



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108431607 A

(43)申请公布日 2018.08.21

(21)申请号 201680074784.X

(22)申请日 2016.12.20

(30)优先权数据

1562932 2015.12.21 FR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2016/053566 2016.12.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/109376 FR 2017.06.29

(71)申请人 生物梅里埃公司

地址 法国迈合西-兰托阿嘞

(72)发明人 桑德里娜·布瑟雷

弗洛伦斯·贝特斯沃思

热勒莫·马丁内斯

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事

务所(普通合伙) 11413

代理人 王春伟 刘继富

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C08F 220/60(2006.01)

权利要求书4页 说明书20页

(54)发明名称

试剂稀释剂

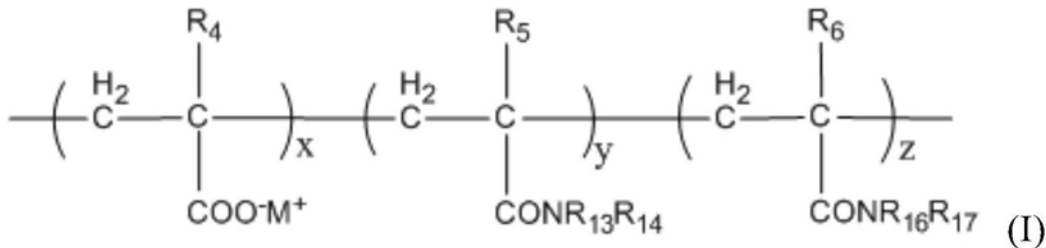
(57)摘要

本发明涉及诊断或预后领域。具体地,其涉及免疫测定组合物,其包含(i)两亲高分子和(ii)基于(甲基)丙烯酸酯单体的两性共聚物,所述单体的一些包含磷酸胆碱基团。所公开的组合物特别是用作稳定剂和/或阻断剂。

1. 一种用于免疫测定的组合物,其至少包含(i)两亲高分子和(ii)基于(甲基)丙烯酸酯单体的两性共聚物,所述(甲基)丙烯酸酯单体的一部分包含磷酸胆碱基团,所述两亲高分子选自以下:

-聚(马来酸酐),其上接枝有至少一个疏水烷基链和至少一个亲水基团,所述聚(马来酸酐)的平均分子量为1000克/摩尔至100000克/摩尔,优选4000克/摩尔至70000克/摩尔,或者

-下式(I)的两亲高分子:



其中

-R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>相同或不同,为氢原子或甲基基团,

-R<sub>13</sub>、R<sub>14</sub>相同或不同,为具有6个至12个碳原子的线性或支化的烷基或烯基基团,另外二者之一可对应于氢原子,

-R<sub>16</sub>、R<sub>17</sub>为(C<sub>1</sub>至C<sub>5</sub>)烷基,另外二者之一可对应于氢原子,

x、y、z对应于结构单元各自的百分比:

-x为20%至90%,

-y为10%至80%,

-z为0至60%,

式(I)的两亲高分子的平均分子量为500克/摩尔至100000克/摩尔,有利地小于或等于50000克/摩尔,优选1000克/摩尔至50000克/摩尔。

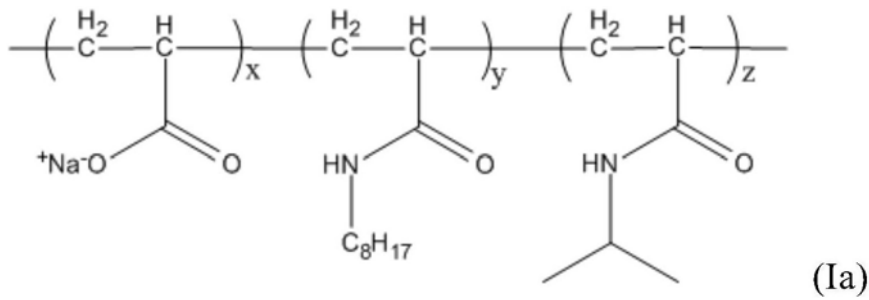
2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于所述疏水烷基链是式(-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-的线性烷基链,其中n是大于或等于4的整数,优选大于或等于6,优选大于或等于8,例如为4至16,优选8至12。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于所述亲水基团是羧酸根基团或带正电荷的基团,特别是烷基化的铵,例如3-(二甲基氨基)-1-丙胺。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其特征在于所述两亲高分子选自被亲水基团取代,特别是被烷基化的铵例如3-(二甲基氨基)-1-丙胺取代的聚(马来酸酐-alt-1-十八碳烯)、聚(马来酸酐-alt-1-十四碳烯)、聚(马来酸酐-alt-1-癸烯)。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的组合物,其特征在于所述两亲高分子选自:

-下式(Ia)的两亲聚合物:



x、y、z对应于结构单元各自的百分比：

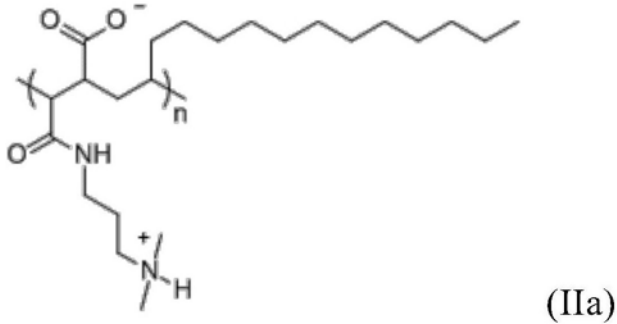
x为34%至36%，优选约35%，

y为24%至26%，优选约25%，

z为38%至42%，优选约40%，

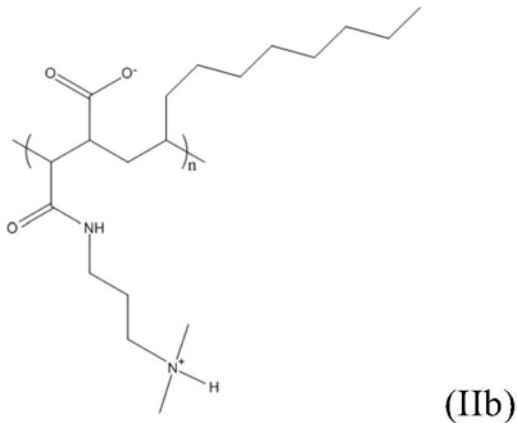
式(Ia)的两亲聚合物的平均分子量为4000克/摩尔至4600克/摩尔，优选约4300克/摩尔，

-下式(IIa)的经取代的聚(马来酸酐-alt-1-十四碳烯)：



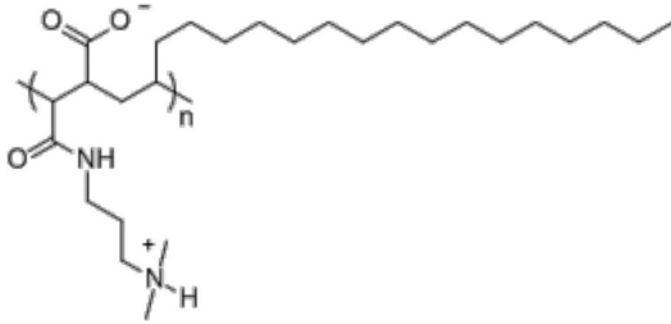
其平均分子量为10000克/摩尔至14000克/摩尔，例如约12000克/摩尔，

-下式(IIb)的经取代的聚(马来酸酐-alt-1-癸烯)：



其平均分子量为16000克/摩尔至20000克/摩尔，例如约18500克/摩尔，和

-下式(IIc)的经取代的聚(马来酸酐-alt-1-十八碳烯)：



(IIc)

其平均分子量为39000克/摩尔至65000克/摩尔。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的组合物,其特征在于所述两性共聚物是基于2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱 (MPC) 单体和另一种甲基丙烯酸酯单体的两性共聚物,所述另一种甲基丙烯酸酯单体是被疏水基团、阴离子基团、阳离子基团或能够形成氢键的基团官能化的。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的组合物,其特征在于所述两性共聚物是基于MPC和被疏水基团官能化的甲基丙烯酸酯的两性共聚物,所述疏水基团选自:

- 线性或支化的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烷基;
- 具有至少一个环烷基的线性或支化的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烷基;
- 具有至少一个双键的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烃链;
- 具有至少一个三键的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烃链;和
- 具有至少一个芳香环的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烃链。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的组合物,其特征在于所述两性共聚物是由NOF CORPORATION销售的Biolipidure™ 206。

9. 一种水溶液,其包含权利要求1至8中任一项所述的组合物和至少一种免疫测定试剂。

10. 根据权利要求9所述的水溶液,其中所述免疫测定试剂选自旨在用于检测或定量可能包含分析物的生物样品中该分析物的结合配偶体,其中所述配偶体可以为标记或未标记的阳性对照、标准品和免疫测定调节剂。

11. 根据权利要求9或10所述的水溶液,所述水溶液特征在于其不包含人或动物来源的稳定剂和/或阻断剂,例如选自动物血清、脱脂乳、水解或非水解酪蛋白、牛或人白蛋白和明胶的稳定剂和/或阻断剂。

12. 一种免疫测定试剂盒,其包含至少一种权利要求9至11中任一项所述的水溶液,和待通过免疫测定进行检测或定量的分析物的至少一种结合配偶体,以及如果适用的话,还包含用于证实所述结合配偶体与所述分析物之间特异性相互作用的必要化合物。

