

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380107552.2

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/75 (2006.01)

C07K 14/775 (2006.01)

G01N 27/62 (2006.01)

G01N 27/64 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 100384996C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2003.12.24

[21] 申请号 200380107552.2

[30] 优先权

[32] 2002.12.24 [33] JP [31] 371959/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/016600 2003.12.24

[87] 国际公布 WO2004/058966 日 2004.7.15

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.24

[73] 专利权人 日东纺绩株式会社

地址 日本福岛县

[72] 发明人 野村文夫 曾川一幸 朝长毅

落合武德 岛田英昭 大桥建也

片山胜博

[56] 参考文献

W00186304A2 2001.11.15

CN1350061A 2002.5.22

审查员 邢云龙

[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 程泳

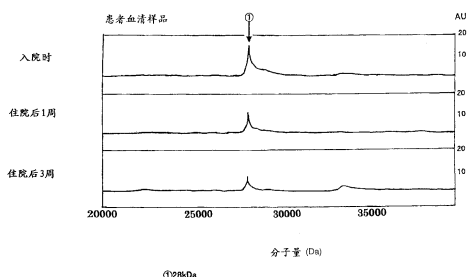
权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 8 页

[54] 发明名称

用于诊断肝脏疾病的标志蛋白质以及使用该
蛋白质诊断肝脏疾病的方法

[57] 摘要

使用蛋白质芯片技术,对生物学样品例如血清进行蛋白质组分析。因而,随着饮酒习惯显示了升高或降低的如下蛋白质:作为人纤维蛋白原 α -E 链分解产物并具有 5,900 分子量的蛋白质、作为载脂蛋白 AII 并具有 7,800 分子量的蛋白质以及作为载脂蛋白 AI 分解产物并具有 28,000 分子量的蛋白质被首次发现。通过检测或定量分析这些蛋白质,例如,一个有饮酒问题的研究对象的肝脏疾病能在早期被诊断出来。



1. 一种诊断肝脏疾病的标志蛋白质，其为人纤维蛋白原 α -E 链分解产物并具有 5,900 分子量的蛋白质，具有如序列列表中 SEQ ID N0: 1 显示的氨基酸序列。

2. 权利要求 1 的标志蛋白质用于制备诊断肝脏疾病发作的可能性、诊断肝脏疾病或肝脏疾病的预后的诊断剂的用途。

3. 根据权利要求 2 的用途，其中所述肝脏疾病是饮酒造成的肝脏疾病。

4. 根据权利要求 3 的用途，其中所述肝脏疾病是酒精性肝异常或酒精依赖性。

5. 根据权利要求 2 的用途，其中诊断剂是针对所述用于诊断样品中肝脏疾病的免疫测定法中标志蛋白质的抗体。

6. 根据权利要求 5 的用途，其中所述抗体是单克隆抗体。

7. 根据权利要求 5 的用途，其中所述免疫测定法是酶免疫测定法、免疫比浊测定法、乳胶免疫凝集法、电化学发光法或荧光法。

8. 根据权利要求 7 的用途，其中所述免疫测定法是酶免疫测定法。

9. 一种由如序列列表中 SEQ ID N0: 1 显示的氨基酸序列组成的蛋白质。

10. 一种测量权利要求 9 所述蛋白质的方法，其通过抗所述蛋白

质的抗体的使用，通过免疫测定法，测量样品中根据权利要求 9 的蛋白质。

11. 根据权利要求 10 的方法，其中所述免疫测定法是酶免疫测定法、免疫比浊测定法、乳胶免疫凝集法、电化学发光法或荧光法。

12. 根据权利要求 11 的方法，其中所述免疫测定法是酶免疫测定法。

用于诊断肝脏疾病的标志蛋白质以及 使用该蛋白质诊断肝脏疾病的方法

技术领域

本发明涉及一系列血清蛋白质，其被发现伴随饮酒习惯会升高或降低，并因此被用作诊断肝脏疾病的标记蛋白质，以及使用蛋白质芯片技术的血清样品的蛋白质组分析；还涉及通过检测或定量上述蛋白质诊断例如问题酗酒者肝脏疾病发作、肝脏疾病、肝脏疾病诊断等等的可能性的方法。

背景技术

诊断酒精引起器官疾病的第一步是了解准确的饮酒史，但是酒精依赖被称为否认性疾病，也就是在所有年纪和国家的成癖酗酒者不准确地报告他（或她）的酒精摄取。所以，证实酒精摄取的客观标志物是必需的。最常测量的饮酒习惯的指标物是 γ -GTP（ γ -谷氨酰转移酶，GGT）。然而，就算酗酒者具有高的GGT水平，GGT水平也不总是与肝炎的严重程度或酗酒者累积酒精摄取相关。另外，饮酒后GGT水平的改变是依赖于个体的，并且有相当多的所谓无反应者在饮大量酒精后并未显示GGT的升高。

另一方面，由于非饮酒的原因，GGT在没有饮酒习惯的人也常常升高，例如因为肥胖的有脂肪肝的人或习惯性服用某些药物的人。例如在医院中指导常常给予完全体检，所以具有高GGT水平的人可被草率地判定为酗酒者。所以，链缺失的转铁蛋白(CDT)被北欧的研究者开发用作GGT检查的补充检查，并且它的用途在欧洲和美国文献中被强调。但是，在得到的日本人的结果中，作为饮酒标志物的CDT只允许检测大约10%的GGT非反应者。

乙醇的第一个代谢物乙醛是如此的有反应性以至于它形成多种蛋

白质的乙醛加合物。例如,尝试通过HPLC等等来检测乙醛-血红蛋白加合物。还有一种加合物,被期待作为能够允许估计过去的酒精摄取量的引人注目的标志物,例如在糖尿病情况下的HbA1c。但是,这样的加合物由于其低敏感性,还没有被投入实际使用。

饮酒习惯是慢性肝炎的两个主要原因之一。关于日本肝纤维化的病例,仅仅由于酒精本身造成的病例的百分比被认为仅在10至15%。然而,这个主要是得自大学的医院等等的的数据。考虑到存在的酗酒者的数目估计多于2,000,000,推测有很多没有机会获得在医疗机构体检的潜在性肝炎患者。另外,既然饮酒习惯是脑出血、高血压、痛风等等恶化的一个因素,那么问题酗酒者的早期和精确的筛选是非常重要的。然而,如上所述,现存的所谓饮酒的标志物中没有具有决定性灵敏性和特异性的标志物,并且因此寻找新型标志物是期望的。

全面表达蛋白质分析的一般方法是二维蛋白质电泳,但是这个方法在低分子量蛋白质或肽的检测上是不利的。近年来,包含表面增强激光解析离子化(SELDI)和飞行时间质谱的联合的蛋白质芯片技术被美国Ciphergen Biosystems公司开发,并且已经开始用于临床,例如检测新型肿瘤标志物。

所以,通过这样的蛋白质组技术等等的利用全面寻找新型标志物是期望的。

发明公开

本发明目的在于找到能够允许问题酗酒者等等肝脏疾病的早期和精确筛选的新型标志物,建立测量所述标志物的系统以及在医学治疗中利用所述标志物。

本发明者对上述问题进行了集中研究,从而完成了本发明。那就是本发明者成功地鉴别出新型的血清蛋白质,通过周期性采集自为戒酒住院的酗酒者血清样品的使用,每一个血清蛋白质显示了与饮酒习惯相关的升高或降低。本发明者发现这些血清蛋白质可被用作诊断肝脏疾病的标志物蛋白质,由此完成了本发明。

据此,本发明涉及选自如下的诊断肝脏疾病的标志物,其为人类纤维蛋白原 α -E链分解产物(具有5,900的分子量的蛋白质)(5.9 kDa蛋白质),载脂蛋白AII分解产物(具有7,800的分子量的蛋白质)(7.8 kDa蛋白质),载脂蛋白AI(具有28,000的分子量的蛋白质)以及具有与作为诊断肝脏疾病的标志蛋白质之上述蛋白质相同功能的这些蛋白质的变异体。

另外,本发明涉及用于诊断肝脏疾病发作的可能性、肝脏疾病或肝脏疾病预后的方法,其是通过检测或量化得自被怀疑有肝脏疾病的病人的样品中诊断肝脏疾病的上述任何一个标记蛋白质。

更进一步地,本发明涉及具有如序列列表中SEQ ID NO: 1显示的氨基酸序列的新型蛋白质,或其具有与作为诊断肝脏疾病的标志蛋白质之所述蛋白质相同功能的变异体,所述变异体是与所述氨基酸序列有90%或更高同源性的蛋白质,或具有通过在如SEQ ID NO:1显示的氨基酸序列中一个或多个氨基酸残基的缺失、替代或添加形成的氨基酸序列的蛋白质。

还要更进一步地,本发明涉及具有如序列列表中SEQ ID NO:2显示的氨基酸序列的新型蛋白质,或其具有与作为诊断肝脏疾病的标志蛋白质之所述蛋白质相同功能的变异体,所述变异体是与所述氨基酸序列有90%或更高同源性的蛋白质,或具有通过在如SEQ ID NO:2显示的氨基酸序列中一个或多个氨基酸残基的缺失、替代或添加形成的氨基酸序列的蛋白质。

此外,本发明涉及使用抗待测蛋白质或变异体的抗体通过免疫测定测量上述蛋白质或其变异体中任何一个的方法。

附图简述

图1显示了通过利用得自CIPHERGEN Biosystems公司的蛋白质芯片系统通过SAXII芯片的使用得自酒精性肝异常患者的血清的测量结果。从峰高的降低能够看出血清中28 kDa蛋白质(载脂蛋白AI)的水平随着时间缓慢降低,顺序依次是入院时的水平,住院1周后的水平和住院3个

月后的水平。

图2显示了以与图1中相同的方式通过WCXII芯片的使用得自酒精性肝异常患者的血清的测量结果。能够看到(1)5.9 kDa蛋白质和(2)7.8 kDa蛋白质的血液水平随着治疗时间由入院时的血液水平而升高。

图3显示了以与图1相同的方式通过WCXII芯片的使用得自酒精性肝异常患者的血清的测量结果。(1) 5.9 kDa蛋白质和(2)7.8 kDa蛋白质的血液水平很明确是高水平的,并且图2和图3之间的比较指出所述疾病使这些蛋白质降低。

