



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I831753 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 02 月 11 日

(21)申請案號：107136895

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 10 月 19 日

(51)Int. Cl. : G01N33/68 (2006.01)

G01N33/543 (2006.01)

A61K47/68 (2017.01)

(30)優先權：2017/10/19 美國

62/574,592

2017/12/15 美國

62/599,117

(71)申請人：美商英代斯實驗公司 (美國) IDEXX LABORATORIES, INC. (US)

美國

(72)發明人：解 宏智 XIE, HONGZHI (US)；拉米賽提 絲琳妮維薩 羅 RAMISETTY,
SREENIVASA RAO (IN)；埃拉米利 墨西 V S N YERRAMILLI, MURTHY VSN
(US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 102628868A

US 2010/0035274A1

審查人員：方冠岳

申請專利範圍項數：54 項 圖式數：13 共 80 頁

(54)名稱

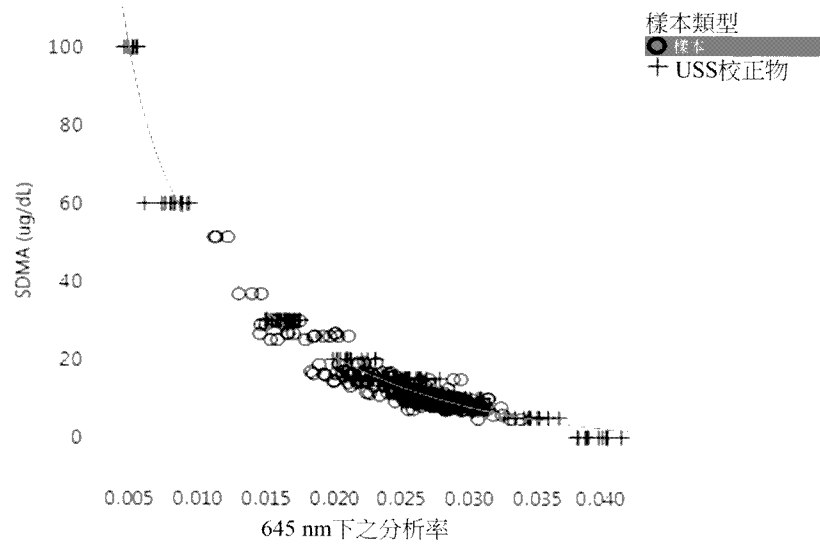
對稱性二甲基精胺酸之檢測

(57)摘要

本揭示案大體關於對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之檢測。更特定而言，本揭示案係關於使用固相檢測 SDMA。本揭示案提供用於檢測諸如來自動物之生物樣本的樣本中對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之裝置、試劑、套組及方法。該方法包括藉由使用諸如競爭性免疫分析之免疫分析形式檢測該樣本中 SDMA 之存在或量。該分析包括使用針對 SDMA 之抗體，其對 SDMA 具有特異性，且其針對其他精胺酸衍生物具有較低親和力。

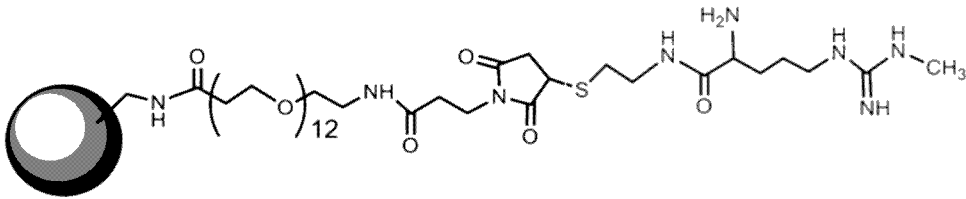
The disclosure generally relates to the detection of symmetrical dimethylarginine (SDMA). More particularly, the disclosure relates to the detection of SDMA using a solid phase. The disclosure provides devices, reagents, kits and methods for detecting symmetrical dimethyl arginine (SDMA) in sample, such as a biological sample from an animal. The method includes detecting the presence or amount of SDMA in the sample by using an immunoassay format, such as a competitive immunoassay. The assay includes the use of antibodies to SDMA that are specific for SDMA and that have less affinity for other arginine derivatives.

指定代表圖：



【圖4】

特徵化學式：





I831753

【發明摘要】

【中文發明名稱】

對稱性二甲基精胺酸之檢測

【英文發明名稱】

DETECTION OF SYMMETRICAL DIMETHYLARGININE

【中文】

本揭示案大體關於對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之檢測。更特定而言，本揭示案係關於使用固相檢測SDMA。本揭示案提供用於檢測諸如來自動物之生物樣本的樣本中對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之裝置、試劑、套組及方法。該方法包括藉由使用諸如競爭性免疫分析之免疫分析形式檢測該樣本中SDMA之存在或量。該分析包括使用針對SDMA之抗體，其對SDMA具有特異性，且其針對其他精胺酸衍生物具有較低親和力。

【英文】

The disclosure generally relates to the detection of symmetrical dimethylarginine (SDMA). More particularly, the disclosure relates to the detection of SDMA using a solid phase. The disclosure provides devices, reagents, kits and methods for detecting symmetrical dimethyl arginine (SDMA) in sample, such as a biological sample from an animal. The method includes detecting the presence or amount of SDMA in the sample by using an immunoassay format, such as a competitive immunoassay. The assay includes the use of antibodies to SDMA that are specific for SDMA and that have less affinity for other arginine derivatives.

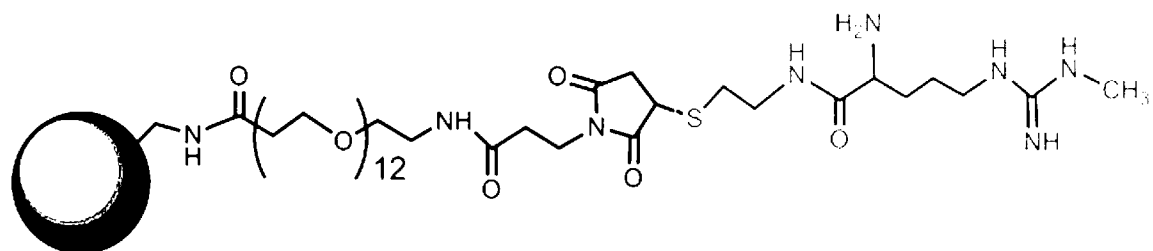
【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】

對稱性二甲基精胺酸之檢測

【英文發明名稱】

DETECTION OF SYMMETRICAL DIMETHYLARGININE

【技術領域】

【0001】 本揭示案大體係關於對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之檢測。更特定而言，本揭示案係關於使用固相檢測SDMA。

【先前技術】

【0002】 檢測來自動物之生物樣本中的游離SDMA可提供動物腎功能之指標。腎臟疾病及病症(例如，腎損傷、腎功能不全、慢性腎臟疾病、腎小球性腎炎、糖尿病腎病變、間質性腎炎、多囊性腎病及高血壓性腎病)趨於削弱包括GFR (腎小球濾過率)之整體腎功能，且可以許多方式診斷，包括使用一般腎臟標記物肌酸酐及BUN。藉由比較健康及患病動物中之SDMA、BUN及肌酸酐之含量，樣本中之SDMA含量可與動物之疾病狀態相關。相應地，相較於患病動物之SDMA含量，顯示正常(參考範圍)肌酸酐及BUN之「健康」動物將具有更低SDMA含量。大體而言，相較於具有正常腎功能之動物，患有腎臟病症/疾病之動物將具有更高血清SDMA含量。在健康人類中，血漿SDMA含量通常在0.3 – 0.7 $\mu\text{mol/l}$ 範圍內(J Am Soc Nephrol (2006) 17: 1128-1134; Eur J Clin Invest. 2007年6月; 37(5): 364–371. Nephrol Dial Transplant (2003) 18: 2542-2550; Nephrol Dial Transplant (2006) 21: 2446-2451; Kidney International, (2001) 59 (78): S14 –S18)。

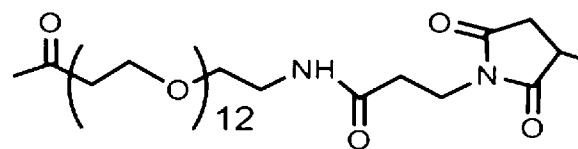
【0003】 類似地，生物樣本中游離SDMA之含量可用作動物心臟疾病之標標記物。樣本中之SDMA含量可與用於心臟疾病之已知標記物的含量相比較，從而確定用於診斷心臟疾病之截止範圍(J Am Soc Nephrol (2006) 17:1128-1134)。

【0004】 相應地，本發明人已發現本領域中需要準確且有效確定來自人類及其他動物之樣本中的SDMA。

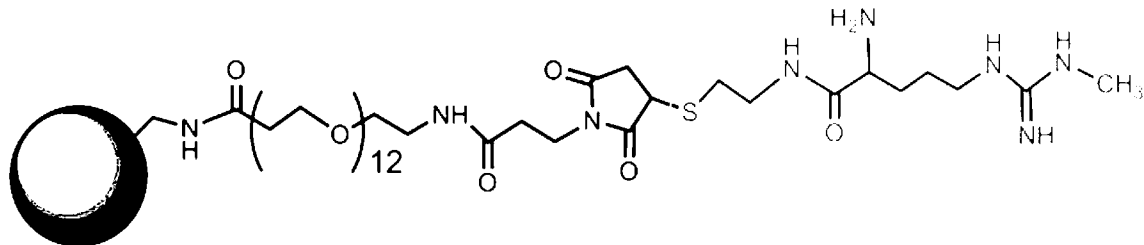
【發明內容】

【0005】 在一個態樣中，本揭示案係針對一種裝置，其包括諸如多孔基質之固體基質，其具有非擴散性地結合於其上之粒子，其中粒子包括捕獲試劑，其包括與連接於粒子之蛋白質共價連接之分析物類似物或分析物衍生物。在各種實施例中，蛋白質可能共價或非共價連接於粒子。蛋白質可能係牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白、鑰孔血藍素(KLH)及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(G6PDH)之一或多者。相較於BSA、卵白蛋白或KLH之非共價連接，蛋白質與粒子之非共價連接可能對界面活性劑或高鹽濃度容忍度更高。衍生物可能係諸如甲基化精胺酸衍生物之精胺酸衍生物，例如非對稱性二甲基精胺酸(ADMA)、L-精胺酸、N-甲基精胺酸(MMA)、醯化ADMA、醯化L-精胺酸及醯化MMA。基質可能置於匣或殼中。

【0006】 在另一態樣中，本揭示案係針對一種捕獲試劑，其包括連接於粒子之N-甲基精胺酸(MMA)或醯化MMA之類似物。在各種實施例中，類似物可能藉由連接物與粒子結合。類似物可能共價連接於與粒子連接之蛋白質，且蛋白質可能共價或非共價連接於粒子。蛋白質可能係牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白、鑰孔血藍素(KLH)及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(G6PDH)之至少一者。連接物可能包括以下結構：



且捕獲試劑可能係：



C

【0007】 在另一態樣中，本揭示案係針對確定樣本中對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之方法。方法包括(a)形成混合物，其包括樣本及標記之共軛物，該共軛物包括共軛於標記之抗SDMA抗體；(b)使混合物與裝置接觸，該裝置包括甲基化精胺酸衍生物之類似物及固體載體或固體基質，(c)洗滌固體載體或基質以移除未結合於固體基質的共軛物；量測與固體載體或基質相關之標記的量以確定樣本中SDMA之存在或量。

【0008】 在各種實施例中，混合物可能與裝置接觸，該裝置具有SDMA作為捕獲試劑之部分及相較於針對SDMA之親和力針對精胺酸衍生物之親和力更小的抗SDMA抗體。舉例而言，抗SDMA抗體針對精胺酸衍生物之親和力可能低於針對SDMA之抗體親和力的約25%、低於約10%、低於約5%、低於約1%、低於約0.1%、低於約0.01%或低於約0.001%。

【0009】在又另一態樣中，本揭示案係針對確定樣本中對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之方法。方法包括(a)形成混合物，其包括樣本及標記之共軛物，該共軛物包括共軛於標記之抗SDMA抗體；(b)使混合物與固體基質接觸，該固體基質包括包含如本文所述之甲基化精胺酸衍生物之捕獲試劑；(c)洗滌固體基質以移除未結合於固體基質的共軛物；且量測與固體基質相關之標記的量以確定樣本中SDMA之存在或量。

【0010】更進一步，本揭示案係針對用於確定樣本中之SDMA的套組，其包括本揭示案之裝置及包括共軛於標記之抗SDMA抗體之共軛物，其中抗SDMA抗體針對捕獲試劑之親和力低於抗體針對SDMA之親和力的約25% (例如，約10%、約5%、約1%、約0.1%、約0.01%或約0.001%)。

【0011】在又另一態樣中，本揭示案係針對用於確定樣本中SDMA之套組，其包括包含捕獲試劑之固體基質，捕獲試劑包括甲基化精胺酸衍生物，及包括共軛於標記之抗SDMA抗體的共軛物，其中抗SDMA抗體針對捕獲試劑之親和力低於抗體針對SDMA之親和力的約25% (例如，約10%、約5%、約1%、約0.1%、約0.01%或約0.001%)。

【0012】更進一步，本揭示案係針對減少或消除針對血清樣本或血漿樣本中對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之免疫分析中的血清-血漿偏差之方法。方法包括(a)形成混合物，其包括樣本及標記之共軛物，該共軛物包括共軛於標記之抗SDMA抗體；(b)使混合物與固體基質接觸，該固體基質包括如本文所述之包括精胺酸衍生物的固相，其中蛋白質非共價連接於粒子，其中抗SDMA抗體針對精胺酸衍生物之親和力低於抗體針對SDMA之親和力的約25% (例如，約10%、約5%、約1%、約0.1%、約0.01%或約0.001%)；(c)洗滌固體基質以移除未結合於固體基質的共軛物；及(d)量測與固體基質相關之標記的量以確定樣本中SDMA之存在或量。

【0013】在另一態樣中，本揭示案係針對一種固相，其包括諸如N-甲基精胺酸(MMA)或醯化MMA之甲基化精胺酸衍生物之類似物，其共價連接於與粒子非共價連接之G6PDH。固相可能包括多孔基質，其可能安裝於殼內。抗SDMA抗體可能結合於類似物，其中相較於針對SDMA所具有之親和力，抗體針對類似物之親和力更小。舉例而言，抗SDMA抗體針

對類似物之親和力低於抗體針對SDMA之親和力的約25%（例如，約10%、約5%、約1%、約0.1%、約0.01%或約0.001%）。抗SDMA抗體可能經標記。

【0014】 在另一態樣中，本揭示案係針對一種組合物，其包括諸如N-甲基精胺酸(MMA)或醃化MMA之甲基化精胺酸衍生物的類似物，其固定於固體基質上，其中類似物與抗SDMA抗體複合。相較於抗體針對溶液中SDMA所具有之親和力，抗體可能針對固定之類似物具有親和力。舉例而言，抗SDMA抗體針對固定之類似物的親和力可能低於抗體針對溶液中SDMA之親和力的約25%（例如，約10%、約5%、約1%、約0.1%、約0.01%或約0.001%）。抗SDMA抗體可能經標記。類似物可能共價連接於蛋白質。蛋白質可能係牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白、鑰孔血藍素(KLH)及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(G6PDH)之一或多者。蛋白質可能非共價連接於固體基質，其中蛋白質可能非共價連接於粒子，該粒子非擴散性地結合於固體基質。

【0015】 在另一態樣中，本揭示案係針對減少或消除針對血清或血漿樣本中分析物之免疫分析中的血清-血漿偏差之方法。方法包括(a)形成混合物，其包括樣本及標記之共軛物，該共軛物包括共軛於標記之抗分析物抗體；(b)使混合物與裝置接觸，該裝置包括包含非擴散性結合於其上之粒子的固體基質，其中粒子包括捕獲試劑，捕獲試劑包括分析物類似物，該類似物與連接於粒子之蛋白質共價連接，其中抗分析物抗體針對分析物捕獲試劑之親和力低於抗體針對分析物之親和力的約25%（例如，約10%、約5%、約1%、約0.1%、約0.01%或約0.001%）；(c)洗滌固相以移除未結合之共軛物；及(d)量測與固相相關之標記的量以確定樣本中分析

物之存在或量。

【0016】 在又另一態樣中，本揭示案係針對一種組合物，其包括抗T4抗體及抗SDMA抗體。抗T4抗體及抗SDMA抗體之至少一者可能連接於生物素、鏈親和素、抗生物素蛋白或可檢測之標記。抗體可能經凍乾。該組合物可能係套組之部分，套組包括含有該組合物之器皿。套組可能進一步包括洗滌溶液，且可能進一步包括酶受質。

【圖式簡單說明】

【0017】 所包括用於進一步理解本揭示案之附圖併入本說明書中且構成本說明書之一部分、闡釋本揭示案之實施例且與實施方式一同用於解釋本揭示案之原則。不嘗試顯示本揭示案之結構性細節，其詳細程度不及基本理解本揭示案可能必需之詳細程度，且不顯示可能實踐本揭示案之各種方式。

【0018】 圖1A及1B顯示使用蛋白質G6PDH-MMA被動塗覆之乳膠粒子作為固相及抗SDMA SPDP HRP共軛物根據本揭示案之方法製備之SDMA校正曲線。

【0019】 圖2顯示使用蛋白質KLH-MMA塗覆之粒子作為固相及抗SDMA SPDP HRP共軛物根據本揭示案之方法製備之SDMA校正曲線。

【0020】 圖3顯示使用MMA化學改質之粒子作為固相及抗SDMA SPDP HRP共軛物根據本揭示案之方法製備之SDMA校正曲線。

【0021】 圖4顯示使用G6PDH-MMA粒子固相及液體SPDP共軛物根據本揭示案之方法製備之樣本分析。

【0022】 圖5A顯示根據本揭示案之方法的催化劑DX[®] SDMA分析與針對207個犬血清樣本之LC-MS分析的相關性。

【0023】圖5B顯示根據本揭示案之方法的催化劑DX[®] SDMA分析與針對86個貓血清樣本之LC-MS分析的相關性。

【0024】圖6A顯示根據本揭示案之方法的催化劑DX[®] SDMA分析與針對207個犬血清樣本之EMIT[®]分析的相關性。

【0025】圖6B顯示根據本揭示案之方法的催化劑DX[®] SDMA分析與針對86個貓血清樣本之EMIT分析的相關性。

【0026】圖7A顯示針對匹配之犬血清及血漿樣本之根據本揭示案之方法的催化劑DX[®] SDMA分析之結果，其使用共價連接之胺-MMA粒子或被動塗覆之G6PDH-MMA粒子。

【0027】圖7B顯示針對匹配之貓血清及血漿樣本之根據本揭示案之方法的催化劑DX[®] SDMA分析之結果，其使用共價連接之胺-MMA粒子或被動塗覆之G6PDH-MMA粒子。

【0028】圖8顯示在具有G6PDH-MMA粒子或卵白蛋白-MMA粒子之20個配對血清及血漿樣本上根據本揭示案之方法進行的催化劑DX[®] SDMA分析之結果。

【0029】圖9顯示在具有卵白蛋白-MMA粒子之20個配對血清及血漿樣本上根據本揭示案之方法進行的催化劑DX[®] SDMA分析之結果。

【0030】圖10顯示根據本揭示案評估被動塗覆之粒子的穩定性之分析結果(塗覆有G6PDH-MMA、G6PDH-MMA或卵白蛋白-MMA)。

【0031】圖11顯示使用用1 M NaCl先行培養且不培養之G6PDH-MMA被動塗覆之粒子的CATALYST DX[®] SDMA校正曲線。

【0032】圖12顯示使用用或不用TWEEN[®] 20界面活性劑預培養後的G6PDH-MMA被動塗覆之粒子的SDMA校正曲線。

【0033】 圖13顯示使用直接塗覆於滑膜上的蛋白質KLH-MMA共軛物(實例2)之SDMA校正曲線。

【實施方式】

相關申請案之交互參照

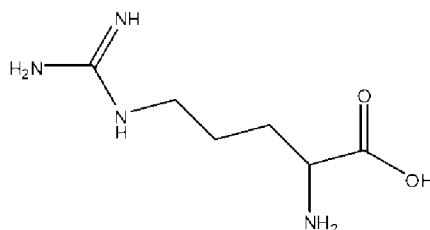
【0034】 本申請案要求2017年10月19日申請之美國臨時專利申請案系列第62/574,592號及2017年12月15日申請之美國臨時專利申請案系列第62/599,117號之優先權，該等文獻之各者的全文以引用方式併入本文中。

【0035】 在各種態樣中，本揭示案提供裝置、試劑、套組及方法，其用於檢測諸如來自動物之生物樣本之樣本中的對稱性二甲基精胺酸(SDMA)。該方法包括藉由使用諸如競爭性免疫分析法之免疫分析計劃檢測樣本中SDMA之存在或量。分析包括使用針對SDMA之抗體，其對SDMA具有特異性且對其他精胺酸衍生物具有更小親和力，包括非對稱性二甲基精胺酸(ADMA)、L-精胺酸及N-甲基精胺酸。

【0036】 在進一步詳細描述本揭示案之前，對許多術語加以定義：

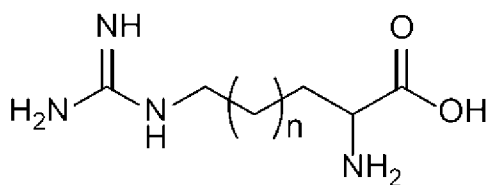
【0037】 Ab係抗體。

【0038】 精胺酸之結構係：



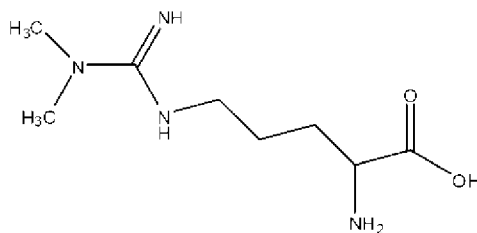
【0039】 L-精胺酸係精胺酸之L-異構物。

【0040】 精胺酸衍生物包括(但不限於)甲基化精胺酸衍生物、醯化精胺酸及衍生物及具有以下結構之化合物：

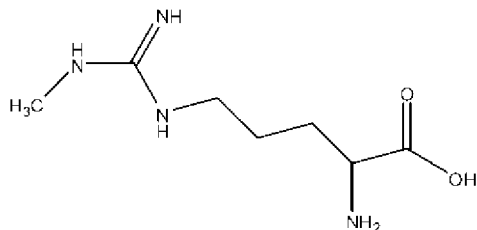


其中n係整數0、2或3。在一些實施例中，出於定義目的，精胺酸衍生物不包括SDMA、ADMA及/或N-MMA，從而提供一類不包括SDMA、ADMA及N-MMA之一或多者的精胺酸衍生物。

