



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1711476 B

(45) 授权公告日 2010.09.08

(21) 申请号 200380103466.4

C07K 16/42(2006.01)

(22) 申请日 2003.11.17

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

20022048 2002.11.18 FI

US 6326159 B1, 2001.12.04, 说明书 3-18 栏.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2005.05.17

CN 1353313 A, 2002.06.12, 全文.

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/FI2003/000875 2003.11.17

ryoichi et al. fluorolabeling of antibody variable domains

with greenfluorescent protein

variants: application to an

energytransferbased homogeneous

immunoassay. protein engineering 13

5. 2000, 13(5), 369-376.

(87) PCT 申请的公布数据

W02004/046733 EN 2004.06.03

edwin et al. anti-immune complex

antibodies enhance affinity and specificity

of primary antibodies. PNAS 90. 1993, 901184-

1189.

(73) 专利权人 芬兰技术研究中心

地址 芬兰埃斯波

(72) 发明人 蒂莫·皮利 马蒂·奥伊特亚

克里斯蒂纳·塔基纳恩

汉斯·索德尔吕恩德

审查员 边昕

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 徐雁漪

(51) Int. Cl.

G01N 33/94(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

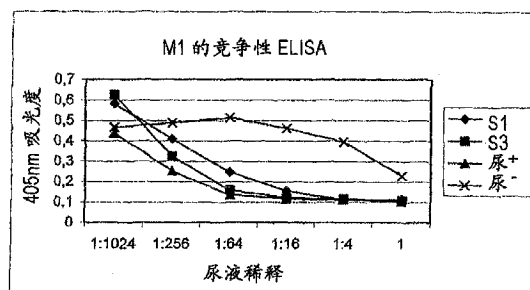
权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 3 页

(54) 发明名称

小分析物的非竞争性免疫测定

(57) 摘要

本发明是针对小分析物的非竞争性免疫测定,其中分析物与两个结合配偶体反应。第一结合配偶体结合到分析物上,在第一结合配偶体和分析物之间形成复合体,第二结合配偶体结合到由第一结合配偶体和分析物形成的复合体。检测在分析物和结合配偶体之间形成的最终复合体。结合配偶体是蛋白质,如包括抗体片段的抗体。本发明进一步涉及在鉴定中有用的试剂对和检验试剂盒,以及试剂对的用途和它们的制备方法。也提供新的试剂和它们的制备方法。



1. 小分析物的非竞争性免疫测定,包括将含有所述分析物的样品与包括结合所述分析物的第一结合配偶体,以及结合所述分析物和所述第一结合配偶体复合体的第二结合配偶体的试剂对反应,测定第二结合配偶体的结合,因此指示样品中分析物的存在,其中通过选择结合所述分析物和第一结合配偶体复合体的结合配偶体,使用原初 scFv 抗体片段噬菌体展示库获得所述第二结合配偶体。

2. 权利要求 1 的测定,其中第一和第二结合配偶体选自抗体片段 Fab 和 scFv。

3. 权利要求 1 或 2 的测定,其中测定是均质测定。

4. 权利要求 3 的测定,其中测定是基于荧光共振能量转移。

5. 前述权利要求中的任何一项的测定,其中分析物是滥用的药物。

6. 权利要求 5 的测定,其中分析物是吗啡、四氢大麻酚或者苯异丙胺。

7. 权利要求 1 的测定,其中第二结合配偶体包括包含 SEQ ID NO5 的 K11 scFv 的配体结合部分。

8. 权利要求 1 或 7 的测定,其中第一结合配偶体包括包含 SEQ ID NO 1 和 SEQ ID NO 2 的 M1Fab 的配体结合部分,或包含 SEQ ID NO3 和 SEQ ID NO 4 的 M2Fab 的配体结合部分。

9. 小分析物的非竞争性免疫测定试剂对,包括结合所述分析物的第一结合配偶体,以及结合所述分析物和所述第一结合配偶体复合体的第二结合配偶体,其中通过选择结合所述分析物和第一结合配偶体复合体的结合配偶体,使用原初 scFv 抗体片段噬菌体展示库获得所述第二结合配偶体,所述第二结合配偶体包括包含 SEQ ID NO 5 的 K11 scFv 的配体结合部分。

10. 权利要求 9 的试剂对,其中第一结合配偶体包括包含 SEQ ID NO 1 和 SEQ ID NO 2 的 M1Fab 的配体结合部分,或包含 SEQ ID NO3 和 SEQ ID NO 4 的 M2Fab 的配体结合部分。

11. 权利要求 10 的试剂对,其中所述第一结合配偶体的配体结合部分由 SEQ ID NO 1 的第 3 到 108 位氨基酸和 SEQ ID NO 2 的第 4 到 123 位氨基酸;或者 SEQ ID NO 3 的第 3 到 108 位氨基酸和 SEQ ID NO 4 的第 4 到 123 位氨基酸形成;并且第二结合配偶体的配体结合部分由 SEQ ID NO 5 的第 3 到 120 位氨基酸和第 140 到 246 位氨基酸形成。

12. 小分析物的非竞争性免疫测定检验试剂盒,所述试剂盒包括权利要求 9、10 或 11 的试剂对。

13. 权利要求 12 的检验试剂盒,包括均质鉴定的试剂。

14. 权利要求 13 的检验试剂盒,包括基于荧光共振能量转移鉴定的试剂。

15. 权利要求 14 的检验试剂盒,包括鉴定多种滥用药物的多个试剂对。

16. 权利要求 15 的检验试剂盒,包括鉴定吗啡、四氢大麻酚或苯异丙胺的试剂。

17. 包括结合小分析物的第一结合配偶体,以及结合所述分析物和所述第一结合配偶体复合体的第二结合配偶体的试剂对,在所述分析物的非竞争性免疫测定中的用途,其中通过选择结合所述分析物和第一结合配偶体复合体的结合配偶体,使用原初 scFv 抗体片段噬菌体展示库获得所述第二结合配偶体。

18. 制备小分析物的非竞争性免疫测定试剂对的方法,包括提供结合所述分析物的第一结合配偶体,以及结合所述分析物和所述第一结合配偶体复合体的第二结合配偶体,其中通过选择结合所述分析物和第一结合配偶体复合体的结合配偶体,使用原初 scFv 抗体片段噬菌体展示库获得所述第二结合配偶体。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述第二结合配偶体是从噬菌体展示库中制备的重组抗体片段。

20. 权利要求 19 的方法,其中首先将展示噬菌体与结合的第一结合配偶体预孵育,挑出结合第一结合配偶体的那些噬菌体,然后分离未结合的噬菌体,与分析物和固定的第一结合配偶体的混合物一起孵育,选择结合到固定的第一结合配偶体和分析物所形成的免疫复合体上、但是不结合到第一结合配偶体上的噬菌体。

21. 权利要求 18、19 或 20 的方法,其中也从 scFv 抗体片段噬菌体展示库中获得第一结合配偶体。

22. 重组结合蛋白,包括包含 SEQ ID NO 5 的 K11scFv 的配体结合部分。

23. 权利要求 22 的重组结合蛋白,其中所述蛋白的配体结合部分由 SEQ ID NO 5 的第 3 到 120 位氨基酸和第 140 到 246 位氨基酸形成。

24. 权利要求 22 的重组结合蛋白,其中蛋白具有 SEQ ID NO 5 的氨基酸序列。

25. DNA,其编码权利要求 22、23 或 24 的重组结合蛋白。

26. 宿主细胞,其表达权利要求 22、23 或 24 的重组结合蛋白。

小分析物的非竞争性免疫测定

发明领域

[0001] 本发明涉及免疫测定,尤其是小分析物的非竞争性免疫测定。本发明进一步在涉及在鉴定中有用的试剂对和检验试剂盒,以及试剂对的用途和它们的制备方法。也提供新的试剂和它们的制备方法。

[0002] 发明的技术背景

[0003] 在竞争性免疫测定中,必须加入与分析物竞争的外来试剂,而在非竞争性测定方法中并非如此。现在所选择的通过免疫化学检测分析物的方法是非竞争性免疫测定方法,其中两种抗体结合到分析物的两个不同表位上,产生所谓的三明治型鉴定。这种鉴定非常适用于高分子量分析物,其提高速度、灵敏度和特异性,在现代免疫测定中必需。然而,发展小分析物的非竞争性鉴定一直是一种困难的事情,因为低分子量分子不够大,不能同时独立地结合到一个以上的抗体。因此,尽管在特异性和灵敏度上存在许多基本问题,但是竞争性免疫测定方法几乎独占性地用于检测小分析物。

