对血红蛋白 β 链 N 末端肽 (VHLTPE) (序列号 1) 以及 α 链 N 末端肽 (VLSPAD) (序列号 10) 的反应性的结果。

[0020] 图 6 表示用抗原固相化 ELISA 法检验本发明抗体、抗血红蛋白抗体对 HbA1c 以及 HbA0 的反应性的结果。

[0021] 图 7 表示用抗原固相化 ELISA 法检验本发明抗体、抗血红蛋白抗体、以及抗 HbA1c 抗体对以 HPLC 分离的血红蛋白亚型的反应性的结果。

[0022] 图 8 表示利用夹心 ELISA 的 HbA1c 浓度测定系、以及 HbA0 浓度测定系中的校正曲线。

具体实施方式

[0023] 本发明的抗体是与 N 末端具有氨基酸序列 VHLTPE (序列号 1)、且 N 末端缬氨酸未被修饰的肽或蛋白质反应,与该肽或蛋白质的 N 末端缬氨酸被修饰的肽或蛋白质不反应的抗体。

[0024] 作为 N 末端具有氨基酸序列 VHLTPE (序列号 1)、且 N 末端缬氨酸未被修饰的肽,可以举出由氨基酸序列 VHLTPE (序列号 1) 构成的寡肽、以及含有氨基酸序列 VHLTPE (序列号 1) 的多肽。作为 N 末端具有氨基酸序列 VHLTPE (序列号 1)、且 N 末端缬氨酸未被修饰的蛋白,可以举出作为健康成人的主要的 Hb 的、具有 Hb β 链的血红蛋白 A0 和具有 Hb δ 链的血红蛋白 A2 (以下称为“HbA2”) 中 δ 链 N 末端未被修饰的蛋白, HbA2 是非常微量的成分。因此,作为与本发明抗体反应的主要 Hb,可以举出 HbA0。

[0025] 另一方面,作为上述 N 末端缬氨酸被修饰的肽或蛋白质,可以举出 N 末端具有氨基酸序列 VHLTPE (序列号 1)、且该 N 末端缬氨酸被糖修饰的肽或 Hb。作为该蛋白质,可以举出 HbA1c。

[0026] 因此,作为本发明的抗体的优选方式,可以举出与 N 末端具有氨基酸序列 VHLTPE (序列号 1)、且 N 末端缬氨酸未被修饰的肽或 Hb 反应,与该肽或 Hb 的 N 末端缬氨酸被修饰的肽或 Hb 不反应的抗体。作为进一步优选的方式,是与 HbA0 反应,与 HbA1c 不反应

的抗体。

[0027] 进而,本发明的抗体优选与 Hb 以外的蛋白质不反应,进一步与不具有氨基酸序列 VHLTPE(序列号 1) 的 Hb、例如 HbF 不反应的抗体。

[0028] 本发明的抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,但特别优选为单克隆抗体。

[0029] 本发明的抗体由于 HbA0 在 β 链 N 末端具有 VHL(序列号 2),因此可以将具有氨基酸序列 VHL(序列号 2) 的肽或蛋白质作为免疫原来使用,通过常规方法制作。作为免疫原的例子,可以举出 VHLC(序列号 3)、VHLTC(序列号 4)、VHLTPC(序列号 5)、VHLTPEC(序列号 6)、VHL(序列号 2)、VHLT(序列号 7)、VHLTP(序列号 8)、VHLTPE(序列号 1)、以及这些肽与载体蛋白结合的抗原。作为载体蛋白,可以举出卵清蛋白(以下称为“OVA”)、牛血清白蛋白(以下称为“BSA”)、阳离子化 BSA(以下称为“cBSA”)、钥孔戚血蓝蛋白(以下称为“KLH”)等。肽与载体蛋白的结合方法可以举出 MBS 法(使用 m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester 的方法)以及 EDC 法(使用 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride 的方法)等。

[0030] 本发明的单克隆抗体例如可以以 Antibodies, A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988) 记载的方法为基准来制作。

[0031] 用于免疫的动物没有特别的限定,例如可以举出小鼠、大鼠等。免疫方法可以根据一般方法来进行。例如,将免疫原悬于通常的缓冲液、生理盐水的溶液,或者免疫原与完全弗氏佐剂等补液的混合物给药到动物皮下、皮内、腹腔等刺激一段时间后,根据需要重复进行同样的操作。抗原的给药量根据给药途径、动物种类来适当决定,通常的给药量优选每次 $10 \mu\text{g} \sim 1\text{mg}$ 左右。

[0032] 用于细胞融合的免疫细胞优选最终免疫的 3~4 日后取出的脾细胞。另外,作为与上述免疫细胞融合的骨髓瘤细胞(以下称为“骨髓瘤细胞”),优选已经确立的公知的各种细胞株,例如可以举出小鼠中的 NS1(P3/NSI/I-Ag4-1) [Eur. J. Immunol. 6 : 511-519(1976)]、SP2/0-Ag14[Nature 276 :269(1978)]、P3-X63-Ag8. 653[J. Immunol. 123 : 1548(1979)]、P3-X63-Ag8U. 1[Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81 :1(1978)] 等,大鼠中的 Y3-Ag1. 2. 3. [Nature 277 :131-133(1979)]、YB2/0(YB2/3HL/P2. G11. 16Ag. 20) [Methods Enzymol. 73B :1(1981)] 等。

[0033] 细胞融合可以使用通常使用的聚乙二醇(以下称为“PEG”)、仙台病毒(HVJ)等。细胞融合的方法与通常的方法相同,例如在骨髓瘤细胞与相对于骨髓瘤细胞为约 1~10 倍的免疫细胞的混合颗粒中,以 30~60% 的浓度滴入平均分子量为 1000~6000 的 PEG,并混合。杂交瘤细胞的选择使用通常的选择性培养基、例如含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷(以下称为“HAT”)的培养基。可使用以 HAT 培养基培养而得到的杂交瘤细胞,利用通常的极限稀释法,进行目标抗体产生株的检索以及单克隆化。

[0034] 目标抗体产生株可以通过以下方法得到,即,利用例如 ELISA 法、RIA 法等,选择产生抗体的杂交瘤细胞,所述抗体与具有 VHLTPE(序列号 1) 的肽或蛋白质反应,与该肽或蛋白质的 N 末端缬氨酸被修饰的肽或蛋白质不反应。

[0035] 具体来说,首先使培养上清中的单克隆抗体与固相化的纯化 HbA0 抗原反应,接着使标记抗 IgG 抗体反应。利用抗原固相化 ELISA 法,筛选产生对 HbA0 具有高反应性的单克

隆抗体的杂交瘤细胞。对得到的杂交瘤细胞的培养上清进一步利用将纯化 HbA0 抗原固相化的板,在 VHLTPE(序列号 1)或糖化 VHLTPE(f-VHLTPE)之间进行竞争性 ELISA 法,选择产生与 VHLTPE(序列号 1)反应、与 f-VHLTPE 不反应的单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0036] 该单克隆抗体可以通过以下方法制造,即,根据常规方法培养杂交瘤细胞,从培养上清分离的方法,将上述杂交瘤细胞给药到与其具有适应性的哺乳类动物,回收腹水的方法。

[0037] 这样得到的本发明的单克隆抗体由于与 Hb β 链 N 末端未被修饰的肽或蛋白质反应、且与 Hb β 链的 N 末端被修饰的肽或蛋白质不反应,因此是与 HbA0 反应、与 HbA1c 不反应的抗体。因此,作为用于将 HbA0 与 HbA1c 区别而进行免疫测定的抗体而有用。

[0038] 使用本发明的抗体,可以进行与 IFCC 参照法相同的 HbA1c 测定。即,使用本发明的抗体测定试样中的 HbA0 量,使用抗 HbA1c 抗体测定上述试样中的 HbA1c 量,由下式 (1) 算出试样中的 HbA1c 含有率(%),即可测定试样中的 HbA1c 含有率。

