



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101087877 B

(45) 授权公告日 2012.08.08

(21) 申请号 200580044615.3  
(22) 申请日 2005.12.27  
(30) 优先权数据  
378598/2004 2004.12.28 JP  
(85) PCT申请进入国家阶段日  
2007.06.25  
(86) PCT申请的申请数据  
PCT/JP2005/023848 2005.12.27  
(87) PCT申请的公布数据  
W02006/070776 JA 2006.07.06  
(73) 专利权人 第一化学药品株式会社  
地址 日本东京  
(72) 发明人 松尾正直 海老沼宏幸 宫崎修  
田中恭子 铃木明子  
(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公  
司 31100  
代理人 徐迅  
(51) Int. Cl.  
*C12N 15/02* (2006.01)

*C07K 16/36* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*G01N 33/53* (2006.01)  
*G01N 33/577* (2006.01)  
*C12P 21/08* (2006.01)

(56) 对比文件  
JP 特开平 8-301900, 1996.11.19, 全文.  
CN 1317976 A, 2001.10.17, 全文.  
CN 1524124 A, 2004.08.25, 全文.  
审查员 丁海

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 3 页

(54) 发明名称  
抗人可溶性血纤蛋白单克隆抗体及使用该抗体的免疫学测定方法

(57) 摘要

本发明涉及特异性识别于通过血纤蛋白原的凝血酶消化生成的可溶性血纤蛋白的 A $\alpha$  链 C 末端区域新产生的结构变化部位的针对可溶性血纤蛋白的单克隆抗体、产生该单克隆抗体的杂交瘤、使用该单克隆抗体的免疫学测定方法以及通过该免疫学测定方法测定被测试样中的可溶性血纤蛋白来评价被测试样的凝血亢进状态的方法。如果采用本发明的单克隆抗体,则可以特异性地测定仅反映初期的凝血亢进、纤溶酶未作用的可溶性血纤蛋白。

1. 针对可溶性血纤蛋白的单克隆抗体,其特征在于,特异性识别于通过血纤蛋白原的凝血酶消化生成的可溶性血纤蛋白的 A $\alpha$  链 C 末端区域新产生的结构变化部位,所述抗体由保藏编号为 FERM BP-10172 的杂交瘤产生。

2. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体,其特征在于,前述识别部位存在于血纤蛋白原经纤溶酶消化而转化为血纤蛋白原 X 时被切离的血纤蛋白原 A $\alpha$  链的 C 末端片段。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体,其特征在于,前述识别部位存在于以血纤蛋白原 A $\alpha$  链的第 425 位氨基酸为 N 末端的分子量约 16KDa 的肽中。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体,其特征在于,前述识别部位存在于具有血纤蛋白原 A $\alpha$  链的第 502-521 位的氨基酸序列的多肽中。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体,其特征在于,可溶性血纤蛋白为血纤蛋白单体或血纤蛋白单体复合物。

6. 如权利要求 3 所述的单克隆抗体,其特征在于,可溶性血纤蛋白为血纤蛋白单体或血纤蛋白单体复合物。

7. 如权利要求 4 所述的单克隆抗体,其特征在于,可溶性血纤蛋白为血纤蛋白单体或血纤蛋白单体复合物。

8. 如权利要求 5 所述的单克隆抗体,其特征在于,血纤蛋白单体复合物为血纤蛋白聚合物、血纤蛋白单体·血纤蛋白原复合物或血纤蛋白单体·FDP 复合物。

9. 如权利要求 6 所述的单克隆抗体,其特征在于,血纤蛋白单体复合物为血纤蛋白聚合物、血纤蛋白单体·血纤蛋白原复合物或血纤蛋白单体·FDP 复合物。

10. 如权利要求 7 所述的单克隆抗体,其特征在于,血纤蛋白单体复合物为血纤蛋白聚合物、血纤蛋白单体·血纤蛋白原复合物或血纤蛋白单体·FDP 复合物。

11. 杂交瘤,其特征在于,所述杂交瘤的保藏编号为 FERM BP-10172,产生权利要求 1~10 中任一项所述的单克隆抗体。

12. 权利要求 1~10 中任一项所述的单克隆抗体在制备用于免疫学测定试样中的可溶性血纤蛋白的试剂中的应用。

13. 可溶性血纤蛋白测定试剂,其特征在于,含有权利要求 1~10 中任一项所述的单克隆抗体。

14. 权利要求 1~10 中任一项所述的单克隆抗体在制备用于评价被测试样的凝血亢进状态的试剂中的应用。

## 抗人可溶性血纤蛋白单克隆抗体及使用该抗体的免疫学测定方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及不与血纤蛋白原反应而特异性识别于通过血纤蛋白原的凝血酶消化生成的可溶性血纤蛋白的 A $\alpha$  链 C 末端区域新产生的结构变化部位的针对可溶性血纤蛋白的单克隆抗体以及使用该抗体的免疫学测定方法,所述单克隆抗体利用若该单克隆抗体的识别部位经纤溶酶消化从可溶性血纤蛋白上切离、则该单克隆抗体与该经纤溶酶消化的可溶性血纤蛋白的反应消失的特性,用于在不受可溶性血纤蛋白纤溶酶分解产物和稳定化血纤蛋白纤溶酶分解产物的影响的情况下特异性地检测可溶性血纤蛋白。本发明还涉及通过该免疫学测定方法测定被测试样中的可溶性血纤蛋白来评价被测试样的凝血亢进状态的方法。

### 背景技术

[0002] 伴随凝血纤溶系统的活化而在血中出现的分子标记的检测对于播散性血管内凝血综合征 (DIC) 的早期诊断和病情的把握是很重要的。其中,作为表征初期的凝血亢进的标记,临床上应用可溶性血纤蛋白单体复合物 (SFMC)。

[0003] 在血管内被活化而生成的凝血酶切断血纤蛋白原的 A $\alpha$  链的 N 末端,将血纤蛋白原变为 desAA 血纤蛋白单体,再切断 B $\beta$  链的 N 末端,生成 desAABB 血纤蛋白单体,生成的血纤蛋白单体与血中的血纤蛋白原等形成复合物,作为 SFMC 在血中循环。已知通过检测该 SFMC,可以早期预测血栓形成。

