



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111868526 A

(43) 申请公布日 2020.10.30

(21) 申请号 201980018844.X

(22) 申请日 2019.03.13

(30) 优先权数据

18161420.7 2018.03.13 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.09.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/056304 2019.03.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/175254 EN 2019.09.19

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 J·波尔茨 T·莫克

B·乌普迈尔 T·扎恩特

(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 李唐

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书1页 说明书25页

(54) 发明名称

减少免疫测定中的干扰

(57) 摘要

本发明涉及用于测定样品中的分析物的方法,其包括a)使所述样品与至少第一和第二检测剂化合物接触;b)测定包含至少一种检测剂化合物的复合物的量;和c)基于步骤b)的结果测定样品中的所述分析物,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。本发明进一步涉及用于检测样品中的分析物的试剂盒,其至少包含所述分析物的第一和第二检测剂化合物,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的;和用于测定样品中的分析物的设备,其至少包含所述分析物的第一和第二检测剂化合物,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部

分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的;和用于测定从所述第一标记物和所述第二标记物获得的至少一种信号的装置;和至少包含第一和第二检测剂化合物的组合物用于检测分析物的用途,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。

1. 用于测定样品中的分析物的方法,其包括

- a) 使所述样品与至少第一和第二检测剂化合物接触;
- b) 测定包含至少一种检测剂化合物的复合物的量;和,
- c) 基于步骤b)的结果测定样品中的所述分析物,

其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。

2. 权利要求1的方法,其中所述第一和第二标记物提供相同的可检测特性。

3. 权利要求1或2的方法,其中由所述第一和/或第二检测剂化合物提供的可检测特性是辐射特性,在一个实施方案中是发光特性,在进一步的实施方案中是化学发光特性。

4. 权利要求1至3中任一项的方法,其中所述第一检测剂化合物中的标记物包括Ru(bpy)₃ 2-bpyCO-OSu (CAS登记号137323-76-3)和/或其中所述第二检测剂化合物中的标记物包含磺基-BPRu NHS酯(CAS登记号482618-42-8)。

5. 权利要求1至4中任一项的方法,其中在步骤b)中测定复合物的量包括检测所述第一检测剂化合物和所述第二检测剂化合物的可检测特性,在一个实施方案中包括同时检测所述第一检测剂化合物和所述第二检测剂化合物的可检测特性。

6. 权利要求1至5中任一项的方法,其中所述方法是免疫测定法。

7. 权利要求1至6中任一项的方法,其中所述样品是体液样品,在一个实施方案中是血液、血清或血浆样品。

8. 权利要求1至7中任一项的方法,其中所述分析物是多肽。

9. 权利要求1至8中任一项的方法,其中所述分析物是抗体,在一个实施方案中是抗甲型肝炎抗体或抗弓形虫抗体。

10. 权利要求1至8中任一项的方法,其中所述分析物是来自致病性生物的抗原,在一个实施方案中是病毒抗原或细菌抗原。

11. 用于检测样品中的分析物的试剂盒,其至少包含所述分析物的第一和第二检测剂化合物,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。

12. 权利要求11的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含至少一种用于所述分析物的捕获化合物和/或用于固定所述捕获化合物或包含至少所述分析物的所述样品的组分的固体支持物。

13. 用于测定样品中的分析物的设备,其至少包含所述分析物的第一和第二检测剂化合物,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的;和用于测定从所述第一标记物和所述第二标记物获得的至少一种信号的装置。

14. 至少包含第一和第二检测剂化合物的组合物用于检测分析物的用途,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。

15. 权利要求1至10中任一项的方法、权利要求11或12的试剂盒、权利要求13的设备和/或权利要求14的用途,其中所述第一和第二检测剂化合物的结合部分是相同的。

减少免疫测定中的干扰

[0001] 本发明涉及用于测定样品中的分析物的方法,其包括a)使所述样品与至少第一和第二检测剂化合物接触;b)测定包含至少一种检测剂化合物的复合物的量;和,c)基于步骤b)的结果测定样品中的所述分析物,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。本发明进一步涉及用于检测样品中的分析物的试剂盒,其至少包含所述分析物的第一和第二检测剂化合物,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的;和用于测定样品中的分析物的设备,其至少包含所述分析物的第一和第二检测剂化合物,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的;和用于测定从所述第一标记物和所述第二标记物获得的至少一种信号的装置;和至少包含第一和第二检测剂化合物的组合物用于检测分析物的用途,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。

[0002] 实验室测试,特别是免疫学测试,已成为疾病诊断中的无价工具。具体地,免疫测定已提供了在复杂混合物,例如体液诸如血液、血清或血浆中特异性检测单一分析物或分析物组的可能性。然而,已经鉴定了免疫测定中的干扰的几个原因,例如,干扰物质与捕获化合物的交叉反应性,检测剂化合物与固相的非特异性结合,通过异嗜性抗体或人抗小鼠抗体(HAMA)对捕获化合物和检测剂化合物的“桥接”结合,仅举几例(参见例如W0 2016097116 A1; Park & Kricka (2013), Ch. 5.3- Interferences in Immunoassay, The Immunoassay Handbook (第四版), 由David Wild编辑, Elsevier, Oxford: 403; Schiettecatte (2012), Interferences in Immunoassays, Advances in Immunoassay Technology, Dr. Norman H.L. Chiu (编))。干扰的另外的靶标可以是标记物,即测定中的信号生成单元(例如Buijs等人 (2011), Ann Clin Biochem. 48(Pt 3):276; Heijboer等人 (2009), Ann Clin Biochem.46(Pt 3):263; Ando等人 (2007), Intern Med. 46(15):1225)。

[0003] 在竞争性免疫测定中,包含在样品中的分析物与标记的分析物(指定剂)竞争结合捕获化合物,其通常为抗体,或者在测试例如病原体的抗体的存在的情况下,所述病原体的抗原。在样品中分析物的浓度高的情况下,则存在强烈竞争,导致指定剂与捕获化合物的结合减少,引起信号降低,其取决于测试形式,导致定量或定性测试结果。如果存在由抗标记物干扰引起的信号减少,则这可以引起假阳性结果。

[0004] 在非竞争性免疫测定中,通过使分析物与特异性结合分析物并本身携带标记物或作为携带标记物的第二分子的靶标的化合物接触来检测分析物。因此,在非竞争性免疫测定中,通过测定分析物和携带标记物的检测剂化合物之间形成的复合物的量来测定分析物的量。因此,可能面临类似的特异性问题,如上所述。抗标记物干扰倾向于通过与标记物结

合而减少信号,引起信号产量下降,且由此引起假阴性结果。在一些情况下,抗标记物干扰也可以以非竞争性测定形式增加信号,由此导致假阳性结果。

[0005] 目前,存在已知如何减少抗标记物干扰的两种不同的策略:最常用的方法是将干扰物质的靶标(标记物或无法生成信号的稍微修饰的靶标(标记物-类似物)以通常超过原始标记物浓度的浓度添加至测定法。标记物或标记物-类似物的添加充当干扰物质的替代靶标,导致干扰物与标记物的结合减少,消除或减少干扰。然而,不可能通过添加更多的活性标记物来充分减少干扰,例如,因为活性标记物的添加会干扰测定。在这种情况下,选择的方法是添加不生成信号、但被干扰物靶向的非活性标记物类似物。然而,由于在反应性标记物和标记物-类似物之间存在结构差异,标记物-类似物减少抗标记物干扰的效率可以受到限制。

[0006] 用于减少标记物-特异性干扰的第二种可能性是用添加至测定法中的结合配偶体特异性靶向受影响的标记物,所述结合配偶体在测定中是非反应性的,但屏蔽干扰物质使其不结合标记物,因此也导致干扰减少(参见,例如,DE 19519973 A1、WO 2017093271 A1; Sapin等人(2007), Clin Chern Lab Med. 45(3):416; DeForge(2010), J Immunol Methods. 362(1-2):70)。然而,这种过程可能需要信号产量的显著降低,且由此引起检测限值的降低或受损。

[0007] 待解决的问题

因此,本发明的目的是提供避免上述问题的改进的免疫测定法。

[0008] 发明概述

这些问题通过具有独立权利要求的特征的方法、试剂盒、设备和组合物来解决。在从属权利要求中列出了可能以分离的方式或任何任意组合实现的典型实施方案。

[0009] 因此,本发明涉及用于测定样品中的分析物的方法,其包括

- a) 使所述样品与至少第一和第二检测剂化合物接触;
- b) 测定包含至少一种检测剂化合物的复合物的量;和,
- c) 基于步骤b)的结果测定样品中的所述分析物,

其中所述第一检测剂化合物包含结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。

[0010] 如以下中所使用,术语“具有”、“包含”或“包括”或其任何任意语法变体以非排他性的方式使用。因此,这些术语既可以是指其中除了这些术语引入的特征之外在本上下文中描述的实体中没有另外特征存在的情况,而且可以是指其中存在一个或多个另外特征的情况。作为实例,表述“A具有B”、“A包含B”和“A包括B”既可以是指其中除了B之外在A中没有另外要素存在的情况(即其中A单独且仅由B组成的情况),而且可以是指其中除了B之外在实体A中存在一种或多种另外要素诸如要素C、要素C和D或甚至其他要素的情况。

