



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107002017 A

(43)申请公布日 2017.08.01

(21)申请号 201580066356.8

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2015.12.11

代理人 周铁 杨思捷

(30)优先权数据

62/093105 2014.12.17 US

(51)Int.Cl.

C12M 1/34(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/50(2006.01)

2017.06.06

G01N 33/53(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/065253 2015.12.11

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2016/100117 EN 2016.06.23

(71)申请人 西门子医疗保健诊断公司

地址 美国纽约州

(72)发明人 I.巴哈 魏铁全

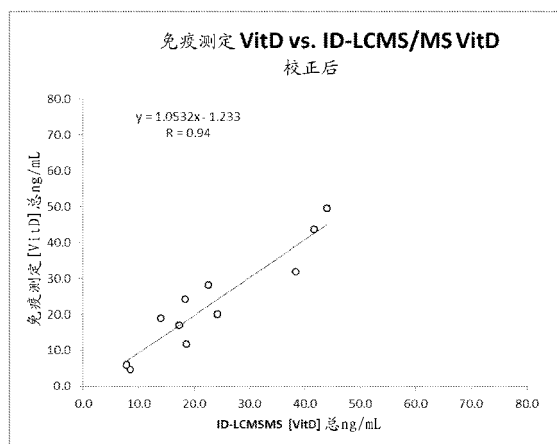
权利要求书3页 说明书11页 附图3页

(54)发明名称

疏水性半抗原分析物的精确测定测量

(57)摘要

公开了用于测定怀疑含有疏水性半抗原分析物的未知样品中的疏水性半抗原分析物的实际浓度的方法,其中所述未知样品怀疑含有干扰物质。对未知样品进行第一测定方法以获得未知样品中的疏水性半抗原分析物的测量浓度。对未知样品进行第二测定方法以获得未知样品中的干扰物质的浓度。应用利用步骤(a)中获得的疏水性半抗原分析物的测量浓度和干扰物质的测量浓度的预先确定的校正公式,以测定未知样品中的疏水性半抗原分析物的实际浓度。



1. 测定怀疑含有疏水性半抗原分析物的未知样品中的疏水性半抗原分析物的实际浓度的方法,其中所述未知样品怀疑含有干扰物质,所述方法包括:

(a) 对未知样品进行第一测定方法以获得所述未知样品中的疏水性半抗原分析物的测量浓度和对所述未知样品进行第二测定方法以获得所述未知样品中的干扰物质的浓度;和

(b) 应用利用步骤(a)中获得的所述疏水性半抗原分析物的测量浓度和所述干扰物质的测量浓度的预先确定的校正公式,以测定所述未知样品中的疏水性半抗原分析物的实际浓度,其中所述校正公式通过包括以下的方法预先确定:

(i) 使用所述第一测定方法测量至少两种不同样品的疏水性半抗原分析物的浓度和使用参考方法测量至少两种不同样品的疏水性半抗原分析物的浓度,其中所述样品还包含所述干扰物质,

(ii) 确定第一测定方法和参考方法之间的偏差,其中所述偏差是每种不同样品的通过参考方法和第一测定方法测定的疏水性半抗原分析物的浓度之间的差异;

(iii) 测量所述至少两种不同样品的干扰物质的浓度,和

(iv) 通过使用所述至少两种不同样品各自的偏差和干扰物质的浓度进行回归分析来确定校正公式。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一测定方法包括:

(i) 向包含所述样品的介质中添加用于测定所述样品中疏水性半抗原分析物的测量浓度的试剂,其中所述试剂包含至少一种疏水性半抗原分析物的结合配偶体,和

(ii) 在使所述疏水性半抗原分析物与所述疏水性半抗原分析物的结合配偶体结合的条件下孵育所述介质。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一测定方法是免疫测定法。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述疏水性半抗原分析物选自脂溶性维生素、类固醇激素、治疗药物和滥用药物。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述疏水性半抗原分析物是维生素D。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品是机体排泄物、机体抽吸物、机体切割物或机体提取物。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述参考方法选自质谱法、液相色谱法、电泳、微流控、显微镜检查、光谱学、化学测定法和免疫测定法及其两种或更多种的组合。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述回归分析包括形成回归线且从回归线开发校正公式。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述回归分析包括形成回归线和使用回归线的斜率和截距来形成以下校正公式:

$$[An] = [mAn] + (a \times [mIS] + b)$$

其中:

[An]是未知样品中疏水性半抗原分析物的实际浓度,

[mAn]是未知样品中疏水性半抗原分析物的测量浓度,

[mIS]是未知样品中干扰物质的测量浓度,

a是回归线的斜率,且

b是回归线的截距。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一测定方法包括:

在测定介质中将所述样品与(i)能够结合疏水性半抗原分析物以形成复合物的疏水性半抗原分析物的抗体和(ii)产生与疏水性半抗原分析物复合物的量相关的信号的信号产生系统的成员组合,其中所述信号产生系统的成员与所述抗体或疏水性半抗原分析物类似物结合,所述疏水性半抗原分析物类似物与所述样品中的疏水性半抗原分析物竞争结合抗体,

在用于形成所述复合物的条件下孵育所述测定介质,

测定来自所述复合物的信号的量,和

将信号的量与样品中疏水性半抗原分析物的测量浓度相关联。

11. 测定怀疑含有维生素D分析物的未知样品中的维生素D分析物的实际浓度的方法,其中所述未知样品怀疑含有胆固醇,所述方法包括:

(a) 对未知样品进行第一测定方法以获得所述未知样品中的维生素D分析物的测量浓度和对所述未知样品进行第二测定方法以获得胆固醇的浓度;和

(b) 应用利用步骤(a)中获得的维生素D分析物的测量浓度和胆固醇的测量浓度的预先确定的校正公式,以测定未知样品中的维生素D分析物的实际浓度,其中所述校正公式通过包括以下的方法预先确定:

(i) 使用第一测定方法测量至少两种不同样品的维生素D分析物的浓度,且使用参考方法测量至少两种不同样品的维生素D分析物的浓度,其中所述至少两种不同样品还包含胆固醇,

(ii) 确定第一测定方法和参考方法之间的偏差,其中所述偏差是每种不同样品的通过参考方法和第一测定方法测定的维生素D分析物的浓度之间的差异;

(iii) 测量所述至少两种不同样品各自的胆固醇的浓度;和

(iv) 通过使用所述至少两种不同样品各自的偏差和胆固醇的浓度进行回归分析来确定校正公式。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述第一测定方法包括:

(i) 向包含所述样品的介质中添加用于测定所述样品中维生素D分析物的测量浓度的试剂,其中所述试剂包含至少一种维生素D分析物的结合配偶体,和

(ii) 在使所述维生素D分析物与所述维生素D分析物的结合配偶体结合的条件下孵育所述介质。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中所述第一测定方法是免疫测定法。

14. 根据权利要求11所述的方法,其中所述样品是机体排泄物、机体抽吸物、机体切割物或机体提取物。

15. 根据权利要求11所述的方法,其中所述参考方法选自质谱法、液相色谱法、电泳、微流控、显微镜检查、光谱学、化学测定法和免疫测定法及其两种或更多种的组合。

16. 根据权利要求11所述的方法,其中所述回归分析包括形成回归线且从回归线开发校正公式。

17. 根据权利要求11所述的方法,其中所述回归分析包括形成回归线和使用回归线的斜率和截距来形成以下校正公式:

$$[\text{维生素D}] = [m\text{维生素D}] + (a \times [m\text{维生素}]) + b$$

其中：

[维生素D]是未知样品中维生素D分析物的实际浓度，

[m维生素D]是未知样品中维生素D分析物的测量浓度，

[m胆固醇]是未知样品中胆固醇的测量浓度，

a是回归线的斜率，且

b是回归线的截距。

18. 根据权利要求11所述的方法，其中所述第一测定方法包括：

在测定介质中将所述样品与 (i) 能够结合维生素D分析物以形成复合物的维生素D分析物的抗体和 (ii) 产生与维生素D分析物复合物的量相关的信号的信号产生系统的成员组合，其中所述信号产生系统的成员与所述抗体或维生素D分析物类似物结合，所述维生素D分析物类似物与所述样品中的维生素D分析物竞争结合抗体，