[0004] 为了检测该 SFMC,目前报告了大量的特异性抗体和免疫学测定方法。例如,G. Soe 等作为识别血纤蛋白与血纤蛋白原结合而成的血纤蛋白·血纤蛋白原复合物形成时在 E 部分产生的结构变化的单克隆抗体,报告了 IF-43 抗体。IF-43 抗体的表位存在于 A $\alpha$  链的 N 末端侧的链 17-78 的氨基酸序列。IF-43 抗体具有在不与由血纤蛋白原、血纤蛋白单体、凝血酶产生的血纤蛋白原分解产物和血纤蛋白分解产物作用的情况下反映凝血系统的特征 (专利文献 1 和非专利文献 1)。

[0005] 然而,已知使用 IF-43 抗体的可溶性血纤蛋白测定用试剂 (IATRO SF, Iatron 公司制) 也作用于血纤蛋白单体的纤溶酶分解产物 (血纤蛋白片段 X、Y 和 E) 与血纤蛋白原的反应生成复合物和血纤蛋白单体的纤溶酶分解产物与血纤蛋白原的纤溶酶分解产物 (片段 X、Y 或 D) 的反应生成复合物 (专利文献 2)。如上所述,IF-43 抗体也作用于纤溶酶作用了的可溶性血纤蛋白,所以很难说是仅纯粹地反映凝血系统的抗体。

[0006] 还报告了识别血纤蛋白原 A $\alpha$  链被凝血酶切断而得的 N 末端的氨基酸序列的抗体。U. SCHEEFERS-BORCHEL 等将与血纤蛋白的 N 末端的氨基酸序列同样的合成六肽 (GPRVVE) 进行免疫,制成了针对可溶性血纤蛋白特异性的抗体 (非专利文献 2)。另一方面,A. Hamano 等将血纤蛋白原经巴曲酶 (Batroxobin) 处理而得的血纤蛋白单体作为免疫原,得到了针对可溶性血纤蛋白特异性的抗体 (专利文献 3 和非专利文献 3)。

[0007] 然而,因为这些抗体的表位为凝血酶与 A $\alpha$  链作用而生成的 N 末端氨基酸序列部

位,所以被认为作用于血纤蛋白单体的纤溶酶分解产物和它们的复合物以及作为稳定化血纤蛋白的纤溶酶分解产物的 XDP 部分(DY、DXD 等)。因此,反映凝血系统和纤溶系统这两者,不能说是仅纯粹地反映凝血系统的抗体。

[0008] 此外,还报告了与由血纤蛋白原的 A $\alpha$  链的链 148-161 的氨基酸序列构成的肽反应的单克隆抗体(专利文献 4)。该抗体的识别部位不存在于被纤溶酶消化的 A $\alpha$  链 C 末端侧,所以被认为与可溶性血纤蛋白的纤溶酶分解产物和稳定化血纤蛋白的纤溶酶分解产物反应,很难说是仅纯粹地反映凝血系统的抗体。

[0009] 如上所述,针对于由凝血系统的亢进生成的可溶性血纤蛋白的以往的抗体大多同时识别由纤溶系统的作用而产生的可溶性血纤蛋白的纤溶酶分解产物和稳定化血纤蛋白的纤溶酶分解产物,还未发现特异性识别纤溶酶未作用的可溶性血纤蛋白的抗体,纯粹地反映凝血系统的测定方法也未有报告。

[0010] 专利文献 1:国际公开第 95/012617 号文本

[0011] 专利文献 2:日本专利特开 2004-53359 公报

[0012] 专利文献 3:国际公开第 98/59047 号文本

[0013] 专利文献 4:日本专利特开平 2-028197 公报

[0014] 非专利文献 1:G. Soe 等, Blood. 88, 2109-2117, 1996.

[0015] 非专利文献 2:U. SCHEEFERS-BORCHEL 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 7091-7095, 1985.

[0016] 非专利文献 3:A. Hamano 等, Clinica Chimica Acta. 318, 25-32, 2002.

[0017] 发明的揭示

[0018] 因此,本发明的目的在于提供可以仅特异性地测定反映初期的凝血亢进、纤溶酶未作用的可溶性血纤蛋白的单克隆抗体,可产生该单克隆抗体的杂交瘤,使用该单克隆抗体的可溶性血纤蛋白的免疫学测定方法,以及通过该免疫学测定方法测定被测试样中的可溶性血纤蛋白来评价被测试样的凝血亢进状态的方法。

[0019] 本发明人为了解决上述课题而认真研究后,发现了特异性识别于通过血纤蛋白原的凝血酶消化生成的可溶性血纤蛋白的 A $\alpha$  链 C 末端区域新产生的结构变化部位的针对可溶性血纤蛋白的单克隆抗体,若可溶性血纤蛋白被纤溶酶消化,则该抗体的识别部位被切离,从而该抗体的作用消失。此外,发现如果使用该抗体,则可以特异性地测定血浆中的纤溶酶未作用的可溶性血纤蛋白,从而完成了本发明。

[0020] 即,本发明提供针对可溶性血纤蛋白的单克隆抗体,所述抗体特异性识别于通过血纤蛋白原的凝血酶消化生成的可溶性血纤蛋白的 A $\alpha$  链 C 末端区域新产生的结构变化部位,如果可溶性血纤蛋白被纤溶酶消化则该部位被切离。

[0021] 此外,本发明提供产生上述单克隆抗体的杂交瘤。

[0022] 此外,本发明提供试样中的可溶性血纤蛋白的免疫学测定方法,其特征在于,使上述单克隆抗体与被测试样反应。

[0023] 此外,本发明提供含有上述单克隆抗体的可溶性血纤蛋白测定试剂。

[0024] 另外,本发明提供通过上述免疫学测定方法测定被测试样中的可溶性血纤蛋白,从而评价被测试样的凝血亢进状态的方法。

[0025] 如果采用本发明的单克隆抗体,则可以在不识别可溶性血纤蛋白的纤溶酶分解产

物和稳定化血纤蛋白的纤溶酶分解产物的情况下,特异性识别纤溶酶未作用的可溶性血纤蛋白。因此,通过使用本发明的单克隆抗体,可以高灵敏度且迅速地对凝血形成的初期阶段进行测定。

[0026] 附图的简单说明

[0027] 图 1 为实施例 3 中实施的对于 J2-23 抗体对在还原条件下经处理的血纤蛋白原的反应性的分析的图(A:CBB 染色, B:蛋白质印迹)。

[0028] 图 2 为实施例 4 中实施的对于 J2-23 抗体对经纤溶酶消化的血纤蛋白原的各消化片段的反应性采用蛋白质印迹法进行分析,对于反应的消化片段通过 CBB 进行了蛋白质染色的电泳图。

