



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101171514 B

(45) 授权公告日 2011. 07. 20

(21) 申请号 200680015352. 8

(22) 申请日 2006. 05. 10

(30) 优先权数据

138113/2005 2005. 05. 11 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 11. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2006/309374 2006. 05. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02006/121064 JA 2006. 11. 16

(73) 专利权人 雅玛山酱油株式会社

地址 日本千叶县

(72) 发明人 田中诚仁 滨冲胜

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

司 31100

代理人 徐迅

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

JP 平 3-44332 A, 1991. 02. 26, 全文.

W0 91/00871 A1, 1991. 01. 24, 说明书第 3 页

18 行 -36 行, 说明书第 6 页 17 行 - 第 7 页 5 行, 权利要求 19、22.

US 6172203 B1, 2001. 01. 09, 摘要, 实施例 2, 权利要求 1、7.

US 6172203 B1, 2001. 01. 09, 摘要, 实施例 2, 权利要求 1、7.

W0 91/00871 A1, 1991. 01. 24, 说明书第 3 页 18 行 -36 行, 说明书第 6 页 17 行 - 第 7 页 5 行, 权利要求 19、22.

Kamada shuichi et al. A sandwich enzyme immunoassay for pulmonary surfactant protein D and measurement of its blood levels in drowning victims. 《Forensic Science International》. 2000, 第 109 卷 51-63.

Mark L & Ingenito E P. Surfactant function and composition after free radical exposure generated by transition metals. 《Am J Physiol》. 1999, 第 276 卷 491-500.

Bi X et al. Thermal stability and DPPC/ Ca²⁺ interactions of pulmonary surfactant SP-A from bulk-phase and monolayer IR spectroscopy. 《Biochemistry》. 2001, 第 40 卷 13659-13669.

审查员 李影

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

肺表面活性蛋白的稳定化方法

(57) 摘要

本发明涉及肺表面活性蛋白的长期稳定化方法, 含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液, 以及包括含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液作为构成试剂的肺表面活性蛋白测定用试剂盒。提供了将肺表面活性蛋白稳定化的方法, 其中, 使钙离子和与氧化还原相关的物质共存。另外, 提供了含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液, 其中, 并用了钙离子和与氧化还原相关的物质。另外, 还提供了肺表面活性蛋白测定用试剂盒, 它是通过利用了抗原抗体反应的免疫学方法来测定样品中的肺表面活性蛋白用的试剂盒, 其

特征在于, 该试剂盒包括含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液作为肺表面活性蛋白的标准溶液, 所述水溶液并用了钙离子和与氧化还原相关的物质。

1. 将肺表面活性蛋白稳定化的方法,其特征在于,使肺表面活性蛋白与钙离子和与氧化还原相关的物质共存;所述与氧化还原相关的物质为选自过氧化氢、2价或3价铁、2价锰和1价铜的1种或2种以上的物质。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,使肺表面活性蛋白的抗原活性稳定化。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,肺表面活性蛋白为重组肺表面活性蛋白D(rSP-D)。

4. 含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液,其特征在于,并用了钙离子和与氧化还原相关的物质;所述与氧化还原相关的物质为选自过氧化氢、2价或3价铁、2价锰和1价铜的1种或2种以上的物质。

5. 如权利要求4所述的水溶液,其特征在于,使肺表面活性蛋白的抗原活性稳定化。

6. 如权利要求4所述的水溶液,其特征在于,肺表面活性蛋白为重组肺表面活性蛋白D(rSP-D)。

7. 肺表面活性蛋白测定用试剂盒,它是通过利用了抗原抗体反应的免疫学方法来测定样品中的肺表面活性蛋白用的试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液作为肺表面活性蛋白的标准溶液,所述水溶液并用了钙离子和与氧化还原相关的物质;所述与氧化还原相关的物质为选自过氧化氢、2价或3价铁、2价锰和1价铜的1种或2种以上的物质。

8. 如权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,使肺表面活性蛋白的抗原活性稳定化。

9. 如权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,肺表面活性蛋白为重组肺表面活性蛋白D(rSP-D)。

肺表面活性蛋白的稳定化方法

技术领域

[0001] 本发明涉及肺表面活性蛋白的稳定化方法、含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的溶液、以及含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的溶液作为构成试剂的肺表面活性蛋白测定用试剂盒。

