



(10) 授权公告号 CN 111868528 B

(45) 授权公告日 2024.10.01

(21) 申请号 201980019669.6

(22) 申请日 2019.04.02

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111868528 A

(43) 申请公布日 2020.10.30

(30) 优先权数据
18165380.9 2018.04.03 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.09.16

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/058224 2019.04.02

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/192978 EN 2019.10.10

(73) 专利权人 赛诺菲

地址 法国巴黎

(72) 发明人 J-M·霍利特 T·博古什
F·沃纳 H·基茨曼

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

专利代理人 沈晓书 黄革生

(51) Int.Cl.
G01N 33/543 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 204719052 U, 2015.10.21
CN 101363849 A, 2009.02.11
US 2007004658 A1, 2007.01.04

审查员 李若琳

权利要求书2页 说明书11页 附图4页

(54) 发明名称

侧向流动免疫测定条状装置

(57) 摘要

本发明涉及用于检测液体样品中的靶肽的侧向流动测定装置,包含:(a) 固体支持物,(b) 样品垫,其用于最初在固体支持物的第一端接收样品和任选对样品进行预处理,(c) 固体支持物第二端上的吸收垫,(d) 缀合物垫,其在干燥状态下包含颗粒和靶肽的可移动缀合物,其中缀合至所述颗粒的靶肽被生物素化,并且颗粒在其表面上包含生物素结合蛋白质,(e) 靶肽反应膜,其包含:(i) 捕获区,其包含针对靶肽的固定的第一捕获试剂,和(ii) 任选的对照区,其包含针对颗粒对照缀合物的固定的第二捕获试剂,其中样品垫、缀合物垫、反应膜和吸收垫装配到固体支持物上,以允许毛细管作用从样品垫通过缀合物垫流至反应膜,并且其中颗粒的靶肽的载量为颗粒最大负载容量的约20%-约55%。

1. 用于检测液体样品中靶肽的竞争性侧向流动测定装置,其包含:
 - (a) 固体支持物,
 - (b) 样品垫,其用于最初在固体支持物的第一端接收样品和任选对样品进行预处理,
 - (c) 固体支持物第二端上的吸收垫,
 - (d) 缀合物垫,其在干燥状态下包含颗粒和靶肽的可移动缀合物,其中缀合至所述颗粒的靶肽被生物素化,并且颗粒在其表面上包含生物素结合蛋白质,使得靶肽的生物素部分通过生物素与生物素结合蛋白质的相互作用缀合至颗粒,
 - (e) 靶肽反应膜,其包含:
 - (i) 捕获区,其包含针对靶肽的固定的第一捕获试剂,和
 - (ii) 任选的对照区,其包含针对颗粒对照缀合物的固定的第二捕获试剂,其中将样品垫、缀合物垫、反应膜和吸收垫装配到固体支持物上,以允许毛细管作用从样品垫通过缀合物垫流至反应膜,并且
其中,颗粒的生物素化靶肽的载量为颗粒最大负载容量的20% -55%,其中颗粒为胶体金纳米粒。
2. 权利要求1的竞争性侧向流动测定装置,其中该装置为条状装置。
3. 权利要求1的竞争性侧向流动测定装置,其中该装置为免疫色谱条状装置。
4. 权利要求1的竞争性侧向流动测定装置,其中颗粒基本上为球形,并且具有10-100nm的直径。
5. 权利要求4的竞争性侧向流动测定装置,其中颗粒基本上为球形,并且具有20-60nm的直径。
6. 权利要求5的竞争性侧向流动测定装置,其中颗粒基本上为球形,并且具有40nm的直径。
7. 上述权利要求任一项的竞争性侧向流动测定装置,其中生物素结合蛋白质选自抗生物素蛋白,链霉抗生物素蛋白和去糖基化抗生物素蛋白。
8. 权利要求7的竞争性侧向流动测定装置,其中去糖基化的抗生物素蛋白为中性抗生物素蛋白。
9. 权利要求1的竞争性侧向流动测定装置,其中颗粒的生物素化靶肽的载量为颗粒最大负载容量的20% -35%。
10. 权利要求1的竞争性侧向流动测定装置,其中所述颗粒在其表面上还包含牛血清白蛋白BSA。
11. 权利要求1的竞争性侧向流动测定装置,其中液体样品为体液,其选自尿液、血浆、全血、汗液和唾液。
12. 权利要求11的竞争性侧向流动测定装置,其中液体样品为尿液。
13. 权利要求1的侧向流动测定装置,其中靶肽为C-末端交联的端肽II型胶原蛋白CTX-II。
14. 用于检测、有利地为定量检测液体样品中的靶肽的方法,该方法包括下列步骤:
 - (a) 将所述液体样品施加到权利要求1-13任一项的装置的样品垫上,以允许样品从样品垫通过缀合物垫流至反应膜,
 - (b) 检测捕获区上缀合物的存在或其量,和

(c) 任选检测对照区上对照缀合物的存在或其量，其中捕获区上缀合物存在或不存在或检测到的量分别指示液体样品中靶肽的不存在或存在或其量。

15. 权利要求1-13任一项的装置在定量液体样品中的靶肽中的用途。

16. 权利要求1-13任一项的装置在制备用于诊断或预后疾病或病症的试剂盒中的用途。

17. 权利要求1-13任一项的装置在制备用于测定个体的软骨降解的试剂盒中的用途。

18. 权利要求1-13任一项的装置在制备用于测定患有骨关节炎的个体的软骨降解的试剂盒中的用途。

19. 权利要求1-13任一项的装置在制备用于在个体中诊断或预后疾病或病症的试剂盒中的用途,包括下列步骤:

(a) 将所述液体样品或稀释的液体样品施加到权利要求1-13任一项的装置的样品垫上,以允许样品从样品垫通过缀合物垫流至反应膜,

(b) 检测捕获区上缀合物的存在或其量,和

(c) 任选检测对照区上对照缀合物的存在或其量,

其中捕获区上缀合物的存在或不存在或检测到的量分别指示液体样品中靶肽的不存在或存在或其量,并且

其中液体样品中靶肽的不存在或存在或其量指示所述疾病或病症的诊断或预后。

20. 权利要求19的用途,其中疾病为骨关节炎,并且靶肽为CTX-II。

21. 权利要求20的用途,包括另外的步骤:

(d) 如果检测到存在的CTX-II高于预定阈值或样品中CTX-II的量高于样品中的预定阈值,则给所述个体开具包含透明质酸或其药学上可接受的盐或衍生物的粘性补充剂的处方。

22. 权利要求20的用途,包括另外的步骤:

(d) 如果检测到存在的CTX-II高于预定阈值或样品中CTX-II的量高于样品中的预定阈值,则给所述个体开具包含hylan G-F 20的粘性补充剂的处方。

23. 权利要求20的用途,包括另外的步骤:

(d) 如果在样品中检测到存在的CTX-II高于预定阈值,则给所述个体施用包含透明质酸或其药学上可接受的盐或衍生物的粘性补充剂。

24. 权利要求20的用途,包括另外的步骤:

(d) 如果在样品中检测到存在的CTX-II高于预定阈值,则给所述个体施用包含hylan G-F 20的粘性补充剂。

侧向流动免疫测定条状装置

发明领域

[0001] 本发明涉及诊断方法和装置领域,并且特别涉及侧向流动免疫测定。

[0002] 发明背景

[0003] 侧向流动测定(LFA)是诊断测定的特定形式,它易于使用,相对低廉并且快速。例如,它们可用于即时(point-of-care)诊断,并且提供对生物、环境或食品样品中的分析物例如多肽和核酸的定性或定量检测。

