



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101918834 A

(43) 申请公布日 2010.12.15

(21) 申请号 200980101750.5

(22) 申请日 2009.01.07

(30) 优先权数据

61/019443 2008.01.07 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.07.07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/030313 2009.01.07

(87) PCT申请的公布数据

W02009/089271 EN 2009.07.16

(71) 申请人 奥索临床诊断有限公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 J·W·贝库斯 J·郑

G·巴什里安斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 权陆军 李连涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书 4 页 说明书 15 页 序列表 7 页
附图 2 页

(54) 发明名称

用于同时分析能够彼此络合的蛋白质的校准物 / 对照物

(57) 摘要

本发明公开了组合物和方法,该组合物和方法包括两种或更多种蛋白质,其中蛋白质中的至少一种已被改变以减弱其相互识别和结合。此类组合物在方法和分析中可用作参照物、校准物或对照物,该方法和分析用于测定可能存在于所关注的样品中的蛋白质中的一种或多种的量、或确认该样品中的该蛋白质中的一种或多种的存在。更具体地讲,本发明涉及组合物和方法,该组合物和方法包括改变的胎盘生长因子-1(P1GF-1)和可溶性 fms 样酪氨酸激酶 (sFlt-1),以及用于测定所关注的样品中的 sFlt-1 和 / 或 P1GF-1 的量或确认所关注的样品中的 sFlt-1 和 / 或 P1GF-1 的存在的方法。

1. 一种用于分析第一蛋白质或第二蛋白质或第一蛋白质和第二蛋白质两者的参照物、校准物或对照物组合物,其中所述第一蛋白质或所述第二蛋白质或所述第一蛋白质和所述第二蛋白质的一个或更多个氨基酸或一个或更多个非氨基酸基团已被删除、修饰或被不同的氨基酸或非氨基酸基团置换,从而减弱或基本消除了所述第一蛋白质和所述第二蛋白质的相互结合。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一蛋白质为受体酪氨酸激酶并且所述第二蛋白质为血管内皮生长因子。

3. 根据权利要求 2 所述的组合物,其中所述血管内皮生长因子为 P1GF。

4. 根据权利要求 2 所述的组合物,其中所述血管内皮生长因子为 P1GF-1。

5. 根据权利要求 2 所述的组合物,其中所述受体酪氨酸激酶为 sFlt-1。

6. 根据权利要求 2 所述的组合物,其中所述受体酪氨酸激酶为 sFlt-1 并且所述血管内皮生长因子为 P1GF。

7. 根据权利要求 2 所述的组合物,其中所述受体酪氨酸激酶为 sFlt-1 并且所述血管内皮生长因子为 P1GF-1。

8. 根据权利要求 4 或权利要求 7 所述的组合物,其中所述 P1GF-1 包含取代以下物质的丙氨酸:

a) 序列标识号 1 的第 25 位脯氨酸,或

b) 序列标识号 1 的第 27 位谷氨酰胺,或

c) 序列标识号 1 的第 60 位半胱氨酸,或

d) 序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸,或

e) 序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸,或

f) 序列标识号 1 的第 84 位天冬酰胺,或

g) 序列标识号 1 的第 98 位脯氨酸,或

h) 序列标识号 1 的第 100 位酪氨酸,或改变的 P1GF-1 具有取代序列标识号 1 的第 70 位半胱氨酸的甘氨酸、或在 a) 到 h) 中所述丙氨酸置换和所述甘氨酸置换的任何组合。

9. 根据权利要求 4 或权利要求 7 所述的组合物,其中所述 P1GF-1 包含取代序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸的丙氨酸和取代序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸的丙氨酸。

10. 根据权利要求 4 或权利要求 7 所述的组合物,其中所述 P1GF-1 包含取代序列标识号 1 的第 70 位半胱氨酸的甘氨酸、取代序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸的丙氨酸和取代序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸的丙氨酸。

11. 一种用于对样品中受体酪氨酸激酶或血管内皮生长因子的检测进行校准的方法,所述方法包括以下步骤:

1) 将权利要求 2 中所述的包含已知量的所述受体酪氨酸激酶和所述血管内皮生长因子的组合物与受体酪氨酸激酶的特异性受体或血管内皮生长因子的特异性受体接触;以及,

2) 将第 1) 步骤中形成的复合物与受体酪氨酸激酶的特异性标记受体和内皮生长因子的特异性标记受体接触;以及,

3) 将结合的受体酪氨酸激酶的特异性标记受体与游离的受体酪氨酸激酶的特异性标记受体分离,或将结合的内皮生长因子的特异性标记受体与游离的内皮生长因子的特异性

标记受体分离；以及，

4) 检测来自与所述组合物的受体酪氨酸激酶复合的结合的受体酪氨酸激酶的特异性标记受体的信号、或来自游离的受体酪氨酸激酶的特异性标记受体的信号；或者，

5) 检测来自与所述组合物的内皮生长因子复合的结合的内皮生长因子的特异性标记受体的信号、或来自游离的内皮生长因子的特异性标记受体的信号；以及，

6) 将来自游离的或结合的特异性标记受体的信号、或来自游离的或结合的内皮生长因子的特异性标记受体的信号与所述组合物中已知量的受体酪氨酸激酶或内皮生长因子相关。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述内皮生长因子为胎盘生长因子。

13. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述血管内皮生长因子为胎盘生长因子-1。

14. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述受体酪氨酸激酶为 sFlt-1。

15. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述受体酪氨酸激酶为 sFlt-1 并且所述血管内皮生长因子为胎盘生长因子。

16. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述受体酪氨酸激酶为 sFlt-1 并且所述血管内皮生长因子为胎盘生长因子-1。

17. 根据权利要求 13 或权利要求 16 所述的方法，其中所述胎盘生长因子-1 包含取代以下物质的丙氨酸：

a) 序列标识号 1 的第 25 位脯氨酸，或

b) 序列标识号 1 的第 27 位谷氨酰胺，或

c) 序列标识号 1 的第 60 位半胱氨酸，或

d) 序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸，或

e) 序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸，或

f) 序列标识号 1 的第 84 位天冬酰胺，或

g) 序列标识号 1 的第 98 位脯氨酸，或

h) 序列标识号 1 的第 100 位酪氨酸，或

改变的 PlGF-1 具有取代序列标识号 1 的第 70 位半胱氨酸的甘氨酸、或在 a) 到 h) 中所述丙氨酸置换和所述甘氨酸置换的任何组合。

18. 根据权利要求 13 或权利要求 16 所述的方法，其中所述 PlGF-1 包含取代序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸的丙氨酸和取代序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸的丙氨酸。

19. 根据权利要求 13 或权利要求 16 所述的方法，其中所述 PlGF-1 包含取代序列标识号 1 的第 70 位半胱氨酸的甘氨酸、取代序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸的丙氨酸和取代序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸的丙氨酸。

20. 一种用于确认样品中蛋白质的存在或测定样品中蛋白质含量的方法，包括以下步骤：

a) 将所述蛋白质特异性的固定的受体与所述样品接触，从而形成第一复合物，所述第一复合物包含固定的受体和所述样品的蛋白质；

b) 将所述第一复合物与所述蛋白质特异性标记受体接触，从而形成第二复合物，所述第二复合物包含受体、所述样品的蛋白质和标记受体；

c) 将在所述第二复合物中结合的标记受体与游离的标记受体分离；

d) 测定来自在所述第二复合物中结合的标记受体的信号或来自游离的标记受体的信号；

e) 将所述蛋白质特异性的固定的受体与权利要求 1 中所述的蛋白质的组合物接触，其中所述组合物中的所述蛋白质含量为已知的，从而形成第三复合物，所述第三复合物包含固定的受体和所述组合物的蛋白质；

f) 将所述第三复合物与所述蛋白质特异性标记受体接触，从而形成受体、所述组合物的蛋白质和标记受体的第四复合物；

g) 将在所述第四复合物中结合的标记受体与游离的标记受体分离；

h) 测定来自在所述第四复合物中结合的标记受体的信号或来自游离的标记受体的信号；和

i) 比较 d) 和 h) 中测定的所述信号，进而确认所述样品中的所述蛋白质存在或测定所述样品中的所述蛋白质含量。

21. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述蛋白质为血管内皮生长因子。

22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述血管内皮生长因子为 P1GF。

23. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述血管内皮生长因子为 P1GF-1。

24. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述蛋白质为血管内皮生长因子并且所述组合物包含受体酪氨酸激酶和所述血管内皮生长因子。

25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中所述血管内皮生长因子为 P1GF 并且所述组合物包含受体酪氨酸激酶和 P1GF。

26. 根据权利要求 24 所述的方法，其中所述血管内皮生长因子为 P1GF-1 并且所述组合物包含受体酪氨酸激酶和 P1GF-1。

27. 根据权利要求 26 所述的方法，其中所述受体酪氨酸激酶为 sFlt-1。

28. 根据权利要求 27 所述的方法，其中所述组合物中的所述 P1GF-1 包含取代以下物质的丙氨酸：

a) 序列标识号 1 的第 25 位脯氨酸，或

b) 序列标识号 1 的第 27 位谷氨酰胺，或

c) 序列标识号 1 的第 60 位半胱氨酸，或

d) 序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸，或

e) 序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸，或

f) 序列标识号 1 的第 84 位天冬酰胺，或

g) 序列标识号 1 的第 98 位脯氨酸，或

h) 序列标识号 1 的第 100 位酪氨酸，或

改变的 P1GF-1 具有取代序列标识号 1 的第 70 位半胱氨酸的甘氨酸、或在 a) 到 h) 中所述丙氨酸置换和所述甘氨酸置换的任何组合。

29. 根据权利要求 28 所述的方法，其中所述 P1GF-1 包含取代序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸的丙氨酸和取代序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸的丙氨酸。

