



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103383393 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201310267569. X

WO 2007011698 A2 , 2007. 01. 25,

(22) 申请日 2013. 06. 28

审查员 肖吉

(73) 专利权人 英克隆生物技术(杭州)有限公司

地址 310023 浙江省杭州市天目山路 398 号  
古荡科技经济园

(72) 发明人 潘剑用 周海涛 闵丹

(74) 专利代理机构 杭州裕阳专利事务所(普通  
合伙) 33221

代理人 江助菊

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101676726 A , 2010. 03. 24,

CN 102167746 A , 2011. 08. 31,

CN 1167920 A , 1997. 12. 17,

CN 1488944 A , 2004. 04. 14,

CN 1924579 A , 2007. 03. 07,

权利要求书2页 说明书15页

(54) 发明名称

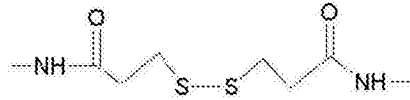
一种替代病人阳性血液的质控品

(57) 摘要

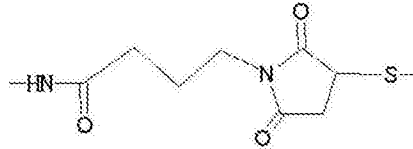
本发明提供一种由两种异源的抗体通过交联反应而获得的包括四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物,其中所述四聚体形式的异源交联抗体在所述异源交联物中所占的质量比优选不小于50%,可作为一种病人阳性血液中病原体抗体的替代物,经稀释液稀释后,作为替代病人阳性血液的质控品用于免疫检测试剂盒中。所述异源交联物生产制备简单、成本低,同时具有非常好的安全性和稳定性。此外,不同批次的质控品之间质量稳定,可有效降低检测误差。

1. 一种替代病人阳性血液的质控品,所述质控品包括稀释液和一种由非人的病原体抗体和健康的未感染病原体的人抗体通过交联反应而获得的异源交联物,其特征在于,所述异源交联物中包括由所述两种异源的抗体形成的四聚体形式的异源交联抗体,所述交联反应形成的连接物结构式选自 4(a), 4(b) 或 4(c) :

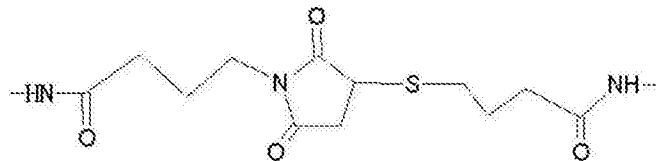
4(a):



4(b):



4(c):



,所述四聚体形式的异源交联抗体在所述异源交联物中所占质量比不小于 50%。

2. 如权利要求 1 所述的质控品,其特征在于,所述非人的病原体抗体可选自单克隆抗体、多克隆抗体、基因工程抗体及其经处理后具有结合抗原活性的片段或其混合物。

3. 如权利要求 1 所述的质控品,其特征在于,所述健康的未感染病原体的人抗体可选自 IgG、IgA、IgD、IgE、IgM 单体及其经处理后具有完整 Fc 片段的抗体片段或者其混合物。

4. 如权利要求 1 所述的质控品,其特征在于,所述异源交联物为由非人的 TORCH 病原体抗体和健康的未感染 TORCH 病原体的人抗体通过交联反应而获得的异源交联物,所述异源交联物包括由所述非人的 TORCH 病原体抗体和所述健康的未感染 TORCH 病原体的人抗体形成的四聚体形式的异源交联抗体。

5. 如权利要求 4 所述的质控品,其特征在于,所述 TORCH 病原体选自 II 型单纯疱疹病毒、I 型单纯疱疹病毒、风疹病毒、人巨细胞病毒或弓形虫。

6. 如权利要求 5 所述的质控品,其特征在于,所述交联反应所使用的试剂包括化学交联剂 SPDP 和还原剂 DTT,所述非人的 TORCH 病原体抗体、所述健康的未感染 TORCH 病原体的人抗体、SPDP 和 DTT 的质量比为 500 : 500 : 16 : 462。

7. 如权利要求 5 所述的质控品,其特征在于,所述异源交联物的获得方法如下所示 :

