



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106415270 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201580012092.8

(22)申请日 2015.03.04

(30)优先权数据

1403815.2 2014.03.04 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.09.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2015/050624 2015.03.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/132588 EN 2015.09.11

(71)申请人 莫洛迪克有限公司

地址 英国贝德福德郡

(72)发明人 保尔·戴维斯 桑德拉·海明顿

(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

代理人 肖善强

(51)Int.Cl.

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

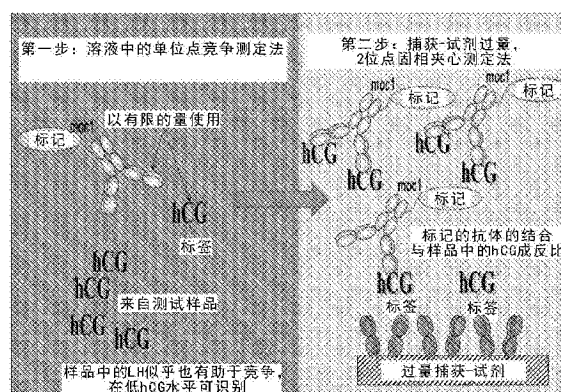
权利要求书2页 说明书21页 附图5页

(54)发明名称

测定法

(57)摘要

提供了用于测定液体样品中存在被分析物的方法,所述方法涉及:使所述液体样品与预定量的所述被分析物的类似物以及过量的第一结合片段接触,其中所述第一结合片段能够与所述被分析物和所述类似物的每种独立地结合;使所述混合物与第二结合片段接触;并且测定表示存在与所述第二结合片段结合的所述类似物-第一结合片段复合物的信号水平;其中如果测定的信号水平低于当不存在被分析物时测定的最大信号水平,则所述样品中存在被分析物。还提供了相应的试剂盒。



1. 一种测定存在于液体样品中的被分析物的存在的方法,所述方法包括:

a) 使所述液体样品与预定量的所述被分析物的类似物以及过量的第一结合片段接触,其中所述第一结合片段能够与所述被分析物和所述类似物的每种独立地结合,使得形成混合物,所述混合物包含类似物-第一结合片段复合物,或者当所述样品中存在被分析物时,所述混合物包含 (i) 类似物-第一结合片段复合物和被分析物-第一结合片段复合物;或 (ii) 被分析物-第一结合片段复合物且无类似物-第一结合片段复合物;

b) 使所述混合物与第二结合片段接触,其中所述第二结合片段能够与所述类似物-第一结合片段复合物结合,但是不与所述被分析物-第一结合片段复合物结合,并且被固定在或能够被固定在固相上;

c) 测定表示与所述第二结合片段结合的所述类似物-第一结合片段复合物的存在的信号水平;

其中如果步骤c) 中测定的信号水平低于当不存在被分析物时测定的最大信号水平,则所述样品中存在被分析物。

2. 一种测定存在于液体样品中的被分析物的存在的方法,所述方法包括:

a) 使所述液体样品与预定量的所述被分析物的类似物以及过量的第一结合片段接触,其中所述第一结合片段能够与所述被分析物和所述类似物的每种独立地结合但是不与所述类似物和被分析物同时结合,使得形成混合物,所述混合物包含类似物-第一结合片段复合物,或者当所述样品中存在被分析物时,所述混合物包含 (i) 类似物-第一结合片段复合物和被分析物-第一结合片段复合物;或 (ii) 被分析物-第一结合片段复合物且无类似物-第一结合片段复合物;

b) 使所述混合物与第二结合片段接触,其中所述第二结合片段能够与所述类似物-第一结合片段复合物结合,但是不与所述被分析物-第一结合片段复合物结合,并且被固定在或能够被固定在固相上;

c) 测定表示与所述第二结合片段结合的所述类似物-第一结合片段复合物的存在的信号水平;

其中如果步骤c) 中测定的信号水平低于当不存在被分析物时测定的最大信号水平,则所述样品中存在被分析物。

3. 根据权利要求1或2的方法,其中所述样品在与所述类似物接触之前与所述第一结合片段接触。

4. 根据权利要求1至3的任一项的方法,还包括通过将步骤(c) 中测定的信号水平与校准数据进行比较来测定所述样品中存在的被分析物的量或浓度的步骤。

5. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述被分析物是hCG或其片段或部分。

6. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述信号源自与所述第一结合片段直接关联或间接关联的标记。

7. 根据权利要求6的方法,其中所述标记选自包含酶、荧光团、放射性核素、溶胶、发色团和发光化合物的组。

8. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述被分析物包含氨基酸序列,并且所述类似物包括与所述被分析物序列的全部或所述被分析物序列的部分相同的氨基酸序列。

9. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述类似物包含所述被分析物中不存在的

结合区。

10. 根据前述权利要求中任一项的方法, 其中所述类似物包含氨基酸序列并且被重组地表达。

11. 根据前述权利要求中任一项的方法, 其中所述第一结合片段和/或所述第二结合片段是抗体。

12. 根据前述权利要求中任一项的方法, 其中所述第一结合片段是Fab或F(ab)₂。

13. 根据前述权利要求中任一项的方法, 其中所述第一结合片段与hCG特异性地结合。

14. 根据权利要求1至11中任一项的方法, 其中所述第一结合片段是hCGβ3-环特异性单克隆抗体。

15. 根据前述权利要求中任一项的方法, 其中所述样品源自生物来源或由生物来源组成, 所述生物来源包括: 血、血清、血浆、组织间液、唾液、痰、水晶体结构液、汗液、尿液、乳、腹水液、粘液、滑液液、腹膜液、经皮渗出物、咽排泄物、支气管肺泡灌洗液、气管呼吸物、脑脊髓液、精液、宫颈粘液、阴道或尿道分泌物或羊水。

16. 一种用于检测目标被分析物的测试试剂盒, 包含:

i) 被分析物类似物;

ii) (a) 被标记的第一结合片段或 (b) 未被标记的第一结合片段和被标记的第三结合片段; 以及

iii) 能够被固定的第二结合片段,

其中所述第一结合片段能够与目标被分析物和类似物的每种独立地结合, 所述第二结合片段能够与所述类似物和所述第一结合片段的复合物结合, 但是不能与所述被分析物或所述第一结合片段和所述被分析物的复合物结合, 并且所述第三结合片段能够与所述第一结合片段或所述类似物-第一结合片段复合物结合。

17. 一种用于检测目标被分析物的测试试剂盒, 包含:

i) 被分析物类似物;

ii) (a) 被标记的第一结合片段或 (b) 未被标记的第一结合片段和被标记的第三结合片段; 以及

iii) 能够被固定的第二结合片段,

其中所述第一结合片段能够与目标被分析物和类似物的每种独立地结合但是不能与所述类似物和所述被分析物两者同时结合, 所述第二结合片段能够与所述类似物和所述第一结合片段的复合物结合, 但是不能与所述被分析物或所述第一结合片段和所述被分析物的复合物结合, 并且所述第三结合片段能够与所述第一结合片段或所述类似物-第一结合片段复合物结合。

测定法

[0001] 本发明涉及用于测定液体样品中存在被分析物的方法和试剂盒。

[0002] 已知用于测定液体样品中存在被分析物的免疫测定法。免疫测定法的常见类型是夹心免疫测定法。在这样的测定法中，在涂有捕获抗体的试板上添加样品。样品中存在的被分析物与捕获抗体结合并且保留在试板上。清洗试板以去除未结合的被分析物，然后添加与结合在捕获抗体上的被分析物结合的检测抗体，从而在两种抗体之间形成被分析物夹层。可以通过与检测抗体附连的标记或者通过添加与检测抗体结合的另外被标记的抗体检测被分析物夹层。被检测的标记的量与样品中的被分析物的浓度成正比。

[0003] 替代方法是竞争抑制试验。又一次，在试板上设置捕获抗体。在试板上添加样品以及目标被分析物的被标记的版本。为了与捕获抗体结合，被标记的被分析物与样品中存在的被分析物竞争。清洗试板，测定捕获的被标记的被分析物存在的量。检测的被标记的被分析物的量通常与样品中的被分析物的浓度成反比。

[0004] 已知的测定法有许多问题。例如，对于某些测定法形式，空间位阻会危及抗体与被分析物之间的免疫复合物的形成（例如当所述相互作用发生在表面时）。

[0005] 在第一方面，本发明提供了测定液体样品中存在的被分析物的方法。本发明提供了测定液体样品中存在的被分析物的方法，所述方法包括：

[0006] a) 使所述液体样品与预定量的所述被分析物的类似物以及过量的第一结合片段(moiety)接触，其中所述第一结合片段能够与所述被分析物和所述类似物的每种独立地结合，使得形成混合物，所述混合物包含类似物-第一结合片段复合物，或者，当所述样品中存在被分析物时，所述混合物包含(i)类似物-第一结合片段复合物和被分析物-第一结合片段复合物；或(ii)被分析物-第一结合片段复合物且无类似物-第一结合片段复合物；

[0007] b) 使所述混合物与第二结合片段接触，其中所述第二结合片段能够与所述类似物-第一结合片段复合物结合，但是不与所述被分析物-第一结合片段复合物结合，并且被固定在或能够被固定在固相上；

[0008] c) 测定表示存在与所述第二结合片段结合的所述类似物-第一结合片段复合物的信号水平；

[0009] 其中如果步骤c)中测定的信号水平低于当不存在被分析物时测定的最大信号水平，则所述样品中存在被分析物。

[0010] 在上述步骤(a)中，所述第一结合片段能够与所述类似物和被分析物同时结合。

[0011] 本发明还提供了一种测定液体样品中存在被分析物的方法，所述方法包括：

[0012] a) 使所述液体样品与预定量的所述被分析物的类似物以及过量的第一结合片段接触，其中所述第一结合片段能够与所述被分析物和所述类似物的每种独立地结合但是不与所述类似物和被分析物同时结合，使得形成混合物，所述混合物包含类似物-第一结合片段复合物，或者当所述样品中存在被分析物时，所述混合物包含(i)类似物-第一结合片段复合物和被分析物-第一结合片段复合物；或(ii)被分析物-第一结合片段复合物且无类似物-第一结合片段复合物；

[0013] b) 使所述混合物与第二结合片段接触，其中所述第二结合片段能够与所述类似

物-第一结合片段复合物结合,但是不与所述被分析物-第一结合片段复合物结合,并且被固定在或能够被固定在固相上;

[0014] c) 测定表示存在与所述第二结合片段结合的所述类似物-第一结合片段复合物的信号水平;

[0015] 其中如果步骤c)中测定的信号水平低于当不存在被分析物时测定的最大信号水平,则所述样品中存在被分析物。

[0016] 本发明提供了相对于现有技术的测定法形式的许多优点,这些优点包括在溶液相形成第一抗体靶复合物;在溶液相中操作竞争免疫测定法形式,然后表面捕获并且结合物从游离的标记分离,这比现有技术的测定法形式涉及更少的清洗步骤。本发明的方法可以允许比已知方法例如RIA测定法和/或Immulin测定法更快地测定液体样品中存在被分析物。优选地,本发明的方法允许在24小时、12小时或4小时内测定液体样品中被分析物的存在。