[0004] 然而,报道小分析物的非竞争性免疫测定进展的出版物很少。在这些文章中,已经研制出第二抗免疫复合体(抗-IC)抗体,其结合与分析物结合的第一抗分析物抗体,但其不结合单独的第一抗体或分析物(Ullman 等,1993;Self 等,1994;Towbin 等,1995)。1993年 Ullman 等描述了一种能够识别四氢大麻酚(THC)抗体的免疫复合体的抗体。通过使用亲和标记的抗 THC 抗体作为免疫原,以及选择其结合在 Δ^9 THC 存在的情况下增强的抗 IC 抗体,获得抗 IC 抗体。1994年 Self 等在制备测定地高辛的抗 IC 抗体中使用相同的原理。1995年, Towbin 等报道了半抗原血管紧张素 II 的三明治免疫测定,其中免疫包括在用抗免疫复合体免疫以获得抗 IC 抗体前,用未复合的第一抗体进行耐受。在小分析物的非竞争性免疫测定中所使用的抗 IC 抗体迄今为止一直是通过免疫获得的常规多克隆或单克隆抗体,这里描述的鉴定包括一抗的标记和二抗的固定化,反之亦然。

[0005] Mares 等已经在 1995 年发明了小分析物的所谓“idiometric”非竞争性免疫测定。他们使用两种类型的抗独特型抗体,其识别 oestradiol 特异的第一抗体的高变区内的不同表位。第一抗独特型抗体(β 型)具有与分析物竞争性第一抗体的结合位点上表位的能力。第二抗独特型抗体(α 型)识别第一抗体的可变区内的表位,这种结合对于分析物的存在不敏感。然而,在 β 型存在时,这种 α 型在空间上被阻碍,不能结合到第一抗体上。这三种类型的抗体允许小分析物的非竞争性鉴定的发展。

[0006] 已经发展了用于半抗原检测的所谓开放三明治免疫测定(Suzuki 等,2000; Suzuki 等,1999; Yokozeki 等,2002)。它们是基于根据在抗原存在时更有利于某些抗体中分离的 V_H 和 V_L 链联合现象的基础上的非竞争性鉴定(Ueda 等,1996)。

[0007] 尽管非竞争性免疫测定方法的显著有利,但鲜见报道这种小分析物鉴定的实例。其原因最可能的是通过免疫动物生产第二(抗免疫复合体,或者抗独特型)抗体的困难。例如,抗半抗原单克隆抗体,其一直通过杂交瘤技术获得(Kohler 和 Milstein,1975),是小鼠的自身抗原,引起抗它们的免疫反应很困难(Maruyama 等,2002;Ullman 等,1993; Kobayashi 等,2000)。另一个问题是用于免疫的免疫复合体在获得对免疫复合体的反应前

易于分解 (Ullman 等, 1993 ; Kobayashiet 等, 2000)。

[0008] 本发明现在提供小分析物的非竞争性免疫测定方案, 其避免了用免疫复合体免疫动物, 当已经获得了抗 IC 抗体时, 其是迄今为止最具有挑战性的工作。本发明也促进了均质的免疫测定, 其进一步提高鉴定的速度、灵敏度和特异性。

[0009] 发明概述

[0010] 与产生在小分析物的免疫测定中使用的抗 IC 抗体相关的困难, 现在可通过提供来源于展示重组结合配偶体文库而不是来源于所免疫动物的必需抗 IC 抗体来避免。可构建噬菌体展示抗体文库, 其包含大量克隆, 可通过连续的淘选富集和选择其中那些编码期望的结合配偶体, 如抗体片段的克隆。这种方案为以低成本高利润和可行的方式发展小分析物的快速、可靠和简单的免疫测定展开了新的可能。

[0011] 所以, 本发明的一个目的是小分析物的非竞争性免疫测定, 包括将含有所述分析物的样品与试剂对反应, 其中试剂对包括结合到所述分析物上的第一结合配偶体, 以及结合到所述分析物和所述第一结合配偶体复合体上的第二结合配偶体。免疫测定的特点是通过选择结合到所述分析物和第一结合配偶体复合体的结合配偶体, 从展示重组结合配偶体文库中获得第二个结合配偶体, 以及测定第二结合配偶体的结合, 因此指示样品中分析物的存在。

[0012] 本发明的另一个目的是小分析物的非竞争性免疫测定的试剂对, 包括结合到所述分析物的第一结合配偶体, 以及结合到所述分析物和所述第一结合配偶体复合体的第二结合配偶体, 特点是通过选择结合到所述分析物和第一结合配偶体复合体上的结合配偶体, 从展示重组结合配偶体文库中获得第二结合配偶体。

[0013] 本发明的另一个目的是小分析物的非竞争性免疫测定检验试剂盒, 所述的检验试剂盒包括包含结合到所述分析物的第一结合配偶体, 以及结合到所述分析物和所述第一结合配偶体复合体上的第二结合配偶体的试剂对, 特点是通过选择结合到所述分析物和第一结合配偶体复合体上的结合配偶体, 从展示重组结合配偶体文库中获得第二结合配偶体。

[0014] 本发明也针对包括结合到分析物上的第一结合配偶体, 以及结合到所述分析物和所述第一结合配偶体复合体上的第二结合配偶体的试剂对, 在小分析物的非竞争性免疫测定中的用途, 其中通过选择结合到所述分析物和第一结合配偶体复合体上的结合配偶体, 从展示重组结合配偶体文库中获得第二结合配偶体。

[0015] 本发明的另一个目的是制备小分析物的非竞争性免疫测定试剂对的方法, 包括提供结合到所述分析物的第一结合配偶体, 以及结合到所述分析物和所述第一结合配偶体复合体上的第二结合配偶体, 特点是通过选择结合到所述分析物和第一结合配偶体复合体上的结合配偶体, 从展示重组结合配偶体文库中获得第二结合配偶体。

[0016] 本发明也提供新的重组结合蛋白, 特点是它们包括包含 SEQ ID NO 1 和 SEQ ID NO 2 的 M1Fab 的配体结合部分 ; 包含 SEQ ID NO 3 和 SEQ ID NO 4 的 M2Fab ; 或者包含 SEQ ID NO 5 的 K11 scFv。

[0017] 编码新的结合蛋白的 DNA 以及表达它们的宿主细胞也包含在本发明中。

[0018] 在独立权利要求中阐述了本发明有利的实施方案。

[0019] 从下列附图、详述和实施例中将显而易见本发明的其它目的、细节和优点。

[0020] 附图的简要描述

[0021] 图 1. 使用 M1Fab 的竞争性 ELISA。尿⁺是掺入 1 μg/ml 吗啡的尿。

[0022] 图 2. 用 Eu 标记的抗 M1+ 吗啡免疫复合体 scFv 片段 K11 的非竞争性时间分辨荧光免疫测定 (TR-FIA)。a) 鉴定的交叉反应性和灵敏度, b) 用 S1 尿对照稀释作为样品的鉴定灵敏度。

[0023] 图 3. 吗啡的均质 TR-FRET 免疫测定。

[0024] 图 4. 通过竞争性 ELISA, M1 抗吗啡 Fab 片段与可待因、海洛因、那可丁 (noscapine) 和罂粟碱的交叉反应性分析。

[0025] 图 5. 基于比较 TR-FRET 的吗啡均质免疫测定。

[0026] 发明详述

[0027] 本发明的非竞争性免疫测定试剂对包括第一结合配偶体和第二结合配偶体。第一结合配偶体结合到分析物上在第一结合配偶体和分析物之间形成复合体。第二结合配偶体结合到由第一结合配偶体和分析物形成的复合体上。结合配偶体通常是蛋白, 如抗体, 包括具有期望结合特性的抗体片段。抗体是免疫球蛋白分子, 其可属于 IgG、IgM、IgE、IgA 或 IgD 类中的任何一类; IgG 和 IgM 最常使用。优选地结合配偶体是包含配体结合位点的抗体片段, 如 Fab、或 scFv 片段。称为 Fab 片段 (抗原结合片段) 的片段由通过二硫桥共价附着到免疫球蛋白重链可变区和第一恒定区上的免疫球蛋白轻链的可变区和恒定区构成。Fv (可变区) 意思是负责配体结合的免疫球蛋白分子的可变区。ScFv (单链 Fv) 意思是一种分子, 其中抗体的重链和轻链的可变区通过肽相连, 形成从单一 mRNA 分子合成的单个多肽链。免疫球蛋白重链和轻链的可变区一起负责配体的结合。配体是结合配偶体结合的物质, 对抗体而言, 它是抗原或半抗原。

