



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112166323 A

(43) 申请公布日 2021.01.01

(21) 申请号 201980036385.8

(22) 申请日 2019.07.01

(30) 优先权数据

62/693439 2018.07.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/040167 2019.07.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/010009 EN 2020.01.09

(71) 申请人 美国西门子医学诊断股份有限公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 J·弗里曼 M·阿库里

C·克鲁姆 E·梅拉贝

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 任晓华 黄希贵

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

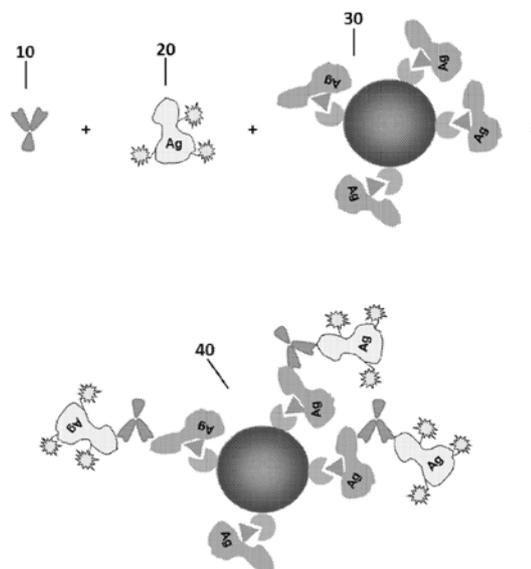
权利要求书2页 说明书8页 附图5页

(54) 发明名称

自身抗体的直接免疫测定测量

(57) 摘要

本文公开了用于检测来自受试者的生物样品中的抗体和/或诊断受试者中的自身免疫性疾病的免疫测定法。公开的免疫测定法使用单个、直接步骤来通过使抗体同时结合捕获抗原(例如与固体支持物结合的未标记抗原)和未与固体支持物结合的标记抗原而评价来自受试者的生物样品中的抗体的水平。



1. 检测来自受试者的生物样品中的抗体的方法,所述方法包括:
 - a) 将来自所述受试者的所述生物样品与以下孵育:
具有与其结合的未标记抗原的固体支持物,其中所述未标记抗原被所述抗体特异性识别;和
标记抗原,其中所述标记抗原不结合所述固体支持物,并且被所述抗体特异性识别,其中,在所述抗体存在的情况下,形成固体支持物/标记抗原复合物;和
 - b) 检测所述固体支持物/标记抗原复合物,其存在表明在所述生物样品中存在所述抗体。
2. 权利要求1的方法,其中所述抗体是自身抗体。
3. 权利要求2的方法,其中所述自身抗体特异性结合甲状腺球蛋白。
4. 权利要求3的方法,其中所述未标记抗原是甲状腺球蛋白,且所述标记抗原是标记的甲状腺球蛋白。
5. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述固体支持物包括柱基质材料、培养板、管、皿、烧瓶、微量滴定板、珠粒/颗粒、热杀死的福尔马林-(或其他化学)-固定的原核或真核细胞、显微镜载片、ACLAR[®] 薄膜或任何其他光学透明的聚合物,或其组合。
6. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述未标记抗原间接连接至所述固体支持物。
7. 权利要求6的方法,其中所述未标记抗原是生物素化的,且所述固体支持物包含链霉抗生物素蛋白。
8. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述标记抗原包含可检测标记物。
9. 权利要求8的方法,其中所述可检测标记物包括酶缀合物、荧光探针、放射性同位素、化学发光标记物、生物发光标记物,或其组合。
10. 前述权利要求中任一项的方法,其进一步包括确定所述受试者的所述生物样品中的所述抗体的水平。
11. 权利要求10的方法,其中所述受试者的所述生物样品中的所述抗体的水平与所述固体支持物/标记抗原复合物的水平成正比。
12. 试剂盒,其包含:
固体支持物;
未标记抗原;和
标记抗原。
13. 权利要求12的试剂盒,其中所述固体支持物能够结合所述未标记抗原,但不能结合所述标记抗原。
14. 试剂盒,其包含:
具有与其结合的未标记抗原的固体支持物;和
标记抗原。
15. 权利要求12-14中任一项的试剂盒,其中所述抗原是甲状腺球蛋白,且所述标记抗原是标记的甲状腺球蛋白。
16. 诊断受试者中的自身免疫性疾病的方法,所述方法包括:
 - a) 将来自所述受试者的生物样品与以下孵育:
具有与其结合的未标记抗原的固体支持物,其中所述未标记抗原被来自所述受试者的

自身抗体特异性识别;和

标记抗原,其中所述标记抗原不结合所述固体支持物,并且被所述自身抗体特异性识别,

其中,在所述自身抗体存在的情况下,形成固体支持物/标记抗原复合物;和

b) 如果检测到所述固体支持物/标记抗原复合物,则诊断所述受试者具有自身免疫性疾病。

自身抗体的直接免疫测定测量

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求2018年7月2日提交的美国临时申请号62/693,439的优先权,所述申请以其整体通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本文公开了检测来自受试者的生物样品中的抗体的方法和诊断所述受试者中的自身免疫性疾病的方法。

[0003] 背景

来自受试者的生物样品中的抗体、诸如自身抗体的评估受到缺乏试剂和测定法的灵敏度和特异性的阻碍。竞争测定法目前用于检测来自受试者的生物样品中的自身抗体。在这些测定中,标记的对照抗体与抗原结合,所述抗原进而可以与固体支持物结合,并且将标记的对照抗体/抗原复合物与怀疑含有自身抗体的生物样品一起孵育。如果样品中存在自身抗体,则标记的对照抗体将从标记的对照抗体/抗原复合物中置换出,导致从复合物生成的信号减少。样品中存在的自身抗体的量与信号的减少成反比。此类竞争测定法基于以下前提:自身抗体和对照抗体将竞争抗原上的相同表位,然而情况并不总是如此。因此,竞争测定法形式具有有限的效用。