(1) 将 5mg 小鼠 anti-TORCH 病原体 McAb 溶解于交联缓冲液中,搅拌加入 50  $\mu$ l SPDP 交联剂,室温下反应 2 个小时后,装入透析袋,用还原缓冲液透析,换液四次,其中所述交联缓冲液为 0.1M 磷酸钾, 0.1M NaCl, pH7.5, 所述还原缓冲液为 0.1M 乙酸钠, 0.1M NaCl, pH4.5, 所述 SPDP 交联剂溶解于无水乙醇中,浓度为 3.2mg/ml ;

(2) 将 5mg 健康的未感染 TORCH 病原体的人 IgG 溶解于交联缓冲液中,搅拌加入 50  $\mu$ l SPDP 交联剂,室温下反应 2 个小时后,装入透析袋,用交联缓冲液透析,换液四次 ;

(3) 在 (1) 中加入 30  $\mu$ l DTT,室温反应 30 分钟后,装入透析袋,用交联缓冲液透析,换液四次,其中所述 DTT 溶解于 0.01M 乙酸钠溶液中,浓度为 1M, pH5.2 ;

- (4) 将 (2)、(3) 中的处理物混合,在 4℃下反应 15 个小时;
  - (5) 往 (4) 中加入 0.4mg 碘乙酰胺封闭剂,反应 30 分钟以封闭未反应的活性基团,然后装入透析袋,用交联缓冲液透析,换液四次;
  - (6) 将 (5) 中的产物装载到 HiLoad 16/60Superdex 200PG 凝胶过滤柱中,以交联缓冲液进行洗脱,并利用 HD-3 紫光分析仪实时检测洗脱产物在 280nm 波长时的吸光值,同时用 XWT-S 小型记录仪绘制层析图谱,按峰收集洗脱产物;
  - (7) 获得含有四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物。
8. 如权利要求 1 所述的质控品,其特征在于,所述稀释液可选自胎牛血清或小牛血清,并且所述异源交联物在所述质控品中的浓度为 5 ~ 25  $\mu$ g/ml。
  9. 如权利要求 8 所述的质控品,其特征在于,所述异源交联物浓度为 20  $\mu$ g/ml。

## 一种替代病人阳性血液的质控品

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种替代病人阳性血液的质控品,所述质控品包括稀释液和一种由两种异源的抗体通过交联反应而获得的含有四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物,属于免疫学技术领域。

### 背景技术

[0002] 如今,诸如病毒、细菌、真菌和寄生虫之类的病原体给人类带来的威胁越来越大。基于抗原和抗体之间特异性和高灵敏性反应的免疫分析方法,如胶体金免疫层析检测、乳胶免疫层析检测、放射免疫检测(RIA)、酶联免疫吸附检测(ELISA)、时间分辨荧光免疫检测(TRFIA)或化学发光免疫检测(CLIA),已经被广泛地用于临床免疫测试之中。这些免疫分析方法通常被用来定性或定量地检测人血液中的病原体抗原或抗体,从而快速和准确地确定感染是否发生和/或感染所处的阶段。

[0003] 临床免疫检测试剂盒一般都包括阴性质控品和阳性质控品。这些质控品往往来自抗体效价较高的病人阳性血液的系列稀释品,或者直接使用不同抗体效价的病人阳性血液,包括血清、血浆或全血。但是利用病人阳性血液制备阳性质控品有很多缺点:1) 很难获得同时具有高效价和高特异性的病人阳性血液;2) 个体之间的抗体效价和特异性差异较大,难以标准化;3) 成本比较高,4) 有些病原体感染病例稀缺,在短时间内很难获得足够的阳性血液;5) 病原体阳性血液具有潜在的传染性,即便经过灭活处理,但仍然难以保证彻底灭活,同时在收集和灭活病人阳性血液时,操作人员也有潜在被感染的风险。为此,人们经常使用替代病人阳性血液的质控品。

[0004] 欧洲专利申请 EP 0 330 902 A2 揭示出在检测人血液特异性抗体时,使用一种或多种人单克隆抗体(如人抗风疹病毒单克隆抗体和人抗水痘带状疱疹病毒单克隆抗体)作为测试对照,但是每次构建的人单克隆抗体只包括一种抗体的恒定区,检测其他抗体类型需要重新构建,而且由于在伦理上不允许利用人体进行抗体制备,因而不得利用噬菌体展示技术和转基因动物等方法来制造人单克隆抗体,这就使得抗体制备比较困难。美国专利 US 6,015,662 揭示出人鼠嵌合抗体可以用于人血液抗体检测的阳性对照,但是每次构建的人鼠嵌合单克隆抗体只包括一种抗体的恒定区,检测其他抗体类型需要重新构建,而且工艺非常复杂,这是因为除了利用杂交瘤技术获得小鼠单克隆抗体之外,还要进行抗体基因克隆以及人鼠嵌合基因的构建和表达。

