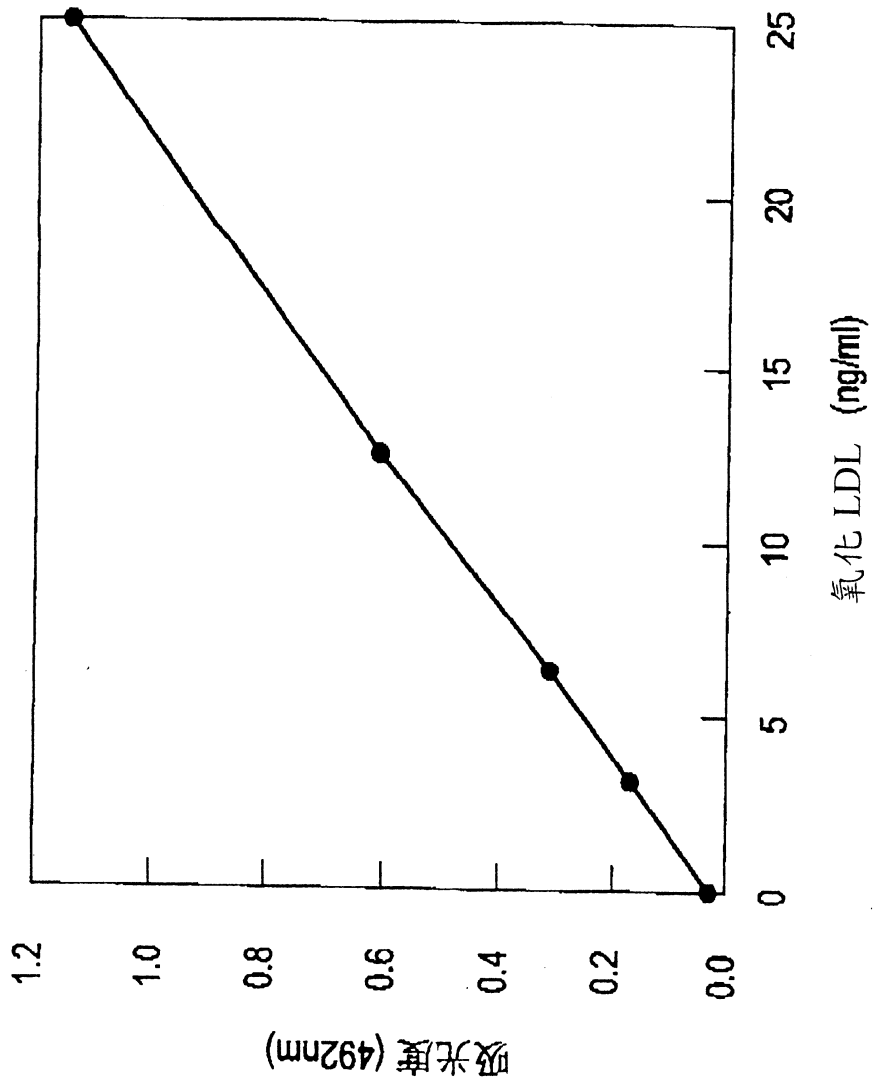
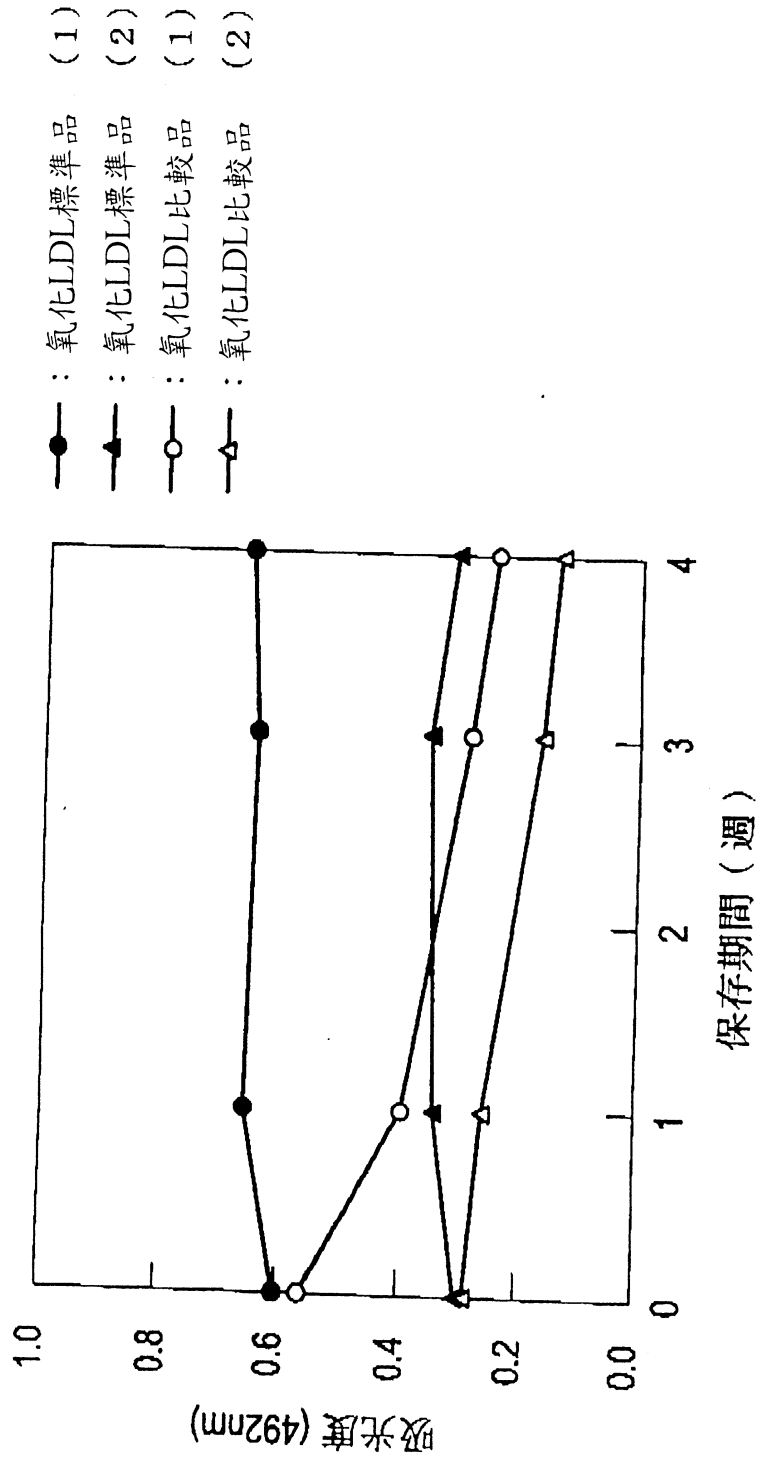


第 1 圖

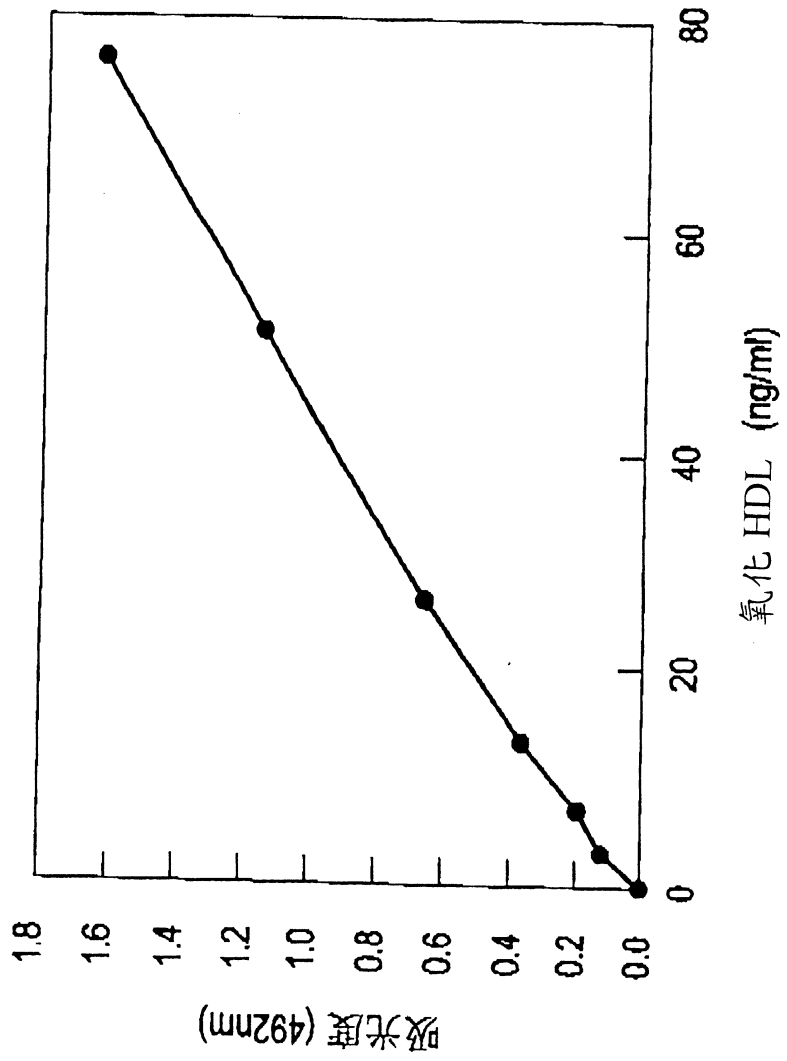


第 2 圖

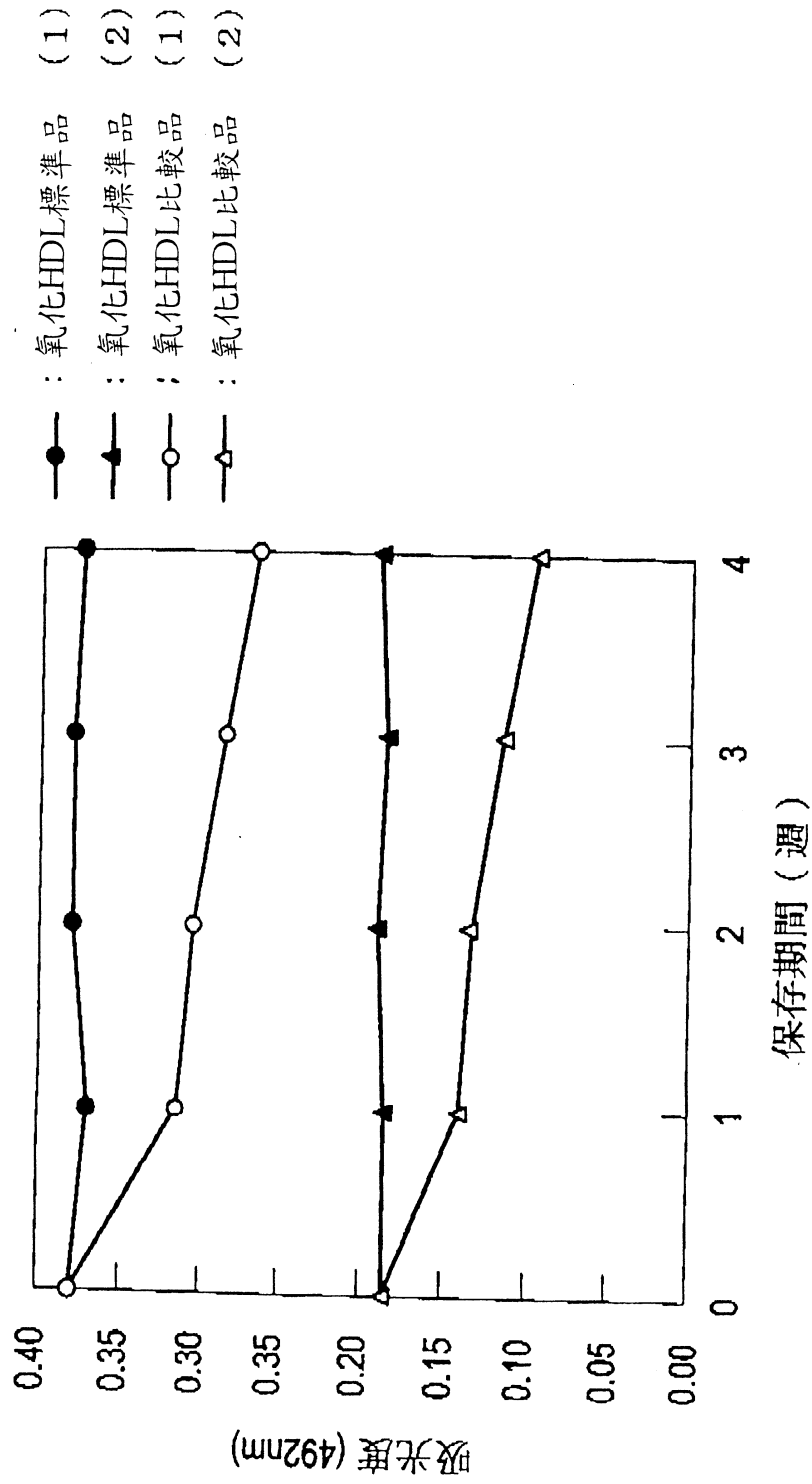


(3/10)

