



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105190311 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201380075980. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 12. 20

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

(30) 优先权数据

13/833, 655 2013. 03. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/077063 2013. 12. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/149111 EN 2014. 09. 25

(71) 申请人 雅培实验室

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 B·L·杜维尔 S·给达 Q·阮

J·P·斯金纳 S·Y·特亨

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所

11410

代理人 程芳

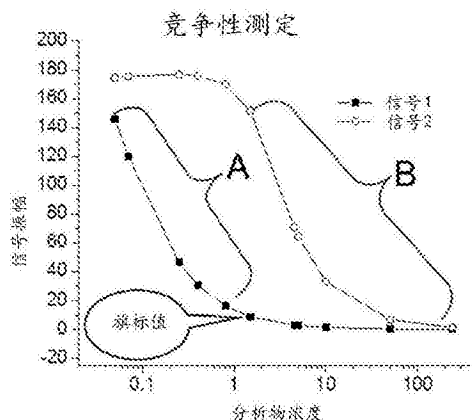
权利要求书6页 说明书39页 附图7页

(54) 发明名称

具有提高的动态范围的测定

(57) 摘要

本文提供了可用于避免“前带现象”或“钩效应”并且扩大可精确测量的分析物浓度范围的测定和试剂盒。



1. 一种试剂盒,其包含:
  - i) 包含第一标记物的第一分析物结合分子;
  - ii) 包含第二标记物的第二分析物结合分子,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,以及
  - iii) 附接至固体支持物上的第三分析物结合分子,其中第三分析物结合分子能够与第一分析物结合分子或第二分析物结合分子同时与分析物结合。
2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和/或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。
3. 根据权利要求1至2中任意一项所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子直接附接至标记物。
4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其中所述固体支持物选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。
5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其中所述固体支持物包含两个或更多个空间上分离的电极。
6. 根据权利要求4所述的试剂盒,其中所述固体支持物包含微粒。
7. 根据权利要求1至6中任意一项所述的试剂盒,其中第一标记物和第二标记物之一或两者选自酶、发色团和荧光团。
8. 根据权利要求1至7中任意一项所述的试剂盒,其中第一标记物和第二标记物是不同的。
9. 根据权利要求1至8中任意一项所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约5倍至约100倍的范围内。
10. 根据权利要求1至8中任意一项所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约100倍。
11. 根据权利要求1至10中任意一项所述的试剂盒,其中所述试剂盒能用于一步夹心测定。
12. 一种扩大测定的动态范围的方法,其包括:
  - a) 使怀疑包含分析物的测试样品与包含第一标记物的第一分析物结合分子、包含第二标记物的第二分析物结合分子和附接至固体支持物上的第三分析物结合分子在允许以下结合的条件下接触:
    - (i) 第一分析物结合分子和第三分析物结合分子,以及
    - (ii) 第二分析物结合分子和第三分析物结合分子,与所述分析物的结合,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子不同时与所述分析物结合;
  - b) 测量与分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物以及与分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度;以及
  - c) 通过比较第一标记物和第二标记物的信号强度确定分析物的浓度。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和/或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。

14. 根据权利要求 12 至 13 中任意一项所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子直接附接至标记物。

15. 根据权利要求 12 至 14 中任意一项所述的方法,其中所述固体支持物选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。

16. 根据权利要求 12 至 15 中任意一项所述的方法,其中第一标记物和第二标记物之一或两者选自酶、发色团和荧光团。

17. 根据权利要求 12 至 16 中任意一项所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在同一反应混合物中接触。

18. 根据权利要求 12 至 16 中任意一项所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在不同的反应混合物中接触。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中第一标记物和第二标记物是相同的。

20. 根据权利要求 12 至 18 中任意一项所述的方法,其中第一标记物和第二标记物是不同的。

21. 根据权利要求 12 至 20 中任意一项所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约 5 倍至约 100 倍的范围内。

22. 根据权利要求 12 至 20 中任意一项所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约 100 倍。

23. 根据权利要求 12 至 22 中任意一项所述的方法,其中所述测定的动态范围包括三个或更多个数量级。

24. 根据权利要求 12 至 23 中任意一项所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子以相差不到约 100 倍的预定摩尔量存在。

25. 根据权利要求 12 至 24 中任意一项所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子未寡聚化或交联。

26. 根据权利要求 12 至 25 中任意一项所述的方法,其中测量与分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度和与分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度的步骤 b) 在分析物浓度的预定范围上在校准测定中完成,并且所述方法进一步包括以下步骤:

d) 通过在提供与分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的最大信号强度的分析物浓度之处或附近,确定校准测定中与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度同与该分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度之比值或该比值的倒数,来建立旗标值。

27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中当与测试样品中的分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度同与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度之比:

超过或等于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度;或者

小于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

28. 根据权利要求 26 所述的方法,其中当与测试样品中的分析物结合的第一分析物结

合分子的第一标记物的信号强度同与该分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度之比：

小于或等于所述旗标值时，从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物获得的信号强度的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度；或者

超过所述旗标值时，从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

29. 根据权利要求 12 至 28 中任意一项所述的方法，其中所述方法使用自动化或半自动化系统来进行。

30. 根据权利要求 12 至 29 中任意一项所述的方法，其中所述测定是一步测定。

31. 一种试剂盒，其包含：

i) 附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子；

ii) 附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子，其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力；以及

iii) 包含标记物的第三分析物结合分子，其中第三分析物结合分子能与第一分析物结合分子或第二分析物结合分子同时与分析物结合。

32. 根据权利要求 31 所述的试剂盒，其中第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和 / 或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。

33. 根据权利要求 31 至 32 中任意一项所述的试剂盒，其中第三分析物结合分子直接附接至所述标记物。

34. 根据权利要求 31 至 33 中任意一项所述的试剂盒，其中所述标记物选自酶、发色团和荧光团。

35. 根据权利要求 31 至 34 中任意一项所述的试剂盒，其中第一固体支持物和第二固体支持物独立地选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。

36. 根据权利要求 31 至 35 中任意一项所述的试剂盒，其中第一固体支持物是包含第一发色团的微粒或珠子且第二固体支持物是包含第二发色团的微粒或珠子。

37. 根据权利要求 31 至 35 中任意一项所述的试剂盒，其中第一固体支持物和第二固体支持物是形状或大小不同的微粒。

38. 根据权利要求 31 至 35 中任意一项所述的试剂盒，其中第一固体支持物是第一电极且第二固体支持物是第二电极，其中第一电极和第二电极是空间上分离的。

39. 根据权利要求 31 至 38 中任意一项所述的试剂盒，其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约 5 倍至约 100 倍的范围内。

40. 根据权利要求 31 至 38 中任意一项所述的试剂盒，其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约 100 倍。

41. 根据权利要求 31 至 40 中任意一项所述的试剂盒，其中所述试剂盒能够用于一步或两步夹心测定。

42. 一种扩大测定的动态范围的方法，其包括：

a) 使怀疑包含分析物的测试样品与附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子、附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子和包含标记物的第三分析物结合分子在允许以下结合的条件下接触：

(i) 第三分析物结合分子通过与第一分析物结合分子结合的分析物与第一固体支持物的结合 ; 以及

(ii) 第三分析物结合分子通过与第二分析物结合分子结合的分析物与第二固体支持物的结合 ; 以及

其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力, 其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子不同时与分析物结合 ;

b) 测量来自与第一固体支持物和与第二固体支持物结合的第三分析物结合分子的标记物的信号强度 ; 以及

c) 通过比较来自与第一固体支持物和与第二固体支持物结合的第三分析物结合分子的标记物的信号强度来确定分析物的浓度。

43. 根据权利要求 42 中所述的方法, 其中第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和 / 或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。

44. 根据权利要求 42 至 43 中任意一项所述的方法, 其中第三分析物结合分子直接附接至所述标记物。

45. 根据权利要求 42 至 44 中任意一项所述的方法, 其中第一固体支持物和第二固体支持物独立地选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。

46. 根据权利要求 42 至 45 中任意一项所述的方法, 其中第一标记物和第二标记物之一或两者选自酶、发色团和荧光团。

47. 根据权利要求 42 至 46 中任意一项所述的方法, 其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在同一反应混合物中接触。

48. 根据权利要求 42 至 47 中任意一项所述的方法, 其中第一固体支持物是包含第一发色团的微粒或珠子且第二固体支持物是包含第二发色团的微粒或珠子。

49. 根据权利要求 42 至 48 中任意一项所述的方法, 其中第一固体支持物和第二固体支持物是形状或大小不同的微粒。

50. 根据权利要求 42 至 47 中任意一项所述的方法, 其中第一固体支持物是第一电极且第二固体支持物是第二电极, 其中第一电极和第二电极是空间上分离的。

51. 根据权利要求 50 所述的方法, 其中第一电极和第二电极包含在手持式照护点装置中。

52. 根据权利要求 42 至 51 中任意一项所述的方法, 其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在不同的反应混合物中接触。

53. 根据权利要求 42 至 52 中任意一项所述的方法, 其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约 5 倍至约 100 倍的范围内。

54. 根据权利要求 42 至 52 中任意一项所述的方法, 其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约 100 倍。

55. 根据权利要求 42 至 54 中任意一项所述的方法, 其中免疫测定的动态范围包括三个或更多个数量级。

56. 根据权利要求 42 至 55 中任意一项所述的方法, 其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子以相差不到约 100 倍的预定摩尔量存在。

57. 根据权利要求 42 至 56 中任意一项所述的方法, 其中第一分析物结合分子和第二分

析物结合分子未寡聚化或交联。

58. 根据权利要求 42 至 57 中任意一项所述的方法, 其中测量与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度以及与分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度的步骤 b) 在分析物浓度的预定范围上在校准测定中完成, 并且所述方法进一步包括以下步骤:

d) 通过在提供与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的最大信号强度的分析物浓度之处或附近, 确定校准测定中与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度同与分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度之比值或该比值的倒数, 来建立旗标值。

59. 根据权利要求 58 所述的方法, 其中当与分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度同与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度之比:

超过或等于所述旗标值时, 从与该分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度; 或者

小于所述旗标值时, 从与该分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

60. 根据权利要求 58 所述的方法, 其中当与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度同与分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度之比:

小于或等于所述旗标值时, 从与该分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度; 或者

超过所述旗标值时, 从与该分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

61. 根据权利要求 42 至 57 中任意一项所述的方法, 其中在使所述测试样品、所述附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子与所述包含标记物的第三分析物结合分子接触之前, 通过洗涤来去除未与所述第一或所述第二固体支持物结合的分析物。

62. 根据权利要求 61 所述的方法, 所述方法进一步包括在与分析物结合的第一分析物结合蛋白质的第一标记物的信号强度趋于平稳的值(平台值)之处或附近建立旗标值的步骤。

63. 根据权利要求 62 所述的方法, 其中当与测试样品中的分析物结合的第一分析物结合蛋白质的第一标记物的信号强度等于或高于所述旗标值时, 从与该分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

64. 根据权利要求 42 至 63 中任意一项所述的方法, 其中该方法使用自动化或半自动化系统来进行。

65. 一种试剂盒, 其包含:

i) 附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子;

ii) 附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子, 其中第一分析物结合分子对分

析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力；以及

iii) 包含衔接至标记物的所述分析物或其片段的示踪剂,其中所述示踪剂能与所述分析物竞争结合第一分析物结合分子或第二分析物结合分子。

66. 根据权利要求 65 所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子和 / 或第二分析物结合分子中的一个或多个为抗体或其片段。

67. 根据权利要求 65 至 66 中任意一项所述的试剂盒,其中所述标记物选自酶、发色团和荧光团。

68. 根据权利要求 65 至 67 中任意一项所述的试剂盒,其中第一固体支持物和第二固体支持物独立地选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。

69. 根据权利要求 65 至 67 中任意一项所述的试剂盒,其中第一固体支持物是包含第一发色团的微粒或珠子且第二固体支持物是包含第二发色团的微粒或珠子。

70. 根据权利要求 65 至 67 中任意一项所述的试剂盒,其中第一固体支持物和第二固体支持物是形状或大小不同的微粒。

71. 根据权利要求 65 至 67 中任意一项所述的试剂盒,其中第一固体支持物是第一电极且第二固体支持物是第二电极,其中第一电极和第二电极是空间上分离的。

72. 根据权利要求 65 至 71 中任意一项所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约 5 倍至约 100 倍的范围内。

73. 根据权利要求 65 至 71 中任意一项所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约 100 倍。

74. 一种扩大测定的动态范围的方法,其包括:

a) 使怀疑包含分析物的测试样品与包含衔接至标记物的所述分析物或其片段的示踪剂、衔接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子、衔接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子相接触,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子不同时与分析物结合;

b) 测量来自与第一固体支持物上的第一分析物结合分子和第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的示踪剂的信号强度;以及

c) 在与衔接至第一固体支持物上的第一分析物结合蛋白质结合的示踪剂的信号强度趋于平稳的值(平台值)之处或附近建立旗标值。

75. 根据权利要求 74 所述的方法,其中当与衔接至第一固体支持物上的第一分析物结合蛋白质结合的示踪剂的信号强度等于或小于所述旗标值时,从与衔接至第二固体支持物上的第二分析物结合蛋白质结合的示踪剂的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度。

## 具有提高的动态范围的测定

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是 2013 年 3 月 15 日提交的美国申请号 13/833,655 的继续申请,该美国申请为了所有目的通过引用而全文并入本文。

### 技术领域

[0003] 本文提供了用于扩大测定的动态范围的试剂盒和方法。

### 背景技术

[0004] 在过去几十年中,已经使用荧光、化学发光或响应于分析物产生信号的其他手段进行了测定。目前,许多测定通过测量在反应混合物的总体积中产生的光信号的强度来进行。产生的光信号可以通过光学手段来测量,其中产生的光信号由大量分子发出。在典型的实施方案中,这些测定可以如下进行:将怀疑含有抗原的样品与包含衔接至固体支持物(例如,微粒)上的第一抗体的试剂组合,以形成反应混合物。该抗原如果存在于样品中,则与该第一抗体特异性结合。向反应混合物中引入包含其上连接有标记的第二抗体的偶联物,并与所述抗原特异性结合,该抗原与第一抗体特异性结合,该第一抗体如前所述衔接至固体支持物上。这样的测定被称为夹心测定或免疫计量测定。这种类型的测定示意性地示于图 1 中。在一般通过进行洗涤步骤从反应混合物中除去未结合的偶联物之后,测量由标记物引起的信号。测量来源于反应混合物的总体积的信号,然后将其与校准曲线进行比较,以确定样品中存在的抗原的浓度。当测定包括在引入偶联物抗体之前去除未结合的样品分析物的洗涤步骤时,它通常被认为是“两步测定”。当测定将偶联物抗体和分析物一起引入抗体包被的微粒而没有中间洗涤步骤时,它被认为是“一步”测定。“钩效应”或“前带现象”是当在“一步测定”形式中存在压倒性的量的抗原时,测定得到假低值的现象。这是由测定中捕获抗体和检测抗体不足引起的。这样的钩效应限制了测定的动态范围。

[0005] 夹心测定可以检测宽范围的分析物浓度;通常,它可准确地测量 2-3 个数量级的分析物浓度。但是,更宽地扩大分析物检测,例如超过 3 个数量级,是不常见的。

### 发明内容

[0006] 在一个方面,本发明提供了试剂盒。在不同的实施方案中,该试剂盒包含:

[0007] i) 包含第一标记物的第一分析物结合分子;

[0008] ii) 包含第二标记物的第二分析物结合分子,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,以及

[0009] iii) 衔接至固体支持物上的第三分析物结合分子,其中第三分析物结合分子能够与第一分析物结合分子或第二分析物结合分子同时与分析物结合。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子直接衔接至标记物。在一些实施方案中,第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和 / 或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。在一些实施方案中,该固体支持物选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。在一些实

实施方案中,该固体支持物包含两个或更多个空间上分离的电极。在一些实施方案中,该固体支持物包含微粒。在一些实施方案中,第一标记物和第二标记物之一或两者选自酶、发色团和荧光团。在一些实施方案中,第一标记物和第二标记物是不同的。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约 5 倍至约 100 倍,例如,约 10 倍至约 100 倍的范围内。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约 100 倍。在一些实施方案中,所述试剂盒可用于一步或两步夹心测定。

[0010] 在一些实施方案中,所述试剂盒包含:

[0011] i) 衔接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子;

[0012] ii) 衔接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力;以及

[0013] iii) 包含标记物的第三分析物结合分子,其中第三分析物结合分子可与第一分析物结合分子或第二分析物结合分子同时与分析物结合。在一些实施方案中,第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和 / 或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。在一些实施方案中,第三分析物结合分子直接衔接至标记物。在一些实施方案中,该标记物选自酶、发色团和荧光团。在一些实施方案中,第一固体支持物和第二固体支持物独立地选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。在一些实施方案中,第一固体支持物是包含第一发色团的微粒或珠子而第二固体支持物是包含第二发色团的微粒或珠子。在一些实施方案中,第一固体支持物和第二固体支持物是形状或大小不同的微粒。在一些实施方案中,第一固体支持物是第一电极而第二固体支持物是第二电极,其中第一电极和第二电极在空间上是分离的。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约 5 倍至约 100 倍,例如,约 10 倍至约 100 倍的范围内。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约 100 倍。

[0014] 在一些实施方案中,例如,对于竞争性测定试剂盒,该试剂盒包含:

[0015] i) 衔接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子;

[0016] ii) 衔接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力;以及

[0017] iii) 包含衔接至标记物的所述分析物或其片段的示踪剂,其中所述示踪剂可与所述分析物竞争结合第一分析物结合分子或第二分析物结合分子。在一些实施方案中,该试剂盒包含的第一分析物结合分子和 / 或第二分析物结合分子中的一个或多个为抗体或其片段。在一些实施方案中,所述标记物选自酶、发色团和荧光团。在一些实施方案中,第一固体支持物和第二固体支持物独立地选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。在一些实施方案中,第一固体支持物是包含第一发色团的微粒或珠子而第二固体支持物是包含第二发色团的微粒或珠子。在一些实施方案中,第一固体支持物和第二固体支持物是形状或大小不同的微粒。在一些实施方案中,第一固体支持物是第一电极而第二固体支持物是第二电极,其中第一电极和第二电极在空间上是分离的。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约 5 倍至约 100 倍,例如,约 10 倍至约 100 倍的范围内。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分

析物的结合亲和力的差异为至少约 100 倍。

[0018] 在另一方面,本发明提供了扩大测定的动态范围的方法。在不同的实施方案中,该方法包括:

[0019] a) 使怀疑包含分析物的测试样品与包含第一标记物的第一分析物结合分子、包含第二标记物的第二分析物结合分子和附接至固体支持物上的第三分析物结合分子在允许以下结合的条件下接触:

[0020] (i) 第一分析物结合分子和第三分析物结合分子,以及

[0021] (ii) 第二分析物结合分子和第三分析物结合分子

[0022] 与分析物的结合,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子不同时与分析物结合;

[0023] b) 测量与分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物以及与分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度;以及

[0024] c) 通过比较第一标记物和第二标记物的信号强度来确定分析物的浓度。在一些实施方案中,第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和/或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子直接附接至标记物。在一些实施方案中,该固体支持物选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。在一些实施方案中,第一标记物和第二标记物之一或两者选自酶、发色团和荧光团。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在同一反应混合物中接触。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在不同的反应混合物中接触。在一些实施方案中,第一标记物和第二标记物是不同的。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约 5 至约 100 倍的范围内。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约 100 倍。在不同的实施方案中,所述测定的动态范围包括三个或更多个数量级,例如,四个或更多个数量级。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子以相差不到约 100 倍(例如,约 10 倍至约 100 倍、约 10 倍至约 50 倍、约 60 倍至约 100 倍、约 25 倍、约 50 倍、约 75 倍)的预定摩尔量存在。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子未寡聚化或交联。在一些实施方案中,所述方法使用自动化或半自动化系统来进行。在一些实施方案中,所述测定是一步测定。

[0025] 在一些实施方案中,测量与分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度和与分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度的步骤 b) 在分析物浓度的预定范围上在校准测定中完成,并且所述方法进一步包括以下步骤:

[0026] d) 通过在提供与分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的最大信号强度的分析物浓度之处或附近,确定校准测定中与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度同与该分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度之比或该比值的倒数,来建立旗标值(flag value)。

[0027] 在一些实施方案中,当与测试样品中的分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度同与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度之

比：

[0028] 超过或等于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度;或者

[0029] 小于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

[0030] 在一些实施方案中,当与测试样品中的分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度同与该分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度之比：

[0031] 小于或等于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物获得的信号强度的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度;或者

[0032] 超过所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

[0033] 在另一方面,本发明提供了扩大测定的动态范围的方法。在一些实施方案中,该方法包括：

[0034] a) 使怀疑包含分析物的测试样品与附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子、附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子和包含标记物的第三分析物结合分子在允许以下结合的条件下接触：

[0035] (i) 第三分析物结合分子通过与第一分析物结合分子结合的分析物与第一固体支持物的结合;以及

[0036] (ii) 第三分析物结合分子通过与第二分析物结合分子结合的分析物与第二固体支持物的结合;以及

[0037] 其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子不同时与分析物结合;

[0038] b) 测量来自与第一固体支持物和与第二固体支持物结合的第三分析物结合分子的标记物的信号强度;以及

[0039] c) 通过比较来自与第一固体支持物和与第二固体支持物结合的第三分析物结合分子的标记物的信号强度来确定分析物的浓度。在一些实施方案中,第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和/或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。在一些实施方案中,第三分析物结合分子直接附接至标记物。在一些实施方案中,第一固体支持物和第二固体支持物独立地选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。在一些实施方案中,第一标记物和第二标记物之一或两者选自酶、发色团和荧光团。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在同一反应混合物中接触。在一些实施方案中,第一固体支持物是包含第一发色团的微粒或珠子而第二固体支持物是包含第二发色团的微粒或珠子。在一些实施方案中,第一固体支持物和第二固体支持物是形状或大小不同的微粒。在一些实施方案中,第一固体支持物是第一电极而第二固体支持物是第二电极,其中第一电极和第二电极在空间上是分离的。在一些实施方案中,第一电极和第二电极包含在手持式照护点装置中。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在不同的反应混合物中接触。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分

