



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101351707 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 26

(21) 申请号 200680049621. 2

*G01N 33/545* (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 12. 27

*G01N 33/574* (2006. 01)

(30) 优先权数据

379307/2005 2005. 12. 28 JP

(56) 对比文件

US 2005/0069967 A1, 2005. 03. 31,

JP 特开 2000-258419 A, 2000. 09. 22,

JP 特开平 11-344493 A, 1999. 12. 14,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 06. 27

审查员 张丽华

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2006/326030 2006. 12. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/074860 JA 2007. 07. 05

(73) 专利权人 积水医疗株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 山本光章 吉田忠晃

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int. Cl.

*G01N 33/543* (2006. 01)

*G01N 33/483* (2006. 01)

*G01N 33/53* (2006. 01)

权利要求书2页 说明书12页 附图2页

(54) 发明名称

凝集测量用试剂以及凝集测量方法

(57) 摘要

提供通过使用反应促进剂的凝集测量用试剂以及测量方法,所述凝集测量用试剂在与受体致敏的载体颗粒共存下,不引起受体致敏的载体颗粒的自发凝集。通过使用特定胺化合物的凝集测量用试剂以及测量方法,所述凝集测量用试剂能够促进基于特异性反应的凝集而不引起载体颗粒的自发凝集。

1. 一种凝集测量用试剂,其包含:  
使用与靶配体特异性反应的受体致敏的不溶性载体颗粒,和  
一种或多种有机胺化合物,  
该有机胺化合物选自如下的化合物组成的组:苄脒盐酸盐和苄胺盐酸盐,  
所述不溶性载体颗粒为乳胶,所述凝集测量用试剂包含 50 至 1,000mM 的该有机胺化合物。
2. 根据权利要求 1 所述的凝集测量用试剂,其中该受体包含抗体,并测量来自免疫反应的凝集。
3. 根据权利要求 2 所述的凝集测量用试剂,其中所述抗体为多克隆抗体、单克隆抗体或包括其反应性位点的片段。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的凝集测量用试剂,其中该靶配体是选自如下的配体任一种或多种:C-反应性蛋白、FDP、D-二聚体、前列腺特异性抗原、血红蛋白 A1c、清蛋白、胃蛋白酶原 I、胃蛋白酶原 II、基质金属蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶和组织蛋白酶。
5. 根据权利要求 1 或 2 所述的凝集测量用试剂,其中该有机胺化合物具有凝集反应的促进作用和颗粒分散性的稳定作用。
6. 根据权利要求 1 所述的凝集测量用试剂,其包含  
处于共存状态的使用与靶配体特异性反应的受体致敏的该不溶性载体颗粒和该有机胺化合物。
7. 根据权利要求 1 所述的凝集测量用试剂,其中该靶配体包含两种或多种配体,并且各该不溶性载体颗粒使用与该靶配体特异性反应的受体致敏。
8. 一种测量凝集反应随时间变化的方法,该反应由向靶配体添加使用与该配体特异性反应的受体致敏的不溶性载体颗粒引起,该方法包含  
使有机胺化合物至少在反应进行时共存,  
其中该有机胺化合物选自如下的化合物组成的组:苄脒盐酸盐和苄胺盐酸盐,  
所述不溶性载体颗粒为乳胶,该有机胺化合物的浓度为 50 至 1,000mM。
9. 根据权利要求 8 所述的测量方法,其包含  
使用预先使该有机胺化合物与其共存的该不溶性载体颗粒。
10. 根据权利要求 9 所述的测量方法,其中该靶配体包括两种或多种,测量凝集反应随时间的变化,所述反应由添加使用与该配体 L1 特异性反应的受体 R1 致敏的不溶性载体颗粒引起,以及测量凝集反应随时间的变化,该反应通过在所述反应变得大体稳定后或在使所述反应大体稳定后或使所述反应大体稳定的同时,进一步添加使用与不同配体 L2 特异性反应的受体 R2 致敏的不溶性载体颗粒而引起。
11. 根据权利要求 10 所述的测量方法,其中使所述反应大体稳定的方法是通过以游离状态添加与 L1 特异性反应的 R1 来进行。
12. 根据权利要求 8 至 11 任一项所述的测量方法,其中该受体包含抗体。
13. 根据权利要求 12 所述的测量方法,其中所述抗体为多克隆抗体、单克隆抗体或包括其反应性位点的片段。
14. 有机胺化合物的用于制备颗粒分散性稳定剂的用途,所述颗粒分散性稳定剂用于

凝集测量用试剂,所述颗粒分散性稳定剂含有有机胺化合物,

其中该有机胺化合物选自如下的化合物组成的组:苯脒盐酸盐和苯胺盐酸盐。

15. 一种稳定凝集测量用试剂的颗粒分散性的方法,其包含

将有机胺化合物添加到凝集测量用试剂中,

其中该有机胺化合物选自如下的化合物组成的组:苯脒盐酸盐和苯胺盐酸盐,

所述凝集测量用试剂包含不溶性载体颗粒,所述颗粒为乳胶,所述凝集测量用试剂在添加该有机胺化合物后包含 50 至 1,000mM 的该有机胺化合物。

## 凝集测量用试剂以及凝集测量方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于通过用特异受体致敏的不溶性载体颗粒的凝集反应测量配体的凝集测量用试剂,以及凝集测量方法。

### 背景技术

[0002] 检测凝集反应的测量方法已传统地并广泛地使用(应用)于方法如平板凝集试验中。特别地,已主要使用利用抗原-抗体反应的免疫凝集方法,这是由于其在灵敏度、特异性和再现性方面优良。

[0003] 最近,使用用特异性识别作为抗原的靶配体的抗体致敏的不溶性载体颗粒和广泛使用的自动分析仪已能够高灵敏度地简便测量该配体。因此,免疫凝集方法已广泛地用于临床检测等。免疫凝集方法是通过使不溶性载体颗粒基于该抗原-抗体反应凝集并光学测量所获得的凝集度来进行靶配体浓度测量的方法。作为该不溶性载体颗粒,通常使用乳胶。在这种情况下,该方法特别称为乳胶比浊法免疫检测(latex turbidimetric immunoassay)(下文缩写为 LTIA 法)。

[0004] 众所周知,在 LTIA 法中,添加凝结促进剂如氯化钠或胍加速免疫凝集的形成和提高测量灵敏度(专利文献 1)。

[0005] 然而,这些凝集促进剂与抗体致敏的乳胶共存导致与免疫反应无关的抗体致敏的乳胶的非特异凝集(也称自发凝集)。存在以共存状态长期贮存后,上述颗粒最终沉淀的问题。所以,作为用于 LTIA 法的测量试剂,通常使用双液试剂形式(two-shot reagent format)。将该抗体致敏的乳胶和该凝集促进剂作为组成试剂单独制备,在进行测量时一起混合。

