

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380109374.7

[43] 公开日 2006年3月8日

[11] 公开号 CN 1745298A

[22] 申请日 2003.11.28

[21] 申请号 200380109374.7

[30] 优先权

[32] 2002.11.29 [33] JP [31] 347423/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/015265 2003.11.28

[87] 国际公布 WO2004/051273 日 2004.6.17

[85] 进入国家阶段日期 2005.7.29

[71] 申请人 卫材株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 片山政彦

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 张轶东 王景朝

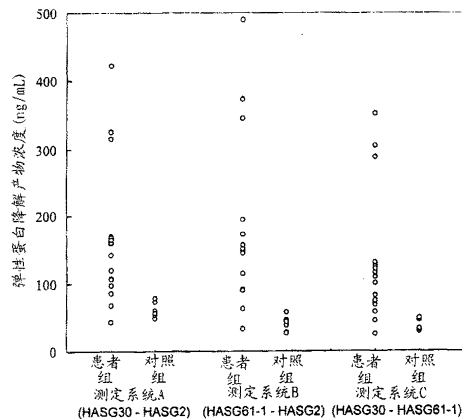
权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 6 页

## [54] 发明名称

用于测定弹性蛋白消化产物的方法和测定试剂盒及检测主动脉壁夹层形成的方法和检测试剂盒

## [57] 摘要

用于方便且高度精确地测定被试者循环液中弹性蛋白消化产物的免疫测定方法，其对检测主动脉壁夹层形成是有用的。该方法包括第一抗体和第二抗体与弹性蛋白消化产物的免疫性结合，其特征在于第一抗体和第二抗体各自为选自杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489)，杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 和杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体和具有与前述任何一种单克隆抗体等同的对人主动脉弹性蛋白消化产物的特异性和亲和性的抗体的抗体。



1. 用于测量弹性蛋白降解产物的免疫测定方法，所述方法包括使第一抗体和第二抗体与弹性蛋白降解产物免疫性结合，其中第一抗体和第二抗体各自为选自杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489)、杂交瘤  
5 HASG-2 (FERM BP-08488) 和杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体以及具有与前述任何一种单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体的抗体。
2. 根据权利要求 1 的方法，其中第一抗体是由杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体，第二抗体是由杂交瘤 HASG-2  
10 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体。
3. 根据权利要求 1 的方法，其中第一抗体是由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体，第二抗体是由杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体。
4. 根据权利要求 1 的方法，其中第一抗体和第二抗体均是由杂交  
15 瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体。
5. 检测主动脉壁夹层形成的方法，所述方法包括通过权利要求 1~4 中任何一项的方法测量循环液中弹性蛋白降解产物的量，及在测量值基础上对主动脉壁夹层形成进行检测。
6. 弹性蛋白降解产物的免疫测定试剂盒，所述试剂盒包括第一抗  
20 体和第二抗体，其中第一抗体和第二抗体各自为选自杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489)、杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 和杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体以及具有与前述任何一种单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体的抗体。
- 25 7. 根据权利要求 6 的试剂盒，其中第一抗体是由杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体，第二抗体是由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体。
8. 根据权利要求 6 的试剂盒，其中第一抗体是由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体，第二抗体是由杂交瘤 HASG-61-1  
30 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体。
9. 根据权利要求 6 的试剂盒，其中第一抗体和第二抗体均是由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体。

10. 根据权利要求 6~9 任何一项的试剂盒, 所述试剂盒用于检测主动脉壁夹层形成。

11. 由杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体。

12. 根据权利要求 1 的方法, 其中第一抗体是由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体或具有与前述单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体, 第二抗体是由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体或具有与前述单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体。

13. 根据权利要求 12 的方法, 其中第一抗体是由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体, 第二抗体是由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体。

14. 检测主动脉壁夹层形成的方法, 所述方法包括用根据权利要求 12 的方法测量循环液中弹性蛋白降解产物的量, 并且在测量值的基础上检测主动脉壁夹层形成。

15. 根据权利要求 6 的试剂盒, 其中第一抗体是由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体或具有与前述单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体, 第二抗体是由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体或具有与前述单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体。

16. 根据权利要求 15 的试剂盒, 其中将第一抗体或第二抗体固定于固相上, 将另一种抗体用酶进行标记。

17. 根据权利要求 15 的试剂盒, 其中第一抗体是由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体, 第二抗体是由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体。

18. 根据权利要求 15 的试剂盒, 所述试剂盒用于检测主动脉壁夹层形成。

19. 由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体。

20. 由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体。

用于测定弹性蛋白消化产物的方法和测定试剂盒  
及检测主动脉壁夹层形成的方法和检测试剂盒

5 技术领域

本发明涉及用于测量弹性蛋白降解产物的方法和试剂盒及检测主动脉壁夹层形成 (aortic dissection) 的方法和试剂盒。

背景技术

10 主动脉壁夹层形成 (亦称主动脉瘤) 是伴随有突发胸痛或腹痛的疾病, 且由部分主动脉内膜撕裂及从撕裂处向内膜出血引起, 从而导致血管壁夹层形成。尽管大多数病例中发病位点在主动脉, 但是损伤可以扩展到血管支。至于其发病原因, 除主动脉内膜的变性和衰弱之外人们还指出了主动脉扩张和高血压 (The Japanese Journal of  
15 Surgery, 97, 873-878(1996))。所述疾病为突发性疾病, 事先患者无任何主观症状, 且当发生血管破裂时, 致死率非常高。一旦发病, 宜立即采取外科手术方法, 用人工血管代替损伤中的血管壁夹层形成位点。此外, 胸主动脉壁夹层形成在夹层形成时可以伴随有严重的胸痛。这与急性心肌梗死的初期症状十分相似。急性心肌梗死相对容易  
20 诊断, 例如用心电图、血液标记的生物化学检测等方法。但是, 主动脉壁夹层形成的病理状况不能通过心电图、血液标记的生物化学检测等方法确定, 发病后致死率也非常高。因此, 这个疾病的鉴别诊断对于治疗方法的选择至关重要 (Sogo Rinsho (General Clinic), 48,  
2151-2155 (1999))。

25 对于主动脉壁夹层形成的诊断来说, 标准的方法是利用已经确立的成像检测技术, 采用专门的仪器如: 放射照相术、CT/MRI 血管造影术及经食管 (trans-esophageal) 的超声回波图等对患者的损伤进行直接的视觉观察。这个诊断也可以通过前述的技术所获得的影像, 在数字上读取血管壁夹层形成位点的直径来进行。此外, 也可以采用如  
30 下诊断方法, 即两次或更多次周期性的进行上述的成像诊断, 计算血管壁夹层形成位点从初步诊断时大小开始的年扩张率数值, 并且将所述数值与统计学数据进行比较。

但是，前述的所有成像诊断技术都需要专门的仪器和尖端的医学技术，并且患者甚至为了诊断就不得不到专门的心血管病医疗机构。此外，例如使用造影剂（contrast medium）会对患者造成一定程度的身体劳损，并且仅检查一个患者就需要花相当多的时间和费用。进而，  
5 因为这些成像检测方法需要大量的时间和劳动，因此，这些方法常被用于有高血压、动脉硬化等的患者或已有一次或多次主动脉壁夹层形成病史的患者的随访，且这些检测方法几乎不用于没有病史或主观症状的患者。此外，这些方法不能完全用作突然患血管壁夹层形成的患者的紧急检测。因此，人们期望建立一个能够方便、快速和准确诊断  
10 的技术，并且因而也可以用作紧急检测。

