



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103765213 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 30

(21) 申请号 201280041481. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 08. 24

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

2011-183791 2011. 08. 25 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 02. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/071432 2012. 08. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/027823 JA 2013. 02. 28

(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 酒井千菜 田代茂

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

11243

代理人 金鲜英 李宏轩

权利要求书1页 说明书9页

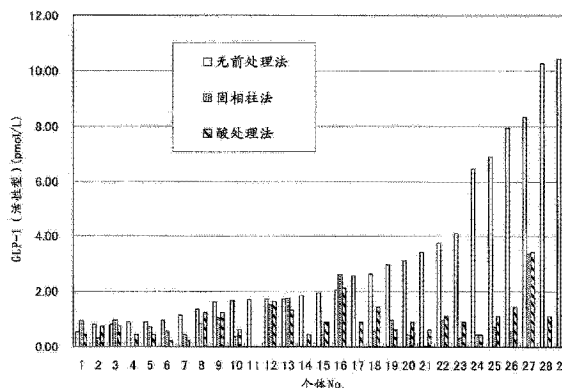
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

胰高血糖素样肽-1的测定法及其中使用的试剂盒

(57) 摘要

一种GLP-1的测定法,其特征在于,其为测定被检体中的胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的存在和/或量的方法,包括预先用酸性溶液处理被检体的工序,以及,一种试剂盒,其为测定被检体中的GLP-1的存在和/或量的试剂盒,包含:(a)酸性溶液、(b)GLP-1的特异性抗体和(c)操作说明书。



1. 一种 GLP-1 的测定法,其特征在于,其为测定被检体中的胰高血糖素样肽 -1(GLP-1)的存在和 / 或量的方法,包括预先用酸性溶液处理被检体的工序。
2. 根据权利要求 1 所述的测定法,其中,酸性溶液为包含甘氨酸、盐酸、醋酸、盐酸胍、硫酸、磷酸中的至少一种的溶液。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的测定法,其中,被检体为血液。
4. 根据权利要求 1 ~ 3 中的任一项所述的方法,其中,GLP-1 的测定法为酶联免疫测定法或竞争性放射免疫测定法。
5. 一种试剂盒,其为测定被检体中的 GLP-1 的存在和 / 或量的试剂盒,包含(a)酸性溶液、(b) GLP-1 的特异性抗体和(c)操作说明书。

胰高血糖素样肽 -1 的测定法及其中使用的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及容易且准确地测定胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 的方法和其中使用的试剂盒。

背景技术

[0002] 在以二肽基肽酶 IV (以下有时称为“DPP-IV”) 活性的抑制为目标的药物、或以胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 为药物的药品(主要是糖尿病药) 的开发中, 为了测定药效评价参数和药物浓度, 分别频繁地对血中活性型 GLP-1 浓度 (GLP-1 (活性型))、或总 GLP-1 浓度 (GLP-1 (总)) 进行测定。

[0003] DPP-IV 抑制剂的作用机理如下: 通过抑制 DPP-IV 活性, 使得具有被 DPP-IV 分解的性质的活性型 GLP-1 浓度上升, 通过该 GLP-1 促进胰岛素的分泌, 促进糖的利用。因此, 通过测定 GLP-1 的浓度可以判定 DPP-IV 抑制剂的作用效果。

[0004] 作为活性型 GLP-1, 已知存在 GLP-1 (7-36 酰胺) 和 GLP-1 (7-37)。已知的是, 这些物质的测定通过使用了特异性抗体的免疫学测定法 (ELISA 法: 密理博公司制试剂盒等) 而广泛进行, 但由于非特异性反应时有发生, 为了测定血浆中的准确浓度, 必须进行一些前处理以消除非特异性反应 (非专利文献 1)。一般 ELISA 法中的非特异性反应可考虑到是起因于血液等被检体的反应、起因于抗体、试剂的反应、起因于微孔板的反应等。以往方法中, 认为非特异性反应起因于被检体, 通过利用柱的前处理法将这些从被检体除去后实施 ELISA 法。该前处理方法利用固相柱或乙醇提取操作将引起非特异性反应的物质和 GLP-1 分离, 1 次检查中所需的血浆量多达 300 μ L, 需要试剂制备、分离操作、氮气干固和再溶解这样的复杂操作以及时间, 对操作人员也要求操作熟练。综上, 以往方法不能称为简便且低成本的测定法。进而, 利用该前处理操作, 被检体中的 20 ~ 30% GLP-1 损失是无法避免的, 因此可以想到 GLP-1 测定值相对于真实值为 70 ~ 80% 左右, 在准确性方面也有问题。

[0005] 现有技术文献

[0006] 非专利文献

[0007] 非专利文献 1: CF. Deacon, JJ. Holst/Best Practice&Research Clinical Endocrinology&Metabolism23 (2009) 425-432

发明内容

[0008] 本发明的课题在于, 提供一种能够解决上述问题的、能够在临床试验中在实用条件下简便且准确地对被检体中的 GLP-1 进行测定的方法和试剂盒。

[0009] 本发明人等进行了深入研究, 通过不使用固相柱而是对被检体进行酸处理, 消除回收操作所导致的损失, 排除非特异性反应物质的影响而获得准确的测定值, 还能够以低成本实现简便的测定。具体而言, 不使用固相柱从而不再需要柱的清洗、洗脱、氮气干固、再溶解这些繁杂操作, 被检体的前处理所需的时间也缩短约 4.5 小时, 必需血浆量可减半。尤其是检查室要求处理大量被检体, 因此根据本发明能够极大提高处理能力。此外, 由于是操

作时无需特殊技能的简便方法,不论是什么样的操作者均能够进行稳定的测定。基于这些见解完成了本发明。

[0010] 此外,已知酸处理具有在某些氨基酸序列的情况下导致其失去活性等影响,一般而言,限于用于活性高(或稳定的)的抗体的精制等。根据本发明的酸处理, GLP-1 稳定,但非特异性反应物质遭受变性等, GLP-1 浓度的测定法中的非特异性反应被抑制,能够准确地测定 GLP-1 浓度,这些效果是出乎意料的。

