



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103454434 B

(45)授权公告日 2016.08.10

(21)申请号 201310406549.6

(22)申请日 2007.10.03

(30)优先权数据

60/828,203 2006.10.04 US

(62)分案原申请数据

200780036803.0 2007.10.03

(83)生物保藏信息

ATCC HB-10709 1991.03.29

PTA-7737 2006.07.19

(73)专利权人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 玉茹.G.孟 洪圭熙

约翰尼.古铁雷斯

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

C07K 16/22(2006.01)

(56)对比文件

CN 1420987 A,2003.05.28,

Gottfried E. Konecny et

al..Association between HER-2/neu and Vascular Endothelial Growth Factor Expression Predicts Clinical Outcome in Primary Breast Cancer Patients.《Clinical Cancer Research》.2004,第10卷第1706-1716页.

N Voorzanger-Rousselot et al..Association of 12 serum biochemical markers of angiogenesis, tumor invasion and bone turnover with bone metastases from breast cancer: a crosssectional and longitudinal evaluation.《British Journal of Cancer》.2006,第95卷第506-514页.

Bruce A. Keyt et al..Identification of Vascular Endothelial Growth Factor Determinants for Binding KDR and FLT-1 Receptors:GENERATION OF RECEPTOR-SELECTIVE VEGF VARIANTS BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.1996,第271卷(第10期),第5638-5646页.

审查员 周露露

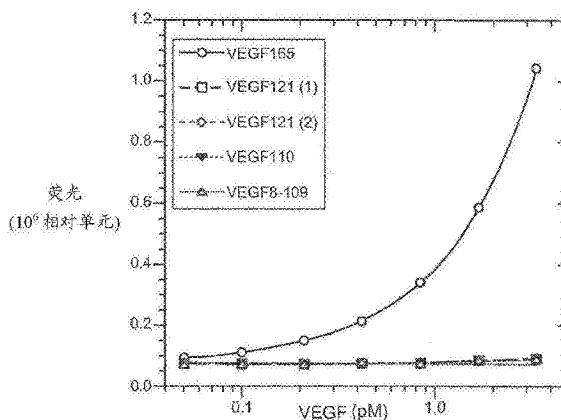
权利要求书2页 说明书20页 附图4页

(54)发明名称

针对VEGF的ELISA

(57)摘要

本发明涉及针对VEGF的ELISA。患者血流或其它生物学样品中血管内皮生长因子(VEGF)活性可以充当癌症、糖尿病、心脏疾患、及其它病理的诊断和预后指标。提供了针对作为抗原的VEGF的抗体-三明治式ELISA方法和试剂盒,用以检测来自动物模型和人患者的生物学样品中的VEGF水平类型,并可以用作诊断/预后指标。



1. 识别并特异性结合人VEGF中大于110的残基的单克隆抗体在制备供一种用于在生物学样品中选择性检测大于110个氨基酸的血管内皮生长因子(VEGF)形式(VEGF₁₁₀₊)的方法使用的试剂盒中的用途,所述形式包括VEGF₁₂₁,该方法包括如下步骤:

(a)使生物学样品与固定化至固体支持物的捕捉试剂接触并一起温育,其中所述捕捉试剂是所述单克隆抗体,且其中所述单克隆抗体能够特异性结合VEGF₁₂₁;

(b)将所述生物学样品与所述固定化捕捉试剂分开;

(c)使所述固定化捕捉试剂-靶物分子复合物与可检测抗体接触,所述可检测抗体能结合VEGF的KDR和/或FLT1受体结合结构域或能结合VEGF1-110中的表位;并

(d)使用针对所述可检测抗体的检测手段来测量所述捕捉试剂所结合的VEGF₁₁₀₊的水平。

2. 权利要求1的用途,其中所述生物学样品是从人受试者中分离的。

3. 权利要求2的用途,其中所述人受试者是血管、糖尿病、或癌症患者,且所述测量步骤(d)还包括与标准曲线进行比较以测定与正常个体相比的VEGF水平。

4. 权利要求1的用途,其中所述生物学样品是肿瘤溶胞产物、血浆、血清或尿。

5. 权利要求1的用途,其中所述捕捉试剂与抗体5C3识别相同表位。

6. 权利要求5的用途,其中所述捕捉试剂是5C3单克隆抗体。

7. 权利要求1的用途,其中所述固定化捕捉试剂包被在微量滴定板上。

8. 权利要求1的用途,其中所述可检测抗体是直接检测的。

9. 权利要求8的用途,其中所述可检测抗体受荧光测定试剂放大。

10. 权利要求9的用途,其中所述可检测抗体是生物素化的,且所述检测手段是亲合素或链霉亲合素-过氧化物酶和3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

11. 权利要求1的用途,其中所述可检测抗体是单克隆抗体。

12. 权利要求11的用途,其中所述可检测抗体是鼠单克隆抗体。

13. 权利要求12的用途,其中所述固定化单克隆抗体是单抗5C3,且所述可检测抗体是单抗A4.6.1。

14. 一种用于在生物学样品中选择性检测VEGF₁₁₀₊形式的免疫测定试剂盒,所述形式包括VEGF₁₂₁,该试剂盒包含:

(a)作为捕捉试剂的针对人VEGF的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体能特异性结合人VEGF中大于110的残基,且其中所述单克隆抗体能够特异性结合VEGF₁₂₁;和

(b)作为检测试剂的可检测抗体,其能结合VEGF的KDR和/或FLT1受体结合结构域或能结合VEGF1-110中的表位。

15. 权利要求14的试剂盒,其还包含所述捕捉试剂的固体支持物。

16. 权利要求15的试剂盒,其中所述捕捉试剂固定化在所述固体支持物上。

17. 权利要求16的试剂盒,其中所述捕捉试剂包被在微量滴定板上。

18. 权利要求17的试剂盒,其还包含所述可检测抗体的检测手段。

19. 权利要求18的试剂盒,其中所述检测手段是比色法的。

20. 权利要求14的试剂盒,其还包含作为抗原标准品的纯化的VEGF。

21. 权利要求14的试剂盒,其中所述捕捉试剂抗体是鼠单克隆抗体单抗5C3,且所述可检测抗体是单抗A4.6.1。

-
22. 权利要求1的用途,其中所述方法进一步选择性检测形式VEGF₁₆₅₊。
23. 权利要求14的免疫测定试剂盒,其中所述免疫测定试剂盒进一步选择性检测形式VEGF₁₆₅₊。

针对VEGF的ELISA

[0001] 本申请是申请日为2007年10月03日、中国申请号为200780036803.0、发明名称为“针对VEGF的ELISA”的发明申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2006年10月4日提交的美国临时申请流水号60/828,203的优先权和权益,本文完整收入其说明书。

发明领域

[0004] 本发明涉及用于检测某些VEGF群体的免疫测定法,其可以用作癌症、心血管、或其它病理患者的诊断和预后方法。

[0005] 发明背景

[0006] 目前完全确立了血管发生牵涉多种病症的发病机理。这些包括实体瘤、眼内新血管综合征(诸如增殖性视网膜病或年龄相关黄斑变性(AMD))、类风湿性关节炎、及银屑病(Folkman等,J.Biol.Chem.267:10931-10934(1992);Klagsbrun等,Annu.Rev.Physiol.53:217-239(1991);及Garner A,Vascular diseases.于:Pathobiology of ocular disease.A dynamic approach.Garner A,Klintworth GK,编第2版(Marcel Dekker,NY,1994),页:1625-1710)。在实体瘤的情况中,新血管形成让肿瘤细胞获得了与正常细胞相比的生长优势和增殖自治。因而,在肿瘤切片中的微血管密度与乳腺癌及数种其它肿瘤的患者存活之间观察到了相关性(Weidner等,N Engl J Med324:1-6(1991);Horak等,Lancet340:1120-1124(1992);及Macchiarini等,Lancet340:145-146(1992))。

[0007] 对血管发生正调节物的寻找产生了许多候选物,包括例如aFGF、bFGF、TGF- α 、TGF- β 、HGF、TNF- α 、血管生成素、IL-8等(Folkman等,见上文,及Klagsbrun等,见上文)。一些迄今鉴定的负调节物包括血小板反应蛋白(Good等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.87:6624-6628(1990))、促乳素的16kDa N端片段(Clapp等,Endocrinology133:1292-1299(1993))、血管他丁(O'Reilly等,Cell79:315-328(1994))、及内皮他丁(O'Reilly等,Cell 88:277-285(1996))。

[0008] 最近几年完成的工作建立了血管内皮生长因子(VEGF)在调节正常及异常血管发生中的关键作用(Ferrara等,Endocr.Rev.18:4-25(1997))。甚至单个VEGF等位基因的遗失导致胚胎致死的发现指向此因子在血管系统的发育和分化中所发挥的不可代替的作用(Ferrara等,见上文)。

[0009] 此外,VEGF已显示为与肿瘤和眼内病症有关的新血管形成的关键介导体(Ferrara等,见上文)。VEGF mRNA在多数所检查的人肿瘤中过表达(Berkman等,J Clin Invest 91:153-159(1993);Brown等,Human Pathol.26:86-91(1995);Brown等,Cancer Res.53:4727-4735(1993);Mattern等,Brit.J.Cancer73:931-934(1996);及Dvorak等,Am J.Pathol.146:1029-1039(1995))。同样,眼部液体中VEGF的浓度与糖尿病性视网膜病和其它缺血相关视网膜病患者中的活跃的血管增殖的存在高度相关(Aiello等,N.Engl.J.Med.331:1480-1487(1994))。此外,研究证明了VEGF在急性黄斑变性(AMD)患者

脉络膜新血管膜中的定位(Lopez等, Invest.Ophthalmol.Vis.Sci. 37:855-868(1996))。

[0010] VEGF由组织产生且不必进入循环而发挥其生物学效应,而是在局部充当旁分泌调节物。Yang等, J.Pharm.Exp.Ther. 284:103(1998)的最近研究发现从循环中清除rhVEGF₁₆₅非常迅速,提示循环中的内源VEGF最可能是VEGF不断合成的结果。此外,数项研究尝试了将循环VEGF的水平与肿瘤负荷相关联,并提示了VEGF水平为潜在的预后标志物(Ferrari和Scagliotti Eur.J.Cancer 32A:2368(1996);Gasparini等, J.Natl.Cancer Inst. 89:139(1997);Kohn Cancer 80:2219(1997);Baccala等, Urology 51:327(1998);Fujisaki等, Am.J.Gastroenterol. 93:249(1998))。显然,准确测量VEGF的能力对理解其在许多生物学过程(诸如维持血管开放、月经周期、缺血、糖尿病、癌症、眼内病症等)中的潜在作用会是重要的。