13. 权利要求1至8中任一项所述的组合物或权利要求9至11中任一项所述的水溶液在免疫测定方法中作为稳定剂和/或阻断剂的用途。

14. 根据权利要求13所述的用途,用于减少 (i) 至少一种用于检测或定量可能含有分析物的生物样品中该分析物的结合配偶体,例如标记的结合配偶体,与 (ii) 固相之间的非特异性相互作用。

15. 根据权利要求13或14所述的用途,用于减少 (i) 免疫测定阳性对照、免疫测定标准品和/或免疫测定调节剂,与 (ii) 固相之间的非特异性相互作用。

16. 一种免疫测定方法,其用于在可能含有目标分析物的生物样品中确定该目标分析物的存在或定量该目标分析物,所述方法包括使所述样品与所述分析物的至少两种结合配偶体P1和P2依次或同时接触,以在适当的情况下形成P1/分析物/P2复合体,检测形成的所述复合体的存在使得能够得出所述样品中存在分析物或分析物的量的结论,其中两种配偶体之一P2被标记以显示所述分析物的存在,如果所述分析物存在,另一配偶体P1优选被固定在固相上,所述标记的配偶体P2包含于至少一种权利要求1至8中任一项所述的组合物或至少一种权利要求9至11中任一项所述的水溶液中。

17. 一种免疫测定方法,其用于在可能含有目标分析物的生物样品中确定该目标分析物的存在或定量该目标分析物,所述方法包括使所述样品与所述分析物的至少一种结合配偶体P1接触并与同所述分析物竞争的试剂R1接触,以形成P1/R1复合体,检测形成的所述复合体的存在使得能够间接得出所述样品中不存在分析物或分析物的量的结论,其中所述结合配偶体P1优选被固定在固相上,所述试剂R1被标记以间接显示所述分析物的存在,所述试剂R1包含于至少一种权利要求1至8中任一项所述的组合物或至少一种权利要求9至11中任一项所述的水溶液中。

## 试剂稀释剂

[0001] 本发明涉及诊断或预后领域。具体地,其涉及用于进行免疫测定、特别是用作稳定剂和/或阻断剂的组合物。

### 背景技术

[0002] 免疫测定通常用于临床、食品、药物和化学分析领域。因此,其目的是确定在可能含有一种或多种分析物的样品中是否存在该分析物。免疫测定是本领域技术人员公知的测试,其涉及待测分析物与结合至该分析物的一个或多个配偶体之间的特异性相互作用。作为所述免疫测定的实例,可以提及如ELISA(酶联免疫吸附测定)、ELFA(酶联荧光测定)和RIA(放射免疫测定)的方法,这些方法可以根据“夹心”原理或者还根据“竞争”原理,以及如免疫组织化学、免疫细胞化学、免疫荧光、蛋白质印迹和斑点印迹的免疫检测方法起作用。“竞争”方法通常用于小分子如半抗原,“夹心”方法用于其他分析物。

[0003] 免疫测定包括使可能含有分析物的样品与至少一种标记的结合配偶体或同标记的分析物竞争的试剂接触。所述结合配偶体或竞争性试剂例如由与能够递送信号的标记缀合的抗体形成。这些试剂可以在用于免疫测定之前溶解并储存在稀释剂中。

[0004] 无论所检测的相互作用类型如何,不需要直接附着在固体基质、结合配偶体或竞争性试剂上的试剂在固体基质、结合配偶体或竞争性试剂上的吸附可能导致产生背景噪音。为了尽可能减少背景噪音,因此减少这些非特异性的相互作用是至关重要的。

[0005] 为此,使用阻断剂或饱和剂,其具有使吸附后的位点饱和的作用。

[0006] 因此免疫测定试剂的稀释剂可以包含阻断剂和/或稳定剂,其一方面用于稳定试剂(缀合物、标记),另一方面用于减少试剂例如与固体基质、结合配偶体和/或竞争性试剂的非特异性相互作用。

[0007] 这些阻断剂优选选自动物来源或人类来源的蛋白质,特别是动物血清、脱脂乳,特别是粉末形式的脱脂乳、水解或非水解的酪蛋白、牛和人白蛋白以及明胶。

[0008] 这些生物来源的产品,特别是动物或人类来源的产品具有其组成随批次而变化的缺点。事实上,对于动物血清,其组成可以根据物种、品种、性别以及它们的饲料(季节变化)而变化。对于纯化的蛋白质,例如牛白蛋白,这些白蛋白的品质根据所使用的纯化方法而变化,而纯化方法取决于供应商。牛免疫球蛋白中的污染物如蛋白酶或更大量或更小量的其他分子的存在会导致背景噪音的变化。这些人类或动物来源的原料保持其稳定能力,但是阻断能力因批次而异。此外,必须按照与生物风险有关的安全标准来使用它们,并且在源产品的供应和存储以及处理方面也存在限制。因此,为了克服这些缺点,使用合成稳定剂和/或阻断剂将是有利的,所述合成稳定剂和/或阻断剂可用于免疫测定用组合物中,并且特别是可用于免疫测定用试剂如标记抗体的稀释剂中。

[0009] 2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的两性共聚物在ELISA类型的免疫测定中被描述为稳定剂和/或阻断剂(Sakaki等人,1999J.Biomed.Mater.Res.,47,523;Sakaki等人,2000,Polymer Journal,第32卷,第8期,637-641页)。2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的共聚物由NOF Corporation公司以商品名Biolipidure™或Lipidure®销售。它们被提供为牛白蛋

白的替代物,特别用于减少非特异性相互作用和/或用于稳定标记的抗体(EP1314982A)。

[0010] 专利申请W098/27434和W02008/058963描述了使用两亲聚合物作为膜蛋白的溶剂和稳定剂或在载体应用中作为溶剂和稳定剂。在申请W02010/073119中也描述了两亲高分子(amphipol)家族的这些化合物作为治疗性抗体的稳定剂的用途。

[0011] 申请人现在已经证实,包含两亲高分子(amphipol)和含至少一个磷酸胆碱基团的两性(甲基)丙烯酸酯共聚物的组合的组合物可以有利地用作试剂稳定剂和/或阻断剂,特别是作为常规使用的动物来源的某些稳定剂和/或阻断剂的替代物。

[0012] 此外,非常出人意料的是,申请人证实,在免疫测定中使用根据本发明的这些组合物使得能够明显地降低背景噪音信号,因此有助于增加测定的灵敏度,同时维持试剂随时间变化的稳定性。

### 发明内容

[0013] 因此,本发明涉及用于免疫测定的组合物,其至少包含(i)两亲高分子(amphipol)和(ii)基于(甲基)丙烯酸酯单体的两性共聚物,这些单体的一部分包含磷酸胆碱基团。

[0014] 特别地,amphipol可以是包含马来酸酐或聚丙烯酸酯的均聚物或共聚物的两亲聚合物,该均聚物或共聚物上接枝有至少一个疏水基团和亲水基团,并且具有1000克·摩尔<sup>-1</sup>至100000克·摩尔<sup>-1</sup>,优选4000克·摩尔<sup>-1</sup>至70000克·摩尔<sup>-1</sup>的平均分子量。

[0015] 在具体实施方案中,amphipol选自被亲水基团取代,例如被烷基化的铵,特别是3-(二甲基氨基)-1-丙胺取代的聚(马来酸酐-alt-1-十八碳烯)、聚(马来酸酐-alt-1-十四烯)、聚(马来酸酐-alt-1-癸烯)。

[0016] 在另一个具体实施方案中,任选地与前述具体实施方案结合,根据本发明的组合物的特征在于,两性共聚物是基于2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(MPC)单体和另一种甲基丙烯酸酯单体的两性共聚物,另一种甲基丙烯酸酯单体用疏水基团、阴离子基团、阳离子基团或允许形成一个或多个氢键的基团官能化。

[0017] 在具体实施方案中,两性共聚物是基于MPC和被疏水基团官能化的甲基丙烯酸酯的两性共聚物,其中疏水基团选自

[0018] -线性或支化的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烷基;

[0019] -具有至少一个环烷基的线性或支化的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烷基;

[0020] -具有至少一个双键的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烃链;

[0021] -具有至少一个三键的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烃链;或

[0022] -具有至少一个芳香环的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烃链。

[0023] 例如,疏水基团为Biolipidures<sup>TM</sup>或Lipidure<sup>®</sup>,例如特别是由NOF Corporation销售的Biolipidure<sup>TM</sup> 206。

[0024] 本发明还涉及包含根据本发明的组合物和至少一种免疫测定试剂的水溶液。特别地,在优选的实施方案中,根据本发明的水溶液的特征在于,其不包含人或动物来源的稳定剂和/或阻断剂,例如选自动物血清、脱脂乳,特别是粉末脱脂乳、水解或非水解的酪蛋白、牛或人白蛋白和明胶的稳定剂和/或阻断剂。

[0025] 本发明还涉及免疫测定试剂盒,其包含至少一种根据本发明的水溶液和待通过免疫测定进行检测或定量的分析物的至少一种结合配偶体,以及如果适用的话,还包含用于

