



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109073641 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780023301.8

(22)申请日 2017.04.12

(30)优先权数据

2016-080660 2016.04.13 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.10.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/014943 2017.04.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/179611 JA 2017.10.19

(71)申请人 美迪恩斯生命科技株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 清水隆平 庄司庆一 张旭

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 张晶 谢顺星

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

按照条约第19条修改的权利要求书1页

按照条约第19条修改的声明或说明1页

(54)发明名称

使用硫酸化多糖类的免疫学测定法

(57)摘要

本发明提供在对生物体试样中的测定对象物质(例如,sIL-2R)进行免疫学检测时,无论血清、加肝素血浆这样的被检测试样的种类如何,均不受被检测试样中的干扰物质的影响,可得到稳定且高精度的测定值的测定方法及试剂盒,所述血清、加肝素血浆这样的被检测试样因常用的不同血液凝固抑制剂的使用而产生。在硫酸化多糖类的存在下进行测定对象物质与同其进行特异性结合的抗体的免疫复合物的形成。所述试剂盒包含:同测定对象特异性结合的抗体、以及含有硫酸化多糖类的缓冲液。

1. 一种测定对象物质的测定方法,其特征在于,在对生物体试样中的测定对象物质进行免疫学测定的方法中,在硫酸化多糖类的存在下,进行测定对象物质与同该测定对象物质特异性结合的抗体的免疫复合物的形成。

2. 一种测定对象物质的测定方法,其为在生物体试样中的测定对象物质的免疫学测定中,减少使用添加有作为抗凝固剂的肝素的血液试样时的测定值与使用血清时的测定值之间的偏差的方法,其特征在于,在硫酸化多糖类的存在下,进行测定对象物质与同该测定对象物质特异性结合的抗体的免疫复合物的形成。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述硫酸化多糖类为葡聚糖硫酸、 $\beta$ -环糊精硫酸。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,其中,在检体稀释液和/或抗体溶液中含有所述硫酸化多糖类。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的方法,其包括对所述形成的免疫复合物进行B/F分离的工序。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的方法,其中,使同测定对象物质特异性结合的第一抗体与第二抗体接触,测定通过抗原抗体反应而形成的免疫复合物。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的方法,其中,测定对象物质为可溶性白细胞介素-2受体、前列腺特异抗原。

8. 一种测定对象物质测定试剂盒,其包含用于权利要求1~7中任一项所述的方法的、同测定对象物质特异性结合的抗体与含有硫酸化多糖类的缓冲液。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其中,作为所述抗体,含有与负载在磁性颗粒上的所述测定对象物质特异性结合的抗体。

10. 根据权利要求8或9所述的试剂盒,其中,测定对象物质为可溶性白细胞介素-2受体、前列腺特异抗原。

## 使用硫酸化多糖类的免疫学测定法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抑制使用硫酸化多糖类的不同种被检测试样之间(特别是血清与加肝素血浆之间)的测定值偏离的免疫学测定法及试剂盒。

### 背景技术

[0002] 在通过抗原抗体反应进行光学测定的免疫学测定法中,存在确认到进行选取的采血管的不同、例如血清被检测试样与血浆被检测试样的测定值发生偏离的现象并成为问题的情况。偏离的原因因测定对象项目的不同而各异,作为迄今为止所知的见解之一,可列举出包含于血浆中的纤维蛋白原的不溶化对血浆被检测试样的测定值的影响。已知有通过使用含有表面活性剂的反应体系中包含配位数3个以下的螯合剂从而回避该影响的技术(专利文献1)。

[0003] 此外,例如为了对各种心肌肌钙蛋白进行评价,通常使用血液试样(血清、血浆或全血)。然而,该选择可受到使用方法的限制。例如,这是由于已知血清在用于快速评价心肌肌钙蛋白的方法中为不适宜的生物学试样,或全血难以实施定量试验。在使用加肝素血浆或加肝素全血而实施的免疫学测定中,即使在使用的方法的性能非常高的情况下,也常常得到缺少可靠性的结果。通常,在血浆中的心肌肌钙蛋白浓度并不是很高时遇到该问题(非专利文献1)。实际上,已知血液试样中的肝素的存在会在各种免疫学的测定之间产生干扰,并对测定结果造成影响,由此可能影响医师的临床诊断。

[0004] 迄今为止,对于在心肌肌钙蛋白试验中回避检体中的干扰物质的影响的方法,公开了一种免疫学测定法,其特征在于,在海美溴铵(聚凝胺)的存在下对含肝素的生物学试样进行实施(专利文献2)。

[0005] 然而,为了稳定地对临床检体进行测定,其还尚不充分。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本专利第5189067号公报

[0009] 专利文献2:日本特开2010-107363号公报

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:P.O.Collison et al.,Ann.Cli.Biochem.,(1995),32,pp.454-458

### 发明内容

[0012] 本发明要解决的技术问题

[0013] 在后文所述的实施例中有详细叙述,本申请的发明人在尝试通过免疫学方法测定生物体试样(血清及加肝素血浆)中的可溶性白细胞介素-2受体(以下,有时简写作sIL-2R)时发现,因由该生物体试样制备的测定用的被检测试样(以下,有时称作检体)的种类的不同,从而在测定值上产生了差别。