[0011] 有文献报道正常和病态患者中极其不同浓度的内源VEGF,其范围从不可检测水平至高水平。测量内源VEGF水平的能力依赖于灵敏且特异性测定法的可获得性。针对VEGF的基于比色法、化学发光、及荧光测定的酶联免疫吸附测定法(ELISA)已有报道。Houck等,见上文(1992);Yeo等, Clin.Chem. 38:71(1992);Kondo等, Biochim.Biophys.Acta 1221:211(1994);Baker等, Obstet.Gynecol. 86:815(1995);Hanatani等, Biosci.Biotechnol.Biochem. 59:1958(1995);Leith和Michelson Cell Prolif. 28:415(1995);Shifren等, J.Clin.Endocrinol. Metab. 81:3112(1996);Takano等, Cancer Res. 56:2185(1996);Toi等, Cancer 77:1101(1996);Brekken等, Cancer Res. 58:1952(1998);Obermair等, Br.J.Cancer 77:1870-1874(1998);Webb等, Clin.Sci. 94:395-404(1998)。

[0012] 例如,Houck等,见上文(1992)描述了表现出具有ng/ml灵敏度的比色ELISA,其灵敏度可能不足以检测内源VEGF水平。Yeo等,见上文(1992)描述了二位点时间分辨免疫荧光测定法,然而,在正常血清中没有检出VEGF(Yeo等, Cancer Res. 53:2912(1993))。Baker等,见上文(1995)(其使用该免疫荧光测定法的改良型式)报道了来自孕妇的血浆中可检测水平的VEGF,在先兆子痫的妇女中观察到更高的水平。使用放射性免疫测定法的Anthony等, Ann.Clin.Biochem. 34:276(1997)报道了孕妇中类似的数据。Hanatani等,见上文(1995)开发了能够测量循环VEGF的化学发光ELISA,并报道了来自30名正常个体(男性和女性)的血浆中的VEGF水平,为8-36pg/ml。Brekken等,见上文(1998)描述了使用对单独的VEGF或VEGF:F1k-1复合物具有结合偏爱的抗体进行的ELISA测定法。

[0013] 用于VEGF检测的ELISA试剂盒可购自R&D Systems(Minneapolis,MN)。R&D VEGF ELISA试剂盒已经被用于三明治式测定法,其中使用单克隆抗体来捕捉靶物VEGF抗原,而使用多克隆抗体来检测VEGF。Webb等,见上文(1998)。还可参见例如Obermair等,见上文(1998)。

[0014] Keyt等, J.Biol.Chem. 271:7788-7795(1996);Keyt等, J.Biol.Chem. 271:5638(1996);及Shifren等,见上文(1996)还开发了基于双重单克隆抗体对的比色ELISA。虽然该ELISA能够在癌症患者中检出升高的VEGF水平,但其缺乏在正常个体中测量内源水平的VEGF所需的灵敏度。Rodriguez等, J.Immunol.Methods 219:45(1998)描述了在纯粹的(neat)血浆或血清中产生10pg/ml VEGF的灵敏度的二位点荧光测定VEGF ELISA。然而,该荧光测定法检测VEGF的完全完整的165/165和165/110种类(据报道VEGF 165/165可以被蛋

白水解切割成三种其它形式：165/110异二聚体、110/110同二聚体、及55个氨基酸的C端片段(Keyt等, *J. Biol. Chem.* 271:7788-7795(1996); Keck等, *Arch. Biochem. Biophys.* 344:103-113(1997))。

[0015] 如此,需要开发在动物模型或患者的生物学样品中检测比现有ELISA更高的可测量水平的VEGF,和/或可以测量VEGF的不同同等型的诊断和预后测定法。

[0016] 发明概述

[0017] 开发了针对作为抗原的VEGF的抗体-三明治式ELISA方法,用以检测生物学样品中的VEGF形式。本文所提供VEGF ELISA能够检测VEGF同等型和大于110的VEGF片段(“VEGF₁₁₀₊”)。还提供了其试剂盒。

[0018] 例如,用于在生物学样品中检测大于110个氨基酸的选择性血管内皮生长因子(VEGF)形式(VEGF₁₁₀₊)的方法包括如下步骤:(a)使生物学样品与固定化至固体支持物的捕捉试剂接触并一起温育,其中所述捕捉试剂是与针对人VEGF的抗体5C3识别相同表位的抗体,所述单克隆抗体特异性结合人VEGF中大于110的残基;(b)将所述生物学样品与所述固定化捕捉试剂分开;(c)使所述固定化捕捉试剂-靶物分子复合物与可检测抗体接触,所述可检测抗体能结合VEGF的KDR和/或FLT1受体结合结构域;并(d)使用针对所述可检测抗体的检测手段来测量所述捕捉试剂所结合的VEGF₁₁₀₊的水平。在某些实施方案中,所述可检测抗体能结合VEGF1-110中的表位。在某些实施方案中,可以实施比较ELISA以检测VEGF的不同类型。在某些实施方案中,所述生物学样品(例如肿瘤样品或肿瘤溶胞产物、血浆、血清、或尿等)是从人受试者中分离的。

[0019] 在一个实施方案中,捕捉试剂是5C3单克隆抗体。在一个实施方案中,固定化的捕捉试剂包被在微量滴定板上。在某些实施方案中,可检测抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中,可检测抗体是鼠单克隆抗体。在一个实施方案中,固定化的单克隆抗体是单抗5C3,且可检测抗体是单抗A4.6.1。在某些实施方案中,可检测抗体是直接检测的。在一个实施方案中,可检测抗体受比色试剂放大。在一个实施方案中,可检测抗体是生物素化的,且检测手段是亲合素或链霉亲合素-过氧化物酶和3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

[0020] 在本发明的某些实施方案中,人受试者是血管、糖尿病、或癌症患者,且测量步骤(d)还包括与标准曲线进行比较以测定与正常个体相比的VEGF水平。

[0021] 还提供了试剂盒。例如,用于在生物学样品中检测大于110个氨基酸的血管内皮生长因子(VEGF)形式(VEGF₁₁₀₊)的免疫测定试剂盒可以包含:(a)作为捕捉试剂的针对人VEGF的抗体,其中所述单克隆抗体能特异性结合人VEGF中大于110的残基;和(b)作为检测试剂的可检测抗体,其能结合VEGF的KDR和/或FLT1受体结合结构域。在某些实施方案中,所述可检测抗体能结合VEGF1-110中的表位。在某些实施方案中,所述试剂盒还包含捕捉试剂的固体支持物。例如,所述捕捉试剂可以固定化在所述固体支持物(例如微量滴定板)上。在某些实施方案中,所述试剂盒还包含可检测抗体的检测手段(例如比色手段、荧光测定手段等)。在某些实施方案中,所述试剂盒还包含作为抗原标准品的纯化的VEGF。在本发明的某些实施方案中,可以提供一种或多种别的VEGF ELISA,用于进行与VEGF₁₁₀₊ELISA的比较研究。在一个实施方案中,所述试剂盒包括捕捉试剂单克隆抗体(其是鼠单克隆抗体单抗5C3),及可检测抗体(其是单抗A4.6.1)。

[0022] 在另一个实施方案中,本发明提供了抗VEGF抗体5C3(其可由以ATCC号PTA-7737保

藏的杂交瘤获得或生成)。本发明还提供了不能结合VEGF1-110但能与杂交瘤细胞系PTA-7737所生成的单克隆抗体结合相同VEGF₁₁₀₊表位的抗体。在某些实施方案中,本发明的抗体偶联有可检测的标记物。在一个实施方案中,提供了以ATCC保藏号PTA-7737保藏的杂交瘤5C3.1.1。

[0023] 附图简述

[0024] 图1A、1B和1C显示了通过不同VEGF ELISA来检测重组体VEGF₁₆₅、VEGF₁₂₁(1)(截短的,依照制造商R&D Systems可能从羧基末端缺失大约9个氨基酸)、VEGF₁₂₁(2)(来自Pepro Tech)、VEGF₁₁₀(通过纤溶酶消化VEGF而生成的N端片段)和VEGF₈₋₁₀₉(具有VEGF₁₆₅的氨基酸8-109的人工VEGF)分子。(1A).ELISA A,其使用3.5F8来包被,并使用生物素化的A4.6.1来检测。(1B).ELISA B,其使用A4.6.1来包被,并使用生物素化的2E3来检测。(1C).ELISA C,其使用5C3来包被,并使用生物素化的A4.6.1来检测。

[0025] 图2显示了A673细胞所生成的VEGF的蛋白质印迹,其使用3.5F8(左)或A4.6.1(右)来探查。样品是使用A4.6.1亲和柱从A673细胞的条件下培养基中纯化的VEGF(第1道)及重组体VEGF蛋白VEGF₁₆₅、VEGF₁₂₁(依照制造商R&D Systems可能从羧基末端缺失大约9个氨基酸)和大肠杆菌所生成的VEGF₈₋₁₀₉(分别第2、3、4道)。

[0026] 图3显示了VEGF₁₆₅、VEGF₁₂₁和VEGF₁₁₀(通过纤溶酶消化VEGF而生成的N端片段)的示意图,其显示了用于三种VEGF ELISA的抗体的提议结合位点。

[0027] 发明详述

[0028] 定义

[0029] 在详细描述本发明前,应当理解本发明不限于具体的组合物或生物学系统,它们当然可以有所变化。还应当理解本文所使用术语是仅仅为了描述具体实施方案的目的,并非意图是限制性的。在用于本说明书及所附权利要求书时,单数形式“一个/种”、“该”和“所述”等包括复数所指物,除非另有明确规定。如此,例如,提到“一个/种分子”任选地包括两个/种或更多个/种此类分子的组合,等等。

[0030] 术语“VEGF”在用于本文时指165个氨基酸的血管内皮细胞生长因子,及相关的121个、145个、189个和206个氨基酸的血管内皮细胞生长因子,如Leung等,Science 246:1306(1989),Houck等,Mol.Endocrin.5:1806(1991),及Neufeld等,见上文所述,及这些生长因子的天然存在等位形式和加工形式。还可参见例如美国专利No.6,057,428的图1A及B。活性VEGF片段可以通过纤溶酶切割而从ECM结合的VEGF中释放,生成前110个氨基酸(参见例如Keyt BA等,The carboxyl-terminal domain(111-165)of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency.J Biol Chem.271:7788-7795(1996))。“VEGF₁₁₀₊”在用于本文时指大于110个氨基酸的VEGF片段(自N端起),但不包括前110个氨基酸或更小片段(例如VEGF₈₋₁₀₉)。

[0031] 术语“检测”以最广义使用来包括靶分子的定性和定量测量。一方面,使用本文所描述的检测方法仅仅来鉴定生物学样品中VEGF₁₁₀₊或VEGF的存在。另一方面,使用所述方法来测试样品中VEGF₁₁₀₊或VEGF是否处于可检测的水平。又一方面,可以使用所述方法来量化样品中VEGF₁₁₀₊或VEGF的量并进一步比较来自不同样品的VEGF₁₁₀₊或VEGF水平。

[0032] 术语“生物学样品”指来自任何动物的身体样品,但优选来自哺乳动物,更优选来自人。在某些实施方案中,此类生物学样品来自血管、糖尿病、或癌症患者。此类样品包括生

