



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02817577.8

[43] 公开日 2004 年 12 月 8 日

[11] 公开号 CN 1554024A

[22] 申请日 2002.7.12 [21] 申请号 02817577.8
 [30] 优先权
 [32] 2001. 7.12 [33] JP [31] 212522/2001
 [86] 国际申请 PCT/JP2002/007116 2002.7.12
 [87] 国际公布 WO2003/006989 日 2003.1.23
 [85] 进入国家阶段日期 2004.3.9
 [71] 申请人 协和美帝克斯股份有限公司
 地址 日本东京都
 [72] 发明人 河野弘明 柳泽卓 益成利幸

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 代理人 孟凡宏

权利要求书 3 页 说明书 44 页 序列表 5 页
 附图 12 页

[54] 发明名称 变性脂蛋白的定量方法、变性脂蛋白的定量用试剂、循环系统疾病的检测方法以及循环系统疾病的检测试剂

[57] 摘要

本发明提供生物体试样中变性脂蛋白的定量方法，其特征在于使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量；循环系统疾病的检测方法，其特征在于使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量；含有抗磷酸胆碱抗体的变性脂蛋白定量用试剂和含有抗磷酸胆碱抗体的循环系统疾病检测试剂。

ISSN 1008-4274

1. 生物体试样中变性脂蛋白的定量方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

5 2. 生物体试样中变性脂蛋白的定量方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

10 3. 生物体试样中变性低密度脂蛋白的定量方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗低密度脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

4. 权利要求3的方法，其中所述与低密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基B蛋白抗体。

15 5. 生物体试样中变性高密度脂蛋白的定量方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗高密度脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

6. 权利要求5的方法，其中所述与高密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基A蛋白抗体。

20 7. 生物体试样中脂蛋白(a)的定量方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗脱辅基蛋白质(a)抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

8. 生物体试样中变性高密度脂蛋白和变性低密度脂蛋白的定量方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体、抗高密度脂蛋白抗体和抗低密度脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

25 9. 权利要求8的方法，其中所述与高密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基A蛋白抗体。

10. 权利要求8的方法，其中所述与低密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基B蛋白抗体。

11. 循环系统疾病的检测方法，其特征在于：使生物体试样与抗

磷酸胆碱抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

12. 循环系统疾病的检测方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

13. 循环系统疾病的检测方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗低密度脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述与低密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基 B 蛋白抗体。

15. 循环系统疾病的检测方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗高密度脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述与高密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基 A 蛋白抗体。

17. 循环系统疾病的检测方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗脱辅基蛋白质(a)抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

18. 血管疾病的检测方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体、抗高密度脂蛋白抗体和抗低密度脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述与高密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基 A 蛋白抗体。

20. 权利要求 18 的方法，其中所述与低密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基 B 蛋白抗体。

21. 变性脂蛋白定量用试剂，该试剂含有抗磷酸胆碱抗体。

22. 变性脂蛋白定量用试剂，该试剂含有抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体。

23. 权利要求 22 的试剂，其中所述抗脂蛋白抗体选自抗脱辅基 B 蛋白抗体、抗脱辅基 A 蛋白抗体和抗脱辅基蛋白质(a)抗体。

24. 权利要求 21-23 中任一项的试剂, 该试剂含有冷冻保护剂。
25. 变性脂蛋白定量用试剂盒, 该试剂盒含有抗磷酸胆碱抗体。
26. 变性脂蛋白定量用试剂盒, 该试剂盒含有抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体。
- 5 27. 权利要求 23 的试剂盒, 其中所述抗脂蛋白抗体选自抗脱辅基 B 蛋白抗体、抗脱辅基 A 蛋白抗体和抗脱辅基蛋白质(a)抗体。
28. 权利要求 25-27 中任一项的变性脂蛋白定量用试剂盒, 该试剂盒含有冷冻保护剂。
29. 循环系统疾病检测试剂, 该试剂含有抗磷酸胆碱抗体。
- 10 30. 循环系统疾病检测试剂, 该试剂含有抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体。
31. 权利要求 30 的检测试剂, 其中所述抗脂蛋白抗体选自抗脱辅基 B 蛋白抗体、抗脱辅基 A 蛋白抗体和抗脱辅基蛋白质(a)抗体。
32. 循环系统疾病检测用试剂盒, 该试剂盒含有抗磷酸胆碱抗体。
- 15 33. 循环系统疾病检测用试剂盒, 该试剂盒含有抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体。
34. 权利要求 33 的试剂盒, 其中所述抗脂蛋白抗体选自抗脱辅基 B 蛋白抗体、抗脱辅基 A 抗体和抗脱辅基蛋白质(a)抗体。
35. 权利要求 32-34 中任一项的循环系统疾病检测用试剂盒, 该
- 20 试剂盒含有冷冻保护剂。
36. 用于生物体试样的冷冻保护剂, 该试剂含有选自糖类、高分子物质和亲水性有机溶剂的化合物作为有效成分。

变性脂蛋白的定量方法、变性脂蛋白的定量用试剂、循环系统疾病的检测方法以及循环系统疾病的检测试剂

5

技术领域

本发明涉及：生物体试样中变性脂蛋白的定量方法，其特征在于使用抗磷酸胆碱抗体对生物体试样中的变性脂蛋白进行定量；生物体试样中变性脂蛋白的定量方法，其特征在于使用抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体对生物体试样中的变性脂蛋白进行定量；循环系统疾病的检测方法，其特征在于使用抗磷酸胆碱抗体对生物体试样中的变性脂蛋白进行定量，由该定量值检测循环系统疾病；循环系统疾病的检测方法，其特征在于使用抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体对生物体试样中的变性脂蛋白进行定量，由该定量值检测循环系统疾病；含有抗磷酸胆碱抗体的变性脂蛋白定量用试剂；含有抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体的变性脂蛋白定量用试剂。

背景技术

动脉硬化多在主动脉、冠状动脉、脑动脉和颈动脉等肌性动脉中发生，是心绞痛、心肌梗塞、脑梗塞等的主要原因疾病。虽有报道指出其原因是血清胆固醇上升、血小板凝集、内皮损伤等，但其成因基本上都未得到明确。

血清脂质强烈显示出与心肌梗塞或心绞痛等冠状动脉疾病、脑梗塞或脑血管性痴呆等脑动脉疾病、或者肾病或糖尿病性肾病等肾动脉疾病以及末梢动脉闭塞症等末梢动脉疾病等各种循环系统疾病的关系，其测定被认为对于这些疾病的诊断、病态的阐明、治疗效果的检测等极为重要。

但是，最近的研究指出：对上述疾病患者组和健康人组的血清脂

质的绝对量进行比较, 结果发现两组之间并没有明显大的差异, 倒是两组中, 存在于血清中的变性的脂蛋白(以下称为变性脂蛋白)的量明显不同[例如 *Circulation*, 94, Suppl. I, 1288 (1996)]。Steinberg 等人还指出了变性脂蛋白之一的氧化脂蛋白与动脉粥样硬化病灶的发展之间的相关性[例如 *N. Engl. J. Med.*, 320, 915 (1989)]。

已证实存在清除受体等变性脂蛋白的受体, 因此有人提出了以下假说: 变性脂蛋白经由这些受体被摄入细胞内形成泡沫细胞, 由此导致开始形成动脉粥样化; 还有人提出: 由于变性脂蛋白损伤内皮细胞, 引起血小板粘连凝集、白细胞集结、血细胞成分向血管内浸润, 并以此为诱因引发平滑肌细胞游走和增殖的假说。

有关变性脂蛋白在病灶部位蓄积, 例如 1988 年 Haberland 等人报道了针对丙二醛改性的低密度脂蛋白(LDL)的抗体[抗丙二醛(MDA)-LDL 抗体]可对动脉硬化病灶部位染色[*Science*, 241, 215 (1988)]、1989 年 Yla Herttuala 等人报道了用抗 MDA-ApoB 抗体进行的免疫印迹法检测出由病灶部位提取的脱辅基 B (apoB) [*J. Clin. Invest.*, 84, 1086 (1989)]等。但是上述抗 MDA-ApoB 抗体是将用丙二醛进行人工氧化改性的脂蛋白作为抗原而得到的抗体, 具有不仅与氧化产物, 也与其他变性蛋白例如氧化白蛋白等交叉反应的性质, 因此不明确是否测定了变性脂蛋白。

如上所述, 已知变性的脂蛋白有乙酰基化脂蛋白、糖基化脂蛋白、丙二醛化脂蛋白、4-羟基-2-壬烯醛(HNE)改性脂蛋白、氧化脂蛋白等, 但生物体内的变性脂蛋白实体如何尚不明确。

已知脂蛋白凝集后性质发生变化, 变得容易被巨噬细胞摄入[*J. Biol. Chem.*, 272, 31700, (1997)], 可以认为这也是脂蛋白变性的一种。已知这种变性由氧化、硫醇化、某种酶处理等引起[*Arterioscler. Thromb.*, 11, 1209 (1991)、*Arch. Biochem. Biophys.*, 310, 489 (1994)、*Biochim. Biophys. Acta.*, 1215, 79 (1994)、*Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 4, 70 (1994)、*Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 2713 (1989)、*Arterioscler. Thromb.*, 11, 1643

(1991)、J. Biol. Chem., 268, 20419 (1993)、Circ. Res., 71, 218 (1992)], 并且漩涡振荡处理等物理处理也会引起这样的变性[Arteriosclerosis, 8, 348 (1988)]. 发生这样变性的脂蛋白容易被巨噬细胞摄入。因此, 在巨噬细胞中引发胆固醇的蓄积, 可认为与动脉硬化性病灶的发生、发展有着密切的关联。

由此开发出变性脂蛋白的测定方法, 用于以动脉硬化为主的循环系统疾病的诊断。

具体地说, 目前已报道有: 使用识别磷脂酰胆碱氧化物的抗体测定氧化脂蛋白的方法(特开平 8-304395 号、特开平 9-288106 号); 使用识别 HDL 氧化磷脂(特别是根磷脂酰胆碱(rhizosphatidylcholine))的抗体—9F5-3a 和抗 apo-AI 抗体测定氧化 HDL 的方法(特开平 9-33525 号); 将识别所有经乙酰基化、丙二醛化、氧化等化学处理的 LDL 的抗体和氧化剂组合来测定氧化 LDL 的方法(特开平 9-5323 号); 使用与纤溶酶原和 LDL 没有交叉反应性且能识别特定的肽的抗体测定变性或改性脂蛋白(a)的方法(特开平 9-297137 号), 所述特定的肽由于脂蛋白(a)的氧化、还原、水解等分解、加热或由于蛋白质变性剂等变性剂等使其一级结构、高级结构或立体结构受到改变、分解或化学改性, 导致结构、组成或构型发生改变; 将抗丙二醛化脂蛋白抗体与表面活性剂联合使用, 测定变性脂蛋白类的方法(特开平 8-101195 号)等, 但这些方法都未显示出充分的成果。

发明内容

本发明的目的在于提供生物体试样中变性脂蛋白的定量方法、循环系统疾病的检测方法、变性脂蛋白定量用试剂和循环系统疾病的检测试剂。

本发明涉及下述(1)-(36):

(1) 生物体试样中变性脂蛋白的定量方法, 其特征在于: 使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体接触, 对生成的免疫复合物进行定量。

(2) 生物体试样中变性脂蛋白的定量方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

5 (3) 生物体试样中变性低密度脂蛋白的定量方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗低密度脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

(4) 上述(3)的方法，其中所述与低密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基 B 蛋白抗体。

10 (5) 生物体试样中变性高密度脂蛋白的定量方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗高密度脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

(6) 上述(5)的方法，其中所述与高密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基 A 蛋白抗体。

15 (7) 生物体试样中脂蛋白(a)的定量方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗脱辅基蛋白质(a)抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

(8) 生物体试样中变性高密度脂蛋白和变性低密度脂蛋白的定量方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体、抗高密度脂蛋白抗体和抗低密度脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

20 (9) 上述(8)的方法，其中所述与高密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基 A 蛋白抗体。

(10) 上述(8)的方法，其中所述与低密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基 B 蛋白抗体。

25 (11) 循环系统疾病的检测方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

(12) 循环系统疾病的检测方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

(13) 循环系统疾病的检测方法，其特征在于：使生物体试样与抗

磷酸胆碱抗体和抗低密度脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

(14) 上述(13)的方法，其中所述与低密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基 B 蛋白抗体。

5 (15) 循环系统疾病的检测方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗高密度脂蛋白抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

(16) 上述(15)的方法，其中所述与高密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基 A 蛋白抗体。

10 (17) 循环系统疾病的检测方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体和抗脱辅基蛋白质(a)抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

(18) 循环系统疾病的检测方法，其特征在于：使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体、抗高密度脂蛋白抗体和抗低密度脂蛋白抗体接触，对
15 生成的免疫复合物进行定量。

(19) 上述(18)的方法，其中所述与高密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基 A 蛋白抗体。

(20) 上述(18)的方法，其中所述与低密度脂蛋白特异性结合的抗体是抗脱辅基 B 蛋白抗体。

20 (21) 变性脂蛋白定量用试剂，该试剂含有抗磷酸胆碱抗体。

(22) 变性脂蛋白定量用试剂，该试剂含有抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体。

(23) 上述(22)的试剂，其中所述抗脂蛋白抗体选自抗脱辅基 B 蛋白抗体、抗脱辅基 A 蛋白抗体和抗脱辅基蛋白质(a)抗体。

25 (24) 上述(21)-(23)中任一项的试剂，该试剂含有冷冻保护剂。

(25) 变性脂蛋白定量用试剂盒，该试剂盒含有抗磷酸胆碱抗体。

(26) 变性脂蛋白定量用试剂盒，该试剂盒含有抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体。

(27) 上述(23)的试剂盒, 其中所述抗脂蛋白抗体选自抗脱辅基 B 蛋白抗体、抗脱辅基 A 蛋白抗体和抗脱辅基蛋白质(a)抗体。

(28) 上述(25)-(27)中任一项的变性脂蛋白定量用试剂盒, 该试剂盒含有冷冻保护剂。

5 (29) 循环系统疾病检测试剂, 该试剂含有抗磷酸胆碱抗体。

(30) 循环系统疾病检测试剂, 该试剂含有抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体。

(31) 上述(30)的检测试剂, 其中所述抗脂蛋白抗体选自抗脱辅基 B 蛋白抗体、抗脱辅基 A 蛋白抗体和抗脱辅基蛋白质(a)抗体。

10 (32) 循环系统疾病检测用试剂盒, 该试剂盒含有抗磷酸胆碱抗体。

(33) 循环系统疾病检测用试剂盒, 该试剂盒含有抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体。

(34) 上述(33)的试剂盒, 其中所述抗脂蛋白抗体选自抗脱辅基 B 蛋白抗体、抗脱辅基 A 抗体和抗脱辅基蛋白质(a)抗体。

15 (35) 上述(32)-(34)中任一项的循环系统疾病检测用试剂盒, 该试剂盒含有冷冻保护剂。

(36) 用于生物体试样的冷冻保护剂, 该试剂含有选自糖类、高分子物质和亲水性有机溶剂的化合物作为有效成分。

20 变性脂蛋白包括任何未经变性的脂蛋白。具体有: 糖基化变性脂蛋白、氧化变性脂蛋白、乙酰基化变性脂蛋白、通过丙二醛等作用产生的醛化变性脂蛋白、4-羟基-2-壬烯醛改性的变性脂蛋白等经化学改变的变性脂蛋白; 经氧化、硫醇化、脂蛋白脂肪酶等酶处理、漩涡振荡等物理处理、冷冻等温度处理而引起的凝集和结合等形态性变性的变性脂蛋白; 经表面结构改变或立体结构改变等结构性变性的变性脂蛋白等。另外, 与未变性的脂蛋白比较, 可见电荷改变、分子量改变、
25 与生物体内受体的亲和性改变、被巨噬细胞等细胞摄入的容易程度改变等生物学改变的脂蛋白也包含在变性脂蛋白中。

本发明的变性脂蛋白的定量方法只要是使用抗磷酸胆碱抗体、免

疫学测定变性脂蛋白的方法即可，并不受特别限定，测定方法的步骤中包含使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体接触的步骤、测定反应生成的变性脂蛋白-抗磷酸胆碱抗体复合物(免疫复合物)的量的步骤。

5 测定方法有免疫学测定方法。免疫学测定方法只要是免疫测定法、免疫印迹法、凝集反应、补体结合反应、溶血性反应、沉淀反应、胶体金法、色谱法、免疫染色法等利用抗原抗体反应的方法，可采用任何的方法，优选免疫测定法。

10 免疫测定法是使用进行了各种标记的抗原或抗体对抗体或抗原进行检测或定量的方法，根据抗原或抗体的标记方法，分为放射免疫检测法(RIA)、酶免疫检测法(EIA 或 ELISA)、荧光免疫检测法(FIA)、发光免疫检测法、物理化学检测法(TIA, LAPIA, PCIA)、流式细胞计量术等，优选酶免疫检测法。

15 放射免疫检测法中使用的放射性标记物可以使用任何公知[J.CLAUSEN 著、佐佐木 实 监译、加藤泰治、户谷敬子译、生化学实验法 15 免疫化学的同定法、东京化学同人(1993)]的放射性同位素。例如可使用 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I 等。

