



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102803964 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

- (21) 申请号 200980160052. 2
- (22) 申请日 2009. 06. 26
- (85) PCT申请进入国家阶段日
2011. 12. 23
- (86) PCT申请的申请数据
PCT/SE2009/000328 2009. 06. 26
- (87) PCT申请的公布数据
W02010/151180 EN 2010. 12. 29
- (71) 申请人 阿特拉斯抗体有限公司
地址 瑞典斯德哥尔摩
- (72) 发明人 M. 乌伦 J. 施温克
- (74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
代理人 张文辉
- (51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006. 01)
G01N 33/537 (2006. 01)

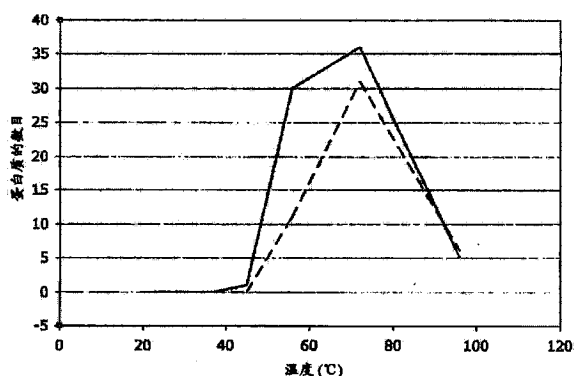
权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 8 页

(54) 发明名称

免疫可检测性的改善

(57) 摘要

在本公开内容中, 提供了一种用于改善至少一种蛋白质在任选稀释的血液、血清或血浆样品中的免疫可检测性的方法, 包括将样品加热至 64-85°C 的温度, 之后进行样品与至少一种亲和配体间的接触以检测和 / 或量化所述至少一种蛋白质的步骤。



1. 用于改善至少一种蛋白质在任选稀释的血液、血清或血浆样品中的免疫可检测性的方法,包括将样品加热至 64-85°C 的温度,之后进行样品与至少一种亲和配体间的接触以检测和 / 或量化所述至少一种蛋白质的步骤。

2. 依照权利要求 1 的方法,其中将所述样品加热至 66-78°C,诸如 70-74°C,诸如约 72°C 的温度。

3. 依照权利要求 1 或 2 的方法,其中在所述样品与至少 4,诸如至少 10,诸如至少 30,诸如至少 50 种不同亲和配体间接触前实施加热。

4. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中将所述温度维持 0.5-45 分钟,诸如 1-30 分钟,诸如 1-29 分钟,诸如 5-20 分钟。

5. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中在加热前用标记物标记所述样品的蛋白质,所述标记物在所述样品与所述至少一种亲和配体间的接触后在检测步骤中直接或间接地可检出。

6. 依照权利要求 5 的方法,其中所述标记物含有生物素。

7. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中在加热前将所述样品稀释 10-10000 倍,诸如 100-2500 倍。

8. 依照权利要求 7 的方法,其中用包含兔 IgG 和 / 或酪蛋白的缓冲液稀释所述样品。

9. 依照权利要求 8 的方法,其中所述缓冲液中的兔 IgG 的浓度是 0.05-5mg/ml,诸如 0.1-2mg/ml,而所述缓冲液中的酪蛋白的浓度是 0.01-1% (w/v),诸如 0.05-2% (w/v)。

10. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少一种亲和配体是至少一种抗体。

11. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少一种亲和配体是与可鉴定的模块,诸如可鉴定的珠偶联的。

12. 用于检测和 / 或量化来自受试者的血液、血清或血浆中的蛋白质的方法:

a) 提供第一和第二任选稀释的来自所述受试者的血液、血清或血浆样品;

b) 将所述第一样品加热至 50-85°C 的温度;

c) 在 b) 的加热后,使所述第一样品与至少一种亲和配体接触,所述亲和配体能够与通过加热提高免疫可检测性的靶蛋白选择性相互作用;

d) 使尚未进行加热的所述第二样品与至少一种亲和配体接触,所述亲和配体能够与通过加热没有提高免疫可检测性的靶蛋白选择性相互作用;

e) 检测步骤 c) 和 d) 中形成的抗体与相应的靶蛋白间的相互作用,由此检测和 / 或量化所述血液、血清或血浆中的蛋白质。

13. 用于鉴定医学状况的生物标志的方法,包括

a) 提供来自患有所述医学状况的第一组受试者和没有所述医学状况的第二组受试者的血液、血清或血浆样品,

b) 任选地在稀释后,将所述样品加热至 50-85°C 的温度,

c) 在加热后使所述样品与能够与至少一种蛋白质选择性相互作用的至少一种亲和配体接触以确定各组中的所述至少一种蛋白质的水平,

d) 比较所述水平以鉴定在来自所述第一组的样品中比在来自所述第二组的样品中更高或更低的程度出现的蛋白质,如此鉴定所述医学状况的生物标志。

免疫可检测性的改善

发明领域

[0001] 本发明涉及检测血液或血液衍生的样品中的蛋白质的领域。

[0002] 发明背景

[0003] 目前,蛋白质组分析中广泛使用且公认的技术是常常与 2D 凝胶电泳或层析技术组合采用的质谱术。然而,小型化且并行化技术平台的最近开发已经打开了支持和补充质谱分析的可能性。

[0004] 发明概述

[0005] 首先,提供了用于改善至少一种蛋白质在任选稀释的血液、血清或血浆样品中的免疫可检测性的方法,包括将样品加热至 50-85°C 的温度,之后进行样品与至少一种亲和配体间的接触的步骤。

[0006] 其次,提供了用于检测和 / 或量化来自受试者的血液、血清或血浆中的蛋白质的方法:

[0007] a) 提供第一和第二任选稀释的来自所述受试者的血液、血清或血浆样品;

[0008] b) 将所述第一样品加热至 50-85°C 的温度;

[0009] c) 在 b) 的加热后,使所述第一样品与至少一种亲和配体接触,所述亲和配体能够与通过加热提高免疫可检测性的靶蛋白选择性相互作用;

[0010] d) 使尚未进行加热的所述第二样品与至少一种亲和配体接触,所述亲和配体能够与通过加热没有提高免疫可检测性的靶蛋白选择性相互作用;

[0011] e) 检测步骤 c) 和 d) 中形成的抗体与相应的靶蛋白间的相互作用,由此检测和 / 或量化所述血液、血清或血浆中的蛋白质。

[0012] 再次,提供了用于鉴定医学状况的生物标志的方法,包括

[0013] a) 提供来自患有所述医学状况 (condition) 的第一组受试者和没有所述医学状况的第二组受试者的血液、血清或血浆样品,

[0014] b) 任选地在稀释后,将所述样品加热至 50-85°C 的温度,

[0015] c) 使所述样品与能够与至少一种蛋白质选择性相互作用的至少一种亲和配体接触以测定各组中的所述至少一种蛋白质的水平,

[0016] d) 比较所述水平以鉴定在来自第一组的样品中比在来自所述第二组的样品中高或低的程度出现的蛋白质,如此鉴定所述医学状况的生物标志。

[0017] 下文更为详细地描述了上述方法的各个实施方案。

[0018] 附图简述

[0019] 在图 1-4 中,实线表示血浆中的蛋白质,而虚线表示血清中的蛋白质。

[0020] 图 1 显示了在以不同温度 (x 轴) 热处理后血浆或血清中展现出至少 2 倍升高的免疫可检测性的蛋白质的数目 (y 轴)。

[0021] 图 2 显示了在以不同温度 (x 轴) 热处理后血浆或血清中展现出至少 2 倍降低的免疫可检测性的蛋白质的数目 (y 轴)。

[0022] 图 3 显示了在以不同温度 (x 轴) 热处理后血浆或血清中展现出至少 2 倍升高的

免疫可检测性的蛋白质的数目 (y 轴)。

[0023] 图 4 显示了在以不同温度 (x 轴) 热处理后血浆或血清中展现出至少 2 倍降低的免疫可检测性的蛋白质的数目 (y 轴)。

[0024] 图 5 显示了来自与于 23°C、56°C 和 72°C 处理后的血清中的蛋白质相互作用的 6 种不同亲和配体的信号。框图从原始荧光信号强度数据产生, 并且基于三次重复分析的结果。MFI = 中值荧光强度, AU = 任意单位。

[0025] 图 6 显示了来自与于 23°C、56°C 和 72°C 处理后的血浆中的蛋白质相互作用的 6 种不同亲和配体的信号。框图从原始荧光信号强度数据产生, 并且基于三次重复分析的结果。MFI = 中值荧光强度, AU = 任意单位。

[0026] 图 7 显示了于 72°C 处理后的来自 PSA 低或高的患者 (PSA > 60ng/ml) 的血浆中的蛋白质水平差异。结果以火山图 (volcano plot) 呈现, 其中将相对倍数变化 (x 轴) 相对于 t 检验结果的显著性 (P 值) (y 轴) 绘图。实线代表 p 值 < 0.01, 而虚线代表 p 值 < 0.05。点框代表....

