



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105358976 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201480017397. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 31

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/531(2006. 01)

2013-074793 2013. 03. 29 JP

G01N 33/543(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2014/059548 2014. 03. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/157723 JA 2014. 10. 02

(83) 生物保藏信息

IPOD FERM BP-11233 2010. 02. 17

IPOD FERM BP-11234 2010. 02. 17

(71) 申请人 积水医疗株式会社

地址 日本国东京都

(72) 发明人 近藤纯一 新山加菜美 山本光章

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 牛海军

权利要求书1页 说明书4页

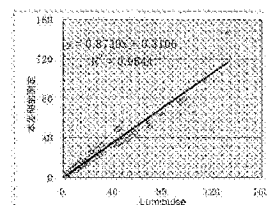
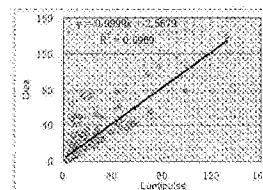
PCT/R0/134表2页 附图1页

(54) 发明名称

胰岛素测定法

(57) 摘要

本发明解决这样的问题:提供用于人胰岛素的乳胶凝集免疫测定法和测定试剂,由此抑制血液样品测定过程中的非特异反应。通过携带抗胰岛素抗体的颗粒的免疫反应在含有两种以上类型的具有 pH 缓冲作用的胺化合物的缓冲液中进行。



1. 胰岛素测定法,所述测定法用于在含有两种以上具有 pH 缓冲作用的胺化合物的缓冲液中利用固定有抗胰岛素抗体的颗粒进行免疫反应。

2. 根据权利要求 1 所述的测定法,其中所述具有 pH 缓冲作用的胺化合物选自由 HEPES、MES 和 Tris 组成的组。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的测定法,其中所述缓冲液具有 7.3 至 7.8 的 pH。

4. 在胰岛素的颗粒凝集免疫测定法中抑制源自血液样品的非特异反应的方法,其中所述方法包括在含有两种以上具有 pH 缓冲作用的胺化合物的缓冲液中利用固定有抗胰岛素抗体的颗粒进行免疫反应。

## 胰岛素测定法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及人胰岛素乳胶凝集免疫测定和测定试剂,利用所述测定和测定试剂可以抑制血液样品测定中的非特异反应。

### 背景技术

[0002] 人胰岛素,一种分子量为 5807 的肽,是用于诊断和治疗糖尿病的重要分子标志物之一。由于与浓度相关的原因,长期以来,竞争性 RIA 和化学发光免疫测定一直是用于人血液样品中胰岛素测定的主流免疫测定技术。随着近来高灵敏度乳胶浊度免疫测定 (LTIA) 的出现,已经报道了可用于生化自动分析仪的 LTIA 试剂,并且一些是可商购的。

[0003] 非专利文献 1 中描述的技术是使用固定有抗胰岛素抗体的乳胶颗粒的夹心 LTIA。然而,仅有少数夹心 LTIA 用于实际肽测定应用的事例,并且所述技术涉及需要解决的问题。

[0004] 引用列表

[0005] 专利文献

[0006] PTL 1:W02011/010673

[0007] 非专利文献

[0008] NPL 1:Kanto Kagaku Cias Insulin II Attachment(2010 年 2 月产生)

[0009] 发明概述

[0010] 技术问题

[0011] 本发明人通过使用基于利用非专利文献 1 的方法获得的测量值与相关领域的非均质化学发光酶免疫测定(常规方法)中测量的值的偏差筛选的样品研究了抑制夹心 LTIA 中非特异反应的方法,并且发现,当用含有两种以上特定 pH 缓冲剂的缓冲液进行 LTIA 免疫反应时,可以减小与利用常规方法测量的值的偏差程度。基于该发现完成本发明。

[0012] 问题的解决方案

[0013] 具体地,本发明涉及以下各项。

[0014] [1] 胰岛素测定法,所述测定法用于在含有两种以上具有 pH 缓冲作用的胺化合物的缓冲液中利用固定有抗胰岛素抗体的颗粒进行免疫反应。

[0015] [2] 根据 [1] 所述的测定法,其中所述具有 pH 缓冲作用的胺化合物选自由 HEPES、MES 和 Tris 组成的组。

[0016] [3] 根据 [1] 或 [2] 所述的测定法,其中所述缓冲液具有 7.3 至 7.8 的 pH。

[0017] [4] 在胰岛素的颗粒凝集免疫测定中抑制源自血液样品的非特异反应的方法,其中所述方法包括在含有两种以上具有 pH 缓冲作用的胺化合物的缓冲液中利用固定有抗胰岛素抗体的颗粒进行免疫反应。

