



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107533050 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201680017680.5

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限公司 11290

(22)申请日 2016.03.29

代理人 王玉玲 李雪春

(30)优先权数据

2015-074168 2015.03.31 JP

2015-074173 2015.03.31 JP

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/060261 2016.03.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/159015 JA 2016.10.06

(71)申请人 美迪恩斯生命科技株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 吉田竜也 杨宇航

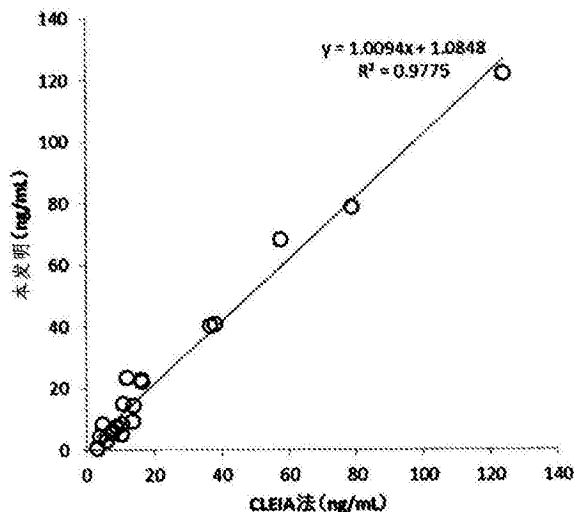
权利要求书1页 说明书13页 附图5页

(54)发明名称

凝血酶-抗凝血酶复合体的测定试剂及测定方法

(57)摘要

一种凝血酶-抗凝血酶复合物(TAT)测定试剂,其特征在于,其包含结合在胶乳粒子上的与抗凝血酶侧结合的抗体和结合在胶乳粒子上的与凝血酶(T)侧结合的抗体,所述与抗凝血酶侧结合的抗体对TAT的反应性为对游离抗凝血酶的反应性的100倍以上,并且优选以使测定时的pH达到5.8~6.6的方式构成。



1. 一种凝血酶-抗凝血酶复合体测定试剂,其特征在于,其包含结合在胶乳粒子上的且与抗凝血酶侧结合来识别凝血酶-抗凝血酶复合体的抗体和结合在胶乳粒子上的且与凝血酶侧结合来识别凝血酶-抗凝血酶复合体的抗体,

所述与抗凝血酶侧结合来识别凝血酶-抗凝血酶复合体的抗体对凝血酶-抗凝血酶复合体的反应性为对游离抗凝血酶的反应性的100倍以上。

2. 根据权利要求1所述的凝血酶-抗凝血酶复合体测定试剂,其特征在于,其以使测定时的pH达到5.8~6.6的方式来构成。

3. 根据权利要求1或2所述的凝血酶-抗凝血酶复合体测定试剂,其包含第二试剂和第一试剂,

所述第二试剂包含结合有所述与抗凝血酶侧结合来识别凝血酶-抗凝血酶复合体的抗体的胶乳粒子和结合有所述与凝血酶侧结合来识别凝血酶-抗凝血酶复合体的抗体的胶乳粒子,

所述第一试剂包含pH为5.8~6.6的缓冲液。

4. 一种测定凝血酶-抗凝血酶复合体的方法,其特征在于,其是测定从活体分离的试样中存在的凝血酶-抗凝血酶复合体的方法,该方法通过使用权利要求1~3中任一项所述的凝血酶-抗凝血酶复合体测定试剂进行胶乳凝聚法来测定凝血酶-抗凝血酶复合体。

5. 一种抗体的筛选方法,其是利用胶乳凝聚法对测定从活体分离的试样中存在的凝血酶-抗凝血酶复合体时所使用的抗体进行筛选的方法,该方法包括:

准备抗体的候选抗体的工序;

使候选抗体与一定量的游离抗凝血酶反应的工序;

通过将所述工序后所得的反应液供于使用将凝血酶-抗凝血酶复合体固定化的基材的酶免疫测定法来测定抗体对游离抗凝血酶的反应性的工序;

将抗体对该游离抗凝血酶的反应性与抗体对凝血酶-抗凝血酶复合体的反应性进行比较的工序;以及

选择对凝血酶-抗凝血酶复合体的反应性为对游离抗凝血酶的反应性的100倍以上的抗体的工序。

6. 一种凝血酶-抗凝血酶复合体测定试剂,其特征在于,其包含结合在胶乳粒子上的且与抗凝血酶侧结合来识别凝血酶-抗凝血酶复合体的第一抗体和结合在胶乳粒子上的且与凝血酶侧结合来识别凝血酶-抗凝血酶复合体的第二抗体,

该凝血酶-抗凝血酶复合体测定试剂以使测定时的pH达到5.8~6.6的方式来构成。

7. 根据权利要求6所述的凝血酶-抗凝血酶复合体测定试剂,其包含第二试剂和第一试剂,

所述第二试剂包含结合有所述第一抗体的胶乳粒子及结合有所述第二抗体的胶乳粒子,

所述第一试剂包含pH为5.8~6.6的缓冲液。

8. 一种测定凝血酶-抗凝血酶复合体的方法,其特征在于,其是测定从活体分离的试样中存在的试样中的凝血酶-抗凝血酶复合体的方法,该方法通过使用权利要求6或7所述的凝血酶-抗凝血酶复合体测定试剂在pH为5.8~6.6的条件下进行胶乳免疫凝聚反应来测定凝血酶-抗凝血酶复合体。

## 凝血酶-抗凝血酶复合体的测定试剂及测定方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及对活体试样中的凝血酶(T)-抗凝血酶(AT) 复合体(TAT) 进行测定的试剂及方法。

### 背景技术

[0002] 凝血酶-抗凝血酶复合体(TAT) 是在血液凝固时产生在血液中的蛋白复合体,血液中的TAT的定量对于弥漫性血管内凝血(DIC) 等血栓形成的诊断有用。然而,TAT的存在量是游离抗凝血酶的存在量的约十万分之一,因此不容易测定。

[0003] 现在主流的TAT定量法包括西门子公司Enzygnost(注册商标)TAT micro等使用酶免疫测定法(ELISA) 的试剂盒及LSI MEDIENCE公司STACIA(注册商标)CLEIA TAT等使用化学发光酶免疫测定法(CLEIA) 的试剂盒,但均是需要固相-液相分离(B/F分离) 的测定法,需要烦杂的清洗作业,需要手动作业或专用设备。

[0004] 专利文献1~3及5中报道了在使用胶乳凝聚法的TAT测定中所用的试剂体系,但均是通过将体外合成的TAT用缓冲液进行稀释而制作的样品的测定,并未报道出能够使用胶乳凝聚法对人检体中的TAT准确地进行浓度测定的试剂。另外,这些文献记载的方法均是依存于抗体的特异性来构建TAT测定试剂或利用添加剂来避免由该交叉反应性带来的影响。专利文献4公开了通过使用不具有交叉反应性的抗体的夹心(sandwich) 法进行的TAT测定,但是并不具有对于在临床上利用而言充分的灵敏度。另外,在任一文献中均未就定量实际检体中的TAT时对测定反应时的pH的测定结果的影响进行研究,迄今为止并没有在利用胶乳免疫凝聚法测定TAT时以酸性侧的pH进行反应的实例。

[0005] 基于以上情况,在测定简便的胶乳凝聚法中需要高灵敏度、高精度地测定活体试样中的TAT的试剂及方法。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本特开2001-289850号公报

[0009] 专利文献2:日本特开平7-238099号公报

[0010] 专利文献3:日本特开2002-316999号公报

[0011] 专利文献4:日本特开平3-48158号公报

[0012] 专利文献5:日本特开2001-228153号公报

### 发明内容

[0013] 发明要解决的课题

[0014] 本发明的课题在于提供使用不必须进行B/F分离或清洗作业的胶乳凝聚法的活体试样中的TAT的测定试剂及测定方法、以及提供高效选择其所使用的抗体的方法。

[0015] 关于TAT的测定,从提高DIC诊断基准的灵敏度、特异度的观点出发,并且从用于在TAT测定值为正常时DIC为否定的排除诊断的使用可能性的观点出发,确认了其临床上的有

用性。但是,现在需要烦杂手艺的ELISA法和需要专用设备的CLEIA法成为主流,这也是测定普及慢的原因。

[0016] 因此,在测定简便的胶乳凝聚法中需要高灵敏度、高精度地测定活体试样中的TAT的试剂及方法。

[0017] 另外,在考虑其临床意义的情况下,需要与CLEIA法同等的能够以数纳克单位进行测定的检测灵敏度,但从所使用的粒子的特性等其测定原理考虑,利用胶乳凝聚法达成与CLEIA法同等的灵敏度是非常困难的课题。