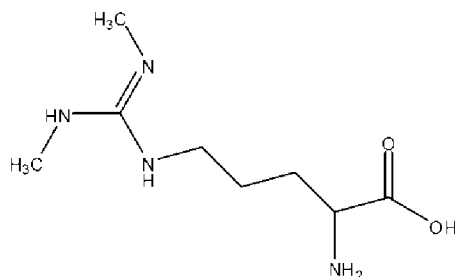
【0041】 ADMA係非對稱性二甲基精胺酸。ADMA之結構係：



【0042】 N-MMA係N-單甲基精胺酸或僅係N-甲基精胺酸，其在本文中亦僅稱為「MMA」。N-單甲基精胺酸之結構係：

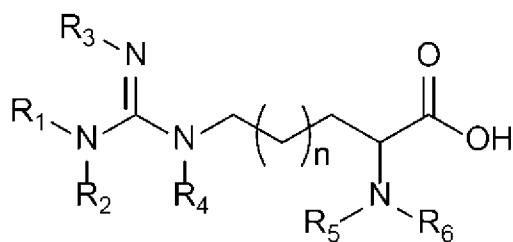


【0043】 SDMA係對稱性二甲基精胺酸。SDMA之結構係：



游離SDMA指代並非多肽鏈之部分的SDMA及SDMA鹽。SDMA之一或多個胺基酸殘基可存在於多肽中。

【0044】 如本文所用，術語「甲基化精胺酸衍生物」指代具有以下結構之化合物：



其中 n 係整數0、1、2或3；且 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 及 R_6 各自獨立地係氫或甲基，其條件係 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 及 R_6 之至少一者係甲基。甲基化精胺酸衍生物之實例包括MMA、SDMA及ADMA，但出於定義目的，甲基化衍生物之特定子集不包括此等化合物之一或多者。

【0045】如本文所用，術語「鹽」意指形成於化合物之酸性及鹼性官能基之間的鹽。說明性鹽包括(但不限於)硫酸鹽、檸檬酸鹽、醋酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、磷酸鹽、乳酸鹽、酒石酸鹽、抗壞血酸鹽、琥珀酸鹽、順丁烯二酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡萄糖醛酸鹽、葡萄糖二酸鹽、蟻酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽及鹽。術語「鹽」亦指代形成於具有諸如羧酸官能基之酸性官能基的化合物與無機或有機鹼之間的鹽。合適鹼包括(但不限於)諸如鈉、鉀及鋰之鹼金屬的氫氧化物；諸如鈣及鎂之鹼土金屬的氫氧化物；諸如鋁及鋅之其他金屬的氫氧化物；氨及有機胺。

【0046】如本文所用，術語「類似物」通常指代一種化合物，該化合物中，一或多個單個原子已經不同原子或經不同官能基替代，該等原子或官能基提供使分析物連接於諸如標記或固體基質之另一部分的方式。舉例而言，使分析物與另一部分連接之方式可能係連接物。類似物可能與針對受體之分析物競爭。特定而言，分析物類似物可以與分析物相似之方式結合於抗體。因為分析物與基質或另一分子之共價連接經常藉由使用分析物類似物完成，故而如免疫分析之領域中普通技術者之一將輕易理解，本

文揭示之「分析物」僅僅連接於或共軛於基質或另一分子包括使用分析物類似物以完成該共價連接或共軛。舉例而言，**MMA**之各種類似物揭示於下文實例中。

【0047】分析物之「衍生物」指代分析物之改質形式，其可與針對受體之分析物競爭，改質係官能基之添加或修改，其不提供使分析物結合於諸如標記或固體基質之另一部分的方式。兩個分子可能係彼此之衍生物，因而視情況分子可能係分析物或分析物之衍生物。舉例而言，精胺酸、**SDMA**、**MMA**及**L-精胺酸**均係彼此之衍生物，分子之間的不同係異構性，或一或兩個甲基之存在或位置。

【0048】如本文所用，術語「抗體」通常指代根據與抗原及針對該抗原之結合的接觸由**B**淋巴細胞產生之醣蛋白。術語「抗體」在其最廣意義上使用且具體涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現所要生物活性即可。

【0049】如本文所用，術語「抗體片段」指代全長抗體之一部分，通常係其抗原結合域或可變域。具體而言，例如，抗體片段可能包括**Fab**、**Fab'**、**F(ab')₂**及**Fv**片段；雙體；線性抗體；單鏈抗體分子；及來自抗體片段之多特異性抗體。

【0050】如本文所用，術語「單株抗體」大體指代獲自一群基本均質的抗體之抗體，亦即，包括該群之個別抗體相同。單株抗體具有高度特異性，針對單個抗原性位點。與通常包括針對不同表位之不同抗體的多株抗體製備相反，各單株抗體係針對抗原上的單個表位。修飾語「單株」僅指代抗體之特徵，且不應理解為需要藉由任何特定方法製造該抗體。具體而言，例如，單株抗體可藉由融合瘤方法製造，或可能藉由重組**DNA**方

法製造，或可能使用已知技術自噬菌體抗體庫分離。

【0051】如本文所用，「抗SDMA抗體」、「抗SDMA抗體部分」或「抗SDMA抗體片段」及/或「抗SDMA抗體變體」及類似物包括任何含有以下之分子的蛋白質或肽，該分子包括至少一部分免疫球蛋白分子，諸如(但不限於)重鏈或輕鏈恆定區之一個互補決定區(CDR)、框架區或其任何部分。如本文所用，抗SDMA抗體可能根據美國專利第8,481,690號製備，該文獻全文併入本文中。

【0052】如本文所用，術語「抗原」通常指代能夠在合適條件下與對該抗原具有特異性之抗體反應的物質。

【0053】如本文所用，術語「分析物」通常指代樣本中檢測及/或量測之物質或一組物質。根據本揭示案之例示性態樣，SDMA或SDMA之鹽視為分析物之實例。

【0054】如本文所用，術語「生物樣本」通常指代來自人類或動物之組織或體液樣本，其包括(但不限於)全血、血漿、血清、脊髓液、淋巴液、腹腔液(腹水)、皮膚之外部、呼吸道、腸道及泌尿道、淚液、唾液、尿液、血細胞、腫瘤、器官、組織及體外細胞培養物部分之樣本。許多該等樣本需要在分析前進行處理。樣本包括原樣本及/或處理之樣本。

【0055】如本文所用，術語「免疫分析」通常指代使用抗體及抗原複合物以產生可量測之反應的測試。「抗體:抗原複合物」可與術語「免疫複合物」互換使用。大體而言，免疫分析包括非競爭性免疫分析、競爭性免疫分析、同質免疫分析及異質免疫分析。在「競爭性免疫分析」中，測試樣本中未標記之分析物(或抗原)係藉由其在免疫分析中與標記之抗原競爭的能力而得以量測。未標記之抗原阻礙標記之抗原結合的能力，此係因

為抗體上的結合位點已經佔用。在「競爭性免疫分析」中，相反地，測試樣本中存在之抗原的量係與產生自標記之訊息的量相關。相反，在亦稱為「三明治」免疫分析之「非競爭性免疫分析」中，分析物結合於兩個高度特異性抗體試劑之間以形成複合物，且抗原之量與複合物相關之訊息量直接成比例。需要分離結合之抗體:抗原複合物之免疫分析通常稱為「同質免疫分析」，且不需要分離抗體:抗原複合物之免疫分析通常稱為「異質分析」。本領域中之技術者之一應輕易理解各種免疫分析形式。

【0056】 如本文所用，術語「免疫複合物」通常指代存在或不存在互補固定之情況下，藉由結合抗原與抗體分子形成之複合物。當標記抗體或抗原之一者時，由於抗原與抗體之間存在結合，故而標記與免疫複合物相關。因此，當標記抗體時，標記因結合而變得與抗原相關。類似地，當標記抗原(例如，具有標記之分析物類似物)時，由於抗原與抗體之間存在結合，故而標記變得與抗體相關。

【0057】 如本文所用，術語「標記」指代可檢測之化合物，其可與本揭示案之抗體或類似物直接或間接(例如，經由共價或非共價方式，單獨或封閉)共軛。標記可能自我檢測(例如，放射性同位素標記、化學發光染料、電化學標記、金屬螯合劑、乳膠粒子或螢光標記)，或在酵素性標記之情況中，可能催化可檢測之基質化合物或組合物之化學改變(例如，諸如辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶及類似物之酶)。用於本揭示案之標記可能係(但不限於)：鹼性磷酸酶；葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(「G6PDH」)；辣根過氧化酶(HRP)；諸如異魯米諾(isoluminol)之化學發光物、諸如螢光素及玫紅化合物之螢光劑；核糖酵素；及染料。標記亦可能係自身可檢測之特定結合分子(例如，生物素、抗生物素蛋白、鏈親和素、地高辛

(digoxigenin)、麥芽糖、寡聚組胺酸、2,4-二硝基苯、苯基硼酸鹽、ssDNA、dsDNA及類似物)。標記之使用產生一種訊息，其可能由諸如檢測電磁輻射或直接直覺化之方式加以檢測，且其可視情況加以量測。

【0058】如本文所用，術語「多肽」通常指代一種分子，其具有由肽鍵連接之胺基酸序列。此術語包括蛋白質、融合蛋白質、寡肽、環肽及多肽衍生物。抗體及抗體衍生物論述於上文之不同部分中，但出於本揭示案之目的，抗體及抗體衍生物視為多肽及多肽衍生物之子集。

【0059】如本文所用，術語「固體載體」、「固相」及「固體基質」指代本揭示案之結合伴侶可附接之非水性基質。固體載體、固相及固體基質之實例包括部分或全部由玻璃(例如，受控帶孔玻璃)形成之載體、合成及天然聚合物、聚醣(例如，瓊脂糖)、聚丙烯醯胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇及聚矽氧、層析條、微滴定聚苯乙烯板或任何其他將允許結合之結合伴侶洗滌或自未結合之材料分離的物質。在一些實施例中，固體載體、固相及固體基質可能係多孔的。在特定實施例中，根據應用，固體載體、固相及固體基質最好可係分析板。固體載體、固相及固體基質可能包括如美國專利申請案第2014/0315216號中所述之分析性測試載片，該文獻以引用方式全文併入本文中。

【0060】與本揭示案相關之術語「粒子(particle/particles)」包括(例如)乳膠粒子、聚苯乙烯，或其他載體材料，諸如二氧化矽、瓊脂糖、陶瓷、玻璃、聚丙烯醯胺、聚甲基丙烯酸甲酯、羧酸鹽改質之乳膠、三聚氰胺及瓊脂精。粒子之不同尺寸將係約0.1微米至約100微米，例如約0.1、0.5、1.0、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100微米。特定而言，適用市售材料包括羧酸鹽改質之乳膠、溴化氰活化之瓊脂精珠

粒、融合之二氧化矽粒子、異硫氰酸鹽玻璃、聚苯乙烯及羧酸鹽單分散性微球。粒子可能具有磁性或順磁性。適用於本發明之粒子能夠連接於諸如衍生物、連接物分子或蛋白質的其他物質。待連接於其他物質的粒子之能力可產生於粒子材料以及產生於添加至粒子之任何表面改質物或官能基。粒子可經官能化或能夠變得官能化，從而共價或非共價連接如本文所述之蛋白質、連接物分子或衍生物。合適官能基包括(例如)胺、生物素、鏈親和素、抗生物素蛋白、蛋白質A、氫硫基、羥基及羧基。

【0061】 「受體」指代任何能夠識別分子之特定空間及極性構成之化合物或組合物，例如表位或決定子位點。闡釋性受體包括抗體、Fab片段及類似物。

【0062】 如本文所用，術語「交叉反應性」通常指代抗體之個別抗原結合位點與多於一個抗原決定子反應之能力，或一群抗體分子與多於一個抗原反應之能力。大體而言，交叉反應因以下而產生：(i)交叉反應抗原與免疫化抗原分享共有之表位，或(ii)其具有在結構上與免疫化抗原上的表位相似之表位(多特異性)。

【0063】 「結合特異性」或「特異性結合」指代實質性識別針對第二分子之第一分子，例如多肽及多株或單株抗體，或對多肽具有特異性之抗體片段(例如，Fv、單鏈Fv、Fab'或F(ab')₂片段)。舉例而言，如本文所用，「特異性」通常指代個別抗體結合位點與僅一個抗原決定子反應之能力，或一群抗體分子與僅一個抗原反應之能力。大體而言，抗原-抗體反應中存在高度特異性。抗體可區分以下中之不同：(i)抗原之初級結構，(ii)抗原之異構形式，及(iii)抗原之二級及三級結構。展現高特異性之抗體-抗原反應顯示出低交叉反應性。

【0064】「實質結合」或「實質地結合」指代在特定分析條件下分析混合物中分子之間的特異性結合或識別之量。在其最廣態樣中，實質結合係關於第一分子無法結合或識別第二分子與第一分子能夠結合或識別第三分子之間的差異，因而該差異足以允許有意義之分析(區分特異性結合)在特定組之分析條件下進行，該等條件包括分子之相對濃度及培養之時間及溫度。

【0065】在另一態樣中，在交叉反應性意義上，一個分子基本上無法結合或識別另一分子，其中在特定組之分析條件下，第一分子針對第二分子呈現之反應性比針對第三分子呈現之反應性小25%、小10%、小5%或小1%。特異性結合可使用許多廣泛已知的方法測試，例如免疫組織化學分析、酶連接之免疫吸附分析(ELISA)、放射性免疫分析(RIA)或西方墨點實驗。

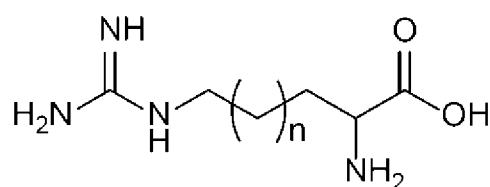
【0066】抗體針對其標靶之親和力可受抗體及/或標靶之環境影響。舉例而言，當一個或另一分子結合於固相或共軛於另一分子時，分子之間的親和力可能不同於溶液中兩個分子之間的親和力。在特定實施例中，本文所揭示之方法利用當分析物處於溶液中時抗分析物抗體針對分析物之親和力與當分析物結合於固相時親和力之間的不同。此外，在各種實施例中，本揭示案之方法利用抗體針對分析物之親和力與抗體針對分析物之衍生物之親和力之間的不同。舉例而言，當抗分析物抗體可能不實質結合分析物之衍生物時，抗體可能以不足反應性結合該衍生物，因而即使抗體與衍生物之低結合親和力亦可適用於本揭示案之方法。舉例而言，當抗體及類似物處於溶液中且衍生物結合於固相時，低結合親和力(例如，抗分析物抗體以低於抗體與分析物之結合的25%之反應性結合分析物之衍生物)

可適用。

【0067】 現轉向本揭示案之各種態樣，本揭示案係針對免疫學方法、設備、試劑及套組，其用於檢測生物樣本中游離SDMA之存在及量。該方法可能包括對照物、校正物或標準物，其包括SDMA或SDMA類似物之一或多者。特定而言，該方法可能使用本領域中彼等技術者所熟知的免疫分析技術完成，其包括(但不限於)使用微盤、多孔基質、流過固相基質及橫向流動裝置。從中獲得用於檢測SDMA之樣本的動物受試者包括人類及非人類動物(例如，伴侶動物、家畜等)受試者。可針對人類及非人類受試者確定與SDMA之存在或量相關之疾病狀態。

【0068】 在一特定態樣中，本揭示案之例示性裝置包括具有非擴散性結合於其上之粒子的固體基質，其中粒子包括共價或被動(非共價)結合於其上之捕獲試劑。捕獲試劑包括分析物或分析物之衍生物，其共價連接於蛋白質，該蛋白質連接於粒子。基質可能係多孔基質，為了易於握持且在自動化分析器上使用，其可置於匣或殼中。參見美國專利公開案第2014/0315216號。

【0069】 當分析物係SDMA時，衍生物包括精胺酸衍生物，諸如非對稱性二甲基精胺酸(ADMA)、L-精胺酸、N-甲基精胺酸(MMA)、醯化ADMA、醯化L-精胺酸、醯化MMA及具有下式之化合物：



其中n係整數0、1、2或3。非對稱性二甲基精胺酸(ADMA)、L-精胺酸、N-甲基精胺酸(MMA)、醯化ADMA、醯化L-精胺酸及醯化MMA可能進一步衍生。在一個態樣中，當衍生物固定於固體載體上時，精胺酸衍生

物針對抗SDMA抗體或抗-醯基-SDMA抗體具有親和力。精胺酸衍生物可能自身係SDMA或醯基-SDMA。或在一些實施例中，SDMA、ADMA N-MMA及其醯化形式之一或多者明確自精胺酸衍生物之組中排除。

【0070】 各種蛋白質可用於連接分析物或分析物之衍生物與固相。特定實例包括牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白、鑰孔血藍素(KLH)及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(G6PDH)。儘管G6PDH熟知為酶標記，但在此上下文中，其功能係連接分析物或衍生物與固相。除非使用合適基質，否則其不具有標記功能，其可藉由在如本文進一步描述之分析中使用分子而非G6PDH (諸如HRP)作為標記在本揭示案之方法中得以避免。G6PDH可能衍生自真核生物、原核生物、酵母或重組表現。

【0071】 對分析物衍生物或類似物所結合之蛋白質(諸如BSA、KLH、卵白蛋白或G6PDH)的任何列舉亦包括蛋白質的變體、異構物、片段及變異體。變體、異構物、片段及變異體保留結合或共軛於分析物、類似物或衍生物及/或結合於固體載體之能力。若蛋白質係酶，蛋白質的變體、異構物、片段或變異體可能或可能不保留酶活性。舉例而言，具有各種胺基酸取代物之G6PDH的變體形式描述於美國專利第6,455,288號中，其全文以引用方式併入本文中。

【0072】 當蛋白質不共價連接於粒子時，相較於BSA、卵白蛋白或KLH與粒子之非共價連接，蛋白質的非共價連接可能對界面活性劑或高鹽濃度容忍度更高。舉例而言，相較於BSA、卵白蛋白或KLH之連接，G6PDH與聚苯乙烯粒子之非共價連接對界面活性劑及高鹽濃度容忍度更高。在各種條件下，可能根據本領域中彼等技術者所熟知的方法測試蛋白質與粒子之連接的容忍度。固相分析形式係常用之結合分析技術。存在許

多分析裝置及程序，其中分析物之存在係由分析物與共軛物及/或固定互補結合成員之結合而指示。在一個特定態樣中，固定結合成員(例如，其精胺酸衍生物或類似物)在分析期間結合於或變得結合於固相，諸如反應孔、量桿、測試條、流過墊、紙、纖維基質或其他合適固相材料。樣本中游離SDMA與抗SDMA抗體之間的結合反應係藉由使樣本與一定量共軛於標記之抗體組合而確定。在使樣本之混合物與固相之共軛物接觸後，培養混合物及固相以允許固定精胺酸衍生物或其類似物與抗SDMA抗體之間的結合。在培養後，自固相移除未結合之反應物。量測標籤之量，該標籤藉由使抗體與衍生物或類似物結合而變得與固相相關。與固相相關之標籤的量與樣本中游離SDMA之量成反比。

【0073】 將精胺酸衍生物或其類似物固定於裝置或固體載體上，因而衍生物或類似物不會由樣本、稀釋劑及/或洗滌程序洗去。

【0074】 在另一態樣中，本揭示案包括一或多種標記之抗體，其在將混合物塗覆於固體載體之前可與測試樣本混合。在此情況中，精胺酸衍生物或其類似物可連接於固體載體，因而類似物不會由樣本、稀釋劑及/或洗滌程序洗走。樣本中標記之抗體與樣本中之SDMA結合，且因此無法與固體載體上的類似物結合。在將混合物塗覆於固體載體且適當培養後，自固體載體上洗去混合物。未結合於樣本SDMA之抗體將變得結合於固體載體上之精胺酸衍生物或其類似物。樣本中SDMA之存在或量與已變得結合於SDMA類似物之抗體的量成反比。與抗體上的標記相關之訊息可藉由合適方法量測。用於量測標記之例示性分析器係催化劑DX[®]系統(IDEXX Laboratories, Inc.)，如美國專利公開案第2014/0315216號中所述，其可與安裝於分析器中之匣或殼中的單層固相組合。

【0075】更特定而言，本揭示案之方法的實例包括形成一種混合物，其包括樣本及標記之共軛物，該共軛物包括共軛於標記之抗SDMA抗體。抗SDMA抗體及標記與抗體之共軛描述於例如美國專利第8,481,690號中。使混合物與本揭示案之裝置接觸，該裝置包括具有非擴散性地結合於其上之粒子的固體基質，其中粒子包括共價或被動(非共價)結合於其上之捕獲試劑。如本文所述，捕獲試劑包括共價連接於蛋白質的SDMA或其衍生物(例如，精胺酸衍生物)，該蛋白質連接於粒子。洗滌固體載體以移除未結合於固體載體之共軛物。量測與固體載體相關之標記的量以確定樣本中SDMA之存在或量。

【0076】如本文所述，SDMA自身可能藉由與蛋白質的共軛及蛋白質與粒子的連接而結合於固相。SDMA與蛋白質的共軛之實例顯示於美國專利申請公開案第US2016/0245801中，其全文併入本文中。在其他實施例中，SDMA之衍生物(例如，精胺酸衍生物、甲基化精胺酸衍生物)可用於替代SDMA，其中相較於針對SDMA之親和力，抗SDMA抗體針對衍生物具有更小親和力。在特定實例中，抗SDMA抗體針對衍生物之親和力低於抗體針對SDMA之親和力的約25%、低於10%、低於5%、低於1%、低於0.1%、低於0.01%或低於0.001%。