30. 根据权利要求 28 所述的方法，其中所述 P1GF-1 包含取代序列标识号 1 的第 70 位半胱氨酸的甘氨酸、取代序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸的丙氨酸和取代序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸的丙氨酸。

31. 一种对样品中蛋白质的检测进行校准的方法,包括以下步骤:

1) 将权利要求 1 中所述的包含已知量的所述蛋白质的组合物与所述蛋白质特异性的受体接触;

2) 将第 1) 步骤中形成的复合物与所述蛋白质特异性标记受体接触;

3) 将结合的标记受体与游离的标记受体分离;

4) 检测来自结合的标记受体的信号或来自游离的标记受体的信号;和

5) 将来自游离的或结合的标记受体的信号与所述组合物中所述已知量的所述蛋白质相关。

32. 一种对样品中蛋白质的检测进行校准的方法,包括以下步骤:

1) 将权利要求 1 中所述的含有已知量的所述蛋白质的组合物与所述蛋白质特异性固定的受体接触,从而形成复合物,所述复合物包含固定的受体和所述组合物的所述蛋白质;

2) 将第 1) 步骤中形成的所述复合物与所述蛋白质特异性标记受体接触,从而形成复合物,所述复合物包含固定的受体、所述组合物的蛋白质和标记受体;

3) 将结合的标记受体与游离的标记受体分离;

4) 检测来自结合的标记受体的信号或来自游离的标记受体的信号;和

5) 将来自游离的或结合的标记受体的所述信号与所述组合物中所述已知量的所述蛋白质相关。

用于同时分析能够彼此络合的蛋白质的校准物 / 对照物

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于 2008 年 1 月 7 日提交的美国临时申请 No. 61/019, 443 的优先权。

技术领域

[0003] 本发明涉及组合物和方法, 该方法包括改变两种或更多种蛋白质以抑制其相互识别和结合。该组合物可在分析检测时用作能够检测改变的和未改变的两者形式或天然形式的蛋白质中的一种或多种的参照物、校准物或对照物。

[0004] 发明背景

[0005] 先兆子痫是高血压、浮肿和蛋白尿的综合征, 影响 5% 到 10% 的妊娠, 并导致大量的母体和胎儿的发病率和死亡率。先兆子痫每年造成全世界至少 200, 000 例孕产妇死亡。先兆子痫的症状通常在妊娠第 20 周后出现。

[0006] 胎儿和胎盘的发育由若干生长因子介导。血管内皮生长因子 (VEGF) 是一种内皮细胞特异性有丝分裂原和血管生成诱导因子。VEGF 介导血管渗透性, 并已表明参与肾小球毛细血管的修复。VEGF 作为同源二聚体结合到两种同源跨膜受体酪氨酸激酶 (fms 样酪氨酸激酶 (Flt-1) 和激酶结构域受体 (KDR)) 中的一种。

[0007] 胎盘生长因子 (PlGF) 为 VEGF 家族成员, 该成员也与胎盘发育有关。PlGF 由细胞滋养层细胞和合体滋养层细胞表达, 并能够诱导内皮细胞的增殖、迁移和活化。PlGF 作为同源二聚体结合到 Flt-1 受体, 但不结合到 KDR 受体。PlGF 和 VEGF 两者均有助于提高有丝分裂活性和促进血管生成, 这对于发育中的胎盘很关键。

[0008] 一种可溶形式的 Flt-1 受体 (sFlt-1) 已在人脐静脉内皮细胞培养基中被鉴别出, 并随后在胎盘组织中实现了体内表达。sFlt-1 是 Flt-1 受体的剪接变体, 缺乏跨膜域和胞质域。sFlt-1 以高亲和性结合到 VEGF, 但 sFlt-1 不促进内皮细胞的有丝分裂。据信 sFlt-1 充当“生理性汇点”来抑制 VEGF 的信号通路。因此, sFlt-1 含量的调控起到调节 VEGF 和 VEGF 信号通路的作用。精细调控 VEGF 和 VEGF 的信号通路对于通过发育中的胎盘中的滋养层细胞维持适当的增殖、迁移和血管生成是很关键的。

[0009] 单个基因进行编码以用于人 PlGF。然而, 对成熟 PlGF mRNA 进行剪接会产生三种不同长度的同工型: PlGF-1 (PlGF131)、PlGF-2 (PlGF152) 和 PlGF-3 (PlGF203)。已报道存在另一种变体 PlGF-4 (Yang, et al, JReprod Immunol, v 60, p53-60, 2003 (Yang 等人, 《生殖免疫学杂志》, 第 60 卷第 53-60 页, 2003 年))。PlGF 以糖基化同源二聚体的形式分泌。

[0010] 最近已表明 sFlt-1 和 PlGF 可以单独或联合用作生物标记来预测、诊断或监测先兆子痫 (Levine et al, NEJM, v 350, p 672-683, 2004 (Levine 等人, 《新英格兰医学杂志》, 第 350 卷第 672-683 页, 2004 年))。

[0011] 成熟人 PlGF-1 的氨基酸序列 (氨基酸残基 1-132) 已公布, 并可来自 Protein Data Bank (蛋白质数据库), 标识为 PDB 1FZV (Iyer, et al, J. Biol Chem, v 276, p 12153-12161, 2001 (Iyer 等人, 《生物化学杂志》, 第 276 卷第 12153-12161 页, 2001 年))。该序列在本文

标识为序列标识号 1：

[0012] MLPAVPPQQW ALSAGNGSSE VEVVPFQEVW GRSYCRALER

[0013] LVDVVSEYPS EVEHMFSPSC VSLLRCTGCC GDENLHCVPV

[0014] ETANVTMQLL KIRSGDRPSY VELTFSQHVR CECRPLREKM

[0015] KPERCGDAVP RR

[0016] 对易患先兆子痫或患有先兆子痫的个体的诊断可以通过确定在取自个体的生物样品（例如尿液、全血、血清、血浆、唾液等）中的血管内皮生长因子（尤其是 P1GF）和 / 或受体酪氨酸激酶（尤其是 sFlt-1）的存在或含量来进行。在分析检测中，参照物、校准物和对照物组合物对于确定目的被分析物的含量或确认被分析物的存在，以用于建立准确和精密的分析检测是很重要的。只要被分析物易得，可溶于适当的溶剂 - 对于生物被分析物通常为含水的、稳定的，并且不会与可能存在于该组合物中的其他组分有害地进行交互，制备此类液体或干物形式的组合物通常不会存在困难。如上所述，P1GF 结合 sFlt-1 以形成稳定的缔合复合物。因此，不能制备包含一起以独立量存在的天然蛋白质的组合物，这些天然蛋白质在分析检测中适于用作参照物、校准物或对照物来检测 P1GF 或 sFlt-1 或检测 P1GF 和 sFlt-1 两者。虽然可以制备含有各个分离的蛋白质的组合物，但有利的是能够制备含有蛋白质两者一起的组合物。因此，存在对包含这些已知量和独立量一起的蛋白质的参照物、校准物或对照物组合物的需求。本发明满足了该需求。

发明内容

[0017] 在一个方面，本发明涉及组合物，该组合物含有两种或更多种蛋白质，该蛋白质中的一种或多种经过改变以充分地减弱或基本防止或消除相互识别和结合。在分析检测组合物中的蛋白质中的一种或多种时，此类组合物可用作参照物、校准物或对照物。

[0018] 为了清楚说明，鉴于形成非共价键缔合复合物的未改变的 / 天然蛋白质 A 和 B 这两种蛋白质，术语“基本防止或消除其相互识别和结合”意指在测定其相互结合的分析中，改变的 A 结合到未改变的 / 天然的 B、或未改变的 / 天然的 A 结合到改变的 B、或改变的 A 结合到改变的 B 不可检测或几乎不可检测，或通过亲和常数的测定所定量测量的相互亲和力小于观察到的未改变的 / 天然的 A 与未改变的 / 天然的 B 的相互亲和力的大约 10%。术语“充分地减弱”意指进行相互结合，但已减弱到对于特定应用为合格的程度。

[0019] 考虑凡是有待在分析检测中确定未改变的或天然蛋白质 A 的存在或含量的情况，该分析检测采用了蛋白质 A 表位特异性的一种或多种受体。并且考虑蛋白质 A 经过改变以减弱或基本消除与蛋白质 B 的结合。虽然蛋白质 A 经过改变，但该表位一直为完整或合格地完整，使得它们保持识别并结合受体的能力。从而，改变的蛋白质 A 在校准分析中使用为合格的，从而确认样品中未改变的 / 天然蛋白质 A 的存在或用于验证分析未改变的 / 天然的蛋白质 A 的准确性和精密性。因此，受体通常能够识别并结合改变的和未改变的 / 天然形式的蛋白质两者。包括受体的分析检测通常为免疫分析法，该分析法使用以下物质作为受体：多克隆或单克隆抗体；完整的、聚合的和 / 或嵌合形式的抗体或抗体片段。也使用其他类型的受体，例如适体 (US 5, 840, 867 ;US 6, 207, 388)。在使用蛋白质 B 表位特异性受体来测定未改变的 / 天然蛋白质 B 的分析检测中，改变的蛋白质 A 的表位不必要一直为完整的。唯一重要的是改变的蛋白质 A 和蛋白质 B 的相互识别和结合已充分地减弱或基本消

除。

[0020] 如果蛋白质 A 和蛋白质 B 两者均被改变以减轻或基本消除其相互识别和结合,那么,在测定未改变的 / 天然蛋白质 A 的分析检测中、或在测定未改变的 / 天然蛋白质 B 的分析检测中、或在分析未改变的 / 天然蛋白质 A 和 B 两者的分析检测中(该分析使用蛋白质 A 表位特异性受体和蛋白质 B 表位特异性受体),这些改变的蛋白质中的表位在分析中保持识别和结合受体的能力。然后,含有改变的蛋白质 A 和改变的蛋白质 B 两者一起的组合物可用于校准检测,从而确认存在未改变的 / 天然蛋白质 A、或存在未改变的 / 天然蛋白质 B、或存在未改变的 / 天然蛋白质 A 和未改变的 / 天然蛋白质 B 两者,并用于验证检测的准确性和精密性。