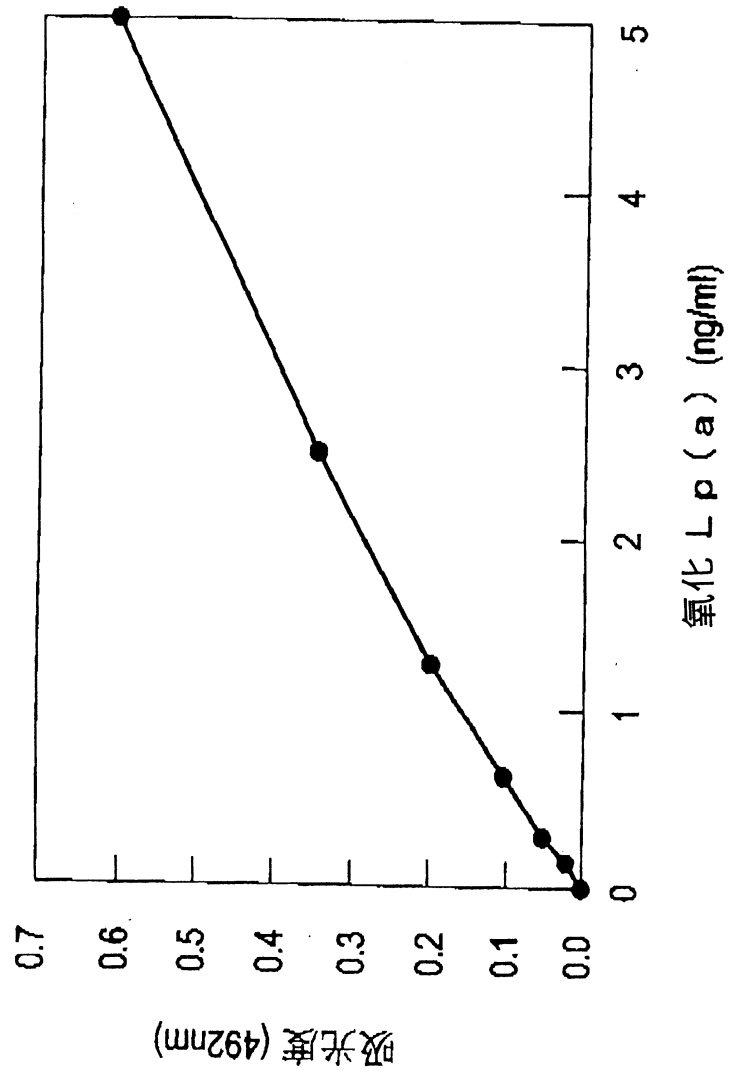
第 3 圖



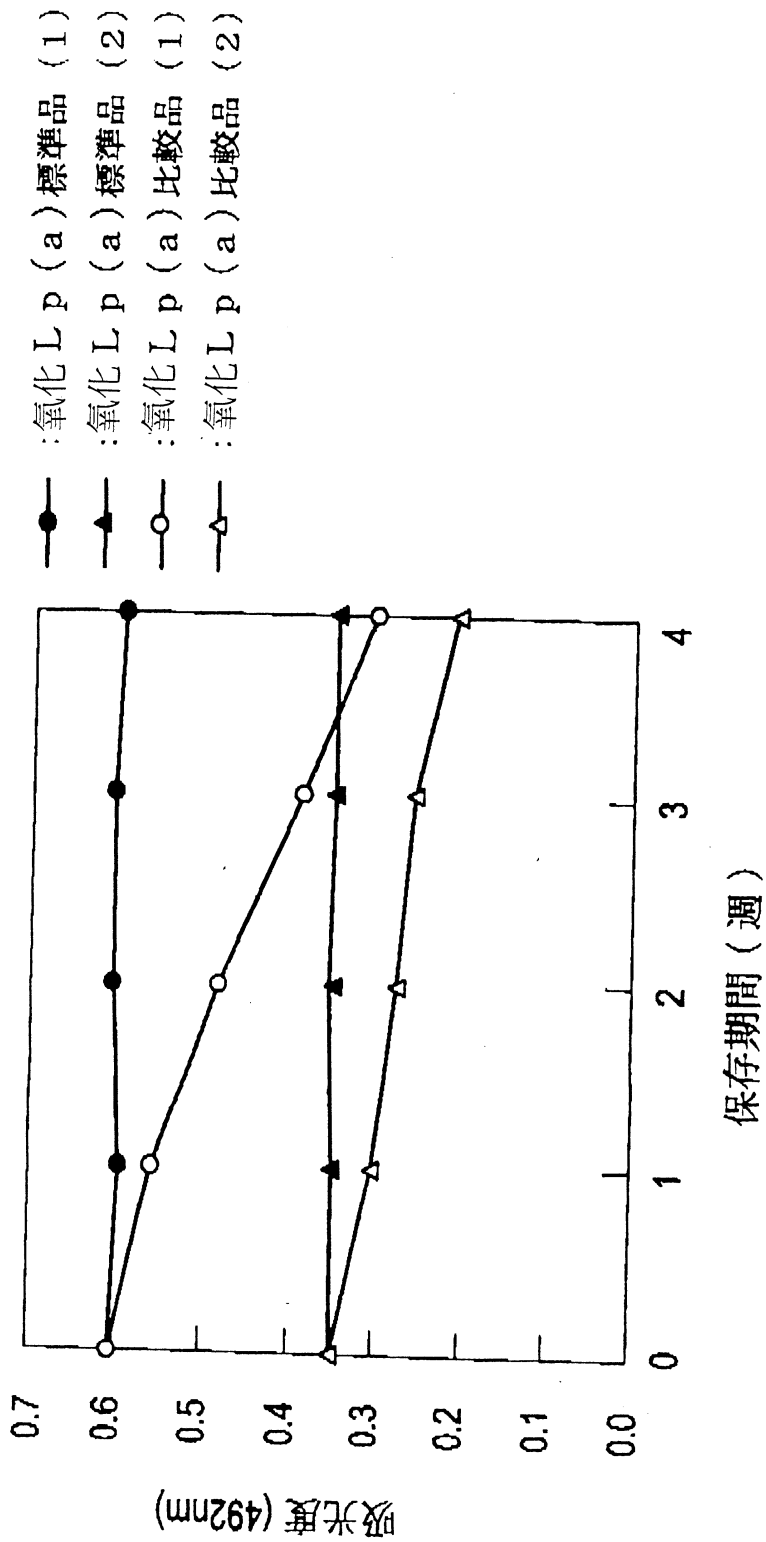
第 4 圖



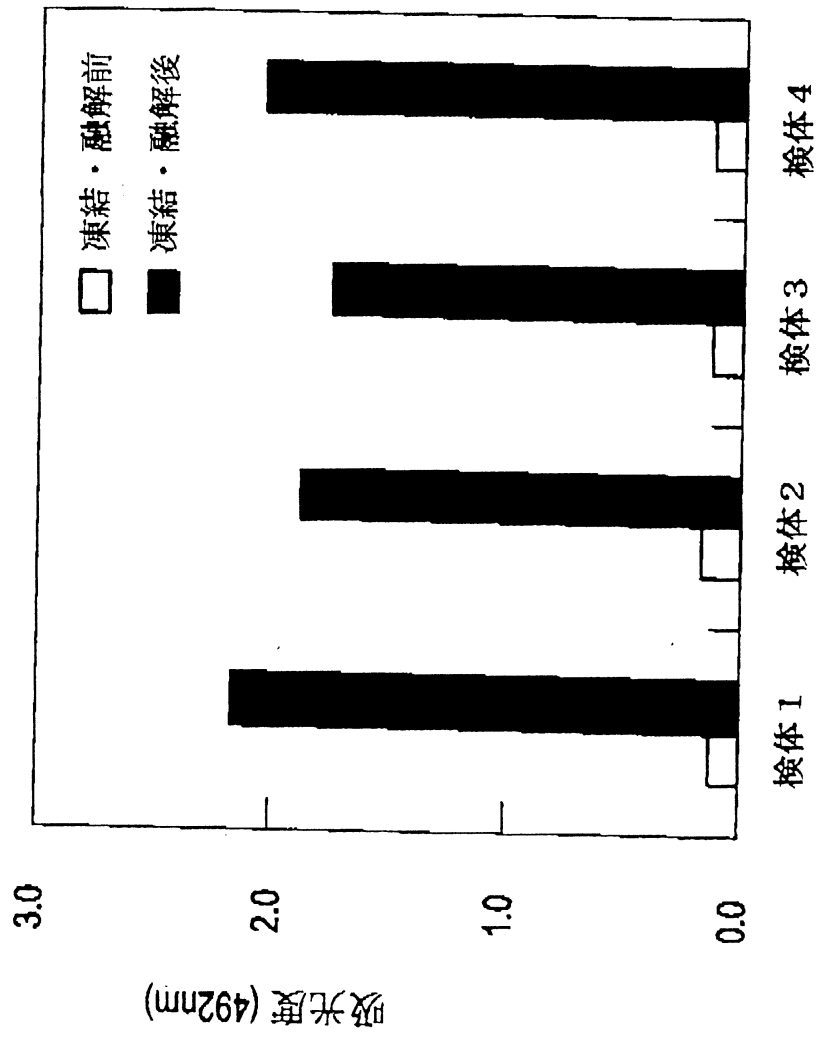
第 5 圖



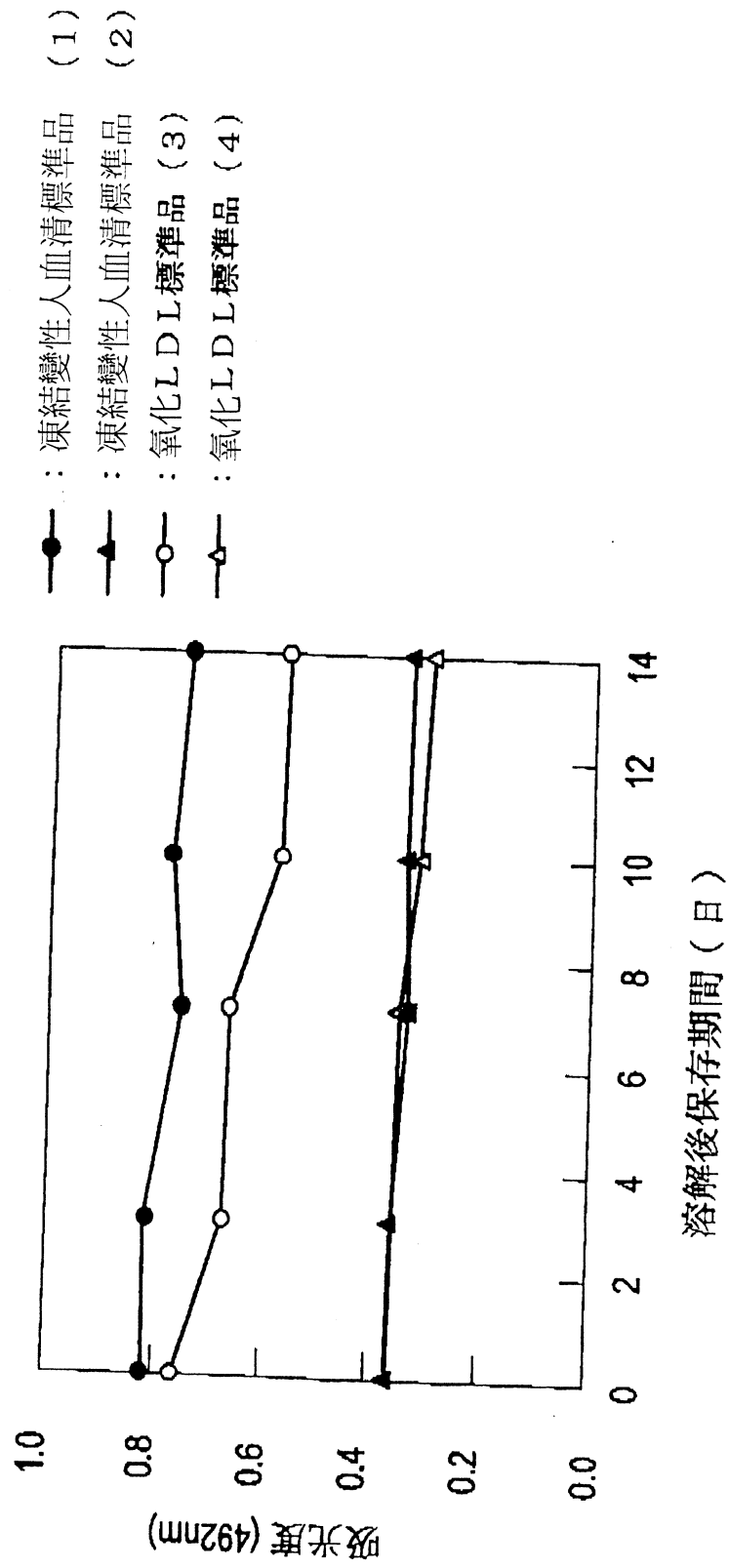
第 6 圖



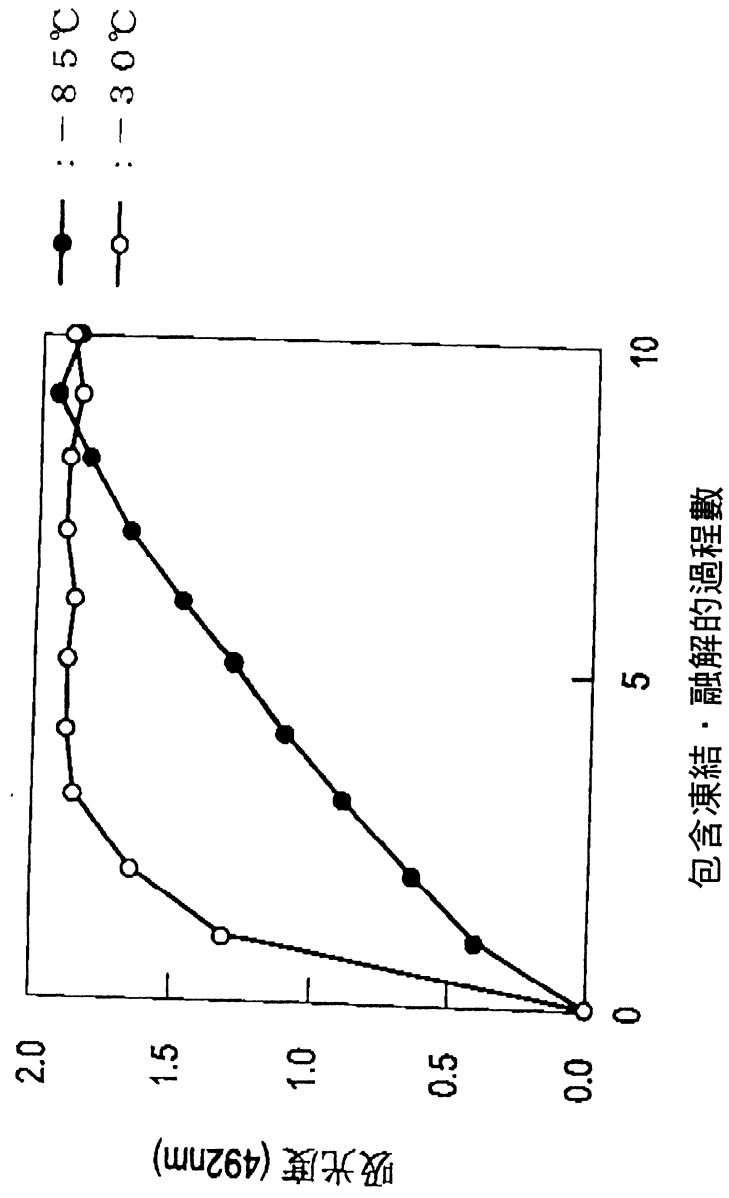
第 7 圖



第 8 圖

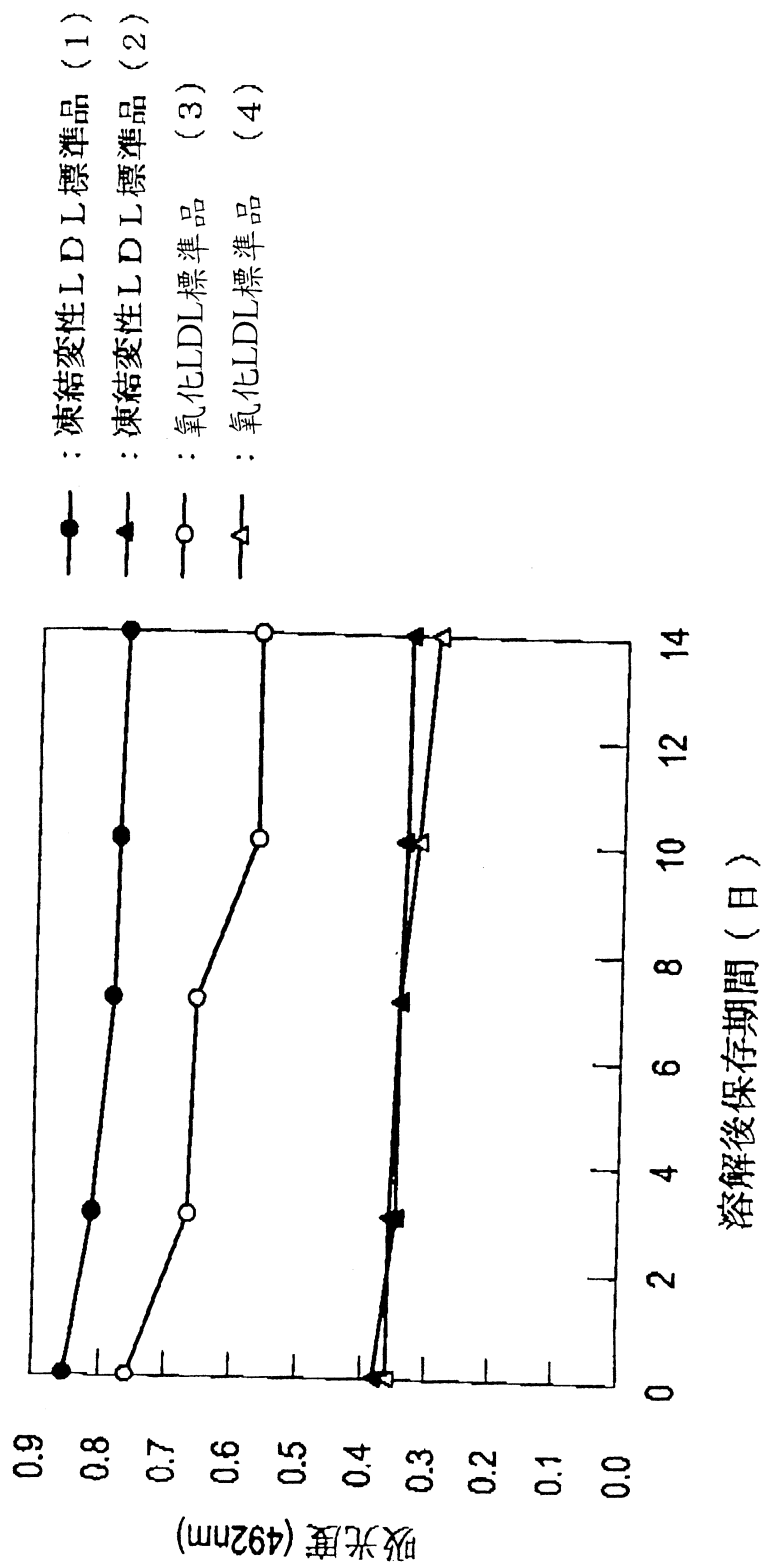


第 9 圖



(10/10)

第 10 圖



修正
補充

公告本

年 月 日

修正

I262191

申請日期: 89.5.24	IPC分類
申請案號: 89110358	C27K 14/775, G01N 33/92

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	中文	變性脂蛋白質之製造及其安定化方法
	英文	A method for manufacturing denatured lipoprotein and method for stabilizing the same
二、發明人 (共5人)	姓名 (中文)	1. 重松 貴 2. 島村 京子 3. 木村 順治
	姓名 (英文)	1. SHIGEMATSU Takashi 2. SHIMAMURA Kyoko 3. KIMURA Junji
	國籍 (中英文)	1. 日本 JP 2. 日本 JP 3. 日本 JP
三、申請人 (共1人)	名稱或姓名 (中文)	1. 協和美帝克斯股份有限公司
	名稱或姓名 (英文)	1. KYOWA MEDEX CO., LTD.
	國籍 (中英文)	1. 日本 JP
	住居所 (營業所) (中文)	1. 日本國東京都中央區入船二丁目1番1號 (本地址與前向貴局申請者不同)
	住居所 (營業所) (英文)	1. 1-1, Irifune 2-Chome, Chuo-ku, Tokyo 104-0042 Japan
	代表人 (中文)	1. 所 洋
	代表人 (英文)	1. Yoh TOKORO

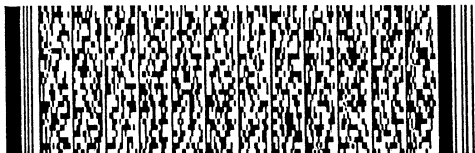


申請日期：	IPC分類
申請案號： 89110358	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	
	英文	
二、 發明人 (共5人)	姓名 (中文)	4. 河野 弘明 5. 末重 信之
	姓名 (英文)	4. KOHNO Hiroaki 5. SUESHIGE Nobuyuki
	國籍 (中英文)	4. 日本 JP 5. 日本 JP
三、 申請人 (共1人)	名稱或 姓名 (中文)	
	名稱或 姓名 (英文)	
	國籍 (中英文)	
	住居所 (營業所) (中文)	
	住居所 (營業所) (英文)	
	代表人 (中文)	
	代表人 (英文)	



一、本案已向

國家(地區)申請專利	申請日期	案號	主張專利法第二十七條第一項國際優先權
日本 JP	1999/06/02	11-155198	有

二、主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

申請案號：

無

日期：

三、主張本案係符合專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，其事實發生日期為：四、有關生物材料已寄存於國外：

寄存國家:1. 日本 JP

寄存機構:1. 通商產業省工業技術院生命工學工業技術研究所

寄存日期:1. 2000/02/17

寄存號碼:1. FERM BP-7171

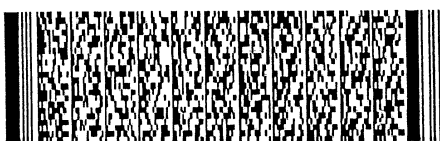
有關生物材料已寄存於國內(本局所指定之寄存機構)：

寄存機構：

寄存日期：

無

寄存號碼：

不須寄存生物材料者：所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、發明說明(1)

【本發明所屬之技術領域】

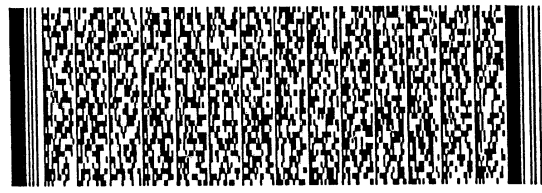
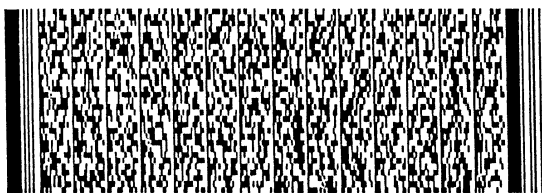
本發明係有關於一種變性脂蛋白質之製造及其安定化方法，更詳言之，本發明係有關將經變性的脂蛋白質凍結乾燥而得的具有優異的長期保存安定性的變性脂蛋白質及其製作方法者。

