



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104321650 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201380020421. 4

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

(22) 申请日 2013. 03. 21

代理人 余颖

(30) 优先权数据

61/624, 871 2012. 04. 16 US

13/801, 275 2013. 03. 13 US

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 10. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/033346 2013. 03. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/158333 EN 2013. 10. 24

(71) 申请人 生物辐射实验室股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·R·宾德 R·P·沃克

M·L·德兰诺伊

权利要求书3页 说明书15页

(54) 发明名称

类风湿性关节炎和其他自身免疫疾病的多重
免疫试验

(57) 摘要

通过多重试验诊断类风湿性关节炎和其他
自身免疫疾病,所述试验涉及针对一组抗原的抗
体,所述抗原包括环化瓜氨酸化肽和至少五个来
自列表的成员,所述列表包括 BRAF1 506-525、
BRAF2 656-675、瓜氨酸化波形蛋白(蛋白)、环化
波形蛋白 415-433cit、环化波形蛋白 58-77cit3、
环化凝聚素 231-250cit sm1、环化血纤蛋白原 A
556-575cit sm、环化血纤蛋白原 A 616-635cit
sm、环化组蛋白 2A H2A/a1-20cit sm2、环化丝
聚蛋白 48-65cit2v1、BRAF(来自 v raf 鼠肉
瘤病毒癌基因同源物 B1 的催化结构域,氨基酸
416-766)。

1. 一种确定人对象是否患有类风湿性关节炎或所患类风湿性关节炎所属阶段的方法，所述方法包括：

(a) 检测来自所述对象的生物样品中结合一组抗原中抗原的抗体的水平，所述抗原组包括环化瓜氨酸化肽和至少五个选自下组的成员：

(i) BRAF1506-525，

(ii) BRAF2656-675，

(iii) 瓜氨酸化波形蛋白（蛋白），

(iv) 环化波形蛋白 415-433cit，以及

(v) 环化波形蛋白 58-77cit3，

(vi) 环化凝聚素 231-250cit sml，

(vii) 环化血纤蛋白原 A 556-575cit sm，

(viii) 环化血纤蛋白原 A 616-635cit sm，

(ix) 环化组蛋白 2A H2A/a 1-20cit sm2

(x) 环化丝聚蛋白 48-65cit2v1，以及

(xi) BRAF（来自 v raf 鼠肉瘤病毒癌基因同源物 B1 的催化结构域，氨基酸 416-766）

以及

(b) 将检测得到的所述水平与所述对象中类风湿性关节炎的存在、不存在或阶段相关联。

2. 如权利要求 1 所述的方法，所述方法包括使所述生物样品接触所述抗原组。

3. 如权利要求 1 所述的方法，所述方法包括使所述生物样品接触多个肽，所述肽具有环化瓜氨酸化肽和至少五个成员各自的至少一种表位。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中步骤 (a) 包括：

(1) 将所述样品与多个其上固定有所述抗原分子的固体支持物孵育，各所述固体支持物上仅固定有所述抗原组的一种所述抗原分子并且所述固体支持物具有选定的区分参数，使得具有所述抗原组中任一抗原的支持物都能够与具有所述抗原组中其他抗原的支持物区分开来，并在特定条件下进行所述孵育，所述条件促进所述样品中可能存在的所述抗体与固定在所述固体支持物上的所述抗原之间免疫结合；

(2) 从所述样品中回收所述固体支持物；

(3) 将回收得到的所述固体支持物与经标记的抗人抗体的溶液在特定条件下孵育，所述条件促进所述固体支持物上可能存在的所述抗体与所述经标记的抗人抗体结合；

(4) 从所述经标记的抗人抗体的溶液中回收所述固体支持物；以及

(5) 检测从所述经标记的抗人抗体的溶液中回收得到的所述固体支持物上连接的标记，并将检测到的所述标记与所述区分参数相关联以获得分别代表所述样品中各所述抗体水平的值。

5. 如权利要求 4 所述的方法，所述固体支持物是珠，步骤 (1) 包括将所述样品与所述珠的混合物在包含所述珠和所述样品的第一悬浮液中孵育，步骤 (2) 包括从所述第一悬浮液中回收所述珠，步骤 (3) 包括将所述珠在包含所述珠和所述经标记的抗人抗体的溶液的第二悬浮液中孵育，且步骤 (4) 包括从所述第二悬浮液中回收所述珠。

6. 如权利要求 5 所述的方法，所述区分参数可通过流式细胞术区分，且步骤 (5) 包括通

过流式细胞术检测所述标记并分选所述珠。

7. 如权利要求 4 所述的方法,所述经标记的抗人抗体是经标记的抗人 IgG。

8. 如权利要求 4 所述的方法,所述经标记的抗人抗体是经标记的抗人 IgM。

9. 如权利要求 4 所述的方法,所述经标记的抗人抗体是经标记的抗人 IgA。

10. 如权利要求 5 所述的方法,所述珠具有磁力反应性,且步骤 (2) 和 (4) 包括将所述第一和第二悬浮液分别暴露于磁场中以从所述悬浮液中吸引所述珠。

11. 如权利要求 4 所述的方法,所述经标记的抗人抗体是使用荧光标记标记的抗人抗体。

12. 如权利要求 11 所述的方法,所述荧光标记选自:荧光素、荧光素异硫氰酸酯、藻红蛋白、若丹明 B 和磺基若丹明 101 的磺酰氯衍生物。

13. 如权利要求 11 所述的方法,所述荧光标记是藻红蛋白。

14. 如权利要求 5 所述的方法,所述区分参数是珠直径。

15. 如权利要求 5 所述的方法,所述区分参数是荧光光谱的差异。

16. 如权利要求 5 所述的方法,所述区分参数是光散射的差异。

17. 如权利要求 5 所述的方法,所述区分参数是吸光度的差异。

18. 如权利要求 1 所述的方法,所述生物样品选自:血液样品、血浆样品和血清样品。

19. 如权利要求 1 所述的方法,所述对象的环化瓜氨酸化肽测试呈阴性。

20. 一种用于确定人对象是否患有类风湿性关节炎或者所患类风湿性关节炎所属阶段的试剂盒,所述试剂盒包括一组抗原,各抗原固定在固体支持物上,所述抗原组包括环化瓜氨酸化肽和至少一个选自下组的成员:

(i) BRAF1 506-525,

(ii) BRAF2 656-675,

(iii) 瓜氨酸化波形蛋白(蛋白),

(iv) 环化波形蛋白 415-433cit, 以及

(v) 环化波形蛋白 58-77cit3,

(vi) 环化凝聚素 231-250cit sm1,

(vii) 环化血纤蛋白原 A 556-575cit sm,

(viii) 环化血纤蛋白原 A 616-635cit sm,

(ix) 环化组蛋白 2A H2A/a 1-20cit sm2,

(x) 环化丝聚蛋白 48-65cit2v1, 以及

(xi) BRAF(来自 v raf 鼠肉瘤病毒癌基因同源物 B1 的催化结构域,氨基酸 416-766),

所述固体支持物还具有选定的区分参数,从而能够将具有所述抗原组中任一抗原的所述支持物区别于具有所述抗原组中其他抗原的所述支持物。

21. 如权利要求 20 所述的试剂盒,所述抗原组包括至少五个选自所述组中的成员。

22. 如权利要求 20 所述的试剂盒,进一步包括经标记的抗人抗体。

23. 如权利要求 20 所述的试剂盒,所述固体支持物是珠。

24. 如权利要求 20 所述的试剂盒,所述区分参数可通过流式细胞术区分。

25. 如权利要求 23 所述的试剂盒,所述珠具有磁力反应性。

26. 如权利要求 22 所述的试剂盒,所述经标记的抗人抗体是经标记的抗人 IgG。

27. 如权利要求 22 所述的试剂盒,所述经标记的抗人抗体是经标记的抗人 IgM。
28. 如权利要求 22 所述的试剂盒,所述经标记的抗人抗体是经标记的抗人 IgA。
29. 如权利要求 22 所述的试剂盒,所述经标记的抗人抗体是使用荧光标记标记的抗人抗体。
30. 如权利要求 29 所述的试剂盒,所述荧光标记选自:荧光素、荧光素异硫氰酸酯、藻红蛋白、若丹明 B 和磺基若丹明 101 的磺酰氯衍生物。
31. 如权利要求 29 所述的试剂盒,所述荧光标记是藻红蛋白。
32. 如权利要求 20 所述的试剂盒,所述区分参数是珠直径。
33. 如权利要求 20 所述的试剂盒,所述区分参数是荧光光谱的差别。
34. 如权利要求 20 所述的试剂盒,所述区分参数是光散射的差别。
35. 如权利要求 20 所述的试剂盒,所述区分参数是吸光度的差别。