[0006] 在专利文献 2 中,公开了将氨基磺酸盐溶解于试剂以分散乳胶试剂的方法,这是因为氨基磺酸盐抑制来自在乳胶凝集反应中的测量试样组分的非特异性聚集和具有优良的贮存稳定性。

[0007] 另外,专利文献 3 公开了稳定化方法,其中使氨基酸酯或聚胺在乳胶试剂中共存以使蛋白质能够稳定化,因而各自结合到乳胶的蛋白质彼此之间的非特异性聚集受到抑制。

[0008] 然而,这些文献仅描述了乳胶的非特异性聚集受到抑制的试剂的稳定化,并没有描述促进凝集反应的效果。

[0009] 此外,即使在将氯化钠或胍用作反应促进剂的情况下,当如在使用自动分析仪测量的情况中限定测量时间时,不一定获得满意的测量灵敏度。所以,期望提供具有更高效果的反应促进剂。

[0010] 专利文献 1 :JP 11-344493 A

[0011] 专利文献 2 :JP 07-229900 A

[0012] 专利文献 3 :JP 2004-108850 A

## 发明内容

### [0013] 本发明解决的问题

[0014] 提供本发明以解决上述传统技术问题。本发明的目的是提供使用有机胺化合物的凝集测量用试剂以及其测量方法,所述凝集测量用试剂不会引起受体致敏乳胶的自发凝集,即使是该受体致敏乳胶与该有机胺化合物共存。

[0015] 而且,本发明另一目的是提供反应促进效果优于传统反应促进剂如氯化钠或胍的使用有机胺化合物的凝集测量用试剂和其测量方法。

### [0016] 解决问题的手段

[0017] 本发明的发明人透彻地研究了在用于乳胶凝集的测量方法中不引起受体致敏乳胶的自发凝集的化合物。结果,本发明人发现一定种类的有机胺化合物具有促进凝集反应而不引起受体致敏乳胶的自发凝集的效果,由此完成本发明。

[0018] 此外,本发明人发现这些有机胺化合物的某一些具有优于传统反应促进剂的反应促进效果,从而完成本发明。

[0019] 即,本发明具有以下构成。

[0020] (1) 凝集测量用试剂,其包括使用与靶配体特异性反应的受体致敏的不溶性载体颗粒和有机胺化合物。

[0021] (2) 根据项目(1)所述的凝集测量用试剂,其中该有机胺化合物是选自如下化合物的一种或多种:2-氨基-2-噻唑啉盐酸盐、苄脒盐酸盐、苄胺盐酸盐、胍盐酸盐、氨基比林、安替比林、4-氨基安替比林、邻苯二胺二盐酸盐、对甲氧基苯胺盐酸盐、盐酸苯海拉明、2,4-二氨基苯甲醚二盐酸盐、盐酸吡啶、1,4-苯二胺盐酸盐、氨基胍盐酸盐和盐酸甜菜碱。

[0022] (3) 根据项目(1)或(2)所述的凝集测量用试剂,其中该不溶性载体颗粒包含乳胶。

[0023] (4) 根据项目(1)至(3)中任一项所述的凝集测量用试剂,其中该受体包含抗体如多克隆抗体、单克隆抗体或包括其反应性位点的片段,并测量来自免疫反应的凝集。

[0024] (5) 根据项目(1)至(4)任一项所述的凝集测量用试剂,其中该靶配体是选自如下配体的任一种或多种:C-反应性蛋白(CRP)、FDP、D-二聚体、前列腺特异性抗原(PSA)、血红蛋白A1c、清蛋白、胃蛋白酶原I(PGI)、胃蛋白酶原II(PGII)、基质金属蛋白酶(MMP)、胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶,和组织蛋白酶。

[0025] (6) 根据项目(1)至(5)任一项所述的凝集测量用试剂,其包含50至1,000mM的该有机胺化合物。

[0026] (7) 根据项目(1)至(6)任一项所述的凝集测量用试剂,其中该有机胺化合物具有凝集反应的促进作用和颗粒分散性的稳定作用。

[0027] (8) 根据项目(1)所述的凝集测量用试剂,其包含处于共存状态的使用与靶配体特异性反应的受体致敏的该不溶性载体颗粒和该有机胺化合物。

[0028] (9) 根据项目(1)所述的凝集测量用试剂,其中该靶配体包含两种或多种配体,并且各该不溶性载体颗粒使用与该靶配体特异性反应的受体致敏。

[0029] (10) 一种测量凝集反应随时间变化的方法,该反应由向靶配体添加使用与该配体特异性反应的受体致敏的不溶性载体颗粒而引起,该方法包括至少在反应进行时使有机胺化合物共存。

[0030] (11) 根据项目 (10) 所述的测量方法,其包含使用预先使有机胺化合物与其共存的该不溶性载体颗粒。

[0031] (12) 根据项目 (11) 所述的测量方法,其中该靶配体包括两种或多种,测量凝集反应随时间的变化,所述反应通过添加使用与配体 L1 特异性反应的受体 R1 致敏的不溶性载体颗粒而引起,测量凝集反应随时间的变化,该反应通过在所述反应变得大体稳定后或在使所述反应大体稳定后或使所述反应大体稳定的同时,进一步添加使用与不同配体 L2 特异性反应的受体 R2 致敏的不溶性载体颗粒而引起。

[0032] (13) 根据项目 (12) 所述的测量方法,其中使所述反应大体稳定的方法通过以游离状态添加与该 L1 特异性反应的该 R1 来进行。

[0033] (14) 根据项目 (10) 至 (13) 任一项所述的测量方法,其中该受体包含抗体如多克隆抗体、单克隆抗体或包括其反应性位点的片段。

[0034] (15) 一种颗粒分散性稳定剂,其用于凝集测量用试剂,含有有机胺化合物。

[0035] (16) 一种稳定凝集测量用试剂的颗粒分散性的方法,其包括将有机胺化合物添加到凝集测量用试剂中。

#### [0036] 发明效果

[0037] 使用本发明的该有机胺化合物的凝集测量用试剂具有如下效果。

[0038] (1) 该凝集测量用试剂可制备为通过使反应促进剂与受体致敏乳胶预先共存而获得的单液试剂,因为即使在该两种物质共存的情况下该试剂也不可能造成该受体致敏乳胶的自发凝集。

[0039] (2) 当将该凝集测量用试剂制备为单液试剂时,可以通过一步反应来测量,所以能够将测量时间缩短至使用传统双液试剂的情况所需的时间的一半以下。此外,当使用单液试剂将反应进行与使用传统双液试剂情况下测量所需的时间相同的时间时,能够获得更高的测量灵敏度。

[0040] (3) 此外,在用于双液试剂的测量系统中组合使用两种上述单液试剂,能够在同一反应容器内连续测量两种配体。该效果对于确定同一样品中两种配体的含量比所需的 PGI/PGII 比的计算和 HbA1c(%) 检测是显著有效的。

