



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105934671 A

(43)申请公布日 2016.09.07

(21)申请号 201480074004.2

约瑟·阿尔伯特·哈普林

(22)申请日 2014.12.03

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(30)优先权数据

代理人 李平 郑霞

61/911,306 2013.12.03 US

61/945,860 2014.02.28 US

61/946,373 2014.02.28 US

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.07.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/068426 2014.12.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/084994 EN 2015.06.11

(71)申请人 哈佛大学董事会

地址 美国马萨诸塞州

权利要求书8页 说明书44页

(72)发明人 迈克尔·乔雷夫

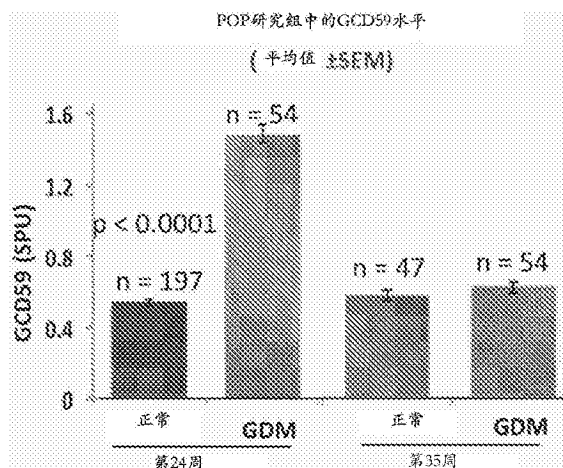
序列表5页 附图4页

(54)发明名称

用于评估妊娠糖尿病的方法和试剂

(57)摘要

本发明涉及在妊娠糖尿病和/或相关障碍和/或病症的评估中用于确定糖化CD59的水平测定、诊断、试剂盒和测定组分。一些试剂盒包括能够结合CD59上的捕获表位的捕获抗体,其中所述捕获表位可以缺乏赖氨酸残基41号(K41)。试剂盒还可以包括能够结合CD59上的检测表位的检测抗体。此类检测表位可以包括糖化K41。



1. 一种用来确定受试者样品中GCD59浓度的试剂盒,所述受试者样品获得自妊娠受试者,其中所述试剂盒可任选地包括一种或多种内部对照品,并且其中所述试剂盒进一步包括:

捕获抗体,该捕获抗体能够与在CD59上的捕获表位结合,其中所述捕获表位并不包括赖氨酸残基41号(K41),

检测抗体,该检测抗体能够与在CD59上的检测表位结合,所述检测表位包括糖化K41,和

蛋白标准品。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,进一步包括还原剂。

3. 如权利要求2所述的试剂盒,其中所述还原剂是硼氢化钠。

4. 如权利要求2所述的试剂盒,其中所述还原剂是在有机溶剂中。

5. 如权利要求4所述的试剂盒,其中所述有机溶剂包括三乙二醇二甲醚、四乙二醇二甲醚、或2-甲氧基乙醚。

6. 如权利要求5所述的试剂盒,其中所述有机溶剂包括2-甲氧基乙醚。

7. 如权利要求4-6中任一项所述的试剂盒,其中所述还原剂是硼氢化钠。

8. 如权利要求7所述的试剂盒,其中所述硼氢化钠以从约0.1M至约10M的浓度存在于所述有机溶剂中。

9. 如权利要求8所述的试剂盒,其中所述硼氢化钠以0.5M的浓度存在于2-甲氧基乙醚中。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的试剂盒,进一步包括包装及其使用说明。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的试剂盒,其中所述捕获表位包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少70%一致性的氨基酸序列。

12. 如权利要求11所述的试剂盒,其中所述捕获表位包括与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少85%一致性的氨基酸序列。

13. 如权利要求12所述的试剂盒,其中使用捕获抗体肽抗原产生所述捕获抗体,该捕获抗体肽抗原包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列的至少70%一致性。

14. 如权利要求13所述的试剂盒,其中使用捕获抗体肽抗原产生所述捕获抗体,该捕获抗体肽抗原包括与SEQ ID NO:4的氨基酸序列的至少85%一致性。

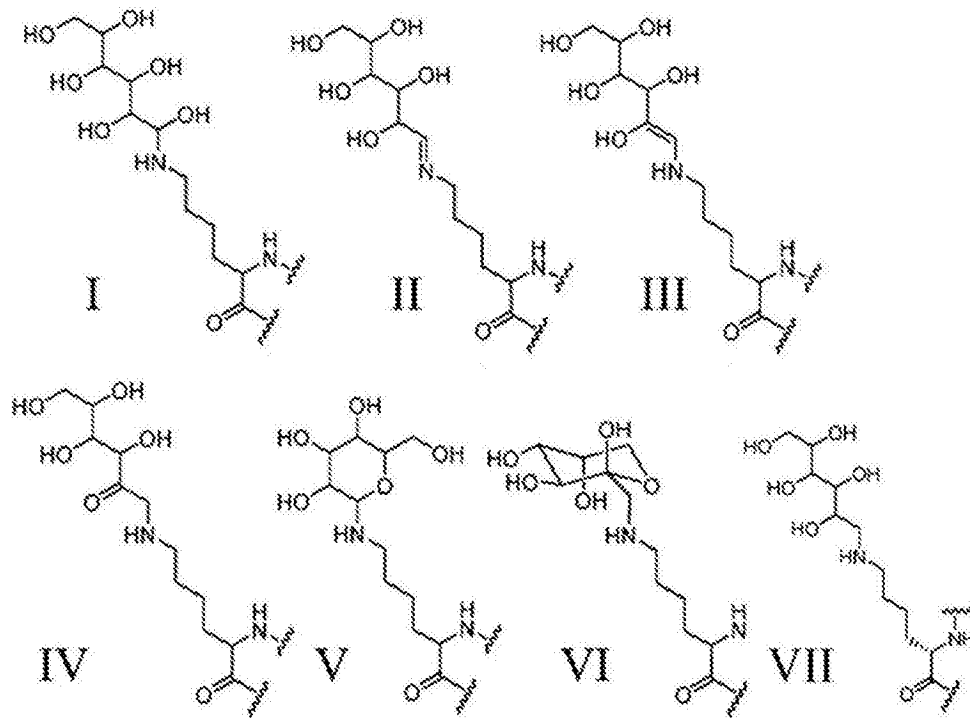
15. 如权利要求13所述的试剂盒,其中使用捕获抗体肽抗原产生所述捕获抗体,该捕获抗体肽抗原包括选自下组的氨基酸序列,该组由SEQ ID NO:3-6组成。

16. 如权利要求15所述的试剂盒,其中所述捕获抗体肽抗原包括一种或多种非天然氨基酸。

17. 如权利要求16所述的试剂盒,其中所述捕获抗体肽抗原包括SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

18. 如权利要求15-17中任一项所述的试剂盒,其中所述捕获抗体肽抗原是环状的。

19. 如权利要求18所述的试剂盒,其中所述包括糖化K41的检测表位包括选自下组的化学结构,该组由结构I-VII组成。



20. 如权利要求19所述的试剂盒,其中所述检测表位包括与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少70%一致性的氨基酸序列。

21. 如权利要求20所述的试剂盒,其中使用检测抗体肽抗原产生所述检测抗体,该检测抗体肽抗原包括选自下组的氨基酸序列,该组由SEQ ID NO:9-11组成。

22. 如权利要求1-21中任一项所述的试剂盒,其中所述蛋白标准品包括替代化合物,所述替代化合物包括:

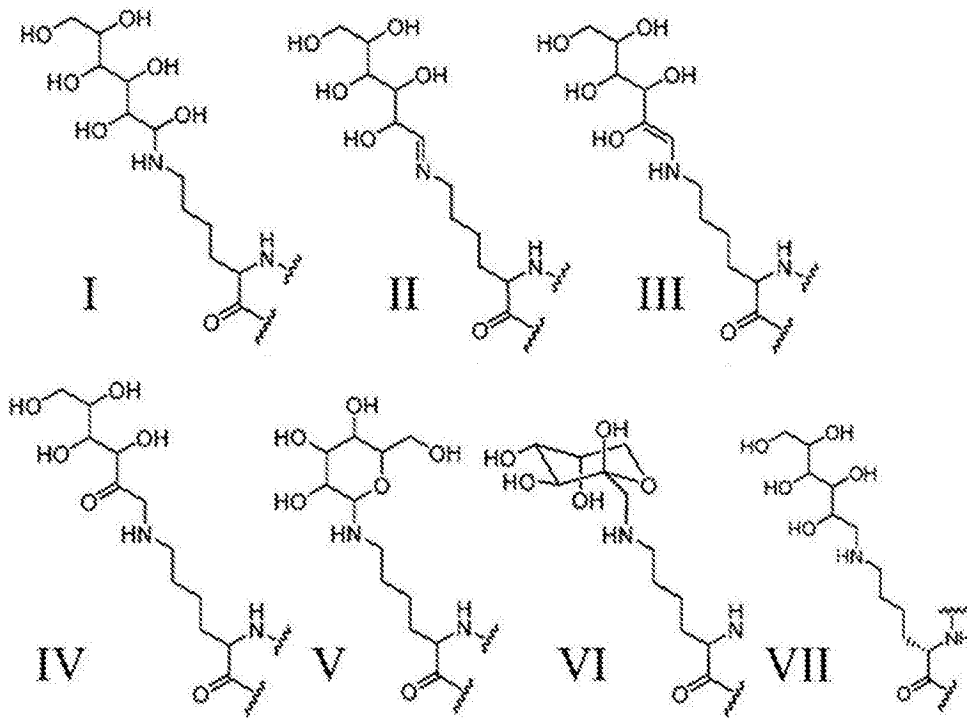
捕获结构域,其中所述捕获结构域与所述捕获抗体结合,和
检测结构域,其中所述检测结构域与所述检测抗体结合。

23. 如权利要求22所述的试剂盒,其中所述捕获结构域包括选自下组的氨基酸序列,该组由SEQ ID NO:2-8组成。

24. 如权利要求22或23所述的试剂盒,其中所述检测结构域包括选自下组的氨基酸序列,该组由SEQ ID NO:9-11组成。

25. 如权利要求24所述的试剂盒,其中所述检测结构域包括糖化K5残基。

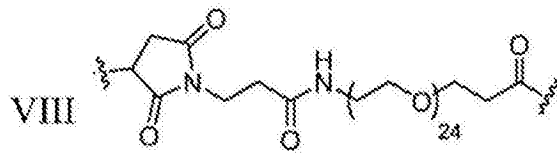
26. 如权利要求25所述的试剂盒,其中所述糖化K5残基包括选自下组的化学结构,该组由结构I-VII组成。



27. 如权利要求22-26中任一项所述的试剂盒,其中所述检测结构域和所述捕获结构域是通过接头连接的。

28. 如权利要求27所述的试剂盒,其中所述接头包括聚乙二醇。

29. 如权利要求28所述的试剂盒,其中所述接头包括如下结构:



30. 如权利要求22-29中任一项所述的试剂盒,其中所述捕获抗体和所述检测抗体各自独立地是单克隆抗体或多克隆抗体。

31. 如权利要求30所述的试剂盒,其中所述捕获抗体是小鼠单克隆抗体。

32. 如权利要求30或31所述的试剂盒,其中所述检测抗体是源自小鼠或兔细胞的单克隆抗体。

33. 如权利要求30-32中任一项所述的试剂盒,其中这些抗体各自可以独立地包括一种或多种可检测标记。

34. 如权利要求30-33中任一项所述的试剂盒,进一步包括二级检测抗体。

35. 如权利要求34所述的试剂盒,其中所述二级检测抗体包括一种或多种可检测标记。

36. 如权利要求35所述的试剂盒,其中所述二级检测抗体连接到辣根过氧化物酶(HRP)上。

37. 如权利要求36所述的试剂盒,包括用于比色定量所述二级检测抗体的HRP底物。

38. 一种用于确定来自妊娠受试者的一种或多种样品中的GCD59浓度的方法,该方法包括:

- 在一个或多个妊娠窗期间,从所述妊娠受试者获得所述一种或多种样品,并且
- 使用如权利要求1-37中任一项所述的试剂盒来确定GCD59的浓度。

39. 如权利要求38所述的方法,其中所述一种或多种样品是在葡萄糖激发后取得。
40. 如权利要求38或39所述的方法,其中所述一种或多种样品是体液样品,这些体液样品选自下组,该组由以下各项组成:血液、尿、粘液、羊水和唾液。
41. 如权利要求40所述的方法,其中所述一种或多种样品包括至少一种血液样品和一种或多种其他体液样品的组合。
42. 如权利要求41所述的方法,包括单一血液样品。
43. 如权利要求38-42中任一项所述的方法,其中所述一个或多个妊娠窗包括妊娠的从约20至约36周。
44. 如权利要求43所述的方法,其中所述一个或多个妊娠窗包括妊娠的第24周。
45. 一种诊断受试者中的妊娠糖尿病(GDM)的方法,该方法包括:
- 在一个或多个妊娠窗期间,从所述受试者获得一种或多种样品,
 - 使用如权利要求1-37中任一项所述的试剂盒来确定所述一种或多种样品中GCD59的浓度,并且
 - 如果GCD59的所述浓度大于预定的截止值,则提供GDM的诊断。
46. 如权利要求45所述的方法,其中所述方法并不包括消耗限制和/或需求。
47. 如权利要求45或46所述的方法,其中所述GDM的诊断包括选自下组的GDM亚类的诊断,该组由以下各项组成:A1类、A2类、B类、C类、D类、F类、R类、H类和T类。
48. 如权利要求45-47中任一项所述的方法,其中所述一种或多种样品是在葡萄糖激发后取得。
49. 如权利要求45-48中任一项所述的方法,其中所述一种或多种样品是体液样品,这些体液样品选自下组,该组由以下各项组成:血液、尿、粘液、羊水和唾液。
50. 如权利要求49所述的方法,包括单一血液样品。
51. 如权利要求45-50中任一项所述的方法,其中所述一个或多个妊娠窗包括妊娠的从约20至约36周。
52. 如权利要求51所述的方法,其中所述一个或多个妊娠窗包括妊娠的第24周。
53. 一种在受试者中诊断GDM的方法,该方法包括:
- 在一个或多个妊娠窗期间,从所述受试者获得一种或多种样品,
 - 使用根据权利要求1-37中任一项所述的试剂盒来确定所述一种或多种样品中GCD59的浓度,
 - 将GCD59的所述浓度与所述受试者的一种或多种其他分析的结果进行比较,并且
 - 基于GCD59的所述浓度和所述受试者的一种或多种其他分析的所述结果提供GDM的诊断。
54. 如权利要求53所述的方法,其中一种或多种其他分析的所述结果包括选自下组的一种或多种生物标志物的水平,该组由以下各项组成:胰岛素、葡萄糖、和除GCD59外的糖化蛋白。
55. 如权利要求54所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括葡萄糖。
56. 如权利要求55所述的方法,其中该葡萄糖的水平包括大于126mg/dI的空腹血浆葡萄糖水平或大于200mg/dI的随机血浆葡萄糖水平。
57. 如权利要求53所述的方法,其中所述一种或多种其他分析包括选自下组的测试,该

组由以下各项组成：葡萄糖激发测试、口服葡萄糖耐量测试(OGTT)、空腹血糖测试、随机血糖测试、餐后2小时血糖测试、血红蛋白A1c(HbA1c)测试、果糖胺测试和1,5-脱水葡萄糖醇测试。

58. 如权利要求53-57中任一项所述的方法,其中所述GDM的诊断包括选自下组的GDM亚类的诊断,该组由以下各项组成:A1类、A2类、B类、C类、D类、F类、R类、H类和T类。

59. 如权利要求53-58中任一项所述的方法,其中所述一个或多个妊娠窗包括妊娠的从约20至约36周。

60. 如权利要求59所述的方法,其中所述一个或多个妊娠窗包括妊娠的第24周。

61. 一种诊断受试者中GDM的方法,其中所述受试者呈现出GDM的一种或多种初步迹象或GDM的一种或多种风险因素,该方法包括

a. 在一个或多个妊娠窗期间,从所述受试者获得一种或多种样品,

b. 使用根据权利要求1-37中任一项所述的试剂盒来确定来自所述受试者的所述一种或多种样品中GCD59的浓度,并且

c. 如果GCD59的所述浓度大于预定的截止值,则提供GDM的诊断。

62. 如权利要求61所述的方法,其中所述一种或多种初步迹象包括来自一种或多种测试的结果,所述一种或多种测试指示出所述受试者呈现出GDM。

63. 如权利要求61或62所述的方法,其中所述一种或多种测试包括选自下组的测试,该组由以下各项组成:OGTT测试、空腹血糖测试、随机血糖测试、餐后2小时血糖测试、HbA1c测试、果糖胺测试和1,5-脱水葡萄糖醇测试。

64. 如权利要求61-63中任一项所述的方法,其中所述一种或多种初步迹象包括GDM的一种或多种症状。

65. 如权利要求64所述的方法,其中GDM的所述一种或多种症状选自下组,该组由以下各项组成:渴感、疲劳、恶心、呕吐、膀胱感染、酵母菌感染和视力模糊。

66. 如权利要求61-65中任一项所述的方法,其中GDM的所述一种或多种风险因素选自下组,该组由以下各项组成:升高的身体质量指数(BMI)、糖尿病的家庭史、前驱糖尿病的家庭史、GDM的家庭史、高育龄、患有多囊卵巢综合征、吸烟史、产科问题史、高胆固醇和身材矮小症。

67. 如权利要求61-65中任一项所述的方法,其中所述一种或多种风险因素包括选自下组的升高的BMI类别,该组由以下各项组成:超重(从约25至约29.9kg/m²的BMI)、I级肥胖(从约30至约34.9kg/m²的BMI)、II级肥胖(从约35至约39.9kg/m²的BMI)和III级肥胖(超过40kg/m²的BMI)。

68. 如权利要求61-65中任一项所述的方法,其中GDM的所述一种或多种风险因素包括所述受试者的种族。

69. 如权利要求68所述的方法,其中所述种族选自下组,该组由以下各项组成:非裔美国人、美洲原住民、西班牙裔和南亚裔。

70. 如权利要求61-69中任一项所述的方法,其中所述一个或多个妊娠窗包括妊娠的从约20至约36周。

71. 如权利要求70所述的方法,其中所述一个或多个妊娠窗包括妊娠的第24周。

72. 一种在受试者中指定发展GDM的风险水平的方法,该方法包括:

- a. 从所述受试者获得一种或多种样品，
 - b. 使用根据权利要求1-37中任一项所述的试剂盒来确定所述一种或多种样品中GCD59的浓度，
 - c. 将GCD59的所述浓度与和发展GDM的两种或更多种风险水平相关的两个或更多个浓度范围相比较，
 - d. 选择包括GCD59的所述浓度的浓度范围和发展GDM的风险的相关水平，并且
 - e. 向所述受试者指定与所选择浓度范围相关的发展GDM的风险水平。
73. 如权利要求72所述的方法，其中所述受试者呈现出GDM的一种或多种风险因素。
74. 如权利要求73所述的方法，其中所述风险因素选自下组，该组由以下各项组成：升高的身体质量指数(BMI)、糖尿病的家庭史、前驱糖尿病的家庭史、GDM的家庭史、高育龄、多囊卵巢综合征的诊断、吸烟史、产科问题史、高胆固醇和身材矮小症。
75. 如权利要求72-74中任一项所述的方法，其中所述一种或多种样品是体液样品，这些体液样品选自下组，该组由以下各项组成：血液、尿、粘液、羊水和唾液。
76. 如权利要求75所述的方法，包括单一血液样品。
77. 一种向一名或多名患有GDM的受试者指定GDM严重性水平的方法，该方法包括：
- a. 在一个或多个妊娠窗期间，从所述一名或多名受试者获得一种或多种样品，
 - b. 使用根据权利要求1-37中任一项所述的试剂盒来确定所述一种或多种样品中GCD59的浓度，
 - c. 将GCD59的所述浓度与和GDM严重性的两种或更多种水平相关的两个或更多个浓度范围相比较，
 - d. 选择包括GCD59的所述浓度的浓度范围和GDM严重性的相关水平，并且
 - e. 向所述一名或多名受试者指定与所选择浓度范围相关的GDM严重性水平。
78. 如权利要求77所述的方法，其中GDM严重性的所述两种或更多种水平包括选自下组的两种或更多种水平，该组由以下各项组成：轻度、中度和重度。
79. 如权利要求77或78所述的方法，其中所述一种或多种样品是体液样品，这些体液样品选自下组，该组由以下各项组成：血液、尿、粘液、羊水和唾液。
80. 如权利要求79所述的方法，包括单一血液样品。
81. 如权利要求77-80中任一项所述的方法，其中所述一个或多个妊娠窗包括妊娠的从约20至约36周。
82. 如权利要求81所述的方法，其中所述一个或多个妊娠窗包括妊娠的第24周。
83. 一种在患有GDM的受试者中监测GDM的方法，该方法包括：
- a. 在一个或多个妊娠窗期间，从所述患有GDM的受试者获得一种或多种样品，
 - b. 使用来自如权利要求1-37中任一项所述的试剂盒来确定所述一种或多种样品中GCD59的浓度，并且
 - c. 将GCD59的所述浓度与早期获得的结果进行比较。
84. 如权利要求83所述的方法，其中所述早期获得的结果包括来自选自下组的测试的结果，该组由以下各项组成：葡萄糖激发测试、OGTT测试、空腹血糖测试、随机血糖测试、餐后2小时血糖测试、HbA1c测试、果糖胺测试和1,5-脱水葡萄糖醇测试。
85. 如权利要求83或84所述的方法，其中所述早期获得的结果包括基线GCD59浓度值。

86. 如权利要求85所述的方法,其中所述基线GCD59浓度值是使用根据权利要求1-37中任一项所述的试剂盒来获得的。

87. 如权利要求83-86中任一项所述的方法,其中所述一种或多种样品是体液样品,这些体液样品选自下组,该组由以下各项组成:血液、尿、粘液、羊水和唾液。

88. 如权利要求83-87中任一项所述的方法,其中所述一个或多个妊娠窗包括妊娠的从约12至约36周。

89. 如权利要求83-88中任一项所述的方法,该方法包括两种或更多种样品,其中所述两种或更多种样品是从约2周间隔至约2个月间隔获得。

90. 一种监测产后受试者中糖尿病病症的方法,该方法包括:

- a. 从所述产后受试者获得一种或多种样品,
- b. 使用根据权利要求1-37中任一项所述的试剂盒来确定所述一种或多种样品中GCD59的浓度,并且
- c. 将GCD59的所述浓度与早期获得的结果进行比较。

91. 如权利要求90所述的方法,其中所述早期获得的结果包括来自选自下组的测试的结果,该组由以下各项组成:葡萄糖激发测试、OGTT测试、空腹血糖测试、随机血糖测试、餐后2小时血糖测试、HbA1c测试、果糖胺测试和1,5-脱水葡萄糖醇测试。

92. 如权利要求90或91所述的方法,其中所述早期获得的结果包括基线GCD59浓度值。

93. 如权利要求92所述的方法,其中所述基线GCD59浓度值是使用如权利要求1-37中任一项所述的试剂盒来获得的。

94. 如权利要求90-93中任一项所述的方法,其中所述一种或多种样品是体液样品,这些体液样品选自下组,该组由以下各项组成:血液、尿、粘液和唾液。

95. 如权利要求90-94中任一项所述的方法,该方法包括两种或更多种样品,其中所述两种或更多种样品是单独地从约2周间隔至约2个月间隔获得。

96. 一种在受试者中诊断先兆子痫的方法,该方法包括:

- a. 从所述受试者获得一种或多种样品,
- b. 使用根据权利要求1-37中任一项所述的试剂盒来确定所述一种或多种样品中GCD59的浓度,并且
- c. 如果GCD59的所述浓度大于预定的截止值,则提供先兆子痫的诊断。

97. 一种在婴儿受试者中降低、逆转和/或预防一种或多种GDM相关病症的方法,该方法包括:

- a. 在一个或多个妊娠窗期间,从怀有所述婴儿受试者的受试者获得一种或多种样品,
- b. 使用根据权利要求1-37中任一项所述的试剂盒来确定所述一种或多种样品中GCD59的浓度,
- c. 使用GCD59的所述浓度,确定所述婴儿受试者中所述一种或多种GDM相关病症的风险、存在和/或进展,并且
- d. 向怀有所述婴儿受试者的所述受试者提供治疗,以降低、逆转和/或预防所述婴儿受试者中所述一种或多种GDM相关病症的发展。

98. 如权利要求97所述的方法,其中所述一种或多种GDM相关病症选自下组,该组由以下各项组成:巨大儿、产伤、高胆红素血症、低血糖症、惊厥和死产。

99. 如权利要求97或98所述的方法,其中所述一种或多种样品是体液样品,这些体液样品选自下组,该组由以下各项组成:血液、尿、粘液、羊水和唾液。

100. 如权利要求99所述的方法,包括单一血液样品。

101. 如权利要求97-100中任一项所述的方法,其中所述一个或多个妊娠窗包括妊娠的从约12至约36周。

102. 如权利要求97-101中任一项所述的方法,其中所述治疗选自下组,该组由以下各项组成:胰岛素疗法和饮食调整。

用于评估妊娠糖尿病的方法和试剂

政府支持

[0001] 本发明在政府支持下在由美国国立卫生研究院授予的批准号DK095429-01下完成,名称为“作为妊娠糖尿病的新颖生物标志物的糖化CD59”。美国政府在本发明中可以具有某些权力。

发明背景

[0002] 糖尿病表征为升高的血糖水平。血糖水平的持续升高可通过称为糖化的过程影响蛋白质。糖化是葡萄糖与蛋白质的非酶促联接,并且被认为是引起糖尿病受试者组织损伤的主要病理生理学机制。糖化涉及葡萄糖和/或其他还原糖与蛋白中的氨基基团的反应,导致席夫碱或醛亚胺的形成。这种不稳定的加合物可以通过阿马多利(Amadori)重排发生互变异构现象生成更稳定的酮胺。

