

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2025 年 2 月 20 日 (20.02.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/035371 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/112994
- (22) 国际申请日: 2023 年 8 月 14 日 (14.08.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司 (SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦1-4层, Guangdong 518057 (CN)。
- (72) 发明人: 张轶 (ZHANG, Yi); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦1-4层, Guangdong 518057 (CN)。卡特鲁卡伊万 (KATRUKHA, Ivan); 俄罗斯联邦莫斯科市华沙高

速28A号, Moscow 117186 (RU)。里巴科娃纳塔利娅 (RIABKOVA, Natalia); 俄罗斯联邦莫斯科市华沙高速28A号, Moscow 117186 (RU)。刘雨青 (LIU, Yuqing); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦1-4层, Guangdong 518057 (CN)。刘君君 (LIU, Junjun); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦1-4层, Guangdong 518057 (CN)。

- (74) 代理人: 中国贸促会专利商标事务所有限公司 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市西城区复兴门内大街158号远洋大厦10层, Beijing 100031 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,

(54) Title: COMPOSITION, KIT, AND METHOD FOR DETECTING LARGE-SIZE CTNITC, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 检测大尺寸cTnITC的组合物、试剂盒和方法、及其应用

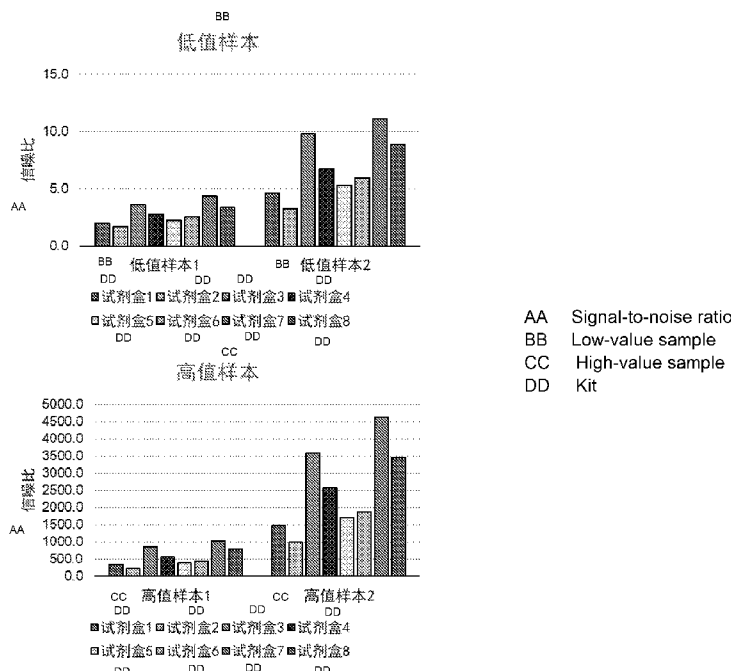


图 1

(57) Abstract: The present application relates to a composition, kit, and method for detecting a large-size cTnITC, and a use thereof. Specifically, the present application relates to a composition and kit containing an antibody specifically binding to any segment of an amino acid sequence of cTnT from position 67 to position 222 and an antibody specifically binding to any segment of an amino acid sequence of TnT, a detection method, and a use in vitro diagnosis of myocardial injury.



GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 本申请涉及检测大尺寸cTnITC的组合物、试剂盒和方法、及其应用。具体地, 本申请涉及含特异性结合cTnT第67-222位氨基酸序列中任意一段的抗体和特异性结合TnC氨基酸序列中任意一段的抗体的组合物和试剂盒、检测方法以及在体外诊断心肌损伤中的应用。

检测大尺寸 cTnITC 的组合物、试剂盒和方法、及其应用

技术领域

5 本申请涉及免疫检测领域，具体涉及用于检测大尺寸 cTnITC（大尺寸心肌肌钙蛋白三元复合物，large-size cardiac troponin ternary complex）的组合物和试剂盒、检测方法、以及它们在体外诊断心肌损伤中的应用。

背景技术

心肌肌钙蛋白（cTn）是心肌损伤的特异性标志物，可用于检测心肌梗死后或心肌梗死过程中的心肌损伤。肌钙蛋白包含三个亚基，分别为心肌肌钙蛋白 I（cTnI）、心肌肌钙蛋白 T（cTnT）、肌钙蛋白 C（TnC）。cTnI 和 cTnT 在血清中的浓度与心肌损伤的严重程度高度相关，是美国和欧洲心脏病学会推荐的心肌梗死的高特异性和高敏感型标志物。然而，导致血液中心肌肌钙蛋白浓度升高的原因有很多，除心肌梗死外，肺栓塞、急性或慢性心衰、心脏创伤、心内膜炎和心肌炎等。这降低了 cTn 对心肌梗死的临床特异性，通常

15 需要配合其他手段用于心肌梗死的诊断。
心肌肌钙蛋白通常以三元复合物 cTnITC 的形式与肌动蛋白丝结合。在心肌损伤时，肌钙蛋白从肌丝中降解下来，释放到血液中。在细胞内或血液循环中，全长的 cTnITC 经过蛋白酶降解，逐渐形成低分子量的三元复合物（LMW-cTnITC）、二元复合物（cTnIC）和游离的 cTnT。研究表明，肌钙蛋白在血液中的存在形式与个体的生理、病理状态相关联。检测不同形式的 cTnITC 复合物有助于医生更全面的掌握患者的生理、病理状态，帮助快速准确的诊断，指导患者的预后。

25 目前，心肌肌钙蛋白检测的传统的免疫学方法主要为酶联免疫吸附法（ELISA）、胶体金免疫层析法（GICA）、电化学发光法（ECL）、化学发光免疫分析法（CLIA）等技术。其中化学发光免疫分析技术的灵敏度高、特异性强、线性范围宽、操作性强、自动化程度高，是临床应用前景最广的免疫分析方法。基于化学发光免疫分析技术，现有的高敏心肌肌钙蛋白检测手段通常用于检测 cTnI 和 cTnT，无法区分肌钙蛋白复合物与游离的肌钙蛋白。在已有的文献报道中，cTnITC 复合物的双抗体夹心免疫分析方法通过捕获抗体识别二元 TnIC 复合物表位，检测抗体识别 TnT 抗原实现。这种检测方法的信噪比较低，特异性不强，难以实现对 cTnITC 复合物的快速、灵敏、特异性检测。

发明内容

本申请的任务在于，提供一种能够灵敏度高且速度快地检测样品中特定形式的 cTnITC 的技术方案，通过捕获抗体和检测抗体的配合，实现特异性检测，特别地，在捕获抗体或检测抗体中加入特异性结合 TnC 的抗体对于提高检测体系的信噪比、提升检测灵敏度是非常有利的。

5 在第一个方面，本申请提供一种用于检测样品中大尺寸 cTnITC 的组合物，包括第一组抗体和第二组抗体，其中，

所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-222 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

10 所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

在第二个方面，本申请提供一种用于检测样品中大尺寸 cTnITC 的试剂盒，包括捕获抗体和检测抗体，其中，所述捕获抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的一组，所述检测抗体选自所述第一组抗体和第二组抗体中的另一组；其中，

15 所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-222 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

在第三个方面，本申请提供一种在体外检测样品中大尺寸 cTnITC 的方法，包括以下步骤：

20 获得检测样品；

将所述待测样品与捕获抗体接触，以形成抗体-抗原复合物；

使所述抗体-抗原复合物与结合有可检测标记的检测抗体接触，以形成抗体-抗原-抗体复合物；和

25 检测所述可检测标记所产生的信号，以确定待测样品中大尺寸 cTnITC 的存在和/或含量；

其中，所述捕获抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的一组，所述检测抗体选自所述第一组抗体和第二组抗体中的另一组；

所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-222 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

30 所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

在第四个方面，本申请提供第一方面任一项所述的组合物在制备用于检测大尺寸 cTnITC 的试剂中的用途。

在第五个方面，本申请提供第一方面任一项所述的组合物、第二方面任一项所述的试剂盒或第三方面任一项所述的方法在心肌损伤体外诊断中的用途。

- 5 在第六个方面，本申请提供第一方面一种在体外诊断心肌损伤的方法，其包括采用第一方面任一项所述的组合物、第二方面任一项所述的试剂盒或第三方面任一项所述的方法检测来自受试者的样品中大尺寸 cTnITC 的步骤。

附图说明

10 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本申请的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 为对大尺寸 cTnITC 检测试剂盒信噪比分析。

图 2 为用血清样本验证大尺寸 cTnITC 检测试剂盒的特异性。

图 3 为对大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 3 的线性分析。

图 4 为对大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 4 的线性分析。

- 15 图 5 为对大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 3 与检测试剂盒 3a 的信噪比分析。

图 6 为对大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 3 与检测试剂盒 3a 对临床血清样本的检测信噪比分析。

图 7 为用血清样本验证大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 3a 的特异性。

- 20 图 8 为采用大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 3 检测的大尺寸 cTnITC 与采用现有试剂盒检测的高敏 cTnI、cTnT 的变化趋势分析。

图 9 为采用大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 3 检测的大尺寸 cTnITC 与采用现有试剂盒检测的高敏 cTnI、cTnT 的浓度变化率分析。