[0041] (4) 有机胺化合物的凝集反应的反应促进效果优良能够有助于缩短反应时间,最终缩短测量时间,和 / 或提高测量灵敏度。

#### 附图说明

[0042] 图 1 是示出借助含苄胺盐酸盐的测量清蛋白用的乳胶试剂测量清蛋白的结果的图。

[0043] 图 2 是示出借助含 2-氨基-2-噻唑啉盐酸盐的测量清蛋白用的试剂测量清蛋白的结果的图。

[0044] 图 3 是示出借助含苄脒盐酸盐的测量清蛋白用的试剂测量清蛋白的结果的图。

#### 具体实施方式

[0045] (要测量的试样)

[0046] 对于本发明的测量试剂的要测量的试样,例如包括血液、血清、血浆、培养的淋巴

细胞上清液、尿、脊髓液、唾液、汗液、腹水和细胞或器官的提取液。

[0047] (配体)

[0048] 作为本发明中的靶配体,任意配体可为要测量的对象,只要该配体能够通过凝集方法测量即可。该配体的具体实例包括蛋白质如 C-反应性蛋白(CRP)、FDP、D-二聚体、前列腺特异性抗原(PSA)、血红蛋白 A1c、清蛋白、胃蛋白酶原 I(PGI)、胃蛋白酶原 II(PGII)、基质金属蛋白酶(MMP)、胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶和组织蛋白酶;肽;糖类;核酸;和脂质等。

[0049] (受体)

[0050] 作为在本发明中使用的受体,使用与该靶配体特异性结合的物质。通常,能够通过用靶配体免疫家兔、绵羊、山羊等获得的抗配体多克隆抗体和抗配体单克隆抗体。其中,从特异性角度,特别期望使用单克隆抗体。可以使用该完整抗体,或者也可使用根据传统方法用酶切断抗体而获得的抗体片段。

[0051] 此外,当要测量的对象是抗体时,能够将抗原用作受体。而且,根据配体种类,能够将凝集素、核酸或其类似物质用作受体。

[0052] (载体颗粒)

[0053] 用于本发明中的使用受体致敏的不溶性载体颗粒没有特别限制,并优选乳胶。作为该乳胶用材料,能够使用任何材料,只要该材料适用于敏化受体的方法即可。除通常用于凝集方法中的主要由聚苯乙烯组成的乳胶外,也可以例举苯乙烯-丁二烯共聚物、(甲基)丙烯酸酯聚合物等。此外,也可以使用由例如以下材料形成的颗粒: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、磁性物质或其它类似物。作为在载体颗粒上敏化受体的方法,也可以使用化学键合法而不使用常用的物理吸附法。

[0054] 将同一种或两种或多种材料或直径的载体颗粒用在本发明中。

[0055] (有机胺化合物)

[0056] 可以使用任意有机胺化合物,只要该有机胺化合物促进凝集反应,和/或当该有机胺化合物与使用受体致敏的载体颗粒共存时不可能造成载体颗粒自发凝集即可。

[0057] 某一有机胺化合物是否不可能造成载体颗粒的自发凝集能够通过下述的筛选方法确定。而且,该有机胺化合物是否促进凝集反应能够通过将使用该有机胺化合物时的凝集度和不使用该有机胺化合物时凝集度进行比较而确定。确定结果后,能够易于评价该有机胺化合物以做出选用决定。

[0058] 具体的讲,优选使用一种或多种选自如下的化合物:2-氨基-2-噻唑啉盐酸盐、苄胺盐酸盐、苄胺盐酸盐、胍盐酸盐、氨基比林、安替比林、4-氨基安替比林、邻苯二胺二盐酸盐、对甲氧基苄胺盐酸盐、盐酸苯海拉明、2,4-二氨基苯甲醚二盐酸盐、盐酸吡啶、1,4-苯二胺盐酸盐、氨基胍盐酸盐、和盐酸甜菜碱。其中,更优选使用苄胺盐酸盐、苄胺盐酸盐和2-氨基-2-噻唑啉盐酸盐。

[0059] 注意:每种有机胺化合物盐没有特别限制。那些盐的实例包括硫酸盐、硝酸盐、氢溴化物、氢氟化物、氢氟硼酸盐、草酸盐、乳酸盐、己二酸盐、酒石酸盐、氢碘化物、甲苯磺酸盐、丙二酸盐和重碳酸盐。除本发明效果外,考虑到作为试剂的处理容易性或易于获得性等选择适合的盐。

[0060] 该有机胺化合物可具有任意浓度,只要该有机胺化合物与未添加该有机胺化合物

的情况比较促进凝集反应即可,和 / 或该有机胺化合物具有这样的浓度,在该浓度下,使载体颗粒共存时不可能发生自发凝集。该有机胺化合物的优选浓度是 50 至 1,000mM。使用的该有机胺化合物各最佳浓度可根据本说明书的描述进行试验研究。

[0061] 本发明中的术语自发凝集表示不是来自配体和载体之间的特异性结合的载体颗粒聚集。本发明中的术语颗粒分散性的稳定作用表示在含受体致敏的不溶性载体颗粒的试剂中有机胺化合物的共存不可能造成该受体致敏的不溶性载体颗粒的自发聚集的作用。可通过例如以下事实评价后者的稳定作用:受体致敏的不溶性载体颗粒与本发明的有机胺化合物共存,接着在静置的预定时间之后,未观察到来自自发聚集的载体颗粒的沉淀的事实;或静置之前和之后含有该有机胺化合物的试剂的光学变化保持在预定比例内的事实。基于该评价,可以选择有机胺化合物。

[0062] 具体的讲,当将乳胶用作受体致敏的载体颗粒时,该评价在如下过程中进行。当发生具有受体致敏的载体颗粒与有机胺化合物共存,接着静置预定时间(例如,在 4°C 下静置 3 天以上)时,测量静置之前和之后在波长 600nm 处的吸光度与在波长 800nm 处的吸光度的比例 ( $A_{600nm}/A_{800nm}$  比)。然后,相关地评价静置后的值和静置前的值(初始值)。静置之后的值相对于初始值的降低率不显示 30% 以下的被评价的有机胺化合物具有稳定作用,可以优选使用这些有机胺化合物。而且,更优选吸光度比中显示 10% 以下降低率的有机胺化合物。最优选吸光度比显示 5% 以下降低率的有机胺化合物。

[0063] 当将乳胶用作受体致敏的载体颗粒时,进行上述过程。如上所述,能够容易地评价颗粒分散性的稳定作用。所以,如上所述的评价过程可用作本发明有机胺化合物的筛选方法。具体的讲,可以例举具有稳定作用的有机胺化合物的选择方法,该稳定作用通过以下事实进行评价:当使该有机胺化合物与抗体致敏的不溶性载体在 4°C 下共存 3 天以上时,静置之后的值相对于最初值的降低率在波长为 600nm 的吸光度与在波长为 800nm 的吸光度的比例 ( $A_{600nm}/A_{800nm}$  比)中不显示 30% 以下。

