



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110720038 A

(43)申请公布日 2020.01.21

(21)申请号 201880038355.6

(22)申请日 2018.07.10

(30)优先权数据

2017-149290 2017.08.01 JP

2017-208678 2017.10.27 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/026098 2018.07.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/026569 JA 2019.02.07

(71)申请人 藤仓化成株式会社

地址 日本东京

(72)发明人 北善纪

(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 11038

代理人 于巧玲

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图31页

(54)发明名称

含有不溶性载体颗粒的免疫测定试剂的劣化防止的手段

(57)摘要

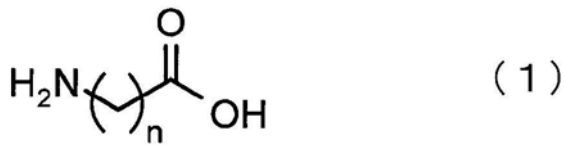
发现了一种在含有致敏或未致敏的不溶性载体颗粒的免疫测定用试剂冻结的情况下抑制该不溶性载体颗粒的非特异性凝集的成分,并提供防止该免疫测定试剂劣化的手段作为课题,作为抑制上述不溶性载体颗粒的非特异性凝集的成分,得到了下述的 ω -氨基酸(1):



至6的整数。],并且提供使用以含有该 ω -氨基酸(1)为特征的不溶性载体颗粒的免疫测定用试剂,以及使用该 ω -氨基酸(1)的免疫测定用试剂的劣化防止方法。

1. 一种免疫测定试剂,其在溶剂中含有致敏或未致敏的不溶性载体颗粒和下述化学式(1)的 ω -氨基酸,

[化1]



式中n是2至6的整数。

2. 根据权利要求1所述的免疫测定试剂,其中,n是2至5的整数。

3. 根据权利要求1所述的免疫测定试剂,其中,n是5。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的免疫测定试剂,其中,不溶性载体颗粒是未致敏的不溶性载体颗粒,试剂中的 ω -氨基酸的浓度是试剂的0.1至10质量%。

5. 根据权利要求1所述的免疫测定试剂,其中,不溶性载体颗粒是致敏的不溶性载体颗粒,n是2至5的整数,试剂中的 ω -氨基酸的浓度是试剂的3至10质量%。

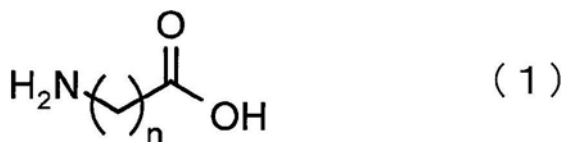
6. 根据权利要求1所述的免疫测定试剂,其中,不溶性载体颗粒是致敏的不溶性载体颗粒,n是6,试剂中的 ω -氨基酸的浓度是试剂的0.1至0.3质量%。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的免疫测定试剂,其为通过凝集法得到的免疫测定试剂。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的免疫测定试剂,其中,不溶性载体颗粒是乳胶颗粒或金胶体颗粒。

9. 一种免疫测定试剂的劣化防止方法,其中,在含有致敏或未致敏的不溶性载体颗粒的免疫测定试剂中,通过使下述化学式(1)的 ω -氨基酸共存来防止该不溶性载体颗粒的非特异性凝集,

[化2]



式中,n是2至6的整数。

10. 根据权利要求9所述的劣化防止方法,其中,n是2至5的整数。

11. 根据权利要求9所述的劣化防止方法,其中,n是5。

12. 根据权利要求9至11中任一项所述的劣化防止方法,其中,不溶性载体颗粒是未致敏的不溶性载体颗粒,试剂中的 ω -氨基酸的浓度是试剂的0.1至10质量%。

13. 根据权利要求9所述的劣化防止方法,其中,不溶性载体颗粒是致敏的不溶性载体颗粒,n是2至5的整数,试剂中的 ω -氨基酸的浓度是试剂的3至10质量%。

14. 根据权利要求9所述的劣化防止方法,其中,不溶性载体颗粒是致敏的不溶性载体颗粒,n是6,试剂中的 ω -氨基酸的浓度是试剂的0.1至0.3质量%。

15. 根据权利要求9至14中任一项所述的劣化防止方法,其中,免疫测定试剂是通过凝集法得到的免疫测定试剂。

16. 根据权利要求9至15中任一项所述的劣化防止方法,其中,不溶性载体颗粒是乳胶

颗粒或金胶体颗粒。

含有不溶性载体颗粒的免疫测定试剂的劣化防止的手段

技术领域

[0001] 本发明是关于含有不溶性载体颗粒的免疫测定试剂的劣化防止的手段的发明。根据本发明,无论未致敏的不溶性载体颗粒还是致敏的不溶性载体颗粒,都能够防止液态形式的试剂的劣化,所述液态形式的试剂的劣化由伴随冻结·融化过程的不溶性载体颗粒彼此的非特异性凝集而引起。作为代表性的不溶性载体颗粒,有乳胶颗粒、金胶体颗粒。

背景技术

[0002] 当前,使用乳胶颗粒、金胶体颗粒等不溶性载体颗粒的免疫测定试剂在各种临床检查项目中都得到使用。

[0003] 例如,在使用乳胶凝集法或金胶体凝集法的免疫测定试剂中,使用在液相中使抗原或抗体致敏的乳胶或金胶体,或未致敏的乳胶或金胶体,形成检测抗体或抗原的测定系统。基于乳胶颗粒、金胶体颗粒由于免疫复合物的形成而凝集的性质,能够通过目视确认凝集的程度,或者可以将浊度的增加作为吸光度或散射光强度的光学变化来进行测定。

[0004] 乳胶凝集法和金胶体凝集法操作简便,能够比较容易地适用于自动分析装置,是当前盛行使用的检查方式之一。

[0005] 使用乳胶颗粒、金胶体颗粒等不溶性载体颗粒的免疫测定试剂即使在销售时为冻结干燥状态,但至少在使用时是作为不溶性载体颗粒的分散液来使用。因此,从易于现场处理的观点出发,优选预先为分散液的形式。

[0006] 现有技术文件

[0007] 专利文献

[0008] 专利文件1:W02014/132833国际公开小册子

发明内容

[0009] 本发明所要解决的课题

[0010] 使用上述分散液形式的乳胶颗粒、金胶体颗粒等不溶性载体颗粒液的免疫测定试剂(以下也称为液状形式的试剂)被保存在2至8℃的适当的冷藏环境中,通常难以发生冻结劣化。然而,在运输时和温度控制不充分的冷藏设备中,液状形式试剂的全部或一部分由于过冷、局部冷却而冻结,在其融化时不溶性载体颗粒彼此会非特异性凝集,这成为问题。当发生这样的非特异性凝集时,试剂的反应性改变,重要的测定值的准确性受损,牵涉到错误的诊断结果,这不是令人满意的。

[0011] 作为液状形式试剂的冻结劣化的防止措施,通常添加甘油、乙二醇等防冻醇、海藻糖等糖类,但效果都不充分。近年来,报道了通过添加5至30质量%的三甲基甘氨酸(甜菜碱)来有效地防止未致敏的乳胶试剂的冻结劣化的方法(专利文献1)。

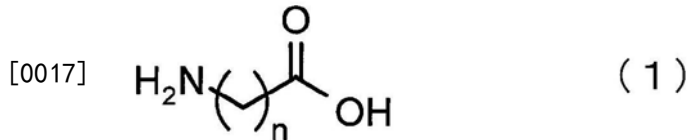
[0012] 因此,本发明的课题在于发现可以将其适用对象的范围从未致敏的不溶性载体颗粒扩大到致敏的不溶性载体颗粒,并且以较少量的使用即可完成的防止冻结劣化的成分,使将液状形式试剂稳定化的技术丰富化,实现技术的进一步提高。

[0013] 用于解决问题的手段

[0014] 本发明人发现,通过使用规定的 ω -氨基酸作为防止冻结劣化的成分解决了上述课题。

[0015] 在本发明中,第一,提供在溶剂中含有致敏或未致敏的不溶性载体颗粒和下述化学式(1)的 ω -氨基酸(以下也称为 ω -氨基酸(1))的免疫测定试剂(以下也称为本发明的免疫测定试剂)。

[0016] [化1]



[0018] [式中n是2至6的整数。]

[0019] 第二,提供免疫测定试剂的劣化防止方法(以下,也称为本发明的劣化防止方法),其通过在含有致敏或未致敏的不溶性载体颗粒的免疫测定试剂中使上述 ω -氨基酸(1)共存,防止了该不溶性载体颗粒的非特异性凝集。

[0020] 予以说明,在本发明中,“致敏”是指在不溶性载体颗粒上使抗原或抗体附着的行为或附着的状态,与“载持”具有相同意义。

[0021] 对关于上述本发明的免疫测定试剂和本发明的劣化防止方法的概述进行说明。

[0022] 不溶性载体颗粒没有限制,只要可以作为免疫测定试剂使用即可,例如可列举乳胶颗粒、二氧化硅颗粒、金胶体颗粒等无机颗粒;明胶颗粒、红细胞等。其中,乳胶颗粒、金胶体颗粒是代表性的不溶性载体颗粒。

[0023] 乳胶也称为聚合物乳液,聚合物分散在水等的水性溶剂中,该水性溶剂成为连续相,真球或接近球形的聚合物颗粒形成为不连续相。所谓乳胶颗粒是形成该乳胶不连续相的聚合物颗粒。在本说明书中,有时使用“乳胶”作为包括乳胶颗粒的通用表达。

[0024] 乳胶的种类没有限制,只要是能够如上所述作为免疫测定试剂使用的种类即可。例如聚苯乙烯乳胶、极低羧酸改性乳胶、亲水基团局部化的乳胶等物理吸附用的乳胶;羧酸改性乳胶、氨基改性乳胶、羟基改性乳胶、缩水甘油基改性乳胶、醛改性乳胶、酰胺改性乳胶等化学结合用乳胶;各种着色乳胶;高比重聚苯乙烯乳胶等血液凝集反应用乳胶;磁性乳胶等。

[0025] 金胶体是金原子结合而形成的微粒的分散液,通过在液体中还原四氯金(III)酸等方法合成。在此, Au^{3+} 离子被还原为金原子,一些金原子结合而成为过饱和状态,然后生成1nm以下的核颗粒,未结合的金原子依次与该核颗粒结合,颗粒成长,由此而合成。通过在合成过程中进行充分搅拌,可以使颗粒的大小均匀化。虽添加柠檬酸等稳定剂以使得微粒(金胶体颗粒)彼此不凝集,但是仍潜在地具有容易凝集的性质。

[0026] 金胶体有色由于表面等离子共振产生的,单分散的粒径均一的金胶体具有单一波长的吸收。

[0027] 金胶体中的金胶体颗粒的粒径比上述乳胶颗粒小,单位重量的比表面积大,因此特别适合于以高浓度存在的物质的定量。

[0028] 致敏的不溶性载体颗粒是在不溶性载体颗粒的表面上使某些物质致敏的不溶性载体颗粒,具体而言,是用于引起免疫测定所必要的抗原抗体反应的、抗体或抗原被致敏的

不溶性载体颗粒。该抗体可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体,进一步,只要能够引起与期望的抗原的抗原抗体反应,就可以是免疫球蛋白分子的全部,也可以是免疫球蛋白分子的一部分。该抗原没有特别限制,只要是通过抗原抗体反应与所期望的抗体结合的抗原即可。未致敏的不溶性载体颗粒是这样的抗体或抗原未被致敏的不溶性载体颗粒。

[0029] 水性溶剂是以水为主体的溶剂,可列举水或各种缓冲液等。 ω -氨基酸(1)可以例如通过规定碳原子数的 α -卤代羧酸的胺化等公知的方法来合成,但是也可以使用市售品。免疫测定试剂的形式没有特别限制,只要使用不溶性载体颗粒,并且除了免疫测定时该颗粒的凝集会对免疫测定值产生不利影响的不溶性载体颗粒即可,但是优选为将不溶性载体颗粒的凝集作为抗原抗体反应指标的“使用凝集法的免疫测定试剂”。作为凝集法,可列举玻片测试法、光学测定法、微量滴定法和过滤器分离法等。作为凝集法以外的方法,可列举夹层法、免疫色谱法、免疫印迹法等。免疫测定的标记可列举放射性同位素、荧光物质、着色物质、显色酶、生物素等,但不限于这些。作为使用未致敏的不溶性载体颗粒的方法,已知通过使未致敏的乳胶颗粒与标本试样(分离的生物成分样品)接触,使测定对象蛋白质吸附在颗粒表面,使针对对象蛋白质的抗体与其反应,产生颗粒的凝集,根据反应液的浊度来测定对象蛋白质的量的方法(日本专利第2677753号),对于基于使用这种未致敏的不溶性载体颗粒的方法的免疫测定试剂,本发明也可以适用。

[0030] 发明的效果

[0031] 根据本发明,提供免疫测定试剂中使用的乳胶、金胶体等不溶性载体颗粒液伴随着冻结·融化的非特异性的凝集所引起的该试剂的劣化手段,作为“免疫测定试剂”和“免疫测定试剂的劣化防止方法”。作为本发明的防止劣化的成分的 ω -氨基酸(1)无论不溶性载体颗粒是致敏的还是未致敏的,且以比较少量的配合,都可以防止不溶性载体颗粒伴随着冻结·融化的非特异性凝集,可以防止免疫测定试剂的劣化。

附图说明

[0032] [图1]是示出对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的未致敏的乳胶试剂的水中粒径变化进行研究的结果的图。

[0033] [图2-1]是示出在“无添加剂”情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的未致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。

[0034] [图2-2]是示出在“添加海藻糖二水合物”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的未致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.3质量%海藻糖二水合物的情况,b是1质量%海藻糖二水合物的情况,c是3质量%海藻糖二水合物的情况。

[0035] [图2-3]是示出在“添加甘油”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的未致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.3质量%甘油的情况,b是1质量%甘油的情况,c是3质量%甘油的情况。

[0036] [图2-4A]是示出在“添加甘氨酸”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的未致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.1质量%甘氨酸的情况,b是0.3质量%甘氨酸的情况,c是1质量%甘氨酸的情况。

[0037] [图2-4B]作为上述图2-4A的继续,图中,d是3质量%甘氨酸的情况,e是10质量%

甘氨酸的情况。

[0038] [图2-5A]是示出在“添加β-丙氨酸”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的未致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.1质量%β-丙氨酸的情况,b是0.3质量%β-丙氨酸的情况,c是1质量%β-丙氨酸的情况。

[0039] [图2-5B]作为上述图2-5A的继续,图中,d是3质量%β-丙氨酸的情况,e是10质量%β-丙氨酸的情况。

[0040] [图2-6A]是示出在“添加4-氨基丁酸”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的未致敏乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.1质量%4-氨基丁酸的情况,b是0.3质量%4-氨基丁酸的情况,c是1质量%4-氨基丁酸的情况。

[0041] [图2-6B]作为上述图2-6A的继续,图中,d是3质量%4-氨基丁酸的情况,e是10质量%4-氨基丁酸的情况。

[0042] [图2-7A]是示出在“添加5-氨基戊酸”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的未致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.1质量%5-氨基戊酸的情况,b是0.3质量%5-氨基戊酸的情况,c是1质量%5-氨基戊酸的情况。

[0043] [图2-7B]作为上述图2-7A的继续,图中,d是3质量%5-氨基戊酸的情况,e是10质量%5-氨基戊酸的情况。

[0044] [图2-8A]是示出在“添加6-氨基己酸”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的未致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.1质量%6-氨基己酸的情况,b是0.3质量%6-氨基己酸的情况,c是1质量%6-氨基己酸的情况。

[0045] [图2-8B]作为上述图2-8A的继续,图中,d是3质量%6-氨基己酸的情况,e是10质量%6-氨基己酸的情况。

[0046] [图2-9A]是示出在“添加7-氨基庚酸”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的未致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.1质量%7-氨基庚酸的情况,b是0.3质量%7-氨基庚酸的情况,c是1质量%7-氨基庚酸的情况。

[0047] [图2-9B]作为上述图2-9A的继续,图中,d是3质量%7-氨基庚酸的情况,e是10质量%7-氨基庚酸的情况。

[0048] [图3-1]是示出在“无添加剂”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10)的致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。

[0049] [图3-2A]是示出在“添加甘氨酸”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.1质量%甘氨酸的情况,b是0.3质量%甘氨酸的情况。

[0050] [图3-2B]作为上述图3-2A的继续,图中,c是3质量%甘氨酸的情况,d是10质量%甘氨酸的情况。

[0051] [图3-3A]是示出在“添加β-丙氨酸”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.1质

量%β-丙氨酸的情况,b是0.3质量%β-丙氨酸的情况。

[0052] [图3-3B]作为上述图3-3A的继续,图中,c是3质量%β-丙氨酸的情况,d是10质量%β-丙氨酸的情况。

[0053] [图3-4A]是示出在“添加4-氨基丁酸”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.1质量%4-氨基丁酸的情况,b是0.3质量%4-氨基丁酸的情况。