[0005] 目前除上述方法制备抗体外,还出现了利用交联剂制备抗体。已有很多种利用交联剂制备交联抗体的方法。如交联剂琥珀酰亚胺吡啶二巯基丙酯[N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, SPDP] 可被用来将两种不同的蛋白(包括抗体和酶)交联在一起而形成交联物(Carlsson J, Drevin H, and Axén R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem. J.*, 1978, 173: 723-737)。交联剂苯二马来酰亚胺(0-phenylenedi-maleimide, 0-PDM) 也被用来将两种

抗体的片段交联在一起(Glennie M, McBride H, Worth A, et al.. Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)<sub>2</sub> antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J. Immunol.*, 1987, 139: 2367-2375)。欧洲专利EP 0 062 227 A1 揭示出利用交联剂戊二醛或高碘酸钠将两种不同物种来源的抗体偶联在一起。此外,美国专利 US 4,507,234 揭示了交联剂二硫代双硝基苯甲酸 [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB] 可被用来制备交联抗体。美国专利 US 4,929,543 揭示了交联剂 S-乙酰巯基丁二酸酐(S-acetylmercaptosuccinic anhydride, AMSA)和马来酰亚胺己酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯(Maleimidohexanoyl-N-hydroxysuccinimide ester, MHS)可被用来制备交联抗体。美国专利 US 5,478,753 揭示了交联剂 4-马来酰亚胺基丁酸-N-琥珀酰亚胺酯(N-γ-maleimidobutyryloxysuccinimide ester, GMBS)可被用来制备交联抗体。

[0006] 交联抗体也常被用于制备替代病人阳性血液的质控品。美国专利 US 4,929,543 揭示了非人的抗体或其 Fab 或 F(ab')<sub>2</sub> 片段和人免疫球蛋白或其 Fc 片段的异源交联物,用于人血清抗体诊断。美国专利 US 5,478,753 揭示了非人的非 IgM 和人 IgM 的异源交联物,用于血清 IgM 诊断试剂盒,异源交联物中的非人的非 IgM 可特异性地识别和结合病原体抗原,人 IgM 可以和标记抗体结合。美国专利 US 5,491,218 揭示了非人的抗体或其片段和另一种抗体的异源交联物,如人 IgM 和抗单纯疱疹病毒抗体 F(ab')<sub>2</sub> 片段的异源交联物,异源交联物中非人的抗体特异性地结合一种特定的病原体,另一种抗体特异性地结合一种特定的抗体类型。中国专利 ZL97109106.4 揭示了非人的抗艾滋病病毒抗体或经处理后具有抗体活性的片段和人免疫球蛋白的异源交联物,可用作病人阳性血液中艾滋病病毒抗体的替代物。但是以上这些专利中并没有揭示制备出的异源交联物的具体组成,这就造成了异源交联物不同批次之间质量不稳定,容易产生检测误差,替代性较差。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种由两种异源的抗体通过交联反应而获得的异源交联物,所述异源交联物包括由所述两种异源的抗体形成的四聚体形式的异源交联抗体。优选地,所述两种异源的抗体为非人的病原体抗体和健康的未感染病原体的人抗体;优选地,所述四聚体形式的异源交联抗体在所述异源交联物中所占的质量比不小于 50%。

[0008] 本发明的目的在于一种异源交联物在病人阳性血液中病原体抗体替代物上的应用,所述异源交联物是由两种异源的抗体通过交联反应而获得的,所述异源交联物包括由所述两种异源的抗体形成的四聚体形式的异源交联抗体。优选地,所述两种异源的抗体为非人的病原体抗体和健康的未感染病原体的人抗体;优选地,所述四聚体形式的异源交联抗体在所述异源交联物中所占的质量比不小于 50%。

