



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112912730 A

(43) 申请公布日 2021.06.04

(21) 申请号 201980067059.3

(22) 申请日 2019.10.23

(30) 优先权数据

62/749,776 2018.10.24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/057568 2019.10.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/086664 EN 2020.04.30

(71) 申请人 奥瑞许科技公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 M·里德 M·戴维斯 G·吉隆

M·费舍尔

(74) 专利代理机构 深圳永慧知识产权代理事务所(普通合伙) 44378

代理人 黄鑫

(51) Int.Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

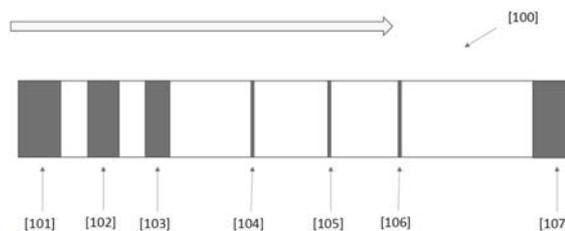
权利要求书2页 说明书13页 附图1页

(54) 发明名称

用于差分同种型检测的横向流动测定

(57) 摘要

公开了横向流动测定法、横向流动测定测试条以及用于检测与急性免疫应答相关联的抗体类别的设备。本发明总体涉及测定法,特别是用于检测与急性感染相关联的抗体同种型的横向流动测定法,以及涉及用于本发明方法中的横向流动测定条。



1. 一种用于检测与急性免疫应答相关联的抗体同种型的横向流动测定法,包括以下步骤:

- a) 使液体生物样品与被标记的抗原接触以与抗原特异性抗体形成复合物;
- b) 用固定的捕获试剂捕获来自步骤a)的被标记的抗原-抗体复合物,所述捕获试剂特异性结合与第一捕获区的成熟免疫应答相关联的抗体同种型;
- c) 用固定的捕获试剂捕获来自步骤a)的被标记的抗原-抗体复合物,所述捕获试剂特异于与位于所述第一捕获区下游的第二捕获区处的急性免疫应答相关联的抗体同种型;
- d) 检测来自步骤c)的捕获的复合物。

2. 根据权利要求1所述的横向流动测定法,其中,与成熟免疫应答相关联的所述抗体同种型是IgG,并且与急性免疫应答相关联的所述抗体同种型是IgM。

3. 根据权利要求1或2所述的横向流动测定法,其中,所述被标记的抗原是被标记的病毒抗原。

4. 根据权利要求3所述的横向流动测定法,其中,所述被标记的病毒抗原是被标记的寨卡病毒抗原。

5. 根据权利要求4所述的横向流动测定法,其中,所述被标记的寨卡病毒抗原是被标记的寨卡NS1多肽。

6. 根据权利要求1至5中任一项权利要求所述的横向流动测定法,其中,所述被标记的抗原的标记是胶体金。

7. 根据权利要求2至6中任一项权利要求所述的横向流动测定法,其中,步骤b)中的所述捕获试剂是蛋白G。

8. 根据权利要求2至7中任一项权利要求所述的横向流动测定法,其中,步骤c)中的所述捕获试剂是抗人IgM抗体或其片段。

9. 根据权利要求1至8中任一项权利要求所述的横向流动测定法,进一步包括以下步骤:在使所述液体生物样品与所述被标记的抗原接触之前,使所述液体生物样品与至少一种其他抗原接触以结合与所述被标记的抗原交叉反应的抗体。

10. 根据权利要求9所述的横向流动测定法,其中,所述被标记的抗原是被标记的寨卡NS1多肽,并且所述至少一种其他抗原是登革热NS1多肽。

11. 一种用于检测与急性感染相关联的抗体同种型的横向流动测定条,包括:

- a) 生物样品的样品接收区域,
- b) 所述样品接收区域下游的阻滞剂区域,
- c) 在所述阻滞剂区域下游的所述横向流动测定测试条上的缀合物区域,包含与所述生物样品中的抗体特异性结合的被标记的抗原,
- d) 在所述缀合物区域下游的所述横向流动测定测试条上的第一捕获区,包含捕获试剂,用以特异性捕获与成熟免疫应答相关联的抗体同种型,
- e) 在所述缀合物区域下游的所述横向流动测定测试条上的第二捕获区,包含捕获试剂,用以特异性捕获与急性免疫应答相关联的抗体同种型,
- f) 可选地,在所述第二捕获区下游的横向流动测定测试条上的控制区,用以指示测定完成,以及
- g) 可选地,与所述横向流动测定测试条流体连通并且位于所述第二捕获区和可选的控

制区的下游的吸收垫。

12. 根据权利要求11所述的横向流动测定条,其中,与成熟免疫应答相关联的所述抗体同种型是IgG,并且与急性免疫应答相关联的所述抗体同种型是IgM。

13. 根据权利要求11或12所述的横向流动测定条,其中,所述被标记的抗原是被标记的病毒抗原。

14. 根据权利要求13所述的横向流动测定条,其中,所述被标记的病毒抗原是被标记的寨卡病毒抗原。

15. 根据权利要求14所述的横向流动测定条,其中,所述被标记的寨卡病毒抗原是被标记的寨卡NS1多肽。

16. 根据权利要求11至15中任一项权利要求所述的横向流动测定条,其中,所述被标记的抗原的标记是胶体金。

17. 根据权利要求12至16中任一项权利要求所述的横向流动测定条,其中,所述第一捕获区中的所述捕获试剂是蛋白G。

18. 根据权利要求17所述的横向流动测定条,其中,所述第一捕获区中的所述捕获试剂是抗人IgM抗体或其片段。

19. 根据权利要求11至18中任一项权利要求所述的横向流动测定条,其中,所述阻滞剂区域包括至少一种其他抗原,以结合与所述被标记的抗原交叉反应的抗体。

20. 根据权利要求19所述的横向流动测定条,其中,所述被标记的抗原是被标记的寨卡NS1多肽,并且所述至少一种其他抗原是登革热NS1多肽。

## 用于差分同种型检测的横向流动测定

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年10月24日提交的美国申请号62/749,776的优先权,该美国申请通过引用并入本文中。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于通过横向流动技术检测与急性免疫应答相关联的抗体类别的诊断方法和设备。

### 背景技术

[0004] 急性免疫应答可指示许多病症,范围从传染病到癌症再到组织损伤。当通过差分免疫球蛋白Fc类或同种型检测(例如IgG对IgM类)来确定这些应答时,至关重要的是一种同种型与测定组分的相互作用不得干扰另一种同种型与测定组分的相互作用。在一种同种型超过另一种同种型且/或对测定组分具有更高的亲和力的情况下,或者当试剂无法区分反应性抗体同种型时,这尤其有风险。例如,当测试对诸如寨卡之类的病毒的免疫应答时,期望检测与急性的、最近的暴露或感染相关联的IgM抗体,而不是检测成熟的免疫应答的IgG抗体的存在。