[0028] 第一结合配偶体可以是常规的多克隆或单克隆抗体或者其片段, 但优选其是重组抗体, 第二结合配偶体也一样。当已经选择了第一结合配偶体时, 其与它的配体复合, 这种复合体用于从重组文库中选择第二结合配偶体。无配体的第一结合配偶体用作反选。第二结合配偶体应当仅识别复合体, 在任何显著的程度上不识别游离的第一结合配偶体或者游离的抗原。

[0029] 重组结合配偶体文库合适地是表达文库, 其典型地是展示文库。展示重组结合配偶体文库的总的原理是它们将结合配偶体作为融合蛋白呈现在表面, 其可以是微生物细胞的表面, 如酵母或细菌细胞, 或者噬菌体。展示重组结合配偶体文库也可以叫做展示文库, 其中在体外表达系统中产生原初蛋白和 mRNA 的稳定复合体。噬菌体展示库是最为常用的。例如在 Hoogenboom 等, 1998 中描述了抗体噬菌体展示技术及其应用。

[0030] 可通过将免疫球蛋白区编码 cDNAs 克隆到适当的噬菌体展示载体中构建噬菌体展示抗体库。将许许多多编码抗体片段变体的 DNA 成批克隆到载体中, 作为噬菌体外壳蛋白的一部分。可通过在细菌中转化载体获得含有许许多多具有不同特异性的抗体片段的巨大文库。细菌的培养导致噬菌体展示抗体片段在它们的表面表达。噬菌体基因组中携带展示抗体的基因, 这样将基因型和表型联系起来。展示蛋白及其 DNA 之间的自然连锁允许通过称作淘选的简单的体外选择过程, 筛选每个与其相应 DNA 联系的大量蛋白变体。在其最简单的方式中, 通过用固定在载体上的感兴趣的配体孵育噬菌体展示变体池, 洗去未结合的噬菌体, 以及通过破坏对配体的结合特异性地洗脱结合的噬菌体完成淘选。随后体内扩增洗脱的噬菌体。该方法重复几次, 导致有利于最紧密结合序列的噬菌体池的逐步富集。大

约 3 到 6 次的选择和扩增后,对最好的克隆进行测序并转化到宿主细胞中进一步表达。宿主细胞可以是真核或原核细胞,例如酵母、动物、植物或昆虫细胞或者细菌细胞。其甚至可以是杂交瘤细胞,其转化后产生重组单克隆抗体。重组结合配偶体或其至少一部分也可以化学合成。

[0031] 使用重组抗体库的观念使小分析物的非竞争性三明治鉴定变得可行。可通过所有的标准免疫测定检测该三明治。通常将一个配偶体固定在载体上,如微量滴定孔或磁珠。在分析物和另一个结合配偶体存在的情况下形成三明治。例如可通过使用二抗或者通过标记结合配偶体中的至少一个检测三明治。标记可以是任何常规的标签,如放射标记、酶、或者荧光化合物。鉴定可以是例如 ELISA 或 FIA。

[0032] 本发明试剂对的主要优点是它能进行均质非竞争性免疫测定,即在溶液中完成的免疫测定。避免固定和洗涤步骤使鉴定变得非常简单。这样的检验也适合在现场检验,即在实验室以外的地方。

[0033] 优选的均质免疫测定是一种基于荧光共振能量转移 (FRET) 的免疫测定,综述见 Szöllösi 等,1998。在 FRET 中,分子荧光基团 (供体) 的能量被激活到高能量状态,并通过分子间的偶极-偶极偶联转移至另一个荧光基团 (受体)。只有供体和受体之间的距离短 (10-100Å) 以及供体的荧光光谱和受体的吸收光谱部分重叠,这才可能。然后检测能量转移在荧光中的改变。常常利用时间分辨荧光 (Hemmil 等,1988)。

[0034] 通过标记两个结合配偶体将 FRET 应用于本发明,其优选地是抗体片段,带有形成 FRET 供体-受体对的荧光基团。当结合配偶体和分析物较小时,荧光基团靠得非常近,从而获得可测量的 FRET 信号。

[0035] 本发明提供小分子量分析物的方便和快捷的分析工具,如治疗性和被滥用的药物、类固醇、激素、代谢产物、以及环境污染物和毒物。这些小分析物的共同特点是它们太小,不适合使用两个识别抗原不同表位抗体的常规三明治鉴定。这些小分析物的分子量正常地低于 5000,但是界限不是绝对的。

[0036] 可在各种研究中使用免疫测定,如在检测环境危害、食品和饲料中的有毒化合物、不断发展过程中的化学指征,例如建筑物中的微生物进展、活的生物体的代谢过程,以及在临床试验、药物监控和药理学研究中。该鉴定非常适合检测滥用的药物,如阿片剂 (例如吗啡)、苯异丙胺 (amphetamines)、大麻素 (cannabinoids) (例如四氢大麻酚 (THC))、巴比妥盐 (barbiturates)、苯 (并) 二氮䓬类 (benzodiazepines)、可卡因、LSD、美沙酮 (methadone)、甲喹酮 (methaqualone)、苯环己哌啶 (phencyclidine)、丙氧芬 (propoxyphene)、三环抗抑郁药 (tricyclic antidepressants)。均质鉴定为现场检验提供了极好的和方便的工具,例如警察在搜捕等中的使用。待分析的样品,例如药物和滥用的药物,可以是任何体液样品,如血液、血清、尿或唾液。

[0037] 本发明的试剂对可包含在检验试剂盒内。这种检验试剂盒可进一步包括鉴定所需要的任何其它试剂,如反应液、缓冲液、洗涤液以及检测方法,如标签和可任选地荧光计。优选地检验试剂盒包括多种互相完全分离的试剂对,例如以微阵列的形式的许多试剂对,其中例如从单一唾液样品中可同时检验出许多不同的滥用药物。

[0038] 在本发明的一个具体的实施方案中,生产检测吗啡的试剂对并在所述物质的均质免疫测定中使用。第一结合配偶体是从由用偶联到免疫载体 BSA 的吗啡所免疫的小鼠的

cDNA 产生的噬菌体展示抗体库中获得的 Fab 片段。通过选择那些结合偶联 BSA 的吗啡的噬菌体以及淘汰那些单独结合 BSA 的噬菌体,富集吗啡特异性抗体噬菌体。几轮淘选后,对两个高度结合的克隆进行测序和表达。表达的 Fab 片段被命名为 M1Fab 和 M2Fab。

[0039] 通过选择结合吗啡和 M1Fab 复合体的抗体,从原初 scFv 抗体片段噬菌体展示库中获得第二结合配偶体。首先将噬菌体与结合的 M1Fab 预温育,挑出结合 M1Fab 的那些噬菌体。分离未结合的噬菌体,与吗啡和固定的 M1Fab 的混合物一起孵育,选择结合到固定的 M1Fab 和吗啡所形成的免疫复合体上的噬菌体。洗去未结合的噬菌体,然后洗脱那些结合复合体的噬菌体。通过在缺少吗啡的情况下检查对 M1Fab 的结合来监控背景。几轮淘选后,获得若干克隆,经过测序和表达,最终得到 scFv 片段 K11。

[0040] 使用用钕标记的 M1Fab 作为第一结合配偶体,以及用 Cy5 标记的 scFv 片段 K11 作为第二结合配偶体完成基于荧光的免疫测定。将结合配偶体与含有吗啡的唾液或尿液样品孵育,然后在预定时间后测量荧光。鉴定是完全均质的,并且在约 5 分钟内就能读取信号。尿液和唾液的灵敏度均明显高于权威机构对吗啡,我们的模型分析物,所要求的灵敏度。检验是这样完成的:将试剂置于微量滴定板的孔中,加入将唾液或尿液的系列稀释液,在优选的模型,例如警察领域的应用中,试剂是以容器内的干粉形式。加入唾液,其溶解试剂,不用进一步处理就可读出结果。

[0041] 本发明提供的新的重组结合蛋白包括 M1Fab、M2Fab 或 K11scFv 的任何配体结合部分。通过“配体结合部分”意思是指分子中负责结合的部分。在说明书和权利要求中所阐述的序列的较小变化或者修饰仍然在本发明的范围内,只要它们不影响蛋白的结合活性。

