



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103620407 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 05

(21) 申请号 201280032103. 5

(22) 申请日 2012. 06. 28

(30) 优先权数据

2011-144464 2011. 06. 29 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 12. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/066484 2012. 06. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/002309 JA 2013. 01. 03

(71) 申请人 三菱化学美迪恩斯株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 冈村佳和 田代茂

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 庞立志 孟慧岚

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页

(54) 发明名称

非特异性反应抑制剂、非特异性反应抑制方法及试剂盒

(57) 摘要

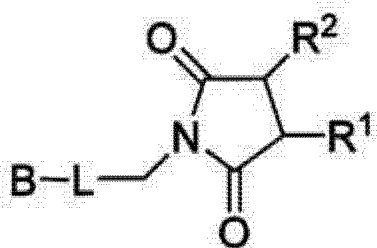
本发明提供非特异性反应抑制剂, 该抑制剂用于简便且有效地抑制免疫学测定法中伴随着测定的非特异性反应, 实现样本中的微量成分(目标物质)的准确的检测及定量。所述非特异性反应抑制剂包含式 I 所示的物质:



在它们各自直接键合的碳之间形成双键, 或者 R¹是氢原子, 且 R²是从含 SH 基的化合物中除去 H 而得的基团, B 是支承体, L 是间隔臂部分。

1. 免疫学测定用的非特异性反应抑制剂,其包含式 I 所示的物质:

[化 1]



式中, R¹ 和 R² 一起在它们各自直接键合的碳之间形成双键,或者 R¹ 是氢原子,且 R² 是从含 SH 基的化合物中除去 H 而得的基团, B 是支承体, L 是间隔臂部分。

2. 权利要求 1 所述的非特异性反应抑制剂,其中,支承体是担载体蛋白或担载体固相载体。

3. 权利要求 2 所述的非特异性反应抑制剂,其中,担载体蛋白是白蛋白。

4. 权利要求 2 所述的非特异性反应抑制剂,其中,担载体固相载体是粒子。

5. 免疫学测定方法,其使用权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的非特异性反应抑制剂。

6. 权利要求 5 所述的免疫学测定方法,其中,免疫学测定方法是胶乳凝集光学测定法、酶免疫分析法、免疫比浊法、酶免疫测定法、荧光免疫测定法或放射免疫测定法。

7. 权利要求 5 或 6 所述的免疫学测定方法,其中,在进行与样本中所含的目标物质的特异性的免疫反应工序之前,使该样本与非特异性反应抑制剂反应。

8. 权利要求 5 或 6 所述的免疫学测定方法,其中,在非特异性反应抑制剂的共存下进行与样本中所含的目标物质的特异性的免疫反应工序。

9. 权利要求 5 或 6 所述的免疫学测定方法,其中,免疫测定是采用夹心法的测定,在非特异性反应抑制剂的共存下进行与样本中所含的目标物质的特异性的免疫反应工序中的一道以上的工序。

10. 免疫学测定试剂盒,其含有权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的非特异性反应抑制剂。

非特异性反应抑制剂、非特异性反应抑制方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及非特异性反应抑制剂、使用该抑制剂的非特异性反应抑制方法以及包含该抑制剂的免疫测定试剂盒,该抑制剂在免疫学测定法中使用,用于抑制非特异性反应,该非特异性反应是对微量的目标物质准确地进行检测、定量的障碍。

背景技术

[0002] 利用抗原抗体反应的免疫学测定法能特异性地检测或者以良好的精度测定作为测定对象的微量成分,因此被广泛应用于临床检查。人们逐渐认识到,在这些免疫学测定法中,由于作为本来目的的目标物质的特异性的抗原抗体反应以外的非特异性反应,测定值的可靠性受损。该现象是由于样本中所含的目标物质(抗原)以外的成分与测定体系的成分反应而引起的。

[0003] 一直以来,为了抑制非特异性反应、得到正确的测定值,进行了各种各样的尝试。例如,通常通过加热或用合适的试剂对欲测定的样本进行预处理,或是在测定体系中添加各种动物血清、免疫球蛋白组分、白蛋白、脱脂牛奶、明胶、表面活性剂等。为了避免通过像类风湿因子那样与抗体的Fc部位结合而引起的非特异性反应,也将Fab、F(ab')₂等抗体片段用于特异性反应。此外,也在测定体系中添加单克隆抗体,该单克隆抗体与测定体系中使用的单克隆抗体的反应特异性不同,并且不阻碍测定体系的反应。

[0004] 此外,也已知如专利文献1所述采用使用马来酰亚胺等使链霉亲和素(streptavidin)交联/聚合而得的产物的技术方案、如专利文献2所述采用酰基化蛋白质凝集体的技术方案。此外,也已知在N取代马来酰亚胺化合物的存在下使被能检测的物质标记的一抗、二抗和试样反应,由此抑制能检测的物质与试样中所含的硫醇基(即SH基)的非特异性的结合的技术方案(专利文献3)。此外,公开了如下内容:在阻碍机体相关分子对载体的非特异性吸附的方法中,对表面具有选自N-羟基琥珀酰亚胺酯基、羧基、马来酰亚胺基和氨基的化学修饰基团的载体使用包含聚环氧烷的封闭剂,该聚环氧烷的末端具有能与上述载体上的化学修饰基团反应的、选自N-羟基琥珀酰亚胺酯基、巯基和氨基的官能团(专利文献4)。