最近，已经有人报告患腹主动脉壁夹层形成的患者中弹性蛋白降解产物的血浓度与腹主动脉壁夹层形成进展之间的关系（参见 *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 14, 12-16 (1997)）。在报告中，从成像检测中得到的患者的主动脉瘤损伤的年扩张率、及最初到医院就诊时  
15 其腹主动脉瘤损伤的直径大小（初始的腹主动脉瘤的大小）与弹性蛋白降解产物的血浓度之间显示略有正相关关系。此外，更最近的报告显示了弹性蛋白降解产物的尿浓度与主动脉瘤诊断之间的关系。（参见 *Biol. Pharm. Bull.*, 22, 854-857 (1999)）。该报告描述了正常被试者与主动脉瘤患者之间弹性蛋白降解产物的尿浓度有统计学差  
20 异。但是尚无循环液中（如血中）弹性蛋白降解产物的水平与主动脉壁夹层形成存在或不存在之间关系的研究报道。

已经显示在人体血液循环中弹性蛋白降解产物的量可以用免疫测定来测量。（参见 *Meth. Enzymol.*, 163, 656-673 (1988); *Clin. Physiol. Biochem.*, 8, 273-282 (1990); *J. Immunol. Methods*, 164,  
25 175-187 (1993); *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 14, 12-16 (1997)）。但是，这些用于测量弹性蛋白降解产物的免疫测定是使用多克隆抗体，所述多克隆抗体得自于用弹性蛋白降解产物使动物（如兔子）免疫得到的抗血清；或者，即使在使用单克隆抗体时，也基于一个竞争性的技术，因此，其测量性能如特异性和重复性方面有待改  
30 善。

## 发明内容

本发明的第一个目的是为了提供一个用于方便和准确测定被试者循环液中弹性蛋白降解产物量的免疫测定方法及试剂盒，其可用于主动脉壁夹层形成的检测。

5 本发明的第二个目的是提供一个能够在短时间内方便和准确地检测主动脉壁夹层形成的方法及试剂盒。

为了达到上述目的，本发明的发明人制备了能与源自人主动脉的弹性蛋白降解产物特异性反应的多种类型的单克隆抗体。结果发现：如果能够用制备的抗体中的特定抗体组合测量人循环液中弹性蛋白降解产物，那么就可以获得有用的主动脉壁夹层形成的检测，于是完成了本发明。

10 本发明提供了一个测量弹性蛋白降解产物的免疫测定方法，该方法包括使第一抗体和第二抗体与弹性蛋白降解产物免疫性结合，其中第一抗体和第二抗体各自为选自杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489)，杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 和杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体和具有与前述任何一种单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体的抗体（在下文中也称为“本发明的测定方法”）。

15 在本发明的测定方法中，优选使用由杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体为第一抗体和由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体为第二抗体的组合；由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体为第一抗体和由杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体为第二抗体的组合；或者第一抗体和第二抗体均为由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体的组合。

20 本发明还提供了检测主动脉壁夹层形成的方法，该方法包括用本发明中的测定方法测量循环液中弹性蛋白降解产物的量和在测量值基础上检测主动脉壁夹层形成。

30 本发明进一步提供了对弹性蛋白降解产物进行免疫测定的测定试剂盒，该试剂盒包括第一抗体和第二抗体，其中第一抗体和第二抗体各自为选自杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489)、杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 和杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体和具有与前述任何一种单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物

的特异性和亲和性的抗体的抗体（在下文中也称为“本发明的测定试剂盒”）。

在本发明的测定试剂盒中，优选使用由杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体为第一抗体和由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体为第二抗体的组合；由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体为第一抗体和由杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体为第二抗体的组合；或者第一抗体和第二抗体均为由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体的组合。

10 本发明的测定试剂盒优选用于主动脉壁夹层形成的检测。

本发明还提供了由杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体。

此外，在本发明的测定方法中，第一抗体可能是由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体或具有与前述单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体；第二抗体可能是由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体或具有与前述单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体。在该实施方案中，优选由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体作为第一抗体，由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体作为第二抗体。还提供了检测主动脉壁夹层形成的方法，该方法包括根据本发明测定方法的该实施方案测量循环液中弹性蛋白降解产物的量和在测量值基础上检测主动脉壁夹层形成。

此外，在本发明的测定试剂盒中，第一抗体可能是由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体或具有与前述单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体；第二抗体可能是由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体或具有与前述单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体。在该实施方案中，优选将第一抗体或第二抗体固定于固相上，用酶标记另一个抗体。在该实施方案中，优选由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体作为第一抗体，由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体作为第二抗体。根据这个实施方案，本发明的测定试剂盒也优选用于检测主动脉壁夹层形成。

进而，本发明也提供了由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体和由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体。

附图简述：

5 图 1 显示了代表检测样品中主动脉弹性蛋白降解产物的浓度与用酶免疫测定确定的吸收度之间关系的标准曲线。

图 2 显示了用酶免疫测定方法确定的主动脉壁夹层形成患者和正常老年男性主动脉弹性蛋白降解产物的血清浓度的分布。在免疫测定系统符号下面的括弧内显示了单克隆抗体的组合。

10 图 3 显示了代表检测样品中主动脉弹性蛋白降解产物的浓度与由电化学发光免疫测定方法测定的发光计数之间关系的标准曲线。

图 4 显示了用电化学发光免疫测定方法确定的主动脉壁夹层形成患者和正常老年男性主动脉弹性蛋白降解产物的血清浓度的分布。

15 图 5 显示了代表人主动脉弹性蛋白降解产物的浓度与吸收度之间关系的标准曲线。

图 6 显示了 11 名主动脉壁夹层形成患者、26 名心肌梗死（急性期）患者及 100 名正常被试者的弹性蛋白降解产物的血清浓度的分布。

实施发明的最佳模式

20 (1) 本发明的测定方法

本发明的测定方法为免疫测定方法，用于测量弹性蛋白降解产物，所述方法包括使第一抗体和第二抗体与弹性蛋白降解产物免疫性结合，其中第一抗体和第二抗体各自为选自由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489)、杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 和杂交瘤 HASG-61-  
25 1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体和具有与前述任何一种单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体的抗体。

HASG-2 和 HASG-30 于 2001 年 5 月 18 日保藏在独立行政法人产业  
30 技术综合研究所特许生物寄托中心 (International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) (邮政地址: Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, 日本), 保藏号

分别为 FERM P-18335 和 FERM P-18336。2003 年 9 月 18 日所述保藏根据布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 的规定转变为国际保藏, 保藏号分别为 FERM BP-08488 和 FERM BP-08489。此外, HASG-61-1 于 2002 年 10 月 8 日保藏在独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心 ( 邮政地址: Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, 日本 ), 保藏号为 FERM P-19058。2003 年 9 月 18 日所述保藏根据布达佩斯条约的规定转变为国际保藏, 保藏号为 FERM BP-08490。用下面的方法可选择具有与 HASG-2 产生的单克隆抗体、HASG-30 产生的单克隆抗体和 HASG-61-1 产生的单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体。

