

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-536322

(P2004-536322A)

(43) 公表日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/98	GO 1 N 33/98	2 GO 4 5
CO 7 K 16/18	CO 7 K 16/18	4 BO 6 4
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	4 BO 6 5
C 1 2 P 21/08	GO 1 N 33/53	S 4 HO 4 5
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	W
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-515859 (P2003-515859)	(71) 出願人	504009745
(86) (22) 出願日	平成14年7月10日 (2002.7.10)		サヴォライネン, マルック
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月7日 (2004.1.7)		フィンランド国 エフアイエヌ-9054
(86) 国際出願番号	PCT/FI2002/000626		O オウル, ランタクオヴィンティ- 1
(87) 国際公開番号	W02003/010539	(71) 出願人	504009756
(87) 国際公開日	平成15年2月6日 (2003.2.6)		ハンヌクセラ, ミンナ
(31) 優先権主張番号	20011517		フィンランド国 エフアイエヌ-9056
(32) 優先日	平成13年7月11日 (2001.7.11)		O オウル, サウタヤンティ- 1
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)	(71) 出願人	504009767
			リーサナンティ, マルヤ
			フィンランド国 エフアイエヌ-9080
			O オウル, テールレーリンティ- 11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルコール消費量を検出するための方法および手段

(57) 【要約】

本発明はヒト身体サンプルからアルコール消費量を検出する方法に関する。この方法では、アルコールの存在下で体内に形成されるホスファチジルアルコールを免疫学的に測定することによりアルコール消費量を検出する。さらに、本発明は、該方法に有用かつホスファチジルアルコールを認識する抗体、該抗体を含んでなる検査キット、および該抗体を産生するハイブリドーマに関する。さらに、本発明は、ホスファチジルアルコールを認識する抗体の作製方法、および該方法により産生される抗体に関する。この方法は、リポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルアルコールを用いて免疫応答性の動物を免疫することを含んでなる。さらに、本発明は、様々なイムノアッセイにおけるホスファチジルアルコールを認識する抗体の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ホスファチジルアルコールを認識する抗体によりヒト身体サンプルからホスファチジルアルコールを測定し、サンプル中にホスファチジルアルコールが存在することがヒトのアルコール消費量を示すことを特徴とする、ヒト身体サンプルからのアルコール消費量の検出方法。

【請求項 2】

リポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルアルコールを検出することを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

上記抗体のほかに、上記リポタンパク質のエピトープであって、ホスファチジルアルコール以外のエピトープを認識する 2 次抗体を使用することを特徴とする、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

2 次抗体がリポタンパク質粒子 HDL、LDL または VLDL のエピトープを認識することを特徴とする、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

2 次抗体がリポタンパク質粒子タンパク質 apoA1 または apoB100 を認識することを特徴とする、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

ELISA アッセイ法であることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

モノクローナル抗体を使用することを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

リポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルアルコールを血液、血漿または血清中で測定することを特徴とする、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

ホスファチジルエタノールを測定することを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

ホスファチジルアルコールを認識することを特徴とする抗体。

【請求項 11】

リポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルエタノールを認識することを特徴とする、請求項 10 記載の抗体。

【請求項 12】

モノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 10 または 11 記載の抗体。

【請求項 13】

ホスファチジルアルコールを認識する抗体を含んでなることを特徴とする検査キット。

【請求項 14】

ホスファチジルアルコールを認識する抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマ。

【請求項 15】

リポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルアルコールを用いて動物を免疫し；
a) 該動物により産生されたホスファチジルアルコール認識抗体を回収すること；または
b) 該抗体を産生する免疫動物の細胞と不死化細胞株とをハイブリドーマを産生させるために融合し、所望の抗体を産生するハイブリドーマを選択し、かつ、該ハイブリドーマにより産生される抗体を回収すること；
を特徴とする、ホスファチジルアルコールを認識する抗体の作製方法。

【請求項 16】

リポタンパク質粒子 HDL、LDL または VLDL 中に取り込まれたホスファチジルアルコールを用

10

20

30

40

50

いて免疫することを特徴とする、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

請求項 15 または 16 記載の方法により作製される抗体。

【請求項 18】

イムノアッセイにおける請求項 10 ~ 12 または 17 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サンプルからアルコール消費量（過剰摂取）を検出するための方法に関する。より具体的には、本発明は、ヒト身体サンプルからアルコール消費量を検出するための方法、該方法において使用する抗体、該抗体を含む検査キット、および該抗体を産生するハイブリドーマに関する。さらに、本発明は、該抗体を産生するための方法、該方法により産生された抗体、および該抗体の使用に関する。 10

【背景技術】

【0002】

過度のアルコールの摂取は健康を害するものであり、国民健康上の共通の問題である。医療センターおよび病院にいるかなりの数の患者はアルコールのヘビーユーザーであり、患者の疾患がアルコールにより引き起こされたという場合もある。ところが、患者自身は自己の飲酒問題を公表しない。しかしながら、アルコール関連問題がより深刻になるのを防ぐために、または少なくともその進行を遅らせるために、また必要であれば、より効率的な治療を患者に提供するために、患者の治療計画を立てる際に飲酒問題を明らかにすることは重要である。患者は通常自分がアルコールのヘビーユーザーであることを明らかにしないことから、医師は別の方法（例えば臨床検査）により過度のアルコールの摂取を認識し得なければならない。 20

【0003】

摂取されたアルコール（エタノール）の大半は、体内で酸化されてアセトアルデヒドと酢酸になり、さらにアセチル補酵素A(AcCoA)になる。長期にわたるアルコールの大量摂取は肝障害（脂肪肝、アルコール性肝炎または肝硬変）を引き起こし得る。おそらく、これらは、肝酵素の値の変化として見出され得る。 30

【0004】

しかしながら、過度のアルコール摂取であったとしても、通常の臨床検査（例えば肝酵素の値の測定による）によって常に検出し得るとは限らない。したがって、この目的のためのより優れた試験法を提供することが以前から求められていた。アルコール消費量を測定する別の方法がStibler (1991)中に記載されている。この文献では、サンプル中の脱シアル化されたトランスフェリンの量を、クロマトグラフィー的にまたは免疫学的に測定する。アルコールの消費によりこのトランスフェリン種の量は増加し、たとえこの方法がさほど特異的でないとしても、おそらく今のところ最善のアルコール消費の指標である。

【0005】

アルコール消費量のその他の可能な指標がホスファチジルエタノール(PEth)である。ホスファチジルエタノールはアルコール存在下でのみ体内で形成される異常リン脂質である。アルコールを飲んだヒトの血液にもみられた(Varga et al. 1998)。この反応はホスホリパーゼD（この酵素はホスファチジルコリンのコリン部分とエタノールを置換する）により触媒される。反応を図1に示す。国際公開W090/07008に開示された方法において、ホスファチジルエタノールがアルコール消費量のマーカーとして間接的に使用されている。この方法では、血液中のリンパ球を単離し、次いでエタノールと細胞刺激物質ホルボールエステルとともに培養することにより、リンパ球からホスファチジルエタノールが産生される。得られた放射活性ホスファチジルエタノールを測定する。上記文献によれば、ホスファチジルエタノールを産生しうる能力が平均よりも高いヒトが、よりアルコール依存症になる傾向がある。この方法は極めて労力を要するものであり、また得られる結果も矛盾 40 50

を含む。Gunnarssonら (1998)は、ホスファチジルエタノールをリンパ細胞培養物中ではなく血液中で直接測定する、より簡便な方法について記載している。この方法では、ヘキササン-イソプロパノール抽出によりヘパリン添加血液から脂質画分を単離し、ホスファチジルエタノールの存在についてマススペクトロメトリーまたは液体クロマトグラフィーのいずれかにより調べる。これらの技術もまた、ルーチンワークとして適合させるには複雑すぎる。

【0006】

ホスファチジルエタノールをアッセイするための上記した方法のいずれもが、アルコール消費量を検出するためにはあまり信用できない。さらに、多くの労力を要し複雑であることから、これらの方法は臨床上のルーチンワークとしては適さないものとなっている。ルーチンの検査業務に適した信頼しうる方法を提供しようとする試みは未だ成功していない。

10

【0007】

イムノアッセイ法は、臨床検査に好適であることが多い。しかしながら、ホスファチジルアルコールに関するかぎり、小分子に対する抗体作製が困難であるということが問題となっている。従来、小ペプチドまたはステロイドホルモンは、より大きな担体タンパク質と結合させる。ところが、従来の担体は脂質抗原に対してあまり適さない。しかしながら、予想外に、抗体がホスファチジルアルコールに対して首尾よく作製され、アルコールの大量消費を検出するための、著しく簡便性の向上したアッセイが可能になった。このようにして、アルコール消費の結果として体内に形成されるホスファチジルアルコールを免疫学的に測定することによるアルコールの大量消費を検出するための発明を完成した。

20

【0008】

従来技術と比較した本発明の方法の利点としては、信頼性、低労力性および迅速性、ならびに高価なクロマトグラフィー装置および/または分光分析装置を必要としないという事実が挙げられる。本発明の方法は、小規模の医療サービス(アルコール乱用者のための福祉事業)ユニットにおいて日常的に使用するのにも適しており、患者の症状を柔軟な様式でモニタリングすることを可能にする。本発明の抗体は、アルコール疾患について行われる研究以外のその他の研究においても使用することができる。

【発明の開示】

【0009】

本発明はヒト身体サンプルからアルコール消費量を検出するための方法を提供する。本発明の方法は、ホスファチジルアルコールを認識する抗体により該サンプルからホスファチジルアルコールを測定することを特徴とし、サンプル中にホスファチジルアルコールが存在することがそのヒトのアルコール消費量を示す。さらに、本発明は、ホスファチジルアルコールを認識することを特徴とする、該方法に有用な抗体を提供する。さらに、本発明は、ホスファチジルアルコールを認識する抗体を含んでなることを特徴とする検査キットを提供する。さらに、本発明は、ホスファチジルアルコールを認識する抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマを提供する。

30

【0010】

さらに、本発明の態様の一つは、ホスファチジルアルコールを認識する抗体の作製方法に関し、その方法は、リポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルアルコールを用いて動物を免疫し、a) 該動物により産生されたホスファチジルアルコール認識抗体を回収すること、またはb) 該抗体を産生する免疫動物の細胞と不死化細胞株とをハイブリドーマを産生させるために融合し、所望の抗体を産生するハイブリドーマを選択し、かつ、該ハイブリドーマにより産生される抗体を回収すること、を特徴とする。さらに、本発明は、上記方法により作製された抗体、およびイムノアッセイにおける本発明の抗体の使用に関する。