[0005] 但是,这些方法虽然在非特异性反应的抑制方面有一定程度的效果,但在一部分样本中,其效果还有所不足,在误诊可能会招致严重后果的临床检查的现场尚不能令人满意。

[0006] 现有技术文献

专利文献

专利文献1:日本专利第3027770号说明书

专利文献2:日本特表平8-506907号公报

专利文献3:日本专利第4571999号说明书

专利文献4:日本特开2006-308307号公报。

发明内容

[0007] 发明所要解决的课题

鉴于这样的状况,本发明的目的是提供非特异性反应抑制剂、其使用方法及测定试剂盒,该抑制剂用于在免疫学测定法中简便且有效地抑制伴随着测定的非特异性反应,实现样本中的微量成分(目标物质)的准确的检测及定量。

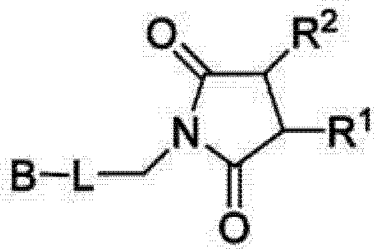
[0008] 用于解决课题的手段

本发明人为了解决上述问题,对非特异性反应进行了认真研究,结果发现,通过在反应液中添加键合有具有马来酰亚胺基的物质(Sulfo-SMCC:磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯或 Sulfo-HMCS:N-(8-马来酰亚胺辛氧基)磺基琥珀酰亚胺)的担载体(キャリアー)蛋白,能避免样本中的干扰物质(非特异性反应物质)的影响,从而完成了本发明。即,如下述实施例中所详述的,作为非特异性反应物质,已知在样本中存在与键合有马来酰亚胺基的担载体蛋白反应的物质。本发明基于该发现,完成了一种用于准确地测定样本中的目标物质的非特异性反应抑制剂以及使用该非特异性反应抑制剂的测定方法及测定试剂。

[0009] 即,本发明涉及:

[1] 免疫学测定用的非特异性反应抑制剂,其包含式 I 所示的物质:

[化 1]



式中, R^1 和 R^2 一起在它们各自直接键合的碳之间形成双键,或者 R^1 是氢原子,且 R^2 是从含 SH 基的化合物中除去 H 而得的基团, B 是支承体(支持体), L 是间隔臂部分。

[0010] [2] [1] 的非特异性反应抑制剂,其中,支承体是担载体蛋白或担载体固相载体。

[0011] [3] [2] 的非特异性反应抑制剂,其中,担载体蛋白是白蛋白。

[0012] [4] [2] 的非特异性反应抑制剂,其中,担载体固相载体是粒子。

[0013] [5] 免疫学测定方法,其使用 [1] ~ [4] 中任一项的非特异性反应抑制剂。

[0014] [6] [5] 的免疫学测定方法,其中,免疫学测定方法是胶乳凝集光学测定法、酶免疫分析法、免疫透射比浊法、酶免疫测定法、荧光免疫测定法或放射免疫测定法。

[0015] [7] [5] 或 [6] 的免疫学测定方法,其中,在进行与样本中所含的目标物质的特异性的免疫反应工序之前,使该样本与非特异性反应抑制剂反应。

[0016] [8] [5] 或 [6] 的免疫学测定方法,其中,在非特异性反应抑制剂的共存下进行与样本中所含的目标物质的特异性的免疫反应工序。

[0017] [9] [5] 或 [6] 的免疫学测定方法,其中,免疫测定是采用夹心法的测定,在非特异性反应抑制剂的共存下进行与样本中所含的目标物质的特异性的免疫反应工序中的一道以上的工序。

[0018] [10] 免疫学测定试剂盒,其含有 [1] ~ [4] 中任一项的非特异性反应抑制剂。

[0019] 发明的效果

通过使用本发明的非特异性反应抑制剂及其使用方法以及测定试剂盒,能简便且有效地抑制样本中的非特异性反应物质的影响,准确地测定样本中的微量成分(目标物质)。

[0020] 本发明所发现的非特异性反应物质与本发明的非特异性反应抑制物质、即键合有马来酰亚胺基或其衍生物的支承体(特别是蛋白质)良好地反应,因此特异性的免疫反应工序中存在键合有马来酰亚胺基的支承体时效果特别好。因此认为,在采用免疫学测定法中的马来酰亚胺法将抗体或抗原等固相化或标记化而制成的试剂中,本发明特别有效。

具体实施方式

[0021] 本发明的非特异性反应抑制剂可以用于公知的免疫学测定法中。

[0022] 作为免疫学测定法,有单向放射免疫扩散法、透射比浊法、散射比浊法、凝集法、放射免疫测定法、酶免疫测定法、荧光免疫测定法等,放射免疫测定法、酶免疫测定法、荧光免疫测定法的测定灵敏度也高,特别适合于极微量成分的测定。

[0023] 放射免疫测定法、酶免疫测定法、荧光免疫测定法分别是使用将放射性物质、酶、荧光物质与特异性地与目标物质反应的抗体结合而成的标记抗体的方法,一般是以与将抗体或抗原与不溶性载体结合而成的固相化抗体或固相化抗原组合的固相法来使用。固相法有夹心法和竞争法,夹心法是制造“固相化抗体-抗原-标记抗体”复合物来进行测定,竞争法的原理是:固相化抗原和样本中的游离抗原竞争性地与反应体系内添加的一定量的标记抗体进行反应。