[0042] 本发明通过下列非限制性的实施例进行举例说明。然而,应当理解的是,在上述说明书中和在实施例中给出的实施方案仅仅是为了说明的目的,在本发明的范围内可能有各种改变和修饰。

[0043] 实施例 1

[0044] 抗吗啡抗体的获得

[0045] 小鼠的免疫

[0046] 在 3 周时间间隔内,用含有偶联 BSA 的吗啡 (Fitzgerald) 的弗式佐剂免疫 4 只六周龄雌性 Balb/c 小鼠。在第二次加强免疫后检验血清样品,选择在直接 ELISA 方法中显示对抗原最强反应的小鼠作为抗体噬菌体展示库的来源。

[0047] 抗体噬菌体展示库的构建

[0048] 所有基本的重组 DNA 方法基本上根据描述的方法 (Sambrook 等, 1990) 进行。将对吗啡-BSA 偶联具有最强抗体免疫反应的小鼠处死,使用 RNagents® 总 RNA 提取系统 (Promega Co., WI, USA) 从脾细胞中分离总 RNA。用 Oligotex mRNA 试剂盒 (QIAGEN Inc., Germany) 分离总 RNA 中的 mRNA 池。用 oligo-dT 引发,从 mRNA 中合成 cDNA。使用抗体 κ 轻链和重链可变区和恒定区特异的引物,用 PCR 扩增编码抗体 Fab 片段的基因。集中抗体轻链的 PCR 产物,并用 NheI 和 AscI 限制性内切酶消化,通过制备型琼脂糖凝胶与 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (QIAGEN Inc., Germany) 结合纯化。将琼脂糖凝胶纯化的抗体轻链 DNA 连接到 pComb3 来源的 Fab 噬菌粒载体 phagemid9 (Barbas 等, 1991), 通过电穿孔转化到大肠杆菌 (E. coli) XL1-Blue 株 (Stratagene) 中。用 QIAGEN Plasmid Midi 试剂盒 (QIAGEN Inc., Germany) 从过夜培养物中分离质粒 DNA。集中编码重链 Fd 区 (可变区和第一恒定

区)的 PCR 产物,并用 SfiI 和 NotI 限制性内切酶消化,通过制备型琼脂糖凝胶分离纯化,连接到含有轻链 DNA 的噬菌粒载体中。通过电穿孔将编码 Fab 片段的重链和轻链的噬菌粒载体转化到大肠杆菌 (*E. coli*)TOP10F' 细菌中 (Invitrogen Inc., CA, USA)。在摇床上, +37℃ 过夜培养转化菌,用 QIAGEN Plasmid Midi 试剂盒分离质粒 DNA。通过对单个克隆的部分 V_L 或 V_H 基因区测序,确保抗体库的多样性。

[0049] 根据以下步骤制备噬菌体展示抗体库:在 2 个平行的转化中,通过电穿孔将 4 μ g 抗体库质粒 DNA 转化到大肠杆菌 (*E. coli*)TOP10F' 中。转化后,将细胞悬浮到 2.8ml SOC 培养基中,在摇床上, +35℃ 培养 1 小时。加入 7ml 预温 (+37℃) 的 SB 培养基、20 μ g/ml 羧苄青霉素和 10 μ g/ml 四环素。在摇床上 +35℃ 培养 1 小时后,加入 30 μ g/ml 羧苄青霉素,继续培养 1 小时,之后加入 1ml ($\sim 10^{11}$ pfu) 辅助噬菌体 VCS-M13 (Stratagene),缓慢振荡,让噬菌体在 +35℃ 感染细菌 20 分钟。结合平行转化,加入含有 50 μ g/ml 羧苄青霉素和 10 μ g/ml 四环素的 80ml 预温 (+37℃) 的 SB 培养基。在摇床上 +35℃ 培养 2 小时后,加入 70 μ g/ml 卡那霉素,继续过夜培养。

[0050] 细胞在 +4℃, 4000g 离心 15 分钟。向上清液中加入 20ml 20% PEG, 2.5M NaCl (PEG/NaCl), 在冰上孵育 30 分钟。将 PEG 沉淀的噬菌体在 +4℃, 13000g 离心 20 分钟。将沉淀在 2ml PBS 中悬浮,将 1ml 溶液转移到 2 个 eppendorf 管中。+4℃ 离心 5 分钟后,通过向上清液中加入 200 μ l PEG/NaCl 沉淀噬菌体。将溶液混合,在 +4℃ 离心 5 分钟。在 1ml PBS 或 PBS+1% BSA 中悬浮沉淀。加入 1 μ l 20% 叠氮钠作为防腐剂。噬菌体展示抗体库保存在 +4℃。

[0051] 抗吗啡抗体库的选择

[0052] 通过下列选择步骤从噬菌体展示抗体库中选择吗啡特异性抗体:用含有 1 μ g 偶联 BSA 的吗啡 (吗啡-BSA, Fitzgerald Industries International, Inc., MA, USA) 的 100 μ l 100mM 碳酸氢钠缓冲液, pH9.8, +4℃ 过夜包被微量滴定孔。滴定孔用 PBS 洗涤 2 次,用含 1% BSA 的 PBS 在 +37℃ 封闭 1 小时。室温下在滴定孔中振荡孵育 100 μ l 噬菌体库 1 小时,之后除去未结合的噬菌体,滴定孔用 PBS 冲洗 22 次。用 100 μ l 100mM HCl (pH2.2) 洗脱结合的噬菌体 15 分钟。将洗脱的噬菌体移出滴定孔,用 1M Tris 中和。在 +35℃, 将 3ml 在补充了 10 μ g/ml 四环素的 SB 培养基中生长的新鲜大肠杆菌 (*E. coli*)XL1-Blue 细胞 ($OD_{600} \approx 1$) 用洗脱的噬菌体感染 15 分钟。加入 7ml 含有 20 μ g/ml 羧苄青霉素和 10 μ g/ml 四环素的预温 (+37℃) 的 SB 培养基,培养物在 +35℃ 摇床上培养 1 小时。加入 30 μ g/ml 羧苄青霉素,继续培养 1 小时。向培养物中加入 1ml 辅助噬菌体 VCS-M13, +35℃ 缓慢振荡培养 15 分钟。用含有 50 μ g/ml 羧苄青霉素和 10 μ g/ml 四环素的 90ml 预温 (+37℃) 的 SB 稀释培养物。摇床上 +35℃ 培养 2 小时后,加入 70 μ g/ml 卡那霉素,继续过夜培养。通过上述 PEG 沉淀纯化扩增的噬菌体。

[0053] 在进一步的富集轮回中使用纯化的噬菌体。4 轮选择后,当与背景比较时,吗啡特异性抗体噬菌体已经富集了 1000 多倍。与每轮选择平行,通过在 BSA 包被的微量滴定孔中培养噬菌体库,监控噬菌体的背景结合。洗涤滴定孔,如在吗啡-BSA 包被的孔中一样洗脱噬菌体。通过将吗啡-BSA 包被的孔中洗脱的噬菌体数量与从背景孔中洗脱的噬菌体数量进行比较,监控吗啡特异性噬菌体的富集。

[0054] 单个克隆的特性描述

[0055] 第四轮淘选后,用QIAGEN Plasmid Midi 试剂盒分离出噬菌粒DNA。用NheI和NotI限制性内切酶消化质粒以分离出Fab基因片段。将琼脂糖凝胶分离的DNA连接到表达载体pKktac中。将连接反应转化到大肠杆菌(E.coli)XL1-Blue细胞中。

[0056] 挑取单个克隆,用QIAprep Spin Miniprep 试剂盒(QIAGEN Inc., Germany)提取小量制备DNA。根据小量制备的测序,发现了2个不同的Fab克隆。这些克隆命名为M1和M2。M1Fab片段的氨基酸序列是SEQ ID NO 1(轻链)和SEQ ID NO 2(重链)。第3到108位氨基酸代表M1轻链(SEQ ID NO 1)的可变区,第109到215位氨基酸代表其恒定区。第4到123位氨基酸代表M1重链(SEQ ID NO 2)的可变区,第124到226位氨基酸代表其恒定区。M2Fab片段的氨基酸序列是SEQ ID NO 3(轻链)和SEQ ID NO 4(重链)。第3到108位氨基酸代表M2轻链(SEQ ID NO 3)的可变区,第109到215位氨基酸代表其恒定区。第4到123位氨基酸代表M2重链(SEQ ID NO 4)的可变区,第124到226位氨基酸代表其恒定区。其余氨基酸来源于克隆技术,C末端氨基酸中的一些有利于蛋白的分离和纯化。也制备了小规模(3ml)Fab表达培养物。通过在PBS中冻融细胞3次,分离细胞的周质部分。