在用于形成所述复合物的条件下孵育所述测定介质，

测定来自所述复合物的信号的量，和

将信号的量与样品中维生素D分析物的测量浓度相关联。

疏水性半抗原分析物的精确测定测量

[0001] 本申请根据35 USC § 119 (e) 主张2014年12月17日提交的美国临时申请号62/093,105的权益。上面引用的专利申请的全部内容在此通过引用明确并入本文。

[0002] 背景

本发明涉及用于测定怀疑含有分析物的样品中分析物的浓度的方法。更具体地,本发明涉及减少干扰物质对上述测定样品中分析物的浓度的方法期间进行的测量的影响。

[0003] 疏水性化合物诸如,例如药物,维生素诸如例如维生素D和维生素B12,以及半抗原激素,通常存在于脂蛋白(其替代分析物标记物是胆固醇)的疏水核心中,胆固醇存在于所有脂蛋白,包括低密度脂蛋白(LDL)、极低密度脂蛋白(VLDL)、中密度脂蛋白(IDL)、高密度脂蛋白(HDL)和乳糜微粒。

[0004] 如上所述,维生素D是一种此疏水性化合物。通过UV光形成维生素D后,其通过血液中的脂蛋白和维生素D结合蛋白(VDBP)转运。在不使用有机溶剂诸如例如醇提取维生素D的维生素D的测定中,使用合适的释放剂从VDBP释放维生素D。然而,脂蛋白核心中的维生素D分子留在脂蛋白的核心中,并且对于大部分未被触及。提取测定法是费力的,并且如上所提及,涉及对样品使用有机溶剂。因此,维生素D或其他疏水性化合物的大多数免疫测定法受样品中的一种或多种干扰物质(诸如例如胆固醇和脂蛋白)负面影响,因为未从干扰物质(诸如例如脂蛋白的核心)释放的维生素D分子不是免疫测定法中使用的抗体可及的。样品中维生素D的实际量可能无法准确测定,并且在免疫测定法中观察到的维生素D的量可能被错误地升高或抑制。

[0005] 评价生物样品中的维生素D水平是重要的,因为维生素D缺乏与哺乳动物中的许多疾病相关。持续需要开发快速和准确的诊断方法来测量取自患者的样品中疏水性半抗原分析物的水平。所述方法应当是完全可自动化的,并且是准确的,甚至当对具有各种干扰物质的样品进行时也是如此。测定方法应当提供样品中疏水性半抗原分析物的量的精确测量,同时尽可能降低由样品中存在的干扰物质导致的不准确性。

[0006] 概述

根据本文所述的原理的一些实例涉及测定怀疑含有疏水性半抗原分析物的未知样品中的疏水性半抗原分析物的实际浓度的方法,其中所述未知样品怀疑含有干扰物质。对未知样品进行第一测定方法以获得未知样品中的疏水性半抗原分析物的测量浓度。对未知样品进行第二测定方法以获得未知样品中的干扰物质的浓度。应用利用步骤(a)中获得的疏水性半抗原分析物的测量浓度和干扰物质的测量浓度的预先确定的校正公式,以测定未知样品中的疏水性半抗原分析物的实际浓度。校正公式通过包括以下的方法预先确定:(i)使用第一测定方法测量至少两种不同样品的疏水性半抗原分析物的浓度,且使用参考方法测量至少两种不同样品的疏水性半抗原分析物的浓度,其中所述至少两种不同样品还包含干扰物质,(ii)确定第一测定方法和参考方法之间的偏差,其中所述偏差是每种不同样品的通过参考方法和第一测定方法测定的疏水性半抗原分析物的浓度之间的差异,(iii)测量所述至少两种不同样品各自的干扰物质的浓度,且(iv)通过使用所述至少两种不同样品各自中的偏差和干扰物质的浓度进行回归分析来确定校正公式。

[0007] 根据本文所述的原理的一些实例涉及测定怀疑含有维生素D分析物的未知样品中的维生素D分析物的实际浓度的方法,其中所述未知样品怀疑含有胆固醇。对未知样品进行第一测定方法以获得未知样品中的维生素D分析物的测量浓度。对未知样品进行第二测定方法以获得胆固醇的浓度。应用利用步骤(a)中获得的维生素D分析物的测量浓度和胆固醇的测量浓度的预先确定的校正公式,以测定未知样品中的维生素D分析物的实际浓度。校正公式通过包括以下的方法预先确定:(i)使用第一测定方法测量至少两种不同样品的维生素D分析物的浓度,且使用参考方法测量至少两种不同样品各自的维生素D分析物的浓度,其中所述样品还包含胆固醇,(ii)确定第一测定方法和参考方法之间的偏差,其中所述偏差是至少两种不同样品各自的通过参考方法和测定方法测定的维生素D分析物的浓度之间的差异,(iii)测量所述至少两种不同样品各自中的胆固醇的浓度,且(iv)通过使用所述至少两种不同样品各自中的偏差和胆固醇的浓度进行回归分析来确定校正公式。

[0008] 附图简述

本文提供的附图不是按比例,并且为了便于理解根据本文所述的原理的某些实例的目的而提供,并且通过说明而非限制所附权利要求的范围的方式来提供。

[0009] 图1是描绘针对样品集合的每个成员的胆固醇浓度绘制的偏差(通过从相同样品集合上的维生素D的免疫测定结果减去样品集合上的维生素D的液相色谱-质谱(LCMS)测定的结果而获得)的图。

[0010] 图2是描绘针对样品集合的每个成员的胆固醇浓度绘制的图1的偏差(基于获得的校正公式校正)的图。

[0011] 图3是描绘针对通过参考方法测量的维生素D的浓度绘制的通过免疫测定测量的维生素D的浓度(不应用校正公式)的图。

[0012] 图4是描绘针对通过参考方法测量的维生素D的浓度绘制的通过免疫测定测量的维生素D的浓度(应用校正公式)的图。

[0013] 具体实施方案的详述

总体讨论

根据本文所述的原理的方法的实例提供了取自宿主的样品中的疏水性半抗原分析物的精确测量,其中所述样品含有一种或多种干扰物质,其影响精确地检测疏水性半抗原分析物的能力。在根据本文所述的原理的方法的实例中,通过使用测定方法测量未知样品的一部分中疏水性半抗原分析物的浓度和使用另一种通常不同的测定方法测量未知样品的另一部分中干扰物质的浓度和应用利用上述测量值两者的预先确定的校正公式来校正疏水性半抗原分析物的测量浓度,以获得未知样品中疏水性半抗原分析物的精确测量值。在一些实例中,干扰物质的浓度的测量作为测试组(其还包括疏水性半抗原分析物的测量)的一部分进行。