[0014] 本发明的目的在于提供在对生物体试样中的测定对象物质(例如,sIL-2R)进行检

测时,无论血清、加肝素血浆这样的被检测试样的种类如何,均不受被检测试样中的干扰物质的影响,可得到稳定且高精度的测定值的测定方法及试剂盒,所述血清、加肝素血浆这样的被检测试样因常用的不同血液凝固抑制剂的使用而产生。

[0015] 解决技术问题的技术手段

[0016] 鉴于上述这样的现状,本申请的发明人进行了仔细研究,结果发现,在对血清及加肝素血浆中的sIL-2R进行免疫学测定的方法中,通过在向反应液中添加了硫酸化多糖类的条件下测定该sIL-2R,无论被检测试样的种类如何,均不受被检测试样中的干扰物质的影响,得到稳定且高精度的测定值,从而完成了本发明。特别惊人的是,在使不具有硫酸基的多糖类及不具有多糖类的含硫酸基化合物共存的情况下,得不到上述的效果,若非硫酸化多糖类共存的情况,则得不到上述的好效果。此外,无论是否进行B/F分离,若不使硫酸化多糖类共存,则受到被检测试样中的干扰物质的影响,因此认为该干扰物质并非是以往已知的纤维蛋白原的不溶化或血红蛋白的影响等。

[0017] 因此,本发明可例示出如下内容。

[0018] [1]一种测定对象物质的测定方法,其特征在于,在对生物体试样中的测定对象物质进行免疫学测定的方法中,在硫酸化多糖类的存在下,进行测定对象物质与同该测定对象物质特异性结合的抗体的免疫复合物的形成。

[0019] [2]一种测定对象物质的测定方法,其为在生物体试样中的测定对象物质的免疫学测定中,减少使用添加有作为抗凝固剂的肝素的血液试样时的测定值与使用血清时的测定值之间的偏差的方法,其特征在于,在硫酸化多糖类的存在下,进行测定对象物质与同该测定对象物质特异性结合的抗体的免疫复合物的形成。

[0020] [3]根据[1]或[2]所述的方法,其中,所述硫酸化多糖类为葡聚糖硫酸、 $\beta$ -环糊精硫酸。

[0021] [4]根据[1]~[3]中任一项所述的方法,其中,在检体稀释液和/或抗体溶液中含有所述硫酸化多糖类。

[0022] [5]根据[1]~[4]中任一项所述的方法,其包括对所述形成的免疫复合物进行B/F分离的工序。

[0023] [6]根据[1]~[5]中任一项所述的方法,其中,使同测定对象物质特异性结合的第一抗体与第二抗体接触,测定通过抗原抗体反应而形成的免疫复合物。

[0024] [7]根据[1]~[6]中任一项所述的方法,其中,测定对象物质为可溶性白细胞介素-2受体、前列腺特异抗原。

[0025] [8]一种测定对象物质测定试剂盒,其包含用于[1]~[7]中任一项所述的方法的、同测定对象物质特异性结合的抗体与含有硫酸化多糖类的缓冲液。

[0026] [9]根据[8]所述的试剂盒,其中,作为所述抗体,含有与负载在磁性颗粒上的所述测定对象物质特异性结合的抗体。

[0027] [10]根据[8]或[9]所述的试剂盒,其中,测定对象物质为可溶性白细胞介素-2受体、前列腺特异抗原。

[0028] 发明效果

[0029] 通过使用本发明的方法及试剂盒,无论常用的被检测试样(血清及加肝素血浆)的种类如何,均可不受被检测试样中的干扰物质的影响,稳定且精度良好地测定生物体试样

中的测定对象物质(例如,sIL-2R)。

### 具体实施方式

[0030] 本发明中的生物体试样为,具有含有采集自人体等的测定对象物质(例如,sIL-2R)的可能性的试样。作为生物体试样,可列举出全血、血清、血浆等血液试样等,特别优选在被检测试样中含有血清与加肝素血浆。

[0031] 作为可用于本发明的被试验试样(检体),只要为可由所述生物体试样进行制备的测定用试样即可,例如,在以血液试样为对象时,可列举出使用血液凝固抑制剂得到的全血、血清、血浆等检体。作为血液凝固抑制剂,例如可使用肝素、EDTA、柠檬酸等。这些血液凝固抑制剂优选在从人等测定对象中进行采血时,能够预先添加至采血管等中而使用。特别是在将血清及加肝素血浆并列作为对象时,本发明的效果好,故而优选。