[0017] 一旦液体样品与类似物和第一结合片段接触,类似物、第一结合片段和被分析物(在存在时)根据公知的布朗运动原理在溶液中自由扩散并且彼此相互作用。当样品中没有被分析物时,第一结合片段可以仅与类似物结合,并且形成包含类似物-第一结合片段复合物的混合物。混合物与第二结合片段接触。第二结合片段与类似物(甚至当其与第一结合片段复合时)结合,并且因此在第二结合片段上捕获类似物-第一结合片段复合物,所述第二结合片段优选地被过量提供。第二结合片段可以例如被固定在表面上,如微孔板的孔中。可替代地,第二结合片段可以是能够被固定的,例如通过被固定的结合片段,使得其在与类似物-第一结合片段复合物结合之前或之后被固定在表面上。在这种情况下,所述方法可以包括使第二结合片段与表面接触以便在表面上固定第二结合片段的额外的步骤。第二结合片段尚未捕获的任何第一结合片段可以在执行步骤(c)之前与捕获的类似物-第一结合片段复合物分离。这避免了第二结合片段尚未捕获的任何第一结合片段的后续检测。可以使用任何合适的分离方法,例如,用缓冲剂清洗、用空气清洗、磁性分离、过滤或免疫色谱法。然后测定表示存在捕获的类似物-第一结合片段复合物的信号水平。

[0018] 该信号优选地从与第一结合片段直接或间接附连或关联的标记(直接地或间接地)得到。不论如何产生信号以及标记如何与第一结合片段关联,信号的水平将与第二结合片段捕获的类似物-第一结合片段的量成正比。

[0019] 第一结合片段本身可以包含标记。可替代地,第一结合片段可以不包含标记,并且方法还可以包括使第一结合片段与第三结合片段接触,其中第三结合片段与第一结合片段(直接或间接)结合并且包含标记。因此,在这样的实施方式中,被标记的第三结合片段提供表示存在捕获的类似物-第一结合片段复合物的信号。第三结合片段可以在测定信号的水平之前在方法的任何阶段与第一结合片段接触。例如,在液体样品与第一结合片段接触之前、在此步骤之后但是在混合物与第二结合片段接触之前或者在混合物与第二结合片段接触之后但是在测定信号水平之前,第三结合片段可以与第一结合片段接触。当第一结合片段已经与类似物形成复合物并且第二结合片段已经捕获所述复合物时,第三结合片段可以与第一结合片段接触。一个或更多个中间结合部分可以被用来使第三结合片段或标记与第一结合片段联结。可以通过标记直接或间接信号的产生。例如,标记可以通过与试剂反应而引起产生信号。在这种情况下,方法还可以包括添加合适的试剂以便产生信号的步骤。以下

详细讨论合适的标记。

[0020] 当样品中不存在被分析物时检测到的信号水平是测试的最大信号。这是因为没有被分析物与用于与第一结合片段结合的类似物竞争,并且因此形成最大量的类似物-第一结合片段复合物并被第二结合片段捕获。这样,通过对已知不包含被分析物的样品进行本发明的方法可以获得最大信号。该最大信号可以与在相同条件下(例如,第一结合片段、类似物和第二结合片段的浓度)对具有未知的被分析物含量的样品执行的测试进行比较,以便确定是否存在以及存在多少被分析物。

[0021] 第一结合片段能够与被分析物和类似物的每种独立地结合,但是优选地不同时结合被分析物和类似物。优选地,第一结合片段对被分析物的亲和力与第一结合片段对类似物的亲和力基本上相同。样品和类似物可以与第一结合片段同时接触。在这种情况下,当样品中存在被分析物时,类似物和被分析物之间直接竞争与第一结合片段结合。可替代地,样品可以在样品或第一结合片段与类似物接触之前与第一结合片段接触。在这种情况下,当样品中存在被分析物时,被分析物与一定比例的可用的第一结合片段结合。类似物然后仅能与被分析物未占用的第一结合片段结合(如果实际上被分析物未占用任何第一结合片段)。在两种实施方式中,被分析物和类似物竞争与第一结合片段结合,并且被分析物-第一结合片段复合物以与样品中被分析物的浓度成正比的量形成。因此,与当样品中不存在被分析物时相比,形成更少的类似物-第一结合片段复合物。如果存在非常高浓度的被分析物,可能会完全击败类似物从而与第一结合片段结合,使得不形成类似物-第一结合片段。因此,形成包含以下各项的任一种的混合物:(i)类似物-第一结合片段复合物和被分析物-第一结合片段复合物;或(ii)只有被分析物-第一结合片段复合物。

[0022] 所述混合物与第二结合片段(可以被固定在或不被固定在表面上)接触。由于混合物中存在比样品中不存在被分析物时更少的类似物-第一结合片段复合物(或者完全没有类似物-第一结合片段复合物),第二结合片段捕获的类似物-第一结合片段的量也少于当样品中不存在被分析物时捕获的量。第二结合片段不与类似物-第一结合片段结合,并且因此,该复合物不会被第二结合片段捕获。第二结合片段不具有对于被分析物的结合亲和力。这意味着最大量的第二结合片段可用于捕获类似物-第一结合片段复合物,因为第二结合片段仅具有与类似物的结合亲和力。

[0023] 在第二结合片段与混合物接触之后,按照如上所述测定表示存在与第二结合片段结合的类似物-第一结合片段复合物的信号水平。在第二结合片段与类似物-第一结合片段复合物结合时而不被固定在表面上的情况下,所述方法优选地包括使第二结合片段与表面接触使得其在测定信号水平之前被固定的步骤。

[0024] 当样品中存在被分析物时,步骤(c)中测定的信号水平将低于当样品中不存在被分析物时测定的信号水平,因为更少的类似物-第一结合片段复合物形成并被第二结合片段捕获。换句话说,检测的信号与样品中的被分析物的浓度成反比。

[0025] 本发明的方法还可以用于测定样品中存在的被分析物的量或浓度。为此,步骤(c)中测定的信号水平通常与校准数据进行比较。校准数据可以通过进行对照获得,在对照中测定一系列已知的被分析物浓度所产生的信号水平。类似物、第一结合片段和第二结合片段的浓度应当对被检测的每种分析物浓度保持恒定。类似地,检测中使用的这些的每种的浓度应当与用于产生校准数据的浓度相同,所述校准数据将被与检测结果比较。因此,本发

明的方法可以包括通过将步骤(c)中测定的信号水平与校准数据进行比较来测定样品中存在的被分析物的量或浓度。

[0026] 由于检测的信号水平与被分析物的浓度成反比,信号水平越高,样品中的被分析物的浓度越低,反之,信号水平越低,样品中的被分析物的浓度越高。当存在非常低水平的被分析物时,这种相反的关系特别有用。这是因为这些情况中检测的信号水平是高的并且因此比信号水平与被分析物的浓度成正比(并且因此,当被分析物以低浓度存在时,产生极低的信号)的常规分析更容易检测。因此,本发明的方法具有以下优点:对低水平的被分析物具有高灵敏度。

[0027] 被分析物可以是能够与本发明的第一结合片段结合的任何存在物。例如,被分析物可以是或可以包括:肽、多肽、蛋白质、核酸、多核苷酸、碳水化合物、病原体、激素、维生素、类固醇、药物(例如滥用或DOA的药物)、感染性试剂或表示感染状态的存在物、微生物、细菌、病毒、毒素、有机化合物、污染物、杀虫剂、疾病的生物标记物、用于怀孕或任何上述项的代谢物或抗体的生物标志物。术语被分析物还包括任何抗原物质、半抗原、抗体、大分子及其组合。优选地,被分析物包括抗体识别的表位。在一种实施方式中,被分析物是人绒毛膜促性腺激素(hCG)或其片段或部分,包括完整的二聚体hCG、游离 α 亚基、游离 β 亚基以及完整的二聚体hCG、游离 α 亚基、游离 β 亚基的剪切的、裂解的或截短的形式,包括糖基化的变体,尤其可以包括游离 β 核心。

[0028] 人绒毛膜促性腺激素(hCG)是妊娠和肿瘤的重要生物标记物,其通常通过特异性免疫测定法来检测并定量。在妊娠期是必不可少的并且在受精的几天内可检测的hCG已经成为最频繁测定的激素之一,并且简单的、一步式的、基于抗体的hCG测量现在是妊娠检测的标准。此外,hCG测定在恶性滋养细胞疾病(绒毛膜癌)的诊断和管理中的作用是肿瘤学的伟大成就之一。它是理想的肿瘤标记物,当绒毛膜癌细胞存在时总是存在,并且与那些细胞的数量在数量上直接相关。结合适当的疗法正确使用hCG测定在这种原本侵略性的肿瘤中已经产生接近100%的存活率(Gregor,CR等人,J 2011,'Antibody Recognition of a Human Chorionic Gonadotropin Epitope(hCG beta₆₆₋₈₀) Depends on Local Structure Retained in the Free Peptide',Journal of Biological Chemistry,Vol.286,No.28, pp.25016-25026)。

[0029] 被分析物的类似物与被分析物的关系在于,第一结合片段能够结合类似物和被分析物,优选地具有基本上相等的亲和力。因此,类似物和被分析物可以具有结构的、序列的、化学的或免疫学的相似性,并且可以包含结合表位。例如,如果被分析物包含氨基酸或核酸序列,类似物可以具有与被分析物的序列的序列同一性。在一些实施方式中,类似物包含与整个被分析物序列或被分析物序列的部分相同的序列。在其他实施方式中,被分析物包含与整个被分析物序列或被分析物序列的部分具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的同一性的序列。与类似物序列的部分相同的被分析物序列的部分的长度可以是约5个至约1000个残基。例如,该部分的长度可以是约5个至约10个,约10个至约15个,约15个至约20个,约20个至约30个,约30个至约50个,约50个至约70个,约70个至约100个,约100个至约150个,约150个至约250个,约250个至约500个,约500个至约750个,或约750个至约1000个残基。

[0030] 类似物-第一结合片段复合体可以被第二结合片段结合。优选地,类似物本身能够

被第二结合片段结合。然而,第二结合片段也可以仅结合类似物与第一结合片段的复合物。相比之下,第二结合片段无法结合被分析物-第一结合片段复合物。因此,类似物可以包含用于第二结合片段的结合区域,其在被分析物中不存在或是存在于被分析物中但无法与第二结合片段结合,例如,其处于被分析物中第二结合片段不可触及的位置。所述结合区域可以包含氨基酸或核苷酸序列,例如,当类似物仅仅由氨基酸序列或核酸序列组成时。当类似物包含氨基酸序列,第二结合片段识别的结合区域可以是在类似物的氨基酸序列的N-末端、C-末端或任意其他位置。当类似物包含核酸序列时,第二结合片段识别的结合区域可以是在类似物的核酸序列的序列的5'端、序列的3'端或任意其他位置。

[0031] 在类似物包含氨基酸序列的情况中,类似物优选地被重组地表达以包括可以与第二结合片段结合并且在被分析物中不存在或者存在于被分析物中但是第二结合片段不可触及的氨基酸序列(结合区域)。可替代地,类似物可以使用标准的多肽合成技术进行合成。重组地表达类似物或者从头到尾合成类似物以包括被第二结合片段识别的氨基酸结合区域的优点在于,这些结合区域中仅一个(one)可以掺入到每个类似物分子中。如果在类似物被合成之后向类似物添加第二结合片段识别的结合区域,有可能使多个(multiple)结合区域掺入到类似物中。类似物中存在多个结合区域可能破坏或抑制本发明的方法。例如,多个结合区域可能阻止类似物与被分析物竞争来结合第一结合片段,或当与第一结合片段复合时,可能阻止类似物与第二结合片段结合。