证实结合配偶体或配偶体与分析物之间特异性相互作用的必要化合物。

[0026] 根据本发明的组合物和水溶液特别可用于减少

[0027] i. 用于检测或定量可能含有分析物的生物样品中该分析物的至少一种结合配偶体, 例如标记的结合配偶体, 与

[0028] ii. 固相之间的非特异性相互作用。

[0029] 其还可用于减少

[0030] i. 免疫测定阳性对照、免疫测定标准品和/或免疫测定调节剂, 与

[0031] ii. 固相之间的非特异性相互作用。

[0032] 最后, 本发明涉及一种免疫测定方法, 其用于在可能含有目标分析物的生物样品中确定该目标分析物的存在或定量目标分析物, 该方法包括使所述样品与所述分析物的至少两种结合配偶体P1和P2依次或同时接触, 两种配偶体之一P2被标记以显示所述分析物的存在, 如果该分析物存在, 则另一配偶体P1优选被固定在固相上, 所述标记的配偶体P2包含于根据本发明的至少一种组合物或水溶液中以在适当的情况下形成P1/分析物/P2复合体, 检测形成的所述复合体的存在使得能够得出样品中分析物的存在或量的结论。

[0033] 本发明还涉及一种免疫测定方法, 其用于在可能含有目标分析物的生物样品中确定该目标分析物的存在或定量目标分析物, 该方法包括使所述样品与所述分析物的至少一种结合配偶体P1接触并与同该分析物竞争的试剂R1接触, 以形成P1/R1复合体, 检测形成的所述复合体的存在使得能够间接得出样品中不存在分析物或分析物的量的结论, 所述结合配偶体P1优选被固定在固相上, 所述试剂R1被标记以间接显示所述分析物的存在, 所述试剂R1包含于根据本发明的至少一种组合物或水溶液中。

## 具体实施方式

[0034] 因此, 申请人已经出人意料地开发出了免疫测定组合物, 其使得能够替代通常用于免疫测定试剂用稀释剂中的动物来源的大分子。

[0035] 根据本发明的免疫测定组合物包含 (i) 两亲高分子和 (ii) 基于 (甲基) 丙烯酸酯单体的两性共聚物, 这些单体的一部分包含磷酸胆碱基团或更普遍地包含下文描述的式 (III) 的基团, 例如这些单体的一部分是MPC单体 (2-甲基丙烯酰氧乙基-磷酸胆碱)。

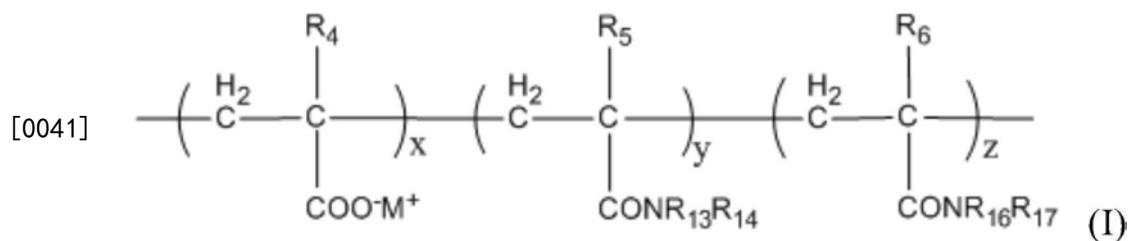
[0036] 两亲高分子

[0037] 在本发明的含义内, 术语“两亲高分子”指短链柔性的两亲聚合物家族, 特别是在综述: Zoonens和Popot, 2014 (J. Membrane Biol. 2014, 247 (0) : 759-796) 和Zoonens等人, 2014 (I. Mus-Veteau (编), Membrane proteins Production for Structural Analysis, © Springer Science+business Media New York 2014, “第7章Amphipols: A General Introduction and Some Protocols”, 第173-203页) 中描述的那些。

[0038] 在具体实施方案中, 可用于根据本发明的组合物中的两亲高分子选自包含马来酸酐或聚丙烯酸酯的均聚物或共聚物的两亲聚合物, 该均聚物或共聚物上接枝有至少一个疏水基团和亲水基团, 并且具有1000克/摩尔至100000克/摩尔, 优选4000克/摩尔至70000克/摩尔的平均分子量。

[0039] 现有技术中描述的第一amphipol为聚丙烯酸酯聚合物, 其中某些羧酸酯官能团被辛胺或异丙胺官能化。

[0040] 在具体实施方案中,可用于根据本发明的组合物中的两亲高分子为如申请W0 98/27434中描述的两亲聚合物,特别是以下式(I)的两亲高分子:



[0042] 其中

[0043]  $\text{-R}_4$ 、 $\text{-R}_5$ 、 $\text{-R}_6$ 相同或不同,为氢原子或甲基基团,

[0044]  $\text{-R}_{13}$ 、 $\text{-R}_{14}$ 相同或不同,为具有6个至12个碳原子的线性或支化的烷基或烯基基团,另外二者之一可对应于氢原子,

[0045]  $\text{-R}_{16}$ 、 $\text{-R}_{17}$ 为( $\text{C}_1$ 至 $\text{C}_5$ )烷基,另外二者之一可对应于氢原子,

[0046]  $x$ 、 $y$ 、 $z$ 对应于单元各自的百分比:

[0047]  $-x$ 为20%至90%,

[0048]  $-y$ 为10%至80%,

[0049]  $-z$ 为0至60%,

[0050] 平均分子量为500克/摩尔至100000克/摩尔,有利地小于或等于50000克/摩尔,优选1000克/摩尔至50000克/摩尔。

[0051] 所有分子量以重量计。

[0052] 在 $\text{R}_{13}$ 至 $\text{R}_{14}$ 烷基基团中,特别可以提及正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、正十一烷基、正十二烷基基团、具有仲碳或叔碳的 $\text{C}_6$ 至 $\text{C}_{12}$ 基团。

[0053] 在 $\text{R}_{13}$ 至 $\text{R}_{14}$ 烯基基团中,特别可以提及具有一个或两个双键的上述 $\text{C}_6$ 至 $\text{C}_{12}$ 线性基团,或具有仲碳或叔碳的相同基团。

[0054] 在 $\text{R}_{16}$ 至 $\text{R}_{17}$ 烷基基团中,特别可以提及乙基、异丙基、正丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、仲戊基、叔戊基、异戊基。

[0055] 式(I)的具有两亲性质的丙烯酸类聚合物以已知方法从丙烯酸类聚合物前体开始获得,该前体任选地可商购获得或通过丙烯酸或甲基丙烯酸的单体或这些单体的混合物的聚合反应而合成。

[0056] 在后者的情况下,获得广义上包含于通用术语“聚合物”中的共聚物。

[0057] 式(I)的具有两亲性质的丙烯酸类聚合物由 $\text{R}_{13}\text{R}_{14}\text{NH}$ 和任选的 $\text{R}_{16}\text{R}_{17}\text{NH}$ 化合物与丙烯酸类聚合物的反应产生,这导致酰胺在整个链上的无规分布。预先或在之后的步骤中将聚合物转化成盐化形式。该合成方法例如在March, J. ((1985) *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, 第372-374页 (Wiley, 纽约)); Wang, T.K., Iliopoulos, I. & Audebert, R. ((1988) *Polym. Bull.* 20, 577-582) 中描述,还在申请W0 98/27434中描述,这些内容通过引用并入。

[0058] 以下示出了上述式(I)的amphipol的实施方案变体:

[0059] 根据第一变体, $\text{R}_{13}$ 、 $\text{R}_{14}$ 对应于氢原子或对应于具有6个至12个碳原子的线性烷基基团,其中 $\text{R}_{13}$ 、 $\text{R}_{14}$ 不能同时为氢原子,优选 $\text{R}_{13}$ 或 $\text{R}_{14}$ 之一为正辛基基团, $\text{R}_{13}$ 和 $\text{R}_{14}$ 基团的另一个为氢原子。

[0060] -根据第二变体,  $R_{16}$ 和 $R_{17}$ 对应于选自异丙基或异丁基基团的烷基基团或对应于氢原子, 并且 $R_{16}$ 、 $R_{17}$ 不能同时对应于氢原子。

[0061] -根据第三变体

[0062]  $x$ 为30%至80%,

[0063]  $y$ 为20%至70%,

[0064]  $z$ 为0至50%。

[0065] -根据第四变体, 具有两亲性质的丙烯酸类聚合物选自以下聚合物, 其中:

[0066]  $M^+$ 为 $Na^+$ 或 $K^+$ ,

[0067]  $R_{13}$ 为正辛基,  $R_{14}$ 为H,

[0068]  $x$ 为70%至80%,

[0069]  $y$ 为20%至30%,

[0070]  $z$ 为0%,

[0071] 平均分子量为2000克/摩尔至50000克/摩尔。

[0072] -根据第五变体, 具有两亲性质的丙烯酸类聚合物选自以下聚合物, 其中:

[0073]  $M^+$ 为 $Na^+$ 或 $K^+$ ,

[0074]  $R_{13}$ 为正辛基,  $R_{14}$ 为H,

[0075]  $R_{16}$ 为异丙基,  $R_{17}$ 为H,

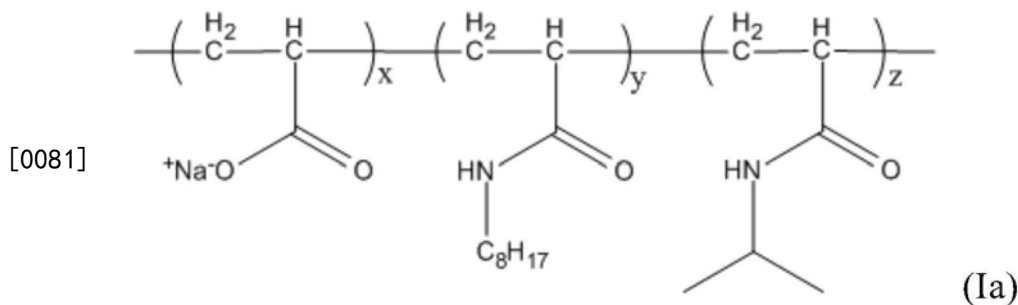
[0076]  $x$ 为30%至40%,

[0077]  $y$ 为20%至30%,

[0078]  $z$ 为30%至50%,

[0079] 平均分子量为2000克/摩尔至50000克/摩尔。

[0080] 在具体实施方案中, 两亲高分子为下式 (Ia) 的聚合物A8-35:



[0082]  $x$ 、 $y$ 、 $z$ 对应于单元各自的百分比,

[0083]  $-x$ 为34%至36%, 优选约35%,

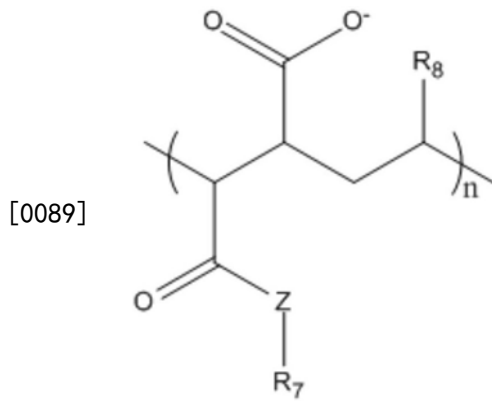
[0084]  $-y$ 为24%至26%, 优选约25%,

[0085]  $-z$ 为38%至42%, 优选约40%,

[0086] 平均分子量为4000克/摩尔至4600克/摩尔, 优选约4300克/摩尔。

[0087] 在另一个具体实施方案中, 可用于根据本发明的组合物中的两亲高分子选自其上接枝有至少一个疏水烷基链和至少一个亲水基团的聚(马来酸酐)。

[0088] 优选地, 其为下式 (II) 的聚合物,



[0090] 其中Z是二价基团,优选O、S或NH, R<sub>7</sub>是亲水基团,优选烷基化的铵, R<sub>8</sub>是疏水基团,例如线性碳链。

[0091] 在具体实施方案中,亲水基团R<sub>7</sub>选自如胺、醇或酮的官能团。

[0092] 这些聚(马来酸酐)的平均分子量优选为1000克/摩尔至70000克/摩尔,更优选10000克/摩尔至20000克/摩尔。

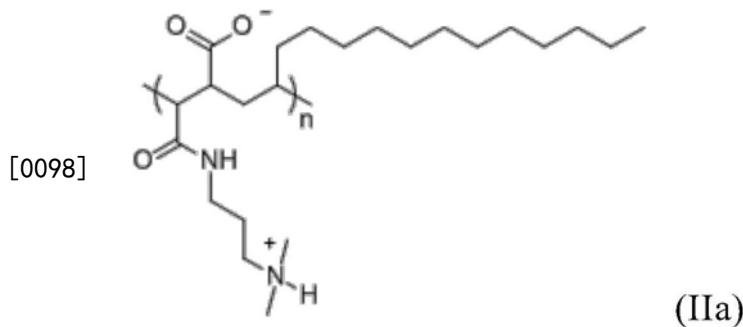
[0093] 在另一个具体实施方案中,亲水基团是羧酸根基团或带正电荷的基团,优选铵,例如下式的烷基化的铵:-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,其中n为2至6,例如3-(二甲基氨基)-1-丙胺。

[0094] 烷基化的铵通过酰胺、酯或硫酯官能团优选连接至马来酸酐,优选通过酰胺官能团连接。

[0095] 疏水烷基链优选选自式-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-的线性烷基链,其中n大于或等于4,优选大于或等于6,优选大于或等于8,例如为4至16,优选8至12。

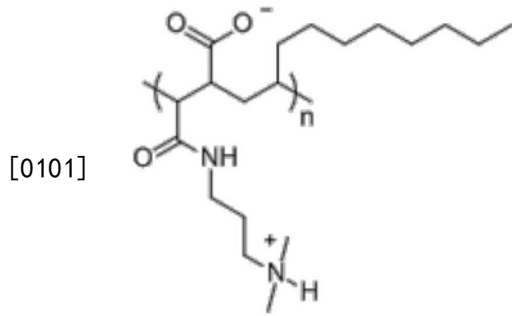
[0096] 马来酸酐的这些聚合物可以特别选自被亲水基团取代的聚(马来酸酐-alt-1-十八碳烯)、聚(马来酸酐-alt-1-十四碳烯)和聚(马来酸酐-alt-1-癸烯),亲水基团优选如上定义的带正电荷的基团,特别是烷基化的铵,例如3-(二甲基氨基)-1-丙胺。

[0097] 在具体实施方案中,根据本发明使用的两亲高分子是下式(IIa)的经取代的聚(马来酸酐-alt-1-十四碳烯):



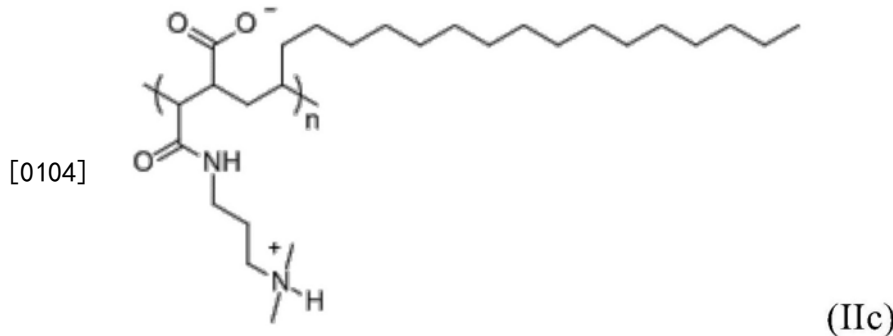
[0099] 其平均分子量为10000克/摩尔至14000克/摩尔,例如约12000克/摩尔。

[0100] 在另一个具体实施方案中,根据本发明使用的两亲高分子为下式(IIb)的经取代的聚(马来酸酐-alt-1-癸烯):



[0102] 其平均分子量为16000克/摩尔至20000克/摩尔,例如约18500克/摩尔。

[0103] 在另一个具体实施方案中,根据本发明使用的两亲高分子是下式(IIc)的经取代的聚(马来酸酐-alt-1-十八碳烯):



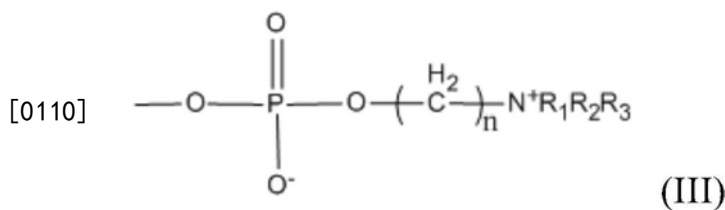
[0105] 其平均分子量为39000克/摩尔至65000克/摩尔。

[0106] 在优选实施方案中,两亲高分子选自PMAL C12 (CAS No.: [869857-14-7])、PMAL C8 (CAS No.: [869856-84-8]) 和PMAL C16 (CAS No.: [869857-16-9])。

[0107] 这些amphipol聚合物中的一些,特别是PMAL系列(例如PMAL C12、PMAL C8和PMAL C16)由Anatrace公司制造和销售。

[0108] 两性聚合物

[0109] 根据本发明的组合物包含如上所述的amphipol与基于(甲基)丙烯酸酯单体的两性共聚物的组合,这些单体的一部分包含下式(III)的基团:



[0111] 其中n是1至6的整数(优选2),

[0112] R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>相同或不同,独立地表示氢或经取代或未经取代的具有1个至6个碳的烷基,优选R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>是甲基。

[0113] 例如,根据式(IV)的R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>可以是甲基、乙基、丙基、丁基、异丁基、戊基、己基。烷基取代基的数目为1至3且取代基包括羟基或芳基。芳基包括苄基或萘基。

[0114] 根据本发明可以使用的两性共聚物的平均分子量优选为100克/摩尔至1000000克/摩尔,例如1000克/摩尔至500000克/摩尔。

[0115] 此外,两性共聚物包括通过使包含式(III)基团的单体与另一可聚合单体聚合而制备的聚合物。

[0116] 在具体实施方案中,包含式(III)基团的单体是包含磷酸胆碱和乙烯基的单体,特别是2-丙烯酰氧乙基磷酸胆碱、2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(以下简称为MPC)、2-(甲基)丙烯酰氧基乙氧基乙基磷酸胆碱、6-甲基(丙烯酰氧己基磷酸胆碱)、10-(甲基)丙烯酰氧基乙氧基壬基磷酸胆碱、烯丙基磷酸胆碱、丁烯基磷酸胆碱、己烯基磷酸胆碱、辛烯基磷酸胆碱、癸烯基磷酸胆碱。这些单体可以通过已知的方法制备,特别是通过日本专利申请第6325/79号和第154591/83号中描述的方法制备。

