

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02827567.5

G01N 33/53

G01N 33/573

G01N 33/534

G01N 33/533

G01N 33/543

[43] 公开日 2005 年 5 月 18 日

[11] 公开号 CN 1618017A

[22] 申请日 2002. 11. 26 [21] 申请号 02827567. 5

[30] 优先权

[32] 2001. 11. 27 [33] US [31] 60/333,133

[86] 国际申请 PCT/US2002/037861 2002. 11. 26

[87] 国际公布 WO2003/046140 英 2003. 6. 5

[85] 进入国家阶段日期 2004. 7. 26

[71] 申请人 迪尔基因国际有限公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 弗朗茨 诺尔

[74] 专利代理机构 北京中原华和知识产权代理有限公司

代理人 寿 宁

权利要求书 2 页 说明书 17 页

[54] 发明名称 用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒

[57] 摘要

本发明包含一种免疫化学测定法用于测定一个样本中至少两种抗原。免疫化学测定法包括使源于病人的样本与一个载体分子相接触，该载体分子包含至少两种捕捉抗体，每种抗体能够特异的结合到样品中抗原的结合部位上。该测定法进一步包含一种检测抗体，该抗体能够特异的结合到同一抗原上另一结合部位，该结合部位不同于捕捉抗体所结合的部位。检测试剂进一步结合到一个或多个检测探针上以便样本中抗原的检测。本发明的免疫化学测定法被特别设计以检测病人样本中在不同的时间间隔所释放的生物化学标记物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1、一种测定样本中至少两种抗原存在的方法，其特征在于其包括：
 - a) 将人或动物的样本与包含至少两种捕捉试剂的载体分子相接触，
5 每种具有对于不同抗原的结合特异性以形成反应混合物。
 - b) 将至少一种检测试剂加入到反应混合物中；并且检测样本中的至少两种抗原的浓度。
- 2、根据权利要求1所述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其特征在于其中的两个抗原分别为心脏特异性早期发作和晚期发作抗原。
- 10 3、根据权利要求2所述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其特征在于其中的早期发作抗原为糖原磷酸化酶 BB (GPBB) 和晚期发作抗原为心肌钙蛋白-I。
- 4、根据权利要求1所述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其特征在于其中的检测试剂和捕捉试剂包括抗体或抗体片段。
- 15 5、根据权利要求4所述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其特征在于其中的抗体包括单克隆，多克隆，人源化，人的，嵌合，重组，双特异性，多特异性抗体或其组合。
- 6、根据权利要求4所述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其特征在于其中的抗体片段包括 Fab, Fab(2)', Fc, Fv, 单链抗体或其组合。
- 20 7、根据权利要求1所述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其特征在于其中的样本来自于人。
- 8、根据权利要求1所述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其特征在于其中的样本包括组织，血液，唾液，血浆样本，淋巴液，脑脊髓液或血清。
- 25 9、根据权利要求1所述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其特征在于其中的检测是在体外进行。
- 10、根据权利要求1所述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其特征在于其中的方法进一步包括检测探针。
- 11、根据权利要求10所述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其
30 特征在于其中的检测探针包括：可检测的酶，辅基，顺磁性基团，荧光物质，发光物质，生物发光物质，放射活性物质，分散型染料，金颗粒或其组合。
- 12、一种用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其特
35 征在于其包含一种包括至少两种捕捉试剂的载体分子和进一步包含至少一种检测试剂，每种捕捉试剂特异性的结合到抗原的结合部位，检测试剂通过与捕捉试剂使用的所不同的结合部位与抗原结合。

13、根据权利要求12所述的用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其特征在于其中的样本包括病人的组织，血液，唾液，血浆，血清，淋巴液，或脑脊髓液。

5 14、根据权利要求13所述的用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其特征在于其中的患者为人。

15、根据权利要求12所述的用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其特征在于其中的生物化学标记物为GPBB和肌钙蛋白-I。

16、根据权利要求12所述的用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其特征在于其中的检测试剂进一步包含检测探针。

10 17、根据权利要求16所述的用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其特征在于其中的检测探针被偶联到检测试剂上。

18、根据权利要求16所述的用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其特征在于其中的检测探针不偶联到检测试剂上。

19、一种用于检测病人中的心肌梗塞的方法，包括：

15 a)将病人的样本与载体分子相接触，载体分子包括抗-GPBB的单克隆抗体，一种抗-肌钙蛋白-I的单克隆抗体，以及至少一种检测试剂。

b)检测样本中的GPBB和肌钙蛋白-I的浓度，其中的检测试剂既结合GPBB和肌钙蛋白-I，其结合部位与捕捉试剂所使用的不同；以及

c)在一个预定的时间用一个新的样本重复a)和b)。

20 20、根据权利要求19所述的用于检测病人中的心肌梗塞的方法，其特征在于其中的检测试剂包含一种或多种检测探针。

用于病人的样本中生物化学标记物的早期 和同步检测的免疫测定法和试剂盒

5

技术领域

本发明涉及一种用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒，特别是涉及一种在疾病或失调发生后的不同时间间隔内用于检测存在于生物样本中的生物化学标记物的组合物和方法。

10

背景技术

疾病诊断的延迟经常导致对组织永久性损害更大的风险或者甚至增加死亡的风险。在很多疾病中，有标记物分子其表达随着疾病的进展而增高。标记物分子为与疾病相关或由疾病产生的抗原，并且可以发生同步的浓度变化，随着疾病的进展而增高。因此，标记物分子的增高可能与病原性的增高相关联，然后发生疾病状况的恶化，举例来说，病毒抗原如 HIV，或者细菌抗原如沙门氏菌。患病的生物还可以对致病原和致病的条件反应，通过产生标记物或增加标记物的产量，该标记物不是正常存在或仅在生物体内以低水平存在，举例来说，心脏病人表现出 CK-MB, 肌钙蛋白-T 或 I 的水平增高。

20

有大量可用的生物化学标记物来检测或排除由突发事件如急性心肌梗塞 (AMI) 或伴随着 ST-T 变化的不稳定性心绞痛导致的对心脏肌肉细胞造成的缺血性损失。然而，大多数这些标记物既不是心脏特异性的而且在 AMI 后也不足以能够被早期检测到，因此不能用于早期检测。

25

检测血清中的肌氨酸激酶 MB 的同功酶 (EC2.7.3.2) 是当前体外检测中最广泛使用的，以确定心肌梗塞 (心脏病发作) 的诊断。然而，尽管这种检测通常能够提供令人满意的结果，一些缺点会限制着它的应用。其中的一个缺点就是在梗塞后仅有相对很短的一段时间使测试保持阳性 (24-48 小时)。在胸痛发作后超过 48 小时进入医院的病人，CK-MB 对于确诊心脏病发作通常没有作用。除此之外，骨骼肌组织通常包含少量的 CK-MB 同工酶，因此患有骨骼肌组织损失 (如汽车事故) 的病人有时会产生假的阳性结果使得心肌梗塞的诊断更为困难。