【0077】基質材料包括由合成或天然纖維構成之纖維毯(例如，玻璃或基於纖維素之材料或熱塑性聚合物，諸如聚乙烯、聚丙烯或聚酯)；由微粒材料構成之燒結結構(例如，玻璃或各種熱塑性聚合物)；或由硝化纖維素、耐綸、聚砜或類似物(本質通常係合成的)構成之鑄膜。基質亦可由燒結、精細聚乙烯粒子構成，其通常已知為多孔聚乙烯，諸如燒結聚乙烯珠粒。該材料可具有0.35與0.55公克/立方公分之間的密度、5與40微米之

間的孔徑及百分之40與60之間的空隙體積。亦可使用由交聯或超高分子量聚乙烯構成之微粒聚乙烯。例示性基質包括來自Chromex Corporation FN#38-244-1 (Brooklyn, N.Y.) 之 10-15 微米多孔聚乙烯及可獲自Whatman, Inc., USA之FUSION 5™基質。

【0078】亦熟知的是，在特定結合分析中使用試劑浸漬之測試條。在該等程序中，將測試樣本塗覆於測試條之一個部分上，且使其藉由條材料轉移或吸走。因此，待檢測或量測之分析物可能藉助於洗提溶劑通過材料或沿材料傳遞，該溶劑可為測試樣本本身或單獨添加之溶液。分析物轉移至測試條上的捕獲或檢測區中，其中能夠結合抗分析物抗體之分析物類似物或其他化合物得到固定。抗體變得結合於檢測區中之程度可藉助於共軛於抗體之標籤確定，其中共軛物與樣本混合。在一個實施例中，能夠結合抗體之類似物在明顯位置處固定於固體載體上。在添加樣本-共軛物混合物之後，可藉由本領域中任何已知的方式檢測固體載體上的SDMA抗體複合物。舉例而言，以引用方式全文併入本文之美國專利第5,726,010號描述適用於本揭示案之橫向流動裝置SNAP®免疫分析裝置(IDEXX Laboratories)的實例。

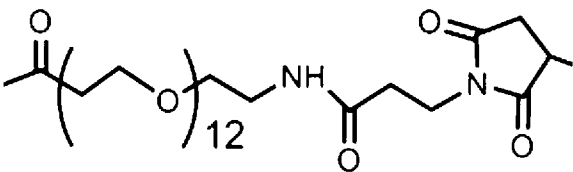
【0079】其他檢測技術使用獨立於用於如本文所述之捕獲試劑的粒子之磁性粒子或微珠粒。舉例而言，藉由使用粒子作為捕獲試劑之部分，超順次氧化鐵浸漬之聚合物珠粒可與例如分析物或分析物之衍生物相關。用於固相之珠粒可自溶液磁性地隔離或分離出來。一旦發生分離，不論直接以光學方式或藉助於照相機，可進行其他測試，包括觀測標記。

【0080】在進一步態樣中，本揭示案係關於使用精胺酸衍生物及其類似物之捕獲試劑，其用於根據本文之揭示內容測定SDMA之方法中。特

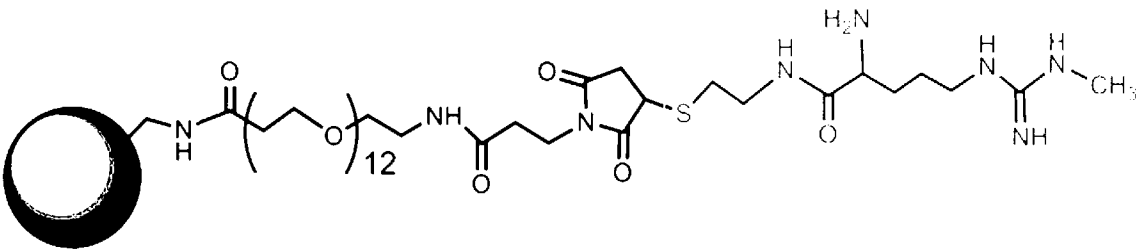
定而言，本揭示案係關於精胺酸衍生物之含硫醇、含羥基、含胺基及含羧酸鹽類似物，其中硫醇基、羥基、胺基或羧酸基使衍生物能夠與諸如活化蛋白質的另一分子(共軛標靶)連接，以形成共軛物。本揭示案之類似物使衍生物能夠連接於諸如蛋白質、多肽、可檢測標記、固體載體及類似物之共軛標靶。

【0081】 本揭示案之一個態樣係關於一種捕獲試劑，其包括精胺酸衍生物之類似物，該衍生物包括例如N-甲基精胺酸(MMA)或醯化MMA之連接於粒子的甲基化精胺酸衍生物。在一個實施例中，類似物藉由連接物結合於粒子，從而類似物共價連接於與粒子相連之蛋白質。蛋白質可能共價或非共價(被動)連接於粒子。蛋白質可能係牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白、鑰孔血藍素(KLH)及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(G6PDH)之至少一者。相較於使用類似物直接連接於其上之固相，使類似物與粒子被動或共價連接且使用粒子將類似物錨向固相導致分析之線性範圍提昇。如本文進一步描述且例示，此實施例亦導致樣本偏差減少或消除。

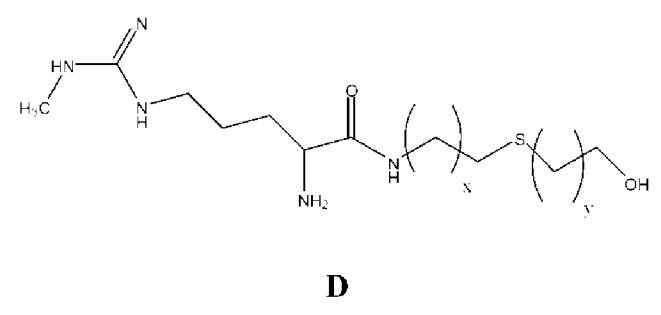
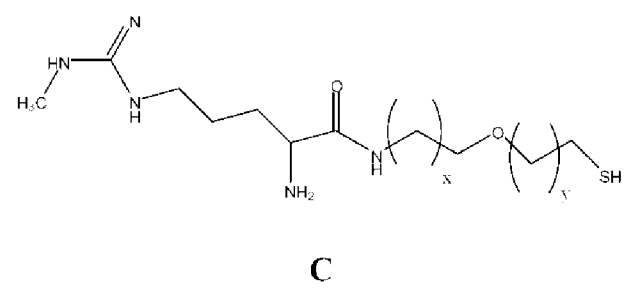
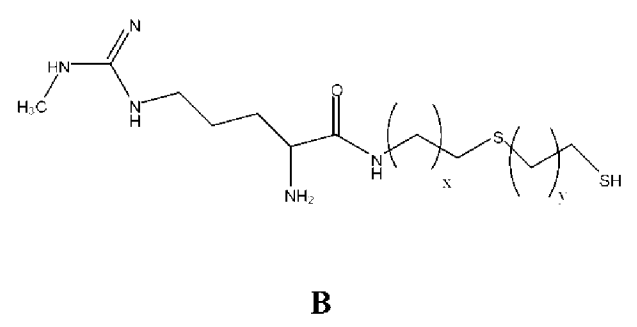
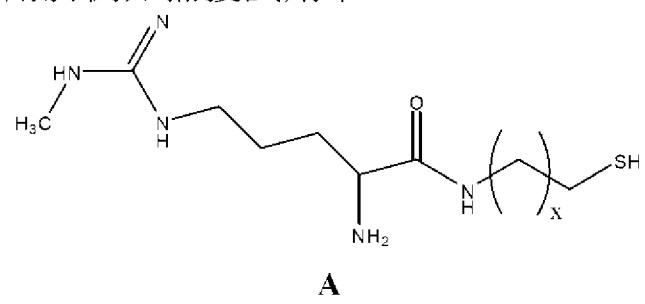
【0082】 在本揭示案之捕獲試劑的一個實例中，連接物包括以下結構：



【0083】 當MMA使用此連接物連接於粒子時，捕獲試劑具有以下結構：

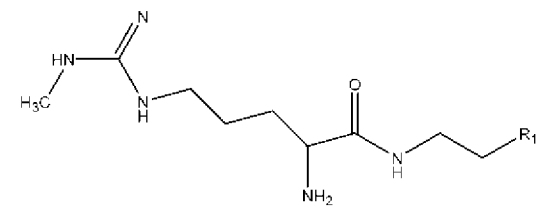


【0084】 此外，以下MMA類似物可能具有以下結構以提供與蛋白質的连接或結合以用於例如捕獲試劑中：



其中x及y係1至5範圍內之整數。

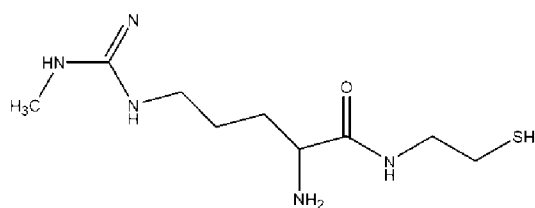
【0085】 根據一個實施例，本揭示案之MMA類似物具有以下通式：



【0086】 其中 R_1 可能係硫醇(或保護之硫醇)、羥基(或保護之羥基)、胺基(或保護之胺基)或羧酸鹽(包括羧酸)或保護之羧酸基。

【0087】 合適硫醇、羥基、胺基基羧酸鹽保護基係本領域中之彼等技術者所已知的，諸如描述於例如T.W. Greene等人. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第3版. (1999)中之彼等物。

【0088】 在一個特定實施例中，本揭示案係針對式(1)之MMA類似物：



(1)

或其鹽。式(1)化合物提供可與共軛標靶反應之可用硫醇，該標靶包括合適「硫醇反應性位點」，亦即，將與硫醇基反應之位點。舉例而言，馬來亞醯胺、烷基及芳基鹵化物及 α -鹵醯基係闡釋性硫醇反應性位點，其可與硫醇反應以形成硫醚。類似地，二硫化吡啶基可與硫醇反應以形成混合之二硫化物。

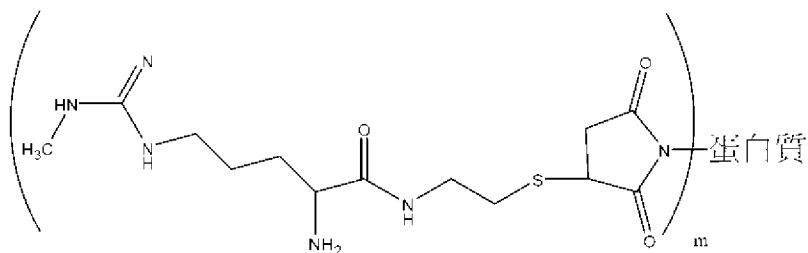
【0089】 在另一實施例中， R_1 係X- R_2 ，其中X係-S-、-O-、-N-或-COO-，且 R_2 係具有硫醇、羥基、胺基或羧酸鹽反應性基團之標記。

【0090】 在一個實施例中， R_1 係X- R_2 ，其中X係-S-、-O-、-N-或-COO-，且 R_2 係已官能化以包括硫醇、羥基、胺基或羧酸鹽反應性基團之蛋白質。

【0091】 在一個實施例中，MMA類似物共軛於馬來亞醯胺活化之蛋白質，諸如(例如)馬來亞醯胺活化之鑰孔貝蛋白質(KLH)或馬來亞醯胺活化之牛血清白蛋白(BSA)。

【0092】 在一個實施例中，式(1)化合物共軛於馬來醯胺活化之蛋白質，諸如(例如)馬來醯胺活化之鑰孔貝蛋白質(KLH)或馬來醯胺活化之牛血清白蛋白(BSA)。

【0093】 因此，在一具體實施例中，本揭示案係關於式(1)化合物與具有下式之馬來醯胺活化之蛋白質的共軛物：



【0094】 通常， m 大於5。然而， m 之值係可變的。舉例而言，在可商購自St. Louis, MO之Sigma-Aldrich的馬來醯胺活化之BSA中， m 係約15個馬來醯胺基/蛋白質；在可商購自Sigma-Aldrich之馬來醯胺活化之KLH中， m 係約80個馬來醯胺基/蛋白質；在可商購自Rockford, IL之Thermo Scientific Pierce Protein Research Products的馬來醯胺活化之BSA中， m 係在約15個至約25個馬來醯胺基/蛋白質範圍內；在可商購自Thermo Scientific Pierce Protein Research Products之馬來醯胺基活化之KLH中， m 係大於約400個馬來醯胺基/蛋白質；且在可商購自A. G. Scientific of San Diego, CA之馬來醯胺基活化之KLH中， m 係在約150個至約300個馬來醯胺基/蛋白質的範圍內。大體而言， m 受限於免疫性蛋白質中存在之可用胺基的數目。可用胺之數目可藉由使免疫性蛋白質與多胺共軛而提高。

【0095】 在一個實施例中，蛋白質係BSA且 m 大於約5。在一個實施例中，蛋白質係BSA且 m 大於約10。在一個實施例中，蛋白質係BSA且 m 大於約25。在一個實施例中，蛋白質係BSA且 m 大於約50。在一個實施例

中，蛋白質係BSA且m大於約75。在一個實施例中，蛋白質係BSA且m在約5至約80範圍內。在一個實施例中，蛋白質係BSA且m大於約75。在一個實施例中，蛋白質係BSA且m在約10至約80範圍內。在一個實施例中，蛋白質係BSA且m大於約75。在一個實施例中，蛋白質係BSA且m在約20至約80範圍內。在一個實施例中，蛋白質係BSA且m大於約75。在一個實施例中，蛋白質係BSA且m在約30至約80範圍內。

【0096】 在一個實施例中，蛋白質係KLH且m大於約5。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m大於約50。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m大於約100。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m大於約200。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m大於約300。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m大於約400。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m大於約500。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m大於約600。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m大於約700。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m大於約800。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m在約5至約800範圍內。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m在約5至約600範圍內。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m在約5至約400範圍內。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m在約5至約200範圍內。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m在約5至約100範圍內。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m在約100至約200範圍內。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m在約100至約300範圍內。在一個實施例中，蛋白質係KLH且m在約100至約400範圍內。在各種態樣中，蛋白質係KLH且m在約100至約500、約100至約600、約100至約700、約100至約800或約100至約1,000範圍內。

【0097】 式(1)化合物與馬來醯胺活化之蛋白質的共軛物可使用本領

域中彼等技術者所熟知的方法特徵化(參見，例如，用於馬來醯胺活化之 BSA、KLH 共軛套組之 Sigma-Aldrich Technical Bulletin (目錄號 MBK1))。

【0098】 在一替代性實施例中，MMA類似物藉由硫醇、羥基、胺基或羧酸基直接連接於固體載體。

【0099】 標記可能自身可檢測(例如，放射性同位素標記、化學發光染料、電化學標記、金屬螯合劑、乳膠粒子或螢光標記)，或在酶標記之情況中，可能催化可檢測之基質化合物或組合物(例如，諸如辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶及類似物之酶)的化學改變。標記可能係自身可能可檢測之特異性結合分子(例如，生物素、抗生物素蛋白、鏈親和素、地高辛、麥芽糖、寡聚組胺酸、2,4-二硝基苯、苯基硼酸鹽、ssDNA、dsDNA等)。MMA可使用本領域中彼等技術者所熟知的方法連接於可檢測之標記。作為闡釋性實例，MMA類似物可連接於來自辣根凍乾粉末(遵循產品受測中之指示，可商購自Sigma-Aldrich St. Louis, MO (目錄號P1709))之馬來醯胺活化的過氧化酶。

【0100】 式(1)之類似物可能根據以下程序製備自MMA (可商購自EMD Chemicals Inc. of Gibbstown, NJ)。MMA之一級及二級胺基係藉由使MMA與二-第三丁基二碳酸鹽(Boc_2O)反應而受到保護。所得第三丁氧基羰基(BOC)保護之MMA ($(\text{Boc}_3)\text{-MMA}$)隨後連接於樹脂。舉例而言，可在2-(1H-7-氮雜苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-三甲基鈾六氟磷酸甲銨(HATU)及N,N-二異丙基乙基胺(DIPEA)於二甲基甲醯胺(DMF)中之存在下，藉由使 $(\text{Boc}_3)\text{-MMA}$ 與樹脂接觸以使 $(\text{Boc}_3)\text{-MMA}$ 連接於半胱胺-4-甲氧基三苯甲基樹脂(可商購自EMD Chemicals, Inc. of Gibbstown, NJ)，從而提供樹

脂結合之(Boc₃)-MMA半胱胺。移除樹脂結合(Boc₃)-MMA半胱胺上的BOC保護基，且使用例如三氟乙酸於二氯甲烷中自樹脂去除所得樹脂結合MMA半胱胺，從而提供MMA半胱胺，其藉由與鹽酸反應轉化為鹽酸鹽。

【0101】 上文所述式A-D之類似物可使用類似方法製造。

【0102】 使用如本文所述之MMA共軛物或其他甲基化精胺酸衍生物之共軛物，可構建裝置的固相組分。舉例而言，固相可能包括MMA或醯化MMA之類似物，其共價連接於G6PDH，該G6PDH非共價連接於非擴散性地結合於固相之粒子，固相諸如(例如)多孔基質。如本文所述，固相可安裝於匣或托架中，從而促進其在自動化分析器上或橫向流動裝置中之使用。

【0103】 在一個態樣中，包括非擴散性結合粒子之固相可藉由將含有粒子之粒子滴點稀釋劑滴點於固相上而製備。舉例而言，粒子滴點稀釋劑可包括各種緩衝劑、界面活性劑及/或其他化合物(例如，糖)，其促進粒子與固相之黏合。在已塗覆稀釋劑之後，塗覆於固相之稀釋劑的體積及稀釋劑中粒子之濃度將影響結合於固相之粒子數目。在各種實施例中，稀釋劑具有約0.001%及1.0%之粒子濃度，例如0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%及1.0%，如在本文中徹底例舉，包括0.001%與1.0%之間的所有值。

【0104】 在使用中，固相亦包括結合於類似物之抗SDMA抗體，其中抗體針對類似物之親和力比其針對SDMA之親和力低。舉例而言，抗SDMA抗體針對類似物之親和力可能低於抗體針對SDMA之親和力的約25%、低於約10%、低於約5%、低於約1%、低於0.1%、低於0.01%或低於0.001%。在實施例中，標記SDMA抗體。

【0105】 類似地，本揭示案係針對一種組合物，其包括N-甲基精胺酸(MMA)、醯化MMA、ADMA、醯化ADMA或另一甲基化精胺酸衍生物之類似物，其中該類似物與抗SDMA抗體複合。在各種實施例中，抗體針對固定類似物之親和力低於其針對溶液中之SDMA的親和力。舉例而言，抗SDMA抗體針對固定類似物之親和力低於抗體針對溶液中之SDMA的親和力之約25%。在實施例中，標記SDMA抗體。類似物可能共價連接於蛋白質，諸如牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白、鑰孔血藍素(KLH)及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(G6PDH)，且蛋白質可能非共價連接於固體載體。在一個實施例中，蛋白質非共價連接於非擴散性地結合於固體載體之粒子。在另一實施例中，蛋白質藉由使用例如本領域中之彼等技術者所熟知的技術共價連接於粒子。

【0106】 抗SDMA抗體可連接於標記以提供可檢測之抗SDMA抗體，以用於受體結合分析中，諸如針對SDMA之免疫分析。抗SDMA抗體可使用本領域中彼等技術者所熟知的方法連接於標記。例如，免疫化學協議；Molecular Biology, 第295卷, R. Burns編2005)中之方法。可檢測之抗SDMA抗體可能以各種均質、三明治、競爭性或非競爭性分析形式使用，從而產生與測試樣本中SDMA之存在或量相關的訊息。在一個實施例中，本揭示案之方法使用抗SDMA抗體特定結合於游離SDMA (亦即，非多肽鏈之部分的SDMA)同時亦與諸如ADMA、L-精胺酸及/或N-甲基精胺酸之SDMA衍生物交聯反應之能力。在本揭示案之方法的各種實施例中，抗SDMA抗體針對衍生物之親和力低於抗體針對SDMA之親和力的約25%、低於約10%、低於約5%、或低於約1%、低於約0.1%、低於約0.01%或低於約0.001%。

【0107】 本揭示案進一步提供診斷套組，其含有如本文所述用於檢測SDMA之裝置及試劑。通常，除SDMA外，該套組含有至少一種與固相關之精胺酸衍生物(諸如SDMA衍生物)及一種基本上結合於SDMA之試劑，諸如抗SDMA抗體。套組通常亦包括描述如何進行上述診斷分析及/或如何解釋自其獲得之結果的指導或指示。相應地，在各種實施例中，本揭示案係針對用於確定樣本中SDMA之套組。套組包括如本文所述之裝置，其包括具有固定於其上之捕獲試劑的固相，且亦包括包含共軛於標記之抗SDMA抗體的共軛物，其中抗SDMA抗體針對捕獲試劑之親和力低於抗體針對SDMA之親和力的約25%。在一個實施例中，套組包括具有包括MMA或醯基MMA之類似物的捕獲試劑之固體載體，及共軛於標記之抗SDMA抗體的共軛物，其中抗SDMA抗體針對捕獲試劑之親和力低於抗體針對SDMA之親和力的約25%。

【0108】 在一個特定實例中，若需要或合適，該套組將包括一種裝置，其與特異性結合之試劑(例如，非固定標記之特異性結合試劑及固定分析物捕獲試劑)及洗滌試劑、以及檢測器試劑及陽性及陰性對照試劑競爭。此外，可包括其他添加劑，諸如穩定劑、緩衝劑及類似物。可改變各種試劑之相對量，從而提供基本使分析敏感度最佳化之溶液中的試劑濃度。特定而言，試劑可提供為乾燥粉末，通常係凍乾的，其溶解時將提供一種試劑溶液，其具有與樣本結合之合適濃度。

【0109】 裝置可能亦包括一種液體試劑，其將未結合之材料(例如，未反應之流體樣本及未結合之特異性結合試劑)自反應區(固相)轉移開。液體試劑可為洗滌試劑，且僅用於自反應區移除未結合之材料，或其可包括檢測器試劑，且同時用於移除未結合之材料且促進分析物檢測。舉例而

言，在特異性結合試劑共軛於酶之情況中，當在反應區處與酶-抗體共軛物反應時，檢測器試劑包括產生可檢測之訊息的基質。在共軛於放射活性、螢光或吸光分子之經標記特異性結合試劑的情況中，檢測器試劑僅用作藉由洗去未結合之標記試劑在反應區處促進複合物形成之檢測的洗滌溶液。

