

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016年10月6日 (06.10.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/155111 A1

- (51) 国际专利分类号: *G01N 1/28* (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/080330
- (22) 国际申请日: 2015年5月29日 (29.05.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权: 201510145431.1 2015年3月30日 (30.03.2015) CN
- (71) 申请人: 上海云泽生物科技有限公司 (SHANGHAI INZEX BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区三鲁公路 3279 号明浦广场 2 号楼 2 楼, Shanghai 201112 (CN)。
- (72) 发明人: 吴冯波 (WU, Fengbo); 中国上海市闵行区三鲁公路 3279 号明浦广场 2 号楼 2 楼, Shanghai 201112 (CN)。 乜永艳 (NIE, Yongyan); 中国上海市闵行区三鲁公路 3279 号明浦广场 2 号楼 2 楼, Shanghai 201112 (CN)。 史小娟 (SHI, Xiaojuan); 中国上海市闵行区三鲁公路 3279 号明浦广场 2 号楼 2 楼, Shanghai 201112 (CN)。
- (74) 代理人: 北京康信知识产权代理有限公司 (KANGXIN PARTNERS, P.C.); 中国北京市海淀区知春路甲 48 号盈都大厦 A 座 16 层, Beijing 100098 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

[见续页]

(54) Title: IMMUNOSUPPRESSANT DRUG EXTRACT REAGENT FOR IMMUNOASSAY

(54) 发明名称: 用于免疫分析的免疫抑制剂药物提取试剂

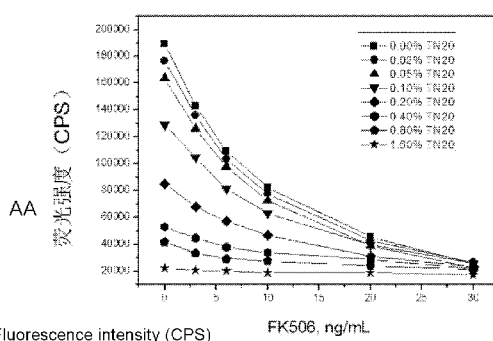
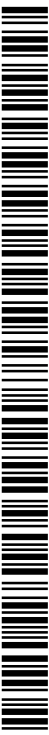


图 1

(57) Abstract: A blood sample immunosuppressant drug extract reagent for immunoassay. The extract reagent comprises a protein denaturant, a proteolytic enzyme, a surfactant and a pH buffer solution. Also provided are a method for detecting the concentration of an immunosuppressant in a whole-blood sample by using the extract reagent and an immunodetection kit containing the extract reagent. The extract reagent has no need to use an organic solvent in a traditional extract method, thereby avoiding the influence of the organic solvent on activity of an antibody in a detection system; a drug extract process dispenses with centrifugation, a processed sample can be directly used for immunodetection, the operation is simple, and the detecting result is accurate and reliable.

(57) 摘要: 一种免疫分析用的血液样品免疫抑制剂药物提取试剂, 提取试剂包括蛋白变性剂、蛋白水解酶、表面活性剂和 pH 缓冲液; 还提供了包括使用所述提取试剂检测全血样品中免疫抑制剂浓度的方法以及包含所述提取试剂的免疫检测试剂盒。该提取试剂无需使用传统提取方法中的有机溶剂, 从而避免了有机溶剂对检测体系中抗体活性的影响; 该药物提取过程无需离心, 处理后的样品可直接用于免疫检测, 操作简单, 检测结果准确可靠。



WO 2016/155111 A1

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, **本国际公布:**
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, — 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
TG)。

用于免疫分析的免疫抑制剂药物提取试剂

技术领域

本发明涉及体外诊断试剂领域，特别地，涉及改进的免疫抑制剂药物提取试剂，以及使用该提取试剂的提取方法和免疫检测试剂盒，可用于测定患者血液样品中免疫抑制剂的浓度水平。

背景技术

免疫抑制剂（Immunosuppressant）是一类通过抑制细胞及体液免疫反应而减轻组织损伤的化学或生物物质，广泛应用于器官移植后的抗排斥反应和治疗自身免疫性疾病（如：类风湿、红斑狼疮、强直性脊柱炎和自身免疫性溶血贫血等）。

10 目前常用的免疫抑制剂主要分为微生物代谢产物、糖皮质激素、抗代谢物、抗淋巴细胞抗体、烷化剂等五类，其中他克莫司（Tacrolimus, FK506）、环孢菌素（Cyclosporin A, CsA）、雷帕霉素（Rapamycin, RPM）等微生物代谢产物应用最广，它们主要通过抑制胞浆内神经钙蛋白的活性，阻断 IL2 等一系列细胞因子的转录，从而发挥其免疫抑制作用，有效抑制 T 淋巴细胞的活化与增殖。

15 对于移植患者的临床用药，免疫抑制剂的血液浓度过低则容易导致免疫排斥，而免疫抑制剂的血液浓度过高，则可能对肝、肾等器官产生毒性，并引发感染、肿瘤等一系列不良临床事件，因此，移植患者免疫抑制剂的合理用药要求精确检测其血液浓度。对于他克莫司、西罗莫司、环孢菌素 A 等常用免疫抑制剂，虽然它们结构各不相同，但在血液中均主要以蛋白结合物方式存在于红细胞中，要准确检测这些免疫抑制剂的
20 血药浓度，必须使免疫抑制剂从其结合蛋白上解离下来，这是这类免疫抑制剂血药浓度检测的共同要求。

目前测定免疫抑制剂血药浓度的方法主要有受体结合法、HPLC-质谱联用（HPLC-MS）、微粒子酶免疫测定（MEIA）、化学发光微粒子免疫测定（CMIA）以及酶联免疫吸附法（ELISA）等。其中受体结合法主要用于药物研究；HPLC-MS 法测定
25 血药浓度准确、灵敏，但其操作繁琐，检测时间长，检测成本高，需要昂贵设备，主要用于科研领域或作为一种参考方法。MEIA 和 CMIA 是目前常用的检测方法，其检测自动化程度高，检测结果准确。然而，上述方法在检测过程中均需使用甲醇、乙腈、乙醚等有机溶剂作为样品提取试剂，以溶解细胞和提取药物，该提取步骤不仅给实验操作和实验后处理带来不便，而且会不同程度地降低免疫检测的灵敏度和准确性，因

为进入免疫反应体系的有机溶剂会不可避免地抑制抗体-药物之间的免疫结合反应，降低抗体的结合力，进而降低检测敏感度；另外，提取试剂中有机溶剂的挥发也容易引起药物浓度的波动，影响检测结果的准确性。

为降低有机溶剂对抗体结合 FK506 的抑制作用，Robert W.Siegel 等人（Clinical
5 Chemistry, 2008,54:6,1008-1017; Pat. No.: US 8022188 B2）通过基因诱变方式对抗体的
互补决定区加以改造，使检测灵敏度得到改善；但该方法需要核酸提取、扩增、测
序、基因诱变、克隆筛选等复杂步骤，实用性不强。为了降低有机溶剂挥发引起的药
物浓度波动，Frank C.Grenier 等人采用低挥发性的 DMSO 配制血液药物提取试剂（US
2008/0020401 A1），但该方法中所用的 DMSO 仍会严重抑制免疫检测体系中的抗体-
10 药物间的结合反应，从而降低检测灵敏度；另外，同上述所有有机溶剂提取试剂一样，
提取试剂的溶胞作用依赖高浓度的二价金属离子（10mM-100mM），且二价金属离子浓
度的变化会导致提取效果的改变，因此全血样品中常用络合物抗凝剂（如：EDTA）的
浓度变化可能引起提取试剂中二价金属离子的浓度变化，进而导致不同样品药物提取
效果的差异，造成测量误差。

15 上述提取试剂处理后的样品均为非均质溶液，使用前需要离心去除固体杂质；该
步骤也增加了操作的难度，延长了检测时间。

为避免有机溶剂对免疫检测的影响，François Legay 等人提出了以 RAPA 作为
FK506 的置换试剂的 FK506 检测方法（US Pat. 6187547 B1）；由于 FK506 和 RAPA 在
血液中均主要与 FKBP（FK 结合蛋白）结合，少量与血清白蛋白和脂蛋白结合，且高
20 度脂溶性的 FK506 和 RAPA 均可以快速穿透细胞膜，因此，免疫分析体系中高浓度的
RAPA 可以快速、有效地将血液中的 FK506 置换出来，且无需溶胞和蛋白变性；由于
抗 FK506 抗体的高度特异性，高浓度的 RAPA 不干扰 FK506 的免疫检测；由于无需
药物提取，该方法检测 FK506 更简单、快捷，可以准确检测大部分不含干扰因子的样
品，但对于某些强干扰样品，尤其是使用了抗体类免疫抑制剂的患者样品，即使使用
25 了相应的抗干扰措施，以该方法检测 FK506 仍常出现很大的误差。