30

为了开始正确的治疗方案以使死亡率和发病率降至最低，对于诊断医师来说能够尽可能快的鉴定标记物是非常有利的。对于大多数检测试验，标记物达到可检测的浓度有一个迟滞时间。在心脏病发作的情况下，从胸疼发作到有可检测水平的 CK-MB, 肌钙蛋白-T 或 I 有 4-6 小时的延迟。肌红

35

蛋白能够更早的被检测到，但通常的检测具有很低的特异性。相应的，需要一种试验能够快速检测到样本中的微量水平的生物化学标记物。同时还需要一种试验能够监测心脏病发作的进展以及随后的梗塞的发生。

由此可见，上述现有的用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒在结构、方法与使用上，显然仍存在有不便与缺陷，而亟待加以进一步改进。为了解决用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒存在的问题，相关厂商莫不费尽心思来谋求解决之道，但长久以来一直未见适用的设计被发展完成，而一般产品又没有适切的结构能够解决上述问题，此显然是相关业者急欲解决的问题。

有鉴于上述现有的用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒存在的缺陷，本发明人基于从事此类产品设计制造多年丰富的实务经验及专业知识，并配合学理的运用，积极加以研究创新，以期创设一种新型结构的用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒，能够改进一般现有的用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒，使其更具有实用性。经过不断的研究、设计，并经反复试作样品及改进后，终于创设出确具实用价值的本发明。

20 发明内容

本发明的主要目的在于，克服现有的用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒存在的缺陷，而提供一种新的用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒，所要解决的技术问题是使本发明的免疫化学测定法被特别设计以检测病人样本中在不同的时间间隔所释放的生物化学标记物。

本发明的目的及解决其技术问题是采用以下技术方案来实现的。依据本发明提出的一种测定样本中至少两种抗原存在的方法，其特征在于其包括：将人或动物的样本与包含至少两种捕捉试剂的载体分子相接触，每种具有对于不同抗原的结合特异性以形成反应混合物。将至少一种检测试剂加入到反应混合物中；并且检测样本中的至少两种抗原的浓度。

本发明的目的及解决其技术问题还可采用以下技术措施进一步实现。

前述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其中的两个抗原分别为心脏特异性早期发作和晚期发作抗原。

前述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其中的早期发作抗原为糖原磷酸化酶 BB (GPBB) 和晚期发作抗原为心肌钙蛋白-I。

前述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其中的检测试剂和捕捉

试剂包括抗体或抗体片段。

前述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其中的抗体包括单克隆，多克隆，人源化，人的，嵌合，重组，双特异性，多特异性抗体或其组合。

5 前述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其中的抗体片段包括 Fab, Fab(2)' Fc, Fv, 单链抗体或其组合。

前述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其中的样本来自于人。

前述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其中的样本包括组织，血液，唾液，血浆样本，淋巴液，脑脊髓液或血清。

10 前述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其中的检测是在体外进行。

前述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其中的方法进一步包括检测探针。

15 前述的测定样本中至少两种抗原存在的方法，其中的检测探针包括：可检测的酶，辅基，顺磁性基团，荧光物质，发光物质，生物发光物质，放射活性物质，分散型染料，金颗粒或其组合。

本发明的目的及解决其技术问题还采用以下的技术方案来实现。依据本发明提出的用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其包含一种包括至少两种捕捉试剂的载体分子和进一步包含至少一种检测试剂，每种捕捉试剂特异性的结合到抗原的结合部位，检测试剂通过与捕捉试剂使用的所不同的结合部位与抗原结合。

本发明的目的及解决其技术问题还可采用以下技术措施进一步实现。

前述的用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其中的样本包括病人的组织，血液，唾液，血浆，血清，淋巴液，或脑脊髓液。

25 前述的用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其中的患者为人。

前述的用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其中的生物化学标记物为 GPBB 和肌钙蛋白-I。

前述的用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其中的检测试剂进一步包含检测探针。

30 前述的用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其中的检测探针被偶联到检测试剂上。

前述的用于病人中急性心肌梗塞早期检测的诊断测试试剂盒，其中的检测探针不偶联到检测试剂上。

35 本发明的目的及解决其技术问题还采用以下的技术方案来实现。依据本发明提出的一种用于检测病人中的心肌梗塞的方法，包括：a)将病人的样本与载体分子相接触，载体分子包括抗-GPBB 的单克隆抗体，一种抗-心

肌钙蛋白-I 的单克隆抗体, 以及至少一种检测试剂。b) 检测样本中的 GPBB 和肌钙蛋白-I 的浓度, 其中的检测试剂既结合 GPBB 和肌钙蛋白-I, 其结合部位与捕捉试剂所使用的不同; 以及 c) 在一个预定的时间用一个新的样本重复 a) 和 b)。

5 本发明的目的及解决其技术问题还可采用以下技术措施进一步实现。

前述的用于检测病人中的心肌梗塞的方法, 其中的检测试剂包含一种或多种检测探针。

本发明与现有技术相比具有明显的优点和有益效果。由以上技术方案可知, 为了达到前述发明目的, 本发明的主要技术内容如下:

10 本发明提出一种用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒, 本发明包含一种免疫化学试验用于在损失后的不同时间检测标记物和标记物的水平。本发明进一步包含一种免疫化学试验用于同步测定样本中的至少两种抗原, 包括将样本与包含至少两种能够特异性结合到至少一个抗原的结合部位的捕捉试剂相接触。免疫化学试验进
15 一步包含检测试剂其能够结合到已结合有捕捉试剂的抗原上。检测试剂还可以被偶联到检测探针上或者检测试剂可以被分别加入到样本中。作为选择, 载体分子还包含一种偶联有检测探针的检测试剂以及检测试剂能够特异性的结合到抗原上。本发明的试验能够被用来检测心脏特异性标记物糖原磷酸化酶 BB (GPBB) 以及心脏肌钙蛋白 I。

20 试验中的检测试剂和捕捉试剂可以包括抗体或抗体片段, 包括单克隆, 多克隆, 人源化, 人的, 嵌合的, 重组的, 双特异性的, 多特异性的抗体或其组合。抗体片段可以包括 Fab, Fab (2)' Fc, Fv, 单链抗体或其组合。

检测探针可以为可检测的酶, 辅基, 顺磁性基团, 荧光物质, 发光物
25 质, 生物发光物质, 放射活性物质, 分散质染料, 金颗粒或其组合。

本发明的一个进一步的实施例提供一种组合物其包含如上所述的载体分子, 并且还包含一种载体或稀释剂用于内部消耗。本发明的组合物能够被用于诊断或者治疗。

30 本发明的其它实施例提供用于检测样本中至少两种目的生物化学标记物。试剂盒包含一个载体分子, 其包含至少两种捕捉试剂, 并进一步包含至少一种, 优选的为至少两种检测试剂。每种捕捉抗原特异性的结合到抗体的结合部位, 并且检测试剂通过不同的结合部位结合到同一抗体上。检测试剂进一步包含检测探针, 其或者与检测试剂相偶联, 或者分别被提供到样本中。

