

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94115039.9

[45] 授权公告日 2002 年 3 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1080762C

[22] 申请日 1994.8.5 [24] 颁证日 2002.3.13

[21] 申请号 94115039.9

[30] 优先权

[32] 1993.8.6 [33] JP [31] 215178/93

[73] 专利权人 日本脏器制药株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 西川胜已 川久保齐

审查员 王 奕

[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 全 菁

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 被检物质的活性测定法

[57] 摘要

本发明提供了利用再构成的血浆血管舒缓素·激肽系的被检物质活性测定法。该方法是在再构成的血浆血管舒缓素·激肽系中于被检物质存在下,使以血液凝固第 X II 因子的活化作为初始反应的一系列酶反应开始之后,再停止该反应,然后定量测定上述反应中生成的生理活性物质。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 被检物质的活性测定法，在由血液凝固第 XII 因子、血浆血管舒缓素和高分子激肽原再构成的血浆血管舒缓素·激肽系中，在被检物质的存在下，使以血液凝固第 XII 因子的活性化作为初始反应的一系列酶反应开始后，停止该反应，然后定量上述反应中生成的活性型血液凝固第 XII 因子、血浆血管舒缓素或舒缓激肽。

2. 根据权利要求 1 的测定法，其特征在于，在生理活性物质的生成量达到饱和之前，停止该生理活性物质的生成。

3. 根据权利要求 1 的测定法，其特征在于，生理活性物质是活性型血液凝固第 XII 因子。

4. 根据权利要求 2 的测定法，其特征在于，生理活性物质是血浆血管舒缓素。

5. 根据权利要求 2 的测定法，其特征在于，生理活性物质是血管舒缓激肽。

6. 根据权利要求 1—4 中任一项的测定法，其特征在于，是由血液凝固第 XII 因子、血浆前血管舒缓素再构成的系。

7. 根据权利要求 1—5 中任一项的测定法，其特征在于，是由血液凝固第 XII 因子、血浆前血管舒缓素、高分子激肽原再构成的系。

被检物质的活性测定法

本发明涉及在再构成的血浆血管舒缓素·激肽系中相对于生成的生理活性物质生成的被检物质的活性测定方法；更详细地说，本发明涉及利用由血浆血管舒缓素·激肽系各成分组成的再构成系，测定在该反应系中生成的生理活性物质，例如活性型血液凝固第 XII 因子、血浆血管舒缓素或血管舒缓激肽的方法。

血管舒缓素是广泛存在于人体所含各种动物血浆及组织中的蛋白质分解酶，血管舒缓素·激肽系的酶系是已知的。血管舒缓素·激肽系在生物体内的作用具有与其它各种酶反应系统，例如肾素·血管紧张素系、血液凝固系、纤溶系、补体系和以前列腺素、白三烯、凝血噁烷为中心的花生四烯酸级联以及儿茶酚胺等密切的关连性。因此，血管舒缓素·激肽系与通过血压调节作用、血液凝固—纤溶—补体系的作用，或者是由花生四烯酸级联生成的种种生理活性物质引起的生物体调节作用和末梢循环改善作用有着深切的关系，对于生物体内的机能调节起着重要的作用。

作为血管舒缓素·激肽系生成产物的激肽类例如血管舒缓激

肽,除了具有伴随末梢血管扩张的降压,血管透过性的亢进、平滑肌的收缩或弛缓、疼痛、发炎、白血球的游走、来自副肾皮质的儿茶酚胺的游离作用等各种生理活性外,还已知可作为包含变应性反应的急性炎症的介体,在生物体内存在的意义很大。

关于这种血浆血管舒缓素·激肽系,认为在生物体内,由于对组织的伤害和侵害刺激引起血液凝固第 XII 因子(哈格曼因子,以下简称 *FXII*)活化而导致一系列的酶反应。即如图 3 所示,活化了的活性型血液凝固第 XII 因子(以下简称 *FXIIa*),同样对血浆中存在的血浆前血管舒缓素起作用,将它转变成活性型酶的血浆血管舒缓素,然后该血浆血管舒缓素对血浆中的高分子激肽原(以下简称 *HK*)作用,使血管舒缓激肽游离。

