



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103857698 A

(43) 申请公布日 2014.06.11

(21) 申请号 201280024421.7

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2012.05.18

代理人 周铁 林森

(30) 优先权数据

61/488630 2011.05.20 US

13/458847 2012.04.27 US

(51) Int. Cl.

C07K 16/26(2006.01)

C07H 21/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.11.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/038637 2012.05.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/162165 EN 2012.11.29

(71) 申请人 西门子医疗保健诊断公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 布鲁斯·A·坎贝尔 林相喜

廖起牧 N.P. 萨哈基安

J.V. 弗里曼 R.A. 埃文格利斯塔

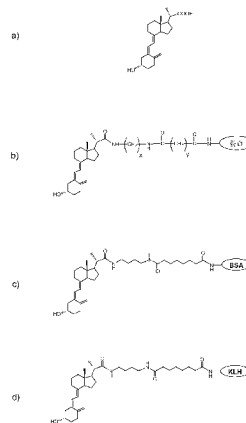
权利要求书10页 说明书37页
序列表18页 附图15页

(54) 发明名称

针对 25-羟基维生素 D2 和 D3 的抗体及其用途

(57) 摘要

本文提供了可用于产生能够结合维生素 D 衍生物,例如 25-羟基维生素 D2 和 / 或 25-羟基维生素 D3,或 25-羟基维生素 D 类似物,例如维生素 D-C22 免疫原性分子或化合物的抗体的抗原性分子。还描述了使用这些抗原分子和相关抗原性化合物产生的抗体。另外,本文公开了用于检测受试者中维生素 D 缺乏的方法、用于治疗怀疑具有维生素 D 缺乏的受试者的方法、用于监测受试者中维生素 D 缺乏进展的方法和用于监测需要其的受试者中维生素 D 缺乏的治疗的方法。还提供用于 25-羟基维生素 D2 和 D3 的检测或定量的方法和试剂,用于稳定化维生素 D 类似物的方法,和用于从生物样品中维生素 D 结合蛋白分离 25-羟基维生素 D2 和 D3 的方法。



1. 分离的抗体,或其抗原结合片段,包括具有氨基酸序列 SEQ ID NO:10 的重链 CDR1,具有氨基酸序列 SEQ ID NO:11 的重链 CDR2,具有氨基酸序列 SEQ ID NO:12 的重链 CDR3,具有氨基酸序列 SEQ ID NO:26 的轻链 CDR1,具有氨基酸序列 SEQ ID NO:27 的轻链 CDR2,和具有氨基酸序列 SEQ ID NO:28 的轻链 CDR3。

2. 根据权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包括氨基酸序列 SEQ ID NO:16。

3. 根据权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区包括氨基酸序列 SEQ ID NO:32。

4. 根据权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链恒定区包括小鼠 IgG1 抗体的氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1 或 4 的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链恒定区包括小鼠 Ig κ 链的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 1-5 任一项的抗体,其中所述抗体为鼠抗体。

7. 根据权利要求 1-5 任一项的抗体,其中所述抗体为重组的。

8. 根据权利要求 1-7 任一项的抗体,其中所述抗体结合 25-羟基维生素 D₂。

9. 根据权利要求 1-7 任一项的抗体,其中所述抗体结合 25-羟基维生素 D₃。

10. 根据权利要求 1-9 任一项的抗体,其中所述抗体结合 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃。

11. 根据权利要求 10 的抗体,其中其以基本上类似的亲和力结合 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃。

12. 根据权利要求 1-11 任一项的抗体,其中所述抗体不显著地结合溶液中的维生素 D₂ 或维生素 D₃。

13. 根据权利要求 1-12 任一项的抗体,其中通过用包括维生素 D-C22 的免疫原注射哺乳动物产生所述抗体。

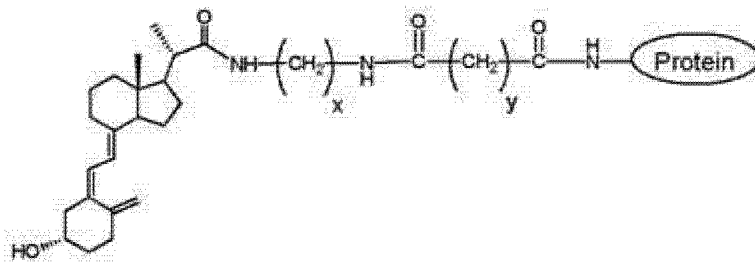
14. 根据权利要求 13 的抗体,其中所述免疫原进一步包括载体蛋白和在线性链中包括至少 6 个原子的接头。

15. 根据权利要求 14 的抗体,其中所述载体蛋白是牛血清白蛋白或钥孔戚血蓝蛋白。

16. 根据权利要求 14 或 15 的抗体,其中所述接头包括从约 12 到 16 个原子的线性链。

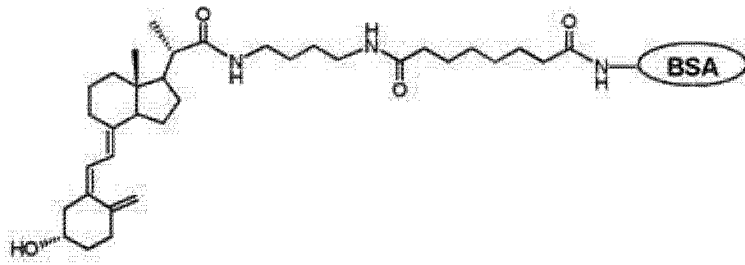
17. 根据权利要求 16 的抗体,其中所述接头包括 14 个原子的线性链。

18. 根据权利要求 13-17 任一项的抗体,其中所述免疫原由下式表示:



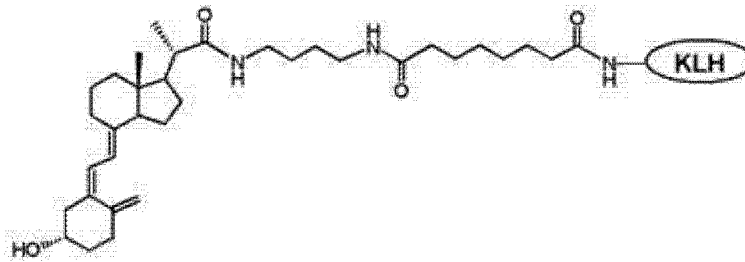
其中 x 和 y 独立地是 1-12,并且至少一个缀合接头的维生素 D-C22 分子结合到载体蛋白。

19. 根据权利要求 13-18 任一项的抗体,其中所述免疫原由下式表示:



其中至少一个缀合接头的维生素 D-C22 分子结合到 BSA 载体蛋白。

20. 根据权利要求 13-18 任一项的抗体,其中所述免疫原由下式表示:



其中至少一个缀合接头的维生素 D-C22 分子结合到 KLH 载体蛋白。

21. 根据权利要求 13 或 20 的抗体,其中所述哺乳动物是小鼠。

22. 产生根据权利要求 1 的抗体的方法,其包括用包括维生素 D-C22 的免疫原注射哺乳动物。

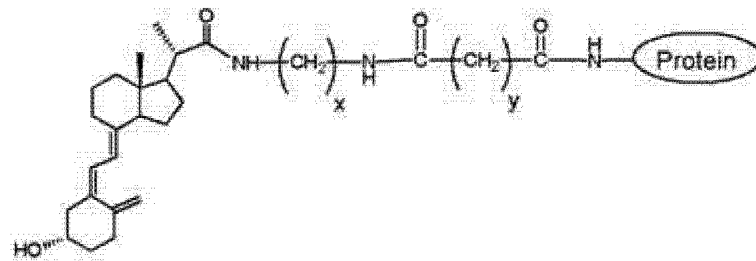
23. 根据权利要求 22 的方法,其中所述免疫原进一步包括载体蛋白和在线性链中包括至少 6 个原子的接头。

24. 根据权利要求 23 的方法,其中所述载体蛋白是牛血清白蛋白(BSA)或钥孔戚血蓝蛋白(KLH)。

25. 根据权利要求 23 或 24 的方法,其中所述接头包括从约 12 到 16 个原子的线性链。

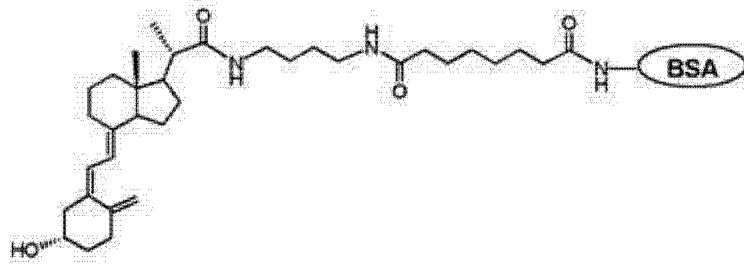
26. 根据权利要求 25 的方法,其中所述接头包括 14 个原子的线性链。

27. 根据权利要求 22-26 任一项的方法,其中所述免疫原由下式表示:



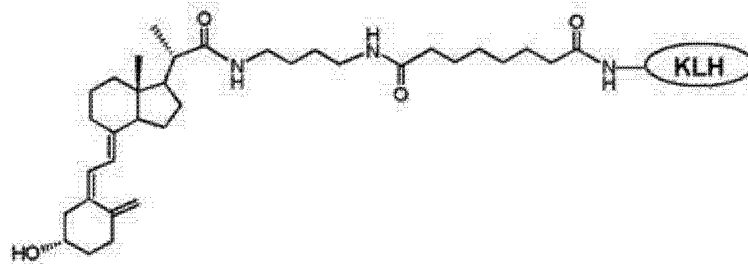
其中 x 和 y 独立地是 1-12,并且至少一个缀合接头的维生素 D-C22 分子结合到载体蛋白。

28. 根据权利要求 22-27 任一项的方法,其中所述免疫原由下式表示:



其中至少一个缀合接头的维生素 D-C22 分子结合到 BSA 载体蛋白。

29. 根据权利要求 22-27 任一项的方法,其中所述免疫原由下式表示:



其中至少一个缀合接头的维生素 D-C22 分子结合到 KLH 载体蛋白。

30. 根据权利要求 22 或 29 的方法,其中所述哺乳动物是小鼠。
31. 表达根据权利要求 1-21 任一项的抗体的分离的细胞。
32. 根据权利要求 31 的细胞,其中所述细胞衍生自免疫接种的小鼠。
33. 根据权利要求 32 的细胞,其中所述细胞是杂交瘤细胞。
34. 根据权利要求 31 的细胞,其中所述细胞是重组产生的。
35. 编码根据权利要求 1-21 任一项的抗体的分离的多核苷酸。
36. 根据权利要求 35 的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸是重组的。
37. 根据权利要求 35 或 36 的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸是 cDNA。
38. 编码抗体重链的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包括序列 SEQ ID NO :2,其编码重链 CDR1 ;序列 SEQ ID NO :3,其编码重链 CDR2 ;和序列 SEQ ID NO :4,其编码重链 CDR3。
39. 根据权利要求 38 的分离的多核苷酸,包括 SEQ ID NO :8。
40. 编码抗体轻链的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包括序列 SEQ ID NO :18,其编码轻链 CDR1 ;序列 SEQ ID NO :19,其编码轻链 CDR2 ;和序列 SEQ ID NO :20,其编码轻链 CDR3。
41. 根据权利要求 40 的分离的多核苷酸,其包括 SEQ ID NO :24。
42. 分离的多核苷酸,其包括根据权利要求 38 和 40 的多核苷酸序列。
43. 根据权利要求 42 的分离的多核苷酸,其中权利要求 38 的序列存在于与权利要求 40 的序列的开放阅读框不同的开放阅读框中。
44. 检测样品中 25-羟基维生素 D2 或 25-羟基维生素 D3 的方法,其包括将样品与根据权利要求 1-21 任一项的抗体或抗原结合片段接触。
45. 根据权利要求 44 的方法,其中根据权利要求 1-21 任一项的抗体或抗原结合片段可检测地被标记。

46. 用于检测受试者中维生素 D 缺乏的方法,所述方法包括:

确定衍生自所述受试者的生物样品中总 25- 羟基维生素 D 的水平;

其中生物样品中水平和正常对照中水平或 30ng/mL 的阈值水平之间减少,指示在所述受试者中维生素 D 缺乏。

47. 用于治疗怀疑具有维生素 D 缺乏的受试者的方法,所述方法包括:确定衍生自所述受试者的生物样品中总 25- 羟基维生素 D 的水平,并且如果确定生物样品中的水平相对正常对照中的水平或 30ng/mL 的阈值水平下降,则向所述受试者施用针对维生素 D 缺乏的治疗。

48. 用于在需要其的受试者中监测维生素 D 缺乏的进展的方法,所述方法包括在第一时间确定衍生自所述受试者的第一生物样品中总 25- 羟基维生素 D 的水平,并在晚于所述第一时间的第二时间确定衍生自所述受试者的第二生物样品中总 25- 羟基维生素 D 的水平,其中在第一生物样品中的水平和第二生物样品中的水平之间下降,指示所述受试者中维生素 D 缺乏的进展,其中在第一生物样品中的水平和第二生物样品中的水平之间很少或无变化,指示受试者中维生素 D 缺乏的稳定化,并且其中在第一生物样品中的水平和第二生物样品中的水平之间上升,指示受试者中维生素 D 缺乏的逆转。

49. 用于监测需要其的受试者中维生素 D 缺乏的治疗的方法,所述方法包括:

在第一时间确定衍生自所述受试者的第一生物样品中总 25- 羟基维生素 D 的水平;并

并在晚于所述第一时间的第二时间和对所述受试者针对所述维生素 D 缺乏治疗后,确定衍生自所述受试者的第二生物样品中总 25- 羟基维生素 D 的水平;

其中在第二生物样品中的水平相对第一生物样品中的水平增加或稳定,指示所述受试者中维生素 D 缺乏治疗的效力,并且其中在第二生物样品中的水平相对第一生物样品中的水平减少,指示所述受试者中维生素 D 缺乏治疗的无效力。

50. 根据权利要求 47 或 49 的方法,其中所述治疗是补充维生素 D 摄入。

51. 根据权利要求 47 或 49 的方法,其中所述治疗是光疗。

52. 根据权利要求 51 的方法,其中所述光疗是增加对自然阳光的暴露或对人工紫外线 B 光线来源的暴露。

53. 根据权利要求 46、47、48 或 49 的方法,其中所述 25- 羟基维生素 D 是 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3。

54. 根据权利要求 46-49 任一项的方法,其中通过将所述生物样品与识别 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触来确定 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 的水平。

55. 权利要求 54 的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。

56. 权利要求 54 或 55 的方法,其中所述抗体或抗原结合片段对 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 具有等摩尔识别。

57. 根据权利要求 54、55 或 56 的方法,其中所述抗体或抗原结合片段与维生素 D3 或维生素 D2 不具有显著的交叉反应性。

58. 根据权利要求 54、55、56 或 57 的方法,其中抗体或抗原结合片段包括 SEQ ID NO:26 的 Lc CDR1, SEQ ID NO:27 的 Lc CDR2,和 SEQ ID NO:28 的 Lc CDR3, SEQ ID NO:10 的 Hc CDR1, SEQ ID NO:11 的 Hc CDR2,和 SEQ ID NO:12 的 Hc CDR3。

59. 根据权利要求 54、55、56、57 或 58 的方法,其中抗体是单克隆抗体 10H9。
60. 根据权利要求 54、55、56、57、58 或 59 的方法,其中用于产生所述抗体的抗原是维生素 D-C22-二氨基丁烷-辛二酰-BSA。
61. 根据权利要求 54-60 任一项的方法,其中所述确定步骤通过竞争性免疫测定进行。
62. 根据权利要求 54-61 任一项的方法,其中所述抗体用化学发光化合物、发磷光性化合物、荧光化合物、放射性标记物、生物素或酶标记。
63. 根据权利要求 54-62 任一项的方法,其中所述抗体固定化在固相支持物上。
64. 根据权利要求 54-63 任一项的方法,其中所述抗体缀合到载体蛋白。
65. 根据权利要求 64 的方法,其中所述抗体-载体蛋白固定化在固相支持物上。
66. 根据权利要求 54-65 任一项的方法,其中通过增强的增强的化学发光(ECL)、酶免疫测定(EIA)、免疫组织化学(IHC)、蛋白免疫印迹分析、放射免疫测定(RIA)、免疫荧光、平衡透析、免疫分化,或酶联免疫吸附测定(ELISA)检测所述生物样品中总 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的水平。
67. 根据权利要求 46-66 任一项的方法,其中所述生物样品是血液。
68. 根据权利要求 46-66 任一项的方法,其中所述生物样品是血清。
69. 根据权利要求 46-66 任一项的方法,其中所述生物样品是血浆。
70. 根据权利要求 54-69 任一项的方法,其中在将所述生物样品与识别 25-羟基维生素 D2 和 8-羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触之前用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)处理生物样品。
71. 根据权利要求 54-69 任一项的方法,其中在将所述生物样品与识别 25-羟基维生素 D2 和 8-羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触同时用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)处理生物样品。
72. 根据权利要求 54-69 任一项的方法,其中在将所述生物样品与识别 25-羟基维生素 D2 和 8-羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触之前用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇处理生物样品。
73. 根据权利要求 54-69 任一项的方法,其中在将所述生物样品与识别 25-羟基维生素 D2 和 8-羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触同时用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇处理生物样品。
74. 根据权利要求 46-73 任一项的方法,其中在所述受试者中维生素 D 缺乏指示或与疾病相关。
75. 根据权利要求 74 的方法,其中所述疾病是佝偻病、骨软化症、高血压、骨质疏松、自身免疫性疾病、心血管疾病、精神分裂症、抑郁症、神经系统疾病、糖尿病、感染性疾病、哮喘、过敏或癌症。
76. 根据权利要求 46-49 任一项的方法,其中用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇处理所述生物样品。
77. 根据权利要求 76 的方法,其中所述生物样品不用甲醇处理。
78. 根据权利要求 76 的方法,其中所述生物样品用甲醇处理。
79. 根据权利要求 54 的方法,其中在所述接触步骤后将 25-羟基维生素 D 类似物添加到所述生物样品。

80. 根据权利要求 79 的方法,其中所述 25-羟基维生素 D 类似物是标记的。
81. 根据权利要求 79 的方法,其中所述 25-羟基维生素 D 类似物存在于包括 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)的缓冲液中。
82. 根据权利要求 80 的方法,其中所述标记的 25-羟基维生素 D 类似物存在于包括 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)的缓冲液中。
83. 根据权利要求 46、47、48 或 49 的方法,其中所述确定步骤需要 20 分钟或更少。
84. 稳定化 25-羟基维生素 D 类似物的方法,包括:
将 25-羟基维生素 D 类似物与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)接触。
85. 根据权利要求 84 的方法,进一步包括在测定系统外将 25-羟基维生素 D 类似物/8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)保存多于 2 个月。
86. 根据权利要求 84 的方法,进一步包括在测定系统内将 25-羟基维生素 D 类似物/8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)保存多于 7 天。
87. 用于在受试者中检测维生素 D 缺乏的方法,所述方法通过确定衍生自所述受试者的生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平,所述方法包括:
在容器中组合生物样品和置换缓冲液;
向所述容器中添加缀合到第一标记物的优先结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或其抗原结合片段;
向所述容器添加缀合到载体蛋白和第二标记物的 25-羟基维生素 D 类似物;
向所述容器添加缀合到识别所述第二标记物的抗体的固相支持物;并
测量生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平;
其中生物样品中水平和正常对照中水平或 30ng/mL 的阈值水平之间减少,指示在所述受试者中维生素 D 缺乏。
88. 根据权利要求 87 的方法,其中所述置换缓冲液包括 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)。
89. 根据权利要求 87 的方法,其中所述置换缓冲液包括 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇。
90. 根据权利要求 87 的方法,其中所述置换缓冲液包括 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)、乙二醇和甲醇。
91. 根据权利要求 87、88、89 和 90 任一项的方法,其中第一标记物包括化学发光化合物、发磷光性化合物、荧光化合物、放射性标记物、生物素或酶。
92. 根据权利要求 87、88、89、90 和 91 任一项的方法,其中所述载体蛋白包括牛血清白蛋白。
93. 根据权利要求 87、88、89、90、91 和 92 任一项的方法,其中所述第二标记物包括荧光素。
94. 根据权利要求 87-93 任一项的方法,其中所述固相支持物是顺磁颗粒。
95. 根据权利要求 87 的方法,其中所述缀合到固相支持物的抗体是结合荧光素的抗体。
96. 根据权利要求 87-95 任一项的方法,其中所述方法需要 20 分钟或更少。
97. 根据权利要求 87-95 任一项的方法,其中所述优先结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或抗原结合片段包括,在优选实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包

括 Lc CDR1 SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 的 Lc CDR2, 和 SEQ ID NO:28 的 Lc CDR3, SEQ ID NO:10 的 Hc CDR1, SEQ ID NO:11 的 Hc CDR2, 和 SEQ ID NO:12 的 Hc CDR3。

98. 根据权利要求 87-97 任一项的方法, 其中所述优先结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体是单克隆抗体 10H9。

99. 根据权利要求 87-97 任一项的方法, 其中用于产生所述单克隆抗体的抗原是维生素 D-C22-二氨基丁烷-辛二酰-BSA。

100. 根据权利要求 87-99 任一项的方法, 其中所述优先结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或其抗原结合片段固定化在固相支持物上。

101. 根据权利要求 87-99 任一项的方法, 其中所述优先结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或其抗原结合片段缀合到载体蛋白。

102. 根据权利要求 101 的方法, 其中所述优先结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或其抗原结合片段与载体蛋白的缀合物固定化在固相支持物上。

103. 根据权利要求 87-102 任一项的方法, 其中所述生物样品是血液。

104. 根据权利要求 87-102 任一项的方法, 其中所述生物样品是血清。

105. 根据权利要求 87-102 任一项的方法, 其中所述生物样品是尿或血浆。

106. 根据权利要求 87-105 任一项的方法, 其中所述 25-羟基维生素 D 类似物存在于包括 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)的稳定化缓冲液中。

107. 根据权利要求 87-106 任一项的方法, 其中在所述受试者中维生素 D 缺乏指示疾病。

108. 根据权利要求 107 的方法, 其中所述疾病是佝偻病、骨软化症、高血压、骨质疏松、自身免疫性疾病、心血管疾病、精神分裂症、抑郁症、神经系统疾病、糖尿病、感染性疾病、哮喘、过敏或癌症。

109. 根据权利要求 87-108 任一项的方法, 其中所述优先结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或其抗原结合片段与维生素 D3 或维生素 D2 不具有显著的交叉反应性。

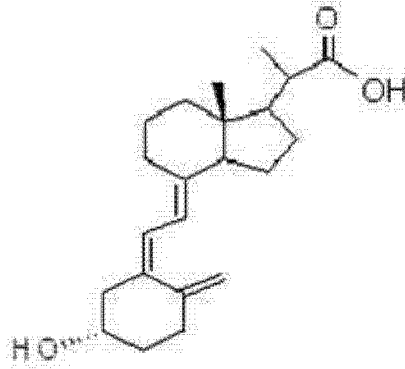
110. 根据权利要求 87-109 任一项的方法, 其中所述优先结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或其抗原结合片段对 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 具有等摩尔的识别。

111. 根据权利要求 87-110 任一项的方法, 其中测量生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平步骤包括测量化学发光。

112. 根据权利要求 79、80、81、82、84、85、86 和 87 任一项的方法, 其中所述 25-羟基维生素 D 类似物是维生素 D-C22。

113. 产生杂交瘤和结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或其抗原结合片段的方法, 包括:

a. 用包括维生素 D-C22 或其衍生物的免疫原免疫接种动物, 所述维生素 D-C22 或其衍生物中羧酸功能被保护以形成酰胺



- b. 从动物收获脾细胞；
 c. 使脾细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤；和
 d. 从所述杂交瘤产生结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或抗原结合片段。

114. 根据权利要求 113 的方法，其中所述抗体或抗原结合片段检测样品中 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3。

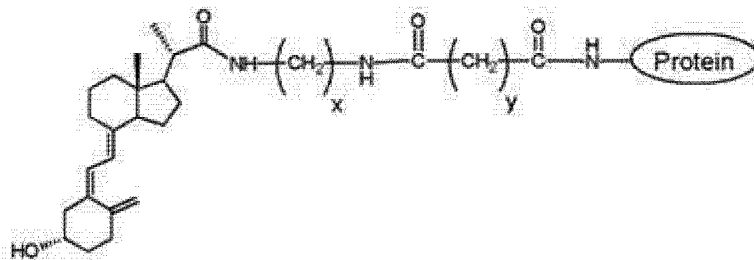
115. 根据权利要求 113 的方法，其中所述抗体或抗原结合片段具有 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的等摩尔识别。

116. 根据权利要求 113 的方法，其中所述抗体对 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的交叉反应性百分比范围从 100% 到 102%。

117. 根据权利要求 113 的方法，其中所述抗体包括具有氨基酸序列 SEQ ID NO:10 的重链 CDR1，具有氨基酸序列 SEQ ID NO:11 的重链 CDR2，具有氨基酸序列 SEQ ID NO:12 的重链 CDR3，具有氨基酸序列 SEQ ID NO:26 的轻链 CDR1，具有氨基酸序列 SEQ ID NO:27 的轻链 CDR2，和具有氨基酸序列 SEQ ID NO:28 的轻链 CDR3。

