[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480039821.0

[51] Int. Cl.
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C07K 17/14 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 1 月 24 日

[11] 公开号 CN 1902496A

[22] 申请日 2004.11.5
[21] 申请号 200480039821.0
[30] 优先权
[32] 2003.11.7 [33] AU [31] 2003906147
[86] 国际申请 PCT/AU2004/001522 2004.11.5
[87] 国际公布 WO2005/045439 英 2005.5.19
[85] 进入国家阶段日期 2006.7.4
[71] 申请人 赫普金尼克斯股份有限公司
地址 澳大利亚维多利亚省
[72] 发明人 D·A·安迪生 T·S·霍华德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 梁 谋

权利要求书 6 页 说明书 27 页 附图 8 页

[54] 发明名称

结合测定组分

[57] 摘要

在一个实施方案中，本发明提供用于检测样品中特异性目标分析物的复合物。该复合物包含被桥接复合物间接连接在分析物结合配偶体上的检测标记。这种排列有利于保护或增强在分析物结合配偶体上的分析物结合位点的可用性且因而增强了分析物的检测。在一些实施方案中，本发明提供了一种适于检测样品中目标特异性抗体的检测复合物。本发明的一个方面提供了一种使用桥连复合物检测一种或多种抗体的方法，使用的桥连复合物包含多聚体分子、二聚体分子或嵌合分子或颗粒，它们各自包含抗原且通过使用抗体或蛋白结合分子、核酸结合分子、糖类结合分子或脂质结合分子偶联到检测标记。

1. 一种检测样品中分析物的方法，所述方法包括样品和检测标记-分析物结合配偶体复合物接触，其中检测标记通过桥连复合物间接连接到分析物结合配偶体从而保护或增强分析物结合配偶体上对分析物的结合位点的可用性，且其中桥连复合物包含蛋白质 X_1、X_2 及其中 X_1 包含颗粒、二聚体、多聚体、嵌合体、融合蛋白或结合到或包含分析物结合配偶体且也可逆的结合到 X_2 的等价结构，其中 X_2 通过 X_1 结合且也结合、融合或以其他方式连接到检测标记上，并检测该检测标记从而指示样品中分析物的存在。

2. 权利要求 1 的方法，其中检测标记-分析物结合配偶体复合物单独或一起贮存或使用。

3. 权利要求 2 的方法，其中检测标记-X_2 组分和 X_1-分析物结合配偶体组分单独贮存且依次使用。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其中分析物结合配偶体为分离的、重组、合成的、天然存在的、化学的或蛋白质分子。

5. 权利要求 1-4 中任一项的方法，其中分析物结合配偶体为蛋白质分子。

6. 权利要求 5 的方法，其中 X_1 包含颗粒、二聚体、多聚体、嵌合体、融合蛋白或包含分析物结合配偶体的等价结构。

7. 权利要求 1-6 中任一项的方法，其中分析物能够与蛋白质特异性结合。

8. 权利要求 7 的方法，其中分析物为抗体。

9. 权利要求 8 的方法，其中抗体为 IgM、IgE、IgA 和 IgG 抗体中的一种。

10. 权利要求 8 的方法，其中分析物结合配偶体为抗原。

11. 权利要求 6 的方法，其中颗粒为病毒颗粒或病毒样颗粒。

12. 权利要求 11 的方法，其中病毒样颗粒为包含分析物结合配

偶体的一个或多个拷贝的重组嗜肝 DNA 病毒病毒样颗粒(VLP)。

13. 权利要求 6 的方法，其中 X_1 为二聚体且分析物结合到该二聚体的一个分子上及 X_2 结合到该二聚体的另一个分子上。

14. 权利要求 6 的方法，其中 X_1 为多聚体形式。

15. 权利要求 6 的方法，其中 X_1 为嵌合体形式。

16. 权利要求 6 的方法，其中 X_1 为融合蛋白形式。

17. 权利要求 6 的方法，其中 X_2 包含抗原结合分子、蛋白结合分子、核酸结合分子、糖类结合分子或脂质结合分子。

18. 权利要求 17 的方法，其中结合分子结合到分析物结合配偶体或结合到 X_1 中不同表位。

19. 权利要求 17 的方法，其中检测标记包含一种或多种质量标记、染料、胶体或磁性颗粒、酶、放射性分子、化学发光团、荧光团、磷光分子、发光分子例如荧火虫荧光素酶、金属与类金属、金属络合物、微粒、核酸、磷光体、电解质、顺磁性和/或磷光性颗粒、发光蛋白、量子点、放射性同位素、氧化还原复合物、底物、病毒或其他等价分子。

20. 一种检测样品中特异性抗体的方法，所述方法包括样品与检测标记-抗原复合物接触，其中抗原包含被抗体特异性识别的表位，且其中检测标记经保护或增强抗原上针对抗体的表位可用性的桥连复合物间接连接到抗原，且其中桥连复合物包含桥连结合配偶体 X_1 和 X_2，其中 X_1 包含颗粒、二聚体、多聚体、嵌合体、融合蛋白或结合到或包含抗原且也可逆的结合到 X_2 的等价结构，其中 X_2 包含抗体或蛋白结合分子，其通过 X_1 结合且也结合、融合或以其他方式连接到检测标记，并检测该检测标记从而指示样品中抗体的存在。

21. 权利要求 20 的方法，其中检测标记-X_2 组分及 X_1-分析物结合配偶体组分单独贮存且依次使用。

22. 权利要求 21 的方法，其中 X_2 结合到抗原或 X_1 的不同表位上。

23. 权利要求 20、21 或 22 的方法，其中 X_1 为抗原的二聚体形式且其中 X_2 与抗原结合。

24. 权利要求 20、21 或 22 的方法，其中 X_1 为抗原的二聚体形式且其中 X_2 和特异性抗体与相同或不同表位结合。

25. 权利要求 20、21 或 22 的方法，其中 X_1 为病毒颗粒或病毒样颗粒。

26. 权利要求 25 的方法，其中病毒颗粒为一种或多种重组体、嵌合体或天然存在的肝炎病毒颗粒。

27. 权利要求 25 的方法，其中病毒样颗粒(VLP)为禽嗜肝 DNA 病毒样颗粒。

28. 权利要求 27 的方法，其中 VLP 为重组禽嗜肝 DNA 病毒样颗粒且 X_2 连接到抗原。

29. 权利要求 27 的方法，其中 VLP 为重组嗜肝 DNA 病毒样颗粒且 X_2 连接到不是抗原的一部分的 X_1 的表位。

30. 权利要求 27 的方法，其中 VLP 为重组鸭嗜肝 DNA 病毒样颗粒且 X_2 为通过鸭嗜肝 DNA 病毒属的 S 或 L 抗原测定的单克隆抗体。

31. 权利要求 20、21 或 22 的方法，其中 X_1 包含抗原和与 X_2 可逆性结合的第二结合蛋白的融合蛋白，其中 X_2 为被第二抗原组分结合的抗体或蛋白质或糖类结合分子，且其中 X_2 也结合、融合或以其他方式连接到检测标记。

32. 权利要求 31 的方法，其中蛋白或糖类结合分子为糖类且 X_1 包含糖类结合蛋白。

33. 权利要求 31 的方法，其中蛋白结合分子为配体且 X_1 包含受体。

34. 权利要求 31 的方法，其中蛋白或糖类结合分子为蛋白质且 X_1 包含蛋白结合蛋白。

35. 权利要求 20 的方法，其中检测标记为质量标记、染料、胶

粒、酶、放射性分子、化学发光团、荧光团、磷光分子、发光分子例如荧火虫荧光素酶、金属与类金属、金属络合物、微粒、核酸、磷光体、电解质、顺磁性和/或磷光性颗粒、发光蛋白、量子点、放射性同位素、氧化还原复合物、底物、病毒或其他等价分子。

36. 权利要求 35 的方法，其中检测标记为胶粒，例如胶体金、胶体银或胶体硒。

37. 权利要求 20 的方法，其中分析物在检测前固定于固体载体上。

38. 权利要求 20 的方法，其中复合物的组分单独或一起贮存或使用。

39. 权利要求 1-38 中任一项的方法，用于检测样品中一种或许多种特异性分析物。

40. 权利要求 20-38 中任一项的方法，用于检测样品中一种或许多种针对肝炎例如甲型肝炎和/或乙型肝炎和/或丙型肝炎和/或戊型肝炎的特异性抗体。

41. 权利要求 40 的方法，其中抗体选自 IgA、IgM、IgE 及 IgG 抗体。

42. 权利要求 40 的方法，其中方法为色谱法或免疫色谱法。

43. 一种检测样品中特异性抗体的试剂盒，所述试剂盒为包含一部分接受样品而另一部分接受检测标记-抗原复合物的隔室形式，其中抗原包含被特异性抗体识别的表位，如果在所述样品中存在，且其中检测标记经桥连复合物间接连接到抗原而保护抗原上针对抗体的表位的可用性且检测其相对参照值，且其中桥连复合物包含桥连结合配偶体 X_1 和 X_2，其中 X_1 包含颗粒、二聚体、多聚体、嵌合体、融合蛋白或结合到或包含抗原且也可逆的结合到 X_2 的等价结构，其中 X_2 包含抗体或蛋白结合分子，其通过 X_1 结合且也结合、融合或以其他方式连接到检测标记。

44. 权利要求 43 的试剂盒，其中检测标记-X_2 组分和 X_1-分析物

结合配偶体组分单独贮存且依次使用。

45. 权利要求 43 或 44 的试剂盒，其中 X_2 结合到抗原或 X_1 中不同表位。

46. 权利要求 43、44 或 45 的试剂盒，其中 X_1 为抗原的二聚体形式且 X_2 结合到抗原。

47. 权利要求 43、44 或 45 的试剂盒，其中 X_1 为抗原的二聚体形式且其中 X_2 和特异性抗体与相同或不同表位结合。

48. 权利要求 43、44 或 45 的试剂盒，其中 X_1 为病毒颗粒或病毒样颗粒。

49. 权利要求 48 的试剂盒，其中病毒颗粒为重组体、嵌合体或天然存在的肝炎病毒颗粒。

50. 权利要求 48 的试剂盒，其中病毒样颗粒(VLP)为禽嗜肝 DNA 病毒样颗粒。

51. 权利要求 50 的试剂盒，其中 VLP 为重组体禽嗜肝 DNA 病毒样颗粒且 X_2 结合到抗原。

52. 权利要求 50 的试剂盒，其中 VLP 为重组体嗜肝 DNA 病毒样颗粒且 X_2 连接到不是抗原的一部分的 X_1 的表位。

53. 权利要求 52 的试剂盒，其中 VLP 为重组鸭嗜肝 DNA 病毒样颗粒且 X_2 为通过鸭乙型肝炎病毒的 S 抗原测定的单克隆抗体。

54. 权利要求 43、44 或 45 的试剂盒，其中 X_1 为包含抗原和与 X_2 可逆性结合的第二抗原组分的融合蛋白，其中 X_2 包含抗体或被第二抗原组分结合的抗原结合分子，且其中 X_2 也结合、融合或以其他方式连接到检测标记。

