



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1969189 B

(45) 授权公告日 2012.03.21

(21) 申请号 200580019597.3

(22) 申请日 2005.06.14

(30) 优先权数据

176288/2004 2004.06.14 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.12.14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2005/010882 2005.06.14

(87) PCT申请的公布数据

W02005/121795 JA 2005.12.22

(73) 专利权人 协和梅迪克斯株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 守田和树 鹈泽耕治 铃木惠美子

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 樊卫民

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

US 4256833 A, 1981.03.17, 参见权利要求 1-8, 说明书第 2 栏第 66 行到第 4 栏第 20 行, 第 5 栏第 65 行到 68 行.

JP 05-188055 A, 1993.07.27, 说明书第 1 段到第 7 段, 第 8 段到第 11 段.

US 4256833 A, 1981.03.17, 参见权利要求 1-8, 说明书第 2 栏第 66 行到第 4 栏第 20 行, 第 5 栏第 65 行到 68 行.

JP 2001-183375 A, 2001.07.06, 全文.

US 4914040 A, 1990.04.03, 说明书第 1 栏第 46 行到第 2 栏 68 行, 第 3 栏第 30 行到第 43 行, 第 3 栏第 44 行到第 4 栏第 43 行.

审查员 杨冀川

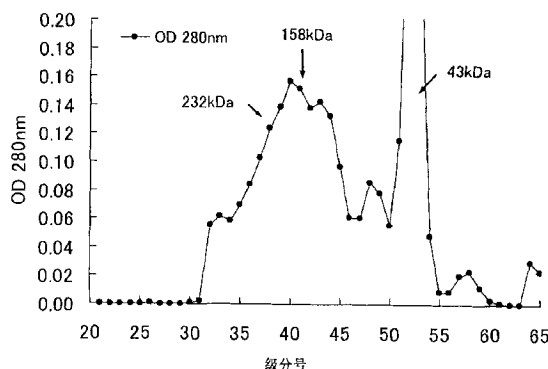
权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图 1 页

(54) 发明名称

非特异性反应被抑制的可溶性白介素-2 受体免疫学测定方法和试剂

(57) 摘要

一种非特异性反应被抑制的待测对象的免疫学定量方法, 其包括下列步骤: 在含水介质中让与待测对象特异性结合的第一抗体经酶标记后形成的酶标抗体与样品反应, 由此形成酶标抗体与待测对象的免疫复合物, 所述酶标抗体基本上只含有一种或多种选自第一抗体与酶之间的结合比率为 1:1、1:2、1:3 和 2:1 的酶标抗体的酶标抗体, 以及测定免疫复合物的酶活性。



1. 一种非特异性反应被抑制的可溶性白介素 -2 受体的免疫学定量方法,其包括下列步骤:

在含水介质中让与可溶性白介素 -2 受体特异性结合的第一抗体经酶标记后形成的酶标抗体与样品反应,由此形成酶标抗体与可溶性白介素 -2 受体的免疫复合物,所述酶标抗体为第一抗体和酶之间的结合比率是 1 : 1、1 : 2 的酶标抗体占整个酶标抗体的分子数目的 50% 以上的酶标抗体,以及

测定免疫复合物的酶活性。

2. 如权利要求 1 所述的免疫学定量方法,还包含下列步骤:让一种抗体与样品反应,由此与可溶性白介素 -2 受体形成免疫复合物,在所述抗体中,分离手段结合第二抗体,所述第二抗体特异性结合的抗原决定部位与结合第一抗体的可溶性白介素 -2 受体的抗原决定部位不同。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的免疫学定量方法,其中第一抗体是除去了 Fc 部分的抗体。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的免疫学定量方法,其中非特异性反应是由人抗鼠抗体引起的反应。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的免疫学定量方法,其中在使酶标抗体与样品反应而与可溶性白介素 -2 受体形成免疫复合物的步骤中,同时存在 IgG 聚合体和 IgG 或二者之一。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的免疫学定量方法,其中非特异性反应是由与标记酶发生反应的抗体引起的反应。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的免疫学定量方法,其中在使酶标抗体与样品反应而与可溶性白介素 -2 受体形成免疫复合物的步骤中,同时存在钝化的该标记酶。

8. 如权利要求 1 或 2 所述的免疫学定量方法,其中酶是过氧化物酶。

9. 一种在非特异性反应被抑制、可溶性白介素 -2 受体的免疫学定量方法中使用的试剂,其包括与可溶性白介素 -2 受体特异性结合的第一抗体经酶标记后形成的酶标抗体,所述酶标抗体为第一抗体和酶之间的结合比率是 1 : 1、1 : 2 的酶标抗体占整个酶标抗体的分子数目的 50% 以上的酶标抗体。

10. 如权利要求 9 所述的试剂,还含有一种抗体,其中分离手段结合第二抗体,所述第二抗体特异性结合的抗原决定部位与结合第一抗体的可溶性白介素 -2 受体的抗原决定部位不同。

11. 如权利要求 9 或 10 所述的试剂,其还含有用于测定酶活性的试剂。

12. 如权利要求 9 或 10 所述的试剂,其中第一抗体是除去了 Fc 部分的抗体。

13. 如权利要求 9 或 10 所述的试剂,其中非特异性反应是由人抗鼠抗体引起的反应。

14. 如权利要求 9 或 10 所述的试剂,其还含有 IgG 聚合体和 IgG 或二者之一。

15. 如权利要求 9 或 10 所述的试剂,其中非特异性反应是由与标记酶发生反应的抗体引起的反应。

16. 如权利要求 9 或 10 所述的试剂,其还含有使标记抗体的酶钝化后得到的酶。

17. 如权利要求 9 或 10 所述的试剂,其中酶是过氧化物酶。

18. 如权利要求 9 或 10 所述的试剂,还含有选自含水介质、金属离子、盐类、糖类、表面活性剂、防腐剂、蛋白质、蛋白质稳定剂中的一种或多种物质。

19. 一种在可溶性白介素 -2 受体的免疫学定量方法中用于抑制非特异性反应的方法,

包括下列步骤：

在含水介质中让与可溶性白介素 -2 受体特异性结合的第一抗体经酶标记后形成的酶标抗体与样品反应,由此形成酶标抗体与可溶性白介素 -2 受体的免疫复合体,所述酶标抗体为第一抗体和酶之间的结合比率是 1 : 1、1 : 2 的酶标抗体占整个酶标抗体的分子数目的 50% 以上的酶标抗体。

20. 如权利要求 19 所述的抑制方法,还包括下列步骤:让一种抗体与样品反应,由此与可溶性白介素 -2 受体形成免疫复合体,在所述抗体中,分离手段结合第二抗体,所述第二抗体特异性结合的抗原决定部位与结合第一抗体的可溶性白介素 -2 受体的抗原决定部位不同。

21. 如权利要求 19 或 20 所述的抑制方法,其中第一抗体是除去了 Fc 部分的抗体。

22. 如权利要求 19 或 20 所述的抑制方法,其中非特异性反应是由人抗鼠抗体引起的反应。

23. 如权利要求 19 或 20 所述的抑制方法,其中在使酶标抗体与样品反应从而与可溶性白介素 -2 受体形成免疫复合体的步骤中,同时存在 IgG 聚合体和 IgG 或二者之一。

24. 如权利要求 19 或 20 所述的抑制方法,其中非特异性反应是由与标记酶反应的抗体引起的反应。

25. 如权利要求 19 或 20 所述的抑制方法,其中在使酶标抗体与样品反应从而与可溶性白介素 -2 受体形成免疫复合体的步骤中,同时存在钝化的该标记酶。

26. 如权利要求 19 或 20 所述的方法,其中酶是过氧化物酶。

非特异性反应被抑制的可溶性白介素-2受体免疫学测定方法和试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及非特异性反应被抑制的待测对象的免疫学定量方法、在非特异性反应被抑制的待测对象的免疫学定量方法中使用的试剂和待测对象的免疫学定量方法中抑制非特异性反应的方法。

背景技术

[0002] 在待测对象的免疫学定量方法中,已证实常常会发生非特异性反应。抗原抗体反应中,非特异性反应种类多样,而特别是由人抗鼠抗体(human anti-mouse antibody,以下简称 HAMA)产生的非特异性反应成为问题。在 HAMA 中,有 HAMA I 型和 HAMA II 型两种,HAMA I 型是在未接触鼠蛋白的人血液中产生的,HAMA II 型是动物饲养员等与鼠接触者,或接受过鼠抗体等鼠蛋白的人产生的。一般的,已知 HAMA 在采用鼠抗体的免疫学定量方法中,是产生问题的非特异因子,由 HAMA 而给测定系统带进误差,因而无法取得正确的测定数据。因此,在处理采用免疫学测定方法定量待测对象所获得的待测对象的定量数据中的不合理数据时,为了避免错误判断,要求开发能得到正确定量数据的方法。

[0003] 在免疫学定量方法中,抑制 HAMA 所引起的非特异性反应的方法,已知有效方法是采用与用于免疫测定的抗体相同的动物种中的免疫球蛋白,或聚合的免疫球蛋白等(参见专利文献 1,专利文献 2,非专利文献 1,非专利文献 2 和非专利文献 3)。

[0004] 此外,在抗原抗体反应中的非特异性反应中,还有由于与用作标记的酶发生反应的抗体引起的非特异性反应,已报道有使测定系统中同时存在钝化的该酶未抑制非特异性反应的方法(参见专利文献 3)。

[0005] 白介素-2(以下记作 IL-2)是由 133 个氨基酸构成的细胞因子,主要由 CD4⁺、CD8⁺ 的 T 细胞产生,也可由自然杀伤细胞(NK 细胞)产生。IL-2 有多种生理活性,主要参与免疫系统的激活。例如作为推进细胞周期进程的因子对 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、LAK(淋巴活化杀伤细胞)、巨噬细胞、嗜中性粒细胞等起作用。

[0006] 已知 IL-2 的受体(以下记作 IL-2R)由 α 链、 β 链和 γ 链构成, α 链的一部分从细胞上游离而以可溶性的白介素-2受体(以下记作 sIL-2R)存在于血液中。已报道因为 sIL-2R 由活化的 T 细胞和 B 细胞产生,所以伴随着生物体内免疫防御机制的活化、T 细胞类和 B 细胞类活化,血液中的 sIL-2R 会增加。有报告指出,由于慢性关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)等自身免疫性疾病,或病毒性肝炎、获得性免疫缺陷综合症(AIDS)等病毒感染症患者中,血清中 sIL-2R 浓度会增高,从而成为体内活化淋巴球的指标之一。同时,还知道肿瘤细胞会产生 sIL-2R,成人 T 细胞白血病(ATL)或非霍奇金淋巴瘤的病程与血清中 sIL-2R 浓度的变化有良好的相关性。已经有各种免疫系统疾病或病症的这类相关性的报告,所以可望把它作为造血性疾病的血液标记。血清中 sIL-2R 浓度可以作为成人 T 细胞白血病的病况监测指标等,以及作为非霍奇金淋巴瘤治疗效果判断、症状缓解后跟踪和复发的早期发现的指标等,有效应用于临床。

[0007] 关于 sIL-2R 测定方法,迄今已有采用两种抗 sIL-2R 抗体的免疫学测定方法(参见专利文献 4)、测定 sIL-2R 的试剂,相应的酶免疫测定试剂开发并投放市场,例如“无细胞 -IL-2R”(山之内制药株式会社)等。

