

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00818657. X

[45] 授权公告日 2008 年 1 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100360937C

[22] 申请日 2000.11.24 [21] 申请号 00818657. X

[30] 优先权

[32] 1999.11.26 [33] GB [31] 9928052.1

[86] 国际申请 PCT/EP2000/011720 2000.11.24

[87] 国际公布 WO2001/038872 英 2001.5.31

[85] 进入国家阶段日期 2002.7.25

[73] 专利权人 奥斯提奥米特生物技术公司

地址 丹麦赫利夫

[72] 发明人 S·克里斯特高 D·B·亨里克森

P·A·C·克鲁斯

[56] 参考文献

WO9826286A 1998.6.18

WO9630765A 1996.10.3

审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王景朝 钟守期

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图 8 页

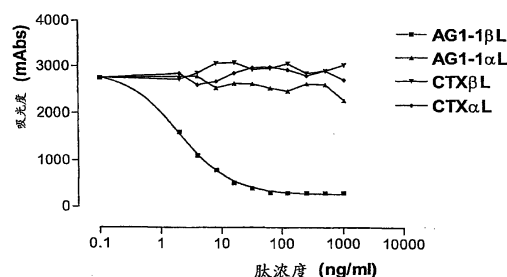
[54] 发明名称

异构化和/或旋光转化的蛋白的测定、其中使用的肽、产生抗体的细胞系、及检测试剂盒

[57] 摘要

一种免疫测定方法，包括对生物样品中源于软骨的异构化或旋光转化的非胶原蛋白或该蛋白的一个或多个异构化或旋光转化片段的数量进行免疫学测定。该方法可以测定所述生物学样品中含至少一个 *Asx 或 *Glx 的蛋白或蛋白片段的数量，其中 *Asx 是 α D Asp 或 Asn，或是 β L 或 β D Asp，而 *Glx 是 α D Glu 或 Gln，或是 γ L 或 γ D Glu。所述蛋白可以是聚集蛋白聚糖、CLP、COMP 或 CILP，或所述片段是聚集蛋白聚糖、CLP、COMP 或 CILP 的片段。

AG1-1 ELISA 的特异性



1. 一种免疫测定法，包括通过测定生物学样品中含有至少一个*Asx或*Glx的蛋白或蛋白片段的数量，对所述生物学样品中源于软骨的异构化或旋光转化的非胶原蛋白的数量或该蛋白的一个或多个异构化或旋光转化的片段的数量进行免疫学测定，其中，*Asx是 α D Asp或Asn，或者是 β L或 β D Asp，而*Glx是 α D Glu或Gln，或是 γ L或 γ D Glu。
2. 权利要求1的方法，其中，所述蛋白是聚集蛋白聚糖、软骨链接蛋白、软骨寡聚间质蛋白或软骨中间层蛋白，或所述片段是聚集蛋白聚糖、软骨链接蛋白、软骨寡聚间质蛋白或软骨中间层蛋白的片段。
3. 权利要求2的方法，其中测定的是含有源自氨基酸序列 Gly-Arg-Val-Arg-Val-*Asx-Ser-Ala-Tyr的聚集蛋白聚糖的至少一种蛋白或蛋白片段的数量。
4. 权利要求2的方法，其中测定的是含有源自氨基酸序列 Tyr-Leu-Ala-Trp-Gln-Ala-Gly-Met-*Asx-Met-Cys-Ser-Ala-Gly-Trp的聚集蛋白聚糖的至少一种蛋白或蛋白片段的数量。
5. 权利要求2的方法，其中测定的是含有源自氨基酸序列 Ala-Gly-Trp-Leu-Ala-*Asx-Gly-Ser-Val-Arg的软骨链接蛋白的至少一种蛋白或蛋白片段的数量。
6. 权利要求1-5中任一项的方法，其中，使用免疫结合配体进行所述测定，该配体特异性地结合含有*Asx或*Glx的氨基酸序列，其中*Asx或*Glx的侧面是非胶原软骨蛋白的氨基酸残基。
7. 权利要求6的方法，其中，所述免疫结合配体是对合成肽具有抗性的抗体，或者是具有免疫结合特异性的该抗体的片段，所述合成肽具有含*Asx或*Glx的氨基酸序列，其中*Asx或*Glx的侧面是非胶原软骨蛋白的氨基酸残基。
8. 权利要求6的方法，其中，所述的氨基酸序列对应于所述蛋白的特征序列，在所述蛋白序列中由*Asx或*Glx替代 α L Asp、Asn、Gln或Glu。
9. 权利要求6的方法，其中，所述的测定提供了与影响关节组织更新的状态和疾病有关的软骨更新指标。

10. 权利要求 9 的方法, 还包括进行关节疾病第二指标的测定和确定数学结合所述两个指标的参数值。
11. 一种免疫结合配体, 该配体特异性地与含*Asx 或*Glx 的氨基酸序列结合, 其中*Asx 或*Glx 的侧面是非胶原软骨蛋白的氨基酸残基, 其中,*Asx 是 α D Asp 或 Asn, 或者是 β L 或 β D Asp, 而*Glx 是 α D Glu 或 Gln, 或是 γ L 或 γ D Glu。
12. 权利要求 11 的免疫结合配体, 其特异性地结合权利要求 3-5 中任一项中给出的序列。
13. 产生单克隆抗体的细胞系, 该抗体为权利要求 11 或 12 的免疫结合配体。
14. 长度至多为 20 个氨基酸的肽, 含有侧面是非胶原软骨蛋白的氨基酸残基的*Asx 或*Glx, 其中,*Asx 是 α D Asp 或 Asn, 或者是 β L 或 β D Asp, 而*Glx 是 α D Glu 或 Gln, 或是 γ L 或 γ D Glu。
15. 权利要求 14 的肽在蛋白或蛋白片段检测中的用途。
16. 一种免疫测定法, 其中, 将生物学样品在权利要求 14 的肽存在下与免疫结合试剂接触, 其中权利要求 14 的肽作为与所述免疫结合试剂结合的竞争试剂。
17. 一种检测试剂盒, 包括 (a) 权利要求 11 的免疫结合配体和 (b) 权利要求 14 的肽并任选地包括一个或多个进行免疫测定的装置、抗体-酶偶联物、抗体-酶偶联物中酶成分的底物、酶-底物反应终止组分、或洗液、结合于所述结合配体的载体或结合于所述结合配体的可检测指标。

异构化和/或旋光转化的蛋白的测定、其中使用的肽、产生抗体的细胞系、及检测试剂盒

本发明涉及对生物学样品如体液中的非胶原软骨蛋白及其片段的免疫测定。这些蛋白和蛋白片段可以作为关节疾病的指标。

类风湿性关节炎 (RA) 是一种严重的慢性和进行性疾病，它影响了发达和发展中国家约 1% 的人口 (Harris, 1993)。虽然类风湿性关节炎的病因牵涉环境、遗传和发育因素，但现在普遍认为 RA 是一种自身免疫疾病。骨关节炎 (OA) 是一种影响了发达世界中 8% 以上人口的慢性病。这种病同样影响了关节的软骨，而尽管已经发现了作为该病病理生理学一部分的一种免疫成分，但并未将 OA 视为一种自身免疫病。

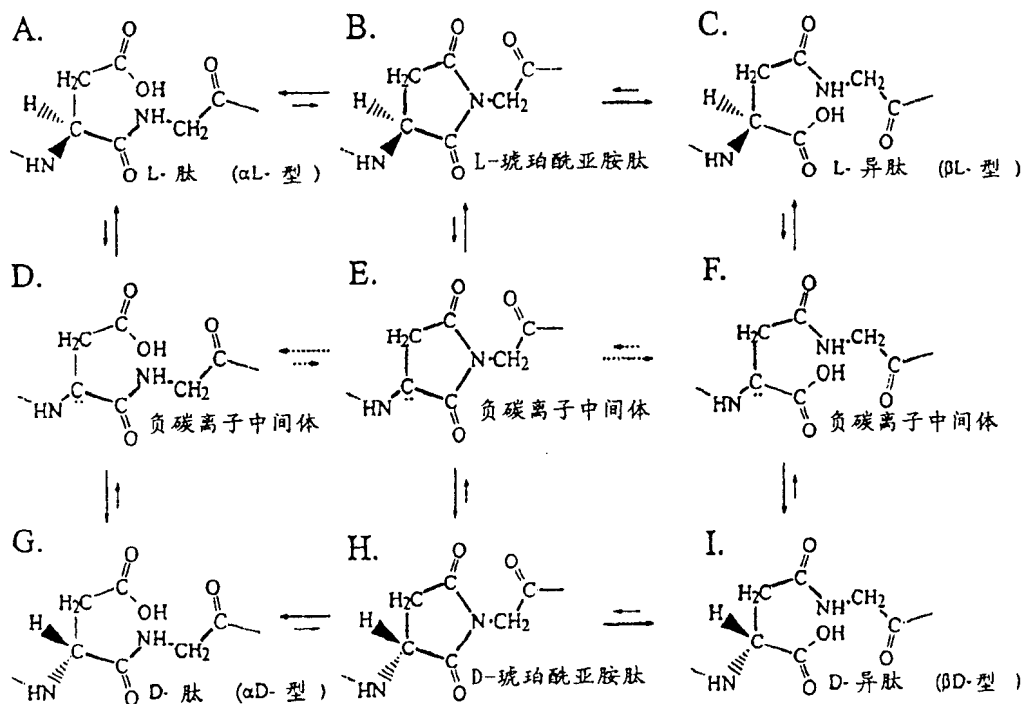
RA 和 OA 的主要临床症状是软骨的异常和退化。然而直到现在还难以对关节炎病人正在损伤的软骨进行直接评定，这是因为在临床实践中还无法得到用于这个过程的特异性指标 (Møller, 1998)。在 RA 的临床诊断时，主要根据疾病症状、功能性损伤如疼痛和由关节损伤引起的活动能力问题来对病人下结论。虽然已引入了一系列标准化的评价体系，但难以定量这些参数 (Stucki 等, 1997)。其它用于诊断 RA 病人的指标，如 C-反应蛋白和类风湿性因子是在涉及疾病的炎症过程中的特异性指标，但并不直接涉及软骨损伤程度，因而它们对 RA 是非特异性的 (Wollheim, 1996)。目前，获得关节炎病人 (个体) 关节状况信息的最好方法是采用放射线性检查。

