

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00815755.3

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 100399030C

[22] 申请日 2000.11.15 [21] 申请号 00815755.3

[30] 优先权

[32] 1999.11.16 [33] US [31] 60/165,736

[86] 国际申请 PCT/US2000/031427 2000.11.15

[87] 国际公布 WO2001/036972 英 2001.5.25

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.16

[73] 专利权人 杰南技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 戴维·T·W·费

克里斯滕·K·托米塔

[56] 参考文献

CN1145636A 1997.3.19

JP11178593A 1996.9.24

a sensitive fluorometric enzyme-linked immunosorbent assay that measures vascular endothelial growth factor 165 in human plasma. carlos et al. journal of immunological methods, Vol. 219 No. 1. 2. 1998

the carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. keyt et al. journal of biological chemistry, Vol. 271 No. 13. 1996

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 黄益芬

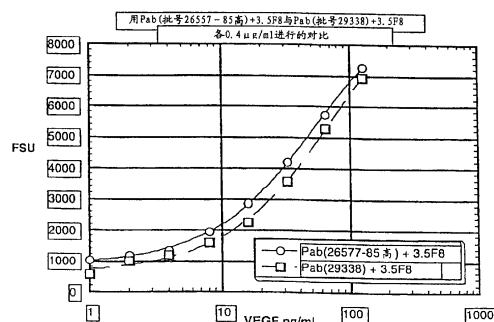
权利要求书 3 页 说明书 38 页 附图 21 页

[54] 发明名称

用于 VEGF 的 ELISA

[57] 摘要

在患者血流或其他生物标本中血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的活性能够作为癌症, 糖尿病, 心脏病, 和其它病理学的诊断和预后指标。发展了 VEGF 作为抗原的抗体-夹心 ELISA 方法和试剂盒以检测来自动物模型和人类患者的生物标本中 VEGF 水平并且用作诊断/预后指标。



1. 一种用于检测生物标本中血管内皮细胞生长因子(VEGF)的多种同种型的方法, 其包括以下步骤:

(a)将生物标本与固定在固体支持物上的捕捉试剂保温, 以使 VEGF 的多种同种型与该捕获试剂结合, 其中捕捉试剂包含一种混合物, 该混合物含有结合 VEGF 的多克隆抗体和结合 VEGF 的单克隆抗体, 所述的单克隆抗体特异性结合人 VEGF 的 111-165 位的氨基酸残基; 和

(b)使结合到固相化捕捉试剂上的 VEGF 与结合 VEGF 的生物活性区的可检测抗体接触, 来检测 VEGF。

2. 权利要求 1 的方法, 其中生物标本分离自人。

3. 权利要求 1 的方法, 其中生物标本是血浆, 血清或尿液。

4. 权利要求 1 的方法, 其中固相支持物是微量滴定板。

5. 权利要求 1 的方法, 其中步骤(a)中的保温在 pH 6.0-9.5 进行。

6. 权利要求 5 的方法, 其中的 pH 是下列之一:

(a) 6.0-7.0;

(b) 6.0-6.5; 或

(c) 6.34-6.36.

7. 权利要求 1 的方法, 其中步骤(a)中的保温在 0-40℃ 进行。

8. 权利要求 7 的方法, 其中的温度是 36-38℃。

9. 权利要求 1 的方法, 其中步骤(a)中的保温进行 0.5-3.0 小时。

10. 权利要求 9 的方法, 其中的保温进行 3 小时。

11. 权利要求 1 的方法, 其中步骤(a)中的保温是过夜保温。

12. 权利要求 1-11 之一的方法, 其进一步包含:

(c)计算在(b)中检测到的 VEGF 的量, 其中 VEGF 用标准曲线定量。

13. 权利要求 1-11 之一的方法, 其中捕捉试剂是固相化的, 单克隆抗体与多克隆抗体的重量比为 0.8:1 至 1.2:1。

14. 权利要求 13 的方法, 其中单克隆抗体对多克隆抗体的重量比为 1:1。

15. 权利要求 14 的方法, 其中固相化单克隆抗体的量为 0.4μg/ml 且固相化多克隆抗体的量为 0.4μg/ml。

16. 权利要求 1-11 之一的方法, 其中可检测抗体是可直接检测的抗体。
17. 权利要求 16 的方法, 其中可检测的抗体是生物素化的抗体或经荧光计量试剂放大的抗体。
18. 权利要求 1-11 的方法, 其中捕获试剂单克隆抗体是小鼠单克隆抗体。
19. 权利要求 18 的方法, 其中捕获试剂单克隆抗体是 MA b 3.5F8。
20. 权利要求 1-11 之一的方法, 其中捕获试剂多克隆抗体是兔或山羊多克隆抗体。
21. 权利要求 1-11 之一的方法, 其中捕获试剂多克隆抗体是亲和纯化的。
22. 权利要求 1-11 之一的方法, 其中可检测抗体是单克隆抗体。
23. 权利要求 22 的方法, 其中可检测抗体是小鼠单克隆抗体。
24. 权利要求 23 的方法, 其中可检测单克隆抗体是 MA b A4.6.1。
25. 一种用于检测生物标本中血管内皮细胞生长因子(VEGF)多种同种型的免疫测定试剂盒, 此试剂盒包括:
  - (a)以包含与 VEGF 结合的多克隆抗体和与 VEGF 结合的单克隆抗体的混合物作为捕捉试剂, 其中单克隆抗体特异性结合人 VEGF 的 111-165 位的氨基酸残基; 和
  - (b)以能结合 VEGF 的生物活性区的可检测抗体作为检测试剂。
26. 权利要求 25 的试剂盒, 进一步包含纯化的 VEGF 作为抗原标准品。
27. 权利要求 25 的试剂盒, 其中可检测抗体是荧光标记的。
28. 权利要求 25 的试剂盒, 其中捕获试剂单克隆抗体是小鼠单克隆抗体。
29. 权利要求 28 的试剂盒, 其中捕获试剂单克隆抗体是 MA b 3.5F8。
30. 权利要求 25 的试剂盒, 其中捕获试剂多克隆抗体是兔或山羊多克隆抗体。
31. 权利要求 25 的试剂盒, 其中捕获试剂多克隆抗体是亲和纯化的。
32. 权利要求 25 的试剂盒, 其中可检测抗体是单克隆抗体。
33. 权利要求 32 的试剂盒, 其中可检测单克隆抗体是小鼠单克隆抗体。
34. 权利要求 33 的试剂盒, 其中可检测单克隆抗体是 MA b A4.6.1。
35. 权利要求 26-34 之一的试剂盒, 其中捕获试剂是固定在固体支持

物上的，单克隆抗体与多克隆抗体的重量比为 0.8:1 至 1.2:1。

36. 权利要求 35 的试剂盒，其中单克隆抗体与多克隆抗体的重量比是 1:1。

37. 权利要求 36 的试剂盒，其中固相化单克隆抗体的量为  $0.4\mu\text{g/ml}$  且固相化多克隆抗体的量为  $0.4\mu\text{g/ml}$ 。

38. 权利要求 35 的试剂盒，其中固相支持物是微量滴定板。

## 用于 VEGF 的 ELISA

### 发明背景

### 发明领域

本发明涉及检测 VEGF 的免疫测定，其可用作癌症，心血管病或其他病理学患者的诊断和预后方法。

### 相关领域描述

现已确定血管发生和多种疾病的发病机理有关。包括固体肿瘤，眼内新生血管综合症如增生性视网膜病或年龄相关的黄斑退化(AMD)，风湿性关节炎，和牛皮癣(Folkman et al. J.Biol.Chem.267:10931-10934(1992); Klagsbrun et al. Annu.Rev.Physiol.53:217-239(1991); and Garner A. Vascular diseases. In: Pathobiology of ocular disease. A dynamic approach. Garner A. Klintworth GK. Eds. 2<sup>nd</sup> Edition(Marcel Dekker . NK, 1994)pp 1625-1710)。在固体肿瘤情况下，新生血管形成使肿瘤细胞与正常细胞相比获得了生长优势和增生的自主权。相应地，在乳腺癌和几种其他肿瘤上已经观察到在肿瘤部位微血管密度和患者存活之间有相互关系(Weidner et al.N Engl J Med 324:1-6(1991); Horak et al. Lancet 340:1120-1124(1992); 和 Macchiarini et al. Lancet 340: 145-146(1992))。

对血管发生的正调节物的研究已经产生了许多候选物，包括 aFGF，bFGF，TGF- $\alpha$ ，TGF- $\beta$ ，HGF，TNF- $\alpha$ ，血管生成素，IL-8 等(Folkman et al., 出处同上，和 Klagsbrun et al., 出处同上)。至今鉴定的负调节物包括血小板结合蛋白(Good et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.87:6624-6628(1990))，16kD 的催乳素 N-末端片段(Clapp et al. Endocrinology, 133:1292-1299(1993))，(O'Reilly et al. Cell 79:315-328(1994))，和 endostatin(O'Reilly et al. Cell 88:277-285(1996))。

过去几年的工作已经确立血管内皮细胞生长因子(VEGF)在正常和异常的血管发生调节中的关键地位(Ferrara et al. *Endocr. Rev.*18:4-25(1997))。发现即使是单个 VEGF 等位基因的缺失也导致胚胎致死,表明此因子在血管系统的发育和分化上起到不可替代的作用(Ferrara et al., 出处同上)。

而且,已经表明 VEGF 是与肿瘤和眼内疾病相关的新生血管形成的关键调节物(Ferrara et al., 出处同上)。被检测的大多数人类肿瘤中 VEGF mRNA 过表达(Berkman et al. *J Clin Invest* 91:153-159(1993); Brown et al. *Human Pathol.* 26:86-91(1995); Brown et al. *Cancer Res.*53:4727-4735(1993); Mattern et al. *Brit. J.Cancer.*73:931-934(1996); and Dvorak et al. *Am J. Pathol.*146:1029-1039(1995))。并且,在眼内液体中 VEGF 的浓度与糖尿病和其他与缺血相关的视网膜病患者的血管活动性增生是高度相关的(Aiello et al. *N. Engl. J. Med.*331:1480-1487(1994))。进而,研究已经证实 VEGF 在患者慢性新生血管膜中的定位受急性黄斑退化(AMD)的影响(Lopez et al. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 37:855-868(1996))。

VEGF 是分子量为 45KD 的肝素结合生长因子(Plouet et al. *EMBOJ.* 8:3801(1989); Neufeld et al. *Prog. Growth Factor Res.* 5:89(1994))。它是由两个相同亚基组成的二聚体糖蛋白。尽管 VEGF 由单一基因编码,但是由于可选择的 mRNA 剪接使体内至少存在五种同工型。这些同工型, VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189, 和 VEGF206, 分别包含 121, 145, 165, 189, 和 206 个氨基酸(Leung et al. *Science* 246:1306(1989); Houck et al. *Mol. Endocrinol.*5:1806(1991); Tischer et al. *J. Biol. Chem.*266:11947(1991); Neufeld et al. *The FASEB Journal* 13:9-22(1999))。VEGF 同工型对肝素表现出不同的亲和性: VEGF121 结合肝素能力弱,而 VEGF 165, VEGF189 和 VEGF206 以递增的亲和性结合肝素。VEGF121 和 VEGF165 是分泌性的并且在循环中发现了此两种同工型。相对照, VEGF189 和 VEGF206 多发现与细胞外基质中含蛋白聚糖的肝素硫酸盐有关(Houck et al. *J. Biol. Chem.*267:26031(1992); Park et al. *Mol. Biol. Cell* 4:1317(1993))。五种同工型中, VEGF165 是在大多数细胞和组织中表达最丰富的变体。

已经鉴定了 VEGF 的五种受体: VEGFR-1(FLT-1), VEGFR-2(KDR/FLK-1)和 VEGFR-3, 它们均是传递信号的酪氨酸蛋白激酶, 和 neuropilin-1 及 neuropilin-2, 这两者是选择性结合 VEGF165 的辅助-同工型-

特异的受体(de Viries et al. Science 255:989(1991); Terman et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 187:1579(1992); Millauer et al. Cell72:835(1993); Neufeld et al., 出处同上)。许多小组正在积极研究这些受体在 VEGF 生物学中的多种作用。

VEGF 由组织产生且不必进入循环发挥其生物学作用, 而是作为旁分泌调节物在局部发挥作用。这就产生了循环性 VEGF 的意义和它在正常生物学或病理学中起到何作用的问题。Yang et al. J. Pharm. Exp. Ther. 284:103(1998) 的最近研究发现 rhVEGF165 从循环中的清除非常快速, 说明循环中内源性 VEGF 很有可能是 VEGF 连续不断合成的结果。此外, 已有几项研究试图发现循环性 VEGF 水平与肿瘤患病的相互关系, 并且已表明 VEGF 水平是潜在的预后标志(Ferrari and Scagliotti Eur. J. Cancer 32A:2368(1996); Gasparini et al. J. Natl. Cancer Inst. 89:139(1997); Kohn Cancer 80:2219(1997); Baccala et al. Urology 51:327(1998); Fujisaki et al. Am. J. Gastroenterol. 93:249(1998))。很明显, 能够精确测量 VEGF 对于理解其在多种生物过程如血管未闭的维持, 月经周期, 缺血, 糖尿病, 和癌症中的作用是很重要的。

文献广泛报道在正常人和患者中内源 VEGF 的浓度不同, 范围从检测不到至高水平。已经有报道 VEGF165/165 可被蛋白水解性地断裂成三种其他形式: 165/110 异二聚体, 110/110 同型二聚体, 和 55 个氨基酸的 C-末端片段(Keyt et al. J.Biol.Chem. 271:7788-7795(1996); Keck et al. Arch.Biochem.Biophys. 344:103-113(1997))。

测量内源 VEGF 水平的能力依赖于敏感性和特异性测定法的可得性。已经报道了用于 VEGF 的以比色、化学发光和荧光为基础的酶联免疫吸附测定(ELISAs)Houck et al., 出处同上,(1992); Yeo et al. Clin. Chem.38:71(1992); Kondo et al. Biochem. Biophys. Acta 1221:211(1994); Baker et al. Obstet. Gynecol. 86:815(1995); Hanatani et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59:1958(1995); Leith and Michelson Cell Prolif. 28:415(1995); Shifren et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 81:3112(1996); Takano et al. Cancer Res. 56:2185(1996); Toi et al. Cancer 77:1101(1996); Brekken et al. Cancer Res. 58:1952(1998); Obermair et al. Br. J. Cancer 77:1870-1874(1998); Webb et al. Clin. Sci. 94:395-404(1998)。相似的 ELISAs 已经成功地应用于血浆和尿液标本中少量药物和其他抗原成分的判定, 无需提取步骤, 并且是简单易完成的。

Houck et al., 出处同上(1992)描述了具有 ng/ml 敏感度的比色 ELISA, 很明显对检测内源的 VEGF 水平不够敏感。Yeo et al., 出处同上(1992)描述了双位点时间-分辨免疫荧光分析, 但是在正常血清中未检测到 VEGF(Yeo et al. Cancer Res. 53:2912(1993)). Baker et al., 出处同上(1995), 使用此免疫荧光分析的改良方式, 报道孕妇血浆中 VEGF 的可检测水平, 在先兆子痫妇女中为较高水平。Anthony et al. Ann. Clin. Biochem. 34:276(1997)使用放射免疫分析报道了孕妇中相似的数据。Hanatani et al., 出处同上(1995)开发出能够测定循环性 VEGF 的化学发光 ELISA 并且报道了 30 个正常个体(男性和女性)的血清 VEGF 水平为 8-36pg/ml。Brekken et al. 出处同上(1998)描述使用了对 VEGF 单独或者 VEGF: Flk-1 复合物有结合优势的抗体的 ELISA 试验。

一种用于 VEGF 检测的 ELISA 试剂盒可从 R&D Systems(Abingdon,U.K.) 商业获得。这种 R&D VEGF ELISA 试剂盒已经被用于夹心试验, 其中单克隆抗体被用于捕捉靶 VEGF 抗原而多克隆抗体被用于检测 VEGF。Webb et al. 出处同上(1998)。还不清楚使用 R&D ELISA 试剂盒的结果是否受蛋白水解过程或 VEGF 降解或其他血清蛋白干扰的影响。Obermair et al., 出处同上(1998)。

Keyt et al. J.Biol.Chem.271:7788-7795(1996); Keyt et al. J.Biol.Chem. 271:5638(1996); 和 Shifren et al., 出处同上(1996)也开发出以二元单克隆抗体对为基础的比色 ELISA。尽管这种 ELISA 能检测癌症患者升高的 VEGF 水平, 但是它缺乏测定正常个体中 VEGF 内源水平所需的敏感性。Rodriguez et al. J.Immunol.Methods 219:45(1998)描述了在纯净的血浆或血清中 VEGF 敏感性为 10pg/ml 的双位点荧光 VEGF ELISA。然而, 这种荧光测定仅能充分检测 VEGF 种类中完整的 165/165 和 165/110。

因此, 需要发展一种诊断性和预后性的测定法, 其在动物模型或患者的生物标本中比现有 ELISAs 能检测到更高的 VEGF 可测定水平, 并且能够测定 VEGF 的所有同工型。

### 发明概述

本发明开发了以 VEGF 作为抗原的多位点抗体-夹心 ELISA 方法和试剂盒以检测生物标本中的 VEGF 并被用作诊断/预后的指标。与现在使用的

VEGF ELISAs 相比, 本测定具有高度敏感性且能够检测循环中内源 VEGF 的多数同工型。

具体地, 本发明提供检测生物标本中 VEGF 的方法, 优选来自血管病, 糖尿病, 或者癌症的病人的标本, 包括以下步骤:

(a)将生物标本与固定于固体支持物的预混合捕捉试剂接触和保温。其中捕捉试剂是抗人 VEGF 的多克隆和单克隆抗体, 该单克隆抗体特异性结合人 VEGF 的 C-末端(残基 111-165)。

(b)从固相化捕捉试剂上分离生物标本;

(c)将固相化捕捉试剂与结合 VEGF 的 KDR 和 FLT1 受体结合结构域的可检测抗体接触; 和

(d)用检测可检测型抗体的工具(means)测定结合于捕捉试剂的 VEGF 水平。

优选地, 以单克隆对多克隆抗体重量比约为 0.8: 1 至 1.2: 1 来固定捕捉试剂。更优选地, 单克隆对多克隆抗体重量比约为 1: 1。

另一方面, 本发明提供检测生物标本中 VEGF 的免疫测定试剂盒, 此试剂盒包括:

(a)作为捕捉试剂, 抗人 VEGF 多克隆和单克隆抗体以单克隆对多克隆抗体重量比约为 0.8: 1 至 1.2: 1 而预混合的混合物, 其中单克隆抗体特异地结合人 VEGF 的 C-末端(残基 111-165); 和

(b)作为检测试剂, 结合 VEGF 的 KDR 和 FLT1 受体结合结构域的可检测抗体。

该测定的独特性在于, 它使用多克隆/单克隆抗体混合物作为捕捉试剂, 并且捕捉性单克隆抗体结合 VEGF 的 C-末端部位。以前公开的 VEGF ELISAs 多数以二元单克隆抗体对为基础来捕捉/检测, 或者以单克隆抗体作为捕捉试剂而以多克隆抗体来检测。如果将多克隆抗体单独作为捕捉抗体, 测定法的所有敏感性会丧失。单克隆捕捉抗体结合 VEGF C-末端的能力确保所有内源 VEGF 分子, 包括 165/165, 165/110 和 110/110 能够被这里描述的测定所检测。而且, 本发明的检测抗体结合 VEGF 的生物活性区, 例如, VEGF 的 KDR 和 FLT1 受体结合结构域, 这确保检测到的 VEGF 分子是不被例如, 循环中可溶性 VEGF 受体封闭的。这样, 这里描述的测定提供对很可能有生物活性的循环性 VEGF 分子更准确的测定。

### 附图描述

图 1 表示抗 rhVEGF 的亲和本克隆抗体两种不同制剂的对比, 用正方形表示优选的抗体而用圆圈代表来自不同放血的相同抗体。

图 2 表示本文中抗 VEGF 的亲和本克隆抗体用胍和甘氨酸洗脱的 ELISAs 的对比。

图 3 表示三种不同 VEGF ELISAs 典型标准曲线和可能的 hook 效应的对比。其中圆圈代表用 Mab 3.5F8 单独作为包被和检测试剂的单-位点测定, 正方形代表用 Mab 3.5F8 作为包被试剂和 Mab A4.6.1(抗 hVEGF 的杂交瘤, 1991 年 3 月 29 日保藏在 American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 USA, 保藏号为 ATCC HB 10709)作为检测试剂的双-位点测定, 菱形代表这里的用 Mab 3.5F8 和亲和纯化的多克隆抗体作为包被试剂而用 Mab A4.6.1 作为检测试剂的多位点测定。

图 4 表示单克隆抗体 Mab 3.5F8 包被最高限, 其中 ELISA 使用 0.4(圆圈), 1(正方形), 2(菱形), 或者 4(三角形) $\mu\text{g/ml}$  单克隆抗体和 1 $\mu\text{g/ml}$  亲和纯化的多克隆抗体。