[0018] 发明的有益效果

[0019] 本发明的测定法使得能够在血液样品测定中抑制非特异反应的同时进行人胰岛素乳胶凝集免疫测定。配制用于免疫测定的 pH 缓冲剂以实现抗原-抗体反应中的最佳 pH,

并且使用两种 pH 缓冲剂以加宽 pH 缓冲范围,或与主要 pH 缓冲剂组合以调节 pH,已是普遍的做法。然而,在缓冲液中含有两种以上特定 pH 缓冲剂将抑制非特异反应是全新的发现。

[0020] 附图简述

[0021] [图 1] 图 1 表示常规 LTIA 中获得的测量结果和本发明的测定法中获得的测量结果的相关图,其中上图表示化学发光酶免疫测定 (Lumipulse Presto<sup>®</sup> Insulin, Fujirebio) 和常规 LTIA(Cias Insulin II, Kanto Kagaku) 之间的相关性,而下图表示化学发光酶免疫测定 (Lumipulse Presto<sup>®</sup> Insulin, Fujirebio) 和本发明的测定法之间的相关性。

[0022] 实施方案描述

[0023] 在本发明的测定法中用作分析物的血液样品是全血、血清或血浆。

[0024] 用于本发明的测定法的含有两种以上具有 pH 缓冲作用的胺化合物的缓冲液可以选择自由 HEPES (2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸)、MES (2-吗啉乙磺酸) 和 Tris (三(羟甲基)氨基甲烷) 组成的组。缓冲液的浓度 (当缓冲液含有两种以上具有 pH 缓冲作用的胺化合物时,两种以上具有 pH 缓冲作用的胺化合物的总浓度) 理想地是 100mM 至 1000mM, 优选为 200mM 至 800mM, 更优选为 400mM 至 800mM。缓冲液的优选的 pH 是 7.3 至 7.8。

[0025] 可用于本发明的测定法的固定有抗胰岛素抗体的乳胶颗粒可以通过本领域已知方法获得,所述方法包括专利文献 1。

[0026] 用于实施本发明的试剂可以具有普通乳胶凝集免疫测定试剂的形式。例如,所述试剂可以具有其中本发明的缓冲液被用作第一试剂,并且含有固定有抗胰岛素抗体的乳胶颗粒的溶液被用作第二试剂的形式,或其中固定有抗胰岛素抗体的乳胶颗粒被包含在本发明的缓冲液中的单一试剂的形式。

[0027] 用于实施本发明的试剂可以含有多种可以包含在乳胶凝集免疫测定试剂中的已知组分,包括,例如,金属离子如钙离子和镁离子;离子、非离子和两性表面活性剂;螯合剂如 EDTA;多糖和聚合物如硫酸葡聚糖;蛋白质如清蛋白;可商购的封闭剂如 Hetero Block (Omega Biologicals, Inc.)、Block Ace (DS Pharma) 和 BPF (Toyobo);以及抗-IgM 抗体。

[0028] 本发明的测定法可以通过使用以下具体程序来进行。将血液样品加至在分析仪如 Hitachi 7170 自动分析仪中的主要由 pH 缓冲液构成的第一试剂,并且在将所述样品孵育后,将含有固定有抗胰岛素抗体的乳胶颗粒的第二试剂加至样品混合物。然后在适当的波长,例如,在 570nm 的主波长和 800nm 的亚波长,测量样品的吸光度,以确定胰岛素浓度。

[0029] 本发明的测定法中具有 pH 缓冲作用的胺化合物的浓度是基于第一试剂与第二试剂的体积混合比为 3:1 的情况。

## 实施例

[0030] 以下使用实施例更详细描述本发明。

[0031] [实施例 1]

[0032] 1. 测定程序

[0033] 在化学发光酶免疫测定 (Lumipulse Presto<sup>®</sup> Insulin, Fujirebio), 常规

LTIA(Cias Insulin II, Kanto Kagaku), 和本发明的测定法中, 测量来自 218 位患者的血清。

[0034] 利用专利文献 1 中描述的固定有抗胰岛素单克隆抗体的乳胶, 使用如下制备的第一试剂和第二试剂, 来进行本发明的测定。

[0035] 第一试剂

[0036] 600mM MES

[0037] 200mM Tris

[0038] 200mM NaCl

[0039] 50  $\mu$ g/mL Hetero Block(Omega Biologicals, Inc.)