[0039]
$$\text{HbA1c 含有率}(\%) = (\text{HbA1c 量} / (\text{HbA1c 量} + \text{HbA0 量})) \times 100(1)$$

[0040] 另外,考虑到本发明单克隆抗体的识别部位,上述式 (1) 还可以用下式 (2) 表示。

[0041]
$$\text{HbA1c 含有率}(\%) = (\text{f-VHLTPE 量} / (\text{f-VHLTPE 量} + \text{VHLTPE 量})) \times 100(2)$$

[0042] 本发明方法中的 HbA0 的测定方法和 HbA1c 的测定方法只要是通常的免疫学测定方法就可以采用任意一种。在这里作为免疫学测定方法,可以举出夹心 ELISA 法、竞争性 ELISA 法、免疫层析法、乳胶凝集法、竞争性乳胶凝集法等。

[0043] 通过在以往的任意的免疫学测定方法中适用本发明的单克隆抗体,可以分别测定 HbA0 与 HbA1c。

[0044] 例如,以夹心 ELISA 法测定时,可以将纯化的 HbA0、或 HbA1c 作为标准品以如下的方法定量 HbA0 或 HbA1c。即,将本发明的单克隆抗体或抗 HbA1c 抗体固定化的 ELISA 板上添加稀释的检测体试样并进行反应后,使标记有酶的抗血红蛋白抗体(以下称为“抗 Hb 抗体”)反应,从显色后的吸光度的变化可以对试样中存在的 HbA0 或 HbA1c 进行特异性地定量。

[0045] 以乳胶凝集法测定时,可以将纯化的 HbA0 或 HbA1c 作为标准品以如下的方法进行定量。即,将本发明的单克隆抗体或抗 HbA1c 抗体的至少一种在不溶性载体乳胶粒子上敏化,通过与检测体试样和抗 Hb 单克隆抗体接触,介由试样中的 HbA0 或 HbA1c,抗体敏化乳胶粒子彼此交联而发生凝集,因此,可以由该凝集度的变化对该 HbA0 或 HbA1c 进行特异性地定量。

[0046] 或者以竞争性乳胶凝集法测定时,可以将纯化的 HbA0 或 HbA1c 作为标准品以如下方法进行定量。即,将 VHLTPE(序列号 1)或 f-VHLTPE 中的至少一种在不溶性载体乳胶粒子上敏化,通过与检测体试样、以及本发明的单克隆抗体或抗 HbA1c 抗体中的至少一种接触,对根据肽敏化乳胶粒子与抗体的凝集反应,检测体试样中的 HbA0 或 HbA1c 显示竞争性抑制,因此,可以由该竞争性抑制的变化对该 HbA0 或 HbA1c 进行特异性地定量。

[0047] 作为检测体试样,只要是含有 HbA0 或 HbA1c 的人体液就没有特别的限制,例如可以举出血液、红血球组分等。

[0048] 作为乳胶凝集法等中的乳胶粒子,只要是在利用了乳胶凝集反应的免疫学凝集反应以及凝集抑制反应中一般使用的微粒的载体就没有特别的限制,但是优选能够在工业上

大量生产的有机系微粒。作为这样的有机系微粒,例如可以举出苯乙烯、氯乙烯、丙烯腈、醋酸乙烯酯、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯等乙烯系单体的均聚物或共聚物;苯乙烯-丁二烯共聚物、甲基丙烯酸甲酯-丁二烯共聚物等丁二烯系共聚物等。另外,还可以优选使用在这样的有机系微粒上结合有羧基、伯氨基、氨基甲酰基、羟基、醛基等官能团的反应性有机系微粒。从抗原或抗体的吸附性优异、可长期稳定地保存生物学活性的角度考虑,在上述乳胶粒子中优选聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物等聚苯乙烯系乳胶粒子。

[0049] 乳胶粒子的形状没有特别的限定,其平均粒径优选乳胶粒子表面的蛋白质与测定对象物质的凝集反应的结果所产生的凝集体能够用肉眼或光学上检测的足够的大小。优选的平均粒径是 $0.02 \sim 1.6 \mu\text{m}$,特别优选 $0.03 \sim 0.5 \mu\text{m}$ 。

[0050] 在乳胶粒子上将本发明的单克隆抗体或抗 HbA1c 抗体进行敏化的方法没有特别的限制,可以使用公知的方法。例如可以举出在乳胶粒子表面物理性吸附的方法、在具有官能团的乳胶粒子表面进行共价键合的方法、以及利用免疫学性的结合进行敏化的方法等。

[0051] 用免疫层析法测定时,可以同时测定 HbA0 和 HbA1c,所以特别适合。例如,如图 1 所示,使用将本发明单克隆抗体和抗 HbA1c 抗体分别在不同部位(A 线和 B 线)固定化的免疫层析支持体。图 1 中的露出化处理可以使用胍或其盐与非离子型表面活性剂、胍或其盐与亚硝酸盐、胍或其盐与非离子型表面活性剂与亚硝酸盐、或者以往公知的胍、硫氰酸、硫氰酸锂、铁氰化物、离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂等。将含有表位被露出化的 HbA0 和 HbA1c 的试样滴落到样品垫。滴落的试样通过毛细管现象而展开,到达 A 线则只有试样中的 HbA0 反应,到达 B 线则只有试样中的 HbA1c 反应。其他的血红蛋白不反应而移动到末端垫。用免疫层析检测仪测定 A 线和 B 线的颜色的浓度、反射强度、或吸光度等,则可以分别定量试样中的 HbA0 和 HbA1c。在这里,将 HbA0 的定量值设为 A、HbA1c 的定量值设为 B,则可以由 $\text{HbA1c}(\%) = (B/(A+B)) \times 100$ 求出 HbA1c(%)。

[0052] 另外,在上述免疫层析支持体中,预先在样品垫上含浸结合有彩色乳胶的抗 Hb 抗体(图 2)。图 2 中的露出化处理可以使用与上述相同的物质。将含有经露出化处理的 HbA1c 的试样滴落到样品垫。滴落的试样中的 Hb(图 2 中以椭圆表示)与抗 Hb 抗体反应,并在支持体上移动。A 线中,形成抗 Hb 抗体-HbA0-本发明抗体的夹心复合体。另一方面,B 线中,形成抗 Hb 抗体-HbA1c-抗 HbA1c 抗体的夹心复合体。其他的 Hb 与抗 Hb 抗体的结合物移动至末端垫。对于形成的上述夹心复合体量,用免疫层析检测仪测定 A 线和 B 线的颜色的浓度、反射强度、或吸光度等,则可以分别定量试样中的 HbA0 和 HbA1c。在这里,将 HbA0 的定量值设为 A、HbA1c 的定量值设为 B,则也可以由 $\text{HbA1c}(\%) = (B/(A+B)) \times 100$ 求出 HbA1c(%)。

[0053] 应予说明,还可以代替彩色乳胶使用金胶体粒子等。

[0054] 在这里,作为抗 HbA1c 抗体,可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体,例如可以使用专利文献(日本特开昭 61-172064 号公报、日本特开平 6-66796 号公报)记载的抗体等。

[0055] 应予说明,实施上述免疫学测定方法时,可以利用使用本发明的抗体而制造的含有该抗体的免疫学测定用试剂盒。该试剂盒可以包括在免疫学测定方法的一般性的构成要素,例如,标记物、载体、支持体、缓冲液、稳定剂、反应器等。

[0056] 实施例

[0057] 接下来,举出实施例具体说明本发明,但这些并不限定本发明的范围。

[0058] 实施例 1(杂交瘤细胞的制作与抗体的获得)

[0059] (I) 材料与方法

[0060] (1) 纯化 HbA0 和纯化 HbA1c 的调制

[0061] 利用使用了非专利文献 (Melisenda J. McDonald et al, JBC, 253(7), 2327-2332, 1978) 所述的 Bio-Rex70 (Bio-Rad 公司) 的离子交换色谱法,由人红血球溶血液纯化 HbA0 和 HbA1c,用于以后的实验。