[0004] 还已经开发了间接结合测定法,其中抗原与固相结合,与生物样品孵育,进行洗涤/分离,并与标记的抗人二抗孵育。然而,此类测定法是费时的并且需要额外的试剂。

[0005] 概述

本文公开了检测来自受试者的生物样品中的抗体的方法,所述方法包括:a)将来自所述受试者的所述生物样品与以下孵育:具有与其结合的未标记抗原的固体支持物,其中所述未标记抗原被所述抗体特异性识别;和标记抗原,其中所述标记抗原不结合所述固体支持物,并且被所述抗体特异性识别,其中,在所述抗体存在的情况下,形成固体支持物/标记抗原复合物;和b)检测所述固体支持物/标记抗原复合物,其存在表明在所述生物样品中存在所述抗体。

[0006] 还提供了诊断受试者中的自身免疫性疾病的方法。所述方法包括:a)将来自所述受试者的生物样品与以下孵育:具有与其结合的未标记抗原的固体支持物,其中所述未标记抗原被来自所述受试者的自身抗体特异性识别;和标记抗原,其中所述标记抗原不结合所述固体支持物,并且被所述自身抗体特异性识别,其中,在所述自身抗体存在的情况下,形成固体支持物/标记抗原复合物;和b)如果检测到所述固体支持物/标记抗原复合物,则诊断所述受试者具有自身免疫性疾病。

[0007] 本文进一步公开了试剂盒,其包含:1)固体支持物、未标记抗原和标记抗原;或2)具有与其结合的未标记抗原的固体支持物和标记抗原。

[0008] 附图简述

当结合附图阅读时,进一步理解概述以及以下详述。为了举例说明公开的方法和试剂盒的目的,在附图中显示所述方法和试剂盒的示例性实施方案;然而,所述方法和试剂盒不

限于公开的具体实施方案。在附图中：

图1举例说明用于公开的免疫测定(在本文中称为抗原桥免疫测定法)的示例性反应方案。

[0009] 图2举例说明用于实施公开的免疫测定的示例性时间线。

[0010] 图3举例说明公开的免疫测定法的示例性剂量应答曲线(抗甲状腺球蛋白抗原的浓度作为观察到的信号(RLU)的函数)。

[0011] 图4举例说明使用公开的免疫测定法比较未稀释的(菱形)和稀释的(正方形)抗体样品的示例性剂量应答曲线。

[0012] 图5举例说明分析递增量的吡啶酯的作用的示例性剂量应答曲线。三角形 = 20X 吡啶酯;正方形= 10X 吡啶酯;且菱形 = 5X 吡啶酯。

[0013] 说明性实施方案的详述

通过参考与附图相关联的以下详述,可以更容易地理解公开的方法和试剂盒,所述附图形成本公开的一部分。应理解,公开的方法和试剂盒不限于本文描述和/或显示的具体方法和试剂盒,并且本文使用的术语是为了仅通过实例的方式描述具体实施方案的目的,并且不意欲限制请求保护的方法和试剂盒。

[0014] 除非另有特别说明,否则关于可能的作用机制或模式或改进原因的任何描述仅仅意在是说明性的,并且公开的方法和试剂盒不应受任何此类建议的作用机制或模式或改进原因的正确性或不正确性的约束。

[0015] 在整个该文本中,本说明书涉及检测抗体的方法和诊断自身免疫性疾病的方法。在本公开描述或请求保护与检测抗体的方法相关的特征或实施方案的情况下,这种特征或实施方案同样适用于诊断自身免疫性疾病的方法。同样,在本公开描述或请求保护与诊断自身免疫性疾病的方法相关的特征或实施方案的情况下,这种特征或实施方案同样适用于检测抗体的方法。

[0016] 在本文叙述或确立数值范围的情况下,该范围包括其端点以及该范围内的所有单个整数和分数,并且还包含由那些端点以及形成在所述范围内的较大值组的子组的内部整数和分数的所有可能组合形成的其中的较窄范围中的每个,其程度与明确地叙述那些较窄范围中的每个的程度相同。在本文中将数值范围规定为大于规定值的情况下,该范围仍然是有限的,并且在其上端以在如本文所述的本发明的上下文中可操作的值为界。在数值范围在本文中规定为小于规定值的情况下,该范围在其下端仍以非零值为界。当定义范围时,无意将本发明的范围限于叙述的具体值。所有范围都是包括性的和可组合的。

[0017] 当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时,应理解具体值形成另一个实施方案。对具体数值的提及至少包括该具体值,除非上下文另外清楚地指出。

[0018] 应理解,为了清楚起见,本文在分开的实施方案的上下文中描述的公开的方法和试剂盒的某些特征也可以在单个实施方案中组合提供。相反,为了简要起见,在单个实施方案的上下文中描述的公开的方法和试剂盒的各种特征也可以分开或以任何子组合提供。

[0019] 如本文所用,单数形式“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“该(the)”包括复数。

[0020] 在整个说明书和权利要求中使用涉及说明书的各方面的各种术语。向此类术语给予其在本领域中的普通含义,除非另外指出。其他特别定义的术语将以与本文提供的定义一致的方式解释。

[0021] 术语“包含”意欲包括由术语“基本上由...组成”和“由...组成”涵盖的实例;类似地,术语“基本上由...组成”意欲包括由术语“由...组成”涵盖的实例。

[0022] 本文公开了用于检测来自受试者的生物样品中的抗体和/或诊断受试者中的自身免疫性疾病的免疫测定法。公开的免疫测定法使用单个、直接步骤来通过使抗体同时结合捕获抗原(例如与固体支持物结合的未标记抗原)和未与固体支持物结合的标记抗原而评价样品中的抗体的水平。由于抗体的二价性质,生物样品中存在的抗体将同时结合与固体支持物结合的未标记抗原和标记抗原,形成包含固体支持物和标记抗原的复合物。测定的读出值(即来自通过抗体与固体支持物连接的标记抗原的信号)与样品中存在的抗体的水平成正比。