[0003] 已经在糖尿病受试者中鉴定了不同的糖化蛋白,这些不同的糖化蛋白包括白蛋白、血红蛋白以及其他。取决于所影响的一个或多个氨基基团的位置,糖化蛋白的功能可以是受损的。例如,血红蛋白的 β -链的氨基-末端糖化产生了糖化的血红蛋白(HbA1c),其中对2,3-二磷酸甘油酸的响应性降低并且氧亲和力增加。凝血系统(抗凝血酶III)的主要凝血酶抑制剂的糖化降低了其针对肝素的亲和力,并且已经假定促成与糖尿病有关的血液高凝状态。

[0004] 某些蛋白的蛋白“糖化”程度的测量可以是有价值的临床工具,用以提供比短期指标(如直接测量血糖水平)更稳定的血糖控制指标,最终有助于改进治疗的功效。诸位发明人之前已经显示,CD59的K41糖化与异常血糖水平相关,并且在K41处的糖化干扰CD59的正常活性(美国专利6,835,545;美国专利7,049,082;和美国专利7,439,330;这些专利中的每个的全部内容通过引用结合在此)。

[0005] 然而,针对改进的检测和诊断糖尿病病症的方法仍然存在需要。具体而言,某些患者群体可从此类改进的方法中受益。一种此类患者群体包括孕妇,这些孕妇处于发展妊娠糖尿病的风险中。

发明概述

[0006] 在一些实施例中,本发明提供了用于确定受试者样品中GCD59浓度的试剂盒。此类受试者样品可以从妊娠的受试者获得。试剂盒可任选地包括一种或多种内部对照品。一些试剂盒包括能够与CD59上的捕获表位结合的捕获抗体,其中所述捕获表位可缺失赖氨酸残基41号(K41)。试剂盒还可包括能够与CD59上的检测表位结合的检测抗体。此类检测表位可包括糖化K41。本发明的试剂盒还可以包括蛋白标准品。在一些情况下,试剂盒可以包括包装和其使用说明。

[0007] 在一些实施例中,捕获表位可以包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少70%一致性的氨基酸序列。在一些情况下,捕获表位可以包括与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少85%一致性的氨基酸序列。可以使用捕获抗体肽抗原生产在此披露的捕获抗体,该捕获抗体肽抗原包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列的至少70%一致性。可以使用捕获抗体肽抗原生产其他捕获抗体,该捕获抗体肽抗原包括与SEQ ID NO:4的氨基酸序列的至少85%

一致性。可以使用捕获抗体肽抗原生产另外的捕获抗体,该捕获抗体肽抗原包括选自下组的氨基酸序列,该组由SEQ ID NO:3-6组成。捕获抗体肽抗原可以包括一个或多个非天然氨基酸。此类捕获抗体肽抗原可以包括SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些情况下,捕获抗体肽抗原可以是环状的。

[0008] 在一些实施例中,检测表位可以包括糖化K41,该糖化K41包括选自下组的化学结构,该组由下文所呈现的结构I-VII组成。检测表位可以包括与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少70%一致性的氨基酸序列。可以使用检测抗体肽抗原生产检测抗体,该检测抗体肽抗原包括选自下组的氨基酸序列,该组由SEQ ID NO:9-11组成。本发明的蛋白标准品可以包括替代化合物,所述替代化合物包括:捕获结构域,其中所述捕获结构域与所述捕获抗体结合;以及检测结构域,其中所述检测结构域与所述检测抗体结合。替代化合物的捕获结构域可以包括选自下组的氨基酸序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:2-8。替代化合物的检测结构域可以包括选自下组的氨基酸序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:9-11。检测结构域可以进一步包括糖化的赖氨酸残基。此类糖化的赖氨酸可以包括选自下组的化学结构,该组由下文所呈现的结构I-VII组成。替代化合物可以包括由接头连接的检测结构域和捕获结构域。此类接头可以包括聚乙二醇。接头可以包括根据下文多呈现的结构VIII的结构。

[0009] 在一些实施例中,本发明的试剂盒可以包括用于还原受试者样品的一种或多种还原剂。此类还原剂可以包括硼氢化钠。在一些情况下,硼氢化钠可以作为还原剂溶液的部分提供。此类溶液可以包括水和/或一种或多种有机溶剂。在一些实施例中,有机溶剂可以选自:三乙二醇二甲醚、四乙二醇二甲醚和2-甲氧基乙醚。硼氢化钠可以按从约0.1M至约10M的浓度存在于还原剂溶液中。

[0010] 本发明的抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。单克隆抗体可以源自小鼠或兔细胞。抗体还可以包括一种或多种可检测标记。可以将二级检测抗体连接到辣根过氧化物酶(HRP)上。包括此类抗体的试剂盒可以包括用于比色定量的HRP底物。

[0011] 本发明的方法可以包括用于确定来自妊娠受试者的一种或多种样品中的GCD59浓度的方法,该方法包括在一个或多个妊娠窗期间从妊娠受试者获得一种或多种样品,并且使用在此描述的试剂盒确定GCD59的浓度。根据此类方法的样品可以包括选自下组的体液样品,该组由以下各项组成:血液、尿、粘液、羊水和唾液。一些样品可以包括至少一种血液样品和一种或多种其他体液样品的组合。根据一些方法,可以使用单一血液样品。根据一些方法,妊娠窗可以包括妊娠的从约20至约36周。在一些情况下,可以在葡萄糖激发后取样。

[0012] 在一些实施例中,本发明提供了诊断受试者中妊娠糖尿病(GDM)的方法,所述方法包括在一个或多个妊娠窗期间从受试者获得一种或多种样品,使用试剂盒确定此类样品中GCD59的浓度,并且如果GCD59的浓度大于预定的截止值(cut-off value)则提供GDM的诊断。在一些情况下,此类方法可以在无需消耗限制和/或需求的情况下进行。根据此类方法的样品可以包括选自下组的体液样品,该组由以下各项组成:血液、尿、粘液、羊水和唾液。一些样品可以包括至少一种血液样品和一种或多种其他体液样品的组合。根据一些方法,可以使用单一血液样品。根据一些方法,妊娠窗可以包括妊娠的从约20至约36周。在一些情况下,GDM的诊断可以包括选自下组的GDM亚类的诊断,该组由以下各项组成:A1类、A2类、B类、C类、D类、F类、R类、H类和T类。

[0013] 根据本发明的一些方法,受试者中的GDM诊断可以通过如下来进行:在一个或多个妊娠窗期间从受试者获得一种或多种样品,使用试剂盒来确定GCD59的浓度,将GCD59的浓度与该受试者的一种或多种其他分析的结果进行比较,并且基于该比较,提供GDM的诊断。其他分析可以包括选自下组的一种或多种生物标志物的水平,该组由以下各项组成:胰岛素、葡萄糖、和除GCD59外的糖化蛋白。其中此类生物标志物包括血糖水平,此类水平可以包括禁食血浆葡萄糖水平或随机血浆葡萄糖水平。另外的分析可以包括选自下组的测试,该组由以下各项组成:葡萄糖激发测试、口服葡萄糖耐量测试(OGTT)、空腹血糖测试、随机血糖测试、餐后2小时血糖测试、血红蛋白A1c(HbA1c)测试、果糖胺测试和1,5-脱水葡萄糖醇测试。

[0014] 在此的披露进一步提供了诊断受试者中GDM的方法,其中这样的受试者呈现出GDM的一种或多种初步迹象或一种或多种风险因素。此类方法可以包括:在一个或多个妊娠窗期间,从受试者获得一种或多种样品,使用试剂盒确定一种或多种受试者样品中的GCD59浓度,并且如果GCD59的浓度大于预定的截止值则提供GDM的诊断。根据此类方法的初步迹象可以包括来自一种或多种测试的结果,其中此类测试指示受试者呈现出GDM。此类测试可以包括OGTT测试、空腹血糖测试、随机血糖测试、餐后2小时血糖测试、HbA1c测试、果糖胺测试和1,5-脱水葡萄糖醇测试。在一些情况下,初步迹象可以包括GDM的一种或多种症状。此类症状可以包括渴感、疲劳、恶心、呕吐、膀胱感染、酵母菌感染和视力模糊。GDM的风险因素可以包括升高的身体质量指数(BMI)、糖尿病的家庭史、前驱糖尿病的家庭史、GDM的家庭史、高育龄、患有多囊卵巢综合征、吸烟史、产科问题史、高胆固醇和身材矮小症。其中受试者包括升高的BMI,BMI类别可以包括超重(从约25至约29.9kg/m²的BMI)、I级肥胖(从约30至约34.9kg/m²的BMI)、II级肥胖(从约35至约39.9kg/m²的BMI)和III级肥胖(超过40kg/m²的BMI)。另外的风险因素可以包括受试者的种族。此类种族可以包括但不限于:非裔美国人、美洲原住民、西班牙裔和南亚裔。

[0015] 在一些实施例中,可以使用本发明的方法来指定在受试者中发展GDM的风险水平。此类方法可以包括:从受试者获得一种或多种样品,使用试剂盒来确定此类样品中GCD59的浓度,将GCD59浓度与和发展GDM的两种或更多种水平相关的两个或更多个浓度范围进行比较,选择包括GCD59的这种浓度的浓度范围和发展GDM的风险的相关水平,并且向受试者指定与所选择的浓度范围相关的发展GDM的风险水平。

[0016] 在此呈现的一些方法包括向患有GDM的一名或多名受试者指定GDM严重性水平,所述方法包括在一个或多个妊娠窗期间,从受试者获得一种或多种样品,使用试剂盒确定该受试者样品中GCD59的浓度,将GCD59的浓度与和GDM严重性的两种或更多种水平相关的两个或更多个浓度范围进行比较,选择包括所确定的GCD59浓度的浓度范围和GDM严重性的相关水平,并且指定与所选择浓度范围相关的GDM严重性水平。GDM严重性的水平可以选自下组,该组由以下各项组成:轻度、中度和重度。

[0017] 在此还提供了在患有GDM的受试者中监测GDM的方法,这些方法包括在一个或多个妊娠窗期间从患有GDM的受试者获得一种或多种样品,使用试剂盒来确定样品中GCD59的浓度,并且将所获得的GCD59浓度与早期获得的结果进行比较。此类早期所获得的结果可以包括来自选自下组的测试的结果,该组由以下各项组成:葡萄糖激发测试、OGTT测试、空腹血糖测试、随机血糖测试、餐后2小时血糖测试、HbA1c测试、果糖胺测试和1,5-脱水葡萄糖醇

测试。早期所获得的结果还可以包括使用试剂盒获得的基线GCD59浓度值。在一些情况下,样品可以从约2周间隔至约2个月间隔获得。

[0018] 在一些实施例中,本发明提供了在产后受试者中监测糖尿病病症的方法,该方法包括从产后受试者获得一种或多种样品,使用试剂盒确定样品中GCD59的浓度,并且将GCD59的浓度与早期所获得的结果相比较。此类早期所获得的结果可以包括来自选自下组的测试的结果,该组由以下各项组成:葡萄糖激发测试、OGTT测试、空腹血糖测试、随机血糖测试、餐后2小时血糖测试、HbA1c测试、果糖胺测试和1,5-脱水葡萄糖醇测试。早期所获得的结果还可以包括使用试剂盒获得的基线GCD59浓度值。在一些情况下,样品可以从约2周间隔至约2个月间隔获得。

[0019] 在此包括诊断受试者中先兆子痫的方法,这些方法包括从受试者中获得一种或多种样品,使用试剂盒确定样品中GCD59的浓度,并且如果GCD59的浓度大于预定的截止值则提供先兆子痫的诊断。还包括在婴儿受试者中降低、逆转和/或预防一种或多种GDM相关病症的方法,这些方法包括在一个或多个妊娠窗期间从怀有婴儿受试者的受试者获得一种或多种样品,使用试剂盒来确定样品中GCD59的浓度,使用所确定的GCD59浓度确定婴儿受试者中GDM相关病症的风险、存在和/或进展,并且向怀有婴儿受试者的受试者提供治疗,以降低、逆转和/或预防婴儿受试者中一种或多种GDM相关病症的发展。GDM相关病症可以包括选自下组的一种或多种,该组由以下各项组成:巨大儿、产伤、高胆红素血症、低血糖症、惊厥和死产。根据此类方法的妊娠窗可以包括妊娠的从约12至约36周。在一些情况下,治疗可以选自下组,该组由以下各项组成:胰岛素疗法和饮食调整。

附图简述

[0020] 从本发明的具体实施例的如下说明,上述内容和其他目的、特征和优点将变得清楚,如附图中所示。附图不一定是按比例,而是强调示出本发明的各种实施例的原理。

[0021] 图1描绘了一幅图,该图显示出在妊娠的24和35周时,从先兆子痫(POP)研究组的预测值所获得的受试者样品中糖化CD59(GCD59)水平。

[0022] 图2描绘了一幅图,该图显示出在与递增浓度的GCD59相关的所分析的组(患有或不患有妊娠糖尿病(GDM)的妊娠受试者)中受试者的百分比。

[0023] 图3描绘了一幅图,该图显示出接受者工作特征(ROC)曲线,该曲线指示出特异性和敏感性,在该特异性和敏感性下,GCD59水平能够检测患有GDM的妊娠受试者。

[0024] 图4描绘了翻译后修饰的杂合肽替代物(糖化的并还原的hCD59替代物)的HPLC迹线。条件:0.50mg在500 μ l H₂O/MeOH中;注射体积:36 μ l;梯度:50min内10%-60%柱:Jupiter 5u,C18,300 \AA , (4.6mm i.d.,250mL);缓冲液:A:0.05%TFA在H₂O中;B:0.05%TFA在MeCN中;流速:1mL/min。

详细说明

概述

[0025] 糖化CD59的发现有助于疾病的分析,其中GCD59的量不同于正常水平。例如,已经发现CD59的糖化水平在糖尿病中升高(秦(Qin),X.等人,糖尿病(Diabetes),2004年10月,53:2653-61)。还已经确定了GCD59存在于体液中。因此,影响CD59糖化的糖尿病或其他疾病的发作、进展和/或消退可以通过监测受试者中体液样品中的GCD59水平来监测。

[0026] 本发明的实施例利用糖化蛋白(如称为CD59的GPI-锚定膜蛋白)的水平,作为糖尿

病病症的稳定指标。如在此使用的,CD59(又称反应性裂解(MIRL)、保护、HRF20和H19的膜抑制剂)和K41糖化的CD59是多肽,其可以从由登录号M95708所披露的mRNA来翻译(戴维斯(Davies)A.,等人,实验医学杂志(Journal J Exp.Med.)170(3),637-654(1989))。CD59是补体系统的关键调节子并且涉及到与糖尿病相关的血管并发症的发病机理。在高血糖条件下,CD59的糖化是增加的,特别是在残基K41处。如在此使用的,“K41-糖化的CD59”或“GCD59”是指在人类CD59的氨基酸41号处进行糖化的CD59(其中残基41号是从去除信号和GPI信号序列后获得的成熟CD59蛋白计数):

LQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDACLITKAGLQVYNKCWKFEHCNFNDVTTRLRENELTYYCCKKDLNCFNEQLEN(SEQ ID NO:1))。相对于HbA1c,血液中K41糖化的CD59(GCD59)的稳态水平的建立可以允许连续测量之间的较短时间间隔,提供了血糖状态的急需的中间估计和对经历测试的受试者的较少负担(秦,X.等人,糖尿病,2004年10月,53:2653-61)。

[0027] 在一些实施例中,本发明提供了用于检测并测量K41糖化的CD59(GCD59)水平的试剂盒、方法和组合物,在一些情况下,它们涉及血糖水平和妊娠糖尿病(GDM)。

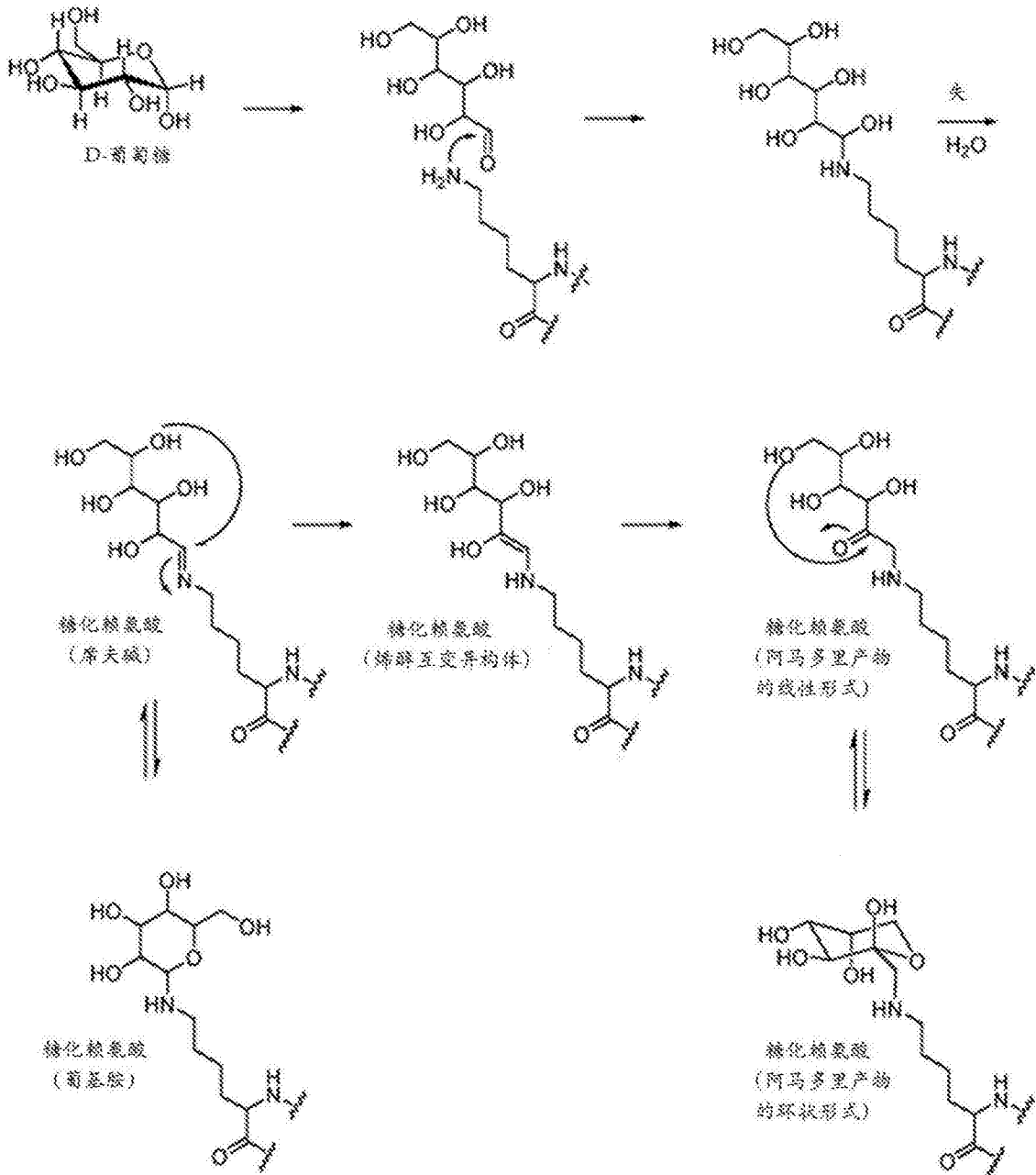
糖化CD59

[0028] 糖化涉及在蛋白、脂质、或其他分子中的用氨基基团还原糖(例如,葡萄糖)的非酶促反应。糖化糖可以按线性或环状形式结合。例如,在糖化的CD59中,该糖化的糖以线性或环状形式结合至CD59,并且包括称为席夫碱的初始醛亚胺加合物、环化的葡基胺、初始席夫碱的互变异构体、和阿马多利加合物的线性(酮)和环状(1-脱氧-吡喃果糖)形式。CD59的糖化产物及其肽片段描述于美国专利6,835,545;美国专利7,049,082;和美国专利7,439,330;其每个的全部内容通过引用结合于此。

[0029] 相比之下,糖化涉及糖与蛋白、脂质、或其他分子的酶促衔接。糖化蛋白的实例包括在N末端具有糖化的 α -氨基基团的那些(例如,糖化血红蛋白)和蛋白的赖氨酸的 ϵ -氨基基团已经被糖化的那些(例如,糖化白蛋白)。那些蛋白(其具有可以与葡萄糖优先并非酶促进行反应的一个或多个 α -氨基和/或 ϵ -氨基基团)被本领域技术人员理解为具有糖化基序。

[0030] 认为蛋白的糖基化代表主要机制,通过该主要机制,高水平的葡萄糖随着时间诱导糖尿病受试者的靶器官中细胞和组织损伤。蛋白的糖化取决于蛋白所暴露于的葡萄糖水平。因为血浆葡萄糖水平作为连续体存在,因此不足为奇的是糖化蛋白存在于非糖尿病和糖尿病受试者中,虽然在糖尿病受试者中比在非糖尿病受试者中处于较高水平。因此,可以在受试者和/或受试者群体中通过检测糖化蛋白(包括但不限于GCD59)的水平来实现受试者中诊断和追踪糖尿病病症并且针对糖尿病病症筛选受试者群体。

[0031] 在一些实施例中,受试者样品包括含糖化赖氨酸残基的GCD59,其中此类残基的糖化侧链包括不同排列的化学键和立体结构。赖氨酸糖化经葡萄糖或其他还原糖残基与赖氨酸残基侧链的氨基基团的非酶促衔接而发生。当葡萄糖首先与赖氨酸侧链发生反应时,它与 ϵ -氨基基团形成席夫碱或醛亚胺。该易变的席夫碱可以环化以形成更稳定的葡基胺或重排并且环化成以下所示的阿马多利加合物。



[0032] 之前已经确定CD59的过度/异常K41糖化与异常的血糖水平有关,并且在K41处的糖化干扰CD59的正常活性。CD59通过结合到补体的膜攻击复合体(MAC)的末端组分来正常运作,借此干扰补体的C9组分的膜插入和聚合。在CD59的K41残基处的糖化干扰CD59的防止MAC组装的能力。认为因为CD59的K41糖化,没有抑制MAC孔形成,这导致增生性慢性糖尿病并发症的发展(参见美国专利号6,835,545、美国专利号7,049,082、美国专利号7,767,791、美国专利号8,008,024、美国专利号8,298,779和美国专利号7,439,330,它们的每一个的内容均通过引用以其全文结合在此)。

GCD59检测试剂盒

[0033] 在一些实施例中,本发明提供了用于检测GCD59的试剂盒。此类试剂盒可以检测并量化受试者样品中的GCD59。如在此使用的术语“受试者样品”是指来自受试者的样品。受试者样品可以包括体液。此类体液受试者样品可以包括但不限于血液、尿液、粘液、羊水、血浆、腹水、脑脊髓液、痰、骨髓、滑液、房水、乳汁、汗水、粪便物、眼泪、腹膜液、淋巴液、阴道分

分泌物、囊胚腔液、脐带血和/或唾液。

[0034] 在一些实施例中,本发明的试剂盒可以包括免疫测定。如在此使用的,术语“免疫测定”是指针对检测和/或测量的一种或多种手段的包括使用抗体的任何测定。免疫测定(例如,酶联免疫吸附测定(ELISA))可以包括“夹心测定”。如在此使用的术语“夹心测定”是指免疫测定,其中所检测的因素是通过至少两种抗体结合的,其中一种抗体捕获此类因素并且另一种抗体仅与检测所需要的此类因素的区域、特征或表位相关。此类测定典型地包括捕获抗体和检测抗体。如在此使用的,术语“捕获抗体”是指免疫测定的抗体组分,该抗体组分典型地结合到底物上,能够与测定中所检测的抗原或其他因素结合。捕获抗体可以结合至一个或多个捕获表位。当提及在夹心测定中所检测的因素时,如在此使用的术语“捕获表位”是指这样一种表位,该表位并不包括在此类夹心测定中结合到检测抗体的此类因素的区域、特征或表位。捕获抗体与一个或多个或表位结合以一个方向保留所检测的因素,该方向有助于此类因素与检测抗体相互作用。

[0035] 如在此使用的术语“检测抗体”是指与一个或多个检测表位相关的免疫测定的抗体组分。当提及在夹心测定中所检测的因素时,术语“检测表位”是指这样一种表位,该表位包括在此类夹心测定中所检测的此类因素的区域、特征或表位。检测抗体可以与一个或多个可检测的标记结合,以辅助结合抗原的检测和/或量化。此类标记可以包括但不限于:荧光标签、生物素部分和/或酶。包括酶的可检测标记可以包括辣根过氧化物酶(HRP)。

[0036] 在一些实施例中,本发明的夹心测定可以包括二级检测抗体。如在此使用的术语“二级检测抗体”是指能够与检测抗体结合的抗体。二级检测抗体可以包括可检测标记。此类标记可以包括但不限于:荧光标签、生物素部分和/或酶。包括酶的一些可检测标记可以包括HRP。

[0037] 在一些实施例中,试剂盒可以包括试剂和/或使用说明。此类试剂盒可以包括一种或多种缓冲液。这些可以包括但不限于:柠檬酸盐缓冲溶液、乙酸盐缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡糖酸钙、d-葡糖酸、甘油磷酸钙、乳酸钙、丙酸、戊酮酸钙、戊酸、磷酸氢钙、磷酸、磷酸三钙、羟基磷灰石(calcium hydroxide phosphate)、乙酸钾、氯化钾、葡糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸钾混合物、乙酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠混合物、氨丁三醇、氢氧化镁、氢氧化铝、海藻酸、无热原水、等渗盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、乙醇等,和/或其组合。