酶免疫检测法中使用的酶标记物可以使用任何公知(石川荣次等编、酵素免疫测定方法、医学书院)的酶。例如可使用碱性磷酸酶、过氧化物酶、荧光素酶等。

20 发光免疫检测法中使用的发光标记物可以使用任何公知[今井一洋编、生物发光和化学发光、广川书店；临床检查 42 (1998)]的发光物。例如可使用 acrydinium 酯、洛芬碱等。

荧光免疫检测法中使用的荧光标记物可以使用任何公知(川生明著、荧光抗体法、Soft Science Crop.)的荧光。例如 FITC、RITC 等。

25 免疫测定法中的测定方法有竞争法、夹心法[免疫学イラストレテッド 第5版(南光堂)]等。

具体地说，使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体接触后，通过使该试样与可与结合了标记物的抗磷酸胆碱抗体反应的抗体反应，可以对生

物体试样中的变性脂蛋白进行检测或定量。通过使结合了标记物的抗磷酸胆碱抗体与生物体试样接触并反应，可以对生物体试样中的变性脂蛋白进行检测或定量。

5 上述免疫测定法中使用的抗体可以使用任意的多克隆抗体、单克隆抗体，也可以使用 Fab、Fab'、F(ab)₂ 等抗体片段。另外，单克隆抗体可以是生物体内自然生成的抗体；由使用人以外的动物获得的杂交瘤生成的抗体；根据编码形成抗体分子的重链和轻链的可变区和恒定区的氨基酸序列的 DNA，采用基因工程方法使抗体分子表达的基因重组抗体等任何抗体。

10 本发明中使用的抗磷酸胆碱抗体只要具有与磷酸胆碱反应的性质，可以是上述任何抗体。具体有 T-15 抗体[J. Exp. Med., 132, 737 (1970)]、由杂交瘤 KTM-285 (FERM BP-7589)生成的单克隆抗体 KTM-285、由转化细胞 KTM-2001 (FERM BP-7549)生成的基因重组抗体 KTM-2001 等。

15 本发明也包含使用抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体对变性脂蛋白进行免疫学测定的方法。

具体地说，将第一抗体(初级抗体)固定于固相后，使生物体试样与第一抗体接触，洗涤试样中不反应的试样成分，然后使第二抗体(二级抗体)与生物体试样中的目标物质和第一抗体的免疫复合物反应，可对生物体试样中变性脂蛋白进行检测或定量。

20 用作一次抗体和二级抗体的抗体有抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体。一次抗体与二级抗体的组合优选以抗磷酸胆碱抗体为一级抗体，抗脂蛋白抗体为二级抗体。

脂蛋白是指以下述结构存在的物质：在血液中以胆固醇脂、甘油三酯等脂类为中心(core)，其表面被磷脂和游离胆固醇、还有蛋白质(脱辅基蛋白质)覆盖。

脂蛋白有超低密度脂蛋白(以下简称为 VLDL)、低密度脂蛋白(以下简称为 LDL)、高密度脂蛋白(以下简称为 HDL)、中间比重脂蛋白(以

下简称为 IDL)、脂蛋白(a) (以下简称为 Lp(a))等。

VLDL 是由以甘油三酯为中心的脂类和脱辅基 B-48、脱辅基 C、脱辅基 E 等蛋白质等构成的比重为 0.96-1.006 的颗粒, 具有内源性脂肪搬运载体的功能。

5 LDL 是富含于胆固醇中的脂蛋白, 是以脱辅基 B-100 作为主要蛋白质、比重为 1.006-1.063 的颗粒, 具有将胆固醇从肝脏搬运到末梢组织的功能。

10 HDL 是主要含有磷脂和胆固醇作为脂类、含有脱辅基 A-I、脱辅基 A-II、脱辅基 C 等作为主要蛋白质、比重为 1.063-1.21 的颗粒, 具有从末梢组织运出胆固醇, 在肝脏中代谢的功能。

IDL 是由 VLDL 向 LDL 转化过程中的中间代谢物, 比 VLDL 更加富含于胆固醇中, 是含有脱辅基 B-100、脱辅基 C、脱辅基 E 等作为主要蛋白质、比重为 1.006-1.019 的颗粒。

15 Lp(a)是具有独特结构的脱辅基蛋白质(a)与类似于 LDL 的脂蛋白颗粒结合、比重为 1.03-1.08 的颗粒, 具有与血液凝固有关的功能。

因此, 可以使用各种脂蛋白中所含的主要脱辅基蛋白质作为抗各种脂蛋白抗体, 通过使用抗磷酸胆碱抗体和与各种脂蛋白中含有的主要脱辅基蛋白质反应的抗体(以下可称为抗脱辅基蛋白质抗体), 可以进行各种变性脂蛋白的检测和定量。

20 与变性脂蛋白中含有的脱辅基蛋白质反应的抗体具体包括抗 Apo-AI 蛋白抗体、抗 Apo-AII 蛋白抗体、抗 Apo-AIV 蛋白抗体、抗 Apo-B-100 蛋白抗体、抗 Apo-B-48 蛋白抗体、抗 Apo-CI 蛋白抗体、抗 Apo-CII 蛋白抗体、抗 Apo-CIII 蛋白抗体、抗 Apo-D 蛋白抗体、抗 Apo-E 蛋白抗体等。

25 例如, 对变性脂蛋白中的变性 LDL 进行检测或定量时, 使用的抗脱辅基蛋白质抗体有抗 Apo-B 蛋白抗体。对变性 VLDL 进行检测或定量时, 使用的抗脱辅基蛋白质抗体有抗 Apo-E 蛋白抗体。对变性 HDL 进行检测或定量时, 使用的抗脱辅基蛋白质抗体有抗 Apo-AI 蛋白抗

体。对变性 Lp(a)进行检测或定量时,使用的抗脱辅基蛋白质抗体有抗脱辅基蛋白质(a)抗体。

5 如上所述,通过使用抗特定脂蛋白抗体,可以对特定种类的变性脂蛋白进行定量或检测。本方法不仅可以对特定的变性脂蛋白进行定量或检测,还可以通过将几种抗脱辅基蛋白质抗体组合,同时对 2 种以上的变性脂蛋白进行定量或检测。

具体地说,通过使用抗 HDL 抗体即抗 Apo-AI 蛋白抗体和抗 LDL 抗体即抗 Apo-B 蛋白抗体,可以对变性 HDL 和变性 LDL 进行定量或检测。

10 作为各种变性脂蛋白的定量方法,可以预先通过离心处理等将生物体试样进行纯化,使纯化的试样与抗磷酸胆碱抗体反应,对特定种类的变性脂蛋白进行定量或检测。

15 从生物体试样中通过离心纯化 LDL 的方法有:使用乙二胺四乙酸钠(EDTA-2Na)和 NaBr 对健康人血清进行密度梯度离心获得 LDL 组分的方法(特开平 7-238098 号公报);向由肝素血获得的人血浆中加入 EDTA,离心后再加入 KBr 溶液,离心,获得 LDL 组分的方法(特开平 8-304395 号公报);通过超速离心法从人血浆中回收 LDL 的方法(特开平 9-288106 号公报)等。

20 通过离心从生物体试样中纯化 Lp(a)的方法有:向肝素采血获得的人血浆中加入 EDTA,将含 EDTA 的 NaCl 加入其上,离心后加入 KBr,离心,将得到的溶液进行凝胶过滤,过赖氨酸琼脂糖凝胶 4B 填充柱,获得 Lp(a)组分的方法(特开平 8-304395 号公报)等。

25 通过离心纯化 HDL 的方法有:向人血清中分别加入四乙酸钠(EDTA-2Na)、NaCl,使用溶剂密度为 1.063 的溶液进行离心,向得到的溶液中加入 NaBr,用溶剂密度为 1.21 的溶液进行离心,获得 HDL 组分的方法(山村卓、新生化学实验讲座 脂质 I、195 (1993)、东京化学同人)等。

本发明的测定方法中,可以是使用例如脱辅基蛋白质的受体、脱

辅基蛋白质结合蛋白等来代替抗脂蛋白抗体。具体的例子有：识别 Apo-AI 的卵磷脂胆固醇脂酰转移酶、识别 Apo-B-100 的肝、小肠细胞的 LDL 受体、识别 Apo-CII 的脂蛋白脂肪酶、识别 Apo-E 的肝 E 受体等。

5 下面，以使用抗磷酸胆碱抗体和抗脱辅基 B 蛋白抗体的免疫测定法为具体例子进行说明。

10 向 96 孔微量滴定板等的固相中加入由缓冲液稀释的抗磷酸胆碱抗体溶液，在低温下温育例如 1-24 小时，然后倾去溶液，加入含有约 1% (w/v) BSA 的 Tris-HCl (pH 8.0) 等缓冲液，在室温下温育例如 1-12 小时进行封闭，然后用含 0.05% (v/v) 吐温 20 等表面活性剂的 PBS (pH 7.4) 等洗涤，制备抗磷酸胆碱抗体结合固相。

15 接着，将血浆等生物体试样用 10mmol/L 含 1% BSA、5% 聚醚、140mmol/L NaCl 的磷酸缓冲液 (pH 7.4) 等样品稀释液稀释，加入孔中，在室温下温育 1-12 小时后，用含 0.05% (v/v) 吐温 20 的 PBS (pH 7.4) 等洗涤。

20 再向各孔中加入用含 1% (w/v) BSA 的 PBS (pH 7.4) 稀释的过氧化物酶等标记的抗人脱辅基 B 蛋白抗体作为二级抗体，在室温下温育 10-60 分钟。接着用含 0.05% (v/v) 吐温 20 的 PBS (pH 7.4) 等洗涤，然后测定标记。可通过预先由已知浓度的标准物质得到的标准曲线进行样品中变性 LDL 的定量。过氧化物酶的检测例如可以使用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMBZ) 溶液。

通过本测定，可以对变性 LDL 进行定量。

本发明涉及循环系统疾病的检测方法，其特征在于使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量。

25 循环系统疾病包括心肌梗塞或心绞痛等冠状动脉疾病、脑梗塞或脑血管性痴呆等脑动脉疾病、肾病或糖尿病性肾病等肾动脉疾病以及末梢动脉闭塞症等末梢动脉疾病等各种循环系统疾病。

本发明中通过变性脂蛋白的定量值，即通过使用抗磷酸胆碱抗体、

或抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体，对生物体试样中的变性蛋白质进行变性脂蛋白定量，可以检测循环系统疾病。

上述定量中使用的抗脂蛋白抗体有抗构成变性脂蛋白的脱辅基蛋白质抗体，例如有抗构成变性 LDL 的 Apo-B 蛋白质抗体、抗构成变性 VLDL 的 Apo-E 蛋白质抗体、抗构成变性 HDL 的 Apo-AI 蛋白质抗体、
5 抗构成变性 Lp(a)的脱辅基蛋白质(a)抗体。通过这些抗体组合使用，可以对各种变性脂蛋白进行定量，从而可检测循环系统疾病。

循环系统疾病患者的生物体试样中含有的变性脂蛋白浓度比健康人的生物体试样中含有的变性脂蛋白显著高。因此，对变性脂蛋白设定
10 临界值(cut-off)，对采集的生物体试样中的变性脂蛋白进行定量，当变性脂蛋白比临界值高时，则可检测判断为循环系统疾病。

健康人的变性脂蛋白的值可以如下取得：从预先经临床诊断为未患循环系统疾病的健康人中采集生物体试样，用本发明的变性脂蛋白定量方法对该生物体试样中的变性脂蛋白进行定量。

15 对临床上诊断各种循环系统疾病的方法并没有特别限定，例如有根据冠状动脉造影术、负荷心电图和超声心动描记术等机器诊断方法、由胸痛症状等自感症状等来诊断的方法等。

临界值是指通过某种物质判定目标疾病组和非疾病组时对该物质规定的值。判定目标疾病和非疾病时，可以如下判定：如果是临界值
20 以下则为阴性，如果是临界值以上则为阳性；或如果是临界值以下则为阳性，如果是临界值以上则为阴性(金井正光编、临床检查法提要 金原出版株式会社)。

用于评价临界值的临床有效性的指标有灵敏度和特异度。

当使用临界值判定某一群体，将是疾病患者且判定为阳性的表示为 a (真阳性)，将是疾病患者但判定为阴性的表示为 b (假阴性)，将非
25 疾病患者但判定为阳性的表示为 c (假阳性)、将非疾病患者且判定为阴性的表示为 d (真阴性)时，可以将 $a/(a+b)$ 表示的值作为灵敏度(真阳性率)、将 $d/(c+d)$ 所示的值作为特异度(真阴性率)。

目标疾病组或非疾病组的测定值的分布通常有部分重复。因此，提高或降低临界值，灵敏度和特异度也随之改变。降低临界值，则灵敏度上升，特异度下降；提高临界值，则灵敏度下降，特异度上升。作为判定方法，优选灵敏度和特异度两者的值都高。另外灵敏度和特异度值不超过 0.5 的判定方法不能认为是有效的判定方法。

设定临界值的方法有：含有非疾病组分布的 95%、且以由中央到两端的任意的值作为临界值的设定方法；非疾病组的分布显示正态分布时，将平均值+2 倍的标准偏差(SD)或平均值-2SD 设定为临界值的方法等。

生物体试样可以是血液、尿、脊髓液、穿刺液等任何试样，优选血液。血液有全血、血浆、血清、溶血产物、血细胞内液等，优选血清或血浆。

本发明的变性脂蛋白定量用试剂和循环系统疾病的检测方法中使用的试剂有含抗磷酸胆碱抗体的试剂。还可以含有抗脂蛋白抗体例如抗脱辅基蛋白质抗体，含有抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体的试剂可以对各种变性脂蛋白进行分别定量或检测。抗磷酸胆碱抗体或抗脱辅基蛋白质抗体可以是结合了标记物的抗体。

抗磷酸胆碱抗体只要具有与磷酸胆碱反应的性质即可，可以是上述任何抗体。具体有：T-15 抗体[J. Exp. Med., 132, 737 (1970)]、由杂交瘤 KTM-285 (FERM BP-7589)生成的单克隆抗体 KTM-285、由转化细胞 KTM-2001 (FERM BP-7549)生成的基因重组抗体 KTM-2001 等。

抗脂蛋白抗体有抗各种脱辅基蛋白质例如 Apo-AI、Apo-AII、Apo-AIV、Apo-B-100、Apo-B-48、Apo-CI、Apo-CII、Apo-CIII、Apo-D、Apo-E 等抗体。

本发明的试剂盒由机器或试剂的组合构成，只要包含与下述各组成元件本质上相同、或与其中部分本质上相同的物质，即使组成或形式不同，也包含在本发明的试剂盒中。

作为试剂，含有抗磷酸胆碱抗体、或含有抗磷酸胆碱抗体和抗脂

蛋白抗体，另外也根据需要包含生物体试样的稀释液、固定抗体的固相、反应缓冲液、洗涤液、标记的二级抗体或其抗体片段、用于检测标记物的试剂、变性脂蛋白等标准物质等。抗磷酸胆碱抗体或抗脂蛋白抗体也可以是结合了标记物的抗体。

5 生物体试样的稀释液有在表面活性剂、缓冲剂等中含有 BSA 或酪蛋白等蛋白质的水溶液等。

固定抗体的固相可以使用使抗磷酸胆碱抗体或抗脂蛋白抗体或它们的抗体片段在由各种高分子材料按照用途成型的材料上固相化的材料。形状有管状、珠状、平板状、乳胶等微粒状、条状等，材料有聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚甲基苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚氯乙烯、尼龙、聚甲基丙烯酸酯、明胶、琼脂糖、纤维素、聚对苯二甲酸乙二醇酯等高分子材料、玻璃、陶瓷或金属等。抗体固相化的方法可通过物理方法和化学方法或将它们联合使用的方法等公知的方法进行。例如在聚苯乙烯制的 96 孔免疫测定用微量滴定板上使抗体或抗体片段等疏水固相化。

15 反应缓冲液只要可以提供固定抗体的固相上的抗体与生物体试样中的抗原进行结合反应时的溶媒环境即可，可以是任何缓冲液，包括表面活性剂、缓冲剂、BSA 或酪蛋白等蛋白质、防腐剂、稳定剂、反应促进剂等。

20 标记的二级抗体或其抗体片段可以使用将本发明中所用的抗体或抗体片段上标记了辣根过氧化物酶(HRP)、牛肠碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶等标记酶的抗体或抗体片段、缓冲剂、BSA 或酪蛋白等蛋白质、防腐剂等混合的物质。

25 用于检测标记物的试剂根据上述标记酶不同而不同，例如如果是辣根过氧化物酶，则可使用四甲基联苯胺或邻苯二胺等用于吸光测定的底物、羧苯丙酸或羧苯乙酸等荧光底物、鲁米诺等发光底物；如果是碱性磷酸酶，则可使用 4-硝基苯基磷酸等用于测定吸光度的底物、4-甲基伞形苯磷酸酯(4-methylumbelliphenyl phosphate)等荧光底物等。

标准物质有：通过超速离心法分离纯化脂蛋白，用铜离子等金属离子将其氧化，使其与乙酸酐反应进行乙酰基化或通过使其与丙二醛等反应等方法得到的变性脂蛋白；冷冻解冻而凝集的变性脂蛋白；通过物理性振荡使其变性的变性脂蛋白等。