[0024] 作为本发明中使用的样本,可例举例如全血、血清、血浆、脊髓液、唾液等体液和尿、粪便提取液等。

[0025] 作为目标物质,只要有在样本含有的可能性、具有免疫学反应性即可,无特别限制,优选有助于疾病的诊断和病情的掌握的物质。可例举例如乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、丙型肝炎病毒(HCV)抗体及抗原、人免疫缺陷病毒(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。此外,可例举各种心肌标志物(肌酸激酶(CKMB)、肌红蛋白、肌钙蛋白)、各种激素类、血清蛋白等。

[0026] 本发明的非特异性反应抑制剂包含上述式I所示的、使马来酰亚胺基或其衍生物直接或间接地与支承体键合而得的物质作为非特异性反应抑制物质。另外,本说明书中,马来酰亚胺基的衍生物是指将马来酰亚胺基(与氢硫基反应)用含SH基的化合物封闭而得的化合物。作为支承体,只要是在测定体系中呈惰性的物质(以下有时称为担载体)就没有特别限制,可例举例如蛋白质、固相载体等。作为担载体蛋白,可例举白蛋白(牛血清白蛋白:BSA和人血清白蛋白:HAS等)、失活碱性磷酸酶(失活ALP)、失活辣根过氧化物酶(失活HRP)、链霉亲和素、亲和素、明胶、酪蛋白、抗体等。作为担载体固相载体,可例举微量滴定板、试管、珠、粒子、纳米粒子、膜等。作为粒子,可例举磁性粒子、聚苯乙烯胶乳之类的疏水性粒子、粒子表面具有氨基、羧基等亲水基团的共聚胶乳粒子、红细胞、明胶粒子等。在测定体系中呈惰性是指不会对与测定对象物质的免疫学反应造成影响、不会对酶反应造成影响等。如果是本领域技术人员,就能根据测定原理适当选择合适的担载体。

[0027] 作为担载体蛋白,既可以从生物试样中纯化,也可以通过基因重组制成合适的蛋白质。

[0028] 担载体蛋白的马来酰亚胺基的键合可以使用公知的交联剂。交联剂只要包含马来酰亚胺基和用于与担载体蛋白键合的官能团（例如氨基反应性官能团、羧基反应性官能团、生物素）即可，在马来酰亚胺基和担载体蛋白之间可以具有环状或直链状的官能团。

[0029] 作为可以使用的交联剂的具体例，作为具有氨基反应性官能团的交联剂，可例举例如式：S-L-M（S 是氨基反应性官能团，M 是马来酰亚胺基，L 是间隔臂部分）所示的化合物，更具体而言可例举 4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯（SMCC）、4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-甲酸磺基琥珀酰亚胺酯（Sulfo-SMCC）、4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧基-[6-氨基己酸]琥珀酰亚胺酯（LC-SMCC）、N-[ε-马来酰亚胺基己酰氧基]琥珀酰亚胺酯（EMCS）、N-[ε-马来酰亚胺基己酰氧基]磺基琥珀酰亚胺酯（Sulfo-EMCS）、N-[γ-马来酰亚胺基丁酰氧基]琥珀酰亚胺酯（GMBS）、N-[γ-马来酰亚胺基丁酰氧基]磺基琥珀酰亚胺酯（Sulfo-GMBS）、N-(11-马来酰亚胺基十一烷酰氧基)琥珀酰亚胺（KMUS）、N-[k-马来酰亚胺基十一烷酰氧基]-磺基琥珀酰亚胺酯（Sulfo-KMUS）、m-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯（MBS）、m-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯（Sulfo-MBS）、4-[p-马来酰亚胺基苯基]丁酸琥珀酰亚胺酯（SMPB）、4-[p-马来酰亚胺基苯基]丁酸磺基琥珀酰亚胺酯（Sulfo-SMPB）、N-[α-马来酰亚胺基乙酰氧基]琥珀酰亚胺酯（AMAS）、N-[β-马来酰亚胺基丙氧基]琥珀酰亚胺酯（BMPS）、6-[β-马来酰亚胺基丙酰胺基]己酸琥珀酰亚胺酯（SMPH）、N-(8-马来酰亚胺基辛酰氧基)琥珀酰亚胺（HMCS）、N-(8-马来酰亚胺基辛酰氧基)磺基琥珀酰亚胺（Sulfo-HMCS）等。

[0030] 作为具有羧基反应性官能团的交联剂，可例举例如式：H-L-M（H 是羧基反应性官能团，M 是马来酰亚胺基，L 是间隔臂部分）所示的化合物，更具体而言可例举 β-马来酰亚胺基丙酸酐肼（BMPH）、3,3'-N-[ε-马来酰亚胺基己酸]酐肼（EMCH）、N-[k-马来酰亚胺基十一酸]酐肼（KMUH）、4-[4-N-马来酰亚胺基苯基]丁酸酐肼-盐酸盐（MPBH）、3-[2-吡啶二硫代]丙酸酐肼（PDPH）等。