物学流体,诸如血清、血浆、玻璃体液、淋巴液、滑液、滤泡液、精液、羊水、乳汁、全血、尿液、脑脊液、唾液、痰、泪液、汗液、粘液、肿瘤溶胞产物、及组织培养液、以及组织提取物(诸如匀浆组织、肿瘤组织、和细胞提取物)。在某些实施方案中,样品是来自任何动物的身体样品,在一个实施方案中,其来自哺乳动物,在一个实施方案中,其来自人受试者。在一个实施方案中,此类生物学样品来自临床患者。

[0033] 术语“可检测抗体”指能够直接经由通过检测手段放大的标记物进行检测的抗体,或是能够间接经由例如经标记的另一抗体进行检测的抗体。对于直接标记,典型地将抗体偶联可通过一些手段检测的模块。在一个实施方案中,可检测抗体是生物素化的抗体。

[0034] 术语“检测手段”指在本文的ELISA中用于检测可检测抗体的存在的模块或技术,并包括放大固定化的标记物(诸如捕捉到微量滴定板上的标记物)的检测试剂。在一个实施方案中,所述检测手段是比色检测剂,诸如亲合素或链霉亲合素-HRP。

[0035] 术语“捕捉试剂”指能够结合和捕获样品中的靶物分子,从而在合适条件下可将捕捉试剂-靶物抗体复合物与剩余样品分开的试剂。典型地,捕捉试剂是固定化的或可固定化的。在三明治式免疫测定法中,捕捉试剂优选是针对靶物抗原的抗体或不同抗体的混合物。

[0036] 本文中的术语“抗体”以最广义使用,具体覆盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、从至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)、及抗体片段,只要它们展现出期望的生物学活性。

[0037] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')₂、及Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;及从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0038] 为了本文的目的,“完整抗体”是包含重链可变域和轻链可变域以及Fc区的抗体。

[0039] “天然抗体”通常指由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成的约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链间有变化。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫键。每条重链在一端具有一个可变域(V_H),接着是多个恒定域。每条轻链在一端具有一个可变域(V_L),而另一端是一个恒定域;轻链的恒定域与重链的第一恒定域排列在一起,而轻链的可变域与重链的可变域排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变域之间形成界面。

[0040] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体相同,除了可能以极少量存在的可能的天然存在突变外。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原性位点。此外,与典型的包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制备物不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除它们的特异性外,单克隆抗体的优势在于它们是通过杂交瘤培养合成的,未受到其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”指示抗体从基本上同质的抗体群获得的特征,不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如,依照本发明使用的单克隆抗体可通过最初由Kohler等, *Nature* 256:495(1975)记载的杂交瘤方法来制备,

[0041] 或者可通过重组DNA方法来制备(参见例如美国专利No.4,816,567)。“单克隆抗体”还可使用例如Clackson等, *Nature* 352:624-628(1991)和Marks等, *J.Mol.Biol.* 222:581-597(1991)中记载的技术从噬菌体抗体库分离。

[0042] 本文的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白)(其中重链和/或轻链的一部分与自特定物种衍生的或属于特定抗体类或亚类的抗体中相应序列相同或同源,而链的剩余部分与自另一物种衍生的或属于另一抗体类或亚类的抗体中相应序列相同或同源)以及此类抗体的片段,只要它们展现期望的生物学活性(美国专利No.4,816,567;Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))。本文感兴趣的嵌合抗体包括“灵长类化的”(“primatized”)抗体,其包含自非人灵长类衍生的可变域抗原结合序列(例如旧世界猴(Old World Monkey),诸如狒狒、猕猴或短尾猴(rhesus or cynomolgus monkey))和人恒定区序列(美国专利No.5,693,780)。

[0043] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是包含自非人免疫球蛋白衍生的最低限度序列的嵌合抗体。在极大程度上,人源化抗体是这样的人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体高变区的残基为具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、家兔或非人灵长类的高变区残基所替换。在有些情况中,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中未找到的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。一般而言,人源化抗体会包含至少一个,通常两个基本上整个如下可变域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白序列的那些。任选地,人源化抗体还会包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的。更多细节参见Jones等,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等,Nature 332:323-329(1988);及Presta Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。在一个实施方案中,提供了人源化5C3抗体,并使用了本文所提供的方法。

[0044] 术语“可变的”指可变域中的某些部分在抗体间序列差异广泛且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性的实情。然而,变异性并非均匀分布于抗体的整个可变域。它集中于轻链和重链可变域中称作高变区的三个区段。可变域中更加高度保守的部分称作框架区(FR)。天然重链和轻链的可变域各自包含四个FR,它们大多采取 β -折叠片构象,通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠片结构一部分的三个高变区连接。每条链中的高变区通过FR非常接近的保持在一起,并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991)。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应器功能,诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)中抗体的参与。

[0045] 木瓜蛋白酶消化抗体生成两个相同的抗原结合片段(称为“Fab”片段,每个具有单个抗原结合位点),及剩余的“Fc”片段(其名称反映了其易于结晶的能力)。胃蛋白酶处理产生了具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原的 $F(ab')_2$ 片段。

[0046] “Fv”是包含完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。此区由紧密、非共价结合的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。正是在这种构造中,每个可变域的三个高变区相互作用而在 V_H-V_L 二聚体表面上确定了一个抗原结合位点。六个高变区共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域(或只包含对抗原特异性的三个高变区的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,只是亲和力低于完整结合位点。

[0047] Fab片段还包含轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的

不同之处在于重链CH1结构域的羧基末端增加了少数残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对其中恒定域半胱氨酸残基携带至少一个游离硫醇基的Fab'的称谓。F(ab')₂抗体片段最初是作为在Fab'片段之间有铰链半胱氨酸的成对Fab'片段生成的。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0048] 根据其恒定域氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)“轻链”可归入两种截然不同型中的一种,称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。

[0049] 根据其重链恒定域氨基酸序列,抗体可归入不同的类。完整抗体有五种主要的类: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中有些可进一步分为“亚类”(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。将与不同类的抗体对应的重链恒定域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的。

[0050] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于一条多肽链上。优选的是,Fv多肽在V_H和V_L结构域之间还包含多肽接头,使得scFv能够形成结合抗原的期望结构。关于scFv的综述参见Plückthun,于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag,New York,第269-315页,1994。

[0051] 术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如轻链可变域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)及重链可变域中的残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991))和/或那些来自“高变环”的残基(例如轻链可变域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)及重链可变域中的残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。“框架区”或“FR”残基指可变域中除本文中所定义的高变区残基外的那些残基。

[0052] 为了治疗/处理的目的,“哺乳动物”指归入哺乳类的任何动物,包括人,家畜和牲畜,及动物园、运动或宠物动物,诸如犬、马、猫、绵羊、猪、牛等。优选地,哺乳动物指人。

[0053] 术语“癌症”、“癌性”或“恶性的”指或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调控的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌瘤(carcinoma)(包括腺癌)、淋巴瘤、母细胞瘤、黑素瘤、肉瘤、和白血病。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(gastric or stomach cancer)(包括胃肠癌)、胃肠基质癌(gastrointestinal stromal cancer)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)(例如肝癌(hepatic carcinoma)和肝瘤(hepatoma))、膀胱癌、肝瘤(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌(kidney or renal cancer)、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、基底细胞癌、睾丸癌、食管癌、肝癌(hepatic carcinoma)、软组织肉瘤、卡波西(Kaposi)氏肉瘤、类癌(carcinoid carcinoma)、间皮瘤、多发性骨髓瘤、及各种类型的头颈癌,以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞性(SL)NHL、中级/滤泡性NHL、中级弥漫性NHL、高级成免疫细胞性NHL、高级成淋巴细胞性NHL、高级小无核裂细胞性NHL、贮积病(bulky disease)NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤、和瓦尔登斯特伦氏(Waldenstrom)巨球蛋白血症)、何杰金(Hodgkin)氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、

急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞性白血病、慢性成髓细胞性白血病、和移植后淋巴增殖性疾病(PTLD)、以及与癍痣病(phakomatoses)、水肿(诸如与脑瘤有关的)和梅格斯氏(Meigs)综合征有关的异常血管增殖。

[0054] 短语“血管的”和“心血管的”可互换使用,描述具有刺激血管发生和/或心血管形成指征/适应症的患者,和抑制血管发生和/或心血管形成指征/适应症的患者。此类病症包括例如动脉疾病,诸如动脉粥样硬化、高血压、炎性血管炎、雷诺(Reynaud)氏病和雷诺氏现象、动脉瘤、及动脉再狭窄;静脉和淋巴病症,诸如血栓性静脉炎、淋巴管炎、及淋巴水肿;及其它血管病症,诸如外周血管病症、AMD、癌症诸如血管肿瘤例如血管瘤(毛细管和洞穴状的(cavernous))、血管球瘤、毛细管扩张、杆菌性血管瘤病、血管内皮瘤、血管肉瘤、血管外皮细胞瘤、卡波西(Kaposi)氏肉瘤、淋巴管瘤、及淋巴管肉瘤、肿瘤血管发生、创伤(trauma)诸如伤口(wound)、烧伤、和其它受伤组织、植入物固定(implant fixation)、癍痕形成、缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury)、类风湿性关节炎、脑血管疾病、肾脏疾病诸如急性肾衰竭、及骨质疏松。这还会包括咽峡炎、心肌梗死诸如急性心肌梗死、心脏肥大、及心力衰竭诸如充血性心力衰竭(CHF)。

[0055] 术语“糖尿病”指牵涉不适当生成或利用胰岛素的进行性糖代谢疾病,且其特征在于高血糖和糖尿。该术语包括糖尿病的所有形式,诸如I型和II型糖尿病和胰岛素耐受性糖尿病(insulin-resistant diabete),诸如Mendenhall氏综合征、沃纳(Werner)综合征、矮怪病(leprechaunism)、脂肪萎缩糖尿病(lipoatrophic diabete)、及其它脂肪萎缩。

