



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105393119 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 09

(21) 申请号 201480037121. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 07. 25

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/860, 009 2013. 07. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 12. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/048283 2014. 07. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/017285 EN 2015. 02. 05

(71) 申请人 生物辐射实验室股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 W·谭 D·杰斯瓦尼 V·古普塔

王千曙 D·尤恩

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖 杨昀

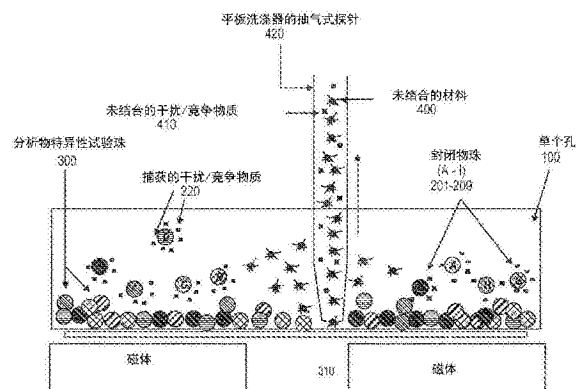
权利要求书4页 说明书14页 附图1页

(54) 发明名称

用于免疫试验的多重封闭物珠

(57) 摘要

提供了用于具有改进的特异性的免疫试验的方法和组合物。本发明公开的基于珠的封闭剂降低与这类试验的试剂和样品相关的干扰。本发明公开的封闭剂可用于分离样品中的干扰分子,从而使得免疫试验的灵敏度提高。提供了封闭亲和试验混合物中干扰分子的方法,其中所述混合物包含样品。



1. 一种封闭包含样品的亲和试验混合物中干扰分子的方法,所述方法包括
 - (a) 使第一封闭剂接触所述样品,所述第一封闭剂包含与第一结合剂相连的第一珠,从而在所述第一结合剂与所述样品中的一种或多种分子之间形成非特异性结合复合物,所述分子否则会干扰所述样品中亲和剂和可能存在的靶分子之间形成亲和复合物;以及
 - (b) 使第二封闭剂接触所述样品,所述第二封闭剂包含与不同于所述第一结合剂的第二结合剂相连的第二珠,从而在所述第二结合剂与所述样品中的一种或多种分子之间形成非特异性结合复合物,所述分子否则会干扰所述样品中亲和剂和可能存在的靶分子之间形成亲和复合物;从而封闭所述试验混合物中的所述干扰分子。
2. 如权利要求 1 所述的方法,所述第一结合剂和所述第二结合剂结合不同的干扰分子。
3. 如权利要求 1 所述的方法,所述第一结合剂和所述第二结合剂结合相同的干扰分子。
4. 如权利要求 1 所述的方法,所述封闭剂的珠是非磁性珠。
5. 如权利要求 1 所述的方法,所述封闭剂的珠是响应磁场的珠。
6. 如权利要求 1 所述的方法,所述第一珠和所述第二珠是相同的珠。
7. 如权利要求 1 所述的方法,所述第一珠和所述第二珠是不同的珠。
8. 如权利要求 1 所述的方法,所述结合剂选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。
9. 如权利要求 1 所述的方法,所述第一封闭剂包含超过一种结合剂。
10. 如权利要求 1 所述的方法,所述第二封闭剂包含超过一种结合剂。
11. 如权利要求 1 所述的方法,所述第一封闭剂和所述第二封闭剂为基本相等的比率。
12. 如权利要求 1 所述的方法,所述第一封闭剂的比率是所述第二封闭剂的至少约 2 倍或更多。
13. 如权利要求 1 所述的方法,所述方法还包括从所述试验混合物的其他组分中除去非特异性结合复合物。
14. 如权利要求 13 所述的方法,其中,除去所述非特异性结合复合物包括向所述试验混合物施加磁场。
15. 如权利要求 13 所述的方法,其中,除去所述非特异性结合复合物包括对所述试验混合物离心。
16. 如权利要求 1 所述的方法,所述试验混合物包含多种不同的荧光珠且所述封闭剂的珠包含与众多其他染料可区分的荧光染料。
17. 如权利要求 16 所述的方法,所述荧光珠被检测和定量。
18. 如权利要求 1 所述的方法,所述封闭剂的珠是非荧光珠。
19. 如权利要求 1 所述的方法,所述方法还包括使所述亲和剂接触所述样品;以及检测是否存在所述亲和复合物或其量。
20. 如权利要求 1 所述的方法,所述方法还包括使所述亲和剂接触所述样品;从所述试验混合物的其他组分中分离所述亲和复合物;以及检测是否存在所述亲和复合物混合物或其量。

21. 如权利要求 20 所述的方法,其中,分离所述亲和复合物包括向所述试验混合物施加磁场。
22. 如权利要求 1 所述的方法,所述方法还包括在使所述亲和剂接触所述样品前:
使所述封闭剂接触亲和剂溶液,从而在所述结合剂和所述亲和剂溶液中的一种或多种干扰分子之间形成非特异性结合复合物;以及
从所述亲和剂溶液的其他组分中分离所述非特异性结合复合物以生成所述亲和剂。
23. 如权利要求 1 所述的方法,所述亲和剂包含抗体或其片段。
24. 如权利要求 23 所述的方法,所述亲和剂还包含珠。
25. 如权利要求 24 所述的方法,所述珠响应磁场。
26. 如权利要求 24 所述的方法,所述试验混合物包含多种不同的珠且所述亲和剂的珠包含与众多其他染料可区分的荧光染料。
27. 如权利要求 19 所述的方法,所述试验混合物包含超过一种亲和剂。
28. 如权利要求 1 所述的方法,所述试验混合物包含超过两种封闭剂。
29. 多种封闭剂,所述封闭剂包含与第一结合剂相连的第一珠和与不同于所述第一结合剂的第二结合剂相连的第二珠,所述结合剂选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。
30. 如权利要求 29 所述的多种封闭剂,所述珠包含与众多其他染料可区分的荧光染料。
31. 如权利要求 29 所述的多种封闭剂,所述珠不生成荧光信号。
32. 如权利要求 29 所述的多种封闭剂,所述珠是非磁性珠。
33. 如权利要求 29 所述的多种封闭剂,所述珠响应磁场。
34. 如权利要求 29 所述的多种封闭剂,所述第一珠与至少两种不同的结合剂相连。
35. 如权利要求 29 所述的多种封闭剂,所述第二珠与至少两种不同的结合剂相连。
36. 如权利要求 29 所述的多种封闭剂,还包含超过两种封闭剂。
37. 一种包含多种封闭剂和特异性针对靶分子的亲和剂的试剂盒,所述多种封闭剂包含第一封闭剂和第二封闭剂,所述第一封闭剂包含与第一结合剂相连的珠,其与样品中的一种或多种干扰分子形成非特异性结合复合物,所述第二封闭剂包含与不同于所述第一结合剂的第二结合剂相连的珠且与样品中的一种或多种干扰分子形成非特异性结合复合物。
38. 如权利要求 37 所述的试剂盒,所述珠是非磁性珠。
39. 如权利要求 37 所述的试剂盒,所述珠响应磁场。
40. 如权利要求 37 所述的试剂盒,所述结合剂选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。
41. 如权利要求 37 所述的试剂盒,所述第一封闭剂的珠与至少两种不同的结合剂相连。
42. 如权利要求 37 所述的试剂盒,所述第二封闭剂的珠与至少两种不同的结合剂相连。
43. 如权利要求 37 所述的试剂盒,所述珠包含与所述试剂盒的其他组分可区分的荧光

染料。

44. 如权利要求 37 所述的试剂盒,所述珠不生成荧光信号。

45. 如权利要求 37 所述的试剂盒,所述亲和剂包含抗体或其片段。

46. 如权利要求 45 所述的试剂盒,所述亲和剂还包含珠。

47. 如权利要求 46 所述的试剂盒,所述珠响应磁场。

48. 如权利要求 46 所述的试剂盒,所述珠包含与所述试剂盒的其他组分可区分的荧光染料。

49. 如权利要求 37 所述的试剂盒,所述试剂盒包含超过两种封闭剂。

50. 如权利要求 37 所述的试剂盒,所述试剂盒包含超过一种亲和剂。

51. 一种封闭亲和试验混合物中干扰分子的方法,所述方法包括:

使封闭剂接触样品,所述封闭剂包含与至少两种不同结合剂相连的珠,从而在所述结合剂和所述样品中的一种或多种分子之间形成非特异性结合复合物,从而封闭所述试验混合物中的所述干扰分子,所述分子否则会干扰亲和剂和所述样品中的可能存在的靶分子之间形成亲和复合物。

52. 如权利要求 51 所述的方法,所述珠是非磁性珠。

53. 如权利要求 51 所述的方法,所述珠响应磁场。

54. 如权利要求 51 所述的方法,其中,至少一种结合剂选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。

55. 如权利要求 51 所述的方法,所述方法还包括从所述试验混合物的其他组分中除去所述非特异性结合复合物。

56. 如权利要求 51 所述的方法,其中,除去所述非特异性结合复合物包括向所述试验混合物施加磁场。

57. 如权利要求 51 所述的方法,所述试验混合物包含多种不同的荧光珠且与至少不同的结合剂相连的珠包含与众多其他染料可区分的荧光染料。

58. 如权利要求 57 所述的方法,所述荧光珠被检测和定量。

59. 如权利要求 51 所述的方法,所述封闭剂的珠不生成荧光信号。

60. 如权利要求 51 所述的方法,所述方法还包括使所述亲和剂接触所述样品;将所述亲和复合物与所述试验混合物的其他组分分离;以及检测是否存在所述亲和复合物或其量。

61. 如权利要求 60 所述的方法,其中,分离所述亲和复合物包括向所述试验混合物施加磁场。

62. 如权利要求 51 所述的方法,所述方法还包括在使所述亲和剂接触所述样品前:

使所述封闭剂接触亲和剂溶液,从而在结合剂和所述亲和剂溶液中的一种或多种干扰分子之间形成非特异性结合复合物;以及

从所述亲和剂溶液的其他组分中分离所述非特异性结合复合物以生成所述亲和剂。

63. 如权利要求 51 所述的方法,所述亲和剂包含抗体或其片段。

64. 如权利要求 63 所述的方法,所述亲和剂还包含珠。

65. 如权利要求 64 所述的方法,所述珠响应磁场。

66. 如权利要求 64 所述的方法,所述试验混合物包含多种不同的珠且所述亲和剂的珠包含与众多其他染料可区分的荧光染料。

67. 如权利要求 51 所述的方法,所述试验混合物包含超过一种亲和剂。

68. 如权利要求 51 所述的方法,所述试验混合物包含超过一种封闭剂。

69. 如权利要求 68 所述的方法,其中,至少一种封闭剂包含与一种结合剂相连的珠。

70. 如权利要求 68 所述的方法,其中,至少一种封闭剂包含与至少两种不同的结合剂相连的珠。

71. 一种包含与至少两种不同的结合剂相连的珠的封闭剂,其中,至少一种结合剂选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。

72. 如权利要求 71 所述的封闭剂,所述珠包含荧光染料。

73. 如权利要求 71 所述的封闭剂,所述珠不生成荧光信号。

74. 如权利要求 71 所述的封闭剂,所述珠是非磁性珠。

75. 如权利要求 71 所述的封闭剂,所述珠响应磁场。

76. 一种包含封闭剂和特异性针对靶分子的亲和剂的试剂盒,所述封闭剂包含与至少两种不同的结合剂相连的珠,且与样品中的一种或多种干扰剂形成非特异性结合复合物。

77. 如权利要求 76 所述的试剂盒,所述珠响应磁场。

78. 如权利要求 76 所述的试剂盒,其中,至少一种结合剂选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。

79. 如权利要求 76 所述的试剂盒,所述珠包含与所述试剂盒的其他组分可区分的荧光染料。

80. 如权利要求 76 所述的试剂盒,所述珠不生成荧光信号。

81. 如权利要求 76 所述的试剂盒,所述亲和剂包含抗体或其片段。

82. 如权利要求 81 所述的试剂盒,所述亲和剂还包含珠。

83. 如权利要求 82 所述的试剂盒,所述珠响应磁场。

84. 如权利要求 82 所述的试剂盒,所述珠包含与所述试剂盒的其他组分可区分的荧光染料。

85. 如权利要求 76 所述的试剂盒,所述试剂盒包含超过一种封闭剂。

86. 如权利要求 76 所述的试剂盒,所述试剂盒包含超过一种亲和剂。

用于免疫试验的多重封闭物珠

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于 2013 年 7 月 30 日提交的美国临时申请 61/860,009 号的优先权,其通过引用纳入本文用于所有目的。

背景技术

[0003] 血清学免疫试验(如亲和试验)可提供用于分析物(如生物样品中的生物分子)定量的灵敏和特异性的方法。然而,这些试验易于受到试验试剂的非特异反应性的影响,其导致分析物测量中的干扰。血清和血浆样品也可导致基质作用或非特异性反应性如高背景。样品中存在的某些蛋白质(如异嗜性抗体)也会增加非特异性信号或导致假阳性。

[0004] 固相免疫试验(如 ELISA 或基于微粒的免疫试验)涉及生物分子经由被动或共价相互作用固定至固相(如孔或微粒)表面。样品中干扰或竞争性生物分子的非特异性结合可接合至试验试剂或固相上未被占据的位点,从而阻碍靶分子的精确检测。

发明内容

[0005] 本发明公开的封闭剂可用于分离样品中的干扰分子,导致免疫试验灵敏度提高。

[0006] 提供了一种在亲和试验混合物中封闭干扰分子的方法,该混合物包含样品。在一些方面中,该方法包括(a)使第一封闭剂接触样品,该第一封闭剂包含与第一结合剂相连的珠,从而在第一结合剂和样品中的一种或多种分子之间形成非特异性结合复合物,这些分子否则会干扰亲和剂和样品中靶分子(如果存在)之间形成亲和复合物;以及(b)使第二封闭剂接触样品,该第二封闭剂包含与不同于第一结合剂的第二结合剂相连的珠,从而在第二结合剂和样品中的一种或多种分子之间形成非特异性结合复合物,这些分子否则会干扰亲和剂和样品中靶分子(如果存在)之间形成亲和复合物;从而封闭试验混合物中的干扰分子。

[0007] 在一些实施方式中,该第一结合剂和第二结合剂结合不同的干扰分子。在其他实施方式中,该第一结合剂和第二结合剂结合同一干扰分子。在一些实施方式中,该结合剂选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。

[0008] 在一些实施方式中,该第一封闭剂包含超过一种结合剂。在一些实施方式中,该第二封闭剂包含超过一种结合剂。

[0009] 在一些实施方式中,该第一封闭剂和该第二封闭剂处于基本相等的比率。在其他实施方式中,该第一封闭剂的比率是该第二封闭剂的至少约 2 倍或更多。

[0010] 在一些实施方式中,该封闭剂的珠是非磁性珠。在其他实施方式中,该封闭剂的珠是对磁场产生应答的珠。

[0011] 在一些实施方式中,该封闭剂的珠是荧光珠。在其他实施方式中,该封闭剂的珠是非荧光珠。在一些情况中,该珠不生成荧光信号。

[0012] 在一些实施方式中,该方法还包括从试验混合物的其他组分中除去非特异性结合

复合物。在一些方面中,除去非特异性结合复合物的方法包括对试验混合物施加磁场。在一些方面中,除去非特异性结合复合物的方法包括对试验混合物离心。

[0013] 在一些实施方式中,该试验混合物包含多种不同的荧光珠且该封闭剂的珠包含可与众多其他染料区分的荧光染料。在一些情况中,这些荧光珠被检测和定量。

[0014] 在一些实施方式中,该方法还包括使亲和剂接触样品;以及检测是否存在亲和复合物或其量。在一些实施方式中,该方法还包括使亲和剂接触样品;从试验混合物的其他组分中分离亲和复合物;以及检测是否存在亲和复合物混合物或其量。在一些方面中,分离亲和复合物包括向试验混合物施加磁场。

[0015] 在一些实施方式中,该方法还包括在使亲和剂接触样品前使封闭剂接触亲和剂溶液,从而在结合剂和亲和剂溶液中一种或多种干扰分子之间形成非特异性结合复合物;以及从亲和剂溶液的其他组分中分离该非特异性结合复合物以生成亲和剂。