对由疾病引起的关节损伤而出现的代谢物如透明质酸盐和聚集蛋白聚糖 (aggrecan) 片段的检测已有报道 (Møller, 1998; Wollheim, 1996)。但，这些指标在临床上的有效性仍有待证实。

本发明是基于一种新方法，用于鉴别软骨退化指标，和建立诊断和预测化验来监测关节疾病。我们已表明关节软骨的特异性成分倾向于异构化和/或旋光转化 (图 1)，并且我们已经鉴别出几种软骨蛋白中的特异性异构化/旋光转化的倾向位点。我们还证实了软骨蛋白的异构化和/或旋光转化片段存在于循环中，并且对这些片段的检测提供了关节软骨退化的一种指标。

一些敏感蛋白中的天冬氨酸和天冬酰胺 (Asx) 以及谷氨酸和谷氨

酰胺 (Glx) 残基将会发生自发性重排, 其中 Asx 和 Glx 残基及相邻残基之间正常的肽键从侧链的正常的 α -羧基基团转移到 β -羧基基团 (对于 Glx 残基为 γ -羧基基团) (Clarke, 1987)。异构化反应通过酰亚胺中间体进行, 其在自发性水解时可以形成以下四种形式之一: 普遍存在为 α L, 异构型 β L, 或是如在下面的天冬氨酸-甘氨酸的反应方案中所概述的两种旋光转化型 α D 和 β D。(该反应类似地发生于其它包含 Asx 和 Glx 的敏感性序列。)



相邻天冬氨酸残基的侧链羧基被肽主链上的氮攻击后可导致形成酰亚胺环, (A \leftrightarrow B)。该酰亚胺环倾向于水解和旋光转化, 产生 D 和 L 两构型的肽和异肽。旋光转化经由一种负碳离子中间体 (D、E 和 F) 进行, 既可以通过直接去质子 (A \leftrightarrow D \leftrightarrow G 或 C \leftrightarrow F \leftrightarrow I) 也可经由酰亚胺途径 (B \leftrightarrow E \leftrightarrow H)。所有图中的肽主链用粗线表示。

然而, 为了形成环酰亚胺 (和异构化/旋光转化), Asx 或 Glx 残基周围的三维结构必须具有最适的构象和足够的柔性 (Geiger 和 Clarke, 1987)。

研究表明, 肽和蛋白中的 Asx 残基的旋光转化主要经由酰亚胺途径 (B \leftrightarrow E \leftrightarrow H) (Geiger 和 Clarke, 1987; Radkiewics 等, 1996)。然而, 其它途径如直接去质子或亚氨基- δ -内酯结构的形成也有助

于旋光转化 (Radkiewics 等, 1996), 但一般认为这些途径较不重要 (Geiger 和 Clarke, 1987; Radkiewics 等, 1996)。

上述的经由酰亚胺中间体的异构化和旋光转化是一个自发的反应, 该反应在生理条件下缓慢地进行 (Geiger 和 Clarke, 1987; Fledelius 等, 1997)。如所有的化学反应一样, 可以通过提高温度来加快该反应的速度。

在蛋白或肽中引入这种结构变化对其功能、稳定性、和理化特性具有显著的影响。在其它特性中, 相对于只由 α L氨基酸组成的蛋白和肽, 含有异构化肽键和/或旋光转化的氨基酸的蛋白和肽的蛋白水解降解显著减少 (Rafferty 等, 1988)。因此, 含有这种修饰的蛋白片段在正常组织更新时不会降解至相同程度 (Van Regenmortel & Muller, 1998), 而且其更倾向于以可检测的浓度存在于循环中。此外, 在检测含有异构化和/或旋光转化的肽键的蛋白或蛋白片段时, 新合成的分子将不对这种检测作出贡献, 因此它将反映正在进行的降解过程。

在 W096/30765 中, 我们公开的 I 型胶原的异构化片段提供了一种改进的骨再吸收的指标, 还进一步公开了 II 型胶原 (如在软骨中发现的) 也含有潜在的异构化位点。

我们已经证实了关节软骨是一种代谢非常缓慢的组织, 它含有可以产生异构化和旋光转化的非胶原蛋白; 而且我们已经证实, 对这些蛋白或其片段的检测, 可以提供一种潜在的用于评定和监测关节病如 RA 或 OA 的关节软骨退化的诊断指标。

本发明提供了一种检测方法, 包括测定生物学样品如体液或组织样品中源于软骨的异构化或旋光转化的非胶原蛋白的量, 或是来自这种蛋白的一个或多个异构化或旋光转化的片段的量。

特别重要的蛋白包括聚集蛋白聚糖和软骨连接蛋白。

聚集蛋白聚糖是软骨关节的一种主要结构成分, 而且已经被研究用于作为诊断关节病的潜在生物指标, 同时被推定为是 RA 和该疾病动物模型中的一种自身抗原 (Poole & Dieppe, 1994; Glant 等, 1998)。

所述蛋白是一种含有多于 2000 个氨基酸残基的高糖基化的大蛋白。聚集蛋白聚糖的结构表现为三个显著的结构域: G1、G2 和 G3。G1 结构域一般被作为在聚集蛋白聚糖中产生最初免疫原性的结构域 (Glant 等, 1998)。这个球状结构域作为与透明质酸多聚体的“连接

体”，且与软骨链接蛋白（CLP）相接触。在关节炎动物模型中被鉴定为免疫系统靶、而且还作为 G1 结构域软骨聚集蛋白聚糖酶或基质溶素的特异性剪切位点的特征性抗原决定部位是：..N₍₃₆₈₎ITEGE（含有一个 N-链接糖基化的共有序列）；₃₇₄ARGSVI..；..VDIPEN₃₄₁（Dudhia 等，1996）。而且，已有文献指出了聚集蛋白聚糖中的天冬氨酸易发生外消旋（Maroudas 等，1998）。

我们已经确定了聚集蛋白聚糖的 G1 结构域（称为 AG1-1）的抗原决定部位 GRVRVNSAY 中的天冬酰胺残基是异构化/旋光转化的易感位点。在下述实例中，我们列举的试验和临床数据支持了测定异构化和/或旋光转化的 AG1-1 对监测 RA 具有临床价值的观点。

软骨链接蛋白（CLP）与透明质酸和聚集蛋白聚糖相结合，对于将聚集蛋白聚糖稳固地锚定于透明质酸多聚体可能起着重要作用。该分子结合聚集蛋白聚糖的 G1 结构域，且与这个蛋白具有结构类似处（Poole & Dieppe, 1994）。作为软骨损伤的一种潜在指标，软骨链接蛋白几乎未受关注，但对该软骨蛋白的自身免疫性表明，在该疾病动物模型中诱发 RA（Zhang 等，1998）。然而，该蛋白可以是后期损伤的一种良好指标，该损伤发生于聚集蛋白聚糖降解至足以与链接蛋白（和 G1 结构域）接触的程度。该链接蛋白还能诱发啮齿类动物自身免疫性关节炎，而免疫显性抗原决定部位则位于蛋白的 N-端以及由聚集蛋白聚糖（和中枢神经系统（CNS）的透明质酸结合蛋白，如神经蛋白聚糖和短蛋白聚糖/BEHAB）占有的两个区域，这些区域包含推定的用于透明质酸结合的共有序列。这里，选择一种这样的序列作为范例。潜在的异构化位点下边画线。用黑体字指出了与聚集蛋白聚糖的 G2 结构域的一个氨基酸差异（保守取代）。

AGWLADGSVRYPI

软骨寡聚间质蛋白（COMP）是非胶原糖蛋白（Neidhart 等，1997），它的生理功能还未确定。在早期 OA 和 RA 的病人中发现，随着早期迅速的累积性关节损伤，COMP 的水平增高，稍后则减少。

软骨中间层蛋白（CILP）是非胶原软骨蛋白，由单独一条分子量为 91.5KDa 的肽链组成，包括 N-链接的寡聚糖（Lorenzo 等，1998a 和 1998b）。

所述蛋白由软骨细胞合成，位于软骨之间。在关节软骨的表面和最

深层均没有发现该蛋白。据报道 CILP 会随着年龄的增长而增加，并被提出可作为早期 OA 的一个指标。

优选地，本方法确定所述生物样品中含有至少一种 *Asx 或 *Glx 的蛋白或蛋白片段的数量，其中，*Asx 是 α D Asp 或 Asn，或是 β L 或 β D Asp，而 *Glx 是 α D Glu 或 Gln，或是 γ L 或 γ D Glu。

优选地，天然蛋白的 Asx/Glx 邻近有甘氨酸或丝氨酸，因为这能促进异构化或旋光转化。

所述蛋白优选是聚集蛋白聚糖、CLP、COMP 或 CILP，或所述片段是聚集蛋白聚糖、CLP、COMP 或 CILP 的片段。

优选地，所述方法测定含有源自以下氨基酸序列：

Gly-Arg-Val-Arg-Val-*Asx-Ser-Ala-Tyr

的聚集蛋白聚糖的至少一种蛋白或蛋白片段的数量；

或是测定含有源自以下氨基酸序列：

Tyr-Leu-Ala-Trp-Gln-Ala-Gly-Met-*Asx-Met-Cys-Ser-Ala-Gly-Trp

的聚集蛋白聚糖的至少一种蛋白或蛋白片段的数量；

或是测定含有源自以下氨基酸序列：

Ala-Gly-Trp-Leu-Ala-*Asx-Gly-Ser-Val-Arg

的 CLP 的至少一种蛋白或蛋白片段的数量。

所述的测定优选使用一种免疫结合配体进行，该配体特异性地结合含有侧面是非胶原软骨蛋白氨基酸残基的 *Asx 或 *Glx 的氨基酸序列。该免疫结合配体应在一定程度上能区别含有 *Asx 或 *Glx 的序列和含有 α L Asp 或 α L Glu 的相应序列，从而足以提供一个有用的检测。检测/抗体对相应的抗原/抗原决定部位的 α L 构型的交叉反应性应小于 25%，优选小于 5%。