因此，免疫抑制剂血药浓度的检测迫切需要一种可以避免使用有机溶剂，又能够
准确、快速、简便地检测药物浓度的药物提取方法。目前，国内外未见具备上述特点
的提取试剂和提取方法的报道。

发明内容

为了克服以有机溶剂提取药物的上述弊端，本发明提供了一种新的用于免疫分析的血液样品免疫抑制剂药物提取试剂和方法。所述药物提取试剂由蛋白变性剂、蛋白水解酶、表面活性剂和 pH 缓冲液组成。所述提取方法包括将样品与提取试剂按一定比例混合、孵育，在蛋白变性剂和蛋白酶作用下溶解细胞，释放胞内药物。本发明无需使用有机溶剂，能有效溶解血液细胞，释放胞内药物。同现有的提取试剂相比，本发明提供的药物提取试剂和方法，不仅避免了溶剂挥发导致的药物浓度改变问题，同时显著降低了溶液介质对抗体-药物间免疫结合的抑制作用。另外，本方法处理后的全血样品为全透明的均质溶液，处理后的样品可直接使用，无需离心，有效简化了样品处理步骤，缩短了检测时间。

因此，本发明的第一个目的在于提供一种从血液样品中提取免疫抑制剂的提取试剂。

本发明的第二个目的在于提供一种用于检测血液样品中免疫抑制剂浓度的方法。

本发明的第三个目的在于提供一种用于检测血液样品中免疫抑制剂浓度的试剂盒。

为了达到上述目的，本发明提供了如下技术方案：

根据本发明的第一个方面，一种从血液样品中提取免疫抑制剂的提取试剂，包括蛋白变性剂、蛋白水解酶、表面活性剂和 pH 缓冲液。

根据本发明，所述蛋白变性剂选自：尿素、盐酸胍、或者其他非有机溶剂类蛋白变性剂。

根据本发明的优选实施例，所述蛋白变性剂为尿素。

根据本发明，所述尿素在提取试剂中的浓度为 4mol/L-12 mol/L，所述盐酸胍在所述提取试剂中的摩尔浓度为 1mol/L-8mol/L；优选的，所述尿素在所述提取试剂中的浓度为 6mol/L-8mol/L，所述盐酸胍在所述提取试剂中的摩尔浓度为 2mol/L-6mol/L。

根据本发明，所述蛋白水解酶选自：枯草杆菌蛋白酶、蛋白酶 K、分散酶等蛋白酶类或者其混合物；优选的，所述蛋白水解酶为枯草杆菌蛋白酶。

根据本发明，所述枯草杆菌蛋白酶在所述提取试剂中的量为 1U/ml-20 U/ml；优选的，为 2.5U/ml-10U/ml。

根据本发明，所述表面活性剂选自：吐温-20、皂素、Triton X-100 中的一种或多种；优选的，为吐温-20。

根据本发明，所述吐温-20 在所述提取试剂中按体积占比为 0.005%-1% (v/v)；优选的，为 0.02%-0.1% (v/v)。

5 根据本发明，所述 pH 缓冲液的 pH 在 6.5-8.5 之间；优选的，为 7.0-8.0。

根据本发明的第二个方面，一种用于血液样品中免疫抑制剂药物浓度检测的方法，包括使用所述的提取试剂在加热条件下处理血液样品，通过蛋白变性剂、蛋白水解酶、表面活性剂的协同作用，在溶解血液细胞、释放药物的同时，将血液样品转变为均质溶液，该均质溶液可以无需离心，直接应用于免疫分析，获得准确的免疫抑制剂药物
10 浓度。

根据本发明，所述免疫抑制剂包括他克莫司、西罗莫司、依维莫司、佐他莫司、环孢霉素或其他结构类似物。

根据本发明，所述血液样品来自器官移植患者或者其他服用免疫抑制剂的患者。

根据本发明，所述提取试剂和血液样品混合时，所述血液样品/所述提取试剂的体
15 积比为 1/1-1/10；优选地，为 1/2-1/5。

根据本发明，所述通过加热方式处理血液样品，其加热温度为 50°C-90°C；优选的，为 60°C-80°C。

根据本发明，所述通过加热方式处理血液样品，其加热时间为 5min-50min；优选的，为 10min-30min。

20 根据本发明，所述提取试剂和提取方法，其作用在于溶解细胞、释放药物，并将血液样品转变为均质溶液。

根据本发明，所述免疫分析为竞争免疫分析方法，其实施方式为：血液样品中的免疫抑制剂与固定量的免疫抑制剂共同竞争结合限量的抗免疫抑制剂抗体。

根据本发明，所述免疫分析采用固相免疫分析方法，其实施方式为：在固相容器
25 表面固定一种免疫试剂，竞争结合反应完成后通过洗涤分离游离检测试剂和结合检测试剂实现待测物浓度检测。

根据本发明，所述固相容器指微孔、试管或其它形式的容器。

根据本发明，所述免疫分析包括以下步骤：

1) 血液样品处理。将样品与提取试剂混合，加热后恢复到室温；

2) 免疫反应。在固定有免疫试剂的固相容器中加入经处理的样品、标记的抗免疫抑制剂的抗体和固定量的免疫抑制剂；或，加入经处理的样品、标记的固定量的免疫抑制剂的抗体和固定量的免疫抑制剂；固定量的免疫抑制剂与样品中的免疫抑制剂竞争结合限量的抗免疫抑制剂的抗体，免疫复合物同时被固相试剂捕获。

3) 分离。洗涤分离的游离检测试剂和结合的检测试剂。

4) 检测。检测固相试剂捕获的免疫复合物所含的示踪物质产生的信号，通过信号强度与免疫抑制剂浓度关系曲线（校准曲线）测定免疫抑制剂浓度。

10 所述的血液样品指抗凝全血样品，包括 EDTA-K(Na)、柠檬酸钠（钾）、肝素抗凝的全血样品；优选的，为 EDTA-K(Na)抗凝全血。

根据本发明的第三个方面，一种用于检测血液样品中免疫抑制剂浓度的试剂盒，所述试剂盒包括：a) 抗免疫抑制剂的抗体；b) 所述的提取试剂；c) 免疫抑制剂；d) 校准品；e) 缓冲溶液。其中，免疫抑制剂的抗体或免疫抑制剂以示踪剂标记，作为检测
15 试剂。

根据本发明的优选实施例，所述的抗免疫抑制剂的抗体指能特异性结合免疫抑制剂药物的抗体，可为多克隆抗体或单克隆抗体；优选的，为单克隆抗体。

根据本发明，所述的提取试剂由蛋白变性剂、蛋白水解酶、表面活性剂和 pH 缓冲液组成。

20 根据本发明，所述的检测试剂指示踪物标记的抗体、抗原或免疫抑制剂半抗原。

根据本发明，所述示踪物质指能引发可检测信号的物质，包括酶、化学发光物质、放射性物质、荧光物质、稀土离子如 Eu^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 及其螯合物配基，也可以是生物素、地高辛等小分子间接示踪物。

根据本发明，所述的缓冲溶液由 pH 缓冲溶液、蛋白质、表面活性剂、检测干扰
25 消除剂组成，用于稀释检测试剂，降低检测本底信号和消除异嗜性抗体等干扰物质对检测的影响。

根据本发明，所述的校准品指含有已知浓度免疫抑制剂的溶液或冻干品，用以建立校准曲线；为降低基质效应，本发明以人全血为基质配制校准品。

有益效果：

5 本发明提供的血液样品提取试剂保留了传统的基于有机溶剂的提取试剂的以下优点：

具有一致的快速溶解细胞、释放药物的效果；

具有一致的灭活样品干扰物质的效果；在提取试剂的作用下，样品中的

异嗜性抗体、类风湿因子等干扰物质均被有效灭活；

10 同时，本发明提供的样品提取试剂又具备了传统的基于有机溶剂的提取试剂所不具备的以下优点：

1) 不含有机溶剂，避免了有机试剂挥发对药物浓度的影响；

2) 不含有机溶剂，有效降低了提取介质对抗体结合药物的抑制作用，使样品提取和实验后的样品处理更加简单；

15 3) 不含二价金属离子，消除了不同样品间具有络合作用的抗凝剂浓度的差异对药物提取效果的影响；

4) 处理后的血液样品为均质溶液，无需离心便可直接检测，简化了操作，缩短了检测时间；

5) 可获得更可靠的检测结果；

20 6) 基于上述特性，使用本发明提供的提取试剂的检测方法，可更方便地应用于全自动的检测设备，或基于本发明提供的提取试剂的检测方法，可更容易地研制与之配套的全自动的检测设备。