[0011] 此外,如下所用,术语“优选”、“更优选”、“最优选”、“具体地”、“更具体地”、“特别地”、“更特别地”或类似术语与任选的特征结合使用,而不限制进一步可能性。因此,这些术语引入的特征是任选的特征,并不意图以任何方式限制权利要求的范围。如本领域技术人员将认识到,可以通过使用替代特征来执行本发明。类似地,通过“在本发明的实施方案中”或类似表述引入的特征意图是任选的特征,没有关于本发明的进一步实施方案的任何限制,没有关于本发明的范围的任何限制,并且没有关于将以这样的方式引入的特征与本发

明的其他任选或非任选特征组合的可能性的任何限制。

[0012] 如果没有另外指明,术语“约”是指具有相关领域中普遍接受的技术精度的指示值,优选地涉及指示值 $\pm 20\%$,更优选地 $\pm 10\%$,最优选地 $\pm 5\%$ 。进一步,术语“基本上”表明不存在对指示的结果或使用具有影响的偏差,即,潜在的偏差不引起指示的结果偏差超过 $\pm 20\%$ 、更优选 $\pm 10\%$ 、最优选 $\pm 5\%$ 。因此,“基本上由...组成”意指包括指定的组分,但不包括其他组分,除了作为杂质存在的材料、由于用于提供所述组分的过程而存在的不可避免的材料以及为了除了达到本发明的技术效果以外的目的而添加的组分。例如,使用短语“基本上由...组成”定义的组合物涵盖任何已知的可接受的添加剂、赋形剂、稀释剂、载体等。优选地,基本上由一组组分组成的组合物将包含小于5重量%、更优选小于3重量%、甚至更优选小于1重量%、最优选小于0.1重量%的非指定组分。

[0013] 在一个实施方案中,本发明的方法是体外方法。此外,它可以包括除了具体提到的步骤之外的步骤。具体地,步骤a)之前可以是提供样品的步骤,或者步骤a)和/或b)可以包括添加其他化合物以促进结合和检测。此外,一些或所有步骤可以通过自动化设备辅助。在一个实施方案中,所述方法是免疫学方法,即,在一个实施方案中,分析物和检测剂化合物中的至少一种是抗体或包含抗体。

[0014] 术语“生物分子”是技术人员已知的,并且通常是指由至少一种生物体的代谢产生的分子。因此,在一个实施方案中,术语“生物大分子”是指由生物体从单体前体产生的聚合物。典型的生物大分子是多肽、DNA、RNA或多糖。

[0015] 在一个实施方案中,如本文所用的术语“多肽”包括特别指定的多肽的变体和片段。变体包括包含如下的多肽,所述多肽包含与特别指定的氨基酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。百分比同一性值优选地在整个氨基酸序列区域计算。技术人员可获得基于各种算法的一系列程序,用于比较不同序列。在这种背景下,Needleman和Wunsch或Smith和Waterman的算法给出特别可靠的结果。为了进行序列比对,可使用程序PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989:151-153)或程序Gap和BestFit [Needleman和Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970)) 和Smith和Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981))],它们是GCG软件包的一部分 [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)]。优选地使用程序GAP在整个序列区域用以下设置测定以百分比(%)表示的上述序列同一性值:空位权重:50,长度权重:3,平均匹配:10.000和平均错配:0.000,其除非另有规定,否则应始终用作序列比对的标准设置。在一个实施方案中,包含任何前述多肽序列的片段的多肽也作为本发明的多肽被包括。该片段是这样的多肽,其仍适合作为分析物或用于本文别处指定的检测剂化合物,例如具有作为如本文别处指定的结合部分的活性。因此,多肽可以包含赋予所述生物活性的本发明多肽的结构域或由其组成。如本文意指的片段优选包含前述氨基酸序列中任一个的至少50个、至少100个、至少250个或至少500个连续的氨基酸残基,其包含前述氨基酸序列中任一个的至少20个、至少30个、至少50个、至少80个、至少100个或至少150个连续氨基酸。本发明的多肽也可以含有另外的多肽序列。具体地,本发明的多肽可以是融合蛋白,其中融合蛋白的一个配偶体是如本文所指定的多肽。这样的融合蛋白可以包含作为其他部分的用于监测表达的多肽(例如绿色、黄色、蓝色或红色荧光蛋

白、碱性磷酸酶等)或所谓的“标签”,其可以用作可检测标记或用作用于纯化目的或将所述多肽结合至固体表面的辅助措施。用于不同目的的标签是本领域中众所周知的,并且包含FLAG-标签、6-组氨酸-标签、MYC-标签、生物素等。

[0016] 如本文所用的术语“抗体”包括单克隆抗体,由至少两个完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体),和抗体片段,只要它们显示出如本文别处所指定的所需结合活性。在一个实施方案中,抗体不是包含在抗血清中的抗体,通常不是多克隆抗体或多克隆血清。因此,在一个实施方案中,抗体是包含在混合物中的抗体,其中包含在所述混合物中的至少80%,在一个实施方案中至少90%,在进一步的实施方案中至少95%的抗体分子是本发明的检测剂化合物。在一个实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中,所述抗体是全长抗体或抗体片段。

[0017] 根据其重链的恒定结构域的氨基酸序列,抗体(免疫球蛋白)可以被分配到不同的类别。存在五种主要类别的免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且其中几种可进一步分为亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的,并且通常描述于例如Abbas等人, *Cellular and Mol. Immunology*, 第4版, W.B. Saunders, Co. (2000)。抗体可以通过抗体与一种或多种其他蛋白或肽的共价或非共价缔合形成的较大融合分子的一部分。

[0018] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“整个抗体”在本文中可互换地用于指其基本上完整形式的抗体,而不是如下定义的抗体片段。所述术语特别是指具有含有Fc区的重链的抗体。在一个实施方案中,“抗体片段”包含完整抗体的一部分,其包含其抗原结合区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双体;线性抗体;单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段(称为“Fab”片段,各自具有单一抗原结合位点)和剩余的“Fc”片段(其名称反映了其容易结晶的能力)。胃蛋白酶处理产生一个F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。“Fv”是含有完整抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施方案中,双链Fv种类由紧密、非共价缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成。在单链Fv(scFv)种类中,一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域可以通过柔性肽接头共价连接,使得轻链和重链可以以类似于双链Fv种类的“二聚”结构缔合。正是以这种构型,每个可变结构域的三个高变区(HVR)相互作用以限定抗原结合位点。总共六个HVR赋予抗体抗原结合特异性。然而,甚至单个可变结构域(或仅包含对抗原特异性的三个HVR的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲和力低于整个结合位点。术语“双体”是指具有两个抗原结合位点的抗体片段,所述片段包含与相同多肽链(VH-VL)中的轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。

[0019] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上均质的抗体群体获得的抗体,即构成群体的单个抗体除了可以少量存在的可能突变(例如天然存在的突变)以外是相同的。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征不是离散抗体的混合物。在某些实施方案中,这样的单克隆抗体通常包括包含结合分析物的多肽序列的抗体,其中通过包括从多个多肽序列中选择单个分析物结合多肽序列的方法获得分析物结合多肽序列。例如,选择过程可以从许多克隆诸如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆的合并物中选择独特克隆。与包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相反,单克隆抗体制备物的每种单克隆

抗体针对抗原上的单一决定簇。除了其特异性之外,单克隆抗体制备物的优势在于它们通常未被其他免疫球蛋白污染。

[0020] 如本文所用,术语“分析物”是指化学分子,在一个实施方案中为有机分子,其以足够的亲和力结合本发明的检测剂化合物,以允许检测分析物/检测剂化合物复合物。在一个实施方案中,分析物/检测剂化合物复合物的解离常数(K_d)为至多 10^{-7} mol/L,在进一步的实施方案中为至多 10^{-8} mol/L,在进一步的实施方案中为至多 10^{-9} mol/L。在一个实施方案中,分析物是生物分子,在进一步的实施方案中,分析物是生物大分子。在进一步的实施方案中,分析物是多肽。

[0021] 在一个实施方案中,在所述分析物是多肽的情况下,所述多肽是由病原体、例如病毒、细菌或原生动物生物产生的抗原;或分析物是受试者产生的针对由病原体、例如病毒、细菌或原生动物生物产生的抗原的抗体。