5 生物体试样中的变性脂蛋白的定量优选在采集生物体试样后立即进行，不过也可以使用保存的生物体试样。生物体试样的保存方法只要具备不使变性脂蛋白的量发生变化的条件即可，并没有特别限定，例如优选在 0-10℃ 不致冻结的低温条件、避光条件和无振荡条件下保存。

10 本发明中使用的生物体试样也可以冷冻保存。冷冻生物体试样时，优选与下述冷冻保护剂共存进行冷冻。

15 冷冻保护剂例如有蔗糖、海藻糖、乳糖、甘露糖醇、葡萄糖等糖类；葡聚糖、硫酸葡聚糖、普鲁兰、聚乙二醇、羧甲基纤维素等高分子物质；甘油或二甲基亚砷等水溶性有机溶剂。这些物质在生物体试样中以例如 0.1-50%，优选 1-30%，进一步优选 5-20% 共存使用。

20 冷冻是将溶剂温度降到冰点以下进行，温度下降时，优选从过冷开始温度急速冷却到过冷温度，瞬间全部回收凝固潜热，优选使用程控冷冻仪(program freezer)。例如冷却到冷却开始温度 10℃ 后，以 -1℃/分钟的速度从该温度冷却到过冷开始温度 -5℃ 至 -10℃ 附近，再从该温度急速冷却至过冷温度 -40℃。之后根据需要急速升温至 -18℃ 的自然升温保持温度，之后再以 -1℃/分钟的速度冷却至目标温度。也可以不到达自然升温温度，而以 -1℃/分钟的速度从过冷温度 -40℃ 冷却到目标温度。冷冻温度下降速度优选 -0.1℃/分钟以上、更优选 -1.0℃/分钟以上。目标温度优选 -20℃ 以下，更优选 -30℃ 以下，特别优选可通过液氮实现的 -196℃。

25 测定冷冻保存的生物体试样中变性脂蛋白时，对试样的解冻方法并没有特别限定，例如有边振荡边冷水浴、热水浴的方法等。

因此，本发明的变性脂蛋白定量用试剂和试剂盒、循环系统疾病

检测试剂或试剂盒中也可以包含上述冷冻保护剂。

以下详细说明本发明中使用的单克隆抗体的制备方法的一个例子。

1. 单克隆抗体的制备方法

5 (1) 抗原的制备

作为抗原，可以使用磷酸胆碱作为直接免疫抗原，优选使磷酸胆碱与其他高分子结合的物质作为免疫抗原使用。高分子有牛血清白蛋白、蛋白质、多糖、核酸、合成高分子等，优选例如脂蛋白。磷酸胆碱优选是含有磷酸胆碱的化合物例如磷酸胆碱衍生物的形式。磷酸胆碱衍生物只要是磷酸胆碱基作为表位被识别的衍生物即可，没有特别限定，例如有 1-棕榈酰基-2-(9-氧代壬酰基)-甘油基-3-磷酸胆碱、1-棕榈酰基-2-(5-氧代戊酰基)-甘油基-3-磷酸胆碱。这些磷酸胆碱衍生物可根据文献[J. Biol. Chem., 266, (17) 11095, (1991)]所述方法制备。

15 作为高分子的脂蛋白有例如 LDL、HDL、VLDL、IDL 等，优选 LDL。对 LDL 并无特别限定，可以是例如来自人、马、牛、兔、狗、山羊、绵羊等各种动物血液、卵黄、乳等的 LDL，优选来自人血液的 LDL。磷酸胆碱衍生物与脂蛋白的结合可通过向脂蛋白溶液中滴加磷酸胆碱衍生物并混合等使两者混合的方式进行。

(2) 动物免疫和抗体生成细胞的制备

20 用(1)中制备的抗原对 3-20 周龄的小鼠、大鼠、仓鼠、兔、豚鼠、山羊、绵羊或鸡进行免疫，收集该动物的脾脏、淋巴结、末梢血中的抗体生成细胞。制备多克隆抗体时，优选使用兔、豚鼠、山羊、绵羊、鸡等，制备单克隆抗体时，优选使用小鼠、大鼠。

25 通过将抗原与适当的佐剂[例如弗氏完全佐剂或氢氧化铝凝胶和百日咳疫苗等]一起给予动物的皮下或静脉内或腹腔内来进行免疫。抗原为部分肽时，可制备与 BSA (牛血清白蛋白)或 KLH (匙孔血蓝蛋白)等载体蛋白偶联的偶联物，以此作为免疫原使用。

抗原的给予是在给予第一次后隔 1-2 周进行 3-10 次。在各次给予

后的第 3-7 天, 从眼底静脉丛采血, 通过酶免疫测定法[Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]等检查该血清与抗原的反应。将血清相对于免疫中使用的抗原显示了充分的抗体滴度的小鼠、大鼠或仓鼠作为抗体生成细胞的供给源。

5 制备多克隆抗体时, 从完成免疫的动物中定期采血, 或通过放血一次性回收血液。通常采血时不对血液采取防凝固措施, 使血液凝固, 然后采用离心等方法回收利用血清组分。可以根据需要对血液中的抗体进行纯化使用。纯化方法例如有: 使用硫酸铵等的盐析法、离子交换层析法、凝胶过滤柱层析法、使用 A 蛋白或 G 蛋白的亲合柱层析法、
10 以及使用使抗原固相化的凝胶进行的亲和柱层析法等, 这些方法可以单独或组合使用。

 用于制备单克隆抗体的抗体生成细胞的采集源有免疫动物的脾脏、淋巴结、末梢血等。另外也可以使用从未进行免疫的动物的脾脏、淋巴结、末梢血等中取出的担负生成抗体功能的细胞, 对这些细胞进行直接免疫, 制备抗体生成细胞, 进行所谓体外免疫[新井、太田、实验医学、6,43 (1988)]的细胞。
15

 进行抗体生成细胞和骨髓瘤细胞融合时, 在最后给予抗原物质后的第 3-7 天, 将免疫的小鼠、大鼠或仓鼠摘除脾脏, 收集脾细胞。将脾脏在 MEM 培养基(日水制药公司)中仔细切碎, 用镊子将其分散, 离心(1200rpm、5 分钟)后, 去掉上清液, 用 Tris-氯化铵缓冲液(pH 7.65)处理 1-2 分钟, 除去红细胞, 用 MEM 培养基洗涤 3 次, 作为融合用脾细胞。
20

(3) 骨髓瘤细胞的制备

 骨髓瘤细胞使用由小鼠获得的细胞株。例如可以使用 8-氮杂鸟嘌呤抗性小鼠(来自 BALB/c)的骨髓瘤细胞株 P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1-7 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41 (NS-1) [European J. Immunology, 6, 511-519 (1976)]、SP2/0-Ag14 (SP-2) [Nature, 276, 269-270 (1978)]、P3-X63-Ag8653 (653) [J.
25

Immunology, 123, 1548-1550 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495-497 (1975)]等。这些细胞株用 8-氮杂鸟嘌呤培养基[在 RPMI-1640 培养基中加入了谷氨酰胺(1.5mmoles/L)、2-巯基乙醇(5×10^{-5} moles/L)、
5 艮他霉素(10 μ g/mL)和胎牛血清(FCS)形成的培养基(以下称为正常培养基)中再加入 8-氮杂鸟嘌呤(15 μ g/mL)形成的培养基]传代, 在细胞融合之前 3-4 天, 在正常培养基上传代, 以保证融合当天有 2×10^7 个以上的细胞数。

(4) 细胞融合

10 细胞融合可以采用由 Kohler 和 Milstein [Nature, 256, 495 (1975)]发明、之后迅速发展并得到各种改进的方法。

将(2)中免疫的抗体生成细胞和(3)中得到的骨髓瘤细胞用 MEM 培养基或 PBS (1.83g 磷酸二钠、0.21g 磷酸一钾、7.65g 食盐、1 升蒸馏水、pH 7.2)充分洗涤, 细胞数按照抗体生成细胞:骨髓瘤细胞=5-10:1 混合, 离心(1,200rpm、5 分钟)后, 去掉上清液, 将沉淀的细胞群充分分散, 然后一边搅拌一边在 37 $^{\circ}$ C 按照 0.2-1mL/ 10^8 个抗体生成细胞的比例
15 向其中加入 2g 聚乙二醇-1000 (PEG-1000)、2mLMEM 和 0.7mL 二甲基亚砷的混合液, 每 1-2 分钟添加数次 1-2mL MEM 培养基, 然后加入 MEM 培养基使总量为 50mL。离心(900rpm、5 分钟)后, 去掉上清液, 轻缓地分散细胞, 用吸量管吸取、吹出, 将细胞轻缓地悬浮于 100ml HAT 培养基[在正常培养基中加入次黄嘌呤(10^{-4} moles/L)、胸腺嘧啶核苷(1.5×10^{-5} moles/L)和氨基蝶呤(4×10^{-7} moles/L)形成的培养基]中。将该悬浮液按照 100 μ L/孔分注 96 孔培养板, 在 5% CO₂ 培养箱中、37 $^{\circ}$ C 下培养
20 7-14 天。

培养后, 取部分培养上清液, 按照下述酶免疫测定法, 选择与磷酸胆碱反应但不与不含磷酸胆碱的抗原反应的细胞。再通过有限稀释法重复两次克隆[第 1 次使用 HT 培养基(HAT 培养基中除去氨基蝶呤的培养基), 第 2 次使用正常培养基], 选择稳定、证实有强抗体滴度的细胞株作为抗磷酸胆碱单克隆抗体生成杂交瘤细胞株。
25

酶免疫测定法

将抗原或表达抗原的细胞铺于 96 孔板上，使杂交瘤培养上清液或纯化抗体作为第一抗体与其反应。

第一抗体反应后，洗涤孔板，添加第二抗体。

5 第二抗体是将可识别第一抗体免疫球蛋白的抗体用生物素、酶、化学发光物质或放射线化合物等标记而形成的抗体。具体地说，如果制备杂交瘤时使用小鼠，则第二抗体采用可识别小鼠免疫球蛋白的抗体。

10 反应后，根据标记第二抗体的物质进行反应，选择可生成与抗原特异性反应的单克隆抗体的杂交瘤。

(5) 单克隆抗体的制备

15 按照 $2 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ 个细胞/只的比例对经降植烷处理[腹腔内给予 0.5ml 2,6,10,14-四甲基十五烷(降植烷)，饲养 2 周]的 8-10 周龄的小鼠或裸鼠腹腔内注射(3)中得到的抗人 SCGF 单克隆抗体生成杂交瘤细胞。10-21 天后杂交瘤形成腹水癌。从该小鼠中收集腹水，离心(3,000rpm、5 分钟)除去固体部分，用 40-50%硫酸铵盐析，然后通过辛酸沉淀法、DEAE-琼脂糖凝胶柱、A 蛋白-柱或凝胶过滤柱进行纯化，收集 IgG 或 IgM 流分，以此作为纯化单克隆抗体。

20 使用亚类分类试剂盒(sub-class typing kit)，通过酶免疫测定法确定抗体的亚类。蛋白量的定量根据劳里法以及 280nm 吸光度计算。

25 由以上方法制备的、生成本发明方法中所用单克隆抗体的杂交瘤的具体例子有杂交瘤 KTM-285。杂交瘤 KTM-285 于 2001 年 5 月 16 日保藏在日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (邮政编码 305-8566)独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心，保藏号为 FERM BP-7589。以下将杂交瘤 KTM-285 生成的单克隆抗体简称为 KTM-285 抗体。

2. 人源化抗体的制备方法

(1) 人源化抗体表达载体的构建

本发明的方法中使用的单克隆抗体除按照上述 1 的单克隆抗体制备方法获得以外，也可以使用基因工程方法从上述细胞中获得编码该抗体的重链(H 链)和轻链(L 链)的 cDNA，将编码 H 链和 L 链的 cDNA 插入抗体表达载体的启动子的下游，构建重组载体，将该载体导入宿主细胞，将获得的该抗体表达细胞在适当的培养基中培养，或给予动物，使该细胞形成腹水癌，再通过分离纯化该培养液或腹水制备。由杂交瘤生成的单克隆抗体是 IgA 型、IgM 型等的多聚体时，如果使用本项的方法生成抗体，则可获得 IgG 型抗体。

这样的抗体表达载体是整合了编码适当的动物抗体的恒定区(C 区)的恒定区重链(CH)和恒定区轻链(CL)的基因的用于动物细胞的表达载体，通过向用于动物细胞的表达载体中分别插入编码适当的动物抗体 CH 和 CL 的基因来构建。

作为动物抗体的 C 区，可以使用例如人抗体 H 链中的 C γ 1 或 C γ 4、小鼠抗体 H 链中的 C γ 1 或 C γ 2a、C γ 2b、C γ 3、人抗体 L 链中的 C κ 、小鼠抗体 L 链中的 C κ 等任意的动物抗体的 C 区。编码抗体 C 区的基因可以使用由外显子和内含子构成的染色体 DNA，也可以使用 cDNA。用于动物细胞的表达载体只要可整合并表达编码抗体 C 区的基因，可以使用任何载体。

所述载体例如有 pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem, 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)]等。用于动物的表达载体中所用的启动子和增强子有 SV40 的早期启动子和增强子[J. Biochem, 101, 1307 (1987)]、小鼠莫洛尼氏白血病病毒的 LTR 启动子和增强子[Biochen. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)]以及免疫球蛋白 H 链的启动子 [Cell, 41, 479 (1985)]、增强子[Cell, 33, 717 (1983)]等。

表达载体可以是抗体 H 链、L 链分别存在于不同载体的形式或存在于同一载体上的形式(串联型)的任意形式,从表达载体构建的容易程度、向动物细胞导入的容易程度、动物细胞内抗体 H 链和 L 链表达量的平衡角度考虑,优选串联型表达载体[J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]. 串联型的人源化抗体表达载体有 pKANTEX93 (WO97/10354)、pEE18 (Hybridoma, 17, 559-567, 1998)等。

构建的人源化抗体表达载体可用于人嵌合抗体和人 CDR 移植抗体在动物细胞中的表达。

(2) 编码抗体可变区的 DNA 的获得

编码抗体例如小鼠抗磷酸胆碱抗体的可变区重链(VH)和可变区轻链(VL)的 cDNA 可如下获得。按照常规方法[Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989); 以下简称分子克隆第 2 版或 Current Protocols in Molecular Biology Supplement 1-38; 以下简称为 Current Protocols], 从生成天然抗体-小鼠抗磷酸胆碱抗体的细胞例如小鼠末梢血细胞或小鼠脾细胞等中构建 cDNA 文库。

cDNA 文库的构建方法有: 分子克隆第 2 版(1989 年)、分子生物学 Current Protocols (1987 年)以及 DNA Cloning1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等中记载的方法、或使用市售试剂盒例如 SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning [Gibco BRL]或 ZAP-cDNA 合成试剂盒 [Stratagene Corp.]的方法等。还可以利用市售的 cDNA 文库例如宝酒造公司制造的小鼠脾细胞 cDNA 文库等。

用于构建 cDNA 文库的克隆载体只要是可在大肠杆菌 K12 菌株中自体复制的即可,可以使用噬菌体载体、质粒载体等任何载体。具体有: ZAP Express [Stratagene Corp., Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK (+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、 λ zap II (Stratagene Corp.)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (Clontec Corp.)、 λ BlueMid (Clontec Corp.)、 λ ExCell (Pharmacia

Corp.)、pT7T318U (Pharmacia Corp.)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]等。

用于导入整合了 cDNA 的载体的大肠杆菌只要是属于大肠杆菌的微生物均可使用。具体可以使用大肠杆菌(*Escherichia coli*)XL1-Blue MRF' [Stratagene Corp.、Strategies, 5, 81 (1992)]、大肠杆菌 C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、大肠杆菌 Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、大肠杆菌 Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、大肠杆菌 NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、大肠杆菌 K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、大肠杆菌 JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]等。通过将 cDNA 整合到上述克隆载体, 再将该克隆载体导入宿主细胞, 即可构建 cDNA 文库。该克隆载体为质粒时, 可通过电穿孔法或氯化钙法等导入宿主细胞。该克隆载体为噬菌体时, 可通过体外包装等方法导入宿主细胞。

从上述获得的 cDNA 文库中制备含有编码小鼠抗磷酸胆碱抗体的 VH 和 VL 的 DNA 的转化细胞株时, 可以根据例如文献[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 2109 (1985)]中记载的编码小鼠抗磷酸胆碱抗体的 VH 和 VL 的 DNA 的核苷酸序列制备探针, 用荧光物质、放射线、酶等标记该探针, 通过噬菌斑杂交、集落杂交、DNA 印迹杂交等选择与该探针杂交的转化细胞株。

探针具体有: 具有 SEQ ID NO.1 所示 VH 的核苷酸序列和 SEQ ID NO.2 所示 VL 的核苷酸序列的全部或部分的 DNA。

编码 VH 的 DNA 例如可通过下述方法扩增获得: 以具有 SEQ ID NO.3 所示核苷酸序列的合成 DNA 为有义引物, 以具有 SEQ ID NO.4 所示核苷酸序列的合成 DNA 为反义引物, 以小鼠脾细胞 cDNA 文库为模板进行聚合酶链反应(以下称为 PCR)。同样, 编码 VL 的 DNA 可通过下述方法扩增获得: 以具有 SEQ ID NO.5 所示核苷酸序列的合成 DNA 为有义引物, 以具有 SEQ ID NO.6 所示核苷酸序列的合成 DNA 为反义引物, 以小鼠脾细胞 cDNA 文库为模板进行 PCR。利用 PCR 还可以获得含有 VH 和 VL 全序列的 DNA。