[0008] 专利文献 1:特开昭 61-65162 号公报

[0009] 专利文献 2:特开平 1-254869 号公报

[0010] 专利文献 3:特开平 5-188055 号公报

[0011] 专利文献 4:特开昭 62-70761 号公报

[0012] 非专利文献 1:临床化学 (Clinical Chemistry),1999,第 45 卷,942-956 页

[0013] 非专利文献 2:癌免疫学免疫治疗 (Cancer Immunological Immunotherapy)1991 年,第 33 卷,80-84 页

[0014] 非专利文献 3:临床化学 (Clinical Chemistry),1990,第 36 卷,1093 页

发明内容

[0015] 本发明的目的是提供在抑制了非特异性反应的免疫学定量待测对象的方法、以及抑制了非特异性反应的免疫学定量待测对象的方法中所采用的试剂和在免疫学定量待测对象的方法中的一种抑制非特异性反应的方法。

[0016] 本发明涉及以下 (1) ~ (35) 项。

[0017] (1) 一种非特异性反应被抑制的待测对象的免疫学定量方法,其包括下列步骤:在含水介质中让与待测对象特异性结合的第一抗体经酶标记后形成的酶标抗体与样品反应,由此形成酶标抗体与待测对象的免疫复合物,所述酶标抗体基本上只含有一种或多种选自第一抗体与酶之间的结合比率为 1 : 1、1 : 2、1 : 3 和 2 : 1 的酶标抗体的酶标抗体;以及测定免疫复合物的酶活性。

[0018] (2) 如 (1) 项所述的免疫学定量方法,还包含下列步骤:让一种抗体与样品反应,由此与待测对象形成免疫复合物,在所述抗体中,分离手段结合第二抗体,所述第二抗体特异性结合的抗原决定部位与结合第一抗体的待测对象物的抗原决定部位不同。

[0019] (3) 如 (1) 或 (2) 项所述的免疫学定量方法,其中第一抗体和酶之间的结合比率分别为 1 : 1、1 : 2 和 1 : 3。

[0020] (4) 如 (1) 或 (2) 所述的免疫学定量方法,第一抗体和酶之间的结合比率分别为 1 : 1 和 1 : 2。

[0021] (5) 如 (1) ~ (4) 中任一项所述的免疫学定量方法,第一抗体是除去了 Fc 部分的抗体。

[0022] (6) 如 (1) ~ (5) 中任一项所述的免疫学定量方法,非特异性反应是由人抗鼠抗体引起的反应。

[0023] (7) 如 (1) ~ (6) 中任一项所述的免疫学定量方法,在使酶标抗体与样品反应而与待测对象形成免疫复合物的步骤中,同时存在 IgG 聚合体和 IgG 或二者之一。

[0024] (8) 如 (1) ~ (5) 中任一项所述的免疫学定量方法,非特异性反应是由与标记酶发生反应的抗体引起的反应。

[0025] (9) 如 (1) ~ (8) 中任一项所述的免疫学定量方法,在使酶标抗体与样品反应而与待测对象形成免疫复合物的步骤中,同时存在钝化的该标记酶。

- [0026] (10) 如 (1) ~ (9) 中任一项所述的免疫学定量方法,酶是过氧化物酶。
- [0027] (11) 如 (1) ~ (10) 中任一项所述的免疫学定量方法,待测对象是可溶性白介素-2 受体。
- [0028] (12) 一种在非特异性反应被抑制、待测对象的免疫学定量方法中使用的试剂,其包括与待测对象特异性结合的第一抗体经酶标记后形成的酶标抗体,所述酶标抗体基本上只含有一种或多种选自第一抗体与酶之间的结合比率为 1 : 1、1 : 2、1 : 3 和 2 : 1 的酶标抗体的酶标抗体。
- [0029] (13) 第 (12) 项所述的试剂,还含有一种抗体,其中分离手段结合第二抗体,所述第二抗体特异性结合的抗原决定部位与结合第一抗体的待测对象物的抗原决定部位不同。
- [0030] (14) 如 (12) 或 (13) 所述的试剂,其含有用于测定酶活性的试剂。
- [0031] (15) 如 (12) ~ (14) 中任一项所述的试剂,第一抗体和酶之间的结合比率分别为 1 : 1、1 : 2 和 1 : 3。
- [0032] (16) 如 (12) ~ (14) 中任一项所述的试剂,第一抗体和酶之间的结合比率分别为 1 : 1 和 1 : 2。
- [0033] (17) 如 (12) ~ (16) 中任一项所述的试剂,第一抗体是除去了 Fc 部分的抗体。
- [0034] (18) 如 (12) ~ (17) 中任一项所述的试剂,非特异性反应是由人抗鼠抗体引起的反应。
- [0035] (19) 如 (12) ~ (18) 中任一项所述的试剂,其含有 IgG 聚合体和 IgG 或二者之一。
- [0036] (20) 如 (12) ~ (17) 中任一项所述的试剂,非特异性反应是由与标记酶发生反应的抗体引起的反应。
- [0037] (21) 如 (12) ~ (20) 中任一项所述的试剂,含有使标记抗体的酶钝化后得到的酶。
- [0038] (22) 如 (12) ~ (21) 中任一项所述的试剂,酶是过氧化物酶。
- [0039] (23) 如 (12) ~ (22) 中任一项所述的试剂,待测对象是可溶性白介素-2 受体。
- [0040] (24) 如 (12) ~ (23) 中任一项所述的试剂,还含有选自含水介质、金属离子、盐类、糖类、表面活性剂、防腐剂、蛋白质、蛋白质稳定剂中的一种或多种物质。
- [0041] (25) 一种在待测对象的免疫学定量方法中用于抑制非特异性反应的方法,包括下列步骤:在含水介质中让与待测对象特异性结合的第一抗体经酶标记后形成的酶标抗体与样品反应,由此形成酶标抗体与待测对象的免疫复合物,所述酶标抗体基本上只含有一种或多种选自第一抗体与酶之间的结合比率为 1 : 1、1 : 2、1 : 3 和 2 : 1 的酶标抗体的酶标抗体。
- [0042] (26) 第 (25) 项所述所述的抑制方法,还包括下列步骤:让一种抗体与样品反应,由此与待测对象形成免疫复合物,在所述抗体中,分离手段结合第二抗体,所述第二抗体特异性结合的抗原决定部位与结合第一抗体的待测对象物的抗原决定部位不同。
- [0043] (27) 如 (25) 或 (26) 所述的抑制方法,第一抗体和酶之间的结合比率分别为 1 : 1、1 : 2 和 1 : 3。
- [0044] (28) 如 (25) 或 (26) 所述的抑制方法,第一抗体和酶之间的结合比率分别为 1 : 1 和 1 : 2。
- [0045] (29) 如 (25) ~ (26) 所述的抑制方法,第一抗体是除去了 Fc 部分的抗体。
- [0046] (30) 如 (25) ~ (29) 中任一项所述的抑制方法,非特异性反应是由人抗鼠抗体引

起的反应。

[0047] (31) 如 (25) ~ (30) 中任一项所述的抑制方法, 在使酶标抗体与样品反应从而与待测对象形成免疫复合体的步骤中, 同时存在 IgG 聚合体和 IgG 或二者之一。

[0048] (32) 如 (25) ~ (29) 中任一项所述的抑制方法, 非特异性反应是由与标记酶反应的抗体引起的反应。

[0049] (33) 如 (25) ~ (32) 中任一项所述的抑制方法, 在使酶标抗体与样品反应从而与待测对象形成免疫复合体的步骤中, 同时存在钝化的该标记酶。

[0050] (34) 如 (25) ~ (33) 中任一项所述的抑制方法, 酶是过氧化物酶。

[0051] (35) 如 (25) ~ (34) 中任一项所述的抑制方法, 待测对象是可溶性白介素 -2 受体。

具体实施方式

[0052] 1. 非特异性反应

[0053] 本发明中所述的非特异性反应, 只要是在待测对象的免疫学测定方法中出现的非特异性反应即可, 并无特别限定, 例如有由 HAMA 引起的非特异性反应、由与标记酶反应的抗体引起的非特异性反应等。就 HAMA 而言, 有 HAMA I 型和 HAMA II 型两种。作为与标记酶反应的抗体, 可以列举例如与过氧化物酶反应的抗体、与碱性磷酸酶反应的抗体等。本发明中与标记酶反应的抗体是指与在本发明的免疫学测定方法中用于标记酶标抗体的酶反应的抗体, 会引起非特异性反应。

[0054] 2. 样品

[0055] 本发明所用的样品, 可以列举全血、血浆、血清、脊髓液、唾液、羊水、尿、汗、胰液等, 优选全血、血浆、血清等。

[0056] 3. 待测对象

[0057] 本发明的待测对象只要是成为抗原的物质即可, 并无特别限定, 优选是至少有两个抗原决定簇的抗原。可以列举例如 sIL-2R、已知作为心肌梗塞标志的肌红蛋白、肌酸激酶 MB (CK-MB)、肌钙蛋白 T 等。

[0058] 4. 抗体

[0059] 形成本发明中使用的酶标抗体的第一抗体, 只要是能与待测对象特异性结合的抗体即可, 并无特别限定, 多克隆抗体、单克隆抗体均可使用, 优选是单克隆抗体。同时, 在本发明中, 不仅可以使抗体, 还可以使用将抗体用木瓜蛋白酶处理得到的 Fab、用胃蛋白酶处理得到的 $F(ab')_2$ 、用胃蛋白酶处理后又经还原处理的 Fab' 等除去了 Fc 部分的抗体片段。作为抗体片段, 特别优选 $F(ab')_2$ 。

[0060] 作为形成本发明中使用的固相抗体的第二抗体, 只要是与待测对象特异性结合的抗体即可, 并无特别限定, 多克隆抗体、单克隆抗体也都可以使用, 但优选单克隆抗体。第二抗体优选是特异性结合在待测对象上的与第一抗原结合的抗原决定部位不同的抗原决定部位的抗体。

[0061] 本发明中使用的抗体, 可以采用待测对象或相当于它的抗原决定部位的肽作为抗原用常规方法获得, 也可以作为商品得到。

[0062] 与 sIL-2R 特异性结合的抗体, 有如杂交瘤 AM92.3 产生的单克隆抗体 (PIERCE 公

司制)、单克隆抗体 7G7/B6(PIERCE 公司制,参见特开昭 62-70761 号公报)等,各自都可以作为第一抗体或第二抗体任意使用。

[0063] 5. 酶标记

[0064] 本发明中,与第一抗体结合的酶,可以列举过氧化物酶(以下简称 POD)、碱性磷酸酯酶、荧光酶、 β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶等,优选过氧化物酶、碱性磷酸酯酶,特别优选过氧化物酶。可以使用任何来源的过氧化物酶,优选来源于西洋山嵛菜的。碱性磷酸酯酶可以是来自牛小肠的碱性磷酸酯酶等。

