



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102246039 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 16

(21) 申请号 201080003521. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 07. 21

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/543(2006. 01)

2009-170292 2009. 07. 21 JP

G01N 33/545(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 06. 08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2010/062261 2010. 07. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02011/010673 JA 2011. 01. 27

(83) 生物保藏信息

FERM BP-11234 2010. 02. 17

FERM BP-11233 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 清水知 山本光章

中村靖

(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 王旭

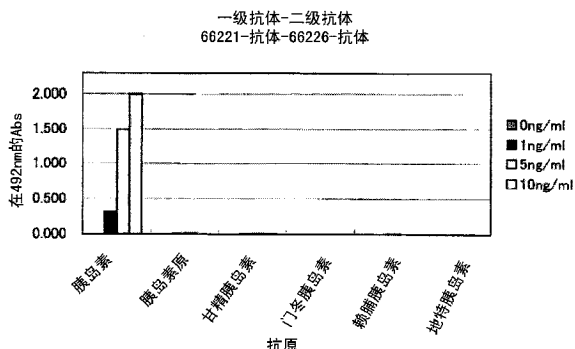
权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 9 页

(54) 发明名称

胰岛素测定法

(57) 摘要

本发明提供在不受胰岛素原和胰岛素类似物的影响下,使用具有与结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应,但不与未结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应的性质的抗体,能够灵敏地并且特异性地测定胰岛素的胰岛素-特异性测定法和测定试剂。



1. 一种胰岛素测定法,所述测定法使用与结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应、但是不与未结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应的抗体。
2. 权利要求 1 的胰岛素测定法,所述测定法使用两种类型的抗体,其中
 - 1) 第一抗体具有与胰岛素反应的性质,和
 - 2) 第二抗体与结合第一抗体的胰岛素反应、但是不与未结合第一抗体的胰岛素反应。
3. 权利要求 2 的胰岛素测定法,其中第一抗体和第二抗体两者均为单克隆抗体。
4. 权利要求 2 的胰岛素测定法,其中第一抗体是多克隆抗体,并且第二抗体是单克隆抗体。
5. 权利要求 3 的胰岛素测定法,其中第一单克隆抗体由具有不同识别位点的两种或多种单克隆抗体组成。
6. 权利要求 3 至 5 中任意一项的胰岛素测定法,其中所述单克隆抗体中的至少一种是不与胰岛素原和胰岛素类似物反应的抗体。
7. 权利要求 3 至 6 中任意一项的胰岛素测定法,其中第二单克隆抗体是不与胰岛素原和胰岛素类似物反应的抗体。
8. 权利要求 3、5、6 和 7 中任意一项的胰岛素测定法,其中第一单克隆抗体和第二单克隆抗体固定于胶乳,并且通过胶乳免疫凝集测定法测定胰岛素。
9. 权利要求 3、5、6 和 7 中任意一项的胰岛素测定法,其中第一单克隆抗体固定于固相,第二单克隆抗体用标记物质标记,并且通过 ELISA 测定胰岛素。
10. 权利要求 3、5、6 和 7 中任意一项的胰岛素测定法,其中第一单克隆抗体用标记物质标记,第二单克隆抗体固定于固相,并且通过 ELISA 或免疫色谱法测定胰岛素。
11. 一种胰岛素测定试剂,所述胰岛素测定试剂包含与结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应、但是不与未结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应的抗体。
12. 权利要求 11 的胰岛素测定试剂,所述胰岛素测定试剂包含两种类型的抗体,其中
 - 1) 第一抗体具有与胰岛素反应的性质,和
 - 2) 第二抗体具有与结合第一抗体的胰岛素反应、但是不与未结合第一抗体的胰岛素反应的性质。
13. 权利要求 12 的胰岛素测定试剂,其中第一抗体和第二抗体两者均为单克隆抗体。
14. 权利要求 12 的胰岛素测定试剂,其中第一抗体是多克隆抗体,并且第二抗体是单克隆抗体。
15. 权利要求 13 的胰岛素测定试剂,其中第一单克隆抗体由具有不同识别位点的两种或多种单克隆抗体组成。
16. 权利要求 13 至 15 中任意一项的胰岛素测定试剂,其中所述单克隆抗体中的至少一种类型是不与胰岛素原和胰岛素类似物反应的抗体。
17. 权利要求 13 至 16 中任意一项的胰岛素测定试剂,其中第二单克隆抗体是不与胰岛素原和胰岛素类似物反应的抗体。
18. 权利要求 13、15、16 和 17 中任意一项的胰岛素测定试剂,其中第一单克隆抗体和第二单克隆抗体固定于胶乳,并且通过胶乳免疫凝集测定法测定胰岛素。
19. 权利要求 13、15、16 和 17 中任意一项的胰岛素测定试剂,其中第一单克隆抗体固定于固相,第二单克隆抗体用标记物质标记,并且通过 ELISA 测定胰岛素。

20. 权利要求 13、15、16 和 17 中任意一项的胰岛素测定试剂,其中第一单克隆抗体用标记物质标记,第二单克隆抗体固定于固相,并且通过 ELISA 或免疫色谱法测定胰岛素。

21. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体具有下述性质:

- 1) 不与未结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应,并且
- 2) 与结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应。

22. 权利要求 21 的单克隆抗体,所述单克隆抗体还具有不与胰岛素原和胰岛素类似物反应的性质。

23. 一种筛选单克隆抗体的方法,所述方法包括下述步骤:

- 1) 选择与胰岛素反应的抗体,和
- 2) 选择与步骤 1) 中选择的抗体结合的胰岛素反应、但是不与未结合所述抗体的胰岛素反应的单克隆抗体。

胰岛素测定法

技术领域

[0001] 本发明涉及利用免疫反应的胰岛素测定法和胰岛素测定试剂。具体而言,本发明涉及一种抗体,该抗体与结合另一种抗-胰岛素抗体的胰岛素反应、但是不与未结合该抗-胰岛素抗体的胰岛素反应。

背景技术

[0002] 胰岛素是肽激素(分子量:大约 5800),其在朗格汉斯胰岛(pancreatic islets of Langerhans)中的 β 细胞中经过前体,即胰岛素原而产生。胰岛素参与糖、氨基酸和脂肪代谢,其重要的生理作用是降血糖效应。糖尿病是由于 β 细胞减少或功能退化、或由于外周组织中胰岛素作用不足导致的胰岛素分泌不足。因此,测定血液胰岛素浓度(其反应 β 细胞的胰岛素分泌功能)是诊断和理解糖尿病的临床状况和确定异常葡萄糖耐受性原因的有用指标。

[0003] 下述技术是已知的使用单克隆抗体的胰岛素测定法。

[0004] 专利文件 1 公开了根据酶联免疫吸附测定法(ELISA)定量胰岛素的方法。这种测定法使用结合不溶性载体的单克隆抗体,以及不与所述抗体竞争用酶标记的表位的单克隆抗体。

[0005] 专利文件 2 公开了根据粒子凝集免疫测定法(particle agglutination immunoassay)定量胰岛素的方法。这种测定法使用具有不同识别位点并且结合不溶性载体的两种单克隆抗体。

[0006] 尽管两个文件均公开了使用具有针对胰岛素的不同识别位点的多个单克隆抗体测定胰岛素的方法,没有公开与胰岛素原或胰岛素类似物(如胰岛素类似物制剂)的交叉反应性。因此,尚不知道是否能够特异性地并且灵敏地测量胰岛素。

[0007] 现有技术文件

[0008] 专利文件

[0009] 专利文件 1:日本公开专利公开号:H01-148962

[0010] 专利文件 2:日本公开专利公开号:H03-118472

[0011] 发明概述

[0012] 本发明要解决的问题

[0013] 本发明提供能够在不受胰岛素原和胰岛素类似物影响的条件下,灵敏地并且特异性地测定胰岛素的胰岛素-特异性测定法和测定试剂。

[0014] 解决该问题的手段

[0015] 发明人通过广泛研究惊讶地发现,通过第一单克隆抗体(其与胰岛素反应)和第二抗体(其与结合第一抗体的胰岛素反应、但是不与未结合第一抗体的胰岛素反应)的组合,能够在不受胰岛素原和胰岛素类似物影响的条件下,灵敏地并且特异性地测定胰岛素。经过进一步研究,发明人发现,使用与结合抗-胰岛素抗体的胰岛素(胰岛素-抗-胰岛素抗体复合物,此后有时称为“胰岛素-抗体复合物”)反应的抗体,可以建立各种形式的此类

胰岛素测定法,由此完成了本发明。因此,本发明包括下述构成组成部分:

[0016] [1] 一种胰岛素测定法,所述测定法使用与结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应、但是不与未结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应的抗体。

[0017] [2] 根据 [1] 所述的胰岛素测定法,其使用两种类型的抗体,其中

[0018] 1) 第一抗体与胰岛素反应,和

[0019] 2) 第二抗体与结合第一抗体的胰岛素反应、但是不与未结合第一抗体的胰岛素反应。

[0020] [3] 根据 [2] 所述的胰岛素测定法,其中第一和第二抗体两者均为单克隆抗体。

[0021] [4] 根据 [2] 所述的胰岛素测定法,其中第一抗体是多克隆抗体,并且第二抗体是单克隆抗体。

[0022] [5] 根据 [3] 所述的胰岛素测定法,其中第一单克隆抗体由具有不同识别位点的两种或多种单克隆抗体组成。

[0023] [6] 根据 [3] 至 [5] 中任意一项所述的胰岛素测定法,其中所述单克隆抗体中的至少一种是不与胰岛素原或胰岛素类似物反应的抗体。

[0024] [7] 根据 [3] 至 [6] 中任意一项所述的胰岛素测定法,其中第二单克隆抗体是不与胰岛素原或胰岛素类似物反应的抗体。

[0025] [8] 根据 [3]、[5]、[6] 和 [7] 中任意一项所述的胰岛素测定法,其中第一和第二单克隆抗体固定于胶乳,并且通过胶乳免疫凝集测定法测定胰岛素。

[0026] [9] 根据 [3]、[5]、[6] 和 [7] 中任意一项所述的胰岛素测定法,其中第一单克隆抗体固定于固相,第二单克隆抗体用标记物质标记,并且通过 ELISA 测定胰岛素。

[0027] [10] 根据 [3]、[5]、[6] 和 [7] 中任意一项所述的胰岛素测定法,其中第一单克隆抗体用标记物质标记,第二单克隆抗体固定于固相,并且通过 ELISA 或免疫色谱法测定胰岛素。

[0028] [11] 一种胰岛素测定试剂,所述胰岛素测定试剂包含能够与结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应、但是不与未结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应的抗体。

[0029] [12] 根据 [11] 所述的胰岛素测定试剂,所述胰岛素测定试剂包含两种类型的抗体,其中

[0030] 1) 第一抗体具有与胰岛素反应的性质,和

[0031] 2) 第二抗体具有与结合第一抗体的胰岛素反应、但是不与未结合第一抗体的胰岛素反应的性质。

[0032] [13] 根据 [12] 所述的胰岛素测定试剂,其中第一和第二抗体两者均为单克隆抗体。

[0033] [14] 根据 [12] 所述的胰岛素测定试剂,其中第一抗体是多克隆抗体,并且第二抗体是单克隆抗体。

[0034] [15] 根据 [13] 所述的胰岛素测定试剂,其中第一单克隆抗体由具有相互之间不同的识别位点的两种或多种单克隆抗体组成。

[0035] [16] 根据 [13] 至 [15] 中任意一项所述的胰岛素测定试剂,其中所述单克隆抗体中的至少一种是不与胰岛素原或胰岛素类似物反应的抗体。

[0036] [17] 根据 [13] 至 [16] 中任意一项所述的胰岛素测定试剂,其中第二单克隆抗体

是不与胰岛素原或胰岛素类似物反应的抗体。

[0037] [18] 根据 [13]、[15]、[16] 和 [17] 中任意一项所述的胰岛素测定试剂，其中第一和第二单克隆抗体在胶乳中固定，并且通过胶乳免疫凝集测定法 (latex immunoagglutination assay) 测定胰岛素。

[0038] [19] 根据 [13]、[15]、[16] 和 [17] 中任意一项所述的胰岛素测定试剂，其中第一单克隆抗体固定于固相，第二单克隆抗体用标记物质标记，并且通过 ELISA 测定胰岛素。