[0032] N-末端或C-末端序列可以是一般称为标签的类型。非限制性实例一般包括:亲和标签、增溶标签、色谱标签和表位标签。特异性标签的非限制性实例包括FLAG-标签、MYC-标签、HA-标签、GST-标签、链霉素标签(Strep-tag)和聚组氨酸标签(poly-histidine tag)。本技术人员将意识到许多其他一般类别的标签以及每个类别的更具体的实例,并且将能够因此选择合适的第二结合片段。在一些实施方式中,结合区域可以是已知的抗原表位或可以是合成的。如果是合成的,其鉴于被分析物可以针对类似物特异性地设计结合区域。对已知的抗体或抗体片段特异性的表位可以形成类似物的部分。

[0033] 在一种实施方式中,被分析物是hCG并且类似物包含与SEQ 1D NO:1或SEQ 1D NO:2的序列具有75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列:

[0034] SEQ 1D NO:1:

[0035] HHHHHHHNELSHFLEGS SSS KEPLRPRCRP INATLAVEKE GCPVCITVNT TICAGYCPTM
TRVLQGVLPALPQVVCNYRD VRFE SIRLPG CPRGVNPVVS YAVALSQCQCALCRRSTTDCG
GPKDHPLTCD DPRFQDSSSS KAPPPSLPSP SRLPGPSDTP ILPQ

[0036] SEQ 1D NO:2:

[0037] NELSHFLEGS SSSKEPLRPR CRP INATLAV EKEGCPVCIT VNTTICAGYC PTMTRVLQGV
LPALPQVVCN YRDVRFE SIR LPGCPRGVNP VVS YAVALSQCQCALCRRSTT DCGGPKDHPL
TCDDPRFQDS SSSKAPPPSL PSPSRLPGPS DTPILPQ

[0038] 两种序列的下划线区域表示唯一表位区域,在本文中称为“ST068”。下划线区域与第二结合片段结合并且在被分析物中不存在,例如hCG中。

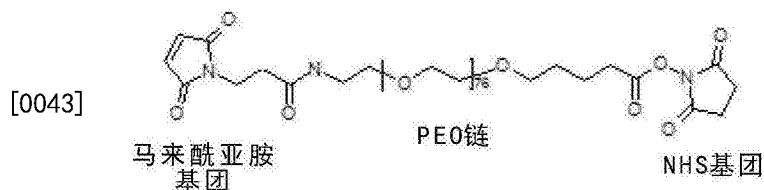
[0039] SEQ 1D NO:1和SEQ 1D NO:2的双下划线区域,即,序列:SIRLPGCPRGVNP VVS YAVALSQCQCALCRRSTT DCGGPKDHPLTCD DPRFQDS SSSKAPPPSL PSPSRLPGPS DTPILPQ,表示hCG中发现的结合区域,称为 β -3。因此,类似物可以包含(并且第一结合片段可以结合)下

述序列,所述序列包含SEQ ID NO:1的双下划线部分,即,SEQ ID NO:1的第85至102位残基,或SEQ ID NO:2的双下划线部分,即,SEQ ID NO:2的第78-95位残基;或由SEQ ID NO:1的双下划线部分,即,SEQ ID NO:1的第85至102位残基组成;或由SEQ ID NO:2的双下划线部分,即,SEQ ID NO:2的第78-95位残基组成。类似物可以包含(并且第二结合片段可以结合)下述序列,所述序列包含SEQ ID NO:1的第8-15位残基或SEQ ID NO:2的第1-8位残基;或由SEQ ID NO:1的第8-15位残基或SEQ ID NO:2的第1-8位残基组成。所述SEQ ID NO:1的第8-15位残基或SEQ ID NO:2的第1-8位残基即序列:NELSHFLE,其可以称为TAG表位。类似物可以包含与序列:S1RLPGCPRGVNPVVSYA具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性的序列,或者可以包含与序列:NELSHFLE具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性的序列。类似物可以包括多组氨酸标签,例如,SEQ ID NO:1的第1-7位残基。

[0040] 在其他实施方式中,具体地讲,在其中被分析物为hCG的实施方式中,类似物包含至少157个氨基酸,并且可以至少包含SEQ ID NO:2的第1-8位和第84-95位氨基酸。可替代地,类似物可以包含至少164个氨基酸,并且可以至少包含SEQ ID NO:1的第1-15位和第95-102位氨基酸。在一个实施方式中,类似物可以与SEQ ID NO:1具有50%的同一性,并且至少包含SEQ ID NO:1的第1-15位和第71-83位氨基酸。

[0041] 在另一个实施方式中,类似物包含NELSHFLEX_mS1RLPGZ_nPVVSYA (SEQ ID NO:3),其中X是具有长度“m”的连接肽,并且Z是具有长度“n”的连接肽。X和Z可以相同或者可以不同,并且可以每个独立地例如,氨基酸序列、聚乙二醇(PEG)、VA(参见以下结构)或β-丙氨酸。

[0042] VA连接肽:



[0044] 连接肽X的功能是减少TAG表位与hCG序列之间的空间干扰。为此,至少1.5nm(15埃)的距离应当足够。这大约等于五个氨基酸或两个AEEAc连接肽(PEG的短的替代选择)或合适的PEG连接肽(例如,具有两个重复单元)。

[0045] 连接肽Z的功能是鼓励反平行β转角,使得hcG-β3的两个侧翼序列以可以与第一结合片段结合的构象表位排列。所述构象表位的第一结合片段的亲和力在测定法的背景中很重要,并且可以通过调节连接肽的性能,例如其长度和氨基酸含量来优化。

[0046] 当X和/或Z为氨基酸序列时,“m”和“n”的长度均可以是约3个至约100个残基,长度均可以是约5个至约90个残基,长度均可以是约10个至约80个残基,长度均可以是约20个至约70个残基。例如,“m”和/或“n”的长度可以是3个、4个或5个残基。在“m”和/或“n”的长度为3个残基的实施方式中,可以使用序列PPN。本文中使用的术语氨基酸包括氨基和羧基的任何分子,包括自然产生的氨基酸、非自然产生的氨基酸和氨基酸衍生物,例如AEEAc和氨基-PEG-酸。

[0047] 所需的类似物的量取决于多个因素。通常以低的、有限的浓度提供类似物。这可以是约4-8微微克/ml,但是所需的浓度对每个批次都不同,并且技术人员可以测定合适的浓度。

[0048] 结合片段(第一、第二和/或第三)可以是自然产生的或完全合成的或部分合成的。结合片段及其靶(类似物和分析物是第一结合片段的靶,类似物-第一结合片段复合物是第二结合片段的靶,并且第一结合片段是第三结合片段(当存在时)的靶)共同形成一对结合伙伴。结对的成员具有彼此特异性结合的性质。特异性结合的结对的类型的实例是抗原-抗体,生物素-抗生物素蛋白,激素-激素受体,互补核苷酸序列,互补的肽序列,受体-配体,酶辅助因子-酶,酶抑制剂-酶,酶-底物,碳水化合物-凝集素,聚合酸-碱,染料-蛋白结合剂,肽-特异性蛋白结合剂(例如,核糖核酸酶-S-肽和核糖核酸酶S-蛋白)等。虽然本发明一般涉及抗原-抗体类型的反应,并且本发明的优选的结合片段是抗体或其片段,也设计了采用其他类型的结合片段和结合配对的其他实施方式。

[0049] 本文中使用的术语“抗体”指的是免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即,包含特异性地结合抗原的抗原结合位点的分子(自然产生的或者部分合成的或全部合成的)。所述术语还涵盖具有作为抗体结合域或与抗体结合域同源的结合域的任何多肽或蛋白质。这些可以从自然来源获得,或者可以部分合成地或全部合成地产生。抗体的实例是:免疫球蛋白同种型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)及其同型子类;包含抗原结合域的片段,如Fab、F(ab')₂、scFv、Fv、dAb、Fd;和双体。抗体可以是多克隆的或单克隆的。单克隆抗体可以在本文中称为“mab”。

[0050] 能够利用单克隆抗体和其他抗体,并且使用重组DNA技术的技术来产生保留原始抗体的特异性的其他抗体或嵌合体分子。这些技术可以涉及向不同的免疫球蛋白的恒定区或恒定区加上框架区引入编码抗体的免疫球蛋白可变区、或互补决定区(CDR)的DNA。例如参见EP-A-184187、GB 2188638A或EP-A-239400。

[0051] 因为可以以许多方式制作或修饰抗体,术语抗体应当理解为涵盖任何特异性结合成员或具有带有所需特性的结合域的物质。因此,该术语涵盖抗体片段、衍生物、抗体的功能等同物和同系物、人源化抗体,包括包含免疫球蛋白结合域的任何多肽(不论是自然产生的还是全部合成的或部分合成的)。因此包含免疫球蛋白结合域或等同物的与另一种多肽融合的嵌合体分子也被包括。嵌合体抗体的克隆和表达详见于EP-A-0120694和EP-A-0125023。人源化抗体可以是具有非人源(例如,鼠科)抗体的可变区和人源抗体的恒定区的经修饰的抗体。例如美国专利号522539中描述了用于制备人源化抗体的方法。

[0052] 已经表明了整个抗体的片段可以执行结合抗原的功能。结合片段的实例是:(i)由VL、VH、CL和CH1域组成的Fab片段;(ii)由VH和CH1域组成的Fd片段;(iii)由单个抗体的VL和VH域组成的Fv片段;(iv)由VH域组成的dAb片段(Ward, E. S. 等人, Nature 341:544-546 (1989));(v)隔离的CDR区;(vi)F(ab')₂片段,包含两个关联的Fab片段的二价体片段;(vii)单链Fv分子(scFv),其中VH域和VL域通过多肽连接肽关联,其允许两个域关联来形成抗原结合位点(Bird等人, Science 242:423-426 (1988);Huston等人, PNAS USA 85:5879-5883 (1988));(viii)双特异性单链Fv二聚体(PCT/US92/09965)和(ix)通过基因融合构造的“双体”、多价体或多特异性片段(WO 94/13804;P. Hollinger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993))。

[0053] 双体是多肽的多聚体,每个多肽包含:包含免疫球蛋白轻链的结合区的第一域和包含免疫球蛋白重链的结合区的第二域,这两个域是联结的(例如,通过多肽连接肽)但是无法彼此关联上来形成抗原结合位点:抗原结合位点通过使多聚体内的一个多肽的第一域

与多聚体内的另一个多肽的第二域关联来形成(W094/13804)。

[0054] 在使用双特异性抗体的情况中,这些双特异性抗体可以是能够通过多种方式制造的常规的双特异性抗体(Hollinger&Winter,Current Opinion Biotechnol.4:446-449 (1993)),例如,通过化学方式制备或从混合杂交瘤制备,或者可以是任何以上提及的双特异性抗体片段。优选的是使用scFv二聚体或双体,而非整个抗体。仅使用可变域,可以在没有Fc区的情况下构造双体和scFv,潜在地降低抗个体基因型反应的效应。其他形式的双特异性抗体包括单链“Janusins”,详见于Traunecker等人,EMBO Journal 10:3655-3659 (1991)。