确定上述获得的编码小鼠抗磷酸胆碱抗体的 VH 和 VL 的 DNA 的全核苷酸序列，由核苷酸序列推断 VH 和 VL 的全氨基酸序列。

(3) 人嵌合抗体表达载体的构建

可向编码上述构建的抗体表达载体中抗体 CH 和 CL 的基因的上游
5 插入编码小鼠抗磷酸胆碱抗体的 VH 和 VL 的 cDNA，构建表达载体。
例如，预先在编码表达载体中抗体 CH 和 CL 的基因的上游设置用于克
隆编码小鼠抗磷酸胆碱抗体的 VH 和 VL 的 cDNA 的限制酶的识别序
列，将编码小鼠抗磷酸胆碱抗体的 VH 和 VL 的 cDNA 经由下述合成
DNA 插入到该克隆位点，由此可以制备表达载体。所述合成 DNA 是
10 由小鼠抗磷酸胆碱抗体的 V 区 3'末端侧的核苷酸序列和表达载体上抗
体的 C 区 5'末端侧的核苷酸序列构成的，可使用 DNA 合成仪来制备，
以使其两端具有适当的限制酶切位点。

(4) 人源化抗体的表达

通过将上述表达载体导入适当的宿主细胞，可获得稳定地生成抗
15 磷酸胆碱抗体的转化细胞株。表达载体向宿主细胞导入的方法有电穿
孔法[特开平 2-257891 号公报, Cytotechnology, 3, 133 (1990)]等。导入表
达载体的宿主细胞只要是可使抗体表达的宿主细胞，可以使用任何细
胞。例如有小鼠 SP2/0-Ag 细胞(ATCC CRL1581)、小鼠 P3X63-Ag8.653
细胞(ATCC CRL1580)、二氢叶酸还原酶基因(以下称为 DHFR 基因)缺
20 损的 CHO 细胞[Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 4216 (1980)]、大鼠 YB2/3HL.
P2. G11. 16Ag.20 细胞(ATCC CRL1662, 以下称为 YB2/0 细胞)等。

导入载体后，可以根据特开平 2-257891 号公报所公开的方法，通
过含有 G418 和 FCS 的 RPMI1640 培养基选择稳定生成抗体的转化细
胞株。将得到的转化细胞株在培养基中培养，可以使其在培养液中生
25 成重组抗体并蓄积。另外也可以根据特开平 2-257891 号公报所公开的
方法，利用 DHFR 基因扩增系统等提高转化细胞株生成重组抗体的量。

可以使用 A 蛋白柱从转化细胞株的培养上清液中纯化抗体(アンチ
ボディイス、第 8 章)。也可以使用其他通常的蛋白质所用的纯化方法。

例如可将凝胶过滤、离子交换层析以及超滤等组合进行纯化。纯化的重组抗体的 H 链、L 链或抗体分子总分子量可用聚丙烯酰胺电泳法 (SDS-PAGE) [Nature, 227, 680 (1970)]或蛋白质印迹法(アンチボディ ス、第 12 章)等测定。

- 5 生成本发明的方法中使用的抗体的抗体生成细胞的具体例子有例如抗体生成细胞 KTM-2001。抗体生成细胞 KTM-2001 于 2001 年 4 月 18 日保藏在日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (邮政编码 305-8566)独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心, 保藏号为 FERM BP-7549。以下将抗体生成细胞 KTM-2001 生成的抗体
- 10 简称为 KTM-2001 抗体。

附图简述

图 1 表示重组质粒 pBSPCVH 的结构。

图 2 表示重组质粒 pBSPCVL 的结构。

- 15 图 3 表示表达载体 pKANTEX93 的结构。

图 4 表示质粒 pBSVH-2 的结构。

图 5 表示质粒 pBSVL-2 的结构。

图 6 表示质粒 pKANTEXPCVH 的结构。

图 7 表示质粒 pKANTEXPChCyl 的结构。

- 20 图 8 表示对健康人和冠状动脉硬化疾病患者的血浆以及作为对照的样品稀释液按照 5 个梯度稀释进行测定的结果。-●-表示动脉硬化患者的血浆, -▲-表示健康人的血浆, -○-表示只有样品稀释液的结果。

图 9 表示健康人和冠状动脉狭窄疾病患者的血浆中变性脂蛋白的测定值。

- 25 图 10 表示健康人和心绞痛患者的血浆中变性脂蛋白的测定值。

图 11 表示健康人和心肌梗塞患者的血浆中变性脂蛋白的测定值。

图 12 表示对来自健康人和冠状动脉硬化疾病患者的血浆的脂蛋白施加各种物理变性进行测定的结果。-○-表示对健康人的血浆、-●-表

示对患者的血浆进行测定的结果。

图 13 表示使脂蛋白脂肪酶与健康人的脂蛋白作用进行酶变性的测定结果。

图 14 表示对经纯化的脂蛋白进行变性，测定与 KTM-285 抗体和
5 KTM-2001 抗体的反应性的结果。

图 15 表示对经纯化的脂蛋白进行变性，测定与 KTM-285 抗体的反应性的结果。

以下通过实施例具体说明本发明。但本发明并不受这些实施例的
10 限定。

实施发明的最佳方式

实施例 1 抗磷酸胆碱抗体的制备(KTM-2001 抗体)

(1) 小鼠抗磷酸胆碱抗体基因的获得

15 1) 小鼠脾细胞 cDNA 文库的构建

使通常饲养的 Balb/c 小鼠失血死亡，然后施行开腹手术，摘取脾脏。在 RPMI1640 培养基(日水制药)中将脾脏剪碎，用镊子将其分散，离心(1200r.p.m、5 分钟)后，去掉上清液，用 Tris-氯化铵缓冲液(pH 7.65)处理 1-2 分钟，除去红细胞，用 RPMI1640 培养基洗涤 3 次，再用生理
20 盐水洗涤 3 次，将其用于 mRNA 的提取。使用 mRNA 提取试剂盒 Quick Prep. mRNA purification kit (商品编码 27-9254-01、Amasham-Pharmacia Corp.)，按照试剂盒所附说明书从 5.0×10^7 个上述脾细胞中获得 mRNA。

使用 cDNA 合成试剂盒 cDNA Synthesis kit (商品编码 27-9260-01、
25 Pharmacia Corp.)，按照试剂盒所附说明书由 5 μ g mRNA 合成两端具有 Eco RI-Not I 接头的 cDNA。将约 6 μ g 制备的各 cDNA 溶解于 10 μ L 灭菌水中，然后通过琼脂糖凝胶电泳收集流分。分别回收约 0.1 μ L 抗体 H 链对应的约 1.8kbp 的 cDNA 片段和约 0.1 μ L L 链对应的约 1.0kbp 的

cDNA 片段。接着将 0.1 μ L H 链对应的约 1.8kbp 的 cDNA 片段和 0.1 μ L L 链对应的约 1.0kbp 的 cDNA 片段、1 μ L λ ZAP II 载体[λ ZAP II 载体经 Eco RI 切断后经牛肠碱性磷酸酶处理: Stratagene]溶解于 11.5 μ L T4 连接酶缓冲液中, 加入 175 单位 T4 DNA 连接酶, 在 12 $^{\circ}$ C 温育 24 小时, 5 再在室温下温育 2 小时。按照常规方法[Maniatis 等编、分子克隆 (Molecular Cloning)、2. 95、Cold Spring Harbor Laboratory 1989 发行], 使用 Giga Pack Gold (Stratagene、商品编码 SC200201), 将 4 μ L 各反应液包装到 λ 噬菌体中, 使其按照常规方法[Maniatis 等编、分子克隆 (Molecular Cloning)、2. 95-107、Cold Spring Harbor Laboratory 1989 发 10 行]感染 Giga Pack Gold 所附的大肠杆菌菌株 XL1-BlueMRF'⁺[Biotechniques, 5, 376 (1987)], 获得噬菌体克隆作为小鼠脾细胞 cDNA 文库。接着, 按照常规方法, 将噬菌体固定于 HyBand N⁺滤膜(商品编码 RPN87B、Amasham-Pharmacia Corp.)上[Maniatis 等编、分子克隆 (Molecular Cloning)、2. 112、Cold Spring Harbor Laboratory 1989 15 发行]。

2) VH 探针 DNA 的制备

向含有 12.5pmole 具有 SEQ ID NO.7 和 SEQ ID NO.8 所示核苷酸序列的引物、10ng 上述 1)中制备的小鼠脾细胞 cDNA 和 200 μ mol/L 脱氧核苷三磷酸的 Ex Taq 聚合酶反应液(宝酒造)中加入 1 单位 Ex Taq 聚合酶(商品编码 RR001A、宝酒造), 在 95 $^{\circ}$ C 进行 5 分钟的预处理, 然后 20 进行 95 $^{\circ}$ C 2 分钟、55 $^{\circ}$ C 2 分钟、72 $^{\circ}$ C 2 分钟的聚合酶链反应(PCR), 共 30 个循环, 回收约 260bp 的 DNA 片段。

PCR 反应全部采用 GeneAmpPCR 系统 9700 (Perkin Elmer)进行。由下述 5 所示的方法确定扩增片段序列, 证实与小鼠抗磷酸胆碱抗体 H 链 cDNA 的核苷酸序列(GENE BANK 检索号 M16334)一致。 25

3) VL 探针 DNA 的制备

向含有 12.5pmole 具有 SEQ ID NO.9 和 SEQ ID NO.10 所示核苷酸序列的引物、10ng 上述 1)中制备的小鼠脾细胞 cDNA 和 200 μ mol/L 脱

氧核苷三磷酸的 Ex Taq.聚合酶反应液(宝酒造)中加入 1 单位 Ex Taq.聚合酶(商品编码 RR001A、宝酒造), 在 95℃进行 5 分钟的预处理, 然后进行 95℃ 2 分钟、55℃ 2 分钟、72℃ 2 分钟的 PCR 反应, 共 30 个循环, 回收约 220bp 的 DNA 片段。由下述 5 所示的方法确定扩增片段序列, 证实与小鼠抗磷酸胆碱抗体 L 链 cDNA 的核苷酸序列 (GENEBANK 检索号 U29423)一致。

4) 小鼠抗磷酸胆碱抗体 cDNA 的克隆

将上述 2)和 3)中制备的探针依照 ECL 直接标记和检测试剂盒(ECL Direct labelling and detection kit)(商品编码 RPN3000、Amasham-Pharmacia Corp.)所附说明书进行标记, 按照常规方法[Maniatis 等编、分子克隆(Molecular Cloning)、2. 108、Cold Spring Harbor Laboratory 1989 发行], 从转印了上述 1)中制备的小鼠脾细胞 cDNA 文库的膜中选择与标记的探针强烈结合的噬菌体克隆。接着, 使用 cDNA 合成试剂盒 ZAP-cDNA 合成试剂盒[商品编码 SC200400、Stratagene Corp.], 将噬菌体克隆亚克隆进入质粒 pBluescript SK (-)中, 获得含有小鼠抗磷酸胆碱抗体 H 链的 cDNA 的重组质粒 pBSPCVH (图 1)和含有小鼠抗磷酸胆碱抗体 L 链的 cDNA 的重组质粒 pBSPCVL (图 2)。将 pBSPCVH 和 pBSPCVL 用 EcoRI 酶切, 则约 1.8kbp 的 cDNA 片段被插入 pBSPCVH, 约 1.1kbp 的 cDNA 片段被插入 pBSPCVL。

(2) H 链 cDNA 和 L 链 cDNA 的可变区的核苷酸序列

使用 Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer、商品编码 402123), 通过双脱氧(Dye Deoxy)法[Maniatis 等编、分子克隆、13.42、Cold Spring Harbor Laboratory 1989 发行]确定上述 4)中得到的 H 链 cDNA 和 L 链 cDNA 的可变区的核苷酸序列。均是在 5' 末端存在推断为起始密码子 ATG 的甲硫氨酸、含有前导序列的全长 cDNA。SEQ ID NO.1 表示 VH 的核苷酸序列, SEQ ID NO.2 表示 VL 的核苷酸序列。

(3) 重组抗体表达载体的构建

1) 人 IgG1 型重组抗体表达载体的构建

将上述 4) 中获得的 H 链 cDNA 和 L 链 cDNA 的可变区按照下述顺序插入 WO97/10354 中记载的人 IgG1 型嵌合抗体表达载体 pKANTEK93 (图 3) 中。

2) 小鼠抗磷酸胆碱抗体 VH 区的插入

为了使小鼠 VH 区的 cDNA 与人恒定区进行基因工程融合, 将各 25pmole SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.4 所示的 2 种合成 DNA 溶解于 10 μ L 由 10mmol/L Tris-盐酸(pH 7.5)、10mmol/L 氯化镁、1mmol/L DTT 和 50mmol/L 氯化钠构成的缓冲液中, 在 70 $^{\circ}$ C 水浴中反应 10 分钟, 然后缓慢冷却, 进行缔合反应, 制备双链合成 DNA 盒。

另一方面, 将 1 μ g 含有 H 链全长 cDNA 的质粒 pBSPCVH 溶解于 30 μ L 由 10mmol/L Tris-盐酸(pH 7.5)、10mmol/L 氯化镁、1mmol/L DTT 和 50mmol/L 氯化钠构成的缓冲液中, 加入 10 单位 *Bst*PI 和 10 单位 *Spe*I, 在 37 $^{\circ}$ C 进行 2 小时消化反应。将该反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 然后回收含有 cDNA 的 VH 区和 Ap 抗性基因的约 3.4kbp 的 DNA 片段。

将 0.1 μ g 上述得到的来自质粒 pBSPCVH 的 *Bst*PI-*Spe*I 片段(3.4kbp) 和双链合成 DNA 盒(10fmole)溶解于 9 μ L 灭菌水, 加入 9 μ L DNA 连接试剂盒 ver.2 溶液 I (商品编码 6022、宝酒造), 在 16 $^{\circ}$ C 进行 1 小时连接反应。使用这样得到的重组质粒 DNA 转化大肠杆菌 DH5 α 菌株, 得到图 4 所示质粒 pBSVH-2。

接着, 将 1 μ g 上述所得 pBSVH-2 溶解于 30 μ L 由 10mmol/L Tris-盐酸(pH 7.5)、10mmol/L 氯化镁、1mmol/L DTT 构成的缓冲液中, 加入 10 单位 *Apa*I, 在 37 $^{\circ}$ C 进行 2 小时消化反应。向该反应液中加入 60 μ L 缓冲液, 使终浓度为 50mmol/L Tris-盐酸(pH 7.5)、10mmol/L 氯化镁、1mmol/L DTT、100mmol/L 氯化钠、0.01% Triton X-100 和 0.01% BSA, 再加入 10 单位 *Not*I, 在 37 $^{\circ}$ C 进行 2 小时消化反应。将该反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 然后回收含有 VH 区的 cDNA 的约 0.5kbp 的 DNA

片段。

另一方面，将 1 μ g 图 3 所示的人嵌合抗体表达载体 pKANTEX93 溶解于 30 μ L 由 10mmol/L Tris-盐酸(pH 7.5)、10mmol/L 氯化镁、1mmol/L DTT 构成的缓冲液中，加入 10 单位 *Apa*I，在 37 $^{\circ}$ C 进行 2 小时消化反
5 应。向该反应液中加入 60 μ L 缓冲液，使终浓度为 50mmol/L Tris-盐酸(pH 7.5)、10mmol/L 氯化镁、1mmol/L DTT、100mmol/L 氯化钠、0.01% Triton X-100 和 0.01% BSA，再加入 10 单位 *Not*I，在 37 $^{\circ}$ C 进行 2 小时消化反
10 应。将该反应液进行琼脂糖凝胶电泳，然后回收含有人 γ 1 H 链恒定区 cDNA、人 κ L 链恒定区 cDNA、小鼠莫洛尼氏白血病病毒的两个启动子、两个剪接信号、脱氢叶酸还原酶基因和 G418 抗性基因的约 13.2kbp 的 DNA 片段。

将 0.05 μ g 上述所得来自质粒 pBSVH-2 (图 4)的 *Not*I-*Apa*I 片段 (0.5kbp)和 0.1 μ g 来自 pKANTEX93 的 *Not*I-*Apa*I 片段(13.2kbp)溶解于 9 μ L 灭菌水，加入 9 μ L DNA 连接试剂盒 ver.2 溶液 I (宝酒造)，在 16
15 $^{\circ}$ C 进行 1 小时连接反应。使用这样得到的重组质粒 DNA 转化大肠杆菌 DH5 α 菌株，得到图 6 所示质粒 pKANTEXPCVH。

3) 小鼠抗磷酸胆碱抗体 VL 区的插入

为了使小鼠 VL 区的 cDNA 与人恒定区进行基因工程融合，将各 25pmole SEQ ID NO.5 和 SEQ ID NO.6 所示的 2 种合成 DNA 溶解于
20 10 μ L 由 10mmol/L Tris-盐酸(pH 7.5)、10mmol/L 氯化镁、1mmol/L DTT 和 50mmol/L 氯化钠构成的缓冲液中，在 70 $^{\circ}$ C 水浴中反应 10 分钟，然后缓慢冷却，进行缔合反应，制备双链合成 DNA 盒。