析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约 5 倍至约 100 倍,例如,约 10 倍至约 100 倍的范围内。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约 100 倍。在一些实施方案中,免疫测定的动态范围包括三个或更多个数量级。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子以相差不到约 100 倍(例如,约 10 倍至约 100 倍、约 10 倍至约 50 倍、约 60 倍至约 100 倍、约 25 倍、约 50 倍、约 75 倍)的预定摩尔量存在。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子未寡聚化或交联。在一些实施方案中,所述方法使用自动化或半自动化系统来进行。

[0040] 在一些实施方案中,上述测定是一步测定(即,其中没有洗涤步骤)。在一些实施方案中,上述测定是两步测定(即,其中有洗涤步骤)。这样的两步测定可以如所描述的进行,除了任选地,在使测试样品、附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子与包含标记物的第三分析物结合分子接触之前通过洗涤来去除未与所述第一固体支持物或所述第二固体支持物结合的分析物。洗涤可以通过本领域技术人员公知的手段来完成。

[0041] 在一步测定的一些实施方案中,测量与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度以及与分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度的步骤 b) 在分析物浓度的预定范围上在校准测定中完成,并且所述方法进一步包括以下步骤:

[0042] d) 通过在提供与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的最大信号强度的分析物浓度之处或附近,确定校准测定中与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度同与分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度之比值或该比值的倒数,来建立旗标值。

[0043] 在一步测定的一些实施方案中,当与测试样品中的分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度同与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度之比:

[0044] 超过或等于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度;或者

[0045] 小于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

[0046] 在一步测定的一些实施方案中,当与测试样品中的分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度同与该分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度之比:

[0047] 小于或等于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度;或者

[0048] 超过所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

[0049] 在两步测定的一些实施方案中,所述方法包括另一步骤 b): 测量与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度以及与分析物和附

接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度,其在分析物浓度的预定范围上在校准测定中完成。该方法进一步任选地包括建立标准来选择两个信号图的足够的区段以用作校准曲线的步骤。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度趋于平稳的值(平台值)之处或附近建立旗标值的步骤。在所述方法的一些实施方案中,当与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度等于或高于旗标值时,从与该分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

[0050] 在进一步的方面,本发明提供了扩大以竞争测定形式进行的测定的动态范围的方法。在一些实施方案中,该方法任选地包括:

[0051] a) 使怀疑包含分析物的测试样品与包含附接至标记物的所述分析物或其片段的示踪剂、附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子、附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子相接触,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子不同时与分析物结合;

[0052] b) 测量来自与第一固体支持物上的第一分析物结合分子和第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的示踪剂的信号强度;以及

[0053] c) 在与附接至第一固体支持物上的第一分析物结合蛋白质结合的示踪剂的信号强度趋于平稳的值(平台值)之处或附近建立旗标值。在一些实施方案中,当与附接至第一固体支持物上的第一分析物结合蛋白质结合的示踪剂的信号强度等于或小于旗标值时,从与附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的示踪剂的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度。

## 附图说明

[0054] 图 1 提供了夹心测定的说明性示意图。

[0055] 图 2 提供了竞争性测定的说明性示意图。

[0056] 图 3 示出了作为钩效应的结果而产生的代表性校准曲线,钩效应的缺乏用标记为“平台期(plateau)”的线示出。横坐标:分析物浓度(例如,单位如 ng/mL)。纵坐标:信号振幅(例如,单位如相对光单位计数)。

[0057] 图 4 提供了测定的一个实施方案的说明性图解,其中第一分析物结合分子附接至第一类型的固体支持物上,第二分析物结合分子附接至第二类型的固体支持物上,并且第三分析物结合分子附接至标记物。

[0058] 图 5 提供了测定的一个实施方案的说明性图解,其中第一分析物结合分子附接至第一标记物,第二分析物结合分子附接至第二标记物,并且第三分析物结合分子附接至固体支持物上。ABM;分析物结合分子。

[0059] 图 6A-B 提供了一步夹心测定的实例。图 6a 示出了独立地由示例性的高亲和力和低亲和力抗体获得的说明性信号图。每张图具有校准曲线的上升段和下降段以及最大强度峰。图 6b 示出了来自低亲和力抗体和高亲和力抗体的信号比值图。这两张图可结合使用以确定测试样品的浓度。

[0060] 图 7 提供了针对前列腺特异性抗原 (PSA) 的模拟夹心测定的实例。图 7a 示出了独立地由高亲和力 and 低亲和力抗体获得的说明性信号图。图 7b 示出了来自低亲和力抗体和高亲和力抗体的信号比值图。这两张图可结合使用以确定测试样品的浓度。

[0061] 图 8A-B 提供了针对脑利钠肽 (BNP) 的夹心测定的实例。图 8a 示出了独立地由高亲和力 and 低亲和力抗体获得的说明性信号图。图 8b 示出了来自低亲和力抗体和高亲和力抗体的信号比值图。这两张图可结合使用以确定测试样品的浓度。

[0062] 图 9 示出了作为如本文所述进行的两步测定的结果而产生的代表性校准曲线。信号 1 源自与分析物结合的、被标记的分析物结合分子, 该分析物还与包被在第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合。信号 2 源自与分析物结合的标记的分析物结合分子, 该分析物还与包被在第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合。括号内的区域 (左侧校准曲线的上升段“A”和右侧校准曲线的上升段“B”) 可用来确定测试样品的浓度。

[0063] 图 10 示出了作为如本文所述进行的竞争性测定的结果而产生的代表性校准曲线。信号 1 源自与包被在第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的示踪剂。信号 2 源自与包被在第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的示踪剂。括号内的区域 (左侧校准曲线的下降段“A”和右侧校准曲线的下降段“B”) 可用来确定测试样品的浓度值。

## 具体实施方式

[0064] 本公开内容部分地基于通过消除或避免例如在包括一步和两步夹心测定在内的夹心测定中所谓的“钩效应”或“前带现象”来增加测定动态范围的测定和方法的发现和设计。

### [0065] 定义

[0066] 以下术语与本公开内容有关：

[0067] 术语“钩效应”和“前带现象”可交换地是指分析物 (例如, 抗原) 的测量水平显示出显著低于样品中存在的实际水平的吸光度。这可由许多因素引起。例如, 它会在以下情况时发生: 足够高的分析物浓度使测定饱和, 使得捕获分析物结合分子以及检测分析物结合分子两者上的所有可用位点均过饱和, 从而防止夹心结构形成。溶液中被分析物饱和的检测结合分子保持未结合并被洗掉, 从而得出假低信号。当数据以信号对分析物 (例如, 抗原) 浓度作图时, 在曲线中观察到“钩”。

[0068] 例如, 在典型的双抗体单步“夹心类型”免疫测定中, 捕获抗体 (其为通常固定到固相上的抗体) 与怀疑含有感兴趣的分析物的测试样品混合。向该混合物中加入含有可检测标记物的抗体 (以下称为“偶联物”)。在该测定中, 捕获抗体与测试样品中的分析物结合以形成捕获抗体 - 分析物复合物。然后该偶联物与捕获抗体 - 分析物复合物结合 (“夹心结构”), 并且使用本领域已知的常规技术, 作为感兴趣的分析物的测量值来检测该偶联物标记物。在大量过量的游离分析物的存在下, 所有的偶联物直接与游离分析物结合, 从而导致较少的偶联物可与捕获抗体 - 分析物复合物结合。因此, 因为较少的游离偶联物可与捕获抗体 - 分析物复合物结合, 与捕获抗体 - 分析物复合物结合的标记物的量减少, 从而降低了检测到的分析物的量。图 3 示出了作为钩效应的结果而产生的校准曲线的实例。如图 3 所示, 相矛盾的是, 在分析物浓度的高端范围, 实际分析物浓度越高, 其测得的浓度显示越低。这与在没有钩效应时获得的曲线形成对比。这样的校准曲线不降低至更低的值, 而是

保持在平台期。

[0069] 具有钩效应的校准曲线因此将具有一个峰和两个特征段，“上升段”和“下降段”。从图 3 中可以看出，上升段是校准曲线逐渐升高至更高值的区段。下降段是校准曲线逐渐降低至更低或甚至负值的区段。上升段是向上的凹形（正曲率），而下降段是向下的凹形（负曲率）。上升段和下降段由凹度从负变为正的拐点隔开。钩效应和相同类型的校准曲线可以在一步夹心测定中观察到。

[0070] “测定”是测量常常含有物质的复杂混合物的溶液中物质的存在或浓度的生化试验。在诸如血清或尿的生物液体中的分析物常常使用测定方法进行测定。此类测定是基于分析物结合分子（例如，抗体或其抗原反应性片段）以高特异性与一种或非常有限的一组分子结合的独特能力。与分析物结合分子（例如，抗体或其抗原反应性片段）结合的分子被称为分析物或抗原。需要分离步骤的测定，通常被称为分离测定或非均相测定，这种测定是普及的，因为它们容易设计，但它们经常需要多个步骤，包括对其上结合有标记的试剂的表面的仔细洗涤。一些测定可以在不进行分离步骤的情况下运行。此类测定常常可通过混合试剂和样品并进行物理测量来简单地进行。此类测定被称为均相测定，或者较不经常地，被称为非分离测定。

[0071] 如本文所用的，表述“夹心测定”意指采用同时（例如，在相同或单独的步骤中）与相同分析物结合的分析物结合分子的测定。所述分析物结合分子之一直接或间接地附接至固体支持物上，从而允许分析物直接或间接地附接至该固体支持物，例如，微粒或电极。其他分析物结合分子直接或间接地附接至标记物，从而允许分析物直接或间接地附接至该标记物以提供用于检测该分析物的信号。例如，分析物结合分子之一可以是用于与样品中的分析物（例如，抗原）特异性结合的捕获分析物结合分子（例如，抗体或其抗原反应性片段），由此该分析物（例如，抗原）直接或间接地附接至固体支持物，例如，电极或微粒，而其他的分析物结合分子可以是用于与样品中的分析物（例如，抗原）特异性结合的检测分析物结合分子（例如，抗体或其抗原反应性片段），由此该分析物（例如，抗原）直接或间接地附接至用于检测抗原的标记物。如果样品中存在相对较高的量的分析物，则将产生较高的信号。如果样品中存在相对较低的量的分析物，则将产生较低的信号。图 1 是说明夹心测定的代表性实例的示意图。

[0072] 如本文所用的，表述“竞争性测定”是指其中未标记的抗原和标记的抗原竞争结合同一抗体位点的测定。或者，抗体和标记的抗体竞争结合同一抗原位点。在前者的实例中，使用标记的抗原和未标记的抗原。固体支持物用可与标记的抗原或与未标记的抗原特异性地结合的抗体包被。将固体支持物、标记的抗原和怀疑含有抗原的患者样品组合在一起。当然，患者样品中的任何抗原是未标记的。标记的抗原和未标记的抗原竞争固体支持物上的抗体位点。只有当标记的抗原附接至固体支持物上的抗体时才可能产生信号，因为只有标记的抗原能够产生信号。患者样品中的抗原的量与产生的信号的量成反比。这种类型的测定在图 2 中示意性地示出。

[0073] 如本文所用的，术语“复合物”意指彼此特异性结合的至少两个分子。复合物的实例包括但不限于，与分析物结合分子结合的一个分析物，与多个分析物结合分子结合的一个分析物，例如，与两个分析物结合分子结合的一个分析物，与多个分析物结合的一个分析物结合分子，例如，与两个分析物结合的一个分析物结合分子。

[0074] 如本文所用的,表述“固体支持物”意指分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段)可附接至其上,从而使得该分析物结合分子在液体介质中不能从固体支持物上脱离的任何固体表面。固体支持物可以容易地与该固体支持物接触的液体分开。在不同的实施方案中,固体支持物可以是,例如,塑料、衍生塑料、磁性或非磁性金属、玻璃或硅。固体支持物的代表性实例包括但不限于电极、试管、珠子、微粒、纳米颗粒、微孔或多孔板的孔、凝胶、胶体、生物细胞、薄片、芯片和本领域普通技术人员所知的其他构造。分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段)可以附接至其上的物体的一个实例是微粒,例如,磁性微粒。微粒一般具有小于 1000 微米的平均直径。微粒可以容易地从其分散于其中的液体中分离。微粒容易地分散在水性介质中。此外,固体支持物任选地提供回收分析物结合蛋白质的手段,即,在与进行测定的条件不同的受控条件下从表面上释放或脱离分析物结合分子的手段。例如,分析物结合分子可借助于可裂解的连接体附接至固体支持物上。

[0075] 如本文所用的,表述“捕获分析物结合分子”意指这样的分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段):其将分析物,例如,抗原,结合至固体支持物上,其结果是抗体将该分析物附接至固体支持物上,由此该分析物直接地或通过居间的部分间接地附接至固体支持物上。

[0076] 如本文所用的,表述“检测分析物结合分子”意指这样的分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段):其附接至在化学或生物反应中提供或可变成提供可检测的信号的部分。

[0077] 术语“一步”测定是指不包括从未结合的样品分析物中分离结合的样品分析物的测定。

[0078] 术语“两步”测定是指包括从未结合的样品分析物中分离结合的样品分析物的测定。

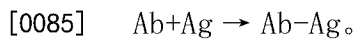
[0079] “约”是指从所述值大约  $\pm 10\%$  的变化。应当理解,这样的变化总是包含在本文所提供的任何给定值中,无论是否具体提及。

[0080] 如本文进一步描述的,“分析物”是指待测的化合物或组合物,其可以是配体,其可以是单表位的或多表位的,抗原的或半抗原的,共享至少一个共同表位位点或受体的单个或多个化合物。说明性的感兴趣的分析物通常包括但不限于,例如,蛋白质、糖蛋白、肽、多肽、寡核苷酸或多核苷酸,以及更具体地,例如,抗体、抗原、半抗原、激素、药物、酶或受体。

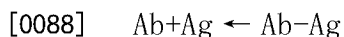
[0081] “抗体”和“多个抗体”是指单克隆抗体、多特异性抗体、双功能抗体、人抗体、人源化抗体(完全或部分人源化的)、动物抗体(诸如但不限于鸟(例如鸭或鹅)、鲨鱼、鲸和哺乳动物,其包括非灵长类(例如,牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠、小鼠等)或非人灵长类(例如,猴、黑猩猩等)、重组抗体、嵌合抗体、单链 Fv (“scFv”)、单链抗体、单域抗体、Fab 片段、F(ab') 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、二硫键连接的 Fv (“sdFv”) 以及抗独特型 (“anti-Id”) 抗体、双域抗体、双可变域 (DVD) 或三可变域 (TVD) 抗体(双可变域免疫球蛋白及其制备方法描述于 Wu, C. 等人, *Nature Biotechnology*, 25(11):1290-1297(2007), 以及公开号为 WO 2001/058956 的国际专利申请,其中每一篇的内容均通过引用并入本文),以及上述任一种的功能活性表位结合片段。如本文所用的术语“双功能抗体”是指包含对一个抗原位点具有特异性的第一臂和对一个不同的抗原位点具有特异性的第二臂的抗体,即,双功能抗体具有双重特异性。

[0082] “抗体片段”和“多个抗体片段”是指包含抗原结合位点或可变区的完整抗体的一部分。该部分不包括完整抗体的 Fc 区的恒定重链域（即，CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub> 或 CH<sub>4</sub>，取决于抗体同种型）。抗体片段的实例包括但不限于 Fab 片段、Fab' 片段、Fab'-SH 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、Fd 片段、Fv 片段、双抗体、单链 Fv(scFv) 分子、只含有一个轻链可变域的单链多肽、含有轻链可变域的三个 CDR 的单链多肽、只含有一个重链可变区的重链可变区单链多肽和含有重链可变区的三个 CDR 的单链多肽。

[0083] “结合常数”如本文所述。在本文中可互换使用的术语“缔合速率常数”、“k<sub>on</sub>”或“k<sub>a</sub>”是指这样的值：其表示特异性结合对的第一成员（SBP1；例如，分析物结合分子，抗体（Ab）或其分析物反应性片段）和特异性结合对的第二成员（SBP2；例如，分析物（例如，抗原（Ag））的结合速率，或特异性结合对的第一成员与特异性结合对的第二成员之间的复合物形成的速率，如以下方程式所示：



[0086] 在本文中可互换使用的术语“解离速率常数”、“k<sub>off</sub>”或“k<sub>d</sub>”是指这样的值：其表示 SBP1（例如，分析物结合分子，抗体或其分析物反应性片段）从 SBP2（例如，抗原）上的解离速率，或 SBP1-SBP2 复合物（例如，抗体-抗原复合物）随时间分离成游离 SBP1（例如，分析物结合分子、抗体或其分析物反应性片段）和 SBP2（例如，抗原）的速率，如以下方程式所示：



[0089] 用于确定缔合和解离速率常数的方法是本领域公知的。使用基于荧光的技术提供了高灵敏度和在平衡的生理缓冲液中检测样品的能力。可以使用其他实验方法和仪器如 **BIACore®**（生物分子相互作用分析）测定（例如，仪器可从 BIAcore International AB, GE Healthcare 公司, Uppsala, Sweden 获得）。此外，也可以使用可从 Sapidyne Instruments(Boise, Idaho) 获得的 **KinExA®**（动力学排除测定）测定。

[0090] 在本文中可互换使用的术语“平衡解离常数”或“K<sub>D</sub>”是指通过将解离速率（k<sub>off</sub>）除以缔合速率（k<sub>on</sub>）而得到的值。缔合速率、解离速率和平衡解离常数用来表示分析物结合分子（例如，抗体或其分析物反应性片段）对抗原的结合亲和力。这可由以下反应和方程式描述：



$$[0092] \quad K_D = \frac{[\text{AB}]}{[\text{A}][\text{B}]}$$

[0093] 这些结合常数中的任何一个，即，k<sub>a</sub>、k<sub>d</sub>或 K<sub>D</sub>，可以想象可用来评估或比较“结合亲和力”，即，结合的倾向或强度。然而，通常如本文所述，结合亲和力是指 K<sub>D</sub>。

[0094] “CDR”在本文中用来指分析物结合分子或抗体可变序列内的“互补性决定区”。在抗体中，在重链和轻链的每一个可变区中有三个 CDR，对于每个可变区，它们被称为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。如本文所用的术语“CDR 组”是指在结合抗原的单个可变区中存在的一组三个 CDR。这些 CDR 的确切边界根据不同的体系已有不同地定义。Kabat 描述的体系 (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National

Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 和 (1991)) 不仅提供了适用于抗体的任何可变区的明确的残基编号体系,而且还提供了限定三个 CDR 的精确的残基边界。这些 CDR 可被称为“Kabat CDR”。Chothia 和同事 (Chothia 和 Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); 和 Chothia 等人, *Nature*, 342:877-883 (1989)) 发现 Kabat CDR 内的某些亚部分采用几乎相同的肽骨架构象,尽管在氨基酸序列水平上具有很大的多样性。这些亚部分被称为“L1”、“L2”和“L3”,或“H1”、“H2”和“H3”,其中“L”和“H”分别指代轻链和重链区。这些区域可以被称为“Chothia CDR”,它们具有与 Kabat CDR 重叠的边界。与 Kabat CDR 重叠的限定 CDR 的其他边界已由 Padlan, *FASEB J.*, 9:133-139 (1995) 和 MacCallum, *J. Mol. Biol.*, 262(5):732-745 (1996) 描述。另外其他的 CDR 边界限定可能不严格遵循此处的一种体系,但仍将与 Kabat CDR 重叠,尽管根据特定残基或成组残基乃至整个 CDR 不显著影响分析物 (例如,抗原) 结合的预测或实验发现,它们可得到缩短或加长。本文所使用的方法可以利用根据这些体系中的任意一个限定的 CDR,尽管某些实施方案使用 Kabat 或 Chothia 限定的 CDR。

[0095] “组分”、“多种组分”和“至少一种组分”通常是指捕获抗体、检测或偶联物抗体、校准物、对照、灵敏度组 (panel)、容器、缓冲液、稀释剂、盐、酶、酶的辅助因子、检测试剂、预处理试剂 / 溶液、底物 (例如,作为溶液)、终止溶液等,根据本文描述的方法和本领域所知的其他方法,其可包含在用于测定诸如患者血清样品的测试样品的试剂盒中。一些组分可以在溶液中被冻干以便重建后在测定中使用。

[0096] 如本文所用的,术语“偶联物”意指包含结合对成员和标记物的实体。

[0097] “对照”是指已知不含分析物 (“阴性对照”) 或含有分析物 (“阳性对照”) 的组合物。阳性对照可以包含已知浓度的分析物。“对照”、“阳性对照”和“校准物”在本文中可互换使用,是指包含已知浓度的分析物的组合物。“阳性对照”可用来确立测定性能特性,并且是试剂 (例如,分析物) 完整性的有用的指示物。

[0098] “表位”、“多个表位”或“感兴趣的表位”是指被识别并且可以结合至其特异性结合配偶体 (例如,分析物结合分子,例如,抗体或其片段) 上的互补位点的任何分析物上的位点。分析物和抗原结合分子是特异性结合对的一部分。例如,表位可以在多肽、蛋白质、半抗原、碳水化合物抗原 (例如但不限于糖脂、糖蛋白或脂多糖) 或多糖上。其特异性结合配偶体可以是,但不限于,分析物结合分子 (例如,抗体或其分析物反应性片段)。

[0099] “旗标值”是阈值或截止值,其决定在确定测试样品中的分析物浓度时是使用来自对分析物具有相对较高结合亲和力的分析物结合分子的信号还是使用来自对分析物具有相对较低和较高结合亲和力的分析物结合分子的信号的比值。旗标值如本文所述来确定。重要的并应当指出的是,旗标值还提供了其中以及就其本身而言重要的测定信息。例如,旗标值可以在一步测定中使用以确定测定所测得的值或结合曲线的部分是否由于钩效应而不真实地降低。

[0100] 如本文所使用的,术语“强度”意指每单位面积或体积上电、光、热或声的强度的量或程度。在不同的实施方案中,术语“强度”是指每单位时间每单位面积计数的光子的数目。例如,每单位面积 1000 个光子可以被记录为在单一像素中的 500 个计数,而每单位面积 80 个光子可以被记录为在单一像素中的 40 个计数。特定的转换取决于所使用的检测系统。强度与计数的光子数目成比例。