[0054] [图3-4B]作为上述图3-4A的继续,图中,c是3质量%4-氨基丁酸的情况,d是10质量%4-氨基丁酸的情况。

[0055] [图3-5A]是示出在“添加5-氨基戊酸”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.1质量%5-氨基戊酸的情况,b是0.3质量%5-氨基戊酸的情况。

[0056] [图3-5B]作为上述图3-5A的继续,图中,c是3质量%5-氨基戊酸的情况,d是10质量%5-氨基戊酸的情况。

[0057] [图3-6A]是示出在“添加6-氨基己酸”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.1质量%6-氨基己酸的情况,b是0.3质量%6-氨基己酸的情况,c是1质量%6-氨基己酸的情况。

[0058] [图3-6B]作为上述图3-6B的继续,图中,d是3质量%6-氨基己酸的情况,e是10质量%6-氨基己酸的情况。

[0059] [图3-7A]是示出在“添加7-氨基庚酸”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的致敏的乳胶试剂中非特异性乳胶颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.1质量%7-氨基庚酸的情况,b是0.3质量%7-氨基庚酸的情况。

[0060] [图3-7B]作为上述图3-7A的继续,图中,c是3质量%7-氨基庚酸的情况,d是10质量%7-氨基庚酸的情况。

[0061] [图4A]是示出在“添加6-氨基己酸”的情况下,对关于冻结·融化次数(0、1、3、6、10次)的致敏的金胶体试剂中非特异性金胶体颗粒的凝集进行研究的结果的图。图中,a是0.1质量%6-氨基己酸的情况,b是0.3质量%6-氨基己酸的情况。

[0062] [图4B]作为上述图4A的继续,图中,c为1质量%6-氨基己酸的情况,d是3质量%6-氨基己酸的情况。

具体实施方式

[0063] [免疫测定试剂]

[0064] 作为本发明的免疫测定试剂中的防止劣化的成分的 ω -氨基羧酸(1)中的碳原子数n是2至6的整数,具体是2、3、4、5或6。

[0065] 进一步,无论不溶性载体颗粒是未致敏的还是致敏的,n都优选是2至5的整数。无论是未致敏的还是致敏的,最优选的n都是“5”,即6-氨基己酸。

[0066] 在未致敏的情况下,试剂中 ω -氨基羧酸(1)的浓度优选是试剂的0.1至10质量%,更优选是0.3至3质量%。在致敏的情况下,在n是2至5的整数的情况下,优选是试剂的3至10质量%,在n是6的情况下,优选是试剂的0.1至0.3质量%。

[0067] 如果冻结·融化后的测定值的变动幅度相等,则 ω -氨基酸(1)的浓度优选较低。这是因为如果浓度高,则认为测定灵敏度有降低的倾向。

[0068] 作为本发明的免疫测定试剂的水性溶剂,可如上所述列举水或各种缓冲液,作为该缓冲液,虽可列举甘氨酸缓冲液、硼酸缓冲液、Good's缓冲液等,但是不限于这些。另外,能够在实质上不损害本发明效果的质和量的限度下添加BSA、阿拉伯树胶、表面活性剂、胆碱、螯合剂、防腐剂等添加剂。该水性溶剂的pH优选在不阻碍抗原抗体反应的范围内,具体是4至9左右,特别优选是6至9左右。

[0069] 不溶性载体颗粒的平均粒径没有特别限制,只要其能够用于免疫测定试剂即可。例如,如果是乳胶颗粒,可以从大约0.01至1 μ m的平均粒径广泛地选择粒径,如果是金胶体颗粒,可以从0.005至0.1 μ m的平均粒径进行选择。

[0070] 在乳胶颗粒、金胶体颗粒等不溶性载体颗粒是未致敏的情况下,能够使用如上所述使标本试样中的测定对象蛋白质直接吸附于载体颗粒,使针对对象蛋白质的抗体与其反应的方法。作为该方法中的测定对象蛋白质,虽可列举血红蛋白A1c,但是不限于此。

[0071] 另外,在不溶性载体颗粒是致敏的情况下,例如,如果是乳胶颗粒,致敏的抗原或抗体的结合方式可以是物理吸附和化学结合中的任一种。另外,可以根据目标的体内抗体自由地选择致敏的抗原。例如,作为致敏的抗原虽可列举梅毒抗原、链球菌溶血素O等,但是完全不限于这些。能够根据捕捉的目标抗原自由地选择致敏的抗体。进一步,致敏的抗体可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体,球蛋白分子可以是IgG、IgM、IgA、IgD和IgE中的任何种类,亚种类也不受限制,进一步,可以是这些球蛋白分子的全部,也可以只是一部分的片段。

[0072] [劣化防止方法]

[0073] 在本发明的劣化防止方法中,在含有致敏或未致敏的不溶性载体颗粒的免疫测定试剂中,上述 ω -氨基酸(1)的共存能够通过制备免疫测定试剂的工序的任何阶段,将 ω -氨基酸(1)添加到试剂中以成为规定的浓度来进行。该 ω -氨基酸(1)的添加可以在不溶性载体颗粒的添加之前或之后。

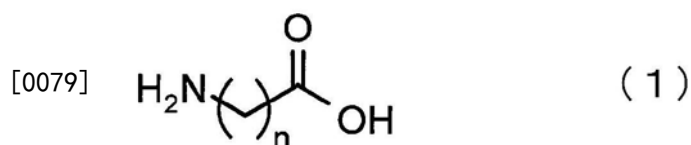
[0074] 施行了本发明的劣化防止方法的免疫测定试剂抑制了在冻结·融化过程中不溶性载体颗粒的非特异性吸附,因此能够防止该免疫测定试剂的劣化。

[0075] 如此制备的免疫测定试剂是本发明的免疫测定试剂。

[0076] 实施例

[0077] 以下记载了作为本发明的具体例子的实施例。予以说明,除非另外说明,否则“%”是相对于配合对象的质量%。另外,在记载“n的数目”,例如“n=5”的情况下,除非另外说明,否则是“n=5的 ω -氨基酸(1)”的意思。如上所述, ω -氨基酸(1)由下述化学式(1)表示。

[0078] [化2]



[0080] [式中n是2至6的整数。]

[0081] [实施例1]未致敏的乳胶的研究

[0082] <第一试剂(未致敏的乳胶分散液)的制备>

[0083] 使(1)未添加(比较例)、(2)海藻糖二水合物(比较例:林原株式会社制造)、(3)甘油(比较例:和光纯药工业株式会社制造)、(4)甘氨酸(比较例:和光纯药工业株式会社制造)、(5) β -丙氨酸($n=2$:东京化成工业株式会社制造)、(6)4-氨基丁酸($n=3$:东京化成工业株式会社制造)、(7)5-氨基戊酸($n=4$:东京化成工业株式会社制造)、(8)6-氨基己酸($n=5$:和光纯药工业株式会社制造),或(9)7-氨基庚酸($n=6$:东京化成工业株式会社制造)分别以[0.3%、1%、3%](上述(2)、(3))或[0.1%、0.3%、1%、3%、10%](上述(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9))溶解在含有10mmol/mL HEPES的缓冲液中,在各体系中添加未致敏的聚苯乙烯乳胶颗粒(平均粒径0.12 μ m:藤仓化成株式会社制造),使其成为0.1%,用氢氧化钠水溶液使其pH成为7.9,制备了37种未致敏的乳胶分散液。

[0084] <由第一试剂的冻结·融化而引起的水中粒径变化的确认>

[0085] 对于上述第一试剂,分别重复0至10次(具体为0、1、3、6、10次)冻结·融化,测定取决于该冻结·融化次数的各试样的乳胶颗粒的水中平均粒径。对于冻结·融化而言,将试剂放入-30℃的冷冻机中3小时以上来进行冻结,然后放置在25℃左右的室温下进行融化,直至完全成为液状。将该冻结·融化过程作为“一次”冻结·融化。另外,使用浓缩粒径分析仪FPAR-1000(大塚电子株式会社制造)测定水中的平均粒径。结果示于图1中。

[0086] 由图1的结果表明:添加了规定量的 ω -氨基酸(1)的体系的乳胶粒径在冻结·融化前后是稳定的。

[0087] <第二试剂(抗体稀释液)的制备>

[0088] 将氯化钠添加到含有10mmol/mL的HEPES的缓冲液中,使氯化钠成为20g/L,添加0.2%Tween-20,将pH调节至7.0。对于适量的该缓冲液,添加小鼠抗人HbA1c单克隆抗体(藤仓化成株式会社制造),使其成为0.05mg/mL,添加山羊抗小鼠IgG多克隆抗体(和光纯药工业株式会社制造),使其成为0.2mg/mL,进一步,添加1%的羟丙基纤维素来制备抗体稀释液。

[0089] <使用第一试剂和第二试剂的由冻结·融化引起的校正曲线变化的确认>

[0090] 对于上述第一试剂,分别以与上述相同的要领重复0至10次冻结·融化,制作并确认了取决于冻结·融化次数的各试样的校正曲线。校正曲线通过使用HbA1c值调节为0%、4.2%、8.5%、12.0%和16.4%的精制的人HbA1c作为标本,标本量为6 μ L,混合150 μ L的第一试剂,在37℃下反应5分钟后,加入50 μ L的第二试剂,测定5分钟的吸光度变化量来完成。测定仪器使用日立自动分析装置7180,以主波长660nm、副波长800nm的两点法(two point end method)进行。结果示于图2(图2-1、2-2、2-3、2-4A、2-4B、2-5A、2-5B、2-6A、2-6B、2-7A、2-7B、2-8A、2-8B、2-9A、2-9B)中。

[0091] 由上述图2所示的结果表明:添加了规定量的 ω -氨基酸(1)的体系的乳胶颗粒即使经过冻结·融化也难以发生非特异性凝集。其中, n 优选是2至5,总体上最优 n 是5的情况。

[0092] [实施例2]致敏乳胶的研究

[0093] <第三试剂(标本稀释剂)的制备>

[0094] 将氯化钠添加到含有50mM甘氨酸的缓冲液中,使氯化钠成为0.15mol/mL,用氢氧化钠水溶液将pH调节为9.0,制备标本稀释液。

[0095] <第四试剂(抗体致敏的乳胶分散液)的制备>

[0096] 将100mg的山羊抗人Lp(a)多克隆抗体(Trina Bioreactives公司制造)添加到20mL的50mM硼酸缓冲液中,进一步混合12.5mL的未致敏的聚苯乙烯乳胶颗粒(平均粒径0.12 μ m:藤仓化成株式会社制造)的10%乳胶分散液。使用超声波装置VCX750(SONIC& MATERIALS INC.),在冰冷下进行1分钟的超声波处理。然后,在室温下搅拌30分钟后,添加7mL的5%BSA水溶液,在50 $^{\circ}$ C下搅拌30分钟。然后,以20000G离心20分钟,除去上清液后,连同10mmol/mL的HEPES一起,使(1)不添加(比较例)、(2)甘氨酸(比较例:和光纯药工业株式会社制造)、(3) β -丙氨酸(n=2:东京化成工业株式会社制造)、(4)4-氨基丁酸(n=3:东京化成工业株式会社制造)、(5)5-氨基戊酸(n=4:东京化成工业株式会社制造)、(6)6-氨基己酸(n=5:和光纯药工业株式会社制造)或(7)7-氨基庚酸(n=6:东京化成工业株式会社制造)分别溶解为0.1%、0.3%、3%、10%(6)为0.1%、0.3%、1%、3%、10%,在各体系中添加上述致敏的聚苯乙烯乳胶颗粒(平均粒径0.12 μ m,藤仓化成株式会社制造),使其成为0.3%,制备了26种抗体致敏的乳胶分散液。

[0097] <使用第三试剂和第四试剂的由冻结·融化引起的校正曲线变化的确认>

[0098] 以上述的要领分别对第四试剂进行0至10次的冻结·融化,确认了取决于冻结·融化次数的各试样的校正曲线。校正曲线通过使用Lp(a)值调节为0mg/dL、15mg/dL、30mg/dL、60mg/dL、100mg/dL的精制的Lp(a)作为标本,对于该标本量2.1 μ L混合210 μ L的第三试剂,在37 $^{\circ}$ C下反应5分钟后,向其中添加70 μ L的第四试剂,测定5分钟的吸光度变化量来完成。测定仪器使用日立自动分析装置7180,以主波长600nm的两点法(two point end method)进行。结果示于图3(图3-1、3-2A、3-2B、3-3A、3-3B、3-4A、3-4B、3-5A、3-5B、3-6A、3-6B、3-7A、3-7B、3-8A、3-8B)中。

[0099] 由图3的结果表明:在n=2至6的整数的各种 ω -氨基酸(1)中,能够抑制由致敏的乳胶颗粒的冻结·融化引起的非特异性凝集。对于该非特异性凝集的抑制作用而言,在n=2至5的整数的情况下,优选是3至10%的浓度,在n=6的情况下,优选是0.1至0.3%的浓度。特别地,表明从灵敏度和抑制非特异性凝集的观点出发,作为n=5的 ω -氨基酸(1)的6-氨基己酸,3%的浓度能够最适合地抑制由致敏的乳胶颗粒的冻结·融化引起的非特异性凝集。

[0100] [实施例3]致敏的金胶体的研究

[0101] <第五试剂(抗体致敏的金胶体分散液)的制备>

[0102] 将7mL的500mM HEPES(pH 7)与350mL的金胶体分散液(Roche Diagnostics公司制造)混合,进一步添加2.1mg的山羊抗人CRP多克隆抗体(ADVY公司制造),在室温下搅拌1小时。之后,添加38.5mL的0.1%BSA水溶液,在室温下搅拌30分钟。之后,以20000G离心20分钟,除去上清液后,分别添加42mL的添加了10mmol/mL的HEPES,0.3%、1%、3%的6-氨基己酸的缓冲液,制备了抗体致敏的金胶体分散液。

[0103] <使用第三试剂和第五试剂的由冻结·融化引起的校正曲线变化的确认>

[0104] 以上述的要领分别对第四试剂进行0至10次的冻结·融化,确认了取决于冻结·融化次数的各试样的校正曲线。校正曲线通过使用CRP值调节为0mg/dL、0.02mg/dL、0.05mg/dL、0.09mg/dL、0.19mg/dL、0.38mg/dL、0.75mg/dL的精制CRP作为标本,对于该标本量2.1 μ L混合140 μ L的第三试剂,在37 $^{\circ}$ C下反应5分钟后,向其中添加140 μ L的第五试剂,测定

5分钟的吸光度的变化量来完成。测定仪器使用日立自动分析装置7180,以主波长600nm的两点法(two point end method)进行。

[0105] 结果示于图4(图4A和B)中。

[0106] 由图4的结果表明:作为 $n=5$ 的 ω -氨基酸(1)的6-氨基己酸能够抑制由致敏的金胶体的冻结·融化引起的非特异性凝集。

[0107] 产业上的可利用性

[0108] 本发明的免疫测定试剂或施行了本发明的劣化防止方法的免疫测定试剂即使在液状形式的试剂冻结这样的严酷的保存环境和运输时的不稳定的温度控制下也可以抑制乳胶颗粒、金胶体颗粒等不溶性载体颗粒的非特异性凝集,可以在不使检测性能降低的情况下进行保存,对于免疫测定试剂的保存和运输的便利做出了显著的贡献。另外,即使是致敏的不溶性载体颗粒也可以应用本发明,这一点是与以往很大的不同之处。这使得即使是使用致敏的不溶性载体颗粒的检测系统的免疫测定试剂也可以稳定地保存,不仅如此,例如,在进行使用致敏的和未致敏的不溶性载体颗粒并存于检测系统中的小型专用分析装置的多个诊断项目测定等的情况下,也可以提供保存和运输的便利。

[0109] 日本专利申请第2017-149290号(申请日:2017年8月1日)和日本专利申请第2017-208678号(申请日:2017年10月27日)的公开内容通过参照整体并入本说明书。对于本说明书中记载的所有文献、专利申请和技术标准而言,各文献、专利申请和技术标准通过参照并入是指与具体地且各自记载的情况下相同程度地通过参照并入本说明书。