[0032] 本发明中作为对象的测定对象物质只要是可使用免疫测定法测定的物质,则没有特别限制。例如可列举出蛋白质、糖蛋白质、类脂质蛋白质、受体(receptor)、酶、病毒抗原、抗病毒抗体等,具体而言,可列举出可溶性白细胞介素-2受体(sIL-2R)、前列腺特异抗原(PSA)、B型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、C型肝炎病毒(HCV)抗体及抗原、人类免疫缺陷病毒(HIV)抗体、人T细胞白血病病毒-1(HTLV-1)抗体、梅毒螺旋体(TP)抗体等、各种心肌标记物(肌酸激酶(CKMB)、肌红蛋白、肌钙蛋白)、各种激素类等。优选为可溶性白细胞介素-2受体。可溶性白细胞介素-2受体是指,主要存在于作为免疫细胞的T细胞的膜上,并与作为配体的白细胞介素-2形成复合物,参与促进T细胞功能的活性化等免疫反应的受体。已知白细胞介素-2受体具有三种子类型(subtype),其中的 $\alpha$ 亚基(subunit)从细胞膜中分离,并存在于血中。认为可溶性白细胞介素-2受体保持与白细胞介素-2的结合性,因此也参与生物体的免疫调节,在临床现场,主要作为急性白血病的标记物使用。

[0033] 可用于本发明的免疫学测定法只要是对测定对象物质使用特异性抗体的公知方法即可。例如可列举出免疫比浊法(TIA)、酶免疫测定法(EIA)、放射免疫测定法(RIA)、乳胶凝集反应法、荧光免疫测定法、免疫层析法等。具体而言,为在反应液中形成被检测试样中的测定对象物质与该测定对象物质特异性的抗体的免疫复合物,通过对该形成产生的信号进行适当检测,从而检测该测定对象物质的存在的方法。能够根据测定体系决定使用的抗体,在以高灵敏度进行定量测定时,可选择使用两种以上抗体的三明治免疫学测定法(三明治免疫分析)。三明治免疫学测定法的方法可通过1个以上的阶段(2个阶段、3个阶段等)进行实施。例如可列举出包括以下工序的方法:形成测定对象物质与同负载于B/F分离用的不溶性载体的该测定对象物质特异性结合的抗体的免疫复合物的工序;对该免疫复合物进行B/F分离的工序;对分离后的该免疫复合物进行测定的工序。

[0034] 例如,在以包含在生物体试样中的sIL-2R作为测定对象物质并对其进行测定时,可通过以下方式进行:进一步使用检体稀释液,将由上文所述的该生物体试样制备的检体制成测定用检体,将负载有与sIL-2R特异性结合的抗体(第一抗体)的不溶性载体、及与使用标记物质进行标记化的第一抗体不同的同sIL-2R特异性结合的抗体(第二抗体)混合,使其形成免疫复合物,通过清洗去除(B/F分离)未反应的抗体及sIL-2R后,测定结合于不溶性载体的标记物质的量。

[0035] 上述的不溶性载体可使用在该技术中通常使用的载体。作为不溶性载体的材料,

例如可列举出乳胶、橡胶、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物、聚氯乙烯、聚乙酸乙烯酯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、苯乙烯-甲基丙烯酸酯共聚物、聚甲基丙烯酸缩水甘油酯、丙烯醛-乙二醇二甲基丙烯酸酯共聚物、聚偏氟乙烯(PVDF)、硅酮等聚合物材料；琼脂糖；明胶；红血球；硅胶、玻璃、不活性氧化铝、磁性体等无机材料等。可组合这些材料的一种或两种以上。

[0036] 此外，不溶性载体的形状可列举出微量滴定板、试管、珠、颗粒、纳米颗粒等。作为颗粒，可列举出磁性颗粒、聚苯乙烯乳胶这样的疏水性颗粒、在颗粒表面具有氨基、羧基等亲水基团的共聚乳胶颗粒、红血球、明胶颗粒等。其中，从实现快速简便的B/F分离的角度出发，特别优选磁性颗粒，具体而言，例如优选使用四氧化三铁( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )、三氧化二铁( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )、各种铁氧体、铁、锰、镍、钴、铬等金属、由钴、镍、锰等的合金组成的微粒等磁性颗粒。此外，可优选使用以将这些磁性颗粒包含于聚苯乙烯等高分子乳胶或明胶、脂质体等内部的形态进行制备的物质或在表面上进行固定化的物质。

[0037] 在这些不溶性载体上对第一抗体进行固定化的方法为该技术中公知的方法。例如可通过物理性吸附法、共价键法、离子键法、这些方法的组合等来进行该固定化。

[0038] 标记物质只要是可在通常的免疫学测定法中使用的标记物质，则没有特别限制，例如可列举出酶、荧光物质、放射性同位素、不溶性粒状物质等。作为该标记用的酶，可列举出碱性磷酸酶、过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、酪氨酸酶、酸性磷酸酶等。作为荧光物质，可列举出异硫氰酸荧光素(FITC)、绿色荧光蛋白质(GFP)、虫荧光素等。作为放射性同位素，可列举出 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 等。

[0039] 此外，在标记物质为酶时，通过使用针对该酶的基质，进行发光、荧光或显色反应，由此可测定标记物质。例如，在酶为碱性磷酸酶的情况下，作为基质，可使用CDP-star(注册商标)(4-氯-3-(甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]癸烷}-4-基)苯基磷酸二钠)、CSPD(注册商标)(3-(4-甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2-(5'-氯)三环[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]癸烷}-4-基)苯基磷酸二钠)、AMPPD(注册商标)(金刚烷基甲氧基苯基磷酸酐氧基二氧杂环丁烷)、APS-5等化学发光基质；4-甲基伞形酮磷酸酯(4-methylumbelliferyl phosphate)等荧光基质；对硝基苯基磷酸脂、BCIP(5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸)、NBT(4-硝基蓝四氮唑)、INT(碘硝基氯化四氮唑蓝)等显色基质。