[0064] 本发明中的术语凝集反应意指来自受体致敏的不溶性载体颗粒的受体和靶配体之间的特异性结合的凝集反应。术语凝集促进作用意指在试剂中受体致敏的不溶性载体颗粒与靶配体共存容易造成特异性凝集的作用。例如,该凝集促进作用可如下确定。将该受体致敏的不溶性载体颗粒加入到含有靶配体的试样中。然后,在预定时间后,将在加入有机胺化合物状态下测量的吸光度和在未加入有机胺化合物状态下测量的吸光度进行比较。该凝集促进作用可通过在加入有机胺化合物状态下测量的吸光度是否高于在未加入有机胺化合物状态下测量的吸光度来确定。作为凝集促进剂,优选具有与氯化钠相同的促进功能或具有比氯化钠更好的促进功能的物质。更优选具有上述提及的颗粒分散性的稳定作用和凝集反应的促进作用的有机胺化合物。考虑到测量方法的容易性,筛选具有这两种功能的化合物可理想地通过以下方式进行:首先研究该化合物是否具有颗粒分散性的稳定作用;然后研究该化合物是否具有凝集反应的促进作用,这是因为上述提及的步骤能够有助于化合物的有效筛选。

[0065] 在前述中,主要描述了乳胶用作受体致敏的载体颗粒的情况。考虑到载体颗粒的材料或平均粒径,可选择用于测量的任何适合波长。此外,描述了使用吸光度比的评价方法。吸光度比可用本领域技术人员能够使用的任何适合方式来替代,这些方式例如颗粒数(沉淀颗粒产率和密度对比)、颗粒尺寸测量值(聚集导致更大尺寸)、散射光测量值或吸收

光谱测量值（聚集导致增大或位移）。进一步，在可能的程度上，可使用电化学检测代替光学检测。

#### [0066] （缓冲液）

[0067] 本发明中的凝集反应在缓冲液中进行。选择其中优化进行凝集反应的缓冲液的种类、浓度和 pH。可使用磷酸盐缓冲液、Tris 盐酸缓冲液、碳酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液、Good' s 缓冲液，或其类似物。将该缓冲液中的缓冲剂的浓度在约 5mM 至 500mM 的范围内调整。该缓冲液常常在中性至碱性 pH 中使用，且通常在 pH7.0 至 9.5 之间使用。

#### [0068] （凝集信号的测量方法）

[0069] 凝集信号的测量可通过任何测量方法进行，只要该方法通常用于凝集反应的测量即可。该测量方法的实例包括吸光度测量、颗粒数测量、颗粒尺寸测量和散射光测量。

[0070] 凝集信号检测可通过上述多种方法进行。使用常用的生化分析仪的方法是方便的。例如，该方法具体如下进行。将含有有机胺化合物和受体致敏的不溶性载体颗粒如乳胶的试剂加入到含有靶配体的试样。该混合物在预定温度进行温育预定时间以在该温育期间测量吸光度。检测吸光度的变化量，从而在测试试样中的配体浓度可基于标准曲线来计算，该标准曲线通过使用浓度事先已知的标准液作为样品来制作。在乳胶凝集方法中，通常使用在波长 500 至 900nm 下测量的吸光度，一般将反应期间吸光度的变化量用于定量。

#### [0071] （凝集测量用试剂的组成）

[0072] 将凝集测量用试剂制备为通过使反应促进剂与受体致敏乳胶预先共存而获得的单液试剂，这是因为本发明的有机胺化合物即使在两种物质共存的情况下也不可能造成该受体致敏乳胶的自发凝集。所以，可将该凝集测量用试剂构成为由单液试剂形成的凝集测量用试剂。当将该凝集测量用试剂制备成单液试剂时，可通过一步反应来测量，所以测量时间可缩短至使用传统双液试剂的情况下所需测量时间的一半以下。此外，当以与使用传统双液试剂的情况下测量所需时间相同的时间，使用单液试剂进行反应时，可获得更高的测量灵敏度。所以，通过将该试剂构成为由单液试剂形成的凝集测量用试剂，本发明效果可最有效地达到。

[0073] 本发明的有机胺化合物具有反应促进效果，所以能够将凝集测量用试剂制备为传统的双液试剂，以构成凝集测量用试剂。

[0074] 不限制通常加入到或用于凝集测量用试剂的盐、糖、蛋白质、表面活性剂、防腐剂等的使用，只要其使用不降低本发明的效果即可。

#### [0075] （测量试剂的用法）

[0076] 本发明的凝集测量用试剂通过所用的胺化合物的作用在凝集反应的反应促进效果方面优良。因此，该试剂能够缩短反应时间和由此的测量时间，和 / 或提高测量灵敏度。所以，作为由单液试剂组成的凝集测量用试剂，该试剂可用于增加每单位时间的测量数。该试剂也可用于测量配体，这对于由两种溶液组成的传统试剂由于测量灵敏度不足而难以进行。

[0077] 进一步，当两种本发明的单液试剂在双液试剂用测量系统中组合使用时，两种配体能够在同一反应容器中连续测量。可采用如下具体的用法。即，当靶配体包括两种或多种时，测量凝集反应随时间的变化，通过添加使用与配体 L1 特异性反应的受体 R1 致敏的不溶性载体颗粒引起所述反应。然后，在所述反应变得大体稳定后，或使所述反应大体稳定后

或使所述反应大体稳定的同时,测量凝集反应随时间的变化,该反应通过进一步添加用与不同的配体 L2 特异反应的受体 R2 致敏的不溶性载体颗粒来引起。

[0078] 可以容易地推定 L1 和 R1 的反应应在 L2 和 R2 的反应的开始时大体稳定,这是因为 L1 和 R1 的反应影响 L2 和 R2 的测量结果。当对于试样中的靶配体量(浓度)难以优选地相应于受体致敏乳胶量(浓度)时,可将 L1 和 R1 的反应通过例如在 L2 和 R2 的反应开始前添加与 L1 特异性反应的物质(可以是游离的 R1)来调整到稳定状态。

[0079] 通过组合使用两种本发明的单液试剂在同一反应容器中连续测量两种配体的方法,对于用于在同一试样中两种配体含量比的确定所要求的 PGI/PGII 比的计算和 HbA1c 等的检测是特别有效的。所以,该方法是完全新颖的。

[0080] 下文中,将通过实施例更详细的描述本发明,但本发明并不限于实施例。

[0081] 实施例

[0082] 实施例 1

[0083] (当乳胶用作不溶性载体颗粒时筛选具有颗粒分散性稳定作用的有机胺化合物)

