



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102422159 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 15

(21) 申请号 201080020403. 2
 (22) 申请日 2010. 06. 30
 (30) 优先权数据
 2009-155075 2009. 06. 30 JP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2011. 11. 09
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2010/061109 2010. 06. 30
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02011/001999 JA 2011. 01. 06
 (73) 专利权人 积水医疗株式会社
 地址 日本国东京都
 专利权人 爱代尔株式会社
 (72) 发明人 近藤纯一 山本光章 金子智惠
 (74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
 公司 11021
 代理人 王旭
 (51) Int. Cl.
 G01N 33/53 (2006. 01)
 G01N 33/543 (2006. 01)
 (56) 对比文件
 EP 1010980 A1, 2000. 06. 21, 全文.
 JP 2002303630 A, 2002. 10. 18, 全文.
 JP 2008249738 A, 2008. 10. 16, 全文.
 US 2005/0084846 A1, 2005. 04. 21, 全文.
 JP S62297755 A, 1987. 12. 24, 全文.
 Yasuji Arase, et al. Usefulness of serum

KL-6 for early diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis in patients with hepatitis. 《Hepatology Research》. 2003, 第 27 卷 89-94.
 A. Bernard and R. Lauwerys. Turbidimetric latex immunoassay for serum ferritin. 《Journal of Immunological Methods》. 1984, 第 71 卷
 沈定树. 间质性肺炎的血清标志物——KL-6. 《国外医学. 呼吸系统分册》. 1996, 第 16 卷 (第 01 期), 55.
 Amal Gad, et al. Assessment of KL-6 as a tumor marker in patients with hepatocellular carcinoma. 《World Journal of Gastroenterology》. 2005, 第 11 卷 (第 42 期), 6607-6612.
 庞红梅等. 血清 KL-6 与风湿病肺间质病变. 《临床荟萃》. 2009, 第 24 卷 (第 05 期), 455-457.
 C. L. Cambiaso and J. N. Limet. Latex agglutination assay for human anti-Brucella IgM antibodies. 《Journal of Immunological Methods》. 1989, 第 122 卷
 B. Passelecq, et al. Latex immunoassay of serum alpha-fetoprotein using polyethylene glycol pretreatment. 《Journal of Immunological Methods》. 1988, 第 109 卷
 审查员 许珊萍
 权利要求书1页 说明书15页

(54) 发明名称
 用于 KL-6 测定的免疫测定试剂

扰抑制剂的 pH 值为 4. 0 至 5. 5 的溶液, 和其上固定抗 KL-6 抗体的不溶载体的溶液。

(57) 摘要
 本发明目的在于提供用于准确测量 KL-6 的测定试剂和测定法, 特别是, 用于准确测量含类风湿因子和 / 或除类风湿因子以外的非特异性物质的样品中的 KL-6 的测定试剂和测定法。可以使用免疫测定试剂来准确测量含有类风湿因子和 / 或除类风湿因子以外的非特异性物质的样品中的 KL-6, 所述免疫测定试剂包含含有类风湿因子干

1. KL-6 免疫测定试剂,所述免疫测定试剂包含含有类风湿因子干扰抑制剂的 pH4.0 至 pH5.5 的溶液和含有其上固定抗 KL-6 抗体的不溶载体的溶液。

2. 权利要求 1 的免疫测定试剂,其中所述不溶载体是胶乳颗粒。

3. 类风湿因子干扰抑制剂和其上固定抗 KL-6 抗体的不溶载体在制备用于 KL-6 免疫测定法的试剂盒中的应用,其中由于在 pH4.0 至 pH5.5 的溶液中样品中 KL-6 和固定在所述不溶载体上的抗 KL-6 抗体之间的免疫反应导致伴随着不溶载体凝集的吸光度变化。

4. 含有类风湿因子干扰抑制剂的 pH4.0 至 pH5.5 的溶液和其上固定抗 KL-6 抗体的不溶载体的溶液在制备用于 KL-6 免疫测定法的试剂盒中的应用,其中由于样品中 KL-6 和固定在所述不溶载体上的抗 KL-6 抗体之间的免疫反应导致伴随着不溶载体凝集的吸光度变化。

5. 权利要求 3 或 4 的应用,其中所述不溶载体是胶乳颗粒。

用于 KL-6 测定的免疫测定试剂

技术领域

[0001] 本发明技术领域涉及用于样品中 KL-6 测量的测定试剂和测定法。而且,本发明技术领域涉及免疫凝集技术、试剂和抑制该技术中非特异性反应的方法。

背景技术

[0002] KL-6 是参与肺纤维化(非专利文献(NPL)1、专利文献(PTL)1)的唾液酸化(sialylated)糖类抗原。因为间质性肺炎中升高的 KL-6 水平和它们的波动表明病理学病症(PTL 1),所以测量 KL-6 水平用于间质性肺炎的诊断和治疗策略的确定。已经公开了,通过测量血清 MUC-1/KL-6 水平预测由于干扰素施用引起的间质性肺炎发作的方法(PTL 2),通过测量 KL-6 在肺癌患者中检查预后的方法(PTL 3),和通过测量胰液中的 KL-6 检测胰管内乳头状黏液癌或胰腺癌的方法(PTL 4)。近年来,增加了对于 KL-6 测量的需要,所述 KL-6 测量用于间质性肺炎包括药物诱导的间质性肺炎、胶原蛋白失调诱导的间质性肺炎等的诊断和确定治疗策略,用于诊断具有肺癌、胰腺癌等的患者,和用于以类风湿性关节炎、局限性肠炎、全身型幼年特发性关节炎、巨淋巴结增生等的抗体制剂来治疗的患者中的间质性肺炎的诊断和确定治疗策略。