另一方面，将 1 μ g 含有 L 链全长 cDNA 的质粒 pBSPCVL 溶解于 30 μ L 由 50mmol/L Tris-盐酸(pH 7.5)、10mmol/L 氯化镁、1mmol/L DTT
25 和 100mmol/L 氯化钠构成的缓冲液中，加入 10 单位 *Eco*RI 和 10 单位 *Sfc*I，在 37 $^{\circ}$ C 进行 2 小时消化反应。将该反应液进行琼脂糖凝胶电泳，然后回收含有 cDNA 的 VL 区的约 0.4kbp 的 DNA 片段。

将 1 μ g 克隆载体 pBluescript SK(-) (Stratagene)溶解于 30 μ L 由

20mmol/L Tris-盐酸(pH 8.5)、10mmol/L 氯化镁、1mmol/L DTT 和 100mmol/L 氯化钾构成的缓冲液中, 加入 10 单位 EcoRI 和 10 单位 BamHI, 在 37°C 进行 2 小时消化反应。将该反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 然后回收含有克隆载体 pBluescript SK(-)的约 2.9kbp 的 DNA 片段。

5 将 0.1 μ g 上述所得来自质粒 pBSPCVL 的 EcoRI-SfcI 片段(0.4kbp)、0.1 μ g 来自质粒 pBluescript SK(-)的 Eco RI-Bam HI 片段(2.9kbp)和双链合成 DNA 盒(10fmole)溶解于 9 μ L 灭菌水, 加入 9 μ L DNA 连接试剂盒 ver.2 溶液 I (商品编码 6022、宝酒造), 在 16°C 进行 1 小时连接反应。使用这样得到的重组质粒 DNA 转化大肠杆菌 DH5 α 菌株, 得到图 5

10 所示质粒 pBSVL-2。接着, 将 1 μ g 上述所得 pBSVL-2 溶解于 30 μ L 由 50mmol/L Tris-盐酸(pH 7.5)、10mmol/L 氯化镁、1mmol/L DTT 和 100mmol/L 氯化钠构成的缓冲液中, 加入 10 单位 EcoRI 和 10 单位 BsiWI, 在 37°C 进行 2 小时消化反应。将该反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 然后回收含有 VL 区 cDNA 的约 3.4kbp 的 DNA 片段。

15 另一方面, 将 1 μ g 上述(3)的 2)中所得表达质粒 pKANTEPCVH 溶解于由 50mmol/L Tris-盐酸(pH 7.5)、10mmol/L 氯化镁、1mmol/L DTT、100mmol/L 氯化钠构成的缓冲液中, 加入 10 单位 EcoRI 和 10 单位 BsiWI, 在 37°C 进行 2 小时消化反应。将该反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 然后回收含有小鼠抗磷酸胆碱抗体 H 链可变区 cDNA、人 γ 1 H 链恒定区 cDNA、人 κ L 链恒定区 cDNA、小鼠莫洛尼氏白血病病毒的两个启动子、两个剪接信号、脱氢叶酸还原酶基因和 G418 抗性基因的约 13.7kbp 的 DNA 片段。

20 将 0.05 μ g 上述所得来自 pBSPCVL 的 EcoRI-BsiWI 片段(0.5kbp)和 0.1 μ g 来自 pKANTEPCVH 的片段(13.7kbp)溶解于 9 μ L 灭菌水, 加入 9 μ L DNA 连接试剂盒 ver.2 溶液 I (宝酒造), 在 16°C 进行 1 小时连接反应。使用这样得到的重组质粒 DNA 转化大肠杆菌 DH5 α 菌株, 得到

25 图 7 所示质粒 pKANTEPC γ 1。

(4) 重组抗磷酸胆碱抗体表达载体的表达

小鼠嵌合抗磷酸胆碱抗体表达载体向 YB2/0 细胞的导入按照 Miyaji 等人的方法, 采用电穿孔法[Cytotechnology、3, 133 (1990)]进行。将 4 μ g 嵌合抗磷酸胆碱抗体表达载体导入 4 \times 10⁶ 个 YB2/0 细胞(ATCC CRL1581)后, 悬浮于 40ml RPMI1640-FCS (10) [含有 10% FCS 的 RPMI1640 培养基(Gibco)], 按照 200 μ L/孔分注于 96 孔微量培养板。在 CO₂ 培养箱、37 $^{\circ}$ C 培养 24 小时, 然后添加 G418 (Gibco), 使其浓度为 0.5mg/ml, 培养 1-2 周。待出现转化细胞株集落, 从发生细胞汇合的孔中回收培养液, 用如下所示的酶免疫测定法(ELISA 法)测定重组抗体的表达量。

(5) 酶免疫测定法(ELISA 法)

1) 用于测定抗体活性的 ELISA

用 PBS 将实施例 2 的(2)中制备的 PC9CHO-LDL 偶联物制备成 1 μ g/mL。将 50 μ L 该溶液或 50 μ L 该溶液的稀释液分别注入 96 孔微量滴定板(Falcon)各孔中, 风干后, 用含有 0.1%BSA 的 PBS 封闭。再向其中加入 50-100 μ L 转化细胞株的培养上清液或纯化的重组抗磷酸胆碱抗体, 在室温下反应 1-2 小时。反应后, 将各孔用 PBS 洗涤, 加入 50-100 μ L 过氧化物酶标记抗人 γ 1 抗体(商品编码 A110POD、American Calex Corp.), 在室温下反应 1-2 小时。用 PBS 洗涤后, 加入 50-100 μ L ABTS 底物溶液[将 550mg 2,2'-连氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵溶解于 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 4.2), 使用之前再加入 1 μ L/mL 过氧化氢而成的溶液], 使其显色, 测定 415nm 的吸光度。

2) 用于测定抗体量的 ELISA

将 50 μ L 抗人 κ L 链抗体(Zymed、商品编码 05-3900)溶液的稀释液分别注入 96 孔微量滴定板(Falcon)各孔中, 风干后, 用含有 0.1%BSA 的 PBS 封闭。再向其中加入 50-100 μ L 转化细胞株的培养上清液或纯化的重组抗磷酸胆碱抗体, 在室温下反应 1-2 小时。反应后, 将各孔用 PBS 洗涤, 加入 50-100 μ L 过氧化物酶标记抗人 γ 1 抗体(商品编码

A110POD、American Calex Corp.), 在室温下反应 1-2 小时。用 PBS 洗涤后, 加入 50-100 μ L ABTS 底物溶液[将 550mg 2,2'-连氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵溶解于 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 4.2), 使用之前再加入 1 μ L/mL 过氧化氢而成的溶液], 使其显色, 测定 415nm 的吸光度。

5

(6) 通过基因扩增获得高表达细胞株

将上述所得克隆悬浮于含有 0.5mg/mL G418、50nmol/L 氨甲蝶呤(以下简称 MTX)的 RPMI1640-FCS(10)培养基中, 使细胞浓度为 1.0-2.0 $\times 10^5$ 细胞/mL, 按照 1mL/孔分注于 24 孔板。在 CO₂ 培养箱、37 $^{\circ}$ C 下培养 1-2 周, 诱导 50nmol/L MTX 抗性克隆。将所得 50nmol/L MTX 抗性克隆悬浮于含有 0.5mg/mL G418、100nmol/L MTX 的 RPMI1640-FCS(10)培养基中, 使细胞浓度为 1.0-2.0 $\times 10^5$ 细胞/mL, 按照 1mL/孔分注于 24 孔板。在 CO₂ 培养箱、37 $^{\circ}$ C 下培养 1-2 周, 诱导 100nmol/L MTX 抗性克隆。将所得 100nmol/L MTX 抗性克隆悬浮于含有 0.5mg/mL G418、200nmol/L MTX 的 RPMI1640-FCS(10)培养基中, 使细胞浓度为 1.0-2.0 $\times 10^5$ 细胞/mL, 按照 1mL/孔分注于 24 孔板。在 CO₂ 培养箱、37 $^{\circ}$ C 下培养 1-2 周, 诱导 200nmol/L MTX 抗性克隆。待细胞汇合时, 用 ELISA 法测定培养液中各嵌合抗体表达量。通过有限稀释法将所得克隆中显示最高表达量的 200nmol/L MTX 抗性克隆进行单细胞克隆。待细胞汇合时, 用 ELISA 法测定培养液中各嵌合抗体表达量。在所得克隆中显示最高表达量的 200nmol/L MTX 抗性克隆的嵌合抗体量约为 10 μ g/mL。将由 pKANTEXPChCy1 导入 YB2/0 细胞获得的 200nmol/L MTX 抗性克隆命名为转化细胞株 KTM-2001(人嵌合抗体 KTM-2001 生产株)。

10

15

20

25

实施例 2 抗磷酸胆碱抗体的制备(KTM-285 抗体)

(1) 人血浆中 LDL 组分的制备

向由肝素血获得的人血浆中加入 EDTA, 使血浆终浓度为

0.25mmol/L, 取 0.75mL 装入超速离心用试管(4mL 容量), 上面加入 250 μ L 含有 0.3mmol/L EDTA 的 0.15mol/L NaCl, 在 10 $^{\circ}$ C、以 185,000 \times g 离心 2.5 小时。去掉 150 μ L 上层, 留取 750 μ L 下层, 加入 150 μ L KBr 溶液(50% w/v), 使密度为 1.063。将经上述密度调整的血浆加入超速离心用试管(4mL 容量)底部, 在 10 $^{\circ}$ C、以 240,000 \times g 离心 16 小时, 仔细回收上层的橙色条带(约 100-150 μ L), 在 4 $^{\circ}$ C、用含有 0.25mmol/L EDTA 的 PBS 透析 6 小时(每间隔 2 小时用 3 升透析液交换 3 次)。通过琼脂糖凝胶电泳法和脂染色法中是否呈现单一条带, 确认所得 LDL 试样的 LDL 纯度, 然后以 BSA 作为标准物质, 用劳里法对蛋白质进行定量, 以该值作为 LDL 浓度。

(2) 免疫用抗原和固相化抗原的制备

1-棕榈酰基-2-(9-氧代壬酰基)-甘油基-3-磷酸胆碱按照文献[J. Biol. Chem., 266(17), 11095 (1991)]记载的方法制备。向 1-棕榈酰基-2-油酰基 10-甘油基-3-磷酸胆碱(Avanti)的氯仿溶液中通入臭氧气体, 通过二甲基硫醚将生成的二酰基甘油基磷酸胆碱的臭氧化物还原合成。在展开溶剂(氯仿:甲醇:水=10:5:1)的条件下, 通过薄层层析法展开得到的氧化物, 分离 1-棕榈酰基-2-(9-氧代壬酰基)-甘油基-3-磷酸胆碱(以下简称为 PC9CHO)。PC9CHO 的纯度通过反相 HPLC (ODS 柱、甲醇:20mmol/L 氯化胆碱水溶液:乙腈=875:100:25)确认是否产生单峰, 在氯仿-乙醇(1:1)溶液中、在-20 $^{\circ}$ C保存。

使用含有 0.25mmol/L EDTA 的 PBS 溶液调整(1)项中获得的纯化 LDL, 使其浓度为 1mg/mL, 向每 1mL 该溶液中加入 100 μ L 溶解了 5,000ng 上述 PC9CHO 的 DMSO 溶液, 搅拌, 获得 PC9CHO-LDL 偶联物。

(3) 单克隆抗体的制备

将混有等量弗氏完全佐剂的磷酸胆碱-LDL 按照 0.1mg/只的剂量给予 6 周龄雄性 Balb/c 小鼠的背部皮下。之后每 3 周将该等量混合物按照 0.1mg/只的剂量给予该小鼠背部皮下 2 次, 3 周后, 按照 0.1mg/只

的剂量由尾静脉给予溶解于 PBS 的 PC9CHO-LDL 偶联物, 3 天后, 按照下述方法从脾脏收集抗体生成细胞。

5 从免疫动物体中无菌摘取脾脏, 在不含血清的 RPMI-1640 培养基(日水制药)中分散, 使其通过 100 目的网形成单个细胞, 悬浮于低渗溶液中, 溶解红细胞, 然后用不含血清的 RPMI-1640 培养基离心洗涤 3 次, 获得抗体生成细胞。

另一方面, 将小鼠骨髓瘤细胞 P3X-Ag8-U1 在含有 10%胎牛血清(FCS)的 RPMI-1640 培养基中培养, 在对数生长期回收细胞, 用不含血清的 RPMI-1640 培养基离心洗涤 3 次。

10 将上述获得的抗体生成细胞悬浮液和小鼠骨髓瘤细胞 P3X-Ag8-U1 悬浮液按照 10:1 的比例混合, 以 1200rpm 离心 5 分钟, 除去培养液。向残留细胞中缓慢加入 1mL 50%聚乙二醇 1500 液(Broeringer-Mannheim Corp.), 再缓慢加入 50mL 不含血清的 RPMI-1640 培养基, 然后以 1200rpm 离心 5 分钟, 除去培养基, 将残留的细胞悬浮于 HAT 培养基(含有 1×10^{-4} mol/L 次黄嘌呤、 4×10^{-7} mol/L 氨基蝶呤、 2×10^{-5} mol/L 胸腺嘧啶核苷的含 10%FCS RPMI-1640 培养基), 使其浓度为 1×10^6 细胞/mL, 将悬浮液以 200 μ L/孔分注入 96 孔微量滴定板。将细胞以上述状态放入 CO₂ 培养箱, 在含有 5% CO₂ 的空气中、在 37 $^{\circ}$ C 下培养。10 天后, 所有孔中均可观察到杂交瘤的集落。

20 为了选择含有生成目标抗体的细胞的孔, 如下所述, 用 ELISA 法对培养上清液中的抗体滴度进行定量。向 96 孔微量滴定板中分注 50 μ L PC9CHO-LDL 偶联物溶液(20 μ g/mL 0.1mol/L 碳酸缓冲液、pH 9.5)或 LDL 溶液(对照、20 μ g/mL 0.1mol/L 碳酸缓冲液、pH 9.5), 在 4 $^{\circ}$ C 静置过夜。将孔板用 PBS 洗涤 3 次, 然后将 250 μ L 1% BSA/PBS 溶液分注到孔板中, 在室温下静置 1 小时, 将各孔用 PBS 洗涤 3 次, 以此作为反应板。向反应板中加入 50 μ L 用含 0.1% BSA 的 PBS 稀释为 11 倍的培养上清液, 在室温下静置反应 3 小时。反应结束后, 将板用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS 洗涤 5 次, 然后加入 50 μ L 过氧化物酶(POD)标记-抗小

25

鼠免疫球蛋白-兔 IgG (Daco Corp.), 在室温下反应 1 小时。反应后, 将板用含有 0.05%吐温 20 的 PBS 洗涤 5 次, 然后加入 50 μ L TMB 显色试剂溶液(Intergene), 在室温下反应 30 分钟, 最后加入 50 μ L 1mol/L 硫酸水溶液, 通过微量板阅读器(MTP-120、Corona 电器)测定 450nm 的吸光度。与对照比较, 选择显示 1.0 以上吸光度的孔内的细胞。

5 克隆采用有限稀释法进行。将上述所得孔内的细胞用含有 1×10^7 个/mL 胸腺细胞的含 10% FCS RPMI-1640 培养基稀释, 使其浓度为 0.5 个/mL, 向 96 孔微量滴定板的各孔中分注 200 μ L, 用 5% CO₂ 培养箱在 37 $^{\circ}$ C 进行培养。培养开始 10-14 天后, 观察各孔, 筛选每孔有 1 个生长集落的孔, 用上述 ELISA 法对其培养上清液中抗体滴度进行定量, 选择含有生成目标抗体的细胞株的孔。再重复 2 次同样的操作, 获得稳定生成目标抗体的单克隆抗体生成细胞株。使用单克隆抗体分类试剂盒(Zymed)对培养上清液中的抗体进行鉴定, 并收集由得到的细胞株生成的抗体的免疫球蛋白类。获得的抗体是 IgM 型。

15 按照 0.5mL/只的剂量将降植烷(2,6,10,14-四甲基十五烷)注入 8 周龄以上雄性 Balb/c 小鼠的腹腔内, 饲养 2 周。

以 1×10^6 个/只对该小鼠腹腔内接种单克隆抗体生成细胞。

7-14 天后, 当小鼠腹腔内有足够的腹水贮留时, 使用 18G 注射针由腹腔回收腹水, 以 3,000rpm 离心 10 分钟, 回收上清液。将该上清液用 PBS 稀释为 3 倍后, 一边搅拌一边向其中滴加并混合与该稀释腹水等量的饱和硫酸铵/PBS 溶液, 滴加结束后继续搅拌一段时间。回收该混合液, 以 3,000rpm 离心 10 分钟, 回收残余物, 然后将该残余物用与稀释 3 倍的腹水等量的 PBS 溶解, 重复与上述同样的操作。将回收的残余物用与腹水量等量的含有 0.5mol/L NaCl 的 PBS 溶解。将上述溶解液通过用含有 0.5mol/L NaCl 的 PBS 平衡的聚丙烯酰胺葡聚糖 S-300 柱, 然后用含有 0.5mol/L NaCl 的 PBS 洗脱, 一边监测洗脱液 280nm 吸光度, 一边回收分子量在 800KD 附近的峰的级分, 以此作为纯化抗体。

