



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102725633 B

(45) 授权公告日 2016.02.03

(21) 申请号 201080063154.5
 (22) 申请日 2010.11.17
 (30) 优先权数据
 12/630229 2009.12.03 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2012.08.03
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2010/056992 2010.11.17
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02011/068680 EN 2011.06.09
 (73) 专利权人 雅培制药有限公司
 地址 美国伊利诺伊州
 (72) 发明人 M. 亚当茨克 J.R. 布拉希尔
 P.G. 马廷利
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 72001
 代理人 李连涛 郭文洁
 (51) Int. Cl.
 G01N 33/50(2006.01)
 G01N 33/53(2006.01)
 (56) 对比文件
 WO 2007/138163 A2, 2007.12.06, 全文.

CN 2783324 Y, 2006.05.24, 全文.
 CN 101126756 A, 2008.02.20, 全文.
 US 2009/0162876 A1, 2009.06.25, 全文.
 C. A. Marquette et al. Disposable screen-printed chemiluminescent biochips for the simultaneous determination of four point-of-care relevant proteins. 《Anal Bioanal Chem》. 2008, 第 393 卷 1191-1198.
 林艳丽等. 化学发光免疫方法测定肌钙蛋白 I 可快速诊断心肌梗塞. 《放射免疫学杂志》. 2003, 第 16 卷(第 2 期), 124.
 Terence G. Henares et al. Current development in microfluidic immunosensing chip. 《analytica chimica》. 2008, 17-30.

审查员 李宏悦

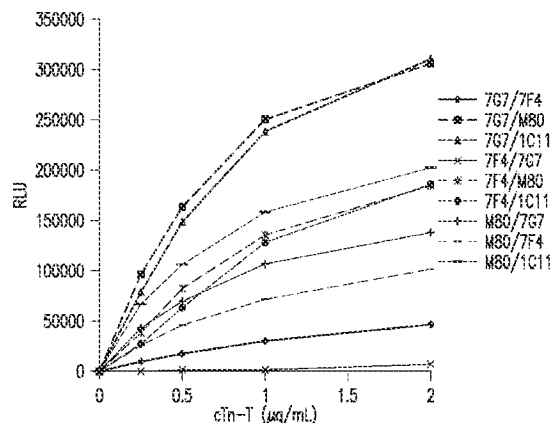
权利要求书6页 说明书42页
序列表32页 附图7页

(54) 发明名称

用于诊断心肌细胞损害的测定

(57) 摘要

公开了用于诊断临床状况、评估危险或预测由于心肌细胞损害的后果的测定。通过测定测试样品中多数心肌细胞抗原的存在、且在单一测定结果中组合多重测定,免疫测定方法和试剂盒提供了心肌细胞损害的评估。



CN 102725633 B

1. 抗体在制备用于检测来自测试样品的在受试者中的心肌细胞损害的免疫测定法的试剂中的用途,所述免疫测定法包括步骤:

a) 使来自怀疑具有心肌细胞损害的受试者的测试样品接触 n 个抗体 A,所述抗体结合在 n' 个心肌细胞抗原 a 上的至少 n 个表位,以形成 n' 个免疫复合物,其中 n 是 1 - 10 的整数;并且 n' 是 2 - 10 的整数,

b) 使包含 n' 个免疫复合物的由步骤 a) 形成的试剂接触 n'' 个抗体 B,所述抗体结合在 n' 个心肌细胞抗原 a 上的 n'' 个表位,以形成 n'' 个可测量组件,其中 n 和 n'' 独立地是 1 - 10 的整数,并且 n' 是 2 - 10 的整数,并且抗体 A 和 B 结合心肌细胞抗原 a 的 ($n + n''$) 个不同表位,

c) 测量至少两个可测量组件的光学、电或状态变化信号;和

d) 通过测定步骤 (c) 中的所述测量是否超过预定水平来检测心肌细胞损害,

其中每个抗体 A 结合在心肌细胞抗原 a 上的至少一个表位,其不同于抗体 B 与之结合的任何表位,

其中所述心肌细胞抗原 a 选自心肌肌钙蛋白 -I、心肌肌钙蛋白 -T、肌酸磷酸激酶 MB(CKMB)、肌红蛋白、肌球蛋白重链、肌球蛋白轻链、B 型利尿钠肽、心脏脂肪酸结合蛋白(H-FABP)、胎盘生长因子(PLGF) 和白细胞介素 -6(IL-6),其中所述 B 型利尿钠肽选自前 BNP、N 端前 BNP 和 hBNP(1-32),和

其中所述抗体 A、抗体 B、或抗体 A 和 B 包含人源化抗体。

2. 权利要求 1 的用途,其中 $n' = 2$ 并且所述心肌细胞抗原 a 是心肌肌钙蛋白 -I(cTnI) 和心肌肌钙蛋白 -T(cTnT)。

3. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述抗体 B 包含抗人 IgG 抗体。

4. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述抗体 B 结合可检测标记,其中所述可检测标记是酶、寡核苷酸、纳米颗粒化学发光体、荧光团、荧光猝灭剂、化学发光猝灭剂或生物素。

5. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述光学信号作为化学发光、荧光、磷光、电化学发光、紫外吸收、可见吸收、红外吸收、折射、表面等离子共振中的心肌细胞抗原 a 浓度依赖性变化进行测量。

6. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述电信号作为电流、电阻、电势、质荷比或离子计数中的心肌细胞抗原 a 浓度依赖性变化进行测量。

7. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述状态变化信号作为大小、可溶性、质量或共振中的心肌细胞抗原 a 浓度依赖性变化进行测量。

8. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述抗体 A 固定在固相上。

9. 权利要求 8 的用途,其中所述固相选自磁性颗粒、珠、试管、微量滴定板、比色杯、膜、支架分子、石英晶体、滤纸、盘和芯片。

10. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述测试样品是全血、血清或血浆。

11. 抗体在制备用于检测来自测试样品的在受试者中的心肌细胞损害的免疫测定法的试剂中的用途,所述免疫测定法包括步骤:

a) 使来自怀疑具有心肌细胞损害的受试者的测试样品接触 n 个抗体 A,所述抗体结合在 n' 个心肌细胞抗原 a 上的至少 n 个表位,以形成 n' 个免疫复合物,其中 n 是 1 - 10 的整数;并且 n' 是 2 - 10 的整数,

- b) 使包含 n' 个免疫复合物的由步骤 a) 形成的试剂接触 n'' 个抗体 B, 所述抗体结合在 n' 个心肌细胞抗原 a 上的 n'' 个表位, 以形成 n' 个可测量组件, 其中 n 和 n'' 独立地是 1 - 10 的整数, 并且 n' 是 2 - 10 的整数, 并且抗体 A 和 B 结合心肌细胞抗原 a 的 $(n + n'')$ 个不同表位, 其中每个抗体 A 结合在心肌细胞抗原 a 上的至少一个表位, 其不同于抗体 B 与之结合的任何表位, 其中抗体 B 由包含至少一种吡啶化合物的可检测标记进行标记, 其中所述抗体 A、抗体 B、或抗体 A 和 B 包含人源化抗体;
- c) 对由步骤 (b) 形成的试剂生成或提供过氧化氢来源;
- d) 将碱性溶液加入由步骤 (c) 形成的试剂中, 以生成光信号;
- e) 测量步骤 (d) 中生成或发出的所述光信号; 和
- f) 通过测定步骤 (e) 中的所述测量是否超过预定水平来检测心肌细胞损害。

12. 权利要求 11 的用途, 其中所述心肌细胞抗原 a 选自心肌肌钙蛋白 -I、心肌肌钙蛋白 -T、肌酸磷酸激酶 MB (CKMB)、肌红蛋白、肌球蛋白重链、肌球蛋白轻链、B 型利尿钠肽、心脏脂肪酸结合蛋白 (H-FABP)、胎盘生长因子 (PLGF) 和白细胞介素 -6 (IL-6)。

13. 权利要求 11 的用途, 其中 $n' = 2$ 并且所述心肌细胞抗原 a 是心肌肌钙蛋白 -I (cTnI) 和心肌肌钙蛋白 -T (cTnT)。

14. 权利要求 11 或 12 的用途, 其中所述抗体 A、抗体 B、或抗体 A 和 B 包含人源化抗体。

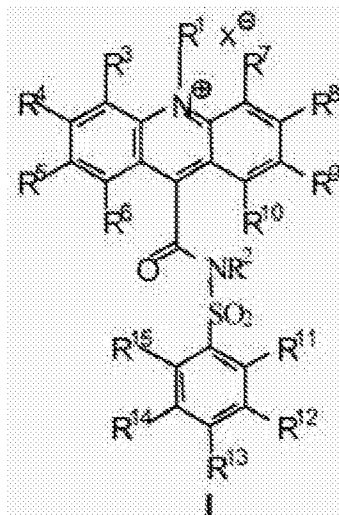
15. 权利要求 11 或 12 的用途, 其中所述抗体 B 包含抗人 IgG 抗体。

16. 权利要求 11 或 12 的用途, 其中所述抗体 A 固定在固相上。

17. 权利要求 16 的用途, 其中所述固相选自磁性颗粒、珠、试管、微量滴定板、比色杯、膜、支架分子、石英晶体、滤纸、盘和芯片。

18. 权利要求 11 或 12 的用途, 其中所述测试样品是全血、血清或血浆。




19. 权利要求 11 或 12 的用途, 其中所述吡啶化合物是具有根据式 I 的结构吡啶-9-甲酰胺:

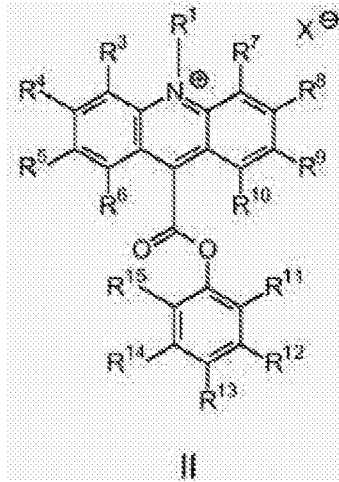


其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自: 烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基, 和

其中 R^3 直到 R^{15} 各自独立地选自: 氢、烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、氨基、酰胺基、酰基、烷氧基、羟基、羧基、卤素、卤化物、硝基、氰基、磺基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基; 和

任选地,如果存在的话, X^{\ominus} 是阴离子。

20. 权利要求 11 或 12 的用途,其中所述吡啶  化合物是具有根据式 II 的结构  的吡啶 -9-羧酸根芳基酯:



其中 R^1 是烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基;和

其中 R^3 直到 R^{15} 各自独立地选自:氢、烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、氨基、酰胺基、酰基、烷氧基、羟基、羧基、卤素、卤化物、硝基、氰基、磺基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基;和
任选地,如果存在的话, X^{\ominus} 是阴离子。

21. 权利要求 11 或 12 的用途,其中所述抗体 A 选自多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体和亲和力成熟的抗体。

22. 权利要求 11 或 12 的用途,其中所述抗体 B 选自多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体和亲和力成熟的抗体。

23. 权利要求 11 或 12 的用途,其中所述过氧化氢通过加入缓冲液或含有过氧化氢的溶液来提供。

24. 权利要求 11 或 12 的用途,其中所述过氧化氢通过将过氧化氢生成酶加入所述测试样品而生成。

25. 权利要求 24 的用途,其中所述过氧化氢生成酶选自:(R)-6-羟基烟碱氧化酶、(S)-2-羟酸氧化酶、(S)-6-羟基烟碱氧化酶、3-酸式-硝基丙酸氧化酶、3-羟基邻氨基苯甲酸氧化酶、4-羟基扁桃酸氧化酶、6-羟基烟酸脱氢酶、脱落醛氧化酶、酰基-CoA 氧化酶、醇氧化酶、醛氧化酶、胺氧化酶、芳基-醇氧化酶、芳基-醛氧化酶、儿茶酚氧化酶、胆固醇氧化酶、胆碱氧化酶、非洲防己碱氧化酶、环己胺氧化酶、细胞色素 c 氧化酶、D-氨基酸氧化酶、D-阿拉伯糖-1,4-内酯氧化酶、D-阿拉伯糖-1,4-内酯氧化酶、D-天冬氨酸氧化酶、D-谷氨酸氧化酶、二氢苯并菲啶氧化酶、二氢乳清酸氧化酶、二氢尿嘧啶氧化酶、二甲基甘氨酸氧化酶、D-甘露醇氧化酶、蜕皮素氧化酶、乙醇胺氧化酶、半乳糖氧化酶、葡萄糖氧化酶、谷胱甘肽氧化酶、甘油-3-磷酸氧化酶、甘氨酸氧化酶、乙醛酸氧化酶、己糖氧化酶、羟基植烷酸氧化酶、吡啶-3-乙醛氧化酶、乳酸氧化酶、L-氨基酸氧化酶、L-天冬氨酸氧化酶、L-半乳糖酸内酯氧化酶、L-谷氨酸氧化酶、L-古洛糖酸内酯氧化酶、L-赖氨酸 6-氧化酶、L-赖氨酸氧化酶、长链醇氧化酶、L-甲基哌啶氧化酶、L-山梨糖氧化酶、苹果酸氧化酶、甲硫醇氧化酶、单氨基酸氧化酶、N6-甲基-赖氨酸氧化酶、N-酰基己糖胺氧化酶、NAD(P)H

氧化酶、硝基烷氧化酶、N-甲基-L-氨基酸氧化酶、核苷氧化酶、草酸氧化酶、多胺氧化酶、多酚氧化酶、聚乙烯醇氧化酶、异戊烯半胱氨酸氧化酶、蛋白质-赖氨酸6-氧化酶、丁二胺氧化酶、吡喃糖氧化酶、5'-磷酸吡哆醛合酶、吡哆醇4-氧化酶、吡咯喹啉-醌合酶、丙酮酸氧化酶、CoA-乙酰化丙酮酸氧化酶、网脉番荔枝碱氧化酶、视黄醛氧化酶、利福霉素-B氧化酶、肌氨酸氧化酶、仲醇氧化酶、亚硫酸氧化酶、超氧化物歧化酶、超氧化物还原酶、四氢小檗碱氧化酶、硫胺素氧化酶、色氨酸 α , β -氧化酶、尿酸氧化酶、香草醇氧化酶、黄嘌呤氧化酶、木糖醇氧化酶及其组合。

26. 权利要求 11 或 12 的用途,其中所述碱性溶液是具有至少 10 的 pH 的溶液。

27. 权利要求 11 或 12 的用途,其中通过测定步骤 (e) 中的所述测量是否超过预定水平来检测心肌细胞损害的步骤 f) 包括关联步骤 (e) 中光信号的量与所述测试样品中心肌细胞抗原 a 的量,其通过使用关于每个心肌细胞抗原 a 的标准曲线或通过关于每个心肌细胞抗原 a 的参考标准的比较实施。

28. 权利要求 27 的用途,其包括与关于每个心肌细胞抗原 a 的参考标准的比较,每个参考标准包含抗独特型抗体。

29. 权利要求 27 的用途,其包括与关于每个心肌细胞抗原 a 的参考标准的比较,每个参考标准包含衍生的心肌细胞抗原。

30. 权利要求 29 的用途,其中所述衍生的心肌细胞抗原包含由聚乙二醇衍生的所述心肌细胞抗原。

31. 权利要求 11 或 12 的用途,其中所述免疫测定法适合于在自动化系统或半自动化系统中使用。

32. 一种用于检测来自测试样品的心肌细胞损害的试剂盒,所述试剂盒包含:

a) 能够结合在 n' 个心肌细胞抗原 a 上的至少 n 个表位的 n 个抗体 A,以形成 n' 个免疫复合物,其中 n 是 1 - 10 的整数;并且 n' 是 2 - 10 的整数;

b) 能够结合在 n' 个心肌细胞抗原 a 上的 n'' 个表位的 n'' 个抗体 B,以形成 n' 个可测量组件,其中 n 和 n'' 独立地是 1 - 10 的整数,并且 n' 是 2 - 10 的整数,并且抗体 A 和 B 能够结合心肌细胞抗原 a 的 $(n + n'')$ 个不同表位;并且其中每个抗体 A 能够结合在所述心肌细胞抗原 a 上的至少一个表位,其不同于抗体 B 能够与之结合的任何表位;和

c) 用于测定所述测试样品中心肌细胞抗原 a 的总量是否超过预定水平的说明书。

33. 权利要求 32 的试剂盒,其中所述心肌细胞抗原 a 选自心肌肌钙蛋白-I、心肌肌钙蛋白-T、肌酸磷酸激酶 MB (CKMB)、肌红蛋白、肌球蛋白重链、肌球蛋白轻链、B 型利尿钠肽,其中 $n' = 2$ 并且所述第一个心肌细胞抗原和所述第二个心肌细胞抗原是不同抗原。

34. 权利要求 32 的试剂盒,其中 $n' = 2$ 并且所述心肌细胞抗原 a 是心肌肌钙蛋白-I (cTnI) 和心肌肌钙蛋白-T cTnT。

35. 权利要求 32 或 33 的试剂盒,其进一步包含固相,其中所述抗体 A 结合所述固相。

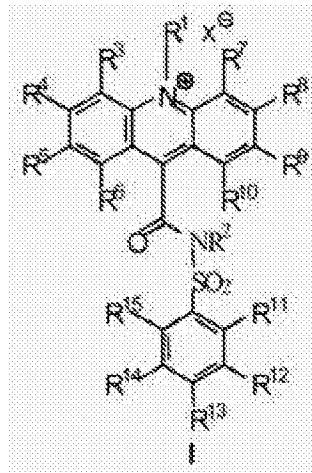
36. 权利要求 35 的试剂盒,其中所述固相选自磁性颗粒、珠、试管、微量滴定板、比色杯、膜、支架分子、石英晶体、滤纸、盘和芯片。

37. 权利要求 32 或 33 的试剂盒,其进一步包含结合所述抗体 B 的可检测标记。

38. 权利要求 37 的试剂盒,其中所述可检测标记是酶、寡核苷酸、纳米颗粒化学发光体、荧光团、荧光猝灭剂、化学发光猝灭剂或生物素。

39. 权利要求 38 的试剂盒,其中所述可检测标记是吡啶 𠵽 化合物。

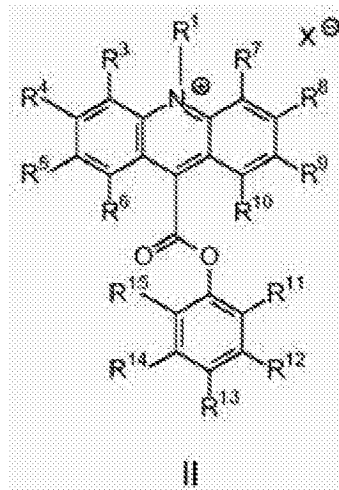
40. 权利要求 39 的试剂盒,其中所述吡啶 𠵽 化合物是具有根据式 I 的结构 的吡啶 𠵽 -9- 甲酰胺:



其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自:烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基,和

其中 R^3 直到 R^{15} 各自独立地选自:氢、烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、氨基、酰胺基、酰基、烷氧基、羟基、羧基、卤素、卤化物、硝基、氰基、磺基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基;和
任选地,如果存在的话, X^{9-} 是阴离子。

41. 权利要求 39 的试剂盒,其中所述吡啶 𠵽 化合物是具有根据式 II 的结构 的吡啶 𠵽 -9- 羧酸根芳基酯:



其中 R^1 是烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基;和

其中 R^3 直到 R^{15} 各自独立地选自:氢、烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、氨基、酰胺基、酰基、烷氧基、羟基、羧基、卤素、卤化物、硝基、氰基、磺基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基;和
任选地,如果存在的话, X^{9-} 是阴离子。

42. 权利要求 40 或 41 的试剂盒,其进一步包含碱性溶液。

43. 权利要求 42 的试剂盒,其中所述碱性溶液是具有至少 10 的 pH 的溶液。

44. 权利要求 43 的试剂盒,其进一步包含过氧化氢来源。

45. 权利要求 44 的试剂盒,其中所述过氧化氢来源包含缓冲液或含有过氧化氢的溶

液。

46. 权利要求 45 的试剂盒,其中所述过氧化氢来源包含过氧化氢生成酶。

47. 权利要求 46 的试剂盒,其中所述过氧化氢生成酶选自:(R)-6-羟基烟碱氧化酶、(S)-2-羟酸氧化酶、(S)-6-羟基烟碱氧化酶、3-酸式-硝基丙酸氧化酶、3-羟基邻氨基苯甲酸氧化酶、4-羟基扁桃酸氧化酶、6-羟基烟酸脱氢酶、脱落醛氧化酶、酰基-CoA 氧化酶、醇氧化酶、醛氧化酶、胺氧化酶、芳基-醇氧化酶、芳基-醛氧化酶、儿茶酚氧化酶、胆固醇氧化酶、胆碱氧化酶、非洲防己碱氧化酶、环己胺氧化酶、细胞色素 c 氧化酶、D-氨基酸氧化酶、D-阿拉伯糖-1,4-内酯氧化酶、D-阿拉伯糖-1,4-内酯氧化酶、D-天冬氨酸氧化酶、D-谷氨酸氧化酶、二氢苯并菲啶氧化酶、二氢乳清酸氧化酶、二氢尿嘧啶氧化酶、二甲基甘氨酸氧化酶、D-甘露醇氧化酶、蜕皮素氧化酶、乙醇胺氧化酶、半乳糖氧化酶、葡萄糖氧化酶、谷胱甘肽氧化酶、甘油-3-磷酸氧化酶、甘氨酸氧化酶、乙醛酸氧化酶、己糖氧化酶、羟基植烷酸氧化酶、吡啶-3-乙醛氧化酶、乳酸氧化酶、L-氨基酸氧化酶、L-天冬氨酸氧化酶、L-半乳糖酸内酯氧化酶、L-谷氨酸氧化酶、L-古洛糖酸内酯氧化酶、L-赖氨酸 6-氧化酶、L-赖氨酸氧化酶、长链醇氧化酶、L-甲基哌啶氧化酶、L-山梨糖氧化酶、苹果酸氧化酶、甲硫醇氧化酶、单氨基酸氧化酶、N6-甲基-赖氨酸氧化酶、N-酰基己糖胺氧化酶、NADH 氧化酶、NADPH 氧化酶、硝基烷氧化酶、N-甲基-L-氨基酸氧化酶、核苷氧化酶、草酸氧化酶、多胺氧化酶、多酚氧化酶、聚乙烯醇氧化酶、异戊烯半胱氨酸氧化酶、蛋白质-赖氨酸 6-氧化酶、丁二胺氧化酶、吡喃糖氧化酶、5'-磷酸吡哆醛合酶、吡哆醇 4-氧化酶、吡咯喹啉-酮合酶、丙酮酸氧化酶、CoA-乙酰化丙酮酸氧化酶、网脉番荔枝碱氧化酶、视黄醛氧化酶、利福霉素-B 氧化酶、肌氨酸氧化酶、仲醇氧化酶、亚硫酸氧化酶、超氧化物歧化酶、超氧化物还原酶、四氢小檗碱氧化酶、硫胺素氧化酶、色氨酸 α , β -氧化酶、尿酸氧化酶、香草醇氧化酶、黄嘌呤氧化酶、木糖醇氧化酶及其组合。

48. 权利要求 32 或 33 的试剂盒,其中所述抗体 B 包含抗人 IgG 抗体。

49. 权利要求 32 或 33 的试剂盒,其进一步包含至少一个心肌细胞抗原参考标准。

50. 权利要求 49 的试剂盒,其中所述至少一个心肌细胞抗原参考标准包含抗独特型抗体。

51. 权利要求 49 的试剂盒,其中所述至少一个心肌细胞抗原参考标准包含衍生的心肌细胞抗原。

52. 权利要求 51 的试剂盒,其中所述衍生的心肌细胞抗原包含由聚乙二醇衍生的所述心肌细胞抗原。

53. 权利要求 12 的用途,其中所述 B 型利尿钠肽包括前 BNP、N 端前 BNP 或 hBNP (1-32)。

54. 权利要求 25 的用途,其中所述胺氧化酶是含铜的胺氧化酶或含黄素的胺氧化酶。

55. 权利要求 47 的用途,其中所述胺氧化酶是含铜的胺氧化酶或含黄素的胺氧化酶。

用于诊断心肌细胞损害的测定

[0001] 相关申请信息

[0002] 无。

技术领域

[0003] 本公开内容一般涉及用于诊断受试者中的心肌细胞损害的测定和试剂盒,并且特别涉及用于检测测试样品中多数心肌细胞抗原的存在的方法和试剂盒,其还避免来自测试样品中存在的其他物质的干扰的可能性。

[0004] 发明背景

[0005] 免疫测定技术在过去数十年已经是已知的,且目前通常在医学中用于广泛多样的诊断目的,以检测生物样品中的靶分析物。免疫测定采用抗体与其相应抗原的高度特异性结合,其中抗原是靶分析物。一般地,抗体或抗原的定量通过某些形式的标记例如放射性或荧光标记来达到。夹心免疫测定涉及结合样品中靶分析物与抗体位点(其通常与固体载体结合),结合标记的抗体与捕获的分析物,且随后测量结合的标记抗体的量,其中标记生成与靶分析物的浓度成比例的信号,因为除非分析物存在于样品中,否则标记抗体不结合。

[0006] 在用于诊断临床状况的目前可用的测定中,评估危险或预测起因于心肌细胞损害的后果是测定下述浓度的那些:心肌肌钙蛋白-T、心肌肌钙蛋白-I、肌酸磷酸激酶MB(CKMB)、肌红蛋白、肌球蛋白重链、肌球蛋白轻链、B型利尿钠肽(包括前BNP、N端前BNP和hBNP(1-32))、心脏脂肪酸结合蛋白(H-FABP)、胎盘生长因子(PLGF)和/或白细胞介素-6(IL-6)。一般地,此类测定作为免疫测定组进行,所述免疫测定对来自患者的测试样品连续执行,并且关于每个分析物的测试因而需要另外增加时间、样品体积和关于每个测定结果的试剂。通常,关于分析物的完全组的测定在单一测定平台上、来自单一厂商、或甚至通过单一检测技术是不可获得的,这增加评估患者的临床状态的复杂性。进一步地,当分开且系列进行时,关于组中的任何单一分析物的结果可能是不可靠的,即可以是或可以不是错误的。个别测定结果中的任何是否是错误的可能是难以测定的或实际上无法测定的,从而导致潜在冲突的结果和相应冲突的诊断、危险评估或结果预测。

[0007] 2种相关抗原心肌肌钙蛋白-T和心肌肌钙蛋白-I的例子是举例说明性的。心肌肌钙蛋白-I测定是从多个厂商容易地商购可得的,但心肌肌钙蛋白-T测定限于单一厂商,Roche Diagnostics,这意味着无替代方案是可获得的。另外,根据假阳性和假阴性结果的多个报道,这2种测定就准确度而言是有限的。(参见例如,P.R. Kenny等人,J. 32 Rheumatol,1258-61,(2005);R.I. Knoblock等人,Archives of pathology & laboratory medicine 2002;126:606-9;和A.N. Makaryus等人,Clin Cardiol 2007;30:92-4)。此外,虽然心肌肌钙蛋白-I和心肌肌钙蛋白-T在理论上都与心肌细胞损害相关,但用于测定患者样品中的心肌肌钙蛋白-I和心肌肌钙蛋白-T的免疫测定约10%时间未能关联。这个不一致可能是由于抗体构造中的差异,其他生物化学差异或在不同测定中的分析。