[0003] 在专利文献 1-4 中,已经将酶联免疫吸附测定(在下文中,ELISA 法)用于 KL-6 测量。虽然 ELISA 是一种可靠方法,但对于大量样品的快速、容易和廉价测试,胶乳免疫凝集测定是较好的,并且其广泛用作用于测量痕量组分的临床试剂。

[0004] 然而,当通过免疫测量方法诸如 ELISA 或胶乳免疫凝集测试含有类风湿因子的样品时,因为来自取决于样品的类风湿因子的干扰而发生非特异性反应是已知的问题(NPL 2)。另外,由于来自嗜异抗体(抗-鼠免疫球蛋白抗体:HAMA 等和抗-山羊免疫球蛋白抗体:HAGA 等)的干扰而发生非特异性反应是已知的问题。

[0005] 已知的是,从结合至胶乳的抗体除去 Fc 部分的方法,一种使用结合至类风湿因子的抗体的方法(PTL 5),和其它类似方法,在胶乳免疫凝集测定中抑制来自类风湿因子的干扰。

[0006] 然而,本发明人已经发现了即使通过上述方法也不能充分抑制其中发生非特异性反应的样品。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] [专利文献 1] 日本公开的审查的申请号 1995-31207

[0010] [专利文献 2] 日本公开的未审查申请号 2005-121441

[0011] [专利文献 3] 日本专利公布号 4083855

[0012] [专利文献 4] 日本公开的未审查申请号 2006-308576

[0013] [专利文献 5] 日本公开的未审查申请号 1995-12818

[0014] 非专利文献

[0015] [非专利文献 1] 间质性肺炎活性的新血清指示剂. 唾液酸化糖类抗原 KL-6(New

serum indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen KL-6). Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fukuhara H, Yamakido M, Akiyama M. 胸 (Chest). 1989 年 7 月 ;96(1) :68-73。

[0016] [非专利文献 2] 用通过胶乳凝集方法检测 C-反应性蛋白的类风湿因子的干扰 (Interference by rheumatoid factor with the detection of C-reactive protein by the latex agglutination method). Deyo RA, Pope RM, Persellin RH. 风湿病学杂志 (J. Rheumatol). 1980 年 5-6 月 ;7(3) :279-87。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明要解决的问题

[0019] 本发明目的是提供用于准确测量 KL-6 的测定试剂和测定法,特别是,用于准确测量含有类风湿因子和 / 或其它非特异性物质的样品中的 KL-6 的测定试剂和测定法。

[0020] 解决问题的方法

[0021] 通过本发明人的广泛研究显示,含有类风湿因子和 / 或其它非特异性物质的样品中的 KL-6 可以利用免疫测定试剂准确测量,所述免疫测定试剂包含含有类风湿因子干扰抑制剂的 pH 4.0 至 5.5 的溶液和其上固定抗 KL-6 抗体的不溶载体。这导致本发明的完成。更具体而言,本发明具有下列配置。

[0022] (1)KL-6 免疫测定试剂,所述免疫测定试剂包含含有类风湿因子干扰抑制剂的溶液 (pH 4.0 至 5.5) 和含有其上固定抗 KL-6 抗体的不溶载体的溶液。

[0023] (2) 上述 (1) 的免疫测定试剂,其中所述不溶载体是胶乳颗粒。

[0024] (3)KL-6 免疫测定法,所述免疫测定法包括:使用样品、类风湿因子干扰抑制剂和其上固定抗 KL-6 抗体的不溶载体来测量伴随着不溶载体凝集的吸光度变化,所述不溶载体凝集由在 pH 4.0 至 5.5 的溶液中样品中 KL-6 和不溶载体上固定的抗 KL-6 抗体之间的免疫反应所致。

[0025] (4)KL-6 免疫测定法,其中将含有类风湿因子干扰抑制剂的 pH 4.0 至 5.5 的溶液和其上固定抗 KL-6 抗体的不溶载体加入到样品,并且测量伴随着不溶载体凝集的吸光度变化,所述不溶载体凝集由样品中的 KL-6 和不溶载体上固定的抗 KL-6 抗体之间的免疫反应所致。

[0026] (5) 上述 (3) 或 (4) 的免疫测定法,其中所述不溶载体是胶乳颗粒。

[0027] 关于本发明中使用的类风湿因子干扰抑制剂没有特别的限制,只要它抑制免疫测定中类风湿因子干扰,并且可以提及与类风湿因子诸如 IgM、IgG 和 IgA 反应的 HBR(Scantibodies Lab) 和动物来源的免疫球蛋白作为实例。

[0028] 如上所述,动物来源的免疫球蛋白可以是多克隆或单克隆抗体。

[0029] 使用的上述类风湿因子干扰抑制剂的量优选为 10 至 200 μ g/mL。

[0030] 作为用于本发明的含有类风湿因子干扰抑制剂的 pH 4.0 至 5.5 的溶液,可以提及向其添加类风湿因子干扰抑制剂的 pH 4.0 至 5.5 的缓冲溶液,诸如柠檬酸、乙酸、甘氨酸和 Good' s 缓冲液,并且上述缓冲溶液的浓度优选为 5 至 200mM。

[0031] 如专利文献 1 中所述,可以在使用肺腺癌来源的细胞系 VMRC-LCR 作为抗原将小鼠免疫后,根据单克隆抗体生产的常规方法制备本发明中使用的抗 KL-6 抗体 (通过细胞融合的产生特异性抗体的组织培养和肿瘤系的起源 (Derivation of specific

antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion). Kohler G, Milstein C. 欧洲免疫学杂志 (Eur J Immunol.). 1976 年 7 月 ;6(7) :511-9)。