类风湿性关节炎和其他自身免疫疾病的多重免疫试验

[0001] 相关专利申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2012 年 4 月 16 日提交的美国临时专利申请号 61/624, 871 以及 2013 年 3 月 13 日提交的美国专利申请号 13/801, 275 的优先权, 上述文献都通过引用纳入本文以用于所有目的。

[0003] 发明背景

[0004] 1. 技术领域

[0005] 本发明涉及免疫诊断领域, 特别感兴趣的是类风湿性关节炎。

[0006] 2. 现有技术说明

[0007] 类风湿性关节炎是一种常见的自身免疫疾病, 影响全世界 0.5-1% 的人口。该系统性疾病的特征是滑膜关节的慢性炎症, 导致软骨和骨破坏, 并最终导致患者残疾。虽然类风湿性关节炎不是威胁生命的疾病, 但其可严重影响患者的生活质量。类风湿性关节炎的诊断大多基于临床观察, 但诊断中越来越多地使用特异性血清蛋白和血清学测试进行辅助。通常用作这些测试靶标的生物标记物是类风湿因子、抗环化瓜氨酸化肽和 C 反应蛋白。

[0008] 类风湿因子 (RF) 是用于描述一组自身抗体的术语, 所述自身抗体独立称作类风湿因子。RF 测试被认为是对于自身免疫疾病类风湿性关节炎 (RA) 的基本筛选和标志。RF 被认为是早期标记, 原因在于其存在与具有轻度关节炎症状的人中出现 RA 的风险升高相关。类风湿因子包括三个亚组, 其与免疫球蛋白 G (IgG) 的可结晶片段 (Fc 片段) 反应以形成处于关节和组织中的沉淀。

[0009] 类风湿因子存在于患有类风湿性关节炎的患者中, 但也存在于患有其他自身免疫病症的患者中 (如系统性红斑狼疮 (SLE)、干燥综合征以及偶发性硬皮病和多肌炎的患者中)。其也见于类风湿性关节炎重叠综合征中, 如 RA/SLE 重叠和硬皮病/RA 重叠。在其他病症中以及不存在疾病的情况下 (尤其是年龄增长时), RF 测试也可能产生阳性结果。可导致阳性 RF 测试结果的其他病症包括慢性活动性肝炎、结节病、慢性感染、多种癌症和梅毒。

[0010] 针对瓜氨酸化蛋白的自身抗体 (如抗 CCP (环化瓜氨酸化肽) 抗体) 是针对类风湿性关节炎的特异性血清标记。可在约 50-60% 的具有早期类风湿性关节炎的患者中检测到“基线期”的抗 CCP 抗体 (在他们最初遇到专家时, 通常是症状发生后的 3-6 个月)。参见例如, Nell, V., 等, *Arthritis Res. Ther.* 5 (增刊 1):16 (2003)。对于不发展成为 RA 的未分化的关节炎形式, 抗 CCP 的特异性约为 95-98%。IgM RF 通常发现于同一患者中, 但其对 RA 的特异性低得多。使用抗 CCP 试验的一项研究显示, 在关节炎的早期阶段中, 当抗 CCP 和 IgM RF 都是阳性时, 对 RA 具有 55% 的敏感性和 97% 的特异性。参见例如, Jansen, A. L., 等, *J. Rheumatol.* 29:2074-6 (2002)。另一项研究显示, 首次就诊时的普遍程度甚至更高——抗 CCP 抗体发现于 70% 的这类患者中。有趣的是, 使用储存的样品发现, 可在关节炎开始前 1.5 至 9 年时检测到抗 CCP。参见例如, **Rantapää**-Dahlqvist, S., 等, *Arthritis Rheum.* 48:2741-9 (2003)。使用抗 CCP 试验的一项研究发现, 跟踪 3 年后, 抗 CCP 阳性患者中 93% 存在从未分化多关节炎到 RA 的进展, 但在抗 CCP 阴性患者中仅为 25%。参见例如, van Gaalen, F. A., 等, *Arthritis Res. Ther.* 5 (增刊 1):28 (2003)。数项观察表明, 与没有

抗 CCP 的患者相比,早期 RA 患者中的抗 CCP 阳性结果可导致发生更糜烂性的疾病。

发明内容

[0011] 现在已经发现,可使用来自人对象的生物样品分析针对抗原组的抗体,所述抗原组不必然包括类风湿因子或 CCP 或上述两者,从而确定人对象是否患有类风湿性关节炎 (RA) 或者患有类风湿性关节炎的对象中类风湿性关节炎的阶段或上述全部。然而,在许多情况下,所述抗原组可包括 CCP 和选自特定列表的一种、二种、三种、四种或至少五种(例如,5、6、7、8、9、10 种或全部)其他抗原。在本发明的某些实施方式中,所述特定列表是:

[0012] (i) BRAF1 506-525 (SEQ ID NO:1),

[0013] (ii) BRAF2 656-675 (SEQ ID NO:2),

[0014] (iii) 瓜氨酸化波形蛋白(蛋白) (SEQ ID NO:3),

[0015] (iv) 环化波形蛋白 415-433cit (SEQ ID NO:4), 或环化瓜氨酸化变体结合的 RA 自身抗体;

[0016] (v) 环化波形蛋白 58-77cit3 (SEQ ID NO:5), 或环化瓜氨酸化变体结合的 RA 自身抗体;

[0017] (vi) 环化凝聚素 231-250cit sm1 (SEQ ID NO:6), 或环化瓜氨酸化变体结合的 RA 自身抗体;

[0018] (vii) 环化纤维蛋白原 A 556-575cit sm (SEQ ID NO:7), 或环化瓜氨酸化变体结合的 RA 自身抗体;

[0019] (viii) 环化纤维蛋白原 A 616-635cit sm (SEQ ID NO:8), 或环化瓜氨酸化变体结合的 RA 自身抗体;

[0020] (ix) 环化组蛋白 2A H2A/a 1-20cit sm2 (SEQ ID NO:9), 或环化瓜氨酸化变体结合的 RA 自身抗体;

[0021] (x) 环化丝聚蛋白 48-65cit2v1 (SEQ ID NO:10), 或环化瓜氨酸化变体结合的 RA 自身抗体;

[0022] (xi) BRAF(来自 v raf 鼠肉瘤病毒癌基因同源物 B1 的催化结构域,氨基酸 416-766) (SEQ ID NO:11)。

[0023] 在一些实施方式中,所述抗原组中的抗原是上述肽,例如使生物样品接触环化瓜氨酸化肽和至少五种上述肽。

[0024] 或者,在一些实施方式中,使生物样品接触多个肽,所述肽具有各环化瓜氨酸化肽和至少五个成员的至少一种表位。对于另一种方法,应理解所述抗原组可相对于特定列表选择性地包含额外的氨基酸或更少的氨基酸,前提是所述肽包含上述表位。因此,在一些实施方式中,所述抗原还包括一个或多个氨基酸,所述氨基酸对于所述抗原是异源的,即不是来自同一天然产生的蛋白。例如,在一些实施方式中,可将特定的肽连接至接头氨基酸序列或天然条件下不与天然蛋白中抗原相邻的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述抗原可包含来自天然产生的蛋白的一个或多个(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、10 或更多个)其他天然(非异源)氨基酸(例如,包含 BRAF1 500-530 的肽包含特定抗原 BRAF1 506-525)。在其他实施方式中,与上述肽相比,所述抗原可含有较少的氨基酸(少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或更多个),前提是所述肽中保留至少一个靶标特异性抗原。作为一个实施例,可使用 BRAF1