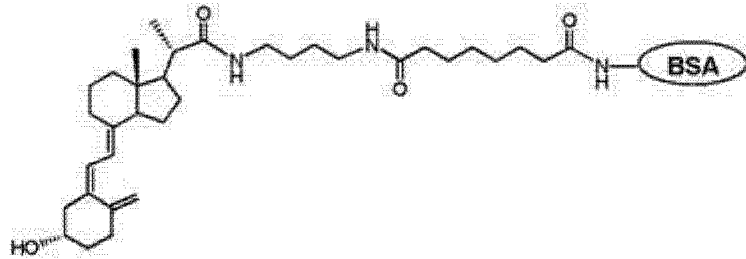
118. 根据权利要求 113 的方法，其中所述免疫原附着到蛋白载体。

119. 根据权利要求 113 的方法，其中所述免疫原由下式表示：



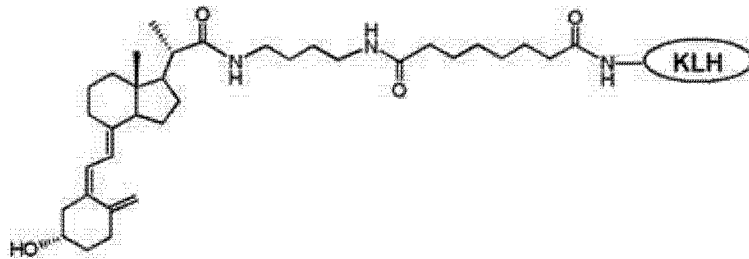
其中 x 和 y 独立地是 1-12，并且至少一个缀合接头的维生素 D-C22 分子结合到载体蛋白。

120. 根据权利要求 113 的方法，其中所述免疫原由下式表示：



其中 x 和 y 独立地是 1-12, 并且至少一个缀合接头的维生素 D-C22 分子结合到牛血清白蛋白。

121. 根据权利要求 113 的方法, 其中所述免疫原由下式表示:



其中至少一个缀合接头的维生素 D-C22 分子结合到钥孔戚血蓝蛋白 (KLH)。

122. 产生结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的单克隆抗体的杂交瘤细胞。

123. 产生抗体或其抗原结合片段的杂交瘤细胞, 所述抗体包括具有氨基酸序列 SEQ ID NO:10 的重链 CDR1, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:11 的重链 CDR2, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:12 的重链 CDR3, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:26 的轻链 CDR1, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:27 的轻链 CDR2, 和具有氨基酸序列 SEQ ID NO:28 的轻链 CDR3。

124. 分离的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其结合样品中的 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3。

125. 根据权利要求 124 的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段具有 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的等摩尔识别。

126. 根据权利要求 124 的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段对 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的交叉反应性百分比范围从 100% 到 102%。

127. 根据权利要求 124 的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体包括具有氨基酸序列 SEQ ID NO:10 的重链 CDR1, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:11 的重链 CDR2, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:12 的重链 CDR3, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:26 的轻链 CDR1, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:27 的轻链 CDR2, 和具有氨基酸序列 SEQ ID NO:28 的轻链 CDR3。

128. 用于检测或确定生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平的方法, 所述方法包括将所述样品与结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或其抗原结合片段接触。

129. 根据权利要求 128 的方法, 其中所述确定步骤包括使用缀合荧光素的维生素 D-C22 的竞争性免疫测定。

130. 根据权利要求 128 的方法, 其中所述抗体和抗原结合片段用于检测维生素 D 衍生物, 例如 25-羟基维生素 D2 和 / 或 25-羟基维生素 D3。

131. 试剂盒,其包括结合样品中的 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 的抗体或其抗原结合片段。

132. 诊断装置,其包括结合样品中的 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 的抗体或其抗原结合片段。

133. 根据权利要求 131 的试剂盒,其进一步包括缀合碱性磷酸酶的维生素 D-C22-牛血清白蛋白(BSA)。

134. 根据权利要求 132 的诊断装置,其进一步包括缀合碱性磷酸酶的维生素 D-C22-牛血清白蛋白(BSA)。

135. 权利要求 132 的装置,其中所述装置进行增强的化学发光(ECL)、酶免疫测定(EIA)、免疫组织化学(IHC)、蛋白免疫印迹分析、放射免疫测定(RIA)、免疫荧光、平衡透析、免疫分化,或酶联免疫吸附测定(ELISA)。

136. 产生杂交瘤的方法,包括:

a. 用包括维生素 D-C22 的免疫原免疫接种动物;

b. 从动物收获脾细胞;和

使脾细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤。

针对 25-羟基维生素 D2 和 D3 的抗体及其用途

[0001] 对相关应用的交叉引用

本申请请求 2012 年 4 月 27 日提交的美国申请号 13/458,847 的优先权,其请求 2011 年 5 月 20 日提交的美国临时申请号 61/488,630 的利益,两者通过引用整体并入本文。

技术领域

[0002] 本文提供用于 25-羟基维生素 D2 和 D3 的检测或定量的方法和试剂,用于稳定化维生素 D 类似物的方法,和用于从生物样品中维生素 D 结合蛋白分离 25-羟基维生素 D2 和 D3 的方法。

技术背景

[0003] 维生素 D 是参与钙的肠吸收和钙稳态调节的类固醇激素。维生素 D 对于强壮、健康骨骼的形成和维持是至关重要的。

[0004] 维生素 D 缺乏可以由于日光暴露不足、营养摄入不足、吸收下降、代谢异常或维生素 D 抗性。维生素 D 缺乏已与佝偻病、软骨病、骨质疏松症、高血压、心脑血管疾病、精神分裂症、抑郁症、神经系统疾病、糖尿病、感染性疾病、哮喘、过敏、癌症以及多种自身免疫性疾病联系起来。

[0005] 无论是消耗的或产生的,维生素 D 的两种形式(D2 和 D3) 都通过肝脏代谢成 25-羟基维生素 D (25(OH)D) 并然后在肝脏或肾脏中转化成 1,25-二羟基维生素 D。维生素 D 代谢物结合于血浆中载体蛋白并分布于整个机体。通常接受的是 25(OH)D 是代谢物,其是维生素 D 状态的最可靠的临床指示物,因为血清 25(OH)D 水平反映机体的维生素 D 储存水平并与维生素 D 缺乏的临床症状相关联。

[0006] 尽管维生素 D 的检测对健康管理价值,对于维生素 D 或其衍生物的检测的准确和灵敏的测定是有限的。对用于维生素 D 的成功测定的开发的一个障碍是在测试生物样品中将被牢固结合的 25-羟基维生素 D3 和 25-羟基维生素 D2 从其维生素 D 结合蛋白(DBP)分离的技术困难。DBP 是结合维生素 D 固醇、G-肌动蛋白、脂肪酸和趋化因子的血清糖蛋白。Swamy 等, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 402: 14-23 (2002)。在血浆中,25-羟基维生素 D3 和 25-羟基维生素 D2 具有两到三周的半衰期,并然而仅以少于 0.05% 游离形式存在。大部分结合于 DBP,具有络合亲和力高如 10^9 M^{-1} ,其涉及氢键键合以及疏水相互作用。

[0007] 开发用于维生素 D 的竞争结合免疫测定的另一个障碍是用于与生物样品中维生素 D 竞争抗体结合位点的维生素 D 类似物的不稳定性。在生物样品中或缓冲溶液中不存在 DBP 情况下的维生素 D 高度不稳定。

[0008] 因此存在准确检测和 / 或定量生物样品中存在的以游离形式或结合 DBP 的维生素 D 和维生素 D 衍生物的测定方法的需求。

[0009] 概要

本文提供抗原性分子,其可以用于产生能够结合维生素 D 衍生的分子的抗体。在一些

实施方案中,所述抗原性分子可以缀合到载体蛋白以形成抗原性化合物。对抗原性分子的载体蛋白缀合可以通过使用化学接头发。在一些实施方案中,抗原性蛋白可以引起抗体,例如单克隆抗体,其结合不同维生素 D 衍生物。很多所述的抗原性分子掺入维生素 D-C22 免疫原(图 1 (a))。更具体地,本文公开了缀合牛血清白蛋白(BSA)的维生素 D-C22 免疫原以产生维生素 D-C22 二氨基丁烷-辛二酰-BSA (维生素 D-C22 BSA) (图 1 (c))。可选地,维生素 D-C22 可以缀合到 KLH 以产生维生素 D-C22 二氨基丁烷-辛二酰-KLH (维生素 D-C22KLH) (图 1 (d))。本文提供的所述抗原性分子和抗原性化合物可以用于在哺乳动物例如小鼠中产生抗原反应性的抗体。依次,免疫接种的哺乳动物可以用作 B 细胞来源以产生克隆性杂交瘤细胞系,其产生抗原反应性单克隆抗体。

[0010] 本文还公开分离的抗体及其抗原结合片段,其可以结合维生素 D 衍生物,例如 25-羟基维生素 D2 和 / 或 25-羟基维生素 D3,或 25-羟基维生素 D 类似物,例如维生素 D-C22 免疫原性分子或化合物。在一些实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。在一些方面,所述抗体和抗原结合片段具有具有氨基酸序列 SEQ ID NO:10 的重链 CDR1,具有氨基酸序列 SEQ ID NO:11 的重链 CDR2,具有氨基酸序列 SEQ ID NO:12 的重链 CDR3,具有氨基酸序列 SEQ ID NO:26 的轻链 CDR1,具有氨基酸序列 SEQ ID NO:27 的轻链 CDR2,具有氨基酸序列 SEQ ID NO:28 的轻链 CDR3。该抗体通过本文所述单克隆抗体 10H9 举例说明。如将进一步所述,本文提供的抗体,虽然实际上是单克隆的,但具有优先结合多于一个抗原的能力。在此方面,本文提供的一些抗体可以以基本上不能区别的方式结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3。还提供了编码所述抗体和抗原结合片段的多核苷酸和用于繁殖和 / 或表达所述多核苷酸的载体。

[0011] 本文进一步提供用于检测受试者中维生素 D 缺乏的方法,通过确定衍生自受试者的生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平,其中生物样品中的水平相对正常对照中的水平或 30ng/mL 的阈值水平下降,指示受试者中维生素 D 缺乏。

[0012] 本文还提供用于治疗怀疑具有维生素 D 缺乏的受试者的方法,通过确定衍生自受试者的生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平,并且如果检测到生物样品中的水平相对正常对照中的水平或 30ng/mL 的阈值水平下降,则向受试者施用针对维生素 D 缺乏的治疗。

[0013] 本文还公开了用于在需要其的受试者中监测维生素 D 缺乏的进展、逆转或稳定化的方法,通过在第一时间确定衍生自受试者的第一生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平,并然后在晚于第一时间的第二时间确定衍生自受试者的第二生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平,其中在第一生物样品中的水平和第二生物样品中的水平之间下降,指示受试者中维生素 D 缺乏的进展或恶化,其中在第一生物样品中的水平和第二生物样品中的水平之间很少或无变化,指示受试者中维生素 D 缺乏的稳定化,并且其中在第一生物样品中的水平和第二生物样品中的水平之间上升,指示受试者中维生素 D 缺乏的逆转或改善。

[0014] 本文还提供了用于在需要其的受试者中监测维生素 D 缺乏的治疗的方法,通过在第一时间确定衍生自受试者的第一生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平,并然后在晚于第一时间的第二时间和在受试者针对所述维生素 D 缺乏的治疗之后确定衍生自受试者的第二生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平,其中第二生物样品中的水平相对第一生物样品中的水平增加或稳定化,指示在所述受试者中维生素 D 缺乏的治疗的效力,并且其中第二生物样品中的水平相对第一生物样品中的水平下降,指示在所述受试者中维生素 D 缺乏

的治疗的无效力。

[0015] 公开了用于稳定化 25-羟基维生素 D 类似物的方法,通过将 25-羟基维生素 D 类似物与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)接触。所述 ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐(hemimagnesium)或 ANS 铵盐)。

[0016] 本文还提供用于在受试者中检测维生素 D 缺乏的方法。用于在受试者中检测维生素 D 缺乏的方法涉及通过组合生物样品和置换缓冲液(displacement buffer)在衍生自受试者的生物样品中确定总 25-羟基维生素 D 的水平。在优选的实施方案中,置换缓冲液包含 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。置换缓冲液可以进一步包含乙二醇。在一些实施方案中,置换缓冲液包含 ANS 和甲醇。在一些实施方案中,置换缓冲液包含 ANS、乙二醇和甲醇。接着,缀合到第一标记物的抗体或抗原结合片段与测定混合物组合,所述抗体或抗原结合片段优先结合维生素 D 衍生物,例如 25-羟基维生素 D₂ 和 / 或 25-羟基维生素 D₃ 或 25-羟基维生素 D 类似物,例如维生素 D-C22 免疫原性分子或化合物。优先结合维生素 D 衍生物,例如 25-羟基维生素 D₂ 和 / 或 25-羟基维生素 D₃ 或 25-羟基维生素 D 类似物,例如维生素 D-C22 免疫原性分子或化合物的抗体或抗原结合片段,优选为如本文所述的抗体或抗原结合片段,例如包含如下序列的抗体或抗原结合片段:SEQ ID NO:26 的 Lc CDR1, SEQ ID NO:27 的 Lc CDR2,和 SEQ ID NO:28 的 Lc CDR3, SEQ ID NO:10 的 Hc CDR1, SEQ ID NO:11 的 Hc CDR2,和 SEQ ID NO:12 的 Hc CDR3。在优选的实施方案中,抗体是单克隆抗体 10H9。接着,具有第二标记物的 25-羟基维生素 D 类似物与测定混合物组合。25-羟基维生素 D 类似物可以存在于包含 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)的稳定化缓冲液中。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。在一些实施方案中,25-羟基维生素 D 类似物缀合到载体蛋白。缀合到识别第二标记物的抗体的固相支持物也与测定混合物组合。通过测量由第一标记物发射的信号确定生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平,其中生物样品中总 25-羟基维生素 D 水平相对正常对照或 30ng/mL 的阈值水平减少,指示受试者中维生素 D 缺乏。

[0017] 附图简述

图 1 描述维生素 D-C22 分子和抗原性化合物的化学结构。图 1 (a)描述未缀合的维生素 D-C22 分子。图 1 (b)提供一般维生素 D-C22 抗原性化合物的表示。图 1 (c)和 1 (d)显示特异性维生素 D-C22 抗原性化合物,其中维生素 D-C22 分子通过接头缀合到 BSA 或 KLH :D-C22 二氨基丁烷-辛二酰-BSA (图 1 (c))和 D-C22 二氨基丁烷-辛二酰-KLH (图 1 (d))。

[0018] 图 2 显示用于产生维生素 D-C22 (vit D-C22)酸的化学过程。

[0019] 图 3 描述用于转化维生素 D-C22 酸成维生素 D-DAB-辛二酰-NHS 或维生素 D-DAB-PEG5-NHS 的化学过程。

[0020] 图 4 阐释用于缀合维生素 D-C22、维生素 D-DAB-辛二酰-NHS 或维生素 D-DAB-PEG5-NHS 到蛋白载体的化学反应方案。

[0021] 图 5 显示用于产生维生素 D-DAB-PEG5-BSA-荧光素缀合物的两步反应。

[0022] 图 6 提供在存在或不存在 25-羟基维生素 D₂ 或 25-羟基维生素 D₃ 的情况下,维生素 D-C22 二氨基丁烷-辛二酰-KLH 和来自杂交瘤 10H9 上清的抗体间结合程度的图形表

示。

[0023] 图 7 是在存在或不存在 25-羟基维生素 D2 或 25-羟基维生素 D3 的情况下,维生素 D-C22 二氨基丁烷-辛二酰-碱性磷酸酶和纯化的 10H9 单克隆抗体间结合程度的图形表示。

[0024] 图 8 显示 ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定的图解。此图解仅用于阐释性目的并不应当被解释为以任何方式的限制。

[0025] 图 9 显示准确性概况,显示 ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定的检测(LoD)和功能性灵敏度(虚线)的限制。

[0026] 图 10 显示从 119 个捐赠者收集的在血清红顶(serum red top)和 SST 管中的维生素 D 总体水平之间的关联和功能性灵敏度。

[0027] 图 11 显示从 119 个捐赠者收集的在血清红顶(serum red top)和 SST 管中的维生素 D 总体水平之间的关联。

[0028] 图 12 显示 ADVIA Centaur 和可商购获得的维生素 D 总量测定的关联。

[0029] 图 13 显示 ADVIA Centaur 和 LC-MS/MS 维生素 D 总量测定的关联。

[0030] 图 14 提供 10H9 单克隆抗体重链可变区的注解描述。

[0031] 图 15 提供 10H9 单克隆抗体轻链可变区的注解描述。

[0032] 阐释性实施方案的详细描述

涉及描述的各方面的各种术语在整个说明书和权利要求中使用。这些术语将给出它们在本领域的通常意义,除非另有指示。其它具体定义的术语将以与本文提供的定义一致的方式来解释。

[0033] 如本说明书和所附权利要求所用,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数对象,除非所述内容另外清楚地规定。因此,例如,提到“一个细胞”包括两个或更多细胞的组合等。

[0034] 如本文所用术语“约”当指可测量的值,例如量、时间持续等,意味着包括从具体值至多 $\pm 20\%$ 的变异,因为这些变异适于进行所公开的方法。除非另有指示,本说明书和权利要求使用的表示成分的量、性质例如分子量、反应条件等的所有数字将被理解为在所有情况下被术语“约”修饰。因此,除非指示相反,下面的说明书和所附权利要求中提出的数字参数是近似值,其可以取决于本发明寻求获得的所希望的性质而变化。至少,并且不作为以限制权利要求范围等价物的教义的应用的尝试,每个数字参数应当至少考虑到报告的重要数字的数量和通过应用普通的舍入技术进行解释。

[0035] 尽管描述本发明的宽范围的数字范围和参数是近似值,但具体实施例中描述的数值仍尽可能精确地报告。但是,任何数字范围固有地包含由在它们各自测试测量中发现的标准偏差产生的某些必要误差。

[0036] “分离的”指从天然状态“通过人的手”改变。如果天然发生的分子或组合物,如果其已被改变或从其最初的环境移除或两者,则其已被“分离”。例如,在活的植物或动物中天然存在的多核苷酸或多肽不是“分离的”,但是分离自其天然状态的共存材料的同样的多核苷酸或多肽是“分离的”,如本文采用的术语。

[0037] “多核苷酸”同义地指“核酸分子”或“核酸”,指任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸,其可以是未修饰的 RNA 或 DNA 或修饰的 RNA 或 DNA。“多核苷酸”包括,无限制,单和双链 DNA、其是单和双链区域的混合物的 DNA、单和双链 RNA 和其是单和双链区域的混合物

的 RNA、包括其可以是单链或更典型地双链的或单和双链区域的混合物的 DNA 和 RNA 的杂交分子。另外，“多核苷酸”指包括 RNA 或 DNA 或 RNA 和 DNA 两者的三链区域。术语多核苷酸还包括包含一种或多种修饰的碱基的 DNA 或 RNA，以及具有为了稳定性或为了其它原因修饰的骨架的 DNA 或 RNA。“修饰的”碱基包括，例如三苯甲基化的碱基和不通常的碱基，如肌昔。可以对 DNA 和 RNA 进行各种修饰，因此，“多核苷酸”包括多核苷酸的如典型地天然发现的化学地、酶学地或代谢地修饰的形式，以及病毒和细胞的特征 DNA 和 RNA 的化学形式。“多核苷酸”还包括相对短的核酸链，经常指寡核苷酸。

[0038] 涉及核酸或氨基酸序列的“基本上相同”指在两种或更多序列间至少 65% 同一性。优选地，术语指两种或更多序列间至少 70% 同一性，更优选至少 75% 同一性，更优选至少 80% 同一性，更优选至少 85% 同一性，更优选至少 90% 同一性，更优选至少 91% 同一性，更优选至少 92% 同一性，更优选至少 93% 同一性，更优选至少 94% 同一性，更优选至少 95% 同一性，更优选至少 96% 同一性，更优选至少 97% 同一性，更优选至少 98% 同一性，更优选至少 99% 同一性或更高的同一性。该同一性可以使用 mBLAST 算法确定 (Altschul 等 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7)。

[0039] “载体”是复制子，例如质粒、噬菌体、粘粒，或病毒，其中另一个核酸区段可以是可操作地插入以便使区段的复制或表达发生。

[0040] 术语“可操作地连接”或“可操作地插入”指对于编码序列的表达必需的调节序列以相对编码序列适当的位置置于核酸分子，以便使编码序列能够表达。通过实例的方式，当启动子可操作地与编码序列连接时，启动子能够控制该编码序列的转录或表达。编码序列可以以有义或反义方向可操作地连接到启动子或调节序列。术语“可操作地连接”有时应用于表达载体中其它转录控制元件 (例如增强子) 的排列。

[0041] 当外源或异源核酸例如 DNA 以被导入细胞时，细胞被“转化”。转化 DNA 可以是或可以不是整合 (共价连接) 入细胞的基因组。例如在原核生物、酵母和哺乳动物细胞中，转化 DNA 可以是维持在游离元件例如质粒上。涉及真核细胞，稳定转染的细胞或“稳定细胞”通过真核细胞建立包括一群包含转化 DNA 的子细胞的细胞系或克隆的能力证明。“克隆”是通过有丝分裂衍生自单个细胞或共同祖先的一群细胞。“细胞系”是原代细胞的克隆，其能够在体外稳定生长很多代。在本文提供的一些实例中，通过用 DNA 转染细胞，细胞被转化。

[0042] “多肽”指包括两种或更多通过肽键或修饰的肽键彼此相连的氨基酸的任何肽或蛋白，即肽等排物。“多肽”既指短链，通常称为肽、寡肽或寡聚体，也指长链，通常称为蛋白。多肽可以包含除了 20 个基因编码氨基酸之外的氨基酸。“多肽”包括通过天然过程，例如翻译后处理，或通过本领域熟知的化学修饰技术修饰的氨基酸序列。这些修饰在基础文本、专著和研究文献中很好地描述。修饰可以发生在多肽的任何地方，包括多肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。在给定的多肽中可以在多个位点以相同或可变程度存在相同类型的修饰。并且，给定多肽可以包含很多类型的修饰。多肽可以作为泛素化的结果是分支的，并且它们可以是环状的，具有或不具有分支。环状的、分支的或分支环状多肽可以由天然翻译后修饰过程产生，或可以通过合成方法制造。修饰包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价附着、血红素部分的共价附着、核苷酸或核苷酸衍生物的共价附着、脂质或脂质衍生物的共价附着、磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol) 的共价附着、交联、环化、二

硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸形成、甲酰化、 γ -羧基化、糖基化、GPI 锚定形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解处理、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒酰化(selenoylation)、硫酸化、转运 RNA 介导的氨基酸加入蛋白质,例如精氨酸化(arginylation),和泛素化(参见,例如 *Proteins - Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., T.E.Creighton, W.H.Freeman and Company, New York, 1993 和 *Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, pgs. 1-12 in *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter 等, *Analysis for Protein Modifications and Nonprotein Cofactors*, *Meth Enzymol* (1990) 182:626-646 和 Rattan 等, *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, *Ann NY Acad Sci* (1992) 663:48-62)。

[0043] “生物分子”包括蛋白、多肽、核酸、脂质、单糖、多糖及其所有的片段、类似物、同源物、缀合物和衍生物。

[0044] 术语“表达”和“产生”本文中同义地使用,并且指基因产物的生物合成。这些术语包括基因转录成 RNA。这些术语还包括 RNA 翻译成一种或多种多肽,并进一步包括所有天然发生的转录后和翻译后修饰。抗体或其抗原结合片段的表达或产生可以在细胞的细胞质内,或进入细胞外环境例如细胞培养物的生长培养基。

[0045] “抗体”指免疫球蛋白(IgG、IgA、IgE、IgM、IgD 和 IgY)的同种型,包括每种同种型的各种单体或聚合形式,除非另有说明。

[0046] 抗原结合片段是任何蛋白的结构,其可以显示对于特定抗原的结合亲和力。一些抗原结合片段由完整抗体的部分构成,其保持亲本抗体分子的抗原结合特异性。例如,抗原结合片段可以包含至少一个可变区(重链或轻链可变区)或已知结合特定抗原的抗体的一个或多个 CDR。合适的抗原结合片段的实例包括,但不限于双抗体和单链分子,以及 Fab、F(ab')₂、Fc、Fabc 和 Fv 分子,单链(Sc)抗体,单独的抗体轻链,单独的抗体重链,抗体的链或 CDR 和其他蛋白质,蛋白质支架,或分子之间的嵌合融合,重链单体或二聚体,轻链单体或二聚体,由一重和一轻链组成的二聚体等。所有的抗体同种型可以用于产生抗原结合片段。另外,抗原结合片段可以包括非抗体蛋白的框架(其可以成功地以对给定目的抗原赋予亲和力的方向掺入多肽区段),例如蛋白质支架。抗原结合片段可以重组产生或通过完整抗体的酶促或化学切割产生。短语“抗体或其抗原结合片段”可以用于指示给定的抗原结合片段掺入短语中提及的抗体的一个或多个氨基酸区段。