55. 权利要求 54 的试剂盒，其中抗原结合分子为糖类且 X_1 包含糖类结合蛋白。

56. 权利要求 54 的试剂盒，其中抗原结合分子为糖类且 X_1 包含糖类结合蛋白。

57. 权利要求 54 的试剂盒，其中抗原结合分子为配体且 X_1 包含

受体。

58. 权利要求 54 的试剂盒，其中抗原结合片段为蛋白质且 X_1 包含蛋白结合蛋白。

59. 权利要求 43 的试剂盒，其中检测标记包含一种或多种质量标记、胶粒、酶、放射性分子、化学发光团、荧光团、磷光分子、发光分子例如荧火虫荧光素酶、金属与类金属、金属络合物、微粒、核酸、磷光体、电解质、顺磁性和/或磷光性颗粒、发光蛋白、量子点、放射性同位素、氧化还原复合物、底物、病毒或其他等价分子。

60. 权利要求 59 的试剂盒，其中检测标记为胶粒，例如胶体金、胶体银或胶体硒。

61. 权利要求 43 或 44 的试剂盒，其中特异性抗体在检测前固定在固体载体上。

62. 权利要求 43-61 中任一项的试剂盒，其中复合物的组分单独或一起贮存或使用。

63. 权利要求 43-62 中任一项的试剂盒，用于检测样品中一种或许多种针对样品中甲型肝炎和/或乙型肝炎和/或丙型肝炎和/或戊型肝炎的特异性抗体。

64. 权利要求 63 的试剂盒，其中抗体选自 IgA、IgM、IgE 及 IgG 抗体。

65. 权利要求 44 的试剂盒，其中试剂盒为色谱试剂盒或免疫色谱试剂盒。

结合测定组分

发明背景

发明领域

本发明总体上涉及诊断学领域。更详细的说，本发明涉及用于检测分析物例如抗体或抗原的方法。本发明的检测方法尤其适于医学或其它疾病或疾病前（pre-condition）的诊断或风险分析，或用于确定感染状态或免疫状态。

先有技术的描述

在说明书的结束部分也列出了本说明书的参考文献详细目录。

在说明书中参考的任何先有技术不是且不应被看作对这种先有技术在任何国家内形成共有普通知识部分的承认及任何形式的建议。

在研究、分析、开发及临床上使用各种不同的测定方法检测目标分析物。免疫测定是一种利用抗体-抗原反应的特异性、强度和多样性分析样品及检测其中特定组分的特别有用的测定方法。

对特异性抗原的抗体的检测已经用于特定疾病状态的诊断。例如，甲型肝炎病毒抗体的存在表明感染了甲型肝炎病毒且对该病毒的继发感染可能具有免疫力。不同种类的抗体或免疫球蛋白的检测也可提供关于疾病或患者免疫状态的进一步的信息。例如，可通过存在的 IgM 抗体区分当前疾病状态，同时通过检测 IgG 抗体区分更久远的感染。

也已经知道针对特异性抗原的抗体的检测方法。例如，酶联免疫吸附测定 (ELISA)及放射免疫测定(RIA)是实验室中常规使用的方法。这些方法通常需要具有一定水平的实验室技术人员。也已经开发了许多种几乎不需要技巧且迅速完成的方法，且因此适于护理上

（at the point of care）检测特异性抗原的抗体。

在许多免疫测定中，需要形成含有特异性抗原连同可检测标记的缀合物。例如，病毒的抗原可与胶体金结合使得可以测定在装置内抗原-胶体金复合物和特异性抗体之间的免疫反应性。可选择的，病毒的抗原可与酶例如辣根过氧化物酶结合，使得可以用 ELISA 测定抗原-酶复合物和特异性抗体之间的免疫反应性。

然而，在胶体金或酶和目标抗原之间结合的过程可导致抗原和要测定的抗体之间的免疫反应性降低。具体说来，抗体结合位点可以是导致其难以接近抗体分子的结合到胶体金或酶的物理位点，或这种结合过程可转变抗原构象导致其不再被抗体分子识别。至少，抗原与胶体金或酶的结合可以为随机趋向(random orientation)，这样在诊断试验中仅有部分抗原分子可与患者的抗体反应而给出可检测的信号。

抗原的金或酶缀合物的制备需要使用高度纯化的抗原以防止形成含有污染蛋白质的金或酶缀合物，污染蛋白质然后可与抗体反应导致非特异性反应及实验结果不可靠。用来广泛纯化抗原的方法增加了这种制备的费用，也会导致抗原免疫活性的降低。

因此需要改良检测分析物例如抗体或抗原的测定系统，使用结合有检测标记（bound detection markers）的分析物-结合分子，作为结果，其与检测标记的结合不会降低测定的灵敏度或特异性。

发明概述

在本说明书中，除非另有说明，词语“包含”或类似表述，例如“包含”（"comprises"）或“包含”（"comprising"）将理解为暗指包括所述元件或整体或元件群或整体群，但是不排除任何其它元件或整体或元件群或整体群。

在一个实施方案中，本发明提供了一种适于检测样品中目标特异性分析物的检测复合物。这种复合物包含通过桥连复合物间接连接到分析物结合配偶体的检测标记。这种排列有利于保护或增强在

分析物结合配偶体上的分析物结合位点的可用性且因而增强了分析物的检测。在一些实施方案中，本发明提供了一种适于检测样品中目标特异性抗体的检测复合物。这种复合物包含间接与抗原组分连接的检测标记，其中抗原包含抗体识别的表位。为了保护这种抗原表位对抗体的可用性且因而便于检测抗体，检测标记通过桥连复合物间接连接到抗原。

本发明的一个方面提供了一种使用桥连复合物检测一种或多种抗体的方法，使用的桥连复合物包含多聚体分子、二聚体分子或嵌合分子或颗粒，它们各自包含抗原且通过使用抗体或蛋白结合分子、核酸结合分子、糖类结合分子或脂质结合分子偶联到检测标记。

本发明提供了一套结合配偶体，用于检测分析物，尤其是保护或增强当分析物结合配偶体连接到检测标记时分析物结合配偶体结合分析物的能力。在一些实施方案中，本发明提供了一种检测体系，使用保护或增强抗原表位结合抗体的可用性且因而便于其检测的检测标记-抗原复合物检测样品中抗体。本发明复合物特别适于作为测定法、试剂盒及其它设备的一部分用于筛选化合物例如特异性抗体或抗原。在一个示例性实施方案中，抗原为肝炎病毒抗原且结合到肝炎病毒抗原的抗体为抗肝炎病毒抗体。

在一些实施方案中，肝炎病毒抗原为甲型肝炎病毒和/或乙型肝炎病毒和/或丙型肝炎病毒和/或戊型肝炎病毒。

虽然在检测特异性抗体中使用特定的检测标记-抗原复合物描述本发明，但是本发明并不局限于此且扩展到使用检测标记-分析物结合配偶体复合物检测特异性分析物。术语“抗原”和“抗原多肽”包括半抗原及其它可产生抗体的分子。

为改良其敏感性和/或特异性，本检测复合物可与广泛的不同免疫测定法组合使用。在一个实施方案中，在暴露到检测标记-抗原复合物前将分析物固定在固体载体上。在一些实施方案中，复合物或复合物组分可贮存在试剂盒或设备的隔室（compartments）内。检测

标记-抗原复合物的组分可贮存在分离的位置（separate locations）或隔室内。

试剂盒可包含可选择的检测标记、桥连配偶体组分及分析物结合配偶体。

在一个方面，检测标记-分析物结合配偶体排列且具有下列结构：

$$M\text{-}X_2+X_1\text{-}A$$

其中：

M 为检测标记，间接连接到 A 从而形成检测标记-分析物结合配偶体复合物；

A 为分析物特异性识别的分析物结合配偶体。在一些实施方案中，A 为带有被检测抗体特异性识别的表位的抗原。在一些实施方案中，A 也结合到 X_2 从而作为 X_2 的一部分表达或者作为 X_2 的一部分天然存在；

X_1 及 X_2 包含桥连结合配偶体，其在检测标记（M）和分析物结合配偶体（A）间形成桥连复合物且通过可逆非共价键（+）连接；

X_1 包含第一桥连结合配偶体，所述桥连结合配偶体为颗粒、二聚体、多聚体、嵌合体或融合蛋白，其包含的一部分连接到 X_2 而另一部分连接到或包含分析物结合配偶体（A），且其中毗连的(-)是在第一桥连结合配偶体和分析物结合配偶体(A)之间的共价键或非共价键；

颗粒是指病毒颗粒或病毒样颗粒（ viral like particle）。在一些实施方案中，X_1 包含的重组病毒样颗粒包含蛋白质分析物结合配偶体。在一些实施方案中，病毒样颗粒得自鸟嗜肝 DNA 病毒且抗原作为 L 多肽的一部分表达。

X_2 包含连接、融合或以另外方式直接或间接连接到可检测标记（M）的第二桥连结合配偶体，且其中毗连的（-）是共价键或非共价键。在一些实施方案中，X_2 使用一对或多对结合分子例如抗体-抗体生物素-链霉抗生物素蛋白(strepavidin)或生物素-抗-生物素抗体对

连接到可检测标记。

在一些实施方案中，X_2 为抗原结合分子、蛋白结合分子、核酸结合分子、糖类结合分子或脂质结合分子。在另一个实施方案中，X_2 为抗原-结合分子。

在另一个实施方案中，X_2 为抗体或其抗原结合片段。

在本排列中使用的分析物结合配偶体可为不同纯度，因为在任何混合物中只有特异性分析物结合配偶体会与检测标记形成复合物。例如，含有目标抗原的整个细胞的溶解产物可用于形成复合物，且仅仅目标抗原会被标记。

检测标记-分析物结合配偶体复合物具有能够定向使目标分析物结合位点的可用性最大化的优点。特别地，如果桥连复合物包含一个或多个抗体，则抗原可与检测标记在各方向均匀（uniform orientation）连接，进一步使抗原表位与患者抗体结合的可用性最大化。

对于免疫测定，抗原可仅具有适于结合患者抗体的单一位点从而给出诊断试验结果。在这种情况下，检测标记与抗原的结合可妨碍或减少随后的或同时发生的患者抗体与相同的抗原类的结合。本发明通过使用其中可得到两个或多个抗体结合位点拷贝的多价体抗原或者其中目标抗原和与胶体金-抗体缀合物结合的相同抗原内的特殊抗原或特殊表位具有物理学上联系的嵌合抗原解决了这个问题。对本领域技术人员来说显而易见的是，检测标记可在任何时间连接到分析物结合配偶体，直到并且包括进行测定时。

附图简述

图 1 为显示检测标记（胶体金）-抗原复合物的图示，包含二聚体 ORF2.1 抗原，该抗原经一个分子连接到与检测标记结合的抗体，二聚体中余下的第二分子与样品抗体(IgM)相互作用。IgM 固定在含有抗人 IgM 的条带（strip）上。

图 2 为显示包含甲型肝炎病毒(HAV)颗粒(第一桥连结合配偶体)