[0062] (2) 各种肽和糖化肽的调制

[0063] 各序列的肽是利用肽自动合成装置通过 Fmoc 法来合成以及纯化。各肽的纯度用 HPLC 确认在 95% 以上。另外,用质量分析装置 (MALDI-TOF) 确认了各肽的分子量与理论值相同。糖化肽是用专利文献 (日本特开昭 61-172064 号公报) 所述的方法合成并纯化。即,使各序列的肽与葡萄糖在无水吡啶中反应并用 HPLC 进行纯化。用质量分析装置 (MALDI-TOF) 确认了各糖化肽的分子量与理论值、即在各肽的分子量上加 162 而得的分子量相同。

[0064] (3) 抗 Hb 抗体和抗 HbA1c 抗体的调制

[0065] 抗 Hb 抗体使用将上述 (1) 的纯化 HbA0 作为免疫原以规定方法制作的小鼠单克隆抗体。抗 HbA1c 抗体使用以专利文献 (日本特开昭 61-172064 号公报) 所述的方法制作的小鼠单克隆抗体。即,将上述 (2) 合成的糖化肽 (f-VHLTPEEKYYC) (序列号 9) 与 KLH 结合,将此作为免疫原。在杂交瘤细胞的筛选中,选择在抗原固相化 ELISA 中与纯化 HbA1c 反应、且与纯化 HbA0 不反应的株。

[0066] (4) 免疫用抗原的调制

[0067] a. 将人血红蛋白 β 链 N 末端肽的 C 末端侧结合有半胱氨酸的各序列的肽 (VHLC (序列号 3)、VHLTC (序列号 4)、VHLTPC (序列号 5)、VHLTPEC (序列号 6)) 按照上述 (2) 所示进行调制。将它们以 5mg/mL 的浓度溶解到含有 0.15mol/L NaCl 的 20mmol/L 磷酸缓冲液 pH7.2 (以下称为“PBS”) 中。

[0068] b. 以 5mg/mL 的浓度将市售 (PIERCE 公司制) 的马来酰亚胺活性型的各载体蛋白 (OVA、BSA、cBSA、KLH) 溶解于纯净水。

[0069] c. 将上述肽溶液与载体蛋白溶液以 1 比 1 混合后,边在室温下缓慢旋转边温育 2 小时。

[0070] d. 然后,在 4°C 下,在 PBS 中进行 2 天的透析。

[0071] e. 回收透析后的液体,并作为各免疫用抗原来使用。

[0072] (5) 免疫与试验采血

[0073] 将上述免疫用抗原与佐剂以 1 : 1 混合后,使用连结注射器制作乳液。将其注入雌的 BALB/c 小鼠的背部皮下 (每只 20 ~ 50 μ g)。将该操作 (免疫) 每 2 周重复 5 次。免疫开始 6 周后,从各小鼠的眼底采取小鼠抗血清,用后述的抗原固相化 ELISA 法确认该抗血清中的抗体效价。应予说明,在任意的 ELISA 法中,将从没有进行免疫的小鼠的眼底采取的血清作为对照使用。

[0074] (6) 细胞融合

[0075] 从由上述试验采血确认了高抗体效价的小鼠中摘出脾脏,通过使用了

50% -PEG1450 (西格玛公司制) 的常规方法进行细胞融合。骨髓瘤细胞使用 SP2/0。得到的融合细胞悬于含有 HAT 和 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 使得脾细胞达到 2.5×10^6 / mL, 并以 0.2 mL 分别注入 96 孔培养板。将其在 5% CO₂ 培养箱中以 37°C 进行培养。

[0076] (7) 筛选

[0077] 细胞融合 10 日后, 作为 1 次筛选, 使用培养上清进行后述的抗原固相化 ELISA 法, 将对于纯化 HbA0 显示高反应性的孔作为 1 次阳性孔进行挑选。该 1 次阳性孔中的细胞在 24 孔板中进行传代。

[0078] 传代 2 天后, 作为 2 次筛选, 使用培养上清进行后述的竞争性 ELISA 法, 将对于人血红蛋白 β 链 N 末端肽 (VHLTPE) (序列号 1) 显示高反应性、且对于相同氨基酸序列的糖化肽 (f-VHLTPE) 不显示反应的孔作为 2 次阳性孔来选择。

[0079] (8) 克隆和免疫球蛋白 (抗体) 采取

[0080] 将 2 次筛选中挑选的 5 株杂交瘤细胞用极限稀释法进行克隆。接着, 为了采取各杂交瘤细胞所产生的免疫球蛋白 (抗体), 对 2 周前将姥鲛烷 0.5 mL 注射到腹腔内的 12 周龄的雌 BALB/c 小鼠, 将杂交瘤细胞以细胞数 0.5×10^6 个的量给药到腹腔内。14 天后采取腹水, 离心处理得到上清。将上清与等量的吸附用缓冲液 (3 mol/L NaCl、1.5 mol/L Glycine-NaOH 缓冲液、pH8.5) 混合后, 进行过滤。使该滤液通过以吸附用缓冲液进行了平衡化的蛋白 A 琼脂糖凝胶柱, 从而将滤液中的抗体吸附于柱后, 用 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液 (pH3.0) 洗脱。将该洗脱液以 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 中和后, 用 PBS 进行透析, 采取抗体。

[0081] (9) ELISA 用板的制作

[0082] 将溶解于 PBS 而调制成 1 μ g/mL 的浓度的纯化 HbA0 作为筛选用抗原, 并以 50 μ L/孔在 96 孔板上进行固相化, 在 4°C 静置一晚。用含有 0.05% Tween20 的 PBS (以下称为 "PBST") 以 400 μ L/孔洗净 3 次后, 以 100 μ L/孔分别注入含有 1% BSA 的 PBST (以下称为 "1% BSA-PBST"), 在室温下静置 1 小时以进行封闭, 从而制作 ELISA 用板。用 PBST 洗净 3 次该 ELISA 用板后, 添加各试剂, 用于实施例记载的各 ELISA 法试验。

[0083] (10) 抗原固相化 ELISA 法

[0084] a. 在 ELISA 用板上以 50 μ L/孔分别注入利用 1% BSA-PBST 逐级稀释的各小鼠抗血清、或者融合细胞的培养上清, 在室温下静置 1 小时。

[0085] b. 用 PBST 洗净 3 次后, 以 50 μ L/孔分别注入用 1% BSA-PBST 稀释 5000 倍的 HRP-GtF(ab')₂-Anti-Mouse Ig' s (Biosource 公司制) 的溶液, 在室温下静置 1 小时。

[0086] c. 用 PBST 洗净 3 次后, 分别注入含有邻苯二胺盐酸盐的显色液 (将邻苯二胺盐酸盐 (东京化成公司制)、过氧化氢溶解于 pH5.0 的枸橼酸缓冲液中, 使得邻苯二胺盐酸盐的浓度为 2mg/mL、过氧化氢的浓度为 0.02%) (以下称为 "OPD 显色液") (50 μ L/孔), 在室温下静置 10 分钟。

[0087] d. 以 50 μ L/孔分别注入 0.75 mol/L 硫酸使反应停止后, 用板检测仪测定 492nm 的吸光度。

[0088] (11) 竞争性 ELISA 法

[0089] a. 在 ELISA 用板上以 25 μ L/孔分别注入将人血红蛋白 β 链 N 末端肽 (VHLTPE) (序列号 1)、或相同氨基酸序列的糖化肽 (f-VHLTPE) 用 1% BSA-PBST 稀释到适当浓度的溶液。