[0014] 校正公式通过包括以下的方法预先确定:(i)使用第一测定方法测量至少两种不同样品的疏水性半抗原分析物的浓度,且使用参考方法测量两种不同样品各自的疏水性半抗原分析物的浓度,其中所述样品还包含干扰物质,(ii)确定第一测定方法和参考方法之间的偏差,其中所述偏差是两种不同样品各自的通过参考方法和第一测定方法测定的疏水性半抗原分析物的浓度之间的差异,(iii)测量所述两种不同样品各自中的干扰物质的浓度,且(iv)通过使用所述至少两种不同样品各自的偏差和干扰物质的浓度进行回归分析来

确定校正公式。

[0015] 本发明人发现使用如上所讨论的校正公式导致疏水性半抗原分析物的更准确的确定,而无论在校正公式不存在的情况下干扰物质引起测定测量值是过高还是过低。

[0016] 短语“疏水性半抗原分析物”是指这样的分析物,其具有小于约2,500、或小于约2,000、或小于约1,500、或小于约1,000、或小于约500的分子量,并且在例如约100至约2,500、或约300至约2,500、或约300至约2,000、或约300至约1,500、或约300至约1,000、或约500至约2,500、或约500至约2,000、或约500至约1,500、或约500至约1,000的分子量范围内。疏水性半抗原分析物是脂溶性的,这意味着疏水性半抗原分析物可溶于例如脂肪、油和脂质中的一种或多种。

[0017] 在一些实例中,所述疏水性半抗原分析物包括但不限于例如维生素、滥用药物、治疗药物和类固醇激素。维生素包括但不限于例如维生素D、维生素B12、维生素E和维生素K。类固醇激素包括,通过说明而不是限制的方式,例如孕激素、雌激素、雄激素、糖皮质激素、盐皮质激素和开环甾类化合物(secosteroid)。在根据本文所述的原理的一些实例中,例如,所述疏水性半抗原分析物是维生素D。

[0018] 如本文所用,术语“维生素D”是指一组脂溶性开环甾类化合物,并且包括例如,以下中的一种或多种:25-羟胆钙化醇(也被称为骨化二醇(calcidiol, calcifediol)、25-羟胆钙化醇、或25-羟基维生素D(简写为25(OH)D),包括25-羟基维生素D₃和25-羟基维生素D₂;骨化二醇(calcidiol);1,25-二羟基维生素D₃(骨化三醇;1,25(OH)₂D₃);1,25-二羟基维生素D₄;1,25-二羟基维生素D₅;和1,25-二羟基维生素D₆;包括上述所有的一种或多种代谢物。

[0019] 待分析的样品是怀疑含有疏水性半抗原分析物和一种或多种干扰物质的样品。所述样品可以是生物样品或非生物样品。生物样品可以来自哺乳动物主体或非哺乳动物主体。哺乳动物主体可以是例如人或其他动物物种。“非生物样品”是与生物材料无关的样品,且包括例如土壤样品、废物流、水样品、空气样品、除空气以外的气体样品和矿物样品。短语“生物样品”是指任何生物材料,诸如,例如,体液、机体组织、机体化合物和培养基。样品可以是来自任何来源的固体、半固体或流体(液体或气体)。在一些实施方案中,样品可以是机体排泄物、机体抽吸物(aspirant)、机体切割物(excisant)或机体提取物。机体通常是哺乳动物的机体,在某些实施方案中,机体是人体。机体排泄物是从机体排泄的那些物质(尽管它们也可以通过切除或提取获得),诸如,例如尿、排泄物、粪便、阴道粘液、精液、泪液、呼气、汗、水泡液和炎性渗出物。机体切割物是从机体切割的那些物质,诸如,例如,皮肤、毛发和组织样品,包括来自器官和机体其他部分的活检样品。机体抽吸物是从机体抽吸的那些物质,诸如,例如,粘液、唾液和痰液。机体提取物是从机体提取的那些物质,诸如,例如,全血、血浆、血清、脊髓液、脑脊髓液、淋巴液、关节液和腹膜液。在一些实例中,样品是全血、血浆或血清。

[0020] 短语“干扰物质”是指一种或多种化合物,其与疏水性半抗原分析物相互作用且使疏水性半抗原分析物不能用于结合结合配偶体,诸如测定疏水性半抗原分析物的测定法中使用的疏水性半抗原分析物的抗体。此类干扰物质包括但不限于例如胆固醇,其存在于所有脂蛋白包括LDL、VLDL、IDL、HDL和乳糜微粒中。

[0021] 校正公式的确定

根据本文所述的原理的实例具体应用于疏水性半抗原分析物的测定,其中干扰物质影响测量的准确性。如上所提及,采用预先确定的校正公式来校正由于测试的样品中存在一种或多种干扰物质导致的不精确结果的测定测量。在根据本文所述的原理的实例中,用于预先确定校正公式的方法包括使用第一测定方法测量至少两种不同样品的疏水性半抗原分析物的浓度和使用参考方法测量至少两种不同样品各自的疏水性半抗原分析物的浓度,其中所述样品各自还包含干扰物质。

[0022] 对于可用于测定来自宿主的未知样品中的疏水性半抗原分析物的浓度的每个测定,由例如制造商或开发者确定预先确定的校正公式。一旦预先确定,校正公式可以通过例如与测定说明书一起包括来传播给用户诸如例如实验室,用于测定未知样品中疏水性半抗原分析物的浓度。用户简单地将预先确定的校正公式应用于对于未知样品的后续分析获得的测定结果,以便计算未知样品中疏水性半抗原分析物的准确浓度。

[0023] 在预先确定校正公式中,经受第一测定方法的含有疏水性半抗原分析物的不同样品的数目是至少两种、或至少三种、或至少四种、或至少五种、或至少六种。在一些实例中,可以采用的含有疏水性半抗原分析物的不同样品的数目为例如2至20,或2至15,或2至14,或2至13,或2至12,或2至11,或2至10,或3至20,或3至15,或3至14,或3至13,或3至12,或3至11,或3至10,或4至20,或4至15,或4至12,或4至10,或5至20,或5至15,或5至12,或5至10,或6至15,或6至14,或6至13,或6至12,或7至15,或7至14,或7至13,或7至12,或8至20,或8至15,或8至12。

[0024] 在一些实例中,采用的疏水性半抗原分析物的浓度跨越待分析的未知样品中疏水性半抗原分析物的预期浓度范围。可以测定的疏水性半抗原分析物的浓度通常例如从约 10^{-5} 至约 10^{-17} M、或约 10^{-6} 至约 10^{-14} M、或约 10^{-8} M至约 10^{-10} M变化。所述样品各自中的干扰物质的浓度可以在例如约10 mg/dL至约1,000 mg/dL、或约50 mg/dL至约1,000 mg/dL、或约100 mg/dL至约1,000 mg/dL、或约200 mg/dL至约1,000 mg/dL、或约300 mg/dL至约1,000 mg/dL、或约500 mg/dL至约1,000 mg/dL、或约10 mg/dL至约500 mg/dL、或约50 mg/dL至约500 mg/dL、或约100 mg/dL至约500 mg/dL、或约200 mg/dL至约500 mg/dL、或约300 mg/dL至约500 mg/dL变化。

[0025] 用于预先确定校正公式的第一测定方法是随后用于测量怀疑含有疏水性半抗原分析物的样品(即未知样品)的测定方法。可以采用任何测定方法作为第一测定方法。在一些实例中,所述第一测定方法包括向包含样品的介质中添加用于测定样品中疏水性分析物的浓度的试剂,其中所述试剂包含至少一种疏水性分析物的结合配偶体,和在使所述疏水性分析物与所述疏水性分析物的结合配偶体结合的条件下孵育所述介质。所述结合产生包含分析物的结合配偶体和分析物或分析物类似物的复合物。测量此类复合物的量且将其与样品中分析物的量相关。