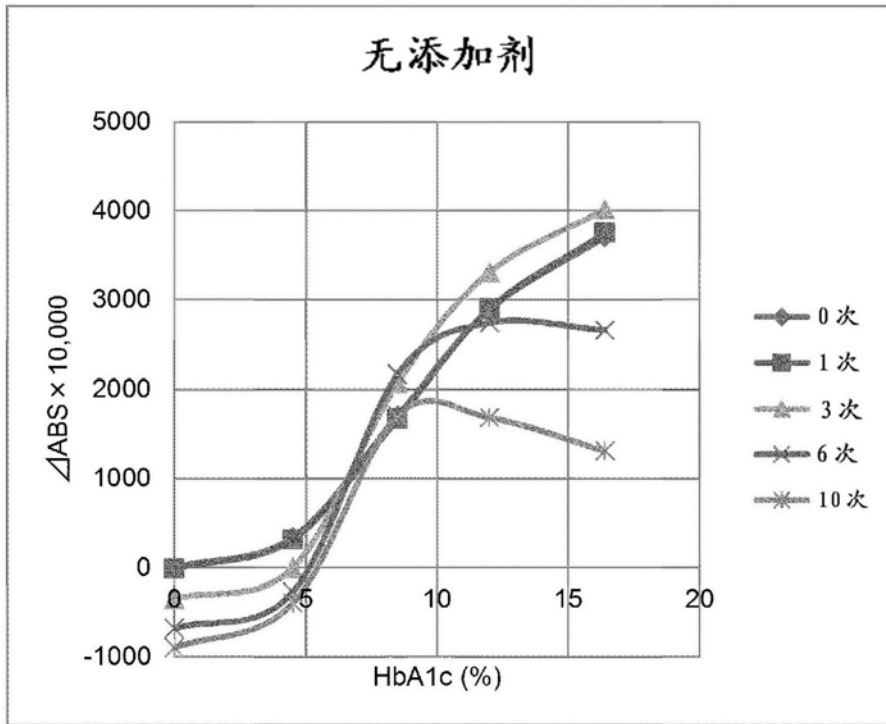


图2-1

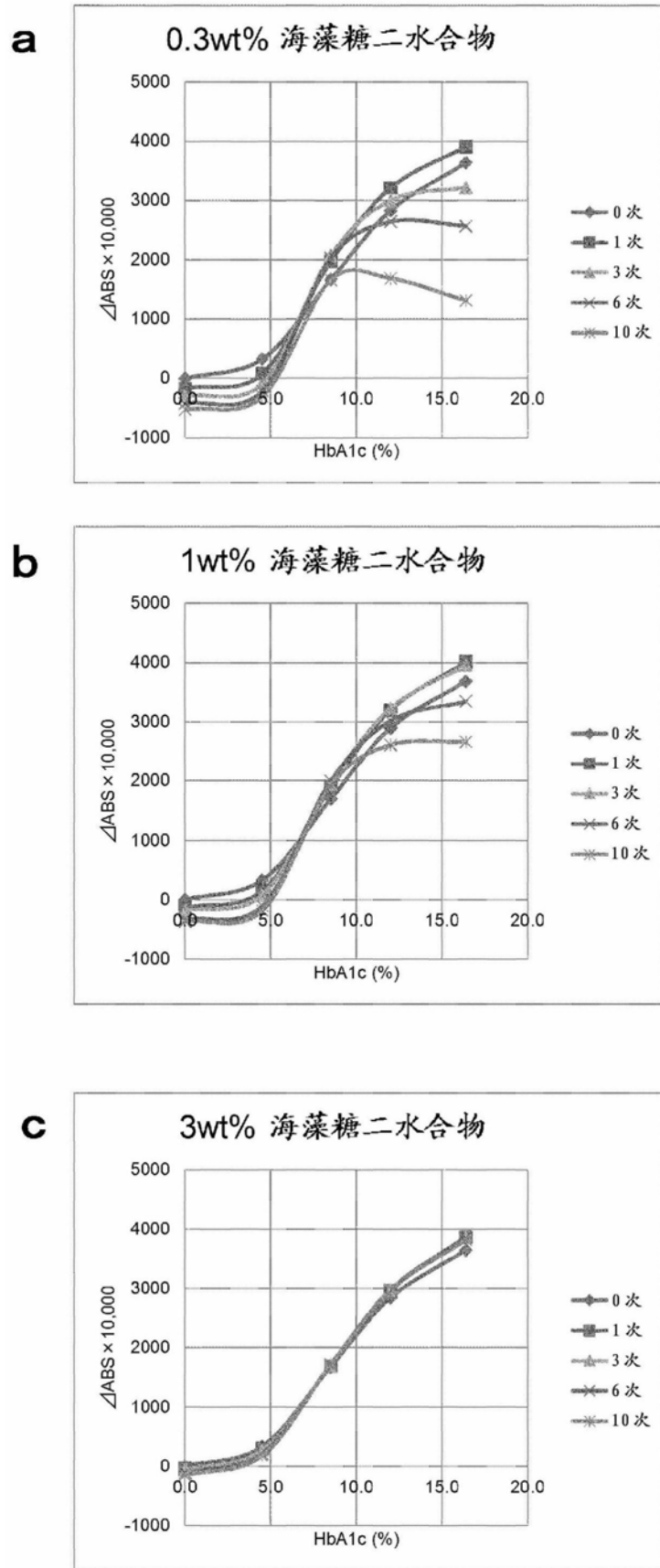


图2-2

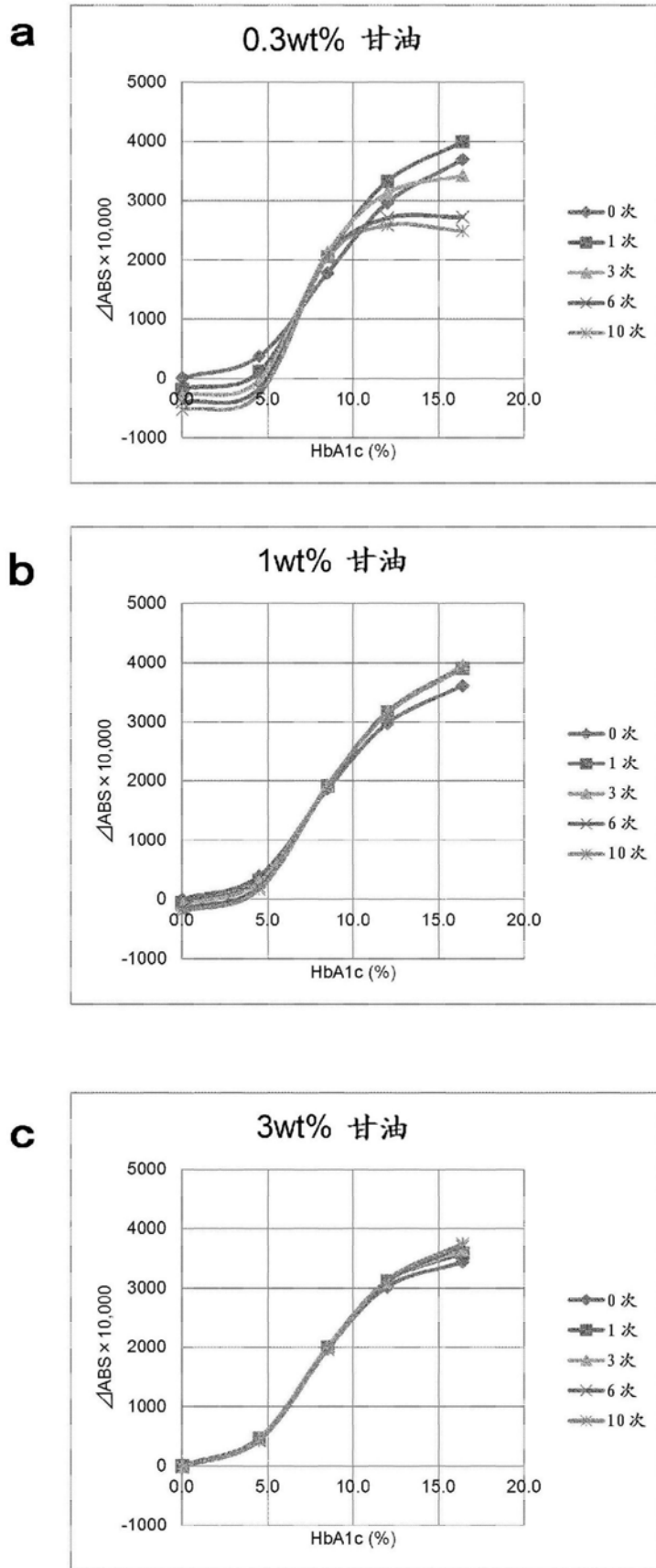


图2-3

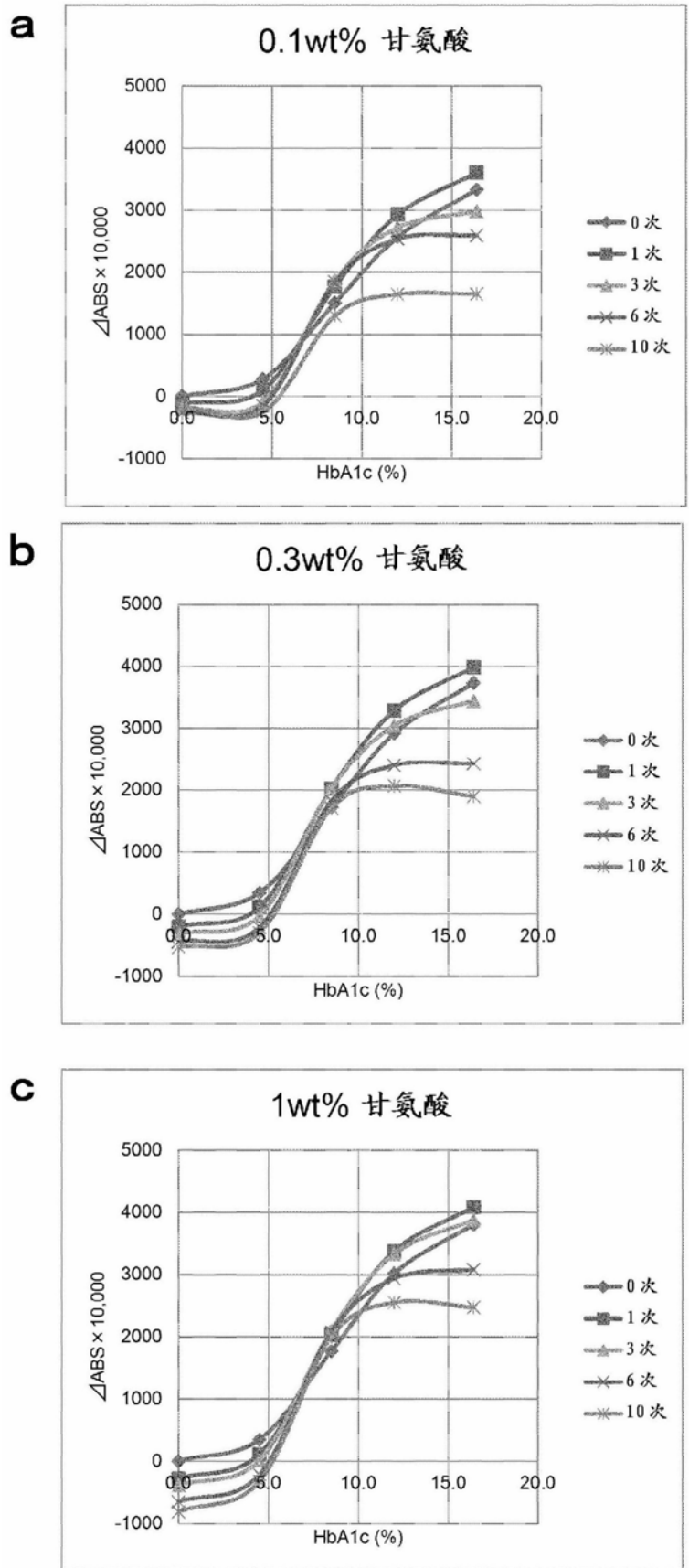


图2-4A

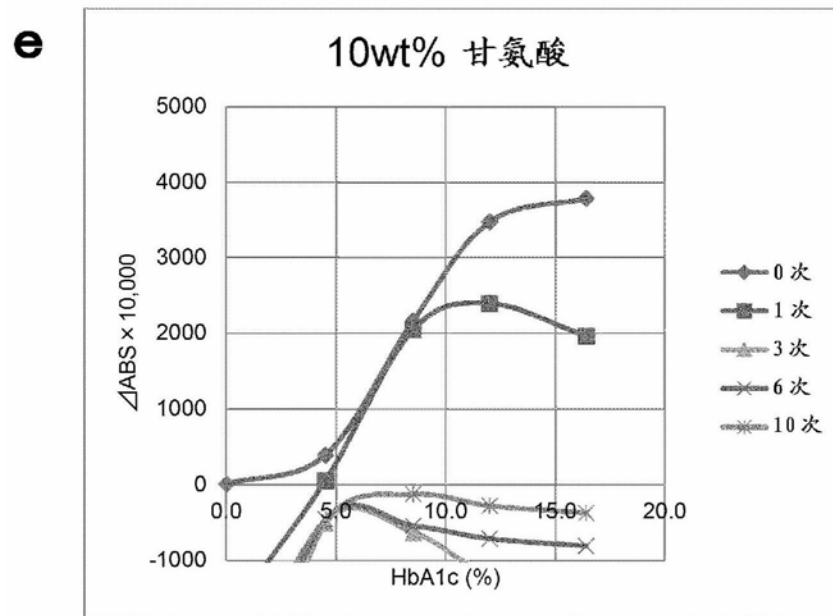
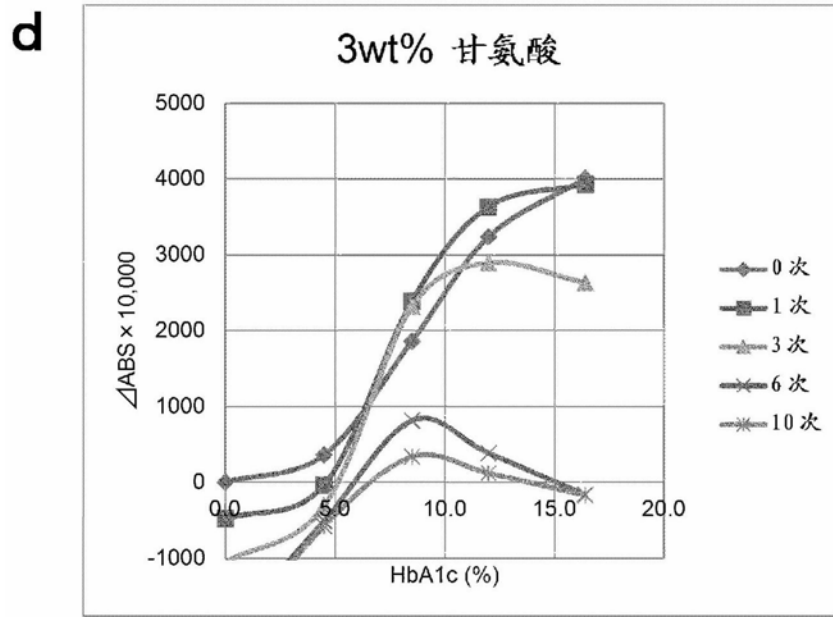