具体实施方式

- 25 下面将结合附图，对实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明的一部分实施例，而不是全部。以下对实施例的描述仅仅是说明性的，绝不作为对本发明的任何限制。基于实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都在本发明的保护范围内。

- 30 在本文中，除非另有说明，否则所使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明的实施方案，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含，从而使得包括一系列要素的方法或者装置不仅包括所明确记载的要素，而且还包括没有明确列出的其他要素，或者是还包括为实施方法或者装置所固有的要素。在没有更多限制的情况下，由语句“包括一个……”限定的要素，并不排除在包括该要素的方法或者装置中还存在另外的相关要素。

如本文中所使用的，术语“至少一个”意指在合理条件下的 1 个或超过 1 个，例如 2 个、3 个、4 个、5 个或 10 个等。

如本文中所使用的，术语“第一”、“第二”仅仅是区别类似的对象，不代表针对对象的特定排序，可以理解地，“第一”、“第二”在允许的情况下可以互换特定的顺序或先后次序。应该理解“第一”、“第二”区分的对象在适当情况下可以互换，以使这里描述的本申请实施例能够以除了在这里图示或描述的那些以外的顺序实施。

如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子（即结合分子与靶分子）之间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。两分子之间的结合亲和力可用 **KD** 值描述。**KD** 值是指由 **kd**（特定的结合分子-靶分子相互作用的解离速率；亦称为 **koff**）与 **ka**（特定结合分子-靶分子相互作用的缔合速率；亦称为 **kon**）之比得到的解离常数，或者指表示为摩尔浓度（**M**）的 **kd/ka**。**KD** 值越小，两分子结合越紧密，亲和力越高。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体（或对某抗原具有特异性的抗体）是指，抗体以小于大约 10^{-5} **M**，例如小于大约 10^{-6} **M**、 10^{-7} **M**、 10^{-8} **M**、 10^{-9} **M** 或 10^{-10} **M** 或更小的 **KD** 结合该抗原。用于分析抗体特异性的相应方法在例如以下文献中有描述：

Harlow&Lane(1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press 以及 **Harlow& Lane(1999)Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press**。适用研究的非限制性实例是，例如采用结构上和/或功能上密切相关的分子进行的结合研究、阻断和竞争研究。这些研究可采用以下方法进行，例如荧光激活细胞分选术（**FACS**）分析、流式细胞术滴定（**FACS 滴定**）分析、表面等离子体共振技术（**SPR**，例如使用）、等温滴定量热法（**ITC**）、荧光滴定法或放射性标记的配体结合测定法。更多的方法包括，例如免疫印迹法（**Western Blot**）、**ELISA**（包括竞争 **ELISA**）测试、**RIA** 测试、**ECL** 测试和 **IRMA** 测试。

在本文中，术语“肌钙蛋白”、“**Tn**”是肌细胞内肌纤蛋白上的一种调节钙介导的肌动蛋白和肌球蛋白之间相互反应的蛋白，存在于心肌和骨骼肌中，由肌钙蛋白 **T**（**TnT**）、肌钙蛋白 **I**（**TnI**）和肌钙蛋白 **C**（**TnC**）三种亚单位组成。其中 **TnT** 是原肌球蛋白结合亚单位，与肌动蛋白及原肌球蛋白互相作用；**TnI** 是抑制亚单位，抑制肌动球蛋白的 **ATP**

酶活性；TnC 是唯一与钙结合的亚单位，可使骨骼肌或心肌收缩。术语“心肌肌钙蛋白”、“cTn”指心脏细胞，优选心内膜下细胞，中表达的所有肌钙蛋白同种型。这些同种型在本领域中已被充分表征，例如 Anderson 1995, *Circulation Research*, vol. 76, no. 4: 681-686 和 Ferrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44: 487-493 中所述。术语“心肌肌钙蛋白”还包括
5 特定心肌肌钙蛋白的变体，此类变体至少具有与该特定心肌肌钙蛋白相同的基础生物学和免疫学特性。特别地，如果它们通过本文提及的相同特异性检测，则它们共享相同的基础生物学和免疫学特性。应当理解，肌钙蛋白的同种型可以被一同（同时或序贯）测定或单独（即完全不测定其它同种型）测定。

如本文中所使用的，术语“心肌肌钙蛋白 T”、“cTnT”指心肌肌钙蛋白 T 亚单位，
10 其氨基酸序列公开于 UniProt 数据库，编号 P45379。

如本文中所使用的，术语“心肌肌钙蛋白 I”、“cTnI”指心肌肌钙蛋白 I 亚单位，其氨基酸序列公开于 UniProt 数据库，编号 P19429。

如本文中所使用的，术语“肌钙蛋白 C”、“TnC”指肌钙蛋白 C 亚单位，其氨基酸序列公开于 UniProt 数据库，编号 P63316。

15 在本文中，术语“大尺寸心肌肌钙蛋白三元复合物 (large-size cardiac troponin)”或“大尺寸 cTnITC (large-size cTnITC)”在本文中可互换使用，意欲包括任意的 TnC 的全长蛋白或片段、cTnI 的全长蛋白或片段、cTnT 的氨基酸残基 223-287 中的一段或多段和 cTnT 的氨基酸残基 1-222 中的一段或多段所形成的复合物。

在本文中，术语“抗体”具有本领域通常理解的含义，是指通常由两对多肽链（每对
20 具有一条轻链（LC）和一条重链（HC））组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ （kappa）和 λ （lambda）轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。各重链由重链可变区（VH）和重链恒定区（CH）组成。各轻链由轻链可变区（VL）和轻链恒定区（CL）组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应子功能，如可介
25 导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）和经典补体系统的第一组分（C1q）的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域（称为互补决定区（CDR）），其间散布有较保守的称为构架区（FR）的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区（VH 和 VL）分别形成抗原结合
30 部位。氨基酸在各区域或结构域的分配可遵循 Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或

Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。在本文中，除非上下文明确指出，否则当提及术语“抗体”时，其不仅包括完整抗体，而且包括抗体的抗原结合片段。

本申请适用于不同的探测体系，包括但不限于荧光标记的反应体系，酶联免疫体系，
5 生物发光体系等。

检测试剂和方法

本申请的一个目的在于提供一种检测试剂，它能够灵敏地、特异地检测大尺寸 cTnITC
(包括 cTnITC 全长和适度水解产物，所述水解产物仍包括 cTnI、cTnT 和 TnC 亚单位或
它们的片段，以及 67-222 位 TnT 片段)、而不识别进一步水解的三元复合物、二元复合物
10 或者游离亚单位和它们的片段。

具体地，在第一个方面，本申请提供一种用于检测样品中大尺寸 cTnITC 的组合物，
包括第一组抗体和第二组抗体，其中，

所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT
第 67-222 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

15 所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨
基酸序列中任意一段的抗体。

在第一方面基础上，本申请第二个方面提供一种用于检测样品中大尺寸 cTnITC 的试
剂盒，包括捕获抗体和检测抗体，其中，所述捕获抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的
一组，所述检测抗体选自所述第一组抗体和第二组抗体中的另一组；其中，

20 所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT
第 67-222 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨
基酸序列中任意一段的抗体。

也就是说，捕获抗体至少包括抗体 1，检测抗体至少包括抗体 2；或者，捕获抗体至
25 少包括抗体 2，检测抗体至少包括抗体 1。

在本申请实施例中，所述第一组抗体不包括特异性结合 cTnT 第 223-287 位氨基酸序
列中任意一段的抗体。

在一些实施方案中，可以将捕获抗体包被于固相载体表面，例如磁珠、胶乳粒子、酶
标板、塑料珠、塑料管、免疫层析试纸条、检测卡，捕获样品中的抗原，然后用带有可检
30 测标记的检测抗体与包被于固相载体表面的捕获抗体结合，通过测定所结合的检测抗体上
可检测标记的量，确定样品中抗原的含量。

所述可检测标记可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学或化学手段检测的任何物质。特别优选的是，此类标记能够适用于免疫学检测（例如，酶联免疫测定法、放射免疫测定法、荧光免疫测定法、化学发光免疫测定法等）。这类标记是本领域熟知的，包括但不限于，酶（例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶，等）、放射性核素（例如， ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P ）、荧光染料（例如，异硫氰酸荧光素（FITC）、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明（TRITC）、藻红蛋白（PE）、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物（例如 Cy7、Alexa 750）、化学发光物质（如吖啶酯类化合物）、以及用于结合上述标记物修饰的亲合素（例如，链霉亲和素）的生物素。本发明中涵盖的标记物可通过本领域已知的方法检测。例如，放射性标记可使用摄影胶片或闪烁计数器检测，荧光标记物可使用光检测器检测，以检测发射的光。酶标记物一般通过给酶提供底物及检测通过酶对底物的作用产生的反应产物来检测。化学发光物质（如吖啶酯类化合物）一般通过给发光物质提供激发液和/或催化剂来检测发射的光。生物素一般通过给生物素提供上述标记物修饰的亲合素（例如，链霉亲和素）及检测与生物素连接的亲合素所携带的标记物来检测。在某些实施方案中，可通过不同长度的接头将如上所述的可检测标记连接至本发明的抗体或其抗原结合片段，以降低潜在的位阻。在一些实施方案中，所述可检测标记选自荧光素、化学发光物质（例如吖啶酯类化合物）、酶（例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶）、放射性同位素、生物素、胶体金和磁性颗粒。