[0065] 6. 第一抗体与酶的结合

[0066] 本发明中,酶标抗体是与作为标记与待测对象特异性结合的第一抗体的酶相结合的抗体,在这种结合中,结合方式可以是例如共价键结合,也可以是酶与抗体直接结合,还可以通过连接物间接结合。结合物的制备方法有例如戊二醛法、高碘酸法、马来酰亚胺法、吡啶二硫化物法等(例如可参见石川荣治著《酶免疫测定法》1987年,医学书院发行),优选马来酰亚胺法。具体实例可举出将用硫醇亚胺(iminothiolane)等氢硫化后的抗体和用琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]-环己烷-1-羧酸酯(succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxylate, SMCC)、N-6-(马来酰亚胺己酰氧基)琥珀酰胺[N-6(maleimidocaproyloxy)succinimide, EMCS]等马来酰亚胺化的酶混合制备。

[0067] 7. 酶标抗体的抗体与酶之间的结合比率

[0068] 本发明所使用的酶标抗体,是每分子抗体结合了少数标记酶分子的酶标抗体,具体而言,基本上是含有选自第一抗体和酶之间的结合比率分别是 1:1、1:2 和 1:3 和 2:1 的酶标抗体中的一种或多种酶标抗体,优选基本上含有选自第一抗体和酶之间的结合比率分别是 1:1、1:2、1:3 的酶标抗体中的一种或多种酶标抗体,更优选基本上是含有选自第一抗体和酶之间的结合比率分别是 1:1、1:2 的酶标抗体中一种或多种酶标抗体。

[0069] 酶标抗体,特别优选第一抗体和酶之间的结合比率为 1:1 或 1:2 的酶标抗体,当酶标抗体是混合物时,第一抗体和酶之间的结合比率是 1:1、1:2 的酶标抗体占整个酶标抗体的分子数目的 50%以上,更优选是占 70%以上,特别优选是占 90%以上。

[0070] 使用上述戊二醛法、高碘酸法、马来酰亚胺法、吡啶二硫化物法等方法使酶与第一抗体结合时,可以通过采用诸如离子交换色谱法、凝胶过滤柱色谱法、疏水色谱法等方法,或将这些方法加以组合除去与多数的酶结合的第一抗体、未反应的酶和抗体来制备这样的酶标抗体。

[0071] 8. 固相抗体

[0072] 本发明中所谓固相抗体,是采用分离方法结合了与待测对象特异性结合的第二抗体。所谓分离方法,可以列举固相物质本身或特异性结合固相物质的物质。该结合的结合方式,可以列举在采用固相物质时的非共价键结合,采用特异性结合固相物质的物质时是共价结合,既可是该物质与抗体直接结合,也可以通过连接物间接结合。作为与固相物质结合的物质和与该物质特异性结合的物质组合,可以列举采用生物素和抗生物素蛋白的组合等。

[0073] 固相,只要是能够固定化第二抗体,并能够应用于待测对象的免疫学测定方法中的固相即可,并无特别限定。例如微型滴定板等聚苯乙烯板、玻璃制或合成树脂制的颗粒

(bead)、玻璃制或合成树脂制的小球(ball)、胶乳、磁性颗粒、硝基纤维素膜等各种膜、合成树脂制的试管等等。

[0074] 9. IgG 聚合物及 IgG

[0075] 本发明中的 IgG 聚合物, 只要是由 IgG 聚合者即可, 并无特定限定, 例如 MAK33-IgG1/IgG1Poly、MAK33-IgG(2b)/Fab(2a)Poly[均为罗氏诊断公司制]等。本发明中的 IgG, 只要是动物的 IgG 即可, 并无特定限定, 例如小鼠、大鼠、仓鼠、兔、豚鼠、山羊、绵羊、鸡、牛、马等动物的 IgG, 优选小鼠的 IgG。由动物 IgG 提纯的产品亦可, 动物的血清亦可。

[0076] 10. 含水介质

[0077] 含水介质可以列举例如去离子水、蒸馏水和缓冲液等, 优选缓冲液。用于配制缓冲液的缓冲剂, 只要有缓冲能力即可, 并无特别限定。可以列举 pH 1 ~ 11 的缓冲剂, 例如乳酸缓冲剂、柠檬酸缓冲剂、乙酸缓冲剂、琥珀酸缓冲剂、苯二甲酸缓冲剂、磷酸缓冲剂、三乙醇胺缓冲剂、二乙醇胺缓冲剂、赖氨酸缓冲剂、巴比妥酸盐缓冲剂、咪唑缓冲剂、苹果酸缓冲剂、草酸缓冲剂和甘氨酸缓冲剂、硼酸缓冲剂、碳酸缓冲剂、古德缓冲剂(Good's buffer)等。

[0078] 古德缓冲液可以列举例如 2-吗啉代乙磺酸(MES)缓冲剂、二-(2-羟乙基)-亚胺三(羟甲基)甲烷(Bis-Tris)缓冲剂、三羟乙基)氨基甲烷(Tris)缓冲剂、N-(2-乙酰氨基)-亚胺二乙酸((ADA)缓冲剂、, 哌嗪-N,N'-二(2-乙磺酸)(PIPES)缓冲剂、2-[N-(乙酰氨基)氨基]乙磺酸(ACES)缓冲剂、3-吗啉代 2-羟丙磺酸(MOPSO)缓冲剂、2-[N,N-二(2-羟乙基)氨基]乙磺酸(BES)缓冲剂、3-吗啉代丙磺酸(MOPS)缓冲剂、2-[N-[三(羟甲基)甲基]氨基]乙磺酸(TES)缓冲剂、N(2-羟乙基)-N'-(2-磺乙基)哌嗪(HEPES)缓冲剂、3-[N,N-二(2-羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸(DIPSO)缓冲剂、2-羟基-3-[N-三(羟甲基)甲基]氨基丙磺酸(TAPSO)缓冲剂、哌嗪-N,N'-二(2-羟基丙-3-磺酸)(POPSO)缓冲剂、N-(2-羟乙基)-N'-(2-羟基-3-磺丙基)哌嗪(HEPPSO)缓冲剂、N-(2-羟乙基)-N'-(3-磺丙基)哌嗪(EPPS)缓冲剂、三羟甲基甘氨酸[N-三(羟甲基)甲基甘氨酸]缓冲剂、蚕豆苷(N,N-二(2-羟乙基)甘氨酸)缓冲剂、3-[N-三(羟甲基)甲基]氨基丙磺酸(TAPS)缓冲剂、2-(N-环己胺)乙磺酸(CHES)缓冲剂、3-(N-环己胺)-2-羟基丙磺酸(CAPSO)缓冲剂、3-(N-环己胺)丙磺酸(CAPS)缓冲剂等。

[0079] 缓冲液的浓度只要适合测定即可, 并无特别限定, 优选 0.001 ~ 2.0mol/L, 更优选 0.005 ~ 1.0mol/L, 特别优选 0.01 ~ 0.1mol/L。

[0080] 11 金属离子

[0081] 金属离子有诸如镁离子、锰离子、锌离子等。

[0082] 12 盐类

[0083] 盐类有诸如氯化钠、氯化钾等。

[0084] 13 糖类

[0085] 糖类有诸如甘露醇、山梨醇等。

[0086] 14 表面活性剂

[0087] 表面活性剂有诸如非离子型表面活性剂、阳离子型表面活性剂、阴离子型表面活性剂、两性表面活性剂等, 优选非离子型表面活性剂。非离子型表面活性剂有诸如吐温 20(Tween 20)、润湿剂 P-40(NP-40)等。

[0088] 15 防腐剂

[0089] 防腐剂有诸如叠氮化钠、抗生素（链霉素、青霉素、庆大霉素等）、Bioace、Proclin300、Proxel GXL 等。

[0090] 16 蛋白质

[0091] 蛋白质有诸如牛血清白蛋白（BSA）、牛胎血清（FBS）、酪素、blockACETM（大日本制药公司制）等。

[0092] 17 蛋白质稳定剂

[0093] 蛋白质稳定剂有诸如过氧化物酶稳定缓冲液（Peroxidase Stabilizing Buffer, DakoCytomation 公司制）等。

[0094] 18 钝化的酶

[0095] 本发明中钝化的酶,是和定量本发明的待测对象的免疫学方法中用来标记酶标抗体的酶相同的酶,即来自同一种生物的同种有活性的酶被钝化的后即可。例如免疫学定量方法中在采用 POD 标记抗体时,采用将该 POD 钝化后的酶,在采用碱性磷酸酶标记抗体时,采用将该碱性磷酸酶钝化后的酶。钝化的酶可以和载体或抗体结合的,但此时抗体必须是不和待测对象或该抗体发生反应的。所谓失活,是指一方面保持与引起非特异性反应的标记抗体发生反应的与抗体反应的特性,而完全或基本上丧失了参与本发明的免疫学定量方法的酶活性,可以通过加热处理、酸或碱变性处理、蛋白酶消化、冻融等方法,或组合这些方法处理。例如 POD 在 100 ~ 125℃ 处理 10 ~ 60 分钟,即可得到钝化的 POD。钝化的 POD 有钝化聚 -POD（罗氏诊断公司制）。钝化的碱性磷酸酶有清道夫 -ALP（东方酵母公司产品）等。

[0096] 19. 待测对象的免疫学定量方法

[0097] 本发明的待测对象的免疫学定量方法,只要其包含选自基本上与待测对象特异性结合的从酶和第一抗体的结合比率分别 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 和 2 : 1 的酶标抗体中的一种或多种酶标抗体的酶标抗体,使其与样品反应与待测物质形成免疫复合体的步骤,以及测定免疫复合体的酶活性的步骤,并无特别限定。此外,所述方法还包含下列步骤:让一种抗体与样品反应,由此与待测对象形成免疫复合体,在所述抗体中,分离手段结合第二抗体,所述第二抗体特异性结合的抗原决定部位与结合第一抗体的待测对象物的抗原决定部位不同。

[0098] 酶标抗体优选是从选自基本上第一抗体与酶结合比率分别以比例为 1 : 1, 1 : 2 和 1 : 3 的酶标抗体中一种或多种酶标抗体的酶标抗体,更优选是选自基本上第一抗体和酶之间的结合比率分别为 1 : 1 和 1 : 2 的酶标抗体中的一种或多种酶标抗体的酶标抗体。

[0099] 标记抗体,特别优选第一抗体和酶之间的结合比率为 1 : 1 或 1 : 2 结合的酶标抗体,酶标抗体为混合物时,第一抗体和酶结合比率为 1 : 1 或 1 : 2 的酶标抗体在整个酶标抗体中所占比例优选为 50% 以上,更优选为 70% 以上,特别优选为 90% 以上。

[0100] 具体的定量方法可列举例如夹心法、竞争法等,优选夹心法。夹心法可列举一步法、延迟一步法和二步法等。

[0101] 更具体的待测对象的免疫学定量方法,可列举例如包含以下步骤的定量方法。

[0102] (1) 使样品中的待测对象与固相抗体反应,形成免疫复合体的步骤（第一次反

应),

[0103] (2) 使样品中的待测对象与酶标抗体反应,形成免疫复合体的步骤(第二次反应),

[0104] (3) 将不形成免疫复合体的酶标抗体与固相分离的步骤,

[0105] (4) 测定固相中生成的免疫复合体中的酶标记的酶活性的步骤,

[0106] (5) 根据预先用已知浓度的待测对象制作标准曲线,通过与第(4)步骤测定的酶活性作比较,定量待测对象的步骤。

[0107] 上述步骤(1)和(2)之间,必要时还可以在第一次反应后增加一个洗涤固相的步骤。并且,步骤(1)和(2)也可以同时进行。

[0108] 第一次反应优选在含水介质中进行。第一次反应的温度为例如 $0 \sim 50^{\circ}\text{C}$,优选为 $4^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 。第一次反应的反应时间为例如5分钟 \sim 20小时。第一次反应后洗涤固相时所用的洗涤液,有诸如磷酸缓冲化的生理盐水(含有 0.15mol/L 氯化钠的 10mmol/L 磷酸缓冲液, $\text{pH}7.2$,以下简称PBS),或含有表面活性剂的PBS等。表面活性剂有诸如吐温20等非离子型表面活性剂。