[0056] 术语“亲和纯化的”指通过使某物质流经亲和层析柱洗脱而将其纯化。

[0057] ELISA

[0058] 血管内皮生长因子(VEGF)是同源二聚体糖蛋白,并且在发育过程中和与肿瘤有关的病理性血管发生中是血管形成的关键血管发生因子。VEGF的表达应答低氧、及潜在地其它因素(诸如生长因子、激素和癌基因)而增强(参见例如Ferrara N:Vascular endothelial growth factor:Basic science and clinical progress.Endocrine Reviews 25:581-611(2004))。人VEGF基因具有8个由内含子分隔开的外显子。可变RNA剪接导致至少4种主要同等型的生成,其单体形式具有121、165、189和206个氨基酸(参见例如Houck KA等,The vascular endothelial growth factor family:identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA.Mol Endocrinol 5:1806-1814(1991);及Tischer E等,The human gene for vascular endothelial growth factor.Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing.J Biol Chem 266:11947-11954(1991))。还报道了较低频率的同等型,包括那些单体形式具有145个(参见例如Poltorak Z等,VEGF145,a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix.J Biol Chem272:7151-7158(1997))和183个(参见例如Jingjing L等,Human Muller cells express VEGF183,a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor.Invest Ophthalmol Vis Sci 40:752-759(1999))氨基酸的同等型。所有VEGF同等型结合两种受体酪氨酸激酶,即VEGFR-1(参见例如De Vries C等,The fms-like tyrosine kinase,a receptor for vascular endothelial growth factor.Science 255:989-991(1992))和VEGFR-2(参见例如Terman BI等,Identification of a new

endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. Oncogene 6:1677-1683 (1991)). VEGF₁₆₅还与神经毡蛋白相互作用(参见例如Soker S等, Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. Cell 92:735-745(1998)). VEGF₁₈₉和VEGF₂₀₆以高亲和力结合肝素,并且大部分被隔绝在胞外基质(ECM)中。VEGF₁₆₅以中等亲和力结合肝素,并且部分可溶而部分结合至细胞表面和ECM。VEGF₁₂₁不结合肝素,并且是易溶的。通过逆转录-PCR分析发现,在乳腺癌和卵巢癌肿瘤标本和细胞系中VEGF₁₂₁和VEGF₁₆₅是最优势性表达的变体,而VEGF₂₀₆表达未检出。发现在细胞系中VEGF₁₈₃和VEGF₁₈₉表达是检测不到的或处于低水平,而在一些肿瘤标本中检出(参见例如Stimpfl M等, Vascular Endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. Clinical Cancer Research 8:2253-2259(2002))。

[0059] 活性VEGF片段可以通过纤溶酶切割而从ECM结合的VEGF中释放,生成前110个氨基酸(参见例如Keyt BA等, The carboxyl-terminal domain(111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. J Biol Chem 271:7788-7795(1996))。这可能是血管发生的生理性和病理性过程中局部调节VEGF生物利用度的机制。参见例如Houck KA等, Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. J Biol Chem 267:26031-26037(1992); Keyt BA等, The carboxy-terminal domain(111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. J Biol Chem 271:7788-7795(1996); 及Roth D等, Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. Am Pathology 168:670-684 (10-12)(2006)。然而,生物学样品中的VEGF₁₁₀浓度尚未有报道。活性VEGF片段还可以通过基质金属蛋白酶(MMP)切割而从ECM结合的VEGF中释放。这得到了来自卵巢癌患者的腹水中具有1-110以外的氨基酸的降解VEGF片段的发现所支持。纤溶酶和MMP3两者在腹水中检出。参见例如Lee S, Shahla MJ等, Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. J Cell Biology 169:681-691(2005)。

[0060] 针对各种抗原的酶联免疫吸附测定法(ELISA)包括那些基于比色法、化学发光、及荧光测定法的ELISA。ELISA已经成功应用于在血浆和尿样品中测定少量的药物和其它抗原性成分,不牵涉提取步骤,并易于实施。本文所述测定法是利用抗体作为针对VEGF和VEGF₁₁₀₊的捕捉试剂和可检测抗体的ELISA。在某些实施方案中,该ELISA是基于细胞的。在测定法的第一步中,使怀疑含有VEGF或含有VEGF₁₁₀₊的生物学样品与捕捉(或包被)抗体接触并一起温育,使得捕捉抗体捕捉或结合至VEGF或VEGF₁₁₀₊,使得其可以在检测步骤中被检出。检测步骤牵涉使用可检测抗体,其在与任何所结合的VEGF或VEGF₁₁₀₊接触时结合至感兴趣的蛋白质(如果存在的话),并使用检测手段来检测抗体上的标记物,由此检出所存在的VEGF或VEGF₁₁₀₊的存在或量。这种ELISA可以与识别总VEGF(例如美国专利No. 6,855,508; 那些本文所述的ELISA,及那些本领域已知的ELISA)或VEGF同等型的ELISA相比较以测定所存在的VEGF的类型。

[0061] 例如,在某些实施方案中,所述测定法利用如下步骤:

[0062] 第1步

[0063] 在本文测定法的第1步中,使生物学样品与固定化的捕捉(或包被)试剂接触并一起温育,所述试剂是抗VEGF单克隆抗体。该抗体可以来自任何物种,但优选的单克隆抗体是鼠或大鼠或小鼠单克隆抗体,更优选鼠的,最优选自本文所鉴定的杂交瘤衍生的单抗5C3。因此,在具体的优选实施方案中,固定化的单克隆抗体是鼠单克隆抗体,最优选单抗5C3。如下实现常规固定化,即或是在测定规程之前使捕捉试剂不溶解,如通过吸附至不溶解于水的基质或表面(美国专利No.3,720,760)或非共价或共价偶联(例如使用戊二醛或碳二亚胺交联,无论是否用例如硝酸和美国专利No.3,645,852或Rotmans等, *J. Immunol. Methods* 57:87-98(1983)所述还原剂在先活化支持物)实现;或是在测定规程之后使捕捉试剂不溶解,例如通过免疫沉淀实现。

[0064] 用于固定化的固相可以是基本上不溶于水的且可用于免疫测定法的任何惰性支持物或载体,包括例如表面、颗粒、多孔基质等形式的支持物。常用的支持物的例子包括小薄片、Sephadex、聚氯乙烯、塑料珠、及由聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯等制造的测定板或试管(包括96孔微量滴定板)、以及微粒材料,诸如滤纸、琼脂糖、交联的右旋糖苷、及其它多糖。或者,反应性不溶于水的基质(诸如溴化氰活化的碳水化合物和美国专利No.3,969,287;3,691,016;4,195,128;4,247,642;4,229,537;及4,330,440所述反应性基片)适合用于捕捉试剂固定化。在一个实施方案中,固定化的捕捉试剂包被在微量滴定板上,更具体地,使用的优选固相是可以用于一次分析数个样品的多孔微量滴定板,例如微测试96孔ELISA板,诸如以Nunc Maxisorb或Immulon出售的。在某些实施方案中,平板是MICROTEST™或MAXISORB™96孔ELISA板,诸如以NUNC MAXISORB™或IMMULON™出售的。

[0065] 用上文所限定的捕捉试剂包被固相,所述捕捉试剂可以根据需要通过非共价的或共价的相互作用或物理连接而连接。用于附着的技术包括美国专利No.4,376,110及其引用的参考文献所述的那些。若共价的,则将平板或其它固相与交联剂连同捕捉试剂在本领域公知的条件下一起温育,例如诸如在室温达1小时。

[0066] 用于将捕捉试剂附着至固相基片的常用交联剂包括例如1,1-二(重氮乙酰基)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羟基-琥珀酰亚胺酯(例如具有4-叠氮-水杨酸的酯)、同双功能亚氨酸酯(包括二琥珀酰亚氨基酯,诸如3,3'-二硫代二-(琥珀酰亚氨基-丙酸酯))、及双功能马来酰亚胺(诸如二-N-马来酰亚胺-1,8-辛烷)。衍生化试剂(诸如甲基-3-[(对叠氮苯基)-二硫代]丙亚氨酸酯(pro-pioimi-date))产生光可活化的(photoactivatable)中间体,其能够在光存在时形成交联。

[0067] 如果利用96孔平板,那么典型地将它们用捕捉试剂包被(典型地在缓冲液诸如0.05M碳酸钠中稀释,通过温育至少约10小时,更优选至少过夜,在约4-20℃、或约4-8℃的温度,及在约8-12的pH、或约pH9-10、或约pH9.6实现)。如果期望较短的包被时间,可以例如在室温包被96孔平板达2小时。可以将平板在测定法本身之前很久堆积和包被,然后可以以手动、半自动、或自动方式(诸如通过使用机器人技术)同时对数个样品实施测定法。

[0068] 然后典型地用封闭剂处理经包被的平板,所述封闭剂非特异性结合至结合位点并使其饱和以阻止游离配体对平板的孔上过多位点的不想要结合。适用于此目的的封闭剂的例子包括例如明胶、牛血清清蛋白、卵清蛋白、酪蛋白、及脱脂乳。封闭处理典型地在如下条件发生,即在环境温度约1-4小时,优选约1至3小时,或在0-4℃过夜。

[0069] 包被和封闭后,将VEGF标准品(纯化的VEGF)或待分析的生物学样品(适当稀释的)添加至固定化相。优选的稀释率按体积计是约1-15%,优选约10%。为此目的的、可以用于稀释的缓冲液包括:(a)含有0.5% BSA、0.05%TWEEN 20™去污剂(P20)、0.05% PROCLIN™300抗生素、5mM EDTA、0.25% Chaps表面活性剂、0.2% β-γ 球蛋白、及0.35M NaCl的PBS,pH7.4;(b)含有0.5%牛血清清蛋白、0.05%聚山梨酯20、5mM EDTA、0.25%CHAPS、0.2%牛γ-球蛋白、及0.35M NaCl的PBS,pH7.4;(c)含有0.5% BSA、0.05%聚山梨酯20(P20)、及0.05% PROCLIN™300的PBS,pH7;(d)含有0.5%BSA、0.05%P20、0.05%PROCLIN™300、5mM EDTA、及0.35M NaCl的PBS,pH6.35;(e)含有0.5% BSA、0.05% P20、0.05% PROCLIN™300、5mMEDTA、0.2% β-γ 球蛋白、及0.35M NaCl的PBS,pH7.4;及(f)含有0.5% BSA、0.05% P20、0.05% PROCLIN™300、5mM EDTA、0.25% Chaps、及0.35M NaCl的PBS,pH7.4。PROCLIN™300充当防腐剂,而TWEEN 20™充当去污剂以消除非特异性结合。

[0070] 虽然捕捉试剂的浓度一般会由VEGF的感兴趣浓度范围来确定(要考虑生物学样品的任何必需稀释),但是正常情况下捕捉试剂的终浓度会凭经验来确定以使测定法在感兴趣范围里的灵敏度最大化。

[0071] 选择用于温育样品和固定化的捕捉试剂的条件以使测定法的灵敏度最大化并使解离最小化。优选地,温育在相当恒定的温度完成,其范围从约0℃至约40℃,优选约20-25℃。温育时间主要取决于温度,一般不大于约10小时以避免不灵敏的测定法。优选地,温育时间从约0.5至3小时,更优选1.5-3小时,在室温,以使游离VEGF₁₁₀₊或VEGF对捕捉试剂的结合最大化。若添加蛋白酶抑制剂以阻止生物学流体中的蛋白酶降解VEGF,则温育的持续时间可以更长。

[0072] 在本阶段,温育混合物的pH通常会在约4-9.5的范围内,优选在约6-9的范围内,更优选约7-8,且最优选的测定(ELISA)稀释剂的pH是pH7.4。选择温育缓冲液的pH以维持捕捉试剂对正被捕捉的VEGF₁₁₀₊或VEGF的显著水平特异性结合。可以采用各种缓冲液以在本步骤过程中达到并维持期望的pH,包括硼酸盐、磷酸盐、碳酸盐、Tris-HCl或Tris-磷酸盐、醋酸盐、巴比妥等。采用的具体缓冲液对于本发明不是至关重要的,但在各个测定法中,一种缓冲液可能比另一种优选。