[0031] 作为具有生物素的交联剂，可例举例如式：X-L-M（X 是生物素，M 是马来酰亚胺基，L 是间隔臂部分）所示的化合物，更具体而言可例举 1-生物素酰胺基-4-[4'-(马来酰亚胺基甲基)环己烷甲酰胺基]丁烷（Biotin-BMCC）、马来酰亚胺-PEG11-生物素、马来酰亚胺-PEG2-生物素等。

[0032] 另外，上述交联剂中的间隔臂部分的长度与普通的交联剂相同，例如为 4～52 埃，优选为 9～20 埃。

[0033] 这些交联剂的键合可以按照公知的方法来进行。该马来酰亚胺基与上述交联剂键合后，可以使用含 SH 基的化合物（例如蛋白质、氨基酸）通过公知的方法封闭。作为上述含 SH 基的化合物，只要是具有 SH 基、能通过上述 SH 基与马来酰亚胺基反应、从而将与上述马来酰亚胺基的反应性封闭的化合物即可，无特别限制。

[0034] 马来酰亚胺基与担载体粒子的键合既可以在制造担载体粒子时使用具有马来酰亚胺基的化合物来进行，也可以使用具有氨基或羧基的化合物、进而使具有氨基反应性官能团或羧基反应性官能团以及马来酰亚胺基的交联剂键合，也可以使上述具有马来酰亚胺基的担载体蛋白键合。担载体蛋白与担载体粒子的制备粒子的键合可以采用物理吸附或共价键合中的任一种。可以使用公知的化合物或上述交联剂。

[0035] 本发明的测定原理可以采用上述免疫学测定方法。

[0036] 该免疫学测定方法中可以使用的抗体既可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,可以使用来源于产生抗体的任意动物品种、例如家兔、山羊、绵羊、猪、马、小鼠或大鼠等的抗体。

[0037] 此外,作为可以使用的抗体,可例举完全抗体、通过酶处理或化学处理将其切断而得的 F(ab')₂、Fab' 等抗体片段。

[0038] 制造“固相化抗体-抗原-标记抗体”复合物来进行测定的夹心法的情况下,这些抗体固定化于固相载体或标记物质。作为固相载体,可例举微量滴定板、试管、珠、粒子、纳米粒子、膜等。作为粒子,可例举磁性粒子、聚苯乙烯胶乳之类的疏水性粒子、粒子表面具有氨基、羧基等亲水基团的共聚胶乳粒子、红细胞、明胶粒子等。其中,从实现迅速简便的 B/F 分离的观点来看,特别优选磁性粒子,具体而言,例如优选使用包括四氧化三铁 (Fe₃O₄)、三氧化二铁 (Fe₂O₃)、各种铁氧体、铁、锰、镍、钴、铬等金属、钴、镍、锰等的合金的微粒等磁性粒子。此外,可以优选采用将这些磁性粒子制成包含在聚苯乙烯等高分子胶乳、明胶、脂质体等的内部的形态,或是固定化于表面。作为膜,可例举硝基纤维素膜、纤维素滤纸、尼龙膜等,也可以使用以免疫色谱法等为原理的简易测定试剂盒的试验片。

[0039] 作为该免疫学测定方法中可以使用的标记物质,可例举例如酶、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,可例举碱性磷酸酶、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,可例举异硫氰酸荧光素 (FITC)、绿色荧光蛋白 (GFP)、荧光素等。作为放射性同位素,可例举 ¹²⁵I、¹⁴C、³²P 等。

[0040] 此外,标记物质是酶的情况下,可以使用与该酶相对应的底物进行发光、荧光或显色反应,从而测定标记物质。例如,酶是碱性磷酸酶的情况下,作为底物,可以使用 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^{3,7}]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^{3,7}]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酰基二氧杂环丁烷)、APS-5 等化学发光底物;4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-methylumbelliferylphosphate)等荧光底物;对硝基苯基磷酸酯、BCIP(5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸酯)、NBT(氯化4-硝基四氮唑蓝)、INT(碘硝基四唑)等显色底物。

[0041] 该抗体(片段)可以仅由其本身或是和蛋白质、多糖类或合成高分子物质等其它高分子物质一起,通过有机化学方法或基于生物学亲和性的相互作用等按照文献中公知的方法来制造缀合体。

[0042] 有机化学方法中,例如可以使用交联试剂进行共价键合,从而制造缀合体。作为主要的交联试剂,可例举碳二亚胺、异氰酸酯、重氮化合物、苯醌、戊二醛、高碘酸、N-羟基琥珀酰亚胺酯化合物、马来酰亚胺化合物、吡啶基二硫化物化合物等。使用这些交联试剂的缀合体的制造例如可以通过与用酶标记抗体将酶与抗体结合的方法同样的方法来进行,在石川等的“酶免疫测定法第三版(医学书院、1987年)75~126页”和 P. Tijssen 的“酶免疫分析法(生物化学实验法 11、东京化学同人、1989年)196~251页”等中有详细记载。

[0043] 作为利用生物学亲和性的缀合体的制造方法的例子,有利用亲和素和生物素的结合的方法。例如,有向同一抗体的抗体(片段)和白蛋白等其它高分子物质这两者都引入生物素分子、通过亲和素进行交联的方法,或者向两者中的一方引入亲和素、向另一方引入

生物素来进行交联的方法。生物素分子的引入中,使用生物素基- ϵ -氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯等作为试剂。