本發明又係有關變性脂蛋白質的製造方法；更詳言之，本發明係關於對含有脂蛋白質的溶液至少包含施加一次凍結步驟，而使該脂蛋白質經變性而成為變性脂蛋白質的製作方法，以及將如此所製作而得的變性脂蛋白質再加凍結乾燥而獲得具有優異的長期保存安定性的變性脂蛋白質及其製作方法者。

【先前技術】

變性脂蛋白質對於冠狀動脈系疾病，如心肌梗塞與狹心症等；腦動脈性疾病，如腦梗塞與腦血管系痴呆等；或腎動脈系疾病，如腎症、糖尿病性腎症；以及末梢動脈閉塞症等末梢動脈系疾病等各種循環器系疾病等有不可脫離的關係，變性脂蛋白質量測定用的標準物質與調查變性脂蛋白質在生理上的角色與生理活性所需各種實驗用試藥，在左右其結果上屬於非常重要的物質。由是，如此的經安定化的變性脂蛋白質，例如辨認變性脂蛋白質的抗體與使其接觸而測定該抗體對試料之反應性，因而測定含於血液成份中變性脂蛋白質的方法中所用的標準物質，與調查變性脂蛋白質的生理上角色與生理活性所需之各種實驗用試藥上，頗為有用。

在冠狀動脈系疾病如心肌梗塞與狹心症等；腦動脈性



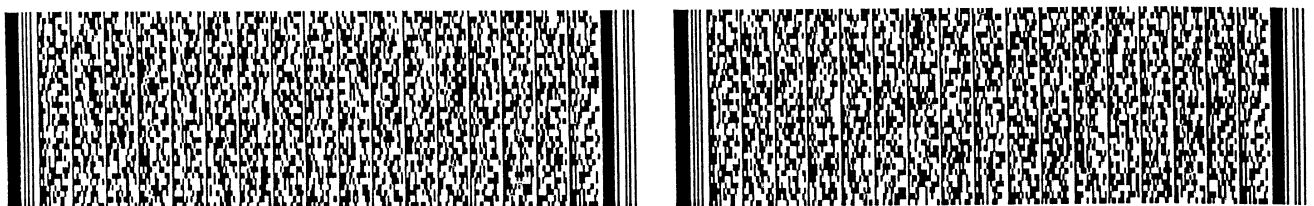
五、發明說明 (2)

疾病如腦梗塞與腦血管系痴呆等；或腎動脈系疾病如腎障阻，糖尿病性腎障阻等；以及末梢動脈閉塞症等末梢動脈系疾病等各種循環器系疾病中，血清中的脂質擔任著重要角色之事實，已受強烈的提醒，而在血清脂質降低藥，尤其是膽固醇降下藥方面保健醫療費有甚大的支出。然而依據最近的研究，這種病患群與正常群互做比較結果，血清脂質的絕對量在兩群間尚無太大差異，而係屬於低密度脂蛋白質(LDL)變性物的氧化LDL在血清中的存在量在兩群中有明顯的差異〔依據例如Toshima, S. et al.(1996)

Circulation, 94, Suppl. I : 1288 之報告〕。又，變性脂蛋白質中之一種的氧化脂蛋白質與粥狀硬化病巢進展的關連性，有史丁柏格(Steinberg)等人士指出〔例如Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., 及 Witztum, J.L., (1988) N. Engl. J. Med., 320 : 915〕。

因此，近年來開發了種種使用於變性脂蛋白質的測定法(例如特開平8-304,395號公報，特開平9-288,106號公報)，為了調查變性脂蛋白質在生理上角色的試驗之重要性逐漸增加了。

然而，為了進行這些實驗，因為測定所需之標準物質不易獲得，而致使問題複雜。亦即，為了調查變性脂蛋白質在生理上的角色，例如必須從多數設施中收集多數血清中的變性脂蛋白質，而加以比較，為此必須維持各試驗的測定值不變動，但在進行這些試驗所必要期間，如無安定而再現性良好的標準物質存在，則不能確保測定間的再現性。又由於使用不同的標準物質，而致測定者間的實驗結



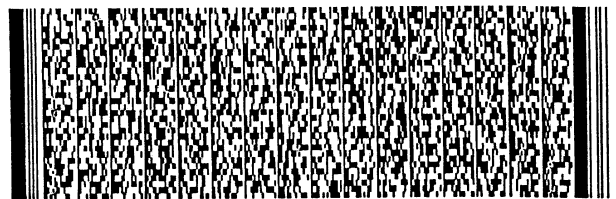
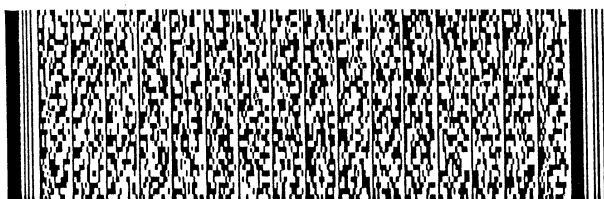
五、發明說明 (3)

果有顯著的變動時，對其生理上角色的解釋有複雜化，而不能得到一定的結論。如此因不能得到可以安定保存的標準物質，致使其生理上的重要性受到肯定，因此，例如，由變性脂蛋白質存在量的測定而作正確判斷疾病之手段的此一應用上的道路，仍然關閉。

通常，例如，在血清中蛋白質量的測定時，以所謂標準血清，或將目的成份單離的狀態，以某種方法予以安定化而成標準物質。就脂蛋白質而言，例如有必要時，在含有脂蛋白質血漿或血清中，混合以蔗糖等非還原性糖並凍結乾燥到水分含量為1~10%質量之範圍，堪予長期保存的安定標準血漿或標準血清的製造方法(EP-A-617289號公報)，從阿樸脂蛋白質及脂質得到的再構成脂蛋白質在蔗糖與甘露糖醇安定化劑存在下凍結乾燥而予安定化的安定凍結乾燥物的工業上製造方法(US-A-5,652,399號公報)等均有報告。但是在上揭公報中只有做為免除脂蛋白質變性而使其安定化之手段的企圖，但仍然未有經安定化的變性脂蛋白質及其製法方法的揭示。

另一方面，眾所知悉的傳統製作變性脂蛋白質的方法，例如有依據超離心分離法而離析，精製脂蛋白質，並以銅離子等金屬離子氧化，或與無水醋酸反應而乙醯基化，或與丙二醛等反應等方法分別製作氧化脂蛋白質，乙醯基化脂蛋白質及丙二醛化脂蛋白質等。但以這些方法製作的變性脂蛋白質較未變性的脂蛋白質更加不安定，以其自然狀態殊難長時間保存。

有鑑於如此的狀況，在特開平9-288,106公報中，揭



五、發明說明 (4)

示一種將磷脂質人工氧化所得磷酯質的氧化物加入於血漿脂蛋白質中的物質用做標準品來測定人氧化脂蛋白質之方法。但是上揭方法中所揭示之標準物質其保存安定性不充分，每次使用時必須每次調製操作煩雜。

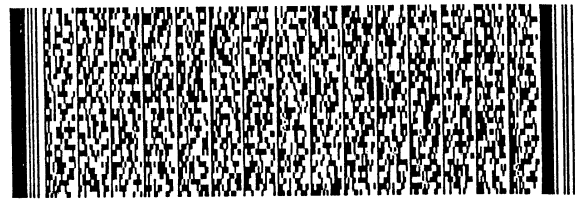
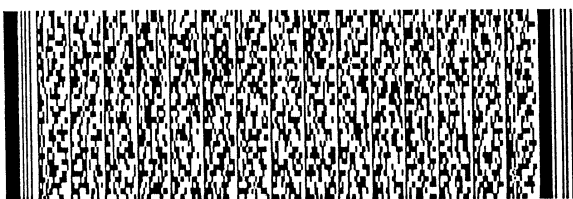
鑑於以上所述諸情事，可長時間安定保存的變性脂蛋白質及其製作方法，乃受迫切要求。

【本發明之內容】

由是，本發明可提供使用為測定血液成份中所含變性脂蛋白質量用之標準物質或為了調查變性脂蛋白質生理上角色與生理活性所需各種試驗用試藥的富於優異長期保存安定性(亦即測定值不依保存期間而變動)的變性脂蛋白質及其製作方法。

本發明人等為了解決上揭目的而精心努力結果，發現將含有脂蛋白質的卵黃、乳汁、全血、血清與血漿，將此部份利用滲透所得的分離脂蛋白質，及依超離心分離法等滲透精製的脂蛋白質等以銅離子等金屬離子所代表的觸媒予以氧化而得的氧化脂蛋白質，以無水醋酸等經乙醯基化的乙醯基化脂蛋白質或以丙二醛等醛化的丙二醛化脂蛋白質等經人工變性的變性脂蛋白質凍結乾燥，由此可顯著的提高變性脂蛋白質的長期保存安定性，因此看得出有解決本發明之目的。本發明人等又發現在凍結乾燥時以蔗糖、乳糖、海藻糖、牛血清白蛋白(以下稱BSA)，或人血清白蛋白(以下稱HSA)等做為安定劑時更可提高變性脂蛋白質長期保存安定性，而更易解決上揭諸問題。

本發明人等更為了解決上揭目的而精心努力結果，對



五、發明說明 (5)

含有脂蛋白質的溶液至少包含加以一次凍結的步驟，使在該溶液中含有的脂蛋白質因變性而獲得測定血液中變性脂蛋白質質量測定用標準物質與調查變性脂蛋白質生理上角色與生理活性用各種試驗用試藥所用變性脂蛋白質。又發現因將如此得到的變性脂蛋白質凍結乾燥而能顯著提高變性脂蛋白質在乾燥狀態下的長期保存安定性及該乾燥狀態下的變性脂蛋白質溶解於溶液中後之保存安定性而解決本發明之目的。本發明人等又發現在此也可因在凍結乾燥時使蔗糖、乳糖、海藻糖、BSA或HSA等中做為安定化劑存在而更為提高變性脂蛋白質的長期保存安定性因而解決上揭諸問題。

基於上揭發現，終於完成了本發明。

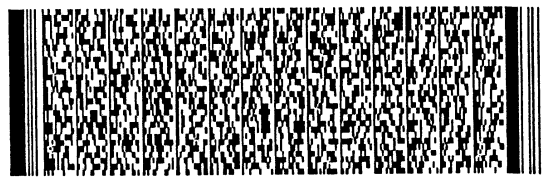
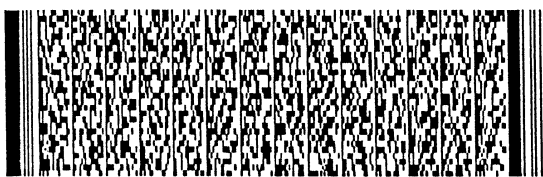
亦即，上揭之目的可利用將脂蛋白質加以人工上的變性而得變性脂蛋白質，將該變性脂蛋白質由於凍結乾燥而使該變性脂蛋白質成為安定化變性脂蛋白質之製造方法而達成。

上揭之目的又可利用對含有脂蛋白質的溶液加以至少包含加一次凍結的步驟，使該溶液中所含脂蛋白質因變性而成為變性脂蛋白質的製作方法而達成。

上揭之目的又可利用對含有脂蛋白質的溶液加以至少包含加次凍結的步驟，使該溶液中所含脂蛋白質因變性而得變性脂蛋白質，再予凍結乾燥而使其安定化成為安定化變性脂蛋白質的製作方法而達成。

【本發明之實施方式】

以下將本發明作詳細之說明。

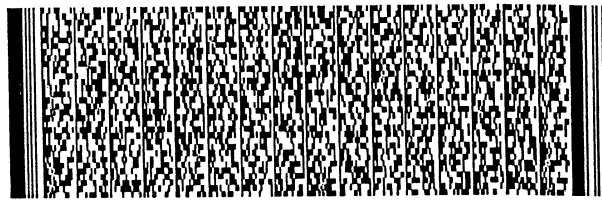
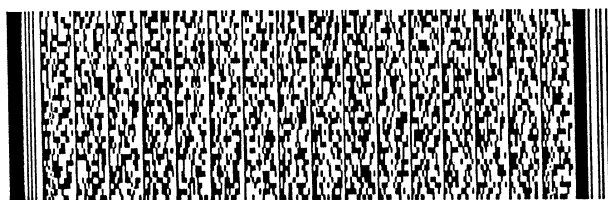


五、發明說明 (6)

依本發明的第一形態，係提供安定化變性脂蛋白質的製造方法，其乃將脂蛋白質做人工變性而得變性脂蛋白質，再將其凍結乾燥，以使此變性脂蛋白質安定化。

在本說明書中，所稱呼之「變性脂蛋白質」，乃指受氧化脂蛋白質、乙醯基化脂蛋白質及丙二醛等作用的醛化脂蛋白質等經化學變化的變性脂蛋白質，以及受凝集與3元結構變化的結構性變化變性脂蛋白質雙方為意義，較之未變性脂蛋白質，其荷電的變化，分子量的變化，對生體內細胞受體之親和性變化，由FOH1a/DLH3(寄存號碼：FERM BP-7171)所產出的抗體(J. Biol. Chem. 1994. 269:15274-15279；及特開平7-238,098號公報)所代表的變性脂蛋白質特異抗體的結合性變化等亦包含被確認之情況。此時，與由上揭FOH1a/DLH3所產生之抗體為代表的變性脂蛋白質特異抗體相結合性的變化，例如以未變性脂蛋白質與本發明變性脂蛋白質當做抗原來固相化成不溶化固相，使與該抗體反應，使用與固相化抗原結合的該抗體量具有特性的酵素標識化抗體當做酵素量檢出時，由未變性脂蛋白質抗原所得信號量與由經變性的脂蛋白質抗原所得信號量，表示其差異。

本發明中所使用之脂蛋白質係來自任何生物均可，例如人、牛、馬、羊、山羊、兔、犬及幾尼亞豬等哺乳類；雞與鵝鶉等鳥類；鮭魚與鯡魚等魚類；及由來於細菌與真菌等微生物的脂蛋白質。又，本發明中所使用之脂蛋白質之具體例有源自於上揭來源之細胞膜、粒線體膜、髓磷脂構造模、與細菌細胞模等生體膜中等存在的構造脂蛋白

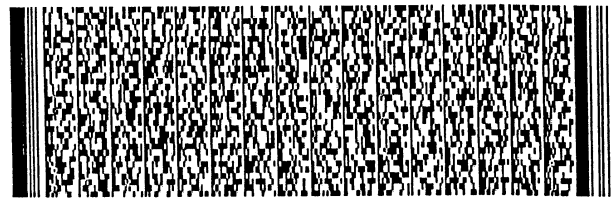
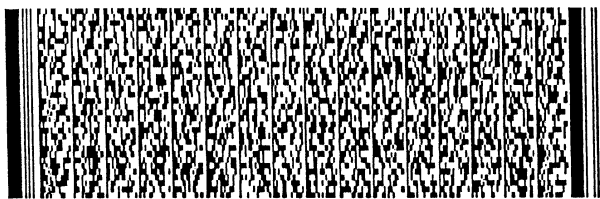


五、發明說明 (7)

質；血漿、卵黃與乳汁等中存在的可溶性脂蛋白質；以及將這些以超離心分離法分割而成的極微細、超低密度脂蛋白質(VLDL)、低密度脂蛋白質(LDL)、脂蛋白質X、中間密度脂蛋白質(IDL)、脂蛋白質a[Lp(a)]、HDL2及HDL3等高密度脂蛋白質(HDL)、及超高密度脂蛋白質(VHDL)等脂蛋白質劃分等。這些脂蛋白質可單獨使用，亦可以兩種以上混合物的形態使用。其中以來自人類的脂蛋白質為佳，人的血漿及來自血清的極微細、VLDL、LDL、LP(a)、HDL2或是HDL3、或此等的混合物較佳，最好的情形是使用人血漿及來自血清的LDL。

以本發明做為代表所使用的人脂蛋白質，係從人的血清以離心沈降法或超離心分離法等廣為人知悉的方法劃分成為既定的比重，並以既知方法將此劃分所得透析或脫鹽精製而得。例如LDL的調製方法，可推舉下揭(1)至(3)的方法。

(1)正常的人血清20~30mL中加入1,2-乙二胺四醋酸鈉(EDTA-2Na)，成為最終濃度1mmol/L。其中加入NaBr，合成比重1.000。分注於離心軟管，其上再以NaBr合成比重1.5、1.063、1.019及1.006的緩衝液，依次重疊，而在4℃下加以24小時的離心力(120,000×g)。從上端起順次滲透，並以折射計測定每個滲透物的比重，而採取比重1.019~1.063的滲透物做為LDL分離物。這樣做而得到的LDL分離物在採取後馬上以含有0.25mmol/L的EDTA的PBS[10mmol/L的磷酸緩衝液140mmol/L NaCl(pH7.4)]透析(特開7-238,098號公報、段落號碼0040)；

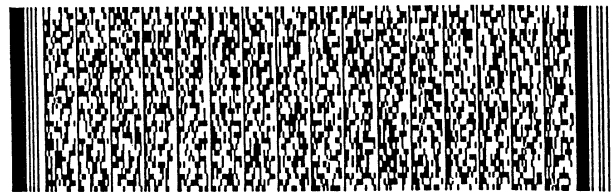
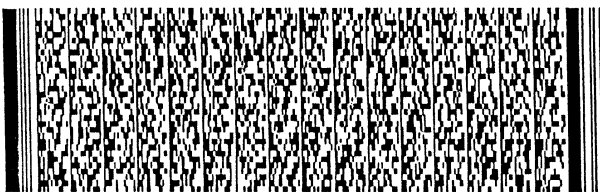


五、發明說明(8)

(2) 在從肝素採血得到的人血漿中加入EDTA，成為最終濃度 0.25mmol/L 。每次取其 0.75mL 於超離心分離用試驗管($1\sim 4\text{mL}$)中，將含有 0.3mmol/L EDTA 0.15mol/L NaCl $250\ \mu\text{L}$ 重疊，在 $10\text{ }^\circ\text{C}$ 下以 $185,000\times g$ 加離心力 2.5 小時。捨棄上層的 $150\ \mu\text{L}$ ，分取下層的 $750\ \mu\text{L}$ ，加入KBr溶液($50\text{w/v}\%$) $150\ \mu\text{L}$ ，成為比重 1.063 。移入經調整好比重的血漿於超離心分離用試驗管($1\sim 4\text{mL}$)之底，在 $10\text{ }^\circ\text{C}$ 下以 $244,000\times g$ 加離心力 16 小時。仔細回收上層的橙色帶(約 $100\sim 150\ \mu\text{L}$)，對含有 0.25mmol/L EDTA的PBS在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下，透析 6 小時(將 3 公升以 2 小時間隔 2 次交替)(特開平 $8-304,395$ 號公報，段落號碼 0050)；又