[0040] 本发明中使用的与测定对象物质特异性结合的抗体，可适当选择使用对本领域技术人员而言公知的物质。例如，与sIL-2R特异性结合的抗体只要是以sIL-2R的氨基酸序列或立体结构等作为表位而进行识别的单克隆抗体或多克隆抗体，则没有特别限定，例如可列举出抗体AM92.3(pierce公司制造)、单克隆抗体7G7/B6(pierce公司制造)、MAB223(R&D Systems公司制造)、MAB623(R&D Systems公司制造)、MAB1020(R&D Systems公司制造)、YNRhIL 2R(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY公司制造)、IL2R.1(Abcam公司制造)、B-B10(Lifetechnologies公司制造)、EPR6452(Genetex公司制造)、OAPA00004(AVIVA system biology公司制造)、DM254-05(Acris antibodies公司制造)等。

[0041] 这些抗体可根据公知的方法，例如在为sIL-2R时，以由人T细胞提纯出的sIL-2R、或在体外(in vitro)制作的重组sIL-2R等作为抗原，对动物进行免疫而制作，并进一步决定表位。表位不仅是指对抗体进行识别的最少区域，还指作为抗体可识别的区域而确认的区域。此外，也可以是能够通过公知的方法进行制备的Fab等抗体片段。此外，这些抗体可从

Genway Biotech公司、Diaclone公司、Santa Cruz公司、R&D Systems公司等适当购入。

[0042] 在本发明的测定中,在使用两种抗体时,只要能够与生物体试样中的测定对象物质(例如,sIL-2R)形成免疫复合物,则没有限制,优选第一抗体与第二抗体进行识别的表位不同。此外,可将单克隆抗体与多克隆抗体适当组合使用。此外,第一抗体及第二抗体可以同时使用两种以上而不分别限定为一种。

[0043] 在上述的免疫学测定法中,本发明中的硫酸化多糖类的添加只要以至少存在于测定对象物质(例如,sIL-2R)与同该测定对象物质(例如,sIL-2R)特异性结合的抗体的第一次的免疫复合物形成时(反应液中)的方式进行即可。具体而言,可以在免疫复合物形成时(反应液中)同时添加,也可以在复合体形成前(所述抗体与含所述测定对象物质的检体接触前)添加到检体中。

[0044] 此外,所添加的硫酸化多糖类可溶解于公知的缓冲液中,作为溶液进行制备。除了缓冲剂以外,可以单独进行制备,也可以在检体的前处理或反应时与所需的公知物质一同进行制备。如上所示,硫酸化多糖类只要至少在免疫复合物形成时(反应液中)进行添加即可,因此可使其包含于在那时可存在的缓冲液等中。可存在于免疫复合物形成时的缓冲液等能够通过所使用的测定法或装置进行适当设定,例如可列举出检体稀释液或抗体溶液(抗体固相颗粒液或标记抗体液等)等。此外,也可添加到多种缓冲液中。

[0045] 作为本发明的硫酸化多糖类,可列举出葡聚糖硫酸、 $\beta$ -环糊精硫酸、N-乙酰基肝素(NAH)、N-乙酰基-脱-O-硫酸化-肝素(NA-de-o-SH)、脱-N-硫酸化-肝素(De-NSH)、脱-N-硫酸化-乙酰基化-肝素(De-NSAH)、高碘酸-氧化肝素(POH)、化学硫酸化昆布糖(CSL)、化学硫酸化海藻酸(CSAA)、化学硫酸化果胶(CSP)、肝素-衍生寡糖(HDO)、戊聚糖多硫酸酯(PPS)及褐藻多糖等。可优选列举出葡聚糖硫酸、 $\beta$ -环糊精硫酸。只要是能够在反应液中能够作为离子存在的方式进行供给,则该物质以何种形态进行添加均可,例如可列举出氯化硫酸化多糖类、溴化硫酸化多糖类等,具体而言,可列举出使氯化锂、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、氯化铵、溴化锂、溴化钠、溴化钾、溴化钙、溴化镁、溴化铵等共存,优选为氯化钠。

[0046] 作为本发明中的硫酸化多糖类的浓度,所述免疫复合物形成时的浓度可从以下范围中进行适当组合而选择:大于0.000004%,为0.000004%以上,优选为0.00004%以上,更优选为0.0004%以上,更优选为0.004%以上,更优选为0.04%以上,更优选为0.01%以上,更优选为0.02%以上,此外,为1%以下,优选为0.4%以下、更优选为0.04%以下的范围。在本发明中,无论生物体试样中是否存在硫酸化多糖类(例如,加肝素血浆中的肝素),反应液中的硫酸化多糖类都以成为上述的浓度范围的方式存在。此外需要注意,若反应液中的硫酸化多糖类过高,则抗原抗体反应受到抑制(阻碍),无法精度良好地进行目标测定。此外,根据本发明,为了能够与检体的种类无关地、稳定且高精度地测定生物体试样中的sIL-2R,根据检体中含有的测定对象物质(例如sIL-2R)的量或所使用的硫酸化多糖决定添加的浓度在设计范围内。