25 本发明所述的免疫抑制剂提取试剂的有效性，源自于其高效的细胞溶解、蛋白变性和与之相应的药物释放能力。因此，本发明不仅可用于人血液样品免疫抑制剂的提取，也可用于人血液和各种动物血液样品的免疫抑制剂以外的其它在体内呈结合状态的药物或非药物物质的提取。

附图说明

图 1 为提取试剂中不同浓度吐温-20 对 FK506 提取效果的影响。

图 2 为提取试剂中不同浓度蛋白变性剂对 FK506 提取效果的影响。

图 3 为提取试剂中不同浓度蛋白酶对 FK506 提取效果的影响。

5 图 4 为样品提取过程中不同孵育温度对校准曲线的影响。

图 5 为不同孵育时间对校准曲线的影响。

图 6 为不同三种前处理液对校准曲线的影响。

图 7A 为基于本发明所述提取试剂的 FK506-TRFIA 检测值与 HPLC-MS 测定值的相关性。

10 图 7B 为基于 ABBOTT-i2000 前处理液的 FK506-TRFIA 检测值与 HPLC-MS 测定值的相关性。

图 7C 为基于索林前处理液的 FK506-TRFIA 检测值与 HPLC-MS 测定值的相关性。

具体实施方式

15 除非另作说明，在权利要求和说明书中按如下阐述使用的定义。

I、免疫抑制剂

本发明中所述免疫抑制剂指能抑制机体免疫细胞的增殖和相关功能，降低机体免疫反应的各种药物；优选的，本发明所述免疫抑制剂指他克莫司、西罗莫司、依维莫司、他左莫司或者环孢菌素。

20 II、提取试剂

本发明所述提取试剂为蛋白变性剂、蛋白水解酶、表面活性剂、pH 缓冲液组成的混合物；通过蛋白变性剂、蛋白水解酶和表面活性剂的协同作用，可快速溶解细胞，释放蛋白结合的免疫抑制剂。

III、免疫抑制剂提取

本发明所述免疫抑制剂提取，指应用所述的提取试剂将样品中结合状态的药物提取出来并成为可检测成分的过程。

将待测血样和提取试剂按适当比例混合；优选地，将 10 μ l-50 μ l 血样与 50 μ l-200 μ l 提取试剂混合；更为优选地，将 25 μ l 血样与 170 μ l 提取试剂混合；涡旋混匀后，加热
5 孵育。选用的孵育温度为蛋白水解酶发挥作用的最适温度；选用的孵育温度和孵育时间要既保证免疫抑制剂被充分解离，又能使蛋白水解酶被有效灭活。一般地，孵育温度为 50 $^{\circ}$ C-90 $^{\circ}$ C，孵育时间为 5min-50min；优选地，选用 60 $^{\circ}$ C-80 $^{\circ}$ C 孵育 10min-30min。孵育结束后，血样与提取试剂的混合物成为均质溶液，可直接应用于免疫分析。

IV、免疫检测

10 免疫检测指利用抗体-抗原(或半抗原)间特异性结合反应检测各种物质的分析方法。本发明所述的免疫检测用于免疫抑制剂的定量测定；所述的免疫检测试剂盒主要包括提取试剂、抗体、固定量的用以与待测物竞争结合抗体的待测物、分析缓冲液和校准品；根据检测模式的不同，可选择标记抗体或待测物。

15 本发明所述的提取试剂的有效性源自于其高效的细胞溶解、蛋白变性和与之相应的药物释放能力，因此，本发明不仅可用于人血液样品免疫抑制剂的提取，也可用于人血液和各种动物血液样品的免疫抑制剂以外的其它呈结合状态的药物或非药物物质的提取；优选的，测试样品为服用免疫抑制剂的患者的抗凝全血样品。

20 本发明的免疫检测试剂盒也包括对本试剂盒操作进行说明的说明书。所述的说明书可以固定在外包装材料上，或以单独的活页形式存放在试剂盒内。所述的说明书可以是印刷或者手写的文字材料，或任何可以存储本说明书并且将信息传递给终端用户的媒介，包括但不限于电子存储媒介，如光盘、磁盘等。

25 尿素是所述提取试剂的一种主要组份；作为一种常用的蛋白变性剂，尿素在高浓度下可以与蛋白质骨架上两个相邻肽键的羰基氧原子形成双氢键，破坏蛋白质的二、三级结构，使蛋白质链充分伸展，失去蛋白质原有的理化性状和生物活性；而当尿素为低浓度时，尿素对蛋白质的变性作用显著降低；基于尿素的该特性，可以使用 6mol/L-10mol/L 的高浓度尿素溶解细胞，使血液蛋白变性，释放免疫抑制剂；同时，少量含尿素的提取试剂样品加入反应容器后被缓冲液所稀释，其尿素浓度降低为原浓度的 1/10-1/5，尿素对反应容器内的抗体活性的影响得以显著降低。

30 枯草杆菌蛋白酶是本发明所述提取试剂的另一种主要组份。枯草杆菌蛋白酶在 60 $^{\circ}$ C-80 $^{\circ}$ C 可以发挥最大的蛋白水解活性，且在该温度下酶活性也快速降低（牛树壹，

韩宝芹。枯草杆菌蛋白酶的纯化及酶学性质，生物技术世界，2014,3,11-12)，因此，在该温度区间枯草杆菌蛋白酶可以在短时间内集中发挥酶解作用，促使溶胞和蛋白变性，同时，在此过程中酶被部分灭活；另外，当含有该酶的提取试剂冷却至室温后，该酶活性也因温度下降而降低（牛树壹，韩宝芹。枯草杆菌蛋白酶的纯化及酶学性质，生物技术世界，2014,3,11-12）；另外，少量提取试剂样品加入反应容器后蛋白酶被缓冲液所稀释；以上三个因素使提取后的样品内残留的酶活性对反应容器内的抗体活性的影响得以显著降低。

表面活性剂是本发明所述提取试剂的另一种重要组份。表面活性剂在本发明中的主要作用是通过与尿素、蛋白酶的协同作用促使细胞破裂，并使细胞裂解后的血液样品处于均质状态；强烈的表面活性剂（如 SDS）具有高效的细胞破裂作用，但其强烈的蛋白变性作用会严重影响抗体活性；本发明使用的非离子型表面活性剂，如吐温-20，在经优化的工作浓度下表现出良好的协同溶胞和增溶作用的同时，并有助于降低免疫分析的本底信号。

以下结合具体实施例，对本发明做进一步说明。应理解，以下实施例仅用于说明本发明而非限制本发明的范围。

以下实施例中，除特别注明外，首先使用本发明所述的提取试剂对血液样品进行处理，然后进行免疫抑制剂浓度检测。

以下实施例中，除特别注明外，所涉及的%为质量体积比（w/v）。

实施例 1、FK506-TRFIA（Time Resolved Fluorescence Immunoassay）

本实施例中，所述的 FK506-TRFIA 是基于固相第二抗体的竞争免疫分析方法，即在羊抗鼠第二抗体包被的微孔中加入处理后的校准品/样品、抗 FK506 单克隆抗体和生物素标记的 FK506，生物素标记的 FK506 与校准品或样品中的 FK506 竞争结合有限的抗 FK506 单克隆抗体，形成的免疫复合物被羊抗鼠第二抗体捕获到微孔表面。洗涤去除未结合的生物素标记的 FK506，加入铕离子（ Eu^{3+} ）标记的链霉亲和素（SA- Eu^{3+} ），使其与微孔内表面免疫复合物中的生物素结合；洗涤去除未结合的 SA- Eu^{3+} ，免疫复合物上的 Eu^{3+} 经解离增强形成稳定的荧光配合物，以荧光强度对 FK506 浓度建立标准曲线，通过校准曲线确定样品中 FK506 浓度。

