

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(10) 国际公布号
WO 2025/035370 A1

(43) 国际公布日
2025年2月20日 (20.02.2025)

- (51) 国际专利分类号:
G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/112993
- (22) 国际申请日: 2023年8月14日 (14.08.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司 (SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦1-4层, Guangdong 518057 (CN)。
- (72) 发明人: 刘雨青 (LIU, Yuqing); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦1-4层, Guangdong 518057 (CN)。张轶 (ZHANG, Yi); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区

科技南十二路迈瑞大厦1-4层, Guangdong 518057 (CN)。刘君君 (LIU, Junjun); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦1-4层, Guangdong 518057 (CN)。卡特鲁卡·伊万 (KATRUKHA, Ivan); 俄罗斯莫斯科市华沙高速28A号, Moscow 117186 (RU)。别列兹尼科娃·阿纳斯塔西娅 (BEREZNIKOVA, Anastasia); 俄罗斯莫斯科市华沙高速28A号, Moscow 117186 (RU)。

- (74) 代理人: 中国贸促会专利商标事务所有限公司 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市西城区复兴门内大街158号远洋大厦F10层, Beijing 100031 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,

(54) Title: COMPOSITION, KIT AND METHOD FOR DETECTING TOTAL CTNITC, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 检测总cTnITC的组合物、试剂盒和方法、及其应用

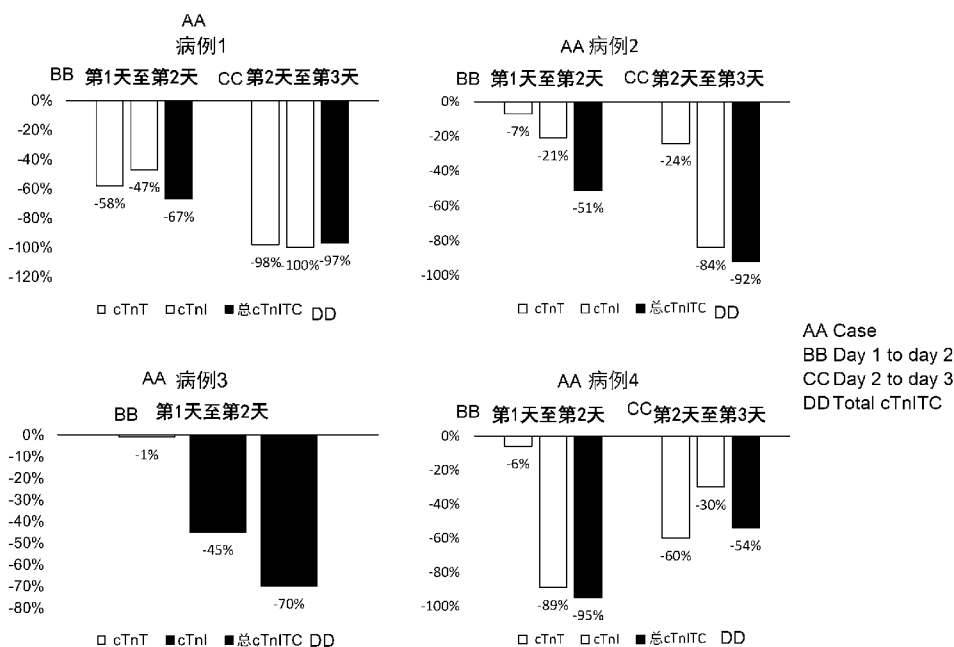


图9

(57) Abstract: The present application relates to a composition, a kit and a method for detecting total cTnITC, and the use thereof. Specifically, the present application relates to a composition and a kit containing an antibody that specifically binds to any one segment of a cTnT amino acid sequence at positions 223-287 and an antibody that specifically binds to any one segment of a TnI amino acid sequence, a detection method, and the use in in-vitro diagnosis of myocardial damage.

WO 2025/035370 A1

IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 本申请涉及检测总cTnITC的组合物、试剂盒和方法、及其应用。具体地, 本申请涉及含特异性结合cTnT第223-287位氨基酸序列中任意一段的抗体和特异性结合TnC氨基酸序列中任意一段的抗体的组合物和试剂盒、检测方法以及在体外诊断心肌损伤中的应用。

检测总 cTnITC 的组合物、试剂盒和方法、及其应用

技术领域

5 本申请涉及免疫检测领域，具体涉及用于检测总三元心肌肌钙蛋白复合物 cTnITC 的组合物和试剂盒、检测方法、以及它们在体外诊断心肌损伤中的应用。

背景技术

10 心肌肌钙蛋白 (cTn) 是心肌损伤的特异性标志物，可用于检测心肌梗死后或心肌梗死过程中的心肌损伤。肌钙蛋白包含三个亚基，分别为心肌肌钙蛋白 I (cTnI)、心肌肌钙蛋白 T (cTnT)、肌钙蛋白 C (TnC)。cTnI 和 cTnT 在血清中的浓度与心肌损伤的严重程度高度相关，是美国和欧洲心脏病学会推荐的心肌梗死的高特异性和高敏感型标志物。然而，导致血液中心肌肌钙蛋白浓度升高的原因有很多，除心肌梗死外，肺栓塞、急性或慢性心衰、心脏创伤、心内膜炎和心肌炎等。这降低了 cTn 对心肌梗死的临床特异性，通常需要配合其他手段用于心肌梗死的诊断。

15 心肌肌钙蛋白通常以三元复合物 cTnITC 的形式与肌动蛋白丝结合。在心肌损伤时，肌钙蛋白从肌丝中降解下来，释放到血液中。在细胞内或血液循环中，全长的 cTnITC 经过蛋白酶降解，逐渐形成低分子量的三元复合物 (LMW-cTnITC)、二元复合物 (cTnIC) 和游离的 cTnT。研究表明，肌钙蛋白在血液中的存在形式与个体的生理、病理状态相关联。检测肌钙蛋白三元复合物 cTnITC 有助于医生更全面的掌握患者的生理、病理状态，帮助快速准确的诊断，指导患者的预后。

20 目前，心肌肌钙蛋白检测的传统的免疫学方法主要为酶联免疫吸附法 (ELISA)、胶体金免疫层析法 (GICA)、电化学发光法 (ECL)、化学发光免疫分析法 (CLIA) 等技术。其中化学发光免疫分析技术的灵敏度高、特异性强、线性范围宽、操作性强、自动化程度高，是临床应用前景最广的免疫分析方法。基于化学发光免疫分析技术，现有的高敏心肌肌钙蛋白检测手段通常用于检测 cTnI 和 cTnT，无法区分肌钙蛋白复合物与游离的肌钙蛋白。在已有的文献报道中，cTnITC 复合物的双抗体夹心免疫分析方法通过捕获抗体识别二元 TnIC 复合物表位，检测抗体识别 TnT 抗原实现。这种检测方法的信噪比较低，特异性不强，难以实现三元复合物 cTnITC 总含量的快速、灵敏、特异性检测。因此，开发一种灵敏度高、检测速度快的检测试剂盒，用于检测血液中肌钙蛋白三元复合物 cTnITC 的总量 (也即总 cTnITC 的含量)，对心血管疾病的诊断与预后指导尤为重要。

发明内容

本申请的任务在于，提供一种能够灵敏度高且速度快地检测样品中心肌肌钙蛋白三元复合物 cTnITC 总含量的技术方案，通过捕获抗体和检测抗体的配合，实现对总 cTnITC 的特异性检测，特别地，在捕获抗体或检测抗体中加入特异性结合 TnC 的抗体对于提高检测体系的信噪比、提升 cTnITC 检测灵敏度是非常有利的。

在第一个方面，本申请提供一种用于检测样品中心肌肌钙蛋白三元复合物的组合物，包括第一组抗体和第二组抗体，其中，

所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 223-287 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

10 所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

在第二个方面，本申请提供一种用于检测样品中心肌肌钙蛋白三元复合物的试剂盒，包括捕获抗体和检测抗体，其中，所述捕获抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的一组，所述检测抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的另一组；其中，

15 所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 223-287 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

20 在第三个方面，本申请提供一种在体外检测样品中心肌肌钙蛋白三元复合物的方法，包括以下步骤：

获得待测样品；

将所述待测样品与捕获抗体接触，以形成抗体-抗原复合物；

使所述抗体-抗原复合物与结合有可检测标记的检测抗体接触，以形成抗体-抗原-抗体复合物；和

25 检测所述可检测标记所产生的信号，以确定待测样品中心肌肌钙蛋白三元复合物的存在和/或总量；

其中，所述捕获抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的一组，所述检测抗体选自所述第一组抗体和第二组抗体中的另一组；

30 所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 223-287 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

在第四个方面，本申请提供第一方面任一项所述的组合物在制备用于检测心肌肌钙蛋白三元复合物的试剂中的用途。

5 在第五个方面，本申请提供第一方面任一项所述的组合物、第二方面任一项所述的试剂盒或第三方面任一项所述的方法在心肌损伤体外诊断中的用途。

在第六个方面，本申请提供一种在体外诊断心肌损伤的方法，其包括采用第一方面任一项所述的组合物、第二方面任一项所述的试剂盒或第三方面任一项所述的方法检测来自受试者的样品中心肌肌钙蛋白三元复合物的步骤。

10 附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本申请的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 为对总 cTnITC 检测试剂盒信噪比分析。

图 2 为用血清样本验证总 cTnITC 检测试剂盒的特异性。

15 图 3 为对总 cTnITC 检测试剂盒 3 的线性分析。

图 4 为对总 cTnITC 检测试剂盒 4 的线性分析。

图 5 为对总 cTnITC 检测试剂盒 3 与试剂盒 3a 信噪比分析。

图 6 为对总 cTnITC 检测试剂盒 3 与试剂盒 3a 对临床血清样本的检测信噪比分析。

图 7 为用血清样本验证总 cTnITC 检测试剂盒 3a 的特异性。

20 图 8 为采用总 cTnITC 检测试剂盒检测的总 cTnITC 与采用现有试剂盒检测的高敏 cTnI、cTnT 的变化趋势分析。

图 9 为采用总 cTnITC 检测试剂盒检测的总 cTnITC 与采用现有试剂盒检测的高敏 cTnI、cTnT 的浓度变化率分析。

具体实施方式

25 下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。以下对至少一个示例性实施例的描述实际上仅仅是说明性的，绝不作为对本发明及其应用或使用的任何限制。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