507-525 代替 BRAF1 506-525。

[0025] 多种上文所列抗原（即 iii-x）是瓜氨酸化的（“cit”、“cit3”等），即在天然的精氨酸位置包含一个或多个（例如 2、3、4、5、6、7、8 或更多个）瓜氨酸。如下文“序列”部分所示，可使用瓜氨酸取代多个精氨酸。所述抗原将包含至少一个瓜氨酸但可包含一个以上。

[0026] 此外，多种抗原（iv-x）表示为环化的。通过添加位于天然肽序列中的一对半胱氨酸的方式使肽环化。在一些实施方式中，所述半胱氨酸位于肽的任一末端。该选项如下文 SEQ ID NO:4 中所示，其中“C”位于序列的任一末端。或者，一个或两个半胱氨酸可位于肽的内部（非末端）位置。例如，SEQ ID NO:5 在内部位置处具有全部两个导入的半胱氨酸。在一些实施方式中，所述半胱氨酸可跨越肽序列中的瓜氨酸。在一些实施方式中，一个或两个半胱氨酸可距离瓜氨酸 3、4、5 或 6 个氨基酸。虽然 SEQ ID NO:4-10 中显示了具体设置半胱氨酸以形成环化肽，应理解对于各天然肽序列（天然序列是 SEQ ID NO:4、5、6、7、8、9 或 10 中任意的缺少半胱氨酸的序列），可考虑其他的半胱氨酸对设置，从而使得相同或基本相同的抗原 / 表位中具有不同的环化选择。如上文所使用的那样，这类选择被认为是“环化瓜氨酸化变体结合的 RA 自身抗体”。

[0027] 使用某些组，可确定经测试 CCP（即针对 CCP 的抗体）阴性的对象是否存在类风湿性关节炎或其阶段，因此 CCP 可从所述抗原组中省略。

[0028] 无论所述抗原组的组成如何，通过比较各组成员的结果与该组成员的截止值并使用容易获得的算法评估所有组成员的全部结果以定义给定样品是“阳性”或“阴性”，可将所得结果与对象中类风湿性关节炎的存在、不存在或阶段关联。所述截止值可从代表已知患有类风湿性关节炎的对象或者已知没有类风湿性关节炎的对象或者已知患有类风湿性关节炎且已知类风湿性关节炎阶段的对象的样品中容易地确定。

[0029] 可将样品与抗原组的分子孵育并检测任意抗原分子是否免疫结合至来自样品的抗体，从而做出本发明所述的决定。在该孵育步骤中与样品孵育的抗原分子是抗原的外源性分子，即外部供应的抗原分子，且不是样品中存在的那些分子（如果任何这类分子确实都存在于样品中）。这些外源性分子可以是已生成所检测抗体的对象中的那些分子的相同拷贝，或者它们可以是对象中抗原分子的部分或片段，或者与具有相同特异性和结合亲和性的抗体免疫结合分子。在某些情况下，可确定该孵育步骤中形成结合的特定外源性抗原分子，以及这些抗原分子中多少形成了结合或结合的程度。因此，在本发明的某些实施方式中，样品中存在的抗体经鉴定表示为孵育步骤中与其形成结合的抗原。这类鉴定的一种方法是利用固定在固体支持物上的抗原分子，对各抗原使用不同的固体支持物，即使用在任意单独固体支持物上仅固定一种抗原分子，和使用通过抗原本身以外的方法进行彼此区分的不同抗原的固体支持物。这可以通过使用固体支持物相关的区分参数（differentiation parameter）实现，通过区分参数可区分具有任意一种抗原的所有支持物与具有任意其他抗原的所有支持物。

[0030] 可通过使用经标记的抗人抗体实现对来自样品的抗体和与样品孵育的抗原分子之间免疫结合的检测。通过样品与抗原组中抗原进行孵育形成的抗原-抗体复合物本身可在第二孵育步骤中与经标记的抗体孵育。随后可检测并在需要时定量所述标记。随后可通过上述区分参数，基于经标记的抗体结合的样品中抗体，实现标记的区分，即确定检测的标

记与来自样品的何种抗体相关。因此,将所述检测的标记与所述区分参数关联。在这种情况下,关联指将标记检测与所述标记(通过抗人抗体)结合的来自样品的抗体联系在一起。

[0031] 如果检测到类风湿性关节炎的存在或该疾病的特定阶段,该方法还可包括开处方、提出建议或进行一种或多种医疗治疗,包括但不限于给予一种或多种药物,用于治疗或改善疾病。

[0032] 本发明还涉及一种试剂盒,所述试剂盒用于确定人对象是否患有类风湿性关节炎或用于确定人对象患有的类风湿性关节炎的阶段。所述试剂盒包含至少一种来自上述列表的抗原,并在一些实施方式中包含抗原组,各抗原都固定在固体支持物上。所述抗原组可包括例如任意上述多种抗原(例如,CCP和一种、二种、三种、四种或至少五种(例如,5、6、7、8、9、10种或全部)其他抗原),且所述固体支持物还包含选择的区分参数,从而可通过这些参数区分具有所述抗原组中任何一种抗原的所有支持物与具有所述抗原组中其他抗原的所有支持物。

[0033] 定义

[0034] 本文所用术语“标记”或“可检测部分”指可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它物理手段检测的组合物。标记的示例是 ^{32}P 、荧光染料、高电子密度试剂、酶(例如,ELISA中常用)、生物素、地高辛以及可被检测的半抗原和蛋白或其他实体(例如通过将放射性标记物整合至肽中或用于检测与肽特异性反应的抗体)。所述标记可整合至例如抗体和/或其它蛋白的任何位置。可以采用本领域已知的用于使抗体接合所述标记物的任何方法,例如,使用如下文献中所述的方法:Hermanson, *Bioconjugate Techniques*(《生物结合技术》)1996,学术出版社有限公司(Academic Press, Inc.),圣迭戈。或者,使用高亲和性相互作用的方法可以获得相同的效果,其中一对结合伴侣(binding partner)中的一个能够结合另一个,例如生物素和链霉亲和素。本文所述本发明的蛋白可直接标记有同位素、发色团、发光团、色原体,或者被间接标记,例如通过生物素,该生物素随后可被复合物中的链霉亲和素(包含荧光、放射性或可被直接检测的其他部分)结合。因此,生物素化的抗体被认为是本文使用的“经标记的抗体”。

[0035] 本文所用术语“抗体”指由一个或多个免疫球蛋白基因编码的多肽,或其特异性结合并识别分析物(抗原)的片段。识别的免疫球蛋白轻链被归类为 κ 或 λ 。免疫球蛋白重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,它们进而分别定义免疫球蛋白类型IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

[0036] 免疫球蛋白G(IgG抗体)的结构单元的一个示例是四聚体。各这类四聚体由相同的两对多肽链组成,每对包含一条“轻”链(约25kD)和一条“重”链(约50-70kD)。每条链的N末端确定约100至110个或更多个氨基酸构成的可变区,所述可变区主要负责抗原识别。术语“轻链可变区”(VL)和“重链可变区”(VH)分别指这些轻链和重链。

[0037] 抗体以完整的免疫球蛋白形式或用不同肽酶对完整的免疫球蛋白进行消化产生的具有良好表征的片段形式存在。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区中的二硫键连接附近消化抗体,产生 $\text{F}(\text{ab}')_2$, Fab的二聚体,其本身是由二硫键连接于 $\text{V}_H\text{-C}_{H1}$ 的轻链。可在温和条件下还原 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 二聚体以打断铰链区中的二硫连接,从而将 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 二聚体转化为两个Fab'单体。Fab'单体实质上是具有部分铰链区的Fab(参见Paul编, *Fundamental Immunology*(《基础免疫学》),第三版,雷文出版社(Raven Press),纽约,1993)。虽然根据对完整抗体的消化定义了多种抗体片段,但是本领域技术人员应理解,这类片段也可用化