提取试剂为 50mM Tris-HCl 缓冲液，pH8.0，含尿素 8mol/L，枯草杆菌蛋白酶 5U/ml 和 0.05%吐温-20。

将 170 μ l 提取试剂和 25 μ l 血液样品或校准品混合，涡旋使之充分混匀，70 $^{\circ}$ C 水浴孵育 20min，取出，恢复至室温。

在包被有羊抗鼠二抗（Abcam 公司）的微孔内加入 25 μ l 处理好的血样/校准品和 100 μ l 0.2 μ g/ml TBST-BSA（50mM Tris-HCl，pH7.5，含 0.9% NaCl，0.05%吐温-20，
5 0.05% NaN₃，0.5% BSA）稀释的 FK506 单克隆抗体（上海强耀公司），混匀，室温（20 $^{\circ}$ C -25 $^{\circ}$ C）振板孵育 30min；

在各微孔中加入 50 μ l 含 0.05 μ g/ml 生物素标记 FK506（浙江海正药业有限公司）的 TBST-BSA 溶液，继续反应 30min；

用 TBST 缓冲液洗涤微孔 2 次；

10 加入 150 μ l 含 2 μ g/ml SA-Eu³⁺（苏州新波生物技术有限公司）的 TBST-BSA 缓冲液，振板孵育 20min，使其与微孔表面的生物素相连接；

用 TBST 缓冲液洗涤微孔板 6 次；加入增强液（苏州新波生物技术有限公司），振板孵育 5min，以时间分辨荧光分析仪（Victor 1420,Perkin-Elmer）检测荧光强度，根据荧光强度及校准曲线计算被测样品所含的药物浓度。

15 检测结果分析

以 FK506 校准品浓度为 X 轴，以检测的荧光强度信号值为 Y 轴，进行四参数拟合，得到回归方程及拟合曲线。将待测样品信号值代入回归方程，即可求得样品浓度。本发明中的检测结果的分析还可以利用专业计算分析软件，如 ELISACalc 软件，便于大量样品的快速分析。

20 实施例 2、提取试剂中不同浓度吐温-20 对 FK506 提取效果的影响

在本实施例中，提取试剂为 50mM Tris-HCl 缓冲液，PH 8.0，含尿素 8mol/L，枯草杆菌蛋白酶 5U/ml 和不同浓度的吐温-20；被测样品为健康人全血介质配制的含不同 FK506 浓度的校准品；操作步骤同实施例 1。结果示于图 1。

图 1 显示，随着提取试剂中吐温浓度的增加，荧光值呈显著下降趋势；吐温浓度
25 大于 0.10%（v/v）时，荧光值下降尤为明显；由于含 0.10%-0.20%（v/v）吐温-20 的提取试剂引入反应体系的吐温-20 浓度仅约 0.01%-0.02%（v/v），这种低浓度的吐温-20 在大多数免疫反应体系中不会造成固相抗体解离，也不会对抗体活性产生明显损害，

因此该现象可能与体系所含的尿素有关，在尿素和吐温-20 的协同作用下，造成了固相表面抗体的解离，从而导致检测信号降低。

当提取试剂中不含吐温-20 时，校准曲线各校准品点的荧光强度和抑制率良好，但此时部分样品（约 20%）在检测过程出现血块粘连微孔孔壁的现象，导致检测精密性降低和测量值偏离，而提取试剂中少量的吐温-20 可避免这一现象。根据本实施例，本
5 发明所述提取试剂中表面活性剂吐温-20 浓度优选为 0.02%-0.1% (v/v)。

实施例 3、提取试剂中不同浓度蛋白变性剂对 FK506 提取效果的影响

在本实施例中，提取试剂为 50mM pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液，含吐温-20 0.05% (v/v)，枯草杆菌蛋白酶 5U/ml 和不同浓度的尿素或盐酸胍；被测样品为健康人全血
10 介质配制的含有不同浓度 FK506 的校准品；操作步骤同实施例 1。结果示于图 2。

图 2 显示，随着蛋白变性剂（尿素或盐酸胍）浓度的增加，各校准品荧光强度均呈下降趋势；蛋白变性剂对抗体-FK506 间免疫反应的抑制以及蛋白变性剂促使药物释放所导致的 FK506 浓度的升高是各校准品荧光强度下降的主因。对于不含蛋白变性剂（仅含蛋白酶）的提取试剂，各校准品荧光强度较高，抑制率较低，显示本实验条件
15 下不含蛋白变性剂的提取试剂中所含的蛋白酶不足以充分释放全血样品中蛋白质所结合的 FK506；另外，以不含蛋白变性剂的提取试剂处理后的全血样品为含有块状杂质的混浊溶液，不便于取样，且检测精密性较差。

从图 2 可知，当提取试剂中尿素浓度从 2 mol/L 增加到 8 mol/L，不含 FK506 的校准品 A 以及低浓度 FK506 校准品（如：3ng/mL）的荧光强度下降幅度很小，说明尿素对抗体-FK506 间的免疫反应的抑制作用很低，但对于高浓度的 FK506 校准品（20ng/mL-30ng/mL），随着尿素浓度的增加其荧光强度明显降低，说明只有高浓度的尿素才能充分促使蛋白质变性和 FK506 的释放；当提取试剂中尿素浓度从 6 mol/L 增加到 8 mol/L，各 FK506 校准品的荧光强度和抑制率均变化不大，表明提取试剂中
20 6mol/L-8 mol/L 的尿素对标本的变性作用已近饱和。同尿素相比，盐酸胍显示了更强的蛋白变性作用；当提取试剂中盐酸胍浓度从 1 mol/L 增加到 6 mol/L 时，不含 FK506 的校准品 A 的荧光强度下降明显，表明盐酸胍对抗体-FK506 间的免疫反应的抑制作用很强；同时，随着盐酸胍浓度的升高，高浓度 FK506 校准品的荧光强度的降低幅度大于低浓度 FK506 校准品的荧光强度降低幅度，也体现了药物的充分释放对盐酸胍浓度有一定依赖性。
25

由于基于尿素的提取试剂对抗体-FK506 免疫结合反应的抑制微弱，同时又能高效释放 FK506，且处理后的样品呈全透明的均质溶液，故本发明所述提取试剂优选 6mol/L-8 mol/L 尿素为蛋白变性剂。

实施例 4、提取试剂中不同浓度蛋白酶对 FK506 提取效果的影响

- 5 在尿素、盐酸胍等变性剂的存在下，提取试剂中的蛋白酶浓度应足以在短时间内裂解细胞，促使蛋白变性，释放蛋白结合药物；同时，样品处理后的蛋白酶残留活性不应对免疫结合反应产生明显不良影响。

在本实施例中，提取试剂为 50mM pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液，含吐温-20 0.05% (v/v)，尿素 8mol/L 和不同浓度的枯草杆菌蛋白酶；被测样品为健康人全血介质配制的含有不同浓度 FK506 的校准品；操作步骤同实施例 1。检测结果示于图 3。

15 图 3 显示，当提取试剂中不含有枯草杆菌蛋白酶时，不同 FK506 浓度校准品的抑制率均呈低水平，且变化欠规律，表明此时样品中的 FK506 多为结合状态；另外，不含枯草杆菌蛋白酶的提取试剂处理后的样品均质性也不理想。当提取试剂中枯草杆菌蛋白酶浓度为 2.5U/ml-10.0 U/ml 时，校准品各点的抑制率趋于一致，各校准品均为琥珀色、全透明的均质液体。从图 3 可以看出，提取试剂中枯草杆菌蛋白酶用量为 5U/ml-10U/ml 时，校准品各点的荧光强度和抑制率均趋于一致，而当枯草杆菌蛋白酶用量>10 U/ml 时，校准品各点的荧光强度呈快速下降趋势，提示高浓度的枯草杆菌蛋白酶将损害抗体-抗原间的结合反应。基于以上现象，本发明所述提取试剂中枯草杆菌蛋白酶用量优选为 2.5U/ml-10U/ml。

20 实施例 5、不同孵育温度对校准曲线和血液样品测量值的影响

在本实施例中，提取试剂为 50mM Tris-HCl 缓冲液，pH 8.0，含吐温-20 0.05%(v/v)，尿素 8mol/L，枯草杆菌蛋白酶 5U/ml，提取试剂与样品混匀后，在不同温度下孵育 20min。

25 被测样品为健康人全血介质配制的含有不同浓度 FK506 的校准品以及 12 份 ABBOTT 公司 ARCHITECT i2000 系统专用试剂（FK506 化学发光微粒子免疫检测试剂）测定过的 EDTA 抗凝全血临床样本（来源于中国人民解放军第二军医大学第三附属医院）（测定值示于表 1）。

参考李鹏飞等人方法（李鹏飞, 刘丽宏, 马萍, 等; 高效液相色谱-串联质谱法在他克莫司临床血药浓度监测中的应用, 质谱学报, 2008,29,137-143), 以 HPLC-MS/MS 法复测上述样品, 测定值示于表 1。