[0016] 在一些实施方式中,该亲和剂包含抗体或其片段。在一些实施方式中,该亲和剂还包含珠。在一个方面中,该珠响应磁场。

[0017] 在一些情况中,该试验混合物包含多种不同的荧光珠且该封闭剂的珠包含与众多其他染料可区分的荧光染料。

[0018] 在一些实施方式中,该试验混合物包含超过一种亲和剂。在一些实施方式中,该试验混合物包含超过两种封闭剂。

[0019] 在另一个方面中,本发明提供了多种封闭剂,包括与第一结合剂相连的第一珠和与不同于第一结合剂的第二结合剂相连的第二珠,该结合剂选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。

[0020] 在一些实施方式中,该珠包含荧光染料。在其他实施方式中,该珠不生成荧光信号。在一些实施方式中,该珠是非磁性珠。在其他实施方式中,该珠响应磁场。

[0021] 在另一个方面中,本发明提供了一种包含多种封闭剂和特异性针对靶分子的亲和剂的试剂盒,所述多种封闭剂包含第一封闭剂和第二封闭剂,该第一封闭剂包含与第一结合剂相连的珠,其与样品中的一种或多种干扰分子形成非特异性结合复合物,该第二封闭剂包含与不同于第一结合剂的第二结合剂相连的珠且与样品中的一种或多种干扰分子形成非特异性结合复合物。

[0022] 在一些实施方式中,该珠是非磁性珠。在一些实施方式中,该珠响应磁场。

[0023] 在一些实施方式中,该结合剂选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。在一些情况中,该第一封闭剂的珠与至少两种不同的结合剂相连。在一些情况中,该第二封闭剂的珠与至少两种不同的结合剂相连。

[0024] 在一些实施方式中,该珠包含可与试剂盒的其他组分区分的荧光染料。在一些实施方式中,该珠不生成荧光信号。

[0025] 在一些实施方式中,该亲和剂包含抗体或其片段。在一些实施方式中,该亲和剂还包含珠。在一些情况中,该珠响应磁场。在一些情况中,该珠包含可与试剂盒的其他组分区分的荧光染料。

[0026] 在一些实施方式中,该试剂盒包含超过两种封闭剂。在一些实施方式中,该试剂盒

包含超过一种亲和剂。

[0027] 在另一个方面中,提供了一种封闭亲和试验混合物中干扰分子的方法,该方法包括使封闭剂接触样品,该封闭剂包含与至少两种不同结合剂相连的珠,从而在结合剂和样品中的一种或多种分子之间形成非特异性结合复合物,从而封闭试验混合物中的干扰分子,这些分子否则会干扰亲和剂和样品中的靶分子(如果存在)之间形成亲和复合物。

[0028] 在一些实施方式中,该封闭剂的珠是非磁性珠。在其他实施方式中,该封闭剂的珠是响应磁场的珠。

[0029] 在一些实施方式中,至少一种结合剂选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 和类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。在其他实施方式中,至少两种结合剂选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。

[0030] 在一些实施方式中,该方法还包括从试验混合物的其他组分中除去非特异性结合复合物。在一些情况中,除去非特异性复合物的步骤还包括对试验混合物施加磁场。

[0031] 在一些实施方式中,该试验混合物包含多种不同的荧光珠且该封闭剂的珠包含与众多其他染料可区分的荧光染料。在其他实施方式中,该封闭剂的珠不生成荧光信号。

[0032] 在一些实施方式中,试验混合物的荧光珠被检测和定量。

[0033] 在一个实施方式中,该方法还包括使亲和剂接触样品;从试验混合物的其他组分中分离亲和复合物;以及检测是否存在亲和复合物或其量。在一些情况中,分离亲和复合物的步骤还包括对试验混合物施加磁场。

[0034] 在其他实施方式中,该方法还包括在使亲和剂接触样品前使封闭剂接触亲和剂溶液,从而在亲和剂溶液中在结合剂和一种或多种干扰分子之间形成非特异性结合复合物;以及从亲和剂溶液的其他组分中分离该非特异性结合复合物以生成亲和剂。该亲和剂可用于本发明所述方法或本领域已知的单重或多重亲和试验(如 ELISA)中。

[0035] 在一些实施方式中,该亲和剂包含抗体或其片段。在其他实施方式中,该亲和剂还包含珠。在一些情况中,该亲和剂的珠响应磁场。在一些实施方式中,该试验混合物包含多种不同的荧光珠且该亲和剂的珠包含与众多其他染料可区分的荧光染料。

[0036] 在一些实施方式中,该试验混合物包含超过一种亲和剂。在一些实施方式中,该试验混合物包含超过一种封闭剂。

[0037] 在另一个方面中,提供了一种封闭剂,该封闭剂包含与至少两种不同的结合剂相连的珠,其中,至少一种结合剂选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。在另一个方面中,提供了一种封闭剂,该封闭剂包含与至少两种不同的结合剂相连的珠,其中,至少一种结合剂选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。

[0038] 在一些实施方式中,该珠包含荧光染料。在一些实施方式中,该珠不生成荧光信号。在一些实施方式中,该珠是非磁性珠。在一些实施方式中,该珠响应磁场。

[0039] 在另一个方面中,本发明提供了一种包含封闭剂和特异性针对靶分子的亲和剂的试剂盒,该封闭剂包含与至少两种不同的结合剂相连的珠,且与样品中的一种或多种干扰

剂形成非特异性结合复合物。

[0040] 在一些实施方式中,该封闭剂的珠响应磁场。至少一种(或至少两种)结合剂可选自:BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体,和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。

[0041] 在一些实施方式中,该封闭剂的珠包含可与试剂盒的其他组分区分的荧光染料。在一些实施方式中,该珠不生成荧光信号。

[0042] 在一些实施方式中,该试剂盒的亲合剂还包含珠。在一些情况中,该亲合剂的珠响应磁场。在一些情况中,该亲合剂的珠包含可与试剂盒的其他组分区分的荧光染料。

[0043] 在一些实施方式中,该试剂盒包含超过一种封闭剂。在一些实施方式中,该试剂盒包含超过一种亲合剂。

[0044] 附图简要说明

[0045] 图 1 显示在多重免疫试验中使用封闭剂的方法的示例性实施方式。

[0046] 发明详述

[0047] 干扰分子包括但不限于临床样品中存在的多反应性抗体和自身抗体,例如阻止免疫试验精确测量靶分析物(如蛋白质)的血清。具体而言,这些分子干扰免疫试验中靶分析物与其亲合剂(如亲和抗体)之间的结合反应。

[0048] 发明人还开发了在多重固相免疫试验中使用一种或多种封闭剂以减少干扰分子与亲合剂的非特异性结合作用并使靶分析物特异性结合亲合剂的方法。例如,基于生物样品中发现或预期存在的干扰分子类型来选择具体试验中使用的封闭剂。

[0049] 该封闭剂可以是接合至少一种(其在一些实施方式中至少两种不同的)结合剂的固相珠,所述结合剂可与样品中的一种或多种干扰分子形成复合物,从而使干扰分子与试验的其他组分(如样品和/或亲合剂)隔绝。此外,封闭剂本身不影响靶分析物的抗体结合。该封闭剂可暴露于单独的样品、单独的亲合剂或含有样品和亲合剂的试验混合物。

[0050] 针对特定干扰分子的封闭剂的特异性取决于其结合剂。样品可含有多种类型的干扰分子,且因此可使用超过一种类型的结合剂或封闭剂。封闭剂的选择将取决于样品和试验试剂,且因此可通过经验确定。

[0051] 这些封闭剂可用于任何亲和试验中,例如免疫试验。在标准的免疫试验中,该封闭剂可以是非磁性的,且任选地是荧光珠。对于基于磁珠的试验,该封闭剂可以是超顺磁性的,且任选地是荧光珠。

[0052] 本发明中提供了用于亲和免疫试验的基于珠的封闭剂的方法、组合物和试剂盒。

[0053] I. 定义

[0054] 除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常所理解的同样含义。参见例如 Lackie, DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY(《细胞分子生物学词典》),埃尔斯威尔出版社(Elsevier)(第 4 版 2007); Sambrook 等, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL(《分子克隆,实验室手册》),冷泉港实验室出版社(冷泉港,纽约 1989)。术语“一个”或“一种”意在表示“一个(种)或多个(种)”。当术语“包含”及其各种变体例如“包括”和“含有”位于叙述步骤或要素之前的时候,是用来表示添加其它的步骤或要素是任选的,并且是非排它性的。本发明的实践中可以使用与本文所述类似或等价的任何方法、装置和材料。本文提供的以下定义是用来帮助理解本文经常用到的