通过血管舒缓素·激肽系的酶反应而游离的激肽系,例如血管舒缓激肽,具有上述那样各种生理活性,因此抑制血管舒缓激肽的作用的物质或者在血浆血管舒缓素·激肽系中阻断反应从而抑制血管舒缓激肽生成的物质有可能作为抗炎症剂、镇痛剂、抗变应性剂来使用。此外,*FXIIa* 在内因性的血液凝固系及纤溶系的开始阶段也是重要因子,对 *FXIIa* 的生成带来影响的物质,可以期待作为血液凝固系,纤溶领域中的药剂。因此,确立对血浆血管舒缓素·激肽系中的反应进行抑制或促进的物质的上述作用能简便迅速而且正确测定的方法,对了解上述生物体机能的调整所起的作用,或对于研制某些药剂方面都是非常有效的手段。

如上所述,采用血浆血管舒缓素·激肽系,在试管内进行药剂的筛选时,不能实施对生物体内反应有伤害和对组织有侵害刺激而引起的FXII的活化,因此采用将FXII添加到已分离了活化物质的血浆中从而引起血浆血管舒缓素·激肽系反应在试管内进行的方法。

然而,在动物血浆中除上述成分外还含有各种成分,还含有对血管舒缓素·激肽反应系带来阻断和促进影响的成分,和其它未知的因子。因此,采用血浆血管舒缓素·激肽系,例如以药剂的筛选等为目的,打算利用本反应系来测定相对于生理活性物质生成的被检测物质活性的情况下,先有技术是使用动物血浆,因此反应系复杂,并且必须常考虑包括可能给血浆血管舒缓素·激肽反应系带来影响的某些未知成分的各种因子的影响。因此,为了控制反应系需要非常高的技术,很难简单实施。

本发明是为了解决先有技术的问题点而作出的发明,其目的在于提供,利用取出血浆血管舒缓素·激肽系中的成分然后再构成的血浆血管舒缓素·激肽系,通过在试管内进行该反应,从而简便迅速而正确地测定被检物质生理活性的方法。

也就是说,本发明测定方法的特征是,在再构成的血浆血管舒缓素·肽系中,在被检物质存在下,使以血液凝固第XII因子的活性化作为初始反应的一系列酶反应开始后,再停止该反应,然后定量测定上述反应中生成的生理活性物质。

作为本发明测定法中再构成血浆血管舒缓素·激肽系的构成成分，当待定量测定的生理活性物质是 *FXIIa* 或血浆血管舒缓素时，可以使用 *FXII* 及血浆前血管舒缓素，也可以构成最好是在其中添加 *HK* 的反应系。此外，在定量测定血管舒缓激肽的情况下，最好是利用采用 *FXII*、血浆前血管舒缓素及 *HK* 的再构成系。这些各构成成分可以使用基本上精制的，并可利用从血浆中分离精制的或用遗传因子工程学方法制得的物质。

本发明测定法中用于引起血浆血管舒缓素·激肽系活性反应的 *FXII* 活化剂，只要是具有 *FXII* 活性化作用的物质都可以使用，例如玻璃、高岭土、硅藻土制品、骨胶原、高胱氨酸、尿酸钠、血小板及其它细胞膜的细胞成分、纤连蛋白、鞣花酸、槲皮黄酮、芦丁、硫酸化糖脂质、蛋白多糖、粘多糖类、硬脂酸钠、硫酸葡聚糖、硫酸直链淀粉、角叉菜胶以及将 *FXII* 限定分解而活化的蛋白酶等，可将它们单独使用或组合使用，这些 *FXII* 活化剂的使用浓度可以适宜地调整。

在实质上精制的 *FXII*、血浆前血管舒缓素及 *HK* 组成的溶液中添加 *FXII* 活化剂并于被检物质存在下进行的混合反应，可以在适宜设定的、容易控制反应的反应温度下进行。混合反应中，血浆血管舒缓素·激肽系反应顺利进行的 *pH*，最好是例如 7.0 至 9.0 左右。此外，为了设定适宜的反应条件，还可以在反应系中适宜地添加氯化钠等盐类和锌离子等金属离子，此外也可添加本技术领域惯用的