[0005] 免疫测定用于根据抗体试剂或靶标的特异性和选择性来量化具有生物学意义的分子。对于即时检验,免疫测定通常以横向流动测定形式使用。参见例如美国专利第8,062,908号、美国专利第7,541,194号、美国专利第7,192,555号和美国专利第6,303,081号。但是,几乎没有诊断工具可以鉴定急性感染。

[0006] IgM抗体通常指示对感染的急性免疫应答。由于IgM抗体通常是免疫系统响应于最初暴露于抗原而产生的抗体的第一同种型,因此检测抗原特异性IgM的免疫测定可用于鉴定急性感染,因为它们可检测出初次感染后最初几天产生的抗体并持续数月。随着对特定抗原的免疫应答的成熟,发生向具有结构上不同的Fc区的其他同种型(例如IgA、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)的转换,产生了混合类别应答。在某些感染中,宿主B细胞甚至可能完全停止产生IgM同种型。抗体N端末端的序列和折叠决定了结合特异性,该序列和折叠是由多个基因盒形成的,并通过免疫应答期间AID依赖性过程中获得的体细胞突变进行微调。在此过程中,一些B细胞还使用相同的AID酶来环出在单个基因(外显子)中包含IgM Fc恒定区的可变区末端下游(3')的插入DNA,将其切除并转移到下游同种型(例如IgG1等)。这是给定B细胞中DNA级的永久性改变,无法再次产生IgM。因此,持续感染的额外时间可以使应答成熟,包括更高浓度的特异性抗体和更多群体的除IgM之外的同种型的更高亲和力抗体。

[0007] 为了从给定的样品中检测特定类别的抗体(诸如IgM),有时必须消除由于存在其他更高丰度或更高亲和力的抗体类别(诸如IgG)而引起的干扰。如本领域技术人员所熟知的,这些Fc抗体类别或同种型将优先结合测定组分并阻止检测目标抗体,诸如IgM。因此,需要一种消除来自一类或多类抗体的干扰以允许检测另一类抗体的测定测试设计。

[0008] 在某些情况下,横向流动测定也可能会遇到与交叉反应抗体有关的问题,这些问

题可能导致假阳性结果。例如，寨卡病毒和登革热病毒是密切相关的黄病毒。寨卡病毒和登革热病毒的非结构蛋白1 (NS1) 表现出高同源性。抗登革热NS1蛋白的抗体也可能识别来自寨卡的NS1, 反之亦然。因此, 除了交叉反应抗体之外, 还需要差分检测样品中与目标靶标的抗体同种型。

## 发明内容

[0009] 本发明大体涉及测定法, 特别是用于检测与急性感染相关联的抗体同种型的横向流动测定法, 以及涉及用于本发明方法中的横向流动测定条。在根据本发明的测定法中, 通过使用对靶标抗体具有特异性的被标记的抗原来实现抗体同种型的检测。一种本发明的横向流动测定法:

[0010] a) 使液体生物样品与被标记的抗原接触以与抗原特异性抗体形成复合物;

[0011] b) 用固定的捕获试剂捕获来自步骤a) 的被标记的抗原-抗体复合物, 所述捕获试剂特异性结合与第一捕获区的成熟免疫应答相关联的抗体同种型;

[0012] c) 用固定的捕获试剂捕获来自步骤a) 的被标记的抗原-抗体复合物, 所述捕获试剂特异于与位于所述第一捕获区下游的第二捕获区处的急性免疫应答相关联的抗体同种型;

[0013] d) 检测来自步骤c) 的所述捕获的复合物。

[0014] 本发明的一些方法还提供了减少交叉反应抗体与被标记的抗原的结合的方法。此类方法例如包括以下额外步骤: 在使所述液体生物样品与所述被标记的抗原接触之前, 使所述液体生物样品与至少一种其他抗原接触以结合与所述被标记的抗原交叉反应的抗体。

[0015] 根据本发明的横向流动测定测试条被设计成在液体生物样品中的与特定抗原结合的至少两种不同的同种型之间进行区分。根据本发明的横向流动测定测试条在相应的捕获区涂有同种型特异性捕获试剂。根据本发明的横向流动测定测试条包括:

[0016] a) 生物样品的样品接收区域,

[0017] b) 所述样品接收区域下游的阻滞剂区域,

[0018] c) 在所述阻滞剂区域下游的所述横向流动测定测试条上的缀合物区域, 包含与所述生物样品中的抗体特异性结合的被标记的抗原,

[0019] d) 在所述缀合物区域下游的所述横向流动测定测试条上的第一捕获区, 包含捕获试剂, 用以特异性捕获与成熟免疫应答相关联的抗体同种型,

[0020] e) 在所述缀合物区域下游的所述横向流动测定测试条上的第二捕获区, 包含捕获试剂, 用以特异性捕获与急性免疫应答相关联的抗体同种型,

[0021] f) 可选地, 在所述第二捕获区下游的横向流动测定测试条上的控制区, 用以指示测定完成, 以及

[0022] g) 可选地, 与所述横向流动测定测试条流体连通并且位于所述第二捕获区和可选的控制区的下游的吸收垫。

[0023] 本发明的一些横向流动测定条也被配置为减少交叉反应抗体与被标记的抗原的结合。此类横向流动测定条可包含阻滞剂区域, 所述阻滞剂区域包括至少一种其他抗原, 以结合与所述被标记的抗原交叉反应的抗体。

[0024] 本发明还涉及横向流动测定设备。根据本发明的横向流动测定设备包括: 容纳根

据本发明的横向流动条的测定部分以及用于观察测试区和可选的控制区的开口。本发明还涉及包括本发明的横向流动测定条和显影剂溶液的横向流动测定试剂盒。

### 附图说明

[0025] 图1示出了根据本发明的横向流动测定测试条[100]的代表性示意图。在将样品施加到样品接收区域[101]之后,样品沿箭头指示的方向移动通过测试条[100],流过阻滞剂区域[102]、缀合物区域[103],其中生物样品中的抗体与被标记的抗原结合,并且随后流通过通过抗体同种型捕获被标记复合物的第一捕获区[104],然后流过用急性感染抗体同种型捕获被标记复合物的第二捕获区[105],然后流过用以收集任何未捕获的被标记的抗原的控制区[106],最后到达吸收垫[107]。

