

[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 200810213696.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 1/38 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月4日

[11] 公开号 CN 101377488A

[22] 申请日 2008.8.28

[21] 申请号 200810213696.0

[30] 优先权

[32] 2007.8.28 [33] US [31] 11/846390

[71] 申请人 奥索临床诊断有限公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 B·桑卡兰 S·S·萨利文

D·C·海恩斯 P·C·霍西默

G·伊尔伍德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 段晓玲 黄可峻

权利要求书2页 说明书12页 附图4页

[54] 发明名称

葡萄糖胺聚糖减少免疫测定中非特异性结合的应用

[57] 摘要

本发明涉及葡萄糖胺聚糖减少免疫测定中非特异性结合的应用。提供一种免疫测定试剂，其包含：稀释剂中的分析物结合剂，以及其量足以减少对分析物进行的样品测定中的非特异性结合的葡萄糖胺聚糖。在所提供的这种免疫测定试剂中，所述分析物是肌钙蛋白 I，所述分析物结合剂是生物素酰化的抗肌钙蛋白 I 抗体，以及所述葡萄糖胺聚糖是硫酸软骨素。还提供一种样品组合物，其包含待测定其中分析物的存在的样品、分析物结合剂和肝素以外的葡萄糖胺聚糖。进一步提供测定样品中分析物的方法，其中使用葡萄糖胺聚糖减少非特异性结合。

1. 一种免疫测定试剂，包含：
稀释剂中的分析物结合剂；以及
葡萄糖胺聚糖，其量足以减少对分析物进行的样品测定中的非特异性结合。
2. 如权利要求 1 所述的免疫测定试剂，其中所述葡萄糖胺聚糖是硫酸软骨素。
3. 如权利要求 2 所述的免疫测定试剂，其中所述硫酸软骨素存在的量为从约 0.25 mg/mL 到约 4 mg/mL。
4. 如权利要求 2 所述的免疫测定试剂，其中所述硫酸软骨素存在的量为约 1 mg/mL。
5. 如权利要求 1 所述的免疫测定试剂，其中所述分析物结合剂是抗体。
6. 如权利要求 1 所述的免疫测定试剂，其中所述分析物是肌钙蛋白 I。
7. 一种样品组合物，包含：
样品，其待测定其中分析物的存在；
分析物结合剂；以及
肝素以外的葡萄糖胺聚糖，其量足以减少对分析物进行的样品测定中的非特异性结合。
8. 如权利要求 7 所述的样品组合物，其中所述样品是血清样品。
9. 如权利要求 7 所述的样品组合物，其中所述样品是包含乙二胺四乙酸的血浆样品。
10. 如权利要求 7 所述的样品组合物，其中所述葡萄糖胺聚糖是硫酸软骨素。
11. 如权利要求 7 所述的样品组合物，其中所述分析物结合剂是抗体。
12. 如权利要求 7 所述的样品组合物，其中所述分析物是肌钙蛋白 I。
13. 一种测定样品中分析物的方法，所述方法包含：
将待测定其中分析物的存在的样品与葡萄糖胺聚糖和分析物结合剂结合，以便形成在所述样品中存在的任何分析物和所述分析物结

合剂的络合物，其中所述葡萄糖胺聚糖减少所述方法中的非特异性结合；以及

测定所形成的络合物以便测定所述分析物。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述样品与所述葡萄糖胺聚糖结合以及所形成的样品随后与所述分析物结合剂结合。

15. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述样品与所述分析物结合剂结合以及所形成的样品随后与所述葡萄糖胺聚糖结合。

16. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述分析物结合剂被作为包含稀释剂中的分析物结合剂和所述葡萄糖胺聚糖的免疫测定试剂提供，以及其中所述免疫测定试剂与所述样品结合。

17. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述分析物是肌钙蛋白 I。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其中所述葡萄糖胺聚糖是硫酸软骨素。

葡萄糖胺聚糖减少免疫测定中非特异性结合的应用

相关申请的交叉引用

[01] 无。

关于联邦资助研究的声明

[02] 无。

技术领域

[03] 本发明涉及免疫测定领域，更特定地涉及使用葡萄糖胺聚糖（glycosaminoglycan）来减少免疫测定中的非特异性结合。

背景技术

[04] 生化结合测定广泛应用于测定在生物样品中的分析物的存在和浓度。这种测定是基于结合伙伴的概念。相关分析物结合于分析物结合剂（例如，分析物的抗体或分析物的受体），因此所述分析物和所述分析物结合剂被称为“结合伙伴”。当结合伙伴中的一个结合于固相时，所述测定被称为异相测定（heterogeneous assay）。这种异相测定包括，例如夹层法、间接法和竞争的方法，在本领域中所有术语易于确认。

[05] 测定的灵敏度典型地指分析物的最小的量，当与缺少所述分析物时所获得的信号读取相比，所述分析物导致测定所产生的信号在统计学上的显著的变化。人们希望提高灵敏度，这是因为其允许分析物的量更小以及分析物的总体上的更为精密的测定。

[06] 非特异性结合指在应用固相的异相测定中结合伙伴的非特异性相互作用。非特异性结合通常减小所述异相测定的灵敏度，因此希望减少这种非特异性结合。

[07] 已知许多用于该方法的目的的方法。例如，蛋白质例如牛血清白蛋白（BSA）、明胶和酪蛋白已经加入到测定试剂中或预吸附到所述固相上来阻断非特异性结合的吸附位点。另外，文献已经报道了通常在高浓度下的各种表面活性剂的使用。

[08] 尽管这些技术可有助于减少一些非特异性吸收，但很多技术已经干扰了所需结合伙伴的特异性相互作用。这些技术也可引起在结合伙伴间所形成的络合物的置换。另外，尽管使用高浓度的蛋白质和

表面活性剂，大量的非特异性结合仍然典型地存在于很多异相测定中。确实需要在异相测定中的减少非特异性结合的替代性方法。

[09] 对于心肌肌钙蛋白 I 的测定特别如此，其中测定的分析物水平非常低，对于精确的和可用的结果来说提高灵敏度是必要的。心肌肌钙蛋白 I 测定有助于急性心肌梗塞的精确诊断和关于死亡率的风险、心肌梗塞或急需血管形成术操作的局部缺血事件的增加概率的具有急性心肌梗塞的非 ST 片段的患者的风险分层评定 (risk stratification)。

