



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107003305 A

(43)申请公布日 2017.08.01

(21)申请号 201580066003.8

(22)申请日 2015.12.04

(30)优先权数据

14196778.6 2014.12.08 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.06.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/078693 2015.12.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/091755 EN 2016.06.16

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 E.法茨 M.盖格 H-P.约泽尔

C.福格尔

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 权陆军 黄希贵

(51)Int.Cl.

G01N 33/537(2006.01)

G01N 33/541(2006.01)

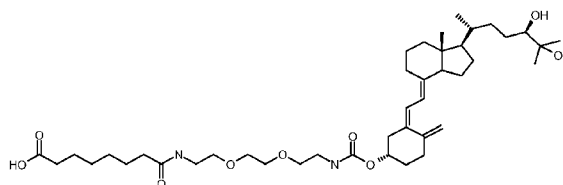
权利要求书2页 说明书28页 附图4页

(54)发明名称

用于测量维生素D的方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于测量25-羟基维生素D的体外方法,其中潜在干扰化合物24,25-二羟基维生素D₃被特异性地结合24,25-二羟基维生素D₃且不结合25-羟基维生素D的结合剂阻断。



1. 一种用于没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的体外方法,所述方法包括下述步骤:

a) 提供得自受试者的样品,其包含与维生素D-结合蛋白结合的维生素D化合物,

b) 将所述样品与以下结合剂混合

(ba) 结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂,由此形成所述第一结合剂和24,25-二羟基维生素D₃之间的复合物;

(bb) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,由此形成所述第二结合剂和25-羟基维生素D之间的复合物;

c) 测量在(bb)中形成的复合物,由此没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述样品是血液、血清或血浆。

3. 根据权利要求1和2中的任一项的方法,其中在步骤(b)之前用释放试剂从维生素D-结合蛋白释放与维生素D-结合蛋白结合的存在于样品中的维生素D化合物。

4. 根据权利要求1-3中的任一项的方法,其中

- K_d (第一结合剂) / K_d (第二结合剂) 是10或更小;和/或

- 浓度(第一结合剂) / 浓度(第二结合剂) 是至多200;

其中 K_d (第一结合剂) 是所述第一结合剂对24,25-二羟基维生素D₃的亲合力,且 K_d (第二结合剂) 是所述第二结合剂对25-羟基维生素D的亲合力,和

其中浓度(第一结合剂) 和浓度(第二结合剂) 分别是步骤b)中的第一结合剂和第二结合剂的摩尔浓度,特别地其中浓度(第一结合剂) 是在 $1 \times (1-10)$ nmol/L至 $200 \times (1-10)$ nmol/L的范围内,和/或浓度(第二结合剂) 是在1-10 nmol/L的范围内。

5. 根据权利要求1-4中的任一项的方法,其中

- 所述第一结合剂关于结合24,25-二羟基维生素D₃的 K_d 是 10^{-8} mol/L或更小;和/或

- 所述第二结合剂关于结合25-羟基维生素D的 K_d 是 10^{-8} mol/L或更小。

6. 根据权利要求1-5中的任一项的方法,其中所述方法选自酶联免疫测定(ELISA)、电化学发光免疫测定(ECLIA)、放射免疫测定(RIA)和化学发光免疫测定(CLIA)。

7. 根据权利要求1-6中的任一项的方法,其中所述25-羟基维生素D选自25-羟基维生素D₂、25-羟基维生素D₃和3-epi-25-羟基维生素D。

8. 根据权利要求1-7中的任一项的方法,其中所述第一结合剂是单克隆抗体或所述单克隆抗体的功能活性部分,且所述第二结合剂是维生素D-结合蛋白或所述维生素D-结合蛋白的功能活性部分。

9. 根据权利要求1-8中的任一项的方法,其中所述第一结合剂具有至少与所述第二结合剂相同的对24,25-二羟基维生素D₃的结合亲合力。

10. 根据权利要求1-9中的任一项的方法,其中所述第二结合剂不能释放与所述第一结合剂结合的24,25-二羟基维生素D₃。

11. 根据权利要求1-10中的任一项的方法,其中所述第一结合剂不具有对25-羟基维生素D的显著交叉反应性。

12. 根据权利要求1-11中的任一项的方法,其中所述体外检测方法作为竞争性测定来进行。

13. 根据权利要求1-12中的任一项所述的体外方法用于没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的用途。

14. 结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂和结合25-羟基维生素D的第二结合剂在用于没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定得自受试者的样品中的25-羟基维生素D的浓度的体外方法中的用途。

15. 一种用于执行根据权利要求1-12中的任一项的方法的试剂盒,所述试剂盒至少包含

a) 结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂,其中所述第一结合剂是单克隆抗体或所述单克隆抗体的功能活性部分,和

b) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,其中所述第二结合剂是维生素D-结合蛋白。

用于测量维生素D的方法

[0001] 背景信息

本发明涉及一种用于测量25-羟基维生素D的体外方法,其中潜在干扰化合物24,25-二羟基维生素D₃被特异性地结合24,25-二羟基维生素D₃且不结合25-羟基维生素D的结合剂阻断。

[0002] 如术语“维生素(vitamin)”已经暗示的,维生素D的充分供给是极其重要的。维生素D的缺乏会导致严重的疾病诸如佝偻病或骨质疏松症。尽管在上个世纪的早期维生素D仍然被视作单一物质,但是在过去的几十年中维生素D系统已经变为维生素D代谢产物的复杂且多样的网络。现在,已知超过40种不同的维生素D代谢产物(Zerwekh, J.E., Ann. Clin. Biochem. 41 (2004) 272-281)。

[0003] 人类只可以通过来自阳光的紫外线在皮肤上的作用而产生D₃维生素或麦角钙化醇。在血液中,维生素D₃结合所谓的维生素D-结合蛋白并将被运输至肝脏,在此处它通过25-羟基化转化成25-羟基维生素D₃。目前已知除皮肤和肝脏(已经提及的两个器官)之外的许多其它组织涉及维生素D代谢(Schmidt-Gayk, H. 等人(编), “Calcium regulating hormones, vitamin D metabolites and cyclic AMP”, Springer Verlag, Heidelberg (1990) 第24-47页)。25-羟基维生素D,更具体地25-羟基维生素D₂和25-羟基维生素D₃、就其数量而言,是维生素D在人生物体中的重要贮存形式。当需要时,这些前体可以在肾中转化以形成生物活性的1 α ,25-二羟基维生素D,即所谓的D激素。生物活性的维生素D尤其调节从肠的钙摄取、骨矿化,并且它影响大量其它代谢途径例如胰岛素系统。

[0004] 当确定受试者或患者的维生素D状况时,测量维生素D水平本身是没有多少益处的,因为维生素D(维生素D₂和维生素D₃)的浓度随食物摄取或者向阳光的暴露有很大波动。另外,维生素D在循环中具有相对短的生物半衰期(24小时),因此由于该原因它也不是适用于确定患者的维生素D状况的合适参数。同样也适用于维生素D的生理学活性形式(1,25-二羟基维生素D)。相对于25-羟基维生素D而言,这些生物活性形式也以相对小的且较大波动的浓度存在。由于所有这些原因,25-羟基维生素D的量化特别是全面分析受试者或患者的总维生素D状况的合适方式。

[0005] 维生素D代谢产物如25-羟基维生素D被维生素D-结合蛋白以高亲和力结合,且也在有限的程度上与白蛋白和一些脂蛋白结合。相比于从任何其它蛋白释放维生素D代谢产物而言,适于从维生素D-结合蛋白释放维生素D代谢产物的方法将在正常情况下也是非常适合的。

[0006] 25-羟基维生素D或其它维生素D化合物与维生素D-结合蛋白的结合使得维生素D化合物的确定极大地复杂化。所有已知的方法要求,待分析的维生素D化合物从它与维生素D-结合蛋白形成的复合物释放或脱离。在下文中,为了简化的目的,这被称为维生素D化合物从维生素D-结合蛋白释放,尽管当然它只可以从维生素D化合物和维生素D-结合蛋白的复合物释放,而不会从单独的维生素D-结合蛋白释放。

[0007] 维生素D-结合蛋白在酸性pH下是未折叠的,但是当pH变回中性条件时具有正确地重折叠且重新结合分析物的高趋势。因此,经常需要首先从维生素D-结合蛋白释放维生素D

化合物,然后将维生素D-结合蛋白与待分析的维生素D化合物分离。

[0008] 由于25-羟基维生素D的高临床重要性,从文献中已知大量允许大致上可靠地确定25-羟基维生素D的方法。

[0009] 例如Haddad, J.G. 等人, J. Clin. Endocrinol. Metab. 33 (1971) 992-995和Eisman, J.A. 等人, Anal. Biochem. 80 (1977) 298-305描述了使用高效液相色谱法(HPLC)确定血液样品中的25-羟基维生素D浓度。

[0010] 用于确定25-羟基维生素D的其它方案尤其是基于维生素D-结合蛋白(如存在于乳中的那些)的应用。因此,Holick, M.F.和Ray, R. (US 5,981,779)和DeLuca等人(EP 0 583 945)描述了关于羟基维生素D和二羟基维生素D的维生素D测定,其基于这些物质与维生素D-结合蛋白的结合,其中借助于竞争性测试程序来确定这些物质的浓度。但是,该方法的先决条件是,待确定的维生素D代谢产物首先必须从原始血液或血清样品分离,并且必须通过例如色谱法进行纯化。

[0011] Armbruster, F.P. 等人(WO 99/67211)教导,应当通过乙醇沉淀法制备用于维生素D确定的血清或血浆样品。在该方法中,通过离心除去蛋白沉淀物,并且乙醇上清液含有可溶性的维生素D代谢产物。这些可以在竞争性结合测定中测量。

[0012] 可选地,EP 0 753 743教导,使用高碘酸盐,可以从血液或血清样品分离蛋白。在该情况下,在来自用高碘酸盐处理过的样品的不含蛋白的上清液中确定维生素D化合物。在一些商业测试中,乙腈被推荐用于萃取血清或血浆样品(例如,在来自DiaSorin的放射免疫测定中或在“Immundiagnostik”公司的维生素D测试中)。

[0013] 在近年,提出了许多不同的释放试剂,其原则上应当适合用于从存在于样品中的任何结合蛋白释放维生素D化合物。但是,这种释放或脱离应当在相对温和条件下进行,因而能够在结合测试中直接使用经释放试剂处理过的样品(参见例如WO 02/57797和US 2004/0132104)。尽管在近年中有很多努力,但是用于确定维生素D的所有可利用的方法具有缺点,诸如费力的样品制备、差的标准化的测试程序之间的不良一致性或峰值(spiked)维生素D的差回收(就此特别参见Zerwekh, J.E., 出处同上)。

[0014] 在US 7,087,395中,金属氢氧化物以及环糊精及其衍生物和金属水杨酸盐已经用于从维生素D-结合蛋白释放维生素D化合物,这会导致维生素D-结合蛋白或其它血清蛋白的不可逆变性。表面活性剂如Triton X100或吐温-20已经用于在变性后防止维生素D化合物非特异性地结合样品中的脂质和蛋白。

[0015] 特别难以使维生素D化合物的测试自动化。自动化要求解决一个非常困难的问题,即钢丝行走存活(surviving a tightrope walk):一方面,需要借助于合适的释放试剂从维生素D-结合蛋白释放维生素D化合物,另一方面,必须选择条件使得所述样品可以直接进一步分析。该直接进一步分析的先决条件是,一方面,内源性维生素D-结合蛋白在该分析期间不会结合或不再显著地结合维生素D化合物,并因此不会干扰该分析,和另一方面,所用的释放试剂不会干扰检测试剂诸如抗体或维生素D-结合蛋白的结合。另外,已知的是,维生素D-结合蛋白的不同等位基因存在于具有不同生物化学表现的人群中。维生素D化合物的释放和测量应当是与各种等位基因/表型可比较的。

[0016] 最近(WO2011/144661),使用适当样品处理的维生素D测定可以在线执行,且无需沉淀/分离可能存在于样品中的任何维生素D-结合蛋白。该方法是基于维生素D释放试剂的

应用,所述维生素D释放试剂含有碳酸氢盐和/或在水解后能够释放碳酸氢根离子(HCO_3^-)的物质(0.1 M至2.0 M的总浓度)、还原剂和碱化剂。通过使用该释放试剂,任何维生素D化合物从维生素D-结合蛋白释放,同时,在样品中包含的维生素D-结合蛋白被灭活且不再结合维生素D。可以通过适当方式测量释放的维生素D化合物。

[0017] 在生物样品中,存在许多在结构上彼此密切相关的维生素D有关的化合物。24,25-二羟基维生素 D_3 以非常显著的量存在于几乎所有的生物样品中,且确实干扰25-羟基维生素D的测量。它的浓度依赖于样品中25-羟基维生素D的总量以及个体的临床背景,从而导致具有不同医学背景的患者组群之间的变化。可以证实,通过将样品与结合24,25-二羟基维生素 D_3 且不结合25-羟基维生素D的结合剂一起温育,可能避免由24,25-二羟基维生素 D_3 造成的干扰。

[0018] 发明概述

在一个实施方案中,本发明涉及一种没有24,25-二羟基维生素 D_3 干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的体外方法,所述方法包括下述步骤:

- a) 提供得自受试者的样品,
- b) 将所述样品与以下结合剂混合

(ba) 结合24,25-二羟基维生素 D_3 的第一结合剂,由此形成所述第一结合剂和24,25-二羟基维生素 D_3 之间的复合物;

(bb) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,由此形成所述第二结合剂和25-羟基维生素D之间的复合物;

c) 测量在(bb)中形成的复合物,由此没有24,25-二羟基维生素 D_3 干扰地确定25-羟基维生素D的浓度。

[0019] 在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法用于没有24,25-二羟基维生素 D_3 干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的用途。

[0020] 在一个实施方案中,本发明还涉及结合24,25-二羟基维生素 D_3 的第一结合剂和结合25-羟基维生素D的第二结合剂在根据本发明的没有24,25-二羟基维生素 D_3 干扰地确定得自受试者的样品中的25-羟基维生素D的浓度的体外方法中的用途。

[0021] 根据另一个实施方案,本发明涉及用于执行根据本发明的方法的试剂盒,所述试剂盒至少包含

- a) 结合24,25-二羟基维生素 D_3 的第一结合剂,其中所述第一结合剂是单克隆抗体或所述单克隆抗体的功能活性部分,和
- b) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,其中所述第二结合剂是维生素D-结合蛋白。