[0023] 在一些实施方案中,免疫测定法可以包括“抗原桥”免疫测定法,其示例性反应方案显示于图1中。将已知具有或怀疑具有目标抗体10的生物样品与标记抗原20和具有与其结合的未标记抗原的固体支持物30孵育。在抗体不存在的情况下,所述标记抗原并不结合固体支持物或以其他方式与固体支持物相互作用。因此,在抗体不存在的情况下,所述标记抗原保持在溶液中,并且固体支持物的分离不会导致所述标记抗原的分离。当生物样品中存在抗体10时,抗体10同时结合与固体支持物30结合的未标记抗原和标记抗原20,由此连接标记抗原20和固体支持物30,并且导致形成固体支持物/标记抗原复合物40。应理解的是,孵育发生的顺序可以不同于图1中例举的顺序。例如,可以首先将已知具有或怀疑具有目标抗体10的生物样品与具有与其结合的未标记抗原的固体支持物30孵育,随后与标记抗原20孵育。或者,已知具有或疑似具有目标抗体10的样品可以同时与具有与其结合的未标记抗原的固体支持物30和标记抗原20孵育。

[0024] 用于实施公开的免疫测定法的示例性时间线在图2中举例说明。在图2中,将已知具有或怀疑具有目标抗体10的生物样品与标记抗原20孵育少于约3分钟。添加具有与其结合的未标记抗原的固体支持物30,并且与抗体/标记抗原混合物孵育约6.5分钟。然后可以检测固体支持物/标记抗原复合物40(未显示)。

[0025] 公开的免疫测定法包括检测来自受试者的生物样品中的抗体的方法。检测来自受试者的生物样品中的抗体的方法包括:

a) 将来自所述受试者的所述生物样品与以下孵育:

具有与其结合的未标记抗原的固体支持物,其中所述未标记抗原被所述抗体特异性识别;和

标记抗原,其中所述标记抗原不结合所述固体支持物,并且被所述抗体特异性识别,其中,在所述抗体存在的情况下,形成固体支持物/标记抗原复合物;和

b) 检测所述固体支持物/标记抗原复合物,其存在表明在所述生物样品中存在所述抗体。

[0026] 在一些实施方案中,所述抗体是自身抗体。因此,公开的方法可以用于检测来自所述受试者的生物样品中的自身抗体。可以通过公开的方法检测的示例性自身抗体是特异性结合甲状腺球蛋白的自身抗体(即抗甲状腺球蛋白抗体)。在其中所述自身抗体特异性结合甲状腺球蛋白的实施方案中,所述未标记抗原是甲状腺球蛋白,且所述标记抗原是标记的甲状腺球蛋白。

[0027] 公开的免疫测定法包括诊断受试者中的自身免疫性疾病的方法。诊断受试者中的

自身免疫性疾病的方法包括：

a) 将来自所述受试者的生物样品与以下孵育：

具有与其结合的未标记抗原的固体支持物，其中所述未标记抗原被来自所述受试者的自身抗体特异性识别；和

标记抗原，其中所述标记抗原不结合所述固体支持物，并且被所述自身抗体特异性识别，

其中，在所述自身抗体存在的情况下，形成固体支持物/标记抗原复合物；和

b) 如果检测到所述固体支持物/标记抗原复合物，则诊断所述受试者具有自身免疫性疾病。

[0028] 公开的方法可用于诊断其中已知所述自身抗体识别的抗原的任何自身免疫性疾病。在一些实施方案中，所述自身免疫性疾病是自身免疫性甲状腺疾病，包括格雷夫斯氏病 (GD) 和桥本氏甲状腺炎 (HT)。在其中所述自身免疫性疾病是自身免疫性甲状腺疾病的实施方案中，所述抗原 (未标记和标记的) 是甲状腺球蛋白。

[0029] 以下公开内容同样适用于检测抗体的方法和诊断自身免疫性疾病的方法。

[0030] 合适的生物样品包括含有或怀疑含有目标抗原的来自受试者的任何生物样品，包括，但不限于，血清、血浆、全血、唾液、尿液、精液、汗液、泪液和身体组织。

[0031] 在一些实施方案中，在孵育步骤之前，可以将来自受试者的生物样品稀释以降低样品的浓度。合适的稀释度包括例如 1:2、1:5、1:10、1:20、1:50、1:100、1:1000 等等。

[0032] 所述固体支持物可以是未标记抗原可以直接或间接与其结合或连接的任何材料。示例性固体支持物包括，但不限于，柱基质材料、培养板、管、皿、烧瓶、微量滴定板、珠粒/颗粒、热杀死的福尔马林- (或其他化学)-固定的原核或真核细胞、显微镜载片、ACLAR[®] 薄膜或任何其他光学透明的聚合物，或其组合。所述固体支持物可以全部或部分地由塑料、纤维素、纤维素衍生物、硝化纤维素、玻璃、玻璃纤维、乳胶，或其组合构成。在一些实施方案中，所述固体支持物包含磁性颗粒。合适的磁性颗粒包括顺磁性颗粒 (PMP) 和乳胶磁性颗粒 (LMP)。

[0033] 所述未标记抗原可以直接结合或间接连接至固体支持物，以由此形成具有与其结合的未标记抗原的固体支持物。所述未标记抗原可以与固体支持物直接结合。用于将未标记抗原直接结合至固体支持物的合适技术包括，例如，共价附接、吸附、非共价相互作用，或其组合。或者，所述未标记抗原可以间接连接至固体支持物。用于将未标记抗原间接连接至固体支持物的合适方式包括，例如，通过肽、蛋白、抗体、接头，或其组合连接。在一些实施方案中，所述未标记抗原可以通过链霉抗生物素蛋白和生物素间接连接至固体支持物。例如，所述未标记抗原可以被生物素化，并且所述固体支持物可以包含链霉抗生物素蛋白。