40

【0011】

本発明の基本となる考え方は、ホスファチジルアルコールに対する抗体の作製に成功したということである。このことは、リポタンパク質中にホスファチジルアルコールを取り込

50

ませ、このリポタンパク質中に取り込ませたホスファチジルアルコールを免疫における抗原として使用する事により可能となった。これにより、リン脂質分子（この場合、ホスファチジルアルコール）の極性部分に対する抗体が提供される。「ホスファチジルアルコール」とは、ホスファチジン酸のエステルであり、この場合、その脂肪酸部分は、通常、天然のホスファチジルコリンの脂肪酸部分と同一である。「リポタンパク質」とは、タンパク質部分と脂質部分の両方を含む化合物のことをいう。これらは細胞膜中および体内を循環するリポタンパク質粒子として存在する。リポタンパク質粒子はホスファチジルアルコールの担体として機能するのに好適である。リン脂質とタンパク質の他に、リポタンパク質粒子は、トリグリセリドやコレステロールなどその他の成分をさらに含む。リポタンパク質粒子は、例えばその密度に基づいて分類される。例えば、以下のリポタンパク質粒子を免疫原の調製に使用することができる：VLDL（超低密度リポタンパク質）、LDL（低密度リポタンパク質）、HDL（高密度リポタンパク質）、VHDL（超高密度リポタンパク質）、IDL（中密度リポタンパク質）またはLp(a)リポタンパク質。LDL、HDLおよびVLDLを使用することにより良好な結果が得られた。

10

20

30

【0012】

ホスファチジルアルコール、好ましくはホスファチジルエタノールを少量の溶媒に溶解し、水溶液中でリポタンパク質中に送達する。ホスファチジルアルコールは、溶媒の濃度が希釈されると、リポタンパク質表面の脂質の間に到達する。免疫する動物の身体が、リポタンパク質の表面に現れる小分子脂質の極性残基（エタノールの場合エチル基）を異物として認識し、これにより抗体を得ることができる。図2はLDLリポタンパク質表面での抗体とホスファチジルエタノールとの結合を示す。酸化させた（酸化させた/酸化する状態に付した）粒子を使用することにより免疫原の抗原性を増強することができる。例えば、ホスファチジル基の脂肪酸の1つを酸化し、得られたアルデヒドを使用して、リポタンパク質のタンパク質部分とホスファチジルアルコールとの間に共有結合を形成させることにより、ホスファチジルエタノールをより密にリポタンパク質中へ取り込ませることができる。また、他の方法で、例えば、リポタンパク質をエチル化することにより（例えば、PEthを添加する前（または後）にアセトアルデヒドで処理することにより）リポタンパク質粒子を修飾することによって、免疫原性を（さらにはアルコール性リポタンパク質の様相をも）増強することも可能である。リポタンパク質から脱シアル酸、すなわち、シアル酸を除去することもでき、この場合リポタンパク質はアルコール性リポタンパク質により密接に類似する。

30

【0013】

上記リポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルアルコールを、ホスファチジルアルコールを認識する本発明の抗体の調製に、それ自体公知の方法で抗原として使用することができる。「ホスファチジルアルコールを認識する抗体」とはホスファチジルアルコールと選択的に結合し得る抗体のことをいい、これには、ホスファチジルアルコールと選択的に結合し得る該抗体のフラグメントも含まれる。かかるフラグメントには、例えば、F(ab')₂およびF(ab)が含まれる。

【0014】

免疫応答性の動物を、リポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルアルコールで免疫し、抗原に対して形成された免疫応答について試験する。抗原に対して陽性の応答を示す動物からポリクローナル抗体を回収し、当業者に公知の方法を用いて精製することができる。本発明の別の実施形態ではモノクローナル抗体を調製する。免疫後、抗体を産生するハイブリドーマを得るために、抗原に対して陽性の応答を示す動物の抗体産生細胞（通常、脾臓細胞）と不死化細胞株とを融合させる。陽性ハイブリドーマの培養液から抗体を単離し、当業者に一般的に知られている方法を用いて精製する。

40

【0015】

所望であれば、ホスファチジルアルコールを認識するフラグメントを調製した抗体から単離することができる。あるいは、かかるフラグメントは遺伝子工学技法を利用して作製することができる。例えば、ラジオアイソトープ、金属粒子、蛍光標識または酵素標識（例

50

えば、³H、金コロイド、ローダミン、フルオレセイン、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ)などの標識をそれ自体が公知の方法で抗体に取り込ませることにより、抗体(フラグメントを含む)をさらに改変することができる。

【0016】

したがって、本発明の抗体は、ホスファチジルアルコールについて、特にリポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルアルコールについて免疫学的に検出することを可能にする。免疫学的に検出するホスファチジルアルコールとしてはホスファチジルエタノールが好ましく、特にリポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルエタノールが好ましい。ホスファチジルアルコールの免疫学的測定方法は、信頼し得る方法でアルコールの大量摂取を検出・モニタリングすることを特に意図したものである。1週間あたり男性では24回分量(dose)のアルコールおよび女性では16回分量のアルコールを超える摂取、あるいは1回あたり男性では7回分量のアルコールおよび女性では5回分量のアルコールを超える摂取が、アルコールの大量摂取とみなすことができる。1回分量(dose)とは約12グラムの純粋エタノールに相当する。この方法は、アルコール性疾患を探しだしたり、研究したりするためにも利用することができる。体内にアルコールが存在する場合、アルコール分子は、ホスホリパーゼDに触媒される反応においてリン脂質中に取り込まれる(通常は水が取り込まれる)。体内のホスファチジルアルコールの量はアルコール消費量と関連し、ホスファチジルアルコールは、アルコール消費後、少なくとも2~4日間、おそらくそれより長い期間体内に残存する。

10

【0017】

ホスファチジルアルコールを認識する抗体は、抗原と抗体との複合体の検出に基づく免疫学的アッセイのいずれにおいても使用することができる。この複合体は直接的に、または2次抗体を使用して間接的に検出することができる。イムノアッセイにおいては固体担体を使用することが多く、その場合、抗体または抗原のいずれかを担体に結合させる。担体に結合させる抗体は、担体と1次抗体を結合させるための中間コンジュゲートとして使用する、いわゆる捕捉抗体であってもよい。

20

【0018】

ある実施形態においては、ホスファチジルアルコールに対する抗体を直接または中間コンジュゲートにより担体と結合させて実施し得るラジオイムノアッセイ(RIA)を利用することができる。患者サンプルのリポタンパク質を、ラジオアイソトープでそれ自体公知の方法により標識し、担体と結合させた抗体と該サンプルを反応させるようにする。ホスファチジルアルコールを含有するリポタンパク質と担体との結合は放射活性を測定することにより検出する。

30

【0019】

アルコール消費量を検出するのに非常に適したイムノアッセイ法は、酵素標識した抗体を使用するELISA(酵素免疫測定法)と呼ばれる方法である。酵素マーカは本発明の抗体に直接取り込ませるか、あるいは2次抗体に取り込ませることができる。ELISAに適した実施形態の一つは、本発明の抗体を直接または中間コンジュゲートにより固体担体に結合し、サンプルと反応させ、かつ、リポタンパク質中に取り込まれた結合ホスファチジルアルコールを、該リポタンパク質のエピトープであって、ホスファチジルアルコール以外のエピトープを認識する2次抗体によって検出することにより実施することができる。酵素マーカは上記2次抗体に結合させることができ、すなわち、マーカを含有する2次抗体によって該2次抗体を検出することができる。マーカは通常、その酵素に対する基質を添加することにより検出するか、生成された生成物の色を検出することにより検出する。

40

【0020】

図3は、ELISA法を利用することによる、サンプルからのホスファチジルエタノール含量の測定を示す。該ELISA法では、ホスファチジルエタノールに対する抗体の他に、ホスファチジルエタノールを含有するリポタンパク質のタンパク質部分を認識する2次抗体を使用する。A)は、抗PEth抗体のウェルプレートのウェル底部への結合を表す。B)は、ウェルプレート上へのサンプルの添加を表す。通常のHDLを白丸(○)で表し、PEthを含有するH

50

DLを黒丸()で表す。C)は、アポタンパク質A-Iに対する標識抗体を用いたPEth含有HDL粒子量の定量を表す。

【0021】

アッセイで使用される2次抗体は通常、ホスファチジルアルコールを含有するリポタンパク質のタンパク質部分に対するものである。これらのいわゆるアポリポタンパク質としては、例えば、apoA1、apoAII、apoB100、apoB-48、apoC1、apoCII、apoCIII、apoD、apoEおよびapoJが挙げられる。LDL粒子は唯一のタンパク質としてapoB-100を含有するが、これはVLDL粒子にも含有される。HDL粒子は、apoB-100は含有しないが、主としてapoA1およびapoAIIを含有する。

【0022】

本発明の抗体のほかに、本発明の検査キットは、ホスファチジルアルコールについての免疫アッセイに必要なその他の試薬および装置(例えば、マーカーを検出するためにアッセイにおいて使用するその他の標識可能抗体および試薬)、ならびに、必要なバッファおよび/または担体(例えば、抗体などの試薬が予め結合していてもよいマイクロタイタープレート)を含んでもよい。

10

【0023】

免疫学的アッセイ法を利用して調べようとする身体サンプルは、例えば、血液、血漿、血清、唾液、組織液もしくは羊水、またはホスファチジルアルコールを含有するその他の器官もしくは体液であってもよい。サンプルは、法医学サンプル、死後サンプルまたは胎芽もしくは胎児の組織から採取したサンプルであってもよい。ELISAおよびRIAアッセイに最適なのは、血漿、血清および血液などの液体サンプルであり、これらは、脂質画分の抽出または溶解を行うことなく、そのままアッセイにおいて使用することができる。

20

【0024】

ホスファチジルエタノールのかわりに、別のアルコールのホスファチジル物を、このアルコールのホスファチジル物に対する抗体を得るためにリポタンパク質中に取り込ませることができる。使用し得るアルコールとしては、8個以下、好ましくは1~4個の炭素原子を含んでなる直鎖状アルコール、すなわち、ホスホリパーゼDにより触媒される反応においてホスファチジルアルコールへと変換されるアルコールを挙げることができる。したがって、飲用に不適なアルコール、例えば、エチレングリコール、イソプロピルアルコール、メタノール、あるいは、プロパノール、ブタノールまたはペンタノールの使用を示すために、ホスファチジルアルコールを認識する様々な抗体を、患者が消費したアルコールの質を決定する際に使用することもでき、これにより適切な治療が可能となる。