某些术语,不对本发明的范围构成限制。

[0055] 术语“亲和试验混合物”或“试验混合物”指基于亲和的试验的反应混合物,其中,通过靶分子特异性结合结合伙伴(例如但不限于抗体或其片段)来检测样品中的靶分子。试验混合物可包含样品、封闭剂、亲和剂、结合剂、缓冲剂、洗涤缓冲剂或其组合。

[0056] 术语“封闭剂”指直接结合免疫试验的试剂或样品中存在的干扰或竞争分子的固相试剂。如本文所述,封闭剂包括固相珠和一种或多种结合剂,该结合剂偶联(例如偶合、连接或结合)至珠。

[0057] 本文所用术语“珠”包括颗粒、微珠、微粒、微球、纳米珠、纳米颗粒、纳米球等。在多个实施方式中,可以使用市售可得的珠或其他颗粒,例如 Miltenyi 颗粒,美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec),德国;Sepharose 珠,药用精细化学公司(Pharmacia Fine Chemicals),瑞典;DYNABEADS™,代纳公司(Dynal Inc.),奥斯陆,挪威;PuraBead™,PM 生物科学公司(ProMetic Biosciences),罗克维尔,马里兰州;来自宾夕法尼亚州亨廷顿谷的免疫子公司(Immunicon)的磁珠;来自印第安纳州费舍尔市的邦斯实验室公司(Bangs Laboratories, Inc.)的微球。

[0058] 本文中,术语“顺磁性”指仅在外部施加的磁场存在时出现的磁性。用于描述上文所定义的珠时,术语“超顺磁性”定义为在外部施加的磁场不存在的情况下不保留任何显著量的磁化,且因此不形成聚集体。

[0059] 术语“反应性基团”指化合物上的化学部分,其能够与单独、不同的化合物上的官能团发生化学反应以形成共价连接。

[0060] 术语“结合剂”指结合免疫试验的试剂或样品中存在的干扰分子的试剂。其还可填充固相基质(如珠、孔、膜等)上未被占据的位点。示例包括但不限于:牛血清白蛋白、牛奶固体、非蛋白质基试剂、蛋白质基试剂、表面活性剂(例如吐温-20、曲通 X-100、CHAPS)、酪蛋白及其衍生物、明胶(如鱼明胶)、胶原、蛋白 A、蛋白 G、蛋白 L、聚合物(例如聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮)、动物血清、非动物血清、免疫球蛋白或免疫球蛋白聚集体、异嗜性抗体、市售封闭物质,和天然或合成的肽。

[0061] 术语“亲和剂”是指与靶分子特异性结合分子。亲和剂的非限制性示例包括抗体、抗体片段(如 Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、scFv-Fc、ScFv-CH、scFab、scFv-拉链)、适配体、配体、酶、抗原和多肽。

[0062] 本文所用术语“靶分子”或“靶分析物”指被亲和剂识别的分子、化合物或复合物,即可被抗体或其片段特异性结合。该术语可以指可被抗体或其片段特异性识别的任意分子,例如,多肽、多核苷酸、糖、脂质、化学部分或其组合(例如,磷酸化或糖基化的多肽、染色质部分等)。本领域技术人员会理解该术语并不表示该分子在各种情况中是免疫原性的,但仅仅表示其可被抗体靶向。

[0063] 本文所用术语“干扰分子”指导致免疫试验中非特异性反应性、高背景和/或假阳性的分子、化合物或复合物。干扰分子可降低免疫试验的特异性。干扰分子不是亲和试验(如免疫试验或免疫试验)的靶分析物(分子)。

[0064] 本文所用术语“类风湿因子”或“RF”指一种自身抗体,其通常结合抗体(如 IgG 类)的 Fc 部分且通常与多种物质交叉反应。类风湿因子可干扰针对特定分析物的免疫试验。例如,在夹心试验中,RF 可在亲和抗体与检测抗体之间桥连,生成人工增加的靶分子的

信号。在竞争性试验中, RF 可封闭标记的靶分子与亲和抗体的结合并生成假性低信号。

[0065] 本文所用术语“异嗜性抗体”指因具有多个结合位点或具有可识别多种具有类似结构的抗原的单个结合位点而具有多重特异性的抗体。异嗜性抗体在正常血液样品中为 5-40%。这些干扰抗体与难以确定的抗原反应并通常显示弱亲合力且是多物种特异性的。例如, 人血清中的异嗜性抗体可对山羊、小鼠和大鼠蛋白质具有反应性。

[0066] 术语“抗体”指保留抗原结合活性的多肽结构, 如免疫球蛋白、偶联物或其片段。该术语包括但不限于: 源自人或其它哺乳动物细胞的 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM 同种型类的多克隆或单克隆抗体, 包括天然形式或遗传修饰形式, 如人源化、人、单链、嵌合、合成、重组、杂合、突变、移接和体外生成的抗体。该术语包括偶联物, 包括但不限于含有免疫球蛋白部分的融合蛋白(如嵌合或双特异性抗体或 scFv) 以及片段(如 Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb 和其他组合物)。

[0067] 示范性免疫球蛋白(抗体)的结构单元包含四聚体。各四聚体由相同的两对多肽链组成, 每对包含一条“轻”链(约 25kD)和一条“重”链(约 50-70kD)。每条链的 N 末端确定约 100 至 110 个或更多个氨基酸构成的可变区, 所述可变区主要负责抗原识别。术语轻链可变区(V_L)和重链可变区(V_H)分别指这些轻链和重链。可变区含有抗体的抗原结合区(或其功能性等价物)并且对于结合的特异性和亲和性是至关重要的。参见 Paul, *Fundamental Immunology*(《基础免疫学》)(2003)。

[0068] 抗体可以完整的免疫球蛋白形式或任何包含特异性抗原结合活性的多种已充分表征片段的形式存在。这样的片段可以通过用多种肽酶消化来产生。胃蛋白酶在铰链区中的二硫键以下消化抗体, 产生 Fab 的二聚体 F(ab')₂, Fab 本身是由二硫键连接到 V_H-C_H1 的轻链。可在温和条件下还原 F(ab')₂ 以打断铰链区中的二硫键, 从而将 F(ab')₂ 二聚体转化为 Fab' 单体。Fab' 单体实质上是具有铰链区部分的 Fab。虽然根据对完整抗体的消化定义了多种抗体片段, 但是本领域技术人员会理解, 这类片段也可用化学方法或重组 DNA 方法从头合成。因此, 本文中术语抗体, 也包括通过修饰整个抗体而生成的抗体片段, 或用重组 DNA 方法从头合成所产生, 或使用噬菌体展示文库鉴定的那些抗体片段(参见如 McCafferty 等, *Nature* 348:552-554(1990))。

[0069] 本文中, 术语“Fv”指单价或双价可变区片段, 并可仅包括可变区(如 V_L和/或 V_H), 以及较长的片段, 如 Fab、Fab' 或 F(ab')₂, 其还可包含 C_L和/或 C_H1。除非另有说明, 术语“Fc”指包含 C_H1 和 C_H2 区的重链单体或二聚体。

[0070] 单链 Fv(scFv)指包含由接头(如肽接头)接合的 V_L和 V_H的多肽。scFv 还可用于形成串联(或二价)scFv 或双抗体。串联 scFv 和双抗体的产生和性质描述于例如 Asano 等(2011)*J Biol. Chem.* 286:1812; Kenanova 等(2010)*Prot Eng Design Sel* 23:789; Asano 等(2008)*Prot Eng Design Sel* 21:597。

[0071] 术语“特异性针对”、“特异性结合”和类似术语指分子(如抗体或抗体片段)与靶标(抗原、表位、抗体靶标等)的结合亲和性比非靶标化合物高至少 2 倍, 例如至少 4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、25 倍、50 倍或 100 倍。例如, 特异性结合(或特异性针对)一抗的抗体与一抗的结合亲和性将通常比非一抗靶标(例如来自不同物种或不同同种型的抗体, 或非抗体靶标)高至少 2 倍。

[0072] 相对于抗体靶标(例如, 抗原、分析物、免疫复合物)的术语“结合”一般表示抗体

与纯群体中的大多数抗体靶标结合（假定合适的摩尔比）。例如，结合给定抗体靶标的抗体一般结合溶液中至少 2/3 的抗体靶标（例如，75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%）。本领域技术人员应理解，取决于测定结合的方法和 / 或阈值，可出现一些变化。