[10] 肌钙蛋白 I (TnI) 是通常在肌肉组织中连同肌钙蛋白 T 和肌钙蛋白 C 发现的蛋白质，调节肌动蛋白和肌球蛋白钙依赖性的相互作用 (Tobacman, *Annu Rev Physiol* 58:447-481, 1996)。三种同种型的 TnI 已经确定：一种与快缩骨骼肌相关，一种与慢缩骨骼肌相关，一种与心肌相关 (Wilkinson and Grand, *Nature* 271:31-35, 1978; Bodor, *J Clin Immunoassay* 17(1):40-44, 1994)。所述心肌肌钙蛋白 (cardiac) 形式在 N 端具有另外的 31 个氨基酸残基，且是在心肌中存在的仅有的肌钙蛋白亚型 (isoform) (Vallins 等, *FEBS Letts* 270(1,2):57-61, 1990)。

[11] 临床研究已经表明心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 在急性心肌梗塞 (AMI) 后的 4-6 小时的血流中是可测定的且此后的数天内是保持提高的 (Mair 等, *Clin Chem* 41(9):1266-1272, 1995; Larue 等, *Clin Chem* 39(6):972-979, 1993)。因此, cTnI 的提高掩盖了肌酸激酶-MB (CK-MB) 和乳酸脱氢酶的诊断的窗口 (Bodor, *J Clin Immunoassay* 17(1):40-44, 1994)。进一步的研究已经表明 cTnI 对于心肌损伤比 CK-MB 具有更好的临床专属性 (Adams 等, *Circulation* 88(1):101-106, 1993; Apple 等, *Clin Chim Acta* 237:59-66, 1995)。

[12] 由于其心脏的专属性和灵敏度, cTnI 已经用于评估具有不稳定心绞痛和非 ST 片段急性冠状动脉综合征 (ACS) 的患者的可靠的标记物。先前的对于具有 ACS 的患者的临床研究 (Lindahl 等, *J Am Coll Cardiol* 38:1497-1498, 2001; Venge 等, *Am J Cardiol* 89:1035-1041, 2002) 已经表明 cTnI 值的较小的增加提供了有关短期和长期死亡风险的重要的预后信息 (Galvani 等, *Circulation* 95:2053-2059, 1997; Antman 等, *N Eng J Med* 335:1342-1349, 1996; Ottani 等, *Am Heart J* 40:917-927, 2000; Heidenreich 等, *J Am Coll Cardiol* 38:478-485,

2001)。归根结底，预后的评估在鉴定最易于获益于特定治疗介入的患者中是有用的。

[13] 因此，需要 cTnI 的任何对于减少异相测定中非特异性结合的试剂和方法来使 cTnI 测定的灵敏度增加。

发明内容

[14] 为此目的，本发明提供了一种免疫测定试剂，其包含在稀释剂中的分析物结合剂，以及其量足以减少对分析物进行的样品测定中的非特异性结合的葡萄糖胺聚糖。

[15] 在本发明一个优选的实施例中，所述分析物是肌钙蛋白，所述分析物结合剂是抗肌钙蛋白 I 单克隆抗体，以及所述葡萄糖胺聚糖是硫酸软骨素。

[16] 进一步提供一种样品组合物，其包含待测定其中分析物的存在的样品、分析物结合剂和其量足以减少对分析物进行的样品测定中的非特异性结合的肝素以外的葡萄糖胺聚糖。

[17] 在本发明一个优选的实施方案中，所述样品是血清或 EDTA 血浆，所述分析物是肌钙蛋白，所述分析物结合剂是抗肌钙蛋白 I 单克隆抗体，以及所述葡萄糖胺聚糖是硫酸软骨素。

[18] 还提供测定样品中分析物的方法，使用葡萄糖胺聚糖以减少非特异性结合。所述方法包含将待测定其中分析物的存在的样品和葡萄糖胺聚糖和分析物结合剂结合，以便形成在所述样品中存在的任何分析物和所述分析物结合剂的络合物，其中所述葡萄糖胺聚糖减少所述方法中的非特异性结合；以及测定所形成的络合物以便测定所述分析物。在所述方法中，所述优选的分析物是肌钙蛋白，更优选地肌钙蛋白 I，所述优选的葡萄糖胺聚糖是硫酸软骨素。

[19] 本发明的另外的特征和优点在与下述附图结合说明时将是明显的。

附图说明

[20] 图 1 示出当将不同的糖掺加 (spike) 到去杂 (rogue) TropI 试样中时的 TropI 测定结果。

[21] 图 2 示出当 BJ 试剂在具有或不具有 EDTA 的情况下用 0、1、2 和 4mg/mL 的硫酸软骨素配置时的 TropI 测定结果。

[22] 图 3 示出在加入或不加入 0.5mg/mL 的 CSC 到所述 BJ 试剂

中的情况下的 TropI 测定结果。

[23] 图 4 示出在 BJ 试剂相比于试剂盒批次（无硫酸软骨素）用不同的硫酸软骨素异构体配置时的 TropI 测定结果；以及

[24] 图 5 图示心肌钙蛋白 I 测定的原理。

具体实施方式

[25] 本发明提供一种免疫测定试剂，其包含在稀释剂中的分析物结合剂，以及其量足以减少对分析物进行的样品测定中的非特异性结合葡萄糖胺聚糖。

[26] 如上所述，通常需要确定生物样品中的分析物的存在和浓度。分析物是在分析过程（诸如免疫测定）中所测定的物质和化学成分。免疫测定是基于所述结合伙伴的概念。相关分析物结合于分析物结合剂（例如，分析物的抗体或分析物的受体），因此所述分析物和所述分析物结合剂被称为“结合伙伴”。

[27] 在许多免疫测定中，所述分析物结合剂是抗体。通常在稀释剂例如磷酸钾缓冲液中提供这种抗体。所述抗体可属于任何免疫球蛋白类型，包括例如 IgG 或 IgM。所述抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。在夹层类型的免疫测定中，可使用抗体或固定在固相上的抗体捕获所述分析物。这种固定化作用能够用本领域中公知的技术完成，所述技术包括使用生物素标记的捕获抗体所连接的抗生蛋白链菌素涂覆的（SAC）固相。样品中存在的相关分析物连接于固定化的捕获抗体，然后标记的抗体又结合至所述捕获的分析物。所述标记可以是本领域中任何公知的，包括例如辣根过氧化物酶和碱性磷酸酯酶。测定的信号然后指示样品存在的分析物的量。所述测定方法将依赖于所选标记的类型，如本领域中所公知的，可包括比色法、荧光法和化学发光法。