30 在本文中，除非另有说明，否则所使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常

理解的含义。并且，本文中所述的免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明的实施方案，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含，从而使得包括一系列要素的方法或者装置不仅包括所明确记载的要素，而且还包
5 括没有明确列出的其他要素，或者是还包括为实施方法或者装置所固有的要素。在没有更多限制的情况下，由语句“包括一个……”限定的要素，并不排除在包括该要素的方法或者装置中还存在另外的相关要素。

如本文中所使用的，术语“至少一个”意指在合理条件下的 1 个或超过 1 个，例如 2 个、3 个、4 个、5 个或 10 个等。

10 如本文中所使用的，术语“第一”、“第二”仅仅是区别类似的对象，不代表针对对象的特定排序，可以理解地，“第一”、“第二”在允许的情况下可以互换特定的顺序或先后次序。应该理解“第一”、“第二”区分的对象在适当情况下可以互换，以使这里描述的本申请实施例能够以除了在这里图示或描述的那些以外的顺序实施。

如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子（即结合分子与靶分子）之间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。两分子之间的结合亲和力可用 **KD** 值描述。**KD** 值是指由 **kd**（特定的结合分子-靶分子相互作用的解离速率；亦称为 **koff**）与 **ka**（特定结合分子-靶分子相互作用的缔合速率；亦称为 **kon**）之比得到的解离常数，或者指表示为摩尔浓度（**M**）的 **kd/ka**。**KD** 值越小，两分子结合越紧密，亲和力越高。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体（或对某抗原具有特异性的抗体）是指，
15 抗体以小于大约 10^{-5} **M**，例如小于大约 10^{-6} **M**、 10^{-7} **M**、 10^{-8} **M**、 10^{-9} **M** 或 10^{-10} **M** 或更小的 **KD** 结合该抗原。用于分析抗体特异性的相应方法在例如以下文献中有描述：**Harlow&Lane(1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press** 以及 **Harlow& Lane(1999)Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press**。适用研究的非限制性实例是，例如采用结构上和/或功能上密切
20 相关的分子进行的结合研究、阻断和竞争研究。这些研究可采用以下方法进行，例如荧光激活细胞分选术（**FACS**）分析、流式细胞术滴定（**FACS 滴定**）分析、表面等离子体共振技术（**SPR**，例如使用）、等温滴定量热法（**ITC**）、荧光滴定法或放射性标记的配体结合测定法。更多的方法包括，例如免疫印迹法（**Western Blot**）、**ELISA**（包括竞争 **ELISA**）测试、**RIA** 测试、**ECL** 测试和 **IRMA** 测试。

30 如本文中所使用的，术语“肌钙蛋白”、“**Tn**”是肌细胞内肌纤蛋白上的一种调节钙介导的肌动蛋白和肌球蛋白之间相互反应的蛋白，存在于心肌和骨骼肌中，由肌钙蛋白 **T**

(TnT)、肌钙蛋白 I (TnI) 和肌钙蛋白 C (TnC) 三种亚单位组成。其中 TnT 是原肌球蛋白结合亚单位，与肌动蛋白及原肌球蛋白互相作用；TnI 是抑制亚单位，抑制肌动球蛋白的 ATP 酶活性；TnC 是唯一与钙结合的亚单位，可使骨骼肌或心肌收缩。术语“心肌肌钙蛋白”、“cTn”指心脏细胞，优选心内膜下细胞，中表达的所有肌钙蛋白同种型。

5 这些同种型在本领域中已被充分表征，例如 Anderson 1995, *Circulation Research*, vol. 76, no. 4: 681-686 和 Ferrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44: 487-493 中所述。术语“心肌肌钙蛋白”还包括特定心肌肌钙蛋白的变体，此类变体至少具有与该特定心肌肌钙蛋白相同的基础生物学和免疫学特性。特别地，如果它们通过本文提及的相同特异性检测，则它们共享相同的基础生物学和免疫学特性。应当理解，肌钙蛋白的同种型可以被一同（同时或序贯）测定或单独（即完全不测定其它同种型）测定。

如本文中所使用的，术语“心肌肌钙蛋白T”、“cTnT”指心肌肌钙蛋白T亚单位，其氨基酸序列公开于UniProt数据库，编号 P45379。

如本文中所使用的，术语“心肌肌钙蛋白I”、“cTnI”指心肌肌钙蛋白I亚单位，其氨基酸序列公开于UniProt数据库，编号 P19429。

15 如本文中所使用的，术语“肌钙蛋白C”、“TnC”指肌钙蛋白C亚单位，其氨基酸序列公开于UniProt数据库，编号 P63316。

如本文中所使用的，术语“总心肌肌钙蛋白三元复合物 (total cardiac troponin ternary complex)”或“总 cTnITC (total cTnITC)”在本文中可互换使用，意欲包括所有 TnC 的全长蛋白或片段、cTnI 的全长蛋白或片段和 cTnT 的氨基酸残基 223-287 中的一段或多段，以及任选的 cTnT 的氨基酸残基 1-222 中的一段或多段所形成的复合物。

如本文中所使用的，术语“抗体”具有本领域通常理解的含义，是指通常由两对多肽链（每对具有一条轻链 (LC) 和一条重链 (HC)）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ (kappa) 和 λ (lambda) 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。各重链由重链可变区 (VH) 和重链恒定区 (CH) 组成。各轻链由轻链可变区 (VL) 和轻链恒定区 (CL) 组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应子功能，如可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）和经典补体系统的第一组分 (C1q) 的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域（称为互补决定区 (CDR)），其间散布有较保守的称为构架区 (FR) 的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区 (VH 和 VL) 分别形成

抗原结合部位。氨基酸在各区域或结构域的分配可遵循 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。在本文中, 除非上下文明确指出, 否则当提及术语“抗体”时, 其不仅包括完整
5 抗体, 而且包括抗体的抗原结合片段。

本申请适用于不同的探测体系, 包括但不限于荧光标记的反应体系, 酶联免疫体系, 生物发光体系等。

检测试剂和方法

本申请的一个目的在于提供一种能够灵敏地检测样品中各种形式的心肌肌钙蛋白三元复合物 cTnITC 的总含量, 且能特异地同 cTn 其它存在形式, 包括 cTnT、cTnI 及 cTnIC
10 等进行区分。

具体地, 在第一个方面, 本申请提供一种用于检测样品中心肌肌钙蛋白三元复合物的组合物, 包括第一组抗体和第二组抗体, 其中,

所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1, 各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT
15 第 223-287 位氨基酸序列中任意一段的抗体;

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2, 各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

在第一方面基础上, 本申请第二个方面提供一种用于检测样品中心肌肌钙蛋白三元复合物的试剂盒, 包括捕获抗体和检测抗体, 其中, 所述捕获抗体选自第一组抗体和第二组
20 抗体中的一组, 所述检测抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的另一组; 其中,

所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1, 各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT
第 223-287 位氨基酸序列中任意一段的抗体;

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2, 各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

25 也就是说, 捕获抗体至少包括抗体 1, 检测抗体至少包括抗体 2; 或者, 捕获抗体至少包括抗体 2, 检测抗体至少包括抗体 1。

在一些实施方案中, 可以将捕获抗体包被于固相载体表面, 例如磁珠、胶乳粒子、酶标板、塑料珠、塑料管、免疫层析试纸条、检测卡, 捕获样品中的抗原, 然后用带有可检测标记的检测抗体与包被于固相载体表面的捕获抗体结合, 通过测定所结合的检测抗体上
30 可检测标记的量, 确定样品中抗原的含量。

所述可检测标记可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学

或化学手段检测的任何物质。特别优选的是，此类标记能够适用于免疫学检测（例如，酶联免疫测定法、放射免疫测定法、荧光免疫测定法、化学发光免疫测定法等）。这类标记是本领域熟知的，包括但不限于，酶（例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶，等）、放射性核素（例如， ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P ）、荧光染料（例如，异硫氰酸荧光素（FITC）、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明（TRITC）、藻红蛋白（PE）、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物（例如 Cy7、Alexa 750）、化学发光物质（如吖啶酯类化合物）、以及用于结合上述标记物修饰的亲合素（例如，链霉亲和素）的生物素。本发明中涵盖的标记物可通过本领域已知的方法检测。例如，放射性标记可使用摄影胶片或闪烁计数器检测，荧光标记物可使用光检测器检测，以检测发射的光。酶标记物一般通过给酶提供底物及检测通过酶对底物的作用产生的反应产物来检测。化学发光物质（如吖啶酯类化合物）一般通过给发光物质提供激发液和/或催化剂来检测发射的光。生物素一般通过给生物素提供上述标记物修饰的亲合素（例如，链霉亲和素）及检测与生物素连接的亲合素所携带的标记物来检测。在某些实施方案中，可通过不同长度的接头将如上所述的可检测标记连接至本发明的抗体或其抗原结合片段，以降低潜在的位阻。在一些实施方案中，所述可检测标记选自荧光素、化学发光物质（例如吖啶酯类化合物）、酶（例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶）、放射性同位素、生物素、胶体金和磁性颗粒。