[0027] 图 8 显示了于 23°C 处理后的来自 PSA 低或高的患者 (PSA > 60ng/ml) 的血浆中的蛋白质水平差异。结果以火山图呈现, 其中将相对倍数变化 (x 轴) 相对于 t 检验结果的显著性 (P 值) (y 轴) 绘图。实线代表 p 值 < 0.01, 而虚线代表 p 值 < 0.05。点框代表火山图中定位具有较小的倍数变化和显著性数值的蛋白质的区域放大。

[0028] 发明详述

[0029] 作为本公开内容的第一方面, 如此, 提供了用于改善至少一种蛋白质在任选稀释的血液、血清或血浆样品中的免疫可检测性的方法, 包括将样品加热至 50-85°C 的温度, 之后进行样品与至少一种亲和配体间的接触的步骤。

[0030] 作为第一方面的结构, 提供了用于检测血液、血清或血浆样品中的蛋白质的方法, 包括:

[0031] a) 将所述样品加热至 50-85°C 的温度;

[0032] b) 使所述样品与至少一种亲和配体接触, 所述亲和配体能够与已知靶蛋白选择性相互作用;

[0033] c) 检测至少一种亲和配体与来自样品的相应靶蛋白间的相互作用, 由此检测样品中的蛋白质。

[0034] 本公开内容基于如下的发现, 即如果在分析前将血浆或血清样品加热, 那么抗体以较高的程度检出血浆和血清样品的一些蛋白质。不限于任何具体的科学理论, 通过加热似乎促进抗体与其在血清或血浆蛋白质中的相应表位间的相互作用。

[0035] 本公开内容的发现可以带来许多益处。使用加热, 有可能检出先前使用免疫学方法检测不到的蛋白质。因此, 可以获得复杂生物学样品的蛋白质内容物的更广泛图像。还有, 加热可以实现以较低水平存在于此类复杂生物学样品中的蛋白质的检测。这可以是特别感兴趣的, 因为已经报告了许多感兴趣的生物标志以较低浓度范围存在。如此, 本公开内容的加热可以是用于提高蛋白质组研究的灵敏性的有用工具。

[0036] 在本公开内容的上下文中, 蛋白质的“免疫可检测性”指蛋白质的线性或构象表位可以通过能够与此类表位选择性相互作用的亲和配体, 诸如抗体检出的程度。

[0037] 此外, 在本公开内容的上下文中, “改善”蛋白质的免疫可检测性指在基于表位识

别的分析中与来自尚未实施加热时的蛋白质的信号（或输出）相比，提高来自蛋白质的信号（或输出）。因此，为了测定是否已经改善免疫可检测性，可以在同时采集的两份来自患者的样品中测量来自所讨论的蛋白质的信号，其中在测量前已经加热样品之一。如果来自加热样品中的蛋白质的信号高于来自非加热样品中的蛋白质的信号，那么免疫可检测性得到改善。为了改善所述比较的精确性，可以实施对每份样品的超过一次测量和 / 或对每个种类的超过一份样品的测量。在一些实施方案中，若信号（按绝对值计）已经升高 1.5 倍或 2 倍，则可以认为免疫可检测性得到改善。

[0038] “样品与至少一种亲和配体间的接触”使检测和 / 或量化样品中的蛋白质成为可能。因此，可以采用亲和配体的选择性来测定亲和配体识别的蛋白质的存在和 / 或多度。可以使用各种设置和形式来实施接触，如下文进一步讨论的。

[0039] 作为本公开内容的第二方面，提供了用于检测和 / 或量化来自受试者的血液、血清或血浆中的蛋白质的方法：

[0040] a) 提供第一和第二任选稀释的来自所述受试者的血液、血清或血浆样品；

[0041] b) 将所述第一样品加热至 50-85°C 的温度；

[0042] c) 在 b) 的加热后，使所述第一样品与至少一种亲和配体接触，所述亲和配体能够与通过加热提高免疫可检测性的靶蛋白选择性相互作用；

[0043] d) 使尚未进行加热的所述第二样品与至少一种亲和配体接触，所述亲和配体能够与通过加热没有提高免疫可检测性的靶蛋白选择性相互作用；

[0044] e) 检测步骤 c) 和 d) 中形成的抗体与相应的靶蛋白间的相互作用，由此检测和 / 或量化所述血液、血清或血浆中的蛋白质。

[0045] 第二方面基于发明人的洞察力，即一些蛋白质的免疫可检测性在本公开内容的热处理期间得到改善，而一些其它蛋白质的免疫可检测性没有升高或者甚至降低。因而，若在已经加热的样品中实施前种蛋白质的检测，而在非加热样品中实施后种蛋白质的检测，则可以实现对更大范围的蛋白质优化的灵敏性。

[0046] 本领域技术人员无需过度负担仅通过实施相同蛋白质的两次测量，一次在加热样品中而一次在非加热样品中，然后比较所得的信号便可以确定蛋白质的免疫可检测性得到改善与否。如果信号在热处理的样品中较高，那么蛋白质作为通过加热提高免疫可检测性的蛋白质选择，并且在未来的分析中使相应的亲和配体与热处理的样品接触。

[0047] 作为本公开内容的第三方面，提供了用于鉴定医学状况的生物标志的方法，包括

[0048] a) 提供来自患有所述医学状况的第一组受试者和没有所述医学状况的第二组受试者的血液、血清或血浆样品，

[0049] b) 任选地在稀释后，将所述样品加热至 50-85°C 的温度，

[0050] c) 在加热后使所述样品与能够与至少一种蛋白质选择性相互作用的至少一种亲和配体接触以测定各组中的所述至少一种蛋白质的水平，

[0051] d) 比较所述水平以鉴定在来自第一组的样品中比在来自所述第二组的样品中高或低的程度出现的蛋白质，如此鉴定所述医学状况的生物标志。

[0052] 本公开内容的第三方面基于发明人的如下发现，即来自正常的和患病的患者的加热样品的比较揭示在分析非加热样品时检测不到的蛋白质表达差异。因此，可以使用本公开内容的方法来鉴定先前认识不到的生物标志。这在图 7 和图 8 中显示，其中显示了来自

正常受试者和患有前列腺癌的受试者的加热的和非加热的样品中的某些蛋白质的水平,并且鉴定出前列腺癌两种蛋白质生物标志。

[0053] 第三方面的医学状况可以例如是疾病或另一种医学病症,诸如癌症。

[0054] 本领域技术人员了解在步骤 d) 中如何比较来自两组的水平,并确定水平间的差异是否足以推断所述蛋白质是生物标志。

[0055] 在第三方面的一个实施方案中,若蛋白质浓度在来自第一组的样品中比在第二组的样品中高至少 25%,诸如高至少 50%,诸如高至少 100%,则在步骤 d) 中将其鉴定为生物标志。此外,若检测系统中来自蛋白质的信号在来自第一组的样品中比在第二组的样品中高至少 25%,诸如高至少 50%,诸如高至少 100%,则其可以鉴定为生物标志。在这里,要比较的浓度或信号可以是样品中的浓度的均值或中值数值。还有,情况可以是仅在一些样品中检出蛋白质,并且在此类情况中,若蛋白质在来自第一组比来自第二组更高百分比的样品中检出,则可以在步骤 d) 中将其鉴定为生物标志。

[0056] 若蛋白质在来自患病组的样品中以较低的程度检出,则其也可以鉴定为生物标志。

[0057] 在本公开内容的实施方案中,所述方法仅涉及检测和 / 或量化血液、血浆或血清的非免疫球蛋白蛋白质。免疫球蛋白蛋白质的一些表位的可检测性受到免疫球蛋白蛋白质是否与其抗原结合影响。不限于任何具体的科学理论,发明人认为靶蛋白的此类相互作用的形成或解离不是加热效果的来源。另外,将样品加热可以改变免疫球蛋白蛋白质的结合活性,并且由此危及其功能性的鉴定。因此,在本公开内容的方法的实施方案中,至少一种亲和配体能够与至少一种非免疫球蛋白蛋白质选择性相互作用。

[0058] 在本公开内容的方法中,将样品加热至 50-85°C 的温度。在下文的例示性实施方案和图 1 中,显示了此类温度范围导致免疫可检测性升高。在本公开内容的方法的实施方案中,将样品加热至 64-85°C,诸如 66-78°C,诸如 70-74°C,诸如约 72°C 的温度。在下文的例示性实施方案和图 1、图 3 和图 4 中,显示了在此范围内的温度比 50-85°C 的更宽范围至少在一些方面更好。

[0059] 通常,本公开内容的加热在时间上受限制,这意味着首先将样品加热至某个温度,于所述温度保持一段时间,然后冷却,通常至室温左右的温度,诸如 20-25°C。因此,通常不以增加的温度实施加热后的步骤,诸如与亲和配体接触。发明人已经发现了,可以在热循环仪中实施加热和任选地冷却。(热循环仪通常在 PCR 中使用)。然而,也可以使用其它加热手段。

[0060] 可以将加热时间保持较低,以提供有效的使用劳力和材料,并且由此改善的分析经济。例如,这在蛋白质组学中可以是有益的,其中可以在一大批受试者中分析许多蛋白质。发明人已经显示了,加热小于 1 小时,或甚至小于半小时的时段足以获得满意的结果。如此,在本公开内容的实施方案中,加热实施一段 0.5-55 分钟,诸如 1-40 分钟,诸如 1-29 分钟,诸如 5-20 分钟,诸如约 15 分钟的时间。

[0061] 在下述例子中,在加热前将样品的蛋白质标记。随后,将标记物与荧光团起反应,并在最终的检测步骤中检测。发明人已经显示了,此类标记提供了有效的分析方案,并且在加热前标记比在加热后标记产生更高数目的具有升高的免疫可检测性的蛋白质。此外,可以将样品在标记和加热之间稀释(例如,10-100 倍)。

[0062] 在本公开内容的实施方案中,如此,可以用标记物在加热前标记样品的蛋白质,所述标记物在样品与至少一种亲和配体间接接触后在检测步骤中直接或间接可检测。标记物可以例如包含生物素。也就是说,标记可以例如是生物素化。标记物可以本身(直接地)或者经由二级标记物(间接地)可检测。如此,在本公开内容的方法的实施方案中,可以在与亲和配体接触后将经标记的蛋白质与二级标记物接触,所述二级标记物在随后的检测步骤中可检测。二标记物可以例如是荧光团。

[0063] 可以在加热前稀释本公开内容的方法的样品。一般认为稀释在基于免疫学检测的分析中降低背景信号(干扰(noise))及来自靶蛋白的信号。在本公开内容的实施方案中,可以在加热前将样品稀释 10-10000 倍,诸如 100-2500 倍,诸如 200-1000 倍,诸如约 500 倍。

[0064] 例如,可以使用包含添加剂诸如兔 IgG 和 / 或酪蛋白的缓冲液来稀释样品。这些添加剂可以淬灭样品中的蛋白质与(特异性)亲和配体间的非特异性结合,由此降低检测中的干扰。