在一些实施方案中，所述试剂盒可以进一步包含用于使相应可检测标记被检测到的试剂（所述可检测标记的底物）。例如，当所述可检测标记为酶时，所述试剂盒还可以包含相应酶的显色底物，例如用于辣根过氧化物酶的邻苯二胺（OPD）、四甲基联苯胺（TMB）、ABTS 或鲁米诺类化合物，或用于碱性磷酸酶的对硝基苯磷酸酯（p-NPP）或 AMPPD。例如当所述可检测标记为化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物）时，所述试剂盒还可以包含用于化学发光的预激发液和/或激发液。

本申请中的试剂盒特别适用于免疫测定，例如 ELISA、特别是双抗体夹心化学发光免疫分析方法。

在本申请中，大尺寸 cTnITC 的量可直接或间接检测获得。可基于检测抗体可检测标记信号，直接检测检测抗体的量或浓度，所述信号和样品中的目标抗原直接相关。此类信号本文中有时也被称为强度信号-例如可以通过测量检测抗体的特异性物理或化学性质的强度值获得。间接测量包括测量来自于次级组分（即不是检测抗体自身）或生物学读出系统的信号，例如可测量的细胞应答、配体、标记或酶促反应产物。

在第三个方面，本申请提供一种在体外检测样品中大尺寸 cTnITC 的方法，包括以下步骤：

获取待测样品；

将所述待测样品与捕获抗体接触，以形成抗体-抗原复合物；

5 使所述抗体-抗原复合物与结合有可检测标记的检测抗体接触，以形成抗体-抗原-抗体复合物；和

检测所述可检测标记所产生的信号，以确定待测样品中大尺寸 cTnITC 的存在和/或含量；

10 其中，所述捕获抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的一组，所述检测抗体选自所述第一组抗体和第二组抗体中的另一组：

所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-222 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

15 在本申请第一个方面至第三个方面中，作为一些实施方案，所述第二组抗体还包括：一个或多个抗体 3，各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnIC 的抗体；和/或，一个或多个抗体 4，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnI 第 18-210 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

20 在此，通过将所述抗体 2 与特异性识别 cTnIC 二元复合物的抗体或特异性识别 cTnI 的抗体组合，能够显著提高检测试剂信噪比。

在本申请第一个方面至第三个方面中，作为一些实施方案，在一些实施方案中，所述第一组抗体包括一个或多个所述抗体 1，所述第二组抗体包括一个或多个所述抗体 2 以及一个或多个所述抗体 3。

25 在本申请第一个方面至第三个方面中，作为一些实施方案，所述第一组抗体包括至少两个抗体 1。在一些实施方案中，所述第二组抗体包括至少两个抗体 2。在一些实施方案中，所述第一组抗体包括至少两个抗体 1；所述第二组抗体包括至少两个抗体 2 以及任选的至少两个抗体 3。多个结合相同靶蛋白的抗体的组合对于大尺寸 cTnITC 的检测是有益的。

30 本申请对抗体的结合表位进行了筛选。在一些实施方案中，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-86 位氨基酸、第 119-138 位氨基酸、第 132-151 位氨基酸、第 145-164 位氨基酸或第 171-190 位氨基酸的抗体。在一些实施方案中，各所述抗体 1 独立地选自特

异性结合 cTnT 第 119-138 位氨基酸、第 132-151 位氨基酸或第 171-190 位氨基酸的抗体。在一些实施方案中，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 119-138 位氨基酸或第 132-151 位氨基酸的抗体。

对于抗体 4 的结合表位，在一些实施方案中，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnI 第 1-15 位氨基酸、第 13-22 位氨基酸、第 18-22 位氨基酸、第 18-28 位氨基酸、第 18-35 位氨基酸、第 22-31 位氨基酸、第 22-40 位氨基酸、第 23-29 位氨基酸、第 24-40 位氨基酸、第 25-40 位氨基酸、第 26-35 位氨基酸、第 34-37 位氨基酸、第 41-49 位氨基酸、第 83-89 位氨基酸、第 86-90 位氨基酸、第 87-90 位氨基酸、第 117-126 位氨基酸、第 130-145 位氨基酸、第 169-178 位氨基酸、第 186-192 位氨基酸、第 190-196 位氨基酸或第 195-209 位氨基酸的抗体。在一些实施方案中，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnI 第 22-40 位氨基酸、第 41-49 位氨基酸或第 83-89 位氨基酸的抗体。在一些实施方案中，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnI 第 41-49 位氨基酸的抗体。

在一些实施方案中，所述捕获抗体为所述第一组抗体，所述检测抗体为所述第二组抗体。研究发现，当第一组抗体作为捕获抗体、第二组抗体作为检测抗体时，大尺寸 cTnITC 的检测具有更高的信噪比。

在本申请中，可以选择市售可得的针对特定表位的抗体，也可通过本领域一般技术手段获得本申请中对大尺寸 cTnITC 特定表位具有特异性结合活性的抗体。一个示例性的方案包括通过杂交瘤技术获得具有特异性结合活性的单克隆，具体包括两种亲本细胞的选择和制备、细胞融合、杂交瘤细胞的选择性培养和克隆化、单克隆抗体的制备、特异性鉴定及纯化等步骤。进一步，还可包括表位鉴定以及筛选的步骤，例如利用 ELISA 或表面等离子共振（SPR）等技术鉴定抗体结合表位。

应用

由于现有 cTnITC 检测试剂盒灵敏度较低，严重影响其在心肌损伤诊断中的应用。临床上也通常选择 cTnI 和 cTnT 作为心肌梗死的高特异性和高敏感型标志物。基于前述组合、试剂盒和检测方法，本申请实现了对大尺寸 cTnITC 的高敏感、高特异性的快速检测，有利于深入理解肌钙蛋白与心肌损伤的相关性。研究表明，相较于 cTnI 和 cTnT，大尺寸 cTnITC 对于心肌损伤情况更为敏感，可以作为更敏感的心肌损伤标志物，帮助疾病诊断以及预后判断。

在第四个方面，本申请提供第一方面任一项所述的组合物在制备用于检测大尺寸 cTnITC 的试剂中的用途。

在第五个方面，本申请提供第一方面任一项所述的组合物、第二方面任一项所述的试

剂盒或第三方面任一项所述的方法在心肌损伤体外诊断中的用途。

在第六个方面，本申请提供一种在体外诊断心肌损伤的方法，其包括采用第一方面任一项所述的组合物、第二方面任一项所述的试剂盒或第三方面任一项所述的方法检测来自受试者的样品中大尺寸 cTnITC 的步骤。

- 5 在一些实施方案中，所述样品为受试者体液或组织样品，例如全血、血清、血浆（包括肝素锂血浆、EDTA 血浆）、尿液、唾液、生物组织或细胞，优选全血、血清或血浆。

有益效果

1) 本申请实现了对大尺寸 cTnITC 的高敏感、高特异性的快速检测。通过选择特异性结合 TnC 的抗体作为捕获抗体或检测抗体，能够显著提高体系信噪比，提升灵敏度。

- 10 2) 由于肌钙蛋白在血液中的存在形式与个体的生理、病理状态相关联，大尺寸 cTnITC 的特异性检测有利于深入理解肌钙蛋白与疾病的相关性。实验结果显示，大尺寸 cTnITC 的变化趋势与 cTnT、cTnI 一致，具有临床价值；并且，大尺寸 cTnITC 的浓度变化率更快，对患者的心肌损伤情况更为敏感，可作为更敏感的心肌损伤标志物，帮助疾病的诊断和预后判断。