[0084] 将示于图 1 中的各种有机胺化合物的每一种各自溶解在 20mM Tris 缓冲液 (pH 7.0) 中。该混合物与用于测量 D-二聚体 (nanopia D-二聚体 (2)) 的 D-二聚体乳胶试剂 (由 Daiichi PureChemicals Co., Ltd. 制造) 的乳胶试剂以 1 : 1 的比例混合,从而制备最终浓度为 62.5 至 500mM 的含有有机胺化合物的乳胶试剂。此外,通过使用 20mM Tris 缓冲液 (pH 7.0) 以同样方式制备的另一种乳胶试剂用作对照。此外,为了比较,也以同样的方式制备各自以最终浓度为 150、300 和 500mM 包含氯化钠的乳胶试剂。这些试剂在 4℃ 下静置 3 天。然后,在波长为 600nm 和 800nm 下测量该上清液和搅拌后的乳胶溶液的各自吸光度,以计算各吸光度比 ( $A_{600nm}/A_{800nm}$  比)。表 1 示出分散状态最优选并且没有乳胶沉淀出现的浓度的结果。表 1 基于以下结果制定:吸光度比 ( $A_{600nm}/A_{800nm}$  比) 和上清液的吸光度不降低,即,在关于 2-氨基-2-噻唑啉盐酸盐,苄胺盐酸盐,苄脒盐酸盐,胍盐酸盐,氨基比林,安替比林,4-氨基安替比林,邻苯二胺二盐酸盐,对甲氧基苄胺盐酸盐,盐酸苯海拉明,2,4-二氨基苯甲醚二盐酸盐,盐酸吡啶,1,4-苯二胺盐酸盐,氨基胍盐酸盐和盐酸甜菜碱的多种有机胺盐酸所研究的浓度范围内,通过自发凝集造成的颗粒沉淀受到抑制。

[0085]

[表 1]

|                       | 悬浮后瞬间 |       |         |       | 4℃下静置 3 天后 |         |       |       |         |
|-----------------------|-------|-------|---------|-------|------------|---------|-------|-------|---------|
|                       |       |       |         |       | 上清液*       |         |       |       |         |
|                       | 800nm | 600nm | 600/800 | 800nm | 600nm      | 600/800 | 800nm | 600nm | 600/800 |
| 有机胺化合物/吸光度            |       |       |         |       |            |         |       |       |         |
| 对照(不添加)               | 0.486 | 1.466 | 3.02    | 92.2  | 91.6       | 99.3    | 98.6  | 98.9  | 100.2   |
| +500mM 2-氨基-2-噻唑啉盐酸盐  | 0.451 | 1.363 | 3.02    | 92.2  | 90.7       | 98.4    | 92.2  | 90.7  | 98.4    |
| +500mM 苄胺盐酸盐          | 0.442 | 1.339 | 3.03    | 92.3  | 90.0       | 97.5    | 92.0  | 90.3  | 98.1    |
| +500mM 苄胺盐酸盐          | 0.442 | 1.337 | 3.02    | 103.5 | 98.5       | 95.2    | 103.6 | 98.4  | 95.0    |
| +500mM 胍盐酸盐           | 0.471 | 1.413 | 3.00    | 126.2 | 116.3      | 92.2    | 125.6 | 116.2 | 92.5    |
| +62.5mM 氨基比林          | 0.461 | 1.388 | 3.01    | 103.7 | 102.4      | 98.8    | 103.7 | 102.4 | 98.8    |
| +500mM 安替比林           | 0.434 | 1.311 | 3.02    | 97.6  | 98.3       | 100.8   | 98.1  | 98.1  | 100.0   |
| +500mM 4-氨基安替比林       | 0.431 | 1.312 | 3.05    | 99.6  | 99.1       | 99.5    | 99.5  | 99.6  | 100.1   |
| +150mM 邻苯二胺二盐酸盐       | 0.483 | 1.420 | 2.94    | 118.6 | 117.2      | 98.8    | 119.1 | 118.3 | 99.3    |
| +150mM 对甲氧基苯胺盐酸盐      | 0.457 | 1.373 | 3.01    | 102.9 | 103.8      | 100.9   | 104.8 | 104.5 | 99.7    |
| +500mM 盐酸苯海拉明         | 0.339 | 1.021 | 3.01    | 103.4 | 102.5      | 99.1    | 104.0 | 103.0 | 99.0    |
| +150mM 2,4-二氨基苯甲酸二盐酸盐 | 0.451 | 1.340 | 2.97    | 106.8 | 116.5      | 109.1   | 109.4 | 117.7 | 107.7   |
| +150mM 盐酸吡啶           | 0.452 | 1.361 | 3.01    | 99.3  | 99.6       | 100.4   | 99.6  | 99.8  | 100.1   |
| +150mM 1,4-苯二胺盐酸盐     | 0.459 | 1.374 | 2.99    | 110.1 | 107.2      | 97.4    | 111.2 | 108.1 | 97.2    |
| +500mM 氨基胍盐酸盐         | 0.465 | 1.398 | 3.01    | 123.2 | 111.2      | 90.2    | 123.7 | 111.2 | 89.9    |
| +150mM 盐酸甜菜碱          | 0.470 | 1.429 | 3.04    | 100.3 | 96.2       | 95.9    | 100.5 | 96.4  | 95.9    |
| +150mM 氯化钠            | 0.483 | 1.462 | 3.03    | 156.8 | 87.0       | 55.5    | 468.9 | 174.8 | 37.3    |
| +300mM 氯化钠            | 0.485 | 1.461 | 3.01    | 59.5  | 32.7       | 54.9    | 463.1 | 173.5 | 37.5    |
| +500mM 氯化钠            | 0.485 | 1.459 | 3.01    | 56.9  | 28.5       | 50.1    | 457.9 | 172.0 | 37.6    |

\*悬浮后瞬间的吸光度和吸光度比的比例(%)

[0086] 表 1 示出在 4℃ 下静置 3 天后各自包含 150、300 和 500mM 氯化钠的乳胶试剂的吸光度比 ( $A_{600nm}/A_{800nm}$  比, 在表 1 中描述为 600/800) 在上清液的结果和搅拌后的结果之间存在 30% 以上的差值。进一步, 表 1 示出搅拌后的吸光度比与对照的吸光度比相比低约 60%。

该结果表明,在一般用作凝集促进剂的氯化钠存在下,抗体致敏的乳胶不能稳定地以分散状态稳定贮存。

[0087] 另一方面,当使用上述有机胺化合物时,在上清液的吸光度比 ( $A_{600\text{nm}}/A_{800\text{nm}}$  比) 和搅拌后的吸光度比 ( $A_{600\text{nm}}/A_{800\text{nm}}$  比) 之间几乎没有差别,并且该对照的吸光度比的差值在 10% 以下。上述结果表明使用上述有机胺化合物导致维持抗体致敏乳胶的分散状态和防止通过自发凝集等的沉淀。