添加剂、助剂等。

混合反应时间,可以根据上述 *FXII*、*FXII* 活化剂、血浆前血管舒缓素、*HK* 及被检物质的浓度或反应液的 *pH* 等适宜地设定,但是如果应该定量测定的生理活性物质的生成量达到饱和,则不能正确地评价被检物质的作用,因此,最好设定在应该定量测定的生理活性物质的生成量达到饱和之前,即反应时间和生成的生理活性物质之间是明确的正的对对应关系,例如为了便于评价最好设定在成直线的比例关系等时间内。

用于停止上述混合反应中生理活性物质生成的方法,可根据待定量测定的生理活性物质的种类适宜地选择。也就是说,例如在要定量测定 *FXIIa* 的情况下,用于停止 *FXIIa* 生成的物质,如果使用例如多利凝等的 *FXII* 活化阻断剂及特异阻断血浆血管舒缓素的阻断剂,优选对 *FXIIa* 无实质性影响的血浆血管舒缓素阻断剂,如 *SBTI* (*Soy Bean Trypsin InhiBitor*: 来源于大豆的胰蛋白酶抑制剂)等,就可以很好地对使用相对于 *FXIIa* 的基质并以 *FXIIa* 的酶活性作为指标而生成的 *FXIIa* 进行定量测定。

此外,在定量测定血浆血管舒缓素的情况下,用于停止血浆血管舒缓素生成的物质,如果使用例如对 *FXIIa* 有特异作用的阻断剂,优选对血浆血管舒缓素无实质影响的阻断剂,如 *LBTI* (*Lima Bean Trypsin Inhibitor*: 来源于 Lima 豆的胰蛋白酶抑制剂)、*CHFI* (*Corn Hageman Fragment Inhibitor*: 来源于玉米的 *Hageman Frage-*

ment 抑制剂)等,就可以很好地对使用相对于血浆血管舒缓素的基质,以血浆血管舒缓素的酶活性作为指标而生成的血浆血管舒缓素进行定量测定。

进而,作为生成的生理活性物质,在定量测定血管舒缓激肽的情况下,可以采用能停止血管舒缓激肽生成的物质,例如将 *HK* 限定分解从而具有使血管舒缓激肽游离的作用的血浆血管舒缓素和相对于 *FXIIa* 的上述阻断剂,或丙酮、乙醇等有机溶媒或盐酸、高氯酸等酸。

用于使这些生理活性物质生成停止的物质的浓度,可以在对各生理活性物质定量测定时不产生实质性影响的浓度范围内适宜地设定。

已生成的生理活性物质的定量测定,可按照已经惯用的测定法进行。作为 *FXIIa* 的生成量测定方法,例如可例举利用 *FXIIa* 的酶活性并采用相对于 *FXIIa* 的基质进行测定的方法,除了血浆前血管舒缓素、*FXII* 或血纤维蛋白酶等天然基质外,使用 *D-Pro-phe-Arg-pNA*、*D-Leu-Gly-Arg-pNA* 等发色合成基质和 *Boc-Glu(OB₂)-Gly-Arg-MCA*、*Boc-Gln-Gly-Arg-MCA* 等荧光合成基质等的方法是简便的并且经常使用。

对已生成的血浆血管舒缓素进行定量测定时,也可以例举使用 *FXII* 或 *HK* 等天然基质,或 *D-Pro-Phe-Arg-pNA*、*Bz-Pro-Phe-Arg-pNA* 等发色合成基质和 *Z-Phe-Arg-MCA* 等萤

光合成基质等的方法。

除上述使用基质的测定法外，还可以利用采用放射免疫测定法(RIA)和酶免疫测定法(EIA)等免疫学的测定法，色谱法等定量分析法。

此外，作为对已生成的血浆血管舒缓激肽进行定量测定的方法，可以例举生物测定法，PIA, EIA等惯用的方法，也可以根据被检物质的数量，测定设施的设备，要求的测定精度等诸条件来选择适宜的方法。