- 15 3) 本申请的组合物或试剂盒能够结合全自动化学发光仪使用，可以实现对大尺寸 cTnITC 的自动化、快速和高通量检测。

4) 本申请的试剂盒灵敏度高，特异性好，重复性好。

实施例

实施例 1 检测方法及检测试剂盒的构建

- 20 将捕获抗体-检测抗体应用于双抗体夹心化学发光免疫分析方法，构建检测试剂盒，用于检测样本中的大尺寸 cTnITC。

(1) 大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 1

捕获抗体为：抗体 1：特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138 的抗体 329cc；

检测抗体为：抗体 3：特异性结合 cTnIC 复合物表位的抗体 20C6cc。

- 25 (2) 大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 2

捕获抗体为：抗体 1：特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138 的抗体 329cc；

检测抗体为：抗体 4：特异性结合 cTnI 氨基酸片段 41-49 的抗体 19C7cc。

(3) 大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 3

捕获抗体为：抗体 1：特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138 的抗体 329cc；

- 30 检测抗体为：抗体 2：特异性结合 TnC 的抗体 7B9cc；和抗体 3：特异性结合 cTnIC 复合物表位的抗体 20C6cc。

(4) 大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 4

捕获抗体为：抗体 1：特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138 的抗体 329cc；

检测抗体为：抗体 2：特异性结合 TnC 的抗体 7B9cc；和抗体 4：特异性结合 cTnI 氨基酸片段 41-49 的抗体 19C7cc。

5 (5) 大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 5

捕获抗体为：抗体 1：特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138 的抗体 329cc；

检测抗体为：抗体 2：特异性结合 TnC 的抗体 7B9cc。

(6) 大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 6

捕获抗体为：抗体 1：特异性结合 cTnT 氨基酸片段 171-190 的抗体 1C11cc；

10 检测抗体为：抗体 2：特异性结合 TnC 的抗体 7B9cc；和抗体 3：特异性结合 cTnIC 复合物表位的抗体 Tcom8。

(7) 大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 7

捕获抗体为：抗体 1：特异性结合 cTnT 氨基酸片段 132-151 的抗体 406cc；

15 检测抗体为：抗体 2：特异性结合 TnC 的抗体 7B9cc；和抗体 3：特异性结合 cTnIC 复合物表位的抗体 20C6cc。

(8) 大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 8

捕获抗体为：抗体 1：特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138 的抗体 300cc；

检测抗体为：抗体 2：特异性结合 TnC 的抗体 7B9cc；和抗体 3：特异性结合 cTnIC 复合物表位的抗体 20C6cc。

20 实验中也使用了将所述大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 3-8 中所使用的抗体 1 替换为下述抗体得到的试剂盒：特异性结合位点在 cTnT 氨基酸 67-86 片段的抗体 7F4 或 7G7，特异性结合位点在 cTnT 氨基酸 145-164 片段的抗体 2F3、1A11 或 1F11cc。实验中也使用了将所述大尺寸 cTnITC 检测试剂盒 4 中所使用的抗体 4 替换为下述抗体得到的试剂盒：特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 18-28 片段的抗体 M18cc，特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 86-90
25 片段的抗体 16A11cc、16A12cc 或 8E10cc，特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 130-145 片段的抗体 M46，特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 190-196 片段的抗体 MF4cc。本文抗体购自海肽生物科技有限公司。

大尺寸 cTnITC 检测试剂盒包括：

30 A. 磁珠包被物工作液，用于实现对样本中大尺寸 cTnITC 的捕获。所述磁珠包被物工作液包括：包被着捕获抗体的超顺磁微粒混合物。

B. 酶标记物工作液，用于实现对超顺磁微粒捕获的大尺寸 cTnITC 抗原的检测。所

述酶标记物工作液包括：碱性磷酸酶标记的检测抗体。

大尺寸 cTnITC 的检测方法如下：

第一步：将样本与磁珠包被物工作液、酶标记物工作液添加到反应管中，经过孵育，样本中的大尺寸 cTnITC 与包被在磁珠上的抗体结合，同时抗体-碱性磷酸酶标记物与样本中大尺寸 cTnITC 结合。反应完成后，固相置于一个磁场内，磁场吸住磁珠，结合在固相上的物质被保留，洗去未结合的物质。

第二步：将化学发光底物添加到反应管内，发光底物（3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷，AMPPD）被碱性磷酸酶所分解，脱去一个磷酸基，生成不稳定的中间产物，该中间产物通过分子内电子转移产生间氧苯甲酸甲酯阴离子，处于激发态的间氧苯甲酸甲酯阴离子从激发态返回基态时，产生化学发光，再通过光电倍增管对反应中所产生的光子数进行测量。所产生光子数与样本内大尺寸 cTnITC 的浓度成正比。样本内分析物的量由校准曲线来确定。

上述大尺寸 cTnITC 检测试剂盒可以在迈瑞全自动化学发光仪 CL2000i、CL6000i、CL8000i 等机型上配套使用。

实施例 2 大尺寸 cTnITC 检测试剂盒信噪比分析

配制含有不同浓度抗原的样本，包括两个高浓度样本（高值样本）和两个低浓度样本（低值样本），其中抗原为重组心肌肌钙蛋白三元复合物（Hytest，8ITCR）。使用检测试剂盒 1-8 分别对样本进行分析。同时记录不含抗原的空白样本信号，计算信噪比。

测试结果见图 1，其中检测试剂盒 3 的信噪比显著高于检测试剂盒 1 和检测试剂盒 5，检测试剂盒 4 的信噪比显著高于检测试剂盒 2 和检测试剂盒 5，表明特异性结合 TnC 的抗体 2 与抗体 3 或抗体 4 共同使用能够显著提升信噪比；检测试剂盒 3、7 和 8 具有较高信噪比，表明特异性结合位点在 cTnT 氨基酸 119-138 位和 132-151 位的抗体 1 对于信噪比提升有明显帮助。

此外，将试剂盒 3-8 中所使用的抗体 1 替换为下述抗体：特异性结合位点在 cTnT 氨基酸 67-86 片段的抗体 7F4 或 7G7、特异性结合位点在 cTnT 氨基酸 145-164 片段的抗体 2F3、1A11 或 1F11cc，将试剂盒 4 中所使用的抗体 4 替换为下述抗体：特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 18-28 片段的抗体 M18cc、特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 86-90 片段 16A11cc、16A12cc 或 8E10cc，特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 130-145 片段的抗体 M46，特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 190-196 片段的抗体 MF4cc，均能有效反应样本的信号差异。

实施例 3 大尺寸 cTnITC 检测试剂盒特异性分析

将等浓度的不同抗原添加至健康人的血清中，并使用检测试剂盒 1-8 分别通过化学发光免疫分析方法对其进行分析。分析的抗原包括：cTnT (Hytest, 8RTT5)、cTnI (Hytest, 8RT17)、cTnIC (Hytest, 8ICR3)、cTnITC (Hytest, 8ITCR)。

实验结果见图 2，检测试剂盒 1-8 均仅能识别 cTnITC 抗原，但不能识别 cTnT、cTnI 及二元 cTnIC。此外，将试剂盒 3-8 中所使用的抗体 1 替换为下述抗体：特异性结合位点在 cTnT 氨基酸 67-86 片段的抗体 7F4 或 7G7、特异性结合位点在 cTnT 氨基酸 145-164 片段的抗体 2F3、1A11 或 1F11cc，将试剂盒 4 中所使用的抗体 4 替换为下述抗体：特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 18-28 片段的抗体 M18cc、特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 86-90 片段 16A11cc、16A12cc 或 8E10cc，特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 130-145 片段的抗体 M46，特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 190-196 片段的抗体 MF4cc，均能有效识别 cTnITC 抗原。

实施例 4 大尺寸 cTnITC 检测试剂盒空白限与检出限的建立

根据临床和实验室标准协会 (CLSI) 的建议 (EP-17A2 Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation) 建立空白限 (LoB) 与检出限 (LoD)。

LoB 测试结果来源于 5 个空白样本，运行 4 天，每次测试重复 4 次。通用公式为 $LoB = \text{平均值} + 1.65 * SD$ 。

LoD 测试结果来源于 5 个低浓度样本，运行 4 天，每次测试重复 4 次。通用公式为 $LoD = LoB + 1.65 * SD$ 。

选择试剂盒 1-8 建立空白限和检出限，测试结果见表 1。

表 1：检测试剂盒的空白限 (LoB) 与检出限 (LoD)

大尺寸 cTnITC 检测试剂盒	1	2	3	4	5	6	7	8
空白限 (LoB) (ng/L)	2.93	3.72	0.20	1.88	2.31	2.04	0.13	1.20
检出限 (LoD) (ng/L)	5.12	6.02	0.34	3.85	4.37	4.03	0.31	2.83

其中检测试剂盒 3 的空白限与检出限显著低于检测试剂盒 1 和检测试剂盒 5，其中检测试剂盒 4 的空白限与检出限显著低于检测试剂盒 2 和检测试剂盒 5，表明特异性结合 TnC 的抗体 2 的加入并与抗体 3 或抗体 4 共同使用能够显著提升试剂盒的灵敏度。

此外，将试剂盒 3-8 中所使用的抗体 1 替换为下述抗体：特异性结合位点在 cTnT 氨基酸 67-86 片段的抗体 7F4 或 7G7、特异性结合位点在 cTnT 氨基酸 145-164 片段的抗体 2F3、1A11 或 1F11cc，将试剂盒 4 中所使用的抗体 4 替换为下述抗体：特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 18-28 片段的抗体 M18cc、特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 86-90 片段 16A11cc、16A12cc 或 8E10cc，特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 130-145 片段的抗体 M46，

特异性结合位点在 cTnI 氨基酸 190-196 片段的抗体 MF4cc, 均具有较低的 LoB 和 LoD 值。

实施例 5 大尺寸 cTnITC 检测试剂盒的线性分析

检测试剂盒 3 和试剂盒 4 的信噪比高、检出限低, 被用于线性分析。

选取临床血清样本为高浓度样本, 将高浓度样本按一定比例稀释, 得到一系列稀释样

5 本, 系列稀释样本的浓度范围为 0-6000 ng/L。

使用检测试剂盒 3 通过化学发光免疫分析方法对样本进行分析。将测试浓度结果平均值和理论浓度进行线性拟合, 并计算在线性范围内相关系数。

实验结果见图 3, 稀释样本的测试浓度与理论浓度呈线性。线性范围内 (0-6000 ng/L) 的 R² 值为 0.9982。

10 使用检测试剂盒 4 通过化学发光免疫分析方法对样本进行分析。将测试浓度结果平均值和理论浓度进行线性拟合, 并计算在线性范围内相关系数。实验结果见图 4, 稀释样本的测试浓度与理论浓度呈线性。线性范围内 (0-6000 ng/L) 的 R² 值为 0.9995。