[0055] 双特异性双体,相比双特异性整个抗体,也可以是有用的,因为它们容易构造并且在大肠杆菌中表达。合适的结合特异性的双体(和许多其他多肽,如抗体片段)可以通过使用来自库的噬菌体展示(W094/13804)容易地进行选择。如果双特异性抗体的一个臂将要保持恒定,例如,具有针对抗原X的特异性,那么可以制作其中另一个臂被改变并且选择合适的特异性的抗体的库。

[0056] “抗原结合域”是包含与抗原部分或全部特异性结合的区域的部分。在大抗原的情况下,抗体可以仅结合抗原的特异性部分,该部分被称为表位。抗原结合域可以由一个或多个抗体可变域提供。抗原结合域可以包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。

[0057] “特异性”一般用于指结合片段不会表现出与除其靶之外的分子任何显著结合的情形,例如,与任何其他分子具有小于约30%、优选地小于约20%、10%、1%、0.5%、0.3%、0.2%或0.1%的交叉反应性。该术语还适用于例如抗原结合域对于由许多抗原携带的特定表位是特异性的情形,在这种情况下,携带抗原结合域的结合片段将能够结合携带表位的多种抗原。

[0058] 第一、第二和第三结合片段没必要必须具有相同类型的结合片段,尽管它们在一些实施方式中可以是这样的。

[0059] 第一结合片段可以是hCgβ3-环-特异性单克隆抗体,例如,抗体“8G5”(参见Gregor等人,J Biol Chem.2011Jul 15;286(28):25016-26)。第一结合片段可以在约1ng/ml的浓度下使用,并且可以是抗体-HRP缀合物。

[0060] 第二结合片段可以被固定在或能够被固定在选自包含以下各项的组的表面上:微量滴定板、硝基纤维素基质、玻璃纤维基质、颗粒、膜、栓(peg)、载玻片(slide)、吸水膜、微流体装置的表面、色谱材料。颗粒可以例如是磁性颗粒、乳胶颗粒、玻璃颗粒、磁敏感颗粒或胶态金属颗粒。

[0061] 如上所述,该信号优选地从与第一结合片段直接或间接附连或关联的标记(直接地或间接地)得到。“标记”指的是能够产生视觉或仪器装置可检测的信号的任何物质。本发明中有用的多种标记包括通过化学的或物理的方式产生信号的标记,例如,可通过光学方式检测到。所述标记包括酶和底物、色原体、催化剂、荧光化合物、化学发光化合物、电活性物质、染料分子、放射性标记和颗粒标记。第一结合片段本身可以内在能够产生可检测的信号。标记可以与第一结合片段共价结合。特别地,标记可以选自可通过光学方式检测到的标记。当标记包含酶时,所述方法可以包括使酶与底物接触以产生信号的步骤。在一种实施方式中,标记是辣根过氧化物酶(HRP)。

[0062] 标记可以包括颗粒,如金颗粒,银颗粒,胶体非金属颗粒,如硒或碲,染色或着色的颗粒,如掺入染料或染料溶胶的聚合物颗粒。染料可以是任何合适的颜色,例如,蓝色。染料可以是发荧光的。染料溶胶可以从市售的疏水性染料如Foron Blue SRP (Sandoz) 和 Resolin Blue BBLs (Bayer) 制备。合适的聚合物标记可以选自合成的聚合物范围,如聚苯乙烯、聚乙烯基甲苯、聚苯乙烯-丙烯酸和聚丙烯醛。使用的单体通常是水溶性的,并且在水性表面活性剂中乳化使得形成单体胶粒 (micelle), 然后通过向乳液添加引发剂使单体胶粒聚合。产生基本上球形的聚合物颗粒。所述聚合物颗粒的理想粒度范围为约0.05至约0.5 μm 。根据示例性的实施方式,标记为蓝色聚合物颗粒或金颗粒。

[0063] 如上所述,在所述方法的开始,第二结合片段可以被固定在表面上,或者可以不被固定。在后一种情况中,第二结合片段可以在其已经与表面接触并被固定之前或之后与类似物-第一结合片段复合物接触。

[0064] 液体样品可以源自任何来源,如工业来源、环境来源、农业来源或生物来源。样品可以源自生物来源或由生物来源组成,所述生物来源包括:血、血清、血浆、组织间液、唾液、痰、水晶体结构液 (ocular lens liquid)、汗液、尿液、乳、腹水液、粘液、滑液液、腹膜液、经皮渗出物、咽排泄物、支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage)、气管呼吸物 (tracheal aspirations)、脑脊髓液、精液、宫颈粘液、阴道或尿道分泌物及羊水。液体样品可以通过稀释、处理或提取成水性液体而从半固态或固态来源得到。

[0065] 在某些情况下,可能预期样品含有非常高浓度的被分析物。例如,当样品已经从具有晚期疾病状态的受试者获得时,可能是这种情况。在这种情况下,在样品与第一结合片段和类似物接触之前可以稀释样品以使被分析物的浓度在合适的范围内以供测定。

[0066] 在第二方面,本发明提供了一种用于检测目标被分析物的测试试剂盒。本发明提供了用于检测目标被分析物的测试试剂盒,所述试剂盒包含:

[0067] i) 被分析物类似物;

[0068] ii) (a) 被标记的第一结合片段或 (b) 未被标记的第一结合片段和被标记的第三结合片段;以及

[0069] iii) 能够被固定的第二结合片段,

[0070] 其中所述第一结合片段能够与目标被分析物和类似物的每种独立地结合,所述第二结合片段能够与所述类似物和所述第一结合片段的复合物结合,但是不能与所述被分析物或所述第一结合片段和所述被分析物的复合物结合,并且所述第三结合片段能够与所述第一结合片段或与所述类似物-第一结合片段复合物结合。

[0071] 所述第一结合片段能够与所述类似物和被分析物两者同时结合。

[0072] 本发明还提供了一种用于检测目标被分析物的测试试剂盒,所述试剂盒包含:

[0073] i) 被分析物类似物;

[0074] ii) (a) 被标记的第一结合片段或 (b) 未被标记的第一结合片段和被标记的第三结合片段;以及

[0075] iii) 能够被固定的第二结合片段,

[0076] 其中所述第一结合片段能够与目标被分析物和类似物的每种独立地结合但是不能与所述类似物和所述被分析物同时结合,所述第二结合片段能够与所述类似物和所述第一结合片段的复合物结合,但是不能与所述被分析物或所述第一结合片段和所述被分析物

的复合物结合,并且所述第三结合片段能够与所述第一结合片段或所述类似物第一结合片段复合物结合。

[0077] 被分析物、类似物以及第一、第二和第三结合片段可以如在与本发明的第一方面所定义。

[0078] 在第三方面,本发明提供了包含与SEQ 1D NO:1或SEQ 1D NO:2的序列具有75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%的同一性的氨基酸序列的或由与SEQ 1D NO:1或SEQ 1D NO:2的序列具有75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%的同一性的氨基酸序列组成的多肽,或者包含氨基酸序列NELSHFLEX_mS1RLPGZ_nPVVSYA (SEQ 1D NO:3)的或由氨基酸序列NELSHFLEX_mS1RLPGZ_nPVVSYA (SEQ 1D NO:3)组成的多肽,其中X和Z是长度分别为“m”和“n”的连接肽。X、Z、m”和“n”如本发明的第一方面所限定。

[0079] 所述多肽可以包含与序列:S1RLPGCPRGVNPVVSYA具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性的序列,和/或可以包含与序列:NELSHFLE具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性的序列。所述多肽可以包含至少164个氨基酸,并且可以至少包含SEQ 1D NO:1的第1-15位和第95-102位氨基酸。所述多肽可以包含至少157个氨基酸,并且可以至少包含SEQ 1D NO:2的第1-8位和第84-95位氨基酸。在一个实施方式中,所述多肽可以与SEQ 1D NO:1具有50%的同一性,并且至少包含SEQ 1D NO:1的第1-15位和第71-83位氨基酸。

[0080] 本发明多肽可以设置为隔离的或重组的形式,并且可以与其他片段融合。多肽可以设置为基本上纯的形式,也就是说,在基本程度上不含其他蛋白。因此,多肽可以在其作为主要成分存在的组合物中被提供(即,当以排除溶剂或载体的重量为基础来测定时,其以至少50%的水平;优选地至少75%、至少90%或至少95%的水平存在)。

[0081] 本发明的第四方面提供编码第三方面的多肽的核酸。

[0082] 如在本文中所使用,关于核酸分子,隔离的或重组的意味着以下各项的任一种:a)体外扩增的,通过例如聚合酶链反应(PCR);b)通过克隆重组产生;c)纯化的,通过例如凝胶分离;或d)合成的,例如通过化学合成。

[0083] 核酸,例如,DNA和RNA,可以通过使用本领域中已知的方法合成,例如,使用常规的化学方法或聚合酶链反应(PCR)扩增或其他扩增方法。

[0084] 在第五方面,本发明提供了包含编码第三方面的多肽的核酸的表达载体。

[0085] 很多种宿主表达载体系统可以用于表达本发明的多肽。所述宿主表达系统可以表示目标的编码序列可以经其产生并且被后续纯化的载体,但还可以表示,当用合适的核苷酸编码序列转录、转导或转染时,可以原地(in situ)表达本发明的多肽的细胞。这些包括,但不限于,微生物,例如用含有多肽编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如,E.coli、B.subtilis);用含有多肽编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,Saccharomyces、Pichia);用含有多肽编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒、CaMV;烟草花叶病毒、TMV)感染的,或用含有多肽编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统;或携带下述重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如COS、CHO、BHK、293、3T3细胞),所述构建体含有来自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或来自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)。

[0086] 在细菌系统中,许多表达载体可以根据旨在用于表达的多肽的用途来有利地选择。例如,当将要生产大量的所述多肽时,可能希望指导表达容易纯化的高水平融合蛋白产物的载体。这些载体包括,但是不限于,E.coli表达载体pUR278(Ruther等人,1983,EMBO J.2:1791);pLN载体(lnouye&lnouye,1985,Nucleic Acids Res.13:3101-3109;Van Heeke&Schuster,1989,J.Biol.Chem.24:5503-5509)等。pGEX载体也可以用于表达作为具有谷胱甘肽S-转移酶(GST)的融合蛋白的外源多肽。一般来讲,所述融合蛋白是可溶的,并且可以通过以下方式容易地从溶解的细胞被纯化:吸附并与包含谷胱甘肽-琼脂糖珠的基质结合,然后在游离谷胱甘肽的存在下洗脱。pGEX载体被设计成包含凝血酶或Xa因子蛋白酶切割位点,使得从GST片段可以释放被克隆的靶基因产物。

[0087] 在昆虫系统中,Autographa californica核型多角体病毒(AcNPV)用作载体来表达外源基因。病毒在Spodoptera frugiperda细胞中生长。多肽编码序列可以被单独地克隆到病毒的非必要区域(例如,多角体蛋白基因)中,并且在AcNPV启动子(例如,多角体蛋白启动子)的控制下放置。在哺乳动物宿主细胞中,可以利用许多基于病毒的表达系统(例如,腺病毒表达系统)。

[0088] 如上所述,可以选择调节插入的序列的表达的或者以所需的特异性方式修饰并处理基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的所述修饰(例如,糖基化)以及处理(例如,裂解)对蛋白质的功能会很重。