[0029] 图 3 为表示 6 种合成肽和本发明单克隆抗体的竞争性抑制的图。

[0030] 图 4 为实施例 6 中实施分析而得到的表示可溶性血纤蛋白和 LTIA 试剂的反应性的图。

[0031] 实施发明的最佳方式

[0032] 本说明书中,“可溶性血纤蛋白”是指血纤蛋白单体(desAA 血纤蛋白单体和 desAABB 血纤蛋白单体)以及血纤蛋白单体复合物(血纤蛋白聚合物、血纤蛋白单体·血纤蛋白原复合物、血纤蛋白单体·FDP 复合物以及血纤蛋白单体与其它生物体中的蛋白质的复合物)。

[0033] 本发明的单克隆抗体所具有的特征为,作用于上述可溶性血纤蛋白,而不作用于血纤蛋白原、血纤蛋白单体的纤溶酶分解产物和稳定化血纤蛋白的纤溶酶分解产物。

[0034] 此外,本发明的单克隆抗体的表位存在于在通过血纤蛋白原的凝血酶消化生成的可溶性血纤蛋白的 A $\alpha$  链 C 末端区域新产生的结构变化部位,该部位通过可溶性血纤蛋白的纤溶酶消化而被切离。对于经纤溶酶消化的可溶性血纤蛋白,单克隆抗体的识别作用消失。具体来说,该表位存在于在血纤蛋白原经纤溶酶消化后生成的片段中位于血纤蛋白原 A $\alpha$  链上的 C 末端片段的以 A $\alpha$  链的第 425 位的氨基酸为 N 末端的分子量约 16KDa 的消化片段肽中。

[0035] 更具体来说,该表位存在于该具有血纤蛋白原 A $\alpha$  链的第 502-521 位的氨基酸序列的多肽中。本发明的单克隆抗体只要识别该具有血纤蛋白原 A $\alpha$  链的第 502-521 位的氨基酸序列的多肽即可,没有特别限定。

[0036] 如上所述,目前未发现不与血纤蛋白本身反应、表位存在于在通过血纤蛋白原的凝血酶消化生成的可溶性血纤蛋白的 A $\alpha$  链 C 末端区域新产生的结构变化部位且该部位通过可溶性血纤蛋白的纤溶酶消化而被切离的单克隆抗体,本发明的单克隆抗体是新的。虽然对于可溶性血纤蛋白的 A $\alpha$  的 C 末端部位的结构变化,目前没有明确的报告,但根据 Y. I. Veklich 等的报告(J Bio Chem, 1993 ;268, 13577-13585),被纤溶酶从 A $\alpha$  链切离的片段为以 A $\alpha$  链的氨基酸序列第 220 位为 N 末端的分子量 40Kda 的消化片段。由此可知,本发明的单克隆抗体的识别部位包含于被纤溶酶切离的片段。此外,该报告中,血纤蛋白的存在形态通过电子显微镜被揭示。存在 2 条的血纤蛋白原的 A $\alpha$  的 C 末端区域在中性条件下结合于中央的 E 结构域,如果血纤肽经凝血酶消化而被切断,则结合于 E 结构域的 A $\alpha$  链的 C 末端区域解离。由于该解离产生 A $\alpha$  链的 C 末端区域的结构变化,本发明的单克隆抗体特异性识别该结构变化部位。

[0037] 本发明的单克隆抗体可以如下进行制作。

[0038] 作为所用的免疫原,较好是生成的血纤蛋白单体或可溶性血纤蛋白,也可以使用仅受到了凝血酶作用(未受到纤溶酶作用)的血纤蛋白原或经巴曲酶处理的血纤蛋白原等。血纤蛋白单体可以按照例如 U. SCHEEFERS-BORCHEL 等的方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 7091-7095, 1985.] 进行调制。具体来说,desAA 血纤蛋白单体可以通过使巴曲酶与血纤蛋白原溶液作用,用尿素或酸将生成的血纤蛋白凝块可溶化而获得;desAABB 血纤蛋白单体可以通过使凝血酶与血纤蛋白原溶液作用,用尿素或酸将生成的血纤蛋白凝块可溶化而获得。此外,也可以通过在使巴曲酶或凝血酶与血纤蛋白原作用时以非常少的量进行处理,直接使用不生成凝块的条件下的处理液。另外,还可以使用使纤溶酶与血纤蛋白原作用而被切离的 A $\alpha$  链的 C 末端片段,或者可以合成与 A $\alpha$  链的 C 末端片段的一部分同样序列的多肽、较好是前述 502-521 位的多肽,使用该合成肽。

[0039] 对免疫所用的动物没有特别限定,例如可以例举小鼠、大鼠等。免疫可以按照常规手法实施。例如,在动物的皮下、皮内、腹腔等给予使免疫原悬浮于通常的缓冲液或生理盐水中而得的悬浮液或者免疫原与弗氏完全佐剂等佐剂的混合物进行短时刺激后,根据需要反复进行同样的操作。抗原的用量根据投与途径、动物种类适当确定,但通常的用量较好是每次 10  $\mu$ g ~ 1mg 左右。

[0040] 细胞融合所用的免疫细胞较好是最后一次免疫的 3 ~ 4 天后摘出的脾脏细胞。此外,作为与前述免疫细胞融合的骨髓瘤细胞,较好是已经确立的公知的各种细胞株,例如可以例举小鼠中的 NS1 (P3/NS1/I-Ag4-1) [Eur. j. Immunol. 6 :511-519(1976)]、SP2/0-Ag14 [《自然》,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 [《自然》,277 :131-133(1979)]、YB2/0(YB2/3HL/P2. G11. 16Ag. 20) [Methods Enzymol. 73B :1(1981)] 等。

[0041] 细胞融合中,可以使用通常所用的聚乙二醇 (PEG)、仙台病毒 (HVJ) 等。细胞融合的手法与常规方法同样,例如在骨髓细胞与相对于骨髓细胞约 1 ~ 10 倍的免疫细胞的混合细胞团中以 30 ~ 60% 的浓度滴入平均分子量 1000 ~ 6000 的聚乙二醇,进行混合。杂交瘤的选择使用常规的选择培养基,例如 HAT 培养基(含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基)。使用以 HAT 培养基培养得到的杂交瘤,通过常规的极限稀释法进行作为目标的抗体产生株的筛选和单克隆化即可。