[0004] 侧向流动测定由色谱系统组成,其中样品的组分(例如血液或尿液)通过毛细管作用力传输至反应膜。免疫化学反应(即抗体-抗原)通常用于检测。样品通过毛细管作用力在膜上移动。标准的侧向流动测定至少具有以下四个部分:样品垫,即液体样品所施加的区域;包含合并了捕获试剂(例如抗体)的标记标签的缀合物垫;反应膜(通常是硝化纤维素膜),其包含用于靶抗原-抗体相互作用的检测线和对照线;以及保留剩余样品的吸收垫(对于综述文章,参见 **Bahadır**&Sezgintürk,Trends in Analytical Chemistry(2016) 82, 286-306;Sajid等人,J.Saudi Chem.Soc.(2015) 19,689-705;Koczula&Gallotta,Essays in Biochemistry(2016) 60,111-120)。

[0005] LFA的典型设置包括使用两种针对待检测分析物的不同抗体的夹心式免疫测定,和包含与样品中未标记分析物分子竞争的标记分析物分子的竞争性免疫测定。用于此目的的标记物包括纳米粒,例如金或碳纳米粒和乳胶珠。

[0006] 侧向流动测定可用于许多不同的分析物,包括细菌抗原(例如,参见WO 2014/059274 A1,WO 99/05524 A1)和蛋白质生物标志物,例如心肌肌钙蛋白I,肌红蛋白(例如,参见Zhu等人,Clinical Chemistry(2011) 57:12,1732-1738)和胶原蛋白端肽(例如,参见Lee等人,Sensors(2013) 13,165-174)。

[0007] 胶原蛋白的N-和C-末端端肽(分别为NTX和CTX)为骨更新的标志物(Lee等人,同上)。例如,已知II型胶原蛋白的人C-末端交联的端肽CTX-II为软骨降解,例如在关节疾病例如骨关节炎(OA)和类风湿性关节炎(RA)中的标志物(Christgau等人,Bone(2001) 29(3): 209-15;Garnero等人,Ann.Rheum.Dis.(2001) 60:619-626;Mouritzen等人,Ann.Rheum.Dis.(2003) 62:332-336)。

[0008] 用于检测CTX-II的免疫测定为商购可获得的,例如来自LifeSpan Biosciences, Inc.(Seattle,WA,USA)的竞争性EIA和夹心式ELISA试剂盒。

[0009] 然而,可利用的测定具有相对低的灵敏度和/或不能即时(POC)使用。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了具有高灵敏度、高动态范围并且可以在POC使用、例如在患者就诊期间在医师办公室使用的侧向流动免疫测定方法和装置。这与本领域中可用的方法形成对比,其中,检测仅限于医学实验室,这需要将样本从护理点送出,然后等待数小时或数天以了解结果,在此期间,护理必须在没有所需信息的情况下继续进行,否则必须暂停直到获得结果为止。

[0012] 特别地,本发明涉及用于检测液体样品中的靶肽的侧向流动测定装置,包含:

- [0013] (a) 固体支持物,
- [0014] (b) 样品垫,其用于最初在固体支持物的第一端接收样品和任选对样品进行预处理,
- [0015] (c) 固体支持物第二端上的吸收垫,
- [0016] (d) 缀合物垫,其在干燥状态下包含颗粒和靶肽的可移动缀合物,其中缀合至所述颗粒的靶肽被生物素化,并且颗粒在其表面上包含生物素结合蛋白质,
- [0017] (e) 靶肽反应膜,其包含:
- [0018] (i) 捕获区,其包含针对靶肽的固定的第一捕获试剂,和
- [0019] (ii) 任选的对照区,其包含针对对照缀合物的固定的第二捕获试剂,
- [0020] 其中将样品垫、缀合物垫、反应膜和吸收垫装配到固体支持物上,以允许毛细管作用从样品垫通过缀合物垫流至反应膜。
- [0021] 本文中有利的是,颗粒的靶肽的载量为颗粒最大负载容量的约20% - 约55%。
- [0022] 所述装置为用于免疫测定的免疫色谱装置,并且有利地为条状形式。该装置特别可以用于定量检测液体样品中的靶肽。
- [0023] 本发明进一步涉及用于检测、特别是定量检测液体样品中靶肽的方法,包括下列步骤:
- [0024] (a) 将所述液体样品施加到本发明的装置的样品垫上,以允许样品从样品垫通过缀合物垫流至反应膜,
- [0025] (b) 检测捕获区的缀合物的存在或其量,和
- [0026] (c) 任选检测对照区的对照缀合物的存在或其量,
- [0027] 其中在捕获区的缀合物存在或不存在或检测到的量分别指示液体样品中靶肽的不存在或存在或其量。
- [0028] 本发明的装置和方法在特定方面用于检测CTX-II。该装置和方法可以用于诊断和预后方法以及用于对个体进行分层的方法和/或用于治疗监测期间。在检测到CTX-II的情况下,本发明的装置和方法可以例如用于诊断或预后患有骨关节炎的患者。
- [0029] 附图描述
- [0030] 图1显示本发明的侧向流动免疫测定的示例性设置。1:样品;10:固体支持物;11:样品垫;12:缀合物垫;13:吸收垫;20:反应膜;21:检测线;22:对照线。
- [0031] 图2显示本发明的竞争性LFA的示例性但典型的设置和过程。A:在检测开始之前;B:阴性检测;C:阳性检测。1:样品。12:缀合物垫;21:检测线;22:对照线。
- [0032] 图3显示50%载有CTX-II的本发明的缀合物。
- [0033] 图4示例在不同的载量(10%、30%、50%、100%)下,颗粒上的CTX-II和样品中不同浓度的CTX-II的检测线强度。
- [0034] 图5显示样品中不同CTX-II浓度和缀合物的不同CTX-II载量(对数标度)下单元中的强度(由读取器读出)。
- [0035] 发明详述
- [0036] 本发明涉及侧向流动测定装置,特别是条状形式,用于检测液体样品、特别是生物样品例如尿液或血液中的肽分析物(寡肽、多肽、蛋白质)。该测定为竞争性免疫测定,其使用与靶肽缀合的可检测颗粒。在缀合物中,靶肽被生物素化,并且颗粒在其表面上包含生物

素结合蛋白质,使得靶肽的生物素部分通过生物素与生物素结合蛋白质的相互作用缀合至颗粒。例如,适合的颗粒包括金纳米粒,并且适合的生物素结合蛋白质包括中性抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白和抗生物素蛋白。

[0037] 本发明涉及用于检测液体样品中的靶肽的侧向流动测定装置,包含:

[0038] (a) 固体支持物,

[0039] (b) 样品垫,其用于最初在固体支持物的第一端接收样品和任选对样品进行预处理,

[0040] (c) 固体支持物第二端上的吸收垫,

[0041] (d) 缀合物垫,其在干燥状态下包含颗粒和靶肽的可移动缀合物,其中缀合至所述颗粒的靶肽被生物素化,并且颗粒在其表面上包含生物素结合蛋白质,

[0042] (e) 靶肽反应膜,其包含:

[0043] (i) 捕获区,其包含针对靶肽的固定的第一捕获试剂,和

[0044] (ii) 任选的对照区,其包含针对对照缀合物的固定的第二捕获试剂,

[0045] 其中将样品垫、缀合物垫、反应膜和吸收垫装配到固体支持物上,以允许毛细管作用从样品垫通过缀合物垫流至反应膜。

[0046] 在本发明的装置中,颗粒的靶肽的载量有利地为颗粒最大负载容量的约20%-约55%。

[0047] 该装置为用于免疫测定的装置,并且有利地为条状形式。该装置特别可以用于定量检测液体样品中的靶肽。检测区和对照区(如果存在)通常为线形。因此,它们在本文中也可以分别称为“检测线”和“对照线”。

[0048] 例如,“对照缀合物”可以例如为颗粒例如金纳米粒与对照肽的缀合物,所述对照肽然后结合在对照区上。对照肽可以有利地非共价地结合(“缀合”)至颗粒。对照区包含捕获试剂,例如针对所述对照肽的抗体或其抗原结合片段或能够结合所述对照肽的结合蛋白质。本文中有利地,对照肽为生物素化的对照肽,并且对照区包含生物素结合蛋白质,例如中性抗生物素蛋白。示例性的对照肽为牛血清白蛋白(BSA),其有利地被生物素化。有利的是,对照肽通常不会出现在待检测的样品中。对照缀合物(如果存在的话)在缀合物垫上作为靶肽的缀合物(“靶标缀合物”或“靶肽缀合物”)。靶肽缀合物和对照肽缀合物可以例如在添加至装置的缀合物垫之前混合。因此,特定的对照缀合物包含纳米粒,例如胶体金纳米粒和生物素化的对照肽,例如BSA。

[0049] 在本发明的上下文中,“肽”是通过肽(酰胺)键连接的氨基酸单体链。本文的术语“肽”包括寡肽、多肽和蛋白质。

[0050] 在本发明的上下文中,“寡肽”是由通过酰胺键彼此结合一起的通常为2至9个氨基酸残基的单(通常)线性链。在本发明的上下文中,“多肽”是通过酰胺键彼此结合在一起的许多(通常为10个或以上,特别是10-约100个)氨基酸残基的单(通常)线性链。在本发明的意义上,蛋白质也是肽。它们通常为至少50个氨基酸长度,并且可以包含多于一条的多肽链。尽管肽在大多数情况下如上所述为线性的,但在某些情况下它们也可以是支链或交联的。在本发明的上下文中,此类肽也被术语“肽”涵盖。

[0051] 侧向流动测定装置的典型设置如图1中所示。该装置具有固体支持物(10),其上装配有样品垫(11),缀合物垫(12),吸收垫(13)和反应膜(20)。固体支持物(“衬卡”)为实际测

定的垫和膜提供支持,但不参与样品和分析物的反应或流动。衬卡例如由聚氯乙烯(PVC)制成。尽管不是必需的,但是衬卡上的垫和膜的组装物通常在塑料壳中。壳体通常在样品垫上方具有至少一个用于施加样品的开口(“样品口”)。对照线和检测线是可视的(例如,通过开口或窗口)以检测或测定结合的标记物。壳体可防止使用者将样品施加到样品垫以外的任何位置。壳体还用于防止条意外溅到膜上。壳体上的外部标记还可用于指示检测线和对照线的位置并且提供其它信息。壳体可以作为现成的盒得到,也可以定制设计以配合在条周围。在这些选择之间做出选择需要平衡单元成本、设计成本、与条的尺寸相容性以及外部标记的要求。可以使用内部销钉和杆将条相对于样品口和观察窗的位置固定。当检测条运行时,它们使材料彼此紧密接触。

[0052] 用于垫的材料包括多孔基质。对于垫最常使用纤维素材料(即滤纸),例如棉绒。然而,玻璃纤维过滤物也最常用于缀合物垫。

[0053] “样品垫”在施加时接收样品,并且促进样品在缀合物垫上的均匀分布。它还可能影响液体进入缀合物垫的速率,防止装置溢流。另外,样品垫还可以包含其它组分,例如蛋白质、洗涤剂、粘度增强剂和缓冲盐,以便处理样品(例如,血样中样品组分的分离,干扰物的去除,pH值的调节,增加粘度,增溶成分和/或防止缀合物与分析物或其它组分之间或与反应膜之间的非特异性结合)。

[0054] “缀合物垫”包含颗粒和靶肽的干燥且可移动的缀合物。当样品流入缀合物垫时,缀合物脱离垫材料,并且与样品一起向前移入反应膜中。因此,样品垫在每个检测条上以恒定体积的样品将缀合物(颗粒-靶肽)递送至反应膜上。如果适用,则缀合物垫还将包含干燥且可移动的对照缀合物。

[0055] 本发明的装置具有“吸收垫”。吸收垫位于检测条的远端,并且保留剩余的样品。它通过膜芯吸流体并且收集处理过的液体。此外,它增加了进入检测条的样品的总体积。

[0056] “反应膜”在检测线和对照线上不可逆地结合捕获试剂。通常,反应膜由聚合物例如硝化纤维素、聚偏二氟乙烯、尼龙或聚醚砜制成。迄今为止,硝化纤维素为最适合反应膜的选择。硝化纤维素膜通过硝酸酯的强偶极与蛋白质内肽键的强偶极相互作用以静电方式结合蛋白质(例如抗体或生物素结合蛋白质)。

[0057] 垫并且特别是反应膜可以由盖带保护。盖带至少在检测线和对照线区域中必须是透明的。

[0058] 本文中的“捕获试剂”(在本文中也称作“生物识别分子”)是指能够特异性识别靶肽或在对照区的情况下能够特异性识别对照肽的分子。最常见地,其为抗体或其抗原结合片段,例如Fab片段。抗体可以为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0059] “第一捕获试剂”对靶肽具有特异性(与在样品中是游离(即未标记的分析物)还是与颗粒缀合(即“标记的”竞争靶肽)无关。任选的“第二捕获试剂”结合对照缀合物(肽,例如作为针对生物素化的对照肽例如BSA的捕获分子的中性抗生物素蛋白),即它是阳性对照。

[0060] 本文中的术语“分析物”是指样品中待检测或测定的靶分子。它是肽,例如蛋白质或较短的寡肽。该肽至少具有一个可以被第一捕获试剂特异性结合的表位。

[0061] “样品”可以是生物样品、环境样品或食品样品等。生物样品例如体液例如尿液、全血、唾液、汗液、血浆或血清为最常见的样品。尿液是本文的典型样品。在血样的情况下,该装置可以包含用于从血清或血浆中分离血细胞的过滤器基体。

[0062] 可以在添加到样品垫之前用稀释缓冲液稀释样品。典型的稀释度为1:2 (样品:稀释缓冲液)。典型的稀释缓冲液可以例如包含磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、BSA和/或非离子表面活性剂,例如Triton™ X-100。

[0063] 本发明的缀合物的“颗粒”用作竞争靶肽的可检测标记(例如,着色标记)。特别地,该颗粒选自胶体金纳米粒、着色乳胶珠、磁性颗粒、碳纳米粒、硒纳米粒、银纳米粒和量子点。在本发明的上下文中,胶体金纳米粒特别适用。此类金纳米粒可商购获得,例如来自Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA。