35 综上所述, 本发明特殊结构的用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒, 其具有上述诸多的优点及实用价值,

并在同类产品及方法中未见有类似的结构设计及方法公开发表或使用而确属创新，其不论在产品结构、方法或功能上皆有较大的改进，在技术上有较大的进步，并产生了好用及实用的效果，且较现有的用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒具有增进的多项功效，从而更加适于实用，而具有产业的广泛利用价值，诚为一新颖、进步、实用的新设计。

上述说明仅是本发明技术方案的概述，为了能够更清楚了解本发明的技术手段，并可依照说明书的内容予以实施，以下以本发明的较佳实施例详细说明如后。

具体实施方式

为更进一步阐述本发明为达成预定发明目的所采取的技术手段及功效，以下结合附图及较佳实施例，对依据本发明提出的用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒其具体实施方式、结构、步骤、特征及其功效，详细说明如后。

本发明包含根据测试早期发作和晚期发作的生物化学标记物，来检测急性心肌梗塞(AMI)或对心肌的其它损伤发生的组合物和方法。本发明进一步包含用于在AMI发生后的不同时间对样本中的蛋白进行检测的免疫化学方法，为了能够跟踪AMI的进展并测定是否还有继发的梗塞。在AMI发作后不同时间检测存在的标记物使得能够早期检测缺血性心肌损伤从而可以进行早期治疗；通过利用只有心脏释放而其它类型的肌肉不释放的标记物实现诊断的特异性；监测继发的AMI；结果的直接评价和损伤严重程度的测量。

本发明包含一种免疫化学试验用于测定样本中的至少两种抗原，包括将样本与包含至少两种捕捉试剂和至少一种检测试剂的载体分子相接触。每种捕捉试剂特异性的结合到抗原的结合部位。检测试剂特异性的结合到同一抗原的不同于捕捉试剂所使用结合部位的其它结合部位。检测试剂进一步包含检测探针，其或者与检测试剂相偶联，或者分别被提供到样本中。本发明的免疫化学试验能够同步检测病人样本中不同时间释放的两种或更多不同的抗原的存在和数量。

定义

此处所述的“捕捉试剂”这一术语包括任何分子，举例来说：抗体或抗体片段，多肽或多肽片段，酶，蛋白，多肽复合物，多肽和碳水化合物复合物，核酸分子，或其它化学实体，只要其具有能够与至少一种的目的抗原相结合或相互作用的结合特异性。

此处所述的“检测试剂”这一术语包括任何分子，举例来说：：抗体

或抗体片段，多肽或多肽片段，酶，蛋白，多肽复合物，多肽和碳水化合物复合物，核酸分子，或其它化学实体，只要其具有能够与(a)至少一种的目的抗原和(b)至少一种检测探针的结合部位相结合或相互作用的超过两种的不同的结合特异性。相应的，检测试剂包括但不限于异种抗体，双特异性，三特异性，四特异性和其它多特异性分子，其结合一种目的抗原和一种检测探针。检测探针还可以结合到载体分子上。

此处所述的“检测试剂”这一术语是指或与检测试剂相偶联或与包含检测试剂的样本相偶联以便复合分子的鉴定的试剂。术语“检测试剂”包括能够与检测试剂相互作用的并形成检测试剂和探针复合物的探针。在一个实施例中，检测探针被标记上1个或更多，2个或更多，3-6，6-12，12-20，或者超过20个可检测的标记物。可检测的标记物的例子包括，但不限于，不同的酶，非肌基基团，荧光物质，发光物质，生物发光物质和放射活性物质。

此处所述的“特异性结合”这一术语包括抗体能够以比其它释放的抗原更高的亲合力与一种抗原相结合。典型的，抗体以至少约 $1 \times 10^7 M$ 的亲合力结合，其与预定的抗原结合是以超过至少两倍的与不同于预定抗原的非特异性抗原（如BSA，酪蛋白）或相关抗原结合的亲合力。例如，一个具有对肌钙蛋白I的特异性结合亲合力的抗体可以比与肌钙蛋白T更高的亲合力与肌钙蛋白I结合。

“识别一种抗原的一种抗体”这一短语与“对一种抗原特异的一种抗体”在次可以与“一种特异性结合抗原的抗体”这一术语可互换的使用。

此处所述的“载体分子”这一术语包括一个固相表面。固相表面不限于任何特殊形式。固相表面能够选自一系列本领域已知的，包括塑料管，小珠，微滴度板，乳胶颗粒，磁性颗粒，纤维素珠，琼脂糖珠，纸，量油计以及类似物。更为优选的，本发明的载体分子包括量油计。

此处所使用的“抗原”这一术语包括任何分子或者生物化学标记物，其用于本发明的免疫试验中能够被检测到。抗原包括，例如：作为疾病或紊乱的结果的在体内的任何新表达或表现出增加或降低表达的任何分子。此名词包括，如存在于体液中的小分子例如药物，毒素，自身抗体，自身抗原，蛋白，碳水化合物，核酸或者这些的组合。

此处所使用的“样本”这一术语包括包含抗原的混合物。优选的，样本得自于活的来源，如动物，举例来说为哺乳动物以及更为优选的为人。样本优选的为体液，即血液，血浆，唾液，尿液等，并且也包括组织样本。

此处所使用的“抗体或抗体片段”这一术语指能够特异结合到抗原上的抗体或片段。能够特异性的结合到一个分子上的抗体或片段能够被证实，通过免疫试验或其它对本领域技术人员已知的技术。

“重组抗体”这一术语包括能够通过重组方法被准备，表达，创造或分离的所有抗体，如噬菌体展示抗体，从转基因动物（如小鼠）中分离的抗体，用转入宿主细胞的重组表达载体表达的抗体，从重组组合抗体文库中分离的抗体，或通过其它方法被准备，表达，创造或分离的抗体，涉及到将免疫球蛋白的基因序列与其它 DNA 序列相拼接。

“单克隆抗体”这一术语包括表现为对特定抗原表位具有单一结合特异性和亲合力的抗体。优选的，这些抗体为哺乳动物抗体，包括鼠，人和人源化抗体。

“人单克隆抗体”这一术语指展示出单一结合特异性的抗体，其具有来源于人系的免疫球蛋白序列的可变区和稳定区。在一个实施例中，人单克隆抗体产自于杂交瘤，包括得自于转基因非人动物的 B 细胞，如转基因小鼠，其具有的基因组包括一个人的重链转基因和一个轻链转基因融合到永生细胞中。