[0022] 发明详述

本发明涉及一种用于在有结合25-羟基维生素D的结合剂存在下确定25-羟基维生素D的总量和/或浓度的方法以及与此有关的试剂盒、组合物和用途。

[0023] 在一个实施方案中,本发明涉及一种用于没有24,25-二羟基维生素 D_3 干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的体外方法,所述方法包括下述步骤:

- a) 提供得自受试者的样品,
- b) 将所述样品与以下结合剂混合

(ba) 结合24,25-二羟基维生素 D_3 的第一结合剂,由此形成所述第一结合剂和24,25-二

羟基维生素D₃之间的复合物；

(bb) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂，由此形成所述第二结合剂和25-羟基维生素D之间的复合物；

c) 测量在 (bb) 中形成的复合物，由此没有24, 25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度。

[0024] 冠词“一个/种”在本文中用于表示一个/种或超过一个/种(即至少一个/种)该冠词的语法对象。

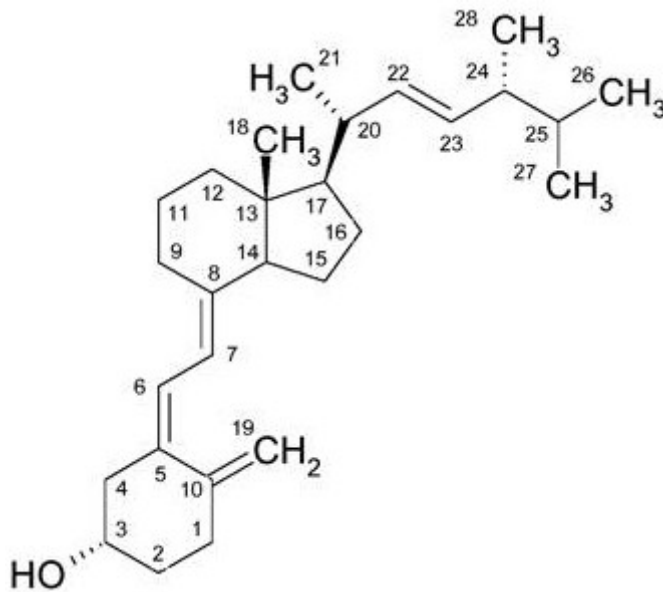
[0025] 表述“一个/种或多个/种”表示1-50个/种，优选地1-20个/种，还优选2、3、4、5、6、7、8、9、10、12或15个/种。

[0026] 术语“检测”表示定性或定量检测样品中的分析物以确定所述分析物的量和/或浓度，在本文中是指分析物(诸如25-羟基维生素D)的测量。“检测”包括任何检测方式，包括直接和间接检测。

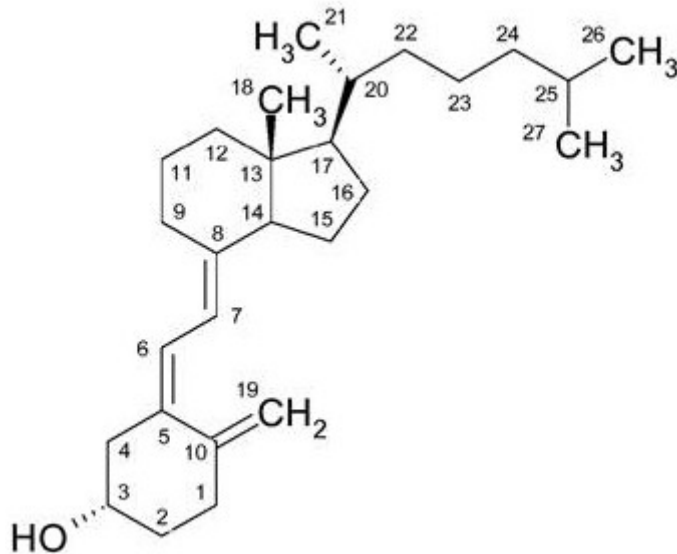
[0027] 术语“确定”在这里用于定性和定量检测样品中的分析物，且可以包括确定分析物的量和/或浓度。该术语也涵盖基于物理参数对分析物的鉴别和/或任何表征。

[0028] 如果没有另外说明，术语“25-羟基维生素D”或“维生素D化合物”应当被理解为包括含有根据以下结构式I和II的维生素D₂的主链或维生素D₃的主链的所有天然存在的化合物。

[0029] 式I



式II



[0030] 在结构式I和II中,根据类固醇命名法说明了维生素D的位置。25-羟基维生素D表示在结构式I和II的位置25处羟基化的维生素D代谢产物,即25-羟基维生素D₂以及25-羟基维生素D₃。另外的已知的羟基维生素D化合物是例如1,25-二羟基维生素D和24,25-二羟基维生素D形式。

[0031] 1,25-二羟基维生素D表示在结构式I和II的位置1处以及位置25处具有羟基化的维生素D的活性形式(所谓的D激素)。

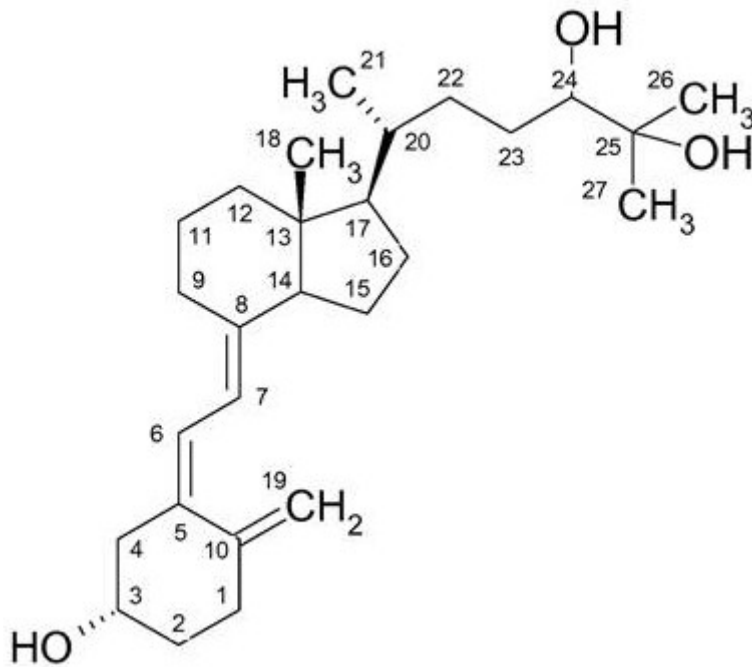
[0032] 其它众所周知的维生素D化合物是24,25-二羟基维生素D₂、24,25-二羟基维生素D₃和3-epi-25-羟基维生素D。

[0033] 在根据本发明的一个实施方案中,所述25-羟基维生素D选自25-羟基维生素D₂、25-羟基维生素D₃、24,25-二羟基维生素D₂、24,25-二羟基维生素D₃和3-epi-25-羟基维生素D。在一个优选的实施方案中,所述25-羟基维生素D选自25-羟基维生素D₂和25-羟基维生素D₃。

[0034] 24,25-二羟基维生素D₃以非常显著量存在于几乎所有的生物样品中,且确实干扰25-羟基维生素D的测量。它的浓度依赖于样品中25-羟基维生素D的总量以及个体的临床背景,从而导致具有不同医学背景的患者组群之间的变化。可以证实,通过将样品与结合24,25-二羟基维生素D₃且不结合25-羟基维生素D的结合剂一起温育,可能避免由24,25-二羟基维生素D₃造成的干扰。

[0035] 如果没有另外说明,术语“24,25-二羟基维生素D”应当理解为包括含有根据以下结构式III的维生素D₃的主链和分别在碳原子24和25处的OH基团的所有天然存在的化合物。在根据本发明的一个实施方案中,所述24,25-二羟基维生素D是24,25-二羟基维生素D₃(24(R),25-(OH)₂D₃)。

[0036] 式III



[0037] 包含分析物(例如25-羟基维生素D, 24,25-二羟基维生素D₃)的样品可以是液体、凝胶或可液化的组合物,优选液体。这样的液体可以是溶液、混悬液或乳剂。具体地,所述样品是生物样品,特别是得自人或动物的身体样品或其混合物。这样的身体样品可以在从受试者提取以后直接使用,或可以在适当条件下储存(例如通过冷冻),以便在预期的时间点执行本发明的方法。具体地,可以测量来自不同受试者和/或不同时间点的样品,以便对比受试者或监测疗法。身体样品的提取可以由技术人员执行,取决于样品。在一个优选的实施方案中,所述样品是血液、血清或血浆。在另一个实施方案中,所述样品是血液或血清。在这样的情况下,从受试者取血液。通过本领域已知的方法可以从血液得到血清。类似地,通过例如收集尿,或通过进行活组织检查,和通过进一步处理样品(如果必要的话),可以得到其它身体样品。

[0038] 如上所述,所述样品分别包含分析物25-羟基维生素D和24,25-二羟基维生素D₃。

[0039] “结合对成员”表示结合对(“bp”)的一个成员,这是指两种不同的分子,其中所述分子之一通过化学或物理方式与第二种分子结合。除了抗原和抗体结合对成员以外,其它结合对包括,作为例子,但不限于,生物素和抗生物素蛋白、碳水化合物和凝集素、互补的核苷酸序列、互补的肽序列、效应物和受体分子、酶辅因子和酶、酶抑制剂和酶、肽序列或化学部分(诸如地高辛/抗-地高辛)和对所述序列化学部分或整个蛋白特异性的抗体、聚合的酸和碱、染料和对应的蛋白结合剂、肽和特异性的蛋白结合剂(例如,核糖核酸酶、S-肽和核糖核酸酶S-蛋白)、金属和它们的螯合剂、适体等。此外,结合对可以包括这样的成员:其为原始结合成员的类似物,例如分析物-类似物或例如通过重组技术或分子工程制备的与原始结合对成员类似且具有相同结合性质的结合成员。

[0040] 在以下情况下,结合对成员是与结合对成员类似的:它们都能够以相同方式结合所述结合对的互补成员。这样的结合对成员可以例如是配体或受体,其已经通过基团对至少一个氢原子的替换而进行修饰以提供例如经标记的配体或经标记的受体。所述结合对成员可以与以下物质类似:分析物,或与所述分析物互补的结合对成员。

[0041] “结合剂”是结合对(“bp”)的一个成员,其结合所述结合对的其它成员,即对应的靶分子,例如24,25-二羟基维生素D₃。结合剂对它的对应靶分子的亲和力(K_d)是10⁻⁷ mol/L。结合剂优选地具有10⁻⁸ mol/L的亲和力。进一步优选的结合剂对它的靶分子具有10⁻⁹ mol/L的亲和力。甚至更优选的结合剂对它的靶分子具有10⁻¹⁰ mol/L的亲和力。

[0042] 技术人员会明白,术语结合24,25-二羟基维生素D₃的“第一结合剂”用于指示,存在于样品中的其它生物分子不会显著地结合对24,25-二羟基维生素D₃特异性的结合剂。优选地,特异性结合剂与除了靶分子以外的生物分子的结合水平导致这样的结合亲和力:其分别为对靶分子的亲和力的仅10%或更低,优选仅5%或更低。优选的结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂将满足以上关于亲和力以及关于特异性的最小标准。

[0043] 在一个实施方案中,根据本发明的“第一结合剂”分别选自多克隆抗体、单克隆抗体和合成抗体(塑料抗体),优选单克隆抗体或合成抗体,进一步优选单克隆抗体或所述单克隆抗体的功能活性部分。在一个实施方案中,第一结合剂结合24,25-二羟基维生素D,进一步优选地,第一结合剂结合24,25-二羟基维生素D₃。优选地,所述抗体是结合24,25-二羟基维生素D₃的单克隆抗体。进一步优选地,所述抗体是结合24,25-二羟基维生素D₃的塑料抗体。

[0044] 根据本发明的“塑料抗体”是具有抗体-样功能的合成聚合物纳米颗粒(Hoshino, Y. 等人, J. Mater. Chem., 2011, 21, 3517-3521)。根据本发明的塑料抗体能够结合和中和特定24,25-二羟基维生素D₃。

[0045] 在一个实施方案中,根据本发明的“第二结合剂”是结合25-羟基维生素D的维生素D-结合蛋白(VitD-BP)或抗体或所述抗体的功能活性部分。进一步优选地,所述第二结合剂是维生素D-结合蛋白,优选重组维生素D-结合蛋白。在另一个实施方案中,所述第二结合剂是维生素D-结合蛋白的功能活性部分,优选维生素D-结合蛋白的结构域I。

[0046] 在本发明的实施例中,抗体mAb<24,25-二羟基维生素D₃>rK-IgG成功地用作第一结合剂。在一个优选的实施方案中,所述第一结合剂是mAb<24,25-二羟基维生素D₃>rK-IgG。

[0047] 天然存在的抗体是共享基础结构的球状血浆蛋白(约150 kDa (http://en.wikipedia.org/wiki/Dalton_unit)),其也被称作免疫球蛋白。因为它们具有添加至氨基酸残基的糖链,所以它们是糖蛋白。每个抗体的基本功能单元是免疫球蛋白(Ig)单体(含仅1个Ig单元);分泌抗体还可以是具有2个Ig单元的二聚体如IgA、具有4个Ig单元的四聚体如硬骨鱼IgM、或具有5个Ig单元的五聚体如哺乳动物IgM。在本发明中,合适形式的例子包括天然存在的抗体的形式,包括称为IgA、IgD、IgE、IgG和IgM的抗体同种型。

[0048] Ig单体是由4个多肽链组成的“Y”形分子;2个相同的重链和2个相同的轻链通过半胱氨酸残基之间的二硫键连接。每个重链是约440个氨基酸长度;每个轻链是约220个氨基酸长度。重链和轻链各含有稳定其折叠的链内二硫键。每个链由称为Ig结构域的结构域组成。这些结构域含有约70-110个氨基酸,并根据其大小和功能分成不同类别(例如可变或V,以及恒定或C)。它们具有特征性的免疫球蛋白折叠,其中2个β折叠产生“夹层”形状,通过保守的半胱氨酸和其它带电氨基酸之间的相互作用保持在一起。

[0049] 存在五类哺乳动物Ig重链,用α、δ、ε、γ和μ表示。存在的重链类型限定了抗体的同种型;这些链分别存在于IgA、IgD、IgE、IgG和IgM抗体中。