[0057] 通过在吗啡-BSA包被的微量滴定孔中的ELISA,检验单个Fab克隆对吗啡的结合:用含有200ng吗啡-BSA的0.1M碳酸氢钠缓冲液,pH9.8,+4℃过夜包被微量滴定孔。对照孔内仅用缓冲液填充。包被后,用PBS液冲洗微量滴定孔3次,室温下用含有0.5%BSA的PBS(BSA/PBS)封闭1小时。微量滴定孔用PBS冲洗3次,将含有周质部分1:10稀释的100μlBSA/PBS加入到微量滴定孔中。室温下在摇床上培养1小时后,微量滴定孔用PBS冲洗3次,加入溶于100μlBSA/PBS中的1:2000稀释的碱性磷酸酶偶联抗小鼠Fab特异性抗体(Sigma,A-1293)。室温下将滴定孔在摇床上培养1小时,用PBS冲洗3次。向滴定孔中加入100μl碱性磷酸酶底物溶液(溶于二乙醇胺-MgCl缓冲液中的2mg/ml对硝基苯酚磷酸钠),测量吸光度。根据初步的结果,M1Fab在鉴定中显示较好的性能,因此继续选择。

[0058] 发酵和纯化

[0059] 将在表达载体pKktac中的抗吗啡Fab片段M1转化到大肠杆菌(E.coli)表达株RV308中。通过在Bio-Flow IV发酵罐(New Brunswick)中补料分批发酵表达Fab,通过Sephacrose SP离子交换和蛋白G层析(Pharmacia)纯化。

[0060] 竞争性免疫测定中一抗的性能

[0061] 使用商品化的尿毒理学对照S1和S3(Bio-Rad)在竞争性ELISA中检验M1抗吗啡Fab片段的性能。S1尿毒理学对照含有20-25%浓度的药物及药物代谢产物(包括吗啡),低于美国物质滥用及精神卫生管理局(SAMSHA)和其他机构所推荐的免疫测定的临界水平。S3尿毒理学对照含有大约3倍免疫测定中止水平浓度的药物和药物代谢产物。用含500ng吗啡-BSA的100μl碳酸氢钠缓冲液,pH9.8,+4℃过夜包被微量滴定孔。滴定孔用PBS冲洗3次,室温下用BSA/PBS封闭1小时。用PBS冲洗3次后,向微量滴定孔中加入溶于掺入了1ngM1Fab的100μlBSA/PBS的S1、S3(Bio-Rad)、阳性对照、或者阴性对照尿稀释液。室温下将滴定孔在摇床上孵育2小时,用PBS冲洗3次。向滴定孔中加入溶于100μlBSA/PBS的1:2000稀释的偶联抗Fab抗体的碱性磷酸酶(Sigma,A-1293),室温下在摇床上孵育1小时。滴定孔用PBS冲洗3次,向滴定孔中加入100μl碱性磷酸酶底物溶液,测量 A_{405} 。结果显示于图1。用样品的1:64稀释可获得阳性结果。

[0062] 对 M1Fab 和吗啡的免疫复合体特异的抗免疫复合体抗体的建立

[0063] 从原初的人 scFv 噬菌体展示库中选择免疫复合体特异性抗体

[0064] 用 ImmunoPure Sulfo-NHS-LC- 生物素试剂盒 (Pierce) 生物素化 M1Fab 片段。纯化生物素化的 M1Fab 片段, 用 Econo-Pac 10DG 柱 (Bio-Rad, CA, USA) 将缓冲液转变为 PBS。在 +4℃ 用 10 μ l 链霉抗生物素包被的磁珠 (Dyna1, M-280) 和 0.5 μ g 生物素化的 M1Fab 过夜预孵含有 200 μ l 原初的人 scFv 噬菌体展示库 (κ 或 λ 轻链) BSA/PBS。从汇集的 50 名健康个体的淋巴细胞构建原初的人 scFv 噬菌体展示库。文库的大小估计为 1×10^8 个克隆。原初的人 scFv 噬菌体展示库含有与 κ 或 λ 特异的 V_L 基因结合的 IgM 特异的 V_H 基因。从磁珠中分离未结合的噬菌体, 其中的 100 μ l 与 100ng 吗啡、500ng 生物素化的 M1Fab、以及 5 μ l 链霉抗生物素包被的磁珠室温下在摇床上孵育 1 小时。以类似的方法进行选择过程中的背景监控, 只是省略结合反应中的吗啡。磁珠用 0.5ml PBS 冲洗 5 次, 用 100 μ l HCl (pH 2.2) 洗脱结合的噬菌体 30 分钟。用 1M Tris 中和洗脱的噬菌体, 感染大肠杆菌 (E. coli) XL1-Blue 细胞。使细胞生长, 根据先前的描述纯化噬菌体。5 轮淘选后, 当将洗脱的噬菌体数量与从背景对照孔中洗脱的噬菌体数量相比时, 见到具有 κ 轻链的 scFv 库。当检验选择轮洗脱的噬菌体池时, 在噬菌体 ELISA 中也可清晰地看到对 M1Fab 和吗啡形成的免疫复合体特异的结合物的富集。

[0065] 单个克隆的特性描述

[0066] 挑取单个噬菌体克隆, 对它们测序。所有的克隆具有相同的序列 (SEQ ID NO 5)。抗 M1+ 吗啡免疫复合体 scFv 片段的氨基酸序列命名为 K11scFv。第 3 到 120 位氨基酸代表重链可变区, 第 140 到 246 位氨基酸代表轻链可变区, 第 121 到 139 位氨基酸代表 K11scFv (SEQ ID NO 5) 的接头。其余的氨基酸来源于克隆技术, C 末端氨基酸中的一些有利于蛋白的分离和纯化。

[0067] 表达和纯化

[0068] 将编码 scFv 片段 K11 的基因插入到表达载体 pKKtac 中, 转化到大肠杆菌 (E. coli) RV308 株中。将细胞接种到 20ml 含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中, +37℃ 在摇床上过夜培养。从过夜培养物中取 10ml, 加入到两个含有具有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 500ml LB 培养基的锥形瓶中。在 +37℃ 摇床上培养细胞, 直到 OD_{600} 为 1, 之后向培养物中加入 0.5ml 1M IPTG 和 100 μ g/ml 氨苄青霉素, 继续在 +30℃ 摇床上过夜培养。培养基上清液和细胞的周质部分都用于 K11scFv 的纯化。细胞在 4000g 离心 15 分钟, 将上清倒入干净烧瓶中。在 20ml PBS 中重悬细胞。通过冻 (-70℃) 融 (+37℃) 细胞 3 次, 分离细胞的周质部分。12000g 离心 30 分钟后, 得到澄清的周质上清液。在 +37℃ 用 2mg/ml DNA 酶 I 处理培养基和周质部分 2 小时, 除去残余的染色体 DNA。由于表达的 K11scFv 在其 C 末端有 6x His-tag 标签, 因此其可通过用固定化金属亲和层析 (IMAC) 纯化。通过使用 STREAMLINE Cheating (Amershampharmacia biotech) 作为基质以及铜作为金属螯合物的膨胀床层析纯化 K11scFv。用 SDS-PAGE 检查 K11scFv 的纯度。

[0069] 建立吗啡的非竞争性免疫测定

[0070] 用钼标记抗免疫复合体抗体 K11scFv

[0071] 根据生产商描述的方法, 通过 DELFIA Eu- 标记试剂盒 (Wallac) 用钼螯合物标记纯化的抗 M1 和吗啡复合体 scFv 片段 K11。将标记 K11scFv 的缓冲液改成 50mM Tris, pH7.8,