[0009] 本发明的另一个目的在于提供一种替代病人阳性血液的质控品,所述质控品包括稀释液和一种由两种异源的抗体通过交联反应而获得的异源交联物,所述异源交联物包括由所述两种异源的抗体形成的四聚体形式的异源交联抗体,所述稀释液可选自小牛血清或胎牛血清,优选为小牛血清,在所述质控品中,所述异源交联物浓度为 5 ~ 25 μg/ml,优选 20 μg/ml。优选地,所述两种异源的抗体为非人的病原体抗体和健康的未感染病原体的人抗体;优选地,所述四聚体形式的异源交联抗体在所述异源交联物中所占的质量比不小于 50%。

[0010] 特别地,本发明提供一种替代病人 TORCH 病原体抗体阳性血液的质控品,其特征在于,所述质控品包括稀释液和一种由非人的 TORCH 病原体抗体和健康的未感染 TORCH 病原体的人抗体通过交联反应所获得的异源交联物,所述异源交联物包括由所述非人的 TORCH 病原体抗体和所述健康的未感染 TORCH 病原体的人抗体形成的四聚体形式的异源交联抗体,所述稀释液可选自小牛血清或胎牛血清,优选为小牛血清,在所述质控品中,所述异源交联物浓度为  $5 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ ,优选  $20 \mu\text{g/ml}$ 。优选地,所述四聚体形式的异源交联抗体在所述异源交联物中所占的质量比不小于 50%。

[0011] 与现有技术相比,本发明所获得的有益效果为:

[0012] 首先,本发明的异源交联物含有四聚体形式的异源交联抗体。所述异源交联物作为病人阳性血液中病原体抗体的替代物,在  $-20^\circ\text{C}$  和  $4^\circ\text{C}$  下保存一个月后的稳定性测试中,所述异源交联物都具有非常好的稳定性。

[0013] 其次,本发明的异源交联物作为病人阳性血液中病原体抗体的替代物,能够很好地替代病人阳性血液中的病原体抗体。

[0014] 再次,本发明的异源交联物来源于非人的病原体抗体和健康的未感染病原体的人抗体,经稀释液稀释后,可作为替代病人阳性血液的质控品,这种质控品与病人阳性血液的性能相当,又能避免病人阳性血液的潜在感染性,同时这种异源交联物具有生产制备简单和成本低的特点。

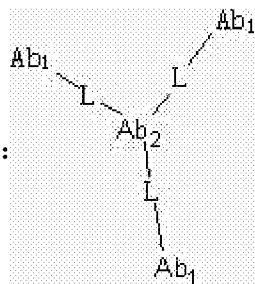
[0015] 并且,本发明的质控品批间差较小,能够有效地降低检测误差。

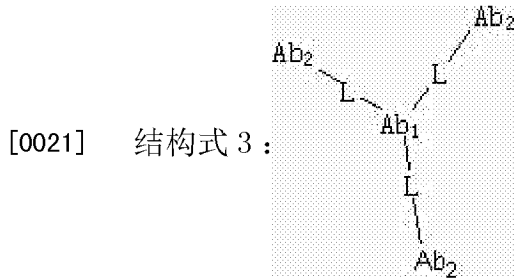
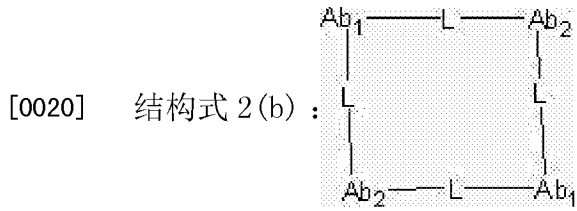
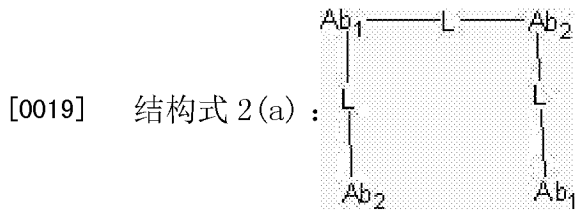
### 具体实施方式

[0016] 本发明利用诸如 SPDP、GMBS 和 DTNB 之类的交联剂将两种异源的抗体交联在一起,从而形成包括四聚体形式的异源交联抗体在内的异源交联物。本发明发现当所述异源交联物含有四聚体形式的异源交联抗体时,所述异源交联物可作为病人阳性血液中病原体抗体的替代物,经稀释液稀释后作为替代病人阳性血液的质控品,用于免疫检测,如胶体金免疫层析检测,乳胶免疫层析检测,放射免疫检测、酶联免疫检测、时间分辨荧光免疫检测或化学发光免疫检测,同时具有非常好的灵敏度、特异性和稳定性。所述四聚体形式的异源交联抗体在所述异源交联物中所占的质量比优选为不小于 50%。