[0050] 不同的重链在大小和组成上不同; α 和 γ 含有约450个氨基酸, δ 含有约500个氨基酸, 而 μ 和 ϵ 具有约550个氨基酸。每个重链具有两个区域, 恒定区 (CH) 和可变区 (VH)。在一个物种中, 恒定区在相同同种型的所有抗体中是相同的, 但是在不同同种型的抗体中不同。重链 γ 、 α 和 δ 具有由3个串联Ig结构域组成的恒定区和用于提高柔性的铰链区; 重链 μ 和 ϵ 具有由4个免疫球蛋白结构域组成的恒定区。重链的可变区在由不同B细胞产生的抗体中不同, 但是对于由单个B细胞或B细胞克隆产生的所有抗体均相同。每个重链的可变区是约110个氨基酸长度, 由单个Ig结构域组成。

[0051] 在哺乳动物中, 存在两类免疫球蛋白轻链, 用 λ 和 κ 表示。轻链具有2个连续结构域: 一个恒定结构域 (CL) 和一个可变结构域 (VL)。轻链的近似长度是211-217个氨基酸。每个抗体含有2个总是相同的轻链; 在哺乳动物中在每个抗体中仅存在一类轻链, κ 或 λ 。其它类型的轻链 (诸如 ι 链) 存在于低等脊椎动物如软骨鱼纲 (Chondrichthyes) 和真骨鱼次亚纲 (Teleostei)。

[0052] 除了天然存在的抗体以外, 已经开发了人工抗体形式, 包括抗体片段。下面描述它们中的一些。

[0053] 尽管所有抗体的一般结构非常相似, 但是给定抗体的独特性质由如上详述的可变 (V) 区决定。更具体地, 可变环 (每个轻 (VL) 链3个, 重 (VH) 链上3个) 负责与抗原结合, 即负责其抗原特异性。这些环被称为互补性决定区 (CDR)。因为来自 VH 和 VL 结构域的 CDR 为抗原结合位点做出贡献, 所以正是重链和轻链的组合而非单独的任一种决定最终的抗原特异性。

[0054] 因此, 本文中使用的术语“抗体”意指与天然存在的抗体具有结构相似性且能够特异性地结合各自靶标的任何多肽, 其中结合特异性由 CDR 决定。因此, “抗体”意图涉及结合各自靶标的、免疫球蛋白衍生的结构, 包括、但不限于选择性地结合各自靶标的全长或完整抗体、抗原结合片段 (实际上或概念上从抗体结构衍生的片段)、前述任一种的衍生物、嵌合分子、前述任一种与另一种多肽的融合物、或任何替代性结构/组成。抗体或其功能活性部分可以是包含至少一个抗原结合片段的任何多肽。抗原结合片段至少由重链的可变结构域和轻链的可变结构域组成, 所述可变结构域以两个结构域一起能够结合特定抗原的方式排列。“各自靶标”在捕获分子、结合分子和检测分子的情况下是分析物, 和在抗-独特型抗体作为优选的捕获分子的情况下是结合分子。

[0055] “全长”或“完全”抗体表示包含通过二硫键互相连接的2个重 (H) 链和2个轻 (L) 链的蛋白, 其包含: (1) 就重链而言, 可变区和包含3个结构域 CH1、CH2 和 CH3 的重链恒定区; 和 (2) 就轻链而言, 轻链可变区和包含1个结构域 CL 的轻链恒定区。至于术语“完全抗体”, 任何抗体意指其具有天然存在的抗体的通常总体结构域结构 (即包含3或4个恒定结构域的重链和1个恒定结构域的轻链以及各自的可变结构域), 即使每个结构域可以包含不改变总体结构域结构的其它修饰, 诸如突变、缺失或插入。

[0056] “抗体的功能活性部分”或“抗体片段”还含有至少一个如上定义的抗原结合片段, 并且表现出与所述功能活性部分 (或片段) 所来源的完全抗体基本上相同的功能和结合特异性。用木瓜蛋白酶进行的有限蛋白水解消化将 Ig 原型切割成3个片段。2个相同的氨基端片段 (各含有一个完整的 L 链和约半个 H 链) 为抗原结合片段 (Fab)。第3个片段 (大小相似但含有带有其链间二硫键的两个重链的羧基端一半) 为可结晶片段 (Fc)。Fc 含有糖、补体结合位点和 FcR 结合位点。有限的胃蛋白酶消化会产生含有 Fab 片段和铰链区的单个 F(ab')₂ 片

段,包括H-H链间二硫键。F(ab')₂对于抗原结合而言是二价的。可以切割F(ab')₂的二硫键以获得Fab'。此外,重链和轻链的可变区可以融合在一起以形成单链可变片段(scFv)。

[0057] 由于全尺寸的抗体的第一代存在某些问题,所以第二代抗体中的许多仅包含抗体的片段。可变结构域(Fv)是由一个VL和一个VH组成的、具有完整抗原结合结构域的最小片段。通过酶促方案或相关基因片段的表达(例如在细菌和真核细胞中),可以产生仅具有结合结构域这类片段。可以使用不同的方案,例如单独的Fv片段或包含“Y”的上臂之一的'Fab'-片段,后者包括Fv+第一恒定结构域。经常通过在两个链之间引入多肽键(其导致单链Fv(scFv)的产生)来稳定这些片段。可选地,可以使用二硫键连接的Fv(dsFv)片段。片段的结合结构域可以与任何恒定结构域组合以产生全长抗体,或者可以与其它蛋白和多肽融合。

[0058] 重组抗体片段是单链Fv(scFv)片段,其是根据本发明的抗体的优选功能活性部分。一般而言,它对它的抗原具有高亲和力,并且可以在多种宿主中表达。这些和其它性质使得scFv片段不仅可适用于医学中,而且具有用于生物技术的潜力。如上文详述的,在scFv片段中,VH和VL结构域用亲水的和柔性的肽接头连接,这会改善表达和折叠效率。经常使用约15个氨基酸的接头,其中最常使用(Gly4Ser)3接头。根据所用的接头,scFv分子可能容易地蛋白水解地降解。随着基因工程技术的发展,聚焦于改善功能和稳定性的研究实际上可以克服这些限制。一个例子是产生二硫键稳定的(或二硫键连接的)Fv片段,其中通过链间二硫键稳定VH-VL二聚体。将半胱氨酸引入在VL和VH结构域之间的界面处,从而形成将2个结构域保持在一起的二硫键。

[0059] scFv的解离会产生单体scFv,其可以复合成二聚体(双体)、三聚体(三体)或更大的聚集体诸如TandAb和Flexibody,它们也代表根据本发明的抗体的功能活性部分。

[0060] 通过具有简单多肽键的2个scFv的结合(scFv)₂或通过2个单体的二聚化(双体),可以产生具有2个结合结构域的抗体。最简单的设计是具有两个功能性抗原结合结构域的双体,所述抗原结合结构域可以是相同的、相似的(二价双体)或对不同抗原具有特异性(双特异性双体)。这些双特异性抗体允许例如将新的效应子功能(诸如细胞毒性的T细胞)募集至靶细胞,这使得它们在医学应用中非常有用。

[0061] 并且,已经开发出包含4个重链可变结构域和4个轻链可变结构域的抗体形式。这些的例子包括四价双特异性抗体(TandAb和Flexibody,Affimed Therapeutics AG, Heidelberg.Germany)。与双特异性双体相比,双特异性的TandAb是仅由一种多肽组成的同源二聚体。因为2个不同的链,所以双体可以构建3种不同的二聚体,其中仅一种具有功能。因此,生产并纯化这种均质产物是更简单和更便宜的。此外,TandAb经常显示更好的结合性质(具有两倍的结合位点数目)和增加的体内稳定性。Flexibody是scFv与双体多聚体基序的组合,从而产生具有高度柔性的多价分子用于连接在细胞表面上彼此相距相当远的2个分子。如果存在超过两个功能性抗原结合结构域和如果它们对不同抗原具有特异性,那么所述抗体是多特异性的。

[0062] 总之,代表抗体或其功能活性部分的特定免疫球蛋白类型包括、但不限于以下抗体:Fab(具有可变轻(VL)链结构域、可变重(VH)链结构域、恒定轻(CL)链结构域和恒定重链1(CH1)结构域的单价片段)、F(ab')₂(包含通过在铰链区处的二硫键或替代键连接的2个Fab片段的二价片段)、Fv(VL和VH结构域)、scFv(单链Fv,其中VL和VH通过接头(例如,肽接

头)连接)、双特异性的抗体分子(具有如本文中所述的特异性的抗体分子,其连接至具有不同于所述抗体的结合特异性的第二功能部分,包括、但不限于,另一种肽或蛋白诸如抗体或受体配体)、双特异性的单链Fv二聚体、双体、三体、四体、微体(minibody)(与CH3连接的scFv)。

[0063] 某些抗体分子或其功能活性部分(包括、但不限于,Fv、scFv、双体分子或结构域抗体(Domantis))可以通过掺入二硫键使VH和VL结构域成线状排列来稳定。可以使用常规技术产生双特异性抗体,其具体方法包括化学方法生产或得自杂合杂交瘤和其它技术,包括、但不限于BiTETM技术(具有不同特异性的抗原结合区与肽接头的分子)和凸起-进入-孔洞工程改造。

[0064] 因此,抗体分子或其功能活性部分可以是Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、(scFv)₂、二价抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、双体、三体、四体或微体。

[0065] 在另一个优选的实施方案中,所述抗体是单克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体。单克隆抗体是相同的单特异性抗体,因为它们由一类免疫细胞产生,所述免疫细胞都是单个母细胞的克隆。嵌合抗体是这样的抗体:其中一个物种的免疫球蛋白的至少一个区域与另一个物种的免疫球蛋白的另一个区域通过基因工程融合以降低其免疫原性。例如鼠VL区和VH区可以与人免疫球蛋白的其余部分融合。嵌合抗体的一种具体类型是人源化抗体。通过将编码非人抗体的CDR的DNA与产生人抗体的DNA合并,产生人源化抗体。得到的DNA构建体然后可以用来表达和产生通常不具有像非人胃肠外抗体或嵌合抗体那样的免疫原性的抗体,因为仅CDR是非人的。

[0066] 在本发明的一个优选实施方案中,在本发明的方法中使用的抗体分子或其功能活性部分包含选自以下的重链免疫球蛋白恒定结构域:人IgM恒定结构域、人IgG1恒定结构域、人IgG2恒定结构域、人IgG3恒定结构域、人IgG4恒定结构域、人IgE恒定结构域和人IgA恒定结构域。

[0067] 如上面在本发明的抗体的背景下详述的,天然存在的抗体的每个重链具有2个区域,恒定区和可变区。存在五类哺乳动物免疫球蛋白重链: γ 、 δ 、 α 、 μ 和 ϵ ,它们分别限定了免疫球蛋白类别IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。

[0068] 在人类中存在4个IgG亚类(IgG1、2、3和4),以它们在血清中的丰度顺序命名(IgG1是最丰富的)。尽管在其IgG亚类的Fc区之间存在约95%相似性,但是铰链区的结构是相对不同的。介于Fab臂(片段抗原结合)和2个重链的2个羧基端结构域CH2和CH3之间的该区域决定了分子的柔性。上铰链(朝向氨基端)区段允许Fab臂之间角度的变异性(Fab-Fab柔性)以及每个单个Fab的旋转柔性。下铰链区(朝向羧基端)的柔性直接决定Fab臂相对于Fc区的位置(Fab-Fc柔性)。铰链依赖性的Fab-Fab和Fab-Fc柔性在触发其它效应子功能(诸如补体激活和Fc受体结合)方面可能是重要的。因此,铰链区的结构给4个IgG类别中的每一个提供它们的独特的生物学概况。

[0069] 铰链区的长度和柔性在IgG亚类之间变化。IgG1的铰链区包括氨基酸216-231,并且因为它是自由柔性的,因此Fab片段可以绕它们的对称轴旋转并在以2个重链间二硫键中的第一个为中心的球体内移动。IgG2具有比IgG1更短的铰链,具有12个氨基酸残基和4个二硫键。IgG2的铰链区缺乏甘氨酸残基,它相对较短且含有刚性聚脯氨酸双螺旋,其通过额外的重链间二硫键而稳定。这些性质限制IgG2分子的柔性。IgG3与其它亚类的差别在于它的

独特的延长的铰链区(长度是IgG1铰链的约4倍),所述延长的铰链区含有62个氨基酸(包括21个脯氨酸和11个半胱氨酸),从而形成无柔性的聚脯氨酸双螺旋。在IgG3中,Fab片段相对远离Fc片段,从而给分子提供较大柔性。IgG3中延长的铰链也造成其相对于其它亚类更大的分子量。IgG4的铰链区比IgG1的铰链区更短,并且它的柔性是在IgG1和IgG2的柔性中间。

[0070] 在维生素D-结合蛋白用作第二结合剂的情况下,在一个实施方案中,在该温育步骤中的pH优选地选自pH 6.0和pH 9.0之间。

[0071] 在一个实施方案中,在结合25-羟基维生素D的抗体用作第二结合剂的情况下,在该温育步骤中的pH将在pH 5和pH 8之间,优选地在该温育步骤中的pH将在pH 5.5和pH 7.5之间。

[0072] 根据一个具体实施方案,所述第一结合剂是单克隆抗体或所述单克隆抗体的功能活性部分,且所述第二结合剂是维生素D-结合蛋白或所述维生素D-结合蛋白的功能活性部分。

[0073] 在另一个实施方案中,所述第一结合剂是单克隆抗体或所述单克隆抗体的功能活性部分,且所述第二结合剂是单克隆抗体或所述单克隆抗体的功能活性部分。

[0074] 还在另一个实施方案中,所述第一结合剂是mAb<24,25-二羟基维生素D₃>或所述单克隆抗体的功能活性部分,且所述第二结合剂是mAb<25-羟基维生素D>或所述单克隆抗体的功能活性部分。