[0109] 第二次反应优选在含水介质中进行。在第二次反应中使用形成酶标抗体的抗体(第一抗体)中的抗原决定簇优选不同于第一次反应中使用的抗体(第二抗体)中的抗原决定簇。第二次反应的反应温度为 $0 \sim 50^{\circ}\text{C}$,优选为 $4^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 。第二次反应的反应时间为5分钟 \sim 20小时。第二次反应后洗涤固相所用的洗涤液,有诸如上述洗涤液等。

[0110] 通过第二次反应在固相上生成的免疫复合体中的酶标记的活性测定方法,可以使酶的底物与该酶反应,通过测定产物来测定免疫复合体中的酶活性。酶的底物与该酶的反应,优选在含水介质中进行。

[0111] 当酶是过氧化物酶时,可以用诸如吸光度法、荧光法、发光法等来测定免疫复合体中过氧化物酶的活性。用吸光度法测定过氧化物酶活性的方法,可以列举将过氧化物酶和它的底物过氧化氢及氧化生色团(chromogen)加以组合使之反应,用分光光度计等测定反应液的吸光度。氧化生色团有诸如无色型生色团、氧化偶合生色团等。

[0112] 无色型生色团是在过氧化氢及过氧化物酶等过氧化活性物质存在存在条件下可以单独转变为色素的物质。具体而言,有0-苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)、10-N-羧甲基氨基甲酰基-3,7-二(二甲氨基)-10H-吩噻嗪(CCAP)、10-N-甲基氨基甲酰基-3,7-二(二甲氨基)-10H-吩噻嗪(MCDP)、N-羧甲基氨基羰基-4,4'-二(二甲氨基)-二苯胺钠盐(DA-64)、4,4'-二(二甲氨基)二苯胺、二[3-二(4-氯苯基)甲基]-4-二甲氨基苯基]胺(BCMA)等。

[0113] 氧化偶合生色团是在过氧化氢及过氧化物酶等过氧化活性物质存在条件下,两种化合物经氧化偶合而生成色素的物质。组合的两种化合物有如偶合剂和苯胺类化合物(Trinder试剂)相组合、偶合剂和酚类的组合等。偶合剂则有诸如4-氨基安替比林(4-AA)、3-甲基-2-苯并噻唑酮肟等。苯胺类化合物有诸如N-(3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺(TOOS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺(DAOS)、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3-甲基苯胺(TOPS)、N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺(HDAOS)、N,N-二甲基-3-甲基苯胺、N,N-二(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-乙

基-N-(3-磺丙基)-3-甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3,5-二甲基苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲氧基苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-琥珀酰乙烯二胺(EMSE)、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-乙酰基乙烯二胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-4-氟-3,5-二甲氧基苯胺(F-DAOS)等。酚类则有诸如苯酚、4-氯酚、3-甲苯酚、3-羟基-2,4,6-三碘苯甲酸(HTIB)等。

[0114] 测定过氧化氢时,过氧化活性物质的浓度只要适合测定即可,并无特别限定,在用过氧化物酶作为过氧化活性物质时,优选1~100kU/L。氧化生色团的浓度只要适合测定即可,并无特别限定,优选0.01~10g/L。

[0115] 用荧光法测定过氧化物酶活性的方法,可以列举将过氧化物酶及其底物过氧化氢,以及荧光物质组合在一起使之进行反应,然后测定产生的荧光强度的方法等。该荧光物质有诸如4-羟基乙酸苯酯、3-(4-羟苯基)丙酸、香豆素等。

[0116] 用发光法测定过氧化物酶活性的方法,可以列举将过氧化物酶及其底物过氧化氢,以及发光物质组合在一起使之进行反应,然后测定产生的发光强度的方法等。该发光物质有诸如鲁米诺等。

[0117] 当酶是碱性磷酸酶时,可以用例如发光法等来测定复合体中的碱性磷酸酶的活性。用发光法来测定碱性磷酸酶的活性的方法,例如有使碱性磷酸酶和它的底物反应,用发光强度计等测定产生的发光物质的发光强度的方法等。碱性磷酸酶的底物,有诸如3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷二钠盐(AMPPD)、2-氯-5-{4-甲氧基螺旋[1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷]-4-基}苯基磷酸二钠盐(CDP-Star™)、3-{4-甲氧基螺旋[1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷]-4-基}苯基磷酸}二钠盐(CSPD™)、[10-甲基-9-(10H)-亚吡啶基]苯氧甲基磷酸二钠盐(Lumigen™APS-5)等。

[0118] 当酶是荧光素酶时,可以用例如发光法等来测定复合体中的荧光素酶的活性。用发光法来测定荧光素酶的活性的方法,可列举例如使荧光素酶和它的底物反应,用发光强度计等测定产生的发光物质的发光强度的方法。荧光素酶的底物有诸如荧光素等。

[0119] 当酶是 β -D-半乳糖苷酶时,可以用例如吸光度法(比色法)等来测定免疫复合体中的 β -D-半乳糖苷酶的活性。吸光度法(比色法)测定 β -D-半乳糖苷酶的活性的方法,可以列举例如使 β -D-半乳糖苷酶和它的底物反应,用分光光度计等测定反应液的吸光度的方法等。 β -D-半乳糖苷酶的底物,可列举例如有2-氯-硝基苯- β -D-乳糖苷、2-硝基苯- β -D-半乳糖苷(ONPG)、5-溴代-4-氯-3-吡啶基- β -D-半乳糖苷(X-gal)等。

[0120] 当酶是葡萄糖氧化酶时,可以用葡萄糖氧化酶作用于其底物葡萄糖,通过测定生成的过氧化氢来测定免疫复合体中的葡萄糖氧化酶的活性。过氧化氢的测定可以用例如上述测定过氧化物酶活性的方法进行。

[0121] 本发明的免疫学定量方法中,都可以有上述缓冲剂、金属离子、盐类、糖类、表面活性剂、防腐剂、蛋白质、蛋白质稳定剂等同时存在于反应中。

[0122] 20 定量试剂

[0123] 本发明的免疫学定量测定待测对象的方法中所用的试剂,包括基本上只含有选自与待测对象特异性结合的第一抗体和酶之间的结合比率分别为1:1,1:2,1:3和2:1的酶标抗体中的一种或多种酶标抗体的酶标抗体,任选还含有一种抗体,其中分离手段结合第二抗体,所述第二抗体特异性结合的抗原决定部位与结合第一抗体的待测对象物的抗原决定部位不同。

[0124] 酶标抗体优选选自第一抗体和酶之间的结合比率分别为1:1,1:2和1:3的酶标抗体中的一种或多种酶标抗体的酶标抗体,更优选是基本上选自第一抗体和酶之间的结合比率分别为1:1和1:2的酶标抗体中的一种或多种酶标抗体的酶标抗体。

[0125] 标记抗体特别优选酶与第一抗体的结合比率为1:1或1:2的酶标抗体,当酶标抗体是混合物时,第一抗体和酶之间的结合比率为1:1或1:2酶标记抗体优选占整个酶标抗体分子数比例的50%以上,更优选是70%以上,特别优选是90%以上。

[0126] 本发明的测定试剂具体形态如下所述。

[0127] 试剂 1

[0128] 含有固相抗体、酶标抗体及用于测定标记后酶活性的试剂的试剂。

[0129] 试剂 2

[0130] 含有固相抗体、酶标抗体、IgG 聚合物及用于测定标记后酶活性的试剂的试剂。

[0131] 试剂 3

[0132] 含有固相抗体、酶标抗体、小鼠 IgG 及用于测定标记后酶活性的试剂的试剂。

[0133] 试剂 4

[0134] 含有固相抗体、酶标抗体、IgG 聚合物、小鼠 IgG 及用于测定标记后酶活性的试剂的试剂。

[0135] 试剂 5

[0136] 含有固相抗体、酶标抗体、使标记抗体的酶钝化后得到的酶及用于测定标记后酶活性的试剂的试剂。

[0137] 试剂 6

[0138] 含有固相抗体、酶标抗体、小鼠 IgG、使标记抗体的酶钝化后得到的酶及用于测定标记后酶活性的试剂的试剂。

[0139] 试剂 7

[0140] 含有固相抗体、酶标抗体、IgG 聚合物、使标记抗体的酶钝化后得到的酶及用于测定标记后酶活性的试剂的试剂。

[0141] 试剂 8

[0142] 含有固相抗体、酶标抗体、小鼠 IgG、IgG 聚合物、使标记抗体的酶钝化后得到的酶及用于测定标记后酶活性的试剂的试剂。

[0143] 试剂 9

[0144] 含有固相抗体、酶标抗体、用于测定标记后酶活性的试剂和待测对象标准品的试剂。

[0145] 试剂 10

[0146] 含有固相抗体、酶标抗体、IgG 聚合物、用于测定标记后酶活性的试剂和待测对象标准品的试剂。

- [0147] 试剂 11
- [0148] 含有固相抗体、酶标抗体、小鼠 IgG、用于测定标记后酶活性的试剂和待测对象标准品的试剂。
- [0149] 试剂 12
- [0150] 含有固相抗体、酶标抗体、IgG 聚合体、小鼠 IgG、测定标记用酶活性的试剂和待测对象标准品的试剂。
- [0151] 试剂 13
- [0152] 含有固相抗体、酶标抗体、使标记抗体的酶钝化后得到的酶及用于测定标记后酶活性的试剂和待测对象标准品的试剂。
- [0153] 试剂 14
- [0154] 含有固相抗体、酶标抗体、小鼠 IgG、使标记抗体的酶钝化后得到的酶、用于测定标记后酶活性的试剂和待测对象标准品的试剂。
- [0155] 试剂 15
- [0156] 含有固相抗体、酶标抗体、IgG 聚合体、使标记抗体的酶钝化后得到的酶、用于测定标记后酶活性的试剂和待测对象标准品的试剂。
- [0157] 试剂 16
- [0158] 含有固相抗体、酶标抗体、小鼠 IgG、IgG 聚合体、使标记抗体的酶钝化后得到的酶、用于测定标记后酶活性的试剂和待测对象标准品的试剂。
- [0159] 本发明的测定用试剂中,用于测定标记后酶活性的试剂,可列举例如含有该酶的底物的试剂。测定该酶活性的试剂中的酶,可列举例如前述的酶。该底物可举例为前述底物。
- [0160] 本发明的测定用试剂中的待测对象的标准品,可列举例如将待测对象调整到已知浓度的水溶液。
- [0161] 本发明的测定试剂可以用试剂盒的形态保存、运输,必要时也可以含有上述缓冲剂、金属离子、盐类、糖类、表面活性剂、防腐剂、蛋白质、蛋白质稳定剂等。
- [0162] 以下为本发明的实施例,但本发明并不只限定于这些实施例。同时,在本实施例中,使用下述制造厂商的试剂、酶、血清和器具。
- [0163] 杂交瘤 AM92.3 :PIERCE 公司出品
- [0164] 杂交瘤 7G7/B6 :PIERCE 公司出品
- [0165] α -MEM(极限必需培养基 α -培养基):Invitrogen 公司出品
- [0166] 96 孔微型滴定板 :Nalge Nunc International 公司出品
- [0167] BSA :InterGen 公司出品
- [0168] 蔗糖 :关东化学公司出品
- [0169] 吐温 20 :关东化学公司出品
- [0170] 庆大霉素 :和光纯药工业公司出品
- [0171] 氯化钠 :和光纯药工业公司出品
- [0172] Bioace :组合化学工业公司出品
- [0173] 邻苯二胺 (OPD) :Sigma-Aldrich 公司出品
- [0174] 尿素过氧化氢盐 :Sigma-Aldrich 公司出品