图 5 表示兔多克隆抗体包被最高限, 其中 ELISA 使用 0(圆圈), 0.1(正方形), 0.4(菱形), 1(三角形), 2(带虚线的倒三角形), 或者 4(带实线的倒三角形) $\mu\text{g/ml}$  亲和纯化的多克隆抗体和 0.4 $\mu\text{g/ml}$  Mab 3.5F8。

图 6 表示 pH 值对这里所述多位点 VEGF ELISA 的影响, 其中圆圈代表 pH4 时的 ELISA, 正方形 pH5, 菱形 pH6, 三角形 pH7, 半线菱形 pH8, 和倒菱形 pH9。

图 7 表示在多位点 VEGF ELISA 中掺入了 rhVEGF 的六份正常人 EDTA 血浆标本稀释的线性关系。

图 8A-8C 表示掺入了 rhVEGF 的正常大鼠 EDTA 血浆标本的线性关系。其中图 8A 表示高掺入, 图 8B 表示中等掺入, 图 8C 表示低掺入, 其中圆圈是大鼠混合血浆 1, 正方形是大鼠混合血浆 2, 菱形是大鼠 1。

图 9A-9B 分别表示掺入了 rhVEGF 的四份雄性和四份雌性 Yorkshire 猪 EDTA 血浆标本的稀释的线性关系。

图 10A-10C 表示三种不同 ELISA 测定对 VEGF 165/165(圆圈), 165/110(正方形), 121/121(菱形)和 110/110(三角形)的特异性。图 10A 表示用 Mab 3.5F8 单独作为包被和检测抗体的单-位点 ELISA 的特异性(图 10A), 图

10B 表示用 Mab 3.5F8 作为包被抗体和 Mab A4.6.1 作为检测抗体的双-位点 VEGF 荧光 ELISA 测定的特异性, 图 10C 表示这里的用 Mab 3.5F8 和 PAb 作为包被抗体而用 Mab A4.6.1 作为检测抗体的多位点 VEGF 荧光 ELISA 测定的特异性。

图 11A 和 11B 分别表示仅使用 Mab 3.5F8 作为包被试剂的双位点 ELISA 检测和本文中用 PAb 和 Mab 3.5F8 作为包被试剂的多位点 ELISA 检测到的正常人血浆和血清 VEGF。

图 12 表示用图 10 中描述的所有三种测定所得心脏病患者血浆 VEGF 的量。其中圆圈代表单位点测定, 正方形代表双位点测定, 三角形代表多位点测定。

图 13 表示正常供体和心血管患者的血浆 VEGF 水平, 其使用以 Mab 3.5F8 作为包被抗体和 Mab 4.6.1 作为检测抗体的双-位点测定或这里的用 Mab 3.5F8 和亲和纯化的多克隆抗体作为包被抗体而用 Mab 4.6.1 作为检测抗体的多位点测定获得, 其中 N 是患者数。

图 14 表示肺癌患者的血清 VEGF, 其使用 Mab 3.5F8 单独作为包被试剂的双位点测定和这里用 PAb 和 Mab 3.5F8 作为包被试剂的多位点 ELISA 来检测。

图 15 表示正常供体和糖尿病患者(非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)和胰岛素依赖型糖尿病(IDDM))的血清 VEGF 水平, 其使用 Mab 3.5F8 作为包被抗体和 Mab 4.6.1 作为检测抗体的双-位点测定来检测。

图 16A 和 16B 表示测定人血浆时, 以亲和纯化的抗 DNA 酶多克隆抗体和亲和纯化的抗 VEGF 多克隆抗体作为包被试剂之一的本文所述多位点测定与以 Mab 3.5F8 作为包被试剂的双位点测定的对比图。图 16A 表示用 Mab 3.5F8 作为包被试剂(x-轴)的双位点 ELISA, 用 Mab 3.5F8 和抗 DNA 酶多克隆抗体作为包被试剂(实心圆圈)的多位点测定以及这里阐述的使用 Mab 3.5F8 和抗 VEGF PAb 作为包被试剂的多位点测定(空心圆圈)测得的血浆 VEGF 的相互关系。图 16B 表示双位点 ELISA(实心圆圈)、用 Mab 3.5F8 和抗 DNA 酶多克隆抗体作为包被试剂的多位点 ELISA(实心菱形), 和这里阐述的使用 Mab 3.5F8 和抗 VEGF PAb 作为包被试剂的多位点测定(实心正方形)的标准曲线。

### 优选实施方案详述

#### A. 定义

这里使用的术语“VEGF”指165个氨基酸的血管内皮细胞生长因子,和相关的121-, 145-, 189-, 和206-氨基酸的血管内皮细胞生长因子,如Leung et al. Science 246:1306(1989), Houck et al. Mol. Endocrin. 5:1806(1991), 和Neufeld et al., 出处同上所述, 以及这些生长因子的天然等位基因形式和加工形式。

术语“检测”使用其最广义的意义, 包括对靶分子的定性和定量测定。一方面, 这里所述的检测方法仅用于鉴定生物标本中VEGF的存在。另一方面, 此方法用于测试标本中VEGF是否为可检测水平。还有一方面, 此方法可用于定量标本中VEGF的量并且进一步对比不同标本中的VEGF水平。

术语“生物标本”指来自任何动物的身体标本, 但是优选来自哺乳动物, 更优选来自人。最优选地, 这些生物标本是来自血管的、糖尿病的或者癌症的患者。这些生物标本包括生物体液如血清, 血浆, 玻璃体液体, 淋巴液, 滑液, 滤泡液, 精液, 羊水, 乳汁, 全血, 尿液, 脑脊液, 唾液, 痰液, 泪液, 汗液, 粘液, 和组织培养基, 也包括组织提取物如匀浆的组织, 和细胞提取物。这里优选的生物标本是血清, 血浆或尿液。

术语“捕捉试剂”指能结合并捕捉标本中靶分子的试剂, 并因此在适当条件下能将捕捉试剂-靶分子复合物与标本中其余部分分离。一般地, 捕捉试剂为固相化或者是可固相化。在夹心免疫测定中, 捕捉试剂优选针对靶抗原的一种抗体或者不同抗体的混合物。

术语“可检测的抗体”指能直接通过可被检测工具放大的标记检测或者间接通过例如, 另一种被标记的抗体而检测的抗体。在直接标记的例子中, 一般将抗体连接于可用某些工具(means)检测的部分上。优选的可检测抗体是生物素化的抗体。

术语“检测工具(means)”指在这里的ELISA中用于检测可检测型抗体的存在的部分或技术, 并且包括能放大固相化标记如在微滴定板上捕捉的标记的检测试剂。优选地, 检测工具是荧光检测试剂如亲和素或链亲和素。

术语“抗体”使用其最广义意义并且包括单克隆抗体(包括激动剂, 拮抗剂和中和抗体), 多克隆抗体, 多价抗体, 多特异性抗体, 和抗体片段, 只要

它们具有所需结合特异性。

本文中术语“单克隆抗体”是指从基本均一的抗体群的抗体，即除了可能少量存在的天然突变以外，该抗体群中的各个抗体均相同。单克隆抗体具有高度的特异性，针对单个抗原位点。而且，与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相反，每种单克隆抗体是针对抗原上的单个表位。除了其特异性之外，单克隆抗体的优点在于它们可被合成并不受其它抗体的污染。修饰词“单克隆”表明该抗体的特点，即其来自基本上同质的抗体群，不解释为需通过任何特殊方法产生该抗体。例如，根据本发明应用的单克隆抗体可通过由 Kohler 等(自然, 256: 495(1975))首先描述的杂交瘤法进行制备，或者可通过重组 DNA 法进行制备(例如见美国专利 4816567)。“单克隆抗体”还可利用例如 Clackson 等(自然, 352: 624-628(1991))和 Marks 等(分子生物学杂志, 222: 581-597(1991))所述技术从噬菌体抗体文库中分离。

本文中单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体，其重链和/或轻链的一部分与源自特殊物种或属于特殊抗体种类或亚类的抗体的相应序列相同或同源，但所述链的剩余部分的序列与源自另一个物种或属于另一个抗体种类或亚类的抗体(以及此抗体的片段，只要它们显示所需的生物学活性)的相应序列相同或同源(美国专利 4,816,567；和 Morrison 等，美国国家科学院院刊, 81: 6851-6855(1984))。

“人源化”型非人(例如小鼠)抗体是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如 Fv、Fab、Fab'、F(ab)')或抗体的其它抗原结合序列，它们包含非人免疫球蛋白的最小序列。在很大程度上，人源化抗体是人免疫球蛋白(受者抗体)中受者的互补决定区(CDR)残基被具有所需特异性、亲和力和性能的小鼠、大鼠、家兔或非人灵长类等非人源物种抗体(供体抗体)的 CDR 残基所取代。在一些实例中，人免疫球蛋白的框架区(FR)残基由相应的非人类残基所取代。而且，人源化抗体可包括在受者抗体或供体 CDR 或框架序列中不存在的残基。这些修饰旨在进一步改善和最大化抗体的性能。通常，人源化抗体基本上包括至少一个(通常包括两个)可变区的全部，其中 CDR 的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的相应部分，而 FR 序列的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列。人源化抗体还任选包括免疫球蛋白恒定区(Fc)，通常为人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。详见 Jones 等，自然，

321: 522-525 (1986); Riechmann等, 自然 332: 323-329 (1988); 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

需要治疗的“哺乳动物”是指哺乳类任何动物, 包括人、家禽、农用动物, 和动物园、运动项目用的动物或宠物, 如犬、马、猫、牛等。优选哺乳动物是人。

术语“癌症”、“癌症的”、和“恶性的”是指或描述哺乳动物中以细胞生长失控为典型特点的生理状态。癌症的例子包括但不限于: 癌, 包括腺癌, 淋巴瘤, 母细胞瘤, 黑素瘤, 肉瘤, 和白血病。这些癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌, 小细胞肺癌, 非小细胞肺癌, 胃肠道癌症, 何杰金氏和非何杰金氏淋巴瘤, 胰腺癌, 成胶质细胞瘤, 宫颈癌, 卵巢癌, 肝癌(liver cancer)例如肝癌(hepatic carcinoma)和肝细胞瘤, 膀胱癌, 乳腺癌, 结肠癌, 结肠直肠癌, 子宫内膜癌, 唾液腺癌, 肾癌如肾细胞癌和 Wilm's 瘤, 基底细胞癌, 黑素瘤, 前列腺癌, 外阴癌, 甲状腺癌, 睾丸癌, 食管癌, 和各种头颈部癌症。这里治疗优选的癌症是乳腺癌, 结肠癌, 肺癌和黑素瘤。

短语“血管的”和“心血管的”可互换使用且描述具有刺激血管发生和/或心血管化以及抑制血管发生和/或心血管化指征的患者。这些疾病包括, 例如, 动脉疾病, 如动脉粥样硬化, 高血压, 炎症性血管炎, Reynaud's 病和 Reynaud's 现象, 动脉瘤, 和动脉再狭窄; 静脉和淋巴疾病如血栓性静脉炎, 淋巴管炎, 和淋巴水肿; 以及其他血管疾病例如外周血管疾病, 癌症例如血管肿瘤如血管瘤(毛细的和空洞的), 血管球肿瘤, 毛细血管扩张, 杆菌性血管瘤病, 血管内皮瘤, 血管肉瘤, 血管外皮细胞瘤, Kaposi's 肉瘤, 淋巴管瘤, 和淋巴管肉瘤, 肿瘤血管发生, 创伤如外伤, 烧伤和其它损伤的组织, 移植物固定, 结疤, 缺血再灌注损伤, 类风湿性关节炎, 脑血管疾病, 肾脏疾病如急性肾衰, 和骨质疏松。这也包括心绞痛, 心肌梗死如急性心肌梗死, 心肌肥大, 和心脏衰竭如充血性心力衰竭(CHF)。

术语“糖尿病”指糖代谢的渐进性疾病包括胰岛素的产生或利用不足并以高血糖和糖尿为特征。此术语包括所有类型的糖尿病, 例如 I 型糖尿病和 II 型糖尿病以及胰岛素抵抗型糖尿病, 例如 Mendenhall's 综合征, Werner 综合征, 矮妖精貌综合征, 脂肪萎缩型糖尿病, 和其它脂肪萎缩。

术语“亲和纯化的”指通过亲和层析柱洗脱来纯化某物质。

B. 完成本发明的方式

这里描述的测定是利用下列步骤的多位点免疫测定。

### 第一步

本文所述测定法的第一步中，将生物标本与固相化捕捉(或包被)试剂接触并保温，此试剂是抗 VEGF 单克隆抗体和抗 VEGF 的多克隆抗体。这些抗体可以来源于任何物种。但是优选地单克隆抗体是鼠的或大鼠的单克隆抗体，更优选鼠的，且最优选 Mab 3.5F8(Rodriguez et al. 出处同上(1998))，多克隆抗体是抗兔或抗山羊抗体，更优选抗兔的。而且，多克隆抗体优选已亲和纯化以降低背景。因此，在具体的优选实施方案中，固相化单克隆抗体是鼠单克隆抗体，最优选 Mab 3.5F8，固相化多克隆抗体是亲和纯化的兔抗体。将固相化捕捉试剂在被固定前混合在一起。传统的固定通过将捕捉试剂变为不溶而完成，此过程或者在测定程序前，或者在之后完成，前者通过吸附于水不溶性基质或表面(美国专利第 3720760 号)或者非共价或共价偶联(例如，如美国专利第 3645852 或 Rotmans et al. J. Immunol. Methods 57:87-98(1983)中描述的，用戊二醛或碳二亚胺交联，此前将支持物用例如，硝酸和还原剂活化或不活化)，后者通过例如免疫沉淀。

用于固定的固相可以是基本不溶于水且可用于免疫测定的任何惰性支持物或载体，包括例如表面，粒状，多孔基质等形式的支持物。常用载体的例子包括小薄片，Sephadex，聚氯乙烯，塑料珠，和用聚乙烯，聚丙烯，聚苯乙烯制造的测定板或试管，以及类似物包括 96 孔微滴定板，还有特殊物质如滤纸，琼脂糖，交联葡聚糖，和其它多糖。或者，反应性水不溶性基质诸如氰溴化物活化的碳水化合物和如美国专利 3969287；3691016；4195128；4247642；4229537；和 4330440 中描述的反应性物质适用于固定捕捉试剂。在一个优选的实施方案中将固相化捕捉试剂包被于微滴定板上，并且具体地使用的优选固相是可用于同时分析若干标本的多孔微滴定板。最优选的是微量测定 96 孔 ELISA 板例如以 Nunc Maxisorb 或 Immulon 为名出售的板。

如上述将固相用预混合的捕捉试剂包被，其可按照目的通过非共价或共价相互作用或物理交联来连接。接合的技术包括美国专利 4376110 所描述的，该专利引入本文作参考。如果是共价交联，将平板或其他固相与交联试剂连同捕捉试剂在本领域熟知的条件下保温，例如室温下 1 小时。

常用于将预混合的捕捉试剂连接于固相底物的交联试剂包括，例如，

1,1-双(二重氨基乙酰)-2-苯基乙烷, 戊二醛, N-羟基琥珀酰亚胺酯, 例如, 与 4-叠氮水杨酸的酯, 同型双功能亚氨酸酯, 包括二琥珀酰亚胺酯如 3,3'-二硫代双(琥珀酰亚氨基丙酸酯), 和双功能马来酰亚胺如二-N-马来酰亚氨基-1,8-辛烷。甲基-3-[(对-叠氮苯基)二硫]丙酰亚胺等衍生试剂产生在光存在时能形成交联的光活化型中间物。

如果使用 96 孔板, 优选将其用捕捉试剂混合物(一般在缓冲液例如 0.05M 碳酸钠中稀释)包被, 该过程是, 在约 4-20 °C, 较优选在约 4-8 °C, pH 约 8-12, 更优选 pH 约 9-10, 且最优选约 9.6 时保温至少约 10 小时, 更优选至少过夜。如果希望包被时间缩短(为 1-2 小时), 可以使用底部有硝酸纤维素膜的 96 孔板(Millipore MULTISCREEN™)或 37 °C 包被。在测定之前可以将平板长时间堆积并包被, 然后以手工, 半自动化, 或例如通过用机器人自动化形式同时完成几个标本的测定。

然后一般将包被的平板用非特异性结合并饱和结合位点的封闭试剂处理以封闭在板孔中自由配体与过剩位点的非目的结合。为此目的的合适的封闭试剂实例包括, 例如, 明胶, 牛血清白蛋白, 卵清蛋白, 酪蛋白, 和脱脂牛奶。封闭处理一般在室温条件下进行约 1-4 小时, 优选约 1.5-3 小时。

包被和封闭后, 将适当稀释的 VEGF 标准品(纯化的 VEGF)或要分析的生物标本加到固定相上。优选的稀释率按体积约为 5-15 %, 优选地约 10 %。可以用于此目的的稀释缓冲液包括(a)含有 0.5 % BSA, 0.05 % TWEEN 20™ 去污剂(P20), 0.05 % PROCLIN™300 抗生物素, 5mM EDTA, 0.25 % Chaps 表面活性剂, 0.2 % β-γ 球蛋白, 和 0.35M NaCl 的 PBS; (b) 含有 0.5 % BSA, 0.05 % P20, 0.05 % PROCLIN™300, pH7 的 PBS; (c) 含有 0.5 % BSA, 0.05 % P20, 0.05 % PROCLIN™300, 5mM EDTA, 和 0.35M NaCl; pH6.5 的 PBS; (d) 含有 0.5 % BSA, 0.05 % P20, 0.05 % PROCLIN™300, 5mM EDTA, 0.2 % β-γ 球蛋白, 和 0.35M NaCl 的 PBS; 和(e) 含有 0.5 % BSA, 0.05 % P20, 0.05 % PROCLIN™300, 5mM EDTA, 0.25 % Chaps 和 0.35M NaCl 的 PBS。本文所述测定法优选的缓冲液是缓冲液(c), 因为它具有区别每种标准品的最大分辨率和最大信-噪比。PROCLIN™300 起防腐剂作用, 而 TWEEN 20™ 作为去污剂以消除非特异性结合。缓冲液(c)中加入的 EDTA 和盐的作用是降低其他缓冲液的背景, 包括缓冲液(b)。

捕捉试剂的重量比(单克隆抗体比多克隆抗体)优选约 0.8 : 1 至 1.2 :

1, 更优选约 1: 1。使用的捕捉试剂的量足以获得相对于 VEGF 标准品的良好信号, 但是与标本中预期的内源性 VEGF 水平对比摩尔浓度不过剩。为达足够的灵敏度, 优选加入生物标本的量是使已固相化捕捉试剂摩尔浓度超过适当稀释后生物标本中预期的游离 VEGF 的最大摩尔浓度。预期的水平主要取决于特定分析标本中游离 VEGF 浓度水平与患者的临床状况的任何已知相互关系。因此, 例如, 癌症患者血清中游离 VEGF 的最大预期浓度非常高, 而基于现有文献预测正常儿童或成人的血清中具有较低浓度的游离 VEGF。

但是, 如果存在过多捕捉试剂, 捕捉试剂将与生物标本中存在的抗-VEGF 竞争结合 VEGF, 产生不准确结果。因此, 通常将生物标本进行必要稀释以达到所需 VEGF 浓度范围, 然后测定捕捉试剂的浓度, 此时捕捉试剂的最终浓度常凭经验决定, 以使测定的敏感性在目的范围内最高。但是, 作为一般原则, 摩尔过剩优选少于标本经任何合适稀释后其中预期的最大量游离 VEGF 的摩尔浓度的约 10 倍。最优选地, 固相化单克隆抗体的量约为 0.4 $\mu$ g/ml, 固相化多克隆抗体的量约为 0.4 $\mu$ g/ml。

选择保温标本和固相化捕捉试剂的条件使测定的敏感性最高且使解离最低。优选地, 在非常恒定的温度下完成保温, 范围从约 0 $^{\circ}$ C 至约 40 $^{\circ}$ C, 优选从约 36 $^{\circ}$ C 至 38 $^{\circ}$ C 以比在例如室温下获得较小变异, 较低变异系数。保温时间主要取决于温度, 一般不超过约 10 小时以避免不敏感测定。优选地, 在 36-38 $^{\circ}$ C 保温约 0.5 至 3 小时, 更优选地 1.5 至 3 小时以使游离的 VEGF 与捕捉试剂的结合最多。如果加入蛋白酶抑制剂阻断生物液体中蛋白酶降解 VEGF 时, 保温的持续时间可以长一些。

在此阶段, 保温混合物的 pH 值一般在约 6-9.5 范围内, 优选在约 6-7 范围内, 更优选在约 6.0-6.5, 且最优选测定(ELISA)稀释液的 pH 值为  $6.35 \pm 0.1$ 。酸性的 pH 值例如 pH4-5 可降低 VEGF 的回收。选择保温缓冲液的 pH 值以维持捕捉试剂对被捕捉的 VEGF 特异性结合的显著水平。可以使用各种缓冲液以达到和保持此步骤中想要的 pH 值, 包括硼酸盐, 磷酸盐, 碳酸盐, Tris-HCl 或 Tris-磷酸盐, 醋酸盐, 巴比妥, 等等。使用的具体缓冲液不是本发明的关键, 但是在每一测定中一种缓冲液可以较其他的优选。