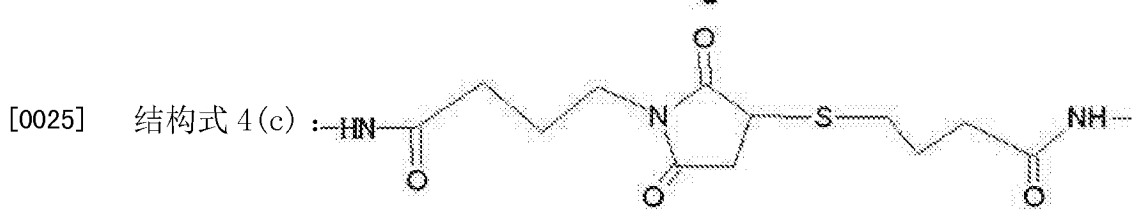
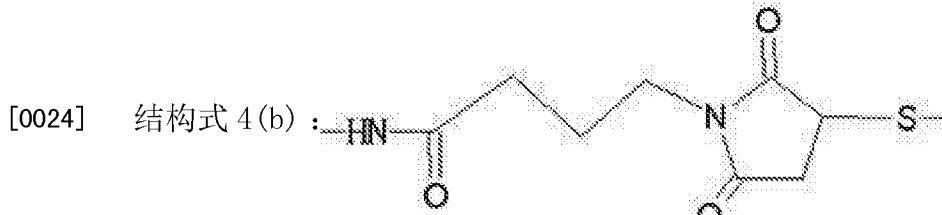
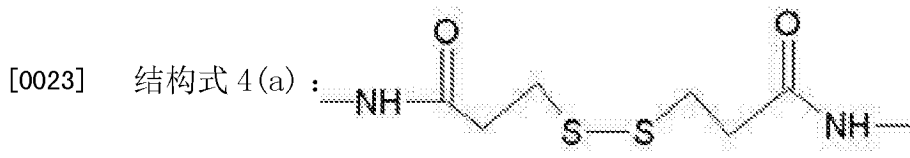
[0017] 在每个所述四聚体形式的异源交联抗体分子中,所述两种异源的抗体分子数比为 3:1 或 2:2 或 1:3。在结构式 1 中,所述两种异源的抗体分子数比为 3:1。在结构式 2(a) 或 2(b) 中,所述两种异源的抗体分子数比为 2:2。在结构式 3 中,所述两种异源的抗体分子数比为 1:3。在这些结构式中,所述两种异源的抗体分别用 Ab1 和 Ab2 表示,L 是利用交联剂对所述两种异源的抗体进行交联反应时形成的连接物。

[0018] 结构式 1:





[0022] 在这些结构式中, Ab1 优选为非人的病原体抗体, 例如小鼠抗 II 型单纯疱疹病毒单克隆抗体、小鼠抗 I 型单纯疱疹病毒单克隆抗体、小鼠抗风疹病毒单克隆抗体、小鼠抗人巨细胞病毒单克隆抗体、小鼠抗弓形虫单克隆抗体、小鼠抗艾滋病病毒单克隆抗体, 小鼠抗甲型肝炎病毒单克隆抗体、小鼠抗甲型肝炎病毒单克隆抗体、小鼠抗乙型肝炎病毒单克隆抗体、小鼠抗丙型肝炎病毒单克隆抗体、小鼠抗丁型肝炎病毒单克隆抗体、小鼠抗戊型肝炎病毒单克隆抗体、小鼠抗庚型肝炎病毒单克隆抗体或小鼠抗其他病原体单克隆抗体。Ab2 优选为一种健康的未感染病原体的人抗体, 例如人 IgG、IgA、IgD、IgE、IgM 抗体单体及其经处理后具有完整 Fc 片段的抗体片段或者其混合物。L 可选自结构式 4(a), 4(b) 或 4(c), 以及该领域内技术人员已知的其他常用的结构式。