[0075] 在根据本发明的一个实施方案中,结合剂携带用于固定化的工具且可以用于固定化。所述用于固定化的工具可以允许共价地或非共价地结合支持物,优选固体支持物。

[0076] 术语“固体支持物”或“固相”表示固相中的材料,其通过非均相反应与液相中的试剂相互作用。固体支持物的应用是化学、生物化学、药学和分子生物学领域中众所周知的。根据要解决的技术问题,已经开发了许多类型的固体支持物。这些中的任一种可以用在本发明的上下文中。例如,在本发明的方法中使用的固体支持物可以包括以下组分:二氧化硅、醋酸纤维素、硝酸纤维素、尼龙、聚酯、聚醚砜、聚烯烃或聚偏氟乙烯或它们的组合。其它合适的固体支持物包括、但不限于可控孔度玻璃、玻璃板或载玻片、聚苯乙烯和活化的葡聚糖。在其它方面,合成的有机聚合物诸如聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯和聚苯乙烯也是示例性的支持物表面。另外,多糖诸如纤维素和葡聚糖是支持物表面的其它示例性例子。其它支持物表面诸如纤维也是可行的。

[0077] 常见的树脂支持物(用在例如组合化学或蛋白质化学中)包括聚苯乙烯树脂,例如与二乙烯基苯交联;羟基甲基聚苯乙烯;氨基甲基聚苯乙烯;TentaGel树脂(TG)和ArgoGel(AG):聚苯乙烯/DVB-聚乙二醇接枝共聚物(PS-PEG) - Bayer; Crowns/Pins (CP) (辐射接枝的聚乙烯/聚丙烯支持物);基于硅藻土/聚丙烯酰胺的树脂(KPA);可控孔度玻璃; PEGA-聚乙二醇/二甲基丙烯酰胺共聚物。

[0078] 可以使用已修饰或活化的(以包含允许实体或支持物与结合剂(例如蛋白或抗体)共价偶联的官能团)固体支持物完成向固体支持物的固定化。通常采用脂肪族连接臂。结合剂,尤其是蛋白或抗体,还可以通过例如离子或疏水机制非共价地连接至表面,并且通过局部地抑制这些机制的释放剂而脱离。另外,通过首先用氨基硅烷活化表面,可以完成结合剂(例如蛋白或抗体)与表面(例如玻璃或金属氧化物表面)的共价连接。用胺反应性官能团衍生的结合剂随后可以连接至表面。支持物,尤其是固体支持物,可以经由一个或多个附接

位点通过共价或非共价键合用蛋白诸如酶、肽、寡核苷酸和多核苷酸衍生化,由此将相同的酸结合至固体支持物。

[0079] 可以将(固体)支持物包含在容器中,其中所述容器是管(诸如离心管或旋转管)、注射器、筒、腔室、多孔平板或试管或其组合。(固体)支持物可以经过预处理或官能化以允许与结合剂发生接头介导的结合。在一个实施方案中,所述固体支持物可以是纤维状或颗粒状,其通常允许适当的接触。适用于本发明的方法中的(固体)支持物的大小可以根据所选的方法变化。第一结合剂或第二结合剂分别可以仅结合至一个(固体)支持物(例如一个容器或多孔板),或可以结合至许多(固体)支持物(例如珠子)。适用于本发明的方法中的(固体)支持物的形状可以是,例如,薄片、预制盘、圆柱体、单纤维或由微粒构成的固体支持物。在一个实施方案中,所述(固体)支持物可以是纤维状或颗粒状以允许最佳接触。(固体)支持物的大小可以变化,并且可以根据将要进行的方法进行选择。

[0080] 在某些实施方案中,所述固体支持物是测试条、芯片(特别是微阵列或纳米阵列芯片)、微量滴定板或微粒(珠子)。

[0081] 许多商业测试系统是基于用抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素(SA)包被的固体支持物的应用,例如SA-包被的微量滴定板、SA-包被的晶格或SA-包被的微粒(珠子)。

[0082] 在测试程序之前或过程中,例如,使生物素化的分析物衍生物结合至该SA固体支持物。当检测维生素D化合物时,该生物素化的分析物衍生物化合物可以例如是生物素化的25-羟基维生素D₂和/或生物素化的25-羟基维生素D₃。

[0083] 在本发明的一个实施方案中,体外检测方法作为竞争性测定来进行。在这样的竞争性测试中,以确定的量加入测试的维生素D化合物的衍生物与来自样品的对应维生素D化合物竞争特异性结合剂的结合位点。在样品中存在的维生素D化合物越多,检测信号越小。

[0084] 在一个实施方案中,所述维生素D化合物的衍生物是生物素化的维生素D化合物。在另一个实施方案中,所述生物素化的维生素D化合物是生物素化的25-羟基维生素D₂和/或生物素化的25-羟基维生素D₃。在另一个实施方案中,所述生物素化的维生素D化合物是生物素化的25-羟基维生素D₂。

[0085] 在一个实施方案中,所述维生素D化合物的衍生物是钌化(ruthenylated)的维生素D化合物。在另一个实施方案中,所述钌化的维生素D化合物是钌化的25-羟基维生素D₂和/或钌化的25-羟基维生素D₃。在另一个实施方案中,所述钌化的维生素D化合物是钌化的25-羟基维生素D₂。

[0086] 如上面所提及的,用在本说明书所公开的检测方法中的优选第二结合剂是抗体和维生素D-结合蛋白。如果以竞争性测定形式使用,那么维生素D-结合蛋白将导致与其竞争对一种或多种(生物素化的)维生素D化合物衍生物的结合的所有维生素D化合物的集成测量。在一个实施方案中,所述维生素D-结合蛋白被可检测地标记,例如钌化。

[0087] 在一个实施方案中,以竞争性测定形式执行根据本发明的方法,其中

i) 所述固体支持物是SA-包被的微粒(珠子),所述竞争剂是生物素化的维生素D化合物的衍生物,且所述第二结合剂是钌化的维生素D-结合蛋白缀合物,或者

ii) 所述固体支持物是SA-包被的微粒(珠子),所述竞争剂是钌化的维生素D缀合物,且所述第二结合剂是生物素化的维生素D-结合蛋白缀合物。

[0088] 根据一个优选的实施方案,所述第一结合剂阻止24,25-二羟基维生素D₃与第二结

合剂的结合。在一个更进一步优选的实施方案中,所述与第一结合剂结合的24,25-二羟基维生素D₃不可被所述第二结合剂结合。还在另一个实施方案中,所述第二结合剂不能释放与第一结合剂结合的24,25-二羟基维生素D₃。

[0089] 本领域技术人员知道,存在于得自受试者的样品中的维生素D化合物结合至维生素D-结合蛋白。因此,在根据本发明的方法中,在一个具体实施方案中,在步骤(b)之前用释放试剂从维生素D-结合蛋白释放与维生素D-结合蛋白结合的存在于样品中的维生素D化合物。

[0090] 在一个实施方案中,根据所述方法提供的得自受试者的样品包含与维生素D-结合蛋白结合的维生素D化合物。

[0091] 释放试剂会使维生素D-结合蛋白变性,优选地释放试剂使维生素D-结合蛋白不可逆地变性。

[0092] 在一个具体实施方案中,在步骤(b)之前通过分别选自蛋白水解性降解、酸性释放、碱性释放、甲醇释放、乙醇沉淀(WO 99/67211)、高碘酸盐释放(EP 0 753 743)、乙腈萃取、金属氢氧化物释放(US 7,087,395)、通过环糊精和/或其衍生物释放(US 7,087,395)或金属水杨酸盐释放(US 7,087,395)的方法从维生素D-结合蛋白释放维生素D化合物。本领域技术人员知道适合在测定/测量维生素D化合物之前释放与维生素D-结合蛋白结合的维生素D化合物的方法。近年来,提出了许多不同的释放试剂,其原则上应当适合于从存在于样品中的任何结合蛋白释放维生素D化合物。

[0093] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的体外方法,所述方法包括下述步骤:

a) 提供得自受试者的样品,和

用释放试剂释放与维生素D-结合蛋白结合的存在于样品中的维生素D化合物,

b) 将所述样品与以下结合剂混合

(ba) 结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂,由此形成所述第一结合剂和24,25-二羟基维生素D₃之间的复合物;

(bb) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,由此形成所述第二结合剂和25-羟基维生素D之间的复合物;

c) 测量在(bb)中形成的复合物,由此没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度。

[0094] 根据一个具体实施方案,在步骤(b)之前通过碱性释放从维生素D-结合蛋白释放维生素D化合物。碱性条件导致维生素D-结合蛋白的变性和存在于要研究的样品中的维生素D化合物的释放。碱化剂的浓度必须足以在步骤(b)之前在预处理反应中使“试剂混合物”(= 要研究的样品+ 碱化剂+ 额外试剂)的pH增加到至少pH 10.0,优选地增加到至少pH 10.5,更优选地增加到至少11.0。技术人员知道,在混合要研究的样品+碱化剂+额外试剂时,必须测量试剂混合物的pH。由于碳酸氢盐和/或在水解后能够释放碳酸氢根离子(HCO₃⁻)的物质的水解,试剂混合物中的pH将降低。

[0095] 在一个具体实施方案中,所述释放试剂包含碳酸氢盐和/或在水解后能够释放碳酸氢根离子(HCO₃⁻)的物质(在0.1 M至2.0 M的浓度)、还原剂和碱化剂。在另一个具体实施方案中,所述释放试剂包含碳酸氢盐(在0.1 M至2.0 M的浓度)、还原剂和碱化剂。在另一个

具体实施方案中,所述释放试剂包含在水解后能够释放碳酸氢根离子(HCO_3^-)的物质(在0.1 M至2.0 M的浓度)、还原剂和碱化剂。这样的释放试剂和释放方法详细描述在WO 2011/144661和WO 2013/072342中。

[0096] “碳酸氢根离子”是具有经验式 HCO_3^- 和61.01道尔顿的分子质量的阴离子。

[0097] “碳酸氢盐”是选自碳酸氢钠(NaHCO_3)、碳酸氢钾(KHCO_3)、碳酸氢铵(NH_4HCO_3)、碳酸氢钙($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$)和碳酸氢镁($\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$)的化合物。

[0098] 根据本发明的一个实施方案,“在水解后能够释放碳酸氢根离子(HCO_3^-)的物质”是碳酸酯。根据本发明的“碳酸酯”是侧接两个烷氧基的羰基。这些碳酸酯的一般结构是 $\text{R}_1\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{OR}_2$ 。存在可得到的环状碳酸酯(例如碳酸乙烯酯)或者非环状碳酸酯(例如碳酸二甲酯)以及它们的羟基化或卤化衍生物。

[0099] 本领域技术人员知道选择合适的还原剂,例如选自2-巯基乙醇、2-巯基乙胺-HCl、TCEP、半胱氨酸-HCl和二硫苏糖醇(DTT)。

[0100] 技术人员还知道选择合适的碱化剂,例如选自NaOH、KOH、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 和LiOH或其混合物。

[0101] 有利的是,在根据本发明的方法的步骤(b)之前使分析物(维生素D化合物)从结合分子(维生素D-结合蛋白)基本上完全释放。

[0102] 在一个具体实施方案中,在根据本发明的方法的步骤(b)中,使所述第一结合剂和所述第二结合剂与样品同时接触。换言之,在一个具体实施方案中,根据本发明的方法同时执行步骤(ba)和(bb)。

[0103] 在一个具体实施方案中,在根据本发明的方法的步骤(b)中,在使所述第二结合剂与样品接触之前或之后,使所述第一结合剂与样品接触。换言之,在一个具体实施方案中,根据本发明的方法在步骤(bb)之前执行步骤(ba)。在另一个实施方案中,根据本发明的方法在步骤(bb)之后执行步骤(ba)。

[0104] 在根据本发明的方法的一个实施方案中,在免疫测定程序中测定/测量/检测25-羟基维生素D的浓度。

[0105] 免疫测定是技术人员众所周知的。用于进行这样的测定的方法以及实际应用和程序总结在有关的教科书中。有关的教科书的例子是Tijssen, P., Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates, 见: Practice and theory of enzyme immunoassays, 第221-278页, Burdon, R.H. 和v. Knippenberg, P.H. (编), Elsevier, Amsterdam (1990), 和Methods in Enzymology的各卷, Colowick, S.P., 和Caplan, N.O. (编), Academic Press), 涉及免疫学检测方法, 特别是第70、73、74、84、92和121卷。

[0106] 在一个实施方案中,用于确定25-羟基维生素D的浓度的方法选自酶联免疫测定(ELISA)、电化学发光免疫测定(ECLIA)、放射免疫测定(RIA)和化学发光免疫测定(CLIA)。在一个优选的实施方案中,在酶联免疫测定(ELISA)中检测25-羟基维生素D。在另一个优选的实施方案中,在(电)化学发光免疫测定(ECLIA)中检测25-羟基维生素D。在另一个实施方案中,在放射免疫测定(RIA)中检测25-羟基维生素D。一个优选的实施方案还是用于确定25-羟基维生素D的化学发光免疫测定(CLIA)。进一步优选的测定是夹心荧光免疫测定(FIA)、微粒捕获酶免疫测定(MEIA)、固相荧光免疫测定(SPFIA)、颗粒浓度荧光免疫测定

(PCFIA), 具有和没有胶乳颗粒增强 (LPFA) 的浊度和比浊测定。在一个实施方案中, 所述测定还可以呈测试条的形式。

[0107] 在此时, 存在许多商购可得的用于分析测量的利用电化学发光 (ECL) 的仪器。关于综述, 参见 Richter, M.M., Chem. Rev. 104 (2004) 3003-3036。可以被诱导以发射 ECL 的物质 (ECL-活性物质) 已经被用作 ECL 标记。ECL 标记的例子包括有机金属化合物诸如三-二吡啶基-钌 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 部分, 其中金属来自例如 VII 和 VIII 族的金属, 包括 Re、Ru、Ir 和 Os。在 ECL 过程中与 ECL 标记反应的物质在本文中被称作 ECL 共反应物。用于 ECL 的常用共反应物包括叔胺 (例如三丙胺 (TPA))、草酸盐和过硫酸盐。由 ECL 标记和共反应物的协调反应产生光; 通过测量从 ECL 标记发射的 ECL, 可以监测结合试剂在结合相互作用中的参与。可选地, 来自 ECL-活性化合物的 ECL 信号可以指示化学环境 (参见, 例如, 美国专利号 5,641,623 和 5,643,713, 它们描述了监测特殊 ECL 共反应物的存在或破坏的 ECL 测定)。关于 ECL、ECL 标记、ECL 测定和用于进行 ECL 测定的仪器的更多背景, 参见 EP 0 441 875、EP 0 500 305、EP 0 973 035、EP 1 892 524、和公开的 PCT No. W087/06706; W089/10551; W090/05301; W093/01308; W098/12539; W099/32662; W099/58962; W098/57154 和 W02001/013095。

