



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102428369 A

(43) 申请公布日 2012. 04. 25

(21) 申请号 201080019807. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 03. 24

G01N 33/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

12/411, 325 2009. 03. 25 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 11. 03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/028491 2010. 03. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02010/111382 EN 2010. 09. 30

(71) 申请人 雅培医护站股份有限公司

地址 美国新泽西

(72) 发明人 J·L·E·坎贝尔 J·E·奥马科

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

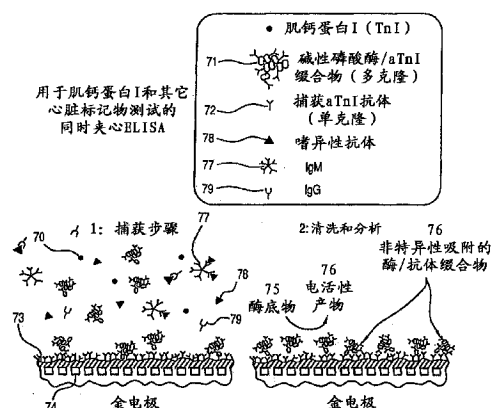
权利要求书 4 页 说明书 29 页 附图 17 页

(54) 发明名称

嗜异性抗体免疫传感器干扰的改善

(57) 摘要

本发明涉及用于减少分析物免疫测定中来自嗜异性抗体的干扰的方法和设备。在一个实施方式中,本发明涉及包括下列步骤的方法:(a)通过使干试剂溶解到生物学样品中以产生至少约20 μ g/mL 的非人 IgM 浓度或等等的片段浓度,而用非人 IgM 或其片段修正所述生物学样品(例如全血样品);和(b)在所述经修正的样品上进行电化学免疫测定以确定所述样品中所述分析物的浓度。优选地,除 IgM 或其片段之外,还用 IgG 或其片段修正所述样品。



1. 在分析物免疫测定中减少来自嗜异性抗体的干扰的方法,其包括:
 - (a) 通过使干试剂溶解到全血样品中以产生至少 20 μ g/mL 的非人 IgM 浓度或等等的片段浓度,而用非人 IgM 或其片段修正所述样品;和
 - (b) 在经修正的样品上进行电化学免疫测定以确定所述样品中所述分析物的浓度。
2. 权利要求 1 的方法,其还包括:
 - (c) 用 IgG 或其片段修正所述全血样品。
3. 权利要求 2 的方法,其中用 IgM 修正所述全血样品。
4. 权利要求 2 的方法,其中用 IgM F(ab')₂ 片段修正所述全血样品。
5. 权利要求 2 的方法,其中用 IgM Fab 片段修正所述全血样品。
6. 权利要求 2 的方法,其中用 IgM Fc 片段修正所述全血样品。
7. 权利要求 2 的方法,其中所述分析物为心血管标记物。
8. 权利要求 2 的方法,其中所述免疫测定是用于选自下列的分析物:TnI, TnT, CKMB, 肌红蛋白, BNP, NT-proBNP 和 proBNP。
9. 权利要求 2 的方法,其中以约 1 分钟至约 30 分钟范围内的预先确定的时间段修正所述样品。
10. 权利要求 2 的方法,其中所述干试剂还包含选自下列的组分:缓冲剂、盐、表面活性剂、稳定剂、简单碳水化合物、复杂碳水化合物和它们的组合。
11. 权利要求 2 的方法,其中所述非人 IgG 和 IgM 是鼠的,羊的或其组合。
12. 权利要求 2 的方法,其中所述电化学免疫测定为酶联夹心免疫测定。
13. 权利要求 2 的方法,其中所述电化学免疫测定是由免疫传感器进行的。
14. 权利要求 2 的方法,其中所述电化学免疫测定是由免疫传感器和免疫参照传感器进行的。
15. 权利要求 2 的方法,其中所述干试剂还包含抗所述分析物的、经酶标记的抗体。
16. 权利要求 2 的方法,还包括:
 - (d) 通过使包含抗所述分析物的经酶标记的抗体的第二干试剂溶解到所述经修正的样品中,而用所述经酶标记的抗体修正所述经修正的样品,其中所述第二干试剂与含有所述 IgM 或其片段的干试剂是分离的。
17. 权利要求 2 的方法,其中在电极上用抗所述分析物的经固定的抗体进行所述电化学测定。
18. 权利要求 2 的方法,其中所述经修正的样品还包含抗所述分析物的经酶标记的抗体,并且与抗所述分析物的经固定的抗体接触以在所述经固定的抗体和经标记的抗体之间形成所述分析物的夹心,所述方法还包括下述步骤:

将所述样品清洗至废料室,和

使所述夹心暴露于能够与所述酶反应以形成能够被电化学检测的产物的底物。
19. 权利要求 2 的方法,其中在患者即时护理时进行所述方法。
20. 权利要求 2 的方法,其中所述电化学免疫测定为酶联免疫吸附测定。
21. 权利要求 2 的方法,其中在包括下列的盒中进行所述免疫测定:免疫传感器、导管、样品入口和样品保留室。
22. 权利要求 21 的方法,其中所述样品入口、所述样品保留室、所述导管和所述免疫传

传感器的至少一个的至少一部分被所述干试剂涂覆。

23. 权利要求 2 的方法,其中所述干试剂还包含所述非人 IgG。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述分析物为 TnI,并且其中使所述干试剂溶解到样品中以给出约 20 μ g/mL 至约 200 μ g/mL 的 IgM 浓度和约 50 μ g/mL 至约 5000 μ g/mL 的 IgG 浓度。

25. 权利要求 23 的方法,其中所述分析物为 TnI,并且其中使所述干试剂溶解到样品中以给出约 20 μ g/mL 至约 60 μ g/mL 的 IgM 浓度和约 500 μ g/mL 至约 1000 μ g/mL 的 IgG 浓度。

26. 权利要求 23 的方法,其中所述分析物为 BNP,并且其中使所述干试剂溶解到样品中以给出约 20 μ g/mL 至约 200 μ g/mL 的 IgM 浓度和约 50 μ g/mL 至约 5000 μ g/mL 的 IgG 浓度。

27. 权利要求 23 的方法,其中所述分析物为 BNP,并且其中使所述干试剂溶解到样品中以给出约 20 μ g/mL 至约 60 μ g/mL 的 IgM 浓度和约 500 μ g/mL 至约 1000 μ g/mL 的 IgG 浓度。

28. 在心肌肌钙蛋白 I 免疫测定中减少来自嗜异性抗体的干扰的方法,其包括:

(a) 用包含下列的混合物修正全血样品:(i) 非人 IgG 或 IgG 片段,和(ii) 非人 IgM 或 IgM 片段,其足以实质上掩蔽所述样品中的任何嗜异性抗体,其中经修正的样品中非人 IgM 的浓度为至少约 20 μ g/mL 或等同的 IgM 片段浓度;和

(b) 在经修正的样品上进行电化学免疫测定。

29. 在脑利钠肽免疫测定中减少来自嗜异性抗体的干扰的方法,其包括:

(a) 用包含下列的混合物修正样品:(i) 非人 IgG 或 IgG 片段,和(ii) 非人 IgM 或 IgM 片段,其足以实质上掩蔽所述样品中的任何嗜异性抗体,其中经修正的样品中非人 IgM 的浓度为至少约 20 μ g/mL 或等同的 IgM 片段浓度;和

(b) 在经修正的样品上进行电化学免疫测定。

30. 用于以减少的来自嗜异性抗体的干扰,在血液样品中进行分析物的免疫测定的设备,其包括壳体、电化学免疫传感器、导管和样品入口,其中所述导管允许血液样品从入口通过至所述免疫传感器,并且其中所述壳体、所述入口和所述导管中的至少一个包括包含非人 IgM 或其片段和任选地 IgG 或其片段的干试剂,所述干试剂能够溶解到所述血液样品中以产生至少约 20 μ g/mL 的 IgM 浓度或等同的片段浓度,并且实质上掩蔽所述样品中的任何嗜异性抗体。

31. 权利要求 30 的设备,其中所述干试剂包含非人 IgM 或其片段以及 IgG 或其片段。

32. 权利要求 31 的设备,其还包括用于计量初始血液样品以形成经计量的血液样品的计量系统。

33. 权利要求 31 的设备,其还包括免疫参照传感器。

34. 权利要求 31 的设备,其中所述分析物为心血管标记物。

35. 权利要求 31 的设备,其中所述免疫测定用于选自下列的分析物:TnI, TnT, CKMB, 肌红蛋白, BNP, NT-proBNP, proBNP, β -HCG, TSH, D-二聚体和 PSA。

36. 权利要求 31 的设备,其中以约 1 分钟至约 30 分钟范围内的预先确定的时间段修正所述样品。

37. 权利要求 31 的设备,其中所述设备为一次性盒。
38. 权利要求 31 的设备,其中所述干试剂还包含抗所述分析物的经酶标记的抗体。
39. 权利要求 31 的设备,其还包括包含抗所述分析物的经酶标记的抗体的第二干试剂,其中所述第二干试剂与包含所述 IgM 或其片段的干试剂是分离的。
40. 权利要求 31 的设备,其中所述干试剂还包含选自下列的组分:缓冲剂、盐、表面活性剂、稳定剂、简单碳水化合物、复杂碳水化合物和它们的组合。
41. 权利要求 31 的设备,其中所述非人 IgG 或其片段和 IgM 或其片段是鼠的,羊的或其组合。
42. 权利要求 31 的设备,其中所述免疫传感器进行电化学酶联夹心免疫测定。
43. 权利要求 31 的设备,其中所述免疫传感器在电极上包括抗所述分析物的经固定的抗体。
44. 权利要求 31 的设备,其中所述分析物为 TnI,并且其中使所述干试剂溶解到样品中以给出约 20 μ g/mL 至约 200 μ g/mL 的 IgM 浓度和约 50 μ g/mL 至约 5000 μ g/mL 的 IgG 浓度。
45. 权利要求 31 的设备,其中所述分析物为 TnI,并且其中使所述干试剂溶解到样品中以给出约 20 μ g/mL 至约 60 μ g/mL 的 IgM 浓度和约 500 μ g/mL 至约 1000 μ g/mL 的 IgG 浓度。
46. 权利要求 31 的设备,其中所述分析物为 BNP,并且其中使所述干试剂溶解到样品中以给出约 20 μ g/mL 至约 200 μ g/mL 的 IgM 浓度和约 50 μ g/mL 至约 5000 μ g/mL 的 IgG 浓度。
47. 权利要求 31 的设备,其中所述分析物为 BNP,并且其中使所述干试剂溶解到样品中以给出约 20 μ g/mL 至约 60 μ g/mL 的 IgM 浓度和约 500 μ g/mL 至约 1000 μ g/mL 的 IgG 浓度。
48. 权利要求 31 的设备,其还包括能够将所述样品清洗至废料室的洗液。
49. 权利要求 31 的设备,其还包括洗液,所述洗液包含能够在所述免疫传感器处反应以形成能够被电化学检测的产物的底物。
50. 在分析物免疫测定中减少来自嗜异性抗体的干扰的方法,其包括:
 - (a) 用 IgM 或其片段和任选地 IgG 或其片段修正生物学样品以产生至少约 20 μ g/mL 的非人 IgM 浓度或等片的片段浓度;和
 - (b) 在经修正的样品上进行免疫测定以确定所述样品中所述分析物的浓度。
51. 权利要求 50 的方法,还包括:
 - (c) 用 IgG 或其片段修正所述生物学样品。
52. 权利要求 51 的方法,其中所述生物学样品选自:全血、血清、血浆、尿和它们经稀释的形式。
53. 权利要求 51 的方法,其中通过使包含 IgM 的干试剂溶解到所述样品中而修正所述生物学样品。
54. 权利要求 51 的方法,其中通过使包含 IgM 片段的干试剂溶解到所述样品中而修正所述生物学样品。
55. 权利要求 51 的方法,其中通过加入包含 IgM 或其片段的溶液而修正所述生物学样

品。

56. 权利要求 51 的方法,其中所述免疫测定方法选自:电化学、电流测量、电势测量、吸收、荧光和发光。

57. 在分析物免疫测定设备中减少嗜异性抗体干扰的方法,其包括:

(a) 以足以实质上掩蔽生物学样品中任何嗜异性抗体的量向所述样品中加入 IgM 或其片段以及 IgG 或其片段并形成经修正的样品,其中以大于 0.004 的重量比加入 IgM 或其片段和 IgG 或其片段;和

(b) 在所述经修正的样品上进行电化学免疫测定以确定所述经修正的样品中分析物的浓度。

58. 权利要求 56 的方法,其中所述重量比大于 0.02。

59. 权利要求 56 的方法,其中所述重量比大于 0.05。

60. 权利要求 56 的方法,其中步骤 (a) 包括向所述生物学样品中加入 IgM。

61. 权利要求 60 的方法,其中在加入步骤之后, IgM 以至少 20 μ g/mL 的浓度存在于所述样品中。

62. 权利要求 56 的方法,其中步骤 (a) 包括向所述生物学样品中加入 IgM 片段。

63. 权利要求 62 的方法,其中在加入步骤之后, IgM 片段以等同于至少约 20 μ g/mL 的 IgM 浓度的浓度存在于所述样品中。

64. 权利要求 56 的方法,其中所述加入包括使 IgM 或其片段从包含于所述免疫测定设备中的干试剂涂层溶解到所述样品中。

65. 权利要求 56 的方法,其中所述加入包括使 IgM 或其片段从包含在样品收集设备上的干试剂涂层溶解到所述样品中。

66. 权利要求 56 的方法,其中所述加入包括将所述样品与包含所述 IgM 或其所述片段的液体混合以形成经修正的混合物,所述方法还包括将所述经修正的混合物引入所述免疫测定设备中的步骤。

67. 用于以减少的来自嗜异性抗体的干扰,在血液样品中进行分析物的免疫测定的设备,其包括壳体、电化学免疫传感器、导管和样品入口,其中所述导管允许血液样品从入口通过至所述免疫传感器,并且其中所述壳体、所述入口和所述导管中的至少一个包括以大于 0.004 的重量比包含非人 IgM 或其片段和 IgG 或其片段的干试剂。

68. 权利要求 67 的设备,其中所述重量比为大于 0.02。

69. 权利要求 67 的设备,其中所述重量比为大于 0.05。

嗜异性抗体免疫传感器干扰的改善

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求 2009 年 3 月 25 日递交的、题目为“嗜异性抗体免疫传感器干扰的改善”的美国申请号 12/411, 325 的优先权, 以其全部通过引用而并入。

发明领域

[0003] 本发明涉及在用于确定液体样品中分析物的存在或浓度的设备和方法中, 减少或消除嗜异性抗体免疫传感器干扰。特别地, 本发明涉及通过用 γ 球蛋白 (例如 IgM) 及其片段修正生物学样品而减少或消除嗜异性抗体免疫传感器干扰。

[0004] 发明背景

[0005] 在生物学样品上就目的分析物进行了众多的实验室免疫测试, 用于诊断, 筛选, 疾病分期, 法医分析, 怀孕测试, 药物测试和其它原因。虽然少数定性测试 (例如怀孕测试) 被简化至简单的试剂盒用于患者在家使用, 大多数定量测试仍然需要经过训练的技术人员在实验室环境中使用复杂装置的专门技术。实验室测试增加分析的成本并延迟结果。在许多情况下, 延迟对于患者的病况或预后可以是有害的, 例如对于表明心肌梗塞和心脏衰竭的标记物的分析。在这些以及类似的关键性情形中, 以即时护理 (point-of-care) 准确、不昂贵并以最少的延迟进行此类分析是有利的。

[0006] 例如, 两点免疫测定 (也称为夹心型免疫测定, 其通常被用于确定生物学测试样品中分析物的浓度) 被用于即时护理分析物检测系统中, 所述系统由 Abbott Point-of-care Inc. 开发为 **i-Stat®** 系统。在典型的两点式酶联免疫吸附测定 (ELISA) 中, 一种抗体结合到固体支持物上以形成“经固定的抗体”, 而第二种抗体与产生信号的试剂 (例如酶) 缀合或结合以形成“信号抗体”。与含有待测量分析物的样品反应后, 所述分析物被“夹”在经固定的抗体与信号抗体之间。洗掉样品和任何非特异性结合的试剂后, 测量余留在固定支持物上的信号抗体的量, 其应当与样品中分析物的量成比例。

[0007] 已描述了许多类型的免疫测定设备和方法。Lauks 在 U. S. Pat. No. 5, 096, 669 中公开了一种用于成功测量血液样品中的分析物的一次性感应设备。Davis 等人在 U. S. Pat. Nos. 5, 628, 961 和 5, 447, 440 中公开了其它的、用于凝固时间设备。这些设备采用了读取装置和适合于所述读取装置的盒, 用于关于时间测量血液样品中分析物的浓度和粘性变化的目的。U. S. Pat. Nos. 5, 096, 669 ; 5, 628, 961 和 5, 447, 440 在此以其全部通过引用而并入。

[0008] 电化学检测 (其中分析物的结合直接或间接引起接近电极的电话性物种的活性变化) 也被应用于了免疫测定。关于电化学免疫测定的综述, 参见 Laurell 等人, *Methods in Enzymology*, vol. 73, "Electroimmunoassay", Academic Press, New York, 339, 340, 346-348 (1981)。

[0009] 对于在受限的空间中构造多层的感应器结构而言, 精密加工技术 (例如光刻法和等离子体沉积) 是有吸引力的。Cozzette 等人的 U. S. Pat. No. 5, 200, 051 中公开了用于电化学免疫传感器精密加工的方法 (例如在硅基质上), 在此以其全部通过引用而并入。这些包括分配方法, 用于将生物学试剂 (例如抗体) 附着于表面的方法 (包括光形成层

(photoformed layer) 和微颗粒乳胶), 以及用于进行电化学测定的方法。

[0010] 在电化学免疫传感器中, 分析物与其相应抗体的结合使电极处的电活性物种产生活性变化, 所述电极保持合适的电势以引起所述电活性物种的氧化或还原。有许多用于满足这些条件配置。例如, 电活性物种可被直接附着至分析物, 或者抗体可被共价地附着至酶, 所述酶由无电活性的底物产生电活性物种, 或者破坏电活性的底物。关于电化学免疫传感器的综述, 参见 M. J. Green (1987) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 316 : 135-142。

[0011] 差示电流测量的概念是电化学领域公知的, 参见例如 Cozzette 所共有的 U. S. Pat. No. 5, 112, 455。此外, 差示电流传感器组合的一个版本公开于 Cozzette 所共有的 U. S. Pat. No. 5, 063, 081 中。此专利还公开了将选择性渗透层用于电化学传感器以及将形成膜的乳胶用于固定生物活性分子, 将所述专利在此通过引用而并入。U. S. Pat. No. 6, 030, 827 中描述了聚乙烯醇 (PVA) 在感应器制造中的应用, 在此通过引用而并入。Vikholm (U. S. 2003/0059954A1) 教导了直接附着于具有排斥生物分子的涂层 (例如 PVA) 的表面的抗体, 所述表面在抗体之间的间隙中, 而 Johansson (U. S. Pat. No. 5, 656, 504) 教导了其上固定有抗体的固相 (例如 PVA)。U. S. Pat. Nos. 6, 030, 827 和 6, 379, 883 教导了用于使聚乙烯醇层形成图样的方法, 并且以其全部通过引用而并入。

[0012] US 20060160164 描述了具有免疫参照电极的免疫测定设备, US20050054078 描述了具有改善的样品闭合的免疫测定设备, US20040018577 描述了多个混合免疫测定, 且 US 20030170881 (作为 US7, 419, 821 被授权) 描述了用于分析物测量和免疫测定的装置和方法, 这些都是共同所有的并且在此通过引用而并入。

[0013] 关于电流测量, 有数种本领域已知的用于减少信号的非法拉第组分的重要性因而增加灵敏度的手段。这些包括较新的电化学方法 (例如使用方波伏安法代替计时电流法) 和化学手段 (例如烷基硫醇试剂) 来钝化电极表面。

[0014] 然而, 常规测定构造的一个限制是易于受到由可能存在于测试样品中的嗜异性抗体引起的干扰。参见, 例如 L. Kricka, "Human Anti-Animal Antibody Interferences in Immunological Assays," *Clinical Chemistry* 45 :7, 第 942-956 页 (1999)。商业的免疫测定中所采用的抗体在许多情况下是在动物中或动物来源的介质中制备的或“产生的”。此外, 许多个体具有天然存在的、动物蛋白的非特异性抗体, 其为可结合至免疫测定中所采用的动物抗体试剂的“内源性抗体”, 导致错误的结果。例如, 能够结合一种或多种测定试剂的内源性抗体造成产生错误测试结果的可能性; 其通过交联所述试剂而导致假阳性结果或通过掩蔽 (sequester) 所述试剂而导致假阴性结果。

[0015] 已发现, 例如用放射标记的鼠单克隆抗体进行的癌症治疗可导致在患者中产生人抗小鼠抗体 (HAMA)。随后显示了 HAMA 存在于取自那些患者的血清样品中, 可引起在夹心型酶免疫测定中用于癌症标记物的试剂鼠单克隆抗体的交联 (Boscato 等人, *Heterophile antibodies : A problem for all immunoassays*, *Clin Chem* 34, 27-33, 1988)。此外, Nicholson 等人 (*Immunoglobulin inhibiting reagent (IIR) : Evaluation of a new method for eliminating spurious elevation in CA125 caused by HAMA*, *Intl J Biol Markers* 11, 46-49, 1996) 显示了使用 IIR (Bioreclamation Inc, NY) 在 CA125 测定中消除 HAMA 干扰的有益结果。据报导, IIR 材料包括来自数个物种的经部分纯化的免疫球蛋白

(IgG, IgM) 制备物,主要是来自 Balb/c 小鼠的鼠 IgG(亚型 IgG2a, IgG2b 和 IgG3)。

[0016] US 6,106,779 教导了某些测定试剂彼此之间,以及与设备组件之间的非特异性结合在诊断性测定中通常是个问题。当抗体识别不是其抗原的分子的区域时,这尤其是个问题。这然后可引起高的背景反应和假阳性的(或阴性的)测定结果。针对此问题可使用的非特异性结合抑制剂包括牛 IgG。