#### [0088] 实施例 2

[0089] 使用含有苄胺盐酸盐的清蛋白测量用试剂测量清蛋白

[0090] (1) 抗 - 清蛋白抗体的制备

[0091] 将 100  $\mu\text{g}$  纯化的人清蛋白 (由 Sigma-Aldrich Corporation 制造) 用于各免疫。初始免疫通过使用将该清蛋白与弗氏完全佐剂以相同的量混合而制备的乳状液 200  $\mu\text{L}$  来进行,并将该乳状液注入 BALB/c 小鼠的腹腔。附加的免疫通过使用 200  $\mu\text{L}$  除将该清蛋白与弗氏完全佐剂混合外以同样方式制备的乳状液来进行。将该附加免疫以两周为间隔重复三次。

[0092] 在进行 ELISA (酶联免疫吸附测定) 以测量在从小鼠胃底静脉获得的各血液中的各抗体效价 (titer) 后,将显示高抗体值的小鼠选出并用于细胞融合。自第四次免疫两周后,将溶解于 200  $\mu\text{L}$  生理盐水的 100  $\mu\text{g}$  清蛋白注入小鼠腹腔,并在 3 天后将小鼠的脾摘除。脾在 RPMI1640 介质中松弛后,将所得物在 1,500rpm 下离心分离以收集脾细胞。使用无胎牛血清的 RPMI1640 介质将细胞洗涤三次以上,加入含 15% 的胎牛血清的 RPMI1640 介质 2mL,接着悬浮,以制备脾细胞悬浮液。将该脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/O-AG14 以 6 : 1 的比例混合,将该混合物在 50% 聚乙二醇存在的情况下进行细胞融合。将所得物在 1,500rpm 下离心分离以收集沉淀。将该沉淀悬浮在 GKN 溶液 (通过在净化水中溶解 2g 葡萄糖、0.4g 氯化钾、8g 氯化钠、1.41g 磷酸氢钠和 0.78g 磷酸二氢钠来制备以具有 1L 的 GKN 溶液) 中。将悬浮液通过离心分离洗涤以收集沉淀。将所获得的沉淀悬浮于 30mL 的含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 介质中。将该悬浮液以 100  $\mu\text{L}$  量等分到三个 96 孔微孔反应板的各孔,同样将含有  $2.5 \times 10^6$  细胞 /mL 的 BALB/c 小鼠胸腺细胞的 HAT 介质作为饲养细胞以 200  $\mu\text{L}$  量等分到三个 96- 孔微孔反应板的各孔。将所得物在 37°C 下在 5% 二氧化碳温育箱中培养。

[0093] 通过使用附加至固相的清蛋白的 ELISA 证实了在培养上清液中抗清蛋白抗体的存在。十天后,在所有孔中证实了融合细胞的增殖。具体的讲,将含有 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  清蛋白和 150mM 氯化钠 (pH7.2, 以下缩写为 PBS) 的 100  $\mu\text{L}$  10mM 磷酸盐缓冲液等分到 96- 孔微孔反应板的各孔,并且该微孔反应板在 4°C 下静置整夜。接着,使用 300  $\mu\text{L}$  的含有 0.05% 吐温 20 和 1% 牛血清清蛋白的 PBS 将微孔反应板洗涤三次,将各孔的培养上清液以 50  $\mu\text{L}/$  孔的方式加入,并将该混合物在室温静置一小时。之后,该微孔反应板用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS 洗涤三次,并将 50  $\mu\text{L}/$  孔过氧化物酶标记的抗小鼠抗体 (由 Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd. 制造) 加入,并将该混合物在室温静置 1 小时。该微孔反应板使用含有 0.5% 吐温 20 的 PBS 洗涤三次,并将含有 0.2% 邻苯二胺和 0.02% 过氧化氢的 50  $\mu\text{L}/$  孔柠檬酸盐缓冲液 (pH 为 5) 加入。该混合物在室温下静置 15 分钟后,将 50  $\mu\text{L}/$  孔 4.5N 硫酸加入以停止该反应。然后在波长为 492nm 下测量吸光度,并且选择示出高吸光度的孔。

[0094] 通过有限稀释法进行单克隆。即,向已以  $10^6$  个细胞等分入作为饲养细胞的 BALB/

c 小鼠胸腺细胞的 96-孔微孔反应板,以 0.1mL 等分入经稀释以在阳极孔中含有 10 个细胞/mL 杂交瘤的溶液。HT 介质用于第一次培养,并且含 15%胎牛血清的 RPMI640 介质用于第二次培养和随后培养。该培养在 37°C 下在 5%二氧化碳培养箱中进行 10 天。通过重复三次一套经由 ELISA 的阳性细胞选择和经由有限稀释法的单克隆操作而获得 30 种抗清蛋白单克隆抗体产生细胞。将该 30 种细胞的每一种的大约  $10^5$  个细胞注入到各降植烷预处理小鼠的腹腔以收集从各小鼠产生的腹水。将各收集的腹水进行离心分离以除去不溶物质。向各所得物中加入等当量的饱和硫酸铵溶液。该混合物在搅拌下放置过夜,并通过离心分离收集沉淀。将各收集的沉淀在 20mM Tris 缓冲液 (pH 8.0) 中溶解以使用该缓冲液透析。将各透析的物质独立地吸附到用该缓冲液平衡的 DEAE-琼脂糖凝胶柱 (DEAE-sepharose column)。随后,将通过依据在该缓冲液中 0 至 300mM 氯化钠的浓度梯度洗脱各该吸附物质获得的各 IgG 馏分使用 50mM 糖胶缓冲液透析。最后获得 30 种经纯化的抗体。

[0095] (2) 抗清蛋白单克隆抗体的选择

[0096] 向各自含有 1.4mg/mL 经纯化的抗体的各 20mM Tris 缓冲液 (pH 8.5) 3mL 中,加入含有 0.3  $\mu$ m 平均粒径的 2%乳胶 (Sekisui Chemical Co., Ltd. 制造) 的 3mL 悬浮液,并将各混合物在 4°C 下搅拌 2 小时。向各所得物中,加入含有 0.4%牛血清清蛋白的 20mM Tris 缓冲液 (pH 8.5) 6mL,接着在 4°C 下搅拌 1 小时。离心分离后,移去该上清液,并将各沉淀使用 20mM Tris 缓冲液 (pH 8.5) 再次悬浮从而达到在 600nm 波长下的 1.0D 的吸光度,由此制备各抗清蛋白抗体致敏的乳胶溶液。

[0097] 接着,向 100  $\mu$ L 含有 150mM 氯化钠的 20mM Tris 缓冲液 (pH 8.5) 中,加入 3  $\mu$ L 含有清蛋白的样品溶液,并将该混合物在 37°C 下温育 5 分钟。向该混合物中,加入各上述抗清蛋白抗体致敏的乳胶溶液的两种组合 (1 : 1 比例的混合溶液) 100  $\mu$ L,接着搅拌。测量在主波长为 570nm 和亚波长 (sub-wavelength) 为 800nm 下的持续 5 分钟的吸光度变化量,选择示出最大吸光度变化的抗体组合。

