



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103765213 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201280041481.X

(22)申请日 2012.08.24

(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

(73)专利权人 美迪恩斯生命科技株式会社

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

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

CN 1483041 A,2004.03.17,

Carolyn F.Deacon et al.Immunoassays for the incretin hormones GIP and GLP-1.《Clinical Endocrinology & Metabolism》.2009,第23卷第425-432页.

Annemieke C.Heijboer et al.Analysis of glucagon-like peptide 1

what to measure?.《Clinica Chimica Acta》.2011,第412卷第1191-1194页.

Lone Pridal et al.Comparison of sandwich enzyme-linked immoadsorbent assay and radioimmunoassay for determination of exogenous glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in plasma.《Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis》.1995,第13卷

审查员 刘迎鸣

权利要求书1页 说明书9页

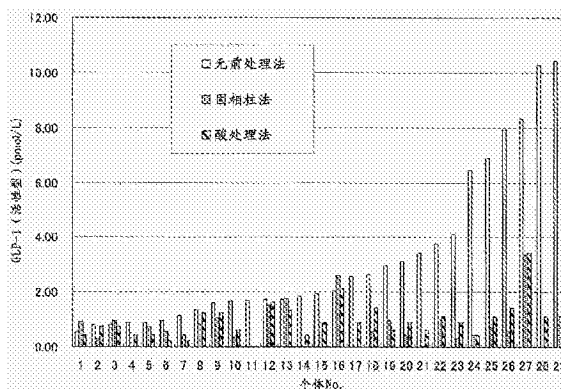
序列表2页 附图4页

(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,其为测定血液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pH1以上且pH2.5以下的酸性溶液处理血液被检体的工序,以及在使用所述酸性溶液处理所述血液被检体之后、在GLP-1测定之前进行中和的工序。

2. 根据权利要求1所述的测定法,其中,所述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,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。

4. 一种试剂盒,其为测定血液被检体中的GLP-1的存在和/或量的试剂盒,包含(a)pH1以上且pH2.5以下的酸性溶液、(b)用于在使用所述酸性溶液处理之后、在GLP-1测定之前进行中和的碱溶液、(c)GLP-1的特异性抗体和(d)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 $\mu$ 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,在准确性方面也存在问题。

[0005] 现有技术文献

[0006] 非专利文献

[0007] 非专利文献1:CF.Deacon,JJ.Ho1st/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] HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGR(序列号1)-CONH<sub>2</sub>

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

[0023] HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG(序列号2)

[0024] 非活性型GLP-1

[0025] GLP-1(9-36)酰胺:

[0026] EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGR(序列号3)-CONH<sub>2</sub>

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

[0028] EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG(序列号4)

[0029] 全长GLP-1

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

[0031] HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG(序列号5)

[0032] GLP-1(1-36)酰胺:

[0033] HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGR(序列号6)-CONH<sub>2</sub>

[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℃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')<sub>2</sub>、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1~100pmoI/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0.2moI/L甘氨酸盐酸缓冲液(pH1.3)150 $\mu$ L、以及标准曲线用标准试样溶液或与个体对应的血浆150 $\mu$ L,混和。在37 $^{\circ}$ C保温10分钟,然后添加30 $\mu$ L的2moI/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 $\mu$ L用PBS稀释4倍而制备成1200 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L,少于被检体量300 $\mu$ 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1pmoI/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 $\mu$ 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] 表1

[0091]

酸处理液	中和液	中和液添加量( $\mu\text{L}$ )
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

[0096]

	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
pH1.3	+6.6	+7.5	-6.6	-12.9
pH2.5	+50.0	+84.4	+65.4	+101.8
pH3.0	+30.1	+71.8	+77.7	+158.7
pH3.5	+33.0	+67.5	+62.3	+156.0
pH4.0	+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
[0098] 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
[0100] 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。

## 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

[0001]

<210> 6  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 [0002] <400> 6  
 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  
 35