[0073] 术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”可互换使用以表示一种氨基酸聚合物或一组两种或更多种相互作用或结合的氨基酸聚合物。该术语可应用于某种氨基酸聚合物，在所述氨基酸聚合物中一个或多个氨基酸残基是相应天然产生氨基酸的人工化学模拟物，以及天然产生的氨基酸聚合物（含有经修饰的残基的聚合物）和非天然产生的氨基酸聚合物。

[0074] II. 封闭剂

[0075] A. 结合剂

[0076] 本发明所述封闭剂可包含一种结合剂，或在一些方面中包含至少两种不同的结合剂。该结合剂可结合具有亲和剂的溶液或样品中的一种或多种干扰分子。此外，该结合剂基本不结合亲和剂特异性结合的预期靶分析物。此外，该结合剂基本不结合多重亲和试验的靶分析物。

[0077] 可结合免疫试验样品中存在的干扰分子的任何试剂都可用作结合剂。示例性试剂详述于，例如，Crowther, JR., 1995, *Methods Mol. Biol.*, 42:1-223; Davies, C., 1994. “Concepts. (概念)” 刊于 *Immunoassay Handbook* (《免疫试验手册》), D. Wild 编, 斯托克顿出版社, 纽约, 第 83-115 页, 以及 Hornbeck, P., 2001, “Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. (酶联免疫吸附试验)” 刊于 *Current Protocols in Immunology* (《新编免疫学实验方法》), 2.1 单元, R. Coico 编, 约翰威利父子出版公司, 新泽西州霍波肯。结合剂的示例包括但不限于: BSA、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、全正常动物血清（例如小鼠血清、大鼠血清、山羊血清、兔血清、绵羊血清）、基于动物的 IgG 聚集体（例如小鼠 IgG、大鼠 IgG、兔 IgG、山羊 IgG、绵羊 IgG）、和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。市售可得结合剂的示例包括 Superchemiblock 异嗜性封闭剂（密理博公司 (Millipore), 马萨诸塞州比尔里卡）、免疫球蛋白抑制性试剂 (IIR; 生物再生公司 (Bioreclamation, Inc.), 纽约州韦斯科伯瑞)、异嗜性封闭管 (Sc 抗体实验室公司 (Scantibodies Laboratory), 加利福尼亚州桑提市) 和 StabliGuard 免疫试验稳定剂 (SM 公司 (SurModics, Inc.), 明尼苏达州勒苏尔)。

[0078] 在一些实施方式中，该结合剂可以是动物（如小鼠、大鼠、绵羊、山羊、驴等）来源的抗体（例如 IgG、IgG、IgM、IgE 或 IgD）。这类抗体可以例如特异性结合和中和异嗜性抗体、类风湿因子或其他干扰分子。例如，免疫球蛋白与异嗜性抗体的接合阻止该异嗜性抗体结合（捕获）特异性针对靶分析物的抗体或检测抗体。该结合剂可以是不可结合靶分析物或特异性针对（例如可特异性结合）靶分析物的亲和抗体的抗体。

[0079] 在一些实施方式中，该结合剂结合一种或多种干扰分子。在具体的实施方式中，超过一种结合剂（如第一结合剂和第二结合剂）可结合相同的干扰分子。

[0080] 在一些实施方式中，该封闭剂包含第一结合剂和第二结合剂。在一些情况中，第一和第二结合剂结合相同的干扰分子。在一些情况中，第一和第二结合剂不结合相同的干扰分子。在一些实施方式中，该封闭剂包含多种结合剂，例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多种结合剂。在一些实施方式中，该结合剂结合多种不同类型的干扰分子，例如 2、3、4、5、6、7、8、

9、10 或更多种干扰分子。

[0081] 一种或多种结合剂可用于亲和试验（如多重亲和试验）以降低干扰分子的作用。在一些实施方式中，这些结合剂以约一比一的比率使用。例如，第一结合剂和第二结合剂以基本等量（如浓度）存在。如果存在超过两种结合剂，所有结合剂都可以是基本等量。在其他实施方式中，这些结合剂以不同量（如浓度）使用。在一些实施方式中，第一结合剂的含量是第二结合剂的约 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更多倍。

[0082] 用于本发明所提供方法的封闭剂的结合剂的含量可根据经验确定。例如，可进行使用封闭剂的滴度实验以建立具体亲和试验中或具有特定样品类型的具体封闭剂所需结合剂的最优含量。

[0083] B. 珠

[0084] 本发明所述封闭剂包含珠。在一些实施方式中，珠尺寸的范围是约 1 μm 至约 100 μm 或更多，例如直径 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 μm 或更大。在其它实施方式中，珠尺寸的范围是约 1nm 至约 1000nm 或更多，例如直径 1、10、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000nm 或更大。这些珠可以是基本均一的尺寸。

[0085] 在一些实施方式中，该珠是非磁性珠。该珠可由聚合物材料制得，例如但不限于：聚苯乙烯、溴化聚苯乙烯、聚丙烯酸、聚丙烯腈、聚酰胺、聚丙烯酰胺、聚丙烯醛、聚丁二烯、聚己内酯、聚碳酸酯、聚酯、聚乙烯、聚对苯二甲酸乙二酯、聚二甲基硅氧烷、聚异戊二烯、聚氨酯、聚乙酸乙烯酯、聚氯乙烯、聚乙烯吡啶、聚氯甲基苯乙烯、聚乙烯基甲苯、聚偏二氯乙烯、聚二乙烯基苯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚交酯、聚乙交酯、聚（丙交酯-共-乙交酯）、聚酞、聚原酸酯、聚磷腈、多磷酸盐、聚砷，或其组合。该珠还可由碳水化合物（例如羧甲基纤维素、羟乙基纤维素）、琼脂糖、凝胶、蛋白性聚合物、多肽、真核和原核细胞、病毒、脂质、金属、树脂、胶乳、橡胶、硅酮（如聚二甲基二苯基硅酮）、玻璃、陶瓷、碳、高岭石、膨润土等制成。

[0086] 在一些实施方式中，该珠响应磁场。在一些情况中，该珠是磁性、超顺磁性、顺磁性或铁磁性的。这些珠可包含包衣材料，例如在磁场中吸引另一材料，例如氧化铁（如磁铁矿、磁赤铁矿）、镁、钼、锂和钽。

[0087] C. 反应性基团

[0088] 反应性基团可以是与相应官能团反应时可形成化学键的电子对供体或受体。该反应性基团可以在封闭剂的珠或结合剂上。例如，珠上的反应性基团与待偶联的结合剂之间的偶联反应可导致反应性基团的一个或多个原子整合至将结合剂接合至珠的新连接中。

[0089] 电子对受体基团的示例包括但不限于：活化的酯（包括 N-羟基琥珀酰亚胺酯或四氟苯基酯）、丙烯酰胺、酰基叠氮、酰基卤化物、酰基腈、醛、酮、烷基卤、烷基磺酸盐、烷基硫代磺酸盐、酸酐、芳基卤、叠氮化物、氮杂环丙烷、硼酸酯、碳二亚胺、重氮烷、二烯、环氧化物、卤代乙酰胺、卤代铂酸盐或卤代三嗪。

[0090] 电子对供体基团的示例包括但不限于：巯基、胺、醇、肼、羟胺、羧酸、环炔烃、酯取代的三芳基膦、甘油、苯醌或杂环。

[0091] 共价连接的示例包括但不限于：羧酰胺、硫醚、酯、亚胺、肼、脒、烷基胺、醚、二硫化物、苯基硫醚、芳基胺、1, 2, 3-三唑、酰胺、硼酸酯、N-丙烯醛基脒、环己烯和氨基三嗪键。该

连接可以是,但不限于,醚、硫醚、羧酰胺、磺酰胺、脲、氨基或胍部分。

[0092] 该共价连接将结合剂(或珠)的反应性基团与珠(或结合剂)上的官能团结合,其直接连接(例如单键)或使用稳定的化学键的组合,例如,单、双、三或芳族碳-碳键,以及碳-氮键、氮-氮键、碳-氧键、碳-硫键、磷-氧键和磷-氮键。