[0065] 缓冲液中的淬灭抗体浓度可以是 0.05-5mg/ml,诸如 0.1-2mg/ml,诸如约 0.5mg/ml,并且缓冲液中的酪蛋白浓度可以是 0.01-10% (w/v),诸如 0.05-2% (w/v),诸如约 0.1% (w/v)。

[0066] 为了提供数种蛋白质的同时检测及由此对血液、样品或血浆的蛋白质内容物的有效分析,可以在同一反应区室中将样品与超过一种亲和配体接触。为了检测同一样品中的超过 30 种不同蛋白质,在小型化且并行化系统中使用亲和配体是有益的,其中可以将配体与珠偶联,所述珠在随后的检测步骤中分析。此外,可以给此类珠提供连接随后的检测步骤中的信号与亲和配体及继而蛋白质的身份(identity)。有时,此类珠称为“编码颗粒”;参见 Kingsmore, S. F. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2006, 5(4), 310-320。使用传统的三明治式测定法,提供能够检测来自同一样品的超过 30 种不同蛋白质的设置实际上是非常困难且费时的。

[0067] 因此,在本公开内容的方法的实施方案中,在样品与至少 4,诸如至少 10,诸如至少 30,诸如至少 50 种不同亲和配体间接接触前实施加热。

[0068] 通过采用与蛋白质偶联的直接或间接可检测的标记物和具有与亲和配体偶联的身份的可检测模块,可以将检测步骤中的假阴性数目保持较低,因为可以忽略不提供来自与蛋白质有关的标记物和与亲和配体有关的模块的信号的任何实体。

[0069] 上文呈现的实施方案主要参照第一方面进行描述。然而,本领域技术人员了解,加以必要的变更,实施方案还适用于第二和第三方面。

[0070] 在本公开内容的上下文中,“至少一种亲和配体”指至少一种种类的亲和配体,其中所述种类由亲和配体的特异性限定。如此,本领域技术人员了解,一种种类的亲和配体可以指一组多克隆抗体,它们都能够与同一抗原选择性相互作用。

[0071] 因而,“不同亲和配体”指具有不同特异性的亲和配体。

[0072] 认为选择或制造合适的亲和配体及选择适合于依照本公开内容的检测和 / 或量化的形式和条件在本领域普通技术的能力范围内。然而,为了例示,下文给出了可以证明有用的亲和配体的例子及用于检测和 / 或量化的形式和条件的例子。

[0073] 如此,在本公开内容的实施方案中,可以自下组选择亲和配体:抗体、其片段和其衍生物,即基于免疫球蛋白支架的亲和配体。抗体及其片段或衍生物可以是分离的和 / 或

单特异性的。抗体包含任何起源,包括鼠、兔、人的单克隆和多克隆抗体和其它抗体,及包含来自不同物种的序列的嵌合抗体,诸如部分人源化抗体,例如部分人源化小鼠抗体。可以通过用选定的抗原免疫动物来生成多克隆抗体。可以使用由Köhler和Milstein(Köhler G和Milstein C(1976)Eur. J. Immunol. 6 :511-519)开发的杂交瘤技术来生成限定特异性的单克隆抗体。本公开内容的抗体片段和衍生物能够与它们作为片段或衍生物来源的抗体一样与相同抗原选择性相互作用。抗体片段和衍生物包含 Fab 片段,其由完整免疫球蛋白蛋白质的重链第一恒定域(CH1)、轻链恒定域(CL)、重链可变域(VH)和轻链可变域(VL)组成;Fv片段,其由两个抗体可变域VH和VL组成(Skerra A和Plückthun A(1988)Science 240 :1038-1041);单链Fv片段(scFv),其由通过柔性肽接头连接在一起的两个VH和VL域组成(Bird RE和Walker BW(1991)Trends Biotechnol. 9 :132-137);Bence Jones二聚体(Stevens FJ等(1991)Biochemistry 30 :6803-6805);骆驼(camelid)重链二聚体(Hamers-Casterman C等(1993)Nature 363 :446-448)和单一可变域(Cai X和Garen A(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 :6280-6285;Masat L等(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91 :893-896)、和单一域支架,如例如来自铰口鲨(nurse shark)的新抗原受体(NAR)(Dooley H等(2003)Mol. Immunol. 40 :25-33)和基于可变重域的微型抗体(Skerra A和Plückthun A(1988)Science240 :1038-1041)。

[0074] 在本公开内容的上下文中,“单特异性抗体”是已经对其自身抗原进行过亲和纯化,由此分开此类单特异性抗体与其它抗血清蛋白和非特异性抗体的多克隆抗体群之一。此亲和纯化产生选择性结合其抗原的抗体。为了获得可以在本公开内容的方法中使用的单特异性抗体,可以通过基于两步免疫亲和力的方案来纯化多克隆抗血清以获得对靶蛋白选择性的单特异性抗体。使用固定化的标签蛋白作为捕捉剂在最初的消减步骤中除去针对抗原片段的通用亲和标签的抗体。在第一消减步骤后,将血清在具有作为捕捉剂的抗原的第二亲和柱上加载,以富集对抗原特异性的抗体(还可参见Nilsson P等(2005)Proteomics 5 :4327-4337)。

[0075] 多克隆和单克隆抗体及其片段和衍生物代表需要选择性生物分子识别的应用中,诸如依照本公开内容的蛋白质检测和/或量化中的亲和配体的传统选择。然而,本领域技术人员知道,由于不断需要选择性结合配体的高通量生成和低成本生成系统,已经开发出新的生物分子多样性技术。这已经实现免疫球蛋白及非免疫球蛋白起源两者的新型亲和配体的生成,所述新型亲和配体有时已经证明为在生物分子识别应用中与结合配体同等有用,并且可以替换免疫球蛋白或者与免疫球蛋白一起使用。

[0076] 亲和配体选择需要的生物分子多样性可以通过多种可能的支架分子之一的组合工程化改造来生成,然后使用合适的选择平台来选择特异性和/或选择性亲和配体。支架分子可以是免疫球蛋白蛋白质起源的(Bradbury AR和Marks JD(2004)J. Immunol. Meths. 290 :29-49)、非免疫球蛋白蛋白质起源的(Nygren PÅ和Skerra A(2004)J. Immunol. Meths. 290 :3-28)、或寡核苷酸起源的(Gold L等(1995)Annu. Rev. Biochem. 64 :763-797)。

[0077] 已经在新结合蛋白的开发中使用大量非免疫球蛋白蛋白质支架作为支持结构。可用于生成依照本公开内容使用的亲和配体的此类结构的非限制性例子是葡萄球菌蛋白A及其域和这些域的衍生物,诸如蛋白Z(Nord K等(1997)Nat. Biotechnol. 15 :772-777);

脂笼蛋白 (Beste G 等 (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 :1898-1903) ; 锚蛋白重复域 (Binz HK 等 (2003) *J. Mol. Biol.* 332 :489-503) ; 纤维素结合域 (CBD) (Smith GP 等 (1998) *J. Mol. Biol.* 277 :317-332 ; Lehtiö J 等 (2000) *Proteins* 41 :316-322) ; γ 晶体蛋白 (crystallines) (Fiedler U 和 Rudolph R, W001/04144) ; 绿色荧光蛋白 (GFP) (Peelle B 等 (2001) *Chem. Biol.* 8 :521-534) ; 人细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4) (Hufton SE 等 (2000) *FEBS Lett.* 475 :225-231 ; Irving RA 等 (2001) *J. Immunol. Meth.* 248 :31-45) ; 蛋白酶抑制剂, 诸如 Knottin 蛋白 (Wentzel A 等 (2001) *J. Bacteriol.* 183 :7273-7284 ; Baggio R 等 (2002) *J. Mol. Recognit.* 15 :126-134) 和 Kunitz 域 (Roberts BL 等 (1992) *Gene* 121 :9-15 ; Dennis MS 和 Lazarus RA (1994) *J. Biol. Chem.* 269 :22137-22144) ; PDZ 域 (Schneider S 等 (1999) *Nat. Biotechnol.* 17 :170-175) ; 肽适体, 诸如硫氧还蛋白 (Lu Z 等 (1995) *Biotechnology* 13 :366-372 ; Klevenz B 等 (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* 59 :1993-1998) ; 葡萄球菌核酸酶 (Norman TC 等 (1999) *Science* 285 :591-595) ; 淀粉酶抑制肽 (tendamistat) (McConnell SJ 和 Hoess RH (1995) *J. Mol. Biol.* 250 :460-479 ; Li R 等 (2003) *Protein Eng.* 16 :65-72) ; 基于纤连蛋白 III 型域的 Trinectins (Koide A 等 (1998) *J. Mol. Biol.* 284 :1141-1151 ; Xu L 等 (2002) *Chem. Biol.* 9 :933-942) ; 和锌指 (Bianchi E 等 (1995) *J. Mol. Biol.* 247 :154-160 ; Klug A (1999) *J. Mol. Biol.* 293 :215-218 ; Segal DJ 等 (2003) *Biochemistry* 42 :2137-2148)。

[0078] 上文所提及的非免疫球蛋白蛋白质支架的例子包括呈现用于生成新的结合特异性的单一随机化环的支架蛋白质、具有为了生成新的结合特异性而随机化自蛋白质表面突出的侧链的刚性二级结构的蛋白质支架、和展现出用于生成新的结合特异性的不连续高变环区的支架。

[0079] 在非免疫球蛋白蛋白质外, 还可以使用寡核苷酸作为亲和配体。称作适体或诱饵的单链核酸折叠成定义明确的三维结构, 并以高亲和力和特异性结合其靶物。(Ellington AD 和 Szostak JW (1990) *Nature* 346 :818-822 ; Brody EN 和 Gold L (2000) *J. Biotechnol.* 74 :5-13 ; Mayer G 和 Jenne A (2004) *BioDrugs* 18 :351-359)。寡核苷酸配体可以是 RNA 或 DNA, 并且可以结合一大批靶分子类别。