[0022] 在一个实施方案中,所述分析物是细菌抗原,例如梅毒螺旋体抗原,疏螺旋体抗原,布鲁氏菌抗原,衣原体抗原,支原体抗原,李斯特氏菌抗原或源自单细胞生物、诸如原生动物的抗原,在一个实施方案中克氏锥虫抗原。在一个实施方案中,所述分析物是针对细菌抗原的抗体,在进一步的实施方案中,针对细菌多肽的抗体。在一个实施方案中,所述抗体是抗梅毒螺旋体抗体,抗疏螺旋体抗体,抗布鲁氏菌抗体,抗衣原体抗体,抗支原体抗体或抗李斯特氏菌抗体。在又一个实施方案中,所述分析物是针对单细胞生物的抗体,在一个实施方案中抗克氏锥虫抗体。在进一步的实施方案中,所述分析物是抗自身抗体,即识别受试者自身产生的抗原的抗体,在一个实施方案中是疾病的诊断和/或预后性抗自身抗体,在一个实施方案中是自身免疫性疾病的诊断和/或预后性抗自身抗体。诊断性和预后性抗自身抗体是本领域中已知的,并且包括例如指示系统性红斑狼疮或多肌炎的抗核抗体,指示桥本氏甲状腺炎或格雷夫氏病的抗甲状腺抗体,指示贫血的抗内在因子抗体以及指示乳糜泻或谷蛋白敏感性的抗组织转谷氨酰胺酶抗体。

[0023] 在一个实施方案中,所述分析物是病毒抗原,例如病毒的抗原,在一个实施方案中,病毒的抗原选自由以下组成的列表:肝炎病毒,虫媒病毒,腺病毒,柯萨奇病毒,埃可病毒,流感病毒,副流感病毒,巨细胞病毒,疱疹病毒,爱泼斯坦-巴尔病毒,腮腺炎病毒,诺如病毒,轮状病毒,风疹病毒,麻疹病毒,人免疫缺陷病毒,水痘带状疱疹病毒,脊髓灰质炎病毒和肠病毒。在一个实施方案中,所述分析物是针对病毒抗原的抗体,在进一步的实施方案中,针对病毒多肽的抗体,或者在进一步的实施方案中,针对病毒衣壳多肽的抗体,一个实施方案中,针对医学相关病毒的抗体,在一个实施方案中,针对选自如上文所指定的列表的病毒的抗体。在一个实施方案中,所述病毒是甲型肝炎病毒,乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒。在一个实施方案中,所述病毒衣壳多肽是肝炎病毒衣壳多肽,在一个实施方案中,甲型肝炎(HA)病毒衣壳多肽。因此,在一个实施方案中,所述分析物是针对肝炎病毒衣壳多肽、例如针对甲型肝炎病毒衣壳多肽的抗体。

[0024] 在一个实施方案中,所述分析物是原生动物抗原,例如,来自弓形虫,在一个实施方案中,刚地弓形虫。在一个实施方案中,所述分析物是针对原生动物抗原的抗体,在进一步的实施方案中,针对原生动物多肽的抗体。在一个实施方案中,所述分析物是针对刚地弓形虫p30多肽(Genbank登录号:S85174.1)的抗体。

[0025] 然而,还设想所述分析物是低分子量化合物,其可通过与检测剂化合物形成复合

物来确定。在一个实施方案中,所述分析物具有至少100的分子质量(对应于100原子质量单位,且对应于100 Da;1 Da对应于 1.66×10^{-27} kg),在进一步的实施方案中,至少250,在进一步的实施方案中,至少500,或者,在进一步的实施方案中,至少1000的分子质量。在一个实施方案中,所述分析物是甲状腺素(T4)、三碘甲状腺原氨酸(T3)、叶酸、叶酸结合蛋白、维生素B₁₂、或内在因子。

[0026] 如本文所用,术语“检测剂化合物”是指包含结合部分和标记物(两者均如本文别处所指定)的化合物。在一个实施方案中,所述结合部分和所述标记物在所述检测剂化合物中形成亲和复合物,在一个实施方案中,其中所述结合部分/标记物复合物的解离常数(K_d)为至多 10^{-8} mol/L,在进一步的实施方案中,至多 10^{-9} mol/L,在进一步的实施方案中,至多 10^{-10} mol/L。在一个实施方案中,所述结合部分和所述标记物是共价连接的。在一个实施方案中,用于测定分析物的方法是非竞争性免疫测定法。在进一步的实施方案中,用于测定分析物的方法是竞争性免疫测定法;如将理解,在这种情况下,所述检测剂化合物是测定的化合物,其在本领域中也称为“指定剂”,即是键合至标记物并与分析物竞争结合捕获化合物的化合物。

[0027] 如本文所用的术语“结合部分”是指检测剂化合物的结构,其不是本文别处所指定的标记物。因此,例如,在所述检测剂化合物是染料标记的抗体的情况下,所述抗体将是结合部分;并且在所述检测剂化合物是染料标记的F(ab)片段的情况下,F(ab)片段将是结合部分。相反,术语“亲和结构域”用于指介导检测剂化合物对分析物的亲和力的检测剂化合物的亚结构。因此,所述亲和结构域是结合部分的亚结构,其包含在所述检测剂化合物/分析物复合物中接触分析物的原子。因此,所述结合部分可以包含多于一个亲和结构域,例如,在一个实施方案中,两个相同的亲和结构域(在所述结合部分是IgG的情况下),在进一步的实施方案中,十个相同的亲和结构域(在所述结合部分是IgM的情况下),在进一步的实施方案中,两个不同的亲和结构域(在所述结合部分是双体的情况下)。在进一步的实施方案中,在所述结合部分是多表位抗原的情况下,所述结合部分可以包含多个,即大于2的任意数目的相同或不同的亲和结构域。

[0028] 在一个实施方案中,第一检测剂化合物的结合部分与第二检测剂化合物的结合部分不同。因此,在一个实施方案中,第一和第二检测剂化合物可以是不同的单克隆抗体,在一个实施方案中,其识别所述抗体的相同表位。在一个实施方案中,在这种情况下,第一检测剂化合物和分析物之间形成的复合物的解离常数和第二检测剂化合物和分析物之间形成的复合物的解离常数相差不超过5倍;在一个实施方案中不超过2倍;在进一步的实施方案中不超过1.5倍。在一个实施方案中,第一检测剂化合物和分析物之间形成的复合物的解离常数具有第二检测剂化合物和分析物之间形成的复合物的解离常数的70%至130%的值。在进一步的实施方案中,第一检测剂化合物和分析物之间形成的复合物的解离常数具有第二检测剂化合物和分析物之间形成的复合物的解离常数的80%至120%的值。在进一步的实施方案中,第一检测剂化合物和分析物之间形成的复合物的解离常数具有第二检测剂化合物和分析物之间形成的复合物的解离常数的90%至110%的值。在进一步的实施方案中,第一检测剂化合物和分析物之间形成的复合物的解离常数和第二检测剂化合物和分析物之间形成的复合物的解离常数基本上相等或相等。

[0029] 在进一步的实施方案中,所述第一检测剂化合物的结合部分和所述第二检测剂化

合物的结合部分是基本上相同的,即仅在与分析物结合无关的结构决定簇中不同。在进一步的实施方案中,所述第一检测剂化合物的结合部分和所述第二检测剂化合物的结合部分是相同的;因此,在一个实施方案中,所述第一检测剂化合物和所述第二检测剂化合物仅在标记物中不同。如技术人员将理解的,在一个实施方案中,该差异可以包括由第一和第二标记物的不同偶联化学决定的差异。

[0030] 如本文所用的术语“标记物”是指适于使包含所述标记物的分子或复合物的存在可检测的化合物。通常,所述标记物具有可检测的特性,通常为光学或/和酶特性。然而,还设想所述可检测特性是发射放射性的特性。如将理解,被确定为检测所述可检测特性的参数也将被称为“信号”或“可检测信号”。为了避免疑问,注意,也可以将信号检测为零或低于检测限值。

[0031] 如本文所用的术语“酶特性”是指通过生物催化的方式从底物产生可检测产物的标记物的特性。因此,酶特性通常由所述标记物中具有所述酶特性的多肽的存在赋予。通常,酶特性是选自以下的至少一种酶活性:磷酸酶活性(例如碱性磷酸酶中)、过氧化物酶活性(例如辣根过氧化物酶中)和糖苷酶活性(例如 β -半乳糖苷酶中)。酶活性的典型底物是本领域中众所周知的。通常,所述酶活性产生具有如上文所述的可检测光学特性的产物,或/和所述酶活性产生可由电子仪器检测的产物。

[0032] 如本文所用的术语“光学特性”是指可由光学仪器检测的任何特性。具体地,光学可测定的特性可以是或可以包含至少一种选自以下的特性:反射性、透射性、发射性、散射性、荧光性、磷光性、衍射性和偏振性。本发明设想的另外的光学特性是颜色、荧光、发光或折射。在一个实施方案中,本文所提及的光学可测定的特性是指可以光学检测的化学化合物的特性,诸如光吸收、发光、光漫反射或与其相关的特性。应当理解,检测如本文所用的光学可测定的特性包括检测以前不可检测的特性的存在,检测以前检测到的特性的不存在,以及检测特性的定量变化,即检测与至少一种光学特性的变化程度相关的信号强度的变化。应当理解,在一个实施方案中,术语“光学特性”也涉及发光,在一个实施方案中,化学发光,在进一步的实施方案中,电化学发光,其也称为电致化学发光。因此,在一个实施方案中,所述可检测信号可以是发光信号,在一个实施方案中,化学发光信号,在进一步的实施方案中,电化学发光信号。根据以上,在一个实施方案中,所述标记物是染料,在一个实施方案中,是化学发光化合物。