【0110】 兩種或更多種試劑可存在於裝置中，舉例而言，裝置可包括用作洗滌試劑之液體試劑及用作檢測器試劑且促進分析物檢測之液體試劑。

【0111】 本揭示案之套組及裝置可用於方法中以減少血清及血漿樣本之間的分析偏差。如下文實例中所述，當與直接連接於固相(例如藉由連接物)之類似物比較時，使用蛋白質以使分析物之類似物或分析物之衍生物與隨後固定於固相上之粒子連接減少了樣本之間的偏差。相應地，在一個實施例中，本揭示案係針對一種方法，其用於減少或消除針對血清或血漿樣本中之分析物的免疫分析中的血清-血漿偏差。該方法包括形成樣本與標記之抗分析物抗體共軛於標記之共軛物的混合物。該混合物與包括固體載體之裝置接觸，載體具有非擴散性結合於其上之粒子，其中粒子包括捕獲試劑，該試劑包括分析物之類似物或分析物之衍生物，其共價連接於與粒子連接之蛋白質。針對分析物捕獲試劑之抗分析物抗體的親和力低於抗體針對分析物之親和力的約25% (例如，約10%、約5%、約1%、約0.1%、約0.01%或約0.001%)。該方法進一步包括洗滌固相以移除未結合之共軛物，且量測與固相相關之標記的量從而確定樣本中分析物之存在或量。

【0112】 在特定實例中，本揭示案包括一種方法，其用於減少或消

除針對血清樣本或血漿樣本中對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之免疫分析中之血清-血漿偏差。該方法包括形成一種混合物，其包括樣本及包括共軛於標記之抗SDMA抗體的標記共軛物。該混合物與固體載體接觸，該載體包括具有連接於蛋白質之類似物的固相，其中蛋白質非共價連接於粒子，該粒子非擴散性地結合於固相。如本文更詳盡地描述，抗SDMA抗體針對精胺酸衍生物之親和力低於抗體針對SDMA之親和力的約25% (例如，約10%、約5%、約1%、約0.1%、約0.01%或約0.001%)。方法包括洗滌固體載體以移除未結合於固體載體之共軛物，且量測與固體載體相關之標記的量，從而確定樣本中SDMA之存在或量。

【0113】 如已在先前描述，在來自動物之生物樣本中檢測游離SDMA可指示動物之腎功能。此外，動物可能患有甲狀腺機能亢進症及腎病。甲狀腺機能亢進症可導致肌肉量損失。肌酸酐係甲狀腺機能亢進患者之腎病的較差標誌，此係因為降低之肌肉量導致較低肌酸酐值。肌酸酐亦因與甲狀腺機能亢進症之較低代謝狀態相關之超濾而降低(參見Jepson R. Feline hyperthyroidism and chronic kidney disease. In: Proceedings from the BSAVA Congress; 四月9-12, 2015; Birmingham, UK)。因此，當肌酸酐量用於監測腎功能時，甲狀腺機能亢進症可標誌腎病之存在(Williams T. Chronic kidney disease in cats with hyperthyroidism. Clin Brief. Sept 2015:10-12)。SDMA係用於監測甲狀腺亢進患者之腎病的優越標誌，此係因為SDMA值不受肌肉量影響。針對此等原因，對於診斷目的有利的是，組合用於甲狀腺標誌的分析-諸如甲狀腺素(T4)-與用於SDMA之分析。如本文所用，用於T4之分析可能包括用於游離T4、結合T4或全部T4之分析。在特定分析結構中，有利的是，在單一器皿中組合

用於T4及SDMA分析所需之試劑。以此方式組合試劑降低了複雜性、成本且簡化了分析工作流。

【0114】 相應地，在一個實施例中，本揭示案係針對一種方法，其用於確定來自患者之生物樣本中SDMA之組合。該方法包括使樣本與抗T4抗體及抗SDMA抗體接觸，且確定T4與抗T4抗體之間的結合，且確定SDMA與抗SDMA抗體之間的結合。在特定實施例中，抗T4抗體或抗SDMA抗體或二者連接於可檢測之標記。為了促進該方法，本揭示案之一個態樣包括一種試劑組合物，其同時包括抗T4及抗SDMA抗體。本揭示案亦針對一種套組，其包括含有試劑組合物之器皿，該器皿用於儲存或用於在T4與SDMA之組合中進行分析之目的。在另一實施例中，試劑組合物及其組分可能經凍乾，其可能位於器皿中。套組可能進一步包括一種器皿，其含有適用於T4分析及SDMA分析之洗滌溶液。套組亦可能包括用於酶標記之基質，其中根據分析之形式，標記可能連接於抗體或可能共軛於適用於T4分析及SDMA分析之SDMA或T4的類似物。

【0115】 在不進一步詳細解釋之情況中，咸信使用先前描述之本領域中的一名技術者可在最大程度上使用本揭示案。本揭示案之其他特徵及優點將在以下實例中顯而易見。提供以下內容僅用於例示目的，且不意欲在上文之廣義詞中限制所描述之本揭示案之範疇。本揭示案中引用之所有參考文獻均以引用方式併入本文中。

實例

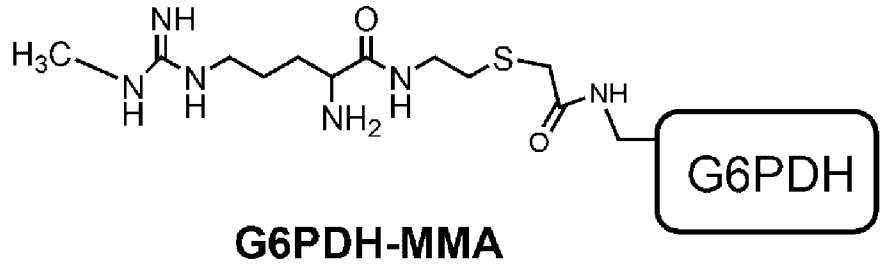
【0116】 實例1：製備與G6PDH之MMA、ADMA及SDMA共軛物

【0117】 MMA、ADMA或SDMA與G6PDH之共軛物係藉由使MMA-SH、ADMA-SH或SDMA-SH與經碘醋酸琥珀醯亞胺酯(SIA)活化

之G6PDH共軛而製備。SIA交聯劑含有胺反應性N-羥基丁二醯亞胺(NHS)酯及氫硫基反應性碘乙醯基。NHS酯與側鏈賴胺酸(K)殘基上存在之一級胺基(-NH₂)及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(G6PDH)之N端反應。在藉由透析之純化後，碘乙醯基與活化MMA (MMA-SH)、ADMA (ADMA-SH)或SDMA (SDMA-SH)之氫硫基反應，該等活化物質產生於穩定硫醚連接之G6PDH-MMA或G6PDH-SDMA共軛物。共軛程序之進一步細節顯示如下：

【0118】 合成G6PDH-MMA共軛物

【0119】 G6PDH-MMA共軛物具有以下結構：



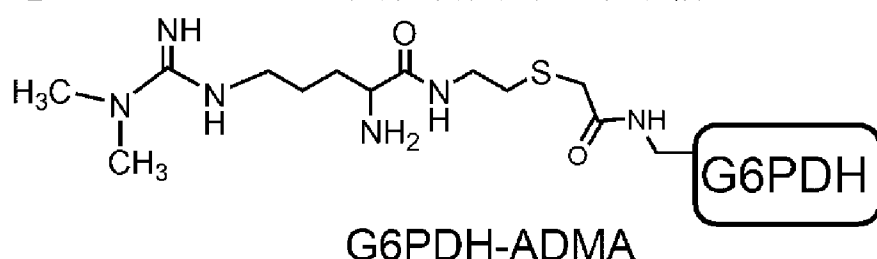
【0120】 根據以下程序製備共軛物。首先，將108 mg G6PDH粉末溶解於33 ml MES緩衝劑(50 mM，pH6.5)中，且在25℃下培養10分鐘以製備2.11 mg/ml G6PDH儲備溶液(由BCA套組量測)。將28.4 ml G6PDH儲備溶液添加至9.1 ml MES緩衝劑(50 mM，pH6.5)中，以形成G6PDH反應溶液。將50 mg SIA溶解於1 ml DMSO中以製備SIA儲備溶液，其濃度係50 mg/ml。將84.9 μl SIA儲備溶液(50 mg/ml於DMSO中)之量添加至前述G6PDH反應溶液(37.5 ml)中，且在25℃下快速混合且翻轉旋轉持續2.0小時。在4℃下針對PBS (4L)透析反應混合物兩次，且在4℃下針對MES緩衝劑(50 mM，pH 8.0)透析一次。隨後，將EDTA (0.5 M，pH 8.0)添加至反應混合物中，獲得5mM之最終EDTA濃度。

【0121】 將25 mg MMA-SH.2HCl化合物溶解於8.4 ml之5 mM

EDTA溶液中且充分混合。隨後，將5.76 ml MMA-SH溶液添加至上述SIA活化之G6PDH溶液中，且在4℃下翻轉旋轉持續24小時。隨後，在4℃下針對PBS透析G6PDH-MMA共軛物三次，且針對MES緩衝劑(50 mM，pH5.0)透析一次。藉由BCA套組量測G6PDH-MMA共軛物之濃度，且隨後儲存於-80℃以供進一步使用。

【0122】 合成G6PDH-ADMA共軛物

【0123】 G6PDH-ADMA共軛物具有以下結構：



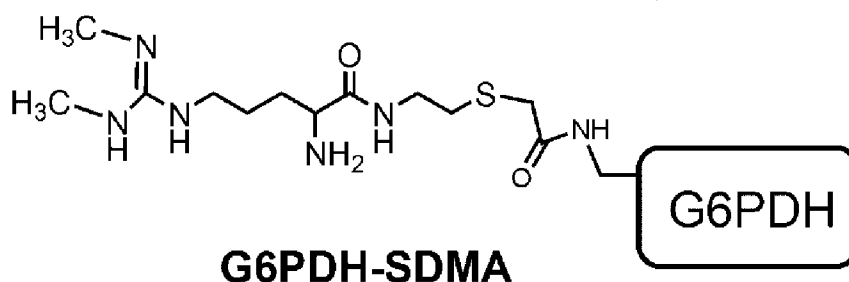
【0124】 根據以下程序製備共軛物。首先，將32.3 mg G6PDH粉末溶解於10 ml MES緩衝劑(50 mM，pH6.5)中，且在25℃下培養10分鐘以製備2.2 mg/ml G6PDH儲備溶液(由BCA套組量測)。將50 mg SIA溶解於1 ml DMSO中以製備SIA儲備溶液，其濃度係50 mg/ml。將18.1 μl SIA儲備溶液(50 mg/ml於DMSO中)之量添加至前述G6PDH反應溶液(8 ml)中，且在25℃下快速混合且翻轉旋轉持續2.0小時。在4℃下針對PBS (4L)透析反應混合物兩次，且在4℃下針對MES緩衝劑(50 mM，pH 8.0)透析一次。隨後，將EDTA (0.5 M，pH 8.0)添加至反應混合物中，獲得5mM之最終EDTA濃度。隨後，將如下合成且溶解於5 mM EDTA溶液(3.8 mM)中之2.7 ml ADMA-SH添加至上文SIA活化之G6PDH溶液中，且在4℃下翻轉旋轉持續24小時。隨後，在4℃下針對PBS透析G6PDH-ADMA共軛物三次，且針對MES緩衝劑(50 mM，pH5.0)透析一次。藉由BCA套組量測G6PDH-ADMA共軛物之濃度，且隨後儲存於-80℃以供進一步使

用。

【0125】 根據以下程序合成ADMA-SH.2TFA。將半胱胺4-甲氧基三苯甲基樹脂(0.9 g, 0.74 mmol)、Fmoc-ADMA(pdb)-OH (1.0 g, 1.5 mmol, 2.0當量)、HATU (0.7 g, 1.8 mmol, 2.5當量)、二異丙基乙胺(0.6 mL, 3.7 mmol, 5.0當量)及脫水DMF (20 mL)添加至20 ml小瓶中。使混合物封端，且在25℃下翻轉旋轉持續16小時。隨後，藉由過濾移除液體，且用DMF (20 mL, 4次)及甲醇(20 mL, 4次)洗滌樹脂。隨後，用20 ml 20%哌啶於DMF中處理樹脂三次，且每次培養30分鐘。用DMF (20 mL, 4次)及甲醇(20 mL, 4次)洗滌樹脂，且在真空下乾燥。為了自樹脂去除ADMA-SH，將3 ml TFA添加至前述樹脂中，且在25℃下翻轉旋轉3小時。在濾除樹脂後，蒸發TFA液體以在真空下乾燥，且獲得類似ADMA-SH.2TFA糖漿之產物。將ADMA-SH.2TFA產物溶解於5 mM EDTA溶液中作為藉由艾爾曼試劑(Ellman's reagent)量測的3.8 mM ADMA-SH儲備物。

【0126】 合成G6PDH-SDMA共軛物

【0127】 G6PDH-SDMA共軛物具有以下結構：

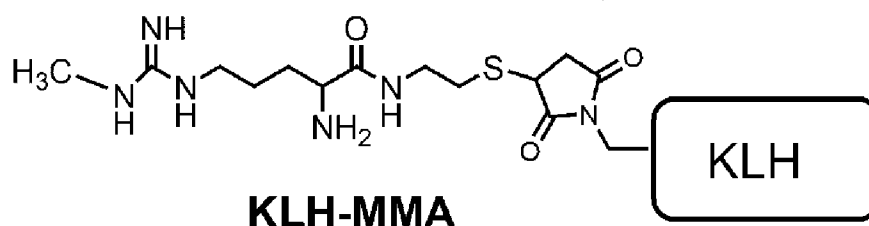


【0128】 根據以下程序製備共軛物。將一瓶葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(G6PDH) (12 mg)溶解於3 ml MES緩衝劑(50 mM, pH 8.0)中，且旋轉1小時以保證酶充分溶解於緩衝劑中。將製備之酶溶液保存於冰上，直至需要。將額外4.5 ml MES緩衝劑(50 mM, pH 8.0)添加於酶溶液中，藉由渦

流(5秒)充分混合，且保存於冰上持續10分鐘。將100 mg G6P溶解於1 mL 去離子水中，且保存於冰上持續10分鐘。將200 mg NADH溶解於1 ml 去離子水中，且保存於冰上持續10分鐘。將0.68 ml G6P溶液及0.34 ml NADH溶液添加於酶溶液中，藉由渦流(5秒)充分混合，且亦保存於冰上持續10分鐘。將一瓶SIA (50 mg)溶解於0.5 ml DMSO (100 mg/ml)中，且將0.14 ml形成之SIA溶液添加至酶溶液中，藉由渦流(5秒)充分混合，用鋁箔覆蓋，且在室溫下旋轉2小時。隨後，將溶液轉移至G2 Slide-A-Lyzer透析盒，且在4°C下在暗處針對PBS緩衝劑(4 L)透析五小時。在將透析緩衝劑轉變為新鮮PBS (4 L)後，在暗處於4°C下再次透析溶液隔夜。隨後，將透析緩衝劑轉變為MES (4 L, 25 mM, pH 8.0)且在4°C下透析溶液3小時。自透析盒移除12.5 ml酶溶液，且添加0.32 ml MES緩衝劑(1M, pH8.0)及0.32 ml EDTA (0.2M, pH8.0)以獲得最終溶液濃度50 mM MES及5 mM EDTA。若必要，例如，若酶溶液小於12.5 ml，MES及EDTA之體積可能得到相應調整。用氫氣使溶液脫氣持續5分鐘。

【0129】 實例2：合成KLH-MMA共軛物

【0130】 KLH-MMA共軛物具有以下結構：

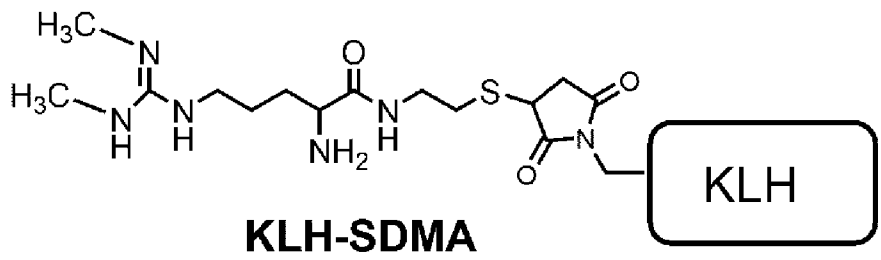


【0131】 根據以下程序製備共軛物。將5 mg馬來醯胺活化之KLH蛋白質溶解於具有5 mM EDTA之2.0 ml MES緩衝劑(50 mM, pH 8.0)中，且隨後與2.5 ml MMA-SH (5 mg/ml於5 mM EDTA溶液中)混合。在4°C下翻轉旋轉反應混合物持續超過36小時，且量測偶聯功效。隨後，使反應混

合物翻轉旋轉持續另一24小時，且再一次量測偶聯功效。隨後，在4℃下用10K分子量截止點針對PBS (4L)透析所製備之KLH-MMA共軛物三次。進一步針對MES緩衝劑(25 mM，pH5.0)透析KLH-MMA共軛物。

【0132】 實例3：合成KLH-SDMA共軛物

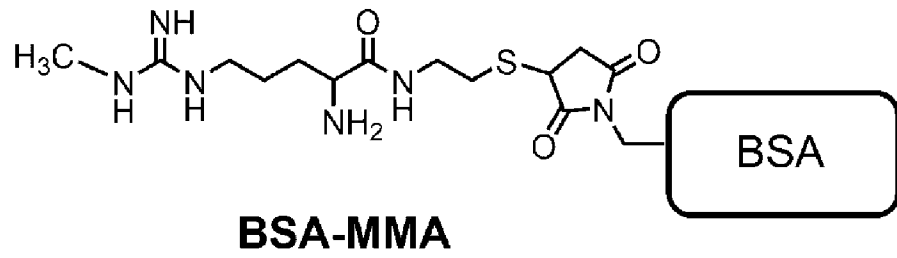
【0133】 KLH-SDMA共軛物具有以下結構：



【0134】 根據以下程序製備共軛物。將5 mg馬來醯胺活化之KLH蛋白質溶解於具有5 mM EDTA之2.0 ml MES緩衝劑(50 mM，pH 8.0)中，且隨後與2.5 ml SDMA-SH溶液(3.6 mM於5 mM EDTA中)混合。在4℃下翻轉旋轉製備之反應混合物持續超過36小時，量測偶聯功效，隨後翻轉旋轉混合物持續另一24小時，且再次量測偶聯功效。隨後，在4℃下用10K分子量截止點針對PBS (4L)透析所製備之KLH-MMA共軛物三次。隨後針對MES緩衝劑(25 mM，pH5.0)透析共軛物。

【0135】 實例4：合成BSA-MMA共軛物

【0136】 BSA-MMA共軛物具有以下結構：

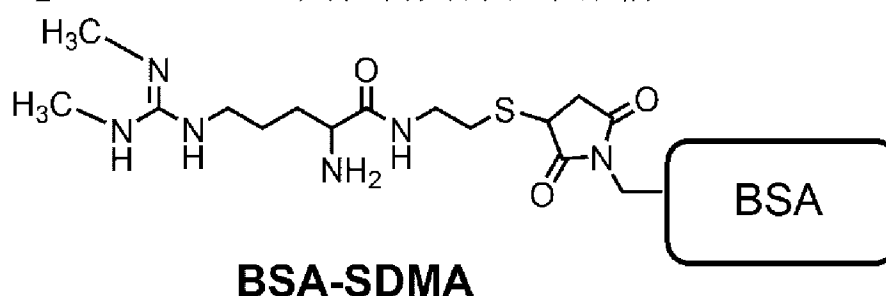


【0137】 根據以下程序製備共軛物。將25 mg MMA-SH溶解於DMSO中以製造50 mM MMA-SH儲備溶液，且經由艾爾曼試劑確定濃度。將MMA-SH儲備物稀釋於MES緩衝劑(50 mM pH8.0及5 mM EDTA)

中，以獲得3.6 mM之最終濃度。將2.5 ml之3.6 mM MMA-SH溶液添加至5 mg馬來醯胺活化之BSA中，充分混合，且隨後在4°C下翻轉旋轉36小時。隨後，在4°C下針對PBS (4 L)透析製備之BSA-MMA共軛物三次，在4°C下針對MES緩衝劑(25 mM，pH5.0)透析一次。

【0138】 實例5：合成BSA-SDMA共軛物

【0139】 BSA-SDMA共軛物具有以下結構：



【0140】 根據以下程序製備共軛物。將剛剛自SDMA-硫醇-樹脂去除之SDMA-SH (100 mg)溶解於MES緩衝劑(50 mM，pH8.0及5 mM EDTA)中，且經由艾爾曼試劑套組確定淨SDMA-SH之濃度係3.6 mM。將2.5 ml SDMA-SH溶液添加至5 mg馬來醯胺活化之BSA中，充分混合，且隨後在4°C下翻轉旋轉持續36小時。在4°C下針對PBS (4 L)透析製備之BSA-SDMA共軛物三次。隨後，針對MES緩衝劑(25 mM，pH5.0)透析共軛物一次。

【0141】 實例6：將G6PDH-MMA與G6PDH-ADMA共軛物被動塗覆於乳膠粒子上

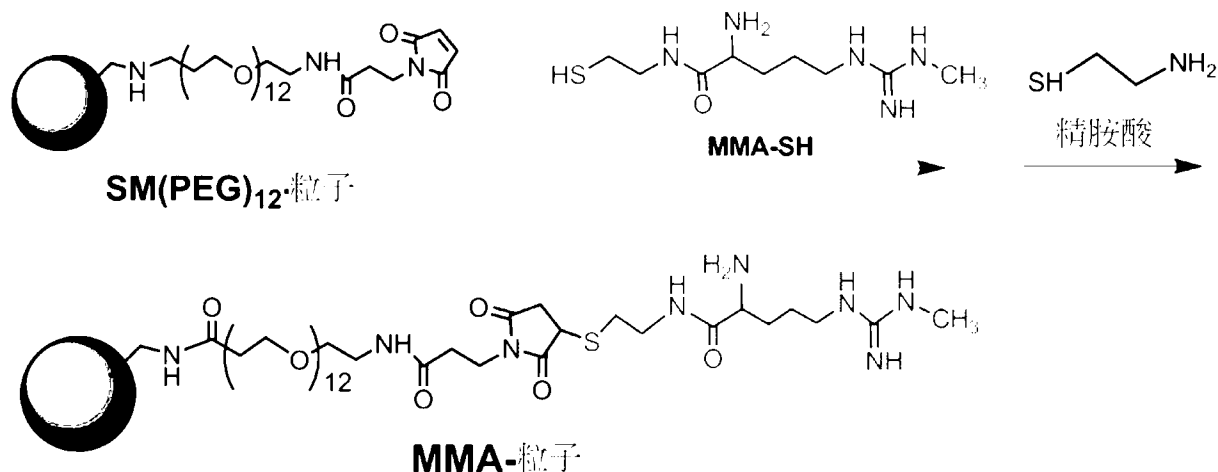
【0142】 以下程序用於製備具有被動塗覆之G6PDH-MMA共軛物的乳膠粒子。類似程序用於製備具有被動塗覆之G6PDH-ADMA共軛物的乳膠粒子。類似程序可用於使粒子被動塗覆有G6PDH與其他精胺酸衍生物之共軛物。此外，類似程序可用於使粒子塗覆有含有其他蛋白質的共軛物。