[0093] 用于接合结合剂与珠的反应性基团的选择取决于珠上的官能团和所需共价连接的类型和/或长度。珠上通常存在的官能团的类型包括但不限于:胺、酰胺、硫醇、醇、酚、醛、酮、磷酸酯/盐、咪唑、胍、羟胺、双取代的胺、卤化物、环氧化物、羧酸酯、磺酸酯、嘌呤、嘧啶、羧酸、烯键,或这些基团的组合。在一些实施方式中,该封闭剂的珠是羧基修饰的珠、氨基修饰的珠、羟基修饰的珠、酰肼修饰的珠或氯甲基修饰的珠。

[0094] 珠(如非磁性或响应磁场)可具有超过一个官能团,并可通过不同的共价连接与超过一种结合剂偶联。例如,第一结合剂可经由第一反应性基团偶联(例如接合、连接)珠且第二结合剂可通过第二不同的反应性基团偶联同一珠。

[0095] 结合剂的反应性基团可以是,但不限于,胺、硫醇、醇、醛或酮、丙烯酰胺、反应性胺(包括尸胺和乙二胺)、活化的羧酸酯(通常是琥珀酰羧酸酯)、酰基叠氮化物、丙烯腈、醛、烷基卤化物、酸酐、苯胺、芳基卤化物、叠氮化物、氮丙啶、脂族胺、硼酸酯、羧酸、重氮烷、卤代乙酰胺、卤代三嗪、胍(包括酰胍)、亚氨基、异氰酸酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、亚磷酰胺、全氟苯甲酰胺基、叠氮基全氟苯甲酰胺基、补骨脂素、反应性铂络合物(包括卤代铂酸盐或硝酸盐)、磺酰卤、巯基,或其变体。

[0096] 反应性基团和珠与结合剂之间共价连接的其他示例参见,例如,S. S. Wong, "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking(《蛋白偶联和交联化学》)",CRC出版社(1991)和G. T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques(《生物偶联技术》)",学术出版社(Academic Press)(1995)。例如,可通过偶联蛋白质的赖氨酸残基的游离氨基和/或N端氨基与珠上的羧基来将蛋白质(如BSA)和抗体与珠偶联。

[0097] D. 荧光染料

[0098] 本发明提供的封闭剂可包含在紫外或可见光谱范围中的波长处具有光发射的荧光染料。荧光染料的非限制性示例包括:咕吨(荧光素、若丹明、6-羧基荧光素、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基若丹明、6-羧基-X-若丹明、5-羧基若丹明-6G、5-羧基若丹明-6G、四甲基若丹明、若丹明绿和若丹明红)、花青、花青琥珀酰酯(磺基吲哚花青琥珀酰酯、(羧基烷基)花青琥珀酰酯、BODIPY琥珀酰酯)、香豆素(伞形酮)、苯甲酰胺(Hoeschst33258)、菲啶(德州红)、吡啶染料、吲哚染料、咪唑染料、吩噻嗪染料、卟啉染料和喹啉染料。荧光染料的示例还包括:4-乙酰胺基-4'-异硫氰酸根合芪-2,2'-二磺酸、吲哚、吲哚异硫氰酸酯、5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)、4-氨基-N-[3-乙烯基磺酰基]苯基]萘酰亚胺-3,5二磺酸酯、N-(4-苯胺基-1-萘基)马来酰亚胺、邻氨基苯甲酰胺、BODIPY、亮黄、香豆素、7-氨基-4-甲基香豆素(AMC,香豆素120)、7-氨基-4-三氟甲基香豆素(香豆素151)、花青染料、荧光桃红、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、5',5"-二溴连苯三酚-磺酰(溴邻苯三酚红)、7-二乙基氨基-3-(4'-异硫氰酸根合苯基)-4-甲基香豆素二乙烯基三胺五乙酸酯、4,4'-二异硫氰根合二氢-芪-2,2'-二磺酸、4,4'-二异硫氰酸根合芪-2,2'-二磺酸、5-[二甲基氨基]萘-1-磺酰氯(DNS,丹酰氯)、4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮)苯甲酸(DABCYL)、4-二

甲基氨基苯基偶氮苯基-4'-异硫氰酸酯 (DABITC)、曙红、曙红异硫氰酸酯、赤藓红 B、赤藓红异硫氰酸酯、乙啶、5-羧基荧光素 (FAM)、5-(4,6-二氯三嗪-2-基)氨基荧光素 (DTAF)、2',7'-二甲氧基-4'5'-二氯-6-羧基荧光素 (JOE)、荧光素、荧光素异硫氰酸酯、荧胺、IR144、IR1446、孔雀石绿异硫氰酸酯、4-甲基伞形酮、邻甲酚酞、副品红、酚红、B-藻红蛋白、邻苯二甲醛、茈、丁酸茈、琥珀酰亚胺基 1-丁酸茈、量子点、反应红 4 (Cibacron. TM. 亮红 3B-A)、6-羧基-X-若丹明 (ROX)、6-羧基若丹明 (R6G)、丽丝胺若丹明 B 磺酰氯若丹明 (Rhod)、若丹明 B、若丹明 123、若丹明 X 异硫氰酸酯、磺基若丹明 B、磺基若丹明 101、磺基若丹明 101 的磺酰氯衍生物 (德州红)、N, N, N', N'-四甲基-6-羧基若丹明 (TAMRA)、四甲基若丹明、四甲基若丹明异硫氰酸酯 (TRITC)、核黄素、玫红酸、镧系螯合衍生物,及其衍生物。本领域技术人员应理解,荧光染料可以是能够发射荧光可检测信号的任何染料。

[0099] 可通过本领域广泛已知的有机合成方法制备荧光珠 (参见例如 Haugland, MOLECULAR PROBES HANDBOOK, 同上, (2002))。荧光染料或荧光材料可与珠的表面偶联或整合至珠。例如,可使用本领域已知的技术对磁性应答性珠进行染色,参见例如美国专利号 6,514,295。简言之,使用有机溶剂使珠溶胀,使荧光染料进入珠。

[0100] 通过改变染料的浓度 (多种信号强度) 和使用整合至珠的不同染料组合 (不同染料发射),可生成多种可区分的珠组 (参见美国专利号 5,981,180)。例如,可通过使用不同比率的 2 种或更多种不同染料 (例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多种不同染料) 掺杂珠来生成一组珠。还可以不同比率使用 2 种不同染料生成一组珠,使得第一染料以多种独特的染料浓度整合至珠且第二染料以多种独特的染料浓度整合至珠。例如,该组珠可包含珠的阵列,其各自具有独特的染料概况,其通过使用两种不同荧光染料的不同染料组合掺杂各珠来建立。

[0101] III. 封闭剂的制备

[0102] 可通过将结合剂包被至珠表面来形成封闭剂。不受制备方法的限制,在一些实施方式中,可进行基于胺的偶联反应以偶联具有伯胺的试剂与羧酸化的珠。首先,通过羧酸化的珠与 1-环己基-3-(2-吗啉基乙基)碳二亚胺 (CMC) 和 1-羟基苯并三唑 (HOBt) 之间的反应形成活性酯。随后,通过反应性酯将结合剂共价偶联至珠表面。对于不带有伯胺的结合剂,可在接合结合剂前对珠衍生化以生成适当的官能团。例如,可如下所述进行两步骤碳二亚胺反应:1) 使用碳二亚胺 (如 EDAC (盐酸 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺)) 活化珠表面上的羧基,其形成活性 O-酰基异脲中间体,以及 2) 将活性酯与结合剂的伯胺反应以形成共价键。

[0103] 该珠在其表面上可具有超过一种类型的官能反应性基团,例如 2、3、4、5 或更多种不同的官能团。在一些情况中,该珠可具有至少一种官能反应性基团。

[0104] 如上文所述,在一些情况中,至少两种单独和不同的结合剂可偶联单个珠。在一些实施方式中,这些结合剂以不同比率位于珠上。在一些实施方式中,这些结合剂的比率范围是约 1:1.5 至 1:10,例如 1:1.5、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5、1:5、1:5.5、1:6、1:6.5、1:7、1:7.5、1:8、1:8.5、1:9、1:9.5 或 1:10。例如,该第一结合剂以特定量共价偶联且该第二结合剂固定于较高或较低的含量,但不是同一含量。