[0021] 在另一方面,本发明涉及用于分析第一蛋白质或第二蛋白质或分析第一和第二蛋白质两者的参照物、校准物或对照物组合物,其中第一蛋白质或第二蛋白质或第一蛋白质和第二蛋白质的一个或多个氨基酸或一个或多个非氨基酸基团已被删除、修饰或被不同的氨基酸基团或非氨基酸基团替换,从而减弱或基本消除了第一蛋白质和第二蛋白质的相互结合。

[0022] 在另一方面,本发明涉及含有受体酪氨酸激酶(优选 fms 样酪氨酸激酶,更优选 sFlt-1)和血管内皮生长因子(其中任一者或两者被氨基酸或糖基删除、修饰或置换而改变)的组合物。血管内皮生长因子可以是胎盘生长因子,并优选 PlGF-1。优选的组合物包含 sFlt-1 和改变的 PlGF-1,改变的 PlGF-1 使丙氨酸取代以下物质:

[0023] a) 序列标识号 1 的第 25 位脯氨酸,或

[0024] b) 序列标识号 1 的第 27 位谷氨酰胺,或

[0025] c) 序列标识号 1 的第 60 位半胱氨酸,或

[0026] d) 序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸,或

[0027] e) 序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸,或

[0028] f) 序列标识号 1 的第 84 位天冬酰胺,或

[0029] g) 序列标识号 1 的第 98 位脯氨酸,或

[0030] h) 序列标识号 1 的第 100 位酪氨酸,或改变的 PlGF-1 具有取代序列标识号 1 的第 70 位半胱氨酸的甘氨酸、或在 a) 到 h) 中的丙氨酸置换和甘氨酸置换的任何组合。

[0031] 优选的组合物包含:sFlt-1;和改变的 PlGF-1,其具有取代序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸的丙氨酸和取代序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸。

[0032] 另一个优选的组合物包含:sFlt-1;和改变的 PlGF-1,其具有取代序列标识号 1 的第 70 位半胱氨酸的甘氨酸、取代序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸的丙氨酸和取代序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸的丙氨酸。

[0033] 在另一方面,本发明涉及用于对样品中蛋白质的检测进行校准的方法,该方法包括以下步骤:

[0034] 将上述含有已知量的蛋白质的组合物与蛋白质的第一表位特异性受体接触,从而形成包含受体和组合物的蛋白质的复合物;

[0035] 将第 1) 步骤中形成的复合物与蛋白质的第二表位特异性标记受体接触,从而形成包含受体、组合物的蛋白质和标记受体的复合物;

[0036] 检测来自结合的标记受体的信号或来自游离的标记受体的信号;以及,

[0037] 将来自游离的或结合的标记受体的信号与组合物中已知量的蛋白质相关。

[0038] 在另一方面,本发明涉及用于对样品中蛋白质的检测进行校准的方法,该方法包括以下步骤:

[0039] 1) 将上述含有已知量的蛋白质的组合物与蛋白质的第一表位特异性的固定的受体接触,从而形成包含固定的受体和组合物的蛋白质的复合物;

[0040] 2) 将第 1) 步骤中形成的复合物与蛋白质的第二表位特异性标记受体接触,从而形成包含固定的受体、组合物的蛋白质和标记受体的复合物;将结合的标记受体与游离的标记受体分离;

[0041] 3) 检测来自结合的标记受体的信号或来自游离的标记受体的信号;以及,

[0042] 4) 将来自游离的或结合的标记受体的信号与组合物中已知量的蛋白质相关。

[0043] 在另一方面,本发明涉及对样品中受体酪氨酸激酶和 / 或血管内皮生长因子的检测进行校准的方法,该方法包括以下步骤:

[0044] 1) 制备含有已知量或预先确定量的受体酪氨酸激酶和已知量或预先确定量的血管内皮生长因子(其中任一者或两者如上所述被改变以减弱或基本消除其相互识别和结合)的组合物;

[0045] 2) 将组合物与受体酪氨酸激酶的第一表位特异性受体和 / 或血管内皮生长因子的第一表位特异性受体接触,从而形成受体酪氨酸激酶的第一表位特异性受体和受体酪氨酸激酶和 / 或血管内皮生长因子的第一表位特异性受体和内皮生长因子的第一复合物;

[0046] 3) 将第 2) 步骤中形成的复合物与受体酪氨酸激酶的第二表位特异性标记受体和 / 或内皮生长因子的第二表位特异性标记受体接触;从而形成包含受体酪氨酸激酶的第一表位特异性受体、受体酪氨酸激酶和受体酪氨酸激酶的第二表位特异性标记受体和 / 或内皮生长因子的第一表位特异性受体、内皮生长因子和内皮生长因子的第二表位特异性标记受体的第二复合物;

[0047] 4) 将结合的受体酪氨酸激酶的特异性标记受体与游离的受体酪氨酸激酶的特异性标记受体分离和 / 或将结合的内皮生长因子的特异性标记受体与游离的内皮生长因子的特异性标记受体分离;

[0048] 5) 检测来自结合的受体酪氨酸激酶的特异性标记受体的信号或来自游离的受体酪氨酸激酶的特异性标记受体的信号;和 / 或,

[0049] 6) 检测来自结合的内皮生长因子的特异性标记受体的信号或来自游离的内皮生长因子的特异性标记受体的信号;和

[0050] 7) 将来自游离的或结合的受体酪氨酸激酶的特异性标记受体的信号和 / 或来自游离的或结合的内皮生长因子的特异性标记受体的信号与组合物中已知量的受体酪氨酸激酶和 / 或内皮生长因子相关。

[0051] 在一个优选的实施例中,受体酪氨酸激酶为 sFlt-1 并且内皮生长因子为 PlGF-1, 该 PlGF-1 已被改变以使丙氨酸取代以下物质:

[0052] a) 序列标识号 1 的第 25 位脯氨酸, 或

[0053] b) 序列标识号 1 的第 27 位谷氨酰胺, 或

[0054] c) 序列标识号 1 的第 60 位半胱氨酸, 或

[0055] d) 序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸, 或

[0056] e) 序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸, 或

[0057] f) 序列标识号 1 的第 84 位天冬酰胺, 或

[0058] g) 序列标识号 1 的第 98 位脯氨酸, 或

[0059] h) 序列标识号 1 的第 100 位酪氨酸, 或

[0060] 改变的 P1GF-1 具有取代序列标识号 1 的第 70 位半胱氨酸的甘氨酸、或在 a) 到 h) 中的丙氨酸置换和甘氨酸置换的任何组合。

[0061] 在一个更优选的实施例中, 受体酪氨酸激酶为 sFlt-1 并且内皮生长因子为 P1GF-1, 该 P1GF-1 已被改变以使丙氨酸取代序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸以及使丙氨酸取代序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸。

[0062] 在另一个更优选的实施例中, 受体酪氨酸激酶为 sFlt-1 并且内皮生长因子为 P1GF-1, 该 P1GF-1 已被改变以使甘氨酸取代序列标识号 1 的第 70 位半胱氨酸、使丙氨酸取代序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸以及使丙氨酸取代序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸。

[0063] 另一方面, 本发明涉及测定样品中蛋白质的量或确认样品中蛋白质存在的方法, 该方法包括以下步骤:

[0064] a) 将样品与蛋白质的第一表位特异性的固定的受体接触, 从而形成包含蛋白质的第一表位特异性的固定的受体和蛋白质的第一复合物;

[0065] b) 将第一复合物与蛋白质的第二表位特异性标记受体接触, 从而形成蛋白质的第一表位特异性受体、蛋白质和蛋白质的第二表位特异性标记受体的第二复合物;

[0066] c) 将在第二复合物中结合的标记受体与游离的标记受体分离;

[0067] d) 测定来自在第二复合物中结合的标记受体的信号或来自游离的标记受体的信号;

[0068] e) 将蛋白质的第一表位特异性的固定的受体与上述含有已知量或预先确定量的蛋白质的组合物接触, 从而形成包含蛋白质的第一表位特异性的固定的受体和组合物的蛋白质的第三复合物;

[0069] f) 将第三复合物与蛋白质的第二表位特异性标记受体接触, 从而形成蛋白质的第一表位特异性受体、组合物的蛋白质和蛋白质的第二表位特异性标记受体的第四复合物;

[0070] g) 将在第四复合物中结合的标记受体与游离的标记受体分离;

[0071] h) 测定来自在第四复合物中结合的标记受体的信号或来自游离的标记受体的信号; 和

[0072] i) 比较 d) 和 h) 中测定的信号, 进而确认蛋白质存在或测定样品中蛋白质含量。

[0073] 在一个优选的实施例中, 待测定的蛋白质为血管内皮生长因子。在一个更优选的实施例中, 待测定的蛋白质为 P1GF, 尤其是 P1GF-1, 并且组合物中的第二蛋白质为受体酪氨酸激酶。在一个更优选的实施例中, 待测定的蛋白质为 P1GF-1 并且组合物中的第二蛋白质为 sFlt-1。在一个更优选的实施例中, 待测定的蛋白质为 P1GF-1, 组合物中的第二蛋白质为 sFlt-1, 组合物的 P1GF-1 已被改变以具有取代以下物质的丙氨酸:

[0074] a) 序列标识号 1 的第 25 位脯氨酸, 或

[0075] b) 序列标识号 1 的第 27 位谷氨酰胺, 或

[0076] c) 序列标识号 1 的第 60 位半胱氨酸, 或

[0077] d) 序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸, 或

- [0078] e) 序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸, 或
- [0079] f) 序列标识号 1 的第 84 位天冬酰胺, 或
- [0080] g) 序列标识号 1 的第 98 位脯氨酸, 或
- [0081] h) 序列标识号 1 的第 100 位酪氨酸, 或
- [0082] 改变的 P1GF-1 具有取代序列标识号 1 的第 70 位半胱氨酸的甘氨酸、或在 a) 到 h) 中的丙氨酸置换和甘氨酸置换的任何组合。
- [0083] 在一个更优选的实施例中, 待测定的蛋白质为 P1GF-1, 组合物中的第二蛋白质为 sFlt-1, 并且组合物的 P1GF-1 具有取代序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸的丙氨酸和取代序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸的丙氨酸。
- [0084] 在另一个更优选的实施例中, 待测定的蛋白质为 P1GF-1, 组合物中的第二蛋白质为 sFlt-1, 并且组合物的 P1GF-1 具有取代序列标识号 1 的第 70 位半胱氨酸的甘氨酸、取代序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸的丙氨酸和取代序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸的丙氨酸。

附图说明

- [0085] 图 1A 示出了基于 ELISA 的 P1GF-1 变体结合到 Flt-1 的可溶性部分。用浓度在 1 和 16ng/ml 之间的范围递增的可溶性蛋白质进行 P1GF-1 变体到人 Flt-1 (以 0.5 μ g/ml 在 96 孔板上涂布) 的结合。野生型 P1GF-1 用作阳性对照。
- [0086] 图 1B 示出了基于 ELISA 的 P1GF-1 变体结合到 Flt-1 的可溶性部分。计算 P1GF-1 变体在浓度为 8ng/ml 时的结合相对于野生型 P1GF-1 的结合的百分比。所示结果代表三次独立实验的平均值。
- [0087] 图 2 示出了三种 P1GF 重组蛋白质的纯度。银染 (A: 通道 1、2 和 3) 和用单克隆 Rat-4 进行的蛋白质印迹 (B: 通道 4、5 和 6)。通道分配: M: SeaBlue ladder (Invitrogen); 通道 1、4: P126 (DE); 通道 2、5: P126 (AA) 以及通道 3、6: P126 (GAA)。

具体实施方式

- [0088] 虽然本发明将与先兆子痫和生物标记蛋白质 sFlt-1 和 P1GF-1 相关的某些优选的实施例进行描述, 但应当理解本发明涉及任何蛋白质组合物及其用途, 其中该组合物的一种或多种蛋白组分已被改变以减弱相互识别和结合。
- [0089] 不管先兆子痫生物标记蛋白质是使用单个分析平台或单个试剂盒测定, 或在独立分析或试剂盒中独立地测定, 有利的是具有在同一配方中包含生物标记蛋白两者一起的对照物或校准物, 这两种生物标记蛋白具有已知的或预先确定的浓度和所需的浓度比率。至少有两个问题与一起使用天然或未改变形式的 sFlt-1 和 P1GF 来制备参照物、校准物或对照物组合物相关: 首先 sFlt-1 和 P1GF 通过上述每一个蛋白质上存在的特定结合域彼此结合; 其次, 在中期到晚期孕妇的血清中, 无论她们是否患有先兆子痫, sFlt-1 相对于 P1GF 通常都显著过剩。由于 P1GF 几乎可以定量结合到 sFlt-1, 因此, 将未修饰的或天然的 P1GF 与未修饰的或天然的 sFlt-1 一起混合并保存, 在用于校准 P1GF 或 sFlt-1 的检测的分析的组合物中不会起到符合要求的作用。
- [0090] 已对 P1GF 进行了氨基酸置换以减弱或基本消除 sFlt-1 和 P1GF 的相互识别和结

合 (Errico et al J. Biol. Chem. 279, 43929-43939, 2004 (Errico 等人,《生物化学杂志》,第 279 卷第 43929-43939 页,2004 年))。这些氨基酸置换对 P1GF 的整个蛋白质结构没有显著的影响。结合表位一直为完整的,并使得这些改变的蛋白质与组合物中的 sFlt-1 一起混合和保存用作分析检测的参照物、校准物或对照物,这些分析检测设计用于检测未改变的或天然 P1GF、未改变的或天然 sFlt-1 或两者。

[0091] 由于可获得 P1GF 的氨基酸序列和三维晶体结构,因此为针对 P1GF 进行氨基酸修饰、删除或置换以便减弱或基本消除与 sFlt-1 的结合提供了便利。

[0092] 通常,有利的是知道结合蛋白质的二级、三级和四级结构、翻译后修饰(如磷酸化、糖基化、硫酸化和泛素化)、三维晶体结构以及与之共同形成缔合复合物的蛋白质的三维晶体结构。然而,该信息对于实践本发明是不需要的。虽然可进行与翻译后修饰相关的基团修饰、删除或置换,但优选可相互识别和结合的蛋白质中的一种或多种的一个或多个氨基酸的修饰、删除或置换。蛋白质位点特异性化学修饰为本领域所熟知 (Techniques in Protein Modification, Lundblad RL, CRC Press, 1995 (《蛋白质修饰技术》, Lundblad RL, CRC 出版社, 1995 年); Chemical Reagents for Protein Modification, Lundblad, RL, CRC Press, 3rd Ed, 2005 (《蛋白质修饰化学试剂(第三版)》, Lundblad, RL, CRC 出版社, 2005 年))。可用氨基酸化学/合成修饰实践本发明。优选的方法涉及基因工程技术。直接获得蛋白质的氨基酸序列是本领域的标准作法。相似地,从编码蛋白质的基因的核苷酸序列间接获得蛋白质的氨基酸序列是本领域的标准作法。可轻易地获得基因的核苷酸序列。并且,当可获得该基因时,可进行定点诱变以删除、置换或修饰一个或多个氨基酸。可以随机的方式或预定的方式进行。用定点诱变改变或突变的蛋白质可被克隆并易于得到。蛋白质和基因工程的详细资料和方案易于从许多出版物和其中的引用文献中得到 (Molecular Cloning, Sambrook J and Russell DW, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002 (《分子克隆》, Sambrook J 和 Russell DW, Cold Spring Harbor Laboratory 出版社, 2002 年); Recombinant Gene Expression Protocols, Tuan RS ed, Humana Press, 1997 (《重组基因的表达方案》, Tuan RS 编辑, Humana 出版社, 1997 年); Methods in Molecular Biology and Protein Chemistry, Spangler BD, John Wiley & Sons Ltd. 2002 (《分子生物学和蛋白质化学方法》, Spangler BD, John Wiley & Sons Ltd., 2002 年); Genetic Engineering Fundamentals, Kammermeyer K and Clark VL, Marcel Dekker Inc, 1989 (《基因工程基本原理》, Kammermeyer K 和 Clark VL, Marcel Dekker Inc, 1989 年); Mayo et al, Nature v 306, p 86-88, 1983 (Mayo 等人,《自然》,第 306 卷第 86-88 页,1983 年); Suggs et al, Proc Nat Acad Sci USA v 78, p 6613-6617 1981 (Suggs 等人,《美国国家科学院院刊》,第 78 卷第 6613-6617 页,1981 年); Scott et al Nature v 302, p 538-540, 1983 (Scott 等人,《自然》,第 302 卷第 538-540 页,1983 年); Helfman et al, Proc Nat Acad Sci USA, v 80, p 31-35, 1983 (Helfman 等人,《美国国家科学院院刊》,第 80 卷第 31-35 页,1983 年); Young et al, Proc Nat Acad Sci USA, v 80, p 1194-1198, 1983 (Young 等人,《美国国家科学院院刊》,第 80 卷第 1194-1198 页,1983 年); US 4, 237, 224; US 4, 273, 875; US 4, 293, 652; US4, 870, 009)。

[0093] 可检测改变的蛋白质来测定与它的伴侣蛋白质的相互识别和结合是否已减弱或基本消除。可使用本领域熟知的实验方案进行该检测。也可用表位特异性受体/抗体来

检测改变的蛋白质,以测定表位相比于未改变的或天然蛋白质是否充分地保持了原状。可定量地或定性地鉴别亲和力。(Errico et al, J Biol Chem, v 279, p 43929-43939, 2004(Errico 等人,《生物化学杂志》,第 279 卷第 43929-43939 页,2004 年);Piehler et al, J Immunol Methods, v 201(2), p189-206,1997(Piehler 等人,《免疫学方法杂志》,第 201 卷第 2 期第 189-206 页,1997 年);Casasnovas et al, v 270, p 13216-13224, 1995(Casasnovas 等人,第 270 卷第 13216-13224 页,1995 年);Boone et al, J Virol, v 11, p 515-519, 1973(Boone 等人,《病毒学杂志》,第 11 卷第 515-519 页,1973 年);美国专利 7,081,346;US7,081,346;US 5,324,633;US 4,340,668;US 2005/0175999)。

[0094] 无论基团(氨基酸和/或非氨基酸)的性质如何改变,或蛋白质性质如何改变(基团的修饰(直接化学修饰:氧化、还原等)、删除或置换),无论参与相互识别和结合的蛋白质中的一个或每一个被改变,两个重要的功能特征是:1)改变的蛋白质与未改变的伴侣蛋白质的相互识别和结合的特性、或当每一个已被改变时伴侣蛋白质的结合使得相互识别和结合被充分地减弱或基本消除,以及 2)如果该特性如前所讨论为特定的应用所需的话,任何改变的蛋白质中的一个或多个表位保持的结合特性与未改变的或天然蛋白质中的表位充分地类似或基本相同。