[0090] b. 接着,以 25 μ L/孔分别注入用 1% BSA-PBST 稀释到适当浓度的融合细胞的培养上清,在室温下静置 1 小时。

[0091] 以后的操作按照与上述 (10) 抗原固相化 ELISA 法的工序 b ~ d 相同的方法进行。

[0092] (II) 结果

[0093] (1) 试验采血中的抗原固相化 ELISA 法试验的结果

[0094] 进行试验采血,利用抗原固相化 ELISA 法检查各小鼠抗血清中抗体对纯化 HbA0 的反应性,结果 6 种小鼠抗血清全都确认了对 HbA0 的反应性(图 3)。认为在本实施例中得到的各小鼠抗血清含有特异性识别作为免疫用抗原的人血红蛋白 β 链 N 末端肽与载体蛋白的复合体、以及作为筛选用抗原的 HbA0 中的共通部分的 Hb β 链的 N 末端序列的抗体。

[0095] (2) 筛选

[0096] 在 1 次筛选中选择对经固相化的纯化 HbA0 显示高反应性的株,进一步对该选择株实施 2 次筛选,结果明确了 5 种抗体(85201、85202、85203、85204、和 85206)对人血红蛋白 β 链 N 末端肽(VHLTPE)(序列号 1)显示高反应性,且对相同氨基酸序列的糖化肽(f-VHLTPE)不显示反应性。

[0097] (3) 克隆和免疫球蛋白(抗体)采取

[0098] 对 2 次筛选中选择的 5 种抗体实施克隆,将产生该单克隆抗体的杂交瘤细胞保藏于独立行政法人产业技术综合研究所(2008 年 11 月 28 日保藏,日本茨城县筑波市东一丁目 1 番地 1 中央第 6)。保藏编号如下。

[0099] 抗体编号:保藏编号

[0100] 85201:FERM BP-11187

[0101] 85202:FERM BP-11188

[0102] 85203:FERM BP-11189

[0103] 85204:FERM BP-11190

[0104] 85206:FERM BP-11191

[0105] 实施例 2(各杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的特异性评价)

[0106] (I) 材料与方法

[0107] (1) 试剂的调制

[0108] 用于评价的各抗原和各抗体按照与实施例 1 的(1)~(4)相同的操作进行调制。另外,HPLC 馏分(fraction)是使用将人红血球溶血液通过利用了东曹公司制的 TSK-gel GlycoHSi 柱的 K0500 法进行分离、并利用馏分收集器回收的各馏分。添加到抗原固相化 ELISA 时,将各馏分用 PBS 稀释 6 倍而使用。

[0109] (2) 特异性的评价

[0110] 按照与实施例 1 的抗原固相化 ELISA 和竞争性 ELISA 法相同的方法进行操作。但是,使用的抗体是纯化 IgG(单克隆抗体:0.2 μ g/mL)。

[0111] (II) 结果

[0112] (1) 对肽和糖化肽的反应性

[0113] 首先,如图 4 所示,确认了在竞争性 ELISA 中用于试验的特异抗体(85201、85202)均只对人血红蛋白 β 链 N 末端肽(VHLTPE)(序列号 1)进行反应,与相同氨基酸序列的糖化肽(f-VHLTPE)不反应。另外,如图 5 所示,确认了与人血红蛋白 α 链 N 末端肽(VLSPAD)

不反应。对其他 3 种特异抗体 (85203、85204、85206) 也进行相同实验,结果确认了只对 VHLTPE(序列号 1) 进行反应、且与 f-VHLTPE 和 VLSPAD(序列号 10) 不反应。

[0114] (2) 对纯化 HbA0 和纯化 HbA1c 的反应性

[0115] 如图 6 所示,在抗原固相化 ELISA 中,首先,作为对照使用的抗 Hb 抗体对于纯化 HbA0 和纯化 HbA1c 同样进行反应。与此相对,用于试验的特异抗体 (85201) 与 HbA1c 不反应,只对 HbA0 进行反应。对其他 4 种特异抗体 (85202、85203、85204、以及 85206) 也进行相同试验,结果确认了只对纯化 HbA0 进行反应,与纯化 HbA1c 不反应。

[0116] (3) 对 HPLC 馏分的反应性

[0117] 如图 7 所示,在抗原固相化 ELISA 中,首先,作为对照使用的抗 Hb 抗体与 HbA1c 和 HbA0 双方反应,另外,同样作为对照使用的抗 HbA1c 抗体只对 HbA1c 的峰有反应而对 HbA0 的峰没有反应。与此相对,用于试验的 3 种特异抗体 (85201、85202、85206) 与 HbA1c 不反应,只对 HbA0 进行反应。对其他 2 种特异抗体 (85203、85204) 也进行相同试验,结果确认了对 HbA0 进行反应,与 HbA1c 不反应。

[0118] 从以上的结果可以确认用于试验的 5 种特异抗体与 HbA1c 不反应,只对 HbA0 进行反应,另外,这些抗体可以检测出血红蛋白 β 链 N 末端六肽序列 (VHLTPE)(序列号 1)。

[0119] 实施例 3(根据 ELISA 的 HbA1c 值的测定)

[0120] (I) 材料与方法

[0121] (1) 抗 HbA1c 抗体、以及抗 Hb 抗体的调制

[0122] 用于测定的抗 HbA1c 抗体和抗 Hb 抗体按照与实施例 1 的 (I)(3) 同样地进行调制。

[0123] (2) 生物素标记抗 Hb 抗体的调制

[0124] 利用市售的生物素标记试剂 (PIERCE 公司,EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin) 对上述 (1) 的抗 Hb 抗体以如下方式进行标记。将以 10mg/mL 的浓度溶解于 PBS 的生物素标记试剂 0.05mL 添加到浓度为 1mg/mL 的抗 Hb 抗体液 1mL 中,在室温下反应 2 小时。反应后,用 PBS 透析,用于测定。

[0125] (3) 检测体和标准试样的调制

[0126] 用装有 EDTA-2Na 的真空采血管 (积水医疗公司制) 对公司内部的志愿者进行采血,通过离心分离来分离红血球。混合该红血球 4 μ L 与抗原处理液 (1% Tween20-10mmol/L NaNO₂-3mol/L 胍盐酸盐 -5mmol/LMES, pH6.0) 0.2mL。在 25°C 下放置 10 分钟后,将该混合液用 3% 脱脂牛奶 -PBST 逐级稀释,从而作为下述夹心 ELISA 的检测体来使用。另外,标准试样使用了通过下述 HPLC 法预先求出了 HbA1c 浓度和 HbA0 浓度的他人的检测体。

[0127] (4) 利用夹心 ELISA 进行的 HbA0 量 (浓度) 的测定

[0128] a. 将实施例 1 中获得的特异抗体 (85201) 用 PBS 稀释到 5 μ g/mL 的浓度。将其以 50 μ L/孔分别注入到 ELISA 板,在 4°C 静置 1 夜。

[0129] b. 用 PBST (350 μ L/孔) 洗净 3 次后,以 100 μ L/孔分别注入 1% BSA-PBST,在室温下静置 1 小时。

[0130] c. 用 PBST 洗净 3 次后,以 50 μ L/孔分别注入上述 (3) 中处理的标准试样或检测体,在室温下静置 1 小时。

[0131] d. 用 PBST 洗净 3 次后,以 50 μ L/孔分别注入用 1% BSA-PBST 稀释到 1 μ g/mL 的

浓度的生物素标记抗 Hb 抗体,在室温下静置 1 小时。

[0132] e. 用 PBST 洗净 3 次后,以 50 μ L/ 孔分别注入用 1% BSA-PBST 稀释到 1 μ g/mL 的浓度的 HRP-Streptavidin (PIERCE 公司制),在室温下静置 30 分钟。