[0064] 通常,在本发明的上下文中,颗粒基本上为球形的,并且具有10-100nm,有利地20-60nm,最有利地40nm的直径。直径为40nm的金纳米粒为最有利的。

[0065] 在本发明的上下文中,“生物素结合蛋白质”可以选自抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白和去糖基化的抗生物素蛋白。去糖基化的抗生物素蛋白称作中性抗生物素蛋白,它也是本文中最适合的生物素结合蛋白质。这些生物素结合蛋白质为商购可获得的,例如来自Thermo Fisher Scientific。

[0066] 可以使用可商购获得的(例如来自Thermo Fisher Scientific)标准生物素化试剂(例如生物素正羟基琥珀酰亚胺酯(生物素-NHS))将待缀合至颗粒(例如金颗粒)的靶肽和对照肽进行生物素化。

[0067] 在制备靶肽缀合物的过程中,颗粒例如金纳米粒与生物素结合蛋白质完全缀合,即颗粒的表面被生物素结合蛋白质饱和。可以添加牛血清白蛋白(BSA)来阻断非特异性相互作用。因此,该颗粒可以在其表面上进一步包含牛血清白蛋白(BSA)。生物素结合蛋白质(例如中性抗生物素蛋白)通常能够结合四个生物素分子。这种能力可用于使生物素化的靶肽间接缀合至颗粒,并且调节颗粒的靶肽的载量(即包被)。在将生物素化的靶肽添加到颗粒和生物素结合蛋白质的复合物中之后,可以任选将游离生物素添加到溶液中以使生物素结合蛋白质的游离生物素结合位点饱和。

[0068] 本发明人已经发现,颗粒的生物素化的靶肽的亚最大载量(包被)导致在灵敏度和动态范围方面的最佳结果。因此,在本文中适合的是,颗粒的靶肽载量(包被)为颗粒的最大负载(包被)容量的约20%-约55%、通常为颗粒的最大负载(包被)容量的约25%-约50%,更通常为颗粒的最大载量(包被)容量的约25%-约45%、甚至更通常为颗粒的最大负载(包被)容量的约25%-约40%,更适合地为颗粒的最大负载(包被)容量的约25%-约35%,并且最合适为颗粒的最大负载(包被)容量的约30%。通常,由于生物素结合蛋白质例如中性抗生物素蛋白可以结合最多四个生物素分子,因此可以基于上述百分比来计算以绝对数值表示的颗粒的靶肽的载量。例如,1mL 40nm金纳米粒OD 1(在526nm)的溶液在其表面上具有约 4.17×10^{-11} mol中性抗生物素蛋白的最大结合容量。这相当于约 1.67×10^{-10} mol生物素(或生物素化靶肽)/mL 40nm金颗粒溶液。因此,生物素化靶肽的30%载量相当于约 5.2×10^{-11} mol生物素化靶肽/mL 40nm金颗粒溶液(OD 1, 在526nm)。

[0069] 试剂例如靶缀合物和任选的对照缀合物以及捕获分子可被分配到垫或反应膜上,例如通过使用适合的分配器平台来进行。例如,可以将缀合物喷雾到缀合物垫上,然后使垫干燥,从而在缀合物垫上产生干燥但可移动的缀合物。

[0070] 本发明还涉及用于检测液体样品中靶肽的方法,包括下列步骤:

[0071] (a) 将所述液体样品施加到本发明的装置的样品垫上,以允许样品从样品垫通过

缀合物垫流至反应膜，

[0072] (b) 检测捕获区上缀合物的存在或其量，和

[0073] (c) 任选检测在对照区上对照缀合物的存在或其量，

[0074] 其中在捕获区上缀合物存在或不存在或检测到的量分别指示液体样品中靶肽的不存在或存在或其量。

[0075] 该方法特别可用于定量样品中的靶肽。

[0076] 因此，当实施本发明的方法时和/或当使用本发明的装置用于检测或定量靶肽时，将样品（或视情况而定的稀释样品）添加到样品垫中（例如如果使用壳体，则通过样品口）。然后，样品将通过缀合物垫运输到反应膜。在缀合物垫上，缀合物将被溶解并且运输到反应膜。检测线的强度取决于原始样品中分析物（即靶肽）的浓度。样品中的浓度越低，则强度越强，这归因于样品中缀合的靶肽与靶肽之间的竞争。附图2示例了该测定。

[0077] 可以使用可商购获得的适合的读出器（例如，来自 opTricon GmbH, Berlin, Germany）来检测检测线（以及视情况而定的对照线）处的强度。本发明的装置可以适合于特别的读出器，例如通过具有特别的形状和尺寸。

[0078] 此外，本发明涉及用于检测液体样品中的靶肽的试剂盒，其包含本发明的装置。该试剂盒可以进一步包含一个或多个容器，该容器包含稀释缓冲液，用于在添加到装置和/或将样品或稀释的样品添加到样品垫的移液管之前稀释样品。该试剂盒还可以包含使用说明书。

[0079] 本发明的装置或本发明的试剂盒可以用于定量液体样品中的靶肽。取决于靶肽的性质，该装置和试剂盒可以用于疾病或病症的诊断或预后。例如，可以在本发明的上下文中测定指示特别疾病、病症或预后的生物标志物（例如肽激素，标志物蛋白质）。特别地，本发明的装置、试剂盒和方法可以用于个体的诊断、预后、风险评估、风险分层、监测和/或治疗对照。本文中的术语“个体”是指活的人或非人动物，例如哺乳动物，特别是人。个体最适合地为患者。如本文所用，术语“患者”是指正在接受医疗护理或由于疾病或医疗状况而应当接受医疗护理的活的人或非人动物（通常为人）。这包括没有明确疾病的正在接受病理指标检查的人。因此，本文所述的方法和测定适用于人和兽疾病。

[0080] 在本发明的上下文中，“诊断”涉及个体的疾病或临床状况的识别和（早期）检测，并且还可以包括鉴别诊断。在某些实施方案中，疾病或临床状况的严重性的评估也可以被术语“诊断”涵盖。

[0081] “预后”涉及对患有特别疾病或临床状况的个体的结果或特定风险的预测。这可以包括对所述个体的恢复机会或不良结果的机会的估计。

[0082] “监测”或“治疗监测”涉及保持追踪已经诊断出的疾病、障碍、并发症或风险，例如分析疾病的进展或特定治疗对疾病或障碍的进展的影响。在本发明中，术语“风险分层”涉及根据个体的进一步预后将个体分为不同的风险组。风险分层还涉及采取预防和/或治疗措施的分层。

[0083] 在本发明的上下文中，术语“患者处置”是指：

[0084] • 允许住院或重症监护病房的决定，

[0085] • 将患者转移到专科医院或专科医院病房的决定，

[0086] • 从重症监护病房或医院提早出院的评估，和/或

[0087] • 资源分配(例如临床医师和/或护理人员、诊断、治疗、手术)。

[0088] 术语“疾病严重性评估”涉及对患者的疾病状况的评估,包括疾病的进展,不良事件的可能性,高额住院费用的可能性以及长期住院或康复的可能性。

[0089] 因此,本发明在一个方面涉及诊断或预后疾病或病症的方法,包括下列步骤:

[0090] (a) 将所述液体样品施加到本发明的装置的样品垫上,以允许样品从样品垫通过缀合物垫流至反应膜,

[0091] (b) 检测捕获区上缀合物的存在或其量,和

[0092] (c) 任选检测在对照区上对照缀合物的存在或其量,

[0093] 其中在捕获区上缀合物的存在或不存在或检测到的量分别指示液体样品中靶肽的不存在或存在或其量,并且

[0094] 其中液体样品中靶肽的不存在或存在或其量指示所述疾病或病症的诊断或预后。

[0095] 鉴于目前可用于测量骨关节炎破坏程度的研究的局限性(例如,关节间隙狭窄的放射学评估只是软骨损失的间接指标),人们非常赞赏软骨降解的生物学标志物。例如,靶肽可以是C-末端交联的端肽II型胶原蛋白(CTX-II),其为软骨降解和用于诊断关节疾病例如骨关节炎(OA)和类风湿性关节炎(RA)、特别是OA的标志物。

[0096] II型胶原蛋白为软骨中的主要胶原蛋白,并且可被软骨细胞和滑膜细胞分泌的蛋白水解酶降解。从这些酶的作用释放的CTX-II肽在尿液中被清除。因此,尿液CTX-II是早期软骨降解的生化敏感性标志物,通常针对患有骨关节炎或类风湿性关节炎的个体(Garnero等人,2000;同上)。

[0097] 因此,该装置可以用于检测个体(通常为患有骨关节炎,特别是膝或髌的骨关节炎,更特别是膝骨关节炎的患者)的软骨降解,并且取决于软骨疾病的存在或程度,可以做出使用某些药物治疗个体的决定。

[0098] 用于治疗与软骨降解相关的疾病、特别是骨关节炎(例如膝或髌的骨关节炎,通常为膝骨关节炎)并且特别是治疗与骨关节炎相关的疼痛的适合的药物为粘性补充剂,其包括透明质酸(也称作透明质烷(HA))或其药学上可接受的盐或衍生物,例如透明质酸钠。HA通常例如通过交联被修饰。基于HA的粘性补充剂通常通过关节内施用,例如注射入膝关节的关节内间隙。特别的透明质烷为“hylan G-F 20”,其包含在产品中,例如**Synvisc®**和**Synvisc-One®**(Sanofi)。这类粘性补充剂和相应的剂量和施用方案描述在例如US 7,931,030 B1和WO 2006/073835 A2中。

[0099] HA可以是动物来源的,例如来自公鸡冠或脐带,或非动物来源的,例如通过细菌发酵。细菌发酵的HA可以如例如Cooney等人(1999)Biotechnol.Prog.,15:898-910中所述制备。细菌发酵的HA也可商购获得(例如Shiseido,Japan;Sigma-Aldrich,USA)。如上所述,HA可以是衍生的(例如,交联的或修饰的或稳定的)或非衍生的。交联剂的实例包括醛、环氧化物、polyaziril、缩水甘油醚(例如1,4-丁二醇二缩水甘油醚)和二乙烯基砜。

[0100] 因此,在本发明的上下文中,术语“透明质酸”、“透明质烷”和“HA”也包括透明质酸的药学上可接受的盐或衍生物,并且特别是“hylan GF 20”,并且更特别为产品**Synvisc®**和**Synvisc-One®**(Sanofi)。

[0101] 因此,本发明还涉及治疗个体的与软骨疾病相关的疼痛(即减轻与软骨疾病相关

的疼痛),特别是与骨关节炎,更特别地是髌或膝的骨关节炎,并且特别是膝的骨关节炎相关的疼痛的方法。该方法包括使用本发明的装置测定所述个体的尿液样品中CTX-II的浓度,其中取决于尿液样品中CTX-II的浓度,用透明质酸、例如hylan GF 20例如**Synvisc®**或**Synvisc-One®**治疗患者,或不使用它们,或者其中使用透明质酸例如hylan G-F 20、例如**Synvisc®**或**Synvisc-One®**的治疗方案基于所述样品中的CTX-II浓度测定。通常将包含透明质酸的药物,例如hylan G-F 20,例如**Synvisc®**或**Synvisc-One®**注射入受影响的关节,特别是膝或髌。类似地,本发明涉及透明质酸、例如hylan G-F 20、例如**Synvisc®**或**Synvisc-One®**,其用于在个体中治疗与软骨疾病相关的疼痛,特别是与骨关节炎相关的疼痛,更特别是与髌或膝的骨关节炎相关的疼痛,并且特别是与膝的骨关节炎相关的疼痛,其中使用本发明的装置测定所述个体的尿液样品中的CTX-II浓度,并且其中取决于尿液样品中CTX-II的浓度,用透明质酸例如hylan GF 20例如hylan G-F 20、例如**Synvisc®**或**Synvisc-One®**治疗患者,或不使用它们,或者其中使用透明质酸、例如hylan G-F 20、例如**Synvisc®**或**Synvisc-One®**的治疗方案基于所述样品中的CTX-II浓度测定。

[0102] 因此,在根据本发明诊断或预后疾病或病症的方法的上下文中,所述方法可以包括另外的步骤:

[0103] (d) 如果在样品中检测到高于预定阈值的CTX-II的存在,则向所述个体开具包含透明质酸或其药学上可接受的盐或衍生物例如hylan G-F 20的粘性补充剂的处方。

[0104] 此外,在根据本发明诊断或预后疾病或病症的方法的上下文中,所述方法可以包括另外的步骤:

[0105] (d) 如果在样品中检测到高于预定阈值的CTX-II的存在,则向所述个体施用包含透明质酸或其药学上可接受的盐或衍生物例如hylan G-F 20的粘性补充剂。

[0106] 因此,本发明进一步涉及包含透明质酸或其药学上可接受的盐或衍生物例如hylan G-F 20的粘性补充剂,其用于在个体中治疗与软骨疾病例如骨关节炎相关的疼痛,其中使用本发明的侧向流动测定装置测定所述个体的尿液样品中CTX-II的浓度,并且其中取决于尿液样品中CTX-II的浓度,给所述个体施用粘性补充剂。

[0107] 换句话说,本发明进一步涉及包含透明质酸或其药学上可接受的盐或衍生物例如hylan G-F 20的药物组合物,其用于在个体中治疗与软骨疾病例如骨关节炎相关的疼痛,其中使用本发明的侧向流动测定装置测定所述个体的尿液样品中CTX-II的浓度,并且其中取决于尿液样品中CTX-II的浓度,将药物组合物施用于所述个体。

[0108] 因此,并且如上所述,本发明还涉及在个体中治疗与软骨疾病例如骨关节炎相关的疼痛的方法,该方法包括如果使用本发明的侧向流动测定装置在所述个体的样品、特别是尿液样品中检测到CTX-II的存在高于预定阈值,则给所述个体施用包含透明质酸或其药学上可接受的盐或衍生物例如hylan G-F 20(例如**Synvisc®**或**Synvisc-One®**)的粘性补充剂。

[0109] 在一个方面,本发明涉及用于检测尿液样品中的CTX-II的侧向测定装置,其包含:

- [0110] (a) 固体支持物,
- [0111] (b) 样品垫,其用于最初在固体支持物的第一端接收样品和任选对样品进行预处理,
- [0112] (c) 固体支持物第二端上的吸收垫,
- [0113] (d) 缀合物垫,其在干燥状态下包含颗粒(特别是金纳米粒)和CTX-II的可移动缀合物,其中缀合至所述颗粒的CTX-II被生物素化,并且该颗粒在其表面上包含生物素结合蛋白质(特别是中性抗生物素蛋白),
- [0114] (e) 反应膜,其包含:
- [0115] (i) 捕获区,其包含针对靶肽的固定的第一捕获试剂(特别是抗体),和
- [0116] (ii) 任选的对照区,其包含针对对照缀合物(特别是生物素化的BSA)的固定的第二捕获试剂(特别是中性抗生物素蛋白),
- [0117] 其中将样品垫、缀合物垫、反应膜和吸收垫装配到固体支持物上,以允许毛细管作用从样品垫通过缀合物垫流至反应膜。
- [0118] 本文中适合的是,颗粒(特别是金纳米粒)中CTX-II的载量(包被)为颗粒的最大负载(包被)容量的约20%-约55%、通常为颗粒的最大负载(包被)容量的约25%-约50%、更通常为颗粒的最大负载(包被)容量的约25%-约45%、甚至更通常为颗粒的最大负载(包被)容量的约25%-约40%、更适合地为颗粒的最大负载(包被)容量的约25%-约35%、并且最适合地为颗粒的最大负载(包被)容量的约30%。
- [0119] 可以通过免疫接种动物例如兔来产生针对CTX-II的多克隆抗体。然后可以例如通过使用亲和色谱法例如从动物的血清中纯化抗体。用于产生单克隆或多克隆抗体的方法为本领域众所周知的。
- [0120] 当测定尿液样品中靶肽的浓度时,由于尿肌酐在个体中(在没有肾疾病的情况下)相对恒定,因此作为校准品可以另外测定所述样品中肌酐的浓度。为此目的,该装置可以另外包含用于比色或荧光测定以测定肌酐的反应区(“肌酐反应区”)。可以将一部分样品(或视情况而定的稀释样品)添加到肌酐测定中以测定肌酐浓度。特别地,其应用于本发明的用于检测CTX-II的装置和方法。
- [0121] 肌酐测定可以为例如条状形式的侧向流动测定,其平行于本发明的侧向流动免疫测定排布在装置中。因此,肌酐测定可以包含样品垫和反应区(类似于侧向流动免疫测定的反应膜)。
- [0122] 肌酐测定通常为“干化学”检测,即,该测定包含处于干燥状态的可移动指示剂染料(或染料组合物),例如在另外的样品垫上干燥。用于检测肌酐的典型染料组合物包含可氧化的染料(例如喹啉)、 Cu^{2+} 离子和羟基过氧化物。当样品中存在肌酐时,铜离子与肌酐之间会形成配合物。在羟基过氧化物的存在下,该 Cu^{2+} -肌酐配合物氧化染料,特别是喹啉。染料的氧化会导致颜色变化,这可以使用读出器检测。适合用于检测肌酐的测定描述在例如US 5,374,561和US 6,001,656中。

实施例

- [0123] 实施例1:CTX-II-中性抗生物素蛋白-金缀合物的制备
- [0124] 所有温育步骤(偶联、封闭、饱和等)均在室温在摇杯(tumbler-shaker)中进行。

[0125] 步骤1-中性抗生物素蛋白-金缀合物:

[0126] 将7.5 μg 中性抗生物素蛋白/1mL 40nm胶体金OD_{526nm} 1溶液在5mM硼酸钠缓冲液中偶联2小时。随后,将溶液用1%BSA封闭30分钟。离心(包括用1%BSA洗涤的步骤)后,将缀合物沉淀重悬于含1%BSA的2mM硼酸盐缓冲液中,并且在0.22 μm 过滤。得到中性抗生物素蛋白-金缀合物。推定中性抗生物素蛋白-金缀合物具有2.5 μg 中性抗生物素蛋白/mL金颗粒的载量。考虑到中性抗生物素蛋白的分子量(60000g/mol),这相当于 4.17×10^{-11} mol中性抗生物素蛋白/mL金溶液的摩尔载量。由于一个中性抗生物素蛋白分子具有四个生物素结合位点,因此理论上 1.67×10^{-10} mol生物素分子(和由此的靶肽,例如CTX-II)可以结合中性抗生物素蛋白-金缀合物/mL溶液。本文中这相当于100%的载量。

[0127] 7.5 μg 金用于偶联,以过量金起作用,并产生可再现的载量。

[0128] 步骤2-CTX-II-中性抗生物素蛋白-金缀合物:

[0129] 将 5.2×10^{-11} mol生物素化CTX-II/mL中性抗生物素蛋白-金缀合物OD_{526nm} 1溶液在含1%BSA的2mM硼酸盐缓冲液中偶联1小时。随后,用 2.5×10^{-4} mol生物素/mL中性抗生物素蛋白-金缀合物OD_{526nm} 1饱和游离生物素结合位点1小时。离心后,将缀合物沉淀物重悬于重悬缓冲液中,并且在0.22 μm 过滤。得到CTX-II-中性抗生物素蛋白-金缀合物。

[0130] 1mL中性抗生物素蛋白-缀合物OD_{526nm} 1理论上可以结合 1.67×10^{-10} mol生物素。CTX-II抗原以合成方式被生物素化,使得1mol CTX-II结合1mol生物素。因此,理论上 1.67×10^{-10} mol的生物素化的CTX-II结合1mL中性抗生物素蛋白-缀合物,这相当于本文的100%载量。通过向1mL中性抗生物素蛋白-金缀合物中仅添加 5.2×10^{-11} mol生物素化的CTX-II,只有约30%的结合位点会被占据;因此,这称作30%载量。在这种情况下,剩余的70%的结合位点将被过量添加的生物素饱和。

[0131] 实施例2:CTX-II免疫测定

[0132] 测定原理

[0133] CTX-II侧向流动装置(LFD)为竞争性免疫测定(参见图1和2),具有以下构件:

[0134] -样品:具有CTX-II的人尿液作为分析物(用含Triton™X-100的PBS以1:2稀释);

[0135] -缀合物垫:胶体金纳米粒和CTX-II的缀合物,以及胶体金纳米粒和生物素化BSA的对照缀合物;

[0136] -检测线:抗-CTX-II抗体。

[0137] 样品中的CTX-II和金-CTX-II缀合物竞争结合检测线(抗-CTX-II抗体)。当金-缀合物与检测线结合时,检测线显示为红色(在样品中CTX-II浓度相对低的情况下)。金颗粒用作着色标记物。样品中的CTX-II越多,则检测线的强度就越低。使用读出器读取检测线的颜色强度,并且使用预先记录的校准曲线将其转换为浓度。对照线(阳性对照)用于验证检测。

[0138] 金纳米粒与中性抗生物素蛋白(和用于阻断非特异性相互作用的BSA)完全偶联,以确保再现性和稳定性。中性抗生物素蛋白能够结合四个生物素分子。这种能力用于将生物素化的CTX-II间接缀合至金纳米粒,并且调节金纳米粒的CTX-II载量(参见图3)。

[0139] 材料和方法

[0140] 金-CTX-II缀合物的组装如下:使40nm金颗粒与中性抗生物素蛋白(5 μg 中性抗生物素蛋白/mL OD 1金纳米粒混悬液(Sigma-Aldrich或BBI Solutions))缀合,然后用牛血