[0047] “抗体组合物”指如本文所述偶联至少一种药学可接受的载体、化学治疗剂或诊断部分的抗体或其抗原结合片段。

[0048] “特异性结合”指抗体或抗原结合片段以大于其可以结合其它生物分子的亲和力的亲和力结合特定生物分子的能力。此术语与“优先”结合同义地使用,指相互作用的组分相对大部分,但不是所有其它该相互作用,有利于特定结合相互作用。

[0049] 本文所述的实施方案不限于特定方法、试剂、化合物、组合物或生物系统,其当然可以变化。并且,本文所用的术语学目的仅在于描述特定抗体或抗原结合片段,并且意图不是限制性的。

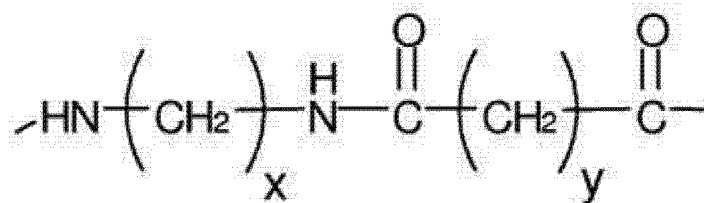
[0050] 抗原性分子和抗原性化合物

本文提供抗原性分子,其可以用于产生能够结合维生素 D 衍生的分子的抗体。在一些实施方案中,所述抗原性分子可以缀合到载体蛋白以形成抗原性化合物。对抗原性分子的载体蛋白缀合可以通过使用化学接头发生。在一些实施方案中,抗原性蛋白可以引起同等地结合不同维生素 D 衍生物的抗体。

[0051] 本文所述的抗原性分子基于维生素 D22 碳衍生物(维生素 D-C22)的使用,当非缀合时,其包括 C22 羧基基团,如在图 1(a)中所述(Hollis 等, Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993))。基于此化合物的抗原性分子保留 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 的共同部分,因为这些分子仅通过其侧臂结构不同,所述侧臂在维生素 D-C22 分子中不存在。由于维生素 D-C22、25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 间结构共同性,使用基于维生素 D-C22 的抗原产生的抗体可以能够识别 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 两者。

[0052] 本文公开的抗原性分子可以与载体蛋白组合以产生抗原性化合物。载体蛋白的使用可以用于增强抗原性分子在哺乳动物中引发免疫应答的能力。例如,载体蛋白可以允许在宿主内更长的半衰期或允许多个抗原性分子附着到相同载体,从而产生多价抗原性化合物。在一些实施方案中,所述抗原性分子可以直接附加到蛋白载体。例如,维生素 D-C22 可以直接缀合到牛血清白蛋白(BSA)。在一些实施方案中,多个抗原性分子可以缀合到相同载体蛋白以产生多价抗原性化合物。可以缀合到给定蛋白载体的抗原性分子的数目将基于所使用的载体而变化。例如,BSA 将容纳相对中等数目的抗原性分子,可能约 10 到约 25;可选地,载体例如钥孔戚血蓝蛋白(KLH)可以容纳约 200 到 300 个抗原性分子。在一个实施方案中,维生素 D-C22 缀合到 BSA,使得约 7 到约 21 个抗原性分子缀合到载体。在一个实施方案中,维生素 D-C22 缀合到 BSA,使得约 12 到约 16 个抗原性分子缀合到载体。在另一个该实施方案中,约 14 个维生素 D-C22 分子缀合到 BSA 载体。本领域技术人员将理解多种多样的载体蛋白可以用于本文所述的目的。举几个例子,一些合适的载体包括 KLH、PEG 化的 KLH、Concholepas concholepas 血蓝蛋白(CCH)、阳离子化的 BSA 和卵清蛋白。在一些实施方案中,抗原性分子经由载体蛋白上存在的氨基缀合到载体蛋白。此类缀合化学对于本领域技术人员是公知的。

[0053] 本文所述抗原性化合物的另一方面可以是化学接头,其允许所述抗原性分子间接缀合到所述载体蛋白。化学接头可以由烷基、芳基、烷氧基、酰胺、磺酰胺或羰基或肽基团组成。维生素 D 衍生物到蛋白的缀合可以通过蛋白的氨基基团和维生素 d 衍生物的反应性的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯(NHS 酯)之间的反应实现。接头的长度可以取决于所用的载体和缀合到载体的抗原性分子的数目变化。然而在其它实施方案中,相同的抗原分子可以使用相同的接头以缀合各种载体蛋白,例如 BSA 或 KLH。在一些实施方案中,接头由具有下式的线性链组成



其中 x 和 y 可以独立地从约 1 到约 12 变化。这提供具有图 1 (b) 中描述的式的一般

抗原性化合物。在一些实施方案中, x 可以是 3 并且 y 可以是 6。在一些实施方案中, x 可以是 3 并且 y 可以是 7。在一些实施方案中, x 可以是 4 并且 y 可以是 7。在一些实施方案中, x 可以是 5 并且 y 可以是 7。在一些实施方案中, x 可以是 4 并且 y 可以是 6。在一些实施方案中, x 可以是 5 并且 y 可以是 6。在一些实施方案中, x 可以是 3 并且 y 可以是 5。在一些实施方案中, x 可以是 4 并且 y 可以是 5。在一些实施方案中, x 可以是 5 并且 y 可以是 5。在一些实施方案中, x 可以是 3 并且 y 可以是 4。在一些实施方案中, x 可以是 4 并且 y 可以是 4。在一些实施方案中, x 可以是 5 并且 y 可以是 4。在一些实施方案中, 接头用于缀合维生素 D-C22 和 BSA 以产生维生素 D-C22 二氨基丁烷 - 辛二酰 -BSA (维生素 D-C22 BSA) (图 1 (c))。在另一个实施方案中, 接头用于缀合维生素 D-C22 和 KLH 以产生维生素 D-C22 二氨基丁烷 - 辛二酰 -KLH (维生素 D-C22 KLH) (图 1 (d))。

[0054] 本文提供的抗原性分子和抗原性化合物可以用于在哺乳动物中产生抗原反应性的抗体。可用于产生抗体的哺乳动物包括小鼠、大鼠、羊、马、猪、牛、兔、驴、人等。在一个实施方案中, 哺乳动物为小鼠。具有抗原阳性血清的哺乳动物可以用作抗体产生 B 细胞的来源, 其可以被分离并用于产生长寿命的抗体产生细胞, 例如杂交瘤细胞。在一些实施方案中, 从免疫接种的小鼠中分离的 B 细胞可以用于产生杂交瘤细胞, 其产生结合维生素 D-C22 或维生素 D 衍生物的抗体。

[0055] 抗体

本文描述了分离的抗体或抗原结合片段, 其优先结合维生素 D 衍生物, 例如 25-羟基维生素 D2 和 / 或 25-羟基维生素 D3, 或 25-羟基维生素 D 类似物, 例如维生素 D-C22 免疫原性分子或化合物。在一个实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体或抗原结合片段。

[0056] 有五类免疫球蛋白, 其中在 Fc 区的重链的一级结构确定免疫球蛋白类别。具体地, α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 链分别对应 IgA, IgD 型, IgE 抗体, IgG 和 IgM 同种型。所述抗体或抗原结合片段包括四-链免疫球蛋白结构的所有同种型和合成多聚体。所述抗体或抗原结合片段还包括通常在鸡或火鸡血清和鸡或火鸡卵黄里发现的 IgY 同种型。抗体或抗原结合片段非共价地优先并且可逆地结合抗原。

[0057] 所公开的主题物质的抗体或抗原结合片段可以衍生自任何物种。例如抗体或抗原结合片段可以衍生自小鼠、大鼠、羊、马、猪、牛、兔、驴、人等。在一个实施方案中, 抗体或抗原结合片段衍生自小鼠。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段衍生自用本文所述的免疫原性化合物免疫接种的小鼠。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段衍生自用维生素 D-C22 BSA 免疫接种的小鼠。在一些实施方案中, 抗体是单克隆抗体, 使用本文所述的免疫原性分子或化合物产生。所述单克隆抗体可以衍生自用本文所述的免疫原性分子或化合物的任一种或更多免疫接种的小鼠。例如, 能够优先结合维生素 D 衍生物, 例如 25-羟基维生素 D2 和 / 或 25-羟基维生素 D3, 或 25-羟基维生素 D 类似物, 例如维生素 D-C22 免疫原性分子或化合物的单克隆抗体, 或其抗原结合片段, 可以衍生自用维生素 D-C22 免疫原性分子或化合物免疫接种的小鼠。

[0058] 在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段可以是嵌合的。如本文所用, 术语“嵌合的”抗体, 或抗原结合片段, 指抗体或其抗原结合片段, 具有衍生自非人哺乳动物、啮齿动物或爬行动物的抗体氨基酸序列的至少一个可变结构域的至少一些部分, 而抗体或其抗原结

合片段的剩余部分衍生自人。例如，嵌合抗体可以包含小鼠抗原结合结构域和人 Fc 或其它该结构性结构域。

[0059] 在一些实施方案中，所述抗体可以是人源化的。例如，人抗体的 CDR 可以用本文所述重和轻链 CDR 替换，以产生抗体或其抗原结合片段，其与本文所述的抗体同样的相同或基本上类似的结合特征，但由人恒定和框架区组成。用于产生这些抗体的方法是本领域技术人员公知的，并且因此应当被认为在本公开的范围之内。

[0060] 本文所述抗体或抗原结合片段可以被标记或另外缀合各种化学或生物分子部分，例如用于诊断应用。所述部分可以是可检测的标记物，例如，化学发光标记物（例如，吖啶酯和磺胺类、鲁米诺和异鲁米诺）、磷光标记物、荧光标记物（例如，FITC）、电化学发光标记物（例如，钆(II)螯合物）、克隆的酶供体、用于单线态氧分子能量传递发光免疫测定技术（luminescent oxygen channeling immunoassay, LOCI）的光敏剂颗粒或化学发光剂颗粒、镧系元素螯合物时间分辨荧光免疫测定（TR-FIA）、放射性标记物、生物素、地高辛、酶制剂等，例如，放射性核素，例如但不限于，氟-14、铅-212、铋-212、碲-211、碘-131、钷-47、镱-186、镱-188、钇-90、碘-123、碘-124、碘-125、溴-77、铟-111、和可裂变核素，如钷-10或锶系元素。在一些实施方案中，酶可以缀合到所述抗体或抗原结合蛋白，用于检测样品中结合的抗体的目的。这些酶缀合物包括，但不限于碱性磷酸酶（AP）、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G6PDH）。在基于溶液的免疫测定中其它用于确定抗体结合的酶将被本领域技术人员理解为适合用作缀合物用于本文所述抗体和抗原结合片段。另外，化合物例如吖啶酯也可以缀合到所提供的抗体和抗原结合片段，以允许在免疫测定中检测。

[0061] 抗体结合主要通过六个 CDR 区确定，尤其是 H 链 CDR3（Kala 等，132 J. Biochem. 535-41 (2002)；Morea 等，275 J. Mol. Biol. 269-94 (1998)；和 Chothia 等，196 J. Mol. Biol. 901-17 (1987)）。然而，抗体框架区可以在抗原-抗体相互作用中发挥作用（Panka 等，85 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 3080-4 (1988)），具体是影响 CDR 环的构象（Foote 等，224 J. Mol. Biol. 487-99 (1992)）。因此，所述抗体或抗原结合片段可以包含任何 H 或 L 链 CDR 或 FWR 区的组合，其赋予对 25-羟基维生素 D2 和 / 或 25-羟基维生素 D3 或基于维生素 D2-C22 的免疫原的优先结合。结构域改组实验，其在本领域中常规进行（Jirholt 等，215 Gene 471-6 (1998)；Söderlind et al., 18 Nature Biotechnology 852-6 (2000)），可以采用以产生根据说明书本文所述和示例的优先结合 25-羟基维生素 D2 和 / 或 25-羟基维生素 D3 或基于维生素 D2-C22 的免疫原的抗体。通过这些结构域改组实验产生的抗体或抗原结合片段在本文所述的抗体或抗原结合片段的范围内。并且，通过改造抗体样蛋白以充当 CDR 支架，CDR 还可以被排列以结合给定的抗原（Nicaise 等，13 Protein Sci. 1882 (2004)）。这些抗原结合蛋白在本文所述抗体的范围内。

[0062] 本文所述的抗体或抗原结合片段可以以各种形式发生，但是将包括表 1 中显示的抗体区段的一个或多个。

[0063] 表 1 所述抗体和其抗原结合片段的抗体区段（“Lc”指示轻链并且“Hc”指示重链）。

10H9 抗体区段	氨基酸 SEQ ID NO.	DNA SEQ ID NO.
Lc CDR1	26	18
Lc CDR2	27	19
Lc CDR3	28	20
Lc FWR1	29	21
Lc FWR2	30	22
Lc FWR3	31	23
Lc FWR4	25	17
Lc 可变结构域	32	24
Hc CDR1	10	2
Hc CDR2	11	3
Hc CDR3	12	4
Hc FWR1	13	5
Hc FWR2	14	6
Hc FWR3	15	7
Hc FWR4	9	1
Hc 可变结构域	16	8

[0064] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括重链 CDR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :10。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括重链 CDR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :11。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括重链 CDR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :12。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括轻链 CDR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :26。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括轻链 CDR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :27。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括轻链 CDR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :28。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括重链 CDR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :10 ;CDR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :11 ;和 CDR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :12。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括轻链 CDR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :26 ;CDR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :27 ;和 CDR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :28。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括重链和轻链,其中重链具有 CDR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :10 ;CDR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :11 ;和 CDR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :12 ;并且轻链具有 CDR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :26 ;CDR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :27 ;和

CDR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :28。CDR 的抗原结合排列还可以使用抗体样蛋白作为 CDR 支架进行改造。这些改造的抗原结合蛋白在本公开的范围內。

[0065] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括重链 FWR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :13。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括重链 FWR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :14。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括重链 FWR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :15。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括轻链 FWR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :29。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括轻链 FWR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :30。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括轻链 FWR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :31。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括重链具有 FWR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :13 ;FWR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :14 ;和 FWR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :15。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括轻链具有 FWR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :29 ;FWR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :30 ;和 FWR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :31。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括重链和轻链,其中重链包括 FWR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :13 ;FWR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :14 ;和 FWR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :15 ;并且轻链包括 FWR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :29 ;FWR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :30 ;和 FWR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :31。

[0066] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括重链具有 CDR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :10 ;CDR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :11 ;和 CDR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :12 ;FWR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :13 ;FWR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :14 ;和 FWR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :15。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段包括轻链具有 CDR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :26 ;CDR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :27 ;和 CDR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :28 ;FWR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :29 ;FWR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :30 ;和 FWR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :31。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段包括重链和轻链,其中重链包括 CDR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :10 ;CDR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :11 ;和 CDR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :12 ;FWR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :13 ;FWR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :14 ;和 FWR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :15 ;并且轻链包括 CDR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :26 ;CDR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :27 ;和 CDR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :28 ;FWR1 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :29 ;FWR2 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :30 ;和 FWR3 氨基酸序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO :31。CDR 和 FWR 的抗原结合排列还可以使用抗体样蛋白作为 CDR 支架进行改造。这些改造的抗原结合蛋白

在本公开的范围內。

[0067] 在一些实施方案中,本文所述抗体或抗原结合片段具有鼠重链。在一些实施方案中,本文所述抗体或抗原结合片段具有鼠轻链。所述抗体或抗原结合片段抗原具有重和轻链,其中重链是鼠重链并且轻链是鼠轻链。在一些实施方案中,本文所述抗体或抗原结合片段具有鼠 IgG1 轻链。在一些实施方案中,本文所述抗体或抗原结合片段具有鼠 Ig κ 轻链。所述抗体或抗原结合片段可以具有重和轻链,其中重链是鼠 IgG1 重链并且轻链是鼠 Ig κ 链。

[0068] 编码抗体的多核苷酸

还描述了编码抗体或抗原结合片段的多核苷酸,所述抗体或抗原结合片段优先结合维生素 D 衍生物,例如 25-羟基维生素 D2 和 / 或 25-羟基维生素 D3,或 25-羟基维生素 D 类似物,例如维生素 D-C22 免疫原性分子或化合物。所述多核苷酸可以以多种形式发生,并且从而可以是天然多核苷酸、重组多核苷酸(例如 cDNA)或合成产生的多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有重链 CDR1 序列,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:10,例如 SEQ ID NO:2。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有重链 CDR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:11,例如 SEQ ID NO:3。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有重链 CDR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:12,例如 SEQ ID NO:4。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有轻链 CDR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:26,例如 SEQ ID NO:18。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有轻链 CDR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:27,例如 SEQ ID NO:19。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有轻链 CDR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:28,例如 SEQ ID NO:20。多核苷酸可以编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有重链 CDR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:10,例如 SEQ ID NO:2 ;CDR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:11,例如 SEQ ID NO:3 ;和 CDR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:12,例如 SEQ ID NO:4。多核苷酸可以编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有轻链 CDR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:26,例如 SEQ ID NO:18 ;CDR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:27,例如 SEQ ID NO:19 ;和 CDR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:28,例如 SEQ ID NO:20。多核苷酸可以编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有重链 CDR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:10,例如 SEQ ID NO:2 ;由核苷酸序列编码的 CDR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:11,例如 SEQ ID NO:3 ;和由核苷酸序列编码的 CDR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:12,例如 SEQ ID NO:4 ;和轻链 CDR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:26,例如 SEQ ID NO:18 ;CDR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:27,例如 SEQ ID NO:19 ;和 CDR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:28,例如 SEQ ID NO:20。

[0069] 在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有重链 FWR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:13,例如 SEQ ID NO:5。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有重链 FWR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:14,例如 SEQ ID NO:6。在一些实施方案中,多核

核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有重链 FWR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:15,例如 SEQ ID NO:7。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有轻链 FWR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:29,例如 SEQ ID NO:21。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有轻链 FWR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:30,例如 SEQ ID NO:22。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有轻链 FWR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:31,例如 SEQ ID NO:23。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有重链 FWR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:13,例如 SEQ ID NO:5;FWR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:14,例如 SEQ ID NO:6;和 FWR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:15,例如 SEQ ID NO:7。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有轻链 FWR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:29,例如 SEQ ID NO:21;FWR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:30,例如 SEQ ID NO:22;和 FWR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:31,例如 SEQ ID NO:23。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有重链和轻链,其中重链 FWR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:13,例如 SEQ ID NO:5;重链 FWR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:14,例如 SEQ ID NO:6;和重链 FWR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:15,例如 SEQ ID NO:7;和轻链 FWR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:29,例如 SEQ ID NO:21;轻链 FWR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:30,例如 SEQ ID NO:22;和轻链 FWR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:31,例如 SEQ ID NO:23。

[0070] 在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有重链 CDR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:10,例如 SEQ ID NO:2;重链 CDR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:11,例如 SEQ ID NO:3;和重链 CDR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:12,例如 SEQ ID NO:4;重链 FWR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:13,例如 SEQ ID NO:5;重链 FWR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:14,例如 SEQ ID NO:6;和重链 FWR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:15,例如 SEQ ID NO:7。在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有轻链 CDR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:26,例如 SEQ ID NO:18;轻链 CDR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:27,例如 SEQ ID NO:19;和轻链 CDR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:28,例如 SEQ ID NO:20;轻链 FWR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:29,例如 SEQ ID NO:21;轻链 FWR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:30,例如 SEQ ID NO:22;和轻链 FWR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:31,例如 SEQ ID NO:23。

[0071] 在一些实施方案中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段具有重链和轻链,其中所述多核苷酸编码重链 CDR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:10,例如 SEQ ID NO:2;重链 CDR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:11,例如 SEQ ID NO:3;重链 CDR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:12,例如 SEQ ID NO:4;重链 FWR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:13,例如 SEQ ID NO:5;重链 FWR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:14,例如 SEQ ID NO:6;和重链 FWR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:15,例如 SEQ ID NO:7;和轻链 CDR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:26,例如 SEQ ID NO:18;

轻链 CDR2,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:27,例如 SEQ ID NO:19;轻链 CDR3,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:28,例如 SEQ ID NO:20;轻链 FWR1,其基本上相同或同一于 SEQ ID NO:29,例如 SEQ ID NO:21;轻链 FWR2,其基本上相同或等同于 SEQ ID NO:30,例如 SEQ ID NO:22;和轻链 FWR3,其基本上相同或等同于 SEQ ID NO:31,例如 SEQ ID NO:23。

[0072] 编码这些改造的抗原结合蛋白的多核苷酸也在本公开的范围內。

[0073] 在一些实施方案中,所述多核苷酸(和它们编码的肽)包括前导序列。任何本领域已知的前导序列都可以采用。在一些实施方案中,前导序列可以是或基于抗体的重或轻链前导序列。前导序列可以包括但不限于限制性位点或翻译起始位点。

[0074] 由于在重和轻链以及编码它们的基因中可能存在的天然序列变异,在编码本文所述抗体或抗原结合片段的氨基酸序列或基因中将预期发现一些水平的变异,对它们独特的结合性质(例如,特异性和亲和力)有很小或无影响。该预期是部分由于遗传密码的退化,以及保守氨基酸序列变异的进化成功,其不会相当地改变所编码蛋白的本质。因此,一些实施方案包括与本文的抗体或抗原结合片段具有 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同源性的抗体或抗原结合片段。其它实施方案包括优先结合维生素 D 衍生物,例如 25-羟基维生素 D2 和 / 或 25-羟基维生素 D3,或 25-羟基维生素 D 类似物,例如维生素 D-C22 免疫原性分子或化合物的抗体,或这些抗体的抗原结合片段,其具有框架、支架或其它非结合区,其与本文所述抗体和抗原结合片段不共享显著的同源性,但是掺入与这些本文所述序列 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同源的赋予结合所需的一个或多个 CDR 或其它序列。

[0075] 本文所述的抗体或抗原结合片段包括具有单个或多个氨基酸取代、缺失或添加的变体,其保留所述抗体或抗原结合片段的生物学性质(例如,亲和力或结合偏好)。本领域技术人员可以产生具有单个或多个氨基酸取代、缺失或添加的变体。这些变体可以包括:(a) 其中一个或多个氨基酸残基被用保守或非保守氨基酸取代的变体,(b) 其中一个或多个氨基酸被添加到变体或从多肽缺失的变体,(c) 其中一个或多个氨基酸包括取代基的变体,和 (d) 其中多肽与另一个肽或多肽例如融合配偶体(partner)、蛋白标签或其它化学部分融合的变体,所述融合可以赋予多肽有用的性质,例如,诸如,抗体表位、多聚组氨酸序列、生物素部分等。本文所述抗体或抗原结合片段可以包括变体,其中在保守或非保守的位置来自一种物种的氨基酸残基被取代为在另一物种中相应的残基。在其它实施方案中,非保守位置的氨基酸残基用保守或非保守残基取代。用于获得这些变体的技术包括基因(抑制、缺失、突变等)化学和酶学技术是本领域普通技术人员已知的。

[0076] 本文所述抗体或抗原结合片段可以具体化为多个抗体同种型,例如 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。抗体或其抗原结合片段特异性很大程度上被 CDR 的氨基酸序列和排列所确定。因此,一种同种型的 CDR 可以转移到另一种同种型而不改变抗原特异性。可选地,已经建立了导致杂交瘤从产生一种抗体同种型转换到另一种(同种型转换)而不改变抗原特异性的技术。因此,这些抗体同种型在所述抗体或抗原结合片段的范围内。

[0077] 本文所述抗体或抗原结合片段对维生素 D 衍生物,例如 25-羟基维生素 D2 和 / 或 25-羟基维生素 D3,或 25-羟基维生素 D 类似物,例如维生素 D-C22 免疫原性分子或化合物具有结合亲和性(以 M),其包括少于 1×10^{-2} 的解离常数 (K_D)。在一些实施方案中, K_D 少于 1×10^{-3} 。在其它实施方案中, K_D 少于 1×10^{-4} 。在一些实施方案中, K_D 少于 1×10^{-5} 。在另外其它实施方案中, K_D 少于 1×10^{-6} 、 2×10^{-6} 、 3×10^{-6} 、 4×10^{-6} 、 5×10^{-6} 、 6×10^{-6} 、

7×10^{-6} 、 8×10^{-6} 或 9×10^{-6} 。在其它实施方案中, K_D 少于 1×10^{-7} 、 2×10^{-7} 、或 3×10^{-7} 、 2×10^{-7} 、 3×10^{-7} 、 4×10^{-7} 、 5×10^{-7} 、 6×10^{-7} 、 7×10^{-6} 、 8×10^{-6} 或 9×10^{-7} 。在其它实施方案中, K_D 少于 1×10^{-8} 、 2×10^{-8} 、 3×10^{-8} 、 4×10^{-8} 、 5×10^{-8} 、 6×10^{-8} 、 7×10^{-8} 、 8×10^{-8} 或 9×10^{-8} 。在其它实施方案中, K_D 少于 1×10^{-9} 、 2×10^{-9} 、 3×10^{-9} 、 4×10^{-9} 、 5×10^{-9} 、 6×10^{-9} 、 7×10^{-9} 、 8×10^{-9} 或 9×10^{-9} 。在其它实施方案中, K_D 少于 1×10^{-10} 、 2×10^{-10} 、 3×10^{-10} 、 2×10^{-10} 、 3×10^{-10} 、 4×10^{-10} 、 5×10^{-10} 、 6×10^{-10} 、 7×10^{-10} 、 8×10^{-10} 或 9×10^{-10} 。在另外其它实施方案中, K_D 少于 1×10^{-11} 、 2×10^{-11} 、 3×10^{-11} 、 4×10^{-11} 、 5×10^{-11} 、 6×10^{-11} 、 7×10^{-11} 、 8×10^{-11} 或 9×10^{-11} 。在一些实施方案中, K_D 少于 1×10^{-12} 。在其它实施方案中, K_D 少于 1×10^{-13} 。在其它实施方案中, K_D 少于 1×10^{-14} 。在另外的其它实施方案中, K_D 少于 1×10^{-15} 。