0.9% NaCl。标记产量是 0.4Eu/scFv。

[0072] 吗啡的非竞争性免疫测定

[0073] 通过非竞争性免疫测定研究 K11scFv 的灵敏度和交叉反应性。用 PBS 冲洗 Transparent Streptawell (Roche) 链霉抗生物素包被的微量滴定孔 3 次。向滴定孔中加入溶于 100 μ l BSA/PBS 的 500ng 生物素化的抗吗啡 M1Fab, 将滴定孔室温下在摇床上孵育 30 分钟。用 PBS 冲洗 3 次后, 向滴定孔中加入溶于 50 μ l BSA/PBS, 掺有吗啡、苯异丙胺, 四氢大麻酚 (THC) 或 S1 尿对照的样品稀释液。向滴定孔中加入溶于 50 μ l BSA/PBS 的 1 : 100 稀释的铕标记的 K11scFv, 继续孵育 1 小时。滴定孔用 PBS 冲洗 3 次, 再向滴定孔中加入 100 μ l Enhancement 液 (Wallac)。室温下振荡 15 分钟后, 通过 VictorV 荧光计 (Wallac) 检测荧光。结果显示于图 2。K11scFv 对第一抗体片段 M1 的结合和对 M1 和吗啡的免疫复合体之间的亲和力有显著的差异。这允许检测样品中 1ng/ml 的吗啡。没有检测到与苯异丙胺或 THC 的交叉反应性。

[0074] 均质时间分辨荧光共振能量转移 (TR-FRET)

[0075] 通过 LANCE Eu-W1024ITC 螯合物试剂盒 (Wallac) 用铕标记抗吗啡 Fab 片段 M1。将标记 M1 的缓冲液改成 50mM Tris, pH7.8, 0.9% NaCl。标记产量是 1.1Eu/Fab。通过 FluoroLink-Ab Cy5 标记试剂盒 (Amershampharmacia biotech) 用 Cy5 标记抗 M1+ 吗啡免疫复合体 scFv 片段 K11scFv。标记产量是 2Cy5/scFv。

[0076] 将吗啡的各种稀释液掺入唾液, 这些样品在加到黑色微量滴定孔 (Nunc) 之前通过棉絮过滤样品。向滴定孔中加入溶于 50 μ l BSA/PBS 的 1 μ g 铕标记的 M1Fab 和 1 μ g Cy5 标记的 K11scFv。室温下孵育 5、15、30 或 60 分钟后, 通过 VictorV 荧光计 (Wallac) 读取 TR-FRET。结果显示于图 3。5 分钟孵育后, 检测唾液中 1ng/ml 吗啡。

[0077] 尽管已经描述了提供本发明的试剂和鉴定的一种策略, 但是各种改变和修饰对于本领域技术人员来说, 将是显而易见的。

[0078] 实施例 2

[0079] M1 Fab 片段与可待因、海洛因、那可丁和罂粟碱的交叉反应性

[0080] 在竞争性 ELISA 中检验 M1 抗吗啡 Fab 片段与可待因、海洛因、那可丁和罂粟碱的交叉反应性。在 +4°C 用溶于 100 μ l 碳酸氢钠缓冲液, pH9.8 的 500ng 吗啡-BSA 包被过夜微量滴定板孔。滴定孔用 PBS 冲洗 3 次, 室温下用 0.5% BSA/PBS 封闭 1 小时, 再用 PBS 冲洗 3 次。向滴定孔中加入溶于含有 5ng 纯化 M1Fab PBS 的 2 份平行 100 μ l 样品, 其中样品含有吗啡、可待因, 海洛因、那可丁和罂粟碱 (39、78、156、313、625、1250、2500 或 5000ng/ml), 室温下在摇床上孵育 30 分钟, 用 PBS 冲洗 3 次。向滴定孔中加入溶于 100 μ l 0.5% BSA/PBS 的 1 : 2000 稀释的碱性磷酸酶偶联抗 Fab 抗体 (Sigma, A-1293), 室温下在摇床上孵育 30 分钟。滴定孔用 PBS 冲洗 3 次, 加入 100 μ l 碱性磷酸酶底物溶液, 测量 A_{405} 。结果显示于图 4。根据竞争性 ELISA 结果, M1 抗体对可待因和海洛因有高度交叉反应性, 其结构上与吗啡非常相似。

[0081] 吗啡的均质时间分辨荧光共振能量转移 (TR-FRET) 免疫测定

[0082] 通过 LANCE Eu-W1024ITC 螯合物试剂盒 (Wallac) 用铕标记抗吗啡 Fab 片段 M1。将标记 M1 的缓冲液改成 50mM Tris, pH7.8, 0.9% NaCl。标记产量是 1.1Eu/Fab。通过 FluoroLink-Ab Cy5 标记试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotec) 用 Cy5 标记抗 M1+ 吗啡免

疫复合体 scFv 片段 K11。标记产量是 2Cy5/scFv。

[0083] 用高浓度 (10 μ g/ml) 的下列药物掺入唾液:吗啡、海洛因、可待因、罂粟碱和那可丁。样品在加到黑色微量滴定孔 (Nunc) 之前通过棉絮过滤。向滴定孔中加入 50 μ l BSA/PBS 中的 1 μ g 钬标记的 M1Fab 和 1 μ g Cy5 标记的 K11scFv。作为对照,测量不添加任何药物的 M1 和 K11 抗体对的背景荧光。室温下 5 分钟孵育后,通过 VictorV 荧光计 (Wallac) 读取 TR-FRET。结果显示于图 5。掺入吗啡的唾液样品产生高荧光值,而其它药物产生与从对照 (未添加任何药物的标记 M1 和 K11scFv 片段) 中所检测到的背景荧光相似的荧光值。K11scFv 结合 M1 和吗啡之间形成的免疫复合体,具有非常高的特异性。K11 能够完全把 M1 和吗啡的免疫复合体与 M1 和海洛因或者和可待因之间的免疫复合体区分开来,其产生与背景水平一致的荧光值。

[0084] 参考文献

[0085] Barbas, C. F. III, Kang, A. S., Lerner, R. A., Benkovic, S. J. (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982.

[0086] Hemmila, I., Malminen, O., Mikola, H., Lovgren, T. (1988) Homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay of thyroxine in serum. Clin. Chem. 34:2320-2322.

[0087] Hoogenboom H. R., de Bruine, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J. -W., 和 Roovers, R. C. (1998) Review article: Antibody phage display technology and its applications. Immunotechnology 4, 1-20.

[0088] Kobayashi, N., Oiwa, H., Kubota, K., Sakoda, S., Goto, J. (2000) Monoclonal antibodies generated against an affinity-labeled immune complex of an anti-bile acid metabolite antibody: an approach to noncompetitive hapten immunoassays based on anti-idiotypic or anti-metatype antibodies. J Immunol Methods, 245, 95-108.

[0089] Kohler, G. 和 Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256, 495-7.

[0090] Mares, A., De Boever, J., Osher, J., Quiroga, S., Barnard, G. 和 Kohen, F. (1995) A direct non-competitive idiometric enzyme immunoassay for serum oestradiol. J Immunol Methods, 181, 83-90.

[0091] Maruyama, H., Sperlagh, M., Zaloudik, J., Liang, S., Mizuki, K., Molthoff, C. 和 Herlyn, D. (2002) Immunization procedures for anti-idiotypic antibody induction in mice and rats. J Immunol Methods, 264, 121.

[0092] Sambrook, J., Fritsch, E. F., 和 Maniatis, T. (1990) Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[0093] Self, C. H., Dessi, J. L. 和 Winger, L. A. (1994) High-performance assays of small molecules: enhanced sensitivity, rapidity, and convenience demonstrated with a noncompetitive immunometric anti-immune complex assay system for digoxin. Clin Chem, 40, 2035-41.

[0094] Suzuki, C., Ueda, H., Mahoney, W. 和 Nagamune, T. (2000) Open sandwich

enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitation of small haptens. *Anal Biochem*, 286, 238-46.

[0095] Suzuki, C., Ueda, H., Tsumoto, K., Mahoney, W. C., Kumagai, I. 和 Nagamune, T. (1999) Open sandwich ELISA with V (H)-/N(L)-alkaline phosphatase fusion proteins. *J Immunol Methods*, 224, 171-84.

[0096] Szollosi, J., Damjanovich, S., Matyus, L. (1998) Application of Fluorescence Resonance Energy Transfer in the Clinical Laboratory: Routine and Research. *Communications in Clinical Cytometry*, 34, 159-179.

[0097] Towbin, H., Motz, J., Oroszlan, P. 和 Zingel, O. (1995) Sandwich immunoassay for the hapten angiotensin II. A novel assay principle based on antibodies against immune complexes. *J Immunol Methods*, 181, 167-76.