30

【0025】

本発明のその他の実施形態では、抗体カラム、ウエスタンブロットおよび免疫組織学的方法などの免疫学的方法をさらに含む。通常、ホスファチジルアルコールに対して作製した抗体は、脂質代謝に関する研究などの生化学の基礎研究においても使用することができる。間接的には、例えば、細胞または組織培養または組織化学的サンプルからホスホリパーゼDの活性および所在を検出するためにも該抗体を使用することができる。

【実施例】

【0026】

本発明を以下の非限定的実施例により説明する。

40

【0027】

実施例 1

免疫原の調製

リポタンパク質を健常なヒトの血漿から単離した。一晚絶食させた後に血液サンプルを採取し、血漿を遠心分離により分離した。リポタンパク質は密度に基づき連続超遠心により血漿から単離した。VLDL画分は密度1.006 g/mlから、LDL画分は密度1.019~1.063g/mlから、およびHDL画分は密度1.063~1.21g/mlから単離した。遠心分離後、リポタンパク質画分を、0.15 M NaCl, 0.01% EDTA, pH 7.4またはPBS, pH 7.4に対して+4にて透析した。

【0028】

50

リポタンパク質粒子のリン脂質濃度を測定し、ホスファチジルエタノールの必要量を最終含有量がリン脂質全量の5%となるように計算した。ホスファチジルエタノール(この場合、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールナトリウム塩(Avanti Polar Lipids, USA)を使用)を、以下の方法にしたがって、ヒトから単離したHDLまたはLDL粒子(リポタンパク質のリン脂質全量の5%)中へ取り込ませた: クロロホルム中に溶解したホスファチジルエタノール(10 mg/ml)を最初に窒素下で乾燥し、さらに室温にて一晩減圧下で乾燥した。次に、得られた乾燥脂質フィルム状物を少量のエタノール中に溶解し、HDLまたはLDL粒子を含有する約1 mlの塩水溶液(0.15 M NaCl, 0.01% EDTA, pH 7.4)中へ(50~100 μ lずつ)滴下添加した。この溶液を低温室(+4)で一晩インキュベートし、次いで、NaBr溶液で密度を1.21 g/ml (HDL)または1.063 g/ml (LDL)に調整し、15 、114,000 gで18時間遠心分離を行った。遠心分離により得られたリポタンパク質画分を0.5 M NaCl, 0.01% EDTA, pH 7.4に対して透析した。得られたホスファチジルエタノール含有リポタンパク質粒子を免疫原として使用した。

10

20

30

【0029】

実施例 2

抗体の調製

抗PEthモノクローナル抗体を標準的プロトコール(Oi & Herzenberger 1980)を用いて調製した。6週齢のメスBalb/cマウスを、実施例1にしたがって調製したLDL粒子に取り込ませたホスファチジルエタノール抗原を用いて3週間間隔で免疫した。2回目の免疫後、陽性を示した血清サンプルを、直接ELISAアッセイ法を使用して同定した。この時、直接ELISAアッセイ法では、抗原、すなわちPEthリポタンパク質をウェルに結合し、試験しようとする血清を添加し、洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗マウス免疫グロブリン抗体を用いて結合抗体を測定した。抗原に対して陽性の応答を示したマウスの脾臓を単離し、ポリエチレングリコール (PEG 4000, Gibco, UK)を使用して、脾臓細胞とマウスミエローマ細胞株P3-X63-Ag8.653 (ATCC CRL-1580, American Type Culture Collection, USA)とを融合させた。ハイブリドーマ細胞を、HAT培地 [DMEM, 高濃度グルコース (Gibco, UK), 10% NCTC-135 (Gibco), 20% FBS (Bioclear, UK), 5% HFCS (Roche Molecular Biochemicals GmbH, Germany), HATサプリメント (Gibco) および ペニシリン/ストレプトマイシン 溶液 (Gibco)]を含むウェルプレート上で選択した。ハイブリドーマ細胞を、上記のようにして、抗原に対する直接的ELISA法を利用してスクリーニングした。陽性を示すウェルについて限界希釈法を利用してクローニングし、単一のコロニーのみを有するウェルについて直接ELISA法を利用して再度スクリーニングした。陽性を示すハイブリドーマ培養液を回収し、Protein-G-Sepharose-アフィニティークロマトグラフィー (Pharmacia, Sweden)を用いてモノクローナル抗体を精製した。以下の試験においては、使用するハイブリドーマ抗体の種類を、抗Ig抗体ウェル(Biotop, Finland)での抗体補足を利用してIgG_{2b}と決定した。

【0030】

実施例 3

抗PEth抗体のリン脂質に対する特異性の測定

ラジオイムノアッセイを実施した。ウサギ抗マウスIgG抗体 (Wallac, Delfia wells, Finland)でコーティングされたウェルを、PBS溶液 (pH 7.4)で2回洗浄し、湿潤チャンバー内で+20 にて30分間、ウェルあたり300 μ lの1% BSA-PBS溶液で混和させながらブロッキングし、再度、PBS溶液で2回洗浄した。実施例2で調製し、1% BSA-PBS溶液で50倍に希釈したマウス抗PEthモノクローナル抗体(その結果、抗体の量は1.4 μ g/mlである)を、ウェルあたり50 μ l添加し、湿潤チャンバー内で+4 にて6時間混和させながらインキュベートし、PBS溶液で2回洗浄した。PBS溶液で希釈し、かつ、HDLを³Hコレステロールで標識した50 μ lの5-%リン脂質HDL溶液(タンパク質0.5 mg/ml、添加したリン脂質0.08 .mg/ml)をウェルに抗原溶液として添加した。以下のリン脂質溶液について試験した:
PEth-HDL : 5% ホスファチジルエタノールを添加した³H-HDL溶液。

40

【0031】

50

PC-HDL: 5% ホスファチジルコリンを添加した³H-HDL溶液。

【0032】

SM-HDL: 5% スフィンゴミエリンを添加した³H-HDL溶液。

【0033】

PE-HDL: 5% ホスファチジリエタノールアミンを添加した³H-HDL溶液。

【0034】

PA-HDL: 5% ホスファチジン酸を添加した³H-HDL溶液。

【0035】

PS-HDL: 5% ホスファチジルセリンを添加した³H-HDL溶液。

【0036】

PI-HDL: 5% ホスファチジリンイノシトールを添加した³H-HDL溶液。

【0037】

LPC-HDL: 5% リゾホスファチジルコリンを添加した³H-HDL溶液。

【0038】

低温室で一晩インキュベートし、混合した。

【0039】

ウェルを4回洗浄し、軽くたたいて乾燥させた。次に、ギロチンカッターを用いてウェルを切断し、2 mlのシンチレーション液 (OptiPhase Highsafe 3, Wallac) 中に入れた。ボルテックス混合後、³H プログラムおよび5分間の測定時間で、ベータカウンター (Wallac) により放射活性を測定した。図4に、結合放射活性量(% dpm)として結果を示す。結果から、使用した抗PEth抗体は、リポタンパク質中に取り込まれたホスファチジリエタノールを特異的に認識することが示された。

【0040】

実施例4

ホスファチジリエタノール測定のためのラジオイムノアッセイ(RIA)

平均アルコール消費量が一週間あたり96回分量のアルコール(55~137回分量の範囲)であって、アルコール嗜癖から回復すべき旨が言い渡されているアルコールヘビーユーザー群と、平均アルコール消費量が一週間あたり9回分量のアルコール(4~15回分量の範囲)である対照群とを、被験者として使用した。被験者は、検知し得るその他の健康上の問題は有していなかった。一晩絶食させた後、被験者から静脈血サンプルを採取し、血漿を遠心分離により分離した。リポタンパク質画分は、図1に記載されるようにして血漿から分離した。分離したHDL画分を³H-コレステロールエステル(Tollefson & Albers, 1986)を用いて標識した。

【0041】

8ウェルからなるストリップとして脱着可能なウェルを有するウェルプレート (NUNC Lock Well MaxiSorp) をアッセイで使用した。マイクロタイタープレートのウェルを、PBS 溶液で20 µg/mlに希釈したヤギ抗マウスIgG (H+L) 抗体 (Zymed Laboratories, USA) をウェルあたり50 µl添加し、+4 にて24時間インキュベートした。PBS 溶液で2回洗浄し、その後、実施例2において調製したマウス抗PEthモノクローナル抗体(基本溶液をPBS溶液で50倍に希釈したもの(43ng/µl)) をウェルあたり100 µl各ウェルに添加し、抗体を室温にて1時間結合させた。ウェルをPBS 溶液で2回洗浄し、ウェルあたり300 µlの容量の1% BSA-PBS 溶液を用いて室温にて2時間ブロッキングし、その後、ブロッキング液を除去した。

【0042】

アルコールヘビーユーザーおよび対照群の血漿から単離した、³H-コレステロールエステルで標識したHDL画分ならびに標準サンプルをそれぞれ、ウェルあたり50 µlを低温室にて一晩インキュベートした。サンプルを、サンプルバッファー (1xPBS, 1% BSA, 0.5% Triton X-100, 1 mM EDTA) でタンパク質濃度0.5mg/mlとなるように希釈した。使用した標準サンプルは0%、1%および10% PEth-HDLであり、これらは様々な対照からのプールHDL画分を含む溶液を用いて調製した。次いで、ウェルを0.5%のTriton X-100を含有するPBS 溶液で

10

20

30

40

50

4回洗浄し、再度、PBSで2回洗浄した。

【0043】

ウェルを軽くたたいて乾燥させ、2 mlのシンチレーション液 (OptiPhase Highsafe 3, Perkin Elmer, Wallac, Finland)をそれぞれ含むシンチレーション用ボトルに入れ、30秒間ボルテックス混合し、Wallac Rack-ベータシンチレーションカウンター (^3H カウント)を用いて放射活性を測定した。サンプル中に含まれるPEth濃度は、標品を用いて計算した。結果を図5に示す。アルコールヘビーユーザーのHDL粒子中ホスファチジルエタノール含量 ($2.75 \pm 0.53 \mu\text{mol/l}$)は、対照群における含量 ($1.70 \pm 0.43 \mu\text{mol/l}$)と比較して有意に高いことが試験により示された ($p < 0.01$, Student's t検定)。