[0089] 为了本发明的多肽的长期的、高产率生产,稳定的表达是优选的。例如,通过以下方式可以产生稳定表达多肽的细胞系:用包含多肽的核苷酸序列和可选的(例如,新霉素或潮霉素)核苷酸序列的表达载体转染细胞,并且选择用于可选的标记物的表达。所述改造的细胞系在筛选和评价与多肽直接或间接相互作用的化合物中特别有用。

[0090] 本发明的多肽的表达水平可以载体扩增来提高(作为综述,参见Bebbington and Hentschel,The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,Vol.3(Academic Press,New York,1987))。当表达多肽的载体系统中的标记物是可扩增的,宿主细胞的培养物中存在的抑制剂的水平提高会提高标记物基因的副本的数量。由于被扩增的区域与多肽基因相关,所以多肽的生产也会提高(Crouse等人,1983,Mol.Cell.Biol.3:257)。

[0091] 一旦本发明的多肽已经被重组地表达,其可以通过本领域中用于纯化多肽的已知的任何方法来纯化,例如,通过色谱法(例如,离子交换色谱法、亲和色谱法例如与蛋白A、聚组氨酸或特异性抗原,以及分级柱色谱法),离心,差异溶解度或通过用于蛋白质纯化的任何其他标准技术。

[0092] 可替代地,通过利用对被表达的融合蛋白特异性的抗体可以容易地纯化任何融合蛋白。例如,Janknecht等人描述的系统允许人源细胞系中表达的非变性融合蛋白的即用的纯化(Janknecht等人,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:8972-897)。在该系统中,目标基因被亚克隆到牛痘重组质粒中,使得基因的开放读码框架转译地融合至由6个组氨酸残基组成的氨基末端标签。所述标签用作融合蛋白的基质结合域。来自用重组牛痘病毒感染的细胞的提取物被装载到Ni²⁺氨基乙酸-琼脂糖柱上,并且用含咪唑缓冲剂选择性地洗脱组氨酸标签的蛋白。

[0093] 在本发明的一个实施方式中,在第一反应阶段,在存在有限量的改性形式(“标记

靶”或“类似物”)的目标靶分子(被分析物)的情况下孵育被标记的抗体,以便形成类似物被标记的抗体复合物。有限量的类似物被应用于混合物,以避免类似物战胜样品中存在的自然产生的被分析物而与抗体结合。因此,由于所述测定法的配置,待研究的样品中存在的被分析物的量越大,第一结合片段将捕获更少量的类似物。所述测定法因此被认为是负读数(negative read)免疫测定法,因为源自被标记的抗体的可检测的信号与样品中存在的目标被分析物的浓度成反比。

[0094] 在第二阶段中,类似物-被标记的抗体复合物被施加在固相上,对反应室中的类似物分子上的独有标签有特异性的捕获物质被固定在该固相上。所述固相载有过量的捕获分子以确保有效捕获溶液中存在的任何类似物-被标记的抗体复合物。捕获分子在固相上捕获类似物-被标记的抗体复合物之后,通过清洗步骤从反应室去除任何未结合的被标记的抗体(即,与靶被分析物复合的抗体),从而仅留下已经在固相上捕获的类似物-被标记的抗体复合物。此后,根据已经使用的标记,通过使用合适的方法来量化标记的存在。

[0095] 抗体上的标记可以选自酶、氟、放射性核素、溶胶、发色团、发光化合物。根据选择的酶,酶的反应产物可以通过光学方法(吸光度或荧光或用肉眼)或电化学方法测定。

[0096] 本发明还提供了以下各项:

[0097] 1.与SEQ 1D NO:1具有至少50%同源性的重组肽。

[0098] 2.与SEQ 1D NO:1具有至少75%同源性的重组肽。

[0099] 3.与SEQ 1D NO:2具有至少50%同源性的重组肽。

[0100] 4.与SEQ 1D NO:2具有至少75%同源性的重组肽。

[0101] 5.包含至少157个氨基酸、由至少SEQ 1D NO:2的第1-8位和第84-95位氨基酸组成的重组肽。

[0102] 6.包含至少164个氨基酸、由至少SEQ 1D NO:1的第1-15位和第95-102位氨基酸组成的重组肽。

[0103] 7.包含SEQ 1D NO:3的序列的重组肽,其中X和Z均表示连接肽。

[0104] 8.根据SEQ 1D NO:1的肽用于免疫测定法的制备的用途,包含:

[0105] 第一抗体,所述第一抗体具有对包含第95-102位氨基酸的区域的结合特异性;

[0106] 第二抗体,所述第二抗体具有对包含第8-15位氨基酸的区域的结合特异性;其中所述第二抗体被固定在固相上且其中所述第一抗体与可检测的标记缀合。

[0107] 9.根据第8段的免疫测定法,其中可检测的标记选自包含酶、荧光团、放射性核素、溶胶、发色团和发光化合物的组。

[0108] 10.根据第8段的免疫测定法,其中所述第二抗体被固定至固相,所述固相选自包含微量滴定板、磁性颗粒、膜、栓、乳胶粒子、载玻片、吸水膜、微流体装置的表面、色谱材料的组。

[0109] 11.一种执行免疫测定法的方法,包括:

[0110] 使怀疑包含目标靶的样品与第一标记抗体、以及根据SEQ 1D NO:1、SEQ 1D NO:2或SEQ 1D NO:3中之一的重组肽接触以启动竞争免疫测定法以使第一标记抗体与靶结合来形成第一抗体-重组肽复合物;

[0111] 向第二抗体施加第一标记抗体-靶复合物,以形成第二抗体-第一标记抗体-重组肽复合物;

[0112] 从第二抗体-第一抗体-重组肽复合物混合物分离未结合的第一抗体;并且

[0113] 检测第二抗体捕获的在重组肽上的第一标记抗体的存在。

[0114] 12.根据第11段的方法,其中形成第一标记抗体-靶复合物的步骤发生在本体溶液(bulk solution)中。

[0115] 13.根据第11段的方法,其中形成第二抗体-第一标记抗体重组肽复合物的步骤发生在表面上,并且其中第二抗体被固定在所述表面上。

[0116] 14.根据第11段的方法,其中可检测的标记选自包含酶、荧光剂、放射性核素、溶胶、发色团和发光化合物的组。

[0117] 15.根据第13段的方法,其中所述第二抗体被固定在颗粒、膜、微量滴定板、载玻片、硝化纤维基质、玻璃纤维基质的表面上。

[0118] 16.根据第15段的方法,其中所述颗粒是磁敏感颗粒、胶态金属颗粒、乳胶颗粒或玻璃颗粒。

[0119] 17.根据第11段所述的方法,其中从第二抗体第一标记抗体靶复合物分离未结合的第一标记抗体的步骤包括用缓冲液洗涤,用空气洗涤,使用磁体、过滤或免疫色谱法去除溶液中的复合物。

[0120] 18.与SEQ 1D NO:1具有至少50%的同一性、由至少SEQ 1D NO:1的第1-15位和第71-83位氨基酸组成的重组肽。

[0121] 本发明还可以在下面的带数字标记的各项中被定义:

[0122] 1.一种测定液体样品中存在被分析物的方法,所述方法包括:

[0123] a)使所述液体样品与预定量的所述被分析物的类似物以及过量的第一结合片段接触,其中所述第一结合片段能够与所述被分析物和所述类似物的每种独立地结合但是不与所述类似物和被分析物同时结合,使得形成混合物,所述混合物包含类似物-第一结合片段复合物,或者当所述样品中存在被分析物时,所述混合物包含(i)类似物-第一结合片段复合物和被分析物-第一结合片段复合物;或(ii)被分析物-第一结合片段复合物且无类似物-第一结合片段复合物;

[0124] b)使所述混合物与第二结合片段接触,其中所述第二结合片段能够与所述类似物-第一结合片段复合物结合,但是不与所述被分析物-第一结合片段复合物结合,并且被固定在或能够被固定在固相上;

[0125] c)测定表示与所述第二结合片段结合的所述类似物-第一结合片段复合物的存在的信号水平;

[0126] 其中如果步骤c)中测定的信号水平低于当不存在被分析物时测定的最大信号水平,则所述样品中存在被分析物。

[0127] 2.根据第1项的方法,其中所述样品在与所述类似物接触之前与所述第一结合片段接触。

[0128] 3.根据第1项或第2项的方法,还包括通过将步骤(c)中测定的信号水平与校准数据进行比较来测定所述样品中存在的被分析物的量或浓度的步骤。

[0129] 4.根据前述各项的任一项的方法,其中所述被分析物是hCG或其片段或部分。

[0130] 5.根据前述各项的任一项的方法,其中所述信号源自与所述第一结合片段直接或间接关联的标记。

[0131] 6. 根据第5项的方法, 其中所述标记选自包含酶、荧光团、放射性核素、溶胶、发色团和发光化合物的组。

[0132] 7. 根据前述各项的任一项的方法, 其中所述被分析物包含氨基酸序列, 并且所述类似物包括与所述被分析物序列的全部或所述被分析物序列的部分相同的氨基酸序列。

[0133] 8. 根据前述各项的任一项的方法, 其中所述类似物包含所述被分析物中不存在的结合区。

[0134] 9. 根据前述各项的任一项的方法, 其中所述类似物包含氨基酸序列并且被重组地表达。

[0135] 10. 根据前述各项的任一项的方法, 其中所述类似物包含氨基酸序列 NELSHFLEX_mSIRLPGZ_nPVVSYA (SEQ ID NO:3), 其中X和Z是长度分别为“m”和“n”的连接肽。

[0136] 11. 根据前述各项的任一项的方法, 其中所述类似物包含 (i) 至少164个氨基酸, 以及至少SEQ ID NO:1的第1-15位和第95-102位氨基酸; 或 (ii) 至少157个氨基酸, 以及至少SEQ ID NO:2的第1-8位和第84-95位氨基酸。

[0137] 12. 根据前述各项的任一项的方法, 其中所述类似物包含SEQ ID NO:1的第8-15位残基和/或SEQ ID NO:1的第85至102位残基。

[0138] 13. 根据前述各项的任一项的方法, 其中所述类似物包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的序列具有90%、95%或100%的同一性的氨基酸序列。

[0139] 14. 根据前述各项的任一项的方法, 其中所述第一结合片段和/或所述第二结合片段是抗体。

[0140] 15. 根据前述各项的任一项的方法, 其中所述第一结合片段是hCGB3-环特异性单克隆抗体。

[0141] 16. 根据前述各项的任一项的方法, 其中所述样品源自生物来源或由生物来源组成, 所述生物来源包括血、血清、血浆、组织间液、唾液、痰、水晶体结构液、汗液、尿液、乳、腹水液、粘液、滑液液、腹膜液、经皮渗出物、咽排泄物、支气管肺泡灌洗液、气管呼吸物、脑脊髓液、精液、宫颈粘液、阴道或尿道分泌物或羊水。

[0142] 17. 一种用于检测目标被分析物的试剂盒, 包含:

[0143] i) 被分析物类似物;

[0144] ii) (a) 被标记的第一结合片段或 (b) 未被标记的第一结合片段和被标记的第三结合片段; 以及

[0145] iii) 能够被固定的第二结合片段,

[0146] 其中所述第一结合片段能够与目标被分析物和类似物的每种独立地结合但是不能与所述类似物和被分析物同时结合, 所述第二结合片段能够与所述类似物和所述第一结合片段的复合物结合, 但是不能与所述被分析物或所述第一结合片段和所述被分析物的复合物结合, 并且所述第三结合片段能够与所述第一结合片段或所述类似物第一结合片段复合物结合。