[0033] 如本文所提及,所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,并且所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。本发明的所述第一和第二标记物是不同的,即,两种标记物可以在至少一种物理、生物学和/或化学特性中有所不同。例如,所述第一和第二标记物可以通过它们与某些抗血清或抗体的相互作用或通过色谱和/或质谱分析来区分。在一个实施方案中,所述区分特性是结构特性。因此,在一个实施方案中,所述第一和第二标记物在它们的化学结构的至少一种特征中是不同的,例如,不同在于至少一个原子、化学键和/或电荷。在一个实施方案中,区分所述第一和第二标记物的特征与所述第一和第二标记物的可检测特性无关;因此,在一个实施方案中,所述第一和第二标记物的可检测特性是相同的,尽管所述第一和第二标记物在结构上不同。在进一步的实施方案中,区分所述第一和第二标记物的特征与所述第一和第二标记物的可检测特性相关;因此,在一个实施方案中,所述第一和第二标记物的

可检测特性是不同的,并且所述第一和第二标记物在结构上是不同的。

[0034] 在一个实施方案中,(不同的)第一和第二标记物提供相同的可检测特性的特质(quality)。如本文所用,术语“可检测特性的特质”是指决定其检测模式的检测模式的物理性质;因此,具有相同可检测特性的特质的两种标记物是这样的两种标记物,其允许通过相同的测量原理,即辐射、透射、发光(包括化学发光)、吸光度等的测量来检测其可检测特性。在进一步的实施方案中,所述第一和第二标记物提供了基本上相同的可检测特性,即,允许通过基本上相同的方法检测其可检测特性,如果至多一种测量参数、例如检测波长重新调整至多2倍,在一个实施方案中至多1.5倍,在进一步的实施方案中至多1.2倍,在进一步的实施方案中至多1.1倍,则两种方法是“基本上相同的”。在进一步的实施方案中,所述第一和第二标记物提供相同的可检测特性,即允许通过相同方法检测其可检测特性。如将理解,在后一种情况下,可以同时检测所述第一和第二标记物的可检测特性。如将进一步理解,所述第一和/或第二标记物的可检测特性的检测可以在对于一种或两种标记物的非最佳条件下进行;例如,在两种标记物具有重叠的吸收光谱的情况下,可以在两种标记物具有相同的摩尔消光系数的非最大吸收波长处测量吸收。因此,在一个实施方案中,在步骤b)中测定复合物的量包括检测所述第一检测剂化合物和所述第二检测剂化合物的特性,在一个实施方案中,包括同时检测所述第一检测剂化合物和所述第二检测剂化合物的特性。

[0035] 在一个实施方案中,所述第一标记物是Ru(bpy)₂-bpyCO-OSu(也称为“BP-Ru”;CAS登记号137323-76-3,= 钌(2+),双(2,2'-联吡啶-κN¹,κN^{1'})[1-[4-(4'-甲基[2,2'-联吡啶]-4-基-κN¹,κN^{1'})-1-氧代丁氧基]-2,5-吡咯烷二酮]-, (OC-6-33) Ru(bpy)₂-bpyCO₂H的反应性酯(= BPRu,或Ru-bpy),CAS登记号115239-59-3),并且第二标记物是磺基-BPRu NHS酯(也称为“磺基-Ru”;CAS登记号482618-42-8,在本领域中也称为钌酸盐(2-),双[[2,2'-联吡啶]-4,4'-二甲磺酸根基(2-)-κN¹,κN^{1'}][1-[4-(4'-甲基[2,2'-联吡啶]-4-yl-κN¹,κN^{1'})-1-氧代丁氧基]-2,5-吡咯烷二酮]-,钠(1:2), (OC-6-31)。

[0036] 如本文所用,术语“测定”是指测定样品中待通过本发明的方法测定的分析物的至少一种可检测特征。在一个实施方案中,本方法适用于任何测定,包括使用和检测至少一种如本文所指定的检测剂化合物。因此,在一个实施方案中,测定包括测定分析物的特征与检测剂化合物的直接或间接相互作用。在一个实施方案中,所述分析物的特征是结合检测剂化合物的结构域,在一个实施方案中,是特异性结合检测剂化合物的结构域。因此,在一个实施方案中,所述分析物的可检测特征是受体或其受体结构域、凝集素、适体(其可以是肽适体或多核苷酸适体)、抗运载蛋白(anticalin)、设计的锚蛋白重复蛋白,或免疫球蛋白或其结合亚结构域,并且所述检测剂化合物包含由所述可检测特征特异性结合的化学结构。相反,在一个实施方案中,所述检测剂化合物包含受体或其受体结构域、凝集素、适体(其可以是肽适体或多核苷酸适体)、抗运载蛋白、设计的锚蛋白重复蛋白,或免疫球蛋白或其结合亚结构域,并且所述分析物的可检测特征包含由所述检测剂化合物特异性结合的化学结构。

[0037] 在本发明的上下文中,“适体”是特异性结合其相互作用配偶体的大分子。适体可以是肽或多核苷酸适体,并且原则上是技术人员已知的。如本文所用的术语“肽适体”是指特异性结合其相互作用配偶体且包含8-80个氨基酸、在一个实施方案中10-50个氨基酸、在进一步的实施方案中15-30个氨基酸的肽。它们可以例如分离自合适的宿主系统(如面包酵

母)中的随机化的肽表达文库(参见,例如,Klevenz等人, Cell Mol Life Sci. 2002, 59: 1993-1998)。

[0038] 如本文所用,术语“抗运载蛋白”是指衍生自特异性结合其相互作用配偶体的脂质运载蛋白的人工多肽。类似地,如本文所用的“设计的锚蛋白重复蛋白”或“DARPin”是包含几个锚蛋白重复基序且特异性结合其相互作用配偶体的人工多肽。

[0039] 在一个实施方案中,所述分析物和/或所述检测剂化合物的可检测特征包含免疫球蛋白或其结合亚结构域。因此,在一个实施方案中,测定包括测定分析物的免疫学特征与检测剂化合物的直接或间接相互作用和/或分析物的特征与检测剂化合物的免疫学特征的直接或间接相互作用。因此,在一个实施方案中,所述方法是免疫测定法。在一个实施方案中,根据本发明的免疫学特征是分析物的结构特征,其促进通过免疫学方式检测样品中的分析物。在一个实施方案中,所述免疫学特征促进鉴定,在进一步的实施方案中,通过免疫学方式定量分析物。因此,典型的免疫学特征是促进区分所述分析物与样品中其他化合物的特征。在一个实施方案中,测定分析物是确定分析物是否以高于方法检测限值的浓度存在于样品中。确定检测限值的方法是本领域技术人员已知的。在进一步的实施方案中,测定是半定量或定量地测定样品中分析物的量或浓度。为了进行定量测定,将测定分析物的绝对或精确量,或将测定分析物的相对量。可以在分析物的精确量无法测定或不应测定的情况下测定相对量。在所述情况下,可以确定分析物的存在量相对于包含第二量的所述分析物的第二样品是增加还是减少。

[0040] 如本领域技术人员将理解,通常不需要分别测定第一检测剂化合物/分析物和第二检测剂化合物/分析物复合物。因此,在一个实施方案中,一起测定第一检测剂化合物和分析物的复合物以及第二检测剂化合物和分析物的复合物,即在所述第一和所述第二检测剂化合物之间不加区分。因此,在一个实施方案中,测定与第一检测剂化合物或第二检测剂化合物或两者的复合物中存在的分析物的总量。在一个实施方案中,这可以通过如下来完成:在步骤b)中同时测定第一和第二标记物的可检测特性,如上所指定;或者在步骤b)中分别测定第一和第二标记物的可检测特性,但在步骤c)中测定第一检测剂化合物的特性和第二检测剂化合物的特性的和值。如从上面所理解,第一和第二标记物可以与相同类型的结合部分结合;因此,所述第一和第二结合部分可以是不同的,但也可以是相同的。因此,测定可以通过使样品与单克隆抗体(其第一级分与第一标记物结合,且其第二级分与第二标记物结合)接触来实现。这加上必要的变更也适用于多克隆抗体制备物。

[0041] 如技术人员将进一步理解,分析物/捕获化合物复合物的测定可以包括另外的步骤和/或另外的化合物的使用。例如,可以使用至少关于标记物与第一和第二检测剂化合物不同的一种或多种另外的检测剂化合物。在一个实施方案中,第一和第二检测剂化合物以1:5至5:1、通常1:2至2:1、约1:1或1:1的比率使用。在进一步的实施方案中,三种检测剂化合物以约2:1:1、1:2:1或1:1:2、约1:1:1或1:1:1的比率使用。因此,在一个实施方案中,第一和第二检测剂化合物和潜在存在的另外的检测剂化合物以约相同量(在进一步的实施方案中以相同量)存在于反应混合物中。在一个实施方案中,使用2至10种检测剂化合物,在一个实施方案中,2至5种检测剂化合物,在一个实施方案中,2至4种检测剂化合物,在一个实施方案中,2至3种检测剂化合物,并且所使用的所有检测剂化合物的标记物是互相不同的。在一个实施方案中,所述检测剂化合物以基本上相等的量使用,在一个实施方案中以相等