[0026] 图2示出了根据本发明的用于检测感染(例如寨卡感染)的横向流动设备。横向流动设备[200]具有带有样品端口[202]的壳体[201]。如图所示,横向流动测试设备[200]还可以包含额外的样品施加构件,在此处被描绘为平垫[203],其可以充当芯以将液体生物制剂输送到样品接收区域。设备[200]包含来自图1的横向流动测定测试条[100],其与平垫[203]流体连通。随着样品在横向流动测定条上的移动,可以在IgM捕获线(壳体[201]上标记为T)上看到被标记的复合物的存在。将在控制线(壳体[201]上标记为C)指示测定的完成。流动方向由箭头指示。

### 具体实施方式

[0027] 本发明涉及用于检测与急性感染相关联的抗体同种型的横向流动测定法。一种本发明的横向流动测定法:a)使液体生物样品与被标记的抗原接触以与抗原特异性抗体形成复合物;b)用固定的捕获试剂捕获来自步骤a)的被标记的抗原-抗体复合物,所述捕获试剂特异性结合与第一捕获区的成熟免疫应答相关联的抗体同种型;c)用固定的捕获试剂捕获来自步骤a)的被标记的抗原-抗体复合物,所述捕获试剂特异于与位于所述第一捕获区下游的第二捕获区处的急性免疫应答相关联的抗体同种型;d)检测来自步骤c)的所述捕获的复合物。

[0028] 本发明的方法、测定条和设备对于需要早期治疗的感染的早期检测特别有用。本发明的测定方法可以通过根据同种型在结合特定疾病抗原的至少两种不同抗体之间进行区分来鉴定疾病的早期感染并与疾病的过去感染区分开。对于本发明的一些测定方法,首先消耗与成熟应答相关联的同种型的生物样品以检测与急性应答相关联的同种型是有利的。

[0029] 急性期为提高患者或群体安全性提供干预机会的疾病,或某一类型的抗体消耗可能会提高某些测定形式的敏感性的样品类型引起了人们的特别关注。此类疾病包括例如虫媒病毒性神经疾病(例如,WNV、EEE病毒和SLE病毒感染)、虫媒病毒性皮疹疾病(例如,登革热病毒、CHIK病毒和寨卡病毒感染)、CMV和EBV传染性单核细胞增多症、汉坦病毒肺综合征、甲型、乙型和戊型肝炎病毒感染、HIV-1和HIV-2感染、麻疹、风疹、腮腺炎、细小病毒B19第五病、幽门螺杆菌感染、伯氏疏螺旋体感染、HCV以及其他病毒感染。参见例如Landry, Clin. and Vacc. Immun. Vol. 23, pp. 540-45, 2016。例如, IgM类抗麻疹抗体的存在指示急性麻疹感染,而IgG类抗麻疹抗体的存在指示以前的麻疹暴露和免疫性。IgM抗体的存在也是

急性甲型肝炎病毒 (HAV) 感染的指标。在感染后4周至6个月之间,血清中可检测到HAV特异性IgM抗体。尽管下面的示例是关于寨卡病毒进行描述的,但是当根据结合特定疾病抗原的同种型在至少两种不同抗体之间进行区分有助于鉴定、测定和/或治疗任何感染或为其所需时,可以使用本发明的测定方法。

[0030] 如本领域已知的,抗体是指基本上由一个或多个免疫球蛋白基因或其片段编码的异二聚体糖蛋白多肽或多肽复合物。公认的免疫球蛋白基因包括 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 和 $\mu$ 恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为 $\kappa$ 或 $\lambda$ 。重链分类为 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 或 $\epsilon$ ,其依次分别定义了免疫球蛋白类别(同种型):IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。重链的恒定结构域组成抗体的Fc区。抗体的Fc部分决定抗体类别。两种不同的抗体同种型(例如IgM和IgG)可以在抗体的N端可变区共享相似性,这使它们可以特异性结合同一抗原,但在具有不同的效应子功能和序列的下游恒定区中却有所不同。

[0031] 通常,抗体是免疫球蛋白,在其表面上或腔中具有与另一分子特异性结合并因此定义为与该分子的特定空间和极性组织互补的区域。抗体可以是多克隆或单克隆的。抗体可以包括完整的免疫球蛋白或其片段。其片段可以包括Fab、Fv和F(ab')<sub>2</sub>、Fab'等。抗体还可以包括通过重组方法制备的嵌合抗体或其片段。

[0032] 抗原是能够与目标抗体特异性结合的任何化合物。抗原与抗体之间的特异性结合意味着两个分子是相关的,使得它们的彼此结合能够区别于抗原与非特异性抗体之间的结合,或者抗体与不同抗原之间的结合。结合可以通过化学或物理手段进行。分子可以特异性结合分子的聚集;例如,针对第二抗体的免疫复合物产生的抗体及其相应的抗原可以被认为是所述免疫复合物的特异性结合配偶体。

[0033] 本发明的测定方法在横向流动测定条上进行。方法进一步包括使横向流动测定条与显影剂溶液接触。接触后,显影剂溶液移动通过横向流动测定条。在本发明的方法中,将液体生物样品置于显影剂溶液中,并且包括生物样品的所得显影剂溶液穿过测定条移动至横向流动测定条上的下游点。在本发明的另一种方法中,将液体生物样品放置在横向流动测定条的样品接收区域上,并且显影剂溶液接触横向流动测定条,以促进生物样品穿过测定条从样品接收区域流向下游点。

[0034] 使用本发明的测定方法进行分析的液体生物样品可以是任何液体生物样品,诸如生物流体,其可以包含目标抗体。生物流体的示例包括但不限于尿液、血液、血浆、血清、口腔液、汗液、精液、粪便、痰、脑脊髓液、眼泪、粘液、羊水、母乳等。口腔液是存在于口腔中的液体。口腔液是唾液和口腔粘膜渗出液的混合物。唾液是由唾液腺产生的。口腔粘膜渗出液通过从毛细血管穿过颊粘膜进入口腔。口腔液同时包含病原体和抗体。诸如口腔液、全血、血浆和血清的生物流体样品是可用于本发明的测定中的样品的优选类型。这些中的每一个都可以使用本领域已知的手段和技术来获取。

[0035] 诸如寨卡病毒感染的病毒感染可以在多种基质中检测到,所述基质可以包括液体生物样品,诸如来自具有临床症状和体征和/或流行病学风险因素的患者全血(静脉或指尖)、血清和血浆、口腔液(例如唾液和口腔粘膜渗出液)、尿液、精液和母乳。美国专利号8,062,908中公开了一种快速收集和分析口腔液的方法。在本发明的用于测量全血的方法中,医护人员将适当体积的血液放置在设备上。液体生物样品的使用量可以基于液体生物样品和测定形式而改变。