学方法或重组 DNA 方法从头合成。因此,本文中术语“抗体”也包括通过全抗体修饰或用重组 DNA 方法从头合成所产生的抗体片段,如单链 Fv。

[0038] 涉及蛋白、肽或抗原时,描述与抗体结合的术语“特异性(或选择性)”或“特异性(或选择性)与……发生免疫反应”或“具有对……的结合特异性”指能在蛋白和其它生物物质的异质群体存在的情况下确定是否存在蛋白、肽或抗原的结合反应。因此,在给定的免疫测定条件下,特定的抗体结合样品中的特定蛋白而不以显著量结合样品中存在的其他蛋白。在这样的条件下与抗体的特异性结合可能需要就抗体对特定蛋白的特异性来选出的抗体。例如,可以选择针对某一蛋白产生的抗体以得到不与其他蛋白而与该蛋白发生特异性免疫反应的抗体。可利用各种免疫测定形式来选择与特定蛋白发生特异性免疫反应的抗体。例如,常规使用固相 ELISA 免疫测定、Western 印迹或免疫组化法来选择与某一蛋白发生特异性免疫反应的单克隆抗体。参见, Harlow 和 Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (《抗体,实验室手册》),冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Publications),纽约(1988),来获得关于可用于确定特定免疫反应性的免疫测定形式和条件的描述。通常,特异性或选择性反应会是背景信号或噪音的至少 2 倍,更通常而言是超过背景 10 至 100 倍。

[0039] 用于本发明的某些实施方式的抗体是抗人抗体,尤其是那些标记的抗人抗体。这些抗人抗体中优选针对人 IgG 的那些抗体、针对人 IgM 的那些抗体和针对人 IgA 的那些抗体。

[0040] 术语“生物样品”包括从生物体中得到的多种样品类型。该术语包括体液诸如血液、唾液、血清、血浆、尿液和生物来源的其它液体样品,固体组织样品诸如活检样品或组织培养物或来源于其中的细胞及其子代。如本文所述,通常所述生物样品是包含可检测量抗体的体液或组织。该术语包含获得后经任何方式处理的样品,如试剂处理、溶解、沉降或对某些组分的富集。该术语包括临床样品,也包括细胞培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、其他生物液体和组织样品。优选的生物样品是血液样品、血浆样品和血清样品。

[0041] 本文所用术语“固体支持物”指可固定试剂(如抗体或抗原)的固体惰性表面或主体,所述试剂在本文所述任意结合反应中具有反应活性。本文所用术语“固定”指分子基础的偶联,其在本文所述试验的任意步骤期间、在任意施加的条件下都不会移开或去偶联。这类固定可通过共价键、离子键、亲和型键或任意其他化学键实现。

[0042] 本文所用术语“颗粒”指固体主体,通常任意形状或表面结构的线性尺寸为微米级(即小于 100 微米)。本文中术语“珠”指形状为球形或近球形的颗粒,通常在组合物中多聚化。

[0043] “多重”试验是在单个样品中同时测量超过一种分析物的分析方法。

[0044] 本文所用术语“内源性”指从提取生物样品的人对象以外的来源导入本发明的试验培养基中的分子或试剂。内源性分子或试剂包括与对象体内存在的分子或试剂相同的那些以及不同的那些。

[0045] 所选实施方式详述

[0046] 在本文所述试验中可使用根据上文所列标准选自上述列表的多组抗原,而可通过比较使用所述抗原组获得的结果与使用针对 RA 的常规测试获得的那些结果,并确定这两种结果之间是否存在一致,尤其是本发明的范围中所进行的试验是否具有优越性,从而确

定任意组的有效性。在这种情况下,优越性指假阳性、假阴性或两者的数目下降,因此该试验提供了较好的特异性。可使用本领域技术人员容易理解的多种算法中的任意一种。在多数情况下,技术人员会希望确定算法中使用的各抗原(“标记物”)的截止值,而用于对单个标记物指定截止值的方法的一个示例是研究来自大量健康成年人对象的样品(如 50 人或更多,或者可能是 50 至 500 人),并鉴定第 95 百分点处,或可能第 98 百分点处的该抗原水平,将其作为截止值。随后对来自测试对象(即需要确定其是否患有 RA)的样品进行单独标记物的分析,并使用算法对结果进行分析。所述算法应能确定何种样品是“阳性的”,剩余样品则是“阴性的”。根据这类算法的一个示例,“阳性”样品指符合以下三个标准中任意一个的那些样品:

[0047] 瓜氨酸化波形蛋白标记物的值等于或大于截止值的 10.0 倍。

[0048] (2) 瓜氨酸化波形蛋白以外任意瓜氨酸标记物的值等于或大于该标记物截止值的 5.0 倍。

[0049] (3) CCP 标记物或 BRAF 标记物的值等于或大于该标记物截止值的 2.0 倍。

[0050] (4) CCP 标记物的值等于或大于 CCP 截止值的 0.5 倍且任意其他标记物的值等于或大于截止值的 2.0 倍。

[0051] 可通过比较一组已知样品上本发明的范围内任意标记物组的结果与针对抗 CCP 的基于 ELISA 试验获得的结果(例如在同组样品上),确定在本发明范围内使用标记物组的有效性和改善(如需要)。最理想的标记物组是假阴性数目比针对抗 CCP 的基于 ELISA 试验所获得的结果少至少 5% 的那些,或者可能少至少 10%,且可能进一步少至少 10%。按绝对值计,本发明的范围内最理想组中的假阴性数目优选为 30% 或更少,更优选为 20% 或更少,且最优选为 10% 或更少。

[0052] 在涉及使用经标记的抗人抗体检测抗原-抗体结合的本发明实施方式中,所述标记可以是直接或间接发射或生成可检测信号的任何物质或组分。在一些实施方式中,所述标记是荧光团,其中许多在文献中报道并因此为本领域技术人员已知,并且其多数易于从生物技术工业的市场供应商处购得。荧光团的文献来源包括 Cardullo 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8790-8794(1988); Dexter, D. L., J. of Chemical Physics 21:836-850(1953); Hochstrasser 等, Biophysical Chemistry 45:133-141(1992); Selvin, P., Methods in Enzymology 246:300-334(1995); Steinberg, I. Ann. Rev. Biochem., 40:83-114(1971); Stryer, L. Ann. Rev. Biochem., 47:819-846(1978); Wang 等, Tetrahedron Letters 31:6493-6496(1990); 以及 Wang 等, Anal. Chem. 67:1197-1203(1995)。

[0053] 以下是可用作标记的荧光团示例:

[0054] 4-乙酰胺基-4'-异硫氰酸根合芪-2,2'二磺酸

[0055] 吡啶

[0056] 吡啶异硫氰酸酯

[0057] 5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)

[0058] 4-氨基-N-[3-乙烯基磺酰基]苯基]萘酰亚胺-3,5二磺酸酯

[0059] N-(4-苯胺基-1-萘基)马来酰亚胺

[0060] 邻氨基苯甲酰胺(anthranilamide)