[0073] 第2步

[0074] 在本文测定方法的第2步(其是任选的)中,将生物学样品与固定化的捕捉试剂分开(优选通过清洗来实现)以除去未捕获的分子。用于清洗的溶液一般是缓冲液(“清洗缓冲液”),其pH使用上文所述针对温育步骤的考虑因素和缓冲液来确定,优选的pH范围是约6-9。可以进行三次或更多次清洗。清洗温度一般从冰箱温度至中等温度(测定期间维持恒定温度),典型地为约0-40℃,更优选约4-30℃。例如,可以在清洗之前将清洗缓冲液放置在贮存器中在4℃在冰中,并可以将洗板器用于本步骤。在该阶段还可以添加交联剂或其它合适的试剂以容许新结合的VEGF₁₁₀₊或VEGF被共价附着至捕捉试剂,若对所捕获的VEGF₁₁₀₊或VEGF可能在随后的步骤中在某种程度上解离存有任何担心的话。

[0075] 第3步

[0076] 在下一步中,使固定化的捕捉试剂与可检测抗体接触,优选在约20-40℃的温度,更优选约20-25℃,其中接触的准确温度和时间主要取决于采用的检测手段。例如,在使用链霉亲和素-过氧化物酶和3,3',5,5'-四甲基联苯胺作为检测手段时,例如,在一个实施方

案中,实施接触(例如约1小时或更长)以使信号放大至最大限度。在清洗平板后,优选将相对于游离VEGF₁₁₀₊或VEGF的预期最高浓度(如上文所述)摩尔过量的抗体添加至平板。该抗体是可直接检测的或可间接检测的。虽然可检测抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体,例如在某些实施方案中,但是其是单克隆抗体,在一个实施方案中,其是鼠的,且在一个实施方案中,其是单抗A4.6.1。同样,可检测抗体可以是可直接检测的,并且在一个实施方案中,其具有比色标记物,且在另一个实施方案中,其具有荧光测定标记物。更优选地,可检测抗体是生物素化的,且检测手段是亲合素或链霉亲合素-过氧化物酶和3,3',5,5'-四甲基联苯胺。检测手段的读出可以是荧光测定的或比色的。抗体的亲和力必须高得足以使得可以检出少量的游离VEGF₁₁₀₊或VEGF,但又高得不足以引起VEGF₁₁₀₊或VEGF从捕捉试剂中拖出。

[0077] 第4步

[0078] 在测定方法的最后一步中,使用针对可检测抗体的检测手段来测量目前被结合至捕捉试剂的游离VEGF的水平。若生物学样品来自血管、糖尿病、或癌症患者,则测量步骤优选包括比较作为以上三步结果而发生的反应和标准曲线以测定与正常个体相比的VEGF₁₁₀₊或VEGF的水平,或优选包括比较作为以上三步结果而发生的反应和识别不同同等型或总VEGF的另一种VEGF ELISA以在比较ELISA且任选地与正常个体比较后测定VEGF类型的水平。

[0079] 抗体生成

[0080] 针对VEGF的多克隆抗体一般通过在动物中多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射VEGF和佐剂来生成。使用双功能或衍生化试剂,例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl₂或R¹N=C=NR,其中R和R¹是不同的烃基,将VEGF或包含靶氨基酸序列的片段与在待免疫物种中有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的,例如匙孔虫戚血蓝蛋白、血清清蛋白、牛甲状腺球蛋白、或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0081] 用作包被或可检测抗体的抗体可以获自任何方便的脊椎动物来源,诸如鼠、灵长类、兔类(lagomorpha)、山羊、家兔、大鼠、鸡、牛、羊、马、犬科动物、猫科动物、或猪。还可以采用嵌合的或人源化的抗体,如记载于例如美国专利No.4,816,567;Morrison等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851(1984);Neuberger等, Nature 312:604(1984);Takeda等, Nature 314:452(1985);及1998年10月15日公布的WO 98/45331,以及上述那些别的参考文献中的。

[0082] 通过将1mg或1μg偶联物(分别用于家兔或小鼠)与3倍体积的弗氏完全佐剂混和,并将该溶液皮内注射于多个部位,由此将动物针对免疫原性偶联物或衍生物进行免疫。一个月后,通过多个部位的皮下注射,用弗氏不完全佐剂中偶联物初始量的1/5-1/10对动物进行强化。7-14天后,采集动物的血液,并测定血清的抗VEGF滴度。对动物进行强化直到滴度达到平台(plateaus)。优选的是,将动物用VEGF但与不同蛋白质和/或通过不同交联剂偶联得到的偶联物进行强化。偶联物还可在重组细胞培养物中作为蛋白质融合物来制备。同样,使用凝聚剂诸如明矾来增强免疫应答。生成多克隆抗体的方法记载于很多免疫学教科书中,诸如Davis等, Microbiology, 第3版, (Harper和Row, New York, New York, 1980)。

[0083] 如下制备单克隆抗体,即从经免疫的动物中回收脾细胞,以常规方式使该细胞永生(例如通过与骨髓瘤细胞融合或通过埃巴(Epstein-Barr)病毒转化而实现),并筛选表

达期望抗体的克隆。参见例如Kohler和Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511(1976)。单克隆抗体或单克隆抗体的抗原结合区(诸如Fab或(Fab)₂片段)可以备选地通过重组方法来生成。

[0084] 合适抗体的例子包括已经用于正被讨论的蛋白质的已知RIA的那些抗体,例如针对本文介绍中给出的参考文献所述VEGF的那些抗体。

[0085] 在某些实施方案中,使用了抗VEGF抗体5C3(该抗体可以由以ATCC编号PTA-7737保藏的杂交瘤获得或生成),任选地,与另一种抗VEGF抗体A4.6.1一起使用。本发明还提供了不能结合VEGF₁₋₁₁₀但能与杂交瘤细胞系PTA-7737所生成的单克隆抗体结合相同VEGF₁₁₀₊表位的抗体。提供了以ATCC保藏号PTA-7737保藏的杂交瘤5C3.1.1。

[0086] 检测

[0087] 向固定化的捕捉试剂添加的抗体会被或是直接标记,或是间接标记,其通过在洗去过量的第一抗体后添加摩尔过量的针对第一抗体的动物物种IgG的第二标记抗体来实现。在后者即间接测定法中,将针对第一抗体的经标记抗血清添加至样品,使得在原位产生经标记的抗体。

[0088] 用于或是第一抗体或是第二抗体的标记物是不干扰游离VEGF₁₁₀₊或VEGF对抗体结合的任何可检测官能度。合适标记物的例子是那些已知用于免疫测定法的众多标记物,包括可以直接检测的模块,诸如荧光染料、化学发光的、及放射性的标记物,以及必须进行反应或衍生化才能被检测的模块,诸如酶。此类标记物的例子包括放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及¹³¹I,荧光团诸如稀土螯合物或荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹酰、伞形酮、萤光素酶例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利No. 4,737,456)、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮,辣根过氧化物酶(HRP),碱性磷酸酶,β-半乳糖苷酶,葡糖淀粉酶,溶菌酶,糖类氧化酶例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶、和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,杂环氧化酶诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,偶联有使用过氧化氢来氧化染料前体的酶诸如HRP,乳过氧化物酶,或微过氧化物酶,生物素/亲合素,生物素/链霉亲合素,生物素/链霉亲合素-β-半乳糖苷酶及MUG,自旋标记物,噬菌体标记物,稳定自由基,等等。如上文所述,荧光测定检测是一个例子。

[0089] 可利用常规方法来将这些标记物共价地结合至蛋白质或多肽。例如,偶联剂(诸如二醛、碳二亚胺、二马来酰亚胺、二亚氨酸酯(bis-imidate)、重偶氮化联苯胺(bis-diazotized benzidine)等等)可以用于使抗体加上上述荧光的、化学发光的、及酶标记物的标签。参见例如美国专利No. 3,940,475(荧光测定法)和3,645,090(酶);Hunter等, *Nature* 144:945(1962);David等, *Biochemistry* 13:1014-1021(1974);Pain等, *J. Immunol. Methods* 40:219-230(1981);及Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30:407-412(1982)。在某些实施方案中,本文的标记物是荧光的以使放大和灵敏度增加至8pg/ml,更优选生物素与链霉亲合素-β-半乳糖苷酶和MUG用于放大信号。在某些实施方案中,使用比色标记物,例如,其中可检测抗体是生物素化的,且检测手段是亲合素或链霉亲合素-过氧化物酶和3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

[0090] 此类标记物(包括酶)与抗体的偶联是免疫测定技术中对于普通技术人员而言标准的操作规程。参见例如O'Sullivan等,“Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay,”于 *Methods in Enzymology*, 编J.J.Langone和H.Van Vunakis,卷73(Academic Press, New York, New York, 1981),页:

147-166。

[0091] 添加最后的经标记抗体后,如下测定所结合抗体的量,即通过清洗而除去过量的未结合经标记抗体,然后使用对标记物适当的检测方法来测量附着的标记物量,并将测量得到的量与生物学样品中游离VEGF₁₁₀₊或VEGF的量相关联。例如,在酶的情况中,显现并测量的颜色量会是对VEGF₁₁₀₊或VEGF存在量的直接测量。具体地,若HRP是标记物,则使用底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺在450nm吸光度检测颜色。

[0092] 在一个例子中,从固定化相中清洗针对第一未标记抗体的经酶标记的第二抗体后,通过将固定化的捕捉试剂与酶底物一起温育来显现并测量颜色或化学发光。然后通过与平行运行的标准VEGF所产生的颜色或化学发光相比较而计算游离VEGF₁₁₀₊或VEGF浓度的量。

[0093] 试剂盒

[0094] 为方便起见,本发明的测定方法可以以试剂盒形式提供。该试剂盒是包括如下基本元件的成套组合:

[0095] (a)由针对人VEGF分子的单克隆抗体构成的捕捉试剂,其中所述单克隆抗体识别VEGF₁₁₀₊;和

[0096] (b)由能结合VEGF的KDR和FLT1受体结合结构域的可检测(经标记的或未标记的)抗体构成的检测试剂。这些基本元件在上文有限定。在某些实施方案中,检测试剂包含能结合VEGF₁₋₁₁₀表位的可检测抗体。

[0097] 优选地,试剂盒还包含捕捉试剂的固体支持物,其可以作为分开的元件提供或者其上已经固定化捕捉试剂。因此,试剂盒中的捕捉抗体可以固定化在固体支持物上,或者它们可以固定化在试剂盒所包括的或与试剂盒分开提供的这种支持物上。