[28] 本发明优选的葡萄糖胺聚糖（GAG）是硫酸软骨素，但是也能够使用其它 GAG。这些其它 GAG 包括透明质酸盐（也叫玻璃酸）、硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素和硫酸角质素。所述硫酸软骨素能够是硫酸软骨素 A、硫酸软骨素 B（现在称为硫酸皮肤素）、硫酸软骨素 C 或其混合物。

[29] 葡萄糖胺聚糖（GAG）或粘多糖是包含重复的二糖单元的长无支链多糖。所述二糖单元包含两个修饰的糖的一个、N-乙酰半乳糖

胺 (GalNAc) 或 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 和糖醛酸例如葡萄糖醛酸盐或艾杜糖醛酸盐。所述透明质酸盐由 D-葡萄糖醛酸盐和 GlcNAc 组成。所述硫酸皮肤素由 D-葡萄糖醛酸 (GlcA) 或 L-艾杜糖醛酸盐 (IdoA) 和 GalNAc 硫酸盐组成。硫酸皮肤素的不均一性引起 O-硫酸盐化作用的变化程度和两种糖醛酸的存在。硫酸软骨素由 D-葡萄糖醛酸和 GalNAc-6 (或 4)-硫酸盐组成。肝素和硫酸乙酰肝素由 D-葡萄糖醛酸盐-2-硫酸盐和 N-硫代-D-氨基葡萄糖-6-硫酸盐 (乙酰肝素的硫酸根比肝素少) 组成。硫酸角质素由半乳糖和半乳糖-6-硫酸盐和 GlcNAc-6-硫酸盐组成。

[30] 硫酸软骨素 (CS) 是硫酸化的葡萄糖胺聚糖。软骨素链具有超过 100 个独立的葡萄糖，其每一个能够在可变的位置和以可变的量硫酸化。硫酸软骨素 A 指 GalNAc 糖 (软骨素-4-硫酸盐) 主要在 4 位碳被硫酸化的 CS。硫酸软骨素 B 现在称为硫酸皮肤素。硫酸软骨素 C 指 GalNAc 糖 (软骨素-6-硫酸盐) 主要在 6 位碳被硫酸化的 CS。硫酸软骨素 D 指 GlcA 主要在 2 位碳和 GalNAc 糖 (软骨素-4, 6-硫酸盐) 主要在 6 位碳被硫酸化的 CS。

[31] 提供其量足以减少对分析物进行的样品测定中的非特异性结合的葡萄糖胺聚糖。如果所述 GAG 为硫酸软骨素，所述量优选地为从约 0.25 mg/mL 到约 4 mg/mL (相当于约 0.025% 到约 0.4%)。在一个特定的实施方案中，硫酸软骨素的量为 1 mg/mL (相当于 0.1%)。根据本发明，所述实施例按照如何确定所应用的 GAG 合适的量的细节。

[32] 待测定其中分析物的存在的样品能够是任何合适的样品，优选地是血清或血浆样品。血浆是血细胞悬浮在其中的血液的流体成分。离心是从血液样品的血细胞中分离血浆的简单的方法。血清是指通过在分离流体成分前使血液凝结，其中的凝固因子自然去除的血浆。血浆样品是从含有抗凝血剂的输血导管中获得的，抗凝血剂如肝素钠、枸橼酸钠、氟化钠以及草酸钾或钾 EDTA (乙二胺四乙酸)。在根据本发明的血浆样品的情况中，血浆优选使用肝素以外的抗凝剂来获得。

[33] 在一个实施方案中，本发明的免疫测定试剂包含稀释剂中对于心肌钙蛋白 I 来说特异性的单克隆抗体和 0.1% 硫酸软骨素。对于

心肌肌钙蛋白 I 的适合的抗体在本领域中是公知的，经常推荐抗体的特定的对和组合作为测定伙伴。本文中具有特定用途的抗体是单克隆抗体，其作为双捕获抗体被指定为 19C7 和 24-40，用连接于抗生蛋白链菌素涂覆的孔的生物素标记，以及作为测定抗体被指定为 16A11 的抗体，用辣根过氧化物酶标记。这些抗体可通过商业获得（见下列的参考）及通过心肌肌钙蛋白 I 测定相关的文献来讨论和生物素酰化的和标记的过程也在本领域中是公知的。

[34] 以上讨论涉及包含其量足以减少非特异性结合的葡萄糖胺聚糖的免疫测定试剂。所述 GAG 可存在于包含所述抗体的稀释剂中。另外，可将所述 GAG 加入到样品组合物中，分析物结合剂随后加入到其中。合并的顺序可以改变，只要在样品中任何分析物与所述分析物结合剂的非特异性结合之前加入所述 GAG。

[35] 因此，进一步提供样品组合物，其包含：待测定其中分析物的存在的样品、分析物结合剂和其量足以减少对分析物进行的样品测定中的非特异性结合的除肝素外的葡萄糖胺聚糖。

[36] 在一个优选的实施方案中，所述样品是血清或 EDTA 血浆，所述分析物是肌钙蛋白，所述分析物结合剂是抗肌钙蛋白 I 单克隆抗体，以及所述葡萄糖胺聚糖是硫酸软骨素。

[37] 也提供了测定样品中分析物的方法，包括：将待测定其中分析物的存在的样品与葡萄糖胺聚糖和分析物结合剂结合，以便形成样品中的任何分析物与分析物结合剂的络合物，其中所述葡萄糖胺聚糖减少所述方法中的非特异性结合；以及测定所形成的络合物以便测定所述分析物。在一个实施方案中，所述样品与所述葡萄糖胺聚糖结合以及所生成的样品随后与所述分析物结合剂结合。在另一实施方案中，所述样品与所述分析物结合剂结合以及所生成的样品随后与所述葡萄糖胺聚糖结合。在又一个实施方案中，提供所述分析物结合剂作为免疫测定试剂，其包含所述在稀释剂中的分析物结合剂和所述葡萄糖胺聚糖，以及所述免疫测定试剂与所述样品结合。在这些方法的每一个中，所述优选的分析物是肌钙蛋白，更为优选地是肌钙蛋白 I，以及所述优选的葡萄糖胺聚糖是硫酸软骨素。