在以下实施例中更详细地说明本发明。但以下实施例仅仅是用于说明本发明的实例，并不具有限定的意义。

实施例 1

在由 6n MFXII、35nM 血浆前血管舒缓素、10nMHK 及规定量的被检物质(被检药)，以及含 TritonX-100、BSA 和 100mMNaCl 的 25mM 三盐酸缓冲液(pH8)组成的溶液中，添加葡聚糖硫酸使其最终浓度为 5 μ g/ml 混合之，然后在冰水中培养后，在反应液中添加 LBTI 使其最终浓度为 20mg/ml。将该反应液，于三盐酸缓冲液(pH8)中，与 1mMD-Pro-Phe-Arg-pNA(合成基质)一起在 30 $^{\circ}$ C 下培养 30 分钟后，添加柠檬酸使反应停止，以 3000rpm 经 10 分钟离心分离后，测定所得上清液在 405nm 处的吸光度(相当于血浆血管舒缓素生成量)。

实施例 2

除了使用 0.6nM 的 FXII 外,按照与实施例 1 同样的方法测定在 405nm 处的吸光度。

图 1 中示出,将实施例 1(●)及实施例 2(▲)中的培养时间进行种种变化时的吸光度变化情况。图中,横轴表示培养时间(分),纵轴表示在 405nm 处的吸光度。实施例 1 的情况下,培养时间直到 7 分钟左右,血管舒缓素随时间的生成大致成直线地增加,约 7 分钟后生成达到饱和,因此培养时间最好设定在 0—7 分钟之间。实施例 2 的情况下,可以将血管舒缓素生成量达到饱和的时间延长至 30 分钟。而且,在实施例 2 中,血浆前血管舒缓素的量与实施例 1 相同,因此最终可能测定的吸光度强度,可以得到 0.4 和实施例 1 的情况相同的强度。

在先有技术的血浆血管舒缓素·激肽系中使用动物血浆的情况下,为了将 FXII 的量减少至 10 分之 1,要将动物血浆稀释 10 倍,与此相应,血浆前血管舒缓素的量也减少至 10 分之 1,最终测定的吸光度的强度也降低到 10 分之 1,这几乎不可能测定。

图 2 中示出,使用本发明的活性测定法,测定用作镇痛剂和抗变应性剂的 5 种被检药(吲哚美辛、凯托洛芬、氨基比林、凯托替芬以及 DSCG)的血浆血管舒缓素生成阻断活性的测定结果。图中,横轴表示被检药浓度(mM),纵轴表示血管舒缓素生成阻断率(%)。

利用再构成的血浆血管舒缓素·激肽系的本发明活性测定法,是实质上排除了其它夹杂因子的反应系,因此没有必要去考虑可能

对血浆血管舒缓素·激肽系带来影响的某些因子和未知成分影响等来控制反应,这样就可以简便迅速而且正确地测定在血浆血管舒缓素·激肽系中相对于生成的生理活性物质的生成的被检物质的纯粹活性(促进能或阻断能)。

本发明的活性测定法中,使用了实质上精制的各构成成分来代替先有技术的血浆血管舒缓素·激肽系中使用的动物血浆,因此与使用动物血浆的情况相比,具有如下例示的各种优点。

①由于可自由调节各构成成分的量,因而可根据被检物质的数量 and 要求的精度来适宜地选择反应系中的反应时间、反应温度、吸光强度等。

②可以基本上忽视动物血浆中存在的 α_2 巨球蛋白、C1—抑制素等内因性抑制素和激肽酶等的影响,而且也可以不考虑可能给反应带来影响的某些动物血浆中的因子和其它未知物质,因而可以单纯而又正确地测定相对于血浆血管舒缓素·激肽系中生成的生理活性物质生成的被检物质的活性。具体地说,例如测定相对于血管舒缓激肽生成的被检物质的作用时,其优点是没有必要使用激肽酶阻断剂。