[0044] 作为本发明的非特异性反应抑制剂的使用方法,有在目标物质和与其相对应的特异性抗体的特异性免疫反应工序之前预先在合适的缓冲液中使非特异性反应抑制剂与样本接触、孵育合适的时间(例如1分钟~2小时)的方法。在此期间,样本中的发生非特异性反应的物质(非特异性反应物质)与非特异性反应抑制剂反应,与特异性免疫反应工序中的标记抗体的非特异性反应活性丧失。

[0045] 关于非特异性反应抑制剂,采用不会对特异性的免疫反应工序造成影响的测定法的情况下,可以直接使用孵育完成后的样本和非特异性反应抑制剂的混合液,另一方面,采用对特异性的免疫反应工序造成影响的测定法的情况下,可以在进行特异性的免疫反应工序之前将孵育完成后的非特异性反应抑制剂除去。

[0046] 例如为最常用的夹心法的情况下,不会对特异性的免疫反应工序造成影响的测定法是指与通过特异性的免疫反应而分离的“固相化抗体-非特异性反应物质-标记抗体”夹心复合物无关的测定法。此时,具体而言可以使用不和上述复合物一起分离的非特异性反应抑制剂(例如包括游离的蛋白质和不分离的粒子等)。

[0047] 例如为最常用的夹心法的情况下,对特异性的免疫反应工序造成影响的测定法是指与通过特异性的免疫反应而分离的“固相化抗体-非特异性反应物质-标记抗体”夹心复合物有关的测定法。此时,具体而言可以使用和上述复合物一起分离的非特异性反应抑制剂(例如上述复合物包含磁性粒子、通过磁力体而分离的情况下,包括同样的磁性粒子等)。

[0048] 作为另一种本发明的非特异性反应抑制剂的使用方法,有在非特异性反应抑制剂的共存下进行特异性的免疫反应工序的方法。例如为最常用的夹心法的情况下,在使固相化抗体与样本中的抗原(目标物质)反应的第一免疫反应工序的缓冲液中添加非特异性反应抑制剂。之所以检出非特异性反应,是因为不经抗体的特异性的反应部位而形成“固相化抗体-非特异性反应物质-标记抗体”夹心复合物,此时,在第一免疫反应中,非特异性反应物质对标记抗体的反应活性被非特异性反应抑制剂吸收。进而,如果在使通过抗体的特异性反应部位而固定化的抗原与标记抗体反应的第二免疫反应工序的缓冲液中也添加,则在第一免疫反应工序中未被完全吸收的非特异性反应物质也被吸收,因此能进一步提高测定的可靠性。

[0049] 与上述同样可以采用任一种测定法,但因为特异性的免疫反应工序中使用非特异性反应抑制剂,所以优选通过不会对上述特异性的免疫反应工序造成影响的测定法来进行。

[0050] 此外,通过在单步夹心法中也在免疫反应工序的缓冲液中添加非特异性反应抑制剂使其反应,可避免非特异性反应。

[0051] 与上述同样可以采用任一种测定法,但因为特异性的免疫反应工序中使用非特异性反应抑制剂,所以优选通过不会对上述特异性的免疫反应工序造成影响的测定法来进行。

[0052] 非特异性反应抑制剂的添加时期可以根据目标物质和测定法来适当选择合适的方法。

[0053] 例如,本发明所发现的非特异性反应物质与本发明的非特异性反应抑制物质、即直接或间接地键合有马来酰亚胺基或其衍生物的支承体(特别是担载体蛋白)良好地反应,因此特异性的免疫反应工序中存在键合有马来酰亚胺基或其衍生物的支承体(特别是蛋白质)时效果特别好。因此,在采用免疫学测定法中的马来酰亚胺法将抗体和抗原等固相化或标记化而制成的试剂中特别优选。

[0054] 例如在使用上述的用式:S-L-M或H-L-M或X-L-M所示的交联剂制成的含抗体的物质(抗体结合载体、标记化抗体等)的免疫学测定中,可以使上述式I所示的非特异性反应抑制物质在至少一道反应工序中共存。因此,本发明包括一种免疫学测定试剂盒,其包括用式:S-L-M或H-L-M或X-L-M所示的交联剂制成的含抗体的物质、上述式I所示的非特异性反应抑制物质。另外,在上述交联剂的化学式和上述式I中同样使用“L”作为表示间隔臂部分的符号,但根据交联剂中的官能团S或H的种类和支承体B的结构,间隔臂部分的结构有时不同。

[0055] 本发明的非特异性反应抑制剂在免疫反应工序之前预先添加至合适的缓冲液中来使用,或者添加至免疫反应工序的缓冲液中来使用。非特异性反应抑制剂的支承体是担载体蛋白的情况下,与非特异性反应物质反应的体系中的非特异性反应抑制物质的浓度优选为0.1~1000 μ g/mL,更优选为1~500 μ g/mL。使用的缓冲液可以是公知的常规免疫反应中使用的合适的缓冲液。非特异性反应抑制物质的支承体是担载体固相载体的情况下,只要是本领域技术人员,就能容易地决定具有与上述担载体蛋白同等的活性的浓度和使用条件。