[0040] 200  $\mu$ g/mL 抗-IgM 抗体

[0041] pH7.5

[0042] 第二试剂

[0043] 7.5mM Tris

[0044] 固定有 66221 抗体的乳胶

[0045] 固定有 66226 抗体的乳胶

[0046] pH8.0

[0047] 将血清 (10  $\mu$ L) 加入至在 Hitachi 7170 自动分析仪中的第一试剂 (150  $\mu$ L), 并且在将样品与第一试剂在 37°C 孵育 5min 后, 将第二试剂 (50  $\mu$ L) 加入至混合物中。然后在 570nm 的主波长和 800nm 的亚波长, 在一定时程内的 19 至 34 个光度点处, 测量样品的吸光度, 从而确定胰岛素浓度。

[0048] 2. 测定结果

[0049] 在常规 LTIA 中测量的血清样品中, 81 个样品呈现超过在化学发光酶免疫测定中被当作 100 的测量值  $\pm$ 30% 的测量值。另一方面, 在本发明的测定中, 没有血清超过  $\pm$ 30%。通过在 X 轴上绘制来自化学发光酶免疫测定的测量值并且在 Y 轴上绘制来自常规 LTIA 或来自本发明的测定法的测量值, 来核对结果的相关性。结果显示在图 1 中。可以看出, 与在常规 LTIA 中相比, 在本发明的测定法中, 与化学发光酶免疫测定结果的偏差更小。

[0050] 工业实用性

[0051] 本发明使得可能在人胰岛素的乳胶凝集免疫测定中抑制血液样品测定中的非特异反应。本发明的该效应是基于对通常用作 pH 缓冲剂的胺化合物的选择性使用, 并且因此, 本发明不在试剂配方设计方面强加任何不必须的限制。这使得本发明高度可用于工业。

[0052] 对保藏的生物材料的引用

[0053] (1)FERM BP-11233

[0054] (2)FERM BP-11234

[0055] [关于保藏的生物材料的注意事项]

[0056] (1) 产生 66221 抗体的杂交瘤 66221

[0057] - 保藏生物材料的保藏机构的名称和地址

[0058] 国家先进工业科学和技术研究所, 国际专利生物保藏机构 (The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary)

- [0059] Chuo 6,1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 日本 ( 邮政编码 305-8566)
- [0060] - 在保藏机构保藏生物材料的日期
- [0061] 2009 年 4 月 8 日 (2009. 4. 8) ( 原始保藏日期)
- [0062] 2010 年 2 月 17 日 (2010. 2. 17) ( 从原始保藏转为布达佩斯条约下的保藏的日期)
- [0063] - 保藏机构分配的登陆号
- [0064] FERM BP-11233
- [0065] (2) 生产 66226 抗体的杂交瘤 66226
- [0066] - 保藏生物材料的保藏机构的名称和地址
- [0067] 国家先进工业科学和技术研究所, 国际专利生物保藏机构
- [0068] Chuo 6,1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 日本 ( 邮政编码 305-8566)
- [0069] - 在保藏机构保藏生物材料的日期
- [0070] 2009 年 4 月 8 日 (2009. 4. 8) ( 原始保藏日期)
- [0071] 2010 年 2 月 17 日 (2010. 2. 17) ( 从原始保藏转为布达佩斯条约下的保藏的日期)
- [0072] - 保藏机构分配的登陆号
- [0073] FERM BP-11234

[0001]

## 关于微生物保藏的说明

申请人或代理人档案号 SEKISUI-43	国际申请号 PCT/JP2014/059548
-----------------------	-------------------------

## 关于微生物保藏的说明

(专利合作条约实施细则 13 之 2)

微生物保藏的说明	
A. 对说明书第 5 页, 第 10 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/>
保藏单位名称 国家先进工业科学和技术研究所, 国际专利生物保藏机构(IPOD)	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) Chuo 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 日本(邮政编码 305-8566)	
保藏日期 2010-02-17	保藏号 IPOD FERM BP-11233
C. 补充说明(必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
无	
D. 本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的) 所有指定国	
E. 补充说明(必要时) 下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”) 无	

由受理局填写

 本页已经和国际申请一起收到

授权官员

由国际局填写

 国际局收到本页日期

授权官员

附页

微生物保藏(2)	
A.对说明书第 5 页, 第 22 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称国家先进工业科学和技术研究所, 国际专利生物保藏机构(IPOD)	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) Chuo 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 日本(邮政编码 305-8566)	
保藏日期 2010-02-17	保藏号 IPOD FERM BP-11234
C.补充说明(必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
无	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
所有指定国	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别, 例如:“保藏的编号”)	
无	