[0101] “标记物”和“可检测标记物”意指直接或间接地附接至分析物结合分子（例如，抗体或其分析物反应性片段）或分析物上以使分析物结合分子（例如，抗体或其分析物反应性片段）与分析物之间的反应变得可检测的部分，并且如此标记的分析物结合分子（例如，抗体或其分析物反应性片段）或分析物被称为“可检测地标记的”。标记物可以产生例如通过视觉或仪器手段可检测的信号。在这方面，标记物可以是任何信号生成部分，并且在本文中有时被称为报道基团。如本文所用的，标记物（或信号生成部分）产生可测量的信号，该信号通过外部手段是可检测的，例如，通过电磁辐射的测量，并且根据所使用的系统，信号水平可以变化到该标记物是在诸如电极、微粒或珠子等固体支持物的环境中的程度。各种标记物包括信号产生物质，如酶（辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、碱性过氧化物酶、葡萄糖 6-磷酸脱氢酶等），发色团或色原（例如，吸收在紫外或可见光区的光的染料、磷光体、荧光剂、荧光团（例如，荧光蛋白（绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、青色荧光蛋白）；藻胆素（藻红蛋白、R-藻红蛋白、B-藻红蛋白）；咕吨衍生物（荧光素、罗丹明、俄勒冈绿 (Oregon green)、曙红、德克萨斯红 (Texas red)）；花青衍生物（花青、Cy 染料、吡啶羰花青、氧杂羰花青、硫杂羰花青、部花青）；萘衍生物（丹酰和氟硅酸钠衍生物）；香豆素衍生物；噁二唑衍生物（吡啶噁唑、硝基苯并噁二唑、苯并噁二唑）；芘衍生物（级联蓝 (cascade blue)）；噁嗪衍生物（尼罗红 (Nile red)、尼罗蓝 (Nile blue)、甲酚紫、噁嗪 170)；吡啶衍生物（原黄素、吡啶橙、吡啶黄）；芳基次甲基 (arylmethine) 衍生物（金胺、结晶紫、孔雀石绿）；四吡咯衍生物（卟吩、酞菁、胆红素)），发光团，化学发光化合物，放射性化合物等）。标记物的代表性实例包括产生光的部分，例如，吡啶鎓化合物，以及产生荧光的部分，例如，荧光素。其他标记物在本文中描述。在此方面，所述部分本身可能不是可检测的，但当与另一部分反应时可能变为可检测的。例如，可以使用酶来产生信号或放大信号或前述两者兼具。作为另一实例，所述部分可以是所谓的猝灭剂或被猝灭剂作用的实体。术语“可检测标记物”的使用旨在包括这类标记的这些和其他手段。

[0102] “患者”和“受试者”可以互换使用，是指动物，如鸟（例如鸭或鹅）、鲨鱼、鲸和哺乳动物，包括非灵长类（例如，牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠和小鼠）和灵长类（例如，猴、黑猩猩和人）。优选地，患者或受试者是人，如怀疑具有、诊断为具有分析物缺乏或分析物的存在或过量或经历对此的预防性或治疗性处理的人。

[0103] “患者样品”、“样品”、“测试样品”在本文中可互换使用。样品，如尿、血清、血浆、羊水、脑脊髓液、胎盘细胞或组织、内皮细胞、白细胞或单核细胞，可以按从患者获得时那样直接使用，或者可进行预处理，例如，通过过滤、蒸馏、提取、浓缩、离心、灭活干扰组分、添加试剂等，从而以本文讨论的某种方式或以本领域已知的其他方式来改变样品的特性。在本公开内容的语境中，样品优选为血清或血浆，最优选为血清。

[0104] 如在本文所述的诊断测定中所用的，“预处理试剂”，例如，裂解、沉淀和 / 或增溶试剂，是裂解存在于测试样品中的任何细胞和 / 或增溶存在于测试样品中的任何分析物的试剂。如本文进一步描述的，预处理对于所有样品不都是必需的。除其他方面外，增溶分析物需要从存在于样品中的任何内源结合蛋白质中释放分析物。预处理试剂可以是均相的（不需要分离步骤）或非均相的（需要分离步骤）。使用非均相预处理试剂时，在进行测定的下一个步骤之前要先从测试样品中移除任何沉淀的分析物结合蛋白质。预处理试剂任选地可以包含：(a) 一种或多种溶剂和盐，(b) 一种或多种溶剂、盐和去污剂，(c) 去污剂，(d) 去污

剂和盐,或(e)适合于细胞裂解和/或分析物增溶的任何试剂或试剂组合。

[0105] 在本文所述的测定和试剂盒的语境中,“质量控制试剂”包括但不限于校准物、对照和灵敏度组。一般使用“校准物”或“标准”(例如,一个或多个,如多个)以便建立校准(标准)曲线以用于分析物如抗体或分析物的浓度的内插。或者,可以使用接近预定的阳性/阴性截止值的单一校准物。可以结合使用多个校准物(即,多于一个校准物或变化量的校准物),以便包含“灵敏度组”。

[0106] “特异性结合配偶体”是特异性结合对的成员。特异性结合对包含两个不同的分子,它们通过化学或物理方式彼此特异性结合。因此,除了共同测定的分析物/分析物结合分子和抗原/抗体特异性结合对之外,其他的特异性结合对可以包括生物素和抗生物素蛋白(或链霉抗生物素蛋白)、碳水化合物和凝集素、互补核苷酸序列、效应物和受体分子、辅因子和酶、酶和酶抑制剂等。此外,特异性结合对可包括作为原始特异性结合成员的类似物的成员,例如,分析物-类似物。免疫反应性特异性结合成员包括抗原、抗原片段和抗体,包括单克隆和多克隆抗体以及复合物及其片段,无论是分离的还是重组产生的。

[0107] 在特异性结合对的成员(例如,抗原(或其片段)和抗体(或其抗原反应性片段))之间的相互作用的语境中,“特异性的”和“特异性”是指该相互作用的选择反应性。词语“特异性结合”和类似词语是指特异性结合对的第一成员(例如,抗体或其抗原反应性片段)与特异性结合对的第二成员(例如,抗原)结合,而不与其他抗原(或其片段)特异性结合的能力。在本公开内容的语境中,与分析物特异性结合的抗体被认为对分析物是特异性的。

[0108] “示踪剂”是指附接至标记物的分析物或分析物片段,其中附接至标记物的分析物可以有效地与分析物竞争对分析物特异性的分析物结合分子上的位点。

[0109] 提供上述术语是为了描述特定实施方案的目的。所述术语并非意在限制。

#### [0110] 1. 简介

[0111] 通常,本文所述的测定和方法需要在夹心测定中使用三种分析物结合分子(在传统夹心测定中使用两种分析物结合分子)来消除一步夹心测定中的“钩效应”和扩大两步夹心测定中的线性测定动态范围。如本文最新描述的,还可采用这样的测定和方法来扩大竞争性测定形式的动态范围。三种分析物结合分子中的两种可用于捕获或检测,但是它们的结合亲和力应该是不同的,例如,如本文进一步描述的,并且第一和第二分析物结合分子独立地通过分析物与第三分析物结合分子结合。当用作捕获分析物结合分子时,在一些实施方案中,第一和第二分析物结合分子可附接至不同类型的微粒或附接至表面上的不同位置上(例如,两个不同的且在空间上分离的电极)。当用作检测分析物结合分子时,在一些实施方案中,第一和第二分析物结合分子可具有标记物,该标记物可具有可区别的光谱特性(例如,寿命、光谱的)。在这两种情况下,由第一和第二分析物结合分子产生的信号可基于它们的空间和光谱特性来分别测量。由第一和第二分析物结合分子获得的信号的比值还可用作选择校准曲线的正确区段的指标。在两步夹心和竞争性形式中,具有不同亲和力的抗体附接至不同的固体支持物上,并且可以独立地测量来自每一固体支持物的信号。

[0112] 在一步夹心测定形式中,对于给定的校准物组,独立地获得在一定范围的分析物浓度上测量分析物结合分子的结合强度的两张校准图(plot)。对感兴趣的分析物具有相对较高结合亲和力的分析物结合分子用作捕获剂或检测剂以获得Plot<sub>高</sub>。对感兴趣的分析物具有相对较低结合亲和力的分析物结合分子用作捕获剂或检测剂以获得Plot<sub>低</sub>。由于钩效

应,两张图将具有最大强度峰(通常在拐点处)、上升段和下降段。预定的旗标值可用于确定使用曲线的哪一区段作为校准曲线。该旗标值如本文所述来确定。 $\text{Plot}_{\text{高}}$ 在较低的分析物浓度处达到其最大强度。 $\text{Plot}_{\text{高}}$ 还可以称为“校准图”。 $\text{Plot}_{\text{低}}$ 在较高的分析物浓度处达到其最大强度。在 $\text{Plot}_{\text{高}}$ 的峰处 $\text{Plot}_{\text{低}}/\text{Plot}_{\text{高}}$ 的比值被指定为旗标值(参见,例如图6a)。当在测试样品测量中信号强度比值 $S_L/S_H$ (来自低亲和力分子的信号/来自高亲和力分子的信号)小于预定的旗标值时,校准曲线的上升段用于测定校准。当信号强度 $S_L/S_H$ 的比值高于该旗标值时,校准曲线的下降段用于测定校准。

[0113] 还可应用倒数。相反地,在通过在 $\text{Plot}_{\text{高}}$ 峰处将 $\text{Plot}_{\text{高}}$ 除以 $\text{Plot}_{\text{低}}$ 来确定旗标值的该方法的实施方案中,当测试样品测量中的信号强度比值 $S_H/S_L$ (来自高亲和力分子的信号/来自低亲和力分子的信号)大于旗标值时,校准曲线的上升段用于测定校准。或者,当测试样品测量中的信号强度比值 $S_H/S_L$ 等于或小于旗标值时,校准曲线的下降段用于测定校准。

[0114] 在两步测定中,高亲和力和低亲和力分析物结合分子均必须附接至固体支持物上(例如,以允许一个或多个洗涤步骤)。对于两步夹心测定形式,来自附接至固体支持物上的相对较高结合亲和力分析物结合分子的信号在较高分析物浓度下达到平台期,而来自附接至固体支持物上的低亲和力分析物结合分子的信号线性地响应于较高的分析物浓度。因此,来自相对较高亲和力分析物结合分子的信号可用于低分析物浓度测量,它确保了测定的灵敏度;而来自相对较低亲和力分析物结合分子的信号可用于高分析物浓度测量。该旗标值可以是来自相对较高亲和力分析物结合分子的平台信号。对于测试样品,如果其来自于相对较高亲和力分析物结合分子的信号等于或高于旗标值,那么将使用来自相对较低亲和力分析物结合分子的信号图。相对较高亲和力分析物结合分子确保了测定的灵敏度,而相对较低亲和力分析物结合分子扩大了测定的动态范围。

[0115] 这描绘在图9中。从该图中可以看出,对于较高亲和力分析物结合分子的校准曲线是左侧的曲线,而对于较低亲和力分析物结合分子的校准曲线是右侧的曲线。两条曲线之间的关系可用来建立选择信号图的合适区段以用于校准测定的标准。在一些实施方案中,旗标值可被设定为接近来自第一固体支持物的信号强度的平台值。对于测试样品,如果来自第一固体支持物的信号等于或高于旗标值,那么来自第二固体支持物的信号图的上升段(右侧的曲线,区段B)将用于校准。使用该方法,可以扩大测定的动态范围。

[0116] 对于竞争性测定形式,来自附接至固体支持物上的相对较高亲和力分析物结合分子的信号在较高分析物浓度下将趋于平稳,而来自附接至固体支持物上的相对较低亲和力分析物结合分子的信号则反向地响应于较高分析物浓度。因此,来自相对较高亲和力分析物结合分子的信号可用于低分析物浓度测量,它确保了测定的灵敏度;而来自相对较低亲和力分析物结合分子的信号可用于高分析物浓度测量。旗标值可以是来自相对较高亲和力分析物结合分子的平台信号。对于测试样品,如果来自于相对较高亲和力分析物结合分子的信号等于或高于旗标值,那么将使用来自相对较低亲和力分析物结合分子的信号图。相对较高亲和力分析物结合分子确保了测定的灵敏度,而相对较低亲和力分析物结合分子扩大了测定的动态范围。

[0117] 这描绘在图10中。从该图中可以看出,对于较高亲和力分析物结合分子的校准曲线是左侧的曲线,而对于较低亲和力分析物结合分子的校准曲线是右侧的曲线。两条曲线

之间的关系可用来建立选择信号图的合适区段以用于校准测定的标准。在一些实施方案中,旗标值可被设定为接近来自第一固体支持物的信号强度的趋于稳定的值。对于测试样品,如果来自第一固体支持物的信号等于或小于旗标值,那么来自第二固体支持物的信号图(下降段,右侧的曲线,区段B)将用于校准。使用该方法,可以扩大测定的动态范围。

[0118] 重要的是要指出,通过在两步和竞争性测定形式中均使用具有不同亲和力和/或不同浓度的两种分析物结合分子,有可能获得很好地分离的信号图,从而扩大测定的动态范围。

## [0119] 2. 试剂盒

[0120] 本文提供了用于测定分析物(或其片段)的测试样品的试剂盒。在不同的实施方案中,该试剂盒包含可一起用于测定测试样品中感兴趣的分析物的第一、第二和/或第三分析物结合分子以及关于测定测试样品中的分析物的说明书。在不同的实施方案中,该试剂盒可包含:

[0121] i) 附接至第一标记物的第一分析物结合分子和包含第二标记物的第二分析物结合分子,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,其中第一标记物和第二标记物是可检测地可区别的(例如,发出可检测地可区别的波长的光);以及附接至固体支持物上的第三分析物结合分子,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子不同时与分析物结合,并且第一分析物结合分子和第二分析物结合分子独立地与分析物结合,从而与第三分析物结合分子结合以形成测定夹心结构;或

[0122] ii) 附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物具有不同的结合亲和力,其中第一固体支持物和第二固体支持物是可区分的(例如,通过空间分离、颜色、形状、大小等);以及附接至标记物的第三分析物结合分子,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子不同时与分析物结合,并且第一分析物结合分子和第二分析物结合分子独立地与分析物结合,从而与第三分析物结合分子结合以形成测定夹心结构;或

[0123] iii) 附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物具有不同的结合亲和力,其中第一固体支持物和第二固体支持物是可区分的(例如,通过空间分离、颜色、形状、大小等);以及包含附接至报道基团的分析物或分析物片段的示踪剂,其将与测试样品中的分析物竞争结合第一和第二分析物结合分子。

[0124] 如本领域技术人员所理解的,下面针对试剂盒所描述的组分在本文所描述的方法中也是有用的。因此,以下对固体支持物和标记物的描述同样适用于本文描述的试剂盒和方法。

[0125] 在不同的实施方案中,该试剂盒可以包含通过本文所述的测定,例如微粒测定或用于照护点装置的测定,来针对分析物(或其片段)测定测试样品的说明书。该说明书可以是纸质形式或计算机可读形式,如磁盘、CD、DVD等。可替代地或另外地,该试剂盒可包含校准物或对照,例如,纯化的和任选冻干的分析物(或其片段),和/或用于进行测定的至少一个容器(例如,管、微量滴定板或条,其可能已经用一种或多种分析物结合分子包被),和/或缓冲液,如测定缓冲液或洗涤缓冲液,其中任意一种可作为浓缩溶液、用于可检测标

记物（例如，酶标记物）的底物溶液或终止溶液来提供。优选地，该试剂盒包含对于进行测定所必要的所有组分，即，试剂、标准、缓冲液、稀释剂等。该说明书还可以包括关于产生用于定量分析物目的的标准曲线或参考标准的说明书。

[0126] 适当时或期望时，试剂盒可以包含固体支持物，例如，电极、微粒、磁性颗粒、珠子、试管、微量滴定板、比色皿、膜、支架分子、薄膜、滤纸、盘或芯片。说明性的固体支持物包括但不限于，例如，电极、孔如微量滴定板的孔、试管、多孔凝胶（例如，硅胶、琼脂糖、葡聚糖或明胶）、聚合物膜（例如，聚丙烯酰胺）、珠子（例如，聚苯乙烯珠或磁珠）、过滤器/膜的条（例如，硝化纤维或尼龙）、微粒（例如，胶乳颗粒或可磁化微粒（例如，具有氧化铁或三氧化二铬核心以及均聚或杂聚涂层和大约 1-10 微米半径的微粒））。基底可以包含合适的多孔材料，该多孔材料具有合适的表面亲和力以结合捕获剂和足够的孔隙率以允许由检测剂进入。通常优选微孔材料，尽管可以使用水合状态的胶状材料。这样的多孔基底优选地是片材的形式，其具有约 0.01 至约 0.5mm 的厚度，优选约 0.1mm。孔径可以有很大不同，而优选孔径为约 0.025 至约 15 微米，更优选约 0.15 至约 15 微米。这样的基底的表面可以由导致分析物结合分子与基底的共价连接的化学过程来激活。捕获剂与基底的不可逆结合通常由通过疏水作用力的吸附来产生；或者，化学偶联剂或其他手段可以用来将捕获剂与基底共价结合，条件是这样的结合不干扰捕获剂结合分析物的能力。

[0127] 适用于本发明的一种支持物是微粒。适合与本文所述的方法一起使用的微粒包括但不限于磁性微粒。微粒的大小通常为约 0.1 至约 100  $\mu\text{m}$  的范围。可商购的微粒能以各种各样的材料获得，包括由陶瓷、玻璃、聚合物和金属制成的材料。适合于在本文描述的方法中使用的磁性微粒是可商购获得的，例如，从 Agilent Technologies, Santa Clara, CA 获得。虽然普遍接受的 0.1 至 100  $\mu\text{m}$  的定义补充了纳米颗粒的大小定义，还有其他方式来定义大小。一般的共识是认为小于 100nm 的微粒是纳米颗粒。大于 0.5  $\mu\text{m}$  的任何微粒和小于 0.5mm 的任何微粒被认为是微粒。一般而言，适合与本文所述的方法一起使用的微粒的大小必须足够大，以使得通过选择的图像系统能够辨析两个微粒。适合与本文所述的方法一起使用的微粒的特性，例如，颜色，是选择问题。本领域普通技术人员可以选择微粒的特性，以便满足由该方法的适当变化所造成的要求。

[0128] 适合与本文所述的试剂盒和方法一起使用的反应容器包括微孔板和在照护点装置中的贮存器。在不同的实施方案中，该反应容器可以具有可生成捕获分析物结合分子-分析物-检测分析物结合分子复合物的图像的特征。在一个实施方案中，反应容器对电磁辐射（通常在光谱的紫外线和可见光范围内）是可透的。适合于制造反应容器的材料包括玻璃和聚合物材料。在一个实施方案中，反应容器的材料不是自发荧光的。然而，通常，反应容器的具体形式或形状不是关键性的。

[0129] 在一些实施方案中，第一和第二分析物结合分子或第三分析物结合分子与微粒结合，该微粒先前已用链霉抗生物素蛋白或生物素（例如，使用 Power-Bind™-SA-MP 链霉抗生物素蛋白包被的微粒（Seradyn, Indianapolis, IN）或抗物种特异性单克隆抗体包被。如果有必要，基底可以衍生化为允许与捕获剂上的各种官能团的反应性。这样的衍生化需要使用某些偶联剂，其实例包括但不限于马来酸酐、N-羟基琥珀酰亚胺和 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺。如果需要，一种或多种捕获剂（例如，分析物结合分子（例如，抗体或其抗原活性片段）），其中每一种对分析物都是特异性的，可附接至固体支持物的不同的

物理或可寻址的位置（例如，如以生物芯片配置（参见，例如，美国专利号 6, 225, 047, 国际专利申请公开号 WO 99/51773 ; 美国专利号 6, 329, 209 ; 国际专利申请公开号 WO 00/56934, 和美国专利号 5, 242, 828）。

[0130] 在不同的实施方案中，第一和第二分析物结合分子或第三分析物结合分子直接或间接地附接至可检测标记物。说明性的标记物包括，例如，荧光团、放射性部分、酶、生物素 / 抗生物素蛋白标记物、发色团、化学发光标记物等。可以使用如本领域已知的任何合适的可检测标记物。例如，可检测标记物可以是放射性标记物（如  $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$  和  $^{33}\text{P}$ ），酶标记物（例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、碱性过氧化物酶、葡萄糖 6- 磷酸脱氢酶等），化学发光标记物（例如，吡啶酯、硫酯或磺酰胺；鲁米诺、异鲁米诺、菲啶鎓酯等），一种或多种发色团，例如，在紫外或可见光区发光的一种或多种染料，磷光体，荧光剂，荧光团（例如，荧光蛋白（绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、青色荧光蛋白）；藻胆素（藻红蛋白、R- 藻红蛋白、B- 藻红蛋白）；咕吨衍生物（荧光素、罗丹明、俄勒冈绿、曙红、德克萨斯红）；花青衍生物（花青、Cy 染料、吡啶羰花青、氧杂羰花青、硫杂羰花青、部花青）；萘衍生物（丹酰和氟硅酸钠衍生物）；香豆素衍生物；噁二唑衍生物（吡啶噁唑、硝基苯并噁二唑、苯并噁二唑）；茈衍生物（级联蓝）；噁嗪衍生物（尼罗红、尼罗蓝、甲酚紫、噁嗪 170）；吡啶衍生物（原黄素、吡啶橙、吡啶黄）；芳基次甲基衍生物（金胺、结晶紫、孔雀石绿）；四吡咯衍生物（卟吩、酞菁、胆红素），发光团，化学发光剂，荧光标记物（例如，荧光素（例如，5- 荧光素、6- 羧基荧光素、3'-6- 羧基荧光素、5(6)- 羧基荧光素、6- 六氯荧光素、6- 四氯荧光素、异硫氰酸荧光素等），罗丹明，量子点（例如，硫化锌加帽的硒化镉），温度测量标记物，或免疫 - 聚合酶链反应标记物。对标记物、标记程序和标记物检测的介绍可见于 Polak 和 Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 第 2 版, Springer Verlag, N. Y. (1997) 和 Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996), 这是由 Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon 出版的组合手册和目录。吡啶鎓化合物可以在均相化学发光测定中用作可检测标记物（参见，例如，Adamczyk 等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16:1324-1328 (2006) ; Adamczyk 等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:2313-2317 (2004) ; Adamczyk 等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14:3917-3921 (2004) ; 和 Adamczyk 等人, *Org. Lett.* 5:3779-3782 (2003)）。