利用如竞争性测定可以选择具有相当的特异性和亲和性的抗体 ( Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) P. 567)。明确地说, 将作为抗原物质的人主动脉弹性蛋白降解产物溶解在具有合适浓度的生理缓冲液中, 在微量培养板的固相上吸收。封闭处理后, 等量加入酶标记的 HASG-2、HASG-30 或 HASG-61-1 单克隆抗体和将要被评价的抗体。通过确认抑制酶标记的 HASG-2、HASG-30 或 HASG-61-1 单克隆抗体的反应的性能, 选择具有相当的特异性和亲和性的抗体。

还可以通过如肽作图方法选择具有相当的特异性和亲和性的抗体。明确地说, 在分子量、疏水性等不同的基础上, 使用高效液相层析设备分离作为抗原物质的人主动脉弹性蛋白降解产物, 并且将抗体与各种被分离的弹性蛋白抗原片段的结合与 HASG-2、HASG-30 和 HASG-61-1 单克隆抗体的那些结合比较, 来评估所述抗体的特异性和亲和性。与抗原片段 ( 所述抗原片段可以与 HASG-2、HASG-30 或 HASG-61-1 单克隆抗体反应 ) 在相当的程度上反应的抗体被确定具有与那些相关的单克隆抗体相当的特异性。

人主动脉弹性蛋白降解产物可以用在 Biochem. J., 61, 11-21 (1955) 所描述的方法得到, 或作为市售产品购得。

所使用的优选抗体的实例包括用人主动脉弹性蛋白降解产物对啮齿类动物如小鼠、大鼠或仓鼠进行免疫制备的单克隆抗体。尽管没有特别地限制动物物种, 但通常最多使用 Balb/C 小鼠。

第一抗体和第二抗体组合的实例包括如下组合，其中由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体或具有与前述单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体为第一抗体；由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体或具有与前述单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体为第二抗体，以及包括其他组合。此外，第一抗体和第二抗体组合的实例还包括由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体作为第一抗体与由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体作为第二抗体的组合，及其他组合。

10 第一抗体和第二抗体可能是相同的抗体。在本发明的测定方法中，优选使用由杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体为第一抗体与由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体为第二抗体的组合；由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489) 产生的单克隆抗体为第一抗体与由杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体为第二抗体的组合；或第一抗体和第二抗体均为由杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488) 产生的单克隆抗体的组合。

这些抗体可以是如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 的片段，且可通过进行标记、固定在固相等进行修饰，只要其具有所需要的特性和亲和性。

20 除使用特殊的抗体组合以外，本发明的测定方法可以通过与用于两类抗体与抗原的免疫学结合的普通夹心技术相同的方式来实施。

在检测方法基础上，可将免疫测定方法分类为：使用放射性同位素标记的化合物的方法、乳胶凝集法、使用荧光标记的化合物的方法、使用电化学发光的方法、使用酶的方法等。尽管本发明测定方法的免疫测定方法没有被特别地限制，但是优选酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或电化学发光免疫测定，因为这些方法既安全又方便。

30 对于 ELISA 来说，已知各种作为测量技术的方法。具体地，作为高定量能力的方便的方法，优选利用过氧化物酶作为标记酶的夹心技术。具体来说，第一抗体或第二抗体在固相如市售 96 孔微量培养板的底面上被吸附。然后，为了使固相上的自发吸附最小化，封闭蛋白如乳酪蛋白被吸附。已知浓度的人主动脉弹性蛋白降解产物溶液作为参照，将其与生物检测样品加到孔内并静置预定的时间段。样品中的弹性蛋白降解产物抗原与固相上的抗体免疫性结合后，洗涤培养板，然

后以合适的浓度将用酶如过氧化物酶标记的另一种抗体加入。为了形成三物质的复合物（固相上的抗体、弹性蛋白降解产物抗原及被标记的抗体），将反应混合物静置预定的时间段。然后洗涤固相，且为了通过标记酶的作用而获得显色，加入过氧化氢与显色底物如 ABTS 的混合液。为终止酶反应，加入抑制剂，然后利用特定设备如培养板读数器根据反应混合物的吸收度，来测量显色反应的程度。利用标准曲线等，通过比较样品溶液的吸收度和标准溶液的吸收度，可以精确确定样品溶液中弹性蛋白降解产物的量。

对于电化学发光免疫测定法来说，已知各种作为测量方法的技术。但是，作为特别方便的、具有高定量能力的技术，优选夹心技术，所述技术以在磁珠上被固定的抗体作为第一抗体，且以用化学发光复合物（优选钉复合物）标记的抗体作为第二抗体。在该技术中，理想的是第一抗体和第二抗体能够与弹性蛋白降解产物发生特异性的反应，且第一抗体与第二抗体可相互相同。对于测量来说，抗弹性蛋白降解产物抗体（第一抗体）在市售磁珠上被固定。在固相上利用共价键或非共价键可以得到固定。于是，为了使其他分子与磁珠的非特异性结合最小化，封闭蛋白如乳酪蛋白被吸附。将已知浓度的弹性蛋白降解产物或生物样品加到反应混合物中，按预定时间段搅拌混合物。在样品中的弹性蛋白降解产物抗原吸附到抗体结合的颗粒表面上之后，洗涤所述颗粒。然后以合适浓度添加另外一个用化学发光复合物（优选钉复合物）标记的抗弹性蛋白降解产物抗体（第二抗体）。将混合物搅拌预定的时间段，以在磁珠上形成三种物质的复合物，即第一抗体、弹性蛋白降解产物抗原和第二抗体。然后，洗涤珠子，在一个专门仪器中的电极之间通上电流，以使得作为标记的化合物的复合物能够化学发光，并测量其发光强度。对于发光来说，可以得到与被钉标记的化合物量相应的发光量。利用标准曲线等，通过比较生物样品的发光量和参照标准的发光量，可以精确得到生物样品中弹性蛋白降解产物的量。

如果使用本发明的测定方法，患有主动脉壁夹层形成的患者则以极其高的阳性率显示血中高浓度的弹性蛋白降解产物。而正常被试者几乎不显示出这样的高浓度，即在大多数主动脉壁夹层形成患者中升高的血浓度。因此，本发明的测定方法对于所述疾病的诊断是有效的。

因此，本发明也提供了一个检测主动脉壁夹层形成的方法，这个方法包括用本发明的测定方法测量循环液中弹性蛋白降解产物的量和在测量值基础上检测主动脉壁夹层形成。

5 循环液意味着所有在体内循环的体液，如血清、血浆、脑脊液和腹水或其中的部分，并且没有特别地限制，只要其是在医疗机构等中通常收集的循环液。但是，特别优选从被试者的血如血清中得到的液体。

10 建立在循环液中弹性蛋白降解产物测量值基础上，用于检测主动脉壁夹层形成的方法的实例包括当测量值显著超过正常被试者等的平均值时，确定存在主动脉壁夹层形成（或主动脉壁夹层形成高度可能性）的方法。