(4) 抗体的选择

将 50 μ L 上述(2)中制备的 PC9CHO-LDL 溶液(20 μ g/mL 0.1mol/L 碳酸缓冲液、pH 9.5)分注于 96 孔微量滴定板(Nunc Corp)中, 在 4 $^{\circ}$ C 静置过夜。将板用 PBS 洗涤 3 次, 然后分注 250 μ L 1% BSA/PBS 溶液, 在 5 室温下静置 1 小时, 将各孔用 PBS 洗涤 3 次, 以此作为反应板。向该反应板中加入 50 μ L 添加了各种种类和浓度的物质的含 0.1% BSA 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)或只含 0.1% BSA 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) (对照: 抑制率 0%), 一边搅拌板一边向板分注 50 μ L 用含 0.1% BSA 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)将上述(3)中所得抗体稀释为 10 100ng/mL 的溶液, 混合, 在 4 $^{\circ}$ C 静置反应过夜。反应结束后, 将板用含有 0.05%吐温 20 的 PBS 洗涤 5 次, 然后加入 50 μ L POD 标记-抗小鼠免疫球蛋白-兔 IgG, 在室温下反应 1 小时。反应后, 将板用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS 洗涤 5 次, 然后加入 50 μ L TMB 显色溶液(Intergene), 在室温下反应 30 分钟, 最后加入 50 μ L 反应中止液, 通过微量板阅读器测定 450nm 的吸光度。制作反应中使用的磷酸胆碱浓度/吸光度的曲线, 以对照的吸光度为 100%时, 由各物质、各浓度的反应抑制率相对地确定反应性。根据该结果, 从上述(3)中获得的单克隆抗体生成细胞株中选择在最低浓度即可获得磷酸胆碱抑制作用的细胞株, 将该生成细胞株命名为 KTM-285。

20

实施例 3 抗体的特异性

将 50 μ L 实施例 2 的(2)中制备的 PC9CHO-LDL 溶液(20 μ g/mL 0.1mol/L 碳酸缓冲液、pH 9.5)分注于 96 孔微量滴定板(Nunc corp.)中, 在 4 $^{\circ}$ C 静置过夜。将板用 PBS 洗涤 3 次, 然后分注 250 μ L 1% BSA/PBS 溶液, 在室温下静置 1 小时, 将各孔用 PBS 洗涤 3 次, 以此作为反应 25 板。向该反应板中加入 50 μ L 添加了各种种类、浓度的物质的含 0.1% BSA 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)或只含 0.1% BSA 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4) (对照: 抑制率 0%), 一边搅拌板一边向板分注 50 μ L 用

含 0.1% BSA 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)将实施例 2 中所得 KTM-285 抗体和实施例 1 中所得 KTM-2001 抗体稀释为 100ng/mL 的溶液,混合,在 4℃ 静置反应过夜。反应结束后,将板用含有 0.05%吐温 20 的 PBS 洗涤 5 次,然后加入 50μL POD 标记-抗小鼠免疫球蛋白-兔 IgG,在室温下反应 1 小时。反应后,将板用含有 0.05%吐温 20 的 PBS 洗涤 5 次,然后加入 50μL TMB 显色溶液(Intergene),在室温下反应 30 分钟,最后加入 50μL 反应中止液,通过微量板阅读器测定 450nm 的吸光度。制作反应中使用的磷酸胆碱浓度/吸光度的曲线,以对照的吸光度为 100%时,由各物质、各浓度的反应抑制率相对地确定反应性。可观察到: KTM-285 抗体、KTM-2001 抗体均以低浓度只对磷酸胆碱产生抑制,而对磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸、硝基苯基磷酸胆碱、磷脂酰胆碱、磷酸乙醇胺、纯化人 LDL、纯化人 HDL 并未产生实质性的抑制。

实施例 4 使用 KTM-2001 抗体进行生物体内变性脂蛋白的测定以及与疾病的相关性

(1) 过氧化物酶标记抗体的制备

向 1mL 纯化抗人脱辅基 B 抗体(山羊、Kappel Corp)溶液(5mg/mL 0.1mol/L 硼酸缓冲液、pH 8.0)中加入 50μL 2-亚氨基噻烷-HCl 溶液(60mmol/L 0.1mol/L 硼酸缓冲液、pH 8.0),在 30℃ 反应 30 分钟,然后使其通过用含有 5mmol/L EDTA 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0)平衡的交联葡聚糖 G-25 柱(1cm × 30cm、Amersham-Pharmacia),回收洗脱的抗体流分。向 1mL 辣根过氧化物酶(简称 HRP。东洋纺)溶液(10mg/mL 0.1mol/L 磷酸缓冲液、pH 7.0)中加入 50μL EMCS 溶液(同人化学社、50mmol/L、DMSO 溶液),在 30℃ 反应 30 分钟,然后使其通过用 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5)平衡的交联葡聚糖 G-25 柱(1cm × 30cm、Amersham-Pharmacia),回收洗脱的 HRP 流分。将上述回收的抗体流分和 HRP 流分混合,在 30℃ 反应 30 分钟,然后使其通过用 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)平衡的交联葡聚糖 G-200 柱(1cm × 30cm、Amersham-

Pharmacia), 回收洗脱的抗体-HRP 偶联物流分, 以此作为过氧化物酶标记抗人脱辅基 B 抗体。向回收的流分中立即加入 BSA, 使其终浓度为 1%, 使用前一直在-50℃保存。

(2) ELISA 法

5 将实施例 1 中制备的 KTM-2001 抗体用 Tris-HCl (pH 8.0) 稀释为 10 μ g/mL, 以 100 μ L/孔向 96 孔微量滴定板(Nunc Corp)的各孔中加入, 在 4℃温育 16 小时。倾去溶液, 加入 350 μ L 含有 1%(w/v) BSA 的 Tris-HCl (pH 8.0), 在室温下温育 2 小时进行封闭, 然后用含有 0.05%(v/v)吐温 20 的 PBS (pH 7.4)洗涤 4 次。

10 接着, 将新鲜的动脉硬化患者血浆和健康人血浆用样品稀释液(含 1% BSA、5%聚醚、140mmol/L NaCl 的 10mmol/L 磷酸缓冲液、pH 7.4) 稀释为 1,000 倍, 再将其用相同的样品稀释液分别稀释为 4/5、3/5、2/5、1/5, 连同纯样品稀释液一起以 100 μ L/孔分别分注到孔中, 在室温温育 2 小时, 然后用含有 0.05%(v/v)吐温 20 的 PBS (pH 7.4)洗涤 4 次。

15 再向各孔中加入 100 μ L 用含有 1%(w/v) BSA 的 PBS (pH 7.4)稀释为 1,000 倍的过氧化物酶标记抗人脱辅基 B 抗体, 在室温温育 30 分钟。接着用含有 0.05%(v/v)吐温 20 的 PBS (pH 7.4)洗涤 4 次, 然后加入 100 μ L 显色液(TMBZ 液、TSI), 在 37℃显色 30 分钟, 然后加入 50 μ L 1mol/L 硫酸使反应停止, 测定 450nm 的吸光度。

20 结果如图 8 所示。由图 8 中可知: 动脉硬化患者血浆中含有与 KTM-2001 抗体具亲和性的变性脂蛋白, 本发明的方法可以定量测定该变性脂蛋白。

实施例 5 使用 KTM-285 抗体进行生物体内变性脂蛋白的测定以及与疾病的相关性

25

将实施例 2 中制备的 KTM-285 抗体用 Tris-HCl (pH 8.0) 稀释为 10 μ g/mL, 以 100 μ L/孔向 96 孔微量滴定板(Nunc Corp)的各孔中加入, 在 4℃温育 16 小时。倾去溶液, 加入 350 μ L 含有 1%(w/v) BSA 的 Tris-HCl

(pH 8.0), 在室温下温育 2 小时进行封闭, 然后用含有 0.05%(v/v)吐温 20 的 PBS (pH 7.4)洗涤 4 次。

接着, 用本发明的测定方法测定健康人和冠状动脉造影术显示任何冠状动脉均有 75%以上狭窄的患者血液中的变性脂蛋白。使用血清作为生物体试样。对被检者禁食 10 小时以上, 在清早空腹状态下, 用真空采血管采集 10mL 全血, 在室温下放置 30 分钟使血液凝固, 然后以 3,000rpm 离心 10 分钟, 回收上清液的液体成分作为血清。

将该血清用样品稀释液(含 1% BSA、5%聚醚、140mmol/L NaCl 的 10mmol/L 磷酸缓冲液、pH 7.4)稀释为 1,000 倍, 每孔分注 100 μ L, 在室温温育 2 小时, 然后用含有 0.05%(v/v)吐温 20 的 PBS (pH 7.4)洗涤 4 次。

再向各孔中加入 100 μ L 用含有 1%(w/v) BSA 的 PBS (pH 7.4)稀释成 1,000 倍的过氧化物酶标记抗人脱辅基 B 抗体, 在室温温育 30 分钟。接着用含有 0.05%(v/v)吐温 20 的 PBS (pH 7.4)洗涤 4 次, 加入 100 μ L 显色液(TMBZ 液、TSI), 在 37 $^{\circ}$ C 显色 30 分钟, 然后加入 50 μ L 1mol/L 硫酸使反应停止, 测定 450nm 的吸光度。结果如图 9 所示。

与健康人比较, 具有冠状动脉 75%以上狭窄的患者的测定值显著增高, 由通过本发明得到的变性脂蛋白的定量值可以检测循环系统的器官—冠状动脉的疾病。

20

实施例 6 通过本发明对心绞痛患者的生物体内物质进行测定

用装有 EDTA 的真空采血管对健康人和心绞痛发作、负荷心电图显示 ST 波低的心绞痛患者采集 10mL 全血, 立即以 3,000rpm 离心 10 分钟, 回收上清液的液体成分作为血浆。与实施例 4 同样, 用 KTM-2001 抗体、用 ELISA 法测定回收的血清。结果如图 10 所示。如图 10 所示, 与健康人比较, 心绞痛患者的变性脂蛋白测定值显著增高, 从通过本发明得到的变性脂蛋白的定量值可以检测循环系统的疾病。

25

实施例7 通过本发明对心肌梗塞患者的生物体内物质进行测定

用装有 EDTA 的真空采血管从显示胸痛症状、心电图显示 ST 波上升、超声心动图显示壁运动局部异常的心肌梗塞患者和健康人的血液中采集 10mL 全血，立即以 3,000rpm 离心 10 分钟，回收上清液液体成分作为血浆。向各血浆中加入乙二胺四乙酸钠(EDTA-2Na)溶液(10mmol/L)，使终浓度为 1mmol/L，向其中加入 NaBr，使密度为 1.000。分注到离心管中，在其上依次加入密度为 1.150、1.063、1.019、1.006 的 NaBr 缓冲液，在 4℃ 离心 24 小时(120,000g)。由上端依次收集组分，用屈光仪测定各组分的密度，收集密度 1.019-1.063 的组分作为 LDL 组分。在收集后，立即将这样获得的 LDL 组分用含 0.25mmol/L EDTA 的 PBS 透析。与实施例 4 同样，将回收的 LDL 组分用 ELISA 法测定。结果如图 11 所示。如图 11 所示，与健康人比较，心肌梗塞患者的变性 LDL 测定值显著增高，从通过本发明得到的变性 LDL 的定量值可以检测循环系统器官的疾病。

15

实施例8 变性 LDL 的测定(1)

使健康人和冠状动脉造影术显示主要冠状动脉与健康人相比 75% 以上狭窄的患者禁食 10 小时以上，然后在清早空腹状态下，用装有 EDTA 的真空采血管采集 10mL 全血，立即以 3,000rpm 离心 10 分钟，回收上清液的液体成分作为血浆。向各血浆中加入乙二胺四乙酸钠(EDTA-2Na)水溶液(10mmol/L)，使终浓度为 1mmol/L，向其中加 NaBr，使密度为 1.000。分注到离心管中，在其上依次加入密度为 1.150、1.063、1.019 和 1.006 的 NaBr 缓冲液，在 4℃ 离心 24 小时(120,000g)。由上端依次收集组分，用屈光仪测定各组分的密度，收集密度 1.019-1.063 的组分作为 LDL 组分。在收集后，立即将这样获得的 LDL 组分用含 0.25mmol/L EDTA 的 PBS 透析。用 15mL 锥形管将回收的纯化 LDL 分成 4 份，在规定时间内用漩涡搅拌器搅拌，使脂蛋白变性。通过被检体在 680nm 的吸光度上升来确定被检体的变性。变性操作后，与实施例

25

4 同样,将该纯化 LDL 用 ELISA 法测定。结果如图 12 所示。

如图 12 所示,通过用漩涡搅拌器搅拌进行变性,健康人、患者的测定值均增高,延长变性时间进行更大的变性,则测定值进一步增高。

5 实施例 9 变性 LDL 的测定(2)

使健康人禁食 10 小时以上,在清早空腹状态用装有 EDTA 的真空采血管进行采血,采血后,以 5-50U/kg 的剂量静脉给予肝素,给予 15 分钟后,再次用装有 EDTA 的真空采血管采集 10mL 全血,立即以 3,000rpm 离心 10 分钟,回收上清液的液体成分作为血浆,一部分在-50
10 °C 冷冻保存。向回收的各血浆中加入乙二胺四乙酸钠(EDTA-2Na)水溶液(10mmol/L),使终浓度为 1mmol/L,向其中加入 NaBr,使密度为 1.000。分注到离心管中,在其上依次加入密度为 1.150、1.063、1.019 和 1.006 的 NaBr 缓冲液,在 4°C 离心 24 小时(120,000g)。由上端依次收集组分,用屈光仪测定各组分的密度,收集密度 1.019-1.063 的组分
15 作为 LDL 组分。在收集后,立即将这样获得的纯化 LDL 用含 0.25mmol/L EDTA 的 PBS 透析。与实施例 4 同样,用 ELISA 测定该纯化 LDL。另一方面,用脂蛋白脂肪酶测定试剂(第一化学)测定冷冻保存的血浆中的脂蛋白脂肪酶浓度,对血浆中的脂蛋白脂肪酶浓度和来自该血浆的纯化 LDL 的 ELISA 测定值进行比较研究。结果如图 13 所示。

20 如图 13 所示,来自脂蛋白脂肪酶浓度高的血浆,则其纯化 LDL 测定值也高,本发明的定量方法可以测定由脂蛋白脂肪酶变性的变性脂蛋白。

实施例 10 变性 LDL 和变性 HDL 的测定

25 (1) 人血浆中 HDL 组分的制备

向由肝素血得到的人血浆中加入 EDTA,使终浓度为 0.25mmol/L,取 0.75mL 装入超速离心试管(4mL 容量),上面加入 250 μ l 含有 0.3mmol/L EDTA 的 0.15mol/L NaCl,在 10°C、以 185,000 \times g 离心 2.5 小时。去

掉 150 μ L 上层, 留取 750 μ L 下层, 加入 150 μ L KBr 溶液(50% w/v), 使密度为 1.063。将经密度调整的血浆移入超速离心试管(4mL 容量)底部, 在 10 $^{\circ}$ C、以 240,000 \times g 离心 16 小时, 去掉上层的橙色条带(约 100-150 μ L), 仔细回收残余组分。向该回收的组分中加入 KBr 溶液(50% w/v), 使密度调整为 1.21, 分注入超速离心试管中, 以 244,000 \times g 离心 10 小时, 回收 750 μ L 上层, 在 4 $^{\circ}$ C 用含 0.25mmol/L EDTA 的 PBS 透析 6 小时(每间隔 2 小时用 3 升透析液交换 3 次)。通过琼脂糖凝胶电泳法和脂染色法中是否呈现单一条带, 确认所得 HDL 试样的纯度, 然后以 BSA 作为标准物质, 用劳里法对蛋白质进行定量, 以该值作为 HDL 浓度。

(2) 变性 LDL 和变性 HDL 的制备

将实施例 2(1)中纯化的 LDL 和上述(1)中纯化的 HDL 一起通过用 PBS 平衡的交联葡聚糖 G-25 柱(1cm \times 30cm、Amersham-Pharmacia), 除去所含 EDTA 后, 以 BSA 作为标准物质, 用劳里法对蛋白质进行定量, 用 PBS 调整为 1mg/mL。向该溶液中添加 CuSO₄, 使终浓度为 5 μ mol/L, 在 37 $^{\circ}$ C、在空气下氧化 3 小时。3 小时后, 加入 EDTA 使浓度为 0.01%, 中止氧化反应, 立即在 4 $^{\circ}$ C 用含有 0.01% EDTA 的 PBS 透析, 回收, 以 BSA 作为标准物质, 用劳里法对蛋白质进行定量, 分别确定变性 LDL、变性 HDL 溶液的浓度。

(3) 变性 LDL 和变性 HDL 的测定

向 96 孔微量滴定板(Nunc)中分注 50 μ L 上述制备的变性 LDL 和变性 HDL 以及氧化前的 LDL 和 HDL 溶液(10 μ g/mL PBS), 在 4 $^{\circ}$ C 静置过夜。将板用 PBS 洗涤 3 次, 然后分注 250 μ L 1% BSA/PBS 溶液, 在室温下静置 1 小时, 将各孔用 PBS 洗涤 3 次, 以此作为反应板。将实施例 2 中得到的 KTM-285 抗体和实施例 1 中得到的 KTM-2001 抗体用含有 0.1% BSA 溶液的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)稀释为 100ng/mL, 向该反应板中分注 50 μ L 上述稀释液, 混合, 在 4 $^{\circ}$ C 静置过夜反应。反应结束后, 将板用含有 0.05%吐温 20 的 PBS 洗涤 5 次, 然后加入 50 μ L POD