- [0175] Proclin :Sigma-Aldrich 公司出品
- [0176] POD :东洋纺织公司出品、罗氏诊断公司出品
- [0177] 硫酸 :关东化学公司出品
- [0178] 胃蛋白酶 :罗氏诊断公司出品
- [0179] 硫醇亚胺 (Iminothiolane) :PIERCE 公司出品
- [0180] EMCS :PIERCE 公司出品
- [0181] FBS :海克隆公司出品
- [0182] NP-40 :Calbiochem 公司出品
- [0183] 小鼠 IgG :Scantibodies Laboratory 公司出品
- [0184] Proxel GXL :Avecia 公司出品
- [0185] POD 稳定化缓冲液 :DakoCytomation 公司出品
- [0186] MES :同仁化学研究所出品
- [0187] MAK33-IgG1/IgG1Poly :罗氏诊断公司出品
- [0188] MAK33-IgG (2b) /Fab (2a) Poly :罗氏诊断公司出品
- [0189] 正常人血清 :Aries 公司出品
- [0190] HAMA 血清 I 型 :罗氏诊断公司出品
- [0191] HAMA 血清 II 型 :罗氏诊断公司出品
- [0192] 无活性 Poly-POD :罗氏诊断公司出品
- [0193] 参考例 1 抗 sIL-2R 单克隆抗体的制备和纯化
- [0194] 用降植烷等分别处理产生抗 sIL-2R 单克隆抗体的杂交瘤 AM92.3 和杂交瘤 7G7/B6, 移植到小鼠腹腔, 回收腹水。以常法的 A 蛋白柱 r 蛋白 A 琼脂糖快速流动 (rProtein A Sepharose Fast Flow, AmershamBioscience 公司出品) 纯化来自腹水的单克隆抗体。由杂交瘤 AM92.3 得到单克隆抗体 KTM-302 抗体, 从杂交瘤 7G7/B6 得到单克隆抗体 KTM-303 抗体。
- [0195] 参考例 2 sIL-2R 的制备
- [0196] 将冷冻保存的已知分泌表达 sIL-2R 的淋巴瘤细胞株 U937 (大日本制药公司出品) 在 37℃ 水浴中尽快解冻, 转移到 15mL 无菌试管中, 加入含有 10% FBS、青霉素、链霉素的 α -MEM 10mL, 充分悬浮。将其在室温下离心分离 (1200rpm) 5 分钟后, 吸取上清液弃去。向残留物中加入 10mL 与上述相同的培养基, 将混悬的细胞悬浊液全部转移到 25cm² 的 T 形烧瓶中, 用二氧化碳培养箱 (5% CO₂, 37℃) 培养 2~3 日。然后依次扩大培养至 150cm²、225cm² 的 T 形烧瓶中。在确认 225cm² T 形烧瓶中的细胞全部汇合后, 将培养上清液收集到无菌容器中, 4℃ 下离心分离 (1200rpm) 10 分钟。离心分离得到的上清液转移到无菌容器中, 充分搅拌 15 分钟后, 经 0.2 μ m 滤器过滤处理后的制品作为 sIL-2R 标准品。
- [0197] 同时, 根据文献 [J. Immunol., 135, 3172-3177 (1985)], 用 10% IL-2 刺激 4 日正常人 IL-2 的依赖 T 细胞的无细胞培养上清液 (不稀释) 中的 sIL-2R 的含量作为 1000U/mL, 进行标准品的评价。
- [0198] 参考例 3 固定抗 sIL-2R 单克隆抗体的固相的制备
- [0199] KTM-302 抗体用 PBS 稀释到其终浓度为 4 μ g/ml, 将其加入固定化用的 96 孔微型滴定板上, 每孔加入 100 μ L。室温下静置一夜后, 用封闭液 (含有 1% BSA, 5% 蔗糖、0.05%

吐温 20、0.01% 庆大霉素硫酸盐的 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.2) 洗涤, 加入 200 μ L 封闭液室温下静置一夜进行封闭。除去封闭液后, 在真空干燥仪中干燥 3 日, 制备成固定后的抗 sIL-2R 单克隆抗体的固相 (板) 制剂。

[0200] 实施例 1

[0201] (1) POD 标记的抗 sIL-2R 单克隆 F(ab')₂ 抗体的制备

[0202] 用 0.01% 胃蛋白酶消化参考例 1 中制备的 KTM-303 抗体后, 经使用了 G3000SW 柱 (东ソ一公司出品: Φ 21.5mm X 60cm) 的 HPLC 系统 (日立制作所出品) 分离纯化 F(ab')₂。将得到 4mg F(ab')₂, 用 100 mmol/L 硼酸缓冲液 (pH8.0) 透析。

[0203] 将该抗 sIL-2R 单克隆 F(ab')₂ 抗体与 POD (东洋纺织公司出品), 用下面的马来酰亚胺法使之结合。

[0204] 即, 用硫醇亚胺将该 F(ab')₂ 巯基化, 用 Sephadex G-25 柱 (Amersham Bioscience 公司出品) 除去未反应的硫醇亚胺。POD 用马来酰亚胺化试剂 EMCS 加以马来酰化, 用 Sephadex G-25 柱除去未反应的 EMCS。将上述该 F(ab')₂ 巯基化的 F(ab')₂ 单克隆抗体与马来酰化的 POD 混合, 30°C 下反应 30 分钟, 制备成 POD 标记的抗 sIL-2R 单克隆 F(ab')₂ 抗体。

[0205] (2) 用凝胶过滤柱色谱分离 POD 标记的抗 sIL-2R 单克隆 F(ab')₂ 抗体

[0206] F(ab')₂ 抗体的分子量为约 92kDa, POD 的分子量为约 44kDa。因此, 可以计算出 POD 与该抗体之间的结合比率为 1 : 1 的酶标抗体的分子量约为 136kDa, 结合比率为 1 : 2 的约为 180kDa, 结合比率为 1 : 3 的约为 224kDa, 结合比率为 1 : 4 的约为 268kDa, 结合比率为 1 : 5 的约为 312kDa, 结合比率为 2 : 1 的约为 228kDa, 结合比率为 2 : 2 的约为 272kDa, 结合比率为 2 : 3 的约为 316kDa, 结合比率为 3 : 1 的约为 320kDa。

[0207] 上述 (1) 所述方法制备的酶标抗体, 以 G3000SW 柱 (东ソ一公司出品: Φ 21.5mm X 60cm), 用 HPLC 系统 (日立制作所出品) 分级。以 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4) 为流动相, 流速 3mL/分钟, 在室温下进行 HPLC。各级分的回收以 3mL/级分进行。另外, 分子量标记, 采用高分子量凝胶过滤法校正用的试剂盒 (HMW Gel Filtration Calibration Kit, Amersham Bioscience 公司出品) 和低分子量凝胶过滤法校正用的试剂盒 (LMW Gel Filtration Calibration Kit, Amersham Bioscience 公司出品)。

[0208] 测定各级分在 280nm 下的吸光度的结果见图 1。如图 1 所示, 证明各吸收峰分别为: 级分 1) 级分 33、级分 2) 级分 40、级分 3) 级分 43、级分 4) 级分 48、级分 5) 级分 52。

[0209] 根据比照分子量标记, 推定在上述各吸收峰显示的各级分的分子量, 分别为 1) 250kDa 以上、2) 约 170kDa、3) 约 140kDa、4) 约 100kDa、5) 约 40kDa。因此, 可以推测, 级分 1) 级分 33 中的酶标抗体是 F(ab')₂ 和 POD 聚合的标记抗体、级分 2) 级分 40 中的酶标抗体是在 1 分子 F(ab')₂ 结合了 2 分子 POD 的标记抗体、级分 3) 级分 43 中的酶标抗体是在 1 分子 F(ab')₂ 结合 1 分子 POD 的标记抗体、级分 4) 级分 48 含有未反应的 F(ab')₂、级分 5) 级分 52 含有未反应的 POD。

[0210] (3) 用 SDS-PAGE 鉴定各分部中的酶标抗体

[0211] 由上述 (2) 所得到的级分 32 ~ 52 的各级分, 制备电泳用的样品使分别来自各级分的蛋白量为 2 ~ 3 μ g/条带。向此样品中加入 1/4 量的用于 SDS-PAGE 样品的缓冲液 [含有 8% SDS (和光纯药工业公司出品)、24% 2-巯基乙醇 (Nacalai 公司出品) 和 40% 甘油

(关东化学公司出品)的 1mol/L Tris 缓冲液, pH6.8], 95℃下加热 5 分钟。将热处理的样品以每条带 20 μL 的量上样到 SDS-PAGE 凝胶上 [PAGEL SPG-520L (Alto 公司出品)], 以相当于每条凝胶 20mA 的电流进行电泳, 用常规方法检测条带。分子量标记采用预染色的宽范围 (Prestained Broad Range), 250kDa、150kDa、100kDa、75kDa、50kDa、37kDa、25kDa、16kDa、10kDa (Bio-Rad 公司出品)。

[0212] 根据 SDS-PAGE 所得条带的位置和分子量标记, 鉴定结果是: 级分 32 ~ 35 中的酶标抗体, 是 F(ab')₂ 和 POD 的结合比率分别为 1 : 5、2 : 3、3 : 1 等的高度聚合物, 即是酶标抗体的混合物 (观察到条带呈模糊状); 级分 36 中的酶标抗体, 是 F(ab')₂ 和 POD 的结合比率分别为 1 : 4 和 2 : 2 的酶标抗体的混合物; 级分 37 中的酶标抗体, 是 F(ab')₂ 和 POD 之间的结合比率分别为 1 : 4、1 : 3、2 : 1 和 2 : 2 的酶标抗体的混合物。

[0213] 同样, 还鉴定出, 级分 38 中的酶标抗体, 是 F(ab')₂ 和 POD 之间的结合比率分别为 1 : 3 和 2 : 1 的酶标抗体的混合物; 级分 39 中的酶标抗体, 是 F(ab')₂ 和 POD 之间的结合比率分别为 1 : 2、1 : 3 和 2 : 1 的酶标抗体的混合物; 级分 40 ~ 41 中的酶标抗体, 是 F(ab')₂ 和 POD 之间的结合比率是 1 : 2 的酶标抗体; 级分 42 中的酶标抗体, 是 F(ab')₂ 和 POD 之间的结合比率分别为 1 : 2 及 1 : 1 的酶标抗体的混合物; 级分 43 ~ 46 中的酶标抗体, 是 F(ab')₂ 和 POD 之间的结合比率是 1 : 1 的酶标抗体。