[0018] 另外,像ELISA法、CLEIA法等那样,胶乳凝聚法不包括利用清洗等的B/F分离的工序,因此克服与除游离抗凝血酶等作为本来目标的测定对象物质以外的交叉反应性是构建试剂、测定法时的课题。

[0019] 用于解决课题的手段

[0020] 本发明人为了解决上述课题而进行了深入研究。其结果发现:在使用胶乳凝聚法的活体试样中的TAT的测定法中,通过使用具有交叉反应性的抗体,并利用该交叉反应性之差,从而可以制作高灵敏度且高精度的TAT测定试剂。即发现:通过使用通过间接抑制ELISA法选择的对TAT的反应性与对游离抗凝血酶的反应性之差为100倍以上的抗体作为抗体之一,从而可以将游离抗凝血酶的影响抑制成最小限而准确地测定活体试样中的TAT。进而发现:在使用胶乳免疫凝聚法的活体试样中的TAT的测定法中,通过在弱酸性的条件下进行凝聚反应,从而可以高灵敏度且特异性地测定活体试样中的TAT,以至完成本发明。

[0021] 即,本发明提供以下方案。

[0022] [1]一种凝血酶-抗凝血酶复合体(TAT)测定试剂,其特征在于,其包含结合在胶乳粒子上的且与抗凝血酶侧结合来识别TAT的抗体和结合在胶乳粒子上的且与凝血酶侧结合来识别TAT的抗体,

[0023] 上述与抗凝血酶侧结合来识别TAT的抗体对TAT的反应性为对游离抗凝血酶的反应性的100倍以上。

[0024] [2]根据[1]所述的TAT测定试剂,其特征在于,其以使测定时的pH达到5.8~6.6的方式来构成。

[0025] [3]根据[1]或[2]所述的TAT测定试剂,其包含第二试剂和第一试剂,

[0026] 所述第二试剂包含结合有上述与抗凝血酶侧结合来识别TAT的抗体的胶乳粒子及结合有上述与凝血酶侧结合来识别TAT的抗体的胶乳粒子,

[0027] 所述第一试剂包含pH为5.8~6.6的缓冲液。

[0028] [4]一种测定凝血酶-抗凝血酶复合体(TAT)的方法,其特征在于,其是测定从活体分离的试样中存在的TAT的方法,该方法通过使用[1]~[3]中任一项所述的TAT测定试剂进行胶乳凝聚法来测定TAT。

[0029] [5]一种抗体的筛选方法,其是利用胶乳凝聚法对测定从活体分离的试样中存在的TAT时所使用的抗体进行筛选的方法,该方法包括:准备候选抗体的工序;使候选抗体与一定量的游离抗凝血酶反应的工序;通过将上述工序后所得的反应液供于使用将TAT固定化的基材的酶免疫测定法来测定抗体对游离抗凝血酶的反应性的工序;将该抗体对游离抗凝血酶的反应性与抗体对TAT的反应性进行比较的工序;以及选择对TAT的反应性为对游离抗凝血酶的反应性的100倍以上的抗体的工序。

[0030] [6]一种凝血酶-抗凝血酶复合体(TAT)测定试剂,其特征在于,其包含结合在胶乳粒子上的且与抗凝血酶侧结合来识别TAT的第一抗体和结合在胶乳粒子上的且与凝血酶侧结合来识别TAT的第二抗体,

[0031] 该TAT测定试剂以使测定时的pH达到5.8~6.6的方式来构成。

[0032] [7]根据[6]所述的TAT测定试剂,其包含第二试剂和第一试剂,

[0033] 所述第二试剂包含结合有上述第一抗体的胶乳粒子及结合有上述第二抗体的胶乳粒子,

[0034] 所述第一试剂包含pH为5.8~6.6的缓冲液。

[0035] [8]一种测定凝血酶-抗凝血酶复合体(TAT)的方法,其特征在于,其是测定从活体分离的试样中存在的试样中的TAT的方法,该方法通过使用[6]或[7]所述的TAT测定试剂在pH为5.8~6.6的条件下进行胶乳免疫凝聚反应来测定TAT。

[0036] 发明效果

[0037] 以往,在选择免疫学测定法中所使用的抗体时,一般的做法是基于经验找出最佳组合。即,在尝试尽可能的组合的基础上选择就可靠性、灵敏度、特异性获得良好结果的组合的方法。但是,若适当组合多种抗体,则未必能够制造就灵敏度和特异性而言具有所需性能的试剂和构建测定体系,反而还存在完全无效果的情况。因此,大多情况下免疫学的测定法的构建大大依赖于抗体所具有的特异性,即使对于本领域技术人员而言要求过度负担的场面也不少。因此,难以制造可靠性、灵敏度、特异性高的试剂和构建测定体系。

[0038] 根据本发明,可以解决上述问题。即,可以有效地选择能够使用于胶乳凝聚法的抗体,还可以适时地向市场提供可靠性、灵敏度、特异性优异的试剂。

[0039] 另外,利用本发明所提供的胶乳凝聚法的试剂,可以既避免血浆基质等背景的影响又准确地测定(定量)活体试样中的微量的TAT。另外,可以利用通用自动分析装置进行测定,具有的优点是没有所谓基于手动作业的工序或专用设备的测定这样的限制。

[0040] 根据本发明,通过将反应时的pH保持为弱酸性,从而可以制备灵敏度、特异性均为高性能的试剂。若pH变高,则发现生理盐水空白、血浆空白、TAT反应性存在pH依存性地降低的倾向。若pH高于中性,则反应性下降,这是本发明人发现的意料之外的效果。因此,通过使反应时的pH为弱酸性范围,从而可以提供具有高反应性且特异性高的试剂。

## 附图说明

[0041] 图1为基于胶乳凝聚法的TAT测定方法的示意图。

[0042] 图2为基于间接抑制ELISA法的反应体系的示意图。

[0043] 图3为表示对基于间接抑制ELISA法的克隆TAT-5与各抗原的结合性进行评价的结果的图。

[0044] 图4为表示结合有各抗体的胶乳试剂与TAT的反应性的评价结果的图。

[0045] 图5为表示结合有各抗体的胶乳试剂与游离抗凝血酶的交叉反应性的评价结果的图。

[0046] 图6为表示使pH在6.0~7.2之间发生变化时的碱的吸光度的变化的图。

[0047] 图7为表示使pH在6.0~7.2之间发生变化时的扣除血浆碱后对TAT反应性的影响的图。

[0048] 图8为表示使pH在5.7~6.2之间发生变化时的碱的吸光度的变化的图(第一试剂的缓冲液为Bis-Tris的情况)。

[0049] 图9为表示使pH在5.7~6.2之间发生变化时的碱的吸光度的变化的图(第一试剂的缓冲液为MES的情况)。

[0050] 图10为表示使用本发明的试剂评价临床检体的测定结果与使用CLEIA法评价临床检体的测定结果的相关关系的图。

### 具体实施方式

[0051] 以下,将以与抗凝血酶侧结合来识别TAT的抗体作为第一抗体、以与凝血酶侧结合来识别TAT的抗体作为第二抗体来构成的TAT测定试剂的一例记载为一个实施方式,但是本发明的范围并不限于此。

[0052] 例如本发明的TAT测定试剂是用于测定活体试样中的TAT的、使用了分别结合有2种TAT抗体的胶乳粒子并基于利用夹心系的胶乳凝聚法的免疫测定试剂。

[0053] 第一抗体只要是与抗凝血酶侧结合来识别TAT的抗TAT抗体即可,但由于在血中的TAT的存在量与游离抗凝血酶的存在量相比为极微量,因此优选使用与游离抗凝血酶的交叉反应性小的抗TAT抗体。

[0054] 具体而言,本发明的TAT测定试剂优选为如下的TAT测定试剂,包含结合在胶乳粒子上的、与抗凝血酶侧结合来识别TAT的第一抗体和结合在胶乳粒子上的、与凝血酶侧结合来识别TAT的第二抗体,上述第一抗体对TAT的反应性为该抗体对游离抗凝血酶的反应性的100倍以上。与胶乳粒子结合的抗体可以使2种抗体分别结合在2种粒子上,也可以使多种抗体结合在1种粒子上,也可以将使1种抗体结合在多种粒子的结合体混合使用。

[0055] 如以下的实施例所示,通过使上述第一抗体对TAT的反应性比该抗体对游离抗凝血酶的反应性高至少100倍,从而得到充分的效果,这是意料之外的结果。即,第一抗体对TAT的反应性只要为该抗体对游离抗凝血酶的反应性的至少100倍以上即可,优选为1000倍以上,更优选为10000倍以上。交叉反应性越少越好,因此上限并无特别限制,但例如可以为不足100000倍或不足50000倍。