“人源化抗体”这一术语指来自于非人种的抗体分子具有一个或更多个来自于人的互补决定区 (CDRs) 和来自于人免疫球蛋白分子的框架区（参见 U. S. Patent No. 5, 585, 089, 以整个该专利作为参考文献包含于此文中）。这些嵌合抗体和人源化单克隆抗体能够被本领域已知的重组 DNA 技术产生，例如用 U. S. Patent Nos. 4, 816, 567 和 5, 225, 539 中所描述的方法，这些都以其整个专利作为参考文献包含于此文中。

“嵌合抗体”，根据本发明，用重组或化学的方法制造。例如，重组嵌合抗体通过将具有正确的抗原特异性的单克隆抗体的基因和正确的生物活性的第二抗体基因相拼接而成。更为特殊的，嵌合抗体可以通过将编码抗体可变区的基因和第二抗体分子的稳定区基因相拼接而成。这种方法被用来产生人源化单克隆抗体，其互补决定区为小鼠的，而框架区为人的（参照，U. S. Patent Nos. 4, 816, 567; 4, 816, 397; 5, 693, 762; 5, 585, 089; 5, 565, 332 和 5, 821, 337, 每个都以其整个专利作为参考文献包含于此文中）。

此处所使用的“肌钙蛋白”这一术语指异构型肌钙蛋白复合体或独特的肌钙蛋白异构型。有九种肌钙蛋白型包括：1) 心脏三重复合体；2) 心脏肌钙蛋白 I (氧化) /T 的二重复合体；3) 心脏肌钙蛋白 I (还原) /T 的二重复合体；4) 心脏肌钙蛋白 I (氧化) /C 的二重复合体；5) 心脏肌钙蛋白 I (还原) /C 的二重复合体；6) 心脏肌钙蛋白 T/C 的二重复合体；7) 未结合的心脏肌钙蛋白 I (氧化)；8) 未结合的心脏肌钙蛋白 I (还原)；以及 9) 未结合的心脏肌钙蛋白 T。如此处所使用的，未结合的肌钙蛋白为没有存在于复合体中的肌钙蛋白。肌钙蛋白复合体可以为双重的或者三重的。

大量的生物化学标记物可以用于检测或排除心肌梗塞 (AMI) 或伴随着 ST-T 变化的不稳定性心绞痛导致的对心脏肌肉细胞造成的缺血性损失。然而, 大多数这些标记物既不是心脏特异性的而且在 AMI 后也不足以能够被早期检测到, 因此不能用于早期检测。能够被用于本发明的试验中的标记物的例子包括, 但不限于, 肌钙蛋白, 包括

异构型肌钙蛋白复合体或独特的肌钙蛋白异构型 (即, 肌钙蛋白-I, 肌钙蛋白-C, 肌钙蛋白-T), 原肌球蛋白, 肌动蛋白, GPBB, 药物 (即, 巴比妥酸盐, 三环抗抑郁药以及毛地黄), 肿瘤抗原 (即, 与乳腺癌, 前列腺癌, 脑癌, 肝癌, 肾癌, 结肠癌, 胰腺癌, 胃癌或肺癌相关联的抗原), 病毒抗原 (即, 与 HIV, 流感病毒或其它病毒相关联或由其产生的抗原), 细菌抗原, 激素 (即, 甲状腺刺激激素 (TSH), 人生长激素, 黄体激素, 睾丸激素, 人绒毛膜促性腺激素 (hCG)), 血浆蛋白 (即纤维蛋白降解产物 (FDP), C-反应蛋白 (CRP), 癌胚抗原蛋白, 甲胎蛋白 (AFP), 癌胚抗原 (CEA)), 噬菌斑抗原, 半抗原 (即, 血管收缩素 I, 后叶加压素, 生长激素抑制素, 心房心钠激素, 内皮丝氨酸, 促黄体激素释放激素 (LH-RH), 肛褶蛙肽或其它多肽), 类固醇 (即氢化可的松), 以及细胞因子如白介素-1 (IL-1), 干扰素-alpha, 干扰素-beta, 干扰素-gamma, 白介素-2 (IL-2), 白介素-4 (IL-4), 白介素-6 (IL-6), 白介素-7 (IL-7), 白介素-12 (IL-12), 白介素-15 (IL-15), B7, CD28, 或其它 Ig 超家族的成员。

本发明还进一步包含使用糖原磷酸化酶的 BB 异构酶作为心脏肌肉损伤的早期启动抗原。不希望被任何特定的理论所限制, 糖原磷酸化酶异构酶 BB (GPBB) 被报道为缺血性心脏紊乱的早期检测的关键性酶 (Mair J., Clin Chim Acta 6; 272: 79-86 (1998))。相当多量的 GPBB 仅在人心脏和脑中发现。在胸疼后 2 小时内可在血中检测到 GPBB。在具有不稳定的绞痛和可逆的 ST-T 变化的病人被抑郁接受后在静止心电图 GPBB 水平也可早期升高, 这可以用于风险分层。GPBB 为心脏特异性的, 其在出现心肌的缺血性损伤后 16-24 小时后在血中消失。该酶短暂的寿命时间使其能够用作梗塞重建的指示, 例如在经过手术后, 可简单的通过检测 GPBB 升高的水平。

本发明还包括免疫化学试验和诊断的方法, 包括将 GPBB 作为早期启动标记物以及一种晚期启动标记物, 对于在心肌中的缺血性诱导的损伤具有特异性。这种晚期启动标记物可优选的为心脏肌钙蛋白-I。血清中的心脏肌钙蛋白为心脏肌肉细胞的结构蛋白, 因此, 其释放是作为心脏肌肉开始坏死的标志。晚期标记物, 心脏肌钙蛋白-I 在胸疼开始 4 小时后出现在循环中; 其在循环中的寿命时间显著的长于 GPBB。因此心脏肌钙蛋白-I 的测量允许在缺血性损伤发生多小时或多天后能够进行诊断。

本发明包含具有增强的特异性的检测试验的组合物和方法。这通过使

用能够结合到至少两种抗原的载体分子来实现，该抗原在疾病发作后不同时间间隔中存在于病人样本中。

特别的，载体分子包含至少两种捕捉试剂，而且还包含至少一种检测试剂。每种捕捉试剂结合到一种不同的抗原或者标记物上。检测试剂可以为载体的部分或者被分别加入。检测试剂以不同的结合部位与已和捕捉试剂相结合的抗原进行结合。检测试剂进一步包含检测探针，其或者偶联到检测试剂上或者被分别加入到样本中。

本发明进一步包含用于检测样本中存在的至少两种抗原的方法，包括将得自于人或动物的样本与包含至少两种捕捉试剂的载体分子相结合，每种载体分子具有对不同抗原的结合特异性以形成反应混合物。检测试剂然后被加入到反应混合物中。然后测定样本中至少两种抗原的浓度。