[0047] 例如可列举出,葡聚糖硫酸(分子量20,000)为0.000004%以上、0.04%以下,葡聚糖硫酸(分子量4,000)为0.0004%以上、0.04%以下, $\beta$ -环糊精硫酸盐为0.02%以上、0.4%以下等。

[0048] 如后文所述的实施例所示,准备添加有肝素的血液试样(加肝素血浆)与除此之外的血液试样(血清),在多种不同浓度的硫酸化多糖类的存在下,测定各血液试样中的测定

对象物质(例如sIL-2R),对两个试样的测定值一致的硫酸化多糖类的浓度范围进行掌握,由此,本领域技术人员能够容易地决定本发明中的硫酸化多糖类的浓度或种类。即,本发明中的硫酸化多糖类的浓度或种类可从使用添加有作为抗凝固剂的肝素的血液试样(加肝素血浆)时的测定值与使用除此之外的血液试样(血清)的测定值一致的浓度范围中进行选择。测定值一致具体而言是指测定值(由测定机器提供的光学计数或使用标准物质而计算的浓度等)在负10%~正10%之间。通常,若在这之间,则可认为在临床上是有用的。

[0049] 本发明的试剂盒可用于实施本发明的方法,其包含与测定对象物质(例如、sIL-2R)特异性结合的抗体、以及含有硫酸化多糖类的缓冲液。

[0050] 与测定对象物质特异性结合的抗体可以使用上文所述的公知的抗体,也可以为单克隆抗体或多克隆抗体中的任一种。此外,保持对心肌肌钙蛋白的特异结合能力的抗体片段例如也可作为Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或Fv而用于试剂盒。

[0051] 进一步,所述抗体能够以其本身的状态用于试剂盒,也可以根据所利用的免疫学方法而以适应该方法的形态用于试剂盒,例如,若利用乳胶凝集免疫测定法,则以固定在乳胶载体上的状态用于试剂盒;若利用使用了磁性颗粒等的高感度测定法,则以固定在磁性颗粒上的状态用于试剂盒;若为免疫层析法等利用基板的方法,则以固定在基板上的状态用于试剂盒;若需要通过标记物质(例如,酶、荧光物质、化学发光物质、放射性同位素、生物素、抗生物素蛋白)进行标记,则以经过标记化的状态用于试剂盒。

[0052] 作为含有所述硫酸化多糖类的缓冲液,参照上文所述即可,例如可列举出检体稀释液或抗体溶液(抗体固相颗粒液或标记抗体液)等。优选作为检体稀释液制备。

[0053] 此外,本发明的试剂盒可含有使用说明书,其中记载有关于使用本发明的试剂盒的免疫学测定法的实施步骤的说明、关于试剂盒本身的保存及操作等注意事项等。

[0054] 实施例

[0055] 以下,通过实施例对本发明进行具体说明,但本发明的范围并不受这些实施例限定。

[0056] 《参考例1:可溶性白细胞介素-2受体测定用试剂的制作与测定》

[0057] 参考例1-1:可溶性白细胞介素-2受体测定用试剂的制作与被检测试样的制备

[0058] 制作用于可溶性白细胞介素-2受体(sIL-2R)的测定的试剂。

[0059] • 检体稀释液:使用含有0.1mol/L HEPES(8.0)、0.15mol/L NaCl、0.05%吐温20的缓冲液。

[0060] • 第一抗体溶液:使用在磁性乳胶颗粒(JSR公司)上结合了识别sIL-2R的小鼠单克隆抗体(R&D Systems公司制造)的磁性颗粒溶液。

[0061] • 第二抗体溶液:使用以马来酰亚胺法对识别sIL-2R的其他小鼠单克隆抗体(R&D Systems公司制造)进行了碱性磷酸酶(ALP)标记的标记抗体溶液。

[0062] • 发光基质溶液:使用CDP-star(Applied Biosystems公司制造)。

[0063] • B/F清洗液:使用含有0.01mol/L MOPS(7.5)、0.15mol/L NaCl、0.05%Triton X-100的缓冲液。

[0064] • 被检测试样(检体)使用通过常规方法采集自健全人的血清、加肝素血浆。

[0065] 参考例1-2:使用可溶性白细胞介素-2受体测定用试剂进行的测定

[0066] 使用全自动临床检查系统(STACIA:LSI Medience公司制造)进行的测定

[0067] 在STACIA专用瓶中,分别填充制备的检体稀释液、第一抗体溶液(磁性乳胶试剂)、第二抗体溶液(酶标记抗体试剂),装配于装置中。接着,根据所述装置的操作方法进行测定。