[0108] 商购可得的 ECL 仪器已经表现出优异性能。由于包括它们的优良灵敏度、动态范围、精确度和复杂样品基质的耐受性在内的原因, 它们已经变得广泛应用。商购可得的仪器使用基于流动池的设计, 其具有永久的可重复使用的流动池。

[0109] 用于确定分析物的可用样品体积经常是有限的, 并且在一个样品中必须确定越来越多的不同分析物。还需要开发用于测定自动化的更快实验室设备和用于检测分析物的更敏感方法。这会导致对高敏感的和特异性的电化学发光测定和用于执行它们的方法的需要。另外, 应当考虑与安全性危害或环境担忧有关的改进。

[0110] 在另一个实施方案中, 在夹心测定中确定 25-羟基维生素 D。

[0111] 在另一个优选的实施方案中, 为了确定样品中的 25-羟基维生素 D, 使用夹心免疫测定。这样的夹心免疫测定没有 24, 25-二羟基维生素 D₃ 干扰地特异性地检测样品中的 25-羟基维生素 D。

[0112] 在一个实施方案中, 在夹心测定中, 将根据本发明的第二结合剂用于捕获 25-羟基维生素 D, 并将第三结合剂 (其被标记成直接地或间接地可检测的) 用于捕获由第二结合剂和 25-羟基维生素 D 形成的复合物。

[0113] 在夹心型测定形式中使用的第二结合剂和第三结合剂在一个实施方案中分别是抗体, 或在另一个实施方案中是维生素 D-结合蛋白 (作为第二结合剂) 和抗体 (作为第三结合剂) 的组合。在将抗体用在夹心型测定中的情况下, 在一个实施方案中还可以使用抗体的功能活性部分。

[0114] 在一个实施方案中, 将本发明的试剂盒用于定性 (25-羟基维生素 D 存在与否) 或定量 (确定 25-羟基维生素 D 的量) 或半定量 (相对量, 特别在给出的截止值以上或以下) 免疫测定。

[0115] 在一个优选的实施方案中, 在电化学免疫测定或电化学发光免疫测定 (=ECLIA) 中检测 25-羟基维生素 D。在电化学测定或电化学发光测定中, 通过与检测剂 (靶分子) 连接的标记来检测结合的分析物分子。电极电化学地开始与检测剂连接的化学标记的发光。由标记发射的光用光检测器来测量, 并指示结合的分析物分子/靶分子复合物的存在或量。ECLA

方法描述在例如美国专利号5,543,112、5,935,779和6,316,607中。对于精确的和灵敏的测量,可以为不同分析物分子浓度将信号调节最大化。

[0116] 本文中使用的术语“标记”或“可检测标记”表示通过直接或间接检测能够产生信号的任何物质。因而可以直接地或间接地检测可检测标记。适合用在本发明中的直接检测标记可以选自任何已知的可检测的标志物基团、如色原体、荧光基团、化学发光基团(例如吡啶酯或二氧杂环丁烷)、电化学发光的化合物、催化剂、酶、酶促底物、染料、荧光染料(例如荧光素、香豆素、罗丹明、噁嗪、试卤灵、酞菁及其衍生物)、胶体金属和非金属颗粒和有机聚合物胶乳颗粒。可检测标记的其它例子是发光的金属络合物,诸如钌或铈络合物,例如用于ECLIA,酶,例如用于ELISA,和放射性同位素;例如用于RIA。

[0117] 间接检测系统包含例如检测试剂,例如用bioaffine结合对的第一配偶体标记检测抗体。合适的结合对的例子是半抗原或抗原/抗体、生物素或生物素类似物诸如氨基生物素、亚氨基生物素或脱硫生物素/抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素、糖/凝集素、核酸或核酸类似物/互补的核酸和受体/配体,例如类固醇激素受体/类固醇激素。优选的第一结合对成员包含半抗原、抗原和激素。特别优选的是半抗原如地高辛和生物素及其类似物。这样的结合对的第二配偶体(例如抗体、抗生蛋白链菌素等)经常被标记以允许直接检测,例如通过如上提及的可检测标记。

[0118] 技术人员知道第一结合剂和/或第二结合剂可以分别用可检测标记进行标记。技术人员知道,为第一结合剂选择的标记必须不同于为第二结合剂选择的标记。

[0119] 根据一个具体实施方案,所述第一结合剂是mAb<24,25-二羟基维生素D₃>,且所述第二结合剂是维生素D-结合蛋白,优选地是标记的维生素D-结合蛋白,更优选地分别是生物素化的或钌化的维生素D-结合蛋白。

[0120] 对于直接检测,适合用在本发明中的标记基团或标记可以选自任何已知的可检测的标志物基团,但不限于:色原体、荧光基团、化学发光基团(例如吡啶酯或二氧杂环丁烷)、电化学发光的化合物、催化剂、酶、酶促底物、染料、荧光染料(例如荧光素、香豆素、罗丹明、噁嗪、试卤灵、酞菁及其衍生物)、胶体金属的和非金属的颗粒和有机聚合物胶乳颗粒。标记基团的其它例子是发光的金属络合物,诸如钌或铈络合物,酶,例如用于ELISA,和放射性同位素。

[0121] 间接检测系统包含例如检测试剂,例如用bioaffine结合对的第一配偶体标记检测抗体。合适的结合对的例子是半抗原或抗原/抗体、生物素或生物素类似物诸如氨基生物素、亚氨基生物素或脱硫生物素/抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素、糖/凝集素、核酸或核酸类似物/互补的核酸和受体/配体,例如类固醇激素受体/类固醇激素。优选的第一结合对成员包含半抗原、抗原和激素。特别优选的是半抗原如地高辛和生物素及其类似物。这样的结合对的第二配偶体(例如抗体、抗生蛋白链菌素等)经常被标记以允许直接检测,例如通过如上提及的标记。

[0122] 在一个具体实施方案中,样品中25-羟基维生素D的浓度是至少1 nmol/L (0.4 ng/mL),进一步优选至多500 nmol/L (200 ng/mL),进一步优选的是在10 nmol/L (4 ng/mL)至500 nmol/L (200 ng/mL)的范围内,进一步优选的是在10 nmol/L (4 ng/mL)至250 nmol/L (100 ng/mL)的范围内。

[0123] 根据本发明“交叉反应”或“交叉反应性”是指,对要确定的维生素D化合物(例如

25-羟基维生素D) (其不同于第一结合剂(特别是抗体)所针对的干扰化合物(例如24,25-二羟基维生素D₃))的结合强度具有用分析物测量的结合强度的10%或更少,优选5%或更少。具体地,通过使用BiaCore™应用亲和力测试可以测量结合强度。如技术人员已知的,结合亲和力(亲和力或结合强度)(如果作为K_d给出)越好/越高,K_d越低。

[0124] 此外,在实施例证实,本发明的第一结合剂没有表现出与25-羟基维生素D的任何显著交叉反应性;即已经发现与25-羟基维生素D的交叉反应性是10%或更少、特别是5%或更少、特别是1%或更少的交叉反应性。在一个实施方案中,所述第一结合剂不具有与25-羟基维生素D的显著交叉反应性,优选地所述第一结合剂具有10%或更少的与25-羟基维生素D的交叉反应性,进一步优选地,所述第一结合剂具有5%或更少的与25-羟基维生素D的交叉反应性,进一步优选地,所述第一结合剂分别具有1%或更少的与25-羟基维生素D的交叉反应性。因而,也可以特异性地和可靠地检测少量的25-羟基维生素D,甚至在有24,25-二羟基维生素D₃存在下。

[0125] 根据本发明,K_d(第一结合剂)是所述第一结合剂对24,25-二羟基维生素D₃的亲和力,且K_d(第二结合剂)是所述第二结合剂对25-羟基维生素D的亲和力。

[0126] “亲和力”限定两个物质之间的相互作用的强度,且优选地通过表面等离子体共振来确定,特别是使用BiaCore®系统。在抗体或抗体片段的情况下,将亲和力确定为K_d值,优选地通过表面等离子体共振来确定,特别是使用BiaCore®系统。可以如在“Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics”, Current Opinion in Immunology, 第5卷, 第2期, 1993, 第282-286页中所述执行亲和力的确定。

[0127] 此外,根据本发明,浓度(第一结合剂)和浓度(第二结合剂)分别是上述本发明的方法的步骤b)中的第一结合剂和第二结合剂的摩尔浓度。

[0128] 此外,根据本发明,MR(第一结合剂)是第一结合剂关于结合24,25-二羟基维生素D₃的结合价,且MR(第二结合剂)是第二结合剂关于25-羟基维生素D的结合价。

[0129] 根据本发明的“结合价”被理解为:对于给定的结合配偶体对而言,通过实验确定的结合位点的数目。就抗体或其功能活性部分而言,理论结合价通常为1或2,但是由于空间效应,通过实验确定的结合价可以是非整数值(例如1.4)。就作为优选第一结合剂的抗体而言,理论结合价通常为1。还由于空间效应,通过实验确定的结合价可以是非整数值(例如0.9)。结合价的确定可以如在Schraeml M. 等人(2012) Methods in Molecular Biology 第901卷, 171-181中所述进行。

[0130] 为了实现25-羟基维生素D的基本上完全测量,有利的是,第一结合剂对24,25-二羟基维生素D₃的K_d是所述第二结合剂对25-羟基维生素D的亲和力的至多10倍,优选相同,更优选地小于后者。因此,在另一个优选的实施方案中,K_d(第一结合剂)/K_d(第二结合剂)是10或更小,优选地1或更小,更优选地0.1或更小。

[0131] 为了实现25-羟基维生素D的基本上完全测量,在一个实施方案中,还有利的是,第一结合剂的浓度分别与第二结合剂的浓度相同,优选地至少10倍,进一步优选50倍,进一步优选100倍,也优选200倍。因此,在一个更进一步优选的实施方案中,浓度(第一结合剂)/浓度(第二结合剂)分别是至多200、优选地至多100、优选地至多50、优选地至多10、优选地至多1,特别地其中浓度(第一结合剂)是在1*(1-10) nmol/L至200*(1-10) nmol/L的范围

内,和/或浓度(第二结合剂)是在1-10 nmol/L的范围内。

[0132] 根据一个具体实施方案,第一结合剂对24,25-二羟基维生素D₃的结合亲和力分别与第二结合剂优选地至少相同,优选地至少高10倍,进一步优选地至少高100倍。

[0133] 另一个重要方面是在本发明的方法中采用的第一结合剂和第二结合剂的结合价,特别是在第一结合剂和/或第二结合剂是抗体或其功能活性部分的情况下。当结合小分析物(例如维生素D化合物)时,结合分子是通常显示MR=2的结合价的抗体,而由于空间原因,第一结合剂是通常显示MR=1和更小的结合价的抗体。在该情况下,优选地要考虑功能摩尔浓度商。

[0134] 对于确定分析物(例如维生素D化合物,优选25-羟基维生素D)的总量而言还有利的是,意图结合分析物的第二结合剂表现出对该分析物足够高的亲和力。还有利的是,意图结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂表现出对该24,25-二羟基维生素D₃足够高的亲和力。

[0135] 对于确定25-羟基维生素D的总量而言还有利的是,第一结合剂关于结合24,25-二羟基维生素D₃的亲和力是足够高的,以便实现24,25-二羟基维生素D₃与第一结合剂的基本上完全结合。因此,在另一个实施方案中,第一结合剂关于结合24,25-二羟基维生素D₃的K_d是10⁻⁸ mol/L或更小,优选地10⁻⁹ mol/L或更小,更优选地10⁻¹⁰ mol/L或更小。

[0136] 在另一个实施方案中,第二结合剂关于结合25-羟基维生素D的K_d是10⁻⁸ mol/L或更小,优选地10⁻⁹ mol/L或更小,更优选地10⁻¹⁰ mol/L或更小。

[0137] 还有利的是,第一结合剂表现出对24,25-二羟基维生素D₃的特异性以便使25-羟基维生素D的假阳性检测最小化。更有利的是,第一结合剂表现出对24,25-二羟基维生素D₃的特异性,具体地以便使第一结合剂的损失最小化和使与24,25-二羟基维生素D₃的结合最大化。因此,在一个优选的实施方案中,所述第一结合剂特异性地结合24,25-二羟基维生素D₃,特别是第一结合剂与不同于24,25-二羟基维生素D₃的靶标的结合是第一结合剂与24,25-二羟基维生素D₃的结合的至多5%。

[0138] 在另一个具体实施方案中,第一结合剂的浓度是在1 * (1-10) nmol/L至200 * (1-10) nmol/L的范围内,诸如1 * (1,2,3,4,5,6,7,8,9或10) nmol/L至200 * (1,2,3,4,5,6,7,8,9或10) nmol/L,特别是1-1000 nmol/L,30-800 nmol/L,50-700 nmol/L,100-600 nmol/L。

[0139] 本领域技术人员知道,这样的方法需要为维生素D化合物的定量测量标准化。在另一个实施方案中,用维生素D校准剂将根据本发明的方法标准化。

[0140] 本领域技术人员还知道,还可以用经修改的程序执行根据本发明的没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的方法。

[0141] 在另一个实施方案中,本发明涉及没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的体外方法,所述方法包括下述步骤:

a) 提供得自受试者的样品,

b) 将所述样品与以下结合剂混合:结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂和结合25-羟基维生素D的第二结合剂,由此分别形成第一结合剂和24,25-二羟基维生素D₃之间的第一复合物以及所述第二结合剂和25-羟基维生素D之间的第二复合物,和

c) 测量在(b)中形成的第二复合物,由此没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟

基维生素D的浓度。

[0142] 在另一个实施方案中,本发明涉及没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的体外方法,所述方法包括下述步骤:

- a) 提供得自受试者的样品,
- b) 将所述样品与以下结合剂混合
 - ba) 结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂,由此形成所述第一结合剂和24,25-二羟基维生素D₃之间的第一复合物、
 - bb) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,由此形成所述结合剂和25-羟基维生素D之间的第二复合物,
- c) 将所述包含第二结合剂和25-羟基维生素D的第二复合物与不包含25-羟基维生素D的第二结合剂分离,和
- d) 测量在 (bb) 中形成的第二复合物,由此没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地测量25-羟基维生素D。

[0143] 在另一个实施方案中,本发明涉及没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的体外方法,所述方法包括下述步骤:

- a) 提供得自受试者的样品,
- b) 将所述样品与以下结合剂混合
 - (ba) 结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂,由此形成所述第一结合剂和24,25-二羟基维生素D₃之间的复合物,
 - (bb) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,
- c) 将所述样品与以下试剂混合:经标记的25-羟基维生素D、来自样品的25-羟基维生素D和竞争对结合25-羟基维生素D的第二结合剂的结合的经标记的25-羟基维生素D,由此得到所述第二结合剂和经标记的25-羟基维生素D之间的第二复合物,
- d) 将被包含于在步骤(c)中得到的第二复合物中的经标记的25-羟基维生素D与未被包含在所述第二复合物中的经标记的25-羟基维生素D分离,和
- e) 测量被包含在所述第二复合物中的经标记的25-羟基维生素D,由此没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地测量25-羟基维生素D。

[0144] 在另一个实施方案中,本发明涉及没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的体外方法,所述方法包括下述步骤:

- a) 提供得自受试者的样品,和
用释放试剂释放与维生素D-结合蛋白结合的存在于样品中的维生素D化合物,
- b) 将所述样品与以下结合剂混合
 - (ba) 结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂,由此形成所述第一结合剂和24,25-二羟基维生素D₃之间的复合物,
 - (bb) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,
- c) 将所述样品与以下试剂混合:经标记的25-羟基维生素D、来自样品的25-羟基维生素D和竞争对结合25-羟基维生素D的第二结合剂的结合的经标记的25-羟基维生素D,由此得到所述第二结合剂和经标记的25-羟基维生素D之间的第二复合物,
- d) 将被包含于在步骤(c)中得到的第二复合物中的经标记的25-羟基维生素D与未被包

含在所述第二复合物中的经标记的25-羟基维生素D分离,和

e) 测量被包含在所述第二复合物中的经标记的25-羟基维生素D,由此没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地测量25-羟基维生素D。

[0145] 用途:

使用本发明的方法,可以检测25-羟基维生素D的总量和/或浓度。

[0146] 在一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法的体外方法用于没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的用途。

[0147] 在另一个实施方案中,本发明涉及结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂和结合25-羟基维生素D的第二结合剂在根据本发明的用于没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定得自受试者的样品中的25-羟基维生素D的浓度的体外方法中的用途。

[0148] 根据本发明的一个实施方案,优选地使用mAb<24,25-二羟基维生素D₃>作为第一结合剂和使用维生素D-结合蛋白作为第二结合剂。

[0149] 在一个实施方案中,本发明还涉及本文中公开的试剂盒用于没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的用途。

[0150] 试剂盒:

在一个实施方案中,本发明涉及用于执行根据本发明的方法的试剂盒,所述试剂盒至少包含

a) 结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂,其中所述第一结合剂是单克隆抗体或所述单克隆抗体的功能活性部分,和

b) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,其中所述第二结合剂是维生素D-结合蛋白。

[0151] 根据本发明的一个实施方案,优选地在试剂盒中提供作为第一结合剂的mAb<24,25-二羟基维生素D₃>和作为第二结合剂的维生素D-结合蛋白。

[0152] 技术人员知道,本文中公开的试剂适合用于制备试剂盒以实践根据本发明的方法。

[0153] 在一个具体实施方案中,所述试剂盒还包含试剂组合物,所述试剂组合物具有0.1 M至2.0 M的碳酸氢盐或能够在水解后释放碳酸氢根离子(HCO₃⁻)的物质、还原剂和碱化剂,优选地所述试剂盒包含试剂组合物,除了根据本发明的第一结合剂和第二结合剂以外,所述试剂组合物具有0.1 M至2.0 M的碳酸氢盐或能够在水解后释放碳酸氢根离子(HCO₃⁻)的物质、2 mM至30 mM的还原剂、1 M至1.5 M的碱化剂溶液。

[0154] 在另一个具体实施方案中,所述试剂盒包含选自2-巯基乙醇、2-巯基乙胺-HCl、TCEP、半胱氨酸-HCl和二硫苏糖醇(DTT)的还原剂和1 M至1.5 M的选自NaOH、KOH、Ca(OH)₂的碱化剂的溶液。

[0155] 在一个实施方案中,所述试剂盒还包含维生素D校准剂。

[0156] 根据本发明的试剂盒已经被证实适合用在维生素D化合物的自动化测试中。本发明优选地涉及根据本发明的试剂盒用于没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的用途。

[0157] 关于25-羟基维生素D的测试优选地是完全自动化的。完全自动化在该情况下是指,实验员仅需将要研究的样品和含有用于测量维生素D化合物的所有组分的试剂包放在自动化的分析仪上,且所有其它步骤由分析仪自动地完成。完全自动化的测试特别优选地

在来自Roche Diagnostics的Elecsys[®]分析仪上进行。

[0158] 在另一个实施方案中,分别根据本发明的试剂组合物、第一结合剂和第二结合剂用在没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地检测25-羟基维生素D的体外方法中,其中25-羟基维生素D选自25-羟基维生素D₂、25-羟基维生素D₃和3-*epi*-25-羟基维生素D,优选地选自25-羟基维生素D₂、25-羟基维生素D₃。

[0159] 如上面已经提及的,25-羟基维生素D₂和25-羟基维生素D₃是用于诊断的维生素D的特别相关形式。在根据本发明的体外方法中,通过针对25-羟基维生素D₂或25-羟基维生素D₃的特异性抗体没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地特异性地检测25-羟基维生素D₂或25-羟基维生素D₃或二者也代表优选的实施方案。

[0160] 除非另外定义,在本文中使用的技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。Singleton等人, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology第2版, J. Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 第4版, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1992); Lewin, B., Genes V, Oxford University Press出版(1994), ISBN 0-19-854287-9; Kendrew, J. 等人(编), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd.出版(1994), ISBN 0-632-02182-9;和 Meyers, R.A. (编), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc. 出版(1995), ISBN 1-56081-569-8给本领域技术人员提供了在本申请中使用的许多术语的一般指导。

[0161] 除非另有说明,本发明的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,它们属于本领域的技能。这样的技术在文献中进行了充分解释,例如,Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版(1989); Gait, M.J., Oligonucleotide Synthesis (1984); Freshney, R.I. (编), Animal Cell Culture (1987); Methods in Enzymology, Academic Press, Inc.; Ausubel, F.M. 等人(编), Current Protocols in Molecular Biology, (1987)和定期更新; Mullis等人(编), PCR: The Polymerase Chain Reaction (1994)。

[0162] 本发明的其它任选特征和实施方案将在随后优选实施方案的描述中更详细地公开,优选地与从属权利要求相结合。如技术人员会认识到的,在其中,各个任选特征可以以分离的方式以及以任何任意可行的组合实现。本发明的范围不受优选实施方案限制。

[0163] 总结本发明的发现,以下实施方案是优选的:

1. 一种用于没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的体外方法,所述方法包括下述步骤:

- a) 提供得自受试者的样品,其包含与维生素D-结合蛋白结合的维生素D化合物,
- b) 将所述样品与以下结合剂混合

(ba) 结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂,由此形成所述第一结合剂和24,25-二羟基维生素D₃之间的复合物;

(bb) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,由此形成所述第二结合剂和25-羟基维生素D之间的复合物;

- c) 测量在 (bb) 中形成的复合物,由此没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基

维生素D的浓度。

[0164] 2. 根据权利要求1的方法,其中所述样品是血液、血清或血浆。

[0165] 3. 根据权利要求1和2中的任一项的方法,其中在步骤(b)之前用释放试剂从维生素D-结合蛋白释放与维生素D-结合蛋白结合的存在于样品中的维生素D化合物。

[0166] 4. 根据权利要求3的方法,其中所述释放试剂会使维生素D-结合蛋白变性,优选地所述释放试剂使维生素D-结合蛋白不可逆地变性。

[0167] 5. 根据权利要求3和4中的任一项的方法,其中在步骤(b)之前通过分别选自蛋白水解性降解、酸性释放、碱性释放、甲醇释放、乙醇沉淀、高碘酸盐释放、乙腈萃取、金属氢氧化物释放、通过环糊精和/或其衍生物释放或金属水杨酸盐释放的方法从维生素D-结合蛋白释放维生素D化合物。

[0168] 6. 根据权利要求3-4中的任一项的方法,其中所述释放试剂包含碳酸氢盐(在0.1 M至2.0 M的浓度)和/或在水解后能够释放碳酸氢根离子(HCO_3^-)的物质(在0.1 M至2.0 M的浓度)、还原剂和碱化剂。

[0169] 7. 根据权利要求1-6中的任一项的方法,其中

- K_d (第一结合剂)/ K_d (第二结合剂)是10或更小,优选地1或更小,更优选地0.1或更小;和/或

- 浓度(第一结合剂)/浓度(第二结合剂)是至多200,优选地至多100,优选地至多50,更优选地至多10,

其中

K_d (第一结合剂)是所述第一结合剂对24,25-二羟基维生素D₃的亲合力,且 K_d (第二结合剂)是所述第二结合剂对25-羟基维生素D的亲合力,且

其中浓度(第一结合剂)和浓度(第二结合剂)分别是步骤b)中的第一结合剂和第二结合剂的摩尔浓度,特别地其中浓度(第一结合剂)是在 $1 \times (1-10)$ nmol/L至 $200 \times (1-10)$ nmol/L的范围内,和/或浓度(第二结合剂)是在1-10 nmol/L的范围内。

[0170] 8. 根据权利要求1-7中的任一项的方法,其中

- 所述第一结合剂关于结合24,25-二羟基维生素D₃的 K_d 是 10^{-8} mol/L或更小,优选地 10^{-9} mol/L或更小,更优选地 10^{-10} mol/L或更小;和/或

- 所述第二结合剂关于结合25-羟基维生素D的 K_d 是 10^{-8} mol/L或更小,优选地 10^{-9} mol/L或更小,更优选地 10^{-10} mol/L或更小。

[0171] 9. 根据权利要求1-8中的任一项的方法,

a) 其中所述受试者是人;和/或

b) 其中所述方法选自酶联免疫测定(ELISA)、电化学发光免疫测定(ECLIA)、放射免疫测定(RIA)和化学发光免疫测定(CLIA);和/或

c) 其中所述25-羟基维生素D选自25-羟基维生素D₂、25-羟基维生素D₃和3-epi-25-羟基维生素D;和/或

d) 其中所述25-羟基维生素D选自25-羟基维生素D₂和25-羟基维生素D₃;和/或

e) 其中所述第一结合剂分别选自多克隆抗体、单克隆抗体和合成抗体(塑料抗体),优选合成抗体或单克隆抗体,进一步优选单克隆抗体或所述单克隆抗体的功能活性部分;和/或

- f) 其中所述第二结合剂是维生素D-结合蛋白, 优选重组维生素D-结合蛋白; 和/或
- g) 其中所述第一结合剂是单克隆抗体或所述单克隆抗体的功能活性部分, 且所述第二结合剂是维生素D-结合蛋白或所述维生素D-结合蛋白的功能活性部分; 和/或
- h) 其中所述第一结合剂是mAb<24, 25-二羟基维生素D₃>, 且所述第二结合剂是维生素D-结合蛋白, 优选经标记的维生素D-结合蛋白, 更优选钆化的维生素D-结合蛋白; 和/或
- i) 其中所述第一结合剂是单克隆抗体或所述单克隆抗体的功能活性部分, 且所述第二结合剂是单克隆抗体或所述单克隆抗体的功能活性部分; 和/或
- j) 其中所述第一结合剂是mAb<24, 25-二羟基维生素D₃> 或所述单克隆抗体的功能活性部分, 且所述第二结合剂是mAb<25-羟基维生素D>或所述单克隆抗体的功能活性部分, 其能够固定化在固体支持物上; 和/或
- k) 其中所述第一结合剂阻止24, 25-二羟基维生素D₃与所述第二结合剂的结合; 和/或
- l) 其中所述与第一结合剂结合的24, 25-二羟基维生素D₃不可被所述第二结合剂结合; 和/或
- m) 其中所述第二结合剂不能释放所述与第一结合剂结合的24, 25-二羟基维生素D₃; 和/或
- n) 其中所述第一结合剂具有至少与第二结合剂相同的对24, 25-二羟基维生素D₃的结合亲和力, 优选地是至少高10倍, 进一步优选至少高100倍; 和/或
- o) 其中所述第一结合剂没有与25-羟基维生素D的显著交叉反应性, 优选地所述第一结合剂具有10%或更少的与25-羟基维生素D的交叉反应性, 进一步优选地, 所述第一结合剂具有5%或更少的与25-羟基维生素D的交叉反应性, 进一步优选地, 所述第一结合剂具有1%或更少的与25-羟基维生素D的交叉反应性; 和/或
- p) 其中使根据权利要求1的步骤(b)的第一结合剂和第二结合剂与所述样品同时接触; 和/或
- q) 其中在使所述第二结合剂与根据权利要求1的步骤b)的样品接触之前或之后使所述第一结合剂与所述样品接触; 和/或
- r) 其中所述样品中25-羟基维生素D的浓度是至少1 nmol/L (0.4 ng/mL), 进一步优选至多500 nmol/L (200 ng/mL), 进一步优选在10 nmol/L (4 ng/mL)至500 nmol/L (200 ng/mL)的范围内, 进一步优选在10 nmol/L (4 ng/mL)至250 nmol/L (100 ng/mL)的范围内; 和/或
- s) 其中所述方法通过维生素D校准剂标准化。
- [0172] 10. 根据权利要求1-9中的任一项的体外方法用于没有24, 25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的用途。
- [0173] 11. 结合24, 25-二羟基维生素D₃的第一结合剂和结合25-羟基维生素D的第二结合剂在用于没有24, 25-二羟基维生素D₃干扰地确定得自受试者的样品中的25-羟基维生素D的浓度的体外方法中的用途。
- [0174] 12. 一种用于执行根据权利要求1-9中的任一项的方法的试剂盒, 所述试剂盒至少包含
- a) 结合24, 25-二羟基维生素D₃的第一结合剂, 其中所述第一结合剂是单克隆抗体或所述单克隆抗体的功能活性部分, 和

b) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,其中所述第二结合剂是维生素D-结合蛋白。

[0175] 13. 一种用于没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的体外方法,所述方法包括下述步骤:

a) 提供得自受试者的样品,

b) 将所述样品与结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂和结合25-羟基维生素D的第二结合剂混合,由此分别形成所述第一结合剂和24,25-二羟基维生素D₃之间的第一复合物以及所述第二结合剂和25-羟基维生素D之间的第二复合物,和

c) 测量在(b)中形成的第二复合物,由此没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度。

[0176] 14. 一种用于没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的体外方法,所述方法包括下述步骤:

a) 提供得自受试者的样品,

b) 将所述样品与以下结合剂混合

ba) 结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂,由此形成所述第一结合剂和24,25-二羟基维生素D₃之间的第一复合物、

bb) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,由此形成所述结合剂和25-羟基维生素D之间的第二复合物,

c) 将所述包含第二结合剂和25-羟基维生素D的第二复合物与不包含25-羟基维生素D的第二结合剂分离,和

d) 测量在(bb)中形成的第二复合物,由此没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地测量25-羟基维生素D。