[0131] 在不同的实施方案中，第一标记物或第二标记物是藻胆素（例如，藻红蛋白、R- 藻红蛋白、B- 藻红蛋白）。R- 藻红蛋白或 PE 可用作基于荧光的指示剂，用于在多种应用中标记分析物结合分子或其他分子。R- 藻红蛋白在约 566nm 处强烈吸收并在 496 和 545nm 处有副峰，并在 575nm 处强烈发射。R- 藻红蛋白是迄今为止鉴定的最亮的荧光染料之一。参见，例如，Phycoerythrin - Wikipedia, 自由的百科全书, 在因特网上的 [en.wikipedia.org/wiki/Phycoerythrin](http://en.wikipedia.org/wiki/Phycoerythrin) 和 R-PHYCOERYTHRIN (PB31), ProZyme Inc., Hayward, CA, 这两者均通过引用并入本文。在可检测标记物是至少一种吡啶鎓化合物的实施方案中，试剂盒可以包含至少一种吡啶 -9- 羧酰胺、至少一种吡啶 -9- 羧酸芳基酯或其任意组合。如果可检测标记物是至少一种吡啶鎓化合物，则试剂盒还可以包含过氧化氢的来源，如缓冲液、溶液和 / 或至少一种碱性溶液。

[0132] 在一些实施方案中，所述试剂盒可以包含或者所述方法可以使用用于标记分析物结合分子的试剂或用于检测分析物结合分子（例如，检测分析物结合分子）和 / 或用于标

记分析物的试剂或用于检测分析物的试剂。分析物结合分子、校准物和 / 或对照可以提供于分开的容器中或预先分配到合适的测定形式中,例如,微量滴定板中。

[0133] 任选地,试剂盒包含质量控制组分(例如,灵敏度组、校准物和阳性对照)。质量控制试剂的制备是本领域公知的,并且在多种免疫诊断产品的插页上有描述。灵敏度组成员任选地用于确立测定性能特征,并进一步任选地是测定试剂盒试剂的完整性和测定的标准化的有用指示剂。

[0134] 试剂盒还可以任选包含进行诊断测定或促进质量控制评价所需要的其他试剂,如缓冲液、盐、酶、酶辅因子、底物、检测试剂等。其他组分,如用于分离和 / 或处理测试样品的缓冲液和溶液(例如,预处理试剂),也可以包含在试剂盒中。试剂盒可以另外包含一个或多个其他对照。试剂盒的一个或多个组分可以被冻干,在此情况下,试剂盒可以进一步包含适合于冻干组分的重建的试剂。

[0135] 试剂盒的各种组分任选地在必要时提供于适当的容器中,例如,微量滴定板中。试剂盒可以进一步包含用于保持或贮存样品的容器(例如,用于尿样的容器或筒匣)。在适当的情况下,试剂盒任选地还可以含有反应容器、混合容器和有利于试剂或测试样品的制备的其他组件。试剂盒还可以包含一个或多个协助获得测试样品的工具,诸如注射器、移液管、镊子、测量匙等。

[0136] 3. 测定形式

[0137] 本公开内容提供了确定测试样品中分析物(或其片段)的存在、量或浓度的方法。本领域已知的任何合适的测定均可在该方法中使用。实例包括但不限于,测定,如夹心测定(例如,包括放射性同位素检测(放射免疫测定(RIA))和酶检测(酶测定(EIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)(例如,Quantikine ELISA 测定,R&D Systems, Minneapolis, MN))、竞争性测定,及其他。

[0138] 本领域公知的用于收集、处理和加工尿、血液、血清和血浆以及其他体液的方法在本发明的实践中使用,例如,当使用根据本公开内容的分析物结合分子作为免疫诊断试剂时,和 / 或在用于分析物的测定的试剂盒中使用。除了分析物、感兴趣的其他分析物,例如,通常为蛋白质、肽、多肽、寡核苷酸或多核苷酸,以及更具体地,例如,抗体、抗原、半抗原、激素、药物、酶或受体,以及本文所述的说明性分析物和其他任何感兴趣的分析物之外,测试样品还可包含另外的部分。例如,样品可以是受试者获得的全血样品。可能有必要或期望在如本文所述的测定之前(例如,用预处理试剂)处理测试样品,特别是全血。甚至在预处理不必要的情况下(例如,大多数尿样品),仅为了方便起见,可任选地进行预处理(例如,作为在商业平台上的方案的一部分)。优选地,测试样品是血清。

[0139] 预处理试剂可以是适合与本文所述的测定和试剂盒一起使用的任何试剂。例如,Sackrison 等人公开了将样品的 pH 值降低至 5.5 或更低以将分析物从分析物结合蛋白质上解离(参见,例如,美国专利申请公开号 2004/0132104)。预处理任选地包括:(a) 一种或多种溶剂(例如,甲醇和乙二醇)和盐,(b) 一种或多种溶剂、盐和去污剂,(c) 去污剂,或(d) 去污剂和盐。预处理试剂是本领域已知的,并且可采用这样的预处理,例如,如用于在 Abbott TDx、AxSYM<sup>®</sup> 和 ARCHITECT<sup>®</sup> 分析仪(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 上的测定,如文献中所述的(参见,例如,Yatscoff 等人,Abbott TDx Monoclonal Antibody Assay Evaluated for Measuring Cyclosporine

in Whole Blood, Clin. Chem. 36:1969-1973(1990), 和 Wallemacq 等人, Evaluation of the New AxSYM Cyclosporine Assay: Comparison with TDx Monoclonal Whole Blood and EMIT Cyclosporine Assays, Clin. Chem. 45:432-435(1999)), 和 / 或为可商购获得的。此外, 可以如 Abbott 的美国专利号 5, 135, 875、欧洲专利公开号 0471293、2006 年 12 月 29 日提交的美国临时专利申请 60/878, 017 和美国专利申请公开号 2008/0020401 ( 由于其关于预处理的教导而通过引用全文并入本文) 所述进行预处理。预处理试剂可以是非均相试剂或均相试剂。

[0140] 对于非均相预处理试剂的使用, 预处理试剂任选地使样品中存在的抗体沉淀。这样的预处理步骤包括经由将通过向样品中加入预处理剂而形成的混合物的上清液与沉淀的抗体分离来移除任何抗体。在这样的测定中, 不存在任何结合蛋白质的混合物的上清液在该测定中使用, 直接进行捕获步骤。

[0141] 对于均相预处理试剂的使用, 没有这样的分离步骤。测试样品和预处理试剂的整个混合物与对分析物 ( 或其片段) 特异性的被标记的分析物结合分子, 如特异性结合分析物的被标记的抗体或其抗原反应性片段相接触。在被第一分析物结合分子捕获之前或期间, 此种测定使用的预处理试剂在预处理后的测试样品混合物中稀释。尽管进行了这样的稀释, 但一定量的预处理试剂 ( 例如, 5M 甲醇和 / 或 0.6M 乙二醇) 在捕获期间仍存在 ( 或余留) 于测试样品混合物中。

[0142] 在非均相形式中, 在从受试者获得测试样品后, 制备第一混合物。该混合物含有将要评估分析物 ( 或其片段) 的测试样品和一种或两种分析物结合分子 ( 例如, 抗体或其抗原活性片段), 其中该分析物结合分子和包含在测试样品中的任何分析物形成分析物结合分子 - 分析物复合物。在不同的实施方案中, 该分析物结合分子可以是特异性结合分析物的第一和第二抗体 ( 或其片段), 例如, 本文所述的抗体, 或其他可商购的抗体。添加测试样品和分析物结合分子以形成混合物的顺序不是关键性的。在不同的实施方案中, 该分析物结合分子固定在固体支持物上。测定中使用的固体支持物 ( 用于第一分析物结合分子和任选地第二分析物结合分子) 可以是本领域已知的任何固体支持物, 诸如但不限于电极、磁性颗粒、微粒、珠子、试管、微量滴定板、比色皿、膜、支架分子、薄膜、滤纸、盘和芯片。

[0143] 在含有第一 ( 和第二) 分析物结合分子 - 分析物复合物的混合物形成后, 使用本领域已知的任何技术将任何未结合的分析物从该复合物中去除。例如, 未结合的分析物可以通过洗涤来去除。然而期望的是, 分析物结合分子相对于测试样品中存在的任何分析物过量地存在, 使得存在于测试样品中的所有分析物均被分析物结合分子结合。

[0144] 在一种测定形式中, 分析物与一种或两种检测分析物结合分子以及一种或两种衔接至固体支持物上的捕获分析物结合分子混合, 使得形成复合物的混合物。以下是形成的备选的夹心复合物的实例:

[0145] i) 如图 4 所示, 第一夹心复合物由衔接或结合至第一固体支持物上的第一分析物结合分子 ( 例如, 包被在微粒上的捕获分析物结合分子) - 分析物 - 衔接至标记物的第三分析物结合分子 ( 例如, 具有报道基团的检测分析物结合分子) 形成。第二夹心复合物由衔接或结合至第二固体支持物上的第二分析物结合分子 - 分析物 - 衔接至标记物的第三分析物结合分子形成。

[0146] ii) 如图 5 所示, 第一夹心复合物由衔接至第一标记物的第一分析物结合分子 ( 例

如,具有报道基团 1 的检测分析物结合分子)-分析物- 附接至固体支持物上的第三分析物结合分子(例如,包被在微粒上的捕获分析物结合分子)形成,而第二夹心复合物由附接至第二标记物的第二分析物结合分子(例如,具有报道基团 2 的检测分析物结合分子)-分析物-与固体支持物结合的第三分析物结合分子形成。

[0147] 通常,正待检测(例如,怀疑含有)分析物(或其片段)的样品可与至少一种捕获剂(例如,分析物结合分子(例如,捕获抗体或其抗原反应性片段)) 和至少一种检测剂(例如,检测分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段)) 同时或顺序地以及以任一顺序相接触。例如,测试样品可先与至少一种捕获剂接触,然后(顺序地)与至少一种检测剂接触。或者,测试样品可先与至少一种检测剂接触,然后(顺序地)与至少一种捕获剂接触。在另一个替代方案中,测试样品可同时与捕获剂和检测剂接触。

[0148] 在一步夹心测定形式中,使怀疑含有分析物(或其片段)的样品与一种或两种类型的捕获分析物结合分子以及一种或两种类型的检测分析物结合分子在允许形成多种捕获剂/分析物/检测剂复合物的温育条件下接触。顺序地或同时将样品、捕获剂和检测剂全都添加至反应容器中。

[0149] 在两步测定形式中,首先使怀疑含有分析物(或其片段)的样品与两种类型的捕获分析物结合分子接触,每一种都附接至不同的固体支持物上。在捕获剂/分析物复合物形成之后,通过洗涤步骤将样品中未结合的分析物从反应容器中去除。然后使复合物与至少一种检测剂(在允许形成捕获剂/分析物/检测剂复合物的条件下)接触。

[0150] 在竞争性测定形式中,首先使怀疑含有分析物(或其片段)的样品与两种类型的捕获分析物结合分子接触,每一种都附接至不同的固体支持物上。在捕获剂/分析物复合物形成之后,将包含附接有报道基团的分析物(或其片段)的示踪剂添加至反应混合物中以结合所有保留的分析物结合分子。示踪剂、样品和捕获分析物结合分子还可在一步中混合。

[0151] 在三种形式的每一种中,任选地,在使测试样品与至少一种捕获剂接触之前,至少一种捕获剂可结合至基底上以利于捕获剂/分析物复合物的分离。捕获剂所结合的基底可以是如以上及此处所述有利于捕获剂/分析物复合物从样品中分离的任何合适的固体支持物。

[0152] 温育可在约 4.5 到约 10.0 的 pH、约 2°C 到约 45°C 的温度下进行至少约一(1) 分钟到约十八(18) 小时,优选约 1 到约 24 分钟,更优选约 4 到约 18 分钟的一段时间。

[0153] 如果捕获剂/分析物复合物与多于一种检测剂接触,则形成多个捕获剂/分析物/检测剂复合物。就捕获剂来说,当至少一种检测剂与捕获剂/分析物复合物相接触时,捕获剂/分析物/检测剂复合物的形成需要在与上述条件类似的条件下温育一段时间。优选地,至少一种检测剂含有可检测标记物。可检测标记物可以在捕获剂/分析物/检测剂复合物形成之前、同时或之后与至少一种检测剂结合。可使用本领域已知的任何可检测标记物(参见上面的讨论,包括 Polak 和 Van Noorden(1997) 和 Haugland(1996))。

[0154] 可检测标记物可以直接地或通过偶联剂与检测剂结合。可以使用的偶联剂的一个实例是 EDAC(1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐),其可从 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 商购获得。可使用的其他偶联剂是本领域已知的。用于将可检测标记物与检测剂结合的方法是本领域已知的。

[0155] 在标记物的定量前,捕获剂/分析物/检测剂复合物可以与,但不是必须与测试样品的其余部分分离。例如,如果至少一种捕获剂结合至固体支持物如孔或珠子,可通过从与固体支持物的接触中去除(测试样品的)流体来完成分离。或者,如果至少一种捕获剂结合至固体支持物,其可同时与测试样品和至少一种检测剂接触以形成捕获剂/分析物/检测剂复合物,随后从与固体支持物的接触中去除测试样品。当测定不包括从未结合的样品分析物中分离结合的样品分析物时,其被认为是‘一步’测定。当测定包括从未结合的样品分析物中分离结合的样品分析物时,其通常被认为是‘两步测定’(或延迟的一步测定,这取决于如何进行分离)。

[0156] 在捕获剂/分析物/检测剂复合物形成后,使用本领域已知的技术定量复合物中标记物的量。产生的信号(例如,颜色、光、放射性、活性氧)可使用本领域技术人员所知的常规技术检测。基于产生的信号的强度,可以定量样品中分析物的量。具体来说,样品中分析物的量与产生的信号的强度成比例。存在的分析物的量可通过比较生成的信号的量与针对分析物的标准曲线或通过参考标准进行比较来定量。该标准曲线可使用已知浓度的分析物的系列稀释液或溶液通过质谱法、重量分析法和本领域已知的其他技术来生成。

[0157] 例如,如果使用酶标记物,则标记的复合物与产生可定量的反应如显色的该标记物的底物反应。如果标记物是放射性标记物,则使用闪烁计数器定量该标记物。如果标记物是荧光标记物,则通过用一种颜色(其被称为“激发波长”)的光刺激标记物并检测该标记物响应于该刺激而发射的另一种颜色(其被称为“发射波长”)来定量该标记物。如果标记物是化学发光标记物,则通过视觉地或使用光度计、X射线胶片、高速摄像胶片、CCD相机等检测发射的光来定量该标记物。一旦已经定量了复合物中的标记物的量,则通过使用已经采用已知浓度的分析物的系列稀释液生成的校准曲线来确定测试样品中分析物的浓度。

[0158] 在不同的实施方案中,所述方法采用微粒固体支持物并使用自动化或半自动化系统来进行。适合在本文所述的方法中使用的成像系统可以是能够获得图像,以使得能解析单个微粒的任何系统。适合与本文所述的方法一起使用的成像系统包括但不限于光学显微镜、荧光成像扫描仪等。成像系统的此类使用例如在 US 20120308997 中描述,该申请由于其有关教导而通过引用并入本文。适合与本文所述的方法一起使用的图像文件格式包括但不限于 JPEG/JFIF、GIF、BMP、TIFF 和 FITS。图像文件格式在“图像文件格式” — “维基百科,自由的百科全书”中描述,这可借助于超文本传输协议从网站 [en.wikipedia.org/wiki/image\\_file\\_formats](http://en.wikipedia.org/wiki/image_file_formats) 获得,其通过引用并入本文,而 FITS 在“FITS” — “维基百科,自由的百科全书”中描述,这可借助于超文本传输协议从网站 [en.wikipedia.org/wiki/FITS](http://en.wikipedia.org/wiki/FITS) 获得,其通过引用并入本文。

[0159] 图像获取过程中的曝光持续时间不是关键性的。适合与本文所述的方法一起使用的曝光时间可以是提供足以辨别图像的相关细节的分辨率的任何曝光时间。

[0160] 感兴趣的区域的选择是重要的。通过使用合适的计算机程序,借助于对比或一些替代标准确定单个微粒的位置。与微粒或其他固体支持物相关联的像素可以被认为是感兴趣的区域。为获得样品中分析物浓度的有意义的值,通常至少约 100 个微粒,例如至少约 200 个微粒位于图像中。适合在本文所述的方法中使用的可商购的计算机程序包括但不限于,商标为“SLIDEBOOK”(Intelligent Imaging Innovations, Inc., Denver, CO; 在因特网上的 [slidebook.com](http://slidebook.com)) 和“METAMORPH”(Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA) 的那些程

序,或在公开领域的软件,例如,ImageJ(在因特网上的 [rsbweb.nih.gov/ij/](http://rsbweb.nih.gov/ij/))。

[0161] 在进行所述方法的一种形式时,可使用可商购的落射荧光显微镜来通过支撑它们的透明表面对复合物进行成像。可使用标准落射荧光显微镜、共焦或 TIRF(全内反射荧光)显微镜。在不同的实施方案中,使用 TIRF 显微镜,因为这种类型的显微镜具有更好的  $z$ -平面分辨率,其可消除来自微粒所处的焦平面上方的信号,从而降低背景信号。这样的显微镜的代表性实例是与高分辨率 CCD 相机(例如,Hamamatsu C4742-80-12AG 型;在因特网上的 [learn.hamamatsu.com/products](http://learn.hamamatsu.com/products)) 耦接的机动化倒置荧光显微镜(OLYMPUS “IX81”;在因特网上的 [olympusamerica.com/](http://olympusamerica.com/))。可以使用的其他类似的显微镜和相机是可商购获得的。

[0162] 在所述方法的这种基本形式中,可使用单色方法来提供比采用来自反应混合物总体积的光信号的传统测定更高的灵敏度。这种更高的灵敏度可以通过相对于在传统测定中用作校准曲线的线性图的斜率,在较低浓度下具有更大斜率的线性函数图来证明。

[0163] 承载捕获分析物结合分子的微粒、附接至荧光团的检测分析物结合分子和怀疑含有分析物的样品在合适的条件下组合以进行测定。在进行测试后,忽略不是从以下复合物发出的任何荧光信号:该复合物包含附接至捕获分析物结合分子的微粒、分析物和包含附接至荧光团的检测分析物结合分子的偶联物。然后,基于偶联物的荧光团发射的荧光进一步定量剩余的复合物。该后一步骤忽略微粒表面上没有达到选择标准的任何部分。基于统计参数,例如,标准偏差,选择标准的典型实例是,将被用于测量的微粒具有基本均匀的涂层,该涂层基本上消除可能由高度非特异性结合引起的偶联物的过度聚集。通常,选择标准根据特定的测定而变化。特定测定领域的普通技术人员应该能够为该特定测定制定有意义的选择标准。最后,测量合格颗粒的每个像素的强度平均值,以便将强度与作为强度的函数建立分析物浓度的校准曲线进行比较。合格颗粒的每个像素的强度平均值可借助于能够测量光强度的 CCD 相机来确定。将强度的测量值转化为以计数为单位表示的参数。每个像素具有对应于在该像素处测量的光强度的数字。

[0164] 在另一个实施方案中,获得反应混合物的白光图像。采用该白光图像来定位每个固体支持物例如微粒的位置。白光图像通过使用完整的电磁谱进行照明和检测而形成。此步骤不是必需的,但是有用的,因为其消除了不是来源于微粒的信号。由此获得荧光图像以确定附接至微粒的检测分析物结合分子的位置和强度。荧光图像使用颜色,例如,红色、绿色。计算每个像素的计数,并且记录每个像素的计数的平均值和标准偏差。从分析中忽略计数大于或小于例如上述标准偏差的两倍的像素。计算剩余像素的每个像素的计数的平均数。从检测分析物结合分子的标记物测量的信号的量决定了分析物的浓度。

[0165] 为了进行会提供更高灵敏度的测量,可使用可商购获得的落射荧光显微镜来通过支撑它们的透明表面对复合物进行成像。这样的显微镜的代表性实例是与高分辨率 CCD 相机(Hamamatsu C4742-80-12AG 型)耦接的机动化倒置荧光显微镜(OLYMPUS “IX81”),其可从许多来源商购获得。

[0166] 在这种更高灵敏度的测量中,使用双色方法来提供比采用来自反应混合物总体积的光信号的传统测定和通过先前描述的单色方法进行的测量都更高的灵敏度。这种更高的灵敏度通过相对于在传统测定或使用单色方法的测定中用作校准曲线的线性图的斜率,在较低浓度下具有更大的斜率的线性函数图来证明。为实施本方法,改动可商购的仪器,增加一个第二检测通道用于检测用第一标记物标识的第一三联体复合物,以及一个第二通

道用于检测用第二标记物标识的第二三联体复合物。荧光通道用包含激发滤光器和发射滤光器的一组滤光器来限定,其允许具有特定波长的光到达样品并且具有特定波长的光到达 CCD 相机。例如,荧光团 PE 仅可在 PE 通道中检测到,而不能在任何其他荧光通道中检测到。类似地,荧光团 Cy5 仅可在 Cy5 通道中检测到,而不能在任何其他荧光通道中检测到。可以容易地改动从而包含第二检测通道的代表性自动化和半自动化系统包括,例如, ARCHITECT<sup>®</sup>、AxSYM<sup>®</sup>、IMx<sup>®</sup> PRISM<sup>®</sup>、EIA(珠子)、Quantum<sup>™</sup>II 和 Abbott 照护点(i-STAT<sup>®</sup>, Abbott Laboratories)。