[0095] 实例 I

[0096] 人 P1GF-1 和变体、sFlt-1、涉及人 P1GF 的抗人 P1GF-1 抗体、与 sFlt-1 结合的 P1GF 和变体的结合特性、ELISA 分析测定 P1GF 和其他材料以及实验方案在 Errico et al, J Biol Chem, v 279, p 43929-43939, 2004(Errico 等人,《生物化学杂志》,279 卷第 43929-43939 页,2004 年)中描述,并在本文中部分再现。关于本文没有明确说明的细胞培养、质粒、细胞系的选择和其他材料以及实验方案,可查阅 Errico 等人的参考文献获取详细内容。

[0097] 材料

[0098] 如 Errico 等人所述,抗人 P1GF 单克隆抗体和人 Flt-1 (Flt-1/Fc 嵌合体)可得自 R&D Systems (Minneapolis, Minnesota USA)。羊抗小鼠 IgG-辣根过氧化物酶 (HRP) 可得自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California USA; www.scbt.com)。

[0099] P1GF 变体的构建

[0100] Errico 等人用 PCR 技术获得 P1GF 变体,该 PCR 技术使用称为 pchP1GF-1 的质粒作为模板进行,并且 PCR 使用映射区域的互补引物进行,该区域对有待突变为丙氨酸的氨基酸进行编码并且进行特定的核苷酸修饰。为了制备具有双重突变的 P1GF 变体,采用具有突变两者的引物。将扩增的 DNA 纯化,并用来转化感受态细菌。用双脱氧核苷酸法对质粒进行双向测序。以下 P1GF-1 单个残基突变为丙氨酸:Asn-16、Pro-25、Gln-27、Cys-60、Asp-72、Glu-73、Asn-74、Asn-84、Pro-98 和 Tyr-100。也产生 P1GF-1 的双重突变体:Asp 72 突变为 Ala, Glu 73 突变为 Ala。

[0101] 含有改变的 P1GF-1 的校准物 / 对照物组合物

[0102] 通过将未改变的 sFlt-1 与改变的 P1GF-1、尤其是双重突变体(其中丙氨酸置换序列标识号 1 的第 72 位天冬氨酸以及序列标识号 1 的第 73 位谷氨酸)、或三重突变体(其中还有另一个突变为甘氨酸置换第 70 位半胱氨酸)混合来制备含有改变的 P1GF-1 和 sFlt-1 的校准物 / 对照物。这些组合物可以由干物形式的制剂或由工作储备水溶液单独混合而成,其中工作储备水溶液是使用在所需 pH 的任何合适的缓冲液(例如磷酸盐 (PBS), pH7.5)

所制备,包含任何其他可用的或所需的附加物(例如抗氧化剂、防腐剂等)。为了进行示意性的说明,改变的 P1GF-1 的浓度在 0 到约 1000pg/mL 的范围内,并且 sF1t-1 固定在 100pg/mL,但两者可以使用其他浓度范围。将未改变的 sF1t-1 与双重突变体或三重突变体的改变 P1GF 混合于 PBS(10g NaCl、0.25g KCl、1.8g Na₂HPO₄、0.3g KH₂PO₄, pH7.5) 中以产生以下参照物、校准物或对照物组:

[0103]

改变的 P1GF1 (pg/mL)	SF1t-1 (pg/mL)
0	100
50	100
100	100
500	100
1000	100

[0104] ELISA 法检测 P1GF

[0105] 用检测 P1GF 的 ELISA 法确定取自孕妇血清样品中的 P1GF 的量。用含有上述改变的 P1GF-1 和 sF1t-1 的溶液组校准 ELISA(以下详细描述)。观察到的该组的每一个 P1GF-1 水平的信号与改变的 P1GF-1 的浓度相关。该关联可以图形形式表示或用适当的统计学和数学校准方法相联系。将在使用血清样品的 ELISA 分析中所观察到的信号与校准图形作比较,以确定样品中 P1GF 的浓度或用建立的数学联系转化为浓度单位。

[0106] 按如下操作进行 ELISA:为了测定样品中的 P1GF,用 1 μg/ml 抗人 P1GF-1 单克隆抗体的 PBS 溶液涂布 96 孔板,每孔 100 μl,并在 4℃ 下孵育过夜。用含 0.05% 的 TWEEN 20(PBT) 的 PBS 清洗孔一次,通过每孔加入 280 μl 的 1% 牛血清白蛋白的 PBS 溶液并在室温(RT)下孵育 3 小时来封闭非特异性结合位点。将孔脱气并保持在冷态下直至使用。检测期间,每一个校准物水平或血清样品取 100 μl,并用 PBET(含有 0.1% 牛血清白蛋白、5mM EDTA、0.05% 的 Tween 20) 适当稀释,然后在 37℃ 下孵育 1 小时。用 PBT 清洗孔五次,并加入另一种用 PBET 稀释到 37ng/ml 的抗人 P1GF-1 单克隆抗体(此抗体为 HRP 共轭的),并在 37℃ 下孵育 1 小时。用 PBT 清洗孔五次,加入 100 μl 由 1mg/ml 的邻苯二胺(溶于 50mM 柠檬酸磷酸盐缓冲液, pH5) 和 0.006% H₂O₂ 组成的 HRP 底物,并在室温暗处孵育 30 分钟。每孔加入 25 μl 的 4 当量 H₂SO₄ 终止反应,用微板阅读器在 490nm 处测定信号吸光度。

[0107] 改变的 P1GF-1 和未改变的 P1GF 与 sF1t-1 结合的比较

[0108] Errico 等人描述了测定改变的 P1GF-1 和未改变的 / 天然 P1GF-1 与 F1t-1 结合的实验。基本上,96 孔板用 0.5 μg/ml 的可溶性人 F1t-1(F1t-1/Fc chimera) 的 PBS(pH7.5) 溶液涂布,每孔 100 μl,并在室温下孵育过夜。用 PBT 清洗板五次,在用上述的牛血清白蛋白溶液封闭孔的非特异性位点后,通过向孔中加入改变的 P1GF-1 或未改变的 / 天然 P1GF 以使结合反应进行,在 37℃ 下孵育 1 小时并在室温下孵育 1 小时。如上所述用 PBT 清洗孔

并用生物素酰化的抗人 P1GF-1 多克隆抗体孵育 (300ng/ml, 溶于 PBET 中), 在 37°C 下孵育 1 小时并在室温下孵育 1 小时。如上所述用 ELISA 分析法进行检测, 比较用改变的 P1GF-1 和未改变的 / 天然 P1GF-1 获得的信号。Errico 等人获得的结果在图 1A 和图 1B 中得到再现。

[0109] 实例 II

[0110] 比较重组 P1GF (DE) 和 P1GF (AA)

[0111] 实验目的:

[0112] 就以下两种情况评估两种重组 P1GF 蛋白质:(1) 它们与人 P1GF 特异性单克隆抗体的结合活性;以及 (2) 它们与 sFlt 的结合活性, 即配体:受体复合物的形成。

[0113] 材料和试剂:

[0114] (1) 重组 P1GF:

[0115] 使用两种形式的纯化的重组 P1GF。

[0116] 该蛋白质由 21 个不属于 P1GF 的氨基酸前导序列组成。前导序列含有“6×His”标签和 4-氨基酸 Xa 识别和裂解位点。

[0117] 前导序列:序列标识号 2:MRGSHHHHHHSGSGSGIEGR

[0118] P1GF (DE) 中的 P1GF 部分序列:氨基酸序列对应野生型 P1GF 的序列标识号 1 中第 4-132 位氨基酸, 从而导致以下的 DE 氨基酸序列:

[0119] 序列标识号 3:

[0120] AVPPQQWALS AGNGSSEVEV VPFQEVWGRS YCRALERLVD VVSEYPSEVE

[0121] HMFSPSCVSL LRCTGCCGDE NLHCVPVETA NVTMQLLKIR SGDRPSYVEL

[0122] TFSQHVRCEC RPLREKMKPE RCGDAVPRR

[0123] P1GF (AA) 中的 P1GF 部分序列:氨基酸序列对应野生型 P1GF 的序列标识号 1 中第 4-132 位氨基酸, 具有在序列标识号 1 的第 72 和 73 位氨基酸处制备的两个突变, 从而导致以下 AA 氨基酸序列:

[0124] 序列标识号 4:

[0125] AVPPQQWALS AGNGSSEVEV VPFQEVWGRS YCRALERLVD VVSEYPSEVE

[0126] HMFSPSCVSL LRCTGCCGAA NLHCVPVETA NVTMQLLKIR SGDRPSYVEL

[0127] TFSQHVRCEC RPLREKMKPE RCGDAVPRR

[0128] (2) 重组 sFlt:

[0129] 得自 Scios Inc. (Mountain View, California USA ;www.sciosinc.com) (批号 9225-89) 的全长 sFlt, 由 687 个可溶性 fms 样酪氨酸激酶 1 (sFlt-1) 的氨基酸组成。

[0130] sFlt-1 序列:

[0131] 序列标识号 5:

[0132] MVS YWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKG TQHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSK
ESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKK KETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEII
HMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTH
RQTNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDK
MQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFPSPEVVWLDGLPAT
EKSARYLTRGYSIIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVNVKPKIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTC

TAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMAIEGKNKMASTLVVADSRI SG
 IYICIASNKVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLEKMPTEGEDLKL SCTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMHYSISKQK
 MAITKEHSITLNLTIMNVS LQDSGTYACRARNVYTGEEILQKKEITIRGEHCNKKAVFSRISKFKSTRNDCTTQSNV
 KH