的量使用。

[0042] 进一步,取决于选择的测定形式,捕获抗体可用于将分析物和分析物/检测剂化合物复合物结合至固体表面。在一个实施方案中,测定法是竞争性免疫测定法,通常是竞争性、非均相免疫测定法,即免疫测定法,其中分析物与所述分析物的标记衍生物竞争结合与固体表面结合的捕获化合物,且其中测定与所述捕获化合物结合的所述分析物的标记衍生物的量。因此,在这种情况下,该方法还包括将指定剂混合至样品。在一个实施方案中,本发明的方法是非均相竞争性免疫测定,并且包括通过测定在所述指定剂和所述不同的捕获化合物之间形成的复合物的量来间接测定分析物与两种不同的捕获化合物之间形成的复合物的量。在一个实施方案中,竞争性测定法是抗HAV(抗甲型肝炎病毒)、抗HBc(抗乙型肝炎核心抗原)、抗HBe(抗乙型肝炎e抗原)、叶酸、叶酸RBC(红血细胞)、抗TSH-R、总维生素D、维生素B12、甲状腺素(Tyroxin) T₄、FT₄(游离甲状腺素)、甲状腺素T₃、FT₃(游离三碘甲状腺原氨酸)、睾酮、孕酮、洋地黄毒苷、抗TG、抗TPO(抗甲状腺过氧化物酶)、DGEA或雌二醇的测定法。

[0043] 在另一个实施方案中,免疫测定法是双抗原夹心测定法(“DAGS”),其中二价分析物,例如,抗体结合至与固体表面结合的捕获化合物,且其中通过如下文所述的检测剂化合物与所述分析物/捕获化合物复合物的结合来测定分析物/捕获化合物复合物的量。在一个实施方案中,DAGS测定法是抗弓形虫IgG、抗风疹IgG、抗HBs(乙型肝炎病毒表面抗原)抗体、HCV(丙型肝炎病毒)核心抗原或抗HCV抗体、CMV抗体(巨细胞病毒)IgG、梅毒(梅毒螺旋体)抗体、HTLV(人类T细胞淋巴细胞病毒)抗体或查加斯病(美洲锥虫病)抗体。

[0044] 如本文所用,术语“捕获化合物”是指直接或间接地结合如上文所指定的分析物的化学分子。在一个实施方案中,所述捕获化合物结合至固体表面或适于结合至固体表面。在一个实施方案中,捕获化合物是有机分子,在进一步的实施方案中,是如上文所述的生物大分子,例如上文所述的多肽。在一个实施方案中,捕获化合物以足够的亲和力间接结合本发明的分析物,以允许检测包含分析物和捕获化合物的复合物;即在这种情况下,捕获化合物是间接配体。如本文所用,术语“间接结合”是指结合,其中配体不直接接触分析物,但接触结合分析物的化学分子,在一个实施方案中,特异性结合分析物的化学分子,其中,在一个实施方案中,结合分析物的所述分子是直接结合分析物的分子,即是直接配体。因此,在一个实施方案中,分析物,结合分析物的化学分子,和间接配体形成具有上述特性的复合物,特别是具有如所示的解离常数。在进一步的实施方案中,捕获化合物以足够的亲和力直接结合本发明的分析物,以允许检测如上文所述的分析物/捕获化合物复合物。因此,在一个实施方案中,捕获化合物是直接配体。

[0045] 如本文所用,术语“固体表面”是指适于结合本发明的捕获化合物且适于例如通过物理方式与样品分离的任何合适的固体表面。在一个实施方案中,所述固体表面是珠粒的表面,在一个实施方案中,是微珠例如磁性或顺磁性微珠。在一个实施方案中,所述表面适于改进捕获化合物的结合,例如通过共价或非共价地附接结合捕获化合物的亚结构的分子。结合捕获化合物的亚结构的典型分子是,例如抗体、链霉抗生物素蛋白、复合镍离子、其中化合物“X”特异性结合“抗X”的任何X-抗X系统的组分(如例如糖和糖-结合蛋白/凝集素或激素及其受体)等。在进一步的实施方案中,固体表面通过共价或非共价键结合所述捕获化合物,例如,通过疏水相互作用。因此,在一个实施方案中,所述固体表面是多簇板的表

面。在一个实施方案中,将多簇板的表面预处理以增加结合捕获化合物的亲和力和/或能力。合适的预处理是本领域中已知的。

[0046] 将生物分子(通常为多肽)与固体表面结合的方法是本领域中众所周知的,并且包括例如,通过疏水相互作用结合,生物素化和经由固定的链霉抗生物素蛋白结合,共价结合,抗体-抗原相互作用等,或这些相互作用的组合,例如抗体和病原体多肽之间的抗体-抗原相互作用,其中所述抗体被生物素化并经由固定的链霉抗生物素蛋白结合至固体表面。因此,捕获化合物也可以优选为捕获复合物。在一个实施方案中,捕获化合物是直接结合分析物的捕获复合物的化合物。本领域技术人员知道如何将捕获化合物或复合物与固体表面结合,这取决于所选择的固体表面。在一个实施方案中,捕获化合物是病毒多肽,例如病毒衣壳多肽。在一个实施方案中,所述捕获化合物是肝炎病毒衣壳多肽,在一个实施方案中是甲型肝炎病毒(HAV)衣壳多肽。然而,也设想捕获化合物是抗体。

[0047] 如本文所用的术语“样品”是指体液的样品,来自组织或器官的样品,或洗涤/漂洗液的样品或从外或内体表面获得的拭子或涂片。在一个实施方案中,怀疑所述样品包含如本文所指定的分析物。在一个实施方案中,所述样品包含至少一种如本文别处指定的分析物。在一个实施方案中,所述样品是血液、血浆、血清、尿液、唾液或泪液样品。可以通过使用刷子、(棉花)拭子、抹刀、漂洗/洗涤液、钻取活检设备、用针或柳叶刀穿刺腔或通过外科手术器械来获得样品。然而,通过众所周知的技术获得的样品,包括在一个实施方案中,来自泌尿生殖道、肛周区域、肛管、口腔、上呼吸道和表皮的刮擦物、拭子或活检,也被包括作为本发明的样品。可以通过裂解技术诸如均质化和/或通过分离技术诸如过滤或离心从体液或组织或器官获得无细胞的液体。在一个实施方案中,样品获得自己知包含HA病毒多肽或/和针对至少一种HA病毒多肽的抗体的体液,即在一个实施方案中,血液、血浆、血清、唾液等,在一个实施方案中,来自血浆或血清。应当理解,可以进一步处理样品以便实施本发明的方法。具体地,可以通过本领域中已知的方法和方式从样品中除去细胞。此外,可以通过本领域中已知的方法和方式从样品提取和/或纯化至少一种分析物。因此,术语“样品”还可以指包含或怀疑包含至少一种从样品稀释、富集、纯化和/或提取的分析物的制备物。

[0048] 如本发明的方法的上下文中使用的术语“接触”是本领域技术人员理解的。在一个实施方案中,该术语是指使本发明的化合物与样品或与另外的化合物物理接触,且由此例如允许样品和化合物相互作用。

[0049] 如本文所用的术语“受试者”是指脊椎动物,在一个实施方案中,哺乳动物受试者。在一个实施方案中,所述受试者是农场动物、伴侣动物或实验动物,例如牛、绵羊、山羊、马、猫、狗、豚鼠、小鼠或大鼠。在一个实施方案中,所述受试者是人。在进一步的实施方案中,所述受试者是怀疑包含如本文所指定的分析物的人。

[0050] 有利地,在作为本发明基础的工作中发现,通过在免疫测定中使用不同的标记物(其可以提供基本上相同的量和/或特质的信号),可以减少来自样品的抗标记物化合物的干扰。例如,在竞争性免疫测定中,可以减少引起假阳性结果的由抗标记物干扰引起的信号降低。类似地,在夹心/双抗原夹心免疫测定中,抗标记物干扰倾向于通过结合标记物而降低信号,引起信号产量的降低,且由此引起假阴性结果。在一些情况下,还已经观察到信号增加,由此引起假阴性结果。至少在所有这些情况下,使用至少两种不同的标记物避免干扰

