

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01137938.3

[45] 授权公告日 2009年6月24日

[11] 授权公告号 CN 100504387C

[22] 申请日 2001.11.6 [21] 申请号 01137938.3

[30] 优先权

[32] 2000.11.6 [33] GB [31] 0027064.5

[73] 专利权人 兰道克斯实验有限公司

地址 英国安特里姆

[72] 发明人 S·P·菲茨格拉德

J·V·拉蒙特

R·I·麦克康奈尔

[56] 参考文献

US4595661A 1986.1.17

CA2169121A 1986.6.17

US4743542A 1988.5.10

CA2097545A1 1993.4.12

WO9826644A2 1998.6.25

US4722889A 1988.2.2

CN1097252A 1995.1.11

审查员 李冰

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李瑛

权利要求书1页 说明书6页

[54] 发明名称

多分析物免疫测定

[57] 摘要

测定样本中分析物的方法，其中是将样本与包括对分析物有特异性的配体在内的一组配体接触，并且还加入能结合分析物以由此降低其有效浓度的清除物质。

1. 测定样本中不同浓度的多种分析物的方法，其中将样本与具有配体阵列的生物芯片接触，该配体阵列上的每一配体特异于每一分析物，该方法还包括加入能结合样品中分析物以由此降低其有效浓度的清除物质，其中清除物质的加入量使得标准曲线的灵敏度在截止区域附近达到最大。

2. 根据权利要求1的测定方法，其中所述分析物是滥用药物。

3. 根据权利要求1或2的测定方法，其中所述清除物质是抗体。

多分析物免疫测定

发明领域

本发明涉及多分析物免疫测定，例如使用在其上面具有一系列分析物特异性配体的生物芯片或微片进行的多分析物免疫测定。

发明背景

现有技术中已描述过生物芯片/微片在免疫测定或核苷酸杂交测定的大量测定中的应用。对于通常设计的装配式阵列，有大量独立反应位点位于固体载体上的空间不同区域中。这些阵列可包含高密度的固定在固体载体表面上的相同或不同分子。

不论在何时测试一组多分析物，都需要正确地定量测定出存在于未知样本中的各分析物的量。因此，对于呈现在一组多分析物上的各个分析物，必须产生最佳标准曲线。该标准曲线必须覆盖适用于测定其所呈现的特定分析物和适于欲测定的患者样本类型的动态范围。该动态范围是衡量该测定法对所测定的分析物的灵敏度的量度标准。

在必须检测各分析物的浓度范围方面会产生困难。因为对于一组分析物，必需测定的各分析物的浓度范围可能相差很大，所以对各标准曲线的最优化会带来灵敏度问题。

在一组多分析物的标准曲线中必须包括的这种动态范围的多样性会在必须加到各生物芯片中的多缀合物的生成过程中带来实际问题。这样的多缀合物是用于将适于各独立免疫测定的可检测标记物加到生物芯片中的试剂。这样的可检测标记物使得各免疫测定能够显现出来，并且随后能够在生物芯片上被定量测定。

例如，对于一系列结合生物芯片格式中滥用药物的配体，需要控制标准曲线的形状。常规筛选指标覆盖广泛的浓度范围；例如，截止范围是从LSD的0.5 ng/ml到鸦片剂的2000 ng/ml。

如果所讨论的分子在其分子量和免疫原性方面非常类似，这有相

当的难度。因此这些分子的所有抗体在可达到的检测限方面具有非常类似的特征。在目前的测试方法中，各种药物有其自己的特异性试验。这使得试验厂商可以调整各独立试验以给该特定药物试验提供最好的筛选指标。然而，在多分析物格式中，将这些条件应用于生物芯片上出现的全部的测定范围。因此，可用于提供宽范围截止限的选择很有限。

US-A-4722889和US-A-5026653公开了通过与对分析物有特异性的标记抗体反应来测定样本中分析物的方法。此外，可使用对分析物有低特异性、但是对起干扰物作用的类似物有高特异性的清除单克隆抗体。