[0214] 此外, 还鉴定出, 级分 47 中的蛋白质, 是 F(ab')₂ 和 POD 之间的结合比率分别为 1 : 1 的酶标抗体同未反应的 F(ab')₂ 的混合物; 级分 48 ~ 51 中的蛋白质, 是未反应的 F(ab')₂; 级分 52 中的蛋白质, 是未反应的 POD。

[0215] (4) 用各级分的酶标抗体制备定量 sIL-2R 的标准曲线

[0216] 参考例 3 中制备的固相化板, 在每孔中各添加 50 μL 含有 0U/mL、200U/mL、400U/mL、1600U/mL、3200U/mL、6400U/mL 的 sIL-2R 标准溶液 (含有 150mmol/L 氯化钠、4% BSA、1% 蔗糖和 0.01% Bioace 的 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.5)。用酶标抗体稀释液 [150mmol/L 氯化钠、10% FBS、0.2% NP-40、100 μg/mL 小鼠 IgG、0.2% Proxel GXL、10% POD 稳定化缓冲液及 0.16 μg/mL POD (罗氏诊断公司出品) 的 100mmol/L 醋酸缓冲液, pH6.0] 稀释上述 (2) 中各级分中的酶标抗体, 制备成酶标抗体溶液 (24 ~ 140ng/mL), 向每孔中各添加 50 μL, 用水平旋转震荡器在室温下震荡 (140 ~ 160rpm) 90 分钟。用洗涤液 (含有 150mmol/L 氯化钠、0.05% 吐温 20 的 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH6.8) 洗涤各孔后, 在每孔中各加入 100 μL 的 OPD 溶液 (含有 2mg/mL OPD、0.75g/L 尿素过氧化氢盐、0.01% Proclin300 的 100mmol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液, pH4.4), 用主波长为 490nm, 副波长为 660nm 测定反应液的吸光度。根据抗原浓度与吸光度制作各级分酶标抗体的标准曲线。

[0217] (5) 用 POD 标记的抗 sIL-2R 单克隆抗体测定样品中的 sIL-2R

[0218] 用 HAMA 血清 I 型 (Lot. 92069721)、HAMA 血清 II 型 (Lot. 14482684) 和正常人血清 (Lot. 101001-2) 各 50 μL, 各血清样品中的 sIL-2R, 用上述 (2) 中所述各级分的标记抗体, 按上述 (4) 中所述方法测定。sIL-2R 的测定值 (U/mL) 表示于表 1 中。

[0219] [表 1]

[0220] 第一表

[0221]

级分号	sIL-2R 的测定值(U/mL)		
	HAMA 血清 I 型	HAMA 血清 II 型	正常人血清
32	16142	1005	230
33	3688	259	270
34	1881	196	266
35	1502	176	290
36	913	158	280
37	662	144	284
38	508	144	284
39	435	135	311
40	367	142	310
41	326	129	321
42	272	133	322
43	287	134	325
44	301	134	332
45	310	137	322
46	286	148	346

[0222] 含有抗体和酶的结合比率分别为 1 : 5、2 : 3、3 : 1 等的高度聚合物的酶标抗体的级分 32 ~ 35 中, HAMA 血清 I 型中的 sIL-2R 的测定值超过 1000U/mL, 特别是被认为高度聚合的级分 32 中则高达 16000U/mL。同时, 被鉴定出抗体和酶之间的结合比率为 1 : 4 或 2 : 2 的级分 36 也显示很高的测定值。

[0223] 但是, 经鉴定, 只含有一种或多种选自抗体和酶之间结合比率分别为 1 : 3、2 : 1、1 : 2 和 1 : 1 的酶标抗体的酶标抗体的级分 38 ~ 46 中的酶标抗体的测定值则几乎都在 500U/mL 以下, 这说明 HAMA 血清 I 型的非特异性反应受到了抑制。

[0224] 特别是从含有 1 分子 F(ab')₂ 和 2 分子 POD 结合的酶标抗体的级分 40, 到含有 1 分子 F(ab')₂ 和 1 分子 POD 结合的酶标抗体的级分 46 附近, 其测定值处于约为 300U/mL 的平衡状态。

[0225] 根据这些结果, 表明每分子抗体与少数标记酶分子结合的酶标抗体, 优选是选自第一抗体和酶结合比率分别为 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 和 2 : 1 的酶标抗体中基本上只含有一种或多种酶标抗体的酶标抗体; 更优选是选自第一抗体和酶结合比率分别为 1 : 1, 1 : 2 和 1 : 3 的酶标抗体中基本上只含有一种或多种酶标抗体的酶标抗体; 特别优选是选自第一抗体和酶结合比率分别为 1 : 1 或 1 : 2 的酶标抗体中基本上只含有一种或多种酶标抗体的酶标抗体, 使用这些抗体可以有效抑制在 HAMA 血清 I 型中表现很强烈的非特异性反

应。

[0226] 实例 2 HAMA 非特异性反应中小鼠 IgG 的效果

[0227] 研究了加入小鼠 IgG 对抑制 HAMA 非特异性反应的效果。实例 1 中制备的级分 40 ~ 46 中的酶标抗体,用酶标抗体稀释液 [含有 150mmol/L 氯化钠、10% FBS、0.2% NP-40、小鼠 IgG、0.2% Proxel GXL、10% POD 稳定化缓冲液及 0.16 μ g/mL POD (罗氏诊断公司出品)的 75mmol/L 的 MES 缓冲液, (pH6.5)] 稀释,小鼠 IgG 的浓度分别配制为 0、20、40、60、80、100、200 μ g/mL。

[0228] 使用 HAMA 血清 I 型 (Lot. 92069721)、HAMA 血清 II 型 (Lot. 14482684) 和正常人血清 (Lot. 101001-2) 各 50 μ L,各血清中的 sIL-2R 值,用和实例 1 (5) 相同的方法测定。

[0229] 结果表示在表 2 中。

[0230] [表 2]

[0231] 第二表

[0232]

小鼠 IgG 的浓度	sIL-2R 的测定值(U/mL)		
	HAMA 血清 I 型	HAMA 血清 II 型	正常人血清
0	452	9063	351
20	458	437	333
40	456	338	336
60	452	296	327
80	403	268	320
100	405	264	334
200	400	268	345

[0233] 没有加入小鼠 IgG 时 HAMA 血清 II 型的测定值为 9000U/mL 以上,这是由于 HAMA 引起的非特异性反应造成的,通过加入 20 μ g/mL 小鼠 IgG,就抑制了 HAMA 引起的非特异性反应,测定值降低为 437U/mL。然而,进一步增加小鼠 IgG, HAMA 血清的测定值降低,加入 80 μ g/mL 以上, sIL-2R 值就达到了平衡。在 HAMA 血清 I 型中,加入 80 μ g/mL 测定值虽然达到了平衡,但没有看到在 HAMA 血清 II 型中所表现的大的改变。另外,正常人血清的测定值是一定的,不随增加小鼠 IgG 的浓度改变,因此,证明加入小鼠 IgG 的浓度在 200 μ g/mL 以下对测定系统没有影响。根据这些结果,得知加入小鼠 IgG 的浓度在 80 μ g/mL 以上即可充分抑制 HAMA 血清 II 型引起的非特异性反应。在 HAMA 血清 I 型中也证实有抑制作用。

[0234] 实例 3 在 HAMA 非特异性反应中高聚合化的小鼠 IgG 的效果和高聚合化的小鼠 IgG 的最适浓度的研究

[0235] 探讨了加入高聚合化的小鼠 IgG 对 HAMA 引起的非特异性反应的抑制。将实例 1 中制备的级分 40 ~ 46 中的酶标抗体,用酶标抗体稀释液 [含有 150mmol/L 氯化钠、10% FBS、0.2% NP-40、100 μ g/ml 小鼠 IgG、高聚合化小鼠 IgG、0.2% Proxel GXL、10% POD 稳定化

缓冲液及 0.16 $\mu\text{g/mL}$ POD(罗氏诊断公司出品)的 75mmol/L 的 MES 缓冲液, pH6.5] 稀释。在用 MAK33-IgG1/IgG1Poly 作为高聚合化的小鼠 IgG 时, 将其分别配制成浓度为 0、75、100、125、150、175、200、300 $\mu\text{g/mL}$ 的酶标抗体溶液。在用 MAK33-IgG(2b)/Fab(2a)Poly 时, 将其分别配制成浓度为 0、5、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 的酶标抗体溶液。

[0236] 使用 HAMA 血清 I 型 (Lot. 90643629)、HAMA 血清 II 型 (Lot. 92069831) 和正常人血清 (Lot. 101001-2) 各 50 μL , 各血清中的 sIL-2R, 用实例 1(5) 相同的方法测定。

[0237] 加入 MAK33-IgG1/IgG1Poly 的效果见表 3。

[0238] [表 3]

[0239] 第三表

[0240]

MAK33-IgG1/IgG1 Poly ($\mu\text{g/mL}$)	sIL-2R 的测定值(U/mL)		
	HAMA I	HAMA II	正常人血清
0	435	281	340
75	285	270	339
100	268	257	317
125	248	247	331
150	241	247	329
175	237	247	329
200	227	229	324
300	217	224	322

[0241] 结果如表 3 所示, 在未加入 MAK33-IgG1/IgG1Poly 的状态下 HAMA 血清 I 型中的 sIL-2R 的测定值是 435U/mL, 随着加入 MAK33-IgG1/IgG1Poly 的浓度增加而测定值降低, 加入浓度在 125 $\mu\text{g/mL}$ 以上时 sIL-2R 的测定值几乎达到稳定。

[0242] 而 MAK33-IgG1/IgG1Poly 的浓度即使增加到 300 $\mu\text{g/mL}$ 正常人血清的测定值也不发生改变, 证明加入 300 $\mu\text{g/mL}$ 以下的 MAK33-IgG1/IgG1Poly, 对测定值没有影响。

[0243] 根据这些结果, 说明在酶标抗体溶液中加入浓度在 125 $\mu\text{g/mL}$ 以上的 MAK33-IgG1/IgG1Poly, 能够充分抑制 HAMA 血清 I 型引起的非特异性反应。

[0244] 加入 MAK33-IgG(2b)/Fab(2a)Poly 的效果如表 4 所示。

[0245] [表 4]

[0246] 第四表

[0247]

MAK33-IgG(2b)/Fab(2a) Poly($\mu\text{g/mL}$)	sIL-2R 的测定值(U/mL)		
	HAMAI	HAMA II	正常人血清
0	556	176	343
5	516	175	355
50	348	175	356
100	235	171	345

[0248] 结果如表 4 所示,用 MAK33-IgG(2b)/Fab(2a)Poly 取代 MAK33-IgG1/IgG1Poly 时, HAMA 血清 I 型中的 sIL-2R 的测定值同样是低的。

[0249] 因此,不仅加入 IgG1,加入其它亚型的 IgG 聚合物,都可抑制 HAMA 血清 I 型引起的非特异性反应。

[0250] 实施例 4

[0251] HAMA 血清检测样品中 sIL-2R 的测定 (1)