的检测标记(胶体金)抗原复合物的图示，通过其多聚性质也包含带有被固定化 IgM 抗体及缀合到检测标记的单克隆抗-HAV 抗体(第二桥连结合配偶体)识别表位的抗原。在限定条件例如病毒浓度及孵育时间下，每个病毒内仅一个或几个拷贝的表位将与结合到胶体金的单克隆抗体反应，剩下病毒颗粒内其余表位与患者抗体反应。IgM 固定在含有抗人 IgM 的条带上。

图 3 为显示包含鸭乙型肝炎病毒(DHBV)(第一桥连结合配偶体)的病毒样颗粒(VLP)的检测标记(胶体金)抗原复合物的图示，包含带有被固定化 IgM 患者抗体及缀合到检测标记的识别 VLP S 抗原上第二表位的单克隆抗-DHBV S 抗原抗体(第二桥连结合配偶体)识别表位的抗原。缀合到胶体金(McAb 7c12)的单克隆抗体定向到 VLP(S 抗原)的 DHBV 部分中表位而不是分析物结合配偶体抗原，剩下 VLP 上抗原的拷贝与患者抗体反应从而给出诊断试验中可见信号。IgM 固定在含有抗人 IgM 的条带上。

图 4 为显示包含鸭乙型肝炎病毒(DHBV)(第一桥连结合配偶体)的病毒样颗粒(VLP)的检测标记(胶体金)抗原复合物的图示，包含带有被固定化 IgM 患者抗体及识别缀合到检测标记的分析物结合抗原上的相同表位的单克隆抗体(第二桥连结合配偶体)识别的表位的抗原。缀合到胶体金的单克隆抗体定向到分析物结合配偶体抗原，但是由于带有表位拷贝的 VLP 的 3-维结构伸展在其表面，每个 VLP 内仅一个或几个拷贝的表位将与单克隆抗体反应，剩下的 VLP 内拷贝与患者抗体结合从而在诊断试验中给出可见信号。IgM 固定在含有抗人 IgM 的条带上。

图 5 为显示检测标记（胶体金）-抗原复合物的图示，包含单价抗原经一个表位与缀合到检测标记的抗体结合，剩下单体的第二表位与样品抗体(IgM)相互作用。IgM 固定在含有抗人 IgM 的条带上。

图 6 为显示检测标记（胶体金）-抗原复合物的图示，复合物中包含的嵌合重组融合蛋白包含融合到分析物结合抗原的甘露糖结合

蛋白（第一桥连结合配偶体），复合物中还包含缀合到胶体金的甘露糖结合蛋白的单克隆抗体（第二桥连结合配偶体）。由于单克隆抗体定向到 MBP，完整分析物抗原与样品抗体自由反应。样品抗体 IgM 固定在含有抗人 IgM 的条带上。

图 7 显示检测标记（胶体金）-抗原复合物的图示，复合物中包含的嵌合重组融合蛋白包含融合到分析物结合抗原的甘露糖结合蛋白（第一桥连结合配偶体），复合物中还包含缀合到胶体金上的甘露糖结合蛋白（MBP）的配体（第二桥连结合配偶体）。由于配体定向到 MBP，完整分析物抗原与样品抗体自由反应。样品抗体 IgM 固定在含有抗人 IgM 的条带上。

图 8 为显示检测对甲型肝炎的 IgM 抗体的图示。特别地，检测标记（胶体金）通过桥连结合配偶体与分析物结合蛋白(HAV 颗粒)连接且使用蛋白：蛋白结合分子(生物素:抗生物素抗体)连接检测标记和第二桥连结合配偶体(X_2)。使用抗-HAV 单克隆抗体结合能够结合目标抗体(甲型肝炎 IgM 抗体)的甲型肝炎病毒颗粒(一个包含颗粒或多聚体的 X_1 的实例)。胶体金缀合到识别生物素化抗－ＨＡＶ 单克隆抗体的抗－生物素抗体上。在使用中，每个病毒颗粒内仅有几个拷贝的表位将和抗－ＨＡＶ抗体反应。

优选实施方案详述

本发明提供了一个测定中用于检测分析物的体系，且更详细的说在免疫测定中检测抗体。

本发明提供了用于检测样品中分析物的方法，此方法包括将样品与检测标记-分析物结合配偶体复合物接触，其中所述检测标记通过桥连复合物间接连接到分析物结合配偶体从而保护或增强对分析物的结合位点的可用性；且检测此检测标记从而指示样品中分析物的存在。

除非另有明确说明，本文中所用单数形式“一”和“该”包括复数方面。因此，例如所用的“抗体”包括单个抗体或一类抗体，

也包括两种或多种相同或不同特异性的抗体；所用的“样品”包括两种或多种样品；等等。

使用本领域认可的方法检测本发明的检测标记-分析物复合物。

本文中所用“检测”，其最广泛的含义包括对分析物的存在进行定性试验或定量试验测定。本领域技术人员将认识到有许多测定方法适用于本发明复合物。色谱测定是特别成熟的，且有大量不同的色谱形式可用，根据常用试剂和设备以及在任何特定考察中所需的结果选择适用的色谱形式。调节根据色谱原理的“快速”测定以满足准确、快速及方便使用的条件。本发明复合物特别适于使用免疫色谱设备。然而，带有检测标记的本复合物也适于用各种格式分析。特别优选且在 Wild D “The Immunoassay Handbook”, Nature Publishing Group, 2001 中描述了免疫测定或基于酶的色谱测定，且通过参考美国专利号 4,016,043、4,590,159、5,714,389、5,877,028、5,922,537、6,168,956 及 6,548,309 结合到本文且经参考公开资料而引用。为了免疫色谱测定，通过与同样连接到检测标记的分析物的抗体凝集反应检测目标分析物。类似的基于酶的测定使用酶反应代替抗原-抗体反应。在已公开的美国专利申请号 20010006821、20040087036 及 20040214347 中描述了免疫色谱法的各种变化，其全部内容已结合到本文中。在已结合到本文中公开的美国专利申请号 20030165970 中描述了用于复合分析物分析的免疫金过滤方法。

已经描述了许多“检测标记”且适于在本发明中使用。可根据任何经分析可鉴别的检测复合物的标记的物理或化学性质检测。因此这种标记可为质量标记（mass tag），其可为放射性的，或可通过颜色、光谱学或其磁性或其顺磁性特征鉴别。在许多测定中分析物的检测涉及结合或未结合检测复合物的空间分离。可选择的，只有连接到目标分析物时，检测标记才可生成一种可区分的信号。特别优选胶体缀合物。

用于本测定的方便的检测标记包括但不限于：例如吖啶鎓酯

（acridinium ester）、吖啶鎓磺酰胺（acridinium sulphonamide）、异鲁米诺（isoluminol）；辅酶例如 ATP、FAD、NAD；电化学发光团(electrochemiluminophores)例如三(双吡啶)钌(ruthenium tris(bipyridul))；酶例如乙酸激酶、碱性磷酸酶、β-内酰胺酶、葡萄糖氧化酶、荧火虫荧光素酶、β-D-半乳糖苷酶（galctosidase）、辣根过氧化物、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、虫漆酶、Renilla 荧光素酶、黄嘌呤氧化酶；荧光团(flurophores)例如三双吡啶铕穴状化合物(europium trisbipyridine cryptate)(及其他镧系元素穴状化合物)、荧光素、β-藻红素、玫瑰红(rhodamine)、伞形酮衍生物、德克萨斯红(Texas Red)；自由基例如氧化亚氮(nitroxide)；融合缀合物例如碱性磷酸酶-抗-植物色素单链抗体；碱性磷酸酶-碱性纤维母细胞生长因子受体；脱水母发光蛋白(apoaequorin)-IgG 重链；细菌碱性磷酸酶-IgG Fc 结合蛋白；荧火虫荧光素酶-蛋白 A；人胎盘碱性磷酸酶-4-1 BB 配体；海生细菌荧光素酶（β-亚基)-蛋白 A；变儿茶酚酶-蛋白 A；蛋白 A-抗植物色素单链抗体；Pyrophorus plagiophthalamus 荧光素酶-蛋白 A；基因例如荧火虫荧光素酶；金属与类金属例如金、银、硒；金属络合物例如三羰基环戊二烯基锰(I)(cyclopentadienylmanganese tricarbonyl)、金簇；微粒例如胶乳、红细胞、脂质体；核酸例如 pUC19 DNA；磷光体例如铕活化的氧硫化钇(yttrium oxisulfide)；发光蛋白例如水母发光蛋白；量子点例如硫化锌包被的（zinc sulfide-coated）CdSe 微粒；放射性同位素例如 ^{125}I；氧化还原络合物例如二茂铁；底物例如半乳糖伞形酮及病毒例如噬菌体 T4。

虽然不希望将本发明限制在任何特定检测标记及检测模式，但是使用流式细胞计量术在高通量体系中是特别便利的。正如本领域中所知，流式细胞计量术是一种高通量技术，该技术包括当混悬在流动液体内的颗粒通过一个或多个激光束通路时，迅速分析颗粒的物理和化学性质。由于各个细胞或颗粒阻断激光束，使用任何适当的跟踪算法检测和记录各个细胞或颗粒发射的散射光和荧光。使用

荧光团特别有效。自表 1 中所列可选择适当荧光团的实例。在此格式中使用的其他可检测标记包括冷光及磷光，也包括前面提及的红外染料。

表 1

探针	Ex[1]（nm）	Em[2] (nm)
反应性及缀合探针		
羟基香豆素	325	386
氨基香豆素	350	455
甲氧基香豆素	360	410
Cascade Blue	375 ; 400	423
荧光黄	425	528
NBD	466	539
R-藻红蛋白(PE)	480; 565	578
PE-Cy5 缀合物	480; 565; 650	670
探针	Ex[1]（nm）	Em[2] (nm)
PE-Cy7 缀合物	480 ; 565 ; 743	767
APC-Cy7 缀合物	650 ; 755	767
Red 613	480 ; 565	613
荧光素	495	519
FluorX	494	520
BODIPY-FL	503	512
TRITC	547	574
X-玫瑰红	570	576
丽丝胺若丹明 B	570	590
PerCP	490	675
德克萨斯红	589	615
别藻蓝素(APC)	650	660
TruRed	490, 675	695
Alexa Fluor 350	346	445
Alexa Fluor 430	430	545
Alexa Fluor 488	494	517
Alexa Fluor 532	530	555
Alexa Fluor 546	556	573
Alexa Fluor 555	556	573
Alexa Fluor 568	578	603
Alexa Fluor 594	590	617

Alexa Fluor 633	621	639
Alexa Fluor 647	650	688
Alexa Fluor 660	663	690
Alexa Fluor 680	679	702
Alexa Fluor 700	696	719
Alexa Fluor 750	752	779
Cy2	489	506
Cy3	(512) ; 550	570 ; (615)
Cy3, 5	581	596 ; (640)
Cy5	(625) ; 650	670
Cy5, 5	675	694
Cy7	743	767
核酸探针		
Hoeschst 33342	343	483
DAPI	345	455
Hoeschst 33258	345	478
SYTOX Blue	431	480
色霉素 A3	445	575
光辉霉素	445	575
YOYO-1	491	509
SYTOX Green	504	523
SYTOX Orange	547	570
溴化乙啡啶 (ethidium Bormide)	493	620
探针	**Ex^1 (nm)**	**Ex^2 (nm)**
7-AAD	546	647
吖啶橙	503	530/640
TOTO-1, TO-PRO-1	509	533
噻唑橙	510	530
Propidium Iodide (PI)	536	617
TOTO-3, TO-PRO-3	642	661
LDS 751	543 ; 590	712 ; 607
细胞功能探针		
Indo-1	361/330	490/405
Fluo-3	506	526
DCFH	505	535