[0078] 本文所述抗体或抗原结合片段在一些实施方案中, 具有对 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 的等摩尔识别。

[0079] 本文所述的抗体或抗原结合片段可以是修饰的, 例如通过任何类型的分子对抗体或其抗原结合片段的共价附着, 使得共价附着不阻止抗体或其抗原结合片段结合其表位。合适的修饰的实例包括但不限于糖基化、酰基化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化等。在一些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段可以自身是衍生的, 通过已知保护 / 封闭基团、蛋白水解切割、与细胞配体或其它蛋白的连接等。抗体或抗原结合片段可以具有翻译后部分, 其改善抗体或其抗原结合片段的活性或稳定性。这些部分包括硫、甲基、碳水化合物、磷以及免疫球蛋白分子上常见的其它化学基团。并且, 抗体或抗原结合片段可以包含一种或多种非经典氨基酸。

[0080] 本文所述的抗体或抗原结合片段可以用诊断标记物标记或缀合。

[0081] 还提供的是包含本文所述多核苷酸的载体。所述载体可以是表达载体。从而提供包含编码目的多肽的序列的重组表达载体。所述表达载体可以包含一种或多种额外序列, 例如但不限于调节序列(例如, 启动子、增强子)、选择标志物和多聚腺苷酸信号。在一些实施方案中, 所述载体可以编码本文所述抗体或抗原结合蛋白的重链区段。在一些实施方案中, 所述载体可以编码本文所述抗体或抗原结合蛋白的轻链区段。在一些实施方案中, 所述重和轻链组分可以由单个载体编码。在其它实施方案中, 所述重和轻链组分可以由不同载体编码。用于转化各种各样宿主细胞的载体是众所周知的并且包括但不限于质粒、噬菌粒、粘粒、杆状病毒、杆粒、细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC) 以及其它细菌、酵母和病毒载体。

[0082] 本说明书范围内的重组表达载体包括合成的、基因组的或 cDNA 衍生的核酸片段, 其编码至少一种重组蛋白, 其可以可操作地连接到合适的调节元件。这些调节元件可以包括转录启动子、编码合适的 mRNA 核糖体结合位点的序列和控制转录和翻译终止的序列。表达载体, 尤其是哺乳动物表达载体, 还可以包括一种或多种非转录元件, 例如复制起始点、连接到要被表达的基因的合适的启动子和增强子, 其它 5' 或 3' 侧翼非转录序列、5' 或 3' 非翻译序列(例如必需的核糖体结合位点)、多聚腺苷化位点、剪切供体和受体位点, 或转录终止序列。也可以掺入赋予在宿主中复制能力的复制起始点。

[0083] 转化脊椎动物细胞中使用的表达载体中的转录和翻译控制序列可以由病毒来源提供。示例性载体可以如 Okayama 和 Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983) 所述的构

建。

[0084] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段编码序列置于强力组成型启动子的控制下,例如用于下列基因的启动子:次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)、腺苷脱氨酶、丙酮酸激酶、 β -肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸及其他。另外,很多病毒启动子在真核细胞中组成性地发挥功能,并且适合用于所述实施方案。这些病毒启动子包括而不仅限于,巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、SV40的早期和晚期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、马洛尼白血病病毒长末端重复序列(LTR)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、埃巴病毒(EBV)、劳氏肉瘤病毒(RSV)以及其他逆转录病毒,和单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子。在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段编码序列置于可诱导的启动子的控制下,例如金属硫蛋白启动子、四环素诱导型启动子、多西环素诱导型启动子、包含一种或多种干扰素刺激反应元件(ISRE)如蛋白激酶R 2',5'-寡聚腺苷酸合成酶,Mx基因,ADAR1的启动子等。

[0085] 本文所述载体可以包含一种或多种内部核糖体进入位点(IRES)。在融合载体中包含IRES序列对增强一些蛋白的表达可以是有益的。在一些实施方案中,载体系统将包括一个或多个多聚腺苷酸位点(例如,SV40),其可以在任何上述核酸序列的上游或下游。载体组成可以是连续连接,或以提供对于表达基因产物(即通过在ORF间引入“间隔区”核苷酸)最佳的间隔的方式排列,或以另一种方法放置。调节元件,例如IRES基序,还可以排列以为表达提供最佳的间隔。

[0086] 载体可以包含选择标志物,其是本领域熟知的。选择标志物包括阳性和阴性选择标志物,例如,抗生素抗性基因(例如,新霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因、四环素抗性基因、青霉素抗性基因)、谷氨酰胺合成酶基因、HSV-TK、用于更昔洛韦选择的HSV-TK衍生物,或用于6-甲基嘌呤选择的细菌的嘌呤核苷磷酸化酶基因(Gadi等, 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000))。编码选择标志物或克隆位点的核酸序列可以是在编码目的多肽或克隆位点的核酸序列的上游或下游。

[0087] 本文所述载体可以用于用编码所述抗体或抗原结合片段的基因转化多种细胞。例如,载体可以用于生成产生抗体或抗原结合片段的细胞。因此,另一方面特征在于用包含编码抗体或其抗原结合片段的核酸序列的载体转化的宿主细胞,所述抗体或其抗原结合片段例如本文所述和示例的抗体或抗原结合片段,结合维生素D衍生物,例如25-羟基维生素D2和/或25-羟基维生素D3,或25-羟基维生素D类似物,例如维生素D-C22免疫原性分子或化合物。

[0088] 根据本文所述和示例的各种实施方案,本领域已知很多技术用于将外源基因引入细胞,并可以用于构建重组细胞,以用于进行所述方法的目的。所使用的技术应当提供异源基因序列到宿主细胞的稳定转移,使得异源基因序列可以遗传并被细胞后代表达,并且从而受体细胞的必需的发育和生理功能没有被破坏。可以使用的技术包括但不限于染色体转移(例如细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞介导的基因转移)、物理方法(例如,转染、原生质体融合、微注射、电穿孔、脂质体载体)、病毒载体转移(例如,重组DNA病毒、重组RNA病毒)等(Cline, 29 Pharmac. Ther. 69-92 (1985)中所述)。磷酸钙沉淀和聚乙二醇(PEG)诱导的细菌原生质体与哺乳动物细胞的融合也可以用于转化细胞。

[0089] 适合在本文所述抗体或抗原结合片段的表达中使用的细胞优选是真核细胞,更

优选植物、啮齿动物或人来源的细胞,其中例如但不限于 NS0、CHO、perC. 6、Tk-ts13、BHK、HEK293 细胞、COS-7、T98G、CV-1/EBNA、L 细胞、C127、3T3、HeLa、NS1、Sp2/0 骨髓瘤细胞和 BHK 细胞。另外,抗体的表达可以使用杂交瘤细胞实现。产生杂交瘤的方法是本领域成熟的。

[0090] 本文所述的用表达载体转化的细胞可以针对本文所述的抗体或抗原结合片段的重组表达进行选择或筛选。扩增重组阳性的细胞并筛选展示所希望的表型的亚克隆,例如高水平表达、增强的生长性质,或获得具有所希望生化特征的蛋白的能力,例如,由于蛋白修饰或改变的翻译后修饰。这些表型可以由于给定亚克隆的内在性质或由于突变。突变可以通过使用化学品、UV 波长光线、辐射、病毒、插入性诱变剂、DNA 错配修复的抑制,或这些方法的组合来实现。

[0091] 一旦鉴定了表达所希望蛋白的细胞,其可以进行扩展和选择。转化的细胞可以以很多方法选择。例如,细胞可以针对目标多肽的表达进行选择。用包含选择性标志物(例如荧光蛋白的产生)的载体转化的细胞可以针对所述标志物的表达正向选择。在其它实施方案中,包含具有药物抗性基因的载体的细胞可以针对在选择性条件下生长的能力进行正向选择。

[0092] 测定和方法

本文所述的抗体和抗原结合片段可以用于检测样品中维生素 D 衍生物或类似物。在一些实施方案中,抗体及其抗原结合片段用于检测维生素 D 衍生物,例如 25-羟基维生素 D₂ 和 / 或 25-羟基维生素 D₃,或 25-羟基维生素 D 类似物,例如维生素 D-C22 免疫原性分子或化合物。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以用于检测从患者或受试者获得的生物样品中维生素 D 衍生物或类似物。在一些实施方案中,所述样品可以是血液或血液组分,例如血浆。在优选的实施方案中,所述患者或受试者是人。在一些方面,所述生物样品可以从人患者或受试者获得,例如,人血液。所述方法可以单独与抗体和抗原结合片段使用,或结合其它容易获得的抗体或检测试剂使用。

[0093] 本文提供用于在受试者中检测维生素 D 缺乏的方法。在优选的实施方案中,所述受试者是人。所述方法包括确定衍生自受试者的生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平,其中生物样品中的水平相对正常对照中的水平或相对 30ng/mL 的阈值水平下降或减少,指示受试者中维生素 D 缺乏。

[0094] 25-羟基维生素 D 可以是两种形式,25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 的任一种。在所述用于检测受试者中维生素 D 缺乏的方法的优选实施方案中,25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 的水平通过将生物样品与识别 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 的抗体或抗原结合片段接触来确定。

[0095] 可采用各种异源和同源方案(无论竞争性或非竞争性)进行用于检测受试者中维生素 D 缺乏的方法。在优选的实施方案中,所述方法通过序贯竞争性免疫测定进行。Centaur™、Vista™和 Immulite™是可以用于进行竞争性免疫测定的测定系统。

[0096] 根据所述用于检测受试者中维生素 D 缺乏的方法,可以通过增强的化学发光(ECL)、酶免疫测定(EIA)、免疫组织化学(IHC)、蛋白免疫印迹分析、放射免疫测定(RIA)、免疫荧光、平衡透析、免疫分化,或酶联免疫吸附测定(ELISA)检测生物样品中总 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 的水平。

[0097] 在所述用于检测受试者中维生素 D 缺乏的方法的优选实施方案中,根据所述方法使用的抗体或抗原结合片段与维生素 D2 和 / 或维生素 D3 不是交叉反应性的。在优选实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是如本文所述的抗体或抗原结合片段。例如,所述抗体或抗原结合片段包含 SEQ ID NO:26 的 Lc CDR1, SEQ ID NO:27 的 Lc CDR2,和 SEQ ID NO:28 的 Lc CDR3, SEQ ID NO:10 的 Hc CDR1, SEQ ID NO:11 的 Hc CDR2,和 SEQ ID NO:12 的 Hc CDR3。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段具有等摩尔识别 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 的性质。在优选的实施方案中,抗体是单克隆抗体 10H9。

[0098] 可以在用于检测受试者中维生素 D 缺乏的方法中使用的识别 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 的抗体或抗原结合片段可以被标记,例如,用可检测的标记物。示例性的标记物包括但不限于化学发光化合物(例如吖啶酯化合物)、发磷光性化合物、荧光化合物、放射性标记物、生物素或酶。所提到的示例性标记物通常仅当通过方法激发时可以被检测,所述方法包括但不限于不同化学品的添加、光线刺激或暴露于底物或其它化合物。当使用吖啶酯化合物时,通过过氧化物和酸 / 碱触发化学发光,造成闪烁,其可以通过适当的设备读取。在引发可检测标记物的可检测性之前可以使用任选的清洗步骤。

[0099] 所述抗体或抗原结合片段可以固定化在固相支持物上。

[0100] 所述抗体或抗原结合片段可以缀合到载体蛋白上。抗体或抗原结合片段和载体蛋白之间的复合物也可以固定化在固相支持物上。

[0101] 在用于检测受试者中维生素 D 缺乏的方法中使用的固相支持物,包括顺磁颗粒、在商标名 SEPHADEX (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N. J.) 下可获得的交联葡聚糖、琼脂糖、聚苯乙烯珠、聚氯乙烯、聚苯乙烯、交联的聚丙烯酰胺、基于硝基纤维素或尼龙的网如片、条或浆、或微量滴定板(如聚苯乙烯或聚氯乙烯制成的那些)的管、板或孔。当使用顺磁颗粒时,在任选的清洗步骤中可以使用一些磁场来源以保留颗粒和与颗粒直接或间接结合的分子。所述分子可以共价地、通过盐桥、氢键键合或另一种键结合。

[0102] 生物样品可以是血液、血清或血浆。在一些实施方案中,在本文所述方法中使用前,生物样品可以在生物条件下保存至多 24 小时。

[0103] 在用于检测受试者中维生素 D 缺乏的方法的一些实施方案中,将生物样品与识别 25 - 羟基维生素 D2 和 25 - 羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触之前,生物样品用 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS)处理或与 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS)组合。或者,在将生物样品与识别 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触的同时,生物样品用 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 处理或与 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 组合。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。ANS 可以存在于例如置换缓冲液中。在将生物样品与抗体或抗原结合片段接触之前或将生物样品与抗体或抗原结合片段接触同时可以任选地将甲醇与 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS)使用。例如,甲醇可以包括在置换缓冲液中。

[0104] 在用于检测受试者中维生素 D 缺乏的方法的一些实施方案中,将生物样品与识别 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触之前,生物样品还用 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 和乙二醇处理或与 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 和乙二醇组合。或者,在将生物样品与识别 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触的同时,生物样品用 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 和乙二醇处理或与 8- 苯

胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇组合。ANS可以以ANS酸或盐的形式(例如,ANS钠盐、ANS钾盐、ANS半镁盐或ANS铵盐)。ANS和乙二醇可以存在于置换缓冲液中。在将生物样品与抗体或抗原结合片段接触之前或将生物样品与抗体或抗原结合片段接触同时可以任选地将甲醇与8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇一起使用。例如,甲醇可以包括在置换缓冲液中。

[0105] 在用于检测受试者中维生素D缺乏的方法的一些实施方案中,在接触步骤后将25-羟基维生素D类似物添加到生物样品中。所述25-羟基维生素D类似物可以是标记的。25-羟基维生素D类似物或标记的25-羟基维生素D类似物也可以存在于包含8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)的稳定化缓冲液中。ANS可以以ANS酸或盐的形式(例如,ANS钠盐、ANS钾盐、ANS半镁盐或ANS铵盐)。

[0106] 本文所述的维生素D类似物可以基于维生素D22碳衍生物(维生素D-C22)的使用,当非缀合时,其包括C22羧基基团,如在图1(a)中所述(Hollis等, Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993))。在一些实施方案中,所述维生素D类似物可以是维生素D-C22。在一些实施方案中,所述羟基维生素D类似物可以缀合到载体蛋白。

[0107] 在用于检测受试者中维生素D缺乏的方法的一些实施方案中,所述维生素D类似物可以直接附着到蛋白载体上。例如,维生素D-C22可以直接缀合到牛血清白蛋白(BSA)。可以缀合到给定蛋白载体的维生素D类似物的数目将基于所使用的载体而变化。本领域技术人员将理解多种多样的载体蛋白可以用于本文所述的目的。举几个例子,一些合适的载体包括KLH、PEG化的KLH、*Concholepas concholepas*血蓝蛋白(CCH)、阳离子化的BSA和卵清蛋白。

[0108] 对维生素D类似物的载体蛋白缀合可以通过使用化学接头发生。化学接头可以由烷基、芳基、烷氧基、酰胺、磺酰胺或羰基或肽基团组成。维生素D类似物或维生素D衍生物到蛋白的缀合可以通过蛋白的氨基基团和维生素D类似物或维生素D衍生物的反应性的N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS酯)之间的反应实现。

[0109] 在用于检测受试者中维生素D缺乏的方法的一些实施方案中,在从生物样品与置换缓冲液组合的点开始20分钟内或更短可以检测维生素D水平。

[0110] 受试者中维生素D缺乏可以指示或与疾病相关联。与维生素D缺乏相关联的疾病可以包括:佝偻病、骨软化症、高血压、骨质疏松、自身免疫性疾病、心血管疾病、精神分裂症、抑郁症、神经系统疾病、糖尿病、感染性疾病、哮喘、过敏或癌症。

[0111] 本文还提供用于治疗怀疑具有维生素D缺乏的受试者的方法,通过确定衍生自受试者的生物样品中总25-羟基维生素D的水平,并且如果确定生物样品中的水平相对正常对照中的水平或30ng/mL的阈值水平下降,则向受试者施用针对维生素D缺乏的治疗。在优选的实施方案中,所述受试者是人。有多种合适的方法治疗维生素D缺乏。维生素D缺乏可以通过补充维生素D摄入或通过光疗来治疗。光疗可以包括增加暴露于自然阳光或暴露于人工的紫外线B光线来源。

[0112] 在所述用于治疗怀疑具有维生素D缺乏的受试者的方法的优选实施方案中,25-羟基维生素D2和25-羟基维生素D3的水平通过将生物样品与识别25-羟基维生素D2和25-羟基维生素D3两者的抗体或抗原结合片段接触来确定。

[0113] 可采用各种异源和同源方案(无论竞争性或非竞争性)来进行用于治疗怀疑具有

维生素 D 缺乏的受试者方法。在优选的实施方案中,所述方法通过序贯竞争性免疫测定进行。Centaur™、Vista™和 Immulite™是可以用于进行竞争性免疫测定的测定系统。

[0114] 根据所述用于治疗怀疑具有维生素 D 缺乏的受试者的方法,可以通过增强的化学发光(ECL)、酶免疫测定(EIA)、免疫组织化学(IHC)、蛋白免疫印迹分析、放射免疫测定(RIA)、免疫荧光、平衡透析、免疫分化,或酶联免疫吸附测定(ELISA)检测生物样品中总 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的水平。

[0115] 在所述用于治疗怀疑具有维生素 D 缺乏的受试者的方法中,根据所述方法使用的抗体或抗原结合片段与维生素 D2 和 / 或维生素 D3 不是交叉反应性的。在优选实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是如本文所述的抗体或抗原结合片段。例如,所述抗体或抗原结合片段包含 SEQ ID NO:26 的 Lc CDR1, SEQ ID NO:27 的 Lc CDR2, 和 SEQ ID NO:28 的 Lc CDR3, SEQ ID NO:10 的 Hc CDR1, SEQ ID NO:11 的 Hc CDR2, 和 SEQ ID NO:12 的 Hc CDR3。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段具有等摩尔识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的性质。在优选的实施方案中,抗体是单克隆抗体 10H9。

[0116] 可以在用于治疗怀疑具有维生素 D 缺乏的受试者的方法中使用的识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或抗原结合片段可以被标记,例如,用可检测的标记物。示例性的标记物包括但不限于化学发光化合物(例如吖啶酯化合物)、发磷光性化合物、荧光化合物、放射性标记物、生物素或酶。所提到的示例性标记物通常仅当通过方法激发时可以被检测,所述方法包括但不限于不同化学品的添加、光线刺激或暴露于底物或其它化合物。当使用吖啶酯化合物时,通过过氧化物和酸 / 碱触发化学发光,造成闪烁,其可以通过适当的设备读取。在引发可检测标记物的可检测性之前可以使用任选的清洗步骤。

[0117] 所述抗体或抗原结合片段可以固定化在固相支持物上。

[0118] 所述抗体或抗原结合片段可以缀合到载体蛋白上。抗体或抗原结合片段和载体蛋白之间的复合物也可以固定化在固相支持物上。

[0119] 在本文所述的方法中使用的固相支持物,包括顺磁颗粒、在商标名 SEPHADEX (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N. J.) 下可获得的交联葡聚糖、琼脂糖、聚苯乙烯珠、聚氯乙烯、聚苯乙烯、交联的聚丙烯酰胺、基于硝基纤维素或尼龙的网如片、条或浆、或微量滴定板(如聚苯乙烯或聚氯乙烯制成的那些)的管、板或孔。当使用顺磁颗粒时,在任选的清洗步骤中可以使用一些磁场来源以保留颗粒和与颗粒直接或间接结合的分子。所述分子可以共价地、通过盐桥、氢键键合或另一种键结合。

[0120] 生物样品可以是血液、血清或血浆。在一些实施方案中,在本文所述方法中使用前,生物样品可以在生物条件下保存至多 24 小时。

[0121] 在用于治疗怀疑具有维生素 D 缺乏的受试者的方法的一些实施方案中,将生物样品与识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触之前,生物样品用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)处理或与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)组合。或者,在将生物样品与识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触的同时,生物样品用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)处理或与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)组合。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。ANS 可以存在于例如置换缓冲液中。在将生物样品与抗体或抗原结合片段接触之前或将生物样品与抗体或抗原结合片段接触同时可以任选地将甲醇与 8-苯胺基-1-萘磺酸

(ANS) 一起使用。例如, 甲醇可以包括在置换缓冲液中。

[0122] 在用于治疗怀疑具有维生素 D 缺乏的受试者的方法的一些实施方案中, 将生物样品与识别 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触之前, 生物样品还用 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 和乙二醇处理或与 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 和乙二醇组合。或者, 在将生物样品与识别 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触的同时, 生物样品用 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 和乙二醇处理或与 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 和乙二醇组合。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如, ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。ANS 和乙二醇可以存在于置换缓冲液中。在将生物样品与抗体或抗原结合片段接触之前或将生物样品与抗体或抗原结合片段接触同时可以任选地将甲醇与 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 和乙二醇一起使用。例如, 甲醇可以包括在置换缓冲液中。

[0123] 在用于治疗怀疑具有维生素 D 缺乏的受试者的方法的一些实施方案中, 在接触步骤后将 25- 羟基维生素 D 类似物添加到生物样品中。所述 25- 羟基维生素 D 类似物可以是标记的。25- 羟基维生素 D 类似物或标记的 25- 羟基维生素 D 类似物也可以存在于包含 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 的稳定化缓冲液中。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如, ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。

[0124] 本文所述的维生素 D 类似物可以基于维生素 D22 碳衍生物(维生素 D-C22) 的使用, 当非缀合时, 其包括 C22 羧基基团, 如在图 1 (a) 中所述(Hollis 等, Clin. Chem. 39(3) :529-33 (1993))。在一些实施方案中, 所述维生素 D 类似物可以是维生素 D-C22。在一些实施方案中, 所述羟基维生素 D 类似物可以缀合到载体蛋白。

[0125] 在用于治疗怀疑具有维生素 D 缺乏的受试者的方法的一些实施方案中, 所述维生素 D 类似物可以直接附着到蛋白载体上。例如, 维生素 D-C22 可以直接缀合到牛血清白蛋白(BSA)。可以缀合到给定蛋白载体的维生素 D 类似物的数目将基于所使用的载体而变化。本领域技术人员将理解多种多样的载体蛋白可以用于本文所述的目的。举几个例子, 一些合适的载体包括 KLH、PEG 化的 KLH、*Concholepas concholepas* 血蓝蛋白(CCH)、阳离子化的 BSA 和卵清蛋白。

[0126] 对维生素 D 类似物的载体蛋白缀合可以通过使用化学接头发生。化学接头可以由烷基、芳基、烷氧基、酰胺、磺酰胺或羰基或肽基团组成。维生素 D 类似物或维生素 D 衍生物到蛋白的缀合可以通过蛋白的氨基基团和维生素 D 类似物或维生素 D 衍生物的反应性的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯(NHS 酯) 之间的反应实现。

[0127] 在用于治疗怀疑具有维生素 D 缺乏的受试者的方法的一些实施方案中, 在从生物样品与置换缓冲液组合的点开始 20 分钟内或更短可以检测维生素 D 水平。

[0128] 受试者中维生素 D 缺乏可以指示或与疾病相关联。与维生素 D 缺乏相关联的疾病可以包括: 佝偻病、骨软化症、高血压、骨质疏松、自身免疫性疾病、心血管疾病、精神分裂症、抑郁症、神经系统疾病、糖尿病、感染性疾病、哮喘、过敏或癌症。

[0129] 本文还提供了用于在需要其的受试者中监测维生素 D 缺乏的进展的方法, 通过在第一时间确定衍生自受试者的第一生物样品中总 25- 羟基维生素 D 的水平, 并然后在晚于第一时间的第二时间确定衍生自受试者的第二生物样品中总 25- 羟基维生素 D 的水平, 其中在第一生物样品中的水平和第二生物样品中的水平之间下降, 指示受试者中维生素 D 缺

乏的进展,其中在第一生物样品中的水平和第二生物样品中的水平之间很少或无变化,指示受试者中维生素 D 缺乏的稳定化,并且其中在第一生物样品中的水平和第二生物样品中的水平之间上升,指示受试者中维生素 D 缺乏的逆转。在优选的实施方案中,所述受试者是人。

[0130] 在所述用于监测受试者中维生素 D 缺乏进展的方法的优选实施方案中,25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的水平通过将生物样品与识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触来确定。