【0044】

実施例 5

ホスファチジルエタノール測定のためのELISA法

平均アルコール消費量が一週間あたり81回分量のアルコール(44~117回分量の範囲)であって、アルコール嗜癖から回復すべき旨が言い渡されているアルコールヘビーユーザー群と、平均アルコール消費量が一週間あたり13回分量のアルコール(1~25回分量の範囲)である対照群とを、被験者として使用した。被験者は、検知し得るその他の健康上の問題は有していなかった。一晩絶食させた後、被験者から静脈血サンプルを採取し、血漿を遠心分離により分離した。

【0045】

マイクロタイタープレート (Delfia, Wallac, Finland)のウェルをウサギ抗マウスIgG (H+L) 抗体でコーティングした。次いで、このウェルをPBS溶液で2回洗浄した。実施例2において調製したマウス抗PEthモノクローナル抗体(基本溶液をPBS溶液で50倍に希釈したもの ($43\text{ng}/\mu\text{l}$))をウェルあたり $100 \mu\text{l}$ 各ウェルに添加し、そのまま室温にて1時間反応させた。ウェルをPBS溶液で2回洗浄し、ウェルあたり約 $350 \mu\text{l}$ の1% BSA-PBS 溶液で室温にて30分間ブロッキングし、再度、PBS溶液で2回洗浄した。

【0046】

次いで、PBS 溶液で10倍に希釈した絶食後血漿サンプルをウェルあたり $100 \mu\text{l}$ 添加し、各サンプルについて2連で行った。これらを+4 にて一晩反応させた。ウェルをPBS溶液で2回洗浄し、1% BSA-PBS 溶液で500倍に希釈したヒツジ抗ヒトApoAI 抗体 (Roche Diagnostic, Germany)をウェルあたり $100 \mu\text{l}$ 添加し、室温にて1時間反応させた。次いで、ウェルをPBS溶液で3回洗浄した。次いで、1% BSA-PBS 溶液で1000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ロバ抗ヒツジIgG(Fab)-POD 抗体 (Roche Diagnostic, Germany)をウェルあたり $100 \mu\text{l}$ 添加し、そのまま室温にて1時間反応させた。PBS洗浄後、1,2-ジアミノベンゼン(OPD) (Sigma)を基質として使用してペルオキシダーゼ反応を行った。OPD錠剤は使用直前に20mlのバッファーに溶解し、ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ 添加し、暗所で室温にて5~15分間インキュベートした。3 Mの硫酸をウェルあたり $50 \mu\text{l}$ 使用して反応を停止させた。吸光度を490 nmの波長で測定した。

【0047】

結果を図6に示す。アルコールヘビーユーザーのHDL粒子中ホスファチジルエタノール含量は対照群よりも有意に高いことが結果から示される ($p < 0.0001$)。

【0048】

実施例2において調製したマウス抗ヒト-PEth-IgG_{2b}抗体と結合し、かつ、ホスファチジルエタノールを含有しているVLDLおよびLDL粒子を、抗ヒトapo B100 抗体 (Roche Diagnostic)を2次抗体として使用することにより血漿から同様に検出した。得られた結果を、抗ヒトApoAI 抗体を使用して行った試験で得られた結果と比較参照した。

【0049】

参考文献リスト

Gunnarsson, T., Karlsson, A., Hansson, P., Johnson, G., Alling, C., & Odham, G. (1998) Determination of phosphatidylethanol in blood from alcoholic males using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering or elect

10

20

30

40

50

rospray mass spectrometric detection, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 705: p p. 243-249.

Oi, V. T. & Herzenberger, L. A. (1980) Immunoglobulin-producing hybrid cell line s. In Selected Methods in Cellular Immunology, B. B. Mishell and Shiigi, S. M., editors. Freeman, San Francisco, pp. 351-372.

Stibler H. (1991) Carbohydrate-deficient transferrin in serum: A new marker of p otentially harmful alcohol consumption reviewed, Clin. Chem. 12: pp. 2029-2037.

Tollefson, J. H. & Albers, J. J. (1986) Isolation, characterization, and assay o f plasma lipid transfer proteins, Methods Enzymol. 129: pp. 797-816.

Varga, A., Hansson, P., Lundqvist, C., & Alling, C. (1998) Phosphatidylethanol i n blood as a marker of ethanol consumption in healthy volunteers: comparison wit h other markers, Alcohol Clin. Exp. Res. 22: pp. 1832-1837.

10

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】ホスホリパーゼDにより触媒される反応におけるホスファチジルコリンからホスファチジルエタノール(PEth)の生成を表す。

【図2】PEthが取り込まれているリポタンパク質粒子と抗PEth抗体との結合を表す。

【図3】抗PEth抗体と、PEth以外のリポタンパク質のエピトープを認識する2次抗体とを使用する、ELISA法によるPEthの測定について表す。

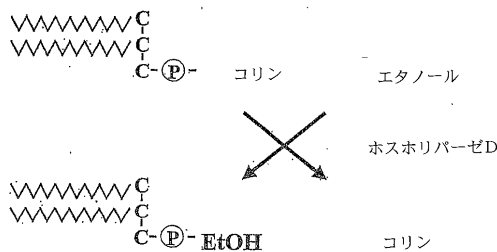
【図4】抗PEth抗体のリン脂質特異性について表す。

【図5】ラジオイムノアッセイにおいて抗PEth抗体を使用することにより示される、アルコールヘビーユーザー()および対照群()の血漿中HDL粒子のPEth濃度を表す。

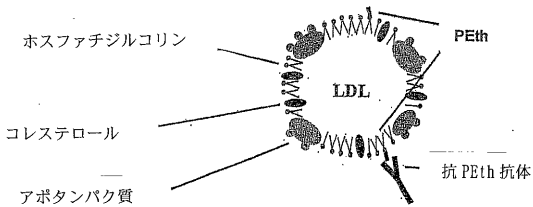
【図6】ELISAアッセイ法において抗PEth抗体を使用することにより示される、アルコールヘビーユーザー()および対照群()の血漿中HDL粒子のPEth濃度を表す。

20

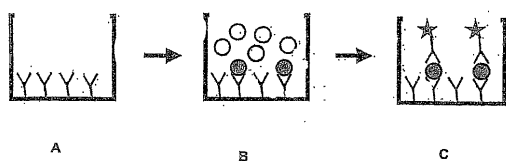
【図1】



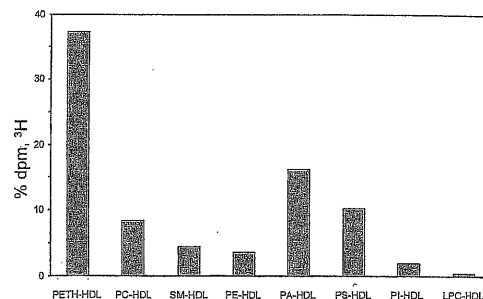
【図2】



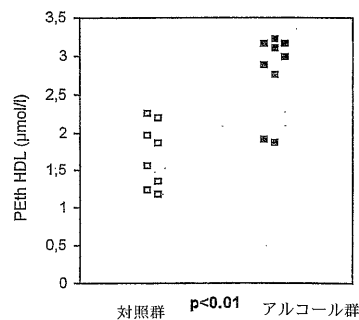
【図3】



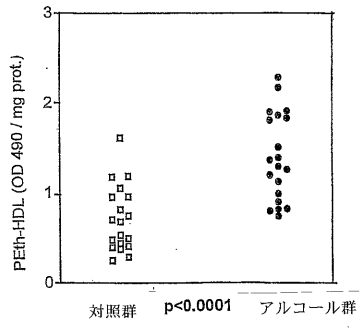
【図4】



【図5】



【 図 6 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 February 2003 (06.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/010539 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53
- (21) International Application Number: PCT/FI02/00626
- (22) International Filing Date: 10 July 2002 (10.07.2002)
- (25) Filing Language: Finnish
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
20011517 11 July 2001 (11.07.2001) FI
- (71) Applicants and
(72) Inventors: SAVOLAINEN, Markku [FI/FI], Rantakuvon-
intie 1, FIN-90540 Oulu (FI), HANNUKSELA, Miina
[FI/FI], Souvajantie 1, FIN-90560 Oulu (FI), LI-
ISANANTTI, Marja [FI/FI], Tallinintie 11, FIN-90800
Oulu (FI).
- (74) Agent: KOLSTER OY AB, Iso Roobertinkatu 23,
P.O.Box 148, FIN-00121 Helsinki (FI).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT (util-
ity model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
- CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (util-
ity model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE
(utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE,
GH, GM, IR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD,
SI, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declarations under Rule 4.17:**
as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(i)) for all designations
— of inventorship (Rule 4.17(ii)) for US only
- Published:**
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/010539 A1

(54) Title: METHOD AND MEANS FOR DETECTING ALCOHOL CONSUMPTION

(57) Abstract: The present invention relates to a method for detecting alcohol consumption from a person's body sample. In the method, alcohol consumption is detected by determining immunologically phosphatidylalcohol formed in the body in the presence of alcohol. The present invention further relates to an antibody which is useful in the method and which recognizes phosphatidy-
l-alcohol, a test kit comprising said antibody, and a hybridoma producing said antibody. The present invention further relates to a method for preparing an antibody recognizing phosphatidylalcohol, and an antibody produced by the method. The method comprises immunizing an immunologically reactive animal with phosphatidylalcohol incorporated into a lipoprotein. Furthermore, the present invention relates to the use of an antibody recognizing phosphatidylalcohol in different immunoassays.

METHOD AND MEANS FOR DETECTING ALCOHOL CONSUMPTION

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The invention relates to a method for detecting alcohol consumption from a sample. More specifically, the invention relates to a method for detecting alcohol consumption from a person's body sample, to an antibody used in the method, to a test kit including the antibody, and to a hybridoma producing said antibody. The invention further relates to a method for producing said antibody, to an antibody produced by the method, and to the use of the antibody.

10 BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Immoderate use of alcohol is a health hazard and a common problem in public health. A significant number of patients in health centres and hospitals are heavy users of alcohol, whose diseases may be alcohol-induced; the patients themselves, however, do not come out with their drinking problem. It may, however, be crucial that a drinking problem is revealed while planning a patient's treatment in order to be able to prevent alcohol-related problems from becoming more serious or at least to retard the process and, if necessary, to refer the patient to a more efficient treatment. Since patients do not usually reveal that they are heavy users of alcohol, a doctor must be capable of recognizing immoderate consumption in other ways, e.g. through laboratory tests.