[0017] US 20080261242 讨论了内源性人嗜异性抗体和人抗动物抗体,其具有结合其它物种的免疫球蛋白的能力,并且存在于超过 10% 的患者的血清或血浆中。这些循环的嗜异性抗体可干扰免疫测定测量。在夹心免疫测定中,这些嗜异性抗体可桥接捕获和检测(诊断)抗体从而产生假阳性信号,或者它们可阻碍诊断抗体的结合从而产生假阴性信号。此外,在竞争性免疫测定中,嗜异性抗体可结合分析抗体并抑制其与分析物的结合。他们也可阻碍或增进抗体-分析物复合物与游离分析物的分离,特别是当在分离系统中使用了抗-物种抗体时。作为结果,常常难以预测这些嗜异性抗体干扰的影响。

[0018] 用于从样品中去除嗜异性抗体的数种其它的方法也是已知的,并且包括:(i) 在醋酸钠缓冲液(pH 5.0)中、于 90°C 将样本加热 15 分钟,然后以 1200g 离心 10 分钟,(ii) 用聚乙二醇(PEG)沉淀,和(iii) 用蛋白 A 或蛋白 G 免疫提取。用于处理嗜异性抗体问题的临床指南也由下述提供了: Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI) Immunoassay Interference by Endogenous Antibodies; Proposed Guideline. CLSI document I/LA30-P (ISBN 1-56238-633-6)。

[0019] 通常,免疫测定生产商努力通过下述来减少嗜异性干扰:(a) 从样品中去除干扰性的免疫球蛋白或使其失活,(b) 修饰测定抗体以使其更不易与嗜异性抗体反应,和(c) 使用减少干扰的封闭剂(大多为 IgGs)。

[0020] 然而,在至少下列领域仍需要用于改善嗜异性抗体的改进的方法:(i) 免疫传感器干扰,最特别地是在即时护理测试的情境中,(ii) 电化学免疫测定,(iii) 免疫传感器与免疫参照传感器结合使用,(iv) 全血免疫测定,(v) 基于一次性盒的免疫测定,(vi) 仅具有单一的清洗步骤的非时序性免疫测定,和(vii) 干试剂涂层。

[0021] 发明概述

[0022] 本发明涉及利用电化学免疫传感器或其它基于配体/配体受体的生物传感器来测定生物学样品(例如血液)中的分析物。具体地,本发明涉及在各种测定中减少来自嗜异性抗体的干扰的改善的方式,所述测定包括例如心血管标记物免疫测定。所述方法涉及收集样品(例如血液样品);然后修正所述样品,例如通过溶解包含所选的非人 IgM(免疫球蛋白 M)或其片段、或非人 IgG 与非人 IgM 或它们的片段的确定的混合物的干试剂。

[0023] 在本发明中,使用足量的免疫球蛋白来基本上掩蔽样品中存在的任何嗜异性抗体。通常选择试剂的量以确保其足以结合浓度为在群体的大多数中存在的浓度的嗜异性抗体。备选地,可选择试剂的量以确保基本上去除超过预先确定的临界浓度值的嗜异性抗体,即结合至所添加的免疫球蛋白并因此防止对测定的干扰。经过一段时间以允许此结合步骤发生后,然后可能在经修正的样品上进行所述免疫测定,例如电化学免疫测定。本发明还涉及这些掩蔽试剂与免疫参照传感器及免疫传感器相结合的用途。本发明对于即时护理血液测试(也称作床边测试和近患者测试)是特别有用的。

[0024] 在第一个实施方式中,本发明涉及在分析物免疫测定中减少来自嗜异性抗体的干

扰的方法,所述方法包括:通过使干试剂溶解到样品中以产生至少 20 μ g/mL 的非人 IgM 浓度或等等的片段浓度,而用非人 IgM 或其片段修正全血样品;和在经修正的样品上进行电化学免疫测定以确定样品中分析物的浓度。在优选的方面,所述方法还包括用 IgG 或其片段修正全血样品。所述非人 IgG 和 IgM 优选是鼠的,羊的或其组合。

[0025] 分析物可广泛地变化但是优选地选自:TnI, TnT, CKMB, 肌红蛋白, BNP, NT-proBNP 和 proBNP。在优选的实施方式中,以约 1 分钟至约 30 分钟范围内的预先确定的时间段修正所述样品。干试剂优选地还包含选自下列的组分:缓冲剂、盐、表面活性剂、稳定剂、简单碳水化合物、复杂碳水化合物和它们的组合。所述干试剂还可包含抗分析物的经酶标记的抗体(信号抗体)。在另一方面,本发明还包括下列步骤:通过使包含经酶标记的抗体的第二干试剂溶解于经修正的样品中,而用抗分析物的经酶标记的抗体(信号抗体)修正所述经修正的样品,其中所述第二干试剂与含有 IgM 或其片段的干试剂是分离的。例如,所述干试剂还可包含非人 IgG。

[0026] 电化学免疫测定优选为酶联夹心免疫测定,并且优选地是由免疫传感器进行的。因此,所述电化学测定优选地是以经固定的抗分析物抗体在电极上进行的。所述经修正的样品优选还包含抗分析物的经酶标记的抗体并且与抗分析物的经固定的抗体接触,以在经固定的抗体和经标记的抗体之间形成分析物的夹心;所述方法还包括下述步骤:将样品清洗至废料室和使所述夹心暴露于能够与所述酶反应以形成能够被电化学检测的产物的底物。在一个实施方式中,所述电化学免疫测定由免疫传感器和免疫参照传感器进行。在另一个实施方式中,所述电化学免疫测定为酶联免疫吸附测定。本方法特别适于在患者即使护理时进行。例如,可在包括免疫传感器,导管,样品入口和样品保留室的盒中进行所述免疫测定。在这方面,所述样品入口、样品保留室、导管和免疫传感器中至少一个的至少一部分可被干试剂涂覆。

[0027] 在另一个实施方式中,本发明涉及在心肌肌钙蛋白 I 免疫测定中减少来自嗜异性抗体的干扰的方法,所述方法包括:用包含下列的混合物修正全血样品:(i) 非人 IgG 或 IgG 片段,和(ii) 非人 IgM 或 IgM 片段,其足以实质上掩蔽样品中的任何嗜异性抗体,其中经修正的样品中非人 IgM 的浓度为至少约 20 μ g/mL 或等等的 IgM 片段浓度;和在所述经修正的样品上进行电化学免疫测定。

[0028] 在另一个实施方式中,本发明涉及在脑利钠肽免疫测定中减少来自嗜异性抗体的干扰的方法,所述方法包括:用包含下列的混合物修正样品:(i) 非人 IgG 或 IgG 片段,和(ii) 非人 IgM 或 IgM 片段,其足以实质上掩蔽样品中的任何嗜异性抗体,其中经修正的样品中非人 IgM 的浓度为至少约 20 μ g/mL 或等等的 IgM 片段浓度;和在所述经修正的样品上进行电化学免疫测定。

[0029] 在另一个实施方式中,本发明涉及一种设备(例如一次性的盒),其用于以减少的来自嗜异性抗体的干扰对血液样品中的分析物进行免疫测定,所述设备包括壳体(housing)、电化学免疫传感器、导管和样品入口,其中所述导管允许血液样品从入口通过至免疫传感器,并且其中所述壳体、入口和导管中的至少一个包括包含非人 IgM 或其片段和任选地 IgG 或其片段的干试剂涂层,所述干试剂能够溶解到血液样品中以产生至少约 20 μ g/mL 的 IgM 浓度或等等的片段浓度并且实质上掩蔽所述样品中的任何嗜异性抗体。在这方面,所述设备优选地还包括用于计量初始血液样品以形成经计量的血液样品的计量系

统。所述设备还可包括免疫参照传感器。所述免疫传感器优选在电极上包括抗分析物的经固定的抗体。

[0030] 在一个方面,所述干试剂还包含选自下列的组分:缓冲剂、盐、表面活性剂、稳定剂、简单碳水化合物、复杂碳水化合物和它们的组合。任选地,所述干试剂还包含抗分析物的经酶标记的抗体。在备选的实施方式中,所述设备还包括包含抗分析物的经酶标记的抗体的第二干试剂,其中所述第二干试剂与包含 IgM 或其片段的干试剂是分离的。所述设备优选地还包括能够将样品清洗至废料室的洗液。所述洗液可包含能够在免疫传感器处反应以形成能够进行电化学检测的产物的底物。

[0031] 在另一个实施方式中,本发明涉及在分析物免疫测定中减少来自嗜异性抗体的干扰的方法,所述方法包括:用 IgM 或其片段和任选地 IgG 或其片段修正生物学样品以产生至少约 20 μ g/mL 的非人 IgM 浓度或等等的片段浓度;和对所述经修正的样品进行免疫测定以确定样品中分析物的浓度。例如,可通过使包含 IgM、IgM 片段、IgG 或 IgG 片段中的一种或多种的干试剂溶解到生物学样品中而修正所述样品。所述方法优选地还包括用 IgG 或其片段修正生物学样品的步骤。所述生物学样品,例如可选自全血、血清、血浆、尿及它们经稀释的形式。所述免疫测定方法优选地选自:电化学、电流测量、电势测量、吸收 (absorbance)、荧光和发光。

[0032] 在另一个实施方式中,本发明涉及在分析物免疫测定设备中减少嗜异性抗体干扰的方法,所述方法包括:向生物学样品中加入 IgM 或其片段以及 IgG 或其片段,其量足以实质上掩蔽样品中的任何嗜异性抗体并形成经修正的样品,其中所加入的 IgM 或其片段以及 IgG 或其片段的重量比大于 0.004,例如,大于 0.02,大于 0.05 或大于 0.1;和在经修正的样品上进行电化学免疫测定以确定经修正的样品中分析物的浓度。在添加步骤之后,存在于样品中的例如 IgM 的浓度可以为至少 20 μ g/mL。备选地,存在于样品中的 IgM 片段的浓度等同于至少约 20 μ g/mL 的 IgM 浓度。在一个方面,所述添加包括使 IgM 或其片段从包含在免疫测定设备中的干试剂涂层溶解到样品中。备选地,所述添加可包括使 IgM 或其片段从包含在样品收集设备上的干试剂涂层溶解到样品中。在另外的方面,所述添加包括使样品与包含 IgM 或其片段的液体混合以形成经修正的混合物,所述方法还包括将经修正的混合物引入免疫测定设备中的步骤。

[0033] 在另一个实施方式中,本发明涉及一种设备,其用于以减少的来自嗜异性抗体的干扰对血液样品中的分析物进行免疫测定,所述设备包括壳体、电化学免疫传感器、导管和样品入口,其中所述导管允许血液样品从入口通过至所述免疫传感器,并且其中所述壳体、所述入口和所述导管中的至少一个包括以大于 0.004 (例如大于 0.02 或大于 0.05) 的重量比包含非人 IgM 或其片段和 IgG 或其片段的干试剂。

[0034] 在另一个实施方式中,本发明涉及通过将液体试剂混合物 (cocktail) 置于壳体、电化学免疫传感器、导管或样品入口中的一个或多个中而用于形成任何上述设备的方法,所述试剂混合物包含非人 IgM 或其片段和任选地 IgG 或其片段。所述方法还包括干燥所述试剂混合物以形成干试剂以及组装所述设备的步骤。

[0035] 在本发明的方法和设备的一些优选的实施方式中,所述分析物为 TnI 或 BNP,且所述干试剂溶解到样品中以给出约 20 μ g/mL–约 200 μ g/mL (例如 20 μ g/mL–约 60 μ g/mL) 的 IgM 浓度 (或等等的 IgM 片段浓度),和约 50 μ g/mL–约 5000 μ g/mL (例如约 500 μ g/

mL- 约 1000 μ g/mL) 的 IgG 浓度 (或等同的 IgG 片段浓度)。

附图说明

[0036] 本发明的这些及其它的目的、特征和优势被描述于以下的具体实施方式详细说明中,并且被显示于下列附图中,其中:

[0037] 图 1 为免疫传感器盒盖的等距俯视图;

[0038] 图 2 为免疫传感器盒盖的等距仰视图;

[0039] 图 3 为免疫传感器盒带衬垫布局的俯视图;

[0040] 图 4 为免疫传感器盒基底的等距俯视图;

[0041] 图 5 为免疫传感器盒布局的图解视图;

[0042] 图 6 为免疫传感器盒内的液体和气体路径的图解视图,包括用于试剂修正液体的位点;

[0043] 图 7 显示了电化学免疫传感器的操作原理;

[0044] 图 8 为电化学免疫传感器构造的侧面视图,其中经抗体标记的颗粒未按比例绘制;

[0045] 图 9 为用于电导测定的掩模设计以及免疫传感器盒的免疫传感器电极的俯视图;

[0046] 图 10 显示了表格,其总结了含有和不含有嗜异性抗体改善试剂的 TnI 和 BNP 盒的数据;

[0047] 图 11 显示了 TnI 免疫传感器和免疫参照传感器相对于时间的应答;

[0048] 图 12 显示了 BNP 免疫传感器和免疫参照传感器相对于时间的应答;

[0049] 图 13 为酶促再生电活性物种的图解显示;

[0050] 图 14 显示了形成区段的工具;

[0051] 图 15 为免疫传感器盒的优选实施方式的俯视图;

[0052] 图 16 为免疫传感器盒的优选实施方式的流控技术图解视图;

[0053] 图 17(A-C) 为在下列处对具有嗜异性抗体的各种肌钙蛋白样品的剂量应答图:(a) 免疫传感器,(b) 相关的免疫参照传感器,和 (c) 减去了免疫参照传感器信号的免疫传感器信号;

[0054] 图 18 显示了具有用于在关闭位置闭合样品入口的可滑动密封元件的盒设备;以及

[0055] 图 19 显示了具有用于在开放位置闭合样品入口的可滑动密封元件的盒设备。

[0056] 发明详述

[0057] 本发明涉及在下列领域中减少或消除由嗜异性抗体的存在引起的干扰:(i) 免疫传感器,最特别地在即时护理测试的情境中,(ii) 电化学免疫测定,(iii) 免疫传感器与免疫参照传感器的联合应用,(iv) 全血免疫测定,(v) 基于一次性盒的免疫测定,(vi) 仅具有单一清洗步骤的非时序性免疫测定,和 (vii) 包括非特异性结合 (NSB) 抑制剂的干试剂涂层。然而,如本领域技术人员将会理解的,所述一般性的概念适用于许多免疫测定方法和平台。

[0058] 本发明利用具有分析物感应器阵列的盒以及用于向免疫传感器或分析物阵列顺序呈递经修正的样品的工具来允许快速原位测定分析物。所述盒被设计为优选地用读取

设备进行操作,例如 Lauks 等人的 U. S. Pat. No. 5, 096, 669 (授权日 1992 年 3 月 17 日) 或 U. S. Pat. No. 7, 419, 821 (授权日 2008 年 9 月 2 日) 中所公开的,二者均在此以其全部通过引用而并入。在此情境中最佳地理解本发明。因此,首先描述了用于操作即时护理免疫测定系统的合适的设备和方法,然后描述了如何最佳地调试所述系统以减少或消除嗜异性抗体干扰。

[0059] 在一个实施方式中,本发明提供了用于处理液体样品以确定所述样品中分析物的存在或分析物的量的盒及其使用方法。所述盒优选地含有计量工具,其允许引入体积未经计量的样品,其中经计量的量被所述盒及其相关的读取装置处理。因此,医师或操作者无需在测量之前就精确地测量样品的体积,从而节省时间、精力并增加准确性和再现性。在一个实施方式中,所述计量工具包括结合有毛细管终止的、延长的样品室并且所述样品室沿其长度具有空气进入点。作用于所述空气进入点的气压使得经计量体积的样品通过毛细管终止。所述经计量的体积是由空气进入点与毛细管终止之间的样品室的体积预先确定的。

[0060] 所述盒可具有用于以气密方式密封样品口的闭合设备。所述闭合设备优选相对于盒体是可滑动的并且提供了移除位于口区域中的任何过量样品的减切作用,从而可靠地密封了所述入口与毛细管终止之间的保留室中的部分样品。参见例如已公开的美国专利申请 US2005/0054078 A1,在此以其全部通过引用而并入。例如,可通过以如下方式使密封元件可滑动地移动过盒表面而密封所述盒,所述方式从样品口移除掉过量的液体样品、将一定体积的液体样品密封在内部的液体样品保留室中、并抑制液体样品过早地穿透内部的毛细管终止。通过所述可滑动的闭合设备获得的密封优选是不可逆的并且防止过量的血液被捕集 (trapped) 于盒中,因为所述闭合设备在口 (血液由此进入盒) 的平面中移动并且提供将血液密封在入口的平面之下的减切作用从而使过量的血液 (即口平面之上的血液) 从所述入口移开并任选地到废料室中。

[0061] 一个示例性的闭合设备显示在图 1 中并包括整合的盖 1 元件 2、3、4 和 9。在这个实施方式中,闭合设备 2 绕着转轴旋转直至钩 3 猛然关闭而封闭样品入口 4。图 1 中包括整合的盖 1 元件 2、3、4 和 9 的闭合设备的备选方案在图 18 和 19 中被显示为单独的可滑动元件 200。图 18 和 19 显示了包括经修饰版本的图 1 的盖的盒设备,所述盖附着于类似于图 4 中的基底的基底,具有插入的黏附层 (图 3 中显示的 21) 以及单独的可滑动的闭合元件 200。图 19 显示了处于开放位置的所述闭合设备 200,其中样品入口 4 可以接受样品 (例如血液)。图 18 显示了处于关闭位置的所述闭合设备 200,其中其以气密方式密封样品入口。在操作中,当样品 (例如血液) 被加入入口并进入保留室 34 之后,手动使元件 200 从开放变为关闭位置。在所示的实施方式中,将入口区域中任何过量的血液移动到溢流室 201 中或临近的保留区域或腔中。所述室或区域可包括液体吸收垫或材料以保留过量的样品 (例如血液)。

[0062] 样品入口 4 可以是圆形的口 (如图 19 中所示),或者是椭圆形的并且所述口的直径通常在 0.2-5mm 的范围内,优选 1-2mm,或具有 1-15mm 的周长 (对于椭圆形而言)。围绕口的区域可以被选择为疏水性的或亲水性的,以控制所施加的样品落下的形状来促进进入所述入口中。图 18 和 19 中所示的闭合设备的优势之一是其防止样品在保留室 34 的末端被推过毛细管终止元件 25。少量样品 (例如血液) 超过毛细管终止而存在对于测量分析物的体积浓度并因此不依赖于样品体积的测试而言是不重要的。然而,对于其中计量样品通

常是有利的免疫测定应用而言,密封元件改善设备的计量准确性,并且确保当分析仪作用于盒导管内的样品时所测定的样品区段相对于免疫传感器被适当放置。

[0063] 在操作中,当样品(例如血液)被加入盒中时,其移动至毛细管终止。因此,当毛细管终止至样品入口的区域(即保留室 34)含有样品时,存在对于测定而言足够的样品。在填充保留室的过程中,一些样品可留在入口的口平面之上。当密封元件从开放位置移动到关闭位置时,在关闭的动作中将入口之上的任何样品剪去而不捕集额外的样品,因而确保了样品不移动超过毛细管终止 25。在优选的实施方式中,将密封元件 200 置于图 3 的带衬垫 21 表面之上千分之几英寸内。当入口接触锁定特征 212 和 213 时,通过随后使 200 的表面降低至粘性的带衬垫而密封入口。由于所述带基本上是不可压缩的并且口具有小的直径,使用者向密封元件施用的任何疏忽的压力将不会引起样品移动超过毛细管终止。

[0064] 在使用数滴样品的某些盒实施方式中,希望的是在保留室中不形成气泡,因为这可影响测定。因此,开发了向保留室 34 中引入超过一滴样品(例如血液)而不引起气泡的可靠工具。可通过首先用电晕和/或试剂混合物处理保留室,将样品入口设计为接受多滴样品而不使得连续的滴引起在保留室 34 中形成被捕集的气泡。

[0065] 在一次性医疗设备上使用电晕处理是本领域公知的并且是增加几乎任何材料(例如金属化的表面,箔,纸,纸板用料(paperboard stock),或塑料例如聚乙烯、聚丙烯、尼龙、乙烯基、PVC 和 PET)的表面活性的有效方式。这种处理使得它们更易接受油墨、涂层和粘合剂。在实践中,将被处理的材料暴露于电子放电或“电晕”。放电区域中的氧分子破裂为原子并结合至被处理的材料中的分子,产生被化学活化的表面。用于电晕处理的合适的设备是商业上可得的(例如 Corotec Corp., Farmington, Conn.)。方法变量包括处理材料所需的功率量,材料速度、宽度,待处理的侧面数目,以及特定材料对电晕处理的响应,所述变量可由技能熟练的操作者确定。安置电晕处理的典型位置与印制、涂覆或层积过程相一致。另一种常见的安置是直接在吹膜上或铸膜挤出机上进行,因为新鲜的材料更易于接受电晕处理。

[0066] 如上文所述,夹心免疫测定形式是最广泛使用的免疫测定方法,并且其也是分析设备(例如本申请中所讨论的盒)中优选的形式。在这一实施方式中,一种抗体(经固定的抗体)结合至固体支持物或免疫传感器,而第二种抗体(信号抗体)缀合/结合至信号产生剂(例如酶,如碱性磷酸酶)。信号产生剂(例如信号抗体)可以是分析设备中干试剂涂层的一部分(如下文中所描述的)并且优选在样品到达免疫传感器之前溶解到生物学样品中。在将样品和非特异性结合的试剂冲洗掉之后,保留在固体支持物上的信号产生剂(例如信号抗体)的量应该在原则上与样品中分析物的量成比例。然而,所述测定构造的一个限制是易于受到由可能存在于生物学样品中的嗜异性抗体引起的干扰。具体而言,能够结合一种或多种测定试剂的内源性抗体引起产生错误测试结果的可能性;其通过交联所述试剂而导致假阳性结果或通过掩蔽所述试剂而导致假阴性结果。