表 1 样品提取过程中不同孵育温度对血液样品测定值(ng/mL)的影响

HPLC-MS 测定值 (ng/ml)	1	1	2	3	4	5	6	8	1	1	2	3	
	.2	.6	.2	.5	.0	.2	.7	.6	1.9	6.1	3	7	
ABBOTT i2000 测定值(ng/ml)	1	1	2	3	3	5	6	9	1	1	2	>	
	.0	.3	.6	.2	.4	.0	.1	.2	3.5	5.8	0.1	30	
不同孵育 温度下本方法 检测血液样品 浓度值(ng/ml)	9 0°C	.0	.1	.3	.6	.1	.1	.1	.5	.8	.5	2.1	5.6
	8 0°C	.8	.1	.5	.2	.0	.9	.4	.2	5.2	1.2	9.6	1.4
	7 0°C	.1	.4	.5	.3	.7	.0	.8	.5	2.7	4.9	1.5	5.9
	6 0°C	.4	.3	.6	.6	.9	.0	.3	.8	0.0	.9	5.5	9.4
	5 0°C	.1	.5	.8	.2	.1	.5	.9	.3	.8	.1	.9	1.6
	4 0°C	.5	.2	.8	.2	.4	.5	.6	.7	.4	1.2	5.9	9.9
	3 0°C	.3	.7	.9	.0	.9	.7	.1	.6	.9	5.0	8.9	2.7
	2 0°C	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1
	1 0°C	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1
	1 0°C	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1	.1

5 本发明采用加热孵育方式处理血液样品, 是为了在较短时间内充分发挥蛋白酶的酶解作用, 同时使蛋白酶在加热孵育过程中部分失活, 以降低蛋白酶对后续免疫反应中抗体活性的影响。表 1 和图 4 显示, 当孵育温度低于 60°C 时, 随着孵育温度的降低, 荧光强度降低明显, 样品测量值低于参考方法 (HPLC-MS 法) 测量值且变化无规律; 该现象表明, 样品处理过程中过低的孵育温度不足以充分溶解细胞、变性蛋白和释放

10 药物; 同时, 孵育温度较低时, 样品提取后残留的蛋白酶活性对抗体 (固相第二抗体和抗 FK506 抗体) 的免疫反应活性产生了较大影响, 导致荧光强度降低。当孵育温度处于 70-80°C 区间时, 校准曲线荧光强度较高, 抑制率相对稳定; 在孵育温度为 70°C 时, 样品测量值与 HPLC-MS 和 ABBOTT i2000 测量值均具有较好的一致性; 当孵育

温度为 90℃时，样品测量值有降低趋势。综上，以本发明所述的提取试剂处理样品的加热孵育温度选用 60℃-80℃。

实施例 6、不同孵育时间对校准曲线和血液样品测量值的影响

在本实施例中，提取试剂为 50mM Tris-HCl 缓冲液，pH 8.0，含吐温-20 0.05%(v/v)，
 5 尿素 8mol/L，枯草杆菌蛋白酶 5U/ml，提取试剂与样品混匀后，在 70℃下孵育不同时间；被测样品为健康人全血介质配制的含有不同浓度 FK506 的校准品，以及实施例 5 中所述 12 份 ABBOTT 公司 ARCHITECT i2000 系统专用试剂（FK506 化学发光微粒子免疫检测试剂）测定过的 EDTA 抗凝全血临床样本（来源于中国人民解放军第二军医大学第三附属医院）。

10 图 5 显示，样品处理过程中随着加热孵育时间从 5min 延长至 40min，校准品各点的荧光强度呈现上升趋势；当热孵育时间从 5min 延长至 10min 时，荧光强度增加更为明显，表明当加热孵育时间不足 10min 时，体系残留的蛋白酶活性可能通过酶解抗体而降低检测信号。对于 5min-40min 内的不同孵育时间，样品测量值均与 HPLC-MS
 15 和 ABBOTT-i2000 测量值呈现良好的一致性（表 2）；由于较长的孵育时间下残留的蛋白酶活性更小，本发明的样品处理加热孵育时间选用 10min-30min。

表 2 样品提取过程中不同孵育时间对血液样品测量值(ng/mL)的影响

HPLC-MS 测定值 (ng/mL)	1 .2	1 .6	2 .2	3 .5	4 2	5 7	6 6.	8.6	11.9	16.1	23	37
ABBOTT i2000 测定值(ng/mL)	1 .3	1 .6	2 .2	3 .4	3	5 1	6 6.	9.2	13.5	15.8 .1	20	>30
不同孵育时间下本方法检测血液样品浓度值(ng/ml)	5min .3	1 .5	1 .9	1 3	3 .9	4 8	5 1	6 6.	7.5	10.8	18.2 .3	25 33.5
	10min .9	0 .6	1 .8	2 .8	3 .1	4 9	5 8	6 2	11.	12.8	16.8 .9	26 35.1
	20min	1 .9	1 .5	2 .2	3 .3	4 5	5 8	7.	8.9	11.7	17.1 .2	22 35
	30min .2	1 .6	1	2 .1	3 .9	3 3	4. 3	6.	8	9.4	15.2 .9	22 32.1
	40min .4	1 .5	1 .8	1 .2	3 .3	4	6 2	7. 2	10.	13.2	15.8 .4	20 35.8

实施例 7、不同前处理液的实验对比

本实施例对比了索林公司 (PRO-Trac™ II Tacrolimus ELISA, DiaSorin)、雅培公司 (ABBOTTARCHITECT i2000 System) 和本发明所述前处理液在本发明所述 FK506-TRFIA 中对校准曲线和样品测量值的影响。

5 索林前处理液处理样品：在离心试管中加入 50 μ l 全血样品和 300 μ l 酶解液 (购自索林医疗 (上海) 有限公司, 批号 305102), 震荡混匀 20 秒, 室温静置 15min, 转至 75 $^{\circ}$ C 水浴锅, 加热 15min, 取出试管, 震荡混匀 20 秒, 1800 \times g 离心 10min; 取上清液为样品。

10 ABBOTT 前处理液处理样品：在离心试管中加入 200 μ l 全血样品和 200 μ l 全血沉淀剂 (购自雅培贸易 (上海) 有限公司, 309221), 震荡混匀 10 秒, 10000 \times g 离心 5-6min; 取上清液为样品。

本发明所述提取试剂处理样品：同实施例 1。

15 采用上述三种不同方法处理 55 份经 HPLC-MS 法测定过的 EDTA 抗凝全血临床样本 (来源于中国人民解放军第二军医大学第三附属医院), 按实施例 1 所述步骤检测处理后的各样品; 以 HPLC-MS 作为参照方法, 考察不同前处理液在 FK506-TRFIA 中对校准曲线 (各校准品平行 4 孔测定) (图 6) 和测量值的影响 (图 7A, 7B, 7C)。

20 从图 6 可知, 在所述 FK506 检测方法中, 以有机溶剂为主要成分的 ABBOTT-i2000 前处理液对检测影响较大, 校准曲线荧光强度最低, 平行 4 孔测定各校准品的荧光强度的平行性较差, 提示有机溶剂对反应体系存在不良影响; 基于索林前处理液与本发明所述提取试剂的 FK506 检测有接近平行的校准曲线, 校准品各点精密性良好, 但以本发明所述提取试剂获得的荧光强度为最高, 说明本发明所述提取试剂既能有效释放药物, 其介质对反应体系的影响更为温和。

25 图 7A, 7B, 7C 显示, 在三种方法处理的 55 份样品中, 基于本发明所述提取试剂、ABBOTT-i2000 前处理液、索林前处理液的 FK506-TRFIA 检测值与 HPLC-MS 测定值的相关系数分别为 0.981、0.957、0.951, 说明基于发明所述的提取试剂的 FK506-TRFIA 检测值与 HPLC-MS 法测定值一致性最好。