[0117] 其他可聚合单体包括(甲基)丙烯酸酯,例如(甲基)丙烯酸甲酯、(甲基)丙烯酸乙酯、(甲基)丙烯酸正丁酯、(甲基)丙烯酸异丁酯、(甲基)丙烯酸戊酯、(甲基)丙烯酸己酯、(甲基)丙烯酸庚酯、(甲基)丙烯酸辛酯、(甲基)丙烯酸十三烷基酯、甲基丙烯酸2-羟乙酯;苯乙烯类单体,例如苯乙烯、 $\alpha$ -甲基苯乙烯、具有被一个(或多于一个)甲基基团取代的苯基基团的苯乙烯和具有被氯取代的苯基基团的苯乙烯;优选官能化的甲基丙烯酸酯。

[0118] 这些聚合物及其合成也描述于专利申请EP 1314982 A1中。

[0119] 具体而言,在具体实施方案中,将使用基于(甲基)丙烯酸酯单体的两性聚合物,这些单体的一部分包含磷酸胆碱基团。

[0120] 包含磷酸胆碱基团的单体的百分比优选为1%至100%,例如1%至50%或5%至10%。

[0121] 优选地,两性共聚物基于2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(MPC),特别是基于包含磷酸胆碱基团的甲基丙烯酸酯单体和包含疏水基团、阴离子基团、阳离子基团和/或能够形成氢键的基团的其他甲基丙烯酸酯单体。

[0122] 疏水基团选自

[0123] -线性或支化的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烷基;

[0124] -具有至少一个环烷基的线性或支化的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烷基;

[0125] -具有至少一个双键的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烃链;

[0126] -具有至少一个三键的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烃链;或

[0127] -具有至少一个芳香环的C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>烃链。

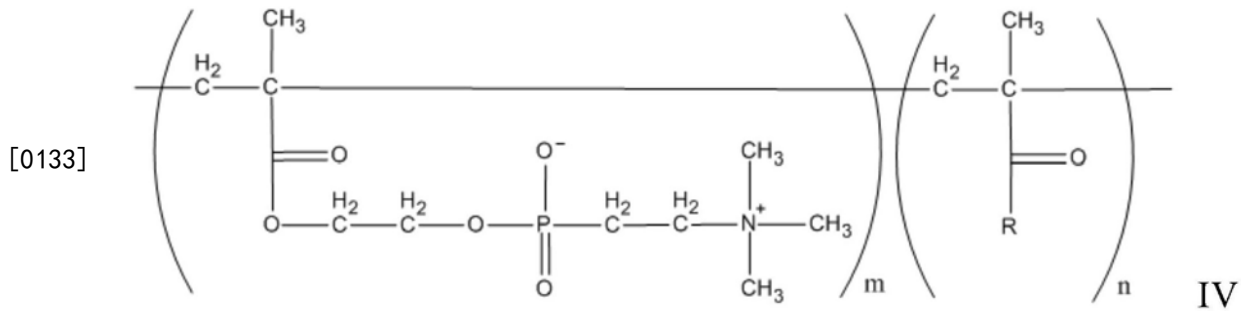
[0128] 优选地,疏水基团选自式-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-的线性烷基链,其中n大于或等于4,优选大于或等于6,优选大于或等于8,例如为4至16,优选8至12。

[0129] 阴离子基团可以特别选自包含羧酸根基团、特别是(C<sub>1</sub>至C<sub>5</sub>)烷基羧酸根的那些,包含磺酸根基团、特别是(C<sub>1</sub>至C<sub>5</sub>)烷基磺酸根的那些,和包含磷酸酯基团、特别是(C<sub>1</sub>至C<sub>5</sub>)烷基磷酸酯的那些。

[0130] 阳离子基团可以特别选自(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sub>9</sub>R<sub>10</sub>R<sub>11</sub>基团,n为1至5的整数,R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>和R<sub>11</sub>相同或不同,为氢或(C<sub>1</sub>至C<sub>4</sub>)烷基链。

[0131] 能够形成氢键的化合物是本领域技术人员众所周知的。能够形成氢键的基团的实例包括胺、醇、硫醇、醛、酸或酮。

[0132] MPC的优选共聚物特别地由NOF Corporation以商品名Lipidure®或Biolipidure®销售,具体地具有以下通式(IV):



[0134] 其中R是如上所定义的疏水基团，m和n对应于两种单体各自的百分比，m为1%至99%，例如1%至50%或1%至10%，n为1%至99%，例如50%至99%或90%至99%。

[0135] 根据更具体的实施方案，2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(MPC)的两性聚合物是MPC和官能化的甲基丙烯酸酯的两性共聚物，其中官能化的甲基丙烯酸酯具有式 $(-CH_2)_n-$ 的线性烷基链，n大于或等于4，或者大于或等于6，或者大于或等于8，例如为4至16，例如8至12。

[0136] 作为优选实例，将选择由NOF Corporation销售的Biolipidure™ 206、Biolipidure™ 203、Biolipidure™ 802或Biolipidure™ 1201用于制备根据本发明的免疫测定组合物。

[0137] 根据本发明的组合物的用途

[0138] 上述根据本发明的免疫测定组合物有利地用作稳定剂和/或阻断剂。

[0139] 在本发明的含义内，“稳定剂”是指能够促进结合配偶体(例如可能在环境温度下储存后变性)的稳定性(热稳定性和随时间变化的稳定性)，能够减少其通过水解而降解，能够阻止其聚集和/或更普遍地能够有助于维持结合配偶体的天然构象和其结合待检测的分析物的能力的化合物或组合物。可以通过比较在环境温度下储存之前和在环境温度下储存30天之后的检测信号来确定免疫测定试剂的热稳定性。如果在30天测量的信号在接近于 $t_0$ 处测量的信号值的范围内，例如在 $t_0$ 处测量的信号的90%至110%的范围内，那么试剂是稳定的。

[0140] “阻断剂”是指能够减少免疫测定的结合配偶体与非特异性分子之间的非特异性相互作用并因此减少在阴性对照存在下获得的信号(“背景噪音”)的化合物或组合物。

[0141] 特别地，根据本发明的组合物可用于减少至少一种免疫测定试剂，优选标记的或未标记的结合配偶体与固相之间的非特异性相互作用。

[0142] 在另一个实施方案中，根据本发明的含水组合物可用于减少

[0143] (i) 免疫测定阳性对照和/或免疫测定标准品和/或免疫测定调节剂与

[0144] (ii) 固相之间的非特异性相互作用。

[0145] 术语“非特异性相互作用”被理解为和结合配偶体与分析物的特异性相互作用相反。

[0146] 特异性相互作用是指结合配偶体对目标分析物的结合偏好(亲和力)比对于非特异性分子(例如一个或多个先天不含有对结合配偶体特异性的识别位点的任意分子)所测量的结合偏好高至少2倍，优选至少5倍，更优选至少10倍或20倍。

[0147] 本文中，术语“分析物”表示样品中包含的物质，其必须通过分析来检测、鉴定和/或定量。因此必须从广义上将其理解为表示化学物质、生物物质或生物化学物质。作为分析物的实例，可以提及蛋白质、肽、半抗原、多糖或寡糖。

[0148] 在本发明含义内的术语“固相”是指任何不溶的材料。免疫测定中的固相优选选择为用于吸引和固定捕获试剂。在另一个替代方案中,固相包含带电荷物质,该带电荷物质具有与捕捉试剂或与该捕捉试剂缀合的物质相反的电荷。固相可以是例如塑料、磁性或非磁性金属、玻璃或硅酮,并且特别是测试管、微板、珠、微粒、芯片、锥体或本领域技术人员已知用于进行免疫测定的任何其他构造。

[0149] 包含根据本发明的组合物和免疫测定试剂的水溶液

[0150] 通过在包含水和根据本发明的组合物的溶剂中稀释免疫测定试剂来获得水溶液,根据本发明的组合物含有如前述部分中所述的amphipol和两性聚合物。

[0151] 因此,本发明的另一方面涉及包含如上定义的根据本发明的组合物和至少一种免疫测定试剂的水溶液。

[0152] 在本发明的含义内,术语“免疫测定试剂”是指旨在与分析物或结合配偶体特异性相互作用的任何试剂。

[0153] 当然,例如术语“免疫测定”中的前缀“免疫”在本申请中不视为严格地表示所述结合配偶体必定是免疫起源的配偶体,例如抗体或抗体片段。实际上,如本领域技术人员所熟知的,该术语更广泛地还用于表示这样的测试和方法:其中结合配偶体不是免疫起源的或天然的配偶体,而是例如由希望进行检测和/或定量的分析物的受体组成。条件是所讨论的结合配偶体应当能够与目标分析物特异性结合。因此,术语ELISA通常用于使用严格意义上非免疫性的结合配偶体的测定,该术语更一般地被英文术语“配体结合测定”涵盖,而术语“免疫”包含在对应于首字母缩略词ELISA的全称中。为了清楚和一致,在本申请中使用术语“免疫”来表示使用能够结合、检测和/或定量所寻找的分析物的至少一种结合配偶体的任何生物分析,优选能够特异性地结合、检测和/或定量所寻找的分析物的任何生物分析,即使所述结合配偶体不具有严格意义上的免疫性质或来源。