DHR	505	534
SNARF	548/579	587/635
荧光蛋白		
Y66F	360	508
Y66H	360	442
EBFP	380	440
Wild-type	396, 475	50, 503
GFPuv	385	508
ECFP	434	477
Y66W	436	485
S65A	471	504
S65C	479	507
S65L	484	510
S65T	488	511
EGFP	489	508
EYFP	514	527
DsRed	558	583
其他探针		
Monochlorobimane	380	461
钙黄绿素	496	517

1 Ex: 峰激发波长（nm）

2 Em: 峰发射波长（nm）

本发明包括分析荧光发射的任何适当方法。在这一点上，本发明考虑的技术包括但不限于，例如 Lakowicz 等. *Biophys. J.* 72: 567,1997,公开的 2-光子及 3-光子时间分辨荧光光谱，其通过引用结合到本文中)，例如 Eriksson 等(*Biophys. J.* 64,1993, 其通过引用结合到本文中)公开的荧光寿命成像和例如 Youvan 等(*Biotechnology et elia* 3 : 1-18, 1997)公开的荧光共振能量转移。

“分析物”包括任何生物学感兴趣分子且包括但不限于：细胞因子、激素、抗原、法医样品、抗体、半抗原、酶、天然产物、化学文库组分、包括兽药或药学上感兴趣的药物、环境成分等。

抗原通常要求为纯化形式，且常常方便地通过重组产生。但是，本发明抗原可为天然合成的、重组体、糖类、脂类或药物分子。通

常通过参考需要与其反应的抗体来测定表达分子的大小和组成。如果抗原特别复杂，其可能包含不需要检测的抗体结合位点。相应的文中所用术语抗原是指以蛋白形式时带有表位的分子部分。此术语不排除修饰的多肽或蛋白质性质分子且包括肉豆蔻化(myristilation)、糖基化、磷酸化等。此定义包括例如含有一种或多种氨基酸类似物（包括例如表 2 中给出的非天然氨基酸）的多肽，或者带有取代键的多肽。多肽或蛋白质指氨基酸聚合物且不应限制任何特定长度。因此此术语包括任何长度的表位、肽、多肽、蛋白质或蛋白质性质分子。这种抗原多肽可包含单表位区经过包括重复表位区的多表位区。虽然考虑自病原体例如病毒、细菌、真菌、原虫、吸虫、线虫、蛋白酶传染性因子等得到肿瘤相关抗原，但是这种抗原多肽可得自单一来源或多重来源。本领域已熟知许多试剂和肿瘤相关蛋白的抗原区。

表 2

非常规氨基酸编码

非常规氨基酸	编码	非常规氨基酸	编码
α-氨基丁酸	Abu	L-N-甲基丙氨酸	Nmala
α-氨基-α-甲基丁酸	Mgabu	L-N-甲基精氨酸	Nmarg
甲酸氨基环丙酯	Cpro	L-N-甲基天冬酰胺	Nmasn
		L-N-甲基天冬氨酸	Nmasp
氨基异丁酸	Aib	L-N-甲基半胱氨酸	Nmcys
甲酸氨基正冰片基-酯	Norb	L-N-甲基谷氨酰胺	Nmgln
		L-N-甲基谷氨酸	Nmglu
环己基丙氨酸	Chexa	L-N 甲基组氨酸	Nmhis
环戊基丙氨酸	Cpen	L-N-甲基异亮氨酸	Nmile
D-丙氨酸	Dal	L-N-甲基亮氨酸	Nmleu
D-精氨酸	Darg	L-N-甲基赖氨酸	Nmlys
D-天冬氨酸	Dasp	L-N-甲基甲硫氨酸	Nmmet
D-半胱氨酸	Dcys	L-N-甲基正亮氨酸	Nmnle
D-谷氨酰胺	Dgln	L-N-甲基正缬氨酸	Nmnva
D-谷氨酸	Dglu	L-N-甲基鸟氨酸	Nmorn
D-组氨酸	Dhis	L-N-甲基苯丙氨酸	Nmphe
D-异亮氨酸	Dile	L-N-甲基脯氨酸	Nmpro
D-亮氨酸	Dleu	L-N-甲基丝氨酸	Nmser
D-赖氨酸	Dlys	L-N-甲基苏氨酸	Nmthr
D-甲硫氨酸	Dmet	L-N-甲基色氨酸	Nmtrp

D-鸟氨酸	Dorn	L-N-甲基酪氨酸	Nmtyr
D-苯丙氨酸	Dphe	L-N-甲基缬氨酸	Nmval
D-脯氨酸	Dpro	L-N-甲基乙基甘氨酸	Nmetg
D-丝氨酸	Dser	L-N-甲基-叔-丁基甘氨酸	Nmtbug
D-苏氨酸	Dthr	L-正亮氨酸	Nle
D-色氨酸	Dtrp	L-正缬氨酸	Nva
D-酪氨酸	Dtyr	α-甲基-氨基异丁酸	Maib
D-缬氨酸	Dval	α-甲基-γ-氨基丁酸	Mgabu
D-α-甲基丙氨酸	Dmala	α-甲基环己基丙氨酸	Mchexa
D-α-甲基精氨酸	Dmarg	α-甲基环戊基丙氨酸	Mcpen
D-α-甲基天冬酰胺	Dmasn	α-甲基-α-萘丙氨酸	Manap
D-α-甲基天冬氨酸	Dmasp	α-甲基青霉胺	Mpen
D-α-甲基半胱氨酸	Dmcys	N-(4-氨基丁基)甘氨酸	Nglu
D-α-甲基谷氨酰氨	Dmgln	N-(2-氨基乙基)甘氨酸	Naeg
D-α-甲基组氨酸	Dmhis	N-（3-氨基丙基）甘氨酸	正n
D-α-甲基异亮氨酸	Dmile	N-氨基-α-甲基丁酸	Nmaabu
D-α-甲基亮氨酸	Dmleu	α-萘丙氨酸	Anap
D-α-甲基赖氨酸	Dmlys	N-苄基甘氨酸	Nphe
D-α-甲基甲硫氨酸	Dmmet	N-(2-氨甲酰基乙基)甘氨酸	Ngln
D-α-甲基鸟氨酸	Dmorn	N-(氨甲酰基甲基)甘氨酸	Nasn
D-α-甲基苯基丙氨酸	Dmphe	N-(2-羧基乙基)甘氨酸	Nglu
D-α-甲基脯氨酸	Dmpro	N-(羧基甲基)甘氨酸	Nasp
D-α-甲基丝氨酸	Dmser	N-环丁基甘氨酸	Ncbut
D-α-甲基苏氨酸	Dmthr	N-环庚基甘氨酸	Nchep
D-α-甲基色氨酸	Dmtrp	N-环己基甘氨酸	Nchex
D-α-甲基酪氨酸	Dmty	N-环癸基甘氨酸	Ncdec
D-α-甲基缬氨酸	Dmval	N-环十二烷基甘氨酸	Ncdod
D-N-甲基丙氨酸	Dnmala	N-环辛基甘氨酸	Ncoct
D-N-甲基精氨酸	Dnmarg	N-环丙基甘氨酸	Ncpro
D-N-甲基天冬酰胺	Dnmasn	N-环十一烷基甘氨酸	Ncund
D-N-甲基天冬氨酸	Dnmasp	N-(2,2-二苯基乙基)甘氨酸	Nbhm
D-N-甲基半胱氨酸	Dnmcys	N-（3,3-二苯基丙基）甘氨酸	Nbhe
D-N-甲基谷氨酰氨	Dnmgln	N-(3-胍基丙基)甘氨酸	Narg
D-N-甲基谷氨酸	Dnmglu	N-(1-羟基乙基)甘氨酸	Nthr
D-N-甲基组氨酸	Dnmhis	N-(羟基乙基)甘氨酸	Nser

D-N-甲基异亮氨酸	Dnmile	N-(咪唑基乙基)甘氨酸	Nhis
D-N-甲基亮氨酸	Dnmleu	N-(3-吲哚基乙基)甘氨酸	Nhtrp
D-N-甲基赖氨酸	Dnmlys	N-甲基-γ-氨基丁酸	Nmgabu
N-甲基环己基丙氨酸	Nmchexa	D-N-甲基甲硫氨酸	Dnmmet
D-N-甲基鸟氨酸	Dnmorn	N-甲基环戊基丙氨酸	Nmcpen
N-甲基甘氨酸	Nala	D-N-甲基苯基丙氨酸	Dnmphe
N-甲基氨基异丁酸	Nmaib	D-N-甲基脯氨酸	Dnmpro
N-(1-甲基丙基)甘氨酸	Nile	D-N-甲基丝氨酸	Dnmser
N-(2-甲基丙基)甘氨酸	Nleu	D-N-甲基苏氨酸	Dnmthr
D-N-甲基色氨酸	Dnmtrp	N-(1-甲基乙基)甘氨酸	Nval
D-N-甲基酪氨酸	Dnmtyr	N-甲基-蒜丙氨酸	Nmanap
D-N-甲基缬氨酸	Dnmval	N-甲基青霉胺	Nmpen
γ-氨基丁酸	Gabu	N-(对-羟基苯基)甘氨酸	Nhtyr
L-t-丁基甘氨酸	Tbug	N-(硫代甲基)甘氨酸	Ncys
L-乙基甘氨酸	Etg	青霉胺	Pen
L-高苯丙氨酸	Hphe	L-α-甲基丙氨酸	Mala
L-α-甲基精氨酸	Marg	L-α-甲基天冬酰胺	Masn
L-α-甲基天冬氨酸	Masp	L-α-甲基- 叔-丁基甘氨酸	Mtbug
L-α-甲基半胱氨酸	Mcys	L-甲基乙基甘氨酸	Metg
L-α-甲基谷氨酰氨	Mgln	L-α-甲基谷氨酸	Mglu
L-α-甲基组氨酸	Mhis	L-α-甲基高苯丙氨酸	Mhphe
L-α-甲基异亮氨酸	Mile	N-(2-甲硫基乙基)甘氨酸	Nmet
L-α-甲基亮氨酸	Mleu	L-α-甲基赖氨酸	Mlys
L-α-甲基甲硫氨酸	Mmet	L-α-甲基正亮氨酸	Mnle
L-α-甲基正缬氨酸	Mnva	L-α-甲基鸟氨酸	Morn
L-α-甲基苯丙氨酸	Mphe	L-α-甲基脯氨酸	Mpro
L-α-甲基丝氨酸	Mser	L-α-甲基苏氨酸	Mthr
L-α-甲基色氨酸	Mtrp	L-α-甲基酪氨酸	Mtyr
L-α-甲基缬氨酸	Mval	L-N-甲基高苯丙氨酸	Nmhphe
N-(N-(2,2-二苯基乙基)氨甲酰基甲基)甘氨酸	Nnbhm	N-(N-(3,3-二苯基丙基)氨甲酰基甲基)甘氨酸	Nnbhe
1-羧基-1-(2,2-二苯基-乙基氨基)环丙烷	Nmbc		