本发明的免疫化学试验优选的被用于检测心肌梗塞的发作。根据此点，本发明的特色为一种用于检测心肌梗塞的方法，包含将人样本与包含两种捕捉试剂的载体分子相结合形成反应混合物的步骤。一种捕捉试剂结合到 GPBB 的结合部位，另一种捕捉试剂结合到肌钙蛋白-I 的结合部位。检测试剂被加入到反应混合物中，其中检测试剂包含一种反应物，优选的为特异于 GPBB 和肌钙蛋白-I 的单克隆抗体，其结合部位与固定到固相上的捕捉抗体的结合部位不同。检测试剂还结合到检测探针上。本发明的免疫试验能够同步检测肌钙蛋白-I 和 GPBB。一个进一步的实施例包括具有载体试剂和检测试剂的载体分子。

根据本发明的另一实施例，在不同时间从病人中取得样本，例如在怀疑有心肌梗塞后，以在试验中进行检测以跟踪疾病的进展或检测随后的心肌梗塞。

本发明的一个进一步的实施例包括一种用于检测病人的心肌梗塞的方法，包括：将得自于病人的样本与载体分子相接触，载体分子包含抗-GPBB 的单克隆抗体，抗心脏肌钙蛋白-I 的单克隆抗体，和至少一种检测试剂，以及检测样本中的 GPBB 和肌钙蛋白-I 的浓度，其中检测试剂能够与 GPBB 和肌钙蛋白-I 在未被捕捉试剂所使用的结合部位进行结合。试验能够用新的样本在超过延长的时间进行重复以监测损伤的进展和监测任何随后的梗塞。

根据本发明的一个实施例，捕捉试剂，检测试剂，或两者为抗体或抗体片段。在本发明的一个优选的实施例中，抗体为单一特异性，双特异性，或多特异性的抗体。用于制备双-和多特异性分子的方法被描述，如，U. S. Patent Nos. 5,260,203；5,455,030；4,881,175；5,132,405；5,091,513；5,476,786 以及 5,013,653，每个都以其整个专利作为参考文献包含于此文中。

在一个优选的实施例中，双特异性或多特异性的抗体具有一个第一可变区，其具有对一个能够被检测的分子的特异性，以及一个第二可变区，其具有对第二个分子的特异性。抗体被连接到一个聚合体上，其中聚合体被连接到至少 1，或更多，优选的为 2 或更多检测分子上。

5 特别的，检测抗体包含两个特异于两种目的抗原的结合区以便检测，另一个结合区特异于一个被单独加入的探针。

根据本发明的一个实施例，抗体部位被联结形成抗体结合物。抗体结合物包括异种抗体，其指两种或更多种抗体或抗体片段相联结，其中的抗体结合物具有至少两种不同特异性的结合区。这些不同的特异性可以是有利的，包括例如对于检测探针的结合部位的结合特异性，以及对于两种目的抗原即 GPBB 和心脏肌钙蛋白抗原的结合特异性。

根据发明的其它实施例，抗体或抗体片段可以重组方式制得。在本发明的一个优选的实施例中，抗体或抗体片段为单克隆抗体。在另一个实施例中，抗体或抗体片段通过个体单克隆抗体的分离产生，将每个特异性抗体的两硫键连接断裂，随后在体外将抗体重链和轻链多肽重组（参见，例
15 如 Arathoon et al., W098/50431）。在另一个实施例中，本发明在免疫化学试验中使用一个或更多个嵌合抗体。

本发明的抗体，包括免疫球蛋白分子的免疫活性片段，即 F(ab)和 F(ab')₂ 片段，其能够通过用酶如胃蛋白酶和木瓜蛋白酶处理抗体来产生。
20 产生和表达抗体的免疫活性片段的方法的例子能够在 U.S. Patent No. 5,648,237 中发现，其以其整个专利作为参考文献包含于此文中。

免疫球蛋白分子由基因编码，其包括 kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon 和 mu 稳定区，以及任何数字的免疫球蛋白的可变区。轻链被证实为或者为 kappa 或为 lambda。轻链包括可变轻链 (VL) 和稳定轻链
25 (CL) 区。重链被证实为 gamma, mu, alpha, delta 或为 epsilon，其被分别定义为免疫球蛋白亚类 IgG, IgM, IgA, IgD 和 IgE。重链包括可变重链 (VH)，稳定重链 1 (CH1)，绞链，稳定重链 2 (CH2)，以及稳定重链 3 (CH3) 区。人 IgG 重链被进一步根据序列变化分为亚类，亚类被命名为 IgG1, IgG2, IgG3 和 IgG4。

30 抗体能够被进一步分解成两对轻链和重链区。配对的 VL 和 VH 区每个都包含一系列七个亚区：结构区 1 (FR1)，互补决定区 1 (CDR1)，结构区 2 (FR2)，互补决定区 2 (CDR2)，结构区 3 (FR3)，互补决定区 3 (CDR3)，结构区 4 (FR4)，其组成抗体-抗原识别区。

在另一个实施例中，本发明用单链抗体 (scFv)，其通常包含一个融合
35 多肽，其由一个轻链的可变区和重链的可变区通过一个多肽连接物融合而成。

能够通过将抗体与可检测的标记物相偶联来促进检测。可检测的标记物的例子包括但不限于，不同的酶，辅基，荧光物质，发光物质，生物发光物质，放射活性物质，分散质染料，金颗粒。适当的可检测标记物的例子，如上所述，包括适当的酶，即辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶，beta-半乳糖酶或乙酰胆碱酯酶；适当的辅基的例子包括，但不限于链霉菌抗生物素蛋白/生物素蛋白和抗生物素蛋白/生物素蛋白；适当的荧光物质的例子包括但不限于伞形酮，荧光素，荧光素异硫氰酸酯，若丹明，二氯三嗪铵荧光素，丹磺酰氯或藻红蛋白；发光物质的例子包括，但不限于发光氨，生物发光物质的例子包括但不限于荧光素酶，荧光素和水母发光蛋白；以及适合的放射活性物质包括但不限于 ^{125}I ， ^{35}S ， ^{14}C ， ^3H ， $\text{Tc}^{99\text{M}}$ 或 Mg^{52} 。抗体能够被偶联到同一或不同的检测标记物上。

商业上可得到的抗体能够被买到并用来产生检测试剂，例如从 ATCC. RTM。在本发明的优选的实施例中，抗体由商业上可得到的杂交瘤细胞系产生。在一个更为优选的实施例中，杂交瘤分泌人抗体。

所有已经存在的用于检测血清酶的 ELISA，放射免疫试验和量油计试验，以及任何用抗体的试验能够根据本发明提供的增强敏感度的方法进行修改。此外，通过使用本发明的方法在体外增强靶信号的应用也是可行的。