[0008] 进一步地,用于循环抗原的此类免疫测定已知对来自其他物质的干扰是敏感的,所述其他物质可能存在于测试样品中,例如异嗜性内源抗体和自身抗体。此类干扰一般通

过执行第二种测定得到解决,以鉴定有疑问的样品,这是费时且昂贵的。解决自身抗体问题的另一种方法是选择分析物特异性抗体,其结合不同于与自身抗体反应的分析物表位的特异性表位。根据这种一般方法,已集中努力探索 2、3 和甚至 4 种分析物特异性抗体的数千种不同组合的使用,以避免来自自身抗体的干扰。然而,这种努力在很大程度上已经是不成功的。目前显而易见的是针对复杂蛋白质分析物的自身抗体很可能在特定样品内是多克隆的,并且在来自不同个体的样品中可能是甚至更不同的。来自不同多克隆自身抗体的干扰可以解释少至 25% 或甚至更少的分析物蛋白质序列结合分析物特异性抗体的观察,这又可以解释使用这种方法的不成功。

[0009] 因此,至少由于上述原因,尽管 MI 的出现,心肌肌钙蛋白 -I 或心肌肌钙蛋白 -T 单独和使用标准测定的起始测试也可能是阴性的,即可能提供假阴性结果。虽然关于心肌肌钙蛋白 -I 或心肌肌钙蛋白 -T 的可用测定已改善 MI 诊断的时间性,然而,具有 MI 症状的许多患者直到呈现后数小时才得到阳性诊断。这导致具有潜在严重结果的延迟或延期治疗。

[0010] 本领域存在关于下述的需要:改善心肌细胞损害的检测包括此类检测的时间性的新免疫测定方法,以及补偿通过可能存在于测试样品中的异嗜性内源抗体和自身抗体的干扰的方法,和特别地,达到这些结果而无需重新设计分析物检测或捕获抗体的此类方法。

[0011] 发明概述

[0012] 在一个方面,本公开内容提供了用于检测来自测试样品在受试者中的心肌细胞损害的免疫测定,所述免疫测定包括步骤:

[0013] a) 使来自怀疑具有心肌细胞损害的受试者的测试样品接触 n 个抗体 ($A_{a^1}^1$), 其结合在 n' 个心肌细胞抗原 (a^n) 上的至少 n 个表位,以形成 n' (n -抗体:抗原) 个免疫复合物 ($(A_{a^1}^1)(A_{a^2}^2) \cdots (A_{a^{n'}}^{n'}) (a^1)$, ($(A_{a^1}^1)(A_{a^2}^2) \cdots (A_{a^n}^n) (a^2)$, $\cdots (A_{a^1}^1)(A_{a^2}^2) \cdots (A_{a^{n'}}^{n'}) (a^n)$), 其中 n 是 1 - 10 的整数;并且 n' 是 2 - 10 的整数。

[0014] b) 使包含 n' (n -抗体:抗原) 个免疫复合物的所述混合物接触 n'' 个抗体 ($B_{a^1}^1$), 其结合在 n' 个心肌细胞抗原 (a^n) 上的 n'' 个表位,以形成 n' ($(n + n'')$ 抗体:抗原) 个可测量组件 (assemblies) ($((A_{a^1}^1)(A_{a^2}^2) \cdots (A_{a^{n'}}^{n'})) ((B_{a^1}^1)(B_{a^2}^2) \cdots (B_{a^{n''}}^{n''})) (a^1)$, $((A_{a^1}^1)(A_{a^2}^2) \cdots (A_{a^n}^n)) ((B_{a^1}^1)(B_{a^2}^2) \cdots (B_{a^n}^n)) (a^2)$, $\cdots ((A_{a^1}^1)(A_{a^2}^2) \cdots (A_{a^{n'}}^{n'})) ((B_{a^1}^1)(B_{a^2}^2) \cdots (B_{a^{n''}}^{n''})) (a^n)$), 其中 n 和 n'' 独立地是 1 - 10 的整数,并且 n' 是 2 - 10 的整数,并且抗体 A 和 B 结合心肌细胞抗原的 $(n + n'')$ 个不同表位。

[0015] c) 测量可测量组件的光学、电或状态变化信号;和

[0016] d) 通过测定步骤 (c) 中的测量是否超过预定水平来检测心肌细胞损害。

[0017] 心肌细胞抗原 (a^n) 可以选自心肌肌钙蛋白 -I、心肌肌钙蛋白 -T、肌酸磷酸激酶 MB (CKMB)、肌红蛋白、肌球蛋白重链、肌球蛋白轻链、B 型利尿钠肽 (包括前 BNP、N 端前 BNP 和 hBNP (1-32))、心脏脂肪酸结合蛋白 (H-FABP)、胎盘生长因子 (PLGF) 和白细胞介素 -6 (IL-6)。在免疫测定的一个示例性实施方案中, $n' = 2$ 并且心肌细胞抗原 (a^n) 是例如心肌肌钙蛋白 -I (cTnI) 和心肌肌钙蛋白 -T (cTnT)。抗体 $A_{a^1}^1$ 、抗体 $B_{a^1}^1$ 、或抗体 $A_{a^1}^1$ 和 $B_{a^1}^1$ 可以包含人源化抗体。

[0018] 在上文免疫测定中,抗体 $B_{a^n}^{n'}$ 可以通过共价或非共价键结合可检测标记,例如酶、寡核苷酸、纳米颗粒化学发光体、荧光团、荧光猝灭剂、化学发光猝灭剂或生物素。光学信号可以作为化学发光、荧光、磷光、电化学发光、紫外吸收、可见吸收、红外吸收、折射、表面等离子共振中的抗原 (a^n) 浓度依赖性变化进行测量。电信号可以作为电流、电阻、电势、质荷比或离子计数中的抗原 (a^n) 浓度依赖性变化进行测量。状态变化信号可以作为大小、可溶性、质量或共振中的抗原 (a^n) 浓度依赖性变化进行测量。

[0019] 在上文免疫测定中,抗体 $B_{a^n}^{n'}$ 可以包含与抗人 IgG 抗体复合的人源化抗体,所述抗人 IgG 抗体缀合至可检测标记,其中可检测标记是酶、寡核苷酸、纳米颗粒化学发光体、荧光团、荧光猝灭剂、化学发光猝灭剂或生物素。

[0020] 在上文免疫测定中,抗体 $A_{a^n}^{n'}$ 可以固定在固相上。固相可以选自磁性颗粒、珠、试管、微量滴定板、比色杯、膜、支架分子、石英晶体、薄膜、滤纸、盘和芯片。

[0021] 在另一个方面,本公开内容提供了用于检测来自测试样品在受试者中的心肌细胞损害的免疫测定,所述免疫测定包括步骤:

[0022] a) 使来自怀疑具有心肌细胞损害的受试者的测试样品接触 n 个抗体 ($A_{a^n}^{n'}$),其结合在 n' 个心肌细胞抗原 (a^n) 上的至少 n 个表位,以形成 n' (n -抗体:抗原) 个免疫复合物 ($(A_{a^n}^{n'}) (A_{a^n}^{n'}) \cdots (A_{a^n}^{n'}) (a^n)$, $(A_{a^n}^{n'}) (A_{a^n}^{n'}) \cdots (A_{a^n}^{n'}) (a^n)$, $\cdots (A_{a^n}^{n'}) (A_{a^n}^{n'}) \cdots (A_{a^n}^{n'}) (a^n)$), 其中 n 是 1 - 10 的整数;并且 n' 是 2 - 10 的整数。

[0023] b) 使包含 n' (n -抗体:抗原) 个免疫复合物的所述混合物接触 n'' 个抗体 ($B_{a^n}^{n''}$),其结合在 n' 个心肌细胞抗原 (a^n) 上的 n'' 个表位,以形成 n' ($(n + n'')$ 抗体:抗原) 个可测量组件 (assemblies) ($((A_{a^n}^{n'}) (A_{a^n}^{n'}) \cdots (A_{a^n}^{n'})) ((B_{a^n}^{n''}) (B_{a^n}^{n''}) \cdots (B_{a^n}^{n''})) (a^n)$, $((A_{a^n}^{n'}) (A_{a^n}^{n'}) \cdots (A_{a^n}^{n'})) ((B_{a^n}^{n''}) (B_{a^n}^{n''}) \cdots (B_{a^n}^{n''})) (a^n)$, $\cdots ((A_{a^n}^{n'}) (A_{a^n}^{n'}) \cdots (A_{a^n}^{n'})) ((B_{a^n}^{n''}) (B_{a^n}^{n''}) \cdots (B_{a^n}^{n''})) (a^n)$), 其中 n 和 n'' 独立地是 1 - 10 的整数,并且 n' 是 2 - 10 的整数,并且抗体 $A_{a^n}^{n'}$ 和 $B_{a^n}^{n''}$ 结合心肌细胞抗原的 $(n + n'')$ 个不同表位,其中抗体 $B_{a^n}^{n''}$ 由包含至少一种吡啶化合物的可检测标记进行标记。

[0024] c) 对步骤 (b) 的混合物生成或提供过氧化氢来源;

[0025] d) 将碱性溶液加入步骤 (c) 的混合物中,以生成光信号;

[0026] e) 测量步骤 (d) 中生成或发出的光信号;和

[0027] f) 通过测定步骤 (e) 中的测量是否超过预定水平来检测心肌细胞损害。

[0028] 在上文免疫测定中,心肌细胞抗原 (a^n) 可以选自心肌肌钙蛋白 -I、心肌肌钙蛋白 -T、肌酸磷酸激酶 MB (CKMB)、肌红蛋白、肌球蛋白重链、肌球蛋白轻链、B 型利尿钠肽 (包括前 BNP、N 端前 BNP 和 hBNP (1-32))、心脏脂肪酸结合蛋白 (H-FABP)、胎盘生长因子 (PLGF) 和白细胞介素 -6 (IL-6)。在免疫测定的一个示例性实施方案中, $n' = 2$ 并且心肌细胞抗原 (a^n) 是心肌肌钙蛋白 -I (cTnI) 和心肌肌钙蛋白 -T (cTnT)。抗体 $A_{a^n}^{n'}$ 、抗体 $B_{a^n}^{n''}$ 、或抗体 $A_{a^n}^{n'}$ 和 $B_{a^n}^{n''}$ 可以包含人源化抗体。

[0029] 在上文免疫测定中,抗体 $B_{a^n}^{n''}$ 可以通过共价或非共价键结合可检测标记,例如酶、

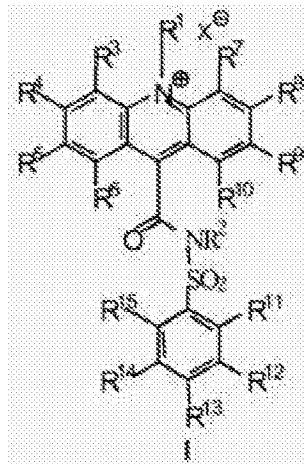
寡核苷酸、纳米颗粒化学发光体、荧光团、荧光猝灭剂、化学发光猝灭剂或生物素。光学信号可以作为化学发光、荧光、磷光、电化学发光、紫外吸收、可见吸收、红外吸收、折射、表面等离子共振中的抗原 (a^n) 浓度依赖性变化进行测量。电信号可以作为电流、电阻、电势、质荷比或离子计数中的抗原 (a^n) 浓度依赖性变化进行测量。状态变化信号可以作为大小、可溶性、质量或共振中的抗原 (a^n) 浓度依赖性变化进行测量。

[0030] 在上文免疫测定中, 抗体 B¹ 可以包含与抗人 IgG 抗体复合的人源化抗体, 所述抗人 IgG 抗体缀合至可检测标记, 其中可检测标记是酶、寡核苷酸、纳米颗粒化学发光体、荧光团、荧光猝灭剂、化学发光猝灭剂或生物素。

[0031] 在上文免疫测定中, 抗体 A¹ 可以固定在固相上。固相可以选自磁性颗粒、珠、试管、微量滴定板、比色杯、膜、支架分子、石英晶体、薄膜、滤纸、盘和芯片。

[0032] 在上文免疫测定中, 吡啶¹化合物可以是具有根据式 I 的结构 of 吡啶¹-9-甲酰胺:

[0033]



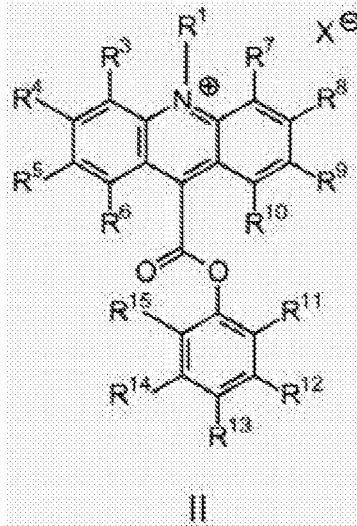
[0034] 其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自: 烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基, 和

[0035] 其中 R^3 直到 R^{15} 各自独立地选自: 氢、烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、氨基、酰胺基、酰基、烷氧基、羟基、羧基、卤素、卤化物、硝基、氰基、磺基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基; 和

[0036] 任选地, 如果存在的话, X^\ominus 是阴离子。

[0037] 可替代地, 在上文免疫测定中, 吡啶¹化合物可以是具有根据式 II 的结构 of 吡啶¹-9-羧酸根芳基酯:

[0038]



[0039] 其中 R^1 是烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基；和

[0040] 其中 R^3 直到 R^{15} 各自独立地选自：氢、烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、氨基、酰胺基、酰基、烷氧基、羟基、羧基、卤素、卤化物、硝基、氰基、磺基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基；和

[0041] 任选地，如果存在的话， X^\ominus 是阴离子。

[0042] 在上文免疫测定中，抗体 A_{D_1} 可以选自多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体和亲和力成熟的抗体。抗体 B_{D_2} 可以选自多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体和亲和力成熟的抗体。

[0043] 在上文免疫测定中，过氧化氢可以通过加入缓冲液或含有过氧化氢的溶液来提供。过氧化氢可以例如通过将过氧化氢生成酶加入测试样品而生成。过氧化氢生成酶可以选自：(R)-6-羟基烟碱氧化酶、(S)-2-羟酸氧化酶、(S)-6-羟基烟碱氧化酶、3-酸式-硝基丙酸氧化酶、3-羟基邻氨基苯甲酸氧化酶、4-羟基扁桃酸氧化酶、6-羟基烟酸脱氢酶、脱落醛氧化酶 (abscisic-aldehyde oxidase)、酰基-CoA 氧化酶、醇氧化酶、醛氧化酶、胺氧化酶、胺氧化酶 (含铜的)、胺氧化酶 (含黄素的)、芳基-醇氧化酶、芳基-醛氧化酶、儿茶酚氧化酶、胆固醇氧化酶、胆碱氧化酶、非洲防己碱 (columbamine) 氧化酶、环己胺氧化酶、细胞色素 c 氧化酶、D-氨基酸氧化酶、D-阿拉伯糖 (arabinono)-1, 4-内酯氧化酶、D-阿拉伯糖-1, 4-内酯氧化酶、D-天冬氨酸氧化酶、D-谷氨酸氧化酶、D-谷氨酸 (D-天冬氨酸) 氧化酶、二氢苯并菲啶氧化酶、二氢乳清酸氧化酶、二氢尿嘧啶氧化酶、二甲基甘氨酸氧化酶、D-甘露醇氧化酶、蜕皮素氧化酶、乙醇胺氧化酶、半乳糖氧化酶、葡萄糖氧化酶、谷胱甘肽氧化酶、甘油-3-磷酸氧化酶、甘氨酸氧化酶、乙醛酸氧化酶、己糖氧化酶、羟基植烷酸氧化酶、吡啶-3-乙醛氧化酶、乳酸氧化酶、L-氨基酸氧化酶、L-天冬氨酸氧化酶、L-半乳糖酸内酯氧化酶、L-谷氨酸氧化酶、L-古洛糖酸内酯氧化酶、L-赖氨酸 6-氧化酶、L-赖氨酸氧化酶、长链醇氧化酶、L-甲基哌啶氧化酶、L-山梨糖氧化酶、苹果酸氧化酶、甲硫醇氧化酶、单氨基酸氧化酶、N6-甲基-赖氨酸氧化酶、N-酰基己糖胺氧化酶、NAD(P)H 氧化酶、硝基烷氧化酶、N-甲基-L-氨基酸氧化酶、核苷氧化酶、草酸氧化酶、多胺氧化酶、多酚氧化酶、聚乙烯醇氧化酶、异戊烯半胱氨酸氧化酶、蛋白质-赖氨酸 6-氧化酶、丁二胺氧化酶、吡喃糖氧化酶、5'-磷酸吡哆醛合酶、吡哆醇 4-氧化酶、吡咯喹啉-醌合酶、丙酮酸氧化酶、丙

酮酸氧化酶 (CoA-乙酰化)、网脉番荔枝碱氧化酶、视黄醛氧化酶、利福霉素-B 氧化酶、肌氨酸氧化酶、仲醇氧化酶、亚硫酸氧化酶、超氧化物歧化酶、超氧化物还原酶、四氢小檗碱氧化酶、硫胺素氧化酶、色氨酸 α , β -氧化酶、尿酸氧化酶 (尿酸酶、尿酸氧化酶)、香草醇氧化酶、黄嘌呤氧化酶、木糖醇氧化酶及其组合。

[0044] 在上文免疫测定中,碱性溶液可以是例如具有至少约 10 的 pH 的溶液。

[0045] 在上文免疫测定中,通过测定步骤 (e) 中的测量是否超过预定水平来检测心肌细胞损害的步骤 f) 包括关联步骤 (e) 中光信号的量与测试样品中心肌细胞抗原 a^n 的量,其通过使用关于每个心肌细胞抗原 a^n 的标准曲线或通过关于每个心肌细胞抗原 a^n 的参考标准的比较。关于每个心肌细胞抗原 a^n 的参考标准可以包含抗独特型抗体。参考标准可以包含衍生的心肌细胞抗原,例如由聚乙二醇衍生的心肌细胞抗原。

[0046] 上文免疫测定中的任何都可以适合于在自动化系统或半自动化系统中使用。

[0047] 在上文免疫测定中的任何中,测试样品可以是全血、血清或血浆。

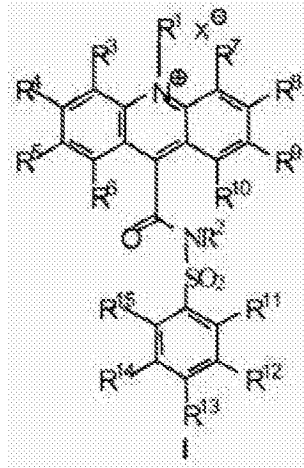
[0048] 在另一个方面,本公开内容提供了用于检测来自测试样品的心肌细胞损害的试剂盒,所述试剂盒包含:结合在 n' 个心肌细胞抗原 (a^n) 上的至少 n 个表位的 n 个抗体 ($A_{a^n}^1$),以形成 n' (n -抗体:抗原) 个免疫复合物 ($(A_{a^1}^1)(A_{a^2}^2)\cdots(A_{a^n}^n)(a^1)$, $(A_{a^1}^1)(A_{a^2}^2)\cdots(A_{a^n}^n)(a^2)$, $\cdots(A_{a^1}^1)(A_{a^2}^2)\cdots(A_{a^n}^n)(a^n)$),其中 n 是 1 - 10 的整数;并且 n' 是 2 - 10 的整数;和结合在 n' 个心肌细胞抗原 (a^n) 上的 n'' 个表位的 n'' 个抗体 ($B_{a^n}^1$),以形成 n' ($(n+n'')$ 抗体:抗原) 个可测量组件 ($((A_{a^1}^1)(A_{a^2}^2)\cdots(A_{a^n}^n))((B_{a^1}^1)(B_{a^2}^2)\cdots(B_{a^n}^n))(a^1)$, $((A_{a^1}^1)(A_{a^2}^2)\cdots(A_{a^n}^n))((B_{a^1}^1)(B_{a^2}^2)\cdots(B_{a^n}^n))(a^2)$, $\cdots((A_{a^1}^1)(A_{a^2}^2)\cdots(A_{a^n}^n))((B_{a^1}^1)(B_{a^2}^2)\cdots(B_{a^n}^n))(a^n)$),其中 n 和 n'' 独立地是 1 - 10 的整数,并且 n' 是 2 - 10 的整数,并且抗体 A 和 B 结合心肌细胞抗原的 $(n+n'')$ 个不同表位,和用于测定测试样品中心抗原 (a^n) 的总量是否超过预定水平的说明书。在试剂盒中,心肌细胞抗原 (a^n) 可以选自心肌肌钙蛋白-I、心肌肌钙蛋白-T、肌酸磷酸激酶 MB (CKMB)、肌红蛋白、肌球蛋白重链、肌球蛋白轻链、B 型利尿钠肽,其中第一个心特异性抗原和第二个心特异性抗原是不同的抗原。在试剂盒的一个示例性实施方案中, $n'=2$ 并且心肌细胞抗原 (a^n) 是心肌肌钙蛋白-I (cTnI) 和心肌肌钙蛋白-T (cTnT)。

[0049] 上文试剂盒可以进一步包含固相,其中抗体 $A_{a^n}^1$ 结合固相。固相可以选自磁性颗粒、珠、试管、微量滴定板、比色杯、膜、支架分子、石英晶体、薄膜、滤纸、盘和芯片。

[0050] 上文试剂盒可以进一步包含抗体 $B_{a^n}^1$ 通过共价或非共价键与之结合的可检测标记。可检测标记可以是酶、寡核苷酸、纳米颗粒化学发光体、荧光团、荧光猝灭剂、化学发光猝灭剂或生物素。

[0051] 在试剂盒的特定实施方案中,可检测标记可以是吡啶𬭩化合物。吡啶𬭩化合物可以是具有根据式 I 的结构 of 吡啶𬭩-9-甲酰胺:

[0052]



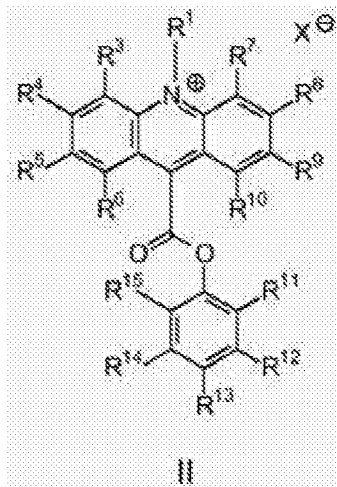
[0053] 其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自：烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基，和

[0054] 其中 R^3 直到 R^{15} 各自独立地选自：氢、烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、氨基、酰胺基、酰基、烷氧基、羟基、羧基、卤素、卤化物、硝基、氰基、磺基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基；和

[0055] 任选地，如果存在的话， X^\ominus 是阴离子。

[0056] 可替代地，在上文试剂盒中，吡啶𬝓化合物可以是具有根据式 II 的结构吡啶𬝓-9-羧酸根芳基酯：

[0057]



[0058] 其中 R^1 是烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基；和

[0059] 其中 R^3 直到 R^{15} 各自独立地选自：氢、烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、氨基、酰胺基、酰基、烷氧基、羟基、羧基、卤素、卤化物、硝基、氰基、磺基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基；和

[0060] 任选地，如果存在的话， X^\ominus 是阴离子。

[0061] 试剂盒可以进一步包含碱性溶液，例如具有至少约 10 的 pH 的溶液。试剂盒可以进一步包含过氧化氢来源。过氧化氢来源可以包含缓冲液或含有过氧化氢的溶液。过氧化氢来源可以包含过氧化氢生成酶。过氧化氢生成酶可以选自：(R)-6-羟基烟碱氧化酶、(S)-2-羟酸氧化酶、(S)-6-羟基烟碱氧化酶、3-酸式-硝基丙酸氧化酶、3-羟基邻氨基苯

甲酸氧化酶、4-羟基扁桃酸氧化酶、6-羟基烟酸脱氢酶、脱落醛氧化酶、酰基-CoA 氧化酶、醇氧化酶、醛氧化酶、胺氧化酶、胺氧化酶(含铜的)、胺氧化酶(含黄素的)、芳基-醇氧化酶、芳基-醛氧化酶、儿茶酚氧化酶、胆固醇氧化酶、胆碱氧化酶、非洲防己碱氧化酶、环己胺氧化酶、细胞色素 c 氧化酶、D-氨基酸氧化酶、D-阿拉伯糖-1,4-内酯氧化酶、D-阿拉伯糖-1,4-内酯氧化酶、D-天冬氨酸氧化酶、D-谷氨酸氧化酶、D-谷氨酸(D-天冬氨酸)氧化酶、二氢苯并菲啶氧化酶、二氢乳清酸氧化酶、二氢尿嘧啶氧化酶、二甲基甘氨酸氧化酶、D-甘露醇氧化酶、蜕皮素氧化酶、乙醇胺氧化酶、半乳糖氧化酶、葡萄糖氧化酶、谷胱甘肽氧化酶、甘油-3-磷酸氧化酶、甘氨酸氧化酶、乙醛酸氧化酶、己糖氧化酶、羟基植烷酸氧化酶、吡啶-3-乙醛氧化酶、乳酸氧化酶、L-氨基酸氧化酶、L-天冬氨酸氧化酶、L-半乳糖酸内酯氧化酶、L-谷氨酸氧化酶、L-古洛糖酸内酯氧化酶、L-赖氨酸 6-氧化酶、L-赖氨酸氧化酶、长链醇氧化酶、L-甲基哌啶氧化酶、L-山梨糖氧化酶、苹果酸氧化酶、甲硫醇氧化酶、单氨基酸氧化酶、N6-甲基-赖氨酸氧化酶、N-酰基己糖胺氧化酶、NAD(P)H 氧化酶、硝基烷氧化酶、N-甲基-L-氨基酸氧化酶、核苷氧化酶、草酸氧化酶、多胺氧化酶、多酚氧化酶、聚乙烯醇氧化酶、异戊烯半胱氨酸氧化酶、蛋白质-赖氨酸 6-氧化酶、丁二胺氧化酶、吡喃糖氧化酶、5'-磷酸吡哆醛合酶、吡哆醇 4-氧化酶、吡咯喹啉-醌合酶、丙酮酸氧化酶、丙酮酸氧化酶(CoA-乙酰化)、网脉番荔枝碱氧化酶、视黄醛氧化酶、利福霉素-B 氧化酶、肌氨酸氧化酶、仲醇氧化酶、亚硫酸氧化酶、超氧化物歧化酶、超氧化物还原酶、四氢小檗碱氧化酶、硫胺素氧化酶、色氨酸 α , β -氧化酶、尿酸氧化酶(尿酸酶、尿酸氧化酶)、香草醇氧化酶、黄嘌呤氧化酶、木糖醇氧化酶及其组合。

[0062] 在上文试剂盒中,抗体 A₁、抗体 B₁、或抗体 A₁和 B₁可以包含人源化抗体。在试剂盒的一个示例性实施方案中,抗体 B₁包含抗人 IgG 抗体。

[0063] 上文试剂盒可以进一步包含一个或多个心抗原参考标准。每个心抗原参考标准可以包含抗独特型抗体。每个心抗原参考标准可以包含衍生的心抗原,例如由聚乙二醇衍生的心抗原。

[0064] 附图简述

[0065] 图 1 是检测和捕获抗体的不同组合的剂量应答曲线图;

[0066] 图 2 是人心肌钙蛋白-T(cTnT)的氨基酸序列;

[0067] 图 3 是 cTnT 自身抗体表位的频率曲线;

[0068] 图 4 是鼠抗心肌钙蛋白-T M8020207 的表位图;

[0069] 图 5 是鼠抗心肌钙蛋白-T 1C11 的表位图;