合适的是，该免疫结合配体是对含侧面是非胶原软骨蛋白氨基酸残基的 *Asx 或 *Glx 的合成肽出现的抗体，或是对所述肽具有免疫结合特异性的所述抗体的片段。

因此上述肽的氨基酸序列优选相应于所述蛋白的特征序列，在该蛋白序列中由 *Asx 或 *Glx 替代 α L Asp、Asn、Gln 或 Glu，即相应于对所讨论的蛋白基本独特的序列。合适的是，所述肽长度为 6-50 个氨基酸，例如长度为 6-15 个氨基酸。

所述测定可用于提供关节病的一种指标。这可以有助于对严重性进行初步诊断或评估或监测治疗效果。

本发明包括的上述方法还包括对关节病的第二指标进行测定和对数学结合的所述两个指标的参数值进行确定。所述第二指标也可以根据本发明的方法导出。

本发明包括源于软骨的异构化或旋光转化的非胶原蛋白或一个或多个这种蛋白的异构化或旋光转化片段在检测中的应用。本发明还包括利用能特异性结合含有*Asx 或*Glx 的氨基酸序列的免疫结合配体在体外诊断或鉴定 OA 或 RA 的严重性,其中*Asx 或*Glx 侧面是非胶原软骨蛋白的氨基酸残基。

本发明进一步提供免疫结合配体,该配体特异性地结合含有侧面是非胶原软骨蛋白的氨基酸残基的*Asx 或*Glx 的氨基酸序列。本发明还包括产生这种免疫结合配体的单克隆抗体的细胞系。

本发明还提供一种肽,优选不超过 50 个氨基酸残基,更优选是不超过 20 个氨基酸残基,如 6-50 个氨基酸残基或更优选是 6-15 个氨基酸残基,这些氨基酸的长度包含侧面是非胶原软骨蛋白的氨基酸残基的*Asx 或*Glx,并用这种肽来检验蛋白或蛋白片段。

本发明包括一种免疫测定方法,其中生物学样品与一种免疫结合剂在作为与该免疫结合剂结合的一种竞争试剂的肽存在下进行接触。

本发明包括一种检测试剂盒,包括(a)如上定义的免疫结合配体或(b)如上描述的肽,并结合(a)或(b)中的另一个,及任选地结合一个或多个用于免疫测定的装置、结合的抗体-酶,抗体-酶结合物中酶成分的底物,酶-底物反应终止组合物,洗液,结合到所述结合配体上的载体或结合到所述结合配体上的可检测指标。

本发明并不局限于酶的免疫测定,还包括任何现有技术中已知的免疫测定方法。

所述免疫结合配体可以是单克隆或多克隆抗体。

适合的免疫结合配体还包括能结合相同抗原决定素的抗体片段,包括 Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段。

测定可以采用多种形式,包括 ELISA、RIA 或 IRMA,这些方法是本领域公知的,所以不需要进一步说明。测定可以是以均一或不均一的形式。

在竞争性检测中,上述肽可以用于和样品中一种或多种异构化或光学转化蛋白或肽竞争一种免疫结合配体。在这种类型的 ELISA 中,异构化和/或光学转化的合成肽可以被固定在固体支持物上。将样品和与固体支持物中的合成肽反应的一种单克隆或多克隆抗体一起温育,经漂洗后,可加入过氧化物酶偶联的(指示性的)抗体。在进一步温育后,加入过氧化物酶底物溶液。通过竞争性作用,与抗体反应的样品中的异构化或光学转化的蛋白或肽抑制了过氧化物酶反应。

作为选择,合成肽可以用于产生单克隆免疫结合配体。这样,在检测中该合成肽不必成为竞争性试剂,例如,被酶裂解的软骨蛋白片段(如聚集蛋白聚糖)可以被纯化并固定在固体支持物上,且利用单克隆抗体便可以进行 ELISA 检测。

本发明可以应用于人类和动物。

适合的体液包括人或动物的尿、血液、血清、血浆和滑液。预期该方法还可以用于如唾液和汗。体液可以直接使用或在接触步骤之前加以纯化。纯化可以通过许多标准程序来完成,包括但不局限于软骨吸收和洗脱、分子筛层析法、透析、离子交换、矾土层析、羟磷灰石层析法和它们的组合。

可以根据公知的已有技术制备含有异构化肽键和/或旋光转化氨基酸残基的合成肽,如通过通常被称为“梅里菲尔德合成法”的固相肽合成技术。经典的溶液相技术也可以使用。常规的肽合成方法可以产生各种肽异构型(α L、 β L、 α D、 β D、 γ L、 γ D)的混合物。一般说来,这种混合物将是满意的,因为正常肽在检测中将是不起作用的。然而,加热纯的 α L-构型制备物将会产生异构化、旋光倒置的异构型。

制备单克隆和多克隆抗体的方法是众所周知的。如参见 Campbell(1986)。通过免疫法可产生合成的异构化和/或旋光转化肽的抗体。然而,由于这些化合物的分子量相对小,因此优选与载体分子偶联的半抗原。适合的载体分子包括但不局限于牛血清白蛋白、甲状腺球蛋白、卵清蛋白、破伤风类毒素和锁眼帽贝血蓝蛋白。优选牛血清白蛋白或甲状腺球蛋白作为载体。为了呈现对产生免疫动物细胞的抗体具有最大免疫原性形式的半抗原,可以使用许多替换偶联方案。适合的方法包括但不局限于戊二醛、碳化二亚胺和高碘酸盐。优选的结合试剂是戊二醛和碳化二亚胺。

抗体的制备可以使用常规技术，包括与含有天然异构化和/或旋光转化的蛋白片段或偶联到载体上的合成肽进行免疫反应。为了提高免疫原性，优选在注射前将免疫原与佐剂混合。佐剂的例子包括但不限于氢氧化铝、佛洛因德佐剂和免疫刺激复合体（ISCOMs），ISCOMs可以根据 Morein（1984）描述的方法制备。

半抗原载体分子的单克隆或多克隆抗体均可以制备。制备单克隆抗体时优选免疫的小鼠，收集免疫小鼠的脾细胞并匀浆之，然后在聚乙二醇存在的情况下与癌细胞融合产生一个细胞杂种，该杂种产生对异构化和/或旋光转化的肽片段具有特异性的单克隆抗体。适合的癌细胞包括但不限于骨髓瘤、肝癌、恶性肿瘤和肉瘤细胞。Goding（1996）详细描述了关于单克隆抗体的生产方法。优选的初步筛选方法包括使用与载体偶联的并涂覆在微量滴定板的固体表面上的、合成的异构化和/或旋光转化肽。

为了制备与异构化和/或旋光转化的肽片段反应的多克隆抗体，可以对不同的动物品种进行免疫。适宜的品种包括但不限于鸡、兔和山羊。优选鸡和兔。

为了适用于本发明方法，通过检测适当序列的异构化和/或旋光转化的合成肽的反应性，可以对这样制备出的抗体进行筛选。

抗体片段可以根据本领域的已知方法来制备（Ishikawa, 1993）。

通过对上述制备的抗体进行免疫测定，可以检测生物学样品如没有经过预先分级或水解的体液。可通过下述方式提供对生物体液中所需片段的专一性：在检测方案中将抗体与异构化和/或旋光转化的合成肽（对它出现抗体或无论如何抗体与它是免疫化学活性的）结合使用。

另外，可以使用单克隆抗体完成免疫测定。这种检测手段将检测的特异性从抗原（蛋白的合成肽异构体）移至抗体（从兔抗血清到单克隆抗体）上。使用这种测定分析不需要进一步使用合成肽异构体。这种免疫测定的模式适宜于采用以下的方式来完成：将病人样品或一种标准溶液与微量滴定板中的与过氧化物酶偶联的抗体溶液一起温育，该滴定板预先涂有纯化的蛋白、蛋白片段、合成肽或其偶联物。漂洗后，平板上的孔与一种底物溶液在暗处温育。通过外加一种终止溶液停止显色反应，最后测定吸光率。或者可以在三明治（夹层）式的检验模式中使用一个或多个单克隆抗体。

免疫测定本身可以采用选自现有各种常规标准检测手段的任何步骤。众所周知，检测的建立是基于特异性的免疫结合配体与感兴趣的特异性分析物之间的相互作用，和利用某些方法来测定由分析物与免疫结合配体形成的复合物。免疫结合配体可以与一种固体支持物复合，作为一种能捕获分析物的免疫结合配体。这种方案可以直接进行，其中，例如通过荧光、放射性或酶的标记对形成的分析物-免疫结合配体复合物进行检测，或是通过一种竞争的形式进行，其中，被标记的标准物与分析物竞争免疫结合配体。这种形式还可以用作一种凝集测定，或是向反应混合物中加入一种合适的沉淀剂使得复合物形成沉淀。特别设计的免疫测定方案可以有多种不同的选择，且大量的临床检测设备和现有领域中可以获知的手段是多种多样的，关于这些程序的种类参见美国专利 US5001225。

抗体和用标准检测手段进行免疫测定的指示剂，如放射性同位素标记、荧光标记或 ELISA，可以采用直接或竞争性形式，并可便利地以包括检测所必需的成分和用法说明的试剂盒形式提供。在本发明的一个实施方案中，这种试剂盒包括一个微量滴定板，上面涂有一层相应的异构化或旋光转化合成肽，制作标准曲线的标准溶液，用于进行定性检测分析的体液（如尿液）对照，与上述提及的合成肽异构体反应的兔抗体，与过氧化物酶偶联的抗兔免疫球蛋白，底物溶液，终止液，漂洗缓冲液和指导手册。

由于可以使用抗体和特异性合成的异构化肽进行免疫测定，可以确定适宜生物流体中相应蛋白片段序列的比率，以及它们的个体水平和它们的总量。因此，检测可被设计成包括抗体，这将导致确定几种异构化和/或旋光转化肽和任意的天然肽序列，或是确定单一异构化和/或旋光转化的肽序列，或其任何所需的组合。