[38] 在本发明的样品组合物和方法中，所述各种适合的分析物结合剂、稀释剂、葡萄糖胺聚糖、样品和分析物如以上关于免疫测定试

剂所讨论。

[39] 本发明的所述试剂、组合物和方法对于心肌肌钙蛋白 I 的免疫测定尤其有效。在下述的实施例中提供该实施方案的进一步细节。

实施例 I 向心肌肌钙蛋白 I (cTnI 或 TropI) 测定捕获 (BJ) 和测定 (CJ) 试剂加入肝素的作用

[40] 本实验的目的是测定向 TropI BJ 和/或 CJ 试剂加入肝素是否减弱 TropI 假阳性结果。得到血清样品中肌钙蛋白 I 的重复的不真实提高的多个报告。也得到了在 EDTA 血浆中不真实提高的 TropI 结果的若干报告。在一些情况中，从同样的患者得到的相配的肝素血浆试样没有显示不真实提高的 TropI 结果。

[41] 实验包括向 BJ 和 CJ 试剂掺加肝素，随后使用这些试剂的测定用先前已经表现阳性 Trop 结果的 TropI 样品进行。

[42] 结果表明肝素掺加入 TropI CJ 以及发现立即运行严重地降低了回复信号。在每 mL 的 CJ 的仅 10 个单元中，所述恢复的 Cal 2 (校准器 2) 信号少于正常的 50%。相反，肝素血浆中的肝素水平典型地为 25-50 单位/mL。要达到由 CJ 试剂传送的肝素的相等的浓度，将需要肝素为 50-100 单位/mL 的水平。基于这些反应，向水平等同于肝素化的血浆的 CJ 中加入肝素是可行的。

[43] 先前已经表现假阳性 TropI 结果的去杂血清试样嵌板的应用，用每 mL 包含 10 个单位的 CJ 溶液进行测定。这些去杂试样表现了 cTnI (心肌肌钙蛋白 I) 浓度的显著的降低。未处理的试样的回收率为 8-35%，其被发现具有 0.7-7.0% 的表观浓度。然而，这些试样中没有完全校正到低于血清参考上限 (URL)。

[44] 该实验的结果导致如下结论：加入到所述 CJ 组分中的肝素引起对于所述试剂的总体信号容量的实质性减少。在每 mL 10 个单位的肝素浓度下，所述信号仅为正常的 50%。然而，去杂患者试样通过向 CJ 加入该水平的肝素被部分校正。然而，本文中更完全的校正可能需要高水平的肝素，其可能将所述测定信号减少到与测定设计的不相容的水平。

实施例 II BJ 试剂中作为样品校正因子的糖的作用

[45] 本实施例的目的是评估糖的能力，例如存在于葡萄糖胺聚糖中的和典型地与辣根过氧化物酶的侧链相关的、来减轻加入到所述

BJ 试剂中的去杂 TropI 样品的作用。

[46] 如实施例 I 所述，加入到去杂样品中的肝素表现为减轻假阳性的结果。肝素是许多直链阴离子粘多糖的异种集合，被称为葡萄糖胺聚糖 (GAG)，其具有抗凝血特性。尽管其它种类可能出现，肝素中主要的糖是 α -L-艾杜糖醛酸 2-硫酸盐、2-脱氧-2-磺氨基- α -D-葡萄糖 6-硫酸盐、 β -D-葡萄糖醛酸、2-乙酰氨基-2-脱氧- α -D-葡萄糖和 α -L-艾杜糖醛酸。

[47] 作为可能的样品校正因子的起始筛选，下列糖被掺加到去杂 TropI 样品中 (以获得测定物质的 2mg/mL 的最终浓度) 来阻断假阳性反应效应：N-乙酰-葡糖胺 (Sigma A8625)、N-乙酰-半乳糖胺 (Sigma A2795)、葡萄糖胺 (Sigma G4875)、N-乙酰神经氨酸 (NANA，唾液酸) (Sigma A0812)、硫酸软骨素 C (Sigma C4384)、甲壳质 (N-乙酰-葡萄糖胺的均聚物) (Sigma C9752)、粘蛋白 (NANA 的聚合物) (Sigma M3895) 和甘露糖 (Sigma M8296)。在初始筛选中的硫酸软骨素 C (CSC) 被发现显著地减小了假阳性 (见图 1)。明显的 TropI 结果在所有而不是一个去杂样品中被普遍地抑制到 URL 以下。所述后者样品对于嗜异染抗体是阳性的。

[48] 基于这些起始筛选研究，进行随后的实验，其中硫酸软骨素 C (CSC) 以一系列增加的水平 (0.25、0.5、1、2、3 和 4 mg/ml) 被直接加入到所述 BJ 试剂中，其中在 BJ 试剂中具有或不具有 EDTA (5.58/mL) (见图 2 和 3 中)。所述组分的效用基于结合于参考校准器反应中的变化的评估的 TropI 去杂样品的阻断。有效地抑制所述去杂 TropI 样品的 CSC 的最低浓度表现为 0.25mg/mL；在稍高的 CSC 水平 (0.5mg/mL) 下，存在略微提高的阻断。由于具有额外试剂添加剂的 EDTA 的存在或不存在的影响不是显著的。

[49] 向 BJ 组分添加 0.25-0.5mg/mL 的 CSC 对于阴性或阳性血清池 (serum pool) 对照具有不显著的影响。另外，参考校准器响应表明了对于低水平 CSC 的微小的变化。在高于 1mg/mL 的 CSC 水平下，具有典型的 10-30% 的响应的减少。

[50] 本实验的结果引起的结论为硫酸软骨素 C 对于减少证明一些血清和 EDTA 血浆试样的非特异性背景反应 (非特异性结合) 是有效的阻断试剂。虽然最低测定水平 (0.25mg/mL) 表明了表观假阳性

反应的显著的减少，但略高的水平（0.5mg/mL）可提供对于可含有较高水平的干扰物的另外的安全性的测定。在 CSC 存在下的 EDTA 水平不具有对于去杂样品的显著的影响。

[51] 观测向 BJ 试剂加入 CSC，其具有使用 TropI 参考校准器时的对于全部剂量-应答关系的最低的有害影响。穿过全部八个参照校准器，所述由至多 1mg/mL 的 CSC 浓度所引起变化一般少于 10%。因此，所述向 0.25-0.50mg/mL 浓度的 BJ 组分加入 CSC，可期望其对于参考校准器具有很少或没有显著影响。

实施例III 在 BJ 中具有 0.05% CSC 的去杂样品

[52] 所述实验的目的是使用 BJ 中 0.5mg/mL（0.05%）CSC 测定去杂样品。在无 CSC 加入时所述去杂样品预测为正，及具有 0.05% CSC 加入到所述生物素稀释剂时所述去杂样品预测为负。0.05% CSC 的加入对于正和负样品的预测没有影响。其结果在图 3 中表明。