引起错误结果。

[0051] 以上作出的定义加上必要的变更适用于以下内容。下面进一步做出的另外的定义和解释也加上必要的变更适用于本说明书中所述的所有实施方案。

[0052] 本发明还涉及用于提高测定中的分析物的检测特异性的方法,其包括用具有不同标记物的第二检测剂化合物替代10%至90%的第一检测剂化合物。

[0053] 如本文所用,术语“用第二检测剂化合物替代一定分数的第一检测剂化合物”是指从测定中省略指示分数的第一检测剂化合物,并且以对应于省略的第一检测剂化合物的量重新包括所述第二检测剂化合物。在一个实施方案中,所述第一和第二检测剂化合物的分数和量是基于摩尔计算的;因此,在测定中的所述第一检测剂化合物的浓度最初为10 pM并替代50%的情况下,将以5 pM的浓度包括所述第二检测剂化合物。在进一步的实施方案中,所述第一和第二检测剂化合物的分数和量是基于信号产量计算的。因此,例如原始测定中的所述第一检测剂化合物的浓度可以设置为100%的任意信号产量;因此,在基于信号产量应当替代50%的第一检测剂化合物的情况下,省略一定量的第一检测剂化合物,使得信号产量降低至50%,并且添加第二检测剂化合物,使得信号产量再次上升至100%。如将理解,如果第一检测剂化合物被多于一种另外的检测剂化合物替代,并且如果多于一种检测剂化合物被一种或多种另外的检测剂化合物替代,则以上加上必要的变更适用。

[0054] 通常,将选择替代的捕获化合物或检测剂化合物的分数,使得可以理论上预期替代的可测量的影响。如本领域技术人员将理解,可测量的效果的预期将取决于用于替代的不同标记物的数量。例如,如果在改进后的测定中使用三种代替一种检测剂化合物,则优选替代例如66%的初始检测剂化合物。通常,设想给定检测剂化合物的分数为 $(100\% / n) \pm 50\%$,其中 $n =$ (测定中使用的不同检测剂化合物的数目)。在另一个实施方案中,使用 $(100\% / n) \pm 20\%$ 的分数。如本领域技术人员将理解,使用的分数的总和将加起来为100%。因此,在一个实施方案中,替代的检测剂化合物的分数为10%至90%,在一个实施方案中为25%至75%,在进一步的实施方案中为40%至60%,在进一步的实施方案中为约50%。

[0055] 本发明进一步涉及用于检测样品中的分析物的试剂盒,其至少包含所述分析物的第一和第二检测剂化合物,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。

[0056] 如本文所用的术语“试剂盒”是指可以包装在一起或可以不包装在一起的本发明的上述化合物、装置或试剂的集合。试剂盒的组分可以由单独的小瓶(即,作为单独部分的试剂盒)包含或提供在单个小瓶中。此外,在一个实施方案中,本发明的试剂盒用于实施上文所述的方法。在一个实施方案中,设想为了实践上述方法,所有组分都以即用方式提供。此外,在一个实施方案中,试剂盒含有用于实施所述方法的说明书。说明书可以由用户手册以纸张或电子形式提供。例如,所述手册可以包含用于解释当使用本发明的试剂盒实施上述方法时获得的结果的说明书。在一个实施方案中,用于检测样品中的分析物的试剂盒(包含至少两种不同的检测剂化合物),还包含至少一种捕获化合物。在进一步的实施方案中,所述试剂盒还包含用于固定所述捕获化合物或用于固定分析物的固体支持物。在一个实施方案中,所述试剂盒中包含2至10种用于所述分析物的检测剂化合物,在一个实施方案中,2至5种用于所述分析物的检测剂化合物,在一个实施方案中,2至4种检测剂化合物,在一个

实施方案中,2至3种用于所述分析物的检测剂化合物。

[0057] 进一步地,本发明涉及用于测定样品中的分析物的设备,其至少包含所述分析物的第一和第二检测剂化合物,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的;和用于测定从所述第一标记物和所述第二标记物获得的至少一种信号的装置。

[0058] 如本文所用,术语“设备”是指包含至少上述可操作相互连接以允许测定的装置的装置系统。上文结合本发明的方法公开了用于测定分析物的量的典型装置和用于进行测定的装置,例如用于测定至少一种信号的装置。如技术人员所理解,用于测定至少一种信号的装置包括能够测定一种信号的装置;也如技术人员所理解,甚至在信号是零或低于特定样品的检测限值的情况下,用于测定信号的装置也是具有检测所述信号的能力的装置。

[0059] 如何以操作方式连接装置将取决于设备中包含的装置的类型。在一个实施方案中,所述装置由单个设备包含。因此,所述设备可以包括(i)用于测量所应用样品中分析物的量的分析单元和(ii)用于处理用于评估的所得数据的计算机单元。公开了用于检测的典型装置,连同涉及上述本发明的方法的实施方案。在这种情况下,可操作连接所述装置,其中系统的用户基于手册中给出的说明和解释将标记物的可检测特性、在一个实施方案中标记物的光学或/和电化学可测定的特性的测定结果汇集在一起;或者所述说明和解释包括在所述设备中包含的可执行程序代码中,使得作为测定的结果,将所应用的样品中的分析物的量或浓度输出至所述用户。本领域技术人员将意识到如何连接所述装置而无需再费周折。典型的设备是可以在没有专门技术人员的特定知识的情况下应用的设备,例如仅需要用样品上样的测试条或电子设备。结果可以给出为原始数据的输出,其需要由技术人员解释。然而,在一个实施方案中,该设备的输出是处理,即评估的原始数据,其解释不需要技术人员。其他典型的设备包括分析单元/设备(例如,生物传感器,阵列,与特异性识别肽的配体偶联的固体支持物,等离子体表面共振设备,NMR光谱仪,质谱仪等)或上述根据本发明的方法提及的评估单元/设备。在一个实施方案中,所述设备中包含2至10种用于所述分析物的检测剂化合物,在一个实施方案中,2至5种用于所述分析物的检测剂化合物,在一个实施方案中,2至4种检测剂化合物,在一个实施方案中,2至3种用于所述分析物的检测剂化合物。

[0060] 此外,本发明涉及至少包含第一和第二检测剂化合物的组合物用于检测分析物的用途,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的;且本发明涉及至少分析物的第一和第二检测剂化合物用于制备诊断组合物或诊断设备的用途,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的;且本发明涉及至少包含分析物的第一和第二检测剂化合物的组合物用于测定样品中的所述分析物的用途,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。

[0061] 鉴于上述内容,特别设想了以下实施方案:

1. 用于测定样品中的分析物的方法,其包括
 - a) 使所述样品与至少第一和第二检测剂化合物接触;
 - b) 测定包含至少一种检测剂化合物的复合物的量;和,
 - c) 基于步骤b)的结果测定样品中的所述分析物,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。
- [0062] 2. 实施方案1的方法,其中所述第一和第二标记物提供相同的可检测特性的特质。
- [0063] 3. 实施方案1或2的方法,其中所述第一和第二标记物提供相同的可检测特性。
- [0064] 4. 实施方案1至3中任一项的方法,其中所述第一和第二标记物提供基本上相同量的可检测特性。
- [0065] 5. 实施方案1至4中任一项的方法,其中由所述第一和/或第二检测剂化合物提供的可检测特性是辐射特性,在一个实施方案中是发光特性,在进一步的实施方案中是化学发光特性。
- [0066] 6. 实施方案1至5中任一项的方法,其中所述第一检测剂化合物中的标记物包括 Ru (bpy) 2-bpyCO-OSu (CAS登记号137323-76-3)。
- [0067] 7. 实施方案1至6中任一项的方法,其中所述第二检测剂化合物中的标记物是磺基-BPRu NHS酯 (CAS登记号482618-42-8)。
- [0068] 8. 实施方案1至7中任一项的方法,其中在步骤b)中测定复合物的量包括检测所述第一检测剂化合物和所述第二检测剂化合物的特性,在一个实施方案中包括同时检测所述第一检测剂化合物和所述第二检测剂化合物的特性。
- [0069] 9. 实施方案1至8中任一项的方法,其中在步骤c)中测定所述分析物包括测定所述第一检测剂化合物的特性和所述第二检测剂化合物的特性的和值。
- [0070] 10. 实施方案1至9中任一项的方法,其中所述结合部分特异性结合所述分析物或特异性结合所述分析物的捕获化合物。
- [0071] 11. 实施方案1至9中任一项的方法,其中所述结合部分与所述分析物竞争结合捕获化合物。
- [0072] 12. 实施方案1至11中任一项的方法,其中所述结合部分是生物分子或其片段,在一个实施方案中是多肽或其片段。
- [0073] 13. 实施方案1至12中任一项的方法,其中所述结合部分是抗体或其片段。
- [0074] 14. 实施方案1至13中任一项的方法,其中所述方法是免疫测定法。
- [0075] 15. 实施方案1至14中任一项的方法,其中所述方法是竞争性测定法。
- [0076] 16. 实施方案1至14中任一项的方法,其中所述方法是夹心测定法,在一个实施方案中是双抗原夹心测定法。
- [0077] 17. 实施方案1至16中任一项的方法,其中所述方法是定性或半定量测定法。
- [0078] 18. 实施方案1至17中任一项的方法,其中所述方法是定量测定法。
- [0079] 19. 实施方案1至18中任一项的方法,其中所述分析物是多肽。
- [0080] 20. 实施方案1至19中任一项的方法,其中所述分析物是抗体,在一个实施方案中是针对来自致病性生物的抗原的抗体,在一个实施方案中是针对病毒抗原的抗体,在一个