- [0061] BODIPY
- [0062] 亮黄 (Brilliant Yellow)
- [0063] 香豆素
- [0064] 7-氨基-4-甲基香豆素 (AMC, 香豆素 120)
- [0065] 7-氨基-4-三氟甲基香豆素 (香豆素 151)
- [0066] 花青染料
- [0067] 四氯四溴荧光素 (cyanosine)
- [0068] 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI)
- [0069] 5',5"-二溴连苯三酚-磺酞 (溴邻苯三酚红)
- [0070] 7-二乙基氨基-3-(4'-异硫氰酸根合苯基)-4-甲基香豆素
- [0071] 二亚乙基三胺五乙酸酯
- [0072] 4,4'-二异硫氰酸根合二氢-芪-2,2'-二磺酸
- [0073] 4,4'-二异硫氰酸根合芪-2,2'-二磺酸
- [0074] 5-[二甲基氨基]萘-1-磺酰氯 (DNS, 丹酰氯)
- [0075] 4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮)苯甲酸 (DABCYL)
- [0076] 4-二甲基氨基苯基偶氮苯基-4'-异硫氰酸酯 (DABITC)
- [0077] 曙红
- [0078] 曙红异硫氰酸酯
- [0079] 赤藓红 B
- [0080] 赤藓红异硫氰酸酯
- [0081] 溴乙非啶 (ethidium)
- [0082] 5-羧基荧光素 (FAM)
- [0083] 5-(4,6-二氯三嗪-2-基)氨基荧光素 (DTAF)
- [0084] 2',7'-二甲氧基-4'5'-二氯-6-羧基荧光素 (JOE)
- [0085] 荧光素
- [0086] 荧光素异硫氰酸酯
- [0087] 荧光胺
- [0088] IR144
- [0089] IR1446
- [0090] 孔雀石绿异硫氰酸酯
- [0091] 4-甲基伞形酮
- [0092] 邻甲酚酞
- [0093] 硝基酪氨酸
- [0094] 副品红
- [0095] 酚红
- [0096] 藻红蛋白 (包括但不限于 B 型和 R 型)
- [0097] 邻苯二甲醛
- [0098] 芪
- [0099] 丁酸芪

- [0100] 琥珀酰亚胺基 1- 丁酸苈
- [0101] 量子点
- [0102] 活性红 4(Cibacron 亮红 3B-A)
- [0103] 6- 羧基 -X- 若丹明 (ROX)
- [0104] 6- 羧基若丹明 (R6G)
- [0105] 丽丝胺若丹明 B 磺酰氯
- [0106] 若丹明 B
- [0107] 若丹明 123
- [0108] 若丹明 X 异硫氰酸酯
- [0109] 磺基若丹明 B
- [0110] 磺基若丹明 101
- [0111] 磺基若丹明 101 的磺酰氯衍生物 (德州红)
- [0112] N, N, N', N' - 四甲基 -6- 羧基若丹明 (TAMRA)
- [0113] 四甲基若丹明
- [0114] 四甲基若丹明异硫氰酸酯 (TRITC)
- [0115] 核黄素
- [0116] 玫红酸
- [0117] 镧系螯合衍生物

[0118] 用于免疫试验的优选的一组荧光团是荧光素、荧光素异硫氰酸酯、藻红蛋白、若丹明 B 和德州红 (磺基若丹明 101 的磺酰氯衍生物)。特别优选藻红蛋白。本段前列表中的任意荧光团都可使用荧光团和抗体上的适当功能基团、通过常规的共价结合连接至抗人抗体。对此类基团的识别以及形成所述连接的反应对于本领域技术人员是显而易见的。

[0119] 可用于代替荧光团的其他标记是放射性标记和酶标记。这些方法为本领域熟知。

[0120] 免疫结合发生的确定由本发明的某些实施方式中的一个或多个步骤组成,且这可涉及从未结合的抗原或抗体中分离或回收抗原-抗体复合物。一种实现这类分离或回收的方法是使用固体支持物,尤其是对第一免疫结合反应中与生物样品孵育的抗原使用。

[0121] 本发明中可使用任何类型的固体支持物。所述固体支持物可以是试验容器的壁或底面、或者插入试验容器中的浸渍条或其他器具、或者置于试验容器内部或悬浮于试验容器中的颗粒。在许多实施方式中颗粒 (尤其是珠) 特别有用,包括微观尺寸 (即微粒) 和由聚合物材料形成的珠。用作微粒的聚合物是相对于生物样品的组分和固定在微粒表面的结合成员以外的试验试剂具有化学惰性的那些。优选的微粒材料 (尤其当试验中使用荧光标记时) 是具有最低自荧光的那些,在样品以及试验中使用的任何缓冲液、溶剂、载剂、稀释剂或悬浮剂中是固体且不溶,此外还可固定试验试剂。合适的聚合物的示例是聚苯乙烯、聚酯、聚醚、聚烯烃、聚环氧烷、聚酰胺、聚氨酯、多糖、纤维素和聚异戊二烯。在许多聚合物中交联用于赋予微粒结构完整性和刚性。微粒的尺寸范围可以变化。在一些实施方式中,微粒的直径范围是约 0.3 微米至约 100 微米,在另一些实施方式中为约 0.5 微米至约 40 微米,在又一些实施方式中为约 2 微米至约 10 微米。

[0122] 可通过使用由磁性反应材料 (即任何对磁场反应的材料) 构成或包含磁性反应材料的颗粒以方便颗粒的回收和清洗。随后,在颗粒和样品孵育的反应容器上施加磁场,使得

颗粒粘附于容器壁上并通过倾泻或吸除除去液体,从而实现孵育后或清洗步骤后固相与液相的分离。本发明中感兴趣的磁性反应材料包括顺磁性材料、铁磁性材料、亚铁磁性材料和变磁性材料。示例包括例如铁、镍和钴,以及金属氧化物,如 Fe_3O_4 、 $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ 、 CoO 、 NiO 、 Mn_2O_3 、 Cr_2O_3 和 CoMnP 。

[0123] 作为试验一部分的施加和移除磁场的方法和仪器是本领域技术人员熟知的且已在文献中报道。文献报道的示例是 Forrest 等,美国专利号 4,141,687(泰克尼康仪器公司(Technicon Instruments Corporation),1979年2月27日);Ithakissios,美国专利号 4,115,534(3M 公司(Minnesota Mining and Manufacturing Company),1978年9月19日);Vlieger, A. M., 等, *Analytical Biochemistry* 205:1-7(1992);Dudley, *Journal of Clinical Immunoassay* 14:77-82(1991);以及 Smart, *Journal of Clinical Immunoassay* 15:246-251(1992)。

[0124] 磁性反应材料可分散在聚合物中,作为聚合物表面上的涂层或作为表面上的两种或多种涂层之一施用,或者以能够将材料固定于颗粒的任意其他方式整合或附连。颗粒中磁性反应材料的含量不是关键,且可在较宽范围内变动。然而,含量会影响微粒的密度,含量和微粒尺寸都可以影响将微粒保持在悬浮状态的容易程度,该悬浮状态能够使液相和固相间达到最大接触并方便流式细胞术的进行。微粒中过量的磁性反应材料会产生足够高水平从而干扰试验结果的自荧光。因此,在一些实施方式中,磁性反应材料的浓度足够低以最小化材料发出的任何自荧光。基于这些考虑,根据本发明,颗粒中的磁性反应材料是例如重量百分比为约 0.05% 至约 75% (相对于颗粒整体)。在一些实施方式中,重量百分比范围是约 1% 至约 50%,例如约 2% 至约 25%,例如约 2% 至约 8%。

[0125] 使用合适的试验试剂包被颗粒表面可通过静电吸引、特异的亲和相互作用、疏水相互作用或共价键连接实现。可通过常规方法使用用于试验试剂共价连接的功能基团对聚合物进行衍生化,特别是通过使用含有功能基团的单体,如作为唯一单体或共聚单体的单体。合适的功能基团的示例是氨基 ($-\text{NH}_2$)、铵基 ($-\text{NH}_3^+$ 或 $-\text{NR}_3^+$)、羟基 ($-\text{OH}$)、羧酸基团 ($-\text{COOH}$) 和异氰酸酯基 ($-\text{NCO}$)。用于将羧酸基团导入聚烯烃的有用的单体是例如丙烯酸和甲基丙烯酸。