背景技术

[0002] 肺表面活性蛋白是对肺表面活性物质特异的脱辅基蛋白质 (SP)，目前报道有亲水性的 SP-A 和 SP-D 以及疏水性的 SP-B 和 SP-C4 种。其中，SP-D 被认为在气管 - 肺胞系的机体防御机构中起重要作用，有报道称，通过利用了抗原抗体反应的免疫学方法测定样品（血清等）中的 SP-D，可以诊断特发性间质性肺炎等肺疾病（非专利文献 1）。

[0003] 在上述报告书中报道的方法使用通过重组 DNA 方法所得的重组 SP-D (rSP-D) 作为标准物质，由于该 rSP-D 不稳定，因此有报道称通过使其与属于钙、钡、镁等周期表 IIA 族的金属离子共存，来提高 rSP-D 等肺表面活性蛋白的稳定性（专利文献 1）。

[0004] 【非专利文献 1】“医学と薬学（医学与药学）”、36(4)、803-808(1996)

[0005] 【专利文献 1】专利第 3573330 号公报

发明内容

[0006] 但是，虽然通过使其与钙离子共存，确实将肺表面活性蛋白的抗原活性稳定化，但是长时间的稳定性仍有问题。即，如专利文献 1 的实施例 1 ~ 3 所示，钙离子虽然对 6 小时左右的比较短时间的肺表面活性蛋白的稳定性显示了非常好的效果，但是对于 10 小时以上或数日间的中长期的肺表面活性蛋白的稳定性，单独的钙离子未必理想，而且还希望进一步提高对温度的稳定性。

[0007] 本发明人为了解决上述问题进行了随机筛选，结果发现使肺表面活性蛋白仅与钙离子和与氧化还原相关的物质共存，即使在 37℃ 的条件下 48 小时以上的时间，抗原活性也不消失仍稳定化，于是完成了本发明。因此，本发明如下所示。

[0008] 将肺表面活性蛋白稳定化的方法，其中，使钙离子和与氧化还原相关的物质共存。

[0009] 如上述 [1] 所述的方法，其中，使肺表面活性蛋白的抗原活性稳定化。

[0010] 如上述 [1] 所述的方法，其中，肺表面活性蛋白为重组肺表面活性蛋白 D (rSP-D)。

[0011] 如上述 [1] 所述的方法，其中，与氧化还原相关的物质为选自过氧化氢、2 价或 3 价铁、2 价锰和 1 价铜的 1 种或 2 种以上的物质。

[0012] 含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液，其中，并用了钙离子和与氧化还原相关的物质。

[0013] 如上述 [5] 所述的水溶液，其中，使肺表面活性蛋白的抗原活性稳定化。

[0014] 如上述 [5] 所述的水溶液，其中，肺表面活性蛋白为重组肺表面活性蛋白 D (rSP-D)。

[0015] 如上述 [5] 所述的水溶液，其中，与氧化还原相关的物质为选自过氧化氢、2 价或 3

价铁、2 价锰和 1 价铜的 1 种或 2 种以上的物质。

[0016] 肺表面活性蛋白测定用试剂盒,它是通过利用了抗原抗体反应的免疫学方法来测定样品中的肺表面活性蛋白用的试剂盒,其特征在于,包括含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液作为肺表面活性蛋白的标准溶液,该水溶液并用了钙离子和与氧化还原相关的物质。

[0017] 如上述 [9] 所述的试剂盒,其中,使肺表面活性蛋白的抗原活性稳定化。

[0018] 如上述 [9] 所述的试剂盒,其中,肺表面活性蛋白为重组肺表面活性蛋白 D(rSP-D)。

[0019] 如上述 [9] 所述的试剂盒,其中,与氧化还原相关的物质为选自过氧化氢、2 价或 3 价铁、2 价锰和 1 价铜的 1 种或 2 种以上的物质。

[0020] 将肺表面活性蛋白(例如 rSP-D)稳定化时,仅使钙离子和与氧化还原相关的物质共存,具体为过氧化氢、2 价或 3 价铁、2 价锰及 / 或 1 价铜,如后述实施例所示,肺表面活性蛋白的抗原活性可较单独使用钙离子时更加稳定化。

[0021] 这样,短时间当然不用说,即使在常温(25℃)保存中长时间,也可以不使肺表面活性蛋白失活地保存流通,测定时的反应也可以在常温至 37℃ 下进行,可使肺表面活性蛋白的免疫学测定的操作性、通用性较目前提高。

具体实施方式

[0022] 本发明的肺表面活性蛋白中 SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D 均有,优选作为诊断项目被确定了有用性的 SP-A 或 SP-D。另外,本发明中,肺表面活性蛋白可以使用从机体组织分离精制的天然蛋白质、利用重组 DNA 技术制备的重组蛋白质的任一种。