[0039] [20] 根据 [13]、[15]、[16] 和 [17] 中任意一项所述的胰岛素测定试剂，其中第一单克隆抗体用标记物质标记，第二单克隆抗体固定于固相，并且通过 ELISA 或免疫色谱法测定胰岛素。

[0040] [21] 一种单克隆抗体，所述单克隆抗体具有下述性质：

[0041] 1) 不与未结合抗 - 胰岛素抗体的胰岛素反应，并且

[0042] 2) 与结合抗 - 胰岛素抗体的胰岛素反应。

[0043] [22] 根据 [21] 所述的单克隆抗体，还具有不与胰岛素原或胰岛素类似物反应的性质。

[0044] [23] 一种筛选单克隆抗体的方法，所述方法包括下述步骤：

[0045] 1) 选择与胰岛素反应的抗体，和

[0046] 2) 选择与步骤 1) 中选择的抗体结合的胰岛素反应、但是不与未结合所述抗体的胰岛素反应的单克隆抗体。

[0047] 发明的效果

[0048] 通过本发明，可以在不受胰岛素原和胰岛素类似物影响的条件下，灵敏地并且特异性地测定胰岛素。由于通过本发明能够精确地监测从 β 细胞分泌的胰岛素，本发明还可用于提供糖尿病的临床状况的描述，因此非常有用。

[0049] 附图简述

[0050] [图 1] 图 1 是胰岛素氨基酸序列的图。在图 1 中，(a) 至 (e) 显示考虑与本发明的抗体的反应性的各种胰岛素类似物制剂的氨基酸序列的差异。图 1 中圆圈中的字母符号表示由一个字符代表的氨基酸。赖脯胰岛素 (Insulin lispro) : (a) 和 (b) 是“K-P”而非“P-K”。门冬胰岛素 (insulin aspart) : (a) 是“D”而非“P”。甘精胰岛素 (insulin glargine) : (d) 是“G”而非“N”并且添加“RR”到 (c) 的“T”。地特胰岛素 (insulin detemir) : (c) 不是“T”并且添加肉豆蔻酸 ($C_{14}H_{28}O_2$) 到 (b) 的“K”。格鲁辛胰岛素 (insulin glulisine) : (b) 是“E”而非“K”并且 (e) 是“K”而非“N”。

[0051] [图 2] 图 2 是使用 Biacore (注册商标) T100 检测 66221- 抗体和胰岛素的反应性的测试的结果图。

[0052] [图 3] 图 3 是使用 Biacore (注册商标) T100 检测 66226- 抗体和胰岛素的反应性的测试的结果图。

[0053] [图 4-1] 图 4-1 是使用 Biacore (注册商标) T100 检测 66221- 抗体和胰岛素原以及各种胰岛素类似物制剂的反应性的测试的结果图。(a)、(b) 和 (c) 分别是针对胰岛素原、赖脯胰岛素、和门冬胰岛素的结果。

[0054] [图 4-2] 图 4-2 与上述相同。(d) 和 (e) 分别是针对甘精胰岛素和地特胰岛素的结果。

[0055] [图 5-1] 图 5-1 是使用 Biacore(注册商标)T100 检测 66226- 抗体和胰岛素原以及各种胰岛素类似物制剂的反应性的测试的结果图。(a)、(b) 和 (c) 分别是针对胰岛素原、赖脯胰岛素和门冬胰岛素的结果。

[0056] [图 5-2] 图 5-2 与上述相同。(d) 和 (e) 分别是针对甘精胰岛素和地特胰岛素的结果。

[0057] [图 6] 图 6 的图表示 ELISA 测试的结果, 该测试通过使用 66221- 抗体和 66226- 抗体分别作为一级抗体和二级抗体, 以及一级抗体在板上固相化来检测与胰岛素、胰岛素原和各种胰岛素类似物制剂的反应性。

[0058] [图 7] 图 7 的图是 ELISA 测试的结果, 该测试通过使用 66226- 抗体和 66221- 抗体分别作为一级抗体和二级抗体, 以及一级抗体在板上固相化来检测与胰岛素、胰岛素原和各种胰岛素类似物制剂的反应性。

[0059] [图 8] 图 8 是使用 Biacore(注册商标)T100 检测 66221- 抗体 (a) 和 66226- 抗体 (b) 与胰岛素类似物制剂, 即格鲁辛胰岛素的反应性的测试的结果图。

[0060] [图 9] 图 9 的图是 ELISA 测试的结果, 该测试通过使用 66221- 抗体和 66226- 抗体分别作为一级抗体和二级抗体, 以及一级抗体在板上固相化来检测与胰岛素、胰岛素原和胰岛素类似物制剂格鲁辛胰岛素的反应性。

[0061] [图 10] 图 10 的图是 ELISA 测试的结果, 该测试通过使用 66226- 抗体和 66221- 抗体分别作为一级抗体和二级抗体, 以及一级抗体在板上固相化来检测与胰岛素、胰岛素原和胰岛素类似物制剂格鲁辛胰岛素的反应性。

[0062] 实施本发明的方式

[0063] 通过考虑本发明的代表性下述方面 [3] 为例, 现在对本发明的实施方案进行描述。如下具体描述方面 [3]: 使用两种类型的单克隆抗体的胰岛素测定法, 其中

[0064] (1) 第一单克隆抗体与胰岛素反应, 和

[0065] (2) 第二单克隆抗体与结合第一单克隆抗体的胰岛素反应、并且不与未结合第一单克隆抗体的胰岛素反应。

[0066] 本发明的单克隆抗体包括第一和第二单克隆抗体, 这些抗体联合用于测定胰岛素。第一单克隆抗体可以是任何单克隆抗体, 只要它是与胰岛素反应的, 并且它不仅可以是完整抗体分子, 也可以是与胰岛素反应的功能片段, 如抗体的 Fab' 部分。

[0067] 第二单克隆抗体可以是任何单克隆抗体, 只要它具有如下性质 1) 和 2) :

[0068] 1) 第二单克隆抗体不与未结合第一单克隆抗体的胰岛素反应, 并且

[0069] 2) 第二单克隆抗体与结合第一单克隆抗体的胰岛素反应。

[0070] 如果“第二单克隆抗体与结合第一单克隆抗体的胰岛素反应”, 如上所述, 则希望第二单克隆抗体的反应位点(识别位点)识别由于与第一单克隆抗体结合而产生的胰岛素的结构变化, 并与具有所述变化的结构的胰岛素反应。在这种情况下, “胰岛素的结构变化”代表由于形成胰岛素-抗体复合物而在胰岛素分子自身中独立产生的结构变化, 或者结合抗体的胰岛素中抗体和胰岛素分子协同构成的结构。

[0071] 由于希望本发明的测定法不受胰岛素原和胰岛素类似物的影响, 需要至少一个单克隆抗体不与胰岛素原和胰岛素类似物反应。胰岛素类似物具体包括胰岛素类似物制剂如赖脯胰岛素, 门冬胰岛素, 甘精胰岛素, 地特胰岛素和格鲁辛胰岛素。

[0072] 本发明的一种形式的第二单克隆抗体可以是这样的抗体,其不与这些化合物中的任何一种交叉反应,并且如果此类抗体用于胰岛素测定法中,则即使在样品中存在所述化合物的条件下,也能够特异性地测定胰岛素。如果所述单克隆抗体中的一个不与胰岛素原和胰岛素类似物反应,则另一个单克隆抗体可以与这些类似物反应或不与这些类似物反应。

[0073] 尽管在本说明书中表述“与胰岛素反应”、“识别”胰岛素、“结合”胰岛素和“表现出与胰岛素的交叉反应性/与胰岛素交叉反应”同义地使用,它们必须以最广义进行解释而限于这些例证。抗体是否与抗原(化合物)如胰岛素“反应”,可以通过下文描述的固相抗原 ELISA、竞争性 ELISA 和夹心 ELISA (sandwich ELISA) 来确定,也可通过使用表面等离子共振 (SPR 法) 原理的方法进行鉴定。SPR 法可以使用名称为 Biacore (注册商标) 的商购装置、传感器和试剂来进行。

[0074] 本发明的抗体“不与化合物反应”的表述表示本发明的抗体基本上不与该化合物反应,而“基本上不与化合物反应”的表述表示,当例如基于 SPR 法使用 Biacore (注册商标) T100 来固定和测量本发明的抗体时,不认为本发明的抗体的反应性增强。具体而言,其意味着抗体和化合物之间的反应性与对照实验(不添加化合物)中的反应性无显著差异。当然,除 SPR 法之外还可通过本领域技术人员熟知的方法验证抗体“基本上不与化合物反应”。

[0075] 本发明的抗体可识别作为抗原的整个胰岛素分子或一部分。

[0076] 可将由杂交瘤 (FERM BP-11233) 产生的单克隆抗体 (66221-抗体) 具体地作为“第一单克隆抗体”提及,可将由杂交瘤 (FERM BP-11234) 产生的另一个单克隆抗体 (66226-抗体) 作为“第二单克隆抗体”提及。

[0077] 可如下容易地产生本发明的抗体:将胰岛素作为抗原(免疫原)溶解在溶剂(如磷酸盐缓冲盐水 (PBS)) 中,并施用这种溶液来免疫动物。如果需要,可在添加适当佐剂到该溶液后使用乳剂进行免疫。该佐剂可以是广泛应用的佐剂,如油包水乳剂、水包油包水乳剂、水包油乳剂、脂质体或氢氧化铝凝胶以及源自生物来源组分的蛋白或肽物质。例如弗氏 (Freund) 不完全或完全佐剂可以优选的方式使用。尽管不被特别限制,希望适当选择佐剂的施用途径、施用剂量和施用时间从而可在将要通过抗原免疫的动物中增强期望的免疫应答。

[0078] 尽管用于免疫的动物的选择不受特别限制,但是优选地是哺乳动物,可以是小鼠、大鼠、牛、兔、山羊和绵羊,尽管小鼠是更优选的。动物可以根据常规技术进行免疫,例如,可通过皮下、皮内、静脉内或腹膜内向动物注射抗原溶液,优选与佐剂的混合物来完成免疫。由于免疫应答一般根据待免疫的动物的类型和品系而不同,希望根据将要使用的动物适当设定免疫方案。优选地,在初次免疫后,重复数次施用抗原。

[0079] 产生单克隆抗体本身的方法可根据,例如,在 *Antibodies, A Laboratory Manual* (抗体,实验室手册) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)) 中描述的方法进行。然而进行下述操作以获得单克隆抗体,但是这些操作不是限制性的。

[0080] 在最后的免疫后,可如下产生杂交瘤:从免疫的动物提取脾或淋巴结细胞(其是产生抗体的细胞),并将这些细胞与增殖性骨髓瘤细胞融合。优选地,具有高的产生抗体能力(数量上和质量上)的细胞用于细胞融合,并且骨髓瘤细胞与将要用于融合的产生抗体

的细胞所来源的动物是相容的。细胞融合可根据本领域熟知的方法进行,可以使用聚乙二醇法、使用仙台病毒的方法或使用电流的方法。获得的杂交瘤可根据已知的方法增殖,在鉴定所产生抗体的性质的同时可以选择所需的杂交瘤。杂交瘤可通过已知的方法如有限稀释或软琼脂法克隆。

[0081] 将描述产生第一单克隆抗体的杂交瘤的选择。

[0082] 考虑所产生的抗体在测定中实际使用的条件,可在选择阶段有效选择杂交瘤。例如可通过 ELISA 或 RIA 选择产生与胰岛素反应的抗体的杂交瘤来获得杂交瘤。具体而言,首先,将固相抗原 ELISA 用于选择产生与胰岛素高度反应的单克隆抗体的杂交瘤,所述固相抗原 ELISA 使培养物上清液中的单克隆抗体与固相化的胰岛素反应,然后使标记的抗-IgG 抗体与固相化的胰岛素反应。

[0083] 可通过大量培养以这种方法选择的杂交瘤产生具有期望性质的单克隆抗体。大量培养的方法不是特别限定的,可包括例如通过在适当培养基中培养杂交瘤从而在培养基中产生单克隆抗体的方法,以及通过将杂交瘤注射到哺乳动物的腹腔中以用于增殖从而在腹水中产生抗体的方法。可通过适当组合阴离子交换色谱法、亲和色谱法、硫酸铵分级分离法、PEG 分级分离法和乙醇分级分离法来纯化单克隆抗体。