[0131] 进行方法中可采用各种异源和同源方案(无论竞争性或非竞争性)来监测受试者中维生素 D 缺乏的进展。在优选的实施方案中,所述方法通过竞争性免疫测定进行。Centaur™、Vista™和 Immulite™是可以用于进行竞争性免疫测定的测定系统。

[0132] 根据所述用于监测受试者中维生素 D 缺乏进展的方法,可以通过增强的化学发光(ECL)、酶免疫测定(EIA)、免疫组织化学(IHC)、蛋白免疫印迹分析、放射免疫测定(RIA)、免疫荧光、平衡透析、免疫分化,或酶联免疫吸附测定(ELISA)检测生物样品中总 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的水平。

[0133] 在所述用于监测受试者中维生素 D 缺乏进展的方法中,根据所述方法使用的抗体或抗原结合片段与维生素 D2 和 / 或维生素 D3 不是交叉反应性的。在优选实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是如本文所述的抗体或抗原结合片段。例如,所述抗体或抗原结合片段包含 SEQ ID NO:26 的 Lc CDR1, SEQ ID NO:27 的 Lc CDR2, 和 SEQ ID NO:28 的 Lc CDR3, SEQ ID NO:10 的 Hc CDR1, SEQ ID NO:11 的 Hc CDR2, 和 SEQ ID NO:12 的 Hc CDR3。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段具有等摩尔识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的性质。在优选的实施方案中,抗体是单克隆抗体 10H9。

[0134] 可以在这些方法中使用的识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或抗原结合片段可以被标记,例如,用可检测的标记物。示例性的标记物包括但不限于化学发光化合物(例如吡啶酯化合物)、发磷光性化合物、荧光化合物、放射性标记物、生物素或酶。所提到的示例性标记物通常仅当通过方法激发时可以被检测,所述方法包括但不限于不同化学品的添加、光线刺激或暴露于底物或其它化合物。当使用吡啶酯化合物时,通过过氧化物和酸 / 碱触发化学发光,造成闪烁,其可以通过适当的设备读取。在引发可检测标记物的可检测性之前可以使用任选的清洗步骤。

[0135] 所述抗体或抗原结合片段可以固定化在固相支持物上。

[0136] 所述抗体或抗原结合片段可以缀合到载体蛋白上。抗体或抗原结合片段和载体蛋白之间的复合物也可以固定化在固相支持物上。

[0137] 在用于监测受试者中维生素 D 缺乏进展的方法中使用的固相支持物,包括顺磁颗粒、在商标名 SEPHADEX (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N. J.) 下可获得的交联葡聚糖、琼脂糖、聚苯乙烯珠、聚氯乙烯、聚苯乙烯、交联的聚丙烯酰胺、基于硝基纤维素或尼龙的网如片,条或浆、或微量滴定板(如聚苯乙烯或聚氯乙烯制成的那些)的管、板或孔。当使用顺磁颗粒时,在任选的清洗步骤中可以使用一些磁场来源以保留颗粒和与颗粒直接或间接结合的分子。所述分子可以共价地、通过盐桥、氢键键合或另一种键结合。

[0138] 生物样品可以是血液、血清或血浆。在一些实施方案中,在本文所述方法中使用前,生物样品可以在生物条件下保存至多 24 小时。

[0139] 在用于监测受试者中维生素 D 缺乏进展的方法的一些实施方案中,将生物样品与识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触之前,生物样品用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)处理或与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)组合。或者,在将生物样品与识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触的同时,生物样品用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)处理或与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)组合。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。ANS 可以存在于例如置换缓冲液中。在将生物样品与抗体或抗原结合片段接触之前或将生物样品与抗体或抗原结合片段接触同时可以任选地将甲醇与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)使用。例如,甲醇可以包括在置换缓冲液中。

[0140] 在用于监测受试者中维生素 D 缺乏进展的方法的一些实施方案中,将生物样品与识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触之前,生物样品还用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇处理或与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇组合。或者,在将生物样品与识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 两者的抗体或抗原结合片段接触的同时,生物样品用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇处理或与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇组合。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。ANS 和乙二醇可以存在于置换缓冲液中。在将生物样品与抗体或抗原结合片段接触之前或将生物样品与抗体或抗原结合片段接触同时可以任选地将甲醇与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇一起使用。例如,甲醇可以包括在置换缓冲液中。

[0141] 在用于监测受试者中维生素 D 缺乏进展的方法的一些实施方案中,在接触步骤后将 25-羟基维生素 D 类似物添加到生物样品中。所述 25-羟基维生素 D 类似物可以是标记的。25-羟基维生素 D 类似物或标记的 25-羟基维生素 D 类似物也可以存在于包含 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)的稳定化缓冲液中。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。

[0142] 本文所述的维生素 D 类似物可以基于维生素 D22 碳衍生物(维生素 D-C22)的使用,当非缀合时,其包括 C22 羧基基团,如在图 1(a)中所述(Hollis 等, Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993))。在一些实施方案中,所述维生素 D 类似物可以是维生素 D-C22。在一些实施方案中,所述羟基维生素 D 类似物可以缀合到载体蛋白。

[0143] 在用于监测受试者中维生素 D 缺乏进展的方法的一些实施方案中,所述维生素 D 类似物可以直接附着到蛋白载体上。例如,维生素 D-C22 可以直接缀合到牛血清白蛋白(BSA)。可以缀合到给定蛋白载体的维生素 D 类似物的数目将基于所使用的载体而变化。本领域技术人员将理解多种多样的载体蛋白可以用于本文所述的目的。举几个例子,一些合适的载体包括 KLH、PEG 化的 KLH、Concholepas concholepasx 血蓝蛋白(CCH)、阳离子化的 BSA 和卵清蛋白。

[0144] 对维生素 D 类似物的载体蛋白缀合可以通过使用化学接头发生。维生素 D 类似物或维生素 D 衍生物到蛋白的缀合可以通过蛋白的氨基基团和维生素 D 类似物或维生素 D 衍生物的反应性的 N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS 酯)之间的反应实现。

[0145] 在用于监测受试者中维生素 D 缺乏进展的方法的一些实施方案中,在从生物样品与置换缓冲液组合的点开始 20 分钟内或更短可以检测维生素 D 水平。

[0146] 受试者中维生素 D 缺乏可以指示或与疾病相关联。与维生素 D 缺乏相关联的疾病可以包括：佝偻病、骨软化症、高血压、骨质疏松、自身免疫性疾病、心血管疾病、精神分裂症、抑郁症、神经系统疾病、糖尿病、感染性疾病、哮喘、过敏或癌症。

[0147] 本文还提供了用于在需要其的受试者中监测维生素 D 缺乏的治疗方法，通过在第一时间确定衍生自受试者的第一生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平，并然后在晚于第一时间的第二时间和在受试者针对所述维生素 D 缺乏的治疗之后确定衍生自受试者的第二生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平，其中第二生物样品中的水平相对第一生物样品中的水平增加或稳定化，指示在所述受试者中维生素 D 缺乏的治疗的效力，并且其中第二生物样品中的水平相对第一生物样品中的水平下降，指示在所述受试者中维生素 D 缺乏的治疗的无效力。在优选的实施方案中，所述受试者是人。

[0148] 在所述用于监测受试者中维生素 D 缺乏的治疗的方法的优选实施方案中，25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的水平通过将生物样品与识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或抗原结合片段接触来确定。

[0149] 进行方法中可采用各种异源和同源方案（无论竞争性或非竞争性）来监测受试者中维生素 D 缺乏的治疗。在优选的实施方案中，所述方法通过序贯竞争性免疫测定进行。Centaur™、Vista™和 Immulite™是可以用于进行竞争性免疫测定的测定系统。

[0150] 根据所述用于监测受试者中维生素 D 缺乏的治疗方法，可以通过增强的化学发光（ECL）、酶免疫测定（EIA）、免疫组织化学（IHC）、蛋白免疫印迹分析、放射免疫测定（RIA）、免疫荧光、平衡透析、免疫分化，或酶联免疫吸附测定（ELISA）检测生物样品中总 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的水平。

[0151] 在所述用于监测受试者中维生素 D 缺乏的治疗的方法的优选实施方案中，根据所述方法使用的抗体或抗原结合片段与维生素 D2 和 / 或维生素 D3 不是交叉反应性的。在优选实施方案中，所述抗体或抗原结合片段是如本文所述的抗体或抗原结合片段。例如，所述抗体或抗原结合片段包含 SEQ ID NO:26 的 Lc CDR1，SEQ ID NO:27 的 Lc CDR2，和 SEQ ID NO:28 的 Lc CDR3，SEQ ID NO:10 的 Hc CDR1，SEQ ID NO:11 的 Hc CDR2，和 SEQ ID NO:12 的 Hc CDR3。在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段具有等摩尔识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的性质。在优选的实施方案中，抗体是单克隆抗体 10H9。

[0152] 可以在用于监测受试者中维生素 D 缺乏的治疗方法中使用的识别 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的抗体或抗原结合片段可以被标记，例如，用可检测的标记物。示例性的标记物包括但不限于化学发光化合物（例如吖啶酯化合物）、发磷光性化合物、荧光化合物、放射性标记物、生物素或酶。所提到的示例性标记物通常仅当通过方法激发时可以被检测，所述方法包括但不限于不同化学品的添加、光线刺激或暴露于底物或其它化合物。当使用吖啶酯化合物时，通过过氧化物和酸 / 碱触发化学发光，造成闪烁，其可以通过适当的设备读取。在引发可检测标记物的可检测性之前可以使用任选的清洗步骤。

[0153] 所述抗体或抗原结合片段可以固定化在固相支持物上。

[0154] 所述抗体或抗原结合片段可以缀合到载体蛋白上。抗体或抗原结合片段和载体蛋白之间的复合物也可以固定化在固相支持物上。

[0155] 在本文所述的方法中使用的固相支持物，包括顺磁颗粒、在商标名 SEPHADEX（Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N. J.）下可获得的交联葡聚糖、琼脂糖、聚苯乙

烯珠、聚氯乙烯、聚苯乙烯、交联的聚丙烯酰胺、基于硝基纤维素或尼龙的网如片、条或浆、或微量滴定板(如聚苯乙烯或聚氯乙烯制成的那些)的管、板或孔。当使用顺磁颗粒时,在任选清洗步骤中可以使用一些磁场来源以保留颗粒和与颗粒直接或间接结合的分子。所述分子可以共价地、通过盐桥、氢键键合或另一种键结合。

[0156] 生物样品可以是血液、血清或血浆。在一些实施方案中,在本文所述方法中使用前,生物样品可以在生物条件下保存至多 24 小时。

[0157] 在用于监测受试者中维生素 D 缺乏的治疗的方法的一些实施方案中,将生物样品与识别 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 两者的抗体或抗原结合片段接触之前,生物样品用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)处理或与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)组合。或者,在将生物样品与识别 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 两者的抗体或抗原结合片段接触的同时,生物样品用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)处理或与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)组合。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。ANS 可以存在于例如置换缓冲液中。在将生物样品与抗体或抗原结合片段接触之前或将生物样品与抗体或抗原结合片段接触同时可以任选地将甲醇与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)一起使用。例如,甲醇可以包括在置换缓冲液中。

[0158] 在用于监测受试者中维生素 D 缺乏的治疗的方法的一些实施方案中,将生物样品与识别 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 两者的抗体或抗原结合片段接触之前,生物样品还用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇处理或与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇组合。或者,在将生物样品与识别 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 两者的抗体或抗原结合片段接触的同时,生物样品用 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇处理或与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇组合。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。ANS 和乙二醇可以存在于置换缓冲液中。在将生物样品与抗体或抗原结合片段接触之前或将生物样品与抗体或抗原结合片段接触同时可以任选地将甲醇与 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)和乙二醇一起使用。例如,甲醇可以包括在置换缓冲液中。

[0159] 在用于监测受试者中维生素 D 缺乏的治疗的方法的一些实施方案中,在接触步骤后将 25-羟基维生素 D 类似物添加到生物样品中。所述 25-羟基维生素 D 类似物可以是标记的。25-羟基维生素 D 类似物或标记的 25-羟基维生素 D 类似物也可以存在于包含 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)的稳定化缓冲液中。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。

[0160] 本文所述的维生素 D 类似物可以基于维生素 D₂₂ 碳衍生物(维生素 D-C₂₂)的使用,当非缀合时,其包括 C₂₂ 羧基基团,如在图 1(a)中所述(Hollis 等, Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993))。在一些实施方案中,所述维生素 D 类似物可以是维生素 D-C₂₂。在一些实施方案中,所述羟基维生素 D 类似物可以缀合到载体蛋白。

[0161] 在用于监测受试者中维生素 D 缺乏的治疗的方法的一些实施方案中,所述维生素 D 类似物可以直接附着到蛋白载体上。例如,维生素 D-C₂₂ 可以直接缀合到牛血清白蛋白(BSA)。可以缀合到给定蛋白载体的维生素 D 类似物的数目将基于所使用的载体而变化。例如,BSA 将容纳相对中等数目的蛋白的连接,可能约 10 到约 25;可选地,载体例如钥孔戚血蓝蛋白(KLH)可以容纳约 200 到 300 个抗原性分子。本领域技术人员将理解多种多样的

载体蛋白可以用于本文所述的目的。举几个例子,一些合适的载体包括 KLH、PEG 化的 KLH、*Concholepas concholepas* 血蓝蛋白(CCH)、阳离子化的 BSA 和卵清蛋白。

[0162] 对维生素 D 类似物的载体蛋白缀合可以通过使用化学接头发生。维生素 D 类似物或维生素 D 衍生物到蛋白的缀合可以通过蛋白的氨基基团和维生素 D 类似物或维生素 D 衍生物的反应性的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯(NHS 酯) 之间的反应实现。

[0163] 在用于监测受试者中维生素 D 缺乏的治疗的方法的一些实施方案中,在从生物样品与置换缓冲液组合的点开始 20 分钟内或更短可以检测维生素 D 水平。

[0164] 受试者中维生素 D 缺乏可以指示或与疾病相关联。与维生素 D 缺乏相关联的疾病可以包括:佝偻病、骨软化症、高血压、骨质疏松、自身免疫性疾病、心血管疾病、精神分裂症、抑郁症、神经系统疾病、糖尿病、感染性疾病、哮喘、过敏或癌症。

[0165] 本文还提供了通过将 25- 羟基维生素 D 类似物与 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 接触用于稳定化 25- 羟基维生素 D 类似物的方法。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。用 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 稳定化的 25- 羟基维生素 D 类似物可以在测定系统外保存多于 2 个月。用 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS) 稳定化的 25- 羟基维生素 D 类似物可以在测定系统内保存多于 7 天。

[0166] 本文还提供用于在受试者中检测维生素 D 缺乏的方法。在优选的实施方案中,所述受试者是人。用于在方法中使用的生物样品可以是衍生自受试者的血液、血清或血浆。用于在受试者中检测维生素 D 缺乏的方法涉及通过组合生物样品和置换缓冲液在衍生自受试者的生物样品中确定总 25- 羟基维生素 D 的水平。所述生物样品可以添加到置换缓冲液或反之亦然以形成测定混合物。所述置换缓冲液将维生素 D 从维生素 D 结合蛋白置换。在优选的实施方案中,置换缓冲液包含 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸(ANS)。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。置换缓冲液可以进一步包含乙二醇。在一些实施方案中,置换缓冲液包含 ANS 和甲醇。在一些实施方案中,置换缓冲液包含 ANS、乙二醇和甲醇。

[0167] 接着,优先结合缀合第一标记物的 25- 羟基维生素 D₂、25- 羟基维生素 D₃,或基于维生素 D-C₂₂ 的免疫原的抗体或抗原结合片段与测定混合物组合。抗体或抗原结合片段可以添加到测定混合物或反之亦然并变成其组分。优先结合 25- 羟基维生素 D₂ 和 25- 羟基维生素 D₃,或基于维生素 D-C₂₂ 的免疫原的抗体或其抗原结合片段,优选是上文所述的抗体或抗原结合片段。在优选的实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含 SEQ ID NO:26 的 Lc CDR1, SEQ ID NO:27 的 Lc CDR2,和 SEQ ID NO:28 的 Lc CDR3, SEQ ID NO:10 的 Hc CDR1, SEQ ID NO:11 的 Hc CDR2,和 SEQ ID NO:12 的 Hc CDR3。在优选的实施方案中,抗体是单克隆抗体 10H9。优先结合 25- 羟基维生素 D₂、25- 羟基维生素 D₃,或基于维生素 D-C₂₂ 的免疫原的抗体或抗原结合片段可以固定化到固相支持物上。优先结合 25- 羟基维生素 D₂、25- 羟基维生素 D₃,或基于维生素 D-C₂₂ 的免疫原的抗体或抗原结合片段可以缀合到载体蛋白。优先结合 25- 羟基维生素 D₂、25- 羟基维生素 D₃,或基于维生素 D-C₂₂ 的免疫原的抗体或抗原结合片段和载体蛋白的复合物也可以固定化到固相支持物上。

[0168] 所述第一标记物优选是可检测的标记物。第一标记物可以是化学发光化合物(例如吖啶酯化合物)、发磷光性化合物、荧光化合物、放射性标记物、生物素或酶。所提到的示例性标记物通常仅当通过方法激发时可以被检测,所述方法包括但不限于不同化学品的添

加、光线刺激或暴露于底物或其它化合物。当使用吡啶酯化合物时,通过过氧化物和酸/碱触发化学发光,造成闪烁,其可以通过适当的设备读取。在引发可检测标记物的可检测性之前可以使用任选的清洗步骤。

[0169] 接着,具有第二标记物的 25-羟基维生素 D 类似物与测定混合物组合。25-羟基维生素 D 类似物可以添加到测定混合物或反之亦然并变成其组分。所述第二标记物可以是用于结合抗荧光素抗体的荧光素、用于结合亲和素,链霉亲和素或抗生物素抗体的生物素、用于结合抗地高辛抗体的地高辛或其它半抗原和结合配偶体。25-羟基维生素 D 类似物可以存在于包含 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)的稳定化缓冲液中。ANS 可以以 ANS 酸或盐的形式(例如,ANS 钠盐、ANS 钾盐、ANS 半镁盐或 ANS 铵盐)。在一些实施方案中,25-羟基维生素 D 类似物缀合到载体蛋白。所述载体蛋白可以是牛血清白蛋白、卵清蛋白、免疫球蛋白或牛 γ -球蛋白 IgG。

[0170] 缀合到识别第二标记物的抗体的固相支持物也与测定混合物组合。所述缀合到识别第二标记物的抗体的固相支持物可以添加到测定混合物或反之亦然并变成其组分。缀合到固相支持物的抗体可以是结合荧光素的抗体。

[0171] 在本文所述的方法中使用的固相支持物,包括顺磁颗粒、在商标名 SEPHADEX (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N. J.) 下可获得的交联葡聚糖、琼脂糖、聚苯乙烯颗粒或珠、聚氯乙烯、聚苯乙烯、交联的聚丙烯酰胺、基于硝基纤维素或尼龙的网如片,条或浆、或微量滴定板(如聚苯乙烯或聚氯乙烯制成的那些)的管、板或孔。当使用顺磁颗粒时,在任选的清洗步骤中可以使用一些磁场来源以保留颗粒和与颗粒直接或间接结合的分子。所述分子可以共价地、通过盐桥、氢键键合或另一种键结合。

[0172] 通过测量由第一标记发射的信号确定生物样品中总 25-羟基维生素 D 的水平,其中生物样品中总 25-羟基维生素 D 水平相对正常对照或 30ng/mL 的阈值水平减少,指示受试者中维生素 D 缺乏。

[0173] 任何本文所述诊断系统的免疫试剂可以以溶液,作为液体分散体或作为基本上干燥的粉末,例如以冻干形式提供。

[0174] 在一些实施方案中,在从生物样品与置换缓冲液组合的点开始 20 分钟内或更短可以检测维生素 D 缺乏。

[0175] 受试者中维生素 D 缺乏可以指示疾病。所述疾病可以包括:佝偻病、骨软化症、高血压、骨质疏松、自身免疫性疾病、心血管疾病、精神分裂症、抑郁症、神经系统疾病、糖尿病、感染性疾病、哮喘、过敏或癌症。

[0176] 试剂盒

试剂盒可以包括如本文所述的抗体或抗原结合片段以及使用说明,例如,用于从受试者收集生物样品和/或使用抗体或抗原结合片段以确定生物样品中总维生素 D 的量。在优选实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包括如本文所述的可检测的标记物。所述试剂盒还可以包括连接固相支持物的维生素 D 类似物。在一些实施方案中,所述试剂盒可以包括标准曲线或数据集,显示维生素 D 的量或水平与正常和/或缺乏维生素 D 水平的关联。

[0177] 提供下列实施例以更详细地描述本文所述实施方案。它们意图阐明,但不限制所述实施方案。

实施例

[0178] 实施例 1——基于维生素 D-C22 的分子和化合物的合成

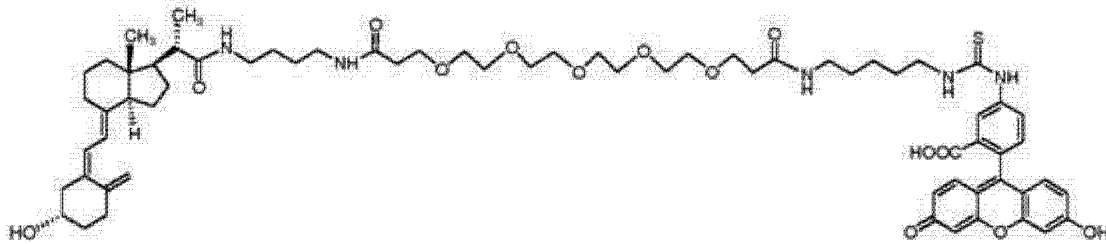
为了产生基于维生素 D-C22 的抗原,所述分子的可操作的形式是必需的。为了实现此,进行了努力经由合成方案以产生维生素 D-C22,所述合成方案基于 Hollis 和 Napoli 的合成方案(Clin. Chem, 31:1815-1819 (1985))。简而言之,23,24-二去甲-5-胆烯酸-3 β -OL 乙酸(2.50 克)与二氯甲烷(25mL)中的甲醇(0.312 mL)、二环己基碳二亚胺(1.59g)和 N,N-二甲基氨基吡啶(160mg)反应 3 小时,以得到 23,24-二去甲-5-胆烯酸-3 β -OL 乙酸甲酯(1.808g)。所述甲酯(1.808g)用己烷(200mL)中的 N-溴代琥珀酰亚胺(1.05g)/偶氮异丁腈(51.7mg)在回流下 30 分钟进行溴化,然后通过用 THF (112 mL)中的四丁基氟化铵(1M, THF 中,23.8mL)在室温下 2 小时脱溴化氢,得到 23,24-二去甲-5,7-胆二烯酸(choledienic acid)-3 β -OL 乙酸甲酯(1.21g)。23,24-二去甲-5,7-胆二烯酸-3 β -OL 乙酸甲酯(1.21g)与甲醇(18mL)和乙醚(22mL)中的氢氧化钾(0.50g)在室温下反应 2.5 小时,以产生 23,24-二去甲-5,7-胆二烯酸-3 β -OL 甲酯(0.962g)。23,24-二去甲-5,7-胆二烯酸-3 β -OL 甲酯(0.962g),在乙醚(1100mL)中,在具有耐热耐蚀过滤器(Vycor filter)的 450 瓦汞灯下照射,在 -10 至 0°C 下进行 3 分钟和 30 秒两次,然后在硅胶上通过柱层析法分离,以得到前维生素 D-C22 甲酯,其在乙醇(100mL)中回流 3 小时,以产生维生素 D-C22 甲酯(0.389g)。维生素 D-C22 甲酯(249mg)与氢氧化钾(6.25g)在甲醇(30mL)中在 60°C 下反应 5 小时,以得到维生素 D-C22 酸(165mg)。(图 2)

为了与维生素 D-C22 形成缀合的化合物,需要 NHS 前体。为了实现此,维生素 D-C22 (165mg)与二环己基碳化二亚胺(116mg)和 N-羟基琥珀酰亚胺(64mg)在 1,4-二噁烷中反应,然后与 1,4-二氨基丁烷(480 μ L),在室温下反应 2 小时以获得维生素 D-DAB (141mg)。由维生素 D-DAB 通过与过量二琥珀酰亚胺辛二酸盐或 PEG-Di-NHS 反应制备蛋白反应性试剂,维生素 D-DAB-辛二酰-NHS 和维生素 D-DAN-PEG5-NHS。通过制备型反相 HPLC 经由 C18 柱纯化 NHS 酯。维生素 D-DAB (30mg)与过量二琥珀酰亚胺辛二酸盐(DSS,133mg)在 DMF (1.2mL)和三乙胺(15 μ L)中反应 3.5 小时。通过制备型 HPLC 经由 Synergi Hydro-RP 柱纯化产物(24.5mg)以产生维生素 D-DAB-辛二酰-NHS。维生素 D-DAB (41 mg)与过量双-PEG5-NHS (282mg)在 DMF (2.0mL)和三乙胺(20 μ L)中反应 3.5 小时。通过制备型 HPLC 经由 Synergi Hydro-RP 柱纯化产物(33.7 mg)以产生维生素 D-DAB-PEG5-NHS。(图 3)如图 4 中所表示的,通过 NHS 酯和蛋白的赖氨酸氨基基团之间的反应制备蛋白缀合物。通过维生素 D-DAB-辛二酰-NHS (5mg)与 BSA (10mg)在 0.1M 磷酸缓冲液 pH7.5 (1mL)和 DMF (0.4mL)的混合物中在室温下反应 2 小时并通过使用离心过滤(centrifiltration)使用 PBS, pH7.2 进行缓冲液交换来制备维生素 D-DAB-辛二酰-BSA。MALDI-TOF 质谱显示每个 BSA 上负载 14 个维生素 D 标记物。