[0068] 具体而言,向5 $\mu$ L检体中加入50 $\mu$ L检体稀释液,在37 $^{\circ}$ C下进行3.5分钟加热后,加入25 $\mu$ L第一抗体溶液(磁性乳胶试剂),在37 $^{\circ}$ C下进行4.2分钟加热。检体中的sIL-2R与第一抗体(磁性乳胶)反应,形成磁性乳胶-sIL-2R复合物。然后,加入50 $\mu$ L第二抗体溶液(酶标记抗体试剂),在37 $^{\circ}$ C下加热4.4分钟。若加入第二抗体溶液(ALP标记抗体),则ALP标记抗体与磁性乳胶-sIL-2R复合物反应,形成磁性乳胶-sIL-2R-ALP标记抗体复合物。在通过清洗去除(B/F分离)未反应的抗体及sIL-2R后,加入100 $\mu$ L发光基质液,在37 $^{\circ}$ C下进行2.7分钟反应后测定发光量。若加入CDP-star,则CDP-star通过复合体中的ALP被水解并发光。检测中将通过光电倍增管(PMT)检测的化学发光基质的发光计数作为测定结果。

[0069] 《实施例1:在反应液中添加硫酸化多糖类或不具有硫酸基的多糖类或不具有多糖类的含硫酸基化合物对sIL-2R的反应性的影响》

[0070] 除了以使其在反应液中成为下述浓度的方式将硫酸化多糖类或不具有硫酸基的多糖类或不具有多糖类的含硫酸基化合物添加到检体稀释液中以外,根据参考例1进行。

[0071] • 硫酸化多糖类:以成为0.04%的方式,将葡聚糖硫酸盐(分子量4000)添加至检体稀释液中。以成为0.04%的方式,将 $\beta$ -环糊精硫酸盐添加至检体稀释液中。

[0072] • 不具有硫酸基的多糖类:以成为0.04%的方式,将葡聚糖添加至检体稀释液中。以成为0.04%的方式,将环糊精添加至检体稀释液中。

[0073] • 不具有多糖类的含硫酸基化合物:以成为0.04%的方式,将CHAP-SO添加至检体稀释液中。以成为0.04%的方式,将辛酸钠添加至检体稀释液中。除此之外,根据参考例1进行。

[0074] 将其结果示于表1。将加肝素血浆的计数除以血清的计数之后乘以100的值表示为加肝素血浆/血清。为无添加的例子时,可知血清及加肝素血浆的可溶性白细胞介素-2受体的反应性不同。进一步,对于葡聚糖硫酸酯盐(分子量4000)或 $\beta$ -环糊精硫酸盐等具有硫酸基的多糖类(硫酸化多糖类),血清与加肝素血浆的反应性一致(加肝素血浆/血清为99%或100%),但对于葡聚糖或环糊精等不具有硫酸基的多糖类、或者CHAPSO或辛酸钠等不具有多糖类的含硫酸基化合物,血清与加肝素血浆的反应性不一致(加肝素血浆/血清为130%~138%)。这表示,为了使血清与加肝素血浆的反应性一致,需要添加具有硫酸基的多糖类。

[0075] [表1]

[0076]

	无添加	葡聚糖硫酸(4,000)	$\beta$ -环糊精硫酸盐	葡聚糖(2,000)	环糊精	CHAPSO	辛酸钠
血清试样(计数)	15544	21591	21328	16185	16156	15508	16224
加肝素血浆试样(计数)	20779	21462	21310	21112	22316	20981	21349
加肝素血浆/血清	134%	99%	100%	130%	138%	135%	132%

[0077] 《实施例2:在反应液中添加各种硫酸化多糖类对可溶性白细胞介素-2受体的反应性的影响》

[0078] 除了以下记载的内容以外,根据参考例1的方法进行。

[0079] • 检体稀释液:使用含有0.1mol/L HEPES (8.0)、0.15mol/L NaCl、0.05%吐温20、0.4mmol/L乙二醇四乙酸的缓冲液。

[0080] • 以使葡聚糖硫酸(分子量20,000)在反应液中成为各浓度(0.0000004、0.000004、0.00004、0.0004、0.004、0.04%)的方式,将其添加至检体稀释液中。

[0081] • 以使葡聚糖硫酸(分子量4,000)在反应液中成为各浓度(0.000004、0.00004、0.0004、0.004、0.04%)的方式,将其添加至检体稀释液中。

[0082] • 以使β-环糊精硫酸盐在反应液中成为各浓度(0.004、0.01、0.02、0.04、0.08、0.2、0.4%)的方式,将其添加至检体稀释液中。

[0083] • 标准品:使用以使重组sIL-2R成为100000、40000、2500、500、0U/mL的方式而稀释的物质。稀释中使用含有0.05mol/L PBS (7.4)、0.05%吐温20、0.1%BSA、0.05%叠氮化钠的缓冲液。使用该标准品,根据公知的方法,由发光计数计算各浓度(U/mL)。

[0084] 将其结果示于表2。将加肝素血浆的浓度除以血清的浓度之后乘以100的值表示为加肝素血浆/血清。为无添加的例子时,可知血清及加肝素血浆的可溶性白细胞介素-2受体的反应性不同。

[0085] 其结果,若将视为一致的范围设为负10%~正10%,则确认到通过添加0.000004%以上的葡聚糖硫酸盐(分子量20,000)、0.0004%以上的葡聚糖硫酸(分子量4,000)、0.004%以上的β-环糊精硫酸盐,血清及加肝素血浆的可溶性白细胞介素-2受体的反应性一致。