[0177] 15. 一种用于没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的体外方法,所述方法包括下述步骤:

a) 提供得自受试者的样品,

b) 将所述样品与以下结合剂混合

(ba) 结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂,由此形成所述第一结合剂和24,25-二羟基维生素D₃之间的复合物,

(bb) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,

c) 将所述样品与以下试剂混合:经标记的25-羟基维生素D、来自样品的25-羟基维生素D和竞争对结合25-羟基维生素D的第二结合剂的结合的经标记的25-羟基维生素D,由此得到所述第二结合剂和经标记的25-羟基维生素D之间的第二复合物,

d) 将被包含于在步骤(c)中得到的第二复合物中的经标记的25-羟基维生素D与未被包含在所述第二复合物中的经标记的25-羟基维生素D分离,和

e) 测量被包含在所述第二复合物中的经标记的25-羟基维生素D,由此没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地测量25-羟基维生素D。

[0178] 16. 一种用于没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地确定25-羟基维生素D的浓度的体外方法,所述方法包括下述步骤:

a) 提供得自受试者的样品,和

用释放试剂释放与维生素D-结合蛋白结合的存在于样品中的维生素D化合物,

b) 将所述样品与以下结合剂混合

(ba) 结合24,25-二羟基维生素D₃的第一结合剂,由此形成所述第一结合剂和24,25-二羟基维生素D₃之间的复合物,

(bb) 结合25-羟基维生素D的第二结合剂,

c) 将所述样品与以下试剂混合:经标记的25-羟基维生素D、来自样品的25-羟基维生素D和竞争对结合25-羟基维生素D的第二结合剂的结合的经标记的25-羟基维生素D,由此得到所述第二结合剂和经标记的25-羟基维生素D之间的第二复合物,

d) 将被包含于在步骤(c)中得到的第二复合物中的经标记的25-羟基维生素D与未被包含在所述第二复合物中的经标记的25-羟基维生素D分离,和

e) 测量被包含在所述第二复合物中的经标记的25-羟基维生素D,由此没有24,25-二羟基维生素D₃干扰地测量25-羟基维生素D。

附图说明

[0179] 以下实施例和附图进一步阐明了本发明。实际保护范围来自本发明所附的权利要求。在附图中示意地描绘了实施方案。

[0180] 图1: 图1显示了7-{2-[2-(2-{(S)-3-[2-[(1R,7aR)-1-((R)-4,5-二羟基-1,5-二甲基-己基)-7a-甲基-八氢-茛-(4E)-亚基]-乙-(Z)-亚基]-4-亚甲基-环己氧基羰基氨基}-乙氧基)-乙氧基]-乙基氨甲酰基}-庚酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(酸的NHS酯)的化学结构。

[0181] 图2: 图2显示了在试剂R1中分别没有或具有阻滞剂(第一结合剂)的Elecsys® 维生素D总免疫测定。25-羟基维生素D₃ (○, 25(OH)D₃); 24,25-二羟基维生素D₃ (●, 24,25(OH)2D₃)。

[0182] 图2a显示了没有阻滞剂(第一结合剂)的结果:mAb<24,25-二羟基维生素D₃>rK-IgG。

[0183] 图2b显示了具有用于干扰消除的阻滞剂(第一结合剂)的结果:mAb<24,25-二羟基维生素D₃>rK-IgG (mAb<24,25(OH)2D₃>)。

[0184] 图3: 对于两个不同的样品集合, Elecsys® 维生素D总免疫测定和LC-MS维生素D测量之间的关联显示在图3a和3b中。没有阻滞剂(○, 没有第一结合剂)和具有阻滞剂(●, 具有第一结合剂)。

[0185] 实施例1

关于合成24,25-二羟基维生素D₃的阻滞剂的程序

1.1 抗原和抗原缀合物的合成

7-{2-[2-(2-{(S)-3-[2-[(1R,7aR)-1-((R)-4,5-二羟基-1,5-二甲基-己基)-7a-甲基-八氢-茛-(4E)-亚基]-乙-(Z)-亚基]-4-亚甲基-环己氧基羰基氨基}-乙氧基)-乙氧基]-乙基氨甲酰基}-庚酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(图1中的酸的NHS酯)的合成

Sestelo, Jose Perez; Cornella, Ivan; De Una, Olga; Mourino, Antonio; Sarandeses, Luis A., Chemistry - A European Journal (2002), 8(12), 2747-2752 描述了起始原料24,25-O-亚异丙基-24R, 25-二羟基维生素D₃的合成。结构显示在图1中。

[0186] 将100 mg起始原料和26.8 mg DMAP在烧瓶中干燥并加入20 ml二氯甲烷。加入121

μl 三乙胺以后,加入作为甲苯20%溶液的86.7 mg光气。将溶液在惰性气氛下在室温(RT;RT被本领域技术人员称作20°C至25°C(68°F至77°F)避光搅拌45分钟,并加入溶解在10 ml二氯甲烷中的324.6 mg二氨基-二氧杂-辛烷。将混合物在相同条件下进一步搅拌过夜。将产物通过制备型HPLC纯化。产量= 72 mg。

[0187] 通过在乙腈中与168 mg辛二酸双N-羟基琥珀酰亚胺酯、68 μl 三乙胺在室温(RT)反应过夜,将55 mg胺衍生物转化成NHS酯。通过加入约1g Dowex 50WXH并连续地搅拌直到反应结束来切割保护基。将产物通过制备型HPLC纯化。产量16 mg。HPLC-ESI-MS: M^+ = 844.7 Da。

[0188] 抗原缀合物的合成:

将5.63 mg上述的NHS酯溶解在500 μl DMSO中并加入50 mg KLH (钥孔戚血蓝素, Sigma H 8283)的溶液中。将pH调至pH= 8.3并将溶液搅拌过夜。在Amicon搅拌池中纯化混合物。

[0189] 氨基的分析: 抗原-KLH比率约500:1。

[0190] 1.2 针对24,25-二羟基维生素D₃的抗体的制备

使用兔B-细胞PCR的抗体开发:

为了制备针对24,25-二羟基维生素D₃的抗体,用与KLH偶联的24,25-二羟基维生素D₃免疫16-周龄ZiKa兔。对所有兔进行重复免疫接种。在第一个月,每周免疫动物。从第二个月开始,每个月1次免疫动物。对于每次免疫接种,将500 μg KLH偶联的24,25-二羟基维生素D₃溶解在1 mL 140 mM NaCl中并在1 ml CFA中乳化。在免疫接种开始以后第45和105天评价滴度的发展。当针对免疫原的滴度可通过ELISA检测时,如在Seeber等人. 2014中所述由B-细胞克隆产生抗体。通过HEK293细胞的瞬时转染来生产重组全长兔IgG。

[0191] 滴度分析:

为了确定针对24,25-二羟基维生素D₃的血清滴度,将24,25-二羟基维生素D₃的生物素化变体与抗生蛋白链菌素包被的96-孔平板偶联。在免疫接种活动开始以后第45天和第105天收集每只兔的少量血清。将生物素化的24,25-二羟基维生素D₃以15 ng/mL的浓度固定化在平板表面上。将来自每只兔的血清在含有1%BSA的PBS中稀释,并将稀释物加入平板中。以稀释度1:300、1:900、1:2700、1:8100、1:24300、1:72900、1:218700和1:656100测试血清。用HRP-标记的F(ab')₂山羊抗-兔Fc γ (Dianova)和作为底物的ABTS (Roche)检测结合的抗体。

[0192] 实施例2

将24,25-二羟基维生素D₃的阻滞剂应用于结合测定

取决于测定程序,可以将特异性地结合24,25-二羟基维生素D₃的阻滞剂(例如多克隆抗体、单克隆抗体、单克隆抗体的功能活性部分或合成抗体(塑料抗体))加入预处理或释放试剂、测定稀释剂或测定缓冲剂,在测定的各种经标记的结合组分(缀合物)之前或与其一起使它们与样品中的维生素D化合物接触。

[0193] 作为一个实施例,描述了在Elecsys[®]维生素D总免疫测定中阻断24,25-二羟基维生素D₃:

- 将0.075 mg/mL的mAb<24,25-二羟基维生素D₃>rK-IgG加入含有钆化的维生素D-结合蛋白缀合物的Elecsys[®]维生素D总免疫测定的试剂R1中。

- 在不含维生素D代谢产物的基质 (Diluent Universal) 中用25-羟基维生素D₃ (○, 25 (OH) D₃) 或24,25-二羟基维生素D₃ (λ, 24,25 (OH) 2D₃) 的稀释系列运行维生素D总测定应用
- 参照物 (不含阻滞剂) 表现出与25-羟基维生素D₃和24,25-二羟基维生素D₃的交叉反应性 (表1和图2a)
- 具有阻滞剂的免疫测定应用表现出减少的与24,25-二羟基维生素D₃的交叉反应性,而对25-羟基维生素D₃的特异性不受影响 (表1和图2b)。

[0194] 表1: mAb<24,25-二羟基维生素D₃>rK-IgG对25-羟基维生素D₃ (25 (OH) D₃) 和24,25-二羟基维生素D₃ (24,25 (OH) 2D₃) 的信号动力学 (显示为B/B₀) 的影响。

		参照物 ○		mAb<24,25(OH)2VitD3> ●	
		信号(平均值)	B/B ₀	信号(平均值)	B/B ₀
25(OH)VitD3	0 nmoL/L	366'500		340'300	
	25 nmoL/L	297'200	81%	262'400	77%
	50 nmoL/L	217'500	59%	214'000	63%
	75 nmoL/L	161'600	44%	167'500	49%
	100 nmoL/L	135'600	37%	142'700	42%
	125 nmoL/L	108'900	30%	113'900	33%
	150 nmoL/L	98'860	27%	102'500	30%
	200 nmoL/L	79'820	22%	78'620	23%
	250 nmoL/L	67'020	18%	60'020	18%
	300 nmoL/L	58'210	16%	50'500	15%
	374 nmoL/L	50'550	14%	42'740	13%
	499 nmoL/L	41'190	11%	34'610	10%
24,25(OH)2VitD3	0 nmoL/L	399'400		342'100	
	24 nmoL/L	268'100	67%	325'200	95%
	48 nmoL/L	213'600	53%	316'400	92%
	72 nmoL/L	147'700	37%	313'000	91%
	96 nmoL/L	127'300	32%	309'900	91%
	120 nmoL/L	103'700	26%	299'600	88%
	144 nmoL/L	98'420	25%	301'200	88%
	192 nmoL/L	85'250	21%	292'900	86%
	240 nmoL/L	71'560	18%	279'100	82%
	288 nmoL/L	61'070	15%	260'900	76%
	360 nmoL/L	51'180	13%	252'300	74%
	480 nmoL/L	45'010	11%	227'300	66%

[0195] 对于两个不同的样品集合,也可以独立地看到mAb<24,25-二羟基维生素D₃>rK-IgG在改善的与LC-MS/MS的关联中的积极作用,所述LC-MS/MS仅对25-羟基维生素D₂和25-

羟基维生素D₃是特异性的(图3a和3b)。没有阻滞剂(○),所述关联是0.92(左)或0.79(右)。加入mAb<24,25-二羟基维生素D₃>rK-IgG(●, mAb<24,25(OH)2D₃>)以后,所述关联分别改善至0.94(左)或0.90(右)。