## 第二步

本文所述测定方法的第二步中, 将生物标本从固相化捕捉试剂中分离(优选通过洗涤)以去除未捕捉的 VEGF。洗涤使用的溶液一般为用上述保温步骤

的考虑和缓冲液确定 pH 值的缓冲液(洗涤缓冲液), 其优选的 pH 值约为约 6-9。洗涤可以进行三次或更多次。洗涤温度一般从冰箱温度至中等温度, 在测定期间保持恒定温度, 一般约 0-40 °C, 更优选约 4-30 °C。例如, 洗涤前可以将洗涤缓冲液放于 4 °C 储存箱的冰中, 且在此步骤中可以使用平板洗涤器。如果担心被捕捉的 VEGF 在随后步骤中可能以某种程度解离时, 在此阶段也可以加入交联试剂或其他合适的试剂以允许现有结合的 VEGF 共价附着于捕捉试剂上。

### 第三步

在下一步中, 将固相化捕捉试剂与可检测的抗体接触, 优选地在约 20-40 °C, 更优选约 36-38 °C, 两者接触的实际温度和时间主要依赖于使用的检测工具。例如, 当使用 4-甲基伞形酮- $\beta$ -半乳糖苷(MUG)和链亲和素- $\beta$ -半乳糖苷酶作为检测工具时, 优选使接触过夜(例如约 15-17 小时或更长)以使信号增至最大。可检测的抗体可以是多克隆或单克隆抗体, 优选是单克隆抗体, 更优选是鼠源的, 且最优选是 MA b A4.6.1。而且, 优选的可检测的抗体是可直接检测的, 优选具有荧光标记。与传统比色标记对比荧光标记有更高测定敏感性。更优选地, 可检测抗体是生物素化的且检测工具是亲和素或链亲和素- $\beta$ -半乳糖苷酶和 MUG。

优选在冲洗平板后加入相对于预期的游离 VEGF 最大浓度(如上所述)为摩尔过量的抗体。尽管可以使用任何抗体, 此抗体(是可直接或间接测定的)优选是多克隆抗体。抗体的亲和性必须足够高以至于可以检测到少量的游离 VEGF, 但是未高到引起 VEGF 从捕捉试剂上脱离。

### 第四步

在测定方法的最后一步中, 用针对可检测抗体的检测工具测定已与捕捉试剂结合的游离 VEGF 水平。如果生物标本来源于血管的, 糖尿病的, 或癌症的患者, 测定步骤优选包括将上面三步的反应结果与标准曲线对比以判定与正常个体对比的 VEGF 水平。

### 抗体的生产

抗 VEGF 的多克隆抗体一般通过在动物上经多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射 VEGF 和佐剂而产生。将 VEGF 或含有靶氨基酸序列的片段与在被免疫种属体内激发免疫应答的蛋白质偶联是有用的, 后一种蛋白如, 匙孔血蓝蛋白, 血清白蛋白, 牛甲状腺球蛋白, 或大豆胰蛋白酶抑制剂, 偶联可利用双功能

或衍化试剂例如,马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基偶联), N-羟基琥珀酰亚胺酯(通过赖氨酸残基偶联), 戊二醛, 琥珀酸酐,  $\text{SOCl}_2$ , 或  $\text{R}^1\text{N} = \text{C} = \text{NR}$ , 其中 R 和  $\text{R}^1$  是不同烷基。

用作包被抗体或可检测抗体的抗体可以从任何方便的脊椎动物来源获得,例如,鼠类,灵长类,兔形目,山羊,兔,大鼠,鸡,牛,羊,马,犬,猫,或猪。可以使用嵌合抗体或人源化抗体,例如下列文献描述的:美国专利第4,816,567; Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851(1984); Neuberger et al. Nature 312:604(1984); Takeda et al. Nature 314:452(1985); 和 1998 年 10 月 15 日公开的 WO 98/45331, 以及上面提及的那些附加参考文献。

通过将 1mg 或 1 $\mu\text{g}$  偶联物(分别针对兔或小鼠)与 3 倍体积的 Freund's 完全佐剂混合,将该溶液在皮内多部位注射,动物可以被这种免疫原性偶联物或衍生物免疫。一个月后将动物用 1 / 5 至 1 / 10 原初量的偶联物的 Freund's 不完全佐剂混合液经多部位皮下注射而加强免疫。7-14 天后将动物放血,测定血清抗-VEGF 滴度。对动物加强免疫直至滴度达到平台期。优选地,将动物用 VEGF 的偶联物加强免疫,但该偶联物是与不同蛋白质的偶联和 / 或通过不同交联试剂的偶联。偶联物也可以是重组细胞培养中的蛋白融合体。而且,可用凝聚试剂例如明矾增强免疫应答。在许多免疫学教科书中描述了生产多克隆抗体的方法,例如, Davis et al. Microbiology, 3<sup>rd</sup> Edition, (Harper & Row, New York, 1980)。

通过从被免疫的动物回收脾细胞和以传统方式使细胞永生化,例如通过与骨髓瘤细胞融合或通过 Epstein-Barr 病毒转化,并且筛选能表达目的抗体的克隆可制备单克隆抗体。参见,例如, Kohler 和 Milstein Eur. J. Immunol. 6:511(1976)。或可以通过重组方法生产单克隆抗体,或单克隆抗体的抗原结合区,例如 Fab 或 (Fab)<sub>2</sub> 片段。

合适的抗体的例子包括那些已经用于目的蛋白的已知 RIA 中者,例如本文所引参考文献中描述的直接抗 VEGF 的那些抗体。

### 检测

加入固相化捕捉试剂中的抗体可直接标记,或可间接检测,其通过洗去过量的第一抗体后,加入摩尔过量的已标记的直接抗第一抗体来源动物种属 IgG 的第二抗体。在后者,间接测定中,将已标记的抗第一抗体的抗血清加

入标本中以在原位产生标记的抗体。

用于第一或第二抗体的标记是任何可检测的不干扰游离 VEGF 与抗体结合的功能物。合适的标记物的例子包括那些在免疫测定中使用的已知的许多标记物，包括可被直接检测的组分，例如，荧光染料，化学发光物质，和放射性标记，还有一些组分，例如必须经反应或衍化才能被检测的酶。这些标记的例子包括放射性同位素  $^{32}\text{P}$ ， $^{14}\text{C}$ ， $^{125}\text{I}$ ， $^3\text{H}$ ，和  $^{131}\text{I}$ ，荧光团如稀土螯合物或荧光素和其衍生物，罗丹明和其衍生物，丹磺酰，伞形酮，荧光素酶例如，萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利第 4737456 号)，虫荧光素，2,3-二氮杂萘二酮，辣根过氧化物酶(HRP)，碱性磷酸酶， $\beta$ -半乳糖苷酶，葡糖淀粉酶，溶菌酶，糖氧化酶例如葡萄糖氧化酶，半乳糖氧化酶，和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，杂环氧化酶例如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶，它与利用过氧化氢以氧化染料前体例如 HRP 的酶偶联，乳过氧化物酶，或微过氧化物酶，生物素/亲和素，生物素/链亲和素，带有 MUG 的生物素/链亲和素- $\beta$ -半乳糖苷酶，离心(spin)标记物，噬菌体标记物，稳定的自由基，等等。如上所述，荧光标记是优选的。

可利用传统方法将这些标记共价结合于蛋白质或多肽上。例如，可以使用偶联试剂如二醛，碳二亚胺，二马来酰亚胺，bis-imidates，二-重氮化-联苯胺，等将抗体用上述荧光，化学发光，和酶标记物标记。参见，例如，美国专利第 3940475(荧光测定)和 3645090(酶)；Hunter et al. *Nature* 144:945(1962)；David et al. *Biochemistry* 13:1014-1021(1974)；Pain et al. *J. Immunol. Methods* 40:219-230(1981)；和 Nygren J. *Histochem. And Cytochem.* 30:407-412(1982)。这里优选的标记是荧光的以使放大性和敏感性提高到 8pg/ml，更优选带有链亲和素- $\beta$ -半乳糖苷酶的生物素和 MUG 以放大信号。

这些标记，包括酶与抗体的偶联是免疫分析技术中对普通技术人员而言标准的操作程序。参见，例如，O'Sullivan et al. "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay", *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone and H. Van Vynakis, Vol. 73(Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166。

加入最后标记的抗体后，判定结合抗体的量，其通过洗涤去除过量未结合的标记抗体，再用相应于该标记物的检测方法测定所结合的标记的量，并找出测定量与生物标本中游离 VEGF 量之间的相互关系。例如，在使用

酶的情况中，显色并测定的量可以直接定量所存在的 VEGF 量。具体地，如果 HRP 是标记物，用底物 OPD 在 490nm 的吸收率来检测颜色。

在一个实施例中，从固定相上洗涤去直接抗未标记的第一抗体的酶标第二抗体后，通过将固相化捕捉试剂与酶的底物保温而产生并测定颜色或化学发光。然后通过对比平行进行的 VEGF 标准品试验所产生的颜色或化学发光来计算游离 VEGF 浓度的量。

### 试剂盒

为方便起见，可以以试剂盒的形式提供本发明的测定方法。此类试剂盒是一种包装组合物，其包括的基本元件有：

(a)捕捉试剂，包括抗人 VEGF 分子的多克隆和单克隆抗体，其中单克隆抗体特异性结合 VEGF 分子的 C-末端，单克隆抗体与多克隆抗体的重量比约为 0.8：1 至 1.2：1；和

(b)检测试剂，包括可检测的(标记的或未标记的)抗体，其结合 VEGF 受体结合结构域 KDR 和 FLT1。

这些基本元件如本文上述所定义。

优选地，试剂盒进一步包括支持捕捉试剂的固体支持物，其为一种单独的元件或在其上已固定了捕捉试剂。因此，试剂盒中捕捉抗体可以是被固定在固体支持物上，或被固定在试剂盒包括的或与试剂盒分别提供的这类载体上。优选地，将捕捉试剂包被在微量滴定板上。检测试剂可以是能直接检测的标记抗体，或能通过在不同种属中产生的直接抗未标记抗体的标记抗体来检测的未标记抗体。当标记是酶时，试剂盒一般包括酶需要的底物和辅助因子，而当标记是荧光团时，包括提供可检测的发色基团的染料前体。当检测试剂未被标记时，试剂盒可以进一步包括针对该可检测抗体的检测工具，例如，抗未标记抗体的标记抗体，优选荧光检测形式。

在一个优选的具体实施方案中，试剂盒中单克隆抗体对多克隆抗体的重量比约为 1：1，可检测的抗体是生物素化的鼠单克隆抗体，单克隆抗体是鼠或大鼠的，更优选鼠的，且最优选 MA b 3.5F8，多克隆抗体是亲和纯化的，且更优选山羊的或兔的，最优选兔的，鼠单克隆抗体的量是 0.4 $\mu$ g/ml，兔多克隆抗体的量是 0.4 $\mu$ g/ml。优选地，本试剂盒中捕捉试剂是固定的。而且，优选可检测的抗体是 MA b A4.6.1。

一般地试剂盒也包含用于进行测定的仪器，和/或作为抗原标准品的

VEGF(例如, 纯化的 VEGF, 优选重组生产的 VEGF), 以及其它附加物例如稳定剂, 洗涤和保温缓冲液, 等等。

VEGF 标准品的例子是在哺乳类细胞中生产的重组人类 VEGF, 所述细胞可从 Genentech. Inc., South San Francisco, California 获得。

试剂盒的成分可以以预定比率提供, 其中各种试剂的相对量可变以提供基本上使测定的敏感度最大的反应溶液中试剂浓度。具体地, 所提供的试剂可以为干粉, 通常是冻干的, 包括赋形剂, 其通过溶解将提供具有适于与待测标本混合的合适浓度的试剂溶液。

下面的实施例意在说明实施本发明的现已知的一个实施方案, 但是不应认为本发明局限于这些实施例。所有公开的和专利的文献在这里引用作为参考。

## 实施例 1

### 2. 材料与方法

#### 2. 1. 试剂

将在大肠杆菌(Genentech, South San Francisco, CA)中表达的纯化的重组人 VEGF165(rhVEGF)用作标准品和对照(在如下面定义的 ELISA 稀释液中制备并在-70 °C 贮存)。链亲和素- $\beta$ -半乳糖苷酶(Strep- $\beta$ -gal)购自 Boehringer Mannheim. W. Germany; MUG 购自 Sigma, St. Louis, MO。二甲亚砜(DEMO)购自 Sigma。

#### 2. 2. 抗 VEGF 抗体

抗 rhVEGF165 抗体的制备如 Kim et al., Growth Factors, 7:53(1992)所描述。简言之, 将 BALB/c 小鼠用偶联了匙孔血蓝蛋白的 rhVEGF165 以 10mg 的剂量腹膜内超免疫。将脾细胞与小鼠骨髓瘤系融合并用 ELISA 筛选含有杂交瘤的孔中培养上清中抗 rhVEGF165 Mab 的存在。将阳性杂交瘤用有限稀释技术克隆两次。本 ELISA 使用的单克隆抗体已在 Kim et al.出处同上(1992)中表述其特征。认为捕捉抗体之一, MAb 3.5F8, 以 13pM 的  $K_d$  结合于肝素结合结构域附近, 氨基酸残基 111-165 处。Rodriguez et al.出处同上(1998)。

用作另一包被抗体的兔多克隆抗体(PAb)可如下制备, 将 VEGF 用标准方法注入兔体内, 使其通过亲和柱来纯化, 其中该层析柱偶联了 VEGF 因而可捕捉多克隆抗体, 因而去除标本中的免疫球蛋白。洗掉不需要的抗体分子并将结合的抗体用 0.2M 甘氨酸, pH2 洗脱, 然后在 4 °C 的 PBS 中透析过夜

前将 pH 调至中性, 含有抗体的洗脱物可用于多位点测定。

检测抗体, MAb A4.6.1, 以 86pM 的  $K_d$  结合 rhVEGF165。几种证据表明此 MAb 在 KDR 受体结合区附近结合 rhVEGF(Kim et al., 出处同上(1992))。

### 2. 3. MAb A4.6.1 的生物素化

将 MAb A4.6.1 按照下列方法用生物素化酰氨基己酸-N-羧基琥珀酰亚胺酯(Biotin-X-NHS)(Research Organics, Cleveland, OH)生物素化。将 MAb A4.6.1 用 100mM  $\text{NaHCO}_3$  pH8.5 于 2-8 °C 透析过夜。将总量 60 $\mu$ l 的 5mg/ml 溶于 DMSO 中的生物素-X-NHS 溶液以生物素: MAb 比率 1: 10(w/w)加入 MAb 中(透析后调节至浓度 2-10mg/ml)。将此混合物在室温轻轻摇动下保温 2 小时, 加入 5 $\mu$ l 乙醇胺终止反应。偶联后, 将抗体于 2-8 °C 轻轻摇动下用 PBS 透析, 且 PBS 每隔两小时更换一次, 总共三次。

### 2. 4. 多位点 VEGF ELISA

两种 Mab, 3.5F8(包被)和生物素化的 A4.6.1(检测), 以及如上述的一种 PAb(包被)用于进行特异而敏感的 VEGF ELISA。在此 ELISA 中, 每孔按 MAb 3.5F8 和亲和纯化的 PAb 各 100 $\mu$ l 混合, 然后以每个于 0.05M 碳酸钠 pH9.6 中为 0.4 $\mu$ g/ml 的量加入 MaxiSorp™96 孔微量滴定板上(Nunc, Roskilde, Denmark)。在 2-8 °C 保温 24-72 小时后, 将已包被的平板用 400 $\mu$ l ELISA 洗涤缓冲液(含 0.05 % TWEEN-20™去污剂的 PBS)经 BIOTEK EL304™平板洗涤器(Biotek Instruments, Winooski, VT)洗涤三次, 用 ELISA 封闭稀释液以 200 $\mu$ l / 孔(含有 0.5 % BSA, 0.05 % TWEEN-20™, 和 0.05 % PROCLIN™300 抗生物素, pH7.2 的 PBS)在室温轻轻摇动下封闭 1-3 小时。封闭后, 将平板用 400 $\mu$ l ELISA 洗涤缓冲液重复洗涤 3 次。然后以 100 $\mu$ l / 孔向双份孔中加入标准品, 标本, 或对照并于 37 °C 摇动保温 1.5-2 小时。为定量人血浆中的 rhVEGF165, 在 ELISA 稀释液(含有 0.5 % BSA, 0.05 % TWEEN-20™, 和 0.05 % PROCLIN™300, 5mM EDTA, 和 0.35M NaCl, pH6.3  $\pm$  0.1 的 PBS)制备标准曲线。标准曲线是由 128pg/ml 经 1: 2 系列稀释至 2pg/ml。标本 / 标准品保温后, 将平板用 400 $\mu$ l ELISA 洗涤缓冲液洗涤 6 次, 并向平板中加入 100 $\mu$ l/孔的用 ELISA 稀释液以 1: 200 新鲜稀释至理想浓度的 MAb A4.6.1-生物素。于 37 °C 摇动保温了 1.5-2 小时后, 将平板如上述洗涤 6 次, 向平板中加入 100 $\mu$ l/孔的用 ELISA 稀释液以 1: 40K 稀释的链亲和素- $\beta$ -半乳糖苷酶。于 37 °C 摇动保温了 45-60 分钟后, 将平板如上述洗涤 6 次, 向

平板中加入 100 $\mu$ l/孔的用含有 1mM MgCl<sub>2</sub> pH 7.3  $\pm$  0.1 的 0.1M NaPO<sub>4</sub> 溶液新鲜稀释至 340 $\mu$ g/ml 的 MUG/DMSO(1/100)。将底物反应 37  $^{\circ}$ C 避光摇动保温 15-17 小时(将平板用箔包裹)。加入 150 $\mu$ l/孔 pH10.5  $\pm$  0.1 的 0.15M 甘氨酸终止反应。每孔内容物的荧光单位(FSU)用 360nm 激发和 460nm 发射滤光片在 CYTOFLUOR 40000<sup>TM</sup> 荧光平板读数仪(PerSeptive Biosystems, Framingham, MA)上读取。使用四参数曲线吻合程序以产生标准曲线, 由它内推标本和对照的浓度。FSU 读数在加入 150 $\mu$ l 甘氨酸后于室温稳定至少 30 分钟。

## 2. 5. 人血浆标本

用几种方法评估准确测定人血浆中 VEGF 的能力。用 rhVEGF165 评定血浆对测定敏感性和性能的影响。将已知量的 rhVEGF165 加入每份人血浆标本中, 回收百分比判定如下: (1)从被测标本 VEGF 总量中减去从平行标本测定的标本中内源 VEGF 的量, (2)然后用“回收的” VEGF 效价除以加入标本中的 VEGF 量再乘以 100。还评定了加入每份人血浆中的 rhVEGF165 的稀释线性关系。在这些研究中, 加入 rhVEGF165 后, 将每份血浆标本用 ELISA 稀释液 1: 10 稀释后再用 ELISA 稀释液 1: 2 系列稀释。在纯净的人 EDTA 血浆(冰冻的)中制备高和低基质(标准)对照。将它们用 ELISA 稀释液以 1/10 稀释成终浓度 10 % 血浆。

测定每份人血浆标本的内源 VEGF 水平。取正常健康个体的血液加入 15 % K3 EDTA Vacutainer 试管中(Becton Dickenson, San Jose, CA)。将试管在 2000  $\times$  g 离心 20 分钟并收集血浆。将血浆标本用 ELISA 稀释液 1: 10 稀释以用于测定。同上也评定所选标本中内源 VEGF 的稀释线性关系。

## 3. 结果

### 3. 1 标本稳定性

将纯净的人 EDTA 血浆的稳定性检测三个冻-融循环。将血浆用干冰处理, 然后轻轻在温水中混合使之解冻。下面表 1 中的数据表明经冻融处理后的 VEGF 的定量无显著影响。因此, 人 EDTA 血浆对三个冻-融循环是稳定的。

表 1：正常人 EDTA 血浆的净冻-融稳定性

| 人 EDTA 血浆 | 双位点   | 多位点    |       |
|-----------|-------|--------|-------|
| 32        | 22.11 | 78.84  | 新鲜    |
|           | 25.4  | 75.16  | 1 冻-融 |
|           | 14.85 | 75.16  | 2 冻-融 |
|           | 18.88 | 72.08  | 3 冻-融 |
| 平均值       | 20.31 | 75.31  |       |
| stddev    | 4.51  | 2.77   |       |
| % CV      | 2.2   | 4      |       |
| 33        | 35.44 | 100.24 | 新鲜    |
|           | 35.87 | 101.71 | 1 冻-融 |
|           | 35.44 | 101.71 | 2 冻-融 |
|           | 39.19 | 101.71 | 3 冻-融 |
| 平均值       | 36.49 | 101.34 |       |
| stddev    | 1.81  | 0.73   |       |
| % CV      | 5     | 1      |       |
| 34        | 17.51 | 78.18  | 新鲜    |
|           | 25.03 | 94.6   | 1 冻-融 |
|           | 22.11 | 94.6   | 2 冻-融 |
|           | 24.72 | 83.95  | 3 冻-融 |
| 平均值       | 22.34 | 87.83  |       |
| stddev    | 3.48  | 8.16   |       |
| % CV      | 16    | 9      |       |
| 39        | 29.35 | 84.62  | 新鲜    |
|           | 31.11 | 81.39  | 1 冻-融 |
|           | 28.02 | 75.16  | 2 冻-融 |
|           | 31.11 | 71.51  | 3 冻-融 |
| 平均值       | 29.90 | 78.17  |       |
| stddev    | 1.50  | 5.93   |       |
| % CV      | 5     | 8      |       |
| 38        | 23.43 | 83.95  | 新鲜    |
|           | 29.94 | 80.07  | 1 冻-融 |
|           | 21.8  | 83.95  | 2 冻-融 |
|           | 24.72 | 66.84  | 3 冻-融 |
| 平均值       | 24.97 | 78.70  |       |
| stddev    | 3.52  | 8.12   |       |
| % CV      | 14    | 10     |       |
| 平均值       | 12    | 6      |       |