[0067] 虽然通过加入小鼠 IgG 减轻了嗜异性干扰,令人惊讶地发现对于某些样品而言,IgG 对于减轻嗜异性干扰是无效的。在这些样品中,即使存在 IgG,系统仍识别样品错误并且作为结果,设备中的算法使得所述设备抑制对错误结果的报告。甚至在存在大量 IgG 时,对于一些样品仍发现这种情况。

[0068] 现在发现,只有在额外存在分离自动物物种的 IgM 类免疫球蛋白或其片段时,这

些系统才产生准确的结果。如在本申请中所使用的,术语“片段”指源自特定分子的任何带有表位的片段。因此,IgM 片段可包括例如 F(ab')₂ 片段、Fab 片段或 Fc 片段,其为 IgM 分子的带有表位的片段。此外,“IgM 或其片段”指单独的 IgM、单独的 IgM 片段(即 IgM 的一个或多个 F(ab')₂ 片段, Fab 片段和 / 或 Fc 片段),或者 IgM 和 IgM 片段的组合。

[0069] 在优选的实施方式中,IgM 或其片段被掺入干试剂涂层中,其在一些实施方式中可以与含有信号产生剂(例如,信号抗体)的干试剂涂层是相同的。因此,在一个实施方式中,所述分析设备包括干试剂涂层,其包含下列的任一项或两项:(a) 适于改善嗜异性抗体效应的组分,例如 IgM 或其片段以及优选地 IgG 或其片段,和 / 或 (b) 信号抗体。所述干试剂涂层可由试剂混合物形成,所述混合物还优选包含下列的任一项或两项:(a) 适于改善嗜异性抗体效应的组分,例如 IgM 或其片段以及优选地 IgG 或其片段,和 / 或 (b) 信号抗体。优选地,首先用电晕处理将放置所述试剂混合物的表面,以提供将促进印制组合物的延展的带电表面组。

[0070] 一般地,用于形成干试剂涂层的试剂混合物还可包含水溶性的蛋白、氨基酸、聚酯、含有羟基基团的聚合物、糖或碳水化合物、盐和任选地染料分子。可使用一种或多种所述各个组分。在一个实施方式中,所述混合物含有牛血清白蛋白(BSA)、甘氨酸、盐、甲氧基聚乙二醇,蔗糖和任选地溴酚蓝以提供有助于观察印制过程的颜色。在一个实施方式中,将 1 至 20 μ L 的混合物印制到所需的表面上(例如在分析设备的保留室中或其它导管内)并允许其在与它的盖组装之前风干(或加热干燥)。

[0071] 在另一个实施方式中,测试盒可包括多个干试剂涂层(在这种情况下可分别被称作第一试剂涂层、第二试剂涂层等,以便区分它们)。例如,IgM 或其片段可被包括在第一试剂涂层中,其例如可接近含有信号产生元件(例如信号抗体)的第二试剂涂层。在这方面,所述第二试剂涂层可位于第一试剂涂层的上游或下游,虽然优选地,含有信号抗体的试剂涂层位于含有用于抑制嗜异性抗体干扰的组分的试剂涂层的下游。在优选的实施方式中,用包含 IgG 或其片段以及 IgM 或其片段的第一试剂涂层涂覆保留室。在这个方面,包含信号抗体的第二试剂涂层优选地位于保留室的下游,例如位于免疫传感器的直接上游。

[0072] 在另外的实施方式中,IgM 或其片段可以不是分析设备(例如盒)的一部分。例如,包含 IgM 或其片段以及优选地 IgG 或其片段的第一试剂涂层可被掺入样品收集设备(例如毛细管或注射器)中。例如,第一试剂涂层可在毛细管或注射器的内壁上形成。

[0073] 在另一个实施方式中,用于改善嗜异性干扰的组分可被包含在溶液中并与生物学样品(例如血液)混合,并将所产生的经修正的样品引入分析设备(例如盒)中。在一个实施方式中,例如可将血液样品与包含 IgM 或其片段(以及优选地 IgG 或其片段)的液体混合以形成经 IgM 修正的样品,然后将其引入分析设备(例如盒)中。另一方面,所述设备中包括含有液体的袋,所述液体包含 IgM 或其片段(以及优选地 IgG 或其片段),其与所述设备中的生物学样品相混合,然后基本上如本申请中所描述地被加工以形成用于分析物检测的夹心测定。

[0074] 在另一个实施方式中,采用电润湿来混合包含 IgM 或其片段和优选地 IgG 或其片段的第一液体与液体生物学样品(例如血液)。在这种实施方式中,可提供用于操控液滴的装置。所述装置例如可具有单侧的电极设计,其中所有的导电元件都被包含在一个表面上,在其上操控液滴。可提供与所述第一表面平行的另外的表面,以包含待操控的液滴。通过

进行基于电润湿的技术来操控液滴,其中被包含或被包埋在上述第一表面之上或之中的电极以受控的方式被相继通电和断电。所述装置可允许若干液滴操控过程,包括将两个液滴合并和混合在一起,将液滴分为两个或更多个液滴,通过由液流形成单独受控的液滴而对连续的液流取样,以及迭代二进制或数字混合液滴以获得所需的混合比率。以这种方式,包含 IgM 或其片段的第一液体的液滴可小心地并受控地与液体生物学样品(例如血液)合并和混合。参见,例如 U. S. Pat. No. 6, 911, 132, 在此以其全部通过引用而并入。

[0075] 虽然本发明可被广泛地应用于免疫测定系统,最好在 i-STAT™ 免疫测定系统(Abbott Point of Care Inc., Princeton, N. J.) 的情境中理解它,如在上文中所引用的共同所有的待审和发布的专利中所描述的。在一些实施方式中,所述系统采用免疫参照传感器(参见 US2006/0160164 A1, 在此以其全部通过引用而并入),用于评估测定过程中发生的 NSB 的程度。NSB 可由于不充分的清洗或由于存在干扰而产生。测定的净信号由下列组成:通过减去产生自免疫参照传感器的非特异性信号而校正的、产生自分析物免疫传感器的特异性信号。免疫参照传感器处的信号量取决于质量控制算法所限定的极限。

[0076] 在一个实施方式中,本发明改善了 i-STAT 免疫测定形式对内源抗体干扰的抵抗性,然而其同样适用于标准的 ELISA 形式。具体地,本发明涉及 IgM 类免疫球蛋白的用途,其被发现实质上减少某些测试样本中由嗜异性抗体引起的干扰。

[0077] 如上文所示,现在发现了用分离自动物种的 IgM 类免疫球蛋白(或其片段),优选地与 IgG 类免疫球蛋白(或其片段)相结合,来修正样品产生减少或消除的嗜异性抗体干扰。在实验中,将小鼠免疫球蛋白 M(IgM, Sigma-Aldrich) 加入样品中而调整用于 i-STAT™ 免疫测定形式的印制混合物。然后测试了已知的患者血浆样品,其之前由于嗜异性抗体的干扰而不能在本领域内被可靠地分析。如上文所示,应注意 i-STAT™ 系统之前对于这些样品没有报告错误的结果,因为所述系统包括失效安全算法,其检测免疫参照传感器处的假信号、以错误代码警告用户、并且抑制结果的显示。这是可靠的即时护理测试所需的质量系统的一部分的实例。

[0078] 令人惊讶地,当测试了新的经小鼠 IgM 修饰的盒并与常规盒的结果进行比较时,所获得的结果表明当采用经 IgM 修饰的盒时,之前有问题的血浆样品现在可以被准确地分析了。

[0079] 图 10 中的数据总结了测试结果,其中测定了鼠 IgM 在测量分别在两种显示已知的嗜异性抗体干扰的样品(样品 1 和 2)中的两种心脏标记物(心肌肌钙蛋白 I(cTnI) 和脑型利钠肽(BNP))方面的效力。在图 10 中,“平均结果”指由净差异信号(分析物传感器处的信号减去参照传感器处的信号)计算的分析物浓度,“盒的数目”指所进行的测定数目,“错误的数目”指对于给定的形式在样品上进行的测试中,由于参照传感器处过量的 NSB 而被抑制的结果的数目。

[0080] 在图 10 中所描述的 cTnI 测试中,用新的经 IgM 修饰的盒(MOD)在血液样品(样品 1)上进行了一组 9 个测试。平均结果为 0.23ng/mL 且没有被鉴别的系统错误,而对于标准(STD)设备,所有 9 个盒均给出由系统报告的错误,平均结果是没有意义的“负”浓度(-0.21ng/mL)。(下文解释了在此情境中“负”值的来源)。因此,利用本发明的 MOD 盒,所有 9 个样品都通过了内部系统质量检查并产生了有意义的结果,而 STD 盒均识别了与样品相关的错误并抑制了对结果的报告。

[0081] 在 BNP 测试组中,用新的 IgM MOD 盒和 STD 盒在第二种样品(样品 2)上进行了一系列 3 个测试。对于本发明的 MOD 盒,平均结果为 -27pg/mL 且没有被鉴别的系统错误,而对于 STD 设备,所有三个测试都给出了由系统报告的错误,平均结果为 -157pg/mL 。同样地,下文中解释了在此情境中“负”值的来源。

[0082] 为了提供进一步的洞悉,图 11 和 12 显示了实际的原始瞬时电化学免疫传感器应答以及免疫参照传感器应答,所述应答与图 10 中总结的对于包含嗜异性干扰的两种样品(样品 1 和 2)的测量相关。

[0083] 样品 1(图 10 和 11)产生自临床实践并且被测定对于 cTnI 是阳性的。所采用的测试盒为 i-STAT™ 心肌肌钙蛋白 I 盒并且包含用于心肌肌钙蛋白 I(实线,图 11)的感应器和用于评估抗 -cTnI 缀合剂的 NSB 程度的免疫参照传感器。参见 US 2006/0160164 A1。

[0084] 图 11 显示了在掺入鼠 IgM 后,电化学免疫传感器对于含有嗜异性抗体活性的样品的应答变化。实线表示在用 IgM 进行处理之前(浅实线)和之后(深实线)在免疫传感器处对于带有抗 -cTnI 抗体的 cTnI 的电流应答。虚线表示在用 IgM 进行处理之前(浅虚线)和之后(深虚线)在免疫参照传感器处对带有抗 -HSA 抗体的人血清白蛋白(HSA)的电流应答。箭头表示加入 IgM 后应答的变化。

[0085] NSB 可由于清洗步骤的问题产生或由于干扰的存在而产生。所采用的免疫参照传感器包括带有以微颗粒标记的抗 -HSA 抗体涂层的电极并且在暴露于样品后被 HSA 涂覆(注意,HSA 天然地由样品产生)。对图 11 的观察表明在加入鼠 IgM(深线)后,产生自 cTnI 免疫传感器(实线)的信号增加了。因此,没有 IgM 时,由于存在嗜异性干扰而低估了肌钙蛋白浓度。这表示样品含有能够结合一种或多种固定于免疫传感器的免疫试剂(抗 -cTnI 抗体)或与碱性磷酸酶(ALP)缀合的抗 -HSA 的干扰物,从而减少了它们对于与分析物相互作用的可利用率。图 11 还明显表明的是,在加入鼠 IgM(浅线)之前,免疫参照传感器(虚线)显示了显著的信号,其在加入鼠 IgM 之后明显减弱。因此,IgM 起到下列作用:减轻能够交联抗 -cTnI 缀合剂(含有动物抗 -cTnI 抗体)与抗 -HSA 试剂(在免疫参照传感器上)的干扰物。

[0086] 值得注意的是,传统的夹心测定在这些情形中将产生错误的结果,而 i-STAT 系统测定产生错误代码,这是因为错误检测算法要求来自参照传感器的信号低于临界值。这优越得多,因为临床上非常希望不报告结果而非报告错误的结果。以这种方式保持了分析系统的质量和完整性。

[0087] 一般而言,商业测定不包括所述参照测量(例如基于免疫参照传感器的测量),而是依赖于在被测样品中不存在干扰物或对干扰物的充分中和。不存在所述参照测量时,样品 1(图 10)将报告 0.00ng/mL 。注意, -0.21 的实际值产生自从较小的分析物传感器电流中减去相对大的免疫参照传感器电流。这明显是非物理的(non-physical)(没有意义的值或结果)并且被报告为零。如在存在 IgM 时所获得的,对于肌钙蛋白的真实样品值实际上是正的(0.23ng/mL)。还要注意,样品 1 具有非常低的 cTnI 浓度。因此,将预期实际的免疫传感器(IS)信号会是低的。此外,下列不是出乎预料的:免疫参照传感器(IRS)处的信号可能略高于 IS 信号,从而引起负值(因为从 IS 信号中减去了 IRS 信号)。此处,我们特别感兴趣的是评估嗜异性抗体对于具有内在的低分析物浓度的样品的效应,其中前者对于后者的相对效应可以是显著的。在实际分析物浓度在范围的高端样品中,嗜异性抗体的相

对效应一般将较不显著。关于肌钙蛋白的其它研究的进一步的细节显示于图 17(A-C) 中, 其提供了在下列处对于具有嗜异性抗体的各种肌钙蛋白样品的剂量应答图: (a) 免疫传感器, (b) 相关的免疫参照传感器, 和 (c) 减去了免疫参照传感器信号的免疫传感器信号。在下面的实施例 5 中有对图 17 的详细描述。

[0088] 图 12 显示了掺入鼠 IgM 后, 电化学 BNP 免疫传感器对于含有嗜异性抗体活性的样品的应答变化。实线表示在用 IgM 进行处理之前 (浅实线) 和之后 (深实线) 在免疫传感器处对于带有抗 -BNP 抗体的 BNP 的电流应答。虚线表示在用 IgM 进行处理之前 (浅虚线) 和之后 (深虚线) 在免疫传感器处对带有抗 -HSA 抗体的人血清白蛋白 (HSA) 的电流应答。箭头表示加入 IgM 后应答的变化。

[0089] 样品 2 (图 10 和 12) 在正常的名义上健康的个体群体中产生并且事实上具有低 BNP 浓度。测试盒 (i-STAT 脑型利钠肽, BNP) 含有用于 BNP 的免疫传感器 (实线, 图 12) 和用于评估抗 -BNP 缀合剂的 NSB 程度的免疫参照传感器。如上文中所示, NSB 可由于清洗步骤的不准确产生或由于干扰的存在而产生。免疫参照传感器包括带有以微颗粒标记的抗 -HSA (人血清白蛋白) 抗体涂层的电极并且在暴露于样品后被 HSA 涂覆 (HSA 天然地由样品产生)。对图 12 的观察表明加入鼠 IgM 后 (深线), 产生自 BNP 免疫传感器 (实线) 的信号降低了。因此, 没有 IgM 时, 由于存在嗜异性干扰而高估了此传感器处的 BNP 浓度。图 12 还明显表明的是, 加入鼠 IgM 之前 (浅线), 免疫参照传感器 (虚线) 显示了显著的信号, 其在加入鼠 IgM 之后 (深线) 明显减弱。因此, IgM 起到下列作用: 减轻能够交联抗 -BNP 缀合剂 (含有动物抗 -BNP 抗体) 与抗 -BNP 或抗 -HSA 试剂 (在分析物和免疫参照传感器表面上) 的干扰物。

[0090] 不存在免疫参照传感器或 IgM 时, 由 BNP 传感器观察到的信号 (浅实线, 图 12) 将对应于错误地升高的结果。免疫参照传感器上干扰所诱导的信号 (浅虚线, 图 12) 允许 (预 -IgM 减轻) 结果在 i-STAT™ 测定形式中被抑制。因此, 对 IgM 的包括允许了报告正确的结果 (0pg/mL BNP)。明显负结果的出现是根据与对于上述 cTnI 实例同一类型的解释。

[0091] 如上文所述, 关于任选地印制在盒中的、包括 IgM 的新的干试剂, 所述试剂优选被配制为含有消除干扰的试剂 (例如鼠和羊的 IgG 以及鼠 IgM) 的水性溶液。如上文中所讨论的, 在引入生物样品 (例如血液) 后, 所述样品优选在测定的第一步中与试剂相混合。所述试剂还可包括无机盐和表面活性剂, 以优化测定在化学和流体属性方面的表现。其它任选的添加剂包括肝素 (以确保足够的抗凝作用) 以及染料 (用于观察印制后试剂的位置)。还任选存在的是稳定剂, 例如叠氮化钠用于抑制微生物生长, 以及乳糖醇和二乙氨基 - 葡聚糖的混合物 (Applied Enzyme Technologies Ltd., Monmouth House, Mamhilad Park, Pontypool, NP4 0HZ UK) 用于稳定蛋白质。

[0092] 为了减少嗜异性抗体干扰, 鼠 IgM 可例如以如下量被掺入: 向样品施用的剂量使得 IgM 浓度为约 10 μ g/mL 至约 100 μ g/mL, 优选的范围为 25 至 40 μ m/mL。液体试剂优选被制备为浓度在 1wt. % 固体至 30wt. % 固体的范围内, 优选的浓度在 5 至 7wt. % 固体的范围内。一旦置于设备中, 所放置的试剂可例如在暖气流中被干燥 30 至 60 分钟。在一个实施方式中, 使用自动化的印制装置将试剂印制在所述设备的样品入口中并使其干燥以形成含有 IgM 的试剂涂层。

[0093] 在优选的实施方式中, 如在心肌肌钙蛋白 I 免疫测定中所实施的, 对于 1 升 (L) 的

批次如下制备基底印制混合物：将蛋白稳定溶液 (PSS, AET Ltd., 50% 固体, 100.0g) 加入 200-250mL 氯化钠 (8.00g) 和叠氮化钠 (0.500g) 的水性溶液中, 将所产生的溶液转移到 1L 体积的烧瓶中。如下制备鼠 IgG 溶液：将鼠 IgG (0.9g) 加入 75mL 去离子水中, 并搅拌 15-60 分钟直至完全溶解。以同样的方式制备同样浓度的羊 IgG 溶液, 使两种溶液都滤过 1.2 μ M 的过滤器。从供应商 (例如 Sigma-Aldrich) 处作为液体得到鼠 IgM。在 280nm 处, 用分光光度计测量三种免疫球蛋白 (Ig) 储液中每一种的蛋白质浓度。计算提供鼠 IgG (0.75g)、羊 IgG (0.75g) 和鼠 IgM (25mg) 所需的这些 Ig 溶液的量, 并且将这些量加入印制溶液中。通过将 DEAE-葡聚糖 (2.5g) 加入 50-100mL 去离子水中并搅拌 30 分钟而制备二乙氨乙基-葡聚糖 (DEAE-葡聚糖) 溶液。将所述 DEAE-葡聚糖溶液加入印制溶液中。向此溶液中加入肝素钠 (10,000IU/mL, 3.00mL), Tween-20 (3.00g) 和 5% (w/v) 的若丹明水性溶液 (200 μ L)。用去离子水将所产生的溶液稀释至 1.000L 并储存在冷冻库或冰箱中直至使用。

[0094] 印制所述液体和类似的液体以在盒组件上形成干试剂涂层, 这优选是自动的并且基于微量涂布系统, 其包括相机和计算机系统以排列组件, 如 U. S. Pat. No. 5, 554, 339 中所公开的。在此专利中, 晶片卡盘 (wafer chuck) 被轨道代替而用于将塑料盒基底供给涂布头。所述轨道在预定的方向上将所述基底呈递给所述头以确保一致的位置性涂布。

[0095] 免疫传感器优选实施方式的晶片级精密加工如下。基底电极 (图 9 的 94) 包括 15 μ m 中心上的 7 μ m 金盘方阵列。所述阵列覆盖直径大约 600 μ m 的圆形区域, 并如下实现：通过在由包含 Si/SiO₂/TiW/Au 的一系列层制成的基质上光成形 (photo-patterning) 厚度为 0.35 μ m 的聚酰亚胺薄层。7 μ m 微电极的阵列提供了对电活性物种的高收集效率, 伴随减少的、来自与暴露的金属的电容相关的任何电化学背景电流的贡献。在金属上包括有 PVA 层显著提高了对背景电流的减少。

[0096] 多孔 PVA 层是通过将 PVA 和 stilbizonium 光活性交联剂的水性混合物旋转涂覆在晶片上的微电极上而制备的。所述旋转涂覆混合物任选地包括牛血清白蛋白 (BSA)。然后其被光成形以仅仅覆盖阵列之上和阵列周围的区域并优选具有约 0.6 μ m 的厚度。

[0097] 差异测量的一般概念是电化学和感应领域中已知的。现在描述的是用于减少电化学免疫感应系统中的干扰信号的新工具。然而, 虽然是针对电流测量电化学传感器对进行的描述, 其在其它电化学感应系统中同样有用, 所述系统包括电势测量传感器、场效应晶体管传感器和电导测定传感器。其也可应用于光学传感器, 例如瞬逝波传感器和光波导、以及其它类型的感应 (包括声波和热计量感应等)。理想地, 来自免疫传感器 (IS) 的信号只源自包含经固定的抗体 (Ab1)、分析物和经标记的信号抗体 (Ab2) 的夹心的形成, 其中所述标记 (例如酶) 与底物 (S) 反应以形成可检测的产物 (P), 如下面的方案 (1) 所示。

[0098] 表面 -Ab1- 分析物 -Ab2- 酶; 酶 + S $\rightarrow$ P (1)

[0099] 已知一些信号抗体 (Ab2) 可能与表面非特异性地结合 (如下面的方案 (2) 和 (3) 中所示), 并且在清洗步骤中不从免疫传感器的区域被完全清洗掉 (直至约 100 微米远), 使得总检测产物的一部分不是根据表面 -Ab1- 分析物 -Ab2- 酶免疫测定夹心结构的, 从而产生干扰信号。

[0100] 表面 -Ab2- 酶; 酶 + S $\rightarrow$ P (2)

[0101] 表面 - 分析物 -Ab2- 酶; 酶 + S $\rightarrow$ P (3)