图4显示了通过SDS-PAGE 7.8 kDa蛋白质和28 kDa蛋白质的电泳结果。能够看出所述样品分别含有目的蛋白。

图5显示合成5.9 kDa蛋白质的质谱数值和HPLC数据。能够看到质谱数值与理论值相符。

图6显示了通过利用得自CIPHERGEN Biosystems公司的蛋白质芯片系统通过WCXII蛋白质芯片矩阵的使用将合成5.9 kDa蛋白质的数据与不饮酒患者的血清数据比较的结果。它们两个都显示了在5.9 kDa的高峰并且它们显示了相同的行为。

图7显示了利用得自CIPHERGEN Biosystems公司的蛋白质芯片系统通过WCXII蛋白质芯片矩阵的使用,在源自酒精摄入量不同的每一个健康人和患者的血清样品的情况下5.9 kDa峰高的测量结果。发现峰高依赖于酒精摄取量而降低。

图8显示了通过使用含有不同浓度5.9 kDa蛋白质的样品通过EIA法(夹心ELISA法)的使用测量吸光度的结果。横坐标轴指的是5.9 kDa蛋白质的浓度,纵坐标轴指的是测量的吸光度。吸光度依赖于5.9 kDa蛋白质的浓度而增加。就是说,这个结果指出样品中5.9 kDa蛋白质的浓度可以用EIA法进行测量。

实行发明的模式

本发明在下面有更详细的解释。

由本发明发现的可被用作诊断肝脏疾病的标志蛋白质之所述蛋白

质是人纤维蛋白原 α -E链的分解产物(具有5,900的分子量的蛋白质)(下文中被提为5.9 kDa蛋白质),载脂蛋白AII分解产物(具有7,800的分子量的蛋白质)(下文中被提为7.8 kDa蛋白质),载脂蛋白AI(具有28,000的分子量的蛋白质)(下文中被提为28 kDa蛋白质)。所述5.9 kDa蛋白质、所述7.8 kDa蛋白质和所述28 kDa蛋白质是具有如序列列表中SEQ ID NO:1、2和3分别显示的氨基酸序列的蛋白质。

各个蛋白质在下面有解释。所述5.9 kDa蛋白质是人纤维蛋白原 α -E链分解产物,包含54个氨基酸并具有5904.2的理论分子量。所述7.8 kDa蛋白质是人载脂蛋白AII分解产物,包含68个氨基酸并具有7753.8的理论分子量。所述28 kDa蛋白质是载体蛋白AI,包含243氨基酸并具有28078.8的理论分子量。至于上面蛋白质中的5.9 kDa蛋白质和7.8 kDa蛋白质,本发明第一次阐明了它们存在于血液中并且它们在肝炎中的临床重要性等等。5.9 kDa蛋白质和7.8 kDa蛋白质是新的蛋白质和新的标志物质。载脂蛋白AI,28 kDa蛋白质是已知的蛋白质,它在脂质代谢中的临床重要性已经建立,并且迄今其临床测量已经被实行。

本发明发现的可作为诊断肝脏疾病的标志蛋白质之5.9 kDa蛋白质、7.8 kDa蛋白质和28 kDa蛋白质并不局限于具有如序列列表中显示的氨基酸序列的蛋白质,还可以是与诊断肝脏疾病的标志蛋白质起相似功能的这些蛋白质的变异体。就是说,要充分地考虑到5.9 kDa蛋白质、7.8 kDa蛋白质和28 kDa蛋白质特别是在血液和组织中非常易于被各种内源或外源蛋白酶降解,导致氨基酸全长和序列长度的改变。在生产重组蛋白质中,当然为了不降低表达效率,应当允许最小可能能够改变抗原性的氨基酸变异。所以,还可以使用的有本发明的5.9 kDa蛋白质、7.8 kDa蛋白质和28 kDa蛋白质的变异体,所述变异体是与本发明的每一个蛋白质的氨基酸序列有90%或更高的同源性(此处,术语“同源性”意味着氨基酸的相同)。任何一个变异体的氨基酸序列可以具有改变了15%或更少的长度,并且当其功能是诊断肝脏疾病的标志蛋白质时本发明也包括这样的变异体。所述变异体优选的是具有95%或更高同源性、更加优选98%或更高同源性的蛋白质。氨基酸序列的同源性可以用众所

周知的软件进行查询，例如通过采用 Wilber, W.J., Lipman, D.J., et al. (Proc. Natl. Sci. USA, 80, 726-730, 1983)的方法中描述的参考方法作为原理得到的软件。另外，GENETYX（软件开发有限公司）等等是商业一般目的的软件，并且很容易被利用。

为本发明的诊断肝脏疾病的标志蛋白质的5.9 kDa蛋白质、7.8 kDa蛋白质和28 kDa蛋白质之变异体也可以是如下的变异体，所述变异体是具有如SEQ ID NO: 1、2和3中显示的每一个氨基酸序列中一个或多个氨基酸氨基的缺失、替代或添加形成的氨基酸序列并且具有与上面作为诊断肝脏疾病的标志蛋白质的三个蛋白质的功能相同的功能。作为这样的变异体，有通过原先氨基酸序列中的氨基酸残基少于10%、优选少于5%、更加优选少于2%的修饰得到的如示例的蛋白质。氨基酸残基的修饰可以通过一般本领域技术人员已知的基因技术作为氨基酸变异而被引入。本发明还包括通过众所周知的修饰例如翻译后修饰、磷酸化、乙酰化、糖链的增加等等而得到的变异体。

肝脏疾病的诊断基于本发明发现的并在上面解释的诊断肝脏疾病的标记蛋白质成为可能。就是说，肝脏疾病发作的可能性、肝脏疾病或肝脏疾病的诊断可以通过检测或定量分析得自被怀疑有肝脏疾病的患者的样品中上述诊断肝脏疾病的标志蛋白质来进行诊断。

作为本发明中可使用的样品，有作为示例的收集自被怀疑有肝脏疾病的患者的血清、血浆、血液和尿。

目前已知的所有方法可以被采用于检测或定量分析本发明的诊断肝脏疾病的标记蛋白质。所述方法包括，例如，质谱法、免疫测定法、电泳法、液相色谱（LC）法和气相色谱（GC）法。

作为质谱法，使用激光解析/电离-飞行时间质谱仪（LDI-TOF MS）的方法被用作示例。作为激光解析/电离-飞行时间质谱仪，有表面增强激光解析/电离-飞行时间质谱仪（SELDI-TOF MS法）和基质辅助激光解析/电离-飞行时间质谱仪（MALDI-TOF MS法）可以作为示例。

例如，当SELDI-TOF MS法被采用时，Ciphergen Biosystems公司开发的蛋白质生物学系统II型质谱仪（Ciphergen Biosystems公司）可被

使用。这个仪器基于包含SELDI（表面增强激光解析电离）和飞行时间质谱仪的联合的蛋白质芯片技术。所述仪器的详细资料公开在国际发表号WO 01/25791 A2、JP-A-2001-28122等等。通常，在SELDI-TOF MS法中，样品被预处理，吸附在芯片上，并然后上样到SELDI-TOF MS质谱仪。当所述样品是血清时，通过使用白蛋白的吸附剂或者用缓冲溶液冲洗所述系统直到因为离子交换芯片白蛋白拥有的电荷被终止以去除白蛋白是优选的。

在这样的方法中使用的所述蛋白质芯片只要它能吸附本发明的诊断肝脏疾病的标志蛋白质就并不被特别地限制。作为蛋白质芯片，可以有被用作实施例的其中具有疏水性或对蛋白质有亲和力的功能性基团（例如离子交换特性）已被修饰的芯片（也被提为化学芯片），以及有抗目的蛋白质的抗体的被固定在其上芯片（生化芯片）。

作为另一个质谱法，使用ESI法（电子喷雾离子化）的质谱法被作为示例。在ESI法的情况下，将经过预处理例如蛋白酶处理的样品上样到直接连接于分离工具例如高效液相色谱的质谱仪上常常是优选的。

作为免疫测定法，有可以用作实施例的如下的免疫测定法，其中迄今已知的蛋白质通过制备抗任何一个本发明的诊断肝脏疾病的标志蛋白质之多克隆或单克隆抗体进行测量。这样的免疫测定法包括酶免疫测定法(EIA法)、免疫比浊测定法(TIA法)、乳胶免疫凝集法（LATEX法）、电化学发光法、荧光法等等。免疫色谱法和使用试纸的方法也是有效的。所有这些方法对本领域的技术人员一般是已知的，并且这些一般已知的方法可以按照它们本身被采用。

作为上述免疫测定法中可使用的抗体，有被作为示例的通过通常使用的方法制备的多克隆或单克隆抗体。这些抗体可以通过使用源自人血的纯化蛋白质，特别是28 kDa 蛋白质、7.8 kDa蛋白质或5.9 kDa蛋白质作为免疫原（抗原）而获得。尽管这些用于制备所述抗体的蛋白质可以从人血中通过纯化而获得，它们也可以通过采用众所周知的肽合成技术通过化学合成而获得。除了这些抗原以外，培养细胞产生的蛋白质也可以被用作抗原。另外，通过基因工程制备的全长重组蛋白质，其变异

体，或所述重组蛋白质或所述变异体的一部分的采用也是经常用的测量方法，并且这个测量方法可被利用。

克隆抗体通过如下得到的杂交瘤而被生产，用例如任何一个上面作为实施例的各种抗原免疫，例如28 kDa 蛋白质、7.8 kDa蛋白质和5.9 kDa蛋白质，也就是所述标志蛋白质的免疫原免疫动物，并然后将源自脾等等的生产抗体的细胞动物融合进骨髓瘤细胞。

所述杂交瘤可以通过下列方法获得。就是说，如上所述得到的抗原（例如标志蛋白质）与众所周知的辅佐剂例如弗氏完全佐剂或不完全佐剂、氢氧化铝佐剂、百日咳杆菌佐剂等等混合以制备用于增敏的佐剂液体，并且这个液体通过腹腔皮下或尾静脉给予动物（例如小鼠或大鼠），分几部分间隔1-3个星期来免疫所述动物。尽管用于增敏的抗原的量通常挑选在1 μ g至100mg的范围内，一般优选的是50 μ g。尽管免疫操作数一般是2至7，但是各种方法是已知的。随后，源自脾等等的生产抗体细胞在试管内与骨髓瘤细胞融合。至于融合的方法，所述融合可以通过本身已经众所周知的Köhler和Milstein (Nature, 256, 495, 1975)的方法通过聚乙二醇（PEG）的使用来进行。所述融合也可以通过仙台病毒的使用或通过电融合法来进行。