[0026] 短语“结合配偶体”是指作为特异性结合对的成员的分子,其是特异性结合另一分子并因此被定义为与另一分子互补的两种不同分子之一。例如,特异性结合对的一个成员可以在表面上或在空腔中具有特异性结合特异性结合对的另一成员的特定空间和极性组织的区域。通过说明而非限制的方式,所述结合配偶体可以是例如抗体或适体(例如,核酸适体或肽适体)。

[0027] 采用抗体作为一种试剂的测定法被称为免疫测定法。短语“分析物的抗体”是指与

分析物(且在一些实例中,与分析物的密切相关的结构类似物,诸如分析物的代谢物)特异性结合并且不会与将扭曲分析物的分析的其他物质结合至任何显著程度的抗体。因此,特异性结合涉及对于两种不同分子中的一种相对于另一种的特异性识别,相比之下,对其他分子的识别实质上较差。另一方面,非特异性结合涉及相对独立于特定表面结构的分子之间的非共价结合。非特异性结合可以由几种因素导致,包括分子之间的疏水性相互作用。

[0028] 通常,通过在测定介质中组合含有疏水性半抗原分析物的样品和疏水性半抗原分析物的抗体来进行用作用于根据本文所述的原理预先确定校正公式的第一测定方法的测定法。可以以游离或缀合模式采用所述抗体。缀合的抗体是例如与支持物或标记或与支持物和标记的组合结合的抗体。采用的其他试剂的性质取决于待进行的测定法的具体类型。介质中的组合经受用于使分析物或分析物类似物与抗体结合以形成复合物的条件。测量所述复合物的量,其中所述复合物的量与介质中分析物的量相关。

[0029] “分析物类似物”是与分析物竞争结合受体(例如分析物的抗体)的修饰分析物。修饰提供了将分析物类似物与另一分子接合的方式。分析物类似物将通常通过超过用将分析物类似物连接至中心(hub)或标记的键代替氢而不同于分析物,但不必如此。所述分析物类似物可以是例如通过例如键或连接基团与另一分子诸如例如标记或支持物缀合的分析物。

[0030] 测定可以在不分离(均质)或分离(非均质)任何测定组分或产物的情况下进行。非均质测定通常涉及一个或多个分离步骤,并且可以是竞争性或非竞争性的。免疫测定可以涉及标记或未标记的试剂。涉及未标记的试剂的免疫测定通常包括形成相对大复合物,所述相对大复合物涉及由根据本文所述的原理的免疫原性缀合物制备的一种或多种抗体。对于抗体复合物的检测,此类测定包括例如免疫沉淀素和凝集法,以及相应的光散射技术例如,例如浊度测定法(nephelometry)和比浊法(turbidimetry)。标记免疫测定包括但不限于例如化学发光免疫测定、酶免疫测定、荧光偏振免疫测定、放射免疫测定、抑制测定、诱导发光测定、以及荧光氧通道测定。

[0031] 一组通常的免疫测定包括使用有限浓度的试剂之一的免疫测定。另一组免疫测定涉及使用过量的一种或多种主要试剂。另一组免疫测定是无分离均质测定,其中标记的试剂在样品中分析物或分析物类似物与抗体结合后调节标记信号。

[0032] 如上所提及,所述测定可以在不分离(均质)或分离(非均质)任何测定组分或产物的情况下进行。均质免疫测定由以下例举:Rubenstein等人,美国专利号3,817,837,第3栏,第6行至第6栏,第64行中公开的EMIT®测定(Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL);免疫荧光法,诸如Ullman等人,美国专利号3,996,345,第17栏,第59行至第23栏,第25行中公开的那些;酶通道免疫测定(“ECIA”),诸如Maggio等人,美国专利号4,233,402,第6栏,第25行至第9栏,第63行中公开的那些;荧光偏振免疫测定(“FPIA”),如例如尤其是美国专利号5,354,693中公开的那些;和酶免疫测定,诸如酶联免疫吸附测定(“ELISA”)。非均质测定的示例为放射免疫测定,其公开于Yalow等人, *J. Clin. Invest.* 39:1157 (1960)中。上述公开内容的相关部分全部通过引用并入本文。

[0033] 其他酶免疫测定是例如由Ngo和Lenhoff, *FEBS Lett.* (1980) 116:285-288讨论的酶调节介导的免疫测定(“EMMIA”);由Oellerich, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* (1984) 22:895-904公开的底物标记的荧光免疫测定(“SLFIA”);由Khanna等人, *Clin. Chem. Acta* (1989) 185:231-240公开的组合酶供体免疫测定(“CEDIA”);均质颗粒标记的

免疫测定,诸如颗粒增强的比浊抑制免疫测定(“PETINIA”)和颗粒增强的比浊免疫测定(“PETIA”)。

[0034] 其他测定包括例如溶胶颗粒免疫测定(“SPIA”),分散染料免疫测定(“DIA”);金属免疫测定(“MIA”);酶膜免疫测定(“EMIA”);和发光免疫测定(luminoimmunoassay)(“LIA”)。其他测定类型包括免疫传感器测定,其涉及在结合抗体后,监测化合物的光学、声学 and 电学特性的变化。此类测定包括例如光学免疫传感器测定、声学免疫传感器测定、半导体免疫传感器测定、电化学换能器免疫传感器测定、电位型免疫传感器测定和电流型电极测定。

[0035] 非均质测定通常涉及一个或多个分离步骤,并且可以是竞争性或非竞争性的。各种竞争性和非竞争性非均质测定形式公开于Davalian等人,美国专利号5,089,390,第14栏,第25行至第15栏,第9行,其通过引用并入本文。在竞争性非均质测定的一个实例中,将分析物的抗体与之结合的支持物与介质接触,所述介质含有怀疑含有分析物的样品和标记的分析物类似物。样品中的分析物与可携带可检测标记的分析物类似物竞争结合分析物的抗体。将支持物和介质分离之后,支持物或介质的标记活性通过常规技术测定,并且与样品中的分析物的量相关。

[0036] 用于根据本文所述的原理预先确定校正公式的测定方法中采用的介质是在通常提供最佳测定灵敏度的中等pH下的水性缓冲介质。水性介质可以仅为水,或可以包括0.1至约40体积%的助溶剂。介质的pH将在约4至约11的范围内,或约5至约10的范围内,或约6.5至约9.5的范围内。pH将通常为任何特异性结合对的结合成员的最佳结合、该测定的其他试剂诸如信号产生系统的成员等等的最适宜pH之间的折中。各种缓冲剂可用来实现所需pH和在测定期间保持pH。说明性缓冲剂包括例如硼酸盐、磷酸盐、碳酸盐、tris、巴比妥、PIPES、HEPES、MES、ACES、MOPS、BICINE等。所采用的具体缓冲剂不是关键的,但在个别测定中,可以优选一种或另一种缓冲剂。

[0037] 测定方法中可以使用各种辅助材料。例如,除缓冲剂之外,介质可以包含介质和采用的试剂的稳定剂。在一些实施方案中,除这些添加剂之外,可以包括蛋白诸如白蛋白;有机溶剂诸如甲酰胺;季铵盐;聚阴离子诸如硫酸葡聚糖;结合增强剂,例如聚亚烷基二醇;多糖诸如葡聚糖、海藻糖等。介质也可以包含用于防止形成血块的试剂。此类试剂是本领域中众所周知的,且包括例如EDTA、EGTA、柠檬酸盐、肝素等。介质也可以包含一种或多种如本领域已知的防腐剂,诸如叠氮化钠、硫酸新霉素、PROCLIN® 300、链霉素等。如果采用,任何上述材料以足以获得所需效果或功能的浓度或量存在。