下面的非限制性的实施例将参照附图对本发明作进一步的描述和说明，在附图中：

图 1 显示的 HPLC 图谱表明加热合成肽在产生异构化和旋光转化肽中的作用。

图 2 显示了 ELISA (AG1-1 ELISA) 检测结果，表明了多克隆兔抗血清的异构化和旋光转化肽的特异性；

图 3 显示了 ELISA (AG1-1 ELISA) 检测结果，表明了单克隆兔

抗血清的异构化和旋光转化肽的特异性；

图 4 显示了将图 2 的 ELISA 应用于血清和滑液流体样品的结果；

图 5 显示了将 AG1-1 ELISA 检测应用于青少年风湿性关节炎患者和对照的结果（实施例 6）；

图 6 显示了将 AG1-1 ELISA 检测应用于骨关节炎患者和对照的结果（实施例 7）；

图 7 显示了将 AG1-1 ELISA 检测应用于骨关节炎患者和对照的结果（实施例 8）；

图 8 显示了将实施例 4 的 CLP 检测应用于来自于 RA 患者的血清、对照和滑液流体样品的结果（实施例 9）；

图 9 显示了将 CLP ELISA 检测应用于来自于 OA 患者的血清样品和对照体的结果（实施例 10）；和

图 10 显示了检测 OA 患者和对照体的 AG1-1 ELISA 结果与 CLP ELISA 结果的比率（实施例 11）。

实施例 1: 合成 AG1-1 肽的异构化

合成 AG1-1 肽 GRV RVNSAY，并以终浓度 1mg/ml 溶于磷酸盐缓冲液。将该肽加热到 90℃ 4 个小时，以促进异构化/旋光转化。用反相 HPLC 分析加热前后的肽制品。

图 1 显示了在 90℃ 加热 4 个小时前（下面的曲线）和加热后（上面的曲线）1mg/ml AG1-1 肽制品的 RP-HPLC 结果。

这表明，加热诱导出三种新形式的肽，它们在 RP-HPLC 中的滞留时间与 β L, α D 和 β D 型相一致。

实施例 2: 源于聚集蛋白聚糖 G1 结构域抗原决定基的 β L 构型抗血清的制备和特异性分析。

主要依据 Hermanson (1996) 所述方法来制备 AG1-1 肽的 CDI 偶联物。简言之，CDI 偶联物的制备过程如下：将 100mg 的甲状腺球蛋白溶于 10ml pH 值为 6.0 的 0.05M MES、0.5M NaCl 中至浓度为 10mg/ml。加入 100 μ l 以下两种试剂（终浓度为 4mM CDI，相对于甲状腺球蛋白对 CDI 约 100 倍摩尔过量，和 10 mM NHS），且将此溶液在室温（18 - 22℃）混合 15 分钟。CDI: 0.4M CDI 贮存液：在使用前立即

制备 76.7mg 混于 1ml 水的溶液, NHS:1M 硫代-NHS 贮存液: 在使用前立即制备 217.1mg 混于 1ml 水的溶液。

通过在四个 NAP25 脱盐柱 (Pharmacia, Sweden) 上的凝胶过滤, 过量的交联反应物被移进 10mM pH 9.0 的磷酸钠溶液中。合并经脱盐激活的甲状腺球蛋白, 分成 2ml 的 6 份。凝胶过滤后, 立即把肽溶液 (在 pH 9.0 的磷酸钠溶液中浓度为 4mg/ml, 取 2ml), 加到每个小瓶中, 同时用一种不相关的肽进行对照偶联实验, 在室温下进行偶联反应两个小时。

通过在 Sephadex G25 柱 (Pharmacia, Sweden) 上进行凝胶过滤, 把每种偶联物转移到 PBS (pH 7.4) 中, 将在 PBS 中的浓度调至 2mg/ml。

在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中用 1ml 0.25mg/ml 的疫苗对兔子 (SSC: CPH 系) 进行皮下免疫, 该缓冲液中含有 50% 的甬洛因德不完全佐剂。在初次免疫后每间隔两个星期后给予兔子促升剂量。三次促升后, 每隔一个月给予随后的促升免疫。在免疫前收集前一次免疫后的血样, 在第二次免疫后一个星期收集检测用的血样来监测血清抗体的水平。接着在第 5 次和第 6 次免疫后一个星期收集血样。

在一个涂有 10ng/ml BSA-BS³-AG1-1 偶联物的 MTP 上检测兔血的特异性, BS³ 偶联物按以下方式制备:

AG1-1 β 肽 (GRVRVD- β -SAY) 溶于新鲜滤过的 PBS 至 2mg/ml, 载体蛋白 (BSA, 牛血清白蛋白) 制备成在 PBS 中 3mg/ml 的浓度。在 1.5 ml 聚丙烯管 (Eppendorf, 德国) 中将 200 μ l 载体蛋白与 200 μ l 肽溶液混合。这相应于肽对载体蛋白约 50 倍摩尔过量。用 5mM pH 5.0 的柠檬酸钠新鲜制备成 6mg/ml 的 BS³ (双琥珀酰亚胺辛二酸盐) 溶液。向载体和肽溶液中加入 50 μ l 的交联剂, 并在室温条件下将之置于混合器上进行涡旋 (与载体蛋白相比, 这相应于 25 倍摩尔过量的交联剂)。30 分钟温育后, 向溶液中加入 50 μ l 0.25M pH 7.5 的甘氨酸。再继续温育 15 分钟, 随后将偶联物在 NAP5 柱 (Amersham Pharmacia, Uppsala, 瑞典) 上脱盐, 并测定蛋白浓度。

为了获得适当的 ELISA 信号, 采用合适的稀释法用含有 1% BSA 和 0.1% Tween 的 PBS 溶液稀释兔抗血清。这种竞争检测模式中结合的抗体可以通过使用第二过氧化物酶来测定, 其中该酶与山羊抗兔抗体和生色过氧化物酶底物偶联。

使用一种 AG1-1 抗血清建立起一种血清检测, 这种检测是在一个涂有 10ng/ml BSA-BS³-AG1-1 的板上以一种竞争性测定来进行的。在孔里移液 20 μ l 样品或标准物, 然后加入在 300mM Tris、0.1% Tween 20 和 pH 8.0 (TBT) 的 1% BSA 中适当稀释的 100 μ l AG1-1 特异性抗体。将板在 20 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟, 在 (TBT) 中漂洗 5 次, 将适当稀释于 100mM pH 7.4 的 Tris、0.4g/l 4-氨基安替比林 (4-Amino-anti-pyrine)、0.012% Bronidox (细菌抑制剂)、0.1% Tween 20 和 20% 胎牛血清 (K5 缓冲液) 的 100 μ l 第二过氧化物酶偶联的山羊抗兔抗血清加入每个孔。所述板在 20 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟, 在 (TBT) 中漂洗 5 次, 通过使用生色的过氧化物酶底物将结合抗体定量。

图 2 表明用涂有 BSA-BS³-AG1-1 的板进行的竞争结合 AG1-1 的特异性 ELISA。多克隆的 AG1-1 特异性兔抗血清和 AG1-1 肽制品以没有“沸腾的”(三角形)或在 90 $^{\circ}$ C 加热 4 个小时(正方形)表示。AG1-1 ELISA 表明与未沸腾的形式比较,“煮沸的”肽制品的反应性高了 7 倍。

AG1-1 特异性抗血清对“煮沸”型肽的优先表明它可以优先识别一个或多个异构化和/或旋光转化型 (β L、 α D 或 β D)。

实施例 3: 特异于源于聚集蛋白聚糖 G1 结构域抗原决定基的 β L 构型的单克隆抗体的制备及其特异性分析

主要依据 Hermanson (1996) 所述方法来制备与 AG1-1 肽偶联的 CDI, CDI 偶联物的制备简要描述如下: 把 100mg 甲状腺球蛋白溶于 10ml pH 值为 6.0 的 0.05M MES、0.5M NaCl 中至浓度为 10mg/ml, 再加入 100 μ l 以下两种试剂 (至终浓度为 4mM CDI, CDI 比甲状腺球蛋白超出约 100 倍摩尔, 和 10mM NHS), 且将溶液在室温 (18 - 22 $^{\circ}$ C) 混合 15 分钟。在使用前制备新鲜的 0.4M CDI 贮存液: 将 76.7mg 混于 1ml 水的溶液, 同样在使用前新制备 NHS: 1M 硫代-NHS 贮存液: 将 217.1mg 混于 1ml 水的溶液。

通过在四个 NAP25 脱盐柱 (Pharmacia, Sweden) 上的凝胶过滤 (用 10mM pH 9.0 的磷酸钠溶液进行), 除去过量的交联反应物。合并经脱盐激活的甲状腺球蛋白, 分成 2ml 的 6 份。立即把下列凝胶过滤后的肽溶液加到每个小瓶中: 溶于 pH 9.0 的磷酸钠溶液中浓度为 4mg/ml,

取 2ml, 同时用一种不相关的肽进行对照的偶联实验。该偶联反应在室温下进行两个小时。

通过在 Sephadex G25 柱 (Pharmacia, Sweden) 上进行凝胶过滤, 把每种偶联物变到 PBS (pH 7.4) 中, 并将在 PBS 中的浓度调至 2mg/ml。

用 200 μ l 0.125mg/ml 的置于磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的疫苗对小鼠 (Balbc \times CF1 雌性系) 进行皮下免疫, 该缓冲液中含有 50% 的弗洛因德不完全佐剂。在初次免疫后每隔两星期免疫一次, 共 8 个星期以增强小鼠 (的免疫性)。在免疫前收集前一次免疫后的血样, 在第二次免疫后一个星期收集检测用的血样来监测血清抗体的水平。接着在第 5 次和第 6 次免疫后一个星期收集血样。

在一个涂有 10ng/ml BSA-BS³-AG1-1 偶联物的 MTP 上检测小鼠血清样品的特异性, 为了获得适当的 ELISA 信号, 采用合适的稀释法用含有 1% BSA 和 0.1% Tween 的 PBS 溶液稀释小鼠血清。这种竞争检测模式中的结合抗体可以通过使用第二过氧化物酶来测定, 其中该酶与兔抗小鼠抗体和一种生色过氧化物酶底物偶联。