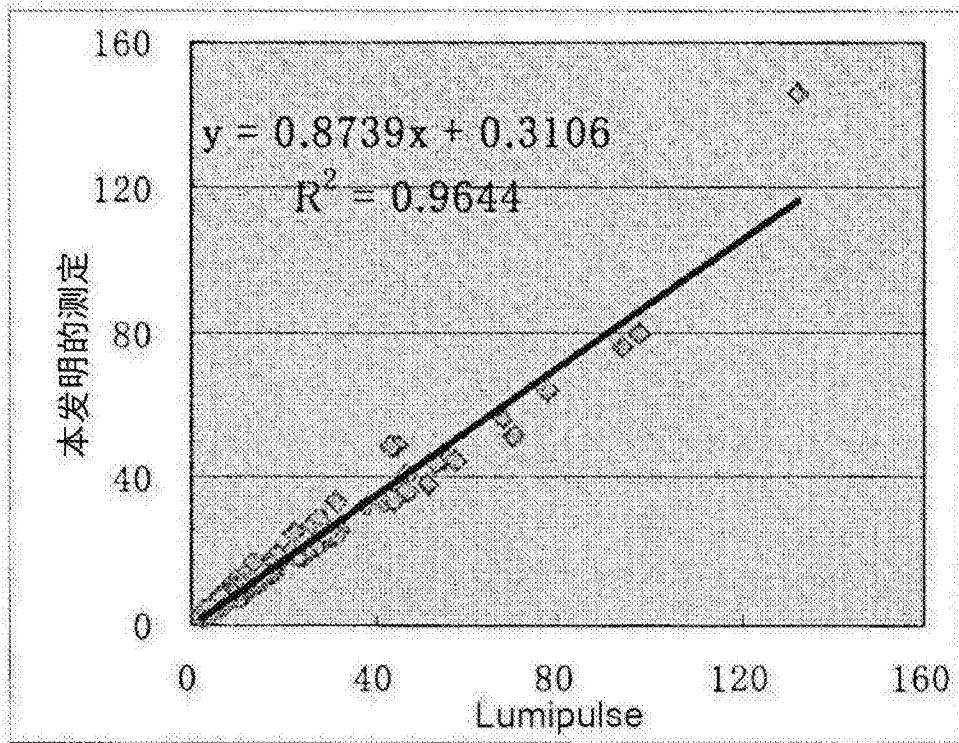
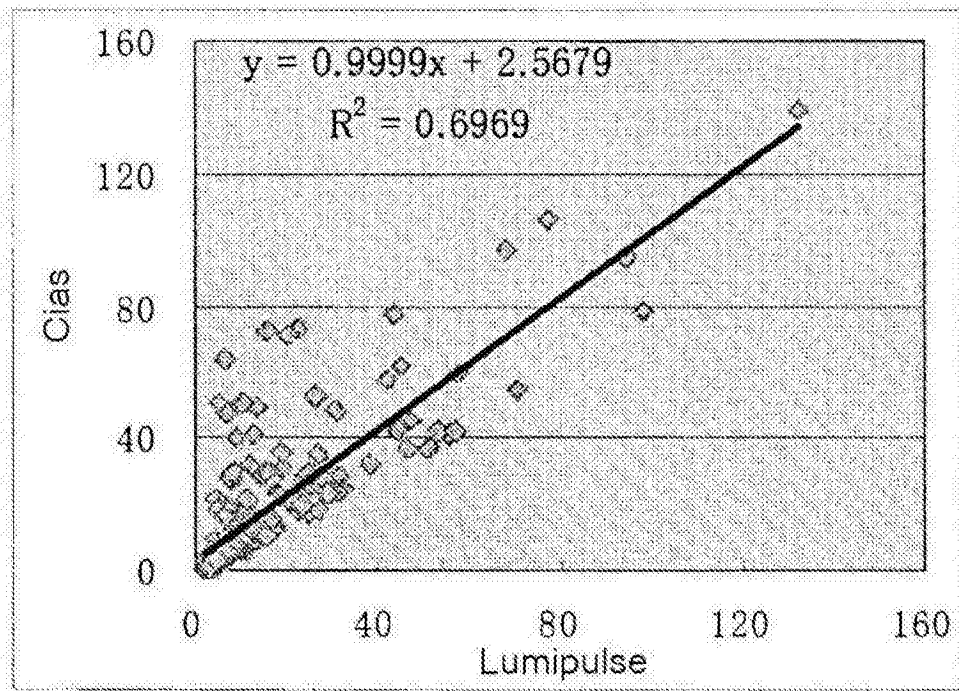


图 1

专利名称(译)	胰岛素测定法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105358976A</a>	公开(公告)日	2016-02-24
申请号	CN201480017397.3	申请日	2014-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
[标]发明人	近藤纯一 新山加菜美 山本光章		
发明人	近藤纯一 新山加菜美 山本光章		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54393 G01N33/74 G01N2333/62		
代理人(译)	牛海军		
优先权	2013074793 2013-03-29 JP		
其他公开文献	CN105358976B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明解决这样的问题：提供用于人胰岛素的乳胶凝集免疫测定法和测定试剂，由此抑制血液样品测定过程中的非特异反应。通过携带抗胰岛素抗体的颗粒的免疫反应在含有两种以上类型的具有pH缓冲作用的胺化化合物的缓冲液中进行。