本发明的捕捉试剂能够被直接固定到固相表面，或被通过本领域技术人员已知的方法在免疫试验孵育中（原位）被固定。捕捉试剂可优选的被固定在载体分子的表面。用于在载体分子表面固定捕捉试剂的方法为但不限于任何特定方法并包括例如，被动吸收，共价连接，物理捕获等。例如，固相表面能够包被和/或检测试剂能够用抗生物素蛋白或链霉菌抗生物素蛋白来标记。

可替换的，捕捉试剂或检测试剂能够在液相中被加入到包含目的抗原的生物液中，尽管如上所示，捕捉试剂和检测试剂可以优选的被固定到载体分子上。

根据本发明的实施例，抗体具有对于一个或多个此处所列举的蛋白的特异性结合亲合力。例如，抗体只对于肌钙蛋白-I 而不是肌钙蛋白-T 具有特异性结合亲合力。一种抗体具有两种或更多个蛋白的特异性结合亲合力，因为，例如：(a) 抗体与两个蛋白上保守的分立的抗原表位结合，或 (b) 抗体结合到两个蛋白的分开和连接的表位。在例子 (a) 中，抗体可以分别的结合到蛋白上，然而在例子 (b) 中，抗体能够结合到蛋白上，当该蛋白与另一蛋白组成复合体时。

由心脏释放的肌钙蛋白的形式，无论是游离的或者为双重或三重复合体，可以表明心脏的特定状况。此处所描述的试验提供对标记物释放模式的分析，其允许医师诊断病人的病情，例如，不稳定的绞痛与心肌梗塞相

比，或者缺点梗塞发生的时间。

根据发明的其它实施例，载体分子包含特异于肌钙蛋白-I 或肌钙蛋白-T 的抗体，以及特异于 GPBB 并进一步结合到一种或更多种检测探针的第二抗体。肌钙蛋白-I 为位于肌肉收缩器官的细纤维丝肌钙蛋白复合体的三个亚单位之一。这种肌钙蛋白复合体在控制肌肉收缩的过程中扮演中枢性作用，因此这三种亚单位被称为调控蛋白。其它两种亚单位（命名为 T 和 C）也和肌钙蛋白-I 一起被固定在心脏和肌肉组织的肌原纤维细丝上。肌钙蛋白-I 被心脏中，慢骨骼肌和快骨骼肌组织中的不同基因所编码。人的这三种形式的肌钙蛋白之间约有 60%的氨基酸序列是同源的。心脏形式的不同区域使其能够产生与另外两种骨骼肌形式不交叉反应的抗体，因此使心脏特异性检测成为可能。

Cummins 等在 American Heart Journal 113:1333-1344(1987)中描述了用于检测人血清中心肌钙蛋白-I 的放射免疫试验的发展。这种试验利用了多克隆抗体的与肌钙蛋白-I 的骨骼肌形式显著交叉反应活性，其限制了它在确诊心肌梗塞中的价值。此外，检测不足够敏感以检测血清中低水平的肌钙蛋白-I。

Bodar 等在 Clinical Chemistry 38:2203-2214(1992)中描述了用于检测血清中的肌钙蛋白-I 的两个单克隆抗体的“三明治”试验。这种试验表明由于鼠单克隆抗体的使用增进了心脏特异性。试验的不严密性对于实验室检测是不可接受的高（11-21%的变异系数）。

根据本发明的一个方面，提供了用于检测至少样本中至少两种目标生物化学标记物。试剂盒包含一种包括了至少两种捕捉试剂的载体分子，以及至少一种检测试剂，每种捕捉试剂特异的结合到抗原的结合部位，检测试剂通过不同结合部位结合到同一抗原上。检测试剂进一步包括一种检测探针，其或与检测试剂相偶联或被单独提供到样本中。

根据本发明的其它方面，一种诊断或治疗的组合物被公开，其能够在体内或体外结合至少两种生物化学标记物。特别的，组合物包含一种载体分子，其具有至少对至少两个抗原有结合特异性的两种捕捉试剂，进一步包含一种检测试剂，其具有对同一抗原的结合特异性，并进一步包含一种检测探针。在一个实施例中，检测试剂为针对肌钙蛋白-I 和 GPBB 所产生的双特异性抗体。在其它实施例中，检测试剂包含两种分别针对肌钙蛋白和 GPBB 所产生的两个单克隆抗体。

此处以及附录的权利要求所使用的，单数形式“a”，“an”以及“the”包括其复数所指除非上下文清楚的表明并非如此。因此，例如，提到一种“复合物”是指一个或多个此种复合物并包括对于本领域技术人员所知的等价物等。

除非另作定义，此处所使用的技术和科学术语具有和本发明所属领域的普通技术人员所通常理解相同含义。尽管和此处所描述的相似或等等的任何方法，仪器和物质都能够用于本发明的应用或检测，此处所描述的方法，仪器和物质。

5 此专利所提及的所有出版物和专利都作为参考文献包含于此用来描述和公开，例如，专利中所描述的构建物和方法，其能够被用来与本专利所描述的相联系。以上所讨论的出版物和全部文本完全被提供因其公开早于本申请的申请日。此处没有构建发明人依靠前面发明来使本专利申请被提前授权的内容作为申请。

10 本发明不受此处所描述的特定剂型，过程步骤和物质所限制很容易被理解，因为这些剂型，过程步骤和物质都可以发生某种程度的变化。也能够被理解即此处所使用的术语只是用来描述特定的实施例并不意味着限制，因为本发明的范围仅受附加的权利要求和其等价物所限制。本申请中所引用的所有参考文献，专利和发表的专利申请作为参考文献被清楚的包含于此。

实施例

实施例 1. 用于缺血性心脏诊断的免疫化学实验

免疫化学实验是基于使用固相载体分子，包含两个位点结合的实验，其使用两种不同的单克隆抗体 (mAb)，一个针对早期发作标记物 GPBB，另一个针对晚期发作标记物肌钙蛋白-I。这两种单克隆抗体在固相的不同位点被吸收。吸收的抗体作为“捕捉抗体”，其特异的结合到存在于病人血液中的标记物上。一个抗早期发作和晚期发作标记物上的不同抗原表位的抗体被用酶或荧光染料或分散染料或金颗粒染色。这种抗体被作为对结合到固相的位点 1 和 2 的抗原的“检测抗体”。针对早期发作以及晚期发作标记物的捕捉抗体结合到标记物的不同抗原表位上因此产生了 2 位点结合检测。数据表明急性心肌梗塞 (AMI) 的早期阶段，即胸疼/胸骨后发作 2-4 小时后在固相的位点 1 上为可测量的。AMI 的峰 (胸疼后 4-16) 在 1 位点和 2 位点可以被测量，AMI 的晚期阶段仅在 2 位点可以被测量。