【0143】 將500 μl 乳膠粒子懸浮液(5% w/v %；粒度0.52 μm)添加至2 ml塑料管中，且以10K rpm離心5分鐘，且移除且丟棄上清液。將500 μl 塗覆緩衝劑添加至粒子丸中，且藉由移液充分混合。隨後，使混合物離心以移除上清液。

【0144】 將1.48 mL G6PDH-MMA (0.638 mg/mL於塗覆緩衝劑(MES 25 mM，pH5.0)中)添加至粒子丸中，且重新懸浮且充分混合粒子。為了使0.5 μM 乳膠粒子塗覆有單層共軛物，每毫克珠粒使用34.3 μg 共軛物。在4°C下，翻轉旋轉粒子懸浮液及共軛物混合物持續16小時。隨後，以10,000 rpm使粒子懸浮液離心持續5分鐘。移除上清液，且用0.2 μm 過濾器過濾。使用BCA蛋白質分析套組(Thermo Fischer)量測共軛物剩餘物，從而確定塗覆功效。用塗覆緩衝劑洗滌粒子兩次，且隨後將其再懸浮於塗覆緩衝劑中且儲存於4°C下。藉由將5 μL 上文粒子懸浮液稀釋於995 μL 水($\times 200$ 稀釋度)中且在650 nm處讀取，從而確定塗覆之粒子濃度。 A_{650} 係0.348，相當於1.8 %固體粒子(w/v)。

【0145】 實例7：合成化學改質之MMA-胺基-粒子

【0146】 化學改質MMA-胺基-粒子之製備係使用以下簡圖顯示，且顯示於以下程序中。此程序可通常與其他精胺酸衍生物一同使用：



【0147】 胺基-粒子之SM(PEG)12-活化

【0148】 將10 ml胺改質聚苯乙烯粒子之懸浮液(5% w/v；粒度0.55 μm)添加至50 ml Falcon管中，且以7000 rpm離心25分鐘，隨後丟棄上清液。用20 ml磷酸鹽緩衝劑(50 mM，pH7.4)洗滌粒子九兩次，且隨後在pH 7.4下將其再懸浮於20 ml磷酸鹽緩衝劑中。將100 mg SM(PEG)12 (Thermo Fischer Pierce)溶解於1 ml DMSO中，以獲得100 mg/ml之最終濃度。在振盪器中，將SM(PEG)12溶液逐滴添加至胺粒子懸浮液中，且隨後在25°C下翻轉旋轉持續4小時。藉由以7000 rpm離心20分鐘洗滌粒子混合物四次，藉由音振作用再懸浮於磷酸鹽緩衝劑(40 ml)中持續1分鐘，且培養20分鐘。在第四次洗滌後，將粒子再懸浮於具有5 mM EDTA之20 ml 磷酸鹽緩衝劑中。

【0149】 共軛於SM(PEG)12粒子之MMA-SH

【0150】 將25 mg MMA-SH-2TFA溶解於4.2 ml之5 mM EDTA溶液中，從而製備12.5 mM MMA-SH儲備溶液。稀釋MMA-SH儲備物(12.5 mM)至1.25 mM，從而製備中間MMA-SH溶液，隨後再一次稀釋至0.05 mM以製備MMA-SH作用溶液。振盪上文SM(PEG)12活化之粒子溶液(10 ml)，且將對應體積之MMA-SH作用溶液(0.05 mM)逐滴添加至粒子溶液。藉由音振作用使粒子充分混合，且隨後在25°C下翻轉旋轉持續15小時。以5 mM添加半胱胺，且與粒子一同培養持續額外1小時。隨後，以6000 rpm使粒子離心持續15分鐘，且用12 ml磷酸鹽緩衝劑藉由音振作用洗滌五次，且再懸浮。隨後，將粒子再懸浮於10 ml磷酸鹽緩衝劑中。為了量測粒子濃度，將懸浮液稀釋於去離子水中200次，且在650 nm處讀取OD。

【0151】 實例8：製備粒子滴點稀釋劑

【0152】 對於500 ml範圍，混合以下材料，且將液體之最終pH調整至7.4。

50 ml 1 M磷酸鹽緩衝劑

50公克蔗糖

20 µl TWEEN[®] 20界面活性劑

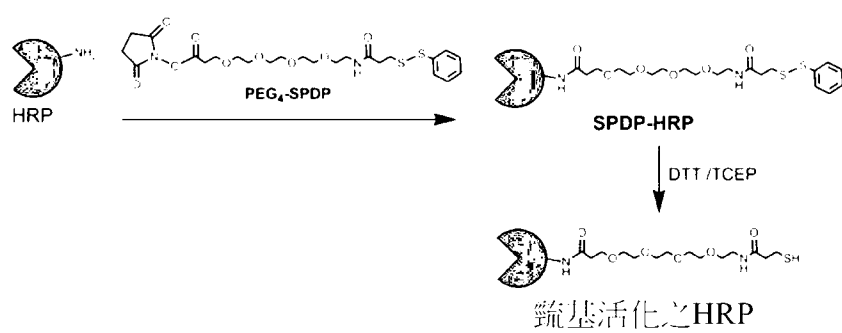
450 ml去離子水

【0153】 實例9：合成抗SDMA抗體-HRP共軛物

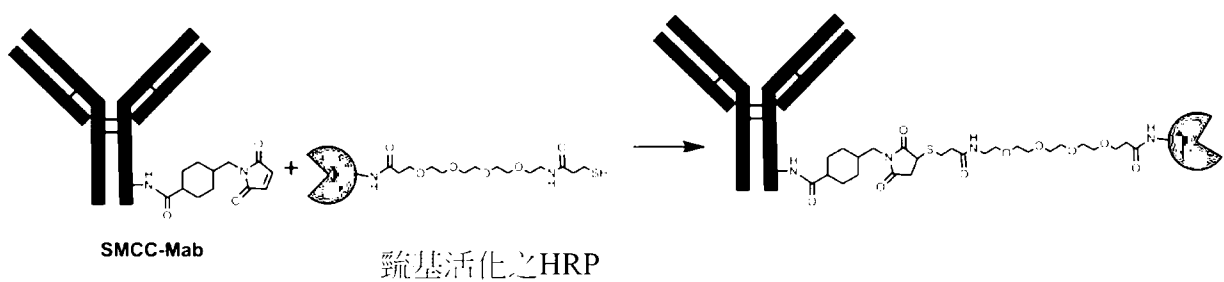
【0154】 四步反應方案用於製備抗SDMA抗體及HRP共軛物，其係經由抗體之磺基活化及酶辣根過氧化酶(HRP)之托特試劑(Traut's reagent)或SPDP試劑活化進行。在步驟1中，馬來醯胺用於使抗體溶液中任何游離硫醇片段封端，以避免抗體在SMCC活化製程期間的交聯。在步驟2中，SMCC交聯劑與抗體反應以生成馬來醯胺活化之抗體(SMCC-Mab)。在步驟3中，在藉由透析將未反應之過量交聯劑移除後，SMCC活化之抗體與巰基活化之HRP反應，其係藉由使用托特試劑之HRP活化或藉由SPDP而製備。SMCC活化之抗體係藉由巰基與HRP酶反應。Mab-HRP之合成的化學途徑係顯示於以下簡圖中(由使用托特試劑之HRP活化或由SPDP代表之步驟3及步驟4)：

【0155】 或者，步驟3及步驟4可如下完成：

步驟3：HRP之SPDP活化劑藉由DTT/TCEP之還原



步驟4：SMCC-Mab與巯基活化之HRP的共軛



【0156】 步驟1-4之程序更特定顯示於下文：

【0157】 步驟1：不純游離硫醇之馬來醯胺封端

【0158】 將 15 μl 0.5 M 馬來醯胺於 DMSO 中添加至 4 ml 之 5.6 mg/mL 抗 SDMA Mab (如美國專利第 8,481,690 號中製備) (總計 22.4 mg) 於 PBS 中，且隨後在室溫下翻轉旋轉持續 45 分鐘。在 4°C 下針對 PBS (4L) 透析封端抗體溶液三次。藉由使用 PBS 進行 10 倍抗體稀釋且讀取 OD 280 nm ($\text{OD}_{280}=1.37$ 等於 1 mg/ml) 將抗體濃度確定為 5.2 mg/ml。

【0159】 步驟2：抗 SDMA Mab 之 SMCC 活化

【0160】 隨後，將 50 μl 磺基-SMCC (無重量形式，在打開前使小瓶平衡至室溫以防止水汽冷凝，將 2 mg 添加至 100 μl DMSO 中以製造 10.0 mg/ml 溶液) 添加至 3.3 ml 馬來醯胺封端之 Mab 以 5.2 mg/ml 於 PBS 中，使其緩慢混合且在室溫下翻轉旋轉(以低速緩慢旋轉)持續 1 小時。在 4°C 下針對 PBS (4L) 透析 SMCC 活化之抗體三次。藉由使用 PBS 對抗體進行 10 倍稀

釋以確定SMCC活化之抗體(SMCC-Ab)的濃度，且隨後在280 nm處讀取OD為4.9 mg/ml。

【0161】 步驟3 (替換物1)：HRP之托特試劑活化

【0162】 將40 mg HRP溶解於3 ml具有5 mM EDTA之PBS中，且HRP之最終濃度係13.3 mg/ml。將0.275 ml托特試劑(20 eq)於水中(10 mg/ml)添加至上文HRP溶液中，且隨後在25°C下翻轉旋轉1小時。隨後，藉由PD-10管柱使溶液脫鹽，且用包括5 mM EDTA之PBS緩衝劑洗滌。收集棕色部分，且量測405 nm處之OD以確定7.8 mg/ml之HRP濃度。

【0163】 步驟3 (替換物1)：製備抗體-HRP托特共軛物

【0164】 將0.7 ml SMCC-Mab於PBS (2.23 mg/ml)中添加至EDTA溶液(0.5 M，pH8.0)中以實現5 mM之最終EDTA濃度。添加上文純化之0.64 ml托特-HRP (12 Eq，7.8mg/ml)，且隨後在4°C下翻轉旋轉混合物持續24小時。以0.5 mM之最終濃度將半胱胺(0.5 M)添加至混合物中以淬滅反應，且使混合物置於室溫下持續2小時。隨後，藉由0.2 µm旋轉過濾器過濾製備之共軛物溶液。將共軛物儲存於4°C下，且SDS-PAGE及SEC用於表徵溶液中存在之共軛物。

【0165】 步驟3 (替換物2)：HRP之SPDP活化

【0166】 將250 mg HRP溶解於12.5 ml PBS中以製造20 mg/ml溶液。使100 mg PEG4-SPDP (聚乙二醇化、長鏈SPDP交聯劑；SPDP係3-(2-吡啶基二硫)丙酸琥珀醯亞胺酯)(Thermo Fisher Scientific)冷卻至室溫，且隨後溶解於1 ml DMSO中以製造100 mg/ml PEG4-SPDP溶液。隨後，將0.7 ml SPDP溶液添加至12.5 ml HRP溶液中，且在室溫下翻轉旋轉1小時。在4°C下針對PBS (4L)透析SPDP-HRP共軛物三次。經由在405

nm處進行OD讀取，確定20倍稀釋之SPDP-HRP溶液的HRP濃度為15.2 mg/ml。

【0167】 藉由TCEP樹脂使SPDP-HRP去封端

【0168】 使6 ml TCEP樹脂漿液離心(3000 rpm持續2分鐘)，且丟棄上清液。隨後，用6 ml含有5 mM EDTA之PBS緩衝劑洗滌樹脂丸粒兩次。隨後，將40 µl 0.5 M EDTA溶液添加至4 ml SPDP-HRP溶液(15.2 mg/ml)中，充分混合，且隨後添加至TCEP樹脂。隨後，充分混合此溶液，且在室溫下翻轉旋轉2小時。在濾除樹脂後，藉由20倍稀釋及在405 nm處進行OD讀取，確定HRP之濃度，得到10.5 mg/ml之濃度。

【0169】 步驟4 (替換物2)：抗體-HRP SPDP共軛物

【0170】 將2.2 ml SMCC-mAb於PBS中(4.9 mg/ml)添加至EDTA中以製備5 mM混合物。向此混合物中添加2.2 ml 去封端之SPDP-HRP (10.5 mg/ml，8 Eq之HRP/Ab)，充分混合，且隨後在4℃下翻轉旋轉持續15小時。為了淬滅SMCC反應，以0.5 mM添加4.4 µl之0.5 M半胱胺於水中，且在4℃下培養2小時。為了阻斷游離硫醇，以1 mM添加4.4 µl之0.5 M半胱胺於DMSO中，且隨後在4℃下培養1小時。隨後，藉由0.2 µm旋轉過濾器過濾製備之共軛物溶液，且儲存於-80℃下。SDS-PAGE及SEC用於分析共軛物。

【0171】 實例10：製備抗SDMA液體共軛試劑

【0172】 如實例11中所述製備抗SDMA大量共軛物溶液於共軛稀釋劑中。使用共軛稀釋劑將抗SDMA抗體共軛物預稀釋至50 µg/mL。為了製備作用溶液，將大量共軛物溶液(50 µg/ml)添加至共軛物稀釋劑中，獲得0.3或0.8 µg/ml之最終濃度。隨後，藉由在25℃下旋轉溶液持續30分鐘

以充分混合作用溶液。隨後，將作用溶液捲入箔中，且儲存於4℃下直至使用。

【0173】 實例11：製備共軛試劑稀釋劑

【0174】 以所列順序將以下材料添加至150 mL STABLZYME SELECT[®]穩定劑中。隨後，藉由在25℃下旋轉2小時混合該混合物，且將pH調整至7.0。

180 mg ANS

2.625 g水楊酸

17.5 g蔗糖

16.5 mg肝素

50 mg非活性HRP

0.5 mL藍色染料

【0175】 將上文材料添加至250 mL STABLZYME SELECT[®]穩定劑中，且緩慢翻轉混合持續若干分鐘。藉由0.2 μ m過濾器過濾稀釋劑，且隨後用鋁覆蓋且儲存於4℃下。

【0176】 實例12：製備針對催化劑DX[®]分析器之SDMA分析載片

【0177】 以0.1%之最終粒子濃度將儲存之G6PDH-MMA或G6PDH-ADMA被動塗覆之乳膠粒子混合至滴點稀釋劑(實例8)中。將35 μ L稀釋之粒子溶液添加至各載片上，該等載片係使用Fusion 5單層基質膜(GE Healthcare Life Sciences)預組裝(參見US 2014/0315216)。隨後，在49℃及745流速下於乾燥烘道中使載片乾燥30分鐘。將乾燥載片裝入具有乾燥劑之箔袋中，且封裝含有載片之袋，且儲存於4℃下。

【0178】 為了使用MMA-胺基-粒子製備載片，將如實例6及實例7中

所述之粒子稀釋於滴點稀釋劑中，其最終粒子濃度係0.1%，且隨後滴點於載片上，且使用上文乾燥程序乾燥。

【0179】 實例13：催化劑DX[®]分析器上之SDMA分析

【0180】 根據以下一般程序且根據製造商(IDEXX Laboratories, Inc.)之指示進行催化劑DX[®]分析。在室溫下培養樣本及抗SDMA-HRP共軛物持續兩分鐘。將兩個11 µL等分試樣之混合物塗覆於如實例12中所述製備之催化劑DX[®]固相。用9 µL洗滌緩衝劑洗滌固相三次。添加兩個11.5 µL等分試樣之TMB基質。隨後，以0.5秒間隔在645 nm處讀取載片之OD持續兩分鐘。

【0181】 圖1顯示使用蛋白質G6PDH-MMA被動塗覆之乳膠粒子作為固相及抗SDMA SPDP HRP共軛物之SDMA校正曲線。SDMA校正物製備於未吸附之犬血清中。固相：粒子濃度(0.1%)；液體共軛物 = 0.3 µg/ml。

【0182】 圖1B顯示使用蛋白質G6PDH-MMA被動塗覆之乳膠粒子作為固相及抗SDMA SPDP HRP共軛物之SDMA校正曲線。SDMA校正物製備於未吸附之犬血清中。固相：粒子濃度(0.025%)；液體共軛物 = 0.027 µg/ml。顯示之資料代表重複六次實驗。

【0183】 圖2顯示使用KLH-MMA被動塗覆之粒子作為固相及抗SDMA SPDP HRP共軛物之SDMA校正曲線。SDMA校正物製備於未吸附之犬血清中。固相：粒子濃度(0.1%)；液體共軛物 = 0.8 µg/ml。

【0184】 圖3顯示使用MMA化學改質之粒子作為固相及抗SDMA SPDP HRP共軛物之SDMA校正曲線。SDMA校正物製備於未吸附之犬血清中。固相：粒子濃度(0.1%)；液體共軛物 = 0.8 µg/ml。

【0185】 圖4顯示使用G6PDH-MMA被動塗覆之粒子固相及液體SPDP共軛物之校正物及患者樣本之催化劑DX[®] SDMA樣本分析。

【0186】 實例14：SDMA、ADMA及MMA塗覆之粒子的固相特性之比較

【0187】 為了進行基於催化劑分析器之SDMA分析，生成不同版本之固相，包括具有固定之粒子的固相，該等粒子如實例1及實例12中所述被動塗覆有基於蛋白質的MMA、ADMA及SDMA共軛物。亦研究如實例7中所述用MMA及SDMA化學改質的固定粒子。

【0188】 一個發現在於，分析表現係由固定於且用於固相上之MMA得以提昇。藉由基於蛋白質的被動塗覆之乳膠粒子或化學改質的粒子，使用固定於固相上的SDMA僅導致SDMA校正物板之間的有限分離。MMA化學改質的乳膠粒子提供具有提昇之分析表現的校正曲線，包括分析準確度及精確度，但在血清及血漿之兩個樣本類型之間具有巨大偏差。最佳催化劑SDMA分析表現係由G6PDH-MMA共軛物提供，該等共軛物被動塗覆於固定於固相上之粒子上。粒子生成具有極佳準確度、精確度及穩定性之分析。

【0189】 亦使用如實例9中所述之托特試劑或SPDP研究抗SDMA-酶共軛物。顯示所形成之共軛物以提供SDMA分析中之較廣動態範圍及提昇之分析表現。

【0190】 如表1所示，相較於KLH-MMA/KLH-SDMA及G6PDH-MMA/G6PDH-SDMA之塗覆效率(~95%)，BSA-MMA/BSA-SDMA塗覆於乳膠粒子之效率(~25%)低得多。KLH-MMA及KLH-SDMA塗覆之乳膠粒子在儲存條件下聚集，隨後將其滴點至載片上，除非粒子在滴點之前進

行充分聲波處理，否則其導致分析之較大變化。當載片於37°C下培養一週時，若KLH-MMA直接滴點於Fusion 5載片上，則KLH-MMA係穩定的，但當培養兩週時，其不穩定。G6PDH-MMA在乳膠粒子上具有高塗覆效率，且即使在37°C下培養兩週時，其在乾燥載片上仍極其結實，因此其為SDMA催化劑分析提供最佳固相。

表1

固相	乳膠粒子上之塗覆效率(%)	粒子聚集	37°C下的載片穩定性
G6PDH-MMA	95	無	穩定，超過14日
G6PDH-SDMA	98	無	未確定
KLH-MMA	95	有	穩定，持續7日
KLH-SDMA	96	有	未確定
BSA-MMA	30	無	未確定
BSA-SDMA	22	無	未確定

【0191】 表2顯示使用具有被動塗覆之KLH-MMA及KLH-SDMA粒子之固相的分析表現之比較。

表2

固相	載片上之粒子 (%)	液體試劑 [共軛物] µg/ml	Cal0之分析率 [SDMA] = 0 µg/dL	Cal4之分析率 [SDMA]=59.9 µg/dL	分析率變化 (%)
KLH-MMA	0.05	0.2	0.027755	0.006454	77
KLH-MMA	0.1	0.2	0.039346	0.023397	41
KLH-SDMA	0.05	0.2	0.021413	0.009627	55
KLH-SDMA	0.1	0.2	0.036312	0.02749	24

【0192】 表3顯示使用具有固定粒子之固相的分析表現比較，該等粒子具有被動塗覆之G6PDH-MMA、G6PDH-ADMA及G6PDH-SDMA。

表3

固相	載片上之粒子 %	液體試劑 [共軛物] $\mu\text{g/ml}$	Cal0之分析率 [SDMA] = 0 $\mu\text{g/dL}$	Cal4之分析率 [SDMA] = 0 $\mu\text{g/dL}$	分析率變化 (%)
G6PDH-MMA	0.03	0.6	0.021232	0.004854	77
G6PDH-SDMA	0.03	0.25	0.034884	0.027355	22
G6PDH-MMA	0.03	0.3	0.027160	-	-
G6PDH-ADMA	0.03	0.3	0.001056	-	-
G6PDH-ADMA	0.03	5.0	0.014504	-	-

【0193】 如表3所示，具有被動塗覆之 G6PDH-MMA、G6PDH-ADMA或G6PDH-SDMA之固定粒子可各自用於催化劑SDMA分析。

【0194】 表4顯示使用具有固定粒子之固相的分析表現比較，該等粒子具有被動塗覆之BSA-MMA及BSA-SDMA。

表4

固相	載片上之粒子 %	液體試劑 [共軛物] $\mu\text{g/ml}$	Cal0之分析率 [SDMA] = 0 $\mu\text{g/dL}$	Cal4之分析率 [SDMA] = 59.9 $\mu\text{g/dL}$	分析率變化 (%)
BSA-MMA	0.1	0.8	0.021580	0.007530	65
BSA-SDMA	0.1	0.8	0.015287	0.012183	20