至于从融合的细胞挑选能够生产能识别所述标志蛋白质的抗体的杂交瘤之方法，所述挑选可如下进行。就是说，杂交瘤选自在有限稀释的融合细胞的HAT培养基和HT培养基中存活的细胞所形成的克隆。当抗所述标志蛋白质的抗体被包含在由接种于96孔板等等的融合细胞形成的任何一个克隆的培养基的上清液中时，能够生产抗所述标志蛋白质的单克隆抗体的克隆可以通过ELISA法进行挑选，其中所述上清液被放在有所述标识蛋白质固定在其上的测定板上，并且在反应之后，第二标记抗体例如抗小鼠免疫球蛋白-HRP标记的抗体与上述抗体反应。作为所述标记抗体的标记物质，除HRP以外可以使用的有酶（例如碱性磷酸酶）、荧光物质、放射活性物质等等。抗所述标志蛋白质的特异性抗体的筛选可以通过使用仅有作为阻断试剂的BSA结合于其上的测定板作为对照的ELISA和上述的ELISA分别同时进行。就是说，在有标志蛋白

质固定于其上的任何一个板中分别为阳性并且在使用BSA的ELISA法中为阴性的克隆被挑选出来。

例如,本发明者建立的杂交瘤CN-1和CN-2是能够特异性识别人5.9 kDa蛋白质的克隆并且是优选的实施例。杂交瘤CN-1和CN-2在专利生物保藏中心(IPOD), 工业技术总研究所(独立的行政法人), Chuo-dairoku, Higashi 1-1-1, 筑波市, 茨城, 日本305-8566被保藏: 杂交瘤CN-1在2003年12月12日被保藏, 保藏号IPOD FERM BP-08564, 杂交瘤CN-2在2003年12月12日被保藏, 保藏号IPOD FERM BP-08565。

所述杂交瘤通常培养在用于细胞培养的培养基上, 例如 α -MEM、RPMI1640、ASF、S-克隆等等, 并且所述单克隆抗体可以从所属培养基上清中回收。下列也是可能的: 在杂交瘤从之衍生的动物裸鼠先前用降植烷处理之后, 为了引发腹水的蓄积, 细胞被腹腔注射进动物, 单克隆抗体从腹水中回收。作为从所述上清或所述腹水中回收所述单克隆抗体的方法, 传统的方法可被采用。作为实施例的有用硫酸铵、硫酸钠等等的盐析、色谱、离子交换色谱以及使用蛋白质A的亲合色谱。

样品中28 kDa蛋白质、7.8 kDa蛋白质和5.9 kDa蛋白质可以通过上面的方法纯化的根据本发明的单克隆抗体的使用进行精确地测量。作为通过EIA法测量样品中28 kDa蛋白质、7.8 kDa蛋白质或5.9 kDa蛋白质的方法, 可以被采用有使用一个或多个抗所述标志蛋白质的单克隆抗体的本身众所周知的方法。所述方法的一个示例描述如下。首先, 抗所述标志蛋白质的单克隆抗体(许多单克隆抗体)通过利用物理结合、化学结合或亲合直接或间接地结合于本身众所周知的固相(例如聚苯乙烯、聚丙烯、聚碳酸酯、聚乙烯、尼龙或聚甲基丙烯酸酯)。增敏抗体的量通常在从1ng至100mg/ml的范围内。样品被加入到通过物理结合、化学结合或亲合结合于所述固相的单克隆抗体(多个抗克隆抗体)以进行反应。在一定的反应时期后, 所述固相被清洗, 并且相应的第二标记抗体(例如抗28 kDa蛋白质的第二标记抗体、抗7.8 kDa蛋白质的第二标记抗体或抗5.9 kDa蛋白质的第二标记抗体)被加入以进行第二反应。所述固相再次被清洗, 并且DAB产色的底物等等被加入以进行反应。当

HRP被用作标记物质时, 已知的底物例如DAB、TMB等等可被使用。所述标记物质不局限于HRP。作为所述标记物质, 作为示例的有不但包括酶也包括标记金属(例如金胶体和铑)、各种化学或生物荧光物质(例如FITC、罗丹明、Texas Red、Alexa和GFP)和放射活性物质(例如 ^{32}P 和 ^{51}Cr)的所有可识别的物质。

所述标记蛋白质也可以通过上述免疫测定法以外的方法进行测量, 例如电泳法、液相色谱(LC)法、气相色谱(GC)法等等。这些方法对本领域的技术人员一般还是已知的并且这些一般已知的方法可以按照它们本身被采用。

通过上面解释的方法, 肝脏疾病发作的可能性、肝脏疾病或肝脏疾病的预后可以通过检测或定量分析得自被怀疑有肝脏疾病的患者的样品中诊断肝脏疾病的标志蛋白质进行诊断。当本发明的诊断方法通过上述质谱被实行时, 所述诊断也可以通过分析得自质谱仪的波谱模式来进行。本发明的诊断方法允许习惯性酗酒者或问题酗酒者肝脏疾病发作的可能性的诊断, 饮酒造成的肝脏疾病例如肝炎、肝纤维化等等的诊断, 以及平常肝脏疾病的诊断。此外, 它还允许例如肝脏疾病治疗进程的诊断。本发明的诊断方法特别适合用于酒精性肝异常、酒精依赖性等等的诊断。本发明参考下面的实施例有更进一步详细地阐述, 这不应当被解释为限制本发明的范围。

实施例1

通过SAXII蛋白质芯片矩阵的使用对诊断肝脏疾病的标志蛋白质的鉴别

使用得自得到了通知同意书的患者的血清, 血清中肝炎的新型标志物通过SAXII蛋白质芯片矩阵(Ciphergen Biosystems公司)的使用进行搜索。所述SAXII芯片指的是一种强阴离子交换芯片并且特征在于它与样品中带负电荷的物质结合。有酒精性肝异常患者入院后立即收集的血清、戒酒后1周的血清和戒酒后3个月的血清以及正常人的血清被用作样品。

(1) 方法

所述蛋白质芯片矩阵的实验室操作方法简述如下。每一个血清样品用8M尿素 (SIGMA) /1% CHAPS(SIGMA)溶液稀释10倍。冰上处理10分钟后, 血清样品进一步用50mM Tris (SIGMA)缓冲液(pH 9.0)稀释10倍并且在4,000 rpm离心5分钟, 上清液被用作稀释的样品。试验通过将SAXII芯片连于生物处理器 (bioprocessor) 来进行。通过这样的方法, 大容量的稀释样品可以被应用。

首先, 150 μ L的50 mM Tris缓冲液(pH 9.0)被加入到在其上有孔的所述芯片, 并且芯片在振摇器上清洗5分钟。在此过程进行两次之后, 100 μ L先前得到的稀释的样品被加入到芯片并且在室温下振摇20分钟以与芯片反应。然后, 稀释的样品被去除, 并且150 μ L的50 mM Tris缓冲液(pH 9.0)被加入到芯片, 之后在振摇器上清洗5分钟。这个过程重复三次。其后, 芯片用400 μ L蒸馏水清洗2次, 并且然后从所述生物处理器上去除。芯片干燥后, 每个有一个蛋白质粘附在其上的点被PAPen(Zymed)环绕并且0.5 μ L的芥子酸 (sinapinic acid) (CIPHERGEN Biosystems公司)在50%乙腈 (Wako) 和0.5% 三氟醋酸 (TFA) (Wako) 中的饱和溶液被两次加入到所述点。如此制备的蛋白质芯片矩阵用蛋白质生物系统II型质谱仪 (CIPHERGEN Biosystems公司) 读取。

(2) 结果

图1显示得自有酒精性肝异常患者入院时的血清的一般测量数据。在这个数据格式中, 横坐标轴指的是从所述SAXII蛋白质芯片分开的每一个样品中的蛋白质的分子量, 纵坐标轴指的是反映了分析物在前述分子量处到达检测器的量的最高峰。所以, 从图1非常明显地发现, 由于有28 kDa分子量的蛋白质而产生的最高峰在有酒精性肝异常的患者入院时被观察到, 但是在入院后几乎观察不到。据此, 发现肝脏疾病可以通过使用这个28 kDa蛋白质作为指示进行诊断。

实施例2

通过WCXII蛋白质芯片矩阵的使用对诊断肝脏疾病的标志蛋白质

的鉴别

其次,使用与实施例1完全相同的样品,血清中肝炎的新型标志物通过WCXII蛋白质芯片矩阵(Ciphergen Biosystems公司)的使用进行搜索。所述WCXII芯片指的是弱阳离子交换芯片并且特征在于它结合于样品中带正电荷的物质。

(1) 方法

所述蛋白质芯片矩阵的实验室操作方法简述如下并且与实施例1中的方法基本相同。每一个血清样品用8M尿素(SIGMA)/1% CHAPS(SIGMA)溶液稀释10倍。冰上处理10分钟后,血清样品进一步用50mM 醋酸钠(SIGMA)缓冲液(pH 6.5)稀释10倍并且在4,000 rpm离心5分钟,上清液被用作稀释的样品。试验通过将WCXII芯片连于生物处理器来进行。首先,150 μ L的50 mM 磷酸钠缓冲液(pH 6.5)被加入到在其上有孔形成的所述芯片,并且芯片在振摇器上清洗5分钟。在此过程进行两次之后,100 μ L先前得到的稀释的样品被加入到芯片并且在室温下振摇20分钟以与芯片反应。然后,稀释的样品被去除,并且150 μ L的50 mM 磷酸钠缓冲液(pH 6.5)被加入到芯片,之后在振摇器上清洗5分钟。这个过程重复三次。其后,芯片用400 μ L蒸馏水清洗2次,并且然后从所述生物处理器上去除。芯片干燥后,每个有一个蛋白质粘附在其上的点被PAPen(Zymed)环绕并且0.5 μ L的芥子酸(Ciphergen Biosystems公司)在50%乙腈(Wako)和0.5% 三氟醋酸(TFA)(Wako)中的饱和溶液被两次加入到所述点。如此制备的蛋白质芯片矩阵用蛋白质生物系统II型质谱仪(Ciphergen Biosystems公司)读取。

(2) 结果

图2显示得自有酒精性肝异常患者入院时的血清的一般测量数据。图3显示正常人的测量数据。下列被发现:从图3很明显地,在5,900 Da分子量(所述 5.9 kDa蛋白质)和7,800 Da分子量(所述7.8 kDa蛋白质)的最高峰在正常人的数据中很高,但是这些最高峰在显示于图2的数据中,即有酒精性肝异常的患者一入院的数据,几乎观察不到。由于所述5.9 kDa蛋白质和所述7.8 kDa蛋白质的峰高随着治疗过程增加并且明显地