[0098] 优选地,捕捉试剂包被在微量滴定板上。检测试剂可以是直接检测的经标记抗体或由不同物种中产生的针对未标记抗体的经标记抗体检测的未标记抗体。若标记物是酶,则试剂盒通常会包括酶所需辅因子和底物,且若标记物是荧光团,则包括提供可检测生色团的染料前体。若检测试剂是未标记的,则试剂盒还可以包含针对可检测抗体的检测手段,诸如针对未标记抗体的经标记抗体,优选以荧光测定检测形式。若标记物是酶,则试剂盒通常会包括酶所需辅因子和底物,若标记物是荧光团,则包括提供可检测生色团的染料前体,且若标记物是生物素,则包括亲合素,诸如亲合素、链霉亲合素、或与HRP或 β -半乳糖苷酶偶联的链霉亲合素及MUG。

[0099] 在一个具体的实施方案中,捕捉试剂是单克隆抗体,优选啮齿类动物的,更优选鼠的或大鼠的或小鼠的,还更优选鼠的,且最优选单抗5C3。同样,在某些实施方案中,可检测抗体是生物素化的单克隆抗体,该单克隆抗体是啮齿类动物的,更优选鼠的或大鼠的或小鼠的,还更优选鼠的,还更优选单抗A4.6.1。在某些实施方案中,捕捉试剂固定化在这种试剂盒中。

[0100] 在某些实施方案中,试剂盒可以包含用于本文所述比较研究的多种ELISA,用于检测各种形式的VEGF和VEGF₁₁₀₊。

[0101] 典型地,试剂盒还包含实施测定法的说明书,和/或作为抗原标准品的VEGF(例如纯化的VEGF,优选重组生成的VEGF,及VEGF₁₁₀),以及其它添加物,诸如稳定剂、清洗和温育缓冲液等等。

[0102] VEGF标准品的例子是可以从Genentech, Inc. (South San Francisco, California)和本文所述的那些公司和方法获得的在哺乳动物细胞中生成的重组人VEGF。

[0103] 试剂盒的成分会以预定比例提供,各试剂的相对量适当地变化以在试剂溶液中提供基本上使测定法的灵敏度最大化的浓度。具体地,试剂可以以干粉(通常是冻干的,包括赋形剂)提供,在溶解后其会提供浓度适于与待测试样品组合的试剂溶液。

[0104] 材料保藏

[0105] 以下材料已保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 USA)(ATCC):

[0106] 5C3.1.1于2006年7月19日保藏于ATCC且保藏号为PTA-7737。

[0107] 分类命名 保藏单位 保藏号 保藏日期

[0108] 小鼠的脾细胞系:抗VEGF 5C3.1.1 ATCC PTA-7737 2006年7月19日

[0109] 以下材料已保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 USA)(ATCC):

[0110] A4.6.1于1991年3月29日保藏于ATCC且保藏号为HB10709。

[0111] 分类命名 保藏单位 保藏号 保藏日期

[0112] 杂交瘤, A4.6.1(抗-hVEGF) ATCC HB 10709 1991年3月29日

[0113] 保藏是依据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约(Budapest Treaty)及其(布达佩斯条约)实施细则的规定进行的。这保证了自保藏之日起保存保藏的存活培养物30年。保藏物可根据布达佩斯条约的条款通过ATCC获得,并服从Genentech公司与ATCC之间的协议,它保证了在有关美国专利授权后或者在任何美国或外国专利申请向公众公开后,以两者中居先者为准,公众可永久且不受限制的获得保藏培养物的后代,而且保证了依据35 USC§122及依照它的管理章程(包括37 CFR§1.14,特别要提及8860G 638)由美国专利和商标局长批准的个人可获得保藏培养物的后代。

[0114] 本申请的受让人已同意,若保藏材料的培养物在合适条件下培养时死亡、丢失或遭到破坏,则他将在接到通知后迅速用同一培养物的另一份材料更换。所保藏材料的可获得性并不解释为对违反任何政府机构依据其专利法所授予的权利实施本发明的许可。

[0115] 认为说明书足以使本领域技术人员能够实施本发明。本发明的范围不受所保藏构建体的限制,因为所保藏实施方案意图作为本发明某些方面的单一例证,任何功能相当的构建物都在本发明的范围内。本文中的材料保藏不构成承认书面说明不足以能够实践本发明的任何方面,包括其最佳模式,也不应解释为将权利要求的范围限制于它所呈现的具体例证。实际上,根据上述描述,除了本文所显示和描述的,本发明的各种更改对于本领域技术人员是显而易见的,而且落在所附权利要求的范围内。

[0116] 应理解本文所述实施例和实施方案仅仅为了例示目的,并且依照它们的各种修饰或变化对于本领域技术人员是有提示的,并包括在本申请的精神和范围及所附权利要求的范围内。通过提及将本文中所引用的所有出版物、专利、和专利申请完整收入本文以用于所有目的。

实施例

[0117] 实施例1:

[0118] 已知血管内皮生长因子(VEGF)(其由于可变RNA剪接而以不同同等型表达)在肿瘤血管发生中发挥关键作用。我们测量了VEGF₁₆₅和总VEGF的浓度,并评估了VEGF₁₁₀(其是通过纤溶酶消化VEGF而生成的活性片段)的相对量。ELISA A(VEGF₁₆₅-206 ELISA)检测VEGF₁₆₅和更长的同等型但不是VEGF₁₂₁。ELISA B(VEGF₁₁₀-206 ELISA)检测VEGF₁₆₅及同等型VEGF₁₂₁和VEGF₁₁₀。ELISA C(VEGF₁₂₁-206 ELISA)检测VEGF₁₆₅及更长的同等型,VEGF₁₂₁及分子量大于VEGF₁₁₀但不是VEGF₁₁₀的VEGF片段(本文称为“VEGF₁₁₀₊”)。

[0119] 材料和方法

[0120] 试剂和细胞:重组VEGF₁₆₅(Genentech)、VEGF₁₂₁(PeproTech, Rocky Hill, New Jersey)、VEGF₈₋₁₀₉(由VEGF₁₆₅的氨基酸8-109组成)及截短的VEGF₁₂₁(R&D Systems, Minneapolis, MN)在大肠杆菌中生成。根据质谱法,截短的VEGF₁₂₁具有完整的N端,但具有26KDa的质量,这与依照制造商从羧基末端截短大约9个氨基酸一致。它在通过还原性条件下的SDS-PAGE分析时在VEGF₁₁₀和VEGF₁₂₁之间迁移。VEGF₁₁₀通过纤溶酶消化VEGF₁₆₅而制备(Keyt BA等, The carboxyl-terminal domain(111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 271:7788-7795 (1996))。质谱法测量得到的分子量是25390,其与理论质量25389匹配。浓度使用bicinchorinic acid法(Pierce, Rockford, IL)测定。用于VEGF₈₋₁₀₉、VEGF₁₂₁和VEGF₁₆₅浓度计算的分子量分别是23.8、28.9和38.2KDa。单克隆抗VEGF抗体A4.6.1、3.5F8、2E3和5C3通过用CHO细胞中生成的VEGF₁₆₅免疫小鼠来生成(Kim KJ等, The vascular endothelial growth factor proteins: Identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors* 7:53-64(1992))。乳腺细胞系SK-BR-3、BT-474、T-47D和MCF-7以及卵巢细胞系ES-2、OVCAR-3和SK-OV-3(美国典型培养物保藏中心, Rockville, MD)培养在RPMI、2mM L-谷氨酰胺及10%FBS(除对于OVCAR-3的20%外)中,在37°C于增湿的5%CO₂培养箱中。

[0121] A673细胞的条件化培养基中的VEGF的纯化:将A673细胞(美国典型培养物保藏中心)培养于50:50 F12/DMEM、2mM L-谷氨酰胺及5%FBS中至60%汇合,然后在无血清培养基(Genentech)中直至汇合。使用用CNBr活化的Sepharose(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)制备的A4.6.1-Sepharose柱从上清液中纯化VEGF。将柱洗脱液和重组VEGF对照(每道0.2μg)在还原性条件下的18%Tris-甘氨酸凝胶(Invitrogen, Carlsbad, CA)上电泳,并印迹至硝酸纤维素上。将印迹用含3%牛血清清蛋白的0.5M Tris-HCl pH7.5、1.5M NaCl、50mM EDTA、0.5% Triton100封闭,并用200ng/ml 3.5F8或A4.6.1接着用2ng/ml 山羊抗小鼠Fc-HRP(Jackson ImmunoResearch)探查。将信号使用SuperSignal West Dura(Pierce)来显现,并记录在X射线胶片上。

[0122] 用于测量VEGF浓度的VEGF ELISA

[0123] ELISA A(VEGF₁₆₅-206 ELISA):除非另有说明,荧光测定ELISA A用于测量样品中的VEGF。荧光测定ELISA A使用3.5F8来包被,使用生物素化的A4.6.1接着使用链霉亲和素-β-半乳糖苷酶来检测,并使用4-甲基伞形基-β-D-半乳糖苷作为底物(Rodriguez CR等, A sensitive fluorometric enzyme-linked immunosorbent assay that measures vascular endothelial growth factor₁₆₅ in human plasma. *J Immunol Methods* 219:45-55(1998))。VEGF₁₆₅标准品为1-128pg/mL、或0.026-3.35pM。比色ELISA A使用3.5F8来包

被,使用生物素化的A4.6.1来检测,其遵循用于下文所述ELISA C的方案。VEGF₁₆₅标准品为1.6-200pg/mL。

[0124] ELISA B(VEGF110-206 ELISA)(先前称为VEGF121-206 ELISA,Konecny GE等, Association between HER-2/neu and Vascular Endothelial Growth Factor Expression Predicts Clinical Outcome in Primary Breast Cancer Patients. Clinical Cancer Research10:1706-1716(2004)):用50mM碳酸盐缓冲液pH9.6中的0.5μg/ml抗体A4.6.1以100μl/孔在4℃包被MaxiSorp96孔微孔板过夜。这一步之后且在含0.05%聚山梨酯20的PBS,pH7.4进行的随后室温温育步骤之间清洗平板。用PBS(150μl/孔)中的0.5%牛血清清蛋白、10ppmProclinTM300(Supelco,Bellefonte,PA)封闭平板达1小时。将VEGF标准品(1.56-200pg/ml VEGF₁₆₅或0.0409-5.24pM VEGF,以二倍连续稀释)及含有0.5%牛血清清蛋白、0.05%聚山梨酯20、5mM EDTA、0.25% CHAPS、0.2%牛γ-球蛋白(Sigma,St.Louis,MO)及0.35M NaCl的PBS,pH7.4(样品缓冲液)中以两倍或三倍连续稀释的连续稀释样品(最小1:10稀释)添加至平板(100μl/孔)并温育2小时。如下检测所结合的VEGF,即在平板上温育生物素化的2E3(或能结合VEGF的受体结合结构域的另一抗体)达1小时,接着温育链霉亲合素-HRP(Amersham,Copenhagen,Denmark)达30分钟,温育生物素基-酪酰胺(tyramide)(ELAST ELISA放大系统,Perkin Elmer Life Sciences Inc.,MA)达15分钟,并温育链霉亲合素-HRP达30分钟。添加底物TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)(Kirkegaard&Perry Laboratories),并通过添加1M磷酸来停止反应。在Titertek叠式读板仪(ICN,Costa Mesa,CA)上在450nm处读取吸光度。使用四参数回归曲线拟合程序(KaleidaGraph,Synergy software,Reading,PA)来拟合滴定曲线。使用落入标准曲线范围里的数据点来计算样品中推定的VEGF浓度。在减去用于本研究的10%血浆中推定的2.1pg/ml内源VEGF后,10%人EDTA血浆(Golden West Biologicals Inc.,Temecula,CA)中1.56-200pg/ml VEGF₁₆₅的回收率是92-120%。