[0133] f. 用 PBST 洗净 3 次后,分别注入 OPD 显色液 (50 μ L/ 孔),在室温下静置 10 分钟。

[0134] g. 以 50 μ L/ 孔分别注入 0.75mol/L 硫酸来停止反应后,用板检测仪测定 492nm 的吸光度。

[0135] h. 以各浓度的标准试样的吸光度为基础制成校正曲线,利用它来求出检测体的浓度。

[0136] (5) 利用夹心 ELISA 进行的 HbA1c 量 (浓度) 的测定

[0137] 按照与上述 (4) 相同的方法,代替特异抗体 (85201) 使用抗 HbA1c 抗体来测定 HbA1c 浓度。

[0138] (6) HbA1c 值的计算

[0139] 以上述 (4) 和 (5) 求出的 HbA0 浓度和 HbA1c 浓度为基础,通过下述式求出 HbA1c 值 (HbA1c 的含有率),

[0140] $\text{HbA1c 含有率}(\%) = (\text{HbA1c 量}(\text{浓度}) / (\text{HbA1c 量}(\text{浓度}) + \text{HbA0 量}(\text{浓度}))) \times 100。$

[0141] (7) 利用 HPLC 法进行的 HbA1c 值的测定

[0142] 利用东曹自动糖化血红蛋白分析仪 HLC-723G8 测定全血红蛋白中的 HbA1c 的含有率。

[0143] (II) 结果

[0144] (1) 校正曲线

[0145] 使用标准试样制作 HbA0 浓度测定系、以及 HbA1c 浓度测定系的校正曲线。如图 8 所示,两测定系均确认了有各抗原浓度依赖性的吸光度的上升。

[0146] (2) 与利用 HPLC 法的测定值的比较

[0147] 对利用本发明抗体并以上述夹心 ELISA 求出的 HbA1c 值与以 HPLC 法求出的 HbA1c 值进行比较。利用由 5 名健康人采取的检测体以两种方法分别求出 HbA1c 值。其结果,如表 1 所示,两种方法求出的 HbA1c 值显示出大致相同的值。

[0148] [表 1]

No.	HbA1c (%)	
	东曹 HPLC	夹心 ELISA
1	5.2	5.3
2	5.2	4.5
3	4.8	4.4
4	4.8	5.2
5	5.0	5.5

[0150] 从以上结果可以确认本发明的抗体可以用于 HbA0 量 (浓度)、HbA1c 量 (浓度)、

以及 HbA1c 值 (HbA1c 的含有率) 的定量测定。

[0001]

序列表

<110> 积水医疗株式会社
 <120> 对血红蛋白β链的N末端区域的抗体
 <130> DC0073
 <150> JP2008-316173
 <151> 2008-12-11
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 肽 VHLTPE
 <400> 1
 Val His Leu Thr Pro Glu
 1 5
 <210> 2
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 肽 VHL
 <400> 2
 Val His Leu
 1
 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 肽 VHLC
 <400> 3
 Val His Leu Cys
 1
 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 肽 VHLTC
 <400> 4
 Val His Leu Thr Cys
 1 5
 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 肽 VHLTPC

[0002]

<400> 5

Val His Leu Thr Pro Cys
1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽 VHLTPEC