[0023] 本发明中,通过使钙离子和与氧化还原相关的物质共存,可以将肺表面活性蛋白稳定化。

[0024] 作为共存的与氧化还原相关的物质,可以是具有氧化作用的物质和具有还原作用的物质的任一种,可例举如选自过氧化氢、2 价或 3 价铁、2 价锰及 1 价铜的 1 种或 2 种以上的物质,特别优选为过氧化氢或 2 价锰离子。

[0025] 对与氧化还原相关的物质的使用浓度没有特别的限定,含有肺表面活性蛋白的水溶液中,为过氧化氢等物质时优选 0.001 ~ 5% (w/v),更优选 0.01 ~ 1% (w/v)。另外为 2 价或 3 价铁、2 价锰、1 价铜等金属离子时,优选 0.001 ~ 1000mM,更优选 0.01 ~ 100mM。并用的钙离子的使用浓度优选在含有肺表面活性蛋白的水溶液中为 0.001 ~ 100mM,更优选 0.01 ~ 100mM。

[0026] 与氧化还原相关的物质为金属离子时,优选使用氯化物、醋酸盐、硝酸盐等水溶性金属盐。另外,钙离子也优选使用氯化钙、醋酸钙、硝酸钙等水溶性钙盐。

[0027] 制备并用了钙离子和与氧化还原相关的物质的、含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液可通过在水或 HEPES 等缓冲液中以上述浓度溶解钙盐(例如,氯化钙等)和与氧化还原相关的物质(过氧化氢,或者锰、铁或铜的盐(例如,氯化锰、氯化铁等)之后,溶解规定量的肺表面活性蛋白(例如,1 ~ 200ng/mL)来实施。另外,对于溶解的顺序没有特别的限定,也可以先溶解肺表面活性蛋白,或者同时溶解。

[0028] 这样制备的含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液作为利用了抗原抗体反

应的免疫学方法来测定样品中的肺表面活性蛋白用的试剂盒的肺表面活性蛋白的标准溶液有用。该试剂盒中适当含有适于免疫透射比浊法 (c immunoassay :TIA)、免疫散射比浊法 (nephelometric immunoassay :NIA)、酶免疫测定法 (enzyme immunoassay :EIA)、荧光免疫测定法 (fluoroimmunoassay :FIA)、胶乳光学测定法 (latex photometric immunoassay :LPIA)、化学发光免疫测定法 (chemiluminescent immunoassay :CLIA)、电化学发光免疫测定法 (electrochemiluminescent immunoassay :ECLIA)、放射免疫测定法 (radio immunoassay :RIA) 等所采用的分析的试剂,作为必须的试剂,含有抗肺表面活性蛋白抗体,还可根据需要包括标记抗肺表面活性蛋白抗体、标记的第 2 抗体等。作为该试剂盒,可例举如利用 ELISA 法的 SP-D 测定试剂盒,具体地讲,可例举如以下的试剂盒。

[0029] (本发明的试剂盒)

[0030] 固相化抗 SP-D 抗体试剂

[0031] 酶标记化抗 SP-D 抗体试剂

[0032] SP-D 标准抗原溶液 (含有钙离子和锰离子)

[0033] 另外也可以添加在上述诊断用试剂盒中通常添加的酶反应基质液、酶反应停止液、清洗液等。该试剂盒的使用方法可按照例如“医学と薬学 (医学与药学)”、36(4), 804-808(1996) 等中记载的公知的测定方法来进行。

[0034] 【实施例】

[0035] 以下,根据实施例来进行详细地说明,本发明不限于此。

[0036] 实施例 1 :37℃ 下的稳定化的研究

[0037] 向缓冲液 (10mM HEPES、150mM 氯化钠、10mM 氯化钙、1.0% (w/v) 牛血清白蛋白、0.5% (w/v) Triton X-100、pH7.4) 中分别以成为 0.1% (w/v)、10mM、5mM、1mM、1mM 的最终浓度来添加过氧化氢、氯化锰、氯化亚铁 (II)、氯化铁 (III) 或者氯化亚铜,将该缓冲液作为稀释用缓冲液。

[0038] 接着,向该稀释用缓冲液中添加一定量的 rSP-D,在 37℃ 下培养 24 ~ 48 小时,将其作为样品液。另外,作为对照,对没有添加过氧化氢、氯化锰、氯化亚铁 (II)、氯化铁 (III) 或氯化亚铜的缓冲液也进行同样的处理。