[0034] 具有与其结合的未标记抗原的固体支持物可以存在于包含一种或多种盐、一种或多种稳定剂和一种或多种表面活性剂的缓冲液中。在一些实施方案中，所述缓冲液可以包含 HEPES 盐、氯化钠、牛白蛋白、牛球蛋白和 Tween 20。在一些实施方案中，所述缓冲液可以包含 HEPES 盐 (16.9 g/L HEPES 酸和 7.6 g/L HEPES 钠)、300 mM 氯化钠、1% 牛白蛋白、0.1% 牛球蛋白和 0.2% Tween 20。

[0035] 在抗体不存在的情况下，所述标记抗原并不结合固体支持物或以其他方式与固体支持物相互作用。因此，在其中所述固体支持物包含链霉抗生物素蛋白的实施方案中，所述

标记抗原将不被生物素化。

[0036] 所述标记抗原包含可检测标记物。合适的可检测标记物包括但不限于酶缀合物(例如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、葡萄糖氧化酶和 β -半乳糖苷酶)、荧光探针、放射性同位素、化学发光和生物发光标记物,或其组合。在一些实施方案中,所述可检测标记物包括吖啶酯或其类似物。吖啶酯类似物包括但不限于二甲基吖啶酯(DMAE)、N-磺基丙基二甲基吖啶酯(NSP-DMAE)、高量子产率吖啶酯(HQYAE)、两性离子吖啶酯(ZAE)、六(亚乙基)二醇吖啶酯(HEGAE)、N-磺基丙基-2-异丙氧基二甲基吖啶酯(Iso-Di-ZAE)、三磺基丙基吖啶酯(TSP-AE)或具有六(亚乙基)二醇接头的N-磺基丙基二甲基吖啶酯(HEG-GLU-AE)。在一些实施方案中,所述可检测标记物包含钆酯或其类似物。所述可检测标记物可以与所述抗原以1:1摩尔比存在或可以摩尔过量存在。例如,所述可检测标记物可以以5、10、20或50摩尔过量存在。

[0037] 所述标记抗原可以存在于包含一种或多种盐、一种或多种稳定剂和一种或多种表面活性剂的缓冲液中。在一些实施方案中,所述缓冲液可以包含HEPES盐、氯化钠、牛白蛋白、牛球蛋白和Tween 20。在一些实施方案中,所述缓冲液可以包含HEPES盐(16.9 g/L HEPES酸和7.6 g/L HEPES钠)、300 mM氯化钠、1%牛白蛋白、0.1%牛球蛋白和0.2% Tween 20。

[0038] 公开的方法可以比当前使用的间接两步测定法(其可以花费大致约1小时)更快地进行。例如,在公开的方法中,已知具有或怀疑具有抗体的生物样品可以在反应混合物中孵育约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟或少于约10分钟。可以添加所述标记抗原并与所述生物样品孵育约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟或少于约5分钟。可以将具有与其结合的未标记抗原的固体支持物添加至生物样品和标记抗原的混合物中,并孵育约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟或少于10分钟。在一些实施方案中,孵育步骤进行总共约10分钟至约20分钟。随后的检测或诊断步骤可以在少于约5分钟内进行。应理解的是,测定所需的时间量可以基于几个因素(包括生物样品中的抗体的水平和抗体对抗原的亲合力)而变化。因此,公开的方法可以进行任何合适的时间量。

[0039] 所述方法可以进一步包括确定所述受试者的所述生物样品中的所述抗体的水平。所述受试者的所述生物样品中的所述抗体的水平与所述固体支持物/标记抗原复合物的水平成正比。因此,可以通过确定固体支持物/标记抗原复合物的水平来确定抗体的水平,这可以例如通过测量来自复合物的信号来进行。类似地,在其中所述方法用于诊断受试者中的自身免疫性疾病的实施方案中,通过测量来自与固体支持物连接的标记抗原的信号来测量固体支持物/标记抗原复合物。

[0040] 公开的方法可以手动进行或可以自动化。例如,公开的方法可以使用ADVIA CENTAUR[®] 免疫测定系统或ATELLICA[™]系统进行。

[0041] 还提供了用于实施公开的方法的试剂盒。所述试剂盒可以包含固体支持物、未标记抗原和标记抗原。合适的固体支持物包括以上公开的那些。所述固体支持物结合未标记抗原,但不结合标记抗原。因此,在一些实施方案中,所述试剂盒包含具有与其结合的未标记抗原的固体支持物和标记抗原。在一些实施方案中,所述抗原是甲状腺球蛋白,且所述标记抗原是标记的甲状腺球蛋白。合适的标记物包括以上针对该方法公开的那些。

实施例

[0042] 提供以下实施例以进一步描述本文公开的一些实施方案。所述实施例意欲举例说明而非限制公开的实施方案。

[0043] 试剂制备

甲状腺球蛋白结合的固相试剂 - 测定固相含有与生物素化的人甲状腺球蛋白偶联的链霉抗生物素蛋白包被的磁性颗粒 (Thermo Fisher Scientific, Dynabeads™ M270 REF 34353), 在缓冲盐水中的靶标颗粒浓度为0.6 g/L, 所述缓冲盐水含有HEPES盐 (16.9 g/L HEPES酸和7.6 g/L HEPES钠)、300 mM氯化钠 (以提供离子强度)、1%牛白蛋白和0.1%牛球蛋白 (作为稳定剂) 以及0.2% Tween 20。

[0044] **标记的甲状腺球蛋白试剂** - 测定标记的试剂含有用ZAE-型吡啶酯标记的人甲状腺球蛋白, 在缓冲盐水中的甲状腺球蛋白靶标浓度为1.2 μ g/mL, 所述缓冲盐水含有HEPES盐 (16.9 g/L HEPES酸和7.6 g/L HEPES钠)、300 mM氯化钠 (以提供离子强度)、1%牛白蛋白和0.1%牛球蛋白 (作为稳定剂) 以及0.2% Tween 20。