[0080] 对于自上文所提及的任何支架结构的变体的集合选择期望的亲和配体, 许多选择平台可用于分离针对选定的靶蛋白的特异性新配体。选择平台包括但不限于噬菌体展示 (Smith GP (1985) *Science* 228 :1315-1317)、核糖体展示 (Hanes J 和 Plückthun A (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 :4937-4942)、酵母双杂交系统 (Fields S 和 Song O (1989) *Nature* 340 :245-246)、酵母展示 (Gai SA 和 Wittrup KD (2007) *Curr Opin Struct Biol* 17 :467-473)、mRNA 展示 (Roberts RW 和 Szostak JW (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 :12297-12302)、细菌展示 (Daugherty PS (2007) *Curr Opin Struct Biol* 17 :474-480, Kronqvist N 等 (2008) *Protein Eng Des Sel* 1-9, Harvey BR 等 (2004) *PNAS* 101 (25) :913-9198)、微珠展示 (Nord O 等 (2003) *J Biotechnol* 106 :1-13, W001/05808)、SELEX (指数富集配体系统进化) (Tuerk C 和 Gold L (1990) *Science* 249 :505-510) 和蛋白质片段互补测定法 (PCA) (Remy I 和 Michnick SW (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 :5394-5399)。

[0081] 如此, 在本公开内容的实施方案中, 亲和配体可以是源自上文所列的任何蛋白质

支架的非免疫球蛋白亲和配体,或寡核苷酸分子。

[0082] 可以在基于亲和配体诸如抗体与抗原间的相互作用的测定法中以技术人员已知的用于检测和/或量化结合剂的任何方式实现本公开内容的检测和/或量化。因而,可以使用上文所描述的任何亲和配体来定量和/或定性检测蛋白质在血液或血液衍生样品中的存在。这些一级亲和配体可以用各种标志物自身标记或者可以继而通过二级、经标记的亲和配体检测以容许检测、显现和/或量化。这可以使用许多标记物之任一种或多种来实现,所述标记物可以使用技术人员已知的,并且因此不牵涉任何过度实验的许多技术之任一种或多种来与一级或二级亲和配体缀合。

[0083] 可以与一级和/或二级亲和配体缀合的标记物的非限制性例子包括荧光染料或金属(例如,荧光素、罗丹明、藻红蛋白、荧胺)、发色染料(例如,视紫质)、化学发光化合物(例如,鲁米诺、咪唑)和生物发光蛋白质(例如,萤光素、萤光素酶)、半抗原(例如,生物素)。多种其它有用的荧光剂和生色团记载于 Stryer L(1968)Science 162:526-533 及 Brand L 和 Gohlke JR(1972)Annu. Rev. Biochem. 41:843-868。也可以用酶(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、beta-内酰胺酶)、放射性同位素(例如,³H、¹⁴C、³²P、³⁵S 或 ¹²⁵I)和颗粒(例如,金)标记亲和配体。在本公开内容的上下文中,颗粒指适合于标记分子的颗粒,诸如金属颗粒。此外,也可以用荧光半导体纳米晶体(量子点)标记亲和配体。量子点具有卓越的量子产率,而且与有机荧光团相比更具光稳定性,并且因此更容易检出(Chan 等(2002)Curr Opin Biotech. 13:40-46)。可以使用各种化学,例如胺反应或硫醇反应来将不同类型的标记物与亲和配体缀合。然而,可以使用与胺和硫醇不同的反应基团,例如醛、羧酸和谷氨酰胺。

[0084] 上述方法方面可以以数种已知形式和设置之任一种(其非限制性部分在下文讨论)使用。

[0085] 显现亲和配体上的标记物的方法可以包括但不限于荧光测定、发光测定和/或酶技术。通过将荧光标记物暴露于特定波长的光,此后检测和/或量化特定波长区的发射光来检测和/或量化荧光。可以通过在化学反应期间形成的发光来检测和/或量化加有发光标签的亲和配体的存在。酶反应的检测是由于源自化学反应的样品色移。不同类型的ELISA是基于酶反应的方法的例子。本领域技术人员知道,为了适当的检测和/或量化,可以修饰多种不同方案。

[0086] 不限于任何具体的科学理论,发明人认为使用本公开内容的加热提高线性表位的免疫可检测性。在本公开内容的方法的实施方案中,亲和配体如此可以能够与线性/连续表位选择性相互作用。举例而言,可以通过用包含表位,但不形成(刚性)二级结构的肽免疫动物来生成能够与线性/连续表位选择性相互作用的抗体。使用蛋白质表位标志标签(Protein Epitope Signature Tag, PrEST)免疫(其经常生成识别线性/连续表位的抗体)来生成下文实施例部分中所采用的抗体。

实施例

[0087] 材料和方法

[0088] 珠偶联

[0089] 依照略有修饰的制造商的方案将单特异性抗体与羧化的珠(COOH Micorspheres,

Luminex-Corp.) 偶联。对于前列腺癌方法,使用离心过滤单元(Ultrafree-MC, Millipore)以 $40 \mu\text{g/ml}$ 的终浓度将每种抗体 $3.2 \mu\text{g}$ 与 10^6 个珠偶联。将珠在具有 NaN_3 的含有蛋白质的缓冲液(ELISA 的封闭试剂, Roche)中贮存。将所有偶联的珠在超声清洁器(Branson, Ultrasonic Corporation)中在超声处理的情况中重悬 5 分钟,之后于 4°C 贮存。在溶液中创建 100plex 珠混合物,优化,如先前所描述的(Schwenk 等(2007) *Mol Cell Proteomics* 6, 125-132),并在整个研究中利用。

[0090] 对于下文呈现的第一和第二种方法,利用羧化磁珠(MagPlex Micorspheres, Luminex-Corp.)。与上文所述方案的差异是在微量滴定板(Greiner Bioone)中偶联珠,并且清洗珠,将板放到磁体(LifeSept, Dexter)上。最后,在溶液中创建 76plex 珠混合物。

[0091] 血清和血浆标记和测定方法

[0092] 首先,将样品(血浆或血清)于室温融化,并以 $10,000\text{rpm}$ 离心 10 分钟。将 $30 \mu\text{l}$ 每种样品转移到微量滴定板(Abgene)中,然后将板密封,涡旋振荡,并离心(以 $3,000\text{rpm}$ 持续 1 分钟)。接着,将 $3 \mu\text{l}$ 每种样品转移到新的微量滴定板中,接着使用液体处理仪(PlateMate 2x2, Matrix)来将 $22 \mu\text{l}$ $1\times$ PBS 添加至每个样品,然后将板密封,涡旋振荡,并离心(以 $3,000\text{rpm}$ 持续 1 分钟)。随后,以 10 倍摩尔过量添加生物素酰-四氧杂十五烷酸的 N-羟基琥珀酰亚氨基酯(NHS-PE04-生物素, Pierce)以产生总体 $1/10$ 样品稀释,接着于 4°C 在微量滴定板摇动器(Thermomixer, Eppendorf)中温育超过 2 小时。通过添加超过生物素 250 倍摩尔过量的 Tris-HCl, pH 8.0 来停止反应,并于 4°C 再温育 20 分钟。然后,将样品立即使用或于 -80°C 贮存。

[0093] 在不除去未掺入的生物素的情况中利用所有样品,并以 $1/50$ 稀释,即, $1 \mu\text{l}$ 样品和 $49 \mu\text{l}$ 测定缓冲液,其由补充有 0.5mg/ml 非特异性兔 IgG(Bethyl)的含 0.1% (w/v) 酪氨酸的 PBS(PVXC) 中的 0.5% (w/v) 聚乙烯醇和 0.8% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮(Sigma) 组成。作为对照,包括非特异性兔 IgG(Jackson ImmunoResearch) 和 HAS 结合 Affibody(Affibody AB)。接着,将板于 72°C 热处理 15 分钟,接着于 23°C 在热循环仪(DNA Engine Tetrad 循环仪, PTC225, BioRad)中温育 15 分钟。然后,将板离心(以 $3,000\text{rpm}$ 持续 1 分钟),并将 $45 \mu\text{l}$ 每种样品添加至 $5 \mu\text{l}$ 珠混合物。在摇动器上于 23°C 发生温育过夜,并且这接着是用 $3\times 50 \mu\text{l}$ PBST($1\times$ PBS pH 7.4, 0.1% Tween20) 在孔中清洗珠。

[0094] 对于用磁珠进行的第一和第二种方法,与磁珠沉积结合使用微量滴定板(Greiner Bioone)以进行板清洗。对于所叙述的前列腺癌方法,采用滤膜底部微量滴定板(Millipore),并利用真空装置(Millipore)来清洗珠。

[0095] 清洗后面接着与 $50 \mu\text{l}$ 含有 PBS 中的 0.1% 低聚甲醛的停止溶液一起温育 10 分钟。接着,将 $1\times 50 \mu\text{l}$ PBST 和 $50 \mu\text{l}$ $0.5 \mu\text{g/ml}$ 在 PBST 中的经 R-藻红蛋白标记的链霉抗生物素蛋白(Invitrogen)添加至珠混合物,并在摇动器上于 23°C 温育 20 分钟。最后,将孔在 $3\times 50 \mu\text{l}$ PBST 中清洗,并在 $100 \mu\text{l}$ PBST 中测量。

[0096] 读出和数据分析

[0097] 使用 Luminex IS 2.3 软件每次单一特异性分析的每个颜色代码 ID 计算 100 个事件在 Luminex LX200 仪上实施测量。经由经 R-藻红蛋白标记的抗兔 IgG 抗体(Jackson ImmunoResearch)来测定每种抗体的偶联效率。为了展现抗体-蛋白质相互作用,选择中值荧光强度(MFI)。使用 Microsoft Office Excel2003 或 R,即统计学计算和图形学的一种