例如可使用交联剂稳定 3D 构象，使用相同双功能（homo-bifunctional）交联剂例如具有（CH_2）$_n$ 间隔基团的双功能亚胺酯类，其中 n 为 1-6，戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯和杂双功能试剂，其通

常含有一个氨基反应部分例如 N-羟基琥珀酰亚胺及其他特异性反应基团例如马来酰亚胺基(maleimido)或二硫代部分(SH)或碳化二亚胺carbodiimide (COOH)。另外，可通过结合 C_α和 N_α-甲基氨基酸且在氨基酸的 C_α及 C_β之间引入双键从结构上限制肽。

术语“融合多肽”或“嵌合多肽”或“杂合多肽”可互换使用表示一种多肽，该多肽包含两种或多种作为相同表达产物的一部分表达，或通过合成方法产生的相连的多肽。融合多肽可包含两种或多种多肽和插入区域例如，连接区或间隔区。特别地，可选择允许或直接或间接促进特定表面拓扑学的区域。例如可通过蛋白酶保护测定（protease protection assay）或通过测定与抗体的相互作用评价在病毒颗粒中的多肽拓扑学。相应地，术语“融合蛋白”中“融合”不以“病毒融合”的意义使用。本文中所用的“受试者”指动物，优选哺乳动物且更优选人。患者无论人或不是人的动物均可指个体、受试者、动物、宿主或受体。本发明的分子和方法应用于人用药物、兽药及一般驯养或野生畜牧业。为方便起见，“动物”包括鸟类例如家禽、笼中鸟（aviary bird）或猎鸟。优选的动物为人或其他灵长类动物、家畜类动物、实验室试验动物、宠物（companion animals）或捕获的野生动物。

实验室试验动物的实例包括鸭、雪雁、小鼠、大鼠、兔、豚鼠及仓鼠。兔及啮齿动物例如大鼠和小鼠，提供了方便的试验体系或动物模型。家畜类动物包括绵羊、母牛、猪、山羊、马和驴。也考量了非哺乳动物例如鸟类、斑马鱼及两栖动物。

抗原可包含不同生物体、种或亚种的两种或多种多肽的表位区域。

术语“样品”以其最广泛语境中用来包括自受试者、实验室或环境纯化或未纯化组合物。在一个优选的实施方案中，样品为从含有得自受试者抗体的体液收集的生物样品，且可包括但不限于得自任何组织例如血、血浆、淋巴、唾液或其他粘液分泌物、泪、脊髓

液等的组织或细胞。应理解所述样品包括经一些加工方式处理的样品，也包括直接自受试者、环境或实验室取得的样品。加工方式可包括例如稀释、过滤或其它分离技术或浸软这类步骤。

除非另有说明，文中所用术语“结合”、“缀合”、“络合”、“连接”、“键合”可互换使用。复合物的组分部分可通过许多不同化学键连接。在一些实施方案中，一个重要的限制是为测定目的复合物要保留完整性。组分间的共价键本质上为非可逆键。但是抗体-抗原及配体-配体结合配偶体键通常是非共价键，在它们符合要求的基础上选定组分。术语“抗原”和“抗原多肽”包括半抗原及可产生抗体的其它分子。

测定和贮存条件

保护或提高结合位点的可用性指如果分析物结合配偶体直接或经抗体缀合到检测标记结合位点的相对可用性。尤其是通过使用根据本发明连接到分析物结合分子上的多聚体、二聚体、嵌合体、融合或病毒颗粒分子，预留分析物结合分子的结合位点用于结合分析物。

可通常使用已熟知的技术例如在生物实验手册例如 Sambrook 和 Russell“*Molecular Cloning-A Laboratory Manual*”（*Cold Spring Harbour Press*，2001，通过引用结合到本文）中概述的技术制备包含分析物结合分子例如抗原的融合蛋白。融合蛋白由在其氨基末端或羧基末端共价连接到一种或多种载体序列的目标氨基酸序列组成。载体序列或者氨基酸序列可包含分析物结合蛋白。如果载体序列携带抗原表位，可方便的使用表位标记方法。在 Sambrook 和 Russell (上述)以及纯化和重折叠实验方案中也描述了表达系统和载体。可根据需表达分析物结合分子的大小及性质使用特异性表达系统例如细菌、哺乳动物、酵母或昆虫宿主。许多市售质粒适用于融合蛋白表达。使用相当程序生成包含融合到第一桥连结合配偶体多肽的分析物结合分子的嵌合体蛋白及多聚体分子。

本文所用“颗粒”是指病毒颗粒或病毒样颗粒。

通过本领域已知的标准技术制备病毒颗粒及病毒样颗粒。VLPs模拟天然病毒体的衣壳或被膜且通过例如在牛痘(Hagensee 等 *J.Virol.* 67 : 315,1993)中或在杆状病毒(Rose 等, *J.Virol.* 67: 1936,1993)中衣壳或被膜蛋白质的重组表达获得。考虑使用乙型肝炎病毒(HBV)亚病毒颗粒(HBsAg-S)生成重组 VLPs。数个研究确定适于插入外来表位的区域(Bruss 等 *J. Virol.* 65 : 3813-3820, 1994; Delpeyroux 等 *J.Mol. Biol.* 195 : 343-350,1987), 包括 N 末端的 PreS 区域融合(Prange 等, *J. Gen. Virol.* 76 : 2131- 2140, 1995)。

通常可使用已熟知技术例如在 Paul, "Fundamental Immunology", 第 3 版, 243-247 (Raven Press, 1993)中概述的技术鉴别抗原且引用参考。这种技术包括筛选能够与抗原-特异性抗体、抗血清和/或 T-cell lines 或克隆反应的多肽及重叠片段。如本文所用的，如果其特异性结合到抗原(即其与蛋白质在 ELISA 或其他免疫测定法中反应，且不与无关蛋白质发生可检测的反应)则抗血清和抗体为“抗原-特异性”。抗原片段可在与全长多肽反应性相似或更高水平上反应。可通常使用本领域普通技术人员熟知的方法进行筛选，例如在 Harlow 和 Lane, "Antibodies : A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)中描述的方法。例如，多肽可固定在固体支持物上且与病人血清接触从而使血清中抗体与固定的多肽结合。然后可除去未结合血清且检测结合的抗体，例如使用标记过的蛋白 A。

术语“结合配偶体”或“结合对”是指通过结构确定的经可逆性非共价键或共价键结合或相互作用的互补分子。示例性蛋白质性质的结合配偶体包括抗体-抗原、酶-底物、生物素-链霉抗生物素蛋白、甘露糖/麦芽糖/直链淀粉-甘露糖/麦芽糖/直链淀粉-结合蛋白及细胞因子或配体受体相互作用。

单克隆抗体适于以纯的形式且大量方便地制备。用于单克隆抗体生产的杂交瘤细胞系制备通过将致敏淋巴细胞与无限增殖细胞系

融合且选择本领域已熟知的特异性抗体程序通过如 Harlow 和 Lane (*supra*) ; 及 Kohler 和 Milstein, *European Journal of Immunology 6* : 511-519,1976 中描述的标准程序而取得。

在另一方面，本发明提供了一种检测样品中抗体的方法，包括使所述抗体与其中抗原包含被抗体特异性识别的表位的检测标记-抗原复合物接触，且其中所述检测标记间接连接到所述抗原从而保护在所述抗原上的表位的可用性；且提供了检测分析物的方法。

与这种实施方案有关，检测标记通过包含结合对的桥连复合物间接连接到所述分析物结合配偶体，其中桥连结合对的第一配偶体是颗粒、复合物、多聚体或包含所述分析物结合配偶体的融合蛋白，且第二桥连结合配偶体缀合到或融合到或以其它方式连接到所述可检测标记。

相应的，本发明进一步提供了一种用于检测样品中抗体的方法，包括使所述抗体与其中抗原包含被所述抗体特异性识别的表位的检测标记-抗原复合物接触，其中所述检测标记间接连接到所述抗原从而保护在所述抗原上的表位的可用性，且其中通过包含结合对的桥连复合物间接连接，其中桥连结合对的第一配偶体是颗粒、复合物、多聚体包括二聚体、嵌合体或融合蛋白或包含所述抗原的相当结构，且桥连结合对的第二配偶体缀合到或以其它方式融合到所述可检测标记；且提供了检测分析物的方法。

在所述的方面中，这种检测标记-分析物结合配偶体复合物包含下列结构:

$M\text{-}X_2\text{+}X_1\text{-}A$

其中:

M 为检测标记，间接连接到 A 从而形成检测标记-分析物结合配偶体复合物;

A 为分析物特异性识别的分析物结合配偶体。在一个实施方案中，A 为带有被患者样品中存在的抗体特异性识别的表位的抗原;

X_1 及 X_2 是桥连结合配偶体，其在检测标记（M）和分析物结合配偶体（A）间形成桥连复合物且通过可逆性非共价键（+）连接;

X_1 包含为颗粒、复合物、二聚体、多聚体或融合蛋白的第一桥连结合配偶体，其包含一部分连接到 X_2 而另一部分连接到分析物结合配偶体（A），且其中毗连的(-)为在第一桥连结合配偶体和分析物结合配偶体(A)之间的共价键或非共价键;

X_2 包含被连接、融合或以另外方式连接到可检测标记（M）的第二桥连结合配偶体，且其中毗连的（-）是共价键或非共价键。

在一些实施方案中，使用一对或多对结合分子例如生物素-链霉抗生物素蛋白或生物素-抗生物素抗体将 X_2 连接到可检测标记上。

在一些实施方案中，X_2 为抗原结合分子、蛋白结合分子、核酸结合分子、糖类结合分子或脂质结合分子。在另一个实施方案中，X_2 为抗原-结合分子。

在另一个实施方案中，X_2 为抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，抗体或其抗原结合片段可具有有利的特异性，与待分析抗体的特异性相同或不同。

在一些实施方案中，缀合或以其它方式连接到检测标记上的第二结合配偶体为单克隆抗体，其识别待分析特异性样品抗体识别的相同的优势免疫表位。

在一个优选的方面，第一桥连配偶体，X_2 包含抗原的二聚体或多聚体形式。

在另一个方面，第一桥连结合配偶体(X_2)为病毒颗粒或病毒样颗粒。优选的病毒颗粒得自嗜肝 DNA 病毒。优选的病毒样颗粒得自如在实施例中图表显示的鸭乙型肝炎病毒。

在另一个实施方案中，第二桥连结合配偶体包含糖类且包含抗原的此融合蛋白也包含糖类结合蛋白。在一些实施方案中，第二桥连结合配偶体包含甘露糖且包含抗原的此融合蛋白包含甘露糖结合蛋白。

在本发明的另一个方面提供了一种用于检测样品中特异性抗体的试剂盒，其隔室形式上包含接受样品的部分，及接受检测标记-抗原复合物部分，其中抗原包含能够被如果样品中存在的所述特异性抗体识别的表位，且其中所述检测标记间接连接到所述抗原从而保护对所述抗体的抗原表位的可用性及检测其与对照的相对值。