[0105] IV. 使用封闭剂的方法

[0106] 图 1 显示上文所述封闭剂的应用。多种封闭剂 (如封闭物珠) 可与一种或多种亲

和剂（如试验珠）掺混在一起。根据何时施用封闭剂，该封闭剂可捕获样品、试验混合物（样品和亲和剂）或两者中存在的干扰分子。存在封闭剂通过降低样品中干扰分子对于亲和剂与靶分析物结合的作用来增强试验的特异性。

[0107] 如果需要超过一种类型的封闭剂，可以等量（如等比率）或不同量（如不同比率）使用不同的封闭剂。例如，在一些情况中，向样品、亲和剂或试验混合物中加入等量的第一封闭剂和第二封闭剂。在其他情况中，第一封闭剂的比率是第二封闭剂的至少约 2 倍或更多，例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10 倍或更多。本发明所述方法中需要的封闭剂的量取决于样品、试验试剂和试验条件。因此，可根据经验确定封闭剂的选择以及所需的使用量。图 1 描述了单独的试验孔 100，其含有封闭剂 201-209（封闭物珠 A-I）、封闭物珠 B 和干扰分子之间的复合物 220、分析物特异性试验珠 300、生成磁场的磁性材料 310、未结合的样品材料 400、未结合的干扰和 / 或竞争分子 410，和平板洗涤器的抽气式探针 420。如同描述的那样，封闭剂和亲和剂可通过荧光区分（显示为不同颜色的珠），该封闭剂不发荧光或以特定波长发射荧光，该波长与亲和剂的波长轻微重叠。类似地，可通过亲和剂（未显示）和标记检测抗体的报告物（未显示）的荧光来测定是否存在靶分子或其水平。

[0108] 在一些实施方式中，封闭剂可与抗体夹心免疫试验联用。例如，封闭剂可用于某一试验（如 ELISA），其中，捕获抗体用于捕获感兴趣的靶分子且偶联于固相（如孔、珠等）。

[0109] 在一些实施方式中，可向样品中直接加入封闭剂。可根据试验中所用的样品类型来选择封闭剂。例如，包含针对 HAMA 的抗体的封闭剂和包含针对类风湿因子（RF）的抗体的封闭剂可用于除去人血清样品中存在的诸如 HAMA 和 RF 的干扰分子。

[0110] 在一些实施方式中，向试验混合物中加入封闭剂。在一些情况中，向样品中同时加入封闭剂和亲和剂。在其他情况中，向样品中依次加入封闭剂和亲和剂。在其他情况中，向含有样品和亲和剂的试验混合物中加入封闭剂。

[0111] 在一些实施方式中，将封闭剂在一定温度下孵育一段时间，从而形成包含封闭剂和一种或多种干扰分子的非特异性结合复合物。在一些情况中，该封闭剂结合不同的干扰分子。

[0112] 任何相关方法都可用于从样品中分离非特异性结合复合物。在一些实施方式中，通过离心从样品中分离封闭剂和非特异性结合复合物。在其他实施方式中，如果封闭剂对磁场产生应答，则向非特异性结合复合物施加磁场，随后将复合物与样品或试验混合物分离。

[0113] 在一些实施方式中，在检测和 / 或定量与靶分析物结合的亲和剂前不从试验混合物中移除非特异性结合复合物。

[0114] 通常，亲和剂和封闭剂的荧光染料基于其发射系统的检测窗口的波长的光的能力进行选择。通常，这些检测窗口被选择为由多个波长隔开，且选择染料以最小化染料的荧光信号与检测窗口的重叠。

[0115] V. 免疫试验

[0116] 可应用本发明所述封闭剂的免疫试验的示例包括：酶联免疫试验（ELISA）、荧光免疫吸附试验（FIA）、免疫组化、游离或环境分析物免疫试验、基于微球的免疫试验、化学连接的免疫试验（CLIA）、放射免疫试验（RIA）、流式细胞术（如荧光激活的细胞分选或 FACS）、Western 印迹、Southern 印迹和免疫印迹。其他可应用的免疫技术包括竞争性和非竞争性

试验系统,例如“夹心”免疫试验、免疫沉淀试验、沉淀素反应、免疫扩散试验、免疫放射测定试验、荧光免疫试验等。免疫试验可以是多重性的,具有多次同时或连续试验,或者可自动进行,例如使用 Bio-Plex® 或类似系统。对于可以使用本发明所述封闭剂的免疫试验的综述,参见例如 The Immunoassay Handbook (《免疫试验手册》), David Wild, 第 3 版, 斯托克顿出版社 (Stockton Press), 纽约, 2005 ; Ausubel 等编, 1994, Current Protocols in Molecular Biology (《新编分子生物学实验指南》), 卷 1, 约翰威利父子公司 (John Wiley & Sons, Inc.), 纽约。

[0117] 一种示例性基于流式细胞术的多重试验 (如 Bio-Rad Bio-Plex 试验、Luminex xMAP 试验等) 允许在单个样品中同时测试多种分析物。该试验利用直径约 5-6 μm 的微球 (如微粒或珠), 其内部标记有两种荧光染料。当这些微球通过流动池时, 其被两种激光测定。一种激光基于微球内含有的两种荧光团的比率鉴定微球, 而另一种激光基于报告荧光的强度定量与微球结合的分析物的量。各微球的表面可含有多个反应基团, 其功能是共价生物分子 (如配体或抗体) 接合的位点。

[0118] VI. 试剂盒

[0119] 在一些实施方式中, 该试剂盒包含超过一种 (如至少两种) 封闭剂, 如本发明所述。在一些实施方式中, 该试剂盒包含一种或多种 (如至少两种) 亲和剂。在一些方面中, 该亲和剂包含抗体或其片段。

[0120] 该封闭剂可以是与结合剂相连的珠。在一些情况中, 该封闭剂的珠偶联一种或多种结合剂。结合剂的示例包括但不限于: 牛血清白蛋白 (BSA)、蛋白 L、胶原、PEG4000/6000、动物血清、鼠基 IgG 聚集体, 和识别 HAGA、HAMA、HARA、HASA 或类风湿因子的来源于山羊、小鼠、兔或绵羊的抗体。

[0121] 在一些实施方式中, 该封闭剂的珠包含可与亲和试验中使用的其他荧光染料区分的荧光染料。在其他实施方式中, 该珠不生成荧光信号。在一些实施方式中, 该试剂盒的珠 (例如封闭剂的珠和亲和剂的珠) 包含可与试剂盒的其他荧光染料区分的一组荧光染料。该封闭剂的珠可以是非磁性的。该珠可响应磁场 (例如超顺磁性)。

[0122] 该亲和剂可连接珠, 该珠响应磁场 (例如超顺磁性)。在一些实施方式中, 该亲和剂的珠包含可与试验中使用的其他荧光染料区分的荧光染料。该亲和剂的珠可以是非磁性的。该珠可响应磁场 (例如超顺磁性)。在一些方面中, 该亲和剂包含抗体或其片段。该亲和剂经选择以结合试验的特定靶分析物。

[0123] 在一些实施方式中, 该试剂盒包含用于进行免疫试验的试剂和物料, 例如 ELISA 板、缓冲液储液、标准品和 / 或对照品、磁体等。

[0124] 该试剂盒还将通常包含使用说明, 或指向外部说明来源 (如网站)。

VII. 实施例

[0125] 实施例 1 : 使用封闭剂在亲和试验前从样品中除去干扰分子。

[0126] 该实施例描述了一种使用封闭剂制备样品的方法。样品 (如血清) 与封闭剂孵育, 该封闭剂根据其对样品中已知存在的特定干扰分子的亲和性选择。在使封闭剂与干扰分子形成复合物的条件下孵育样品和封闭剂的掺混物。通过离心 (或本领域任何已知方法) 从样品中分离复合物和未结合的封闭剂。随后收集目前不含或基本不含干扰分子的样品。

[0127] 实施例 2 :在基于磁珠的亲合试验中使用封闭剂。

[0128] 该实施例显示本发明所述方法的一个示例性实施方式(参见图 1)。具体而言,该实施例描述了用于多重基于磁珠的亲合试验的实验方案(例如 Bio-Rad Bio-Plex 系统),其可用于测量样品中不同靶分析物的水平。