[0098] Ueda, H., Tsumoto, K., Kubota, K., Suzuki, E., Nagamune, T., Nishimura, H., Schueler, P. A., Winter, G., Kumagai, I. 和 Mahoney, W. C. (1996) Open sandwich ELISA: a novel immunoassay based on the interchain interaction of antibody variable region. *Nat Biotechnol*, 14, 1714-8.

[0099] Ullman, E. F., Milburn, G., Jelesko, J., Radika, K., Pirio, M., Kempe, T. 和 Skold, C. (1993) Anti-immune complex antibodies enhance affinity and specificity of primary antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 1184-9.

[0100] Yokozeki, T., Ueda, H., Arai, R., Mahoney, W. 和 Nagamune, T. (2002) A homogeneous noncompetitive immunoassay for the detection of small haptens. *Anal Chem*, 74, 2500-4.

[0101] 序列表

[0102] <110> VTT 生物技术

[0103] <120> 小分析物的非竞争性免疫测定

[0104] <130> 2021739PC

[0105] <160> 5

[0106] <170> Patent In Version 3.1

[0107] <210> 1

[0108] <211> 215

[0109] <212> PRT

[0110] <213> Mus sp.

[0111] <400> 1

[0112] Met Ala Asp Ile Lys Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser

[0113] 1 5 10 15

[0114] Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser

[0115] 20 25 30

[0116] Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu

[0117] 35 40 45

[0118] Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

[0119]	50	55	60
[0120]	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu		
[0121]	65	70	75
[0122]	Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu		
[0123]	85	90	95
[0124]	Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Thr		
[0125]	100	105	110
[0126]	Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser		
[0127]	115	120	125
[0128]	Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp		
[0129]	130	135	140
[0130]	Ile Asn Val Lys Trp Asn Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val		
[0131]	145	150	155
[0132]	Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met		
[0133]	165	170	175
[0134]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser		
[0135]	180	185	190
[0136]	Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys		
[0137]	195	200	205
[0138]	Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
[0139]	210	215	
[0140]	<210>2		
[0141]	<211>236		
[0142]	<212>PRT		
[0143]	<213>Mus sp.		
[0144]	<400>2		
[0145]	Met Ala Ala Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Thr Leu Val Lys		
[0146]	1	5	10
[0147]	Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Ile Thr Phe		
[0148]	20	25	30
[0149]	Ser Thr Tyr Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu		
[0150]	35	40	45
[0151]	Glu Trp Val Ala Ser Ile Asn Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp		
[0152]	50	55	60
[0153]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asp Lys Gly Asn Ile		
[0154]	65	70	75
[0155]	Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr		
[0156]	85	90	95
[0157]	Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Gly Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val		

[0158]	100	105	110
[0159]	Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro		
[0160]	115	120	125
[0161]	Pro Ser Val Tyr Pro Leu Val Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser		
[0162]	130	135	140
[0163]	Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
[0164]	145	150	155
[0165]	Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe		
[0166]	165	170	175
[0167]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr		
[0168]	180	185	190
[0169]	Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala		
[0170]	195	200	205
[0171]	His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp		
[0172]	210	215	220
[0173]	Cys Gly Thr Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys		
[0174]	225	230	235
[0175]	<210>3		
[0176]	<211>215		
[0177]	<212>PRT		
[0178]	<213>Mus sp.		
[0179]	<400>3		
[0180]	Met Ala Asp Ile Lys Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser		
[0181]	1	5	10
[0182]	Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn		
[0183]	20	25	30
[0184]	Tyr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu		
[0185]	35	40	45
[0186]	Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe		
[0187]	50	55	60
[0188]	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu		
[0189]	65	70	75
[0190]	Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Ala Leu		
[0191]	85	90	95
[0192]	Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala		
[0193]	100	105	110
[0194]	Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser		
[0195]	115	120	125
[0196]	Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp		

[0197]	130	135	140
[0198]	Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val		
[0199]	145	150	155
[0200]	Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met		
[0201]		165	170
[0202]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser		
[0203]		180	185
[0204]	Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys		
[0205]		195	200
[0206]	Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
[0207]	210	215	
[0208]	<210>4		
[0209]	<211>236		
[0210]	<212>PRT		
[0211]	<213>Mus sp.		
[0212]	<400>4		
[0213]	Met Ala Ala Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys		
[0214]	1	5	10
[0215]	Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Ile Thr Phe		
[0216]		20	25
[0217]	Ser Lys Tyr Val Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Arg Leu		
[0218]		35	40
[0219]	Glu Trp Val Thr Ser Ile Asn Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp		
[0220]		50	55
[0221]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gly Asn Ile		
[0222]	65	70	75
[0223]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr		
[0224]		85	90
[0225]	Tyr Cys Thr Arg Glu Gly Ser Tyr Gly Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val		
[0226]		100	105
[0227]	Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Leu Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro		
[0228]		115	120
[0229]	Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser		
[0230]		130	135
[0231]	Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
[0232]	145	150	155
[0233]	Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe		
[0234]		165	170
[0235]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr		

[0236]	180	185	190
[0237]	Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala		
[0238]	195	200	205
[0239]	His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp		
[0240]	210	215	220
[0241]	Cys Gly Thr Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys		
[0242]	225	230	235
[0243]	<210>5		
[0244]	<211>272		
[0245]	<212>PRT		
[0246]	<213>人 (Homo sapiens)		
[0247]	<400>5		
[0248]	Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro		
[0249]	1	5	10
[0250]	Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp		
[0251]	20	25	30
[0252]	Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
[0253]	35	40	45
[0254]	Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp		
[0255]	50	55	60
[0256]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser		
[0257]	65	70	75
[0258]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
[0259]	85	90	95
[0260]	Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
[0261]	100	105	110
[0262]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
[0263]	115	120	125
[0264]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Asp Ile Gln Met Thr		
[0265]	130	135	140
[0266]	Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile		
[0267]	145	150	155
[0268]	Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln		
[0269]	165	170	175
[0270]	Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn		
[0271]	180	185	190
[0272]	Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
[0273]	195	200	205
[0274]	Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr		

[0275]	210	215	220
[0276]	Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly		
[0277]	225	230	235 240
[0278]	Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser		
[0279]	245	250	255
[0280]	Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala Ser Arg His His His His His His		
[0281]	260	265	270