[0167] 承载捕获分析物结合分子的微粒、附接至荧光团的检测分析物结合分子和怀疑含有分析物的样品在合适的条件下组合以进行测定。在进行测定后,忽略不是从以下复合物发出的任何荧光信号:该复合物包含附接至捕获分析物结合分子的微粒、分析物和包含附接至第一荧光团的检测分析物结合分子的偶联物。接下来,获得捕获分析物结合分子的图像(其特征在于与第一荧光团不同的第二荧光团)。该图像忽略与没有以均匀的方式用捕获分析物结合分子包被的任何微粒相对应的任何像素。如果微粒没有被均匀包被,则忽略来自该部分的像素。然后,基于偶联物发射的荧光进一步定量该复合物。该后一步骤忽略复合物上没有达到选择标准的任何部分。选择标准的典型实例是均匀的涂层,该涂层基本上消除可能由高度非特异性结合导致的偶联物的过度聚集。如前所述,选择标准根据特定的测定而变化。最后,测量合格颗粒的每个像素的强度平均值,以便将强度与建立分析物浓度的校准曲线进行比较。

[0168] 在另一个实施方案中,获得样品的白光图像。采用该白光图像来确定微粒的位置。该步骤不是必需的,但是有用的,因为可能希望定位每个固体支持物例如微粒的位置。由此获得第一荧光图像以确定附接到微粒上的捕获分析物结合分子的位置。第一荧光图像使用颜色,例如,红色、绿色。获得第二荧光图像以确定作为偶联物的组分存在的分析物结合分子的位置。第二荧光图像使用颜色,例如,红色、绿色,但第二荧光图像的颜色与第一荧光图像的颜色不同。选择来源于微粒上的捕获分析物结合分子和偶联物上的分析物结合分子两者的像素用于进一步分析。计算每个像素的计数,并且记录每个像素的计数的平均值和标准偏差。从分析中忽略计数大于或小于例如计算的标准偏差的两倍的像素。计算剩余像素的每个像素的计数的平均数。从检测分析物结合分子的标记物测量的信号的量决定了分析物的浓度。

[0169] 4. 试剂盒和方法针对特定仪器的改动

[0170] 本文描述的概念、试剂盒和方法可以在包括任何手动、自动化或半自动化系统在内的任何系统或仪器上实现。仅作为示例包括以下改动。

[0171] 可以改变试剂盒(或其组分),以及通过如本文所述的测定确定测试样品中分析物浓度的方法,以在多种自动化和半自动化系统(包括其中固体支持物包含电极或微粒的那些系统)中使用。说明性的自动化和半自动化系统例如在美国专利号 5,089,424 和 5,006,309 中描述,并且是商业销售的,例如,由 Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 作为 ARCHITECT<sup>®</sup> 销售。

[0172] 自动化或半自动化系统与非自动化系统(例如,ELISA)相比的一些区别包括捕获分析物结合分子(例如,捕获分析物结合分子,例如,抗体或其抗原反应性片段)所附接

的基底（其可影响夹心结构形成和分析物反应性），以及捕获、检测和 / 或任何任选的洗涤步骤的长度和时机。非自动化形式如 ELISA 可能需要相对较长的与样品和捕获试剂的温育时间（例如，约 2 小时），而自动化或半自动化形式（例如，ARCHITECT<sup>®</sup>，Abbott Laboratories）可能具有相对较短的温育时间（例如，对于 ARCHITECT<sup>®</sup> 约 18 分钟）。类似地，非自动化形式如 ELISA 可能温育检测分析物结合分子（例如，检测分析物结合分子，例如，抗体或其抗原反应性片段）如偶联物试剂相对较长的温育时间（例如，约 2 小时），而自动化或半自动化形式（例如，ARCHITECT<sup>®</sup>）可能具有相对较短的温育时间（例如，对于 ARCHITECT<sup>®</sup> 约 4 分钟）。

[0173] 可从 Abbott Laboratories 获得的其他平台包括但不限于 AxSYM<sup>®</sup>、IMx<sup>®</sup>（参见，例如，美国专利号 5, 294, 404，其通过引用全文并入本文）、PRISM<sup>®</sup>、EIA（珠子）和 Quantum<sup>™</sup>II 以及其他平台。此外，测定、试剂盒和试剂盒组分可以以其他形式使用，例如，在电化学或其他手持式或照护点测定系统上使用。例如，本公开内容适用于进行夹心测定的商业 Abbott 照护点（i-STAT<sup>®</sup>，Abbott Laboratories）电化学测定系统。在单次使用测试装置中的免疫传感器及其制造和操作方法例如在美国专利号 5, 063, 081、美国专利申请公开号 2003/0170881、美国专利申请公开号 2004/0018577、美国专利申请公开号 2005/0054078 和美国专利申请公开号 2006/0160164 中描述，这些文献由于其有关教导而通过引用全文并入本文。

[0174] 特别地，对于测定针对 I-STAT<sup>®</sup> 系统的改动，下面的配置是有用的。制造了具有一对金电流测量工作电极和银 - 氯化银参比电极的微制造硅芯片。在一个工作电极上，具有固定的高亲和力捕获分析物结合分子的聚苯乙烯珠子（0.2mm 直径）附着到电极上的图案化聚乙烯醇的聚合物涂层上。固定的较低亲和力捕获分析物结合分子附着至第二电极上。将该芯片组装到具有适合测定的流体形式的 I-STAT<sup>®</sup> 筒匣中。在该筒匣的样品保持室的壁的一部分上，有包含用碱性磷酸酶（或其他标记物）标记的检测分析物结合分子的层。在该筒匣的流体袋内是包含对氨基苯酚磷酸的水性试剂。

[0175] 在操作时，将含有分析物的样品加入到测试筒匣的保持室内，并且将筒匣插入到 I-STAT<sup>®</sup> 读取器中。在检测分析物结合分子（例如，检测分析物结合分子，例如，抗体或其抗原反应性片段）已经溶解到样品中后，筒匣内的泵组件迫使样品进入含有芯片的导管中。在其中对其进行振荡以促进在捕获分析物结合分子、分析物和标记的检测分析物结合分子之间形成夹心结构。在测定的倒数第二个步骤中，将流体从袋中压出并进入导管，以从芯片上洗下样品并进入废料室中。在测定的最后一个步骤中，碱性磷酸酶标记物与对氨基苯酚磷酸反应，以裂解磷酸基团并允许释放的对氨基苯酚在工作电极处被电化学氧化。基于测量的电流，读取器能够借助于内置的算法和出厂设定的校准曲线计算样品中的分析物的量。

[0176] 进一步且不言而喻地，本文所述的方法和试剂盒必然包括用于进行测定的其他试剂和方法。例如，包括多种缓冲液，如本领域已知的和 / 或可容易制备的，或优化以用于例

如洗涤的,作为偶联物稀释剂和 / 或作为校准稀释剂的缓冲液。示例性的偶联物稀释剂是在某些试剂盒 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 中使用的,并含有 2-(N- 吗啉代) 乙磺酸 (MES)、盐、蛋白质阻断剂、抗微生物剂和去污剂的 ARCHITECT<sup>®</sup> 偶联物稀释剂。示例性的校准物稀释剂是在某些试剂盒 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 中使用的,包含含有 MES 的缓冲液、其他盐、蛋白质阻断剂、抗微生物剂的 ARCHITECT<sup>®</sup> 校准物稀释剂。此外,如 2008 年 12 月 31 日提交的美国专利申请号 61/142,048 中描述的,可以获得改善的信号生成,例如,以 I-STAT<sup>®</sup> 筒匣形式,使用连接到信号或检测分析物结合分子的核酸序列作为信号放大器。

[0177] 通常,为了与本发明的试剂盒和方法一起使用,改动了自动化和半自动化系统以使用两个不同的通道分析样品,第一通道用于检测用第一标记物标识的第一三联体复合物,而第二通道用于检测用第二标记物标识的第二三联体复合物。

[0178] 通常,本发明的试剂盒和方法可用于任何目的,例如,用于诊断、预测或评估患者的治疗性 / 预防性处理的功效,以及其他用途。

#### [0179] 5. 分析物

[0180] 本文所提供的试剂盒和方法对于检测任何感兴趣的分析物是有用的。说明性的感兴趣的分析物通常包括但不限于,例如,蛋白质、肽、多肽、寡核苷酸或多核苷酸,以及更具体地,例如,抗体、抗原、半抗原、激素、药物、酶或受体。在适当时,可商购的分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段)可以在现在描述的试剂盒和测定中使用,或者分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段)可以使用本领域中已知的方法来产生。通常,使用本文所述的试剂盒和方法检测的分析物可以通过夹心测定来检测。

[0181] 使用本发明试剂盒和测定方法检测的说明性的感兴趣的分析物包括但不限于,例如,细胞因子、免疫抑制药物、心血管疾病抗原、癌抗原、传染病抗原、药物剂、激素、血浆、血清和 / 或血液抗原、生物标志物(例如,肾损伤的生物标志物)、维生素和自身免疫抗原。这样的分析物包括但不限于,例如:细胞因子、免疫抑制药物(例如,西罗莫司、他克莫司、依维莫司、坦罗莫司 (temsorolimus)、唑罗莫司、环孢菌素或任何这些化合物的类似物);心血管疾病抗原(例如,肌钙蛋白 I、心肌肌钙蛋白 I (cTnI)、血清肌酸激酶 MB 同工酶 (CKMB)、碱性或 B 型利尿钠肽 (BNP)、半乳糖凝集素 3、髓过氧化物酶 (MPO)、肌红蛋白、D-二聚体纤维蛋白降解产物(或 FDP)、高灵敏度 C 反应蛋白);癌抗原(例如,前列腺特异性抗原 (PSA)、甲胎蛋白 (AFP)、CA 125、CA 15-3、CA 19-9、CA 19-9 XR、癌胚抗原 (CEA)、细胞角蛋白 19、细胞角蛋白片段 21-1 (CYFRA21-1)、人附睾蛋白 4 (HE4)、前胃泌素释放肽 (ProGRP)、鳞状细胞癌抗原 (SCC-Ag));传染病抗原(例如,巨细胞病毒 (CMV) IgG、CMV IgM、风疹 IgG 抗体、风疹 IgM、弓形虫 IgG、弓形虫 IgM、甲型肝炎病毒 (HAV) IgG、HAV IgM、乙型肝炎病毒核心蛋白 (HBc)、HBc IgM、乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)、乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg)、丙型肝炎病毒 (HCV)、人类免疫缺陷病毒 (HIV)、美洲锥虫病 (Chagas)、EB 病毒 (EBV)、梅毒、人嗜 T 淋巴细胞病毒 (HTLV)、抗链球菌溶血素 O (ASO));药物剂(例如,对乙酰氨基酚、苯丙胺 / 甲基苯丙胺、巴比妥酸盐、苯并二氮杂䓬、大麻酚、可卡因、迷幻药 (Ecstasy)、乙醇、美沙酮、阿片剂、苯环利定 (PCP)、丙氧芬、水杨酸盐、三环类抗抑郁药、阿米卡星、卡马西平、洋地黄毒苷、地高辛、庆大霉素、锂、苯巴比妥、苯妥英、奎尼丁、茶碱、妥布霉素、丙戊酸、万古霉

素) ;激素 (例如, 硫酸脱氢表雄酮 (DHEA-S)、雌二醇、卵泡刺激激素 (FSH)、人绒毛膜促性腺素 (hCG)、促黄体激素 (LH)、孕酮、催乳素、性激素结合球蛋白 (SHBG)、睾酮、皮质醇、胰岛素、胃蛋白酶原 I、胃蛋白酶原 II、C-肽、甲状旁腺激素 (PTH)、甲状腺激素 T3、甲状腺激素 T4、促甲状腺激素)、酶 (例如, 酸性磷酸酶、丙氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、淀粉酶、天冬氨酸氨基转移酶、肌酸激酶、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶 (GGT)、乳酸脱氢酶 (LDH)、 $\alpha$  羟丁酸脱氢酶 ( $\alpha$  HBDH)、脂肪酶、胆碱酯酶、血浆铜蓝蛋白); 血浆、血清和 / 或血液抗原 (例如, 白蛋白、微量白蛋白、前白蛋白、肌酸酐、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C、胆红素、脂蛋白 (a) [Lp(a)]、低密度脂蛋白 (LDL)、高密度脂蛋白 (HDL)、载脂蛋白 A1、载脂蛋白 B、补体 C3、补体 C4、触珠蛋白、免疫球蛋白 A (IgA)、免疫球蛋白 E (IgE)、免疫球蛋白 G (IgG)、免疫球蛋白 M (IgM)、 $\kappa$  轻链、 $\lambda$  轻链、 $\beta$  2 微球蛋白、血红蛋白、高半胱氨酸、C 反应蛋白 (CRP)); 生物标志物 (例如, 肾损伤的生物标志物, 例如, 嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)); 维生素 (例如, 维生素 B12、叶酸、维生素 D); 抗环瓜氨酸肽 (抗 CCP) 抗体、 $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶 (AAT)、 $\alpha$ -1 糖蛋白、自身免疫抗原 (例如, 类风湿因子 (RF)、抗甲状腺球蛋白 (抗 Tg) 和抗甲状腺过氧化物酶抗体 (抗 TPO 抗体))。

#### [0182] 6. 示踪分析物

[0183] 在不同的实施方案中, 在竞争性测定中使用的示踪分析物是感兴趣的分析物或其片段或模拟物, 它可以在夹心测定中与捕获分析物结合分子和检测分析物结合分子形成复合物。在适当时, 如本文所述及本领域中已知的, 蛋白质分析物可以从天然来源中纯化或通过重组或合成手段产生。非蛋白质分析物可以通过本领域技术人员已知的化学和合成 (包括生物合成) 手段来产生。示踪分析物可以直接或间接地附接至标记物。

[0184] 如本文所述, 标记物可以是任何可检测的标记物。说明性的标记物包括, 例如, 荧光团、放射性部分、酶、生物素 / 抗生物素蛋白标记物、发色团、化学发光标记物等。可以使用如本领域已知的任何合适的可检测标记物。例如, 可检测标记物可以是放射性标记物 (如  $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$  和  $^{33}\text{P}$ ), 酶标记物 (例如, 辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、碱性过氧化物酶、葡萄糖 6-磷酸脱氢酶等), 化学发光标记物 (例如, 吖啶酯、硫酯或磺酰胺; 鲁米诺、异鲁米诺、菲啶鎓酯等), 一种或多种发色团, 例如, 在紫外或可见光区发光的一种或多种染料, 磷光体, 荧光剂, 荧光团 (例如, 荧光蛋白 (绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、青色荧光蛋白)); 藻胆素 (藻红蛋白、R-藻红蛋白、B-藻红蛋白); 咕吨衍生物 (荧光素、罗丹明、俄勒冈绿、曙红、德克萨斯红); 花青衍生物 (花青、Cy 染料、吲哚羰花青、氧杂羰花青、硫杂羰花青、部花青); 萘衍生物 (丹酰和氟硅酸钠衍生物); 香豆素衍生物; 噁二唑衍生物 (吡啶噁唑、硝基苯并噁二唑、苯并噁二唑); 苝衍生物 (级联蓝); 噁嗪衍生物 (尼罗红、尼罗蓝、甲酚紫、噁嗪 170); 吖啶衍生物 (原黄素、吖啶橙、吖啶黄); 芳基次甲基衍生物 (金胺、结晶紫、孔雀石绿); 四吡咯衍生物 (卟吩、酞菁、胆红素)), 发光团, 化学发光剂, 荧光标记物 (例如, 荧光素 (例如, 5-荧光素、6-羧基荧光素、3'6-羧基荧光素、5(6)-羧基荧光素、6-六氯荧光素、6-四氯荧光素、异硫氰酸荧光素等)), 罗丹明, 量子点 (例如, 硫化锌加帽的硒化镉), 温度测量标记物, 或免疫-聚合酶链反应标记物。在不同的实施方案中, 示踪分析物用藻胆素 (例如, 藻红蛋白、R-藻红蛋白、B-藻红蛋白) 进行标记。在一些实施方案中, 示踪分析物用吖啶鎓化合物, 例如, 吖啶-9-羧酰胺、至少一种吖啶-9-羧酸芳基酯或其任意组合进行标记。

[0185] 7. 分析物结合分子

[0186] 通常,本文所述的试剂盒和测定采用三种分析物结合分子,其中这三种分析物结合分子中的两种竞争与分析物和第三分析物结合分子的复合。竞争与分析物和/或第三分析物结合分子复合的分析物结合分子以不同的亲和力结合分析物,例如,与分析物结合的亲和力有约3倍至约5倍、约5倍至约100倍、约5倍至约10倍、约5倍至约25倍、约25倍至约50倍、约50倍至约100倍、约3倍、约5倍、约10倍、约25倍、约50倍、约100倍或更多倍的差异。在不同的实施方案中,所述分析物结合分子中的一种或两种直接或间接地与标记物结合。在不同的实施方案中,所述分析物结合分子中的一种、两种或三种是抗体或其抗原反应性片段(即,结合分析物)。

[0187] 在一些实施方案中,所述分析物结合分子中的一种、两种或三种是非抗体分析物结合分子。已开发了以类似于抗体的方式针对并结合靶标的其他化合物。这些“抗体模拟物”中的一些使用非免疫球蛋白骨架作为替代的蛋白质框架用于抗体的可变区。

[0188] 例如,Ladner 等人(美国专利号 5,260,203)描述了单多肽链结合分子,其具有类似于聚集的、但在分子上分离的抗体轻链和重链可变区的结合特异性。该单链结合分子含有通过肽连接体连接的抗体重链和轻链可变区两者的抗原结合位点,并将折叠成类似于两肽抗体的结构。该单链结合分子相对于常规抗体显示出几个优点,包括更小的尺寸、更高的稳定性且更易于修饰。

[0189] Ku 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92(14):6552-6556(1995))公开了基于细胞色素 b562 的抗体替代物。Ku 等人(1995)生成了一个文库,其中对细胞色素 b562 的两个环进行随机化并针对与牛血清白蛋白的结合进行选择。发现个别突变体与抗 BSA 抗体类似地与 BSA 选择性结合。

[0190] Lipovsek 等人(美国专利号 6,818,418 和 7,115,396)公开了一种以纤连蛋白或纤连蛋白样蛋白质骨架和至少一个可变环为特征的抗体模拟物。这些基于纤连蛋白的抗体模拟物被称为 Adnectins,表现出天然或工程化抗体的许多相同的特性,包括对于任何目标分析物的高亲和力和特异性。用于开发新的或改进的结合蛋白质的任何技术可与这些抗体模拟物一起使用。

[0191] 这些基于纤连蛋白的抗体模拟物的结构类似于 IgG 重链的可变区的结构。因此,这些模拟物表现出与天然抗体在性质和亲和力方面相似的抗原结合性质。另外,这些基于纤连蛋白的抗体模拟物表现出超过抗体和抗体片段的某些好处。例如,这些抗体模拟物的天然折叠稳定性不依赖于二硫键,因此,在通常会分解抗体的条件下是稳定的。此外,由于这些基于纤连蛋白的抗体模拟物的结构类似于 IgG 重链,因此环随机化和改组过程可以在体外使用,该过程类似于抗体在体内的亲和力成熟的过程。

[0192] Beste 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96(5):1898-1903(1999))公开了一种基于脂质运载蛋白骨架的抗体模拟物(Anticalin<sup>®</sup>)。脂质运载蛋白由在蛋白质的末端具有四个高变环的 $\beta$ 桶状结构组成。Beste(1999)对环进行随机诱变并针对与例如荧光素的结合进行选择。三种变体表现出与荧光素特异性结合,其中一种变体显示出与抗荧光素抗体类似的结合。进一步的分析表明,所有随机化位置都是可变的,表明 Anticalin<sup>®</sup>将适合作为抗体的替代物。Anticalins<sup>®</sup>是单链小肽,通常为 160 至 180 个残基,其提供了相对于抗

体的若干优点,包括生产成本降低、储存稳定性增加和免疫反应降低。

[0193] Hamilton 等人(美国专利号 5,770,380)公开了一种合成抗体模拟物,其使用与用作结合位点的多个可变肽环连接的杯芳烃的刚性非肽有机骨架。肽环相对于彼此均从杯芳烃的几何学上的同一侧伸出。由于这种几何学确认,所有环均可用于结合,从而提高了与分析物的结合亲和力。然而,与其他抗体模拟物相比,基于杯芳烃的抗体模拟物并非完全由肽组成,因此,它较不易受蛋白酶的攻击。骨架也并不单纯由肽、DNA 或 RNA 组成,这意味着该抗体模拟物在极端的环境条件下是相对稳定的并具有长寿命。另外,由于基于杯芳烃的抗体模拟物相对较小,因此不太可能产生免疫原性应答。

[0194] Murali 等人(Cell. Mol. Biol. 49(2):209-216(2003))讨论了一种将抗体缩小为较小的拟肽的方法,他们将其称作“抗体样结合拟肽”(ABiP),其也可以用作抗体的替代物。

[0195] Silverman 等人(Nat. Biotechnol., 23:1556-1561(2005))公开了融合蛋白,它是包含多个结构域的单链多肽,被称为“avimer”。avimer 通过体外外显子改组和噬菌体展示从人类细胞外受体结构域开发而来,是一类在其对于各种靶分子的亲和力和特异性方面略微类似于抗体的结合蛋白质。所产生的多域蛋白质可以包含多个独立的结合域,与单表位结合蛋白质相比,其可表现出提高的亲和力(在有些情况下是亚纳摩尔级的)和特异性。例如,在美国专利申请公开号 2004-0175756、2005-0048512、2005-0053973、2005-0089932 和 2005-0221384 中公开了关于 avimer 的构建和使用方法的其他细节。

[0196] 通常情况下,可商购的抗体或分析物结合分子可以在本测定中使用。在不同的实施方案中,例如,使用已知的重组和/或单克隆抗体产生技术生成分析物结合分子中的一种、两种或三种。

[0197] 可以按照本领域已知的方法制备和修饰(例如,保守置换)单克隆抗体。修饰的抗体或其抗原反应性片段检测分析物的能力可使用本领域已知的用于评估抗原结合特异性的任何标准方法来测定,该方法包括,例如,本文描述和举例说明的方法。这样的方法包括但不限于酶联免疫吸附测定、Western 印迹法、表面等离子体共振(例如, **BIAcore®**)、**KinExA®**(动力学排除测定)测定和放射免疫测定。优选地,修饰的抗体或抗原反应性片段显示出至少与相应的未修饰抗体一样好,并且优选地(甚至期望地)好于相应的未修饰抗体的分析物结合特性。