[0036] 使液体生物样品与被标记的抗原接触的步骤在液相中进行。根据本发明的一种方法,使液体生物样品和被标记的抗原在溶液中在横向流动测定测试条上的缀合物垫或缀合物区域上接触。在本发明的方法中,使用下文描述的显影剂溶液,其促进样品向测定条上的迁移。将液体生物样品与溶液中的被标记的抗原在缀合物区域的测定条上接触放置。在本发明的方法中,将缀合物区域与被标记的抗原一起温育并干燥,并且当显影剂溶液到达缀合物区域时,将被标记的抗原从缀合物区域的基质中洗脱,并且可用于与存在于生物样品中的抗原特异性抗体结合。根据本发明的另一种方法,使液体生物样品和被标记的抗原在溶液中在放置于横向流动测定测试条上之前接触。

[0037] 可以使用被标记的抗原检测存在于生物样品中的抗体。当使用被标记的抗原时,由于抗体与被标记的抗原结合而形成被标记的复合物。如上所述,形成被标记抗体的结合反应采用特异性结合抗体-抗原相互作用。可以通过目视检测或仪器检测来检测标记的存在,从而检测在下游捕获区的抗体的存在。

[0038] 标记可以是本身可见或能够产生可通过目视或仪器手段检测到的信号的任何物质。特定标记的选择对本发明并不重要,但是标记应该能够自行产生可检测的信号,或者可以仪器检测,或者可以结合一种或多种额外的信号产生组分(诸如酶/底物信号产生系统)进行检测。

[0039] 如本领域中已知的,标记类型的选择涉及考虑待检测的分析物和所需的检测手段。可检测标记的检测将取决于所选择的部分或试剂,并且可以通过现有技术中已知的任何方法来进行,例如,目视检查、紫外和可见分光光度法、荧光法、放射性计数等。在一优选实施例中,当金颗粒用作可检测标记时,获得测定结果并通过目视检查进行分析。本领域已知且适用于本发明方法的各种标记包括本身可见或通过化学或物理手段产生信号的标记。此类标记可以包括酶和底物、色原、催化剂、荧光化合物、化学发光化合物、分子信标、炭黑、聚苯乙烯珠和放射性标记。本领域已知的其他合适的标记包括颗粒标记,诸如胶体金属颗粒(诸如胶体金)、胶体非金属颗粒(诸如硒或碲)、染色或有色颗粒(诸如染色的塑料或染色的微生物)、有机聚合物胶乳颗粒和脂质体、有色珠、聚合物微胶囊、囊、红细胞、红细胞血影或包含直接可见物质的其他囊泡等。美国专利号4,313,734描述了使用金溶胶作为抗体的标记。通常,使用视觉上可检测的标记。这样可以直接目视或仪器读取样品中分析物的存在或含量,而在测试区域无需额外的信号产生组分。将标记附着于诸如多肽的抗原的方法是本领域已知的。参见例如Bioconjugate Techniques, Hermanson, Third Ed., 2013。

[0040] 在根据本发明的优选测定方法中,可检测的标记是金属胶体颗粒,诸如金微粒或金纳米颗粒,其可以通过人眼以及仪器读取来观察。在本发明的测定方法中,用作可检测标记的胶体颗粒的粒径在20nm和80nm之间。对于仪器读取测定,通过使用分光光度计在特定波长下测量光密度(OD)来测量颗粒的浓度。然后将OD用作被标记的抗原总量的量度。在根据本发明的测定方法中,被标记的抗原的量应优选超过待检测的抗体以允许完全标记。

[0041] 在根据本发明的测定方法中,被标记的抗原可以是任何被标记的病毒抗原。在本发明的方法中,被标记的病毒抗原识别至少两种不同同种型的抗体,即与急性免疫应答相关联的同种型和与急性免疫应答相关联的同种型。在本发明的横向流动测定法中,病毒抗原是寨卡病毒抗原。在根据本发明的优选方法中,寨卡病毒抗原是可以结合IgM和IgG抗体的NS1多肽或其片段或变体。在根据本发明的测定方法中,被标记的抗原是通过将寨卡NS1

多肽与胶体金缀合而形成的寨卡NS1金缀合物。在此类横向流动测定法中,与成熟免疫应答相关联的同种型的抗体是抗寨卡-NS1 IgG,并且与急性免疫应答相关联的抗体是抗寨卡-NS1 IgM。

[0042] 捕获试剂是与特定类别的抗体特异性结合但不与另一类别的抗体特异性结合的试剂。重链的恒定结构域组成抗体的Fc区。抗体的Fc部分决定抗体类别。因此,用于特定同种型的捕获试剂特异性识别Fc区。捕获试剂可以是识别抗体同种型或类别的抗体或蛋白质、适体或其他特异性亲和试剂。例如,如本领域已知的蛋白G结合人IgG的所有亚类,但不结合人IgM。蛋白A仅与IgG的某些亚类以及其他类别的抗体结合。对一类抗体具有特异性的抗体也可以用作捕获试剂。例如,抗IgM抗体或其片段可用于捕获IgM。

[0043] 可以将捕获试剂固定在表面上的特定区域,以形成针对特定类别抗体的捕获区。例如,捕获试剂可以固定在横向流动测定测试条上的特定区域(region/area/zone)或线上。可以使用本领域已知的技术将捕获试剂固定到横向流动测定条的捕获区域上。

[0044] 在根据本发明的测定方法中,与成熟免疫应答相关联的抗体同种型是IgG,并且与急性免疫应答相关联的抗体同种型是IgM。两种抗体同种型均与相同的被标记的抗原结合。抗体同种型可以对抗原具有不同的亲和力,并且可以在液体生物样品中以不同的水平表达。在根据本发明的横向流动测定法中,捕获与成熟免疫应答相关联的抗体同种型的步骤发生在捕获与急性免疫应答相关联的抗体同种型的步骤之前。因此,在本发明的方法中,所使用的横向流动测定条被配置为使得成熟免疫应答抗体同种型捕获区位于急性免疫应答抗体同种型捕获区上游。

[0045] 进行根据本发明的测定方法以从生物样品中检测寨卡IgM抗体。在此类方法中,首先从生物样品中捕获IgG。将蛋白G固定在硝化纤维素膜上,以在IgM捕获线的上游捕获人IgG。蛋白G对人IgG亚类1-4表现出高亲和力,但对人IgM并非如此。此外,蛋白G线能够检测抗寨卡NS1 IgG抗体,并减少样品流过设备时以及样品穿过IgM检测线之前存在于样品中的IgG量。IgG捕获线对于设备的IgM敏感性是必需的。

[0046] 根据本发明的用于检测抗寨卡IgM的优选横向流动测定法包括以下步骤:

[0047] a) 使液体生物样品与寨卡NS1金缀合物接触以形成被标记的IgG和IgM抗体复合物;b) 使被标记的IgG抗体与蛋白G反应以捕获被标记的IgG抗体;