[0032] 作为本发明中使用的不溶载体的实例,可以提及有机聚合物粉末、无机粉末、微生物、血细胞和细胞碎片。

[0033] 作为上述有机聚合物粉末的实例,可以提及天然聚合物粉末诸如不溶琼脂糖、纤维素和不溶葡聚糖以及合成聚合物粉末诸如聚苯乙烯、苯乙烯-苯乙烯磺酸酯共聚物、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共聚物和乙酸乙烯酯-丙烯酸酯共聚物,特别地,其中已经均匀悬浮合成聚合物粉末的胶乳是合乎需要的。

[0034] 作为上述无机粉末的实例,可以提及金属碎片诸如金、钛、铁和镍;二氧化硅;氧化铝和碳粉。

[0035] 虽然上述不溶载体的平均粒径取决于测定和测量装置,但是通常使用具有 0.05 至 1.0 μm 直径的颗粒。

[0036] 作为将抗 KL-6 抗体固定在上述不溶载体上的方法实例,可以提及化学或物理结合。

[0037] 上述其上固定抗 KL-6 抗体的不溶载体通常存在于溶液中,并且作为使用的溶液的实例,可以提及 Tris、甘氨酸和 Good' s 缓冲液。

[0038] 可以提及生理学(生物学)来源的体液作为“分析物”,其是本发明测定法中的主要测量目标。可以具体提及血液、血清、血浆、尿、唾液、痰、泪、耳垢或前列腺液,但样品可以不限于这些。

[0039] 胶乳凝集和血细胞凝集反应是用于使用上述试剂测量抗体-抗原反应的测量系统的实例。作为测量由上述反应所引起凝集的方法,可以采用通过其进行光学检验凝集程度的方法。

[0040] 特别地,在光学检验方法中,将含有上述类风湿因子干扰抑制剂和样品的 pH 4.0 至 5.5 的溶液与上述其上固定抗 KL-6 抗体的不溶载体的溶液混合以后,测量伴随着不溶载体的凝集的散射光强度、吸光度或透射光强度,所述不溶载体的凝集由样品中 KL-6 和固定在不溶载体上的抗 KL-6 抗体之间的免疫反应所引起。这里,上述混合物的 pH 优选在 4.0 至 5.5 范围内。可以使用 300 至 1000nm 的测量波长,并且所述测定基于本领域技术人员知识,根据使用的不溶载体的粒径、浓度和反应时间,测量散射光强度、吸光度或透射光强度的增加或减少。

[0041] 为了实施本发明的免疫测定,应当在其中样品、类风湿因子干扰抑制剂和其上固定抗 KL-6 抗体的不溶载体存在于 pH 4.0 至 5.5 溶液中的条件下,进行样品中的 KL-6 和固定在不溶载体上的抗 KL-6 抗体之间的免疫反应。

[0042] 优选地,作为上述 pH 4.0 至 5.5 的溶液的实例,可以提及 5 至 200mM 的柠檬酸、乙酸、甘氨酸和 Good' s 缓冲液。

[0043] 发明效果

[0044] 根据本发明,在使用不溶载体的凝集反应的免疫测定法诸如胶乳免疫凝集测定法中,即使当存在关于可归因于类风湿因子或嗜异抗体的非特异性反应、其中干扰不被结合至类风湿因子的抗体或多种动物来源抗体所抑制的非特异性反应、可归因于除类风湿因子或嗜异抗体以外的某物的非特异性反应、归因于使用抗体制剂的非特异性反应等的发生或

增强的顾虑时,也可以快速、容易、廉价和准确地测试许多样品。

具体实施方式

[0045] 材料和方法

[0046] < 抗 KL-6 抗体 >

[0047] 将通过专利文献 1 中(特别在第一实施例中)描述的方法获得的抗体用作抗 KL-6 抗体。专利文献 1 中描述的抗体生产方法如下:

[0048] -----

[0049] 1) 免疫

[0050] 用 5×10^6 由肺腺癌细胞系(在下文,VMRC-LCR)获得的细胞将八周龄雌性 BALB/c 小鼠皮下免疫,并且随后,以 2 周间隔用 8×10^6 细胞将小鼠腹膜内注射两次。

[0051] 2) 细胞融合

[0052] 在最终免疫以后三天,将脾除去并将其通过不锈钢筛以制备细胞混悬液。将脾细胞 (8.4×10^7) 与 P3-NSI-Ag4/1 (NSI)8- 氮鸟嘌呤抗性骨髓瘤细胞 (4.2×10^7) 混合并且离心。接着,将 1mL 的 45% 聚乙二醇(平均分子量 6000) 加入到沉淀,并且将混合物轻轻搅拌 2 分钟。在洗涤以后,将混合物悬浮在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 培养基(完全 RPMI 培养基)中,并且以每孔 0.1mL 将 10^6 细胞加至 96 孔微量培养板。在 24 小时以后,添加 0.1mL 含有 $100 \mu\text{M}$ 次黄嘌呤、 $0.4 \mu\text{M}$ 氨基嘌呤和 $16 \mu\text{M}$ 胸苷的完全 RPMI 培养基(HAT 培养基)。在培养开始后的第二、第三、第五、第七和第十天,将 0.1mL 培养上清液丢弃并且添加等体积(0.1mL)的 HAT 培养基。12 天以后在全部孔中观察到杂交瘤的增殖。