#### [0198] a. 合成产生

[0199] 一经测序,就可以使用本领域已知的方法,例如,完全固体支持物合成、部分固体支持物合成、片段缩合和经典的溶液合成,来合成特异性地结合分析物的多肽如单克隆抗体(或其片段)。参见,例如, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149(1963)。在固体支持物上,合成一般使用  $\alpha$ -氨基保护的树脂从肽的 C-末端开始。例如,合适的起始原料可以通过将所需的  $\alpha$ -氨基酸附接至氯甲基化树脂、羟甲基树脂或二苯甲基胺树脂来制备。一种这样的氯甲基化树脂由 Bio Rad Laboratories(Richmond, CA)以商品名 BIO-BEADS SX-1 出售,并且 Bodonszky 等人, Chem. Ind. (London) 38:1597(1966)描述了羟甲基树脂的制备。二苯甲基胺(BHA)树脂已由 Pietta 和 Marshall, Chem. Comm. 650(1970)描述,并且可作为盐酸盐的形式商购自 Beckman Instruments, Inc. (Palo Alto, CA)。如同订购肽一样,自动肽合成仪是可商购的。

[0200] 因此,可以根据由 Gisin, Helv. Chim. Acta. 56:1467(1973)描述的方法,通过借助

于例如碳酸氢铯催化剂将  $\alpha$ -氨基保护的氨基酸偶联至氯甲基化树脂来制备多肽。初始偶联后,通过选择包括三氟乙酸 (TFA) 或盐酸 (HCl) 溶液的试剂在室温下在有机溶剂中除去  $\alpha$ -氨基保护基团。

[0201] 合适的  $\alpha$ -氨基保护基团包括已知在肽的逐步合成技术中有用的那些基团。 $\alpha$ -氨基保护基团的实例是:酰基型保护基团(例如,甲酰基、三氟乙酰基和乙酰基)、芳香族氨基甲酸酯型保护基团(例如,苄氧羰基(Cbz)和取代的Cbz)、脂肪族氨基甲酸酯保护基团(例如,叔丁氧羰基(Boc)、异丙氧羰基和环己氧羰基)和烷基型保护基团(例如,苄基和三苯基甲基)。Boc和Fmoc是有用的保护基团。侧链保护基团在偶联过程中保持完整并且在氨基末端保护基团的脱保护过程中或偶联过程中不会分裂开。侧链保护基团必须在完成最终肽的合成之后并且在不会改变目标肽的反应条件下可移除。

[0202] 除去  $\alpha$ -氨基保护基团后,剩余的被保护的氨基酸以所需顺序逐步偶联。过量的每种受保护的氨基酸通常与合适的羧基活化剂如二环己基碳二亚胺(DCC)在溶液中,例如,在二氯甲烷和二甲基甲酰胺(DMF)混合物中一起使用。

[0203] 在所需氨基酸序列已经完成,通过用诸如TFA或氟化氢(HF)的试剂处理,从树脂支持物上解偶所需的肽,该试剂不仅从树脂上切下肽,而且还切下所有剩余的侧链保护基团。当使用氯甲基化树脂时,氟化氢处理导致游离肽酸的形成。当使用二苯甲基胺树脂时,HF处理直接产生游离的肽酰胺。或者,当使用氯甲基化树脂时,可以通过用氨处理肽树脂来解偶侧链保护的肽,以得到所需的侧链保护的酰胺,或用烷基胺处理,以得到侧链保护的烷基酰胺或二烷基酰胺。然后以通常的方式通过用氟化氢处理除去侧链保护,以得到游离酰胺、烷基酰胺或二烷基酰胺。

[0204] 这些和其他的固体支持物肽合成程序是本领域中公知的。这样的程序也由Stewart和Young在Solid support Peptide Syntheses(第2版,Pierce Chemical Company,1984)中描述。

#### [0205] b. 重组产生

[0206] 特异性结合分析物(或其片段)的多肽如单克隆抗体(或其片段)可以使用本领域已知的方法重组产生。例如,包含编码抗体(或其片段)的核苷酸序列的分离的核酸可以在宿主细胞中表达,并且该抗体可以得到分离。分离的核酸包含编码针对分析物的抗体的氨基酸序列的核苷酸序列。例如,分离的核酸可以用寡核苷酸合成仪来合成。本领域普通技术人员将容易理解,由于遗传密码的简并性,一个以上的核苷酸序列可以编码给定的氨基酸序列。就此而言,可以使用编码与针对分析物的抗体的氨基酸序列基本相同的氨基酸序列的核苷酸序列,条件是所表达的变异抗体与针对分析物的抗体竞争。优选地选择给定宿主细胞偏好的密码子进行重组产生。可以使用聚合酶链反应(PCR)、连接或连接链反应(LCR)将编码针对分析物的抗体的氨基酸序列的核苷酸序列与其他核苷酸序列组合,以编码抗分析物抗体或其抗原反应性片段。单独的寡聚核苷酸通常含有互补组件的5'或3'突出端。一旦组装,即可将编码抗分析物抗体或其抗原反应性片段的核苷酸序列插入到载体中,可操作地连接至对于在给定宿主细胞中表达所必需的控制序列,并引入(如通过转化或转染)到宿主细胞中。核苷酸序列可以进一步操作(例如,连接至编码另外的免疫球蛋白域如另外的恒定区的一个或多个核苷酸序列)和/或在宿主细胞中表达。

[0207] 虽然不是所有的载体和表达控制序列都可以起到同样好的表达感兴趣的多核苷

酸序列的作用,并且不是所有的宿主都能用相同的表达系统起到同样好的作用,但认为本领域技术人员将能够在这些载体、表达控制序列、优化的密码子和宿主中作出选择以用于本公开内容中而无需任何过多的实验。例如,在选择载体方面,必须考虑宿主,因为载体必须能够在其中复制或能够整合到染色体中。还应考虑载体的拷贝数、控制拷贝数的能力和由该载体编码的任何其他蛋白质如抗生素标志物的表达。在选择表达控制序列方面,还可考虑多种因素。这些因素包括但不限于该序列的相对强度、其可控性以及其与编码抗分析物抗体的核苷酸序列的相容性,特别是在潜在的二级结构方面。应通过考虑以下因素来选择宿主:它们与所选载体的相容性、它们的密码子使用、其分泌特性、它们正确折叠多肽的能力、它们的发酵或培养要求、它们使蛋白质糖基化的能力(或其缺乏)以及由核苷酸序列编码的产物的易纯化性,等等。

[0208] 重组载体可以是自主复制载体,即作为染色体外的实体存在的载体,其复制独立于染色体复制(如质粒)。或者,载体可以是当引入宿主细胞时被整合到宿主细胞基因组中并且与它被整合到的染色体一起复制的载体。

[0209] 所述载体优选地是表达载体,其中编码抗分析物抗体的多核苷酸序列可操作地连接到该多核苷酸序列的转录所需的附加区段。载体通常来源于质粒或病毒DNA。许多用于在本文提及的宿主细胞中表达的合适的表达载体是可商购的或在文献中描述。对于真核宿主有用的表达载体包括但不限于包含来自SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。具体的载体包括pCDNA3.1(+)\Hyg(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)和pCI-neo(Stratagene, La Jolla, CA)。在酵母细胞中使用的表达载体的实例包括但不限于2 $\mu$ 质粒及其衍生物、POT1载体(参见,例如,美国专利号4,931,373)、pJS037载体(描述于Okkels, Ann. New York Acad. Sci. 782:202-207(1996))和pPICZ A、B或C(Invitrogen)。在昆虫细胞中使用的表达载体的实例包括但不限于pVL941、pBG311(Cate等人, Cell 45:685-698(1986))和pBluebac4.5以及pMelbac(这两者均可从Invitrogen获得)。

[0210] 可以使用的其他载体允许编码抗分析物抗体的核苷酸序列发生拷贝数扩增。这类可扩增的载体是本领域中公知的。这些载体包括但不限于那些可以通过二氢叶酸还原酶(DHFR)扩增(参见,例如, Kaufinan, 美国专利号4,470,461;和 Kaufinan等人, Mol. Cell. Biol. 2:1304-1319(1982))和谷氨酰胺合成酶(GS)扩增(参见,例如,美国专利号5,122,464和欧洲专利申请公开号0 338 841)而扩增的载体。

[0211] 重组载体可以进一步包含使得该载体能够在所讨论的宿主细胞中复制的核苷酸序列。在哺乳动物宿主细胞中使用的这种序列的一个实例是SV40复制起点。使载体能够在酵母细胞中复制的合适的序列是酵母质粒2 $\mu$ 复制基因REP1-3和复制起点。

[0212] 所述载体还可以包含选择性标记,即,其产物弥补了宿主细胞中的缺陷的基因或多核苷酸,如编码DHFR的基因或粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)TPI基因(参见,例如, Russell, Gene 40:125-130(1985)),或赋予对药物如氨苄青霉素、卡那霉素、四环素、氯霉素、新霉素、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性的基因。对于丝状真菌,选择性标记包括但不限于amdS、pyrG、arcB、niaD和sC。

[0213] 载体中还存在“控制序列”,其为对于抗分析物抗体的表达而言必需的或有利的任何组分。每种控制序列对编码抗分析物抗体的核苷酸序列而言可以是天然的或外来的。这类控制序列包括但不限于前导序列、聚腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、增强子或上游激

活序列、信号肽序列和转录终止子。至少，控制序列包括至少一个可操作地连接至编码抗分析物抗体的多核苷酸序列的启动子。

[0214] 所谓“可操作地连接”是指借助于酶连接或以其他方式，相对于彼此以使得能够行使序列的正常功能的构型，两个或更多个核苷酸序列的共价连接。例如，编码前序列或分泌前导序列的核苷酸序列可操作地连接至多肽的核苷酸序列，如果其表达为参与该多肽的分泌的前蛋白质；启动子或增强子可操作地连接至编码序列，如果其影响该序列的转录；核糖体结合位点可操作地连接至编码序列，如果其定位成以便促进翻译。通常，“可操作地连接”意指所连接的核苷酸序列是连续的，并且在分泌性前导序列的情况下，是连续的且在同一阅读框中。连接通过在方便的限制性位点处连接来完成。如果不存在这样的位点，则可以同标准重组 DNA 方法一起使用合成的寡核苷酸衔接子或连接体。

[0215] 在本公开内容的背景下可以使用众多的表达控制序列。这类有用的表达控制序列包括与上述表达载体的结构基因相关联的表达控制序列以及已知控制原核或真核细胞或其病毒的基因表达的任何序列及其各种组合。用于在哺乳动物细胞中引导转录的合适的控制序列的实例包括 SV40 和腺病毒的早期和晚期启动子，例如，腺病毒 2 主要晚期启动子、MT-1(金属硫蛋白基因)启动子、人巨细胞病毒立即早期基因启动子(CMV)、人延伸因子 1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )启动子、果蝇最小热休克蛋白 70 启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、人遍在蛋白 C(UbC)启动子、人生长激素终止子、SV40 或腺病毒 E1b 区聚腺苷酸化信号以及 Kozak 共有序列(Kozak, J. Mol. Biol. 196:947-50(1987))。

[0216] 为了提高在哺乳动物细胞中的表达，可以在编码抗体或其片段的多核苷酸序列的 5' 非翻译区插入合成内含子。合成内含子的一个实例是来自质粒 pCI-Neo(可从 Promega Corporation, Madison, WI 获得)的合成内含子。

[0217] 用于在昆虫细胞中引导转录的合适的控制序列的实例包括但不限于多角体蛋白启动子、P10 启动子、杆状病毒立即早期基因 1 启动子、杆状病毒 39K 延迟早期基因启动子和 SV40 聚腺苷酸化序列。

[0218] 用于在酵母宿主细胞中使用的合适的控制序列的实例包括酵母  $\alpha$ -接合系统的启动子、酵母磷酸丙糖异构酶(TPI)启动子、来自酵母糖酵解基因或醇脱氢酶基因的启动子、ADH2-4c 启动子和诱导型 GAL 启动子。

[0219] 用于在丝状真菌宿主细胞中使用的合适的控制序列的实例包括 ADH3 启动子和终止子，源自编码米曲霉(*Aspergillus oryzae*)TAKA 淀粉酶磷酸丙糖异构酶或碱性蛋白酶、黑曲霉(*A. niger*) $\alpha$ -淀粉酶、黑曲霉或构巢曲霉(*A. nidulas*)葡糖淀粉酶、构巢曲霉乙酰胺酶、米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*)天冬氨酸蛋白酶或脂肪酶的基因的启动子，TPI1 终止子，以及 ADH3 终止子。

[0220] 编码感兴趣的抗体的多核苷酸序列还可以包括或可以不包括编码信号肽的多核苷酸序列。当抗分析物抗体将从表达它的细胞中分泌时，存在信号肽。如果存在的话，这样的信号肽应该是被选择用于表达多肽的细胞所识别的信号肽。信号肽可以是与抗分析物单克隆抗体同源的或异源的，或者可以是与宿主细胞同源的或异源的，即，在正常情况下由该宿主细胞表达的信号肽或在正常情况下不由该宿主细胞表达的信号肽。因此，信号肽可以是原核的，例如，来源于细菌，或是真核的，例如，来源于哺乳动物、昆虫、丝状真菌或酵母细胞。

[0221] 例如,信号肽的存在或不存在将取决于用于产生抗分析物抗体的表达宿主细胞。为了在丝状真菌中使用,信号肽可以方便地来源于编码曲霉 (*Aspergillus* sp.) 淀粉酶或葡糖淀粉酶的基因、编码米黑根毛霉脂肪酶或蛋白酶或柔毛腐质霉 (*Humicola lanuginosa*) 脂肪酶的基因。为了在昆虫细胞中使用,信号肽可以来源于昆虫基因(参见,例如,国际专利申请公开号 WO 90/05783),如鳞翅目烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 脂动激素前体(参见,例如,美国专利号 5,023,328)、蜜蜂蜂毒肽 (Invitrogen)、蜕皮类固醇 UDP 葡糖基转移酶 (egt) (Murphy 等人, *Protein Expression and Purification* 4:349-357(1993) 或人胰脂肪酶 (hpl) (*Methods in Enzymology* 284:262-272(1997))。

[0222] 用于在哺乳动物细胞中使用的信号肽的具体实例包括鼠 Ig $\kappa$  轻链信号肽 (Coloma, *J. Imm. Methods* 152:89-104(1992))。用于在酵母细胞中使用的合适的信号肽包括来自酿酒酵母的  $\alpha$ -因子信号肽(参见,例如,美国专利号 4,870,008)、小鼠唾液淀粉酶的信号肽(参见,例如, Hagenbuchle 等人, *Nature* 289:643-646(1981))、经修饰的羧肽酶信号肽(参见,例如, Valls 等人, *Cell* 48:887-897(1987))、酵母 BAR1 信号肽(参见,例如,国际专利申请公开号 WO 87/02670) 和酵母天冬氨酸蛋白酶 3 (YAP3) 信号肽(参见,例如, Egel-Mitani 等人, *Yeast* 6:127-137(1990))。

[0223] 任何合适的宿主可以用于产生抗分析物抗体,包括细菌、真菌(包括酵母)、植物、昆虫、哺乳动物或其他合适的动物细胞或细胞系,以及转基因动物或植物。细菌宿主细胞的实例包括但不限于革兰氏阳性细菌,如芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的菌株,例如,短芽孢杆菌 (*B. brevis*) 或枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*),假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 或链霉菌属 (*Streptomyces*) 的菌株,或革兰氏阴性细菌,如大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株。例如,通过原生质体转化(参见,例如, Chang 等人, *Molec. Gen. Genet.* 168:111-115(1979))、使用感受态细胞(参见,例如, Young 等人, *J. of Bacteriology* 81:823-829(1961), 或 Dubnau 等人, *J. of Molec. Biol.* 56:209-221(1971))、电穿孔(参见,例如, Shigekawa 等人, *Biotechniques* 6:742-751(1988)) 或接合(参见,例如, Koehler 等人, *J. of Bacteriology* 169:5771-5278(1987)),能够实现载体向细菌宿主细胞内的引入。

[0224] 合适的丝状真菌宿主细胞的实例包括但不限于曲霉属的菌株,例如,米曲霉、黑曲霉或构巢曲霉,镰孢属 (*Fusarium*) 或木霉属 (*Trichoderma*) 的菌株。可以使用本领域技术人员已知的技术,通过包括原生质体形成、原生质体转化以及细胞壁再生的方法转化真菌细胞。用于转化曲霉属宿主细胞的合适的程序在欧洲专利申请公开号 238 023 和美国专利号 5,679,543 中描述。用于转化镰孢属的种的合适的方法由 Malardier 等人, *Gene* 78:147-156(1989) 和国际专利申请公开号 WO 96/00787 描述。可使用由 Becker 和 Guarente, 于 Abelson, J. N. and Simon, M. I., editors, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, *Methods in Enzymology* 194:182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito 等人, *J. of Bacteriology* 153:163(1983); 以及 Hinnen 等人, *PNAS USA* 75:1920(1978) 所述的程序转化酵母。

[0225] 合适的酵母宿主细胞的实例包括酵母属的菌株,例如,酿酒酵母 (*S. cerevisiae*), 裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*), 克鲁维酵母属 (*Klyveromyces*), 毕赤酵母属 (*Pichia*) 如巴斯德毕赤酵母 (*P. pastoris*) 或甲醇毕赤酵母 (*P. methanolica*), 汉逊酵母属 (*Hansenula*) 如多形汉逊酵母 (*H. polymorpha*), 或耶氏酵母属 (*yarrowia*)

的菌株。用异源多核苷酸转化酵母细胞以及从中产生异源多肽的方法由 Clontech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA, USA (在 Yeastmaker™ 酵母转化系统试剂盒 (Yeast Transformation System Kit) 的产品方案中) 和 Reeves 等人, FEMS Microbiology Letters 99:193-198(1992), Manivasakam 等人, Nucleic Acids Research 21:4414-4415(1993) 以及 Ganeva 等人, FEMS Microbiology Letters 121:159-164(1994) 披露。

[0226] 合适的昆虫宿主细胞的实例包括但不限于鳞翅目 (Lepidoptera) 细胞系, 如草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (Sf9 或 Sf21) 或粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 细胞 (High Five) (参见, 例如, 美国专利号 5, 077, 214)。昆虫细胞的转化和异源多肽的产生是本领域技术人员公知的。

[0227] 合适的哺乳动物宿主细胞的实例包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系、猿 (例如, 绿猴) 细胞系 (COS)、小鼠细胞 (例如, NS/O)、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞系、人细胞 (如人胚肾 (HEK) 细胞 (例如, HEK 293 细胞 (A. T. C. C. 保藏号 CRL-1573)))、不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞和组织培养中的植物细胞。优选地, 所述哺乳动物宿主细胞是 CHO 细胞系和 HEK 293 细胞系。另一种宿主细胞是 B3.2 细胞系 (例如, Abbott Laboratories, Abbott Bioresearch Center) 或另一种二氢叶酸还原酶缺乏 (DHFR-) CHO 细胞系 (例如, 可从 Invitrogen 获得)。

[0228] 用于将外源多核苷酸引入哺乳动物宿主细胞中的方法包括磷酸钙介导的转染、电穿孔、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染、病毒载体以及 Life Technologies Ltd, Paisley, UK 所述的使用 Lipofectamine™ 2000 的转染方法。这些方法是本领域中公知的, 并且例如由 Ausbel 等人 (编), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, New York, USA (1996) 所描述。哺乳动物细胞的培养根据已建立的方法来进行, 例如, 如 Jenkins, Ed., Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Human Press Inc. Totowa, N. J., USA (1999) 以及 Harrison 和 Rae, General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press (1997) 中所披露的。

[0229] 在生产方法中, 使用本领域已知的方法在适于产生抗分析物抗体的营养培养基中培养细胞。例如, 通过在合适的培养基中和在允许表达和 / 或分离抗人分析物单克隆抗体的条件下进行的摇瓶培养、在实验室或工业发酵罐中的小规模或大规模发酵 (包括连续、分批、补料分批或固态发酵) 来培养细胞。使用本领域已知的程序, 在包含碳源和氮源以及无机盐的合适的营养培养基中进行培养。合适的培养基可从商业供应商获得或可以按照公开的组成 (例如, 在美国模式培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) 的目录中) 制备。如果抗分析物抗体被分泌到营养培养基中, 则可以直接从培养基中回收。如果抗分析物抗体不分泌, 则可以从细胞裂解物中回收。

[0230] 所得到的抗分析物抗体可以通过本领域已知的方法来回收。例如, 抗分析物抗体可以通过常规程序从营养培养基中回收, 该程序包括但不限于离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀。

[0231] 抗分析物抗体可以通过本领域已知的多种程序来纯化, 该程序包括但不限于, 色谱法 (诸如但不限于离子交换、亲和力、疏水、色谱聚焦和大小排阻)、电泳程序 (诸如但不限于制备型等电聚焦)、差示溶解度 (诸如但不限于硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE 或提取 (参见, 例如, Janson 和 Ryden, editors, Protein Purification, VCH Publishers, New

York(1989))。

[0232] c. 通过免疫、杂交瘤或其他手段的抗体产生

[0233] 与分析物（或其片段）特异性结合的其他抗体（或其片段）可以使用本领域已知的多种不同技术来制备。例如，可以通过用含有合适的免疫原的免疫原制品对合适的受试者（诸如但不限于兔、山羊、小鼠或其他哺乳动物）进行免疫来产生多克隆和单克隆抗体。免疫原可以采用本领域公知的亲和色谱法、免疫沉淀或其他技术从其生产细胞中富集/纯化和分离。或者，免疫原可以利用本领域已知的常规技术使用化学合成来制备（诸如但不限于合成仪）。然后可以筛选在受试者中产生的抗体，以确定该抗体是否与免疫原（或其片段）结合。