在一些实施方案中，所述试剂盒可以进一步包含用于使相应可检测标记被检测到的试剂（所述可检测标记的底物）。例如，当所述可检测标记为酶时，所述试剂盒还可以包含相应酶的显色底物，例如用于辣根过氧化物酶的邻苯二胺（OPD）、四甲基联苯胺（TMB）、ABTS 或鲁米诺类化合物，或用于碱性磷酸酶的对硝基苯磷酸酯（p-NPP）或 AMPPD。例如当所述可检测标记为化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物）时，所述试剂盒还可以包含用于化学发光的预激发液和/或激发液。

本申请中的试剂盒特别适用于免疫测定，例如 ELISA、特别是双抗体夹心化学发光免疫分析方法。

在本申请中，总 cTnITC 的量可直接或间接检测获得。可基于检测抗体可检测标记信号，直接检测检测抗体的量或浓度，所述信号和样品中的目标抗原直接相关。此类信号本文中有时也被称为强度信号-例如可以通过测量检测抗体的特异性物理或化学性质的强度值获得。间接测量包括测量来自于次级组分（即不是检测抗体自身）或生物学读出系统的信号，例如可测量的细胞应答、配体、标记或酶促反应产物。

在第三个方面，本申请提供一种在体外检测样品中心肌钙蛋白三元复合物的方法，

包括以下步骤：

获得待测样品；

将所述待测样品与捕获抗体接触，以形成抗体-抗原复合物；

使所述抗体-抗原复合物与结合有可检测标记的检测抗体接触，以形成抗体-抗原-抗体

5 复合物；和

检测所述可检测标记所产生的信号，以确定待测样品中心肌肌钙蛋白三元复合物的存在和/或总量；

其中，所述捕获抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的一组，所述检测抗体选自所述第一组抗体和第二组抗体中的另一组：

10 所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 223-287 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

15 在本申请第一个方面至第三个方面中，作为一些实施方案，所述第一组抗体还包括一个或多个抗体 3，各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-222 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

在此，通过将所述抗体 1 与特异性识别 cTnT 的 67-222 位的抗体组合，能够显著提高检测试剂信噪比。

20 在本申请第一个方面至第三个方面中，作为一些实施方案，所述第二组抗体还包括：一个或多个抗体 4，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnIC 的抗体；和/或一个或多个抗体 5，各所述抗体 5 独立地选自特异性结合 cTnI 第 18-210 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

25 在本申请第一个方面至第三个方面中，作为一些实施方案，所述第一组抗体包括一个或多个所述抗体 1 和一个或多个所述抗体 3；所述第二组抗体包括一个或多个所述抗体 2，以及一个或多个所述抗体 4 和/或一个或多个所述抗体 5。

在一些实施方案中，所述第一组抗体包括一个抗体 1，以及任选的一个抗体 3；所述第二组抗体包括一个抗体 2 以及任选的一个抗体 4 和/或一个抗体 5。

30 在一些实施方案中，所述第一组抗体包括至少两个抗体 1。在一些实施方案中，所述第二组抗体包括至少两个抗体 2。在一些实施方案中，所述第一组抗体包括至少两个抗体 1 以及任选的至少两个抗体 3；所述第二组抗体包括至少两个抗体 2 以及任选的至少两个抗体 4 和/或至少两个抗体 5。多个结合相同靶蛋白的抗体的组合对于总 cTnITC 的检测是

有益的。

本申请对抗体的结合表位进行了筛选。在一些实施方案中，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 223-242 位氨基酸、第 262-281 位氨基酸的抗体。在一些实施方案中，所述抗体 1 特异性结合 cTnT 第 223-242 位氨基酸的抗体。

5 在一些实施方案中，各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-86 位氨基酸、第 119-138 位氨基酸、第 132-151 位氨基酸、第 145-164 位氨基酸或第 171-190 位氨基酸的抗体。在一些实施方案中，各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnT 第 119-138 位氨基酸或第 132-151 位氨基酸的抗体。

10 在一些实施方案中，各所述抗体 5 独立地选自特异性结合 cTnI 第 1-15 位氨基酸、第 13-22 位氨基酸、第 18-22 位氨基酸、第 18-28 位氨基酸、第 18-35 位氨基酸、第 22-31 位氨基酸、第 22-40 位氨基酸、第 23-29 位氨基酸、第 24-40 位氨基酸、第 25-40 位氨基酸、第 26-35 位氨基酸、第 34-37 位氨基酸、第 41-49 位氨基酸、第 83-89 位氨基酸、第 86-90 位氨基酸、第 87-90 位氨基酸、第 117-126 位氨基酸、第 130-145 位氨基酸、第 169-178 位氨基酸、第 186-192 位氨基酸、第 190-196 位氨基酸或第 195-209 位氨基酸的抗体。在
15 一些实施方案中，各所述抗体 5 独立地选自特异性结合 cTnI 第 22-40 位氨基酸、第 41-49 位氨基酸或第 83-89 位氨基酸的抗体。在一些实施方案中，各所述抗体 5 独立地选自特异性结合 cTnI 第 41-49 位氨基酸的抗体。

20 在一些实施方案中，所述捕获抗体为所述第一组抗体，所述检测抗体为所述第二组抗体。研究发现，当第一组抗体作为捕获抗体、第二组抗体作为检测抗体时，总 cTnITC 的检测具有更高的信噪比。

在本申请中，可以选择市售可得的针对特定表位的抗体，也可通过本领域一般技术手段获得本申请中对不同形式的 cTnITC 特定表位具有特异性结合活性的抗体。一个示例性的方案包括通过杂交瘤技术获得具有特异性结合活性的单克隆，具体包括两种亲本细胞的选择和制备、细胞融合、杂交瘤细胞的选择性培养和克隆化、单克隆抗体的制备、特异性
25 鉴定及纯化等步骤。进一步，还可包括表位鉴定以及筛选的步骤，例如利用 ELISA 或表面等离子共振（SPR）等技术鉴定抗体结合表位。

应用

30 由于现有 cTnITC 检测试剂盒灵敏度较低，严重影响其在心肌损伤诊断中的应用。临床上也通常选择 cTnI 和 cTnT 作为心肌梗死的高特异性和高敏感型标志物。基于前述组合物、试剂盒和检测方法，本申请实现了对总 cTnITC 的高敏感、高特异性的快速检测，有利于深入理解肌钙蛋白与心肌损伤的相关性。研究表明，相较于 cTnI 和 cTnT，总 cTnITC

对于心肌损伤情况更为敏感，可以作为更敏感的心肌损伤标志物，帮助疾病诊断以及预后判断。

在第四个方面，本申请提供第一方面任一项所述的组合物在制备用于检测心肌肌钙蛋白三元复合物的试剂中的用途。

5 在第五个方面，本申请提供第一方面任一项所述的组合物、第二方面任一项所述的试剂盒或第三方面任一项所述的方法在心肌损伤体外诊断中的用途。

在第六个方面，本申请提供一种在体外诊断心肌损伤的方法，其包括采用第一方面任一项所述的组合物、第二方面任一项所述的试剂盒或第三方面任一项所述的方法检测来自受试者的样品中心肌肌钙蛋白三元复合物的步骤。

10 在一些实施方案中，所述样品为受试者体液或组织样品，例如全血、血清、血浆（包括肝素锂血浆、EDTA 血浆）、尿液、唾液、生物组织或细胞，优选全血、血清或血浆。

有益效果

1) 实现对总 cTnITC 的高敏感、高特异性的快速检测。本申请使用了特异性结合 TnC 的抗体作为捕获抗体或检测抗体，通过一系列实验表明，TnC 抗体的使用能够显著提高体系信噪比，提升灵敏度。

15 2) 由于肌钙蛋白在血液中的存在形式与个体的生理、病理状态相关联，三元肌钙蛋白复合物 cTnITC 的特异性检测有利于深入理解肌钙蛋白与疾病的相关性。三元肌钙蛋白复合物 cTnITC 的总浓度变化趋势与 cTnT、cTnI 一致，具有临床价值；cTnITC 的总浓度的变化率更快，对患者的心肌损伤情况更为敏感，可作为更敏感的心肌损伤标志物，帮助疾病的诊断和预后判断。

20 3) 本申请的检测试剂盒结合全自动化学发光仪使用，可以实现三元肌钙蛋白复合物 cTnITC 检测的自动化、快速和高通量。

4) 本申请的检测试剂盒灵敏度高，特异性好，重复性好。

实施例

25 实施例 1 检测方法及检测试剂盒的构建

将捕获抗体-检测抗体应用于双抗体夹心化学发光免疫分析方法，构建检测试剂盒，用于检测样本中的总三元肌钙蛋白复合物 cTnITC。

具体地，构建下述试剂盒用于后面的实验：

1. 总 cTnITC 检测试剂盒 1：

30 捕获抗体为：抗体 1：7E7（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 223-242）；抗体 3：329cc（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138）。

检测抗体为：抗体 4：20C6cc（特异性结合 cTnIC 复合物表位）。

2. 总 cTnITC 检测试剂盒 2：

捕获抗体为：抗体 1：7E7（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 223-242）；抗体 3：329cc（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138）。

5 检测抗体为：抗体 5：19C7cc（特异性结合 cTnI 氨基酸片段 41-49）。

3. 总 cTnITC 检测试剂盒 3：

捕获抗体为：抗体 1：7E7（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 223-242）；抗体 3：329cc（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138）。

10 检测抗体为：抗体 2：7B9cc（特异性结合 TnC）；抗体 4：20C6cc（特异性结合 cTnIC 复合物表位）；

4. 总 cTnITC 检测试剂盒 4：

捕获抗体为：抗体 1：7E7（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 223-242）；抗体 3：329cc（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138）。

15 检测抗体为：抗体 2：7B9cc（特异性结合 TnC）；抗体 5：19C7cc（特异性结合 cTnI 氨基酸片段 41-49）。

5. 总 cTnITC 检测试剂盒 5：

捕获抗体为：抗体 1：7E7（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 223-242）；抗体 3：329cc（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138）。