[0070] 图 6 是人心肌钙蛋白-I(cTnI)的氨基酸序列;

[0071] 图 7 显示在人心肌钙蛋白-I 自身抗体中发现的反应性心肌钙蛋白-I 表位的频率;和

[0072] 图 8 是单克隆 19C7 的表位图。

[0073] 发明详述

[0074] 本公开内容提供了用于检测来自测试样品在受试者中的心肌细胞损害的改进测定。该测定用于诊断临床病状、评估危险或预测与心肌细胞损害相关的后果。根据公开的免疫测定方法和试剂盒,心肌细胞损害可以甚至诊断至心肌细胞死亡的程度。另外地,免疫

测定方法和试剂盒特别用于基于来自受试者的测试样品检测心肌细胞损害,其中测试样品还可以含有可能干扰心肌损害指示物测定的其他物质,特别是当此类测定报道为单一测定结果时。相比之下,如本文公开的方法和试剂盒提供了增强心肌细胞损害测定的新方法,其通过组合来自心肌细胞损害的至少 2 个不同指示物的结果且将信号报道为单一结果实施,其中指示物是心肌细胞抗原。来自不同心肌细胞抗原测定的结果可以连续或平行执行。

[0075] 因此,本公开内容提供了用于相对于基于心肌细胞损害的单一指示物的方法(例如依赖于单独的心肌肌钙蛋白-I(cTnI)或单独的心肌肌钙蛋白-T(cTnT)测定的那些)增加的分析 and 临床灵敏度的方法和试剂盒。相应地,目前公开的方法和试剂盒提供了 MI 的更可靠诊断、危险分层和预后。该方法和试剂盒用于患者的诊断和护理,所述患者患有心脏病理学例如充血性心力衰竭、急性冠状动脉综合征、心肌梗死、心肌炎等,以及肾疾病、肾损伤等。

[0076] 该方法部分基于超过一个捕获期抗体和超过一个检测抗体的使用,以改善特异性。这种测定方法还补偿可能存在于测试样品中的其他物质例如异嗜性内源抗体和自身抗体的存在,而无需重新设计分析物特异性检测抗体或捕获抗体,并且避免鉴定有疑问样品的第二测定的需要。另外,该方法提供了人源化免疫试剂的使用,以克服异嗜性抗体干扰。抗人 IgG 检测抗体的使用校准内源自身抗体,并且当与人源化免疫试剂结合使用时,提供了“通用的”信号生成物。衍生的心肌细胞抗原也描述为适合于测定标准化的参考标准。

[0077] A. 定义

[0078] 如本文这个部分和整个公开内容中使用的部分标题不预期是限制性的。

[0079] 如本文使用的,单数形式“一(a, an)”和“该(the)”包括复数参考,除非上下文另有明确说明。对于本文数目范围的叙述,明确考虑了具有相同精确度在中间的每个插入数目。例如对于范围 6-9,除 6 和 9 外,还考虑了数目 7 和 8,并且对于范围 6.0-7.0,明确考虑了数目 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 和 7.0。

[0080] a) 酰基(和其他化学结构基团定义)

[0081] 如本文使用的,术语“酰基”指 $-C(O)R_a$ 基团,其中 R_a 是氢、烷基、环烷基、环烷基烷基、苯基或苯烷基。酰基的代表性例子包括但不限于甲酰基、乙酰基、环己基羰基、环己基甲基羰基、苯甲酰基、苄基羰基等。

[0082] 如本文使用的,术语“烯基”意指含有 2 - 10 个碳且含有通过去除 2 个氢形成的至少一个碳-碳双键的直链或支链烃。烯基的代表性例子包括但不限于乙烯基、2-丙烯基、2-甲基-2-丙烯基、3-丁烯基、4-戊烯基、5-己烯基、2-庚烯基、2-甲基-1-庚烯基、和 3-癸烯基。

[0083] 如本文使用的,术语“烷基”意指含有 1 - 10 个碳原子的直链或支链烃。烷基的代表性例子包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、3-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、正庚基、正辛基、正壬基、和正癸基。

[0084] 如本文使用的,术语“烷基基团”意指衍生自直链或支链烃的通式 C_nH_{2n+1} 的一系列单价基团中的任何。

[0085] 如本文使用的,术语“烷氧基”意指通过氧原子附加至母体分子部分的如本文定义的烷基。烷氧基的代表性例子包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、2-丙氧基、丁氧基、叔

丁氧基、戊氧基和己氧基。

[0086] 如本文使用的,术语“炔基”意指含有 2 - 10 个碳原子且含有至少一个碳 - 碳三键的直链或支链烃基团。炔基的代表性例子包括但不限于乙炔基、1- 丙炔基、2- 丙炔基、3- 丁炔基、2- 戊炔基和 1- 丁炔基。

[0087] 如本文使用的,术语“酰胺基”指通过羰基(其中术语“羰基”指 $-C(O)-$ 基团)附加至母体分子部分的氨基。

[0088] 如本文使用的,术语“氨基”意指 $-NR_bR_c$, 其中 R_b 和 R_c 独立地选自氢、烷基和烷基羰基。

[0089] 如本文使用的,术语“芳烷基”意指通过如本文定义的烷基附加至母体分子部分的芳基。芳烷基的代表性例子包括但不限于苄基、2- 苄乙基、3- 苄丙基和 2- 萘 2- 基乙基。

[0090] 如本文使用的,术语“芳基”意指苯基或二环或三环稠环系统,其中稠环中的一个或多个是苯基。二环稠环系统通过与环烯基、环烷基或另一苯基稠合的苯基示例。三环稠环系统通过与环烯基、如本文定义的环烷基或另一种苯基稠合的二环稠环系统示例。芳基的代表性例子包括但不限于蒽基、奠基 (azuleny1)、芴基、茛满基、茛基、萘基、苯基和四氢萘基。本公开内容的芳基可以由独立地选自烷氧基、烷基、羧基、卤素和羟基的 1、2、3、4 或 5 个取代基任选取代。

[0091] 如本文使用的,术语“羧”或“羧基”指 $-CO_2H$ 或 $-CO_2$ 。

[0092] 如本文使用的,术语“羧烷基”指 $-(CH_2)_nCO_2H$ 或 $-(CH_2)_nCO_2$ 基团,其中 n 是 1 - 10。

[0093] 如本文使用的,术语“氰基”意指 $-CN$ 基团。

[0094] 如本文使用的,术语“环烯基”指具有 3 - 10 个碳原子和 1 - 3 个环的非芳香族环状或二环系统,其中每个 5 元环具有 1 个双键,每个 6 元环具有 1 或 2 个双键,每个 7 和 8 元环具有 1 - 3 个双键,并且每个 9 至 10 元环具有 1 - 4 个双键。环烯基的代表性例子包括环己烯基、八氢萘基、降冰片烯基等。环烯基可以由独立地选自烷氧基、烷基、羧基、卤素和羟基的 1、2、3、4 或 5 个取代基任选取代。

[0095] 如本文使用的,术语“环烷基”指具有 3 - 12 个碳原子的饱和单环、二环或三环烃环系统。环烷基的代表性例子包括环丙基、环戊基、二环 [3. 1. 1] 庚基、金刚烷基等。本公开内容的环烷基可以由独立地选自烷氧基、烷基、羧基、卤素和羟基的 1、2、3、4 或 5 个取代基任选取代。

[0096] 如本文使用的,术语“环烷基烷基”意指 $-R_dR_e$ 基团,其中 R_d 是烯基,且 R_e 是环烷基。环烷基烷基的代表性例子是环己基甲基等。

[0097] 如本文使用的,术语“卤素”意指 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 或 $-F$;术语“卤化物”意指二元化合物,其中一部分是卤素原子,并且另一部分是比卤素更少电负性的元素或基团,例如烷基基团。

[0098] 如本文使用的,术语“羟基”意指 $-OH$ 基团。

[0099] 如本文使用的,术语“硝基”意指 $-NO_2$ 基团。

[0100] 如本文使用的,术语“氧代烷基”指 $-(CH_2)_nC(O)R_a$, 其中 R_a 是氢、烷基、环烷基、环烷基烷基、苯基或苯烷基,并且其中 n 是 1 - 10。

[0101] 如本文使用的,术语“苯烷基”意指由苯基取代的烷基。

[0102] 如本文使用的,术语“磺基(sulfo)”意指 $-SO_3H$ 基团。

[0103] 如本文使用的,术语“磺烷基”指 $-(CH_2)_nSO_3H$ 或 $-(CH_2)_nSO_3$ 基团,其中 n 是 1 - 10。

[0104] b) 阴离子

[0105] 如本文使用的,术语“阴离子”指无机或有机酸的阴离子,例如但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、甲磺酸、甲酸、乙酸、草酸、琥珀酸、酒石酸、扁桃酸、延胡索酸、乳酸、柠檬酸、谷氨酸、天冬氨酸、磷酸酯、三氟甲磺酸、三氟乙酸和氟磺酸及其任何组合。

[0106] c) 抗体

[0107] 如本文使用的,术语“抗体”指由基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段编码的一种或多种多肽组成的蛋白质,并且包含多克隆抗体、单克隆抗体及其片段,以及由免疫球蛋白基因序列改造的分子。识别的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及众多免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为 κ 或 λ 。重链分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其进而分别定义免疫球蛋白类别, IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。如此处表示的,符号形式“ A_n^m ”意指结合在抗原 n' 上的表位 n 的抗体。例如, A_1^1 可以是结合在抗原 a^1 上的 1 个表位的抗体,其中抗原 a^1 是心肌肌钙蛋白 -I, 并且 A_2^2 可以是结合在抗原 a^2 上的 1 个表位的抗体,其中抗原 a^2 是心肌肌钙蛋白 -T。

[0108] d) 过氧化氢生成酶

[0109] 如本文使用的,术语“过氧化氢生成酶”指能够产生具有分子式 H_2O_2 的化学化合物,即过氧化氢作为反应产物的酶。过氧化氢生成酶的非限制性例子在下表 A-1 中列出。

[0110] 表 A-1

[0111]

公认的通用名	IUBMB 酶命名法	优选底物
(R)-6-羟基烟碱氧化酶	EC 1.5.3.6	(R)-6-羟基烟碱
(S)-2-羟酸氧化酶	EC 1.1.3.15	(S)-2-羟酸
(S)-6-羟基烟碱氧化酶	EC 1.5.3.5	(S)-6-羟基烟碱
3-酸式-硝基丙酸氧化酶	EC 1.7.3.5	3-酸式-硝基丙酸酯
3-羟基邻氨基苯甲酸氧化酶	EC 1.10.3.5	3-羟基邻氨基苯甲酸酯
4-羟基扁桃酸氧化酶	EC 1.1.3.19	(S)-2-羟基-2-(4-羟苯基)乙酸酯
6-羟基烟酸脱氢酶	EC 1.17.3.3	6-羟基烟酸酯
脱落醛氧化酶	EC 1.2.3.14	脱落醛
酰基-CoA 氧化酶	EC 1.3.3.6	酰基-CoA
醇氧化酶	EC 1.1.3.13	伯醇
醛氧化酶	EC 1.2.3.1	醛
胺氧化酶		
胺氧化酶(含铜的)	EC 1.4.3.6	伯单胺、二胺和组胺
胺氧化酶(含黄素的)	EC 1.4.3.4	伯胺
芳基-醇氧化酶	EC 1.1.3.7	芳香族伯醇 (2-萘基)甲醇 3-甲氧苄醇
芳基-醛氧化酶	EC 1.2.3.9	芳香族醛
儿茶酚氧化酶	EC 1.1.3.14	儿茶酚
胆固醇氧化酶	EC 1.1.3.6	胆固醇
胆碱氧化酶	EC 1.1.3.17	胆碱
非洲防己碱氧化酶	EC 1.2.1.3.2	非洲防己碱
环己胺氧化酶	EC 1.4.3.12	环己胺
细胞色素 c 氧化酶	EC 1.9.3.1	
D-氨基酸氧化酶	EC 1.4.3.3	D-氨基酸
D-阿拉伯糖-1,4-内酯氧化酶	EC 1.1.3.37	D-阿拉伯糖-1,4-内酯
D-阿拉伯糖-1,4-内酯氧化酶	EC 1.1.3.37	D-阿拉伯糖-1,4-内酯
D-天冬氨酸氧化酶	EC 1.4.3.1	D-天冬氨酸酯
D-谷氨酸氧化酶	EC 1.4.3.7	D-谷氨酸酯
D-谷氨酸(D-天冬氨酸)氧化酶	EC 1.4.3.15	D-谷氨酸酯
三氢苯并吡啶氧化酶	EC 1.5.3.12	三氢血根碱
三氢乳酸氧化酶	EC 1.3.3.1	(S)-三氢乳酸
三氢尿嘧啶氧化酶	EC 1.3.3.7	5,6-三氢尿嘧啶
二甲基甘氨酸氧化酶	EC 1.5.3.10	N,N-二甲基甘氨酸
D-甘露醇氧化酶	EC 1.1.3.40	甘露醇
蜕皮素氧化酶	EC 1.1.3.16	蜕皮素
乙醇胺氧化酶	EC 1.4.3.8	乙醇胺
半乳糖氧化酶	EC 1.1.3.9	D-半乳糖
葡萄糖氧化酶	EC 1.1.3.4	β -D-葡萄糖
谷胱甘肽氧化酶	EC 1.8.3.3	谷胱甘肽

[0112]

甘油-3-磷酸氧化酶	EC 1.1.3.21	sn-甘油-3-磷酸
甘氨酸氧化酶	EC 1.4.3.19	甘氨酸
乙醛酸氧化酶	EC 1.2.3.5	乙醛酸酯
己糖氧化酶	EC 1.1.3.5	D-葡萄糖 D-半乳糖 D-甘露糖 麦芽糖 乳糖 纤维二糖
羟基植烷酸氧化酶	EC 1.1.3.27	L-2-羟基植烷酸
咪唑-3-乙醛氧化酶	EC 1.2.3.7	(咪唑-3-基)乙醛
乳酸氧化酶		乳酸
L-氨基酸氧化酶	EC 1.4.3.2	L-氨基酸
L-天冬氨酸氧化酶	EC 1.4.3.16	L-天冬氨酸酯
L-半乳糖酸内酯氧化酶	EC 1.3.3.12	L-半乳糖酸-1,4-内酯
L-谷氨酸氧化酶	EC 1.4.3.11	L-谷氨酸酯
L-古洛糖酸内酯氧化酶	EC 1.1.3.8	L-古洛糖酸-1,4-内酯
L-赖氨酸 6-氧化酶	EC 1.4.3.20	L-赖氨酸
L-赖氨酸氧化酶	EC 1.4.3.14	L-赖氨酸
长链醇氧化酶	EC 1.1.3.20	长链醇
L-甲基嘧啶氧化酶	EC 1.5.3.7	L-甲基嘧啶
L-山梨糖氧化酶	EC 1.1.3.11	L-山梨糖
苹果酸氧化酶	EC 1.1.3.3	(S)-苹果酸酯
甲硫醇氧化酶	EC 1.8.3.4	甲硫醇
单氨基酸氧化酶		
N ⁶ -甲基-赖氨酸氧化酶	EC 1.5.3.4	6-N-甲基-L-赖氨酸
N-酰基己糖胺氧化酶	EC 1.1.3.29	N-酰基-D-葡糖胺 N-羟乙酰葡糖胺 N-乙酰半乳糖胺 N-乙酰甘露糖胺
NAD (P) H 氧化酶	EC 1.6.3.1	NAD (P) H
硝基烷氧化酶	EC 1.7.3.1	硝基烷
N-甲基-L-氨基酸氧化酶	EC 1.5.3.2	N-甲基-L-氨基酸
核苷氧化酶	EC 1.1.3.39	腺苷
草酸氧化酶	EC 1.2.3.4	草酸酯
多胺氧化酶	EC 1.5.3.11	1-N-乙酰精胺
多酚氧化酶	EC 1.14.18.1	
聚乙烯醇氧化酶	EC 1.1.3.30	聚乙烯醇
异戊烯半胱氨酸氧化酶	EC 1.8.3.5	S-异戊二烯基-L-半胱氨酸
蛋白质-赖氨酸 6-氧化酶	EC 1.4.3.13	肽基-L-赖氨酸-肽
丁二胺氧化酶	EC 1.4.3.10	丁-1,4-二胺
吡喃糖氧化酶	EC 1.1.3.10	D-葡萄糖

[0113]

		D-木糖 L-山梨糖 D-葡萄糖酸-1,5-内酯
5'-磷酸吡哆醛合酶	EC 1.4.3.5	5'-磷酸吡哆胺
吡哆醇 4-氧化酶	EC 1.1.3.12	吡哆醇
吡咯喹啉-酮合酶	EC 1.3.3.11	6-(2-氨基-2-羧乙基)-7,8-二氧代-1,2,3,4,5,6,7,8-八氢喹啉-2,4-二羧酸酯
丙酮酸氧化酶	EC 1.2.3.3	丙酮酸酯
丙酮酸氧化酶 (CoA-乙酰化)	EC 1.2.3.6	丙酮酸酯
网脉番荔枝碱氧化酶	EC 1.21.3.3	网脉番荔枝碱
视黄醛氧化酶	EC 1.2.3.11	视黄醛
利福霉素-B 氧化酶	EC 1.10.3.6	利福霉素-B
肌氨酸氧化酶	EC 1.5.3.1	肌氨酸
仲醇氧化酶	EC 1.1.3.18	仲醇
亚硫酸氧化酶	EC 1.8.3.1	亚硫酸酯
超氧化物歧化酶	EC 1.15.1.1	超氧化物
超氧化物还原酶	EC 1.15.1.2	超氧化物
四氢小檗碱氧化酶	EC 1.3.3.8	(S)-四氢小檗碱
硫胺素氧化酶	EC 1.1.3.23	硫胺素
色氨酸 α - β -氧化酶	EC 1.3.3.10	L-色氨酸
尿酸氧化酶 (尿酸酶、尿酸氧化酶)	EC 1.7.3.3	尿酸
香草醇氧化酶	EC 1.1.3.38	香草醇
黄嘌呤氧化酶	EC 1.17.3.2	黄嘌呤
木糖醇氧化酶	EC 1.1.3.41	木糖醇

[0114] e) 自身抗体

[0115] 如本文使用的,短语“自身抗体”指结合分析物的抗体,所述分析物在其中产生抗体的受试者中内源产生。

[0116] f) n' (n - 抗体 : 抗原) 个免疫复合物

[0117] 如本文使用的,短语“ n' (n - 抗体 : 抗原) 个免疫复合物”指 n 个抗体 A 和 n' 个心肌细胞抗原 a 的组合,其中抗体和抗原通过在每个抗体上的至少一个抗原组合位点和在 n' 个心肌细胞抗原 a^n 各自上的至少一个表位之间的特异性、非共价相互作用结合,其中 n 是 1 - 10 的整数,并且 n' 是 2 - 10 的整数。如此处表示的,符号形式 $(A_1^1)(A_2^2) \dots (A_n^n)(a^1), (A_1^1)(A_2^2) \dots (A_n^n)(a^2), \dots (A_1^1)(A_2^2) \dots (A_n^n)(a^n)$ 意指 2 个或更多个抗体 : 抗原免疫复合物。例如, $(A_1^1)(A_2^2) \dots (A_n^n)(a^1)$ 是第一个抗体 : 抗原免疫复合物,其中 A_1^1 是结合在抗原 a^1 上的一个表位的第一个抗体,和任选地, A_2^2 是结合在抗原 a^1 上的第二个表位的第二个抗体等等,直到 A_n^n ,其为结合在抗原 a^1 上的第 n 个表位的第 n 个抗体,其中抗原 a^1 是心肌肌钙蛋白 -I ; 并且 $(A_1^1)(A_2^2) \dots (A_n^n)(a^2)$ 是第二个抗体 : 抗

原免疫复合物,其中 $A_{a^2}^1$ 是结合在抗原 a^2 上的一个表位的第一个抗体,和任选地, $A_{a^2}^2$ 是结合在抗原 a^2 上的第二个表位的第二个抗体等等,直到 $A_{a^2}^n$,其为结合在抗原 a^2 上的第 n 个表位的第 n 个抗体,其中抗原 a^2 是心肌肌钙蛋白-T。

[0118] g) $n'(n+n')$ 抗体:抗原)个可测量组件

[0119] 如本文使用的,术语“ $n'(n+n')$ 抗体:抗原)个可测量组件”指 n 个抗体 A 、 n' 个抗体 B 和 n' 个心肌细胞抗原 a 的组合,以形成 $n'(n+n')$ 个可测量的抗体:抗原免疫复合物,其中 n 和 n' 独立地是 $1-10$ 的整数, n' 是 $2-10$ 的整数,并且抗体 A 和 B 结合心肌细胞抗原的 $(n+n')$ 个不同表位。抗体和心肌细胞抗原的组合产生光学、电或状态变化信号,其是可以检测且定量的且因此该组合是“可测量的”。如此处表示的,符号形式 $((A_{a^1}^1)(A_{a^1}^2)\cdots(A_{a^1}^n))((B_{a^1}^1)(B_{a^1}^2)\cdots(B_{a^1}^{n'})) (a^1), ((A_{a^2}^1)(A_{a^2}^2)\cdots(A_{a^2}^n))((B_{a^2}^1)(B_{a^2}^2)\cdots(B_{a^2}^{n'})) (a^2), \cdots ((A_{a^n}^1)(A_{a^n}^2)\cdots(A_{a^n}^n))((B_{a^n}^1)(B_{a^n}^2)\cdots(B_{a^n}^{n'})) (a^n)$ 意指 2 个或多个抗体:抗原可测量组件。例如, $((A_{a^1}^1)(A_{a^1}^2)\cdots(A_{a^1}^n))((B_{a^1}^1)(B_{a^1}^2)\cdots(B_{a^1}^{n'})) (a^1)$ 是第一个可测量组件,其中 $A_{a^1}^1$ 是结合在抗原 a^1 上的一个表位的第一个抗体,和任选地, $A_{a^1}^2$ 是结合在抗原 a^1 上的第二个表位的第二个抗体等等,直到 $A_{a^1}^n$,其为结合在抗原 a^1 上的第 n 个表位的第 n 个抗体,并且 $B_{a^1}^1$ 是结合在抗原 a^1 上的一个表位的第一个抗体,和任选地, $B_{a^1}^2$ 是结合在抗原 a^1 上的第二个表位的第二个抗体等等,直到 $B_{a^1}^{n'}$,其为结合在抗原 a^1 上的第 n' 个表位的第 n' 个抗体,其中抗原 a^1 是心肌肌钙蛋白-I;并且 $((A_{a^2}^1)(A_{a^2}^2)\cdots(A_{a^2}^n))((B_{a^2}^1)(B_{a^2}^2)\cdots(B_{a^2}^{n'})) (a^2)$ 是第二个可测量组件,其中 $A_{a^2}^1$ 是结合在抗原 a^2 上的一个表位的第一个抗体,和任选地, $A_{a^2}^2$ 是结合在抗原 a^2 上的第二个表位的第二个抗体等等,直到 $A_{a^2}^n$,其为结合在抗原 a^2 上的第 n 个表位的第 n 个抗体,并且其中 $B_{a^2}^1$ 是结合在抗原 a^2 上的一个表位的第一个抗体,和任选地, $B_{a^2}^2$ 是结合在抗原 a^2 上的第二个表位的第二个抗体等等,直到 $B_{a^2}^{n'}$,其为结合在抗原 a^2 上的第 n' 个表位的第 n' 个抗体,其中抗原 a^2 是心肌肌钙蛋白-T。

[0120] h) 可检测标记

[0121] 如本文使用的,术语“可检测标记”指经由偶联至该部分的一种或多种分子的光学、电或状态变化的其他物理指示生成可测量的信号的任何部分。此类物理指示物包含分光镜、光化学、生物化学、免疫化学、电磁、放射化学和化学工具,例如但不限于荧光、化学荧光、化学发光等。优选的可检测标记包括吡啶鎓化合物,例如如本文下文部分 B 中所示具有根据式 I 的结构吡啶鎓-9-甲酰胺,和也如本文下文部分 B 中所示具有根据式 II 的结构吡啶鎓-9-羧酸根芳基酯。

[0122] i) 受试者

[0123] 如本文使用的,术语“受试者”和“患者”可互换使用,与受试者是否具有或目前经历任何形式的治疗无关。如本文使用的,术语“受试者”指任何脊椎动物,包括但不限于哺乳动物(例如牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、犬、大鼠和小鼠,非人

灵长类动物（例如猴例如食蟹猴、黑猩猩等）和人）。优选地，受试者是人。

[0124] j) 测试样品

[0125] 如本文使用的，术语“测试样品”一般指待测试和 / 或怀疑含有目的分析物且还可以包括针对一种或多种目的分析物的自身抗体的生物学材料。生物学材料可以衍生自任何生物学来源，但优选是可能含有心肌细胞抗原的生物学流体。生物学材料的例子包括但不限于粪便、全血、血清、血浆、红细胞、血小板、组织间液、唾液、晶体液、脑脊液、汗液、尿、腹水液、粘液、鼻流体、唾液、滑液、腹膜液、阴道液、月经、羊膜液、精液、粪便 (soil) 等。测试样品可以如得自生物学来源直接使用或在修饰样品特征的预处理后使用。例如，此类预处理可以包括由血液制备血浆，稀释粘性流体等等。预处理的方法还可以涉及过滤、沉淀、稀释、蒸馏、混合、浓缩、干扰组分的失活、试剂的添加、裂解等。如果此类预处理方法就测试样品而言采用，那么此类预处理方法是这样的，从而使得心肌细胞抗原以与未处理测试样品中的那种成比例的浓度保留在测试样品中（例如，即，未实施一种或多种任何此类预处理方法的测试样品）。

[0126] B. 用于检测测试样品中的心肌细胞抗原的免疫测定

[0127] 本公开内容涉及用于检测测试样品中的心肌细胞抗原的免疫测定，其特别用于与可能含有其他物质的测试样品一起使用，所述其他物质可以干扰心肌细胞抗原的免疫检测。此类物质包括例如异嗜性内源抗体、和针对心肌细胞抗原的自身抗体。本公开内容的免疫测定涉及从受试者中获得测试样品，并且随后使用免疫检测来检测心肌细胞抗原的存在，同时补偿可能存在于样品中的任何此类物质的存在。这通过提供 n 个抗体 ($A_{a^1}^{11}$) 和 n' 个抗体 ($B_{a^1}^{11}$) 部分达到，所述 n 个抗体 ($A_{a^1}^{11}$) 结合 n' 个心肌细胞抗原 (a^1)，以形成 n' 个抗体：抗原免疫复合物 ($A_{a^1}^{11}$) ($A_{a^1}^{21}$) \cdots ($A_{a^1}^{n1}$) (a^1), ($A_{a^2}^{12}$) ($A_{a^2}^{22}$) \cdots ($A_{a^2}^{m2}$) (a^2), \cdots ($A_{a^n}^{1n}$) ($A_{a^n}^{2n}$) \cdots ($A_{a^n}^{nn}$) (a^n), 所述 n' 个抗体 ($B_{a^1}^{11}$) 结合 n' 个心肌细胞抗原 (a^1)，以形成 n' 个抗体：抗原免疫复合物的可检测的组件 (($A_{a^1}^{11}$) ($A_{a^1}^{21}$) \cdots ($A_{a^1}^{n1}$)) (($B_{a^1}^{11}$) ($B_{a^1}^{21}$) \cdots ($B_{a^1}^{n1}$)) (a^1), (($A_{a^2}^{12}$) ($A_{a^2}^{22}$) \cdots ($A_{a^2}^{m2}$)) (($B_{a^2}^{12}$) ($B_{a^2}^{22}$) \cdots ($B_{a^2}^{m2}$)) (a^2), \cdots (($A_{a^n}^{1n}$) ($A_{a^n}^{2n}$) \cdots ($A_{a^n}^{nn}$)) (($B_{a^n}^{1n}$) ($B_{a^n}^{2n}$) \cdots ($B_{a^n}^{nn}$)) (a^n), 其中每个心肌细胞抗原 a^n 独立地包含至少 2 个表位，其中抗体 $A_{a^n}^{1n}$ 和 $B_{a^n}^{1n}$ 结合在抗原 a^n 上的 n 个不同表位，并且其中 n 是 1 - 10 的整数。换言之， n 个抗体 $A_{a^n}^{1n}$ 各自结合在心肌细胞抗原 a^n 上的至少一个表位，并且 n 个抗体 $B_{a^n}^{1n}$ 各自结合在心肌细胞抗原 a^n 上的至少一个不同表位，其不同于 n 个抗体 $A_{a^n}^{1n}$ 中的任何与之结合的任何表位。抗体 $B_{a^n}^{1n}$ 可以是例如由可检测标记进行标记的“检测抗体”。抗体可以在固相上提供，所述固相可以是固体载体，在其上固定例如抗体 $A_{a^n}^{1n}$ 或 $B_{a^n}^{1n}$ 。