[0179] 通过在 BSA 的游离巯基和荧光素-5-马来酰亚胺之间的反应随后赖氨酸氨基基团与维生素 D-DAB-PEG5-NHS 的反应经由两步缀合制备维生素 D-DAB-PEG5-BSA-荧光素缀合物(图 5)使用 Sephadex G25 柱通过凝胶过滤分离缀合物。发现使用 10:1 的荧光素-5-马来酰亚胺对 BSA 摩尔比随后通过以 20:1 维生素 D-DAB-PEG5-NHS 对 BSA 摩尔比缀合制备的缀合物产生最好的 Centaur® 测定曲线。

[0180] 制备维生素 D-荧光素-缀合物并用作磁性颗粒包被抗原用于 Centaur® 测定。使

用小分子衍生物,维生素 D-DAB-PEG5-尸胺-异硫氰酸荧光素(vitamin D-DAB-PEG5-amino pentyl-thioureidyl fluorescein), MW1208 (下文结构) 作为磁性颗粒包被抗原也可以获得良好的免疫测定结果。



[0181] 实施例 II——对维生素 D-C22 抗原性化合物有反应性的抗体的产生

进行实验以产生能够优先结合具有维生素 D-C22 抗原性分子的结构方面的分子的抗体。根据 Galfre 等 (Nature, 266:550 (1977)), 如 Oi 和 Herzenberg 所修改 (Selected Methods in Cellular Immunology (1980)) 的方法进行这些实验。最初, BALB/c 小鼠用乳化在弗氏完全佐剂中的维生素 D-C22 BSA 免疫接种, 随后使用弗氏不完全佐剂第二次免疫接种。第二次免疫接种后 2 周收集免疫接种小鼠的血清。

[0182] 通过 ELISA 如下测试所收集血清的抗原反应性: 包被维生素 D-C22 KLH 的微量滴定板与稀释在稀释缓冲液中的小鼠抗血清孵育一小时。清洗板并添加稀释缓冲液中缀合到辣根过氧化物酶(HRPO)的第二抗体(山羊抗小鼠 IgG)并孵育 30 分钟。清洗板并添加显色底物 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺(TMB)。所产生的颜色使用 1N 硫酸停止并且在 450nm 测量光密度。所测试的来自所有五只小鼠的血清显示相对正常小鼠血清(NMS)的实质的反应性(表 2)。

[0183] 表 2 通过来自免疫接种小鼠血清的维生素 D-C22 检测

包被: 维生素 D-C22 二氨基丁烷-辛二酰-KLH@ 500ng/mL							
维生素 D-C22 初始显色 (initial bleed) 05/12/08	MOUSE #	NMS	0	1	2	3	4
	1:12800	0.070	0.931	1.357	1.669	1.795	1.622
	1:6400	0.069	1.532	2.020	2.478	2.581	2.310
	1:3200	0.070	2.234	2.685	3.126	3.161	2.845
	1:1600	0.077	2.940	3.228	3.520	3.504	3.303
	1:800	0.085	3.414	3.552	3.582	3.565	3.552
	1:400	0.100	3.585	3.573	3.680	3.630	3.578
	1:200	0.128	3.664	3.689	3.656	3.678	3.640
	1:100	0.180	3.628	3.666	3.645	3.605	3.576

[0184] 实施例 III——对维生素 D-C22 抗原性化合物有反应性的单克隆抗体的产生

选择对维生素 D-C22 抗原显示阳性免疫应答的小鼠用于单克隆抗体开发。简而言之, 从所选择的小鼠收获的脾细胞与小鼠 Sp2/0 骨髓瘤细胞融合。选择所获得的产生对 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 有反应性的抗体的杂交瘤, 并通过限制性稀释程序克隆至少两次以获得产生单克隆抗体的细胞系。被鉴定并进一步测试的一个单克隆细胞系是 10H9 杂交瘤。

[0185] 杂交瘤克隆的分离后, 进行研究以确定抗体结合 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 的相对能力。为了评价此, 进行抗体置换测定以确定维生素 D-C22 和所产生的抗抗

原(10H9)的反应性抗体之间的结合可以被 25-羟基维生素 D2 或 25-羟基维生素 D3 的存在所破坏达到的程度。来自产生对维生素 D-C22 反应性抗体的 10H9 杂交瘤细胞系的细胞培养物上清在存在或不存在 25-羟基维生素 D2 或 25-羟基维生素 D3 的情况下在用维生素 D-C22 KLH 包被的微量滴定板上共孵育 1 小时。清洗板后,添加山羊抗小鼠 IgG-HRP0 并孵育 30 分钟。清洗板并随后与四甲基联苯胺(TMB)孵育。所产生的颜色使用 1N 硫酸停止并且在 450nm 测量光密度。如表 3 中所示(并如图 6 中所描述),结合维生素 D-C22 KLH 的抗体通过与 25-羟基维生素 D2 或 25-羟基维生素 D3 共孵育以浓度依赖性的方式被破坏。25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 均显示基本上类似的结合破坏概况,其是所测试的抗体的等摩尔亲和力的特征。

[0186] 表 3 通过 25-羟基维生素 D2 或 25-羟基维生素 D3 的维生素 D-C22-反应性抗体置换。

包被: 维生素 D-C22 二氨基丁烷-辛二酰-KLH@ 50ng/mL				
Ag@ (终浓度)		0	25 OH-D2	25 OH-D3
			0.4 ug/mL	0.4 ug/mL
维生素D-C22 10H9 细胞培养物上清@ (终稀释度)	1:4	1.997	0.323	0.384
	1:16	1.244	0.154	0.176
	1:64	0.672	0.097	0.105
	1:256	0.313	0.086	0.090
追踪物: GAM-IgG-HRP (Fc) @1:20K				

[0187] 接着,使用纯化的抗体而非细胞上清液进行置换实验。在此实验中,目标抗体经由两小时孵育直接包被在微量滴定板上。清洗包被的板并然后与 25-羟基维生素 D2 或 25-羟基维生素 D3 在存在缀合碱性磷酸酶的维生素 D-C22-二氨基丙烷-辛二酰的情况下共孵育。30 分钟后,清洗板并通过添加底物磷酸对硝基苯酯(PNPP)显色。在 405nm 测量光密度有色的溶液。再一次,结合到维生素 D-C22 的 10H9 通过与 25-羟基维生素 D2 或 25-羟基维生素 D3 共孵育以浓度依赖性的方式被破坏(表 4)。25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 均显示基本上类似的结合破坏概况,其是所测试的抗体的等摩尔亲和力的特征(图 7)。

[0188] 表 4 通过 25-羟基维生素 D2 或 25-羟基维生素 D3 的维生素 D-C22-反应性抗体置换。

包被50ug/mL维生素D-C22 Mab 10H9@1ug/mL		O.D.
26uL 25OH-VIT D2@碘化终浓度 (ng/mL)	0	1.277
	5	1.189
	10	1.007
	25	0.771
	100	0.106
	200	0.080
	400	0.069
	1000	0.063
26uL 25OH-VIT D3@碘化终浓度 (ng/mL)	0	1.213
	5	1.083
	10	0.800
	25	0.513
	100	0.115
	200	0.089
	400	0.077
	1000	0.069
+25ul N-(Vit D C22 羧基)-1,4-二氨基丁烷 -N'-辛二酰-碱性磷酸酶 (JLS06-6X) @100ng/mL(最终)在置换缓冲液中		

[0189] 实施例 IV

维生素 D 测定

将生物样品添加到反应杯中随后加入置换缓冲液并允许反应 4.5 分钟。添加缀合到吡啶酯的单克隆抗体并允许反应 5.5 分钟以结合样品中的 25-羟基维生素 D。缀合到牛血清白蛋白和荧光素的 25-羟基维生素 D 类似物与包被抗荧光素的顺磁颗粒一起添加并允许反应 3.75 分钟。清洗反应杯并添加酸和碱试剂以起始化学发光反应。得到结果的时间 (time-to-result) 是 18 分钟。患者样品中的 25-羟基维生素 D 的量和系统检测到的相对光单位 (RLU) 的量之间存在反比关系。

[0190] 测定 :ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定是单通道,18 分钟的抗体竞争性免疫测定,其使用共价结合到顺磁颗粒 (PMP) 上的抗荧光素标记的单克隆抗体、一种用吡啶酯 (AE) 标记的单克隆抗体和用荧光素标记的维生素 D 类似物 (图 8)。所述维生素 D 总量测定对于单个确定需要 20 μ L 样品体积。得到结果的时间是 18 分钟,并且通量是 240 次测试 / 小时。

[0191] 简而言之,使用化学发光技术的序贯步骤的半抗原 / 抗体竞争性免疫测定的第一个步骤开始于分析仪将 20 μ L 生物样品分散到小池中,随后通过添加包含 8-苯胺基-1-萘磺酸铵盐 (Sigma-aldrich, St. Louis, MO) 和乙二醇 (Sigma-aldrich, St. Louis, MO) 的 200 μ L 置换缓冲液 (50mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.09% 叠氮化钠, pH=7.5), 并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 4.5 分钟。将包含吡啶酯标记的抗-25-羟基维生素 D 单克隆抗体 (单克隆抗体 10H9) 的 Lite 试剂 (50 μ L) 加入到混合物中,并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 5.5 分钟。将 C22-PEG-BSA 荧光素缀合物 (50 μ L) 和抗荧光素单克隆抗体包被的顺磁微粒 (100 μ L) 加入到混合物中在 37 $^{\circ}$ C

下孵育 3.75 分钟。第四个步骤是分离具有结合的 C22-PEG-BSA- 荧光素缀合物和吡啶酯标记的抗-25-羟基维生素 D 单克隆抗体的固相复合物,然后清洗 3 次以除去任何游离的 Lite 试剂。最后是顺序分散 300 μ L 每种酸试剂,然后是碱试剂以引发化学发光反应。从样品到结果的总孵育时间是 18 分钟。生物样品中存在的 25-羟基维生素 D 的量和以相对光单位 (RLU) 定量的化学发光的量之间有间接的关系。在基于 Centaur 的测定中,在吡啶酯发射的 RLU 和维生素 D 的量之间存在反比关系,因为从血浆中载体蛋白释放的 25-羟基维生素 D 与维生素 D-BSA- 荧光素竞争结合有限量的吡啶酯标记的 10H9 单克隆抗体。患者样品中高水平的 25 (OH) D 将减少磁性颗粒上的吡啶酯-MAb- 维生素 D-BSA- 荧光素复合物的量,导致更低的 RLU。

[0192] 精度:精度研究基于 CLSI 方案 EP5-A2:在单独的 ADVIA Centaur 系统上每天 2 轮进行 10 天。使用维生素 D 总量范围从 4 到 120ng/mL 的样品确定测定精度。

[0193] 分析灵敏度:分析灵敏度定义为对应从最低标准品获得的以相对光单位表示的平均信号加 2 SD 的浓度。分析灵敏度研究按照 CLSI 方案 EP5-A2 进行。使用最低标准品的 60 次重复确定分析灵敏度。

[0194] 空白的限制,检测的限制,和功能灵敏度:空白的限制定义为分析物的浓度,其对应人的负基池(basepool)的分布的第 95 百分位数。维生素 D 总量低标准品使用两批试剂在三个系统(n=120)上测定 20 次。检测的限制(LoD)根据 CLSI 方案 EP17-A 确定。检测的限制定义为可以具有 95% 概率被检测的维生素 D 的最低浓度。通过使用低水平维生素 D 样品确定 LoD,其使用两批试剂在三个系统(n=120)上测定 20 次。使用单独的设备经过 10 天确定功能灵敏度。对总共 60 个重复,一式两份每天进行两轮。ADVIA Centaur 维生素 D 总量灵敏度组成员浓度范围从 3.0 到 20.0ng/mL。使用批内、初始(day zero)、两点校准曲线来校准浓度。

[0195] 干扰研究:按照 NCCLS EP-7A 中的指导评价来自内源和非内源物质的干扰。每个样品掺入干扰物并与匹配的未掺入的对照比较。

[0196] 交叉反应性:使用 ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定分析五种维生素 D 衍生物。维生素 D 衍生物掺入包含 27ng/mL 维生素 D 总量的样品。测定掺入样品的三份重复并且确定维生素 D 总量浓度。

[0197] 管类型研究:使用 ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定分析 EDTA 和血清分离器管(SST)管的相关性。从 119 个供体收集血清红顶(Serum red top)、SST 和 EDTA 管并使用 Centaur 维生素 D 总量测定测定。每个样品评价三份重复。确定血清和 SST 和血清相比 EDTA 的线性回归相关性。

[0198] 方法关联性:ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定与可商购获得的、符合 FDA 规定的、维生素 D 总量免疫测定比较,使用 199 个患者样本,每种方法单个重复。样本浓度范围从 5 到 150ng/mL。另外,23 个患者样品通过 LC-MS/MS 和 ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定来测定。此第二群体中的样本范围从 11 到 82ng/mL。

[0199] 结果:

从 ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定获得的数据证明对 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的等摩尔检测,并显示对 LC-MS/MS 的示踪能力。对 25(OH)D₂ 的交叉反应性确定为在 50 ng/mL 下 105%。该测定展示少于 3.0ng/mL 的检测限制(LoD),少于 4ng/mL 的功能灵敏度(20% 剂量

总 CV), 和 250ng/mL 的上限。对于在 22.1、52.3、121 和 153 ng/mL 的样品, 总量测定 CV 分别为 6.4%、7.1%、4.2% 和 3.7%。展示了至多达 240ng/mL 的线性。相对 LC-MS/MS 的关联性研究使用 150 个血清样品进行, 获得了 0.96 的斜率, 1.0 的截距和 0.97 的回归系数。

[0200] 精度: ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定的精度概况展示了总维生素 D 在 7.65ng/mL 下 8.8% 和在 123.36ng/mL 下 2.0% 之间的总 CV。精度分析显示在表 5 中。

[0201] 表 5 ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定的精度分析

样品	平均值 (ng/mL)	批内SD (ng/mL)	批内CV (%)	总SD (ng/mL)	总CV (%)
1	7.65	0.65	8.5	0.67	8.8
2	10.65	0.85	8.0	1.07	10.1
3	13.11	0.84	6.4	0.91	6.9
4	15.87	1.02	6.4	1.18	7.4
5	18.40	1.31	7.1	1.44	7.8
6	22.63	1.79	7.9	1.79	7.9
7	59.75	1.76	3.0	1.92	3.2
8	99.63	1.95	2.0	2.07	2.1
9	112.74	1.98	1.8	3.07	2.7
10	115.71	1.98	1.7	2.55	2.2
11	123.36	2.29	1.9	2.51	2.0

[0202] 分析灵敏度: ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定的分析灵敏度是 2.4ng/mL。分析灵敏度显示在表 6 中。

[0203] 表 6 ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定的分析灵敏度

样品	重复	平均 RLU+2SD	剂量 (ng/mL)
维生素 D 空白	60	688200	2.4

[0204] 空白的限制, 检测的限制, 和功能灵敏度: ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定的空白的限制是 2.8ng/mL, 检测的限制是 3.8ng/mL, 并且功能灵敏度是 4ng/mL (图 9)。

[0205] 干扰研究: 在所测试的浓度下, 对于内源干扰物, ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定展示 $\leq 10\%$ 乖离率。内源干扰物研究的结果显示在表 7。

[0206] 表 7 ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定的干扰物研究结果

干扰物	浓度	预期维生素 D 总量 (ng/mL)	观察的维生素 D 总量 (ng/mL)	乖离率 (%)
未缀合的胆红素	60mg/dL	30.88	32.67	5.77
缀合的胆红素	60mg/dL	33.82	30.67	-9.31
白蛋白	9g/dL	22.5	20.4	-9.33
血红蛋白	500mg/dL	29.08	29.70	2.13
甘油三酯	500mg/dL	22.7	23.6	3.96
尿酸	20mg/dL	35.45	33.45	-5.64

[0207] 交叉反应性: ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定展示对非羟基化形式的维生素 D2 和维生素 D3 以及对 3- ϵ -25 (OH) D3 非常低的交叉反应性。交叉反应性分析结果显示在表 8 中。

[0208] 表 8 ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定的交叉反应性

交叉反应物	浓度 (ng/mL)	预期(内源)维生素 D 总量 (ng/mL)	观察的维生素 D 总量 (ng/mL)	交叉反应性 (%)
25-(OH)-维生素 D3	27	0	27	100
25-(OH)-维生素 D2	30	27	58	102
维生素 D2	100	27	28	0.04
维生素 D3	100	27	28	0.04
3-epi-25(OH)D3	100	27	27	0.0

[0209] 管类型研究：在血清红顶、SST 和 EDTA 管类型中用收集的 119 个供体样本进行样品管类型相关性。血清红顶和 SST 间的回归分析展示 0.999 的相关系数(R), 1.01 的斜率

和 -0.14 的截距(图 10)。血清红顶和 EDTA 间的回归分析展示 0.997 的相关系数(R), 1.00 的斜率和 0.41 的截距(图 11)。

[0210] 方法比较 :用 199 个样本进行样品相关性,比较 ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定和可商购获得的,符合 FDA 规定的维生素 D 总量测定。回归分析展示 0.993 的相关系数(R), 1.00 的斜率和 1.61 的截距(图 12)。另外,测定了 23 个样本比较 ADVIA Centaur 维生素 D 总量测定和可商购获得的维生素 D 总量 LC-MS/MS 测定。回归分析展示 0.98 的相关系数(R), 1.03 的斜率和 -2.3 的截距(图 13)。

序列号	序列
1	TTTTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCG
2	TACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAAC
3	TTTACTATCTATAATCAGAAG
4	ATAAGAGCGCATTACGACGGGAGAGTT
5	GTGCAGCTGCTCGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGA GCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATT ACTGAC
6	CTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGT
7	TTCAAGGGCAAGGCCACATTAAGTGTAGACAAGTCATCCAG CACAGCCTACATGGAAGCTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTC TGCAGTCTATTACTTT
8	GTGCAGCTGCTCGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGA GCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATT ACTGACTACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAA GAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGTTT TACTATCTATAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTAAC TGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAAGCTCCTCAG TCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTACTTTATAAGAGC GCATTACGACGGGAGAGTTTTTTGGGGCCAAGGCACCACTCT CACAGTCTCCTCG
9	FWGQGTTLTVSS
10	YTMNWVKQSHGKN
11	FTIYNQK
12	IRAHYDGRV
13	VQLLESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTD
14	LEWIGLINPYNG
15	FKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYF

16	VQLLESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTDYTMNWVKQSHGK NLEWIGLINPYNGFTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLT SEDSAVYYFIRAHYDGRVFWGQGTTLTVSS
17	ACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTAGAAATAAAACGG
18	CAGAGCCTTGACACAGTAATGGAAACACCTATTTACAT
19	CTGATCTACCAAGTTTCCAAC
20	TGCTCTCAAATTACACATTTTCTCTCC
21	TGTGAACTAGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTC AGTCTTGGAGATCAAGCCTCCGTCTCTTGCAGATCTAGT
22	CGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTC
23	CGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCA GGGACAGATTTCACTCAAGATCACCAGAGTGGAGGCTGA GGATCTGGGAGTTTATTTTC
24	TGTGAACTAGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTC AGTCTTGGAGATCAAGCCTCCGTCTCTTGCAGATCTAGTCAG AGCCTTGACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATCGGTAC CTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACCAA GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGC AGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCACCAGAGT GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAATTAC ACATTTTCTCTCCACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTAGAAAT AAAACGG
25	TFGGGTKLEIKR
26	QSLVHSNGNTYLH
27	LIYQVSN
28	CSQITHFPP
29	CELVMTQSPLSLPVS LGDQASVSCRSS
30	RYLQKPGQSPKL
31	RFSGVPDRFSGSGGTDFTLKITRVEAEDLG VYF
32	CELVMTQSPLSLPVS LGDQASVSCRSSQSLVHSNGNTYLHRYLQ KPGQSPKLLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKITRVEAEDL GVYFCSQITHFPPTFGGGTKLEIKR

SEQUENCE LISTING

<110> SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS, INC.
SPENCER LIN
QIMU LIAO
BRUCE CAMPBELL

<120> 针对 25- 羟基维生素 D2 和 D3 的抗体及其用途

<130> SMSD-0099

<140>

<141>

<150> 61/488, 630

<151> 2011-05-20

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400> 1

ttttggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctcg

36

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400> 2

tacacatga actgggtgaa gcagagccat ggaaagaac

39

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400> 3

tttactatct ataatcagaa g

21

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400> 4

ataagagcgc attacgacgg gagagtt

27

<210> 5

<211> 90

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400> 5
gtgcagctgc tcgagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gagcttcaat gaagatatcc 60

tgcaaggctt ctggttactc attcactgac 90

<210> 6

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400> 6

cttgagtgga ttggacttat taatccttac aatggt 36

<210> 7

<211> 99

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400> 7

ttcaagggca aggccacatt aactgtagac aagtcatcca gcacagccta catggaactc 60

ctcagtctga catctgaaga ctctgcagtc tattacttt 99

<210> 8

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp
 20 25 30

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 14

Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
 1 5 10

<210> 15

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 15

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 1 5 10 15

Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 20 25 30

Phe

115

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400> 17

acgttcggag gggggaccaa gctagaaata aaacgg

36

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400> 18

cagagccttg tacacagtaa tggaaacacc tatttacct

39

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400> 19

ctgatctacc aagtttccaa c

21

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400> 20

tgctctcaaa ttacacattt tectccc

27

<210> 21

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400> 21

tgtgaactag tgatgacca gtctccactc tccctgcctg tcagtcttgg agatcaagcc

60

tccgtctctt gcagatctag t

81

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400> 22

cggtagctgc agaagccagg ccagtctcca aagctc

36

<210> 23

<211> 102	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸	
<400> 23	
cgatcttctg ggggtcccaga caggttcagt ggcagtggat caggacaga tttcacactc	60
aagatcacca gagtggaggc tgaggatctg ggagtttatt tc	102
<210> 24	
<211> 342	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸	
<400> 24	
tgtgaactag tgatgacca gtctccactc tccctgcctg tcagtcttgg agatcaagcc	60
tccgtctctt gcagatctag tcagagcctt gtacacagta atggaaacac ctattttacat	120
cggtacctgc agaagccagg ccagtctcca aagctcctga tctaccaagt ttccaaccga	180
ttttctgggg tcccagacag gttcagtggc agtggatcag ggacagattt cacactcaag	240
atcaccagag tggaggctga ggatctggga gtttatttct gctctcaaat tacacatttt	300
cctcccacgt tcggaggggg gaccaagcta gaaataaac gg	342
<210> 25	
<211> 12	
<212> PRT	
<213> 人工序列	

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400> 25

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400> 26

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400> 27

Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<210> 31
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述 :合成的多肽

<400> 31
 Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 1 5 10 15

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 20 25 30

Tyr Phe

<210> 32
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述 :合成的多肽

<400> 32
 Cys Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
 1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Val Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His
 20 25 30

Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Arg Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80

Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln
 85 90 95

Ile Thr His Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

<210> 33

<211> 348

<212> DNA

<213> 未知的

<220>

<223> 未知的描述 :10H9 单克隆抗体重链可变区多核苷酸

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (348)

<400> 33

gtg cag ctg ctg gaa tct gga cct gag ctg gtg aag cct gga gct tca
 Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

48

1	5	10	15	
atg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act gac tac acc				96
Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr				
	20	25	30	
atg aac tgg gtg aag cag agc cat gga aag aac ctt gag tgg att gga				144
Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly				
	35	40	45	
ctt att aat cct tac aat ggt ttt act atc tat aat cag aag ttc aag				192
Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys				
	50	55	60	
ggc aag gcc aca tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac atg				240
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met				
	65	70	75	80
gaa ctc ctc agt ctg aca tct gaa gac tct gca gtc tat tac ttt ata				288
Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe Ile				
	85	90	95	
aga gcg cat tac gac ggg aga gtt ttt tgg ggc caa ggc acc act ctc				336
Arg Ala His Tyr Asp Gly Arg Val Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu				
	100	105	110	
aca gtc tcc tcg				348
Thr Val Ser Ser				
	115			
<210> 34				
<211> 116				
<212> PRT				
<213> 未知的				
<220>				
<223> 未知的描述 :10H9 单克隆抗体重链可变区多肽				

<400> 34

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15

Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr
 20 25 30

Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe Ile
 85 90 95

Arg Ala His Tyr Asp Gly Arg Val Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 35

<211> 342

<212> DNA

<213> 未知的

<220>

<223> 未知的描述 :10H9 单克隆抗体轻链可变区多核苷酸

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (342)