[0026] 其中, 两种异源的抗体优选为一种非人的病原体抗体和一种健康的未感染病原体的人抗体。所述病原体可选自艾滋病病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、

丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、庚型肝炎病毒、单纯疱疹病毒、风疹病毒、人巨细胞病毒、人 T 淋巴细胞病毒、西尼罗河病毒；金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、表皮葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、粪肠球菌、肺炎链球菌；弓形虫、克氏锥虫、梅毒螺旋体、恶性疟原虫、间日疟原虫。所述非人的病原体抗体是指来自除人类在外的小鼠、大鼠、豚鼠、兔、鸡、猪、绵羊、山羊、马、骡和骆驼等动物的单克隆抗体、多克隆抗体、基因工程抗体、利用所述病原体抗原免疫动物所获得的抗体及其经处理后具有抗原结合活性的片段或其混合物。

[0027] 单克隆抗体是指仅由来自动物体内的一种类型的免疫细胞(如 B 淋巴细胞)制造出来的只与一种抗原表位结合的免疫球蛋白。以最常用的小鼠单克隆抗体为例,用一种病原体抗原免疫小鼠,经过多次免疫后,分离出小鼠脾脏 B 淋巴细胞,并与小鼠骨髓瘤细胞融合,通过对所产生的杂交瘤细胞进行多次亚克隆筛选就可获得分泌所需单克隆抗体的杂交瘤细胞(Köhle G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256:495-497;Albitar Maher. Monoclonal Antibodies: Methods in Molecular Biology, Vol. 378, 2007)。接着在体外培养分泌所需单克隆抗体的杂交瘤细胞,收集培养液,或者将杂交瘤细胞注射到同系小鼠的腹腔中,收集腹水,最后利用辛酸-硫酸铵法、饱和硫酸铵盐析沉淀法或亲和层析柱法就可从培养液或腹水中分离出单克隆抗体(Nakazawa M, Mukumoto M, Miyatake K. Immunoelectron Microscopy: Methods in Molecular Biology, 2010, 657:63-74;E. 哈洛, D. 莱恩. 《抗体技术实验指南》)。

[0028] 多克隆抗体是指由来自动物体内的多种类型的免疫细胞(如 B 淋巴细胞)制造出来的可与多种抗原表位结合的免疫球蛋白。以兔多克隆抗体为例,用一种病原体抗原多次免疫兔子,然后收集血清,再利用辛酸-硫酸铵法、饱和硫酸铵盐析沉淀法或亲和层析柱法或离子交换层析法分离出多克隆抗体(Nakazawa M, Mukumoto M, Miyatake K. Immunoelectron Microscopy: Methods in Molecular Biology, 2010, 657:63-74;E. 哈洛, D. 莱恩. 《抗体技术实验指南》)。

[0029] 基因工程抗体是指通过基因工程技术改造现有优良的非人动物物种单克隆抗体基因,尽量减少抗体中动物物种来源成分,同时保留原有抗体特异性,从而创造出一种新型抗体,主要包括嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体和单域抗体(Chames, Patrick. Antibody Engineering: Methods in Molecular Biology, Vol. 907, 2nd ed. 2012;Proetzl G, Ebersbach H. Antibody Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology, Vol. 901, 2012;Saerens D, Muyldermans S. Methods in Molecular Biology, Single Domain Antibodies: Methods and Protocols, Vol. 911, 2012)。

[0030] 利用病原体抗原免疫动物所获得的抗体是指利用病原体抗原免疫除人类在外的动物所获得的单克隆抗体或多克隆抗体。

[0031] 对非人的病原体抗体而言,经处理后具有抗原结合活性的片段是指利用病原体抗原免疫除人类在外的动物所获得的单克隆抗体或多克隆抗体以及通过基因工程技术对所获得的单克隆抗体进行改造所获得的基因工程抗体,经过化学手段或酶消化处理所获得的仍然保持抗原结合性质的抗体片段,如单克隆抗体经木瓜蛋白酶消化后所产生的 Fab 片段,或者经胃蛋白酶消化后产生的  $F(ab')_2$ ,其中  $F(ab')_2$ 再经酶 IdeS 消化后还可获得 Fab' 片段。