[0128] 免疫测定方法

[0129] 本公开内容的免疫测定方法可以以广泛多样形式中的任何执行。免疫测定的一般综述在 *Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology*, Asai, 编辑 Academic Press, Inc. New York (1993), 和 *Basic and Clinical Immunology 7th Edition*, Stites & Terr, 编辑 (1991) 中可获得，所述参考文献整体引入本文作为参考。一般的异质夹心免疫测定采用第一种（捕获）抗体与之结合的固相（作为固体载体），所述第

一种抗体与其为抗原的目的分析物上的至少一个表位反应。第二种（检测）抗体也与其为抗原的目的分析物上的至少一个表位反应。第二种抗体可以缀合至可检测标记，所述可检测标记提供在检测抗体结合捕获的分析物后测量的信号。当含有分析物的测试样品接触第一种抗体时，所述第一种抗体捕获目的分析物。目的分析物与第二种抗体接触，导致由第一种抗体、目的分析物和第二种抗体组成的免疫检测复合物的形成，并且所述复合物结合固相。由第二种（检测）抗体生成的信号与目的分析物的浓度成比例，如通过免疫检测复合物的形成速率（ k_1 ）与免疫检测复合物的解离速率（ k_2 ）比较测定的。如果存在的话，关于确切地它们将在目的分析物上何处结合是无法预测的异嗜性内源抗体和任何自身抗体，可以基本上干扰第一种和 / 或第二种抗体的结合，并且因此干扰所得到的信号。

[0130] 与已知免疫测定相比较，本公开内容的免疫测定基于组合至少 2 个目的分析物的免疫检测结果，所述目的分析物是心肌细胞抗原。心肌细胞抗原可以是对于其已确定在抗原升高的体内水平和心肌细胞损害之间的关联的任何抗原。已知的此类抗原包括例如心肌肌钙蛋白 -I、心肌肌钙蛋白 -T、肌酸磷酸激酶 MB (CKMB)、肌红蛋白、肌球蛋白重链、肌球蛋白轻链、B 型利尿钠肽（包括前 BNP、N 端前 BNP 和 hBNP (1-32)）、心脏脂肪酸结合蛋白 (H-FABP)、胎盘生长因子 (PLGF) 和白细胞介素 -6 (IL-6)。在免疫测定的一个示例性实施方案中，使用 2 个心肌细胞抗原，并且是例如肌钙蛋白 I (cTnI) 和心肌肌钙蛋白 -T (cTnT)。

[0131] 还与一般的免疫测定形式形成对比，并且如本文其他地方描述的，根据本公开内容的一个示例性实施方案的免疫测定采用多个抗体 $A_1^{a^n}$ 和多个抗体 $B_1^{a^n}$ ，其中每个抗体 $A_1^{a^n}$ 结合在心肌细胞抗原 a^n 上的至少一个表位，其不同于抗体 $B_1^{a^n}$ 与之结合的任何表位。其中 $A_1^{a^n}$ 和 $B_1^{a^n}$ 通过对于在任何给定心肌细胞抗原 a^n 上的相同表位的结合特异性的缺乏区分的多个抗体 $A_1^{a^n}$ 和 $B_1^{a^n}$ 的使用，改善检测的特异性，改善信号的品质并且因此其关于心肌细胞损害的准确度，并且还降低由于任何异嗜性内源抗体和 / 或自身抗体的存在而在信号中来自非特异性结合的噪声。由抗体 $B_1^{a^n}$ 生成的信号保持与 n' 个心肌细胞抗原 a^n 的组合浓度成比例，但通过新免疫检测复合物： $((A_1^{a^n}) (A_2^{a^n}) \cdots (A_{n'}^{a^n})) ((B_1^{a^n}) (B_2^{a^n}) \cdots (B_{n'}^{a^n})) (a^1), ((A_1^{a^n}) (A_2^{a^n}) \cdots (A_{n'}^{a^n})) ((B_1^{a^n}) (B_2^{a^n}) \cdots (B_{n'}^{a^n})) (a^2), \cdots ((A_1^{a^n}) (A_2^{a^n}) \cdots (A_{n'}^{a^n})) ((B_1^{a^n}) (B_2^{a^n}) \cdots (B_{n'}^{a^n})) (a^n)$ 的形成速率与新免疫检测复合物的解离速率比较进行测定。通过增加来自与每个心肌细胞抗原 a^n 的特异性结合的信号，超过一个抗体 $A_1^{a^n}$ 和超过一个抗体 $B_1^{a^n}$ 的使用因此改善免疫测定的准确度。该方法还提供了人源化免疫试剂的使用，其克服来自可能存在于测试样品中的异嗜性抗体的任何干扰。另外，抗人 IgG 抗体可以用于抗体 $B_1^{a^n}$ ，以校准针对每个心肌细胞抗原 a^n 的内源自身抗体。此外，当与人源化免疫试剂结合使用时，抗人 IgG 提供了“通用的”信号生成物。衍生的心肌细胞抗原例如衍生的心肌肌钙蛋白 -I 或衍生的心肌肌钙蛋白 -T 可以用于提供适合于测定标准化的可溶试剂。例如，心肌细胞抗原可以用聚乙二醇适当地衍生。

[0132] 因此，根据一个实施方案，本公开内容检测至少 2 个心肌细胞抗原 a^n 的存在的免疫测定是异质测定，其可以采用固相，所述固相可以是固体载体。免疫测定可以例如通过将一个或多个抗体 ($A_1^{a^n}$), ($A_2^{a^n}$), \cdots ($A_{n'}^{a^n}$) 固定在固相上执行，其中每个抗体 $A_1^{a^n}$ 是与心肌细胞抗原 a^n 上的至少一个表位反应的外源抗体。在对于每个抗体 $A_1^{a^n}$ 与 a^n 的特异性结

合足够的条件下,怀疑含有心肌细胞抗原 (a^1), (a^2), \dots (a^n) 且可能含有或不含有其他干扰物质的测试样品与抗体 ($A_{a^1}^1$), ($A_{a^2}^2$), \dots ($A_{a^n}^n$) 接触,从而形成免疫复合物 ($A_{a^1}^1$) ($A_{a^2}^2$) \dots ($A_{a^n}^n$) (a^1), ($A_{a^1}^2$) ($A_{a^2}^2$) \dots ($A_{a^n}^2$) (a^2), \dots ($A_{a^1}^n$) ($A_{a^2}^n$) \dots ($A_{a^n}^n$) (a^n)。免疫复合物 ($A_{a^1}^1$) ($A_{a^2}^2$) \dots ($A_{a^n}^n$) (a^1), ($A_{a^1}^2$) ($A_{a^2}^2$) \dots ($A_{a^n}^2$) (a^2), \dots ($A_{a^1}^n$) ($A_{a^2}^n$) \dots ($A_{a^n}^n$) (a^n) 与抗体 ($B_{a^1}^1$), ($B_{a^2}^2$), \dots ($B_{a^n}^n$) 接触,以形成 n' 个抗体: 抗原免疫复合物的可测量组件 (($A_{a^1}^1$) ($A_{a^2}^2$) \dots ($A_{a^n}^n$)) (($B_{a^1}^1$) ($B_{a^2}^2$) \dots ($B_{a^n}^n$)) (a^1), (($A_{a^1}^2$) ($A_{a^2}^2$) \dots ($A_{a^n}^2$)) (($B_{a^1}^2$) ($B_{a^2}^2$) \dots ($B_{a^n}^2$)) (a^2), \dots (($A_{a^1}^n$) ($A_{a^2}^n$) \dots ($A_{a^n}^n$)) (($B_{a^1}^n$) ($B_{a^2}^n$) \dots ($B_{a^n}^n$)) (a^n), 其中每个心肌细胞抗原 a^n 独立地包含至少 2 个表位, 并且其中抗体 $A_{a^n}^n$ 和 $B_{a^n}^n$ 结合在抗原 a^n 上的 n 个不同表位, 其中 n' 是 2 - 10 的整数。这个步骤在对于抗体 $B_{a^n}^n$ 与心肌细胞抗原 a^n 中的任何的特异性结合足够的条件下进行, 所述心肌细胞抗原 a^n 存在于测试样品中。

[0133] “可测量组件”意指当形成时生成对物理检测和 / 或定量敏感的信号的分子构造。在特定实施方案中, 例如抗体 $B_{a^n}^n$ 可以用可检测标记进行标记。取决于使用的检测方法, 测量组件的光学、电或状态变化信号。另外, 抗人 IgG 抗体可以用于检测抗体, 其针对心肌细胞抗原 a^n 的内源自身抗体校准。

[0134] 尽管免疫测定在上文描述为包括用于举例说明目的的步骤顺序, 但测试样品可以与抗体 A 和检测抗体 B 同时或连续、以任何次序接触。

[0135] 在根据本公开内容的夹心免疫测定的一个形式中, 检测包括检测来自固相附着的免疫检测复合物的信号, 所述固相附着的免疫检测复合物是 n' 个抗体: 抗原免疫复合物 (($A_{a^1}^1$) ($A_{a^2}^2$) \dots ($A_{a^n}^n$)) (($B_{a^1}^1$) ($B_{a^2}^2$) \dots ($B_{a^n}^n$)) (a^1), (($A_{a^1}^2$) ($A_{a^2}^2$) \dots ($A_{a^n}^2$)) (($B_{a^1}^2$) ($B_{a^2}^2$) \dots ($B_{a^n}^2$)) (a^2), \dots (($A_{a^1}^n$) ($A_{a^2}^n$) \dots ($A_{a^n}^n$)) (($B_{a^1}^n$) ($B_{a^2}^n$) \dots ($B_{a^n}^n$)) (a^n)。在一个实施方案中, 一般通过洗涤将免疫检测复合物与固相分开, 并且检测来自结合的标记的信号。在根据本公开内容的夹心免疫测定的另一个形式中, 免疫检测复合物作为随后检测的固相附着的复合物保持。

[0136] 抗体

[0137] 在根据本公开内容的免疫测定中, 每个抗体 $A_{a^n}^n$ 可以是多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体、亲和力成熟的抗体或抗体片段。类似地, 每个抗体 $B_{a^n}^n$ 可以是多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体、亲和力成熟的抗体或抗体片段。

[0138] 虽然单克隆抗体对于分析物 / 抗原是高度特异性的, 但多克隆抗体可以优选用作每个抗体 $A_{a^n}^n$, 以固定尽可能多的分析物 / 抗原。对于分析物 / 抗原具有固有更高的结合特异性的单克隆抗体随后可以优选用于每个抗体 $B_{a^n}^n$ 。在任何情况下, 抗体 $A_{a^n}^n$ 和 $B_{a^n}^n$ 识别在每个心肌细胞抗原 a^n 上的非重叠表位, 并且在一个示范性实施方案中, 能够同时结合每个心肌细胞抗原上的不同表位, 各自不干扰彼此的结合。

[0139] 多克隆抗体通过将免疫原注射 (例如皮下或肌内注射) 到合适的非人哺乳动物 (例如小鼠或兔) 内产生。一般地, 免疫原应诱导对于靶抗原具有相对高亲和力的高滴度抗

体的产生。

[0140] 需要时,一个或多个心肌细胞抗原可以通过本领域众所周知的缀合技术缀合至载体蛋白质。通常使用的载体包括钥孔血蓝蛋白(KLH)、甲状腺球蛋白、牛血清白蛋白(BSA)、和破伤风类毒素。缀合物随后用于免疫接种动物。

[0141] 抗体随后得自从动物中获得的血样。用于产生多克隆抗体的技术在文献中广泛描述(参见例如,Methods of Enzymology,“Production of Antisera With Small Doses of Immunogen: Multiple Intradermal Injections,”Langone 等人 eds.(Acad. Press, 1981))。例如通过结合且从靶抗原与之结合的基质中洗脱,可以进一步纯化通过动物产生的多克隆抗体。本领域技术人员知道免疫学领域通常用于多克隆以及单克隆抗体纯化和/或浓缩的多种技术(参见例如,Coligan,等人(1991)Unit 9, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience)。

[0142] 对于许多应用,单克隆抗体(mAbs)是优选的。用于产生分泌mAbs的杂交瘤的一般方法是众所周知的(Kohler和Milstein(1975)Nature, 256:495)。简言之,如由Kohler和Milstein描述的,该技术需要从5个分开的癌症患者的区域引流淋巴结中分离淋巴细胞,所述癌症患者具有黑素瘤、畸胎瘤或宫颈癌、神经胶质瘤或肺癌,(其中样品得自手术样品),合并细胞,并且将细胞与SHFP-1融合。杂交瘤就结合癌细胞系的抗体产生进行筛选。在mAbs中的特异性的证实可以使用常规筛选技术(例如酶联免疫吸附测定,或“ELISA”)来完成,以测定目的mAb的单元反应模式。

[0143] 如本文使用的,术语“抗体”包含抗原结合抗体片段,例如单链抗体(scFv或其他),其可以使用噬菌体展示技术产生/选择。在感染细菌的病毒(细菌噬菌体或噬菌体)表面上表达抗体片段的能力使得能够例如从大于 10^{10} 个非结合克隆的文库中分离单一结合抗体片段。为了在噬菌体表面上(噬菌体展示)表达抗体片段,将抗体片段基因插入编码噬菌体表面蛋白质(例如pIII)的基因内,并且抗体片段-pIII融合蛋白在噬菌体表面上展示(McCafferty 等人(1990)Nature, 348: 552-554;Hoogenboom 等人(1991)Nucleic Acids Res. 19: 4133-4137)。

[0144] 因为在噬菌体表面上的抗体片段是功能性的,所以具有抗原结合抗体片段的噬菌体可以通过抗原亲和力层析与非结合噬菌体分开(McCafferty 等人(1990)Nature, 348: 552-554)。取决于抗体片段的亲和力,对于单轮亲和力选择获得20倍-1,000,000倍的富集因子。然而,通过用洗脱的噬菌体感染细菌,更多噬菌体可以生长且实施另一轮选择。以这种方式,在一轮中1000倍的富集可以在两轮选择中变成1,000,000倍(McCafferty 等人(1990)Nature, 348: 552-554)。因此,即使当富集低时(Marks 等人(1991)J. Mol. Biol. 222: 581-597),多轮亲和力选择也可以导致罕见噬菌体的分离。因为噬菌体抗体文库在抗原上的选择导致富集,所以大多数克隆在少至3-4轮选择后结合抗原。因此,仅相对小数目克隆(几百个)需要就结合抗原进行分析。

[0145] 通过在噬菌体上展示非常大和多样的V基因储库可以产生人抗体而无需先前免疫接种(Marks 等人(1991)J. Mol. Biol. 222: 581-597)。在一个实施方案中,通过PCR从未免疫接种的供体中分离存在于人外周血淋巴细胞中的天然VH和VL储库。V基因储库可以使用PCR随机剪接在一起,以产生scFv基因储库,其可以克隆到噬菌体载体内,以产生30,000,000种噬菌体抗体的文库(同上)。从单一“天然”噬菌体抗体文库中,已分离

针对超过 17 种不同抗原的结合抗体片段,包括半抗原、多糖和蛋白质 (Marks 等人 (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597; Marks 等人 (1993). Bio/Technology. 10: 779-783; Griffiths 等人 (1993) EMBO J. 12: 725-734; Clackson 等人 (1991) Nature. 352: 624-628)。已产生针对自身蛋白质的抗体,包括人甲状腺球蛋白、免疫球蛋白、肿瘤坏死因子和 CEA (Griffiths 等人 (1993) EMBO J. 12: 725-734)。抗体片段对于用于选择的抗原是高度特异性的,并且具有在 1 nM - 100 nM 范围中的亲和力 (Marks 等人 (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597; Griffiths 等人 (1993) EMBO J. 12: 725-734)。更大的噬菌体抗体文库导致针对更大比例抗原的更高结合亲和力的更多抗体的分离。

[0146] 如本领域技术人员应当理解的,抗体可以通过许多商业服务(例如 Berkeley Antibody Laboratories, Bethyl Laboratories, Anawa, Eurogenetec 等)中的任何进行制备。

[0147] 固相

[0148] 固相可以是具有足够的表面亲和力以结合抗体的任何合适材料,例如每个抗体 A₁ 或每个抗体 B₁, 或每个抗体 A₁ 和每个抗体 B₁。在一个示例性实施方案中,每个 A₁ 结合固相。固相可以采用许多形式中的任何,例如磁性颗粒、珠、试管、微量滴定板、比色杯、膜、支架分子、石英晶体、薄膜、滤纸、盘或芯片。有用的固相材料包括:天然聚合碳水化合物及其合成修饰、交联或取代的衍生物,例如琼脂、琼脂糖、交联海藻酸、取代且交联的瓜尔胶、特别是具有硝酸和羧酸的纤维素酯、混合的纤维素酯和纤维素醚;含有氮的天然聚合物,例如蛋白质和衍生物,包括交联或修饰的明胶;天然烃聚合物,例如乳胶和橡胶;合成聚合物,例如乙烯基聚合物,包括聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚乙烯乙酸酯及其部分水解的衍生物、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、上述缩聚物的共聚物和三聚物,例如聚酯、聚酰胺及其他聚合物,例如聚氨基甲酸酯或聚环氧化物;无机材料例如碱土金属和镁的硫酸盐或碳酸盐,包括硫酸钡、硫酸钙、碳酸钙,碱和碱土金属铝和镁的硅酸盐;和铝或硅氧化物或水合物,例如粘土、矾土、滑石、高岭土、沸石、硅胶、或玻璃(这些材料可以用作具有上文聚合材料的滤器);和上文类别的混合物或共聚物,例如通过在预先存在的天然聚合物上起始合成聚合物的聚合获得的接枝共聚物。所有这些材料可以以合适形状使用,例如薄膜、片、管、颗粒或板,或它们可以包被到、键合或层压至合适的惰性载体,例如纸、玻璃、塑料薄膜、织物等。硝酸纤维素对于广泛多样的试剂包括单克隆抗体具有极佳的吸收和吸附性质。尼龙也具有相似特征并且也是合适的。

[0149] 可替代地,固相可以构成微粒。在本公开内容中有用的微粒可以通过本领域技术人员选自任何合适类型的颗粒材料,并且包括由聚苯乙烯、聚丙烯酸甲酯、聚丙烯、乳胶、聚四氟乙烯、聚丙烯腈、聚碳酸酯或相似材料组成的那些。进一步地,微粒可以是磁性或顺磁微粒,以便促进微粒在磁场内的操作。在一个示例性实施方案中,微粒是羧酸化的磁性微粒。

[0150] 微粒可以悬浮于可溶试剂和测试样品的混合物中,或可以通过载体材料保留且固定。在后面一种情况下,在载体材料之上或之中的微粒无法大量移动至在载体材料内的其他地方的位置。可替代地,微粒可以通过沉降或离心与为可溶试剂和测试样品的混合物的悬液分开。当微粒是磁性或顺磁的时,微粒可以通过磁场与为可溶试剂和测试样品的混合物的悬液分开。

[0151] 本公开内容的方法可以适合于在系统中使用,所述系统利用微粒技术,包括自动化和半自动化系统,其中固相包含微粒。此类系统包括在悬而未决的美国申请号 425,651 和美国专利号 5,089,424(其分别对应于公开的 EPO 申请号 EP 0 425 633 和 EP 0 424 634) 和美国专利号 5,006,309 中描述的那些。

[0152] 在特定实施方案中,固相包括一个或多个电极。例如,抗体 A₁ 可以例如直接或间接附着至一个或多个电极。在一个实施方案中,例如,抗体 A₁ 可以附着至磁性或顺磁微粒,其随后使用磁体置于电极表面附近。其中一个或多个电极充当固相的系统是有用的,其中检测基于电化学相互作用。这个类型的示例性系统例如在美国专利号 6,887,714(2005 年 5 月 3 日授权) 中描述。基础方法就电化学检测而言在下文进一步描述。

[0153] 抗体 A₁ 或 B₁ 可以通过吸附附着至固相,在其中它们通过疏水性力保留。可替代地,固相的表面可以通过化学过程激活,所述化学过程引起抗体与载体的共价连接。

[0154] 为了改变或增强固相的固有电荷,荷电物质可以直接包被到固相上。在对应于 EP 公开号 0326100 的美国申请号 150,278 和美国申请号 375,029(EP 公开号 0406473) 中描述的,用于固定具有带负电聚合物的可固定反应复合物的离子捕获程序可以根据本公开内容采用,以影响快速溶液相免疫化学反应。在这些程序中,通过在带负电的聚阴离子/免疫复合物和先前处理的、带正电的基质之间的离子相互作用,可固定的免疫复合物与反应混合物的其余部分分开,并且通过使用许多信号生成系统中的任何进行检测,包括例如化学发光系统,如对应于 EPO 公开号 0 273,115 的美国申请号 921,979 中描述的。

[0155] 如果固相是硅或玻璃,那么表面一般必须在附着每个抗体 A₁ 或 B₁ 前活化。活化的硅烷化合物例如三乙氧基氨基丙基硅烷(可从 Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. 获得)、三乙氧基乙烯基硅烷(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.)、和(3-巯基-丙基)-三甲氧基硅烷(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) 可以分别用于引入反应基团,例如氨基、乙烯基和硫醇。此类活化表面可以用于直接连接抗体(在氨基或硫醇的情况下),或活化表面可以与接头进一步反应,所述接头例如戊二醛、二(琥珀酰亚胺基)辛酸酯、SPPD 9 琥珀酰亚胺基 3-[2-吡啶基二巯基]丙酸酯)、SMCC(琥珀酰亚胺基-4-[N 马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸酯)、SIAB(琥珀酰亚胺基[4 碘乙酰基]氨基苯甲酸酯)和 SMPB(琥珀酰亚胺基 4-[1 马来酰亚胺苯基]丁酸酯),以分离抗体与表面。乙烯基可以氧化,以提供用于共价附着的工具。乙烯基还可以用作锚用于多种聚合物例如聚丙烯酸的聚合作用,其可以提供用于特异性抗体的多个附着点。氨基可以与多种分子量的氧化右旋糖酐反应,以提供不同大小和能力的亲水接头。可氧化右旋糖酐的例子包括葡聚糖 T-40(分子量 40,000 道尔顿)、葡聚糖 T-110(分子量 110,000 道尔顿)、葡聚糖 T-500(分子量 500,000 道尔顿)、右旋糖酐 T-2M(分子量 2,000,000 道尔顿)(所有这些可从 Pharmacia, Piscataway, N. J. 获得),或 Ficoll(分子量 70,000 道尔顿;可从 Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. 获得)。另外,聚电解质相互作用可以用于将特异性抗体固定在固相上,其使用于 1988 年 1 月 29 日提交的美国申请号 150,278、和于 1989 年 7 月 7 日提交的美国申请号 375,029 中描述的技术和化学,所述专利各自引入本文作为参考。

[0156] 影响固相的选择的其他考虑包括使标记实体的非特异性结合降到最低的能力和与采用的标记系统的相容性。例如,与荧光标记一起使用的固相应具有足够低的背景荧光,以允许信号检测。

[0157] 在特异性抗体附着后,固体载体的表面可以用材料例如血清、蛋白质或其他封闭剂进一步处理,以使非特异性结合降到最低。

[0158] 一般而言的检测系统

[0159] 如上所述,根据本公开内容的免疫测定采用一个或多个抗体 B₁,其各自对于心肌细胞抗原 aⁿ 是特异性的。在特定实施方案中,每个抗体 B₁ 结合可检测标记。

[0160] 适合于在本公开内容的检测抗体中使用的可检测标记包括具有部分的任何化合物或组合物,所述部分可通过分光镜、光化学、生物化学、免疫化学、电、光学或化学工具检测。此类标记包括例如酶、寡核苷酸、纳米颗粒化学发光体、荧光团、荧光猝灭剂、化学发光猝灭剂或生物素。因此,例如在采用光学信号的免疫测定中,光学信号作为化学发光、荧光、磷光、电化学发光、紫外吸收、可见吸收、红外吸收、折射、表面等离子共振中的分析物浓度依赖性变化进行测量。在采用电信号的免疫测定中,电信号作为电流、电阻、电势、质荷比或离子计数中的分析物浓度依赖性变化进行测量。在采用状态变化信号的免疫测定中,状态变化信号作为大小、可溶性、质量或共振中的分析物浓度依赖性变化进行测量。

[0161] 根据本公开内容的有用标记包括磁珠(例如 Dynabeads™), 荧光染料(例如荧光素、Texas Red、罗丹明、绿色荧光蛋白)等(参见例如, Molecular Probes, Eugene, Oreg., USA), 化学发光化合物例如吖啶(例如吖啶-9-甲酰胺)、菲啶(phenanthridinium)、二氧杂环丁烷(dioxetanes)、鲁米诺等,放射性标记(例如 ³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C 或 ³²P), 催化剂例如酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶和 ELISA 中通常使用的其他), 和比色标记例如胶体金(例如在 40-80 nm 直径大小范围中的金颗粒以高效率散射绿光)或有色玻璃或塑料(例如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等)珠。教导此类标记的使用的专利包括美国专利号 3,817,837 ;3,850,752 ;3,939,350 ;3,996,345 ;4,277,437 ;4,275,149 ;和 4,366,241。

[0162] 标记可以在与生物学样品接触前、或接触过程中或接触后附着至每个抗体 B₁。标记可以通过与抗体的共价或非共价相互作用附着。所谓的“直接标记”是在测定中使用前直接附着或掺入检测抗体内的可检测标记。直接标记可以通过本领域技术人员众所周知的许多工具中的任何附着至或掺入抗体 B₁ 内。

[0163] 相比之下,所谓的“间接标记”一般在测定过程中的某些点结合每个抗体 B₁。通常,间接标记结合在使用前附着至或掺入检测试剂内的部分。因此,例如,每个抗体 B₁ 可以是在测定中使用前生物素化的。在测定过程中,抗生物素蛋白缀合的荧光团可以结合具有生物素的检测试剂,以提供容易检测的标记。