實例15：分析表現之分析

【0195】 針對犬樣本及貓樣本，比較催化劑DX® SDMA測試表現與LC-MS及EMIT®分析(參見美國專利申請案第2016/245801號)。

【0196】 圖5A顯示催化劑DX® SDMA測試與針對犬血清樣本(207個樣本)之LC-MS分析的相關性。催化劑 [SDMA] ($\mu\text{g/dL}$) = $1.22065 + 0.93353 \text{ LC-MS [SDMA]} (\mu\text{g/dL})$ ，其中 $R^2 = 0.945$ 。R-平方值表示測試結果相關性較強。

【0197】 圖5B顯示催化劑DX® SDMA測試與針對貓血清樣本(86個

樣本)之 LC-MS 分析的相關性。催化劑 [SDMA] ($\mu\text{g/dL}$) = $1.22065 + 0.93353 \text{ LC-MS [SDMA]} (\mu\text{g/dL})$ ，其中 $R^2 = 0.945$ 。R-平方值表示測試結果相關性較強。

【0198】圖6A顯示催化劑DX[®] SDMA測試與針對犬血清樣本(207個樣本)之EMIT分析的相關性。催化劑 [SDMA] ($\mu\text{g/dL}$) = $0.56438 + 0.93980 \text{ EMIT [SDMA]} (\mu\text{g/dL})$ ，其中 $R^2 = 0.939$ 。R-平方值表示測試結果相關性較強。

【0199】圖6B顯示催化劑DX[®] SDMA測試與針對貓血清樣本(86個樣本)之EMIT分析的相關性。催化劑 [SDMA] ($\mu\text{g/dL}$) = $0.56438 + 0.93980 \text{ EMIT [SDMA]} (\mu\text{g/dL})$ ， $R^2 = 0.939$ 。R-平方值表示測試結果相關性較強。

【0200】實例16：共價連接之胺-MMA粒子及被動塗覆之G6PDH-MMA粒子中血清/血漿偏差之比較

【0201】在匹配之血清與血漿樣本上進行催化劑DX[®] SDMA分析，該等樣本具有共價連接之胺-MMA粒子或被動塗覆之G6PDH-MMA粒子。重複進行實驗。如下計算樣本偏差： $(\text{血清SDMA} (\mu\text{g/dL}) - \text{血漿SDMA} (\mu\text{g/dL})) / ((\text{血清SDMA} (\mu\text{g/dL}) + \text{血漿SDMA} (\mu\text{g/dL})) / 2)$ ，其反映血清與血漿值之間的差值除以血清與血漿值的平均值。

【0202】如表5及圖7A所示，在犬樣本中，對於胺-MMA共價連接之粒子，觀測到64%至82%之血清/血漿偏差。相反，對於被動塗覆之G6PDH-MMA粒子，觀測到0%至11%之血清/血漿偏差。因此，在具有共價連接之胺-MMA粒子的犬樣本中，被動塗覆之G6DPH-MMA粒子極大減小所觀測之血漿/血清偏差。

【0203】 如表6及圖7B所示，在貓樣本中，對於胺-MMA共價連接之粒子，觀測到-36%至35%之血清/血漿偏差。相反，對於被動塗覆之G6PDH-MMA粒子，觀測到-3%至6%之血清/血漿偏差。因此，在具有共價連接之胺-MMA粒子的貓樣本中，被動塗覆之G6DPH-MMA粒子極大減小所觀測之血漿/血清偏差。

表5

粒子	樣本名稱	樣本類型	Calc. [SDMA] µg/dL	偏差
胺-MMA	患者1	血漿	8.2	81%
		血清	19.5	
	患者2	血漿	8.9	64%
		血清	17.3	
	集中之患者	血漿	8.7	82%
		血清	20.8	
G6PDH-MMA	患者1	血漿	15.1	0%
		血清	15.0	
	患者2	血漿	13.9	3%
		血清	14.2	
	集中之患者	血漿	14.4	11%
		血清	16.2	

表6

粒子	樣本名稱	樣本類型	Calc. [SDMA] µg/dL	偏差
胺-MMA	1871	血漿	21.31	-36%
		血清	14.83	
	1923	血漿	10.93	22%
		血清	13.61	
	1931	血漿	14.90	35%
		血清	21.16	
	1933	血漿	9.86	35%
		血清	14.02	
G6PDH-MMA	1871	血漿	17.42	2%
		血清	17.86	
	1923	血漿	11.34	-3%

	1931	血清	11.00	4%
		血漿	12.67	
		血清	13.21	
	1933	血漿	10.60	6%
		血清	11.29	

【0204】 實例17：被動塗覆之G6PDH-MMA粒子與被動塗覆之卵白蛋白-MMA粒子中之血清/血漿偏差

【0205】 在具有G6PDH-MMA粒子(圖8)或卵白蛋白-MMA粒子(圖9)之20個配對犬血清與血漿樣本上進行催化劑DX[®] SDMA分析。圖8及圖9中圖表之Y軸描繪實際與量測之SDMA濃度之間的差值，其單位係µg/dL。此差值稱為「偏差」。重複進行實驗。G6PDH及卵白蛋白塗層導致血清或血漿中所量測之SDMA值之間的最小偏差。此外，在血清樣本中，實際與所量測之SDMA值之間存在最小偏差，且在血漿樣本中，實際與所量測之SDMA值之間存在最小偏差。

【0206】 實例18：被動塗覆之蛋白質-MMA粒子之穩定性

【0207】 評估粒子上蛋白質-MMA被動塗層之穩定性。

【0208】 水溶液中之穩定性

【0209】 在4℃下將被動塗覆之粒子(塗覆有G6PDH-MMA；具有其基質G6P及NAD之G6PDH-MMA；或卵白蛋白-MMA)培養於pH6.4之50 mM磷酸鈉及2.5%蔗糖中，持續5小時至8日範圍之各種時間段。對培養5小時之粒子等分試樣進行聲波處理。此外，比較新塗覆之粒子與已在-20℃下經歷單次凍結-融化循環之塗覆粒子。在培養後，粒子用於SDMA分析，且結果顯示於圖10中。當使用卵白蛋白-MMA塗覆之粒子時，相較於G6PDH-MMA塗覆之粒子，此等預培養對SDMA值具有更大影響。此等結果表明，當培養於水溶液中時，相較於卵白蛋白-MMA塗覆之粒子，

G6PDH-MMA塗覆之粒子更穩定。

【0210】 含有高鹽濃度之水溶液中的穩定性

【0211】 為了分析被動塗層針對高鹽濃度之容忍度，使用G6PDH-MMA被動塗覆之粒子進行SDMA分析，該等粒子在4°C下經或未經1 M NaCl預處理隔夜。以0、6.25、12.5、25、50及100 µg/dL SDMA使用SDMA標準物進行分析。

【0212】 圖11顯示使用用1 M NaCl先行培養且不培養之G6PDH-MMA被動塗覆之粒子的催化劑DX[®] SDMA校正曲線。重複實驗三次。曝露於1 M氯化鈉(標記「吸附」)中之粒子或對照粒子(標記「未吸附」)的粒子之間的SDMA校正曲線係無法區分的。此表示，G6PDH-MMA被動塗覆之粒子在4°C下於1 M氯化鈉中隔夜係穩定的。

【0213】 界面活性劑中之穩定性

【0214】 將G6PDH-MMA被動塗覆之粒子培養於4°C下隔夜(>12小時)，其培養於具有或不具有0.1%界面活性劑TWEEN[®] 20 (聚乙二醇山梨聚糖單月桂酸酯)的緩衝劑中。在隔夜培養之後，將粒子用於催化劑DX[®] SDMA分析。在犬血清中製備釘有SDMA之SDMA校正物，其最終濃度係0、20、40、60、80或100 µg/dL。所得校正曲線顯示於圖12中。資料表示，分析中使用界面活性劑預培養對G6PDH-MMA被動塗覆之粒子不具有影響。

【0215】 進行另一實驗以比較G6PDH-MMA、BSA-MMA及KLH-MMA被動塗覆之乳膠粒子的界面活性劑容忍度。在4°C下於儲存緩衝液中用0.1%或1% Tween 20處理各類型之共軛物塗覆的乳膠粒子隔夜。藉由微BCA套組量測釋放至儲存緩衝劑中之蛋白質以確定粒子上殘留之共軛物的

百分比。如表7所示，在三種類型之共軛物中，BSA-MMA塗覆之乳膠粒子在Tween 20存在下最不穩定。相反，即使在用1% Tween 20培養時，G6PDH-MMA塗覆之粒子亦顯示最高容忍度。KLH-MMA塗覆之粒子在相當程度上對界面活性劑處理具有容忍度，但在儲存期間粒子輕易聚集，導致較差分析精確度。

表7

固相	殘留於具有0.1% Tween 20之粒子上的共軛物	殘留於具有1.0% Tween 20之粒子上的共軛物
BSA-MMA	63%	60%
KLH-MMA	89%	87%
G6PDH-MMA	99%	99%

【0216】 總而言之，詳述之各種實驗表明，G6PDH-MMA塗覆之乳膠粒子顯示最高塗覆效率及穩定性。G6PDH-MMA亦在儲存及滴點緩衝劑中保持單分散性，且相較於塗覆有其他諸如BSA-MMA及KLH-MMA之共軛物的粒子，其提供最佳分析表現。

【0217】 實例19：將KLH-MMA直接塗覆於分析載片上。

【0218】 圖13顯示使用直接塗覆於滑膜上的蛋白質KLH-MMA共軛物(實例2)之SDMA校正曲線。將35 µl KLH-MMA共軛物之等分試樣(14.3 µg/ml於具有2%蔗糖及0.05% Tween 20之磷酸鹽緩衝劑中)置於用Fusion 5單層基質膜(GE Healthcare Life Sciences)預組裝之滑片上(參見US 2014/0315216)。隨後，在49℃及745流速下於乾燥烘道中使載片乾燥30分鐘。在未吸附之犬血清中製備SDMA校正物。在室溫下，以0.6 µg/ml用抗SDMA-HRP共軛物培養校正物持續兩分鐘。將兩個11 µL混合物等分試樣塗覆於滑片上。用9 µL洗滌緩衝劑洗滌固相三次。添加兩個

11.5 μL 之TMB基質等分試樣。隨後，以0.5秒間隔在645 nM處讀取載片之OD持續兩分鐘。曲線上之各點代表三次實驗之平均結果。

【0219】 上文提供之實例僅具有闡釋性且並不意味本揭示案之所有可能實施例、應用或修改內容之詳盡清單。因此，在不背離本揭示案之範疇及精神的情況下，本揭示案之所述方法及系統的各種修改及變化將對本領域中之彼等技術者顯而易見。儘管已相關於特定實施例描述本揭示案，應理解，如請求之揭示內容不應過度受限於該等特定實施例。實際上，用於進行本揭示案之所述模式的各種修改意欲處於所附申請專利範圍之範疇內，該等修改對分子生物學、免疫學、化學、生物化學或相關領域中之彼等技術者而言係顯而易見的。

【0220】 應理解，本揭示案不限於本文所述之特定方法、協議及試劑等，此係因為此等因素可能因技術者所認知而改變。亦應理解，本文所用術語僅用於描述特定實施例之目的，且不意欲限制本揭示案之範疇。亦注意到，如本文及所附申請專利範圍所用，除非上下文明確規定，否則單數形式「一(a/an/the)」包括複數形式。因此，舉例而言，提及「連接物」係提及一或多個連接物及其本領域中彼等技術者已知的等效形式。

【0221】 除非經過定義，否則本文所用之所有技術及科學術語具有如本揭示案所屬之領域中普通技術者之一所一般理解的相同含義。本揭示案之實施例及其各種特點及優勢細節係關於非限制性實施例更詳盡地解釋及/或闡述於所附圖示中且在以下描述中詳細闡述。應注意，即使未在本文中詳細陳述，圖中闡釋之特點未必按比例繪示，且一個實施例之特點可能如技術者應認識到而用於其他實施例。

【0222】 假設任何較低值與任何較高值之間存在至少兩個單位之分

離，則本文列舉之任何數值包括一個單位之增量中較低值至較高值的所有值。作為實例，若敘述組分之濃度或製程變量之值(諸如例如，尺寸、角度大小、壓力、時間及類似值)係例如1至90，特定而言20至80、更特定而言30至70，則意圖係該等諸如15至85、22至68、43至51、30至32等值係明確地列舉於此說明書中。適當時，對於小於一之值，一個單位視為0.0001、0.001、0.01或0.1。此等僅係意圖明確之實例，且列舉之最低值與最高值之間數值的所有可能組合均視為以相似方式明確陳述於本說明書中。

【0223】 儘管與本文所述彼等物類似或等效之任何方法及材料均可用於實踐或測試本揭示案，但仍描述特定方法、裝置及材料。上文引述之所有文獻及公開案的揭示內容均明確地以引用方式全文併入，其程度與單獨以引用方式併入相同。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種測定樣本中對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之裝置，其包含固體基質，該固體基質包含非擴散性地結合於其上反應區之粒子，其中該粒子包含捕獲試劑，該捕獲試劑包含(a)共價連接至蛋白質之SDMA衍生物，該蛋白質連接至該粒子，或(b)共價連接至該粒子之SDMA衍生物，其中對於(a)及(b)各者，該SDMA衍生物係選自由以下組成之群：L-精胺酸、N-甲基精胺酸(MMA)、醯化ADMA、醯化L-精胺酸、醯化MMA及醯化SDMA。

【請求項2】

如請求項1之裝置，其中該蛋白質共價連接於該粒子。

【請求項3】

如請求項1之裝置，其中該蛋白質非共價連接於該粒子。

【請求項4】

如請求項1之裝置，其中該蛋白質係以下至少一者：牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白、鑰孔血藍素(KLH；Keyhole Limpet Hemocyanin)及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(G6PDH)。

【請求項5】

如請求項1之裝置，其中該基質係多孔基質。

【請求項6】

如請求項5之裝置，其中該基質係置於匣或殼中。

【請求項7】

一種捕獲試劑，其包含連接於粒子之N-甲基精胺酸(MMA)或醯化

MMA。

【請求項8】

如請求項7之捕獲試劑，其中該N-甲基精胺酸(MMA)或醯化MMA係藉由連接物結合於該粒子。

【請求項9】

如請求項7之捕獲試劑，其中該N-甲基精胺酸(MMA)或醯化MMA與連接於粒子之蛋白質共價連接。

【請求項10】

如請求項9之捕獲試劑，其中該蛋白質共價連接於該粒子。

【請求項11】

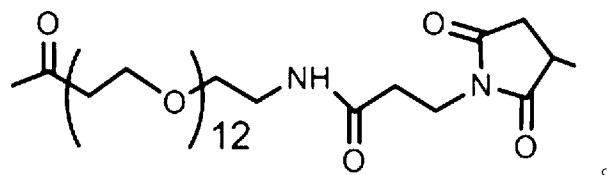
如請求項9之捕獲試劑，其中該蛋白質非共價連接於該粒子。

【請求項12】

如請求項9之捕獲試劑，其中該蛋白質係以下至少一者：牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白、鑰孔血藍素(KLH)及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(G6PDH)。

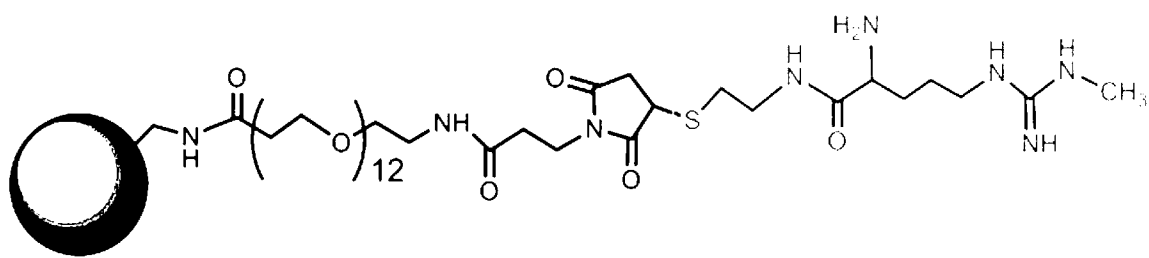
【請求項13】

如請求項8之捕獲試劑，其中該連接物包含以下結構：



【請求項14】

如請求項13之捕獲試劑，其包含：



【請求項15】

一種測定樣本中對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之方法，其包含：

- (a) 使該樣本與如請求項1之裝置及包括共軛於標記之抗SDMA抗體的非固定標記共軛物接觸；
- (b) 洗滌該固體基質之反應區以移除未結合於該固體基質之反應區中之共軛物；及
- (c) 量測與該反應區相關之該標記的量以確定該樣本中SDMA之存在或量。

【請求項16】

如請求項15之方法，其中步驟(a)包含形成一種混合物，該混合物包括該樣本及包括共軛於標記之抗SDMA抗體的該共軛物，且使該樣本與該裝置之接觸包含使該混合物與該裝置接觸。

【請求項17】

如請求項15之方法，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親和力係低於針對SDMA的抗體之抗體親和力的約25%。

【請求項18】

如請求項15之方法，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親和力係低於針對SDMA的抗體之抗體親和力的約10%。

【請求項19】

如請求項15之方法，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親

和力係低於針對SDMA的抗體之抗體親和力的約5%。

【請求項20】

如請求項15之方法，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親和力係低於針對SDMA的抗體之抗體親和力的約1%。

【請求項21】

一種測定樣本中對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之方法，其包含：

(a) 形成包含該樣本與抗SDMA抗體之混合物；

(b) 使該混合物與固體基質接觸，該固體基質包含如請求項7至14中任一項之捕獲試劑；

(c) 洗滌該固體基質以移除未結合於該固體基質的抗SDMA抗體；

及

(d) 量測與該固體基質相關之該抗SDMA抗體的量以確定該樣本中SDMA之存在或量。

【請求項22】

一種測定樣本中對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之方法，其包含：

(a) 使該樣本與固體基質及包含抗SDMA抗體之非固定共軛物接觸，其中該基質包含固定於反應區中之如請求項7至14中任一項之捕獲試劑；

(c) 洗滌該反應區以移除未結合於該反應區中之抗SDMA抗體；及

(d) 量測與該固體基質相關之抗SDMA抗體的量以確定該樣本中SDMA之存在或量。

【請求項23】

一種用於測定樣本中之SDMA的套組，其包含如請求項8之裝置及包

含共軛於標記之抗SDMA抗體之共軛物，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親和力低於該抗體針對SDMA之親和力的約25%。

【請求項24】

一種用於測定樣本中之SDMA的套組，其包含如請求項5之裝置及包含共軛於標記之抗SDMA抗體之共軛物，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親和力低於該抗體針對SDMA之親和力的約10%。

【請求項25】

一種用於測定樣本中之SDMA的套組，其包含如請求項5之裝置及包含共軛於標記之抗SDMA抗體之共軛物，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親和力低於該抗體針對SDMA之親和力的約1%。

【請求項26】

一種用於測定樣本中之SDMA的套組，其包含固體基質，該固體基質包含如請求項7至14中任一項之捕獲試劑及包含共軛於標記之抗SDMA抗體的共軛物，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親和力低於該抗體針對SDMA之親和力的約25%。

【請求項27】

如請求項26的套組，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親和力低於該抗體針對SDMA之親和力的約10%。

【請求項28】

如請求項26的套組，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親和力低於該抗體針對SDMA之親和力的約5%。

【請求項29】

如請求項26的套組，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親

和力低於該抗體針對SDMA之親和力的約1%。

【請求項30】

一種固相，其包含選自由以下組成之群的精胺酸衍生物：N-甲基精胺酸(MMA)、醯化MMA、非對稱性二甲基精胺酸(ADMA)、醯化ADMA及醯化SDMA，其中該衍生物共價連接於G6PDH，其中該G6PDH非共價連接於粒子。

【請求項31】

如請求項30之固相，其進一步包含多孔基質。

【請求項32】

如請求項31之固相，其中該多孔基質係安裝於殼中。

【請求項33】

如請求項32之固相，其進一步包含結合於該精胺酸衍生物之抗SDMA抗體，其中該抗體針對該衍生物之親和力低於其針對SDMA之親和力。

【請求項34】

如請求項33之固相，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親和力低於該抗體針對SDMA之親和力的約25%。

【請求項35】

如請求項33之固相，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親和力低於該抗體針對SDMA之親和力的約10%。

【請求項36】

如請求項33之固相，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親和力低於該抗體針對SDMA之親和力的約5%。

【請求項37】

如請求項33之固相，其中該抗SDMA抗體針對該精胺酸衍生物之親和力低於該抗體針對SDMA之親和力的約1%。

【請求項38】

如請求項30之固相，其中該抗SDMA抗體經標記。

【請求項39】

一種組合物，其包含選自由以下組成之群的精胺酸衍生物：固定於固體基質上之N-甲基精胺酸(MMA)、醯化MMA、非對稱性二甲基精胺酸(ADMA)或醯化ADMA，其中該精胺酸衍生物係與抗SDMA抗體複合。

【請求項40】

如請求項39之組合物，其中該抗體針對該固定之精胺酸衍生物的親和力低於其針對溶液中SDMA之親和力。

【請求項41】

如請求項40之組合物，其中該抗SDMA抗體針對該固定之精胺酸衍生物的親和力低於該抗體針對溶液中SDMA之親和力的約25%。

【請求項42】

如請求項40之組合物，其中該抗SDMA抗體針對該固定之精胺酸衍生物的親和力低於該抗體針對溶液中SDMA之親和力的約10%。

【請求項43】

如請求項40之組合物，其中該抗SDMA抗體針對該固定之精胺酸衍生物的親和力低於該抗體針對溶液中SDMA之親和力的約5%。

【請求項44】

如請求項40之組合物，其中該抗SDMA抗體針對該固定之精胺酸衍

生物的親和力低於該抗體針對溶液中SDMA之親和力的約1%。

【請求項45】

如請求項39之組合物，其中該抗SDMA抗體經標記。

【請求項46】

如請求項39之組合物，其中該精胺酸衍生物共價連接於蛋白質。

【請求項47】

如請求項46之組合物，其中該蛋白質係選自由以下組成之群：牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白、鑰孔血藍素(KLH)及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(G6PDH)。