[0056] 此外,可以并用缓冲液中常用的添加剂,例如,反应促进剂、洗涤剂或稳定剂。还可以并用其它非特异性反应抑制剂。作为合适的缓冲液,例如可以使用20~100mmol/L磷酸盐缓冲液(pH6~8)或50mmol/L Tris-盐酸/100mmol/L NaCl(pH7~8)等。作为反应促进剂,可例举例如葡聚糖硫酸酯或聚乙二醇等,作为洗涤剂,可例举例如TritonX-100、Tween20等,作为稳定剂,可例举白蛋白、脱脂牛奶、明胶等蛋白质或叠氮化钠、硫柳汞、Kathon CG、Proclin等防腐剂。

[0057] 作为包括本发明的非特异性反应抑制剂的测定试剂盒,还可以在现有的免疫学测定试剂盒中包括非特异性反应抑制剂。一般来说,采用ELISA法的测定试剂盒由标记抗体液、固相化抗体、标准物质等试剂构成,根据需要还包括用于通过夹心法使样本与固相化抗体反应的缓冲液、用于酶反应的显色液和反应停止液、用于洗涤固相的洗涤液、样本的预处理剂等而构成。这些构成试剂为冷冻干燥品的情况下,有时也附带有用于复原的溶液。

[0058] 本发明的非特异性反应抑制剂既可以单独作为试剂盒的构成试剂,也可以预先添加其它构成试剂。但是,如果考虑到不增加测定操作就能得到非特异性反应抑制效果,则优选作为构成试剂的一种成分添加。例如,本发明的非特异性反应抑制剂可例举添加于样本处理液、使样本与固相化抗体反应的缓冲液、标记抗体溶液中,作为试剂盒的构成试剂。这些构成试剂为冷冻干燥品的情况下,也可以添加于复原液中。相对于标记抗体,非特异性反应抑制剂优选使用0.1~1000重量倍,特别优选使用1~500重量倍。

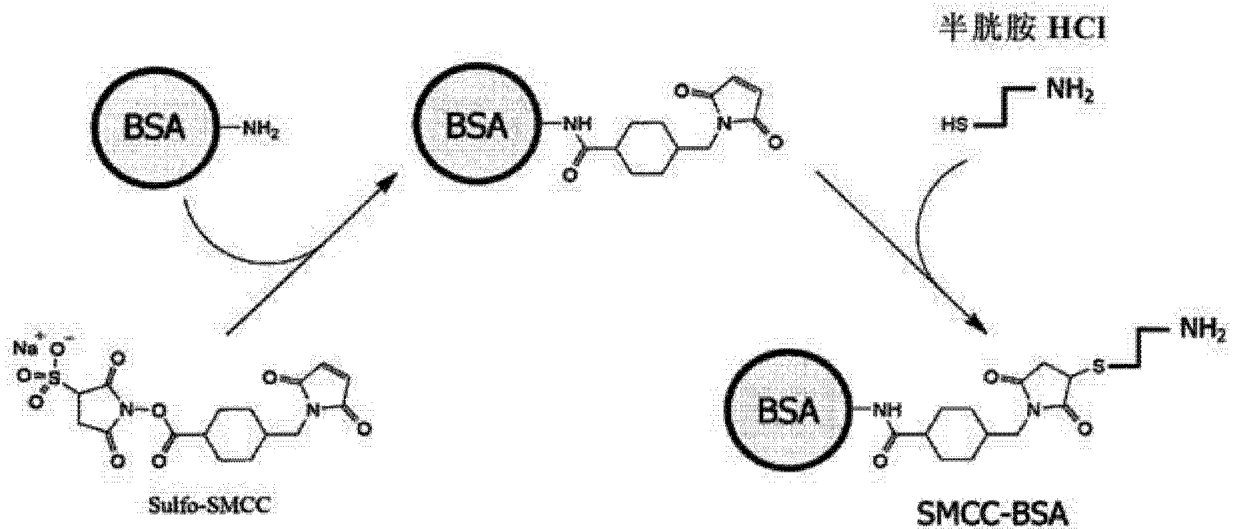
实施例

[0059] 以下,通过实施例对本发明进行具体说明,但它们不限定本发明的范围。

[0060] 《实施例 1:非特异性反应抑制剂 (SMCC-BSA) 的制造》

将牛血清白蛋白 (BSA:西格玛公司 (シグマ社)) 以 10mg/mL 溶解于 0.1mol/L HEPES (pH7.0), 接着与溶解于二甲亚砜 (DMSO) 的 50mg/mL Sulfo-SMCC (4-(N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-甲酸磺基琥珀酰亚胺酯) (PIAS 公司 (ピラス社)) 溶液混合, 在 37°C 下放置一晚。在该反应液中添加 114mg/mL 半胱胺 HCl 溶液, 将末端的马来酰亚胺基封闭。将其作为非特异性反应抑制剂用于以下研究。

[0061] [化 2]



[0062] 《实施例 2:HBs 抗原测定体系的构建》

(1) 磁性粒子结合抗体溶液的制造

(1-1) 用马来酰亚胺法进行制造的磁性粒子结合抗体溶液

使磁性粒子 (JSR 公司) 和 BSA (西格玛公司) 结合后, 接着制成利用 Sulfo-SMCC (PIAS 公司) 使抗 HBs 小鼠单克隆抗体结合而成的磁性粒子溶液。另外, 抗 HBs 小鼠单克隆抗体是按照公知的方法利用 CH1 细胞制造重组 HBs 抗原、将其免疫小鼠而制成的。