[0102] 如上文所示, 第二免疫传感器任选地可被置于盒中, 其作为免疫参照传感器 (IRS)

起作用并且给出与在主要免疫传感器上产生的相同的（或可预测地相关的）NSB 程度。可通过从主要免疫传感器信号中减去所述免疫参照传感器的信号而减少干扰，即去除了信号的 NSB 组分，从而改善测定的表现，如下面的方案（4）中所示。这种校正可任选地包括减去或加上其它的偏差值。

[0103] 经校正的信号 = IS-IRS (4)

[0104] 所述免疫参照传感器优选在所有主要的方面（例如尺寸、多孔筛选层、乳胶颗粒涂层和金属电极构成）都与主要免疫传感器相同，除了用以高浓度天然存在于样品（正常的和病理状态的）中的血浆蛋白的抗体代替了分析物（例如 cTnI）的捕获抗体之外。免疫传感器和参照免疫传感器可被分别装配为硅片上相邻的结构 94 和 96，如图 9 中所示。虽然就肌钙蛋白 I 和 BNP 测定描述了优选的实施方式，所述结构也可用于其它的心脏标记物测定，这包括例如肌钙蛋白 T、肌酸激酶 MB、降钙素原、proBNP、肌红蛋白等，以及临床诊断中所使用的其它夹心测定，例如 PSA 和 TSH。

[0105] 结合血浆蛋白的合适抗体的实例包括人血清白蛋白抗体、纤维蛋白原抗体和 IgG fc 区域的抗体，其中优选的是白蛋白抗体。然而，如果可获得合适的抗体，可使用任何以大于约 100ng/mL 的浓度存在的天然蛋白或血液组分。但是，所述蛋白应当以足够的量存在以快速涂覆传感器（相比于进行分析物测定所需的时间）。在优选的实施方式中，存在于血液样品中的蛋白浓度足以在接触血液样品的约 100 秒内结合超过 50% 在参照免疫传感器上可得的抗体。一般而言，第二经固定抗体具有的亲和常数为约 1×10^{-7} 至约 1×10^{-15} M。例如优选地，白蛋白抗体具有的亲和常数为约 1×10^{-10} M，这是由于白蛋白在血液样品中的高摩尔浓度（其为约 1×10^{-4} M）。

[0106] 已发现，提供由源自样品的天然白蛋白覆盖的表面显著减少了可能存在的其它蛋白和细胞材料的结合。此方法通常优于使用常规封闭剂来使 NSB 最小化的常规免疫测定，因为这些常规试剂通常必须被干燥并且在使用前保持数月或数年稳定，在此期间它们可能降解而产生比所需的更粘的表面，并导致 NSB 随时间上升。相反，本申请中描述的方法提供了在使用之时的新鲜表面。

[0107] 下面描述的是用于心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 的免疫传感器，其具有用于进行差异测量的参照免疫传感器以降低 NSB 的效应。通过相同的方法来制备用抗 -cTnI 和抗 -HSA 涂覆的、经羧化物修饰的乳胶颗粒（由 Bangs Laboratories Inc. 或 Seradyn Microparticles Inc. 供应）。首先通过离心缓冲交换所述颗粒，然后加入抗体，允许所述抗体被动地吸附到所述颗粒上。然后用 MES 缓冲液 (pH 6.2) 中的 EDAC 活化所述颗粒上的羧基，从而与抗体形成酰胺键。通过离心去除任何珠聚集体且将完成的珠冻存。

[0108] 已发现对于抗 - 人血清白蛋白 (HSA) 抗体而言，饱和覆盖乳胶珠使得珠质量增加约 7%。由包含 7mg 抗 -HSA 和 100mg 珠的混合物，利用共价连接制备经涂覆的珠。使用此制备物，将约 0.4nL 的液滴（包含约 1% 固体在去离子水中）微涂布（使用 U. S. Pat. No. 5,554,339 的方法和装置，在此以其全部通过引用而并入）到覆盖传感器 96 的光成形多孔聚乙烯醇选择性渗透层上，并允许其干燥。经干燥的颗粒粘附到所述多孔层上并实质上防止其溶解到血液样品中或洗液中。

[0109] 对于肌钙蛋白抗体而言，饱和覆盖乳胶珠表面使得在珠中产生约 10% 的质量增加。因此，通过向 100mg 珠中加入 10mg 的抗 -TnI 以及耦合剂，实现了饱和覆盖。然后将这

些珠微涂布到传感器 94 上。

[0110] 在另一个实施方式中,用具有血浆蛋白抗体(例如抗-HSA)和分析物抗体(例如抗-cTnI)的珠涂覆免疫传感器 94。乳胶珠是由约 2mg 或更少的抗-HSA/100mg 珠制成的,然后用抗 cTnI 进行的饱和涂覆在免疫传感器处提供了优越的 NSB 特性。已发现肌钙蛋白测定的斜率(信号相对于分析物浓度)没有受到实质性影响,因为珠上有足够的抗-cTnI 以捕获可获得的分析物(抗原)。通过测定对于不同抗体的珠饱和浓度,以及具有仅有抗靶分析物的抗体的珠的免疫传感器的斜率,可针对具有抗给定分析物和血浆蛋白的抗体的珠确定抗体组合的适当比率。

[0111] 具有参照免疫传感器的免疫传感器的一个重要方面是通过血浆蛋白(优选 HSA/抗-HSA 组合)层制造的表面的“人源化”。这似乎使得珠更不易于抗体-酶缀合物的 NSB。这似乎也减少了珠的变化。不被理论所束缚,似乎当传感器被样品覆盖时,因为抗-HSA 表面,它们快速地被天然白蛋白涂覆。这与常规的封闭材料相比给出了优越的结果,所述常规的封闭材料在制造中被干燥并通常在长期储藏后被重新水合。“人源化”传感器表面的另一个优势是其为人抗-小鼠抗体(HAMA)和其它嗜异性抗体干扰提供了额外的抵抗模式。HAMA 对于免疫测定的影响是公知的。

[0112] 本发明的设备和方法中可采用的免疫参照传感器的另一个用途是监测在分析循环中获得的清洗效率。如上文所述,背景噪音的一个来源是仍在溶液中或非特异性地吸附在传感器上、并且没有通过清洗步骤被移除的少量酶缀合物。本发明的这一方面涉及使用少量的洗液、如实施例 2 中所述通过引入空气区段而进行有效的清洗步骤。

[0113] 在优选实施方式(其为电流测量电化学系统)的操作中,通过分析仪记录产生自 ALP 活性的、与免疫传感器 94 和免疫参照传感器 96 处的对氨基苯酚的氧化相关的电流。免疫传感器和免疫参照传感器处的电势,相对于银-氯化银参照电极保持相同的值。为了去除干扰的影响,分析仪根据上文的等式(4),从免疫传感器的信号中减去免疫参照传感器的信号。其中在两个传感器之间有特征性的常量偏差,这也被减去。将被认可的是,免疫参照传感器不需要具有与免疫传感器相同的所有非特异性特性,仅需要其在测定的清洗和 NSB 部分都一致性地成比例。嵌入分析仪中的算法可补偿两个传感器之间任何其它基本上恒定的不同。

[0114] 使用免疫传感器和免疫参照传感器的差异性组合而非单独的免疫传感器,对于测定提供了下列改进。在优选的实施方式中,所述盒的设计提供了干试剂,其产生溶解到约 10 μ L 血液样品中的约 4-5 十亿个酶缀合物分子。在结合和清洗步骤的末期,传感器处的酶分子数目为约 70,000。在以优选实施方式进行的实验中,在免疫传感器和参照免疫传感器上平均有约 200,000(± 约 150,000) 个酶分子作为非特异性结合的背景。使用以免疫参照传感器进行的差异性测量,去除了约 65% 的不确定性,显著改善了测定的表现。而其它的实施方式可具有其它程度的改善,保留了测定表现方面整体改善的基础。

[0115] 任选的免疫参照传感器的其它用途是检测反常的样品条件,例如不当抗凝结的样品,其在整个导管中放置材料并在免疫传感器和免疫参照传感器处都引起增加的待测电流。这一效应与测量步骤中非特异性吸附的酶以及存留在传感器上洗液薄层中的酶相关。

[0116] 任选的免疫参照传感器的另一个用途是针对清洗效率校正信号。在某些实施方式中,免疫传感器处的信号水平依赖于清洗的程度。例如,以更多的液体/气体区段转换进行

的更长的清洗可给出更低的信号水平,这是由于一部分特异性结合的缀合物被洗掉了。虽然这可能是相对小的效应(例如少于5%),但校正可改善测定的总体表现。校正可基于传感器处的相对信号而实现,或与位于邻近所述传感器的导管中的传导性传感器相结合而实现,所述传导性传感器是作为用于检测和计算气体区段/液体转换数目的传感器。这为嵌入分析仪中的算法校正工具提供了输入。

[0117] 在具有内源性蛋白(例如HSA)的参照免疫传感器的另一个实施方式中,通过使免疫参照传感器被抗外源蛋白(例如牛血清白蛋白(BSA))的抗体涂覆而有可能达到同样的目的。在这种情况下,在接触传感器之前需要使BSA的一部分溶解到样品中的步骤,以作为额外的试剂提供。所述溶解步骤可以BSA作为干试剂在盒的样品保留室中进行,或者在外部收集设备(例如涂覆了BSA的注射器)中进行。这一方法提供了某些优势,例如可就表面电荷、特定的表面基团、糖基化的程度等选择蛋白。这些特性在可获得的内源性蛋白选择中不一定存在。

[0118] 除了盐外,其它的试剂可改善免疫测定中的全血精确性。这些试剂应当以促进快速溶解的方式被呈递给血液样品。支持基质包括纤维素、聚乙烯醇和明胶(或者它们的混合物),其被涂覆在血液保留室(或另一个导管)的壁上并促进快速溶解,例如在少于15秒内完成大于90%。

[0119] 除了包括IgM或其片段之外,其它任选的添加剂可被包括在盒中或与所述测定结合使用。在样品不是在肝素化的管中被收集或没有在肝素化的管中被适当混合的情形中,可加入抗凝剂肝素以改善表现。加入足够的肝素,从而新鲜的未肝素化的血液在盒的测定循环中(通常在2-20分钟的范围内)将保持是非凝结的。可加入山羊和小鼠的IgG以对抗免疫测定领域中公知的嗜异性抗体问题。可加入Proclin、DEAE葡聚糖、Tris缓冲剂和乳糖醇作为试剂稳定剂。可加入Tween 20以减少蛋白质与塑料的结合,塑料是用于所述盒的优选材料。其也允许试剂更均匀地涂覆塑料表面并作为杂质起作用而使糖(例如乳糖醇)的结晶最小化,从而它们保持为玻璃状。可加入叠氮化钠以抑制细菌生长。

[0120] 本发明的盒具有下述优势:在测定顺序中,样品与第二液体可在不同的时间接触传感器阵列。也可用起初作为干燥涂层在相应导管内存在的其它试剂或化合物独立地修正样品和第二液体。液体在盒内受控的运动进一步允许当样品或液体移动到导管的新区域时,超过一种物质被修正到各个液体中。以这种方式,向各个液体提供了多种修正,大大扩展了可进行的自动化测定的复杂性,并因此增加了本发明的用处。

[0121] 在一次性盒中,所包含的液体量优选被保持为少的,以使成本和尺寸最小化。因此在本发明中,也可通过使区段的气液界面经过传感器阵列或其它待冲洗的区域至少一次,而利用导管内的区段来帮助清洁和冲洗导管。已发现,与用更大体积的液体进行的连续冲洗相比,通过所述方法使用更少的液体实现了更有效的冲洗。

[0122] 导管内的限制在本发明中有数个目的。位于样品保留室和第一导管之间的毛细管终止被用于促进保留室中的样品计量,这是通过防止保留室中的样品移位直到施加了足够的压力来克服毛细管终止的阻力。第二导管内的限制是用于当液体到达收缩处时,使洗液沿着备选的路径转向废料室。提供衬垫中的小洞和疏水性涂层是为了防止从第一导管流向第二导管,直到施加了足够的压力。控制本发明的导管之内和导管之间的液流的特征在本申请中统称为阀。

[0123] 因此,本发明的一个实施方式提供具有样品保留室的一次性盒,所述保留室与含有分析物传感器或分析物传感器阵列的第一导管相连。部分含有液体的第二导管与所述第一导管相连,并且可向所述第二导管内的液体中引入空气区段以使其区段化。提供了泵工具以使第一导管内的样品转移,并且其使液体从第二导管转移到第一导管中。因此,可使传感器首先与样品接触然后与第二种液体接触。

[0124] 在另一个实施方式中,所述盒包括位于第一导管和废料室之间的可闭合的阀。这种实施方式允许仅使用与第一导管相连的单一的泵工具来使液体从第二导管转移到第一导管中。这种实施方式还允许有效地清洗本发明的盒的导管,这对于小的一次性盒而言是重要的特征。在操作中,样品被移动以接触传感器,然后被移动通过可闭合的阀进入废料室。在浸湿后,所述可闭合的阀密封废料室的开口而提供气封,这允许仅使用与第一导管相连的泵工具而使第二导管中的液体与传感器接触。在这种实施方式中,所述可闭合的阀允许以这种方式转移液体并防止空气从废料室进入第一导管。

[0125] 在另一个实施方式中,提供了可闭合的阀以及用于将区段引入导管中的工具。这种实施方式具有许多优势,例如使区段化的液体在传感器或传感器阵列上往复运动的能力。因此,第一区段或第一组区段用于冲洗传感器,然后新鲜的区段代替它用于进行测量。仅需要一个泵工具(与第一导管相连的泵工具)。

[0126] 在另一个实施方式中,在涂覆分析物传感器的液体薄膜中进行分析物的测量。此种薄膜测定优选电流测量地进行。此种盒在以下方面区别于前述实施方式:其具有当样品经过阀被排出时被密封的可闭合的阀;以及导管内的通气口,其允许随后向测量的液体中引入至少一个空气区段从而增加从传感器冲洗样品的效率,而且还允许在测量前从传感器去除基本上所有的液体,并且进一步允许使新鲜液体的区段通过传感器以允许顺次的重复测量,用于改善的准确性和再现性的内部检测。

[0127] 如上文中所讨论的,用于检测低浓度免疫活性分析物的分析方案依赖于形成经酶标记的抗体/分析物/结合表面的抗体的“夹心”复合物。样品中的分析物浓度被转换为成比例的酶表面浓度。所述酶通过将底物转换为可检测的产物而能够放大分析物的化学信号。例如,当所述酶为碱性磷酸酶时,单一的酶分子可产生大约9千个可检测的分子/分钟,这与其中电活性物种代替碱性磷酸酶附着于抗体的方案相比,在分析物的可检测性方面提供了数个数量级的改进。

[0128] 在免疫传感器的实施方式中,在从传感器记录应答之前,使传感器首先与样品接触然后再与洗液接触是有利的。在具体的实施方式中,在经修正的样品接触传感器之前,用结合样品中的目的分析物的抗体-酶缀合物(信号抗体)修正样品。样品中的结合反应产生分析物/抗体-酶复合物。所述传感器包括抗所述分析物的经固定的抗体,其接近电极表面附着。与传感器接触后,所述分析物/抗体-酶复合物结合接近电极表面的经固定的抗体。此刻从电极附近移除尽可能多的抗体-酶缀合物,以使来自传感器的背景信号最小化是有利的。抗体-酶复合物的酶有利地能够转化液体中所提供的底物而产生电活性物种。所述活性物种接近电极产生,并且当施用合适的电势时其提供来自电极处的氧化还原反应的电流(电流测量操作)。备选地,如果电活性物种是离子,其可被电势测量地测量。在电流测量中,电势可在测量过程中被固定或者根据预先确定的波形变化。例如,可使用三角波来扫掠极值之间的电势,如在公知的循环伏安法技术中所使用的。备选地,数字技

术（例如方波）可被用于改善对接近电极的电活性物种的检测的灵敏度。由电流或电压测量，计算了样品中分析物的量或分析物的存在。这些和其它分析电化学方法是本领域中公知的。

[0129] 在其中的盒包含免疫传感器的实施方式中，所述免疫传感器有利地由下列精密加工而成：惰性金属（例如金、铂或铱）的基底传感器和覆盖有生物活性层的多孔选择性渗透层，所述生物活性层附着至微颗粒（例如乳胶颗粒）。将微颗粒涂布在覆盖电极表面的多孔层上，形成粘附的多孔生物活性层。所述生物活性层具有特异性结合目的分析物的特性，或者当存在分析物时显示可检测的变化，并且最优选地为抗所述分析物的经固定的抗体。

[0130] 关于附图，本发明的盒包括盖（图 1 和 2）、基底（图 4）和薄膜粘性的衬垫（图 3），所述衬垫被置于所述基底和所述盖之间。现在关于图 1，所述盖 1 由刚性材料（优选塑料）制成，并且能够在灵活的转轴区域 5, 9, 10 重复变形而不破裂。所述盖包括盖子 (lid) 2，其通过灵活的转轴 9 附着于所述盖的主体。在操作中，当将样品引入样品保留室 34 中后，可将所述盖子 2 在样品入口 4 的进口处固定，防止样品渗漏，并且通过钩 3 使所述盖子 2 固定。所述盖还包括两个浆 6, 7，其可相对于盖体移动，并且所述盖体与所述浆通过灵活的转轴区域 5, 10 相连。在操作中，当由泵工具操作时，浆 6 对包含腔 43 的气囊施力以使盒导管内的液体转移，所述腔 43 被薄膜衬垫 21 覆盖。当由第二泵工具操作时，浆 7 对衬垫 21 施力，所述衬垫 21 可由于其中切开的切口 22 而变形。使所述盒适于插入读取装置中，并因而为此具有多个机械和电学连接。还应是显然的是，可能对盒进行手动操作。因此，在将盒插入读取装置中后，所述衬垫将压力传递到含有液体的箔包 (pack) 上（所述箔包中填充了大约 130 μ L 的分析 / 清洗溶液（“液体”）并位于腔 42 中），用刺 38 使包装破裂，并将液体排入导管 39 中，所述导管 39 通过基底中的短横断导管与传感器导管相连。分析液填充分析导管的前部，其首先将液体推到作为毛细管终止的带衬垫中的小开口上。利用应用于盒的分析仪机制的其它动作来将一个或多个区段注射到分析导管内受控位置处的分析液中。这些区段被用于以最少的液体帮助清洗传感器表面和周围的导管。

[0131] 所述盖还包括由薄的柔软的膜 8 覆盖的孔。在操作中，施加于所述膜上的压力通过衬垫中的小孔 28 将一个或多个空气区段排入导管 20 中。

[0132] 关于图 2，所述基底的下表面还包括第二导管 11 和第一导管 15。第二导管 11 包括收缩处 12，其通过为液体的流动提供阻力而控制液体流动。任选的涂层 13, 14 提供疏水性表面，其与衬垫孔 31, 32 一起控制第二和第一导管 11, 15 之间的液体流动。基底中的凹处 17 为导管 34 中的空气提供了穿过衬垫中的孔 27 通向导管 34 的路径。

[0133] 关于图 3，薄膜衬垫 21 包括各种孔和切口以促进液体在基底和盖内的导管之间转移，并在需要的时候允许衬垫在压力下变形。因此，孔 24 允许液体从导管 11 流入废料室 44；孔 25 包括导管 34 和 15 之间的毛细管终止；孔 26 允许气体在凹处 18 和导管 40 之间流动；孔 27 提供凹处 17 和导管 34 之间的气体运动；孔 28 允许液体通过任选的可闭合的阀 41 从导管 19 流向废料室 44。孔 30 和 33 分别允许被包括在 (housed) 剖面 35 和 37 中的多个电极与导管 15 内的液体接触。在具体的实施方式中，剖面 37 包括基本电极和 / 或反 - 参照电极，而剖面 35 包括至少一个分析物传感器和任选地电导测定传感器。在图 3 中，带 21 在 22 处被切开，这在装置施加向下的力以在倒刺 38 上破裂元件 42 内的 calibrant 袋时允许被三个切口 22 包围的带变形。所述带还在 23 处被切开，这在装置提供向下的力时允许所

述带向下屈而到元件 43 中,从而从室 43 排出空气并使样品液体通过导管 15 而向传感器移动。图 3 中的元件 29 作为带中的开口,将图 2 的盖中的区域与图 4 的基底相连。

[0134] 关于图 4,导管 34 是在经组装的盒中将样品入口 4 与第一导管 11 相连的样品保留室。剖面 35 包括分析物传感器,或分析物响应性表面,以及任选的电导测定传感器。剖面 37 包括基本电极(如果需要的话)作为电化学传感器的电流回路,并且还可包括任选的电导测定传感器。剖面 36 提供衬垫孔 31 和 32 之间的液体路径,从而液体可在第一和第二导管之间通过。凹处 42 在经组装的盒中包括含有液体的包装(例如可破裂的袋),其由于插入读取装置内后施加于浆 7 上的压力而被刺 38 刺穿。液体从被刺穿的包装流入 39 处第二导管中。气囊包括凹处 43,其在上表面被衬垫 21 密封。气囊是泵工具的一个实施方式并由应用于浆 6 的压力启动,其转移导管 40 中的空气并从而将样品从样品室 34 转移到第一导管 15 中。

[0135] 空气从气囊进入样品保留室的位置(衬垫孔 27)和毛细管终止 25 一起限定样品保留室的预定体积。当浆 6 被压下时,相应于所述体积的样品量被转移到第一导管中。因此,这种排布是用于将计量量的未计量样品递送到盒导管中的计量工具的一个可能的实施方式。

[0136] 在本发明的盒中,在基底塑料部分中提供了用于计量样品区段的工具。所述区段的大小是由基底中间隔(compartment)的大小、毛细管终止的位置和带衬垫中的空气管孔控制的。这一体积可从 $2\mu\text{L}$ 至 $200\mu\text{L}$ 容易地变化。在本发明的情境中,有可能对样品容量的所述范围进行扩展。