[0056] 在制备上述第一抗体时,可以是对除人以外的动物而言免疫了游离抗凝血酶的抗体,也可以是免疫了TAT的抗体,若是可以与抗凝血酶侧结合来识别TAT的抗体,则可以用于本发明。

[0057] 在此,在本申请发明中,“与抗凝血酶侧结合”是指:和在试样中存在最多的游离状态的抗凝血酶与游离凝血酶结合而形成复合体(TAT)的状态的抗凝血酶相结合。因此,在将具有形成复合体时的结构的抗凝血酶称作复合体型结构抗凝血酶、将具有未形成复合体时的结构的抗凝血酶称作游离型结构抗凝血酶(游离抗凝血酶)的情况下,“与抗凝血酶侧结合”是指与复合体型结构抗凝血酶结合。

[0058] 游离型结构抗凝血酶具有与复合体型结构抗凝血酶不同的结构。这是由于:游离型结构抗凝血酶以因与游离凝血酶结合形成复合体而使其结构发生变化的状态存在。

[0059] 作为第二抗体,只要是能够与凝血酶侧结合来识别TAT的抗体即可,可以使用与凝血酶特异性反应的抗体。在试样中几乎不存在游离凝血酶,因此大多情况下即使是对游离凝血酶具有交叉反应性的抗体也能利用。若是本领域技术人员,则可以适当选择使用。

[0060] 在制备该抗体时,可以是对除人以外的动物免疫了游离凝血酶的你抗体,也可以是免疫了TAT的抗体,若是可以与凝血酶侧结合来识别TAT的抗体,则可以使用在本发明中。

[0061] 在此,在本发明中,“与凝血酶侧结合”是指和试样中存在的游离状态的凝血酶与抗凝血酶结合而形成复合体(TAT)的状态的凝血酶相结合。因此,在将具有形成复合体时的结构的凝血酶称作复合体型结构凝血酶、将具有未形成复合体时的结构的凝血酶称作游离型结构凝血酶的情况下,“与凝血酶侧结合”是指与复合体型结构凝血酶结合。

[0062] 考虑游离型结构凝血酶有可能具有与复合体型结构凝血酶不同的结构。这是由于:游离型结构凝血酶以因与抗凝血酶结合形成复合体而使其结构发生变化的状态存在。

[0063] 上述的第一抗体及第二抗体可以使用多克隆抗体或单克隆抗体中的任一种。对于本领域技术人员而言,这些抗体可以按照公知的方法取得。

[0064] 作为在抗体制作用途对免疫原进行免疫的动物,可以使用绵羊、马、山羊、家兔、小鼠、大鼠等,尤其在多克隆抗体制作中优选兔子、山羊等。另外,还可以利用制作杂交瘤细胞的公知的方法得到单克隆抗体,此时,优选小鼠、大鼠或者家兔等。

[0065] 作为免疫原,可以如上述那样使用TAT,也可以在本申请发明中使用以结合有玻连蛋白的VTAT作为免疫原所制作的抗体。另外,在第一抗体的情况下,可以使用抗凝血酶,在第二抗体的情况下,可以使用凝血酶。

[0066] 这些免疫原可以使用以从活体采集的试样作为原料纯化得到的TAT,也可以使用将游离凝血酶和游离抗凝血酶混合而在体外合成的TAT。作为合成TAT,例如可以是能够作为生物制剂获得的凝血酶和抗凝血酶在试管内孵育得到的TAT,可以将大肠菌、哺乳动物细胞、感染杆状病毒的昆虫细胞等使用已知翻译表达体系进行表达的细胞回收并纯化后作为免疫原来使用。

[0067] 另外,在可以仅通过部分肽对立体结构的差异进行免疫的情况下,具体而言在想鉴定抗体的结合部位而制作抗体的情况下,就第一抗体的情况而言,也可以使用抗凝血酶来制作,就第二抗体的情况而言,也可以使用凝血酶的部分肽来制作。作为此时的抗原的肽序列的选择、肽片段的合成方法、免疫方法,可以使用已知的方法。

[0068] 参照图1对基于胶乳凝聚法的测定方法进行说明。如图1所示,在第一抗体与TAT的抗凝血酶侧结合、第二抗体与TAT的凝血酶侧结合的情况下,发生胶乳凝聚,基于此时的吸光度的值可以进行TAT浓度的测定。

[0069] 活体内的TAT和未形成TAT的游离抗凝血酶的存在比例,以健康人的测定值范围作为参考认为在1:60000~1:110000之间,一般认为以约1:100000的比例存在。另外,已知有在败血症或肝病中该存在比例发生变化的情况,但是即使在游离抗凝血酶量变少的情况下,也为1:50000左右。因此,若第一抗体对游离抗凝血酶也显示反应性,则难以进行TAT的定量。为此,要对TAT进行定量,需要使用对游离抗凝血酶的反应性低的抗体,并且认为需要对TAT的反应性在计算上为对游离抗凝血酶的反应性的50000~100000倍以上,结果发现:如以下的实施例所示,在本发明中,若对TAT的反应性为对游离抗凝血酶的反应性的100倍以上,则通过将该抗体用作第一抗体,从而可以充分地进行TAT的定量。

[0070] 在本发明中,“对TAT的反应性为对游离抗凝血酶的反应性的100倍以上”,可列举对各抗原的亲合性之比为100倍以上的情况、后述的以间接抑制ELISA评价时的、显示一定比例的抑制率所需的抗原量之比为100倍以上的情况等。

[0071] 如下说明将对TAT的反应性为对游离抗凝血酶的反应性的100倍以上的抗体利用间接抑制ELISA进行评价或筛选的情况。

[0072] 首先,准备与抗凝血酶侧结合来识别TAT的抗体(第一抗体的候选抗体)。此种抗体只要选择利用基于后述的杂交瘤的单克隆抗体产生法等得到抗体后结合部位为抗凝血酶侧的、识别TAT的抗体即可。当然,预先在有结合部位为抗凝血酶侧的、识别TAT的抗体存在的情况下将其供于以下的评价体系即可。

[0073] 即,使候选抗体与一定量(例如0.1、0.5、1、5、10、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的TAT、或包含可以抑制TAT的反应的抗原的溶液反应充分的时间(例如12小时)。接着,使上述反应液与将TAT固定化的基材反应一定时间。之后,进行清洗操作后,使用标记二次抗体测定与基材上的TAT结合的抗体的量(抗体残留率)。

[0074] 例如,首先,在没有抑制该抗体的反应的抗原存在的条件下,将一定量的TAT固相于板等基材。对于本领域技术人员而言,固相于基材的抗原(TAT)的量可以考虑所使用的抗原的分注量与评价对象的抗体的种类的关系进行适当设定。

[0075] 在没有抑制该抗体的反应的抗原存在的条件下,使各浓度(例如0.04~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的上述第一抗体的候选抗体与将上述TAT固定化的基材反应一定时间。之后,进行清洗操作后,使用标记二次抗体(抗小鼠IgG—HRP),测定与基材上的TAT结合的抗体的量。确定吸光度达到1.0附近(若是表1的记载方法则为1000)时的抗体浓度。可以将该抗体浓度作为由抗原所致的抑制时的抗体浓度(表3:反应时浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ))。

[0076] 接着,使由上述方法确定的浓度的候选抗体与一定量(例如0.1、0.5、1、5、10、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的TAT或包含游离抗凝血酶的溶液反应充分的时间(例如12小时)。接着,使上述反应液与固定化TAT的基材反应一定时间。之后,进行清洗操作后,使用标记二次抗体(抗小鼠IgG—HRP)测定与基材上的TAT结合的抗体的量(抗体残留率)。

[0077] 予以说明,抗体残留率可以将未实施基于抗原的吸收时所得的检测值设为100%来计算。

[0078] 在抗体对游离抗凝血酶的反应性高的情况下,可以与TAT结合的抗体的量减少,因此利用标记二次抗体检测的抗体的量变少(抗体残留率变低),另一方面,在抗体对游离抗凝血酶的反应性低的情况下,可以与TAT结合的抗体大量残留,因此利用标记二次抗体检测到的抗体的量变多(抗体残留率变高)。