指出了治疗的效果。发现这些蛋白质可以被用作诊断肝脏疾病的标志蛋白质。

实施例3

28 kDa蛋白质的鉴别

(1) 通过SAXII蛋白质芯片试验发现的28 kDa蛋白质用FPLC Pharmacia LKB (Amersham Pharmacia Biotech AB)通过HiTrap Q柱的使用在下列条件下被纯化: 50 mM Tris缓冲液(pH 9.0)以及2ml/min的流速。因而, 目的28 kDa蛋白质作为基本单一部分能被纯化。这个部分通过如下的电泳被证实。所述部分与2x样品缓冲液(0.25 M Tris盐酸 (pH 6.8), 4% SDS, 20%甘油, 0.01%溴酚蓝和10% β -巯基乙醇)以1: 1比例混合并且在90°C处理2分钟。如此处理的所述部分被用来进行电泳。所述电泳通过15至25%的聚丙烯酰胺梯度凝胶(Perfect NT Gel System Products)的使用在10mA下进行。

(2) 如图4中第4和5泳道显示, 通过使用Coomassie Tablet R-350(Phast GI Blue R)的考马斯亮蓝染色一个在相应于28 kDa位置的条带被证实。

(3) 然后, 凝胶的条带被切割下来并且肽通过胶体内水解方法进行分离。简单地说, 通过切割得到的一片所述凝胶清洗两次并且然后用胰酶在35°C处理过夜。其后, 用胰酶处理的样品通过反相HPLC进行纯化。至于纯化的条件, 用0.1%三氟醋酸和0.09%三氟醋酸90%乙腈的梯度洗脱通过TSK gel ODS-80Ts QA (TOSOH)柱的使用而进行。

对得到的28 kDa蛋白质片段的内在氨基酸序列进行测定。所述28 kDa蛋白质的氨基酸序列显示为序列列表中的SEQ ID NO:3。作为28 kDa蛋白质片段氨基酸测序的结果, 28 kDa蛋白质在28 kDa蛋白质片段内在氨基酸序列的基础上被发现是人载脂蛋白AI。

(4) 然后, 在与所述芯片试验中使用的相同的血清样品中的载脂蛋白AI的水平通过使用实施例6中描述的已知的自动分析仪的免疫测定法进行测量, 得到了表1中显示的结果。从免疫测定结果发现在得自通

过治疗获得效果的患者的血清中载脂蛋白AI水平在治疗后明显降低。另一方面,如所述蛋白质芯片试验的结果观察到的由于所述28 kDa蛋白质(载脂蛋白AI)产生的峰高通过治疗也降低了,也就是,它反映了治疗的效果。

因而,发现通过所述免疫测定法得到的结果和所述蛋白质芯片试验的结果非常高度相关,预示着峰高可被用于分析发病率。

实施例4

7.8 kDa蛋白质的鉴别

(1)象所述28 kDa蛋白质一样,通过WCXII蛋白质芯片试验发现的7.8 kDa蛋白质用FPLC Pharmacia LKB (Amersham Pharmacia Biotech AB)通过HiTrap CM Sepharose FF柱的使用在下列条件下也从血清样品进行纯化:50mM醋酸铵缓冲液以及2ml/min的流速。因而,目的7.8 kDa蛋白质能够被纯化。有通过所述蛋白质芯片试验证实的7.8 kDa蛋白质在其中的部分通过如下的电泳进行证实。所述部分与含有SDS的2x样品缓冲液以1:1的比例混合并且在90°C处理2分钟。这样处理的所述部分被用在电泳中。电泳通过15至25%聚丙烯酰胺梯度凝胶的使用在10mA进行。

(2)如图4中第2和3泳道各自所示,通过考马斯亮蓝染色在相应于28 kDa的位置的一个条带被证实。如上述28 kDa蛋白质的实施例3,基本只含有7.8 kDa这个蛋白质的部分被浓缩并且然后进行SDS-PAGE,目的7.8 kDa带从凝胶上切割下来,并且肽通过胶体内水解法进行分离。这个方法和实施例3中的方法一样。简单地说,通过切割得到的一片凝胶清洗两次并且然后用胰酶在35°C处理过夜。其后,用胰酶处理的所述样品通过反相HPLC进行纯化。至于纯化的条件,用0.1%三氟醋酸和0.09%三氟醋酸90%乙腈的梯度洗脱通过TSK gel ODS-80Ts QA (TOSOH)柱的使用而进行。

(3)对得到的7.8 kDa蛋白质片段进行氨基酸测序并且在7.8 kDa蛋白质片段的内在氨基酸序列的基础上发现它源自人载脂蛋白AI。然

而，全长人载脂蛋白AI的理论分子量是11432.4。就是说，发现7.8 kDa蛋白质是人载脂蛋白AI分解产物。所述7.8 kDa蛋白质的氨基酸序列显示为SEQ ID NO:2。

实施例5

5.9 kDa蛋白质的鉴别

(1) 通过WCXII蛋白质芯片实验发现的5.9 kDa蛋白质用FPLC Pharmacia LKB (Amersham Pharmacia Biotech AB)通过HiTrap CM Sepharose FF柱的使用在下列条件下从血清样品进行纯化：50mM醋酸铵缓冲液以及2ml/min的流速。因而，目的5.9 kDa蛋白质能够被纯化。对具有高含量5.9 kDa蛋白质的部分通过蛋白质芯片法再次进行检查，浓缩并且然后通过HPLC (TOSOH) 进一步纯化。所述纯化条件如下：Sephasil蛋白质C4柱(Amersham Pharmacia Biotech AB)，乙腈梯度，以及1 mL/min。

(2) 对所述部分通过蛋白质芯片法再次进行检查，通过冷冻干燥进行浓缩并且然后进行氨基酸测序。作为纯化的5.9 kDa蛋白质氨基酸测序的结果，该蛋白质被发现是人纤维蛋白原 α -E链分解产物。就是说，因为全长人纤维蛋白原 α -E链的分子量是72488.3，所述5.9 kDa蛋白质被发现是人纤维蛋白原 α -E链分解产物。所述5.9 kDa蛋白质的氨基酸序列显示为SEQ ID NO:1。

另外，为了证实所述5.9 kDa蛋白质氨基酸序列的精确性，完全并化学合成具有该氨基酸序列的蛋白质。具有54个氨基酸的化学合成的蛋白质的分子量是5904.1，这与理论值一致(图5)。此外，该合成蛋白质与实际的样品作比较。试验通过与实施例2中完全相同的WCXII蛋白质芯片矩阵(Ciphergen Biosystems公司)的使用而进行。在所述试验中，合成蛋白质作为样品在浓度为100ng/mL进行反应并且与所述实际样品相比较。结果显示在图6中。作为结果，由于合成蛋白质产生的最高峰显示了与由于血清样品中5.9 kDa蛋白质产生的最高峰一致的行为。通过这些结果，证实血清中5.9 kDa蛋白质具有如SEQ ID NO:1显示的氨基酸

序列。

实施例6

有酒精性肝异常患者基于本发明诊断肝脏疾病的标志蛋白质与基于肝炎传统标志物的诊断之间的比较

(1) 方法

肝炎传统标志物的测量数值通过使用和上面使用的相同的血清而获得，即16个有酒精性肝异常的住院患者一入院的血清，入院后一周的血清以及入院后三个月的血清。用自动分析仪的测量如下进行。AST, GGT, TG, Apo AI和Apo AII用Hitachi7150分析仪（日立）进行测量。作为试剂，N-assay L GOT (AST) (Nittobo), N-assay L γ -GTP-H (GGT) (Nittobo), N-assay TG L (TG) (Nittobo), N-assay TIA Apo AII-H (Apo AI) (Nittobo)和N-assay TIA Apo AII (Apo AII) (Nittobo)分别被使用。FDP和FDP-E用LPIA-S500 (Diayatron)通过使用预先测定的参数进行测量。在该测量中，LPIA FDP乳胶和LPIA FDP-E乳胶(Teikoku Hormone MFG有限公司)被用作试剂。为了比较，使用蛋白质芯片的测量结果通过基于最高峰的数字值来表达。所述数字值的单位是绝对单位。

(2) 结果

表1显示了因酒精性肝异常住院的患者的普通血清中的下列项目：临床检查生化测量标志物(AST, GGT和TG)的水平，免疫测量标志物(Apo AI, Apo AII, FDP和FDP-E)的水平以及通过蛋白质芯片法本发明肝脏疾病的标志蛋白质的测量结果。在表1从右边起第一和第二纵栏(“FDP-E 5,900 Da” 栏和“Apo AII 7,800 Da”栏)中，显示了通过使用与实施例2中相同的蛋白质芯片法通过测量所述5.9 kDa蛋白质和所述7.8 kDa蛋白质，即本发明的诊断肝脏疾病的标志蛋白质，得到的测量数值。在表1从右边起第六纵栏(“Apo AI”栏)，显示了通过传统方法测量所述28 kDa蛋白质，即本发明的诊断肝脏疾病的标志蛋白质，得到的测量数值。

表2显示了通过测量得自健康人的血清样品中5.9 kDa蛋白质(FDP-E 5,900 Da)和7.8 kDa蛋白质(Apo AII 7,800 Da)，即本发明诊断肝脏疾病的标记蛋白质，得到的测量数值。