Stddev=标准差

CV=变异系数

### 3. 2 检测的极限

将空白, 1, 2, 4 和 8pg/ml 标准品的大约 20 个复制物, 用这里的多位点 VEGF ELISA 测定。用分析物(VEGF)浓度判定检测的极限, 其中测得 VEGF 的平均 FSU 值减 2 个标准差高于空白荧光发射(460nm)的平均 FSU 值加上 2 个标准差。表 2 中的结果表明检测的极限在 ELISA 稀释液中为 8pg/ml。由于一般将血浆标本 1: 10 稀释以使基质干扰最小化, 所以在原始标本中至少可检测到 80pg/ml 或 1.6pM VEGF。

表 2: 检测的极限(0.4μg/ml, 0.4μg/ml)

| 复制品   | 标准<br>0 pg/ml | 标准<br>1 pg/ml | 标准<br>2 pg/ml | 标准<br>4 pg/ml | 标准<br>8 pg/ml |
|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|       | FSUs          | FSUs          | FSUs          | FSUs          | FSUs          |
| 1     | 1103          | 1277          | 1351          | 1546          | 2216          |
| 2     | 1091          | 1382          | 1359          | 1617          | 2292          |
| 3     | 1103          | 1336          | 1413          | 1745          | 2241          |
| 4     | 1180          | 1328          | 1986          | 1770          | 2266          |
| 5     | 1235          | 1321          | 1382          | 1654          | 2216          |
| 6     | 1135          | 1382          | 1631          | 1735          | 2216          |
| 7     | 1180          | 1306          | 1328          | 1692          | 2266          |
| 8     | 1154          | 1125          | 1512          | 1654          | 2241          |
| 9     | 1079          | 1351          | 1366          | 1682          | 2279          |
| 10    | 1129          | 1559          | 1529          | 1678          | 2384          |
| 11    | 1129          | 1314          | 1445          | 1654          | 2266          |
| 12    | 1263          | 1413          | 1299          | 1617          | 2228          |
| 13    | 1079          | 1382          | 1336          | 1631          | 2216          |
| 14    | 1235          | 1284          | 1851          | 1716          | 2565          |
| 15    | 1135          | ---           | 1711          | 1780          | 2266          |
| 16    | 1129          | ---           | 1590          | 2077          | 2266          |
| 17    | 1017          | ---           | 1445          | 1654          | 2279          |
| 18    | 1351          | ---           | 1445          | 1740          | 2371          |
| 19    | 1079          | ---           | 1546          | 1599          | 2318          |
| 20    | 2025          | ---           | 1626          | 1663          | 2228          |
| 均值    | 1192          | 1340          | 1508          | 1695          | 2281          |
| 标准差   | 211           | 94            | 183           | 108           | 82            |
| +1 SD | 1402          | 1434          | 1690          | 1803          | 2363          |
| +2 SD | 1613          | 1528          | 1873          | 1911          | 2445          |
| -1 SD | 981           | 1246          | 1325          | 1587          | 2199          |
| -2 SD | 770           | 1152          | 1142          | 1479          | 2117          |

3. 3 抗 VEGF PAb 的检验和制备

将从同一兔中纯化的但是不同次抽血的抗 rhVEGF 兔多克隆抗体的两种不同制剂在测定中对比，用 MAb 3.5F8 作为单克隆抗体，并用 0.4μg/ml 的每种类型抗体。结果，如图 1 中显示，表明两种抗体都适于应用。

将兔多克隆抗体用甘氨酸洗脱，然后用胍洗脱，所得抗体用于本文优选条件下的测定中。图 2 和表 3 中的结果表明这两种洗脱方法无显著性差异。但是，甘氨酸洗脱似乎稍微敏感一些。正常人 EDTA 血浆标本以及高和低基质对照的对比表现出在两种制剂中相似的定量。胍峰比甘氨酸峰更紧密结合 VEGF。

表 3：以甘氨酸和胍作为洗脱剂的对比

| 正常人 EDTA 血浆 | PAb(甘氨酸)+Mabs<br>3.5F8/A4.6.1<br>(pg/ml) | PAb(胍)+Mabs<br>3.5F8/A4.6.1<br>(pg/ml) | %<br>回收 |
|-------------|------------------------------------------|----------------------------------------|---------|
| 1           | 37                                       | 48                                     | 77      |
| 2           | 41                                       | 34                                     | 123     |
| 3           | 112                                      | 90                                     | 124     |
| 4           | 79                                       | 62                                     | 128     |
| 5           | 49                                       | 36                                     | 136     |
| 6           | 40                                       | 57                                     | 71      |
| 7           | 59                                       | 45                                     | 132     |
| 8           | 35                                       | 31                                     | 116     |
| High Mat    | 99                                       | 102                                    | 97      |
| Low Mat     | 9                                        | 8                                      | 115     |
| 平均回收率 % 112 |                                          |                                        |         |

3. 4 robustness/ruggedness

用 ANOVA 统计分析评价低和高基质对照在测定组间和测定组内的精确性。在测定范围内以低浓度和高浓度将 rhVEGF 掺入纯净的人 EDTA 血浆来制备基质对照。结果显示测定组间变异(CV)范围为 11-17 % 而测定组内变异范围为 8-14 %。数据总结如表 4。

表 4： 基质对照的可重复性

| 试验名称    | 高(pg/ml)   | 低(pg/ml)   |
|---------|------------|------------|
| kn324p2 | 107.5      | 6.8        |
| kn324p2 | 111.2      | 11.6       |
| kn324p3 | 93.8       | 10.4       |
| kn324p3 | 96.7       | 11.2       |
| kn320p7 | 103.6      | 13.7       |
| kn320p7 | 103.6      | 13.7       |
| kn320p8 | 99.7       | 14.3       |
| kn320p8 | 102.0      | 14.7       |
| kn322p2 | 110.6      | 13.3       |
| kn322p2 | 102.0      | ---        |
| kn322p3 | 97.0       | 14.4       |
| kn322p3 | 103.9      | 13.9       |
| kn322p1 | 99.0       | 12.0       |
| kn322p1 | 95.2       | 12.3       |
| kn320p3 | 101.1      | 15.3       |
| kn320p3 | 98.0       | 14.5       |
| kn320p2 | 105.1      | 14.9       |
| kn320p2 | 100.5      | 14.2       |
| kn320p1 | 106.0      | 14.1       |
| kn320p1 | 103.4      | 13.9       |
| kn319p2 | 87.1       | 10.2       |
| kn319p2 | 100.2      | 9.3        |
| kn319p1 | 97.6       | 9.4        |
| kn319p1 | 99.6       | 9.1        |
| kn316p1 | 92.4       | 11.7       |
| kn316p1 | 97.9       | 11.3       |
| kn313p1 | 117.8      | 18.8       |
| kn313p1 | 111.4      | 16.2       |
| kn212p2 | 92.4       | 14.6       |
| kn212p2 | 92.4       | 15.7       |
| kn311p1 | 123.9      | 14.2       |
| kn212p1 | 103.8      | 13.9       |
| kn212p1 | 93.2       | 13.7       |
| kn331p1 | 106.2      | 12.9       |
| kn331p1 | 109.2      | 13.3       |
| kn331p2 | 99.8       | 11.9       |
| 基质对照    | 测定组内(% CV) | 测定组间(% CV) |
| 低       | 14.0       | 11.0       |
| 高       | 8.0        | 17.0       |

### 3. 5 hook 效应

过去几种标本在增加标本稀释度时已经表现出与测定的 VEGF 增加呈非线性关系。因此, 测试这里的多位点 ELISA 的 hook 效应(用单位点和双位点 ELISA 并行对照)。用测定缓冲液将 rhVEGF 从 16ng/ml 稀释成 1pg/ml。结果(如图 3 描绘)显示 VEGF 定量没有显著降低。但是, 从 512pg/ml 开始可看到轻微降低和平台效应。因为在本文所述的多位点 ELISA 测定中使用的标本稀释产生的浓度小于 128pg/ml, 所以 hook 效应不必考虑。

### 3. 6 包被最大量

判断包被最大量的方法除了 Pab 或 MAb 3.5F8 包被浓度改变外与上面方法部分描述的相同。具体地, 图 4 中将 MAb 3.5F8 的浓度从 0.4 改变至 4 $\mu$ g/ml 而保持多克隆抗体的浓度不变(0.1 $\mu$ g/ml), 图 5 和表 5 中多克隆抗体的浓度从 0.4 变化至 4 $\mu$ g/ml 而保持 MAb 3.5F8 的浓度不变(0.4 $\mu$ g/ml)。

当对于低和高对照 VEGF 定量中 MAb 3.5F8 和 PAb 基本恒定在浓度 0.1 和 0.4 $\mu$ g/ml 而其他包被抗体的浓度不变时, 优选包被浓度的上限(例如 0.4 $\mu$ g/ml)以增加捕捉 VEGF 的机会。在每例中 MAb 3.5F8 和 PAb 的浓度为 1 $\mu$ g/ml 时增加了测定的 VEGF 的量, 但此浓度也产生较高的背景。因此, 结果表明两种包被试剂的优选浓度约为 0.4 $\mu$ g/ml。

表 5: 多克隆抗体加 MAb 3.5F8 的包被最大量

|            |                |                |                |                |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Mab 3.5F8  | 0.4 $\mu$ g/ml | 0.4 $\mu$ g/ml | 0.4 $\mu$ g/ml | 0.4 $\mu$ g/ml |
| PAb        | 0 $\mu$ g/ml   | 0.4 $\mu$ g/ml | 0.1 $\mu$ g/ml | 0              |
| 高基质(pg/ml) | 100.4          | 89.3           | 94.0           | 97.3           |
| 低基质(pg/ml) | 22.4           | 9.7            | 10.1           | 5.4            |
|            |                |                |                |                |
| 8 个不同      | 97.3           | 33.5           | 42.5           | 10.7           |
| 正常人血       | 202.5          | 106.5          | 77.0           | 19.7           |
| 浆供体(pg/ml) | 162.3          | 52.9           | 59.0           | 26.8           |
|            | 92.0           | 27.5           | 29.8           | 11.1           |
|            | 115.6          | 41.4           | 42.5           | 11.0           |
|            | 202.5          | 70.8           | 69.7           | 15.8           |
|            | 409.9          | 196.6          | 207.9          | 94.9           |
|            | 512.1          | 25.7           | 275.0          | 113.0          |

### 3. 7 多位点 VEGF ELISA 的 pH 图谱

进行 pH 作图以判定改变测定缓冲液的 pH 是否增加或减少正常人 EDTA 血浆中 VEGF 的回收。改变 pH 能离解结合蛋白或其他复合物，如果存在这样的复合物，它将干扰 MAb A4.6.1 检测。

检查所述测定的 pH 图谱的方法除了标本保温和生物素保温时，将测定缓冲液用 NaOH 或 HCl 调节使测定缓冲液 pH 范围为 pH4 至 9 以外，与上面方法部分中描述的相同。将标准曲线，低和高基质，和四份正常人 EDTA 血浆标本用这些改变 pH 的测定缓冲液进行稀释后评定。

图 6 和表 6 的结果显示 pH4 和 5 时没有 VEGF 的回收。但是，在可接受范围内测定对照组于 pH6-9 出现良好的 VEGF 血浆回收。测定缓冲液的 pH 从 6-9 变化时 VEGF 定量没有显著差异。但是，优选的测定缓冲液是 pH 约为  $6.35 \pm 0.1$  者，其导致 VEGF 的最大量结合并适合于测定中的所有稀释步骤。

表 6：正常人 EDTA 血浆在改变 pH 时的 VEGF 回收

| pH          | 4   | 5   | 6     | 7     | 8     | 9     |
|-------------|-----|-----|-------|-------|-------|-------|
| 正常人 EDTA 血浆 |     |     | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml |
| 1           | --- | --- | 198.9 | 122.0 | 173.3 | 204.0 |
| 2           | --- | --- | 141.4 | 81.7  | 138.7 | 138.6 |
| 3           | --- | --- | 240.7 | 150.3 | 220.9 | 243.5 |
| 4           | --- | --- | 112.2 | 113.2 | 176.7 | 190.3 |
| 对照          |     |     | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml |
| 高基质         | --- | --- | 104.5 | 105.0 | 93.8  | 124.0 |
| 低基质         | --- | --- | 25.7  | 25.1  | 19.7  | 16.9  |

### 3. 8 稀释线性关系

将大约 85pg/ml rhVEGF 掺入纯净的人 EDTA 血浆中，系列稀释成 1/10，1/20，1/40 和 1/80 并分析。结果，如表 7 和图 7，显示掺入 EDTA 血浆的 rhVEGF 表现出与预期浓度线性相关，相关系数为 0.996。经测定，连续系列稀释的稀释校正浓度值之间差异百分率不超过  $19\% \pm 7.5$  的均值，如表 7 所示。

表 7: 正常人 EDTA 血浆的稀释线性关系

| 正常人 EDTA<br>血浆(标本) | 测定的<br>pg/ml | 稀释度 | 校正的浓度 | % 差异 |
|--------------------|--------------|-----|-------|------|
| S1                 | 103          | 10  | 1026  | ---  |
|                    | 62           | 20  | 1237  | 21   |
|                    | 35           | 40  | 1416  | 14   |
|                    | 20           | 80  | 1599  | 13   |
| S2                 | 109          | 10  | 1088  | ---  |
|                    | 59           | 20  | 1176  | 8    |
|                    | 35           | 40  | 1416  | 20   |
|                    | 22           | 80  | 1788  | 26   |
| S3                 | 104          | 10  | 1039  | ---  |
|                    | 60           | 20  | 1202  | 16   |
|                    | 32           | 40  | 1278  | 6    |
|                    | 21           | 80  | 1677  | 31   |
| S4                 | 88           | 10  | 878   | ---  |
|                    | 52           | 20  | 1036  | 18   |
|                    | 32           | 40  | 1278  | 23   |
|                    | 19           | 80  | 1528  | 20   |
| S5                 | 93           | 10  | 926   | ---  |
|                    | 57           | 20  | 1136  | 23   |
|                    | 32           | 40  | 1278  | 12   |
|                    | 18           | 80  | 1433  | 12   |
| S6                 | 119          | 10  | 1192  | ---  |
|                    | 81           | 20  | 1612  | 35   |
|                    | 47           | 40  | 1893  | 17   |
|                    | 29           | 80  | 2298  | 21   |

### 3. 9 人血浆中 VEGF 的准确-定量

在从几个正常健康个体新鲜收集的血浆中测定内源 VEGF 水平。在个体人 EDTA 血浆标本中掺入最低, 低, 中, 和高浓度的 rhVEGF 以落入标准曲线的测定范围。判定内源 VEGF 的浓度并且从所测定的浓度中减去之以获得

与靶掺入的对比。表 8 中的结果显示高，中，低，和较低掺入的平均回收 % 分别为 99%，113%，106% 和 118%。

表 8: 人 EDTA 血浆中 rhVEGF 的掺入回收

|      | [内源的]<br>pg/ml | [测定的]<br>pg/ml | [测定的内源的]<br>pg/ml | [靶]<br>pg/ml | %<br>回收 |
|------|----------------|----------------|-------------------|--------------|---------|
| 高掺入  | 18.6           | 100.5          | 81.9              | 85.3         | 96      |
|      | 22.5           | 114.8          | 92.3              | 85.3         | 108     |
|      | 30.3           | 111.0          | 80.8              | 85.3         | 95      |
|      | 22.8           | 96.2           | 73.4              | 85.3         | 86      |
|      | 18.4           | 103.2          | 84.9              | 85.3         | 100     |
|      | 34.1           | 121.1          | 87.0              | 85.3         | 102     |
|      | 平均回收 %         |                |                   |              | 99      |
| 中掺入  | 21.0           | 98.3           | 47.1              | 49.3         | 96      |
|      | 9.1            | 89.1           | 80.1              | 49.3         | 162     |
|      | 10.8           | 66.8           | 55.9              | 49.3         | 113     |
|      | 21.0           | 59.5           | 38.5              | 49.3         | 78      |
|      | 9.1            | 66.8           | 57.8              | 49.3         | 117     |
|      | 平均回收 %         |                |                   |              | 113     |
| 低掺入  | 4.5            | 32.9           | 28.4              | 22.9         | 124     |
|      | 10.0           | 32.9           | 22.9              | 22.9         | 100     |
|      | 14.9           | 38.3           | 23.4              | 22.9         | 102     |
|      | 8.6            | 31.2           | 22.6              | 22.9         | 99      |
|      | 9.3            | 33.7           | 24.4              | 22.9         | 107     |
|      | 15.9           | 40.9           | 25.0              | 23.5         | 106     |
|      | 36.2           | 58.8           | 22.6              | 23.5         | 96      |
|      | 38.9           | 66.4           | 27.5              | 23.5         | 117     |
|      | 平均回收 %         |                |                   |              | 106     |
| 更低掺入 | 4.3            | 24.9           | 20.2              | 17.8         | 114     |
|      | 4.6            | 26.1           | 21.5              | 17.8         | 120     |
|      | 7.4            | 27.9           | 20.4              | 17.8         | 114     |
|      | 6.6            | 26.4           | 19.9              | 17.8         | 111     |
|      | 10.8           | 33.1           | 22.2              | 17.8         | 124     |
|      | 5.5            | 29.6           | 24.0              | 17.8         | 135     |
|      | 3.9            | 22.7           | 18.6              | 17.8         | 105     |
|      | 平均回收 %         |                |                   |              | 118     |

\*0.4μg/ml Mab 3.5F8+0.4μg/ml PAb 包被

### 3. 10 正常大鼠 EDTA 血浆中 VEGF 的精确-定量

在一个个体和两个混合的雄性大鼠 EDTA 血浆标本中掺入低, 中, 和高浓度的 rhVEGF 以达到标准曲线的测定范围。判定内源 VEGF 的浓度并且从所测定的浓度中减去以获得与靶掺入物(稀释对照)的对比。然后将掺入物用 ELISA 稀释液 1: 2 稀释以判定稀释线性关系。表 9 中结果显示高于 6.25pg/ml 的高, 中, 和低掺入的平均回收百分率范围从 84-103 %。

表 9: 正常大鼠 EDTA 血浆中 VEGF 掺入物的回收

| [预期的]         | [测定的]                  |      | [测定的]                  |      | [测定的]           |      |        |
|---------------|------------------------|------|------------------------|------|-----------------|------|--------|
| 稀释对照<br>pg/ml | 雄性大鼠混合<br>血浆<br>1pg/ml | 回收 % | 雄性大鼠混合<br>血浆<br>2pg/ml | 回收 % | 个体雄性大鼠<br>pg/ml | 回收 % | 平均回收 % |
| <u>高掺入</u>    |                        |      |                        |      |                 |      |        |
| 151           | 160                    | 106  | 155                    | 103  | 148             | 98   | 103    |
| 98            | 106                    | 109  | 85                     | 87   | 92              | 95   | 97     |
| 53            | 58                     | 109  | 43                     | 81   | 43              | 82   | 91     |
| 24            | 25                     | 105  | 15                     | 61   | 18              | 76   | 81     |
| <u>中掺入</u>    |                        |      |                        |      |                 |      |        |
| 44            | 41                     | 94   | 40                     | 92   | 39              | 89   | 92     |
| 22            | 27                     | 125  | 20                     | 93   | 16              | 71   | 96     |
| 11            | 13                     | 115  | 7                      | 66   | 7               | 65   | 82     |
| 5             | 5                      | 104  | 0                      | 0    | 1               | 15   | 40     |
| <u>低掺入</u>    |                        |      |                        |      |                 |      |        |
| 20            | 18                     | 88   | 19                     | 93   | 12              | 62   | 81     |
| 10            | 14                     | 135  | 9                      | 86   | 6               | 63   | 95     |
| 6             | 6                      | 102  | 1                      | 18   | 0               | 0    | 40     |
| 3             | 2                      | 52   | 0                      | 0    | 0               | -    | 26     |
| <u>较低掺入</u>   |                        |      |                        |      |                 |      |        |
| 10            | 10                     | 98   | 8                      | 76   | 5               | 49   | 74     |
| 5             | 8                      | 149  | 3                      | 47   | 2               | 42   | 79     |
| 4             | 8                      | 202  | 0                      | 0    | 0               | 0    | 67     |
| 内源的           | LTS                    |      | 43                     |      | 39              |      |        |