[0042] 作为目标的抗体产生株可以通过以例如 ELISA 法、RIA 法等选择产生与未受纤溶酶的作用的可溶性血纤蛋白特异性反应而不与血纤蛋白原、血纤蛋白单体的纤溶酶分解产物和稳定化血纤蛋白的纤溶酶分解产物反应的抗体的杂交瘤而获得。

[0043] 具体来说,先将培养上清中的单克隆抗体通过抗小鼠 IgG 抗体等固定化,使含有可溶性血纤蛋白和血纤蛋白原的试样与之反应。接着,使以酶等标记了的抗血纤蛋白原抗体与之反应,选择仅与可溶性血纤蛋白反应且不与血纤蛋白原反应的单克隆抗体。然后,选择不与作为纤溶酶分解产物的血纤蛋白片段 X、Y 或 E 和稳定化血纤蛋白分解产物 (XDP) 反应的单克隆抗体。由此,制成表位存在于被纤溶酶切离的片段的单克隆抗体即可。

[0044] 该单克隆抗体可以通过按照常法培养杂交瘤后从培养上清分离的方法、将前述杂交瘤投与到对其具有适应性的哺乳类动物中后以腹水形式回收的方法来制造。

[0045] 通过在以往任意的免疫学测定方法中使用本发明的单克隆抗体,可以特异地测定人体液中未受到纤溶酶的作用的可溶性血纤蛋白。

[0046] 例如,在以 ELISA 法测定的情况下,可以将经纯化的可溶性血纤蛋白作为标准品通过如下的方法对可溶性血纤蛋白进行定量。即,可以在固定了本发明的单克隆抗体的 ELISA 板上添加经稀释的试样使其反应后,使酶标了的抗血纤蛋白原多克隆抗体与之反应,根据显色后的吸光度变化对存在于试样中的未受到纤溶酶的作用的可溶性血纤蛋白进行特异性的定量。以 LTIA 测定的情况下,可以将经纯化的可溶性血纤蛋白作为标准品通过如下的方法对可溶性血纤蛋白进行定量。即,通过使本发明的单克隆抗体的至少 1 种于作为不溶性载体的胶乳粒子上敏化,使其与试样接触,抗体敏化胶乳粒子之间通过试样中的可溶性血纤蛋白交联而产生凝集,因此可以根据该凝集度的变化对该可溶性血纤蛋白进行特异性的定量。作为试样,只要是含有可溶性血纤蛋白的人体液即可,没有特别限定,例如可以例举血液、尿等。

[0047] 作为 LTIA 法等中的抗体敏化胶乳粒子的胶乳粒子,只要是在利用胶乳凝集反应的免疫学凝集反应和抗凝反应中通常所用的微粒载体即可,没有特别限定,较好是可在工业领域大量生产的有机类微粒。作为这样的有机类微粒,例如可以例举苯乙烯、氯乙烯、丙烯腈、乙酸乙烯酯、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯等乙烯基类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类共聚物等。此外,可优选使用在这样的有机类微粒上结合了羧基、伯氨基、氨基甲酰基、羟基、醛基等官能团的反应性有机类微粒。上述的胶乳粒子中,从抗原或抗体的吸附性良好、可长期稳定地保持生物学活性的角度考虑,较好是聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物等聚苯乙烯类胶乳粒子。

[0048] 对胶乳粒子的形状没有特别限定,但其平均粒径较好是胶乳粒子表面的蛋白质与测定对象物质的凝集反应而产生凝集体足以通过肉眼或光学方法检出的大小。平均粒径较好是  $0.02 \sim 1.6 \mu\text{m}$ ,特别好是  $0.03 \sim 0.5 \mu\text{m}$ 。

[0049] 作为于胶乳粒子上敏化本发明的单克隆抗体的方法,没有特别限定,可以使用公知的方法。例如,可以例举使其物理吸附于胶乳粒子表面的方法,于具有官能团的胶乳粒子表面通过共价键、免疫结合进行敏化的方法等。

[0050] 本发明的可溶性血纤蛋白测定试剂中,除了敏化了本发明的单克隆抗体的胶乳粒子之外,也可以适当添加 BSA、蔗糖等稳定剂或叠氮化钠等防腐剂。还可以在本发明的可溶性血纤蛋白测定试剂中再组合入稀释剂而制成胶乳凝集反应应用试剂盒。该稀释剂中可以根据需要添加上述的稳定剂或防腐剂。

[0051] 实施例

[0052] 以下,例举实施例,对本发明进行具体说明,但本发明的范围并不限于这些实施例。

[0053] 实施例 1 单克隆抗体的调制

[0054] (1) 杂交瘤的调制

[0055] 对溶解于 PBS 的人纯化血纤蛋白原进行巴曲酶处理,将生成的可溶性血纤蛋白作为免疫原。将该免疫原与弗氏完全佐剂 (GIBCO 公司制) 1 比 1 混合乳化,以 1 周的间隔在 6 周龄的雌 BALB/C 小鼠的皮下给予  $0.1\text{mg}/0.1\text{mL}$  的乳液 6 次后,在最后一次免疫的 3 天后摘出脾脏。将由摘出的脾脏得到的脾脏细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0-Ag14 以 6 比 1 的比例混

合,在 50% 聚乙二醇 1540 (和光纯药工业公司制) 的存在下进行细胞融合。细胞融合中,作为脾脏细胞以  $2.5 \times 10^6$ /mL 的浓度悬浮于 HAT 培养基,在 96 孔培养板 (CORNING 公司制) 中分别每孔注入 0.2mL。将其在 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中于 37°C 进行培养,大约 2 周后,对于产生了杂交瘤的孔的培养上清按照如下的 ELISA 法筛选有可能产生针对可溶性血纤蛋白的抗体的株。