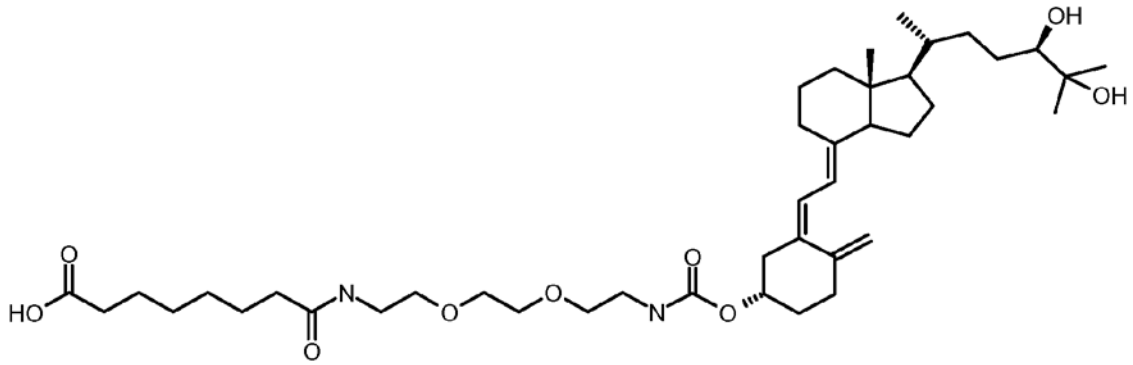


图 1

参照物

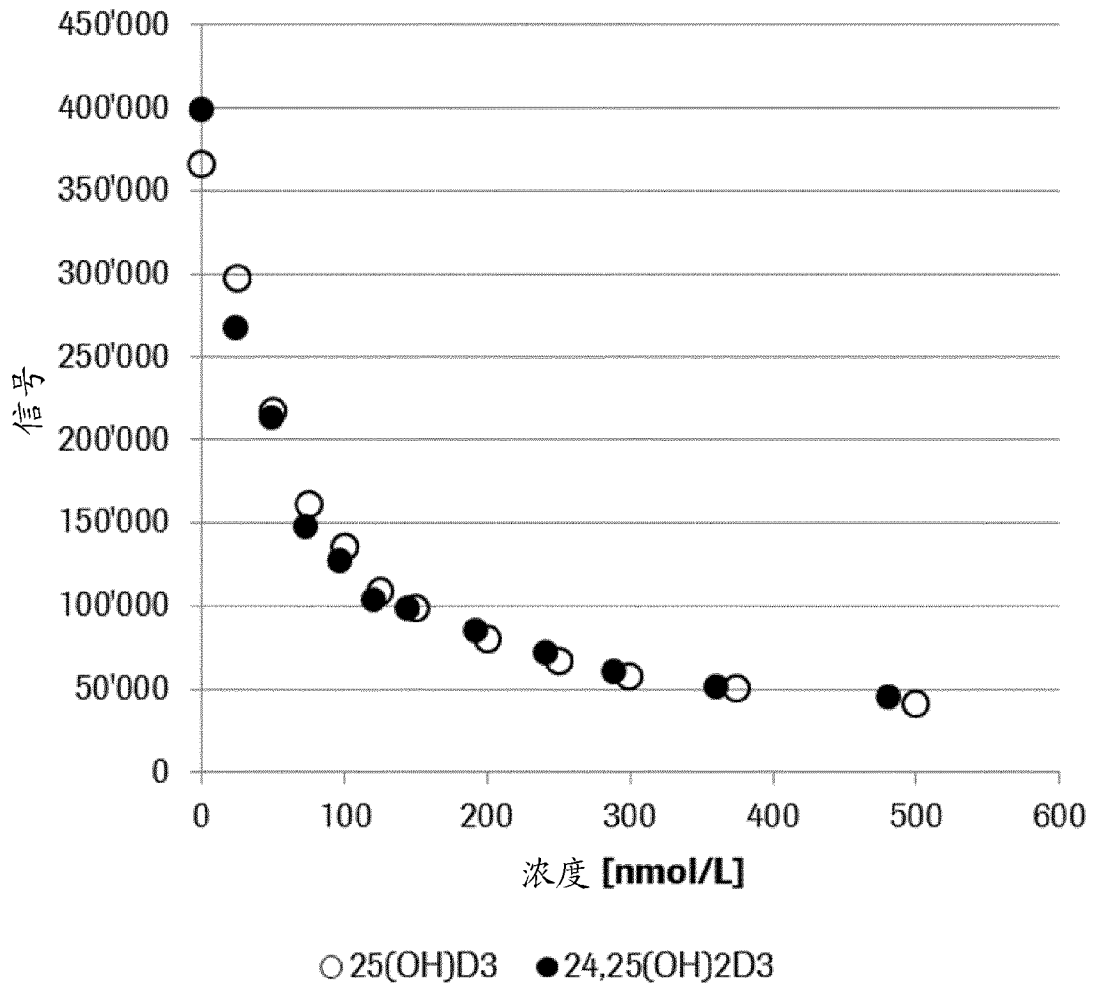


图 2a

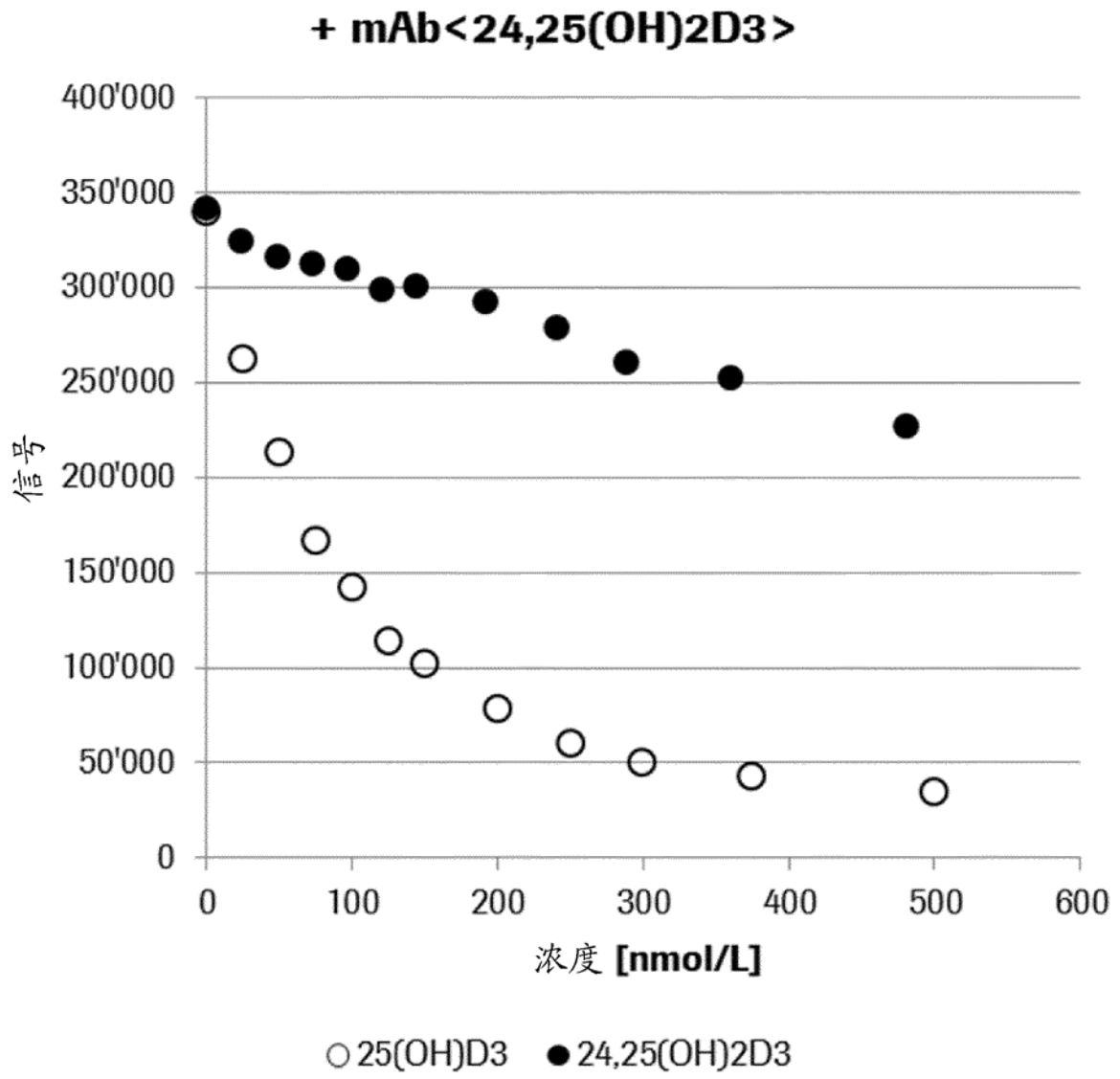


图 2b

与LC-MS/MS的可比性

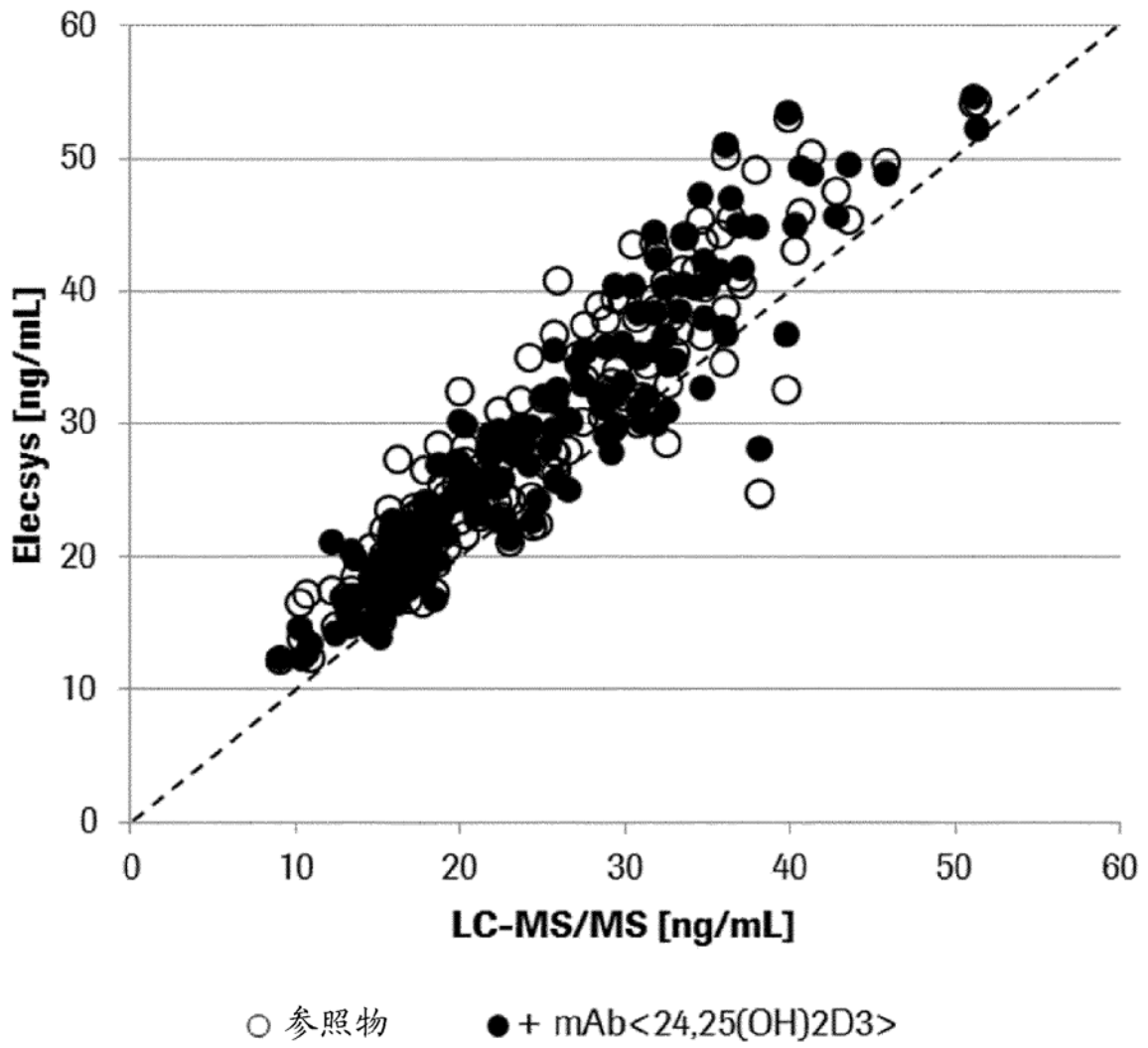


图 3a

与LC-MS/MS的可比性

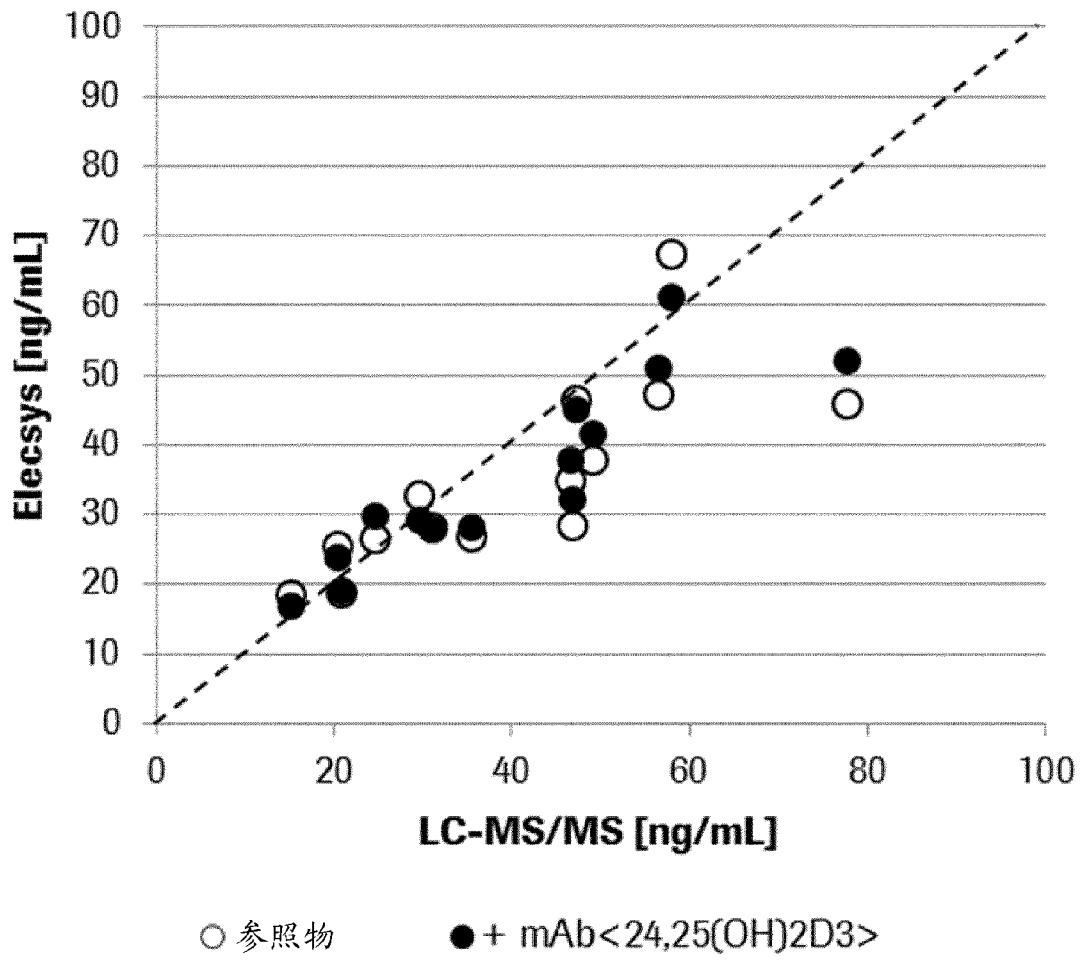


图 3b

专利名称(译)	用于测量维生素D的方法		
公开(公告)号	CN107003305A	公开(公告)日	2017-08-01
申请号	CN201580066003.8	申请日	2015-12-04
申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
[标]发明人	E 法茨 M 盖格 H P 约泽尔 C 福格尔		
发明人	E.法茨 M.盖格 H-P.约泽尔 C.福格尔		
IPC分类号	G01N33/537 G01N33/541		
CPC分类号	G01N33/537 G01N33/541 G01N33/82 C07K16/26		
优先权	2014196778 2014-12-08 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于测量25-羟基维生素D的体外方法，其中潜在干扰化合物24,25-二羟基维生素D3被特异性地结合24,25-二羟基维生素D3且不结合25-羟基维生素D的结合剂阻断。