[0011] 即,本发明如下所述。

[0012] (1) 一种 GLP-1 的测定法,其特征在于,其为测定被检体中的胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 的存在和 / 或量的方法,包括预先用酸性溶液处理被检体的工序。

[0013] (2) 根据(1)所述的测定法,其中,酸性溶液为包含甘氨酸、盐酸、醋酸、盐酸胍、硫酸、磷酸中的至少一种的溶液。

[0014] (3) 根据(1)或(2)所述的测定法,其中,被检体为血液。

[0015] (4) 根据(1)~(3)中的任一项所述的方法,其中, GLP-1 的测定法为酶联免疫测定法或竞争性放射免疫测定(竞争性 RIA)法。

[0016] (5) 一种试剂盒,其为测定被检体中的 GLP-1 的存在和 / 或量的试剂盒,包含(a)酸性溶液、(b) GLP-1 的特异性抗体和(c)操作说明书。

[0017] 作为“GLP-1”,包括活性型 GLP-1、非活性型 GLP-1、全长 GLP-1 等由全长 GLP-1 生成的物质。

[0018] 各“GLP-1”的氨基酸序列如下所示。

[0019] 活性型 GLP-1

[0020] GLP-1 (7-36) 酰胺 :

[0021] HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (序列号 1)-CONH₂

[0022] GLP-1 (7-37) :

[0023] HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (序列号 2)

[0024] 非活性型 GLP-1

[0025] GLP-1 (9-36) 酰胺 :

[0026] EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (序列号 3)-CONH₂

[0027] GLP-1 (9-37) :

[0028] EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (序列号 4)

[0029] 全长 GLP-1

[0030] GLP-1 (1-37) :

[0031] HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (序列号 5)

[0032] GLP-1 (1-36) 酰胺 :

[0033] HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (序列号 6)-CONH₂

[0034] 上述“GLP-1”中,活性型 GLP-1 具有肠促胰岛素(Incretin)作用。本发明优选针对活性型 GLP-1 来使用。

[0035] 发明的效果

[0036] 根据本发明,能够有效地抑制测定被检体中的 GLP-1 时的非特异性反应,能够简便且准确地测定该 GLP-1。通过利用本发明,能够使供于测定的被检体量为以往的一半左

右,此外不论测定者的熟练程度如何均能够准确地且低成本地测定 GLP-1。即使在临床现场也无需繁杂操作,能够简便地实施均一的测定,这是非常有用的。

附图说明

[0037] 图 1 是表示对 29 名健康人的空腹时血浆通过无前处理法、固相柱法、酸处理法处理后测定活性型 GLP-1 浓度的结果的图。

[0038] 图 2 是表示对进食后的血浆通过固相柱法(有校正、无校正)、酸处理法处理后测定活性型 GLP-1 浓度的结果的图。

[0039] 图 3 是表示用各种酸处理后的空腹时血浆和进食后血浆中的活性型 GLP-1 浓度的测定结果的图。

[0040] 图 4 是表示对另外 50 名健康人的空腹时血浆通过无前处理法、固相柱法、酸处理法处理后测定活性型 GLP-1 浓度的结果的图。

[0041] 图 5 是表示对另外 50 名健康人的进食后血浆通过无前处理法、固相柱法、酸处理法处理后测定活性型 GLP-1 浓度的结果的图。

[0042] 图 6 是基于实施例 5、6 的结果对无前处理法、固相柱法、酸处理法中的各组合的相关性进行解析的结果的图。

具体实施方式

[0043] 本发明的特征在于,在测定被检体中的 GLP-1 时,预先对被检体进行酸处理而供于前述测定。

[0044] 本发明可以用于公知的测定被检体中的 GLP-1 的存在和 / 或量(浓度)的方法。即,本发明的测定法除了本发明的预先对被检体进行酸处理而供于前述测定外可以与通常的 GLP-1 测定法相同。作为测定法,可以列举例如免疫学方法、仪器分析法等,优选免疫学方法。

[0045] 作为 GLP-1 量的测定,一般进行的是仅以被称为“GLP-1(活性型)”的活性型 GLP-1 为对象的测定和以被称为“GLP-1(总)”的、活性型 GLP-1、非活性型 GLP-1、全长 GLP-1 等由全长 GLP-1 生成的 GLP-1 总量为对象的测定等。各 GLP-1 量的测定法本身没有任何限定,可以利用公知的免疫分析、仪器分析等进行,优选免疫学方法,例如优选使用酶联免疫测定法、竞争性 RIA 法等。作为酶联免疫测定法,例如采用利用吸光、荧光、化学发光等方法,其中特别优选使用荧光、化学发光法。还可以使用市售的 EIA、ELISA 或 RIA 试剂盒进行测定。

[0046] 本发明中,预先对被检体进行酸处理是指,在将被检体供于前述 GLP-1 量的测定工序之前,用酸性溶液进行处理。例如,在被检体中加入酸性溶液,在室温或 37°C 保温一定时间。一定时间优选为约 10 ~ 30 分钟。此外,此后用碱溶液进行了中和的方式有时也称为进行了酸处理。在添加碱溶液后,立即混和即可。