检测抗体为：抗体 2：7B9cc（特异性结合 TnC）。

20 6. 总 cTnITC 检测试剂盒 6：

捕获抗体为：抗体 1：7E7（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 223-242）。

检测抗体为：抗体 2：7B9cc（特异性结合 TnC）。

7. 总 cTnITC 检测试剂盒 7：

捕获抗体为：抗体 1：155（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 262-281）。

25 检测抗体为：抗体 2：7B9cc（特异性结合 TnC）；抗体 4：Tcom8（特异性结合 cTnIC 复合物表位）。

8. 总 cTnITC 检测试剂盒 8：

捕获抗体为：抗体 1：7E7（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 223-242）；抗体 3：406cc（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 132-151 片段）。

30 检测抗体为：抗体 2：7B9cc（特异性结合 TnC）；抗体 4：20C6cc（特异性结合 cTnIC 复合物表位）；

9. 总 cTnITC 检测试剂盒 9:

捕获抗体为: 抗体 1: 7E7 (特异性结合 cTnT 氨基酸片段 223-242); 抗体 3: 300cc (特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138 片段)。

检测抗体为: 抗体 2: 7B9cc (特异性结合 TnC); 抗体 4: 20C6cc (特异性结合 cTnIC

5 复合物表位);

10. 总 cTnITC 检测试剂盒 10:

捕获抗体为: 抗体 1: 155 (特异性结合 cTnT 氨基酸片段 262-281); 抗体 3: 406cc (特异性结合 cTnT 氨基酸片段 132-151 片段)。

检测抗体为: 抗体 2: 7B9cc (特异性结合 TnC); 抗体 4: 20C6cc (特异性结合 cTnIC

10 复合物表位);

11. 总 cTnITC 检测试剂盒 11:

捕获抗体为: 抗体 1: 7E7 (特异性结合 cTnT 氨基酸片段 223-242); 抗体 3: 7G7 (特异性结合 cTnT 氨基酸片段 67-86 片段)。

检测抗体为: 抗体 2: 7B9cc (特异性结合 TnC); 抗体 4: 20C6cc (特异性结合 cTnIC

15 复合物表位);

12. 总 cTnITC 检测试剂盒 12:

捕获抗体为: 抗体 1: 7E7 (特异性结合 cTnT 氨基酸片段 223-242); 抗体 3: 1C11cc (特异性结合 cTnT 氨基酸片段 171-190 片段)。

检测抗体为: 抗体 2: 7B9cc (特异性结合 TnC); 抗体 4: Tcom8 (特异性结合 cTnIC

20 复合物表位)。

实验中也使用了将所述总 cTnITC 检测试剂盒 3-5、8-12 中所使用的抗体 3 替换为下述抗体的试剂盒: 特异性结合位点为 cTnT 氨基酸 67-86 片段的抗体 7F4、特异性结合位点为 cTnT 氨基酸 145-164 片段的抗体 2F3、1A11 或 1F11cc。实验中也使用了将所述总 cTnITC 检测试剂盒 4 中所使用的抗体 5 替换为下述抗体的试剂盒: 特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 18-28 片段的抗体 M18cc、特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 86-90 片段的抗体 16A11cc、16A12cc 或 8E10cc、特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 130-145 片段的抗体 M46、特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 190-196 片段的抗体 MF4cc。

总 cTnITC 检测试剂盒包括:

30 A.磁珠包被物工作液, 用于实现对样本中三元 cTnITC 复合物的捕获。所述磁珠包被物工作液包括: 包被着捕获抗体的超顺磁微粒混合物。

B.酶标记物工作液, 用于实现对超顺磁微粒捕获的三元 cTnITC 复合物抗原的检测。

所述酶标记物工作液包括：碱性磷酸酶标记的检测抗体。

检测方法如下：

5 第一步：将样本与磁珠包被物工作液、酶标记工作液添加到反应管中，经过孵育，样本中的三元 cTnITC 复合物与包被在磁珠上的抗体结合，同时抗体-碱性磷酸酶标记物与样本中三元 cTnITC 复合物结合。反应完成后，固相置于一个磁场内，磁场吸住磁珠，结合在固相上的物质被保留，洗去未结合的物质。

10 第二步：将化学发光底物添加到反应管内，发光底物（3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷，AMPPD）被碱性磷酸酶所分解，脱去一个磷酸基，生成不稳定的中间产物，该中间产物通过分子内电子转移产生间氧苯甲酸甲酯阴离子，处于激发态的间氧苯甲酸甲酯阴离子从激发态返回基态时，产生化学发光，再通过光电倍增管对反应中所产生的光子数进行测量。所产生光子数与样本内三元 cTnITC 复合物的浓度成正比。样本内分析物的量由校准曲线来确定。

上述总 cTnITC 检测试剂盒在迈瑞全自动化学发光仪 CL2000i、CL6000i、CL8000i 等机型上配套使用。

15 实施例 2 总 cTnITC 检测试剂盒信噪比分析

配制含有不同浓度抗原的样本，包括两个高浓度样本（高值样本 1、高值样本 2）和两个低浓度样本（低值样本 1、低值样本 2），其中抗原为重组心肌肌钙蛋白三元复合物 cTnITC（Hytest, 8ITCR）。使用总 cTnITC 检测试剂盒 1-12 分别对样本进行分析。同时记录不含抗原的空白样本信号，计算信噪比。

20 测试结果见图 1。其中检测试剂盒 5 的信噪比高于检测试剂盒 6，表明特异性结合 cTnT 氨基酸片段 67-222 的抗体 3 的加入提升了信噪比。检测试剂盒 3 的信噪比显著高于检测试剂盒 1 和检测试剂盒 5，检测试剂盒 4 的信噪比显著高于检测试剂盒 2 和检测试剂盒 5，表明特异性结合 TnC 的抗体 2 与抗体 4 或抗体 5 共同使用能够显著提升信噪比。检测试剂盒 3、8 和 9 信噪比相似，表明选择特异性结合 cTnT 第 67-222 位氨基酸不同片段的抗体作为抗体 3，所得试剂盒信噪比接近。检测试剂盒 8 的信噪比显著优于检测试剂盒 10，表明选择特异性结合 cTnT 第 223-242 位氨基酸的抗体作为抗体 1 比选择特异性结合 cTnT 第 262-281 位氨基酸的抗体具有更好的信噪比。检测试剂盒 3 的信噪比显著高于检测试剂盒 11 和 12，表明特异性结合 cTnT 第 119-138 的抗体作为抗体 3 相较于特异性结合 cTnT 第 67-86 位或第 171-190 位的抗体是更有优势的。

30 此外，将所述总 cTnITC 检测试剂盒 3-5、8-12 中所使用的抗体 3 替换为下述抗体：特异性结合位点为 cTnT 氨基酸 67-86 片段的抗体 7F4、特异性结合位点为 cTnT 氨基酸

145-164 片段的抗体 2F3、1A11 或 1F11cc，将所述总 cTnITC 检测试剂盒 4 中所使用的抗体 5 替换为下述抗体：特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 18-28 片段的抗体 M18cc、特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 86-90 片段的抗体 16A11cc、16A12cc 或 8E10cc、特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 130-145 片段的抗体 M46、特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 190-196 片段的抗体 MF4cc，均能有效反应样本的信号差异。本文抗体购自海肽生物科技有限公司。

实施例 3 总 cTnITC 检测试剂盒特异性分析

将等浓度的不同抗原添加至健康人的血清中，使用总 cTnITC 检测试剂盒 1-9 分别通过化学发光免疫分析方法进行分析。分析的抗原包括：cTnT (Hytest, 8RTT5)、cTnI (Hytest, 8RT17)、cTnIC (Hytest, 8ICR3)、cTnITC (Hytest, 8ITCR)。实验结果见图 2。三元肌钙蛋白复合物 cTnITC 的检测试剂盒 1-9 均仅能识别 cTnITC 抗原，不能识别 cTnT、cTnI 及二元 cTnIC。

将所述总 cTnITC 检测试剂盒 3-5、8-12 中所使用的抗体 3 替换为下述抗体：特异性结合位点为 cTnT 氨基酸 67-86 片段的抗体 7F4、特异性结合位点为 cTnT 氨基酸 145-164 片段的抗体 2F3、1A11 或 1F11cc，将所述总 cTnITC 检测试剂盒 4 中所使用的抗体 5 替换为下述抗体：特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 18-28 片段的抗体 M18cc、特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 86-90 片段的抗体 16A11cc、16A12cc 或 8E10cc、特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 130-145 片段的抗体 M46、特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 190-196 片段的抗体 MF4cc，均能有效识别 cTnITC 抗原。

实施例 4 总 cTnITC 检测试剂盒空白限与检出限的建立

根据临床和实验室标准协会 (CLSI) 的建议 (EP-17A2 Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation) 建立空白限 (LoB) 与检出限 (LoD)。

LoB 测试结果来源于 5 个空白样本，运行 4 天，每次测试重复 4 次。

通用公式为 $LoB = \text{平均值} + 1.65 * SD$

LoD 测试结果来源于 5 个低浓度样本，运行 4 天，每次测试重复 4 次。

通用公式为 $LoD = LoB + 1.65 * SD$

选择试剂盒 1-9 建立空白限和检出限，测试结果见表 1。

表 1: 试剂盒的空白限 (LoB) 与检出限 (LoD)

总 cTnITC 检测试剂盒	1	2	3	4	5	6	7	8	9
空白限 (LoB) (ng/L)	4.8	6.1	0.9	2.3	3.2	4.2	3.4	0.8	1.8

检出限 (LoD) (ng/L)	8.6	11.2	1.5	3.8	5.8	7.2	5.9	1.4	3.1
------------------	-----	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

其中检测试剂盒 5 的空白限与检出限低于检测试剂盒 6，表明特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138 的抗体 3 的加入提升了灵敏度。检测试剂盒 3 的空白限与检出限显著低于检测试剂盒 1 和检测试剂盒 5，检测试剂盒 4 的空白限与检出限显著低于检测试剂盒 2 和检测试剂盒 5，表明特异性结合 TnC 的抗体 2 与抗体 4 或抗体 5 共同使用显著提升了试剂盒 5 的灵敏度。