[0038] 在一些实施例中,试剂盒组分可以按含水介质的形式或以冻干的形式包装。试剂盒的容器装置一般包括至少一个小瓶,试管,烧瓶,瓶子,注射器或其他容器装置,其中可以放置有成分,优选为等份分装的。当存在超过一种试剂盒组分(可将标记试剂和标签包装在一起)时,试剂盒通常还可以包含可将另外的组分分别放置于其中的第二、第三或其他另外的容器。一些试剂盒还可以包括用于包含无菌的、药学上可接受的缓冲液和/或其他稀释剂的第二容器装置。

[0039] 在一些实施例中,可将组分的各种组合包含在一个或多个小瓶中。本发明的试剂盒还可以包括用于包含本发明化合物和/或组合物的装置,例如,严密封装的用于商业销售的蛋白、核酸、和任何其他试剂容器。此类容器可包括将期望的小瓶保留在其中的注射或吹模成型塑料容器。

[0040] 试剂盒组分可以提供于一种或多种液态溶液中。此类液态溶液可以是水溶液,包括但不限于无菌的水溶液。一些试剂盒组分可以以一种或多种干燥粉剂的形式提供。当试剂和/或组分以干燥粉剂的形式提供时,此类粉剂可以通过添加适合体积的溶剂重构。溶剂可在另一个容器装置中提供,或者可以被要求由个体使用此类试剂盒来提供。一些试剂盒可以包括使用试剂盒组分以及使用试剂盒中不包含的任何其他试剂的说明书。说明书可包括可被实现的变化。

[0041] 在一些实施例中,本发明的试剂盒可以包括用于检测和/或量化GCD59的夹心测定,在此称为GCD59检测和/或量化测定。在一些情况下,此类测定可以包括高希(Ghosh)等人中所描述的那些中任一种(高希等人,2013,美国血液学杂志(Am. J. Hematol.)88:670-6,其内容以其全文通过引用结合于此)。

抗体、抗原和测定

[0042] 本发明的GCD59检测和/或量化测定可以包括一种或多种捕获抗体、一种或多种检测抗体、一种或多种二级检测抗体和/或蛋白标准品(可任选地包括一种或多种替代化合物)。如在此使用的术语“抗体”是最广义上引用并且特别涵盖了各种实施例,这些实施例包括但不限于:单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,由至少两个完整抗体所形成的双特异性抗体)、和抗体片段(如双抗体,只要它们展现出所希望的生物活性)。抗体主要是基于氨基酸的分子,但是还可以包括一个或多个修饰(包括但不限于添加一个或多个可检测标记)。在此披露的GCD59检测和/或量化测定的捕获抗体可以能够与CD59结合。此类捕获抗体可以与存在于CD59上的一个或多个捕获表位相结合。在GCD59检测和/或量化测定中,存在于CD59上的捕获表位可以包括或可以不包括K41残基。

[0043] 在一些实施例中,捕获表位可以选自成熟CD59蛋白(没有N末端分泌-和GP1-信号序列,SEQ 1D NO:1)。存在于CD59上的一些捕获表位可以包括氨基酸序列FEHCNFDVTTTLRENELTYCYCKKDL(SEQ 1D NO:2)。存在于CD59上的一些捕获表位可以包括氨基酸序列FEHCNFDVTTTLRENELTYCYCKK(SEQ 1D NO:3)。存在于CD59上的一些捕获表位可以包括氨基酸序列HCNFDVTTTLRENELTYCYCKK(SEQ 1D NO:4)。

[0044] 在一些实施例中,本发明的捕获抗体可以通过使用肽抗原来生产。如在此使用的术语“肽抗原”和“蛋白抗原”是指可以在一个或多个宿主中用来引发免疫应答以便产生与此类肽和/或蛋白特异性结合的抗体的肽和/或蛋白。可以使用与CD59上捕获表位对应的肽抗原和/或与此类肽具有部分一致性的肽抗原来生产捕获抗体。

[0045] 根据这种方法,可以生产与所使用肽抗原特异性结合的捕获抗体。包括SEQ 1D NO:2-4中任一项的氨基酸序列的肽抗原或其衍生物可以用来产生捕获抗体。对应于CD59的肽抗原可以在用来生产捕获抗体之前进行修饰和/或突变。此类修饰可以包括掺入非编码氨基酸。此类修饰和/或突变可以使得此类肽抗原适当折叠。一些修饰和/或突变可以增加此类肽抗原的稳定性和/或确保所希望的折叠。包括SEQ 1D NO:4的肽抗原可以突变来包括氨基酸序列ACNFDVTTTLRENELTYCYCAK(SEQ 1D NO:5),并且用来产生捕获抗体。

[0046] 在一些实施例中,包括SEQ 1D NO:2的肽抗原可以进行突变并且用来产生捕获抗体。包括SEQ 1D NO:2的肽抗原可以包括非编码氨基酸。对20个编码蛋白原氨基酸进行鉴别,并且在此通过以下一个字母或三个字母代号来指代:天冬氨酸(Asp:D)、异亮氨酸(Ile:I)、苏氨酸(Thr:T)、亮氨酸(Leu:L)、丝氨酸(Ser:S)、酪氨酸(Tyr:Y)、谷氨酸(Glu:E)、苯丙

氨酸(Phe:F)、脯氨酸(Pro:P)、组氨酸(His:H)、甘氨酸(Gly:G)、赖氨酸(Lys:K)、丙氨酸(Ala:A)、精氨酸(Arg:R)、半胱氨酸(Cys:C)、色氨酸(Trp:W)、缬氨酸(Val:V)、谷氨酰胺(Gln:Q)、甲硫氨酸(Met:M)、天冬酰胺(Asn:N)。在自然界中,编码氨基酸以其左旋的(L)立体异构形式存在。除非另有说明,在此提及的氨基酸是L-立体异构体。如在此使用的术语“非编码的氨基酸”是指具有不存在于以上列出的20个编码氨基酸中的侧链或其他特征的氨基酸,并且可以包括但不限于:N-甲基氨基酸、N-烷基氨基酸、 α 、 α -二取代氨基酸、 β -氨基酸、D-氨基酸、及本领域中已知的其他非编码氨基酸(参见,美国专利申请公开号2011/0172126,其内容以其全文通过引用结合于此)。非编码氨基酸的另外实例包括但不限于: β -丙氨酸(β A)和 α -氨基异丁酸(Aib)。

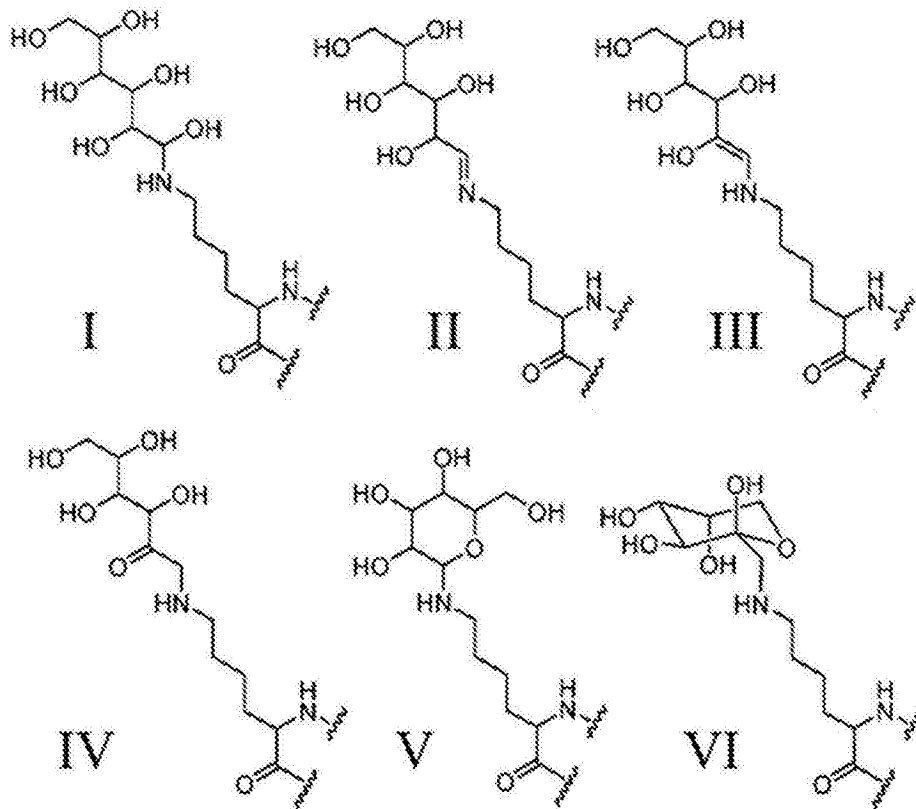
[0047] 在一些实施例中,包括AFEHCNFNDVTTRLRENELTYCAAKDL(SEQ 1D NO:6)的肽抗原可以用来产生捕获抗体,或者在用来生产捕获抗体之前,突变为包括非编码氨基酸(例如, β A和/或Aib)。此类突变肽抗原可以包括氨基酸序列AFEHCNFNDVTTRLRENELTYYC(β A)KDL(SEQ 1D No:7)和/或AFEHCNFNDVTTRLRENELTYYC(Aib)AKDL(SEQ 1D NO:8)。

[0048] 在一些实施例中,用来生产捕获抗体的肽抗原可以包括包含在此类肽抗原中的半胱氨酸残基之间的二硫键。包括二硫键的一些肽抗原可以是环状的和/或包括环状环或环结构。包括SEQ 1D NO:4或5的氨基酸序列的肽抗原包括在C2和C20(其对应于成熟CD59序列中的残基39和63)之间的二硫键,该二硫键导致此类抗原中的环状环存在。包括SEQ 1D NO:6-8的氨基酸序列的肽抗原可以包括在C5和C23(其对应于在成熟CD59序列中的残基39和63)之间的二硫键,该二硫键也导致此类抗原中的环状环结构。

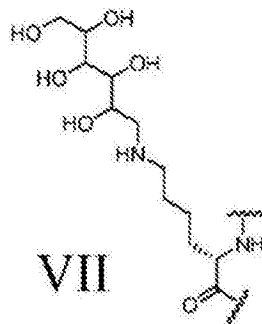
[0049] 在一些实施例中,在此披露的GCD59检测和/或量化测定的检测抗体可以能够与存在于CD59上的检测表位结合。在GCD59检测和/或量化测定中,存在于CD59上的检测表位可以包括或不包括糖化K41,该糖化K41当作为序列的部分列出时在此还称为“K*41”或“K*”。

[0050] 在一些实施例中,检测表位可以选自成熟CD59蛋白(没有N末端分泌-和GP1-信号序列,SEQ 1D NO:1)。存在于CD59上的此类检测表位可以包括氨基酸序列NKCWKFEHCNFNDV(SEQ 1D NO:9)。

[0051] 检测表位还可以包括一个或多个糖化的赖氨酸残基。糖化的残基可以包括不同排列的化学键和立体化学结构。检测表位的一些糖化赖氨酸残基可以包括在赖氨酸糖化和/或重排期间所形成的任何结构,这些结构包括任何中间形式。这包括结构1-V1中任一种。



[0052] 在一些实施例中,检测表位的糖化赖氨酸残基可以包括阿马多利产物。存在于检测表位上的此类阿马多利产物可以是以线性或环状形式。一些检测表位可以包括糖化的赖氨酸残基,其中糖化的侧链如在葡糖醇赖氨酸中已经还原了(以下描绘成结构VII)。



[0053] 在一些实例中,糖化的赖氨酸残基可以通过与一种或多种还原剂的化学反应来还原。此类治疗可以诱导糖化赖氨酸残基采取葡糖醇赖氨酸的构象。此类还原剂可以包括但不限于:氰基硼氢化钠(NaCNBH_3) (用于还原包括席夫碱的糖化赖氨酸残基)和/或硼氢化钠(NaBH_4) (用于还原包括席夫碱的糖化赖氨酸残基和包括阿马多利产物的残基)。

[0054] 本发明的检测抗体可以通过使用肽和/或蛋白抗原以在一个或多个宿主中引发免疫应答来进行生产。还可以使用与GCD59上检测表位对应的肽抗原和/或与此类肽具有部分一致性的肽抗原来生产检测抗体。根据这种方法,可以生产与所使用肽抗原特异性结合的检测抗体。包括SEQ ID NO:9的氨基酸序列的肽抗原可以用来产生检测抗体。

[0055] 在一些实施例中,对应于GCD59的肽抗原可以在用来生产检测抗体之前进行修饰和/或突变。此类修饰可以包括掺入非编码氨基酸。在一些情况下,此类修饰和/或突变可以确保此类肽抗原所希望的折叠或调整此类肽抗原的稳定性。突变的肽抗原可以包括突变为包括氨基酸序列NKAWKFEHANFND(SEQ ID NO:10)的SEQ ID NO:9。此类肽抗原可以用来生产

检测抗体。包括SEQ ID NOs:9和/或10的一些肽抗原可以包括糖化K5残基(对应于成熟CD59蛋白(SEQ ID NO:1)的K41)。此类肽抗原的这种糖化赖氨酸残基可以包括在赖氨酸糖化和/或重排和/或还原期间所形成的任何结构,这些结构包括任何中间形式。这包括结构1-V11中任一种。

[0056] 本发明的一些肽可以包括端基修饰。此类端基修饰可以包括N末端乙酰化,在此由“Ac-”表示。C末端残基可以包括酰胺基团,在此由“-NH₂”表明。

[0057] 在一些实施例中,将如以上所描述的抗体、抗体片段、其变体或衍生物与在此描述的抗原蛋白、肽、表位和/或结构域进行特异性免疫反应。本发明的抗体和/或抗原可以包括由高希(Ghosh)等人所披露的那些中任一种(高希等人,2013,美国血液学杂志(Am.J.Hematol.)88:670-6,其内容以其全文通过引用结合于此)。

[0058] 在一些情况下,可以在用作免疫原之前,将抗原与一种或多种抗原载体缀合或合成为融合蛋白。如在此使用的术语“抗原载体”是指蛋白、其他大分子结构的蛋白复合物,其可以与一种或多种抗原缀合,以在免疫时减少颗粒和/或凝胶形成。此外,在免疫之前、期间和/或之后,抗原载体可以增加抗原稳定性。可以在此使用的抗原载体可以包括但不限于钥孔虫戚血蓝蛋白(KLH)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、大豆胰蛋白酶抑制剂、多抗原肽系统以及类似物。在一些实施例中,本发明的抗原可以缀合到KLH上(参见美国专利号5,855,919,其内容以其全文通过引用结合于此)。KLH包括大量的赖氨酸残基,这些赖氨酸残基促进抗原耦合并且能够使大比例的抗原与抗原载体来促进抗原特异性免疫反应。

[0059] 如在此使用的术语“抗体片段”是指完整抗体的任何部分。在一些实施例中,抗体片段包括来自完整抗体的抗原结合区。抗体片段的实例包括但不限于:Fab、Fab'、F(ab')₂、和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;以及从抗体片段形成的多特异性抗体。抗体的木瓜蛋白酶消化产生两种相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,每个都具有单个抗原结合位点。还产生了残余的“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理得到具有两个抗原结合位点的F(ab')₂片段,该片段仍能交联抗原。本发明的试剂盒可以包括这些片段中的一个或多个。出于本文的目的,抗体可以包括重可变结构域和轻可变结构域连同Fc区域。

[0060] 如在此使用的,术语“天然抗体”是指通常约150,000道尔顿的异四聚体的糖蛋白,其由两个相同的轻(L)链和两种相同的重(H)链组成。每条轻链经共价二硫键与重链相连,而二硫键的数目视不同免疫球蛋白同种型的重链而不同。每条重链和轻链也含有规律性隔开的链内二硫桥。每条重链的一端为可变结构域(V_H),其后是多个恒定结构域。每条轻链的一端为可变结构域(V_L),在另一端为恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域配对,轻链可变结构域与重链的可变结构域配对。

[0061] 如在此使用的,术语“可变结构域”是指特异性抗体结构域,其在抗体之间序列差异广泛并且负责每个具体抗体针对其具体抗原的结合和特异性。

如在此使用的,术语“Fv”是指包括完全抗原识别和抗原结合部位的抗体片段。这些区域由紧密地非共价连接的一条重链和一条轻链可变结构域的二聚体组成。

[0062] 如在此使用的,术语“轻链”是指来自指定为两种截然不同类型之一的任何脊椎动物物种的抗体的组分,基于恒定结构域的氨基酸序列称为κ和λ。根据“重链”恒定区的氨基酸序列,可将抗体分为不同类型。存在5大类完整抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中

的若干可以进一步分成亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。如在此使用的,术语“单链Fv”或“scFv”是指V_H和V_L抗体结构域的融合蛋白,其中这些结构域一起连接到单一多肽链。Fv多肽接头可以使得scFv形成用于抗原结合的所希望的结构。

[0063] 如在此使用的,术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段。双抗体包括在相同多肽链中连接到轻链可变结构域V_L的重链可变结构域V_H。通过使用太短以至于不允许在相同链上的两个结构域之间配对的接头,这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合位点。双抗体更全面地描述在例如EP 404,097;W093/11161;以及霍林格(Hollinger)等人,(霍林格,P等人,美国国家科学院院刊(PNAS),1993.90:6444-8)中,其每一篇内容都通过引用以其全文结合于此。

[0064] 如在此使用的,术语“单克隆抗体”是指从基本上同种的细胞(或克隆)群获得的抗体,即,包括该群体的单独抗体是相同的和/或结合相同表位,除了在生产单克隆抗体期间可能出现的可能的变体,此类变体一般以少量存在。与一般包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂形成对照,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇

[0065] 修饰语“单克隆”指示当获得自基本上均一的抗体群体的抗体的特征,并且不应理解为要求通过任何具体方法产生抗体。

[0066] 在一些情况下,单克隆抗体可以是兔单克隆抗体。此类抗体可以,例如,根据美国专利号5,675,063、7,429,487、7,732,168、8,062,867或8,367,408或者美国公开号2011/0020934或2014/0004566中所传授的方法中的任一种来进行生产,其每篇内容通过引用以其全文结合在此。此类方法可以包括使用兔浆细胞瘤细胞、兔融合配偶体细胞和/或杂交瘤细胞。兔浆细胞瘤细胞可以包括但不限于:240E1-1细胞,如在美国专利号5,675,063中所描述的,并且对应于ATCC登录号CRL-11872。兔融合配偶体细胞可以表达癌基因(例如,myc和/或ab1癌基因)并且可以包括但不限于240E1-1-2细胞,如在美国专利号5,675,063中所描述的并且对应于ATCC登录号HB11870。在一些情况下,兔杂交瘤可以包括ATCC登录号HB-11871的那些,还如在美国专利号5,675,063中所描述的。

[0067] 在此的单克隆抗体包括“嵌合的”抗体(免疫球蛋白),其中重和/或轻链的一部分与对应的衍生自一个特定种类的抗体或属于一个特定抗体种类或亚类的序列相同或同源,而该一个或多个链的其余部分是衍生自另一个种类的抗体的或属于另一个抗体种类或亚类的抗体连同此种抗体的片段中的对应序列相同或同源。

[0068] 如在此描述的,术语“人源化抗体”是指嵌合抗体,该嵌合抗体包括来自一个或多个非人类(例如,鼠)抗体来源的小部分,与源自一个或多个人类免疫球蛋白来源的剩余部分。对大部分情况而言,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的抗体的高变区中的残基由来自非人种类(供体抗体)如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的具有所希望的特异性、亲和力、和/或容量的抗体的高变区中的残基替换。

[0069] 如在此使用的,术语“超变区”是指包括负责抗原结合的氨基酸残基的抗体的抗原结合域中的区域。在超变区中存在的氨基酸确定了互补决定区(CDR)的结构。如在此使用的,术语“CDR”是指包括与其靶抗原或表位互补的结构的抗体的区域。

[0070] 在一些实施例中,本发明的化合物和/或组合物可以是抗体模拟物。如在此使用的,术语“抗体模拟物”是指任何分子,该任何分子模拟抗体的功能或作用,并且特异性结合并且具有与其分子靶标的高亲和性。一些抗体模拟物可以是单抗,被设计为掺入纤维连接

蛋白III型结构域(Fn3)作为蛋白支架(US 6,673,901;US 6,348,584)。抗体模拟物可以包括本领域中已知那些中的任一种,其包括但不限于:affibody分子、affilin、affitin、anticalin、avimer、Centyrin、DARPinTM、Fynomer和Kunitz和结构域肽。在其他实施例中,抗体模拟物可以包括一种或多种非肽区域。

[0071] 如在此使用的,术语“抗体变体”是指在结构和/或功能中类似于抗体的生物分子,其与天然抗体相比包括在其氨基酸序列、组成或结构方面的一些不同。

[0072] 本领域已知抗体(无论单克隆或多克隆的)的制备。用于生产抗体的技术是本领域中熟知的并且描述,例如,于哈洛(Harlow)和莱恩(Lane),(Cold Spring Harbor Laboratory Press),1988以及哈洛和莱恩,冷泉港实验室出版社,1999中。单克隆抗体的生产可以包括用一种或多种抗原的宿主免疫,其包括一种或多种蛋白、肽或其他分子来诱发特异性结合此类抗原的淋巴细胞。收集淋巴细胞并与永生化细胞系融合。将得到的杂交瘤细胞培养于具有选择剂的适合的培养基中,来支持仅融合细胞的生长。

[0073] 在一些情况下,本发明的抗体还可以通过重组方法制备,如美国专利号4,816,567、美国公开号2004/0067496、或国际公开号WO 2014/004586A1、或WO 2004/032841中所描述的那些,其每篇内容以其全文通过引用结合于此。编码本发明抗体的核酸(例如,DNA、RNA、cDNA)序列可以使用常规程序通过分离、扩增和/或测序容易地得到。例如,编码所希望抗体的重链和轻链的核酸可以通过聚合酶技术(例如,PCR、RT-PCR)使用能够与此类核酸特异性结合的寡核苷酸探针来进行扩增(奥兰迪(Orlandi)等人,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)86(1989)3833-7,其内容以其全文通过引用结合于此)。在一些情况下,杂交瘤细胞可以作为核酸的优选来源。一旦分离或以其他方式获得,可以将核酸置于表达载体中。然后可以将表达载体转染到宿主细胞中用于抗体表达。宿主细胞可以包括但不限于:猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、VERO细胞、HeLa细胞、HEK293细胞、NS0细胞、W138细胞、BHK细胞、COS-7细胞、Caco-2细胞、MDCK细胞和骨髓瘤细胞(及其亚类和变体)。在一些情况下,此类宿主细胞并不另外生产免疫球蛋白。本发明的抗体还可以通过修饰编码已知抗体的核酸来获得,这样使得人类重链和轻链恒定域的编码序列用来替代来自其他物种的同源序列(其可存在于此类核酸中)(参见,美国专利号4,816,567或7,462,697、国际专利号WO 2004/016740或WO 2005/016950、或欧洲公开号EP 1651659或EP 1539947,其每篇内容以其全文通过引用结合于此)。

[0074] 本发明的抗体还可以通过一种或多种已知的抗体的优化来开发。这种优化可包括改变一种或多种所希望的特性。优化抗体的方法可以发现于,例如,斯佐霍(Stroh1),WR和斯佐霍LM,“治疗性抗体工程(Therapeutic Antibody Engineering)”,剑桥:伍德海(Woodhead)公司出版(2012),第6章,其内容以其全文通过引用结合于此。在一些情况下,可以优化抗体来调整对其结合配偶体的亲和性。此类优化可以包括通过添加、缺失或取代一种或多种氨基酸改变抗体氨基酸序列。在一些情况下,抗体可以根据以下各项中所描述的方法中的任一种来进行优化:美国专利号8,404,816、国际公开号WO 2006/050491或欧洲专利号EP1819830,其每篇内容以其全文通过引用结合于此。

[0075] 在一些情况下,可以对抗体CDR区域做出调节抗体亲和性的改变。可以根据本领域中已知的方法评估对于结合配偶体的抗体亲和性,这些方法包括但不限于:ELISA、表面等离子体共振(SPR)和动力学排除测定技术。

蛋白标准品

[0076] 本发明的试剂盒包括一种或多种蛋白标准品。如在此使用的，术语“蛋白标准品”是指免疫测定的组分，该免疫测定用于校准并且可以精确量化由此类测定所评估的一种或多种因素。蛋白标准品可以包括由免疫测定所分析的已知浓度的一种或多种因素。一些蛋白标准品可以包括此类因素的变体。本发明的一些蛋白标准品可以包括包含合成构建体的替代化合物，该合成构建体作为被量化的一种或多种蛋白的替代物。如在此使用的，术语“替代化合物”是指在某些情况下替代另一种实体的实体。本发明的一些替代化合物被设计用作蛋白标准品，在蛋白标准制品中替代CD59或其变体。此类替代化合物可以包括取自成熟CD59蛋白(SEQ ID NO:1)的两个或更多个氨基酸序列。此类替代化合物氨基酸序列可以包括一个或多个捕获结构域。如在此使用的，术语“捕获结构域”是指与一种或多种捕获抗体结合的蛋白质结构域。本发明的替代化合物还可以包括一个或多个检测结构域。如在此使用的，术语“检测结构域”是指与一种或多种检测抗体结合的蛋白质结构域。

[0077] 本发明的替代化合物可以包括捕获结构域，这些捕获结构域包括任何在此描述的捕获表位、和/或任何在此描述的肽抗原，这些肽抗原与任何在此描述的捕获表位相对应。一些捕获结构域可以包括SEQ ID NO:2-8的一种或多种氨基酸序列。