[0126] 连接基团可用作增加颗粒表面反应基团密度的方法,也可用作减少空间位阻的方法。连接基团也可用作将涂层材料固定至颗粒表面的方法。某些连接基团是包含一个反应基团的单官能接头,以及包含两个或多个反应基团的多官能交联剂,能够与两个或多个不同的功能性靶标(例如肽、蛋白、大分子、半导体纳米晶体或底物)形成键。在一些实施方式中,所述多官能交联剂是包含两个不同反应基团的异双官能交联剂。合适的反应基团的示例是硫醇基 ($-\text{SH}$)、羧酸酯 ($-\text{COOR}$)、羧基 ($-\text{COOH}$)、羰基 ($-\text{C}(\text{O})-$)、胺 (NH_2)、羟基 ($-\text{OH}$)、醛基 ($-\text{CHO}$)、羟基 ($-\text{OH}$)、活性氢、酯、磷酸盐/酯 ($-\text{PO}_3$) 和光敏部分。胺活性基团的示例是异硫氰酸酯、异氰酸酯、酰基叠氮、NHS 酯、磺酰氯、醛和乙二醛、环氧化物和环氧乙烷、碳酸盐/酯、芳基化剂、亚氨酸酯、碳二亚胺和酸酐。硫醇反应基团的示例是卤化乙酰和烷基卤衍生物、马来酰亚胺、氮丙啶、丙烯酰基衍生物、芳基化剂和硫醇-二硫化物交换试剂。羧酸酯反应基团的示例是重氮烷和重氮乙酰基化合物,如羰基二咪唑和碳二亚胺。羟基反应基团的示例是环氧化物和环氧乙烷、羰基二咪唑、高碘酸盐氧化、 N, N' -二琥珀酰亚胺基碳酸酯或 N -羟基琥珀酰亚胺氯甲酸酯、酶促氧化、烷基卤素和异氰酸酯。醛和酮反应基团的示例是用

于席夫碱形成或还原胺化的胍衍生物。活性氢反应基团的示例是用于曼尼希 (Mannich) 缩合和碘化反应的重氮衍生物。光敏基团的示例是芳基叠氮化物和卤代芳基叠氮化物、二苯甲酮、重氮化合物和双吡丙啶 (diazirine) 衍生物。

[0127] 本发明实践中有用的其他合适的反应基团和反应类型通常是生物共轭化学领域公知的那些。目前优选的使用反应螯合物的反应类型是在相对温和条件下进行的那些反应。这些包括但不限于亲核取代 (例如胺和醇与酰基卤、活性酯反应)、亲电取代 (例如烯胺反应) 以及碳-碳和碳-杂原子多键的加成反应 (例如迈克尔反应、狄尔斯-阿尔德加成 (Diels-Alder addition))。这些和其他有用的反应可参见例如 March, *Advanced Organic Chemistry* (《高级有机化学》), 第三版, 约翰威力和桑斯公司 (John Wiley & Sons), 纽约, 1985; Hermanson, *Bioconjugate Techniques* (《生物共轭技术》), 学术出版社 (Academic Press), 圣地亚哥, 1996; 以及 Feeney 等, *Modification Of Proteins* (《蛋白质修饰》); *Advances in Chemistry Series* (《化学进展系列》), 第 198 卷, 美国化学协会 (American Chemical Society), 华盛顿特区, 1982。

[0128] 在一些实施方式中, 所述官能基团是包含两个不同反应基团的异双官能交联剂, 所述反应基团含有能够与肽和蛋白相互作用的杂环。例如, 异双官能交联剂 (如 N-[γ -马来酰亚胺基丁酰氧基]琥珀酰亚胺酯 (GMBS) 或 4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯 (SMCC)) 包含能够与肽或蛋白中的氨基或硫醇基团相互作用的胺反应基团和硫醇反应基团。适用于异双官能交联剂的其他反应基团组合包括, 例如, 羰基和巯基反应基团; 胺和光敏基团; 巯基和光敏基团; 羰基和光敏基团; 羧酸酯和光敏基团; 以及精氨酸和光敏基团。合适的连接基团的示例是聚赖氨酸、聚天冬氨酸、聚谷氨酸和聚精氨酸。可使用 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、CMC1-环己基-3-(2-吗啉基乙基) 碳二亚胺 (CMC)、N-羟基苯并三唑 (HOBt) 和 / 或其他交联剂。

[0129] 来自多种起始单体的常规乳化聚合技术形成的颗粒在许多情况下都适用, 因为其具有最低水平的自荧光。相反地, 经修饰增加孔隙从而增加其表面积的颗粒 (即在文献中称作“多孔”颗粒的那些) 倾向于发出高水平的自荧光, 通常是不理想的。自荧光随着尺寸和二乙烯基苯单体含量的增加而增加。

[0130] 可利用上文所述区分参数使用固体支持物进行多重化, 即对给定组内的所有抗体和所有抗原同时进行试验。

[0131] 区分参数的一个示例是颗粒直径, 其中固体支持物是被分入具有非重叠直径子范围的组中的颗粒。在这些实施方式中, 对直径子范围的宽度和相邻子范围平均直径之间间隔进行了选择, 从而能够通过流式细胞术区分子范围, 且这类选择对于熟知流式细胞术的使用和仪器的技术人员而言是显而易见的。在该说明书中, 术语“平均直径”指数字平均直径。在一些实施方式中, 子范围宽度是平均直径的约 $\pm 5\%$ CV 或更小, 其中“CV”代表“变异系数”并定义为颗粒直径的标准偏差除以平均颗粒直径再乘以 100%。多个子范围中平均直径之间的最小间隔可根据微粒尺寸分布、通过尺寸区分微粒用于附连不同试验试剂的难易程度以及流式细胞术设备的类型和灵敏度而变化。在一些实施方式中, 当不同子范围的平均直径间隔其中一个子范围的平均直径的至少约 6% 时, 例如其中一个子范围的平均直径的至少约 8% 时, 例如其中一个子范围的平均直径的至少约 10% 时, 会获得最佳结果。在一些实施方式中, 各子范围中颗粒直径的标准偏差小于相邻子范围的平均直径间隔的三

分之一。

[0132] 可用于区分不同颗粒组的区分参数的另一个示例是荧光。通过将一种或多种荧光材料整合至颗粒中,荧光材料具有不同荧光发射光谱并在此基础上进行区分,从而实现通过荧光进行区分。可通过使用具有不同荧光强度或以不同波长发射荧光的荧光材料,或通过改变整合的荧光材料的含量来实现区分。还可通过使用针对各颗粒亚组的荧光团的组合实现通过荧光团进行区分。例如,可制备颗粒使其含有红色荧光物(如 Cy5)以及远红荧光物(如 Cy5.5),对于不同的亚组采用不同的相对含量。可使用其他荧光物进一步扩展该系统。因此,各微粒可含有波长各异的多种荧光染料。

[0133] 通过使用不同波长下的荧光发射,波长的差异可用于颗粒组之间彼此的区分,还同时区分了经标记的抗人抗体中的标记与区分各颗粒组的标记。可用作区分颗粒组的方法的荧光底物的一个示例是荧光素,并且可用于试验检测的底物的一个示例是藻红蛋白。在该示例的使用中,可使用不同浓度的荧光素对不同颗粒组进行染色以区分彼此,而藻红蛋白被用作该试验中使用的多种经标记结合成员上的标记。

[0134] 可用于区分多个颗粒组的区分参数的另一个示例是光散射。侧角光散射根据颗粒尺寸、粒度、吸光度和表面粗糙度的变化而变化,而前角光散射主要受尺寸和折射率的影响。这些特性中任一项的改变都会导致光散射差异,所述光散射差异可用作区分多个组的方法。

[0135] 区分参数的又一个示例是吸光度。对颗粒施加光时,颗粒对光的吸收主要由侧向(侧角)散射光的强度变化显示,而正向散射光的强度相对不受影响。因此,颗粒相关的多个有色染料之间的吸光度差异是通过观察侧向散射光强度的差异确定的。

[0136] 区分参数的又一个示例是各组中的颗粒数目。当各组中的颗粒数目以已知方式变化时,可通过具有各反应的颗粒数目将具有多个试验反应的颗粒计数与特定试验相关联。