权利要求书

- 1、一种免疫分析用的血液样品免疫抑制剂药物提取试剂，包括蛋白变性剂、蛋白水解酶、表面活性剂和 pH 缓冲液。
- 2、根据权利要求 1 所述的提取试剂，其特征在于，所述蛋白变性剂选自：尿素、盐酸胍或其它非有机溶剂类蛋白变性剂。
- 3、根据权利要求 2 所述的提取试剂，其特征在于，所述尿素在所述提取试剂中的摩尔浓度为 4mol/L-12mol/L，所述盐酸胍在所述提取试剂中的摩尔浓度为 1mol/L-8mol/L。
- 4、根据权利要求 3 所述的提取试剂，其特征在于，所述尿素在所述提取试剂中的摩尔浓度为 6mol/L-8mol/L，所述盐酸胍在所述提取试剂中的摩尔浓度为 2mol/L-6mol/L。
- 5、根据权利要求 1 所述的提取试剂，其特征在于，所述蛋白水解酶选自：枯草杆菌蛋白酶、蛋白酶 K、分散酶中的一种或多种。
- 6、根据权利要求 5 所述的提取试剂，其特征在于，所述蛋白水解酶为枯草杆菌蛋白酶。
- 7、根据权利要求 6 所述的提取试剂，其特征在于，所述枯草杆菌蛋白酶在所述提取试剂中的量为 2.5U/ml-10U/ml。
- 8、根据权利要求 1 所述的提取试剂，其特征在于，所述表面活性剂选自吐温-20、皂素、Triton X-100 中的一种或多种。
- 9、根据权利要求 8 所述的提取试剂，其特征在于，所述表面活性剂为吐温-20。
- 10、根据权利要求 9 所述的提取试剂，其特征在于，所述吐温-20 在所述提取试剂中按体积占比为 0.005%-1% (v/v)。
- 11、根据权利要求 10 所述的提取试剂，其特征在于，所述吐温-20 在所述提取试剂中按体积占比为 0.02%-0.1% (v/v)。
- 12、根据权利要求 1 所述的提取试剂，其特征在于，所述 pH 缓冲液的 pH 在 6.5-8.5 之间。

- 13、一种用于血液样品中免疫抑制剂药物浓度检测的方法，其特征在于，使用如权利要求 1-12 中任一项所述的提取试剂通过加热方式处理血液样品，然后通过免疫分析测定其中所含的药物浓度。
- 14、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述免疫抑制剂包括他克莫司、西罗莫司、依维莫司、佐他莫司、环孢霉素或其他结构类似物。
- 15、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述提取试剂和所述血液样品混合时，所述血液样品与所述提取试剂的体积比为 1/1-1/10。
- 16、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于，所述提取试剂和所述血液样品混合时，所述血液样品与所述提取试剂的体积比为 1/2-1/5。
- 17、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述加热的温度为 50°C-90°C，所述加热的时间为 5min-50min。
- 18、根据权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述加热的温度为 60°C-80°C，所述加热的时间为 10min-30min。
- 19、一种用于检测血液样品中免疫抑制剂浓度的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括：a) 特异性结合免疫抑制剂药物的抗体，b) 含有所述免疫抑制剂的校准品；c) 如权利要求 1-12 中任一项所述的提取试剂；d) 检测试剂，所述检测试剂为示踪物标记的抗体、抗原或半抗原。
- 20、根据权利要求 19 所述的试剂盒，其特征在于，所述示踪物包括酶、化学发光物质、放射性物质、荧光物质、稀土离子、生物素、地高辛，所述稀土离子包括 Eu^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 及其螯合物配基。