### 3. 11 正常大鼠 EDTA 血浆用 ELISA 稀释的线性关系

测定大鼠 EDTA 血浆(2 份雄性混合血浆, 1 个体)的稀释的线性关系。在纯净的血浆标本中掺入低(20pg/ml), 中(44pg/ml), 和高浓度(98 pg/ml)的 rhVEGF 并用 ELISA 稀释液进行 1/10, 1/20, 1/40 和 1/80 系列稀释。表 10 和图 8A-8C 中的结果显示在测定范围 8-128pg/ml 内, 自最低限 1 / 20 稀释开始, 正常大鼠血浆标本被线性稀释。

表 10: 大鼠血浆标本线性关系总结(相关系数为单位(R))

| 掺入 | 大鼠混合血浆 1 | 大鼠混合血浆 2 | 大鼠 1  | 平均 R 值 |
|----|----------|----------|-------|--------|
| 高  | 0.996    | 0.996    | 0.999 | 0.997  |
| 中  | 1        | 0.999    | 0.994 | 0.998  |
| 低  | 0.929    | 0.993    | 0.98  | 0.967  |

### 3. 12 正常 Yorkshire 猪 EDTA 血浆中 VEGF 的准确-定量

在八个 Yorkshire 猪(四个雄性和四个雌性)的 EDTA 血浆标本中掺入最低, 低, 中, 和高浓度的 rhVEGF 以致达到标准曲线的测定范围。判定内源 VEGF 的浓度并且从所测定的浓度中减去它以获得与靶掺入(稀释对照)的对比。然后将掺入物用 ELISA 稀释液 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 稀释以判定稀释线性关系。图 9A(雌性)和图 9B(雄性)以及表 11 中的结果显示在测定范围 8-128pg/ml 内, 自最低限 1/20 稀释开始, 正常 Yorkshire 猪血浆标本被线性稀释。

表 11: Yorkshire 猪标本的线性关系总结

| 性别   | 相关系数(R)    |
|------|------------|
| 雌性   | 0.99718    |
| 雌性   | 0.99917    |
| 雌性   | 0.99998    |
| 雌性   | 0.99958    |
| 雄性   | 1          |
| 雄性   | 0.99965    |
| 雄性   | 0.99995    |
| 雄性   | 0.99961    |
| 均值   | 0.99939    |
| s.d. | 0.00093491 |
| % CV | 0.094      |

### 3. 13 用三种 ELISA 检测各种类型的 VEGF

设计本试验以判定是否这里的多位点 ELISA 可以测定所有 VEGF 变体。图 10A， 10B， 和 10C 分别显示 VEGF 的单位点， 双位点和多位点 ELISA 的对比。通过对比这些图可以看出这里的多位点测定能够捕捉更多的 VEGF 变体。

### 3. 14 用双位点， 多位点， 或 PAb 作包被进行检测

对比这里使用 PAb 和 MAb3.5F8 作为包被抗体的多位点 ELISA 与仅使用 MAb3.5F8 或 PAb 作为包被抗体的 ELISA 以评价正常人标本中 VEGF 的量。表 12 列出的结果显示在多位点测定中检测到的 pg/ml 水平的 VEGF 量远高于用 PAb 单独或 MAb3.5F8 单独测定的量。

表 12：在正常人血浆标本中用 PAb 单独，MAb 单独，或 PAb 加 MAb 测定的 VEGF 的量

| NHP 标本号 | 捕捉试剂                     |                              |                                          |
|---------|--------------------------|------------------------------|------------------------------------------|
|         | Mab 3.5F8<br>(平均值 pg/ml) | 抗 VEGF 的 PAb (平均<br>值 pg/ml) | 抗 VEGF 的 PAb<br>Mab 3.5F8<br>(平均值 pg/ml) |
| 1       | 49                       | 173                          | 225                                      |
| 2       | 26                       | LTS                          | 149                                      |
| 3       | 39                       | 124                          | 211                                      |
| 4       | 41                       | 103                          | 189                                      |
| 5       | 27                       | LTS                          | 153                                      |
| 6       | 29                       | LTS                          | 149                                      |
| 7       | 16                       | LTS                          | 159                                      |
| 8       | 25                       | LTS                          | 144                                      |
| 9       | 21                       | LTS                          | 122                                      |
| 10      | 36                       | 148                          | 185                                      |
| 11      | 24                       | 72                           | 171                                      |
| 12      | 23                       | LTS                          | 145                                      |
| 13      | 40                       | 103                          | 200                                      |
| 14      | 34                       | 83                           | 143                                      |
| 15      | 42                       | LTS                          | 200                                      |
| 16      | 20                       | 85                           | 152                                      |
| 17      | 51                       | 196                          | 285                                      |
| 18      | 25                       | LTS                          | 145                                      |
| 19      | 20                       | LTS                          | 154                                      |
| 20      | 20                       | LTS                          | 143                                      |
| 21      | 23                       | LTS                          | 155                                      |
| 22      | 28                       | 77                           | 163                                      |
| 23      | 39                       | 180                          | 285                                      |
| 24      | 24                       | 87                           | 168                                      |
| 25      | 45                       | 148                          | 261                                      |
| 26      | 21                       | 131                          | 179                                      |
| 27      | 34                       | LTS                          | 189                                      |
| 28      | 18                       | LTS                          | 131                                      |
| 29      | 50                       | 159                          | 251                                      |
| 30      | 73                       | LTS                          | 359                                      |
| 31      | 21                       | 85                           | 149                                      |
| 32      | 42                       | 214                          | 237                                      |
| 33      | 33                       | LTS                          | 234                                      |
| 34      | 30                       | 152                          | 206                                      |
| 35      | 21                       | 87                           | 154                                      |
| 36      | 76                       | 307                          | 445                                      |
| 37      | 28                       | 70                           | 225                                      |
| 38      | 53                       | 51                           | 304                                      |
| 39      | 32                       | 84                           | 193                                      |
| 40      | 28                       | LTS                          | 106                                      |
| 41      | 44                       | 105                          | 275                                      |
| 42      | 32                       | 44                           | 217                                      |
| 43      | 28                       | 69                           | 197                                      |
| 44      | 25                       | LTS                          | 69                                       |
| 45      | 50                       | 114                          | 285                                      |
| 46      | 28                       | 38                           | 176                                      |
| 47      | 21                       | 67                           | 125                                      |
| 48      | 28                       | 27                           | 192                                      |
| 49      | 29                       | LTS                          | 159                                      |
| 50      | 18                       | 27                           | 107                                      |

LTS=未检测到

### 3. 15 用双位点和多位点 ELISAs 测定的正常人血浆和正常人血清中的 VEGF 水平的对比

将来自正常人类供体的血浆和血清标本用 MAb 3.5F8 作为捕捉抗体和 PAb A4.6.1 作为检测抗体的双位点 ELISA 以及用 PAb 和 Mabs 的本文所述多位点测定分析, 方法如方法部分所述。图 11A 和图 11B 分别总结血浆和血清的结果, 表明在两类标本中本文所述多位点测定比双位点测定可检测更多的 VEGF。

### 3. 16 用单位点, 双位点, 和多位点 ELISAs 测定的正常人和心脏病患者的 VEGF 水平对比

由 Genentech, Inc. 赞助了为评价 TNK, 一种 t-PA 变体的效率而进行的临床试验, 来自正常人供体和来自上述临床试验中登记的患心脏病供体的标本用 MAb3.5F8 作为包被和检测试剂进行单位点 ELISA, 用 Mab 3.5F8 作为捕获抗体, MAb A4.6.1 作为检测抗体进行双位点 ELISA 分析, 或用 PAb 和 Mabs 及方法章节所述方法进行本文所述多位点测定。图 12 显示用所有三种试验所测定的心脏病患者中血浆 VEGF 的量, 图 13 和表 13 通过 VEGF 的平均值, 标准差, % CV 和 s.e.m. 总结了用双位点和多位点试验测定的正常人和心脏病患者血浆 VEGF 的量。结果显示在两种类型标本中用本文所述多位点测定比双位点测定检测到更多 VEGF。

表 13: 对正常人和心脏病患者中 VEGF 的双位点和多位点测定的敏感性

|               | 正常供体  |        | 心脏病患者 |        |
|---------------|-------|--------|-------|--------|
|               | 双位点   | 多位点    | 双位点   | 多位点    |
| 均值 pg/ml      | 32.61 | 192.40 | 37.54 | 279.23 |
| s.d.          | 13.05 | 67.66  | 23.89 | 156.69 |
| % CV          | 40.02 | 35.17  | 63.65 | 56.11  |
| s.e.m.(标准误均值) | 1.84  | 9.56   | 5.34  | 35     |

### 3. 17 用双位点和多位点 ELISAs 测定的肺癌患者血清 VEGF 水平的对比

将来自非小细胞肺癌患者的血清标本用 MAb3.5F8 作为捕获抗体和 MAb A4.6.1 作为检测抗体的双位点 ELISA, 和用 PAb 和 Mabs 的本文所述多

位点测定和方法部分所述方法进行分析。图 14 展示的结果表明在肺癌标本中本文所述多位点测定比双位点测定可检测到更多的 VEGF。

3. 18 糖尿病患者的血清 VEGF 水平

用上面描述的双位点 ELISA(MAb3.5F8 作为包被试剂和 MAb A4.6.1 作为检测试剂)测定正常人和 NIDDM( I 型糖尿病)及 IDDM( II 型糖尿病)患者的血清 VEGF 水平。图 15 显示, 用此测定时, NIDDM 和 IDDM 患者血清 VEGF 水平高于正常人。因为在其他疾病患者中多位点测定比双位点测定可检测到更多的 VEGF, 所以预期本文所述多位点测定适合于检测糖尿病患者体内升高的 VEGF 水平。

3. 19 在多位点测定中抗 VEGF PAb 相对于抗 DNA 酶的 PAb 的特异性

如上述进行正常人血浆标本的双位点和多位点 ELISA。此外, 用抗 DNA 酶的 PAb 而不是抗 VEGF 的 PAb 作为包被试剂进行多位点测定。都是 0.4μg/ml 的浓度。图 16 和表 14 显示用多位点 VEGF 测定检测的 VEGF 是特异的。用抗 DNA 酶的 PAb 加上 MAb3.5F8 进行的 ELISA 结果显示几乎与单独用 MAb3.5F8 作为捕捉试剂的 ELISA 结果相同, 其斜率为 1.04(图 16A)。

表 14: 评价人 EDTA 血浆的 VEGF 量

| 人 EDTA 血浆  | MAb 3.5F8<br>(0.4μg/ml) | 抗 VEGF 的 PAb<br>(0.4μg/ml)和 MAb<br>3.5F8(0.4μg/ml) | 抗 DNA 酶的 PAb<br>(0.4μg/ml)和 MAb<br>3.5F8(0.4μg/ml) |
|------------|-------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 高基质(pg/ml) | 147.9                   | 147.4                                              | 119.2                                              |
| 低基质(pg/ml) | 12.8                    | 18.3                                               | 12.5                                               |
| 7 个不同      | 61.1                    | 164.0                                              | 59.5                                               |
| 正常人血浆      | 33.8                    | 120.4                                              | 48.4                                               |
| 供体(pg/ml)  | 34.6                    | 174.3                                              | 64.5                                               |
|            | 47.4                    | 104.5                                              | 102.1                                              |
|            | 28.3                    | 70.4                                               | 79.6                                               |
|            | 67.6                    | 113.0                                              | 71.8                                               |
|            | 61.1                    | 105.9                                              | 65.4                                               |

## 3. 20 优选的测定和结果的总结

|                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 测定的类型                              | 免疫测定(荧光 ELISA): 鼠抗-VEGF 单克隆抗体(MAb3.5F8)和兔亲和纯化的多克隆抗体作捕捉试剂, 抗-VEGF 单克隆抗体(MAbA4.6.1)作为检测试剂。                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 标准品                                | rhVEGF 参考物质 VEGF 或等效物。标准曲线用 ELISA 稀释液稀释:<br>PBS/0.5 % BSA/0.05 % Polysorbate 20/0.05 %<br>PROCLIN™300/5mM EDTA/0.35M NaCl, pH6.35 ± 0.1                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 合格的种属                              | 人, 大鼠, Yorkshire 猪                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 生物基质                               | 血清, EDTA 血浆,<br>ELISA 稀释液 = 稀释缓冲液                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 测定范围                               | ELISA 稀释液中 1-128pg/ml                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 生物基质中的定量范围<br>可定量浓度最低限<br>可定量浓度最高限 | 对人血清和 EDTA 血浆为 80pg/ml 至 1280pg/ml(1/10 最低限稀释)<br>对 Yorkshire 猪 EDTA 血浆为 240pg/ml 至 850pg/ml (1/20 最低限稀释)<br>在此范围内仅在大约 60 % 的 % CV 时有报道内源 VEGF 量低至 120pg/ml<br>对大鼠 EDTA 血浆为 80pg/ml 至 1280pg/ml                                                                                                                                                                                                       |
| 人 EDTA 血浆中的测定组内精确性                 | 低 14 % 高 8 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 人 EDTA 血浆中的测定组间精确性                 | 低 11 % 高 8 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 准确性                                | 在六个正常人 EDTA 血浆标本中掺入高, 中, 低浓度的 rhVEGF, 平均回收 % 为:<br>低 中等 高<br>106 % 113 % 99 %<br>在 4 个正常人血清标本中掺入高浓度的 rhVEGF, 平均回收 % 为:<br>高 113 %<br>在 3 个大鼠 EDTA 血浆标本中掺入高, 中, 低浓度的 rhVEGF, 定量范围内平均回收 % 为:<br>低 中等 高<br>82 % 91 % 99 %<br>在四个雌性和四个雄性 Yorkshire 猪 EDTA 血浆标本中掺入高, 中, 低浓度的 rhVEGF, 据报道 rhVEGF 定量低于 12pg/ml(所测定的内源 VEGF), 仅供参考(平均回收 % 在低于 12pg/ml 时大约为 60 %). 在定量范围内平均回收 % 为:<br>低 中等 高<br>n/a 86 % 107 % |

|                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|----------|----|----------------------------------|-------|----------------------------------|---|----------|----|----|---|-------|-------|---|---|-------|-------|---|---|-------|-------|---|---|----------|----|---|---|-------|
| 特异性                       | 将 rhVEGF, IGF, TNF NGF, hGH, IFN, Ilbllla, rhuMAb VEGF, 抗-VEGF MAb 3.5F8 掺入人 EDTA 血浆中。在内源 VEGF 血清水平以上仅 rhVEGF 掺入是可测量值。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 线性关系和干扰                   | <p>将 rhVEGF 掺入六个不同正常人 EDTA 血浆标本。将标本连续 1/2 稀释以包括标准曲线的范围。每个标本进行四次稀释。将获得的 rhVEGF 值对 1/稀释度绘图并且计算线性回归分析的相关系数 (<math>R^2</math>)。在标准曲线范围内标本是线性的。</p> <table><tr><td>n</td><td>平均 <math>R^2</math></td><td>SD</td></tr><tr><td>6</td><td>0.996</td><td>0.005</td></tr></table> <p>将 rhVEGF 以高, 中, 低浓度掺入三个大鼠 EDTA 血浆标本。在高和中等定量范围内标本是线性的。</p> <table><tr><td>n</td><td>平均 <math>R^2</math></td><td>SD</td><td>掺入</td></tr><tr><td>3</td><td>0.998</td><td>0.002</td><td>高</td></tr><tr><td>3</td><td>0.998</td><td>0.003</td><td>中</td></tr><tr><td>3</td><td>0.967</td><td>0.034</td><td>低</td></tr></table> <p>将 rhVEGF 掺入 8 个猪 EDTA 血浆标本并将标本连续 1/2 稀释以包括标准曲线的范围。每个标本进行四次稀释。在标准曲线范围内标本是线性的。</p> <table><tr><td>n</td><td>平均 <math>R^2</math></td><td>SD</td></tr><tr><td>8</td><td>1</td><td>0.001</td></tr></table> | n     | 平均 $R^2$ | SD | 6                                | 0.996 | 0.005                            | n | 平均 $R^2$ | SD | 掺入 | 3 | 0.998 | 0.002 | 高 | 3 | 0.998 | 0.003 | 中 | 3 | 0.967 | 0.034 | 低 | n | 平均 $R^2$ | SD | 8 | 1 | 0.001 |
| n                         | 平均 $R^2$                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | SD    |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 6                         | 0.996                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0.005 |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| n                         | 平均 $R^2$                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | SD    | 掺入       |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 3                         | 0.998                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0.002 | 高        |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 3                         | 0.998                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0.003 | 中        |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 3                         | 0.967                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0.034 | 低        |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| n                         | 平均 $R^2$                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | SD    |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 8                         | 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 0.001 |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 标本稳定性                     | <p>测试 5 正常 EDTA 血浆标本的冻-融稳定性。人 EDTA 血浆标本对 3 个冻-融循环稳定。</p> <p>平均回收 %:</p> <table><tr><td>1X</td><td>101 %</td></tr><tr><td>2X</td><td>101 %</td></tr><tr><td>3X</td><td>93 %</td></tr></table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1X    | 101 %    | 2X | 101 %                            | 3X    | 93 %                             |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 1X                        | 101 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 2X                        | 101 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 3X                        | 93 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| RUGGEDNESS/<br>ROBUSTNESS | <p>PH 作图显示多位点测定可耐受 pH6-9。在 pH4 和 5 时不能对 rhVEGF 定量。</p> <p>标本保温 1.5 和 16 小时对标本定量无影响。(对照回收中的差异 %: H 对照 19 %, L 对照 16 %)。测定在室温下进行。</p> <p>在人血浆和血清标本的 VEGF 定量中保温温度无影响(1 小时与 37 °C 过夜)。平均回收 %:</p> <table><tr><td>1 小时</td><td>过夜</td></tr><tr><td>血清</td><td>113 %                      121 %</td></tr><tr><td>血浆</td><td>115 %                      113 %</td></tr></table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1 小时  | 过夜       | 血清 | 113 %                      121 % | 血浆    | 115 %                      113 % |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 1 小时                      | 过夜                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 血清                        | 113 %                      121 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 血浆                        | 115 %                      113 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 测定的可接受性<br>基质对照           | Westgard Multi-rules. 平均数 $\pm$ 2SD(对于低对照为 30 % CV)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 缓冲液对照                     | n/a                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 标准曲线:                     | >0.994                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 相关系数                      | <10 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 精确性(% CV)                 | <20 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 准确性(% 差异)                 | <20 % CV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 回归参数                      | 各稀释度之间<20 % 差异                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 标本                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |
| 具体评价                      | <p>含有 rhuMAb VEGF 的标本会干扰 VEGF 定量的准确性。</p> <p>测试了多种标本以改善内源 VEGF(欲从可能的结合蛋白上释放 VEGF)的标本线性关系。从 0.5-1.5M 增加 NaCl 的量与改变 pH 值相结合并加入甘氨酸或 KSCN(预处理)或加热灭活均不改善稀释线性关系或增加测定的 VEGF。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |       |          |    |                                  |       |                                  |   |          |    |    |   |       |       |   |   |       |       |   |   |       |       |   |   |          |    |   |   |       |

#### 4. 讨论

已知正常个体在生长, 妊娠, 和老化或病理生理疾病状态中 VEGF 的水平或循环形式知之甚少。这里描述了能测定 VEGF 的各种同工型和它们在人血浆中水平的敏感, 高通量测定的开发和特点。此测定代表在正常个体和多种疾病状态下测定 VEGF 水平的重要工具。

这里的多位点 VEGF ELISA 能以同样良好的效力测定 165/165, 165/110, 121/121, 和 110/110 VEGF 变体。通过此测定, 可在正常供体中检测到较高的血浆 VEGF( $192 \pm 68\text{pg/ml}$ ,  $n=50$ )。对相同的 18 例心血管病患者, 检测到比正常供体显著升高的血浆 VEGF( $279 \pm 157\text{pg/ml}$ ,  $n=18$ ,  $p<0.001$ )。见图 13。实际上, 单克隆抗体 MAb 3.5F8 加上亲和纯化的抗无关蛋白质的多克隆抗体不比单独 MAb 3.5F8 者产生任何额外信号。得出结论是除了完整 VEGF, 其他 VEGF 变体和同工型存在于正常供体和心血管病患者的循环中。对于任何打算理解循环中 VEGF 的生物活性的测定而言, 证明 VEGF 的受体结合结构域可用于结合的能力是很重要的特征。

荧光底物, 链亲和素- $\beta$ -半乳糖苷酶/MUG, 优选用于检测系统以便 ELISA 可检测正常个体中内源 VEGF 水平。此底物的使用和最佳 ELISA 稀释剂的判定导致更低的背景吸收值, 其被优选以提高测定的敏感性。

由于用作捕捉和检测的抗体的选择使这里描述的多位点 ELISA 是高度特异的。包被抗体之一, MAb 3.5F8, 结合在 VEGF 的肝素结合结构域附近(残基 111-165)并且另一包被抗体, 兔多克隆抗体结合 VEGF。检测抗体, MAb A4.6.1, 结合在该分子的 KDR 受体结合结构域(残基 1-110), 产生对 VEGF 特异的 ELISA。