[0125] ELISA C(VEGF121-206ELISA):将微孔板用1μg/ml抗VEGF5C3抗体包被,并如上所述进行封闭。将VEGF标准品(4.00-512pg/ml VEGF₁₆₅或0.105-13.4pM VEGF,以2倍连续稀释)和样品缓冲液中连续稀释的样品添加至平板。将平板温育2小时。通过添加生物素化的A4.6.1接着添加链霉亲合素-HRP和作为底物的TMB来检测所结合的VEGF。读取平板,并如上文所述的那样分析数据。在减去用于本研究的10%血浆中1.6pg/ml推定的内源VEGF后,10%血浆中4.00-512pg/ml VEGF₁₆₅的回收率是77-101%。

[0126] 结果与讨论

[0127] VEGF ELISA:前述ELISA A使用3.5F8来包被,并使用生物素化的A4.6.1来检测(Rodriguez CR等,A sensitive fluorometric enzyme-linked immunosorbent assay that measures vascular endothelial growth factor165in human plasma. J Immunol Methods 219:45-55,1998)。其检测VEGF165(VEGF₁₆₅)而非VEGF121(1)(VEGF₁₂₁(1))(其购自R&D Systems并从羧基末端缺失大约9个氨基酸)、及VEGF121(2)(VEGF₁₂₁(2))(其购自PeproTech)(图1A)。根据BIAcore,3.5F8结合VEGF₁₆₅而非VEGF₁₂₁。A4.6.1结合所有同等型和VEGF₁₁₀中存在的受体结合结构域(Kim KJ等,The vascular endothelial growth factor proteins:Identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. Growth Factors 7:53-64,1992)。3.5F8可能在氨基酸116和118

(其不存在于VEGF₁₂₁中)附近结合。5C3可能在氨基酸111-113(其不存在于VEGF₁₁₀中)附近结合(图3)。ELISA A可能可以检测含有VEGF₁₆₅序列的VEGF同等型,包括VEGF₁₈₃、VEGF₁₈₉和VEGF₂₀₆(参见例如Stimpfl M等,Vascular Endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer.Clinical Cancer Research 8:2253-2259,2002)。ELISA B(先前称为VEGF₁₂₁-206 ELISA,Konecny GE等, Association between HER-2/neu and Vascular Endothelial Growth Factor Expression Predicts Clinical Outcome in Primary Breast Cancer Patients.Clinical Cancer Research10:1706-1716,2004)使用A4.6.1来包被,并使用生物素化的2E3来检测。A4.6.1和2E3结合所有三种分子中存在的受体结合结构域。参加例如Kim KJ等,The vascular endothelial growth factor proteins:Identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies.Growth Factors 7:53-64(1992);及Muller YA等,Vascular endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site.Proc Natl Acad Sci USA 94:7192-7197(1997)。还可以使用在这些区域里结合的其它抗体。这种ELISA平等地检测VEGF₁₆₅、VEGF₁₂₁、截短的VEGF₁₂₁(从羧基末端缺失大约9个氨基酸)、VEGF₁₁₀及VEGF₈₋₁₀₉(图1B)。这种ELISA可以检测总VEGF,包括大于通过基质金属蛋白酶消化所生成的VEGF₁₁₀的片段。本文所述ELISA C(其使用5C3来包被,并使用生物素化的A4.6.1来检测)平等地检测VEGF₁₆₅、VEGF₁₂₁、及截短的VEGF₁₂₁,但不检测VEGF₁₁₀或VEGF₈₋₁₀₉(图1C)。根据BIAcore,5C3结合VEGF₁₂₁而非VEGF₈₋₁₀₉。这种ELISA可以检测VEGF₁₁₀₋₂₀₆所检测的所有VEGF分子,除VEGF₁₁₀及更小片段外。

[0128] 对于使用最小1:10稀释的样品中的VEGF,ELISA A、ELISA B和ELISA C的灵敏度分别是10、16和40pg/ml VEGF₁₆₅(或对于不同VEGF同等型和片段分别为0.26、0.41和1.05pM)。ELISA B和ELISA C是可重现的(表1和2)。ELISA B和ELISA C对VEGF(VEGF-A)是特异性的。浓度高至50ng/ml的VEGF-B、VEGF-C和VEGF-D仅给出背景信号。胰岛素样生长因子1、生长激素、重组神经生长因子、肿瘤坏死因子(Genentech)、血小板衍生生长因子AB、胎盘生长因子、转化生长因子β1(R&D Systems)(高至200ng/ml)仅给出背景信号。肝素(Leo Laboratories,Bucks,UK和Dublin,Ireland)(高至100U/ml)对测定法没有显著效应。

[0129] 表1:ELISA B(VEGF₁₁₀₋₂₀₆ ELISA)。标准品范围是缓冲液中的1.56-200pg/ml VEGF₁₆₅(0.0409-5.24pM VEGF)。1.56pg/ml标准品相对于空白的OD比率是1.37±0.11。CV是变异系数。

	对照 ^a	均值 (pg/ml)	项间 %CV	项内 %CV
[0130]	低的	3.07	17.7	13.5
	中间的	38.0	9.50	6.54
	高的	127	9.11	6.95

[0131] ^a通过将重组VEGF₁₆₅掺入人EDTA血浆中而制备中间对照和高对照。通过将VEGF₁₆₅

掺入70%血浆中而制备低对照,因为血浆含有内源VEGF。将对照1:10稀释,并在34个独立测定法中一式两份测定。

[0132] 表2:ELISA C(VEGF₁₂₁₋₂₀₆ELISA)。标准品范围是4.00-512pg/ml VEGF₁₆₅(0.105-13.4pM VEGF)。4pg/ml标准品相对于空白的OD比率是 2.72 ± 0.37 。CV是变异系数。

	对照 ^a	均值 (pg/ml)	项间 %CV	项内 %CV
[0133]	低的	3.28	20.6	8.35
	中等的	11.7	6.56	2.39
	高的	56.5	2.57	1.37

[0134] ^a通过将重组VEGF₁₆₅掺入人EDTA血浆中而制备对照。将它们1:10稀释,并在15个独立测定法中一式两份测定。

[0135] 细胞系的条件化培养基中的VEGF:通过三种ELISA(其使用大肠杆菌中生成的非糖基化VEGF作为标准品)来测量来自用VEGF₁₆₅cDNA(Meng等,2000)转染的六种稳定CHO克隆的条件化培养基。来自六种稳定CHO克隆的条件化培养基中的糖基化重组VEGF₁₆₅在三种ELISA中给出非常相似的浓度。ELISA B所测量的浓度分别是28、63、64、43、3.8和3.2nM。通过ELISA A和ELISA C所测量的VEGF浓度与ELISA B所测量的VEGF浓度相比的比率分别是 0.90 ± 0.08 和 1.08 ± 0.10 。因此,三种ELISA平等地定量糖基化VEGF,而且在培养条件下很少有对VEGF₁₆₅的蛋白质水解。

[0136] 通过ELISA A、ELISA B和ELISA C所测量的A673细胞条件化培养基中的VEGF浓度分别是0.15、0.29和0.24nM VEGF。ELISA A所测量的浓度较低,表明VEGF₁₂₁是存在的。在使用A4.6.1亲和柱从条件化培养基中纯化VEGF并通过蛋白质印迹进行分析时,3.5F8检出两条带,可能是糖基化的和非糖基化的VEGF₁₆₅。较低的条带具有与大肠杆菌中生成的纯化的VEGF₁₆₅相同的迁移率(图2,左)。N-聚糖酶处理使较高条带转变成较低条带。A4.6.1检出两条额外的较低分子量条带,可能是糖基化的(其与推定的非糖基化VEGF₁₆₅条带部分重叠)和非糖基化的VEGF₁₂₁(图2,右)。较低的条带具有与大肠杆菌中生成的纯化的VEGF₁₂₁相同的迁移率,而且N-聚糖酶处理使较高条带转变成较低条带。

[0137] 通过ELISA B所测量的来自乳腺细胞系SK-BR-3、BT-474、T-47D和MCF-7的条件化培养基中的VEGF浓度分别是3.6、16、13、及13pM。ELISA A所测量的VEGF浓度与ELISA B所测量的VEGF浓度的比率分别是0.49、0.42、0.43和0.38(或49%、42%、43%或38%),这与这些相应细胞系中43%、35%、40%和41%的VEGF₁₆₅表达一致(Stimpfl M等,Vascular Endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer.Clinical Cancer Research 8:2253-2259,2002)。对于这些细胞系,ELISA C所测量的VEGF浓度与ELISA B所测量的VEGF浓度的比率是1.1-1.2,表明存在很少的VEGF₁₁₀。ELISA B所测量的在来自卵巢细胞系ES-2、OVCAR-3和SK-OV-3的条件化培养基中的VEGF浓度分别是32、11和20pM。ELISA A所测量的VEGF浓度与ELISA B所测量的VEGF浓度的比率分别是0.24、0.20、和0.32(或24%、20%和32%),其与在这些相应细胞系中38%、42%和24%的VEGF₁₆₅

表达相比较(Stimpfl等,见上文)。对于这些细胞系,ELISA C所测量的VEGF浓度与ELISA B所测量的VEGF浓度的比率是0.64-0.79,表明VEGF₁₁₀(或更小的片段)可能是存在的。