[0164] 在间接标记的另一个例子中,能够特异性结合免疫球蛋白恒定区的多肽,例如多肽 A 或多肽 G,也可以用作用于检测抗体的标记。这些多肽是链球菌细菌的细胞壁的正常组成成分。它们显示出与来自多个物种的免疫球蛋白恒定区的强非免疫原性反应性(一般参见 Kronval, 等人 (1973) J. Immunol., 111: 1401-1406, 和 Akerstrom (1985) J. Immunol., 135: 2589-2542)。此类多肽因此可以进行标记且加入测定混合物中,在其中它们将结合每个抗体 A₁ 和 B₁, 以及自身抗体,标记全部且提供可归于样品中存在的分析物和自身抗体的复合信号。

[0165] 在本公开内容中有用的某些标记可能需要使用一种或多种另外试剂,以产生可检

测信号。在 ELISA 中,例如酶标记(例如 β -半乳糖苷酶)将需要底物(例如 X-gal)的添加,以产生可检测信号。在使用吖啶鎓化合物作为直接标记的免疫测定中,加入碱性溶液和过氧化氢的来源。

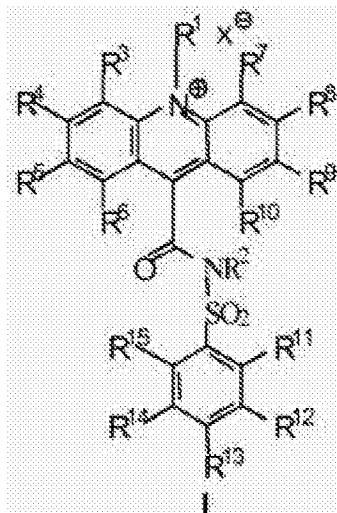
[0166] 检测系统 - 示例性形式

[0167] 化学发光免疫测定:在一个示例性实施方案中,化学发光化合物作为缀合至每个抗体 B₂ 的直接标记用于上述方法中。化学发光化合物可以是例如吖啶鎓化合物。当吖啶鎓化合物用作可检测标记时,那么上述方法可以进一步包括对起因于使测试样品接触抗体 A 和抗体 B₂ 的混合物生成或提供过氧化氢的来源,并且将至少一种碱性溶液加入混合物中,以生成光信号。随后测量由混合物生成或发出的光信号,以检测测试样品中的心肌细胞抗原 a''。

[0168] 过氧化氢的来源可以是缓冲溶液或含有过氧化氢的溶液或当加入测试样品时生成过氧化氢的酶。碱性溶液充当触发溶液,并且至少一种碱性溶液和可检测标记在其中加入的次序不是关键的。在该方法中使用的碱性溶液是含有至少一种碱且具有大于或等于 10 优选地大于或等于 12 的 pH 的溶液。碱性溶液的例子包括但不限于氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铵、氢氧化镁、碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钙、碳酸钙和碳酸氢钙。加入测试样品中的碱性溶液的量取决于在测定中使用的碱性溶液的浓度。基于使用的碱性溶液的浓度,本领域技术人员可以容易地决定在本文描述的方法中待使用的碱性溶液的量。

[0169] 在根据本公开内容且使用吖啶鎓化合物作为可检测标记的化学发光免疫测定中,优选地吖啶鎓化合物是吖啶鎓-9-甲酰胺。具体地,吖啶鎓-9-甲酰胺具有根据式 I 的结构:

[0170]



[0171] 其中 R¹和 R²各自独立地选自:烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基,和

[0172] 其中 R³直到 R¹⁵各自独立地选自:氢、烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、氨基、酰胺基、酰基、烷氧基、羟基、羧基、卤素、卤化物、硝基、氰基、磺基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基;

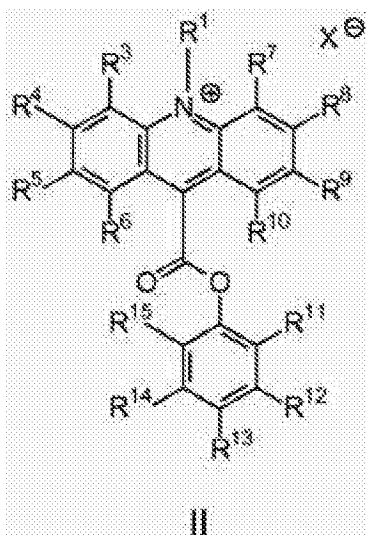
[0173] 和进一步地其中烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基中的任何可以含有一个或多个杂原子;和

[0174] 任选地,如果存在的话, X^{\ominus} 是阴离子。

[0175] 用于制备吡啶鎓-9-甲酰胺的方法在下述中描述:Mattingly, P. G. J. *Biolumin. Chemilumin.*, 6, 107-14; (1991); Adamczyk, M.; Chen, Y.-Y., Mattingly, P. G.; Pan, Y. J. *Org. Chem.*, 63, 5636-5639 (1998); Adamczyk, M.; Chen, Y.-Y.; Mattingly, P. G.; Moore, J. A.; Shreder, K. *Tetrahedron*, 55, 10899-10914 (1999); Adamczyk, M.; Mattingly, P. G.; Moore, J. A.; Pan, Y. *Org. Lett.*, 1, 779-781 (1999); Adamczyk, M.; Chen, Y.-Y.; Fishpaugh, J. R.; Mattingly, P. G.; Pan, Y.; Shreder, K.; Yu, Z. *Bioconjugate Chem.*, 11, 714-724 (2000); Mattingly, P. G.; Adamczyk, M. In *Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications*; Dyke, K. V. Ed.; CRC Press: Boca Raton, pp. 77-105 (2002); Adamczyk, M.; Mattingly, P. G.; Moore, J. A.; Pan, Y. *Org. Lett.*, 5, 3779-3782 (2003); 以及美国专利号 5, 468, 646、5, 543, 524 和 5, 783, 699 (各自为了其关于这点的教导整体引入本文作为参考)。

[0176] 可替代地,吡啶鎓化合物可以是吡啶鎓-9-羧酸根芳基酯;吡啶鎓-9-羧酸根芳基酯可以具有根据式 II 的结构:

[0177]



[0178] 其中 R^1 是烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基;和

[0179] 其中 R^3 直到 R^{15} 各自独立地选自:氢、烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、氨基、酰胺基、酰基、烷氧基、羟基、羧基、卤素、卤化物、硝基、氰基、磺基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基;和

[0180] 任选地,如果存在的话, X^{\ominus} 是阴离子。

[0181] 可以用于本公开内容中的具有上式 II 的吡啶鎓-9-羧酸根芳基酯的例子包括但不限于 10-甲基-9-(苯氧基羰基)吡啶鎓氟磺酸酯(可从 Cayman Chemical, Ann Arbor, MI 获得)。用于制备吡啶鎓-9-羧酸根芳基酯的方法在下述中描述:McCapra, F., 等人, *Photochem. Photobiol.*, 4, 1111-21 (1965); Razavi, Z 等人, *Luminescence*, 15:245-249 (2000); Razavi, Z 等人, *Luminescence*, 15:239-244 (2000); 和美国专利号 5, 241, 070 (各自为了其关于这点的教导整体引入本文作为参考)。

[0182] 除至少一种吡啶鎓化合物外,指示物溶液还可以包含至少一种表面活性剂。当溶

解于水中时,降低水的表面张力且增加有机化合物的溶解性的任何表面活性剂可以用于本发明中。可以使用的表面活性剂的例子是一种或多种非离子型或离子型表面活性剂(例如阴离子、阳离子或两性离子型表面活性剂)。可以使用的非离子型表面活性剂的例子包括但不限于叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇 (TRITON X-100, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)、聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯 (Tween 20)、壬基酚聚氧乙烯醚 (Nonidet P10)、癸基二甲基氧化膦 (APO-10)、环己基 -n- 乙基 - β -D- 麦芽糖苷、环己基 -n- 己基 - β -D- 麦芽糖苷、环己基 -n- 甲基 - β -D- 麦芽糖苷、n- 癸酰基蔗糖、n- 癸基 - β -D- 吡喃葡萄糖苷、n- 癸基 - β -D- 吡喃麦芽糖苷、n- 癸基 - β -D- 硫代麦芽糖苷、洋地黄皂苷、n- 十二烷酰蔗糖、n- 十二烷基 - β -D- 吡喃葡萄糖苷、n- 十二烷基 - β -D- 麦芽糖苷、聚氧乙烯 (10) 十二烷基醚 (Genapol C-100)、异十三烷醇聚乙二醇醚 (Genapol X-80)、异十三烷醇聚乙二醇醚 (Genapol X-100)、庚烷 -1, 2, 3- 三醇、n- 庚基 - β -D- 吡喃葡萄糖苷、n- 庚基 - β -D- 硫代吡喃葡萄糖苷及其组合。可以使用的离子型表面活性剂的例子包括胆酸钠、鹅脱氧胆酸、胆酸、去氢胆酸、多库酯钠、多库酯钠盐、甘胆酸水合物、甘氨脱氧胆酸一水合物、甘石胆酸乙酯、N- 月桂酰肌氨酸钠盐、N- 月桂酰肌氨酸、十二烷基硫酸锂、丙酸钙、1- 辛烷磺酸钠盐、1- 丁烷磺酸钠、鹅脱氧胆酸钠、胆酸钠水合物、1- 癸烷磺酸钠、1- 癸烷磺酸钠、脱氧胆酸钠、脱氧胆酸钠一水合物、十二烷基苯磺酸钠、十二烷基硫酸钠、鹅脱氧甘胆酸钠、甘胆酸钠水合物、1- 庚烷磺酸钠、己烷磺酸钠、1- 壬烷磺酸钠、辛基硫酸钠、戊烷磺酸钠、1- 丙烷磺酸钠水合物、牛磺脱氧胆酸钠水合物、牛磺猪脱氧胆酸钠水合物、牛磺熊脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠盐水合物、牛磺石胆酸 3- 硫酸二钠盐、Triton® X-200、Triton® QS-15、Triton® QS-44、Triton® XQS-20、Trizma® 十二烷基硫酸盐、熊脱氧胆酸、烷基三甲基溴化铵、盐酸安普罗铵、苯扎氯铵、苜蓿氯铵、十六烷基二甲基苄基氯化铵、十二烷基二甲基苄基溴化铵、胆碱对甲苯磺酸盐、双十八烷基二甲基溴化铵、十二烷基乙基二甲基乙基溴化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十六烷基二甲基乙基溴化铵、Ggirard' s 试剂、十六烷基溴化吡啶、十六烷基氯化吡啶一水合物、十六烷基氯化吡啶一水合物、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基对甲苯磺铵、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基对甲苯磺铵、Hyamine® 1622、甲苜蓿氯铵、溴化肉豆蔻基三甲铵、奥芬溴铵、N, N', N'- 聚氧化乙烯 (10)-N- 牛油 -1, 3- 二氨基丙烷、四庚基溴化铵、四 (癸基) 溴化铵、通佐溴铵和 Luviquat™ FC370、Luviquat™ HM 552、Luviquat™ HOLD、Luviquat™ MS 370、Luviquat™ PQ 11PN 及其组合(都可从 Sigma Aldrich, St. Louis, MO 获得)。

[0183] 任选地,测试样品可以在加入至少一种碱性溶液、过氧化氢来源和可检测标记中的任何一种或多种前进行处理。此类处理可以包括稀释、超滤、萃取、沉淀、透析、层析和消化。此类处理可以加上任何预处理且与任何预处理分开,测试样品可以如本文先前讨论的接受或实施所述预处理。此外,如果此类处理方法就测试样品而言采用,那么此类处理方法是这样的,从而使得心肌细胞抗原以与未处理测试样品中的那种成比例的浓度保留在测试样品中(例如,即,未实施一种或多种任何此类处理方法的测试样品)。

[0184] 如本文先前短暂提及的,测试样品、至少一种碱性溶液、过氧化氢的来源和可检测标记在其中加入以形成混合物的时间和次序不是关键的。此外,通过至少一种碱性溶液、过氧化氢来源和可检测标记形成的混合物可以任选允许温育一段时间。例如,混合物可以允许温育约 1 秒 - 约 60 分钟的时间段。具体地,混合物可以允许温育约 1 秒 - 约 18 分

钟的时期。

[0185] 用于每个抗体 B_h 的可检测标记可以是相同的,前提是针对每个抗原 aⁿ 获得合适的标准曲线或参考标准,分开测量来自各自的信号,且测定关于每个抗原的校准测量抗原量,且随后与关于每个其他抗原 aⁿ 的那些组合,以避免混淆关于每个抗原的结果。可以使用关于每个抗体 B_h 的不同可检测标记,并且取决于选择的标记化合物,可以允许来自超过抗原 aⁿ 的信号的同时测量,如果信号可容易地彼此区分。例如,可以使用具有不同发出光谱的不同荧光标记。

[0186] 当使用化学发光的可检测标记时,在将至少一种碱性溶液、过氧化氢的来源和可检测标记加入测试样品后,生成可检测信号,即化学发光信号。由混合物生成的信号检测固定持续时间。优选地,形成混合物且同时检测信号。检测的持续时间可以范围为约 0.01 - 约 360 秒,更优选约 0.1 - 约 30 秒,且最优选约 0.5 - 约 5 秒。生成的化学发光信号可以使用本领域技术人员已知的常规技术进行检测。

[0187] 因此,在根据本公开内容的化学发光免疫测定中,使用化学发光可检测标记且加入测试样品中,在加入碱性溶液和可检测标记后生成的化学发光信号指示测试样品中每个心肌细胞抗原 aⁿ 的存在,可以检测所述信号。测试样品中每个心肌细胞抗原 aⁿ 的量或浓度可以基于生成信号的强度进行定量。具体地,对于每个心肌细胞抗原 aⁿ,测试样品中含有的心肌细胞抗原 aⁿ 的量与生成的信号强度成比例。具体地,存在的心肌细胞抗原 aⁿ 的量可以基于比较生成的光量与关于心肌细胞抗原 aⁿ 的标准曲线或通过对于心肌细胞抗原 aⁿ 特异性的参考标准的比较进行定量。此类参考标准各自可以包含例如抗独特型抗体。每个参考标准可以包含例如衍生的心肌细胞抗原,例如由聚乙二醇衍生的心肌细胞抗原。例如,关于心肌肌钙蛋白 -I 的合适参考标准是衍生的心肌肌钙蛋白 -I,例如由聚乙二醇衍生的心肌肌钙蛋白 -I。类似地,关于心肌肌钙蛋白 -I 的合适参考标准是衍生的心肌肌钙蛋白 -T,例如由聚乙二醇衍生的心肌肌钙蛋白 -T。应当理解如本文其他地方描述的其他心肌细胞抗原也容易地衍生,以获得合适的参考标准,这取决于选择用于免疫测定的心肌细胞抗原。使用连续稀释,或已知浓度的心肌细胞抗原的溶液,通过质谱法,比重测定地和通过本领域已知的其他技术,可以产生关于每个心肌细胞抗原的合适标准曲线。

[0188] 荧光偏振免疫测定 (FPIA): 在一个示例性实施方案中,荧光标记根据本发明用于荧光偏振免疫测定 (FPIA) 中。一般地,荧光偏振技术基于下述原理:当通过特征性波长的平面偏振光激发时,荧光标记将在另一个特征性波长发出光(即,荧光),其保留相对于入射光的偏振程度,所述入射光与给定介质中标记的转速反相关。由于这个性质,具有有限旋转的标记,例如结合具有相对更低转速的另一种溶液组分的标记,将保留比在溶液中游离时发出光的相对更大的偏振程度。

[0189] 这种技术可以用于根据本发明的免疫测定中,例如通过这样选择试剂,从而使得荧光标记的实体的结合形成在大小中足够不同的复合物,从而使得可以检测在给定平面中发出的光强中的变化。例如,当标记的心肌肌钙蛋白抗体由一个或多个心肌肌钙蛋白抗原结合时,所述心肌肌钙蛋白抗原通过与心肌肌钙蛋白反应的捕获抗体和/或自身抗体捕获,相对于结合容易检测的游离的标记心肌肌钙蛋白抗体,所得到的复合物足够地更大,并且其旋转足够地受限制。

[0190] 在 FPIA 中有用的荧光团包括荧光素、氨基荧光素、羧基荧光素等,优选 5 和 6- 氨

基甲基荧光素、5 和 6- 氨基荧光素、6- 羧基荧光素、5- 羧基荧光素、硫脲荧光素和甲氧基三唑基 - 氨基荧光素、和相似的荧光衍生物。荧光偏振测定可以用其进行的商购可得的自动化仪器的例子包括 :IMx 系统、TDx 系统、和 TDxFLx 系统 (都可从 Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill. 获得)。

[0191] 扫描探针显微镜检查 (SPM) :扫描探针显微镜检查 (SPM) 用于免疫测定的用途也是本公开内容的免疫测定方法可容易适应于其的技术。在 SPM、特别是原子力显微镜检查中,捕获抗体附着至固相,除能够结合自身抗体外,所述固相具有适合于扫描的表面。抗体 A_n 例如可以吸附至塑料或金属表面。可替代地,根据本领域普通技术人员已知的方法,抗体 A_n 可以共价附着至例如衍生的塑料、金属、硅或玻璃。在抗体 A_n 附着后,测试样品与固相接触,并且扫描探针显微镜用于检测且定量固相附着的复合物。SPM 的使用消除关于在免疫测定系统中一般采用的标记的需要。此类系统在引入本文作为参考的美国申请号 662, 147 中描述。

[0192] MicroElectroMechanical Systems (MEMS) :根据本公开内容的免疫测定也可以使用 MicroElectroMechanical Systems (MEMS) 执行。MEMS 是整合到硅上的显微镜结构,其组合机械、光学和流体元件与电子学,允许目的分析物的方便检测。适合于在本公开内容中使用的示例性 MEMS 装置是 Protiveris' multicantilever 阵列。这种阵列基于特别设计的硅微悬臂的化学 - 机械启动和微悬臂偏离的后续光学检测。当在一侧上用结合配偶体包被时,当微悬臂暴露于含有互补分子的溶液时,它将弯曲。这种弯曲通过由于结合事件在表面能中的变化引起。弯曲程度 (偏离) 的光学检测允许测量结合微悬臂的互补分子的数量。

[0193] 电化学检测系统 :在其他实施方案中,根据本公开内容的免疫测定使用电化学检测进行,关于其的技术是本领域技术人员众所周知的。此类电化学检测通常采用连接至装置的一个或多个电极,所述装置测量且记录电流。此类技术可以在许多商购可得的装置中实现,例如 I-STAT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 系统,其包含手提式电化学检测仪器和自含的测定特异性试剂筒。例如,在本发明中,碱性触发溶液可以包含在自含的血红蛋白试剂筒中,且在加入测试样品后,电流将在至少一个电极上生成,这与测试样品中血红蛋白的量成比例。关于电化学检测的基本程序已例如由 Heineman 和同事描述。这需要初次抗体 (Ab, 大鼠抗小鼠 IgG) 的固定,随后暴露于含有抗原 (Ag, 小鼠 IgG) 的溶液、缀合至酶标记的二次抗体 (AP-Ab, 大鼠抗小鼠 IgG 和碱性磷酸酶)、和对氨基苯基磷酸酯 (PAPP) 的顺序。AP 将 PAPP 转换为对氨基苯酚 (PAP_R, “R” 预期区分还原形式与氧化形式, PAP_O, 醌亚胺), 其在 pH 9.0 不干扰氧和水的还原的电势下是电化学可逆的,其中 AP 显示出最佳活性。PAP_R 不引起电极污垢,与其前体磷酸苯酯通常用作酶底物的苯酚不同。尽管 PAP_R 经历空气和光氧化,但这些在小规模和短时帧容易预防。先前已报道在使用范围为 20 μl - 360 μL 的 PAPP 体积的微电化学免疫测定中达到的关于 PAP_R 的皮摩尔检测极限和关于 IgG 的毫微微克检测极限。在伴随电化学检测的毛细管免疫测定中,迄今为止报道的最低检测极限是小鼠 IgG 的 3000 个分子,其使用 70 μL 的体积和 30 分钟或 25 分钟的测定时间。

[0194] 在根据本公开内容采用电化学检测的一个示例性实施方案中,与心肌细胞抗原 a_n 反应的抗体 A_n 可以固定在其为固相的电极的表面上。电极随后与来自例如人的测试样品接触。样品中的任何分析物结合抗体 A_n, 以形成第一个固相附着的复合物。自身抗体也结合电极的表面,从而变得固定在电极的表面上。测试样品中不由捕获抗体 A_n 结合的分析

物结合固定的自身抗体,其与分析物反应,以形成第二个固相附着的复合物。这些固相附着的复合物与抗体 B₁接触,所述抗体 B₁也是分析物特异性的且具有可检测标记。包括 A₁-aⁿ-B₁的免疫检测复合物加上自身抗体-aⁿ-B₁复合物的形成导致通过可检测标记的信号生成,其随后进行检测。

[0195] 多种电化学检测系统在下述中描述:美国专利号 7,045,364(2006年5月16日授权;引入本文作为参考)、美国专利号 7,045,310(2006年5月16日授权;引入本文作为参考)、美国专利号 6,887,714(2005年5月3日授权;引入本文作为参考)、美国专利号 6,682,648(2004年1月27日授权;引入本文作为参考);美国专利号 6,670,115(2003年12月30日授权;引入本文作为参考)。

[0196] C. 试剂盒

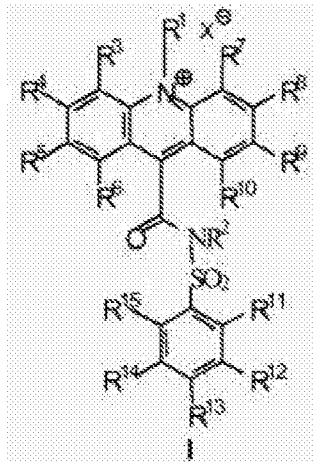
[0197] 本公开内容还提供了用于就心肌细胞抗原的存在测定测试样品的试剂盒,其中测试样品可能含有干扰心肌细胞抗原的免疫检测的其他物质。根据本公开内容的试剂盒包括用于实践根据本公开内容的一个或多个免疫测定的一个或多个试剂。试剂盒一般包括具有容纳试剂的一个或多个容器的包装,作为一个或多个分开的组合物或任选地作为其中将允许试剂的相容性的混合物。测试试剂盒还可以包括一种或多种其他材料,其从用户观点来看可能是需要的,例如一种或多种缓冲液、一种或多种稀释剂、一种或多种标准、和/或在样品加工、洗涤或进行测定的任何其他步骤中有用的任何其他材料。

[0198] 在特定实施方案中,测试试剂盒包括一个或多个个人源化单克隆抗体,其中每个人源化单克隆抗体对于所选心肌细胞抗原 a_n是特异性的。这种组分可以用作根据本发明的免疫测定中的阳性对照。如果需要的话,这种组分可以以多个浓度包括在测试试剂盒中,以促进测试样品中检测的信号可以与之相比较的标准曲线的生成。可替代地,标准曲线可以通过制备试剂盒中提供的单一人源化单克隆抗体溶液的稀释物来生成。

[0199] 根据本公开内容的试剂盒可以包括一个或多个抗体 A₁,其中每个 A₁结合在心肌细胞抗原 aⁿ上的至少一个表位,和一个或多个检测抗体 B₁,其中每个 B₁结合在心肌细胞抗原 a_n上的至少一个表位,其不同于 A₁与之结合的任何表位,和用于检测或定量每个心肌细胞抗原 aⁿ的说明书。在特定实施方案中,根据本公开内容的测试试剂盒可以包括抗体 A₁和/或抗体 B₁与之结合的固相。固相可以是材料例如磁性颗粒、珠、试管、微量滴定板、比色杯、膜、支架分子、石英晶体、薄膜、滤纸、盘或芯片。

[0200] 根据本公开内容的测试试剂盒可以包括例如作为抗体 A₁和抗体 B₁的一个或多个非人单克隆抗体,各自针对心肌细胞抗原 aⁿ。试剂盒还可以包括一个或多个检测标记,其可以是或缀合至每个抗体 B₁。在特定实施方案中,测试试剂盒包括至少一个直接标记,其可以是酶、寡核苷酸、纳米颗粒化学发光体、荧光团、荧光猝灭剂、化学发光猝灭剂或生物素。在某些实施方案中,直接标记是吡啶𬭩化合物,例如根据式 I 的吡啶𬭩-9-甲酰胺:

[0201]

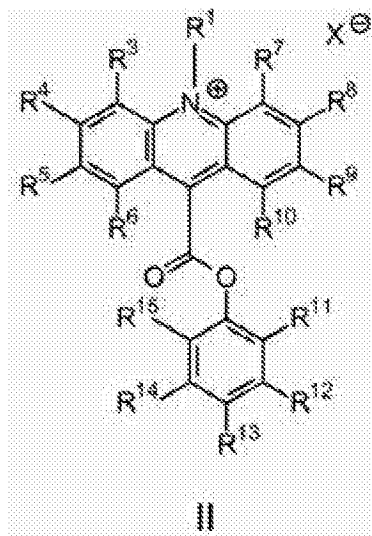


[0202] 其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自：烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基，和

[0203] 其中 R^3 直到 R^{15} 各自独立地选自：氢、烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、氨基、酰胺基、酰基、烷氧基、羟基、羧基、卤素、卤化物、硝基、氰基、磺基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基；和任选地，如果存在的话， X^\ominus 是阴离子。

[0204] 可替代地，吡啶𬝓化合物可以是具有根据式 II 的结构吡啶𬝓-9-羧酸根芳基酯：

[0205]



[0206] 其中 R^1 是烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基；和

[0207] 其中 R^3 直到 R^{15} 各自独立地选自：氢、烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基、氨基、酰胺基、酰基、烷氧基、羟基、羧基、卤素、卤化物、硝基、氰基、磺基、磺烷基、羧烷基和氧代烷基；和任选地，如果存在的话， X^\ominus 是阴离子。

[0208] 根据本公开内容且包括吡啶𬝓化合物的测试试剂盒还可以包括碱性溶液。例如，碱性溶液可以是具有至少约 10 的 pH 的溶液。

[0209] 在特定实施方案中，根据本公开内容的测试试剂盒可以进一步包括过氧化氢来源，例如缓冲溶液、含有过氧化氢的溶液、或过氧化氢生成酶。例如，测试试剂盒可以包括一定量的选自下述的过氧化氢生成酶：(R)-6-羟基烟碱氧化酶、(S)-2-羟酸氧化酶、