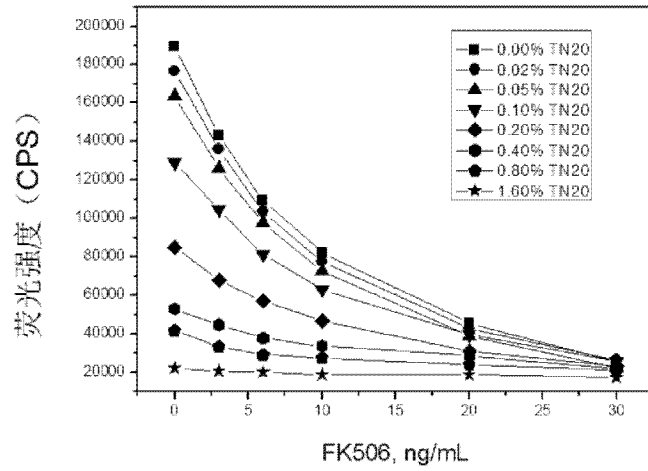


图 1

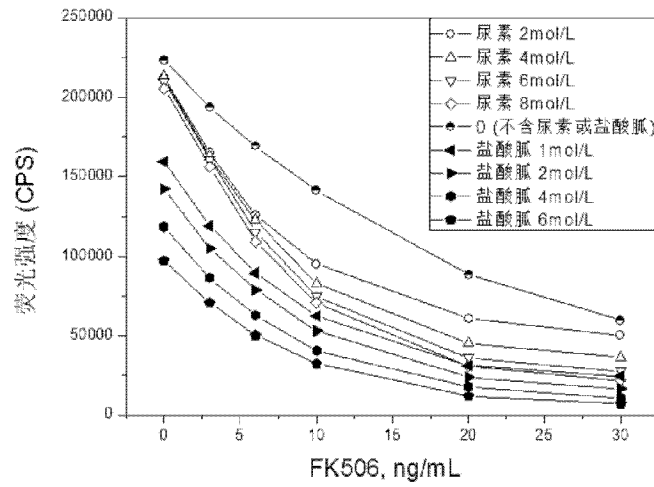


图 2

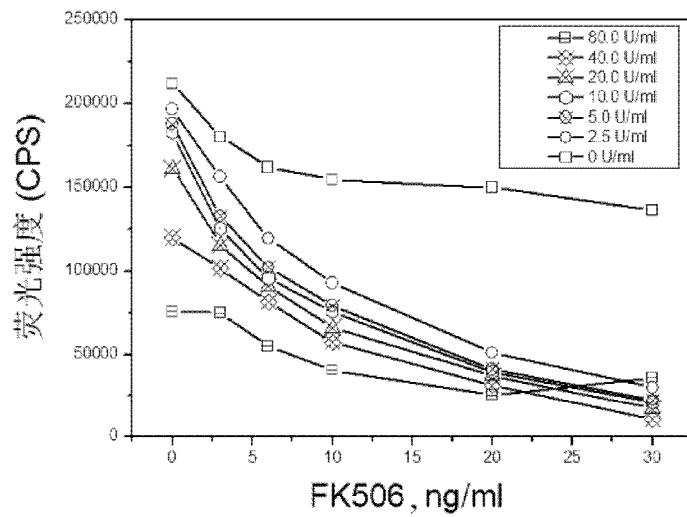


图 3

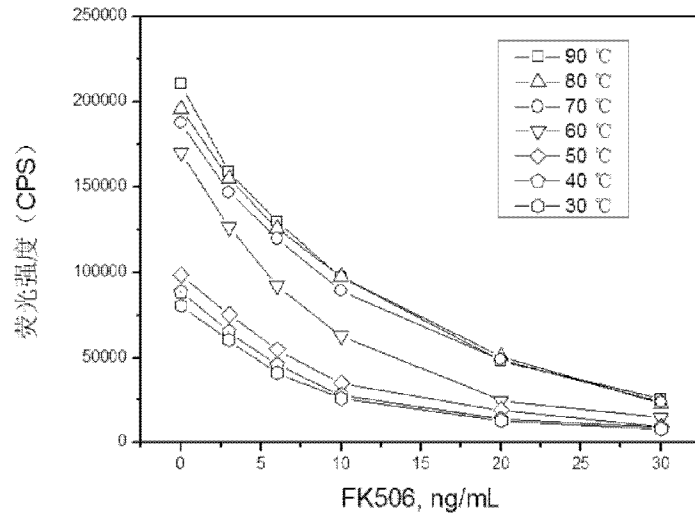


图 4

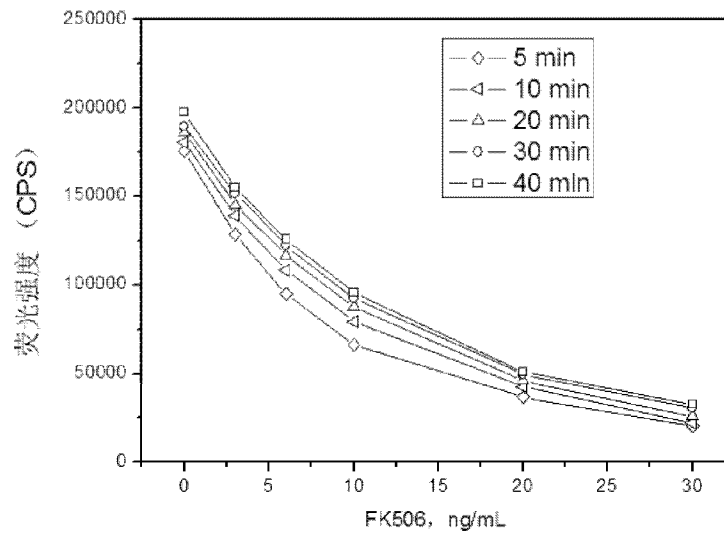


图 5

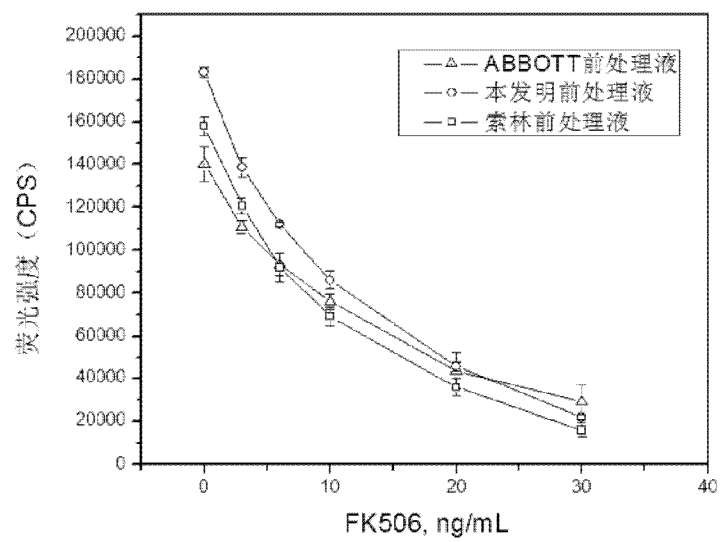


图 6

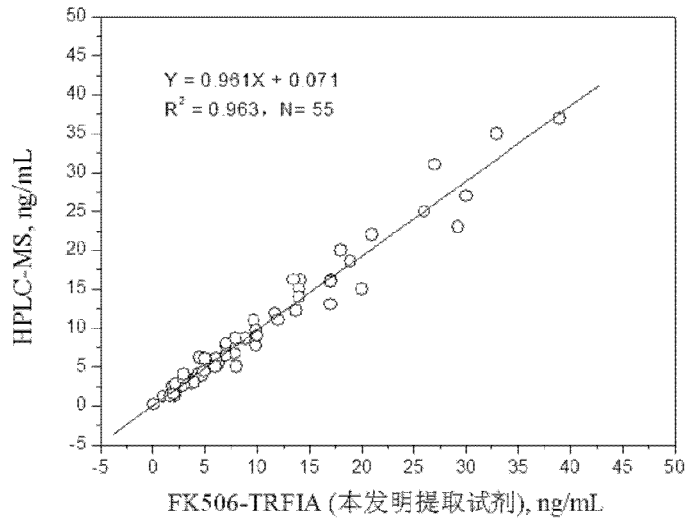


图 7A

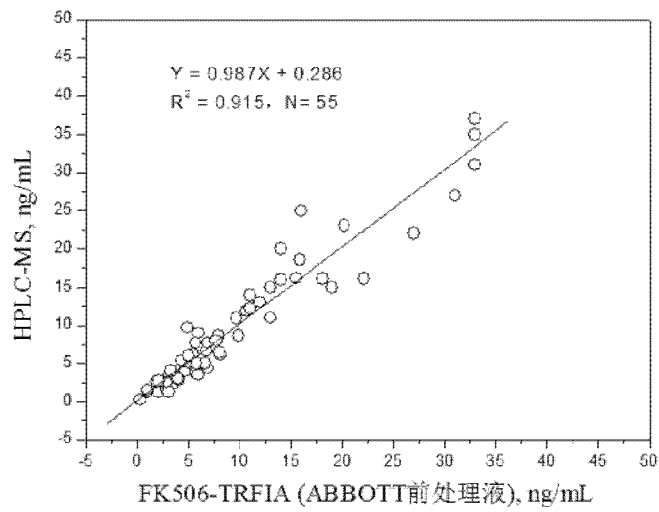


图 7B

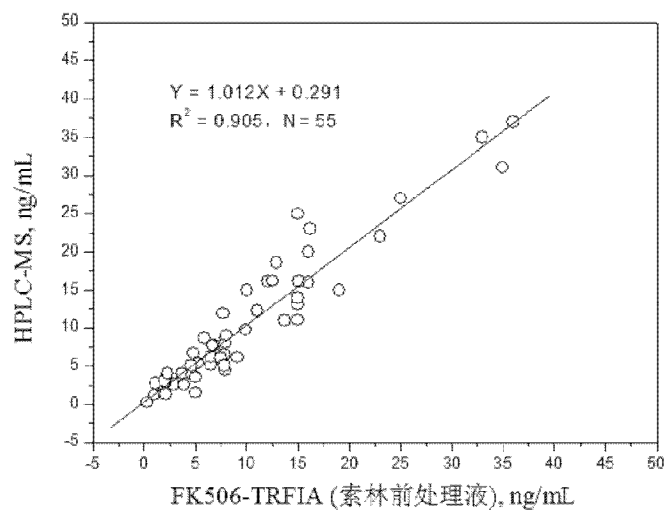


图 7C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/080330

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 1/28 (2006.01) i; G01N 33/577 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33; G01N 1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, CNKI, EPODOC, WPI, ISI Web of Knowledge: drug concentration, immunization, inhibit, extract, release, protein denaturation, guanidine hydrochloride, therapeutic drug monitoring, TDM, immunosuppressant medicine, drug, extracting reagent, albuminous, degeneration, protein, denaturant, urea, guanidine, proteolytic enzyme?, subtilisin, protease K, dispase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102939524 A (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION), 20 February 2013 (20.02.2013), description, paragraphs [0055] and [0080-0082], and figures 3 and 5	1, 5-18
Y	CN 102939524 A (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION), 20 February 2013 (20.02.2013), description, paragraphs [0055] and [0080-0082], and figures 3 and 5	2-4, 19-20
Y	LI, Xiangrong et al., "Denaturation Study of Bovine Serum Albumin Induced by the Guanidine Chloride or Urea by Microcalorimetry", ACTA CHIMICA SINICA, volume 66, number 5, 14 March 2008 (14.03.2008), page 516	2-4
Y	CN 101946179 A (ABBOTT LABORATORIES), 12 January 2011 (12.01.2011), claim 29, and description, paragraph [0066]	19-20
A	CN 101664394 A (SONG, Hongtao), 10 March 2010 (10.03.2010), the whole document	1-20
A	CN 104160273 A (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.), 19 November 2014 (19.11.2014), the whole document	1-20

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
28 December 2015 (28.12.2015)

Date of mailing of the international search report
06 January 2016 (06.01.2016)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
ZHANG, Jing
Telephone No.: (86-10) **62085648**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/080330

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5089390 A (SYNTEX INC.), 18 February 1992 (18.02.1992), the whole document	1-20
A	EP 0717850 B1 (CIBA GEIGY AG et al.), 28 May 1997 (28.05.1997), the whole document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/080330

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102939524 A	20 February 2013	CN 102939524 B	07 October 2015
		US 2013130401 A1	23 May 2013
		JP 5452383 B2	26 March 2014
		WO 2011158738 A1	22 December 2011
		JP 2012002593 A	05 January 2012
		EP 2584337 A1	24 April 2013
CN 101946179 A	12 January 2011	WO 2009078875 A1	25 June 2009
		JP 2011508209 A	10 March 2011
		BR PI0722361 A2	29 April 2014
		CN 101946179 B	13 August 2014
		EP 2232264 A1	29 September 2010
		JP 5134692 B2	30 January 2013
		CA 2709272 A1	25 June 2009
		CA 2709272 C	10 March 2015
		EP 2232264 A4	20 April 2011
CN 101664394 A	10 March 2010	None	
CN 104160273 A	19 November 2014	US 8586322 B2	19 November 2013
		JP 2015512049 A	23 April 2015
		EP 2823304 A1	14 January 2015
		US 2013236918 A1	12 September 2013
		WO 2013133917 A1	12 September 2013
		KR 20140137423 A	02 December 2014
US 5089390 A	18 February 1992	US 5401649 A	28 March 1995
EP 0717850 B1	28 May 1997	CZ 9600662 A3	11 September 1996
		CZ 289434 B6	16 January 2002
		AT 153769 T	15 June 1997
		FI 961004 A	04 March 1996
		CA 2169162 C	03 February 2004
		FI 961004 A0	04 March 1996
		FI 111035 B	15 May 2003
		GR 3023578 T3	29 August 1997
		HU 218743 B	28 November 2000
		NO 960924 A	07 March 1996
		JP H09502272 A	04 March 1997
		HU 9600564 D0	28 May 1996
		PL 176727 B1	30 July 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/080330