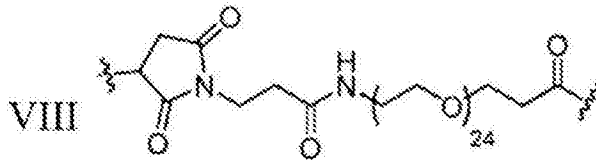
[0078] 在一些实施例中，本发明的替代化合物可以包括检测结构域，这些检测结构域包括任何在此描述的任何检测表位，和/或任何在此描述的肽抗原，这些肽抗原与任何在此描述的检测表位相对应。一些检测结构域可以包括SEQ ID NO:9或10的氨基酸序列的一种或多种。一些检测结构域可以包括糖化赖氨酸残基。检测结构域的此类糖化赖氨酸残基可以包括在赖氨酸糖化和/或重排期间所形成的任何结构，这些结构包括任何中间形式。这些可以包括包含还原的结构V11的结构1-V1中任一种。

[0079] 在一些实施例中，本发明的替代化合物可以包括在国际专利申请号PCT/US 2012/024645，标题为翻译后修饰的蛋白替代物及其用途(Surrogates of Post-Translationally Modified Proteins and Uses Thereof)中所披露的替代化合物中的任一种，其内容以其全文通过引用结合于此。

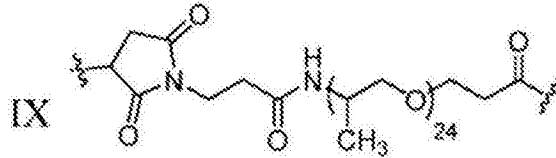
[0080] 在检测结构域上存在的糖化赖氨酸残基可以包括阿马多利产物。存在于检测结构域上的此类阿马多利产物可以是以线性或环状形式。一些检测结构域可以包括葡糖醇赖氨酸。

[0081] 在一些实施例中，本发明替代化合物的捕获结构域和检测结构域通过接头连接。如在此使用的，术语“接头”是指用来连接蛋白、肽、结构域或部分的化合物或分子。接头可以是独立的环状的或非环状的，经取代的或非经取代的，分枝的或未分枝的杂脂肪族部分。在另外的实施例中，接头长度可以从约1至约500个原子。在仍另外的实施例中，接头可以包括聚合物区域。此类聚合物区域可以包括从约1至约100个单体。在另外的实施例中，聚合物区域可以包括从约10至约60个单体。在仍另外的实施例中，聚合物区域可以包括从约20至约40个单体。一些聚合物区域可以包括乙二醇单体。在另外的实施例中，聚合物区域可以包括丙二醇单体。在仍另外的实施例中，接头可以不包括电荷。

[0082] 在一些实施例中，本发明的接头可以包括根据V111的结构：



[0083] 在一些实施例中,本发明的接头可以包括根据IX的结构:



[0084] 在此描述的蛋白标准品可以与受试者样品一起进行测定,以便确定所测定的一种或多种因素的浓度。在此描述的一些蛋白标准品与受试者样品一起进行测定,以确保此类样品中GCD59浓度的确定。在一些情况下,确定包括替代形式的糖化赖氨酸的GCD59的浓度。本发明的一些测定可以包括各种溶液的制备,在每种溶液中具有已知浓度的蛋白标准品。这些溶液可以与受试者样品一起进行测定,并且通过将各蛋白标准品溶液中的已知浓度对由测定产生的一种或多种信号作图,用来产生标准曲线。然后将标准曲线与从受试者样品分析产生的信号进行比较,并且用来推断所分析的一种或多种因素的浓度值。

[0085] 在一些实施例中,本发明的蛋白标准品可以包括国际申请号PCT/US 2012/024645中所披露的替代化合物中的任一种,其内容以其全文通过引用结合于此。此类替代化合物的合成方法还可以包括针对国际申请号PCT/US 2012/024645中所披露的替代化合物的所披露的那些中的任一种。

变体

[0086] 在此披露的蛋白中的任一种(包括但不限于:抗体、融合蛋白、替代化合物、肽和/或肽抗原)可以作为整个多肽、多个多肽或多肽的片段存在,其独立地可以由一种或多种核酸、多个核酸、核酸片段或任何上述的变体进行编码。如在此使用的,术语“多肽”是指很多时候由肽键连接在一起的氨基酸残基的聚合物(天然或非编码的)。如在此使用的,该术语是指具有任何大小、结构或功能的蛋白质、多肽以及肽。在一些情况下,所编码的多肽比约50个氨基酸小,并且然后该多肽称为肽。如果多肽是一种肽,它将是至少约2、3、4、或至少5个氨基酸残基长。因此,多肽包括基因产物、天然存在的多肽、合成多肽、同源物、直系同源物、旁系同源物、片段、以及前述多肽的其他等价物、变体和类似物。多肽可以是单分子或者可以是多分子复合物,如二聚体、三聚体或四聚体。它们还可以包括单链或多链多肽,并且可以结合或连接。术语多肽还可以适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的一种人工化学类似物。

[0087] 如在此使用的,术语“变体”,当是指蛋白或肽时,是指其氨基酸序列与天然的或参照序列不同的分子。与天然或参照序列相比,该氨基酸序列变体可以在氨基酸序列内的某些位置处具有取代、缺失、和/或插入。肽变体可以包括一种或多种非编码氨基酸。一些肽、多肽和/或其片段可以包括天然和非编码的氨基酸和/或修饰的氨基酸或者完全由非编码氨基酸组成。非编码氨基酸可以包括但不限于β-丙氨酸和α-氨基异丁酸。

[0088] 通常情况下,变体将与天然或参照序列具有从约50%一致性(同源性)至约99%一致性。一些变体可以包括与天然或参照序列的从约50%至约75%一致性,从约60%至约

85%一致性,从约70%至约95%一致性或从约80%至约99%一致性。

[0089] 如在此使用的,术语“天然的”或“初始的”,当是指序列时,是指对原始分子可以进行比较的相对术语。天然或初始序列不应当与野生型序列混淆。自然序列或分子可以表示野生型(在自然界中发现该序列)但是不必与野生型序列一致。

[0090] 如在此使用的,术语“同系物”,当它用于氨基酸序列时,意指与第二物种的第二序列具有基本一致性的其他物种的对应序列。

[0091] 如在此使用的,术语“类似物”意指包括多肽变体,这些多肽变体差别是一个或多个氨基酸变化,例如,仍保持亲本多肽特性的氨基酸残基的取代、添加或缺失。

[0092] 如在此使用的,术语“衍生物”同时与术语“变体”使用,并且是指相对于参照分子或初始分子以任何方式修饰或改变的分子。

[0093] 可以将可检测标记和/或氨基酸(如一种或多种赖氨酸)添加到本发明的肽序列(例如,在N末端或C末端处)。可检测标记可以用于肽纯化或定位。赖氨酸可以用来增加肽溶解度或来允许生物素化。可替代地,位于肽或蛋白的氨基酸序列的羧基和氨基末端区域的氨基酸残基可以任选地缺失,提供截短序列。某些氨基酸(例如,C末端或N末端残基)可以可替代地缺失,取决于序列的使用,像例如,序列作为可溶的或者连接到固相支持体上的较大序列的部分的表达。

[0094] “取代的变体”,当是指蛋白时,是具有在所去除的天然或起始序列中的至少一个氨基酸残基和在相同位置处其位置中所插入的不同氨基酸的那些。取代可为单取代,其中分子中仅一个氨基酸经取代,或其可为多取代,其中同一分子中两个或更多个氨基酸经取代。

[0095] 如在此使用的,术语“保守性氨基酸取代”是指用具有相似大小、电荷、或极性的不同氨基酸对序列中正常存在的氨基酸的取代。保守取代的实例包括非极性的(疏水的)残基(如异亮氨酸、缬氨酸和亮氨酸)取代为另一个非极性残基。类似地,保守取代的实例包括一个极性(亲水性)残基取代为另一个,如在精氨酸和赖氨酸之间、在谷氨酰胺和天冬酰胺之间、和在甘氨酸和丝氨酸之间。此外,碱性残基(如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)取代为另一种残基,或者一种酸性残基(如天冬氨酸或谷氨酸)取代为另一种酸性残基是保守取代的另外的实例。非保守性取代的实例包括非极性(疏水的)氨基酸残基(如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸)取代为极性(亲水的)残基(如半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或赖氨酸),和/或极性残基取代为非极性残基。

[0096] 如在此使用的,术语“插入变体”,当是指蛋白时,是紧邻在天然或初始序列中的具体位置处的氨基酸插入一个或多个氨基酸的那些。如在此使用的,术语“紧邻”是指与初始或参照氨基酸的 α -羧基或 α -氨基官能团连接的相邻氨基酸。

[0097] 如在此使用的,术语“缺失变体”,当是指蛋白时,是在天然或初始氨基酸序列中去除了一个或多个氨基酸的那些。通常情况下,缺失变体在分子的特定区域中具有一个或多个氨基酸缺失。

[0098] 如在此使用的,术语“衍生物”在此是指包括天然或初始蛋白的变体,这些变体包括用有机的蛋白类或非蛋白类衍生化试剂的一种或多种修饰、以及翻译后修饰。传统地,通过使蛋白的靶向的氨基酸残基与能够与所选侧链或末端残基反应的有机衍生剂反应,或通过利用在所选重组宿主细胞中起作用的翻译后修饰机制,来引入共价修饰。这些得到的共

价衍生物在针对鉴定针对生物活性、针对免疫测定、或针对制备用于免疫亲和纯化重组糖蛋白的抗蛋白抗体的重要残基的程序中是有用的。此类修饰在本领域中普通技术范围内，并且无需过度实验来进行。

[0099] 如在此使用的，术语“特征”，当是指蛋白时，定义为分子的基于不同氨基酸序列的组分。本发明的蛋白特征包括表面表现、局部构象形状、折叠、环、半环、结构域、半结构域、位点、末端或其任何组合。

[0100] 如在此使用的，术语“折叠”，当是指蛋白时，是指基于能量最低化，氨基酸序列的最终构象。折叠可以发生在二级或三级水平的折叠过程处。二级水平折叠的实例包括 β 折叠和 α 螺旋。三级折叠的实例包括在聚集或分离能量学力期间所形成的结构域和区域。以此方式形成的区域包括疏水和亲水的口袋等等。

[0101] 如在此使用的，术语“转角”，当它涉及蛋白质构象时，是指弯曲，该弯曲改变了肽或多肽的主链的方向，并且可以涉及一个、两个、三个或更多个氨基酸残基。

[0102] 如在此使用的，术语“环”，当指代蛋白时，是指肽或多肽的结构特征，该环逆转了肽或多肽的主链的方向并且包括四个或更多个氨基酸残基。奥利瓦(Oliva)等人鉴定了至少5类蛋白环(奥利瓦, B等人, 1997. 266(4): 814-30)。

[0103] 如在此使用的，术语“半环”，当指代蛋白时，是指已鉴定环的部分，该部分具有衍生该半环的环的至少半数氨基酸残基。应理解的是环可以不总是包含偶数个氨基酸残基。因此，在那些情况(其中环包含或被鉴定为包括奇数个氨基酸)下，奇数个环的半环将包括该环的整数部分或下一个整数部分(该环的氨基酸数/2+/-0.5个氨基酸)。例如，鉴定为7个氨基酸环的环可以产生3个氨基酸或4个氨基酸的半环($7/2=3.5+/-0.5$ 为3或4)。

[0104] 如在此使用的术语“结构域”，当指代蛋白时，是指具有一个或多个可鉴定的结构或功能特征或特性的蛋白或肽的基序(例如，包括糖化残基，能够与一个或多个因素结合，作为蛋白质-蛋白质相互作用的位点)。

[0105] 如在此使用的，术语“半结构域”，当指代蛋白时，是指已鉴定结构域的部分，该部分具有衍生该半结构域的结构域的至少半数氨基酸残基。应理解的是结构域可以不总是包含偶数个氨基酸残基。因此，在那些情况(其中结构域包含或被鉴定包括奇数个氨基酸)下，奇数个结构域的半结构域将包括该结构域的整数部分和下一个整数部分(该结构域的氨基酸数/2+/-0.5个氨基酸)。例如，鉴定为7个氨基酸结构域的结构域可以产生3个氨基酸或4个氨基酸的半结构域($7/2=3.5+/-0.5$ 为3或4)。还应当理解的是，亚结构域可以在结构域或半结构域内鉴定，这些亚结构域比衍生它们的结构域或半结构域中所鉴定的所有结构或功能特性具有更少的结构或功能特性。还应当理解的是包括任何结构域类型的氨基酸在此不必沿着多肽的主链连续(即，不相邻的氨基酸可以在结构上折叠以产生结构域、半结构域或亚结构域)。

[0106] 如在此使用的，术语“位点”，当它涉及基于氨基酸的实例时，与“氨基酸残基”和“氨基酸侧链”同义使用。位点表示在肽或多肽内的位置，该肽或多肽可以在本发明的基于多肽的分子内进行修饰、操作、改变、衍生或变化。

[0107] 如在此使用的，术语“末端(termini或terminus)”，当指代蛋白时，是指肽或多肽的末端。这种末端并不仅限于肽或多肽的第一或最终位点，还可以包括末端区域中的另外的氨基酸。本发明的基于多肽的分子可以表征为具有N末端(以具有游离氨基基团(NH₂)的

氨基酸终止)和C末端(以具有游离羧基(COOH)的氨基酸终止)两者。在一些情况下,本发明的蛋白是由通过二硫键或通过非共价力聚集在一起的多个多肽链(多聚体、寡聚体)组成。这些类型的蛋白将具有多个N或C末端。可替代地,可以对多肽的末端进行修饰,这样使得它们以基于非多肽的部分如有机缀合物开始或结束,视情况而定。

[0108] 一旦任何特征已经被鉴定或定义为本发明分子的组分,那么这些特征的任何若干操作和/或修饰可以通过移动、交换、转化、缺失、使随机化或复制来进行。此外,应当理解的是特征的操作可以导致与对本发明分子修饰相同的结果。例如,涉及缺失结构域的操作将导致分子长度的改变,就好像修饰编码少于全长分子的核酸。

[0109] 修饰和操作可以通过该本领域中已知方法(如位点定向诱变)来完成。然后可以针对活性,使用体外或体内测定(如在此描述的那些或本领域中任何其他适合的筛选测定)对得到的修饰的分子进行测试。

[0110] 在一些实施例中,本发明的蛋白和/或肽可以包括是同位素的一个或多个原子。如在此使用的,术语“同位素”是指具有一个或多个另外中子的化学元素。本发明的一些多肽可以是氘化的。如在此使用的,术语“氘化”是指在物质中用氘同位素替代一个或多个氢原子的过程。氘同位素是氢的同位素。氢的核包含一个质子,然而氘核包含一个质子和一个中子。本发明的多肽可以是氘化的,以便改变一种或多种物理性质,如稳定性,或以允许用于诊断和/或实验应用中。

缀合物和组合

[0111] 在一些实施例中,本发明的多肽可以是与一个或多个同源或异源性分子进行复合、缀合或组合。如在此使用的,术语“同源分子”是指相对于初始分子在结构或功能的至少一种中是相似的分子,同时“同源分子”是相对于初始分子在结构或功能的至少一种中是不同的分子。因此,结构同系物是可以基本结构相似的分子。此类同系物可以是相同的。功能同系物是可以基本功能相似的分子。在某些情况下,此类同系物可以是相同的。

[0112] 在一些实施例中,本发明的多肽可以包括缀合物。本发明的此类缀合物可以包括天然发生的物质或配体,如蛋白质(例如,人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)或球蛋白);碳水化合物(例如右旋糖酐、支链淀粉、甲壳质、壳聚糖、菊糖、环糊精或透明质酸);或脂质。缀合物还可以是重组或合成分子,如合成聚合物,例如,合成多肽、聚氨基酸缀合物和寡核苷酸(例如,适体)。聚氨基酸的实例包括但不限于:聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨基甲酸酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷嗪。多元胺的实例包括:聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、多元胺、假肽-多元胺、肽模拟物多元胺、树状多元胺、精氨酸、脘,鱼精蛋白,阳离子脂质,阳离子卟啉,一种多元胺的季盐或一种 α 螺旋肽。

核酸

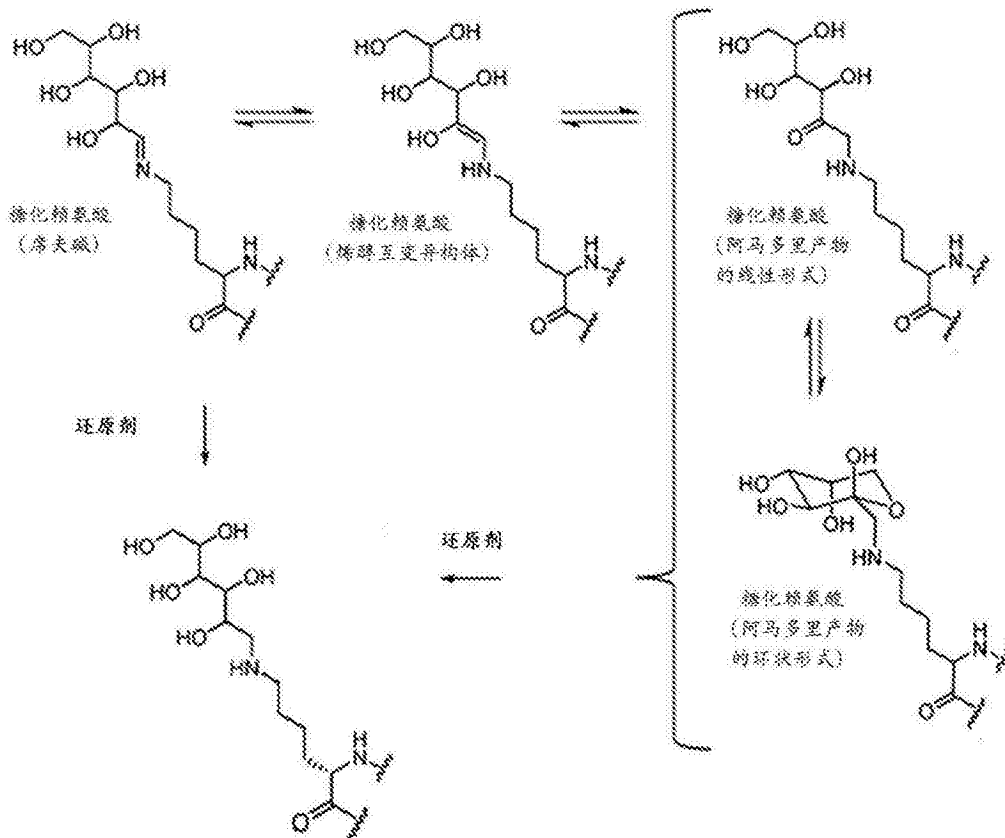
[0113] 在一些实施例中,核酸可以编码本发明的多肽。此类核酸分子可以包括但不限于:DNA分子、RNA分子、多核苷酸、寡核苷酸、mRNA分子、载体、质粒等等。本发明还包括细胞、细胞系、杂交瘤等等。一些细胞可以进行编程或产生以表达编码本发明多肽的核酸分子。

样品

[0114] 在一些实施例中,本发明的测定有助于受试者样品中糖化CD59水平的评估。受试者样品可以包括GCD59,其中K41糖化残基包括包含不同排列的化学键和立体化学结构的糖化侧链。此类糖化侧链结构的实例包括1-V1。

[0115] 在受试者样品中GCD59的检测(其中GCD59包括任何糖化侧链结构)可以使用本发明的测定进行。此类测定可以包括能够识别此类GCD59糖化侧链结构中一种或多种的检测抗体。此类测定还可以在沒有预处理受试者样品的情况下进行。

[0116] 在一些实施例中,本发明的测定可能需要在GCD59检测前用一种或多种还原剂预处理受试者样品。用还原剂处理受试者样品可以还原一种或多种糖化侧链结构(见下文)。



[0117] 如在此使用的,术语“还原剂”是指在氧化还原反应期间提供电子的化学试剂。还原剂可以包括但不限于:硼氢化钠(NaBH_4)和氰基硼氢化钠(NaCNBH_3)。在GCD59分析之前,可以进行用一种或多种还原剂预处理受试者样品,以改变糖化侧链的结构。在一些情况下,本发明的检测抗体可以针对GCD59,其中K41包括葡糖醇赖氨酸。包括此类检测抗体的测定可能需要在分析之前还原受试者样品,以便还原糖化K41。一些样品可以用 NaCNBH_3 进行预处理。 NaCNBH_3 预处理将包括席夫碱的糖化K41残基还原为葡糖醇赖氨酸。一些样品可以用 NaBH_4 进行预处理。 NaBH_4 预处理将包括席夫碱或阿马多利产物的糖化K41残基还原为葡糖醇赖氨酸。 NaBH_4 的化学特性连同其在有机还原中的用途在本领域中是熟知的。此类特性和用途可以在罗姆(Rohm)和哈斯(Haas):硼氢化钠消化(The Sodium Borohydride Digest), 2003,第1-212页中发现详细地描述,其内容以其全文通过引用结合于此。

[0118] 本发明的试剂盒可以单独或在溶液中提供一种或多种还原剂。还原剂溶液可以包括各种溶剂中的一种或多种。在一些情况下,还原剂溶液包括作为溶剂的水。在一些情况下,还原剂溶液可以包括一种或多种有机溶剂。有机溶剂是包括基于碳的组分的溶剂。有机

溶剂可以包括但不限于:1,1-二氯乙烷、1,2-二氯乙烷、1,2-二甲氧基-乙烷、1-丁醇、1-庚醇、1-己醇、1-辛醇、1-戊醇、1-丙醇、2-氨基乙醇、2-丁醇、2-丁酮、2-甲氧基乙醚、2-戊醇、2-戊酮、2-丙醇、3-戊醇、3-戊酮、乙酸、丙酮、乙腈、乙酰丙酮、苯胺、苯甲醚、苯、苯甲腈、苯甲醇、二硫化碳、四氯化碳、氯苯、氯仿、环己烷、环己醇、环己酮、二乙醚、二乙胺、二乙二醇、二乙二醇二甲醚、二甲氧基乙烷(乙二醇二甲醚)、二甲亚砜(DMSO)、二甲基醚、N,N-二甲基-甲酰胺(DMF)、N,N-二甲基-乙酰胺、二甲基酞酸酯、二甲基亚砜(DMSO)、二-正丁基酞酸酯、二噁烷、乙醇、乙醚、乙酸乙酯、乙酰乙酸乙酯、苯甲酸乙酯、乙二醇、甘油、庚烷、2-乙基己醇、六甲基磷酰胺、六甲基磷三酰胺(HMPT)、己烷、异丁醇、甲醇、乙酸甲酯、甲基叔丁基醚(MTBE)、二氯甲烷、N,N-二甲基苯胺、硝基甲烷、N-甲基-2-吡咯烷酮、戊烷、石油醚(轻石油)、吡啶、叔丁醇、四乙二醇二甲醚、四氢呋喃(THF)、甲苯、三乙胺、硝基甲烷和三乙二醇二甲醚。在一些实施例中,还原剂溶液可以包括三乙二醇二甲醚、2-甲氧基乙醚和/或四乙二醇二甲醚溶剂。

[0119] 包括有机溶剂的还原剂溶液可以包括NaBH₄溶液。在各种有机溶剂中的NaBH₄溶液可以在罗姆和哈斯:硼氢化钠消化,2003的第8页上发现。NaBH₄的商业制品可以用来制备用于样品处理的还原剂溶液,或者来制备包括在本发明试剂盒中的还原剂溶液。此类商业制品可以包括但不限于99%硼氢化钠溶液0.5M于2-甲氧基乙醚中;99%硼氢化钠溶液3M于四乙二醇二甲醚中;99%硼氢化钠溶液2.0M于三乙二醇二甲醚中;99.5%硼氢化钠溶液0.5M于2-甲氧基乙醚中;99.5%硼氢化钠溶液3M于四乙二醇二甲醚中;99.5%硼氢化钠溶液2.0M于三乙二醇二甲醚中;99.9%硼氢化钠溶液3M于四乙二醇二甲醚中;99.9%硼氢化钠溶液2.0M于三乙二醇二甲醚中;99.95%硼氢化钠溶液0.5M于2-甲氧基乙醚中;99.95%硼氢化钠溶液3M于四乙二醇二甲醚中;99.95%硼氢化钠溶液2.0M于三乙二醇二甲醚中;99.99%硼氢化钠溶液0.5M于2-甲氧基乙醚中;99.99%硼氢化钠溶液3M于四乙二醇二甲醚中;99.99%硼氢化钠溶液2.0M于三乙二醇二甲醚中;99.999%硼氢化钠溶液0.5M于2-甲氧基乙醚中;99.999%硼氢化钠溶液3M于四乙二醇二甲醚中;99.999%硼氢化钠溶液2.0M于三乙二醇二甲醚中;和99.9%硼氢化钠溶液0.5M于2-甲氧基乙醚中。

[0120] 针对样品处理所制备的或针对包括在本发明试剂盒中所制备的还原剂溶液可以包括从约0.1M至约10M浓度的还原剂。在一些情况下,本发明的还原剂溶液可以包括在用来处理样品之前需要稀释的母液。本发明的还原剂母液可以包括大于1M浓度的还原剂,包括但不限于:1.5M、2M、3M、4M、5M或10M。在一些情况下,在样品处理前,将还原剂母液稀释到0.5M至1M还原剂浓度。可以使用在母液中发现的相同溶剂或用不同溶剂进行稀释。例如,在样品处理之前,可以用水将包括有机溶剂的母液进行稀释。

[0121] 在一些情况下,将受试者样品与1M浓度的还原剂以样品对还原剂从约1:1的比例至约1:1000的比例进行组合。可以将一些受试者样品以约1:5、1:10、1:20、1:100或1:500的比例用1M浓度的还原剂进行组合。在组合后,可以将受试者样品还原剂溶液孵育从约20分钟至约2小时、从约1小时至约4小时、从约3小时至约24小时、从约12小时至约3天、从约2天至约5天或至少5天,以允许发生样品还原。