[0133] (3) 人 sFlt-1 和人 P1GF 的单克隆抗体：

[0134]	单克隆抗体名称	来源	目录号	批号	克隆号
[0135]	RD-1 小鼠抗 sFlt	RD Sys		CGG07605B	49560
[0136]	RD-2 小鼠抗 sFlt	RD Sys		BYC01605A	49543
[0137]	Rat-1 大鼠抗 P1GF	RD Sys	不适用	1103925	358903
[0138]	Rat-2 大鼠抗 P1GF	RD Sys	不适用	1103933	358939
[0139]	Rat-3 大鼠抗 P1GF	RD Sys	不适用	1103931	358932
[0140]	Rat-4 大鼠抗 P1GF	RD Sys	不适用	1103926	358905
[0141]	Rat-5 大鼠抗 P1GF	RD Sys	不适用	1103927	358907
[0142]	MS-1 小鼠抗 P1GF	RD Sys	MAB264	不适用	37203

[0143] 实验实例：

[0144] (1)ELISA 分析 1：

[0145] • 用 0.5 μg/mL 的重组 P1GF (DE) 或 P1GF (AA) 涂布高结合微孔板并用 BSA/PBS 封闭

[0146] • 标准的 ELISA 步骤由以下组成：将单克隆抗体稀释于酪蛋白 /PBS 中；将 HRP 标记的驴抗小鼠 IgG 或驴抗大鼠 IgG 以 1：3K 稀释于酪蛋白 /PBS 中；每孔加入 100 μL 样品或缀合物体积；每一个步骤在 37°C /30 分钟 / 振荡条件下孵育；清洗板 6 次，100 μL 的 OPD 底物在 25°C 下显色 30 分钟；加入 25 μL 的终止溶液；记录 492nm 处的 OD 值。

[0147] • 分析 1 的 ELISA 结果在表 1 中示出。

[0148] 表 1 抗 P1GF 单克隆抗体与重组 P1GF (未改变的和改变的) 的识别

[0149]

涂布的重组 P1GF (0.5 μg/mL)	对涂布的 P1GF 的抗体结合活性 (OD)							
	抗 P1GF 单克隆抗体名称、克隆号和浓度 (ng/mL)							
	抗体	Ms-1	Rat1	Rat2	Rat4	Rat3	Rat5	
P1GF-1 (DE)	(10ng/mL)	37203	358903	358939	358905	(100ng/mL)	358932	358907
P1GF-1 (AA)		1.823	2.098	2.237	2.114		1.233	1.256
		2.650	1.789	2.233	1.935		1.305	1.297

[0150] • 结论：所有检测的单克隆抗体对 P1GF (DE) 和 P1GF (AA) 两者均做出反应，指示出 D72/E73A 突变没有影响单克隆抗体的结合并且这些抗体表位的位点不在这两个突变位点处。

[0151] (2)ELISA 分析 2：

[0152] • 用 0.5 μg/mL 的重组 P1GF (DE) 或 P1GF (AA) 涂布高结合微孔板并用 BSA/PBS 封闭

[0153] • 标准 ELISA 步骤由以下组成：第一板使用以不同的浓度稀释于酪蛋白 /PBS 的 sFlt 孵育；第二板使用含有 RD-1 和 RD-2 两种单克隆抗体 (每一种的浓度为 0.1 μg/mL)

的抗 sFlt 混合溶液孵育；第三板使用 HRP 标记的驴抗小鼠 IgG(以 1 : 4K 稀释于酪蛋白 / PBS 中) 孵育；以及第四板使用 100 μ L 的 OPD 底物孵育,使 OPD 底物在 25℃ 下显色 30 分钟。第一、第二和第三板孵育步骤为 37℃ 下振摇 15-20 分钟；每一个步骤之间清洗板 6 次。第 4 次孵育后加入 25 μ L 的终止液并记录 492nm 处的 OD 值。

[0154] • 分析 2 的 ELISA 结果在表 2 中示出。

[0155] 表 2 sFlt 与重组 P1GF(改变的和未改变的)的结合

涂布的重组 P1GF (0.5 μg/mL)	sFlt 与涂布的 P1GF 形成复合物			
	孵育时 sFlt 的浓度 (ng/mL)			
	1800	600	200	66.67
BSA (对照)	0.004	0.006	0.010	0.020
P1GF-1 (DE)	1.728	1.204	0.524	0.316
P1GF-1 (AA)	0.150	0.080	0.060	0.040

* 用小鼠抗 sFlt 和 HRP 标记的抗小鼠缀合物检测结合的 sFlt:P1GF 复合物

[0157] • 结论:sFlt 与涂布的 P1GF(DE) 形成受体:配体复合物。然而,使用 P1GF(AA) 突变体时,这种复合物的形成极大地减少,指示出序列标识号 1 的第 72 和 73 位氨基酸对于 sFlt-1 结合和复合物的形成是十分重要的。

[0158] (3)Biacore 分析:

[0159] • sFlt 经 NHS/EDC 与 RU = 6738 偶联固定于 Biacore 芯片 FC-2 上。FC-1 为空白,作为阴性对照。

[0160] • 将 P1GF(DE) 或 P1GF(AA) 注入 FC-1 和 FC-2 来评估复合物的形成

[0161] • Biacore 结果在表 3 中示出。

[0162] 表 3 sFlt:P1GF 复合物的 Biacore 测定

CMS 芯片:		重组人 P1GF 20 μg/mL	
		P1GF (DE)	P1GF (AA)
Biacore (RU)	FC1: 空白	11	12
	FC2: sFlt	156	30
	FC2 - FC1	145	18

[0164] • 结论:注入的 P1GF(DE) 结合于固定的 sFlt,从而形成受体:配体复合物,而注入的 P1GF(AA) 与固定的 sFlt 的结合较弱。

[0165] 实例 III

[0166] 野生型重组 P1GF 和两个额外的 P1GF 突变体之间的比较

[0167] 实验目的:

[0168] 构建三种额外的重组 P1GF 蛋白质,并进行评价以用于:(1) 它们与人 P1GF 特异性单克隆抗体的结合活性;以及(2) 它们与 sFlt 的结合活性,即配体:受体复合物的形成。

[0169] 材料和试剂:

[0170] (1) 按照如下方式构建三种额外的重组 P1GF 蛋白质:

[0171] -P126(DE):重组 P1GF 野生型:序列标识号 6:

[0172] MRGSAVPPQQWALSAGNGSSEVEVVPFQEVWGRSYCRALERLVDVVSEYPSEVEHMFSP

[0173] SCVSLLRCTGCCGDENLHCVPVETANVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQHVRCECRPLR

[0174] EKMKPERCGDAVGPQIVGGVYLL

[0175] 前四个氨基酸残基为无关氨基酸 (MRGS);最后的十个氨基酸为 10G 表位 (C 端标签);位于 10G 表位前面的两个氨基酸也是无关氨基酸 (Gly-Pro);在无关氨基酸 (即在 MRGS 之后开始和在 GP 之前) 之间的 126 位氨基酸序列是与序列标识号 1 的第 4 至 129 位氨基酸相同的 P1GF 序列。

[0176] -P126 (AA):P1GF 突变体 1:序列标识号 7:

[0177] MRGSAVPPQQWALSAGNGSSEVEVVPFQEVWGRSYCRALERLVDVVSEYPSEVEHMFSP

[0178] SCVSLLRCTGCCGAANLHCVPVETANVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQHVRCECRPLR

[0179] EKMKPERCGDAVGPQIVGGVYLL

[0180] 与 P126 (DE) 类似,不同的是带下划线的氨基酸 (AA) 是两个突变的氨基酸

[0181] -P126 (GAA):P1GF 突变体 2:序列标识号 8:

[0182] MRGSAVPPQQWALSAGNGSSEVEVVPFQEVWGRSYCRALERLVDVVSEYPSEVEHMFSP

[0183] SCVSLLRCTGCCGAANLHCVPVETANVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQHVRCECRPLR

[0184] EKMKPERCGDAVGPQIVGGVYLL

[0185] 与 P1GF 突变体 1 P126 (AA) 类似,不同的是在 AA 前二位的氨基酸的另外突变是由 C 突变为 G

[0186] 所有三种重组蛋白质都在细菌中表达并都形成不溶性包涵体。超声波降解后,用 4M 尿素的 PBS 溶液和 2M 尿素的 PBS 溶液洗涤,包涵体最终溶解于 8M 尿素 /15mM 还原谷胱甘肽 (GSH) /50mM Tris-HCL (pH7.8) 中。P1GF 蛋白质通过以下三个步骤的透析进行再折叠:(1) 在透析缓冲液中透析 24 小时,该透析缓冲液包含 3M 尿素 /50mM TRIS (pH7.5) /2mM EDTA /0.2M 精氨酸 /2mM GSH;(2) 在透析缓冲液中透析 24 小时,该透析缓冲液包含 2M 尿素 /50mM TRIS (pH7.5) /2mM EDTA /0.2M 精氨酸 /1.2mM GSH /0.4mM 氧化谷胱甘肽 (GSSG);以及 (3) 在透析缓冲液中透析 24 小时,该透析缓冲液包含 0.8M 尿素 /20mM TRIS (pH7.5) /2mM EDTA /0.2M 精氨酸 /0.48mM GSH /0.16mM GSSG。通过将透析的蛋白质溶液装载到亲和柱中来进一步纯化再折叠的 P1GF,通过交联 10G 标签特异性单克隆抗体和 CNBr 活化的 Sepharose 4Fast Flow (琼脂糖凝胶 4FF) 树脂 (GE 目录号 17-0981-01) 而制备。然后用 40% 的乙腈洗提结合的 P1GF。最后在缓冲液交换为 PBS 后得到纯化的 P1GF 蛋白质。