【請求項48】

如請求項39之組合物，其中該蛋白質非共價連接於該固體基質。

【請求項49】

如請求項48之組合物，其中該蛋白質非共價連接於粒子，該粒子非擴散性地結合於該固體基質。

【請求項50】

一種測定樣本中對稱性二甲基精胺酸(SDMA)之方法，其包含：

(a) 形成包含該樣本與抗SDMA抗體之混合物；

(b) 使該混合物與包含精胺酸衍生物之固相接觸，其中該精胺酸衍生物選自由以下組成之群：L-精胺酸、N-甲基精胺酸(MMA)、醯化ADMA、醯化L-精胺酸、醯化MMA及醯化SDMA，且該抗SDMA抗體針對該固定之精胺酸衍生物的親和力低於其針對溶液中SDMA之親和力；

(c) 洗滌該固相以移除未結合於該固相的抗SDMA抗體；及

(d) 量測與該固相相關之該抗SDMA抗體的量以確定該樣本中

SDMA之存在或量。

【請求項51】

如請求項50之方法，其中該抗SDMA抗體針對包含該精胺酸衍生物之該固相的親和力低於該抗體針對溶液中SDMA之親和力的約25%。

【請求項52】

如請求項50之方法，其中該抗SDMA抗體針對包含該精胺酸衍生物之該固相的親和力低於該抗體針對溶液中SDMA之親和力的約10%。

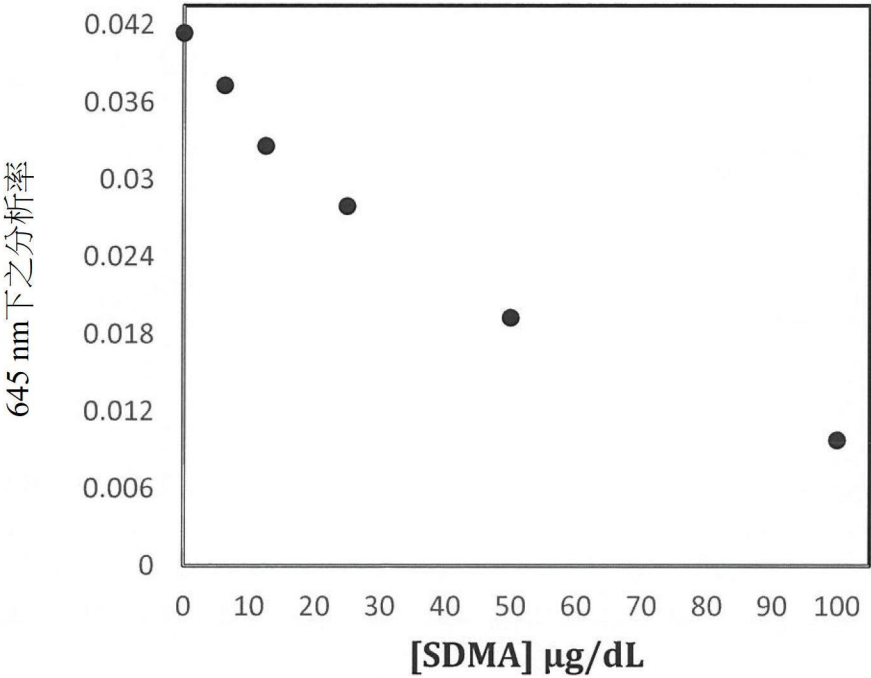
【請求項53】

如請求項50之方法，其中該抗SDMA抗體針對包含該精胺酸衍生物之該固相的親和力低於該抗體針對溶液中SDMA之親和力的約5%。

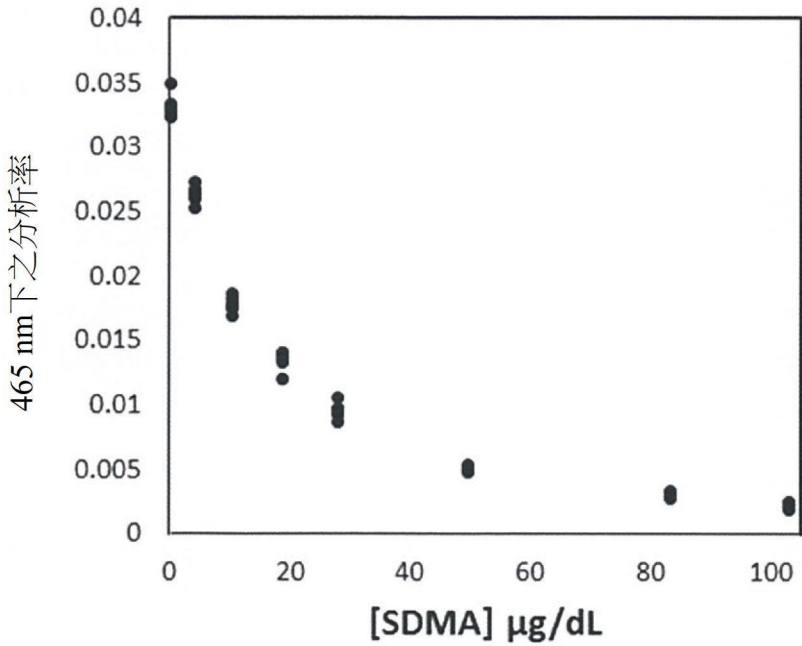
【請求項54】

如請求項50之方法，其中該抗SDMA抗體針對包含該精胺酸衍生物之該固相的親和力低於該抗體針對溶液中SDMA之親和力的約1%。