除以上试剂盒外，将所述总 cTnITC 检测试剂盒 3-5、8-12 中所使用的抗体 3 替换为下述抗体：特异性结合位点为 cTnT 氨基酸 67-86 片段的抗体 7F4、特异性结合位点为 cTnT 氨基酸 145-164 片段的抗体 2F3、1A11 或 1F11cc，将所述总 cTnITC 检测试剂盒 4 中所使用的抗体 5 替换为下述抗体：特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 18-28 片段的抗体 M18cc、特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 86-90 片段的抗体 16A11cc、16A12cc 或 8E10cc、特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 130-145 片段的抗体 M46、特异性结合位点为 cTnI 氨基酸 190-196 片段的抗体 MF4cc，均具有较低的 LoB 和 LoD 值。

实施例 5 总 cTnITC 检测试剂盒的线性分析

检测试剂盒 3 和试剂盒 4 的信噪比高、检出限低，被用于线性分析。

选取浓度不同的两个临床血清样本为高浓度样本，将高浓度样本按一定比例稀释，得到一系列稀释样本，系列样本的浓度范围为 0-120 ng/L 和 0-6000 ng/L。使用检测试剂盒 3 通过化学发光免疫分析方法对样本进行分析。将测试浓度结果平均值和理论浓度进行线性拟合，并计算在线性范围内相关系数。实验结果见图 3，稀释样本的测试浓度与理论浓度呈线性。线性范围内，低浓度范围 (0-120 ng/L) 的 R2 值为 0.9990，高浓度范围 (0-6000 ng/L) 的 R2 值为 0.9992。

使用检测试剂盒 4 通过化学发光免疫分析方法对样本进行分析。将测试浓度结果平均值和理论浓度进行线性拟合，并计算在线性范围内相关系数。实验结果见图 4，稀释样本的测试浓度与理论浓度呈线性。线性范围内，低浓度范围 (0-120 ng/L) 的 R2 值为 0.9979，高浓度范围 (0-6000 ng/L) 的 R2 值为 0.9988。

实施例 6 交换捕获抗体与检测抗体的试剂盒构建与测试

将检测试剂盒 3 的捕获抗体与检测抗体进行交换，构建检测试剂盒 3a。

检测试剂盒 3 包括：

捕获抗体：抗体 1：7E7 (特异性结合 cTnT 氨基酸片段 223-242)；抗体 3：329cc (特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138)。

检测抗体：抗体 2：7B9cc（特异性结合 TnC）；抗体 4：20C6cc（特异性结合 cTnIC 复合物表位）。

检测试剂盒 3a 包括：

5 捕获抗体：抗体 2：7B9cc（特异性结合 TnC）；抗体 4：20C6cc（特异性结合 cTnIC 复合物表位）；

检测抗体：抗体 1：7E7（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 223-242）；抗体 3：329cc（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138）。

10 配制含有不同浓度抗原的样本，包括三个高浓度样本和三个低浓度样本，其中抗原为重组心肌钙蛋白三元复合物（Hytest, 8ITCR）。使用检测试剂盒 3、3a 分别对样本进行分析。同时记录不含抗原的空白样本信号，计算信噪比。测试结果见图 5，说明检测试剂盒 3 捕获抗体和检测抗体对调后，信噪比降低。

15 使用检测试剂盒 3、3a 分别对患有心血管疾病的患者的临床血清样本进行分析。同时记录健康人血清样本的信号，计算信噪比。测试结果见图 6。其中检测试剂盒 3 的信噪比显著高于检测试剂盒 3a，表明优选的捕获抗体和检测抗体为：捕获抗体为：抗体 1（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 223-242）和抗体 3（特异性结合 cTnT 氨基酸片段 119-138），检测抗体为：抗体 2（特异性结合 TnC）和抗体 4（特异性结合 cTnIC 复合物表位），试剂盒的信噪比更高。其中检测试剂盒 3a 信噪比较检测试剂盒 3 低，其在不同样本中的信号差异变化规律与检测试剂盒 3 的近似。

20 对检测试剂盒 3a 的特异性进行分析。将等浓度的不同抗原添加至健康人的血清中，使用三元肌钙蛋白复合物 cTnITC 检测试剂盒 3a 通过化学发光免疫分析方法进行分析。分析的抗原包括：cTnT（Hytest, 8RTT5）、cTnI（Hytest, 8RT17）、cTnIC（Hytest, 8ICR3）、cTnITC（Hytest, 8ITCR）。实验结果见图 7。三元肌钙蛋白复合物 cTnITC 的检测试剂盒 3a 能识别 cTnITC 抗原，不能识别 cTnT、cTnI 及二元 cTnIC。

25 综合看，试剂盒 3a 可以用于检测临床血清样本，试剂盒 3 在整体灵敏度和特异性上的表现更优选。

实施例 7 总 cTnITC 特异性免疫分析的临床性能评估

总 cTnITC 检测试剂盒 3 被用于临床性能评估。

为评估三元肌钙蛋白复合物 cTnITC 夹心免疫测定法的临床性能，对患者不同时间点的血清样本进行动态监测。同时检测患者血清中的高敏 cTnI 和 cTnT 值。

30 选择有心肌损伤的患者入组，患者年龄大于或等于 18 岁。这些患者被诊断为患有心肌梗死、心衰，或经历了心脏手术治疗，表现出高敏 cTnI 或高敏 cTnT 测试值升高。患

者入组后，连续 3 天采集患者的肝素锂血浆样本，使用迈瑞化学发光仪及配套试剂测试样本中的总 cTnITC 的浓度值。

结果如图 8 所示，总 cTnITC 的浓度值与高敏 cTnI、cTnT 测试值的变化趋势一致，表明总 cTnITC 的浓度值具有临床价值，可以应用于评估患者心肌损伤情况。进一步对总
5 cTnITC 的浓度变化情况进行分析，如图 9 所示，相比于 cTnI 和 cTnT，总 cTnITC 的浓度值变化速率更快，表明总 cTnITC 的浓度值变化对患者的心肌损伤情况更为敏感。

除本文中描述的那些外，根据前述描述，本发明的各种修改对本领域技术人员而言会是显而易见的。这样的修改也意图落入所附权利要求书的范围内。本发明的全部范围由所
10 附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 一种用于检测样品中心肌肌钙蛋白三元复合物的组合物，包括第一组抗体和第二组抗体，其中，

所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT（心肌肌钙蛋白 T）第 223-287 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC（肌钙蛋白 C）氨基酸序列中任意一段的抗体。

2. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述第一组抗体还包括一个或多个抗体 3，各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-222 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

3. 权利要求 1 或 2 所述的组合物，其中所述第二组抗体还包括：

一个或多个抗体 4，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnIC（心肌肌钙蛋白 IC 二元复合物）的抗体；和/或

一个或多个抗体 5，各所述抗体 5 独立地选自特异性结合 cTnI 第 18-210 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

4. 权利要求 3 所述的组合物，其中所述第一组抗体包括一个或多个所述抗体 1 和一个或多个所述抗体 3；所述第二组抗体包括一个或多个所述抗体 2，以及一个或多个所述抗体 4 和/或一个或多个所述抗体 5。

5. 权利要求 1-4 任一项所述的组合物，其中各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 223-242 位氨基酸或第 262-281 位氨基酸的抗体；优选特异性结合 cTnT 第 223-242 位氨基酸的抗体。

6. 权利要求 2-5 任一项所述的组合物，其中各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-86 位氨基酸、第 119-138 位氨基酸、第 132-151 位氨基酸、第 145-164 位氨基酸或第 171-190 位氨基酸的抗体；

优选地，各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnT 第 119-138 位氨基酸或第 132-151 位氨基酸的抗体。

7. 权利要求 3-6 任一项所述的组合物，其中各所述抗体 5 独立地选自特异性结合 cTnI 第 1-15 位氨基酸、第 13-22 位氨基酸、第 18-22 位氨基酸、第 18-28 位氨基酸、第 18-35 位氨基酸、第 22-31 位氨基酸、第 22-40 位氨基酸、第 23-29 位氨基酸、第 24-40 位氨基酸、第 25-40 位氨基酸、第 26-35 位氨基酸、第 34-37 位氨基酸、第 41-49 位氨基酸、第 83-89 位氨基酸、第 86-90 位氨基酸、第 87-90 位氨基酸、第 117-126 位氨基酸、第 130-145 位氨

氨酸、第 169-178 位氨基酸、第 186-192 位氨基酸、第 190-196 位氨基酸或第 195-209 位氨基酸的抗体；

优选地，各所述抗体 5 独立地选自特异性结合 cTnI 第 22-40 位氨基酸、第 41-49 位氨基酸或第 83-89 位氨基酸的抗体；

更优选地，各所述抗体 5 独立地选自特异性结合 cTnI 第 41-49 位氨基酸的抗体。

8. 一种用于检测样品中心肌肌钙蛋白三元复合物的试剂盒，包括捕获抗体和检测抗体，其中，所述捕获抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的一组，所述检测抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的另一组；其中，

所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 223-287 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

9. 权利要求 8 所述的试剂盒，其中所述第一组抗体还包括一个或多个抗体 3，各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-222 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

10. 权利要求 8 或 9 所述的试剂盒，其中所述第二组抗体还包括：

一个或多个抗体 4，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnIC 的抗体；和/或

一个或多个抗体 5，各所述抗体 5 独立地选自特异性结合 cTnI 第 18-210 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

11. 权利要求 8-10 任一项所述的试剂盒，其中所述第一组抗体包括一个或多个所述抗体 1 和一个或多个所述抗体 3；所述第二组抗体包括一个或多个所述抗体 2，以及一个或多个所述抗体 4 和/或一个或多个所述抗体 5。