语言和环境 (lhaka, R 等 (1996) J. Comput. Graph. Stat. 5, 299–3214) 来实施数据分析和图示。

[0098] 结果

[0099] a) 第一种方法

[0100] 经由 EU 项目 Mo1PAGE 获得来自一名正常患者的血清和血浆样品。

[0101] 选择如下的研究抗体,其靶向不同类的蛋白质诸如已知的血清蛋白质。此研究中总共包括 135 种单特异性抗体 (msAb),其靶向 93 种独特的蛋白质编码基因的产物。单特异性抗体获自 HPA 项目 (www.proteinatlas.org)。作为对照,包括非特异性兔 IgG (Jackson ImmunoResearch) 和 HSA 结合 Affibody (Affibody AB)。一式三份分析所有血清和血浆样品。因此,对血浆和血清两者调查每个温度的一个时间间隔。因而,将样品稀释、标记、并在测定缓冲液中制备。然后,处理包括于 23°C、37°C、45°C、56°C 持续 30 分钟,及于 72°C 持续 15 分钟和于 96°C 持续 5 分钟。在各个热处理时间间隔后将所有样品冷却至 23°C,然后与珠混合物组合。

[0102] 为了优化免疫可检测性,在生物素化后于一定的温度范围热处理样品。测试中包括的温度是:23°C、37°C、45°C、56°C、72°C 和 96°C。在图 1 中,将展现出至少两倍信号强度升高的蛋白质数目相对于热处理温度绘图。72°C 导致最高数目的具有升高的信号的蛋白质。56°C 也导致相当数目的具有升高的信号的蛋白质,但是结果不优于 72°C,尤其在血清样品中。96°C 仅导致少数具有升高的信号的蛋白质。

[0103] 在图 2 中,展现出至少两倍信号强度降低的蛋白质数目相对于热处理温度的图显示了加热的副效应。在这里,显示了 96°C 导致相对较高数目的具有降低的信号蛋白质,尤其在血清样品中。于 96°C,具有降低的信号蛋白质数目在血清样品和血浆样品两者中实际上都高于具有升高的信号的蛋白质数目。将温度从 56°C 提高至 72°C,具有降低的信号蛋白质数目在血清中是升高的,而在血浆中是降低的。

[0104] 加热至 37°C 和 45°C 显示对信号强度没有或仅有次要的影响。

[0105] b) 第二种方法

[0106] 经由 EU 项目 Mo1PAGE 获得来自一名正常患者的血清和血浆样品。

[0107] 选择如下的研究抗体,其靶向不同类的蛋白质诸如已知的血清蛋白质。此研究中总共包括 135 种单特异性抗体 (msAb),其靶向 93 种独特的蛋白质编码基因的产物。单特异性抗体获自 HPA 项目 (www.proteinatlas.org)。作为对照,包括非特异性兔 IgG (Jackson ImmunoResearch) 和 HSA 结合 Affibody (Affibody AB)。因此,对血浆和血清两者调查两个温度的四个时间间隔。将样品稀释、标记、并相应地在测定缓冲液中制备。然后,与于 23°C 的 30 分钟相比,对 56°C 和 72°C 两者选择 5、10、15 和 30 分钟的时间间隔。在各个热处理时间间隔后将所有样品冷却至 23°C,然后与珠混合物组合。对于于 23°C 处理 30 分钟,于 56°C 处理 30 分钟和于 72°C 处理 15 分钟,一式三份分析样品。

[0108] 在图 3 中,与在第一种方法中一样,将展现出至少两倍信号强度升高的蛋白质数目相对于热处理温度绘图。此外,72°C 在血清和血浆两者中都导致最高数目的具有升高的信号的蛋白质。56°C 在血浆中导致相当数目的具有升高的信号的蛋白质,但是结果没有 72°C 那样好。

[0109] 在图 4 中,展现出至少两倍信号强度降低的蛋白质数目相对于热处理温度的图显

示了第二种方法的加热的副效应。将温度从 56°C 提高至 72°C, 对于血清和血浆两者, 具有降低的信号的蛋白质数目较小。这是令人惊讶的, 因为一般认为与热诱导的凝固相比, 蛋白质更易于沉淀。

[0110] 图 5 显示了于 23°C、56°C 和 72°C 热处理后的血清中靶定的 92 种蛋白质之 6 种的检测水平。图 6 显示了血浆中实现的相应结果。使用非标准化的中值荧光强度水平在框图中汇总了数据。在分别于 23°C 处理 30 分钟, 加热至 56°C 达 30 分钟, 及加热至 72°C 达 15 分钟后直接比较来自个别靶蛋白的信号强度。一些蛋白质的信号强度在加热后降低, 而一些其它蛋白质的信号强度升高。然而, 值得注意的是, 对于图的所有蛋白质, 信号在 72°C 处理后比在 56°C 处理后高。实际上, 在第二种方法中检出的所有蛋白质中, 对于一种单一蛋白质, 信号仅在温度从 56°C 提高至 72°C 时是降低的。

[0111] 总之, 加热至范围为约 50°C 至约 85°C 的温度似乎对使用免疫学检测时在血液或血液衍生样品中的蛋白质分析具有有益的影响。72°C 左右的温度范围, 诸如 64-85°C、66-78°C 或 70-74°C 似乎是特别有益的。

[0112] c) 前列腺癌分组

[0113] 自瑞典隆德和马尔默大学医院 (Lund and Malmö University Hospitals, Sweden) 的病理学部获得血浆样品。自经历前列腺特异性抗原 (PSA) 水平常规测试的男性患者, 收集 20 份具有正常 PSA 水平的样品和 20 份具有高 PSA 水平的样品。后一组具有 60-3,000 ng/ml 的 PSA 水平, 其充当前列腺癌的指标, 因此此组称为癌症组。正常组具有小于 1.5 ng/ml 的 PSA 水平。超出规定的 PSA 水平, 不易得到患者信息, 并且已经获得匿名的样品以符合伦理要求。

[0114] 在没有任何先前的疾病偏爱的情况中而仅由于其在 HPA 项目 (www.proteinatlas.org) 内使用的验证方法中的性能来选择研究的抗体。此研究中总共包括 96 种单特异性抗体 (msAb), 其靶向 95 种不同血清蛋白质。另外, 自 Roche (Basel) 和 HyTest (Finland) 获得三种抗 PSA 抗体 (HPX 抗体), 并且作为阳性对照包括在内。以随机化布置分析所有血浆样品, 并经由 log₂ 转化、整数标准化 (integral normalization)、和概率商标准化 (probabilistic quotient normalization) 加工获得的强度值。

[0115] 通过 Student 氏 t 检验及结合要通过火山图显现的相对倍数变化来鉴定在正常与癌症样品间展现出显著不同检测的蛋白质, 如图 7 和图 8 中所显示的。图显示了标准化的荧光强度率 (x 轴) 和相应的假发现率校正的 P 值 (y 轴), 反映了差别检出某些蛋白质如何显著 (the significance of how certain proteins are differentially detected)。每种靶物的 P 值越低, 蛋白质差别存在的概率越高。图内部的水平线分别标示通常使用的 P 值 0.05 和 0.01。

[0116] 在图 7 中, 将样品于 72°C 热处理, 如材料和方法部分中所描述的。发现与正常患者 (低 PSA 水平) 相比, 三种 HPX 抗体在癌症组 (高 PSA 水平) 中以显著更高水平检出 PSA。另外, 两种新的标志物蛋白 HPA0464 ($p < 0.01$) 和 HPA0481 ($p < 0.05$) 在癌症组中似乎受到下调, 并且仅在 72°C 加热后发现。在图 8 中, 样品没有进行热处理, 并且对于这些患者, 抗 PSA 抗体的总体显著性降低。在这里, 发现两种新的蛋白质, 其中在具有诊断为前列腺癌的风险升高的患者中, HPA0006 的目标水平较高, 而 HPA0058 的目标水平较低。因此, 一些蛋白质的免疫可检测性通过加热升高, 而一些其它蛋白质的免疫可检测性在无加热后更好。

[0117] 总之,两种蛋白质(HPA0464 和 HPA0481)在来自患有前列腺癌的受试者的热处理样品中比在来自健康受试者的热处理样品中以更低的程度检出(图 7)。然而,在非热处理样品中没有看到此差异(图 8)。因此,热处理对于在此类分析中将两种蛋白质鉴定为前列腺癌生物标志是必要的。