[0137] 液体被推过预分析导管 11,所述导管可被用于在样品于传感器导管 19 处呈递前,将试剂(例如颗粒、可溶性分子、或者 IgM 或其片段)修正到样品中。备选地,所述修正试剂可位于部分 15 中,超过部分 16。将样品推过预分析导管还起到下列作用:向膈泵浆 7 中引入张力,这改善了其对于液体转移的作用的响应。

[0138] 在一些测定中,如果需要对分析物进行定量,那么计量是有利的。对于从导管排出的样品和/或液体提供了废料室 44,以防止盒外表面的污染。还提供了连接废料室与外部大气的通风口 45。所述盒的一个所需的特征是,一旦装入了样品无需操作者或其它人接触样品就可完成分析并将盒丢弃。

[0139] 现在关于图 5,提供了盒特征和组件的示意图,其中 51-57 是导管和样品室的部分,其能够任选地被干试剂涂覆以修正样品或液体。样品或液体至少一次通过干试剂以将其溶解。用于修正样品的试剂可包括下列的一种或多种:抗体-酶缀合物(信号抗体)、IgM 和/或其片段、IgG 和/或其片段、以及防止测定化合物中特异性或非特异性结合反应的其它封闭剂。也可提供不可溶但帮助防止将测定组分非特异地吸附到盒的内表面的表面涂层。

[0140] 在具体的实施方式中,在第一导管和废料室之间提供可关闭的阀。在一个实施方式中,所述阀 58 包括以不可渗透的物质涂覆的干燥海绵材料。在操作中,用样品或液体接触海绵材料引起海绵的膨胀以填充腔 41(图 4),从而实质上阻碍液体进一步流入废料室 44。此外,润湿的阀也阻碍空气在第一导管与废料室之间的流动,这允许与样品室相连的第一泵工具转移第二导管内的液体,并以下列方式将液体从第二导管转移到第一导管中。

[0141] 现在关于图 6,其显示了免疫传感器盒的示意布局,提供了三个泵 61-63。虽然以

具体实施方式的形式描述了这些泵,将容易理解,在本发明中可使用能够行使泵 61-63 的各自功能的任何泵设备。因此,泵 1、61 应当能够将样品从样品保留室转移到第一导管中;泵 2、62 应当能够转移第二导管内的液体;而泵 3、63 应当能够将至少一个区段插入第二导管中。本申请中所涉及的其它类型的泵包括但不限于:接触气体工具的气囊(其中将压力施加于所述气囊),灵活的膈,活塞和气缸,电动力学泵和声波泵。关于泵 3、63,术语“泵”包括通过其将一个或多个区段插入第二导管中的所有设备和方法,例如用于从气囊中转移空气的气体工具,溶解时产生气体的干燥化学物质,或与电流源可操作连接的多个电解电极。在具体的实施方式中,使用生成机械区段的膈来产生区段,所述膈可具有超过一个气囊或室。如所显示的,孔 8 具有单一的开口,其连接内膈泵和填充了液体的、其中将注入区段的导管 20。所述膈可以被区段化以产生多个区段,每一个都被注射到填充了液体的导管内特定的位置中。图 6 中,元件 64 表示免疫传感器进行捕获反应以形成包含经固定的抗体、分析物和信号抗体的夹心的区域。

[0142] 在备选的实施方式中,使用被动特征来注射区段。通过带衬垫来密封盒基底中的孔。覆盖孔的带衬垫在任一端具有两个小孔。一个孔是开放的而另一个孔是用过滤材料覆盖的,所述过滤材料接触液体后润湿。以疏松的亲水性材料(例如纤维素纤维过滤器、纸过滤器或玻璃纤维过滤器)填充所述孔。这种亲水性材料通过毛细管作用将液体拉进基底中的孔内,从而转移先前在所述孔中的空气。空气通过带衬垫中的开口被排出而制造这样的区段,其体积是由所述孔的体积以及疏松亲水性材料的空体积确定的。可选择用于覆盖基底中的孔入口之一的过滤器,以计量液体填充孔的速率并从而控制所述区段被注射到盖的导管内的速率。这一被动特征允许任何数目的受控区段被注射到液体路径中的特定位置并需要最小的空间。

[0143] 基于当前的公开,显然本方法提供了在分析物免疫测定中减少或消除来自嗜异性抗体的干扰的方式,其中首先收集样品(例如全血样品),然后通过使包含 IgM 或其片段的干试剂溶解到所述样品中而修正所述样品。这产生了具有浓度为至少约 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的、溶解的非人 IgM 的样品,所述非人 IgM 足以实质上掩蔽样品中的任何嗜异性抗体。一旦完成了这个步骤,就有可能在经修正的样品上进行免疫测定(例如电化学免疫测定),以确定分析物的浓度。

[0144] 应注意,干试剂溶解和夹心形成的步骤可同时发生或以分步的方式发生。所述方法主要涉及为心血管标记物(例如, TnI, TnT, CKMB, 肌红蛋白, BNP, NT-proBNP, 和 proBNP)的分析物,但是也可被用于其它标记物(例如 β -HCG, TSH, D-二聚体和 PSA)。为了确保在检测步骤之前大部分嗜异性抗体被掩蔽,优选样品修正步骤进行所选的预先确定的时间段,所述时间段在约 1 分钟至约 30 分钟的范围内。

[0145] 所述方法优选在包括下列的盒中进行:免疫传感器、导管、样品入口和样品保留室,其中这些元件中的至少一个的至少一部分被干试剂涂覆。应注意,所述干试剂可包括缓冲剂、盐、表面活性剂、稳定剂、简单碳水化合物、复杂碳水化合物和各种组合。此外,所述干试剂还可包括抗所述分析物的经酶标记的抗体(信号抗体)。

[0146] 对于 TnI 和 BNP 测定,干试剂优选溶解到样品中以给出至少 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ (例如至少 $30\text{ }\mu\text{g/mL}$, 至少 $40\text{ }\mu\text{g/mL}$, 或至少 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$) 的 IgM 浓度(或者等同的 IgM 片段浓度)。关于范围,干试剂优选溶解到样品中以给出从约 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 至约 $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ (优选从约 $20\text{ }\mu\text{g/}$

mL 至约 60 μ g/mL) 的 IgM 浓度 (或等同的 IgM 片段浓度)。

[0147] 在优选的实施方式中 (例如 TnI 和 BNP 测定), 将 IgG 或其片段与 IgM 或 IgM 片段组合使用。因此, 例如所述干试剂涂层还可包含 IgG 或 IgG 片段, 其量足以溶解到样品中以给出大于约 50 μ g/mL (例如大于约 100 μ g/mL、大于约 250 μ g/mL 或大于约 500 μ g/mL) 的 IgG 浓度, 或者等同的 IgG 片段浓度。关于范围, 用 IgG 或其片段进行的修正优选产生从约 50 μ g/mL 至约 5000 μ g/mL (优选从约 500 μ g/mL 至约 1000 μ g/mL) 的 IgG 浓度, 或等同的 IgG 片段浓度。因此, 在一些优选的实施方式中, 干试剂溶解到样品中以给出从约 20 μ g/mL 至约 200 μ g/mL、优选从约 20 μ g/mL 至约 60 μ g/mL 的 IgM 浓度, 以及从约 50 μ g/mL 至约 5000 μ g/mL、优选从约 500 μ g/mL 至约 1000 μ g/mL 的 IgG 浓度。

[0148] 在其中用 IgG 或其片段以及 IgM 或其片段修正生物学样品 (例如全血) 的那些实施方式中, 优选以大于 0.004 (例如大于 0.02、大于 0.05 或大于 0.1) 的重量比加入 IgM 或其片段和 IgG 或其片段。关于范围, IgM 或其片段与 IgG 或其片段的重量比优选为 0.004 至 4, 例如从 0.02 至 2, 或者从 0.05 至 0.15。这些重量比适用于所需的修正介质 (例如干燥涂层) 以及所产生的经修正的样品。

[0149] 如上文所暗示的, 除了使用整个 IgM 分子之外或者不使用整个 IgM 分子, 也可能使用 IgM 片段, 所述整个 IgM 分子包含五聚体, 其中单个单体由连接至 F(ab')₂ 区域的 Fc 区域形成, 而所述 F(ab')₂ 区域又包含两个 Fab 区域。使用二硫键还原 (-S-S- 至 -SH HS-) 和酶促胃蛋白酶或木瓜酶消化的组合, 可以各种方式实现 IgM 的片段化, 以产生 F(ab')₂ 片段、Fab 片段和 / 或 Fc 片段的一些组合。可通过色谱法将这些片段分开而用于单独使用, 或者组合使用。例如, 当封闭位点在 Fc 片段上时, 可使用所述片段而非整个 IgM 分子。这同样适用于 Fab 片段和 F(ab')₂ 片段。使用这种方法时所希望的是, 必要片段的摩尔浓度类似于 (例如等同于) 天然 IgM 五聚体的浓度。如之前所述, 本发明的优选实施方式以至至少约 20 μ g/mL 的浓度使用 IgM。由于 IgM (五聚体) 具有约 900KD 的分子量, 这等同于约 22.2nM 的 IgM 浓度。当使用 IgM 片段时, 希望补偿 Fc 和 F(ab')₂ 中五倍的摩尔差异, 以及 Fab 片段中 10 倍的摩尔差异, 以达到实质上相同水平的封闭。

[0150] 在实际的测定步骤中, 优选的是一旦在经固定的抗体和信号抗体之间形成夹心, 随后将样品介质清洗到废料室中, 然后使所述夹心暴露于能够与酶反应以形成能够进行电化学检测的产物的底物。优选的形式是电化学酶联免疫吸附测定。

[0151] 优选地, 所述设备是这样的设备: 其以减少的来自嗜异性抗体的干扰在样品 (例如血液样品) 中进行分析物的免疫测定。所述设备为具有电化学免疫传感器、导管和样品入口的壳体, 其中所述导管允许样品以受控的方式从入口通过至免疫传感器。在一个方面, 所述壳体的至少一部分被可包含非人 IgM 和 / 或其片段、或者非人 IgG 与非人 IgM 和 / 或它们的片段的混合物的干试剂涂覆。重要的特征是, 所述干试剂能够溶解到样品中以产生至少约 20 μ g/mL 的 IgM 浓度或等同的 IgM 片段浓度。这通常足以掩蔽样品中的任何嗜异性抗体。在优选的实施方式中, 所述设备还包括免疫参照传感器。免疫传感器优选涉及检测心血管标记物, 例如下列分析物: 例如 TnI、TnT、CKMB、肌红蛋白、BNP、NT-proBNP 和 proBNP。所述设备在其中运行的系统通常允许样品以预先确定的时间段保持与试剂接触, 所述时间段为例如 1 至 30 分钟。优选所述设备为一次性的盒 (例如以单一样品填充), 为了测试使用一次然后丢弃。通常, 所述设备包括能够将样品清洗至废料室的洗液, 和能够在免疫传感

器处与酶夹心反应以形成适于电化学检测的产物的底物。

[0152] 更广泛地,本发明涉及在对于任何生物学样品(例如包括全血、血清、血浆、尿及其稀释形式的样品)的分析物免疫测定中,减小来自嗜异性抗体的干扰。此外,用于修正样品以产生给定的非人 IgM 浓度的方式可基于溶解干试剂或通过加入含有 IgM 的溶液。另外,在经修正的样品上进行免疫测定以确定所选择的分析物的浓度可基于各种技术,这包括电化学技术(例如电流和电势测量)以及光学技术(例如吸收、荧光和发光)。

[0153] 根据下列非限制性的实施例将更好地理解本发明。

[0154] 实施例 1

[0155] 图 7 显示了根据本发明具体实施方式的电流免疫测定的原理,所述具体实施方式用于测定肌钙蛋白 I (TnI) (心脏功能的标记物) 的存在和量。将血液样品引入本发明的盒的样品保留室中,并通过使所涂覆的干试剂溶解到样品保留室中而对所述样品进行修正。所述干试剂包括 IgM77,如上文所述,其在溶解到样品中后选择性地结合可能被包含在所述样品中的互补的嗜异性抗体 78。在其它实施方式中(未显示),可采用衍生自 IgM 的片段来掩蔽包含在样品中的嗜异性抗体。如所显示的,所述干试剂还包含 IgG 79,其在溶解到样品中后,同样选择性地结合互补的抗体 78。在其它实施方式中,可采用衍生自 IgG 的片段来掩蔽包含在样品中的嗜异性抗体。

[0156] 此外,包含共价结合至多克隆抗-肌钙蛋白 I 抗体(aTnI)71(信号抗体)的碱性磷酸酶(AP)的缀合物分子也溶解到样品中。此缀合物特异性地结合血液样品中的 TnI,70,而产生由结合至 AP-aTnI 缀合物的 TnI 构成的复合物。在捕获步骤中,此复合物结合捕获 aTnI 抗体 72(经固定的抗体),所述捕获 aTnI 抗体 72 附着于免疫传感器上或接近免疫传感器附着。传感器芯片具有用于监测样品何时到达所述传感器芯片的导电性传感器。液体到达的时间可被用于检测盒内的渗漏:延迟到达发出渗漏信号。可使用液体的边缘作为位置标记物而主动控制样品区段在传感器导管内的位置。当样品/空气界面通过导电性传感器时产生精确的信号,其可被用作液体标记物,由此可执行受控的液体移动(excursion)。所述液体区段优选在传感器上方边对边振荡,以便将全部样品呈递给免疫传感器表面。可越过传感器芯片而在传感器导管中引入第二试剂,其在液体振荡过程中均质分布。

[0157] 所述传感器芯片含有捕获区域或被目的分析物的抗体涂覆的区域。这些捕获区域是由聚酰亚胺或另一种光刻产生的层的疏水性环限定的。将以某种形式含有抗体(例如结合至乳胶微球)的微液滴或数个微液滴(体积为约 5 至 40 纳升)涂布到传感器表面上或传感器上的选择性渗透层上。所述光限定的环含有这种水性液滴,这允许经抗体涂覆的区域以数微米的精确度被定位。所述捕获区域可以 0.03 平方厘米至大约 2 平方厘米的尺寸被制备。这一尺寸的上限受到当前实施方式中导管和传感器大小的限制,而不是对本发明的限制。

[0158] 因此,以包含共价结合抗-肌钙蛋白 I 抗体的生物层 73 涂覆金电极 74, TnI/AP-aTnI 复合物结合所述抗-肌钙蛋白 I 抗体。AP 由此与起初存在于样品中的 TnI 的量成比例地、靠近电极而被固定。除了特异性结合外,酶-抗体缀合物可非特异性地结合传感器。NSB 提供了来自传感器的不希望的背景信号,并且优选使其最小化。如上文中所描述的,冲洗方案(特别地,利用区段化的液体来冲洗传感器)提供了使背景信号最小化的有效工具。在冲洗步骤之后的第二步中,将底物 75 呈递给传感器,所述底物被例如碱性磷酸酶

水解以产生电活性产物 76。在具体的实施方式中,所述底物包括磷酸化二茂铁或对氨基苯酚。电流测量电极保持固定的电化学电势,其足以氧化或还原底物水解的产物而非直接的底物;或者电势一次或多次扫描过合适的范围。任选地,可用其中在制造过程中形成 $TnI/AP-aTnI$ 复合物的层涂覆第二电极,其作为参照传感器或用于测量的校准工具。

[0159] 在当前的实施例中,传感器包括两个电流测量电极,其用于检测从 4-氨基磷酸苯与酶标记碱性磷酸酶的反应而酶促产生的 4-氨基苯酚。所述电极优选是由涂覆了聚酰亚胺光刻 (photodefined) 层的黄金表面生产的。聚酰亚胺绝缘层中均匀间隔的开口限定了小金电极的格栅 (grid),在此 4-氨基苯酚在两个电子/分子的反应中被氧化。传感器电极还包括生物层,而参照电极可例如由缺少生物层的金电极、或由银电极、或其它的合适的材料构成。不同的生物层可为各个电极提供感应不同分析物的能力。

[0160] 可选择底物(例如对氨基苯酚物种)以使得所述底物和产物的 $E(1/2)$ 差别较大。优选地,底物的伏安法半波电势 $E(1/2)$ 比产物的高得多(正值更大)。当满足条件时,可在底物的存在下选择性地电化学测量产物。

[0161] 电极的尺寸和间隔在决定灵敏度和背景信号方面起到了重要的作用。格栅中的重要参数为被暴露的金属的百分比和活性电极之间的间隔。电极的位置可以是位于抗体捕获区域的正下方或者以受控的距离偏离捕获区域。电极的实际电流测量信号依赖于传感器相对于抗体捕获位点的位置和分析过程中液体的运动。电极处的电流被记录下来,其依赖于传感器附近电活性产物的量。

[0162] 在这一实施例中,碱性磷酸酶活性的检测依赖于对 4-氨基苯酚氧化电流的测量。这在相对于 $Ag/AgCl$ 基本芯片的电势为大约 +60mV 时实现。所使用的确切检测形式依赖于传感器的构造。在传感器的一个版本中,金微电极阵列位于抗体捕获区域的正下方。当分析液体被拉过所述传感器时,位于捕获位点上的酶在酶受限的反应中将 4-氨基磷酸苯转化为 4-氨基苯酚。4-氨基磷酸苯的浓度被选择为过量的,例如为 K_m 值的 10 倍。分析溶液是 0.1M 二乙醇胺、1.0M NaCl,经缓冲至 pH 为 9.8。此外,所述分析溶液含有 0.5mM $MgCl_2$,其为酶的辅因子。备选地,碳酸盐缓冲液具有所需的特性。

[0163] 在另一个电极几何结构的实施方式中,电极位于距捕获区域数百微米处。当新鲜的分析液区段被拉过捕获区域时,酶产物的形成不因电极反应而损失。一段时间后,溶液从捕获区域被缓慢地拉过检测器电极而产生电流峰,由此可确定酶活性。

[0164] 在碱性磷酸酶活性的灵敏检测中,一个重要的考虑因素是与金传感器处发生的背景氧化和还原相关的非-4-氨基苯酚电流。在这些电势处,金传感器倾向于在碱性缓冲剂中产生可观的氧化电流。背景电流主要依赖于缓冲剂浓度,金电极的区域(暴露的区域),表面预处理和所使用的缓冲剂的性质。二乙醇胺对于碱性磷酸酶是特别好的活化缓冲剂。在摩尔浓度时,相对于非活化缓冲剂(例如碳酸盐)酶促速率增加大约 3 倍。

[0165] 在备选的实施方式中,缀合于抗体或其它结合分析物的分子的酶是尿素酶,且底物为尿素。在这一实施方式中,通过使用铵灵敏电极来检测由尿素水解产生的铵离子。铵特异性电极是本领域技术人员公知的。合适的、经精密加工的铵离子选择性电极公开于 U. S. Pat. No. 5, 200, 051 中,其在此通过引用而并入。其它与底物反应而产生离子的酶是本领域已知的,与其一起使用的其它离子传感器也是本领域已知的。例如,可在磷酸盐离子选择性电极处检测由碱性磷酸酶底物产生的磷酸盐。

[0166] 现在关于图 8,其显示了经精密加工的免疫传感器实施方式的构造。优选地,提供平面非导电基质 80,通过本领域技术人员已知的常规手段或精密加工在其上放置导电层 81。导电材料优选是贵金属(例如金或铂),虽然也可使用其它的惰性金属(例如铱),以及石墨、导电聚合物或其它材料的非金属电极。还提供了电连接 82。将生物层 83 置于电极的至少一部分上。在当前的公开中,生物层指在其表面上包含足量分子 84 的多孔层,所述分子 84 可结合目的分析物或通过产生能够测量的变化而对此类分析物的存在作出响应。任选地,选择渗透性筛选层可被插入电极和生物层之间,以筛选电化学干扰物,如 U. S. Pat. No. 5, 200, 051 中所描述的。

[0167] 在具体的实施方式中,所述生物层是由约 0.001 至 50 微米范围内特定直径的乳胶珠构成的。通过共价连接与上文的生物层定义一致的、任何合适的分子来修饰所述珠。本领域中存在许多连接方法,包括提供胺反应性 N-羟基琥珀酰亚胺酯基团,用于温和的耦合蛋白质的赖氨酸或 N-末端胺基团。在具体的实施方式中,从下列中选择生物分子:离子载体、辅因子、多肽、蛋白质、糖肽、酶、免疫球蛋白、抗体、抗原、外源凝集素、神经化学受体、寡核苷酸、多核苷酸、DNA、RNA 或适当的混合物。在大多数具体实施方式中,所述生物分子为所选择的抗体,其结合下列的一种或多种:人绒毛膜促性腺激素、肌钙蛋白 I、肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 C、肌钙蛋白复合物、肌酸激酶、肌酸激酶亚单元 M、肌酸激酶亚单元 B、肌红蛋白、肌球蛋白轻链、或它们的经修饰的片段。此类经修饰的片段是通过氧化、还原、缺失、添加或修饰至少一个氨基酸而产生的,包括用天然组分或合成组分进行的化学修饰。优选地,生物分子特异性地结合分析物,且结合分析物配体的亲和常数为约 10^{-7} 至 10^{-15} M。

[0168] 在一个实施方式中,通过下述方法将生物层附加至传感器,所述生物层包含具有被合适的分子共价修饰的表面的珠。使用微量涂布针来将经修饰的珠悬浮液小液滴(优选约 20nL)置于传感器表面上。允许所述液滴干燥,这在珠的表面上产生在使用过程中抗移位的涂层。

[0169] 除了其中生物层相对于电流测量传感器位于固定位置的免疫传感器外,本发明还涉及这样的实施方式:其中生物层被涂覆在运动的粒子上。盒可含有能够与分析物相互作用的运动微粒,例如在捕获步骤之后位于电流测量电极的磁性粒子,其中利用磁力来在电极处聚集粒子用于测量。本发明中的运动微粒的一个优势是,其在样品或液体中的运动加速结合反应,使得测定的捕获步骤更快。对于使用非磁性运动微粒的实施方式,使用多孔过滤器来捕获电极处的珠子。