[0234] 免疫原（即，纯化的蛋白质、表达蛋白质的肿瘤细胞或重组表达的免疫原（或其片段或变体（或其片段））的单位剂量和免疫方案将取决于待免疫的受试者、其免疫状态和该受试者的体重。为了增强受试者中的免疫应答，免疫原可以与佐剂如弗氏完全或不完全佐剂一起施用。

[0235] 如上所述用免疫原对受试者的免疫诱发多克隆抗体应答。在免疫的受试者中的抗体滴度可以使用固定化抗原通过诸如 ELISA 的标准技术随时间推移进行监测。

[0236] 产生抗体的其他方法包括使用表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠（参见，例如，国际专利申请公开号 WO 91/00906、WO 91/10741 和 WO 92/03918）。或者，人单克隆抗体可以通过将抗原引入到已经移植了人类抗体产生细胞或组织（例如，人骨髓细胞、外周血淋巴细胞（PBL）、人胎儿淋巴结组织或造血干细胞）的免疫缺陷小鼠中来产生。这样的方法包括在 SCID-hu 小鼠（参见，例如，国际专利申请公开号 WO 93/05796；美国专利号 5,411,749；或 McCune 等人，*Science* 241:1632-1639(1988)）或 Rag-1/Rag-2 缺陷小鼠中产生抗体。人抗体免疫缺陷小鼠也可商购获得。例如，Rag-2 缺陷小鼠可从 Taconic Farms (Germantown, NY) 获得。

[0237] 单克隆抗体可以通过用免疫原免疫受试者来产生。在免疫后适当的时间，例如，当抗体滴度处于足够高的水平时，可从免疫的动物收集抗体产生细胞并使用标准技术用其制备单克隆抗体。例如，可以通过标准体细胞融合程序将抗体产生细胞与无限增殖化细胞如骨髓瘤细胞融合，以产生杂交瘤细胞。这样的技术是本领域公知的，并且包括，例如，最初由 Kohler 和 Milstein, *Nature* 256:495-497(1975) 开发的杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术 (Kozbar 等人, *Immunology Today* 4:72(1983)) 和产生人单克隆抗体的 EBV-杂交瘤技术 (Cole 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96(1985))。用于产生单克隆抗体杂交瘤的技术是本领域技术人员公知的。

[0238] 单克隆抗体也可以通过以下方式产生：从表达人免疫球蛋白基因并且已用免疫原免疫的转基因小鼠中收集抗体产生细胞，例如，脾细胞。脾细胞可通过与人骨髓瘤融合或通过用 EBV 转化而无限增殖化。这些杂交瘤可使用本领域中描述的人 B 细胞或 EBV-杂交瘤技术来制备（参见，例如，Boyle 等人，欧洲专利公开号 0 614 984）。

[0239] 通过筛选杂交瘤培养上清液，例如，通过筛选以选择与固定化免疫原（或其片段）特异性结合的抗体，或者通过如本文所述测试抗体以确定该抗体是否具有所需的特性，即，与免疫原（或其片段）结合的能力，来检测产生与免疫原特异性结合的单克隆抗体的杂交瘤细胞。鉴定出产生具有所需特异性的抗体的杂交瘤细胞之后，可以例如通过有限稀释程

序,例如 Wands 等人 (Gastroenterology 80:225-232 (1981)) 所述的程序,对克隆进行亚克隆,并通过标准方法进行培养。

[0240] 产生在如本文所述的筛选测定中测试阳性的单克隆抗体的杂交瘤细胞可以在一定条件下在营养培养基中培养一定的时间,该条件和时间足以允许杂交瘤细胞分泌单克隆抗体到培养基中,从而产生完整抗体。适于杂交瘤细胞的组织培养技术和培养基在本领域中普遍描述(参见,例如, R. H. Kenneth, 于 Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, N. Y. (1980))。然后可收集含有所述抗体的条件化杂交瘤培养上清液。任选地,可以通过常规免疫球蛋白纯化程序,例如蛋白 A 色谱法、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法,从培养基中分离由亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0241] 可以通过构建重组组合免疫球蛋白文库并用免疫原或其片段筛查该文库来工程构建单克隆抗体。用于产生和筛查噬菌体展示文库的试剂盒可商购获得(参见,例如, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, 目录号 27-9400-01; 和 Stratagene SurfZAP Phage Display Kit, 目录号 240612)。同样地,酵母展示载体是本领域已知的,并可商购获得(例如,可从 Invitrogen 获得的 pYD1)。简言之,筛查抗体文库以鉴定并分离表达与免疫原或其片段特异性结合的抗体的噬菌体或酵母细胞。优选地,文库的初筛包括用固定化的免疫原或其片段筛查。

[0242] 筛查后,分离出展示噬菌体或酵母,并且可以从展示噬菌体或酵母(例如,从噬菌体或酵母基因组)中回收编码所选抗体的多核苷酸,并通过众所周知的重组 DNA 技术将其亚克隆到其他表达载体(例如,酿酒酵母细胞,例如 EBY100 细胞 (Invitrogen)) 中。该多核苷酸可以进一步操作(例如,连接至编码另外的免疫球蛋白域如另外的恒定区的核酸)和 / 或在宿主细胞中表达。

[0243] 一旦按照上述方法获得了与分析物特异性结合的单克隆抗体,就可以根据本领域中已知的方法对其进行测序。然后可使用重组 DNA 技术、化学合成或化学合成与如上所述的重组 DNA 技术的组合来制备该抗体。

[0244] 此外,在本公开内容的一些方面,也许有可能采用可商购的抗分析物抗体或如在文献中描述的用于产生抗分析物抗体的方法。或者,可以使用在文献中描述的方法来产生抗分析物抗体。

#### [0245] d. 抗体片段

[0246] 还可如本文所述使用与分析物结合的抗体的抗原反应性片段。抗体片段可以是 Fab、Fab'、Fab'-SH 片段、二硫键连接的 Fv、单链 Fv (scFv)、F(ab')<sub>2</sub> 片段等。用于产生抗体片段的各种技术是本领域技术人员已知的。例如,这样的片段可以通过完整抗体的蛋白水解消化来衍生(参见,例如, Morimoto 等人, J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992), 和 Brennan 等人, Science 229:81 (1985)), 或直接从重组宿主细胞产生。例如, Fab'-SH 片段可以直接从大肠杆菌中回收并化学偶联以形成 F(ab')<sub>2</sub> 片段(参见,例如, Carter 等人, Bio/Technology 10:163-167 (1992))。在另一个实施方案中, F(ab')<sub>2</sub> 使用促进 F(ab')<sub>2</sub> 分子组装的亮氨酸拉链 GCN4 来形成。或者, Fv、Fab 或 F(ab')<sub>2</sub> 片段可以直接从重组宿主细胞培养物中分离。单链可变区片段 (scFv) 通过使用短连接肽或序列连接轻链和 / 或重链可变区来制备(参见,例如, Bird 等人, Science 242:423-426 (1998))。

单链变体可以通过重组或合成方式产生。对于 scFv 的合成产生,可以使用自动化合成仪。对于 scFv 的重组产生,可以将含有编码 scFv 的多核苷酸的合适的质粒引入到合适的宿主细胞中,该宿主细胞或者是真核的,如酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞,或者是原核的,如大肠杆菌。编码感兴趣的 scFv 的多核苷酸可通过常规操作如多核苷酸的连接来制备。所得到的 scFv 可以使用本领域中已知的标准蛋白质纯化技术来分离。而且,其他形式的单链抗体如双抗体也涵盖在本公开内容中。双抗体是二价的双特异性抗体,其中 VH 和 VL 域在单条多肽链上表达,但使用的连接体过短以至于无法使同一条链上的两个域之间配对,从而迫使该域与另一条链的互补域配对并产生两个抗原结合位点(参见,例如, Holliger 等人, PNAS USA 90:6444-6448(1993); 和 Poljak 等人, Structure 2:1121-1123(1994))。

[0247] 所述抗体及其抗原反应性片段具有多种用途。一方面,该抗体(或其片段)可用作一种或多种免疫诊断试剂。例如,该抗体可以在检测测试样品中分析物的存在的一种或多种方法中用作一种或多种免疫诊断试剂。更具体地,该抗体(或其抗原反应性片段)可在测定中用作捕获抗体或检测抗体,以检测测试样品中分析物的存在。

[0248] 以下实施例用于说明本公开内容。这些实施例并非旨在以任何方式限定所请求保护的发明的范围。

[0249] 实施例 1

[0250] 目前市售的 PSA 测定的测定范围约为 0.1ng/mL 至 100ng/mL(例如, Abbott ARCHITECT® Total PSA Assay, Abbott Park, IL)。在更高的 PSA 浓度下,可在一步测定形式中观察到钩效应。在本实施例中,我们在如本文所述进行的一步测定形式中模拟了 0 至 400,000ng/mL 的分析物浓度的信号响应,以便扩大检测 PSA 的测定动态范围。

[0251] 对于模拟条件,抗体 1 以 10nM 的最终抗体浓度和 0.5nM 的与 PSA 的解离常数包被在 1 型微粒上。抗体 2 以 10nM 的最终抗体浓度和 50nM 的与 PSA 的解离常数包被在 2 型微粒上。偶联物抗体浓度为 10nM,并且它与 PSA 的解离常数为 0.5nM。与每一微粒类型结合的偶联物抗体的量如下确定:首先使用标准结合方程式计算与微粒结合的分析物的量。然后,计算微粒上能够与偶联物抗体结合的分析物的百分比。表 1 列出了在每一类型的微粒上检测到的分析物的量。

[0252] 表 1

[0253]

ng/mL	来自 1 型微粒的信号	来自 2 型微粒的信号	2 型/1 型之比
0.00	0.000	0.000	0.000
0.05	0.001	0.000	0.010
0.10	0.003	0.000	0.010
5	0.141	0.001	0.010
50	1.402	0.016	0.012
100	2.770	0.038	0.014
200	5.319	0.112	0.021
400	7.113	0.459	0.065
800	4.005	0.828	0.207
1,600	2.053	0.845	0.411
3,200	1.035	0.641	0.619
6,400	0.519	0.405	0.779
12,800	0.260	0.229	0.881
25,600	0.130	0.122	0.938
51,200	0.065	0.063	0.968
102,400	0.033	0.032	0.984
204,800	0.016	0.016	0.992
409,600	0.008	0.008	0.996

[0254] 表 1 提供了显示用于确定测试样品中的代表性分析物（在此，PSA）浓度的动态范围扩大的说明性数据。第 2 列的值可以用来确定 PSA 浓度。测定动态范围为 0.05ng/mL 至 409,600ng/mL，与之相比，目前市售的 ARCHITECT<sup>®</sup> PSA 的测定范围为 0.1ng/mL 至 100ng/mL。

[0255] 表 1 和图 7 提供了显示用于确定测试样品中的代表性分析物（在此，PSA）浓度的动态范围扩大的说明性数据。来自 1 型微粒的信号在 400ng/mL 分析物浓度时达到其最大强度并且在更高的分析物浓度时降低。因此，每一信号值对应于两个分析物浓度。如果使用该强度图作为校准曲线，不可能确定测试样品的浓度。然而，2 型微粒与 1 型微粒的信号比值作为分析物浓度的函数单调增加。因此，该比值之一可用作旗标或指标。例如，在来自 1 型微粒的最大信号处，该信号比值是 0.065。因此，信号比值 0.065 将是旗标值。如果测试样品的信号比值小于 0.065，则来自 1 型微粒的信号图的上升段将用于校准（在图 7 中示出）；如果该信号比值高于 0.065，则来自 1 型微粒的信号图的下降段将用于校准。该模型证实了测定动态范围可以扩大至 409,600ng/mL，或者更高。这通过在测定中包括高或低亲和力抗体并使用信号比值作为旗标值以选择校准曲线的哪一区段用于校准来实现。该旗标值还可用来确定来自 1 型曲线的结果是否由于因样品中高 PSA 浓度引起的钩效应而不真实地降低。

[0256] 实施例 2

[0257] 在此提供了在一步测定形式中使用两种检测抗体的夹心测定的实例。

[0258] 该测定被设计为在夹心测定中使用能够检测肽的亲力的成熟抗体 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL ;例如,如在美国专利 7, 939, 069 中所述产生的,通过引用其有关教导而并入) 测量脑利钠肽 (BNP) 的浓度。

[0259] 该测定以一步夹心形式进行。捕获抗体包被在 5 微米聚合物实验室 (Polymer Lab) (Church Stretton, United Kingdom) 颗粒上。分别用 Cy3 和 FITC 荧光染料标记两种抗体,一种是高亲和力的和一种是低亲和力的。该高亲和力抗体 (Ab1-Cy3) 对 BNP 具有 0.3nM 的  $K_D$ 。该低亲和力抗体 (Ab2-FITC) 对 BNP 具有大于 20nM 的  $K_D$ 。

[0260] 将 250nM 至 2pM 浓度范围的 100  $\mu$  L 分析物顺序地与 5  $\mu$  L 100nM Ab1-Cy3、2  $\mu$  L 0.1% 微粒和 10  $\mu$  L 400nM Ab2-FITC 混合。微粒在温育一小时后洗涤并在显微镜上成像。由 Ab1-Cy3 检测的分析物在 Cy3 通道中测量,而由 Ab2-FITC 检测的分析物在 FITC 通道中测量。

[0261] 图 8a 示出了独立地在 Cy3 和 FITC 通道中测得的 2pM 至 250nM 的肽的信号图。使用来自两个通道的数据观察到钩效应。图 8b 示出了作为肽浓度的函数的 FITC 和 Cy3 通道的比值图;它随着分析物浓度单调地增加。在最大 Cy3 信号处,该信号比值为 0.07,其用作旗标值。如果测试信号的信号比值高于 0.07,那么图 8a 中的所示区域的校准图用来确定其浓度。

[0262] 所有专利、专利申请公开文本、期刊文章、教科书以及在说明书中提到的其他出版物都代表本发明所属领域的技术人员的水平。

[0263] 2013 年 3 月 15 日提交的、名称为“ASSAY WITH INTERNAL CALIBRATION”的共同拥有的、共同未决的申请——序列号为 13/833, 365 的美国非临时申请,由于其中关于用于具有单一内部校准物的测定的试剂盒和方法的教导而明确地通过引用以其全文并入。

[0264] 所有这些出版物都通过引用并入本文,其程度如同具体地和单独地指出每个单独的出版物均通过引用而并入。

[0265] 在此说明性地描述的本发明可以在不存在任何一个或多个本文未具体公开的元素或限制的情况下适当地实施。因此,例如,本文中关于术语“包括”、“基本上由... 组成”和“由... 组成”中的任一术语的每种情况可以被替换为另两个术语中的任一个。同样地,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数的引用物,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“该方法”包括一种或多种方法和 / 或该类型的步骤,它们在本文中进行了描述和 / 或本领域普通技术在阅读本公开内容后将会明白。

[0266] 已采用的术语和表述用作描述性术语而非限制性术语。就此而言,当某些术语已在“定义”部分定义,并且在“具体实施方式”的其他地方另有定义、描述或讨论时,所有这些定义、描述和讨论均旨在归于这些术语。也并非有意在这些术语和表述的使用中排除所示和所述的特征或其部分的任何等同物。此外,虽然在“具体实施方式”中使用了副标题,例如“定义”,但是这样的使用仅是为了方便参考,并非意在将一个部分中提出的任何公开内容仅限制在该部分;更确切地说,在一个副标题下提出的任何公开内容旨在构成在每个其他副标题下的公开内容。

[0267] 应当认识到,在所请求保护的发明的范围之内,各种修改是可能的。因此,应该理解,尽管已经在优选的实施方式和任选的特征的上下文中具体公开了本发明,但本领域技术人员可以采取本文公开的概念的修改和变化。这样的修改和变化被认为处于由所附权利