产生单克隆抗体的杂交瘤主要按 Köhler 和 Milstein (22) 的描述来制备, 并加以如前所述 (7, 23) 的改进。在 47% 聚乙二醇 (PEG) 和 7.5% 的二甲基亚砜 (DMSO) 存在下, 将小鼠的脾细胞与 Ag8x 63.653 骨髓瘤细胞 (24) 以约 2:1 的比例融合。脾细胞置于人内皮细胞培养上清液 (HACS, Costar, F1, USA)。接着在含有次黄嘌呤-氨基嘌呤-胸苷 (HAT) 的介质中进行选择, 在主要如 (7) 描述的进行的间接 ELISA 检测中, 可以通过培养上清液来筛选能识别消化 II 胶原的胶原酶的抗体。选择的细胞系至少克隆三次, 并在含有 2% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中增殖。根据厂商的用法说明书 (Pharmacia, Uppsala, 瑞典), 使用蛋白 A 经过亲和层析从培养上清液分离出单克隆抗体。其简要描述了一个装填了蛋白 A 琼脂糖 4B 的 10 \times 1cm (10ml) 柱, 并用 0.1M pH8.8 的 Tris 溶液平衡。2 升培养上清液经过一个 Nalgene 0.45 μ m 的过滤器过滤, 再加入 200ml 1M pH8.8 的 Tris 溶液。培养上清液以 1ml/min 的速度加于柱上, 接着用 100-150ml 0.1M pH8.8 的 Tris 溶液冲洗柱子。用 0.1M pH 3.0 的氨基乙酸将结合的免疫球蛋白从柱子上洗脱下来, 置于装有 50 μ l 1M pH8.8 的 Tris 溶液的小管中。使用 IsoStrip™ 同形像试剂盒 (Boehringer Mannheim GmbH, Munich,

Germany) 鉴定亚类的单克隆抗体。

使用一种 AG1-1 单克隆抗体 (称为 MabF49) 建立起一种血清检测方法, 这种检测是作为一种竞争性检测在涂有链霉抗生素蛋白微量滴定板 (Exiqon, Trørød, 丹麦) 上进行的。平板用漂洗缓冲液 (25mM Tris, 51mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.2) 漂洗三次, 与每孔 100 μ l 的以含 0.1% Tween 20 的 PBS 稀释成 1.25ng/ml 生物素化的 AG1-1 β L 肽 (生物素 - GRVRVD- β -SAY) 一起温育, 在摇床 (300RPM) 于 20 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟后, 把 50 μ l 样品或校准物移入孔中, 接着加入 100 μ l AG1-1 特异性单克隆抗体 F49, 该抗体稀释于:

pH 6.0, 100mM Tris, 50mM MES, 50mM CaCl₂, 5% 山梨醇, 1% BSA, 0.02% Tween 20, 0.4g/l 4-氨基安替比林, 0.012% Bronidox (细菌抑制剂) (检测缓冲液)。平板于 4 $^{\circ}$ C 过夜温育 (18-24 小时), 用漂洗缓冲液漂洗 5 次, 在每个孔内加入 100 μ l 适当稀释于检测缓冲液的与兔抗小鼠抗血清偶联的第二过氧化物酶。平板在 20 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟, 在 TBT 中漂洗 5 次, 通过使用生色过氧化物酶底物将结合的抗体定量。

图 3 表明按如上所述进行的 AG1-1 特异性单克隆 ELISA 检测中结合的竞争性, AG1-1 肽 (GRVRVNSAY) 的非异构化 (α L) 和异构化 (β L) 构型或源于 I 型胶原 C-端肽 (EKAHDGGR, CTx) 的对照肽的制备。AG1-1 ELISA 表明异构化 β L 肽制品的反应性高于 α L 型 500 以上。

实施例 4: 特异于源于抗原决定基的软骨连接蛋白 (CLP) 的抗血清的制备

源于与甲状腺球蛋白配对的肽: Ala-Gly-Trp-Leu-Ala-Asx*-Gly-Ser-Val-Arg 的 CLP 与 CDI 的偶联物按实施例 2 中描述的方法准备。为了促进异构化和/或旋光转化, 在偶联之前将 CLP 肽在 90 $^{\circ}$ C 加热 4 个小时。Thy-CDI-CLP 偶联物用于对兔子进行免疫, 如实施例 2 中所描述的一样。

分离的偶联物用于初步筛选兔血, 其中使用了一种 BS³ 琥珀酰亚胺共价的交联物和 BSA 作为载体蛋白 (根据: Greg T. Hermanson, 'Bioconjugate techniques' ('生物偶联技术'), 1996, Academic Press, San Diego, USA)。

兔血特异性的检测在涂有 10 ng/ml BSA-BS³-CLP 偶联物的 MTP 上

进行。为了获得适宜的 ELISA 检测信号，将兔抗血清用含有 1% BSA 和 0.1% Tween 的 PBS 溶液稀释。在这种竞争性检测模式中，结合抗体的检测是通过使用了一种与山羊抗兔抗体和一种过氧化物酶生色底物偶联的第二过氧化物酶来进行的。

选择有最好反应的兔抗血清来建立 CLP 特异性检测。这种检测是作为一种在涂有 10ng/ml BSA-BS³-CLP 的平板上的竞争性检测。吸移 20μl 样品或校准物至平板孔内，接着加入 100μl 用 TBT 适当（300mM Tris、0.1% Tween 20、1% BSA、pH8.0）稀释的 CLP 特异性抗体。平板在 20℃ 温育 60 分钟，在 TBT 里漂洗 5 次，在每个孔中加入 100μl 与以 K5 缓冲液适当稀释的山羊抗兔抗血清偶联的第二过氧化物酶。然后平板在 20℃ 温育 60 分钟，在 TBT 里漂洗 5 次，通过使用过氧化物酶生色底物来定量结合抗体的数量。

实施例 5: AG1-1 ELISA 中优先识别抗原决定基的异构化和/或旋光转化构型的测量对监测 RA 患者的临床价值

在上述检验中要测定 RA 患者及相应年龄对照者的血清样品，而且要按实施例 2 所述那样在 AG1-1 ELISA 中检测滑液流体。

图 4 表明了来自于 RA 患者和对照的血清样品在 AG1-1 特异性检测中的测定结果。在图的右边，显示了测定的四个滑液流体样品的结果。表明这种检测用于滑液流体样品效果是显著的。通常由于其它蛋白存在的间质效应，滑液流体会产生太高的背景，从而针对一种软骨蛋白片段的 ELISA 检测会出现不同的结果。

数据表明循环中的 AG1-1 肽片段的异构化/旋光转化构型的测定产生的临床估计值可用于诊断、监控和治疗 RA 患者，及用于临床估计关节疾病患者的软骨损坏。

实施例 6: AG1-1 ELISA 中优先识别抗原决定基的异构化和/或旋光转化构型的测量对监测 JRA 患者（青少年风湿性关节炎）的临床价值

另外进行了如实施例 2 描述的 AG1-1 血清 ELISA 的临床估测，血清样本来自于青少年风湿性关节炎（JRA）患者及年龄相仿的对照组。图 5 显示了检测 30 个 JRA 患者和 32 个年龄相仿的正常人的结果。非

参数 T-检测 (Mann-Whitney, 双跟踪的) 显示了相对于对照组, JRA 患者平均的 AG1-1 浓度显著地提高了 ($P < 0.0001$)。在这个实验中, 还发现了关节病患者中有显著的提高。注意到完全缺乏与血清交叉重叠测定 ($r = 0.05$, 数据没有给出) 的联系。血清交叉重叠的一步 ELISA 是一种特异于异构化软骨 I 型片段 (Rosenquist 等, 1998), 这种检测中的量度特异地反应了骨的再吸收。因此在 AG1-1 检测和血清交叉重叠测定之间缺少相关表明 AG1-1 检测是不受破骨细胞再吸收过程中释放的 I 型胶原的代谢物影响的。通过注意 JRA 的诊断, 一种与时间的相关 ($r = 0.44$) 表明: 在最新诊断的以最高速度出现关节软骨损伤的没有治疗的患者中其 AG1-1 的浓度极大地提高了。

实施例 7: AG1-1 ELISA 中优先识别抗原决定基的异构化和/或旋光转化构型的度量对监测 OA 患者的临床价值

为了提供对如实施例 2 描述的 AG1-1 检测的临床价值的评估, 从而来加强对 OA 中软骨代谢的估计, 在如上所述的检测中测定了来自于 OA 患者及年龄相仿的对照组的血清样品。共测定了 40 个最近诊断的 OA 患者样品和 40 个年龄相仿的正常人样品。图 6 显示了在 AG1-1 特异性检测中来自于 OA 患者和对照组的血清样本的测定结果。所有 OA 样品测定值高于对照样品 ($P < 0.0001$, 双跟踪非参数的 T-检测, Mann-Whitney)。

图 6 中出现的数字表明了循环中的 AG1-1 肽片段的异构化/旋光转化构型的测定对于诊断/监测 OA 患者, 及临床估计关节疾病患者的进行性软骨损坏有临床价值。

实施例 8: AG1-1 ELISA 中优先识别抗原决定基的异构化和/或旋光转化构型的度量对监测 OA 和 RA 患者的临床价值

在如实施例 3 描述的单克隆 AG1-1 β 检测中, 测定了 OA 患者和来自于没有关节炎或其它影响关节或软骨代谢的疾病的健康个体的血清样品。共测定了 39 个最近诊断的 OA 患者样品、16 个 RA 患者样品和 18 个年龄相仿的对照组样品。图 7 显示了来自于 OA 患者和对照组的血清样品的 AG1-1 β 特异性检测结果。所有 OA 和 RA 样品测定值高于对照样品 ($P < 0.0001$, 双跟踪非参数的 T-检测, Mann-Whitney)。

图 7 中出现的数据表明了循环中的 AG1-1 肽片段的 β -Asp 异构化构型的测定对于诊断/监测 OA 患者, 及临床估计关节疾病患者的进行性软骨损坏有临床价值。

实施例 9: RA 患者样品的 CLP 特异性 ELISA 测定的临床价值

通过测定来自于 RA 患者和相应对照组的样品对实施例 4 描述的 CLP 检测的临床价值进行评定。如图 4 显示的带有 AG1-1 测定值的相同样本系列也在 CLP ELISA 中进行了测定。图 8 表明 RA 患者、对照组, 和滑液流体样品的 CLP 血清 ELISA 测定结果。RA 组的平均浓度是 111.5ng/ml, 对照组为 48.94ng/ml, 两者之间的差异通过双跟踪非参数的 T-检测 (Mann-Whitney) 评定为统计学显著 ($p=0.017$)。