图2-4B

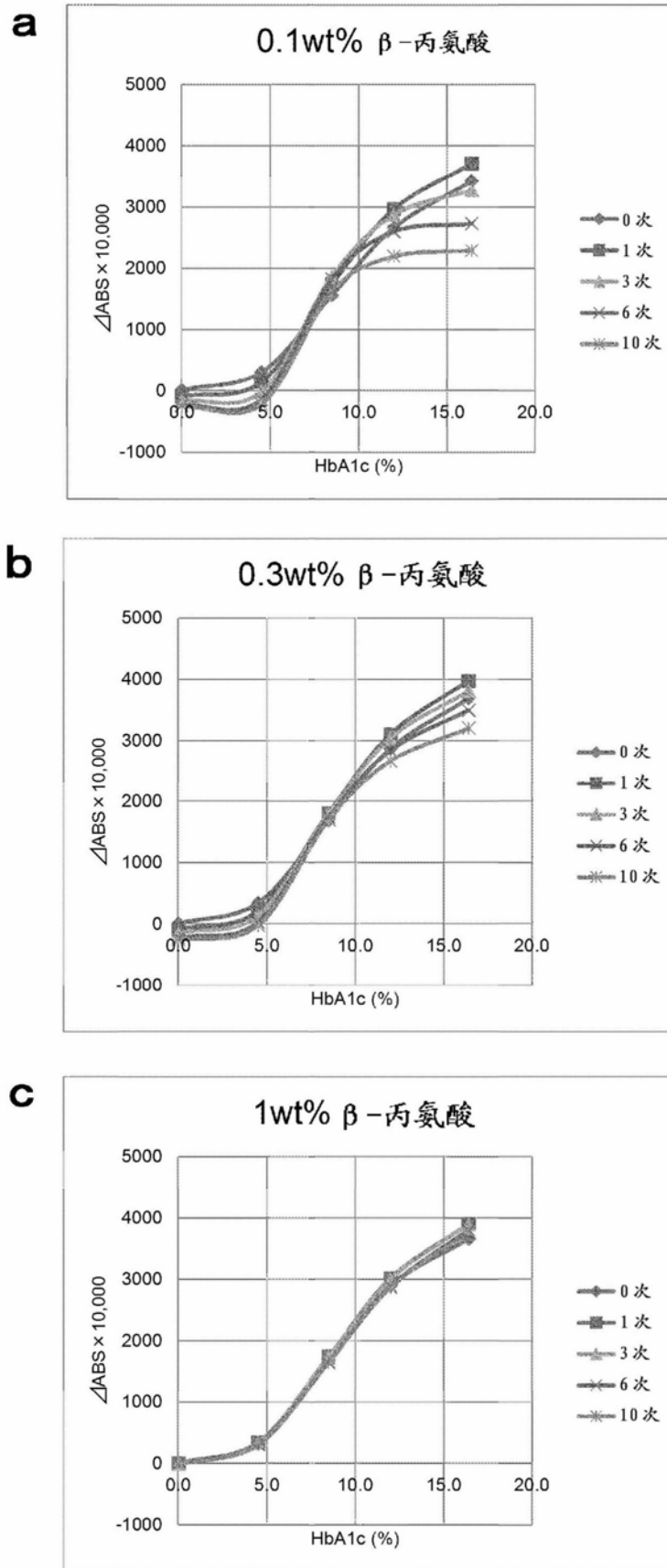


图2-5A

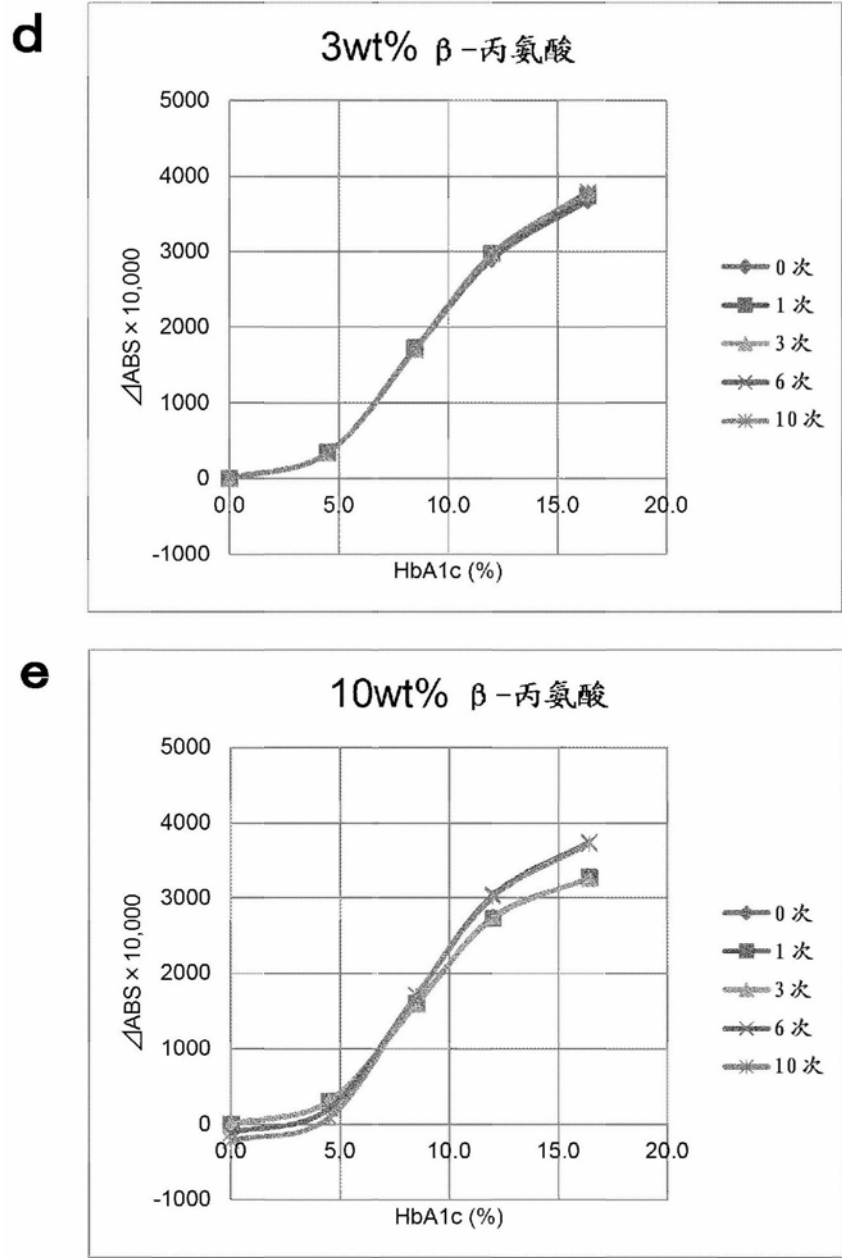


图2-5B

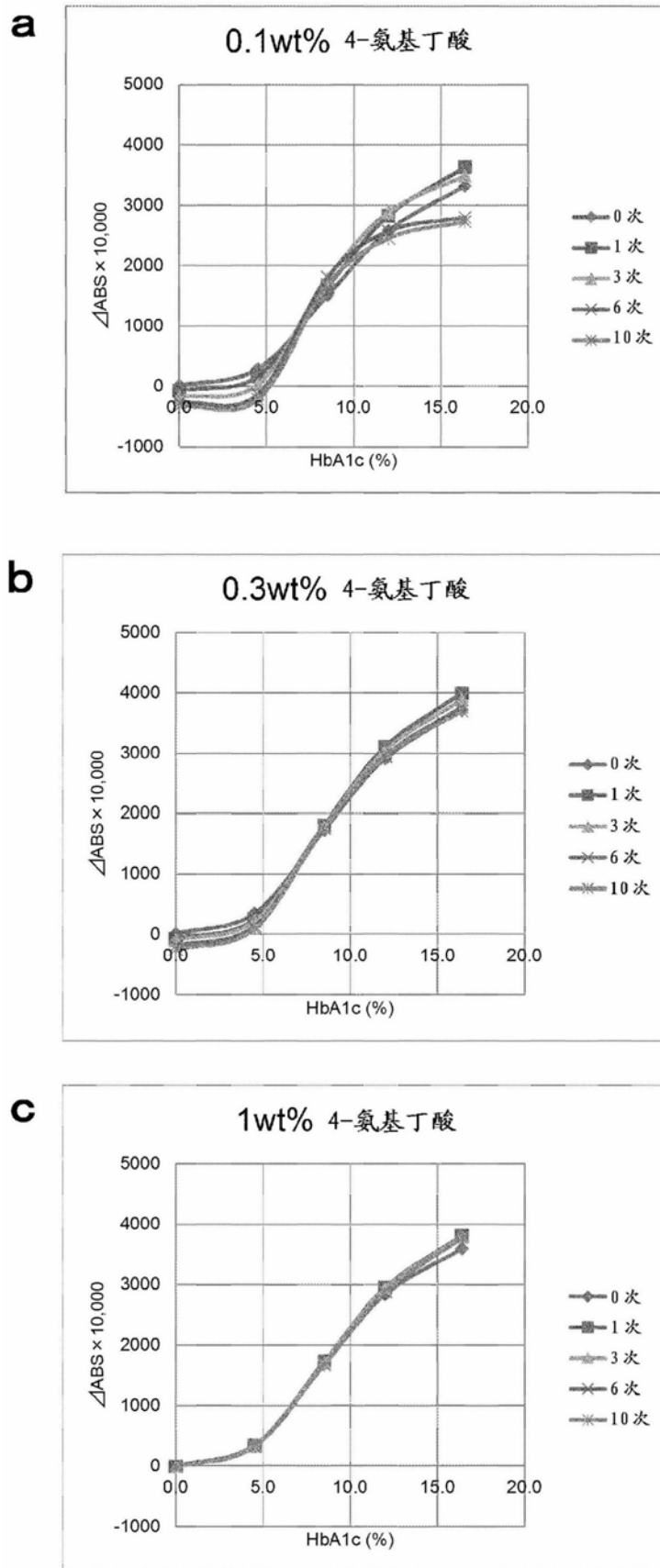


图2-6A

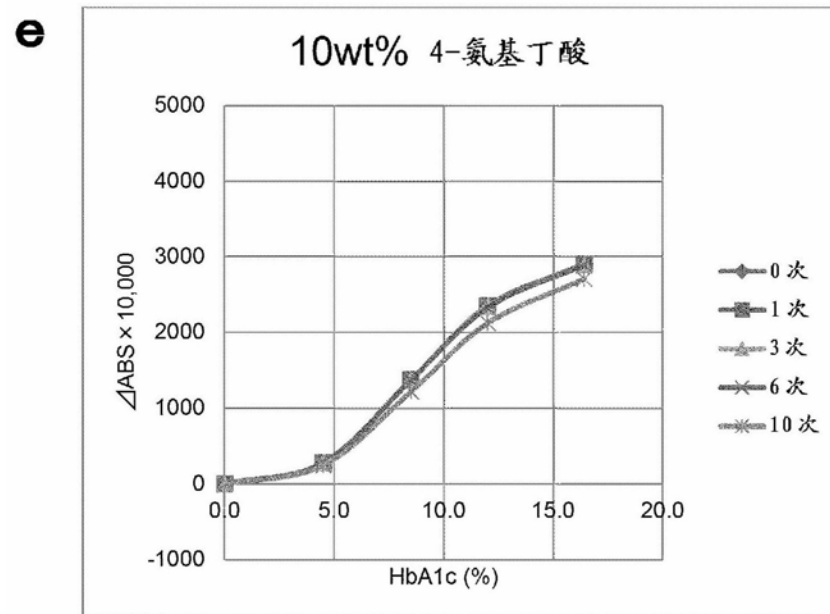
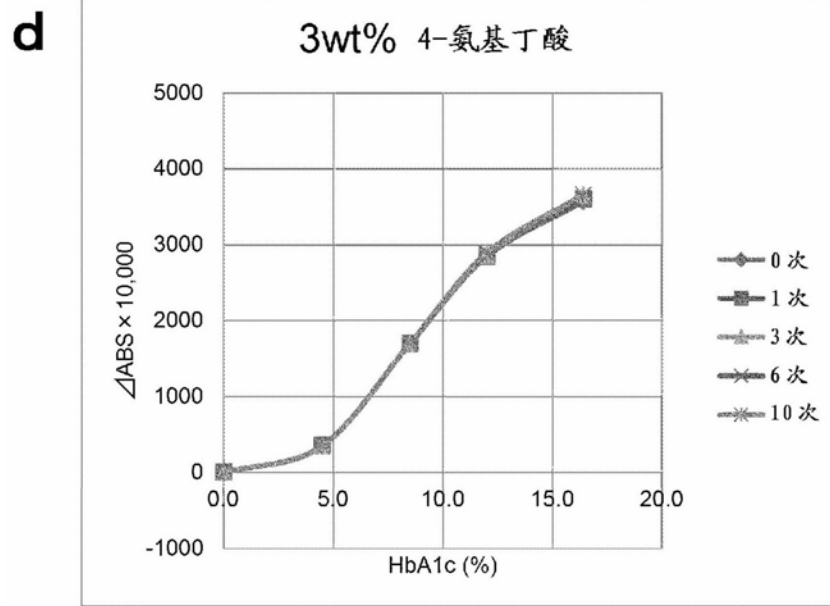