(S)-6-羟基烟碱氧化酶、3-酸式-硝基丙酸氧化酶、3-羟基邻氨基苯甲酸氧化酶、4-羟基扁桃酸氧化酶、6-羟基烟酸脱氢酶、脱落醛氧化酶、酰基-CoA 氧化酶、醇氧化酶、醛氧化酶、胺氧化酶、胺氧化酶(含铜的)、胺氧化酶(含黄素的)、芳基-醇氧化酶、芳基-醛氧化酶、儿茶酚氧化酶、胆固醇氧化酶、胆碱氧化酶、非洲防己碱氧化酶、环己胺氧化酶、细胞色素 c 氧化酶、D-氨基酸氧化酶、D-阿拉伯糖-1,4-内酯氧化酶、D-阿拉伯糖-1,4-内酯氧化酶、D-天冬氨酸氧化酶、D-谷氨酸氧化酶、D-谷氨酸(D-天冬氨酸)氧化酶、二氢苯并菲啶氧化酶、二氢乳清酸氧化酶、二氢尿嘧啶氧化酶、二甲基甘氨酸氧化酶、D-甘露醇氧化酶、蜕皮素氧化酶、乙醇胺氧化酶、半乳糖氧化酶、葡萄糖氧化酶、谷胱甘肽氧化酶、甘油-3-磷酸氧化酶、甘氨酸氧化酶、乙醛酸氧化酶、己糖氧化酶、羟基植烷酸氧化酶、吡啶-3-乙醛氧化酶、乳酸氧化酶、L-氨基酸氧化酶、L-天冬氨酸氧化酶、L-半乳糖酸内酯氧化酶、L-谷氨酸氧化酶、L-古洛糖酸内酯氧化酶、L-赖氨酸 6-氧化酶、L-赖氨酸氧化酶、长链醇氧化酶、L-甲基哌啶氧化酶、L-山梨糖氧化酶、苹果酸氧化酶、甲硫醇氧化酶、单氨基酸氧化酶、N6-甲基-赖氨酸氧化酶、N-酰基己糖胺氧化酶、NAD(P)H 氧化酶、硝基烷氧化酶、N-甲基-L-氨基酸氧化酶、核苷氧化酶、草酸氧化酶、多胺氧化酶、多酚氧化酶、聚乙烯醇氧化酶、异戊烯半胱氨酸氧化酶、蛋白质-赖氨酸 6-氧化酶、丁二胺氧化酶、吡喃糖氧化酶、5'-磷酸吡哆醛合酶、吡哆醇 4-氧化酶、吡咯喹啉-酮合酶、丙酮酸氧化酶、丙酮酸氧化酶(CoA-乙酰化)、网脉番荔枝碱氧化酶、视黄醛氧化酶、利福霉素-B 氧化酶、肌氨酸氧化酶、仲醇氧化酶、亚硫酸氧化酶、超氧化物歧化酶、超氧化物还原酶、四氢小檗碱氧化酶、硫胺素氧化酶、色氨酸 α , β -氧化酶、尿酸氧化酶(尿酸酶、尿酸氧化酶)、香草醇氧化酶、黄嘌呤氧化酶、木糖醇氧化酶及其组合。

[0210] 根据本公开内容的测试试剂盒优选包括用于进行本发明的一个或多个免疫测定的说明书。在本公开内容的试剂盒中包括的说明书可以附着至包装材料或可以作为包装插页包括。虽然说明书一般是书面或印刷材料，但它们并不限于此。本公开内容考虑了能够存储此类说明书且将其传达给最终用户的任何媒体。此类媒体包括但不限于电子存储媒体(例如磁盘、磁带、筒、芯片)、光学媒体(例如 CD ROM)等。如本文使用的，术语“说明书”可以包括提供说明书的因特网站的网址。

[0211] D. 本公开内容的方法的适应

[0212] 本公开内容例如适合于共同拥有的商业 Abbott Point of Care(i-STAT™) 电化学免疫测定系统，其执行关于几个心标记包括 TnI、CKMB 和 BNP 的夹心免疫测定。在一次性使用测试装置中操作其的免疫传感器和方法在共同拥有的公开号 US 20030170881、US 20040018577、US 20050054078 和 US 20060160164 中描述，其各自引入本文作为参考。关于电化学和其他类型的免疫传感器的制造的另外背景在共同拥有的美国专利号 5,063,081 中发现，其也引入本文作为参考。

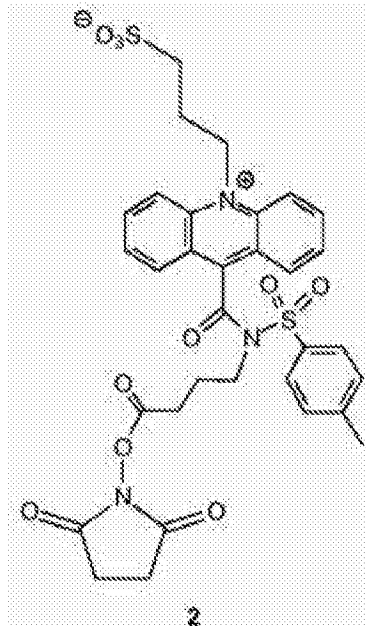
[0213] 例如且非限制性的，现在将给出本发明的实施例。

[0214] 实施例 1. 检测抗体缀合物

[0215] 一般缀合程序：将检测抗体溶解于缀合缓冲液(100 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl, pH 8.0)中，以给出 1-10 mg/mL(6.25-62.5 μ M) 的浓度。吡啶[9-[[[4-[(2,5-二氧代-1-吡咯烷基)氧基]-4-氧代丁基][(4-甲基苯基)磺酰基]氨基]羰基]-10-(3-磺丙基)-, 内盐, 2(Adamczyk, M.; Chen, Y.-Y.; Mattingly, P. G.; Pan, Y. J. Org. Chem. 1998,

63,5636-5639.) 标记试剂以 1 - 50 mM 的浓度在 N,N- 二甲基甲酰胺 (DMF) 中制备,如下文式 2 中所示:

[0216]



[0217] 将所选抗体用吡啶标记试剂以 1 - 35 倍的摩尔过量在环境温度在黑暗中处理 3 - 14 小时。然后,使用 10 千道尔顿分子量截止膜针对由含有 0.1% CHAPS(3-[(3-胆酰胺基丙基) 二甲基铵基]-1-丙磺酸盐) 的 10 mM 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 组成的 3 体积 (1000× 缀合物溶液体积) 透析缓冲液,将吡啶-9-甲酰胺-抗体缀合物溶液在环境温度透析经过 20 小时。

[0218] 吡啶-9-甲酰胺-抗体缀合物通过在 280/369 nm 的 UV 吸光度分析,以测定吡啶-9-甲酰胺标记与根据下式计算的蛋白质的掺入比 (IR) :

$$[0219] \quad IR = A_{369}/369 / ([A_{280} - (A_{369}/4.1)]/280)$$

[0220] 其中:

[0221] A₂₈₀ 和 A₃₆₉ 是得自缀合物的 UV 可见光谱的吸光度值;

[0222] 4.1 是关于吡啶-9-甲酰胺标记的 $\sim A_{369}/A_{280}$ 比;

[0223] 280 是关于抗体在 280 nm 的消光系数 (即,对于 IgG mAb $280 = 210,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$);

[0224] 和

[0225] 369 是关于吡啶-9-甲酰胺标记在 369 nm 的消光系数。

[0226] 关于合并级分的平均掺入比可以范围为 0.4 - 0.8 × 使用的吡啶-9-甲酰胺标记试剂的摩尔过量。

[0227] a) 对表位 cTnT₆₀₋₇₀ 作图的鼠抗心肌肌钙蛋白-T 7G7 (Biodesign International/Meridian Life Sciences, Saco, ME; 目录号 H86429M) 针对 PBS 进行透析,以给出 0.35 mg/mL 的溶液浓度。在缀合后,计算的 IR 是 3.1。

[0228] b) 对表位 cTnT₆₁₋₇₀ 作图的鼠抗心肌肌钙蛋白-T 7F4 (Fitzgerald Ind Intl, Concord, MA, 目录号 10R-T127C) 针对 PBS 进行透析,以给出 0.469 mg/mL 的溶液浓度。在

缀合后,计算的 IR 是 2.8。

[0229] c) 对表位 cTnT₉₅₋₁₈₁作图的鼠抗心肌肌钙蛋白-T 1C11(Fitzgerald Ind Intl, Concord, MA, 目录号 10R-T127D) 针对 PBS 进行透析,以给出 0.469 mg/mL 的溶液浓度。在缀合后,计算的 IR 是 2.8。

[0230] d) 对表位 cTnT cTnT₇₃₋₈₇作图的鼠抗心肌肌钙蛋白-T M8020207(Fitzgerald Ind Intl, Concord, MA, 目录号 10R-T85D) 针对 PBS 进行透析,以给出 0.413 mg/mL 的溶液浓度。在缀合后,计算的 IR 是 4.1。

[0231] e) 鼠抗心肌肌钙蛋白-I 19C7 (HyTest, Turku, Finland, 目录号 4T21) 对表位 cTnI₄₁₋₄₉作图。在缀合后,计算的 IR 是 2.2。

[0232] 实施例 2. 在磁性微粒上的捕获抗体

[0233] 将羧基顺磁微粒 (5% 固体, 额定 5 微米直径, Polymer Labs, Varian, Inc. Amherst, MA) 在 2-(N-吗啉代) 乙磺酸缓冲液 (MES, 2 mL, pH 6.2, 50 mM) 中稀释至 1% 固体的浓度, 随后用 MES 缓冲液 (3×, 2 mL) 洗涤, 并且最后重悬浮于 MES (2 mL) 中。通过与 1-乙基-3-[3-二甲氨基丙基] 碳化二亚胺盐酸盐 (20 μL 11 mg/1.129 mL 的水溶液) 混合 20 分钟活化颗粒, 随后洗涤 (MES, 2 mL), 并且重悬浮于 MES (2 mL) 中。将鼠抗心肌肌钙蛋白-T 1C11(Fitzgerald Ind Intl, Concord, MA, 目录号 10R-T127D) 以 60 μg/mL 加入悬液中。在混合 60 分钟后, 将抗原包被的颗粒磁性隔离, 并且将抗原溶液替换为由 1% BSA 的 PBS (2 mL) 溶液组成的封闭液。在混合 30 分钟后, 将颗粒用 1% BSA 的 PBS (3×, 2 mL) 溶液洗涤, 并且最后重悬浮于 1% BSA 的 PBS (2 mL) 溶液中, 并且调整至 1% 固体的终浓度。

[0234] 微粒类似地用下述鼠抗心肌肌钙蛋白-T 抗体进行制备: 7G7(Biodesign International/Meridian Life Sciences, Saco, ME; 目录号 H86429M); 7F4(Fitzgerald Ind Intl, Concord, MA, 目录号 10R-T127C); 和 M8020207 (“M80”, Fitzgerald Ind Intl, Concord, MA, 目录号 10R-T85D)。

[0235] 微粒类似地用下述鼠抗心肌肌钙蛋白-I 抗体的混合物进行制备: 对表位 cTnI₈₆₋₉₂ 作图的 8E10(HyTest, Turku, Finland, 目录号 4T21; 目录号 4T21) 和 M06(Strategic Biosolutions, Inc, Newark, DE, 目录号 D2440M406-MA)。

[0236] 实施例 3: 用于捕获和检测抗体的组合的化学发光免疫测定心肌肌钙蛋白-T 剂量应答

[0237] 通过将母液悬液在含有蔗糖 (13.6%) 和抗微生物剂的 MES 缓冲液 (20 mM, pH 6.6) 中稀释至 0.05% 固体, 制备在实施例 2 中制备的每个捕获抗体微粒的工作悬液。通过将母液稀释至 10 ng/mL 制备每个检测抗体缀合物的工作溶液。心肌肌钙蛋白-T (Biospecific, 目录号 J34510359) 标准溶液以 0、0.25、0.5、1.0 和 2.0 μg/mL 制备。

[0238] 在 ARCHITECT® i2000 仪器 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 上进行测定。简言之, 将心肌肌钙蛋白-T 标准溶液 (10 μL) 用 ARCHITECT® PreIncubation Diluent (50 μL) 和捕获抗体微粒 (50 μL) 稀释, 并且在仪器反应器皿中温育。在温育后, 将微粒磁性隔离且用 ARCHITECT® 洗涤缓冲液洗涤。加入检测抗体溶液 (50 μL), 将悬液温育, 并且随后将微粒再次洗涤。随后连续加入含有过氧化氢的 ARCHITECT® 预触发溶液和含有氢氧化钠的 ARCHITECT® 触发溶液, 并且记录化学发光信号 (相对光单位, RLU)。

[0239] 关于捕获和检测抗体的组合的剂量应答曲线显示于表 1 和图解显示于图 1 中。

[0240] 表 1

[0241] 检测缀合物 / 捕获抗体 (RLU)

[0242]

肌钙蛋白-T ($\mu\text{g/mL}$)	7G7 7F4	7G7/ M80202 07	7G7/ 1C11	7F4/ 7G7	7F4/ M80202	7F4/ 1C11	M8020 207/ 7G7	M8020 207/ 7F4	M8020 207/ 1C11
2	468	305420	3105	6870	184343	18588	137713	100426	202062
	29		18			6			
1	298	250755	2384	1469	136026	12732	106585	71224	157435
	77		64			5			
0.5	172	163605	1488	618	82486	63012	70107	45245	105484
	46		94						
0.25	908	96153	7937	452	38363	26439	42508	25611	66447
	1		4						
0	333	338	317	269	297	256	367	379	368

[0243] 实施例 4. 自身抗体对心肌肌钙蛋白-T 的表位作图

[0244] 在链霉抗生物素蛋白包被的微板 (Reacti-Bind™, Streptavidin; Pierce, Rockford, IL) 上针对覆盖如图 2 中所示的整个 cTnT 氨基酸序列的生物素化的肽文库 (表 2) (UniProtKB/Swiss-Prot P45379 (TNNT2_HUMAN), 去除起始子甲硫氨酸, 297 aa, SEQ ID NO: 96), 每个肽长度, 15 aa; 重叠, 12 aa; PEPscreen®, Sigma-Genosys, The Woodlands, TX) 筛选抗体。

[0245] 因此, 将肽 (100 μL , 1200 pmol/mL) 在微板上排列; 随后将微板密封且在环境温度温育 / 混合 1 小时。随后将微板用 ARCHITECT® 洗涤缓冲液洗涤, 且抽吸至干燥。将样品 (500 μL) 用 9.5 mL Axsym 肌钙蛋白预温育稀释剂稀释, 随后排列 (100 μL / 孔) 至具有肽文库的微板。将板密封且在 37°C 温育, 以 28 rpm 混合 2 小时。然后, 将板用 ARCHITECT® 洗涤缓冲液洗涤, 并且使用在 Berthold Mithras 微板阅读器 (Berthold Technologies Inc, Oak Ridge, TN) 上的化学发光检测, 测定针对每个肽的应答。将小鼠抗人 IgG 吖啶标记的缀合物溶液 (100 μL) 加入每个测试孔中。在缀合物加入所有测试样品后, 随后将微板密封, 置于 28 rpm 的定轨振荡器上, 并且在 37°C 温育 1 小时。随后去除缀合物溶液, 并且将微板的孔用 ARCHITECT® Line Diluent (3 \times 300 μL) 洗涤。将微板装载到已在 37°C 平衡的仪器内。将 ARCHITECT® 预触发溶液 (100 μL) 分配到每个孔中。在加入预触发溶液后, 将板振荡 72 秒。随后将 ARCHITECT® 触发溶液 (100 μL) 分配到每个孔中, 并且记录化学发光信号 2 秒。图 3 显示在人心肌肌钙蛋白-T 自身抗体中发现的反应性心肌肌钙蛋白-T 表位的频率。

[0246] 表 2. cTnT 抗原肽文库

[0247]

cTnT 肽编号	SEQ. ID. NO.	cTnT 序列	AA 位置
1	1	SDIEEVVEEYEEEEQ	1-15
2	2	EEVVEEYEEEEQEEA	4-18
3	3	VEEYEEEEQEEAAVE	7-21
4	4	YEEEEQEEAAVEEEE	10-24
5	5	EEQEEAAVEEEEEEDWR	13-27
6	6	EAAAVEEEEEEDWREDE	16-30
7	7	AVEEEEEEDWREDEDEQ	19-33
8	8	EEEDWREDEDEQEEA	22-36
9	9	DWREDEDEQEEAAEE	25-39
10	10	EDEDEQEEAAEEDAE	28-42
11	11	DEQEEAAEEDAEAEA	31-45
12	12	EAAAEEDAEAEAETE	34-48
13	13	AEEAEAEAETEETR	37-51
14	14	DAEAEAETEETRAEE	40-54
15	15	AEAETEETRAEEDEE	43-57
16	16	ETEETRAEEDEEEEEE	46-60
17	17	ETRAEEDEEEEEAKE	49-63
18	18	AEEDEEEEEAKEAED	52-66
19	19	DEEEEEAKEAEDGPM	55-69
20	20	EEEAKEAEDGPMEEES	58-72
21	21	AKEAEDGPMEEESKPK	61-75
22	22	AEDGPMEEESKPKPRS	64-78
23	23	GPMEEESKPKPRSFMP	67-81
24	24	EESKPKPRSFMPNLV	70-84
25	25	KPKPRSFMPNLVPPK	73-87
26	26	PRSFMPNLVPPKIPD	76-90

[0248]

27	27	FMPNLVPPKIPDGER	79-93
28	28	NLVPPKIPDGERVDF	82-96
29	29	PPKIPDGERVDFDDI	85-99
30	30	IPDGERVDFDDIHRK	88-102
31	31	GERVDFDDIHRKRME	91-105
32	32	VDFDDIHRKRMEKDL	94-108
33	33	DDIHRKRMEKDLNEL	97-111
34	34	HRKRMEKDLNELQAL	100-114
35	35	RMEKDLNELQALIEA	103-117
36	36	KDLNELQALIEAHFE	106-120
37	37	NELQALIEAHFENRK	109-123
38	38	QALIEAHFENRKKEE	112-126
39	39	IEAHFENRKKEEEL	115-129
40	40	HFENRKKEEELVSL	118-132
41	41	NRKKEEEELVSLKDR	121-135
42	42	KEEELVSLKDRIER	124-138
43	43	EELVSLKDRIERRA	127-141
44	44	VSLKDRIERRAERA	130-144
45	45	KDRIERRAERAEQQ	133-147
46	46	IERRAERAEQQRIR	136-150
47	47	RRAERAEQQRIRNER	139-153
48	48	ERAEQQRIRNEREKE	142-156
49	49	EQQRIRNEREKERQN	145-159
50	50	RIRNEREKERQNRLA	148-162
51	51	NEREKERQNRLAEER	151-165
52	52	EKERQNRLAEERARR	154-168
53	53	RQNRLAEERARREEE	157-171
54	54	RLAEERARREEEENR	160-174
55	55	EERARREEEENRRKA	163-177
56	56	ARREEEENRRKAEDE	166-180
57	57	EEENRRKAEDEARK	169-183
58	58	ENRRKAEDEARKKKA	172-186

[0249]

59	59	RKAEDEARKKKALSN	175-189
60	60	EDEARKKKALSNMMH	178-192
61	61	ARKKKALSNMMHFGG	181-195
62	62	KKALSNMMHFGGYIQ	184-198
63	63	LSNMMHFGGYIQKQA	187-201
64	64	MMHFGGYIQKQAQTE	190-204
65	65	FGGYIQKQAQTERKS	193-207
66	66	YIQKQAQTERKSGKR	196-210
67	67	KQAQTERKSGKRQTE	199-213
68	68	QTERKSGKRQTEREK	202-216
69	69	RKSGKRQTEREKKKK	205-219
70	70	GKRQTEREKKKKILA	208-222
71	71	QTEREKKKKILAERR	211-225
72	72	REKKKKILAERRKVL	214-228
73	73	KKKILAERRKVL AID	217-231
74	74	ILAERRKVL AIDHLN	220-234
75	75	ERRKVL AIDHLNEDQ	223-237
76	76	KVL AIDHLNEDQLRE	226-240
77	77	AIDHLNEDQLREKAK	229-243
78	78	HLNEDQLREKAKELW	232-246
79	79	EDQLREKAKELWQSI	235-249
80	80	LREKAKELWQSIYNL	238-252
81	81	KAKELWQSIYNLEAE	241-255
82	82	ELWQSIYNLEAEKFD	244-258
83	83	QSIYNLEAEKFDLQE	247-261
84	84	YNLEAEKFDLQEKFK	250-264
85	85	EAEKFDLQEKFKQQK	253-267
86	86	KFDLQEKFKQQKYEI	256-270
87	87	LQEKFKQQKYEINVL	259-273
88	88	KFKQQKYEINVLNR	262-276
89	89	QQKYEINVLNRIND	265-279
90	90	YEINVLNRINDNQK	268-282

[0250]

91	91	NVLRNRINDNQKVS	271-285
92	92	RNRINDNQKVS	274-288
93	93	INDNQKVS	277-291
94	94	NQKVS	280-294
95	95	VSKTRGKAKVTGRWK	283-297

[0251] 实施例 5. 单克隆抗体对心肌肌钙蛋白 -T 的表位作图

[0252] 针对生物素化的肽文库 (表 2, 实施例 4) 筛选来自实施例 1 的鼠抗心肌肌钙蛋白 -T M8020207 吡啶鎓-9-甲酰胺缀合物。将缀合物稀释至 100 ng/mL, 随后将缀合物溶液 (100 μ L) 加入每个测试孔中。在缀合物加入后, 随后将微板密封, 置于 28 rpm 的定轨振荡器上, 并且在 37°C 温育 1 小时。随后去除缀合物溶液, 并且将微板的孔用 ARCHITECT® Line Diluent (3 \times 300 μ L) 洗涤。将微板装载到已在 37°C 平衡的仪器内。将 ARCHITECT® 预触发溶液 (100 μ L) 分配到每个孔中。在加入预触发溶液后, 将板振荡 72 秒。随后将 ARCHITECT® 触发溶液 (100 μ L) 分配到每个孔中, 并且记录化学发光信号 2 秒。如图 4 中显示, 初次应答针对对应于 cTnT₇₃₋₈₇ 的肽 25。

[0253] 针对生物素化的肽文库 (表 2, 实施例 4) 筛选来自实施例 1 的鼠抗心肌肌钙蛋白 -T 1C11。将抗体稀释至 100 ng/mL, 随后将 100 μ L 加入每个测试孔中。将板密封且在 37°C 温育, 以 28 rpm 混合 2 小时。然后, 将板用 ARCHITECT® 洗涤缓冲液洗涤。将山羊抗小鼠 IgG 吡啶鎓标记的缀合物溶液 (100 μ L) 加入每个测试孔中。在缀合物加入所有测试样品后, 随后将微板密封, 置于 28 rpm 的定轨振荡器上, 并且在 37°C 温育 1 小时。随后去除缀合物溶液, 并且将微板的孔用 ARCHITECT® Line Diluent (3 \times 300 μ L) 洗涤。将微板装载到已在 37°C 平衡的仪器内。将 ARCHITECT® 预触发溶液 (100 μ L) 分配到每个孔中。在加入预触发溶液后, 将板振荡 72 秒。随后将 ARCHITECT® 触发溶液 (100 μ L) 分配到每个孔中, 并且记录化学发光信号 2 秒。如图 5 中显示, 初次表位应答针对对应于 cTnT₁₈₁₋₁₉₅ 的肽 61。

[0254] 实施例 6. 关于心肌肌钙蛋白 -T 的标准曲线

[0255] 将来自实施例 2 的鼠抗心肌肌钙蛋白 -T M8020207 包被的微粒稀释至 0.3% 固体。将来自实施例 1 的鼠抗心肌肌钙蛋白 -T 7G7 吡啶鎓-9-甲酰胺缀合物稀释至 30 ng/mL。由人心肌肌钙蛋白 -I-T-C 复合物 (HyTest, Turku Finland, 目录号 8T62) 制备标准溶液, 以给出 cTnT 浓度: 0、7.0、13.0、40.0 和 269.0 pM。通过将 hcTnITC 掺料到阴性人血浆内制备 3 种测试样品, 以给出 0、7.0 和 40 pM 的额定 cTnT 浓度。

[0256] 如实施例 3 中在 ARCHITECT® i2000 上分析标准溶液和人血浆样品。标绘点对点校准曲线 (RLU 与 cTnT 浓度比较)。结果在表 3 中列出。

[0257] 表 3. 磁性微粒心肌肌钙蛋白 T 测定结果

[0258]

样品	RLU	pM cTnT
Cal A	2,369	0
Cal B	15,275	7
Cal C	28,071	14
Cal D	81,462	42
Cal E	422,814	279

阴性血浆	2,074	#N/A
掺料血浆 @7pM	13,788	6.18
掺料血浆 @42 pM	74,126	38.07

[0259] 实施例 7. 自身抗体针对心肌肌钙蛋白 -I 的表位作图

[0260] 在链霉抗生物素蛋白包被的微板 (Reacti-Bind™, Streptavidin;Pierce, Rockford, IL) 上针对覆盖如图 6 中所示的整个 cTnI 氨基酸序列的生物素化的肽文库 (表 4) (UniProtKB/Swiss-Prot P19429-1(TNNI3_HUMAN), 去除起始子甲硫氨酸, 209 aa, SEQ ID NO: 97) 肽长度, 15 aa;重叠, 12 aa;PEPscreen®, Sigma-Genosys, The Woodlands, TX) 筛选抗体。因此, 将肽 (100 μL, 1200 pmol/mL) 在微板上排列;随后将微板密封且在环境温度温育/混合 1 小时。随后将微板用 ARCHITECT® 洗涤缓冲液洗涤, 且抽吸至干燥。将样品 (500 μL) 用 9.5 mL Axsym 肌钙蛋白预温育稀释剂稀释, 随后排列 (100 μL/孔) 至具有肽文库的微板。将板密封且在 37°C 温育, 以 28 rpm 混合 2 小时。然后, 将板用 ARCHITECT® 洗涤缓冲液洗涤, 并且使用在 Berthold Mithras 微板阅读器 (Berthold Technologies Inc, Oak Ridge, TN) 上的化学发光检测, 测定针对每个肽的应答。将小鼠抗人 IgG 吖啶酯标记的缀合物溶液 (100 μL) 加入每个测试孔中。在缀合物加入所有测试样品后, 随后将微板密封, 置于 28 rpm 的定轨振荡器上, 并且在 37°C 温育 1 小时。随后去除缀合物溶液, 并且将微板的孔用 ARCHITECT® Line Diluent (3 × 300 μL) 洗涤。将微板装载到已在 37°C 平衡的仪器内。将 ARCHITECT® 预触发溶液 (100 μL) 分配到每个孔中。在加入预触发溶液后, 将板振荡 72 秒。随后将 ARCHITECT® 触发溶液 (100 μL) 分配到每个孔中, 并且记录化学发光信号 2 秒。图 7 显示在人心肌肌钙蛋白 -I 自身抗体中发现的反应性心肌肌钙蛋白 -I 表位的频率。

[0261] 表 4. cTnI 肽文库

[0262]

cTnI 肽编号	SEQ ID NO.	cTnI_序列	AA 位置
1	98	ADGSSDAAREPRPAP	1-15
2	99	SSDAAREPRPAPAPI	4-18
3	100	AAREPRPAPAPIRRR	7-21
4	101	EPRPAPAPIRRRSSN	10-24
5	102	PAPAPIRRRSSNYRA	13-27
6	103	APIRRRSSNYRAYAT	16-30
7	104	RRRSSNYRAYATEPH	19-33
8	105	SSNYRAYATEPHAKK	22-36
9	106	YRAYATEPHAKKKSK	25-39
10	107	YATEPHAKKKSKISA	28-42
11	108	EPHAKKKSKISASRK	31-45

[0263]

12	109	AKKKSKISASRKLQL	34-48
13	110	KSKISASRKLQLKTL	37-51
14	111	ISASRKLQLKTLLLQ	40-54
15	112	SRKLQLKTLLLQIAK	43-57
16	113	LQLKTLLLQIAKQEL	46-60
17	114	KTLLLQIAKQELERE	49-63
18	115	LLQIAKQELEREAE	52-66
19	116	IAKQELEREAEERRG	55-69
20	117	QELEREAEERRGEGK	58-72
21	118	ERAEERRGEGKGRAL	61-75
22	119	AEERRGEGKGRALSTR	64-78
23	120	RRGEGKGRALSTRCQP	67-81
24	121	EKGRALSTRCQPLEL	70-84
25	122	RALSTRCQPLELAGL	73-87
26	123	STRCQPLELAGLGFA	76-90
27	124	CQPLELAGLGFAELQ	79-93
28	125	LELAGLGFAELQDLC	82-96
29	126	AGLGFAELQDLCRQL	85-99
30	127	GFAELQDLCRQLHAR	88-102
31	128	ELQDLCRQLHARVDK	91-105
32	129	DLCRQLHARVDKVDE	94-108
33	130	RQLHARVDKVDEERY	97-111
34	131	HARVDKVDEERYDIE	100-114
35	132	VDKVDEERYDIEAKV	103-117
36	133	VDEERYDIEAKVTKN	106-120
37	134	ERYDIEAKVTKNITE	109-123
38	135	DIEAKVTKNITEIAD	112-126
39	136	AKVTKNITEIADLTQ	115-129
40	137	TKNITEIADLTQKIF	118-132
41	138	ITEIADLTQKIFDLR	121-135
42	139	IADLTQKIFDLRGKF	124-138
43	140	LTQKIFDLRGKFKRP	127-141