[0053] 3) 杂交瘤的选择

[0054] 通过酶免疫测定选择针对 VMRC-LCR 细胞产生抗体的杂交瘤。如下进行酶免疫测定:

[0055] 在 96-孔微量细胞培养板中培养 VMRC-LCR 细胞直到汇合,在 0.25% 戊二醛中固定 5 至 7 分钟,并且洗涤五次。接着,添加 0.1mL 杂交瘤培养上清液,并且允许混合物在室温反应 1 小时。洗涤五次以后,添加 $50 \mu\text{L}$ 辣根过氧化物酶-缀合的山羊抗小鼠免疫球蛋白作为第二抗体并且允许其反应 1 小时。洗涤六至七次以后,添加含有 1.1% 过氧化氢溶液和 $150 \mu\text{g/mL}$ 的 2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)的 $100 \mu\text{L}$ 的 50mM 柠檬酸缓冲液,并且允许混合物在室温下显色 10 分钟。接着,加入 $50 \mu\text{L}$ 的 10% 草酸以终止反应。通过微量培养板分光光度计测量 405nm 的吸光度,并且选择具有 0.02 以上吸光度的杂交瘤。

[0056] 将选择的杂交瘤转至其中已经附着 BALB/c 小鼠胸腺细胞(饲养细胞)的 24 孔培养板,并且用含有 $100 \mu\text{M}$ 次黄嘌呤和 $16 \mu\text{M}$ 胸苷的完全 RPMI 培养基(HT 培养基)培养。达到汇合以后,通过酶免疫测定再次选择产生抗 VMRC-LCR 细胞的抗体的杂交瘤。

[0057] 接着,通过有限稀释法克隆所选择的杂交瘤。简言之,将细胞稀释至 50 或 10 细胞/mL,以每孔 0.1mL 将其加至含有饲养细胞的 96 孔微量细胞培养板,并且用 HT 培养基培养 2 周。选择来自具有单杂交瘤集落的孔的克隆。这些克隆通过酶免疫测定与 VMRC-LCR 细胞反应,并且选择杂交瘤克隆,所述杂交瘤克隆分泌不对正常人肺成纤维细胞显示反应的抗体。

[0058] 通过冷冻切片的免疫过氧化物酶染色,由这些克隆中选择与人肺成纤维细胞反应

的克隆。具体而言,通过外科步骤获得人肺癌和其它器官的癌以及正常组织并且制备4- μ m的冷冻切片。在丙酮固定以后,添加杂交瘤克隆培养上清液,并且允许将混合物在室温反应30分钟。在彻底洗涤以后,允许混合物与生物素化的抗小鼠IgG抗体在室温反应(对 γ 链、 λ 链和 κ 链反应)30分钟。进一步洗涤以后,添加抗生物素蛋白-生物素化的辣根过氧化酶,并且允许混合物在室温下反应1小时。彻底洗涤以后,添加含有0.5mg/mL二胺基联苯胺(作为底物)和0.01%过氧化氢(pH 7.0)的50mMTris-HCl缓冲液,并且允许混合物显色。

[0059] 用这样的方式,获得产生单克隆抗体的杂交瘤,所述单克隆抗体与肺泡上皮;细支气管上皮;支气管腺浆液细胞;甲状腺滤泡细胞;食管上皮;贲门腺细胞;胰管上皮;管上皮;膀胱变移上皮;子宫内膜;肺腺癌;肺鳞状细胞癌;肺小细胞癌;胃、十二指肠乳头、胆管、胰腺、结肠、直肠、甲状腺和乳腺的腺癌;和食管鳞状细胞癌反应,但不与支气管上皮;表面胃粘膜细胞;幽门腺;十二指肠上皮;结肠上皮;直肠上皮;肝细胞;胰腺外分泌细胞;胰腺内分泌细胞;肾小球细胞;宫颈鳞状上皮细胞;皮层;宫颈鳞状细胞癌;和肝细胞癌反应。该杂交瘤命名为KL-6细胞并且将其产生的单克隆抗体命名为抗KL-6抗体。

[0060] 4) 单克隆抗体产生

[0061] 体内移植

[0062] 预先(5至10天前)用0.5mL的2,6,10,14-四甲基十五烷腹膜内注射待用杂交瘤移植的BALB/c小鼠,并且腹膜内移植 5×10^6 杂交瘤细胞。3周以后,在移植小鼠中腹膜内杂交瘤肿瘤形成并且腹部扩大。

[0063] 因此,在腹水和血清中产生高浓度单克隆抗体,并且收集这些流体。

[0064] -----

[0065] < 胶乳颗粒的制备 >

[0066] 简言之,将1100g蒸馏水、200g苯乙烯、0.2g苯乙烯磺酸钠和50g蒸馏水中溶解1.5g过硫酸钾的水溶液在装有搅拌器、回流冷凝器、温度检测器、氮气入口和夹套的2-L玻璃反应容器中混合。用氮气替换容器的气氛,并且在搅拌的条件下将混合物在70°C聚合48小时。

[0067] 聚合以后,将上述溶液经过滤纸过滤并回收胶乳颗粒。通过至少100个颗粒的图像分析来测量获得的胶乳颗粒的直径。使用透射电子显微镜(JEM-1010, JEOL)以10,000 \times 放大率获取用于胶乳颗粒图像分析的照片。平均直径是0.2 μ m。

实施例

[0068] [实施例 1]

[0069] (含有抗KL-6抗体固定化的胶乳颗粒的溶液(含有其上固定抗KL-6抗体的胶乳颗粒的溶液;在下文中称为试剂2)的制备)