实施方案中是针对原生动物的抗体。

[0081] 21. 实施方案1至20中任一项的方法,其中所述分析物是抗甲型肝炎抗体或抗弓形虫抗体。

[0082] 22. 实施方案1至19中任一项的方法,其中所述分析物是来自致病性生物的抗原,在一个实施方案中是细菌抗原。

[0083] 23. 实施方案1至22中任一项的方法,其中使用2至10种检测剂化合物,在一个实施方案中,2至5种检测剂化合物,在一个实施方案中,2至4种检测剂化合物,在一个实施方案中,2至3种检测剂化合物,且其中所有检测剂化合物的标记物互相不同。

[0084] 24. 用于提高测定中的分析物的检测特异性的方法,其包括用具有不同标记物的第二检测剂化合物替代10%至90%的第一检测剂化合物。

[0085] 25. 实施方案24的方法,其中25%至75%,在进一步的实施方案中40%至60%,在进一步的实施方案中约50%的所述第一检测剂化合物被替代。

[0086] 26. 用于鉴定包含干扰物的样品的方法,所述干扰物扰乱使用具有第一标记物的检测剂化合物的分析物测定,所述方法包括

- a) 使所述样品的等分试样与具有所述第一标记物的第一检测剂化合物接触;
- b) 使所述样品的等分试样与具有第二标记物的第二检测剂化合物接触;
- c) 测定由所述第一标记物生成的第一信号;
- d) 测定由所述第二标记物生成的第二信号;

e) 通过将步骤c)的第一信号与步骤d)的第二信号进行比较,来鉴定包含扰乱使用具有第一标记物的检测剂化合物的分析物测定的干扰物的样品。

[0087] 27. 实施方案26的方法,其进一步包括测定多种分析物。

[0088] 28. 用于检测样品中的分析物的试剂盒,其至少包含所述分析物的第一和第二检测剂化合物,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。

[0089] 29. 实施方案28的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含至少一种用于所述分析物的捕获化合物。

[0090] 30. 实施方案28或29的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含用于固定所述捕获化合物或包含至少所述分析物的所述样品的组分的固体支持物。

[0091] 31. 用于测定样品中的分析物的设备,其至少包含所述分析物的第一和第二检测剂化合物,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的;和用于测定从所述第一标记物和所述第二标记物获得的至少一种信号的装置。

[0092] 32. 至少包含第一和第二检测剂化合物的组合物用于检测分析物的用途,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。

[0093] 33. 至少分析物的第一和第二检测剂化合物用于制备诊断组合物或诊断设备的用途,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同

的。

[0094] 34. 实施方案32或33的用途,其中所述分析物是如实施方案19至22中任一项中所指定的分析物。

[0095] 35. 至少包含分析物的第一和第二检测剂化合物的组合物用于测定样品中的所述分析物的用途,其中所述第一检测剂化合物包含第一结合部分和第一标记物,且所述第二检测剂化合物包含第二结合部分和第二标记物,且其中所述第一标记物和所述第二标记物是不同的。

[0096] 36. 实施方案1至27中任一项的方法、实施方案28至30中任一项的试剂盒、实施方案31的设备和/或实施方案32至35中任一项的用途,其中所述第一和第二检测剂化合物的亲和结构域和/或结合部分是相同的。

[0097] 37. 实施方案1至27中任一项的方法、实施方案28至30中任一项的试剂盒、实施方案31的设备和/或实施方案32至35中任一项的用途,其中所述第一和第二检测剂化合物的亲和结构域和/或结合部分是不同的。

[0098] 本说明书中引用的所有参考文献就其整个公开内容和本说明书中具体提及的公开内容而言在此通过引用并入。

[0099] 以下实施例应当仅举例说明本发明。它们无论如何不应被解释为限制本发明的范围。

[0100] 实施例1:定性和竞争性Elecsys抗甲型肝炎病毒(抗HAV)测定的特异性增加

根据生产商的说明,在自动化的Elecsys[®] cobas分析仪(Roche Diagnostics GmbH)上进行用于体外测定抗HAV抗体的免疫测定。Elecsys[®]是Roche集团的注册商标。

[0101] 该测定根据竞争原理实施。在第一次孵育中,将50 μ l样品与添加的HAV抗原一起孵育,使得样品抗HAV结合HAV抗原。在第二次(随后的)孵育步骤中,将对HAV抗原特异性的生物素化和钆-标记的抗体连同链霉抗生物素蛋白包被的微粒一起添加至样品-HAV抗原混合物中,使得HAV抗原上仍然游离的结合位点变成被占据的。经由生物素和链霉抗生物素蛋白的相互作用使整个复合物与固相(微粒)结合。接下来,将反应混合物吸入测量室中,在此处,将微粒磁性捕获至电极的表面上。然后用ProCell/ProCell M(信号生成所必需的包含三丙基胺的缓冲溶液)除去未结合的物质。然后,向电极施加电压诱导化学发光发射,其通过光电倍增管测量。经由校准曲线测定结果,其为通过2-点校准专门生成的仪器(Ca11 = 包含人抗HAV阴性血清的阴性校准物;Ca12 = 包含人血清中的人抗HAV的阳性校准物)。详细地,使用单克隆MAK<HAV>M-2.157-F(ab')₂-抗体片段,一个等分试样用BP-Ru标记,另一个等分试样用碘基-Ru标记;这些用于生成3种不同版本的抗HAV测定:

测定1:R2中使用的100%的MAK<HAV>M-2.157-F(ab')₂用碘基-Ru标记

测定2:R2中使用的100%的MAK<HA V>M-2.157-F(ab')₂用BP-Ru标记

测定3:已使用测定1 R2和测定2 R2的1 +1混合物(意指BP-Ru和碘基-Ru的混合物)。BP-Ru和碘基-Ru对总体信号的信号贡献是相似的。

[0102] 第一标记物是“BP-Ru”,也称为Ru(bpy)₂-bpyCO-OSu(CAS登记号137323-76-3, = 钆(2+), 双(2,2'-联吡啶- κ N¹, κ N^{1'}) [1-[4-(4'-甲基[2,2'-联吡啶]-4-基- κ N¹, κ N^{1'})-1-氧代丁氧基]-2,5-吡咯烷二酮]-, (OC-6-33) Ru(bpy)₂-bpyCO₂H的反应性酯(= BPRu,或Ru-bpy),CAS登记号115239-59-3),并且第二标记物是“碘基-Ru”,也称为碘基-BPRu NHS酯

(CAS登记号482618-42-8,在本领域中也称为钌酸盐(2-),双[[2,2'-联吡啶]-4,4'-二甲磺酸根基(2-)- $\kappa N^1, \kappa N^1$][1-[4-(4'-甲基[2,2'-联吡啶]-4-yl)- $\kappa N^1, \kappa N^1$]-1-氧代丁氧基]-2,5-吡咯烷二酮]-,钠(1:2), (OC-6-31)。

[0103] 用校准物和标准样品的结果显示于表1。此外,用全部3种测定法测试27种已知的抗标记物干扰样品,诸如抗磺基-Ru干扰样品以及一种已知的抗BP-Ru干扰样品(表2)。已知这些样品当在各自的抗HAV测定变式中使用,引起假阳性结果。如所预期,抗Sulfu-Ru干扰样品在测定1中是假阳性的,但在测定2中是正确阴性的,并且抗BP-Ru干扰样品在测定1中是正确阴性的,但在测定2中是假阳性的。有趣的是,除了一种抗磺基Ru干扰样品(PN0206_0925)以外的所有样品都在含有BP-Ru和磺基Ru的标记物混合物的测定3中是正确阴性的,意味着特异性的显著提高。

[0104] 截止值指数(COI)如下计算:

截止值是使用阴性(Ca11)和阳性(Ca12)校准物使用2-点校准测定的。截止值指数(COI)是通过将计数(样品)除以截止值测定的。如果 $COI \leq 1$,则结果被解释为反应性的,并且如果 $COI > 1$,则是非反应性的。

[0105] 实施例2:定量DAGS Elecsys Toxo IgG测定的灵敏度的增加

根据生产商的说明,在自动化的Elecsys[®] cobas分析仪(Roche Diagnostics GmbH)上实施用于体外测定Toxo-IgG抗体的免疫测定。Elecsys[®]是Roche集团的注册商标。

[0106] 根据夹心原理(夹在两个Toxo-p30抗原之间的IgG抗体)实施测定。在第一次孵育10 μ l样品中,生物素化的重组刚地弓形虫特异性抗原和用钌复合物标记的刚地弓形虫特异性重组抗原形成夹心复合物。在第二步中,添加链霉抗生物素蛋白-包被的微粒,使得经由生物素和链霉抗生物素蛋白的相互作用将样品抗体和Toxo-抗原的免疫复合物与固相结合。接下来,将反应混合物吸入测量室中,在此处,将微粒磁性捕获至电极的表面上。然后用ProCell/ProCell M(信号生成所必需的包含三丙基胺的缓冲溶液)除去未结合的物质。然后,向电极施加电压诱导化学发光发射,其通过光电倍增管测量。经由校准曲线测定结果,其为通过2-点校准专门生成的仪器(Ca11 = 包含抗弓形虫阴性的人血清的阴性校准物; Ca12 = 包含对于抗弓形虫IgG反应性的人血清的阳性校准物)。