表3显示了通过蛋白质芯片法测量有酒精性肝脏疾病的住院患者5.9 kDa 蛋白质和7.8 kDa蛋白质得到的平均测量数值。

Table 1

有酒精性肝异常的患者在戒酒后临床检查数值的改变

		AST U/L	GGT U/L	TG mg/dL	APO AI mg/dL	APO AII Mg/dL	FDP μg/mL	FDP-E ng/mL	FDP-E 5,900Da AU	APO AII 7,800Da AU
No. 1	入院	34	542	672	144	37.3	2.99	110.32	11.7	9.9
	入院后1周	39	559	246	121	27.8	2.76	135.69	24.2	10.9
	入院后3个月	25	121	142	79	17.4	1.63	80.20	20.8	6.1
No. 2	入院	13	9	103	88	15.0	3.57	77.28	0	3.1
	入院后1周	30	16	98	94	15.1	3.69	136.11	1.0	11.7
	入院后3个月	15	3	173	95	20.8	2.65	126.56	1.8	20.0
No. 3	入院	42	68	100	155	38.2	1.37	70.18	0	0
	入院后1周	22	45	91	105	26.0	7.05	592.26	0	1.7
	入院后3个月	18	19	117	104	21.5	15.96	1257.50	0.7	5.0
No. 4	入院	86	1452	150	234	45.0	3.39	93.30	0.5	7.9
	入院后1周	21	701	73	112	26.1	5.24	347.94	3.5	12.6
	入院后3个月	15	24	68	95	17.7	7.27	516.60	17.7	21.1
No. 5	入院	24	74	93	95	21.8	0.31	35.11	0.8	2.4
	入院后1周	23	64	139	86	21.0	1.36	47.86	4.8	16.1
	入院后3个月	35	160	154	80	18.5	3.27	71.87	6.2	18.1
No. 6	入院	44	108	141	149	37.7	1.56	42.53	9.2	12.1
	入院后1周	25	64	117	98	26.0	3.56	248.95	48.0	21.4
	入院后3个月	17	24	109	83	19.3	8.88	743.54	58.0	20.0
No. 7	入院	37	272	119	218	46.5	2.54	90.77	0	0
	入院后1周	27	174	77	157	33.7	2.05	91.00	23.0	18.4
	入院后3个月	19	26	81	95	23.3	1.58	50.95	21.7	10.4
No. 8	入院	40	61	170	183	33.3	3.87	127.00	1.7	3.3
	入院后1周	24	57	65	113	22.7	3.17	189.23	0	5.7
	入院后3个月	22	36	113	101	20.6	2.35	105.10	1.8	6.9
No. 9	入院	20	77	244	114	28.4	4.33	118.19	0	0.4
	入院后1周	25	65	121	109	24.9	50.13	330.58	0	7.1
	入院后3个月	24	36	260	109	24.0	5.33	270.77	1.7	14.0
No. 10	入院								2.0	5.6
	入院后1周	55	232	67	69	18.5	13.52	915.69	8.7	16.1
	入院后3个月	17	41	54	107	20.6	0.87	35.35	1.7	21.4
No. 11	入院	38	81	187	151	34.5	2.82	58.02	15.8	19.3
	入院后1周	20	67	98	116	28.1	6.33	554.17	56.0	26.4
	入院后3个月	22	18	74	104	18.1	15.51	1310.60	52.0	18.6
No. 12	入院	18	37	103	135	24.8	1.91	43.10	0	11.7
	入院后1周	17	31	110	126	19.6	1.78	68.85	0.8	6.4
	入院后3个月	21	32	118	136	22.6	1.03	33.59	1.2	15.0
No. 13	入院	18	31	84	198	30.6	1.99	38.14	12.2	9.4
	入院后1周	100	23	72	154	22.7	6.74	342.92	32.8	13.9
	入院后3个月	17	18	80	180	22.6	14.37	1118.50	45.0	15.0
No. 14	入院	63	44	333	154	39.5	3.07	96.96	0	3.1
	入院后1周	43	39	72	111	27.0	2.50	146.95	0.3	11.0
	入院后3个月	37	26	159	92	23.2	4.73	382.86	0.3	12.1
No. 15	入院	49	86	91	146	28.9	1.35	58.93	13.0	7.0
	入院后1周	19	79	82	83	23.0	2.29	59.44	28.5	17.7
	入院后3个月	22	60	112	86	22.5	2.99	177.59	51.0	18.0
No. 16	入院	29	84	90	162	31.3	3.24	88.54	2.5	1.3
	入院后1周	12	70	118	102	26.6	1.86	84.94	1.7	10.3
	入院后3个月	16	15	96	72	17.0	5.84	213.87	2.0	13.3

表2

健康人中5.9 kDa和7.8 kDa蛋白质的水平

健康人编号 (n=12)	FDP-E	APD A II
	5.9kDa AU	7.8kDa AU
No.1	59.1	35.1
No.2	51.7	32.0
No.3	62.5	42.8
No.4	63.1	44.0
No.5	89.2	95.4
No.6	58.5	42.2
No.7	64.6	45.5
No.8	66.2	44.6
No.9	23.1	56.9
No.10	55.4	51.7
No.11	63.7	52.0
No.12	36.0	24.6

表3

5.9 kDa和7.8 kDa蛋白质的平均水平

	FDP-E	APO A II
	5.9kDa AU	7.8kDa AU
健康人 (n=12)	57.76	47.23
一入院	4.34	6.03
入院后1周	14.58	13.00
入院后3个月	17.73	15.63

病人数(n = 16)

如表1至3显示，一般使用的AST和GGT水平的降低以及这些水平恢复到正常水平范围反映了肝脏治疗效果。然而，在得自被认为是无反应者的患者的第5号样品的情况下，即使当一般使用的GGT水平不能被用作治疗效果的指示时，所述5.9 kDa蛋白质和7.8 kDa蛋白质的血液水

平会升高并且明显地指出治疗的效果。GGT水平不总是与肝炎的严重程度或蓄积酒精摄取相关。另外，饮酒后GGT水平的改变依赖于个体会不同并且有相当数量的所谓无反应者即使在引用大量酒精后并不显示GGT水平的升高。所以，所述新蛋白质被认为在评价这些GGT无反应者的治疗是有效的。

实施例7

酒精摄取和本发明标志蛋白质之间的相关性

通过上述实施例，诊断肝脏疾病的新标志物的有效性就它们的特异性这一点被证实。为了酒精摄取量和所述标志物之间相关性的进一步阐明进行了下列试验。

方法

试验通过仅从健康人和酒精摄取确定的饮酒患者收集样品来进行。在所述试验中，这些研究对象被分成三个试验组，即，作为非饮酒者的健康人组，有相应于1合（Go,日本容积单位）酒酒精摄取的患者组以及有相当于3合酒酒精摄取的患者组。对于这些组，测量通过使用蛋白质芯片法分别进行并且所述组就每一个新标志物相互进行比较。使用蛋白质芯片的测量方法与在实施例1中SAXII蛋白质芯片矩阵和实施例2中WCXII蛋白质芯片矩阵情况下所述的方法完全相同。

结果

结果显示在图7中。作为结果，发现由于所有诊断肝脏疾病的新标志蛋白质分别产生的峰高依赖于酒精摄取而不同。此处，显示了尤其是所述5.9 kDa蛋白质的结果。所述5.9 kDa蛋白质依赖于酒精摄取而降低并且它在有3合的酒精摄取的试验组中降低到基本上无法检测。就是说，发现所述5.9 kDa蛋白质在量上依赖于酒精摄取而不同，并且因此是令人满意地可用来估计酒精摄取量的标志物。还发现所述5.9 kDa蛋白质可被用作酒精依赖性的标志物。

实施例8

单克隆抗体的制备

为了制备抗5.9 kDa蛋白质的单克隆抗体通过使用实施例5中获得的完全合成的5.9 kDa蛋白质作为免疫原进行了下列试验。

(1) 免疫

完全合成的5.9 kDa蛋白质用磷酸盐缓冲液(pH 7.0)稀释到1mg/ml的浓度, 并且50 μ g (50 μ l)的稀释液与50 μ l的弗氏完全佐剂(WAKO)完全混合直到达到乳化。如此制备的所述悬浮液被腹腔注射到用乙醚麻醉的6周的Balb/c雌性小鼠(Nippon Clear有限公司)。2周后, 如上面相同量的完全合成5.9 kDa蛋白质(50 μ g/ml)与弗氏不完全佐剂(WAKO)混合。通过与在弗氏完全佐剂的情况下完全相同的过程达到乳化以获得悬浮液并且小鼠用所述悬浮液致敏。致敏两周后, 进行与上面相同的过程。对于第四次免疫, 即最后一次免疫, 用磷酸盐缓冲液(pH 7.0) 制备完全合成的5.9 kDa蛋白质(50 μ g/ml)的稀释液并且然后通过尾静脉注射给予小鼠。

(2) 杂交瘤的建立

最后一次免疫后三天, 在乙醚麻醉状态下通过手术将脾从用合成的5.9 kDa蛋白质致敏的所述小鼠取出, 并且在无菌条件下将脾分散以制备脾细胞。融合根据Köhler和Milstein (Nature, 256, 495, 1975)的方法进行。所述脾细胞通过聚乙二醇(PEG4000) (MERK)的使用与骨髓瘤细胞P3-X63-Ag8-U1 (P3U1)融合。至于融合比例, 脾细胞的数量是 10×10^7 , 而骨髓瘤细胞P3-X63-Ag8-U1 (P3U1)的数量是 2×10^7 。就是说, 脾细胞和骨髓瘤细胞的融合比例是5 : 1。融合的细胞被分散在10% 胎牛血清(INVITROGEN) α -MEM (IRVINE) HAT(Cosmo Bio有限公司), 接种到96孔微量滴定培养板(Sumitomo Bakelite有限公司)并且然后在37°C和5% CO₂的条件下培养。

(3) 筛选

大约2周后, 克隆的生长被证实并且进行筛选。用于进行筛选的方

法描述如下。为了生产用于筛选的板，上面指导性实施例中纯化的合成5.9 kDa蛋白质溶解于磷酸盐缓冲液中并且以1 µg/100 µl/孔的量被接种于96孔板(Nunc)。所述板在4°C放置两个晚上并且然后用含有0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液清洗三次。为了抑制非特异性反应，每个孔放入200µl的1.5%牛血清白蛋白溶液，并且所述板在4°C放置过夜。如此完成的板用含有0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液清洗三次后，100µl的培养上清液在每个孔中反应，并且所述板被进一步清洗。然后，HRP标记的抗小鼠免疫球蛋白抗体(Zymed)，第二抗体被加入以进行反应。清洗后，100µl 3mg/ml HRP的一个产色底物邻苯二胺(OPD) (Nacalai tesque)的柠檬酸产色溶液被加入到每一孔中在一定期间产生颜色。然后，100µl的1N硫酸作为终止溶液加入到每个孔中并且在492nm的测量波长处测量吸光度。通过上面过程发现是阳性的克隆通过限制稀释方法进行再克隆，并且对得到的上清液再次进行检查。

(4) 抗体的证实

两个克隆，即克隆CN-1和CN-2，作为识别合成的5.9 kDa蛋白质的克隆通过ELISA证实它们与合成的5.9 kDa蛋白质反应被挑选出来。表4显示通过单克隆抗体分型试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech)的使用分析通过这些克隆产生的抗体的结果。