(1-2) 用 EDC 法进行制造的磁性粒子结合抗体溶液

制成利用碳二亚胺 (西格玛公司) 使磁性粒子 (JSR 公司) 和抗 HBs 小鼠单克隆抗体结合而成的磁性粒子溶液。

[0064] (2) 标记抗体溶液的制造

将抗 HBs 兔多克隆抗体通过马来酰亚胺法进行碱性磷酸酶 (ALP) 标记, 制成标记抗体溶液。抗 HBs 兔多克隆抗体是将 (1-1) 中制成的重组 HBs 抗原免疫兔子而制成的。

[0065] (3) 发光底物溶液

使用 2-氯-5-(4-甲氧基螺 {1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)-三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷}-4-基)-1-苯基磷酸二钠 (CDP-Star (注册商标): 应用生物系统公司 (アプライド バイオシステム社))。

[0066] (4) 测定法

测定使用全自动临床检查系统 STACIA (三菱化学美迪恩斯公司 (三菱化学メディエンス社) 制)。

[0067] 在 50 μL 的样本中添加通过马来酰亚胺法或 EDC 法制成的 60 μL 的磁性粒子结合

抗体溶液,在 37℃下加温 3.5 分钟后,添加 60 μL 的标记抗体溶液,在 37℃下加温 8.6 分钟,进行 BF 分离、洗涤后,添加 100 μL 的发光底物溶液,在 37℃下反应 2.7 分钟后,测定发光量(计数(counts))。

[0068] 《实施例 3:非特异性反应抑制剂所带来的避免样本中干扰物质影响的效果的确认》

实施例 2 的方法中,以最终浓度 0.03% 添加实施例 1 中制成的非特异性反应抑制剂,研究其效果的有无。

[0069] 对于有 HBs 抗原检查依赖性的患者组中得到的 HBs 抗原阳性样本 1 例以及确认到非特异性反应的 HBs 抗原阴性样本 5 例,在各条件下进行测定。使用通过马来酰亚胺法敏化的磁性粒子结合抗体的情况下,与使用通过 EDC 法(碳二亚胺法)敏化的磁性粒子结合抗体的情况相比,虽然确认到更强的非特异性反应,但在马来酰亚胺法敏化磁性粒子结合抗体中添加非特异性反应抑制剂后,该非特异性反应被显著抑制。

[0070] 上述情况暗示,研究中使用的非特异性样本包含因为磁性粒子上的固定化方法而产生的非特异性反应物质。此外,由于在马来酰亚胺法中显著发生,因此预测,对于固定在磁性粒子上的马来酰亚胺基发生了非特异性反应。

[0071] [表 1]

样本编号	常规测定 (敏化法:马来酰亚胺法)	常规测定 (敏化法:马来酰亚胺法 +SMCC-BSA添加)	常规测定 (敏化法:EDC法)
阳性样本(对照)	117178	—	128593
非特异性样本1	9567	371	433
非特异性样本2	1068	447	512
非特异性样本3	1294	251	326
非特异性样本4	810	395	328
非特异性样本5	822	319	383

[0072] 《实施例 4:非特异性反应抑制剂的添加浓度的研究》

按照实施例 2 测定样本中的 HBs 抗原。在构成试剂中的磁性粒子结合抗体溶液中以分别为 0.00003%、0.0003%、0.003%、0.03%、0.3% 的浓度添加实施例 1 中制成的 SMCC-BSA,对显示出与实施例 3 同样的非特异性反应的非特异性样本 6 进行测定,比较其反应性。其结果是,可以确认通过在磁性粒子结合抗体溶液中添加 0.0003% 以上的 SMCC-BSA,可避免非特异性样本的影响。

[0073] [表 2]

SMCC-BSA	0	0.00003%	0.0003%	0.003%	0.03%	0.3%
计数	834	614	349	364	319	326

[0074] 《实施例 5:非特异性反应的原因研究 1》

按照实施例 2 测定样本中的 HBs 抗原。进行研究时,如下所述进行 MGLTX(磁性胶乳(magnetic latex))-BSA-SMCC-Ab、MGLTX-BSA-SMCC、MGLTX-BSA 的制造。

[0075] (1)MGLTX-BSA-SMCC-Ab

使磁性粒子(JSR公司)和BSA(西格玛公司)结合后,接着制成利用 Sulfo-SMCC(PIAS公司)使实施例2中制造的抗HBs小鼠单克隆抗体结合而成的磁性粒子溶液。

[0076] (2)MGLTX-BSA-SMCC

使磁性粒子(JSR公司)和BSA(西格玛公司)结合后,制成结合有 Sulfo-SMCC(PIAS公司)的磁性粒子溶液。

[0077] (3)MGLTX-BSA

制成结合有磁性粒子(JSR公司)和BSA(西格玛公司)的磁性粒子溶液。

[0078] 将构成试剂中的磁性粒子结合抗体溶液换成能在该磁性粒子的制造过程中生成的MGLTX-BSA-SMCC-Ab或MGLTX-BSA-SMCC或MGLTX-BSA,在以下条件下进行HBs抗原阴性样本和非特异性样本1的测定。

- (A) 只有(1)
- (B) (1)及最终浓度0.03% SMCC-BSA
- (C) 只有(2)
- (D) 只有(3)