[0137] 如上述示例所示,可将广泛的参数或特征用作区分参数以区分一组的颗粒和另一组的颗粒。区分参数可来自颗粒尺寸、来自颗粒组成、来自影响光散射的颗粒物理特征、来自将不同发射光谱和/或散射特征赋予颗粒的可激发荧光染料或有色染料,或者来自不同浓度的一种或多种荧光染料。当可区分的颗粒参数是荧光染料或颜色时,可将其包被于颗粒表面上,包埋在颗粒内或者连接至颗粒材料的分子。因此,可通过将聚合物材料与荧光染料混合、或通过使用染料浸渍颗粒来制造荧光颗粒。已整合有染料并因此适于在本发明中使用的颗粒是市售可得的,可购自供应商,如斯菲罗公司(Spherotech, Inc., 利伯蒂维尔,伊利诺伊州,美国)和分子探针有限公司(Molecular Probes, Inc., 尤金,俄勒冈州,美国)。

[0138] 使用颗粒(尤其是微粒)时,使用流式细胞术是一种通过区分参数分选颗粒的简便方法,并在多种情况下确定标记是否已通过试验组分连接至颗粒,作为试验反应的结果。

[0139] 流式细胞术的方法和仪器是本领域已知的,且可用于本发明的实践中。通常,流式细胞术涉及颗粒(或细胞)以流动的方式通过光束并偶联至电光传感器,通过方式为一次仅有一个颗粒能够通过传感器的区域。当各颗粒通过该区域时,由于颗粒的存在,光束被扰乱,检测到产生的散射光和荧光。仪器使用光信号鉴定各颗粒属于哪个亚组,连同标记的存在和量,从而可实现单独的试验结果。用于流式细胞术的仪器和方法的描述可在文献中找到。示例是 McHugh, "Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and

Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes(用于多个可溶性分析物的定量和同时检测的流式微球免疫试验)”, Methods in Cell Biology 42(《细胞生物学方法42》), B部分, (学术出版社(Academic Press), 1994); McHugh等, “Microsphere-Based Fluorescence Immunoassays Using Flow Cytometry Instrumentation(使用流式细胞术仪器的基于微球的荧光免疫试验)”, Clinical Flow Cytometry(《临床流式细胞术》), Bauer, K. D., 等编(巴尔的摩, 马里兰州, 美国: 威廉姆斯和威廉姆斯公司(Williams and Williams), 1993), 第535-544页; Lindmo等, “Immunometric Assay Using Mixtures of Two Particle Types of Different Affinity(使用不同亲和性的两种颗粒混合物的免疫试验)”, J. Immunol. Meth. 126:183-189(1990); McHugh, “Flow Cytometry and the Application of Microsphere-Based Fluorescence Immunoassays(流式细胞术和基于微球的荧光免疫试验的应用)”, Immunochemica 5:116(1991); Horan等, “Fluid Phase Particle Fluorescence Analysis: Rheumatoid Factor Specificity Evaluated by Laser Flow Cytometry(流相颗粒荧光分析: 激光流式光度术评估的类风湿因子特异性)”, Immunoassays in the Clinical Laboratory(《临床实验室中的免疫试验》), 185-189(利斯公司(Liss)1979); Wilson等, “A New Microsphere-Based Immunofluorescence Assay Using Flow Cytometry(一种新的使用流式细胞术的基于微球的免疫荧光试验)”, J. Immunol. Meth. 107:225-230(1988); Fulwyler等, “Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes(用于多种可溶性分析物的定量和同时检测的流式微球免疫试验)”, Meth. Cell Biol. 33:613-629(1990); 库尔特电子公司(Coulter Electronics Inc.), 英国专利号 1,561,042(1980年2月13日公开); 以及 Steinkamp等, Review of Scientific Instruments 44(9):1301-1310(1973)。

[0140] 本发明的方法以及含有用于实践该方法的材料的本发明的试剂盒能够同时检测并可选地定量生物样品中的多个抗体。这些抗体或这些抗体的亚组的存在是相关的, 可以作为提取样品的对象中类风湿性关节炎以及其他自身免疫疾病存在、不存在或其阶段的指示。在一些实施方式中, 对样品中多种抗体的一部分或全部的检测和/或定量被用于提供预后或评估药物(例如抗关节炎药物)治疗的有效性。诊断、预后或评估药物有效性可通过例如将样品中某些抗体的量与健康个体、患病个体或上述两者相关的已知量相关联来实现。

[0141] 实施例 1

[0142] 该实施例显示了本发明的一项在一组 389 份样品上进行的试验, 所述样品来自在该研究前 6 个月内已经首次诊断为类风湿性关节炎(RA)的成年人对象, 以确定试验的灵敏度。通过在正常的一组 168 份样品(即来自未出现 RA 症状的个体的样品)中进行相同试验的方式设立截止值。使用标准的 LUMINEX® 珠-珠试验技术(路明克斯公司(Luminex Corporation), 奥斯汀, 德克萨斯州, 美国)进行研究, 涉及将血清样品与连接有抗原的珠孵育, 对各组血清自身抗体有特异性的抗体与各组标记孵育, 随后将珠与藻红蛋白标记的抗人 IgG 孵育以检测结合的抗体。使用了 9 种标记物: CCP、瓜氨酸化波形蛋白(重组)、环化波形蛋白 58-77cit3、环化波形蛋白 415-433cit、环化波形蛋白 58-77cit3sm1、BRAF1 506-525、BRAF2 656-675、环化组蛋白 2A/a 1-20cit 小-2 以及环化血纤蛋白原 A(616-635)

cit3 小。所有数据均以相对荧光单位 (RFI) 的形式报道。3 个“正常”样品显示了 RA 的存在并从截止值确定中排除。使用来自剩余的 165 份正常样品的结果,选择各标记物的 98 百分位作为该标记的截止值。

[0143] 通过以下算法完成数据的分选:

[0144] 对于瓜氨酸化波形蛋白标记物,如果任意测试样品的值等于或大于截止值的 10.0 倍,则结果为“阳性”。

[0145] 所有测试样品(即来自 389 份样品组)中,对于瓜氨酸化波形蛋白以外的瓜氨酸标记物,等于或大于该标记截止值 5.0 倍的结果为“阳性”。

[0146] 在所有测试样品中,CCP 或 BRAF 标记物值等于或大于该标记截止值 2.0 倍的结果为“阳性”。

[0147] 在所有测试样品中,CCP 值等于或大于 CCP 截止值的 0.5 倍且任意其他标记物的值等于或大于截止值的 2.0 倍为“阳性”。

[0148] 根据该算法,389 份测试样品中的 254 份为“阳性”,表明该试验的灵敏度为 65.3%。为进行比较,使用伯乐实验室公司(Bio-Rad Laboratories, Inc., 赫尔克里斯,加利福尼亚州,美国)的 BIOPLEX™200 系统对相同的 389 份测试样品进行了抗 CCP 的测试。BIOPLEX™200 测试仅测得 226 份阳性样品(58.1%)。

[0149] 实施例 2

[0150] 该实施例显示了本发明的一项试验,该试验在来自 323 名成年人对象的血清样品上进行,各对象都接受了 RA 的临床诊断,并使用根据 106 名正常患者(未显示 RA 症状)的样品所确立的截止值分析试验结果。使用与实施例 1 相同的 LUMINEX® 珠-珠试验技术进行所有确定。使用了 9 种标记:CCP、瓜氨酸化波形蛋白(重组)、环化波形蛋白 58-77cit3、环化波形蛋白 415-433cit、环化波形蛋白 58-77cit3sm1、BRAF1 506-525、BRAF2 656-675、环化组蛋白 2A/a 1-20cit 小-2 以及环化血纤蛋白原 A(616-635) cit3 小。使用与实施例 1 相同的算法分析结果。根据商品化 ELISA 试剂盒(DIASTAT™, 轴盾诊断公司(Axis-Shield Diagnostics plc), 敦提, 苏格兰)对来自诊断患有 RA 对象的 323 份测试样品单独测试了抗 CCP。323 份测试样品的 DIASTAT ELISA 测试显示 241 份为阳性且 82 份为阴性。经 DIASTAT ELISA 测试显示为阳性的所有 241 份测试样品在本发明的测试中也为阳性。经 DIASTAT ELISA 测试显示为阴性的 82 份测试样品中,12 份(或 15%)在本发明的测试中为阳性,因此 DIASTAT ELISA 测试的灵敏度为 78.3%对比 74.6%。