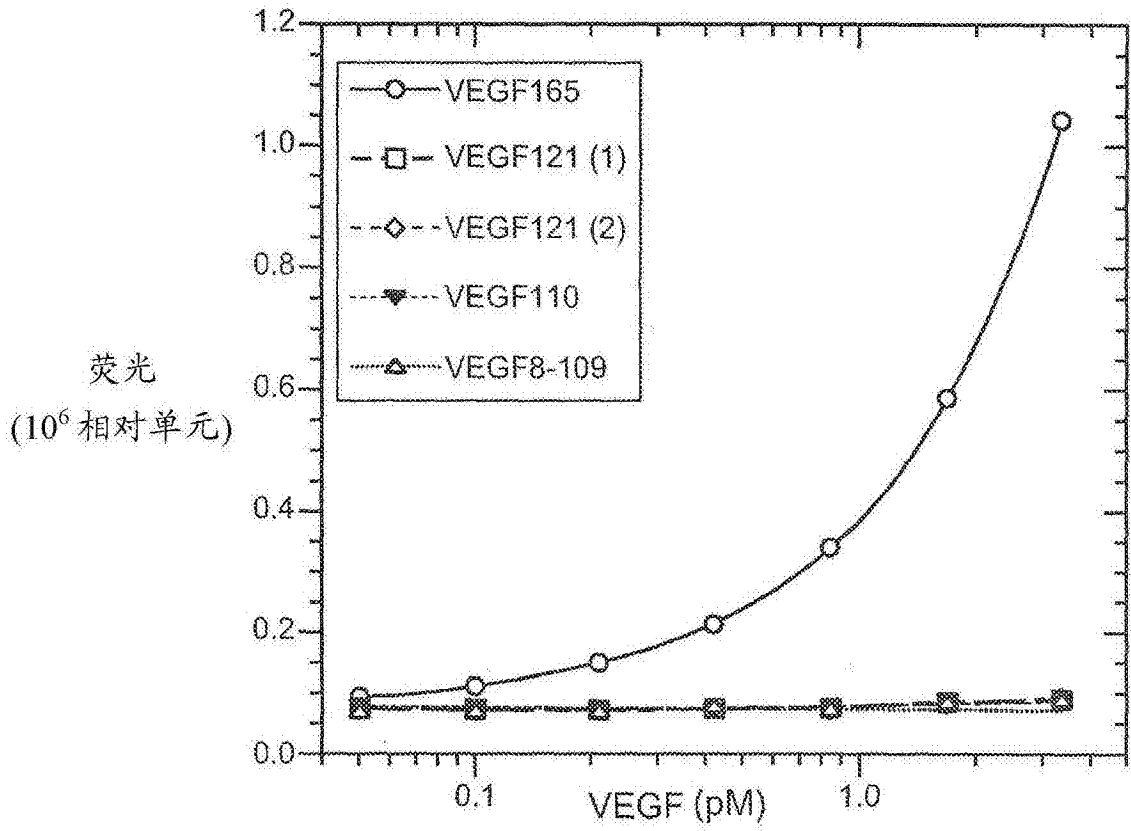


图1A

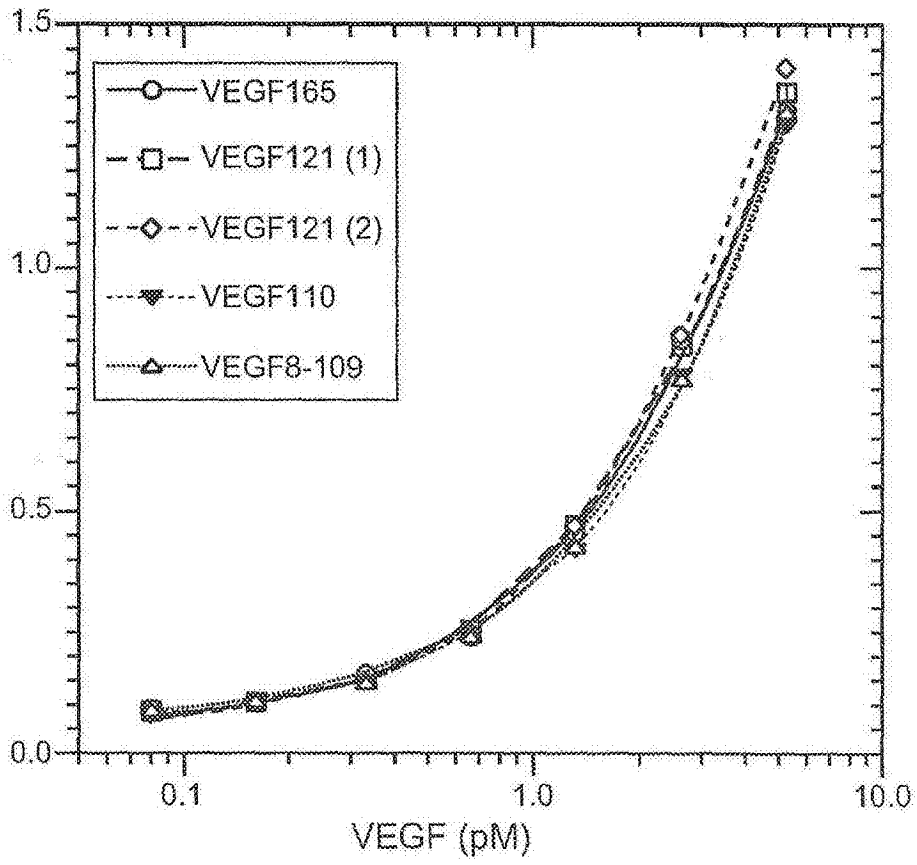


图1B

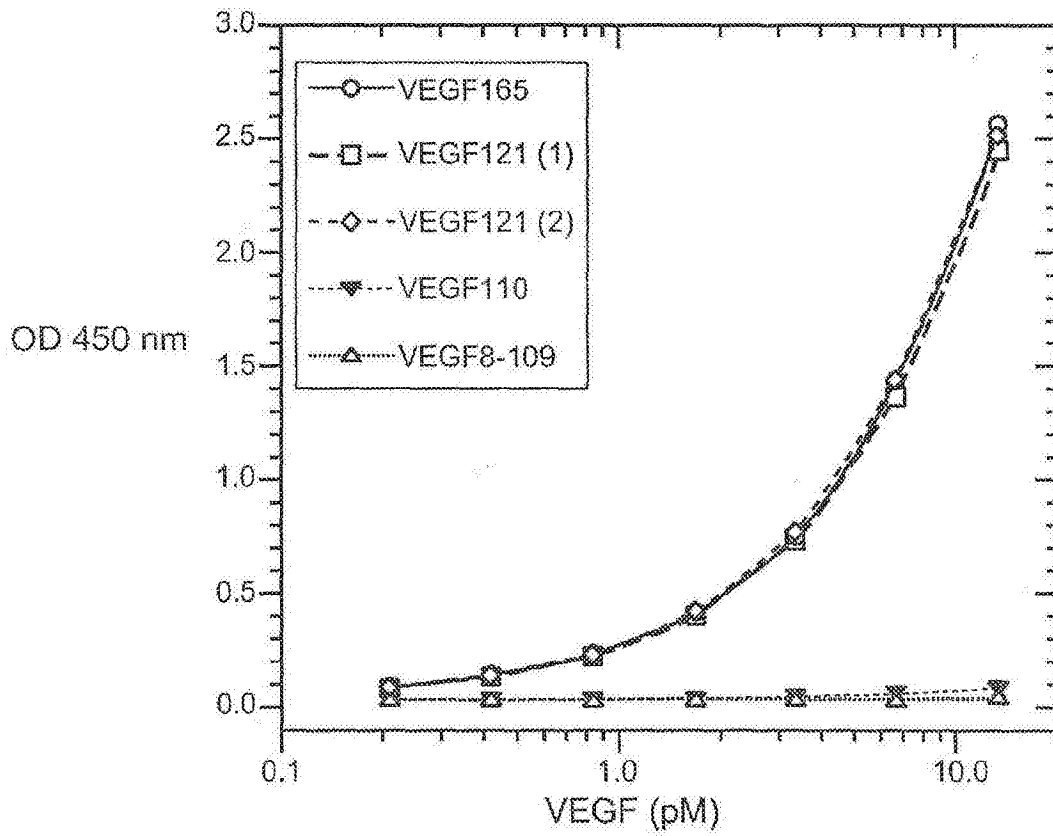


图1C

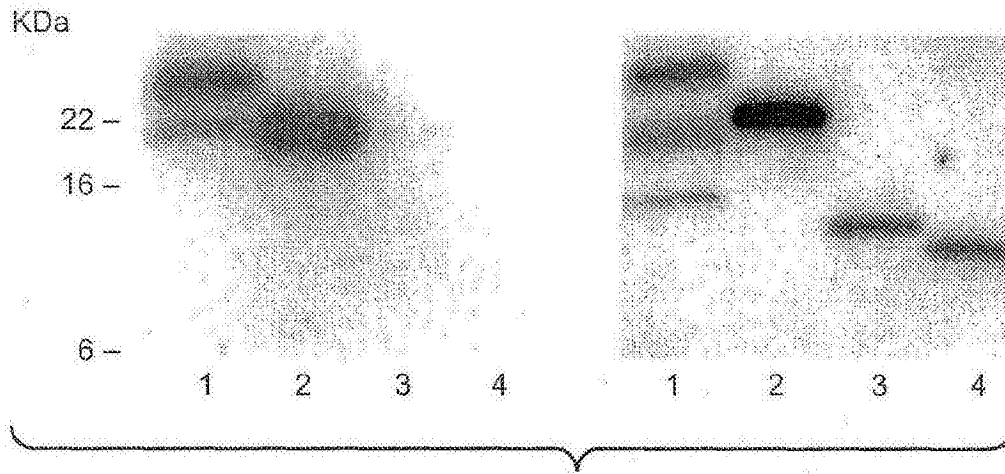


图2

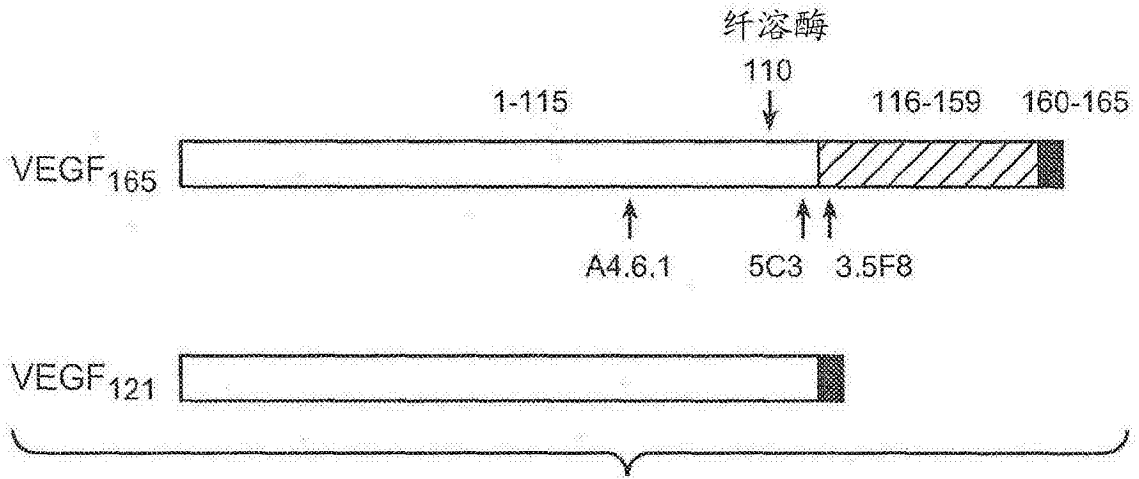


图3