[0070] 将调至0.7mg/mL的抗KL-6抗体溶液(5mM Tris-HCl, pH 8.0)加至等量的含有1.0%具有0.2 μ m平均粒径的胶乳颗粒的溶液(5mM Tris-HCl, pH 8.0)。在4°C搅拌2小时以后,添加等量的2.0% BSA溶液(5mM Tris-HCl, pH 8.0),并且将混合物在4°C搅拌1小时。离心以后,弃去上清液,并且将沉淀在5mM Tris-HCl, pH 8.0中再悬浮。用5mM Tris-HCl, pH 8.0将该混合物稀释,以致在600nm波长的吸光度是4.5Abs。该溶液用作试剂2。

[0071] 含有类风湿因子干扰抑制剂的溶液（在下文中，试剂 1）的制备。

[0072] 具体而言，制备含有 1000mM 氯化钠、1.0% BSA 和 50 μ g/mL HBR(Scantibodies Lab, 3KC533) 的 30mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.0) 并且将其用作试剂 1。

[0073] （样品）

[0074] 通过 N-assay Nittobo TIA RF(日东纺医学株式会社 (Nittobo Medical Co., Ltd.)) 测量来自具有风湿病的患者的样品中类风湿因子的浓度并且使用 PicoLumi(注册商标)KL-6(三光纯药株式会社 (Sanko Junyaku Co., Ltd.)) 测量 KL-6 的浓度；根据各产品文件和制造商的指导书测量每一个。将测量的 KL-6 值表示为 100% 并且与根据本发明的免疫测定法的测量值相比。

[0075] （KL-6 浓度的测定）

[0076] 将试剂 1 和试剂 2 混合，并且使用日立 (Hitachi) 7170 自动分析仪测量含有类风湿因子的样品中 KL-6 的浓度。具体而言，将 150 μ L 试剂 1 加至 2.5 μ L 样品并且在 37°C 温育 5 分钟以后，添加 50 μ L 试剂 2，并且将混合物搅拌。在 570nm 的主波长和 800nm 的次波长，经过接下来的 5 分钟来测量与凝集有关的吸光度变化。通过将吸光度变化应用于校准曲线来计算 KL-6 的浓度，所述校准曲线是通过测量已知浓度标准物质获得的。

[0077] （混合物的 pH 测定）

[0078] 以和上述 KL-6 测定中相同比例将样品、试剂 1 和试剂 2 混合以后，使用 Castany LAB F-21pH 计 (Horiba Ltd.) 测量 pH。

[0079] [实施例 2 至 4]

[0080] 代替实施例 1 的试剂 1 中 30mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.0)，使用 pH 4.5(实施例 2)、pH 5.0(实施例 3) 和 pH 5.5(实施例 4) 的 30mM 柠檬酸盐缓冲液。使用和实施例 1 相同试剂和相同测定进行测量。

[0081] （比较例 1 至 6）

[0082] 使用和实施例 1 相同试剂和相同测定进行测量，不同之处在于，使用 pH 3.5 的 30mM 甘氨酸缓冲液（比较例 1）和 pH 6.0(比较例 2)、6.5(比较例 3)、7.0(比较例 4)、7.5(比较例 5) 和 8.0(比较例 6) 的 30mM 磷酸盐缓冲液，代替实施例 1 的试剂 1 中 30mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.0)。

[0083] 结果和讨论

[0084] 对于含有高浓度类风湿因子的样品（升高的类风湿因子样品）研究当试剂 1 的 pH 改变时非特异性反应抑制的有效性。将对于升高的类风湿因子样品 A 和 B 以及正常样品 C 的 pH 3.5 至 8.0 的试剂 1 的测量结果（实施例 1 至 4, 比较例 1 至 6）显示在表 1 中。

[0085]

[表 1]

表 1

样品稀释溶液	pH		柠檬酸				甘氨酸	磷酸				
	RF 浓度 (IU/mL)	KL-6 浓度* (U/mL)	4.0	4.5	5.0	5.5	3.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
样品 A	1019	553	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	比较例 1	比较例 2	比较例 3	比较例 4	比较例 5	比较例 6
样品 B	894	2880	109.7%	111.3%	111.6%	111.6%	120.4%	146.5%	143.0%	137.8%	135.9%	123.8%
样品 C	11	494	109.6%	112.8%	114.5%	112.1%	114.3%	113.0%	112.1%	114.1%	114.5%	114.9%
			94.4%	91.0%	89.5%	93.0%	100.5%	91.6%	85.1%	86.0%	90.5%	93.3%

甘氨酸: 甘氨酸缓冲液
 柠檬酸: 柠檬酸盐缓冲液
 磷酸: 磷酸盐缓冲液
 RF: 类风湿因子

*: 通过 Picolumi (注册商标) KL-6 测量

实施例和比较例中的百分数是相对于用 Picolumi (注册商标) KL-6 测量的 100% 的值

Conc: 浓度

Ex.: 实施例

Comp Ex.: 比较例

[0086] 将通过 Picolumi (注册商标) KL-6 测量的 KL-6 浓度认为是 100%，当通过本发明的测定测量的 KL-6 值小于 85% 或大于 115% 时，认为非特异性反应发生。如果所述值在

85%至115%范围内,认为所述方法具有足够准确性,并且证实非特异性反应抑制的有效性。

[0087] 使用现有技术的类风湿因子干扰抑制剂和 pH 范围 (pH 6.0 至 8.0),对于升高的类风湿因子样品 B 的测量值在经 Picolumi (注册商标)KL-6 的测量值的 85%至 115%的范围内。另一方面,对于高类风湿因子样品 A 的测量值,超过在现有技术(比较例 2 至 6)的 pH 范围内经 Picolumi (注册商标)KL-6 测量值的 115%,并且观察到非特异性反应,即使通过类风湿因子干扰抑制剂也不能将其充分抑制。