实施例IV 软骨素 A、B 和 C 的比较性能

[53] 本实验的目的是确定是否任何硫酸软骨素的异构体可提供对去杂样品的保护。在上述实验中使用所述硫酸软骨素 C 是具有一些硫酸软骨素 A 的硫酸软骨素 C 的混合物。混合物中硫酸软骨素 C 的最低量是 85%。因为存在的所述 A 异构体可至多为 15%，所述 A、B 和 C 异构体用来测定功效。

[54] 所得结果表明硫酸软骨素的全部异构体在减少所述去杂样品的观测浓度上是成功的，没有有关假阳性抑制的异构体间的显著的差异（见图 4）。这引起了以下结论：在异构体 A 和 B 的所述浓度的范围下硫酸软骨素的百分纯度对于所述假阳性抑制没有影响。

实施例V 心肌肌钙蛋白 I 测定

[55] 使用免疫测定的免疫测定技术（见图 5），其包括存在于具有生物素基化抗体的样品中的心肌肌钙蛋白 I 的联立反应（小鼠单克隆抗 cTnI:克隆 19c7，其识别肌钙蛋白 I 的氨基酸 41-49 及特异于包含氨基酸 24-40 的肌钙蛋白 I 区域的第二克隆）以及辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗体结合物（小鼠单克隆抗 cTnI:克隆 16A11，其识别肌钙蛋白 I 的氨基酸 87-91）。所述生物素酰化的肌钙蛋白单克隆抗体特异地与样品中的肌钙蛋白 I 反应来形成结合于 SAC 孔的抗原蛋白链菌素的络合物。未结合的材料通过洗涤而去除，所述肌钙蛋白络合物用所述

HRP 标记的单克隆抗体（其特异地结合于肌钙蛋白 I 的不同于生物素酰化单克隆抗体所结合的抗原表位）测定。所述结合的 HRP 结合物是通过发光反应来测定的。向孔中加入含有发光物质的试剂（氨基苯二酰一胍衍生物和过酸盐）和电子转移试剂。在结合物中的 HRP 催化氨基苯二酰胍衍生物的氧化，产生光。所述电子转移试剂（取代的乙酰苯胺）提高了所产生的光的水平及延长了其放射。所述光信号由 VITROS™ 免疫诊断系统（Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ）所读取。HRP 结合物的量正比于 cTnI 的浓度。

[56] 所述测定步骤如下：1) 向 SAC 孔加入：80μL 样品、35μL 生物素试剂（BJ）和 35μL 结合物试剂（CJ）；2) 培养 10 分钟 40 秒；3) 洗涤所述 SAC 孔；4) 加入 200μL 信号试剂并测定光发射。

[57] 所述 SAC 孔是通过用抗生蛋白链菌素涂覆聚苯乙烯孔而制造的。简单而言，所述聚苯乙烯孔首先用 3.5MRad 照射来使蛋白质吸收最优化。在所述聚苯乙烯孔上涂覆生物素酰化的牛血清白蛋白（B-BSA），其是通过将生物素化学偶联到使用商业可得的活化酯（生物素-XX-NHS, Calbiochem, 英国，诺丁汉）的 BSA 而制造的。通过用 B-BSA 溶液培养所述孔 10 分钟来完成涂覆。所述 B-BSA 是通过物理吸附而不是共价结合到聚苯乙烯表面上的。在用抗生蛋白链菌素覆盖前洗涤所述孔。通过培养抗生蛋白链菌素溶液 50 分钟来将抗生蛋白链菌素涂覆到具有生物素覆盖的表面的孔上。在抗生蛋白链菌素和生物素之间的相互作用是非共价的，但是特别强（ 10^{15} L/mol）。在干燥和保存之前洗涤所述孔。

[58] 抗生蛋白链菌素对于生物素具有四个结合位点，这样抗生蛋白链菌素在固定到表面上后还具有三个未占据的生物素结合为位点。这些结合位点能够作用于测定的生物素酰化的组分。

[59] 所述结合试剂（CJ）包含下列组分：

| <u>组分</u> | <u>量 g/L</u> |
|---------------------------------|--------------|
| 水 | 849.3 |
| K ₂ HPO ₄ | 13 |
| KH ₂ PO ₄ | 17 |
| 异噻唑啉酮 | 20 |
| 30% BSA | 100 |

| | |
|-----------------------|-------|
| HRP 标记的单克隆抗体 16A11 克隆 | 4mg/L |
| pH | 6.6 |

[60] 所述测定和捕获试剂 (BJ) 包含下列组分:

| <u>组分</u> | <u>量 g/L</u> |
|---------------------------------|--------------|
| 水 | |
| K ₂ HPO ₄ | 13 |
| KH ₂ PO ₄ | 17 |
| 异噻唑啉酮 | 20 |
| 30%牛血清白蛋白 | 100 |
| EDTA (等摩尔的二钠和三钠) | 15mM |
| 硫酸软骨素 C | 1 |
| 生物素酰化的单克隆抗体 24-40aa 特异克隆 | 5.5mg/L |
| 生物素酰化的单克隆抗体 19C7 克隆 | 3mg/L |
| pH | 6.6 |

[61] 所述单克隆抗体是商业上可获得的。HyTest 有限公司 (Itainen Pitkakatu 4C, Pharma City, Torku, 芬兰 20520) 是小鼠单克隆抗体克隆 19C7 (特异于包含氨基酸 41-49 的肌钙蛋白 I 的区域) 的供应商。该单克隆抗体是按如下所述被生物素酰化的。HyTest 也是小鼠单克隆抗体克隆 16A11 的供应商 (特异于包含氨基酸 87-91 的肌钙蛋白 I 的区域)。该单克隆抗体是按如下所述被 HRP 标记的。Strategic BioSolutions (111 Pencader Dr., 纽瓦克, 特拉华州, 美国 19702) 是小鼠单克隆抗体克隆 (特异于包含氨基酸 24-40 的肌钙蛋白 I 的区域) 的供应商。该单克隆抗体是按如下所述被生物素酰化的。

[62] 该生物素酰化过程包括如下: 所述 19C7 克隆和 Strategic BioSolutions 24-40 定向的克隆使用公知的区域特异性化学分别结合于生物素。

[63] 所述 HRP 标记过程包括如下: 所述来自 HyTest 的 16A11 克隆使用下列方法结合于 HRP: 1) 所述单克隆抗体用与硫代-SMCC [硫代琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸盐] 反应的顺丁烯二酰亚胺基团活化; 2) 所述 HRP 用与 NHS-SATA [*s*-乙酰基硫代乙酸 N-羧基琥珀酰亚胺] 反应的硫醇基活化; 3) 纯化两个活化试剂而后相互作用一起产生 16A11-HRP, 其随后被纯化。