[0047] 本发明中能够使用的被检体只要是前述 GLP-1 量的测定中能够使用的即可,没有限制,可以列举血液(全血、血浆、血清等)。可以优选使用血浆。

[0048] 本发明中的酸处理是指:GLP-1 不变性但除其以外的引起非特异性反应的夹杂物发生变性等、从而抑制对于前述 GLP-1 量的测定的影响的方法。

[0049] 作为本发明的酸处理中使用的酸性溶液,只要是 GLP-1 不变性但除其以外的引起非特异性反应的夹杂物能够变性、对后续测定没有影响的物质即可。这样的酸性溶液是本领域技术人员无需进行过度的尝试试验即能够从公知的酸性溶液中选择出的。例如, pH4 以下的酸性溶液。更优选 pH2.5 以下的酸性溶液。酸性溶液的 pH 的下限没有特别限制,例如为 pH1 以上。具体而言,可以列举包含甘氨酸(氨基乙酸)、盐酸、醋酸、盐酸胍、硫酸、磷酸中的至少 1 种的溶液。适宜的 pH 根据各酸而不同,本领域技术人员可以容易地确定。通常优选 pH 较低。此外,具有缓冲能力的酸性溶液由于能够弥补操作性的偏差而优选。例如,可以列举甘氨酸-盐酸缓冲液、盐酸-氯化钾缓冲液、柠檬酸缓冲液、醋酸缓冲液、柠檬酸-磷酸缓冲液等。通过使用这样的酸性溶液可以仅使非特异性反应物质变性,因此能够准确地仅测定 GLP-1。此外,由于变性后的非特异性反应物质不易沉淀、析出,因此前处理后无需经过被检体的离心、沉淀除去操作就能够供于测定,操作简便。

[0050] 酸性溶液更优选相对于试样溶液以 1:9 ~ 1:1 的体积添加。

[0051] 进行酸处理后,为了不影响前述 GLP-1 量的测定,可以添加碱溶液将其中和为 pH7 左右。作为能够用于进行中和的碱溶液,只要是不影响测定的碱溶液即可,本领域技术人员无需进行过度的尝试试验即能够从公知的碱溶液中选择。可以列举例如 Tris(三羟甲基氨基甲烷)、氢氧化钠、氢氧化钾、氨、碳酸钠、碳酸氢钠。此外,具有缓冲能力的碱溶液由于能够弥补操作性的偏差而优选。例如,可列举出 Tris-盐酸缓冲液、磷酸缓冲液、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液、碳酸-碳酸氢盐缓冲液等。

[0052] 本发明的试剂盒的特征在于,可以用于实施本发明的测定法,包含用于预先对被检体进行酸处理的酸性溶液。具体而言,包含:

[0053] (a) 酸性溶液、

[0054] (b) GLP-1 的特异性抗体、

[0055] (c) 操作说明书。

[0056] 本发明的试剂盒中使用的前述抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体中的任一种。此外,试剂盒中还可以使用保持与 GLP-1 的特异性结合能力的抗体片段,例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、或 Fv。

[0057] 进而,前述抗体可以本来状态用于试剂盒,也可以根据所利用的免疫学手法而以适合于该手法的形态用于试剂盒,例如,如果采用胶乳凝集免疫测定法则可以以固定于胶乳载体的状态用于试剂盒,如果采用使用了磁性粒子等的高灵敏度测定法则可以以固定于磁性粒子的状态用于试剂盒,如果是免疫色谱法等利用基板的方法则可以以固定于基板的状态用于试剂盒,如果需要利用标记物质(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)进行标记则可以以标记化的状态用于试剂盒。

[0058] 此外,本发明的试剂盒中包含的前述操作说明书只要至少言及通过酸性溶液预先处理被检体即可,没有特别限定,除了前述言及内容,还可以包含例如关于使用本发明的试剂盒的免疫学测定的实施步骤的说明、关于试剂盒自身的保存、操作等的注意事项等。

[0059] 予以说明,用于进行酸处理的酸性溶液即使与测定 GLP-1 的试剂不同,只要是在测定 GLP-1 时用于预先对被检体进行酸处理则实质上构成本发明的试剂盒。

[0060] 实施例

[0061] 以下列举实施例具体说明本发明。但本发明不限于以下实施例的方式。

[0062] 《实施例 1:本发明的利用酸处理的测定法和以往的利用固相柱的测定法的步骤》

[0063] 1-1:本发明的利用酸处理的测定法的步骤

[0064] 1-1-1:被检体

[0065] 关于被检体,以健康人为对象,在 EDTA 采血管(NIPRO 公司制)中按照日本特开 2008-104870 添加 DIPROTIN A(抑二肽素 A),在空腹时或进食后采血,在以下的测定中使用与个体对应的血浆。

[0066] 1-1-2:标准曲线用标准试样溶液

[0067] 使用胰高血糖素样肽 1(人,7-36 酰胺)(肽研究所公司制)作为标准物质,制备 0 和 1~100pmol / L 为止的 8 级别浓度的溶液,用于定量。

[0068] 1-1-3:酸处理

[0069] 在聚丙烯制管中添加 0.2mol / L 甘氨酸盐酸缓冲液(pH1.3)150 μ L、以及标准曲线用标准试样溶液或与个体对应的血浆 150 μ L,混和。在 37 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟,然后添加 30 μ L 的 2mol / L Tris- 盐酸缓冲液(pH8.5)进行中和,作为酸处理后的样品,用于以下的活性型 GLP-1 量的测定。

[0070] 1-1-4:活性型 GLP-1 浓度的测定

[0071] 活性型 GLP-1 浓度的测定中,使用利用了抗 GLP-1 单克隆抗体的 GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1(ACTIVE)ELISA KIT96 孔板(密理博公司制)。测定法是按照所附的说明书进行的。测定装置使用的是 Veritas 微孔板发光检测仪(普洛麦格公司制),利用 SoftMax Pro(分子仪器(日本)公司制)进行解析。