表4: 单克隆抗体的特征

杂交瘤	分类	轻链
克隆 CN-1	IgM	κ
克隆 CN-2	IgM	κ

(5) 单克隆抗体的制备和纯化

在给予10周的Balb/c雌性小鼠(Nippon Clear有限公司) 0.5ml降植烷(Aldrich)两周后小鼠腹腔注射获得的每个杂交瘤CN-1和CN-2的1 x 10⁷个细胞。大约2周后，在乙醚麻醉状态下通过手术收集在小鼠腹腔蓄积的腹水。作为通过所述筛选中采用的ELISA法证实的结果，通过将逐步稀释的腹水用作样品，发现所述腹水含有高浓度的单克隆抗体。所述

腹水用40%硫酸铵处理，并用PBS透析，并且然后单克隆抗体CN-1和CN-2通过S-300的使用进行纯化。作为结果，每一个单克隆抗体CN-1和CN-2不被还原时，在分子量大约900,000的单个条带被证实，当每一个抗体用巯基乙醇还原时，在分子量大约70,000和25,000的两个条带被证实。每一个纯化抗体CN-1和CN-2的量是每只鼠大约10mg或以上，也就是，这足够工业利用。

实施例9

通过EIA法5.9 kDa蛋白质的测量

通过ELISA法(EIA法)通过分别作为第一抗体和第二抗体的抗5.9 kDa蛋白质的两个单克隆抗体CN-2和CN-1的使用，调查了测量样品中5.9 kDa蛋白质的可能性。

(1) 方法

为了制备ELISA的板，第一抗体CN-2溶于磷酸盐缓冲液(pH 6.7)并以1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ /孔的量放入96孔板(Nunc)。所述板在4°C放置两夜并且然后用含有0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液清洗三遍。为了抑制非特异性反应，每个孔放入200 μl 的1.5%牛血清白蛋白溶液，并且所述板在4°C放置过夜。如此完成的板用含有0.05%吐温20清洗三遍后，100 μl 不同浓度的合成5.9 kDa蛋白质被加入到每个孔中作为参考标准并且反应在室温进行1小时。反应完成后，所述板用含有0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液清洗三次，并且作为第二抗体的HRP标记的CN-1抗体被加入以进行反应。清洗后，100 μl 的3mg/ml HRP的一个产色底物邻苯二胺(OPD) (Nacalai tesque)的柠檬酸产色溶液被加入到每一孔中在一定期间产生颜色。然后，100 μl 的1N硫酸作为终止溶液加入到每个孔中并且在492nm的测量波长处测量吸光度。

(2) 结果

在如上述测量不同浓度合成5.9 kDa蛋白质的产色数值的基础上，制备了测量合成5.9 kDa蛋白质的标准曲线，获得图8中显示的结果。如从图8所见，吸光度依赖于合成5.9 kDa蛋白质的浓度而增加。就是说，

发现因为能识别5.9 kDa蛋白质的单克隆抗体CN-1和CN-2在抗原决定簇上不同,5.9 kDa蛋白质能通过夹心ELISA法中使用这些抗体进行测量。

工业应用

如上面具体描述地,即使在患者的GGT水平例如在对肝炎(例如GGT)、伴随肥胖的脂肪肝的传统标志物有低反应性的非反应者或一般使用某些药物的人的情况下由于非饮酒的原因很高时,为了掌握所述患者的状态,本发明的诊断肝脏疾病的标志蛋白质可以被用作指示以精确调查对治疗有饮酒造成的肝脏疾病的患者的评价效果。就是说,GGT具有低特异性,因为它由于非饮酒的原因,例如病毒性慢性肝炎、肥胖或某些药物的持续使用而升高。另一方面,本发明诊断肝脏疾病的标志蛋白质的优点在于它们的特异性是有希望的,因为它们的水平即使在病毒性肝纤维化的情况下也不会改变。还发现这些标志蛋白质特征在于允许样品的容易处理并且有很高的测量再现性,因为在这种情况下测量的物质是不依赖于生化酶功能的肽。本发明的诊断方法也允许习惯性酗酒者或问题酗酒者肝脏疾病发作的可能性的诊断或饮酒引起的肝脏疾病的诊断,例如肝炎、肝纤维化等等。此外,它还允许例如这样肝脏疾病的治疗进展的诊断。本发明的诊断方法适合于特别是酒精性肝异常、酒精依赖性等等的诊断。在本发明的诊断方法中,可以通过一般使用的EIA法、免疫色谱、试纸等等测量标志蛋白质进行诊断。所述诊断通过这样一般使用的方法很容易地进行的这个事实考虑到肝脏疾病患者目前的人数从未来预防医学的观点被认为有很重大的意义。

序列表

<110> 用于诊断肝脏疾病的标志蛋白质以及使用该蛋白质诊断肝脏疾病的方法

<120> Nitto Boseki Kabushiki Kaisya

<130> W1359-00

<150> JP 2002-371959

<151> 2002-12-24

<160> 3

<210> 1

<211> 54

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

```

Ser Ser Ser Tyr Ser Lys Gln Phe Thr Ser Ser Thr Ser Tyr Asn Arg
  1           5           10           15
Gly Asp Ser Thr Phe Glu Ser Lys Ser Tyr Lys Met Ala Asp Glu Ala
          20           25           30
Gly Ser Glu Ala Asp His Glu Gly Thr His Ser Thr Lys Arg Gly His
          35           40           45
Ala Lys Ser Arg Pro Val
      50

```

<210> 2

<211> 68

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

```

Glu Pro Cys Val Glu Ser Leu Val Ser Gln Tyr Phe Gln Thr Val Thr
  1           5           10           15
Asp Tyr Gly Lys Asp Leu Met Glu Lys Val Lys Ser Pro Glu Leu Gln
          20           25           30
Ala Glu Ala Lys Ser Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro
          35           40           45
Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe
          50           55           60
Val Glu Leu Gly