[0088] 意外地,将试剂 1 的 pH 改变至从 4.0 至 5.5 的范围后,对于升高的类风湿因子样品 A 和 B 二者的测量值都在经 Picolumi (注册商标)KL-6 测量值的 85%至 115%范围内并且抑制了非特异性反应(实施例 1 至 4)。该结果显示,通过本发明抑制了类风湿因子和非类风湿因子的非特异性反应,并且测定值是准确的。因为在对于样品 C 的测量值中没有观察到 pH- 或缓冲液- 依赖性变化,所以证实了改变 pH 或改变缓冲液不影响 KL-6 的测量值。

[0089] 表 2 中显示了当将样品、试剂 1 和试剂 2 以和上述 KL-6 浓度测定中相同比例混合时的 pH 测量结果。

[0090]

[表 2]

表 2

样品稀释溶液 pH	柠檬酸				磷酸					
	4.0 实施例 1	4.5 实施例 2	5.0 实施例 3	5.5 实施例 4	6.0 比较例 1	6.5 比较例 2	7.0 比较例 3	7.5 比较例 4	8.0 比较例 5	8.0 比较例 6
样品 A	4.0	4.5	5.0	5.5	3.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
样品 B	4.0	4.5	5.0	5.5	3.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
样品 C	4.0	4.5	5.0	5.5	3.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0

甘氨酸: 甘氨酸缓冲液
 柠檬酸: 柠檬酸盐缓冲液
 磷酸: 磷酸盐缓冲液
 Ex.: 实施例
 Comp. Ex.: 比较例

[0091] 如上所述, 没有观察到非特异性反应的试剂 1 的 pH (pH 4.0 至 5.5), 混合以后仍是 4.0 至 5.5。(实施例 1 至 4)。这表示, 当测量 KL-6 浓度时, 通过使用 4.0 至 5.5 的 pH 可

以获得相同的非特异性反应抑制有效性。

[0092] [实施例 5 和 6 以及比较例 7 至 10]

[0093] (试剂 1 的制备)

[0094] < 实施例 5 和 6 >

[0095] 制备含有 1000mM 氯化钠、1.0% BSA 和 50 μ g/mL HBR(Scantibodies Lab, 3KC533) 的 30mM 柠檬酸盐缓冲液 (实施例 5 :pH 4.0、4.5、5.0 和 5.5) 和 30mM 乙酸盐缓冲液 (实施例 6 :pH 4.0、4.5、5.0 和 5.5) 作为含有类风湿因子干扰抑制剂的溶液。

[0096] < 比较例 7 >

[0097] 简言之, 制备含有 1000mM 氯化钠和 1.0% BSA 的 30mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0), 30mM 甘氨酸缓冲液 (pH 3.5) 以及 30mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0) 作为不含类风湿因子干扰抑制剂的溶液 (无 HBR)。

[0098] < 比较例 8 >

[0099] 制备含有 1000mM 氯化钠、1.0% BSA 和 50 μ g/mL HBR(Scantibodies Lab, 3KC533) 的 30mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0), 30mM 甘氨酸缓冲液 (pH 3.5) 及 30mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 作为含有类风湿因子干扰抑制剂的溶液。

[0100] < 比较例 9 >

[0101] 制备含有 1000mM 氯化钠和 1.0% BSA 的 30mM 磷酸盐缓冲液 (pH6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0), 30mM 甘氨酸缓冲液 (pH 3.5) 以及 30mM 乙酸盐缓冲液 (pH 4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0) 作为不含类风湿因子干扰抑制剂的溶液。

[0102] < 比较例 10 >

[0103] 制备含有 1000mM 氯化钠、1.0% BSA 和 50 μ g/mL HBR(Scantibodies Lab, 3KC533) 的 30mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0), 30mM 甘氨酸缓冲液 (pH 3.5) 及 30mM 乙酸盐缓冲液 (pH 6.0) 作为含有类风湿因子干扰抑制剂的溶液。

[0104] (样品测量)

[0105] 通过和实施例 1 相同的测定测量 KL-6 浓度, 其使用在实施例 5 和 6 以及比较例 7 至 10 中的上述缓冲液作为各自的试剂 1 并且将实施例 1 中描述的试剂 2 作为试剂 2。

[0106] 结果和讨论

[0107] 当含有或不含有类风湿因子干扰抑制剂的溶液 pH 不同时, 研究非特异性反应抑制的有效性。结果显示在表 3、4 和 5 中。如表中, 基于在多种条件下每个样本的表现, 将样品分成组 a、b 和 c。

[0108]

[表 3]

表 3

在不含有类风湿因子干扰抑制剂的溶液中的每个 pH 的测量值(比较例 7)

	RF 浓度 (IU/mL)	KL-6 浓度* (U/mL)	柠檬酸					磷酸						
			4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0			
组 a	样品 D	100	211	131.9%	116.5%	116.0%	115.3%	138.3%	133.9%	117.6%	133.8%	146.5%	142.8%	140.1%
	样品 E	1755	953	141.8%	131.2%	157.5%	323.8%	707.8%	704.8%	875.3%	659.9%	499.6%	542.2%	605.4%
组 b	样品 F	371	284	145.3%	116.5%	123.9%	127.2%	126.1%	271.1%	150.6%	273.0%	380.2%	267.6%	171.3%
	样品 G	376	301	123.2%	199.5%	253.2%	326.8%	217.4%	461.8%	256.3%	375.4%	610.3%	693.6%	737.5%
	样品 H	18	752	212.3%	153.9%	134.6%	134.5%	131.1%	137.9%	134.7%	137.5%	145.6%	134.9%	126.5%
组 c	样品 I	8	1327	108.9%	99.5%	94.3%	96.1%	92.2%	92.0%	97.0%	97.8%	97.9%	98.3%	96.9%
	样品 J	144	708	102.9%	102.9%	99.7%	105.2%	107.8%	105.9%	108.5%	109.4%	112.8%	110.7%	113.1%