实施例 6 交换捕获抗体与检测抗体的检测试剂盒构建与测试

将检测试剂盒 3 的捕获抗体与检测抗体进行交换, 构建检测试剂盒 3a。

15 检测试剂盒 3 包括:

捕获抗体为: 抗体 1: 特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138 的抗体 329cc;

检测抗体为: 抗体 2: 特异性结合 TnC 的抗体 7B9cc; 和抗体 3: 特异性结合 cTnIC 复合物表位的抗体 20C6cc。

检测试剂盒 3a 包括:

20 捕获抗体为: 抗体 2: 特异性结合 TnC 的抗体 7B9cc; 和抗体 3: 特异性结合 cTnIC 复合物表位的抗体 20C6cc;

检测抗体为: 抗体 1: 特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138 的抗体 329cc。

25 配制含有不同浓度抗原的样本, 包括三个高浓度样本和三个低浓度样本, 其中抗原为重组心肌肌钙蛋白三元复合物 (Hytest, 8ITCR)。使用检测试剂盒 3、3a 分别对样本进行分析。同时记录不含抗原的空白样本信号, 计算信噪比。测试结果见图 5。

使用检测试剂盒 3、3a 分别对患有心血管疾病的患者的临床血清样本进行分析。同时记录健康人血清样本的信号, 计算信噪比。测试结果见图 6。其中检测试剂盒 3 的信噪比显著高于检测试剂盒 3a, 表明优选的捕获抗体和检测抗体的组合为: 捕获抗体为抗体 1 (特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138), 检测抗体为抗体 2 (特异性结合 TnC) 和抗体 3 (特异性结合 cTnIC 复合物表位), 具有该捕获抗体和检测抗体的组合的检测试剂盒的信噪比
30 更高。其中检测试剂盒 3a 信噪比较检测试剂盒 3 低, 其在不同样本中的信号差异变化规

律与检测试剂盒 3 近似。

对检测试剂盒 3a 的特异性进行分析。将等浓度的不同抗原添加至健康人的血清中，使用检测试剂盒 3a 通过化学发光免疫分析方法对其进行分析。分析的抗原包括：cTnT (Hytest, 8RTT5)、cTnI (Hytest, 8RT17)、cTnIC (Hytest, 8ICR3)、cTnITC (Hytest, 8ITCR)。实验结果见图 7。剂盒 3a 能识别 cTnITC 抗原，但不能识别 cTnT、cTnI 及二元 cTnIC。

综合看，试剂盒 3a 可以用于检测临床血清样本，试剂盒 3 在考虑整体灵敏度和特异性上的表现更优。

实施例 7 大尺寸 cTnITC 特异性免疫分析的临床性能评估

检测试剂盒 3 被用于临床性能评估。为评估使用夹心免疫测定法检测大尺寸 cTnITC 的临床性能，对心肌损伤患者不同时间点的血清样本进行动态监测。同时检测患者血清中的高敏 cTnI 和 cTnT 值。

选择有心肌损伤的患者入组，患者年龄大于或等于 18 岁。这些患者被诊断为患有心肌梗死、心衰，或经历了心脏手术治疗，表现出高敏 cTnI 或高敏 cTnT 测试值升高。患者入组后，连续 3 天采集患者的肝素锂血浆样本，使用迈瑞化学发光仪及配套试剂测试样本中的大尺寸 cTnITC 的浓度值。

结果如图 8 所示，大尺寸 cTnITC 的浓度值与高敏 cTnI、cTnT 测试值的变化趋势一致，表明大尺寸 cTnITC 的浓度值具有临床价值，可以应用于评估患者心肌损伤情况。进一步对大尺寸 cTnITC、高敏 cTnI、cTnT 的浓度变化情况进行分析，如图 9 所示，相比于 cTnI 和 cTnT，大尺寸 cTnITC 的浓度值变化速率更快，表明大尺寸 cTnITC 的浓度值变化对患者的心肌损伤情况更为敏感。

除本文中描述的那些外，根据前述描述，本发明的各种修改对本领域技术人员而言会是显而易见的。这样的修改也意图落入所附权利要求书的范围内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 一种用于检测样品中大尺寸 cTnITC 的组合物, 包括第一组抗体和第二组抗体, 其中,

所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1, 各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT (心肌肌钙蛋白 T) 第 67-222 位氨基酸序列中任意一段的抗体;

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2, 各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC (肌钙蛋白 C) 氨基酸序列中任意一段的抗体。

2. 权利要求 1 所述的组合物, 其中所述第一组抗体不包括特异性结合 cTnT 第 223-287 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

3. 权利要求 1 或 2 所述的组合物, 其中所述第二组抗体还包括:

一个或多个抗体 3, 各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnIC (心肌肌钙蛋白 IC 二元复合物) 的抗体; 和/或,

一个或多个抗体 4, 各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnI (心肌肌钙蛋白 I) 第 18-210 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的组合物, 其中所述第一组抗体包括一个或多个所述抗体 1, 所述第二组抗体包括一个或多个所述抗体 2 以及一个或多个所述抗体 3。

5. 权利要求 1-4 任一项所述的组合物, 其中各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-86 位氨基酸、第 119-138 位氨基酸、第 132-151 位氨基酸、第 145-164 位氨基酸或第 171-190 位氨基酸的抗体;

优选地, 各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 119-138 位氨基酸、第 132-151 位氨基酸或第 171-190 位氨基酸的抗体。

6. 权利要求 3-5 任一项所述的组合物, 其中各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnI 第 1-15 位氨基酸、第 13-22 位氨基酸、第 18-22 位氨基酸、第 18-28 位氨基酸、第 18-35 位氨基酸、第 22-31 位氨基酸、第 22-40 位氨基酸、第 23-29 位氨基酸、第 24-40 位氨基酸、第 25-40 位氨基酸、第 26-35 位氨基酸、第 34-37 位氨基酸、第 41-49 位氨基酸、第 83-89 位氨基酸、第 86-90 位氨基酸、第 87-90 位氨基酸、第 117-126 位氨基酸、第 130-145 位氨

氨酸、第 169-178 位氨基酸、第 186-192 位氨基酸、第 190-196 位氨基酸或第 195-209 位氨基酸的抗体；

优选地，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnI 第 22-40 位氨基酸、第 41-49 位氨基酸或第 83-89 位氨基酸的抗体；

更优选地，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnI 第 41-49 位氨基酸的抗体。

7. 一种用于检测样品中大尺寸 cTnITC 的试剂盒，包括捕获抗体和检测抗体，其中，所述捕获抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的一组，所述检测抗体选自所述第一组抗体和第二组抗体中的另一组；其中，

所述第一组抗体包括一个或多个所述抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-222 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

8. 权利要求 7 所述的试剂盒，其中所述第一组抗体不包括特异性结合 cTnT 第 223-287 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

9. 权利要求 7 或 8 所述的试剂盒，其中所述第二组抗体还包括：

一个或多个抗体 3，各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnIC 的抗体；和/或，

一个或多个抗体 4，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnI 第 18-210 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

10. 权利要求 7-9 任一项所述的试剂盒，其中所述第一组抗体包括一个或多个所述抗体 1，所述第二组抗体包括一个或多个所述抗体 2 以及一个或多个所述抗体 3。

11. 权利要求 7-11 任一项所述的试剂盒，其中所述捕获抗体为所述第一组抗体，所述检测抗体为所述第二组抗体。

12. 权利要求 7-11 任一项所述的试剂盒，其中各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-86 位氨基酸、第 119-138 位氨基酸、第 132-151 位氨基酸、第 145-164 位氨基酸或第 171-190 位氨基酸的抗体；优选地，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 119-138 位氨基酸、第 132-151 位氨基酸或第 171-190 位氨基酸的抗体；和/或

各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnI 第 1-15 位氨基酸、第 13-22 位氨基酸、第

18-22 位氨基酸、第 18-28 位氨基酸、第 18-35 位氨基酸、第 22-31 位氨基酸、第 22-40 位氨基酸、第 23-29 位氨基酸、第 24-40 位氨基酸、第 25-40 位氨基酸、第 26-35 位氨基酸、第 34-37 位氨基酸、第 41-49 位氨基酸、第 83-89 位氨基酸、第 86-90 位氨基酸、第 87-90 位氨基酸、第 117-126 位氨基酸、第 130-145 位氨基酸、第 169-178 位氨基酸、第 186-192 位氨基酸、第 190-196 位氨基酸或第 195-209 位氨基酸的抗体；优选地，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnI 第 22-40 位氨基酸、第 41-49 位氨基酸或第 83-89 位氨基酸的抗体；更优选地，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnI 第 41-49 位氨基酸的抗体。

13. 一种在体外检测样品中大尺寸 cTnITC 的方法，包括以下步骤：

获取待测样品；

将所述待测样品与捕获抗体接触，以形成抗体-抗原复合物；

使所述抗体-抗原复合物与结合有可检测标记的检测抗体接触，以形成抗体-抗原-抗体复合物；和

检测所述可检测标记所产生的信号，以确定待测样品中大尺寸 cTnITC 的存在和/或含量；

其中，所述捕获抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的一组，所述检测抗体选自所述第一组抗体和第二组抗体中的另一组：