[0098] (3) 测量清蛋白用乳胶试剂的制备

[0099] 通过使用含有 1.4mg/mL 的该经选择的抗清蛋白单克隆抗体的 20mM Tris 缓冲液 (pH 8.5) 3mL 来进行如上所述的相同操作,从而制备测量清蛋白用乳胶试剂。

[0100] (4) 苯胺盐酸盐最佳浓度的确定

[0101] 将测量清蛋白的乳胶试剂以这样的方式制备:该试剂分别含有各最终浓度 150、300 和 500mM 苯胺盐酸盐 (TOKYO KASEIKOGYO CO., LTD. 制造)。将制备的试剂在 4°C 下静置 3 天,然后,在波长为 600nm 和 800nm 下测量该试剂的上清液和悬浮液的吸光度,从而计算吸光度比 ( $A_{600nm}/A_{800nm}$  比,其在表 2 中描述为“600/800”) (表 2)。根据结果,将在测量清蛋白用乳胶试剂中的最佳苯胺盐酸盐浓度确定为 500mM。在 500mM 浓度下,当进行吸光度测量时,该上清液的吸光度不降低,即,由自发凝集造成的颗粒沉淀受到抑制,最优选该颗粒的分散状态。

[0102] [表 2]

[0103]

| 测量清蛋白用试剂 | 800nm  | 600nm  | 600/800 |
|----------|--------|--------|---------|
| 对照       | 0.7297 | 1.5746 | 2.16    |

|                 |        |        |      |
|-----------------|--------|--------|------|
| +150mM 苄胺盐酸盐上清液 | 0.2912 | 0.6358 | 2.18 |
| 搅拌后             | 1.2363 | 1.9812 | 1.60 |
| +300mM 苄胺盐酸盐上清液 | 0.7180 | 1.5243 | 2.12 |
| 搅拌后             | 0.8197 | 1.6854 | 2.06 |
| +500mM 苄胺盐酸盐上清液 | 0.7217 | 1.5523 | 2.15 |
| 搅拌后             | 0.7277 | 1.5598 | 2.14 |

[0104] (5) 含有苄胺盐酸盐的测量清蛋白用乳胶试剂的制备

[0105] 制备最终浓度为 500mM 的含有苄胺盐酸盐的测量清蛋白用乳胶试剂。

[0106] (6) 清蛋白测量

[0107] 向各 200  $\mu$ L 含有苄胺盐酸盐的测量清蛋白用乳胶试剂中,加入各 3  $\mu$ L 的含有 0 至 50  $\mu$ g/mL 清蛋白的样品溶液,接着搅拌该混合物。在主波长为 570nm 和亚波长为 800nm 下在 37 $^{\circ}$ C 下测量吸光度变化量 5 分钟(图 1 中的 A)和 10 分钟(图 1 中的 B)。

[0108] (7) 比较例

[0109] 向各 100  $\mu$ L 的含有 500mM 苄胺盐酸盐或 500mM 氯化钠的 20mM Tris 缓冲液(pH 8.5)中,加入各 3  $\mu$ L 的含有 0 至 50  $\mu$ g/mL 清蛋白的样品溶液,接着在 37 $^{\circ}$ C 下温育该混合物 5 分钟。然后加入各 100  $\mu$ L 上述测量清蛋白用乳胶试剂并搅拌,在 37 $^{\circ}$ C 下在主波长为 570nm 和亚波长为 800nm 下测量吸光度变化量 5 分钟(图 1 中的 C 和 D)。

[0110] (8) 结果

[0111] 图 1 示出使用具有苄胺盐酸盐的单液试剂(图 1 中的 A)测量 5 分钟时的测量灵敏度与传统测量方法使用双液试剂(图 1 中的 C)测量 10 分钟时的测量灵敏度相似,尽管单液试剂的反应时间是双液试剂的反应时间的一半,并且在使用单液试剂测量 5 分钟时的测量灵敏度也与使用氯化钠(图 1 中的 D)测量时的测量灵敏度相似。因此,具有苄胺盐酸盐的单液试剂能使测量时间显著缩短。此外,使用单液试剂测量 10 分钟(图 1 中的 B)时的测量灵敏度与使用双液试剂测量 10 分钟(图 1 中的 C)时的测量灵敏度比较显示出大的增加。结果示出:当以与传统测量同样量的时间进行测量时,能够得到在测量灵敏度上大的增加。

[0112] 实施例 3

[0113] 使用含有 2-氨基-2-噻唑啉盐酸盐的测量清蛋白用试剂测量清蛋白

[0114] 除了使用 2-氨基-2-噻唑啉盐酸盐作为有机胺化合物以测量清蛋白外,与上述实施例 1 同样的方式制备试剂。结果在图 2 中示出。图 2 表明 2-氨基-2-噻唑啉盐酸盐具有与苄胺盐酸盐相似的效果。

[0115] 实施例 4

[0116] 使用含有苄脒盐酸盐的测量清蛋白用试剂测量清蛋白

[0117] 除了使用苄脒盐酸盐作为有机胺化合物以测量清蛋白外,与上述实施例 1 同样的方式制备试剂。结果示于图 3。

[0118] 图 3 表明 :通过使用苜脒盐酸盐,以与使用苜胺盐酸盐同样的方式获得的单液试剂能使测量时间显著缩短,并且当以与传统测量同样量的时间进行测量时,能够得到测量灵敏度上大的增加。图 3 还表明 :与使用传统反应促进剂氯化钠(图 3 中的 D)的情况比较,仅仅通过使用苜脒盐酸盐(图 3 中的 C)代替氯化钠已获得测量灵敏度大的增加。

[0119] 工业实用性

[0120] 本发明可提供配体的凝集测量用试剂,该试剂作为试剂具有优异的稳定性和测量灵敏度。进一步,当使受体致敏的载体颗粒与反应促进剂预先共存时,本发明可提供作为单液试剂的试剂。

[0121] 特别地,当试剂制备为单液试剂时,测量可简单地进行,可得到反应时间的缩短。即,以与传统测量同样量的时间,使用单液试剂进行测量的测量灵敏度增加。此外,组合使用两种单液试剂可提供在同一反应容器中能够连续测量两种配体的试剂。因此,该试剂在临床检测领域作为突破性的测量试剂是非常有用的。