[0086] [表2]

[0087] 葡聚糖硫酸盐(分子量20,000)

[0088]

硫酸化多糖浓度(%)	0	0.0000004%	0.000004%	0.00004%	0.0004%	0.004%	0.04%
血清试样(U/mL)	119	185	224	259	259	270	271
加肝素血浆试样(U/mL)	142	223	223	247	252	266	267
加肝素血浆/血清	119%	121%	100%	95%	97%	99%	99%

[0089] 葡聚糖硫酸盐(分子量4,000)

[0090]

硫酸化多糖浓度(%)	0	0.000004%	0.00004%	0.0004%	0.004%	0.04%
血清试样(U/mL)	119	175	176	217	259	262
加肝素血浆试样(U/mL)	142	217	217	235	245	249
加肝素血浆/血清	119%	124%	123%	108%	95%	95%

[0091] β-环糊精硫酸盐

[0092]

硫酸化多糖浓度(%)	0.000%	0.004%	0.01%	0.02%	0.04%	0.08%	0.2%	0.4%
血清试样(U/mL)	119	147	161	173	170	180	192	191

加肝素血浆试样 (U/mL)	142	149	174	175	168	162	174	189
加肝素血浆/血清	119%	101%	108%	101%	99%	90%	91%	99%

[0093] 《比较例1:在反应液中添加不具有的硫酸基的多糖类及不具有多糖类的含硫酸基化合物对sIL-2R的反应性的影响》

[0094] 将不具有的硫酸基的多糖类及不具有多糖类的含硫酸基化合物同时添加至反应液中研究是否可成为与硫酸化多糖类相同的反应性。除了将不具有的硫酸基的多糖类及不具有多糖类的含硫酸基化合物以成为下述的浓度的方式添加至检体稀释液以外,根据参考例1进行。

[0095] • 不具有多糖类的含硫酸基化合物:以使NDSB-195、NDSB-201、NDSB-256分别成为0.385mmol/L、3.85mmol/L的方式将其添加至检体稀释液中。

[0096] • 不具有多糖类的含硫酸基化合物及不具有的硫酸基的多糖类的混合:以使NDSB-195成为3.85mmol/L、使葡聚糖(分子量2000)成为0.19%的方式,将其添加至检体稀释液中。

[0097] 将其结果示于表3。将加肝素血浆的计数除以血清的计数之后乘以100的值表示为加肝素血浆/血清。由其结果可知,对于不具有多糖类的含硫酸基化合物,血清与加肝素血浆的测定值不一致,且在添加了不具有硫酸基的多糖类的状态下,测定值也不一致。

[0098] 在使不具有硫酸基的多糖类及不具有多糖类的含硫酸基化合物共存时,无法得到实施例1、2的具有硫酸基的多糖类那样的效果,不使具有硫酸基的多糖类共存时不能获得所述的好效果,其不受硫酸基与多糖类的存在的影响,因此为意外的结果。

[0099] [表3]

[0100]

化合物	无添加物	NDSB-195		NDSB-201		NDSB-256		NDSB-195+ 葡聚糖(2000)
		3.85mM	0.385 mM	3.85mM	0.385 mM	3.85mM	0.385 mM	
浓度	—	3.85mM	0.385 mM	3.85mM	0.385 mM	3.85mM	0.385 mM	3.85mM+0.19%
血清试样 (计数)	5352	5476	5388	5317	5352	5390	5200	5822
加肝素血浆试 样(计数)	6619	6943	7173	6678	7143	7115	7055	7617
加肝素血浆/ 血清	124%	127%	133%	126%	133%	132%	136%	131%

[0101] 《实施例3:在反应液中添加硫酸化多糖类对total PSA的反应性的影响》

[0102] 实施例3-1:total PSA测定用试剂的制作与被检测试样的制备

[0103] 制作用于total PSA的测定的试剂。

[0104] • 检体稀释液:使用含有0.1mol/L HEPES(8.0)、0.15mol/L NaCl、0.05%吐温20的缓冲液。

[0105] • 第一抗体溶液:使用在磁性乳胶颗粒(JSR公司)上结合了识别PSA的小鼠单克隆抗体(Biospacific公司制造)的磁性颗粒溶液。

[0106] • 第二抗体溶液:使用以马来酰亚胺法对识别PSA的其他小鼠单克隆抗体

(Biospacific公司制造)进行了碱性磷酸酶(ALP)标记的标记抗体溶液。

[0107] • 发光基质溶液:使用CDP-star (Applied Biosystems公司制造)。

[0108] • B/F清洗液:使用含有0.01mol/L MOPS (7.5)、0.15mol/L NaCl、0.05% Triton X-100的缓冲液。

[0109] • 以使 $\beta$ -环糊精硫酸盐在反应液中成为各浓度(0.002、0.004、0.008、0.031%)的方式将其添加至检体稀释液中。

[0110] • 被检测试样(检体)使用通过常规方法采集自健全人的血清、加肝素血浆。

[0111] • 标准品:使用以使重组PSA成为100、50、10、1、0ng/mL的方式而稀释的物质。稀释中使用含有0.01mol/L MOPS (7.0)、0.15mol/L NaCl、0.05% Triton X、0.05% Proclin 300的缓冲液。使用该标准品,根据公知的方法,由发光计数计算各浓度(ng/mL)。