[0072] 1-2:以往的利用固相柱的测定法的步骤

[0073] 除了将 1-1-3 的酸处理变更为以下的固相柱以外,与 1-1 同样进行。

[0074] 作为固相柱,使用的是 Oasis HLB Extraction Plate(Waters 公司制)。使用方法是按照所附的说明书进行的。在进行柱的平衡(conditioning)后,将 1-1-1 中制备的血浆 300 μ L 用 PBS 稀释 4 倍而制备成 1200 μ L,添加到孔中后,离心(10 \times g、3 分钟、室温)。然后,添加 10% 甲醇溶液 1mL,然后进行离心(10 \times g、3 分钟、室温),对孔进行清洗。重复进行 2 次该操作。接着安设深孔板,添加含有 0.5% 氨的 75% 甲醇溶液 0.5mL,然后离心(10 \times g、3 分钟、室温),进行洗脱。重复进行 2 次该操作,然后利用离心(100 \times g、1 分钟、室温)从孔中完全回收洗脱液。接着将该洗脱液在氮气气流下进行干固。向其中添加 GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1(ACTIVE)ELISA KIT96 孔板试剂盒(密理博公司制)所包含的分析缓冲液 250 μ L,在微孔板振荡摇床(Plate Shaker)中进行约 5 分钟的再溶解,作为前处理后的样品用于活性型 GLP-1 浓度的测定。由于再溶解量为 250 μ L,少于被检体量 300 μ L,因此测定值乘以体积校正系数(0.83:再溶解量除以被检体量而得的值)。

[0075] 此外,作为比较而不进行前处理时,将 1-1-1 中制备的血浆直接用于活性型 GLP-1 浓度的测定(也无需进行体积校正)。

[0076] 《实施例 2:活性型 GLP-1 浓度测定中的前处理法的效果的比较》

[0077] 当对于同一个体比较活性型 GLP-1 浓度和总 GLP-1 浓度时,在无前处理的方法中发现了活性型 GLP-1 浓度超过总 GLP-1 浓度的个体,表明无前处理时未能准确测定活性型 GLP-1,确认了以往的利用固相柱进行的前处理的有效性。

[0078] 空腹时活性型 GLP-1 浓度非常低(在定量下限 1pmol / L 附近),因此通过测定空

腹时血浆,能够准确地确认非特异性反应物质对测定值的影响。

[0079] 按照实施例 1,利用各前处理法测定了活性型 GLP-1 浓度。

[0080] 由 29 名空腹时的健康人制备与个体对应的血浆,利用无前处理法、固相柱法、酸处理法处理血浆后,测定活性型 GLP-1 浓度。其中,固相柱法中,测定值由于前处理所导致的损失而较低,因此为了方便比较,使用的是对测定值进行了回收率校正(测定值 / 0.75)的结果。其结果是,本发明的酸处理法获得了与固相柱法同等的结果。结果示于图 1。

[0081] 无前处理时,多个被检体确认到非特异性值的上升,但通过基于被检体的酸处理法的前处理显著抑制了该上升。此外,固相柱法中,为了方便而对测定值进行回收率校正而求取值,但回收率并非总是稳定的,无法确定测定值是否正确。但是,酸处理法即使不使用如上的校正系数也为与固相柱法的校正后的测定值同等程度,因此可知简便且高精度地求出测定值。上述表明:利用酸处理能够稳定、准确地获得测定结果。

[0082] 《实施例 3:活性型 GLP-1 浓度测定中的前处理法的效果的比较》

[0083] 按照实施例 1,利用各前处理法测定了 10 名进食后的健康人的活性型 GLP-1 浓度。

[0084] 进食导致内源性活性型 GLP-1 浓度增加,因此通过测定进食后的血浆能够确认酸处理法不影响内源性的活性型 GLP-1 浓度的测定。

[0085] 由 10 名进食后的健康人制备与个体对应的血浆,通过固相柱法、酸处理法处理血浆后,测定活性型 GLP-1 浓度。其中,固相柱法中,测定值由于前处理所导致的损失而较低,因此为了方便比较,使用的是对测定值进行了回收率校正(测定值 / 0.75)的结果。结果可知,本发明的酸处理法获得了与进行了回收率校正的固相柱法同等的结果,能够准确地测定活性型 GLP-1 浓度。结果示于图 2。

[0086] 可知:与实施例 2 同样地,通过酸处理法,不论测定者的熟练度和柱的批次差异等如何,均能够稳定、简便且高精度地求出测定值。

[0087] 《实施例 4:各种酸的酸处理条件的比较》

[0088] 按照实施例 1 和下述表 1,各测定 2 人的空腹时或进食后的与个体对应的血浆,对无前处理法、固相柱法和酸处理法时的化学发光强度进行比较。固相柱法中,化学发光强度由于前处理所导致的损失而较低,因此为了方便比较,使用的是对化学发光强度进行了回收率校正(化学发光强度 / 0.75)的结果。酸处理液全部和与个体对应的血浆等量(150 μ L)地添加,实施例 1 所示的酸处理条件以外的酸处理液的种类和中和条件示于表 1。关于酸处理法,使用的是针对中和液添加量进行了体积校正{化学发光强度 \times (与个体对应的血浆量 + 酸处理液量 + 中和液添加量) / (与个体对应的血浆量 + 酸处理液量)}的结果。

[0089] [表 1]

[0090]

[0091]

酸处理液	中和液	中和液添加量(μ L)
0.2mol/L甘氨酸-盐酸缓冲液(pH2.5)	1mol/LTris-盐酸缓冲液(pH8.5)	20
0.2mol/L甘氨酸-盐酸缓冲液(pH3.0)	0.5mol/LTris-盐酸缓冲液(pH8.5)	20
0.2mol/L甘氨酸-盐酸缓冲液(pH3.5)	0.25mol/LTris-盐酸缓冲液(pH8.5)	20
0.2mol/L甘氨酸-盐酸缓冲液(pH4.0)	0.05mol/LTris-盐酸缓冲液(pH8.5)	25
HCl (pH1.3)	1mol/LTris-盐酸缓冲液(pH8.5)	30
HCl (pH2.5)	0.1mol/LTris-盐酸缓冲液(pH8.5)	20
HCl (pH3.0)	0.05mol/LTris-盐酸缓冲液(pH8.5)	30
HCl (pH3.5)	0.05mol/LTris-盐酸缓冲液(pH8.5)	20
HCl (pH4.0)	0.025mol/LTris-盐酸缓冲液(pH8.5)	20
醋酸(pH2.5)	2mol/L NaOH	30
醋酸(pH3.0)	0.5mol/LTris-盐酸缓冲液(pH8.5)	30
醋酸(pH3.5)	0.1mol/LTris-盐酸缓冲液(pH8.5)	30
醋酸(pH4.0)	0.1mol/LTris-盐酸缓冲液(pH8.5)	20