[0056] 首先,将各培养上清中的 IgG 通过山羊抗小鼠 IgG (Fc) 抗体 (JACKSON 公司制) 固相化于微孔板 (NUNC 公司制) 上。使可溶性血纤蛋白和血纤蛋白原,血纤蛋白 X、Y、E,稳定化血纤蛋白分解产物 (XDP) 与其反应。然后,使过氧化物酶标记的抗血纤蛋白原兔多克隆抗体 (DAKO 公司制) 与之反应后,加入含邻苯二胺 (东京化成公司制) 的过氧化物酶底物溶液使之显色,加入 1.5N 硫酸停止显色后,通过微量板阅读仪 (Microplate Reader) (吸光度 492nm) 进行测定,选择对可溶性血纤蛋白表现出高反应性而未对血纤蛋白原、血纤蛋白 X、Y、E 和稳定化血纤蛋白分解产物 (XDP) 表现出反应性的株。将该杂交瘤进行采用极限稀释法的克隆,确立了 1 种抗可溶性血纤蛋白单克隆抗体产生杂交瘤 (J2-23)。该杂交瘤以 FERM BP-10172 的保藏编号于 2004 年 12 月 3 日被保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心 (〒305-8566 日本茨城县筑波市东 1-1-1 中央第 6)。另外,以下的记载中,将由杂交瘤 (J2-23) 分泌的抗可溶性血纤蛋白单克隆抗体称为 J2-23 抗体。

[0057] (2) 单克隆抗体的调制

[0058] 对 2 周前预先在腹腔内注射了 0.5mL 降植烷的 12 周龄的雌 BALB/C 小鼠向腹腔内以细胞数  $0.5 \times 10^6$  个的量投与以上得到的杂交瘤。约 14 天后采取腹水,离心处理而得到上清。将上清与等量的吸附用缓冲液 (3mol/L NaCl-1.5mol/L 甘氨酸-NaOH, pH8.5) 混合后,进行过滤。将该滤液通过用吸附用缓冲液平衡了的蛋白质 A 柱 (Pharmacia 公司制) 而使抗体吸附于柱后,用 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH3.0) 从柱上洗脱,纯化抗可溶性血纤蛋白单克隆抗体 (J2-23 抗体)。

[0059] 实施例 2 抗可溶性血纤蛋白单克隆抗体 (J2-23 抗体) 的免疫球蛋白类型和特异性的鉴定 (1)

[0060] 通过 ELISA 法 (ZYMED 公司制) 鉴定了 J2-23 抗体的免疫球蛋白类型,结果为 IgG1、 $\kappa$  轻链。

[0061] 将 J2-23 抗体用 PBS 调整至  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度后,以  $50 \mu\text{L}/$  孔加入到 96 孔 ELISA 板 (NUNC 公司制) 中,在 4°C 孵育一夜。将板用 PBS 清洗 3 次后,以  $100 \mu\text{L}/$  孔加入封闭液 (含 1% BSA 的 PBS),封闭 1 小时。去除封闭液后,以  $50 \mu\text{L}/$  孔加入用封闭液稀释了的表 1 所示的各种抗原,在室温下孵育 1 小时。用封闭液清洗 3 次后,加入过氧化物酶标记的抗血纤蛋白原兔多克隆抗体,在室温下孵育 1 小时。再用封闭液清洗 3 次后,以  $50 \mu\text{L}/$  孔加入实施例 1 的过氧化物酶底物溶液。10 分钟后,以  $50 \mu\text{L}/$  孔加入 1.5N 硫酸,测定 492nm 处的吸光度。

[0062] 表 1 中,血纤蛋白原 (以下也记作 Fbg) 是将 Sigma 公司制的纯化品通过凝胶过滤法进一步纯化后使用。desAA 血纤蛋白单体 (以下也记作 desAAFbn) 和 desAABB 血纤蛋白单体 (以下也记作 desAABBFbn) 是将使巴曲酶或凝血酶分别与经纯化的 Fbg 作用后生成的凝块用酸可溶化而调制。另外,desAAFbn-Fbg 复合物和 desAABBFbn-Fbg 复合物是将酸可溶化 desAAFbn 和 desAABBFbn 分别添加到 Fbg 溶液中,将通过复合物形成而高分子化的部分

以凝胶过滤法分离而调制。Fbg 片段 X 和 Y 都使用市售品（国际バイオ公司）。血纤蛋白片段 X 和 Y 是将前述 Fbg 片段 X 和 Y 进行凝血酶处理而制成血纤蛋白片段 X 和 Y。Fbg 片段 E、血纤蛋白片段 E、D 二聚物 (DD) 和 D 单体 (D) 使用市售品（国际バイオ公司）。含 DD/E 的 XDP 部分是使纤溶酶作用于血纤蛋白块，将消化产物以凝胶过滤分离后，将高分子部分作为 XDP 部分。

[0063] 结果示于表 1。表 1 中，“+”表示通过夹心式 ELISA 法反应，“-”表示未反应。

[0064] [表 1]

[0065]

抗原	J2-23 抗体
血纤蛋白原	-
desAA 血纤蛋白单体	+
desAA 血纤蛋白 - 血纤蛋白原复合物	+
DesAABB 血纤蛋白单体	+
DesAABB 血纤蛋白 - 血纤蛋白原复合物	+
血纤蛋白原片段 X	-
血纤蛋白片段 X	-
血纤蛋白原片段 Y	-
血纤蛋白片段 Y	-
血纤蛋白原片段 E	-
血纤蛋白片段 E	-
含 DD/E 的 XDP 部分	-
DD	-
D	-

[0066] 由表 1 可知，本发明的单克隆抗体 (J2-23 抗体) 对于各种液相的抗原，与 desAAFbn、desAAFbn-Fbg 复合物、desAABBFbn 和 desAABBFbn-Fbg 复合物反应，与未处理的 Fbg、纤溶酶的血纤蛋白原分解产物 (FbgDP，即血纤蛋白原片段 X、血纤蛋白原 Y、血纤蛋白原 E 和 D) 及血纤蛋白分解产物 (FbnDP，即血纤蛋白片段 X、血纤蛋白片段 Y、血纤蛋白片段 E、含 DD/E 的 XDP 部分、DD) 不反应。

[0067] 实施例 3 抗可溶性血纤蛋白单克隆抗体 (J2-23 抗体) 的特异性的鉴定 (2)

[0068] 将实施例 2 中评价的各种抗原在非还原条件下 SDS-PAGE 分离后，转印到 PVDF 膜

上,用含 3%脱脂乳的 PBST(含 0.05% Tween20 的 PBS) 封闭 1 小时后,使作为一级抗体的单克隆抗体(J2-23 抗体)、作为二级抗体的过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 抗体(Biosource international 公司制)与之反应。将 PVDF 膜用 PBST 清洗后,加入二氨基联苯胺作为底物,使其显色。其结果为,确认除 desAAFbn 和 desAABBFbn 以外,也与 Fbg 反应,未发现与各种 FbgDP 反应。另外,将 Fbg 在还原条件下处理,实施了同样的操作,结果发现与 A $\alpha$  链有强烈反应(图 1)。