[0112] 实施例3-2:使用total PSA测定用试剂的测定与结果。

[0113] 除了将测定对象设为total PSA,以与参考例1-2相同的方式进行实施。

[0114] 将其结果示于表4。将加肝素血浆的浓度除以血清的浓度之后乘以100的值表示为加肝素血浆/血清。为无添加的例子时,可知血清及加肝素血浆的total PSA的反应性不同。进一步,若将视为一致的范围设为负10%~正10%,则确认到通过添加0.002%以上的 $\beta$ -环糊精硫酸盐,血清及加肝素血浆的total PSA的反应性一致。

[0115] [表4]

[0116]  $\beta$ -环糊精硫酸盐

[0117]

硫酸化多糖浓度(%)	0.000%	0.031%	0.008%	0.004%	0.002%
血清试样(ng/mL)	0.48	0.54	0.54	0.58	0.53
加肝素血浆试样(ng/mL)	0.56	0.58	0.58	0.59	0.54
加肝素血浆/血清	116%	107%	106%	101%	103%

[0118] 工业实用性

[0119] 在检测测定对象物质(例如,sIL-2R)的情况下,无论特别常用的检体的种类(血清及加肝素血浆)如何,本发明均可稳定且以高精度得到测定结果而不受检体中的干扰物质的影响。临床检查需要简便且快速地进行测定,不仅在检查室中,在POCT领域等中也会进行测定。例如,以血液试样作为对象时,若考虑到能够在各种状况下进行测定,则在该试样的选取中使用的容器多种多样,因此,无论得到的检体的种类如何,能够在使用特别常用的血清或加肝素血浆的同时,稳定且以高精度得到测定结果的本发明是特别有用的。

[0120] 以上,根据特定的实施方式对本发明进行了说明,但对于本领域技术人员而言显而易见的变动或改良也包含在本发明的范围中。

1. 一种测定对象物质的测定方法,其为在生物体试样中的测定对象物质的免疫学测定中,减少使用添加有作为抗凝固剂的肝素的血液试样时的测定值与使用血清时的测定值之间的偏差的方法,其特征在于,在硫酸化多糖类的存在下,进行测定对象物质与同该测定对象物质特异性结合的抗体的免疫复合物的形成。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述硫酸化多糖类为葡聚糖硫酸、 $\beta$ -环糊精硫酸。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,在检体稀释液和/或抗体溶液中含有所述硫酸化多糖类。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,其包括对所述形成的免疫复合物进行B/F分离的工序。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的方法,其中,使同测定对象物质特异性结合的第一抗体与第二抗体接触,测定通过抗原抗体反应而形成的免疫复合物。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的方法,其中,测定对象物质为可溶性白细胞介素-2受体、前列腺特异抗原。

7. 一种测定对象物质测定试剂盒,其包含用于权利要求1~6中任一项所述的方法的、同测定对象物质特异性结合的抗体与含有硫酸化多糖类的缓冲液。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其中,作为所述抗体,含有与负载在磁性颗粒上的所述测定对象物质特异性结合的抗体。

9. 根据权利要求7或8所述的试剂盒,其中,测定对象物质为可溶性白细胞介素-2受体、前列腺特异抗原。

[0001] 修改说明：

[0002] 申请人对权利要求书进行了以下修改：

[0003] 1. 将权利要求1删除；

[0004] 2. 对权利要求2~10的编号及引用关系进行适当修改。

专利名称(译)	使用硫酸化多糖类的免疫学测定法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109073641A</a>	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201780023301.8	申请日	2017-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	美迪恩斯生命科技株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	美迪恩斯生命科技株式会社		
[标]发明人	清水隆平 庄司庆一 张旭		
发明人	清水隆平 庄司庆一 张旭		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54333 G01N2400/18 G01N2400/22 G01N2400/40		
代理人(译)	张晶		
优先权	2016080660 2016-04-13 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供在对生物体试样中的测定对象物质(例如, sIL-2R)进行免疫学检测时, 无论血清、加肝素血浆这样的被检测试样的种类如何, 均不受被检测试样中的干扰物质的影响, 可得到稳定且高精度的测定值的测定方法及试剂盒, 所述血清、加肝素血浆这样的被检测试样因常用的不同血液凝固抑制剂的使用而产生。在硫酸化多糖类的存在下进行测定对象物质与同其进行特异性结合的抗体的免疫复合物的形成。所述试剂盒包含: 同测定对象特异性结合的抗体、以及含有硫酸化多糖类的缓冲液。

	无添加	葡聚糖硫酸(4,000)	$\beta$ -环糊精硫酸盐	葡聚糖(2,000)	环糊精	CHAPSO	辛酸钠
血清试样(计数)	15544	21591	21328	16185	16156	15508	16224
加肝素血浆试样(计数)	20779	21462	21310	21112	22316	20981	21349
加肝素血浆/血清	134%	99%	100%	130%	138%	135%	132%