[0038] 根据采用的测定法的性质,介质可以包含一种或多种组分,诸如,例如,标记是其部分的信号产生系统的其他成员。

[0039] 所述信号产生系统可具有一种或多种组分,至少一种组分是标记。所述信号产生系统产生与样品中疏水性半抗原分析物的存在相关的信号。所述信号产生系统包括产生可测量的信号所需的所有试剂。所述信号产生系统的其他组分可以包括在显影溶液中,并且可以包括但不限于例如底物、增强剂、活化剂、化学发光化合物、辅因子、抑制剂、清除剂、金属离子和结合信号产生物质所需的特异性结合物质。所述信号产生系统的其他组分可以是例如辅酶、与酶产物反应的物质、其他酶和催化剂。所述信号产生系统提供通过外部装置,通过使用电磁辐射,理想地通过目测可检测的信号。示例性的信号产生系统描述于美国专

利号5,508,178,其相关公开内容通过引用并入本文。

[0040] 术语“标记”包括聚(氨基酸)标记和非聚(氨基酸)标记。术语“聚(氨基酸)标记部分”包括作为蛋白的标记,例如但不限于例如酶、抗体、肽和免疫原。术语“非聚(氨基酸)标记”包括不是蛋白的那些标记。所述非聚(氨基酸)标记能够直接被检测或可通过产生可检测信号的反应检测。所述非聚(氨基酸)标记可以是同位素的或非同位素的,并且通过说明而非限制的方式,可以是例如放射性同位素、发光化合物(其包括但不限于例如吖啶酯、荧光化合物和化学发光化合物)、编码催化剂的多核苷酸、促进剂(promoter)、染料、辅酶、酶底物、放射性基团和可扩增的多核苷酸序列。在一些实例中,所述非聚(氨基酸)标记为例如放射性同位素的,发光的(诸如,例如,吖啶酯),微粒(诸如,例如,可以将结合物与未结合物分离的磁性颗粒,可以通过浊度和浊度测定法(nephelometry)测量的胶乳颗粒,和化学发光珠粒(例如LOCI化学发光珠粒(chemibeads)))。

[0041] 一些已知的测定法利用信号产生系统(sps),其采用第一和第二sps成员。sps成员可以是关联的,因为sps的一个成员的活化产生产物(诸如,例如光),其导致sps的另一个成员的活化。

[0042] 在已知测定法的一些实施方案中,sps成员包含敏化剂诸如,例如光敏剂,和化学发光组合物,其中敏化剂的活化产生使化学发光组合物活化的产物。第二sps成员通常产生可检测信号,所述可检测信号与结合和/或未结合的sps成员的量(即与所检测的分析物或与反映待检测的分析物的量的试剂结合或未结合的sps成员的量)相关。在根据本文所述原理的一些实例中,敏化剂试剂或化学发光试剂之一是根据本文所述原理制备的缀合物试剂。可以利用的光敏剂和化学发光试剂的实例是描述于美国专利号5,340,716和6,251,581(其相关公开内容通过引用并入本文)中的那些。

[0043] 在一个具体实例中,通过说明且非限制的方式,可以采用诱导发光免疫测定法。诱导发光免疫测定法在美国专利号5,340,716(Ullman)(其公开内容通过引用并入本文)中提及。该测定法采用光敏剂试剂和化学发光试剂。在一种方法中,该测定法使用标记颗粒-缀合物作为光敏剂试剂,其中颗粒-缀合物的标记是光敏剂。化学发光试剂包含分析物的抗体。分析物与包含分析物类似物的颗粒-缀合物竞争分析物的抗体。如果存在分析物,则较少数目的标记的颗粒-缀合物的分子与化学发光化合物紧密接近。因此,测定信号将减小。当两种标记紧密接近时,光敏剂产生单线态氧,并活化化学发光试剂。经活化的化学发光试剂随后产生光。所产生的光的量与所形成的复合物的量相关,其进而与样品中存在的分析物的量相关。

[0044] 测定介质中各种试剂的浓度将通常由分析物的目标浓度范围、测定的性质等决定。然而,试剂各自的最终浓度通常凭经验确定,以优化测定法在目标范围的灵敏度。也就是说,显著的分析物的浓度变化应当提供可精确测量的信号差异。考量诸如信号产生系统的性质和分析物的性质通常决定各种试剂的浓度。

[0045] 如上所提及,在介质中组合提供所述样品和试剂。尽管可以改变添加至所述介质的顺序,但对于本文所述的测定形式的一些实施方案将存在某些优选。最简单的添加顺序当然是同时添加所有材料,并测定所述测定介质对信号具有的影响,如在均质测定中。或者,可以相继将每种试剂或试剂组组合。在一些实施方案中,在如下所讨论的各个添加之后,可以涉及孵育步骤。在非均质测定中,在一个或多个孵育步骤之后还可以采用洗涤步

骤。

[0046] 可以在添加上述各种试剂之间以一个或多个时间间隔包括任何时间间隔将一个或多个孵育期间应用于介质。该介质通常以足以使试剂的各种组分的结合发生的温度和时间进行孵育。在测量期间过程中,适中的温度通常用于实施测定,通常为恒定温度,优选室温。孵育温度通常范围为例如约5℃至约99℃,或约15℃至约70℃,或约20℃至约45℃。孵育的时间段为例如约0.2秒至约24小时,或约1秒至约6小时,或约2秒至约1小时,或约1至约15分钟。所述时间段取决于介质的温度和各种试剂的结合速率。测量期间的温度通常范围为例如约10℃至约50℃或约15℃至约40℃。

[0047] 在测定方法的下一步骤中,检查介质的包含分析物和分析物的抗体的复合物的存在。复合物的量指示样品中分析物的量。在许多实施方案中,介质的检查涉及从介质检测信号。信号的量与样品中分析物的存在和/或量相关。检测的特定模式取决于sps的性质。如上所讨论,存在许多方法,通过该方法,sps的标记可以产生可通过外部装置检测的信号。信号产生系统的活化取决于信号产生系统成员的性质。

[0048] 测量期间的温度通常范围为约10℃至约70℃,或约20℃至约45℃,或约20℃至约25℃。在一种方法中,使用已知浓度的分析物形成标准曲线。也可以使用校准物和其他对照。

[0049] 由任何标记产生的发光或光可以目测、照相、光量测定(actinometrically)、分光光度测量,诸如通过使用光电倍增器或光电二极管,或通过测定其与介质中分析物的量相关的量的任何其他方便的装置。信号的存在和/或量的检查还包括信号的检测,这通常仅是其中阅读信号的一个步骤。通常使用仪器阅读信号,所述仪器的性质取决于信号的性质。所述仪器可以是但不限于例如分光光度计,荧光计,吸收分光计,光度计和化学光度计(chemiluminometer)。

[0050] 如上所提及,对于校正因子的预先确定,样品中疏水性半抗原分析物的浓度通过第一测定方法对样品的一部分进行,且通过参考方法对同样品的一部分进行。对于根据本文所述的原理的校正公式的预先确定中使用的样品各自实施这些确定。参考方法是用于测定分析物的方法,其不同于如上所讨论的不同样品各自中疏水性半抗原分析物的浓度的测量中采用的第一测定方法。参考方法应当是直接测量分析物或其衍生物特异性的特征(例如如通过质谱法所测量的m/z比)的方法。可以采用的参考方法的实例包括,通过说明而非限制的方式,质谱法、液相色谱法,包括高效液相色谱法,例如电泳、微流控、显微镜检查、光谱学、化学测定、免疫测定及其两种或更多种的组合。