[0084] 可通过适当组合下述方法选择产生第二单克隆抗体的杂交瘤:使用结合第一单克隆抗体的胰岛素替换在选择产生第一单克隆抗体的杂交瘤的情况下使用的固相化的胰岛素的选择法(其中胰岛素结合第一固相化的单克隆抗体从而观察与第二单克隆抗体候选物的夹心的形成的方法),其中第二单克隆抗体的候选物被固相化从而观察与通过预先温育第一单克隆抗体和胰岛素而形成的胰岛素-抗体复合物的反应性的选择法,或其中使用 Biacore(注册商标) T100 鉴定来选择显示与胰岛素没有反应性的抗体的方法。

[0085] 本发明相关的抗体可以是完整抗体分子和具有抗原-抗体反应活性的功能片段。抗体可以通过免疫动物、通过基因重组技术获得的那些或嵌合抗体。抗体的功能片段包括 $F(ab')_2$ 和 Fab' , 这些功能片段可通过用蛋白水解酶(例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)加工上述获得的抗体来产生。

[0086] 本发明的第一和第二单克隆抗体之一或二者可以固定在不溶性载体上或用熟知和常用的标记物质进行标记,我们将在下文对其进行描述。我们可以将它们分别称作“固定(固相)的抗体”和标记的抗体。此类固定的或标记的抗体包括在本发明的范围中。例如,固定的抗体可通过使不溶性载体物理吸附或化学结合单克隆抗体(在它们中间可存在适当的间隔物)来产生。不溶性载体可由聚合物基质材料,如聚苯乙烯树脂,无机基质材料,如玻璃,多糖基质材料,如纤维素和琼脂糖制成,形状不受特别限制并可任意选择。例如,不溶性载体可以是板形(例如微量培养板和膜)、珠子、粒子(例如胶乳粒子和胶体金粒子)或筒状(例如试管)。

[0087] 样品中胰岛素的量可以使用标记的抗体,如标记的蛋白质 A 或 G 来确定,其可结合本发明的第二单克隆抗体。抗体的标记物质包括酶、荧光材料、化学发光材料、生物素、抗生物素蛋白、放射性同位素、胶体金粒子和有色胶乳。标记物质可通过常规方法,如戊二醛、马来酰亚胺、二硫吡啶(pyridyl disulfide) 或高碘酸法结合抗体。然而,固定的或标记的抗体的类型和产生方法不限于上述那些。例如,当酶如过氧化物酶或碱性磷酸酶用作标记物质时,可使用酶的特异性底物测定酶活性,所述特异性底物例如关于辣根过氧化物酶(HRP)

为邻苯二胺 (OPD) 或 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺,关于 ALP 为磷酸对硝基苯酯。当生物素用作标记物质时,至少抗生物素蛋白或酶修饰的抗生物素蛋白通常用在该反应中。

[0088] 在本说明书中,“不溶性载体”可以表示为“固相”,用不溶性载体物理或化学支持抗原或抗体或该支持状态可表示为“固定”、“固定的”、“固相”、“敏化”或“吸附”。术语“检测”或“测量”必须以最广义解释,包括胰岛素存在性证明和 / 或定量。

[0089] “样品”,其含有在使用本发明的抗体的测定法中待检测的分析物,可以主要是从活体 (生物体) 获得的体液。体液可具体包括但不限于血液 (全血)、血清、血浆、尿、唾液、痰、胰腺提取物、泪液、耳液溢和前列腺液。

[0090] 本发明提供的测定试剂 (试剂盒) 的形式不受特别限制,只要该试剂能够测定胰岛素。代表性标记免疫测定法即,ELISA 和免疫色谱法,和代表性粒子凝集免疫测定法,即胶乳免疫凝集测定法 (LITA) 将被考虑作为实例并进行描述。

[0091] 标记联合 (Label-linked) 免疫测定 :ELISA

[0092] 检测存在于样品中的胰岛素的测定试剂 (试剂盒) 的形式可包括下述组成部分 :

[0093] (a) 固定有第一单克隆抗体的固相 (如板),和

[0094] (b) 用标记物质标记的第二单克隆抗体。

[0095] 固定有第一单克隆抗体的固相 (如板) 捕获样品中的胰岛素以形成胰岛素 - 抗体复合物。用标记物质标记的第二单克隆抗体与胰岛素 - 抗体复合物反应从而形成夹心,样品中的胰岛素可通过测量标记物质的量 (其通过适合于该标记物质的方法来测量) 来测定。关于配置测定试剂 (试剂盒) 的具体方法,如用于固定第一单克隆抗体至固相的方法和用于通过标记物质标记第二单克隆抗体的方法,除了本文描述的那些之外还可以在不受限制的条件上使用熟知的技术。尽管这种配置可作为均质测定系统而形成,但是优选地,该配置作为异质测定系统而形成。

[0096] 方面 [19] (根据方面 [13]、[15]、[16] 和 [17] 中任意一项所述的胰岛素测定试剂,其中第一单克隆抗体固定于固相,第二单克隆抗体用标记物质标记,并且通过 ELISA 测定胰岛素) 可推荐为特别优选的形式。

[0097] 考虑到测定试剂的灵敏性和特异性,与上述相反的配置可如下使用 :

[0098] (a) 用标记物质标记的第一单克隆抗体,和

[0099] (b) 固定有第二单克隆抗体的固相 (如板)。

[0100] 在这种配置中,测试样品优选与含有用标记物质标记的第一单克隆抗体的溶液混合从而在溶液中预先形成胰岛素 - 抗体复合物,并将胰岛素 - 抗体复合物添加到固定有第二单克隆抗体的固相。在这种配置中,为了增强灵敏性的目的,具有不同识别位点的两种或多种单克隆抗体可以优选的方式用作用标记物质标记的第一单克隆抗体,即方面 [15] (根据方面 [13] 所述的胰岛素测定试剂,其中第一单克隆抗体由具有不同的识别位点的两种或多种单克隆抗体组成)。

[0101] 方面 [20] 可推荐为特别优选的形式 (根据方面 [13]、[15]、[16] 和 [17] 中任意一项所述的胰岛素测定试剂,其中第一单克隆抗体用标记物质标记,第二单克隆抗体固定于固相,并且通过 ELISA 测定胰岛素)。

[0102] 标记联合免疫测定 :免疫色谱法

[0103] 典型的免疫色谱法按照在片状固相支持物 (如膜) 上在纵向上与边缘的距离的顺

序如下配置：测试样品溶液由于毛细管作用（毛细管现象）连续移动经过：“1. 样品加载位点，”“2. 标记的试剂位点，其在膜上以可扩散的方式保持含有第一单克隆抗体的标记的试剂（第一单克隆抗体用标记物质如胶体金粒子标记），”和“3. 固定有第二单克隆抗体的捕获试剂位点，其用于捕获用标记物质标记的第一单克隆抗体和胰岛素的复合物”。

[0104] 具体而言，当预定量的含有胰岛素的测试样品添加到样品加载位点时，样品在固相支持物上扩散和移动的过程中渗入标记的试剂位点，胰岛素结合标记的试剂（含有第一单克隆抗体）以形成标记的试剂-胰岛素复合物（胰岛素-标记的试剂复合物）。标记的试剂-胰岛素复合物继续在膜上扩散和移动，当渗入膜上的捕获试剂位点（其含有第二单克隆抗体）时，该复合物被固定于固相支持物上的捕获试剂捕获从而在该位点形成捕获试剂（第二单克隆抗体）-胰岛素-标记的试剂（第一单克隆抗体）复合物。分析物的存在可通过检测标记的试剂来确定，该检测通过人们选择的方法，例如在可见胶体金粒子的情况下检测凝集作用的外观（凝集图像/图片）和在酶的情况下由于添加底物来检测显色反应。

[0105] 尽管对于“1. 样品加载位点，”和“2. 标记的试剂位点，其在膜上以可扩散的方式保持含有第一单克隆抗体的标记的试剂（第一单克隆抗体用标记物质如胶体金粒子标记）”以测试样品移动方向的顺序为了便于理解而进行了分别的描述，但是显然本领域技术人员能理解可使用熟知的形式/配置，如处于从上端“1”和“2”的顺序的堆叠结构（stacked structure）。

[0106] 在免疫色谱法中，在测试样品通过“2. 标记的试剂位点，其在膜上以可扩散的方式保持含有第一单克隆抗体的标记的试剂（第一单克隆抗体用标记物质如胶体金粒子标记）”时形成胰岛素-抗体复合物，因此，为了增强灵敏性，如在ELISA的情况下，具有不同识别位点的两种或多种单克隆抗体可以优选的方式用作用标记物质标记的第一单克隆抗体，即方面[15]（根据方面[13]所述的胰岛素测定试剂，其中第一单克隆抗体由具有不同的识别位点的两种或多种单克隆抗体组成）。

[0107] 方面[20]可推荐为特别优选的形式（根据方面[13]、[15]、[16]和[17]中任意一项所述的胰岛素测定试剂，其中第一单克隆抗体用标记物质标记，第二单克隆抗体固定于固相，并且通过免疫色谱法测定胰岛素）。

[0108] 比浊免疫测定法：LTIA

[0109] 用于检测样品中存在的胰岛素的测定试剂（试剂盒）的四种实施方案，A至D可包括下述各项：

[0110] A. (a) 固定有第一单克隆抗体的胶乳粒子和 (b) 固定有第二单克隆抗体的胶乳粒子；

[0111] B. (a) 固定有第一单克隆抗体的胶乳粒子和 (b) 第二单克隆抗体；

[0112] C. (a) 第一单克隆抗体和 (b) 固定有第二单克隆抗体的胶乳粒子；和

[0113] D. (a) 固定有第一和第二单克隆抗体两者的胶乳粒子。

[0114] 这些测定试剂（试剂盒）可以优选的方式用于LTIA中。为了获得期望的能力，如增强的灵敏性，A至D中使用的胶乳粒子可根据粒径和类型适当选择。胶乳粒子可以是适合用于装载抗原或抗体的那些。例如，胶乳粒子可以是聚苯乙烯、苯乙烯-磺酸（磺酸酯）共聚物、苯乙烯-异丁烯酸共聚物、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共

聚物或乙酸乙烯酯-丙烯酸酯共聚物。尽管胶乳粒子的形状不受特别限制,但是优选地,平均粒径如此限定,以使得所产生的凝聚物(作为胶乳粒子表面上的抗体(或抗原)与分析物之间凝集反应的结果)具有足够通过视觉或光学检测的大小。平均粒径优选为 0.02 至 1.6 μm ,特别是 0.03 至 0.5 μm 。替代胶乳粒子,可以使用由金属胶体、明胶、脂质体、微胶囊、二氧化硅、氧化铝、炭黑、金属化合物、金属、陶瓷或磁性材料制造的粒子。

[0115] 例如,临床检查中使用的 LTIA 试剂通常以第一和第二试剂溶液的形式提供,它们与所用测试样品顺次混合。A 至 D 每种形式中 (a) 和 (b) 之一或两者可包含于第一或第二试剂溶液中。包含 (a) 和 (b) 的方法可适当根据用于临床检查的测量装置的细节和测定试剂的设计(如能力和可用性)进行选择。尽管优选地,形式 A 中的 (a) 和 (b) 两者均包含于第二试剂中,形式 A 中的 (a) 和 (b) 也可以优选方式分别包含于第一和第二试剂中。

[0116] 方面 [18] 可推荐为特别优选的形式(根据方面 [13]、[15]、[16] 和 [17] 中任意一方面所述的胰岛素测定试剂,其中第一和第二单克隆抗体固定于胶乳,并且通过胶乳免疫凝集测定法测定胰岛素)。

[0117] 尽管考虑方面 [3] 描述了本发明的实施方案,其作为实例是本发明的代表性形式,显然本领域技术人员能够理解本发明可以多种形式实施,例如对于第一抗体使用多克隆抗体,如在方面 [4] 中,和对于第一抗体使用具有不同识别位点的两种或多种单克隆抗体,如在方面 [5] 中,条件是使用关于“胰岛素-抗体复合物”的抗体。

[0118] 尽管参考实施例将更详细的描述本发明,本发明不限于这些实施例。

实施例

[0119] [第一测试实施例] 生成本发明的单克隆抗体的方法

[0120] 1. 制备免疫抗原

[0121] 在人胰岛素(Fitzgerald Industries International,30-AI51)与完全弗氏佐剂(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)1 : 1 混合后,使用连接注射器来生成将要用作免疫抗原的乳剂。