[0187] (2) 抗人 P1GF 单克隆抗体、抗人 sFlt 单克隆抗体可得自 R&D Systems (Minneapolis, Minnesota USA);HRP 标记的驴抗大鼠 IgG (目录号 712-035-150) 可得自 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (WestGrove, Pennsylvania, USA);ELISA 板为得自 Corning Life Sciences 的 Costar hind binding (目录号 2592);电泳凝胶 NuPAGE 4-12%、PVDF 转移膜和 SeeBlue ladder 得自 Invitrogen (Carlsbad CA, USA);阻滞剂酪蛋白 /PBS 和 SuperSignal West Dura 蛋白质印迹底物购自 Pierce (Rockford, IL, USA)。CNBr 活化的 Sepharose 4 Fast Flow (琼脂糖凝胶 4FF) 树脂 (目录号 17-0981-01) 和银染试剂盒 (目录号 17-1150-01) 得自 GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)

[0188] 实验实例:

[0189] (1) 重组 P1GF:图 2 示出了通过银染和蛋白质印迹方法检测的三种 P1GF 重组蛋白质的纯度。

[0190] (2)ELISA 分析 1

[0191] • 高结合微孔板用 0.5 μ g/mL 的重组 P126 (DE) 或 P126 (AA) 或 P126 (GAA) 涂布并用 BSA/PBS 封闭

[0192] • 标准的 ELISA 步骤由以下组成:将单克隆抗体稀释于酪蛋白/PBS 中;将 HRP 标记的驴抗小鼠 IgG 或驴抗大鼠 IgG 以 1 : 3K 稀释于酪蛋白/PBS 中;每孔加入 100 μ L 样品或缀合物体积;每一个步骤在 37 $^{\circ}$ C /30 分钟/振摇条件下孵育;清洗板 6 次,100 μ L 的 OPD 底物在 25 $^{\circ}$ C 下显色 30 分钟;加入 25 μ L 的终止溶液;记录 492nm 处的 OD 值。

[0193] • ELISA 结果在表 4 中示出。

[0194]

涂布的重组 PIGF (0.5 μ g/mL)		对涂布的 PIGF 的抗体结合活性 (OD)						
		抗 PIGF 单克隆抗体名称、克隆号和浓度 (ng/mL)						
		Ms-1	Rat1	Rat2	Rat4		Rat3	Rat5
		37203	358903	358939	358905		358932	358907
P126 (DE)	1ng/mL 的抗体	1.023	1.368	1.497	1.634	10ng/mL 的抗体	0.779	0.834
P126 (AA)		0.967	1.301	1.633	1.681		0.681	0.697
P126 (GAA)		1.134	1.226	1.530	1.591		0.806	0.799

[0195] • 结论:所有检测的单克隆抗体都对 P126 (DE)、P126 (AA) 和 P126 (GAA) 做出反应,指示出 D72A/E73A 的双重突变和 C70G/D72A/E73A 的三重突变没有影响单克隆抗体结合并且这些抗体表位的位点不在这些突变位点处。

[0196] (3)ELISA 分析 2:

[0197] • 高结合微孔板用 0.5 μ g/mL 的重组 P126 (DE)、P126 (AA) 和 P126 (GAA) 涂布并用 BSA/PBS 封闭

[0198] • 标准 ELISA 步骤由以下组成:第一板使用以不同的浓度稀释于酪蛋白/PBS 的 sFlt 孵育;第二板使用含有 RD-1 和 RD-2 的两种单克隆抗体(每一种的浓度为 0.1 μ g/mL)的抗 sFlt 混合溶液孵育;第三板使用 HRP 标记的驴抗小鼠 IgG(以 1 : 4K 稀释于酪蛋白/PBS 中)孵育;以及第四板使用 100 μ L 的 OPD 底物孵育,使 OPD 底物在 25 $^{\circ}$ C 下显色 30 分钟。第一、第二和第三板孵育步骤为 37 $^{\circ}$ C 下振摇 15-20 分钟;每一个步骤之间清洗板 6 次。第 4 次孵育后加入 25 μ L 的终止液并记录 492nm 处的 OD 值。

[0199] • ELISA 结果在表 5 中示出。

涂布的重组 PIGF (0.5 μ g/mL)	sFlt 与涂布的 PIGF 形成复合物			
	孵育时 sFlt 的浓度 (ng/mL)			
	1800	600	200	66.67
BSA (对照)	0.009	0.008	0.005	0.003
P126 (DE)	>3	1.833	0.833	0.347
P126 (AA)	0.210	0.182	0.115	0.143
P126 (GAA)	0.150	0.101	0.095	0.088

* 用小鼠抗 sFlt 和 HRP 标记的抗小鼠缀合物检测结合的 sFlt: PIGF 复合物

[0200]

[0201]

[0202] • 结论 :sFlt 与涂布的 P126(DE) 形成受体 :配体复合物。然而,使用 P126(AA) 突变体和 P126(GAA) 突变体时,这种复合物的形成极大地减少,指示出序列标识号 1 的第 70、72 和 73 位氨基酸对于 sFlt-1 结合和复合物的形成是十分重要的。

[0203] (4)ELISA 分析 3:

[0204] • 用 0.5 μ g/mL 的重组 sFlt 涂布高结合微孔板并用 BSA/PBS 封闭

[0205] • 标准 ELISA 步骤由以下组成:第一板使用以不同的浓度稀释于酪蛋白 /PBS 的 P126(DE) 或 P126(AA) 或 P126(GAA) 孵育;第二板使用 0.1 μ g/mL 的抗 PIGF Rat-4 单克隆抗体溶液孵育;第三板使用 HRP 标记的驴抗大鼠 IgG(以 1 : 4K 稀释于酪蛋白 /PBS 中)孵育;

[0206] 以及第四板使用 100 μ L OPD 底物孵育,使 OPD 底物在 25 $^{\circ}$ C 下显色 30 分钟。第一、第二和第三板孵育步骤为 37 $^{\circ}$ C 下振摇 15-20 分钟;每一个步骤之间清洗板 6 次。第 4 次孵育后加入 25 μ L 的终止液并记录 492nm 处的 OD 值。

[0207] • ELISA 结果在表 6 中示出。

[0208]

表 6 重组 PIGF (未改变的和改变的)的结合

涂布的 sFlt (0.5ng/mL)	PIGF (改变的和未改变的)的复合物的形成				
	孵育时 PIGF 的浓度 (ng/mL)				
	1000	500	250	100	0
P126 (DE)	>3	1.388	0.557	0.259	0.021
P126 (AA)	0.299	0.118	0.101	0.077	0.009
P126 (GAA)	0.119	0.117	0.069	0.088	0.051

* 用小鼠抗 PIGF (Rat-4)和缀合物检测结合的 sFlt: PIGF 复合物

[0209] • 结论 :未改变的 PIGF、P126(DE) 与涂布的 sFlt 形成配体 :受体复合物。然而,改变的 PIGF (P126(AA) 和 P126(GAA)) 未能形成此类复合物,指示出序列标识号 1 的第 70、72 和 73 位氨基酸对于 sFlt 结合和复合物的形成是十分重要的。

[0210] 本发明具体实施例的描述出于示例性的目的。本发明并非意图进行穷举性的说明或将本发明的范围限制为本文所述的具体形式。本领域的普通技术人员将理解,如权利要求书中所述,在不脱离本发明的精神和范围的情况下可进行各种修改。

[0211] 本文引用的所有专利、专利申请和出版物据此以引用方式并入。

序列表

<110>Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.

<120> 用于同时分析能够彼此络合的蛋白质的校准物 / 对照物

<130>CDS5073WOPCT

<150>US 61/019, 443

<151>2008-01-07

<160>8

<170>3.3 版 PatentIn

<210>1

<211>132

<212>PRT

<213> 智人

<400>1

```

Met Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn
1           5           10           15
Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg
           20           25           30
Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr
           35           40           45
Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu
           50           55           60
Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro Val
65           70           75           80
Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp
           85           90           95
Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu
           100          105          110
Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala
           115          120          125
Val Pro Arg Arg
           130

```

<210>2

<211>21

<212>PRT

<213> 智人

<400>2

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Ile Glu Gly Arg
 20

<210>3

<211>129

<212>PRT

<213> 智人

<400>3

Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn Gly Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser Tyr Cys
 20 25 30
 Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr Pro Ser Glu
 35 40 45
 Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu Arg Cys Thr
 50 55 60
 Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro Val Glu Thr Ala
 65 70 75 80
 Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp Arg Pro Ser
 85 90 95
 Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu Cys Arg Pro
 100 105 110
 Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg
 115 120 125
 Arg

<210>4

<211>129

<212>PRT

<213> 智人

<400>4

Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn Gly Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser Tyr Cys
 20 25 30
 Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr Pro Ser Glu
 35 40 45
 Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu Arg Cys Thr
 50 55 60
 Gly Cys Cys Gly Ala Ala Asn Leu His Cys Val Pro Val Glu Thr Ala
 65 70 75 80
 Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp Arg Pro Ser
 85 90 95
 Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu Cys Arg Pro
 100 105 110
 Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg
 115 120 125
 Arg

<210>5

<211>687

<212>PRT

<213> 智人

<400>5

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro
 20 25 30
 Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr
 35 40 45
 Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys Trp Ser Leu Pro
 50 55 60
 Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala
 65 70 75 80
 Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr
 85 90 95

Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val
100 105 110

Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile
115 120 125

Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
130 135 140

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
145 150 155 160

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
165 170 175

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
180 185 190

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
195 200 205

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
210 215 220

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val
225 230 235 240

Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr
245 250 255

Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys
260 265 270

Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His
275 280 285

Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys
290 295 300

Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys
305 310 315 320

Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val
325 330 335

Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr Val Ala Gly Lys Arg Ser
340 345 350

Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val
355 360 365

Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu
370 375 380

Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala
385 390 395 400

Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys

	405	410	415
Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val Lys Pro Gln Ile Tyr Glu			
	420	425	430
Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala Leu Tyr Pro Leu Gly Ser			
	435	440	445
Arg Gln Ile Leu Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Ile Pro Gln Pro Thr Ile			
	450	455	460
Lys Trp Phe Trp His Pro Cys Asn His Asn His Ser Glu Ala Arg Cys			
465	470	475	480
Asp Phe Cys Ser Asn Asn Glu Glu Ser Phe Ile Leu Asp Ala Asp Ser			
	485	490	495
Asn Met Gly Asn Arg Ile Glu Ser Ile Thr Gln Arg Met Ala Ile Ile			
	500	505	510
Glu Gly Lys Asn Lys Met Ala Ser Thr Leu Val Val Ala Asp Ser Arg			
	515	520	525
Ile Ser Gly Ile Tyr Ile Cys Ile Ala Ser Asn Lys Val Gly Thr Val			
	530	535	540
Gly Arg Asn Ile Ser Phe Tyr Ile Thr Asp Val Pro Asn Gly Phe His			
545	550	555	560
Val Asn Leu Glu Lys Met Pro Thr Glu Gly Glu Asp Leu Lys Leu Ser			
	565	570	575
Cys Thr Val Asn Lys Phe Leu Tyr Arg Asp Val Thr Trp Ile Leu Leu			
	580	585	590
Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr Met His Tyr Ser Ile Ser Lys Gln Lys			
	595	600	605
Met Ala Ile Thr Lys Glu His Ser Ile Thr Leu Asn Leu Thr Ile Met			
	610	615	620
Asn Val Ser Leu Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ala Cys Arg Ala Arg Asn			
625	630	635	640
Val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln Lys Lys Glu Ile Thr Ile Arg			
	645	650	655
Gly Glu His Cys Asn Lys Lys Ala Val Phe Ser Arg Ile Ser Lys Phe			
	660	665	670
Lys Ser Thr Arg Asn Asp Cys Thr Thr Gln Ser Asn Val Lys His			
	675	680	685

<210>6

<211>142

<212>PRT

<213> 智人

<400>6

```

Met Arg Gly Ser Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
1           5           10           15
Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
           20           25           30
Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
           35           40           45
Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
           50           55           60
Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu ASn Leu His Cys Val Pro
65           70           75           80
Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
           85           90           95
Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
           100           105           110
Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp
           115           120           125
Ala Val Gly Pro Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu
           130           135           140

```

<210>7

<211>142

<212>PRT

<213> 智人

<400>7

```

Met Arg Gly Ser Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
1           5           10           15
Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
           20           25           30
Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
           35           40           45
Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
           50           55           60
Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Ala Ala Asn Leu His Cys Val Pro
65           70           75           80
Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly

```

	85	90	95
Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys			
	100	105	110
Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp			
	115	120	125
Ala Val Gly Pro Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu			
	130	135	140

<210>8

<211>142

<212>PRT

<213> 智人

<400>8

Met Arg Gly Ser Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly			
1	5	10	15
Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly			
	20	25	30
Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu			
	35	40	45
Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu			
	50	55	60
Leu Arg Cys Thr Gly Cys Gly Gly Ala Ala Asn Leu His Cys Val Pro			
65	70	75	80
Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly			
	85	90	95
Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys			
	100	105	110
Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp			
	115	120	125
Ala Val Gly Pro Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu			
	130	135	140

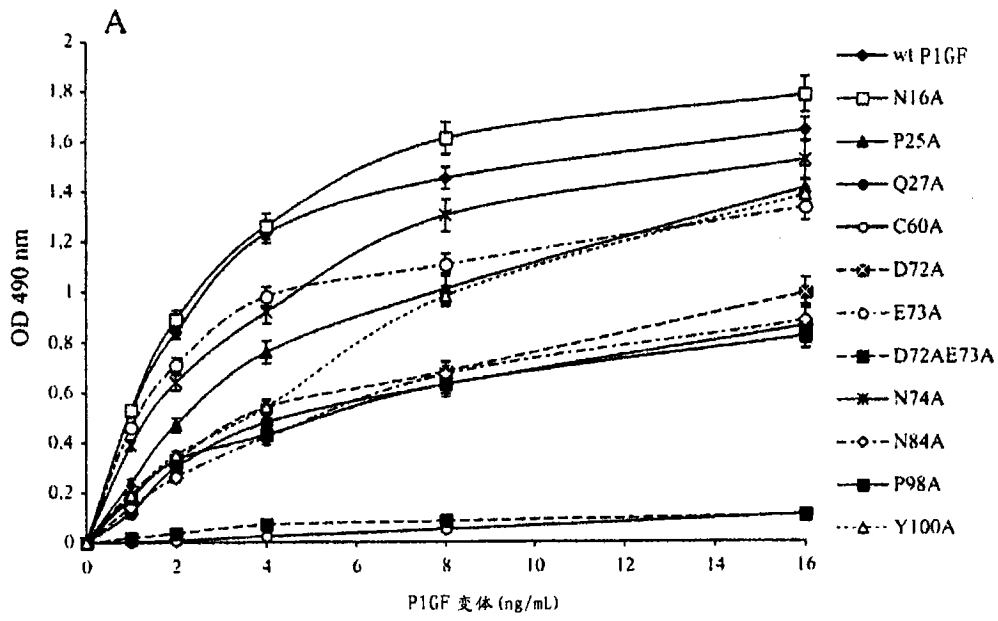


图 1A

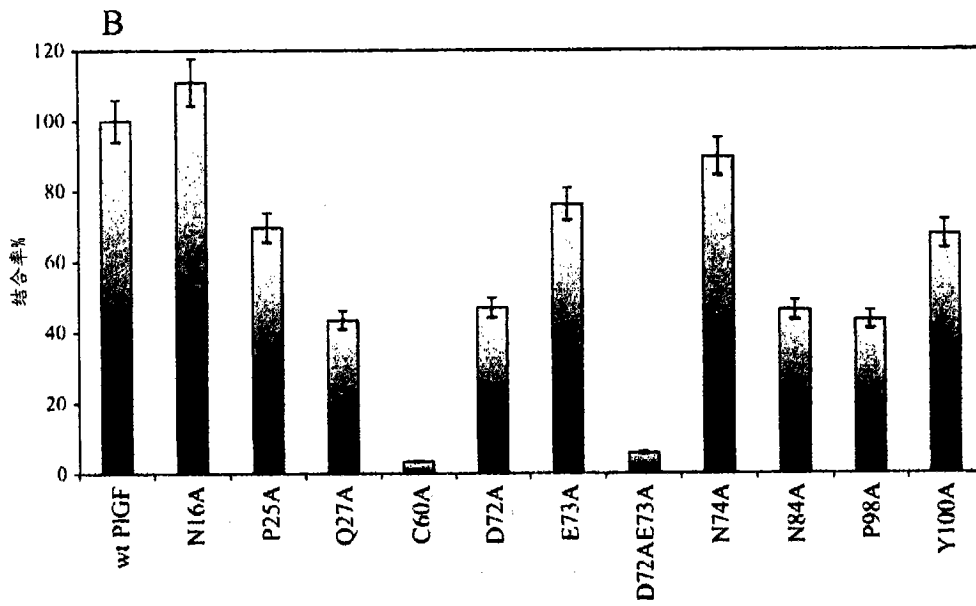


图 1B

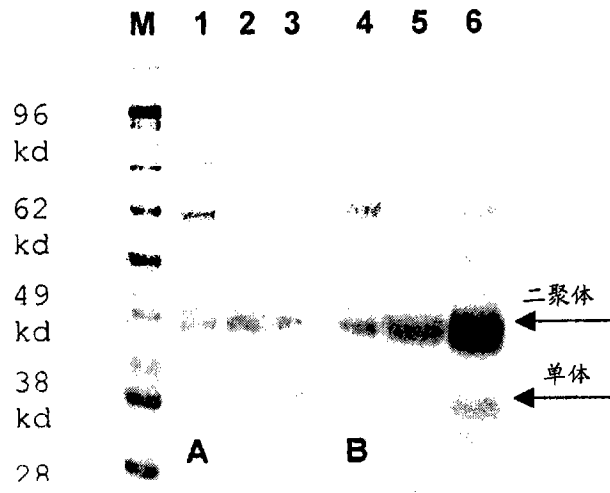


图 2

专利名称(译)	用于同时分析能够彼此络合的蛋白质的校准物/对照物		
公开(公告)号	CN101918834A	公开(公告)日	2010-12-15
申请号	CN200980101750.5	申请日	2009-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
[标]发明人	JW贝库斯 J郑 G巴什里安斯		
发明人	J·W·贝库斯 J·郑 G·巴什里安斯		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2496/80 G01N33/96 Y10T436/105831		
代理人(译)	李连涛		
优先权	61/019443 2008-01-07 US		
其他公开文献	CN101918834B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了组合物和方法，该组合物和方法包括两种或更多种蛋白质，其中蛋白质中的至少一种已被改变以减弱其相互识别和结合。此类组合物在方法和分析中可用作参照物、校准物或对照物，该方法和分析用于测定可能存在于所关注的样品中的蛋白质中的一种或多种的量、或确认该样品中的该蛋白质中的一种或多种的存在。更具体地讲，本发明涉及组合物和方法，该组合物和方法包括改变的胎盘生长因子-1(P1GF-1)和可溶性fms样酪氨酸激酶(sFlt-1)，以及用于测定所关注的样品中的sFlt-1和/或P1GF-1的量或确认所关注的样品中的sFlt-1和/或P1GF-1的存在的方法。

涂布的重组 P1GF (0.5 μg/mL)	对涂布的P1GF的抗体结合活性(OD)					
	抗P1GF单克隆抗体名称、克隆号和浓度 (ng/mL)					
	Ms-1	Rat1	Rat2	Rat4	Rat3	Rat5
抗体	37203	358903	358939	358905	358932	358907
P1GF-1 (DE) (10ng/mL)	1.823	2.098	2.237	2.114	1.233	1.256
P1GF-1 (AA)	2.650	1.789	2.233	1.935	1.305	1.297