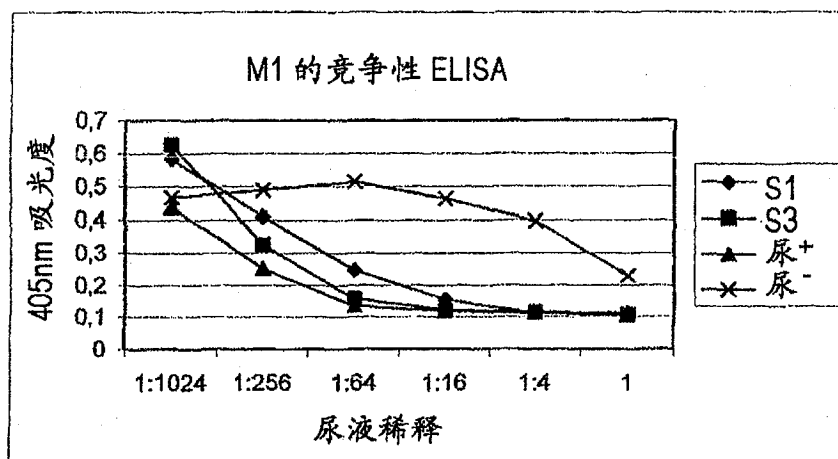


图 1

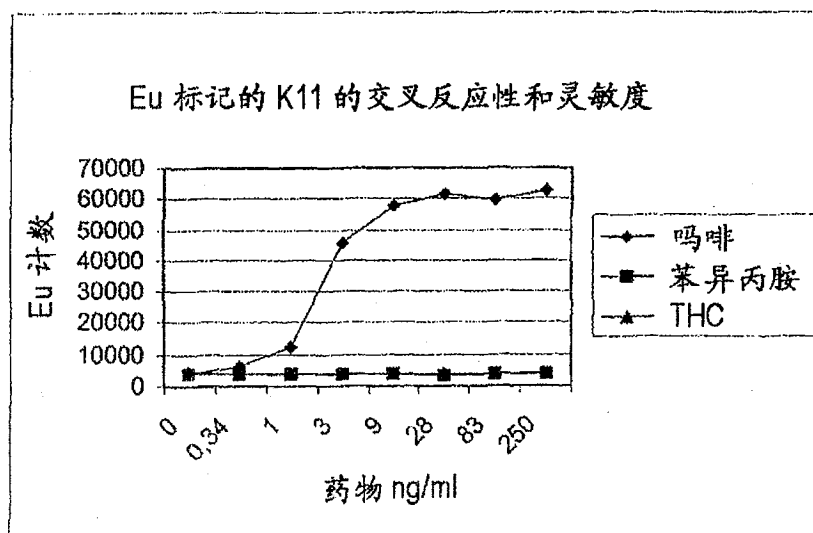


图 2a

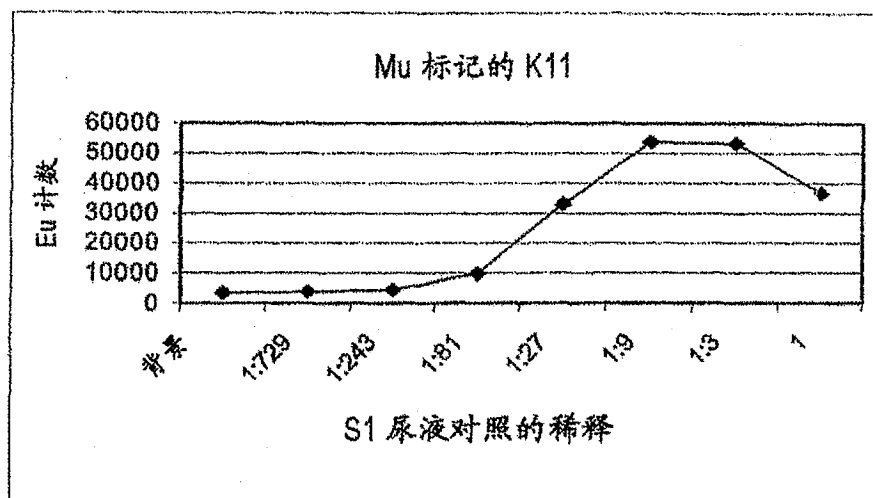


图 2b

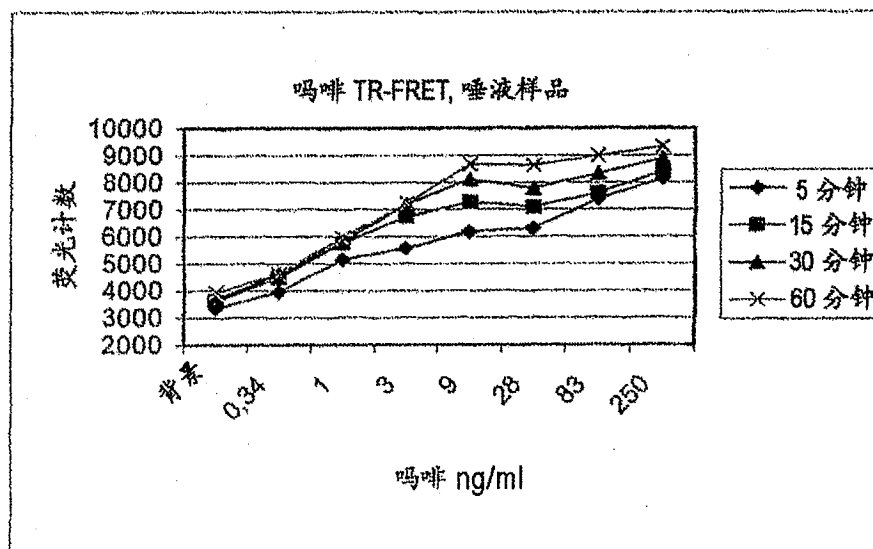


图 3

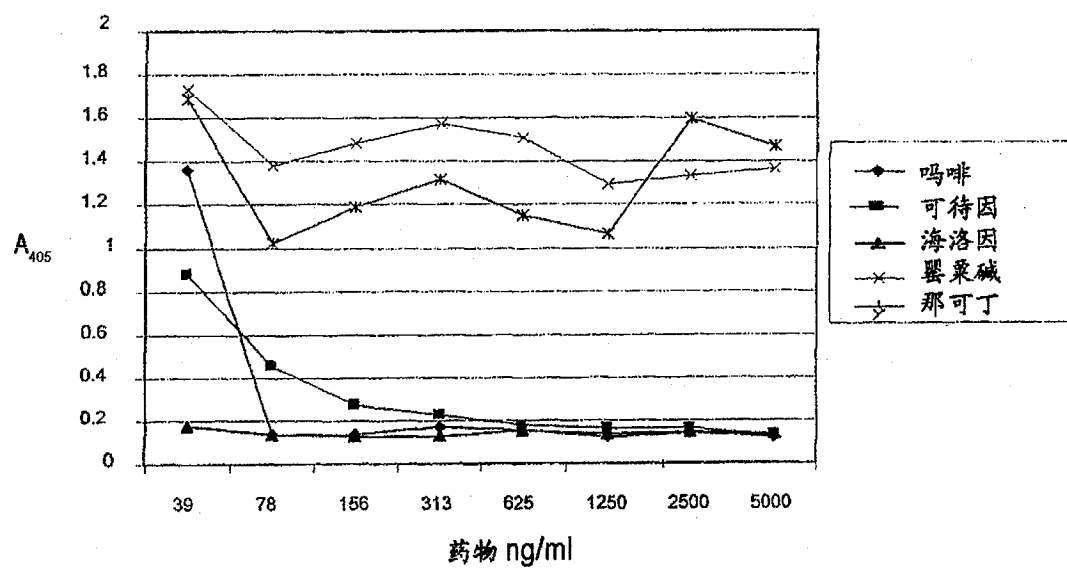


图 4

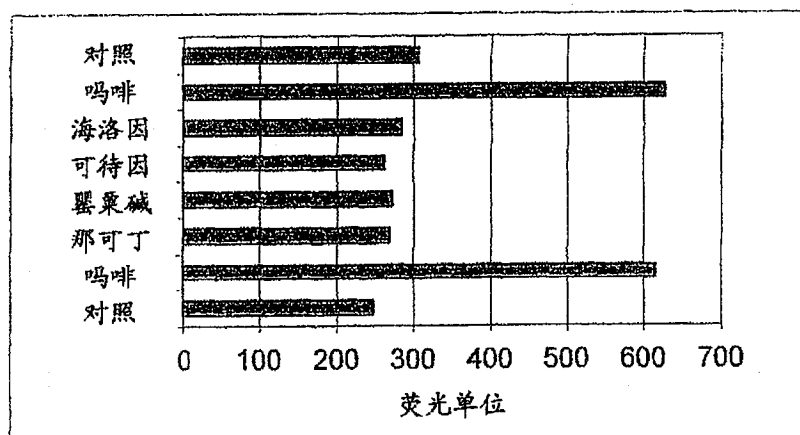


图 5

专利名称(译)	小分析物的非竞争性免疫测定		
公开(公告)号	CN1711476B	公开(公告)日	2010-09-08
申请号	CN200380103466.4	申请日	2003-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	芬兰技术研究中心		
申请(专利权)人(译)	芬兰技术研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	芬兰技术研究中心		
[标]发明人	蒂莫皮利 马蒂奥伊特亚 克里斯蒂纳塔基纳恩 汉斯索德尔吕恩德		
发明人	蒂莫·皮利 马蒂·奥伊特亚 克里斯蒂纳·塔基纳恩 汉斯·索德尔吕恩德		
IPC分类号	G01N33/94 G01N33/53 C07K16/42 C07K16/44 G01N33/542 G01N33/68		
CPC分类号	C07K2317/622 G01N33/9486 G01N33/542 G01N33/946 C07K16/44 G01N33/948 G01N33/6857		
优先权	2002002048 2002-11-18 FI		
其他公开文献	CN1711476A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是针对小分析物的非竞争性免疫测定，其中分析物与两个结合配偶体反应。第一结合配偶体结合到分析物上，在第一结合配偶体和分析物之间形成复合体，第二结合配偶体结合到由第一结合配偶体和分析物形成的复合体。检测在分析物和结合配偶体之间形成的最终复合体。结合配偶体是蛋白质，如包括抗体片段的抗体。本发明进一步涉及在鉴定中有用的试剂对和检验试剂盒，以及试剂对的用途和它们的制备方法。也提供新的试剂和它们的制备方法。

Szörlösi