应用

[0122] 可以将本发明的GCD59检测试剂盒用来检测和/或定量一种或多种样品中的GCD59。此类样品可以源自一名或多名受试者。一些受试者可以包括女性受试者、妊娠受试

者、产后受试者和/或婴儿受试者。

[0123] 由本发明的一种或多种试剂盒所确定的GCD59浓度水平可以用于诊断一种或多种疾病、障碍和/或病症。如此,本发明的一些实施例可以包括使用本发明的一种或多种试剂盒诊断一种或多种疾病、障碍和/或病症的方法。在一些情况下,由本发明的一种或多种试剂盒所确定的GCD59浓度水平可以用于确定发展一种或多种疾病、障碍和/或病症的风险。在此还有使用本发明的一种或多种试剂盒确定发展一种或多种疾病、障碍和/或病症的风险的方法。由本发明的一种或多种试剂盒所确定的GCD59浓度水平可以用于确定折磨一名或多名受试者的一种或多种疾病、障碍和/或病症的严重性。如此,本发明的方法可以包括使用本发明的一种或多种试剂盒确定折磨一名或多名受试者的一种或多种疾病、障碍和/或病症的严重性。在一些情况下,由本发明的一种或多种试剂盒所确定的GCD59浓度水平可以用于监测折磨一名或多名受试者的一种或多种疾病、障碍和/或病症的发作、进展或消退。如此,本发明的实施例可以包括使用本发明的一种或多种试剂盒用于监测折磨一名或多名受试者的一种或多种疾病、障碍和/或病症的发作、进展或消退的方法。

[0124] 在一些实施例中,由本发明的一种或多种试剂盒所确定的GCD59浓度水平可以用于确定折磨一名或多名受试者的一种或多种疾病、障碍和/或病症的疗程。如此,本发明可以包括使用本发明的一种或多种试剂盒确定折磨一名或多名受试者的一种或多种疾病、障碍和/或病症的疗程和因此治疗此类受试者的方法。还提供了减少,逆转和/或预防一种或多种疾病、障碍和/或病症的方法,这些方法包括以下步骤:确定一种或多种样品中GCD59的存在和/或浓度,确定所述受试者中一种或多种疾病、障碍和/或病症的风险、存在和/或进展并且因此治疗受试者。

[0125] 本发明的一些方法可以包括从来自患有糖尿病的个体的样品中制备的GCD59的内部对照品。如在此使用的,术语“内部对照品”是指在测定中作为参考和/或比较点的一种或多种样品,以便做出关于所分析的一种或多种因素的存在、不存在或水平的判断。一些内部对照样品可以包括阴性或阳性对照样品。阴性对照样品是已知缺少所分析的一种或多种因素的样品。阳性对照样品是已知包括所分析的一种或多种因素的样品。此类对照品可以包括不同浓度的GCD59(例如,低、中和高)。在一些实施例中,GCD59内部对照品可以获得自从患有糖尿病的个体所收集的血浆样品。根据预先规定的准则,可以将用GCD59内部对照品获得的分析值用来接受或拒绝个体分析。这种标准可以包括但不限于由韦斯特加(Westgard)等人披露的韦斯特加氏规则(韦斯特加,J.O.等人,1981,临床化学(Clin Chem);27:493-501,其内容以其全文通过引用结合于此)。

[0126] 在一些情况下,可以根据由高希等人所描述的任何那些来进行本发明的方法(高希等人,2013,美国血液学杂志(Am. J. Hematol.)88:670-6,其内容以其全文通过引用结合于此)。

糖尿病

[0127] 在一些实施例中,本发明的试剂盒可以用于糖尿病的检测、诊断和/或预后。糖尿病是一种表征为升高的血糖水平的疾病,还称为高血糖症。胰岛素,连同其他激素(包括但不限于:胰高血糖素和肾上腺素),针对维持血液中正常血糖水平是至关重要的。结合至细胞受体的胰岛素促进葡萄糖的细胞摄取,在血液中为细胞提供能量源并且降低血糖水平(罗杰(Rodger),W.,加拿大医学协会期刊(CMAJ.),1991.145(10):1227-37)。胰岛素通过胰

β 细胞表达,并且当血糖水平升高时上调其表达。在糖尿病中,胰岛素水平和/或对胰岛素的敏感性是打断,减少来了细胞葡萄糖摄取并且提高了葡萄糖的循环水平。糖尿病的两种主要形式是胰岛素依赖型(在此还称为幼年型糖尿病或1型糖尿病)和胰岛素不依赖型(在此还称为成人发作性糖尿病或11型糖尿病)。1型糖尿病是不太常见的,并且典型地由 β 细胞(胰岛素的主要来源)的自身免疫破坏造成。患有糖尿病的那些患者90%或更多患有11型糖尿病。这种形式的疾病表征为减少的胰岛素分泌和/或降低的对胰岛素的敏感性(例如,胰岛素刺激细胞中葡萄糖摄取的能力下降)(罗杰(Rodger),W.,非胰岛素依赖型(11型)糖尿病(Non-insulin-dependent(Type 11)diabetes mellitus),加拿大医学协会期刊(CMAJ),1991.145(12)1571-81)。11型糖尿病被认为部分由于遗传易感性而发生,并且最常在超重和/或肥胖的受试者中发生。

[0128] 如在此使用的,术语“糖尿病患者”是指患有一种或多种类型胰岛素缺乏的个体(例如,减少的胰岛素水平和/或降低的胰岛素敏感性)。术语糖尿病患者包括但不限于:患有幼年型糖尿病(1型糖尿病)、成人发作性糖尿病(11型糖尿病)、妊娠糖尿病(GDM)、和胰岛素缺乏的任何其他病症的个体。术语“糖尿病患者”是由医疗专业中实践人员所已知的并理解的本领域术语,其正式定义可以在哈里森的医学原则(Harrison's Principles of Medicine)中发现(哈里森(Harrisons),第14卷,内科医学原理(Principles of Internal Medicine),编辑福西(Fauci),A.S.,E.布朗沃尔德(Braunwald),K.J.伊塞巴彻(Isselbacher),J.D.威尔逊(Wilson),J.B.马丁(Martin),D.L.卡斯帕(Kasper),S.L.豪泽(Hauser),D.L.隆哥(Longo),麦格劳希尔集团(McGraw-Hill),纽约,1999)。

妊娠糖尿病(GDM)

[0129] 在一些实施例中,本发明的试剂盒可以用于妊娠糖尿病(GDM)的检测、诊断和/或预后。如在此使用的,术语“妊娠糖尿病”或“GDM”是指糖尿病病症,其表征为升高的血糖水平、碳水化合物不耐受和/或由妊娠造成的降低的胰岛素敏感性。在一些情况下,每个国家中的GDM诊断都可以依靠由来自向在那里实践的内科医师发布建议这些国家的专业机构设置的不同标准。GDM可以影响高达18%具有不良结果的妊娠,这些不良结果影响母亲和后代,其包括短期和长期影响。目前,在女性受试者中GDM的诊断和监测主要依赖于血糖水平的测量。血糖是在不断变化的,并且受到包括膳食和活动水平的多个外部因素影响。血糖水平可以按小时计而改变。通过加上饮食要求和/或对经历测试的受试者的限制,这使得GDM测试复杂化。

[0130] GDM是影响妊娠女性的最普遍的障碍之一,并且在妊娠期间、在出生时以及甚至出生后,和它一起携带有并发症的更大风险。此外,此类并发症可以影响母亲和后代。患有GDM的个体缺少足够分解碳水化合物成能量的能力(奥肯(Okun),N.,加拿大家庭医生(Can Fam Physician.),1997.43:88-93)。在一些情况下,GDM诊断可以通过检测高血糖水平和/或通过观察在妊娠期间对葡萄糖激发的应答能力降低来进行。这样的诊断在晚期妊娠经常发生。尽管导致GDM的机制尚未明确,但是在一些情况下,认为在妊娠期间升高的激素可以干扰正常胰岛素信号,包括但不限于胰岛素抗性。这种胰岛素信号功能障碍导致细胞的葡萄糖摄取降低和血糖水平升高。在此披露的研究指示出,GCD59水平在患有GDM的受试者中是升高的。

GDM筛选和诊断

[0131] GDM是妊娠最常见的医疗并发症之一。在每个国家中,GDM诊断可以通过由负责向各国执业医师颁发意见的专业机构所设置的标准来确定。关于如何进行GDM诊断,在美国的专业机构中连同在美国专业机构和国外专业机构之间正在进行争论。这种美国专业机构可以包括但不限于:国立卫生研究院(NIH)、美国糖尿病协会(ADA)和美国妇产科医师研讨会(ACOG)。这种国际机构可以包括但不限于:国际糖尿病协会和妊娠研究组(1ADPSG)。美国专业机构和国外专业机构可以基于不同研究、此类研究的不同分析调整其方法,并且可以受到卫生保健和经济压力的影响。事实上,确定GDM的因素和诊断标准可以随着时间来改变。如此,在一些实施例中,针对在此描述的GDM的诊断测试可以根据最新的建议进行,这些最新的建议是由各国的专业机构颁发,涉及妊娠女性、胎儿、和新生儿的健康。

[0132] 根据一些当前美国做法,建议针对GDM筛选全部妊娠女性。在一些情况下,筛选可以包括患者病历回顾、临床风险因素评估和/或包括葡萄糖激发的一种或多种测试。如在此使用的,术语“葡萄糖激发”是指一种测试组成,其表征为向受试者给予葡萄糖。葡萄糖激发测试典型地评估受试者中对葡萄糖激发的应答。这包括分析血糖水平。在葡萄糖激发期间所给予的葡萄糖的量可以变化。典型测试包括给予从约50g至约100g的葡萄糖。在其他实施例中,给予75g的葡萄糖。在一些情况下,在一次或多次葡萄糖激发后或者在饮食后可以评估GCD59水平。

[0133] “低风险”妊娠受试者,处于发展GDM的最低风险,包括小于25岁的那些,具有正常体重,没有糖尿病家族史(在一级亲属的水平),没有糖代谢异常史,没有不良产科后果史并且不是高危种族(例如,西班牙裔、美洲原住民、非裔美国人和南亚裔)。妊娠受试者风险评估典型是在第一次产前检查期间进行。处于发展GDM的较高风险的女性(例如,肥胖、GDM的个人史、糖尿、糖尿病家族史,等)通常尽快进行测试。如果这类女性的初步测试呈阴性,建议在妊娠第24和28周之间进行复检。

[0134] 在不存在葡萄糖激发的情况下,血浆葡萄糖水平可以指示GDM。在此披露的一些方法包括空腹血糖测试。根据此类测试,可以确定空腹血浆葡萄糖(FPG)水平。空腹血浆葡萄糖水平是指在禁食一段时间后直接测量的血糖水平。空腹时间可以从约1小时至约24小时。在某些实施例中,可以在空腹约12小时后测量FPG水平。在妊娠受试者中,大于126mg/dl的空腹血浆葡萄糖水平指示出妊娠糖尿病。

[0135] 在一些实施例中,可以进行随机血糖测试。此类测试测量随机血浆葡萄糖水平(还称为偶然血浆葡萄糖水平)。随机血糖水平是指在没有任何消耗限制和/或需求(例如,空腹)的情况下获得的血糖水平。在妊娠受试者中,大于200mg/dl的随机血浆葡萄糖水平指示出此类受试者中的GDM。在某些实施例中,针对FGP水平和随机血浆水平,在第二天需要第二次测量,以确认GDM的诊断。在本发明的一些实施例中,GCD59水平还可以在没有任何消耗限制和/或需求(例如,空腹)的情况下获得。

[0136] 在高血糖症是更微弱的情况下,用于诊断的其他方法可以是必要的。在鉴定为高危的妊娠受试者中,一步法可以是足够的。根据一步法,在没有任何前血糖筛选的情况下,可以通过口服葡萄糖耐量测试(OGTT)进行诊断。针对平均风险个体,典型进行两步法。根据两步法,进行包括葡萄糖激发的初始筛选。在两步法的初始筛选中,由美国产科医生学院于2001年提出的意见要求使用50g、一小时口服葡萄糖激发测试(GCT)(产科实践位委员会(Committee on Obstetric Practice),美国妇产科学院:委员会的意见(The American

College of Obstetricians and Gynecologists:Committee Opinion),2011)。一小时口服GCT测量在口服给予50g葡萄糖后1小时测量血糖浓度。80%患有GDM的妊娠受试者具有高于130mg/dl截止值的血糖水平,并且90%具有高于140mg/dl截止值的水平。如在此使用的,术语“截止值”是指这样的一种值或水平,在该值或水平下,可以做出关于诊断确定或其他类型诊断的指示,其中低于既定截止值的水平导致不同于基于高于既定截止值的决定的决定(美国糖尿病协会(American Diabetes Association),糖尿病护理(Diabetes Care),31(1):S62-S67)。

[0137] 在两步法的第二步骤中,进行100g OGTT。如在此使用的,术语“口服葡萄糖耐量测试”或“OGTT”是指测量身体使用葡萄糖能力的测试。此类测试典型在早上开始,其中受试者已经8-12小时没有吃过。基线浓度是基于初始血液样品建立的。如在此使用的,术语“基线”,当是指测量值、水平或值时,是指后续的测量值、水平或值可以与之相比较的初始测量值、水平或值。在取得初始血液样品后,给予受试者具有所测量浓度的葡萄糖的葡萄糖溶液来饮用。在100g OGTT中,在葡萄糖溶液中给予100g的葡萄糖。典型地需要受试者在5分钟的时间范围内喝完。最终,OGTT包括获得随后的血液样品,来监测血糖和/或胰岛素水平。根据100g OGTT,当受试者血糖水平超出如下值时,可以做出妊娠受试者中的GDM的诊断:基线读数95mg/dl的截止值、在葡萄糖给予后一小时180mg/dl的截止值、在葡萄糖给予后两小时155mg/dl的截止值和/或在葡萄糖给予后三小时140mg/dl的截止值。在一些实施例中,GDM的诊断可以需要四分之二的测试产生升高的血糖水平。

[0138] 在一些情况下,在两步GDM诊断法的第二步骤中进行75g OGTT。除仅给予75g的葡萄糖以外,根据100g OGTT进行75g OGTT。根据75g OGTT,当受试者血糖水平超出如下值时,可以做出妊娠受试者中的GDM的诊断:基线读数95mg/dl的截止值、在葡萄糖给予后一小时180mg/dl的截止值和/或在葡萄糖给予后两小时155mg/dl的截止值。在一些实施例中,GDM的诊断可以需要四分之二的测试产生升高的血糖水平。

[0139] 在一些情况下,在GDM筛选期间进行2小时的餐后血糖测试。2小时的餐后血糖测试包括饭后2小时的血糖水平的分析。

[0140] 在一些情况下,可以在GDM筛选期间进行1,5-脱水葡萄糖醇测试。在高血糖期间1,5-脱水葡萄糖醇水平是降低的(其中血糖水平高于180mg/dl),在高血糖症已经结束后需要长达2周来恢复至正常(麦吉尔(McGill),J.B.等人,糖尿病护理(Diabetes Care),2004.27(8):1859-65)。可以进行1,5-脱水葡萄糖醇测试来确定受试者是否已经忍受长时间高血糖症。

[0141] 在一些情况下,可以在GDM筛选期间进行血红蛋白A1c(HbA1c)测试。此类测试测量了血液中糖化形式的血红蛋白HbA1c的水平。在高血糖症期间,HbA1c水平增加。HbA1c保留在血液中从约8至约12周,直到包括HbA1c的红细胞被替换,使得HbA1c在此期间整体血糖水平的一个良好长期读数(http://medweb.bham.ac.uk/easdec/prevention/what_is_the_hba1c.htm)。

[0142] 在一些实施例中,可以在GDM筛选期间进行果糖胺测试。在高血糖症的情况下,果糖胺水平升高。在高血糖症消退后,升高的果糖胺水平仍然升高持续两到三周,使得其高血糖水平的良好长期指标(德尔皮埃尔(Delpierre),G等人,生物化学杂志(Biochem J),2002.365:801-8)。

[0143] 在一些实施例中,可以在妊娠之前获得并且分析受试者样品。此类受试者样品可以从女性受试者获得。受试者样品还可以用来确定在妊娠晚期中形成GDM和/或先兆子痫的风险水平。

[0144] 在一些实施例中,可以将用于确定GCD59水平的本发明的试剂盒和方法与在此描述的任何测试组合。此类测试可以包括但不限于:葡萄糖激发测试、口服葡萄糖耐量测试、空腹血糖测试、随机血糖测试、餐后2小时血糖测试、血红蛋白A1c(HbA1c)测试、果糖胺测试和1,5-脱水葡萄糖醇测试。在一些实施例中,出于诊断、预后和/或监测GDM或其他糖尿病病症的目的,可以将用于确定GCD59水平的本发明的试剂盒和方法与此类测试组合。

[0145] 可以将用于确定GCD59水平的本发明的试剂盒和方法与其他糖化蛋白的检测组合。存在于体液内的许多其他蛋白包括可以能够糖化的氨基基团。此类蛋白可以包括糖化的白蛋白、糖化的血红蛋白、糖化的免疫球蛋白、糖化的血液结合素、糖化的维生素D结合蛋白、糖化的纤维蛋白质 α 链、糖化的载脂蛋白A1、糖化的转铁蛋白、糖化的巨球蛋白 α 2、糖化的补体成分4A、糖化的纤维蛋白质 β 链、糖化的纤维蛋白质 α 链、糖化的含自水解酶结构域的蛋白1 4B、糖化的阿米洛利敏感胺氧化酶含铜前体、糖化的血管紧张素转化酶亚型1前体、糖化的肽酶家族M2血管紧张素转换酶、糖化的顺乌头酸酶1、糖化的溶酶体酸性磷酸酶亚型1前体、糖化的胰腺炎相关蛋白、糖化的 α -辅肌动蛋白-4、糖化的具有血小板反应蛋白1型基序的金属蛋白酶、糖化的天冬氨酰葡萄糖苷酶、糖化的腺苷高半胱氨酸酶、糖化的 α -2-HS-糖蛋白、糖化的醇脱氢酶NADP⁺、糖化的醛酮还原酶家族1、糖化的乙醛脱氢酶家族1成员L1、糖化的醛缩酶B果糖二磷酸、糖化的胰腺淀粉酶 α 2A、和糖化的载脂蛋白A4(浮田(Ukita)等人,临床化学(Clin.Chem.)(1991)37:504;约翰森(Johansen)等人,糖生物学(Glycobiol.)(2006)16:844;和戴维斯(Davies)等人,实验医学杂志(J.Exp.Med.)(1989)170:637)。在一些实施例中,GCD59可以作为包括以上列出的任何糖化蛋白的一组或一批生物标志物的部分进行检测。

GDM类别

[0146] 在一些实施例中,妊娠受试者可以分为基于某些标准的疾病的不同亚类。两种这样的分类包括患有葡萄糖耐量降低(IGT)的那些和患有空腹血糖异常(IFG)的那些。这些类别指定受试者的血糖水平高于正常水平,但是未升到GDM的水平或者达不到GDM诊断的要求。确定将受试者分成这些类别的因素针对各国可以是不同的,并且可以通过这些国家中负责向这些国家中实践的内科医师提供建议的专业机构来控制。

[0147] 在一些实施例中,当与具有正常空腹血糖水平(小于100mg/dl)的那些和其水平导致GDM的临时性诊断的那些(在一些情况下水平为大于126mg/dl)相比,这些受试者中空腹血糖水平包括从约100mg/dl至约125mg/dl时,妊娠受试者可以被诊断患有IFG。在一些情况下,在OGTT结果后,妊娠受试者可以被诊断患有IGT。在一些情况下,与具有正常水平(在一些情况下,具有小于140mg/dl的水平)的那些和其水平导致GDM的临时性诊断的那些(在一些情况下,具有大于200mg/dl的水平)相比,患有IGT的妊娠受试者可以在葡萄糖给予后两小时包括从约140mg/dl至约199mg/dl的血糖水平。

[0148] 在一些实施例中,患有IGT和/或IFG的妊娠受试者被称为患有糖尿病前期。如在此使用的,术语“糖尿病前期”是指以形成糖尿病的高风险为表征的病症(美国糖尿病协会(American Diabetes Association),糖尿病护理(Diabetes Care),2008.31(1):S62-

S67)。确定将受试者指定为糖尿病前期类别的因素针对各国可以是不同的,并且可以通过这些国家中负责向这些国家中实践的内科医师提供建议的专业机构来控制。

[0149] 在一些情况下,患有GDM的妊娠受试者可以被分为包括由普里西拉怀特(Priscilla White)博士开发的一类GDM的类别,其在此称为“怀特GDM种类”(邓恩(Dunn), P.M.,普里西拉怀特博士(1900-1989)的波士顿和妊娠糖尿病(Boston and pregnancy diabetes),儿童期胎儿及新生儿疾病档案(Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.)2004年5月;89(3):F276-8,以其全文通过引用结合在此)。这些GDM种类可以包括任何表1中所列出的那些。

表1.GDM种类

种类	描述
A1	胰岛素不依赖性
A2	胰岛素依赖性
B	糖尿病<10年,在20岁后发作
C	糖尿病10-19年,在10-19岁之间发作,无血管并发症
D	糖尿病>20年,在10岁之前发作,伴有血管并发症
F	伴有肾病
R	伴有视网膜病变
T	伴有之前肾移植
H	伴有心脏病

[0150] 怀特GDM疾病包括A1类、A2类、B类、C类、D类、F类、R类、T类和H类。这些种类中,A1类和A2类用来将患有GDM的、而不是已存在的糖尿病的受试者分类。其他种类用来对妊娠受试者分类,这些受试者患有在妊娠前一些时间点形成的糖尿病。

[0151] 在一些实施例中,GDM可以根据GDM严重性的两种或更多种水平来分类。如在此使用的,术语“GDM严重性水平”是指疾病的一类,该疾病表征为不同水平的并发症或不良后果,典型地从不太严重至更严重。GDM严重性可以基于与此类并发症或不良后果有关的一种或多种因素的水平来分配。在其他实施例中,GDM严重性可以基于血糖代谢来分配。GDM严重性还可以通过GCD59的水平来确定。在此类实施例中,基于从受试者样品获得的GCD59浓度水平落在介于预定的截止值之间,可以向受试者分配轻度、中度和重度GDM水平。

初步迹象和风险因素

[0152] 典型地,没有GDM的症状。在一些情况下,症状发生,并且包括但不限于:渴感、疲劳、恶心、呕吐、膀胱感染、酵母菌感染和视力模糊(<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000896.htm>)。疾病的初步迹象典型涉及测试结果(例如,升高的血糖水平、升高的糖化蛋白水平)。

[0153] GDM风险因素可以包括但不限于:升高的身体质量指数(BMI)、糖尿病或GDM的家族史、高育龄、多囊卵巢综合征史、吸烟史、产科问题史、高胆固醇、身材矮小症和种族(罗斯(Ross),G.,澳大利亚家庭医生(Australian Family Physician),2006.35(6):392-6;豪尔赫(Bjorge),T.等人,美国流行病学杂志(Am J Epid)2004.160(12):1168-76;马(Ma),R.M.等人,糖尿病护理(Diabetes Care),2007.30(11):2960-1)。在一些情况下,风险因素的存在或不存在可以影响关于女性受试者的测试和/或治疗的一个或多个行动方案。

[0154] 如在此使用的,术语“身体质量指数”是指从受试者重量和高度所计算的数值,该数值与既定受试者的体脂肪水平有关。该值获得自受试者,通过将以千克计的受试者重量除以以米计的(高度)²。在一些情况下,BMI值可以被解释为如下:低于 $18.5\text{kg}/\text{m}^2$ -体重过轻; $18.5\text{kg}/\text{m}^2$ - $24.9\text{kg}/\text{m}^2$ -正常; $25.0\text{kg}/\text{m}^2$ - $29.9\text{kg}/\text{m}^2$ -超重; $30.0\text{kg}/\text{m}^2$ - $34.9\text{kg}/\text{m}^2$ -1级肥胖; $35.0\text{kg}/\text{m}^2$ - $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ -11级肥胖和高于 $40\text{kg}/\text{m}^2$ -111级肥胖。根据这样的解释,超重的受试者具有形成GDM的2.14倍增加的风险(约瑟夫(Yessoufou),A.等人,实验糖尿病研究(Experimental Diabetes Research),2011.2011:1-12)。肥胖的受试者具有形成GDM的3.56倍增加的风险,并且严重肥胖的受试者具有形成GDM的8.56倍增加的风险。BMI解释可能在各国中是不同的,并且可能通过负责针对在这些国家和/或管理机构中实践的内科医师制定指南的专业机构来确定。

[0155] 具有糖尿病前期和/或GDM史的妊娠受试者具有形成GDM的较高风险。此外,具有糖尿病、糖尿病前期和/或GDM家族史的妊娠受试者具有形成GDM的较高风险。在第一次产前预约期间,通常回顾受试者史和/或家族史。在一些实施例中,受试者史和/或家族史可以用来做出关于受试者测试和/或治疗的决定。

[0156] 高育龄也是形成GDM的风险因素。患有GDM的妊娠受试者的百分比在不同年龄群中是不同的(罗斯(Ross),G.,澳大利亚家庭医生(Australian Family Physician),2006.35(6):392-6)。在20岁以下的妊娠受试者约1%在妊娠期间形成GDM,而从20到24岁的妊娠受试者约1.8%形成GDM,从25到29岁的妊娠受试者约2.5%形成GDM,从30到34岁的妊娠受试者约4.1%形成GDM,从35到39岁的妊娠受试者约6.5%形成GDM,从40到45岁的妊娠受试者约9.8%形成GDM并且超过45岁的妊娠受试者约12.8%形成GDM。