此多位点 ELISA 的特异性随着对 VEGF 的生物学的更多了解而变得重要, Keyt et al. 出处同上(p.7788)已经证明此研究中检测的不同 VEGF 变体在体外具有不同的生物学活性。测定特异性的知识在评价临床数据和在实验室数据间对比中也是非常重要的。

已发表的报道(Kondo et al., 出处同上(1994); Takano et al. 出处同上(1996); Rodriguez et al., 出处同上)已经指出在癌症患者中血清 VEGF 水平升高。考虑到血管发生在固体肿瘤发展中是普遍现象, 并且在各种来源的多种肿瘤细胞中观察到 VEGF, 一种肿瘤血管发生因子的表达, 循环 VEGF 水平的测定具有作为广谱实体肿瘤的非侵入性诊断标志的潜力。

结论是,已经发展出测定大多数 VEGF 分子形式的敏感 ELISA。按照本发明,在动物体内产生抗人 VEGF 的抗体,其 C-末端特异的抗体为单克隆抗体且完整 VEGF 特异抗体为多克隆抗体,优选亲和纯化的抗体。这两种抗体可作为在固体支持物如微量滴定板上的包被抗体(固相化捕捉试剂)。只要用于检测的抗体对人 VEGF 的 KDR 和 FLT1 结合结构域是特异的,它们可以是多克隆抗体或单克隆抗体。

相信如这里描述的准确且敏感的 ELISAs 在帮助理解多种疾病状态下 VEGF 水平是重要的。更好理解 VEGF 水平以及在正常个体和在病理生理疾病状态下存在的主要同工型将增加对 VEGF 在正常和病理血管发生中作用的知识。

尽管已经描述了本发明以及它们的具体实施方案,应当理解它能进一步修饰并且此申请打算包括本发明的任何变化,应用,或适应,其一般遵循本发明的原则并且包括背离本发明内容但在本发明所属领域中是已知的或习惯的操作,而且可以被应用于本文所述的基本特征,并落在附加的权利要求书的范围内。