12. 权利要求 8-11 任一项所述的试剂盒，其中所述捕获抗体为所述第一组抗体，所述检测抗体为所述第二组抗体。

13. 权利要求 8-12 任一项所述的试剂盒，其中各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 223-242 位氨基酸或第 262-281 位氨基酸的抗体，优选特异性结合 cTnT 第 223-242 位氨基酸的抗体；和/或

各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-86 位氨基酸、第 119-138 位氨基酸、第 132-151 位氨基酸、第 145-164 位氨基酸或第 171-190 位氨基酸的抗体；优选地，各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnT 第 119-138 位氨基酸或第 132-151 位氨基酸的抗体；和/或

各所述抗体 5 独立地选自特异性结合 cTnI 第 1-15 位氨基酸、第 13-22 位氨基酸、第

18-22 位氨基酸、第 18-28 位氨基酸、第 18-35 位氨基酸、第 22-31 位氨基酸、第 22-40 位氨基酸、第 23-29 位氨基酸、第 24-40 位氨基酸、第 25-40 位氨基酸、第 26-35 位氨基酸、第 34-37 位氨基酸、第 41-49 位氨基酸、第 83-89 位氨基酸、第 86-90 位氨基酸、第 87-90 位氨基酸、第 117-126 位氨基酸、第 130-145 位氨基酸、第 169-178 位氨基酸、第 186-192 位氨基酸、第 190-196 位氨基酸或第 195-209 位氨基酸的抗体；优选地，各所述抗体 5 独立地选自特异性结合 cTnI 第 22-40 位氨基酸、第 41-49 位氨基酸或第 83-89 位氨基酸的抗体；更优选地，各所述抗体 5 独立地选自特异性结合 cTnI 第 41-49 位氨基酸的抗体。

14. 一种在体外检测样品中心肌肌钙蛋白三元复合物的方法，包括以下步骤：

获得待测样品；

将所述待测样品与捕获抗体接触，以形成抗体-抗原复合物；

使所述抗体-抗原复合物与结合有可检测标记的检测抗体接触，以形成抗体-抗原-抗体复合物；和

检测所述可检测标记所产生的信号，以确定待测样品中心肌肌钙蛋白三元复合物的存在和/或总量；

其中，所述捕获抗体选自第一组抗体和第二组抗体中的一组，所述检测抗体选自所述第一组抗体和第二组抗体中的另一组；

所述第一组抗体包括一个或多个抗体 1，各所述抗体 1 独立地选自特异性结合 cTnT 第 223-287 位氨基酸序列中任意一段的抗体；

所述第二组抗体包括一个或多个抗体 2，各所述抗体 2 独立地选自特异性结合 TnC 氨基酸序列中任意一段的抗体。

15. 权利要求 14 所述的方法，其中所述第一组抗体还包括一个或多个抗体 3，各所述抗体 3 独立地选自特异性结合 cTnT 第 67-222 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

16. 权利要求 14 或 15 所述的方法，其中所述第二组抗体还包括：

一个或多个抗体 4，各所述抗体 4 独立地选自特异性结合 cTnIC 的抗体；和/或

一个或多个抗体 5，各所述抗体 5 独立地选自特异性结合 cTnI 第 18-210 位氨基酸序列中任意一段的抗体。

17. 权利要求 14-16 任一项所述的方法，其中所述第一组抗体包括一个或多个所述抗体 1 和一个或多个所述抗体 3；所述第二组抗体包括一个或多个所述抗体 2，以及一个或多个所述抗体 4 和/或一个或多个所述抗体 5。

18. 权利要求 14-17 任一项所述的方法，所述捕获抗体为所述第一组抗体，所述检测抗体为所述第二组抗体。

19. 权利要求 1-7 任一项所述的组合物在制备用于检测总心肌肌钙蛋白三元复合物的试剂中的用途。

20. 权利要求 1-7 任一项所述的组合物、权利要求 8-13 任一项所述的试剂盒或权利要求 14-18 任一项所述的方法在心肌损伤体外诊断中的用途。

21. 一种在体外诊断心肌损伤的方法，其包括采用权利要求 1-7 任一项所述的组合物、权利要求 8-13 任一项所述的试剂盒或权利要求 14-18 任一项所述的方法检测来自受试者的样品中总心肌肌钙蛋白三元复合物的步骤。