[0147] 18. 一种多肽, 所述多肽包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的序列具有75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列或由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的序列具有75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列组成, 或者包含序列NELSHFLEX_mSIRLPGZ_nPVVSYA (SEQ ID NO:

3) 或由序列NELSHFLEX_mSIRLPGZ_nPVVS_YA (SEQ ID NO:3) 组成, 其中X和Z是长度分别为“m”和“n”的连接肽。

[0148] 19. 对根据第18项的编码多肽的核酸。

[0149] 20. 包含根据第19项的核酸的表达载体。

[0150] 本发明的每个方面的优选特征作必要修正后也适用于每个其他方面。本文中提及的现有技术文件以法律允许的最完整程度被并入。

附图说明

[0151] 图1表示根据本发明的实施方式的混合竞争免疫测定法的示意性描述, 并且表示目标被分析物与样品中存在的或可能存在的另一种物质之间可能发生的可能的交叉反应。在目标被分析物为hCG的示例性实施方式中, 交叉反应物质为LH。

[0152] 图2表示抑制曲线, 表明用于hCG测定的选择的单克隆抗体, moc1 (针对保守的β3-hCG环区提出), 与LH交叉反应。数据表示以使50%的抗体饱和和所需的配体的量为基础, 相比hCG, 与LH的交叉反应性是0.27%。

[0153] 图3提供了显示用于与βhCG结合的单克隆抗体, moc1的特异性的进一步的表征数据。曲线图表示归因于I125放射标记的moc 1 (具有结合的被标签的hCG) 的在y轴上的计数的数量, x轴表示从1000倍至512000倍的稀释水平。数据表示一系列曲线, 这些曲线显示moc1抗体能够辨别βhCG以及αhCG或LH的能力。缓冲液对照、569游离α和LH都遵循类似样态, 在低稀释具有高计数, 计数随着样品被稀释而下降。然而, 当用游离βhCG、“缺刻的(nicked)”βhCG、完整的hCG、“缺刻的”hCG或“核心(core)”hCG (未被标记的靶) 孵育抗体和被标签的hCG时, 信号被显著抑制, 甚至在低稀释时被显著抑制, 因为未被标记的靶成功地战胜被标签的hCG而结合抗体。

[0154] 图4表示重组的moc1Fab₁ (单体) 和Fab₂ (二聚体) 的比较。

[0155] 图5示出了血清TAG测定与RIA测定之间以具有低hCG浓度至高hCG浓度的样品为基础的比较。x轴表示通过TAG测定测量的hCG浓度 (IU/L)。y轴表示通过RIA测定测量的hCG浓度 (IU/L)。

[0156] 图6示出了血清TAG测定法与ImmuIite测定法之间以具有低hCG浓度至高hCG浓度的样品为基础的比较。x轴表示通过TAG测定法测量的hCG浓度 (IU/L)。y轴表示通过ImmuIite测定法测量的hCG浓度 (IU/L)。

[0157] 图7示出了血清TAG测定法与RIA测定法之间以具有中等hCG浓度至高hCG浓度的样品为基础的比较。x轴表示通过TAG测定法测量的hCG浓度 (IU/L)。y轴表示通过RIA测定法测量的hCG浓度 (IU/L)。

[0158] 图8示出了血清TAG测定法与ImmuIite测定法之间的以具有中等hCG浓度至高hCG浓度的样品为基础的比较。x轴表示通过ImmuIite测定法测量的hCG浓度 (IU/L)。y轴表示通过TAG测定法测量的hCG浓度 (IU/L)。

[0159] 实施例1-血清TAG测定法方案

[0160] 试剂

- 标准稀释剂 — Serasub (SS)
- 样品预稀释剂 — 正常羊血清 (NSS)
- moel — 10ul 原液 (1:1000) 置于 4ml 3% BSA/1%
- [0161] NSS/PBS
- TAG — 10ul 原液 (1:1000) 置于 4ml 3% BSA/1%
- NSS/PBS
- 微量滴定板 — 预涂覆抗 TAG
- [0162] 样品制备
- [0163] 0-100IU/L-在SS中按1:2稀释
- [0164] 100-1000-在NSS中按1:5稀释,然后根据需要在SS中进一步稀释。
- [0165] 1000-在NSS中按1:50稀释,然后根据需要在SS中进一步稀释。
- [0166] 测定
- [0167] • 通过在SS中稀释最高hCG标准液 (100IU/L) 六次以产生50、25、12.5、6.25、3.125和1.56IU/L标准液来制备标准曲线。仅包含SS以得到零标准液。
- [0168] • 酌情稀释血清样品 (如上所述)。
- [0169] • 使用多道移液器,向微量滴定板的孔添加35μl moel溶液。
- [0170] • 添加35μl标准液和样品。
- [0171] • 使用多道移液器,向所有的孔添加35μl TAG溶液。
- [0172] • 在室温下摇晃板1小时。
- [0173] • 通过倾斜 (tipping) 并吸附 (blotting onto) 在薄页纸上来去除孔中的内容物。
- [0174] • 用0.1% Tween/PBS清洗六次。
- [0175] • 添加100μl femto底物,在BMG Fluostar光度计上读数。
- [0176] • 使用BMG Omega Mars数据分析软件计算结果。
- [0177] 实施例2-尿液TAG测定方案
- [0178] 试剂
- 标准稀释剂 — Urisub (US)
- 样品稀释剂 — 10%正常羊血清 (NSS) /US
- moel — 10 ul 原液 (1:1000) 置于 4 ml 3%BSA/1%
- [0179] NSS/20%FCS/PBS
- TAG — 2.3 ul 原液 (1:1000) 置于 4 ml 3% BSA/1%
- NSS/PBS
- 微量滴定板 — 预涂覆抗 TAG
- [0180] 样品制备
- [0181] 0-100IU/L-纯净的
- [0182] >100IU/L-在10%NSS/US中稀释
- [0183] 测定
- [0184] ●通过在US中稀释最高hCG标准液 (100IU/L) 六次以产生50、25、12.5、6.25、3.125

和1.56IU/L标准液来制备标准曲线。仅包含SS以得到零标准液。

- [0185] • 酌情稀释尿液样品(如上所述)。
- [0186] • 使用多道移液器,向微量滴定板的孔添加35μl moc1溶液。
- [0187] • 添加35μl标准液和样品。
- [0188] • 使用多道移液器,向所有的孔添加35μl TAG溶液。
- [0189] ● 摇晃板,然后在37℃孵育两小时。
- [0190] • 通过倾斜并吸附在薄页纸上来去除孔中的内容物。
- [0191] • 用0.1% Tween/PBS清洗六次。
- [0192] ● 添加100μl femto底物,在BMG Fluostar光度计上读数(参见设置数据)。
- [0193] ● 使用BMG Omega Mars数据分析软件计算结果(参见设置数据)。

[0194] 实施例3-moc1Fab变体的比较

[0195] 本领域技术人员通过本领域已知的常规方法在E.coli中生产重组moc1Fab₁(单体)和Fab₂(二聚体)。每种Fab变体(单体变体和二聚体变体)被纯化,并且根据制造商的说明书通过使用Lightning Link HRP试剂盒(Innova Bioscience)与辣根过氧化物酶(HRP)缀合。针对缀合过程考虑每个Fab变体的分子量,使得单体Fab₁变体和二聚体Fab₂变体用HRP经历相当水平的标记。

[0196] 在用HRP标记以及初始活性测试之后,通过使用TAG和hCG在竞争测定中评估被标记的Fab变体以便得到按照实施例1中提供的一般方法的标准曲线。

[0197] 表1和图4中给出了测定结果。

[0198] 表1.相对于负hCG标准的测定输出和%信号的平均数据

hCG 标准 (IU/L)	化学发光 (RLU)		%信号	
	单体	二聚体	单体	二聚体
0	1202503	2572679	100	100
1.56	1165822	2346433	97	91
3.125	1080330	2162202	90	84
[0199] 6.25	961748	1900875	80	73.9
12.5	687755	1340029	57	52
25	440407	848495	36.6	33
50	197693	504683	16.4	19.6
100	49539	130589	4	5
200	11774	23302	1	0.9

[0200] 表1和图4表明了可在比较的测定条件下Fab₂二聚体变体相对于Fab₁单体变体在化学发光输出方面具有显著的约1倍的提高。此外,Fab₂二聚体变体在hCG浓度范围1.56-25IU/L下对样品中的hCG浓度比Fab₁单体变体更敏感,如该范围内%信号更剧烈地减小所示(参见图4)。

[0201] 实施例4-TAG测定法与ImmuLite和RIA测定法的临床研究

[0202] 进行研究来对TAG测定法(采用本文所描述的Fab₂二聚体变体)和已知的测定法,

ImmuLite测定法和RIA测定法,在临床样品中检测hCG的能力进行比较。

[0203] 通过每种测定法方法分析临床血清样品中hCG的存在和浓度。按照实施例1所描述进行TAG测定法。根据制造商的说明书进行ImmuLite测定法(Siemens)。根据英国国家卫生署(National Health Service,UK)提供的方案进行RIA测定法。简而言之,测定法使用纯化的多克隆抗体和碘化的hCG,其中样品在测量之前被稀释并与抗体和被标记的hCG混合24小时。

[0204] 表2和3以及图5-8中给出了测定法的结果。

[0205] 表2.通过TAG测定法、ImmuLite测定法或RIA测定方法检测临床血清样品中的hCG,其中hCG在样品中的浓度范围是从低到高hCG浓度。

[0206]

样品	hCG 浓度 (IU/L)		
	TAG	RIA	Immulite
1	17	13	16
2	5	4	5
3	70	46	100
4	18	5	7
5	7	5	8
6	104	75	176
7	26	14	33
8	397	321	398
9	14	10	11
10	1163	1148	1279
11	82	70	95
12	76	75	120
13	1391	1336	1834
14	726	779	875
15	15	5	5
16	949	1305	1200

[0207]

17	23	11	28
18	34040	49380	58146
19	96546	122920	177465
20	154	108	156
21	14	12	13
22	175265	194800	164721
23	24615	22330	25561
24	1545	1067	1425
25	3	<4	<1
26	2	<4	<1
27	12	9	13
28	1405	1063	1402
29	8	9	11
30	1	<4	<1
31	33	32	39
32	2	<4	<1
33	9	6	10
34	10	9	13

[0208] 表3.通过TAG测定法、Immulin测定法或RIA测定方法检测临床血清样品中的hCG，其中hCG在样品中的浓度范围是从中等到高hCG浓度。

[0209]

hCG 浓度 (IU/L)		
Immulin	RIA	TAG
164721	194800	175265

[0210]

25561	22330	24615
21884	17700	19028
721139	676000	640363
21884	17290	12977
721139	735400	675028
182140	166750	164552
39602	30430	36581
26551	19230	23276
58258	51900	44120
36871	41600	38110
25546	35000	23997
17112	13350	12132
154163	147200	150430
17494	17200	14079
14202	10210	14459
14230	9700	19655
220085	193900	314760
69034	41860	48667
435384	264200	333333
19546	19670	15863
22642	14285	21467
27591	25800	14364
156336	106600	86333
376837	273500	148267
28086	18550	15583
66289	46560	33289
114379	59160	114315
28862	16770	26918