[0170] 现在关于图 9,显示了对于单一基质上数个电极的掩模设计。通过掩藏和侵蚀技术,可放置单独的电极和导线。因此,以低成本在紧凑的区域中提供了多个免疫传感器 94 和 96,和电导测定传感器 90 和 92,以及其各自的连接垫 91,93,95 和 97 用于进行与读取装置的电连接。原则上,以这种方式可以组装非常大的传感器阵列,每一个传感器对不同的分析物敏感或者作为控制传感器或参照免疫传感器起作用。

[0171] 特别地,如下制备免疫传感器。将硅晶片热氧化以形成大约 1 微米的绝缘氧化物层。将钛/钨层溅射到氧化物层上以形成优选 100 至 1000 埃的厚度,随后是最优选为 800 埃厚的金层。然后,将光致抗蚀剂溅射到晶片上并适当干燥和烘烤。然后利用接触掩模(例如相应于图 9 中所示的掩模)使表面曝光。使隐像显现,并使晶片暴露于金腐蚀剂。用可光刻的聚酰亚胺涂覆经成形的金层,适当烘烤,利用接触掩模使其曝光,显影,在 O_2 等离子

体中清洁,并优选在 350℃进行 5 小时亚胺化反应。可任选地对所述晶片背面进行金属化以作为抗性加热元件,其中将以恒温形式使用所述免疫传感器。然后用涂覆了抗体的颗粒印制所述表面。将液滴(优选体积为约 20nL 并在去离子水中含有 1%的固体内容物)置于传感器区域上并通过风干使其在原位干燥。任选地,将抗体稳定剂(由 SurModica Corp. 或 AET Ltd 提供)涂覆在传感器上。

[0172] 颗粒的干燥引起它们以防止溶解到样品中或含有底物的液体中的方式粘附至表面。这种方法提供了可靠且可再现的、适于大量制造传感器芯片的固定过程。

[0173] 实施例 2

[0174] 关于盒的使用方法,将未计量的液体样品通过样品入口 4 引入盒的样品保留室 34 中。毛细管终止 25 防止样品在这一阶段通过而进入导管 15,并用样品填充保留室 34。关闭盖子 2 或元件 200 以防止样品从盒中渗漏。然后,将盒插入读取装置中(例如 Zelin 的 U. S. Pat. No. 5, 821, 399 中所公开的,将其在此通过引用而并入)。将所述盒插入读取装置中激活了下列机制:当相对于刺 38 挤压位于 42 处的含有液体的包装时,所述包装被刺破。液体从而被排入第二导管中,顺次到达 39、20、12 和 11。位于 12 的收缩处防止液体的进一步移动,因为残余的流体静力学压力通过液体经由第二导管部分 11 流入废料室 44 中而被分散了。在第二步中,对泵工具的操作向气囊 43 施加压力,迫使空气穿过导管 40、穿过剖面 17 和 18 并在预先确定的位置 27 进入导管 34。毛细管终止 25 和位置 27 为原始样品的经计量部分划定了界限。当样品在样品保留室 34 中时,用包含 IgM(和 / 或其片段)的干试剂涂层以及所述室的内表面上的其它材料修正所述样品。然后通过气囊 43 内产生的气压将样品的经计量的部分排出通过毛细管终止。样品进入导管 15 内并与分析物传感器或位于剖面 35 内的分析物传感器接触。

[0175] 在采用位于剖面 35 内的免疫传感器的实施方式中,在样品到达传感器之前用例如酶-抗体缀合物(信号抗体)和 IgM 试剂或其片段修正所述样品。为了促进分析物与传感器的有效结合,使含有分析物的样品任选地在振荡运动中重复通过传感器。优选地,使用约 0.2 至 2Hz 之间的振荡频率,最优选 0.7Hz。因此,使得与信号抗体相联合的信号酶与存在于样品中的分析物的量成比例地被纳入到接近电流测量电极表面处。

[0176] 一旦提供了使分析物 / 酶-抗体缀合物复合物结合免疫传感器的机会,通过施加于气囊 43 的进一步的压力排出样品,所述样品通过到废料室 44。之后的清洗步骤从传感器室去除非特异性结合的酶缀合物。通过泵工具 43 将第二导管中的液体移动至与传感器相接触。缓慢地拉动分析液直到在导电性传感器处检测到第一空气区段。

[0177] 可通过任何合适的工具在导管内产生空气区段,所述工具包括但不限于:(1) 被动工具,如图 14 中所显示的和下文所描述的;(2) 主动工具,包括利用泵瞬时降低导管内的压力从而使空气经过挡板(flap)或阀被拉入导管内;或者(3) 通过溶解预先置于导管内的化合物,所述化合物在接触导管中的液体后释放气体,其中此类化合物可包括碳酸盐、碳酸氢盐等。这类区段在从导管 15 中清除被样品污染的液体方面非常有效。通过如所描述的将一个或多个空气区段引入第二导管中,大大提升了冲洗传感器区域的效率。使空气区段的前缘和 / 或后缘一次或多次通过传感器,以冲洗和混悬可能从样品中沉积的无关材料。无关材料包括除了特异性结合分析物或分析物 / 抗体-酶缀合物复合物的材料之外的任何材料。然而,本发明的目的是所述冲洗不被充分延长或十分剧烈,以致促进特异性结合的分析

物或分析物 / 抗体 - 酶缀合物复合物从传感器上解离。

[0178] 将空气区段引入液体中的第二个优势是使液体区段化。例如,在用液体的第一区段来冲洗传感器后,将第二区段置于传感器上并最小限度地混合所述两个区段。这一特征还通过更有效地去除未结合的抗体 - 酶缀合物而减少了来自传感器的背景信号。在前缘清洗后,缓慢地拉动分析液直至在导电性传感器处检测到第一空气区段。此区段在清除与第一分析液样品相混合的、被样品污染的液体方面非常有效。为了进行测量,将新的部分液体置于传感器上,并关于时间记录电流或电势(适合于操作的模式)。

[0179] 实施例 3

[0180] 现在关于图 15,显示了免疫传感器盒的俯视图。盒 150 包括基底部分和顶部,优选是由塑料构造的。通过薄的粘性衬垫或薄的柔软的膜将所述两个部分相连。如同之前的实施方式,经组装的盒包括样品保留室 151,通过样品入口 167 向其中引入含有目的分析物的样品。与之前一样,经计量的样品部分通过毛细管终止 152(优选由连接盒的所述两部分的衬垫或膜中 0.012 英寸(0.3mm)的激光切孔形成)和位于样品保留室内预定点的进入点 155 的组合作用,经由样品导管 154(第一导管)被递送至传感器芯片 153,其中通过泵工具(例如推动到样品隔 156 上的浆)的作用引入空气。接触传感器以允许结合发生后,将样品移动至含有吸附样品的芯吸材料的通风口 157,从而针对液体或空气的进一步通过而密闭所述通风口。所述芯吸材料优选为棉纤维材料、纤维素材料、或其它有孔的亲水性材料。本应用中重要的是,所述材料足够能吸收(即具有足够的芯吸速度),使得阀在与随后撤出下文描述的样品隔启动工具相当的时间段内关闭,从而样品不被随后拉回到传感器芯片区域中。

[0181] 如在具体实施方式中所显示的,提供了清洗导管(第二导管)158,其一端与通风口 159 相连,而另一端在样品导管的点 160 处与样品导管相连,所述点 160 位于通风口 157 和传感器芯片 153 之间。在将所述盒插入读取装置内后,将液体引入导管 158 中。优选地,所述液体起初存在于箔袋 161 内,当启动工具向所述袋施加压力时,所述箔袋被针刺破。还提供了短导管 162,其经由衬垫 163 中的小开口将液体连至导管 154。第二毛细管终止起初防止液体到达毛细管终止 160,从而使液体被保留在导管 158 内。

[0182] 在通风口 157 被关闭后,泵被启动而在导管 154 内产生降低的压力。通气口 164 提供用于使空气经由第二通风口 165 进入导管 158 的工具,所述通气口 164 优选包括衬垫中的小挡板切口或包括振动以提供间歇性气流的膜。第二通风口 165 优选还含有润湿时能够关闭所述通风口的芯吸材料,其允许随后压低样品隔 156 以关闭通风口 165(如果需要的话)。与启动样品隔 156 同时,将液体从导管 158 经过毛细管终止 160 拉入导管 154 中。因为液体的流动被进入通风口 164 的空气中断了,至少引入一个空气区段(区段或区段流(stream of segments))。

[0183] 样品隔 156 的进一步撤出将含有至少一个空气区段的液体拉回通过传感器芯片 153 的感应表面。液体内气液交界的存在提高了对传感器芯片表面的冲洗以去除剩余的样品。优选地,与从导电性电极接收的信号相结合而控制样品隔 156 的移动,所述导电性电极位于临近分析物传感器的传感器芯片内。以这种方式,检测到传感器上液体的存在,并且可通过在不连续的步骤中移动液体而进行多次读数。

[0184] 在这一实施方式中,当传感器、基本芯片 165、和传感器与基本电极之间的导管

154 的壁连续部分仅被液体薄膜涂覆时,进行分析物测量是有利的。如下获得合适的膜:通过操作样品隔 156 而撤出液体,直至位于传感器旁边的传导性测定传感器显示出,大量的液体不再存在于导管 154 的那个区域中。已发现,可在非常低的电流 (nA) 下进行测量,由基本芯片和传感器芯片之间的薄膜的增加的阻力引起的电势下降(与大量液体相比)是不显著的。

[0185] 基本芯片 165 优选为银/氯化银。下列也是有利的:避免空气区段(其在相对疏水的氯化银表面上容易地形成),以使基本芯片形成小的银/氯化银区域,其中散布着更为亲水的区域(例如二氧化硅表面)。因此,优选的基本电极构成包括银/氯化银正方形的阵列,其密集地排布并散布有二氧化硅。如果银/氯化银的区域有些凹陷,避免非故意的区段也是有利的。

[0186] 现在关于图 16,其显示了免疫传感器盒的优选实施方式的流控技术的图解视图。区域 R1-R7 代表与特定操作功能相关的导管的特定区域。因此,R1 代表样品保留室;R2 代表样品导管,其中样品的经计量的部分被转移至捕获区域,并且其中以涂覆在导管壁上的物质任选地修正所述样品;R3 代表捕获区域,其包括电导测定传感器和分析物传感器;R4 和 R5 代表第一导管的部分,其任选地被用于以涂覆在所述导管壁上的物质进一步修正液体,其中实现了更复杂的测定方案;R6 代表第二导管的一部分,在将盒插入读取装置中后向所述第二导管部分引入液体;R7 包括位于毛细管终止 160 和 166 之间的导管的一部分,其中可发生进一步的修正;R8 代表位于点 160 和通风口 157 之间的导管 154 的一部分,并且其可进一步被用于修正包含在其中的液体。

[0187] 实施例 4

[0188] 关于流控技术和分析物测量的协调,在分析顺序中,用户将样品放入盒中,将盒放入分析仪中并在 1 至 20 分钟内,对一个或多个分析物进行定量测量。这里是分析过程中发生的事件顺序的非限制性实例:

[0189] (1) 将 25 至 50 μ L 样品引入样品入口 167 并填充至由粘性带中 0.012 英寸 (0.3mm) 的激光切孔形成的毛细管终止 151,所述粘性带使盖和基底组件保持在一起。将一个或多个干试剂涂层溶解到样品中,所述干试剂涂层包含用于改善嗜异性干扰的 IgM 和/或其片段,以及优选的信号抗体。用户旋转装在快速挡板 (snap flap) 上的乳胶橡胶盘 (rubber disk) 以关闭样品入口 167 并将盒放置在分析仪中。

[0190] (2) 分析仪与盒接触,由发动机驱动的活塞压到箔袋 161 上,迫使清洗/分析液流出而进入中央导管 158。

[0191] (3) 单独的由发动机驱动的活塞接触样品隔 156,沿着样品导管推动经测量的样品区段(从试剂区域 R1 至 R2)。在传感器芯片 153 处通过导电性传感器检测样品。传感器芯片位于捕获区域 R3 中。

[0192] (4) 介由 R2 和 R5 之间的样品隔 156,以预先确定的并且受控的方式使样品振荡受控的时间以促进与传感器的结合。

[0193] (5) 将样品推向盒的废物区域 (R8) 并与被动泵 157 接触,所述被动泵是纤维素或类似的吸附芯的形式。润湿所述芯的动作针对气流密封了所述芯,从而消除了其排出由样品隔 156 产生的过量压力的能力。主动的通风口成为了图 16 的“受控通气口”。

[0194] (6) 快速排空样品导管(通过从样品隔 156 撤出由发动机驱动的活塞实现)迫使

空气（来自通风口）和清洗 / 分析液（来自第二导管）的混合物移动到位于图 16 中的 R5 与 R4 之间的入口中。通过重复快速排空样品导管，产生了一系列由空气分开的液体区段，其朝向样品入口被拉过传感器芯片（从 R4 至 R3 至 R2 和 R1）。这洗掉了传感器上过量的试剂并用适于分析的试剂润湿所述传感器。通过向中央清洗 / 分析液导管内的 R7 和 R6 中加入试剂，可进一步修正源于箔袋的清洗 / 分析液。

[0195] (7) 以更慢的速度将清洗 / 分析液区段拉向样品入口，以产生这样的传感器芯片：其仅含有分析液薄层。此时进行电化学分析。优选的分析方法是电流测量法，但是也可使用电位测量法或阻抗检测。

[0196] (8) 机制收缩，而允许所述盒从分析仪上被移除。

[0197] 实施例 5

[0198] 在一些实施方式中，所述设备采用免疫参照传感器用于评估测定过程中发生的 NSB 程度。免疫参照传感器以与分析物免疫传感器大体相同的方式被加工，除了免疫试剂是抗-HSA（人血清白蛋白）抗体而不是抗-分析物抗体之外。在暴露于人全血或血浆样品之后，参照传感器被特异性结合的 HSA 涂覆，HSA 为存在于所有人血液样品中的高丰度内源蛋白，因而作为共同的参照用于使用当前的免疫测定形式进行的所有单独的测试。NSB 是由于不充分的清洗或由于干扰的存在而产生的，其可介由所述第二传感器而被监测。

[0199] 测定的净信号是由产生自分析物免疫传感器的特异性信号组成的，其通过减去产生自参照传感器的非特异性信号而被校正，例如净信号 = 分析物传感器信号 - 参照传感器信号 - 偏差，如上文的等式 4 所示。所述“偏差”是一个系数，其说明两个传感器在经受 NSB 的趋势方面的差别。实际上，其说明关于非特异性地结合缀合物的能力方面，每个传感器的相对“粘性”，并且所述“偏差”是基于不含分析物且没有干扰的样品的应答建立的。这是通过独立的实验进行的。

[0200] 参照传感器处所耐受的信号量依赖于由质量控制算法所限定的极限，所述算法寻求保护低分析物浓度时结果的完整性，在低分析物浓度时 NSB 的效应最有可能以可改变临床环境中决策制定的方式影响测定结果。主要的是，参照传感器处过量信号的存在作为旗帜表明 NSB 的存在，这是由于不充分的清洗步骤或者由于干扰。

[0201] 图 17 显示了关于样品入口（样品保留室）中 IgM 浓度的免疫传感器应答，所述样品入口印制了对于三个正常健康供体的干试剂，其中两个具有高水平的嗜异性抗体活性（供体 A 和 B）而一个具有低的嗜异性抗体活性（供体 C）。具体而言，图 17A 显示了 cTnI 免疫传感器信号的应答，图 17B 显示了相关的免疫参照传感器，而图 17C 显示了净测定信号（分析物信号 - 参照信号）。所有的数据都是在溶解于样品中的 IgM 在 0 至 100 μ g/mL 的范围内收集的。从这些图中清楚的是，超过约 20 μ g/mL 的 IgM 浓度在这些样品上实质上改善了嗜异性抗体的效应。

[0202] 本领域技术人员将认可，在这些样品中、在加入 IgM 后明显在分析物传感器和参照传感器处均减少了信号，并且显示出与抗-动物 / 嗜异性抗体对于由在动物物种中产生的抗体制备而成的免疫试剂的作用相关的相对非特异性。此外，由于所采用的样品是在临床环境之外，在正常的、名义上健康的个体中获得的，这证明了这些干扰在一般群体中相对普遍的性质。

[0203] 基于供体库的大小（大约 200 个个体），其中观察到了来自供体 A 和 B 的样品中相

对极端的干扰,人们可估计,大约 1% 的个体具有可用鼠 IgM 减轻的显著的嗜异性干扰。

[0204] 一般的嗜异性干扰(即除了需要 IgM 来减轻的那些之外)以各种方式被估计为在多达 40% 的群体中发生。参见 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Immunoassay Interference by Endogenous Antibodies; Proposed Guideline; CLSI document I/LA30-P (ISBN 1-56238-633-6)。

[0205] 我们用显示嗜异性干扰的样品进行的研究表明,虽然其中的大多数可被单独的 IgG 中和,较小的亚群(大概 10-20%)需要用 IgM 来减轻,如本申请中所描述的。然而,由于制造商在所有的情形中均努力提供高完整性的测试结果,从干扰中和/减轻的角度来关注所述亚群是必要的。此外,应当认识到的是:(i) 内源抗体干扰的研究和减轻受到合适样品的可获得性的限制,以及(ii) 存在下述概然性(如果不是可能性的话):有这样的个体,其具有的嗜异性干扰水平需要更高浓度的干扰-清除剂来产生无干扰结果。

[0206] 虽然嗜异性减轻剂的影响在显示出干扰的离散样品的情形中是最显著的,这些干扰的普遍性性质暗示,当应用于个体的群体时,提高的减轻可与一般性地降低免疫测定中的变化性相关。如果个体受试者的阵列具有可变但离散水平的嗜异性干扰(其增加测试结果中的变化但是足够轻而不被质量控制算法检测到),减少干扰将预期减少与群体的测量相关的总体变化性。例如,对健康个体参照群体心肌肌钙蛋白水平的测量将被预期对测量过程中嗜异性干扰被中和的程度有一些依赖性。使用干扰清除性试剂的两种制剂测量了 180 个名义上健康的个体的群体,每个个体具有循环中不可检测的心肌肌钙蛋白。一种制剂含有 375 μ g/mL IgG,而第二种制剂含有 750 μ g/mL IgG 和 25 μ g/mL IgM。对来自这一群体的血浆样品的 540 次测量的标准偏差为 0.0103ng/mL 和 0.0088ng/mL(分别对于低 Ig 制剂和高 Ig 制剂)。

[0207] 虽然如上文所描述的,本发明一般是针对减少或清除以全血样品进行的分析物免疫测定中来自嗜异性抗体的干扰,其也可应用于在其它类型的生物学样品(例如血浆、血清和尿,以及经稀释的样品(例如用缓冲液稀释的血液、血浆、血清和尿))中进行的免疫测定。此外,虽然本发明一般是涉及通过使干试剂溶解到样品中而修正所述样品,在其它实施方式中下列也是实际的:在分析过程中或在样品收集过程中将所述试剂作为液体加入样品中。同样显然的是,在本申请中关于电化学检测方法(例如,电流和电势测量方法)描述了本发明,但其同样可应用于其它检测模式,特别是光学方法(例如基于发光、荧光和吸收的方法)。

[0208] 虽然根据各种优选实施方式描述了本发明,本领域技术人员将认可可进行各种修饰、替代、省略和改变而不背离本发明的精神。因此,本发明的范围仅意欲受到下面的权利要求的范围的限制。