所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-222 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

14. 权利要求 13 所述的方法，其中所述第一组抗体不包括特异性结合 cTnT 第 223-287 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

15. 权利要求 13 或 14 所述的方法，其中所述第二组抗体还包括：

一个或多个抗体 3，各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnIC 的抗体；和/或，

一个或多个抗体 4，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnI 第 18-210 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

16. 权利要求 15 所述的方法，其中所述第一组抗体包括一个或多个所述抗体 1，所述

第二组抗体包括一个或多个所述抗体 2，以及一个或多个所述抗体 3。

17. 权利要求 13-16 任一项所述的方法，其中所述捕获抗体为所述第一组抗体，所述检测抗体为所述第二组抗体。

18. 权利要求 1-6 任一项所述的组合物在制备用于检测大尺寸 cTnITC 的试剂中的用途。

19. 权利要求 1-6 任一项所述的组合物、权利要求 7-12 任一项所述的试剂盒或权利要求 13-17 任一项所述的方法在心肌损伤体外诊断中的用途。

20. 一种在体外诊断心肌损伤的方法，其包括采用权利要求 1-6 任一项所述的组合物、权利要求 7-12 任一项所述的试剂盒或权利要求 13-17 任一项所述的方法检测来自受试者的样品中大尺寸 cTnITC 的步骤。