[0003] A vast majority of alcohol (ethanol) consumed becomes oxidised to acetaldehyde and acetate and further to acetylcoenzyme A (AcCoA) in the body. Long-term heavy consumption of alcohol may cause liver damage (fatty liver, hepatitis alcoholica or cirrhosis of the liver), which may possibly be found as changes in liver enzyme values.

[0004] However, even immoderate use of alcohol cannot always be detected by ordinary laboratory tests, such as by determining liver enzyme values. Therefore, the aim has long been to provide better tests for this purpose. An alternative method for determining alcohol use has been described in Stibler 1991. In the publication, the amount of desialylated transferrin in a sample is detected chromatographically or immunologically. The use of alcohol increases the amount of this transferrin type and, even if the method is not very specific, it is probably the best indicator of alcohol use at the moment.

[0005] Another potential indicator of alcohol consumption is phosphatidylethanol (PEth). Phosphatidylethanol is an abnormal phospholipid,

WO 03/010539

PCT/FI02/00626

2

formed in the body only in the presence of alcohol. It has also been found in the blood from persons who have drunk alcohol (Varga et al. 1998). The reaction is catalyzed by phospholipase D, which replaces the choline part of phosphatidylcholine with ethanol. The reaction is shown in Figure 1. Phosphatidylethanol has been indirectly used as a marker of alcohol consumption in the method disclosed in publication WO 90/07008. In the method, blood lymphocytes are isolated and subsequently cultured with ethanol and a cell-stimulating substance, phorbol ester, the lymphocytes thus producing phosphatidylethanol. The resulting radioactive phosphatidylethanol is measured. According to the publication, a person prone to alcohol dependency has a larger than average capacity to produce phosphatidylethanol. The method is extremely laborious and the results obtained are contradictory. Gunnarsson et al. (1998) have described a simpler method wherein phosphatidylethanol is determined directly in blood, not in a lymphocyte culture. In the method, a lipid fraction is isolated from heparinized blood by hexane-isopropanol extraction and the presence of phosphatidylethanol is determined either mass spectrometrically or liquid chromatographically. Also these techniques are too complex in order to suit routine work.

[0006] Neither of the above-mentioned methods for assaying phosphatidylethanol is very reliable in detecting alcohol consumption. Furthermore, the large amount of work and complexity render the methods unsuitable for clinical routine work. The attempts to provide a reliable method suitable for routine laboratory work have been unsuccessful.

[0007] Immunoassay methods are often well suited for clinical laboratory tests. As far as phosphatidylalcohol is concerned, however, the problem has been the fact that it is difficult to produce an antibody against small molecules. Conventionally, small peptides or steroid hormones are attached to larger carrier proteins. Conventional carriers are, however, poorly suited for lipid antigens. Unexpectedly, however, an antibody has now been successfully produced against phosphatidylalcohol, enabling a considerably simpler assay for detecting heavy use of alcohol. It has thus been invented to detect heavy use of alcohol by immunologically determining phosphatidylalcohol formed in the body as a result of alcohol use.

[0008] Advantages of the method of the invention over prior art include reliability, small amount of work and quickness as well as the fact that no expensive chromatographic and/or spectrometric equipment are needed. The

WO 03/010539

PCT/FI02/00626

3

method is suitable to be used routinely also in small health care service (welfare for intoxicant abusers) units, enabling a patient's condition to be monitored in a flexible manner. The antibody of the invention may also be used in other research than that conducted on alcohol diseases.

5 SUMMARY OF THE INVENTION

[0009] The present invention provides a method for detecting alcohol consumption from a person's body sample. The method of the invention is characterized in that phosphatidylalcohol is determined from the sample by means of an antibody recognizing phosphatidylalcohol, the presence of phosphatidylalcohol in the sample indicating the person's alcohol consumption. The present invention also provides an antibody useful in the method, characterized in that it recognizes phosphatidylalcohol. The invention also provides a test kit, characterized in that it comprises an antibody recognizing phosphatidylalcohol. The invention further provides a hybridoma, characterized in that it produces an antibody recognizing phosphatidylalcohol.

[0010] One aspect of the invention further relates to a method for producing an antibody recognizing phosphatidylalcohol, the method being characterized by immunizing an animal with phosphatidylalcohol incorporated into a lipoprotein; and a) recovering the phosphatidylalcohol-recognizing antibody produced by the animal; or b) fusing cells of the immunized animal that produce the antibody with an immortal cell line in order to produce a hybridoma; selecting a hybridoma producing the desired antibody; and recovering the antibody produced by the hybridoma. The invention further relates to an antibody produced by the above-mentioned method and to the use of the antibody of the invention in immunoassay.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0011] Figure 1 describes formation of phosphatidylethanol (PEth) from phosphatidylcholine in a reaction catalyzed by phospholipase D,

[0012] Figure 2 describes binding of an anti-PEth antibody to a lipoprotein particle into which PEth has been incorporated,

[0013] Figure 3 describes determining PEth by an ELISA method, using the anti-PEth antibody and a second antibody recognizing an epitope of a lipoprotein, which is other than PEth,

[0014] Figure 4 describes the phospholipid specificity of the anti-PEth antibody,

WO 03/010539

PCT/FI02/00626

4

[0015] Figure 5 shows the PEth concentrations of HDL particles in the plasma of heavy users of alcohol (black squares) and in the plasma of controls (white squares) as indicated using the anti-PEth antibody in radio-immunological assay, and

5 **[0016]** Figure 6 shows the PEth concentrations of HDL particles in the plasma of heavy users of alcohol (black squares) and in the plasma of controls (white squares) as indicated using the anti-PEth antibody in the ELISA assay method.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

10 **[0017]** The idea underlying the present invention is that an antibody against phosphatidylalcohol has now been successfully produced. This was possible by incorporating phosphatidylalcohol into a lipoprotein and by using this phosphatidylalcohol incorporated into a lipoprotein as an antigen in immunization. This provides an antibody to the polar part of a phospholipid molecule, in this case phosphatidylalcohol. "Phosphatidylalcohol" is an ester of phosphatide acid, whose fatty acids in this case are usually the same as the fatty acids of naturally occurring phosphatidylcholine. "Lipoproteins" refer to a compound containing both protein and lipids. These occur both in cell membranes and as lipoprotein particles circulating in the body. The lipoprotein particles are well suited for serving as carriers of phosphatidylalcohol. In addition to phospholipids and proteins, the lipoprotein particles further comprise other components, such as triglycerides and cholesterol. The lipoprotein particles are classified e.g. on the basis of their density. For example, the following lipoprotein particles can be used in the preparation of an immunogen: VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein), HDL (high density lipoprotein), VHDL (very high density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein) or Lp(a) lipoprotein. The use of LDL, HDL and VLDL has yielded good results.

25 **[0018]** Phosphatidylalcohol, which is preferably phosphatidylethanol, is dissolved in a small amount of solvent and conveyed into a lipoprotein in an aqueous solution, the phosphatidylalcohol finding its way to among the lipids on the surface of the lipoprotein as the solvent concentration is diluted. The body of the animal to be immunized recognizes the polar residue of the small-molecule lipid that has appeared on the surface of the lipoprotein (in the case of ethanol an ethyl group) as a foreign substance, which enables an antibody

30

35

to be obtained. Figure 2 shows the binding of the antibody to phosphatidylethanol on the surface of LDL lipoprotein. It is possible to increase the antigenicity of an immunogen by using oxidised particles (undergone oxidation/subjected to oxidation). It is possible, for instance, to incorporate phosphatidylethanol more tightly into a lipoprotein by oxidising one fatty acid of phosphatidyl and, using the resulting aldehyde, to form a covalent bond between the protein part of the lipoprotein and the phosphatidylalcohol. It is also possible to increase immunogenicity (and even the semblance of an alcoholic's lipoprotein) by modifying the lipoprotein particle also otherwise, for instance by ethylating the lipoprotein e.g. by acetaldehyde treatment prior to adding PETH (or after it). It is also possible to desialylate the lipoproteins, i.e. remove sialic acid therefrom, in which case they resemble an alcoholic's lipoproteins more closely.

[0019] The above-described phosphatidylalcohol incorporated into a lipoprotein can be used as an antigen in a manner known *per se* in the preparation of the antibody of the invention recognizing phosphatidylalcohol. An "antibody recognizing phosphatidylalcohol" refers to an antibody capable of selectively binding to phosphatidylalcohol, including fragments of said antibody also capable of selectively binding to phosphatidylalcohol. Such fragments include e.g. F(ab')₂ and F(ab).

[0020] An immunologically reactive animal is immunized with phosphatidylalcohol incorporated into a lipoprotein and the immune response formed against an antigen is tested. A polyclonal antibody can be recovered from animals giving a positive response to the antigen, and purified using methods known to those skilled in the art. In another embodiment of the invention, a monoclonal antibody is prepared. After immunizations, the antibody-producing cells of the animals giving a positive response to the antigen, usually spleen cells, are fused with an immortal cell line in order to obtain a hybridoma producing the antibody. The antibody is isolated from the culture medium of the positive hybridomas, and purified using methods commonly known to those skilled in the art.

[0021] If desired, a fragment recognizing phosphatidylalcohol can be isolated from the antibody prepared. Alternatively, such a fragment can be produced using methods of gene technology. The antibody, including the fragments, can be further modified e.g. by incorporating a label, such as a radioactive isotope, a metal particle or a fluorescent or enzyme label (e.g. ³H,

colloidal gold, rhodamine, fluorescein, peroxidase, alkaline phosphatase) thereto in manners known *per se*.

5 **[0022]** The antibody of the invention now enables phosphatidylalcohol, and in particular phosphatidylalcohol incorporated into a lipoprotein, to be detected immunologically. Phosphatidylalcohol to be detected immunologically is preferably phosphatidylethanol and, in particular, phosphatidylethanol incorporated into a lipoprotein. The immunological method for determining phosphatidylalcohol is intended particularly for detecting and monitoring heavy use of alcohol in a reliable manner. Consumption exceeding 24 doses of alcohol in men and 16 doses of alcohol in women per week or, alternatively, more than 7 doses in men and more than 5 doses in women at a single occasion can be considered as heavy use of alcohol. One dose corresponds with about 12 grams of pure ethanol. The method can also be utilized in finding and studying alcohol diseases. In the presence of alcohol in the body, an alcohol molecule incorporates into phospholipids in a reaction catalyzed by phospholipase D wherein ordinarily water incorporates. The amount of phosphatidylalcohol in the body correlates with alcohol consumption, and phosphatidylalcohol remains in the body for at least 2 to 4 days after consumption, maybe longer.