[0069] 由以上的结果可知,本发明的单克隆抗体(J2-23 抗体)的表位不出现在于液相中的未变性的 Fbg 中,通过使 Fbg 变性,出现在 Fbg 的 A $\alpha$  链上。因为 J2-23 抗体不与各种 FbgDP 反应,所以判明该部位存在于纤溶酶作用于可溶性血纤蛋白后被切离的片段上。

[0070] 实施例 4 抗可溶性血纤蛋白单克隆抗体(J2-23 抗体)的表位分析(1)

[0071] 以实施例 3 中得到的发现为基础,通过如下的方法分析 A $\alpha$  链上的表位位置。在将纯化 Fbg 用 10mmol/L Tris 缓冲液(pH8.0)以 10mg/mL 溶解得到的溶液中以 0.2 单位/mL 的最终浓度添加纤溶酶(クロモジエニツクス公司制),在 37 $^{\circ}$ C 使其消化 30 分钟。然后,以 500 单位/mL 的最终浓度加入抑肽酶(三菱ウエルファーマ公司制),使纤溶酶失活。将该消化液进行还原处理后,以 SDS-PAGE 15-25% 进行分离后,转印到 PVDF 膜上,进行 CBB 染色,并且与上述实施例 3 同样地使用本发明的单克隆抗体(J2-23 抗体)进行免疫印迹分析。

[0072] 其结果为,确认约 16kDa 的与 J2-23 抗体反应的消化片段(图 2 的箭头的条带)。切出被 CBB 染色的该消化片段,考察 N 末端氨基酸序列,结果为以 Fbg A $\alpha$  链的第 425 位为 N 末端的序列(TGKEKVTS)。

[0073] 该序列在 Fbg 通过纤溶酶消化变化为 Fbg-X 时位于被切离的片段中,所以判明本发明的单克隆抗体的表位在 Fbg 的 A $\alpha$  链上,而且存在于被纤溶酶消化而切离的 A $\alpha$  链的 C 末端区域。另外,判明本发明的抗体的表位存在于该纤溶酶消化片段内 A $\alpha$  链的第 425 位以后。对纤溶酶消化 A $\alpha$  链 C 末端片段表现出反应性的针对可溶性血纤蛋白的抗体是以往不为人知的新抗体。

[0074] 实施例 5 抗可溶性血纤蛋白单克隆抗体(J2-23 抗体)的表位分析(2)

[0075] 以实施例 4 中得到的发现为基础,通过如下的方法进一步分析 A $\alpha$  链上的表位位置。

[0076] 基于 Doolittle 等的方法(《生物化学》1997,16:1703),从 Fbg 分离纯化 A $\alpha$  链。将纯化 A $\alpha$  链用内切蛋白酶 Asp-N(Sigma 公司制)消化后,与实施例 4 同样地进行免疫印迹分析。

[0077] 其结果为,在 7~8kDa 确认消化片段,考察了该消化片段的 N 末端氨基酸序列,结果为以 Fbg A $\alpha$  链的第 502 位为 N 末端的序列(DTAST)。由该消化片段的分子量和 Asp-N 的剪切部位位于天门冬氨酸的氨基侧这一点进行推测,推测为第 502~573 位的肽。

[0078] 接着,从第 502 开始合成 6 种相当于上述消化片段的氨基酸序列的肽(AA502-521、AA512-531、AA522-541、AA532-551、AA542-561、AA552-571),通过如下的方法进一步确定本发明的单克隆抗体(J2-23 抗体)的表位。

[0079] 首先,将山羊抗小鼠 IgG(Fc) 抗体用 PBS 调整至 5 $\mu$ g/mL 的浓度后,以 50 $\mu$ L/孔加入微孔板中,在 4 $^{\circ}$ C 孵育一夜。将板用 PBST(含 0.05% 的 Tween20 的 PBS) 清洗 3 次后,以

100  $\mu$  L/孔加入封闭液 (BSA-PBST), 在室温下孵育 1 小时。用 PBST 清洗 3 次后, 将本发明的单克隆抗体 (J2-23 抗体) 用 BSA-PBST 调整至 0.2  $\mu$  g/mL 的浓度, 以 50  $\mu$  L/孔加入, 在室温下孵育 1 小时。用 PBST 清洗 3 次后, 以 25  $\mu$  L/孔加入用 BSA-PBST 稀释至 0 ~ 100  $\mu$  g/mL 的各合成肽, 在室温下孵育 30 分钟。接着, 将后述实施例 6 中调制的可溶性血纤蛋白用 BSA-PBST 调整至 1  $\mu$  g/mL 后, 以 25  $\mu$  L/孔加入, 在室温下孵育 1 小时。用 PBST 清洗 3 次后, 以 50  $\mu$  L/孔加入用 BSA-PBST 稀释至 5000 倍的 HRP-兔抗人血纤蛋白原抗体 (DAKO 公司制), 在室温下孵育 1 小时。用 PBST 清洗 3 次后, 以 50  $\mu$  L/孔加入实施例 1 的过氧化物酶底物溶液。10 分钟后, 以 50  $\mu$  L/孔加入 1.5N 硫酸, 测定 492nm 处的吸光度。

[0080] 其结果示于图 3。6 种合成肽中, 仅 AA502-521 确认竞争性抑制反应, 所以确认本发明的单克隆抗体 (J2-23 抗体) 的表位识别 Fbg 的 A $\alpha$  链的第 502 ~ 521 位的氨基酸序列。这表示凝血酶与 Fbg 作用后生成的可溶性血纤蛋白的 A $\alpha$  链 C 末端区域至少第 502 ~ 521 位附近的结构发生变化, 可以说本发明的单克隆抗体 (J2-23 抗体) 是特异性识别该结构变化的对于可溶性血纤蛋白特异的抗体。