[0151] 为总结实施例 1 和 2,两项实施例中本发明的测试方法都产生较少的假阴性——在实施例中少 12%而在实施例 2 中少 15%。在两者情况下,使用本发明的测试方法所获得的假阳性数目都少于 2%。

[0152] 在所附的权利要求书中,术语“一个”或“一种”是用来表示“一个(种)或多个(种)”。在述及步骤或要素时,其前导术语“包含”及其变化形式例如“包括”和“含有”旨在表示其它步骤或要素的增加是可任选且不被排除的。本说明书中引用的所有专利、专利申请和其它公开的参考材料都通过引用全文纳入本文中。当本说明书的内容与本发明引用的任何参考材料或任何现有技术之间存在矛盾之处的时候,以本说明书为准。所述矛盾之处包括现有技术对词或词组的定义与本说明书对相同的词或词组明确给出的定义之间的差异。

- [0153] 序列
- [0154] (i) BRAF1 506-525 (SEQ ID NO:1)
- [0155] RKTRHVNILLFMGYSTKPQL
- [0156] (ii) BRAF2 656-675 (SEQ ID NO:2)
- [0157] YSNINNRDQIIFMVGRGYLS
- [0158] (iii) 瓜氨酸化波形蛋白 (蛋白) (SEQ ID NO:3)
- [0159] MSTRSVSSSSYRRMFGGPGTASRPSSSRSYVTTSTRTYSLGSALRPSTSRSLYASSPGGVYATRSSAV
RLRSSVPGVRLQLQDSVDFSLADAINTEFKNTRTNEKVELQELNDRFANYIDKVRFLQEQNKILLAELEQLKGGKGS
RLGDLYEEMRELRQVDQLTNDKARVEVERDNLAEIMRLREKLQEMLQREEAENTLQSFQRQVDNASLARLD
LERKVESLQEEIAFLKKLHEEEIQELQAQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALRDVRQQYESVAAKNLQEAEEWYKSK
FADLSEAANRNDALRQAKQESTEYRRQVQSLTCEVDALKGTNESLERQMRMEENFAVEAANYQDTIGRLQDEI
QNMKEEMARHLREYQDLLNVKMALDIEIATYRKLLEGEESRISLPLPNFSSLNLRETNLDSLPLVDTHSKRTLLI
KTVETRDGQVINETSQHDDLE
- [0160] (iv) 环化波形蛋白 415-433cit (SEQ ID NO:4)
- [0161] CLPNFSSLNL[CIT]ETNLDSLPLC
- [0162] 由于第一和最后一个半胱氨酸 (C) 之间的二硫键, 该肽是环化的;
- [0163] [CIT] = 瓜氨酸
- [0164] (v) 环化波形蛋白 58-77cit3 (SEQ ID NO:5)
- [0165] GGCVYAT[R/CIT]SSACV[R/CIT]L[R/CIT]SSVPGV
- [0166] 由于粗体和带下划线的半胱氨酸 (C) 之间的二硫键, 该肽是环化的; [R/CIT] = 精氨酸或瓜氨酸, 但该肽包含至少一个 CIT; 粗体和带下划线的选项是实施例中测试的那些。
- [0167] (vi) 环化凝聚素 231-250cit sm1 (SEQ ID NO:6)
- [0168] CHFS[R/CIT]ASSCIDELFQD[R/CIT]FFT[R/CIT]
- [0169] 由于粗体和带下划线的半胱氨酸 (C) 之间的二硫键, 该肽是环化的; [R/CIT] = 精氨酸或瓜氨酸, 但该肽包含至少一个 CIT; 粗体和带下划线的选项是实施例中测试的那些。
- [0170] (vii) 环化血纤蛋白原 A 556-575cit sm (SEQ ID NO:7)
- [0171] NTKESSSHPGCAEFPS[CIT]GKC
- [0172] 由于粗体和带下划线的半胱氨酸 (C) 之间的二硫键, 该肽是环化的; [CIT] = 瓜氨酸
- [0173] (viii) 环化血纤蛋白原 A 616-635cit sm (SEQ ID NO:8)
- [0174] THSTK[R/CIT]CHAKS[R/CIT]PV[R/CIT]GIHTSC
- [0175] 由于粗体和带下划线的半胱氨酸 (C) 之间的二硫键, 该肽是环化的; [R/CIT] = 精氨酸或瓜氨酸, 但该肽包含至少一个 CIT; 粗体和带下划线的选项是实施例中测试的那些。
- [0176] (ix) 环化组蛋白 2A H2A/a 1-20cit sm2 (SEQ ID NO:9)
- [0177] MSG[R/CIT]GKQGCKA[R/CIT]AKAKT[R/CIT]SSC
- [0178] 由于粗体和带下划线的半胱氨酸 (C) 之间的二硫键, 该肽是环化的; [R/CIT] = 精氨酸或瓜氨酸, 但该肽包含至少一个 CIT; 粗体和带下划线的选项是实施例中测试的那些。
- [0179] (xii) 环化丝聚蛋白 48-65cit2v1 (SEQ ID NO:10)
- [0180] CTIHAHPGS[R/CIT][R/CIT]GG[R/CIT]HGYHHC

[0181] 由于粗体和带下划线的半胱氨酸 (C) 之间的二硫键,该肽是环化的;[R/CIT] = 精氨酸或瓜氨酸,但该肽包含至少一个 CIT;粗体和带下划线的选项是实施例中测试的那些。

[0182] (xiii) BRAF (来自 v raf 鼠肉瘤病毒癌基因同源物 B1 的催化结构域,氨基酸 416-766) (SEQ ID NO:11)

[0183] LQKSPGPQRERKSSSSSEDRNRMKTLGRRDSSDDWEIPDGQITVGQRIGSGSFGTVYKKGWHGDVAVKM
LNVTAPTPQQLQAFKNEVGVLRKTRHVNILLFMGYSTKPQLAIVTQWCEGSSLYHHLHI IETKFEMIKLIDIARQTA
QGMDYLHAKSIIHRDLKSNINFLHEDLTVKIGDFGLATVKSRSWSGSHQFEQLSGSILWMAPEVIRMQDKNPYSFQSD
VYAFGIVLYELMTGQLPYSNINNRDQIIFMVGRGYLSPDLSKVRSNCPKAMKRLMAECLKKRDERPLFPQILASIE
LLARSLPKIHRSASEPSLNRAGFQTEDFSLYACASPKTPIQAGGYGAFPVH

专利名称(译)	类风湿性关节炎和其他自身免疫疾病的多重免疫试验		
公开(公告)号	CN104321650A	公开(公告)日	2015-01-28
申请号	CN201380020421.4	申请日	2013-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
[标]发明人	SR宾德 RP沃克 ML德兰诺伊		
发明人	S·R·宾德 R·P·沃克 M·L·德兰诺伊		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N2800/102 G01N33/564 G01N33/6854		
代理人(译)	余颖		
优先权	13/801275 2013-03-13 US 61/624871 2012-04-16 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

通过多重试验诊断类风湿性关节炎和其他自身免疫疾病，所述试验涉及针对一组抗原的抗体，所述抗原包括环化瓜氨酸化肽和至少五个来自列表的成员，所述列表包括BRAF1 506-525、BRAF2 656-675、瓜氨酸化波形蛋白(蛋白)、环化波形蛋白415-433cit、环化波形蛋白58-77cit3、环化凝聚素231-250cit sm1、环化血纤蛋白原A 556-575cit sm、环化血纤蛋白原A 616-635cit sm、环化组蛋白2A H2A/a1-20cit sm2、环化丝聚蛋白48-65cit2v1、BRAF(来自v raf鼠肉瘤病毒癌基因同源物B1的催化结构域，氨基酸416-766)。