10 **[0023]** The antibody recognizing phosphatidylalcohol can be used in any immunological assay based on detecting a complex between an antigen and an antibody. This complex can be detected either directly or indirectly by using secondary antibodies. A solid carrier is often used in immunoassays, in which case either the antibody or the antigen is bound to the carrier. The antibody bound to the carrier may also be a so-called capture antibody used as an intermediate conjugate in order to bind a primary antibody to the carrier.

15 **[0024]** In one embodiment, a radioimmunological assay (RIA) is used which can be carried out such that the antibody against phosphatidylalcohol is, directly or by means of an intermediate conjugate, attached to the carrier. The lipoproteins of a patient's sample are marked by a radio isotope in a manner known *per se* and the samples are left to react with the antibody attached to the carrier. The binding of the lipoproteins containing phosphatidylalcohol to the carrier is detected by measuring radioactivity.

20 **[0025]** A highly suitable immunoassay for detecting alcohol consumption is an assay called ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), wherein an antibody labelled with an enzyme is used. An enzyme marker can be incorporated either directly into the antibody of the invention or, alterna-

tively, to a secondary antibody. One embodiment suitable for ELISA can be implemented by attaching the antibody of the invention directly or by means of an intermediate conjugate to a solid carrier by leaving it to react with a sample and by detecting the bound phosphatidylalcohol incorporated into a lipoprotein by means of a second antibody recognizing an epitope of said lipoprotein, the epitope being other than phosphatidylalcohol. An enzyme marker can be attached to said second antibody or said second antibody can be detected by means of a secondary antibody containing the marker. A marker is usually detected by adding a substrate to the enzyme and by detecting the colour of the product produced.

[0026] Figure 3 shows determining the phosphatidylethanol content from a sample by using the ELISA method wherein, in addition to the antibody provided against phosphatidylethanol, a second antibody is used which recognizes the protein part of a lipoprotein containing phosphatidylethanol. A) describes the attachment of an anti-PEth antibody to the bottom of the wells of a well plate. B) describes the addition of the sample onto the well plate. An ordinary HDL is an open circle while an HDL containing PEth is a grey circle. C) shows the quantification of the amount of HDL particles containing PEth with a labelled antibody directed against apoprotein A-I.

[0027] The second antibody used in the assay is usually directed against the protein part of a lipoprotein containing phosphatidylalcohol. These so-called apolipoproteins include e.g. apoAI, apoAII, apoB100, apoB-48, apoCI, apoCII, apoCIII, apoD, apoE and apoJ. An LDL particle contains only one protein apoB-100, which is also contained in VLDL particles. HDL particles do not contain apoB-100 but mostly apoAI and apoAII.

[0028] In addition to the antibody of the invention, the test kit of the invention may also include other reagents and devices necessary for the immunoassay of phosphatidylalcohol, such as other, possibly labelled antibodies and reagents to be used in the assay in order to detect a marker, as well as necessary buffers and/or carriers, such as microtiter plates to which reagents, such as an antibody, have possibly been attached already.

[0029] A body sample to be examined using an immunological assay method may be e.g. blood, plasma, serum, saliva, tissue or amniacal fluid or some other part or fluid containing phosphatidylalcohol. The sample may also be a medico-legal sample, a *post mortem* sample or a sample taken from tissues of an embryo or a foetus. Most suitable for ELISA and RIA assays are

WO 03/010539

PCT/FI02/00626

8

fluid samples, such as plasma, serum and blood, which can be used in the assay as such, without lipid fraction extraction or dissolution.

5 [0030] Instead of phosphatidylethanol, a phosphatidyl of another alcohol may be incorporated into a lipoprotein in order to obtain an antibody against the phosphatidyl of this alcohol. Alcohols that may be used include straight-chain alcohols comprising no more than eight, preferably 1 to 4, carbon atoms, i.e. alcohols that are converted into phosphatidylalcohols in a reaction catalyzed by phospholipase D. Different antibodies recognizing phosphatidylalcohols may thus also be used in determining the quality of the alcohol consumed by a patient in order to indicate use of impotable alcohols, such as ethylene glycol, isopropyl alcohol, methanol and possibly also propanol, butanol and pentanol, enabling appropriate treatment.

10 [0031] Other embodiments of the invention further include immunological methods, such as antibody columns, Western blot and immunohistological methods. Naturally, antibodies produced against phosphatidylalcohols may also be used in biochemical basic research, such as research on lipid metabolism. Indirectly, they may also be used for detecting the activity and location of phospholipase D e.g. from cell or tissue cultures or histological samples.

20 [0032] The invention will be explained by means of the following non-restrictive examples.

Example 1

Preparation of immunogen

25 [0033] Lipoproteins were isolated from the plasma of healthy humans. The blood samples were obtained after an overnight fast and the plasma was separated by centrifugation. The lipoproteins were isolated from the plasma by sequential ultracentrifugation on the basis of their density. A VLDL fraction was isolated from a density of 1.006 g/ml, an LDL fraction from a density of 1.019 to 1.063 g/ml and an HDL from a density of 1.063 to 1.21 g/ml. 30 After centrifugation, the lipoprotein fractions were dialyzed against 0.15 M NaCl, 0.01% EDTA, pH 7.4 or PBS, pH 7.4 at +4°C.

[0034] The phospholipid concentration of the lipoprotein particles was measured and the necessary amount of phosphatidylethanol was calculated such that its final content was 5% of the total amount of phospholipids. 35 Phosphatidylethanol, which was 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanol sodium salt (Avanti Polar Lipids, USA), was incorporated into human isolated

HDL or LDL particles (5% of lipoprotein phospholipids) in accordance with the following method: Said phosphatidylethanol, which was dissolved in chloroform (10 mg/ml) was first dried under nitrogen and further under vacuum for overnight at room temperature. The dry lipid film was then dissolved in a small volume of ethanol and added (50 to 100 μ l) drop-wise into about 1 ml of a water salt solution (0.15 M NaCl, 0.01% EDTA, pH 7.4) containing the HDL or LDL particles. The solutions were incubated overnight in cold (+4°C) and then adjusted to a density of 1.21 g/ml (HDL) or 1.063 g/ml (LDL) with NaBr solution and centrifuged at 114 000 g for 18 h at 15°C. The centrifuged lipoprotein fractions were dialyzed against 0.5 M NaCl, 0.01% EDTA, pH 7.4. The phosphatidylethanol-containing lipoprotein particles obtained were used as immunogens.

[0035] Example 2

[0036] Preparation of antibody

[0037] A monoclonal anti-PEth antibody was prepared using standard protocols (Oi & Herzenberger 1980). Six-week-old female Balb/c mice were immunized at intervals of three weeks with a phosphatidylethanol antigen incorporated into LDL particles, which was prepared according to Example 1. After second immunization, the positive serum samples were identified using a direct ELISA assay wherein the antigen, i.e. PEth lipoprotein, was bound to wells, the serum to be tested was added, washing was carried out and bound antibody was determined using an anti-mouse immunoglobulin antibody, which was labelled with horseradish peroxidase. The spleens of the mice that had given a positive response to the antigen were isolated and spleen cells were fused with mouse myeloma cell line P3-X63-Ag8.653 (ATCC CRL-1580, American Type Culture Collection, USA) using polyethylene glycol (PEG 4000, Gibco, UK). Hybridoma cells were selected on a well plate in HAT medium [DMEM, high glucose (Gibco, UK), 10% NCTC-135 (Gibco), 20% FBS (Bioclear, UK), 5% HFCS (Roche Molecular Biochemicals GmbH, Germany), HAT supplement (Gibco) and penicillin/streptomycin solution (Gibco)]. The hybridoma cells were screened using the direct ELISA against the antigen, as described above. The positive wells were cloned using a limiting dilution method and the wells having a single colony only were again screened using the direct ELISA. The culture media of the positive hybridomas were collected and the monoclonal antibody was purified with protein-G-Sepharose-affinity chromatography (Pharmacia, Sweden). In the following tests, the class of the hybridoma

WO 03/010539

PCT/FI02/00626

10

doma antibody used was determined as IgG_{2b} by using antibody capture on anti-Ig antibody wells (Biotop, Finland).

[0038] Example 3

[0039] Determining phospholipid specificity of anti-PEth antibody

5 **[0040]** A radioimmunoassay was carried out. Wells coated with rabbit anti-mouse IgG antibody (Wallac, Delfia wells, Finland) were washed twice with PBS solution (pH 7.4), blocked with 1% BSA-PBS solution, 300 μ l/well for 30 minutes at +20°C in a humid chamber, mixing, and washed again twice with PBS solution. 50 μ l/well of the monoclonal mouse anti-PEth antibody prepared
10 in Example 2 and diluted 1:50 in 1% BSA-PBS solution, the amount of antibody then being 1.4 μ g/ml, was added to the wells and incubated for six hours at +4°C in a humid chamber, mixing; washed twice with PBS solution. 50 μ l of 5-% phospholipid HDL solutions which were diluted in PBS solution and whose HDL was labelled with ³H cholesterol (0.5 mg/ml of protein, 0.08 mg/ml of added phospholipid) were added as antigen solutions to the wells. The following phospholipid solutions were tested:

- | | | |
|----|-------------------------|---|
| | [0041] PEth-HDL: | 5% phosphatidylethanol added to ³ H-HDL solution |
| 20 | [0042] PC-HDL: | 5% phosphatidylcholine added to ³ H-HDL solution |
| | [0043] SM-HDL: | 5% sphingomyelin added to ³ H-HDL solution |
| 25 | [0044] PE-HDL: | 5% phosphatidylethanol amine added to ³ H-HDL solution |
| | [0045] PA-HDL: | 5% phosphatide acid added to ³ H-HDL solution |
| | [0046] PS-HDL: | 5% phosphatidyl serine added to ³ H-HDL solution |
| 30 | [0047] PI-HDL: | 5 % phosphatidylinositol added to ³ H-HDL solution |
| | [0048] LPC-HDL: | 5% lysophosphatidylcholine added to ³ H-HDL solution |
| 35 | [0049] | Incubation in a cold room overnight, mixing. |

WO 03/010539

PCT/FI02/00626

11

[0050] The wells were washed four times and dabbed dry. Next, the wells were cut apart using a guillotine cutter and dropped into 2 ml of scintillation liquid (OptiPhase Highsafe 3, Wallac). After vortexing, radioactivity was measured by a beta counter (Wallac) using ^3H programme and a 5-minute measurement time. The results are shown as the amount (% dpm) of bound radioactivity in Figure 4. The results show that the anti-PEth antibody used recognizes specifically the phosphatidylethanol incorporated into a lipoprotein.