[0048] c) 使被标记的IgM与抗IgM抗体反应以在IgG捕获区下游捕获被标记的IgM;以及

[0049] d) 检测所捕获的IgM。

[0050] 在根据本发明的一种测定方法中,液体生物样品流过本发明的横向流动测定测试条,来自液体生物样品的抗寨卡IgG和IgM抗体与来自缀合物垫的比色寨卡NS1金缀合物接触;如果液体生物样品包含抗寨卡NS1 IgG抗体,则被标记的复合物和未标记的抗寨卡NS1 IgG抗体将在第一捕获区[104]与蛋白G结合,从而在第一捕获区产生红紫色线;如果液体生物样品不包含抗寨卡IgG抗体,则不会观察到颜色。类似地,如果液体生物样品包含抗寨卡NS1 IgM抗体,则被标记的复合物和未标记的抗寨卡NS1 IgM抗体将在第二捕获区[105](或测试线(T),如图2所示)与抗IgM抗体结合,产生一条红紫色线;如果液体生物样品不包含抗寨卡IgM抗体,则不会观察到颜色。未与任一捕获区结合的寨卡NS1金缀合物沿硝化纤维素向上移动至控制区(或控制线(C),如图2所示)。

[0051] 本发明的一些方法进一步涉及减少由于交叉反应性抗体引起的假阳性。此类方法

包括以下额外步骤：在使液体生物样品与被标记的抗原接触之前，使液体生物样品与至少一种其他抗原接触以结合交叉反应性抗体。当针对一种特异性抗原的抗体与另一种不同抗原结合时，抗原之间就会发生交叉反应。两种抗原具有相似的表位，这使一种抗原的抗体能够识别另一种抗原。交叉反应性抗体是与所研究的感染的抗原交叉反应的与所研究的感染的抗体不同的抗体。在本发明的一种方法中，至少其他抗原存在于横向流动条的阻滞剂区域上。在本发明的另一种方法中，将至少其他抗原添加到显影剂溶液中。在本发明的其他方法中，至少一种其他抗原与被标记的抗原同时与生物样品接触，或者在生物样品已经与被标记的抗原接触之后但在捕获被标记的抗原-抗体复合物的步骤之前添加。

[0052] 在本发明的方法中，被标记的抗原是被标记的寨卡NS1多肽，并且至少一种其他抗原是登革热NS1多肽。一种用于检测抗寨卡IgM的本发明的方法，本发明的方法包括以下步骤：

[0053] a) 使液体生物样品与登革热NS1多肽接触；

[0054] b) 使液体生物样品与寨卡NS1金缀合物接触以形成被标记的IgG和IgM抗体复合物；

[0055] c) 使被标记的IgG抗体与蛋白G反应以捕获被标记的IgG抗体；

[0056] d) 使被标记的IgM与抗IgM抗体反应以在IgG捕获区下游捕获被标记的IgM；以及

[0057] e) 检测所捕获的IgM。

[0058] 在上述方法的一个实施例中，将登革热NS1多肽添加到显影剂溶液中。在此类方法中，当将液体生物样品添加到显影剂溶液中时，样品在流到横向流动测定条上之前与溶液中的登革热NS1多肽接触。在另一种此类方法中，当将液体生物样品添加到样品端口时，样品在样品端口的横向流动测定条上与溶液中的登革热NS1多肽接触。在上述方法的另一个实施例案中，登革热NS1多肽存在于阻滞剂区域，并且当生物样品与显影剂溶液一起迁移至阻滞剂区域时，登革热NS1多肽从阻滞剂区域的基质中洗脱，并在溶液中与生物样品接触。不希望受任何特定理论束缚，据信与登革热NS1的预结合可阻止交叉反应性抗登革热NS1抗体稍后与寨卡NS1结合。

[0059] 横向流动测定测试条可用于本发明的检测急性感染的方法。横向流动色谱测定法、条和设备为本领域技术人员所熟知（参见例如美国专利号5,569,608、5,120,643、5,656,503、4,855,240和5,591,645；英国专利GB 2204398A和欧洲专利EP 0323605 B1），并且此类测定法可以零售或以OEM形式市售许多分析物。

[0060] 如图1所示，根据本发明的横向流动测定测试条[100]包括：a) 生物样品的样品接收区域[101]，b) 样品接收区域下游的阻滞剂区域[102]，c) 阻断剂区域下游的横向流动测定测试条上的缀合物区域[103]，包含与生物样品中的抗体特异性结合的被标记的抗原，d) 缀合物区域下游的横向流动测定试纸条上的第一捕获区或捕获线[104]，包含捕获试剂以特异性捕获与成熟免疫应答相关联的抗体同种型，e) 缀合物区域下游的横向流动测定测试条上的第二捕获区或捕获线，包含捕获试剂以特异性捕获与急性免疫应答相关联的抗体同种型，f) 可选地，第二捕获区下游的横向流动测定测试条上的控制区或控制线[106]，用以指示测定完成，以及g) 可选地，与横向流动测定测试条流体连通并且位于第二捕获区和可选的控制区下游的吸收垫[107]。

[0061] 横向流动测定测试条是指用于横向流动色谱的测试条。横向流动（色谱）测定法通

常涉及将怀疑包含待检测的分析物的液体生物样品施加至横向流动(免疫色谱)测定条的样品接收区域。测定条包括基质材料(例如,纸、硝化纤维素等,参见例如美国专利号5,569,608),悬浮或溶解于其中的测试流体和分析物可通过毛细管作用从样品接收区域穿过该基质材料流至一个或多个捕获区,其中可见信号或不可见信号表明存在或不存分析物。通常,测定条将包括用于将待检测的分析物与其特异性结合配偶体(例如,其中分析物是抗体,结合配偶体是抗原)特异性结合的装置,其用可检测的标记修饰。如果液体生物样品中存在分析物,则它将其被标记的结合配偶体结合以形成复合物,该复合物将沿着所述条流向捕获区,在该捕获区中将检测到被标记的抗体。

[0062] 横向流动测定测试条的样品接收区域是指首先向横向流动测定测试条施加样品的区域。除了接收样品之外,样品接收区域的功能可以包括例如:所施加的样品的pH控制/修改和/或比重控制/修改,可能会干扰或导致测定中的非特异性结合或引导和控制样品流向测试区域的样品组分的去除或改变。例如,设备的收集垫可用于从受试者的口腔中收集口腔液样品,然后将其放置在显影剂溶液小瓶中。收集垫将显影剂溶液与其口腔液样品一起芯吸,以进行横向流动测定测试。对于全血、血清或血浆采集,将样品直接移液到样品接收区域或采集上,然后将采集垫放置在显影剂小瓶中,以通过横向流动测定测试流动,从而运输样品。在根据本发明的特定测定方法中,将全血(例如,从指尖或静脉穿刺或针头获得的一滴全血(5 $\mu$ L至50 $\mu$ L))直接施加到样品施加区域,而无需任何类型的事先稀释或处理。