WO-A-98/26644公开了使用与分析物反应的“检测抗体”来测定样本中的分析物例如滥用的药物的方法。第二个反应使用了“中和抗体”（可能与检测抗体相同），这样的抗体结合分析物，并由此阻止分析物在用检测抗体进行的测定中发生正反应。因此，与检测抗体发生正反应、但是在第二个反应中反应下降的样本含有目的分析物；在这两个反应中给出类似正反应的样本含有干扰物。该方法的优点是无需知道干扰物的确切性质。

发明概述

本发明是基于下述认识，即当考虑到每一分析物必须在与一组分析物的其它分析物非常不同的浓度下检测，并且每一缀合物必须以适于其所识别的特定分析物的浓度/稀释度呈现在多缀合物试剂中时，可能难以将动态范围最优化。现在已经认识到，可能需要以彼此非常不同的浓度检测和定量测定一组分析物中的分析物。

具体来说，本发明涉及改变发现在一个区域中灵敏度太高、而在另一区域中灵敏度不够高的标准曲线（对于在所考虑的一组多分析物中发现的一种分析物/一系列分析物）的灵敏度。它包括向测定系统中，例如向测定缓冲液中加入一定量的清除抗体或其它清除物质。这样的清除物质可以与固定在生物芯片表面上以捕获分析物的清除剂相同或不同。使用清除物质的目的是特异性地清除/扫除样本（标准或

患者样本)中的一些分析物,并由此降低其有效的可检测浓度。这也降低了标准曲线的非常灵敏部分的灵敏度,并改善了标准曲线另一区域的灵敏度。

本发明描述

用于本发明的生物芯片可通过已知方法制得。参见例如GB-A-2324866。

这样的生物芯片提供了一组配体,例如抗体。可能有几种对于不同分析物有特异性的不同配体。这种新的测定方法可用于测试一种或多种这样的分析物,并且可使用一种或多种抗体。可以使用的其它清除物质对于本领域技术人员来说是显而易见的,并包括aptamer。这样的清除物质一般包含在测定缓冲液中,测定缓冲液通常含有常规组分如溶剂等。

标准曲线的灵敏度是 B/B_0 的函数,其中 B 和 B_0 分别代表结合物质和零标准物的光单位值。可以在需要定量测定的每一情况下构建标准曲线。或者,例如对于滥用药物测定,是/否测定是令人满意的,对于此在100%截止的校准是合适的。

为了举例说明,本发明涉及一组滥用药物多分析物,并使用抗体作为清除剂。典型的这样一组多分析物包括用于测定下述滥用药物的竞争性免疫测定:苯丙胺、脱氧麻黄碱、THC、苯并二氮杂革、鸦片剂、巴比妥类药物、苯甲酰爱康宁、美沙酮、PCP和LSD。

对于滥用药物标准曲线(0% - 300%),100%标准含有每一这些药物的截止浓度,即在截止浓度以下能断定样本在药物方面呈阴性,在截止浓度以上能断定样本在药物方面呈阳性。是如下所列出的宽范围截止浓度在从加入多缀合物中获得所有分析物的合适标准曲线过程中引起问题。

<u>滥用药物</u>	<u>截止</u>
苯丙胺	1000 ng/ml
脱氧麻黄碱	1000 ng/ml
THC	50 ng/ml

苯并二氮杂葑	200 ng/ml
鸦片剂	2000 ng/ml或300 ng/ml
巴比妥类药物	200 ng/ml
苯甲酰爱康宁	300 ng/ml
美沙酮	300 ng/ml
PCP	25 ng/ml
LSD	0.5 ng/ml

在确定清除抗体的用量时，通常必须在下述两个方面折中：即在0% - 25%标准之间增加B/Bo的值，和在75% - 100% - 125%之间不减小降低值。换句话说，虽然目的是使得曲线的灵敏度在0% - 25%之间降低，但是在确定每种药物的截止判定值的75% - 125%之间灵敏度必须不能降低。因此非常重要的是，使灵敏度在截止区域附近最大，以精确地确定样本的肯定性或否定性。