[0157] GDM的比率还受到种族的影响,在非裔美国人、美洲原住民、西班牙裔和南亚裔(包括但不限于太平洋岛民)的妊娠受试者中具有较高的发病率(金(Kim),S.Y.等人,预防慢性病(Prev Chronic Dis),2012.9:E88)。

GDM相关的病症

[0158] GDM是母亲及其后代围产期和产后并发症的主要原因。在分娩、剖腹产次数增加、先兆子痫/子痫的风险、流产和/或妊娠后糖尿病的情况下,患有GDM的妊娠受试者可能面临并发症。被患有GDM的妊娠受试者所生的婴儿受试者可能面临巨大儿、先天缺陷、产伤、高胆红素血症、低血糖症、惊厥和死胎。

[0159] 与GDM有关的主要不良后果之一是巨大儿。如在此使用的,术语巨大儿是指在婴儿受试者中表征为大出生体重的病症。如在此使用的,大出生体重是指高于约8磅、13盎司或约高于4kg的出生体重。如在此使用的,术语“婴儿受试者”是指为婴儿的受试者并且包含从出生到约1岁的受试者。表征患有巨大儿的婴儿受试者包括出生总人数的约10%。通常,与患有GDM的妊娠受试者所生的婴儿受试者相关的异常分娩或分娩困难(在此还称为难产)和/或产伤是由于这些婴儿受试者的大尺寸,引起在出生期间对母亲和后代的躯体应激(南加费安(Najafian),M.等人,妇产科(Obstetrics and Gynecology),2012.2012:353791)。在患有GDM的妊娠受试者中,升高的血糖水平典型导致通过胎盘到发育的后代的增加的葡萄糖和养分运输(约瑟夫(Yessoufou),A.等人,实验糖尿病研究(Experimental Diabetes Research),2011.2011:1-12)。在发育的后代中营养过剩水平还可以使得该后代在出生后处于形成低血糖症或低血糖的危险中。在子宫内增加的养分水平导致发育的后代造成的升

高的胰岛素生产。在出生后,胎盘养分的传递停止并且婴儿受试者中升高的循环胰岛素引起血糖水平下降。

[0160] 妊娠相关的高血压障碍,如先兆子痫已经显示出与GDM相关(菲戈(Feig),D.S.等人,公共科学图书馆医学(PLoS Med),2013.10(4):e1001425)。先兆子痫是表征为血压升高和蛋白尿(尿中蛋白)的妊娠受试者中严重的医疗病症。研究指示出患有GDM的妊娠受试者具有形成先兆子痫的较高风险。还已经显示出先兆子痫的风险随着对葡萄糖的不耐性增加。此外,患有先兆子痫的妊娠受试者已经显示出具有胰岛素抗性的较高发病率。

妊娠窗

[0161] 在本发明的实施例的上下文中,包括妊娠的时间长度可以分成两个或更多个妊娠窗。如在此使用的,术语“妊娠窗”是指任何时间上,发育和/或生理上定义的怀孕期。妊娠窗可以包括妊娠周。人妊娠典型的期限是从约40至约42周(但在一些情况下可能超过42周)并且以妊娠受试者的最后一次月经周期结束开始计算。如此,妊娠窗可以包括妊娠的从约0至约46、从约0至约42、从约2至约42、从约4至约42、从约8至约42、从约12至约42、从约16至约42、从约20至约42、从约24至约42、从约28至约42、从约32至约42、从约36至约42、从约12至约36、从约16至约36、从约20至约36、从约24至约36、从约10至约28、从约16至约28、从约20至约28、从约16至约24、或从约18至约24周。在一些情况下,妊娠窗可以包括妊娠的第1周、第2周、第3周、第4周、第5周、第6周、第7周、第8周、第9周、第10周、第11周、第12周、第13周、第14周、第15周、第16周、第17周、第18周、第19周、第20周、第21周、第22周、第23周、第24周、第25周、第26周、第27周、第28周、第29周、第30周、第31周、第32周、第33周、第34周、第35周、第36周、第37周、第38周、第39周、第40周、第41周、第42周、第43周、第44周、第45周、第46周或第46周后。妊娠窗还可以包括妊娠月。妊娠典型的期限是9-10个月。如此,妊娠窗可以包括妊娠的从约第1个月至约第10个月、从约第2个月至约第10个月、从约第3个月至约第10个月、从约第4个月至约第10个月、从约第5个月至约第10个月、从约第6个月至约第10个月、从约第7个月至约第10个月、从约第8个月至约第10个月、从约第9个月至约第10个月、从约第1个月至约第9个月、从约第2个月至约第9个月、从约第3个月至约第9个月、从约第4个月至约第9个月、从约第5个月至约第9个月、从约第6个月至约第9个月、从约第7个月至约第9个月、从约第8个月至约9个月、从约第1个月至约第6个月、从约第1个月至约第4个月、从约第1个月至约第3个月、从约第3个月至约第9个月、从约第3个月至约第6个月、从约第4个月至约第6个月、从约第3个月至约第7个月、从约第2个月至约第7个月或从约2个月至约第6个月。在一些情况下,妊娠窗可以包括第1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个月。在其他实施例中,妊娠窗可以包括多个妊娠期。可以将妊娠期限分为三个妊娠期。妊娠早期可以包括妊娠的从约第1个月至约第3个月和/或妊娠的从约第1周至约第12周。在妊娠早期期间,典型的发育包括胎儿生长至约28g的重量(或约1盎司)以及长度从约7.6cm至约10cm(或从约3至约4英寸)长。妊娠中期可以包括妊娠的从约第4个月至约第6个月和/或妊娠的从约第13周至约第28周。在妊娠中期期间,典型的发育包括胎儿生长至约910g的重量(或约2磅)以及长度从约23cm至约31cm(或从约9英寸至约12英寸)长。妊娠晚期可以包括妊娠的从约7个月至约9个月和/或妊娠的从约29至约40周。在妊娠晚期期间,典型的发育包括胎儿生长至约3.2kg的重量(或约7磅)以及长度从约45cm至约51cm(或从约18至约20英寸)长。

[0162] 在一些实施例中,妊娠窗可以包括胚胎发育的阶段。这些阶段可以包括但不限于:

胚泡形成、胎盘的形、胚胎形成、心脏发育、肺发育、肝发育、肾发育、胃肠道发育和神经系统发育。

监测和疗法

[0163] 在此披露的分析可以包括使用从受试者获得的单个样品。这些样品可以包括体液样品。体液样品可以包括但不限于：血液、尿、粘液、羊水、唾液和/或在此披露的其他样品类型。可以在单个受试者样品或在多个受试者样品中分析生物标志物水平。例如，GCD59水平可以随着时间监测。如在此使用的，术语“监测”是指随着时间观察、评估和/或测量的行为。观察、评估和/或测量可以以一个或多个量或值的形式进行记录。

[0164] 在一些实施例中，出于监测目的的值可以包括浓度值。监测典型地通过获得可以与后续的值进行比较的初始或基线值来进行。在监测期间，可以获得一个或多个后续值，并且与基线值和/或任何其他之前获得的值进行比较。可以获得后续的值，以用于短期比较、长期比较、每周比较、每月比较等等的目的。短期比较可以用于监测受试者样品中响应于对受试者的具体激发（例如，葡萄糖激发）的一种或多种生物标志物水平。这些受试者样品可以每10、20、30、40、50、75和/或150分钟来获得，并且分析以产生用于比较的后续的值。用于短期比较的受试者样品可以每1、2、3、4、5、10、12和/或24小时来获得，用于产生后续的值。这些受试者样品可以包括血液、尿、粘液、羊水、唾液和/或在此披露的任何其他体液。血糖水平和/或糖化的蛋白水平也可以从这些样品中获得。在一些情况下，GCD59的水平（包括但不限于：浓度值）可以从受试者样品中获得，以用于短期比较。

[0165] 在一些实施例中，长期比较可以用来监测受试者中的一个或多个生物标志物水平/浓度。获得的用于长期比较的后续的值可以每周、每月、每季度、每年和/或至少每年来获得。长期比较可以包括从受试者样品获得的后续的值，这些受试者样品约2周至约2个月间隔获得。这些受试者样品可以包括体液样品。这些体液样品可以包括血液、尿、粘液、羊水、唾液和/或在此披露的任何其他体液样品。在一些实施例中，可以从样品中获得血糖水平，以用于长期比较。在其他实施例中，可以从样品中获得糖化的蛋白水平，以用于长期比较。在另外的实施例中，可以获得GCD59水平（例如，GCD59浓度水平）。

[0166] 在关于监测GDM的实施例中，观察、评估和/或测量值可以包括但不限于：反应重量、血糖水平、糖化的蛋白水平（例如，GCD59）、生物标志物水平、胎儿重量、胎儿大小和BMI的值。GDM的监测可以通过反复测试和/或观察来进行。可以在妊娠前、当第一次产前体检时或在妊娠的既定期间内获得基线值。例如，基线值可以从妊娠的约12周至约36周、从妊娠的约20周至约36周和/或从妊娠的约24周至约28周获得，包括在妊娠的第24周期间、在妊娠的第25周期间、在妊娠的第26周期间、在妊娠的第27周期间和/或在妊娠的第28周期间。一些基线值可以是浓度值。此类浓度值可以从各种来源获得。基线浓度值还可以从体液中获得，这些体液包括但不限于血液、尿、粘液、羊水、唾液和/或在此披露的任何其他体液。

[0167] 在一些实施例中，基线值可以包括用来评估与GDM相关的一种或多种因素的一种或多种测试的结果。此类测试可以包括但不限于：葡萄糖激发测试（GCT）、OGTT、空腹血糖测试、随机血糖测试、餐后2小时血糖测试、HbA1c测试、果糖胺测试和1,5-脱水葡萄糖醇测试。

[0168] 在GDM监测期间，可以获得一个或多个后续值，并且与基线值和/或任何其他之前获得的值进行比较。出于短期比较、长期比较、每周比较、每月比较、妊娠期（trimester）比较、跨分娩（transpartum）比较（例如，在分娩前和分娩后之间的比较）、跨妊娠

(transgestational)比较(例如,在妊娠前、妊娠周围和/或妊娠后之间的比较)和妊娠间(interpregnancy)比较(例如,在第一次妊娠和第二次、第三次和/或第四次妊娠之间)的目的,可以获得一些后续的值。短期比较可以用于监测响应于对受试者的具体激发(例如,葡萄糖激发)的一种或多种生物标志物水平。针对短期比较所获得的体液样品可以每10、20、30、40、50、75和/或150分钟来获得,并且分析以产生用于比较的后续的值。在其他实施例中,用于短期比较的体液可以每1、2、3、4、5、10、12和/或24小时来获得,用于产生后续的值。用于短期比较的一些体液样品可以包括血液、尿、粘液、羊水、唾液和/或在此披露的任何其他体液。在一些情况下,血糖水平可以从这些样品中获得。糖化的蛋白水平(包括但不限于浓度值)还可以从用于短期比较的体液中获得。这些水平可以包括GCD59水平。

[0169] 在一些实施例中,长期比较可以用来监测妊娠受试者中的一个或多个生物标志物水平/浓度。针对长期比较所获得的后续的值可以每周、每月、每个妊娠期、每次妊娠和/或在妊娠前、妊娠周围和妊娠后时期中的每一个中来获得。一些长期比较可以包括从受试者样品获得的后续的值,这些受试者样品以约2周至约2个月间隔获得。一些此类受试者样品可以包括体液样品。这些体液样品可以包括血液、尿、粘液、羊水、唾液和/或在此披露的任何其他体液。在一些情况下,针对长期比较,可以从样品中获得血糖水平。在其他实施例中,针对长期比较,可以从样品中获得糖化的蛋白水平。在另外的实施例中,可以获得GCD59水平(例如,GCD59浓度水平)。

[0170] 可以进行监测,以观察一种或多种病症和/或疾病的发作。可以进行一些监测来确定GDM和/或先兆子痫的发作。在此类实施例中,所获得的基线值可未指示GDM和/或先兆子痫;然而,所获得的后续的值可以指示出发作。可以通过监测受试者样品,包括但不限于体液,来确定发作。这些体液可以包括血液、尿、粘液、羊水、唾液和/或在此披露的任何其他体液。在一些受试者样品中,可以监测血糖水平,以确定GDM和/或先兆子痫的发作。在其他实施例中,可以监测糖化的蛋白水平,以确定GDM和/或先兆子痫的发作。在另外的实施例中,可以监测GCD59水平(例如,GCD59浓度水平),以确定GDM和/或先兆子痫的发作。

[0171] 在一些实施例中,可以进行监测,以观察或评估一种或多种病症和/或疾病的进展或消退。可以进行一些监测来观察或评估GDM和/或先兆子痫的进展或消退。在此类实施例中,所获得的基线值可指示GDM和/或先兆子痫;然而,所获得的后续值可能指示出疾病的进展或消退。可以通过监测受试者样品,包括但不限于体液,来评估进展或消退。这些体液可以包括血液、尿、粘液、羊水、唾液和/或在此披露的任何其他体液。在一些实施例中,可以监测血糖水平,来评估GDM和/或先兆子痫的进展或消退。在其他实施例中,可以监测糖化的蛋白水平,以评估GDM和/或先兆子痫的进展或消退。在另外的实施例中,可以监测GCD59水平(例如,GCD59浓度水平),以评估GDM和/或先兆子痫的进展或消退。

[0172] 在一些实施例中,可以进行监测,以观察或评估产后受试者中糖尿病病症的进展。如在此使用的,术语“产后受试者”是指近期生产完的受试者。产后受试者可以包括在约最近一小时、约最近一天、约最近一个月、约最近3个月和/或约最近一年内生产完的受试者。本发明的试剂盒可以用来确定从产后受试者中获得的一种或多种样品中的GCD59水平。可以将从产后受试者获得的一种或多种样品中获得的这种GCD59水平用来诊断、预测或以其他方式分析此类产后受试者中的一种或多种糖尿病病症。

[0173] 在一些实施例中,可以进行受试者样品的评估,以便应用适合形式的疗法。此类受

试者样品可以从患有GDM的妊娠受试者中获得。GDM的治疗策略可以包括饮食调整、增加运动、增加锻炼、定期血糖监测和/或胰岛素疗法。选择基于来自妊娠受试者的样品评估的一种或多种治疗策略并且向妊娠受试者施用所选择的治疗策略的一种或多种可以防止GDM相关的并发症,该GDM相关的并发症此类妊娠受试者所生的婴儿受试者。可以针对一种或多种生物标志物评估从此类妊娠受试者获得的样品,以便选择一种或多种治疗策略。此类生物标志物可以包括糖化的蛋白,该糖化的蛋白包括但不限于GCD59。可以使用从妊娠受试者样品获得的GCD59浓度值来选择用于治疗GDM的一种或多种样品。在此类实施例中,可以降低、逆转和/或预防在此类妊娠受试者所生的婴儿受试者中一种或多种GDM相关的病症。

[0174] 本发明的一些方法可以用来监测经历GDM治疗的受试者。此类方法可以包括基于从任何类型在此描述的监测获得的见解调整给药和/或疗法类型。

伴随诊断

[0175] 在一些实施例中,本发明的测定可以用作伴随诊断。如在此使用的,术语“伴随诊断”是指一种测定,其结果有助于受试者的诊断或治疗。伴随诊断可以用于将患者疾病、障碍或病症严重水平分层,允许调整治疗方案和给药,以减少成本、缩短临床试验的时间、增加安全性和/或增加有效性。伴随诊断可以用来预测疾病、障碍或病症的发展并且有助于预防性疗法的处方。一些伴随诊断可以针对一种或多种临床试验用于选择受试者。在一些情况下,伴随诊断测定可以与促进治疗优化的特殊治疗并行。

[0176] 在一些实施例中,本发明的GCD59检测测定可以用作与血糖水平相关的疾病、障碍和/或病症的伴随诊断。本发明的一些伴随诊断可以用于预测和/或确定糖尿病、糖尿病前期或其他糖尿病病症(包括但不限于GDM)的严重性。本发明的一些伴随诊断可以用来将受试者以形成糖尿病并发症的风险来分层。此类糖尿病并发症可以包括但不限于:糖尿病酮症酸中毒、高血糖症、低血糖症、高血糖高渗状态、糖尿病昏迷、呼吸道感染、齿龈病、心脏损害、肾损害、感觉减退、视力丧失、心血管疾病、肌肉退化和中风。本发明的一些伴随诊断可以用于促进和加快抗糖尿病和代谢疾病药物的药物研发。

即时测试

[0177] 在一些实施例中,在此描述的试剂盒可以用于即时测试((point-of-care testing))。如在此使用的,术语“即时测试”是指医学测试,该医学测试在受试者接受医疗护理的地方或附近进行。即时测试可以有利于在测试、测试结果审查和治疗之间的较短间隔。即时测试还可以允许患者进行测试并且接受由在同一天和/或在相同医疗访问期间此类测试的结果所确定的治疗。

定义

[0178] 动物:如在此使用的,术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施例中,“动物”是指在任何发育阶段的人。“动物”还可以是指在任何发育阶段的非人类动物。在某些实施例中,非人类动物是哺乳类动物(例如,啮齿类动物,小鼠、大鼠、兔子、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物、或猪)。一些动物可以包括但不限于:哺乳类动物、鸟、爬行类动物、两栖类动物、鱼、和蠕虫。一些动物是转基因动物、基因工程动物、或克隆。

[0179] 大致:如在此使用的,术语“大致”或“大约”,当应用至一个或多个感兴趣的值时,是指与一个所指出的参考值相似的一个值。在某些实施例中,术语“大致”或“大约”是指在规定的参考值的任一方向(大于或小于)的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、

13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小的值的范围,除非另行说明或另外从上下文明显可见(除了这些数目将超过可能值的100%的情况)。

[0180] 与……结合:如在此使用的,术语“与……结合”、“缀合”、“连接”、“附接”、和“束缚”,当关于两个或更多个部分使用时,意指这些部分直接地或通过作为连接剂的一个或多个另外部分与一个另外的部分在物理上相互结合或连接,以形成足够稳定的结构,这样使得这些部分在使用该结构的条件(例如,生理条件)下仍然保持物理结合。“结合”不需要严格通过直接的共价化学键合。还可以表明,离子或氢键或基于杂交的连接或疏水作用是足够稳定的,这样使得“结合的”实体仍然保持物理结合。

[0181] 可检测的标记:如在此使用的,“可检测的标记”是指与另一个实体附接、掺入的或结合的一种或多种标志物、信号、或部分,这些标志物、信号、或部分易于通过本领域中已知的方法来检测,这些方法包括放射线照相术、荧光、化学发光、酶活性、吸光度、免疫学检测等等。可检测的标记可以包括放射性同位素、荧光团、生色团、酶、染料、金属离子、配体、生物素、亲和素、链霉亲和素和半抗原、量子点、聚组氨酸标签、myc标签、flag标签、人类流感血球凝集素(HA)标签等等。可检测的标记可以位于其附接的、掺入或结合的实体中的任何位置。例如,当与肽或蛋白附接、掺入或结合时,它们可以在氨基酸、肽、或蛋白内,或位于N-或C-末端。

[0182] 表位:如在此使用的,“表位”是指分子上的表面或区域,该分子能够与免疫系统的的一个或多个组分相互作用,其包括但不限于抗体。在一些实施例中,当指代蛋白或蛋白模块时,表位可以包括氨基酸的线性段或由折叠的一个或多个氨基酸链形成的三维结构形成的面片。

[0183] 特征:如在此使用的,“特征”是指特性、性质、或区别性的要素。

[0184] 片段:如在此使用的,“片段”是指一部分。例如,蛋白质的片段可以包括通过消化从所培养细胞分离的全长蛋白质而获得的多肽。在一些实施例中,蛋白质的片段包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250或更多个氨基酸。抗体片段可以包括经受酶消化的或像这样合成的抗体的部分。

[0185] 妊娠的:如在此使用的术语“妊娠的”意指相对于妊娠的术语,这样使得“妊娠前的”是指在妊娠前的一个或多个时期,“妊娠周围”是指包括妊娠的时期,并且“妊娠后”是指在妊娠后的的一个或多个时期。

[0186] 一致性:如在此使用的,术语“一致性”是指在聚合物分子,例如,在寡核苷酸分子(例如,DNA分子和/或RNA分子)之间和/或在多肽分子之间的整体关联性。例如,两种氨基酸序列的百分比一致性的计算可以通过出于最优比较的目的比对两种序列来进行(例如,出于最优比对的目的,可以将缺口引入第一和第二氨基酸序列中的一个或两个,并且出于比较的目的,可以忽略不一致的序列)。在某些实施例中,出于比较目的比对的序列长度是参照序列长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%。然后比较相应的氨基酸残基位置处的氨基酸。当第一序列中的位置被与在第二序列中的相应位置相同的氨基酸占据时,则这些分子在那个位置是一致的。两个序列之间的同一性百分比是这两个序列共有的相同位置数目的函数,考虑缺口数、每个缺口的长度,它们需要被引入以进行两个序列的最佳比对。序列比较和两个序列之间同一性百

分比的测定可以使用数学算法来完成。例如,在两个核苷酸序列之间的百分比一致性可以使用方法如在以下各项中所描述的那些来确定:计算分子生物学(Computational Molecular Biology),莱斯克(Lesk),A.M.,编辑,牛津大学出版社(Oxford University Press),纽约,1988;生物计算:信息学和基因组计划(Biocomputing:Informatics and Genome Projects),史密斯(Smith),D.W.,编辑,学术出版社(Academic Press),纽约,1993;分子生物学序列分析(Sequence Analysis in Molecular Biology),冯·海涅(von Heinje),G.,学术出版社,1987;序列数据的计算机分析(Computer Analysis of Sequence Data),第一部分,格里芬(Griffin),A.M.,和格里芬,H.G.,编辑,胡马纳出版社(Humana Press),新泽西州,1994;和序列分析引物(Sequence Analysis Primer),格里布斯考(Gribskov),M.和德弗罗(Devereux),J.,编辑,M斯托克顿出版社(M Stockton Press),纽约,1991;其每一个以其全文通过引用在此结合。例如,两个核苷酸序列之间的百分比一致性可以,例如,使用已经纳入ALIGN程序(2.0版本)的Myers和Miller的算法,使用PAM120权重残基表,空位长度罚分12以及空位罚分4,来确定(CABIOS,1989,4:11-17)。可替代地,在两个核苷酸序列之间的百分比一致性可以使用GCG软件包中的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵来确定。通常被采用以确定序列之间百分比一致性的方法包括但不限于在卡里略(Carillo),H.和李普曼(Lipman),D.,工业和应用数学学会应用数学杂志(SIAM J Applied Math.),48:1073(1988)披露的那些;通过引用结合在此。在公开可获得的计算机程序中编码了用于确定一致性的技术。确定两个序列之间一致性的示例性计算机软件包括但不限于:GCG程序包(德弗罗(Devereux),J.,等人,核酸研究(Nucleic Acids Research),12(1),387(1984)),BLASTP、BLASTN、和FASTA(阿尔丘尔(Altschul),S.F.等人,分子生物学杂志(J.Molec.Biol.),215,403(1990))。

[0187] 分离的:如在此使用的,术语“分离的(isolated)”是与“分离的(separated)”同义,但是伴随这样一个推论,分离是通过人工进行的。在一个实施例中,分离的物质或实体是从之前与其结合的组分中的至少一些分离的物质或实体(无论在自然界中或在实验设置中)。分离的物质可以具有关于其结合的物质不同纯度水平。分离的物质和/或实体可以与其最初结合的其他组分的至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、或更多分离。在一些实施例中,分离的试剂是大于约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或大于约99%纯的。如在此使用的,如果物质基本上没有其他组分,那么它是“纯的”。

[0188] 基本上分离的:所谓“基本上被分离的”意指该化合物基本上从它形成的或被检测到的环境中分离出来。部分分离可以包括,例如,富含本披露的化合物的组合物。基本上分离可以包括按重量计包含至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%或至少约99%的本披露的化合物或其盐的组合物。用于分离化合物及其盐的方法在本领域是常规的。在一些实施例中,物质或实体的分离包括化学结合和/或化学键的破坏。在某些实施例中,分离可以仅包括从与分离物质或实体之前结合并不包括这种破坏的组分分离。

[0189] 修饰的:如在此使用的,术语“修饰的”是指与亲本或参照分子或实体相比,分子或实体的变化的状态或结构。分子可以按包括化学上地、结构上地、和功能上地许多方式进行修饰。在一些实施例中,通过非编码氨基酸的引入来修饰本发明的化合物和/或组合物。

[0190] 突变:如在此使用的,术语“突变”是指变化和/或改变。突变可以变化和/或改变蛋白(包括肽和多肽)和/或核酸(包括多核酸)。一些突变包括蛋白和/或核酸序列的变化和/或改变。此类变化和/或改变可以包括一个或多个氨基酸(在蛋白和/或肽的情况下)和/或核苷酸(在核酸和/或多核酸的情况下)的添加、取代和或缺失。在实施例中,其中突变包括氨基酸和/或核苷酸的添加和/或取代,这种添加和/或取代可以包括一个或多个氨基酸和/或核苷酸残基并且可以包括修饰的氨基酸和/或核苷酸。

[0191] 非人类脊椎动物:如在此使用的,“非人类脊椎动物”包括除智人以外的所有脊椎动物,包括野生的和驯养的物种。非人类脊椎动物的实例包括但不限于:哺乳动物,如羊驼、白臀野牛、欧洲野牛、骆驼、猫、牛、鹿、够、驴、大额牛、山羊、豚鼠、马、美洲驼、骡、猪、兔、驯鹿、绵羊、水牛、和牦牛。