[0079] 将该抗体残留率与最初使TAT与抗体反应(以TAT进行抑制反应)后再使反应液与固体化TAT反应时的抗体残留率进行比较。

[0080] 而且,例如在加入50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 游离抗凝血酶进行抑制反应时的抗体残留率为50%的情况下,由以上述的TAT进行抑制时的结果来计算显示相同的抗体残留率所需的TAT的量。在以TAT进行抑制时,只要达成抗体残留率50%所需的TAT抑制抗原的量不足0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,则可以使对TAT的反应性为对游离抗凝血酶的反应性的100倍以上。

[0081] 可以将如此选择的抗体选作第一抗体。予以说明,在第一抗体为单克隆抗体的情况下,对TAT的亲合性( $K_d$ )优选为 $10^{-8}$ 以下,但是,就本领域技术人员而言,可以以对TAT的亲合性的值作为参考来适当选择适合于胶乳试剂的抗体。

[0082] 本发明中使用的抗体包含抗体片段。上述抗体片段为所需的抗体的片段,而且是具有与本来的抗体相同的反应性的抗体片段。本发明中可以使用的抗体片段包含例如Fab、

Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或Fv等。这些片段例如可以将抗体利用常规方法通过蛋白分解酶进行消化、接着按照蛋白的分离、纯化的常规方法来得到。这些片段可以直接固相于胶乳粒子来使用,也可以将按Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段制备的片段固相于胶乳粒子。从避免抗体对Fc片段的非特异反应的观点出发,更优选Fab'、F(ab')<sub>2</sub>。

[0083] 本发明中使用的抗体可以如下得到:首先,利用基于杂交瘤的单克隆抗体产生法等得到TAT抗体(候选抗体),之后,从TAT抗体(候选抗体)中按照如上所述的方法及基准选择与游离抗凝血酶的交叉反应性低的抗体,具体而言选择对TAT的反应性为对游离抗凝血酶的反应性的100倍以上的抗体。

[0084] 成为候选的抗体例如可以利用基于由公知的细胞融合法制作的杂交瘤的单克隆抗体产生法得到。作为抗体产生细胞,可以选自除人以外的动物例如小鼠、大鼠、豚鼠等。杂交瘤及单克隆抗体的制备可以按照常规方法例如续生化学实验讲座(日本生化学会编)或免疫生化学研究法(日本生化学会编)记载的方法来进行。

[0085] 作为第二抗体,只要是与凝血酶侧结合来识别TAT的抗体,则并无特别限制。在单克隆抗体的情况下,对TAT的亲合性(Kd)优选为10<sup>-8</sup>以下,但是,对于本领域技术人员而言,可以以对TAT的亲合性的值作为参考来适当选择适合于胶乳试剂的抗体。关于选择抗体的方法,可以使用与第一抗体同样地制作的抗体。

[0086] 第一抗体与第二抗体的组合只要在胶乳凝聚法中能够进行TAT的测定,则并无特别限制,优选选出血浆等活体试样中所含的基质(背景)的影响最少的抗体组合。

[0087] TAT测定试剂所要求的灵敏度,需要可以测定能够明确地区分健康人和患者的基准值或者该基准值的2倍浓度,因此本发明的试剂优选为能够对活体试样中的10~15ng/mL的TAT进行定量的试剂,更优选为能够对3~4ng/mL的TAT进行定量的试剂,进一步优选为即使对1ng/mL左右的浓度也能进行定量的试剂。

[0088] 结合上述的第一抗体及第二抗体的胶乳粒子,只要是在胶乳凝聚反应中可以使用的胶乳粒子,则并无特别限制,平均粒径优选为0.05μm~0.5μm,更优选为0.2~0.4μm。

[0089] 所使用的胶乳粒子的种类可以仅使用1种胶乳粒子,也可以使用多种胶乳粒子。例如可以将粒径不同的胶乳粒子组合使用。胶乳粒子实质上难以以单一粒径进行制造,因此以全体粒子的平均粒径来进行规定。因此,在平均粒径0.05μm~0.5μm的情况下,即使是包含平均粒径不在该范围的胶乳粒子的情况,有时也属于本发明。对于本领域技术人员而言,包含粒径不同的胶乳粒子是在常识的范围内,就本领域技术人员而言,可以使用包含未大大偏离该粒径分布的粒子群的溶液来构建胶乳试剂。

[0090] 予以说明,该平均粒径可以利用公知的方法来测定,例如通过使用透射型电子显微镜装置的图像解析来计算。

[0091] 作为本发明的胶乳粒子,只要是通常本领域中所使用的胶乳粒子,则并无特别限定,可列举例如:由使苯乙烯、氯乙烯、丙烯腈、乙酸乙烯酯、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯等乙烯基系单体进行聚合而得的均聚物(例如聚苯乙烯、甲基丙烯酸聚合物、丙烯酸聚合物等)形成的粒子;由丁二烯系共聚物(例如苯乙烯-丁二烯共聚物、甲基丙烯酸甲酯-丁二烯共聚物、丙烯腈-丁二烯共聚物等)形成的粒子;由除此以外的共聚物(例如苯乙烯-苯乙烯磺酸盐共聚物、甲基丙烯酸酯共聚物、丙烯酸酯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共聚物等)形成的粒子。可列举具有羧基、伯氨基、氨基甲酰基(-CONH<sub>2</sub>)、羟基、醛基等作为官能团且基体由

上述有机系微粒形成的粒子。

[0092] 作为将抗体固相于胶乳粒子的方法,只要依据公知的方法进行即可,例如可以使抗体和胶乳粒子悬浮于缓冲液中、在25℃下使其反应1小时后利用离心分离、封闭处理等通常在本领域中进行的处理来得到。另外,还可以选择将抗体和胶乳粒子通过化学键进行固相的方法、通过生物素-亲和素反应将抗体固相的方法。

[0093] 在使抗体与胶乳粒子结合时,抗体可以在能维持对上述的TAT的反应性及特异性的条件下进行。

[0094] 从容易进行适合的试剂的制备的方面出发,作为将第一抗体加以固相的第一胶乳粒子、将第二抗体加以固相的第二胶乳粒子,可以按照抗体的种类来制备固相胶乳液,也可以使第一抗体和第二抗体固相于1种胶乳粒子来进行试剂的制备。就本领域技术人员而言,可以适当设计如何使抗体与胶乳粒子固相来进行试剂的制备。

[0095] 本发明的试剂可以是1个试剂体系,也可以是2个试剂体系。在本发明的试剂为1个试剂体系的情况下,在活体试样中添加将上述抗体固相的胶乳粒子悬浮液,使其发生抗原抗体反应,由此可以测定活体试样中的TAT。在本发明的试剂为2个试剂体系的情况下,将以缓冲液成分为主体的第一试剂添加到活体试样后,再添加包含将上述抗体加以固相后的胶乳粒子的第二试剂,由此使其发生抗原抗体反应,可以测定活体试样中的TAT。

[0096] 胶乳粒子的凝聚程度使用例如吸光度来测定,从预先求得的标准品的校准曲线求出其浓度,由此可以对检体中的TAT浓度进行定量。予以说明,只要在吸光度的测定波长通常为340nm~1000nm、优选为500nm~900nm的条件下进行测定即可。关于对胶乳凝聚反应进行测光的时间,可以根据在发生胶乳凝聚反应的时间的单位时间的变化速度或一定时间的变化量进行测光。例如在测定吸光度的情况下,可以根据胶乳凝聚反应开始30秒钟后到5分钟后的单位时间的吸光度变化速度或一定时间的吸光度变化量来进行测光。反应温度优选为10~50℃,更优选为20~40℃。反应时间可以适当地确定,例如可以利用通用自动分析机在10~15分钟的反应时间内进行测定。予以说明,就本领域技术人员而言,在使用光学设备或通用自动分析机的分析中,可以按照公知的方法适当确定反应温度、反应时间、测定波长、测定时间、试剂构成、胶乳浓度、胶乳固定化的抗体浓度、各种添加剂浓度。

[0097] 本发明中使用的胶乳粒子的浓度,只要是可以在基于胶乳凝聚法的免疫学测定试剂中的浓度,则并无特别限定,但为了测定TAT所需的反应时的胶乳粒子的浓度优选为0.005w/v%~0.2w/v%,更优选为0.01w/v%~0.1w/v%。

[0098] 可以在本发明的试剂中应用的被检试样,只要是有可能含有TAT的被检试样,则并无特别限定,但优选为活体试样,也可以为培养细胞,尤其可以适合用于血清、血浆的测定。优选为来自哺乳动物的试样,更优选为来自人的试样。