[0081] 实施例 6 使用胶乳凝集反应 (LTIA) 的可溶性血纤蛋白的测定

[0082] (1) 抗体敏化胶乳的调制

[0083] 将单克隆抗体 (J2-23 抗体) 用 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 稀释至 0.7mg/mL 而得的抗体液与 1% 胶乳溶液 (粒径 0.2  $\mu$  m, 积水化学工业公司制) 等量混合, 在 4 $^{\circ}$ C 搅拌约 2 小时。然后, 加入等量的 1% BSA, 搅拌 1 小时后, 进行离心 (100000 $\times$ g, 5 分钟) 处理。将沉淀的胶乳用含 0.5% BSA 的 5mmol/L MOPS (pH7.0) 悬浮, 得到抗体敏化胶乳。

[0084] (2) 可溶性血纤蛋白的调制

[0085] 与实施例 2 同样地, 调制酸可溶性 desAAFbn 或 desAABBFbn, 分别在人柠檬酸血浆中以 0 ~ 50  $\mu$  g/mL 的最终浓度进行添加, 将所得的混合物作为可溶性血纤蛋白。

[0086] (3) 可溶性血纤蛋白的测定

[0087] 调制含 0.4% BSA 和 0.5mol/L 氯化钠的 30mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.5) (第 1 试剂), 使用以上调制的抗体敏化胶乳 (第 2 试剂), 通过生物化学自动分析装置日立 7170 型进行测定。在自动分析装置内的 37 $^{\circ}$ C 的反应池内添加 3  $\mu$  L 以上调制的可溶性血纤蛋白和 100  $\mu$  L 第 1 试剂, 添加第 1 试剂 5 分钟后, 添加 100  $\mu$  L 第 2 试剂, 进行抗原抗体反应 5 分钟。接着, 以 570nm 的主波长和 800nm 的副波长测定点 (point) 18 ~ 34 之间的反应前后的吸光度变化 (图 4)。确认了对应于添加的 desAAFbn 或 desAABBFbn 的浓度的吸光度变化, 所以确认通过使用本发明的单克隆抗体, 能够测定血中的可溶性血纤蛋白的量。