[0063] 样品接收区域可以是样品垫,并且可以由能够接收液体生物样品并且在施加时能够吸收液体样品并将液体样品传递至阻滞剂垫的任何材料制成。适用于本发明的测定条的样品垫材料还包括在美国专利号5,075,078中公开的那些施加垫材料,该美国专利以引用的方式并入本文中。用于样品施加区域的合适材料包括但不限于亲水性聚乙烯材料或垫、丙烯酸纤维、玻璃纤维、滤纸或垫、干燥纸、纸浆、织物等。

[0064] 可选地,样品接收区域可以是平垫[203],如图2所示。样品接收区域可以包括额外的样品施加构件(例如,芯)。因此,一方面,样品接收区可以包括样品施加垫以及样品施加构件。样品施加构件通常由容易吸收任何多种本文所设想的流体样品并且物理形态保持坚固的材料构成。通常,样品施加构件由诸如白色粘合聚酯纤维的材料构成。此外,将样品施加构件(如果存在)定位成与样品施加垫流体接触。流体接触可以包括重叠、邻接或交错类型的接触。样品施加构件还可以用亲水整理剂处理。通常,样品施加部件(如果存在)可以包含与示例性样品施加垫中所使用的试剂相似的试剂并且由与之相似的材料构成。液体生物样品可以直接施加到平垫[203]上。例如,平垫[203]可以插入受试者口腔中,并用作口腔液的收集垫。可以将其他流体(例如血液或血清)直接放置在平垫[203]上。液体生物样品也可以在小瓶中的显影剂溶液中稀释,并且将平垫[203]放置在小瓶中。

[0065] 本发明的测定条可以任选地包括阻滞剂垫。如本领域中已知的,阻滞剂垫包含试剂以确保设备内对各种样品基质中存在的非特异性或干扰性物质的最小反应性。阻滞剂垫可以由多种材料组成,只要它们不阻碍口腔液向横向流动测定试纸条下游流动即可。此类材料包括但不限于纸、纤维素、硝化纤维素、聚酯、玻璃纤维等。可以选择用以减少或消除试剂或口腔液从色谱测试条向毛细管基质的回流的材料。在存在缓冲剂和盐的情况下,阻滞剂垫中包含的制剂有助于调节测试线处的最终反应的pH值和离子强度。阻滞剂垫也可以用缓冲剂浸渍,以调节液体生物样品流动时的样品pH值,以及横向流动测定的兼容性。

[0066] 阻滞剂垫还可以包括一种或多种降低交叉反应性从而减少假阳性的发生的阻滞剂。在本发明的一种横向流动测定条中,阻滞剂区域包括至少一种其他抗原以结合交叉反应性抗体。例如,在本发明的用于检测抗寨卡抗体的一种横向流动测定条中,被标记的抗原是被标记的寨卡NS1多肽,并且至少一种其他抗原是登革热NS1多肽。

[0067] 阻滞剂垫上的其他示例性阻滞剂包括但不限于牛血清白蛋白(BSA)、甲基化BSA、酪蛋白、脱脂奶粉、脱氧胆酸盐和月桂酰肌氨酸。阻滞溶液还可以包含表面活性剂、防腐剂和其他试剂,以增强通过测试条的流动,改善测定结果并保护样品完整性。阻滞剂垫是通过将适量的阻滞溶液施加到垫上并干燥随后将其放置在横向流动测定测试条上制成的。

[0068] 横向流动测定测试条的缀合物区域或缀合物垫用于使标记试剂和对照试剂保持稳定状态,并促进它们与可能存在于液体生物样品中的目标分析物快速有效地溶解、移动并发生特异性反应。在根据本发明的横向流动测定测试条中,缀合物区域可以是缀合物垫。将缀合物垫放置在横向流动测定测试条上,使得液体生物样品必须穿过或通过缀合物垫以迁移到测试区或测试线。可选地,可以将缀合物区域编织到横向流动测定测试条中,或者可以与横向流动测定测试条在同一位置成列放置。与阻滞剂垫一样,缀合物垫可以由与该测定兼容并且基本上不阻碍口腔液和试剂流动的任何方便的材料(例如硝化纤维素)制成。适用于本发明的其他缀合物垫材料包括在美国专利5,075,078中公开的那些色谱材料,该美国专利以引用的方式并入文中。

[0069] 在根据本发明的横向流动测定测试条中,缀合物垫携带缀合至标记物的特异性抗原以及释放和稳定剂,以允许在测试区或测试线处检测抗原。缀合物垫还通过抑制测定设备内的非特异性结合事件来提供一定程度的控制。在根据本发明的横向流动测定测试条中,用包括阻滞剂和标记稳定剂的抗原标记溶液处理缀合物垫。阻滞剂包括以上讨论的那些。稳定剂容易获得并且在本领域中是公知的,并且可以例如用于稳定被标记的试剂。

[0070] 根据本发明的测定条包括基质材料(例如,纸、硝化纤维素等,参见例如美国专利号5,569,608),悬浮或溶解于其中的测试流体和分析物可以通过毛细管作用流过该基质材料。基质材料可以包括但不限于天然的、合成的或经过合成修饰的天然存在的材料,诸如多糖(例如,纤维素材料,诸如纸和纤维素衍生物,如醋酸纤维素和硝化纤维素);聚醚砜;尼龙;二氧化硅;无机材料,诸如失活的氧化铝、硅藻土、 $MgSO_4$ 或均匀分散在多孔聚合物基质中的其他无机细碎材料,诸如氯乙烯-氯乙烯-丙烯共聚物和氯乙烯-乙酸乙烯酯共聚物;天然存在的(例如,棉)和合成的(例如,人造丝)布;多孔凝胶,诸如硅胶、琼脂糖、葡聚糖和明胶;聚合物膜,诸如聚丙烯酰胺等。在本发明的优选测定条中,基质材料是硝化纤维素膜。不同类型的市售硝化纤维素膜(例如Millipore, HF90, GE FF120, Sartorius)具有不同的吸收能力和毛细管流动。

[0071] 在横向流动测定测试条中,基质材料可以粘附到层压背衬上。背衬可以是塑料材料,诸如例如聚酯薄膜或PVC或聚苯乙烯。在制备测定条时,可以使用本领域已知的技术将基质材料层压到塑料卡上。具有层压背衬的硝化纤维素膜是市售的。

[0072] 根据本发明的CCED条具有两个或更多个捕获区。在本发明的横向流动测定条中,捕获区包含固定的捕获试剂以通过同种型特异性捕获抗体。用于蛋白质固定以在横向流动基质上产生捕获区的技术是本领域已知的。在根据本发明的横向流动测定测试条中,横向流动测定测试条上的第一捕获区在缀合物区域的下游,以特异性捕获第一同种型的抗体。