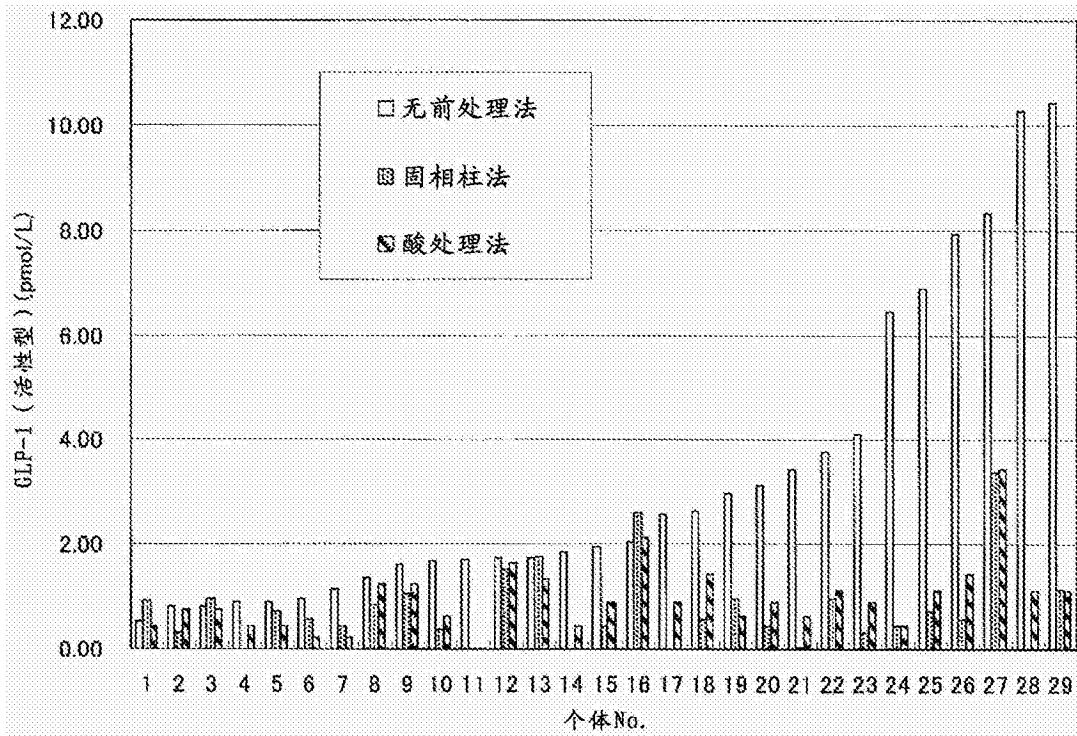


图1

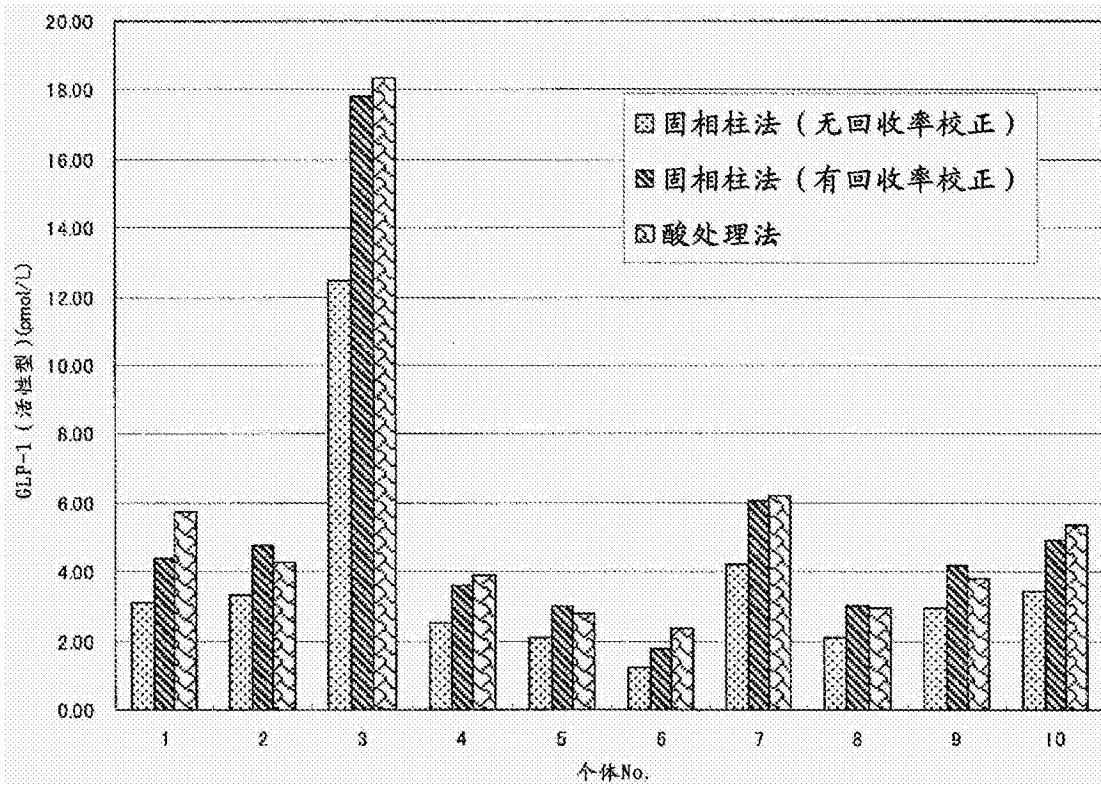


图2

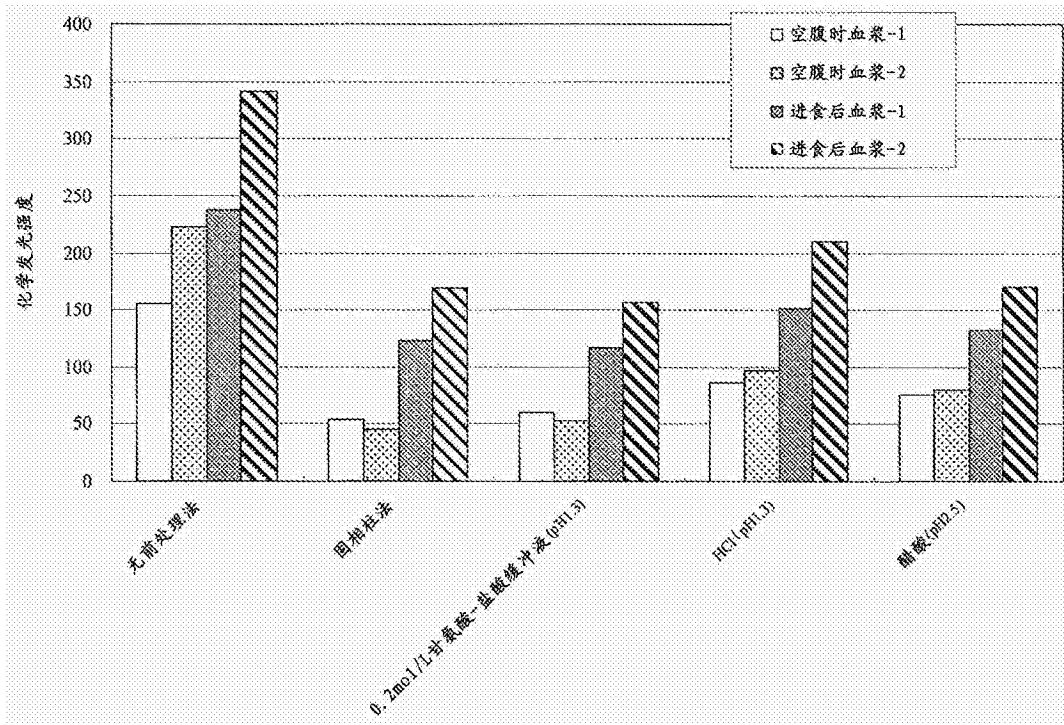


图3

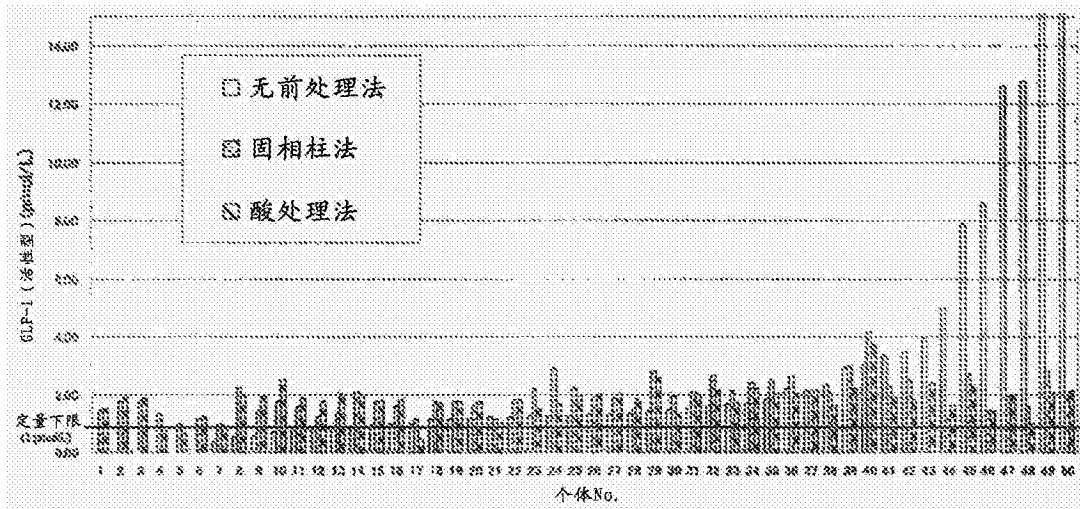