<400> 35

tgt gaa cta gtg atg acc cag tct cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt 48
Cys Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

gga gat caa gcc tcc gtc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac 96
Gly Asp Gln Ala Ser Val Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His
20 25 30

agt aat gga aac acc tat tta cat cgg tac ctg cag aag cca ggc cag 144
Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Arg Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

tct cca aag ctc ctg atc tac caa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc 192
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
50 55 60

cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag 240
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80

atc acc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa 288
Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln
85 90 95

att aca cat ttt cct ccc acg ttc gga ggg ggg acc aag cta gaa ata 336
Ile Thr His Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

aaa cgg 342
Lys Arg

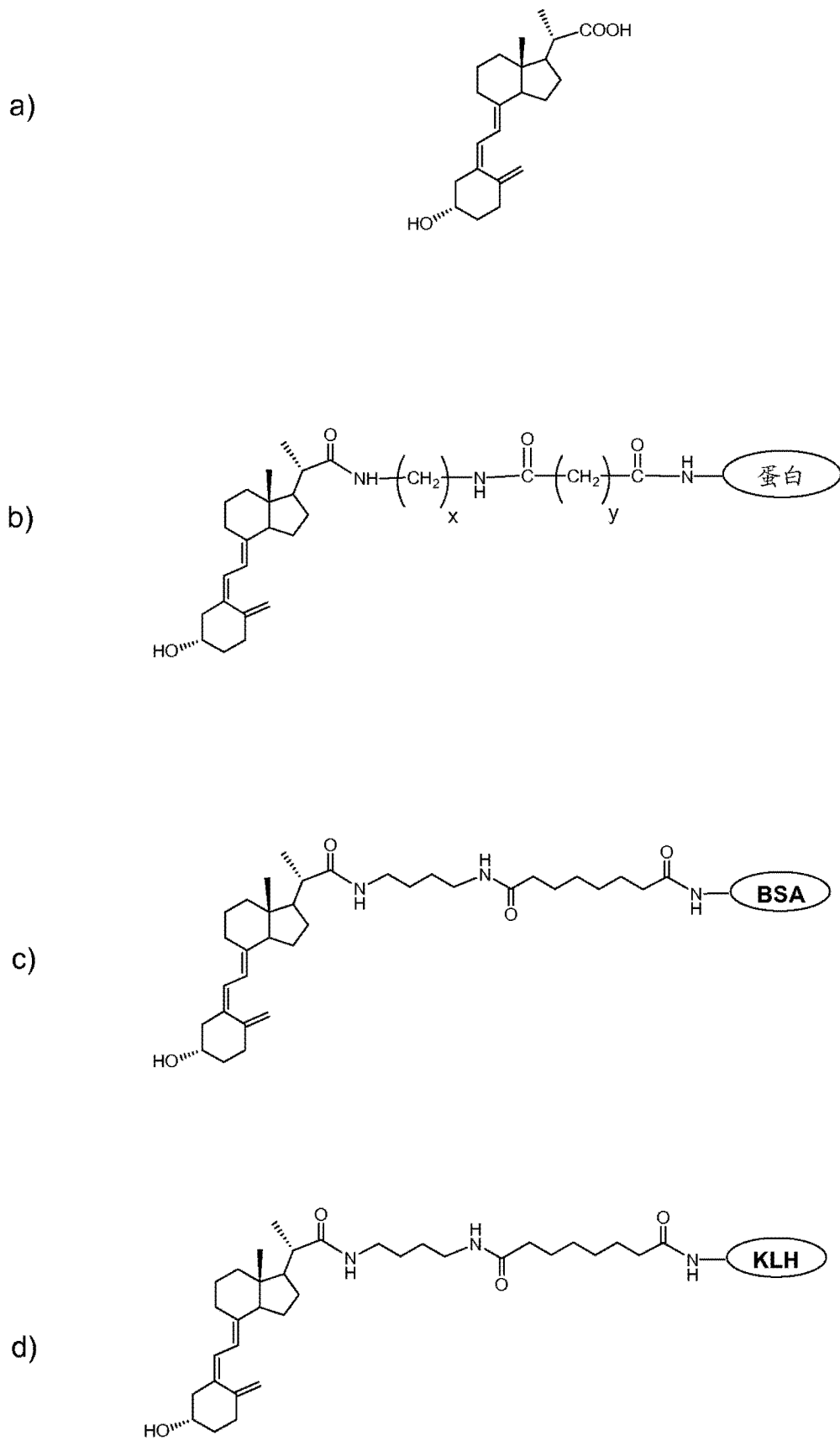


图 1

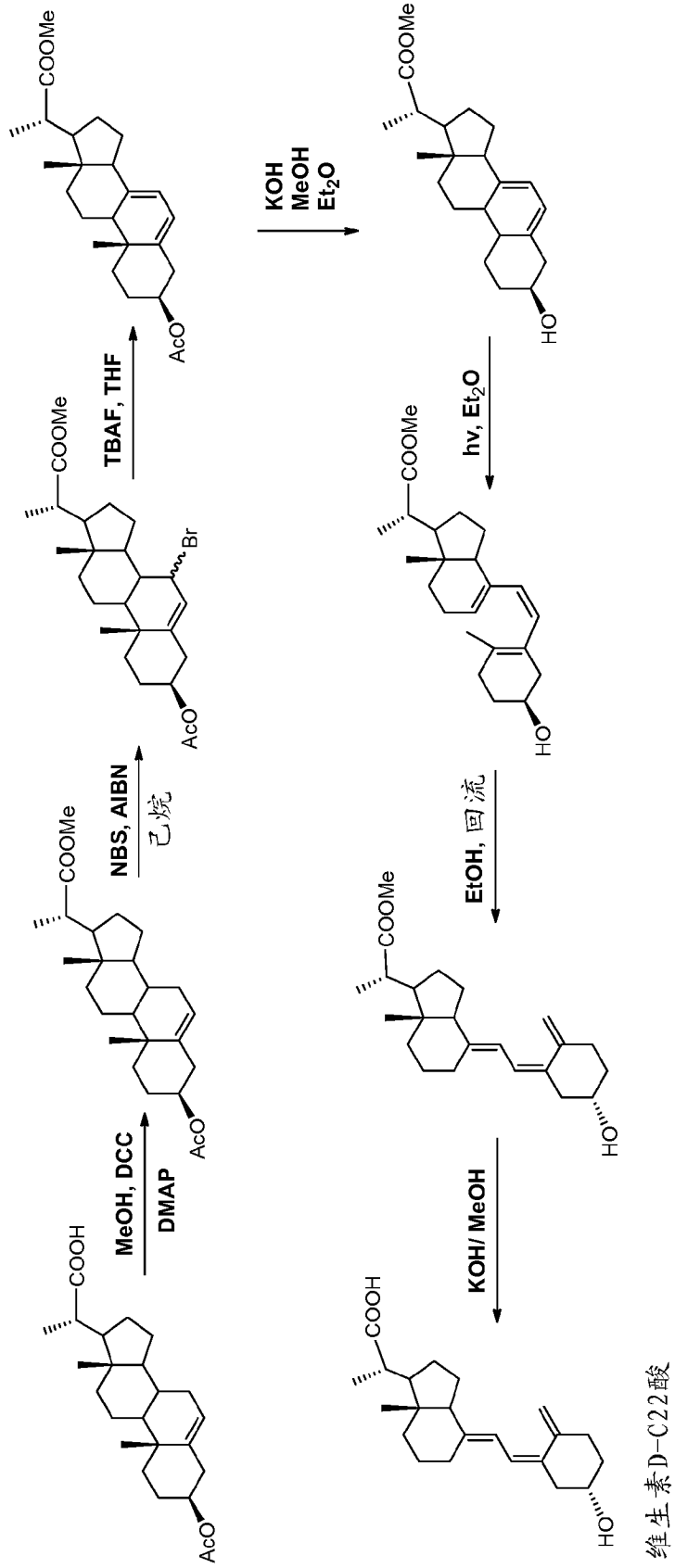


图 2

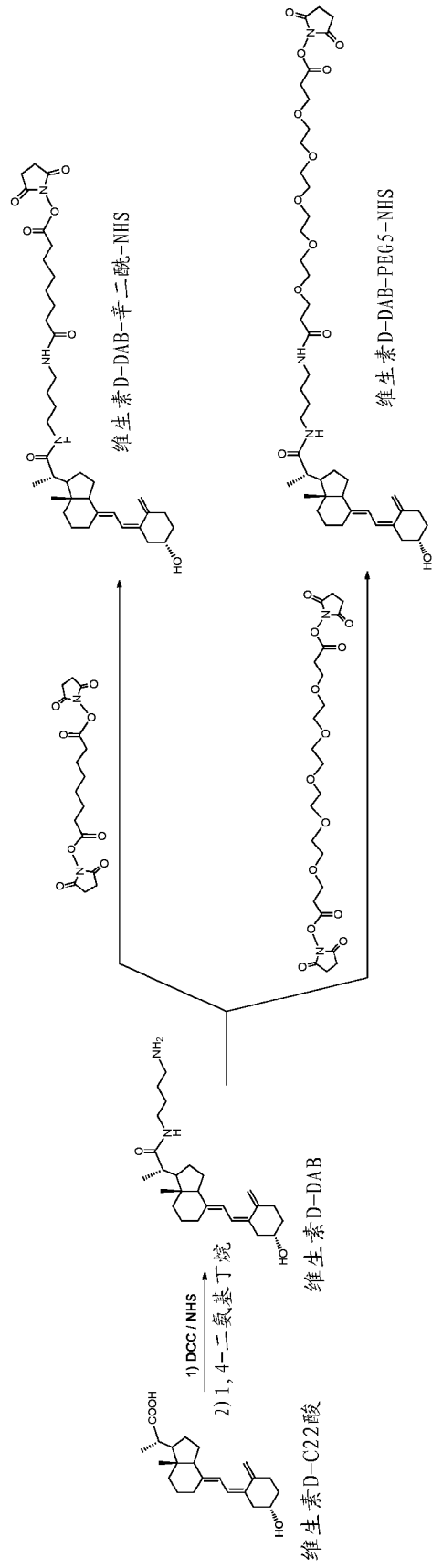


图 3

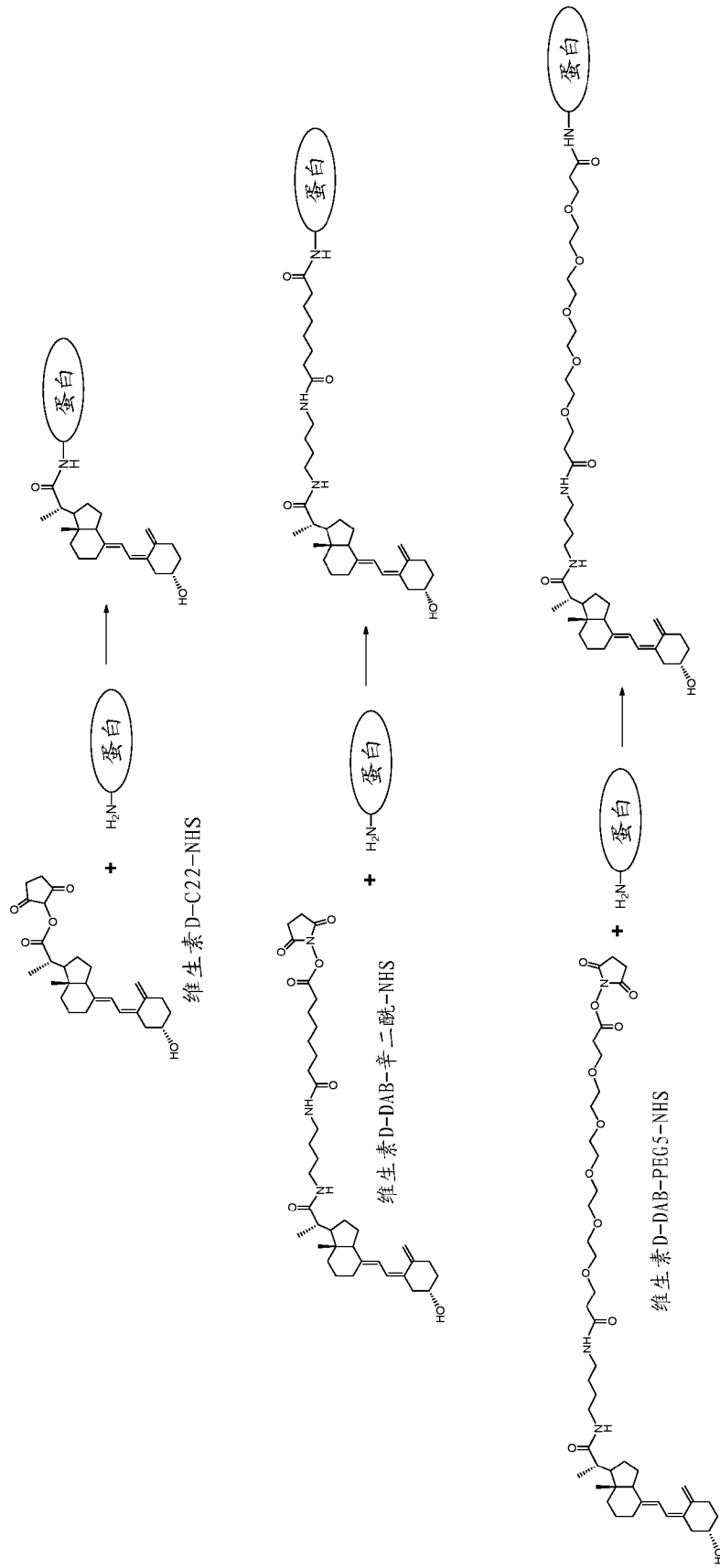


图 4

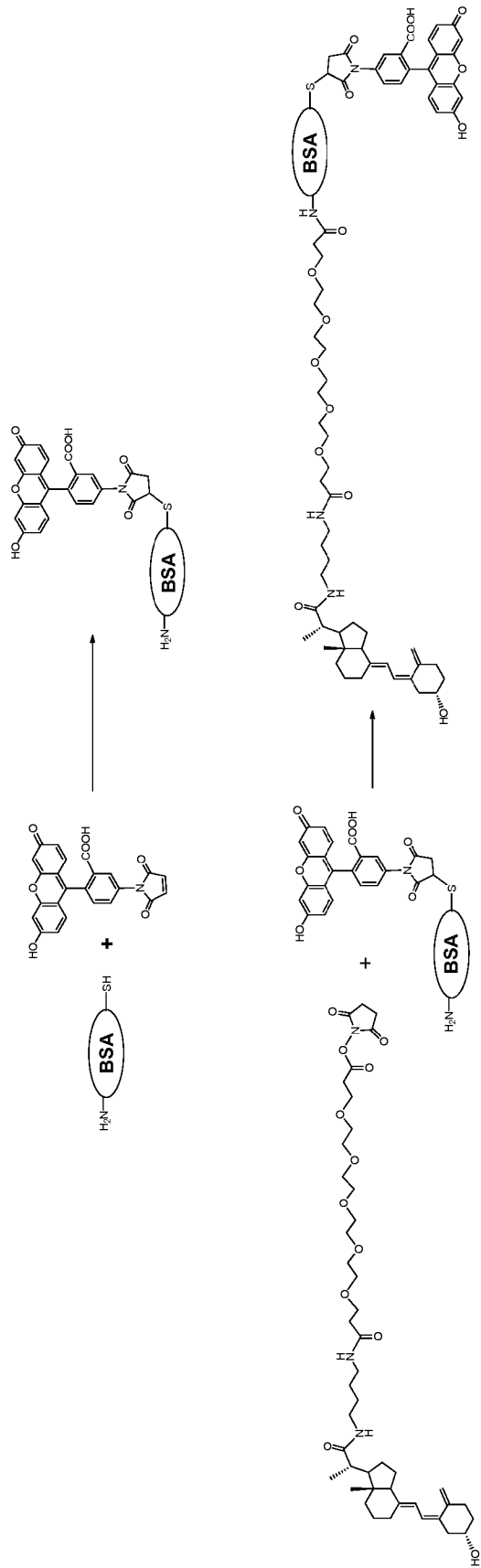


图 5

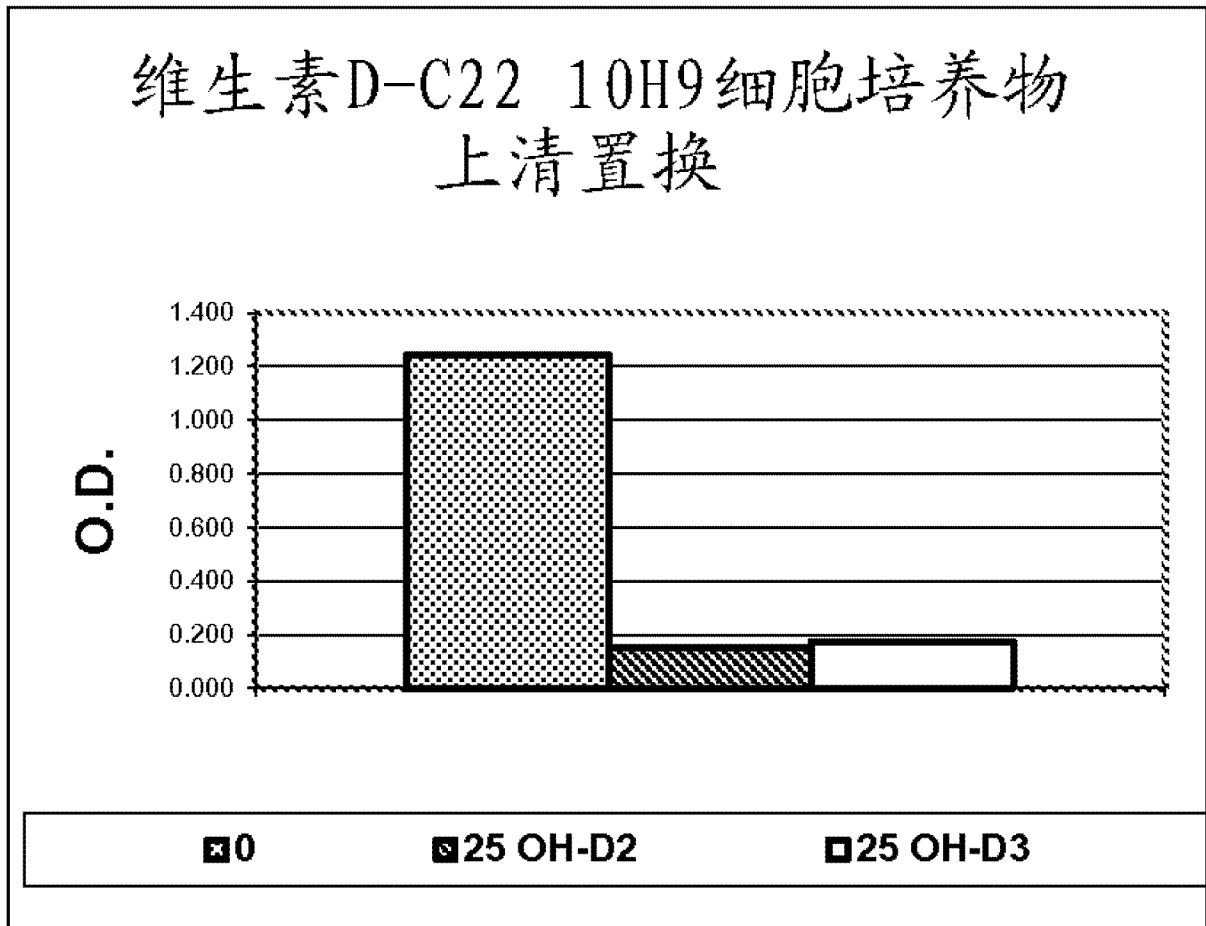


图 6

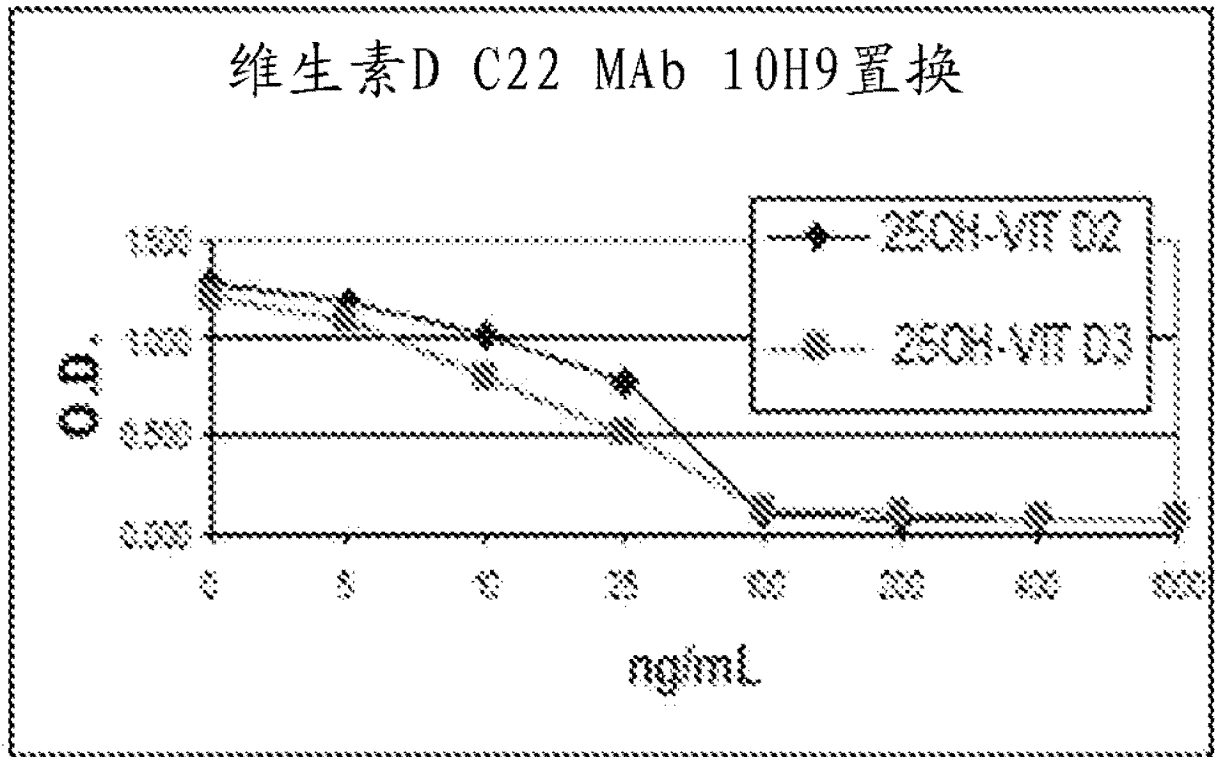
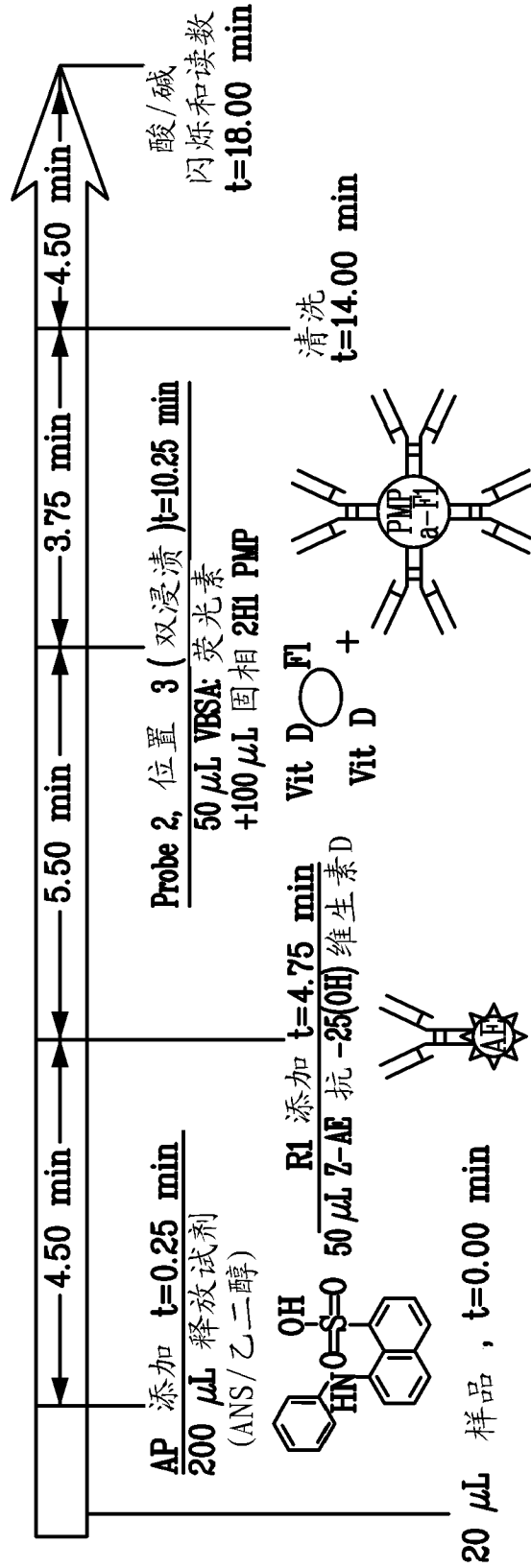