30

实施例 2. 肌钙蛋白-I 的纯化

为生成鼠抗-肌钙蛋白-I 抗体，心脏肌钙蛋白-I 首先按照 Syska 等, FEBS Letters 40: 253-257 (1974) 如下的方法进行分离。约有 500mg 的肌钙蛋白-I 被偶联到 ACTIGEL-ALD 胶上 (Sterogene Corporation, Arcadia, Calif.), 通过用 10mM 磷酸钾, 1M 氯化钾, pH6.5 的缓冲液 (偶联缓冲液) 来清洗 50 毫升的凝胶。肌钙蛋白-C 然后被加入到凝胶中, 硼氢化氰钠被

35

加入最终浓度为 0.1M。产生的悬浮液在室温下被搅拌 4 小时，并被到入小柱中以收集凝胶。凝胶然后用 225ml 的偶联缓冲液洗。凝胶从小柱中移出并加入到 150 毫升 10mM 磷酸钾，1M 氯化钾，pH6.5，包含 0.1M 氨基乙醇的溶液中。悬浮液在 4℃ 搅拌过夜以封闭任何未反应的偶联基团。然后凝胶被放入到小柱中并用 150 毫升的偶联缓冲液清洗，最终形成 100 毫升的磷酸钠，pH7.2，包含 0.15M 氯化钠和 0.05% 叠氮化钠的溶液。

人的心脏被整理并在 4℃ 被切成 1 厘米的条。所产生的组织在室温下在 750 毫升的 75mM，pH8.0 的包含 8M 尿素，15mM 巯基乙醇和 1mM 的氯化钙 Tris 缓冲液均质化。

产生的组织匀浆在 7000 × g 离心 30 分钟，所产生的上清液通过粗棉布过滤并除去颗粒。上述制备的肌钙蛋白-C 偶联凝胶被放入小柱中并用 250ml 的抽提缓冲液在室温清洗。产生的上清液在室温搅拌 80 分钟然后在 7000 × g 离心 20 分钟。上清液被丢弃，沉淀凝胶被用抽提缓冲液转入到小柱中。小柱在室温下用 700 毫升的抽提缓冲液清洗，纯化的肌钙蛋白-I 然后被用 75mM Tris 缓冲液，pH8.0，包含 8M 尿素，15mM 巯基乙醇和 10mM 乙二胺四乙酸（洗脱缓冲液）从小柱中洗脱。含有显著数量肌钙蛋白-I 的片段被收集并被加入 75mM Tris 缓冲液，pH8.0，包含 15mM 巯基乙醇和 10mM 乙二胺四乙酸。产生的溶液在氮压下被离心。

实施例 3. 鼠抗肌钙蛋白-I 抗体的制备

按照前面的实施例 2 的步骤所得到的纯化肌钙蛋白-I，与等体积的弗氏佐剂混合。产生的混合物被均质化以产生液体/油乳状液，其构成了起始的免疫原。鼠通过注射包含的 250ug 的心脏肌钙蛋白-I 免疫原进行初始免疫。然后鼠被每月注射 250ug-500ug 的纯化的心脏肌钙蛋白-I 作为免疫原，然后他们在每个月注射后的约 7-10 天后被取血以提供鼠抗-肌钙蛋白-I 血清。

实施例 4. 心脏特异性肌钙蛋白-I 抗体的分离和纯化

在实施例 3 中制备的抗血清被收集，其中 56ml 被用 56ml 的包含 0.15M 氯化钠的 5mM pH7.2 的咪唑缓冲液稀释。苯甲基磺酰基氟 (PMSF)，亮肽素，抑肽酶和抑胃肽 A 被加入最终浓度分别为 15ug/ml，0.5ug/ml，和 0.75ug/ml 以抑制抗血清中的蛋白酶。在实施例 2 中合成的肽凝胶被加入到稀释的抗血清中并在室温下搅拌 1 小时。产生的混合物被转入到小柱中并在室温下用 55ml 的包含 0.15M 氯化钠和 0.05% 的叠氮化钠的 5mM pH7.2 的咪唑缓冲液清洗。纯化的心脏特异性抗体被从 55ml 的第一洗脱液从凝胶中洗脱，随后用 55ml 的第二缓冲液（包含 3M 硫氰酸钠和 0.05% 的叠氮

化钠 5mM pH7.0 的咪唑缓冲液)。包含在这些洗脱物中的纯化抗体被透析，最终稀释浓度为 10^9 在包含 0.15M 氯化钠和 0.05% 的叠氮化钠的 10mM pH7.2 的磷酸钠缓冲液。产生的透析物然后被在 $7000 \times g$ 离心 15 分钟以除去未溶解物质。产生的包含纯化的心脏特异性肌钙蛋白-I 抗体的上清液的蛋白浓度被用分光光度测定。

实施例 5. 肌钙蛋白-I-碱性磷酸酶复合物的制备

通过实施例 3 方法制备的肌钙蛋白-I 被通过下述步骤化学连接到碱性磷酸酶上。肌钙蛋白-I 用 25ul 的 SATA 处理 (N-琥珀酸-S-硫代乙酰乙酸)。在反应溶液在室温下搅拌 30 分钟，溶液在 2 升的包含 2mM EDTA 的 pH7.5 的 50mM 磷酸钠中于 4°C 透析过夜。SATA 修饰的肌钙蛋白-I 被通过加入羟胺使其终浓度为 50mM 去乙酰化并溶液在室温下保持 2 小时。修饰的肌钙蛋白-I 在 2 升的包含 2mM EDTA 的 pH7.2 的 30mM 三乙醇胺中透析过夜。从小牛的肠中得到 6mg 的碱性磷酸酶 (AP) (Biozyme Corporation, San Diego, Calif) 在 1.55ml 的体积中，被放置到玻璃检测管。新鲜的硫代-SMCC (硫代琥珀酸 4-N-maleimidomethyl-环己胺-1-羧化酯) 溶液被制备，在去离子水中浓度为 5mg/ml。全部的 87ul 的 SMCC 溶液被加入到 AP 中并在室温下搅拌 1 个小时。

修饰的 AP 溶液然后被在 2 升的包含 5mM 氯化镁和 1mM 氯化锌的 pH7.2 的 30mM 三羟乙基胺中于 4°C 透析过夜。巯基乙胺和碘乙酰胺被加入到溶液最终浓度为 10mM 并在室温下搅拌 20 分钟。产生的 AP 连接到肌钙蛋白-I 的复合物被通过 SEPHACRYL S-300 的柱 (Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, N. J.) 中以从未反应产物中纯化 AP 肌钙蛋白-I 连接物。