```

65

<210> 3

<211> 243

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr

1

5

10

15

Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln

20

25

30

Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp

35

40

45

Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu

50

55

60

Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu

65

70

75

80

Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys

85

90

95

Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met

100

105

110

Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu

115

120

125

Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu

130

135

140

Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg

145

150

155

160

Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala

165

170

175

Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr

180

185

190

His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys

195

200

205

Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser

210

215

220

Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu

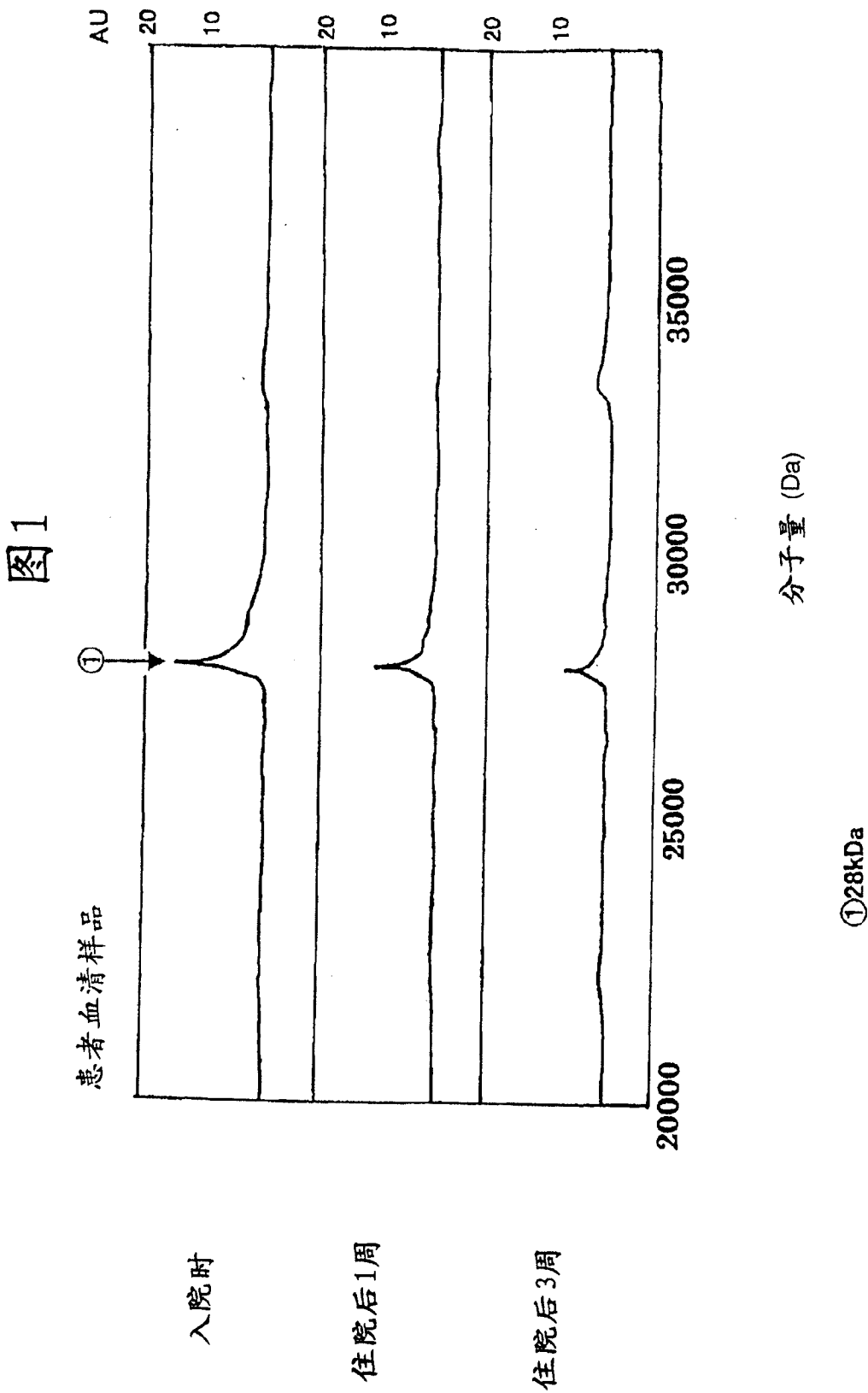
225

230

235

240

Asn Thr Gln



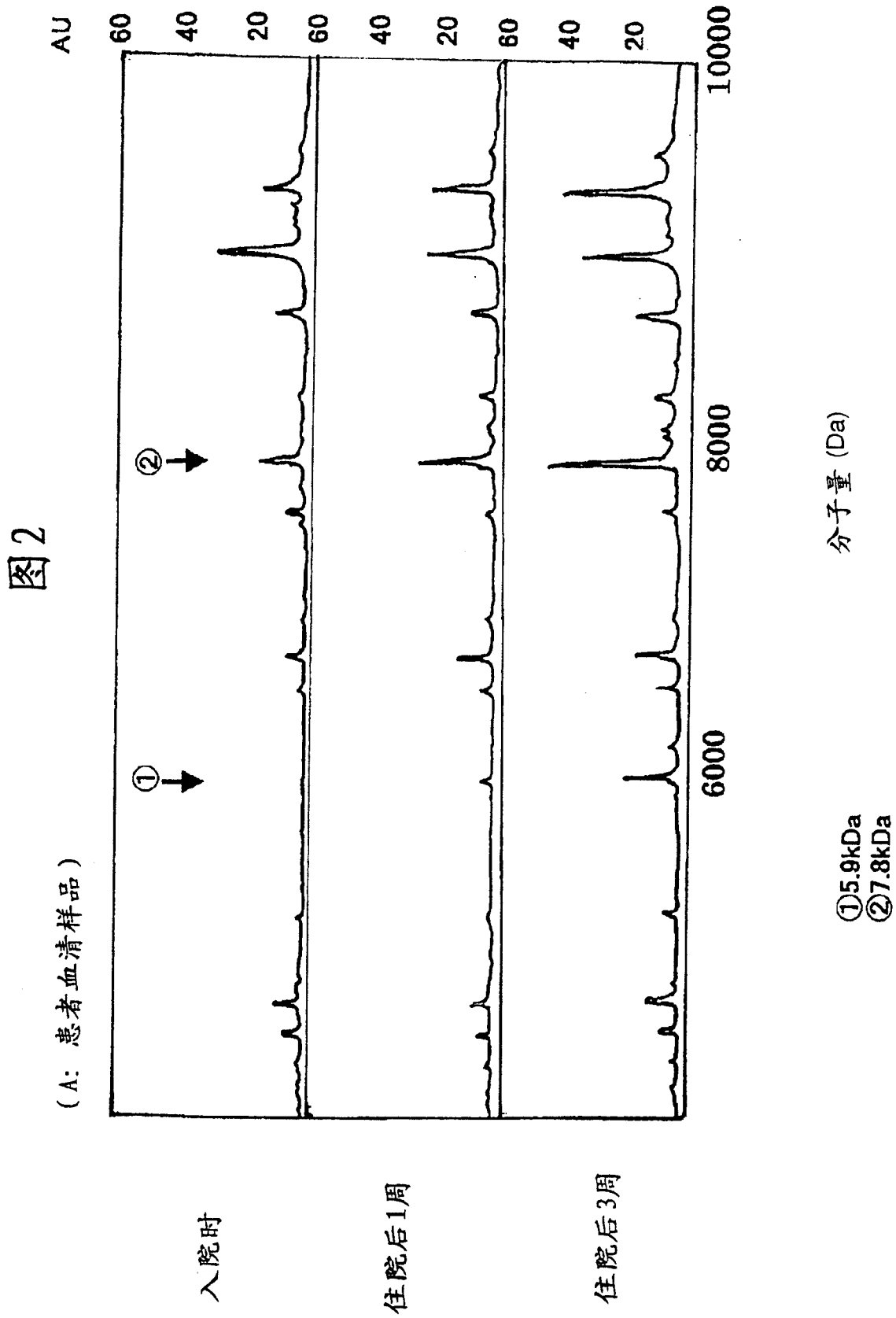


图3

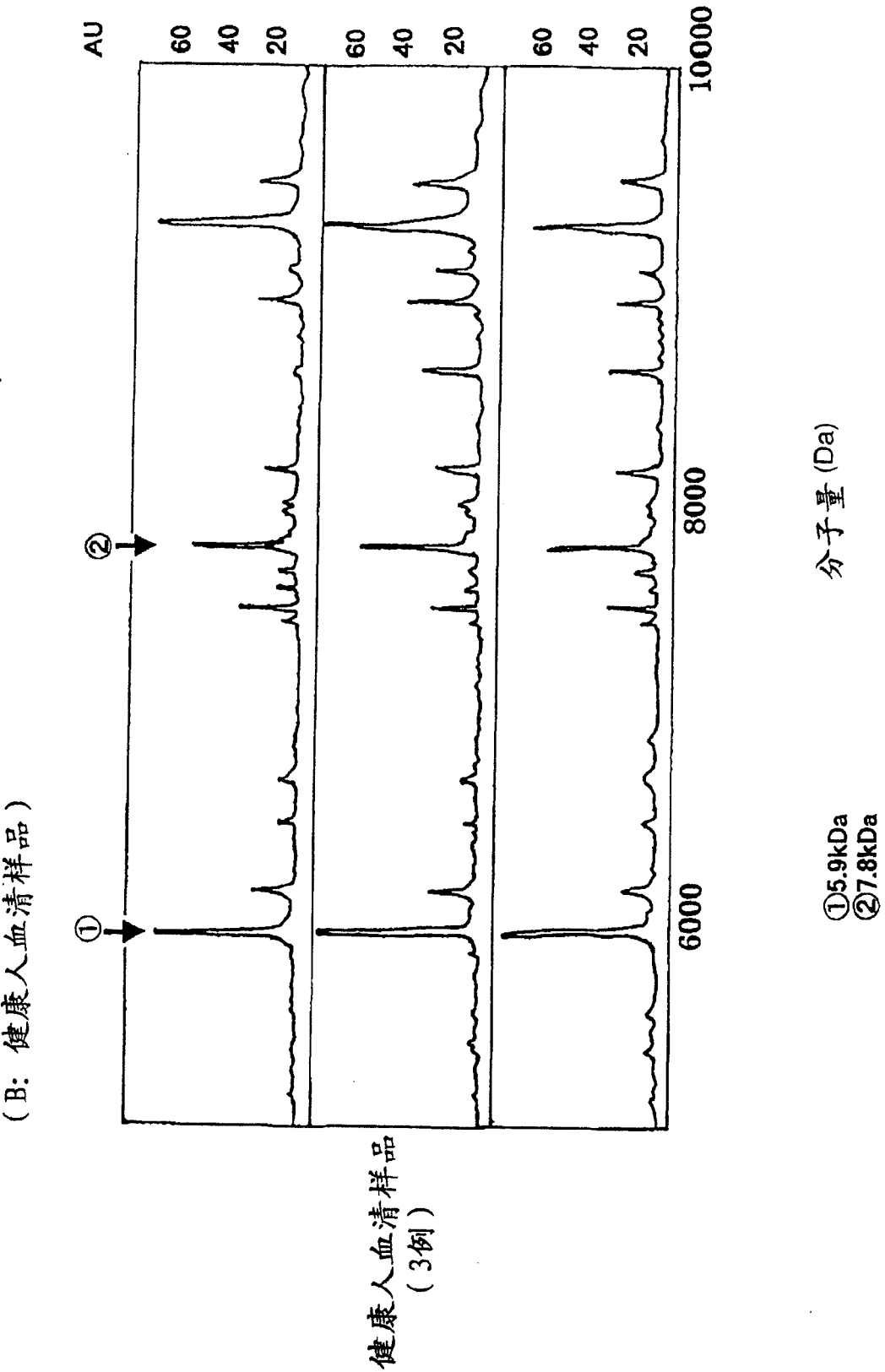
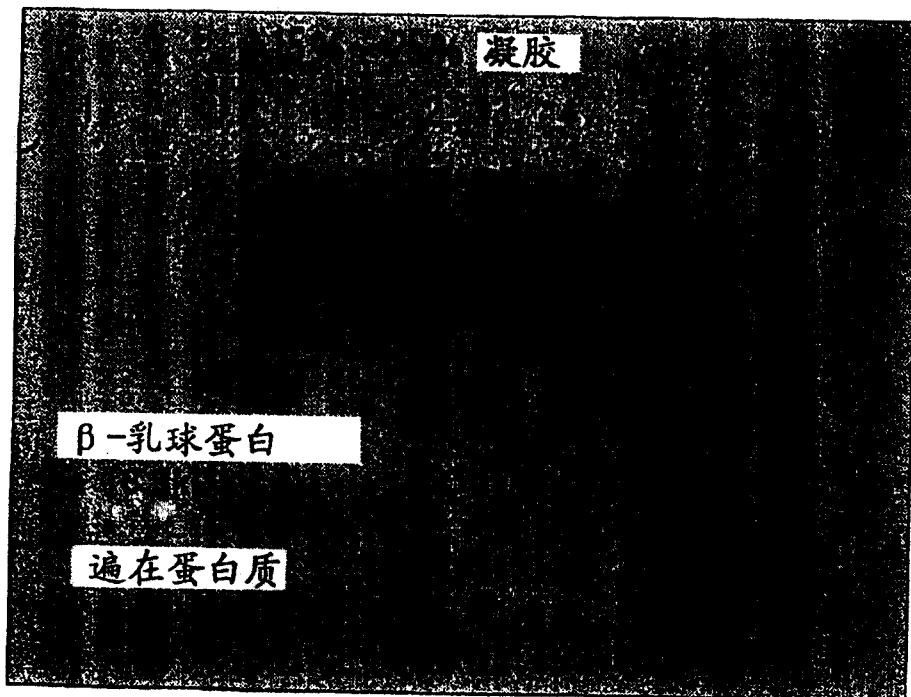