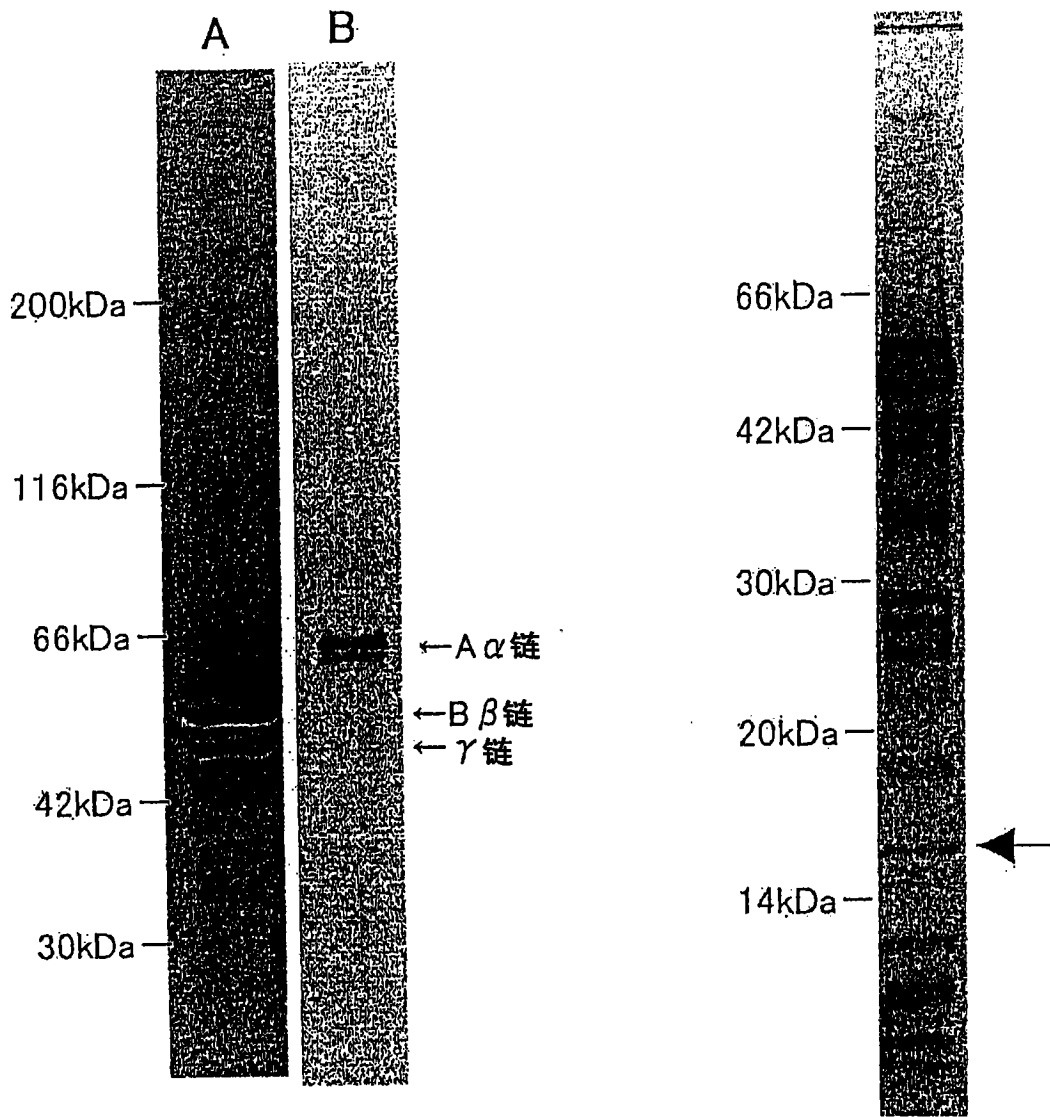


图 1

图 2

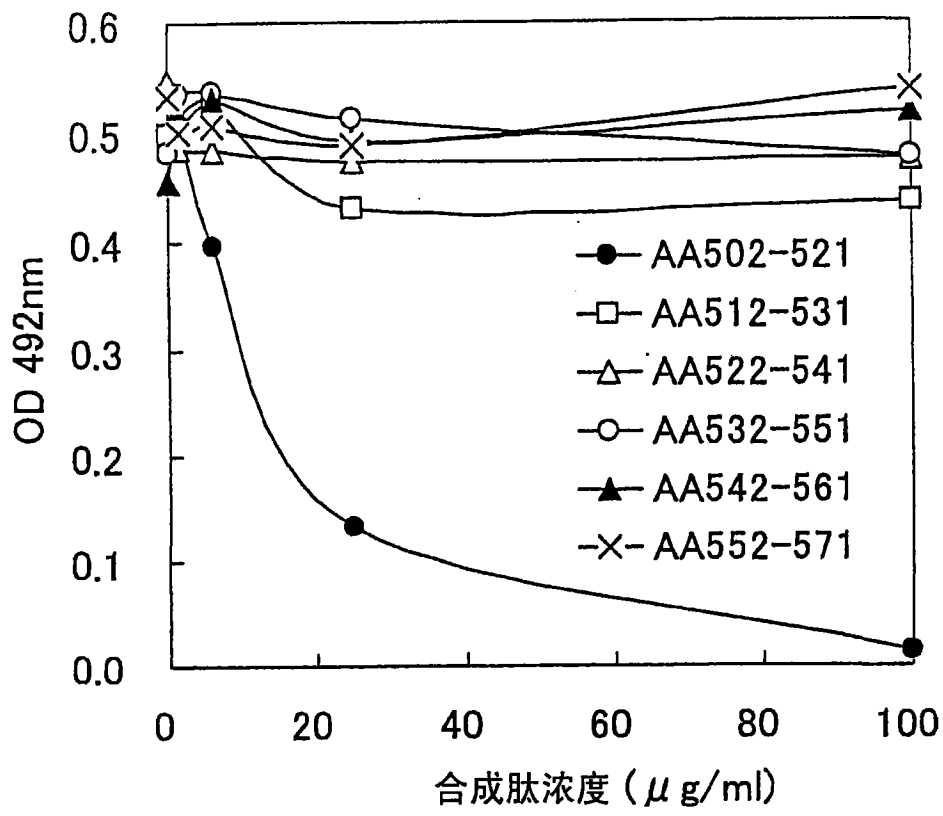


图 3

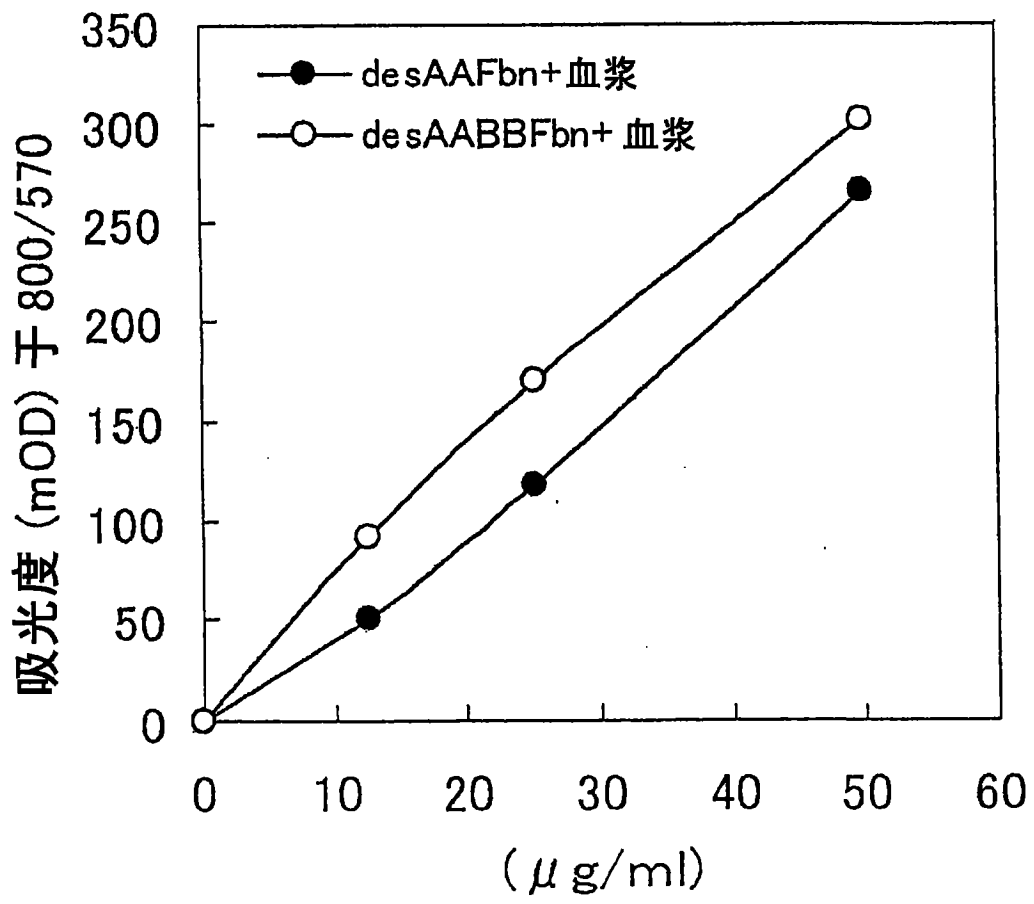


图 4

专利名称(译)	抗人可溶性血纤蛋白单克隆抗体及使用该抗体的免疫学测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101087877B</a>	公开(公告)日	2012-08-08
申请号	CN200580044615.3	申请日	2005-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	第一化学药品株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	第一化学药品株式会社		
[标]发明人	松尾正直 海老沼宏幸 宫崎修 田中恭子 铃木明子		
发明人	松尾正直 海老沼宏幸 宫崎修 田中恭子 铃木明子		
IPC分类号	C12N15/02 C07K16/36 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/18 G01N2800/224 G01N33/86 C07K14/745 C07K14/75 G01N2333/75		
代理人(译)	徐迅		
审查员(译)	丁海		
优先权	2004378598 2004-12-28 JP		
其他公开文献	CN101087877A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及特异性识别于通过血纤蛋白原的凝血酶消化生成的可溶性血纤蛋白的A $\alpha$ 链C末端区域新产生的结构变化部位的针对可溶性血纤蛋白的单克隆抗体、产生该单克隆抗体的杂交瘤、使用该单克隆抗体的免疫学测定方法以及通过该免疫学测定方法测定被测试样中的可溶性血纤蛋白来评价被测试样的凝血亢进状态的方法。如果采用本发明的单克隆抗体，则可以特异性地测定仅反映初期的凝血亢进、纤溶酶未作用的可溶性血纤蛋白。