[0129] 该试验的组分包括样品(含有靶分析物和干扰分子)、亲合剂、封闭剂、磁体、平板洗涤机和荧光检测器。这些亲合剂(分析物特异性试验珠 300)是一系列荧光编码的磁珠,其各自偶联特异性针对具体靶分析物(分子)的独特抗体。这些封闭剂(封闭物珠 201-209)偶联不同的结合剂(例如结合剂 A-I),这些结合剂可结合试验孔(单个孔 100)中存在的一种或多种干扰分子。

[0130] 获得测试样品、标准品和质量控制样品。标准品用于生成标准曲线。具体而言,制备了标准品的标准稀释系列以生成在各点之间具有四倍稀释的八点标准曲线。

[0131] 向试验孔中加入测试样品。向样品中加入一系列预先选择的封闭剂,随后加入多种亲合剂。将掺混物在 850rpm 的转速下室温孵育 30 分钟以使封闭剂捕获样品中存在的干扰分子 220 并使亲合剂结合其靶分析物。将磁体 310 置于孔底部,从而向亲合剂施加磁场。使用洗涤缓冲液对孔洗涤三次。使用具有抽气式探针的平板洗涤机除去未结合的干扰分子 410(未与封闭剂结合的干扰分子)和其他未结合的材料 400。随后,向孔中加入生物素偶联的检测抗体并将掺混物在 850rpm 的转速下室温孵育 30 分钟。随后使用洗涤缓冲液和平板洗涤机对孔洗涤三次。随后,向孔中加入链霉亲和素-PE 并将掺混物在 850rpm 的转速下室温孵育 10 分钟。随后再次使用洗涤缓冲液和平板洗涤机对孔洗涤三次。将孔移出磁场并将孔中的内容物(如亲合剂)重悬于试验缓冲液中。使用具有两个激光器和相关光学器件的流式细胞仪或具有 LED/CCD 相机的荧光平板成像仪获取来自亲合剂的荧光信号。来自亲合剂的荧光信号关联样品中存在的特定靶分析物的水平。

[0132] 实施例 3 :在亲合试验中使用封闭剂。

[0133] 该实施例显示从亲合试验混合物中除去干扰分子的方法的一个示例性实施方式,该混合物是样品和亲合剂的混合物。在该实施例中,亲合剂不结合珠。

[0134] 将封闭剂与含有样品和亲合剂的亲合试验混合物混合并在室温下孵育约 30-60 分钟以使试验混合物的干扰分子与封闭剂形成复合物。随后,通过离心从试验混合物中除去复合物。根据本领域已知的标准方法检测与靶分析物结合的亲合剂。

[0135] 实施例 4 :使用封闭剂和亲合剂溶液。

[0136] 该实施例显示通过使用磁性封闭剂从亲合剂溶液(例如含有抗体或其片段的试剂)中除去干扰分子的方法的一个示例性实施方式。

[0137] 向含有一种或多种分子(这些分子干扰亲合剂与其靶分析物(分子)的结合)的亲合剂溶液中加入封闭剂(例如,与不同结合剂连接的一组珠)。将混合物在室温下孵育约 30 分钟以使封闭剂与干扰分子形成复合物。随后通过向混合物施加磁场来从亲合剂溶液中分离复合物并收集加工后的亲合剂溶液并用于标准亲合试验(如免疫试验)。

[0138] 应理解,本文所述的实施例和实施方式仅用于说明目的,本领域技术人员应了解据此作出的各种修饰或改变,且它们包括在本申请的主旨和范围以及所附权利要求书的范围内。本说明书中引用的所有专利、专利申请、网络资源和其它公开的参考材料都通过引用全文结合入本文中。当本说明书的内容与本发明引用的任何参考材料以及任何现有技术之

间存在矛盾之处的时候,以本说明书为准。所述矛盾之处包括现有技术对词或词组的定义与本说明书对相同的词或词组明确给出的定义之间的差异。

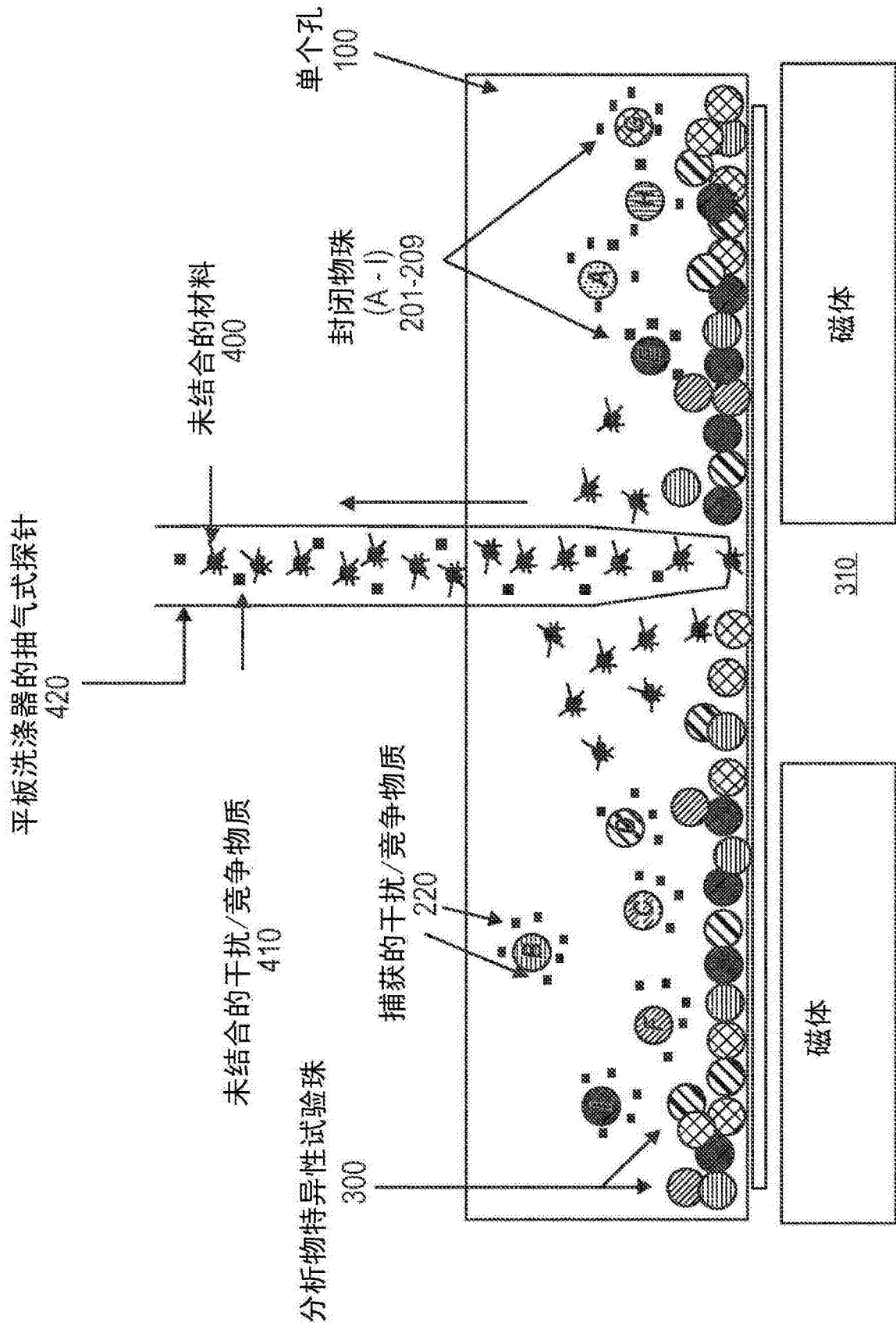


图 1

专利名称(译)	用于免疫试验的多重封闭物珠		
公开(公告)号	CN105393119A	公开(公告)日	2016-03-09
申请号	CN201480037121.1	申请日	2014-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
[标]发明人	W·谭 D·杰斯瓦尼 V·古普塔 王千曙 D·尤恩		
发明人	W·谭 D·杰斯瓦尼 V·古普塔 王千曙 D·尤恩		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54393		
代理人(译)	余颖 杨昀		
优先权	61/860009 2013-07-30 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了用于具有改进的特异性的免疫试验的方法和组合物。本发明公开的基于珠的封闭剂降低与这类试验的试剂和样品相关的干扰。本发明公开的封闭剂可用于分离样品中的干扰分子，从而使得免疫试验的灵敏度提高。提供了封闭亲和试验混合物中干扰分子的方法，其中所述混合物包含样品。