(3) 以EDTA為抗凝固劑，以超離心分離法從所得人血漿中劃分回收比重為 $1.019\sim 1.069$ 部份的LDL。復以瓊脂糖電氣泳動法，因該法可得單純銳利光譜帶可確認LDL純度後，對含 0.25mmol/L EDTA的PBS溶液($\text{pH}7.4$)充分的透析(特開平 $9-288,106$ 號公報，段落號碼 0062)。

又例如做為調製脂蛋白質a[Lp(a)]的方法之一例者如下：在肝素採血所得人血漿中加入EDTA，使成最後濃度 $0.25\ \text{mmol/L}$ ，再重疊以含有 0.3mmol/L EDTA 0.15mol/L NaCl $250\ \mu\text{L}$ ，而在 $8\text{ }^\circ\text{C}$ 下加 20 小時 $105,000\times g$ 離心力。捨去上層，在下層中加入預先在乳鉢中磨成粉末的KBr，在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下以不生泡沫的狀況下溶解，調整成比重 1.125 ，在 $8\text{ }^\circ\text{C}$ 下加 20 小時 $105,000\times g$ 離心力。仔細回收上層橙色帶域，使用生物膠(Biogel)A-5m(バイオラツド(Biorad)公司製)，以 1mol/L NaCl， 2mmol/L EDTA， 10mmol/L 磷酸緩



五、發明說明 (9)

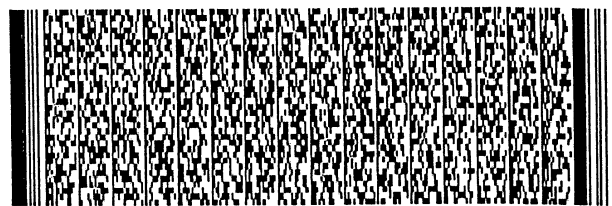
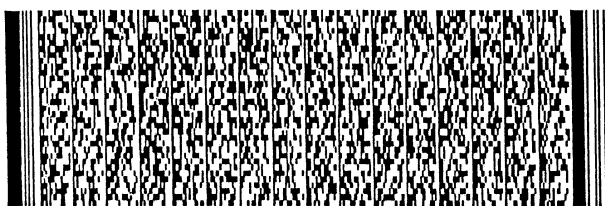
衝液做為展開溶媒，施以凝膠過濾。所得各部份以Lp(a)測定用套具[泰爾茂(Terumo)株式會社製]來測定而回收Lp(a)分離物。此分離物以賴氨酸琼脂糖(lysinesepharose) 4B [フアルマシア公司所製] 將其吸附滲透而用含0.2mol/L ϵ -胺基己酸的緩衝液溶出，並對含有0.25mmol/L EDTA的PBS透析(特開平8-304,395公報，段落號碼0052)。

在本發明中，其脂蛋白質的人工變性方法，並不特別加以限定，而係採用眾所知悉的方法。例如使用人脂蛋白質之變性方法時，可以有如下方法：在金屬離子的存在下氧化人脂蛋白質的方法；將人脂蛋白質乙醯基化的方法；使用丙二醛將人脂蛋白質醛化法；及用磷脂質以人工性氧化而得之化合物(例如1-棕櫚醯-2-(9-羧化壬醛)-甘油-3-磷膽鹼及1-棕櫚醯-2-(5-羧化乙酸壬脂)-甘油-3-磷膽鹼)，以適當溶媒(如DMSO)溶解的溶液在人的脂蛋白質加添的方法。其中較受歡迎的方法為在金屬離子的存在下氧化人脂蛋白質的方法；將人脂蛋白質乙醯基化的方法；及使用丙二醛將人脂蛋白質醛化法等較為理想。

下文中以上揭較佳三方法做為代表對象詳述之。

首先詳述在金屬離子存在下氧化人脂蛋白質的實施形態如下。上揭實施形態之一例記載如下：如上揭方法調製之人脂蛋白質(滲透)以不含EDTA的緩衝液[如PBS(pH7.4)]透析等來除去EDTA，調整成既定的蛋白質濃度(50~2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，最好為100~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)後，添加硫酸銅(CuSO_4)到既定濃度，約以36~38 $^{\circ}\text{C}$ 使其反應。

以上揭實施形態所用金屬離子，有氟化銅(II)二水合



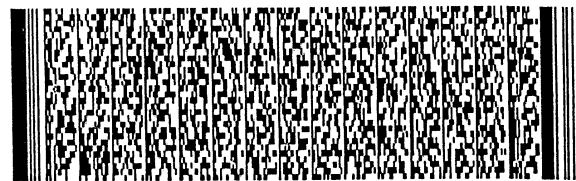
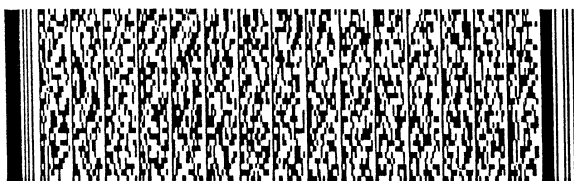
五、發明說明 (10)

物、溴化銅(II)、氧化銅(II)、氫氧化銅(II)、硫酸銅(II)、硫酸銅(II)五水合物、硒化銅(I)、硒化銅(II)、硒酸銅(II)五水合物、六氟矽酸銅(II)四水合物、醋酸銅(II)一水合物、四胺銅(II)硫酸鹽一水合物、及由1,2-乙二胺銅(II)硫酸鹽二水合物來的銅離子；氯化鐵(II)、溴化鐵(II)六水合物、硝酸鐵(II)六水合物、硫氰酸鐵(II)三水合物、醋酸鐵(II)四水化合物、草酸鐵(III)五水合物、硫酸胺鐵(II)六水合物、硫酸鉀鐵(III)十二水合物、硫酸胺鐵(II)十二水合物，及由硫酸鐵來的鐵離子；血紅素(Hb)、轉移酶(Tf)及乳吩寧(Lf)的金屬離子及這些的混合物。其中由硫酸銅(II)、硫酸銅(II)五水合物來的銅離子或這些的混合物使用上效果較佳。又，這些金屬離子可單獨使用，或以二種以上混合物的形態使用均可。

又，上揭實施形態中，金屬離子的使用量，只要是足以充分氧化人脂蛋白質之量即可，不必特加限制，例如金屬離子的濃度，對被氧化的人脂蛋白質1g，用10~200 $\mu\text{mol/L}$ ，最好是25~100 $\mu\text{mol/L}$ 之量。

又在上記實施形態金屬離子的使用量如果能充分的氧化人的脂蛋白質，則用量並無特別限制，例如金屬離子的濃度係被氧化人的脂蛋白質1克對10~200 $\mu\text{mol/L}$ ，理想為25~100 $\mu\text{mol/L}$ 之量。

又，在上揭實施形態中，若反應時間太短時，則脂蛋白質變性(氧化)不十分旺盛，反之，反應時間太長時，則引起脂蛋白質本身過度分解，例如脫輔基蛋白質的抗原性消失等情事發生，並不理想。又，反應時間視殘存之EDTA



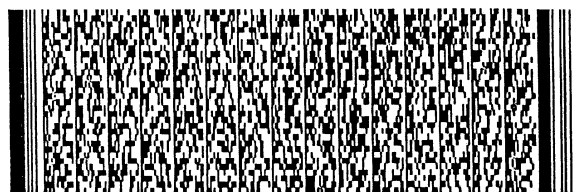
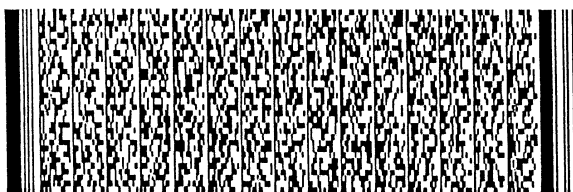
五、發明說明 (11)

之量與溶液全體之量的變動，是以不能概括的規定，但以上揭實施形態中調製的脂蛋白質(滲透)時，則約在36～38℃經1～24小時，而最好是2～4小時。

其次，在下文中詳述有關人脂蛋白質乙醯基化的實施形態以上記實施形態之一例在下文記載調製既定蛋白質濃度(約500～2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，最好是500～1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的人脂蛋白質(滲透)溶液中加入等容量的飽和醋酸鈉，在0～4℃下攪拌1～2小時。再加入0.25～4 μL 無水醋酸(即對人脂蛋白質0.5～2 $\mu\text{L}/\text{mg}$)，最好是0.4～2.4 μL (即對人脂蛋白質0.8～1.2 $\mu\text{L}/\text{mg}$)，在0～4℃下攪拌60～120分鐘後，對含有0.25mmol/L EDTA的PBS(pH7.4)在2～8℃下充分的(500～1000倍容積)透析2～3次(2小時以上/次)。

第三，下文中詳述有關用丙二醛將人脂蛋白質醛化的實施形態，以上文實施形態之一例在下文記載：在磷酸緩衝液中(pH6.5)既定蛋白質濃度(約0.25～1mg/mL，最好是0.25～0.5mg/mL)的人脂蛋白質(滲透)溶液內加入丙二醛溶液(丙二醛組織胺甲基縮醛1mol/L在有0.1mol/L鹽酸存在下以100℃加熱5分鐘而加水分解者)加入0.625～10 μL (即對人脂蛋白質2.5～10 $\mu\text{L}/\text{mg}$)，最好是1～6 μL (即對人脂蛋白質4～6 $\mu\text{L}/\text{mg}$)，在30～40℃下令其反應2-4小時後，將此反應液對含有0.25mmol/L EDTA的PBS(pH7.4)2～8℃下充分(500～1000倍容2～3次(2小時以上/次)加以透析。

本發明的方法必須包含凍結乾燥的步驟，做達成為安定化如此得到的脂蛋白質的目的，在本說明書中，「凍結

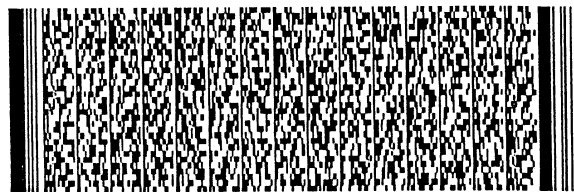
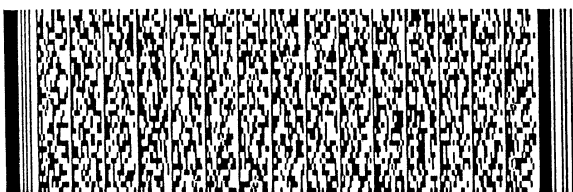


五、發明說明 (12)

乾燥」一詞，當做在該範圍中所使用同樣的意義來用，亦即將試料凍結，在凍結狀態下減壓，從試料中除去水與昇華性物質而乾燥的意思。在本發明中，凍結乾燥的條件，只要是能使變性脂蛋白質安定化，即不特別加以限制，通常在 $-80\sim 20^{\circ}\text{C}$ 下，最好是 $-80\sim 15^{\circ}\text{C}$ 的溫度， $0.667\sim 13.33\text{Pa}$ ，最好是 $0.667\sim 1.333\text{Pa}$ 之壓力下，施以 $12\sim 72$ 小時，最好是 $24\sim 72$ 小時的凍結乾燥。依如此的凍結乾燥步驟，含有變性脂蛋白質的凍結乾燥物中的水分含量，通常有 10 質量%以下，最好是 1 質量%以下。

在本發明中，最好在凍結乾燥步驟中存在有安定化劑。在上揭形態中所使用的安定化劑，乃屬於該範圍中通常使用者，具體而言，為蔗糖、乳糖、海藻糖等糖類；牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)等之蛋白質等。其中蔗糖、乳糖、海藻糖、牛血清白蛋白(BSA)及人血清白蛋白(HSA)為最受愛用的安定化劑。又上揭安定化劑可單獨使用，或以二種以上混合物形態使用均可。又此時安定化劑的使用量，只要能夠達到變性脂蛋白質安定化之量，即不必特加限定，通常為 $1\sim 20$ 質量%，最好為 $2\sim 5$ 質量%。

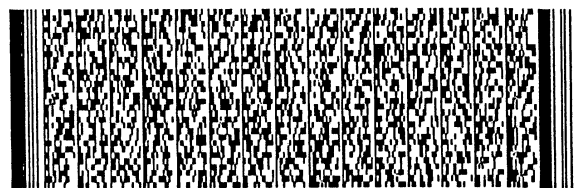
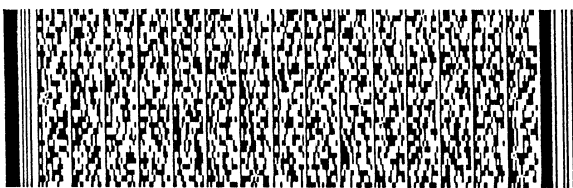
又，在本發明中，令在凍結乾燥步驟中存在安定化劑的安定化劑添加時期，並不特加限制，但最好在凍結乾燥前預先添加安定化劑，尤其最好在變性步驟與凍結乾燥步驟之間添加安定劑。再者，於凍結乾燥後，未必需要除去安定化劑之步驟，考慮變性脂蛋白質的保存安定性，不如在凍結乾燥狀態保持期間，繼續讓安定化劑存在。



五、發明說明 (13)

依照本發明的第二形態，對含有脂蛋白質的溶液，至少包含加以一次凍結的步驟，來提供使該溶液中所含脂蛋白質變性而成為變性脂蛋白質的製造方法。又，依照本發明的第三形態，由再凍結乾燥這樣得到的變性脂蛋白質，來提供因該變性脂蛋白質之安定化而成安定化變性脂蛋白質的製造方法。本發明人等發現對含有脂蛋白質的溶液至少包含加一次凍結步驟而使該溶液中所含脂蛋白質變性而得到的變性脂蛋白質亦可當做測定血液中變性脂蛋白質量所用之標準物質與調查變性脂蛋白質在生理上的角色與生理活性所用試料；及如此所得變性脂蛋白質更施以凍結乾燥，因而有優異的乾燥狀態下的長期保存安定性及該乾燥狀態下的變性脂蛋白質溶解於溶液後的保存安定性，基此見解，獲悉了上揭形態的方法。

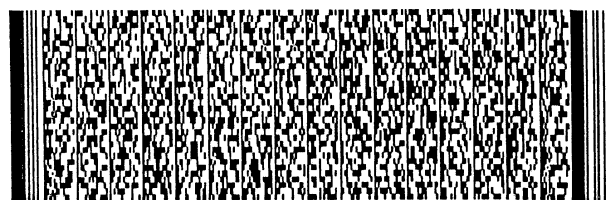
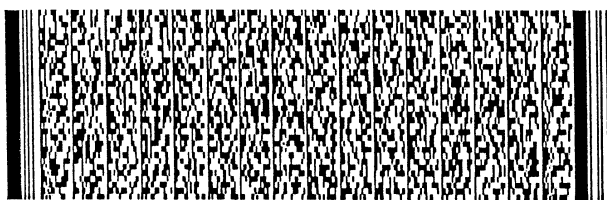
關於第二與第三形態的方法，以將含有脂蛋白質的溶液凍結的步驟為必須要件。在第二與第三形態中，「脂蛋白質」一詞，與上揭第一形態中者的定義相同。含有脂蛋白質的溶液例如有血清、血漿及乳糜微粒(cylomicron)、超低密度脂蛋白質(VLDL)、低密度脂蛋白質(LDL)、脂蛋白質X、中間密度脂蛋白質(IDL)、脂蛋白質a[Lp(a)]、HDL2及HDL3等高密度脂蛋白質(HDL)、及超高密度脂蛋白質(VHDL)等脂蛋白質滲透物。這些之中，血清、血漿、乳糜微粒(cylomicron)、超低密度脂蛋白質(VLDL)、LDL、LP(a)、HDL2及HDL3、及其混合物，可做為較好的含有脂蛋白質的溶液，最好的是人血漿、人血清、及來自人血漿與血清之LDL。



五、發明說明 (14)

第二形態的方法，以對含有脂蛋白質的溶液施以包含凍結的步驟為必須的要件。在本說明書中所稱「包含凍結的步驟」一詞，意指至少包含一次凍結該溶液中含有的脂蛋白質內的或實質的圍繞該脂蛋白質環境中水份的一部或全部的步驟，由於施行本發明的包含凍結的步驟而獲得的變性脂蛋白質有上揭第一形態中所記載的變性脂蛋白質中之任何一種。施行本發明的包含凍結的步驟而得的變性脂蛋白質中較佳者有氧化脂蛋白質、醛化脂蛋白質、或雜交流細胞系FOH1a/DLH3(寄存號碼：FERM BP-7171)所產生的抗體(本說明書中簡稱「DLH3抗體」)反應的脂蛋白質。又以上揭方法使用的雜交流細胞系FOH1a/DLH3已在1994年2月17日於日本國茨城縣築波市東1丁目1番3號地址的通商產業省工業技術院生命工學工業技術研究所寄存號碼FERMP-14153「Mouse-Mouse hybridoma FOH1a/DLH3」之標示寄託，該寄託又於2000年5月26日以基於布達佩斯特條約轉換寄託，現以寄存號碼FERM BP-7171保管於該所。

在上揭形態中，對含有脂蛋白質的溶液以變性為目的施行的包含凍結的步驟的條件，如屬能使該溶液中所含脂蛋白質變性，則不必特加限制，又於包含凍結的步驟，於施行凍結之際依實質上圍繞脂蛋白質的環境，其凍結效果頗受左右，故不能一概限定。例如包含凍結的步驟中的凍結條件，為 $0.01 \sim 10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ，最好是以 $0.01 \sim 1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 的降溫速度，降溫到 $0 \sim -196^{\circ}\text{C}$ ，最好是以 $-5 \sim -85^{\circ}\text{C}$ 的溫度來凍結，並維持所定溫度 $0 \sim 36$ 小時，最好是 $0 \sim 16$ 小時。又在第二形態中，為了使脂蛋白質變性而施行的包含凍結的



五、發明說明 (15)