<400> 6

Val His Leu Thr Pro Glu Cys
1 5

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽 VHLT

<400> 7

Val His Leu Thr
1

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽 VHLTTP

<400> 8

Val His Leu Thr Pro
1 5

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽 VHLTPEEKYYC

<400> 9

Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Tyr Tyr Cys
1 5 10

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽 VLSPAD

<400> 10

Val Leu Ser Pro Ala Asp
1 5

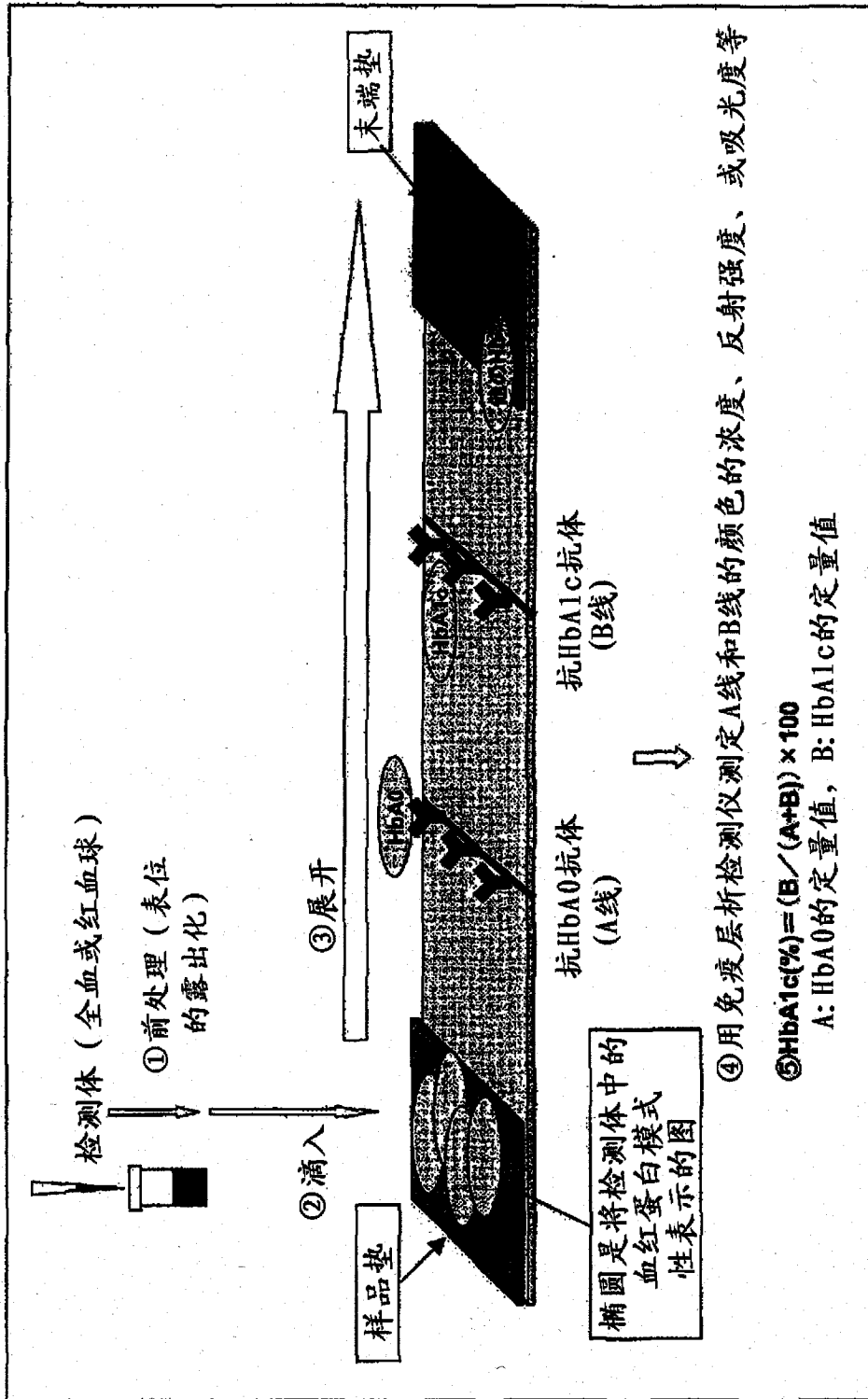


图 1

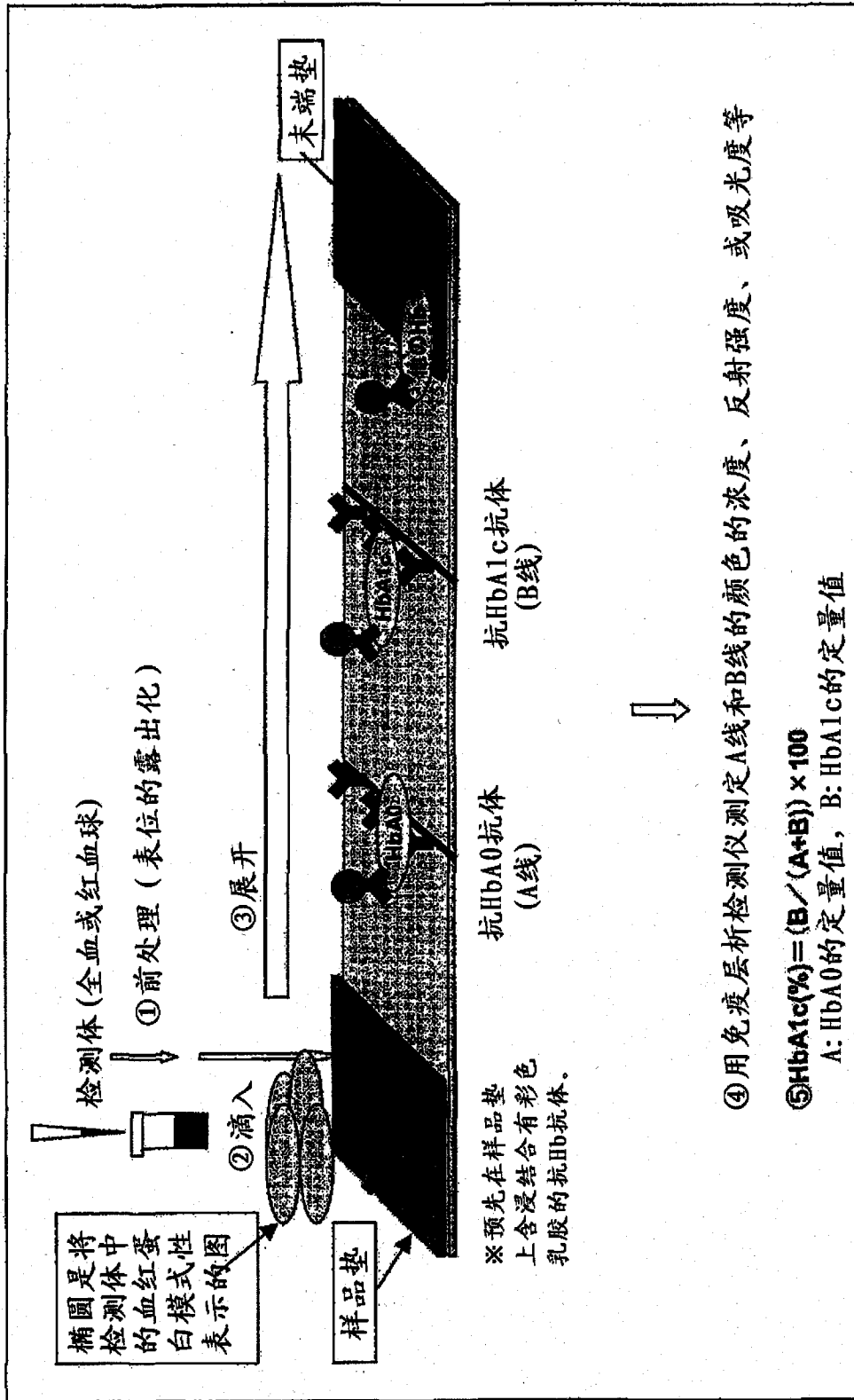


图 2

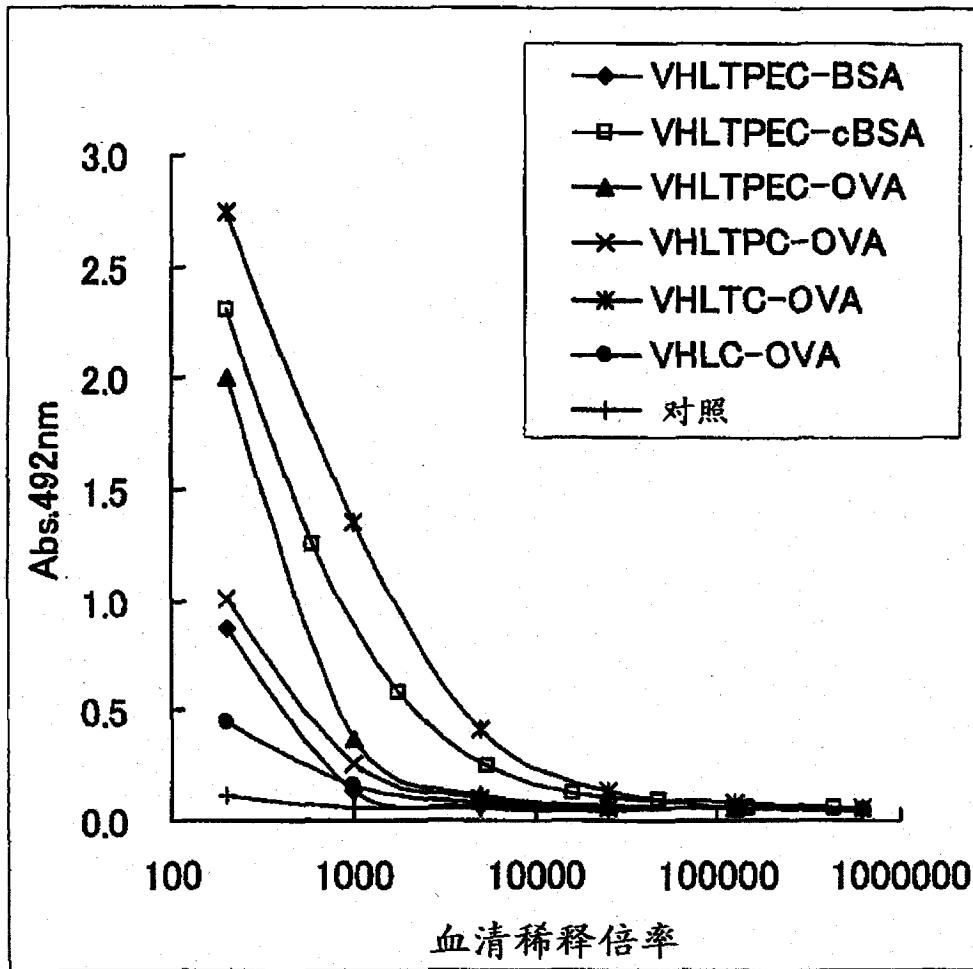


图 3

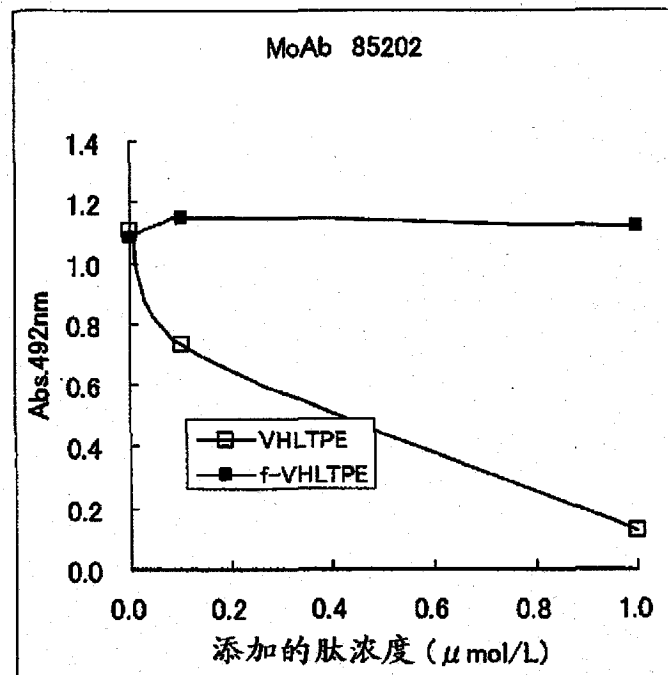
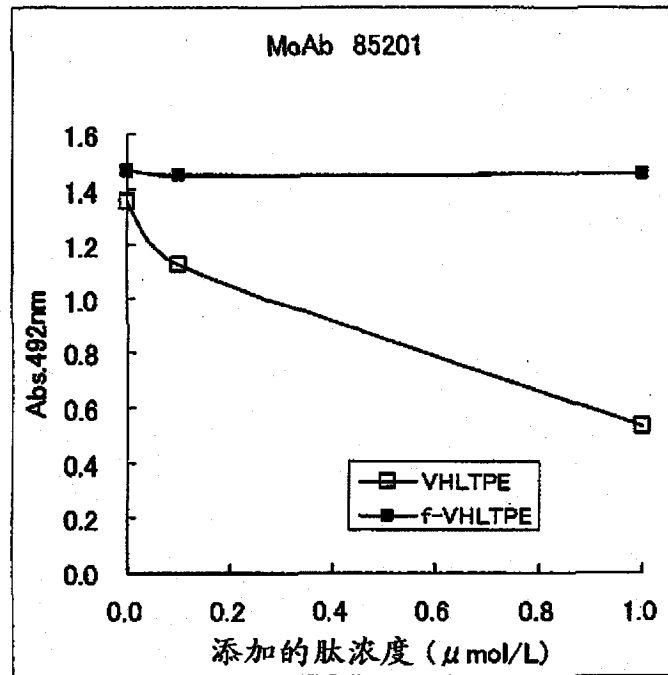