在一个优选的实施例中，本发明的这个方面的检测标记通过包含结合对的桥连复合物间接连接到抗原，其中桥连结合对的第一配偶体为颗粒、复合物、二聚体、多聚体或包含所述抗原的融合蛋白，且桥连结合对的第二配偶体缀合到或以其他方式连接到所述可检测标记上。

根据这个方面，这种检测标记-分析物结合配偶体复合物包含桥连复合物且具有下列结构:

$$M\text{-}X_2\text{+}X_1\text{-}A$$

其中:

M 为检测标记，间接连接到 A 从而形成检测标记-分析物结合配偶体复合物;

A 为分析物特异性识别的分析物结合配偶体。在一个实施方案中，A 为带有被患者样品中存在的抗体特异性识别的表位的抗原;

X_1 及 X_2 包含桥连结合配偶体，其在检测标记（M）和分析物结合配偶体（A）间形成桥连复合物且通过可逆性非共价键（+）连接;

X_1 包含为颗粒、复合物、二聚体、多聚体或融合蛋白的第一桥连结合配偶体，其包含一部分连接到 X_2 而另一部分连接到分析物结合配偶体（A），且其中毗连的(-)是在第一桥连结合配偶体和分析物结合配偶体(A)之间的共价键或非共价键;

X_2 包含同样连接、融合或以另外方式连接到可检测标记（M）的第二桥连结合配偶体，且其中毗连的（-）是共价键或非共价键。

在一些实施方案中，X_2 包含蛋白结合分子、糖类结合分子、核酸结合分子或脂质结合分子。

在另一个实施方案中，X_2 包含抗体或抗原结合分子。

在一个实施方案中，检测标记-分析物结合配偶体复合物且具有下列结构:

$$M_1\text{-}X_2\text{+}X_1\text{-}A_1$$

其中:

M_1 为间接连接到 A 而形成检测标记-抗原复合物的可见的、光学上或磁学上或其他仪器或化学上可检测的标记;

A_1 为带有被患者样品中存在的抗体特异性识别的表位的抗原;

X_1 及 X_2 包含在检测标记和结合配偶体之间形成桥连复合物的桥连结合配偶体，且通过可逆性(+)非共价键结合;

X_1 包含为颗粒、复合物、二聚体、多聚体或融合蛋白的第一桥连结合配偶体，其所包含的一部分连接到 X_2 而另一部分连接到或包含抗原（A_1），且其中毗连的(-)是在第一桥连结合配偶体和抗原(A_1)之间的共价键或非共价键;

X_2 包含第二桥连结合配偶体，其为抗体或抗原-结合分子，缀合或以其它方式连接到可见的、光学上或磁学上或其他仪器或化学上可检测的标记(M_1)，且其中毗邻的(-)为共价键或非共价键。

在一些实施方案中，试剂盒为色谱包括免疫色谱试剂盒且分析物固定到固体支持物上从而便于其检测。

此试剂盒可选择性或另外包含单独的隔室以贮存检测标记-第二桥连结合配偶体复合物及所述第一桥连结合配偶体-抗原复合物。在一些实施方案中，检测标记、X_2、X_1 及分析物结合配偶体的一种或每一种贮存在单独的隔室中。如果在试剂盒中这些组分单独贮存，这些组分在测定前或在测定程序间可结合。组分可以溶液形式、无水、冷冻或冻干形式贮存。

在一个优选的实施方案中，制造期间在加入设备前可以混合胶体金-单克隆抗体缀合物与同源抗原。在戊型肝炎病毒的实例中，缀合有单克隆抗体 4B2 的胶体金(Riddell, M. A.等 *J.Virol.* 74:8011-8017,

2000)与等体积的重组 HEV 抗原 ORF2.1 混合，且在添加到设备的“缀合垫前”在约 15-37℃孵育。然后干燥试剂，接着再水合，预先形成的复合物适于在设备中和固定化抗-HEV 特异性 IgM 反应。

可选择的，在设备制造期间可物理上分离胶体金-单克隆抗体缀合物与抗原，且在进行测定期间混合及形成复合物。在甲型肝炎病毒的实例中，向设备的“缀合垫”（“conjugate pad”）加入缀合有单克隆抗体 K3-4C8 的胶体金（MacGregor A 等，*J. Clin.Microbiol.*, 18(5): 1237-1243,1983)，同时向“病毒垫”(“virus pad”）单独加入灭活的完整病毒 HAV 抗原且然后干燥试剂。在进行测定期间， 首先再水合“缀合垫”且然后在进行测定时与“病毒垫”接触，使病毒再水合。在此过程中新生成了复合物且然后适于在设备中与固定化抗-HAV 特异性 IgM 反应。

可选择的，可通过间接方法例如不限制使用胶体金-抗生物素抗体缀合物和如果混合则形成胶体金-单克隆抗体缀合物的非共价键复合物的生物素-单克隆抗体缀合物，从而制备胶体金-单克隆抗体缀合物。

试剂盒以无水和/或冻干形式方便的贮存且在使用前重建。

在一个优选的实施方案中，这种患者样品中特异性抗体为固定化的。使用同样可为对特定抗体同种型例如 IgM、IgA、IgE 或 IgG 特异的抗物种（anti-species）抗体可方便的将抗体固定在固体支持物上。在本领域中目前已知许多不同的固体支持物且包括珠（beads）、颗粒（particles）、平板（plates）、膜（membranes）、滤器（filters）、管（tubes）等。

在高通量或多重（multiplexed）测定中，本发明的检测复合物特别适于作为组分使用复合检测复合物能够单独或共同分析复合样品。优选的测定法通过计算机软件自动化进行和/或控制。

通过下列非限制性实施例进一步描述了本发明。

实施例 1

戊型肝炎病毒的二聚体 ORF2.1 抗原

在此实施例制造期间，在胶体金-抗体缀合物应用到设备上以前缀合物与二聚体戊型肝炎病毒 ORF2.1 抗原复合。单克隆抗体 (McAb 4B2)可定向目标针对目的抗原中优势免疫表位，且在饱和量的抗原存在下仅二聚体的一个分子将与结合到胶体金的单克隆抗体反应，剩下二聚体中第二分子与患者抗体反应从而在诊断试验中给出如图 1 图示代表的可见信号。在这个实施例中，患者抗体为 IgM 来指示目前或近期感染了编码此目标目的抗原的病原生物体，但是本方法同样可以使用其它类的抗体(例如 IgG 或 IgA 或 IgE)代替在可包含扁平表面（flat）、平坦表面（planar）、圆形表面（round）或弯曲表面（curved）固相上适当的抗免疫球蛋白抗体是显而易见的。在 Li, F 等 *J Med Virol.* 52 : 289-300, 1997; Anderson D. A.等 *J. Virol. Methods.* : 131-142, 1999; Li, F.等 *J Med Virol.* 60 : 379-386,2000 ;和 Riddell, M. A.,等(supra)中描述了该 ORF2.1 重组抗原。

实施例 2

甲型肝炎病毒的多聚体抗原

通过集合分离的含有这两部分的隔室，在进行测定期间胶体金-抗体缀合物与甲型肝炎病毒颗粒（抗原）复合。在这个实施例中，单克隆抗体(K34C8) 也可定向目标针对目的抗原（病毒）中优势免疫表位，但是在限定条件例如病毒浓度及孵育时间下每个病毒颗粒内仅一个或几个拷贝的表位将与结合到胶体金的单克隆抗体反应，剩下病毒颗粒内其余表位与患者抗体反应从而在诊断试验中给出如图 2 图示代表的可见信号。

实施例 3

鸭肝炎病毒的病毒样颗粒(VLP).

A.抗 DHBV 桥的用途

在这个实施例中，胶体金-抗体缀合物可优先与鸭乙型肝炎病毒(DHBV)的病毒样颗粒（VLPs）复合，其中目标抗原表达为嵌合体 VLP

的一部分(在以 Hepgenics Pty Ltd 名义的国际申请号 WO 2004/092387 中描述)。在这个实施例中，结合到胶体金(7C12)的单克隆抗体定向针对 VLP (S 或 L 抗原)的 DHBV 部分中表位而不是目标目的抗原中表位，因此 VLP 内目标目的抗原的剩下拷贝与患者抗体反应从而在诊断试验中给出如图 3 图示代表的可见信号。

实施例 4

鸭乙型肝炎病毒的病毒样颗粒(VLP).

B.抗分析物桥的用途

在这个实施例中，胶体金-抗体缀合物又可优先与鸭乙型肝炎病毒的病毒样颗粒（VLPs）复合，其中目标抗原表达为嵌合体 VLP 的一部分(在以 Hepgenics Pty Ltd 名义的国际申请号 WO 2004/092387 中描述)。在这个实施例中，结合到胶体金的单克隆抗体可定向目标针对目的抗原中优势免疫表位，但是由于带有多个拷贝表位的 VLP 的 3-维结构伸展在其表面，每个 VLP 内仅一个或几个拷贝的表位将与结合到胶体金的单克隆抗体反应，VLP 内剩下拷贝与患者抗体反应从而在诊断试验中给出如图 4 图示代表的可见信号。

实施例 5

带有第二结合位点的单价抗原作为桥

A. 在分析物抗原上第二表位的用途

在第 5 个实施例中，胶体金-抗原缀合物可与单价抗原复合。在这个实施例中，缀合到胶体金的单克隆抗体不定向针对目标目的抗原中优势免疫表位，而是定向目标针对目的抗原中分离表位，剩下优势免疫表位与患者抗体反应从而在诊断试验中给出如图 5 图示代表的可见信号。

实施例 6

带有第二结合位点的单价抗原作为桥

B.融合蛋白例如甘露糖结合蛋白(MBP)和分析物桥的融合蛋白的用途

此实施例也应用嵌合重组抗原例如甘露糖结合蛋白 (MBP)和目标目的抗原的融合，其中缀合到胶体金的单克隆抗体定向于 MBP，剩下目标整个目的抗原与患者抗体自由反应从而在诊断试验中给出如图 6 图示代表的可见信号。

实施例 7

带有配体结合位点的单价抗原作为桥

在此实施例中，胶体金和甘露糖化学性缀合，由于 MBP 对该配体的天然亲和性，其与胶体金和甘露糖化学性缀合物结合，剩下优势免疫表位与患者抗体反应从而在诊断试验中给出如图 7 图示代表的可见信号。

实施例 8

使用蛋白：蛋白结合分子（生物素：抗生物素抗体）连接甲型肝炎病毒-检测标记的多聚体抗原和 X_2

通过集合含有这两部分的分离的试验隔室，在进行测定期间将胶体金-抗体缀合物与甲型肝炎病毒颗粒复合。在此实施例中，经本领域中已熟知方法可通过使用将胶体金缀合到抗生物素抗体或链霉抗生物素蛋白（streptavidin）与缀合到生物素的单克隆抗体（K34C8（MacGregor 等（同上））形成复合物生成胶体金-抗体缀合物。在此实施例中，单克隆抗体(K34C8)也可定向针对抗原中优势免疫表位，但是在限定条件例如病毒浓度和/或孵育时间下每个病毒颗粒内仅一个或几个拷贝的表位将与结合到胶体金的单克隆抗体反应，剩下病毒颗粒内其余表位与患者抗体反应从而在诊断试验中给出如图 8 图示代表的可见信号。