图2-6B

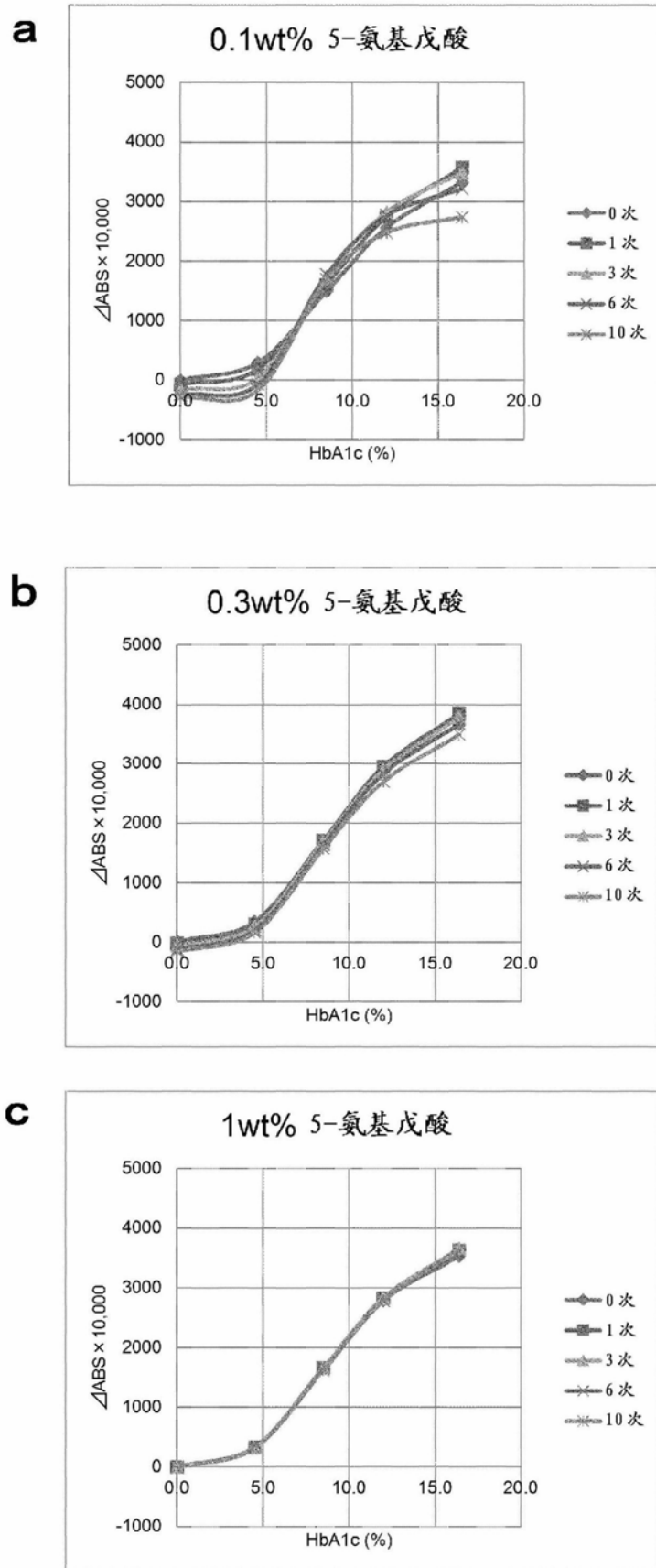


图2-7A

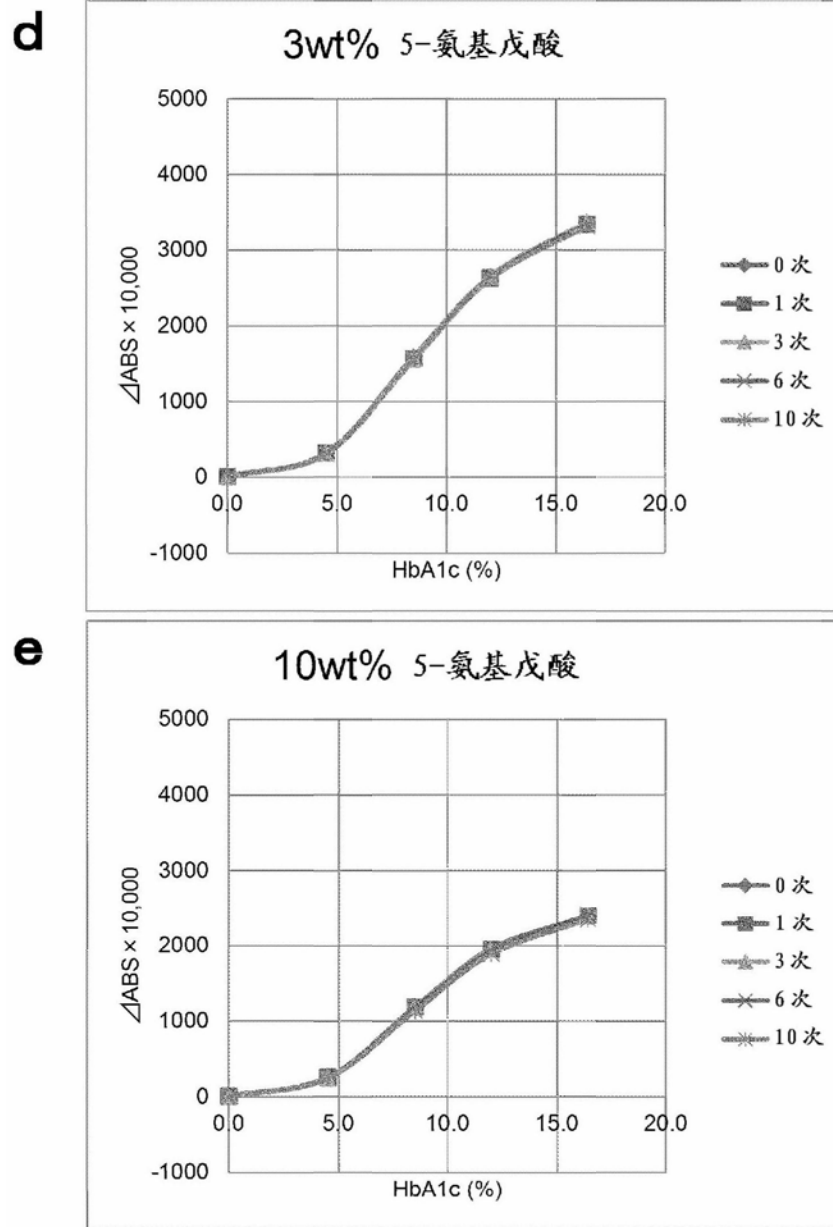


图2-7B

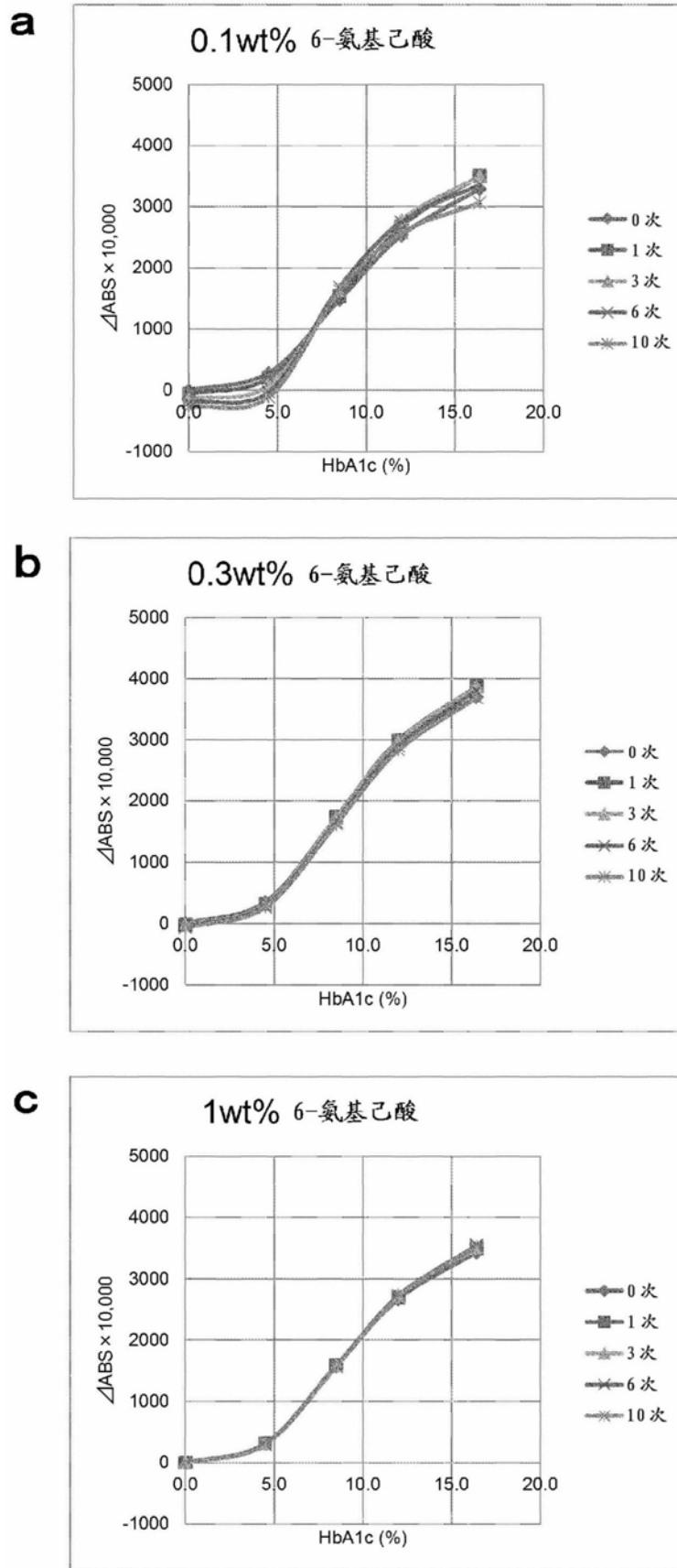


图2-8A

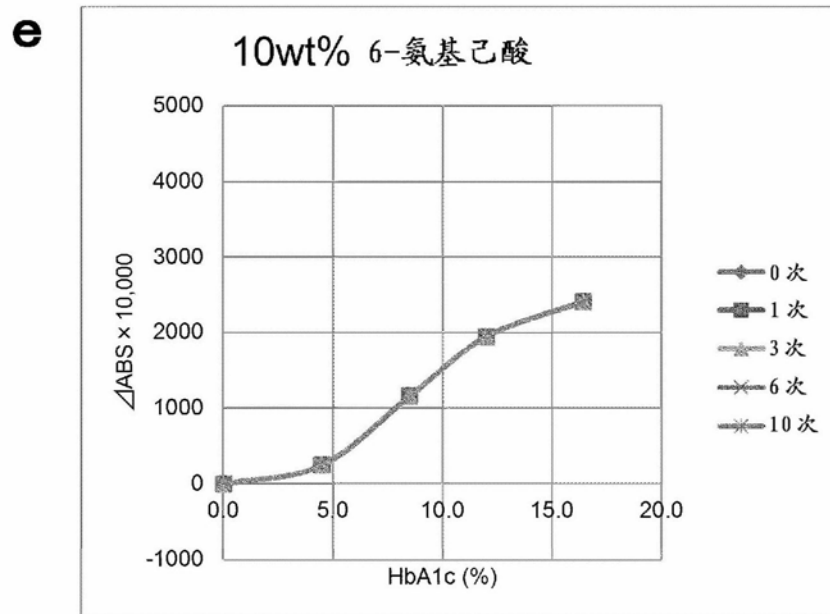
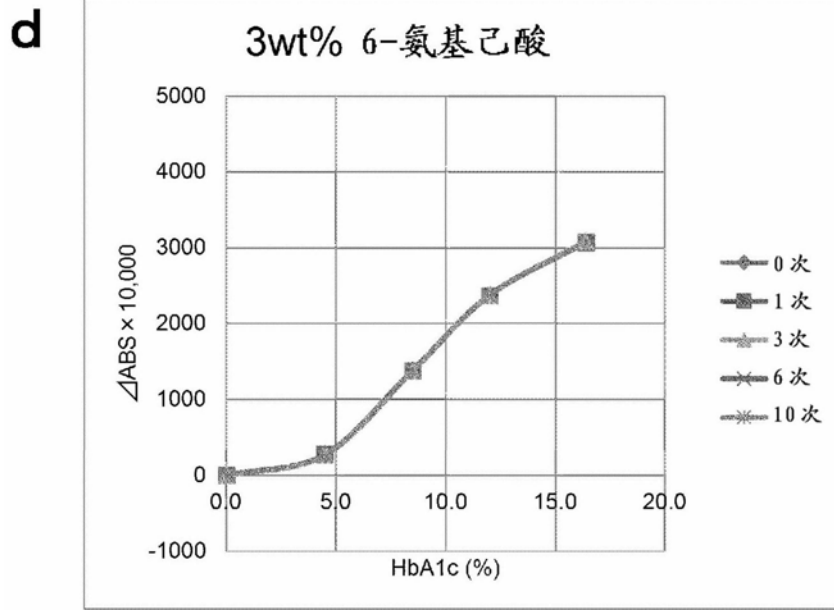


图2-8B

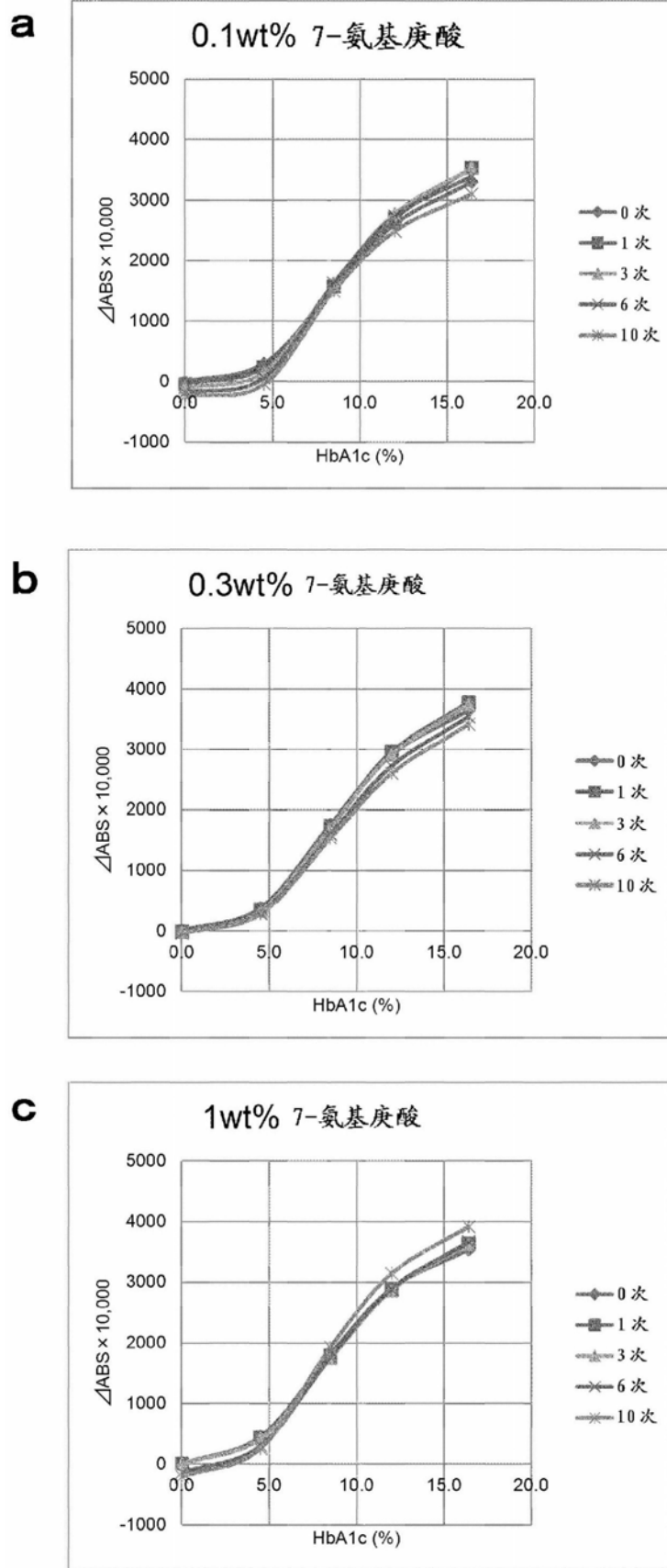
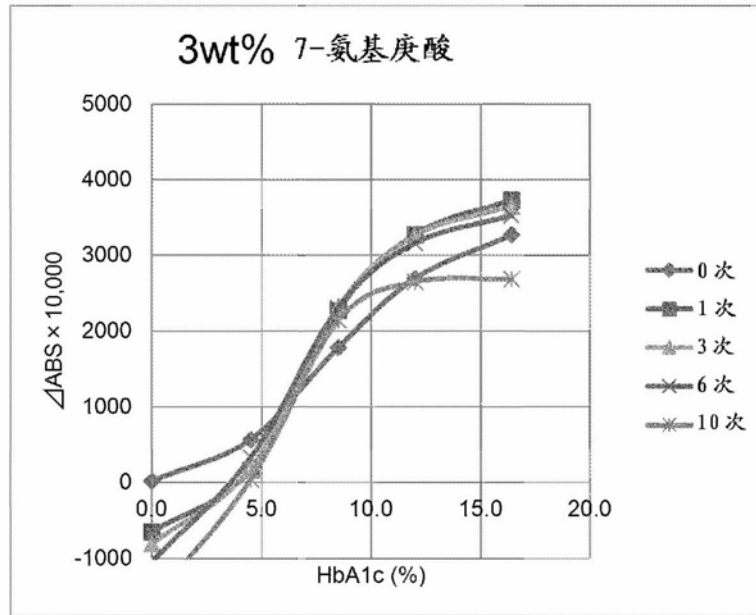