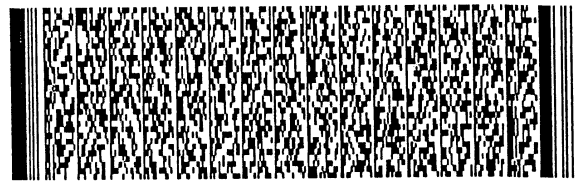
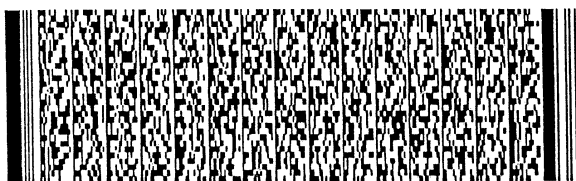
步驟，至少須要進行一次，又可反覆進行。反覆進行時包含凍結的步驟數為1~10次，更好的是1~4次。在本發明中，其反覆施行之步驟內容，係包含凍結的步驟每次相異亦可，又各步驟的凍結條件同樣或相異亦可。此時如凍結乾燥過程數超過10次，則相配合的脂蛋白質的變性效果減弱而不經濟。

又依上揭第二形態的為了脂蛋白質的變性所施包含凍結的步驟，可以是凍結後包含融解的步驟。在上揭的第二形態中，包含凍結的步驟中包含融解時，雖然其條件並無特別的限制，融解係以 $0.01 \sim 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{分}$ ，最好是以 $0.1 \sim 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{分}$ 的昇溫速度，到達於 $0 \sim 42 \text{ }^\circ\text{C}$ ，最好是至 $0 \sim 37 \text{ }^\circ\text{C}$ 之溫度為止。

又依上揭第二形態的為了脂蛋白質的變性所施包含凍結的步驟，可以是該步驟內包含乾燥步驟。此時凍結後包含乾燥步驟的條件，並無特別的限制，但乾燥例如以 $-80 \sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ，最好是 $-80 \sim 15 \text{ }^\circ\text{C}$ 的溫度， $0.6 \sim 13 \text{ Pa}$ ，最好是 $0.6 \sim 1.3 \text{ Pa}$ 之壓力下，進行 $12 \sim 72$ 小時，最好是 $24 \sim 72$ 小時的乾燥。

又依上揭第二形態的為了脂蛋白質的變性所施包含凍結的步驟，可以是含有脂蛋白質溶液予以凍結乾燥，所得乾燥物溶解於溶媒後，將該溶液再度凍結乾燥的步驟。此時凍結乾燥步驟與第一形態時的定義同樣。又溶解最初凍結乾燥所得乾燥物的溶媒，只要能夠將乾燥物溶解即可，並無特別的限制，例如水、脫離子水及蒸餾水均可。

第三形態的方法，係將由上揭第二形態的方法所得變



五、發明說明 (16)

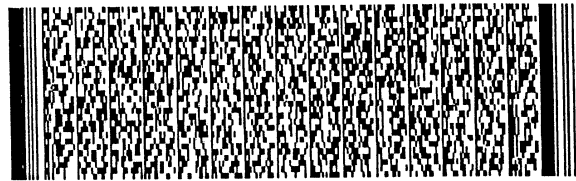
性脂蛋白質再加以凍結乾燥，而使該變性脂蛋白質更加安定化為必須要件。上揭形態的凍結乾燥工程，關於安定化劑的添加時期以外，與第一形態時的定義相同。即在第三形態的安定化劑，依在第二形態中包含凍結的步驟內容而異，例如，於對含有變性脂蛋白質溶液進行包含凍結的步驟之際，其安定化劑係在進行包含凍結步驟前預先添加，或在以變性為目的的包含凍結的步驟與以安定化為目的的凍結乾燥步驟之間添加均可。又凍結含有變性脂蛋白質之溶液之際，安定化劑最好預先在包含凍結步驟前添加。

依本發明的第四形態，可提供依上揭第一或第三形態所製造安定化變性脂蛋白質。

如此所製造的變性脂蛋白質及安定化變性脂蛋白質具有優異的長時間保持安定性，例如使其接觸於能辨識變性脂蛋白質的抗體，以測定該抗體對試料的反應性，由此測定血液成份中所含變性脂蛋白質之方法中所用標準物質，與調查變性脂蛋白質在生理上角色與生理活性的各種實驗用試藥。

由是，依照本發明之第五形態，可提供以上揭第一或第三形態所製作的安定化變性脂蛋白質做為標準物質使用的變性脂蛋白質的測定方法。又依照本發明的第六形態，可提供上揭第一或第三形態所製造安定化變性脂蛋白質做為標準物質而含有的變性脂蛋白質測定用的試藥工具包。

在上揭第五形態中，變性脂蛋白質的測定方法並不特加限制而係可使用已知的方法，具體上令其接觸於可辨識變性脂蛋白質的抗體，而測定該抗體對試料的反應性。因

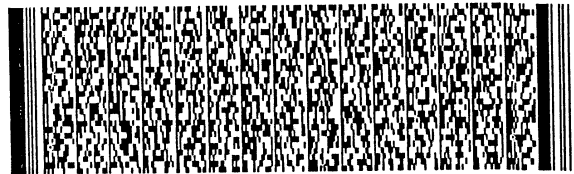
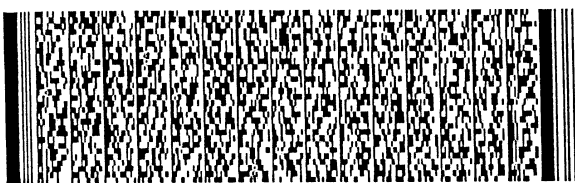


五、發明說明 (17)

此將含於血液成份中以變性脂蛋白質做免疫學上的測定方法，例如放射線免疫學測定法(RIA)、酵素免疫學測定法(ELISA)、螢光免疫學測定法(FIA)、發光免疫學測定法、凝集免疫學測定法、免疫比濁法及免疫比臚法等。又測定樣式有競合法與三明治法。這些方法中，本發明的安定性變性脂蛋白質，在免疫學上的測定方法中，尤其是放射線免疫學測定法、酵素免疫學測定法、螢光免疫學測定法及發光免疫學測定法中，頗受歡迎做為標準物質使用。

又在上揭第六形態中，變性脂蛋白質測定用的試藥包裝袋，如係含有本發明的安定化變性脂蛋白質為標準物質者，則不必特別加以限制。如使用本發明安定化變性脂蛋白質為標準物質以外者，則由與已知的包裝袋同樣構成而形成。例如使用本發明的安定化變性脂蛋白質為ELISA法之標準物質時，本試藥包裝袋，係含有檢體稀釋液、抗體固相化固相、反應用緩衝液、洗淨液、標識化2次抗體(最好是酵素標識化二次抗體)、檢出用試藥(例如發光液)、及做為標準物質的本發明安定化變性脂蛋白質的全部或一部。上揭形態亦尚含於本發明的概念內。由是依照第七形態，可提供檢體稀釋液、抗體固相化固相、反應用緩衝液、洗淨液、標識化2次抗體、檢出用試藥、及做為標準物質的依上揭第一或第三形態製作的安定化變性脂蛋白質的全部或一部為構成要素的變性脂蛋白質測定用試藥包裝。

在上揭第七形態中，即使試藥包裝中不含標準物質時而在實質上為了使用於包裝而存在之前提之下，關於本發



五、發明說明 (18)

明的標準物質，仍應視為試藥包裝的構成要素。

其次以ELISA施行的變性脂蛋白質活性測定法為例，參照下列實施例來詳細說明本發明的變性脂蛋白質製造方法及其效果，但不表示本發明的形態受下揭實施例的限定。

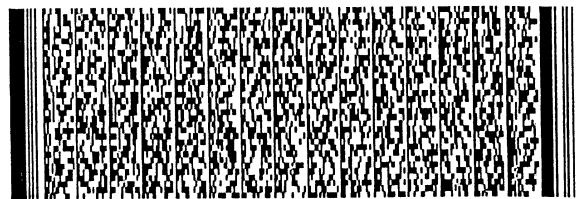
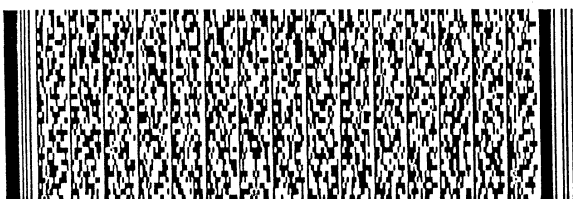
實施例1

(1) LDL的調製

以EDTA為抗凝固劑而得的人血漿用超離心分離法(10℃下調整成比重1.019，加120,000×g，20小時後，回收上層，調整成比重1.063，再加以120,000×g，24小時)後，以比重1.019~1.063的部分，當做LDL滲透來回收後此時LDL的純度，可用瓊脂糖電氣泳動法確認可得單純的銳利光譜帶。

其次將此LDL滲透而以含有0.25mmol/L EDTA的PBS(PH 7.4)充分(16小時或一個晚上)透析而精製。再將如此精製的LDL溶解於含有0.25mmol/L EDTA的PBS(PH7.4)內，使LDL蛋白質濃度成為1mg/mL，以4℃保存至使用時為止。又在本實施例中，蛋白質之含量係以勞里修正法(Lowry modified Method)決定之。簡言之，將2(w/v)%碳酸鈉、0.4(w/v)%氫氧化鈉、0.16(w/v)%酒石酸、1(w/v)%SDS溶液及4(w/v)%硫酸銅溶液以100對1混合的試藥1.5mL，各與標本及標準物質(BSA)0.5mL混合。在室溫下反應20分鐘，添加苯酚試藥0.15mL，並馬上混合。在室溫下反應45分鐘後，測定660nm時的吸光度。

(2) LDL的氧化



五、發明說明 (19)

在(1)中調製的LDL對500~1000倍容積以上不含EDTA的PBS(PH7.4)透析3次以上(2小時以上/次)，由此除去EDTA，並溶解於不含EDTA的PBS(PH7.4)中，使LDL的濃度成200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其次，此LDL溶液10mL中添加硫酸銅(CuSO_4)成最終濃度5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵養3小時而使LDL氧化。再者，此溶液中添加EDTA，使其最終濃度成為1mmol/L，俟氧化反應停止後，將含500~1000倍容積以上之EDTA 1mmol/L的PBS(PH7.4)透析3次以上(2小時以上/回)以除去 CuSO_4 ，調製氧化LDL，並將此保存於4 $^{\circ}\text{C}$ 。

又在本實施中，氧化LDL量的表現，係以做為原料的LDL之蛋白質質量定義之。

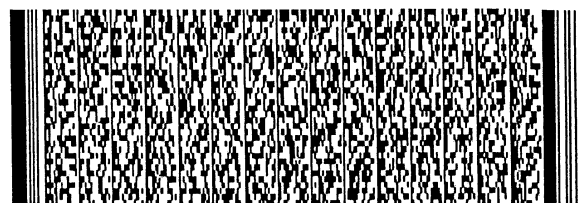
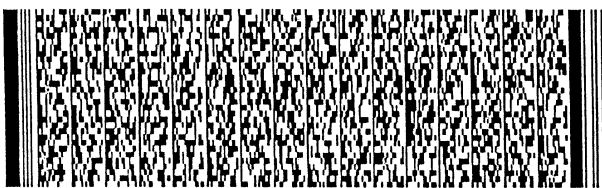
(3) 氧化LDL凍結乾燥品的調製

在(2)中所調製的氧化LDL以PBS(PH7.4)稀釋，使其蛋白質濃度成6.25ng/mL(稱為「L型」)及12.5ng/mL(稱為「H型」)，再分別添加BSA及蔗糖、使其最終濃度分別成2(w/v)%及5(w/v)%，充分的混合。其次，取此混合液分裝1mL於每一玻璃瓶中，使用共和真空凍結乾燥裝置RL-201BS(共和真空技術株式會社製)，在-50 $^{\circ}\text{C}$ 下凍結16小時後，在20 $^{\circ}\text{C}$ ，1.33Pa的減壓下凍結乾燥48小時，使水份氣化除去後，密封在4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。又此時凍結乾燥品中的水分含量為0.8質量%。

(4) 使用氧化LDL的凍結乾燥品為標準品製作的檢量線。

a. 過氧化酶標識抗體的製作

在精製的抗人體脫輔基B抗體[亞基、克米功(ヤギ、ケミコン)社製]溶液(5mg/mL、0.1mol/L硼酸緩衝液

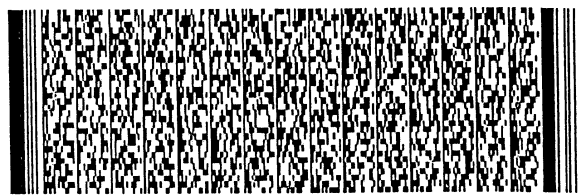
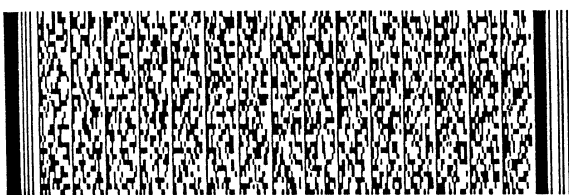


五、發明說明 (20)

PH8.0)1mL中，加入50 μ L的2-亞胺基硫代乳酸-HCl溶液(60mmol/L、0.1mol/L硼酸緩衝液PH8.0)，在30 $^{\circ}$ C下使其反應30分鐘後，在反應溶液中加入5mmol/L的含有EDTA的0.1mol/L磷酸緩衝液PH8.0)，在30 $^{\circ}$ C下使其反應30分鐘後，將反應溶液以含有5mmol/L的EDTA的0.1mol/L磷酸緩衝液(PH6.0)平衡化的交聯葡聚糖(Sephadex)G-25柱(1cm \times 30cm)[ファルマシア(pharmacia)社製]回收被溶出之抗體滲透物。在西洋芥菜過氧化酶(簡稱「HRP」東洋紡社製)溶液(10mg/mL、0.1mol/L磷酸緩衝液PH7.0)1mL中加入50 μ L之EMCS溶液(同人化學社製、50mmol/L DMSO溶液)，30 $^{\circ}$ C下使其反應30分鐘後，將反應溶液以0.1mol/L的磷酸緩衝液(PH6.5)平衡化的交聯葡聚糖(Sephadex)G-25柱(1cm \times 30cm)[ファルマシア(pharmacia)社製]回收被溶出之HRP滲透物。如此所回收的抗體滲透物及HRP滲透物經混合後，在30 $^{\circ}$ C下反應30分鐘後，將反應溶液以0.1mol/L的磷酸緩衝液(PH7.0)平均化的交聯葡聚糖(Sephadex)G-200柱(1cm \times 100cm)[(ファルマシア(pharmacia)社製)將溶出抗體HRP共軛滲透物做混合回收，以此做為過氧化酶標識抗人脫輔基B抗體。經回收的滲透物馬上添加以BSA，使其最終濃度成為1(w/v)%，以-50 $^{\circ}$ C保存至使用時為止。

b. DLH3抗體的調製

8週齡以上的雄Balb/c白老鼠的腹腔內，每隻注入0.5mL/的異十八烷(pristane)(2,6,10,14-四甲五癸烷)後飼育2星期。其次在此白老鼠之腹腔內接種產生所希望的單細胞抗體的細胞，即Mouse-Mouse hybridoma FOH1a/



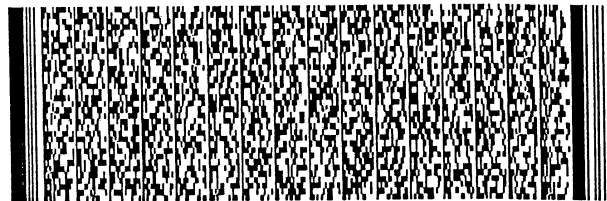
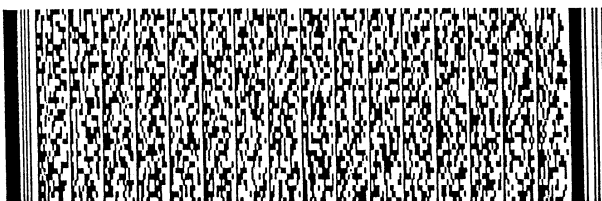
五、發明說明 (21)

DLH3(寄存號碼 : FERM BP-7171 ; J. Biol. Chem. 1994. 269 : 15274 ~ 15279 ; 及特開平7-238,098公報) 1×10^6 隻。7 ~ 14日 後，白老鼠腹腔內積留了充分的腹水時，使用18G的注射針從腹腔內回收腹水，以3000rpm離心分離10分鐘，回收上部澄清部份。在此上面澄清部加以等量之PBS(PH 7.4)後，與此混合液等量之飽和硫酸氫液充分攪拌，費1小時點滴，再繼續攪拌1小時後，以3000rpm離心分離10分鐘，廢棄其上面澄清部而回收沈澱物。又此沈澱物中加入含0.5mol/L的NaCl的PBS(PH7.4)使其溶解，以含0.5mol/L NaCl的PBS(PH7.4)平衡化的交聯丙烯基(Sephacryl)s-300柱(2.5cm \times 100cm)[ファルマシア(pharmacia)社製]處理此溶液，回收1gM滲透物，當做DLH3抗體。又DLH3抗體的濃度，則由測定其光路長1cm，於280nm時的吸光度，再除以1.3，此值當做抗體濃度(mg/mL)。

c. 三明治式ELISA分析

(3)中所調製之氧化LDL凍結乾燥品中加精製水1mL溶解後，以含有1(w/v)%BSA的PBS稀釋，使成既定濃度(0ng/mL、3.125ng/mL、6.25ng/mL、12.5ng/mL、及5ng/mL)。

在96F微板(microplate)[ヌンク(Nunc)社所製]的各井中，加入以Tris-HCl(PH8.0)稀釋成10 μ g/mL的上揭b所調製的DLH3抗體，此DLH3抗體加入各井成1 μ g/井，在4 $^{\circ}$ C下孵養16小時。捨棄抗體溶液，加入含有1(w/v)%BSA的Tris-HCl(PH8.0)350 μ L後，在室溫下孵養2小時，封閉後，以含有0.05(v/v)%吐溫(Tween)20的PBS(PH7.4)洗淨4次。



五、發明說明 (22)

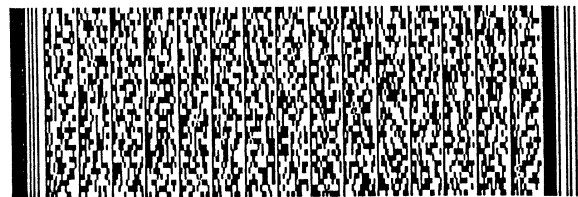
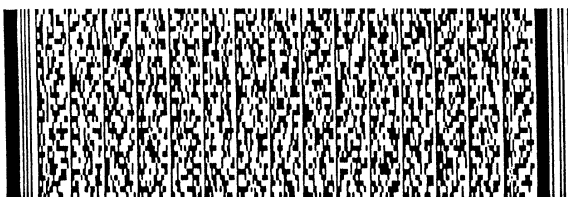
其次以上揭方法調製的含有既定濃度氧化LDL凍結乾燥品的稀釋液，分別分注於各井，每井 $100\ \mu\text{L}$ ，在室溫下孵養2小時後，以含有 $0.05(\text{v/v})\%$ 吐溫(Tween)20的PBS(PH7.4)洗淨4次。