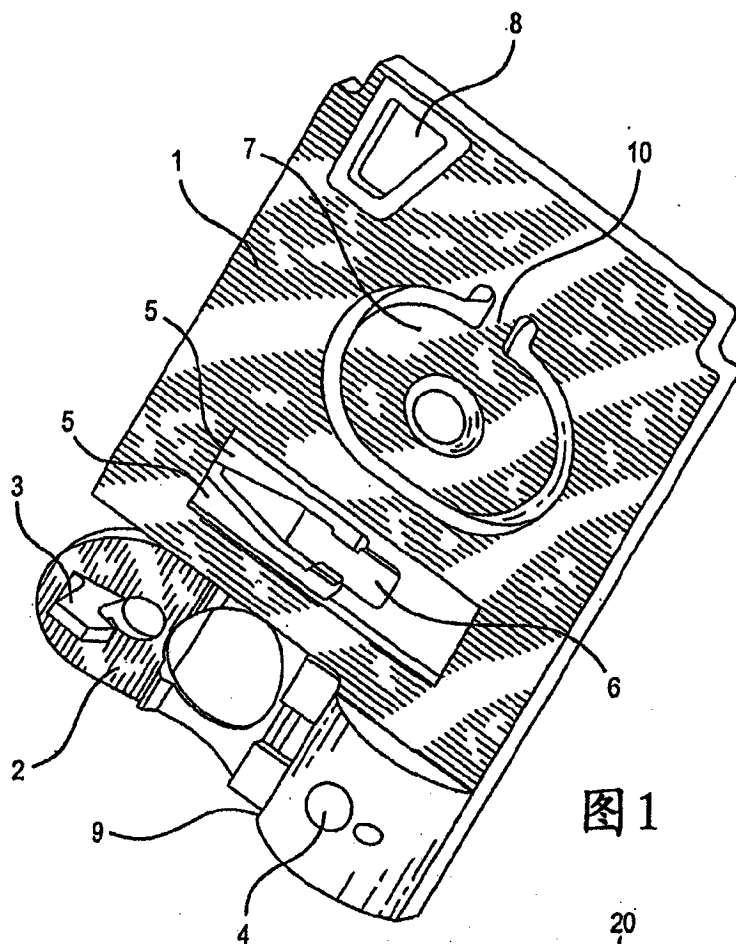


图 1

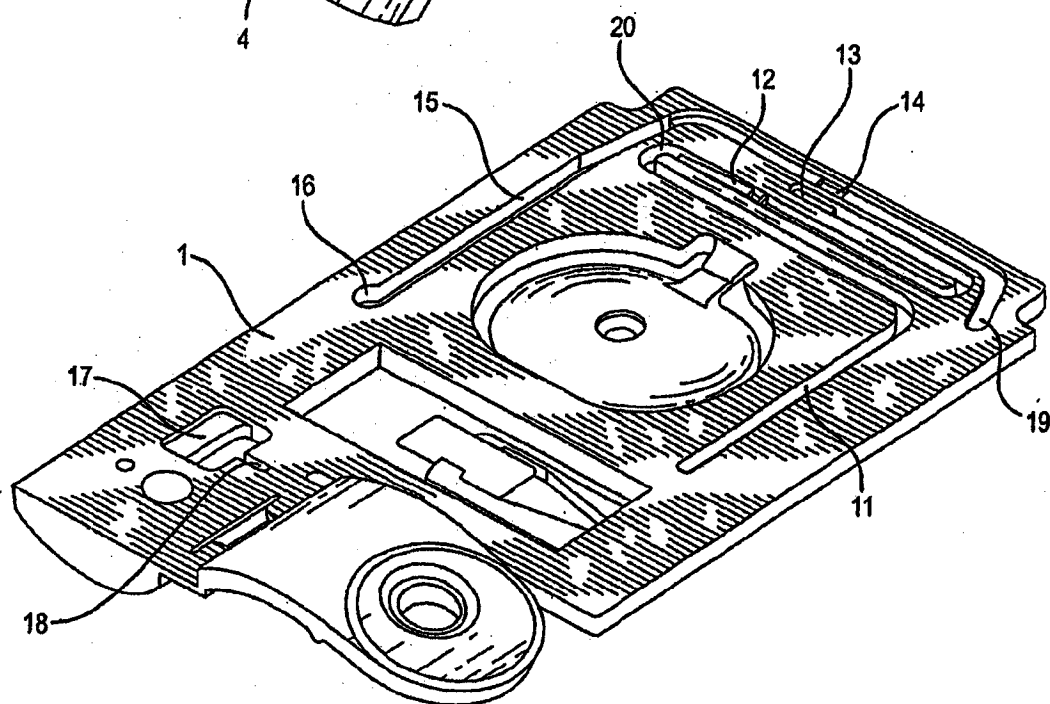


图 2

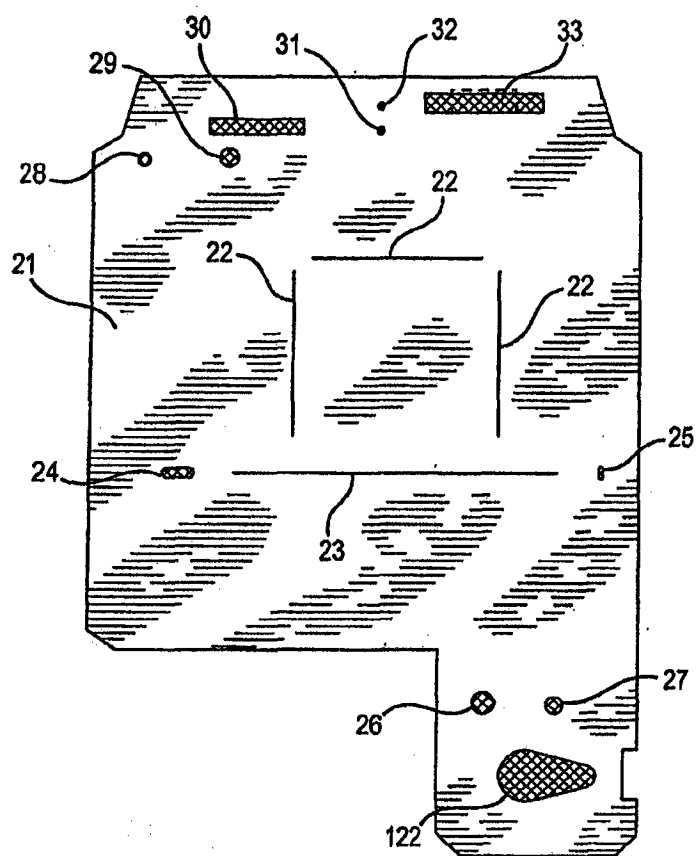


图 3

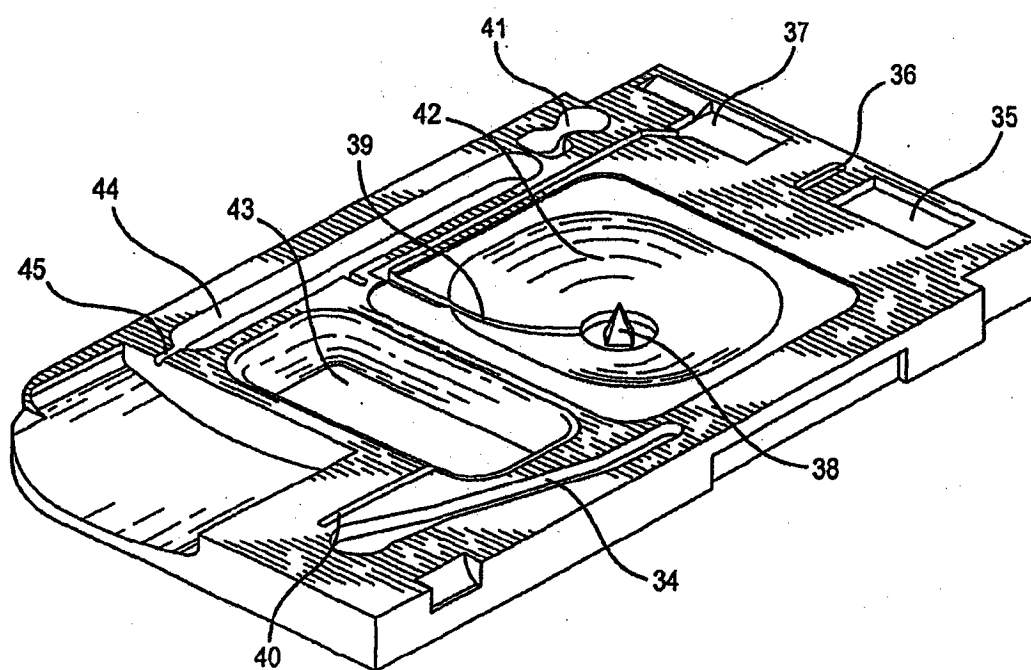


图 4

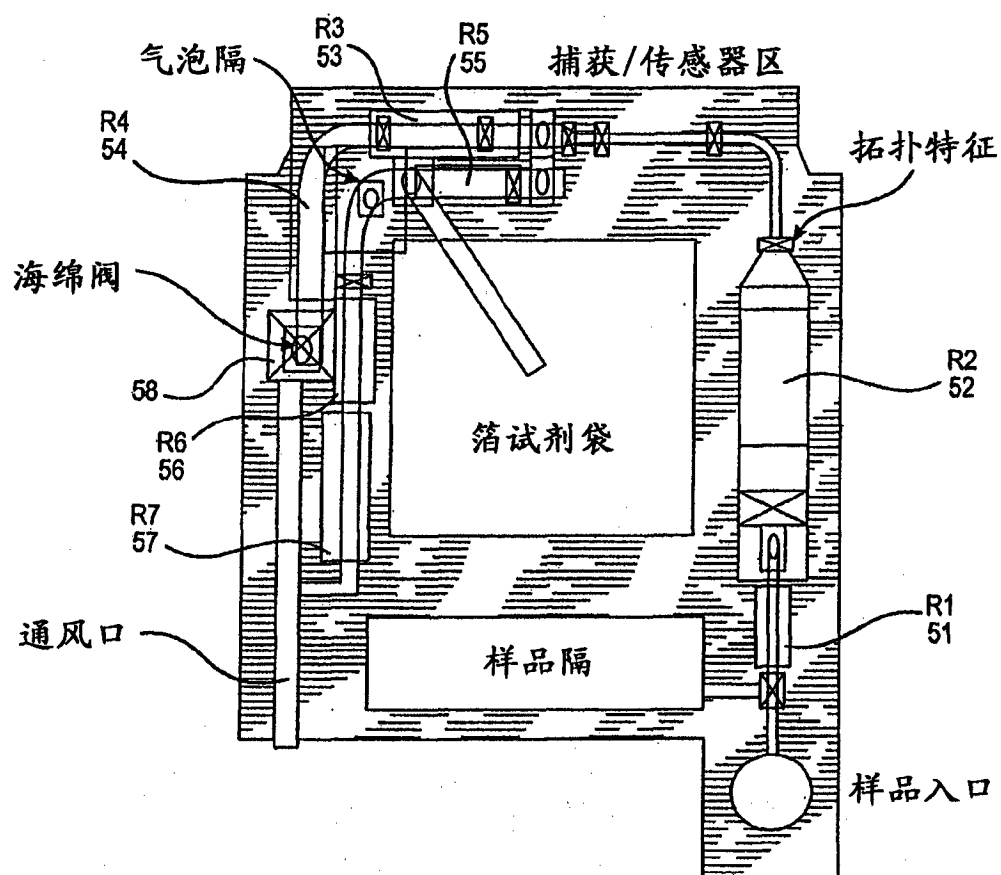


图 5

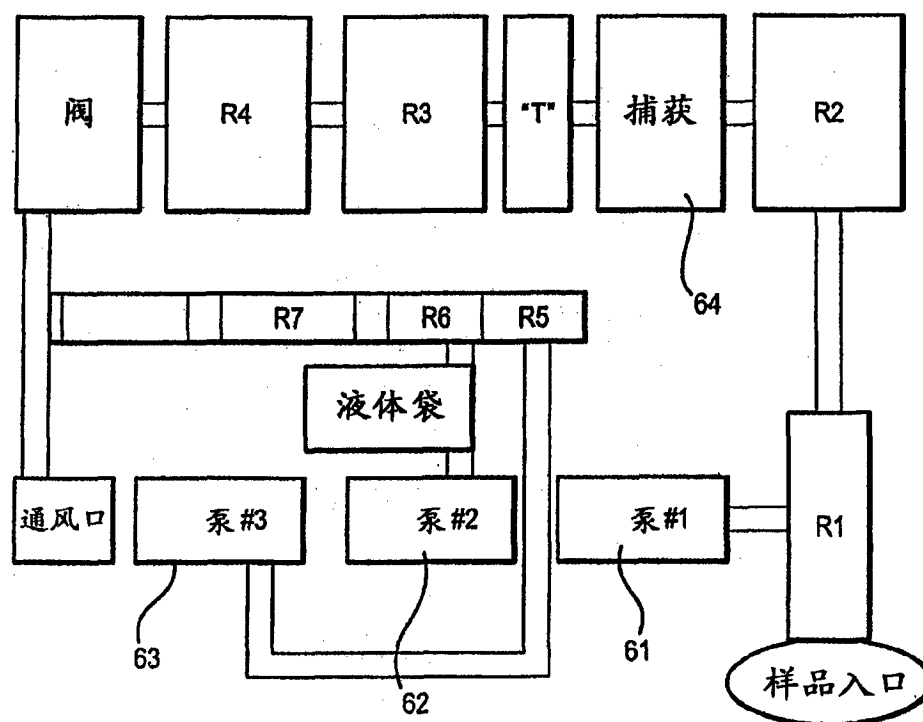


图 6

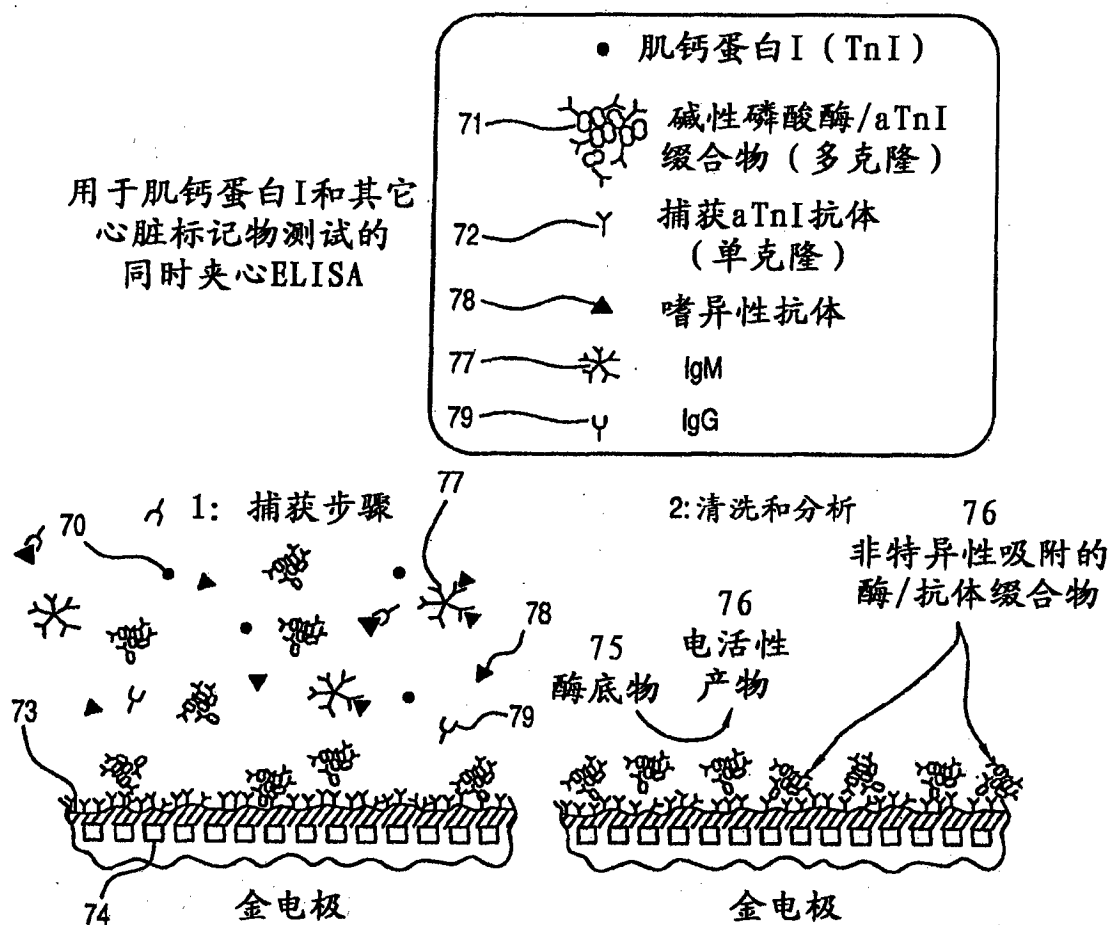


图 7

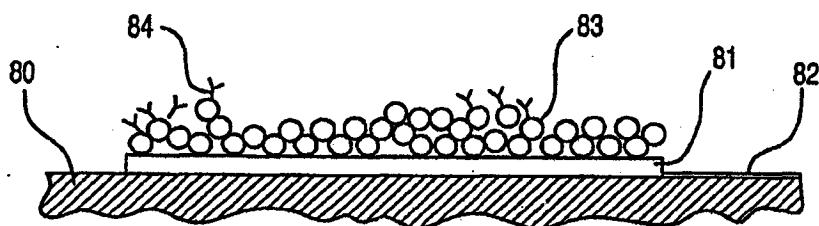


图 8

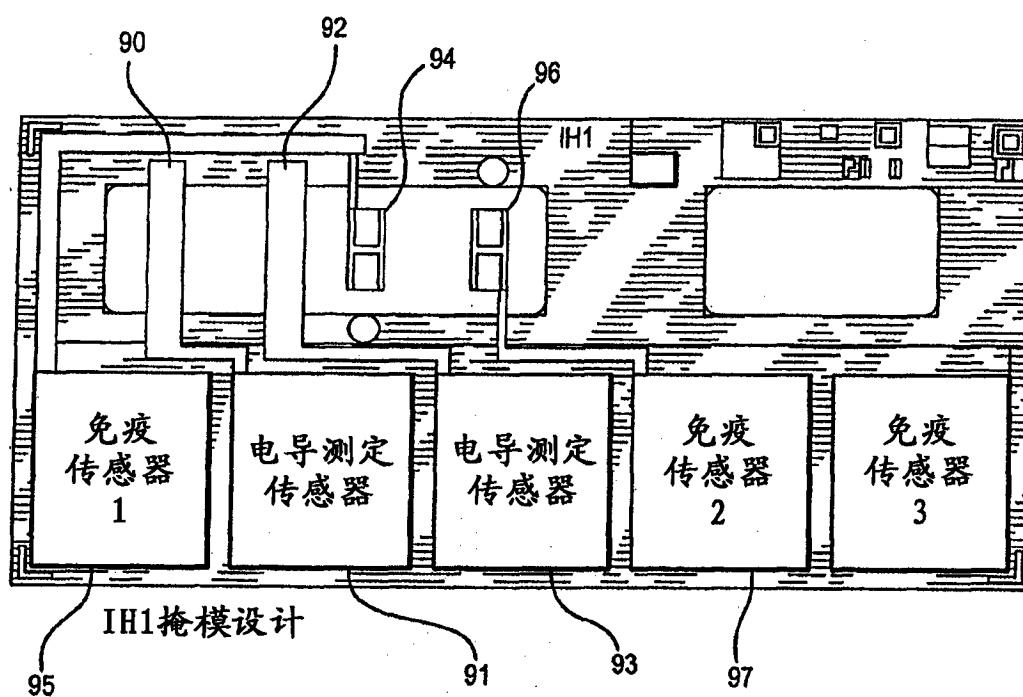


图 9

包括和不包括IgM的血浆样品中的嗜异性干扰
MODified盒除IgG外包含IgM-STD盒仅包含IgG

样品/供体	数据	MOD	STD
实施例1 cTnI分析物 (样品1)	平均结果 (ng/ml)	0.23	-0.21
	盒的数目	9	9
	错误的数目	0	9
实施例2 BNP分析物 (样品2)	平均结果 (pg/ml)	-27	-154
	盒的数目	3	3
	错误的数目	0	3