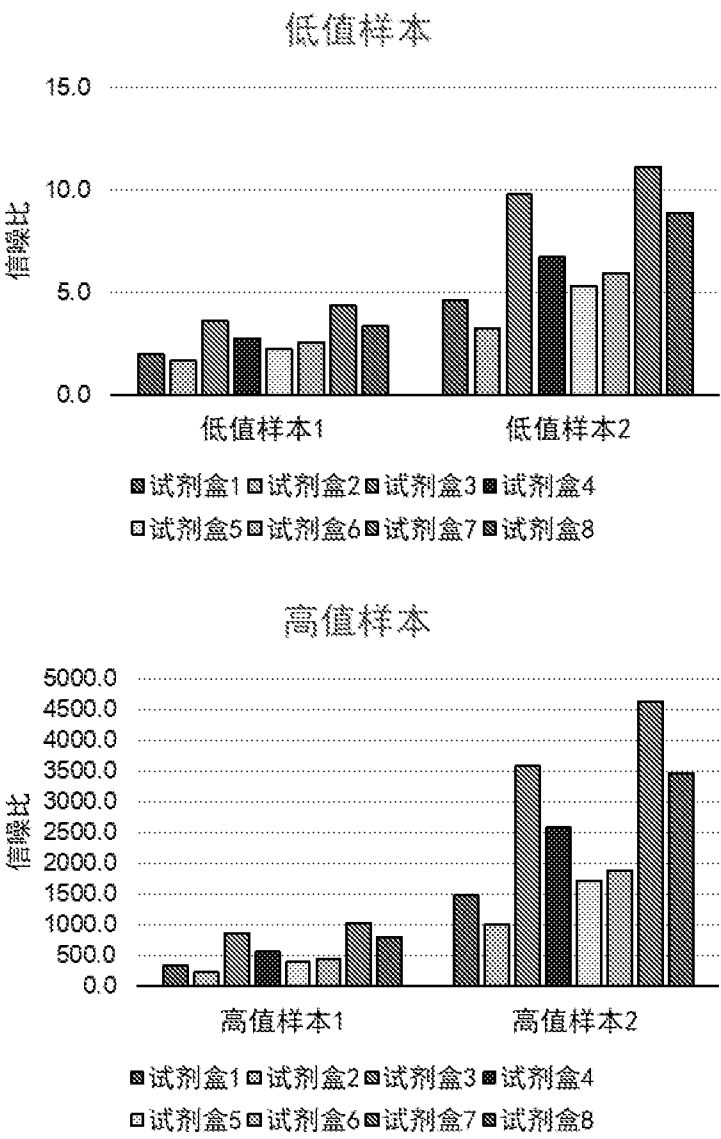


图 1

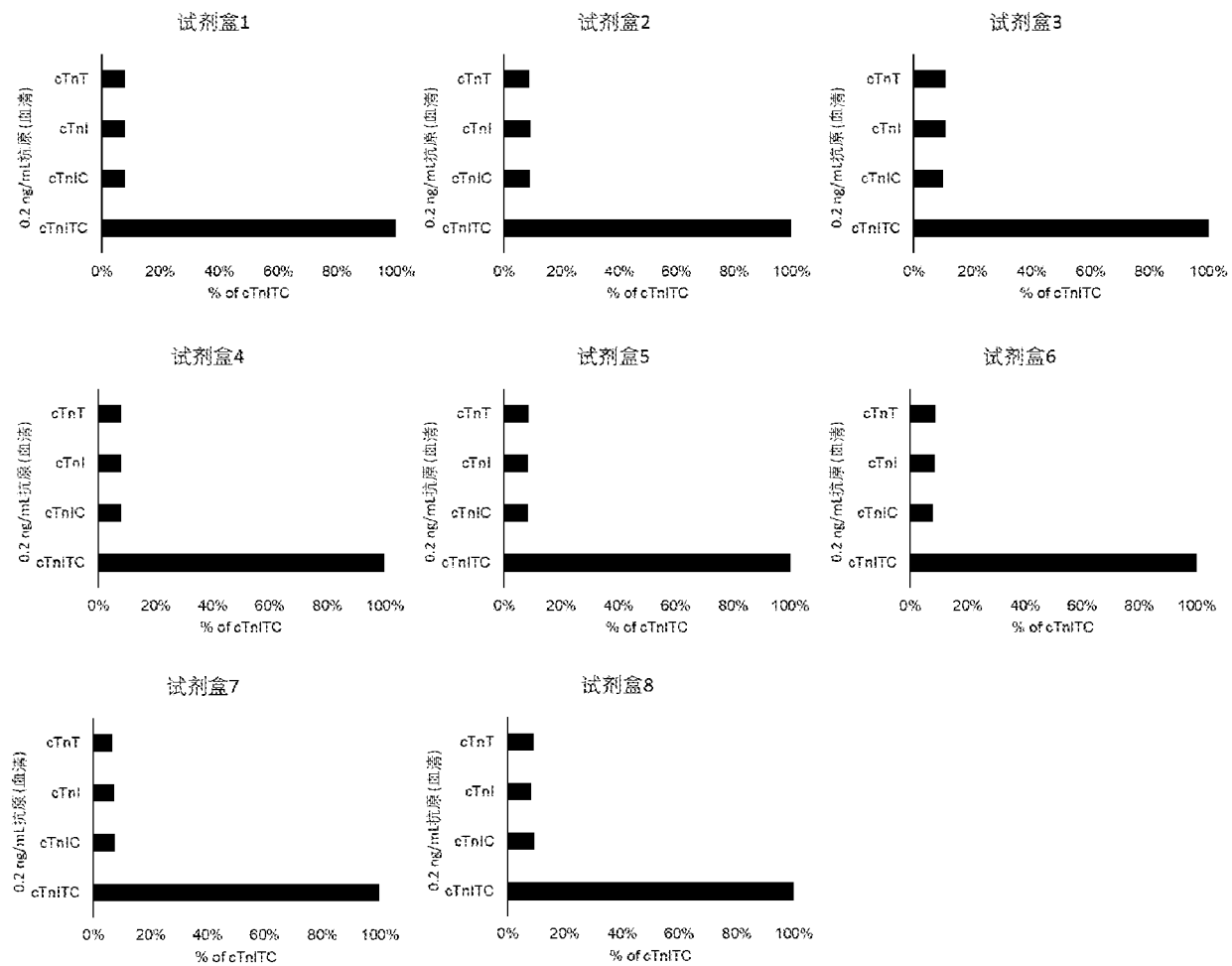


图 2

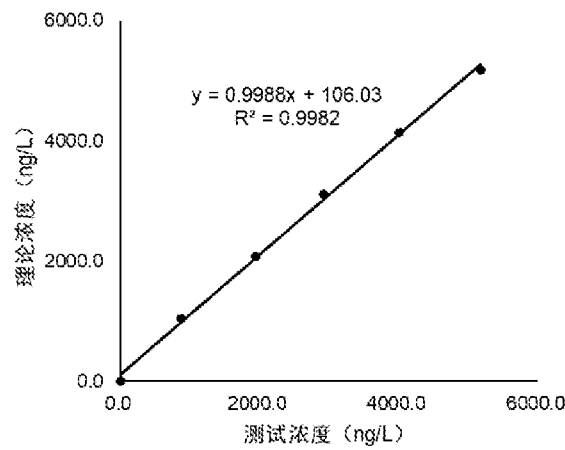


图 3

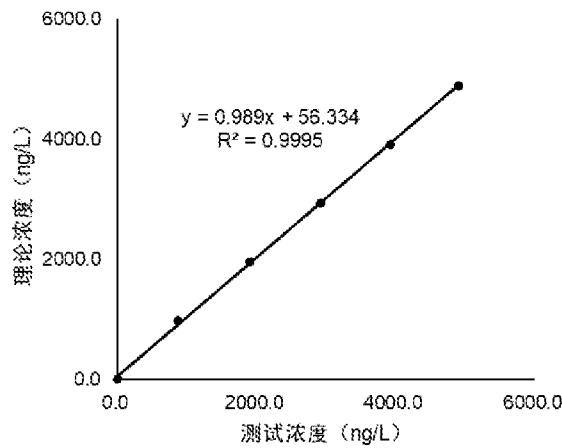


图 4

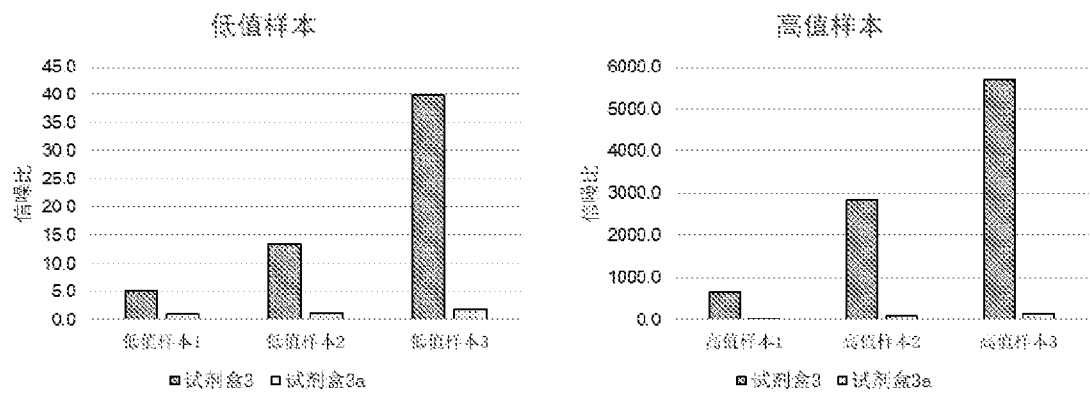


图 5

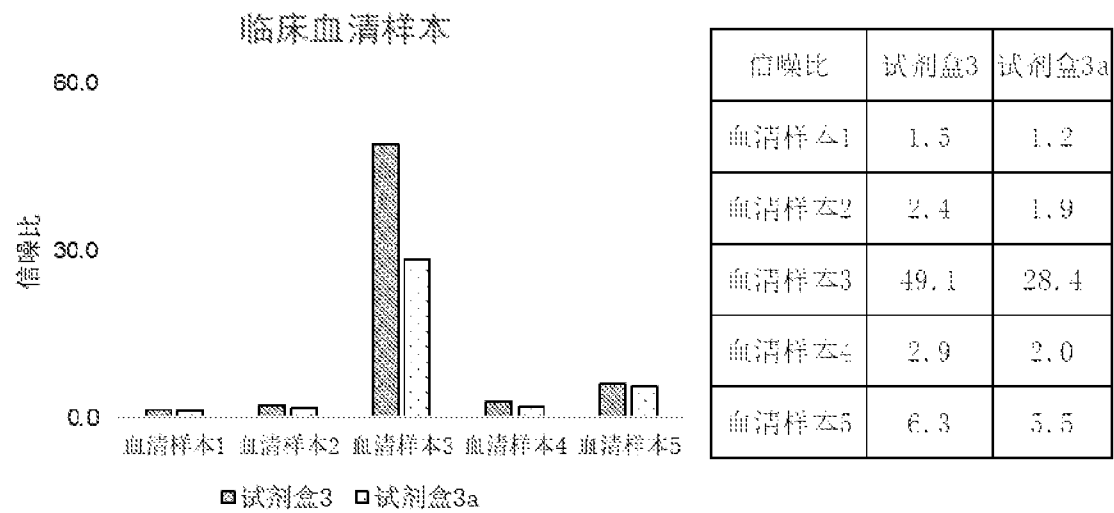


图 6

试剂盒3a

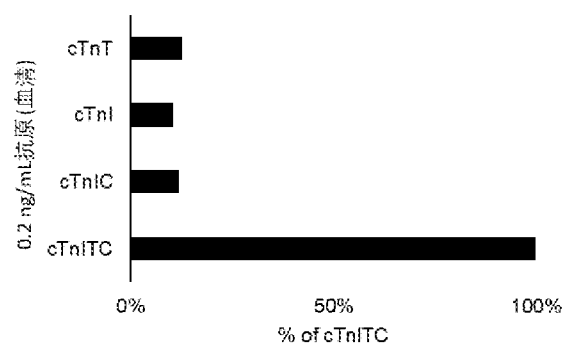


图7

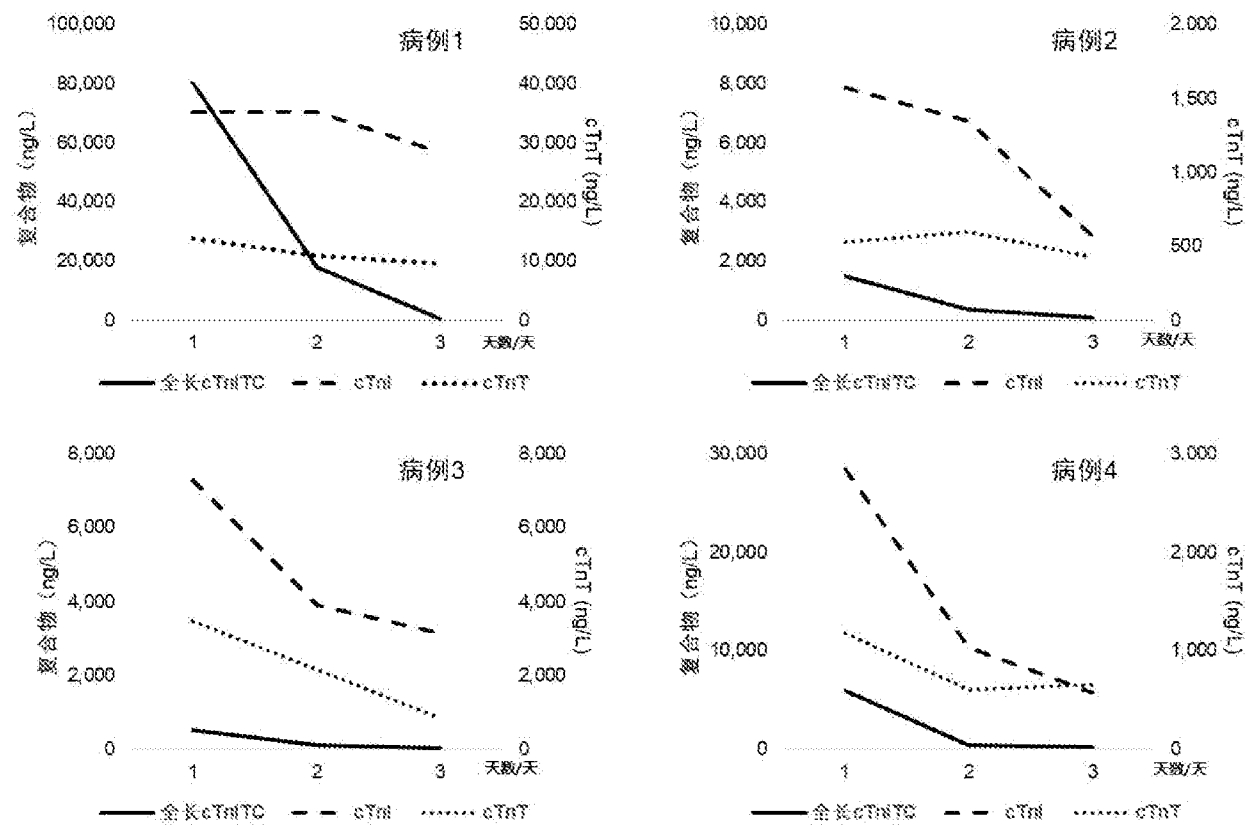


图8

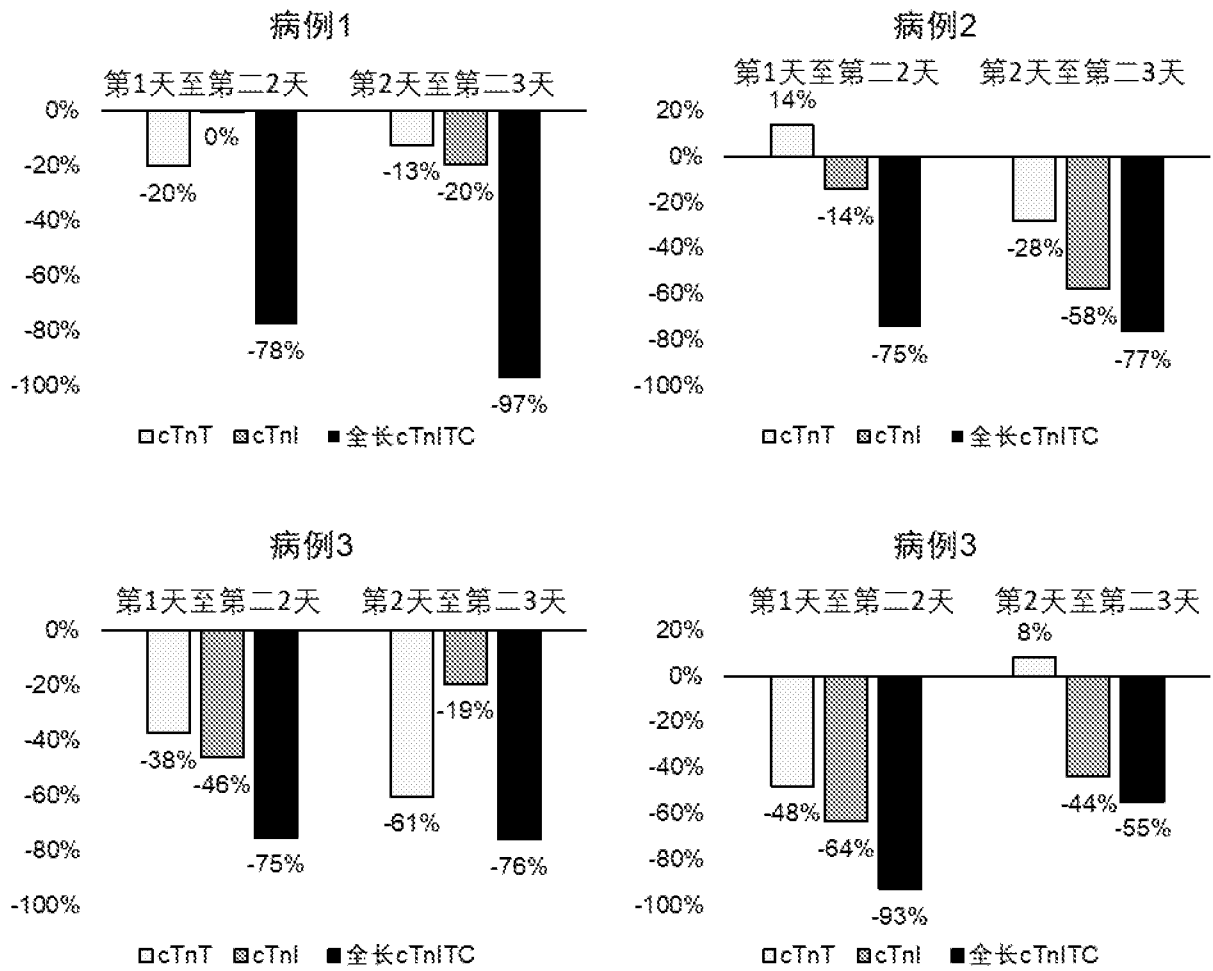


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/112994

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: G01N33 C07K7 C07K16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, CNKI, 万方, WANFANG: 肌钙蛋白, Tn, cTn, cTnI, cTnT, cTnC, cTn ITC, cTn TIC, 三元复合物, 三聚体, 三聚物, 复合物, 三元, 免疫检测, 抗体, 单抗, 多抗; VEN, WOTXT, EPTXT, USTXT, PubMed, ISI Web of Knowledge: Tn, cTn, cTnI, cTnT, cTnC, cTn ITC, cTn TIC, Troponin, compex, ternary, triplet, immunoassay, antibody

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIN, Yixin et al. "Development of a Qualitative Sequential Immunoassay for Characterizing the Intrinsic Properties of Circulating Cardiac Troponin I" <i>Clinical Chemistry</i> , Vol. 56, No. 8, 01 August 2010 (2010-08-01), 1307-1319 ISSN: 1530-8561, abstract, page 1308, right-hand column, paragraph 2 to page 1310, left-hand column, paragraph 2, page 1310, right-hand column, paragraph 3, and page 1312, left-hand column, table 1, and figure 2 and supplemental figure 6	1-20
X	WO 2009111033 A2 (AXELA INC.) 11 September 2009 (2009-09-11) claims 1-28, and description, pages 8 and 11-15, and embodiments 1 and 3	1-20
Y	US 2021231654 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 29 July 2021 (2021-07-29) description, paragraphs 97-134	1-20
Y	DAMEN, S. A. J. et al. "Cardiac Troponin Composition Characterization after Non ST-Elevation Myocardial Infarction: Relation with Culprit Artery, Ischemic Time Window, and Severity of Injury" <i>Clinical Chemistry</i> , Vol. 67, No. 1, 22 November 2020 (2020-11-22), 227-236 abstract, page 228, left-hand column to page 230, left-hand column, and figure 1	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "D" document cited by the applicant in the international application
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 April 2024

Date of mailing of the international search report

27 April 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/112994**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VYLEGZHANINA, A. V. et al. "Full-Size and Partially Truncated Cardiac Troponin Complexes in the Blood of Patients with Acute Myocardial Infarction" <i>Clinical Chemistry</i> , Vol. 65, No. 7, 01 July 2019 (2019-07-01), 882-892 page 883, left-hand column to page 884, right-hand column	1-20
A	US 2016356789 A1 (TRUE HEALTH DIAGNOSTICS LLC) 08 December 2016 (2016-12-08) entire document	1-20
A	CN 107216381 A (ZHENG ZHONGLIANG) 29 September 2017 (2017-09-29) entire document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/112994

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2009111033	A2	11 September 2009	US	2009233268	A1	17 September 2009