[0264]

44	141	KIFDLRGKFKRPTLR	130-144
45	142	DLRGKFKRPTLRRVR	133-147
46	143	GKFKRPTLRRVRISA	136-150
47	144	KRPTLRRVRISADAM	139-153
48	145	TLRRVRISADAMMQA	142-156
49	146	RVRISADAMMQALLG	145-159
50	147	ISADAMMQALLGARA	148-162
51	148	DAMMQALLGARAKES	151-165
52	149	MQALLGARAKESLDL	154-168
53	150	LLGARAKESLDLRAH	157-171
54	151	ARAKESLDLRAHLKQ	160-174
55	152	KESLDLRAHLKQVKK	163-177
56	153	LDLRAHLKQVKKEDT	166-180
57	154	RAHLKQVKKEDTEKE	169-183
58	155	LKQVKKEDTEKENRE	172-186
59	156	VKKEDTEKENREVGD	175-189
60	157	EDTEKENREVGDWK	178-192
61	158	EKENREVGDWKKNID	181-195
62	159	NREVGDWKKNIDALS	184-198
63	160	VGDWKKNIDALSGME	187-201
64	161	WRKNIDALSGMEGRK	190-204
65	162	NIDALSGMEGRKCKKF	193-207
66	163	ALSGMEGRKCKKFES	196-209

[0265] 实施例 8. 单克隆抗体针对心肌肌钙蛋白 -I 的表位作图

[0266] 针对生物素化的肽文库 (实施例 7) 筛选来自实施例 1 的鼠抗心肌肌钙蛋白 -I 19C7 吡啶鎓-9-甲酰胺缀合物。将缀合物稀释至 100 ng/mL, 随后将缀合物溶液 (100 μ L) 加入每个测试孔中。在缀合物加入后, 随后将微板密封, 置于 28 rpm 的定轨振荡器上, 并且在 37°C 温育 1 小时。随后去除缀合物溶液, 并且将微板的孔用 ARCHITECT® Line Diluent (3 \times 300 μ L) 洗涤。将微板装载到已在 37°C 平衡的仪器内。将 ARCHITECT® 预触发溶液 (100 μ L) 分配到每个孔中。在加入预触发溶液后, 将板振荡 72 秒。随后将 ARCHITECT® 触发溶液 (100 μ L) 分配到每个孔中, 并且记录化学发光信号 2 秒。如图 8 中显示, 初次应答针对包含来自厂商的表位指定的对应于 cTnI₃₇₋₅₇ 的肽 13-15。(SEQ ID NOS: 110、111 和 112)。

[0267] 实施例 9. 用于心肌肌钙蛋白 -I 测定的标准曲线

[0268] 将来自实施例 2 的鼠抗心肌肌钙蛋白 -I 8E10/M06 包被的微粒稀释至 0.3% 固体。将来自实施例 1 的鼠抗心肌肌钙蛋白 -I 19C7 吡啶鎓-9-甲酰胺缀合物稀释至 30 ng/mL。由人心肌肌钙蛋白 -I-T-C 复合物 (HyTest, Turku Finland, 目录号 8T62) 制备标准溶液, 以

给出 cTnI 浓度 :0、10.0、21.0、63.0 和 419.0 pM。通过将 hcTnITC 掺料到阴性人血浆内制备 3 种测试样品,以给出 0、10.0 和 63 pM 的额定 cTnI 浓度。如实施例 3 中在 ARCHITECT® i2000 上分析标准溶液和人血浆样品。标绘点对点校准曲线 (RLU 与 cTnI 浓度比较)。结果在表 5 中列出。

[0269] 表 5. 磁性微粒心肌肌钙蛋白 -I 测定结果

[0270]

样品	RLU	pM cTnI
Cal A	449	0
Cal B	10, 173	10
Cal C	20, 244	21
Cal D	59, 799	63
Cal E	377, 720	419
阴性血浆	867	0.45
掺料血浆 @10 pM	6, 059	6.04
掺料血浆 @63 pM	35, 742	37.35

[0271] 实施例 10. 用于心肌肌钙蛋白测定的标准曲线

[0272] 将来自实施例 2 的鼠抗心肌肌钙蛋白 -I 8E10/M06 包被的微粒和鼠抗心肌肌钙蛋白 -T M8020207 包被的微粒 1:1 稀释至 0.3% 固体的悬液。将来自实施例 1 的鼠抗心肌肌钙蛋白 -I 19C7 吡啶鎓 -9- 甲酰胺缀合物和鼠抗心肌肌钙蛋白 -T 7G7 吡啶鎓 -9- 甲酰胺缀合物 1:1 稀释至 30 ng/mL 的溶液。由人心肌肌钙蛋白 -I-T-C 复合物 (HyTest, Turku Finland, 目录号 8T62) 制备标准溶液,以给出 cTn 浓度 :0、17.0、34.0、103.0 和 687.0 pM。通过将 hcTnITC 掺料到阴性人血浆内制备 3 种测试样品,以给出 0、17.0 和 103 pM 的额定 cTn 浓度。如实施例 3 中在 ARCHITECT® i2000 上分析标准溶液和人血浆样品。标绘点对点校准曲线 (RLU 与 cTn 浓度比较)。结果在表 6 中列出。

[0273] 表 6. 磁性微粒心肌肌钙蛋白测定结果

[0274]

样品	RLU	pM cTn
Cal A	13, 623	0
Cal B	20, 953	17
Cal C	45, 617	34
Cal D	92, 650	103
Cal E	465, 222	687
阴性血浆	13, 542	#N/A
掺料血浆 @17pM	30, 008	23.50
掺料血浆 @103 pM	92, 899	103.51

[0275] 本领域技术人员将容易理解在本公开内容中描述的免疫测定充分适合于执行目的且获得提及的结果和优点,以及其中固有的那些。本文描述的分子复合物和方法、程序、处理、分子、具体化合物是优选实施方案的目前代表,是示例性的,并且不预期作为关于本发明范围的限制。对于本领域技术人员显而易见的是,可以对本文公开的本公开内容做出不同置换和修改,而不背离本发明的精神和范围。

[0276] 说明书中提及的所有专利和出版物指示本公开内容所属领域技术人员的水平。所有专利和出版物引入本文作为参考,其程度与每个个别出版物特别且个别指出引入作为参考相同。

[0277] 本文举例说明性描述的本公开内容适当地可以在不存在本文未具体公开的任何一种或多种要素、一种或多种限制的情况下进行实践。因此,例如,在本文的每种情况下,术语“包含”、“基本上由……组成”和“由……组成”中的任何可以替换为其他 2 个术语中的任一。已采用的术语和表达用作描述而不是限制性术语,并且不预期在此类术语和表达的使用中排除所示且所述特征或其部分的任何等价物,但认识到多种修改在请求保护的本公开内容的范围内是可能的。因此,应当理解尽管本公开内容已通过优选实施方案和任选特征具体公开,但本领域技术人员可以采用本文公开的概念的修改和变动,并且此类修改和变动视为在如通过附加权利要求定义的本发明范围内。

[0278] 应当理解前述说明书预期举例说明而不是限制本发明的范围。本发明的其他方面、优点和修改在下文所述的权利要求的预期范围内。

序列表

<110> Abbott Laboratories

Adamczyk, Maciej

Brashear, Roy Jeffrey

Mattingly, Phillip G.

<120> 用于诊断心肌细胞损害的测定

<130> 057975-404361

<140> US 12/630, 229

<141> 2009-03-12

<160> 163

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Ser Asp Ile Glu Glu Val Val Glu Glu Tyr Glu Glu Glu Glu Gln

1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Glu Glu Val Val Glu Glu Tyr Glu Glu Glu Glu Gln Glu Glu Ala

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Val Glu Glu Tyr Glu Glu Glu Glu Gln Glu Glu Ala Ala Val Glu

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Tyr Glu Glu Glu Glu Gln Glu Glu Ala Ala Val Glu Glu Glu Glu

1	5	10	15
<210>	5		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	5		
Glu	Glu	Gln	Glu
Glu	Ala	Ala	Val
Glu	Glu	Glu	Glu
Asp	Trp	Arg	
1	5	10	15
<210>	6		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	6		
Glu	Glu	Ala	Ala
Val	Glu	Glu	Glu
Glu	Glu	Glu	Glu
Asp	Trp	Arg	Glu
Asp	Glu		
1	5	10	15
<210>	7		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	7		
Ala	Val	Glu	Glu
Glu	Glu	Glu	Glu
Asp	Trp	Arg	Glu
Asp	Glu	Asp	Glu
Asp	Glu	Gln	Glu
Glu	Glu	Ala	
1	5	10	15
<210>	8		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	8		
Glu	Glu	Glu	Asp
Trp	Arg	Glu	Asp
Glu	Asp	Glu	Asp
Glu	Gln	Glu	Glu
Ala			
1	5	10	15
<210>	9		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	9		
Asp	Trp	Arg	Glu
Asp	Glu	Asp	Glu
Asp	Glu	Gln	Glu
Glu	Glu	Ala	Ala
Glu	Glu		
1	5	10	15
<210>	10		
<211>	15		
<212>	PRT		

<400> 21

Ala Lys Glu Ala Glu Asp Gly Pro Met Glu Glu Ser Lys Pro Lys

1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

Ala Glu Asp Gly Pro Met Glu Glu Ser Lys Pro Lys Pro Arg Ser

1 5 10 15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

Gly Pro Met Glu Glu Ser Lys Pro Lys Pro Arg Ser Phe Met Pro

1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

Glu Glu Ser Lys Pro Lys Pro Arg Ser Phe Met Pro Asn Leu Val

1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 25

Lys Pro Lys Pro Arg Ser Phe Met Pro Asn Leu Val Pro Pro Lys

1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 26

Pro Arg Ser Phe Met Pro Asn Leu Val Pro Pro Lys Ile Pro Asp

1 5 10 15

<210> 27

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 27
 Phe Met Pro Asn Leu Val Pro Pro Lys Ile Pro Asp Gly Glu Arg
 1 5 10 15
 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 28
 Asn Leu Val Pro Pro Lys Ile Pro Asp Gly Glu Arg Val Asp Phe
 1 5 10 15
 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 29
 Pro Pro Lys Ile Pro Asp Gly Glu Arg Val Asp Phe Asp Asp Ile
 1 5 10 15
 <210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 30
 Ile Pro Asp Gly Glu Arg Val Asp Phe Asp Asp Ile His Arg Lys
 1 5 10 15
 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 31
 Gly Glu Arg Val Asp Phe Asp Asp Ile His Arg Lys Arg Met Glu
 1 5 10 15
 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 32

Val Asp Phe Asp Asp Ile His Arg Lys Arg Met Glu Lys Asp Leu
 1 5 10 15
 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 33

Asp Asp Ile His Arg Lys Arg Met Glu Lys Asp Leu Asn Glu Leu
 1 5 10 15
 <210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 34

His Arg Lys Arg Met Glu Lys Asp Leu Asn Glu Leu Gln Ala Leu
 1 5 10 15
 <210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 35

Arg Met Glu Lys Asp Leu Asn Glu Leu Gln Ala Leu Ile Glu Ala
 1 5 10 15
 <210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 36

Lys Asp Leu Asn Glu Leu Gln Ala Leu Ile Glu Ala His Phe Glu
 1 5 10 15
 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 37

Asn Glu Leu Gln Ala Leu Ile Glu Ala His Phe Glu Asn Arg Lys
 1 5 10 15
 <210> 38
 <211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 38

Gln Ala Leu Ile Glu Ala His Phe Glu Asn Arg Lys Lys Glu Glu
1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 39

Ile Glu Ala His Phe Glu Asn Arg Lys Lys Glu Glu Glu Glu Leu
1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 40

His Phe Glu Asn Arg Lys Lys Glu Glu Glu Glu Leu Val Ser Leu
1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 41

Asn Arg Lys Lys Glu Glu Glu Glu Leu Val Ser Leu Lys Asp Arg
1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 42

Lys Glu Glu Glu Glu Leu Val Ser Leu Lys Asp Arg Ile Glu Arg
1 5 10 15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 43

Glu Glu Leu Val Ser Leu Lys Asp Arg Ile Glu Arg Arg Arg Ala

1	5	10	15
<210>	44		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	44		
Val Ser Leu Lys Asp Arg Ile Glu Arg Arg Arg Ala Glu Arg Ala			
1	5	10	15
<210>	45		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	45		
Lys Asp Arg Ile Glu Arg Arg Arg Ala Glu Arg Ala Glu Gln Gln			
1	5	10	15
<210>	46		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	46		
Ile Glu Arg Arg Arg Ala Glu Arg Ala Glu Gln Gln Arg Ile Arg			
1	5	10	15
<210>	47		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	47		
Arg Arg Ala Glu Arg Ala Glu Gln Gln Arg Ile Arg Asn Glu Arg			
1	5	10	15
<210>	48		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	48		
Glu Arg Ala Glu Gln Gln Arg Ile Arg Asn Glu Arg Glu Lys Glu			
1	5	10	15
<210>	49		
<211>	15		
<212>	PRT		

<213> 智人

<400> 49

Glu Gln Gln Arg Ile Arg Asn Glu Arg Glu Lys Glu Arg Gln Asn

1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 50

Arg Ile Arg Asn Glu Arg Glu Lys Glu Arg Gln Asn Arg Leu Ala

1 5 10 15

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 51

Asn Glu Arg Glu Lys Glu Arg Gln Asn Arg Leu Ala Glu Glu Arg

1 5 10 15

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 52

Glu Lys Glu Arg Gln Asn Arg Leu Ala Glu Glu Arg Ala Arg Arg

1 5 10 15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 53

Arg Gln Asn Arg Leu Ala Glu Glu Arg Ala Arg Arg Glu Glu Glu

1 5 10 15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 54

Arg Leu Ala Glu Glu Arg Ala Arg Arg Glu Glu Glu Glu Asn Arg

1 5 10 15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 55

Glu Glu Arg Ala Arg Arg Glu Glu Glu Glu Asn Arg Arg Lys Ala
1 5 10 15

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 56

Ala Arg Arg Glu Glu Glu Glu Asn Arg Arg Lys Ala Glu Asp Glu
1 5 10 15

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 57

Glu Glu Glu Glu Asn Arg Arg Lys Ala Glu Asp Glu Ala Arg Lys
1 5 10 15

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 58

Glu Asn Arg Arg Lys Ala Glu Asp Glu Ala Arg Lys Lys Lys Ala
1 5 10 15

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 59

Arg Lys Ala Glu Asp Glu Ala Arg Lys Lys Lys Ala Leu Ser Asn
1 5 10 15

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 60

Glu Asp Glu Ala Arg Lys Lys Lys Ala Leu Ser Asn Met Met His
1 5 10 15

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 61

Ala Arg Lys Lys Lys Ala Leu Ser Asn Met Met His Phe Gly Gly
1 5 10 15

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 62

Lys Lys Ala Leu Ser Asn Met Met His Phe Gly Gly Tyr Ile Gln
1 5 10 15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 63

Leu Ser Asn Met Met His Phe Gly Gly Tyr Ile Gln Lys Gln Ala
1 5 10 15

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 64

Met Met His Phe Gly Gly Tyr Ile Gln Lys Gln Ala Gln Thr Glu
1 5 10 15

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 65

Phe Gly Gly Tyr Ile Gln Lys Gln Ala Gln Thr Glu Arg Lys Ser
1 5 10 15

<210> 66

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 66
 Tyr Ile Gln Lys Gln Ala Gln Thr Glu Arg Lys Ser Gly Lys Arg
 1 5 10 15
 <210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 67
 Lys Gln Ala Gln Thr Glu Arg Lys Ser Gly Lys Arg Gln Thr Glu
 1 5 10 15
 <210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 68
 Gln Thr Glu Arg Lys Ser Gly Lys Arg Gln Thr Glu Arg Glu Lys
 1 5 10 15
 <210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 69
 Arg Lys Ser Gly Lys Arg Gln Thr Glu Arg Glu Lys Lys Lys Lys
 1 5 10 15
 <210> 70
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 70
 Gly Lys Arg Gln Thr Glu Arg Glu Lys Lys Lys Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15
 <210> 71
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 71

Gln Thr Glu Arg Glu Lys Lys Lys Lys Ile Leu Ala Glu Arg Arg
 1 5 10 15
 <210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 72
 Arg Glu Lys Lys Lys Lys Ile Leu Ala Glu Arg Arg Lys Val Leu
 1 5 10 15
 <210> 73
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 73
 Lys Lys Lys Ile Leu Ala Glu Arg Arg Lys Val Leu Ala Ile Asp
 1 5 10 15
 <210> 74
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 74
 Ile Leu Ala Glu Arg Arg Lys Val Leu Ala Ile Asp His Leu Asn
 1 5 10 15
 <210> 75
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 75
 Glu Arg Arg Lys Val Leu Ala Ile Asp His Leu Asn Glu Asp Gln
 1 5 10 15
 <210> 76
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 76
 Lys Val Leu Ala Ile Asp His Leu Asn Glu Asp Gln Leu Arg Glu
 1 5 10 15
 <210> 77
 <211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 77

Ala Ile Asp His Leu Asn Glu Asp Gln Leu Arg Glu Lys Ala Lys

1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 78

His Leu Asn Glu Asp Gln Leu Arg Glu Lys Ala Lys Glu Leu Trp

1 5 10 15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 79

Glu Asp Gln Leu Arg Glu Lys Ala Lys Glu Leu Trp Gln Ser Ile

1 5 10 15

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 80

Leu Arg Glu Lys Ala Lys Glu Leu Trp Gln Ser Ile Tyr Asn Leu

1 5 10 15

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 81

Lys Ala Lys Glu Leu Trp Gln Ser Ile Tyr Asn Leu Glu Ala Glu

1 5 10 15

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 82

Glu Leu Trp Gln Ser Ile Tyr Asn Leu Glu Ala Glu Lys Phe Asp

1	5	10	15
<210>	83		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	83		
Gln Ser Ile Tyr Asn Leu Glu Ala Glu Lys Phe Asp Leu Gln Glu			
1	5	10	15
<210>	84		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	84		
Tyr Asn Leu Glu Ala Glu Lys Phe Asp Leu Gln Glu Lys Phe Lys			
1	5	10	15
<210>	85		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	85		
Glu Ala Glu Lys Phe Asp Leu Gln Glu Lys Phe Lys Gln Gln Lys			
1	5	10	15
<210>	86		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	86		
Lys Phe Asp Leu Gln Glu Lys Phe Lys Gln Gln Lys Tyr Glu Ile			
1	5	10	15
<210>	87		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	87		
Leu Gln Glu Lys Phe Lys Gln Gln Lys Tyr Glu Ile Asn Val Leu			
1	5	10	15
<210>	88		
<211>	15		
<212>	PRT		

<213> 智人

<400> 88

Lys Phe Lys Gln Gln Lys Tyr Glu Ile Asn Val Leu Arg Asn Arg
1 5 10 15

<210> 89

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 89

Gln Gln Lys Tyr Glu Ile Asn Val Leu Arg Asn Arg Ile Asn Asp
1 5 10 15

<210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 90

Tyr Glu Ile Asn Val Leu Arg Asn Arg Ile Asn Asp Asn Gln Lys
1 5 10 15

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 91

Asn Val Leu Arg Asn Arg Ile Asn Asp Asn Gln Lys Val Ser Lys
1 5 10 15

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 92

Arg Asn Arg Ile Asn Asp Asn Gln Lys Val Ser Lys Thr Arg Gly
1 5 10 15

<210> 93

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 93

Ile Asn Asp Asn Gln Lys Val Ser Lys Thr Arg Gly Lys Ala Lys
1 5 10 15

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 94

Asn Gln Lys Val Ser Lys Thr Arg Gly Lys Ala Lys Val Thr Gly

1 5 10 15

<210> 95

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 95

Val Ser Lys Thr Arg Gly Lys Ala Lys Val Thr Gly Arg Trp Lys

1 5 10 15

<210> 96

<211> 297

<212> PRT

<213> 智人

<400> 96

Ser Asp Ile Glu Glu Val Val Glu Glu Tyr Glu Glu Glu Glu Gln Glu

1 5 10 15

Glu Ala Ala Val Glu Glu Glu Glu Asp Trp Arg Glu Asp Glu Asp Glu

20 25 30

Gln Glu Glu Ala Ala Glu Glu Asp Ala Glu Ala Glu Ala Glu Thr Glu

35 40 45

Glu Thr Arg Ala Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Ala Lys Glu Ala

50 55 60

Glu Asp Gly Pro Met Glu Glu Ser Lys Pro Lys Pro Arg Ser Phe Met

65 70 75 80

Pro Asn Leu Val Pro Pro Lys Ile Pro Asp Gly Glu Arg Val Asp Phe

85 90 95

Asp Asp Ile His Arg Lys Arg Met Glu Lys Asp Leu Asn Glu Leu Gln

100 105 110

Ala Leu Ile Glu Ala His Phe Glu Asn Arg Lys Lys Glu Glu Glu Glu

115 120 125

Leu Val Ser Leu Lys Asp Arg Ile Glu Arg Arg Arg Ala Glu Arg Ala

130 135 140

Glu Gln Gln Arg Ile Arg Asn Glu Arg Glu Lys Glu Arg Gln Asn Arg

145 150 155 160

Gln Lys Ile Phe Asp Leu Arg Gly Lys Phe Lys Arg Pro Thr Leu Arg
 130 135 140
 Arg Val Arg Ile Ser Ala Asp Ala Met Met Gln Ala Leu Leu Gly Ala
 145 150 155 160
 Arg Ala Lys Glu Ser Leu Asp Leu Arg Ala His Leu Lys Gln Val Lys
 165 170 175
 Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu Asn Arg Glu Val Gly Asp Trp Arg Lys
 180 185 190
 Asn Ile Asp Ala Leu Ser Gly Met Glu Gly Arg Lys Lys Lys Phe Glu
 195 200 205

Ser

<210> 98
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 98

Ala Asp Gly Ser Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala Pro
 1 5 10 15

<210> 99
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 99

Ser Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala Pro Ala Pro Ile
 1 5 10 15

<210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 100

Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala Pro Ala Pro Ile Arg Arg Arg
 1 5 10 15

<210> 101
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 101

Glu Pro Arg Pro Ala Pro Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn
 1 5 10 15

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 102

Pro Ala Pro Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr Arg Ala
1 5 10 15

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 103

Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr
1 5 10 15

<210> 104

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 104

Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Glu Pro His
1 5 10 15

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 105

Ser Ser Asn Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Glu Pro His Ala Lys Lys
1 5 10 15

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 106

Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Glu Pro His Ala Lys Lys Lys Ser Lys
1 5 10 15

<210> 107

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 107

Tyr Ala Thr Glu Pro His Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ile Ser Ala
1 5 10 15

<210> 108

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 108

Glu Pro His Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ile Ser Ala Ser Arg Lys
1 5 10 15

<210> 109

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 109

Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln Leu
1 5 10 15

<210> 110

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 110

Lys Ser Lys Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln Leu Lys Thr Leu
1 5 10 15

<210> 111

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 111

Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln Leu Lys Thr Leu Leu Leu Gln
1 5 10 15

<210> 112

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 112

Ser Arg Lys Leu Gln Leu Lys Thr Leu Leu Leu Gln Ile Ala Lys
1 5 10 15

<210> 113

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 113
 Leu Gln Leu Lys Thr Leu Leu Leu Gln Ile Ala Lys Gln Glu Leu
 1 5 10 15
 <210> 114
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 114
 Lys Thr Leu Leu Leu Gln Ile Ala Lys Gln Glu Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 <210> 115
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 115
 Leu Leu Gln Ile Ala Lys Gln Glu Leu Glu Arg Glu Ala Glu Glu
 1 5 10 15
 <210> 116
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 116
 Ile Ala Lys Gln Glu Leu Glu Arg Glu Ala Glu Glu Arg Arg Gly
 1 5 10 15
 <210> 117
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 117
 Gln Glu Leu Glu Arg Glu Ala Glu Glu Arg Arg Gly Glu Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 118
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 118

<212> PRT
 <213> 智人
 <400> 124
 Cys Gln Pro Leu Glu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu Leu Gln
 1 5 10 15
 <210> 125
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 125
 Leu Glu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu Leu Gln Asp Leu Cys
 1 5 10 15
 <210> 126
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 126
 Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu Leu Gln Asp Leu Cys Arg Gln Leu
 1 5 10 15
 <210> 127
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 127
 Gly Phe Ala Glu Leu Gln Asp Leu Cys Arg Gln Leu His Ala Arg
 1 5 10 15
 <210> 128
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 128
 Glu Leu Gln Asp Leu Cys Arg Gln Leu His Ala Arg Val Asp Lys
 1 5 10 15
 <210> 129
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 129
 Asp Leu Cys Arg Gln Leu His Ala Arg Val Asp Lys Val Asp Glu

1	5	10	15
<210>	130		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	130		
Arg Gln Leu His Ala Arg Val Asp Lys Val Asp Glu Glu Arg Tyr			
1	5	10	15
<210>	131		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	131		
His Ala Arg Val Asp Lys Val Asp Glu Glu Arg Tyr Asp Ile Glu			
1	5	10	15
<210>	132		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	132		
Val Asp Lys Val Asp Glu Glu Arg Tyr Asp Ile Glu Ala Lys Val			
1	5	10	15
<210>	133		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	133		
Val Asp Glu Glu Arg Tyr Asp Ile Glu Ala Lys Val Thr Lys Asn			
1	5	10	15
<210>	134		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	134		
Glu Arg Tyr Asp Ile Glu Ala Lys Val Thr Lys Asn Ile Thr Glu			
1	5	10	15
<210>	135		
<211>	15		
<212>	PRT		