又，再在各井內，加入上揭(a)所調製的過氧化酶標識抗人脫輔基B抗體中加有含 $1(\text{w/v})\%$ BSA的PBS(PH7.4)成1000倍的稀釋液 $1000\ \mu\text{L}$ ，在室溫下孵養30分鐘。接著以含有 $0.05(\text{v/v})\%$ 吐溫(Tween)20的PBS(PH7.4)洗淨4次後，加入含有0-苯二胺(和光純藥工業社製) 3mg/mL 的 $0.03(\text{w/v})\%$ 過氧化氫水 $100\ \mu\text{L}$ ，令其發色30分鐘後，加入 1mol/L 硫酸 $50\ \mu\text{L}$ ，使其停止反應，測定其 492nm 的吸光度。其結果如第1圖所示。如第1圖所示，使用本發明的氧化LDL凍結乾燥品，可製作成清晰的檢量線。

(5) 保存安定性的比較

(3)中所調製的氧化LDL的凍結乾燥品[氧化LDL標準品(1)(H型): 12.5ng ;及氧化LDL標準品(2): 6.25ng (H型)]，將其於 4°C 下保持一定時間(0、1、3、4星期)。又在(2)所調製的氧化LDL中，加入PBS(PH7.4)稀釋，使其蛋白質濃度成 6.25ng/mL ，稱「L型」及 12.5ng/mL (稱「H型」)，再各添加BSA與蔗糖，使最終濃度分別成 $2(\text{w/v})\%$ 與 $5(\text{m/v})\%$ ，使其均勻混合。此混合溶液不經凍結乾燥，一直在 4°C 下冷藏保存者，[分別當做氧化LDL比較品(1)(H型): 12.5ng/mL ;及氧化LDL比較品(2): 6.25ng/mL (L型)]，以 4°C 保存一定期間(0、1、3、4星期)。

保存一定期間後，在氧化LDL標準品(1)及(2)中加入



五、發明說明 (23)

精製水1mL使其溶解，同時對氧化LDL比較品(1)及(2)，各以上揭(4)c. 同樣的操作，測定492nm的吸光度。其結果如第2圖所示。

如第2圖所示，在本發明經凍結乾燥的氧化LDL標準品(1)及(2)中，較之調製直後(0週)，其測定值殆無變動，反之，經冷藏保存的氧化LDL比較品(1)及(2)，較之調製直後(0週)，其經過4週後之測定值，分別降低約50%及約45%，可知較之本發明的氧化LDL標準品(1)及(2)，其保存安定性遜色太多。

實施例2

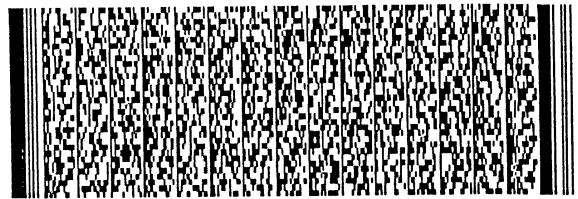
(1)HDL的調製

以ETDA為抗凝固劑而得的人血漿中除去LDL後，調整比重為1.21而用超離心分離法(10℃下120,000×g，48小時)，回收比重1.063~1.21的部份，做為HDL滲透物而回收。此時HDL的純度，以瓊脂糖電氣泳動法，可確認可得到單純的銳利光譜帶。

其次將此HDL分離物，對含0.25mmol/L EDTA的PBS(PH7.4)充分(16小時)的透析而精製。再將如此精製的HDL，溶解於含有0.25mmol/L EDTA的PBS(PH7.4)中，使其蛋白質濃度成為1mg/mL，而在4℃下保存至使用時。又於本實施例中，蛋白質的含量係以實施例1(1)中記載的勞里修正法(Lowry modified Method)決定之。

(2)HDL的氧化

(1)中所調製HDL對500~1000倍容以上的不含EDTA的PBS(PH7.4)透析3次以上(2小時以上/次)，因而除去EDTA



五、發明說明 (24)

，溶於不含EDTA的PBS(PH7.4)中，使HDL的濃度成為100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。接著在此HDL溶液10mL中，添加硫酸銅(CuSO_4)，使最終濃度成為10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ，在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵養18小時，使HDL氧化。更對此溶液添加EDTA，使其最終濃度成為1mmol/L，在氧化反應停止後，對含有500~1000倍容以上的EDTA 1mmol/L的PBS(PH7.4)透析3次(2小時以上/次)，以除去 CuSO_4 ，調製氧化HDL，保存於4 $^{\circ}\text{C}$ 下。

又，在本實施例中，氧化HDL量的表示，係以做為原料的HDL蛋白質質量來定義。

(3) 氧化HDL凍結乾燥品的調製

以(2)所調製的氧化HDL中，分別添加BSA與蔗糖，使其最終濃度各成2(w/v)%，及5(w/v)%，充分混合後，分注入玻璃瓶中，每瓶各1mL，使用共和真空凍結乾燥裝置RL-201BS(共和真空技術株式會社製)，在-50 $^{\circ}\text{C}$ 下凍結16小時後，在20 $^{\circ}\text{C}$ 、1.33Pa減壓下凍結乾燥48小時，將水份氣化除去後封閉，在4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。又此時凍結乾燥品中水分含量為0.8質量%。

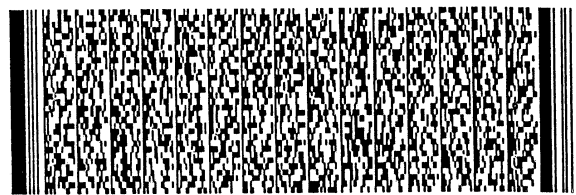
(4) 使用氧化HDL凍結乾燥品做為標準品製作的檢量線

a. 濃度調整

以(3)所調製的氧化HDL的凍結乾燥品中加入精製水1mL溶解後，以含1(w/v)%BSA的PBS稀釋成既定濃度(0ng/mL、3.125ng/mL、6.25ng/mL、12.5ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、及75ng/mL)。

b. 三明治式ELISA分析

在96F微板(microplate)[ヌンク(Nunc)社製]的各井



五、發明說明 (25)

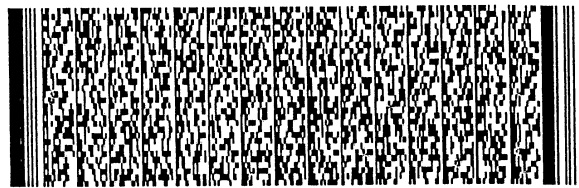
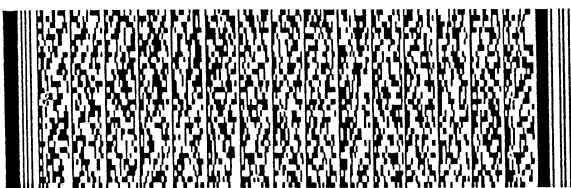
中，加入以碳酸緩衝液(PH9.5)稀釋成 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度的抗人脫輔基A1白老鼠單細胞抗體[ケミコン(Chemicon)社製]溶液 $0.1\text{mL}/\text{井}$ ，在 4°C 下孵養16小時。捨棄抗體溶液，加入含有 $1(\text{w}/\text{v})\%$ BSA的PBS(PH7.4) $350 \mu\text{L}$ ，室溫下孵養2小時封閉後，以含有 $0.05(\text{v}/\text{v})\%$ 吐溫(Tween)20的PBS(PH7.4)洗淨4次。

其次，以上揭a調製的含有既定濃度氧化HDL凍結乾燥品的稀釋液，注入於各井，每井 $100 \mu\text{L}$ ，室溫下孵養2小時後，用含有 $0.05(\text{v}/\text{v})\%$ 吐溫(Tween)20的PBS(PH7.4)洗淨4次。

更在各井中加入以含有 $1(\text{w}/\text{v})\%$ BSA的PBS(PH7.4)稀釋150倍的DLH3抗體 $100 \mu\text{L}$ ，在室溫下孵養1小時。接著以含有 $0.05(\text{v}/\text{v})\%$ 吐溫(Tween)20的PBS(PH7.4)洗淨4次後，加入含有 $1(\text{w}/\text{v})\%$ BSA的PBS稀釋1000倍的過氧化酶標識抗白老鼠IgM抗體(ザイメツト公司所製) $100 \mu\text{L}$ ，室溫下孵養30分鐘。以含有 $0.05(\text{v}/\text{v})\%$ 吐溫(Tween)20的PBS(PH7.4)洗淨4次後，加入含有0-第二胺 $3\text{mg}/\text{mL}$ 的 $0.03(\text{w}/\text{v})\%$ 過氧化氫水 $100 \mu\text{L}$ ，使其發色，靜放30分鐘後，加入 $1\text{mol}/\text{L}$ 的硫酸 $50 \mu\text{L}$ ，使其停止反應，測定 492nm 的吸光度。其結果如第3圖所示。如第3圖所示，使用本發明之氧化HDL凍結乾燥品可作成清晰的檢量線。

(5) 保存安定性的比較

在(3)所調製的氧化HDL凍結乾燥品[氧化HDL標準品(1)(H型)： 12.5ng ；及氧化HDL標準品(2)： 6.25ng (L型)]，以 4°C 下保存一定時間(0、1、2、3、4週)。又，在(2)



五、發明說明 (26)

所調製的氧化HDL，以PBS(PH7.4)稀釋，使其蛋白質濃度成6.25ng/mL(稱「L型」)，及12.5ng/mL(稱「H型」)，再分別加入BSA與蔗糖，使其最終濃度各成2(w/v)%與5(w/v)%，充分的混合。此混合液不經凍結乾燥而一直以4℃冷藏保存者分別稱氧化HDL比較品(1)(H型)：12.5ng/mL；及氧化HDL比較品(2)：6.25ng/mL(L型)，將其在4℃下保存一定期間(0、1、2、3、4週)。

保存一定期間後，加精製水1mL於氧化HDL標準品(1)及(2)之溶解液及對氧化HDL比較品(1)與(2)，各施以與上揭(4)(b)同樣之操作，測定492nm之吸光度，其結果如第4圖所示。

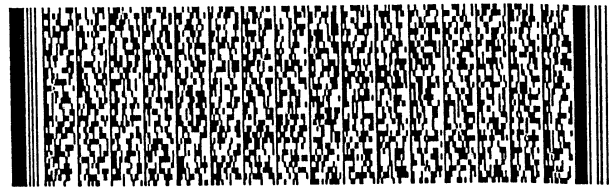
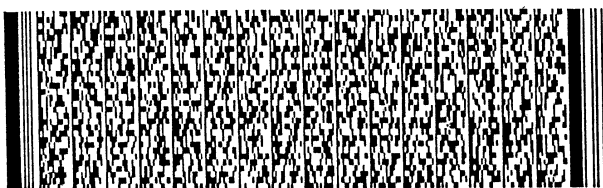
如第4圖所示，本發明之凍結乾燥氧化HDL標準品(1)與(2)，與調製直後(0週)比較，其測定值殆無變動。反之，經冷藏保存的氧化HDL比較品(1)與(2)，與調整直後(0週)比較，其測定值分別有40%及30%的降低，較之本發明之氧化HDL標準品(1)與(2)，其保存安定性相當遜色。

實施例3

(1)Lp(a)的調製

從EDTA為抗凝固劑而得的人血漿以超離心分離法(15℃下120,000×g，48小時)，回收比重1.060~1.125之部份，更以生物膠(Biogel)A-5(バイオラツド社製)做凝膠過濾，回收Lp(a)劃分。此時Lp(a)的純度，以瓊脂糖電氣泳動法，可確認有單純的銳利光譜帶。

其次，將此Lp(a)分離物對含有0.25mmol/L EDTA的PBS(PH7.4)充分(16小時透析)而精製。又，將如此精製的



五、發明說明 (27)

Lp(a) 溶解於含有 0.25mmol/L EDTA 的 PBS(PH7.4) 中，使 Lp(a) 蛋白質濃度成 1mg/mL，在 4℃ 下保存至使用時。此外，在本實施例中，蛋白質的含量係以實施例 1(1) 所記載之勞里修正法(Lowry modified Method) 決定之。

(2) Lp(a) 的氧化

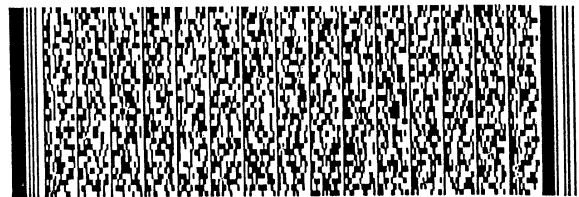
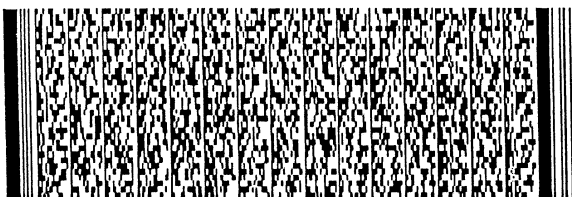
以(1)所調製的 Lp(a) 對不含 EDTA 的 500 ~ 1000 倍容以上 PBS(PH7.4) 透析 3 次以上(2 小時以上/次) 而除去 EDTA，並溶於不含 EDTA 的 PBS(PH7.4) 中，使 Lp(a) 濃度成 100 μ g/mL。接著在此 Lp(a) 溶液 10mL 中添加硫酸銅(CuSO₄)，使成最終濃度 10 μ mol/L，在 37℃ 下孵養 18 小時，使 Lp(a) 氧化。又對此溶液，添加 EDTA，使最終濃度成為 1mmol/L，停止氧化反應後，對含有 EDTA 1mmol/L PBS(PH7.4) 以 500 ~ 1000 倍容透析 2 ~ 3 次(2 小時以上/次)，除去 CuSO₄，而調製氧化 Lp(a)，在 4℃ 下保存。

又，在本實施例中，氧化 Lp(a) 量之表示，以做為原料的 Lp(a) 蛋白質之量來定義。

(3) 氧化 Lp(a) 的凍結乾燥品的調製

以(2)所調製的 Lp(a) 中，分別添加 BSA 與蔗糖，使各成最終濃度 2(w/v)% 與 5(w/v)%，充分的混合後，分裝於玻璃瓶中，每瓶 1mL，使用共和真空凍結乾燥裝置 RL-201 BS(共和真空技術株式會社)，在 -50℃ 下凍結 16 小時後，20℃、1.33Pa 之減壓下凍結乾燥 48 小時，以將水份氣化除去後，栓封，4℃ 下保存。此外，此時凍結乾燥品中之水份含量為 0.8 質量%。

(4) 氧化 Lp(a) 的凍結乾燥品，做為標準品使用時的檢量



五、發明說明 (28)

線的製作

a. 濃度調整

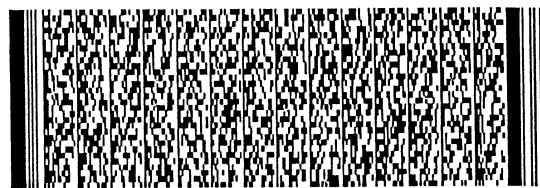
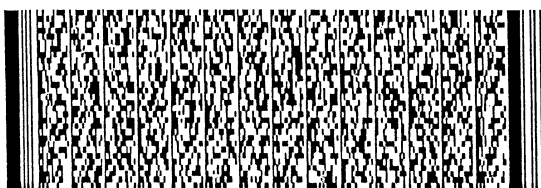
以(3)所調製的氧化Lp(a)的凍結乾燥品，溶解於精製水1mL中，成為一定濃度(0ng/mL、0.15625ng/mL、0.3125ng/mL、0.625ng/mL、1.25ng/mL、2.5ng/mL、及5ng/mL)。

b. 三明治式ELISA分析

在96F微板(microplate)[ヌンク(Nunc)社製]各井中，添加以碳酸緩衝液(PH9.5)稀釋成10 μ g/mL的抗人Lp(a)白老鼠單細胞抗體[ケミコン(Chemicon)社製]，加入量為1 μ g/井，在4°C下孵養16小時。捨棄抗體溶液，加入含有1(w/v)%BSA的PBS(PH7.4)350 μ L，在室溫下孵養2小時而封閉後，以含0.05(v/v)%吐溫(Tween)20的PBS(PH7.4)洗淨4次。

其次，將上揭a中所調製含有既定濃度的氧化Lp(a)凍結乾燥品的水溶液，分裝於各井，每井100 μ L，在室溫下孵養2小時後，以含有0.05(v/v)%吐溫(Tween)20的PBS(PH7.4)洗淨4次。

此外，在各井中加入含有1(w/v)%BSA的20mmol/L Tris-HCl溶液(PH7.4)稀釋成10 μ g/mL濃度的稀釋液100 μ L之實施例1(4)b所調製之DLH3抗體，在室溫下孵養1小時，接著以含有0.05(v/v)%吐溫(Tween)20的PBS(PH7.4)洗淨4次後，加入以含有1(m/v)%BSA的PBS稀釋1000倍的過氧化酶標識抗白老鼠IgM抗體[ケミコン(Chemicon)社製]100 μ L，在室溫下孵養30分鐘。以含有0.05(v/v)%吐溫



五、發明說明 (29)

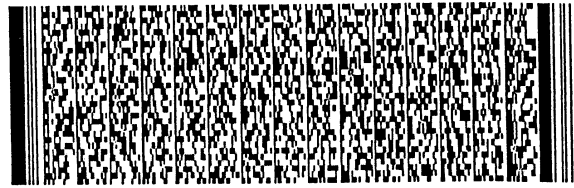
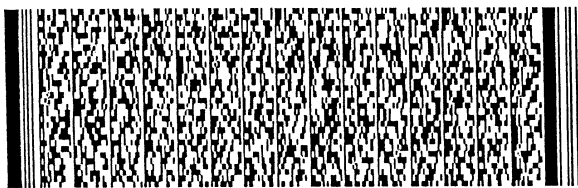
(Tween)20 的 PBS (PH7.4) 洗淨4次後，加入含有0-第二胺 3mg/mL 的 0.03(w/v)% 過氧化氫水 100 μ L 發色30分鐘後，加入 1mol/L 硫酸 50 μ L 使反應停止，測定 492nm 的吸光度，其結果如第5圖所示。如第5圖所示，使用本發明的氧化 Lp (a) 凍結乾燥品可製作成清晰的檢量線。