[0051] 一旦已对于采用的不同样品各自通过至少第一测定方法和参考方法测量了疏水性半抗原分析物的浓度,则确定第一测定方法和参考方法之间的偏差。所述偏差是含有疏水性分析物的不同样品各自的通过参考方法和第一测定方法测定的疏水性半抗原分析物的浓度之间的差异。

[0052] 除了不同样品各自中使用第一测定方法和参考方法测量疏水性半抗原分析物的浓度之外,还对不同样品各自中的干扰物质的浓度实施测量。可以使用用于测定干扰物质的测定方法来实施不同样品中的干扰物质的浓度的测量。测定方法可以选自上面提及的第一测定方法或参考方法中任一种。分析的不同样品应当涵盖干扰物质的宽范围的浓度,使得根据本文所述的原理产生的校正公式可用于后来分析大患者群体遇到的干扰物质的宽

范围的浓度。这可以例如通过分析超过用于产生校正公式所需的数目的多个样品(参见上面关于用于产生校正公式的含有疏水性半抗原分析物的样品的数目的讨论)和从样品选择提供干扰物质的宽范围的浓度的那些样品来实现。

[0053] 通过使用不同样品各自中的偏差和干扰物质的浓度进行回归分析来确定校正公式。回归分析是聚焦于因变量和一个或多个自变量之间的关系的关系的回归分析。可以采用任何合适的回归分析,诸如但不限于例如线性回归分析,多项式回归的高阶,普通最小二乘回归,Passing-Bablok回归和Deming回归(加权或非加权)。

[0054] 在通过说明而非限制的实例中,回归分析包括如线性回归中形成回归线,和从回归线的斜率和截距开发校正公式。在该实例中,对于各不同样品,将如上所述获得的偏差针对如上所述获得的干扰物质的浓度绘图。可以开发以下关系或校正公式: $[An] = [mAn] + (a \times [mIS] + b)$ 其中 $[An]$ 是未知样品中疏水性分析物的实际浓度, $[mAn]$ 是未知样品中疏水性分析物的测量浓度, $[mIS]$ 是未知样品中干扰物质的测量浓度, a 是回归线的斜率,且 b 是回归线的截距。因此,用户诸如实验室可以使用上述校正公式来使用预先确定校正公式的测定法来精确地测定疏水性半抗原分析物的浓度。进行测定后,将未知样品中的疏水性半抗原分析物的测量浓度和干扰物质的测量浓度插入公式中,以获得未知样品中疏水性半抗原分析物的准确浓度。例如,对于特异性疏水性半抗原分析物的具体测定,预先确定的校正公式被确定为 $[An] = [mAn] + (0.22 \times [mIS] + (-28))$;因此,如果 $[mAn]$ 的值为36 ng/mL且 $[mIS]$ 的值为130 ng/mL,则方程变为 $[An] = 36 + (0.22 \times 130 + (-28))$ 或 $[An] = 36 + 28.6 - 28 = 36.6$ ng/mL。

[0055] 进行测定的试剂盒

用于进行具体测定的试剂可以存在于试剂盒中,所述试剂盒可用于方便地进行用于测定疏水性半抗原分析物的测定法。在一个实例中,试剂盒在包装组合中包含用于分析分析物的试剂,其性质取决于具体测定形式。所述试剂可以包括例如分析物的结合配偶体。所述试剂可以各自在分开容器中,或者各种试剂可以组合于一个或多个容器中,这取决于试剂的交叉反应性和稳定性。该试剂盒可以进一步包括用于进行测定的其他分别包装的试剂,诸如额外的结合成员和辅助试剂。

[0056] 试剂盒中各种试剂的相对量可以在很大程度上变化,以提供显著优化本发明方法期间需要发生的反应和进一步显著优化测定灵敏度的试剂浓度。在适当情形下,试剂盒中的一种或多种试剂可以作为通常冻干的干燥粉末(包括赋形剂)提供,其在溶解后将提供具有用于进行方法或测定的适当浓度的试剂溶液。该试剂盒可以进一步包括根据如上文所述的本发明的实施方案的方法或测定以及校正公式的书面说明书。

[0057] 如本文所使用,短语“至少”意味着指定项的数目可以等于或大于所述数目。如本文所使用,短语“约”意味着所述数目可以相差 $\pm 10\%$;例如“约5”意指4.5至5.5的范围。

[0058] 名称“第一”和“第二”是完全任意的,且并不意在表明所标识项目间的任何顺序或排序或项目的任何添加顺序。本文使用第一和第二的实例包括例如第一测定方法和第二测定方法以及第一sps成员和第二sps成员。

[0059] 以下实施例通过实例说明而非限制的方式进一步描述本发明的具体实施方案,并且意在描述,而非限制本发明的范围。本文公开的份和百分数以体积计,除非另有说明。

实施例

[0060] 校正公式的确定

采用由11种不同血清样品组成的集合,其中样品集合的每个成员都获得自不同个体。使用来自Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (Newark DE)的免疫测定法分析各样品的一部分的25(OH)维生素D的浓度。在DIMENSION®临床化学系统(Siemens Healthcare Diagnostics Inc.)上进行免疫测定。DIMENSION® EXL® 25(OH)维生素D总测定法(VitD)是基于发光氧通道免疫测定(LOCI)技术的均质竞争性化学发光免疫测定。其测量血清和血浆两者中总25(OH)维生素D浓度(25(OH) D₂和25(OH) D₃)。LOCI VitD组分包括释放试剂,两种合成珠粒试剂和生物素化单克隆抗体。第一珠粒试剂(敏化珠粒(Sensibeads))用链霉抗生物素蛋白包被且含有光敏染料,且使用类似于美国专利号6,153,442、7,022,529、7,229,842和美国专利申请公开号20050118727A中所述的方法的方法制备。所述光敏剂是双-(三己基)-硅-叔丁基酞菁。第二珠粒试剂(化学发光珠粒(Chemibeads))用25(OH)维生素D₃类似物包被,且含有化学发光染料,且通过类似于美国专利号7,179,660中所述的程序的程序制备。所述化学发光化合物为2-(4-(N,N,二-十四烷基)-苯胺基-3-苯基二甲基噻吩(thioxene)与铈螯合物。将所述样品与释放试剂(苯胺基萘磺酸(ANS))一起孵育以便从其结合蛋白释放维生素D分子。然后将反应混合物与生物素化的抗体孵育以形成25(OH)维生素D/生物素化的抗体复合物。添加化学发光珠粒以除去过量的游离生物素化抗体,然后添加敏化珠粒以触发化学发光珠粒-类似物/抗体-生物素/链霉抗生物素蛋白-敏化珠粒复合物的形成。在680 nm照射反应混合物,从敏化珠粒产生单线态氧,其扩散至化学发光珠粒并触发化学发光反应。在612 nm测量所得信号,并且其与样品中的总25(OH)维生素D的浓度成反比。

[0061] 使用ID-LC/MS/MS(同位素-稀释液相色谱/质谱/质谱法)作为参考方法分析各样品的另一部分的维生素D浓度。

[0062] 根据制造商的方案借助来自Siemens Healthcare Diagnostics Inc.的总胆固醇浓度测定(No. DF27)分析各样品的另一部分的胆固醇浓度。在测定中,胆固醇酯酶(CE)催化胆固醇酯的水解以产生游离胆固醇,其与预先存在的游离胆固醇一起在由胆固醇氧化酶(CO)催化的反应中被氧化以形成胆甾-4-烯-3-酮和过氧化氢。在辣根过氧化物酶(HPO)存在的情况下,因此形成的过氧化氢用于氧化N,N-二乙基苯胺-HCl/4-氨基安替比林(DEA-HCl/AAP)以产生在540nm吸收的发色团。由于氧化的DEA-HCl/AAP导致的吸光度与总胆固醇浓度成正比,并使用多色(452nm、540nm、700nm)端点技术(nm为纳米)测量。