图4

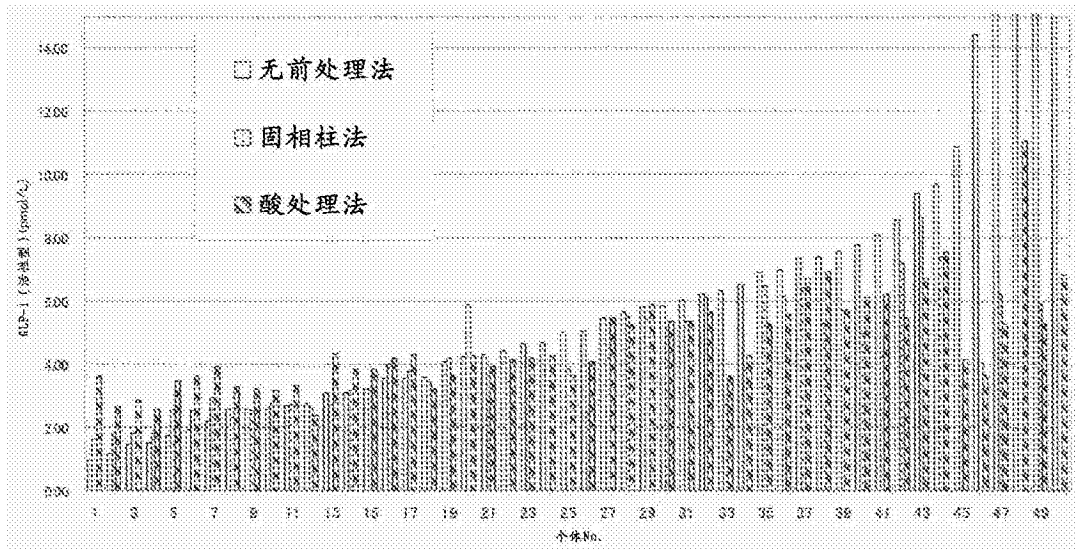


图5

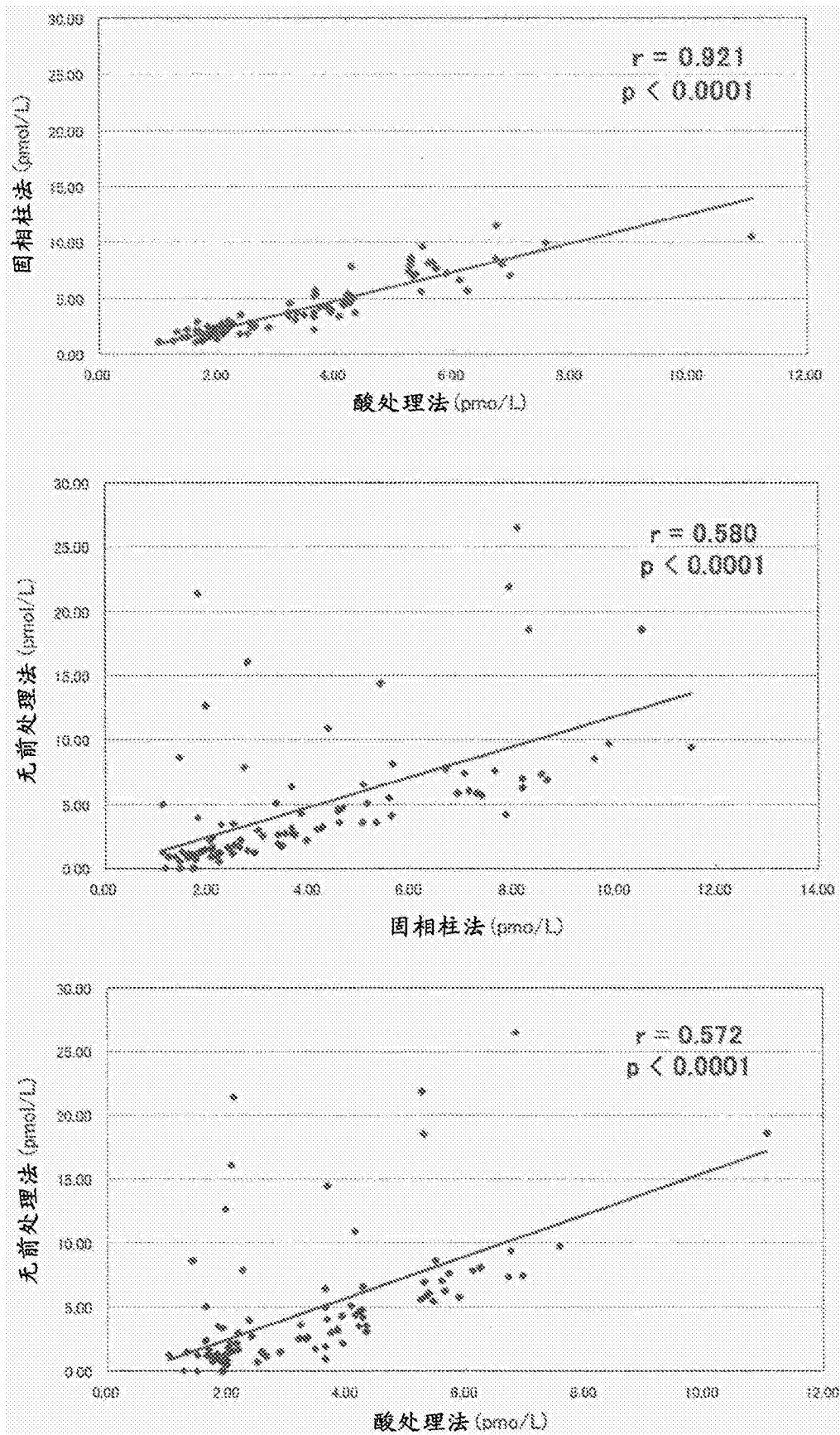


图6

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	<a href="#">CN103765213B</a>	公开(公告)日	2016-08-17
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)	美迪恩斯生命科技株式会社		
[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	G01N33/74 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	CN103765213A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

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。