CLP 检测和 AG1-1 检测的估计值之间有非常高的相关性 ($r=0.82$, 剔除一个 RA 样品)。

实施例 10: OA 患者样品的 CLP 特异性 ELISA 测定的临床价值

对实施例 4 描述的 CLP 检测的临床效能进行进一步的评定。图 6 中描述的来自于最近诊断的活动性 OA 患者的样品系列也在 CLP 检测中进行了测定。图 9 显示了来自于 OA 患者和对照组的血清样品在使用兔 I99025 的抗血清的 CLP 血清 ELISA 中的差异 (与在图 4 所示的 AG1-1 ELISA 测定中同样的患者群)。OA 组的平均浓度是 20.6ng/ml, 对照组为 47.3ng/ml, 两者之间的差异通过双跟踪非参数的 T-检测 (Mann-Whitney) 评定为统计学显著 ($p<0.0001$)。对 OA 患者测定的 CLP 浓度显著低于对照组。

实施例 11: CLP 和 AG1-1 估测值之间的算术比率的对于评估关节病的临床价值

通过计算 OA 患者和对照的 AG1-1 和 CLP 测定值 (实施例 7 和 10) 得出两者之间的比率。图 10 表示了图 4 和 6 中显示的 OA 患者及对照人群 AG1-1 和 CLP 测定值之间的比率。两组人群之间的差异是高度显著的, 这就允许建立起一个作为“病理的比率”绝对排除值。差异高度显著, 其 $p<0.0001$ (双跟踪非参数的 T-检测), T 值为 22.4。

根据两组之间高度显著的差异, 显然可以确定这个比率的一个绝对

排除值，作为正常或非正常关节代谢的个体患者之间允许存在允许差异。这个比率很适于判断“病理的”关节代谢它为全身关节代谢检测提供了一个标准化的简便方法。

鉴于本发明是以一些具体特例来描述的，故很多变动情况也可能是在本发明的范畴之内。

参考文献

1. Møller, HJ, 类风湿性关节炎的接合组织指标, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1998: 58: 269-278.
2. Stucki, G, Langenegger T., 类风湿性关节炎的处理, Curr Opin. Rheumatol, 1997, 9: 229-35.
3. Wollheim, F.A., 类风湿性关节炎中关节损伤的光兆物, AMPIS, 1996, 104: 81-93.
4. Geiger, T. 和 Clarke, S., (1987), 肽链中天冬酰胺和天冬氨酰残基去氨基化、异构化和外消旋作用, J. Biol. Chem., 262 (2): 785-794.
5. Clarke, S., (1987), 在细胞蛋白内天冬酰胺和天冬氨酰残基倾向自发形成琥珀酰基, Int. J. Peptide Protein Res. 30: 808-821.
6. Poole, A.R., Dieppe, P. 1994, 用于类风湿性关节炎的生物学指标, Sem. Arthr. Rheum, 23: 17-31.
7. Fledelius, C., Johnsen, A.H., Cloos, P.A.C., Bonde, M., Qvist, P., 1997, 来源于 I 型胶原质的尿的降解产物的特征。鉴别 C-端肽 ($\alpha 1$) 区域的 β -异构化 Asp-Gly 序列, J. Biol. Chem.; 15: 9755-9763.
8. Glant, T.T. Cs-Szabó, G., Nagase, H., Jacobs, J.J., Mikecz, K., 1998, 通过源于正常和骨关节炎人软骨的聚集蛋白聚糖片段诱导 Balbc 小鼠的进行性多种关节炎, Arthritis Rheum. 41: 1007-1018.
9. Dudhia, J., Davidson, C.M., Wells, T.M., Vynois, D.H., Hardingham, T.E., Bayliss, M.T. 1996. 人类关节炎软骨中聚集蛋白聚糖的 C-末端区域的与年龄相关的 chondroitin 含量, Biochem. J. 313:

993-940。

10. Zhang, Y., Guerassimov, A., Leroux, J.Y., Cartman, A., Webber, C., Lalic, R., de Miguel, E., Rosenberg, G., Poole, A.R. 1998. 通过软骨连接蛋白诱导 Balbc 小鼠关节炎: 包含能被 T 和 B 淋巴细胞识别的独特区域, *Am. J. Pathol.*, 153: 1283-1291.

11. Radkiewicz, J.L., Zipse, H., Clarke, S. 和 Houk, K.N. (1996), 通过琥珀酰亚胺中间物促进天冬酸和天冬酰胺残基外消旋作用: 一种从头开始的理论机制的探索, *J. Am. Chem. Soc.* 118: 9148-9155.

12. Rafferty B, Coy DH 和 Poole S, (1998), 对生长激素释放因子(1-29)酰胺的超活性类似物的药物动力学估计, *Peptide* 9(1): 207-9.

13. Van Regenmortel M. 和 Muller S. (1998) D-肽作为免疫原和诊断剂, *Current Opinion in Biotechnology* 9: 377-382.

14. Campbell, A.M., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol 12 (1986) .

15. Morein, B. 等, *Nature*, 308: 457-460 (1984) .

16. Goding, J.W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, (1986) .

17. E. Ishikawa. *Journal of Immunoassay* 3:209-327 (1983) .

18. Greg T. Hermanson, "Bioconjugate techniques" 1996, Academic press, San Diego, USA.

19. Neidhart, M., Hauser, N., Paulsson, M., Diceare, P.E., Michel, B.A., Hauselman, H.J. *British Jnl. of Rheumatology*, 1997 36: 1151-1160.

20. Lorenzo P, Bayliss, MT 和 Heinegard D., 1998a 存在于人类关节软骨中部的一种新的软骨蛋白 (CILP) 随着年龄而增长, *J. Biol. Chem.*, 1998a, 273 (36) 23463-23468.

21. Lorenzo P., Neame, P., Sommarin, Y. 和 Heinegard D., (1998b) 克隆和推导一种新的软骨蛋白 (CILP) 的氨基酸序列, 能鉴定包括核苷焦磷酸水解酶的 proform, *J. Biol. Chem.*, 273 (36) 23469-23475.

22. Köhler G, Milstein C. 连续培养分泌预先确定特异性抗体的融合细胞, *Nature*, 1975, 256: 495-497.

23. Rosenquist C, Fledelius C, Christgau S, Pedersen BJ, Bonde M, Christiansen C, 血清交叉重叠一步 ELISA, 首次应用单克隆抗体测定源于 I 型胶原 C-末端肽的相关骨降解产物的血清, *Clin Chem*, 1998, 44: 2281-2289.

24. Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K., 一种失去免疫球蛋白表达但允许抗体分泌型杂种细胞系构建的新的鼠骨髓瘤细胞系, *J Immunol.*, 1979; 123: 1548-1550.

25. Maroudas A, Bayliss MT, Uchitel-Kaushansky N, Schneiderman R, Gilav E, 人类关节软骨中聚集蛋白聚糖的周转: 将外消旋化的天冬氨酸作为分子时代的一种指标物来利用, *Arch Biochemistry and Biophysics* 1998; 350: 61-71.