图 7

ADVLA Centaur 维生素D总含量测定的图解



25-羟基 25-羟基
 维生素 D₃ 维生素 D₂
 样品中 25(OH) 维生素 D

图 8

ADVIA Centaur 维生素D总量功能灵敏度

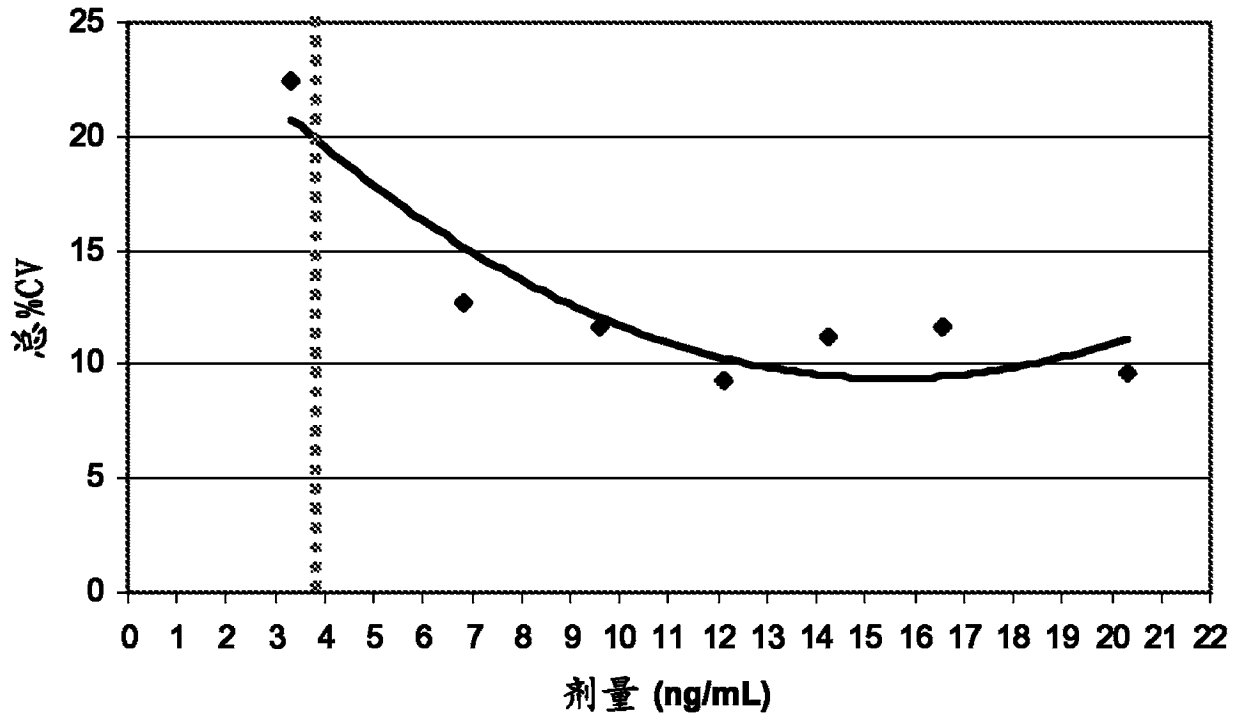


图 9

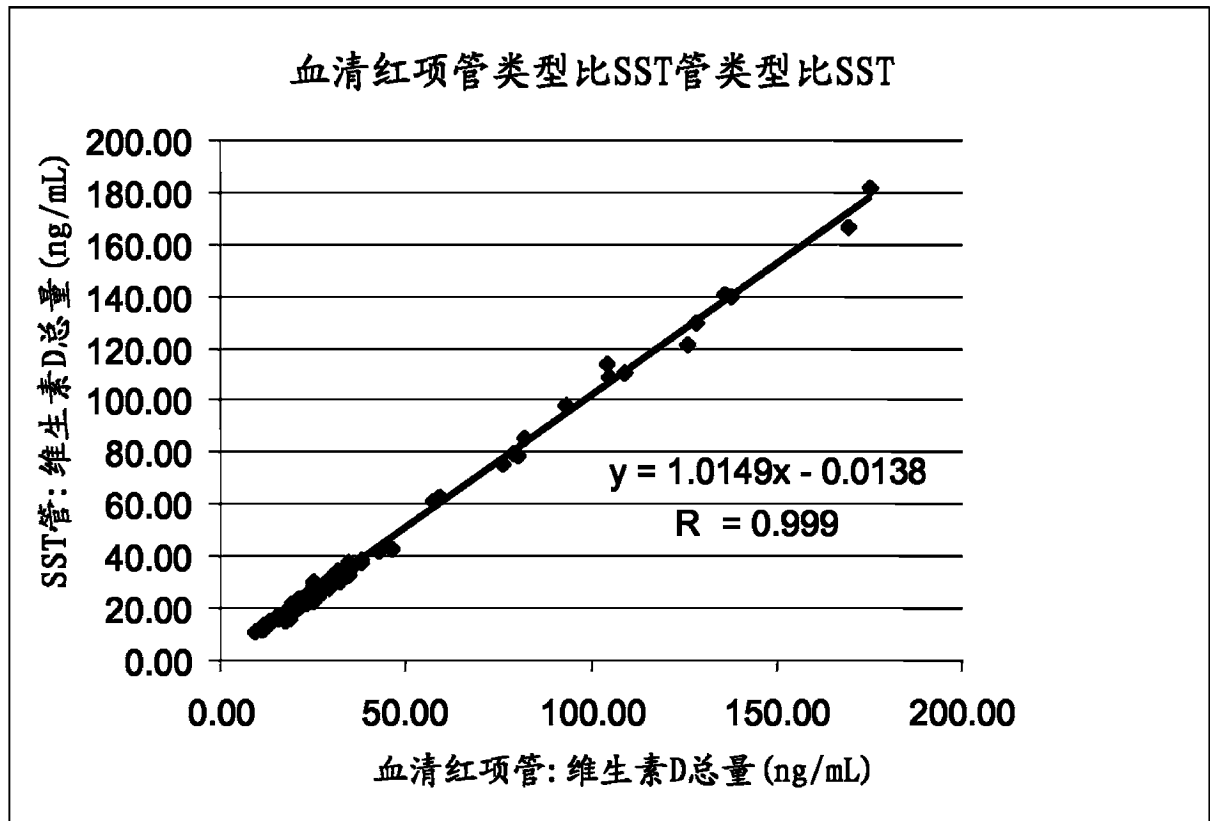


图 10

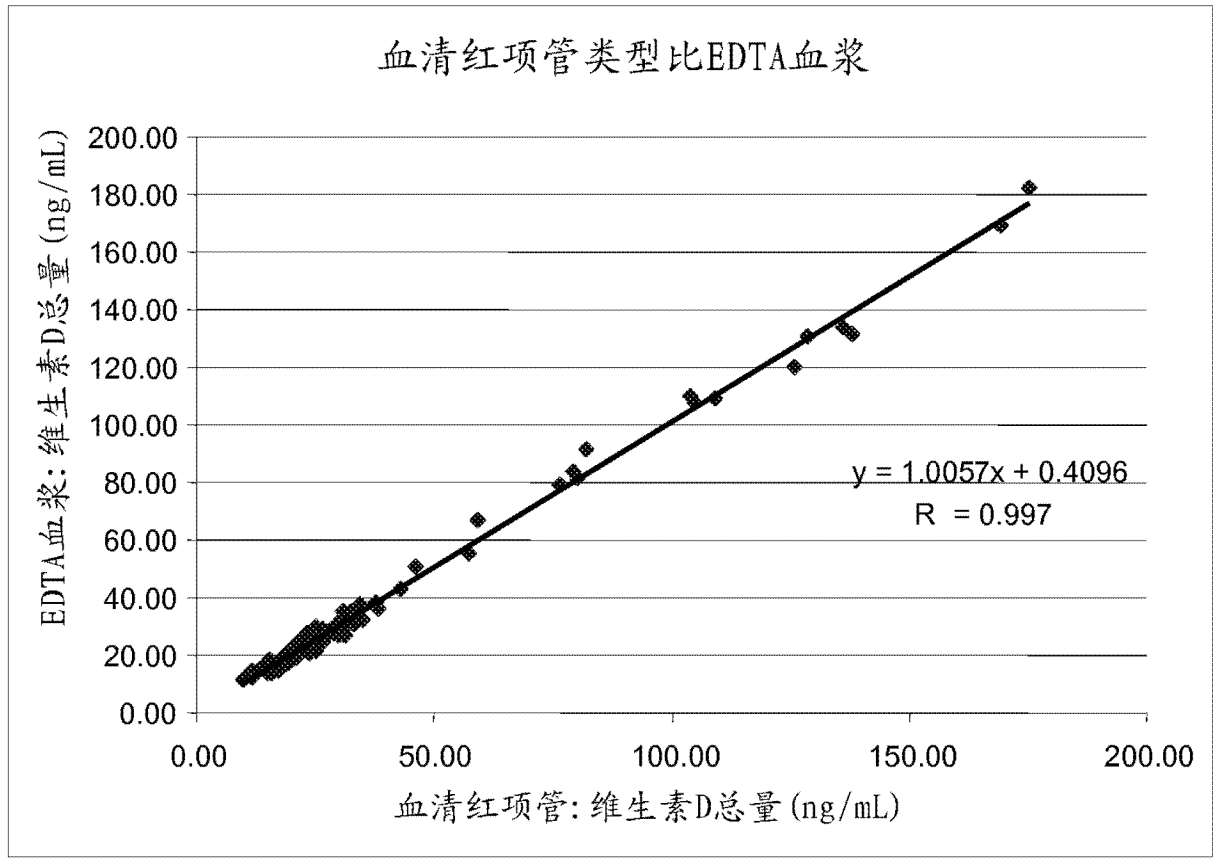


图 11

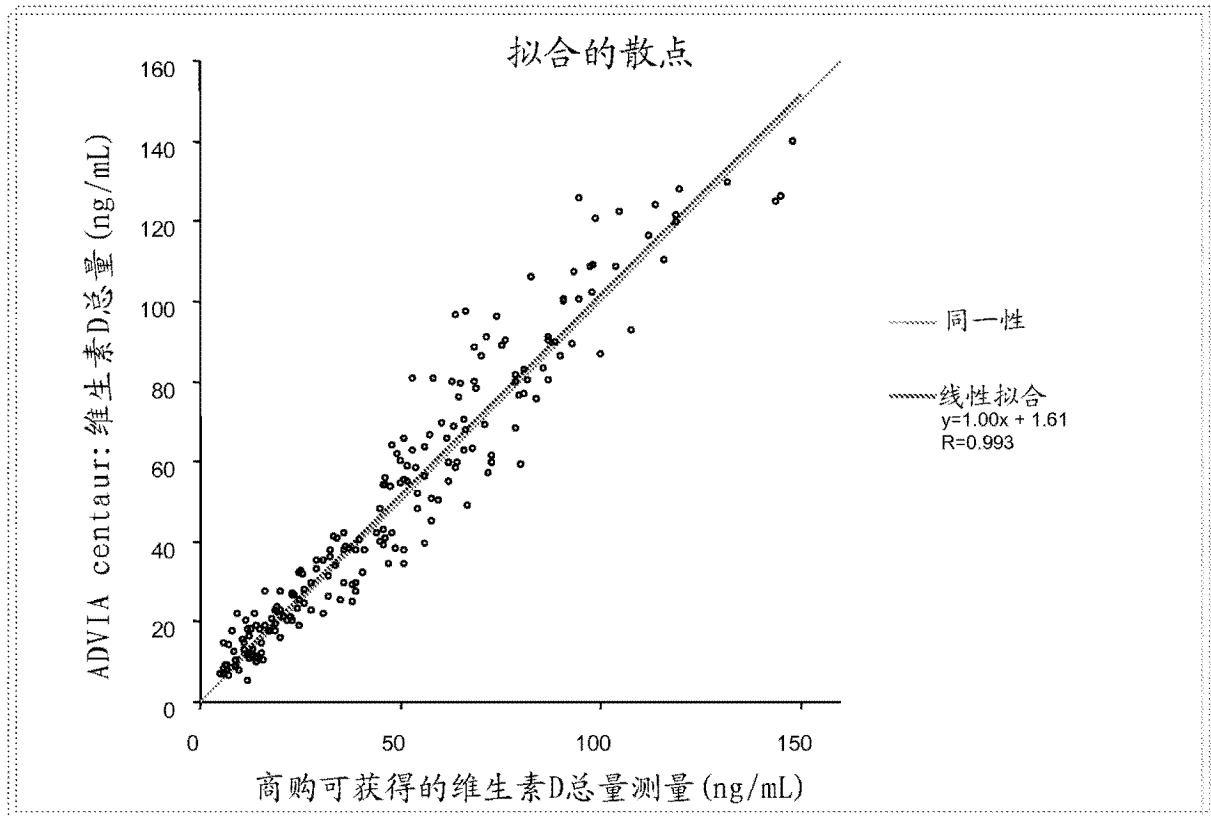


图 12

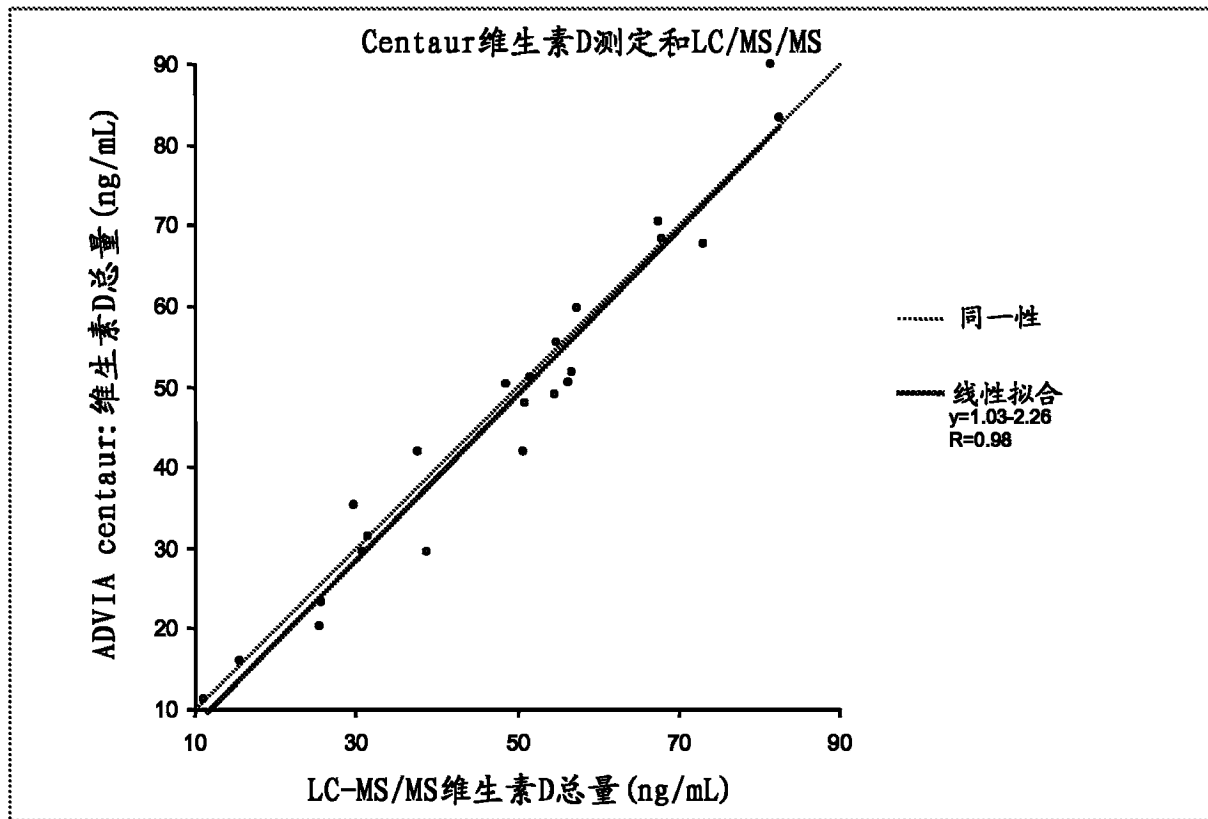


图 13

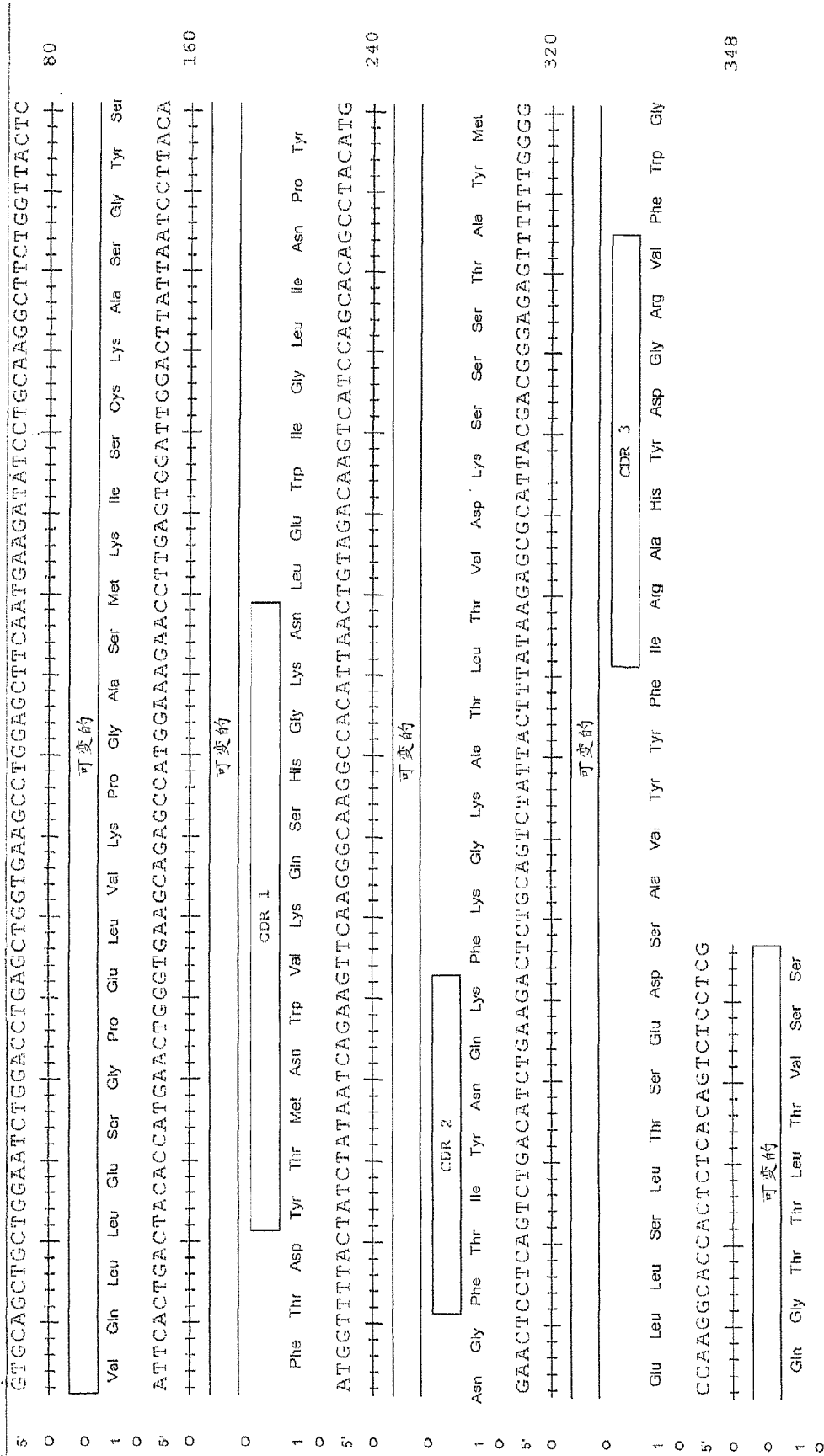


图 14

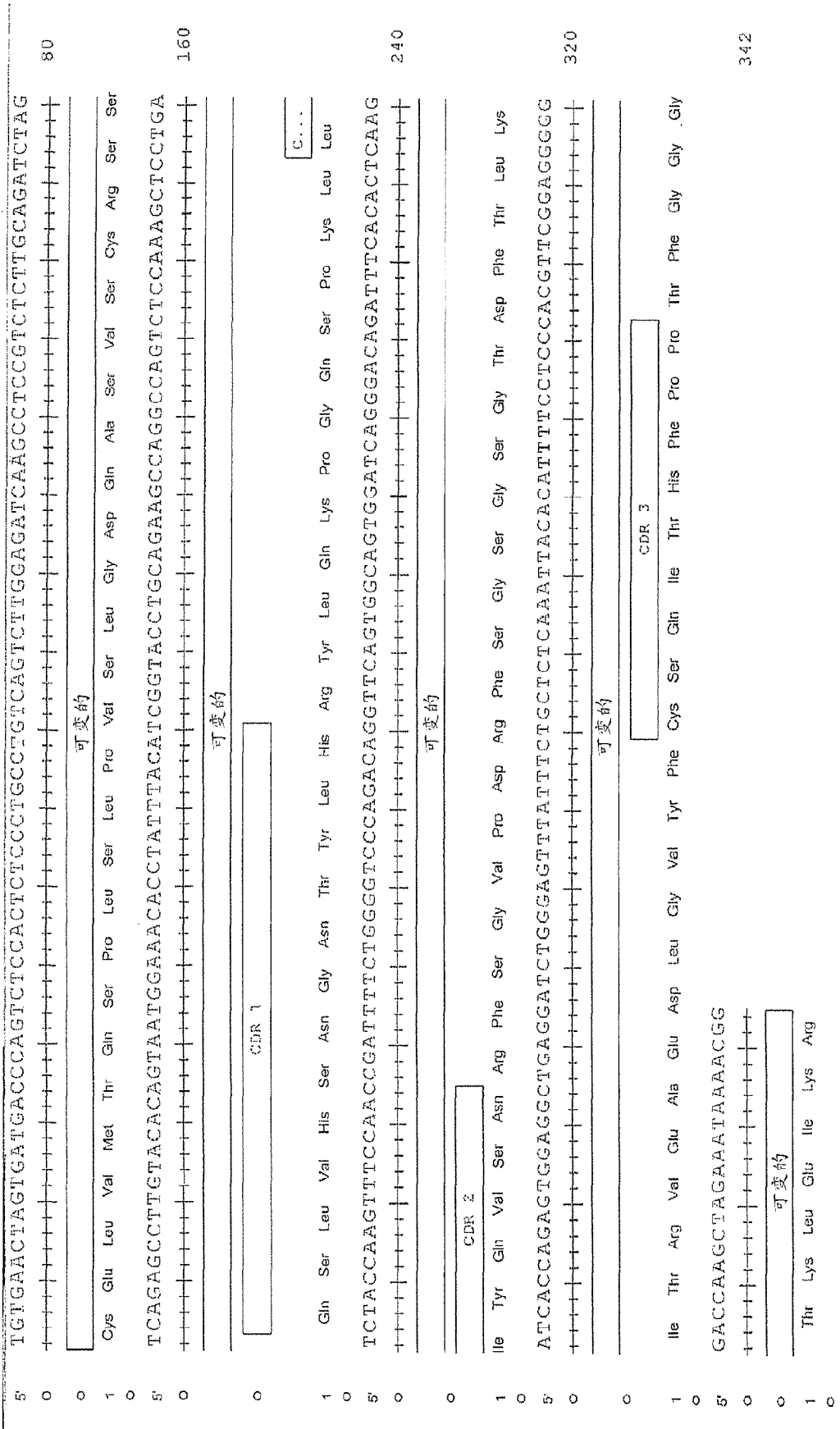


图 15

专利名称(译)	针对25-羟基维生素D2和D3的抗体及其用途		
公开(公告)号	CN103857698A	公开(公告)日	2014-06-11
申请号	CN201280024421.7	申请日	2012-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
当前申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
[标]发明人	布鲁斯A坎贝尔 林相喜 廖起牧 N P 萨哈基安 J V 弗里曼 R A 埃文格利斯塔		
发明人	布鲁斯·A·坎贝尔 林相喜 廖起牧 N.P.萨哈基安 J.V.弗里曼 R.A.埃文格利斯塔		
IPC分类号	C07K16/26 C07H21/00 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/82 C07K16/44 A61P3/02 G01N2800/02		
代理人(译)	周铁 林森		
优先权	61/488630 2011-05-20 US 13/458847 2012-04-27 US		
其他公开文献	CN103857698B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本文提供了可用于产生能够结合维生素D衍生物，例如25-羟基维生素D2和/或25-羟基维生素D3，或25-羟基维生素D类似物，例如维生素D-C22免疫原性分子或化合物的抗体的抗原性分子。还描述了使用这些抗原分子和相关抗原性化合物产生的抗体。另外，本文公开了用于检测受试者中维生素D缺乏的方法、用于治疗怀疑具有维生素D缺乏的受试者的方法、用于监测受试者中维生素D缺乏进展的方法和用于监测需要其的受试者中维生素D缺乏的治疗方法。还提供用于25-羟基维生素D2和D3的检测或定量的方法和试剂，用于稳定化维生素D类似物的方法，和用于从生物样品中维生素D结合蛋白分离25-羟基维生素D2和D3的方法。