[0122] 2. 杂交瘤的产生

[0123] 免疫抗原皮下注射到雌性 BALB/c 小鼠(20 至 50 μg /小鼠)背侧区。免疫每周重复两次。在免疫开始三周后,从在血样中具有高抗体滴度的小鼠中提取脾,通过常规程序使用 50% PEG 1450(Sigma)进行细胞融合。使用 SP2/0 骨髓瘤细胞。将获得的融合细胞以 $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ (作为脾细胞)悬浮在含有 HAT,15%胎牛血清和 10% BM-Condimed H1 Hybridoma Cloning Supplement(BM-调节 H1 杂交瘤克隆添加物)(Roche Diagnostics K. K.)的 RPMI 1640 培养基中,以 0.2-mL 等份地分配在 96-孔培养板中。融合细胞在 37°C 于 5% CO_2 的保温箱中培养。

[0124] 3. 筛选产生第一单克隆抗体的杂交瘤

[0125] 从细胞融合开始七天后,培养上清液用于进行固相抗原 ELISA(下文描述)作为初次筛选用于选择对胰岛素显示高反应性的孔作为初次阳性孔。初次阳性孔中的细胞在 24-孔板中连续传代。连续培养两天后,培养上清液用于进行竞争性 ELISA(下文描述)作为二次筛选来选择对胰岛素表现出高反应性的孔作为二次阳性孔。

[0126] 3-1. 产生固相抗原 ELISA 板

[0127] 使用含有 150mM 氯化钠的 10mM PBS(pH 7.2) 以 $1 \mu\text{g/mL}$ 的浓度制备的胰岛素在 96-孔板上以 $50 \mu\text{L}$ /孔固相化作为筛选抗原并允许在 4°C 放置过夜。用 $400 \mu\text{L}$ /孔的 PBS 溶液 (含有 0.05% 吐温 (注册商标) 20 和 0.1% ProClin 300) (Supelco ;PBST) 洗涤三次后, 含有 1% BSA 的 PBST (BSA-PBST) 以 $100 \mu\text{L}$ /孔分配并允许在室温放置一小时用于封闭从而产生 ELISA 板。ELISA 板用 PBST 洗涤三次并通过添加试剂用于实施例中描述的 ELISA 测试。

[0128] 3-2. 固相抗原 ELISA

[0129] (i) 用 BSA-PBST 逐步稀释的小鼠抗血清或融合细胞的培养上清液在固相抗原 ELISA 板上以 $50 \mu\text{L}$ /孔分配并允许在室温放置一小时。

[0130] (ii) 用 PBST 洗涤三次后, 用 BSA-PBST 5000 倍稀释的 HRP-Gt F(ab')₂-抗-小鼠 Ig' s (BioSource, AMI4404) 溶液以 $50 \mu\text{L}$ /孔分配并允许在室温放置一小时。

[0131] (iii) 用 PBST 洗涤三次后, OPD (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (东京化学工业有限公司)) 以 2mg/mL 溶解在含有 0.02% 过氧化氢 / 水的 0.2M 柠檬酸盐缓冲溶液 (下文称为底物溶解溶液) 中, 以 $50 \mu\text{L}$ /孔添加, 并允许在室温放置一小时。

[0132] (iv) 另外, 含有 1mM EDTA 的 1.5N 硫酸 (下文称为反应终止液) 以 $50 \mu\text{L}$ /孔添加, 使用 Titertek (注册商标) Multiskan Plus MK II (Flow Laboratories Inc) 在波长 492nm 测量吸光度。

[0133] 3-3. 竞争性 ELISA

[0134] (i) 用 BSA-PBST 以 0, 2.5, 5 和 $10 \mu\text{g/mL}$ 稀释的人胰岛素 (Fitzgerald Industries International, 30-AI51) 溶液在固相抗原 ELISA 板上以 $25 \mu\text{L}$ /孔分配。

[0135] (ii) 用 BSA-PBST 稀释 5 和 25 倍的融合细胞培养物上清液或其未稀释的溶液然后以 $25 \mu\text{L}$ /孔分配并允许在室温放置一小时。

[0136] (iii) 以与如上文描述的“3-2. 固相抗原 ELISA”中的步骤 (ii) 至 (iv) 相同的方式进行后继操作。

[0137] 4. 筛选产生第二单克隆抗体的杂交瘤

[0138] 从细胞融合开始七天后, 培养物上清液用于进行夹心 ELISA (下文描述) 从而选择对结合第一 F(ab')₂ 单克隆抗体的胰岛素表现高反应性的孔, 所述第一 F(ab')₂ 单克隆抗体预先通过克隆和单克隆抗体收集 (下文描述) 来收集。

[0139] 4-1. 夹心 ELISA

[0140] (i) 使用 Immuno Pure (注册商标) F(ab')₂ 制备试剂盒 (Pierce, prod#44888) 处理第一单克隆抗体 (在本例中为 66221- 抗体) 以制备 F(ab')₂。

[0141] (ii) 用 PBS 溶液以 $2 \mu\text{g/mL}$ 的浓度制备的第一 F(ab')₂ 单克隆抗体在 96-孔板上以 $50 \mu\text{L}$ /孔进行固相化, 并允许在 4°C 放置过夜。用 $400 \mu\text{L}$ /孔 PBST 洗涤三次后, BSA-PBST 以 $100 \mu\text{L}$ /孔进行分配并允许在室温放置一小时用于封闭从而产生 ELISA 板。

[0142] (iii) 用 BSA-PBST 以 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 稀释的人胰岛素 (Fitzgerald Industries International, 30-AI51) 溶液在 ELISA 板上以 $50 \mu\text{L}$ /孔分配并允许在室温放置一小时。

[0143] (iv) 用 PBST 洗涤三次后, 用 BSA-PBST 逐步稀释的融合细胞的培养物上清液以 $50 \mu\text{L}$ /孔分配并允许在室温放置一小时。

[0144] (v) 用 PBST 洗涤三次后, 用 BSA-PBST 稀释 10000 倍的 HRP-Gt-抗-小鼠

IgG-Fc(Bethyl Laboratories, A90-131P) 溶液以 50 μ L/ 孔分配并允许在室温放置一小时。

[0145] (vi) 用 PBST 洗涤三次后, OPD(Tokyo Chemical Industry. (东京化学工业)) 以 2mg/mL 在底物溶解溶液中溶解, 以 50 μ L/ 孔添加并允许在室温放置一小时。

[0146] (vii) 反应终止液以 50 μ L/ 孔添加, 使用 Titertek(注册商标) Multiskan Plus MK II(Flow Laboratories) 测量 492nm 的吸光度。

[0147] 5. 克隆和单克隆抗体收集

[0148] 通过上文描述的 3 和 4 的筛选选择的杂交瘤通过有限稀释法进行克隆从而分别获得杂交瘤 66221 和 66226。为收集杂交瘤产生的单克隆抗体, 以对应于 0.5×10^6 细胞的量向 12-周龄雌性 BALB/c 小鼠腹膜内施用杂交瘤, 该小鼠两周前用 0.5mL 的降植烷腹膜内注射。14 天后收集腹水, 通过离心获得上清液。上清液与等量的吸附缓冲液 (3mol/L NaCl, 1.5mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液, pH 8.5) 混合, 然后过滤。滤出液通过用吸附缓冲液平衡的蛋白质 A 琼脂糖柱以使用该柱吸附滤出液中的抗体, 该抗体用 0.1mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 3.0) 洗脱。洗脱液用 1mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中和后, 用 PBS 透析以收集抗体。

[0149] 该抗体, 称为 66221- 抗体和 66226- 抗体, 随后用于测试中。

[0150] 产生 66221- 抗体和 66226- 抗体的杂交瘤于 2009 年 4 月 8 日分别以保藏号 FERM P-21800 和 FERM P-21801 通过国际专利生物保藏中心, 日本产业技术总合研究所 (International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) (地址: Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 日本) 进行保藏。随后, 在 2010 年 2 月 17 日, 基于最初保藏, 分别以保藏号 FERM BP-11233 和 FERM BP-11234 转移至布达佩斯条约。

[0151] [第二测试实施例] 本发明的单克隆抗体与胰岛素原和胰岛素类似物的交叉反应性

[0152] 使用 Biacore(注册商标) T100 对于 66221- 抗体和 66226- 抗体与胰岛素原和胰岛素类似物的交叉反应性进行测试。对于胰岛素类似物, 使用胰岛素类似物制剂如赖脯胰岛素、门冬胰岛素、甘精胰岛素和地特胰岛素。

[0153] 1. 试剂和仪器

[0154] 1-1. 单克隆抗体

[0155] (i) 66221- 抗体 : 2.30mg/mL

[0156] (ii) 66226- 抗体 : 3.99mg/mL

[0157] 1-2. 分析物

[0158] (i) 重组人胰岛素 : Fitzgerald Industries International, 30-AI51

[0159] (ii) 胰岛素原 : IRR 胰岛素原, 人的, 用于免疫测定 ; NIBSC 编号 : 84/611

[0160] (iii) 胰岛素类似物制剂

[0161] (1) 赖脯胰岛素, 100 单位 /mL : Eli Lilly Japan K. K.

[0162] (2) 门冬胰岛素, 100 单位 /mL : Novo Nordisk Pharma Ltd.

[0163] (3) 甘精胰岛素, 100 单位 /mL : sanofi-aventis K. K.

[0164] (4) 地特胰岛素, 100 单位 /mL : Novo Nordisk Pharma Ltd.

[0165] 1-3. Biacore(注册商标)装置和专用试剂组(Biacore:现在为GE Healthcare; 尽管下文所述的(i)至(viii)是当时Biacore的产品和目录编号,这些现在可从GE Healthcare获得)

[0166] (i)Biacore(注册商标)T100;Biacore, JJ-1037-02

[0167] (ii)S系列传感器芯片CM5;Biacore, BR-1005-30

[0168] (iii)胺偶联试剂盒;Biacore, BR-1000-50

[0169] (iv)乙酸盐5.0;Biacore, BR-1003-51

[0170] (v) α -小鼠免疫球蛋白;Biacore, BR-1005-14

[0171] (vi)甘氨酸1.5;Biacore, BR-1003-54

[0172] (vii)甘氨酸2.0;Biacore, BR-1003-55

[0173] (viii)HBS-EP+10 \times (运行缓冲液);Biacore, BR-1006-69(用NaOH,以pH 8.5制备,并在使用时用纯化水稀释10倍)

[0174] 2. 测试方法

[0175] 66221-抗体或66226-抗体通过固定在传感器芯片上的 α -小鼠免疫球蛋白捕获,胰岛素、胰岛素原和多种胰岛素类似物制剂作为分析物添加以评价与其的反应性。使用的具体操作程序如下。

[0176] (i) α -小鼠免疫球蛋白固定在传感器芯片CM5上(根据所附的说明书手册)。

[0177] (ii)66221-抗体或66226-抗体用HBS-EP+(pH 8.5)稀释至5 μ g/mL并以流速30 μ L/min添加300秒。

[0178] (iii)各种抗原用HBS-EP+(pH 8.5)稀释至10ng/mL,并以0和10ng/mL两种浓度各添加120秒。在此情况下,对于自由运行解离时间设定为120秒。

[0179] (iv)甘氨酸1.5和甘氨酸2.0以1:1混合以形成再生溶液,并且再生处理进行180秒。

[0180] 3. 结果

[0181] 3-1. 与胰岛素反应的结果

[0182] 对于66221-抗体和66226-抗体,与胰岛素的反应性使用Biacore(注册商标)T100进行检验。结果描述于图2和3中。在10ng/mL的胰岛素浓度时,66221-抗体显示8.5RU的反应性(图2)。相反,对于66226-抗体未检测到反应性(图3)。纵轴(RU)表示Biacore(注册商标)测定系统独特的单位,表示由于传感器表面上的反应引起的质量变化。

[0183] 3-2. 与胰岛素原和胰岛素类似物制剂的反应结果

[0184] 对于66221-抗体和66226-抗体,与胰岛素原或各种胰岛素类似物制剂(赖脯胰岛素、门冬胰岛素、甘精胰岛素和地特胰岛素)的反应性使用Biacore(注册商标)T100进行检验。结果描述于图4-1、4-2、5-1和5-2中。在每种情况下,在10ng/mL的抗原浓度时,对于66221-抗体,检测到5.5至13RU的反应。相反,对于66226-抗体未检测到反应性。