甘氨酸: 甘氨酸缓冲液

柠檬酸: 柠檬酸盐缓冲液

磷酸: 磷酸盐缓冲液

RF: 类风湿因子

*: 通过 Picolumi (注册商标)KL-6 的测量

百分数是相对于通过 Picolumi (注册商标) KL-6 测量的 100% 的值

灰色阴影区域中的数字: 大于 Picolumi (注册商标) KL-6 的 ±15% 的值

在缓冲液名称下面的 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 3.5, 6.0, 6.5, 7.0 和 8.0 表示样品稀释溶液的 pH

Conc.: 浓度

[0110]

[表 4]

表 4
在含有类风湿因子干扰抑制剂的溶液中的每个 pH 的测量值[实施例 5 (pH 4.0-5.5)和比较例 8 (pH 3.5, 6.0-8.0)]

	RF 浓度 (IU/mL)	KL-6 浓度* (U/mL)	柠檬酸					磷酸					
			4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0		
组 a	样品 D	100	211	92.0%	108.8%	110.9%	110.3%	123.8%	115.6%	125.2%	130.1%	131.6%	127.6%
	样品 E	1755	953	105.2%	109.3%	109.7%	112.2%	132.4%	123.2%	130.3%	160.5%	175.6%	180.7%
	样品 F	371	284	96.7%	98.0%	99.5%	103.1%	104.6%	101.5%	96.9%	99.0%	97.4%	97.4%
组 b	样品 G	376	301	94.9%	100.5%	100.2%	97.5%	101.4%	97.5%	94.6%	98.9%	97.2%	96.0%
	样品 H	18	752	96.8%	97.0%	101.8%	103.9%	101.3%	105.3%	100.4%	101.3%	101.1%	99.5%
	样品 I	8	1327	110.7%	98.9%	97.3%	96.2%	92.3%	97.0%	98.9%	98.7%	98.3%	97.3%
组 c	样品 J	144	708	101.2%	103.7%	99.1%	99.5%	98.0%	101.9%	103.7%	102.7%	101.4%	100.9%

甘氨酸: 甘氨酸缓冲液

柠檬酸: 柠檬酸盐缓冲液

磷酸: 磷酸盐缓冲液

RF: 类风湿因子

*: 通过 Picolumi (注册商标)KL-6 的测量

百分数是相对于通过 Picolumi (注册商标) KL-6 测量的 100% 的值

灰色阴影区域中的数字: 大于 Picolumi (注册商标) KL-6 的±15% 的值

在缓冲液名称下面的 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 3.5, 6.0, 6.5, 7.0 和 8.0 表示样品稀释溶液的 pH

Conc.: 浓度

[表 5]

表 5
在不含和含有类风湿因子干扰抑制剂的溶液中的每个 pH 的测量值
(1) 不含有类风湿因子干扰抑制剂的溶液(比较例 9)

	RF 浓度 (IU/mL)	KL-6 浓度* (U/mL)	乙酸					磷酸					
			4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0		
组 a	样品 D 100	211	122.1%	116.1%	119.3%	128.2%	138.3%	148.1%	117.6%	133.8%	146.5%	142.8%	140.1%
	样品 E 1755	953	149.1%	152.0%	179.1%	911.5%	707.8%	631.0%	875.3%	659.9%	499.6%	542.2%	605.4%
	样品 F 371	284	127.4%	117.5%	124.2%	150.3%	126.1%	325.7%	150.6%	273.0%	380.2%	267.6%	171.3%
组 b	样品 G 376	301	163.9%	207.8%	291.8%	412.7%	217.4%	468.8%	256.3%	375.4%	610.3%	693.6%	737.5%
	样品 H 18	752	168.8%	139.5%	134.2%	135.4%	131.1%	142.7%	134.7%	137.5%	145.6%	134.9%	126.5%
	样品 I 8	1327	94.7%	91.2%	91.4%	91.2%	92.2%	93.7%	97.0%	97.8%	97.9%	98.3%	96.9%
组 c	样品 J 144	708	96.0%	98.8%	98.8%	103.8%	107.8%	108.8%	108.5%	109.4%	112.8%	110.7%	113.1%

[表 5(续)]

表 5(续)
(2) 含有类风湿因子干扰抑制剂的溶液[实施例 6 (pH 4.0-5.5)和比较例 10 (pH 3.5 和 6.0-8.0)]

组	RF 浓度 (IU/mL)	KL-6 浓度* (U/mL)	乙酸					磷酸				
			4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	
组 a	样品 D	100	211	104.9%	105.7%	102.6%	113.0%	126.4%	130.1%	125.2%	131.6%	127.6%
	样品 E	1755	953	111.9%	104.7%	112.3%	114.9%	140.5%	160.5%	130.3%	175.6%	180.7%
	样品 F	371	284	91.2%	98.2%	102.1%	101.0%	98.5%	99.0%	96.9%	97.4%	97.4%
	样品 G	376	301	105.1%	97.2%	104.9%	105.8%	102.8%	98.9%	94.6%	97.2%	96.0%
组 b	样品 H	18	752	86.7%	96.3%	97.6%	101.8%	99.9%	101.3%	100.4%	101.1%	99.5%
	样品 I	8	1327	92.3%	91.7%	90.2%	92.7%	94.0%	98.9%	98.3%	97.3%	97.3%
组 c	样品 J	144	708	93.8%	94.2%	95.7%	96.9%	101.3%	102.7%	103.7%	101.4%	100.9%