## （2）本发明的测定试剂盒

15 本发明的测定试剂盒是测量弹性蛋白降解产物的免疫测定试剂盒，该试剂盒包含第一抗体和第二抗体，其中第一抗体和第二抗体各自选自自由杂交瘤 HASG-30 (FERM BP-08489)、杂交瘤 HASG-2 (FERM BP-08488)、杂交瘤 HASG-61-1 (FERM BP-08490) 产生的单克隆抗体，及具有与前述任何一种单克隆抗体相当的对人主动脉弹性蛋白降解产物的特异性和亲和性的抗体。

20 第一抗体和第二抗体为正如在本发明的测定方法中所描述的。

在本发明的测定试剂盒中，优选将第一抗体或第二抗体固定于固相上，且将另一种抗体用酶或电化学发光复合物标记。

25 固相的实例包括在普通夹心技术中用于使两种类型的抗体与一个抗原免疫性结合的固相，没有特别限定其形状和材料。具体的实例包括微量滴定板和珠等。使用方便的方式能够使抗体固定于固相上。

30 标记的实例包括在普通夹心技术中用于使两种类型的抗体与一个抗原免疫性结合的标记，如：放射活性物质、胶乳、荧光物质、化学发光物质、金属胶体颗粒、酶等。在本发明的测定试剂盒中，优选酶或电化学发光复合物做标记物。使用方便的方式能够使标记与抗体结合。

包含在本发明的测定试剂盒中的抗体可能是溶液或冻干产品的形式。

本发明的测定试剂盒可能包含通常用于免疫测定的、除第一抗体和第二抗体之外的试剂。这些试剂的实例包括标准的抗原（人主动脉弹性蛋白降解产物）溶液、底物溶液、稀释样品的溶液、洗涤溶液等。

5 根据本发明的测定方法，可以使用本发明的测定试剂盒。本发明的测定试剂盒优选用于检测主动脉壁夹层形成。

### 实施例

参考下面的实施例，将对本发明进行更具体的解释。但是本发明的范围并不限于这些实施例。

10 实施例 1: 抗人主动脉弹性蛋白降解产物单克隆抗体的制备和利用酶免疫测定测量血清中的主动脉弹性蛋白降解产物。

#### 1) 针对人主动脉弹性蛋白降解产物的单克隆抗体的制备

用每只动物 0.1mg 的人主动脉弹性蛋白降解产物 (Elastin Products Company) 与完全弗氏佐剂 (Difco) 对 Balb/C 雌性小鼠 (6 15 周龄) 进行腹膜内施用。3 周以后, 用同样量的人主动脉弹性蛋白降解产物与不完全弗氏佐剂 (Difco) 进行腹膜内施用。再过 3 周后, 将每只动物 0.1mg 的人主动脉弹性蛋白降解产物施用于小鼠。最后一次免疫后 3 天, 从小鼠取出脾脏。在无菌超净台进行下面的步骤。用筛子分散被取出的脾脏, 并且在 50% 聚乙二醇 1500 (Roche Diagnostics) 20 存在时与事先培养的 Sp2/0-Ag14 小鼠骨髓瘤细胞混合, 以进行细胞融合。将已经融合的杂交瘤细胞分散到几个 96 孔微量培养板上, 并在含 10% 胎牛血清及 HAT 试剂 (Sigma-Aldrich) 的 RPMI 1640 液体培养基中 (Sigma-Aldrich) 培养 1~2 周。在培养期间, 只有稳定产生单克隆抗体的杂交瘤细胞存活、未融合的骨髓瘤细胞或小鼠脾细胞死亡。 25 通过 ELISA 的方法用已固定了抗原的培养板选择产生抗人主动脉弹性蛋白降解产物的单克隆抗体的细胞。具体地, 当杂交瘤细胞的群体充分地生长时, 收集培养物上清液并且加到在作为固相的 96 孔微量培养板 (Nalge Nunc International Corporation) 上吸附的免疫原中, 以使得上清液中的单克隆抗体能够与免疫原反应。然后, 添加合适浓 30 度的、对小鼠 IgG 具有反应性的且用过氧化物酶 (Dako 日本) 标记的第二抗体。预定的时间后洗涤培养板, 并且添加 ABTS 底物溶液 (Roche Diagnostics)。在出现显色反应的基础上, 选择产生目标单克隆抗体

的杂交瘤系。被选择的系经历了几次克隆。通过用已经固定了 A 蛋白的琼脂糖凝胶 (Pharmacia) 对小鼠腹水进行亲和层析, 以常规方式从每一个系进行大规模的单克隆抗体制备。

## 2) 通过酶免疫测定测量血清中主动脉弹性蛋白降解产物

5 将用上述 (1) 得到的单克隆抗体制成纯化的 IgG。对两种类型的单克隆抗体的各种组合 (通过竞争性测定确定相互不竞争的单克隆抗体的组合) 进行下面的测量。将第一单克隆抗体在 PBS 中溶解, 终浓度为 0.01 mg/mL; 并将 0.1 mL 等分试样加到 96 孔微量培养板 (Nalge Nunc International Corporation) 的每一个孔内。内含的单克隆抗体被吸附以后, 弃掉溶液, 并将 0.2 mL 含有 1% 脱脂乳的 PBS 添加到  
10 每一个孔内以用于封闭。1 小时后, 弃掉脱脂乳溶液, 用含有 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich) 的 Tris-缓冲生理盐水 (在下文中缩写为 “Tween-TBS”) 洗涤所述孔。将具有预定浓度的人主动脉弹性蛋白降解产物的参照溶液或样品血清加到已洗涤过的孔内。测量前, 用含有  
15 1% 脱脂乳的 PBS 溶液 10 倍稀释样品血清。用膜盖住培养板, 室温下静置 1 小时; 然后, 弃去所有溶液后, 用 Tween-TBS 洗涤 3 次。继之, 将 0.1 mL 含有 1% 脱脂乳的 PBS 溶液及用过氧化物酶 (Roche Diagnostics) [利用过碘酸法 (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed. Harlow & D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press p348  
20 (1988))] 标记的第二单克隆抗体添加到每一个孔内。然后, 用膜盖住培养板, 室温下静置 1 小时。反应完成后, 弃去培养板上所有溶液, 用 Tween-TBS 将孔洗涤 3 次。洗涤完成完成后, 将 0.1 mL 含过氧化氢 (Sigma) 的 TMBZ 底物溶液添加到每个孔内。因为要进行显色反应, 故将培养板静置 10 分钟。然后, 将 0.1 mL 的 2 N 盐酸 (Wako Pure  
25 Chemical Industries) 水溶液添加到培养板的每个孔内, 并使之充分混合以终止反应。反应终止后, 在 450 nm 波长下用微量培养板读数器 (Molecular Devices Corporation) 测量培养板每个孔中反应混合物的吸收度, 以得到显色反应强度的数值。

30 利用前述的测定系统的检查显示, 3 种类型的单克隆抗体可以用作该测定系统的材料。产生这 3 种类型的单克隆抗体的杂交瘤被命名为 HASG-2、HASG-30 和 HASG-61-1。HASG-2 和 HASG-30 于 2001 年 5 月 18 日被保藏在独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心

( 邮政地址 : Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, 日本 ), 保藏号分别为 FERM P-18335 和 FERM P-18336。然后, 所述保藏于 2003 年 9 月 18 日根据布达佩斯条约转变为国际保藏, 且保藏号分别为 FERM BP-08488 和 FERM BP-08489。此外, HASG-61-1 于 2002 年 10 月 8 日被保藏在独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心, 且保藏号为 FERM P-19058。然后, 所述保藏于 2003 年 9 月 18 日根据布达佩斯条约转变为国际保藏, 且保藏号为 FERM BP-08490。