图2-9A

d



e

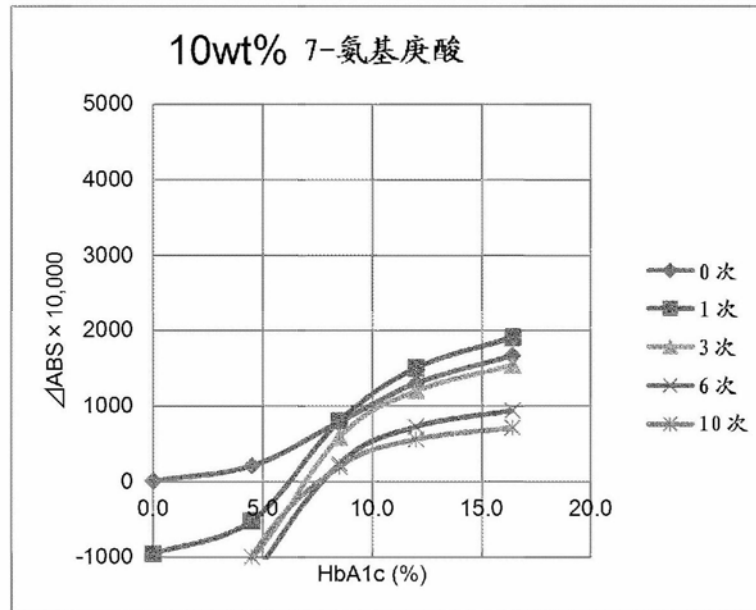


图2-9B

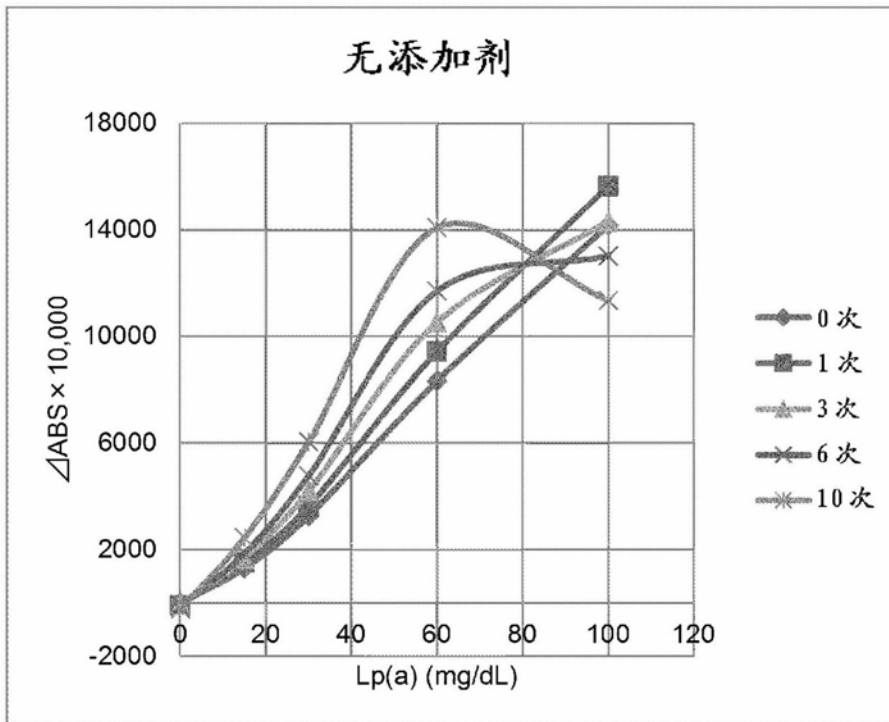


图3-1

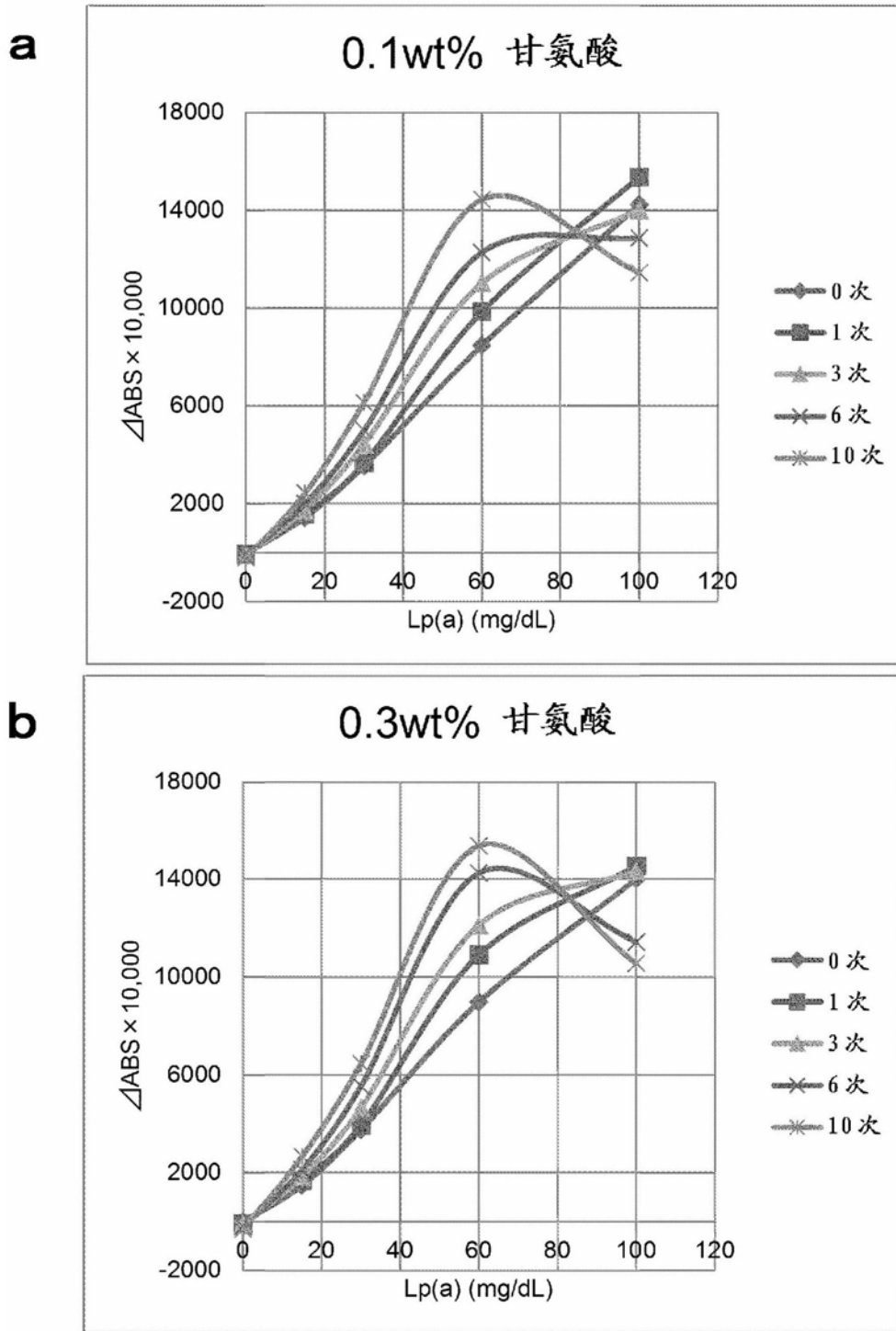


图3-2A

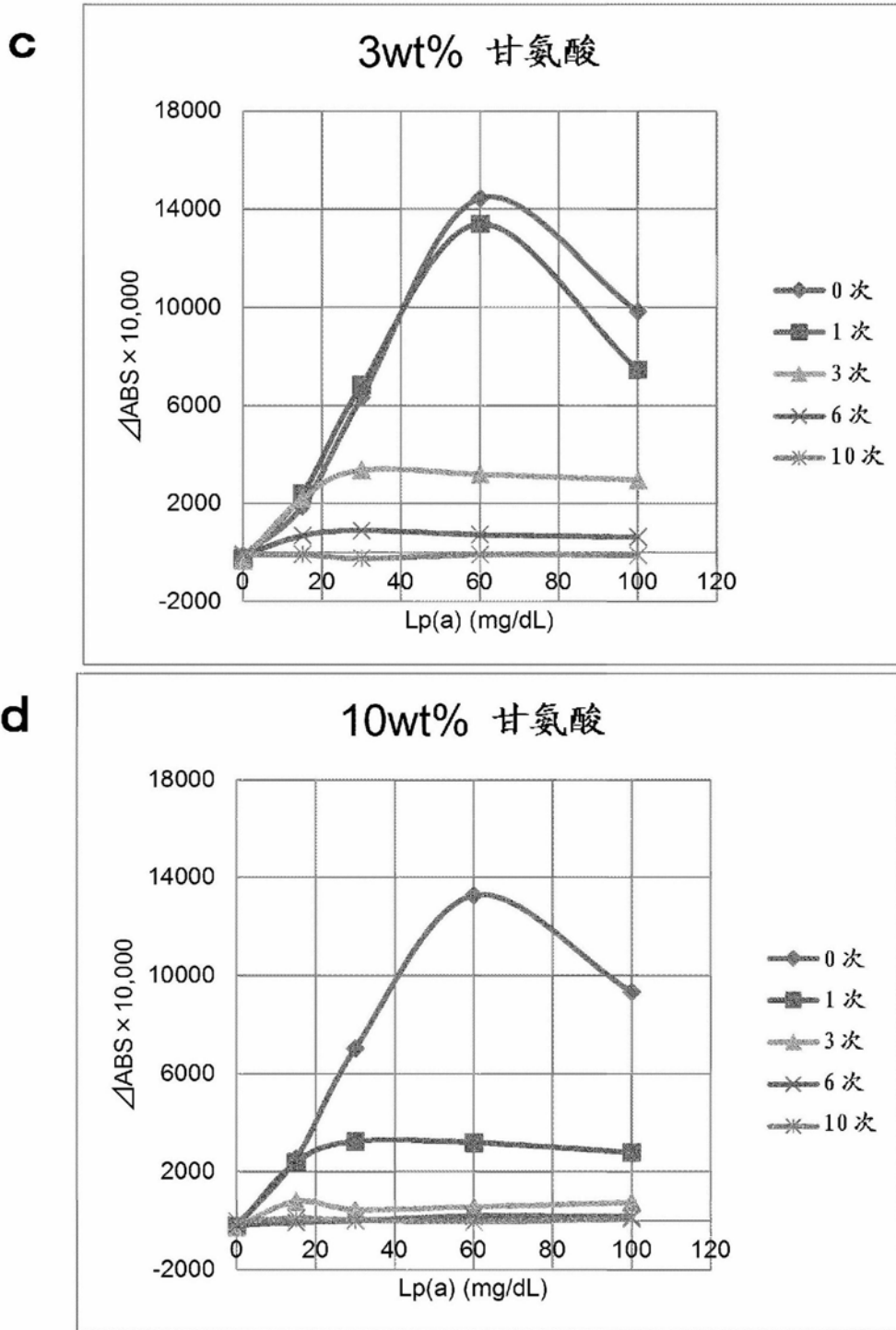


图3-2B

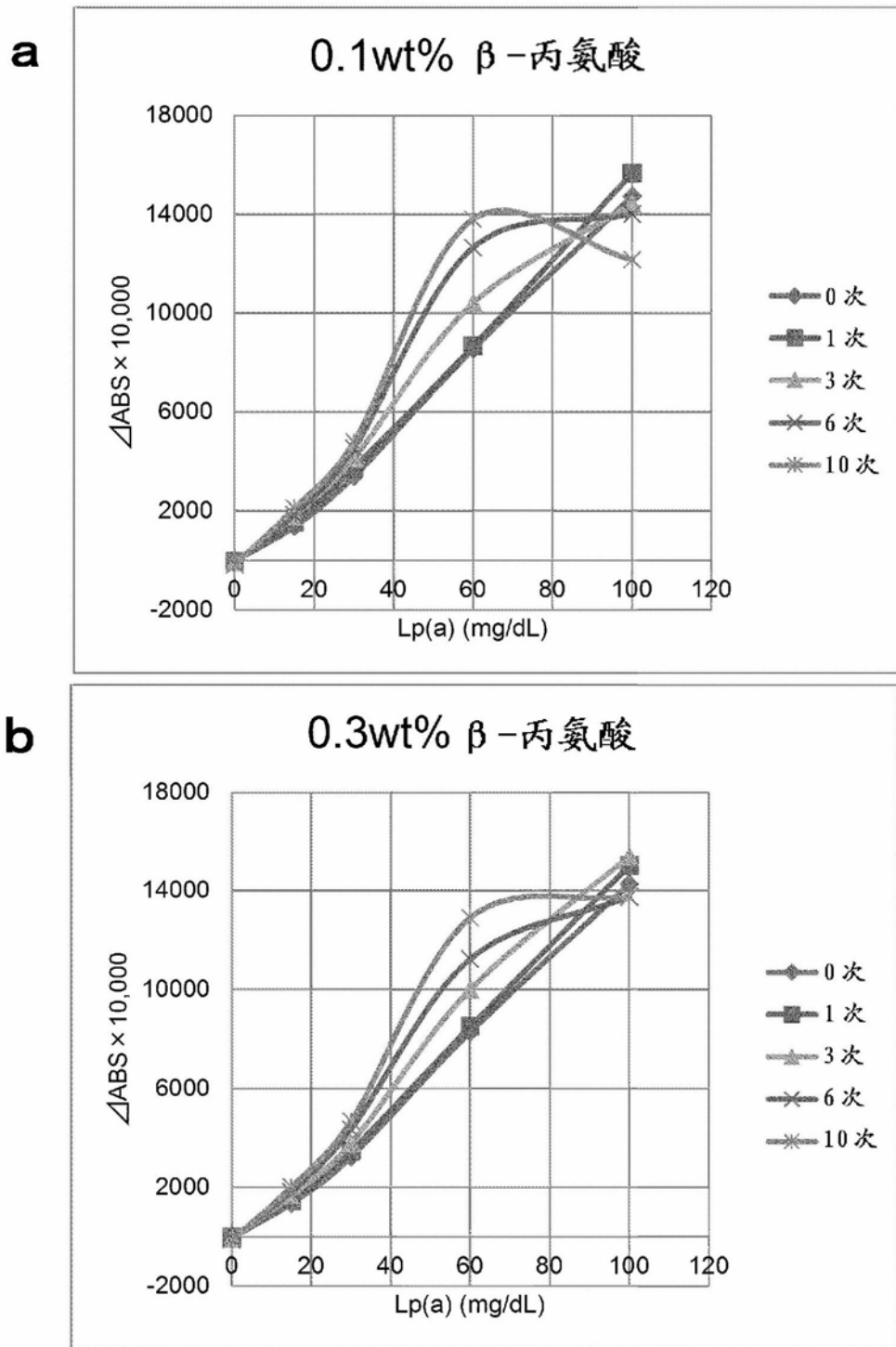