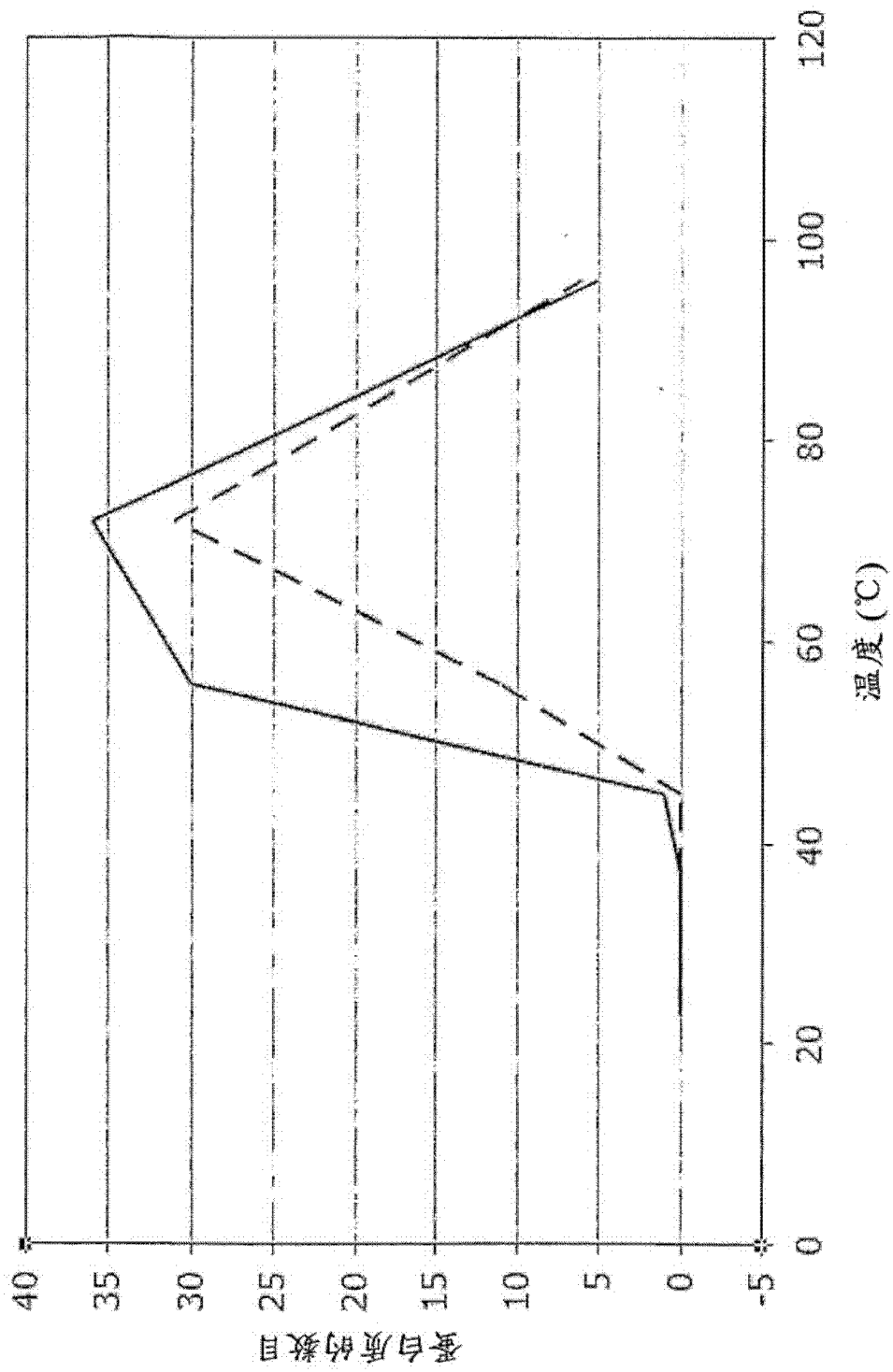


图 1

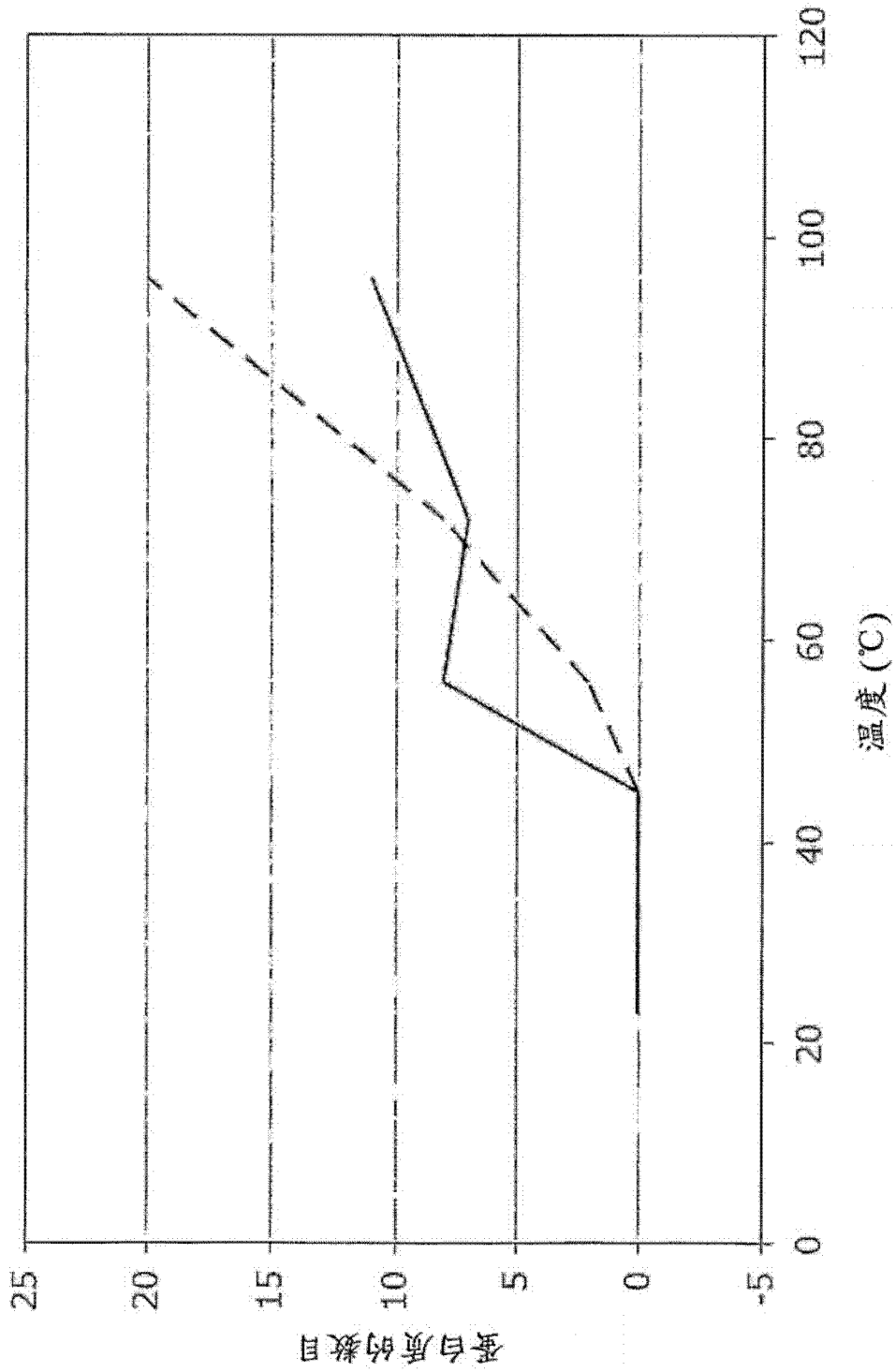


图 2

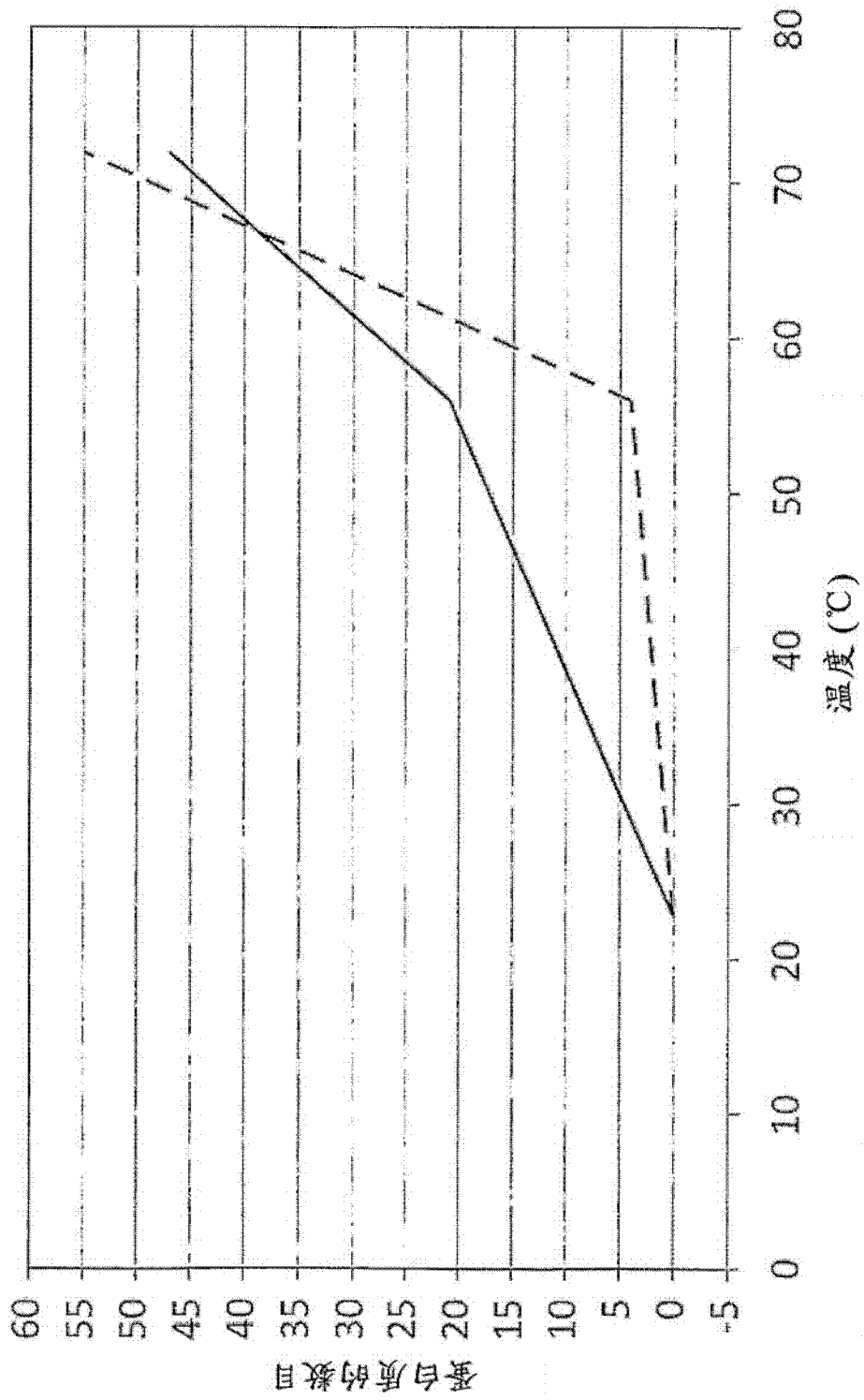


图 3

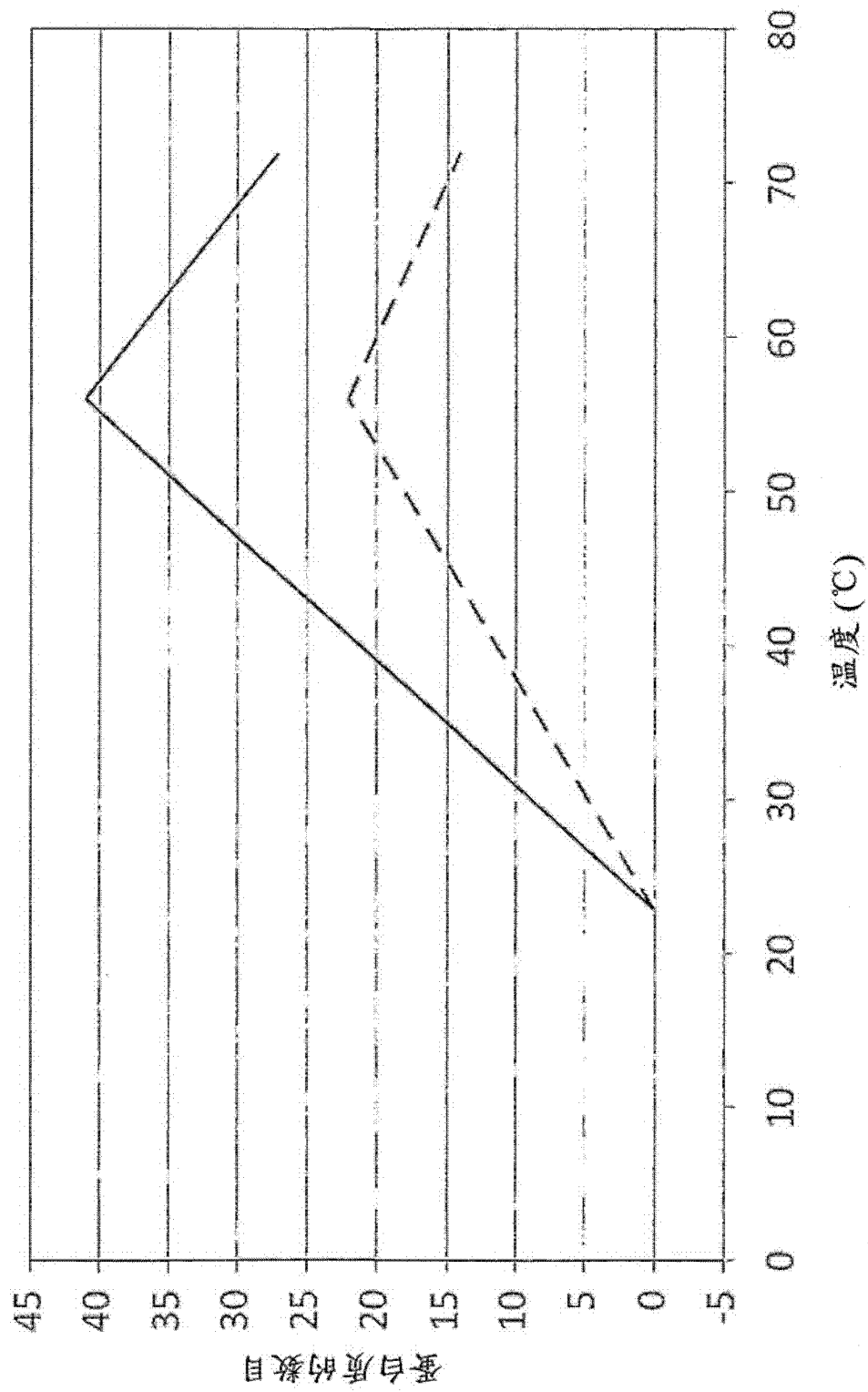


图 4

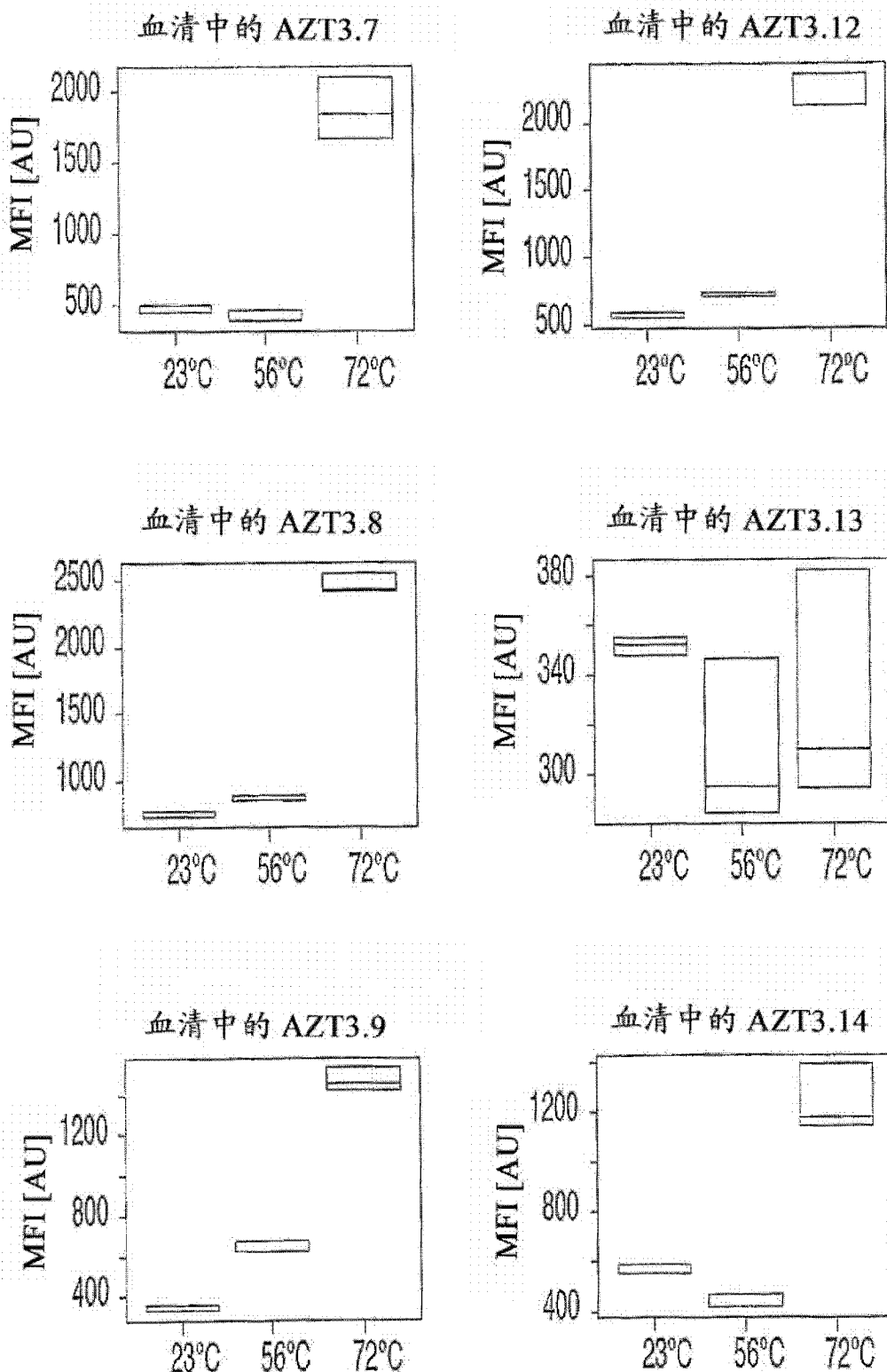


图 5

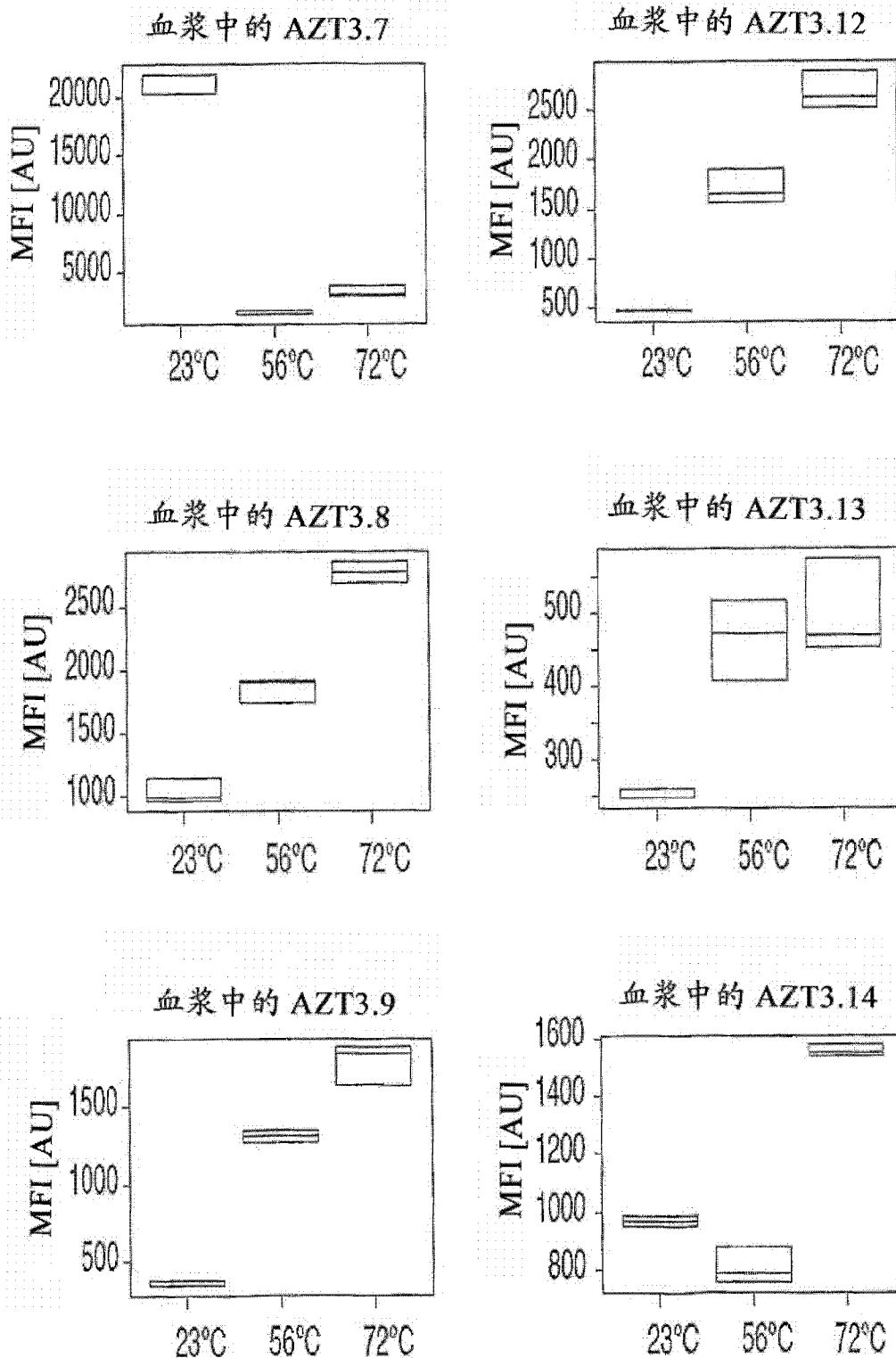


图 6

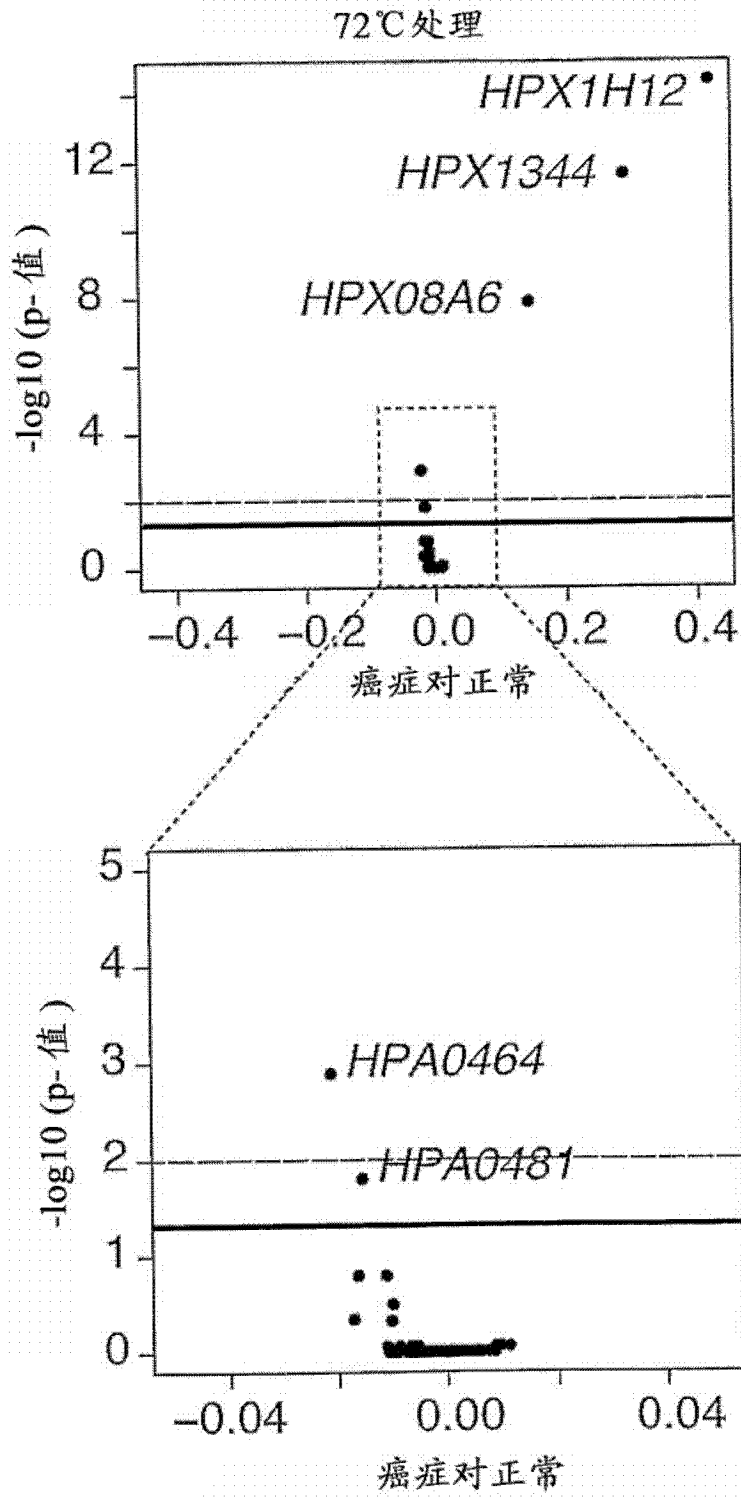


图7

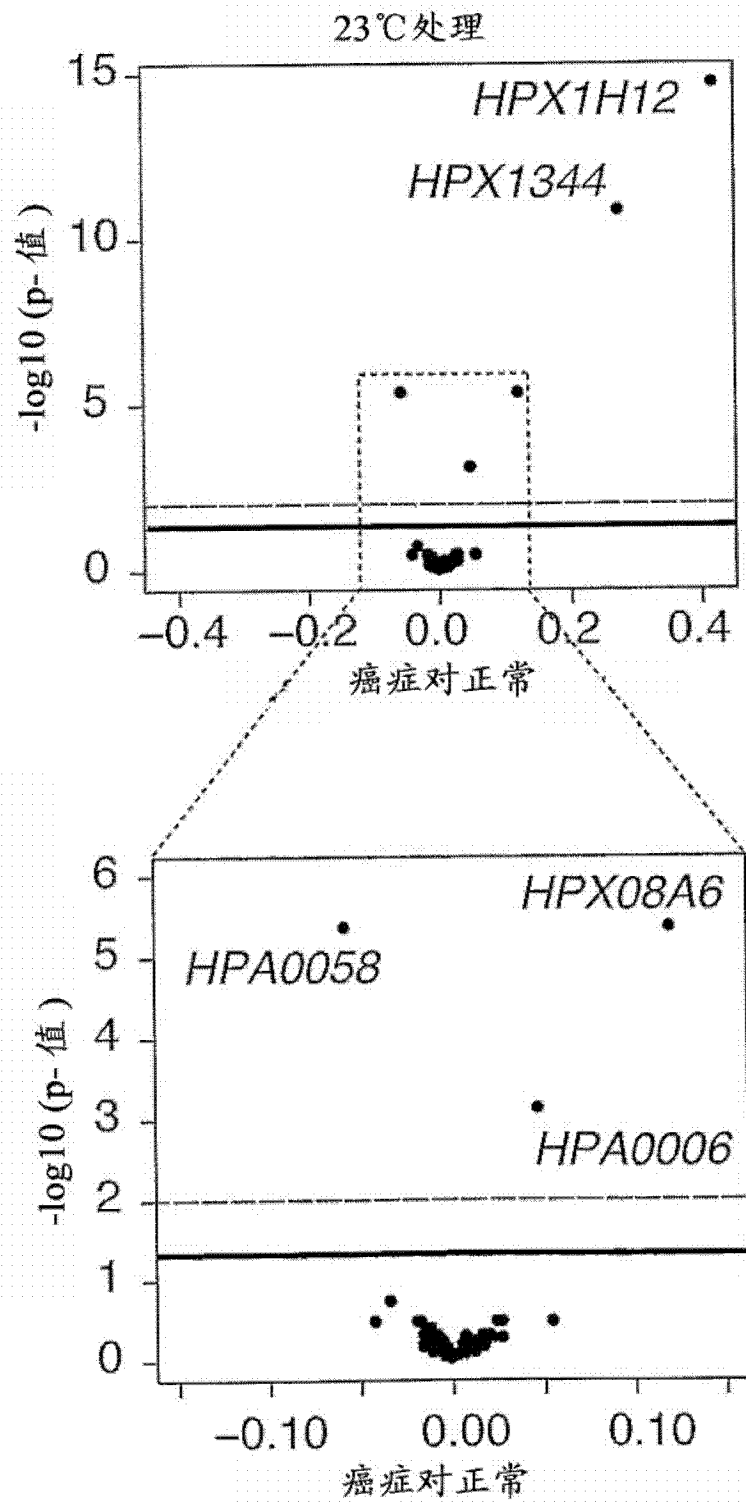


图 8

| | | | |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 免疫可检测性的改善 | | |
| 公开(公告)号 | CN102803964A | 公开(公告)日 | 2012-11-28 |
| 申请号 | CN200980160052.2 | 申请日 | 2009-06-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 阿特拉斯抗体有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 阿特拉斯抗体有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 阿特拉斯抗体有限公司 | | |
| [标]发明人 | M 乌伦 J 施温克 | | |
| 发明人 | M.乌伦 J.施温克 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/537 | | |
| CPC分类号 | G01N33/5375 G01N33/5306 | | |
| 代理人(译) | 张文辉 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

在本公开内容中，提供了一种用于改善至少一种蛋白质在任选稀释的血液、血清或血浆样品中的免疫可检测性的方法，包括将样品加热至64-85°C的温度，之后进行样品与至少一种亲和配体间的接触以检测和/或量化所述至少一种蛋白质的步骤。