在前述的酶免疫测定系统中, 使用由 HASG-30 产生的单克隆抗体作为第一单克隆抗体, 且使用由 HASG-2 产生的单克隆抗体作为第二单克隆抗体的测定系统被命名为测定系统 A。此外, 使用由 HASG-61-1 产生的单克隆抗体作为第一单克隆抗体, 且使用由 HASG-2 产生的单克隆抗体作为第二单克隆抗体的测定系统被命名为测定系统 B。此外, 使用由 HASG-30 产生的单克隆抗体作为第一单克隆抗体, 且使用由 HASG-61-1 产生的单克隆抗体作为第二单克隆抗体的测定系统被命名为测定系统 C。

用前述的 3 种测定系统, 测量 17 名主动脉壁夹层形成患者和 7 名对照组被试者 ( 4 名正常男性成人, 3 名良性疾病患者 ) 的血清抗原水平。根据作为参照的人主动脉弹性蛋白降解产物溶液的抗原浓度和吸收度值, 利用可商购的软件程序 ( SOFTmax-J Ver. 2.1, Wako Pure Chemical Industries ) 做出标准曲线 ( 图 1 ), 以得到被检测血清的抗原浓度。结果在图 2 中显示。

用测定系统 A 获得的 17 名主动脉壁夹层形成的患者及 7 名对照组被试者的血清抗原水平的平均值  $\pm$  标准差分别为:  $165.9 \pm 96.5$  ng/mL 和  $60.0 \pm 10.4$  ng/mL。用测定系统 B 获得的 17 名主动脉壁夹层形成的患者及 7 名对照组被试者的血清抗原水平的平均值  $\pm$  标准差分别为:  $173.4 \pm 117.5$  ng/mL 和  $40.0 \pm 10.1$  ng/mL。用测定系统 C 获得的 17 名主动脉壁夹层形成的患者及 7 名对照组被试者的血清抗原水平的平均值  $\pm$  标准差分别为:  $128.8 \pm 91.5$  ng/mL 和  $35.5 \pm 7.6$  ng/mL。对于每个测定系统来说, 正常范围 ( 截止值 ( cutoff value ) ) 的上限被试验性地确定为: 对照组的血清浓度值 + 2 倍标准差。对测定系统 A 来说, 正常范围的上限被确定为 80.8 ng/mL, 测定系统 B 为 60.2

ng/mL, 而测定系统 C 为 50.7 ng/mL。使用这些被确定的正常范围上限, 用测定系统 A 和测定系统 C 检测时, 17 名患者中的 15 名患者被确定为阳性; 而用测定系统 B 检测时, 17 名患者中的 16 名患者被确定为阳性。因而, 在所有的测定系统中, 对于目标疾病来说, 获得的阳性率大约为 90%。

#### 实施例 2: 用电化学发光免疫测定测量血清中主动脉弹性蛋白降解产物

将在实施例 1 中得到的、由 HASG-2 产生的抗人主动脉弹性蛋白降解产物单克隆抗体制备为纯化的 IgG, 并用 PBS 将其稀释到终浓度为 0.2 mg/mL。将 0.25 mL Dynabeads M-450 Epoxy1 (Dyna1) 悬浮液添加到 1mL 抗体溶液中, 在聚丙烯容器中密封, 并于室温下轻轻搅拌 4 小时。然后, 将此混合物在 4℃ 下静置大约 12 小时, 以使结合稳定化。然后, 为了封闭该珠表面过量的结合位点, 将 2 mL 含有 1% 脱脂乳的 PBS 溶液、0.1% 叠氮化钠、0.3 mM 苯基甲磺酰氟 (PMSF) 及 2mM EDTA (在下文中称为 SM/PBS) 添加到抗体结合的珠上。为了使封闭稳定化, 需将混合物静置大约 12 小时。然后, 用 PBS 将珠子洗涤 2 次, 用 SM/PBS 溶液稀释 20 倍, 并且作为液体在 4℃ 保存备用。

此外, 单独制备终浓度为 6mg/mL 的由 HASG-2 产生的抗体的纯化产品溶液。向 1mL 所述抗体溶液中添加约 2 mg 钆 (IGEN, Inc.), 将混合物于室温下静置 2 小时。然后, 加入 2mL 0.2 M 甘氨酸/PBS (pH7.8) 来封闭过量的反应位点。将该钆标记的抗体溶液用 Ultro-gel Aca 44 凝胶层析进行处理, 用含 0.1% 叠氮化钠的 PBS 洗脱, 并分离首先被洗脱的标记抗体。将上述由 HASG-2 制备的用钆标记的单克隆抗体在 4℃ 保存备用。

与实施例 1 相同, 使用人主动脉弹性蛋白降解产物 (Elastin Products Company, Inc.) 作为标准。此外, 用 SM/PBS 将钆标记的 HASG-2 抗体稀释 100 倍。利用自动的电化学发光免疫测定仪器 (Picolumi 8220, Sanko Junyaku Co., Ltd) 进行生物学样品的测量, 所述仪器配置有特定的反应溶液、特定的洗涤溶液等。将样品血清用 SM/PBS 稀释 10 倍并用于测量。收集各 0.2 mL 标准的及被稀释的样品血清, 添加到一个特定的反应管内并将其放到特定的反应管架

上。将已经制备的抗体结合的珠和被标记的抗体也添加到各自特定容器内，并放入自动测定设备内。自动测量过程如下。首先，将 0.025 mL 抗体结合的珠添加到反应管内，在间歇搅拌下使其与第一抗体反应约 3 分钟。将反应管中的溶液吸出，然后，用洗涤溶液洗涤所述管 2 次。

- 5 洗涤后，加入 0.2 mL 钡标记的抗体溶液，在间歇搅拌下使其与第二抗体反应约 6 分钟。将反应管中的溶液吸出，然后，用洗涤溶液洗涤所述管 2 次。洗涤后，加入 0.3 mL 发光电解质溶液，并测量发光量。用同时测得的参照抗原的测得值制作标准曲线，并计算抗原浓度。

- 通过用只有 SM/PBS 得到的发光计数作为空白值，以作为参照的人  
10 主动脉弹性蛋白降解产物溶液的抗原浓度和发光计数制作标准曲线（图 3），并计算样品血清中的抗原浓度。结果在图 4 中显示。通过测量得到的 16 名主动脉壁夹层形成患者和 13 名正常老年男性中血清抗原水平的平均值  $\pm$  标准差分别为  $120.1 \pm 101.1$  ng/mL 和  $34.5 \pm 8.5$  ng/mL。与施用实施例 1 所描述的两个不同类型的抗人主动脉弹性蛋白  
15 降解产物单克隆抗体的酶免疫测定系统一样，这个建立在电化学发光免疫测定法基础上的测定系统也以高阳性率检测出主动脉壁夹层形成。这表明仅使用一种类型的 HASG-2 抗体作为珠子固定的抗体和被标记的抗体的测定系统可以获得与实施例 1 所描述的测定系统相似的测量性能。此外，还表明使用电化学发光免疫测定法能够大量减少测量  
20 时间。