5 标记-抗小鼠免疫球蛋白-兔 IgG, 在室温反应 1 小时, 反应后将板用含有 0.05%吐温 20 的 PBS 洗涤 5 次, 然后加入 50 μ L TMB 显色溶液 (Intergene Corp), 在室温下反应 30 分钟, 最后加入 50 μ L 反应中止液, 用微量板阅读器测定 450nm 的吸光度。结果如图 14 所示。如图 14 所示, KTM-285 抗体和 KTM-2001 抗体不与变性操作前的 LDL 和 HDL 反应, 但与变性 LDL 和变性 HDL 反应。由此可知可以测定变性 LDL 和变性 HDL。

实施例 11 变性脂蛋白的测定

10 将实施例 10 中制备的变性 LDL 与 250 μ L 1% BSA/PBS 溶液混合, 分注入 96 孔微量滴定板(Nunc)的各孔中, 在室温下静置 1 小时, 将各孔用 PBS 洗涤 3 次, 以此作为反应板。将实施例 10 中制备的变性 LDL、变性前的 LDL 溶液(170 μ g/mL PBS)和变性 LDL 分别进行 1/2 稀释、1/4 稀释、1/8 稀释, 将上述稀释液以 100 μ L/孔向该反应板的各孔中分注, 15 再将实施例 2 中得到的 KTM-285 抗体用含有 0.1% BSA 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)稀释为 970 μ g/mL, 向各孔中分注 50 μ L, 混合, 在 24 $^{\circ}$ C 静置 20 分钟反应。反应结束后, 将板用微量板阅读器测定 450nm 的吸光度。结果如图 15 所示。如图 15 所示, KTM-285 抗体不与变性操作前的 LDL 反应, 但与进行了变性操作的 LDL 反应。由此可知本发明可以进行变性 LDL 的测定。使用实施例 10 中制备的变性 HDL 也再 20 现了同样的结果。

产业可应用性

25 本发明可提供: 生物体试样中变性脂蛋白的定量方法, 其特征在于使用抗磷酸胆碱抗体对生物体试样中的变性脂蛋白进行定量; 生物体试样中变性脂蛋白的定量方法, 其特征在于使用抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体对生物体试样中的变性脂蛋白进行定量; 循环系统系统疾病的检测方法, 其特征在于使用抗磷酸胆碱抗体对生物体试样中的

- 变性脂蛋白进行定量，由该定量值检测循环系统系统疾病；循环系统系统疾病的检测方法，其特征在于使用抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体对生物体试样中的变性脂蛋白进行定量，由该定量值检测循环系统系统疾病；变性脂蛋白定量用试剂，该试剂含有抗磷酸胆碱抗体；变性脂蛋白定量用试剂，该试剂含有抗磷酸胆碱抗体和抗脂蛋白抗体。
- 5

[序列表独立文本]

- SEQ ID NO.3——人工序列的说明：合成 DNA
- SEQ ID NO.4——人工序列的说明：合成 DNA
- 10 SEQ ID NO.5——人工序列的说明：合成 DNA
- SEQ ID NO.6——人工序列的说明：合成 DNA
- SEQ ID NO.7——人工序列的说明：合成 DNA
- SEQ ID NO.8——人工序列的说明：合成 DNA
- SEQ ID NO.9——人工序列的说明：合成 DNA
- 15 SEQ ID NO.10——人工序列的说明：合成 DNA

- 5 <110> 协和美帝克斯股份有限公司 (KYOWA MEDEX CO., LTD)
- <120> 变性脂蛋白的检测方法及其检测试剂、心血管疾病的评价方法及其评价试剂
- <130> 11405W01
- 10 <140>
- <141>
- <150> JP2001-212622
- 15 <151> 2001-07-12
- <160> 10
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- 20 <210> 1
- <211> 470
- <212> DNA
- 25 <213> 小家鼠
- <400> 1
- ctcccaatct tcacattcag aaatcagcac tcagtctgt cactatgaag ttgtggtaa 60
- 30 actgggtttt tcttttaaca cttttacatg gtatccagtg tgaggtgaag ctggtggaat 120
- ctggaggagg cttggtacag cctgggggtt ctctgagact ctctgtgca acttctgggt 180
- tcaccttcag tgatttctac atggagtggg tccgccagcc tccaggaag agactggagt 240
- 35 ggattgctgc aagtagaaac aaagctaag attatacaac agagtacagt gcatctgtga 300

agggtcgggtt catcgtctcc agagacactt cccaaagcat cctctacctt cagatgaatg 360
 ccctgagagc tgaggacact gccatttatt actgtgcaag agattactac ggtagtagct 420
 5 actggtactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctcctca 470
 <210> 2
 <211> 422
 10 <212> DNA
 <213> 小家鼠
 <400> 2
 15 tgtcaaacag cagggggagc aggatggagt ttcagacca ggtactcatg tccttctgctc 60
 tctgcatgct tgggtcctgt gcagacattg tgatgactca gtctccaact ttccttctgctg 120
 tgacagcaag taagaaggct accattagtt gcacggccag tgagagcctt tattcaagca 180
 20 aacacaaggt gcactacttg gcttgggtacc agaagaaacc agagcaatct cctaaactgc 240
 tgatatacgg ggcattccaac cgatacattg gggtcctga tcgcttcaca ggcagtggat 300
 ctgggacaga tttactctg accatcagca gtgtacaggt tgaagacctc acacattatt 360
 25 actgtgcaca gttctacagc tctcctctca ogttcgggtc tgggaccaag ctggagctga 420
 aa 422
 30 <210> 3
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 35 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成DNA

	<400> 3	
	gtcacctct cctcagctc caccaaggc ccgatcca	39
	<210> 4	
5	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
10	<223> 人工序列的描述: 合成DNA	
	<400> 4	
	ctagtggatc cgggccttg gtggaggctg aggagacg	38
	<210> 5	
15	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
20	<223> 人工序列的描述: 合成DNA	
	<400> 5	
	tacagctatc ctctcacgtt cgggtgctgg accaagctgg ag	42
25	<210> 6	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
30	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成DNA	
	<400> 6	
35	gatcccgtag gtttcagctc cagcttggtc ccagcaccca acgtgagagg atag	54

	<210> 7	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
5	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成DNA	
	<400> 7	
10	ggttcacctt cagtgatttc tacatgg	27
	<210> 8	
	<211> 23	
	<212> DNA	
15	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成DNA	
20	<400> 8	
	ccagacatcg aagtaccagt agc	23
	<210> 9	
	<211> 26	
25	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成DNA	
30	<400> 9	
	gagcctttat tcaagcaaac acaagg	26
	<210> 10	
35	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成DNA