本领域技术人员将理解本文所述本发明易于进行除特定描述的以外的变化及修改。应理解本发明包括所有的这种变化和修改。本发明也包括在此说明书中单独的或共同的涉及的或指示的所有步骤、特征、组合物和化合物，以及任何两种或多种所述步骤或特征的任何及所有组合。

文献目录

anderson D. A. 等，J. Virol. Methods. 81:131-142, 1999;

Ausubel 等 "Current Protoclos in Biology" John Wiley & Sons Inc, 1994- 1998;

Bruss et al., J. Virol. 65 : 3813-3820,1994 ;

Delpeyroux 等 J. Mol. Biol. : 343-350,1987 ;

Eriksson et al. Biophys. J. 2 : 64, 1993;

Hagensee et : 315,1993 ;

Harlow and Lane, "Antibodies : A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, 1988;

Kohler and Milstein, European Journal of Immunology 6 : 511-519,1976 ;

Lakowicz 等，Biophys. J. 72: 567, 1997;

Li, F et al. J Med Virol. 52 : 289-300,1997 ;

Li, F et al. J Med Virol. 60 : 379-386, 2000;

MacGregor A. 等, J. Clin. Microbiol., 18(5): 1237-1243, 1983 ;

Paul, Fundamental Immunology, 3rd ed., 243-247 (Raven Press, 1993);

Prange, et al, J. Gen. Virol. 76 : 2131- 2140, 1995;

Riddell, M. A., et al J. Virol. 74 : 8011-8017,2000 ;

Rose et al J. Virol. 67: 1936, 1993 ;

Sambrook and Russell "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold spring Harbour Press, 2001;

Wild D. , "The Immunoassay Handbook" Nature Publishing Group, 2001;

Youvan et al. (Biotechnology et elia 3 : 1-18,1997).

戊型肝炎病毒二聚 ORF2.1 抗原

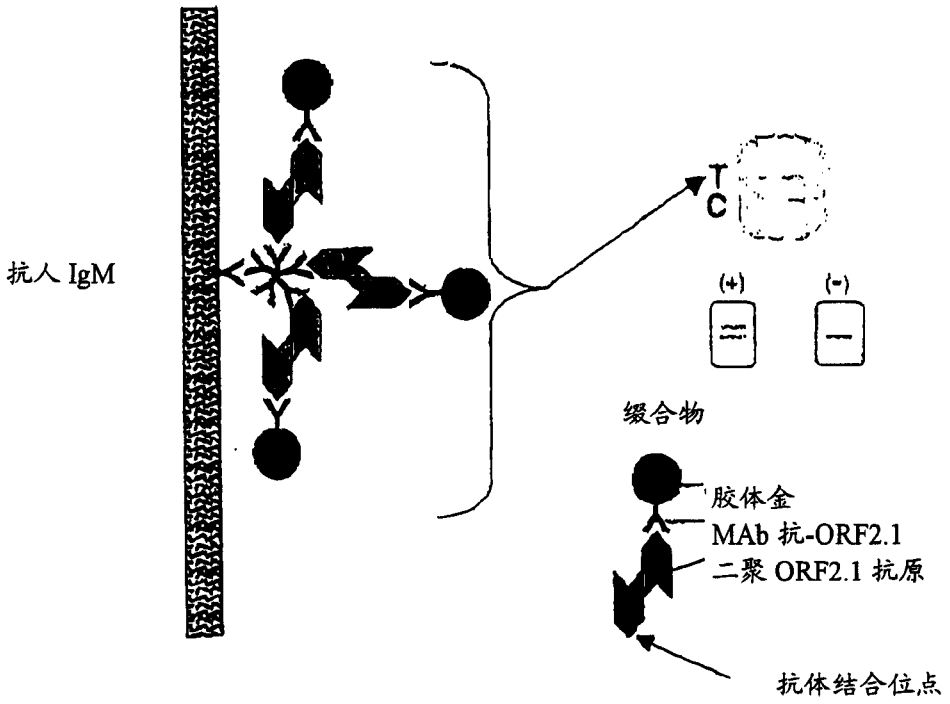

Figure 1

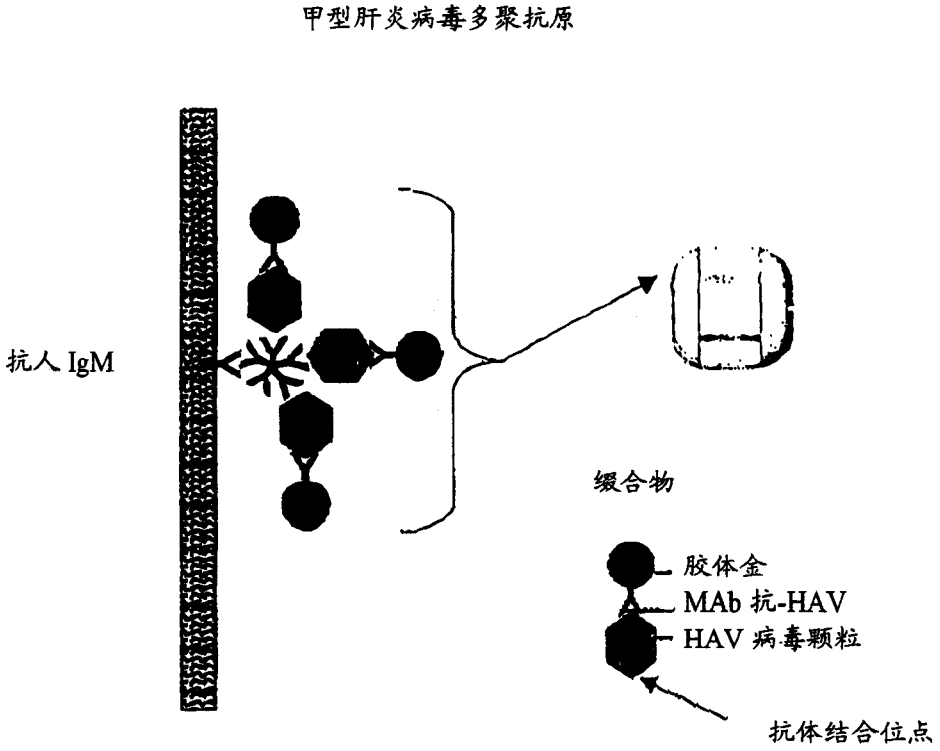

Figure 2

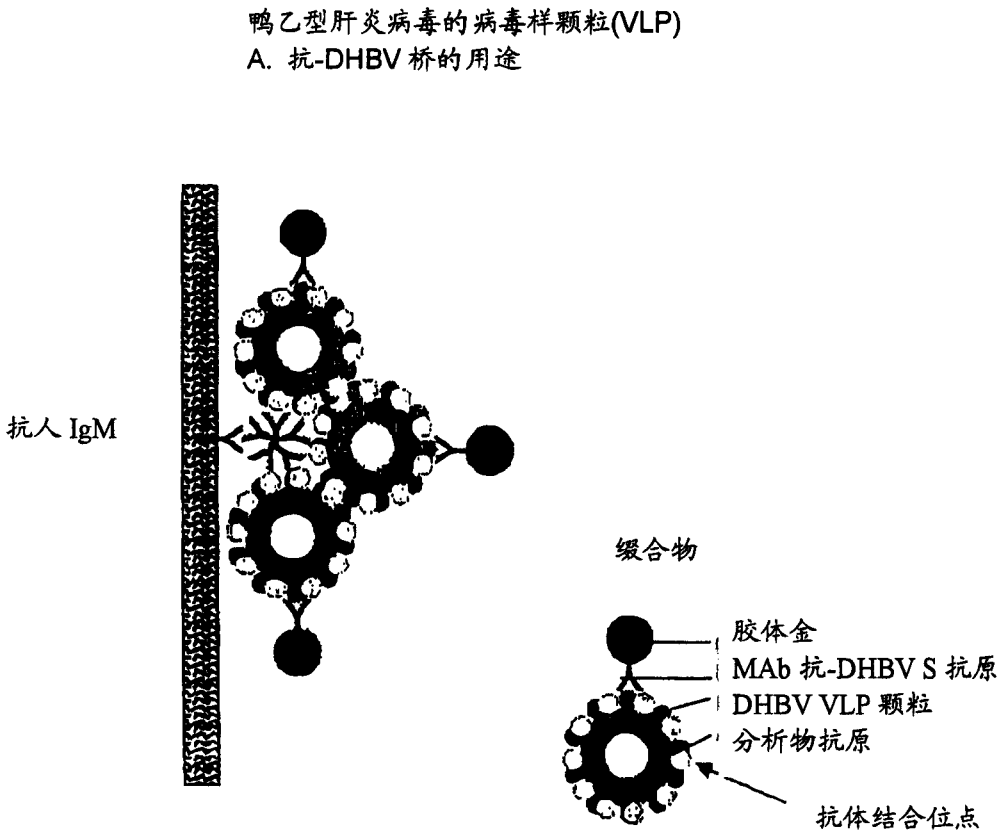
鸭乙型肝炎病毒的病毒样颗粒(VLP)
A. 抗-DHBV 桥的用途
抗人 IgM
缀合物
胶体金
MAb 抗-DHBV S 抗原
DHBV VLP 颗粒
分析物抗原
抗体结合位点

Figure 3

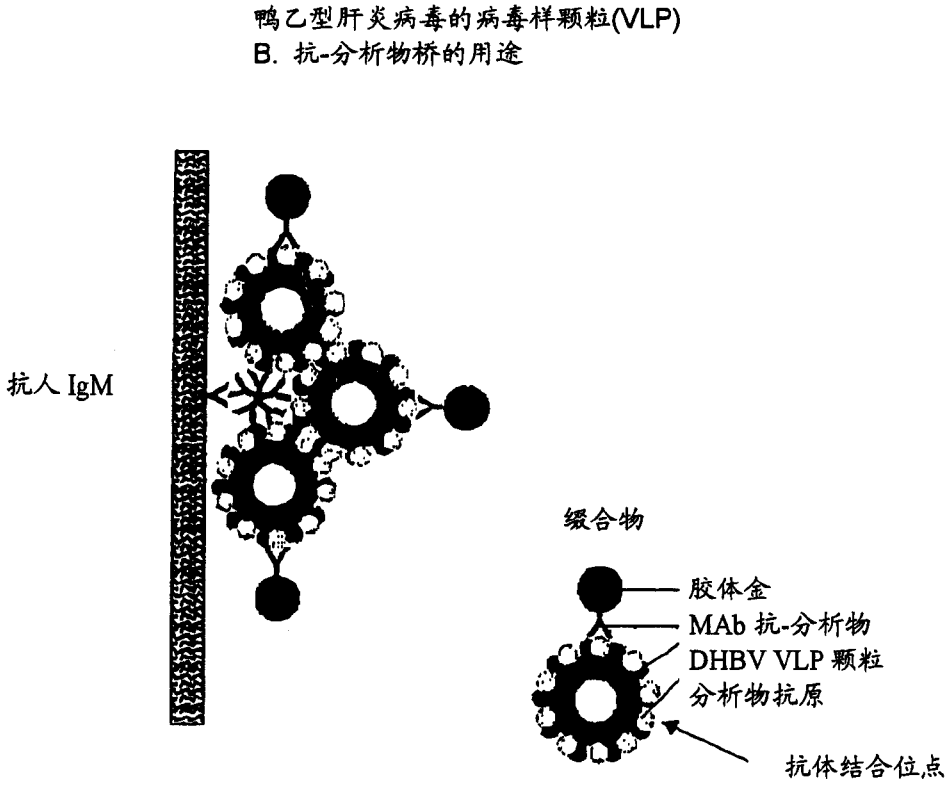
鸭乙型肝炎病毒的病毒样颗粒(VLP)
B. 抗-分析物桥的用途
抗人 IgM
缀合物
胶体金
MAb 抗-分析物
DHBV VLP 颗粒
分析物抗原
抗体结合位点