[0092] 结果示于图3和表2。

[0093] [表2]

[0094] 表2相对于固相柱法的各化学发光强度差的比较

[0095] 0.2mol/L甘氨酸-盐酸缓冲液

	空腹时 血浆-1	空腹时 血浆-2	进食后 血浆-1	进食后 血浆-2
固相柱法	54	45	123	169
pH 1.3	+6.6	+7.5	-6.6	-12.9
pH 2.5	+50.0	+84.4	+65.4	+101.8
pH 3.0	+30.1	+71.8	+77.7	+158.7
pH 3.5	+33.0	+67.5	+62.3	+156.0
pH 4.0	+34.2	+70.3	+56.7	+183.6
无前处理法	+101.7	+177.1	+114.8	+172.2

[0097] HCl

	空腹时 血浆-1	空腹时 血浆-2	进食后 血浆-1	进食后 血浆-2
固相柱法	54	45	123	169
pH 1.3	+32.5	+51.0	+28.8	+40.5
pH 2.5	+24.9	+58.7	+60.3	+166.4
pH 3.0	+28.4	+55.0	+77.8	+161.3
pH 3.5	+34.1	+57.4	+90.6	+168.0
pH 4.0	+20.7	+49.9	+52.3	+113.2
无前处理法	+101.7	+177.1	+114.8	+172.2

[0099] 醋酸

	空腹时 血浆-1	空腹时 血浆-2	进食后 血浆-1	进食后 血浆-2
固相柱法	54	45	123	169
pH 2.5	+21.7	+34.8	+10.1	+0.8
pH 3.0	+31.4	+52.5	+70.6	+137.6
pH 3.5	+24.9	+50.5	+63.4	+139.4
pH 4.0	+19.0	+57.8	+70.2	+163.7
无前处理法	+101.7	+177.1	+114.8	+172.2

[0101] 结果是,与固相柱法相比,无前处理法时化学发光强度差方面确认到+101.7~+177.1的偏离。在全部的酸即甘氨酸-盐酸缓冲液、HCl和醋酸的情况下,确认到与无前处理法相比,相对于固相柱法的化学发光强度差的偏离变小。尤其是,甘氨酸-盐酸缓冲液(pH1.3)、HCl(pH1.3)、醋酸(pH2.5)的情况下,确认到相对于固相柱法的化学发光强度差为-12.9~+51.0,有偏离变小的倾向,可知pH低的条件更为理想。其中,利用甘氨酸盐酸缓冲液(pH1.3)进行了酸处理时非特异性反应物质的除去效果最好(相对于固相柱法的化学发光强度差:-12.9~+7.5),表明获得了与固相柱法同等的结果。

[0102] 《实施例5:活性型GLP-1浓度测定中的前处理法的效果的比较》

[0103] 按照实施例1,利用各前处理法测定了活性型GLP-1浓度。

[0104] 由50名空腹时的健康人制备与个体对应的血浆,利用无前处理法、固相柱法、酸处理法处理血浆后,测定活性型GLP-1浓度。其中,固相柱法中,测定值由于前处理所导致的损失而较低,因此为了方便比较,使用的是对测定值进行了回收率校正(测定值/0.75)的结果。结果,本发明的酸处理法获得了与固相柱法同等的结果。结果示于图4。

[0105] 《实施例6:活性型GLP-1浓度测定中的前处理法的效果的比较》

[0106] 按照实施例1,利用各前处理法测定50名进食后的健康人的活性型GLP-1浓度。

[0107] 由50名进食后的健康人制备与个体对应的血浆,利用固相柱法、酸处理法处理血浆后,测定活性型GLP-1浓度。其中,固相柱法中,测定值由于前处理所导致的损失而较低,因此为了方便比较,使用的是对测定值进行了回收率校正(测定值/0.75)的结果。结果得

知,本发明的酸处理法获得了与进行了回收率校正的固相柱法同等的结果,能够准确地测定活性型 GLP-1 浓度。结果示于图 5。

[0108] 《实施例 7:各前处理法中的测定值的相关性比较》

[0109] 对于实施例 5 和 6 中获得的 100 人的测定值中的、属于定量范围的 97 人的测定值,使用回归分析进行解析。

[0110] 其结果为,酸处理法与固相柱法的相关最为良好($r = 0.921$)。结果示于图 6。

[0111] 产业上的可利用性

[0112] 本发明可以在以糖尿病治疗、预防为目标的药物、食品的开发等中,为了评价其效果而对血中活性型 GLP-1 浓度(GLP-1 (活性型))、总 GLP-1 浓度(GLP-1 (总))进行测定之际使用。根据本发明,能够简便且准确地测定该 GLP-1,因此极为有用。

[0001]

序列表

<110> 三菱化学美迪恩斯株式会社
 <120> 胰高血糖素样肽-1的测定法及其中使用的试剂盒
 <130> OP-12230-PCT
 <150> JP2011-183791
 <151> 2011-08-25
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 1
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30
 <210> 2
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 2
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30
 <210> 3
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 3
 Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala
 1 5 10 15
 Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25
 <210> 4
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 4
 Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala
 1 5 10 15
 Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25
 <210> 5
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 5
 His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val
 1 5 10 15
 Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu
 20 25 30
 Val Lys Gly Arg Gly
 35

[0002]

```

<210> 6
<211> 36
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6
His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val
1          5          10
Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu
          20          25          30
Val Lys Gly Arg
          35