[0045] 样品制备

根据推荐的稀释程序, 制备来自WHO参考材料 (抗甲状腺球蛋白血清, 人NIBSC代码65/093) 的样品 (10个水平)。每份样品内的抗甲状腺球蛋白的预期浓度提供于表1中。类似地, 用高度浓缩的人抗甲状腺球蛋白抗体 (例如, 10,000和50,000 IU/mL之间) 制备患者血清标准品, 并稀释以制备跨越宽浓度范围的10个水平 (表2)。使用公开的免疫测定法 (被称为“抗原桥免疫测定法”) 和当前使用的竞争测定法在ADVIA CENTAUR® 系统上分析所有样品。

[0046] 抗原桥免疫测定法的反应程序

通过ADVIA CENTAUR® 系统进行以下步骤, 如图2中所举例说明:

- 将25 μ L含有抗甲状腺球蛋白抗体的样品分配至比色杯中;
- 将样品孵育4.75分钟;
- 试剂探针1分配100 μ L标记的甲状腺球蛋白试剂, 并将混合物孵育2.75分钟;
- 试剂探针2分配200 μ L甲状腺球蛋白结合的固相试剂, 并将混合物在37°C下孵育6.5分钟;
- 使用磁体分离形成的复合物, 并将复合物吸出并用洗涤缓冲液洗涤;
- 分配各自300 μ L的酸试剂 (HCL) 和碱 (NaOH) 试剂以起始化学发光反应; 和
- 报告相对光度单位 (RLU) 结果。

[0047] 用于竞争性免疫测定法的反应程序

以下步骤手动进行或使用ADVIA CENTAUR® 系统进行:

- 将40 μ L含有抗甲状腺球蛋白抗体的样品分配至比色杯中;
- 将100 μ L标记的试剂添加至比色杯中, 并在37°C下孵育2.5分钟。通过将人甲状腺球蛋白 (~ 0.38 μ g/mL) 与吡啶酯在含有BSA、蛋白稳定剂和防腐剂的缓冲盐水溶液中混合来制备标记的试剂。

· 将200 μ L固相在比色皿中混合, 并在37°C下孵育5.0分钟。通过将多克隆山羊抗人抗体 (~ 49.5 μ g/mL) 结合的多克隆人抗甲状腺球蛋白抗体 (~ 1.98 μ g/mL) 在含有BSA、蛋白稳定剂和防腐剂的缓冲液中混合来制备固相试剂, 所述多克隆山羊抗人抗体与顺磁颗粒共价偶联;

- 然后应用磁体以分离、吸出并用试剂水洗涤比色杯；
- 分配各自300 μL 的酸试剂(HCL)和碱试剂(NaOH)以起始化学发光反应；和
- 报告RLU结果。

[0048] 数据分析

由反应产生的RLU被确定为以每mL抗体活性的内部单位(IU/mL)计的预期浓度的函数(WHO参考样品的表1和血清患者样品的表2)。在抗原桥免疫测定法中,信号(RLU)与样品中存在的自身抗体的浓度成正比,而在竞争测定法中,信号与样品中存在的自身抗体的浓度成反比。

[0049] 表1.

WHO样品	预期浓度(IU/mL)	抗原桥测定法RLU	竞争测定法RLU
水平1	0	3381	887440
水平2	7.8125	47742	897444
水平3	15.625	84672	863750
水平4	31.25	151756	815643
水平5	62.5	276207	759089
水平6	125	486019	614878
水平7	250	779351	371528
水平8	500	918564	339795

[0050] 表2.

患者样品	预期浓度(IU/mL)	抗原桥测定法RLU	竞争测定法RLU
水平1	4.35	8122	700855
水平2	7.16	15445	649511
水平3	21.40	30262	638638
水平4	16.18	63240	564694
水平5	30.77	105924	502377
水平6	48.43	200597	395283
水平7	94.23	295594	308100
水平8	164.12	398975	221646

[0051] 与在低浓度下对于竞争测定法观察到的信号相对减少相比,桥测定表现出显著更高的信号相对增加。低浓度下信号的相对增加或减少对测定的检测能力具有直接影响。例如,检测限值(LoD)(其为可以在95%的时间检测到抗体的最低浓度)取决于测定的检测能力。在上面显示的实验中,对于桥测定法和竞争测定法,LoD分别被计算为1 IU/mL和45 IU/mL。以上结果表明,公开的抗原桥免疫测定法比当前使用的竞争测定法更灵敏。

[0052] 优化抗原桥免疫测定法

单步免疫测定法的一个潜在缺点是“钩效应(hook effect)”,其导致可检测信号随着分析物浓度增加而减少,导致潜在的假低结果。如图3中所示,例如,在较低的抗甲状腺球蛋白抗体浓度下,抗原桥测定表现出抗体的浓度和相对信号(RLU)之间的直接关系。然而,随着抗体的浓度增加,在图3中的相对信号开始变得饱和(约500UI/ml)。在低浓度的抗甲状腺球蛋白抗体存在的情况下,大量固体支持物/未标记的甲状腺球蛋白复合物遇到有限数量

的抗体。随着抗体的浓度增加,固体支持物/未标记的甲状腺球蛋白复合物变得不足,使得抗体总量中仅一部分与固体支持物/未标记的甲状腺球蛋白复合物结合,且无法完全检测到与固体支持物/未标记的甲状腺球蛋白复合物结合的一部分抗体。用公开的免疫测定法,可以通过优化抗体相对于标记和结合的未标记的甲状腺球蛋白的摩尔比来克服这种“钩效应”。如图4中所示,与未稀释(菱形)样品相比,当抗甲状腺球蛋白抗体样品被稀释(正方形)时,抗体测量范围增加并且实现信号和抗体浓度之间的线性关系。

[0053] 为了分析标记物对在免疫测定法中获得的相对信号的影响,改变添加至甲状腺球蛋白中的吡啶酯的量以获得吡啶酯标记物的5、10和20摩尔过量的比率。如图5中所示,用较高量的吡啶酯获得较高的相对信号。