[64] 虽然已陈述本发明的实施方案，但是可以理解的是，因为本领域技术人员可做修改，尤其是借助上述叙述，因此本发明不限于所述实施方案。在不偏离本发明主旨的情况下，在本发明上述公开的范围内可做合理的变化和修改。

| | 纯 | Cond #1 | Cond #2 | Cond #3 | Cond #4 | Cond #5 | Cond #6 | Cond #7 | Cond #8 |
|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | β-乙酰基-葡萄糖胺 | β-乙酰基-葡萄糖胺 | 葡萄糖胺 | β-乙酰神经氨酸 | 硫酸软骨素c | 甲壳质 | 粘蛋白 | 甘露糖 |
| | Pred. Conc. | Pred. Conc. | Pred. Conc. | Pred. Conc. | Pred. Conc. | Pred. Conc. | Pred. Conc. | Pred. Conc. | Pred. Conc. |
| NEG POOL | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| NEG POOL | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| POS POOL | 4.63 | 4.18 | 4.08 | 3.96 | 3.70 | 3.54 | 3.61 | 3.57 | 3.58 |
| POS POOL | 4.64 | 4.19 | 3.94 | 3.99 | 3.67 | 3.55 | 3.67 | 3.60 | 3.61 |
| TC0005 | 0.52 | 0.48 | 0.45 | 0.44 | 0.45 | 0.01 | 0.44 | 0.44 | 0.46 |
| TC0005 | 0.58 | 0.54 | 0.45 | 0.48 | 0.40 | 0.02 | 0.40 | 0.37 | 0.44 |
| 58413 | 0.80 | 0.48 | 0.63 | 0.58 | 0.62 | 0.00 | 0.68 | 0.47 | 0.56 |
| 58413 | 0.83 | 0.62 | 0.62 | 0.60 | 0.61 | 0.00 | 0.64 | 0.47 | 0.56 |
| 58732 | 5.49 | 4.67 | 4.93 | 4.50 | 4.96 | 0.11 | 5.08 | 4.76 | 4.91 |
| 58732 | 4.64 | 4.98 | 4.07 | 4.20 | 4.50 | 0.10 | 4.51 | 4.37 | 4.16 |
| 58201 | 1.95 | 1.83 | 1.76 | 1.76 | 2.20 | 0.00 | 2.23 | 1.86 | 1.87 |
| 58201 | 2.01 | 2.19 | 2.05 | 1.95 | 2.09 | 0.00 | 1.87 | 1.98 | 1.63 |
| 5654 | 0.88 | 0.76 | 0.80 | 0.85 | 0.90 | 0.20 | 1.00 | 0.41 | 0.93 |
| 5654 | 0.88 | 1.01 | 0.81 | 0.84 | 0.82 | 0.20 | 0.83 | 0.43 | 0.85 |
| 5345 | 1.08 | 1.02 | 0.98 | 0.91 | 1.09 | 0.08 | 0.97 | 0.70 | 1.01 |
| 5345 | 1.10 | 1.10 | 0.96 | 1.00 | 0.91 | 0.08 | 0.96 | 0.50 | 0.92 |
| 52674 | 1.19 | 1.04 | 1.13 | 1.07 | 1.15 | 0.00 | 1.20 | 0.64 | 1.19 |
| 52674 | 1.11 | 1.49 | 1.03 | 0.98 | 0.99 | 0.01 | 1.13 | 0.64 | 1.12 |
| 5686 | 1.10 | 1.11 | 1.15 | 1.06 | 1.07 | 0.00 | 1.14 | 0.60 | 1.24 |
| 5686 | 1.18 | 1.24 | 1.13 | 1.08 | 1.02 | 0.00 | 1.23 | 0.63 | 1.06 |

图1

| | 条件 1 | | 条件 2 | | 条件 3 | | 条件 4 | | 条件 5 | | 条件 6 | | 条件 7 | |
|----------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|
| | AU | Tcpd (ng/mL) | AU | Tcpd (ng/mL) | AU | Tcpd (ng/mL) | AU | Tcpd (ng/mL) | AU | Tcpd (ng/mL) | AU | Tcpd (ng/mL) | AU | Tcpd (ng/mL) |
| MNS1 | 2915 | 0.52 | 2939 | 0.57 | 2380 | 0.59 | 2725 | 0.51 | 2782 | 0.55 | 2083 | 0.57 | 2967 | 0.52 |
| MNS2 | 110800 | 7.28 | 10522 | 7.71 | 56641 | 8.08 | 108737 | 7.44 | 100092 | 7.34 | 92234 | 7.84 | 118284 | 7.31 |
| MNS3 | 198847 | 11.17 | 198847 | 12.16 | 118284 | 9.29 | 194708 | 11.66 | 18202 | 11.38 | 188957 | 12.34 | 203761 | 11.10 |
| Neg/posd | 1.52 | 0.00 | 1.21 | 0.00 | 1.47 | 0.00 | 1.44 | 0.00 | 1.53 | 0.00 | 1.32 | 0.00 | 1.70 | 0.00 |
| Res/posd | 35224 | 3.13 | 36455 | 3.33 | 34808 | 3.68 | 38254 | 3.37 | 39103 | 3.47 | 35050 | 3.80 | 35260 | 2.95 |
| Y0006 | 468 | 0.11 | 414 | 0.12 | 408 | 0.13 | 320 | 0.07 | 312 | 0.07 | 282 | 0.06 | 874 | 0.21 |
| 58403 | 1.95 | 0.02 | 2.01 | 0.03 | 1.92 | 0.02 | 2.23 | 0.03 | 1.89 | 0.02 | 1.66 | -0.02 | 10.68 | 0.25 |
| 5872 | 8.72 | 0.21 | 5.91 | 0.18 | 4.38 | 0.15 | 12.07 | 0.23 | 8.36 | 0.23 | 6.67 | 0.24 | 163.28 | 1.88 |
| 59201 | 1.74 | 0.01 | 1.93 | 0.00 | 1.66 | 0.00 | 1.72 | 0.00 | 1.57 | 0.00 | 1.56 | -0.03 | 57.39 | 0.81 |
| 5664 | 1307 | 0.29 | 8.21 | 0.24 | 5.31 | 0.19 | 26.73 | 0.50 | 24.11 | 0.50 | 10.60 | 0.36 | 57.62 | 0.81 |
| 5945 | 7.14 | 0.17 | 6.43 | 0.19 | 4.74 | 0.16 | 7.10 | 0.18 | 7.03 | 0.20 | 5.51 | 0.19 | 66.40 | 0.89 |
| 5886 | 4.71 | 0.11 | 5.34 | 0.16 | 2.95 | 0.08 | 2.79 | 0.05 | 3.10 | 0.07 | 2.75 | 0.06 | 49.65 | 0.73 |
| 59574 | 380 | 0.08 | 4.42 | 0.13 | 3.25 | 0.10 | 4.12 | 0.10 | 4.07 | 0.11 | 3.89 | 0.11 | 24.74 | 0.46 |
| CS | 1ng/mL | 1ng/mL | 2ng/mL | 2ng/mL | 4ng/mL | 4ng/mL | 1ng/mL | 1ng/mL | 2ng/mL | 2ng/mL | 4ng/mL | 4ng/mL | 0ng/mL | 0ng/mL |
| ET/A | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - |

图2

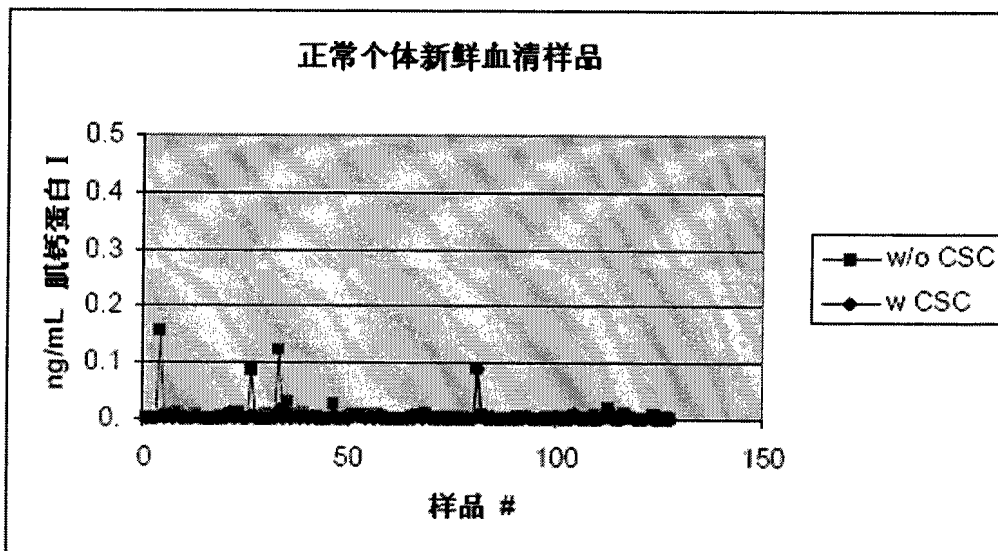


图3

| CONC. | 试剂盒批次 | | | PredConc |
|-------|-------|-------|-------|----------|
| | CS-A | CS-B | CS-C | |
| 7003 | 0.002 | 0.002 | 0.004 | 0.000 |
| 7009 | 0.005 | 0.005 | 0.004 | 0.338 |
| 7011 | 0.005 | 0.003 | 0.005 | 0.000 |
| 7015 | 0.012 | 0.011 | 0.010 | 0.000 |
| 7027 | 0.007 | 0.006 | 0.008 | 0.002 |
| 7029 | 0.006 | 0.004 | 0.005 | 0.095 |
| 7036 | 0.006 | 0.007 | 0.005 | 0.000 |
| 7041 | 0.005 | 0.005 | 0.004 | 0.000 |
| 7047 | 0.005 | 0.006 | 0.005 | 0.004 |
| 7063 | 0.004 | 0.005 | 0.004 | 0.704 |
| 7065 | 0.026 | 0.024 | 0.024 | 0.113 |
| 7066 | 0.005 | 0.004 | 0.005 | 0.177 |
| 7076 | 0.013 | 0.012 | 0.014 | 0.117 |
| 7084 | 0.007 | 0.005 | 0.006 | 0.383 |
| 7086 | 0.006 | 0.005 | 0.004 | 0.083 |
| 7115 | 0.036 | 0.036 | 0.032 | 0.175 |
| 7116 | 0.010 | 0.008 | 0.009 | 0.090 |
| 7134 | 0.007 | 0.005 | 0.006 | 0.238 |
| 7180 | 0.007 | 0.007 | 0.006 | 0.123 |
| 7193 | 0.006 | 0.005 | 0.007 | 0.084 |