[0211] 图5-8表明了通过TAG测定法检测并测量临床血清样品中的hCG浓度与已知的ImmuLite和RIA测定法强烈相关,在所有情况下的 R^2 值都大于0.9。由于hCG靶表位的抗体识

别的差异,所以分析方法之间存在一些变型,然而所有测定法都能够准确地检测临床血清中的hCG。

[0212] 此外,进一步的临床研究表明TAG测定法的重要的有益效果是其特别地以良好的灵敏度报告。已经看出,在已知的RIA和ImmuIite测定法能够这样做之前,TAG测定法能够检测非常低水平的hCG并且检测患者样品中的升高,这对于监测正在接受治疗的患者是很宝贵的,特别是当hCG的水平非常低时。除TAG测定法比已知的测定法方法更出色的灵敏度之外,TAG测定法是基于实验室的并且能够在比使用简单的实验设施和设备的已知的测定法更短的时间周期(4小时)内完成。

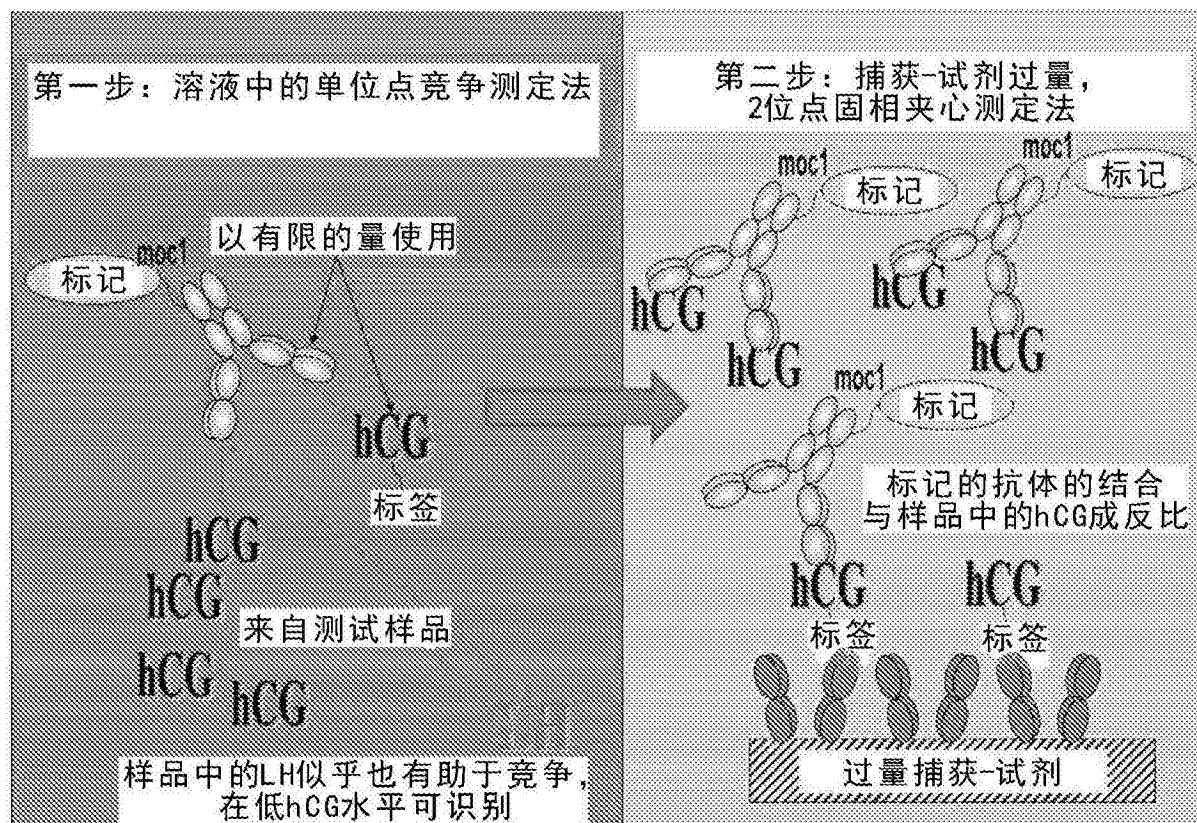


图1

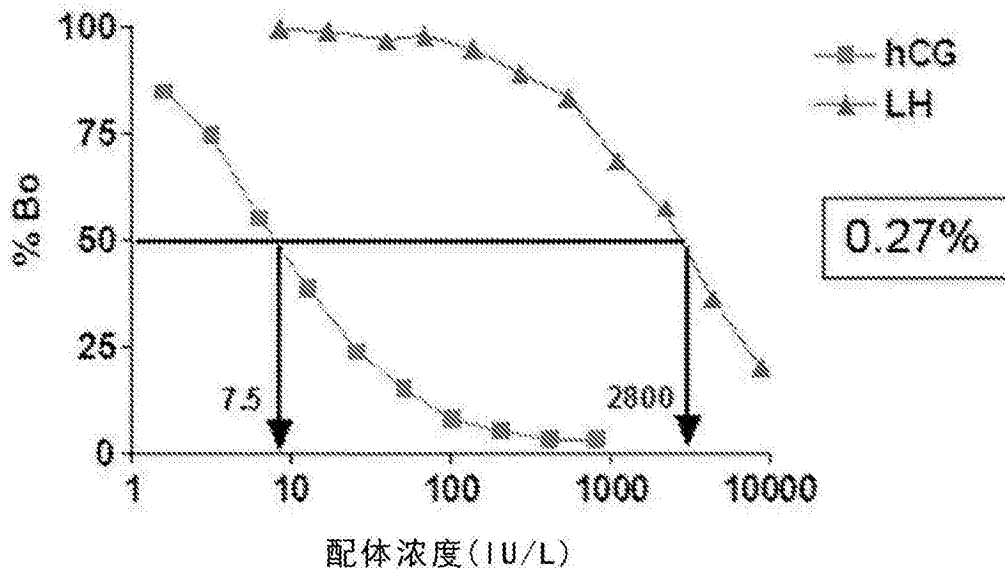


图2

在moc1 RIA中与NIBSC标准品竞争

均在0.5 pmole/ml下

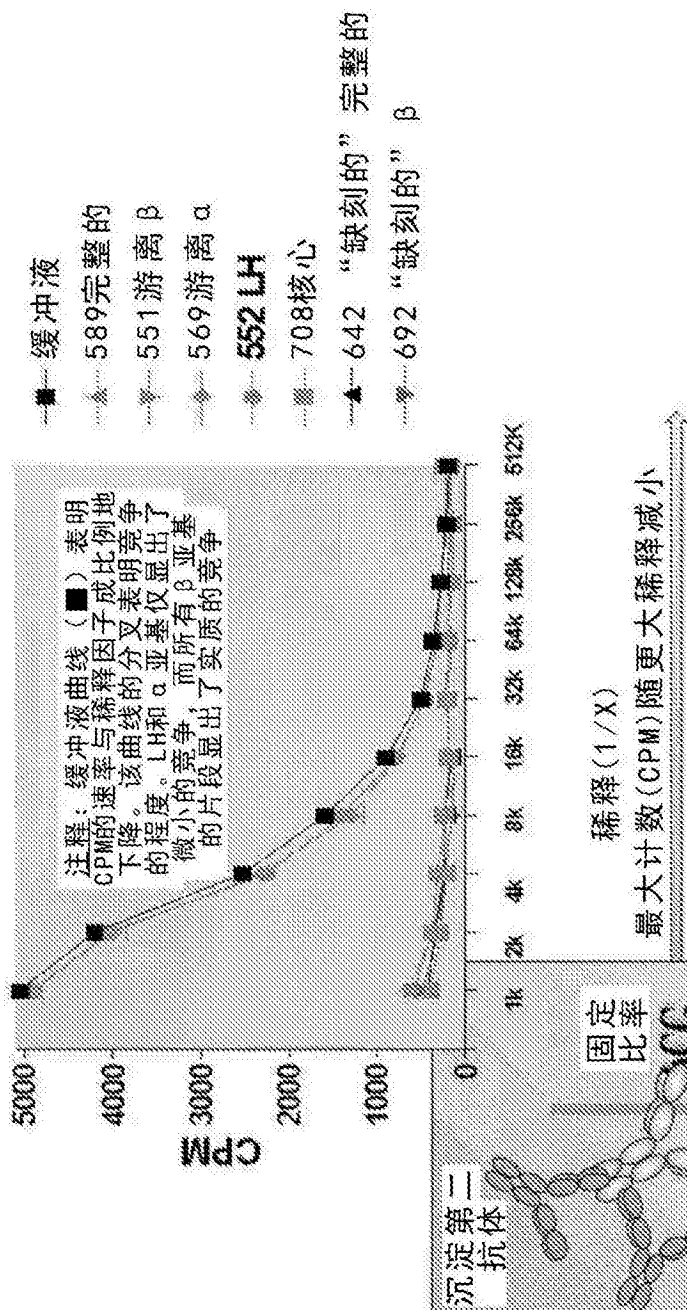


图3

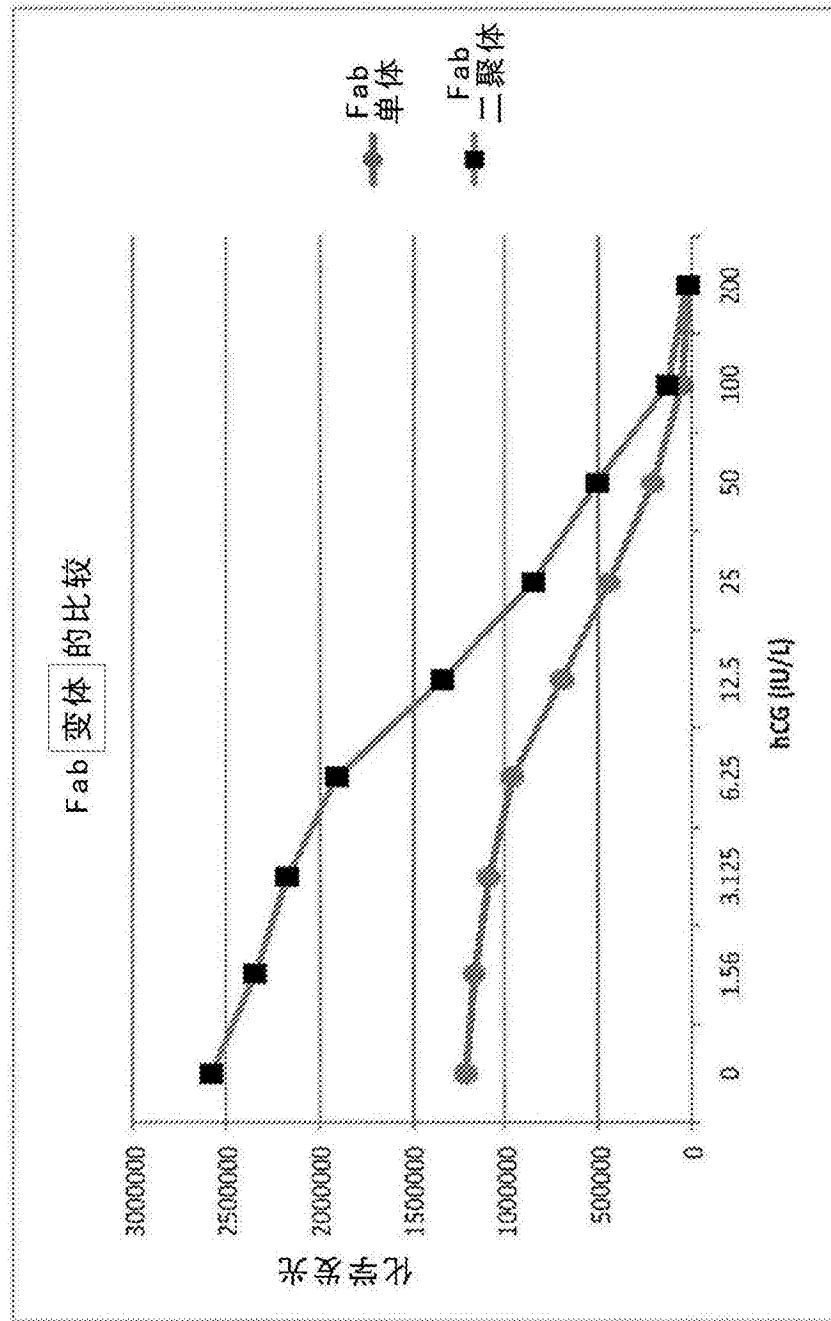


图4

RIA和Tag测定法的比较

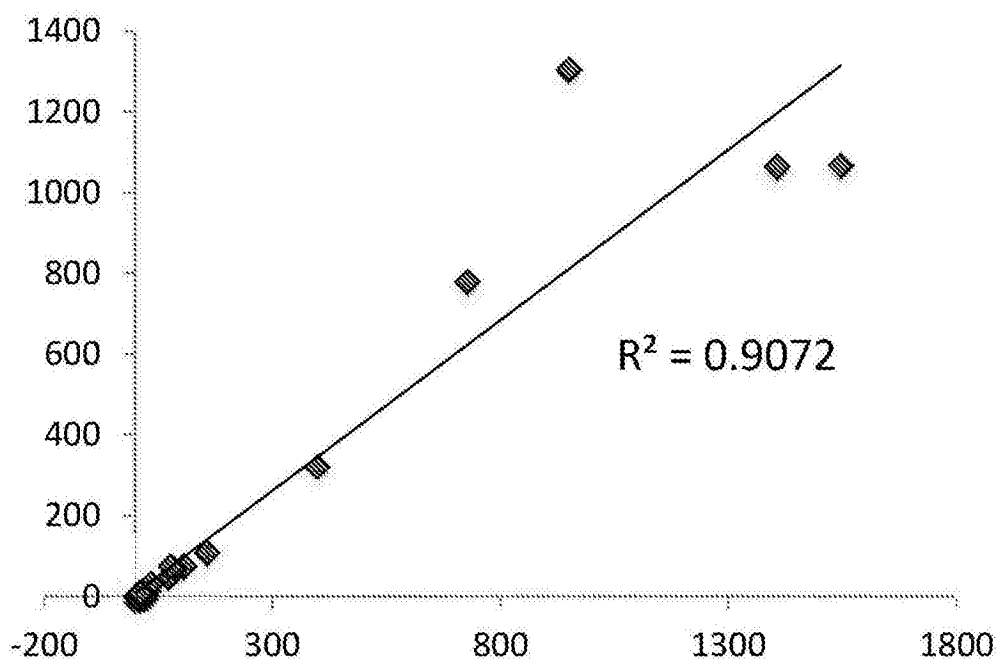


图5

Immolute和Tag测定法的比较

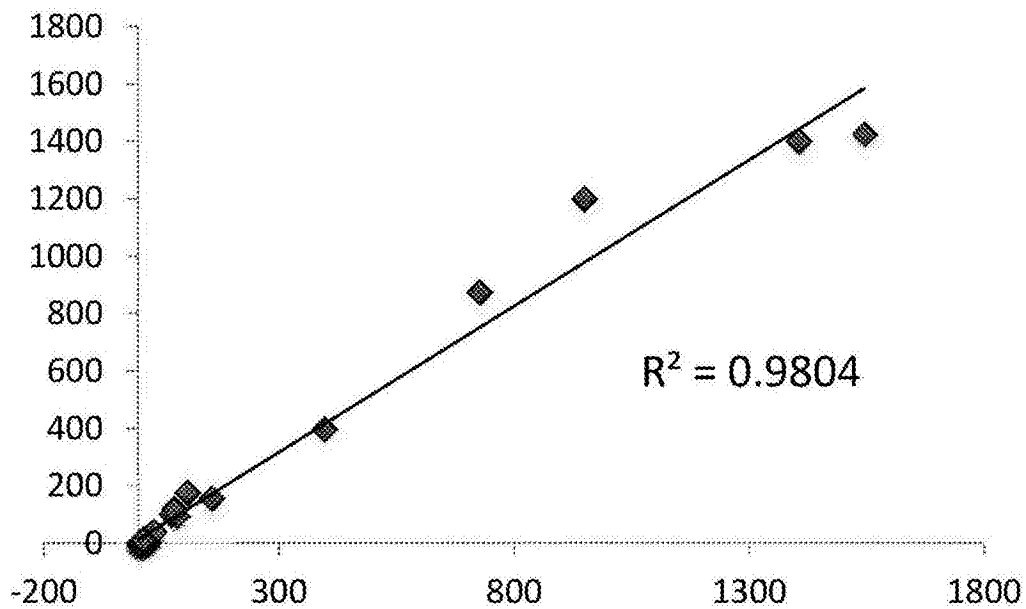


图6

使用具有高浓度hCG的临床血清的Tag测定法与RIA的比较