图 10

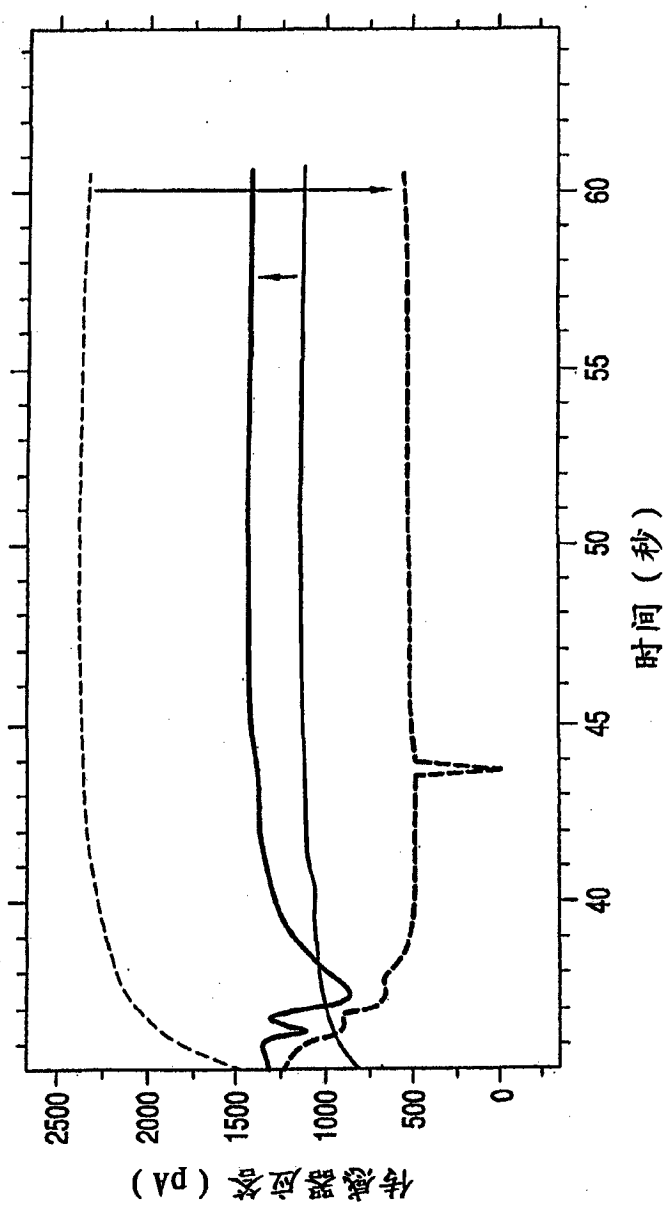


图 11

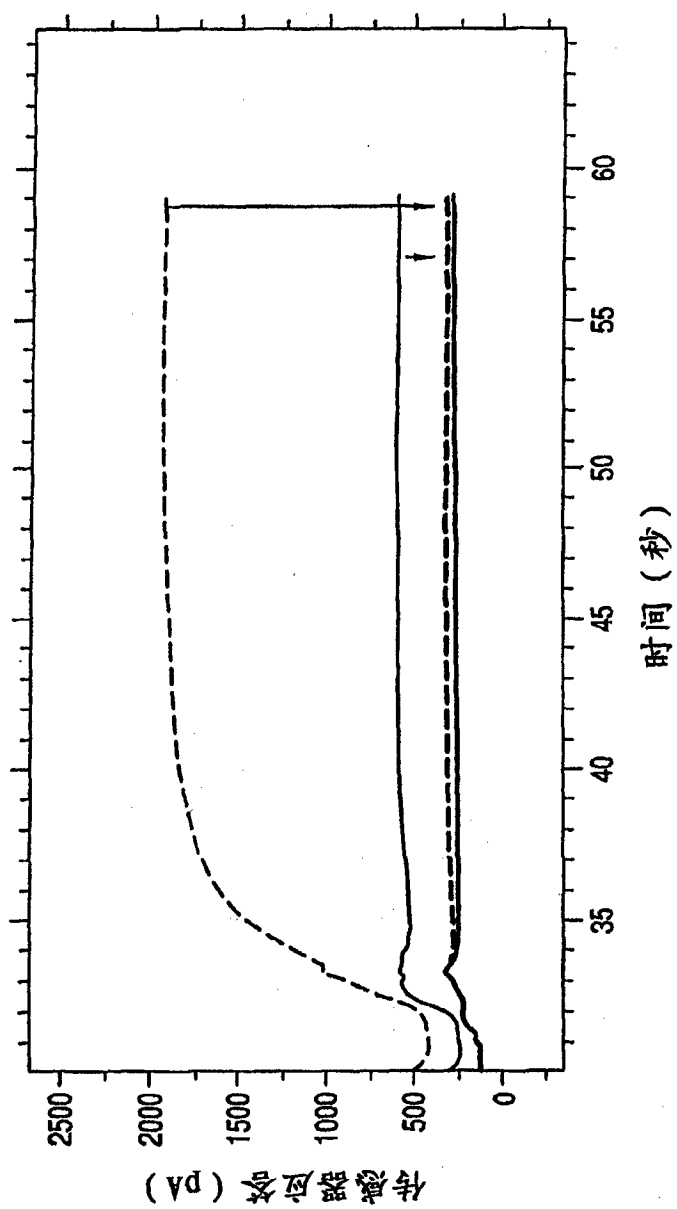


图 12

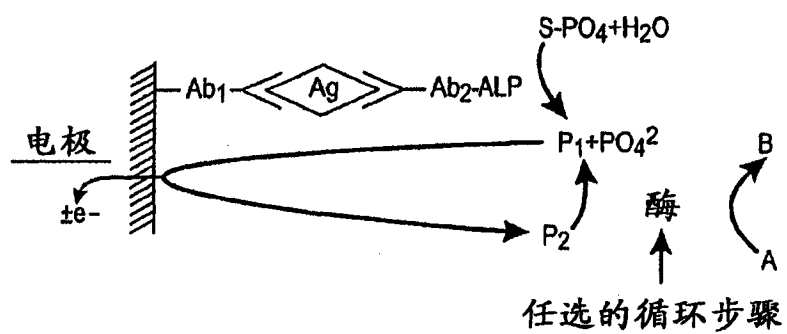


图 13

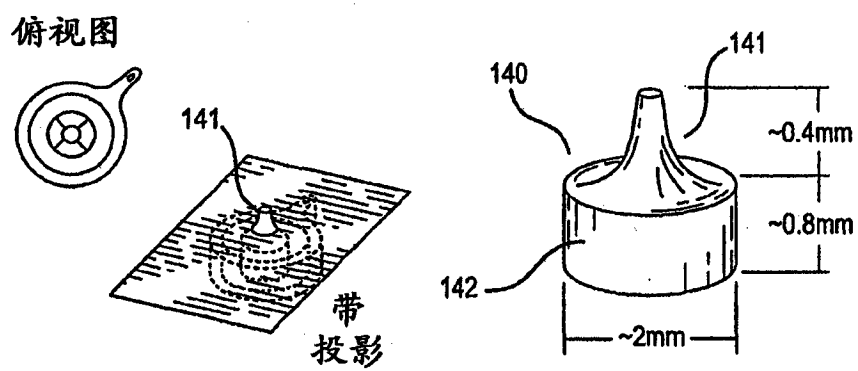


图 14

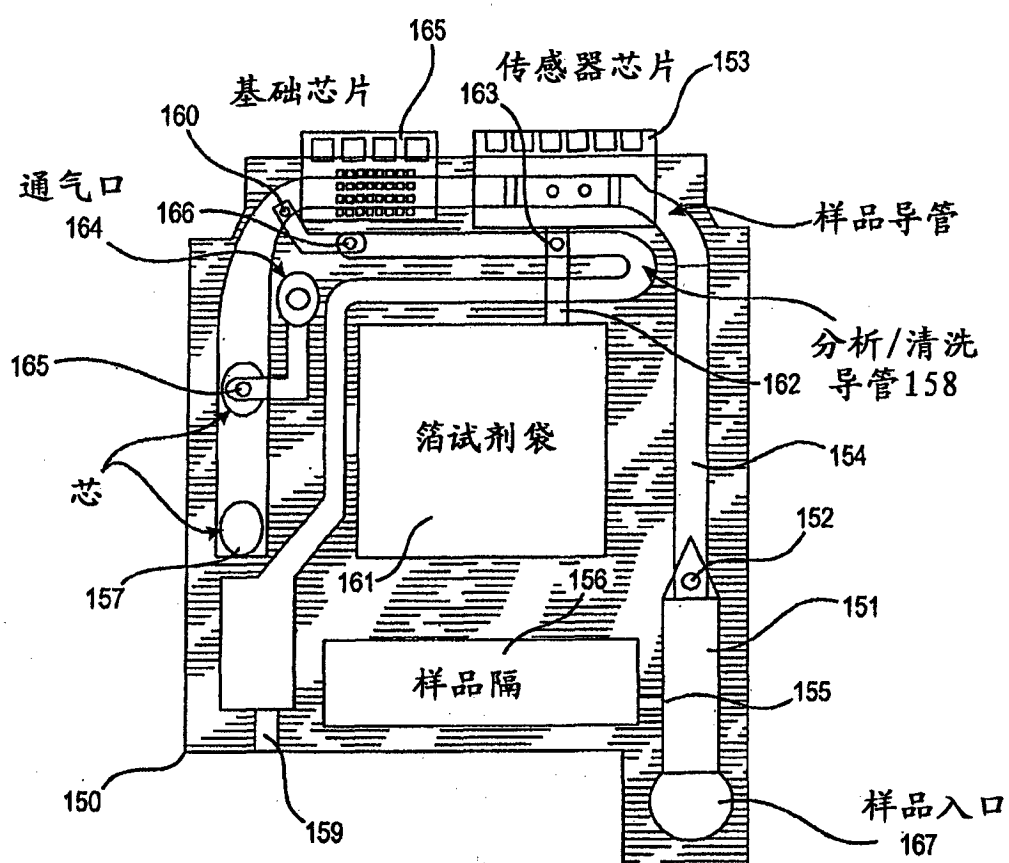


图 15

用于i-STA免疫盒的流体简图

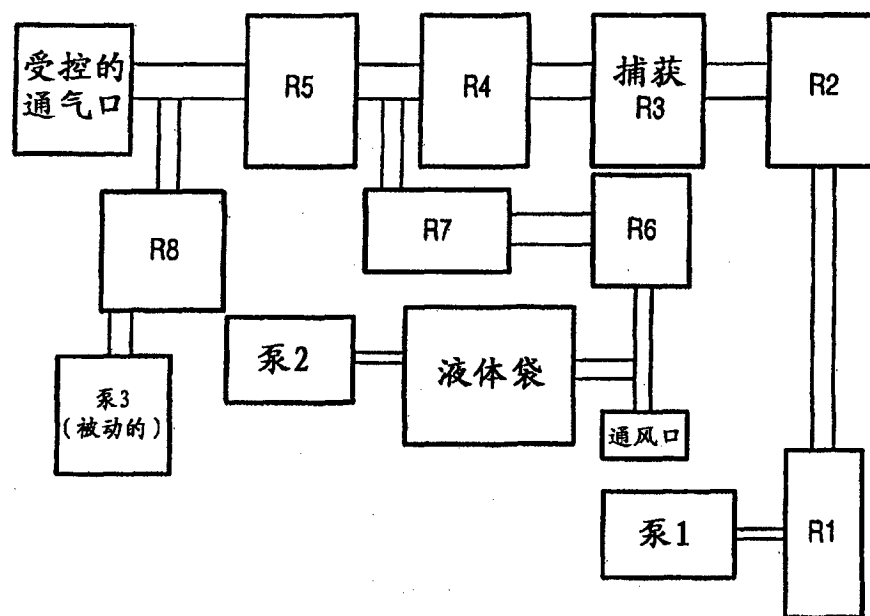


图 16

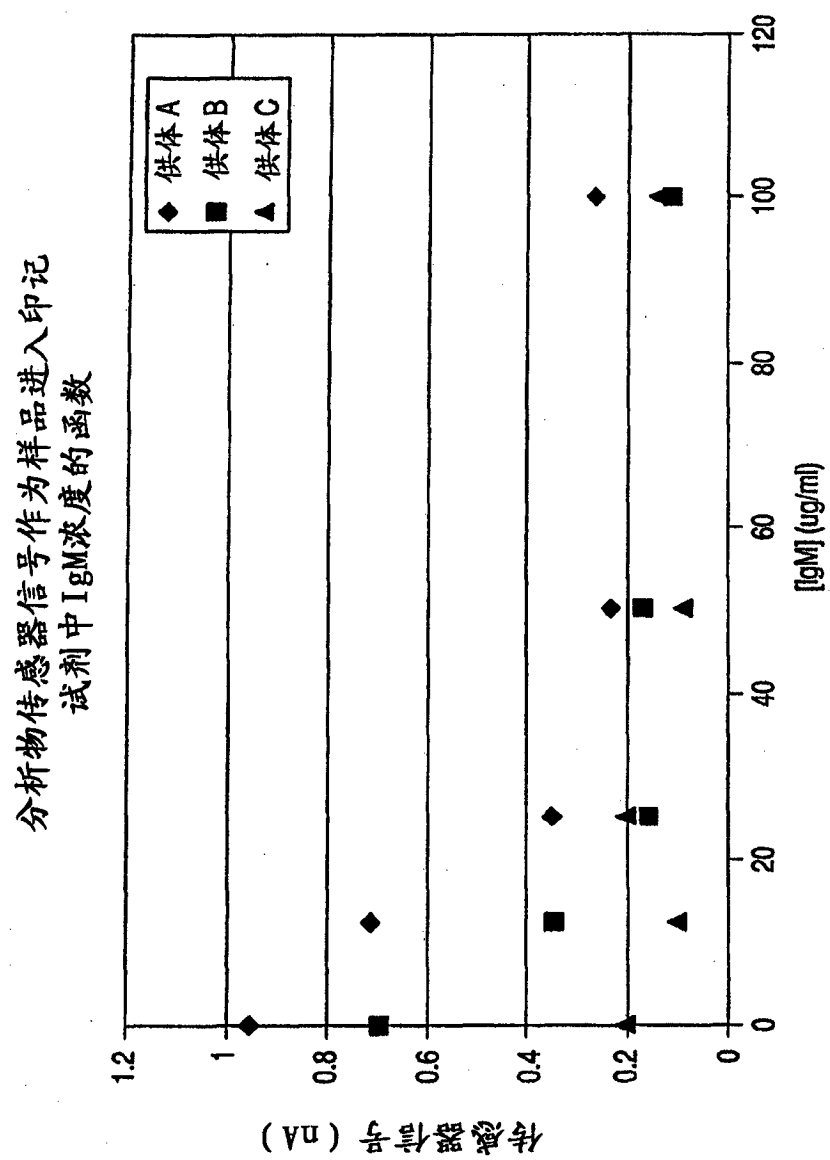


图 17A

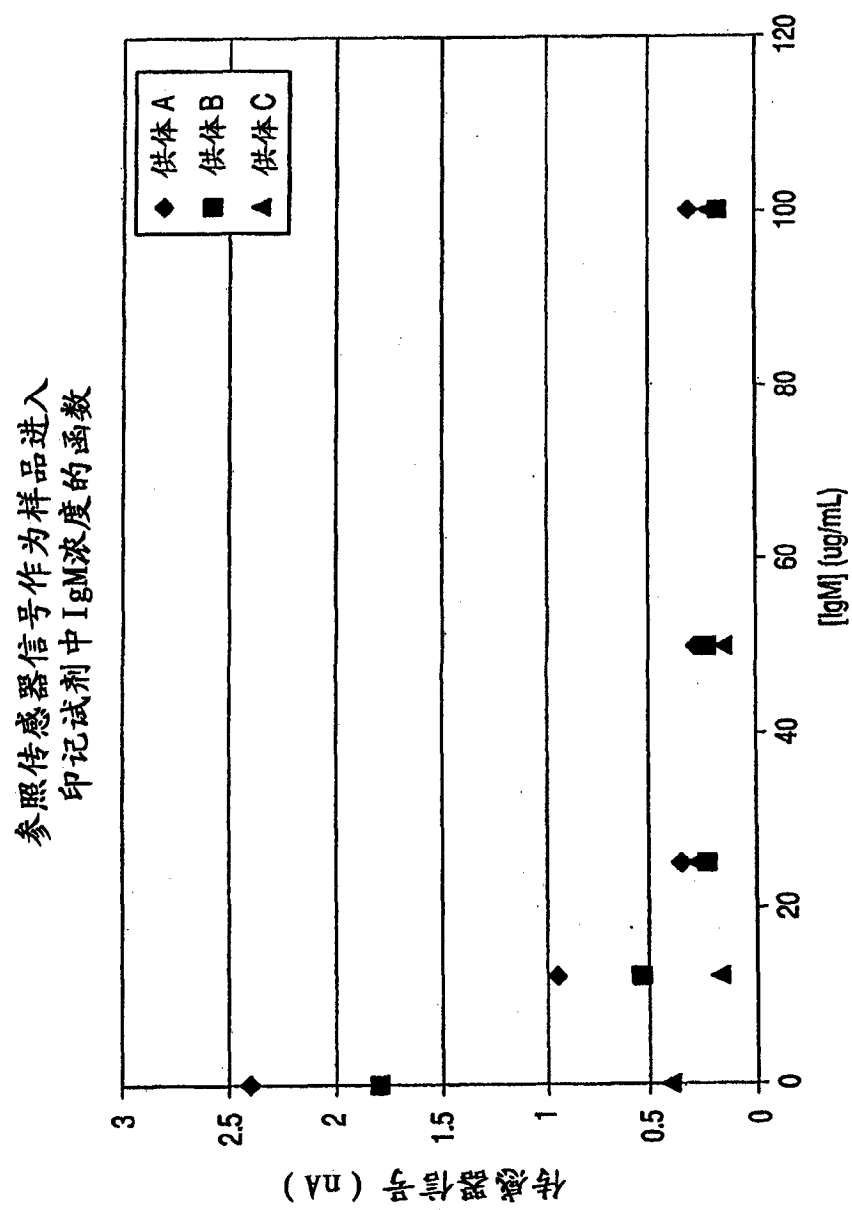


图 17B

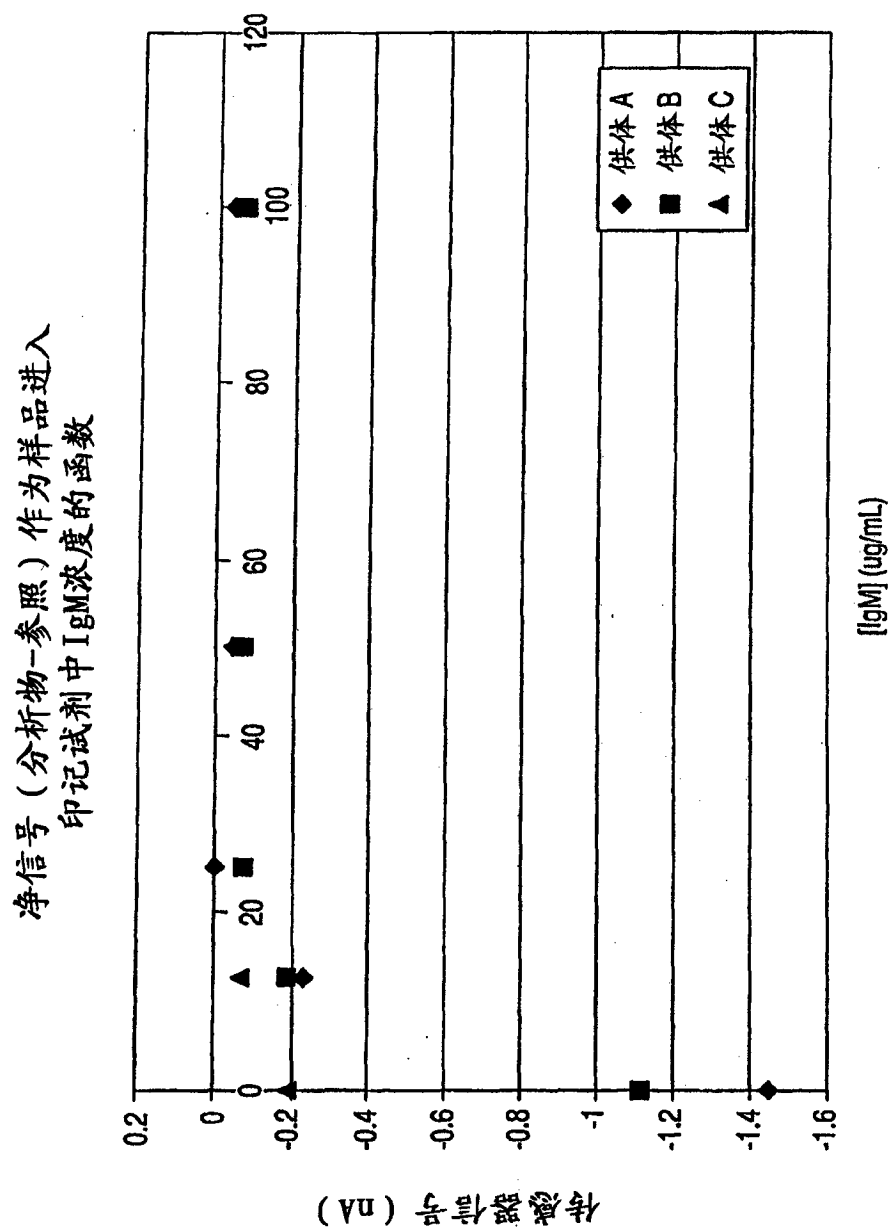


图 17C

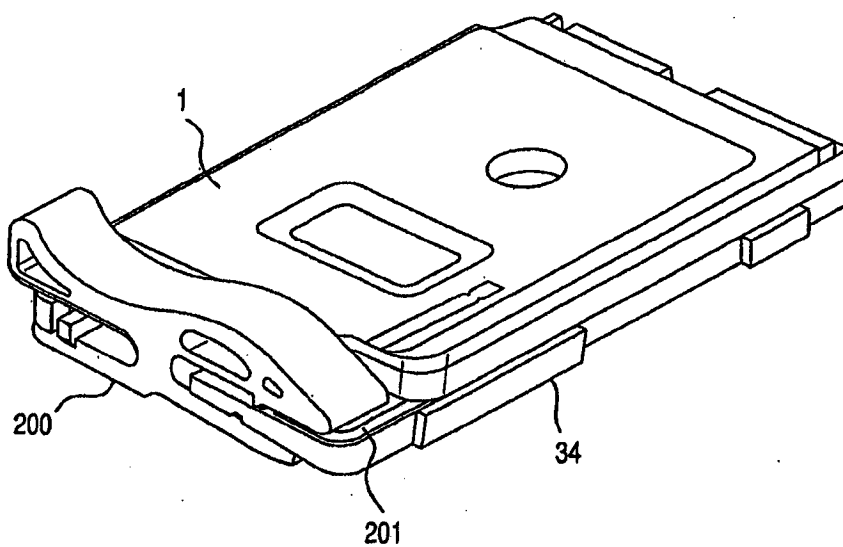


图 18

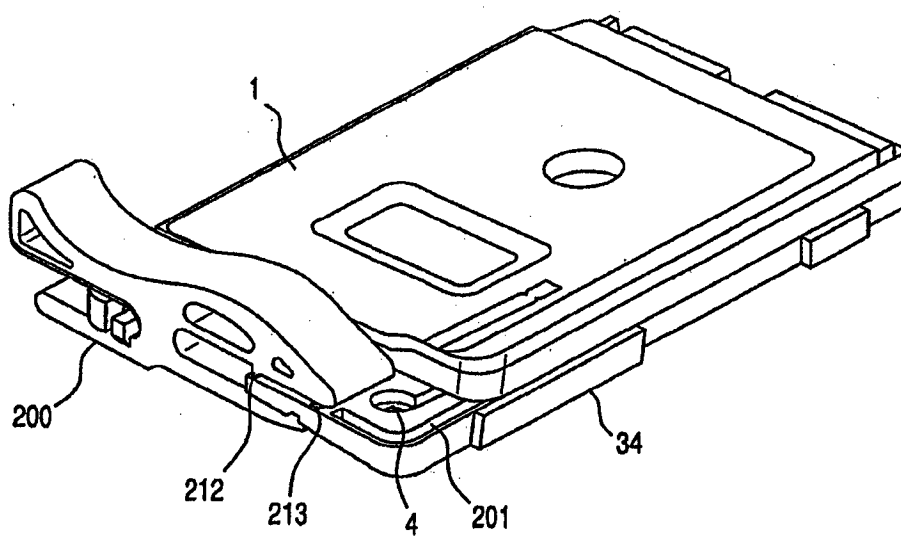


图 19

专利名称(译)	嗜异性抗体免疫传感器干扰的改善		
公开(公告)号	CN102428369A	公开(公告)日	2012-04-25
申请号	CN201080019807.X	申请日	2010-03-24
[标]申请(专利权)人(译)	雅培医护站股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	雅培医护站股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	雅培医护站股份有限公司		
[标]发明人	JLE坎贝尔 JE奥马科		
发明人	J·L·E·坎贝尔 J·E·奥马科		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N2333/4712 G01N33/5306 Y10S436/825 G01N2333/58 Y10S436/824 Y10T436/112499 Y10T436/25125 Y10T436/25375		
优先权	12/411325 2009-03-25 US		
其他公开文献	CN102428369B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于减少分析物免疫测定中来自嗜异性抗体的干扰的方法和设备。在一个实施方式中，本发明涉及包括下列步骤的方法：(a)通过使干试剂溶解到生物学样品中以产生至少约20μg/mL的非人IgM浓度或等等的片段浓度，而用非人IgM或其片段修正所述生物学样品(例如全血样品)；和(b)在所述经修正的样品上进行电化学免疫测定以确定所述样品中所述分析物的浓度。优选地，除IgM或其片段之外，还用IgG或其片段修正所述样品。