[0154] 作为存在于根据本发明的水溶液中的结合配偶体类型的试剂的实例,可以提及抗体、抗体片段、Nanofitins、受体、适配体,DARPin或任何其他特别选择的大分子以获得与分析物的特异性相互作用,优选与分析物高亲和力的相互作用,其中通过表面等离子体共振测量的 $K_D$ 小于 $1\mu\text{M}$ ,特别是小于 $100\text{nM}$ ,优选小于 $10\text{nM}$ 。

[0155] 可以如下获得多克隆抗体:用免疫原免疫动物,然后取出所述动物的血清,并通过例如亲和柱层析在柱上将所述抗体与血清的其他成分分离,从而以纯化形式回收所需抗体,在层析柱上固定被抗体特异性识别的抗原,特别是免疫原或使用蛋白A或蛋白G。

[0156] 单克隆抗体可以通过本领域技术人员众所周知的杂交瘤技术获得。单克隆抗体也可以是通过本领域技术人员众所周知的技术由基因工程获得的重组抗体。

[0157] 作为抗体片段的实例,可以提及片段Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 以及scFv(单链可变片段)、dsFv(双链可变片段)。这些功能性片段可以特别地通过基因工程获得。

[0158] Nanofitins(商品名)是小蛋白质,其与抗体一样能够与生物靶标结合,从而使该靶标能够在生物体内被检测、捕获或非常简单地被靶向。

[0159] 适配体是寡核苷酸,通常是在包含最多 $10^{15}$ 种不同序列的库中鉴定的RNA或DNA,该鉴定通过称为SELEX(“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment”(Ellington AD和Szostak JW,1990,Nature,346:818-822))的体外选择的组合方法进行。考虑到RNA采用不同和复杂结构的能力,大多数适配体是RNA化合物,这使得可以在其表面

上形成具有不同几何形状的空穴,从而允许固定各种配体。适配体是可用于生物技术、诊断或治疗应用的感兴趣的生物化学工具。它们的选择性和固定配体的特性与抗体相当。

[0160] “DARPin”,表示Designed Ankyrin Repeat ProteINS(Boersma YL and Plü tckthun A,2011,Curr.Opin.Biotechnol,22:849-857),是另一类蛋白质,其能够模拟抗体并以高亲和力和高选择性结合目标蛋白质。它们来源于锚蛋白家族,这些蛋白质是适配体蛋白,其允许整合膜蛋白固定至构成细胞质膜“骨架”的血影蛋白/肌动蛋白网络。锚蛋白的结构基于大约33个氨基酸的基序重复,对于DARPin也是如此。每个基序具有螺旋-转角-螺旋型的二级结构。DARPin包含至少三个,优选四个至五个重复基序,并通过筛选组合库获得。

[0161] 在具体实施方案中,包含在根据本发明的水溶液中的免疫测定试剂选自旨在用于检测或定量可能含有分析物的生物样品中该分析物的结合配偶体,其中所述结合配偶体可以是标记(例如标记的抗体)或不标记的免疫测定的阳性对照、标准品或调节剂。

[0162] “阳性对照”是指在含有待检测分析物的样品的存在下,能够产生符合免疫测定期望信号的信号的化合物。

[0163] “标准品”是指用于产生标准范围的化合物,这是可以对分析物进行定量的必要步骤。标准品的已知浓度或量与通过免疫测定获得的信号之间的关系用数学表示:即为校准曲线。

[0164] “调节剂”是指用于调节分析物的免疫测定测量值的化合物。在这种情况下,由调节剂产生的信号及其浓度是已知的。考虑到免疫测定试剂的老化或应用条件,调节剂用于调节预先得到的校准曲线。

[0165] 存在于根据本发明的水溶液中的结合配偶体可以被标记,即结合,优选共价地、直接地或间接地与标记结合。很多时候,使用交联剂通过化学偶联进行标记。其因此被称为缀合的结合配偶体。经常使用的标记的结合配偶体的实例是与酶缀合的抗体,也称为缀合抗体。

[0166] “标记”特别是指能够直接或间接产生可检测信号的任何分子。这些检测标记的非限制性清单由下列组成:

[0167] ●产生可通过例如比色、荧光、发光进行检测的信号的酶,如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,

[0168] ●发色团,如荧光化合物、发光化合物、染料,

[0169] ●放射性分子,如 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 或 $^{125}\text{I}$ ,

[0170] ●荧光分子如Alexa或藻青蛋白,和

[0171] ●电化学发光盐,例如基于吡啶鎓或钌的有机金属衍生物。

[0172] 因此,在具体实施方案中,根据本发明的水溶液除了前面部分所述的聚合物之外还包含与标记缀合的抗体,也称为“检测抗体”。

[0173] 还可以使用间接检测系统,例如能够与抗配体反应的配体。然后配体对应于标记,与结合配偶体一起构成缀合物。

[0174] 配体/抗配体对是本领域技术人员众所周知的,例如以下配体/抗配体对是本领域技术人员众所周知的:生物素/链霉亲和素、半抗原/抗体、抗原/抗体、肽/抗体、糖/凝集素、多核苷酸/互补多核苷酸。

[0175] 然后抗配体可以通过所述的直接检测标记直接进行检测,或者抗配体本身可以通过其他配体/抗配体对等进行检测。

[0176] 存在于根据本发明的水溶液中的免疫测定试剂的量取决于其最终用途。在具体实施方案中,免疫测定试剂是以100pg/mL至20μg/mL,例如20ng/mL至3μg/mL的比例存在的标记抗体。

[0177] 根据本发明的聚合物组合物有利地用于替代通常添加有作为稳定剂和/或阻断剂的试剂的分子,特别是动物来源的大分子。

[0178] 因此,在具体实施方案中,根据本发明的水溶液的特征在于,其不包含动物来源的稳定剂和/或阻断剂,该动物来源选自动物血清、水解或未水解的酪蛋白、脱脂乳,特别是粉末脱脂乳、牛或人白蛋白和明胶,即使使用了除蛋白质以外的大分子仍将其通称为“填充蛋白质”。

[0179] 该水溶液优选以用作免疫测定中阻断剂的有效浓度包含前文段落中所述的amphipol和两性共聚物。这些有效浓度将由本领域技术人员确定,特别是根据所用试剂浓度、试剂性质、所需的稳定和/或阻断效果和/或免疫测定的类型来确定。

[0180] 典型地,将使用的水溶液中amphipol的最终浓度为0.01%至0.2%(重量/体积)、优选0.02%至0.05%、例如0.02%,水溶液中两性聚合物的最终浓度为0.01%至0.3%(重量/体积)、优选0.03%至0.08%,例如0.05%。

[0181] 水溶液可以另外含有其他成分,特别是缓冲剂、清洁剂、盐、染料、软化剂、防腐剂等。

[0182] 根据本发明的免疫测定试剂盒

[0183] 本发明的水溶液特别可用于检测可能含有分析物的生物样品中该分析物的方法,该方法包括通过使所述样品与至少一种分析物的结合配偶体接触而进行免疫测定。

[0184] 因此,包含根据本发明的水溶液的免疫测定试剂盒构成了本发明的另一个主题。

[0185] 免疫测定试剂盒含有一种或多种进行免疫测定所必需的化合物,特别是一种或多种标记或未标记的分析物的结合配偶体,以及用于检测结合配偶体与分析物之间的特异性相互作用所必需的所有化合物。

[0186] 当免疫测定为夹心类型时,免疫测定试剂盒则包含两种结合配偶体,两种结合配偶体中的一种被标记以形成“示踪物”或“检测配偶体”,另一配偶体被捕获在固相上,也被称为“捕获配偶体”。

[0187] 根据本发明的这些免疫测定试剂盒还可以包含一种或多种以下组成:

[0188] ●用捕获配偶体如捕获抗体敏化的固相,例如微板或锥体,

[0189] ●洗涤液,

[0190] ●标记的结合配偶体,例如缀合抗体,

[0191] ●不含免疫测定试剂的根据本发明的组合物,

[0192] ●根据本发明的组合物或根据本发明的包含作为阳性对照试剂的水溶液,

[0193] ●根据本发明的组合物或根据本发明的包含一种或多种作为标准品的已知浓度试剂的水溶液,

[0194] ●根据本发明的组合物或根据本发明的包含作为调节剂的已知浓度试剂的水溶液,

[0195] ●进行免疫测定的说明书。

[0196] 在通过例如Vidas®型的自动装置进行免疫测定的具体实施方案中,根据本发明的免疫测定试剂盒是包含以下单独要素的盒:

[0197] ●锥体,其用结合配偶体、例如待检测分析物的特异性抗体敏化,

[0198] ●套盒,即包含多个孔、例如4个至20个孔的固相,其中一些优选是密封的,至少一个孔包含根据本发明的水溶液,例如含有试剂的水溶液,该试剂优选为对待检测分析物特异的标记抗体,

[0199] ●如果适用的话,不含免疫测定试剂的根据本发明的组合物,

[0200] ●如果适用的话,根据本发明的组合物或根据本发明的包含作为阳性对照试剂的水溶液,

[0201] ●如果适用的话,根据本发明的组合物或根据本发明的包含作为调节剂的已知浓度试剂的水溶液。

[0202] 上述试剂盒中所述的固相和套盒本身也构成本发明的一部分。

[0203] 根据本发明进行免疫测定的方法

[0204] 本发明还涉及用于在可能含有分析物的生物样品中确定该分析物的存在或对该分析物进行定量的任何免疫测定方法,其包括使用特别是作为阻断剂和/或稳定剂的本发明的组合物或水溶液。