甘氨酸: 甘氨酸缓冲液

磷酸: 磷酸盐缓冲液

乙酸: 乙酸盐缓冲液

RF: 类风湿因子

*: 通过 Picolumi (注册商标)KL-6 的测量

百分数是相对于通过 Picolumi (注册商标)KL-6 测量的 100% 的值

灰色阴影区域中的数字: 大于 Picolumi (注册商标)KL-6 的 ±15% 的值

在缓冲液名称下面的 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 3.5, 6.0, 6.5, 7.0 和 8.0 表示样品稀释溶液的 pH

Conc: 浓度

[0112] 在每个 pH, 不论类风湿因子干扰抑制剂的存在, 由表 3 和 4 中的组 c 获得通过 Picolumi (注册商标)KL-6 的测量值的 ±15% 的极好结果, 表明类风湿因子干扰抑制剂自

身对于测量值没有不利影响。

[0113] 另一方面,证实了当使用不含类风湿因子干扰抑制剂测量时超过经 Picolumi (注册商标) KL-6 测量值的 115% 并且发生非特异性反应的样本诸如表 3 中组 a 和 b 中包括的样本的存在。

[0114] 当添加类风湿因子干扰抑制剂时,不论 pH,对于来自表 4 中组 b 的样本获得极好结果,并且证实类风湿因子干扰抑制剂抑制非特异性反应。另一方面,在 pH 3.5 和在 pH 6.0 和 8.0 之间,即使当添加类风湿因子干扰抑制剂时,对于来自表 4 中组 a 的样本也没有观察到非特异性反应抑制作用;然而,在 pH 4.0 和 5.5 之间,观察到强非特异性反应抑制作用。

[0115] 即使当将缓冲液从柠檬酸(三羧酸)变为具有 pH 4.0 至 6.0 的乙酸(单羧酸)时,虽然在不含类风湿因子干扰抑制剂的溶液的情况下存在超过经 Picolumi (注册商标) KL-6 测量值的 115% 并且发生非特异性反应的样本[表 5(1)],但是在 pH 4.0 与 5.5 之间的确实包括类风湿因子干扰抑制剂的溶液的情况下,观察到和柠檬酸缓冲液的情况中相同的非特异性反应-抑制作用[表 5(2)]。另一方面,在表 3 至 5 的组 a 中,使用柠檬酸盐或乙酸盐缓冲液在 pH 6.0 未观察到非特异性反应抑制-效果,表明当测量 KL-6 时,无论缓冲液的类型,使用类风湿因子干扰抑制剂,并且将样品稀释溶液的 pH 调节至 4.0 和 5.5 之间,将最有效地抑制非特异性反应。

[0116] 工业可利用性

[0117] 本发明提供测量 KL-6 以辅助关于间质性肺炎的诊断和治疗策略的确定的方法和用于上述方法实施的测定试剂或试剂盒。本发明可用于对于间质性肺炎包括药物诱导的间质性肺炎和胶原蛋白失调起源的间质性肺炎的诊断和确定治疗策略、具有癌症诸如肺癌和胰腺癌的患者诊断,并且用于诸如对于用类风湿性关节炎、局限性肠炎、全身型幼年特发性关节炎和巨大淋巴结增生症的抗体制剂来治疗的患者中的间质性肺炎的诊断和治疗策略确定的目的。因为将本发明根据需要作为试剂、试剂盒和这些在制造中的用途来保护,所以其具有工业实用性并且不从可专利性排除。

专利名称(译)	用于KL-6测定的免疫测定试剂		
公开(公告)号	CN102422159B	公开(公告)日	2014-10-15
申请号	CN201080020403.2	申请日	2010-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社 爱代尔株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社 爱代尔株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社 爱代尔株式会社		
[标]发明人	近藤纯一 山本光章 金子智惠		
发明人	近藤纯一 山本光章 金子智惠		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	Y10S436/815 Y10S436/808 G01N2333/4725 Y10S436/805 G01N33/6884 G01N33/543		
代理人(译)	王旭		
优先权	2009155075 2009-06-30 JP		
其他公开文献	CN102422159A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明目的在于提供用于准确测量KL-6的测定试剂和测定法，特别是，用于准确测量含类风湿因子和/或除类风湿因子以外的非特异性物质的样品中的KL-6的测定试剂和测定法。可以使用免疫测定试剂来准确测量含有类风湿因子和/或除类风湿因子以外的非特异性物质的样品中的KL-6，所述免疫测定试剂包含含有类风湿因子干扰抑制剂的pH值为4.0至5.5的溶液，和其上固定抗KL-6抗体的不溶载体的溶液。

・ “国际公开”：2009，第21卷（第09号）455-457。
 2. L. Cambiaso and J. N. Limet. Latex agglutination assay for human anti-Brucella antibodies. 《Journal of Immunological Methods》. 1989, 第 122 卷
 3. Passelecq, et al. Latex immunoassay of human alpha-fetoprotein using polyethylene glycol pretreatment. 《Journal of Immunological Methods》. 1988, 第 109 卷

审查员 许珊萍

权利要求书1页 说明书15页

抑制剂的 pH 值为 4.0 至 5.5 的溶液, 和其上固定 KL-6 抗体的不溶载体的溶液。