<213> 智人

<400> 135

Asp Ile Glu Ala Lys Val Thr Lys Asn Ile Thr Glu Ile Ala Asp
1 5 10 15

<210> 136

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 136

Ala Lys Val Thr Lys Asn Ile Thr Glu Ile Ala Asp Leu Thr Gln
1 5 10 15

<210> 137

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 137

Thr Lys Asn Ile Thr Glu Ile Ala Asp Leu Thr Gln Lys Ile Phe
1 5 10 15

<210> 138

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 138

Ile Thr Glu Ile Ala Asp Leu Thr Gln Lys Ile Phe Asp Leu Arg
1 5 10 15

<210> 139

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 139

Ile Ala Asp Leu Thr Gln Lys Ile Phe Asp Leu Arg Gly Lys Phe
1 5 10 15

<210> 140

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 140

Leu Thr Gln Lys Ile Phe Asp Leu Arg Gly Lys Phe Lys Arg Pro
1 5 10 15

<210> 141

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 141

Lys Ile Phe Asp Leu Arg Gly Lys Phe Lys Arg Pro Thr Leu Arg

1 5 10 15

<210> 142

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 142

Asp Leu Arg Gly Lys Phe Lys Arg Pro Thr Leu Arg Arg Val Arg

1 5 10 15

<210> 143

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 143

Gly Lys Phe Lys Arg Pro Thr Leu Arg Arg Val Arg Ile Ser Ala

1 5 10 15

<210> 144

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 144

Lys Arg Pro Thr Leu Arg Arg Val Arg Ile Ser Ala Asp Ala Met

1 5 10 15

<210> 145

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 145

Thr Leu Arg Arg Val Arg Ile Ser Ala Asp Ala Met Met Gln Ala

1 5 10 15

<210> 146

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 146

Arg Val Arg Ile Ser Ala Asp Ala Met Met Gln Ala Leu Leu Gly
1 5 10 15

<210> 147

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 147

Ile Ser Ala Asp Ala Met Met Gln Ala Leu Leu Gly Ala Arg Ala
1 5 10 15

<210> 148

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 148

Asp Ala Met Met Gln Ala Leu Leu Gly Ala Arg Ala Lys Glu Ser
1 5 10 15

<210> 149

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 149

Met Gln Ala Leu Leu Gly Ala Arg Ala Lys Glu Ser Leu Asp Leu
1 5 10 15

<210> 150

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 150

Leu Leu Gly Ala Arg Ala Lys Glu Ser Leu Asp Leu Arg Ala His
1 5 10 15

<210> 151

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 151

Ala Arg Ala Lys Glu Ser Leu Asp Leu Arg Ala His Leu Lys Gln
1 5 10 15

<210> 152

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 152
 Lys Glu Ser Leu Asp Leu Arg Ala His Leu Lys Gln Val Lys Lys
 1 5 10 15
 <210> 153
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 153
 Leu Asp Leu Arg Ala His Leu Lys Gln Val Lys Lys Glu Asp Thr
 1 5 10 15
 <210> 154
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 154
 Arg Ala His Leu Lys Gln Val Lys Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu
 1 5 10 15
 <210> 155
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 155
 Leu Lys Gln Val Lys Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu Asn Arg Glu
 1 5 10 15
 <210> 156
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 156
 Val Lys Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu Asn Arg Glu Val Gly Asp
 1 5 10 15
 <210> 157
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 157

Glu Asp Thr Glu Lys Glu Asn Arg Glu Val Gly Asp Trp Arg Lys
 1 5 10 15
 <210> 158
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 158
 Glu Lys Glu Asn Arg Glu Val Gly Asp Trp Arg Lys Asn Ile Asp
 1 5 10 15
 <210> 159
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 159
 Asn Arg Glu Val Gly Asp Trp Arg Lys Asn Ile Asp Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 <210> 160
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 160
 Val Gly Asp Trp Arg Lys Asn Ile Asp Ala Leu Ser Gly Met Glu
 1 5 10 15
 <210> 161
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 161
 Trp Arg Lys Asn Ile Asp Ala Leu Ser Gly Met Glu Gly Arg Lys
 1 5 10 15
 <210> 162
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 162
 Asn Ile Asp Ala Leu Ser Gly Met Glu Gly Arg Lys Lys Lys Phe
 1 5 10 15
 <210> 163
 <211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 163

Ala Leu Ser Gly Met Glu Gly Arg Lys Lys Lys Phe Glu Ser

1

5

10

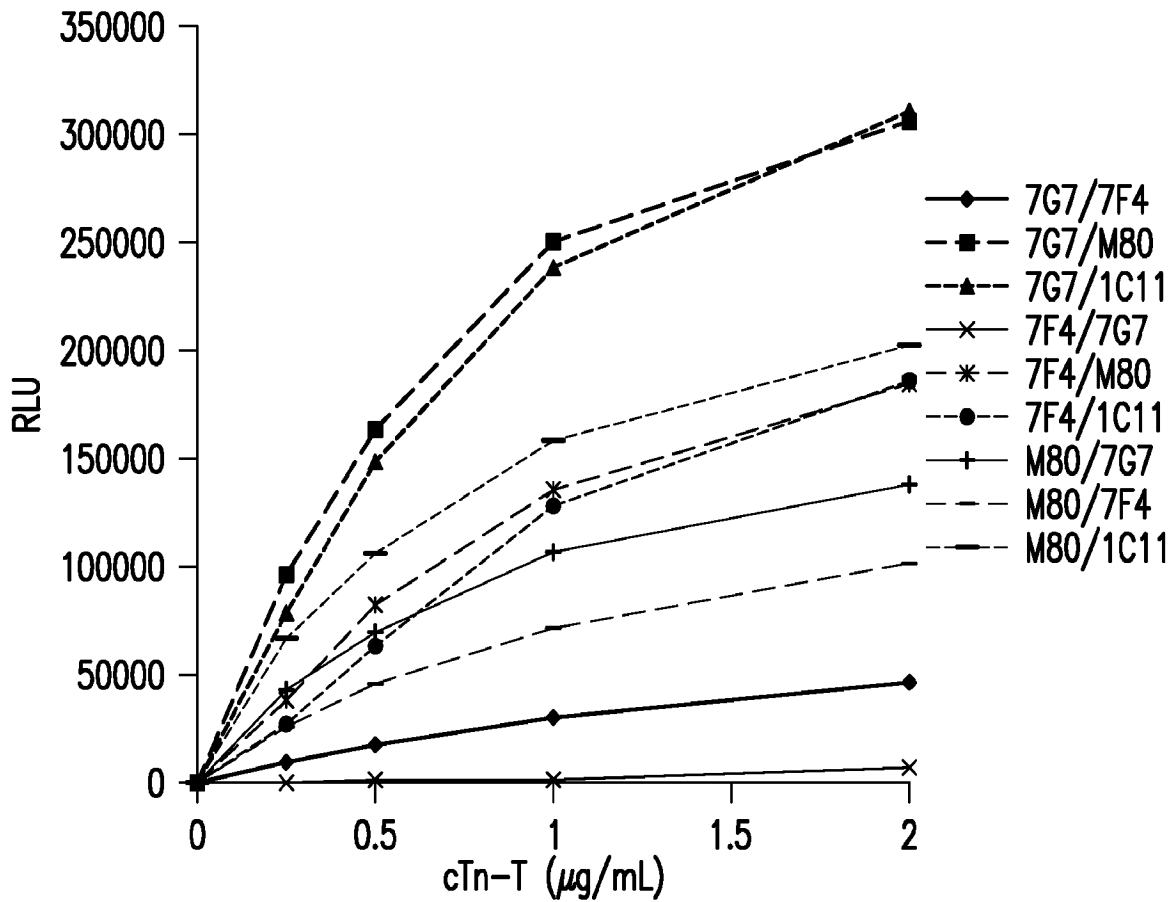


图 1

SDIEEVVEEY.EEEEQEEAAV EEEEDWREDE DEQEEAAEED AEAETEET
 RAEDEEEEE AKEAEDGPM ESKPKPRSFM PNLVPPKIPD GERVDFDDIH
 RKRMEKDLNE LQALIEAHFE NRKKEEEELV SLKDRIERRR AERAEQQRIR
 NEREKERQNR LAERARREE EENRRKAEDE ARKKKALSNM MHFGGYIQKQ
 AQTERKSGKR QTEREKKKKI LAERRKVLAI DHLNEDQLRE KAKELWQSIY
 NLEAEKFDLQ EKFKQQKYEI NVLRNRINDN QKVSCTRGA KVTGRWK

(297 aa)

图 2

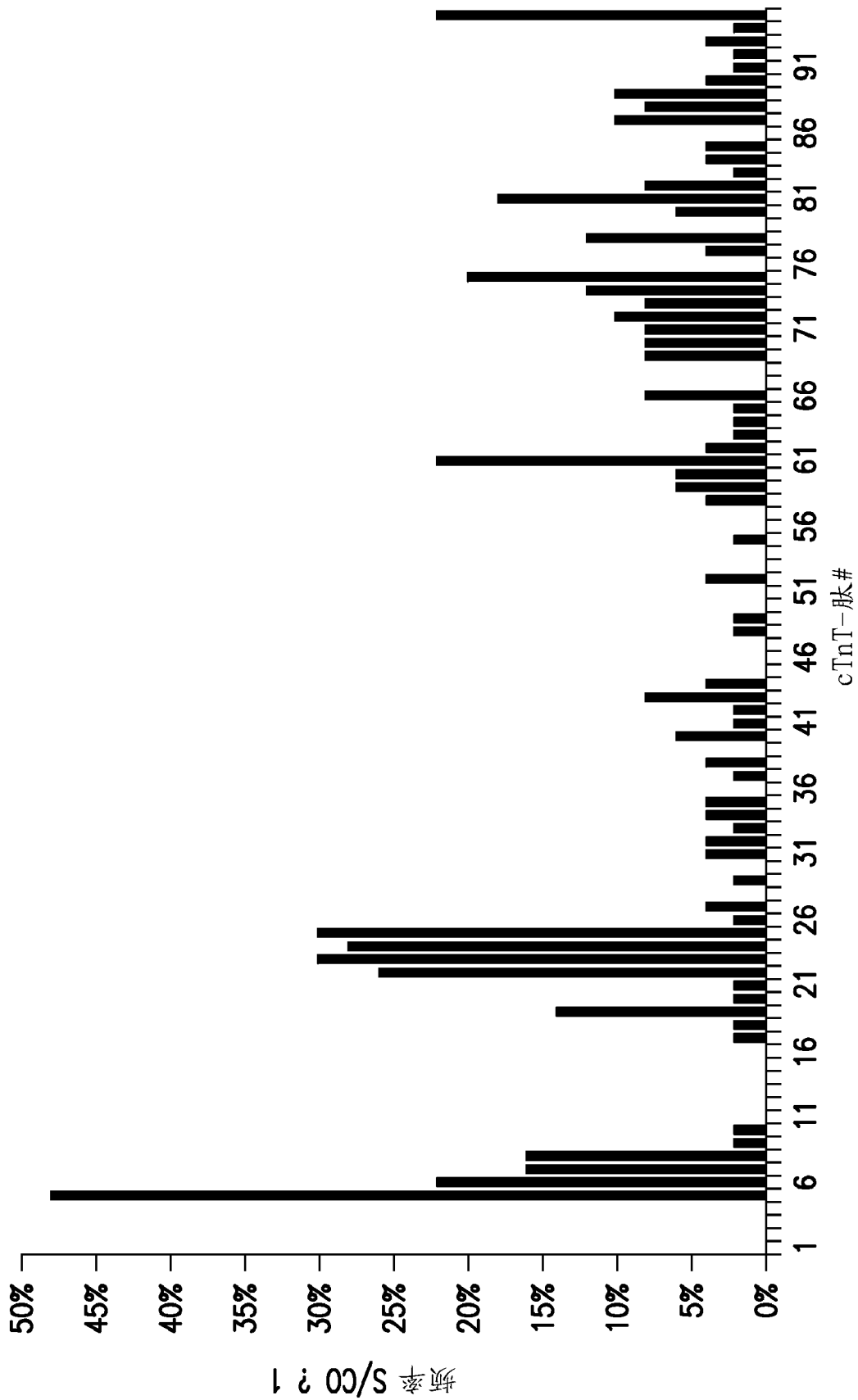


图 3

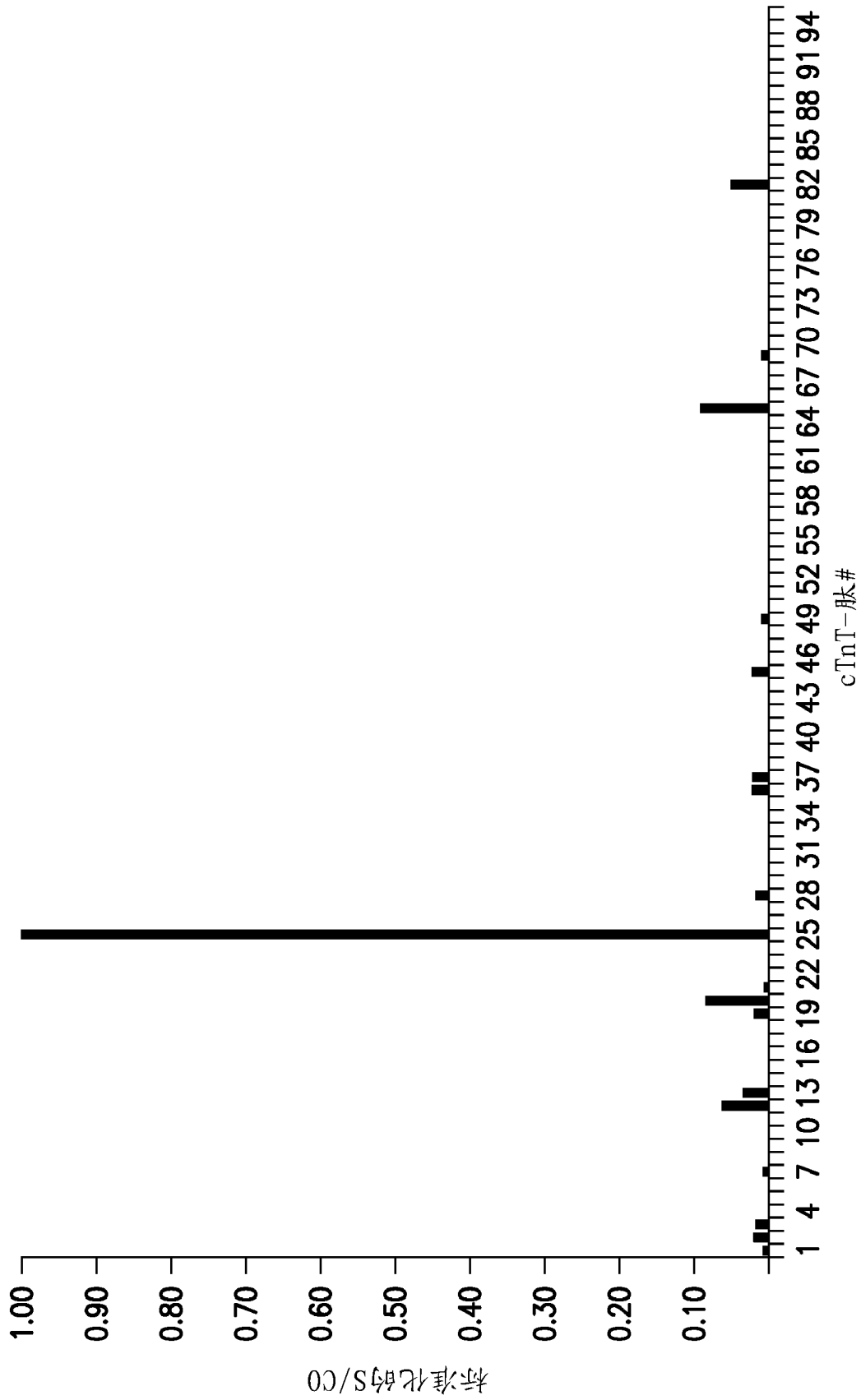


图 4

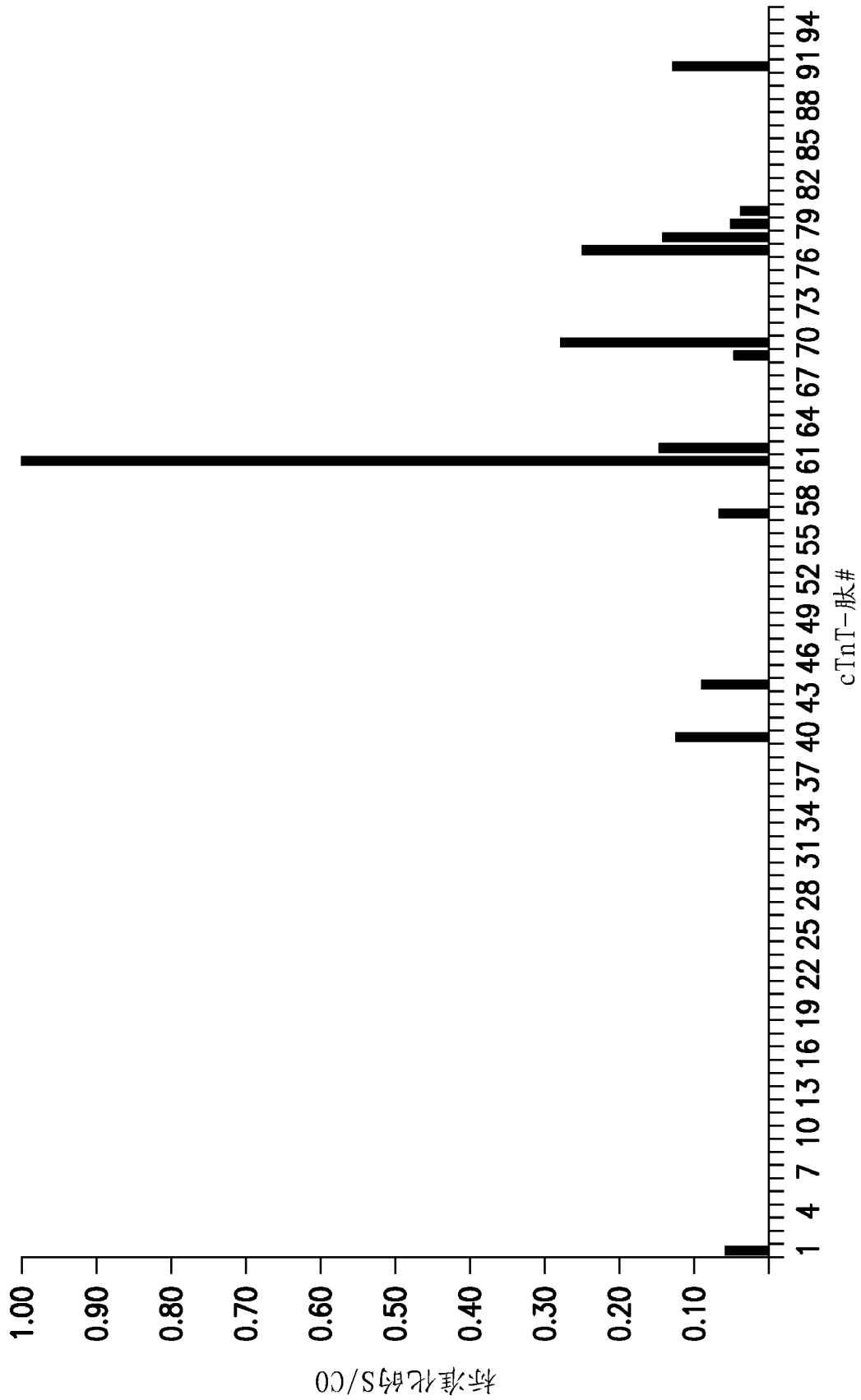


图 5

ADGSSDAARE PRPAPAPIRR RSSNYRAYAT EPHAKKSKI SASRKLQLKT
LLLQIAKQEL EREAEEERGE KGRALSTRCQ PLELAGLGFA ELQDLRQLH
ARVDKVDEER YDIEAKVTKN ITEIADLTQK IFDLRGKFKR PTLRRVRISA
DAMMQALLGA RAKESLDLRA HLKQVKKEDT EKENREVGDW RKNIDALSGM
EGRKKKFES

(209 aa)

图 6

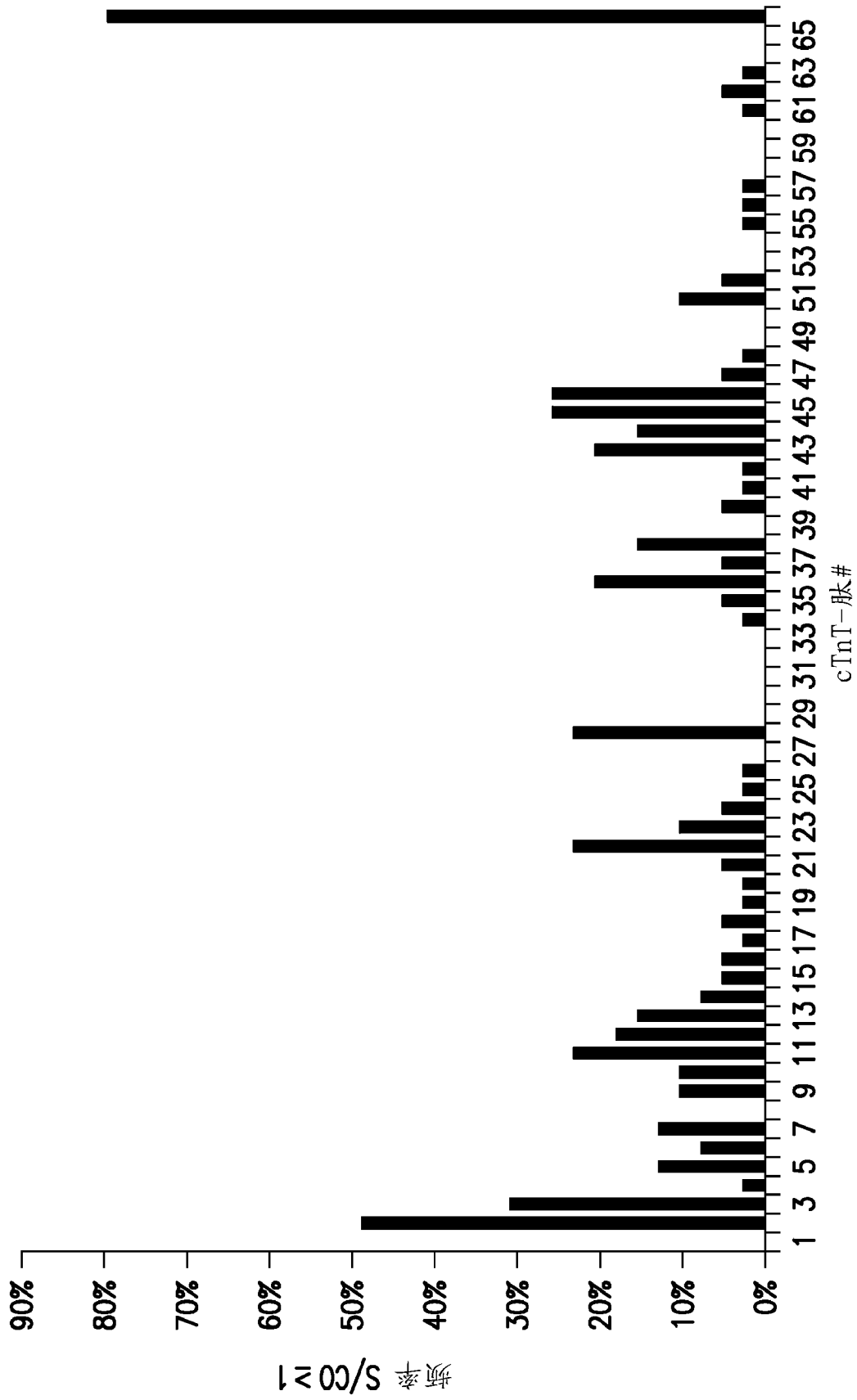


图 7

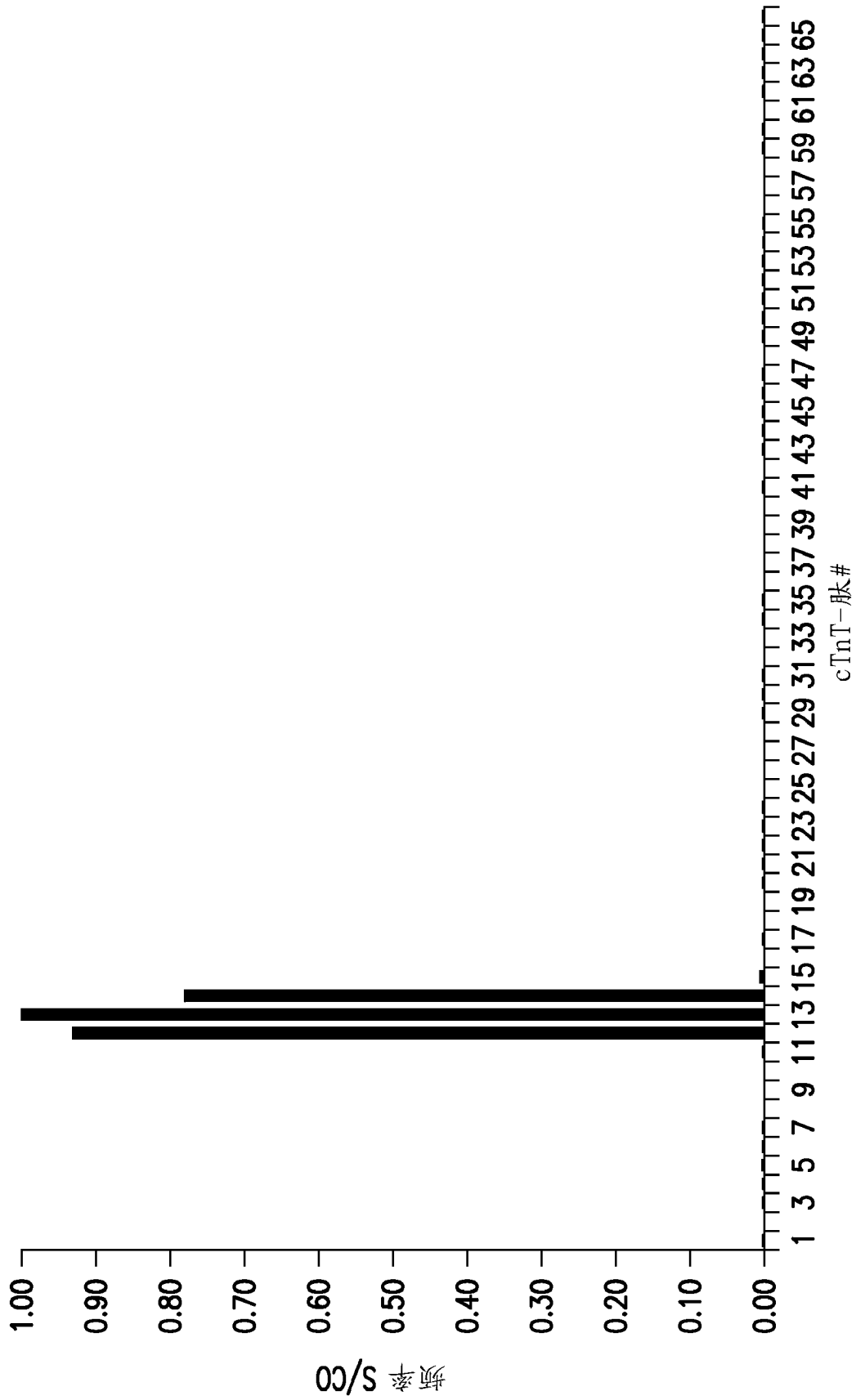


图 8

专利名称(译)	用于诊断心肌细胞损害的测定		
公开(公告)号	CN102725633B	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201080063154.5	申请日	2010-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药有限公司		
[标]发明人	M 亚当茨克 J R 布拉希尔 P G 马廷利		
发明人	M.亚当茨克 J.R.布拉希尔 P.G.马廷利		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6878 C07D219/14 G01N33/56966 G01N33/6893 G01N2333/4712 G01N2333/5412 G01N2333/58 G01N2800/325		
代理人(译)	李连涛 郭文洁		
优先权	12/630229 2009-12-03 US		
其他公开文献	CN102725633A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了用于诊断临床症状、评估危险或预测由于心肌细胞损害的后果的测定。通过测定测试样品中多数心肌细胞抗原的存在、且在单一测定结果中组合多重测定，免疫测定方法和试剂盒提供了心肌细胞损害的评估。