[0185] [实施例1]使用本发明的单克隆抗体的组合对胰岛素的测定1

[0186] 1. 产生胶乳粒子

[0187] 装配有搅拌机、回流冷凝器、热传感装置、氮导入管和护套的玻璃反应容器(容量:2L)填充1100g的蒸馏水,200g的苯乙烯,0.2g的苯乙烯磺酸钠和溶解在50g的蒸馏水

中的 1.5g 的过硫酸钾 (potassium peroxodisulfate) 水溶液,并且在容器内用氮气置换后,在 70°C 搅拌下进行聚合 48 小时。

[0188] 聚合结束后,该溶液用滤纸过滤以提取胶乳粒子。透射电子显微镜仪器 (JEOL Ltd., 型号“JEM-1010”) 用于在 10000 倍放大率对胶乳粒子成像并分析至少 100 个获得的胶乳粒子的直径以确定平均粒径。所获得的平均粒径是 0.3 μm 。

[0189] 2. 制备抗 - 胰岛素抗体敏化的胶乳粒子

[0190] 2-1. 产生 66221- 抗体 - 敏化的胶乳粒子溶液

[0191] 向具有平均粒径 0.3 μm 的 1.0% 胶乳溶液 [在 5mM Tris 缓冲液 (下文称为 Tris-HCl), pH 8.5 中] 中添加用等体积 5mM Tris-HCl (pH 8.5) 稀释至 0.60mg/mL 的 66221- 抗体溶液,并在 4°C 搅拌两小时。随后添加等体积的含有 0.5% BSA 的 5mM Tris-HCl (pH 8.5) 并在 4°C 搅拌一小时。离心溶液并去除上清液后,将沉淀重悬浮在 5mM Tris-HCl (pH 8.5) 中以产生 66221- 抗体 - 敏化的胶乳粒子溶液。

[0192] 2-2. 产生 66226- 抗体 - 敏化的胶乳粒子溶液

[0193] 具有平均 0.3 μm 粒径的胶乳以与上文相同的方式用于产生 66226- 抗体 - 敏化的胶乳粒子溶液。

[0194] 3. 制备试剂

[0195] 3-1. 制备第一试剂

[0196] 含有 500mM 氯化钠和 0.2% BSA 的五 (5) 毫摩尔 Tris-HCl (pH 8.5) 用作第一试剂。

[0197] 3-2. 制备第二试剂

[0198] 混合等体积的 66221- 抗体 - 敏化的胶乳粒子溶液和 66226- 抗体 - 敏化的胶乳粒子溶液并用 5mM Tris-HCl (pH 8.5) 稀释从而获得波长 600nm 处 5.0Abs 的吸光度来制备第二试剂。

[0199] 4. 测定

[0200] 组合第一和第二试剂,使用 Hitachi 7170 自动分析仪鉴定胰岛素浓度 - 依赖性粒子凝聚物形成。具体而言,添加 150 μL 的第一试剂至 10 μL 的浓度为 0、5、25、50、100 和 200 $\mu\text{U/mL}$ 的胰岛素溶液中并在 37°C 加热 5 分钟。随后,添加 50 μL 的第二试剂,然后搅拌。五分钟后,与凝集形成相关的吸光度变化在 570nm 和亚波长 800nm 测量。

[0201] [表 1]

[0202]

胰岛素浓度 $\mu\text{U}/\text{mL}$	吸光度 mAbs
0	11.4
5	23.6
25	40.9
50	57.7
100	82.9
200	117.1

[0203] 5. 测定结果

[0204] 表 1 显示灵敏性依赖于胰岛素浓度而增加并可被定量。

[0205] [实施例 2] 使用本发明的单克隆抗体的组合对胰岛素的测定 2

[0206] 将 66221- 抗体或 66226- 抗体中任一种固相化, 另一种用作二级抗体来通过 ELISA 测试与胰岛素原和胰岛素类似物的反应性。

[0207] 1. 所用抗体和抗原

[0208] (1) 单克隆抗体

[0209] 66221- 抗体 :2. 30mg/mL

[0210] 66226- 抗体 :3. 99mg/mL

[0211] (2) 抗原

[0212] 所用胰岛素、胰岛素原和胰岛素类似物制剂 (赖脯胰岛素、门冬胰岛素、甘精胰岛素和地特胰岛素) 与第二测试实施例中相同。

[0213] 2. ELISA 法

[0214] (i) 用 PBS 稀释至 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 66221- 抗体或 66226- 抗体的溶液在 96- 孔板中以 $50\mu\text{U}$ / 孔固相化并允许在室温放置两小时。[0215] (ii) 用 $400\mu\text{U}$ / 孔的 PBST 洗涤三次后, 以 $100\mu\text{L}$ / 孔分配 BSA-PBST 分配并允许在室温放置一小时用于封闭从而产生 ELISA 板。[0216] (iii) 用 BSA-PBST 稀释至 0、1、5 和 10ng/mL 的人胰岛素、胰岛素原和胰岛素类似物制剂中每一种的溶液在 ELISA 板上以 $50\mu\text{L}$ / 孔分配并允许在室温放置一小时。[0217] (iv) 用 PBST 洗涤三次后, 用 BSA-PBST 稀释至 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的生物素标记的 66226- 抗体或 66221- 抗体溶液以 $50\mu\text{L}$ / 孔分配并允许在室温放置一小时。[0218] (v) 用 PBST 洗涤三次后, 用 BSA-PBST 稀释 5000 倍的 HRP- 缀合 (PIERCE, Prod# 21126) 的 Immuno Pure (注册商标) 链霉抗生物素蛋白溶液以 $50\mu\text{L}$ / 孔分配并允许在室温放置一小时。[0219] (vi) 用 PBST 洗涤三次后, OPD (Tokyo Chemical Industry) 以 2mg/mL 溶解在底物溶解溶液中, 以 $50\mu\text{L}$ / 孔添加并允许在室温放置一小时。

[0220] (vii) 以 50 μ L/孔添加反应终止溶液,使用 Titertek(注册商标)Multiskan Plus MK II(Flow Laboratories) 测量 492nm 的吸光度。

[0221] 3. 结果

[0222] 3-1. 66221 固相抗体板测定结果

[0223] 测试结果描述于表 2 和图 6 中。

[0224] 当 66221- 抗体用作一级抗体,66226- 抗体用作二级抗体时,对于胰岛素观察到吸光度的浓度依赖性增加,而对于胰岛素原和胰岛素类似物制剂(赖脯胰岛素、门冬胰岛素、甘精胰岛素和地特胰岛素)没有观察到吸光度的浓度依赖性增加。

[0225] [表 2]

[0226]

一级抗体		66221-抗体				
二级抗体		生物素标记的66226-抗体				
抗原 浓度	人胰岛素	人胰岛素原	胰岛素类似物制剂/甘精胰岛素	胰岛素类似物制剂/门冬胰岛素	胰岛素类似物制剂/赖脯胰岛素	胰岛素类似物制剂/地特胰岛素
0ng/ml	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1ng/ml	0.316	0.005	0.004	-0.011	-0.005	-0.017
5ng/ml	1.491	0.006	0.013	0.001	0.007	-0.013
10ng/ml	1.995	-0.013	0.008	-0.006	0.000	-0.016

[0227] 3-2. 66226 固相抗体板测定结果

[0228] 测试结果描述于表 3 和图 7 中。

[0229] 当 66226- 抗体用作一级抗体,66221- 抗体作用二级抗体,在胰岛素、胰岛素原和胰岛素类似物制剂(赖脯胰岛素、门冬胰岛素、甘精胰岛素和地特胰岛素)任何一种中没有观察到吸光度的浓度依赖性增加。

[0230] [表 3]

[0231]

一级抗体		66226-抗体				
二级抗体		生物素标记的66221-抗体				
抗原 浓度	人胰岛素	人胰岛素原	胰岛素类似物制剂/甘精胰岛素	胰岛素类似物制剂/门冬胰岛素	胰岛素类似物制剂/赖脯胰岛素	胰岛素类似物制剂/地特胰岛素
0ng/ml	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1ng/ml	-0.011	-0.002	0.001	-0.004	-0.006	-0.017
5ng/ml	-0.010	0.004	0.004	-0.003	-0.002	-0.011
10ng/ml	-0.010	0.014	0.015	-0.001	0.006	-0.007

[0232] 4. 讨论

[0233] 从上述结果得出结论,胰岛素可在无胰岛素原和胰岛素类似物制剂的影响下进行定量,因为当 66221- 抗体和 66226- 抗体分别用作一级抗体和二级抗体时没有观察到交叉

反应性。当 66226- 抗体和 66221- 抗体分别用作一级抗体和二级抗体时,不能测定胰岛素,因此注意到 66226- 抗体不表现与胰岛素的反应性,但是与结合 66221- 抗体的胰岛素反应。请注意使用 Biacore(注册商标)T100 的本发明的单克隆抗体的交叉反应性测试结果(第二测试实施例)中,66221- 抗体与胰岛素、胰岛素原和所有胰岛素类似物制剂反应,而 66226- 抗体不与它们中任何一种反应。

[0234] 因此,作为这种测定系统的反应机制,推测当 66221- 抗体首先结合胰岛素时胰岛素中发生一些结构变化并且 66226- 抗体特异性识别结构变化位点从而形成夹心。

[0235] [第三测试实施例] 本发明的单克隆抗体与胰岛素类似物的交叉反应性

[0236] 对于 66221- 抗体和 66226- 抗体与胰岛素类似物的交叉反应性,使用 Biacore(注册商标)T100 进行测试。一种胰岛素类似物制剂,即格鲁辛胰岛素用作胰岛素类似物。

[0237] 1. 试剂和仪器

[0238] 1-1. 单克隆抗体

[0239] (i)66221- 抗体 :2. 30mg/mL

[0240] (ii)66226- 抗体 :3. 99mg/mL

[0241] 1-2. 分析物

[0242] 胰岛素类似物制剂

[0243] (i) 格鲁辛胰岛素,100 单位 /mL :sanofi-aventis K. K.

[0244] 1-3. Biacore(注册商标)装置和专用试剂组

[0245] 使用的 Biacore(注册商标)装置和专用试剂组与第二测试实施例中的相同。

[0246] 2. 测试方法

[0247] 测试以与第二测试实施例中相同的方式进行,除了格鲁辛胰岛素(一种胰岛素类似物制剂)用作分析物。

[0248] 3. 结果

[0249] 3-1. 与胰岛素类似物制剂反应的结果

[0250] 对于 66221- 抗体和 66226- 抗体二者,与胰岛素类似物制剂格鲁辛胰岛素的反应性使用 Biacore(注册商标)T100 进行检验。结果描述于图 8 中。66221- 抗体和 66226- 抗体均未显示出反应性。纵轴(RU)表示 Biacore(注册商标)测定系统独特的单位,表示由于传感器表面上的反应引起的质量变化。

[0251] [实施例 3] 使用本发明的单克隆抗体的组合对胰岛素的测定 3

[0252] 66221- 抗体或 66226- 抗体中任一种被固相化,而另一种抗体组合作为二级抗体用于通过 ELISA 测试与胰岛素、胰岛素原和胰岛素类似物的反应性。

[0253] 1. 所用抗体和抗原

[0254] (1) 单克隆抗体

[0255] 66221- 抗体 :2. 30mg/mL

[0256] 66226- 抗体 :3. 99mg/mL

[0257] (2) 抗原 :胰岛素、胰岛素原和胰岛素类似物制剂(格鲁辛胰岛素)

[0258] 2. ELISA 法

[0259] 实施与实施例 2 中相同的方法,除了格鲁辛胰岛素用作胰岛素类似物制剂。

[0260] 3. 结果

[0261] 3-1. 66221 固相抗体板测定结果

[0262] 测试结果描述于表 4 和图 9 中。

[0263] 如实施例 2 中的情况,当 66221- 抗体用作一级抗体并且 66226- 抗体用作二级抗体时,对于胰岛素检测到吸光度的浓度依赖性增加,而对于胰岛素原和胰岛素类似物制剂(格魯辛胰岛素)没有检测到吸光度的浓度依赖性增加。

[0264] [表 4]

	一级抗体	66221-抗体		
	二级抗体	生物素标记的66226-抗体		
	抗原	人胰岛素	人胰岛素原	胰岛素类似物制剂/格魯辛胰岛素
[0265]	抗原浓度			
	0ng/mL	0.000	0.000	0.000
	1ng/mL	0.316	0.005	0.031
	5ng/mL	1.491	0.006	0.000
	10ng/mL	1.995	-0.013	0.003