- 实施例 3: 用酶免疫测定方法测量血清中主动脉弹性蛋白降解产物  
将实例 1(1) 中由 HASG-2 和 HASG-3 产生的单克隆抗体制备成纯  
化的 IgG。将 HASG-2 单克隆抗体溶解于 PBS 中，终浓度为 0.01 mg/mL，  
25 并将 0.1 mL 上述溶液添加到 96 孔微量培养板 (Nalge Nunc International Corporation) 的每个孔内。含有的单克隆抗体被吸附后，弃去溶液，并将 0.2 mL 含有 1% 脱脂乳的 PBS 溶液加到每个孔内以进行封闭。1 小时后，弃去脱脂乳溶液，并用 PBS 洗涤所述孔。将预定浓度的作为参照的人主动脉弹性蛋白降解产物或样品血清添加到  
30 已经洗涤过的孔内。用膜盖住培养板，室温下静置 1 小时，然后，弃去所有的溶液，用含 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich) 的 PBS 洗涤所述孔 3 次。然后，将 0.1 mL 含有 1% 脱脂乳的 PBS 溶液及用过氧化

物酶 (Roche Diagnostics) [利用过碘酸法 (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed. Harlow & D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press p348 (1988))] 标记的 HASG-3 单克隆抗体添加到每个孔内。然后, 用膜盖住培养板, 室温下静置 1 小时。反应完成后, 5 弃去培养板上所有溶液, 用含 0.05% Tween 20 的 PBS 洗涤所述孔 3 次。洗涤完成后, 将 0.1 mL 含过氧化氢 (Roche Diagnostics) 的 ABTS 底物溶液添加到每个孔内。将培养板静置, 以使显色反应进行 10 分钟。然后, 将 0.1 mL 2mM 叠氮化钠水溶液添加到培养板的每个孔内, 并充分混合以使反应终止。反应终止后, 用微量培养板读数器 (Molecular 10 Devices Corporation) 在 490nm 波长下测量培养板上每个孔内的反应混合物的吸收度, 以得到显色反应强度的数值。

用上述测定方法测量 100 名正常成年人 (70 名男性, 30 名女性)、26 名急性心肌梗死患者及 11 名主动脉壁夹层形成患者的血清抗原水平。根据作为参照的人主动脉弹性蛋白降解产物溶液的抗原浓度和吸 15 收度值, 利用可商购的软件程序 (SOFTmax-J Ver. 2.1, Wako Pure Chemical Industries) 制作标准曲线 (图 4), 并计算出样品血清中的抗原浓度。结果在图 5 中显示。

100 名正常被试者的平均值为 44.44 ng/mL。标准差为 10.8 ng/mL。当假定以 66.0 ng/mL 作为正常范围的上限时, 所述值约等于 20 平均值 + 2 倍标准差, 11 名主动脉壁夹层形成患者中的 8 名患者 (72.7%) (平均值 + 标准差 = 111.65 + 66.04 ng/mL) 显示阳性结果, 而 26 名急性心肌梗死患者中的 3 名患者 (11.5%) (平均值 + 标准差 = 55.42 + 38.66 ng/mL) 显示阳性结果。