[0054] 类似地,可以优化抗甲状腺球蛋白抗体与固体支持物/未标记甲状腺球蛋白复合物的比率,以产生期望的剂量应答并增加分析灵敏度和测量范围。

[0055] 本领域技术人员将理解,可以对本发明的优选实施方案进行许多改变和修改,并且可以在不脱离本发明的精神的情况下进行此类改变和修改。因此,意欲所附权利要求覆盖落入本发明的真实精神和范围内的所有此类等同变式。

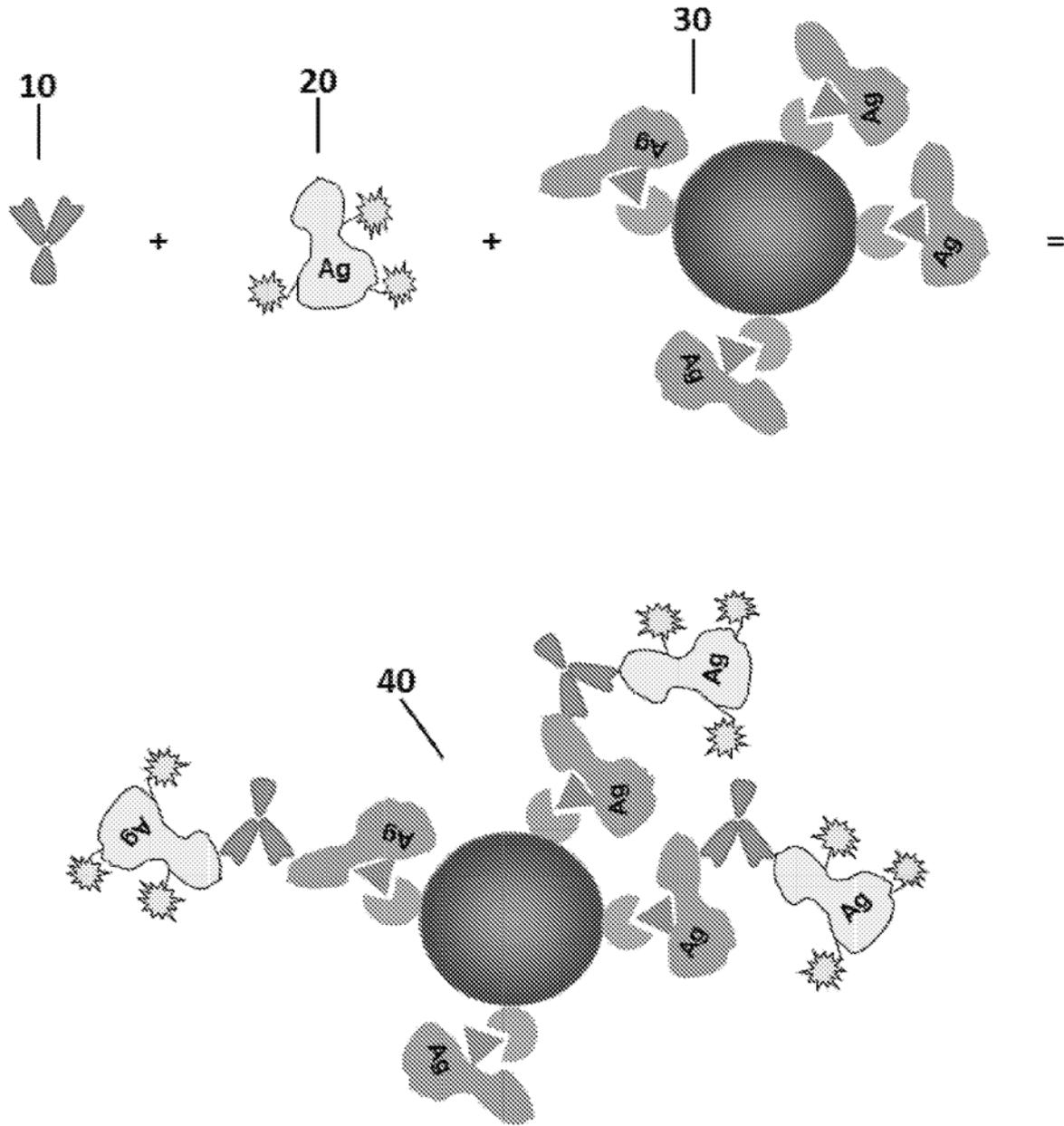


图 1

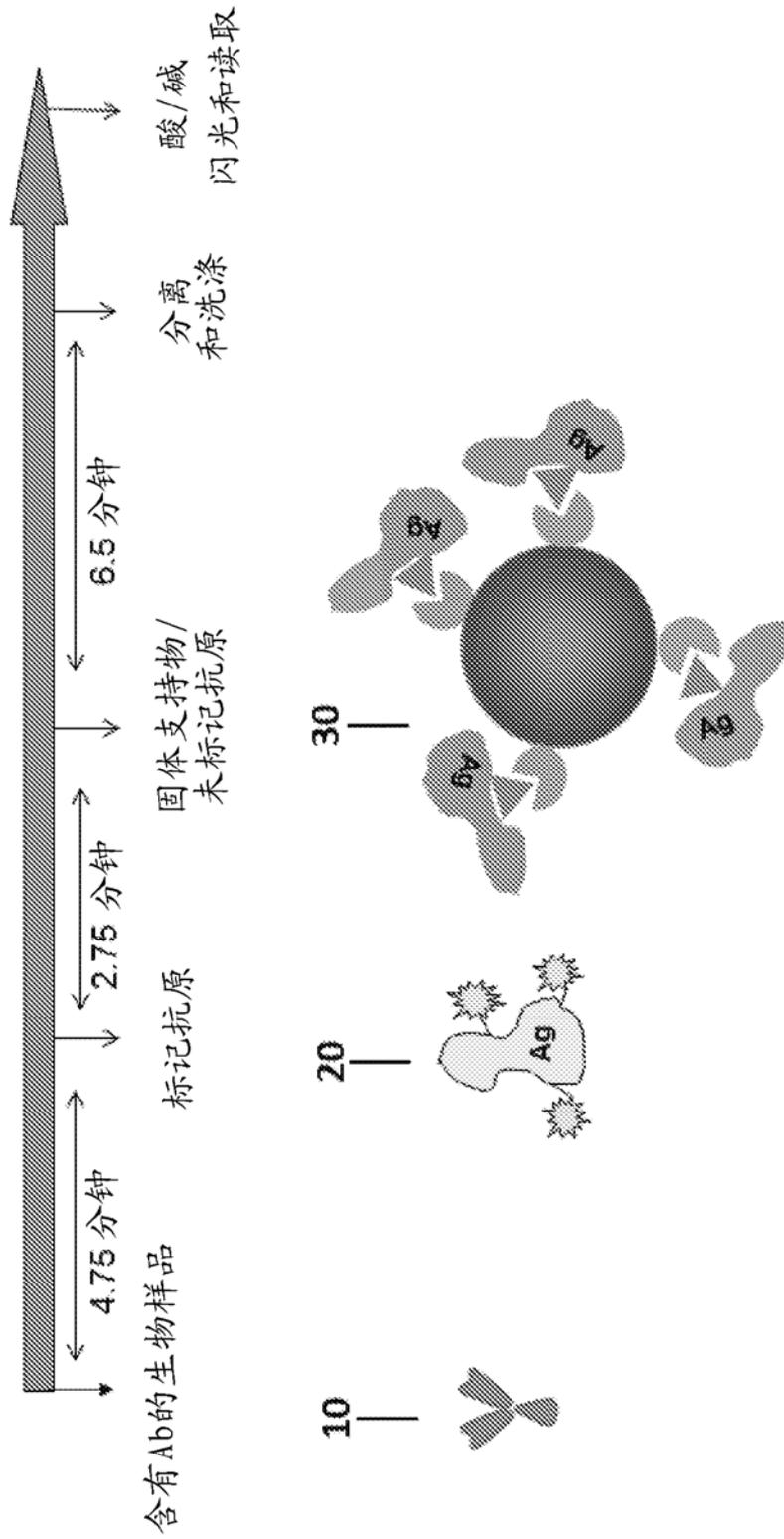


图 2