要求所限定的本发明的范围内。

抗体-抗原-标记抗体夹心法

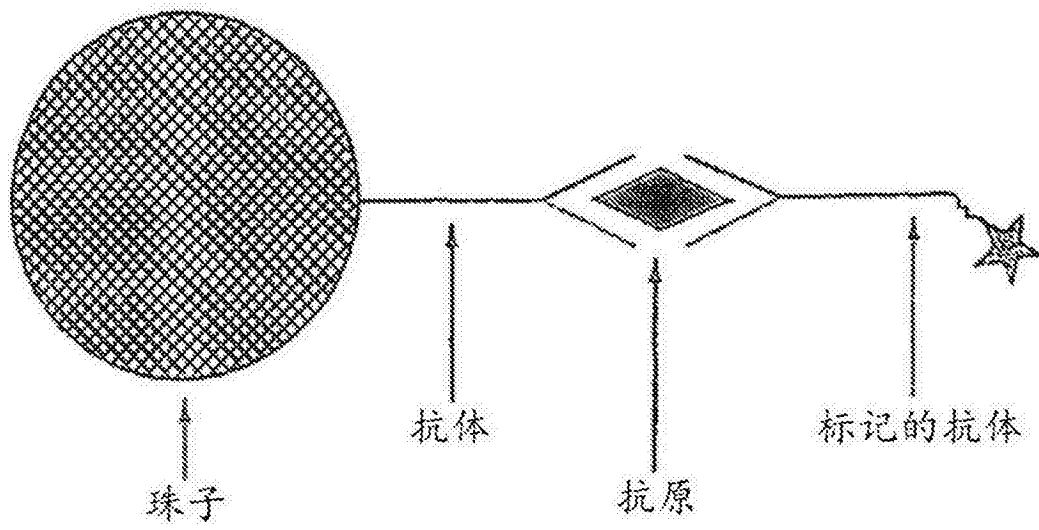


图 1

竞争性测定

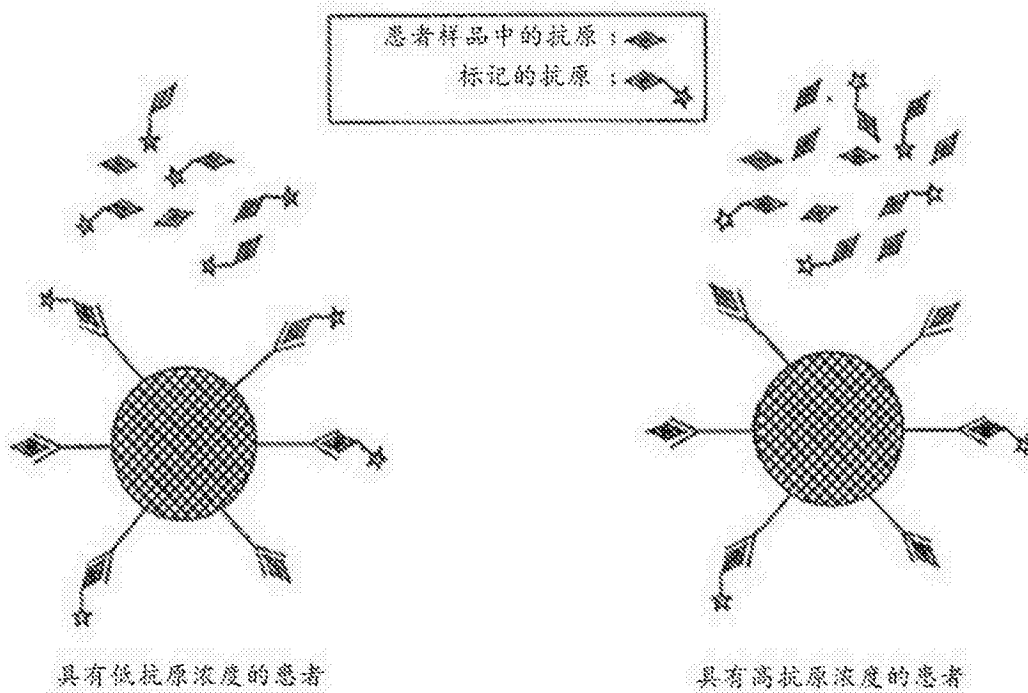


图 2

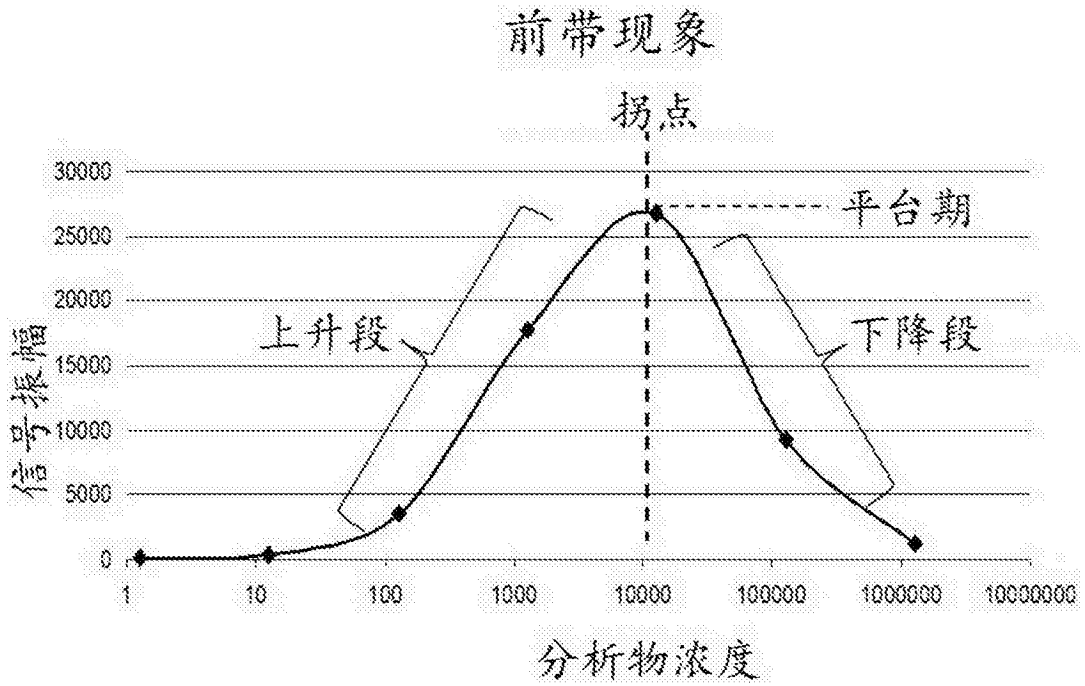


图 3

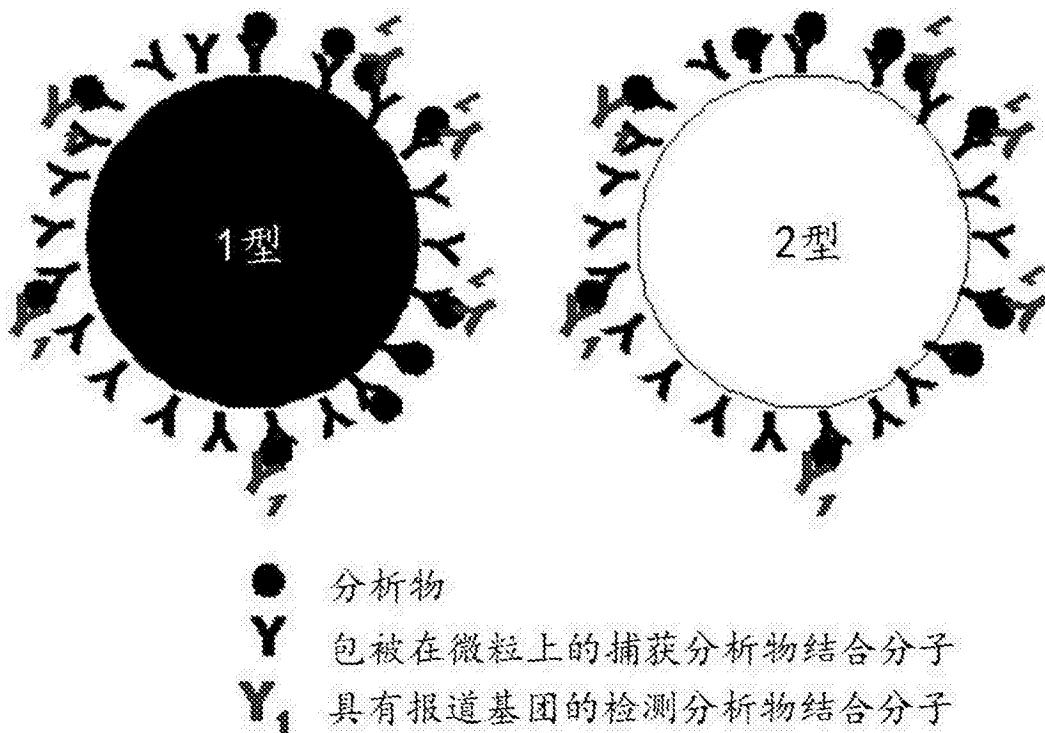
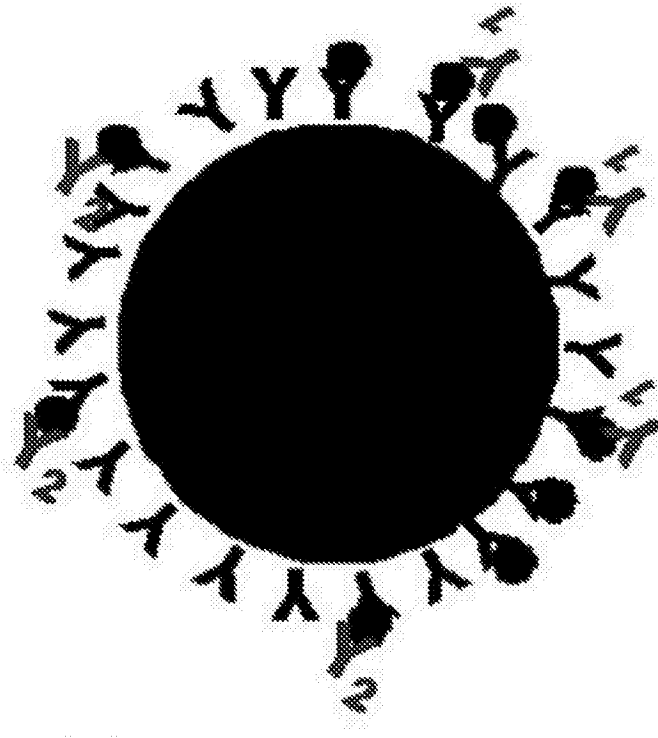


图 4



- 分析物
- Y 包被在微粒上的捕获ABM
- Y<sub>1</sub> 具有报道基团1的检测ABM
- Y<sub>2</sub> 具有报道基团2的检测ABM

图 5

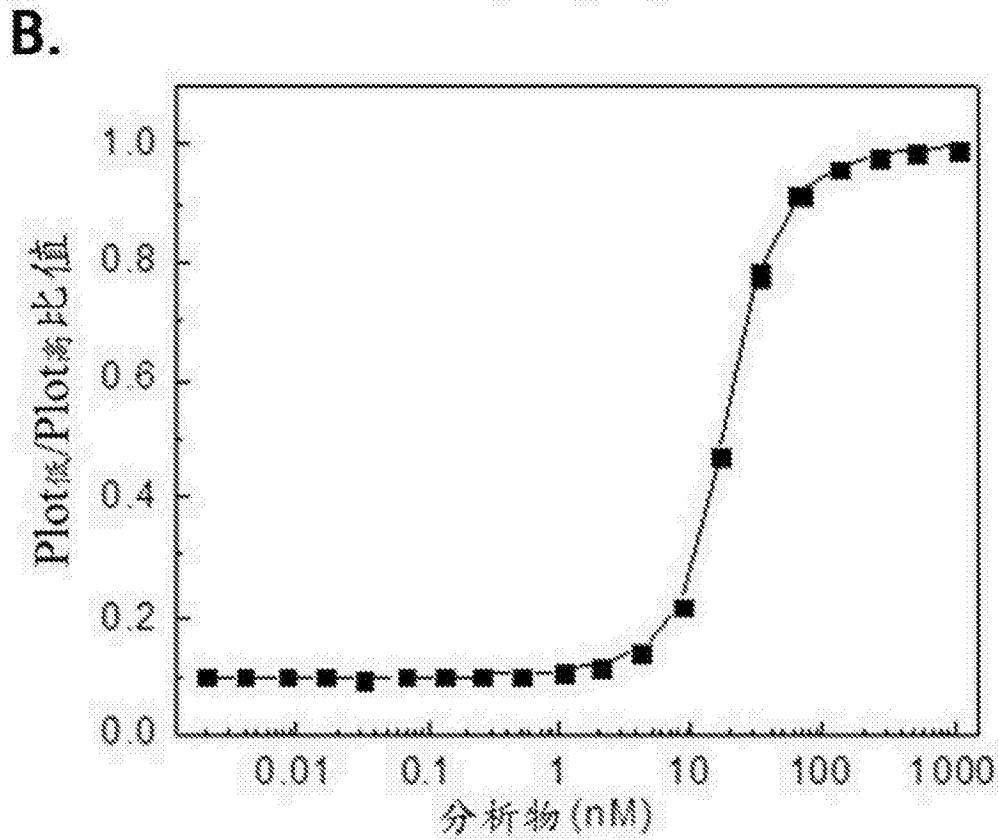
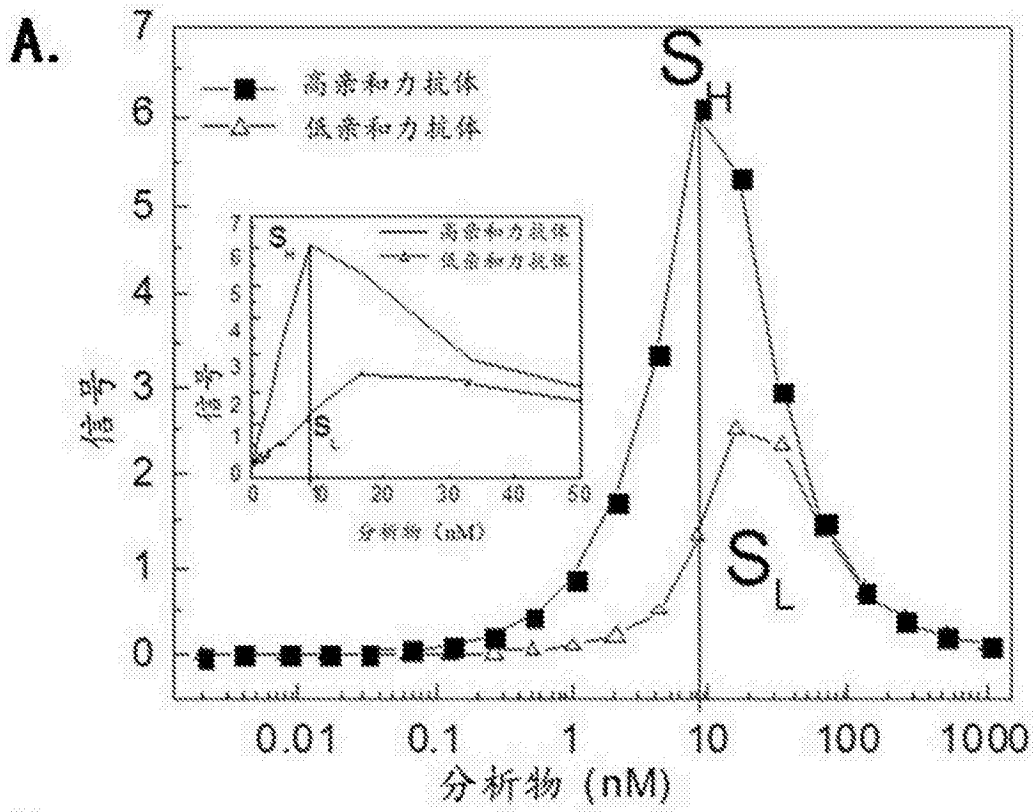


图 6

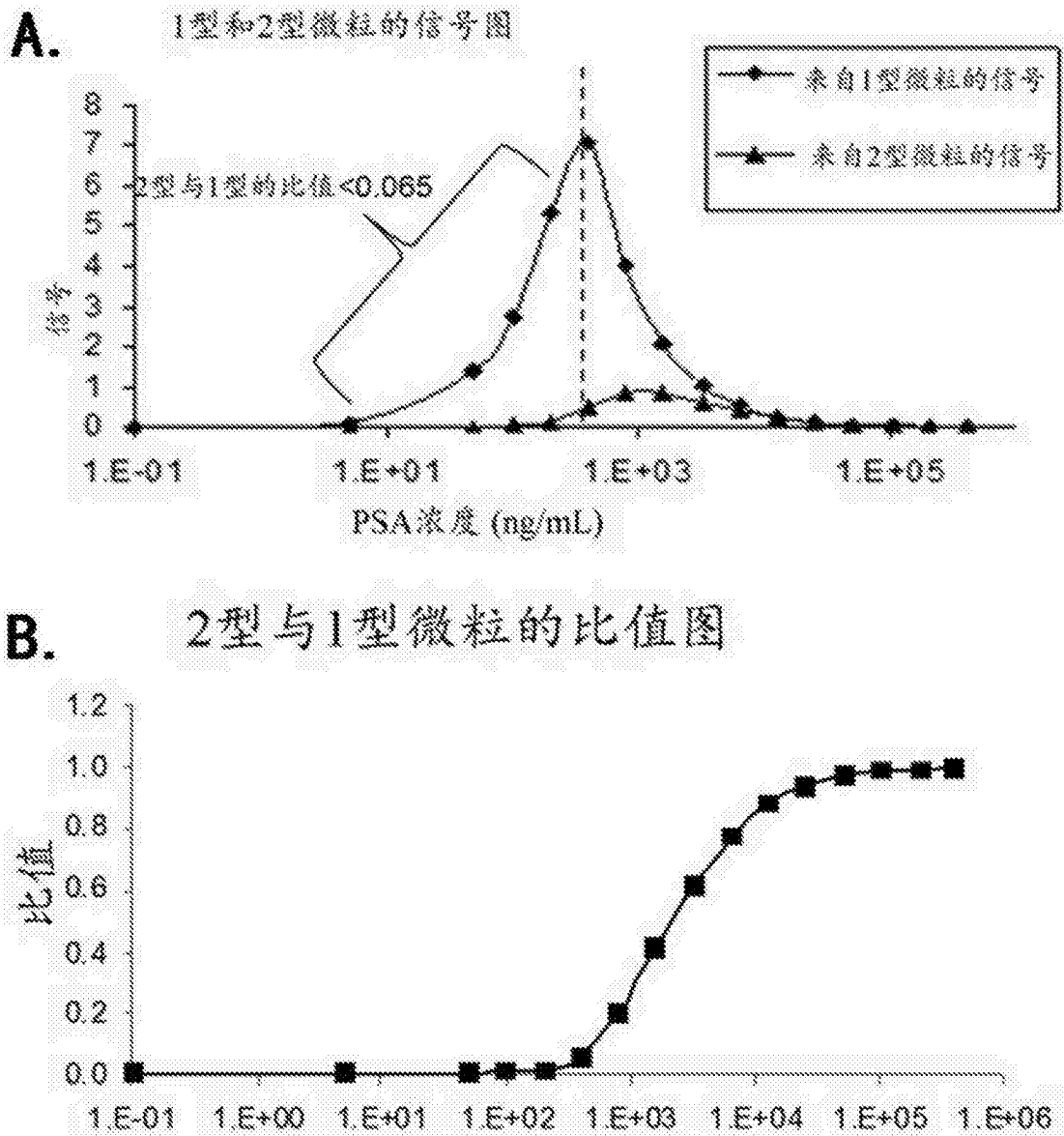


图 7

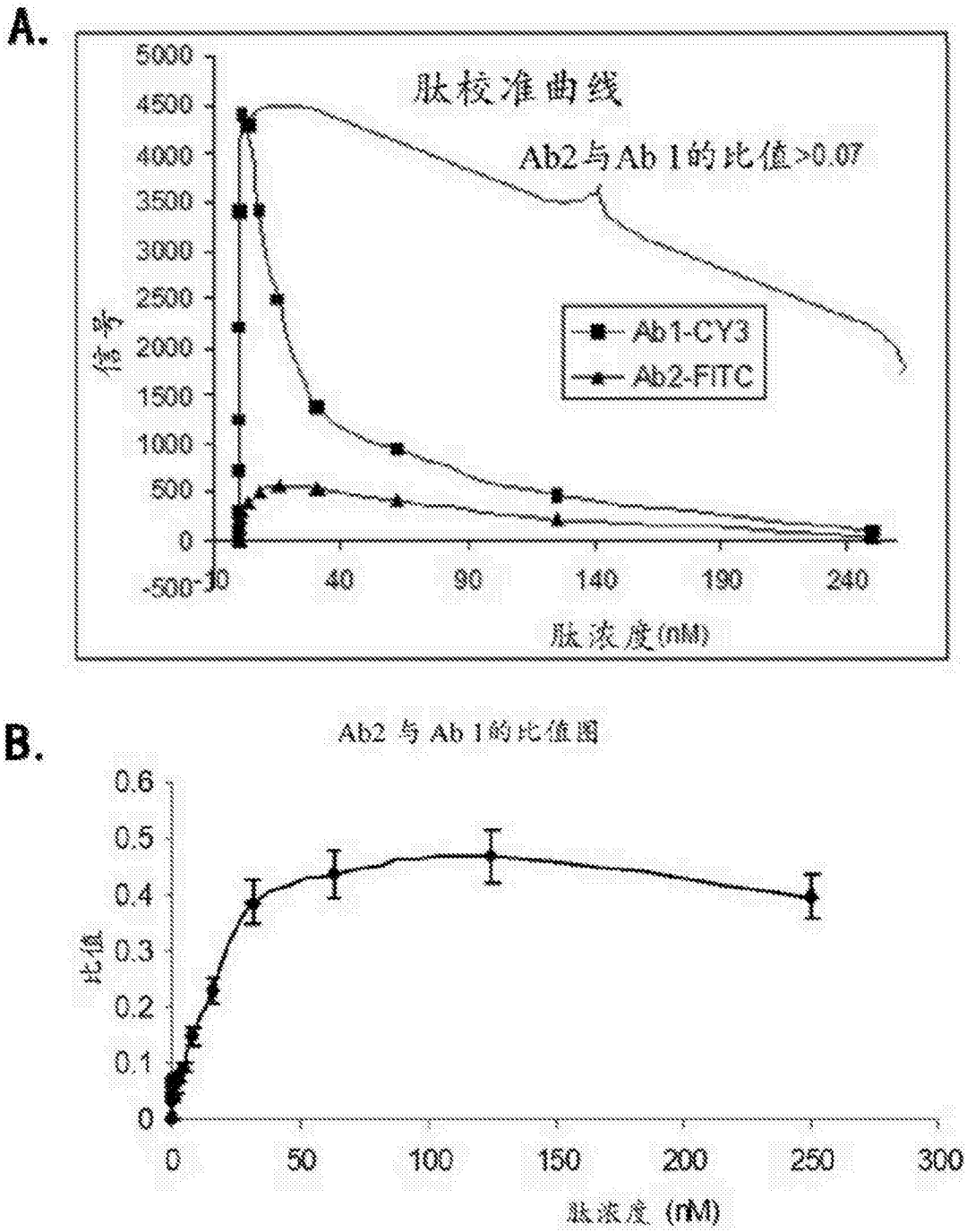


图 8

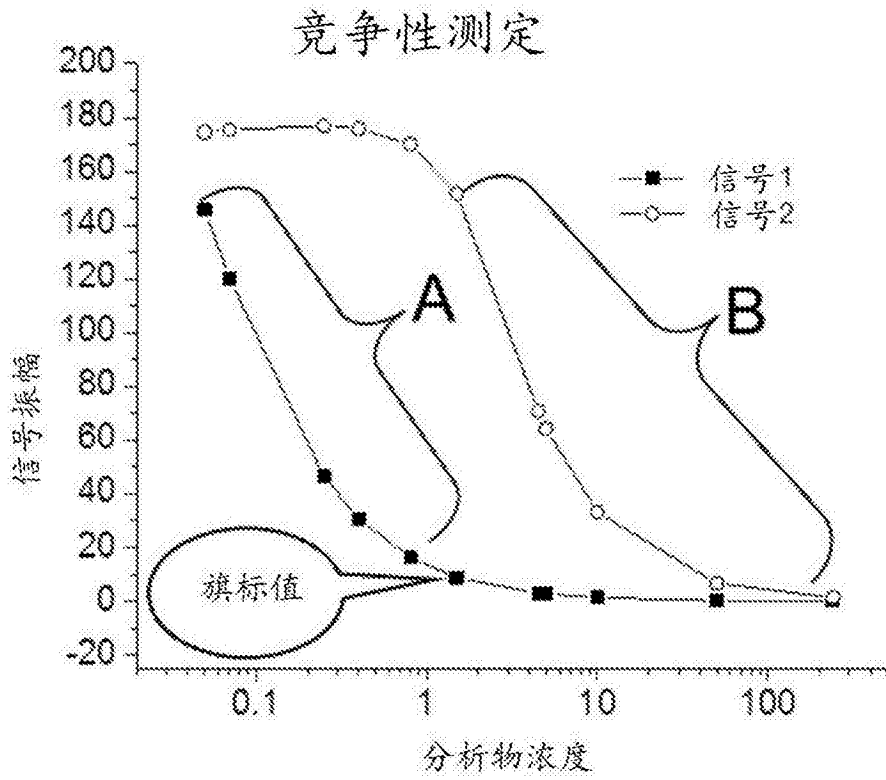


图 9

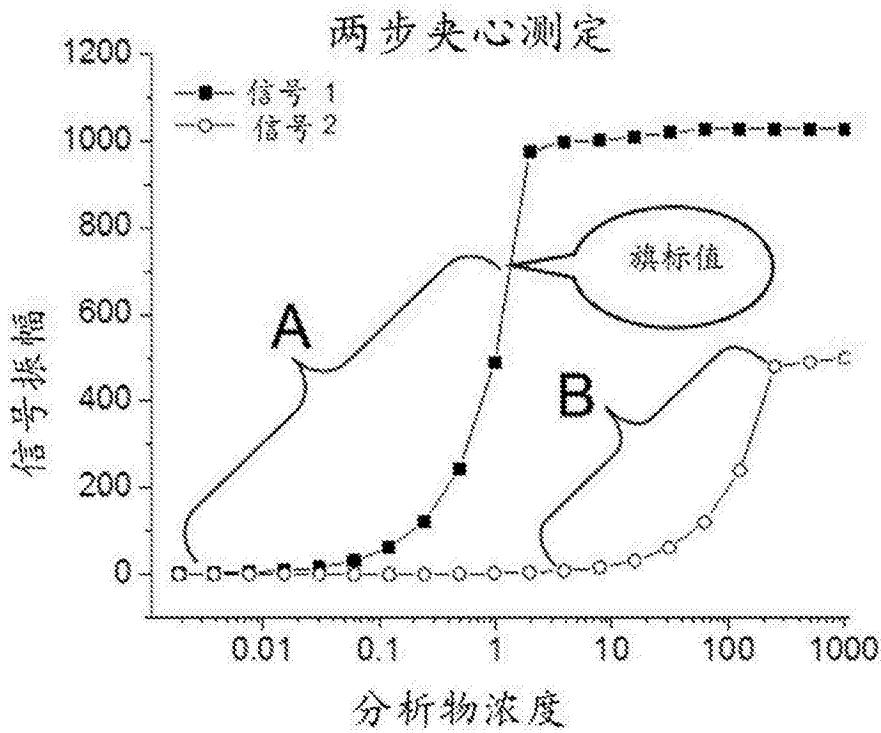


图 10

专利名称(译)	具有提高的动态范围的测定		
公开(公告)号	<a href="#">CN105190311A</a>	公开(公告)日	2015-12-23
申请号	CN201380075980.5	申请日	2013-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培实验室		
当前申请(专利权)人(译)	雅培实验室		
[标]发明人	BL杜维尔 S给达 Q阮 JP斯金纳 SY特亭		
发明人	B·L·杜维尔 S·给达 Q·阮 J·P·斯金纳 S·Y·特亭		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/5306 G01N33/54306		
代理人(译)	程芳		
优先权	13/833655 2013-03-15 US		
其他公开文献	CN105190311B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本文提供了可用于避免“前带现象”或“钩效应”并且扩大可精确测量的分析物浓度范围的测定和试剂盒。