图 4

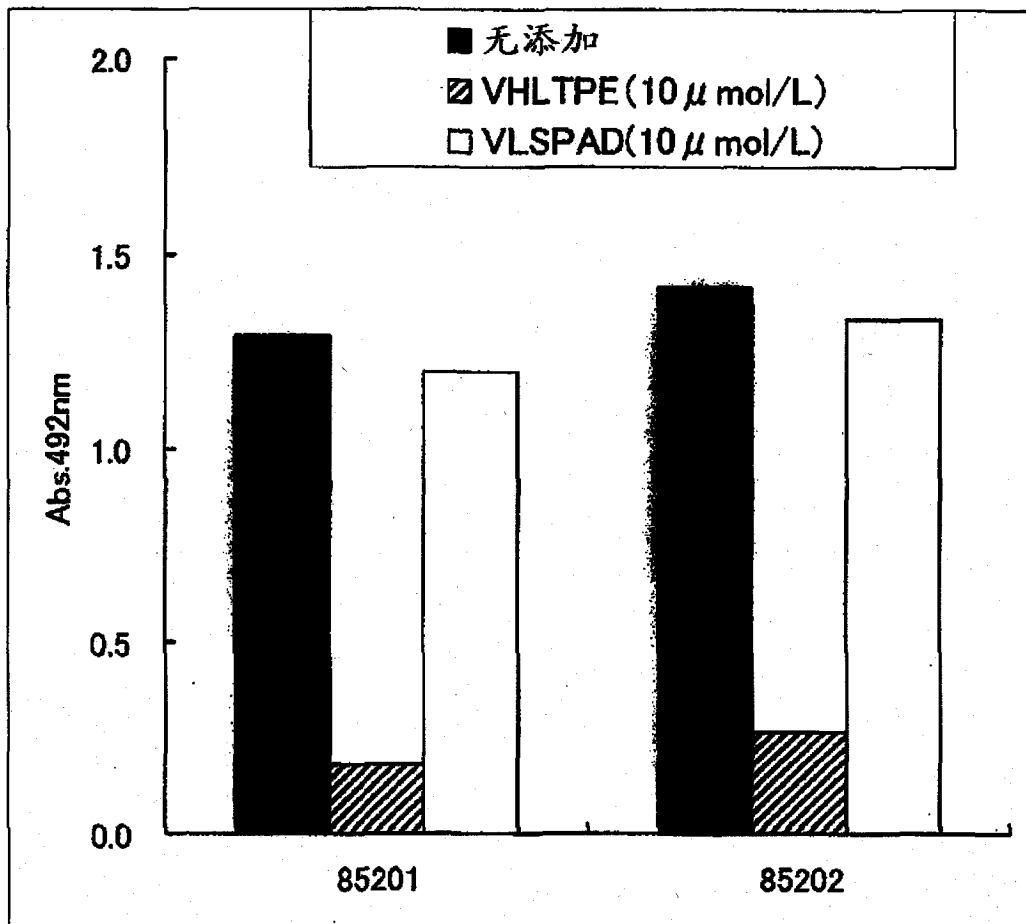


图 5

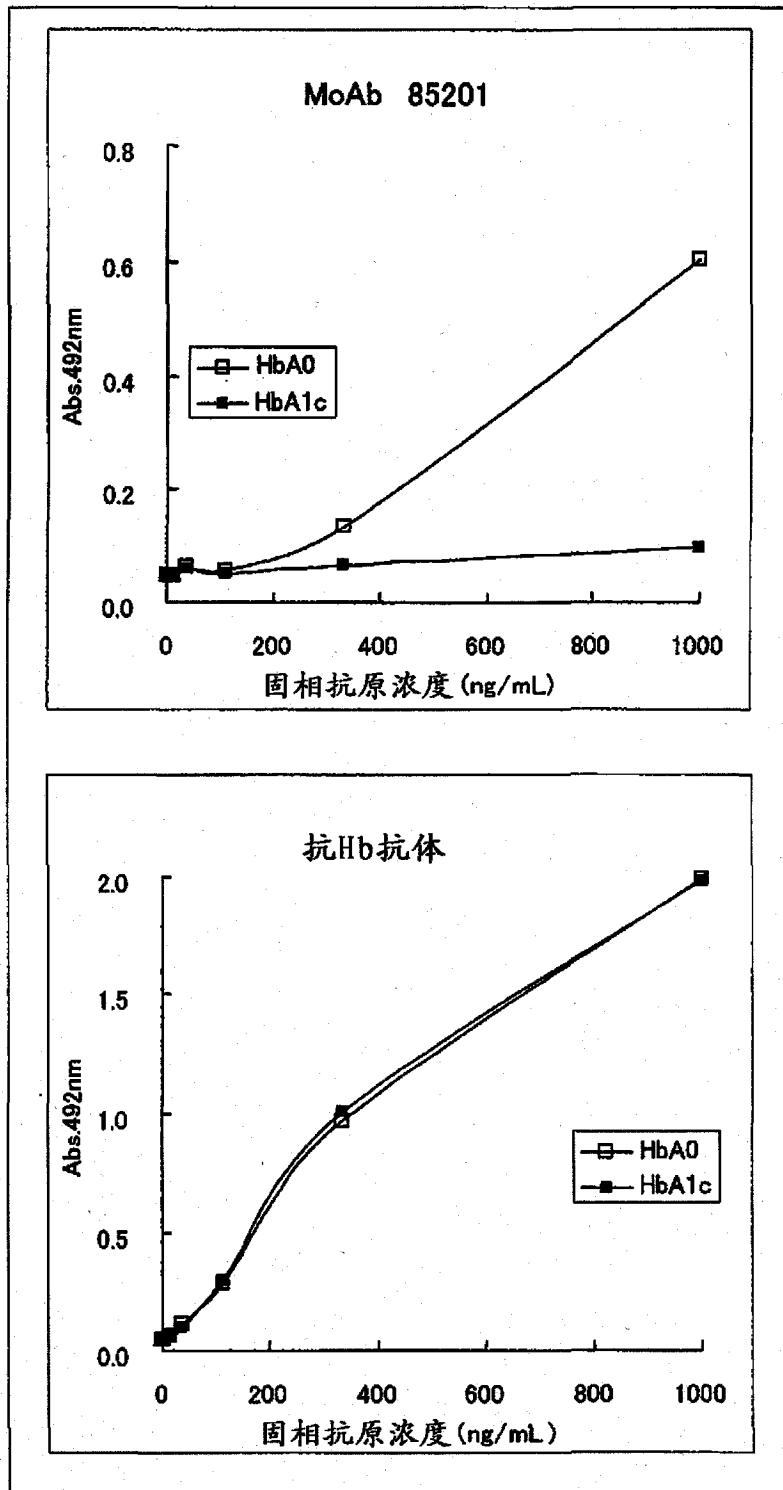


图 6

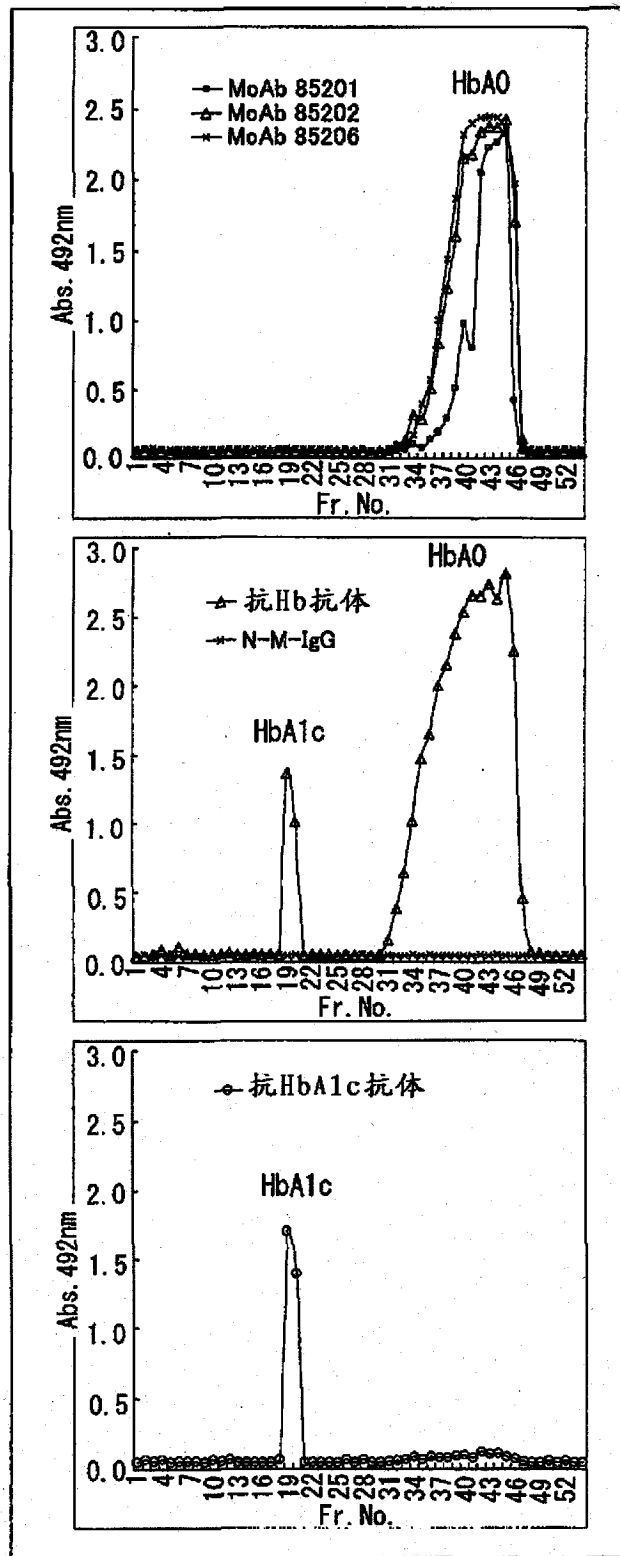


图 7

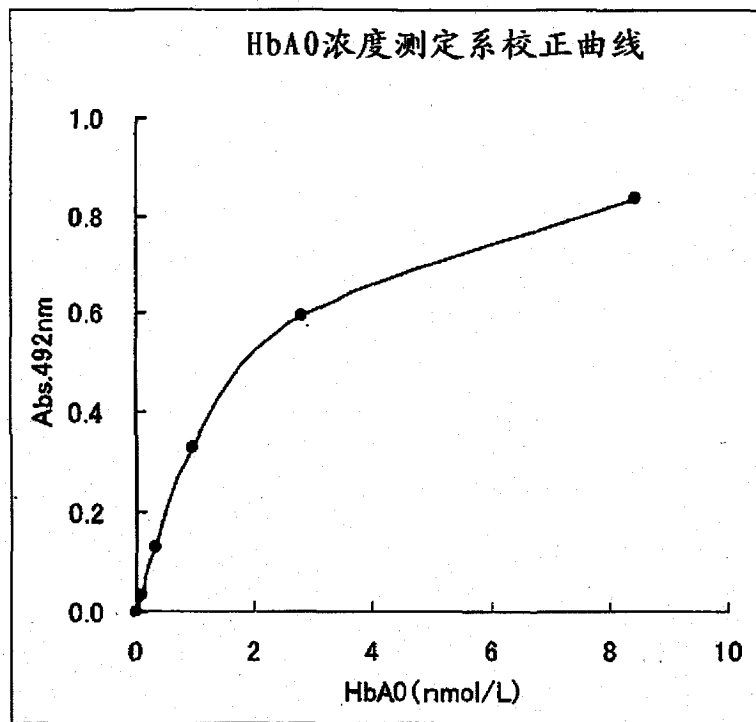
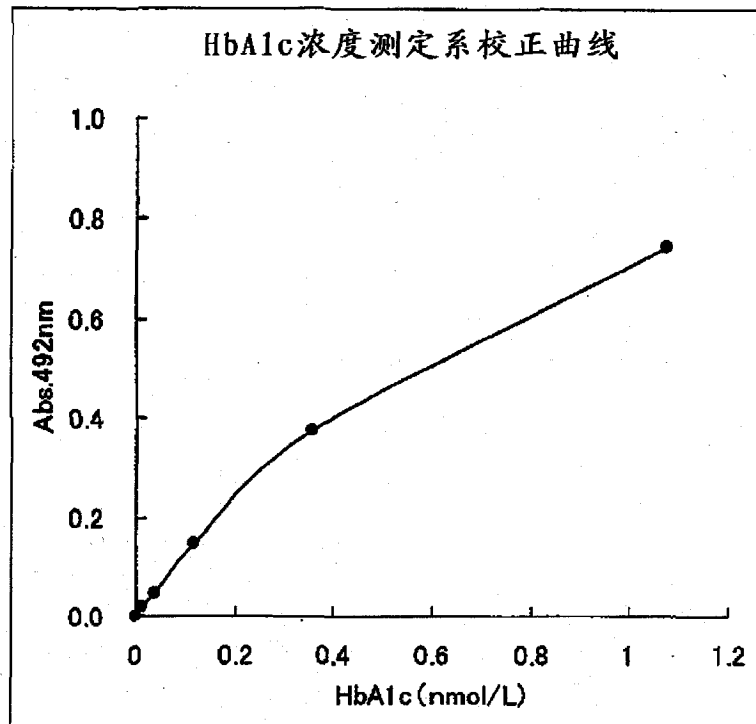


图 8

专利名称(译)	对血红蛋白β链的N末端区域的抗体		
公开(公告)号	CN102245637A	公开(公告)日	2011-11-16
申请号	CN200980149839.9	申请日	2009-12-10
[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	宫崎修 田久保耕平 藏下俊祐		
发明人	宫崎修 田久保耕平 藏下俊祐		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/53 C07K7/06		
CPC分类号	G01N33/723 C07K2317/34 C07K14/805 C07K2317/33 C07K16/18 C07K2317/14 C12N5/163 G01N33/531 G01N33/721		
代理人(译)	苗堃		
优先权	2008316173 2008-12-11 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供能够测定与IFCC参照法相同的HbA1c含有率的通用的方法。本发明提供一种抗体，该抗体与N末端具有氨基酸序列VHLTPE(序列号1)、且N末端缬氨酸未被修饰的肽或蛋白质反应，与该多肽或蛋白质的N末端缬氨酸被修饰的肽或蛋白质不反应。

No.	HbA1c (%)	
	东曹 H PLC	夹心 EL ISA
1	5.2	5.3
2	5.2	4.5
3	4.8	4.4
4	4.8	5.2
5	5.0	5.5