[0099] 本发明的试剂除将抗体固定化的胶乳粒子以外还可以进一步含有可以添加到基于胶乳凝聚法的免疫学测定试剂中的添加剂、例如缓冲液、凝聚促进剂、非特异反应抑制剂、敏化剂等。作为可以添加到本发明的试剂中的敏化剂,可列举海藻酸钠、海藻酸丙二醇酯等。另外,作为可以添加到本发明的试剂中的凝聚促进剂,适合使用水溶性高分子和蛋白质。可列举例如:葡聚糖、硫酸葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙二醇、聚乙烯基吡咯烷酮等水溶性高分子;牛血清白蛋白等白蛋白类;γ-球蛋白等球蛋白类。

[0100] 另外,也可以添加第三抗体来使用。关于第三抗体的使用,例如在希望能够从低浓

度到高浓度广泛地测定TAT测定试剂的可测定范围的情况下,优选使用反应速度不同的抗体作为第三抗体。

[0101] 作为上述缓冲液,优选在pH5.8~6.6具有缓冲能力的缓冲液,更优选为6.0~6.4,进一步优选为6.1~6.3,特别优选为6.15~6.25,最优选为约6.2。若为1试剂体系,则只要将试剂的pH调节为5.8~6.6即可,若为2试剂体系,则只要在混合时以使pH达到5.8~6.6的方式构成即可。例如可列举以下的方式:在由以缓冲液成分为主体的第一试剂和包含将抗体固相后的胶乳粒子的第二试剂构成的情况下,预先将第一试剂的pH调节为5.8~6.6,并且在将两试剂混合时使混合液的pH达到5.8~6.6。

[0102] pH可以利用pH调节剂来调节,但优选利用缓冲液进行调节。适合使用Tris缓冲液、Bis-Tris缓冲液、磷酸缓冲液或Good's缓冲液等,反应时的缓冲液浓度优选为10~500mmol/L,更优选为20~200mmol/L。

[0103] 予以说明,在将血液试样与试剂混合时的pH在5.8~6.6以外的情况下,可以另行利用pH调节剂等进行调节。

[0104] 作为可以添加到本发明的试剂中的非特异反应抑制剂,可列举:针对非特异反应的原因物质的抗体或受体、Tris缓冲液、磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、乙酸缓冲液或Good's缓冲液等缓冲液类;EDTA、CyDTA、DTPA、EGTA、NTA、NTP等螯合剂;氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硫酸钙、硫酸镁、碳酸钙、碳酸钠等盐类;脂肪酸二乙醇酰胺、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、脂肪酸山梨糖醇酐酯、烷基聚葡萄糖苷、烷基单甘油基醚、聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯、脂肪酸烷醇酰胺、烷基糖苷等非离子性表面活性剂。

[0105] 本发明的试剂可以包含能够作为标准物质使用的TAT。TAT可以从活体纯化的TAT,也可以是由基因重组等合成的TAT。作为合成TAT,例如可以通过将能够作为生物制剂获得的凝血酶和抗凝血酶在试管内孵育而得到。另外,也可以在大肠杆菌、哺乳动物细胞、感染杆状病毒的昆虫细胞等中回收使用已知的翻译表达体系进行表达的细胞并进行纯化后,将其混合来合成TAT。

[0106] 实施例

[0107] 实施例1合成TAT的制备

[0108] 将市售的人凝血酶制剂(日本血液制剂机构制)和抗凝血酶制剂(日本血液制剂机构制)用PBS(以9.6g/L溶解DuIbecco's PBS(-)粉末“Nissui(日水制药株式会社)”)进行稀释,并按照1:3的摩尔比混合后,使其在37℃反应30分钟。30分钟后,以使达到0.75mM的方式添加DFP(氟磷酸二异丙酯、和光纯药公司制),停止反应。

[0109] 由于在所得的反应物中包含未反应的凝血酶、抗凝血酶,因此利用以预先包含500mMNaCl的50mM Tris-HCl缓冲液(pH7.4)平衡化的Hi Load26/60Superdex 200HR(GE HEALTHCARE公司制)进行纯化。

[0110] 在TAT馏分用SDS-PAGE确认后,进行回收。所得的TAT用包含0.5%的BSA的生理盐水进行稀释,使用CLEIA试剂(STACIA(注册商标)CLEIA TAT、LSI MEDIENCE公司制)进行了评价。将其作为合成TAT来使用。

[0111] 实施例2抗TAT抗体的制备

[0112] 细胞融合法按照安藤民卫、岩崎辰夫/著“单克隆抗体/杂交瘤和ELISA”(讲谈社)来实施。

[0113] 将实施例1制备的合成TAT 50 $\mu$ g与弗氏完全佐剂(DIFCO公司制)混合,作为给予抗原。

[0114] 每隔2周对BALB/c小鼠(雌性、4周龄)给药3次,第4次的给予量是静脉注射半量25 $\mu$ g。

[0115] 1周后,从脾脏分离淋巴细胞,与骨髓瘤细胞P3x63-Ag.8混合后,使用聚乙二醇(PEG4000、Merck公司制)实施细胞融合。

[0116] 利用HAT选择培养基选择杂交瘤,以对合成TAT的结合活性为指标筛选1周后产生目标抗体的杂交瘤。即,分别用0.05M碳酸缓冲液(pH9.5)将合成TAT稀释成0.2 $\mu$ g/mL,对免疫板(Maxisorp、NUNC公司制)添加50 $\mu$ L/孔。在4 $^{\circ}$ C下使其反应过夜后,用包含0.05% Tween-20的PBS清洗3次,对各孔添加100 $\mu$ L包含1.0%BSA的PBS,进行封闭。

[0117] 接着,对各孔添加50 $\mu$ L培养上清液,使其在37 $^{\circ}$ C下反应1小时后,用包含0.05% Tween-20的PBS清洗3次。将过氧化物酶标记抗小鼠免疫球蛋白抗体(Dako公司制)用包含0.05% Tween-20的PBS稀释成1000倍,对各孔添加50 $\mu$ L。

[0118] 在37 $^{\circ}$ C下反应1小时后,同样地清洗5次,对各孔添加邻苯二胺溶液(和光纯药公司制)50 $\mu$ L。在室温下反应5~10分钟后,用2N硫酸溶液停止反应。

[0119] 用孔板分光光度计(EL312e、BIO-TEK INSTRUMENTS公司制)测定492nm的吸光度。选择产生与合成TAT的反应良好的抗体的细胞,利用极限稀释法进行克隆。10天后,进行筛选,取得产生与合成TAT反应的抗体的杂交瘤。

[0120] 实施例3抗凝血酶抗体的制备

[0121] 利用与实施例2同样的方法,以免疫抗原作为凝血酶,得到抗凝血酶抗体。选择与凝血酶特异性反应的抗体,并将其中的单克隆体作为抗凝血酶抗体(T-1)来使用。

[0122] 实施例4基于间接抑制ELISA的抗体特异性的评价

[0123] 利用间接抑制ELISA法进行了各抗体的反应性的评价。基于间接抑制ELISA法的反应体系的示意图如图2所示。

[0124] 将所要评价的浓度0.04~0.4 $\mu$ g/mL的识别TAT的抗体(抗TAT抗体)候选与抑制抗原(凝血酶原(Enzyme Research公司制)、凝血酶、抗凝血酶、合成TAT)混合,进行孵育。使被部分抑制的该抗体候选作为一次抗体与固相化于96孔板的合成TAT结合。再使过氧化物酶标记抗小鼠免疫球蛋白抗体(Dako公司制)作为二次抗体来结合,添加发色基质,测定吸光度。另外,由发色的变化率计算抗体的残留率。

[0125] 关于特定的抗体(TAT-5),使用各抑制抗原时的吸光度如表1所示,由吸光度计算的抗体的残留率如表2所示。

[0126] 例如,TAT的抑制抗原浓度为10 $\mu$ g/mL时的残留率为 $285/1066 \times 100 = 26.7(\%)$ 。对各抗体的各抗原浓度计算残留率。予以说明,在表中,Pro-T表示凝血酶原,T表示凝血酶,AT表示抗凝血酶。

[0127] 表1 间接抑制ELISA的测定结果

[0128]

抑制抗原	Pro-T	T	AT	TAT
0	1066	1066	1066	1066
0.016	1074	1059	1059	1063

0.08	1062	1062	1059	1045
0.4	1085	1067	1065	965
2	1064	1049	1033	661
10	1071	1057	1001	285
50	1072	1056	789	112

[0129] (抑制抗原浓度; $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,吸光度( $492\text{nm}\times 1000$ ),各 $N=2$ 测定(平均值))

[0130] 表2 抗体残留率(%)

[0131]