图 4



- 1 标志蛋白质
- 2 血清样品1
- 3 血清样品1
- 4 血清样品2
- 5 血清样品2
- 6 低分子量示记
- 7 高分子量标记

图 5

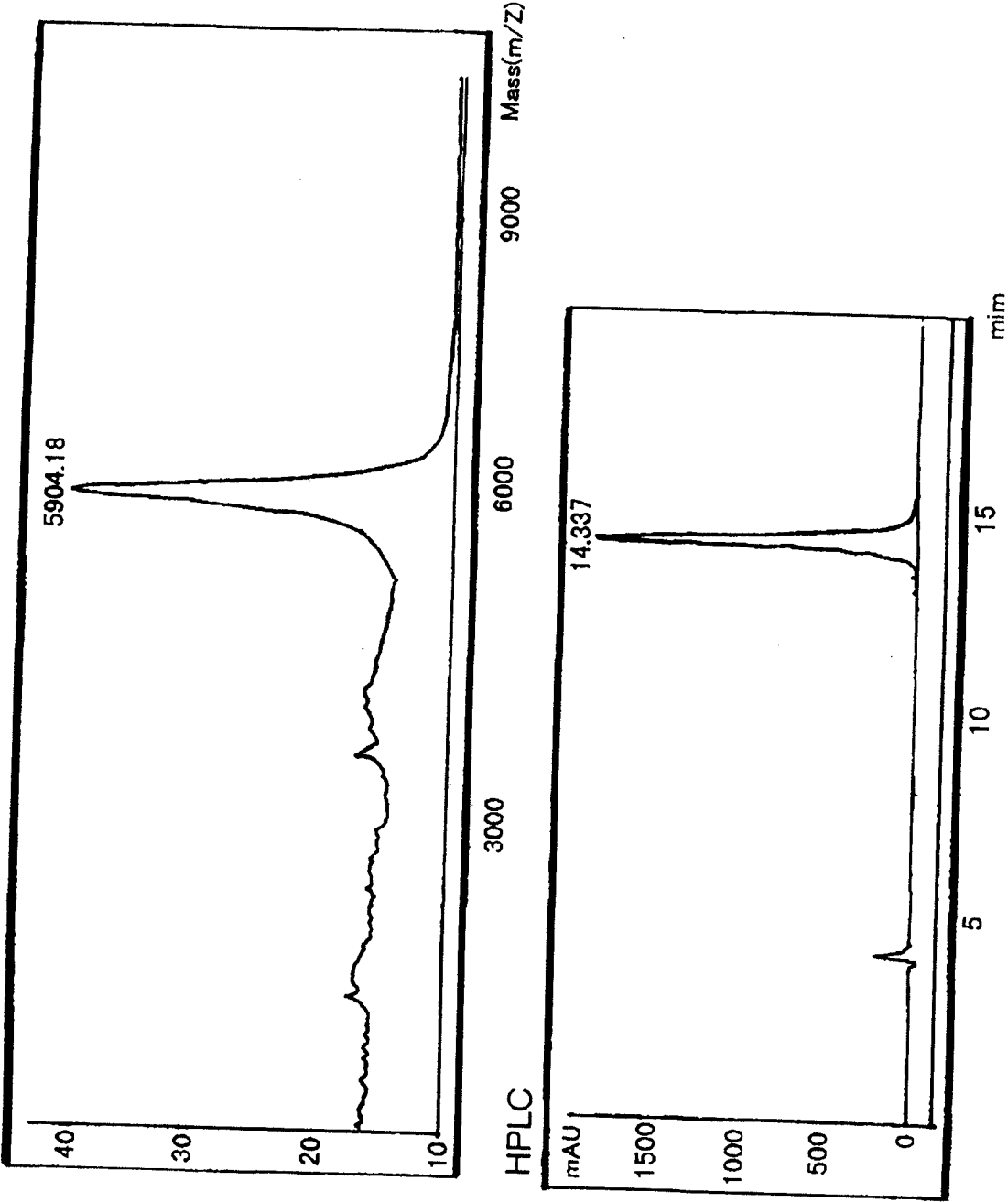
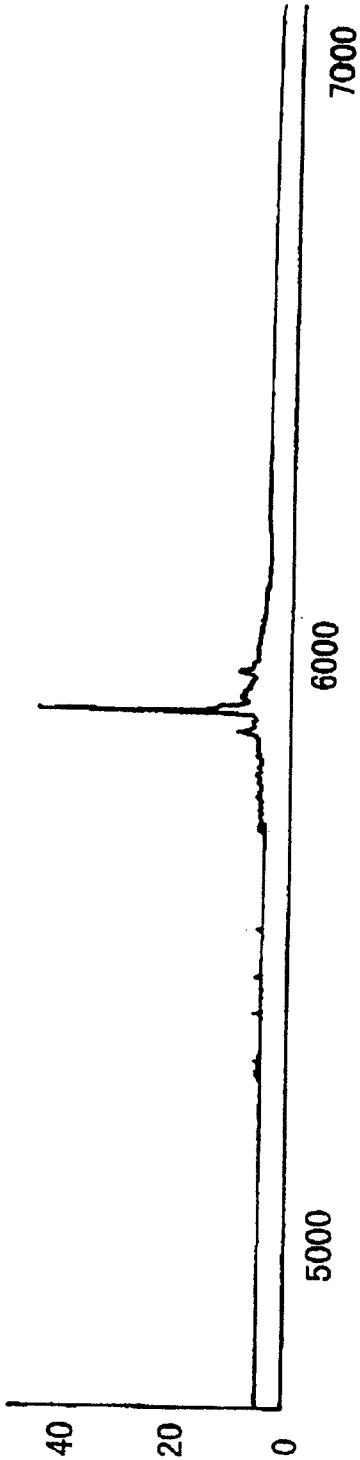


图6

合成肽



酒精摄入0 G0的血清样品

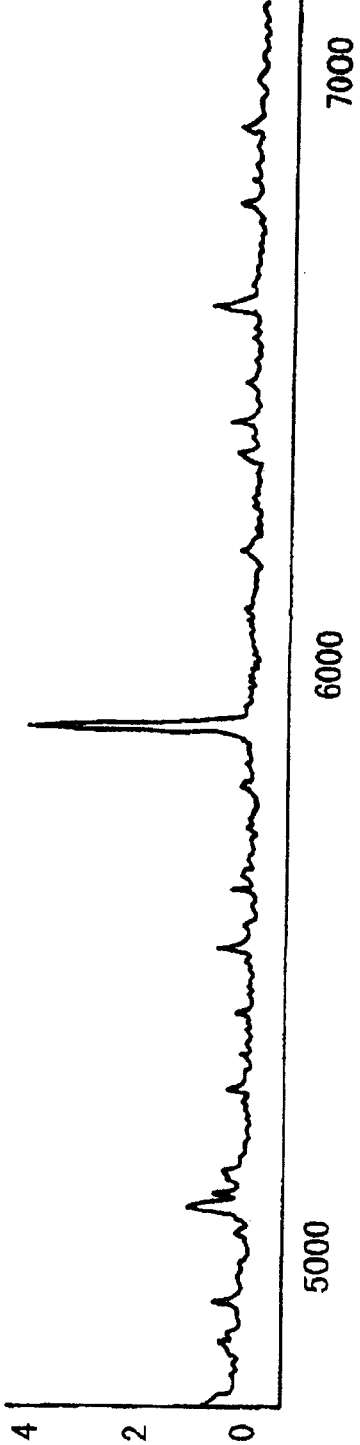


图7

随酒精摄入5.9kDa蛋白质水平中的改变

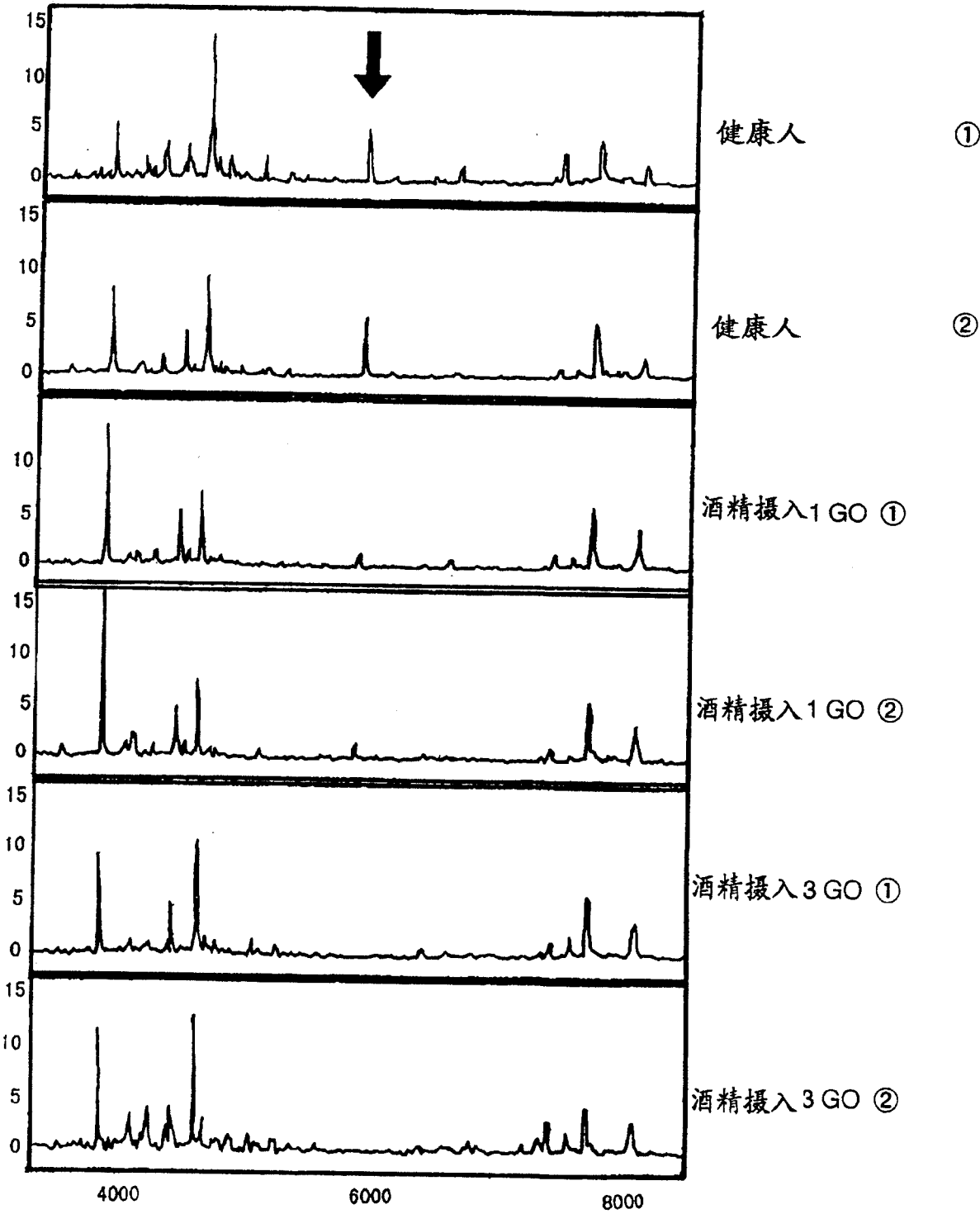


图8

EIA法测量5.9kDa蛋白质的标准曲线