图3-3A

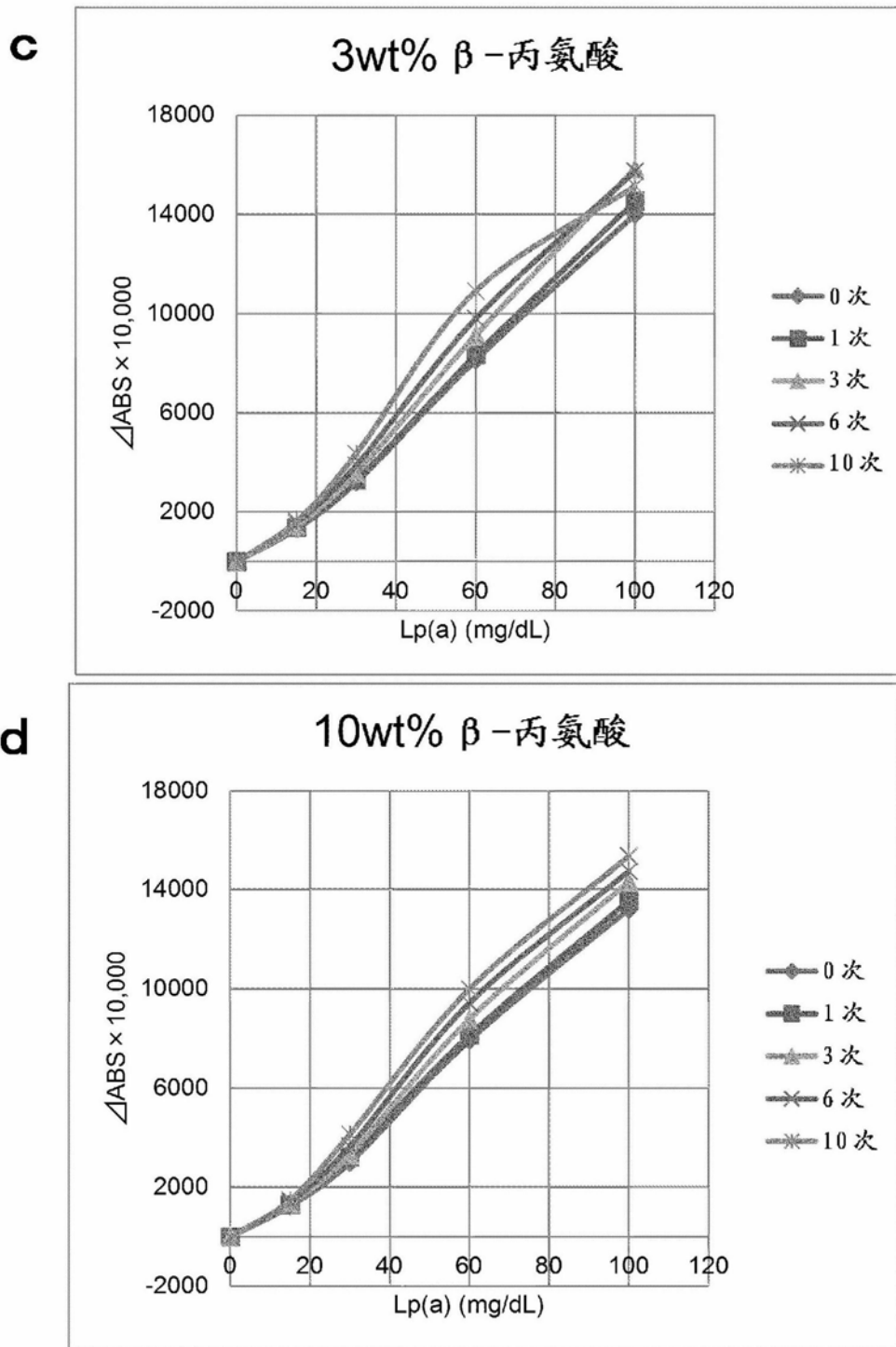


图3-3B

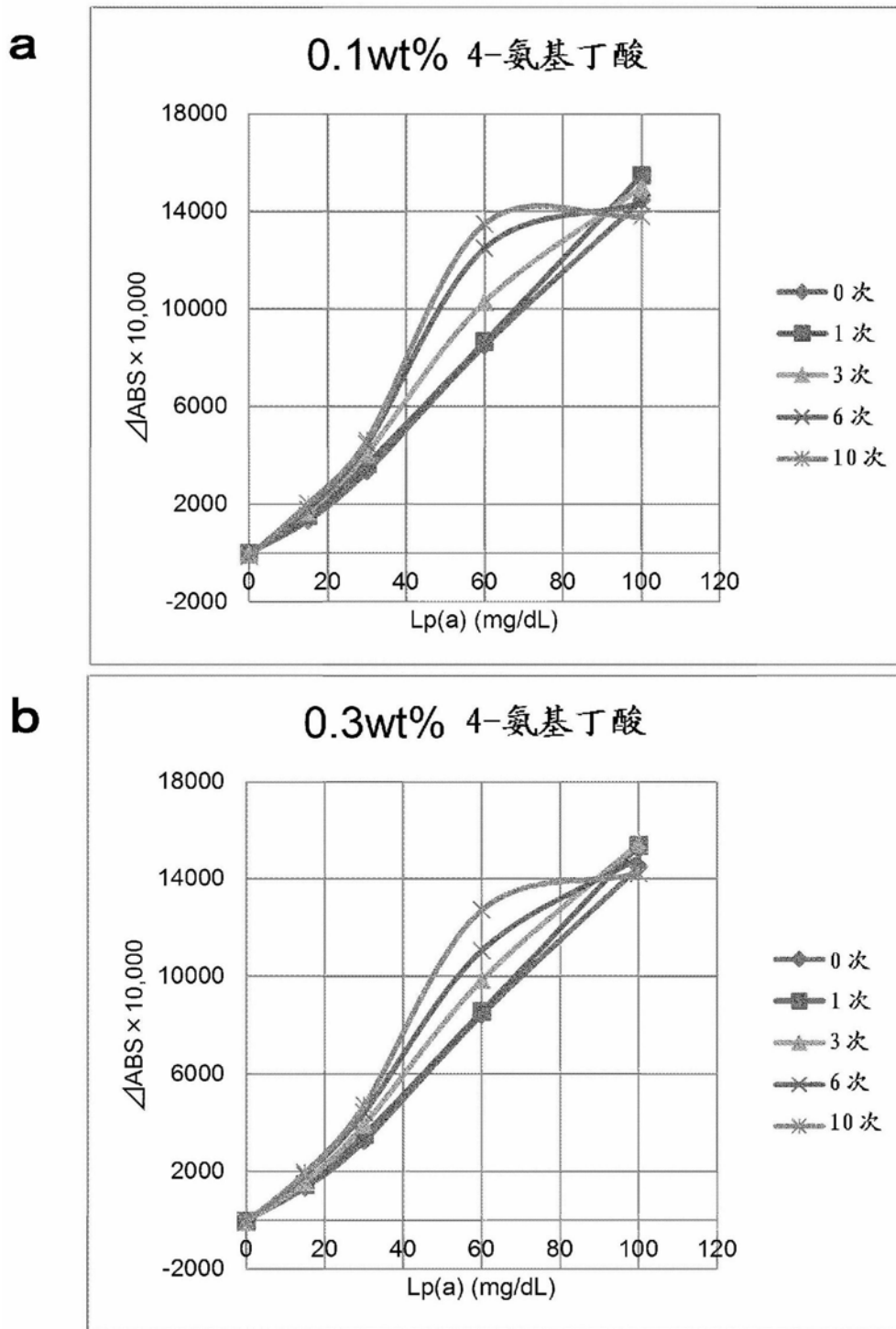


图3-4A

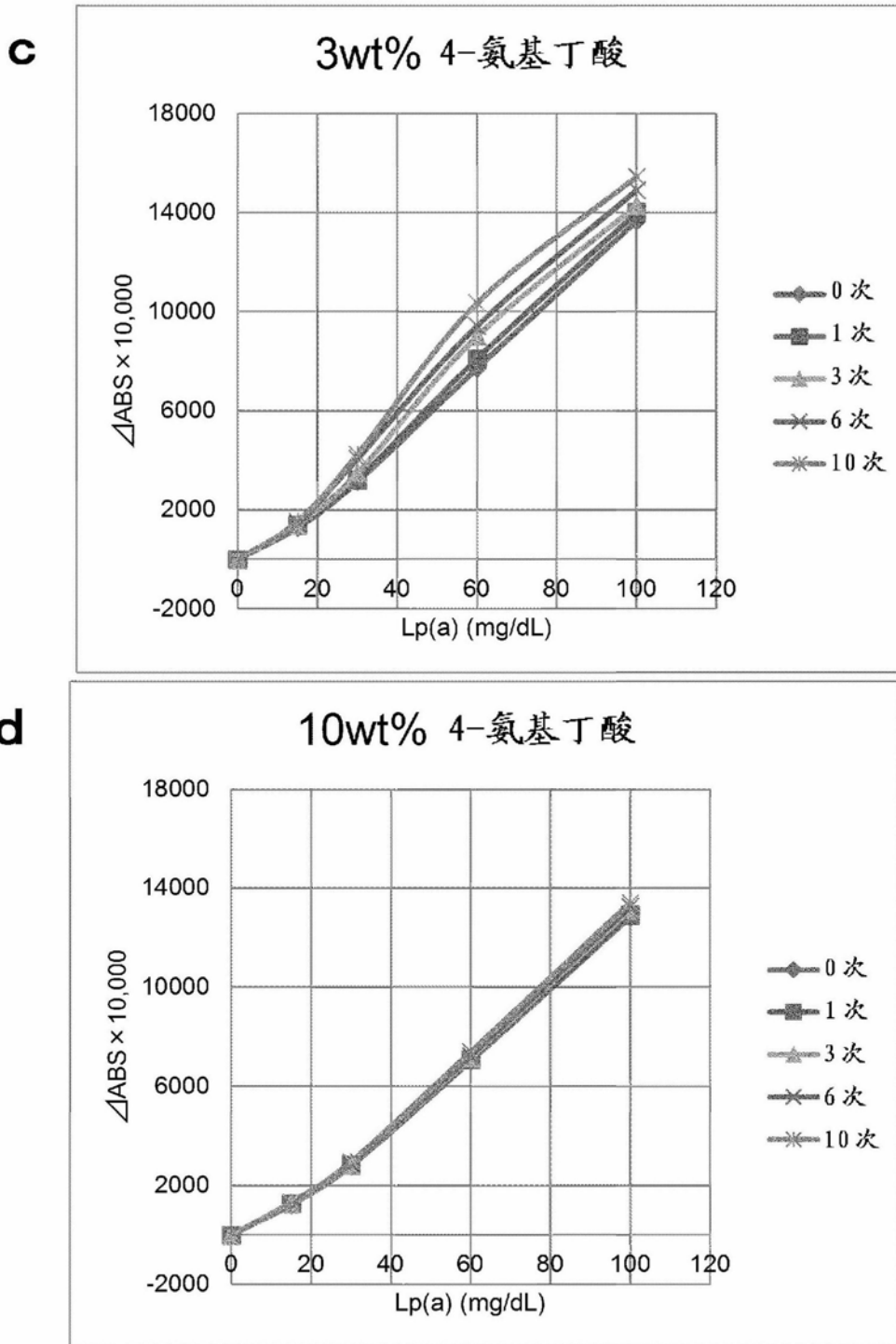


图3-4B

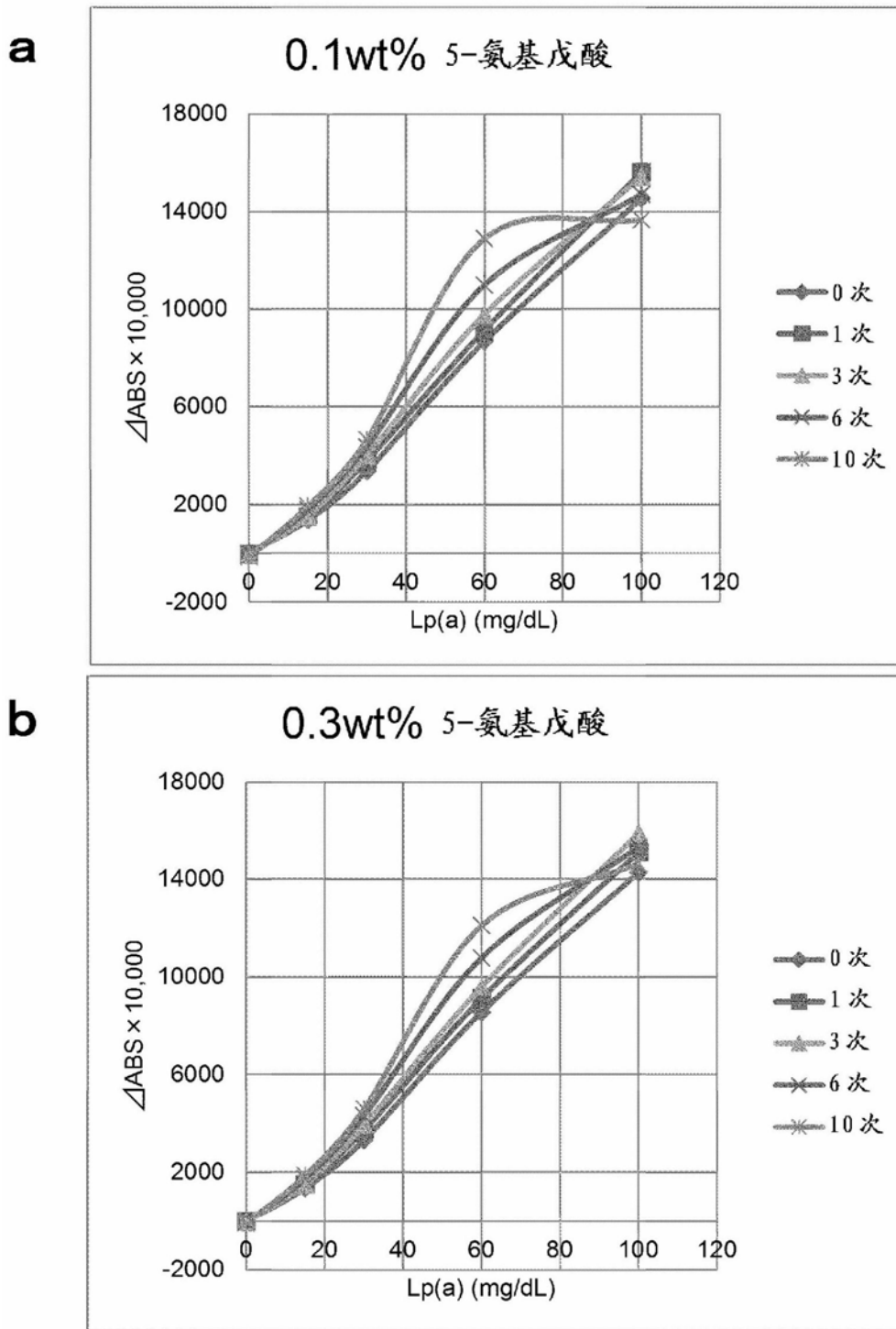
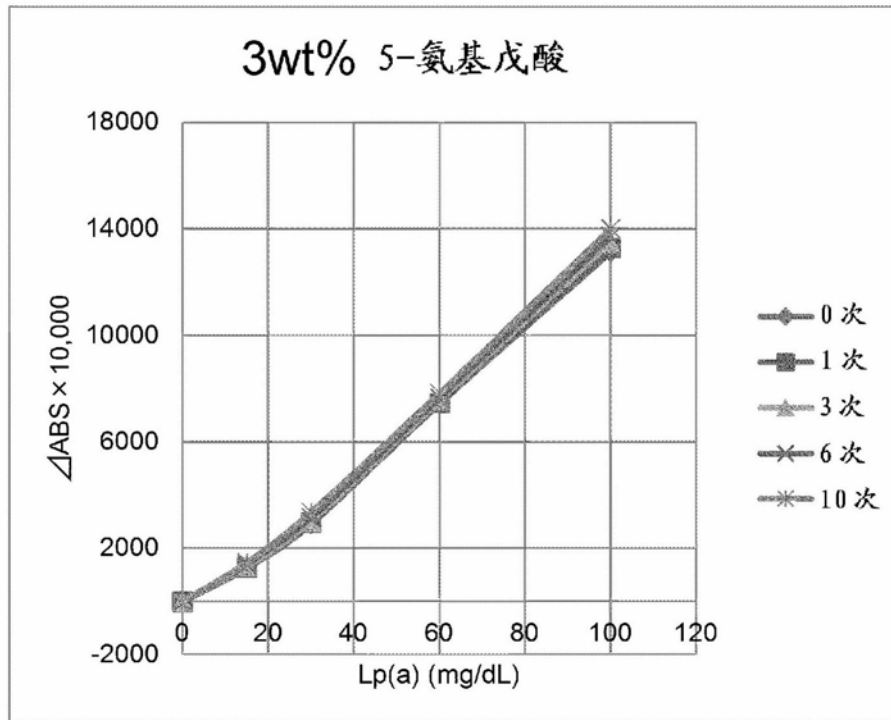