图4

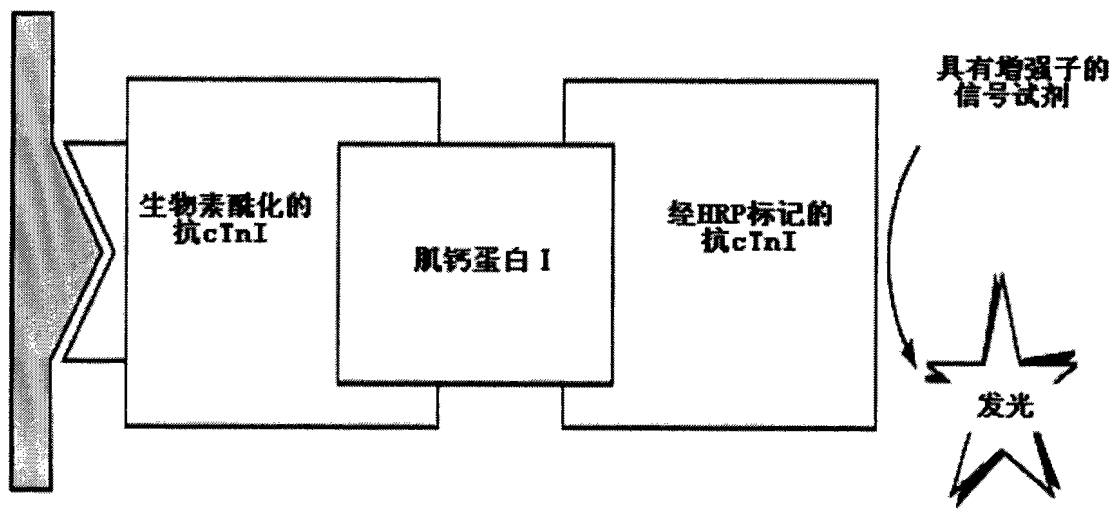


图5

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 葡萄糖胺聚糖减少免疫测定中非特异性结合的应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN101377488A | 公开(公告)日 | 2009-03-04 |
| 申请号 | CN200810213696.0 | 申请日 | 2008-08-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 奥索临床诊断有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 奥索临床诊断有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 奥索临床诊断有限公司 | | |
| [标]发明人 | B桑卡兰 SS萨利文 DC海恩斯 PC霍西默 G伊尔伍德 | | |
| 发明人 | B·桑卡兰 S·S·萨利文 D·C·海恩斯 P·C·霍西默 G·伊尔伍德 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N1/38 | | |
| CPC分类号 | G01N33/6887 G01N33/5306 G01N33/54393 Y10T436/25 | | |
| 代理人(译) | 段晓玲 | | |
| 优先权 | 11/846390 2007-08-28 US | | |
| 其他公开文献 | CN101377488B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及葡萄糖胺聚糖减少免疫测定中非特异性结合的应用。提供一种免疫测定试剂，其包含：稀释剂中的分析物结合剂，以及其量足以减少对分析物进行的样品测定中的非特异性结合的葡萄糖胺聚糖。在所提供的这种免疫测定试剂中，所述分析物是肌钙蛋白I，所述分析物结合剂是生物素酰化的抗肌钙蛋白I抗体，以及所述葡萄糖胺聚糖是硫酸软骨素。还提供一种样品组合物，其包含待测定其中分析物的存在的样品、分析物结合剂和肝素以外的葡萄糖胺聚糖。进一步提供测定样品中分析物的方法，其中使用葡萄糖胺聚糖减少非特异性结合。

| | Cond #1 | | Cond #2 | | Cond #3 | | Cond #4 | | Cond #5 | | Cond #6 | | Cond #7 | | Cond #8 | |
|----------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 |
| | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 | 糖 |
| NEG POOL | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| NEG POOL | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| POS POOL | 4.83 | 4.18 | 4.06 | 3.96 | 3.70 | 3.54 | 3.61 | 3.57 | 3.58 | 3.57 | 3.57 | 3.57 | 3.57 | 3.57 | 3.57 | 3.57 |
| POS POOL | 4.84 | 4.19 | 3.94 | 3.89 | 3.67 | 3.55 | 3.67 | 3.67 | 3.67 | 3.67 | 3.67 | 3.67 | 3.67 | 3.67 | 3.67 | 3.67 |
| TC0005 | 0.52 | 0.48 | 0.45 | 0.44 | 0.45 | 0.01 | 0.44 | 0.44 | 0.44 | 0.44 | 0.44 | 0.44 | 0.44 | 0.44 | 0.44 | 0.44 |
| TC0005 | 0.58 | 0.54 | 0.45 | 0.48 | 0.49 | 0.02 | 0.49 | 0.49 | 0.49 | 0.49 | 0.49 | 0.49 | 0.49 | 0.49 | 0.49 | 0.49 |
| 58413 | 0.80 | 0.48 | 0.63 | 0.58 | 0.62 | 0.00 | 0.68 | 0.47 | 0.58 | 0.47 | 0.58 | 0.47 | 0.58 | 0.47 | 0.58 | 0.47 |
| 58413 | 0.83 | 0.62 | 0.62 | 0.60 | 0.61 | 0.00 | 0.64 | 0.47 | 0.58 | 0.47 | 0.58 | 0.47 | 0.58 | 0.47 | 0.58 | 0.47 |
| 58732 | 5.48 | 4.67 | 4.83 | 4.50 | 4.36 | 0.11 | 5.08 | 4.76 | 4.91 | 4.76 | 4.91 | 4.76 | 4.91 | 4.76 | 4.91 | 4.76 |
| 58732 | 4.84 | 4.98 | 4.07 | 4.20 | 4.50 | 0.10 | 4.51 | 4.37 | 4.18 | 4.37 | 4.18 | 4.37 | 4.18 | 4.37 | 4.18 | 4.37 |
| 58201 | 1.95 | 1.83 | 1.76 | 1.76 | 2.20 | 0.00 | 2.22 | 1.86 | 1.87 | 1.86 | 1.87 | 1.86 | 1.87 | 1.86 | 1.87 | 1.86 |
| 58201 | 2.01 | 2.19 | 2.05 | 1.95 | 2.08 | 0.00 | 1.87 | 1.98 | 1.83 | 1.98 | 1.83 | 1.98 | 1.83 | 1.98 | 1.83 | 1.98 |
| 5654 | 0.88 | 0.78 | 0.80 | 0.85 | 0.90 | 0.20 | 1.00 | 0.41 | 0.93 | 0.41 | 0.93 | 0.41 | 0.93 | 0.41 | 0.93 | 0.41 |
| 5654 | 0.88 | 1.01 | 0.81 | 0.84 | 0.82 | 0.20 | 0.83 | 0.43 | 0.85 | 0.43 | 0.85 | 0.43 | 0.85 | 0.43 | 0.85 | 0.43 |
| 5345 | 1.08 | 1.02 | 0.98 | 0.91 | 1.09 | 0.08 | 0.97 | 0.70 | 1.01 | 0.97 | 0.70 | 1.01 | 0.97 | 0.70 | 1.01 | 0.97 |
| 5345 | 1.10 | 1.10 | 0.96 | 1.00 | 0.91 | 0.08 | 0.96 | 0.50 | 0.92 | 0.96 | 0.50 | 0.92 | 0.96 | 0.50 | 0.92 | 0.96 |
| 52674 | 1.19 | 1.04 | 1.13 | 1.07 | 1.15 | 0.00 | 1.20 | 0.64 | 1.19 | 0.64 | 1.19 | 0.64 | 1.19 | 0.64 | 1.19 | 0.64 |
| 52674 | 1.11 | 1.49 | 1.03 | 0.98 | 0.98 | 0.01 | 1.13 | 0.64 | 1.12 | 0.64 | 1.12 | 0.64 | 1.12 | 0.64 | 1.12 | 0.64 |
| 5686 | 1.10 | 1.11 | 1.15 | 1.06 | 1.07 | 0.00 | 1.14 | 0.60 | 1.24 | 0.60 | 1.24 | 0.60 | 1.24 | 0.60 | 1.24 | 0.60 |
| 5686 | 1.18 | 1.24 | 1.13 | 1.08 | 1.02 | 0.00 | 1.23 | 0.63 | 1.08 | 0.63 | 1.08 | 0.63 | 1.08 | 0.63 | 1.08 | 0.63 |