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		CA 2169162 A1	16 March 1995
		SK 281369 B6	12 February 2001
		DE 69403484 D1	03 July 1997
		DK 0717850 T3	20 October 1997
		ES 2103136 T3	16 August 1997
		HU T73692 A	30 September 1996
		RU 2138052 C1	20 September 1999
		AU 7694894 A	27 March 1995
		PL 313392 A1	24 June 1996
		HK 1005754 A1	22 January 1999
		BR 9407422 A	09 April 1996
		SK 31096 A3	03 July 1996
		AU 680946 B2	14 August 1997
		WO 9507468 A1	16 March 1995
		CN 1130425 A	04 September 1996
		NZ 273595 A	27 August 1996
		DE 69403484 T2	04 December 1997
		GB 9318612 D0	27 October 1993
		CN 1088196 C	24 July 2002
		NO 960924 D0	07 March 1996
		EP 0717850 A1	26 June 1996
		JP 2892503 B2	17 May 1999

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/080330

<p>A. 主题的分类</p> <p>G01N 1/28(2006.01) i; G01N 33/577(2006.01) i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>G01N33;G01N1</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CNTXT, CNKI, EPODOC, WPI, ISI Web of Knowledge: 药物浓度, 药浓度, 免疫, 抑制, 提取, 释放, 蛋白变性, 尿素, 盐酸胍, 蛋白水解酶, 枯草杆菌蛋白酶, 蛋白酶K, 分散酶, therapeutic drug monitoring, TDM, immunosuppressant medicine, drug, extracting reagent, albuminous, degeneration, , protein, denaturant, urea, guanidine, proteolytic enzyme?, subtilisin, protease K, dispase</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 102939524 A (株式会社日立高新技术) 2013年 2月 20日 (2013 - 02 - 20) 说明书[0055]段, [0080-0082]段, 图3, 5</td> <td>1, 5-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102939524 A (株式会社日立高新技术) 2013年 2月 20日 (2013 - 02 - 20) 说明书[0055]段, [0080-0082]段, 图3, 5</td> <td>2-4, 19-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>李向荣等. "牛血清蛋白在盐酸胍和尿素体系中变性的微量热研究" 化学学报, 第66卷, 第5期, 2008年 3月 14日 (2008 - 03 - 14), 第516页</td> <td>2-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101946179 A (雅培制药有限公司) 2011年 1月 12日 (2011 - 01 - 12) 权利要求29, 说明书[0066]段</td> <td>19-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101664394 A (宋洪涛) 2010年 3月 10日 (2010 - 03 - 10) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104160273 A (西门子医疗保健诊断公司) 2014年 11月 19日 (2014 - 11 - 19) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 102939524 A (株式会社日立高新技术) 2013年 2月 20日 (2013 - 02 - 20) 说明书[0055]段, [0080-0082]段, 图3, 5	1, 5-18	Y	CN 102939524 A (株式会社日立高新技术) 2013年 2月 20日 (2013 - 02 - 20) 说明书[0055]段, [0080-0082]段, 图3, 5	2-4, 19-20	Y	李向荣等. "牛血清蛋白在盐酸胍和尿素体系中变性的微量热研究" 化学学报, 第66卷, 第5期, 2008年 3月 14日 (2008 - 03 - 14), 第516页	2-4	Y	CN 101946179 A (雅培制药有限公司) 2011年 1月 12日 (2011 - 01 - 12) 权利要求29, 说明书[0066]段	19-20	A	CN 101664394 A (宋洪涛) 2010年 3月 10日 (2010 - 03 - 10) 全文	1-20	A	CN 104160273 A (西门子医疗保健诊断公司) 2014年 11月 19日 (2014 - 11 - 19) 全文	1-20
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
X	CN 102939524 A (株式会社日立高新技术) 2013年 2月 20日 (2013 - 02 - 20) 说明书[0055]段, [0080-0082]段, 图3, 5	1, 5-18																					
Y	CN 102939524 A (株式会社日立高新技术) 2013年 2月 20日 (2013 - 02 - 20) 说明书[0055]段, [0080-0082]段, 图3, 5	2-4, 19-20																					
Y	李向荣等. "牛血清蛋白在盐酸胍和尿素体系中变性的微量热研究" 化学学报, 第66卷, 第5期, 2008年 3月 14日 (2008 - 03 - 14), 第516页	2-4																					
Y	CN 101946179 A (雅培制药有限公司) 2011年 1月 12日 (2011 - 01 - 12) 权利要求29, 说明书[0066]段	19-20																					
A	CN 101664394 A (宋洪涛) 2010年 3月 10日 (2010 - 03 - 10) 全文	1-20																					
A	CN 104160273 A (西门子医疗保健诊断公司) 2014年 11月 19日 (2014 - 11 - 19) 全文	1-20																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2015年 12月 28日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2016年 1月 6日</p>																						
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>受权官员</p> <p>张晶</p> <p>电话号码 (86-10)62085648</p>																						

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US 5089390 A (SYNTEX INC) 1992年 2月 18日 (1992 - 02 - 18) 全文	1-20
A	EP 0717850 B1 (CIBA GEIGY AG等) 1997年 5月 28日 (1997 - 05 - 28) 全文	1-20

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/080330

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102939524	A	2013年 2月 20日	CN	102939524	B	2015年 10月 7日
				US	2013130401	A1	2013年 5月 23日
				JP	5452383	B2	2014年 3月 26日
				WO	2011158738	A1	2011年 12月 22日
				JP	2012002593	A	2012年 1月 5日
				EP	2584337	A1	2013年 4月 24日
CN	101946179	A	2011年 1月 12日	WO	2009078875	A1	2009年 6月 25日
				JP	2011508209	A	2011年 3月 10日
				BR	PI0722361	A2	2014年 4月 29日
				CN	101946179	B	2014年 8月 13日
				EP	2232264	A1	2010年 9月 29日
				JP	5134692	B2	2013年 1月 30日
				CA	2709272	A1	2009年 6月 25日
				CA	2709272	C	2015年 3月 10日
				EP	2232264	A4	2011年 4月 20日
CN	101664394	A	2010年 3月 10日	无			
CN	104160273	A	2014年 11月 19日	US	8586322	B2	2013年 11月 19日
				JP	2015512049	A	2015年 4月 23日
				EP	2823304	A1	2015年 1月 14日
				US	2013236918	A1	2013年 9月 12日
				WO	2013133917	A1	2013年 9月 12日
				KR	20140137423	A	2014年 12月 2日
US	5089390	A	1992年 2月 18日	US	5401649	A	1995年 3月 28日
EP	0717850	B1	1997年 5月 28日	CZ	9600662	A3	1996年 9月 11日
				CZ	289434	B6	2002年 1月 16日
				AT	153769	T	1997年 6月 15日
				FI	961004	A	1996年 3月 4日
				CA	2169162	C	2004年 2月 3日
				FI	961004	A0	1996年 3月 4日
				FI	111035	B	2003年 5月 15日
				GR	3023578	T3	1997年 8月 29日
				HU	218743	B	2000年 11月 28日
				NO	960924	A	1996年 3月 7日
				JP	H09502272	A	1997年 3月 4日
				HU	9600564	D0	1996年 5月 28日
				PL	176727	B1	1999年 7月 30日
				CA	2169162	A1	1995年 3月 16日
				SK	281369	B6	2001年 2月 12日
				DE	69403484	D1	1997年 7月 3日
				DK	0717850	T3	1997年 10月 20日
				ES	2103136	T3	1997年 8月 16日
				HU	T73692	A	1996年 9月 30日
				RU	2138052	C1	1999年 9月 20日
				AU	7694894	A	1995年 3月 27日
				PL	313392	A1	1996年 6月 24日
				HK	1005754	A1	1999年 1月 22日
				BR	9407422	A	1996年 4月 9日
				SK	31096	A3	1996年 7月 3日
				AU	680946	B2	1997年 8月 14日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/080330

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		WO	9507468	A1	1995年 3月 16日
		CN	1130425	A	1996年 9月 4日
		NZ	273595	A	1996年 8月 27日
		DE	69403484	T2	1997年 12月 4日
		GB	9318612	D0	1993年 10月 27日
		CN	1088196	C	2002年 7月 24日
		NO	960924	D0	1996年 3月 7日
		EP	0717850	A1	1996年 6月 26日
		JP	2892503	B2	1999年 5月 17日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)