③可以抑制由于动物血浆不均匀而导致的反应分散,因而提高了测定精度。

本发明的活性测定法中,在定量测定生成的生理活性物质时,可根据希望适宜地选择各种方法,例如FXII生成阻断能的测定方法,

血浆血管舒缓素生成阻断能的测定方法、血管舒缓激肽生成阻断能的测定方法,因此在测定中自由度大,而且适用范围宽。

而且,本发明的活性测定法是利用了使用实质上精制的各成分并排除夹杂的其它因子的再构成系,因而可从各种角度来筛选具有血浆血管舒缓素·激肽系中相对于各种生理活性物质生成的活性(生成促进能或阻断能)的药剂,可以根据明确而具体的作用机制来筛选药剂,因而对研制治疗各种疾病的新药起很大的作用。

以下简单说明附图。

图1示出,在本发明的实施例1和实施例2中,在各段培养时间的吸光度的变化。

图2示出,使用本发明的活性测定法,对相对于各种被检药的血浆血管舒缓素生成的阻断活性的测定结果。

图3示出,说明血浆血管舒缓素·激肽系的酶反应机制图。

说明书附图

图 1

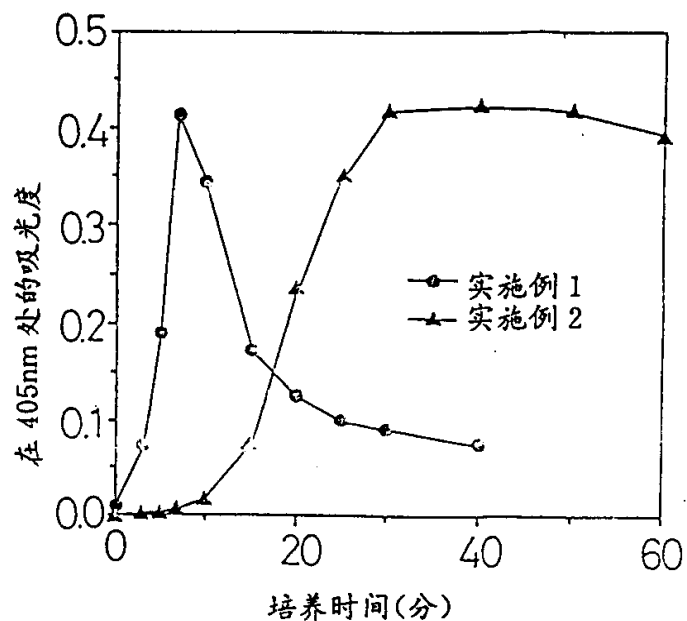


图 2

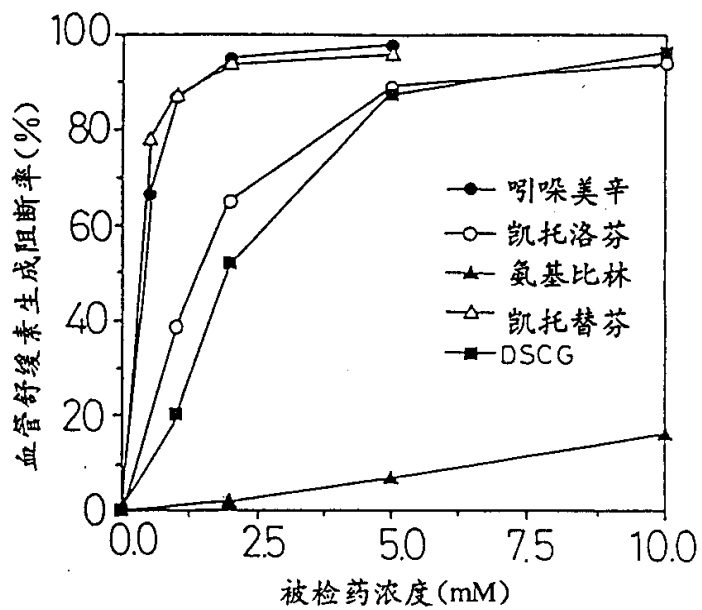


图 3