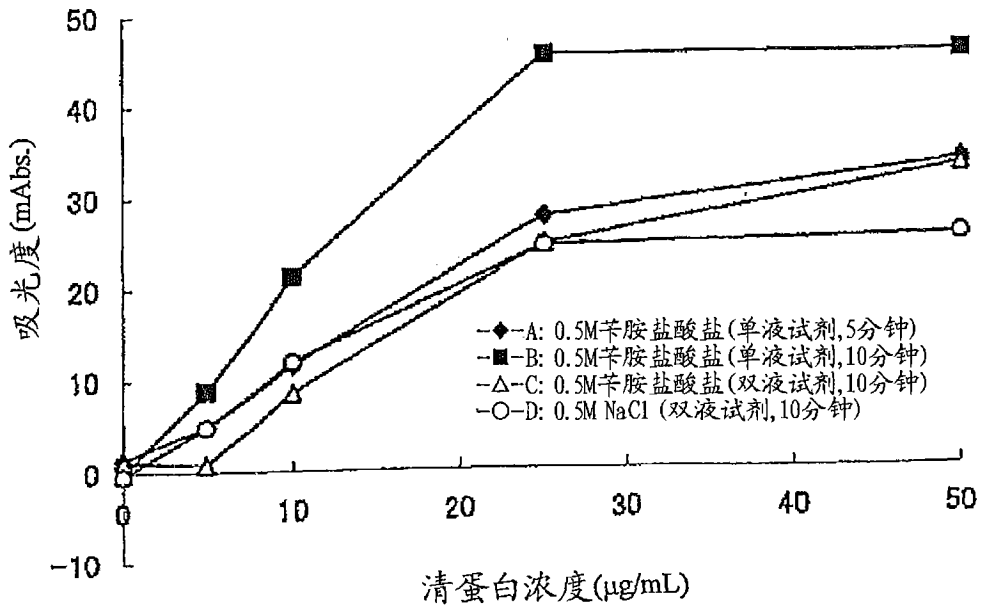


图 1

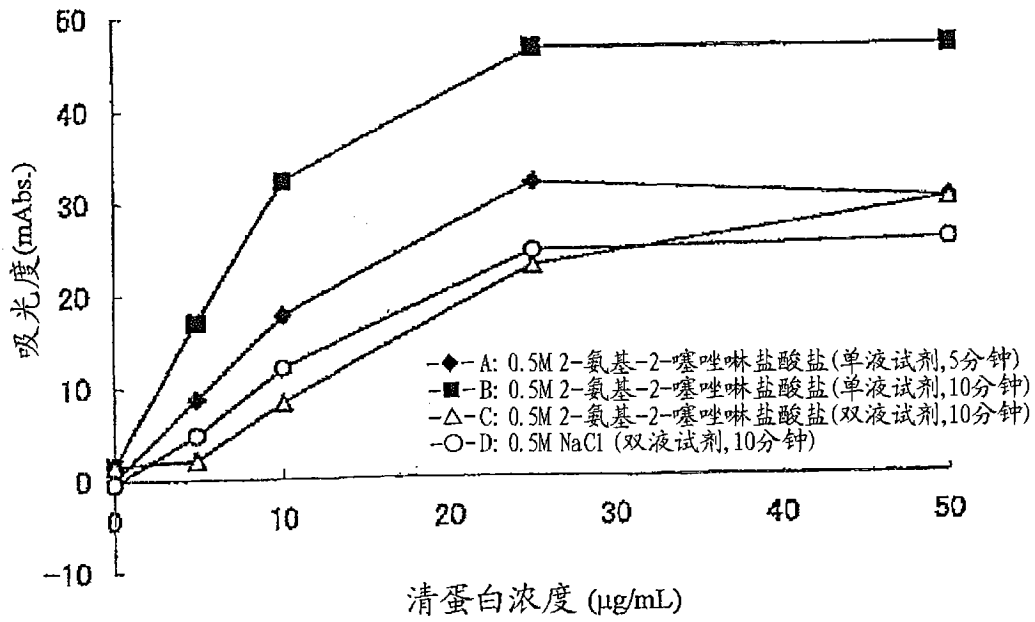


图 2

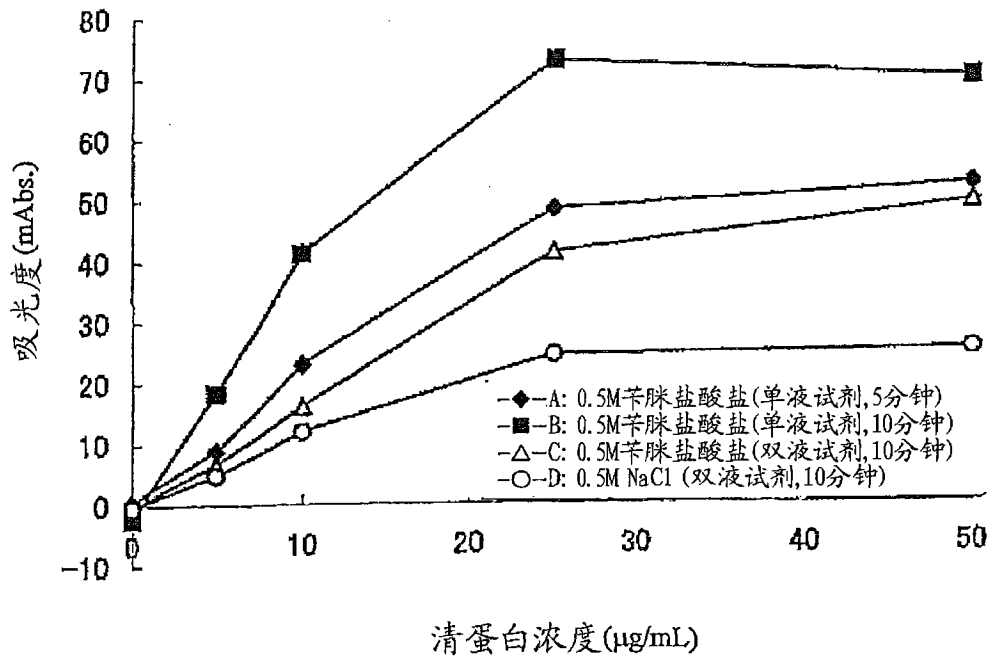


图 3

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 凝集测量用试剂以及凝集测量方法                                       |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101351707B</a>                          | 公开(公告)日 | 2014-03-26 |
| 申请号            | CN200680049621.2                                      | 申请日     | 2006-12-27 |
| [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         | 山本光章<br>吉田忠晃  |         |            |
| 发明人            | 山本光章<br>吉田忠晃  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/543 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/545 G01N33/574 |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/54313  |         |            |
| 代理人(译)         | 刘新宇   |         |            |
| 审查员(译)         | 张丽华   |         |            |
| 优先权            | 2005379307 2005-12-28 JP                              |         |            |
| 其他公开文献         | CN101351707A  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>        |         |            |

#### 摘要(译)

提供通过使用反应促进剂的凝集测量用试剂以及测量方法，所述凝集测量用试剂在与受体致敏的载体颗粒共存下，不引起受体致敏的载体颗粒的自发凝集。通过使用特定胺化合物的凝集测量用试剂以及测量方法，所述凝集测量用试剂能够促进基于特异性反应的凝集而不引起载体颗粒的自发凝集。