抑制抗原	Pro-T	T	AT	TAT
0	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
0.016	100.8%	99.3%	99.3%	99.7%
0.08	99.6%	99.6%	99.3%	98.1%
0.4	101.8%	100.1%	99.9%	90.5%
2	99.8%	98.4%	96.9%	62.0%
10	100.5%	99.2%	93.9%	26.7%
50	100.6%	99.1%	74.0%	10.5%

[0132] (抑制抗原浓度 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

[0133] 另外,计算抑制率与以抗凝血酶 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 施加抑制时的残留率同等的TAT抗原量并进行比较,由此求得TAT对抗凝血酶的反应性差(倍率)。若该差异较大,则意味着与抗凝血酶相比对TAT的特异性强。计算通过绘制TAT的抑制曲线(抑制抗原添加浓度对数-残留率%)并使用样条函数来进行。

[0134] 例如在TAT-5的情况下,抗凝血酶 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 的残留率为74.0%,与该残留率同样时的TAT抗原量为 $1.144\mu\text{g}/\text{mL}$ 。即,反应性之差为 $50/1.144=44$ 倍。(图3)。

[0135] 此外,对27种抗体克隆进行上述倍率的计算。添加TAT和抗凝血酶的量的差异(倍率)为100倍以上的抗体存在13种,添加TAT和抗凝血酶的量的差异(倍率)为1000倍以上的抗体存在7种,添加TAT和抗凝血酶的量的差异(倍率)为10000倍以上的抗体存在2种。5种抗体如表3所示。

[0136] 表3

克隆	反应时浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$50\mu\text{g}/\text{mL}$ AT抑制 (残留%)	与AT $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 同等 抑制的TAT ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	倍率(倍)
TAT-1	0.04	88.2	0.001	49892
TAT-2	0.08	92.3	0.029	1700
TAT-3	0.08	89.4	0.290	218
TAT-4	0.08	18.0	0.720	89
TAT-5	0.40	74.0	1.144	44

[0137] 实施例5胶乳凝聚法试剂的TAT反应性的评价

[0138] 使实施例4的利用间接抑制ELISA评价的抗凝血酶侧抗体(TAT-1、TAT-2、TAT-3、

TAT-4、TAT-5) 及实施例3中得到的凝血酶侧抗体(T-1)在胶乳粒子上致敏,并评价了其反应性。

[0140] 抗体在胶乳粒子上的致敏如下进行:使各个抗体吸附于0.32 $\mu$ m的聚苯乙烯胶乳粒子上,用0.3%BSA溶液进行封闭处理后,通过离心处理以0.05%叠氮化钠(Kishida化学公司制)溶液进行清洗后,使其再度分散于0.05%叠氮化钠溶液中而进行。

[0141] 制备包含上述制作的抗体致敏后的胶乳粒子的试剂,评价对TAT的反应性。所使用的试剂的组成如以下所示。第一试剂使用100mM Bis-tris(同仁化学公司制)pH6.0、500mM NaCl、0.15%BSA。第二试剂使用的是:以使各抗体致敏粒子在波长700nm的吸光度达到1.0的方式用0.05%叠氮化钠溶液稀释并混合后的试剂。

[0142] 由于在血清中包含大量的TAT,因此将其用包含0.5%的BSA的生理盐水进行稀释,并用CLEIA试剂进行评价后,作为血清TAT来使用。作为测定用试样,使用的是:将评价后的血清TAT用合并血浆(VITRO LOGIC公司制)以使TAT浓度达到1000ng/mL的方式稀释后的物质。

[0143] 作为测定设备,使用7170S(Hitachi High-Technologies公司制)。测定用参数设定为样品量12 $\mu$ L、第一试剂90 $\mu$ L、第二试剂90 $\mu$ L、主波长570nm、

[0144] 副波长800nm,从测光点第34点的吸光度减去第20点的吸光度再使其为10000倍时的值作为 $\Delta$ Abs来实施测定。

[0145] 结果如图4所示。就表3所示的5种抗体而言,相对于未添加TAT,TAT1000ng/mL的反应性均以 $\Delta$ Abs计为100以上。

[0146] 表3中的TAT-1、TAT-2、TAT-3可以利用胶乳凝聚法确认到高反应性。另外,对TAT-4、TAT-5的抗体也确认到比上述TAT-1、TAT-2、TAT-3小的反应性。

[0147] 实施例6胶乳凝聚法试剂与抗凝血酶的交叉反应性评价

[0148] 使用在将实施例5中记载的人血清用包含0.5%BSA的生理盐水稀释成1000ng/mL的样品中以成为250、500 $\mu$ g/mL的方式进一步添加抗凝血酶得到的样品,对制备的试剂与抗凝血酶的交叉反应性进行了评价。

[0149] 将未添加抗凝血酶时的反应性与添加各浓度的抗凝血酶时的反应性进行了比较。

[0150] 测定用试剂、测定设备、测定参数均与实施例4同样地实施。评价中使用的抗TAT抗体的种类为TAT-1、TAT-2、TAT-3、TAT-4、TAT-5。

[0151] 胶乳试剂与抗凝血酶的交叉反应性的评价结果如图5所示。实施例4的以间接抑制ELISA得到100倍以上的特异性的抗体(TAT-1、TAT-2、TAT-3)即使在添加抗凝血酶浓度500 $\mu$ g/mL时也保持70%以上的反应性。另一方面,关于100倍以下的抗体(TAT-4、TAT-5),随着抗凝血酶浓度的增加,均确认到反应性极度降低(图5)。

[0152] 对实施例5的胶乳凝聚反应体系中确认到反应性的各抗体利用ELISA法确认交叉反应性的结果可知:就TAT-1、TAT-2、TAT-3的各抗体而言,在胶乳凝聚的两反应体系中确认到高特异性,与此相对,TAT-4、TAT-5的各抗体虽然利用胶乳凝聚法观察到反应性,但是特异性并不充分。

[0153] 因此,在实施例4的利用间接抑制ELISA确认到的抗体的反应性之差为100倍以上时,确认到:这些抗体非常适合作为试剂来使用。

[0154] 实施例7第一试剂pH的影响

[0155] 使pH在5.7~7.2之间发生变化来评价胶乳试剂的pH对反应性的影响。

[0156] 关于试剂组成,作为第一试剂,使用100mM Bis-tris或MES(同仁化学公司制)、700mM NaCl、0.15%BSA、0.20%海藻酸钠(和光纯药公司制)、0.05%EmuIgen 150(花王公司制),作为第二试剂,抗凝血酶侧抗体使用TAT-1,凝血酶侧抗体使用T-1,以使各抗体致敏粒子在700nm的吸光度达到1.0的方式用0.05%叠氮化钠溶液进行稀释并混合。在胶乳粒子上的抗体致敏除使用粒径0.20 $\mu$ m的粒子以外与实施例5同样地实施。

[0157] 测定对象样品的制备使用包含0.5%BSA的生理盐水(记为SaIine)、人合并血浆(记为PIasma)。另外,将利用CLEIA试剂评价的人血清用上述合并血浆稀释成各浓度(10、50、100ng/mL)后,作为TAT样品。测定设备、参数与实施例4同样地进行。

[0158] 使用Bis-tris作为第一试剂的缓冲液并使pH在6.0~7.2之间发生变化时对反应性的影响出现如下的倾向。首先,在pH6.7下SaIine Base达到0以下(图6)。除去血浆碱后的对TAT反应性的影响出现随着pH变高而使反应性逐渐下降的倾向(图7)。

[0159] 可知:以能够高灵敏度地测定TAT的试剂性能为目标,并且以TAT浓度为50ng/mL时的信号( $\Delta$  Abs)100以上为1个指标,此时,反应液中的pH优选为6.6以下(图7)。

[0160] 进而,以空白的抑制和反应性的兼顾为目标,对pH5.7~6.2时对空白值的影响进行了调查。其结果存在以下倾向:在使用Bis-tris、MES中的任一种缓冲液的情况下,空白的吸光度随着pH上升而变低。尤其判明:空白的吸光度在pH5.7~5.8之间的降低大,在pH6.0~pH6.2之间吸光度变为100以下(图8、9)。

[0161] 若pH变高,则出现SaIine空白、PIasma空白、TAT反应性发生pH依赖性地降低的倾向。若pH高于中性,则反应性降低,这是本发明人等发现的意料之外的效果。

[0162] 由以上情况可知:从空白抑制的观点出发,pH的下限为5.8,特别优选pH6.2,从维持反应性的观点出发,pH的上限为6.6,特别优选为6.2。

[0163] 实施例8使用临床检体的相关试验

[0164] 使用临床检体验证本发明的TAT测定胶乳试剂是否能够用于血中的TAT浓度测定。

[0165] 使用试剂组成如下所示制备的试剂。将100mM Bis-tris pH6.2、700mM NaCl、0.05%EmuIgen 150、0.20%海藻酸钠、0.15%BSA作为第一试剂。第二试剂使用与实施例7同样的试剂。