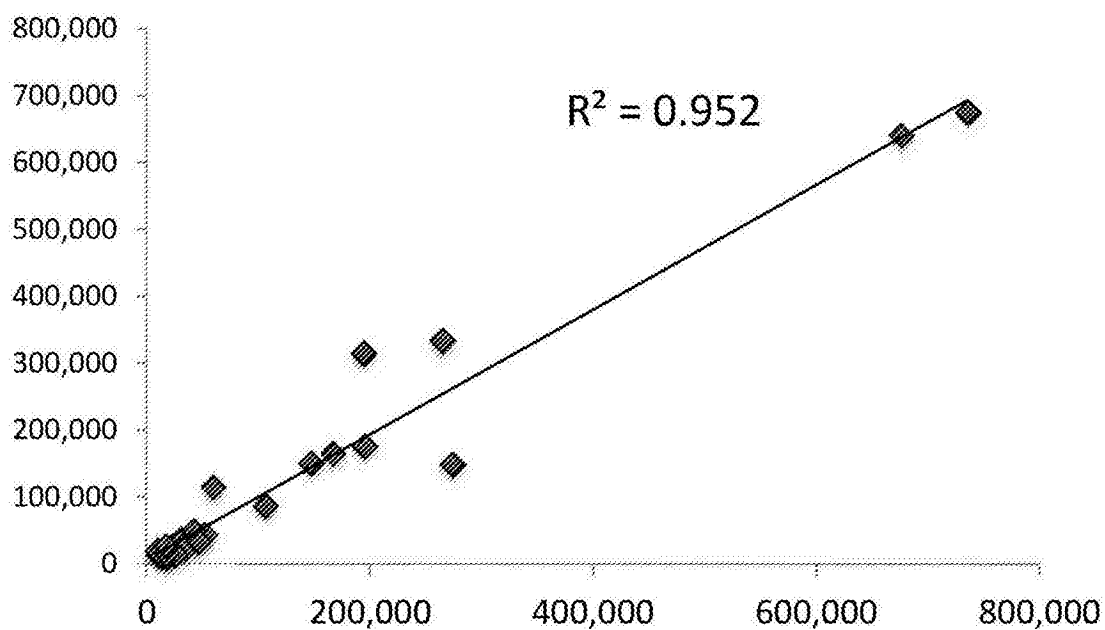


图7

使用具有高浓度hCG的临床血清的Tag测定法与Immulinite的比较

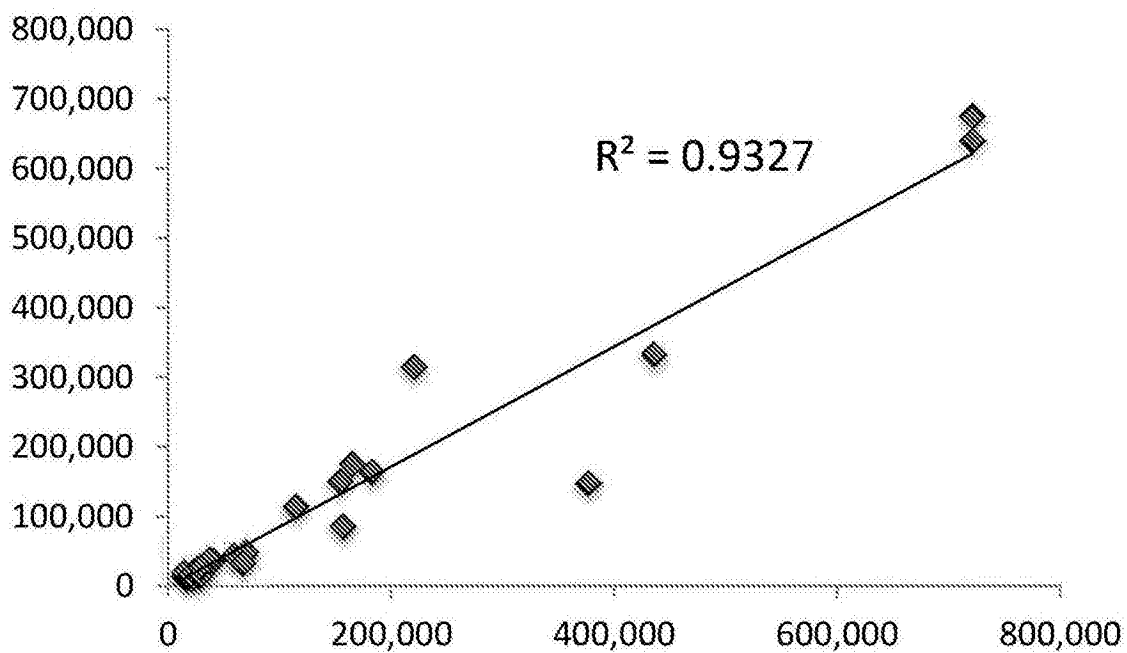


图8

专利名称(译)	测定法		
公开(公告)号	CN106415270A	公开(公告)日	2017-02-15
申请号	CN201580012092.8	申请日	2015-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	莫洛迪克有限公司		
申请(专利权)人(译)	莫洛迪克有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	莫洛迪克有限公司		
[标]发明人	保尔戴维斯 桑德拉海明顿		
发明人	保尔·戴维斯 桑德拉·海明顿		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/543		
优先权	2014003815 2014-03-04 GB		
其他公开文献	CN106415270B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了用于测定液体样品中存在被分析物的方法，所述方法涉及：使所述液体样品与预定量的所述被分析物的类似物以及过量的第一结合片段接触，其中所述第一结合片段能够与所述被分析物和所述类似物的每种独立地结合；使所述混合物与第二结合片段接触；并且测定表示存在与第二结合片段结合的所述类似物-第一结合片段复合物的信号水平；其中如果测定的信号水平低于当不存在被分析物时测定的最大信号水平，则所述样品中存在被分析物。还提供了相应的试剂盒。