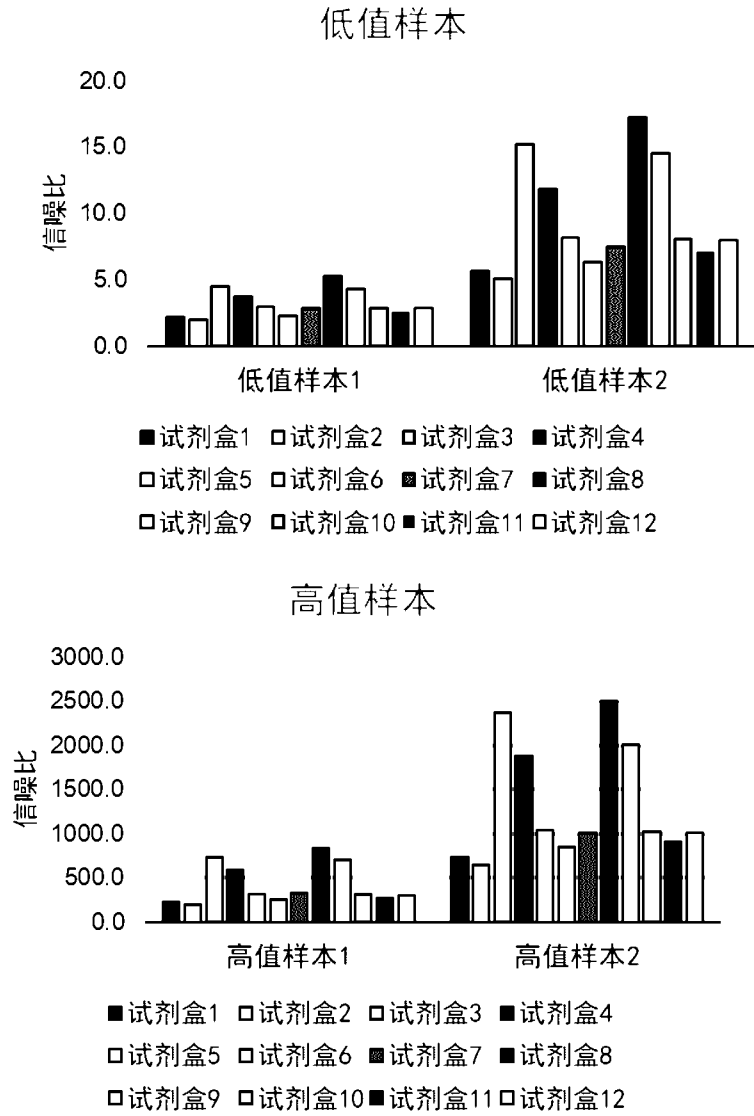


图 1

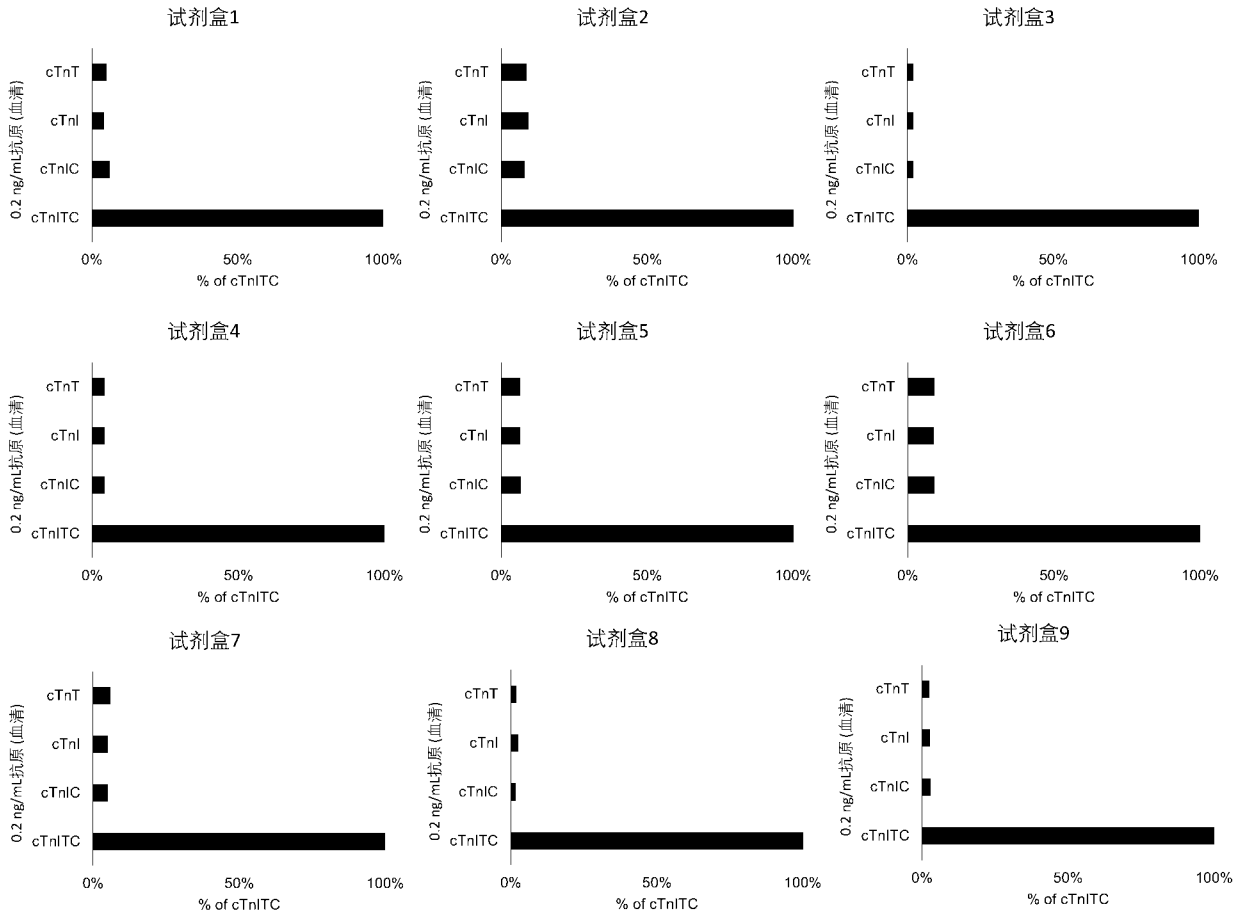


图 2

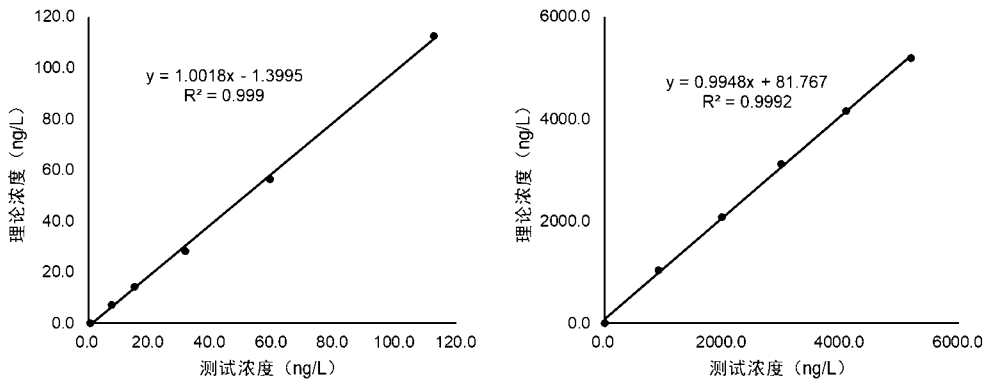


图 3

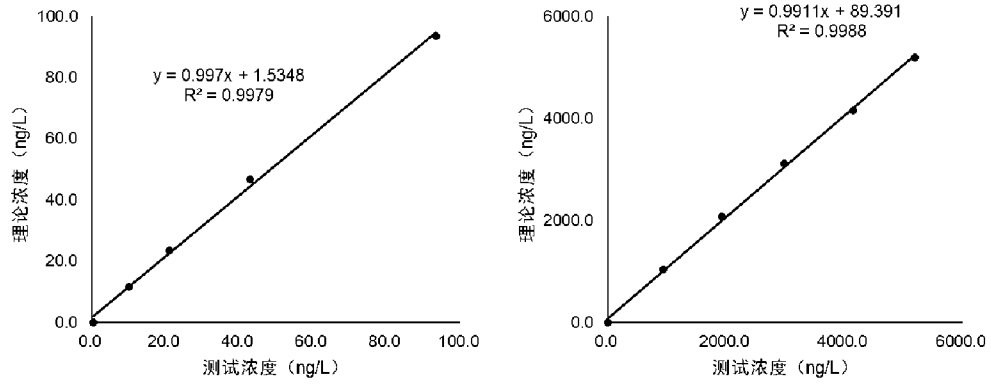


图 4

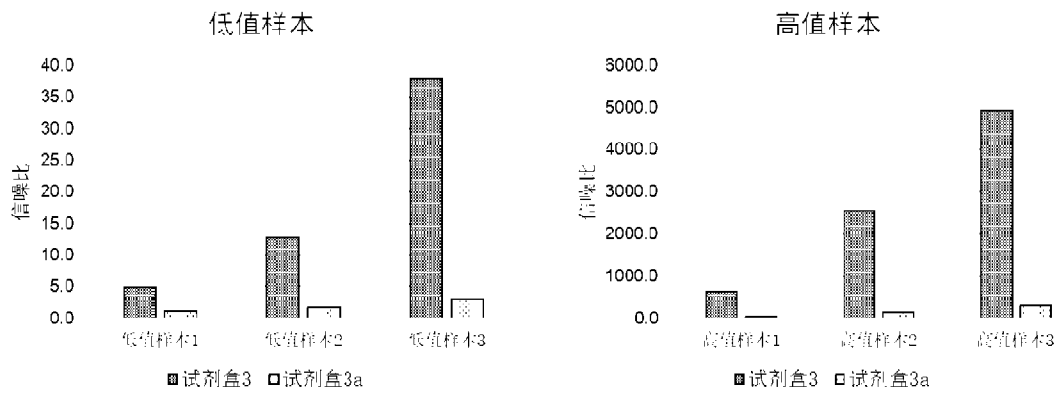


图 5

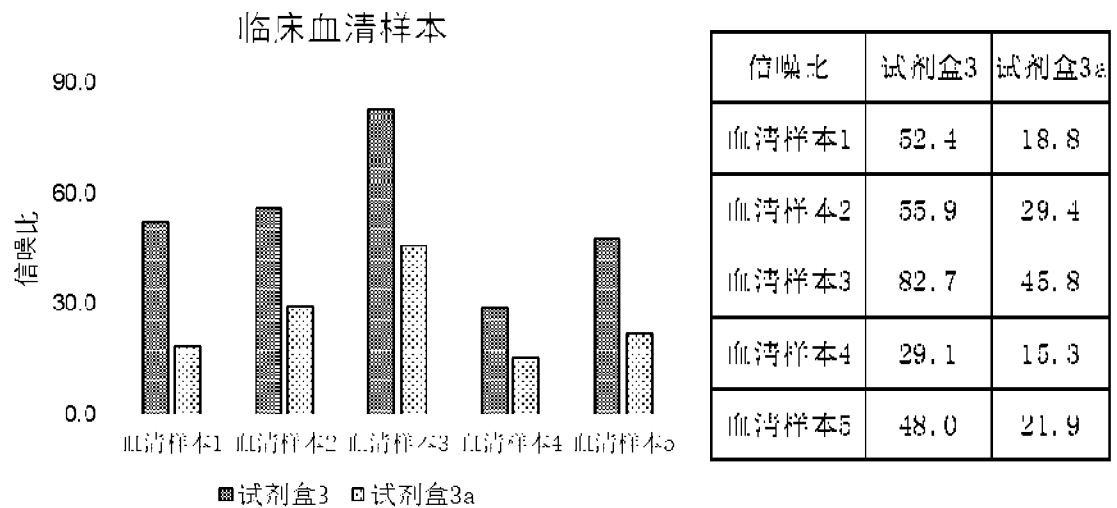


图 6

试剂盒3a

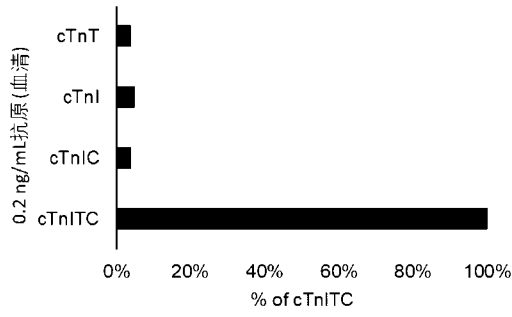


图7

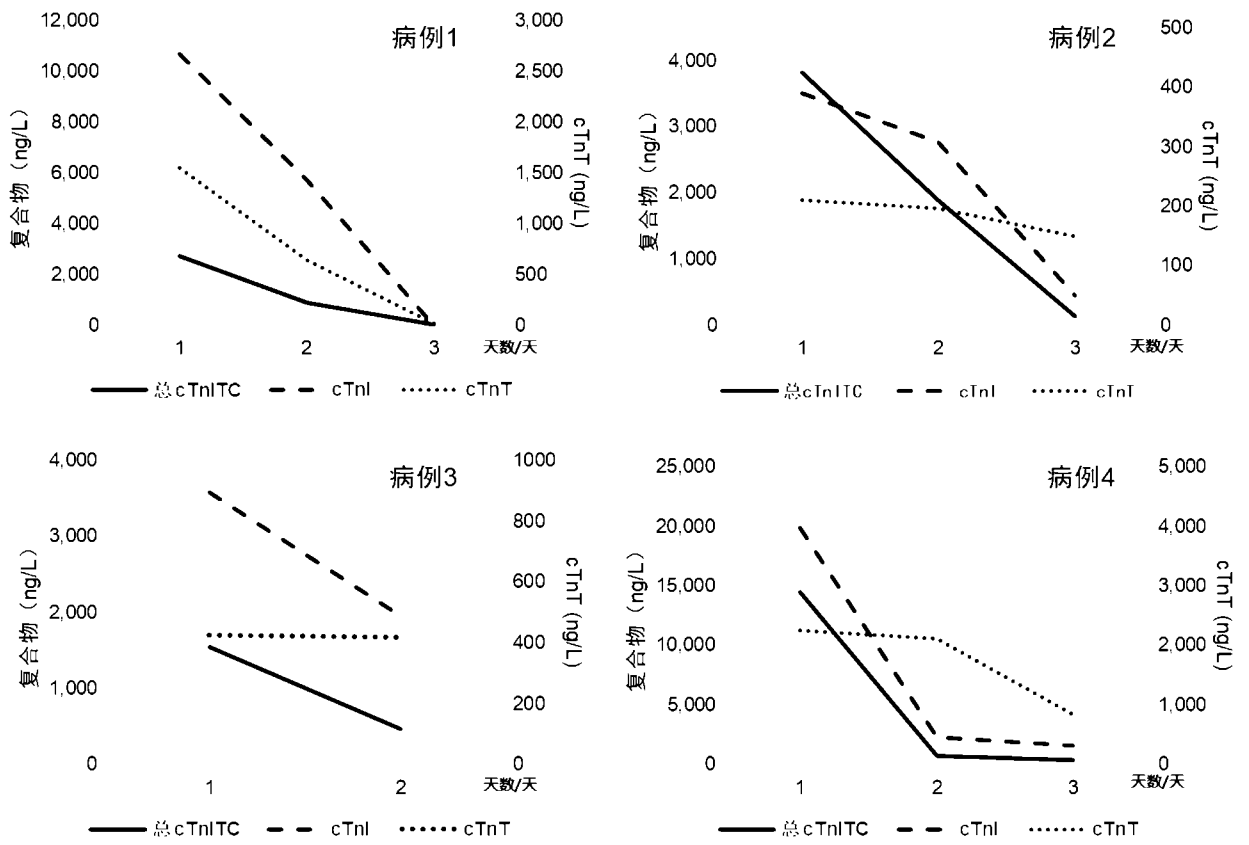


图8

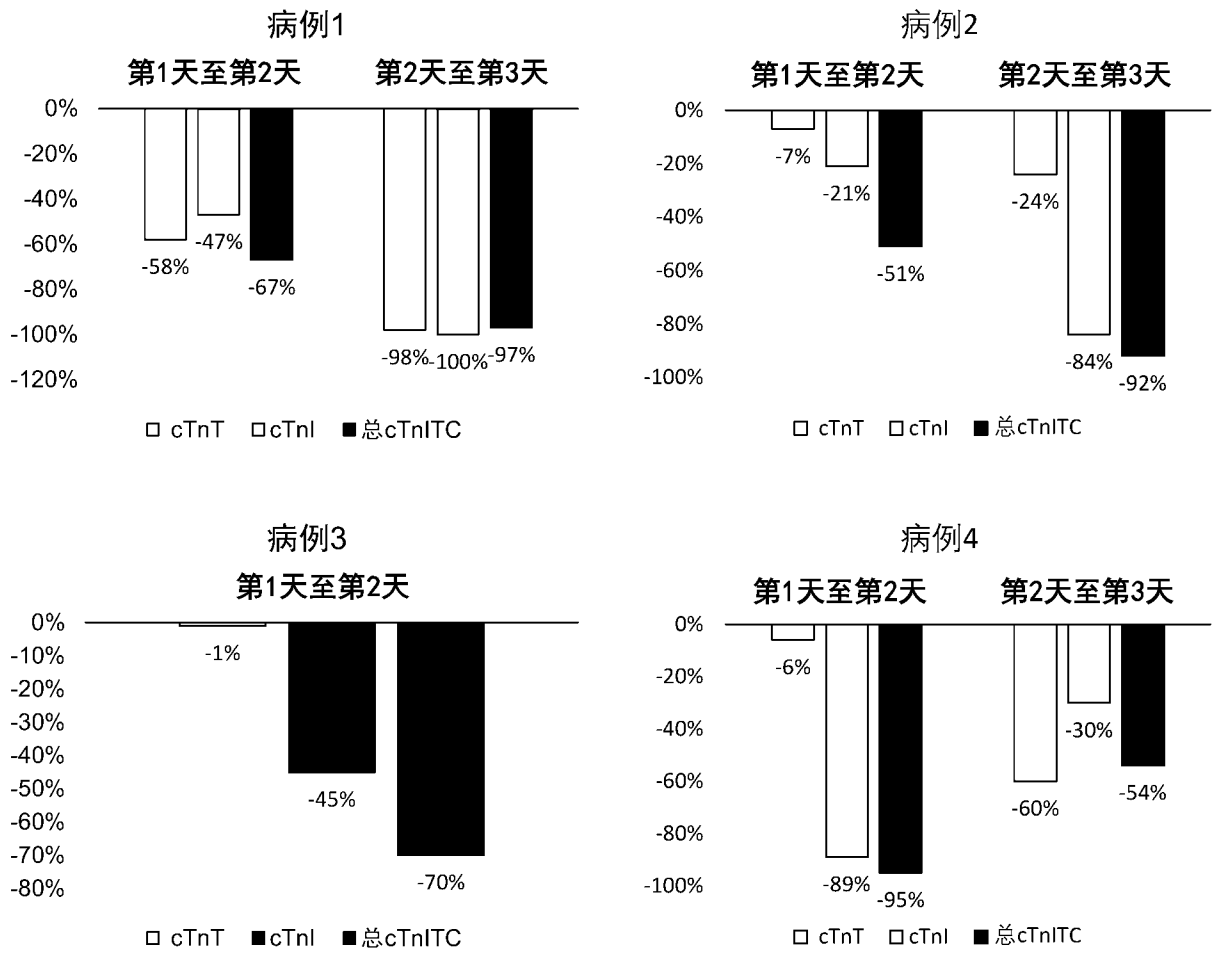


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/112993

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/68(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT; ENTXTC; WPABSC; VEN; ENTXT; CNKI; Web of Science; 百度学术, BAIDU SCHOLAR: 深圳迈瑞, 心肌肌钙蛋白, 肌钙蛋白, 复合物, cTnT, TnC, TnI, 抗体, 标记, 7E7, 329cc, 7B9cc, cardiac troponin, troponin, complex, antibod+, label		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009233268 A1 (AXELA INC.) 17 September 2009 (2009-09-17) description, paragraphs [0006]-[0094]	1-21
A	CN 114994304 A (XIAMEN BIOTIME BIOTECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 02 September 2022 (2022-09-02) entire document	1-21
A	US 5795725 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC.) 18 August 1998 (1998-08-18) entire document	1-21
A	US 6174686 B1 (BIOSITE DIAGNOSTICS INC.) 16 January 2001 (2001-01-16) entire document	1-21
A	US 2004219604 A1 (UNIVERSITY OF TURKU) 04 November 2004 (2004-11-04) entire document	1-21
A	US 6156521 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC.) 05 December 2000 (2000-12-05) entire document	1-21
A	US 2005164317 A1 (BIOSITE INC.) 28 July 2005 (2005-07-28) entire document	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 December 2023		Date of mailing of the international search report 11 December 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/112993

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	2009233268	A1	17 September 2009	US 8338189 B2	25 December 2012
CN	114994304	A	02 September 2022	None	
US	5795725	A	18 August 1998	None	
US	6174686	B1	16 January 2001	None	
US	2004219604	A1	04 November 2004	US 7348157 B2	25 March 2008
US	6156521	A	05 December 2000	None	
US	2005164317	A1	28 July 2005	US 7604946 B2	20 October 2009

<p>A. 主题的分类</p> <p>G01N33/68(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: G01N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNTEXT;ENTXTC;WPABSC;VEN;ENTXT;CNKI;Web of Science;百度学术: 深圳迈瑞, 心肌肌钙蛋白, 肌钙蛋白, 复合物, cTnT, TnC, TnI, 抗体, 标记, 7E7, 329cc, 7B9cc, cardiac troponin, troponin, complex, antibod+, label</p>																										