清白蛋白 (BSA) 封闭。(OD: 光密度 (OD 1=1 的光密度))。然后给缀合的中性抗生物素蛋白加载生物素化的CTX-II。与CTX-II一起温育后,将游离生物素添加到溶液中以饱和中性抗生物素蛋白的游离生物素结合位点。

[0141] 为了计算加载的CTX-II量,推定每mL金颗粒混悬液实际结合2.5 μ g中性抗生物素蛋白,并且1mol中性抗生物素蛋白结合4mol生物素。

[0142] 结果(也参见图4和5):

[0143] a) 在100%载量下(用于缀合的CTX-II过量):

[0144] -样品中CTX-II浓度为0 μ g/L时检测线强度低。

[0145] -样品中CTX-II浓度为10 μ g/L时,检测线的强度没有目视可识别的下降(仅在100 μ g/L CTX-II时目视可检测到竞争)。

[0146] -因此,为了灵敏度,应降低CTX-II载量。

[0147] b) 在50%载量下:

[0148] -灵敏度,如100%载量,但0 μ g/L CTX-II的检测线更强。

[0149] c) 在30%载量下:

[0150] -检测线在0 μ g/L CTX-II时强度大;

[0151] -10 μ g/L CTX-II时检测线强度具有目视可识别的下降。

[0152] d) 在10%的载量下:

[0153] -检测线强度大;没有由于样品中CTX-II导致的目视可检测的强度降低。

[0154] 结论:

[0155] 间接偶联(例如通过中性抗生物素蛋白)通常允许用CTX-II调节颗粒的载量,以优化测定,并且特别是将载量降低至本案的最佳30%载量。在这种载量下,样品中低CTX-II浓度时检测线染色显著,而高CTX-II浓度时低。使用读出器(图5)验证目视检查(图4)。这种优化允许在宽浓度范围内具有高灵敏度,这是使用现有技术方法不可能实现的。

[0156] 100%的载量需要降低测定中的总缀合物浓度,使得即使在低CTX-II浓度下,检测线的强度也非常弱,并且信号强度不在读出器的线性范围内。

[0157] 还测试了反向设置(即非竞争性测定;缀合金纳米粒的抗-CTX-II抗体,在检测线处的CTX-II)。然而,由于需要100%的载量,因此导致灵敏度不足。此外,这种反向设置比竞争性设置更昂贵。