[0063] 从使用参考方法对各不同样品获得的维生素D的浓度减去使用免疫测定方法对各不同样品获得的维生素D的浓度,以获得各不同样品的偏差。将各不同样品的偏差针对各不同样品的胆固醇浓度作图。结果描绘于图1中,其中[*vitD*]是维生素D的浓度,LCMS是使用参考方法测量的维生素D的浓度,DM EXL是使用免疫测定法测量的维生素D的浓度,mg是毫克,dL是分升,*y*是标准变量,*x*是预测变量,且R²是相关系数的平方。

[0064] 从上述结果开发以下校正公式:

$[An] = [mAn] + (a \times [mIS] + b)$,其中[An]是未知样品中维生素D的实际浓度,[mAn]是未知样品中维生素D的测量浓度,[mIS]是未知样品中胆固醇的测量浓度,a是回归

线的斜率,其在本实施例中是0.2213,且b是回归线的截距,其在本实施例中是-27.966。因此,所述校正公式是

$$[\text{实际维生素D}] = [\text{测量的维生素D}] + (0.2213 \times [\text{胆固醇}] - 27.966)。$$

[0065] 校正公式的验证

通过使用测量的维生素D浓度和上述校正公式计算与维生素D的实际浓度的偏差来进行上述确定的校正公式的验证。将所述偏差针对不同样品各自的胆固醇浓度作图。结果描绘于图2中,其中 $3E-5$ 是 3×10^{-5} 。如可见,在应用校正公式以测定样品中的维生素D的实际浓度之后,偏差和胆固醇浓度之间的相关性不再存在。

[0066] 如参考图3和4可见,在应用校正公式之后,相关系数(使用免疫测定法测定的维生素D浓度和使用ID-LCMS/MS方法测定的维生素D浓度之间的相关性的数据的分散)改善。在图3和4中,R是相关系数,ng是纳克,且mL是毫升。

[0067] 本说明书中引用的所有出版物和专利申请通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利申请被明确且单独指明通过引用并入一样。

[0068] 尽管已经出于清楚理解的目的通过实例说明和举例的方式详细描述了前述发明,但鉴于本发明的教导,对于本领域普通技术人员显而易见的是,在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下,可以对其进行某些变化和改变。此外,出于解释的目的,上述说明使用特定术语来提供本发明的透彻理解。然而,对于本领域技术人员将显而易见的是,不需要具体细节来实施本发明。因此,呈现本发明的上述具体实施方案的描述是为了说明和描述的目的;它们并非意在穷举或将本发明限制为所公开的精确形式。鉴于上述教导,许多改变和变化是可能的。选择并描述实施方案是为了解释本发明的原则和其实际应用,进而使本领域技术人员能够利用本发明。