Figure 4

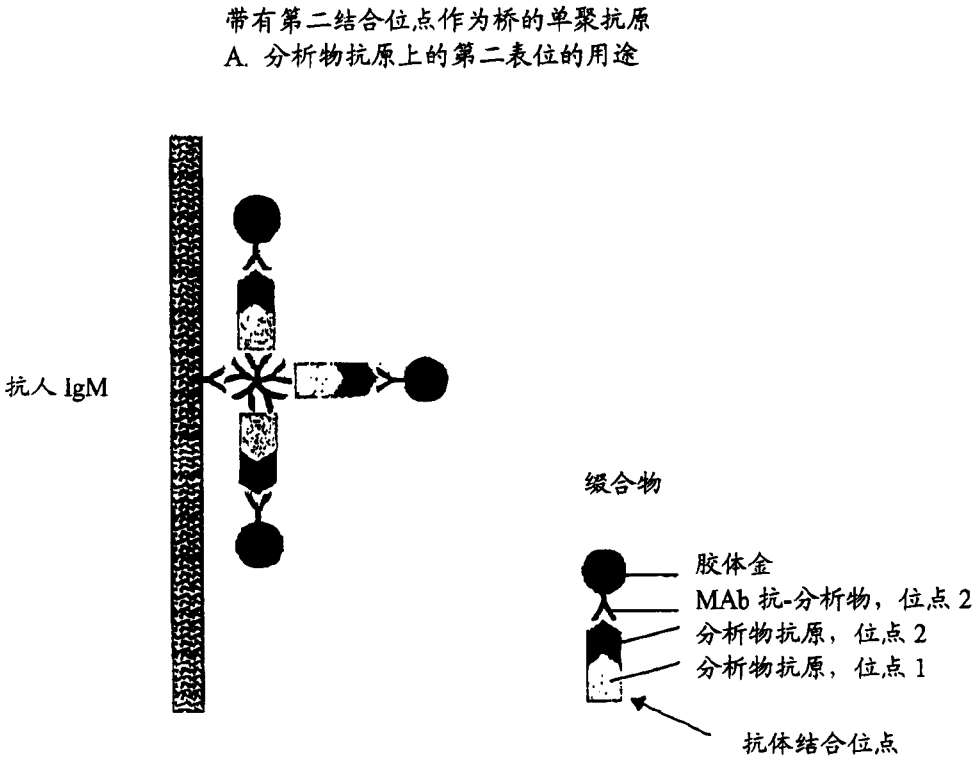
带有第二结合位点作为桥的单聚抗原
A. 分析物抗原上的第二表位的用途
抗人 IgM
缀合物
胶体金
MAb 抗-分析物，位点 2
分析物抗原，位点 2
分析物抗原，位点 1
抗体结合位点

Figure 5

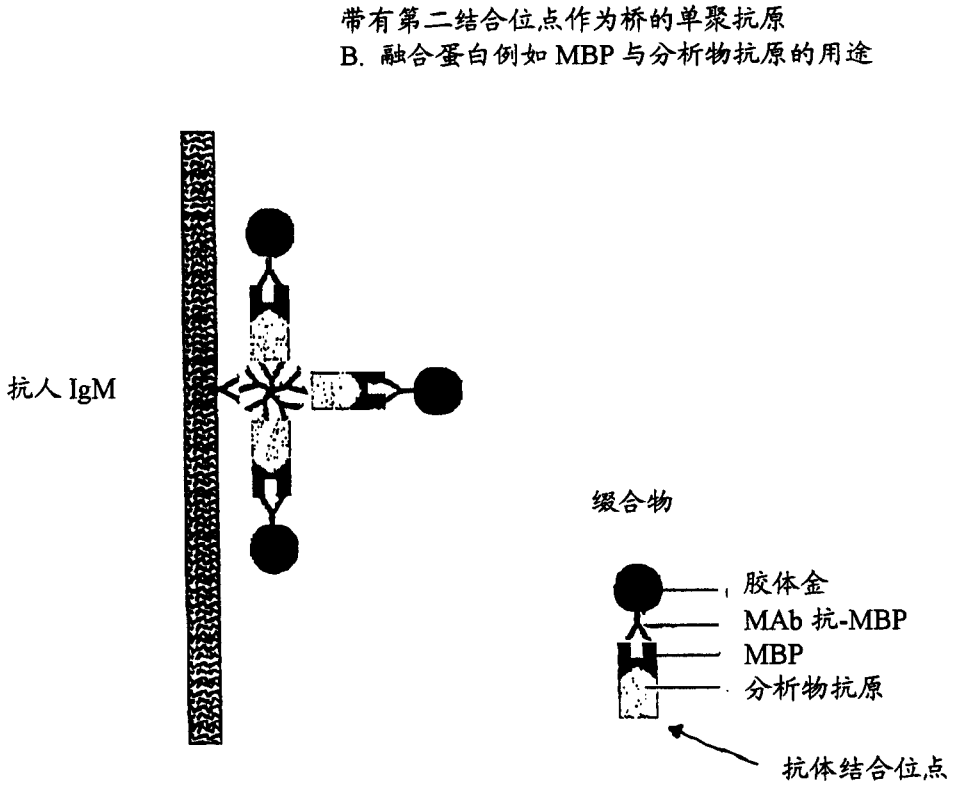
带有第二结合位点作为桥的单聚抗原
B. 融合蛋白例如 MBP 与分析物抗原的用途
抗人 IgM
缀合物
胶体金
MAb 抗-MBP
MBP
分析物抗原
抗体结合位点

Figure 6

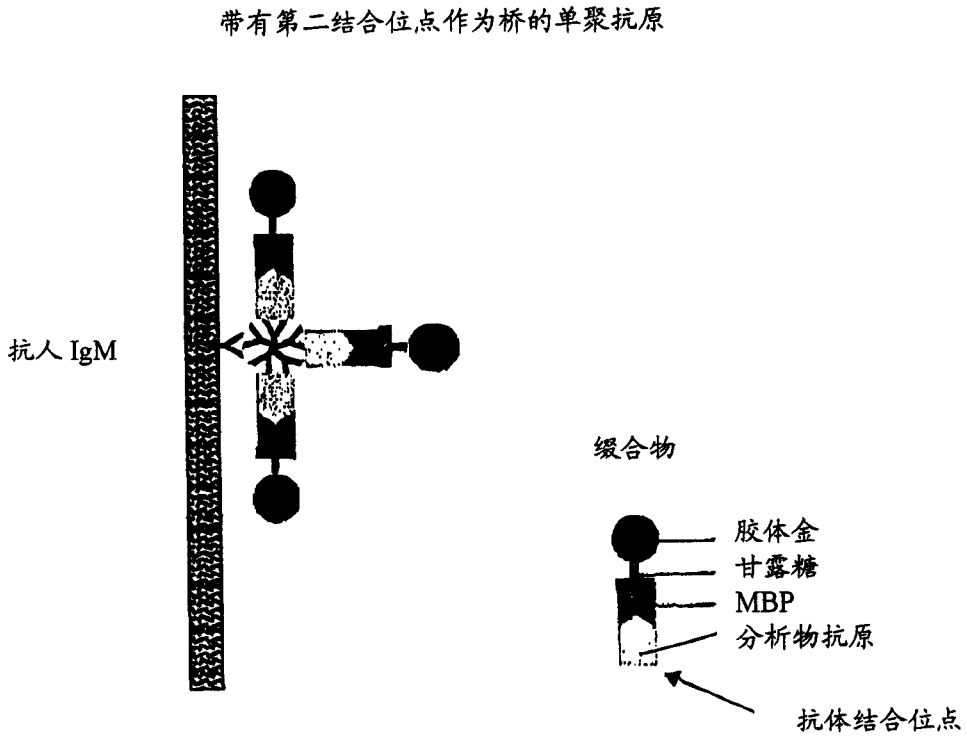

Figure 7

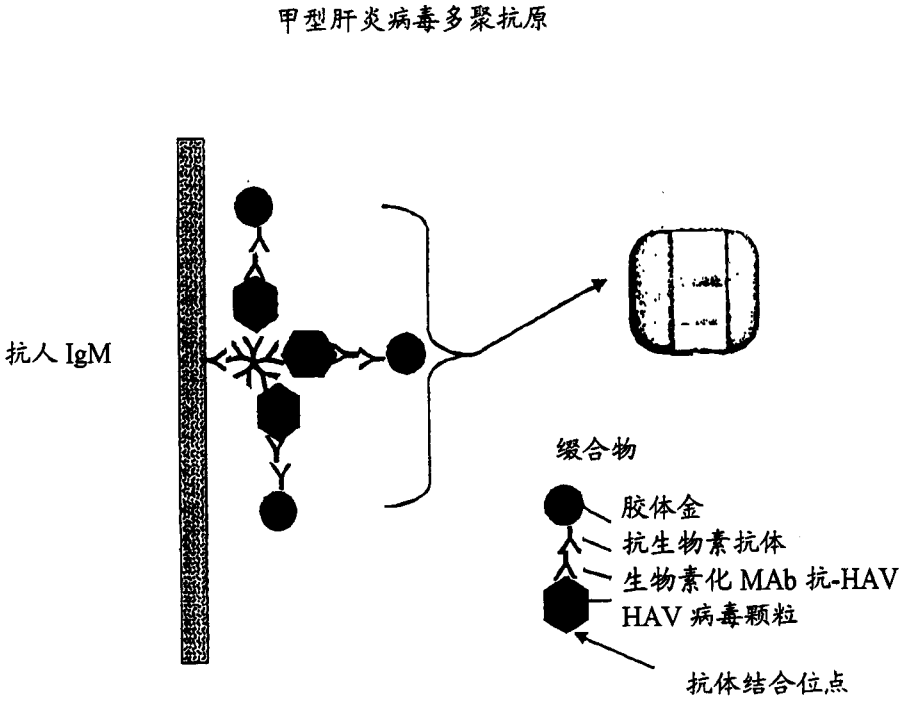
甲型肝炎病毒多聚抗原
抗人 IgM
缀合物
胶体金
抗生物素抗体
生物素化 MAb 抗-HAV
HAV 病毒颗粒
抗体结合位点

Figure 8