AG1-1 肽

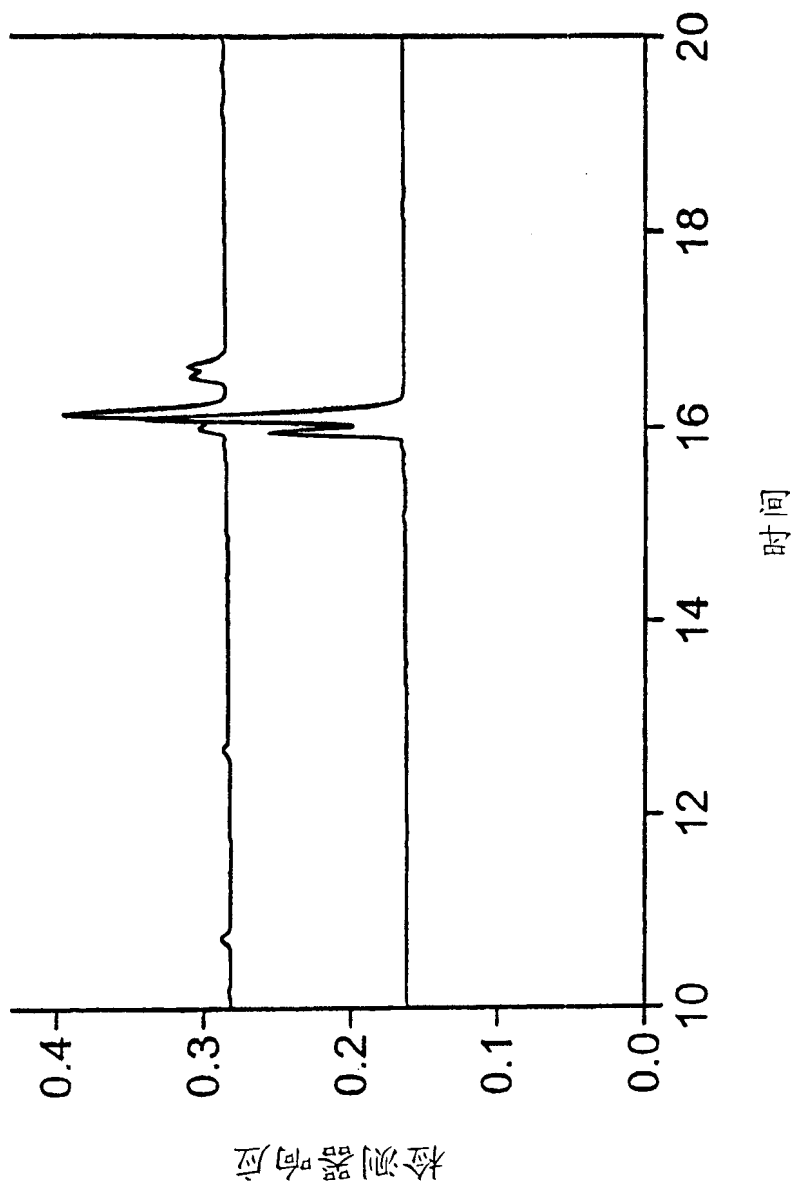


图 1

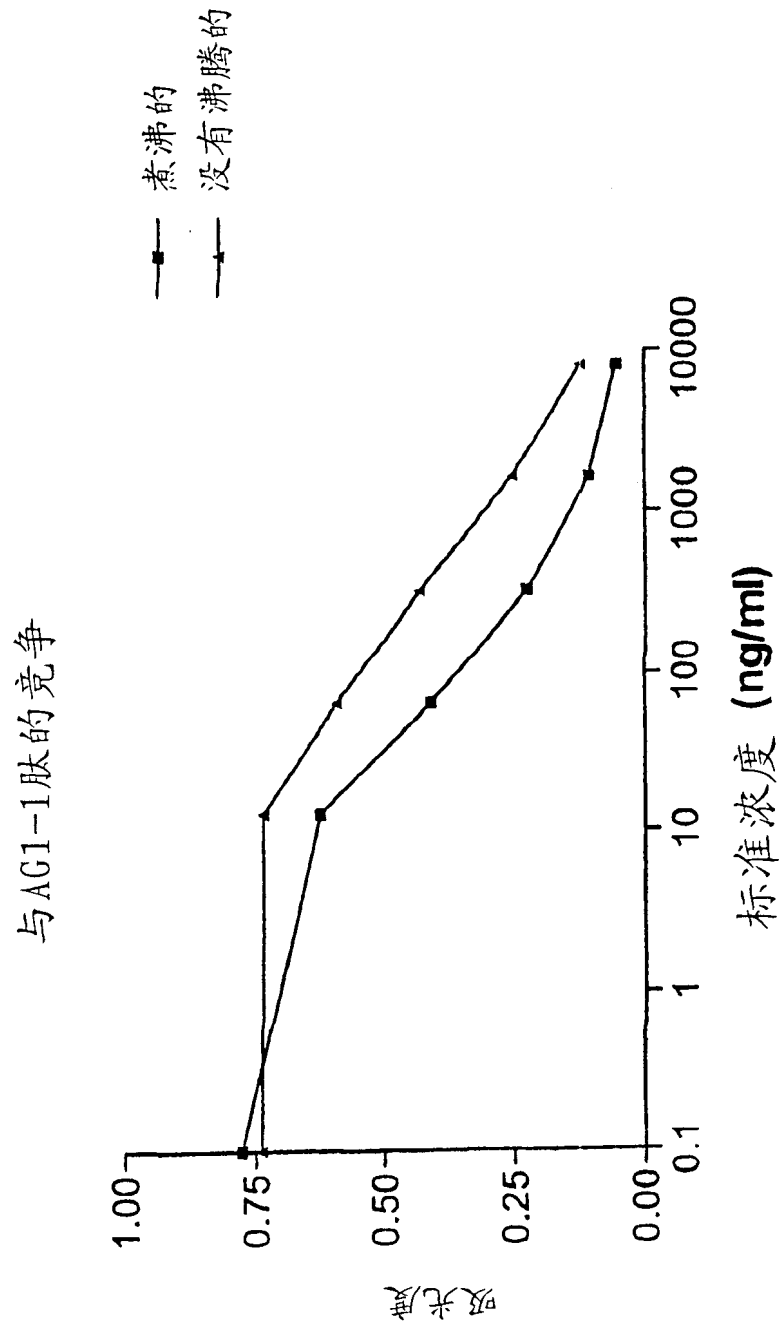


图 2

AG1-1 ELISA的特异性

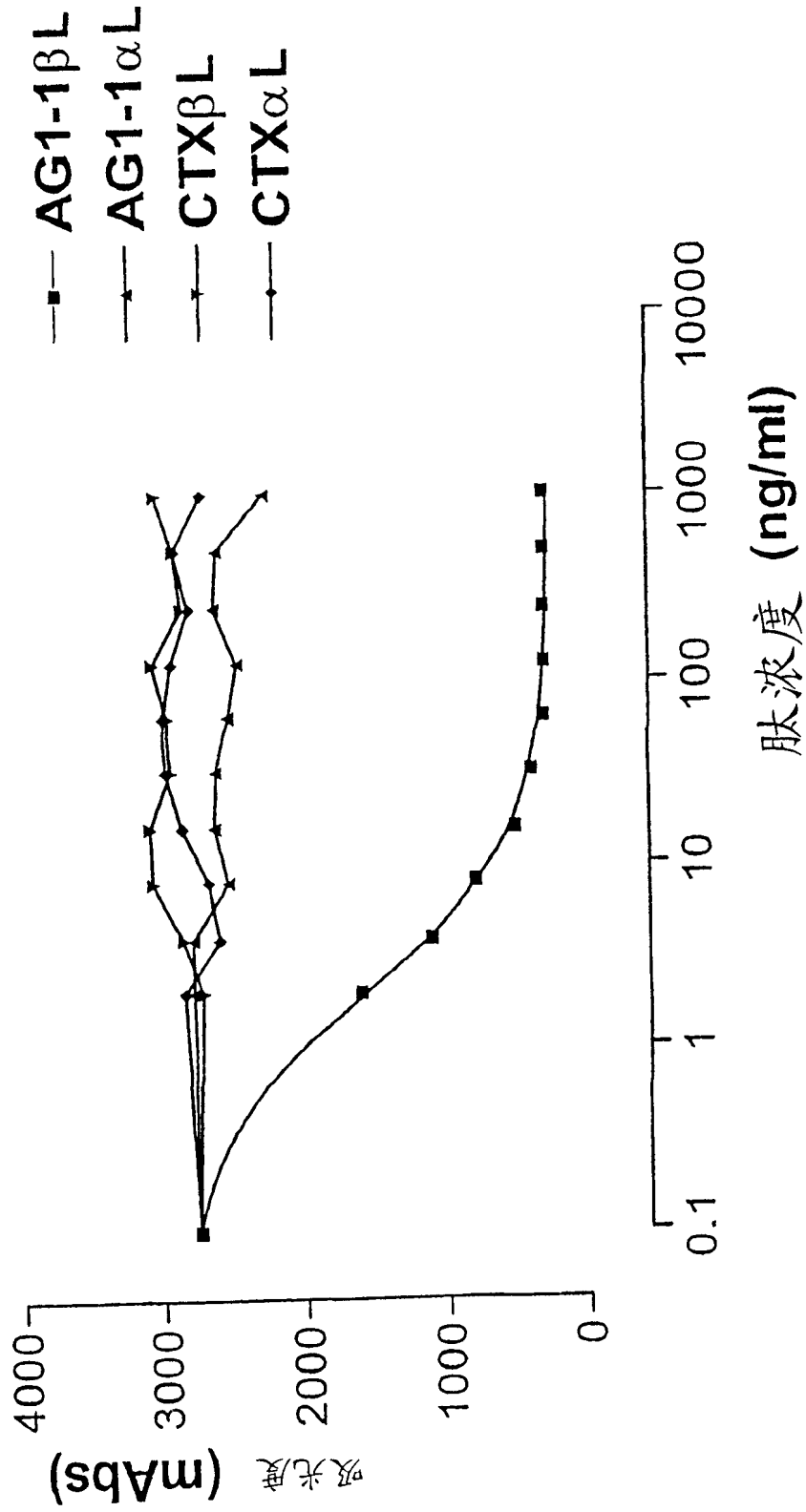
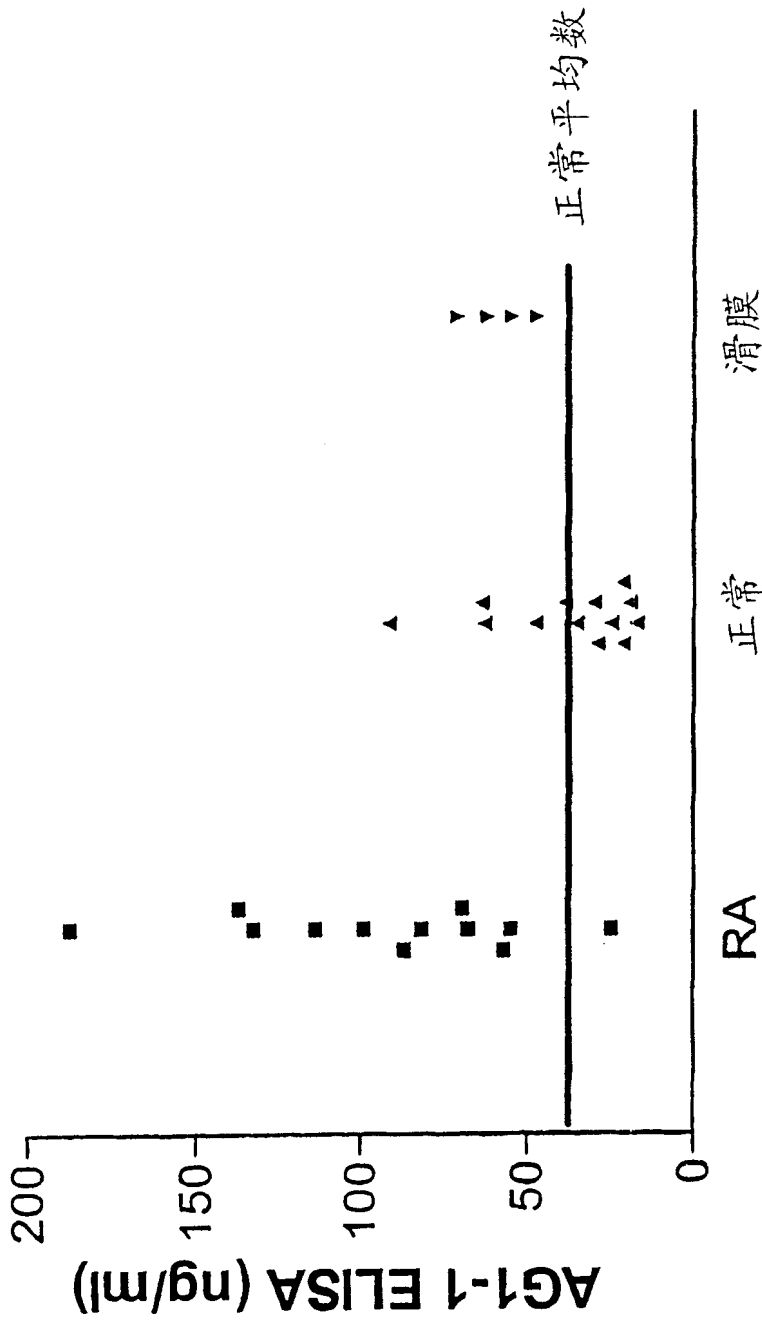