```

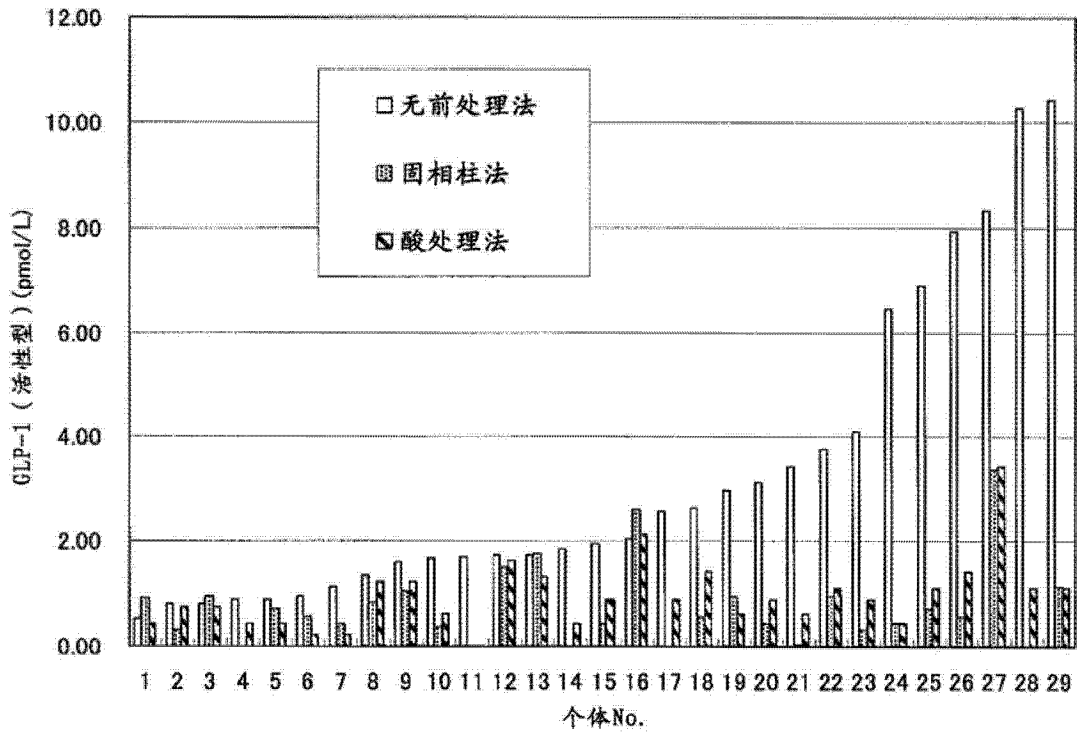


图 1

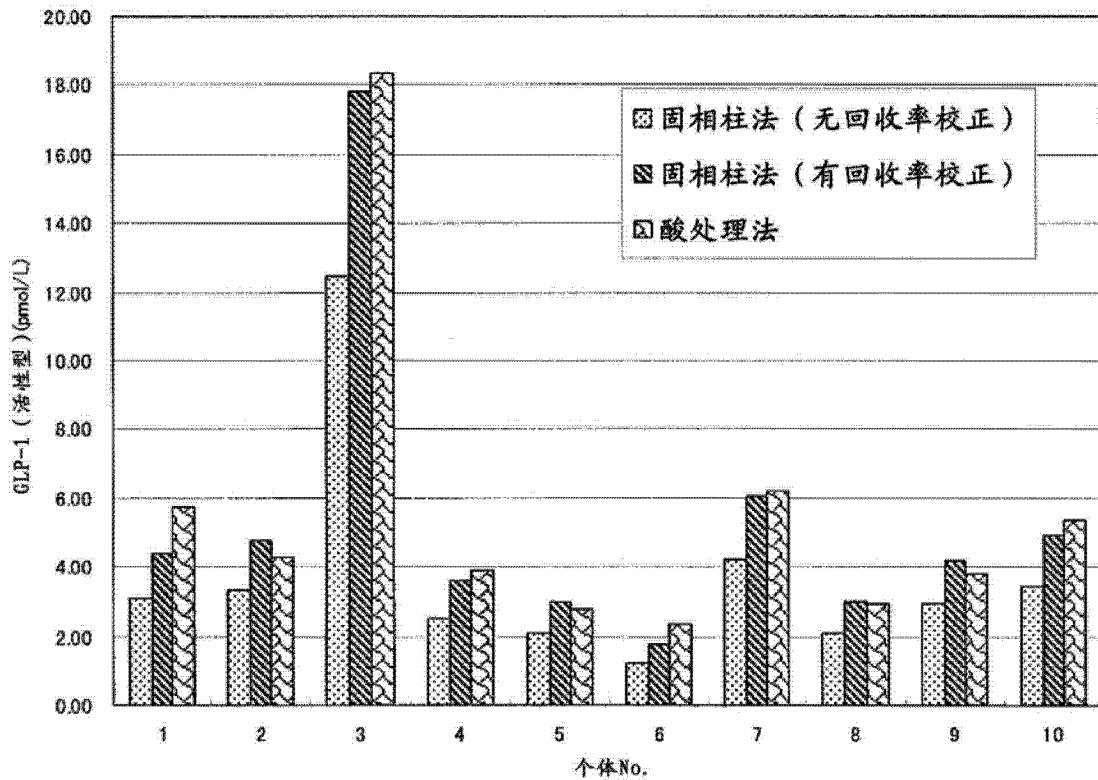


图 2

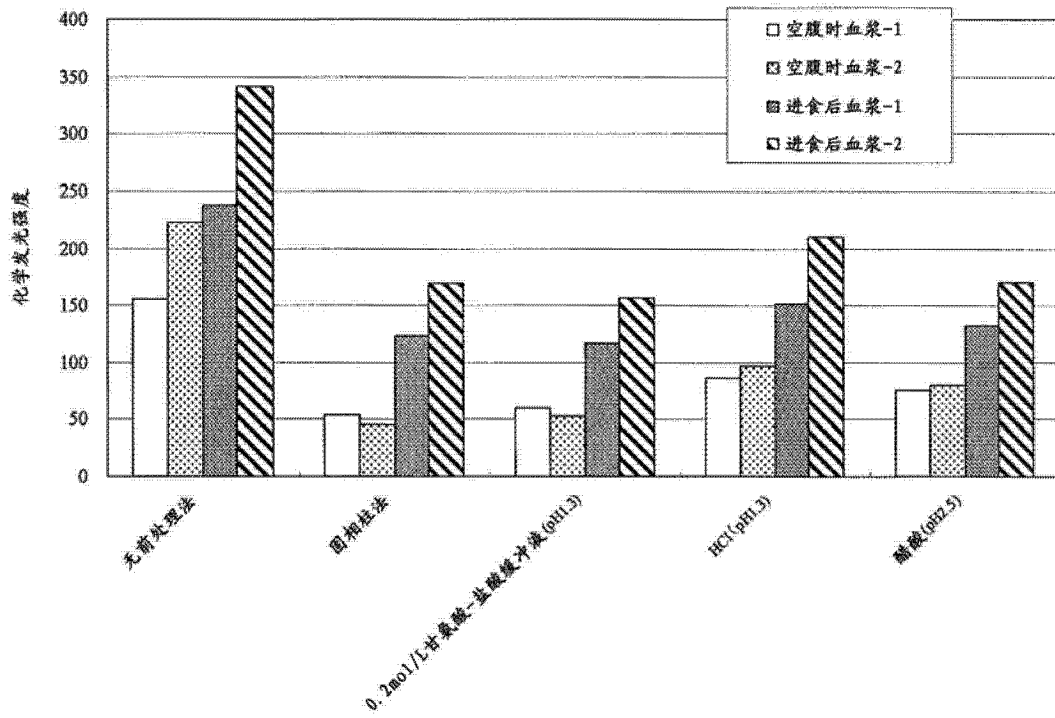


图 3

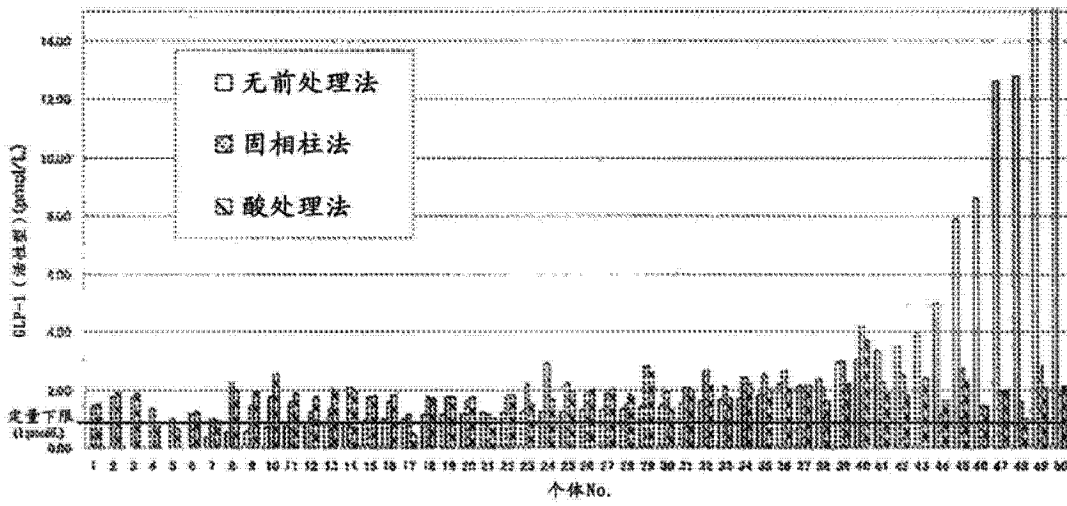


图 4

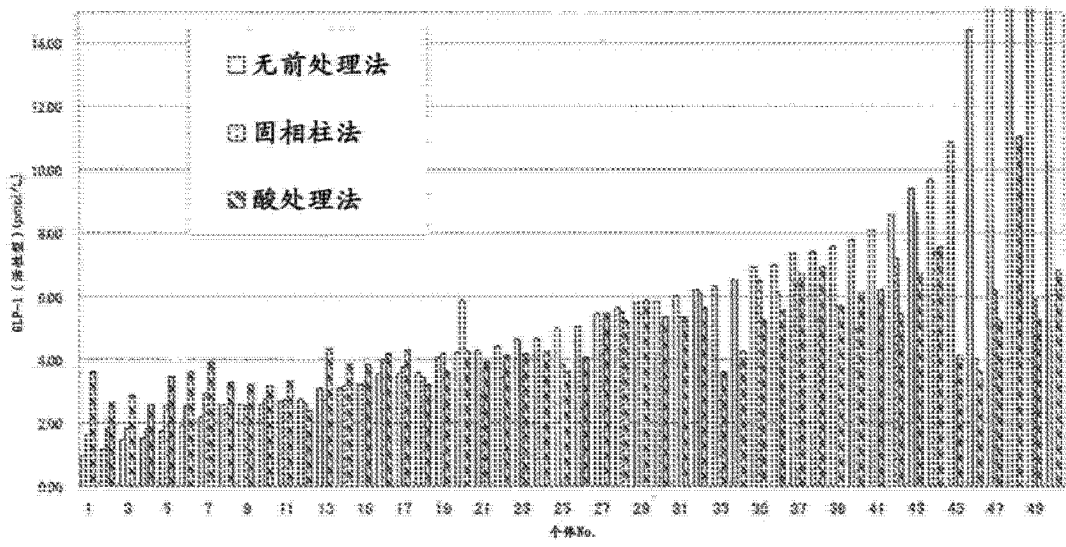


图 5

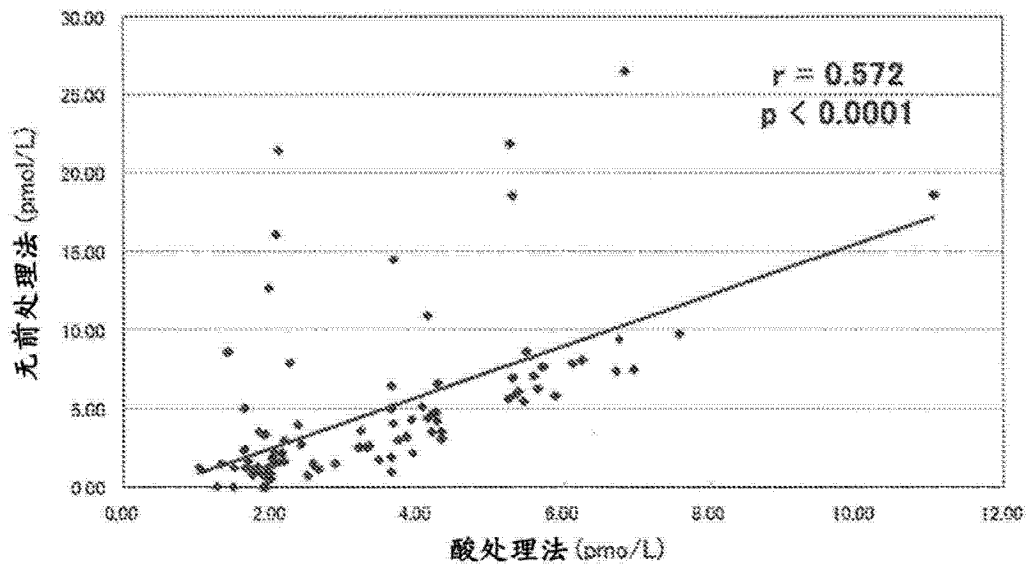
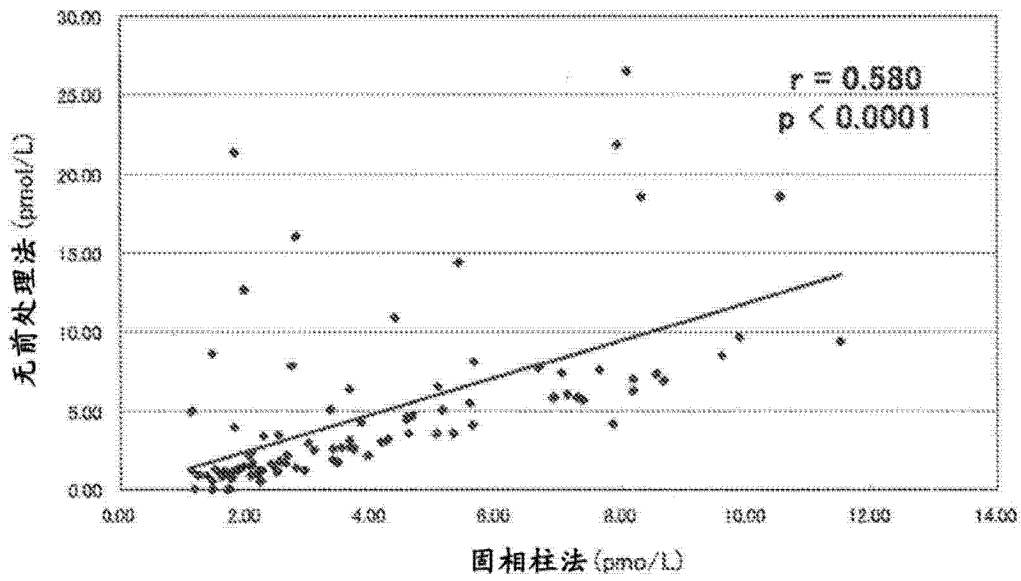