[0039] 培养之后,使用该样品液和对照液以及ヤマサ醤油株式会社制的 SP-D 测定试剂盒,按照“医学と薬学 (医学和药学)”、36(4),804-808(1996) 记载的测定法 (以下,称为标准操作法) 来测定 SP-D。将该结果示于表 1。由表 1 可知,通过并用钙离子和与氧化还原相关的物质,特别是并用铁离子或锰离子,对 SP-D 的抗原活性的稳定有效。

[0040] 【表 1】

[0041]

将0小时的测定值作为100时, 24小时后或48小时后的测定值的比例 (%)		
添加物	24小时后	48小时后
对照 (没有添加)	61	44
氯化锰	98	91
氯化亚铁 (II)	96	94
氯化铁 (III)	96	96
氯化亚铜	80	71
过氧化氢	83	79

[0042] 实施例 2 :25℃下稳定性的研究

[0043] 向缓冲液 (10mM HEPES、150mM 氯化钠、10mM 氯化钙、1.0% (w/v) 牛血清白蛋白、0.5% (w/v) Triton X-100、pH7.4) 中分别以成为 0.1% (w/v)、10mM 的最终浓度添加过氧化氢或氯化锰,将该缓冲液作为稀释用缓冲液。

[0044] 接着,向该稀释用缓冲液中添加一定量的 rSP-D,在 25℃下培养 3 天至 5 天,将其作为样品液。另外,对于没有添加过氧化氢或氯化锰的无添加的缓冲液也进行同样的处理。

[0045] 培养之后,按照标准操作法,测定样品液和对照液中的 SP-D。将其结果记在表 2。如表 2 所示可以确认,添加了过氧化氢或氯化锰的添加样品在 25℃、处理 5 天后也保持同等的抗原性。另一方面,对于无添加的仅有钙离子的情况,确认在 250℃处理 5 天后有 20%以上的抗原性失活。

[0046] 由此可知,通过并用钙离子和过氧化氢或氯化锰可大幅提高热稳定性,即使在 25℃处理 5 天,也可以保持 90%以上的抗原活性。

[0047] 【表 2】

[0048]

将0小时的测定值作为100时, 3天后或5天后的测定值的比例 (%)		
添加物	3天后	5天后
对照 (没有添加)	85	78
氯化锰	95	96
过氧化氢	98	98

[0049] 实施例 3 :没有氯化钙时的添加效果

[0050] 向缓冲液 (10mM HEPES、150mM 氯化钠、1.0%牛血清白蛋白、0.5% TritonX-100、pH7.4) 中,以最终浓度为 10mM 添加氯化钙,以最终浓度为 50mM、10mM、1mM 添加氯化锰,或者以最终浓度为 1%、0.1%、0.01% (W/V) 添加过氧化氢,或者以最终浓度为 1mM 添加氯化亚铁 (II)。将该缓冲液作为稀释用缓冲液。

[0051] 另外,向该稀释用缓冲液中添加一定量的 SP-D,在 25℃或 37℃下培养表 3 或表 4 所示的时间,将其作为样品液。另外,作为对照对没有向缓冲液中添加上述物质的无添加试样也进行相同的处理。

[0052] 使用该对照液、样品液,使用ヤマサ醤油株式会社制的 SP-D 测定试剂盒,按照标准操作法测定样品液中的 SP-D。

[0053] 由结果可知,对 25℃ (表 3) 的情况,虽然单独使用锰离子就能保持稳定,但是在 37℃ (表 4) 下,利用单独的锰离子或钙离子均不能使 SP-D 的抗原活性保持稳定。

[0054] 【表 3】

[0055]

添加剂	相对于0天时测定值的比例 (%)		
	3天后	5天后	7天后
无添加	33	31	26
50mM氯化锰	95	104	98
10mM氯化锰	93	105	97
1mM氯化锰	98	101	89
1%过氧化氢	-	80	67
0.1%过氧化氢	-	<25	<25
0.01%过氧化氢	-	<25	<25
1mM氯化亚铁 (II)	95	85	44
10mM氯化钙	84	81	76

[0056] - 表示未测定

[0057] 【表 4】

[0058]

添加剂	相对于0小时测定值的比例 (%)		
	24小时后	48小时后	120小时后
无添加	25	<25	<25
50mM氯化锰	97	90	89
10mM氯化锰	91	92	79
1mM氯化锰	48	51	<25
1%过氧化氢	<25	<25	<25
0.1%过氧化氢	<25	<25	<25
0.01%过氧化氢	<25	<25	<25
1mM氯化铁 (II)	<25	<25	<25
10mM氯化钙	72	63	35