(5) 保存安定性的比較

以(3)中所調製的氧化 Lp(a) 凍結乾燥品 [氧化 Lp(a) 標準品(1)(H型) : 12.5ng ; 及氧化 Lp(a) 標準品(2) : 6.25ng (L型)] ，在 4 $^{\circ}$ C 下保存一定時間(0、1、2、3、4週)。又，(2)所調製的氧化 Lp(a) 以 PBS (PH7.4) 稀釋後，使其蛋白質濃度成為 6.25ng/mL (稱「L型」) 及 12.5ng/mL (稱「H型」) ，再分別添加 BSA 與蔗糖，使其最終濃度各成 2(w/v)% 與 5(w/v)% ，並充分的混合。將此混合溶液不經凍結乾燥而在 4 $^{\circ}$ C 下冷藏保存的各氧化 Lp(a) 比較品(1)(H型) : 12.5ng/mL ; 及氧化 Lp(a) 比較品(2) : 6.25ng/mL (L型) ，在 4 $^{\circ}$ C 下保存一定期間(0、1、2、3、4週) 在 4 $^{\circ}$ C 下保存。

保存一定期間後，加精製水 1mL 於氧化 Lp(a) 標準品(1) 及(2) 中使其溶解，並對氧化 Lp(a) 比較品(1) 與(2) ，分別施行上揭(4)(b) 同樣操作，測定 492nm 吸光度，其結果如第6圖所示。

如第6圖所示，本發明之經凍結乾燥氧化 Lp(a) 標準品(1) 及(2) ，與調製直後(0週) 比較，其測定值殆無變動。反之，經冷藏保存的氧化 Lp(a) 比較品(1) 及(2) ，與調製直後(0週) 比較，其測定值在經過4週後，分別降低約 50% 及 40% ，較之本發明之氧化 Lp(a) 標準品(1) 及(2) ，其保



五、發明說明 (30)

存安定性相當低劣。

實施例4

(1) 凍結變性人血漿的調製

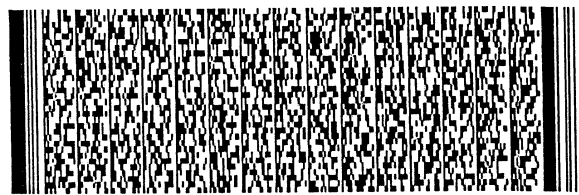
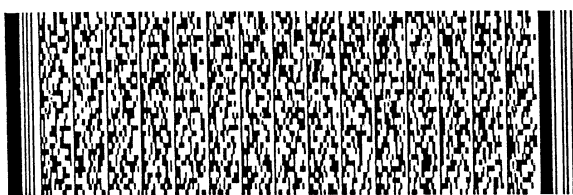
使用肝素為抗凝固劑，從受檢者4人採血，以通用方法採取血漿，依實施例1(4)所記載ELISA法同樣的方法加以分析。

其次，各血漿分裝於玻璃瓶中，每瓶各2mL，從室溫(25°)移藏於-30°C的冷凍櫃，經過3小時以上後，恢復室溫，完全融解內容物。將此施以包含凍結過程的各血漿，依實施例1(4)所記載ELISA法同樣的方法加以分析。這些結果如第7圖所示。如第7圖所示，因對血漿施以包含凍結的過程，血漿中所含脂蛋白質受有意的變性，可確認生產了凍結變性脂蛋白質(氧化LDL)。

(2) 凍結變性人血漿的凍結乾燥品的調製

經上揭(1)的包含凍結的過程共施行4次的各血漿分別以等容積混合，對此混合液，依實施例1(4)所記載ELISA法，從實施例1(4)所示檢量線算出變性LDL(氧化LDL)的濃度。

其次，以(1)調製的凍結變性人血漿，以含有140mmol/L NaCl、最終濃度2(w/v)%BSA、最終濃度5(w/v)%蔗糖、0.25mmol/L EDTA-2Na的10mmol/L磷酸緩衝液(PH7.4)稀釋，使其氧化LDL濃度成6.25ng/mL(L型)及12.5ng/mL(H型)。接著分裝此稀釋液於玻璃瓶中，每瓶各1mL，使用共和真空凍結乾燥裝置RL-201BS(共和真空技術株式會社製)，-50°C下凍結16小時後，以5°C、1.33Pa減壓下凍結乾燥



五、發明說明 (31)

48小時，將水份氣化除去後栓封，以4℃保存至使用時，以此做為凍結變性人血漿的凍結乾燥品。此外，此凍結乾燥品中的水份含量為0.8質量%。

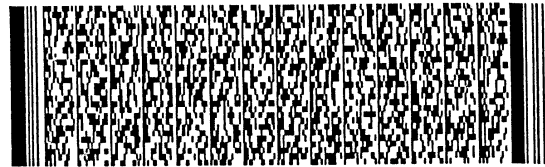
(3) 凍結變性人血漿的凍結乾燥品濃度測定

加精製水1mL於(2)所調製凍結變性人血漿的凍結乾燥品中，經溶解後，對此溶液，依實施例1(4)所記載之三明治ELISA法之氧化LDL測定方法，測定492nm的吸光度，由此值應用實施例1(4)所製作的檢量線確認氧化LDL濃度結果，凍結乾燥品中氧化LDL濃度在凍結乾燥過程前後殆無變化。

(4) 保存安定性的比較

(2)所調製的凍結變性人血漿的凍結乾燥品[凍結變性人血漿標準品(1)(H型)：12.5ng；及凍結變性人血漿標準品(2)(L型)：6.25ng(L型)]在4℃下保存一定時間(0、6、12個月)。又，在實施例1(3)所調製氧化LDL凍結乾燥品[氧化LDL標準品(1)(H型)：12.5ng；及氧化LDL標準品(2)(L型)：6.25ng在4℃下保存一定期間(0、6、12個月)。

在保存一定期間後，加精製水1mL於凍結變性人血漿標準品(1)與(2)及氧化LDL標準品(1)與(2)中而溶解之，並將此溶液依實施例1(4)所記載ELISA法同樣之方法加以分析，其結果如下揭第1表。



五、發明說明 (32)

保存期間 (月)	OD ₄₉₂			
	凍結變性人血 漿標準品(1)	凍結變性人血 漿標準品(2)	氧化LDL 標準品(1)	氧化LDL 標準品(2)
0	0.740	0.272	0.758	0.283
6	0.727	0.270	0.508	0.222
12	0.677	0.274	0.430	0.207

如第1表所示，本發明之氧化LDL標準品如屬低濃度[氧化LDL標準品(2)]，其保存安定性優異，以凍結而施行脂蛋白質變性後，再經凍結乾燥而安定化的本發明凍結變性人血漿標準品，即使濃度變高[凍結變性人血漿標準品(1)]，較之本發明之氧化LDL標準品，可知其長期間的保存安定性有意義的較優異。

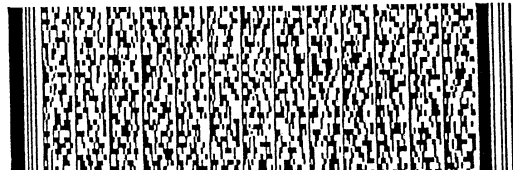
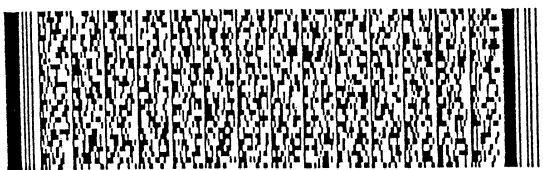
實施例5

(1) 凍結變性人血清的調製

從受檢者4人採血，以常用方法分離血清而混合之。此血清中添加BSA與蔗糖，使其最終濃度各成2(w/v)%及5(w/v)%，充分混合後，分裝於玻璃瓶，每瓶2mL，使用共和真空凍結乾燥裝置RL-201BS(共和真空技術株式會社製)，在-50℃凍結16小時後，以5℃、1.33Pa的減壓下凍結乾燥48小時，將水份氣化除去後栓封，以4℃下保存。又，此凍結乾燥品中水份含量為0.8質量%。

(2) 凍結變性人血清凍結乾燥品的調製

含(1)所調製的凍結變性人血清的玻璃瓶中加入2mL的



五、發明說明 (33)

精製水，充分溶解內容物。對此溶解液，依實施例1(4)所記載ELISA法的氧化LDL的測定方法，從實施例1(4)製作的檢量線，算出LDL的濃度。

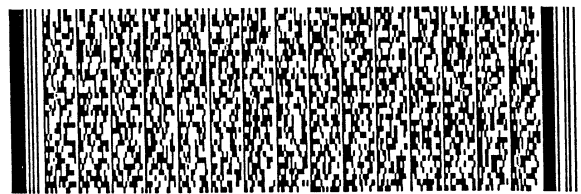
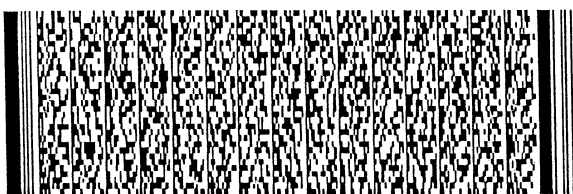
其次，(1)所調製的凍結變性人血清中，以140mmol/L NaCl、最終濃度2(w/v)%BSA、終濃度5(w/v)%蔗糖、0.25mmol/L，含有EDTA-2Na 10mmol/L磷酸緩衝液(PH7.4)稀釋，使其氧化LDL濃度成6.25ng/mL(L型)及12.5ng(H型)。接著將此稀釋液以玻璃瓶分裝，每瓶1mL，使用共和真空凍結乾燥裝置RL-201BS(共和真空技術株式會社製)，在-50℃下凍結16小時後，以5℃、1.33Pa的減壓下凍結乾燥48小時，將水份氣化除去後栓封，在4℃下保存至使用時，將此做為凍結變性人血清的凍結乾燥品。又，此凍結乾燥品中的水份含量為0.8質量%。

(3)凍結變性人血清的凍結乾燥品之濃度測定

加精製水1mL於(2)所調製的凍結變性人血清的凍結乾燥品中溶解後，對此溶液依實施例1(4)所記載ELISA法的氧化LDL測定方法，從實施例1(4)製作的檢量線確認氧化LDL濃度結果，凍結乾燥品中氧化LDL濃度在凍結乾燥過程前後殆無變化。

(4)溶解後保存安定性的比較

(2)所調製的凍結變性人血清的凍結乾燥品中，分別加入精製水1mL而溶解之，成為氧化LDL濃度分別為12.5ng/mL及6.25ng/mL的凍結變性人血清標準品(1)(H型)及(2)(L型)，將這些在4℃下保存一定期間(0、3、7、10、14日)。此外，實施例1(3)所調製氧化LDL凍結乾燥品亦以上



五、發明說明 (34)

揭同樣方法溶解，做為氧化LDL濃度分別為12.5ng/mL及6.25ng/mL的氧化LDL標準品(3)(H型)及(4)，同樣在4℃下以溶解狀態保存一定期間(0、3、7、10、14日)。

保存一定期間後，凍結變性人血清標準品(1)與(2)及氧化LDL標準品(3)與(4)，分別依實施例1(4)所記載三明治ELISA法的氧化LDL測定方法加以分析，其結果如第2表及第8圖所示。

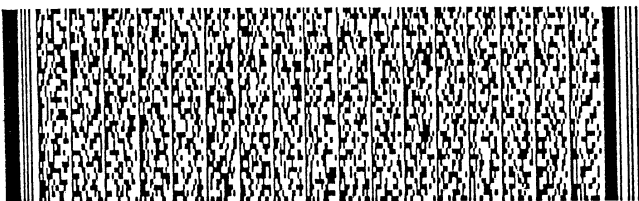
保存期間 (月)	OD ₄₉₂			
	凍結變性人血清標準品(1)	凍結變性人血清標準品(2)	氧化LDL標準品(3)	氧化LDL標準品(4)
0	0.8175	0.3693	0.7689	0.3608
3	0.8107	0.3533	0.6762	0.3615
7	0.7602	0.3387	0.6705	0.3473
10	0.7800	0.3440	0.5772	0.3240
14	0.7630	0.3400	0.5760	0.2985

如第二表所示，本發明的氧化LDL標準品如屬低濃度[氧化LDL標準品(4)]者，其溶解後的保存安定性雖為優異，但因凍結而使脂蛋白質變性後，再經凍結乾燥而安定化的本發明凍結變性人血清標準品，即使濃度變高[凍結變性人血清標準品(1)]，與本發明氧化LDL標準品相較，其溶解後的保存安定性有意義的優異。

實施例6

(1) 凍結變性LDL的調製

將實施例1(1)所調製的LDL，對500~1000倍容以上的



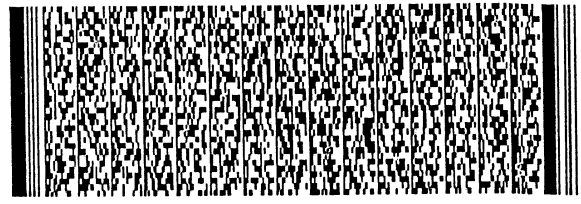
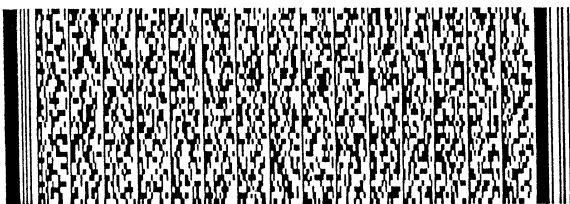
五、發明說明 (35)

不含EDTA的PBS(PH7.4)透析3次以上(2小時以上/次)，因而除去EDTA，以140mmol/L NaCl、最終濃度2(w/v)% BSA、最終濃度5(w/v)% 蔗糖、0.25mmol/L含EDTA-2Na的10mmol/L磷酸緩衝液(PH7.4)稀釋，使LDL濃度成1mg/mL，充分混合。其次將此稀釋液分裝於玻璃瓶，每瓶2mL，從室溫22℃移入庫內溫度分別為-85℃及-30℃的冷凍庫，經1小時以上後，恢復於室溫，使內容物完全融解。反覆含上揭凍結，融解過程共10次。又包含上揭凍結，融解過程間，回收內容物的一部份後，就此標本，依實施例1(4)所記載三明治ELISA法分析之，其結果如第9圖所示。

如第9圖所示，庫內溫度-30℃時，包含凍結、融解的過程反覆3次後LDL的變性大致達於飽和狀態。反之，庫內溫度為-85℃時，包含凍結、融解的步驟如不反覆約9次，LDL的變性就不能達於飽和狀態，而呈現變性LDL的生產量，依降低溫度而有差異。

(2)凍結變性LDL凍結乾燥品的調製

在(1)中以庫內溫度-30℃時施以包含凍結的過程共4次所調製的凍結變性LDL，以140 mmol/L NaCl、最終濃度2(w/v)% BSA、最終濃度5(w/v)% 蔗糖、含0.25mmol/L EDTA-2Na的10mmol/L磷酸緩衝液(PH7.4)稀釋，使氧化LDL濃度成為6.25ng/mL(L型)及12.5ng/mL(H型)。其次，將此稀釋液分裝於玻璃瓶，每瓶1mL，使用共和真空凍結乾燥裝置RL-201BS(共和真空技術株式會社製)，在-50℃下凍結16小時後，以5℃、1.33Pa之減壓下凍結乾燥48小時，將水份氣化除去後栓封，在4℃下保存至使用時，成為凍



五、發明說明 (36)

結變性LDL的凍結乾燥品。又，此凍結乾燥品中的水份含量為0.8質量%。

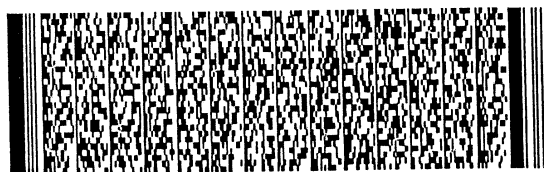
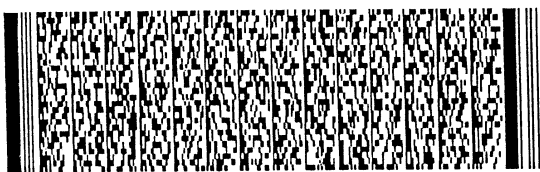
(3) 凍結變性LDL凍結乾燥品的濃度測定

加入精製水1mL於(2)所調製的凍結變性LDL的凍結乾燥品中而溶解後，對此溶液依實施例1(4)所記載ELISA法氧化LDL測定方法，從實施例1(4)製成的檢量線確認氧化LDL濃度，結果，凍結乾燥過程前後，殆未有凍結乾燥品中氧化LDL濃度的變化。

(4) 溶解後保存安定性的比較

(2)所調製的凍結變性LDL的凍結乾燥品中，分別加入精製水1mL而溶解之，成為氧化LDL濃度各為12.5ng/mL及6.25ng/mL的凍結變性LDL標準品(1)(H型)及(2)(L型)，這些在4°C下保存一定期間(0、3、7、10、14日)。此外，實施例1(3)所調製的氧化LDL凍結乾燥品亦與上揭同樣方法溶解，成為氧化LDL濃度分別為12.5ng/mL及6.25ng/mL的氧化LDL標準品(3)(H型)及(4)(L型)，同樣在4°C下以溶解狀態保存一定期間(0、3、7、10、14日)。

保存一定期間後，凍結變性LDL標準品(1)及(2)及氧化LDL標準品(3)與(4)，各依實施例1(4)所記載三明治ELISA法的氧化LDL測定方法，測定492nm的吸光度，由此值應用實施例1(4)製成的檢量線算出各標準品中的氧化LDL。其結果如下揭第3表及第10圖所示。



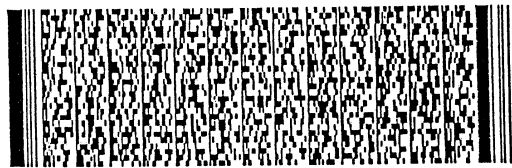
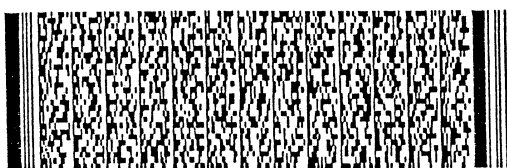
五、發明說明 (37)