实施例 6. 肌钙蛋白-I 免疫实验竞争性结合

根据实施例 4 制备的纯化肌钙蛋白-I 抗体被稀释到在 100mM 包含 0.05% 叠氮化钠 pH4.0 的柠檬酸钠溶液中为 10ug/ml。抗体在室温下在 100ul 聚苯乙烯微滴度板中包被过夜。微滴度板用 10mM 包含 1M 氯化钠的 pH7.2 的 Tris 缓冲液清洗三次并用包含 10mM pH7.2, 10% 葡萄糖酸, 1% 牛血清白蛋白和 0.05% PROCLIN™ 300, 5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-1 (CAS 26172-55-4), 2-甲基-4-异噻唑啉-3-1 (CAS 2682-20-4), 烷基羧酸酯, 修饰的异二醇的溶液封闭。超量的液体被从微滴度板孔中吸出并且板在室温下干燥。抗体包被的平板被储藏于 4°C 直到使用。如实施例 2 中所制备的纯化的心脏肌钙蛋白-I 在无肌钙蛋白-I 的正常人血清中稀释到最终浓度为 5, 25 和 50ng/ml 以提供免疫测定。肌钙蛋白-I 标记的碱性磷酸酶在 50mM pH7.4 三羟乙基胺, 1mM 氯化镁, 0.1mM 氯化锌和 0.05% 叠氮化钠的溶液中被稀释到 5ug/ml

浓度。

血清样本或肌钙蛋白-I 标准被一式两份的加入到前述由抗体包被的微滴度板孔中。然后肌钙蛋白-I 标记的 AP (80u1) 被加入到板中并在室温下孵育 2 小时。微滴度板用去离子水清洗五次并且 0.83mg/ml 旁磷酸硝基磷酸在包含 5mM 氯化镁, 0.1mM 氯化锌, 0.02%TWEEN 20, 和 0.05%PROCLIN 300 的 25mM pH9.80 二羟乙基胺的底物溶液 (100u1) 被加入到所有的孔中。底物溶液被在室温下孵育 30 分钟并且通过加入 100u1 的 2N 氢氧化钠来中止反应。在微滴度板中溶液的吸收用适当的计数仪在 405nm 读数。

10 实施例 7. 生物素化的肌钙蛋白抗体和抗生物素蛋白-HS 磁性胶乳的制备

生物素-琥珀酸酯 (6-((6-((生物素化)氨基)己酰)氨基))己酸, 琥珀酸酯, 在 40mM 二甲基甲酰胺被缓慢加入, 通过将抗体溶液以 2mg/ml 混合到 50mM 硼酸钾, 150mM 氯化钠, pH8.2 溶液 (BBS) 中以实现最终摩尔比率为 20/1 生物素/抗体。溶液在室温下孵育 2 小时, 然后溶液在 4°C 中被透析至少 12 小时。

1 毫升的 Estapor Paramagnetic 乳胶颗粒在水中以至少 10%的固体被加入到 9ml 的 0.55mg/ml 抗生物素蛋白-HS (Scripps Laboratories, San Diego, Calif.) 在 50mM Tris 氯化氢, 150mM 氯化钠, pH7.5、乳胶溶液在 45°C 中孵育 2 小时。乳胶被清洗三次, 每次用 10ml 的 BBS, 并重新悬浮于 10ml 的 BBS 中。

实施例 8. 人心肌钙蛋白-I 和肌钙蛋白-T 的免疫测定法

下列免疫测定法被用来检测肌钙蛋白-I 和肌钙蛋白-T, 存在于人的血清, 血浆, 或者在包含纯化蛋白的溶液。

包含肌钙蛋白-I 或肌钙蛋白-T 的样本被稀释到 1-10ng/ml 肌钙蛋白-I 或肌钙蛋白-T 在包含 10mM 3-(N-吗啉)丙烷磺酸, 650mM 氯化钠, 1mM 氯化镁, 0.1mM 氯化锌, 1mg/ml 聚乙烯乙醇 (10,000mw), 10mg/ml 牛血清白蛋白, 1mg/ml 叠氮化钠, pH7.0 的检测缓冲液中。微滴度板中 25 微升的稀释样本中被加入 50 微升的包含 2.5 微克/毫升的抗肌钙蛋白-I 或抗肌钙蛋白-T 复合物和 2.5 微克/毫升生物素化抗肌钙蛋白-I 或抗肌钙蛋白-T 多克隆抗体的检测缓冲液以形成反应混合物。反应混合物在室温下孵育 30 分钟, 25 微升的抗生物素蛋白-HS 包被的磁性乳胶 (0.5%乳胶在检测缓冲液中) 被加入到微滴度板的孔中, 随后在室温下孵育 5 分钟。

磁性乳胶被离心并在 BBS-Tween (20mM 硼酸, 150mM 氯化钠, 0.1mg/ml 叠氮化钠, 0.02%聚氧乙烯-20-山梨聚糖单月桂酸 (Tween-20), pH8.2) 中

清洗两次以及在 TBS (40mM Tris, 150mM 氯化钠, pH7.5) 中清洗一次。沉淀物被根据生产者的用法说明被重新悬浮于 ELISA 扩增试剂中 (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.)。在扩增完成后, 磁性乳胶被离心并且 80 微升的着色的上清液被转入到新的微滴度板。用微滴度板计数仪测量在 490nm 的吸收。

5 根据上述材料, 本发明的许多修饰和改变都是可以的。因此, 可以理解在发明的附加的权利要求的范围内都被保护, 除非另作特别的说明。

10 以上所述, 仅是本发明的较佳实施例而已, 并非对本发明作任何形式上的限制, 虽然本发明已以较佳实施例揭露如上, 然而并非用以限定本发明, 任何熟悉本专业的技术人员, 在不脱离本发明技术方案范围内, 当可利用上述揭示的方法及技术内容作出些许的更动或修饰为等同变化的等效实施例, 但是凡是未脱离本发明技术方案的内容, 依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰, 均仍属于本发明技术方案的范围内。

专利名称(译)	用于病人的样本中生物化学标记物的早期和同步检测的免疫测定法和试剂盒		
公开(公告)号	CN1618017A	公开(公告)日	2005-05-18
申请号	CN02827567.5	申请日	2002-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	迪尔基因国际有限公司		
申请(专利权)人(译)	迪尔基因国际有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	迪尔基因国际有限公司		
[标]发明人	弗朗茨诺尔		
发明人	弗朗茨 诺尔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/573 G01N33/68 G01N33/533 G01N33/534		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N33/54393 G01N33/573		
代理人(译)	寿宁		
优先权	60/333133 2001-11-27 US		
其他公开文献	CN100593721C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明包含一种免疫化学测定法用于测定一个样本中至少两种抗原。免疫化学测定法包括使源于病人的样本与一个载体分子相接触，该载体分子包含至少两种捕捉抗体，每种抗体能够特异的结合到样品中抗原的结合部位上。该测定法进一步包含一种检测抗体，该抗体能够特异的结合到同一抗原上另一结合部位，该结合部位不同于捕捉抗体所结合的部位。检测试剂进一步结合到一个或多个检测探针上以便样本中抗原的检测。本发明的免疫化学测定法被特别设计以检测病人样本中在不同的时间间隔所释放的生物化学标记物。