[0192] 互补位:如在此使用的,“互补位”是指抗体的抗原结合位点。

[0193] 患者:如在此使用的,“患者”是指可以寻求或需要治疗、需要的治疗、正在接受治疗、将接受治疗的受试者,或针对具体疾病或病症受训练有素的(例如,有许可证的)专业人员护理的受试者。

[0194] 肽:如在此使用的,术语“肽”是指少于或等于约50个氨基酸长,例如,约5、10、15、20、25、30、35、40、45、或50个氨基酸长的氨基酸链。

[0195] 感兴趣的蛋白:如在此使用的,术语“感兴趣的蛋白”或“所希望的蛋白”包括在此提供的那些及其片段、突变体、变体、和改变。

[0196] 区域:如在此使用的,术语“区域”是指区或一般区域。在一些实施例中,当指代蛋白或蛋白模块时,区域可以包括沿着蛋白或蛋白质模块的氨基酸线性序列,或者可以包括三维区域、表位或一簇表位。一些区域包括末端区域。如在此使用的,术语“末端区域”是指位于既定对象的端或末端的区域。当指代蛋白时,末端区域可以包括N-和/或C-末端。在有或没有与一个或多个部分或实体修饰或缀合的情况下,N-末端是指包括具有游离氨基基团的氨基酸的蛋白质端。在有或没有与一个或多个部分或实体修饰或缀合的情况下,C-末端是指包括具有游离羧基基团的氨基酸的蛋白质端。因此,N-和/或C-末端区域可以包括N-和/或C-末端连同周围的氨基酸。一些N-和/或C-末端区域包括从约3个氨基酸至约30个氨基酸、从约5个氨基酸至约40个氨基酸、从约10个氨基酸至约50个氨基酸、从约20个氨基酸至约100个氨基酸和/或至少100个氨基酸。在一些实施例中,N-末端区域可以包括任何长度的包括N-末端而不包括C-末端的氨基酸。一些C-末端区域可以包括任何长度的包括C-末端而不包括N-末端的氨基酸。

[0197] 抗体识别区域:如在此使用的,术语“抗体识别区域”是指在一个或多个抗原上的或两个或更多个抗原之间的一个或多个区域,该一个或多个区域由对应抗体特异性识别并结合。一些抗体识别区域可以包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或至少10个氨基酸残基。抗体识别区域可以包括在相互极为接近的两个蛋白质之间的或相同蛋白的两个结构域之间的连接。

[0198] 样品:如在此使用的,术语“样品”是指取自来源和/或提供用于分析或加工的等分试样或部分。样品可以包括组织学的或细胞学的标本、组织、体液和/或活检片。一些样品可以来自生物来源,如组织、细胞、或成分。一些样品可以包括体液样品。体液样品可以包括但不限于:血液、尿、粘液、羊水、唾液、淋巴液、滑液、脑脊髓液、羊膜脐带血、阴道液和精液。一些样品可以是或包括从整个生物体或其组织、细胞或成分的子集、或其片段或部分制备的

匀浆、裂解物或提取物,其包括但不限于,例如,血浆、血清、脊髓液、淋巴液、皮肤的外部部分、呼吸道、肠道和泌尿生殖道、眼泪、唾液、乳汁、血细胞、肿瘤、器官。一些样品可以包括介质,如营养肉汤或凝胶,其可以包含细胞成分,如蛋白或核酸分子。

[0199] 信号序列:如在此使用的,短语“信号序列”是指可以指导蛋白质的运输或定位的序列。

[0200] 稳定的:如在此使用的“稳定的”是指足够稳健以在与反应混合物的分离中留存,以达到有用的纯度。在一些实施例中,稳定化合物维持所希望的三维构象或折叠。

[0201] 稳定的:如在此使用,术语“稳定化”、“稳定的”、“稳定区域”意指使得稳定或变得稳定。稳定性可以相对于绝对值进行测量。在一些实施例中,稳定性是相对于参照化合物或实体进行测量的。

[0202] 受试者:如在此使用的,例如,出于实验、诊断、和/或治疗目的,术语“受试者”是指可以向其施用本发明的试剂盒或方法的任何生物体。典型受试者包括动物(例如,哺乳动物,如小鼠、大鼠、兔、非人类灵长动物、和人类)和/或植物。如在本文中提及的,“受试者样品”包括源自一名或多名受试者的样品。

[0203] 基本上:如在此所使用,术语“基本上”是指展示出一个所感兴趣的特征或特性的总体的或接近总体的范围或程度的定性的状态。生物学领域的普通技术人员应当理解的是生物学以及化学现象很少(如果有的话)会达到完成和/或进行到完成或实现或避免一个绝对的结果。因此,术语“基本上”被用在此处用来获得在许多生物学以及化学现象中潜在地缺少的内在的完全性。

[0204] 患有:“患有”疾病、障碍、和/或病症的个体已经诊断为或显示出疾病、障碍、和/或病症的一种或多种症状。

[0205] 易患:“易患”疾病、障碍、和/或病症的个体并没有诊断出和/或可能没有展现出疾病、障碍、和/或病症的症状,但具有形成疾病或其症状的倾向。在一些实施例中,易患疾病、障碍、和/或病症(例如,癌症)的个体可以表征为以下各项中的一个或多个:(1)与疾病、障碍、和/或病症的发展相关的遗传突变;(2)与疾病、障碍、和/或病症的发展相关的遗传多态性;(3)与疾病、障碍、和/或病症相关的蛋白和/或核酸的增加和/或降低的表达和/或活性;(4)与疾病、障碍、和/或病症的形成相关的习性和/或生活方式;(5)疾病、障碍、和/或病症的家族史;和(6)暴露于和/或感染与疾病、障碍、和/或病症的发展相关的微生物。易患疾病、障碍、和/或病症的一些个体将发展疾病、障碍、和/或病症。易患疾病、障碍、和/或病症的一些个体将不发展疾病、障碍、和/或病症。

[0206] 合成的:术语“合成的”意指人工生产的、制备的、和/或生产的。本发明多核苷酸或多肽或其他分子的合成可以是化学的或酶的。

[0207] 治疗:如在此使用的,术语“治疗”是指部分或完全缓解、改善、改进、减轻、延缓发作、抑制进展、减少严重性、和/或降低具体感染、疾病、障碍、和/或病症的一种或多种症状或特征的发病率。例如,“治疗”癌症可以是延长生存期并且抑制指肿瘤的生长、和/或速率。出于降低与疾病、障碍、和/或病症相关的病理发展的风险的目的,可以向并没有显示出疾病、障碍、和/或病症的迹象的受试者或向仅显示出疾病、障碍、和/或病症的早期迹象的受试者给予治疗。

等效物和范围

[0208] 本领域的普通技术人员应当认识到、或通过使用不超出使用常规实验即能够确定与在此说明的本发明的具体实施例一致的很多等效物。本发明的范围并非旨在限制以上的说明,而是如所附的权利要求书中所给出。

[0209] 在权利要求中,冠词如“一个”、“一种”以及“该”可以表示一个或多个,除非指明与此相反或另外地从上下文中是显然的。如果组的一个、多于一个或全部成员存在于、使用于或另外相关于给出的产品或流程,则在该组的一个或多个成员之间包括“或者”的权利要求或说明书被认为是满意的,除非有相反的指明或另外从上下文明显可见。本发明包括实施例,在这些实施例中组中的恰好一个成员存在于、使用于或以其他方式相关于给出的产品或流程。本发明包括实施例,在这些实施例中组中多于一个或全部成员存在于、使用于或以其他方式相关于给出的产品或流程。

[0210] 还应注意,术语“包括”旨在开放式的,并且容许但不需要包括另外的要素或步骤。因此,当在此使用术语“包括”时,还包括并且披露了术语“由……组成”。

[0211] 在给出范围的情况下,包括端点。此外,应该理解的是,除非另有指明或另外地从上下文中以及本领域的普通技术人员的理解中是显然的,被表达为范围的数值可以假定在本发明的不同实施例中所说明的范围内的任何一个特定值或子区域为该范围的下限单位的十分之一(除非另外地在上下文中清楚地指出)。

[0212] 此外,应了解的是,在现有技术内的本发明的任何特定实施例都可以明确地从任何一个或多个权利要求项中排除。因为此类实施例被认为对于本领域的普通技术人员是已知的,即使没有在此明确地提出这种排除,它们也可以被排除。出于任何原因(无论是否与现有技术存在相关联),本发明的组合物的任何具体实施例(例如,通过其编码的任何核酸或蛋白;任何生产方法;任何使用方法;等等)可以从任何一个或多个权利要求中被排除。

[0213] 将所有引用的来源,例如,参考文献、公开物、数据库、数据库条目、和在此引用的技术,通过引用并入本申请中,即使在引文中没有明确说明。在引用来源和本申请的相互矛盾的说法的情况下,本申请中的说法应当为准。章节和表格标题不旨在为限制性的。

实例

实例1. 还原的合成的替代化合物合成

[0214] 根据以下方法合成用作替代化合物的还原的合成蛋白。等摩尔量的在半胱氨酸残基2和20(对应于成熟CD59的残基39和63)之间包括二硫键的Ac-ACNFNDVTTRLRENELTYCYCAAK-NH₂(SEQ 1D NO:5)和又称为MAL-DPEG®24-NHS酯(Quanta生物设计公司(Quanta Biodesign),鲍威尔,俄亥俄州)的N-羟基琥珀酰亚胺基-75-N-(3-马来酰亚胺丙酰基)-氨基-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73-二十四氧杂戊烷七十烷醇酯,分子量:1394.55,其中该单一化合物离散的聚-(乙二醇)“DPEG®”间隔子(82个原子和95.2 Å)溶解于二甲亚砜(DMSO)中。分批添加三乙胺以使pH达到7.0,并且在室温下搅拌该反应混合物1小时。

[0215] 分析的高效液相色谱法(HPLC)监测指示出反应的完成。然后向以上反应混合物添加一当量的Ac-NKAWKFEHANFNDC-OH(SEQ 1D NO:11),其中K5,对应于成熟CD59的K41,包括葡萄糖醇赖氨酸,并且继续搅拌一小时。分析的HPLC监测指示出反应物的消失和新峰的形成。该产物通过HPLC用LC-60Luna制备型C18柱(10µm,60x 300mm),使用等度条件来负载化合物(5%B持续10min,然后15%持续5min),然后在60min内以15%-45%A在B中的线性梯度(其

中A=0.05%三氟乙酸(TFA)于乙腈中并且B=0.05%TFA于水中)以流速=100mL/min进行纯化。以纯度>97%获得所希望的产物。氨基酸分析给出了以下结果(计算值):Ala 5.2(5); Arg 1.8(2);Asp 8.1(8);Glu 3.2(3);His 0.82(1);Leu 1.9(2);Lys 2.1(2);Phe 3.0(3);Thr 2.9(3);Tyr 2.0(2);Val1.0(1)。参见图4。

实例2. 含有阿马多利的替代化合物合成

[0216] 根据以下方法合成包括替代化合物的含有阿马多利的合成蛋白标准品。将等摩尔量的在半胱氨酸残基2和20(对应于成熟CD59中的残基39和63)之间包括二硫键的Ac-ACNFNDVTTRLRENELTYCYCAAK-NH₂(SEQ 1D NO:5)和MAL-DPEG®24-NHS酯(分子量:1394.55;单一化合物DPEG®间隔子是82个原子并且是95.2A,Quanta生物设计公司)溶解于DMSO中。分批添加三乙胺以使pH达到7.0,并且在室温下搅拌该反应混合物1小时。

[0217] 分析的HPLC监测指示出反应的完成。向以上反应混合物添加一当量的Ac-NKAWKFEHANFNDC-OH(SEQ 1D NO:11),其中K5(对应于成熟CD59的K41)是糖化的,包括阿马多利产物,并且继续搅拌一小时。分析的HPLC监测指示出反应物的消失和新峰的形成。该产物通过HPLC用LC-60Luna制备型C18柱(10μm,60x 300mm),使用等度条件来负载化合物(5% B持续10min,然后15%持续5min),然后在60min内以15%-45%A在B中的线性梯度(其中A=0.05%TFA于乙腈中并且B=0.05%TFA于水中)以流速=100mL/min来进行纯化。然后获得所希望的产物。

实例3. GCD59夹心ELISA与用还原剂预处理的样品

[0218] GCD59夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)测量血清或血浆GCD59。基本元件包括作为捕获抗体的抗CD59鼠单克隆抗体4466(10A7)、作为检测抗体的抗葡萄糖醇赖氨酸兔单克隆抗体、山羊抗兔IgG-H&I交叉吸附抗体、作为二级检测抗体的辣根过氧化物酶(HRP)-缀合的(Bethyl实验室,蒙哥马利,得克萨斯州)和用作蛋白标准品的合成的糖化CD59替代化合物,该蛋白标准品包括由接头连接的两个CD59结构域。将板用捕获抗体包被。为了进行此工作,将捕获抗体稀释于1X杜尔贝科(Dulbecco)氏磷酸盐缓冲盐水中(DPBS;隆萨,巴塞尔,瑞士),至3μg/ml的最终浓度。将Immulon 4HBX板的孔(赛默飞世尔,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)用100μl的3μg/ml捕获抗体溶液包被。然后将这些板在4℃下在震荡的条件下孵育过夜,持续最少16小时。第二天早上,将板用包括具有0.05%TWEEN®-20(伯乐实验室有限公司,赫拉克勒斯,加州)的1X磷酸盐缓冲生理盐水(PBS;隆萨,巴塞尔,瑞士)板洗涤缓冲液(缓冲液D)洗涤3次。然后用在PBS中无蛋白封闭缓冲液(缓冲液B)(pH 7.4)(赛默科技(Thermo Scientific),沃尔瑟姆,马萨诸塞州)在室温下持续1小时在震荡条件下封闭板。再次用缓冲液D洗涤这些板2次,并且在室温下风干2小时,包裹在聚氯乙烯(PVC)包装膜(VWR国际公司,拉德诺,宾夕法尼亚州)中并且储存在-20℃下。

[0219] 分析新鲜的或从在-80℃下储存的等分试样解冻的血清或血浆样品。将冷冻的样品在37℃的水浴中解冻,涡旋并且置于冰上直到在测定中使用。然后用硼氢化钠(NaBH₄;西格玛-奥德里奇(Sigma-Aldrich),圣路易斯,密苏里州)还原新鲜的并且冷冻的样品。为了还原,将来自各样品的50μl等分试样置于微量离心管(VWR国际公司,拉德纳,宾夕法尼亚州)中并且与2.5μl新鲜制备的1M NaBH₄合并。然后在用1ml的1%乙酸淬灭之前,在室温下,将样品孵育1小时(VWR国际公司,拉德纳,宾夕法尼亚州)。通过吸移、随后涡旋彻底混合样品。得到的样品混合物包括5%浓度的原始样品。通过将来自各样品的200μl与800μl缓冲液

C合并,该缓冲液C包括10mM乙二胺四乙酸(EDTA;西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)和1%诺纳P40(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)并且涡旋,产生1%的样品浓度来进一步稀释稀释过的样品。将200 μ l得到的溶液添加到在15ml BD离心管(BD公司(Becton, Dickinson and Company),富兰克林湖,新泽西)中的10ml缓冲液C中,并且通过涡旋充分混合,得到0.02%的最终样品浓度。

[0220] 从母液制备合成的糖化CD59替代化合物样品。母液包括溶解于1ml的1X PBS(隆萨,巴塞尔,瑞士)中的1mg替代化合物标准品,并且等分到100个单次使用的微量离心管中,每个管中10 μ l。可以将母液储存在-80 $^{\circ}$ C下直到使用。为了制作标准校准曲线,使用用作蛋白标准母液的合成的糖化CD59替代化合物来制备在单个管中3ng/ml、2ng/ml、1ng/ml、0.5ng/ml、0.25ng/ml和0.125ng/ml的标准校准曲线浓度。将各浓度100 μ l一式三份在测定中进行分析。

[0221] 在添加稀释的样品和标准品之前,将捕获抗体包被的板加热至室温持续约30分钟。将100 μ l的各稀释的样品和制备的标准品添加至板孔,并且然后在震荡下将板在室温下孵育1小时。然后将这些板用缓冲液D洗涤4次,并且印记在纸巾上去除过量的洗涤缓冲液。包括无蛋白T20封闭缓冲液的缓冲液A(pH 7.4)(赛默飞世尔,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)以1:10稀释于1X PBS中,并且用来稀释检测抗体至2.5 μ g/ml的终浓度。然后将稀释的检测抗体溶液添加至测定板的各孔中,并且在震荡下在室温下孵育2小时。然后将这些板用缓冲液D洗涤4次,并且印记在纸巾上去除过量的洗涤缓冲液。

[0222] 将二级检测抗体的0.5 μ g/ml母液以1:35,000稀释于包括10%缓冲液A的PBS中,并且将100 μ l添加至测定板的各孔中。然后在震荡条件下,将板在室温下孵育1小时。然后将板用缓冲液D洗涤4次。

[0223] 使用HRP底物通过比色检测结合的第二检测抗体。在使用之前,将1步超四甲基联苯胺(TMB)-ELISA(赛默飞世尔,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)在室温下孵育5-6小时。然后将100 μ l添加至各孔,并且在震荡条件下允许在室温下显色持续18分钟。然后将反应用10%v/v硫酸终止(VWR国际公司,拉德纳,宾夕法尼亚州)。在停止反应的30分钟内,在450nm下,通过分光光度分析(Multiskan FC,赛默飞世尔,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)获得各孔的吸光度值。使用从用作蛋白标准样品的合成的糖化CD59替代化合物获得的吸光度值,通过对所获得的吸光度对每个已知浓度作图来生成标准曲线。

[0224] GCD59浓度值呈现为标准肽单元(SPU)。1SPU定义为对应于如在用于校对的标准曲线中所获得的1ng/ml合成的GCD59替代化合物的OD读数。确定样品中以SPU表示的GCD59浓度是通过根据标准曲线鉴定与ELISA板中针对样品所测量的吸光度值相对应的合成的GCD59替代化合物的浓度来进行的。

实例4. 没有还原剂预处理的GCD59夹心ELISA

[0225] 首先将板用捕获抗体进行包被。为了进行此工作,将捕获抗体稀释于0.05M碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州),至3 μ g/ml的终浓度。将Immulon 4HBX板的孔(赛默飞世尔,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)用100 μ l的3 μ g/ml捕获抗体溶液包被。然后将这些板在4 $^{\circ}$ C下在震荡的条件下孵育过夜(持续最少16小时)。第二天早上,将板用缓冲液D洗涤3次,并且然后在震荡条件下用缓冲液B在室温下封闭1小时。再次用缓冲液D洗涤这些板2次,并且在室温下风干2小时,包裹在PVC包装膜(VWR国际公司,拉德诺,宾

夕法尼亚州)中并且储存在-20℃下。

[0226] 可以分析新鲜的或从在-80℃下储存的等分试样解冻的血清或血浆样品。将样品在37℃的水浴中解冻,涡旋并且置于冰上直到在测定中使用。在分析前,将样品在缓冲液C中稀释至1%,并且进行涡旋。将200μl得到的溶液添加到在15ml BD离心管(BD公司,富兰克林湖,新泽西)中的10ml缓冲液C中,并且通过涡旋充分混合,得到0.02%的最终样品浓度。

[0227] 从母液中制备合成的糖化CD59替代化合物用作蛋白标准品,该合成的糖化CD59替代化合物包括位于SEQ ID NO:11的位置5的阿马多利-修饰的赖氨酸残基,该位置5对应于缺少信号和GP1信号序列的成熟人类CD59中的K41。母液包括溶解于1ml的1X PBS(隆萨,巴塞尔,瑞士)的1mg的合成的糖化CD59替代化合物,并且等分到100个单次使用的微量离心管中,每个管中10μl。可以将母液储存在-80℃下直到使用。为了制作标准校准曲线,使用用作蛋白标准母液的合成的糖化CD59替代化合物来制备在单个管中3ng/ml、2ng/ml、1ng/ml、0.5ng/ml、0.25ng/ml和0.125ng/ml的标准校准曲线浓度。将各浓度100μl一式三份在测定中进行分析。

[0228] 在添加稀释的样品和替代化合物标准品之前,将捕获抗体包被的板加热至室温持续约30分钟。将100μl的各稀释的样品和制备的替代化合物标准品添加至板孔,并且然后在震荡下将板在室温下孵育1小时。然后将这些板用缓冲液D洗涤4次,并且印记在纸巾上去除过量的洗涤缓冲液。将缓冲液A以1:10在1X PBS中稀释并且用来稀释检测抗体至2.5μg/ml的终浓度。然后将稀释的检测抗体溶液添加至测定板的各孔中,并且在震荡下在室温下孵育2小时。然后将这些板用缓冲液D洗涤4次,并且印记在纸巾上去除过量的洗涤缓冲液。

[0229] 将二级检测抗体的0.5μg/ml母液以1:35,000稀释于包括10%缓冲液A的PBS中,并且将100μl添加至测定板的各孔中。然后在震荡条件下,将板在室温下孵育1小时。然后将板用缓冲液D洗涤4次。

[0230] 使用HRP底物通过比色检测结合的第二检测抗体。在使用之前,将1步超TMB-ELISA(赛默飞世尔,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)在室温下孵育5-6小时。然后将100μl添加至各孔,并且在震荡条件下允许在室温下显色持续18分钟。然后将反应用10%v/v硫酸终止(VWR国际公司,拉德纳,宾夕法尼亚州)。在停止反应的30分钟内,在450nm下,通过分光光度分析(Multiskan FC,赛默飞世尔,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)获得各孔的吸光度值。使用从用作蛋白标准样品的合成的糖化的CD59替代化合物获得的吸光度值,通过对所获得的吸光度对每个已知浓度作图来生成标准曲线。

[0231] 然后通过外推法,使用每种所获得的吸光度值,并且将其与使用用作蛋白标准品值的合成的糖化CD59替代化合物产生的标准曲线进行比较,来获得GCD59浓度值。

实例5. 妊娠糖尿病研究

[0232] 针对GCD59浓度分析来自妊娠患者的样品。样品获得自一组从2006-2008参加在布莱根妇女医院(Brigham&Women's hospital)进行的“先兆子痫预测(POP)的研究”的1600名受试者。对POP研究中的女性进行仔细监测并且由内分泌学家进行随访。来自该组的251个样品是来自在她们妊娠的第24周中的受试者。其中,54名具有GDM的诊断,而197名没有。101个样品来自在她们妊娠第35周中的相同受试者。这些包括来自54名诊断患有GDM的受试者和随机选自没有GDM诊断的那些受试者的47名受试者的样品。

[0233] 来自所分析的那些受试者,具有GDM诊断的受试者具有较高的平均年龄(34岁±5岁对31岁±5岁)、重量(152lbs±35lbs对140lbs±22lbs)和身体质量指数(BMI,28kg/m²±6kg/m²对24kg/m²±4kg/m²)。

[0234] 这些样品中GCD59浓度的分析指示出,在24周时间点处,在具有和没有GDM诊断的受试者之间的清晰的分离(参见图1)。此外,在从诊断患有GDM的受试者中在35周取得的样品中的GCD59浓度下降,反映出对管理GDM的治疗的反应。

[0235] 图2是一幅图,该图指示出在包括诊断患有GDM的受试者和没有GDM诊断(正常)的那些的所分析的组中的、与各GCD59浓度相关的受试者的百分比。

[0236] 结论:GCD59ELISA的结果指示出,在敏感性和特异性大于90%的情况下,正常受试者和患有GDM的受试者之间明显不同。图3是一幅图,该图显示出受试者工作特征(ROC)曲线,该曲线指示出特异性,在该特异性下,GCD59水平能够检测患有GDM的妊娠受试者。

实例6. 妊娠受试者的分层

[0237] 募集500名妊娠受试者。所有的受试者经历了标准血糖评估(包括但不限于100g OGTT与3小时监测)连同在妊娠22和24周之间同时分析GCD59水平。对于一些受试者,随访测量在第35周进行。针对每个受试者评估早产及产后度量。将GCD59水平与血糖评估和其他度量进行比较,来寻找相关性。预期GCD59水平与血糖水平相关。

实例7. 伴随诊断

[0238] 将用于确定GCD59浓度水平的试剂盒用作伴随诊断,来促进并且加快针对抗糖尿病和代谢疾病药物的药物研发,有助于患者诊断,有助于患者监测并且鉴定处于发展与疾病有关的并发症的风险的个体。使用这些试剂盒,基于GCD59浓度水平来使受试者分层,并且选择受试者进行临床试验。使用这些试剂盒,来确定针对患有或疑似患有糖尿病前期、糖尿病或代谢疾病的受试者的治疗类型和剂量。

实例8. 风险分层

[0239] 根据形成糖尿病并发症的风险,使用用于检测和/或定量GCD59水平的试剂盒来使受试者分层。为了将GCD59水平与这种风险相关,使用试剂盒分析来自流行病学研究的档案样品(包括但不限于具有里程碑意义的流行病学的糖尿病并发症控制试验(DCCT))。分析来自DCCT试验的档案样品。该DCCT是主要多中心、随机、临床研究,该研究在1983和1993之间进行,被设计来评估密集的抗糖尿病治疗是否影响在患有1型糖尿病的患者中发生的早期血管并发症的发作或进展。这种实验涉及来自美国和加拿大的1,441名受试者(DCCT和ED1C:糖尿病控制和并发症试验和随访研究(The Diabetes Control and Complications Trial and Follow-up Study),美国卫生及公共服务部,国立卫生研究院,2008年5月,NIH出版号08-3874)。使用试剂盒分析样品,并且与试验中评估的度量相关。使用GCD59水平,根据发展糖尿病并发症的风险,将相关性用于进一步分析中来使受试者分层。