[0051] Example 4**[0052] Radioimmunoassay (RIA) for determining phosphatidylethanol**

[0053] A group of heavy users of alcohol whose alcohol consumption on average was 98 doses of alcohol (ranging between 55 and 137 doses) per week and who had referred for detoxification as well as a group of controls whose alcohol consumption on average was 9 doses of alcohol (ranging between 4 and 15 doses) per week were used as testees. The testees had no (other) noticeable health problems. Venous blood samples were taken from the testees after an overnight fast and plasmas were separated by centrifugation. Lipoprotein fractions were separated from the plasma as described in Figure 1. The isolated HDL fractions were labelled with ^3H cholesterol ester (Tollefson & Albers, 1986).

[0054] Well plates with detachable wells as 8-well strips (NUNC Lock Well MaxiSorp) were used in the assay. The wells of microtiter plates were coated with goat anti-mouse-IgG (H+L) antibody (Zymed Laboratories, USA) 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (diluted in PBS solution), 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ and incubated for 24 h at +4°C. Washing was carried out twice with PBS solution, after which the mouse monoclonal anti-PEth antibody (100 $\mu\text{l}/\text{well}$ of a 1:50 dilution in PBS solution of the stem solution 43 ng/ μl) prepared in Example 2 was added and the antibody was allowed to bind for one hour at room temperature. The wells were washed twice with PBS solution and blocked for two hours at room temperature with 1% BSA-PBS solution at a volume of 300 $\mu\text{l}/\text{well}$, after which the blocking was removed.

[0055] HDL fractions labelled with ^3H cholesterol ester isolated from the plasma of heavy users of alcohol and the controls as well as standard samples each 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ were incubated in a cold room overnight. The samples were diluted in a sample buffer (1xPBS, 1% BSA, 0.5% TritonX-100, 1 mM EDTA) to a concentration of 0.5 mg/ml of protein. The standard samples used were 0%, 1% and 10% PEth-HDL, which was made using a solution comprising pooled HDL fractions from different controls. Next, the wells were washed four times with PBS solution containing 0.5% of TritonX-100, and again twice with PBS.

[0056] The wells were dabbed dry and dropped into scintillation bottles each comprising 2 ml of scintillation liquid (OptiPhase Highsafe 3, PerkinElmer, Wallac, Finland), vortexed for 30 seconds and measured for radioac-

tivity using a Wallac Rack-beta scintillation counter (^3H count). The PEth concentration contained in the samples was calculated using standards. The results are shown in Figure 5. The tests showed that the phosphatidylethanol content in the HDL particles of heavy users of alcohol ($2.75 \pm 0.53 \mu\text{mol/l}$) was significantly higher than in the control group ($1.70 \pm 0.43 \mu\text{mol/l}$) ($p < 0.01$, Student's t-test).

[0057] Example 5

ELISA method for determining phosphatidylethanol

[0058] A group of heavy users of alcohol whose alcohol consumption on average was 81 doses of alcohol (ranging between 44 and 117 doses) per week and who had referred for detoxification as well as a group of controls whose alcohol consumption on average was 13 doses of alcohol (ranging between 1 and 25 doses) per week were used as testees. The testees had no (other) noticeable health problems. Venous blood samples were taken from the testees after an overnight fast and plasmas were separated by centrifugation.

[0059] Wells of a microtiter plate (Delfia, Wallac, Finland) were coated with rabbit anti-mouse-IgG(H+L) antibody. The wells were then washed twice with PBS solution. The mouse monoclonal anti-PEth antibody ($100 \mu\text{l/well}$ of a 1:50 dilution in PBS solution of the stem solution $43 \text{ ng}/\mu\text{l}$) prepared in Example 2 was added to each well and left to react for one hour at room temperature. The wells were washed twice with PBS solution and blocked with 1% BSA-PBS solution about $350 \mu\text{l/well}$ for half an hour at room temperature, and washed again twice with PBS solution.

[0060] Fast plasma diluted in 1:10 PBS solution was then added $100 \mu\text{l/well}$, two parallel ones from each sample. These were left to react at $+4^\circ\text{C}$ overnight. The wells were washed twice with PBS solution and added to sheep anti-human-ApoA1 antibody (Roche Diagnostic, Germany) diluted in 1:500 1% BSA-PBS solution $100 \mu\text{l/well}$ and left to react at room temperature for one hour. The wells were then washed three times with PBS solution. Peroxidase labelled donkey anti-sheep-IgG(Fab)-POD antibody (Roche Diagnostic, Germany) diluted 1:1000 in 1% BSA-PBS solution was then added $100 \mu\text{l/well}$ and left to react at room temperature for one hour. After the PBS washings, a peroxidase reaction was conducted using 1,2-diaminobenzene (OPD) (Sigma) as a substrate. An OPD tablet was dissolved just before use in 20 ml of buffer and added $100 \mu\text{l/well}$ and incubated for 5 to 15 minutes at room

temperature in dark. The reaction was stopped using 3 M sulphuric acid 50 μ l/well. Absorbance was measured at a wavelength of 490 nm.

5 **[0061]** The results are shown in Figure 6. The results show that the phosphatidylethanol content in the HDL particles of heavy users of alcohol was significantly higher than in the control group ($p < 0.0001$).

10 **[0062]** The VLDL and LDL particles bound by the mouse anti-human-PEth-IgG_{2b} antibody prepared in Example 2 and containing phosphatidylethanol were detected, correspondingly, from the plasma by using an anti-human-apoB100 antibody (Roche Diagnostic) as a second antibody. The results obtained were in line with those obtained in the tests conducted using anti-human-ApoA1 antibody.

WO 03/010539

PCT/FI02/00626

15

REFERENCE LIST

- 5 Gunnarsson, T., Karlsson, A., Hansson, P., Johnson, G., Alling, C., & Odham, G. (1998) Determination of phosphatidylethanol in blood from alcoholic males using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering or electrospray mass spectrometric detection, *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* 705: pp. 243 to 249.
- 10 Oi, V. T. & Herzenberger, L. A. (1980) Immunoglobulin-producing hybrid cell lines. In *Selected Methods in Cellular Immunology*, B.B.Mishell and Shiigi, S.M., editors. Freeman, San Francisco, pp. 351 to 372.
- 15 Stibler H. (1991) Carbohydrate-deficient transferrin in serum: A new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed, *Clin. Chem.* 12: pp. 2029 to 2037.
- Tollefson, J. H. & Albers, J. J. (1986) Isolation, characterization, and assay of plasma lipid transfer proteins, *Methods Enzymol.* 129: pp. 797 to 816.
- 20 Varga, A., Hansson, P., Lundqvist, C., & Alling, C. (1998) Phosphatidylethanol in blood as a marker of ethanol consumption in healthy volunteers: comparison with other markers, *Alcohol Clin.Exp.Res.* 22: pp. 1832 to 1837.

WO 03/010539

PCT/FI02/00626

16

CLAIMS

1. A method for detecting alcohol consumption from a person's body sample, **characterized** in that phosphatidylalcohol is determined from the sample by means of an antibody recognizing phosphatidylalcohol, the presence of phosphatidylalcohol in the sample indicating the person's alcohol consumption.
2. A method as claimed in claim 1, **characterized** in that phosphatidylalcohol incorporated into a lipoprotein is detected.
3. A method as claimed in claim 2, **characterized** in that in addition to said antibody, a second antibody recognizing an epitope of said lipoprotein is used, the epitope being other than phosphatidylalcohol.
4. A method as claimed in claim 3, **characterized** in that the second antibody recognizes an epitope of lipoprotein particle HDL, LDL or VLDL.
5. A method as claimed in claim 4, **characterized** in that the second antibody recognizes lipoprotein particle protein apoA1 or apoB100.
6. A method as claimed in any one of claims 1 to 5, **characterized** in that the method is an ELISA assay method.
7. A method as claimed in any one of the preceding claims, **characterized** in that a monoclonal antibody is used.
8. A method as claimed in claim 7, **characterized** in that the phosphatidylalcohol incorporated into a lipoprotein is determined in blood, plasma or serum.
9. A method as claimed in any one of the preceding claims, **characterized** in that phosphatidylethanol is determined.
10. An antibody, **characterized** in that it recognizes phosphatidylalcohol.
11. An antibody as claimed in claim 10, **characterized** in that it recognizes phosphatidylethanol incorporated into a lipoprotein.
12. An antibody as claimed in claim 10 or 11, **characterized** in that it is a monoclonal antibody.
13. A test kit, **characterized** in that it comprises an antibody recognizing phosphatidylalcohol.
14. A hybridoma, **characterized** in that it produces an antibody recognizing phosphatidylalcohol.

WO 03/010539

PCT/FI02/00626

17

15. A method for preparing an antibody recognizing phosphatidylalcohol, **characterized** by immunizing an animal with phosphatidylalcohol incorporated into a lipoprotein; and
- 5 a) recovering the phosphatidylalcohol-recognizing antibody produced by the animal; or
- b) fusing cells of the immunized animal that produce the antibody with an immortal cell line in order to produce a hybridoma; selecting a hybridoma producing the desired antibody; and recovering the antibody produced
- 10 by the hybridoma.
16. A method as claimed in claim 15, **characterized** by immunizing with phosphatidylalcohol incorporated into lipoprotein particle HDL, LDL or VLDL.
17. An antibody produced by the method of claim 15 or 16.
- 15 18. The use of the antibody of any one of claims 10 to 12 or 17 in an immunoassay.