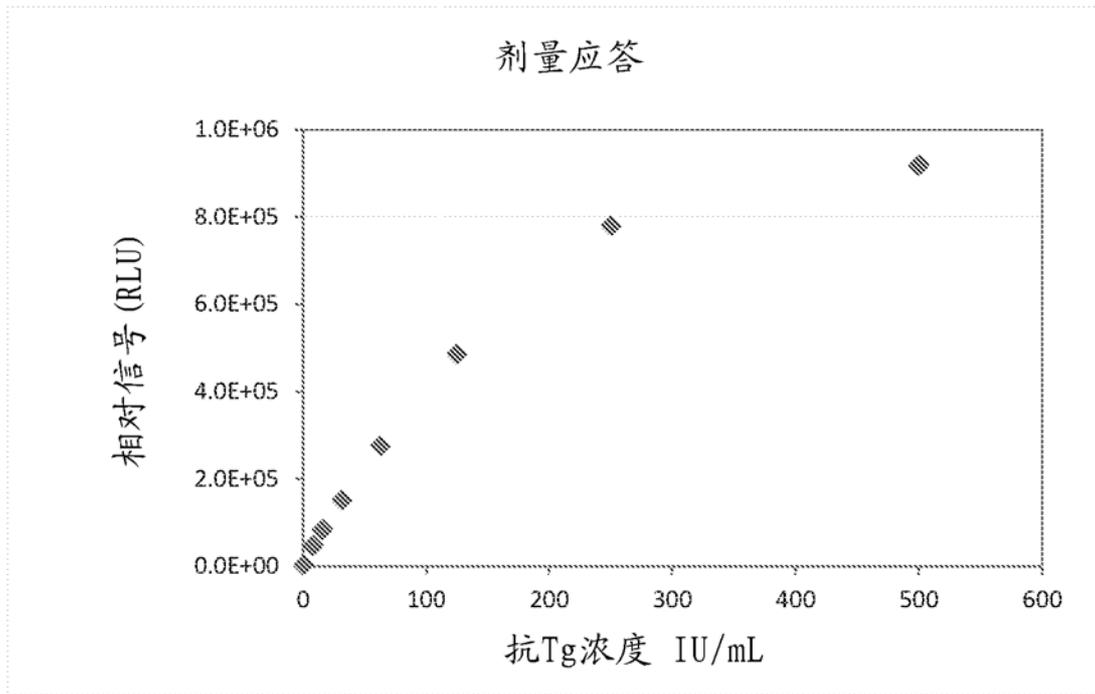


图 3

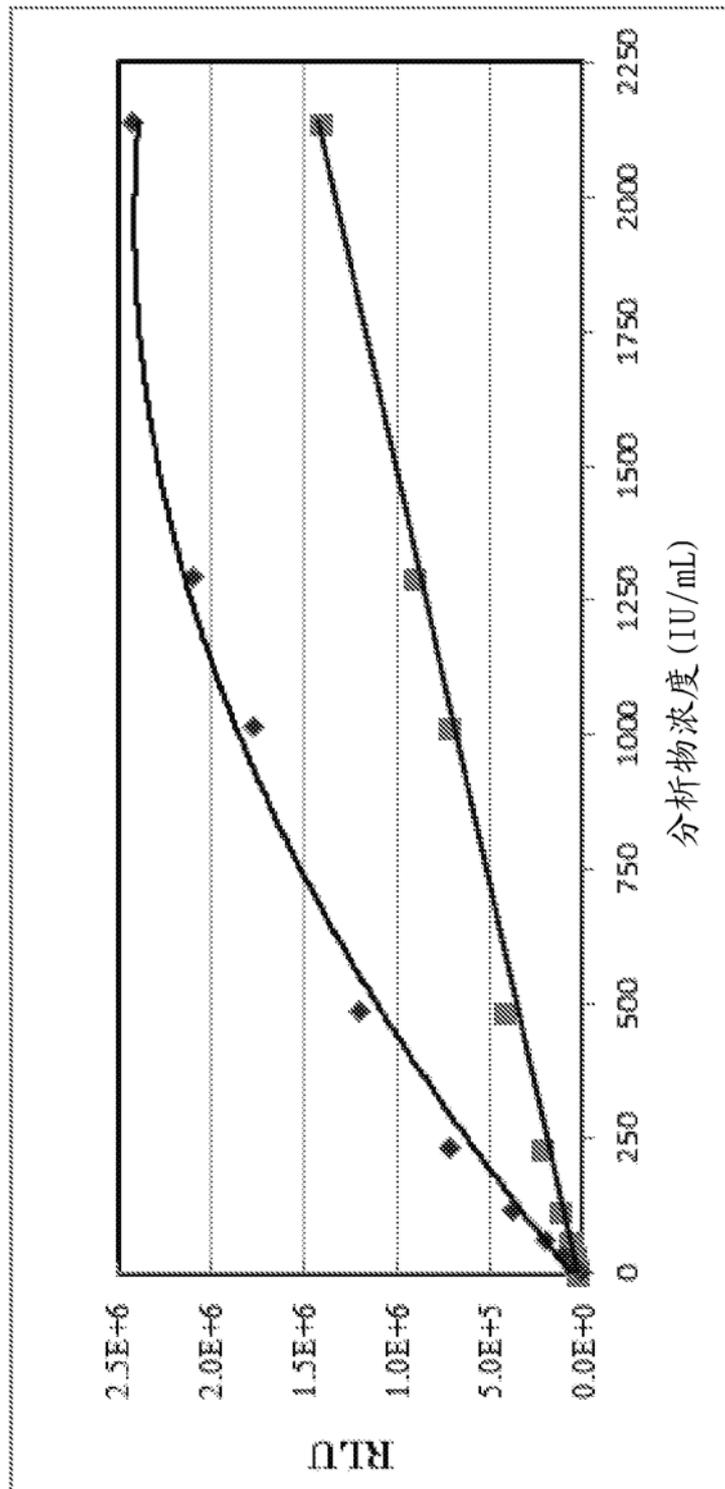


图 4

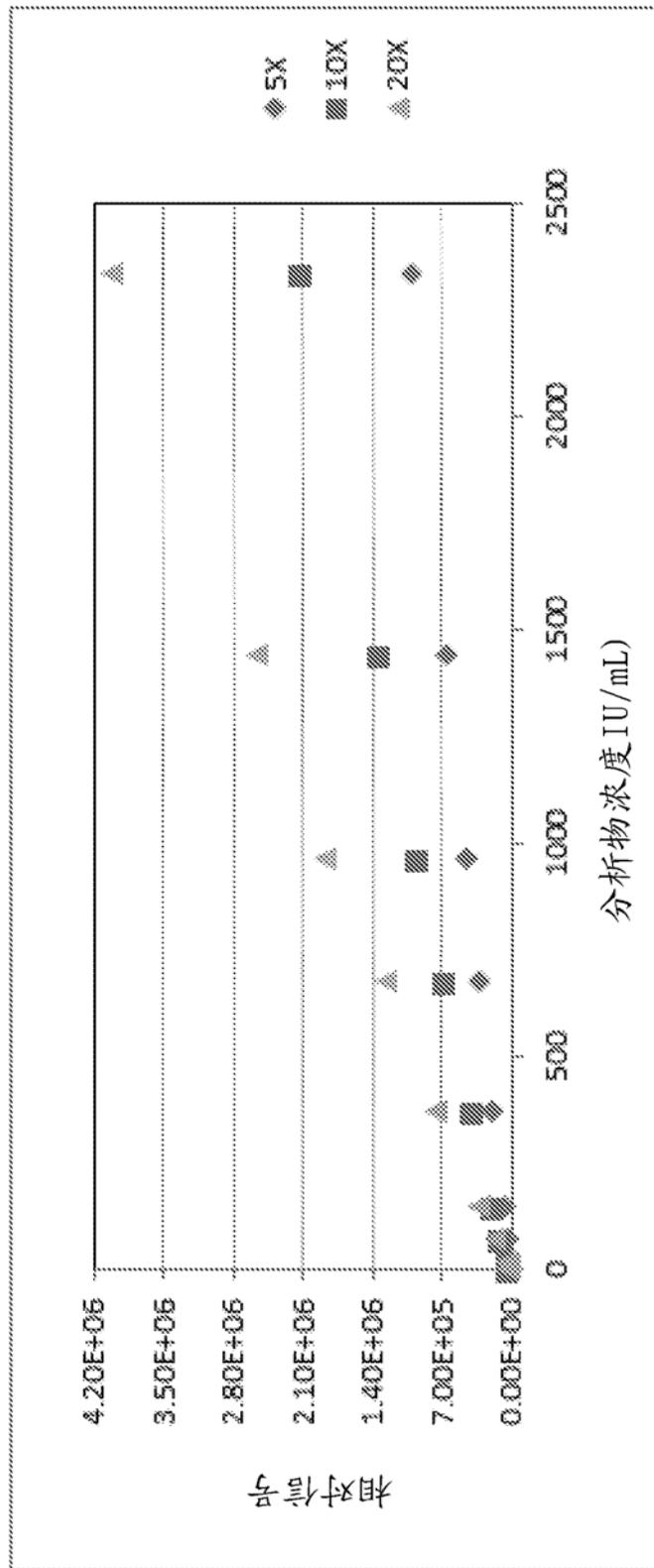


图 5