[0266] 3-2. 66226 固相抗体板测定结果

[0267] 测试结果描述于表 5 和图 10 中。

[0268] 如实施例 2 中的情况,当 66226- 抗体是一级抗体并且 66221- 抗体是二级抗体时,对于胰岛素、胰岛素原或胰岛素类似物制剂(格魯辛胰岛素)没有检测到吸光度的浓度依赖性增加。

[0269] [表 5]

	一级抗体	66226-抗体		
	二级抗体	生物素标记的66221-抗体		
	抗原	人胰岛素	人胰岛素原	胰岛素类似物制剂/格魯辛胰岛素
[0270]	抗原浓度			
	0ng/mL	0.000	0.000	0.000
	1ng/mL	-0.011	-0.002	0.022
	5ng/mL	-0.010	0.004	0.001
	10ng/mL	-0.010	0.014	0.001

[0271] 4. 讨论

[0272] 上述结果表明,当 66221-抗体和 66226-抗体分别用作一级抗体和二级抗体时,和当 66226-抗体和 66221-抗体分别用作一级抗体和二级抗体时,没有显示与胰岛素类似物制剂格鲁辛胰岛素的交叉反应性。

[0273] 工业可用性

[0274] 使用本发明的单克隆抗体,可在不受胰岛素原和胰岛素类似物影响下对胰岛素进行灵敏地且特异性地测定。由于来自 β 细胞的胰岛素分泌可通过本发明精确监测,所以本发明也可用于视觉化糖尿病的临床状态,因此是非常有用的。

[0275] 保藏号

[0276] (1)FERM BP-11233

[0277] (2)FERM BP-11234

[0278] [保藏的生物材料的参考]

[0279] (1) 产生 66221-抗体的杂交瘤 66221

[0280] i) 保藏生物材料的保藏单位的名称和地址。

[0281] 国际专利生物保藏中心,日本产业技术总合研究所 (International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

[0282] Tsukuba Central 6,1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566,日本

[0283] ii) 在 i) 中保藏单位保藏生物材料的日期

[0284] 2009 年 4 月 8 日 (最初保藏日期)

[0285] 2010 年 2 月 17 日 (从最初保藏移送至布达佩斯条约的日期)

[0286] iii) 在 i) 中保藏单位对该保藏指定的保藏号。

[0287] FERM BP-11233

[0288] (2) 产生 66226-抗体的杂交瘤 66226

[0289] i) 保藏生物材料的保藏单位的名称和地址。

[0290] 国际专利生物保藏中心,日本产业技术总合研究所 (International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)Tsukuba Central 6,1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566,日本

[0291] ii) 在 i) 中保藏单位保藏生物材料的日期

[0292] 2009 年 4 月 8 日 (最初保藏日期)

[0293] 2010 年 2 月 17 日 (从最初保藏移送至布达佩斯条约的日期)

[0294] iii) 在 i) 中保藏单位对该保藏指定的保藏号。

[0295] FERM BP-11234

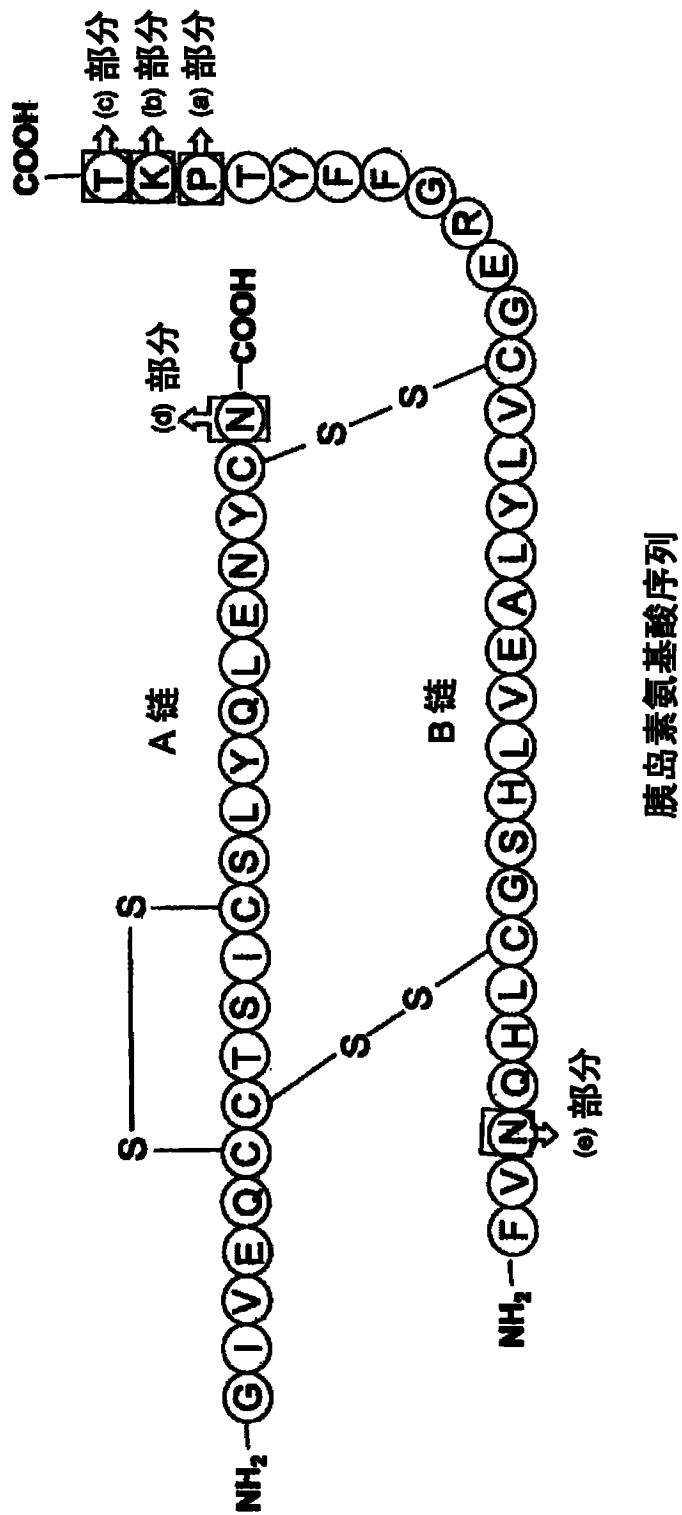


图 1

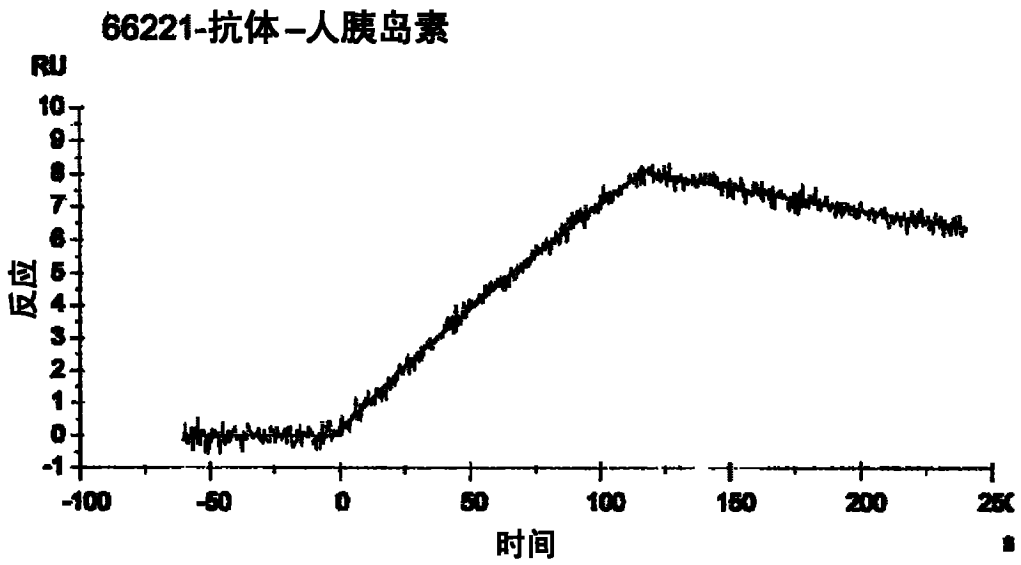


图 2

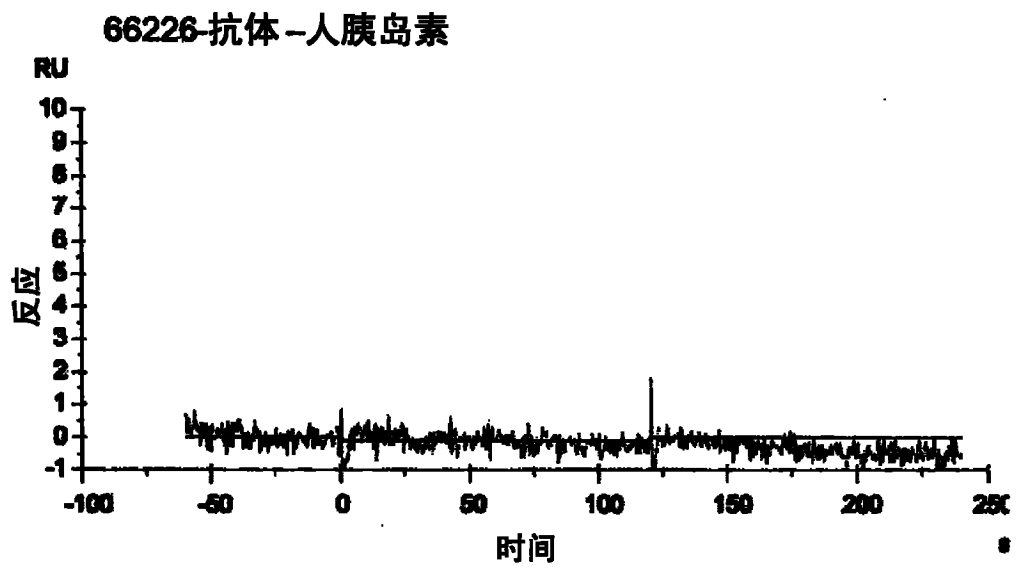
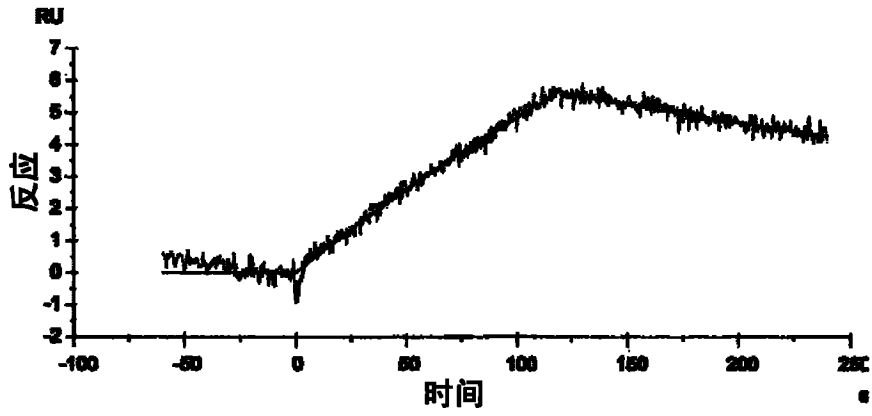
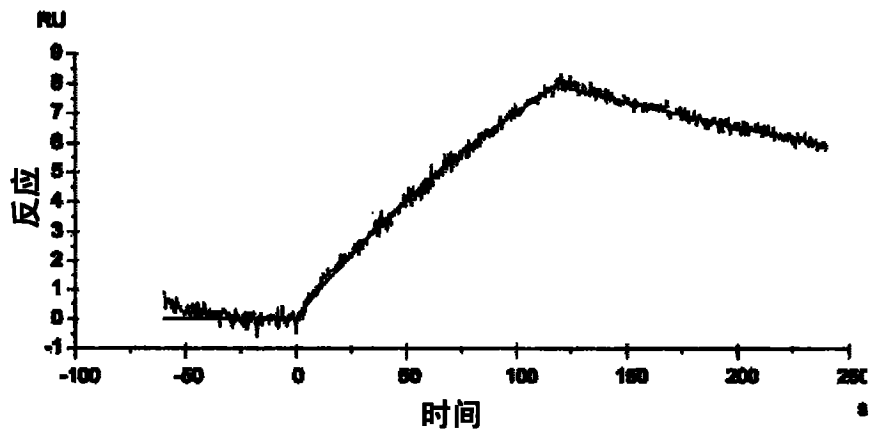