[0158] 本文引用的文献通过引用整体并入。

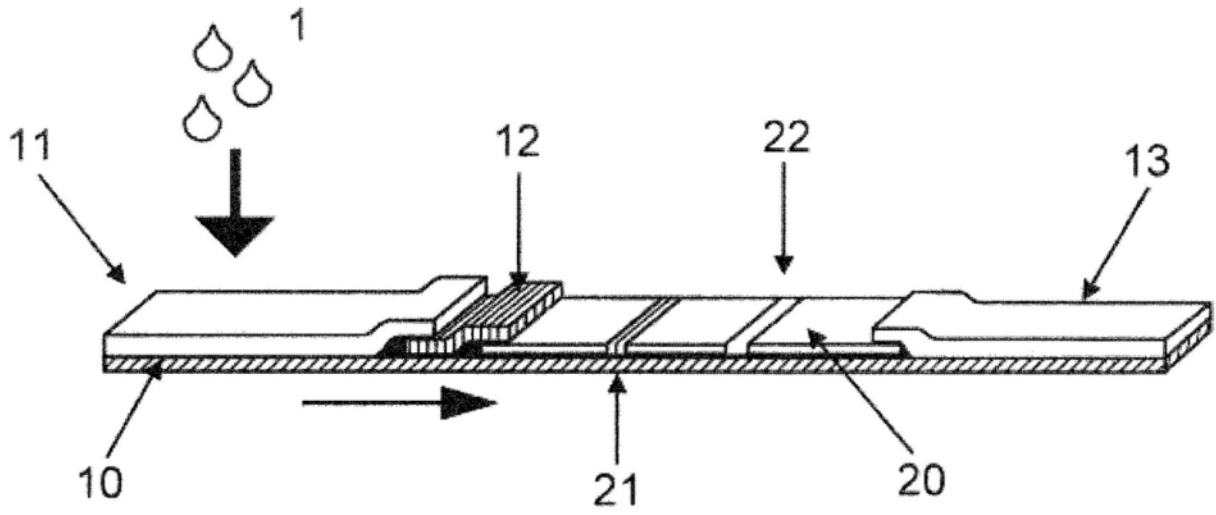


图1

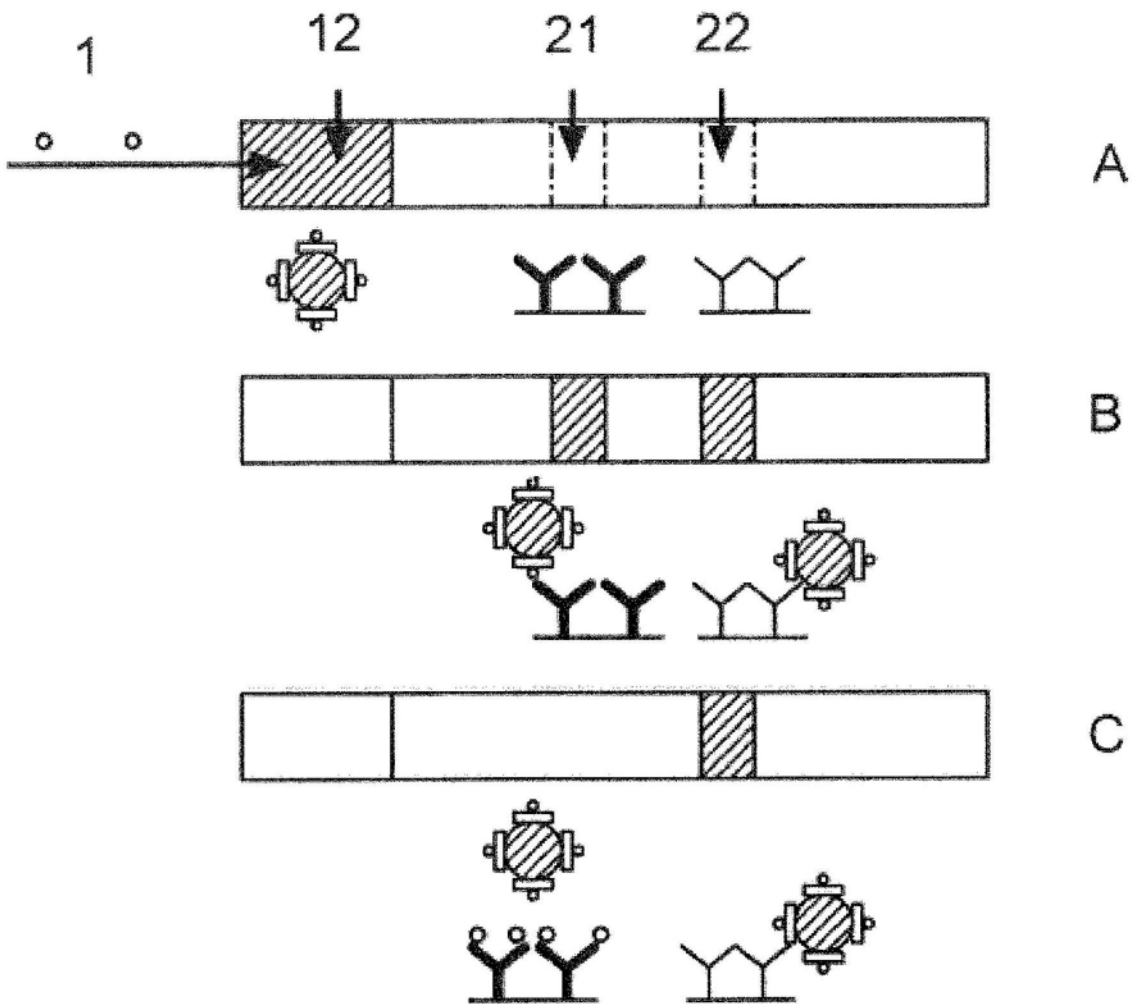


图2

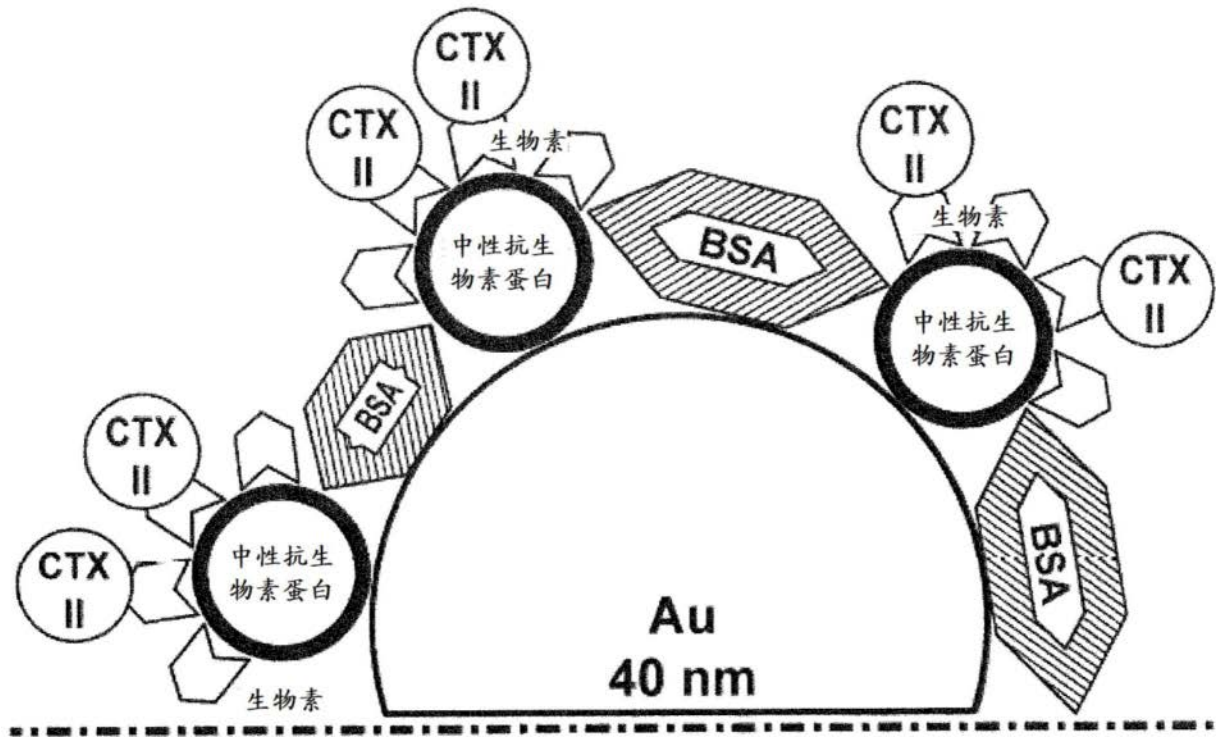


图3

	CTX-II [$\mu\text{g}/\text{l}$]		
	1	10	100
100%			
50%			
30%			
10%			

图4

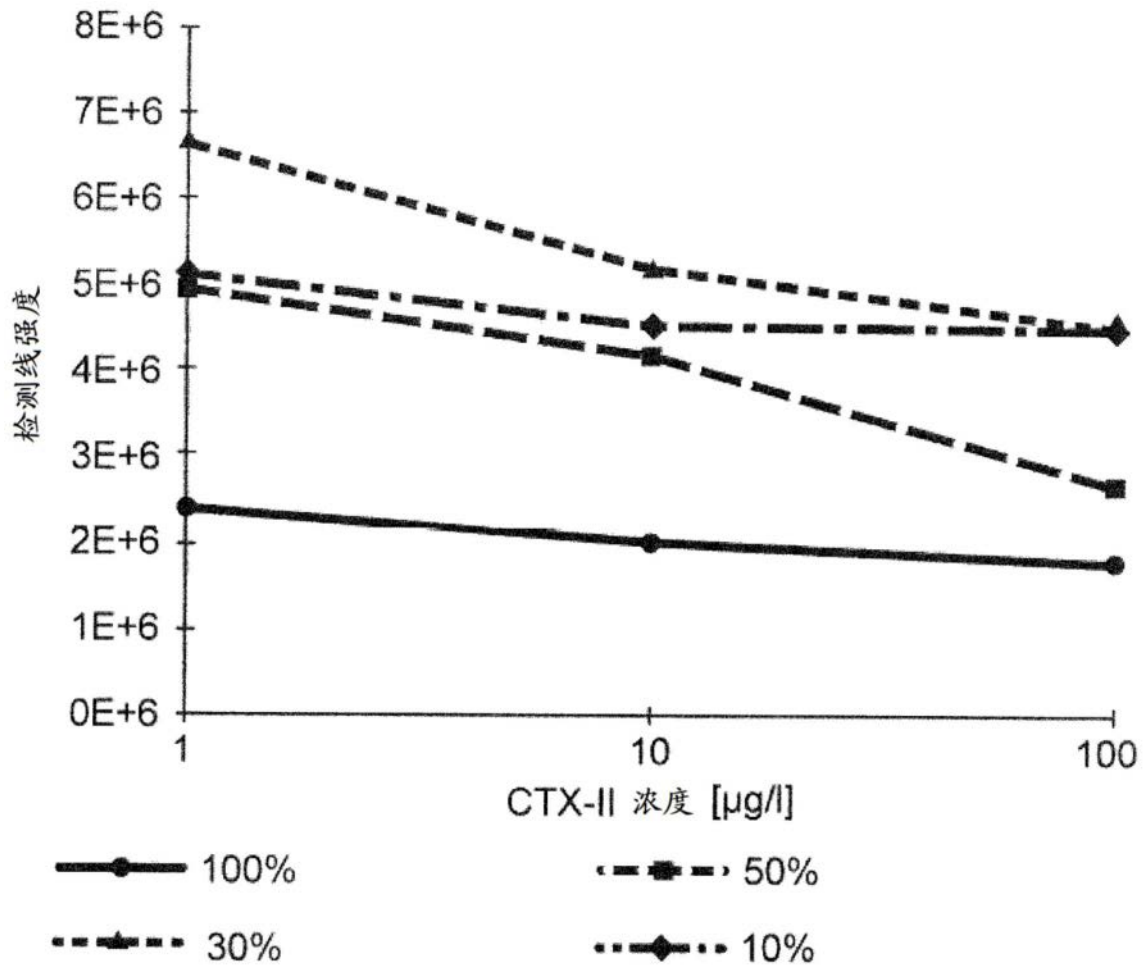


图5