5

<400> 10

gaggatagct gtagaactgt gcacag

26

图 1

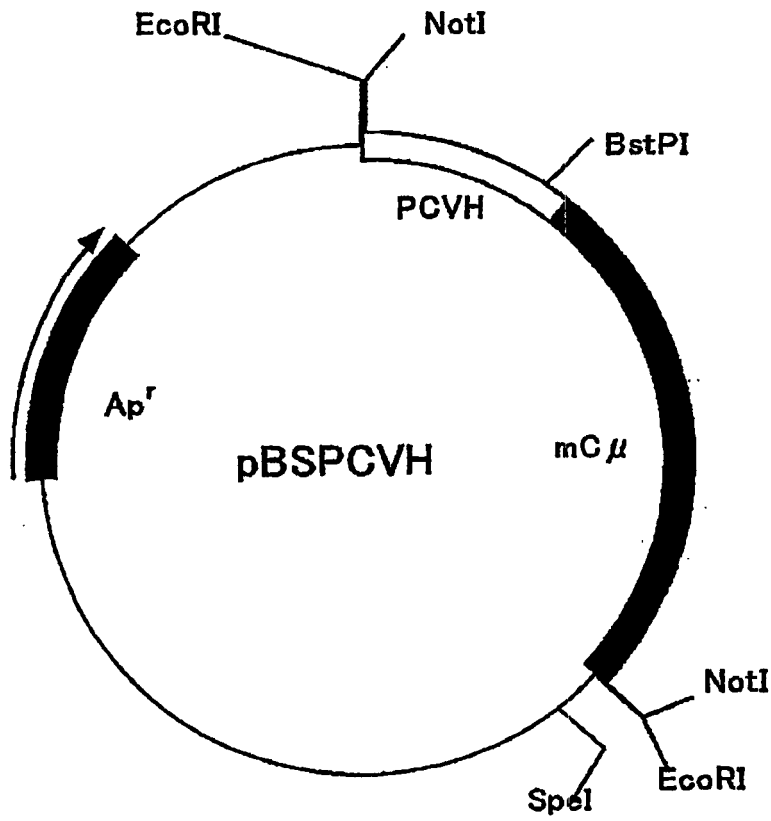


图 2

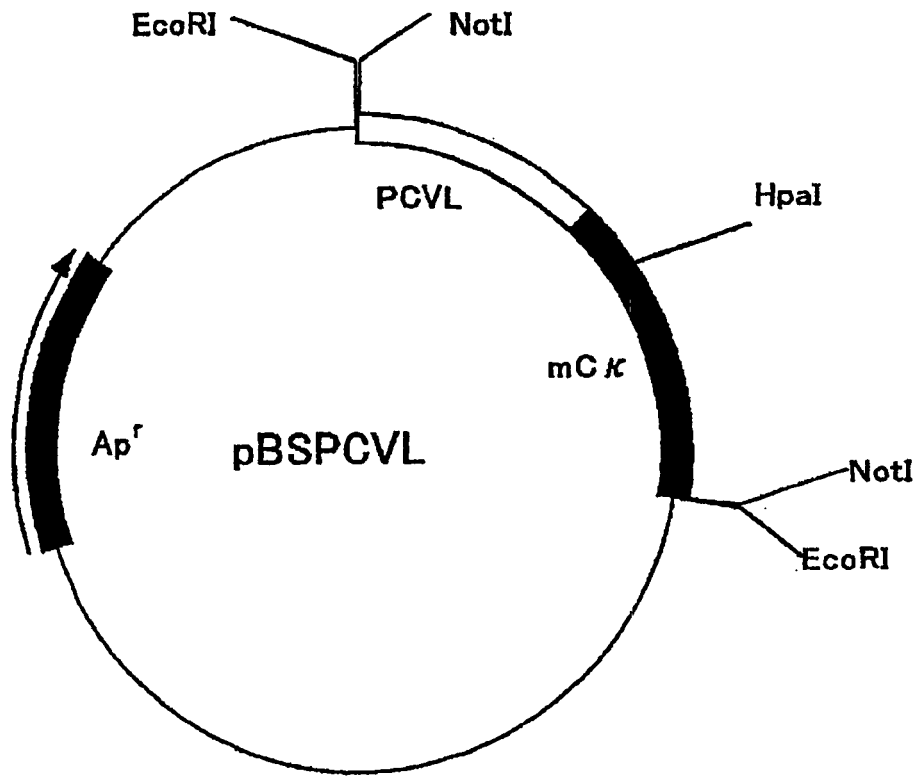


图 3

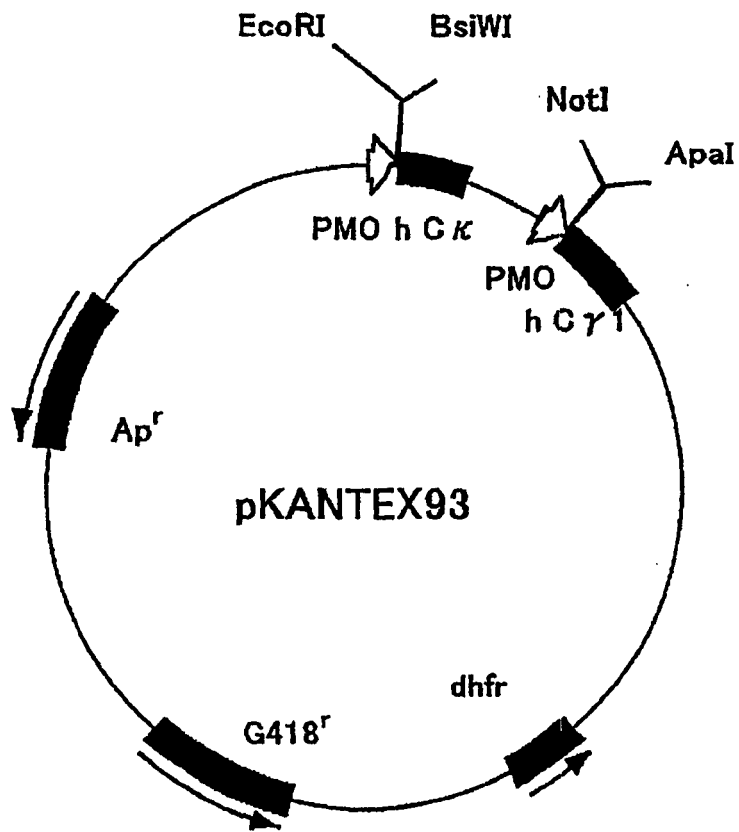


图 4

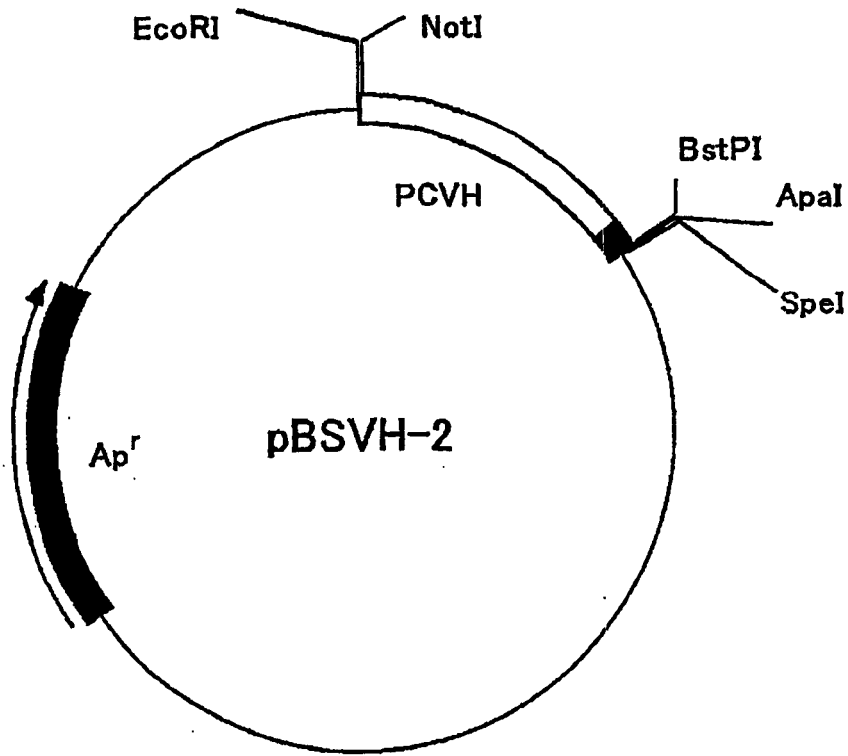


图 5

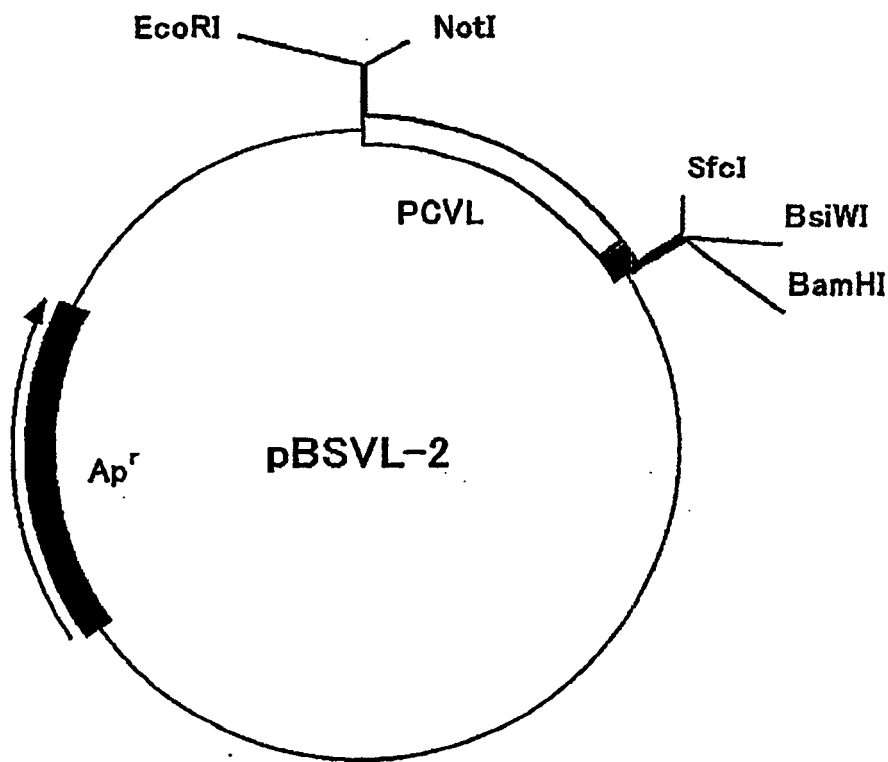


图 6

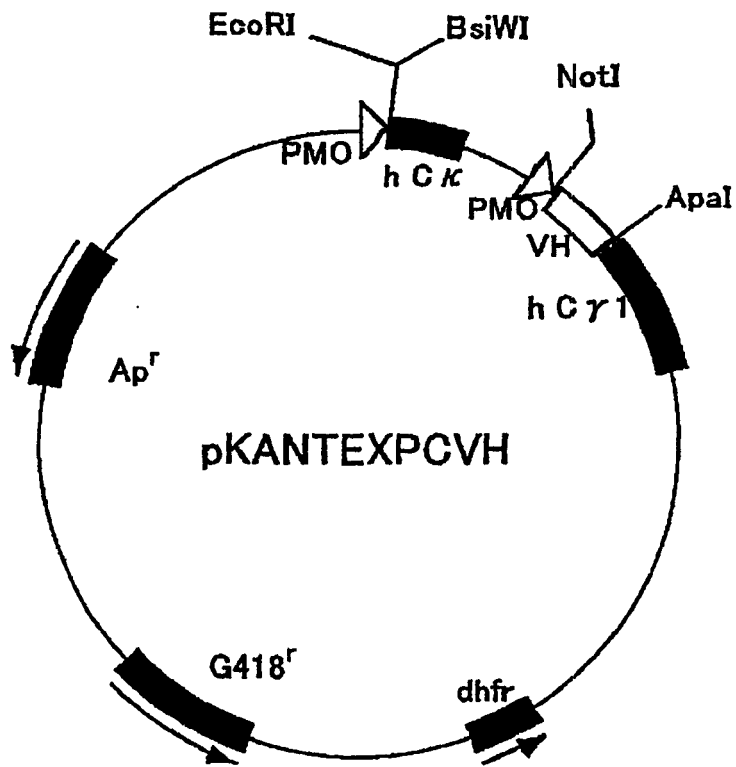


图 7

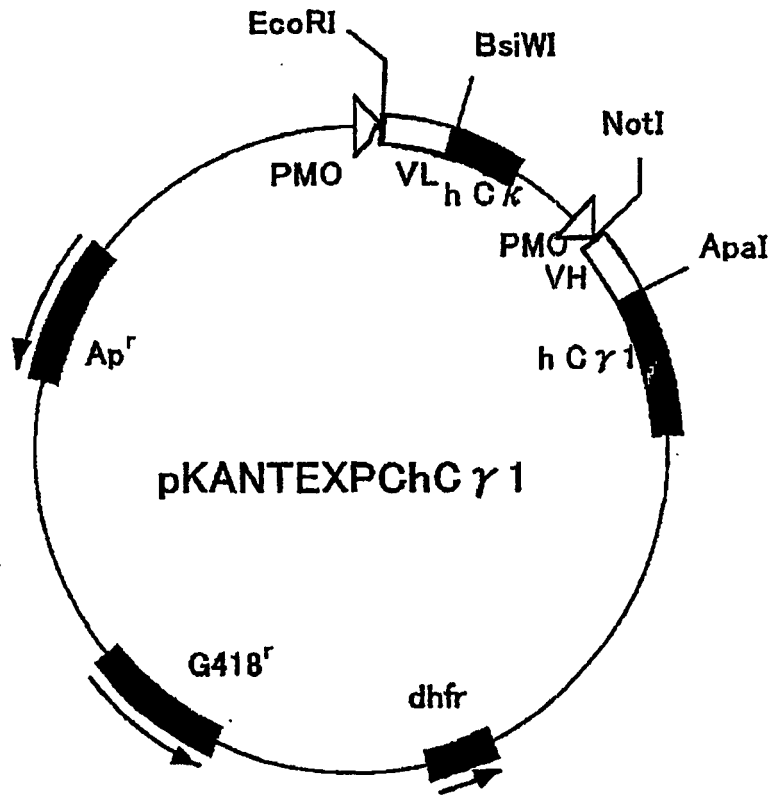


图 8

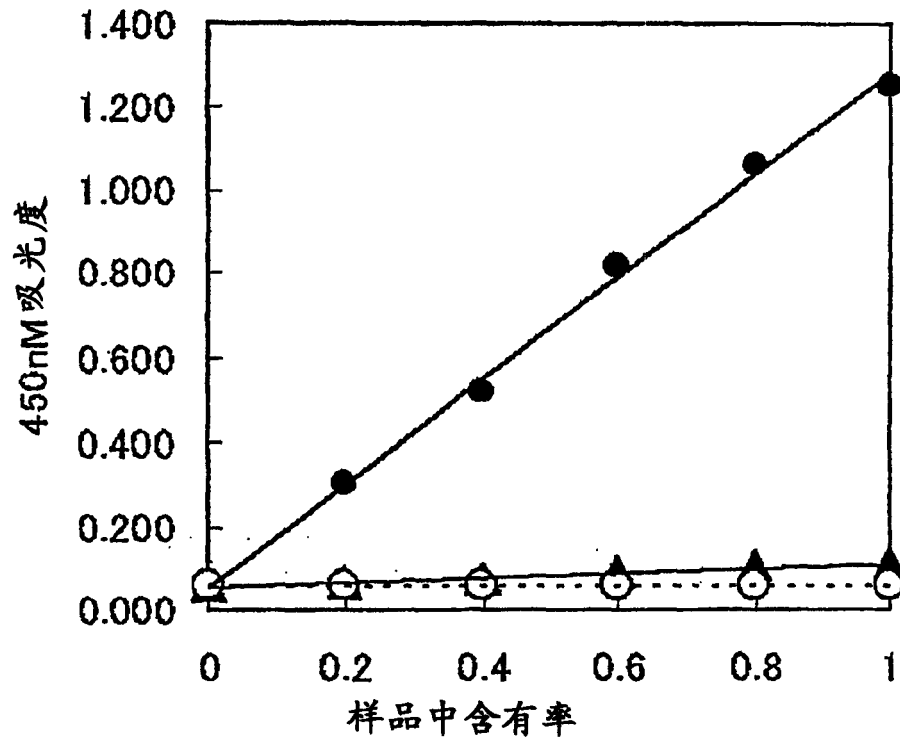


图 9

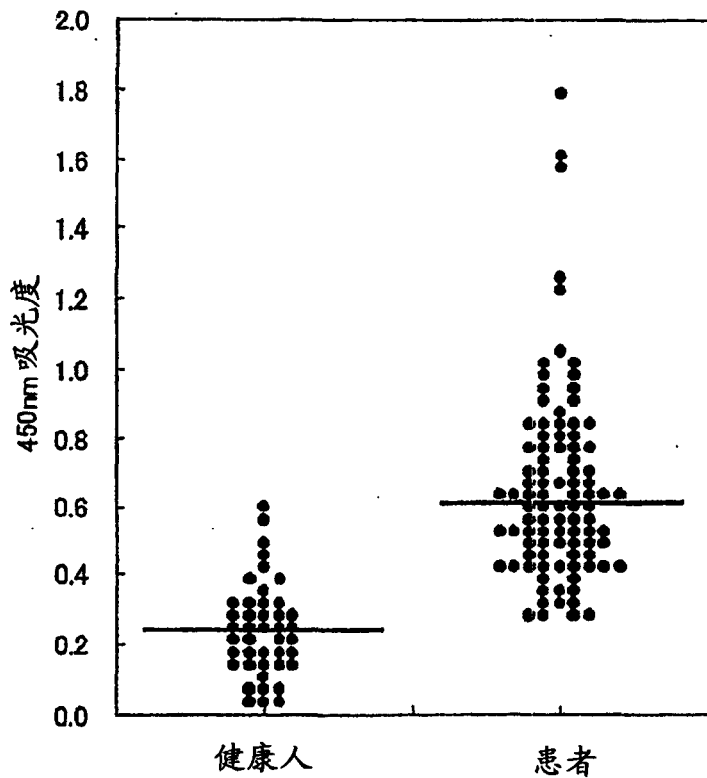
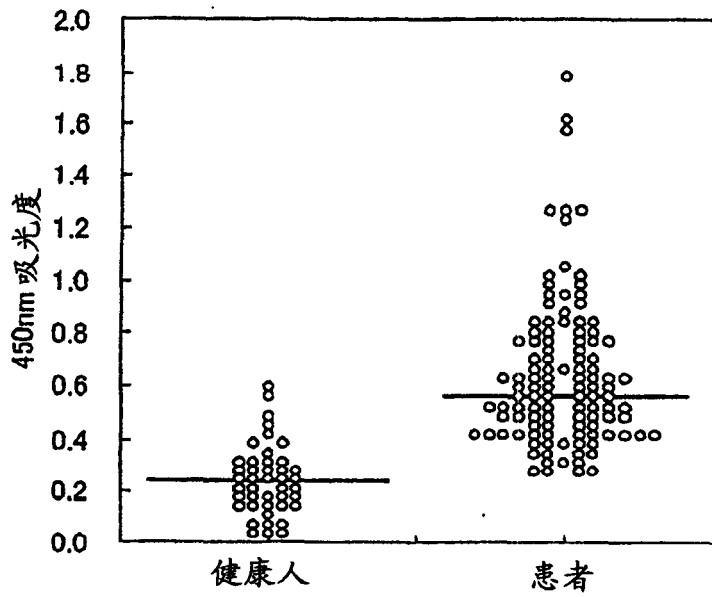


图 10

图 11

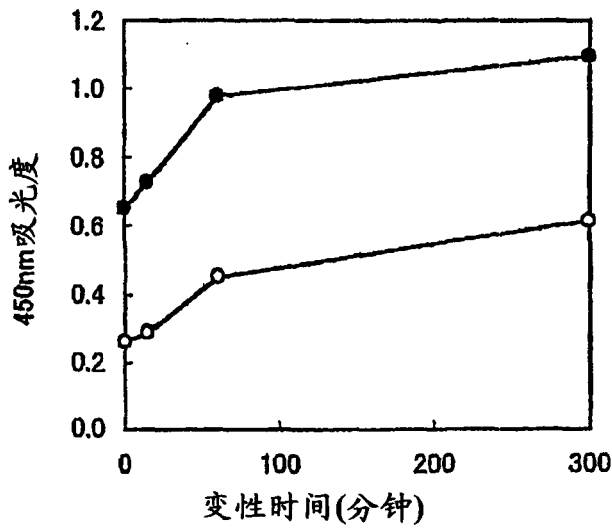
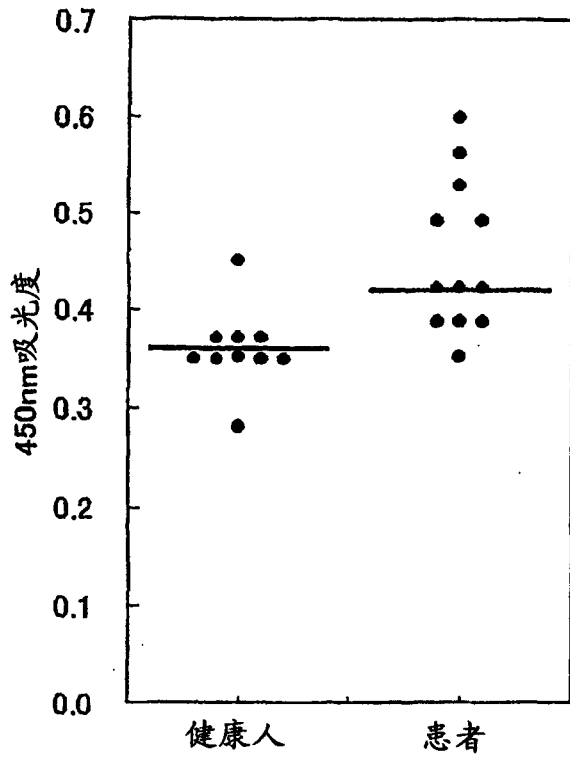


图 12

图 13

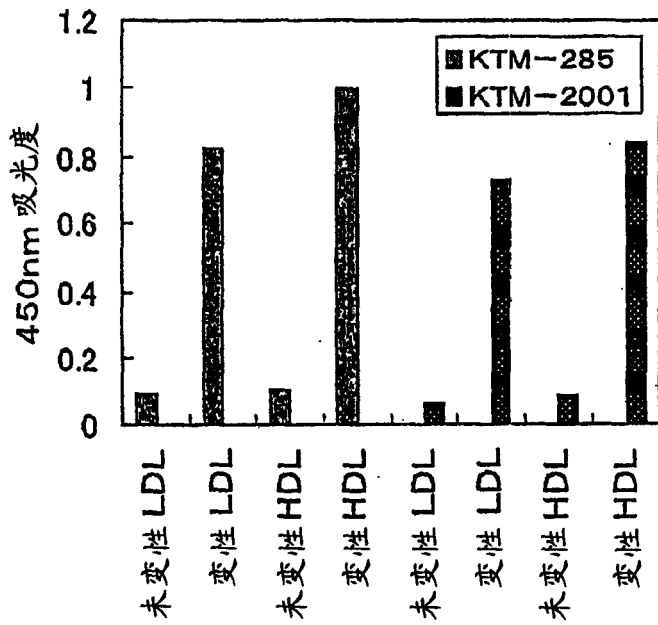
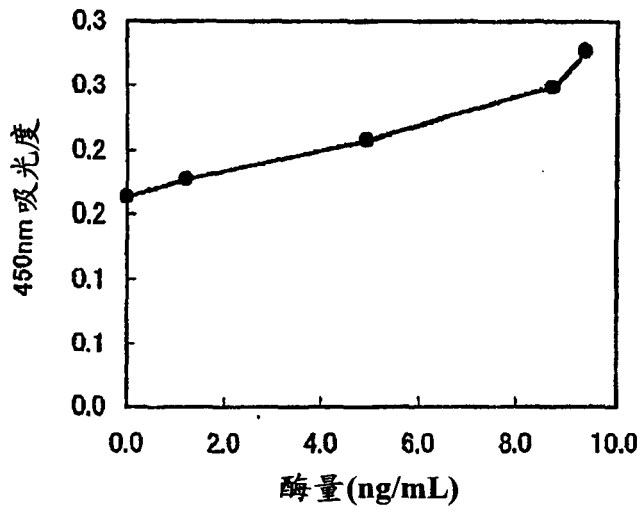
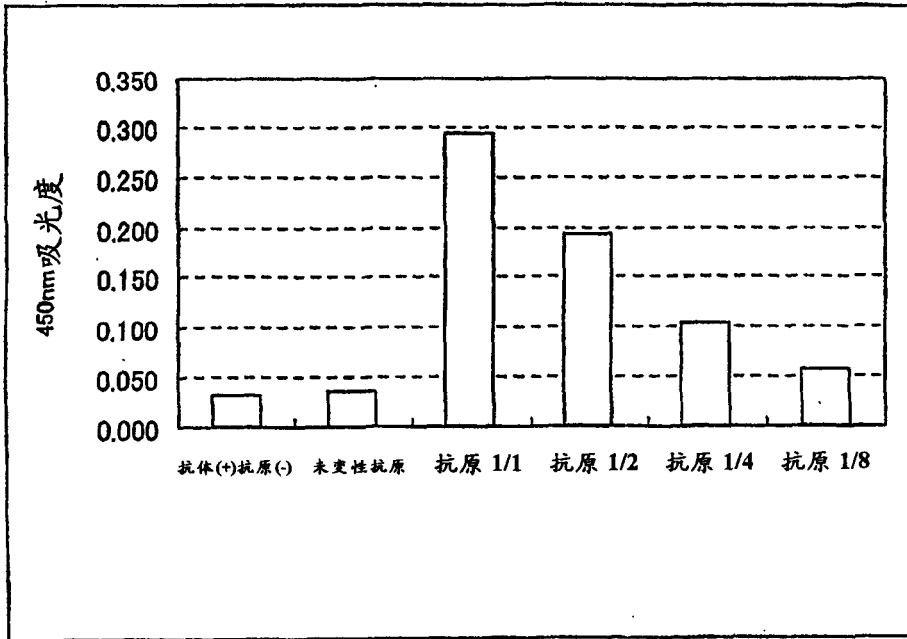


图 14

图 15



专利名称(译)	变性脂蛋白的定量方法、变性脂蛋白的定量用试剂、循环系统疾病的检测方法以及循环系统疾病的检测试剂		
公开(公告)号	CN1554024A	公开(公告)日	2004-12-08
申请号	CN02817577.8	申请日	2002-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	协和美帝克斯股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	协和美帝克斯股份有限公司		
[标]发明人	河野弘明 柳泽卓 益成利幸		
发明人	河野弘明 柳泽卓 益成利幸		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2800/32 G01N33/92 G01N2405/04 G01N2800/323		
优先权	2001212522 2001-07-12 JP		
其他公开文献	CN100516878C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供生物体试样中变性脂蛋白的定量方法，其特征在于使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量；循环系统疾病的检测方法，其特征在于使生物体试样与抗磷酸胆碱抗体接触，对生成的免疫复合物进行定量；含有抗磷酸胆碱抗体的变性脂蛋白定量用试剂和含有抗磷酸胆碱抗体的循环系统疾病检测试剂。