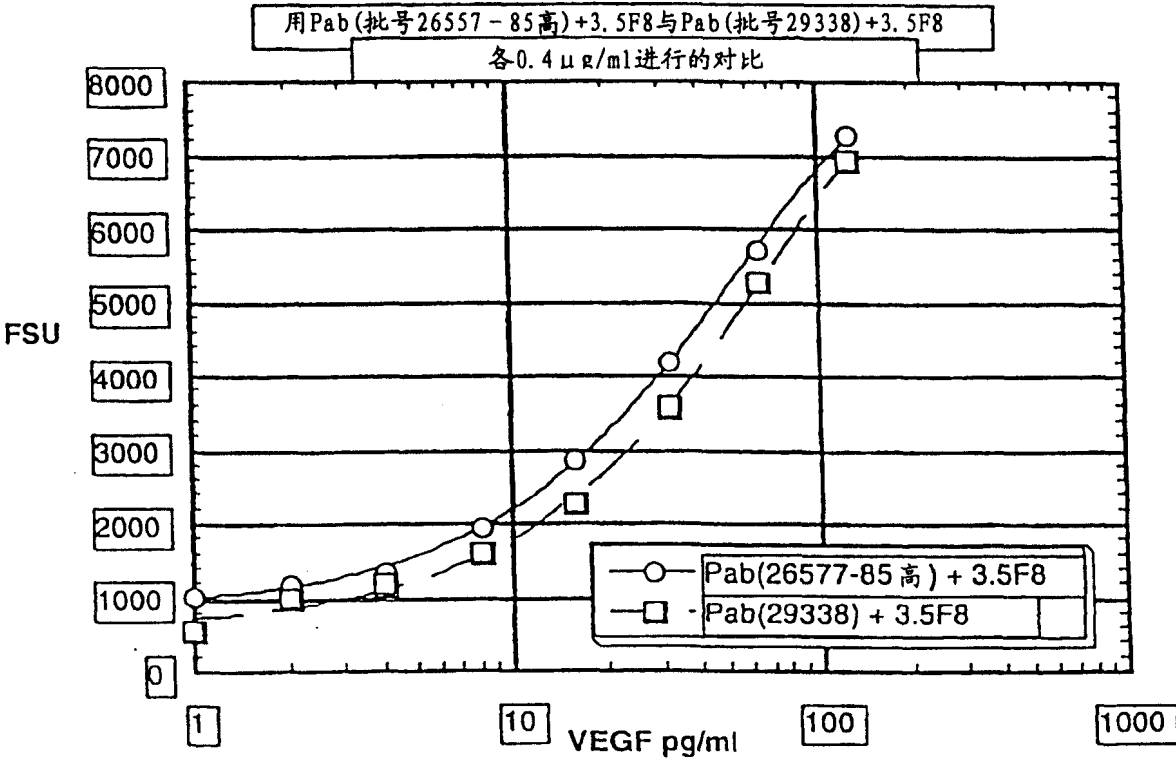


图 1

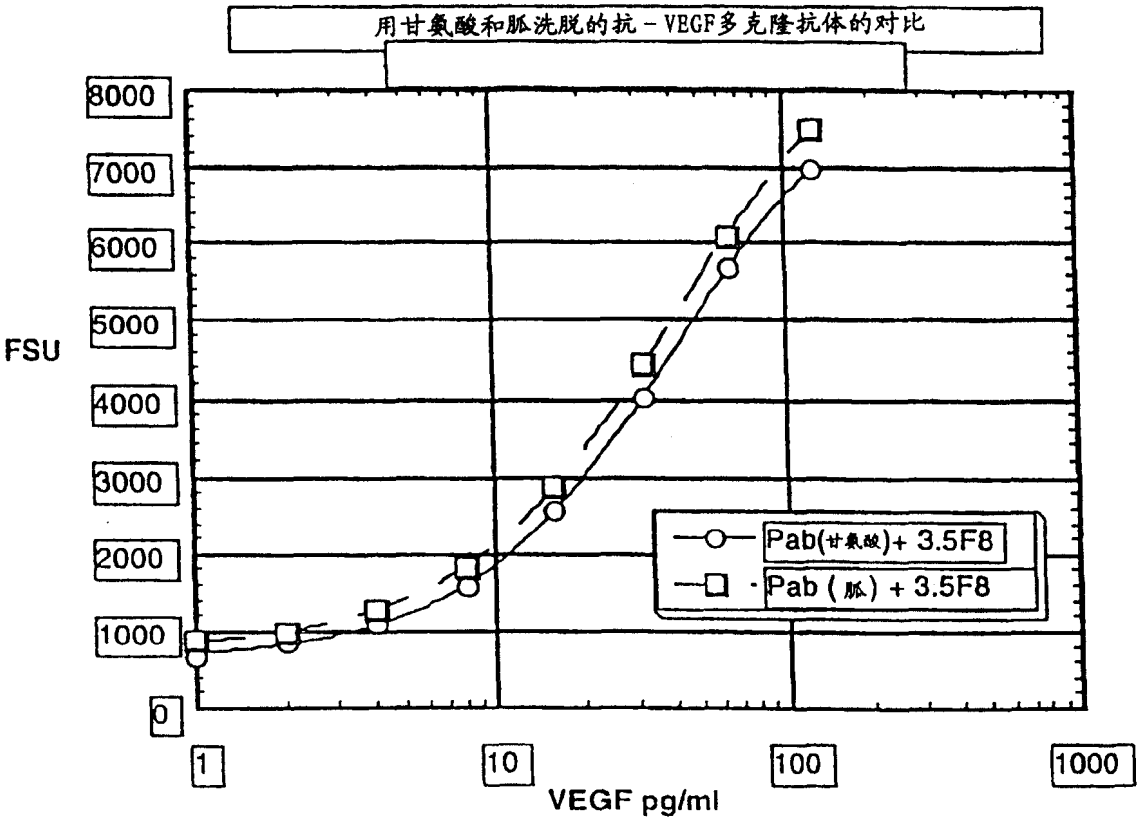


图 2

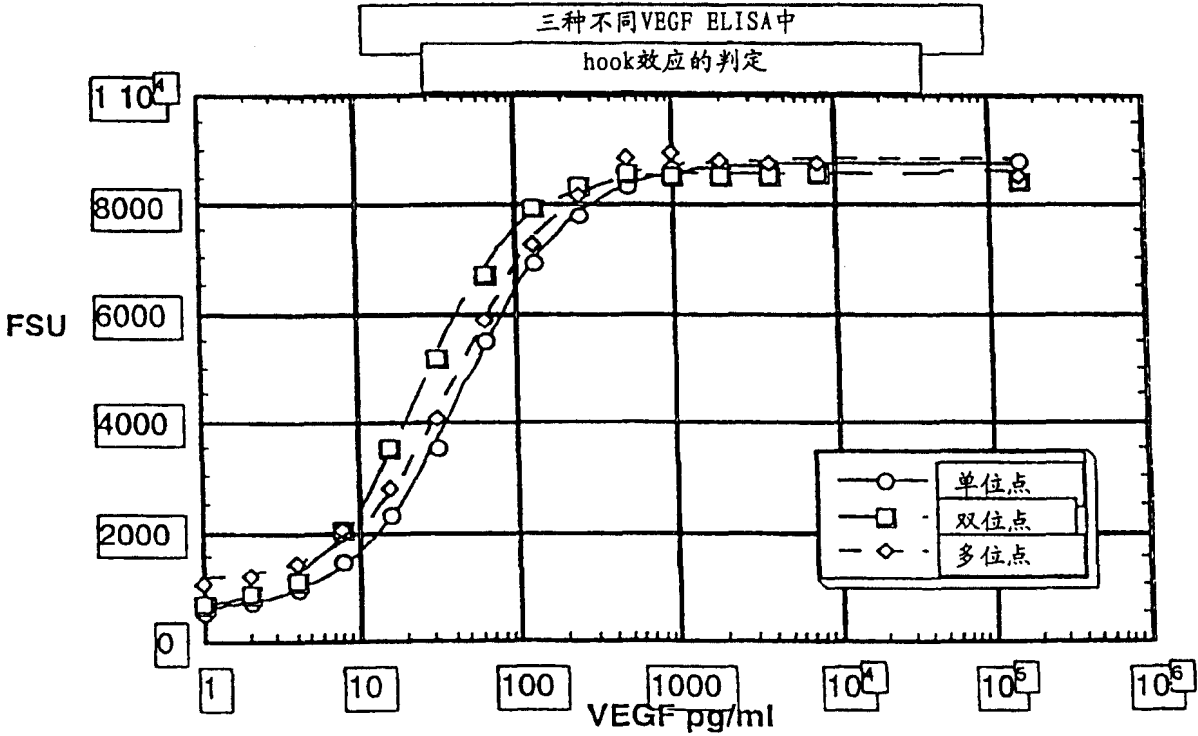


图 3

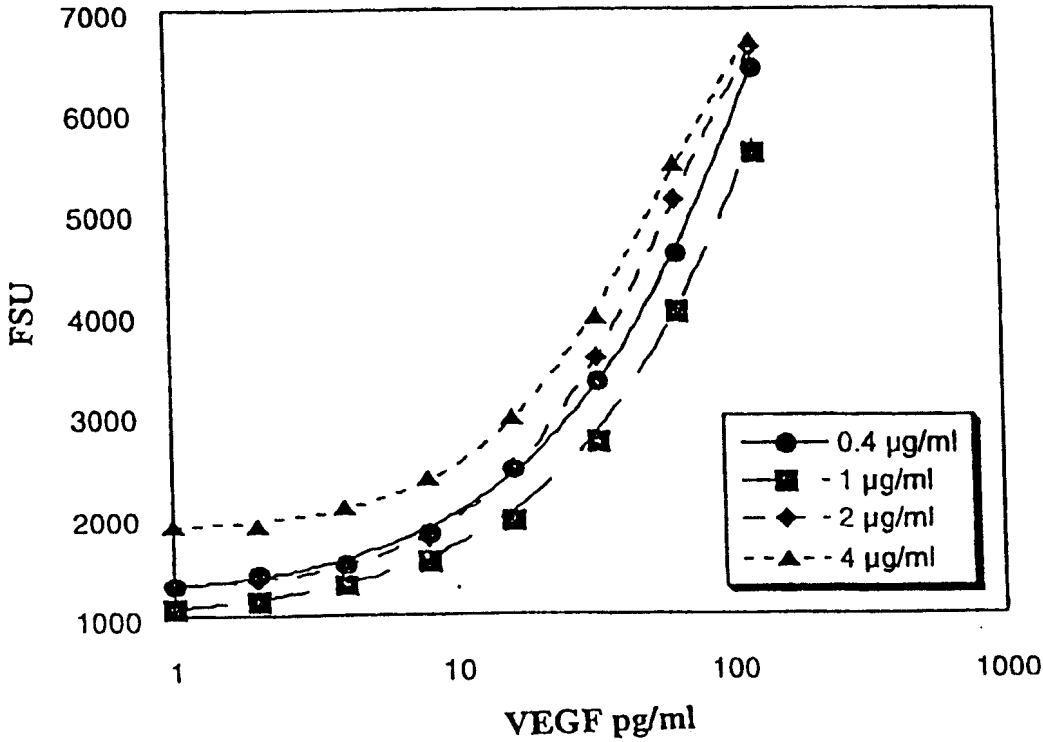


图 4

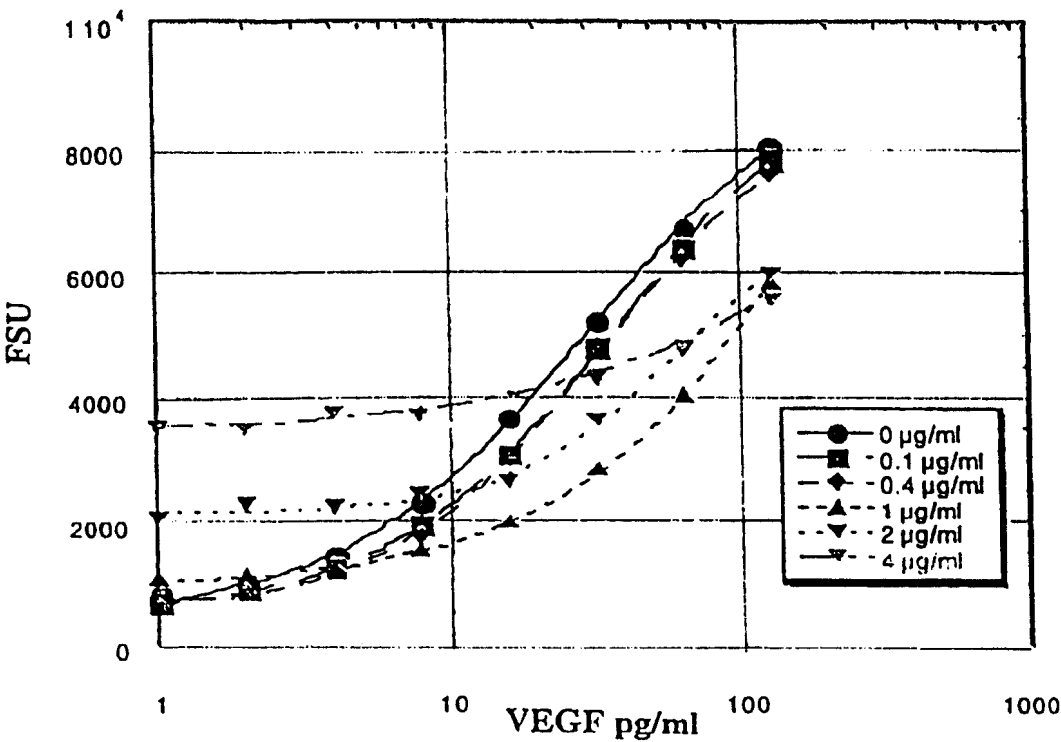


图 5

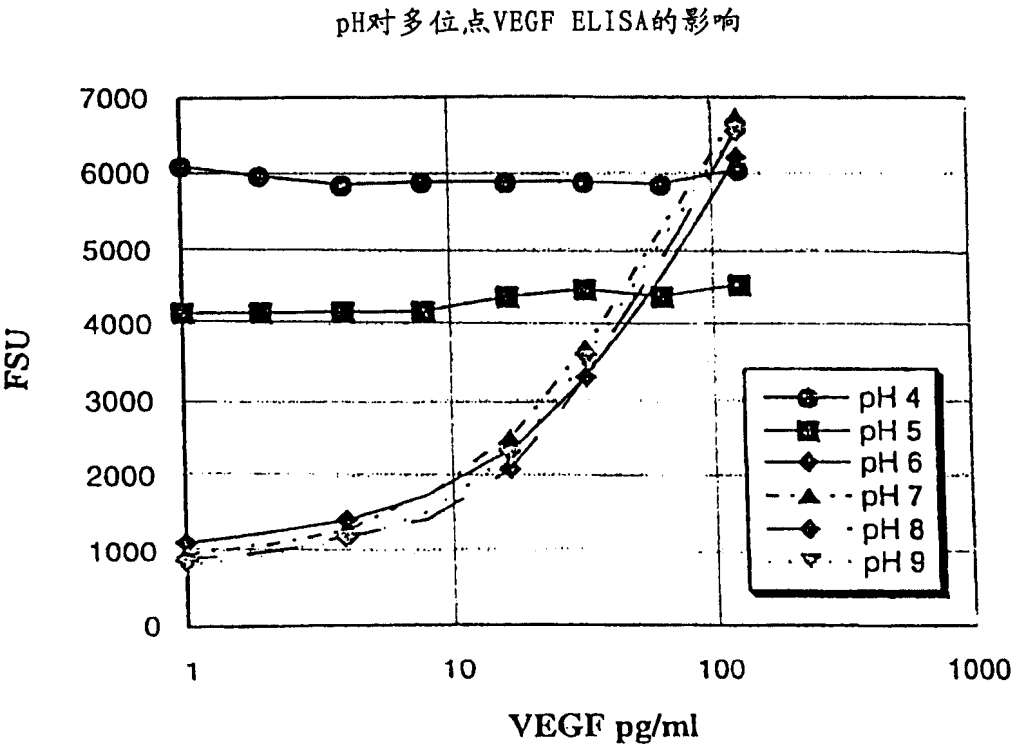


图 6

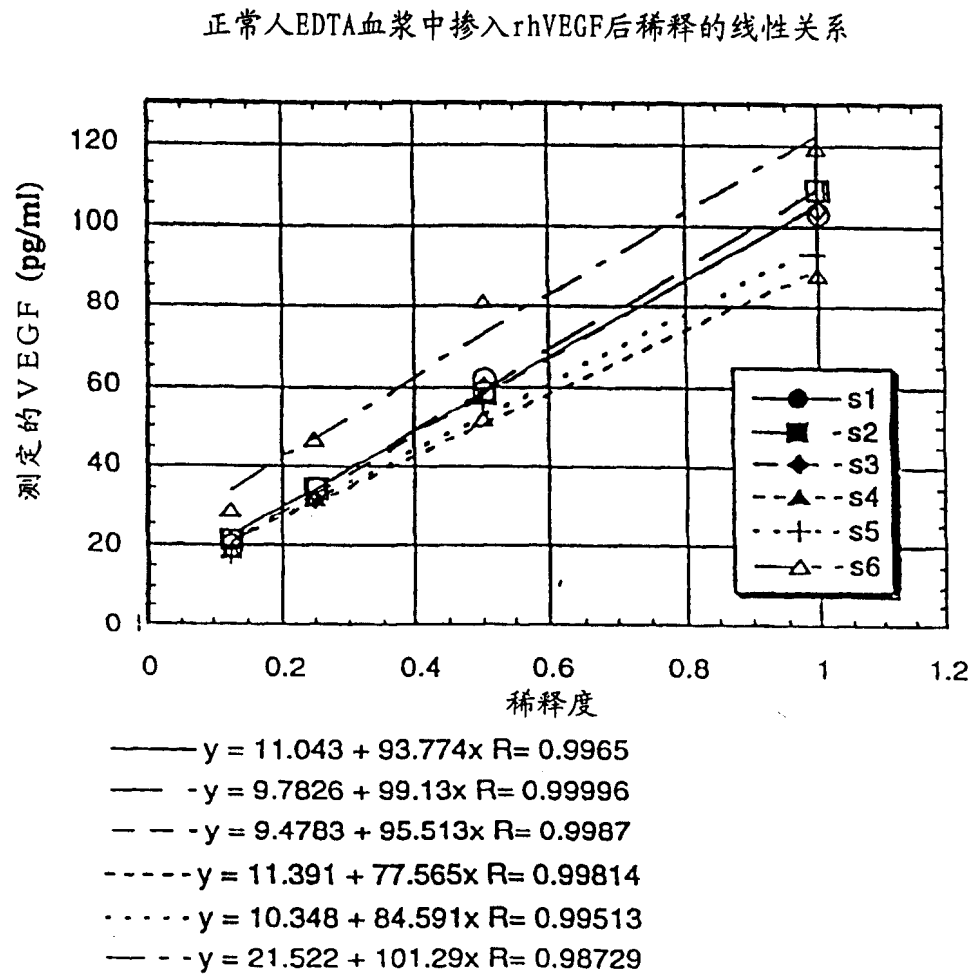


图 7

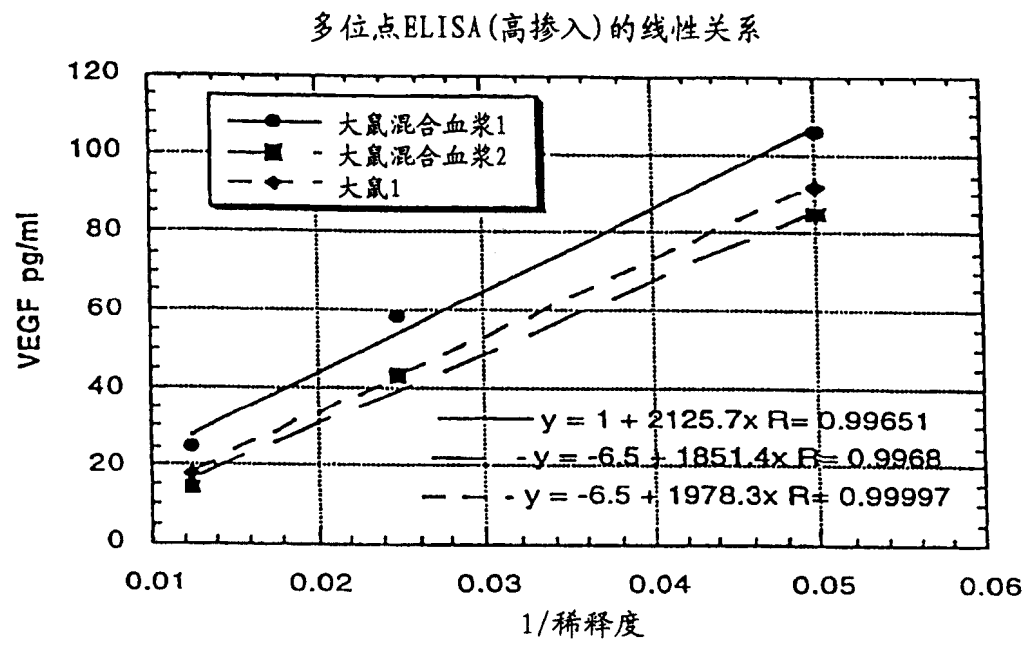


图 8A

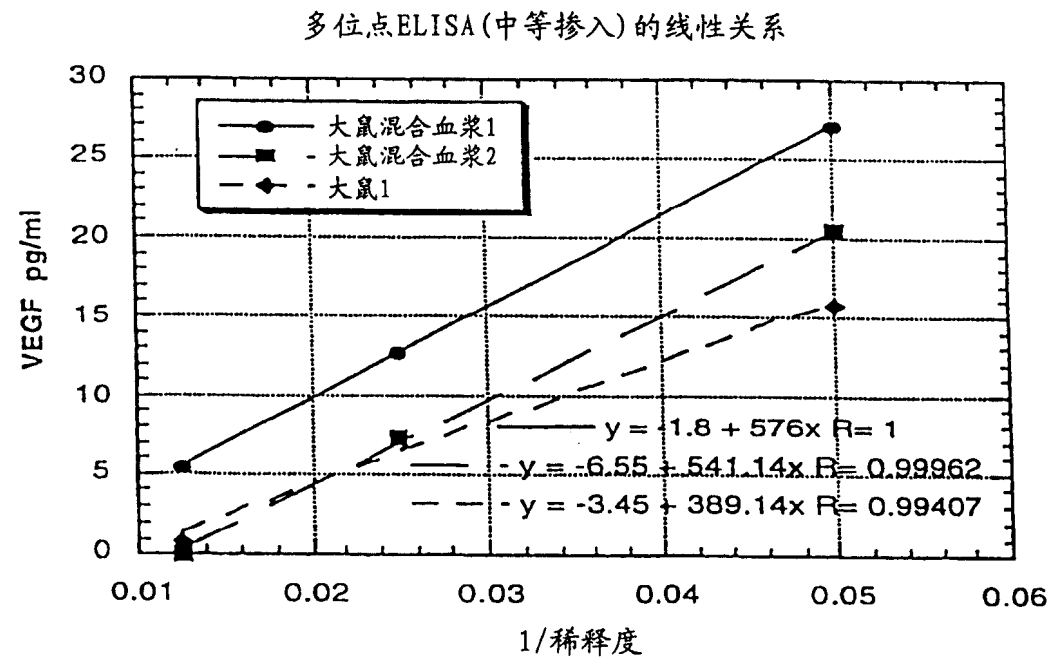


图 8B

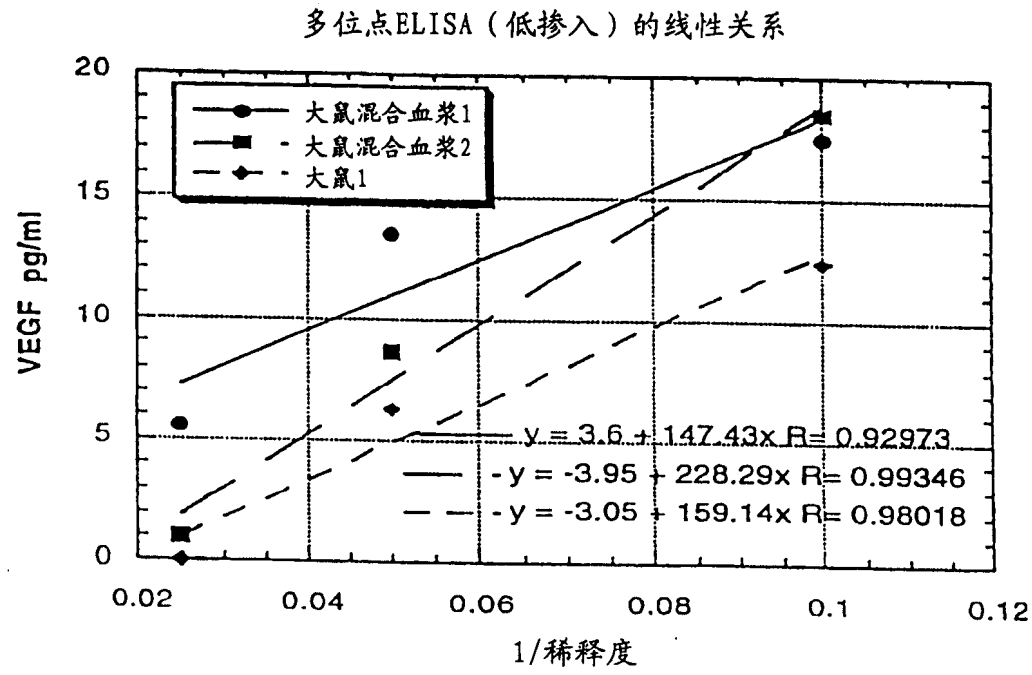


图 8C

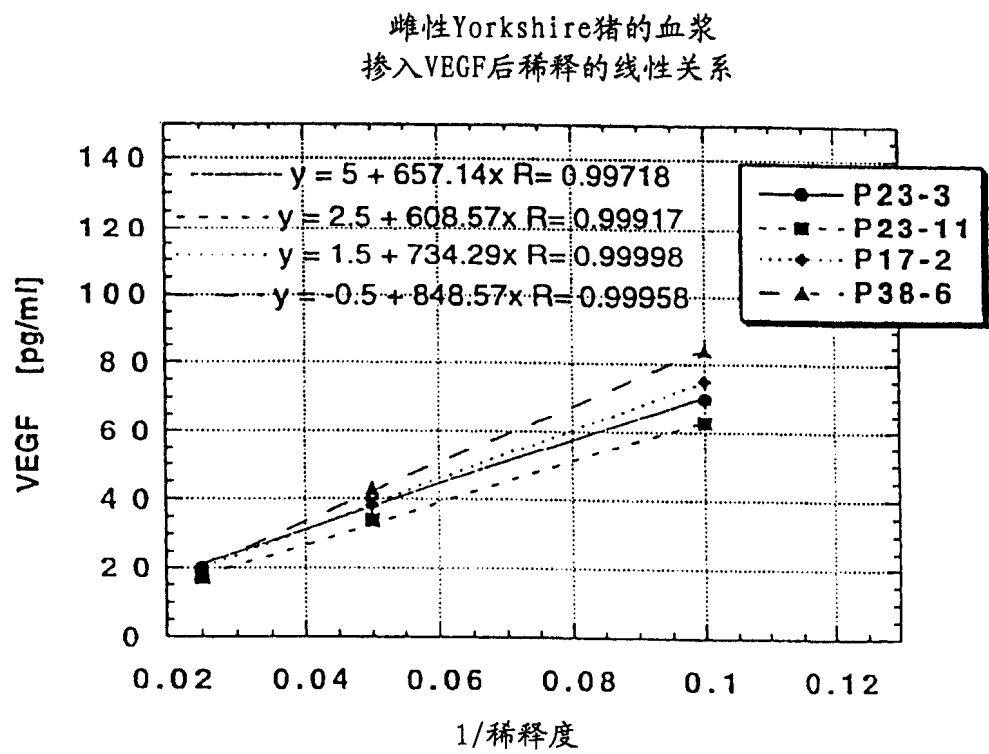


图 9A

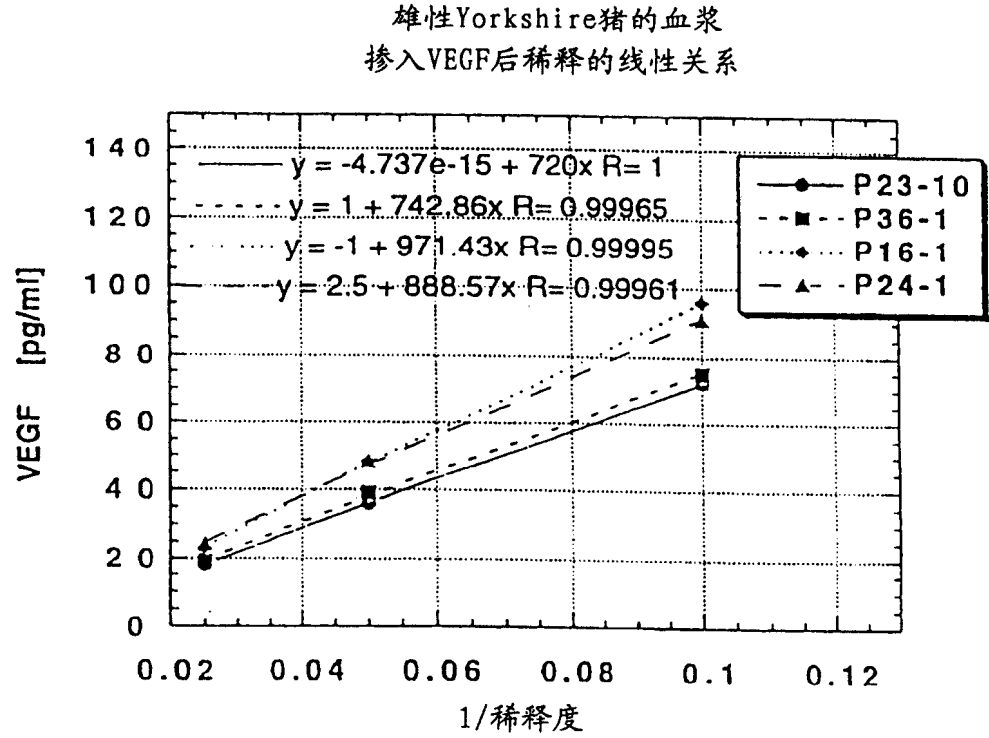


图 9B

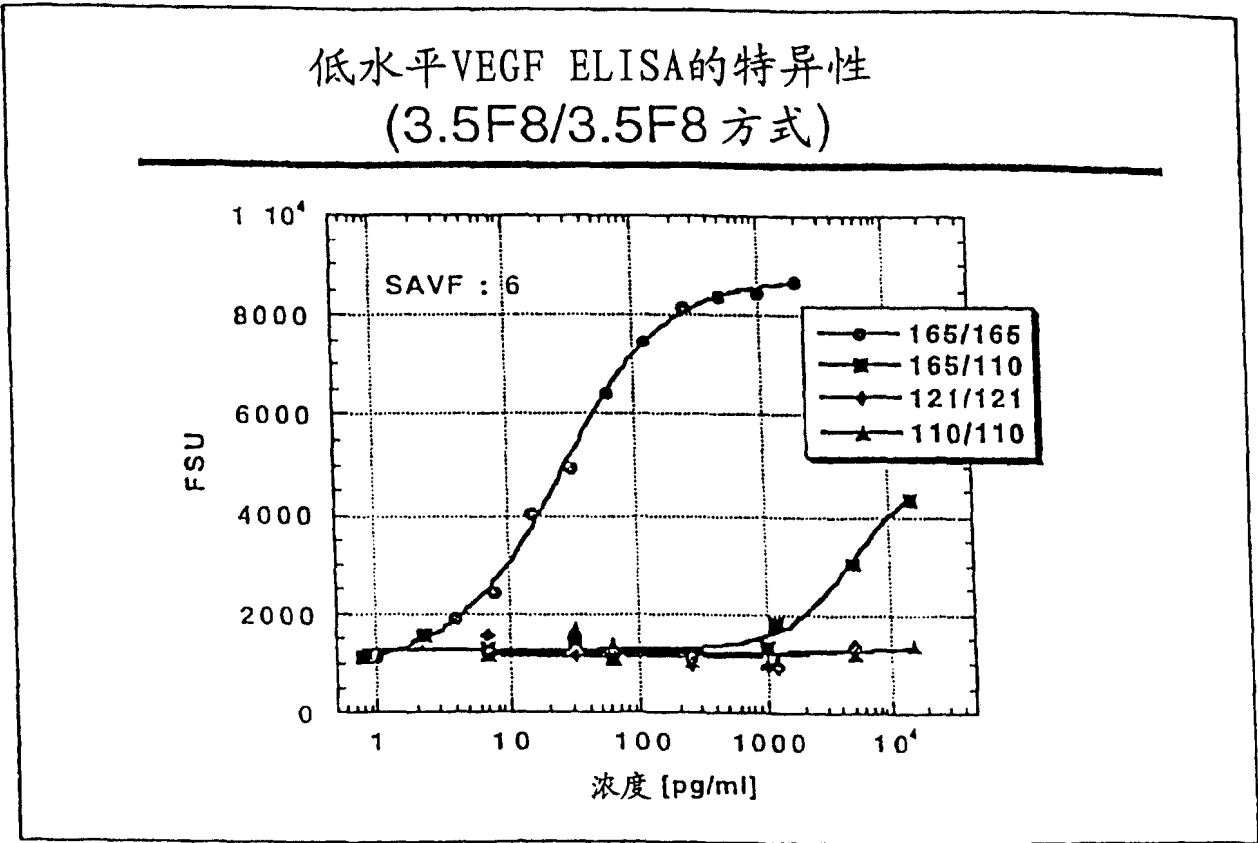


图 10A

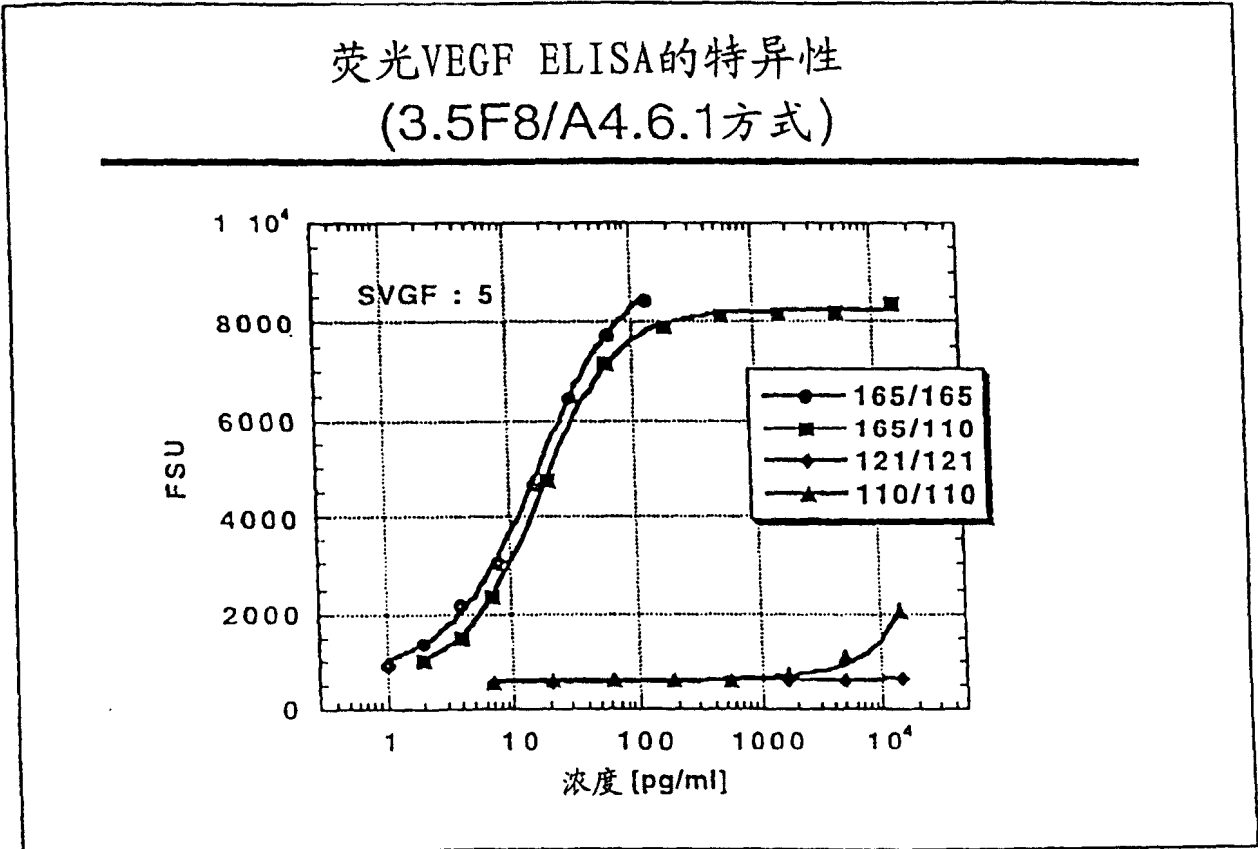


图 10B

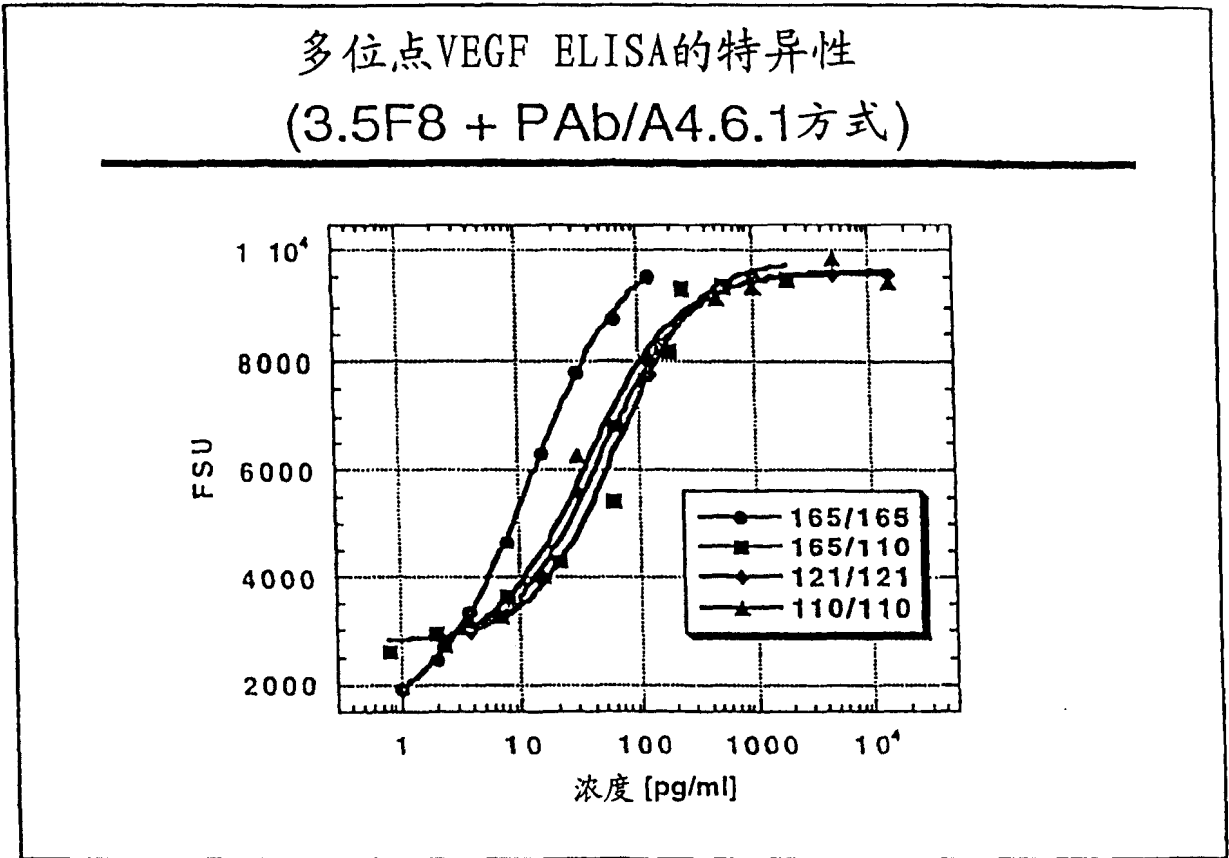


图 10C

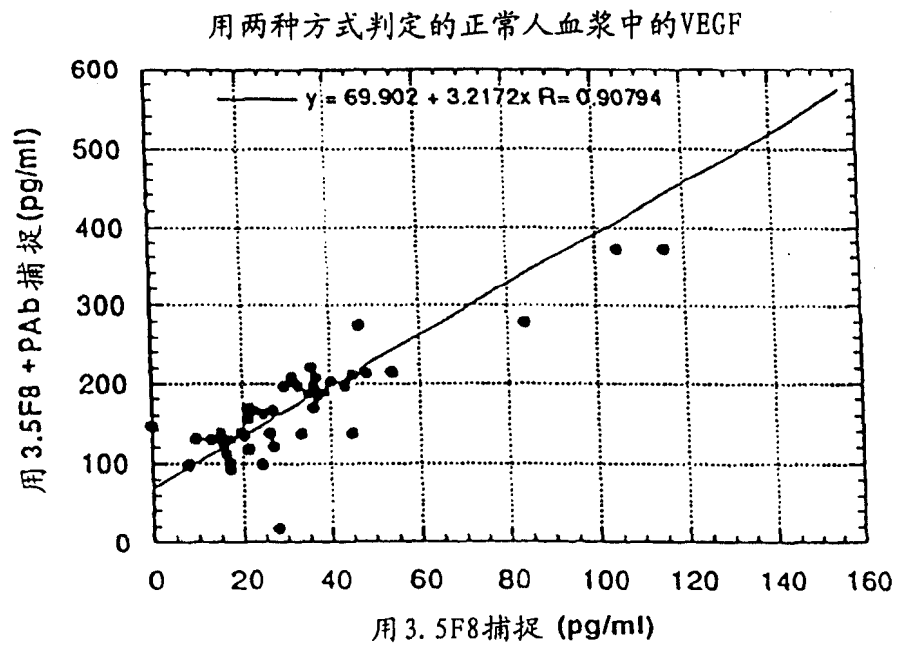


图 11A

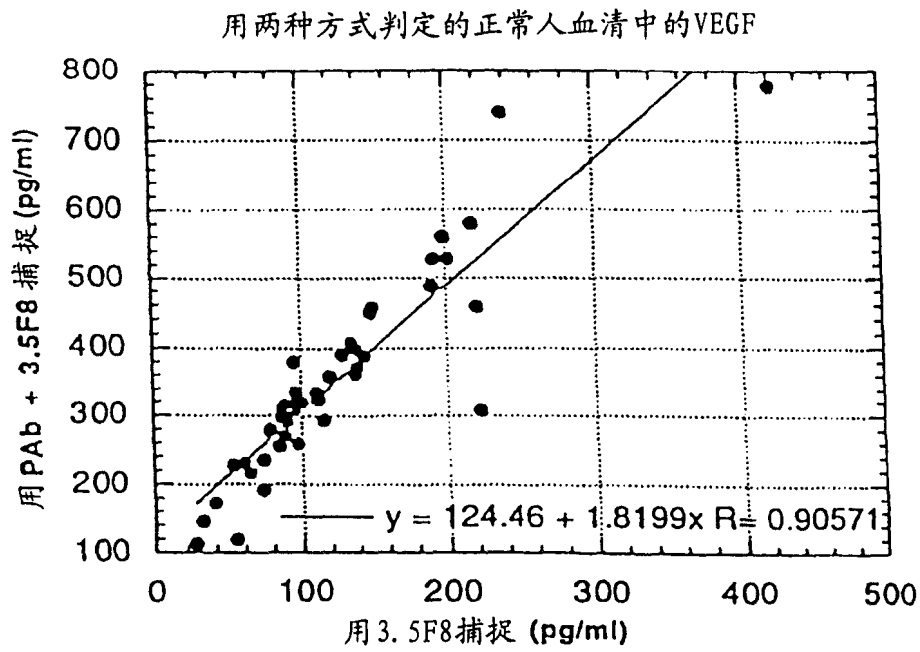


图 11B

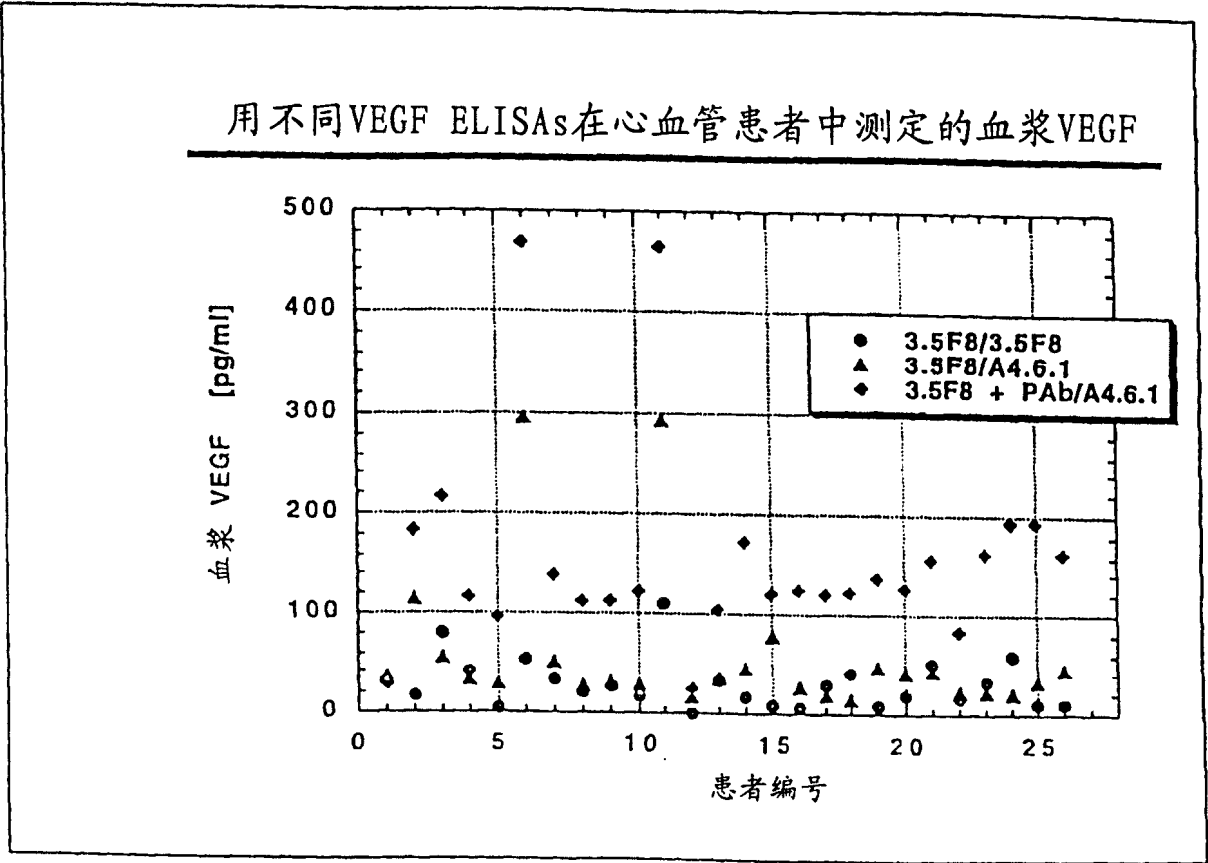


图 12

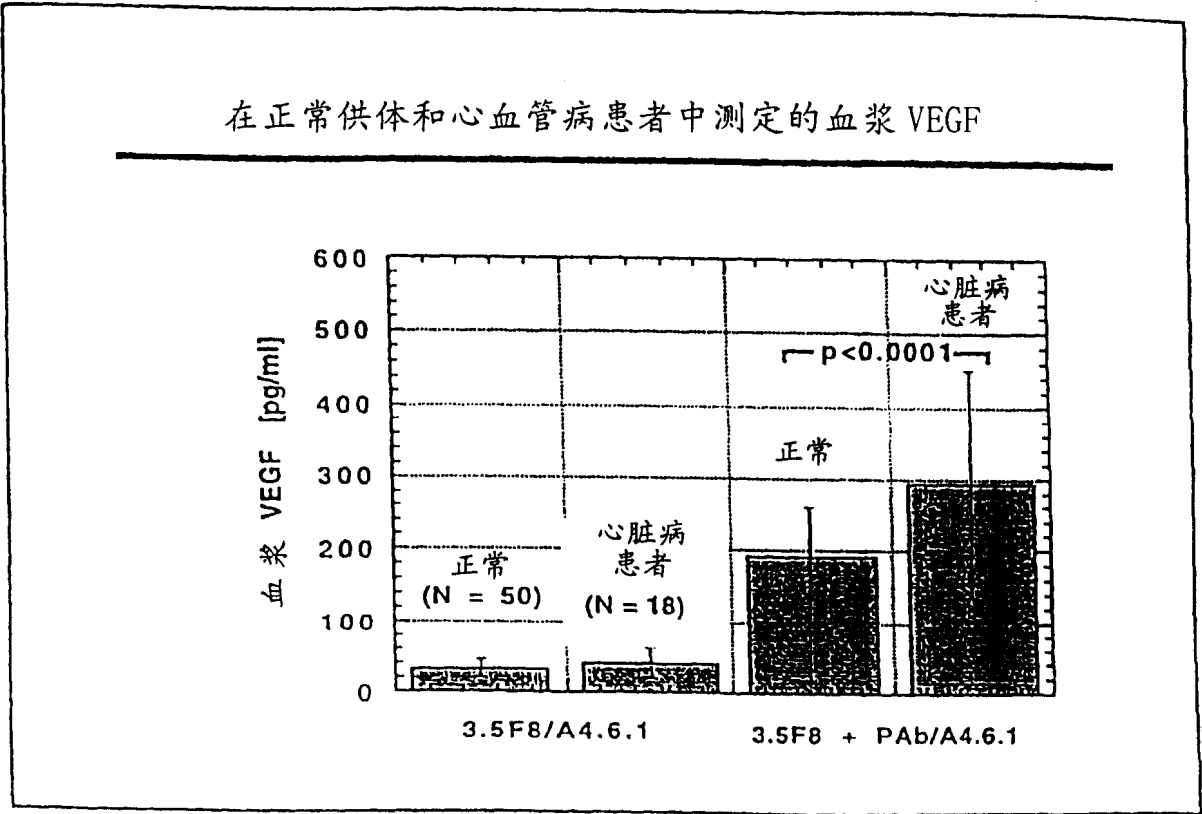


图 13

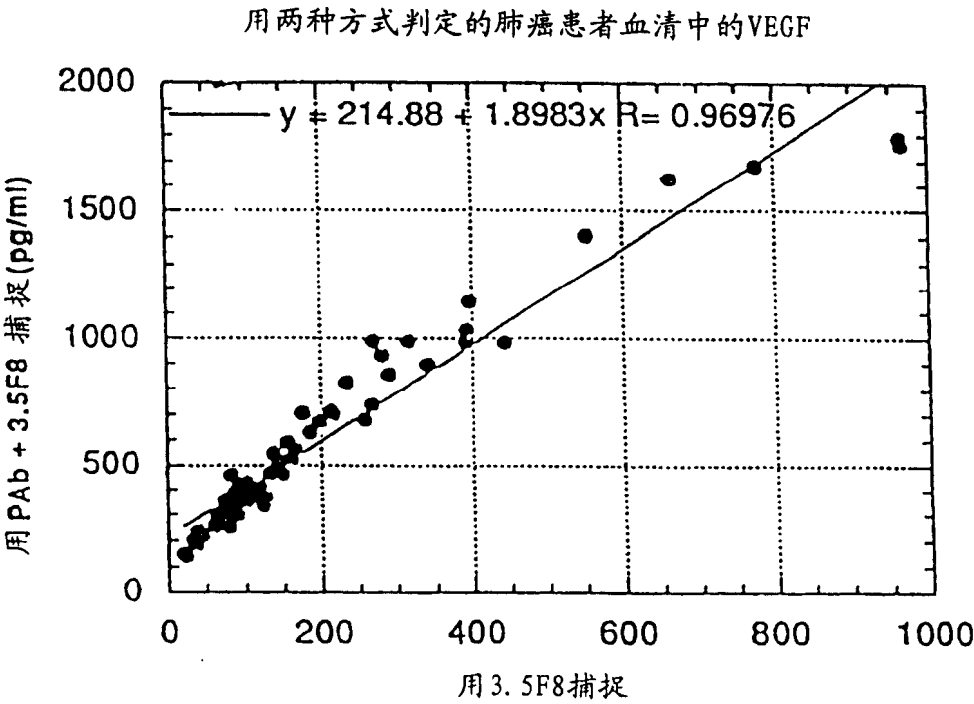
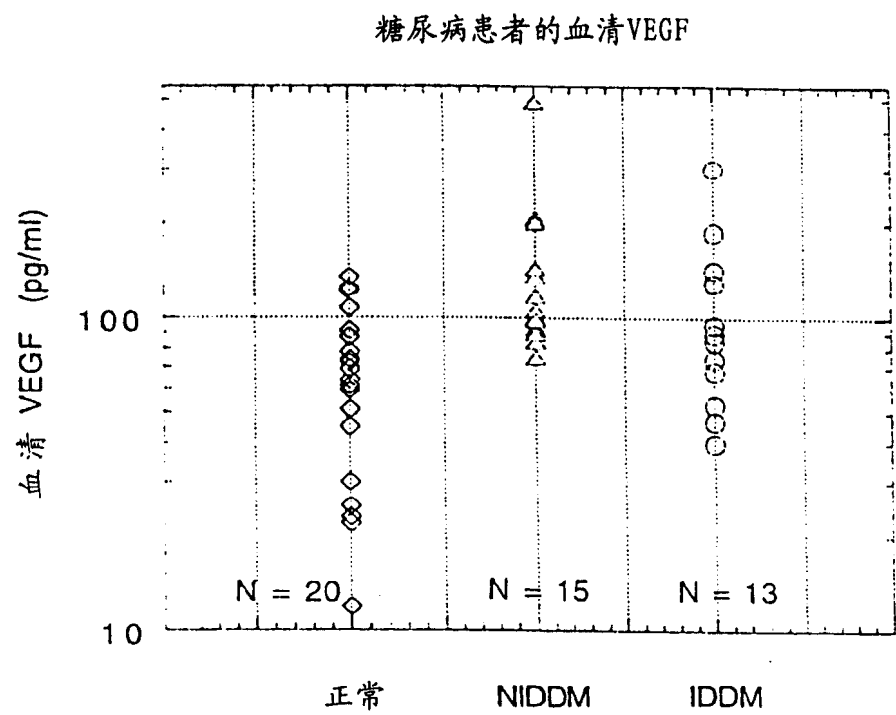


图 14



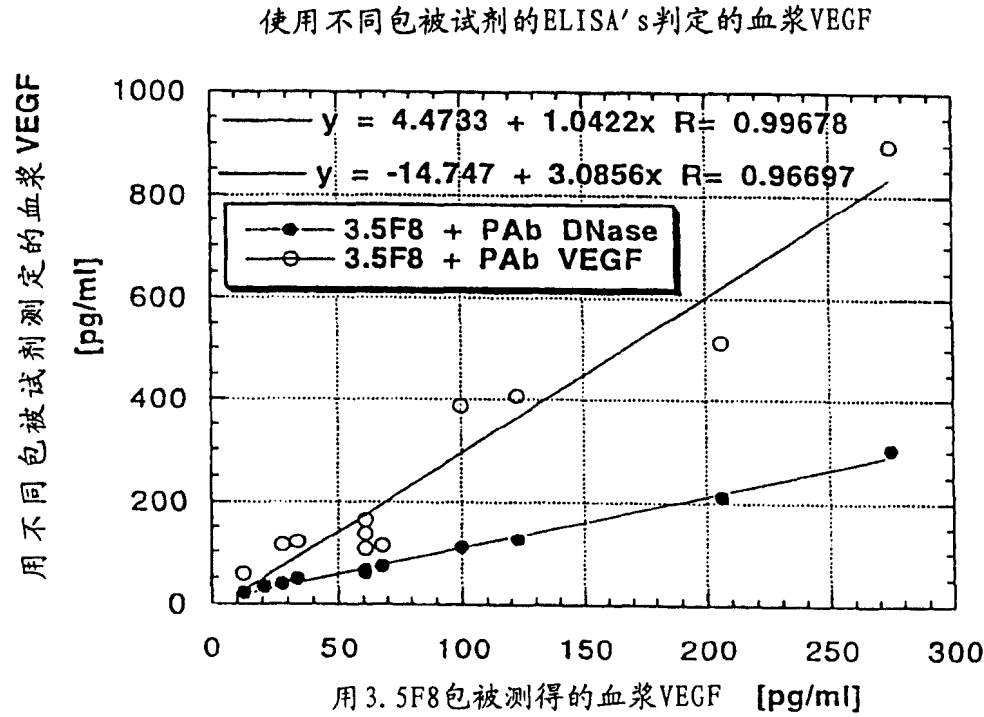


图 16A

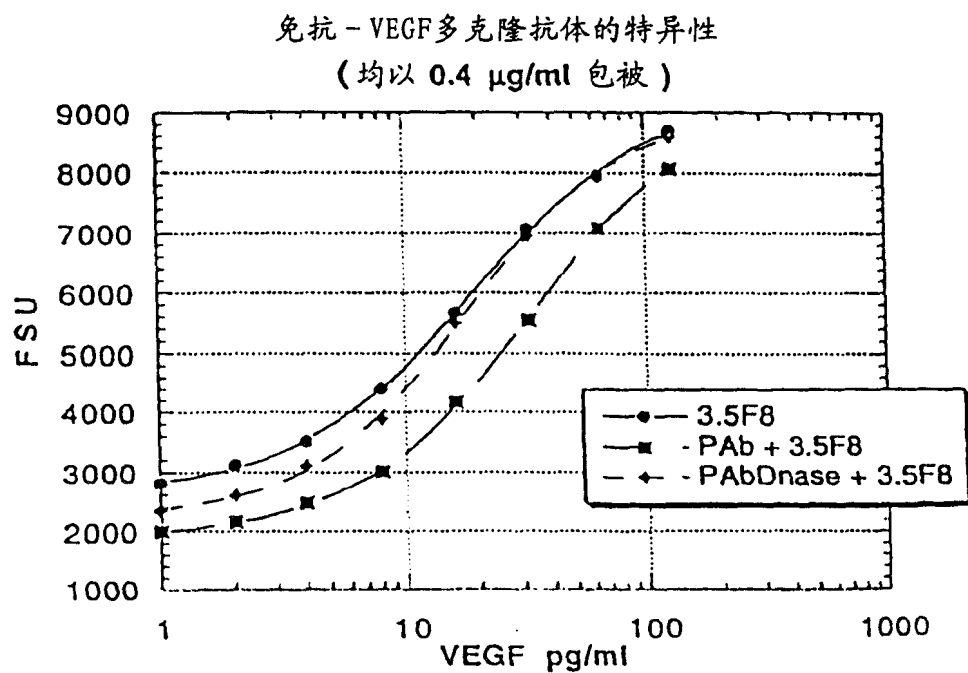


图 16B

|                |                                                                                     |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于VEGF的ELISA                                                                        |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN100399030C</a>                                                        | 公开(公告)日 | 2008-07-02 |
| 申请号            | CN00815755.3                                                                        | 申请日     | 2000-11-15 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 健泰科生物技术公司                                                                           |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 杰南技术公司                                                                              |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 杰南技术公司                                                                              |         |            |
| [标]发明人         | 戴维TW费<br>克里斯滕K托米塔                                                                   |         |            |
| 发明人            | 戴维·T·W·费<br>克里斯滕·K·托米塔                                                              |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/74 G01N33/543 G01N33/53 G01N21/78 G01N33/483 G01N33/577 G01N33/68            |         |            |
| CPC分类号         | Y10S435/975 G01N33/543 Y10S436/813 Y10S436/809 G01N33/6872 G01N2333/475 G01N33/6863 |         |            |
| 优先权            | 60/165736 1999-11-16 US                                                             |         |            |
| 其他公开文献         | CN1420987A                                                                          |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                      |         |            |

#### 摘要(译)

在患者血流或其他生物标本中血管内皮细胞生长因子(VEGF)的活性能够作为癌症，糖尿病，心脏病，和其它病理学的诊断和预后指标。发展了VEGF作为抗原的抗体-夹心ELISA方法和试剂盒以检测来自动物模型和人类患者的生物标本中VEGF水平并且用作诊断/预后指标。