[0166] 对照试剂使用CLEIA试剂来测定。就标准品而言,将TAT校准器(LSI MEDIENCE公司制)与胶乳试剂、CLEIA试剂一起使用。

[0167] 使用检体使用20个柠檬酸血浆检体。测定设备、参数均与实施例4同样地测定。CLEIA试剂的测定设备使用STACIA(LSI MEDIENCE公司制)依据文档附件记载的参数实施了测定。

[0168] 利用两试剂进行测定得到的结果如图10所示。

[0169] 本发明的胶乳试剂在3ng/mL~120ng/mL的范围下,即使在临床检体中也显示与以往的基于CLEIA试剂的测定试剂良好的相关性。若使用本发明,则可以不进行B/F分离等处理便可高灵敏度地进行临床检体的测定。

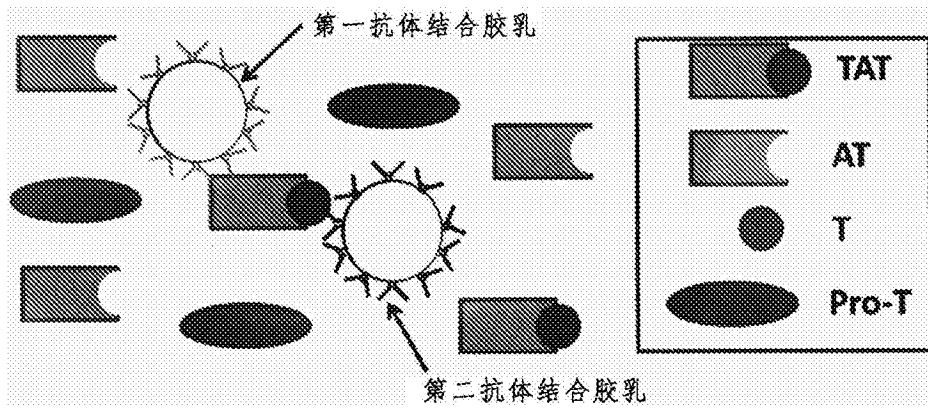


图1

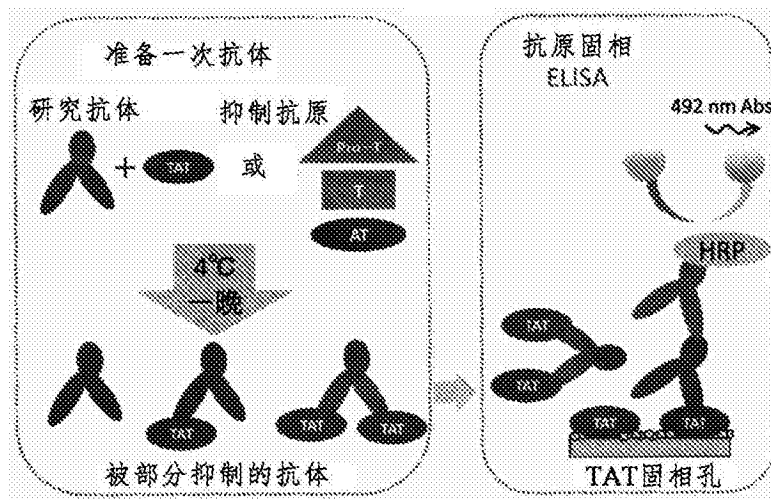


图2

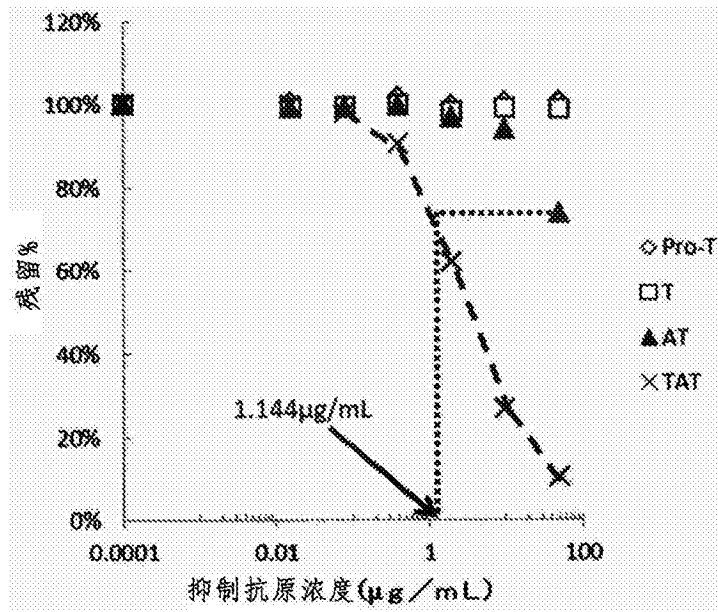


图3

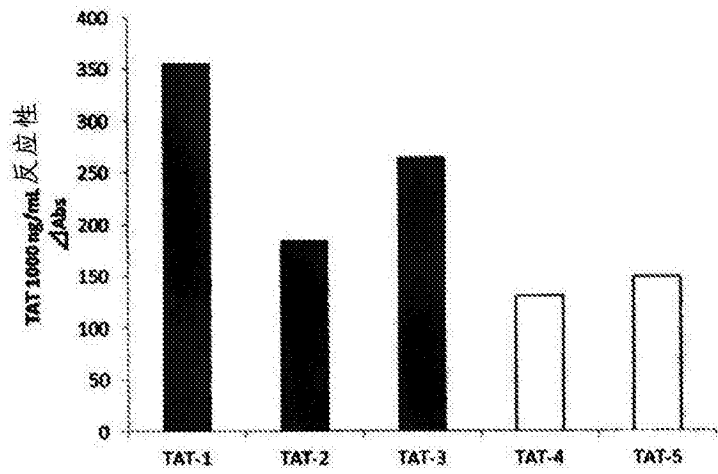


图4

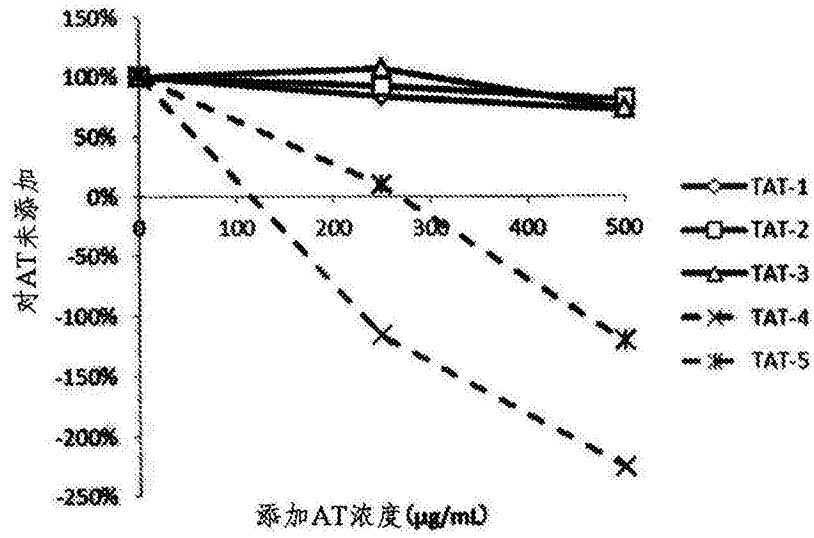


图5

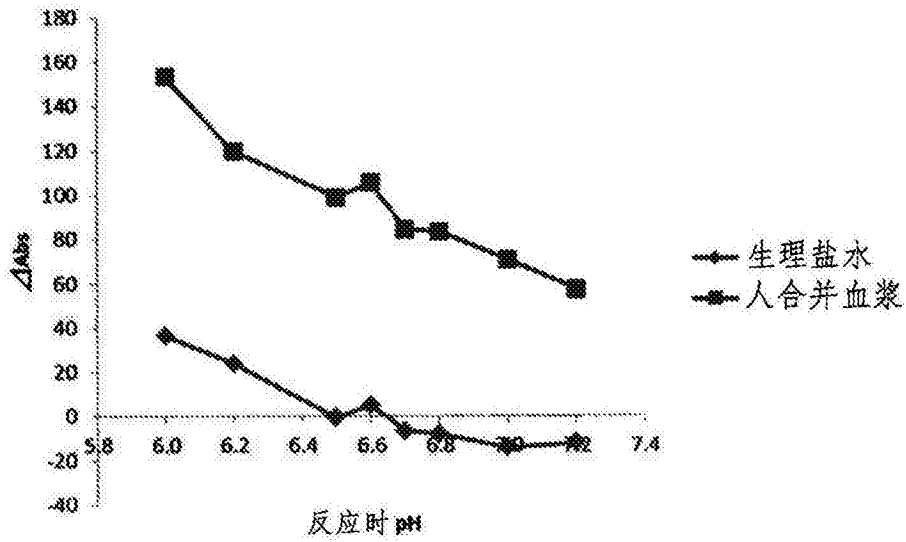


图6

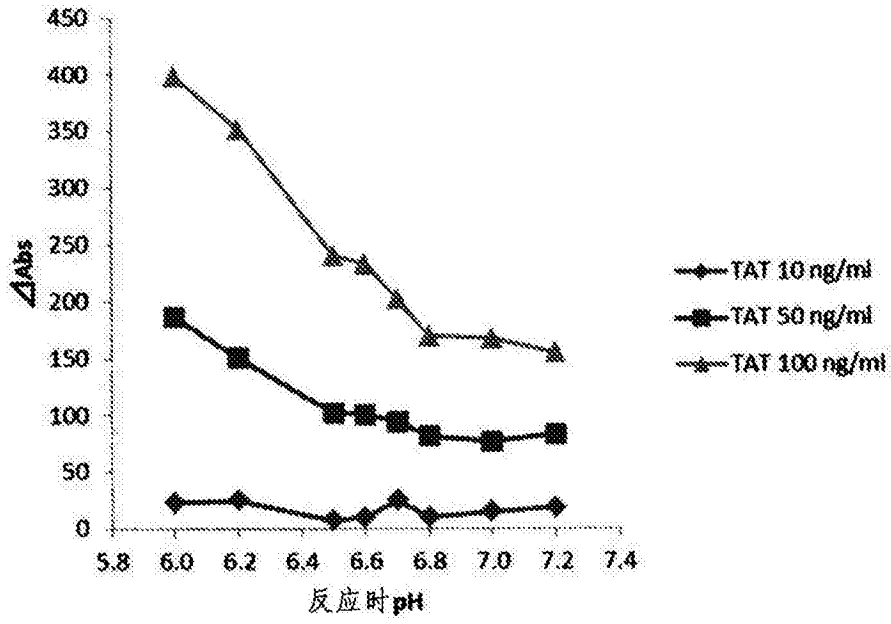


图7

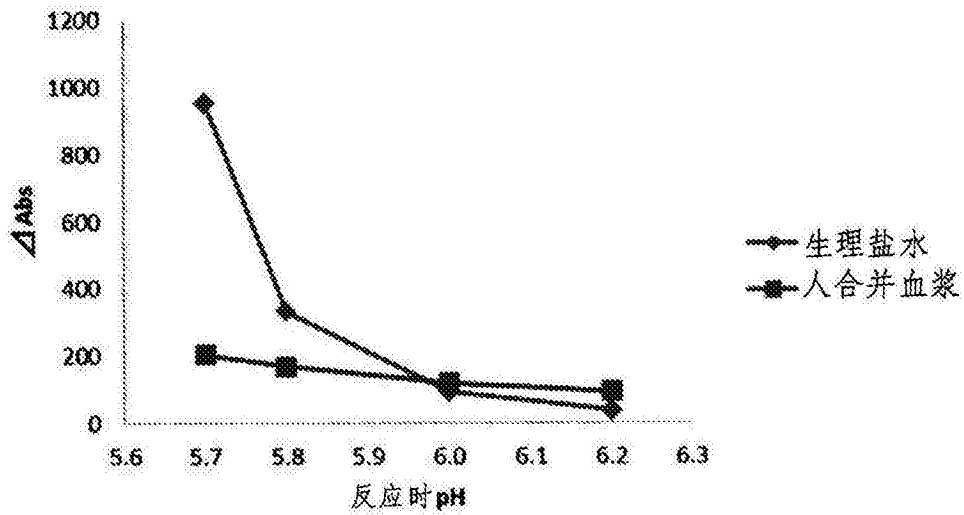


图8

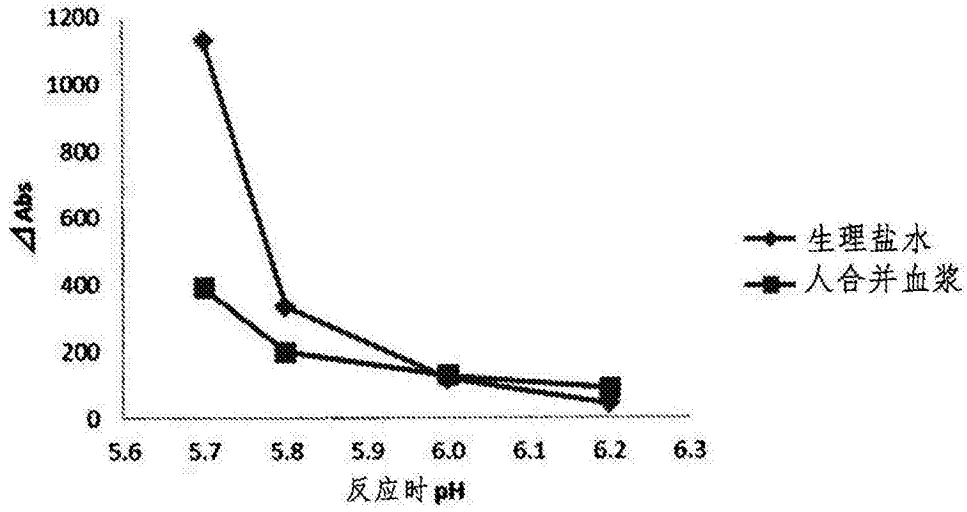