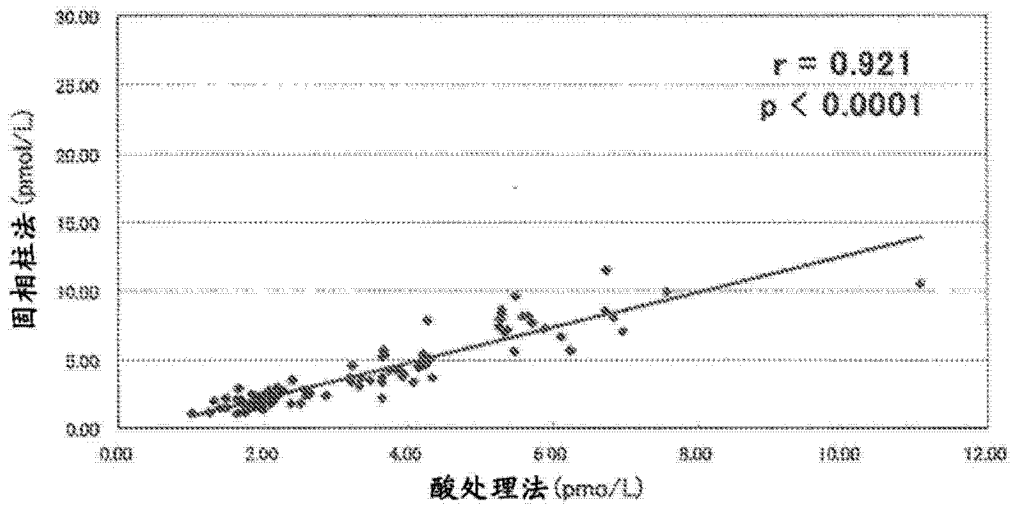


图 6

专利名称(译)	胰高血糖素样肽-1的测定法及其中使用的试剂盒		
公开(公告)号	CN103765213A	公开(公告)日	2014-04-30
申请号	CN201280041481.X	申请日	2012-08-24
[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	酒井千菜 田代茂		
发明人	酒井千菜 田代茂		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/74 G01N2333/605		
代理人(译)	金鲜英 李宏轩		
优先权	2011183791 2011-08-25 JP		
其他公开文献	CN103765213B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种GLP-1的测定法，其特征在于，其为测定被检体中的胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的存在和 / 或量的方法，包括预先用酸性溶液处理被检体的工序，以及，一种试剂盒，其为测定被检体中的GLP-1的存在和 / 或量的试剂盒，包含：(a) 酸性溶液、(b) GLP-1的特异性抗体和(c) 操作说明书。