## 25 工业适用性

根据本发明, 通过测量循环液中 (如血清中) 弹性蛋白降解产物的量, 即可以高阳性率快速而方便地检测主动脉壁夹层形成, 而不需要专门设备。

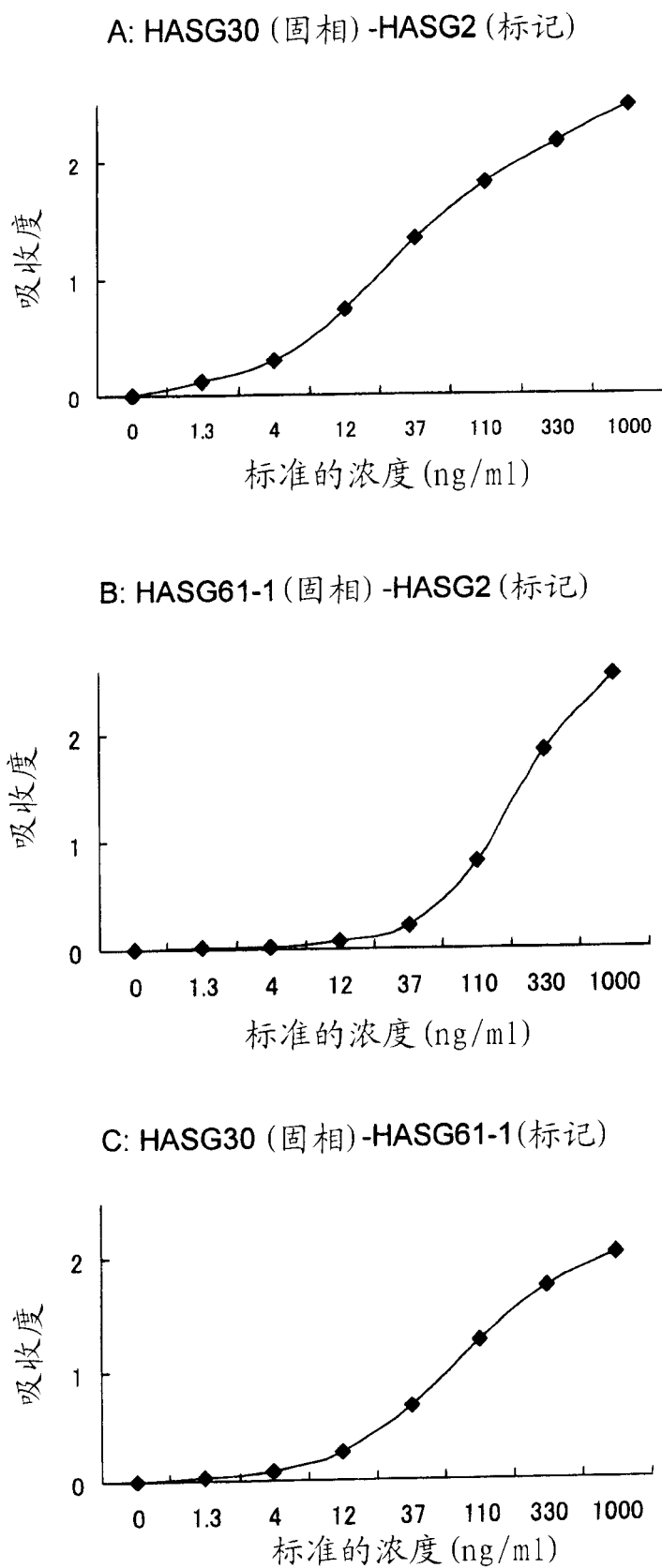


图 1

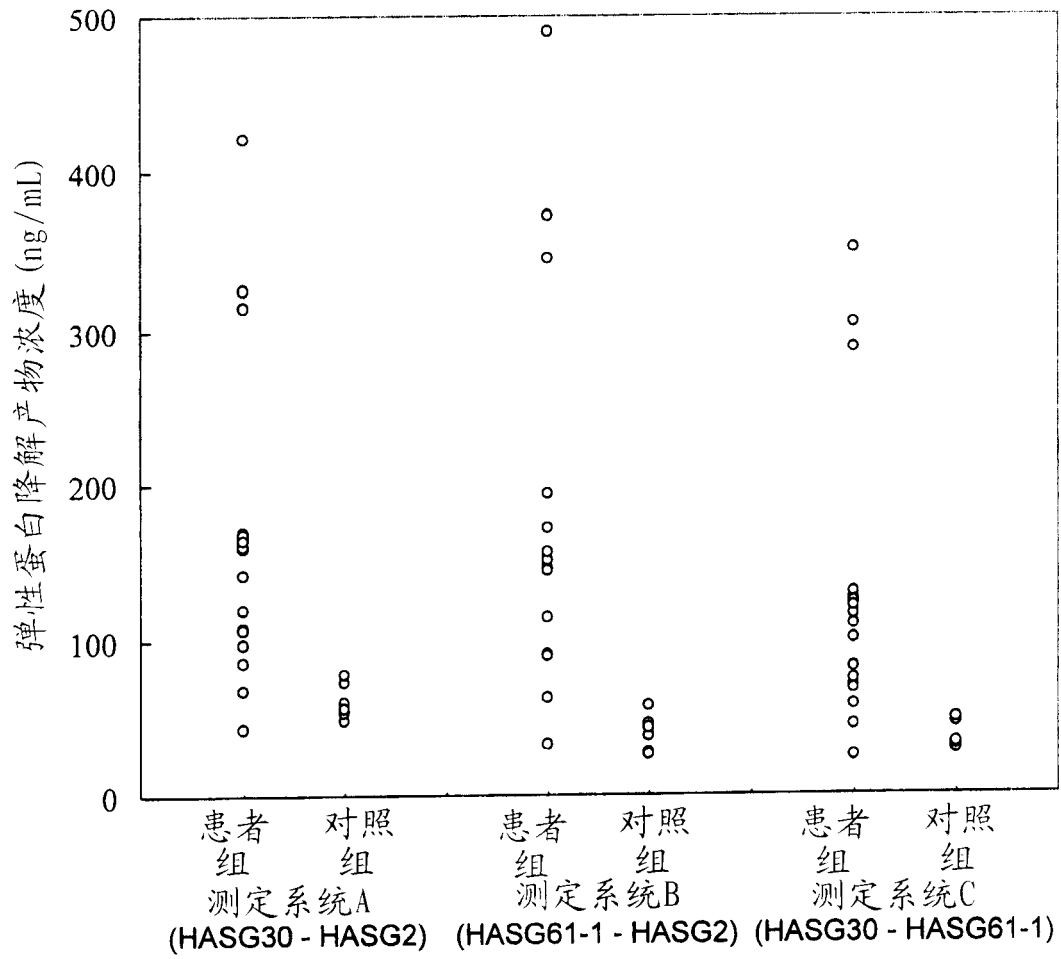


图 2

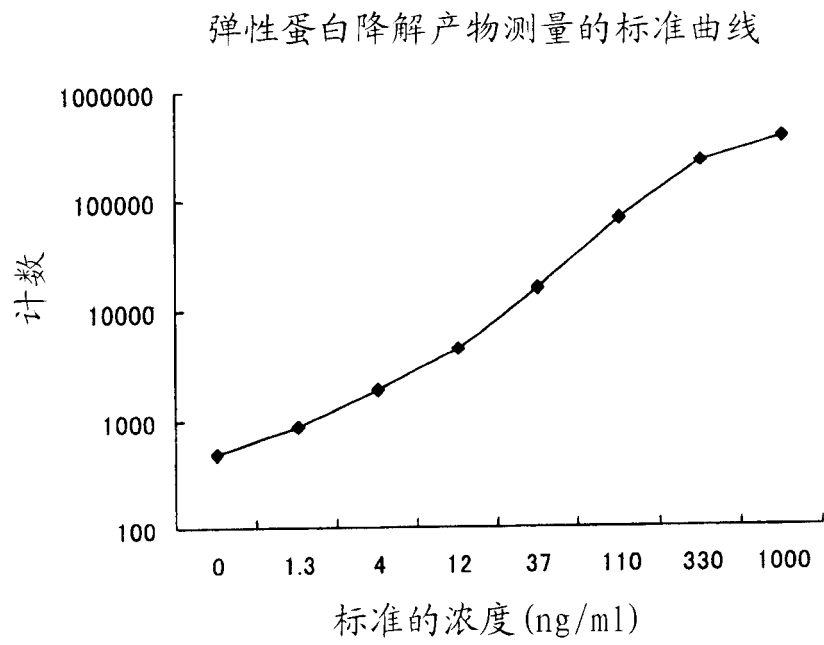


图 3

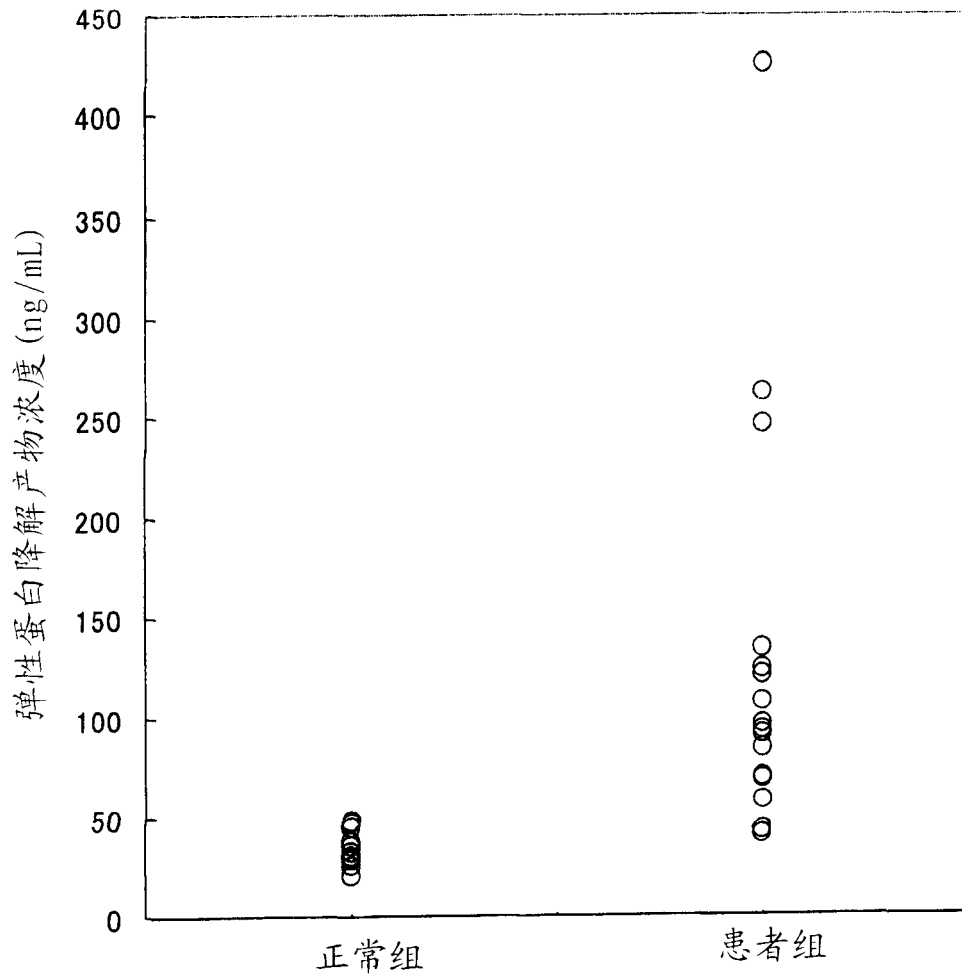


图 4

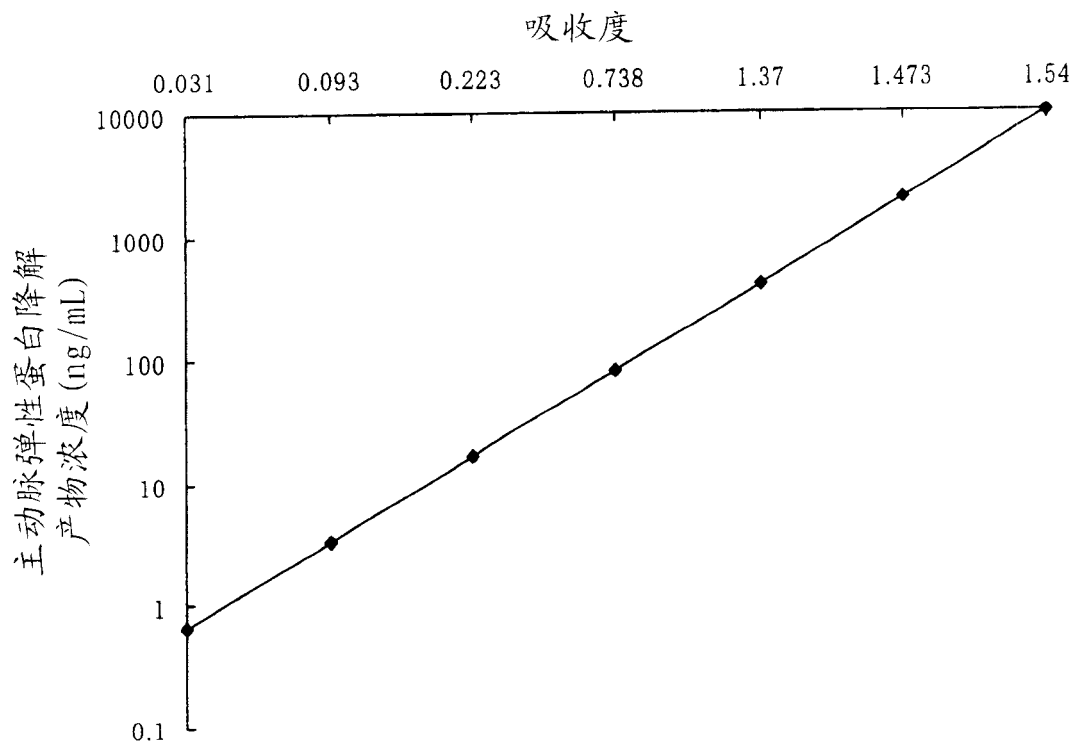


图 5

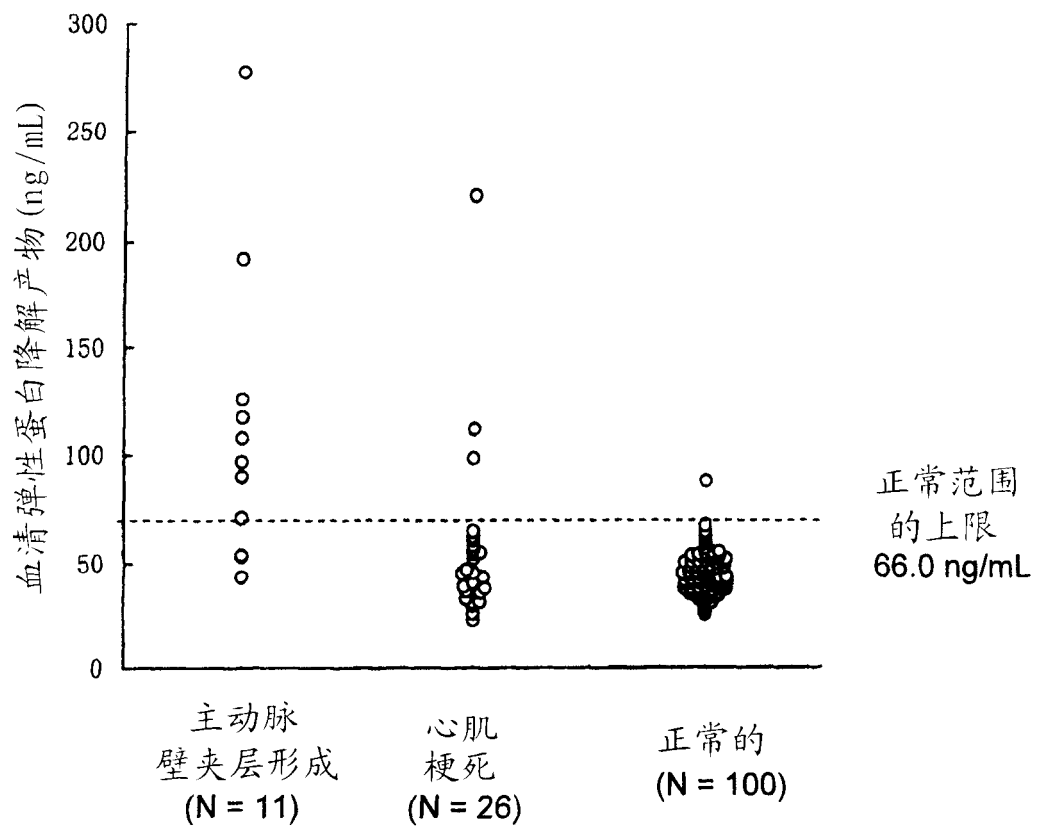


图 6

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于测定弹性蛋白消化产物的方法和测定试剂盒及检测主动脉壁夹层形成的方法和检测试剂盒      |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN1745298A</a>                     | 公开(公告)日 | 2006-03-08 |
| 申请号            | CN200380109374.7                               | 申请日     | 2003-11-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 卫材株式会社   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 卫材株式会社   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 卫材株式会社   |         |            |
| [标]发明人         | 片山政彦   |         |            |
| 发明人            | 片山政彦   |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/577 C07K16/18 G01N33/68       |         |            |
| CPC分类号         | C07K16/18 G01N33/6881 G01N2333/78              |         |            |
| 代理人(译)         | 王景朝  |         |            |
| 优先权            | 2002347423 2002-11-29 JP                       |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

用于方便且高度精确地测定被试者循环液中弹性蛋白消化产物的免疫测定方法，其对检测主动脉壁夹层形成是有用的。该方法包括第一抗体和第二抗体与弹性蛋白消化产物的免疫性结合，其特征在于第一抗体和第二抗体各自为选自杂交瘤HASG - 30(FERM BP - 08489)，杂交瘤HASG - 2(FERM BP - 08488)和杂交瘤HASG - 61 - 1(FERM BP - 08490)产生的单克隆抗体和具有与前述任何一种单克隆抗体等同的对人主动脉弹性蛋白消化产物的特异性和亲和性的抗体的抗体。