第一捕获区在第二捕获区的上游。捕获区和存在的任何控制区应彼此足够分开(例如约5mm),以在视觉上区分不同的区。

[0073] 在根据本发明的横向流动测定测试条中,与成熟免疫应答相关联的抗体可以是IgG。IgG的捕获区(也称为IgG测试线)将结合存在于已测试样品中的IgG。蛋白G与人IgG的所有亚类结合。在根据本发明的横向流动测定测试条中,第一捕获区包括在硝化纤维素膜上被蛋白G条带化的区域。在此类横向流动测定测试条中,第一捕获区用于从生物样品中基本上耗尽IgG抗体。可以包括额外的捕获区以用于进一步检测和/或分化同种型。

[0074] 在根据本发明的横向流动测定测试条中,将横向流动测定测试条上的第二捕获区放置在第一捕获区下游。在根据本发明的横向流动测定测试条中,与急性免疫应答相关联的抗体同种型可以是IgM。IgM的捕获区(也称为IgM测试线)将结合存在于已测试样品中的IgM。在根据本发明的横向流动测定测试条中,第二捕获区包括在硝化纤维素膜上被抗IgM抗体条带化的区域。

[0075] 可选的控制区或控制线(C)包含对被标记的抗原具有特异性的抗体,所述控制区或控制线捕获多余的抗原标记,表明液体已充分迁移通过设备。在进行所有有效测试的过程中,无论样品是否对感染具有反应性或非反应性,在C线处都会出现一条红紫色线。在根据本发明的用于检测寨卡IgM的横向流动测定测试条中,控制区可以包括被抗NS1抗体条带化的硝化纤维素膜。例如,在用于检测寨卡抗体的免疫分析测试条中,控制区包含固定到硝化纤维素膜上的抗NS1抗体,并且胶体金标记的寨卡NS1抗原的可视化用于确认组分洗脱、试剂活性以及足够的设备性能。

[0076] 多余的试剂通过控制(C)线迁移到吸收垫[107]中,所述吸收垫充当多余设备流体的储存器。在横向流动测定测试设备中,吸附垫可以位于控制线的下游。来自膜的流体(包含未结合的复合物和未反应的试剂)移至吸收垫。吸收垫不仅充当设备流体的末端储存器,而且还将流体吸引到横向流动测定测试条上。吸收垫应具有足够的芯吸特性,以防止液体在测定条上回流。吸收垫可以由本领域已知的材料制成。

[0077] 本发明的用于检测寨卡病毒IgM的横向流动测定条被配置为包括:样品接收区域;在样品接收区域下游的阻滞剂区域,任选地包含登革热NS1多肽;在阻滞剂区域下游的缀合物区域,包含胶体金标记的寨卡NS1多肽;在缀合区下游的第一捕获区,包含固定的蛋白G;在第一捕获区下游的第二捕获区,包含固定的抗IgM抗体;以及可选地,在第二捕获区下游的控制线。

[0078] 可以使用本领域已知的技术来制备和组装根据本发明的测定测试条。根据本发明的测定测试条可以位于壳体中。根据本发明的测定设备包括壳体,所述壳体具有用于施加待测试的液体生物样品的样品端口,以及用于观察一个或多个捕获区和控制区的开口或窗口。例如,壳体可以具有仅观察第二捕获区和控制区的开口。

[0079] 根据本发明的测定方法和设备可以进一步使用显影剂溶液。显影剂溶液有助于液体生物样品进入设备并进入测定条的毛细管流动。显影剂溶液通常是本领域已知的表面活性剂、盐、防腐剂、缓冲剂等的水溶液。所用显影剂溶液的量应足以运输样品,但不至于淹没测定或稀释结果,以致无法确定。

[0080] 本发明还提供了包括一种或多种本文所述的测定设备的测定试剂盒以及所述试剂盒的使用方法。试剂盒可以任选地包含可用于实施本发明方法的任何缓冲剂、试剂、检测

试剂等。根据本发明的测定试剂盒包括根据本发明的测定设备和与所述设备一起使用的显影剂溶液的预测量小瓶。

[0081] 在根据本发明的寨卡感染的优选测定方法中,通过将生物液体样品直接添加到设备颈部的样品端口中来启动测定,如图2所示,并将设备的收集垫插入显影剂溶液中。显影剂溶液和液体生物样品通过色谱横向流动、水合阻滞剂和缀合物垫组分向上输送至设备,并继续通过捕获区,并通过控制线到达吸收垫。

[0082] 应当理解,本文描述的示例和实施例仅用于说明目的,并且将向本领域技术人员建议鉴于所述示例和实施例的各种修改或改变,并且所述各种修改或改变将包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求的范围之内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请的全部内容出于所有目的通过引用的方式并入本文。

[0083] 示例

[0084] 示例1

[0085] 用对人IgM具有特异性亲和力的单克隆抗体进行的横向流动测定法在横向流动测定条的测试线(第二捕获区,图1中的[105])上进行条带化。IgG捕获区(图1中的[104])在测试线上游用蛋白G进行条带化。测试了从寨卡病毒感染患者中收集的一组样品,以检测抗寨卡NS1 IgM抗体的存在。通过InBios在ZIKA Detect™ Capture ELISA中验证了人抗寨卡NS1 IgM抗体的存在与否。如下表1所示,在急性感染期间,在寨卡设备的测试线上检测到人抗寨卡NS1 IgM抗体,但在症状发作后90天之内未在收集的样品中检测到所述抗体,这表明在测试线上特异性捕获了IgM但未捕获IgG抗体。在系列抽检1043-TDS-0257中,抗寨卡NS1 IgM抗体在第3天未检测到,在19-62天之间可检测到,但在症状发作后91天减弱。在系列抽检1043-TDS-0343中,抗寨卡NS1 IgM抗体在症状发作后18至60天之间可检测到。在感染后一年之后收集样品ZIK170713C和ZIK17018B,在这两个样品中无抗寨卡NS1 IgM的可检测水平。

[0086] 表1

样品 ID	症状发作后的 天数	测试线	InBios 寨卡 IgM ELISA 的反应性
1043-TDS-0257	4	NR	NR
1043-TDS-0257V2	19	R	R
1043-TDS-0257V3	26	R	R
1043-TDS-0257V4	35	R	R
1043-TDS-0257V5	40	R	R
1043-TDS-0257V6	47	R	R
1043-TDS-0257V7	54	R	R
1043-TDS-0257V8	62	R	R
1043-TDS-0257V9	91	NR	N/A
1043-TDS-0343	3	NR	NR
1043-TDS-0343V2	18	R	R
1043-TDS-0343V3	25	R	R
1043-TDS-0343V4	32	R	R
1043-TDS-0343V5	38	R	R
1043-TDS-0343V6	46	R	R
1043-TDS-0343V7	53	R	R
1043-TDS-0343V8	60	R	R
ZIK170713C	369	NR	NR
ZIK170718C	377	NR	NR