[0205] 因此,本发明还涉及用于检测可能含有分析物的生物样品中该分析物的方法,其包括:

[0206] i.通过使所述样品与分析物的至少一种结合配偶体接触而进行免疫测定,

[0207] ii.如果适用的话,用于通过使阳性对照与分析物的所述一种或多种结合配偶体接触来检查免疫测定的有效性的测试,

[0208] iii.读取免疫测定结果,

[0209] iv.当通过步骤i中的免疫测定所获得的信号大于免疫测定阈值时,确定测试样品中存在所述分析物,

[0210] 所述方法包括使用根据本发明的组合物或水溶液。

[0211] 在上述检测方法的实施方案中,步骤(i)中进行的免疫测定使用根据本发明的组合物或水溶液。

[0212] 在上述检测方法的另一个实施方案中,使用根据本发明的水溶液获得步骤(ii)中进行的对照测试,其中试剂是对照。

[0213] 当然,可以组合前面两个实施方案。

[0214] 在本发明情况下,测试样品可以为各种来源,例如为食品、环境、生物、兽医、临床、药物或化妆品来源。

[0215] 在食品来源的样品中,可以非限制性地提及奶制品(酸奶、奶酪等)、肉、鱼、蛋、水果、蔬菜、水、饮料(奶、果汁、碳酸饮料等)的样品。当然,这些食品来源的样品也可以取自酱汁或更精细的菜肴或未加工或部分加工的原料。食品样品也可以来源于动物饲料,例如饲料饼或动物膳食。对于所有这些样品,如果其不是液体,则事先处理以使其处于液态。

[0216] 如上所述,样品可以是环境来源的,并且可以由例如取自地表、水等的样品组成。

[0217] 样品还可以由人或动物来源的生物样品组成,其可以对应于生物流体样品(尿液、

全血或衍生物如血清或血浆、唾液、脓液、脑脊液等)、粪便(例如霍乱腹泻物)、取自鼻、喉咙、皮肤、伤口、器官、组织或分离的细胞的样品、以及拭子样品。显然这是非限制性清单。

[0218] 通常,术语“样品”是指用于分析目的而取自一个或多个实体的部分或量,更特别是小部分或少量。该样品可以任选地经历预处理,预处理例如涉及混合、稀释或研磨步骤,特别是在初始实体处于固态的情况下。

[0219] 分析的样品通常可能含有或疑似含有至少一种分析物,该分析物代表待检测、待表征或待监测的微生物、疾病或生理状况的存在。

[0220] 用于通过免疫测定检测分析物的这种方法的步骤是本领域技术人员众所周知的上述步骤。特别地,第一步骤在于使测试样品与分析物的一种或多于一种结合配偶体接触,优选地与至少两种结合配偶体接触以进行夹心测定。如上所述,两种配偶体中的一种可以与标记偶联以形成缀合物或示踪物。如本领域技术人员已知的,其他结合配偶体可以被捕获在固体载体上。

[0221] 从而,由缀合物发出的检测信号与生物样品中分析物的量成比例。

[0222] 免疫测定 i) 和对照测试 ii) 可以以任何顺序、同时或相继地在相同或不同的固相载体上进行。

[0223] 免疫测定的读取也是本领域技术人员众所周知的步骤,其取决于所使用的测定。

[0224] 最后,最后的步骤在于,当通过步骤 i) 中的免疫测定获得的信号大于免疫测定的检测阈值时,确定测试样品中存在所述分析物。该步骤也是本领域技术人员众所周知的。

[0225] 本发明的另一主题涉及一种在可能包含分析物的生物样品中进行免疫测定来定量所述目标分析物的方法,其包括

[0226] i. 通过使所述样品与分析物的至少一种结合配偶体接触而进行免疫测定,

[0227] ii. 如果适用的话,用于通过使阳性对照与分析物的所述一种或多于一种结合配偶体接触来检查免疫测定的有效性的测试,

[0228] iii. 如果用于检查有效性的测试是阳性的,则读取免疫测定结果,和

[0229] iv. 通过将来自免疫测定的信号与标准曲线进行比较来确定测试样品中所述分析物的量,其中试剂是免疫测定调节剂,

[0230] 所述方法包括使用根据本发明的组合物或水溶液。

[0231] 在上述检测方法的实施方案中,步骤(i)中进行的免疫测定使用根据本发明的组合物或水溶液。

[0232] 在上述定量方法的另一个实施方案中,使用根据本发明的水溶液获得步骤(ii)中进行的对照测试,其中试剂是对照。

[0233] 在上述定量方法的又一个实施方案中,使用根据本发明的水溶液获得步骤(iv)中使用的标准曲线,其中试剂是免疫测定调节剂。

[0234] 当然,可以组合前面三个实施方案。

[0235] 当然,在用于检测目标分析物的方法的上下文中所述的对样品和各种方法步骤的描述适用于对目标分析物进行定量的方法。唯一的区别在于最后的步骤,该步骤在于如上所述的通过与标准曲线比较来确定分析物的量。

[0236] 在上述方法的具体实施方案中,根据本发明的进行免疫测定的方法包括,使所述样品与所述分析物的至少两种结合配偶体P1和P2依次或同时接触,两种配偶体之一P2被标

记以显示所述分析物的存在,如果该分析物存在,则另一配偶体P1优选被固定在固相上,所述标记的配偶体P2包含于如上所述的根据本发明的至少一种组合物或根据本发明的至少一种水溶液中,以在适当的情况下形成P1/分析物/P2复合体,检测形成的所述复合体的存在使得能够得出样品中分析物的存在或量的结论。

[0237] 在另一个实施方案中,进行免疫测定的方法包括,使所述样品与所述分析物的至少一种结合配偶体P1接触并与该分析物竞争的试剂R1接触,以形成P1/R1复合体,检测形成的所述复合体的存在使得能够间接得出样品中不存在分析物或分析物的量的结论,所述结合配偶体P1优选被固定在固相上,所述试剂R1被标记以间接显示所述分析物的存在,所述试剂R1包含于根据本发明的至少一种组合物或根据本发明的至少一种水溶液中。

[0238] 前面部分所述的相同的特征和优选方案,特别是关于免疫测定不同步骤中具体聚合物和化合物的选择,也适用于根据本发明的检测方法和定量方法。

[0239] 本发明的免疫测定方法特别包括使用上文所述的本发明的免疫测定试剂盒。

[0240] 根据以下实施例将更好地理解本发明,所述实施例是为了说明的目的而给出的并且是非限制性的。

[0241] 实施例

[0242] 用于测定心肌肌钙蛋白I的、用于本发明试剂稀释剂的不同制剂的比较

[0243] 用VIDAS®自动免疫测定仪(bioMérieux)对用于免疫测定心肌肌钙蛋白I的缀合抗体稀释剂进行研究。一次性锥体既可用作反应的固相,也可用作移液系统。自动分析仪的套盒由10个孔(X0至X9)组成,孔上面覆盖有密封和标记的铝箔。第一个孔(X0)包含预切部分以便于引入样品。最后一个孔(X9)是测量底物荧光的光学比色皿。分析所需的各种试剂包含在中间的孔中。从而,测定的所有步骤由仪器自动执行。这些步骤由反应混合物的一系列吸入和返回循环构成。心肌肌钙蛋白I的免疫测定通过单步夹心测定进行。

[0244] a) 锥体的敏化和钝化

[0245] 所用抗体的特征和供应商列于下表1中。将锥体用300 $\mu$ L单克隆抗体19C7和B90的溶液敏化,每种抗体在pH6.2的PBS缓冲液中稀释至2.5 $\mu$ g/mL。在+18/25 $^{\circ}$ C下用敏化溶液孵育约20小时后,将锥体清空。然后加入300 $\mu$ L含有10g/L牛白蛋白的相同溶液。在+18/25 $^{\circ}$ C下继续钝化过夜。将锥体清空、干燥,然后在+4 $^{\circ}$ C下保存、防潮直到使用。

[0246] 表1. 用于心肌肌钙蛋白I的免疫测定的抗体

抗体名	靶标	供应商 (Cat. No.)
<b>19C7</b>	TnI	Hytest (4T21-19C7)
[0247] <b>B90</b>	TnI	SDIX (B9085MA06-MA)
<b>3D5F7</b>	TnI	bioMérieux (非商购)
<b>7B9</b>	TnC	Hytest (4T27-7B9)

[0248] 缩写TnI对应于心肌肌钙蛋白I,缩写TnC对应于心肌肌钙蛋白C.缩写Cat.No.对应于供应商的参考货号。

[0249] b) 缀合抗体稀释剂和缀合物溶液的制备

[0250] 根据表2制备缀合抗体的各种稀释剂溶液。

[0251] 表2. 缀合抗体的各种稀释剂的组成

[0252]

化合物	REF 稀释剂	稀释剂 1	稀释剂 2	稀释剂 3 本发明的 稀释剂
PBS pH 6.4	X	X	X	X
马血清 5%	X	X		
Biolipidure 206 <sup>1</sup> 0.05%			X	X
PMAL C12 <sup>2</sup> 0.02%		X		X