保存期間 (月)	OD ₄₉₂			
	凍結變性LDL 標準品(1)	凍結變性LDL 標準品(2)	氧化LDL 標準品(3)	氧化LDL 標準品(4)
0	0.8633	0.3826	0.7689	0.3608
3	0.8265	0.3532	0.6762	0.3615
7	0.7924	0.3516	0.6705	0.3473
10	0.7952	0.3439	0.5772	0.3240
14	0.7886	0.3476	0.5760	0.2985

由表3表可知，本發明的氧化LDL標準品如屬低濃度者[(氧化LDL標準品(4))，則溶解後的保存安定性優異，唯依凍結施以變性的脂蛋白質，變性後更以凍結乾燥安定化的本發明凍結變性人血清標準品，濃度提高後[凍結變性LDL標準品(1)]，較之本發明之氧化LDL標準品，其溶解後的保存安定性有意義的優異。

[產業上利用的可能性]

如上揭情形，本發明係為脂蛋白質人工變性所得的變性脂蛋白質，經凍結乾燥所得的保存安定性優異的變性脂蛋白質及其製作方法。又，本發明係關於對含有變性脂蛋白質的溶液至少包含加以一次凍結的過程，而使該脂蛋白質變性而得的變性脂蛋白質的製作方法，以及將這樣製作而得的變性脂蛋白質再加以凍結乾燥而獲得優異保存安定性的變性脂蛋白質及其製作方法。變性脂蛋白質對於冠狀動脈系疾病，如心肌梗塞與狹心症等，腦動脈性疾病，如腦硬塞與腦血管系痴呆等，或腎動脈系疾病，如腎病、糖

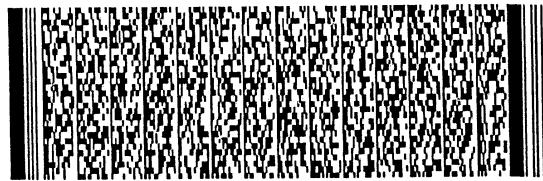
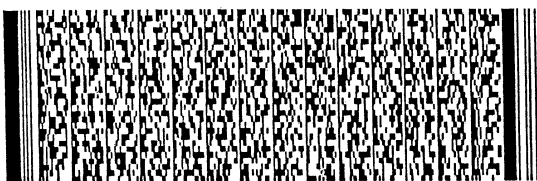


五、發明說明 (38)

尿病性腎病、以及末梢動脈閉塞症等末梢動脈系疾病等各種循環器系疾病等關係至為密切。血液中變性脂蛋白質之量測定用的標準物質與變性脂蛋白質生理上角色與生理活性調查所用試藥，為左右這些試驗結果的非常重要的物質。

由是，本發明的方法，使具有優異保存安定性，亦即經常指示一定測定值的變性脂蛋白質的製作成為可能。上揭優點加上對含有變性脂蛋白質的溶液至少包含加一次凍結的過程而得的變性脂蛋白質凍結乾燥所得的安定性脂蛋白質，不只其保存安定性，其溶解後的安定性亦很優異，且成本發明之安定化變性脂蛋白質實際應用時之形態，在溶液形態時其安定性亦甚優，是以要測定變性脂蛋白質時非常有益。

爰此，本發明之安定化變性脂蛋白質，例如令其與能辨識變性脂蛋白質之抗體接觸，來測定該抗體對試料的反應性，由此測定含於血液成份中的變性脂蛋白質的方法中當做標準物質，與變性脂蛋白質生理上角色與生理活性調查上各種實驗用試藥是有用的，加之，如上揭諸目的上之診斷技術商品化與試藥的開發上，有非常重要的影響，乃不言而喻。



圖式簡單說明

第1圖為表示於本發明實施例1中所得氧化LDL(以銅將氧化LDL凍結乾燥後，而用既定的方法溶解者)做為試料作成的檢量線圖。

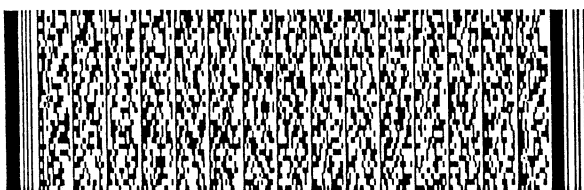
第2圖為表示於本發明實施例1中所得氧化LDL(以銅將氧化LDL凍結乾燥者)保存於4℃下，以一定間隔用既定方法溶解後作為試料測定時，與以銅將氧化的LDL不經凍結乾燥而直接保存於4℃下，以一定間隔做為試料測定時兩種測定值的比較圖。

第3圖為表示於本發明實施例2中所得氧化LDL(以銅將氧化LDL凍結乾燥後，而用既定的方法溶解者)做為試料作成的檢量線圖。

第4圖為表示於本發明實施例2中所得氧化LDL(以銅將氧化LDL凍結乾燥者)保存於4℃下，以一定間隔用既定方法溶解後作為試料測定時，與以銅將氧化的LDL不經凍結乾燥而直接保存於4℃下，以一定間隔做為試料測定時兩種測定值的比較圖。

第5圖為表示於本發明實施例3中所得氧化脂蛋白質a [Lp(a)](以銅將氧化的Lp(a)凍結乾燥後，以既定方法熔融者)作為試料作成的檢量線圖。

第6圖為表示於本發明實施例3中所得氧化Lp(a)(以銅將氧化的Lp(a)凍結乾燥者)保存於4℃下，以一定間隔用所定方法溶解後作為試料測定時，與以銅氧化的Lp(a)不經凍結乾燥而直接保存於4℃下，以一定間隔做為試料測定時兩種測定值的比較之指示圖。



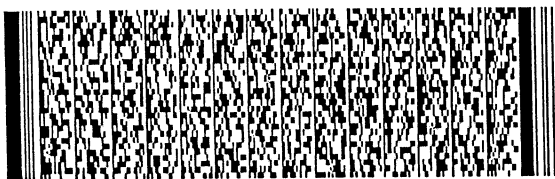
圖式簡單說明

第7圖為於本發明實施例4中，對血漿施以包含凍結的過程，而製作變性脂蛋白質的說明圖。

第8圖為於本發明實施例5中，依照ELISA法所做關於實施例5(2)中所調製之凍結變性人血清標準品及實施例1(3)中所調製氧化LDL標準品評價兩者在溶解後保存安定性時所作測定值(吸光度)的比較圖。

第9圖為於實施例6中，對人LDL施以包含凍結的過程，而製作變性脂蛋白質的說明圖。

第10圖為於實施例6中，依照ELISA法所做關於實施例6(2)中所調製之凍結變性LDL標準品及實施例1(3)中所調製氧化LDL標準品評價兩者在溶解後保存安定性時所作測定值(吸光度)的比較圖。

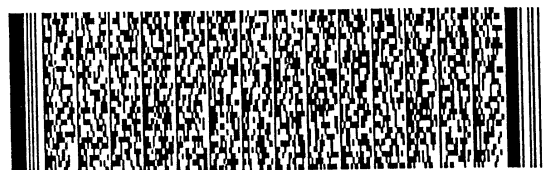
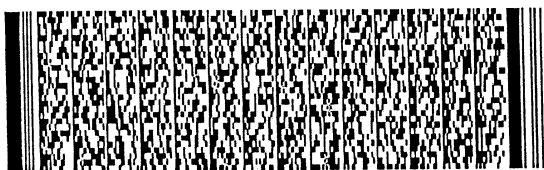


四、中文發明摘要 (發明名稱：變性脂蛋白質之製造及其安定化方法)

本發明提供一種變性脂蛋白質之製造及其安定化方法；變性脂蛋白質可使用於具有優異長期保存安定性(即不大容易引起蛋白質之變性)之血液中變性脂蛋白質量之測定與生理活性測定用之標準物質；本發明之安定化變性脂蛋白質的方法，包含將脂蛋白質以人工方法變性而得變性脂蛋白質，並將該變性脂蛋白質凍結乾燥之製程；或包含對含有變性蛋白質之溶液，至少施加以一次的凍結步驟，而使含於該溶液中的脂蛋白質變性，且得到變性脂蛋白質，以及更將變性脂蛋白質凍結乾燥之製程。

五、英文發明摘要 (發明名稱：A method for manufacturing denatured lipoprotein and method for stabilizing the same)

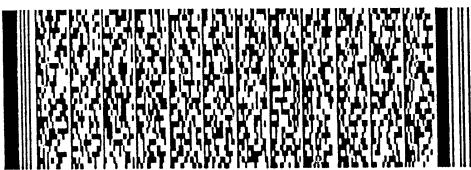
A denatured lipoprotein manifesting an excellent storage life (namely, a protein is not easily subjected to denaturation) and suitable for the use as a standard substance for the determination of a denatured lipoprotein content in blood and the determination of a physiological activity thereof and a method for the production thereof are provided. The method for stabilizing



四、中文發明摘要 (發明名稱：變性脂蛋白質之製造及其安定化方法)

五、英文發明摘要 (發明名稱：A method for manufacturing denatured lipoprotein and method for stabilizing the same)

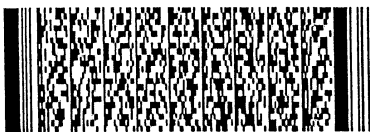
denatured lipoprotein according to this invention comprises artificially denaturing a lipoprotein thereby obtaining a denatured lipoprotein and lyophilizing said denatured lipoprotein; or comprises subjecting one or more freezing steps to a solution containing a lipoprotein thereby denaturing the lipoprotein in said solution and obtaining a denatured lipoprotein, and thereafter



四、中文發明摘要 (發明名稱：變性脂蛋白質之製造及其安定化方法)

五、英文發明摘要 (發明名稱：A method for manufacturing denatured lipoprotein and method for stabilizing the same)

lyophilizing said denatured lipoprotein.

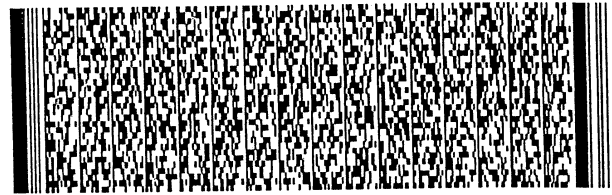
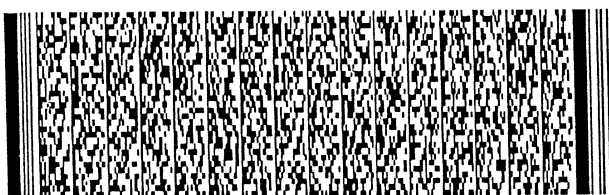


六、申請專利範圍

1. 一種將脂蛋白質施以人工變性，得到變性脂蛋白質之製造方法，係對含有脂蛋白質的溶液至少施加一次每分鐘下降 $0.01 \sim 10^{\circ}\text{C}$ 的降溫步驟，到達溫度為 $0 \sim -196^{\circ}\text{C}$ 之凍結製程，以及至少施加一次昇溫步驟，使溶液溫度上昇至 $0 \sim 42^{\circ}\text{C}$ 的融解製程，如此，使溶液中所含的脂蛋白質變性成為變性脂蛋白質為其特徵者。

2. 如申請專利範圍第1項之變性脂蛋白質之製造方法，其中所述變性脂蛋白質係使用來作為測定血液中之變性脂蛋白質量之標準藥劑者。

3. 如申請專利範圍第1項之變性脂蛋白質之製造方法，其中所述變性脂蛋白質又與一種DLH3抗體反應，而該DLH3抗體係將8週齡以上的雄Balb/c白老鼠的腹腔內，每隻注入 0.5mL 的異十八烷(pristane)(2,6,10,14-四甲五癸烷)後飼育2星期；其次在此白老鼠之腹腔內接種產生所希望的單細胞抗體的細胞， 1×10^6 隻；7~14日後，白老鼠腹腔內積留了充分的腹水時，使用18G的注射針從腹腔內回收腹水，以 3000rpm 離心分離10分鐘，回收上部澄清部份；在此上面澄清部加入等量之PBS(PH7.4)後，與此混合液等量之飽和硫酸氨液充分攪拌，費1小時點滴，再繼續攪拌1小時後，以 3000rpm 離心分離10分鐘，廢棄其上面澄清部而回收沈澱物；又此沈澱物中加入含 0.5mol/L 的NaCl的PBS(PH7.4)使其溶解，以含 0.5mol/L NaCl的PBS(PH7.4)平衡化的交聯丙烯基(Sephacryl)s-300柱($2.5\text{cm} \times 100\text{cm}$)[ファルマシア(pharmacia)社製]處理此溶液，回



六、申請專利範圍

收1gM滲透物而得者。

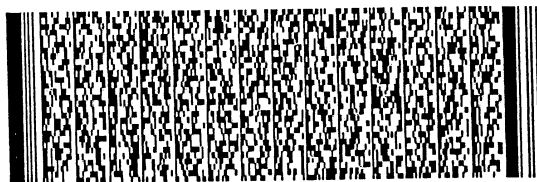
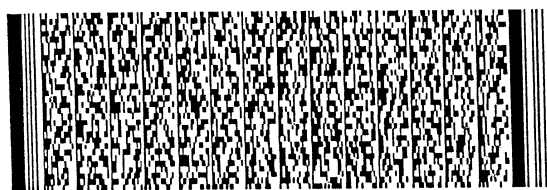
4. 一種安定化變性脂蛋白質的製造方法，係將從極微細、VLDL、LDL、LP(a)、HDL2及HDL3所成群中至少選出一種的脂蛋白質在金屬離子觸媒存在下施以使其氧化、乙醯基化，並予以丙二醛經醛化的人工變性，得到變性脂蛋白質，將該變性脂蛋白質在由蔗糖、乳糖、海藻糖、牛血清白蛋白(BSA)及人血清白蛋白(HSA)形成群中至少選用一種的安定劑存在下，於 $-80^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ 的溫度、 $0.667 \sim 13.33\text{Pa}$ 的壓力、 $12 \sim 72$ 小時的條件下凍結乾燥，由是使該變性脂蛋白質安定化而成之安定化變性脂蛋白質者。

5. 如申請專利範圍第4項之方法，其中所述該脂蛋白質為人脂蛋白質。

6. 如申請專利範圍第4項之方法，其中所述金屬離子為銅離子、鐵離子或該等離子的混合物。

7. 一種安定化變性脂蛋白質之製造方法，係對含有脂蛋白質的溶液至少施加一次每分鐘下降 $0.01 \sim 10^{\circ}\text{C}$ 的降溫步驟，到達溫度為 $0 \sim -196^{\circ}\text{C}$ 之凍結製程，以及至少施加一次昇溫步驟，使溶液溫度上昇至 $0 \sim 42^{\circ}\text{C}$ 的融解製程，如此，使溶液中所含的脂蛋白質變性，而得變性脂蛋白質，再對該變性脂蛋白質，於 $-80 \sim 20^{\circ}\text{C}$ 的溫度， $0.667 \sim 13.33\text{Pa}$ 的壓力、 $12 \sim 72$ 小時的條件下凍結乾燥，由是使該變性脂蛋白質安定化而成之安定化變性脂蛋白質者。

8. 如申請專利範圍第7項之安定化變性脂蛋白質之製造方法，其中凍結乾燥係在由蔗糖、乳糖、海藻糖、牛血



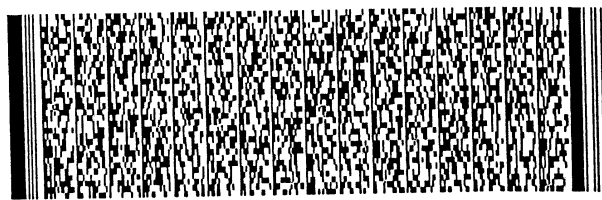
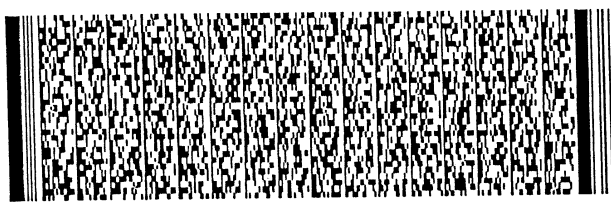
六、申請專利範圍

清白蛋白(BSA)及人血清白蛋白(HSA)形成群中至少選用一種的安定劑存在下進行者。

9. 如申請專利範圍第7項或第8項之安定化變性脂蛋白質之製造方法，其中所述變性脂蛋白質又與一種DLH3抗體反應，而該DLH3抗體係將8週齡以上的雄Balb/c白老鼠的腹腔內，每隻注入0.5mL/的異十八烷(pristane)(2,6,10,14-四甲五癸烷)後飼育2星期；其次在此白老鼠之腹腔內接種產生所希望的單細胞抗體的細胞， 1×10^6 隻；7~14日後，白老鼠腹腔內積留了充分的腹水時，使用18G的注射針從腹腔內回收腹水，以3000rpm離心分離10分鐘，回收上部澄清部份；在此上面澄清部加入等量之PBS(PH7.4)後，與此混合液等量之飽和硫酸氨液充分攪拌，費1小時點滴，再繼續攪拌1小時後，以3000rpm離心分離10分鐘，廢棄其上面澄清部而回收沈澱物；又此沈澱物中加入含0.5mol/L的NaCl的PBS(PH7.4)使其溶解，以含0.5mol/L NaCl的PBS(PH7.4)平衡化的交聯丙烯基(Sephacryl)s-300柱(2.5cm×100cm)[ファルマシア(pharmacia)社製]處理此溶液，回收IgM滲透物而得者。

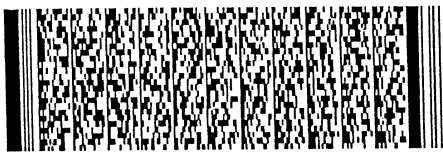
10. 如申請專利範圍第7項或第8項之安定化變性脂蛋白質之製造方法，其中所述變性脂蛋白質係，可作為從放射線免疫學測定法、酵素免疫學測定法、螢光免疫學測定法、發光免疫學測定法、凝集免疫學測定法、免疫比濁法及免疫比臚法中選出之測定法之標準物質使用者。

11. 如申請專利範圍第9項之安定化變性脂蛋白質之製



六、申請專利範圍

造方法，其中所述變性脂蛋白質係，可作為從放射線免疫學測定法、酵素免疫學測定法、螢光免疫學測定法、發光免疫學測定法、凝集免疫學測定法、免疫比濁法及免疫比臙法中選出之測定法之標準物質使用者。



六、指定代表圖