[0252] 将实例 1 中制备的级分 40~46 中的酶标抗体,用酶标抗体稀释液(含有 150mmol/L 氯化钠、10% FBS、0.2% NP-40、100 $\mu\text{g/mL}$ 小鼠 IgG、200 $\mu\text{g/mL}$ MAK33-IgG1/IgG1Poly、0.2% Proxel GXL、10% POD 稳定化缓冲液及 0.16 $\mu\text{g/mL}$ POD 的 75mmol/L 的 MES 缓冲液, pH6.5) 稀释,制备成酶标抗体溶液,用实施例 1(5) 相同的方法,测定 HAMA 血清 I 型 (Lot. 90643637) 和 HAMA 血清 II 型 (Lot. 92069840) 中的 sIL-2R。以下将上述制备的酶标抗体溶液,以及用实施例 1(4) 中所述的方法配制的酶标抗体溶液以外的试剂(参考例 3 制备的固相滴定板、实施例 1(4) 中的标准物质溶液、洗涤液、OPD 溶液及反应终止液)概括称为“实施例 4 的试剂”。以下记载了实施例 4 的试剂成分。

[0253] 实施例 4 的试剂

[0254] 抗 sIL-2R 抗体固定化滴定板:4 $\mu\text{g/mL}$ KTM-302 抗体用 100 μL /孔固定化的 8 孔 X 12 条的 96 孔微型滴定板

[0255] 标准物质溶液:分别含有 0U/mL、200U/mL、400U/mL、1600U/mL、3200U/mL、6400U/mL 的 sIL-2R 的标准物质溶液(含有 150mmol/L 氯化钠、4% BSA、1% 蔗糖和 0.01% Bioace 的 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.5)

[0256] 酶标抗体溶液:含规定量(24~140ng/mL)的实施例 1 中级分 40~46 的经 POD 标记抗体的标记抗体稀释液(含有 150mmol/L 氯化钠、10% FBS、0.2% NP-40、100 $\mu\text{g/mL}$ 小鼠 IgG、200 $\mu\text{g/mL}$ MAK33-IgG1/IgG1Poly、0.2% Proxel GXL、10% POD 稳定化缓冲液及 0.16 $\mu\text{g/mL}$ POD 的 75mmol/L 的 MES 缓冲液, pH6.5)

[0257] 洗涤液:含有 150mmol/L 氯化钠、0.05% 吐温 20 的 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH6.8

[0258] OPD 溶液:含有 2mg/mL OPD、0.75g/L 尿素过氧化氢盐、0.01% Proclin300 的 100mmol/L 的磷酸-柠檬酸缓冲液, pH4.4

[0259] 反应终止液:1mol/L 的硫酸

[0260] 还另行用 イムライズ IL-2R (DPC 公司出品) 测定了各血清中的 sIL-2R。结果见表

5。

[0261] [表 5]

[0262] 第 5 表

[0263]

试剂	sIL-2R 的测定值(U/mL)	
	HAMA 血清 I 型	HAMA 血清 II 型
イムライズ IL-2R	408	906
实施例 4 的试剂	200	219

[0264] 此结果表明,采用イムライズ IL-2R 的试剂盒测定, HAMA 血清中的 sIL-2R 也低,能够充分抑制 HAMA 的非特异性反应。

[0265] 实施例 5

[0266] 含有 HAMA 的检测样品中 sIL-2R 的测定 (2)

[0267] 测定在正常人血清中加入了不同量 HAMA 血清的检测样品中的 sIL-2R,以便了解不同 HAMA 的浓度对测定值的影响。

[0268] 首先,以用于制备检测样品的 HAMA 血清 I 型 (Lot. 90643656)、HAMA 血清 II 型 (Lot. 92069858) 和正常人血清 (F41489B) 作为样品,用实施例 4 的试剂测定各样品中的 sIL-2R,同时,用于 HAMA 测定的夹心 ELISA 试剂盒 ImmuSTRIP HAMA Fragment (Immunomedics 公司出品) 测定 HAMA。各自的测定结果、以及在制备检测样品时使用了 5 倍浓缩的 HAMA 血清 (以下简称 5x HAMA 血清) 而得到的 5x HAMA 血清中的 sIL-2R 以及 HAMA 浓度的理论值,都表示在表 6 中。

[0269] [表 6]

[0270] 第 6 表

[0271]

样品	sIL-2R(U/mL)		HAMA(μ g/mL)	
	测定值	5 x HAMA 血清 的理论值	测定值	5 x HAMA 血清 的理论值
HAMA 血清 I 型	260.5	1302.7	26.1	130.5
HAMA 血清 II 型	275.5	1377.7	12.5	62.5
正常人血清	266.0	-	0.0	-

[0272] 5x HAMA 血清 (血清 I 型或血清 II 型) 与正常人血清分别以 1 : 1、1 : 2 和 1 : 4 的比例混合作为样品,用实施例 4 的试剂和イムライズ IL-2R 测定各样品中的 sIL-2R。另一方面,根据上述求得的 5x HAMA 血清及正常人血清的 sIL-2R 浓度与样品的血清混合比进行计算,求出各样品中的 sIL-2R 理论值,再通过测定值与理论值之比,求出对测定值的影

响率(%)。同样根据 sIL-2R 理论值计算求得各样品中的 HAMA 的浓度。

[0273] 5x HAMA 与正常人血清的混合比为 1 : a 时的 sIL-2R 理论值

[0274] $= (5x \text{ HAMA 血清之 sIL-2R 浓度 (理论值)} + \text{正常人血清的 sIL-2R 浓度} \times a) / (1+a)$

[0275] 影响率(%) = $[(\text{sIL-2R 浓度的测定值} / \text{sIL-2R 浓度的理论值}) \times 100] - 100$

[0276] 第 7 表中表示采用实施例 4 的试剂、第 8 表中表示采用 イムライズ IL-2R 抗体分别得到的各样品中 HAMA 的浓度、sIL-2R 浓度的理论值和测定值, 以及影响率。

[0277] [表 7]

[0278] 第 7 表 用实施例 4 的试剂测定结果

[0279]

样品			sIL-2R		
HAMA 血清	血清的混合比 5 x HAMA:正常人	HAMA ($\mu\text{g/mL}$)	理论值 (U/mL)	测定值 (U/mL)	对测定的 影响率
HAMA 血清 I 型	1:4	26.1	473.3	514.1	8.6%
	1:2	43.5	611.6	660.4	8.0%
	1:1	65.3	784.3	837.0	6.7%
HAMA 血清 II 型	1:4	12.5	488.3	511.5	4.7%
	1:2	20.8	636.6	663.0	4.2%
	1:1	31.1	821.9	847.3	3.1%

[0280] [表 8]

[0281] 第 8 表 用 イムライズ IL-2R 抗体的测定

[0282]

样品			sIL-2R		
HAMA 血清	血清的混合比 5 x HAMA:正常人	HAMA ($\mu\text{g/mL}$)	理论值 (U/mL)	测定值 (U/mL)	对测定值 的影响率
HAMA 血清 I 型	1:4	26.1	504.5	709.0	40.5%
	1:2	43.5	637.6	890.0	39.6%
	1:1	65.3	803.8	1040.0	29.4%
HAMA 血清 II 型	1:4	12.5	519.5	1150.0	121.3%
	1:2	20.8	662.6	1630.0	146.0%
	1:1	31.1	841.4	2200.0	161.5%

[0283] 对于 HAMA 血清 I 型, 用实施例 4 的试剂测定时, 即使 HAMA 浓度增加到 $65.3 \mu\text{g/}$

mL(为市售 HAMA 血清 I 型中所含 HAMA 的 2.5 倍),对测定值的影响率也为 10%以下,而用 イムライズ IL-2R 测定时,对测定值的影响率为 30 ~ 40%,说明受到 HAMA 的影响。对于 HAMA 血清 II 型,用实施例 4 的试剂测定时,即使 HAMA 浓度增加到 31.1 μ g/mL(为市售 HAMA 血清 II 型中所含 HAMA 的 2.5 倍),对测定值的影响率为 5%以下,而用 イムライズ IL-2R 测定时,对测定值的影响率为 120 ~ 160%,说明受到 HAMA 很大的影响。根据这些结果,也表明用 イムライズ IL-2R 时,对 HAMA 引起的非特异性反应的抑制不充分,而用实施例 4 的试剂对 HAMA 引起的非特异性反应则可以充分抑制。

[0284] 实施例 6

[0285] sIL-2R 测定试剂盒

[0286] 由以下各种试剂组成试剂盒。

[0287] 1) 抗 sIL-2R 抗体固定化板

[0288] 将 4 μ g/mL KTM-302 抗体以 100 μ L/孔制成固相化的 8 孔 X12 条的 96 孔微型滴定板

[0289] 2) 酶标抗体

[0290] 成分:含有规定量(24 ~ 140ng/mL)的实施例 1 中的级分 40 ~ 46 的 POD 标记抗体的酶标抗体稀释液(含有 150mmol/L 氯化钠、10% FBS、0.2% NP-40、100 μ g/mL 小鼠 IgG、200 μ g/mL MAK33-IgG1/IgG1Poly、0.2% Proxel GXL、10% POD 稳定化缓冲液及 0.16 μ g/mL POD 的 75mmol/L 的 MES 缓冲液, pH6.5)

[0291] 体积:6mL/瓶

[0292] 3) 标准物质

[0293] 相当于 0U/mL、200U/mL、400U/mL、1600U/mL、3200U/mL、6400U/mL 的 sIL-2R 的标准物质溶液[(含有 150mmol/L 氯化钠、4% BSA、1% 蔗糖和 0.01% Bioace 的 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.5)0.5mL/瓶的冷冻干燥制品。

[0294] 4) 检测样品稀释液

[0295] 成分:含有 150mmol/L 氯化钠、4% BSA、1% 蔗糖、0.2% Proxel GXL、20 μ g/mL 小鼠 IgG 的 10mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.45)0.5mL/瓶的冷冻干燥制品。

[0296] 体积:6mL/瓶

[0297] 5) 发色底物

[0298] OPD 片(Sigma-Aldrich 公司出品),10mg/片 X 6

[0299] 6) 发色基底物溶解液

[0300] 成分:含有 0.75g/L 尿素过氧化氢盐及 0.1% Proclin300 的 100mmol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH4.4)

[0301] 体积:30mL/瓶

[0302] 7) 反应终止液

[0303] 成分:1mol/L 硫酸

[0304] 体积:6mL/瓶

[0305] 8) 洗涤液

[0306] 含有 150mmol/L 氯化钠和 0.05% 吐温 20 的 10mmol/L 磷酸缓冲液 (pH6.8)

[0307] 实施例 7

[0308] 对由于与 POD 反应的抗体而引起的非特异性反应的抑制

[0309] (1) 显示由非 HAMA 引起的非特异性反应的检测样品

[0310] 用检测样品稀释液 (含有 50mmol/L 氯化钠、4% BSA、1% 蔗糖、0.2% Proxel GXL 和 20 μ g/mL 小鼠 IgG 的 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.45) 将人血清检测样品 A 稀释成 1/1、1/4、1/8, 用实施例 4 的试剂测定各自的 sIL-2R 浓度。在第 9 表中, 表示了根据测定值及测定值与稀释率求出的检测样品原液的 sIL-2R 的计算值。检测样品原液的 sIL-2R 计算值由于稀释率不同而有差异, 稀释的线性关系不好, 说明产生了非特异性反应。