图 3



样品类型

图 4

JRA患者和对照体之间的差异

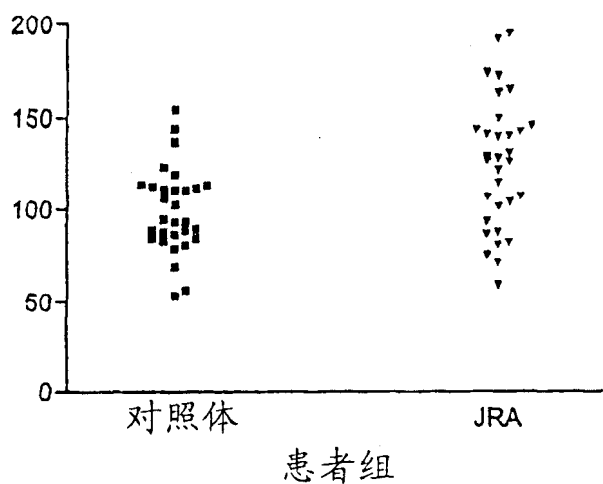


图 5

AG1-1血清ELISA

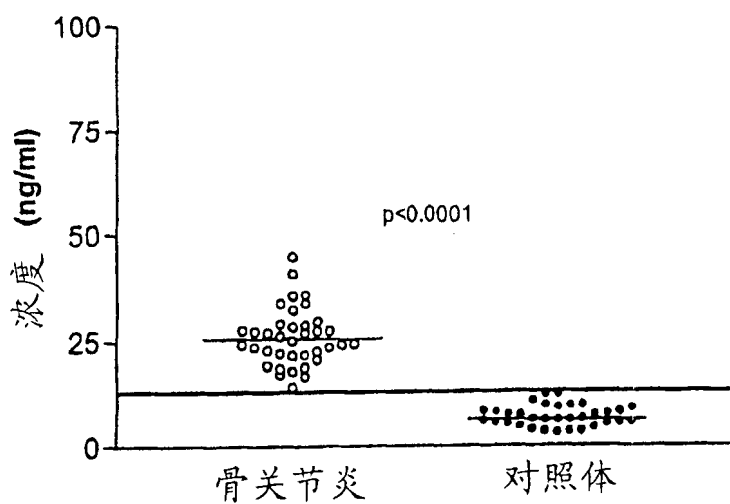


图 6

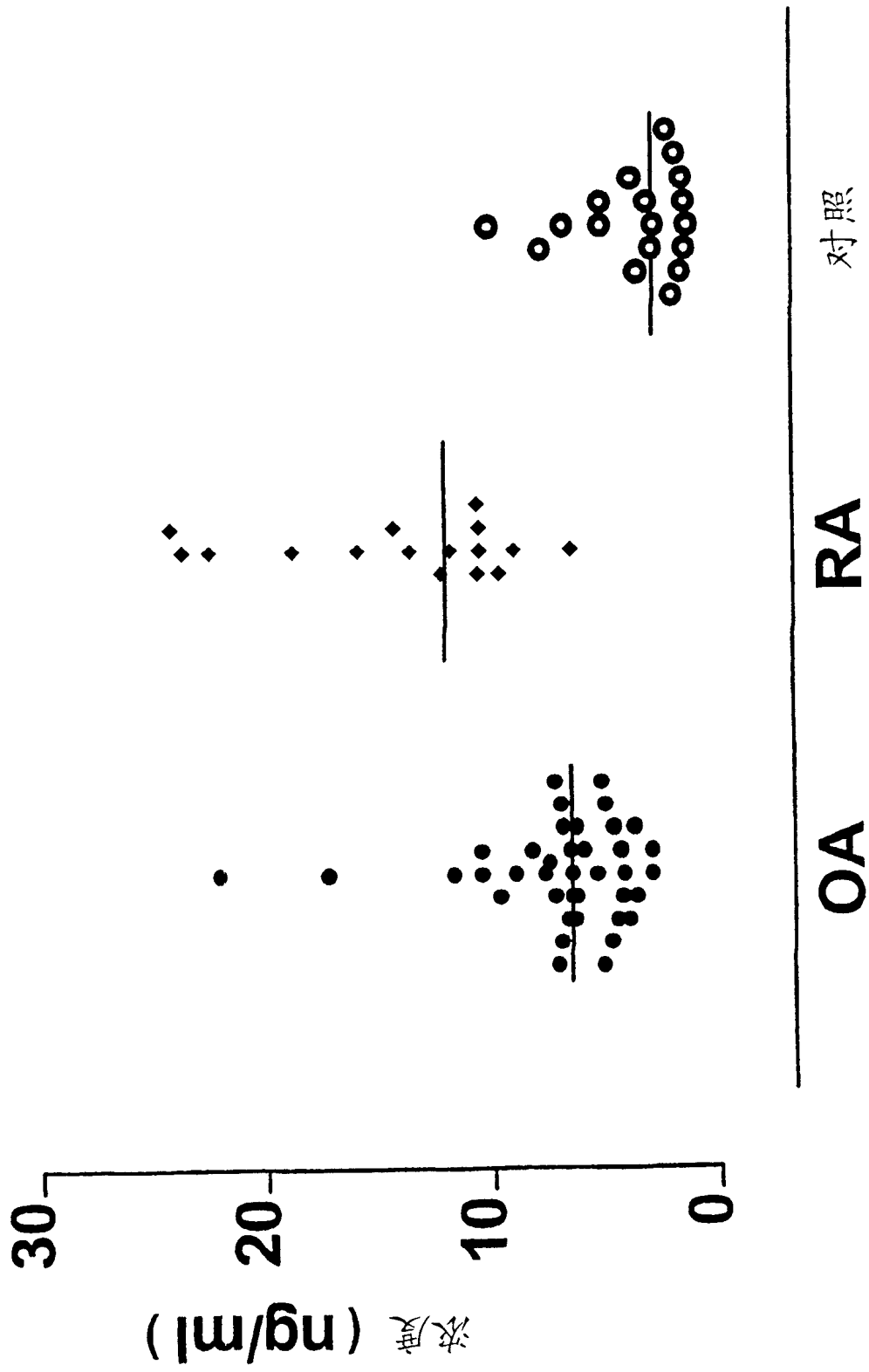


图 7

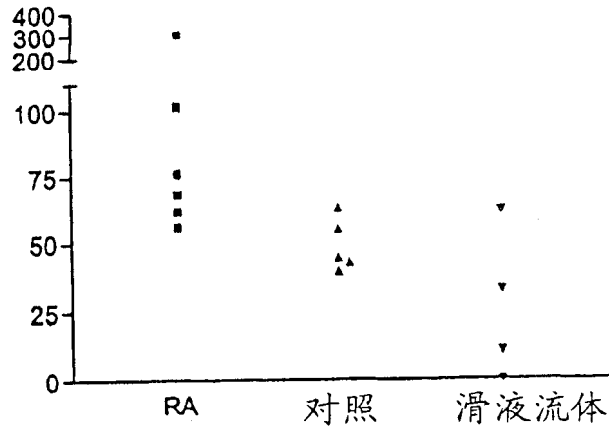


图 8

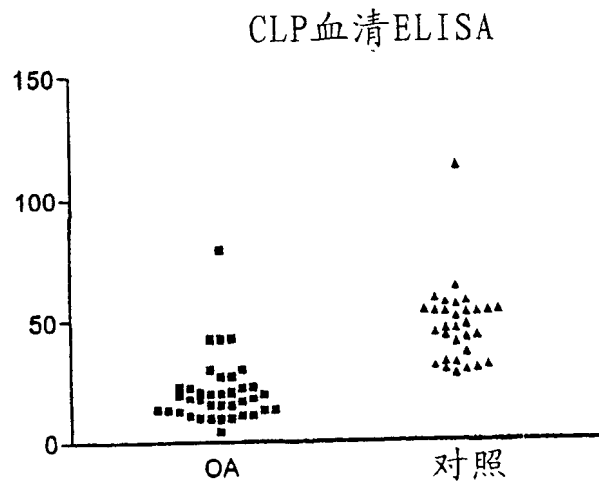


图 9

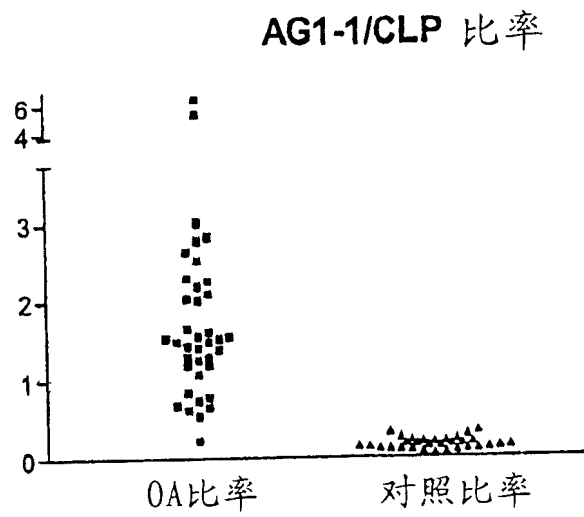


图 10

专利名称(译)	异构化和/或旋光转化的蛋白的测定、其中使用的肽、产生抗体的细胞系、及检测试剂盒		
公开(公告)号	CN100360937C	公开(公告)日	2008-01-09
申请号	CN00818657.X	申请日	2000-11-24
[标]发明人	S·克里斯特高		
发明人	S·克里斯特高 D·B·亨里克森 P·A·C·克鲁斯		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 C07K7/00 C07K16/18 C07K14/78 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/6887 C07K16/18		
代理人(译)	王景朝		
审查员(译)	王丽华		
优先权	1999028052 1999-11-26 GB		
其他公开文献	CN1425136A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种免疫测定方法，包括对生物样品中源于软骨的异构化或旋光转化的非胶原蛋白或该蛋白的一个或多个异构化或旋光转化片段的数量进行免疫学测定。该方法可以测定所述生物样品中含至少一个*Asx或*Glx的蛋白或蛋白片段的数量，其中*Asx是 α D Asp或Asn，或是 β L或 β D Asp，而*Glx是 α D Glu或Gln，或是 γ L或 γ D Glu。所述蛋白可以是聚集蛋白聚糖、CLP、COMP或CILP，或所述片段是聚集蛋白聚糖、CLP、COMP或CILP的片段。