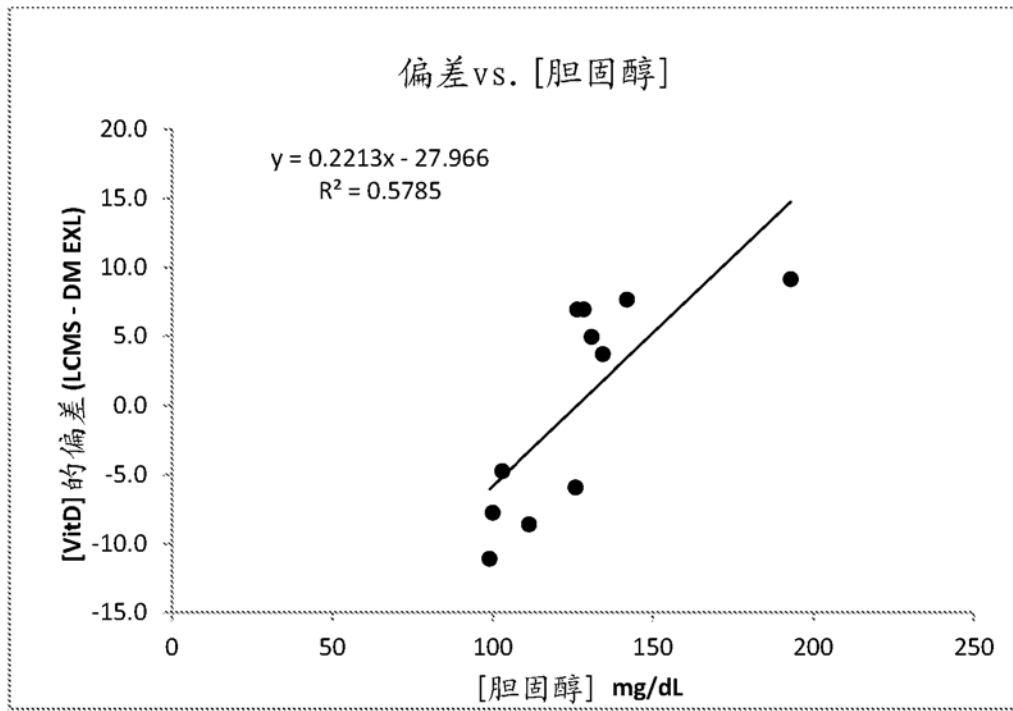


图 1

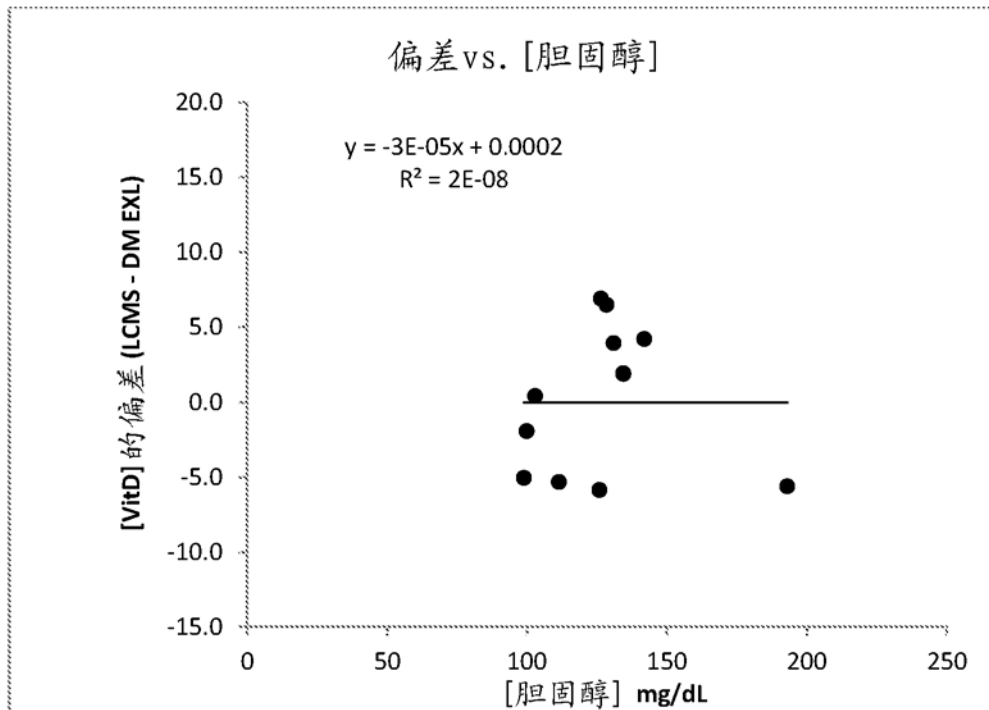


图 2

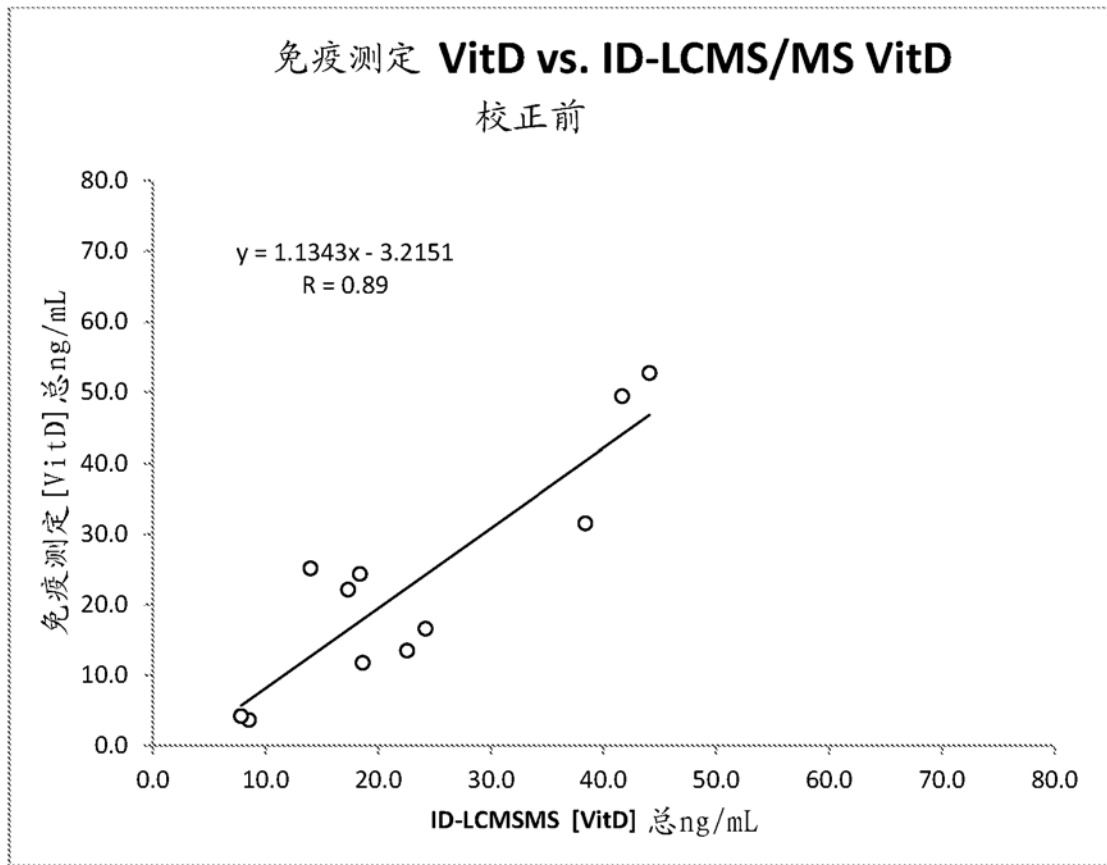


图 3

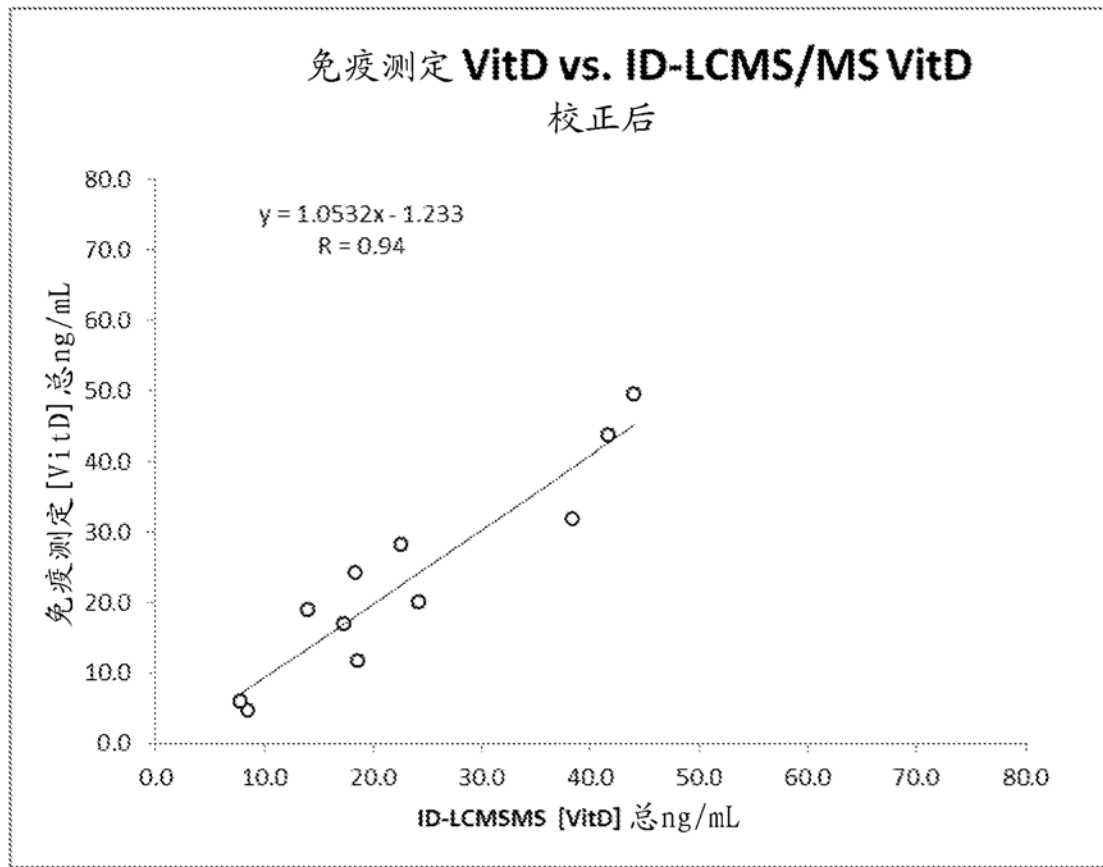


图 4

专利名称(译)	疏水性半抗原分析物的精确测定测量		
公开(公告)号	CN107002017A	公开(公告)日	2017-08-01
申请号	CN201580066356.8	申请日	2015-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
当前申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
[标]发明人	I 巴哈 魏铁全		
发明人	I.巴哈 魏铁全		
IPC分类号	C12M1/34 G01N33/50 G01N33/53		
代理人(译)	周铁 杨思捷		
优先权	62/093105 2014-12-17 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了用于测定怀疑含有疏水性半抗原分析物的未知样品中的疏水性半抗原分析物的实际浓度的方法，其中所述未知样品怀疑含有干扰物质。对未知样品进行第一测定方法以获得未知样品中的疏水性半抗原分析物的测量浓度。对未知样品进行第二测定方法以获得未知样品中的干扰物质的浓度。应用利用步骤(a)中获得的疏水性半抗原分析物的测量浓度和干扰物质的测量浓度的预先确定的校正公式，以测定未知样品中的疏水性半抗原分析物的实际浓度。