				US	8338189	B2	25 December 2012
				US	2013196338	A1	01 August 2013
				US	8877516	B2	04 November 2014
				EP	2265950	A2	29 December 2010
				EP	2265950	B1	23 January 2019
US	2021231654	A1	29 July 2021	WO	2019235420	A1	12 December 2019
				JPWO	2019235420	A1	17 June 2021
				JP	7370322	B2	27 October 2023
				JP	2023182782	A	26 December 2023
				EP	3805757	A1	14 April 2021
US	2016356789	A1	08 December 2016	None			
CN	107216381	A	29 September 2017	CN	107216381	B	30 April 2021

A. 主题的分类

G01N 33/68(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: G01N33 C07K7 C07K16

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CNTXT, CNKI, 万方: 肌钙蛋白, Tn, cTn, cTnI, cTnT, cTnC, cTn ITC, cTn TIC, 三元复合物, 三聚体, 三聚物, 复合物, 三元, 免疫检测, 抗体, 单抗, 多抗 VEN, WOTXT, EPTXT, USTXT, PubMed, ISI Web of Knowledge: Tn, cTn, cTnI, cTnT, cTnC, cTn ITC, cTn TIC, Troponin, complex, ternary, triplet, immunoassay, antibody

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	LIN Yixin等. "Development of a Qualitative Sequential Immunoassay for Characterizing the Intrinsic Properties of Circulating Cardiac Troponin I" Clinical Chemistry, 第56卷, 第8期, 2010年8月1日 (2010 - 08 - 01), 1307-1319 ISSN: 1530-8561, 摘要, 第1308页右栏第2段-第1310页左栏第2段, 第1310页右栏第3段, 第1312页左栏, 表1, 图2, 补充图6	1-20
X	WO 2009111033 A2 (AXELA INC.) 2009年9月11日 (2009 - 09 - 11) 权利要求1-28, 说明书第8、11-15页, 实施例1、3	1-20
Y	US 2021231654 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 2021年7月29日 (2021 - 07 - 29) 说明书第97-134段	1-20
Y	DAMEN Sander A.J.等. "Cardiac Troponin Composition Characterization after Non ST-Elevation Myocardial Infarction: Relation with Culprit Artery, Ischemic Time Window, and Severity of Injury" Clinical Chemistry, 第67卷, 第1期, 2020年11月22日 (2020 - 11 - 22), 227-236 摘要, 第228页左栏-230页左栏, 图1	1-20

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

★ 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“p” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年4月17日

国际检索报告邮寄日期

2024年4月27日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

张绚

电话号码 (+86) 020-28950282

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	VYLEGZHANINA Alexandra V.等. "Full-Size and Partially Truncated Cardiac Troponin Complexes in the Blood of Patients with Acute Myocardial Infarction" Clinical Chemistry, 第65卷, 第7期, 2019年7月1日 (2019 - 07 - 01), 882-892 第883页左栏-884页右栏	1-20
A	US 2016356789 A1 (TRUE HEALTH DIAGNOSTICS LLC) 2016年12月8日 (2016 - 12 - 08) 全文	1-20
A	CN 107216381 A (郑忠亮) 2017年9月29日 (2017 - 09 - 29) 全文	1-20

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/112994

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2009111033	A2	2009年9月11日	US	2009233268	A1	2009年9月17日
				US	8338189	B2	2012年12月25日
				US	2013196338	A1	2013年8月1日
				US	8877516	B2	2014年11月4日
				EP	2265950	A2	2010年12月29日
				EP	2265950	B1	2019年1月23日
US	2021231654	A1	2021年7月29日	WO	2019235420	A1	2019年12月12日
				JPWO	2019235420	A1	2021年6月17日
				JP	7370322	B2	2023年10月27日
				JP	2023182782	A	2023年12月26日
				EP	3805757	A1	2021年4月14日
US	2016356789	A1	2016年12月8日	无			
CN	107216381	A	2017年9月29日	CN	107216381	B	2021年4月30日