图 3

(a) 66221-抗体-胰岛素原



(b) 66221-抗体-赖脯胰岛素



(c) 66221-抗体-门冬胰岛素

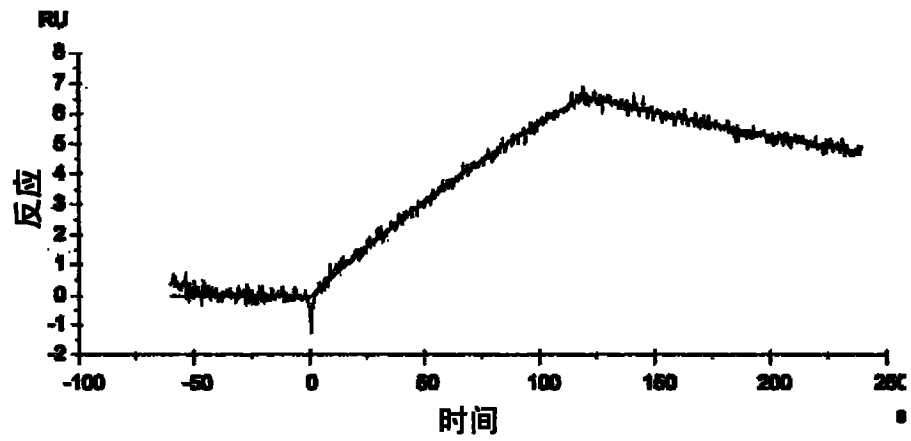


图 4-1

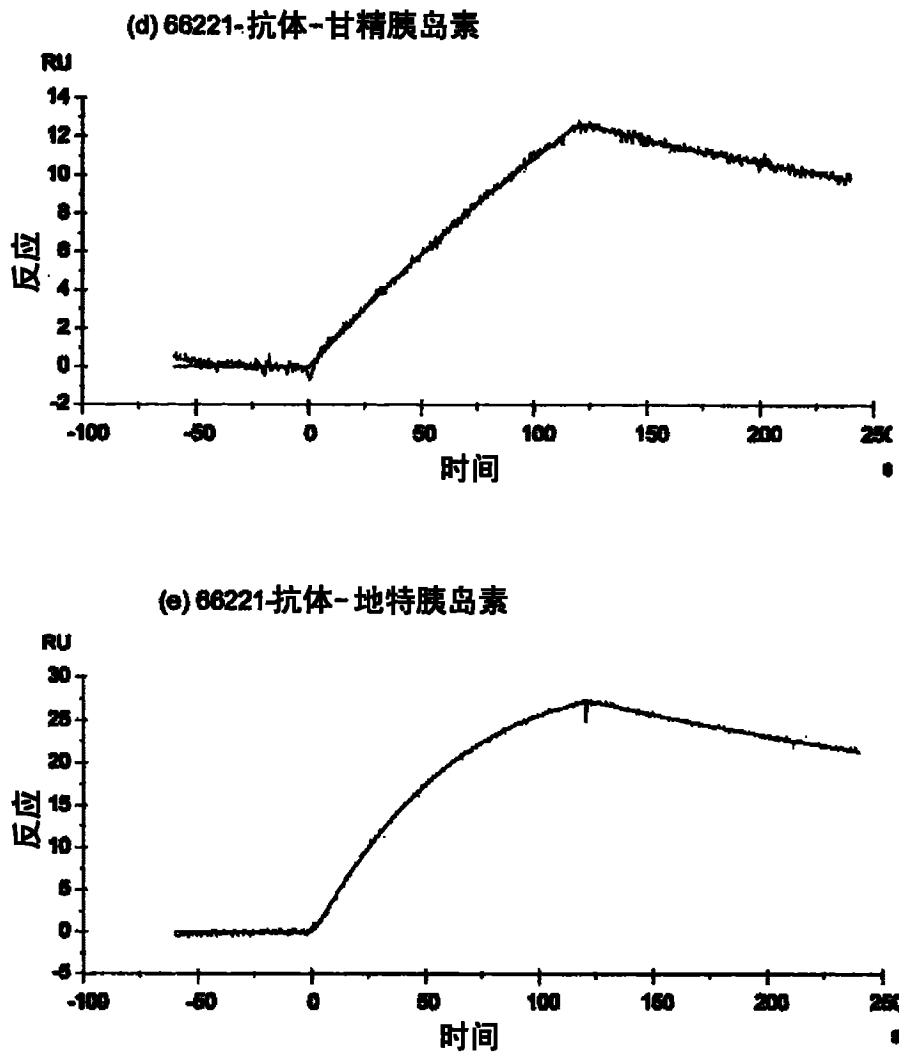
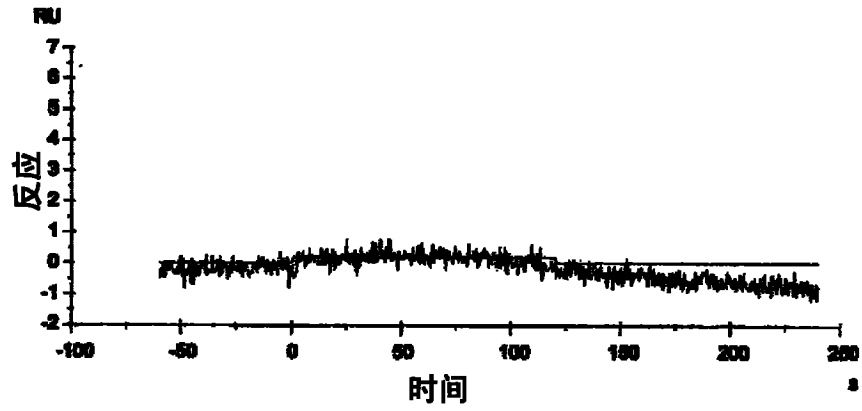
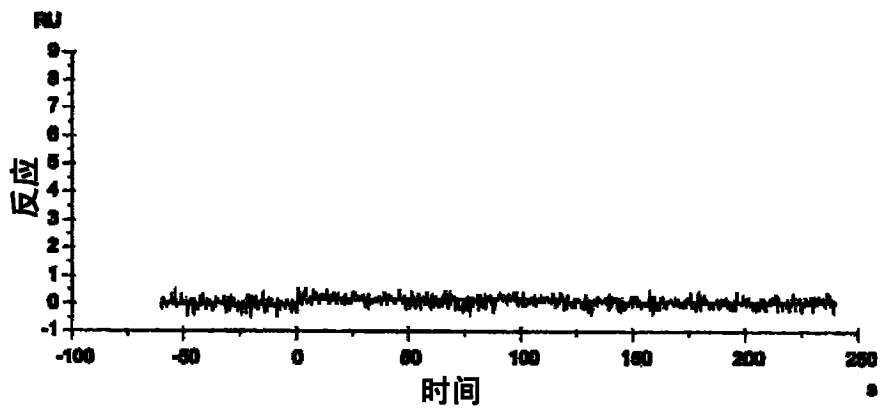


图 4-2

(a) 66226-抗体-胰岛素原



(b) 66226-抗体-赖脯胰岛素



(c) 66226-抗体-门冬胰岛素

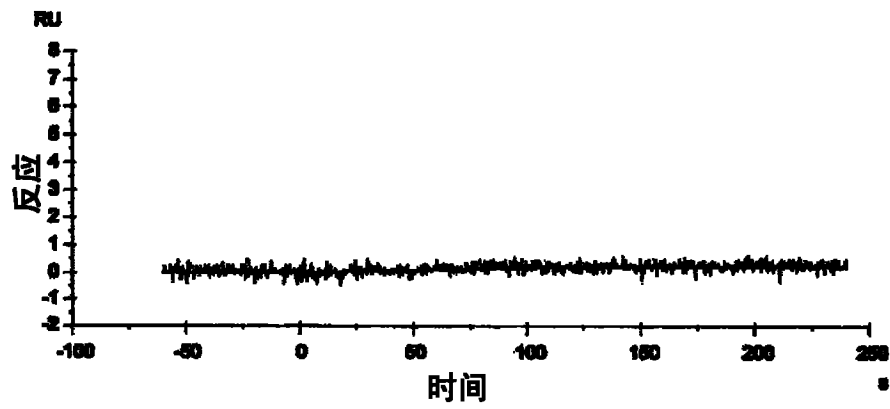
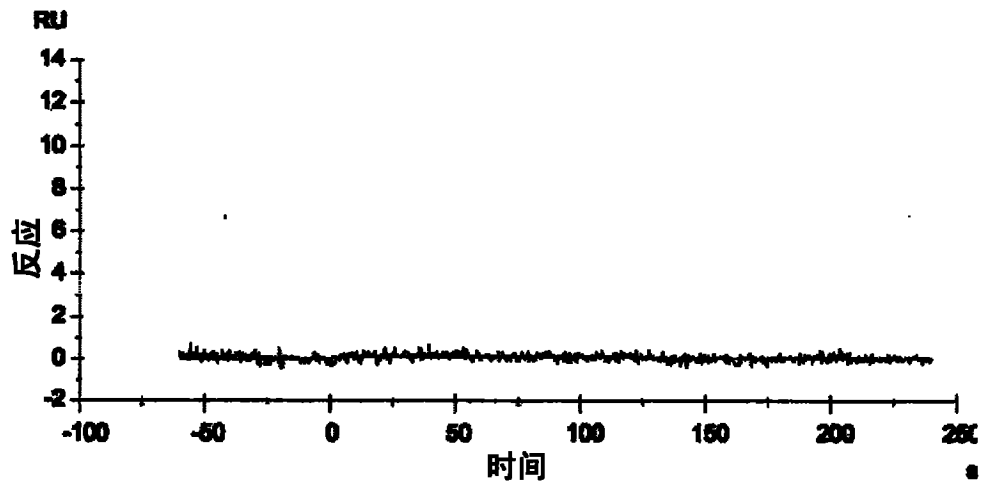