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2009233268 A1 (AXELA INC) 2009年9月17日 (2009 - 09 - 17) 说明书第[0006]-[0094]段</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 114994304 A (厦门宝太生物科技股份有限公司 等) 2022年9月2日 (2022 - 09 - 02) 全文</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 5795725 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 1998年8月18日 (1998 - 08 - 18) 全文</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6174686 B1 (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 2001年1月16日 (2001 - 01 - 16) 全文</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2004219604 A1 (UNIV TURKU) 2004年11月4日 (2004 - 11 - 04) 全文</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6156521 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 2000年12月5日 (2000 - 12 - 05) 全文</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2005164317 A1 (BIOSITE INC) 2005年7月28日 (2005 - 07 - 28) 全文</td> <td>1-21</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	US 2009233268 A1 (AXELA INC) 2009年9月17日 (2009 - 09 - 17) 说明书第[0006]-[0094]段	1-21	A	CN 114994304 A (厦门宝太生物科技股份有限公司 等) 2022年9月2日 (2022 - 09 - 02) 全文	1-21	A	US 5795725 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 1998年8月18日 (1998 - 08 - 18) 全文	1-21	A	US 6174686 B1 (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 2001年1月16日 (2001 - 01 - 16) 全文	1-21	A	US 2004219604 A1 (UNIV TURKU) 2004年11月4日 (2004 - 11 - 04) 全文	1-21	A	US 6156521 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 2000年12月5日 (2000 - 12 - 05) 全文	1-21	A	US 2005164317 A1 (BIOSITE INC) 2005年7月28日 (2005 - 07 - 28) 全文	1-21
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
X	US 2009233268 A1 (AXELA INC) 2009年9月17日 (2009 - 09 - 17) 说明书第[0006]-[0094]段	1-21																								
A	CN 114994304 A (厦门宝太生物科技股份有限公司 等) 2022年9月2日 (2022 - 09 - 02) 全文	1-21																								
A	US 5795725 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 1998年8月18日 (1998 - 08 - 18) 全文	1-21																								
A	US 6174686 B1 (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 2001年1月16日 (2001 - 01 - 16) 全文	1-21																								
A	US 2004219604 A1 (UNIV TURKU) 2004年11月4日 (2004 - 11 - 04) 全文	1-21																								
A	US 6156521 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 2000年12月5日 (2000 - 12 - 05) 全文	1-21																								
A	US 2005164317 A1 (BIOSITE INC) 2005年7月28日 (2005 - 07 - 28) 全文	1-21																								
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年12月7日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年12月11日</p>																									
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p>	<p>授权官员</p> <p>吴爱坪</p> <p>电话号码 (+86) 0512-88997286</p>																									

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/112993

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
US	2009233268	A1	2009年9月17日	US 8338189 B2	2012年12月25日
CN	114994304	A	2022年9月2日	无	
US	5795725	A	1998年8月18日	无	
US	6174686	B1	2001年1月16日	无	
US	2004219604	A1	2004年11月4日	US 7348157 B2	2008年3月25日
US	6156521	A	2000年12月5日	无	
US	2005164317	A1	2005年7月28日	US 7604946 B2	2009年10月20日