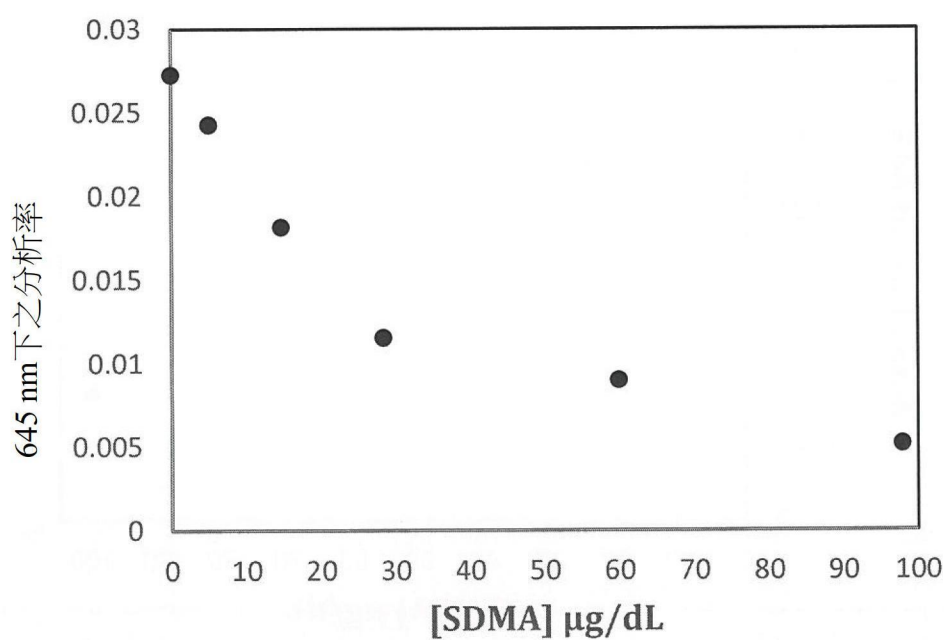
【發明圖式】



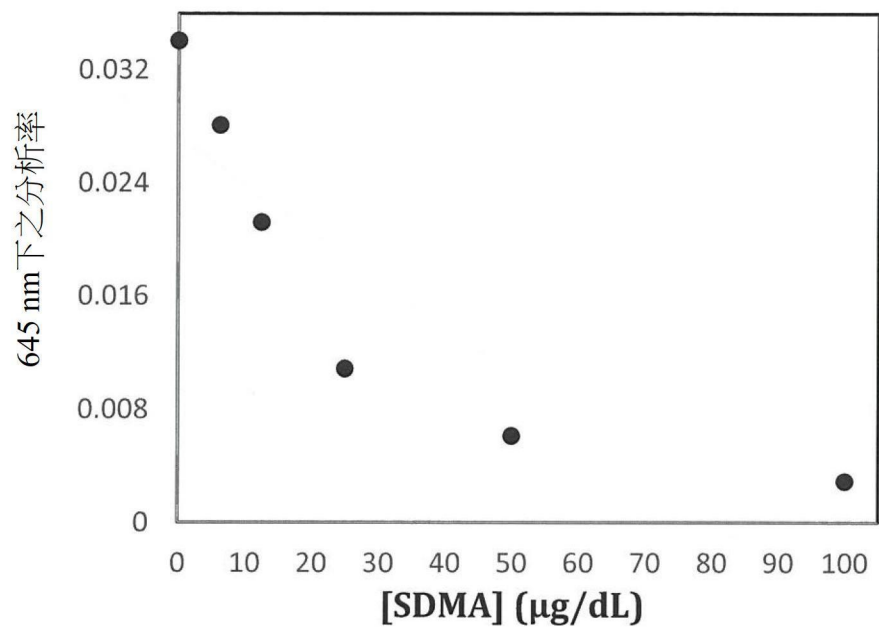
【圖1A】



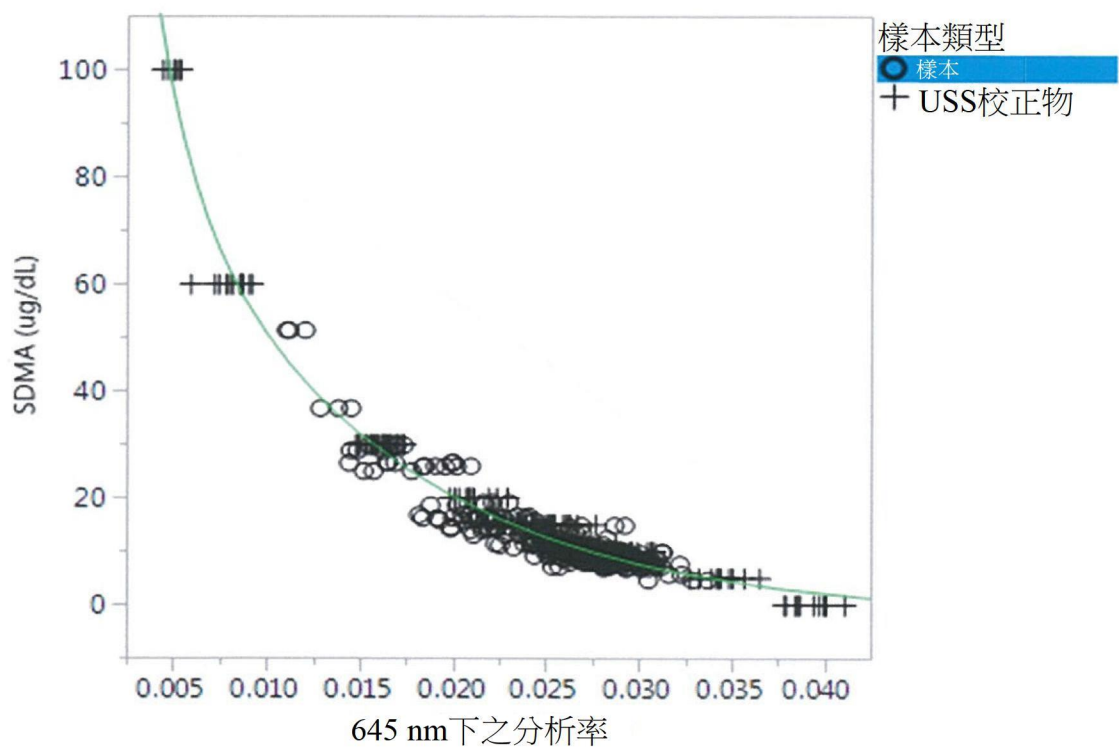
【圖1B】



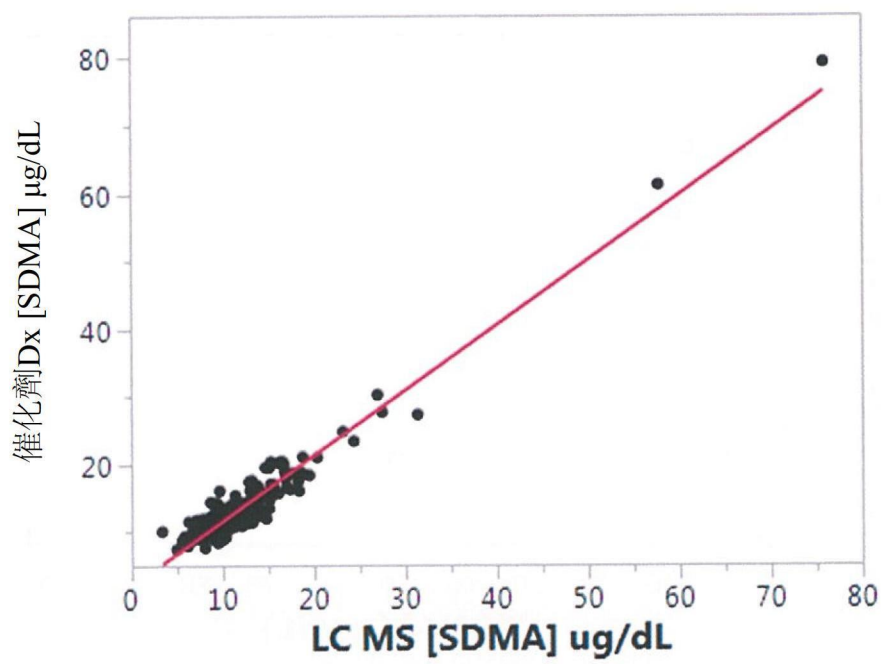
【圖2】



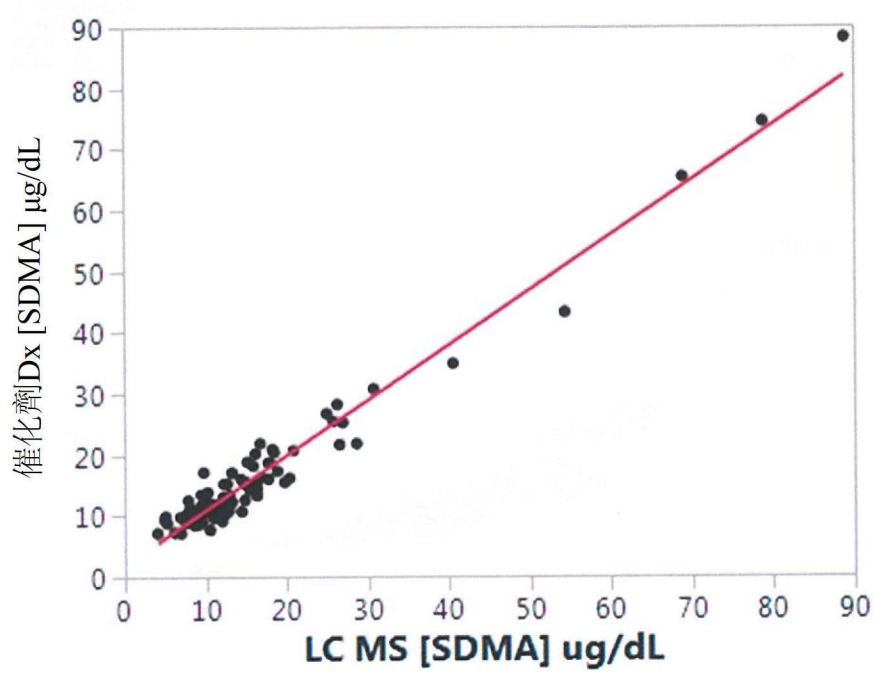
【圖3】



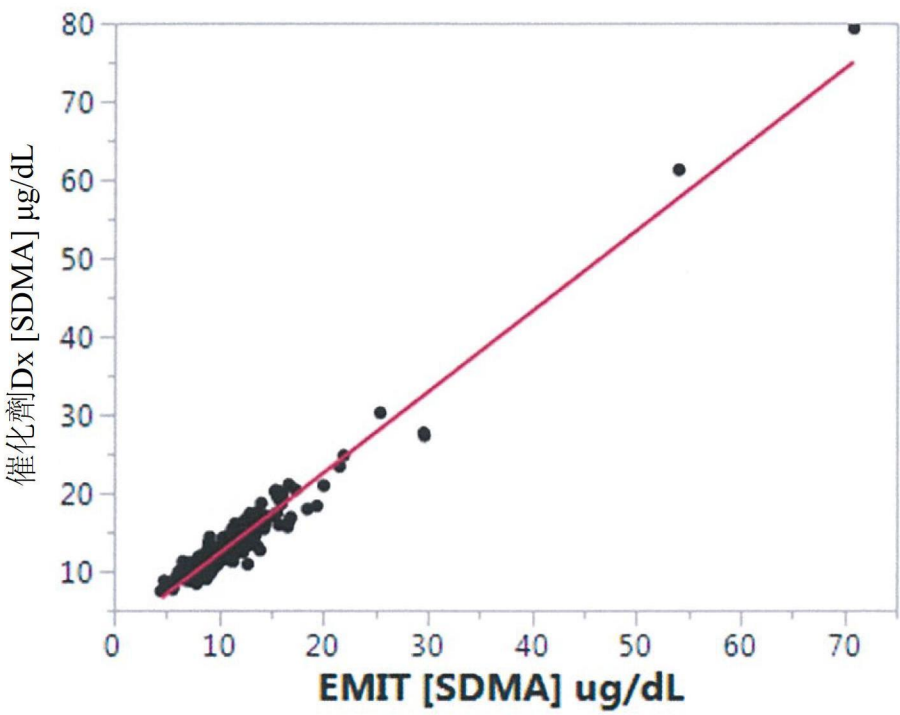
【圖4】



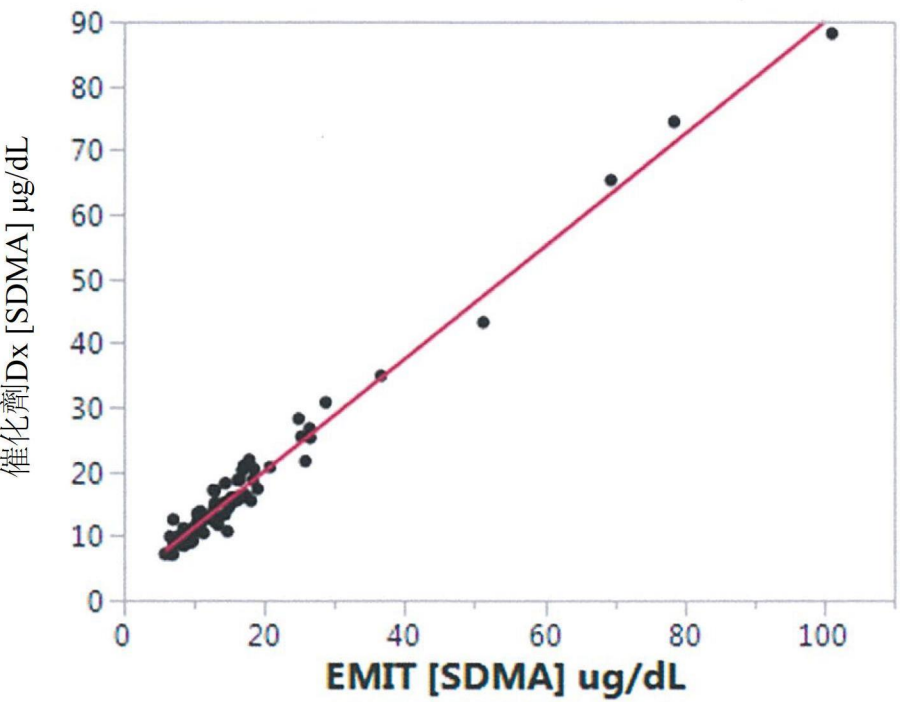
【圖5A】



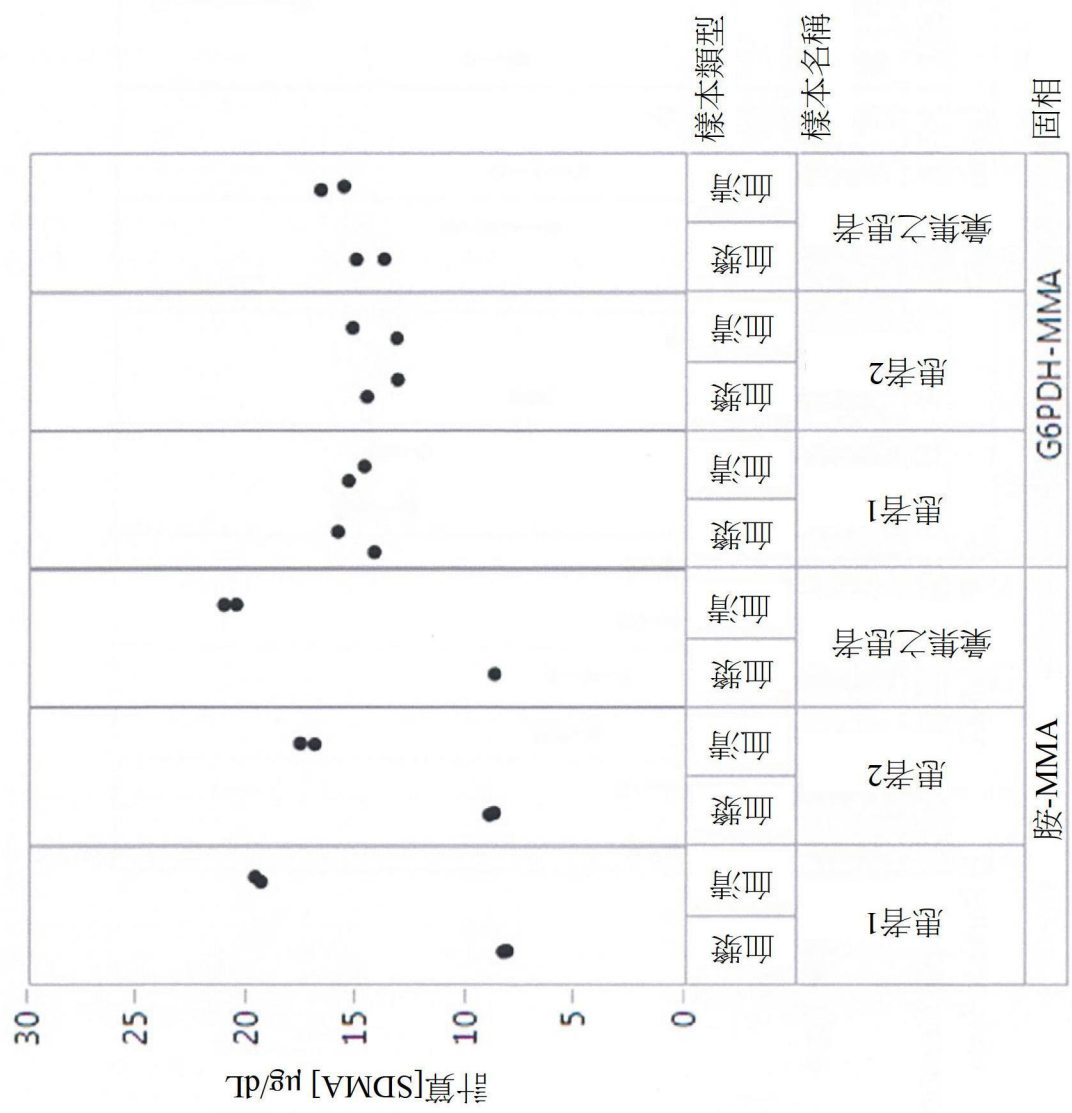
【圖5B】



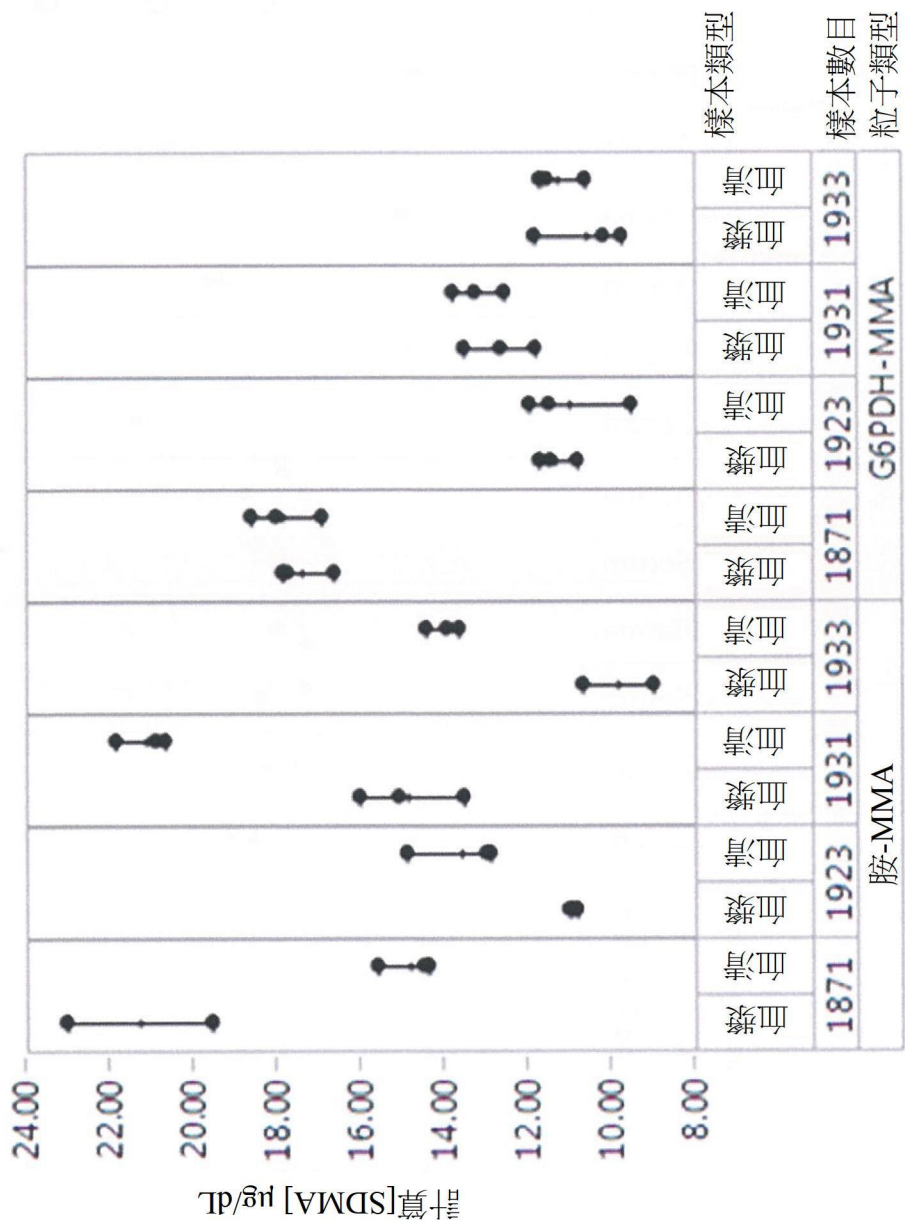
【圖6A】



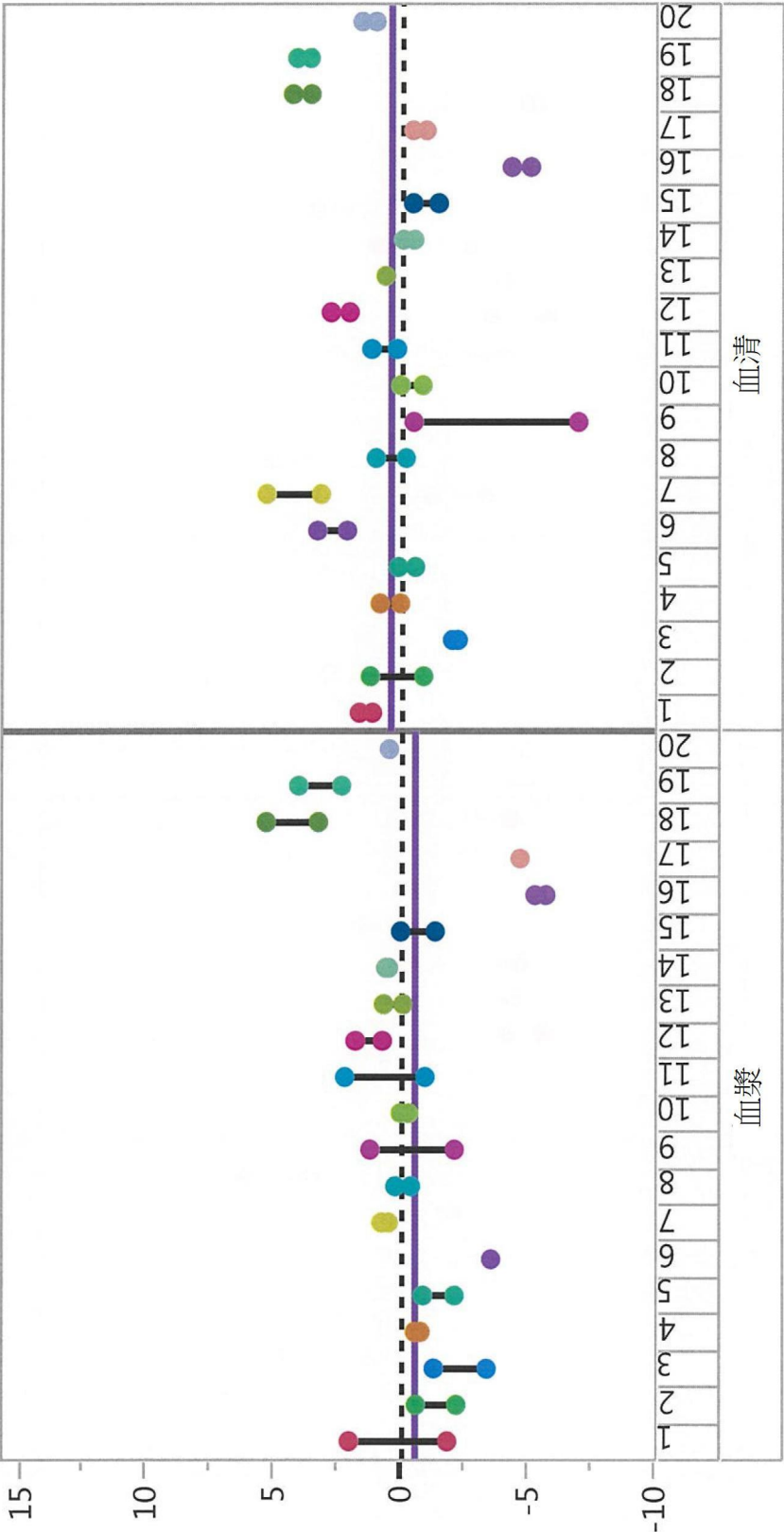
【圖6B】



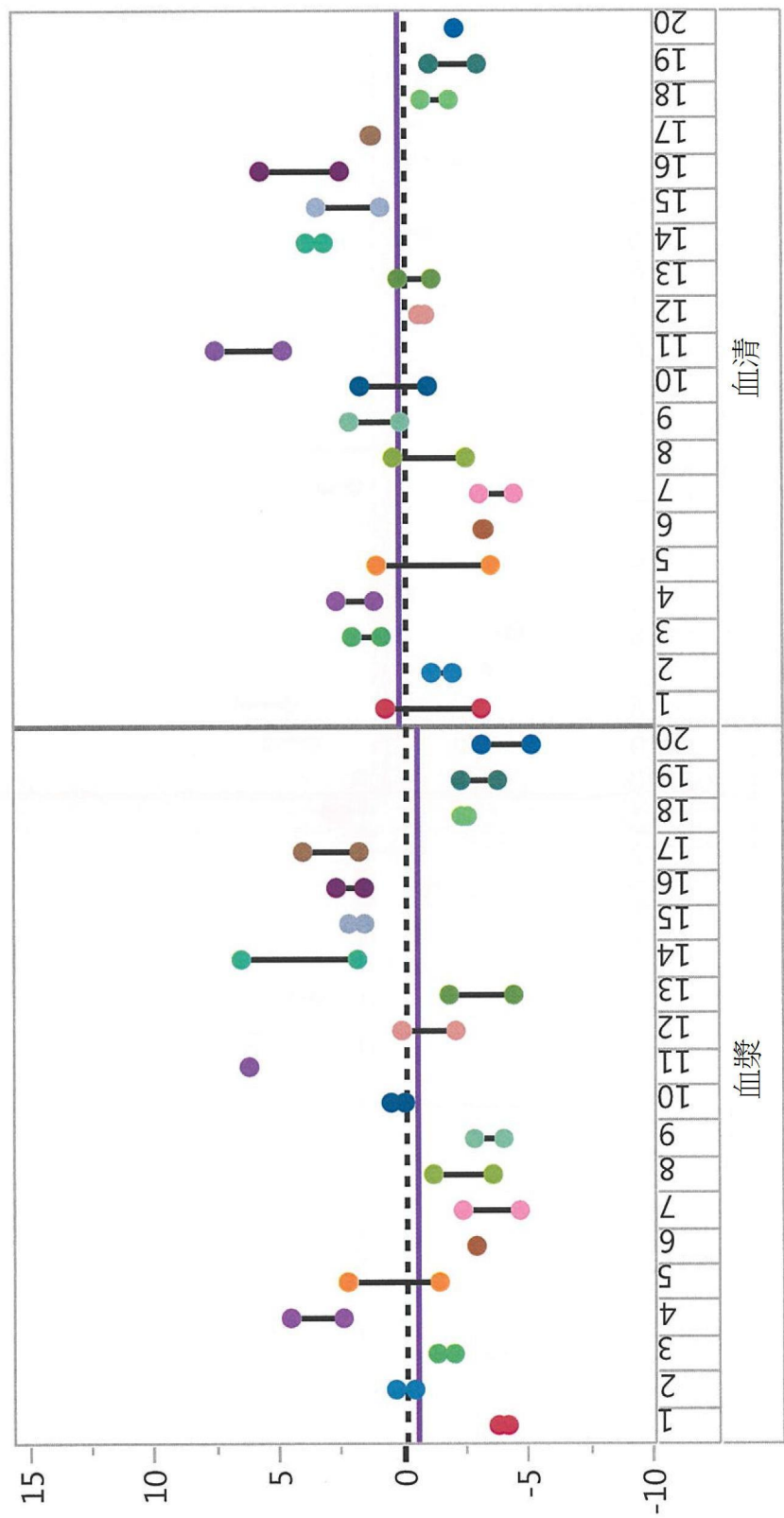
【圖7A】



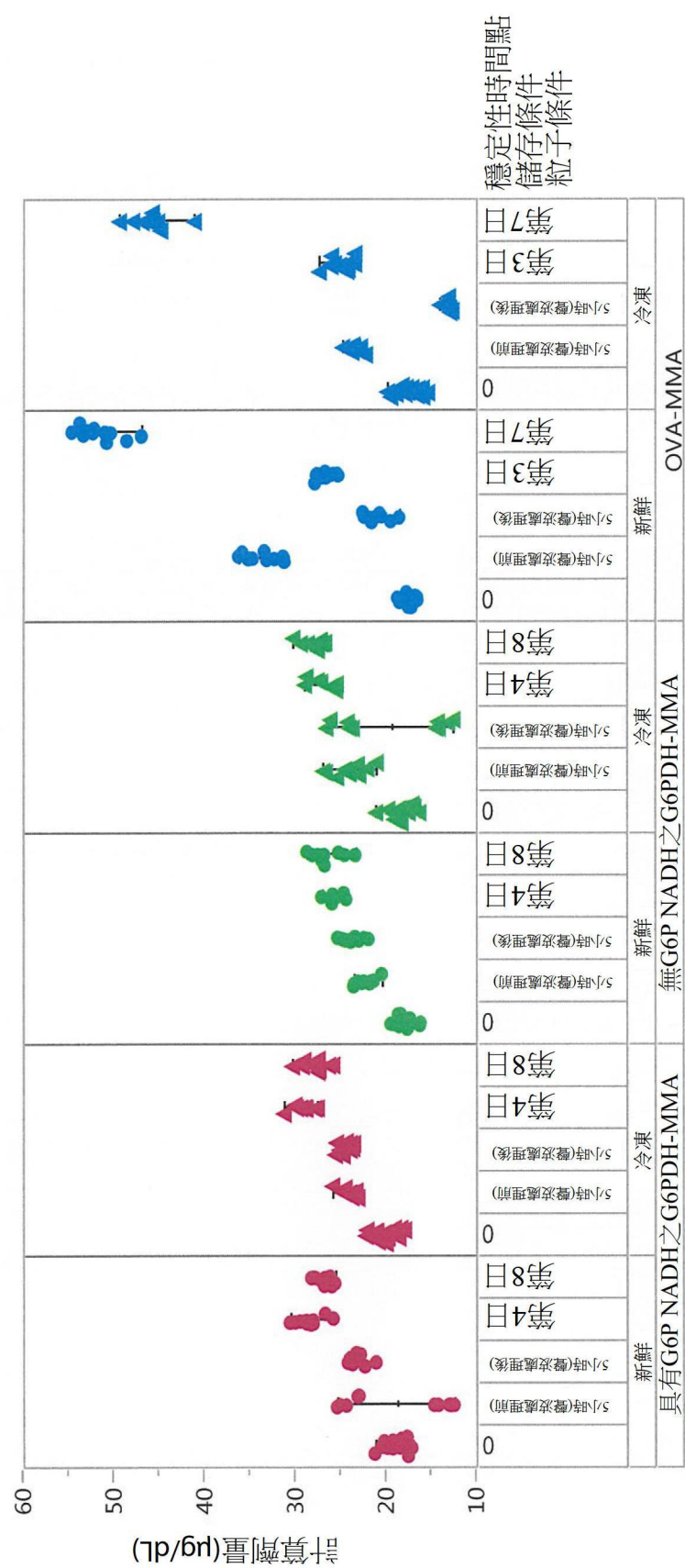
【圖7B】



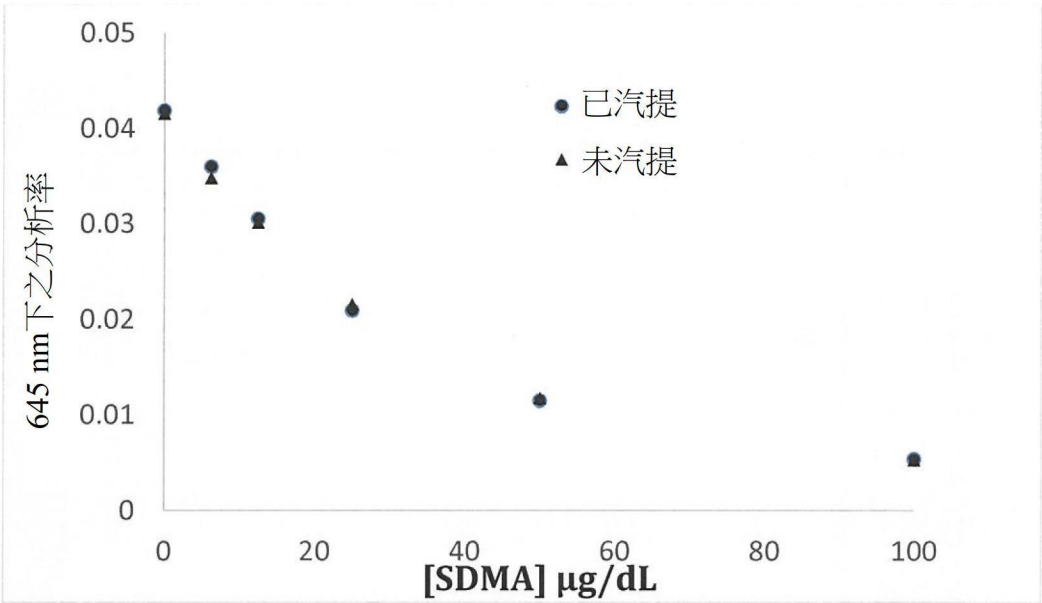
【圖8】



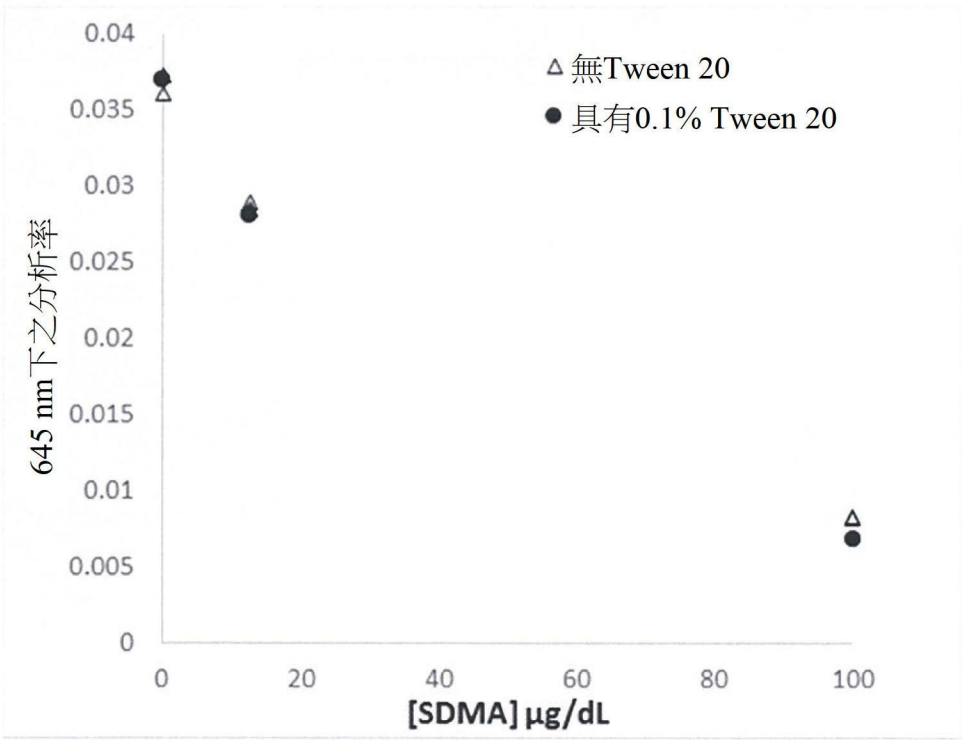
【圖6】



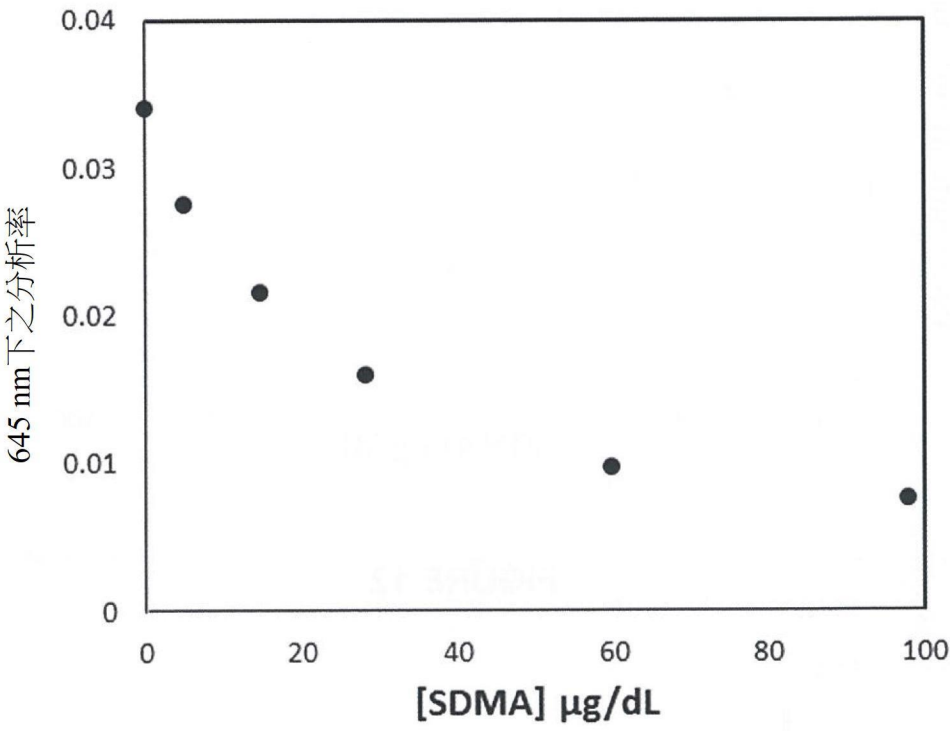
【圖10】



【圖11】



【圖12】



【圖13】