[0253] X表示化合物存在于该稀释剂中。

[0254] <sup>1</sup>由NOF Corporation以参考号Biolipidure-206销售。

[0255] <sup>2</sup>CAS No.869857-14-7由Anatrace公司以参考号P5012销售。

[0256] 使用稀释剂REF和稀释剂1至3制备缀合物的各种溶液。缀合物的每种溶液含有与碱性磷酸酶偶联的Fab'片段形式的2种单克隆检测抗体3D5F7和7B9(在表1中描述)。这些缀

合抗体在以上表2中描述的各种稀释剂中分别被稀释至大约0.5 $\mu$ g/mL。

[0257] c) 免疫测定程序

[0258] 用天然样品(点A、B、C、E和G,对于这些点,肌钙蛋白I的浓度是已知的)或PBS-BSA缓冲液作为空白样品(点O)来测试缀合物溶液。

[0259] 一旦VIDAS®锥体与样品接触,由于捕获抗体被固定在所述锥体上,免疫反应开始。自动分析仪将测试样品(135 $\mu$ L)与270 $\mu$ L缀合物溶液混合。

[0260] 孵育需要在37°C下进行大约9分钟,并使得心肌肌钙蛋白I一方面与吸附在锥体上的抗体特异性结合,另一方面与缀合抗体(检测抗体)特异性结合。然后通过用pH 7.8的200mM Tris、300mM NaCl、0.2%的Triton X-100的缓冲液洗涤3次来除去未结合的组分。在最后的检测步骤中,吸出底物4-甲基伞形花酮磷酸酯,然后返回到锥体中;缀合抗体的酶催化该底物水解成4-甲基伞形花内酯的反应,在450nm测量其发射的荧光。荧光信号的值(RFV=相对荧光值)与样品中存在的抗原的浓度成比例。

[0261] d) 结果

[0262] 表3给出了当获得的信号与在参考稀释剂(REF)中稀释的缀合抗体(现有技术)比较时,由VIDAS®自动分析仪测定的荧光信号(RFV=相对荧光值),以及各种稀释剂制剂(表2)。

[0263] 表3用各种稀释剂制剂获得的结果

[0264]

项目	REF 稀释剂	稀释剂 1	稀释剂 2	稀释剂 3 本发明的 稀释剂
RFV 信号点O(空白)	7.5	9.8	7.0	4.5
RFV 信号点A (4.0 ng/L)	13	13	18	18
RFV A / RFV O	1.7	1.3	2.6	4.0
RFV A - RFV O	5.5	3.3	11.0	13.5
RFV 信号点B (10.2 ng/L)	26.0	25.0	31.5	33.5
RFV B / RFV O	3.5	2.6	4.5	7.4
RFV B - RFV O	18.5	15.3	24.5	29.0

[0265] 从表3中可以看出,将PMAL C12添加至REF稀释剂(稀释剂1)对观察到的信号几乎没有影响。然而,用Biolipidure 206(稀释剂2)替换马血清则改善该范围底部的动力学(点A和点B的信号较高),但不会降低背景噪音(点O的信号为约7RFV)。向该稀释剂(稀释剂3,本

发明的稀释剂)中添加PMAL C12,其使背景噪音显著降低,从7RFV变为4.5RFV。结果是RFV A/RFV 0和RFV B/RFV 0比率显著增加。因此,Biolipidure 206和PMAL C12的组合具有意料不到的协同效应。

[0266] d) 在各种稀释剂制剂中稀释的缀合抗体的稳定性

[0267] 将缀合抗体(检测抗体)在表2中列出的各种稀释剂制剂中稀释至0.5 $\mu$ g/mL,并立即用于测定样品(A、B、C、E和G)。所得结果对应于时间T0的结果。然后将稀释于各种稀释剂中的检测抗体在+2/8 $^{\circ}$ C(正常条件)或+18/25 $^{\circ}$ C(加速稳定条件)下储存1个月。一个月后,在相同条件下用VIDAS重新测定相同的样品,并将检测抗体的稀释溶液储存1个月。对于每种条件,计算在一个月结束时获得的RFV信号与在T0获得的RFV信号的比率。结果列于表4。

[0268] 表4. 缀合抗体在不同稀释剂制剂中的稳定性

点 (肌钙蛋白浓度)	1个月时RFV信号/ T0时RFV信号							
	REF 稀释剂		稀释剂 1		稀释剂 2		稀释剂 3	
	2/8 $^{\circ}$ C	18/25 $^{\circ}$ C	2/8 $^{\circ}$ C	18/25 $^{\circ}$ C	2/8 $^{\circ}$ C	18/25 $^{\circ}$ C	2/8 $^{\circ}$ C	18/25 $^{\circ}$ C
点A (4.0 ng/L)	1.08	1.12	1.15	0.96	1.14	0.97	1.06	1.03
点B (10.2 ng/L)	1.10	1.08	1.06	0.96	0.97	0.89	0.99	0.91
点C (18.3 ng/L)	0.98	1.00	1.04	0.98	0.94	0.81	1.00	0.89
点E (93.6 ng/L)	0.97	1.12	1.01	0.98	0.98	0.86	1.00	0.92
点G (590 ng/L)	1.01	0.93	1.03	0.99	1.02	0.87	1.02	0.93

[0270] 该比率 $\geq 1.10$ 或 $\leq 0.90$ 以灰色突出标记。

[0271] 对于被视为稳定的缀合抗体的制剂,信号比率必须大体包括在[0.90-1.10]的范围内。包含Biolipidure 206的稀释剂2不能在不存在马血清(存在于REF稀释剂中的相当稳定剂)的情况下获得可接受的稳定性值。但是,通过将PMAL C12加入Biolipidure 206中,对于各种测试浓度可以获得令人满意的值(参见稀释剂3)。

[0272] e) 聚合物PMAL C8的效果

[0273] 稀释剂4具有与稀释剂3(表2)相同的组成,除了稀释剂3中的PMAL C12被稀释剂4中的PMAL C8替代。使用含有已知浓度的肌钙蛋白I的新样品组来比较这两种稀释剂。根据c)中所述的程序,通过在VIDAS上进行的免疫测定来对这些样品进行测试,并进行以下修改。在稀释剂3或稀释剂4中将缀合抗体各自稀释至0.9 $\mu$ g/mL的浓度。所得结果(RFV信号)列于表5。

[0274] 表5. 含有PMAL C12或PMAL C8的本发明稀释剂的比较

[0275]

肌钙蛋白 I 浓度 (ng/L)	使用稀释剂3的缀合物溶液 (0.02%的PMAL C12)	使用稀释剂4的缀合物溶液 (0.02%的PMAL C8)
0.001	8	8
2.83	20	17
10.0	45	42
21.8	77	71
49.7	163	152

[0276] 包含PMAL C12的稀释剂3和包含PMAL C8的稀释剂4产生相等的RFV信号。因此与PMAL C12一样,PMAL C8具有相同的意料不到的协同效应。

[0277] f) PMAL C12和Biolipidure 206对不合格批次的缀合抗体的协同效应

[0278] 取决于纯化条件、储存条件或任何其他原因,某些批次的缀合抗体可能具有增加的背景噪音,约15RFV至20RFV而不是通常观察到的4RFV至8RFV。在批次放行前进行质量控制,使得能够排除这些不合格的缀合抗体批次,这些批次不会用于最终产品(免疫测定试剂盒)。

[0279] 表7. 稀释剂3中PMAL C12和Biolipidure 206浓度对不合格批次的缀合抗体的信噪比的影响

[0280]

项目	PMAL C12 + Biolipidure 206 的浓度		
	0.02% + 0.05% ( 稀释剂 3)	0.02% + 0.1%	0.05% + 0.1%
RFV 信号点0(空白)	16.0	12.0	8.9
RFV 信号点 A (4.0 ng/L)	32	31	30
RFV A / RFV O	2.0	2.6	3.4
RFV A – RFV O	16.0	19.0	21.1
RFV 信号点 B (10.2 ng/L)	43.7	31.0	30.0
RFV B / RFV O	2.7	3.8	4.9
RFV B – RFV O	27.7	33.5	34.6

[0281] 在使用含有0.02%PMALC12和0.05%Biolipidure 206的稀释剂3时,观察到两种不合格批次的缀合抗体的背景噪音为16RFV。通过将PMAL C12的浓度增加到0.05%,将Biolipidure 206的浓度增加到0.1%,可以将该背景噪音降低到8.9RFV,这使得信噪比有相当大的改善,并且可以设想在免疫测定中使用该批次。这些不合格批次的较高初始背景噪音需要更高浓度的PMAL C12和Biolipidure 206以证明其协同阻断效果。

专利名称(译)	试剂稀释剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN108431607A</a>	公开(公告)日	2018-08-21
申请号	CN201680074784.X	申请日	2016-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
[标]发明人	桑德里娜布瑟雷 弗洛伦斯贝特斯沃思 热勒莫马丁内斯		
发明人	桑德里娜·布瑟雷 弗洛伦斯·贝特斯沃思 热勒莫·马丁内斯		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C08F220/60		
CPC分类号	C08L33/02 C08L43/02 C08F220/60 G01N33/53 G01N33/68 G01N33/5436		
代理人(译)	王春伟		
优先权	2015062932 2015-12-21 FR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及诊断或预后领域。具体地，其涉及免疫测定组合物，其包含(i)两亲高分子和(ii)基于(甲基)丙烯酸酯单体的两性共聚物，所述单体的一些包含磷酸胆碱基团。所公开的组合物特别是用作稳定剂和/或阻断剂。