图9

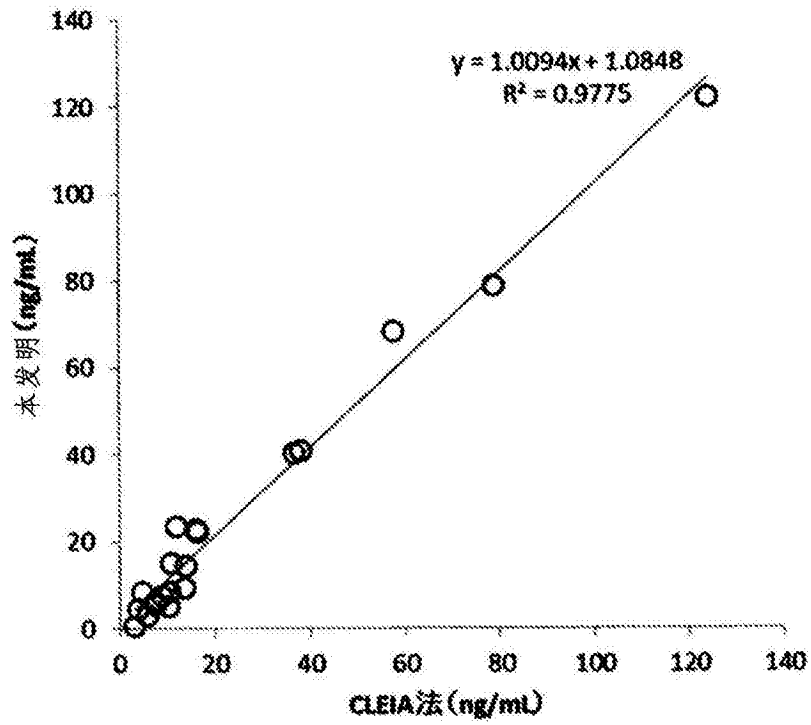


图10

专利名称(译)	凝血酶-抗凝血酶复合体的测定试剂及测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107533050A</a>	公开(公告)日	2018-01-02
申请号	CN201680017680.5	申请日	2016-03-29
[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)	美迪恩斯生命科技株式会社		
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	吉田竜也 杨宇航		
发明人	吉田竜也 杨宇航		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/5306 G01N33/54333 G01N33/54353 G01N2333/974		
代理人(译)	王玉玲 李雪春		
优先权	2015074168 2015-03-31 JP 2015074173 2015-03-31 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种凝血酶-抗凝血酶复合体(TAT)测定试剂，其特征在于，其包含结合在胶乳粒子上的与抗凝血酶侧结合的抗体和结合在胶乳粒子上的与凝血酶(T)侧结合的抗体，所述与抗凝血酶侧结合的抗体对TAT的反应性为对游离抗凝血酶的反应性的100倍以上，并且优选以使测定时的pH达到5.8~6.6的方式构成。