其结果是,在(A)和(C)的非特异性样本中,确认到测定值的升高,此外,在(B)中,通过在(A)中添加非特异性反应抑制剂(SMCC-BSA), (A)中确认到的测定值的升高被抑制,得到与阴性样本同等的测定值。以上内容暗示,与磁性粒子结合的交联剂(SMCC)和非特异性反应的发生有很大关联。

[0079] [表3]

实验条件	MGLTX	阴性样本	非特异性样本1
(A)	MGLTX-BSA-SMCC-Ab	340	1184
(B)	MGLTX-BSA-SMCC-Ab (SMCC-BSA添加)	335	371
(C)	MGLTX-BSA-SMCC	335	1245
(D)	MGLTX-BSA	425	495

[0080] 《实施例6:非特异性反应的原因研究2》

按照实施例2测定样本中的HBs抗原。进行研究时,如下所述制造磁性粒子,该磁性粒子是将与实施例5(2)同样地制成的MGLTX-BSA-SMCC进一步用3种马来酰亚胺基封闭剂处理而成的。

[0081] (1)半胱胺(2MEA)

使磁性粒子(JSR公司)和BSA(西格玛公司)结合后,与 Sulfo-SMCC结合,用半胱胺(Wako公司)对所得磁性粒子溶液进行封闭处理,进行制备。

[0082] (2)硫葡萄糖

使磁性粒子(JSR公司)和BSA(西格玛公司)结合后,与 Sulfo-SMCC结合,用硫葡萄糖(Wako公司)对所得磁性粒子溶液进行封闭处理,进行制备。

[0083] (3)巯基琥珀酸

使磁性粒子(JSR公司)和BSA(西格玛公司)结合后,与 Sulfo-SMCC结合,用巯基琥珀酸(Wako公司)对所得磁性粒子溶液进行封闭处理,进行制备。

[0084] 将构成试剂中的磁性粒子结合抗体溶液如上所述换成该磁性粒子的制造时使用的马来酰亚胺基封闭剂的种类,进行 HBs 抗原阴性样本和非特异性样本 1 的测定。作为实验条件,如下所述进行。

- (A) 只有 (1)
- (B) (1) 及最终浓度 0.03% SMCC-BSA
- (C) 只有 (2)
- (D) 只有 (3)

其结果是,在 (A)、(C)、(D) 的任一种非特异性样本中,确认到测定值的升高,此外,在 (B) 中,通过在 (A) 中添加非特异性反应抑制剂 (SMCC-BSA), (A) 中确认到的测定值的升高被抑制,得到与阴性样本同等的测定值。因此可知,非特异性反应的发生与马来酰亚胺基的封闭剂的种类无关。

[0085] 以上内容表示,与磁性粒子结合的连接剂 (SMCC) 和非特异性反应的发生有很大关联。

[0086] [表 4]

实验条件	马来酰亚胺基封闭剂	阴性样本	非特异性样本1
(A)	半胱胺 (2MEA)	251	1299
(B)	半胱胺 (2MEA) (SMCC-BSA添加)	335	371
(C)	硫葡糖	540	1322
(D)	巯基琥珀酸	436	1342

[0087] 《实施例 7:非特异性反应的原因研究 3》

按照实施例 2 测定样本中的 HBs 抗原。进行研究时,与实施例 1 同样地制造用半胱胺 HCl 封闭的 SMCC-BSA 和不用半胱胺 HCl 封闭的 SMCC-BSA 这两种非特异性反应抑制剂。添加这些非特异性反应抑制剂,进行非特异性样本的测定,但可知全都有相同程度的非特异性反应抑制效果。

[0088] 由以上内容可知,利用具有马来酰亚胺基的担载体蛋白,能抑制非特异性反应。

[0089] [表 5]

非特异性抑制剂	非特异性样本5
未添加(对照)	822
有封闭	345
无封闭	319

[0090] 产业实用性

据本发明人所知,本发明所发现的非特异性反应物质的非特异性反应与疾病无关,以在 300 ~ 1000 份健康人样本中有 1 份的频率发生。

[0091] 通过使用本发明的非特异性反应抑制剂及其使用方法以及测定试剂盒,能简便且有效地抑制以这样的高频率发生的样本中的非特异性反应物质的影响,准确地测定样本中

的微量成分,在各种疾病的诊断中 useful。

[0092] 以上按照特定的形态对本发明进行了说明,但对本领域技术人员而言显而易见的变形和改进也包含在本发明的范围内。

专利名称(译)	非特异性反应抑制剂、非特异性反应抑制方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN103620407A	公开(公告)日	2014-03-05
申请号	CN201280032103.5	申请日	2012-06-28
[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)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
[标]发明人	冈村佳和 田代茂		
发明人	冈村佳和 田代茂		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/5306 C07D207/416		
代理人(译)	庞立志		
优先权	2011144464 2011-06-29 JP		
其他公开文献	CN103620407B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供非特异性反应抑制剂，该抑制剂用于简便且有效地抑制免疫学测定法中伴随着测定的非特异性反应，实现样本中的微量成分(目标物质)的准确的检测及定量。所述非特异性反应抑制剂包含式I所示的物质：式中，R1和R2一起在它们各自直接键合的碳之间形成双键，或者R1是氢原子，且R2是从含SH基的化合物中除去H而得的基团，B是支承体，L是间隔臂部分。