WO 03/010539

PCT/FI02/00626

1/3

Figure 1

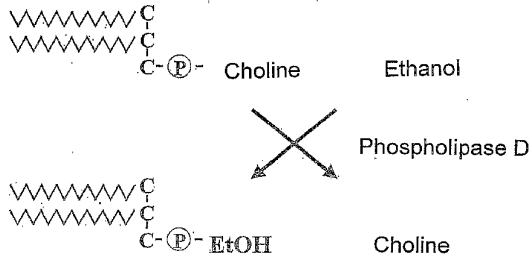


Figure 2

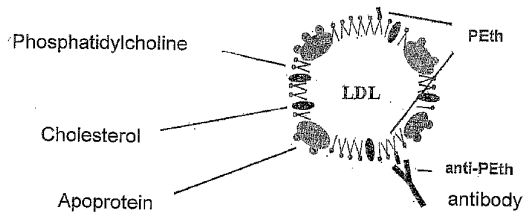


Figure 3

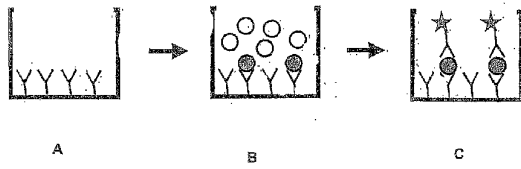


Figure 4

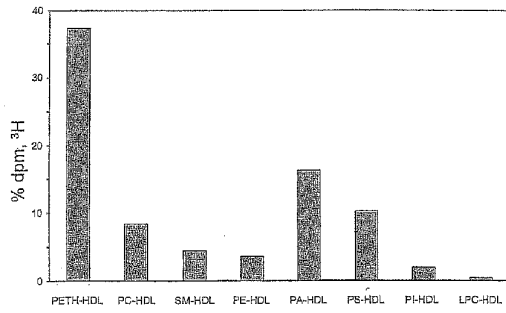


Figure 5

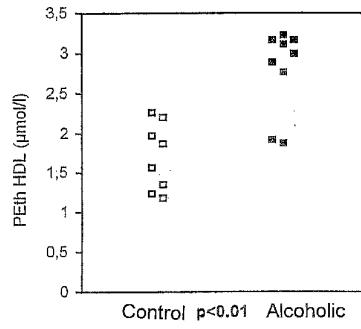
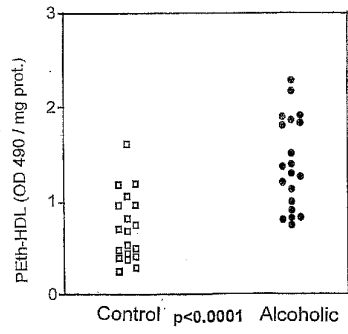


Figure 6



【手続補正書】

【提出日】平成15年7月17日(2003.7.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト身体サンプルからアルコール消費量を検出する方法であって、該サンプルから、アルコール部分に4個以下の炭素原子を含み、かつリポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルアルコールを、ホスファチジルアルコールを認識する抗体により測定し、サンプル中のホスファチジルアルコールの存在がそのヒトのアルコール消費量を示すことを特徴とする方法。

【請求項2】

前記抗体に加えて、前記リポタンパク質のエピトープを認識する2次抗体を使用し、このエピトープがホスファチジルアルコール以外であることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項3】

2次抗体がリポタンパク質粒子HDL、LDLまたはVLDLのエピトープを認識することを特徴とする、請求項2記載の方法。

【請求項4】

2次抗体がリポタンパク質粒子タンパク質apoA1またはapoB100を認識することを特徴とする、請求項3記載の方法。

【請求項5】

ELISAアッセイ法であることを特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

モノクローナル抗体を使用することを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

ホスファチジルアルコールを血液、血漿または血清中で測定することを特徴とする、請求項6記載の方法。

【請求項8】

ホスファチジルエタノールを測定することを特徴とする、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

アルコール部分に4個以下の炭素原子を含み、かつリポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルアルコールを認識することを特徴とする抗体。

【請求項10】

モノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項9記載の抗体。

【請求項11】

アルコール部分に4個以下の炭素原子を含み、かつリポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルアルコールを認識する抗体を含んでなることを特徴とする検査キット。

【請求項12】

アルコール部分に4個以下の炭素原子を含み、かつリポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルアルコールを認識する抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマ。

【請求項13】

アルコール部分に4個以下の炭素原子を含み、かつリポタンパク質中に取り込まれたホスファチジルアルコールを用いて動物を免疫し；

a) 該動物により産生されたホスファチジルアルコール認識抗体を回収すること；または

b) 該抗体を産生する免疫動物の細胞と不死化細胞株とを融合させてハイブリドーマを生成させ、所望の抗体を産生するハイブリドーマを選択し、かつ、該ハイブリドーマにより産生される抗体を回収すること；

を特徴とする、ホスファチジルアルコールを認識する抗体の作製方法。

【請求項 1 4】

リポタンパク質粒子HDL、LDLまたはVLDL中に取り込まれたホスファチジルアルコールを用いて免疫することを特徴とする、請求項 1 3記載の方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 3または 1 4記載の方法により産生される抗体。

【請求項 1 6】

イムノアッセイにおける請求項 9、1 0または 1 5のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI 02/00626
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: G01N 33/53 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI DATA, EPO-INTERNAL, PAJ, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	National Library of Medicine (NLM), file Medline, Medline accession no. 613327, Sillanaukee P. et al: "Acetaldehyde-modified hemoglobin as a marker of alcohol consumption: comparison of two new methods"; & The Journal of laboratory and clinical medicine, volume 120, no. 1, July 1992, page 42 - 47, abstract	1-18
	--	
A	National Library of Medicine (NLM), file Medline, Medline accession no. 9835304, Varga A. et al: "Phosphatidylethanol in blood as a marker of ethanol consumption in healthy volunteers: comparison with other markers"; & Alcoholism, clinical and experimental research, volume 22, no. 8, Nov 1998, page 1832 - 1837, abstract	1-18
	--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
15 October 2002	18-10-2002	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Lars Wallentin/ELY Telephone No. +46 8 782 25 00	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI 02/00626

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	National Library of Medicine (NLM), file Medline, Medline accession no. 9521560, Gunnarsson T. et al: "Determination of phosphatidylethanol in blood from alcoholic males using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering or electrospray mass spectrometric detection"; & Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications, volume 705, no. 2, 13 Feb 1998, page 243 - 249, abstract -----	1-18

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 N 5/00

B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 504223798

ニッシネン アンティ

フィンランド国 エフアイエヌ - 9 0 2 5 0 オウル, トルニハウカンティエ 6 - 8 ビー 7

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74) 代理人 100122389

弁理士 新井 栄一

(72) 発明者 サヴォライネン, マルック

フィンランド国 エフアイエヌ - 9 0 5 4 0 オウル, ランタクオヴィンティエ 1

(72) 発明者 ハンヌクセラ, ミンナ

フィンランド国 エフアイエヌ - 9 0 5 6 0 オウル, サウタヤンティエ 1

(72) 発明者 リーサナンティ, マルヤ

フィンランド国 エフアイエヌ - 9 0 8 0 0 オウル, テールレーリンティエ 1 1

(72) 発明者 ニッシネン アンティ

フィンランド国 エフアイエヌ - 9 0 2 5 0 オウル, トルニハウカンティエ 6 - 8 ビー 7

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CA25 CA26 CB01 DA60 DA62 DA63 DA64

DA65 DA66 DA74 FB03

4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 CE12 DA13

4B065 AA91X AB05 AC14 BA24 CA25 CA46

4H045 AA11 AA30 AA40 CA40 DA76 EA50 FA72 GA26

专利名称(译)	检测酒精消耗的方法和手段		
公开(公告)号	JP2004536322A	公开(公告)日	2004-12-02
申请号	JP2003515859	申请日	2002-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	萨沃Rheine的逗号外观 韩努库塞拉明娜 莉萨·楠三通Maruya 尼西嫩江赌注		
申请(专利权)人(译)	Savorainen马尔 Han'nukusera , 明娜 Risananti , Maruya Nisshinen赌注		
[标]发明人	サヴォライネンマルック ハンヌクセラミンナ リーサナンティマルヤ ニッシネンアンティ		
发明人	サヴォライネン,マルック ハンヌクセラ,ミンナ リーサナンティ,マルヤ ニッシネン アンティ		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/92 G01N33/98		
CPC分类号	G01N33/98 G01N33/531 G01N33/92		
FI分类号	G01N33/98 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53.S G01N33/53.W C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA60 2G045/DA62 2G045/DA63 2G045/DA64 2G045/DA65 2G045/DA66 2G045/DA74 2G045/FB03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/AA40 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	2001001517 2001-07-11 FI		
其他公开文献	JP4192092B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种从人体样本中检测酒精消耗的方法。在这种方法中，通过免疫测定在酒精存在下体内形成的磷脂酰醇来检测酒精消耗。此外，本发明涉及可用于该方法并识别磷脂酰醇的抗体，包含该抗体的检测试剂盒，以及产生该抗体的杂交瘤。此外，本发明涉及产生识别磷脂酰醇的抗体的方法，以及通过该方法产生的抗体。该方法包括用掺入脂蛋白的磷脂酰醇免疫免疫活性动物。此外，本发明涉及在各种免疫测定中识别磷脂酰醇的抗体的用途。

(5) Int. Cl. ⁷	F I	ターマコード (参考)
G01N 33/98	GO1N 33/98	2GO45
C07K 16/18	C07K 16/18	4BO64
C12N 5/10	C12P 21/08	4BO65
C12P 21/08	GO1N 33/53	S 4HO45
G01N 33/53	GO1N 33/53	W

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 38 頁) 最終頁に付

(2) 出願番号	特願2003-515859 (P2003-515859)	(7) 出願人	504009745
(6) (2) 出願日	平成14年7月10日 (2002.7.10)		サヴォライネン, マルク
(8) 翻訳文提出日	平成16年1月7日 (2004.1.7)		フィンランド国 エアアイエヌ-905
(8) 国際出願番号	PCT/FI2002/000626		O オウル, ランタクオヴィンティ-
(8) 国際公開番号	WO2003/010539	(7) 出願人	504009756
(8) 国際公開日	平成15年2月6日 (2003.2.6)		ハンヌクセラ, ミンナ
(3) 優先権主張番号	20011517		フィンランド国 エアアイエヌ-905
(3) 優先日	平成13年7月11日 (2001.7.11)		O オウル, サウタヤンティ-
(3) 優先権主張国	フィンランド (FI)	(7) 出願人	504009767
			リーサナンティ, マルヤ
			フィンランド国 エアアイエヌ-908
			O オウル, テールレーリンティ-
			1