图 5-1

(d) 66226-抗体-甘精胰岛素



(e) 66226-抗体-地特胰岛素

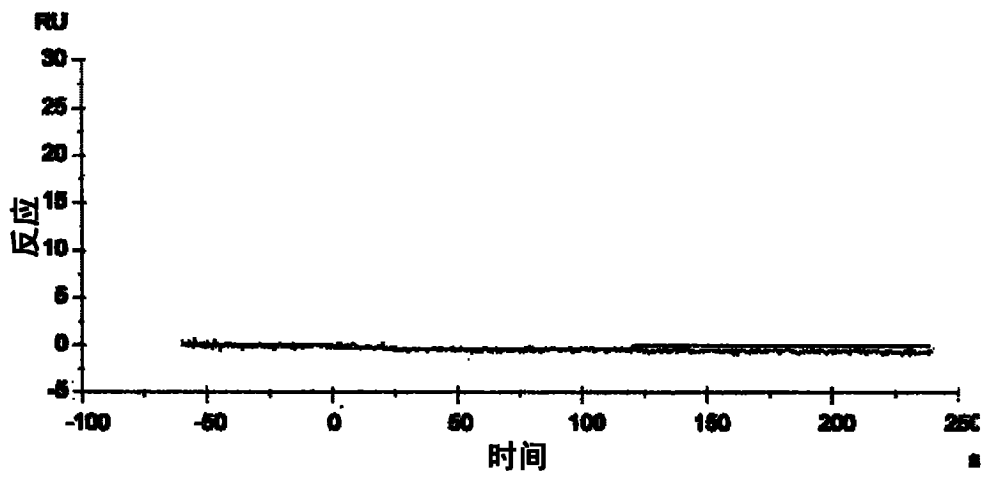


图 5-2

一级抗体-二级抗体
66221-抗体-66226-抗体

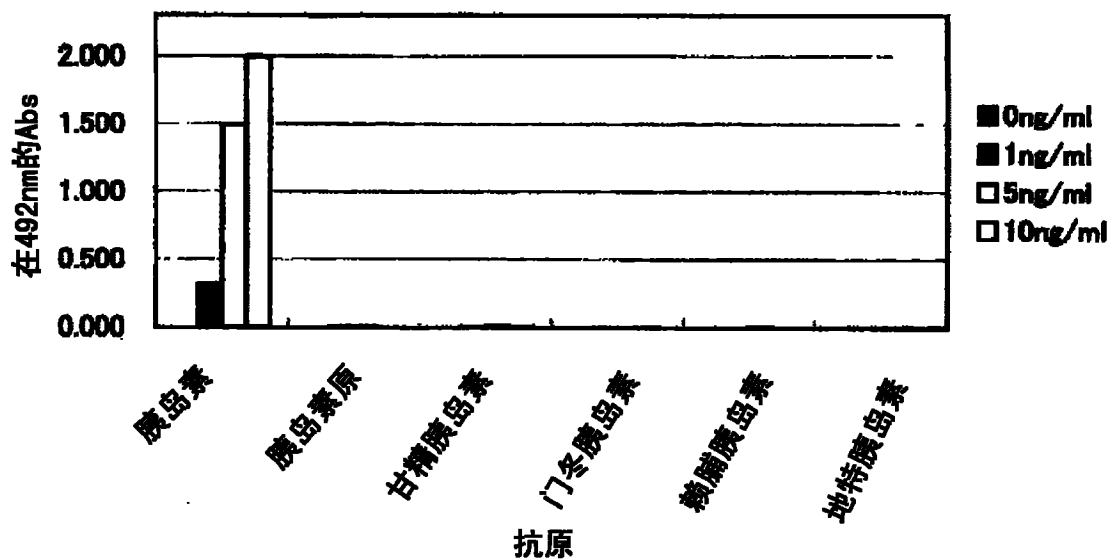


图 6

一级抗体-二级抗体
66226-抗体-66221-抗体

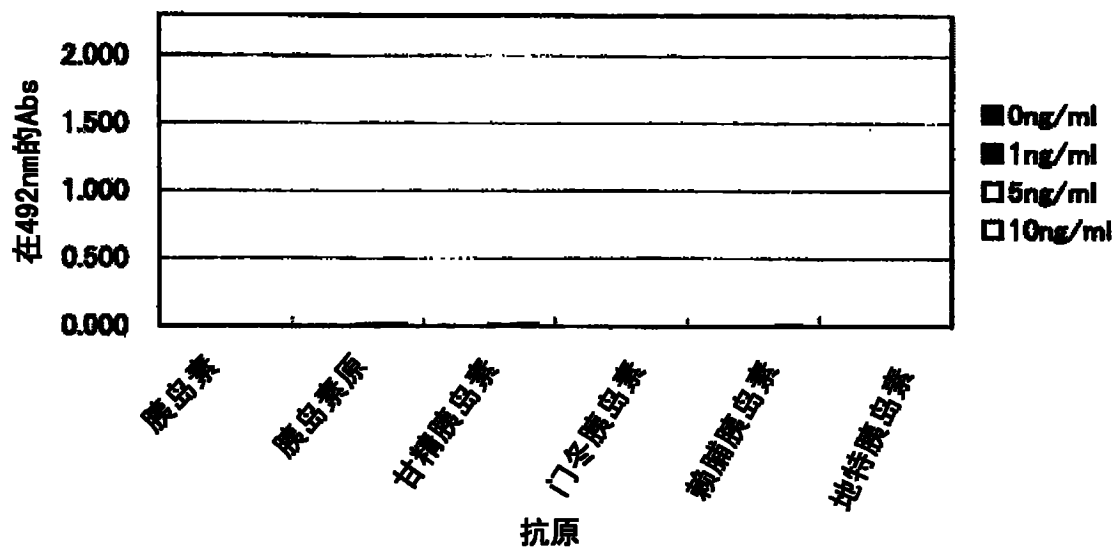


图 7

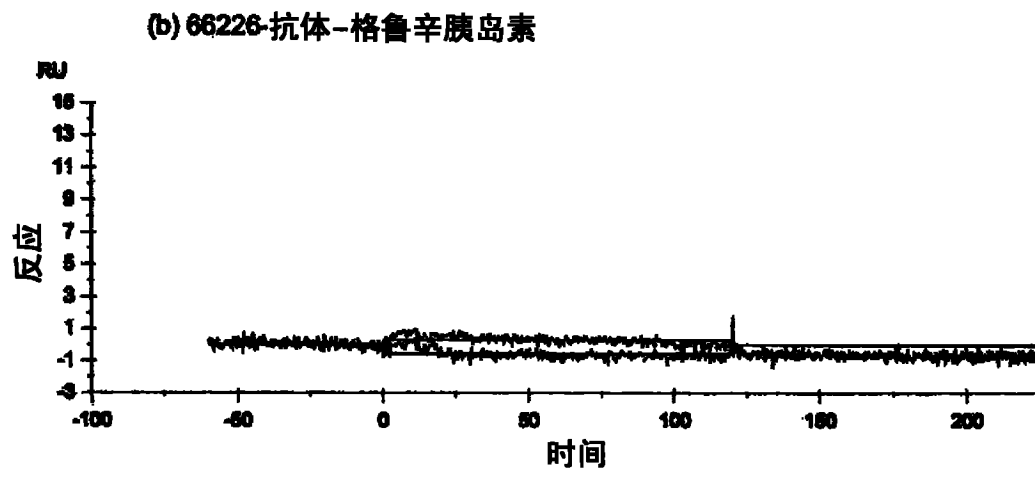
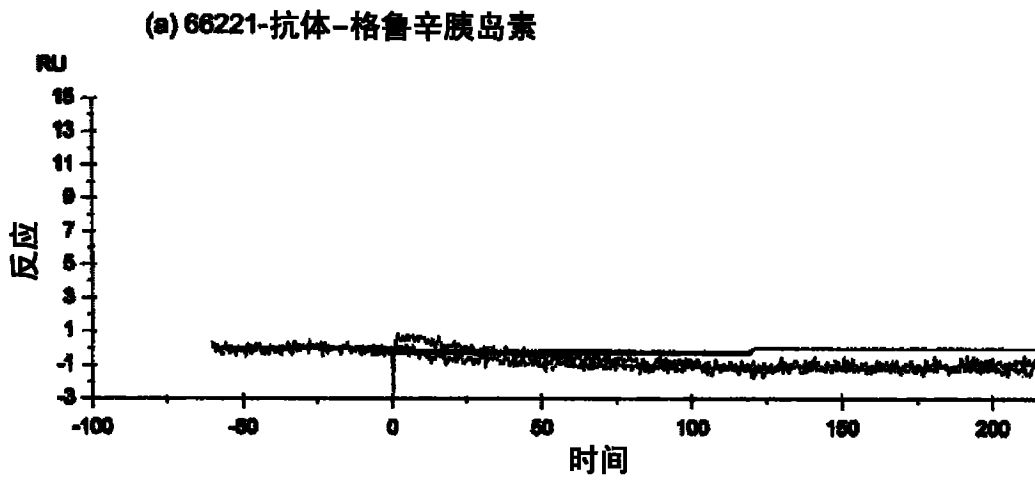


图 8

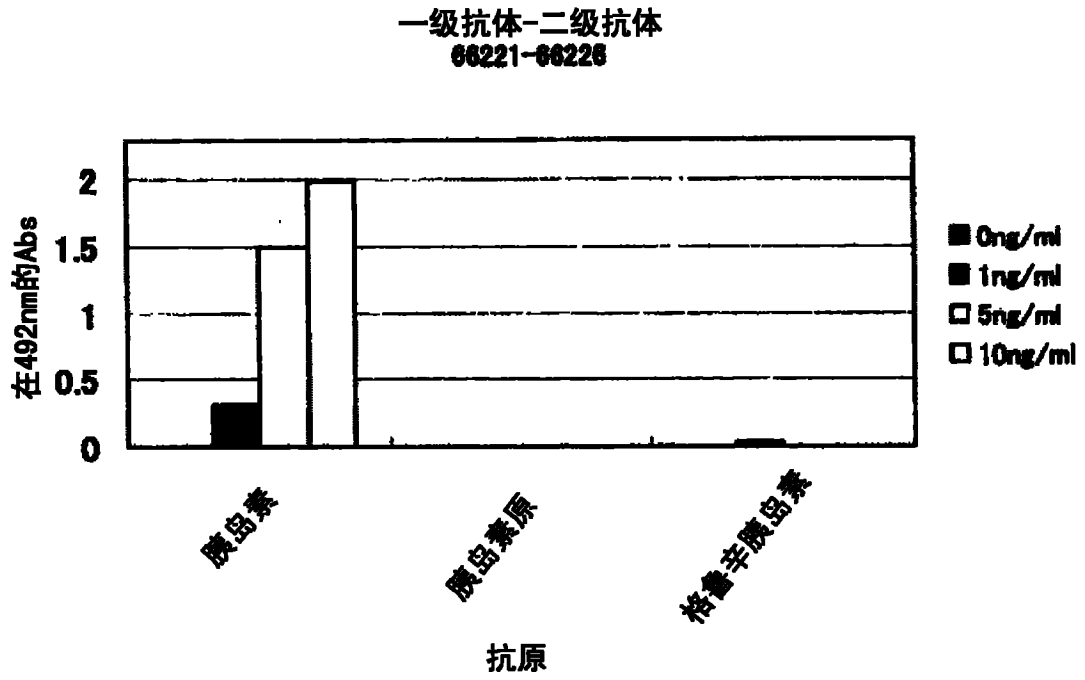


图 9

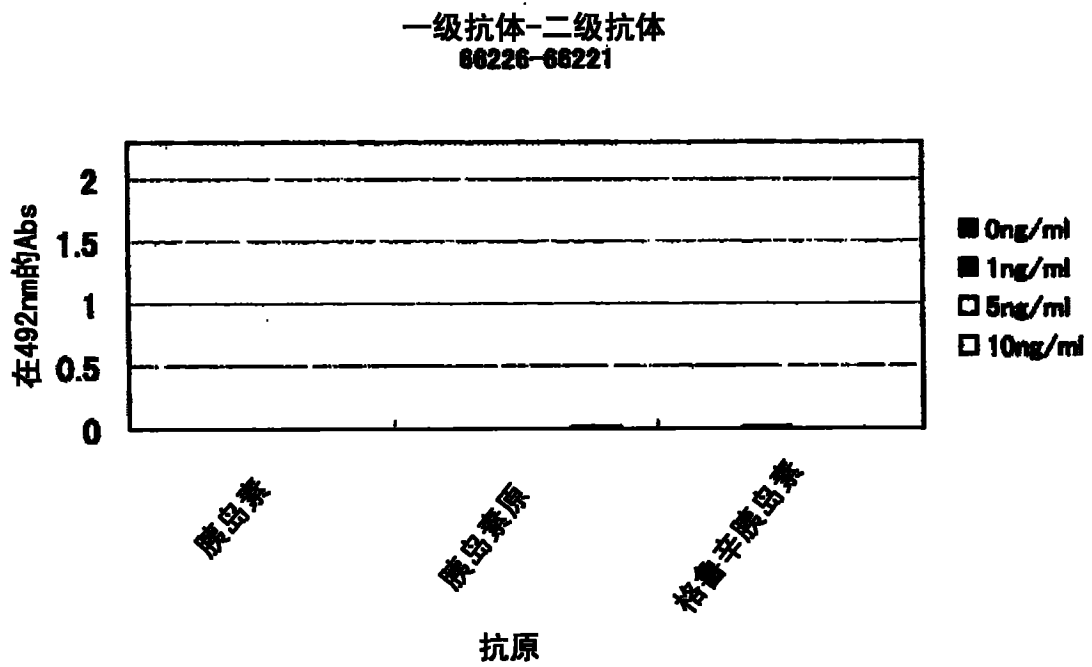


图 10

专利名称(译)	胰岛素测定法		
公开(公告)号	CN102246039A	公开(公告)日	2011-11-16
申请号	CN201080003521.2	申请日	2010-07-21
[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 清水知 山本光章 中村靖		
发明人	近藤纯一 清水知 山本光章 中村靖		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545		
CPC分类号	G01N33/53 G01N2333/62 G01N33/74 C07K16/26		
代理人(译)	王旭		
优先权	2009170292 2009-07-21 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供在不受胰岛素原和胰岛素类似物的影响下，使用具有与结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应的，但不与未结合抗-胰岛素抗体的胰岛素反应的性质的抗体，能够灵敏地并且特异性地测定胰岛素的胰岛素-特异性测定法和测定试剂。