[0107] 详细地,使用两种差异标记的重组Toxo-p30抗原特质,一种用BP-Ru标记,另一种用磺基-Ru(标记物的化学名称,参见实施例1)标记。使用两种重组Toxo-p30抗原特质来生成3种不同版本的Toxo IgG测定:

测定1:R2中使用的100%的重组Toxo-p30抗原用磺基-Ru标记

测定2:R2中使用的100%的重组Toxo-p30抗原用BP-Ru标记

测定3:已使用测定1 R2和测定2 R2的1 +1混合物(意指BP-Ru和磺基-Ru的混合物)。

BP-Ru和磺基-Ru对总体信号的信号贡献是相似的。

[0108] 根据制造商的说明,如果 < 1 IU/mL,则结果被解释为非反应性的;如果 ≥ 1 至 < 3 IU/mL,则为不确定的,并且如果 ≥ 3 IU/mL,则是反应性。用校准物和标准样品的结果显示于表3中。此外,用所有3种测定法检测在各自的测定变式中引起假阴性或假不确定结果的几种抗磺基-Ru和抗BP-Ru干扰样品(表4)。如所预期,抗磺基-Ru干扰样品在测定1中是假阴性或假不确定的,但在测定2中是正确不确定或正确阳性的。反之亦然,对于抗BPRu干扰样品干扰测定2也是如此。有趣的是,在含有BP-Ru和磺基 Ru的标记物混合物的测定3中,发现

所有样品是正确不确定或正确阴性的,意味着灵敏度的显著增加。

[0109] 引用的参考文献:

Ando等人 (2007), Intern Med. 46(15):1225

Buijs等人 (2011), Ann Clin Biochem. 48(Pt 3):276

DE 19519973 A1

DeForge (2010), J Immunol Methods. 362(1-2):70

Heijboer等人 (2009), Ann Clin Biochem.46(Pt 3):263

Klevenz等人, Cell Mol Life Sci. 2002, 59: 1993-1998

Park & Kricka (2013), Ch. 5.3- Interferences in Immunoassay, in The Immunoassay Handbook (第四版), 由David Wild编辑, Elsevier, Oxford: 403

Sapin等人 (2007), Clin Chern Lab Med. 45(3):416

Schiettecatte (2012), Interferences in Immunoassays, Advances in Immunoassay Technology, Dr. Norman H.L. Chiu (编)

WO 2016097116 A1

WO 2017093271 A1。

表 2: 用混杂物样品的结果(竞争性测定)

样品	测定 1-磺基-钌化的指定剂 (MAK<HAV>)			测定 2 - BP-钌化的指定剂 (MAK<HAV>)			测定 3-混合物(磺基-钌化的 指定剂(MAK<HAV>) + BP- 钌化的指定剂 (MAK<HAV>))		
	计数	COI	结果	计数	COI	结果	计数	COI	结果
抗 BP-Ru 干扰样品	159869	1.25	非反应性	50216	0.717	反应性	99017	1.04	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_0925	63520	0.497	反应性	86291	1.23	非反应性	77826	0.821	反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_2129	93909	0.735	反应性	85916	1.23	非反应性	99826	1.05	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_1262	94703	0.742	反应性	81018	1.16	非反应性	97326	1.03	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0207_0566	101832	0.797	反应性	78782	1.12	非反应性	100607	1.06	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_0724	105903	0.829	反应性	80791	1.15	非反应性	101139	1.07	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_2122	107407	0.841	反应性	84885	1.21	非反应性	106178	1.12	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_1230	108378	0.849	反应性	82170	1.17	非反应性	99824	1.05	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0207_0477	110320	0.864	反应性	85196	1.22	非反应性	109382	1.15	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_1267	110617	0.866	反应性	92156	1.32	非反应性	114060	1.20	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_1916	111650	0.874	反应性	84128	1.20	非反应性	112683	1.19	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_1745	112114	0.878	反应性	84520	1.21	非反应性	109502	1.16	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_1553	113528	0.889	反应性	72598	1.04	非反应性	96960	1.02	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_1817	117513	0.920	反应性	86872	1.24	非反应性	111157	1.17	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_0565	117666	0.921	反应性	87660	1.25	非反应性	107823	1.14	非反应性

抗磺基-Ru 干扰样品 PN0207_0593	119933	0.939	反应性	78713	1.12	非反应性	108002	1.14	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_1583	120282	0.942	反应性	78909	1.13	非反应性	106890	1.13	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_1984	121079	0.948	反应性	76967	1.10	非反应性	99293	1.05	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_1171	121810	0.954	反应性	71141	1.02	非反应性	96741	1.02	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_2091	122340	0.958	反应性	82940	1.18	非反应性	111595	1.18	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_0198	122619	0.960	反应性	87140	1.24	非反应性	114490	1.21	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206-1041	122734	0.985	反应性	82519	1.18	非反应性	101632	1.13	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_1637	123664	0.968	反应性	75914	1.08	非反应性	101700	1.07	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206-0124	124528	0.999	反应性	79108	1.13	非反应性	97853	1.09	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_1273	125034	0.979	反应性	89055	1.27	非反应性	117489	1.24	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_0260	125799	0.985	反应性	85140	1.22	非反应性	111152	1.17	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0206_0529	125911	0.986	反应性	85068	1.21	非反应性	108449	1.14	非反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 PN0207_0482	125949	0.986	反应性	85310	1.22	非反应性	113409	1.20	非反应性

表 3: 用校准物和标准样品的结果(DAGS 测定)

样品	测定 1-磺基-钆化的抗原(p30)		测定 2 - BP-钆化的抗原(p30)		测定 3-混合物(磺基-钆化的抗原(p30) + BP-钆化的抗原(p30))				
	计数	IU/mL	结果	计数	IU/mL	结果	计数	IU/mL	结果
Cal 1	596			578			596		
	613			582			573		
Cal 2	230736			137280			172190		
	228936			135030			170122		
PC 1	1392	1.10	不确定	1060	1.12	不确定	1171	1.10	不确定
PC 2	100729	52.7	反应性	57418	51.0	反应性	73030	51.5	反应性
NHS 3	589	<0.13	非反应性	594	<0.13	非反应性	585	<0.13	非反应性
NHS 4	587	<0.13	非反应性	552	<0.13	非反应性	553	<0.13	非反应性
NHS 5	591	<0.13	非反应性	548	<0.13	非反应性	554	<0.13	非反应性
HS 12	2593	2.29	不确定	1753	2.29	不确定	2074	2.31	不确定
HS 10	2608	2.31	不确定	1294	1.54	不确定	1707	1.84	不确定
HS 9	2631	2.33	不确定	1806	2.37	不确定	2158	2.41	不确定
HS 13	2721	2.41	不确定	1947	2.59	不确定	2249	2.52	不确定
HS 6	2743	2.43	不确定	1725	2.24	不确定	2075	2.31	不确定
HS 11	2780	2.46	不确定	1916	2.54	不确定	2270	2.54	不确定
HS 7	2807	2.49	不确定	1915	2.54	不确定	2318	2.60	不确定
HS 15	2835	2.51	不确定	1987	2.65	不确定	2297	2.58	不确定
HS 8	3082	2.73	不确定	1993	2.66	不确定	2447	2.76	不确定
HS 24	3591	3.17	反应性	2329	3.15	反应性	2788	3.15	反应性

HS 22	4766	4.14	反应性	3166	4.30	反应性	3793	4.25	反应性
HS 17	4797	4.16	反应性	3386	4.59	反应性	3988	4.46	反应性
HS 23	4817	4.18	反应性	3224	4.38	反应性	3852	4.32	反应性
HS 16	4883	4.23	反应性	3011	4.09	反应性	3625	4.08	反应性
HS 14	5110	4.41	反应性	3190	4.33	反应性	3980	4.45	反应性
HS 19	5323	4.57	反应性	3638	4.92	反应性	4247	4.73	反应性
HS 25	6630	5.56	反应性	4392	5.86	反应性	5314	5.80	反应性
HS 5	34145	21.9	反应性	18575	20.3	反应性	24184	21.0	反应性

抗磺基-Ru 干扰样品 HS 16 T2	1941	1.67	不确定	3100	4.21	反应性	2736	3.09	反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 HS 17 T2	1993	1.72	不确定	3465	4.69	反应性	2978	3.37	反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 HS 22 T2	2001	1.73	不确定	3298	4.48	反应性	2897	3.28	反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 HS 14 T2	2029	1.76	不确定	3192	4.34	反应性	2901	3.28	反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 HS 23 T2	2038	1.77	不确定	3246	4.41	反应性	2885	3.26	反应性
抗磺基-Ru 干扰样品 HS 25 T2	2626	2.32	不确定	4419	5.90	反应性	3896	4.36	反应性