[0311] [表 9]

[0312] 第 9 表

[0313]

稀释率	sIL-2R 测定值 (U/mL)	检测样品原液 sIL-2R 的计算 值(U/mL)
1/1	11794	11794
1/4	2169	8676
1/8	486	3888

[0314] 为了确认检测样品的非特异性反应是否由于 HAMA 引起, 用测定 HAMA 的试剂盒 HAMA ELISA (罗氏诊断公司出品) 测定了检测样品 A 中所含的 HAMA 的浓度。结果表示在表 10 中, 在 HAMA 血清 I 型、HAMA 血清 II 型中, 检测到高浓度的 HAMA, 而检测样品 A 的 HAMA 值却在检测限 5ng/mL 以下, 否定了存在 HAMA。因此, 考虑检测样品 A 的非特异性反应是由 HAMA 以外的原因引起的。

[0315] [表 10]

[0316] 第 10 表

[0317]

样品	HAMA 测定值 (ng/mL)
检测样品 A	3.5
HAMA 血清 I 型	3603
HAMA 血清 II 型	18033

[0318] (2) 检测样品 A 非特异性反应的抑制

[0319] 将检测样品 A 用检测样品稀释液稀释至 1/2、1/4、1/6、1/11、1/21、1/31, 用下述成分的、用由高碘酸法标记的 POD 标记抗体组成的 sIL-2R 测定试剂 (以下简称 sIL-2R 测定试剂 B) 测定 sIL-2R, 根据测定值及稀释率求出的检测样品原液的 sIL-2R 的计算值。同时, sIL-2R 测定试剂 B 除酶标抗体外和实施例 4 的试剂构成相同, 该 POD 标记抗体, 没有经凝胶过滤分离抗体。

[0320] sIL-2R 测定试剂 B

[0321] 抗 sIL-2R 抗体固定化板: 将 4 μ g/mL KTM-302 抗体以 100 μ L/孔制成固相化的 8 孔 X12 条的 96 孔的微型滴定板

[0322] 标准物质溶液: 分别含有 0U/mL、200U/mL、400U/mL、1600U/mL、3200U/mL、6400U/

mL 的 sIL-2R 的标准物质溶液 [(含有 150mmol/L 氯化钠、4% BSA、1% 蔗糖和 0.01% Bioace 的 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.5)

[0323] 酶标抗体溶液:含有规定量 (24 ~ 140ng/mL) 的由高碘酸法标记的 POD 标记抗体的标记抗体稀释液 (含有 150mmol/L 氯化钠、10% FBS、0.2% NP-40、20 μg/mL 小鼠 IgG、0.2% Proxel GXL、10% POD 稳定化缓冲液及 0.16 μg/mL POD 的 10mmol/L 的磷酸缓冲液, pH7.5)

[0324] 洗涤液:含有 150mmol/L 氯化钠和 0.05% 吐温 20 的 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH6.8

[0325] OPD 溶液:含有 2mg/L OPD、0.75g/L 尿素过氧化氢盐、0.01% Proclin 300 的 100mmol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液, pH4.4

[0326] 反应终止液:1mol/L 硫酸

[0327] 另一方面,将检测样品 A 用小鼠血清稀释至 1/2、1/4、1/8,用实施例 4 的试剂测定 sIL-2R 进行非特异性反应吸收试验,结果计算出检测样品 A 中所含的 sIL-2R 的理论值为 3624U/mL。根据上述和使用实施例 4 的试剂时各种稀释率时检测样品原液中 sIL-2R 的计算值,求出与理论值 3624U/mL 之比,和 sIL-2R 的测定值、检测样品原液中 sIL-2R 的计算值一起,表示于表 11 (用实施例 4 的试剂时) 和表 12 (用 sIL-2R 测定试剂 B 时) 中。

[0328] [表 11]

[0329] 第 11 表

[0330]

稀释率	测定值	检测样品原液 sIL-2R 的计算值(U/mL)	计算值与理论值 3624 U/mL 之比(%)
1/1	11794	11794	325
1/4	2169	8676	239
1/8	486	3888	107

[0331] [表 12]

[0332] 第 12 表

[0333]

稀释率	测定值	检测样品原液 sIL-2R 的计算值(U/mL)	计算值与理论值 3624 U/mL 之比(%)
1/2	10657	21314	588
1/4	8623	34492	952
1/6	1233	7398	204
1/11	413	4543	125
1/21	177	3717	103
1/31	119	3689	98

[0334] 比较稀释率同样为 1/4 的检测样品的测定值时,表明用 sIL-2R 测定试剂 B 的测定值为用实施例 4 的试剂时的约 4 倍。同时,实施例 4 的试剂在稀释率为 1/8 时,几乎对非特异性反应没有影响,而 sIL-2R 测定试剂 B,可以看到在稀释率为 1/11 时相对于理论值为 125%,对非特异性反应几乎无作用,因此必须稀释为 1/21 ~ 1/31 的。有报告指出,用高碘酸法使酶和抗体结合,一般会形成聚合化的高度聚合的标记抗体(石川荣治著《酶免疫测定法》1987 年,医学书院发行)。因此,在 sIL-2R 测定试剂 B 中使用的由高碘酸法标记的 POD 标记抗体,考虑包含着每分子抗体结合的 POD 分子数高达 1 : 4 或 1 : 5,或以 2 : 2、2 : 3 及 3 : 1 的比例结合的抗体。

[0335] 根据以上结果,说明采用了实施例 1 的级分 40 ~ 46 的 POD 标记抗体、即抗体与 POD 结合比率分别为 1 : 1 或 1 : 2 的 POD 标记抗体的实施例 4 的试剂,可以有效抑制由 HAMA 以外的其它原因引起的非特异性反应。

[0336] (3) 钝化的过氧化物酶对检测样品 A 的非特异性反应的影响

[0337] 采用加入了 200 μ g/mL MAK33-IgG Poly 或 400 μ g/mL 无活性 Poly-POD 的实施例 4 的试剂,测定 1/4 稀释的检测样品 A 及对照血清 II(在正常人血清中加入 sIL-2R 而成)的 sIL-2R。也进行实施例 4 的试剂测定作为对照。结果见表 13 所示。同时,在对照血清 II 中含有的 sIL-2R,用 sIL-2R 测定试剂 B 测定为 2154U/mL,计算得出稀释为 1/4 的检测样品 A 的 sIL-2R 的理论值为 906U/mL(3624U/mL X 1/4)。

[0338] [表 13]

[0339] 第 13 表

[0340]

标记抗体稀释液	sIL-2R 测定值(U/mL)	
	稀释为 1/4 的检测样品 A	对照血清 II
实施例 4 的试剂	2022	2213
+MAK33-IgG Poly	1034	2176
+无活性 Poly- POD	736	2276
sIL-2R 理论值	906	2154

[0341] 实施例 4 的试剂中即使加入了 200 μ g/mL MAK33-IgG Poly 或 400 μ g/mL 的无活性 Poly-POD,并不改变对照血清 II 的测定值,所以可以认为对测定系统没有影响。

[0342] 稀释为 1/4 的检测样品 A 用实施例 4 的试剂测定 sIL-2R 的数值是 2022U/mL,与理论值比照,可以发现非特异性反应,但在标记抗体稀释液中加入 MAK33-IgG Poly 或无活性 Poly-POD,测定值降低到接近理论值,进一步抑制了非特异性反应。特别是加入了无活性 Poly-POD,几乎完全抑制了非特异性反应,证明存在由与 POD 起反应的抗体引起的非特异性反应。实施例 4 的试剂可以抑制检测样品 A 的非特异性反应,即与 POD 起反应的抗体引起的非特异性反应,如果还同时存在无活性 Poly-POD,则可以充分抑制抗 POD 抗体引起的非特异性反应。

[0343] 在产业上应用之可能性

[0344] 本发明提供了用于病症监控和疾病诊断等中样本中待测对象的免疫学定量方法及其定量试剂,以及免疫学定量方法中抑制非特异性反应的方法。

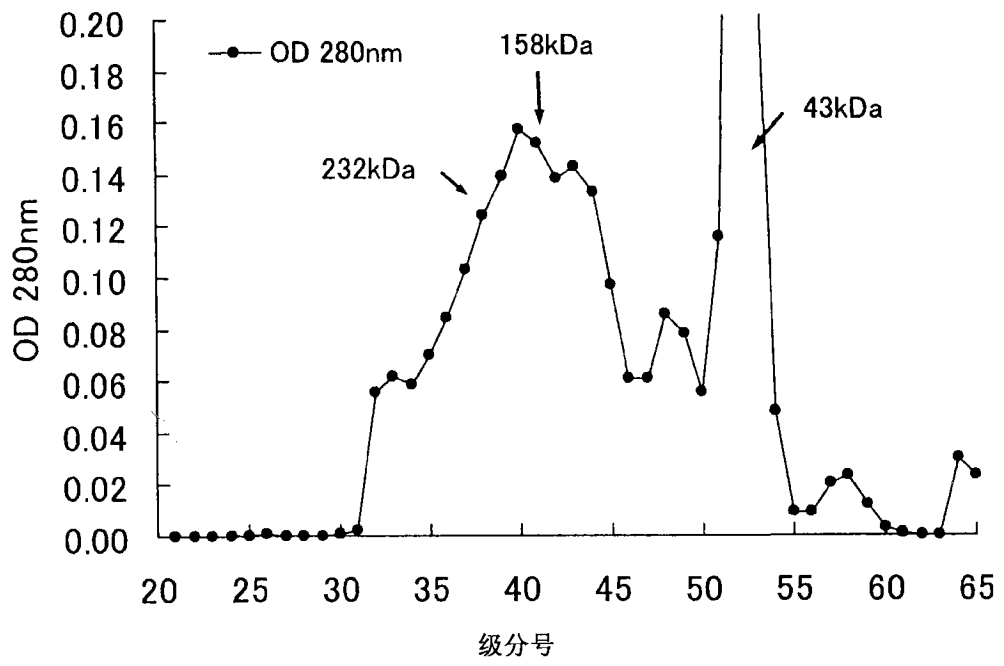


图 1

专利名称(译)	非特异性反应被抑制的可溶性白介素-2受体免疫学测定方法和试剂		
公开(公告)号	CN1969189B	公开(公告)日	2012-03-21
申请号	CN200580019597.3	申请日	2005-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
[标]发明人	守田和树 鹤泽耕治 铃木惠美子		
发明人	守田和树 鹤泽耕治 铃木惠美子		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/535 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/535 G01N2333/55 G01N33/5306 G01N33/54393 G01N33/581		
代理人(译)	杨青		
优先权	2004176288 2004-06-14 JP		
其他公开文献	CN1969189A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种非特异性反应被抑制的待测对象的免疫学定量方法，其包括下列步骤：在含水介质中让与待测对象特异性结合的第一抗体经酶标记后形成的酶标抗体与样品反应，由此形成酶标抗体与待测对象的免疫复合体，所述酶标抗体基本上只含有一种或多种选自第一抗体与酶之间的结合比率为1:1、1:2、1:3和2:1的酶标抗体的酶标抗体，以及测定免疫复合体的酶活性。