[0088] R:反应性;NR:无反应。

[0089] 示例2

[0090] 用对人IgM具有特异性亲和力的单克隆抗体进行的横向流动测定法在横向流动测定条的测试线(第二捕获区,图1中的[105])上进行条带化。IgG捕获区(图1中的[104])在测试线上游用蛋白G进行条带化。表2显示了在横向流动设备的阻滞剂垫上存在0.5 $\mu$ g登革热NS1蛋白的测定结果。阻滞剂垫中的登革热NS1降低了观察到的与登革热阳性抗体样品的交叉反应性。

[0091] 表2

[0092]

样品 ID	无登革热 NS1	添加到阻滞剂垫中的登革热 NS1
1043-DNG-0209	R	R
1043-DNG-0212	R	R
1043-DNG-0235	R	R
1043-DNG-0256	R	NR
1043-DNG-0274	R	R
1043-DNG-0294	R	NR
0845-0074-02	R	NR
0845-0074-06	R	R
0845-0074-09	R	NR

[0093] R:反应性;NR:无反应。

[0094] 表3显示了将登革热NS1蛋白添加到显影剂溶液而不是阻滞剂垫中的测定结果。为了同样降低与登革热样品的交叉反应性,与0.5 $\mu$ g相比,需要更大量的登革热NS1,167 $\mu$ g。

[0095] 表3

[0096]

样品 ID	无登革热 NS1	添加到显影剂溶液中的登革热 NS1	添加到阻滞剂垫中的登革热 NS1
DLS16-67408	R	NR	NR
DLS16-67603	R	NR	NR
1043-DNG-0264	R	R	R

[0097] R:反应性;NR:无反应。

[0098] 表4显示了将登革热NS1蛋白固定在蛋白G线上游或下游但在IgM捕获线上游的横向流动测定条上的测定结果。在这些配置中,交叉反应性的降低并不显著。

[0099] 表4

[0100]

样品 ID	无登革热 NS1	添加到阻滞剂垫中的登革热 NS1	IgG 捕获区上游的登革热 NS1 线	捕获区之间的登革热 NS1 线
DLS 1534105	R	NR	R	R
DLS 1667586	R	NR	R	R

[0101] R:反应性;NR:无反应。

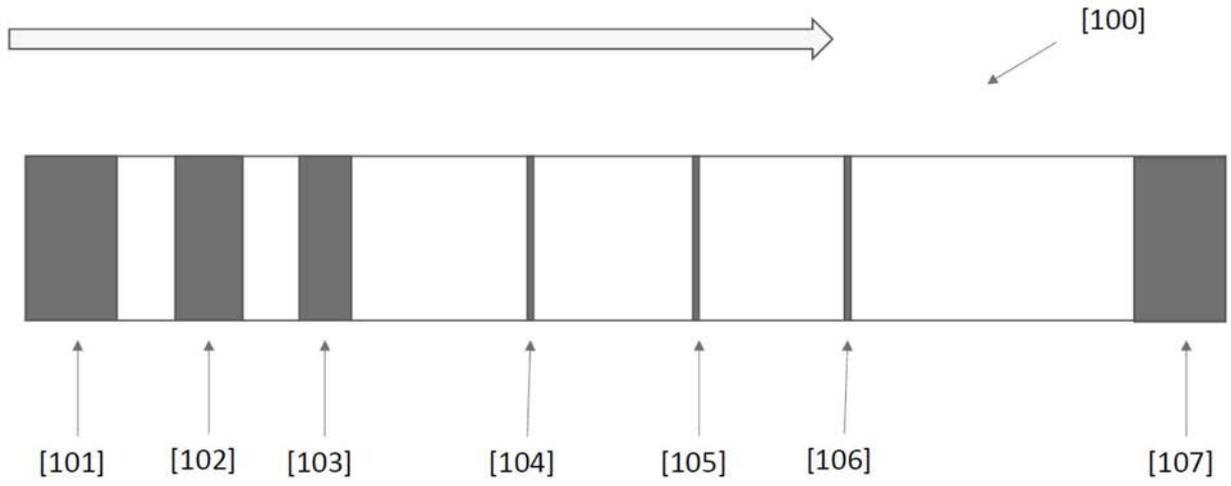


图1

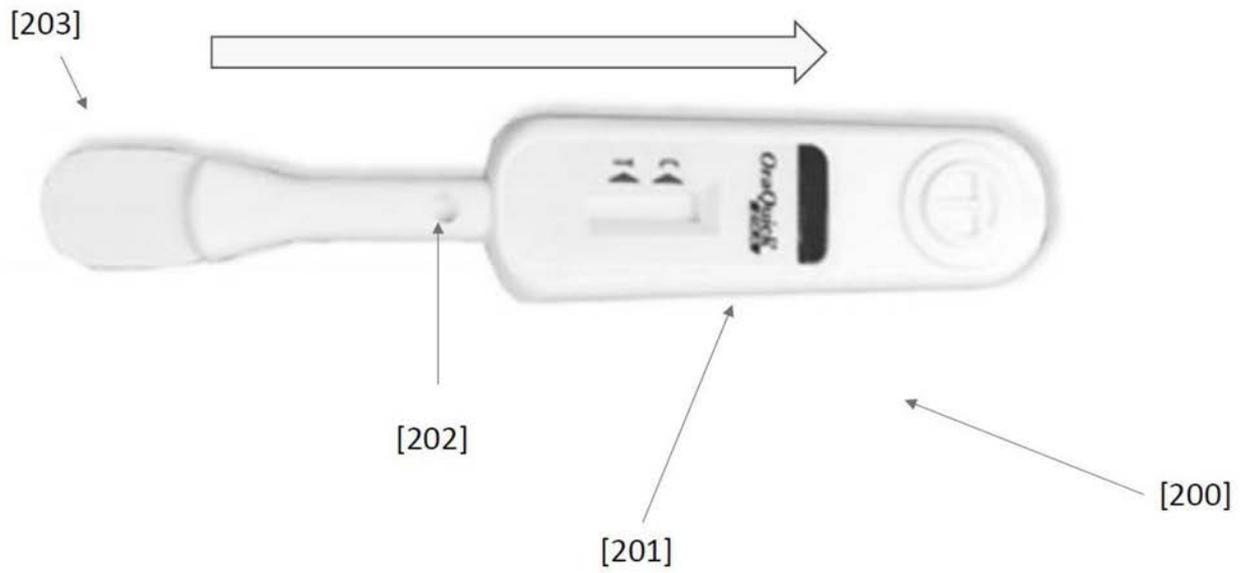


图2