实例9. 糖化蛋白的预测

[0240] 在文献中报道了糖化蛋白如人血清清蛋白、低密度脂蛋白、和CD59(表2,分别为实体1-3)(浮田(Ukita)等人,临床化学(Clin.Chem.)(1991)37:504;约翰森(Johansen)等人,糖生物学(Glycobiol.), (2006)16:844;和戴维斯(Davies)等人,实验医学杂志(J.Exp.Med.)(1989)170:637)。这三个参考文献分别报道了尿中1,823、1,152、和1,400种蛋白。通过分析这三个数据集,鉴定658种蛋白为所有三个研究所共有的((Marimuthu)等

人,蛋白质组研究杂志(J.Proteome.Res.), (2011)10:2734;安达(Adachi)等人,基因组生物学(Genome.Biol.)(2006)7:R80;和李(Li)等人,质谱中的快速通讯(Rapid Commun.Mass Spectrom.)(2010)24:823)。用NetGlycate-1.0软件(www.cbs.dtu.dk/services/NetGlycate-1.0;和(Johansen)等人,糖生物学(Glycobiol.)(2006)16:844)分析这658种蛋白的样品预测出,实体1、9、和13-30的蛋白(表2)很可能在尿中被糖化。该分析显示出针对至少一个赖氨酸,实体1、9、和13-30的蛋白中任一种具有至少一个>0.9的糖化潜在分数截止值。

[0241] 在658种蛋白中,已经发现实体4-12(表2)的蛋白是在血浆和红细胞中被糖化(马里木苏(Marimuthu)等人,蛋白质组研究期刊(J.Proteome.Res.), (2011)10:2734)。

表2. 示例性糖化蛋白的列表

条目	蛋白描述	基因符号
1	人血清清蛋白 ¹	Alb ¹
2	低密度脂蛋白 ¹	LDL ¹
3	CD59 ⁴	CD59
4	血红素 ²	HPX ³
5	维生素D结合蛋白 ²	GC ³
6	纤维蛋白原, α 链 ²	FGA ³
7	载脂蛋白A1 ²	APOA1 ³
8	转铁蛋白 ²	TF ³
9	巨球蛋白, α 2 ²	A2M ³
10	补体成分4A ²	C4A ³
11	纤维蛋白原, β 链 ²	FGB ³

12	纤维蛋白原, α 链 ²	FGA ³
13	含自水解酶结构域的蛋白 1 4B	ABHD14B ³
14	阿米洛利敏感胺氧化酶 (含铜) 前体	ABP1 ³
15	血管紧张素转化酶亚型 1 前体	ACE ³
16	肽酶家族 M2 血管紧张素转换酶	ACE2 ³
17	顺乌头酸酶 1	ACO1 ³
18	溶酶体酸性磷酸酶亚型 1 前体	ACP2 ³
19	胰腺炎相关蛋白	ACPP ³
20	α -辅肌动蛋白-4	ACTN4 ³
21	具有血小板反应蛋白 1 型基序的金属蛋白酶	ADAMTS1 ³
22	天冬氨酰葡萄糖苷酶	AGA ³
23	腺苷高半胱氨酸酶	ACHY ³
24	α -2-HS-糖蛋白	AHSG ³
25	醇脱氢酶 (NADP ⁺)	AKR1A1 ³
26	醛酮还原酶家族 1	AKR1B1 ³
27	乙醛脱氢酶家族 1 成员 L1	ALDH1L1 ³
28	醛缩酶 B, 果糖二磷酸	ALDOB ³
29	淀粉酶, α 2A (胰腺的)	AMY2A ³
30	载脂蛋白 A4	APOA4 ³

¹浮田(Ukita)等人,临床化学(Clin.Chem.)(1991)37:504。

²张(Zhang)等人,蛋白质组研究杂志(J.Proteome.Res.),(2011)10:3076。

³马里木苏(Marimuthu)等人,蛋白质组研究杂志(J.Proteome.Res.),(2011)10:2734。

⁴戴维斯(Davies)等人,实验医学杂志(J.Exp.Med.),(1989)170:637。

实例10. 使用受试者样品作为内部对照品

[0242] 在三种GCD59浓度(低、中和高)下,使用内部对照品进行测定,该GCD59是在从患有糖尿病的个体汇集的血浆样品制备的。根据预先规定的标准,遵循Westgard规则(Westgard rules),使用从内部对照样品获得的值来接受或拒绝个体ELISA分析(韦斯特加JO,巴里(Barry)PL,亨特(Hunt)MR,等人,在临床化学中用于质量控制的多规则谢瓦尔特图(A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry),临床化学

(Clin Chem)1981;27:493-501)。

[0243] 针对包括用还原剂的预处理的测定(根据实例3),如之前描述的,将内部对照血浆样品进行还原、淬灭并且稀释至1%以在-80℃下储存。在继续测定之前,将内部对照样品解冻并且稀释至0.2%、0.1%、和0.05%。在各测定板上,一式两份分析内部对照样品。

[0244] 针对根据实例4(其不需要还原剂处理)的测定,如之前所描述的,将内部对照血浆样品稀释至1%并且储存在-80℃下。在继续测定之前,将内部对照样品解冻并且稀释至0.2%、0.1%、和0.05%。在各测定板上,一式两份分析内部对照样品。

实例11. 具有有机溶剂的还原剂溶液

[0245] 根据实例3的方法(除样品还原程序之外)制备并分析样品。分析新鲜的或从在-80℃下储存的等分试样解冻的血清或血浆样品。将冷冻的样品在37℃的水浴中解冻,涡旋并且置于冰上直到在测定中使用。然后用硼氢化钠(NaBH_4 ; 西格玛-奥德里奇(Sigma-Aldrich), 圣路易斯, 密苏里州)还原新鲜的并且冷冻的样品。

[0246] 还原剂溶液包括在水中或在有机溶剂中的 NaBH_4 , 该有机溶剂选自:三乙二醇二甲醚、四乙二醇二甲醚和2-甲氧基乙醚。具有水的还原剂溶液包括1M NaBH_4 。具有三乙二醇二甲醚的还原剂溶液包括2M NaBH_4 。具有四乙二醇二甲醚的还原剂溶液包括3M NaBH_4 , 并且具有2-甲氧基乙醚的还原剂溶液包括0.5M NaBH_4 (西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州)。通过将有机溶剂溶液添加到水中, 将在有机溶剂中的高于1M浓度的 NaBH_4 溶液稀释于水中。照原样使用在有机溶剂中浓度小于1M的 NaBH_4 溶液。在将还原剂溶液与样品合并之前, 将包括三乙二醇二甲醚或四乙二醇二甲醚的溶液用水稀释至1M。

[0247] 为了还原, 将来自各样品的50 μl 等分试样置于微量离心管(VWR国际, 拉德纳, 宾夕法尼亚州)中并且用2.5 μl 的1M NaBH_4 溶液或5 μl 的0.5M NaBH_4 溶液(或将提供2.5 μmol NaBH_4 当量的体积)进行处理。然后在用1ml的1%乙酸淬灭之前, 在室温下, 将样品孵育1小时(VWR国际公司, 拉德纳, 宾夕法尼亚州)。通过吸移、随后涡旋彻底混合样品。

实例12. 还原剂溶液的比较

[0248] 将正常的(N)连同糖尿病(D)血清/血浆样品在室温下融解并且在各组中汇集(以形成N集和D集)。通过吸移来混合汇集的N和D样品, 涡旋并且保存在冰上。然后将样品再次等分, 各50 μl , 以获得4个糖尿病样品(D1-D4)和4个正常样品(N1-N4)。根据表3制备四种 NaBH_4 制品形式各自的工作液。在该表中, MME是指2-甲氧基乙醚, TGDE是指三乙二醇二甲醚并且TG是指四乙二醇二甲醚。母液连同 NaBH_4 是从西格玛-奥德里奇(圣路易斯, 密苏里州)购买的。

表3. 还原剂溶液

制品号	母液	工作液
1	0.5M NaBH_4 于MME中	0.5M(无稀释)
2	2M NaBH_4 于TGDE中	1M(用水稀释)
3	3M NaBH_4 于TG中	1M(用水稀释)
4	1M NaBH_4 于水中	1M(无稀释)

[0249] 将D1和N1样品用5 μl 的制品1进行处理, 将D2和N2样品用2.5 μl 的制品2进行处理, 将D3和N3样品用2.5 μl 的制品3进行处理, 并且将D4和N4样品用2.5 μl 的制品4进行处理。在用1ml的1%乙酸进行淬灭之前, 在室温下进行反应一小时。通过吸移来混合样品, 产生包括

5%还原样品的终溶液。然后通过将200 μ l的样品与800 μ l的血清稀释缓冲液合并,将样品进一步稀释至1%还原样品。通过将15ml无蛋白T20封闭缓冲液(赛默飞世尔,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)、10ml的0.5M EDTA、5ml的NP40和470ml的无菌水合并来制备血清稀释缓冲液。将得到的溶液涡旋15秒。然后将1%还原样品再次等分成两个500 μ l等分试样,将其冷冻于-80 $^{\circ}$ C下直到分析。

[0250] 根据实例3的方法,对还原的样品进行ELISA分析。从最终吸光度读数外推出的GCD59浓度值以标准肽单元(SPU)呈现于表4中。

表4.GCD59浓度值

样品	GCD59(SPU)
D1	0.70
D2	0.53
D3	0.56
D4	0.67
N1	0.15
N2	0.15
N3	0.14
N4	0.15

[0251] 这些结果指示出,用制品1还原的样品产生了最高水平的可检测的GCD59,比用制品4处理的样品的可检测水平略微更高。

序列表

- <110> 哈佛大学董事会 (President and Fellows of Harvard College)
 <120> 用于评估妊娠糖尿病的方法和试剂
 <130> 00742-253W04
 <150> 61/945, 860
 <151> 2014-02-28
 <150> 61/946, 373
 <151> 2014-02-28
 <150> 61/911, 306
 <151> 2013-12-03
 <160> 11
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 [0001] <220>
 <223> 合成的构建体
 <400> 1
 Leu Gln Cys Tyr Asn Cys Pro Asn Pro Thr Ala Asp Cys Lys Thr Ala
 1 5 10 15
 Val Asn Cys Ser Ser Asp Phe Asp Ala Cys Leu Ile Thr Lys Ala Gly
 20 25 30
 Leu Gln Val Tyr Asn Lys Cys Trp Lys Phe Glu His Cys Asn Phe Asn
 35 40 45
 Asp Val Thr Thr Arg Leu Arg Glu Asn Glu Leu Thr Tyr Tyr Cys Cys
 50 55 60
 Lys Lys Asp Leu Cys Asn Phe Asn Glu Gln Leu Glu Asn
 65 70 75
 <210> 2
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 2

Phe Glu His Cys Asn Phe Asn Asp Val Thr Thr Arg Leu Arg Glu Asn
1 5 10 15

Glu Leu Thr Tyr Tyr Cys Cys Lys Lys Asp Leu
20 25

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 3

Phe Glu His Cys Asn Phe Asn Asp Val Thr Thr Arg Leu Arg Glu Asn
1 5 10 15

[0002]

Glu Leu Thr Tyr Tyr Cys Cys Lys Lys
20 25

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 4

His Cys Asn Phe Asn Asp Val Thr Thr Arg Leu Arg Glu Asn Glu Leu
1 5 10 15

Thr Tyr Tyr Cys Cys Lys Lys
20

<210> 5

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 5

Ala Cys Asn Phe Asn Asp Val Thr Thr Arg Leu Arg Glu Asn Glu Leu
1 5 10 15

Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala Lys
20

<210> 6

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 6

Ala Phe Glu His Cys Asn Phe Asn Asp Val Thr Thr Arg Leu Arg Glu
1 5 10 15

Asn Glu Leu Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala Lys Asp Leu
20 25

[0003]

<210> 7

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 残基的翻译后修饰

<222> (24).. (24)

<223> bAla

<400> 7

Ala Phe Glu His Cys Asn Phe Asn Asp Val Thr Thr Arg Leu Arg Glu
1 5 10 15

Asn Glu Leu Thr Tyr Tyr Cys Xaa Lys Asp Leu
20 25

<210> 8

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 残基的翻译后修饰

<222> (24)..(24)

<223> Aib

<400> 8

Ala Phe Glu His Cys Asn Phe Asn Asp Val Thr Thr Arg Leu Arg Glu
1 5 10 15

Asn Glu Leu Thr Tyr Tyr Cys Xaa Ala Lys Asp Leu
20 25

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0004]

<223> 合成的构建体

<400> 9

Asn Lys Cys Trp Lys Phe Glu His Cys Asn Phe Asn Asp Val
1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 10

Asn Lys Ala Trp Lys Phe Glu His Ala Asn Phe Asn Asp
1 5 10

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 11

[0005] Asn Lys Ala Trp Lys Phe Glu His Ala Asn Phe Asn Asp Cys
1 5 10

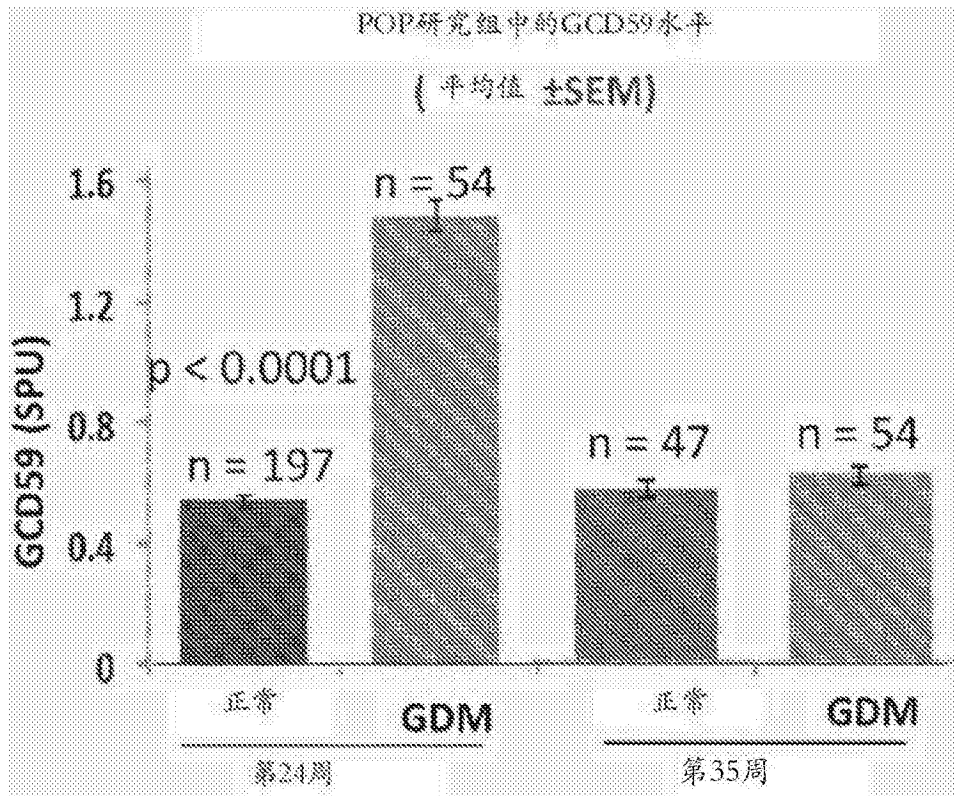


图1

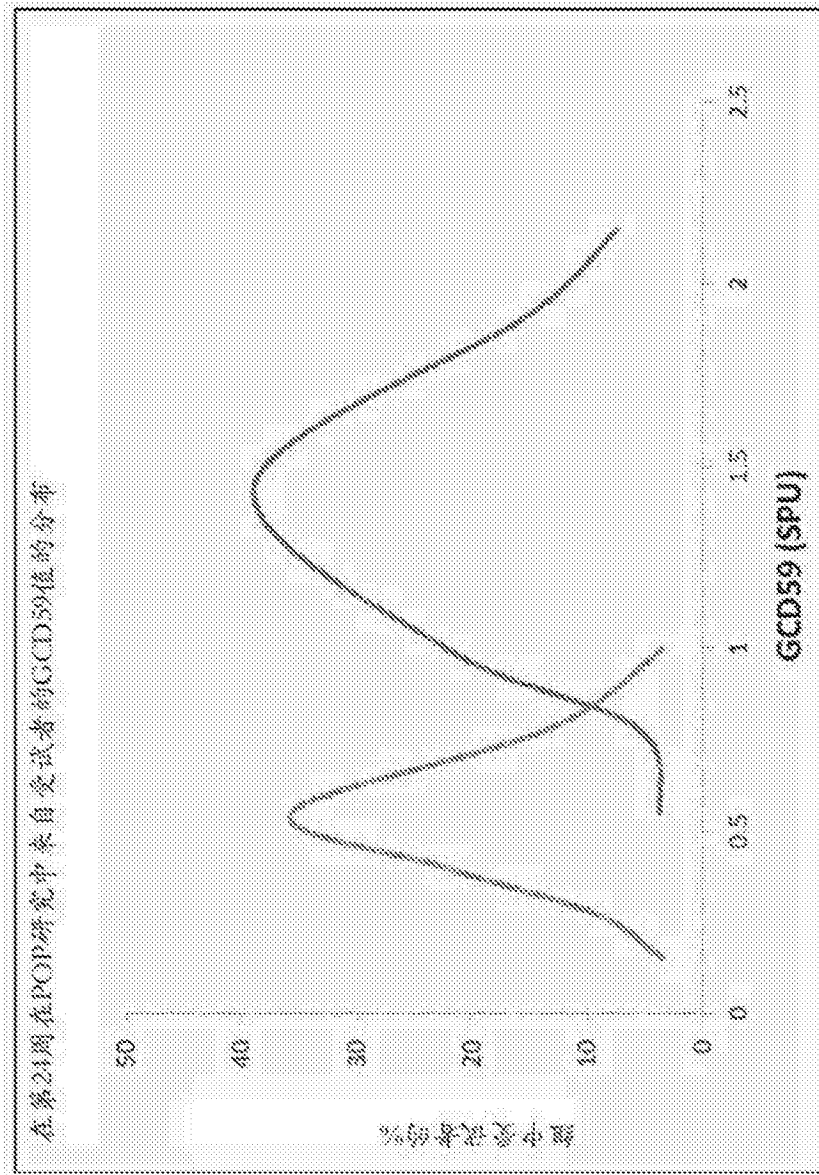


图2

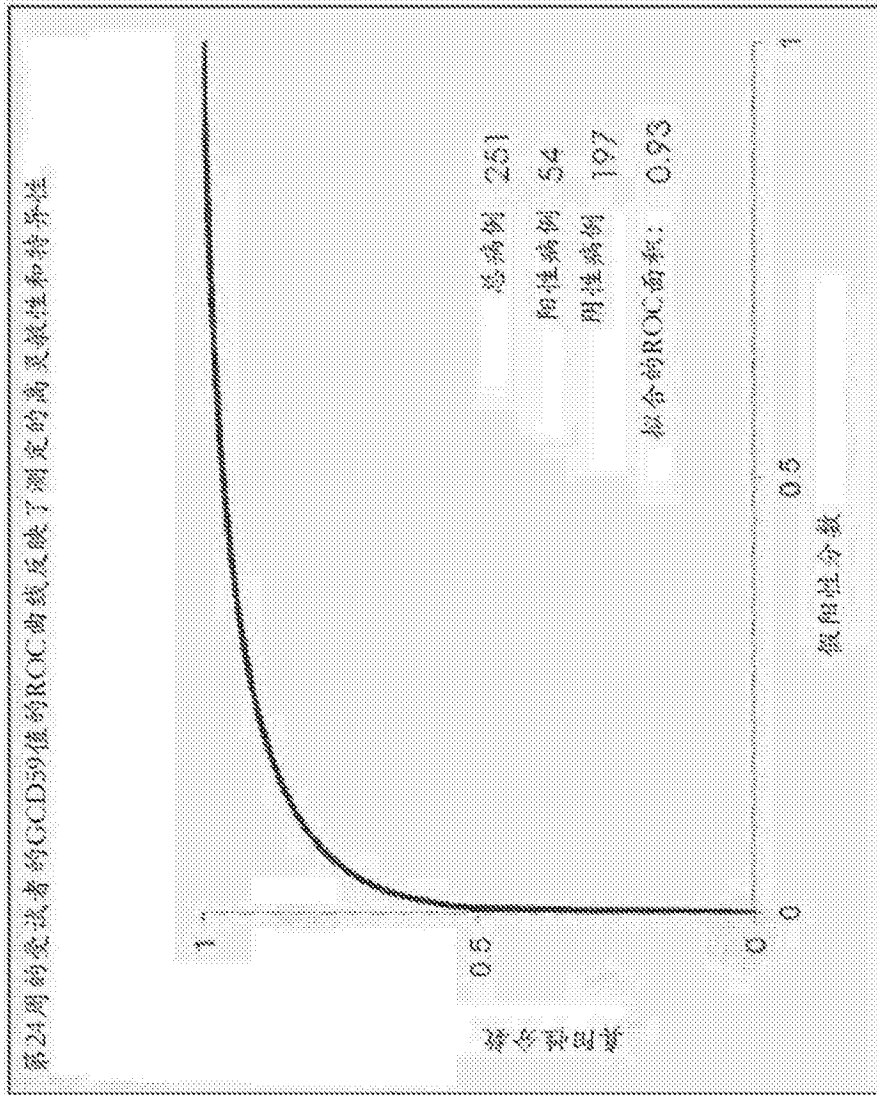


图3

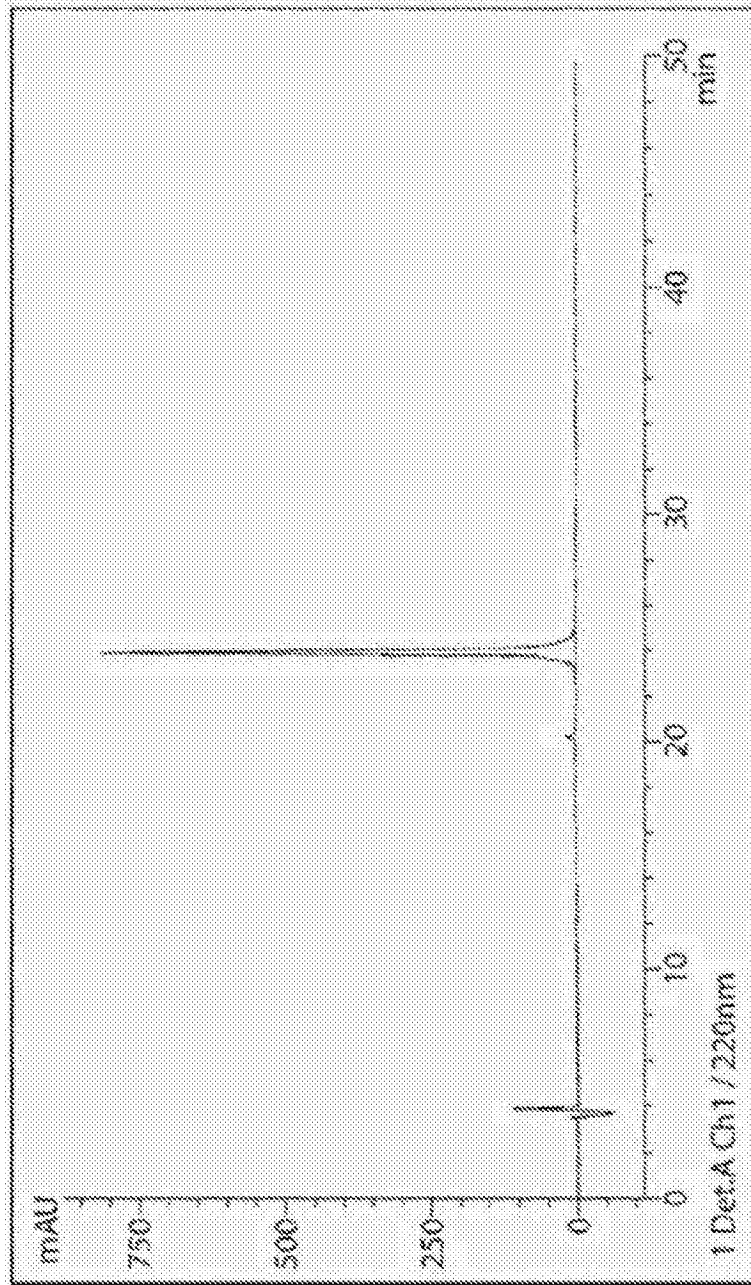


图4

专利名称(译)	用于评估妊娠糖尿病的方法和试剂		
公开(公告)号	CN105934671A	公开(公告)日	2016-09-07
申请号	CN201480074004.2	申请日	2014-12-03
申请(专利权)人(译)	哈佛大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	哈佛大学董事会		
[标]发明人	迈克尔·乔雷夫 约瑟·阿尔伯特·哈普林		
发明人	迈克尔·乔雷夫 约瑟·阿尔伯特·哈普林		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	A61P15/00 A61P15/08 G01N33/566 G01N33/689 G01N2333/70596 G01N2400/02 G01N2440/38 G01N2800/042 G01N2800/368 G01N33/577 G01N33/581 G01N33/6854 G01N33/6893		
代理人(译)	李平 郑霞		
优先权	61/911306 2013-12-03 US 61/945860 2014-02-28 US 61/946373 2014-02-28 US		
其他公开文献	CN105934671B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及在妊娠糖尿病和/或相关障碍和/或病症的评估中用于确定糖化CD59的水平测定、诊断、试剂盒和测定组分。一些试剂盒包括能够结合CD59上的捕获表位的捕获抗体，其中所述捕获表位可以缺乏赖氨酸残基41号(K41)。试剂盒还可以包括能够结合CD59上的检测表位的检测抗体。此类检测表位可以包括糖化K41。