[0059] 实施例 4: 含有氯化钙状态时的添加效果

[0060] 向缓冲液 (10mM HEPES、150mM 氯化钠、10mM 氯化钙、1.0% 牛血清白蛋白、0.5% Triton X-100、pH7.4) 中, 以最终浓度为 50mM、10mM、1mM 添加氯化锰, 以最终浓度为 5mM、1mM 添加氯化亚铁 (II), 以最终浓度为 1mM 添加氯化铁 (III), 以最终浓度为 1mM 添加氯化亚铜, 以最终浓度为 1%、0.1%、0.01% (W/V) 添加过氧化氢。将该缓冲液作为稀释用缓冲液。

[0061] 另外, 向该稀释用缓冲液中添加一定量的重组 SP-D, 在 25℃ 或 37℃ 下培养表 5 及 6 所记载的时间, 将其作为样品液。另外作为对照, 对于没有向缓冲液中添加上述物质的无添加试样 (含有氯化钙) 也进行相同的处理。

[0062] 使用该对照液、样品液, 使用ヤマサ醤油株式会社制的 SP-D 测定试剂盒, 按照标准操作法测定样品液中的 SP-D。

[0063] 结果可知, 对于 25℃ (表 5)、37℃ (表 6) 的任一种情况, 通过并用钙离子, 均可以使 SP-D 的抗原活性保持稳定。

[0064] 【表 5】

[0065]

添加剂1	添加剂2	相对于0小时时测定值的比例 (%)			
		3天后	5天后	7天后	14天后
10mM氯化钙	无添加	76	75	56	51
	50mM氯化锰	92	106	101	88
	10mM氯化锰	89	99	89	76
	1mM氯化锰	84	91	81	62
	1%过氧化氢	84	95	88	—
	0.1%过氧化氢	95	95	96	91
	0.01%过氧化氢	83	90	103	68
	1mM氯化亚铁 (II)	—	102	86	88
	1mM氯化铁 (III)	—	104	93	99

[0066] — 表示未测定

[0067] 【表 6】

[0068]

添加剂1	添加剂2	相对于0小时时测定值的比例 (%)		
		24小时后	48小时后	120小时后
10mM氯化钙	无添加	61	44	31
	50mM氯化锰	95	95	97
	10mM氯化锰	98	91	78
	1mM氯化锰	80	76	36
	1%过氧化氢	93	76	—
	0.1%过氧化氢	94	93	102
	0.01%过氧化氢	86	55	—
	5mM氯化亚铁 (II)	96	94	—
	1mM氯化亚铁 (II)	93	85	67
	1mM氯化铁 (III)	99	94	87
	1mM氯化亚铜	80	71	—

专利名称(译)	肺表面活性蛋白的稳定化方法		
公开(公告)号	CN101171514B	公开(公告)日	2011-07-20
申请号	CN200680015352.8	申请日	2006-05-10
[标]申请(专利权)人(译)	山佐株式会社		
申请(专利权)人(译)	雅玛山酱油株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	雅玛山酱油株式会社		
[标]发明人	田中诚仁 滨冲胜		
发明人	田中诚仁 滨冲胜		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6884 C07K14/785 G01N2333/785		
代理人(译)	徐迅		
审查员(译)	李影		
优先权	2005138113 2005-05-11 JP		
其他公开文献	CN101171514A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及肺表面活性蛋白的长期稳定化方法，含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液，以及包括含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液作为构成试剂的肺表面活性蛋白测定用试剂盒。提供了将肺表面活性蛋白稳定化的方法，其中，使钙离子和与氧化还原相关的物质共存。另外，提供了含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液，其中，并用了钙离子和与氧化还原相关的物质。另外，还提供了肺表面活性蛋白测定用试剂盒，它是通过利用了抗原抗体反应的免疫学方法来测定样品中的肺表面活性蛋白用的试剂盒，其特征在于，该试剂盒包括含有被稳定化了的肺表面活性蛋白的水溶液作为肺表面活性蛋白的标准溶液，所述水溶液并用了钙离子和与氧化还原相关的物质。

将0小时的测定值作为100时，24小时后或48小时后的测定值的比例(%)		
添加物	24小时后	48小时后
对照(没有添加)	61	44
氯化锰	98	91
氯化亚铁(II)	96	94
氯化铁(III)	96	96
氯化亚铜	80	71
过氧化氢	83	79