图3-5A

c



d

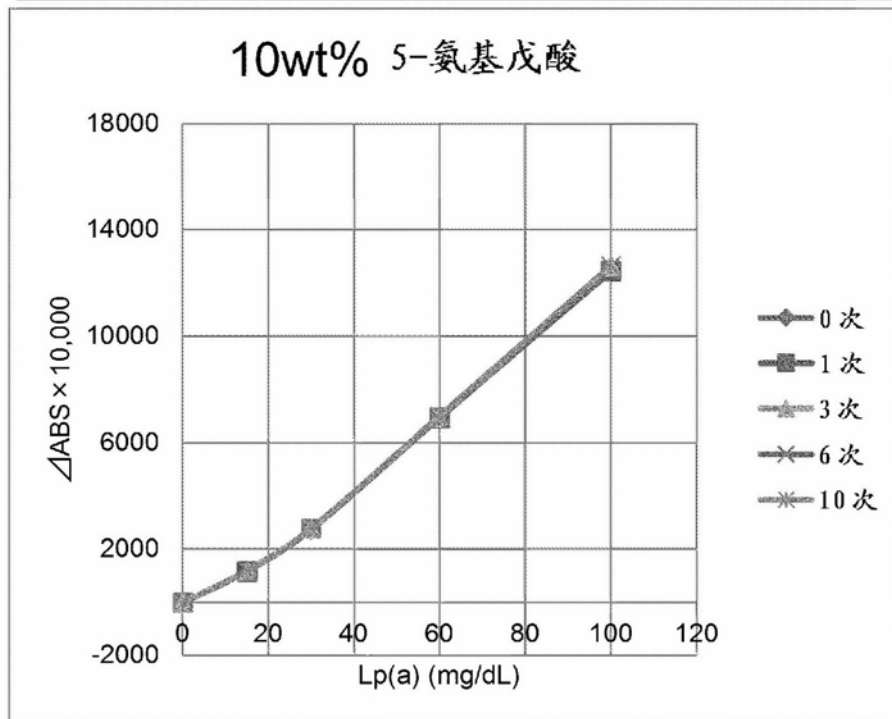


图3-5B

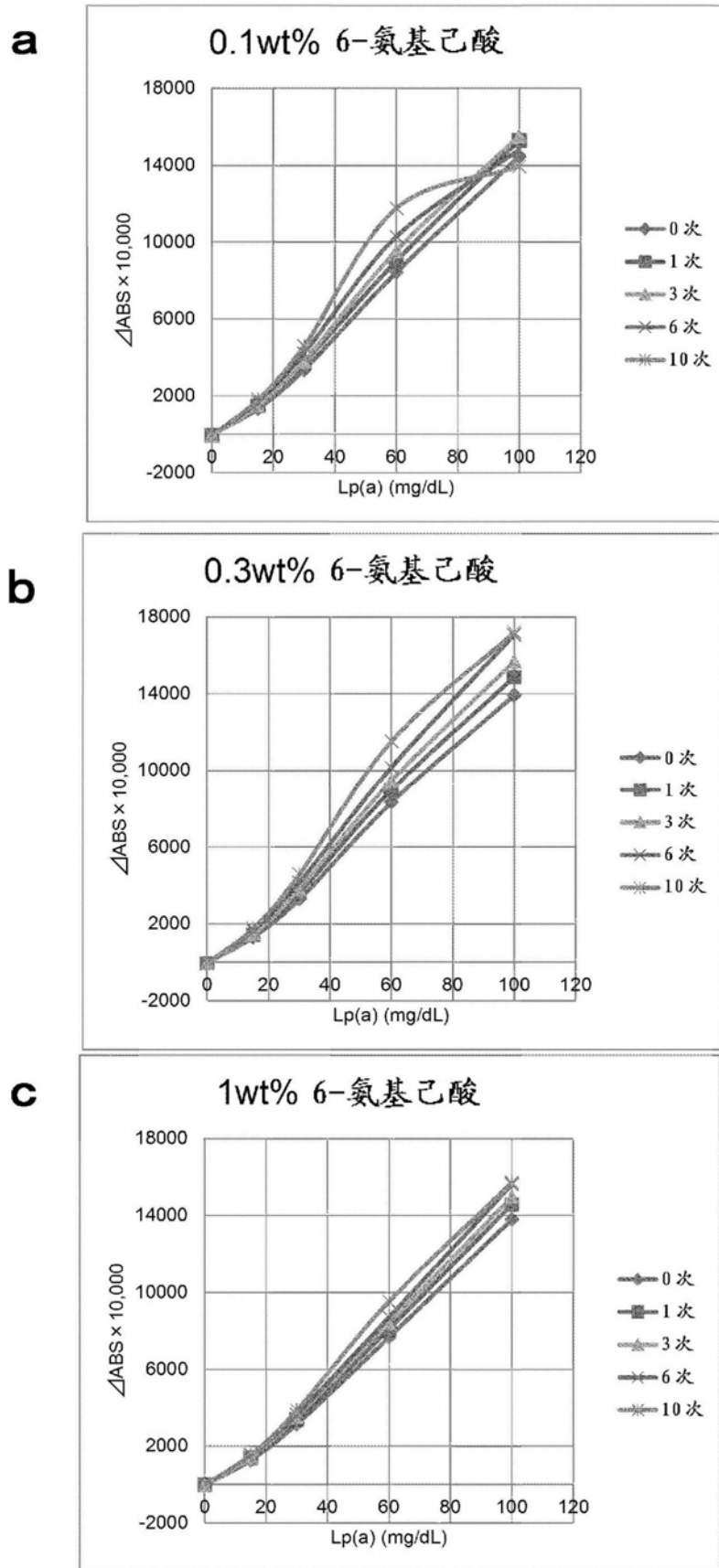


图3-6A

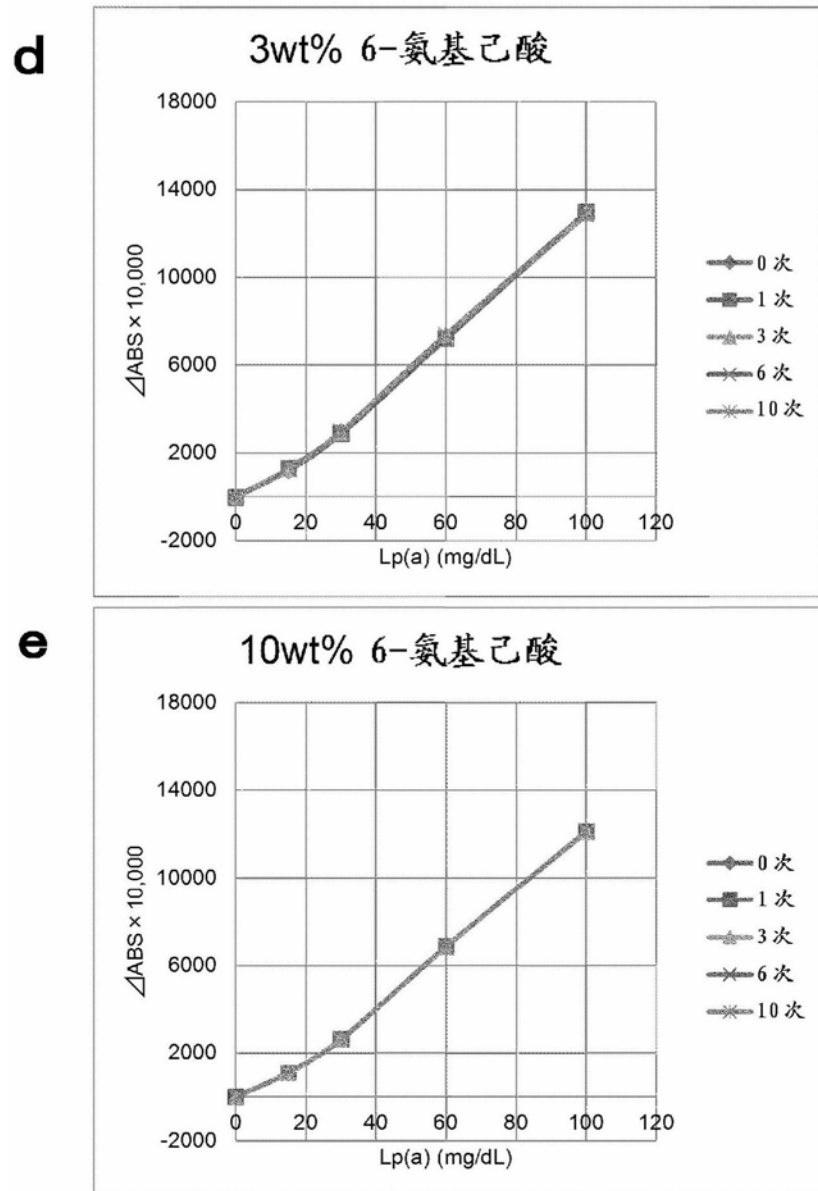


图3-6B

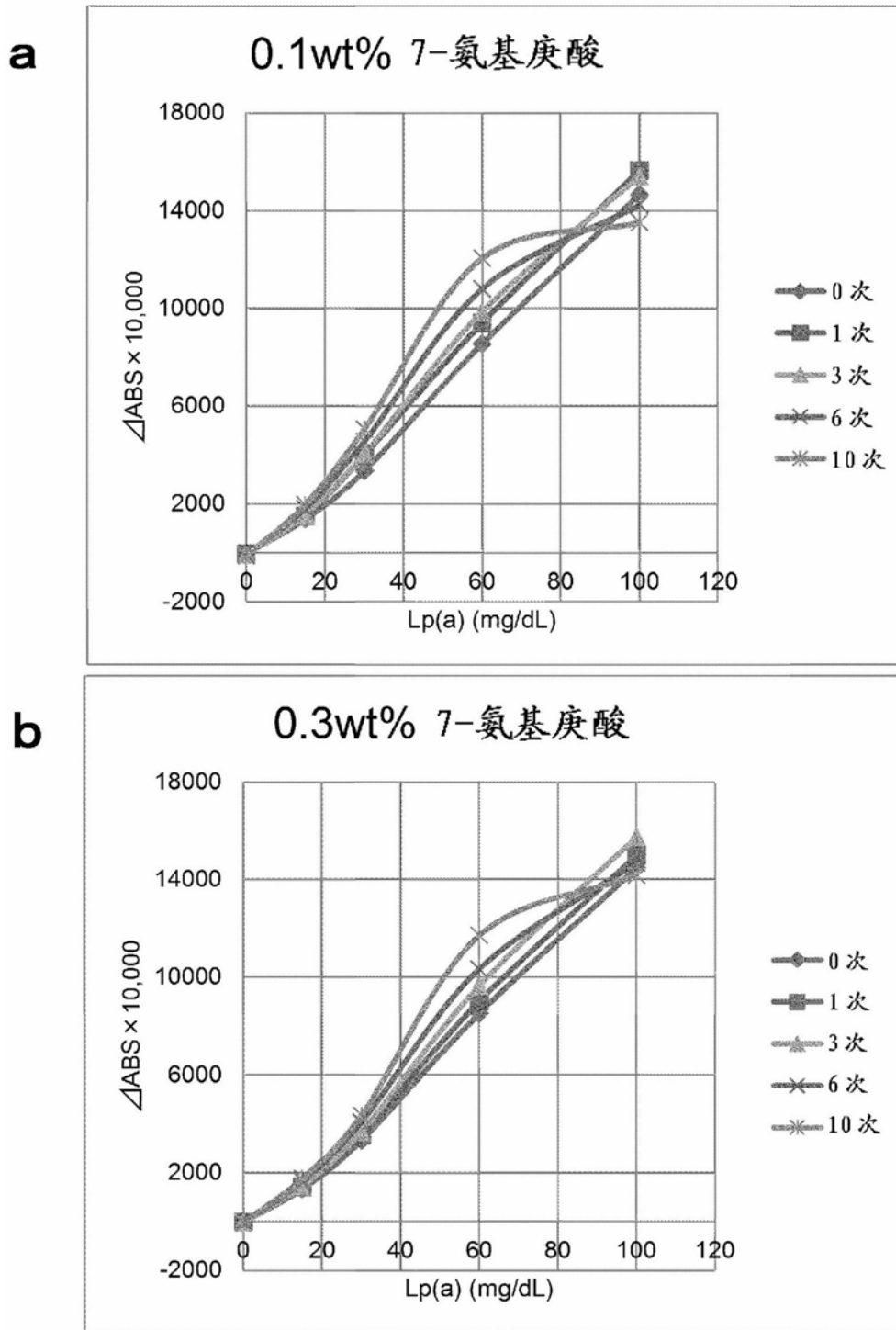


图3-7A

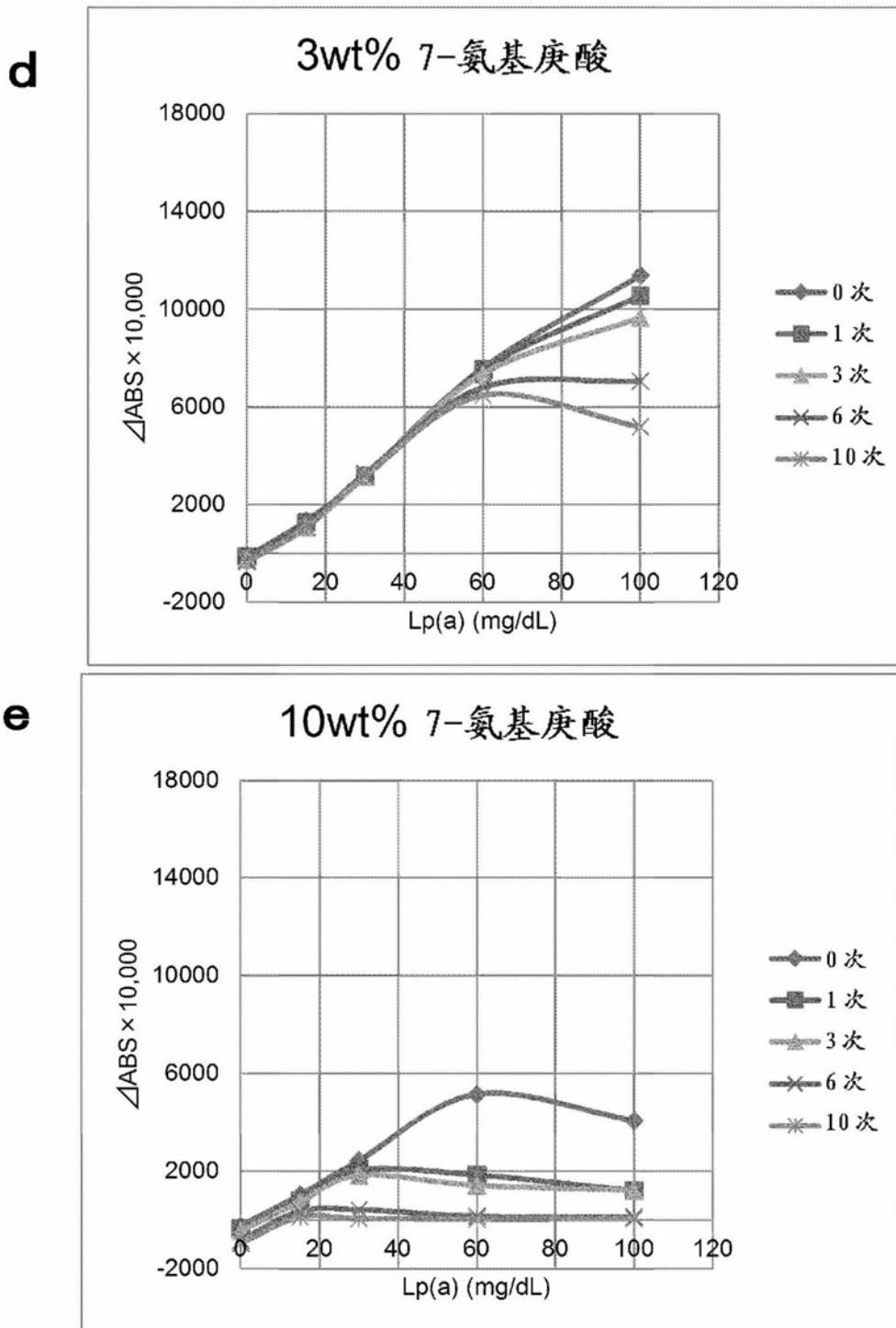


图3-7B

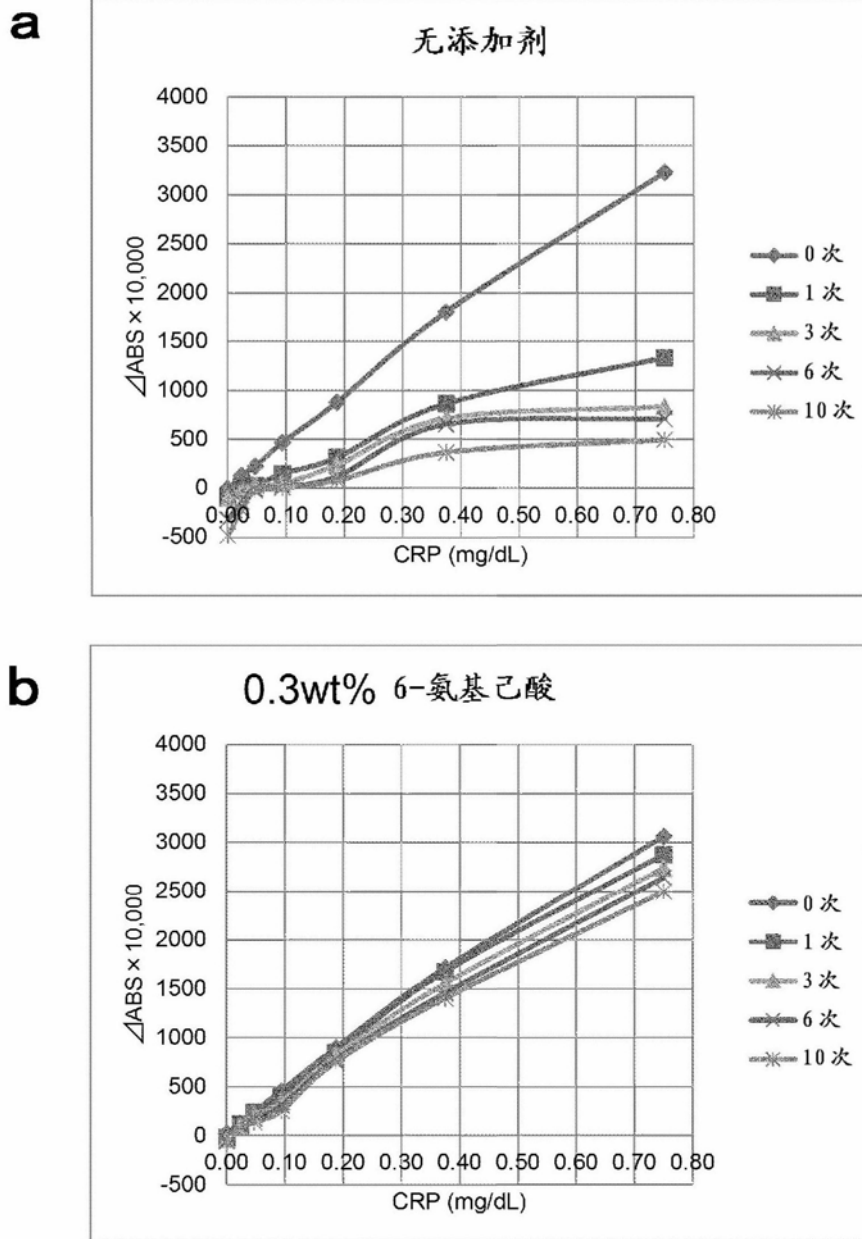
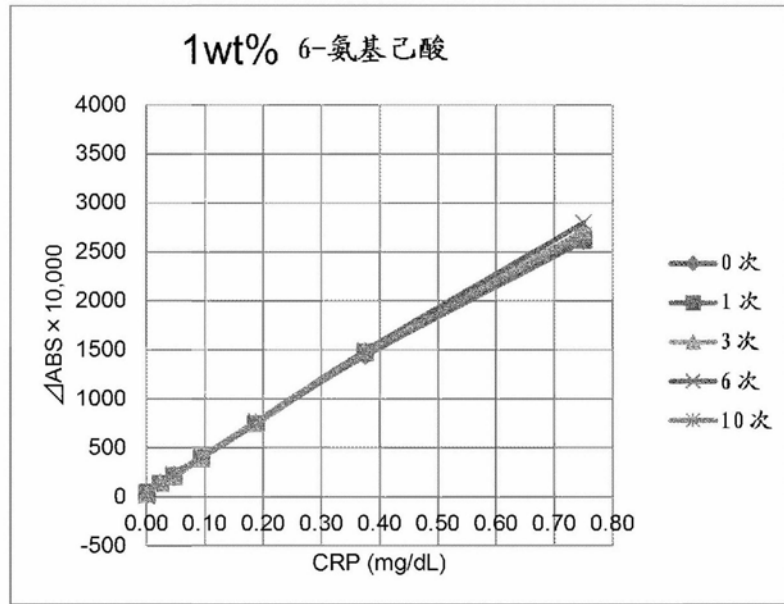


图4A

c



d

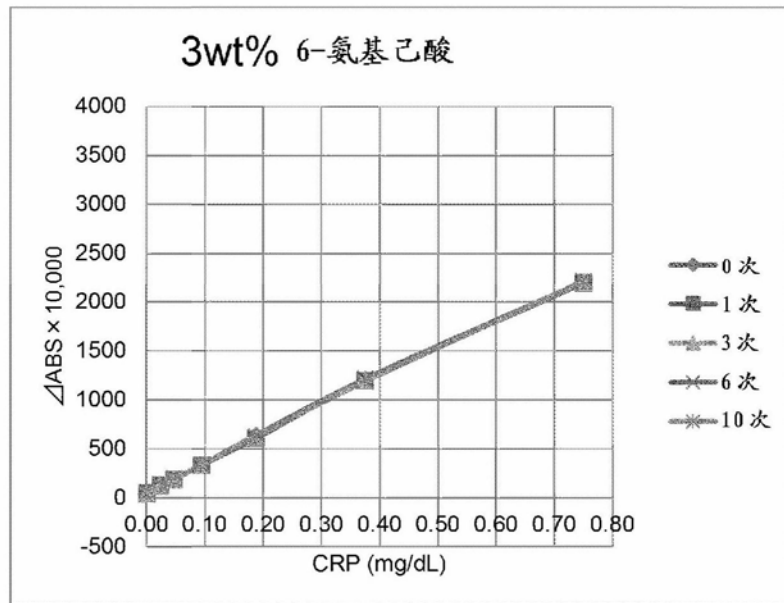


图4B

专利名称(译)	含有不溶性载体颗粒的免疫测定试剂的劣化防止的手段		
公开(公告)号	CN110720038A	公开(公告)日	2020-01-21
申请号	CN201880038355.6	申请日	2018-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	藤仓化成株式会社		
申请(专利权)人(译)	藤仓化成株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	藤仓化成株式会社		
[标]发明人	北善纪		
发明人	北善纪		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
代理人(译)	于巧玲		
优先权	2017149290 2017-08-01 JP 2017208678 2017-10-27 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

发现了一种在含有致敏或未致敏的不溶性载体颗粒的免疫测定用试剂冻结的情况下抑制该不溶性载体颗粒的非特异性凝集的成分，并以提供防止该免疫测定试剂劣化的手段作为课题，作为抑制上述不溶性载体颗粒的非特异性凝集的成分，得到了下述的 ω -氨基酸(1)：[式中n是2至6的整数。]，并且提供使用以含有该 ω -氨基酸(1)为特征的不溶性载体颗粒的免疫测定用试剂，以及使用该 ω -氨基酸(1)的免疫测定用试剂的劣化防止方法。