任一特定分析物的截止区域是已知的，或者可由本领域技术人员容易地确定出。本领域技术人员还可以容易地确定出如何使曲线的灵敏度在截止点附近最大。

使用PCP、BZG和苯丙胺进行实验，以证实通过加入不同量的适当清除抗体在截止区域所达到的标准曲线的改变程度。更具体地说，下述PCP、BZG和苯丙胺的数据证实了在不加入清除抗体的情况下标准曲线在截止区域不够灵敏（对于每一种情况下其在0% - 25%之间过于灵敏）。对于本发明目的和这些分析物，曲线在0% - 25%之间过于灵敏，在超过该点的区域内不够灵敏。

PCP的结果如下所示：

表1

标准	B/Bo 0 Ab	B/Bo 0.5 Ab	B/Bo 1 Ab	B/Bo 2 Ab
25	69.37	94.88	113	108.3
75	31.79	44.61	69.78	95.72
100	25.65	32.59	52.18	64.49
125	20.34	26.58	38.4	49.5

加入1-2 mg/L PCP抗体显著地改善了曲线在75-125%截止区域附近的灵敏度。这清楚地表明了抑制下降百分比从没有加入抗体时的11.45% (B/Bo从75%时的31.79减小到125%时的20.34) 减小到加入2 mg/L PCP抗体时的46.22% (B/Bo从75%时的95.72减小到125%时的49.50)。

BZG的结果如下所示:

表2

标准	B/Bo 0 Ab	B/Bo 20 Ab	B/Bo 50 Ab	B/Bo 80 Ab
25	31.77	43.46	73.41	76.14
75	14.46	19.54	32.45	47.89
100	12.14	17.81	27.44	40.23
125	9.47	13.03	20.38	30.38

为了显著改善此标准曲线的灵敏度, 必须加入大量BZG抗体。必须加入50-80 mg/L来改善截止区域的灵敏度。在没有加入抗体时, 抑制下降百分比是4.99% (B/Bo从75%时的14.46减小到125%时的9.47), 加入80 mg/L BZG抗体时改善至17.51% (B/Bo从75%时的47.89减小到125%时的30.38)。

苯丙胺的结果如下所示:

表3

标准	B/Bo 0 Ab	B/Bo 0.5 Ab	B/Bo 1.25 Ab
25	14.46	76.52	98.55
75	5.61	38.73	67.83
100	4.32	22.57	43.58
125	3.49	20.16	40.91

为了改善标准曲线的截止区域的灵敏度, 1.25 mg/L苯丙胺抗体是最佳加入量。超过1.25 mg/L的浓度不能进一步改善结果。在没有加入抗体时, 抑制下降百分比是2.12% (B/Bo从75%时的5.61%减小到125%时的3.49%), 加入1.25 mg/L苯丙胺抗体时改善至26.92% (B/Bo从75%时的67.83%减小到125%时的40.91%)。

专利名称(译)	多分析物免疫测定		
公开(公告)号	CN100504387C	公开(公告)日	2009-06-24
申请号	CN01137938.3	申请日	2001-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	兰道克斯实验有限公司		
申请(专利权)人(译)	兰道克斯实验有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	兰道克斯实验有限公司		
[标]发明人	SP菲茨格拉德 JV拉蒙特 RI麦克康奈尔		
发明人	S·P·菲茨格拉德 J·V·拉蒙特 R·I·麦克康奈尔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/94		
CPC分类号	G01N33/94 G01N33/54306		
代理人(译)	李瑛		
审查员(译)	李冰		
优先权	2000027064 2000-11-06 GB		
其他公开文献	CN1353312A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

测定样本中分析物的方法，其中是将样本与包括对分析物有特异性的配体在内的一组配体接触，并且还加入能结合分析物以由此降低其有效浓度的清除物质。