[0032] 一种健康的未感染病原体的人抗体是从健康的未感染病原体的人血液(包括血清、血浆或全血)中提取而出的,可选择性地包括 IgG、IgA、IgD、IgE、IgM 抗体单体及其经处理后具有完整 Fc 片段的抗体片段或者其混合物。从血液中提取抗体的方法可选自辛酸-硫酸铵法、饱和硫酸铵盐析沉淀法或亲和层析柱法或离子交换层析法分离出单克隆抗体(Nakazawa M, Mukumoto M, Miyatake K. *Immunolectron Microscopy: Methods in Molecular Biology*, 2010, 657:63-74 ;E. 哈洛, D. 莱恩. 《抗体技术实验指南》)。所述抗体单体是指用于交联反应的人抗体应是单聚体,如果不是单聚体,如人血清中的 IgM 抗体通常以五聚体形式存在,则应事先经过处理,让它们变成单聚体(Ditzel H, Erb K, et al.. Preparation of antigen-binding monomeric and half-monomeric fragments from human monoclonal IgM antibodies against colorectal cancer-associated antigens. *Human Antibodies*, 1993, 4(2):86-93)。

[0033] 对健康的未感染病原体的人抗体而言,经处理后具有完整 Fc 片段的抗体片段是指 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM 单体经木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化后所产生的完整 Fc 片段,或者经过化学手段或酶消化处理所获得的仍然具有完整 Fc 片段的其他抗体片段。

[0034] 通过选择合适的非人的病原体抗体,本发明提供一种可替代病人艾滋病病毒、肝炎病毒或 TORCH 病原体抗体阳性血液的质控品,其中肝炎病毒可选自甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、庚型肝炎病毒, TORCH 病原体选自 I 型单纯疱疹病毒(HSV-I)、II 型单纯疱疹病毒(HSV-II)、风疹病毒(RV)、人巨细胞病毒(HCMV)和弓形虫(TOXO)。

[0035] 特别地,本发明提供一种替代病人 TORCH 病原体抗体阳性血液的质控品,所述质控品包括稀释液和一种由非人的 TORCH 病原体抗体和健康的未感染 TORCH 病原体的人抗体通过交联反应所获得的异源交联物,所述异源交联物包括由所述非人的 TORCH 病原体抗体和所述健康的未感染 TORCH 病原体的人抗体形成的四聚体形式的异源交联抗体,所述稀释液可选自小牛血清或胎牛血清,优选为小牛血清,在所述质控品中,所述异源交联物浓度为 5 ~ 25  $\mu\text{g/ml}$ ,优选 20  $\mu\text{g/ml}$ 。优选地,所述四聚体形式的异源交联抗体在所述异源交联物中所占的质量比不小于 50%。

[0036] 特别地,本发明提供一种替代病人艾滋病病毒抗体阳性血液的质控品,所述质控品包括稀释液和一种由非人的艾滋病病毒抗体和健康的未感染艾滋病病毒的人抗体通过交联反应所获得的异源交联物,所述异源交联物包括由所述非人的艾滋病病毒抗体和所述健康的未感染艾滋病病毒的人抗体形成的四聚体形式的异源交联抗体,所述稀释液可选自小牛血清或胎牛血清,优选为小牛血清,在所述质控品中,所述异源交联物浓度为 5 ~ 25  $\mu\text{g/ml}$ ,优选 20  $\mu\text{g/ml}$ 。优选地,所述四聚体形式的异源交联抗体在所述异源交联物中所占的质量比不小于 50%。

[0037] 特别地,本发明提供一种替代病人肝炎病毒抗体阳性血液的质控品,所述质控品包括稀释液和一种由非人的肝炎病毒抗体和健康的未感染肝炎病毒的人抗体通过交联反应所获得的异源交联物,所述异源交联物包括由所述非人的肝炎病毒抗体和所述健康的未感染肝炎病毒的人抗体形成的四聚体形式的异源交联抗体,所述稀释液可选自小牛血清或胎牛血清,优选为小牛血清,在所述质控品中,所述异源交联物浓度为 5 ~ 25  $\mu\text{g/ml}$ ,优选 20  $\mu\text{g/ml}$ 。优选地,所述四聚体形式的异源交联抗体在所述异源交联物中所占的质量比不

小于 50%。

[0038] 此外,根据本领域的技术人员所知,通过选择合适的非人的病原体抗体,本发明提供一种替代病人其他病原体抗体阳性血液的质控品。

[0039] 当本发明的异源交联物用于免疫检测时,通常还需加入一种起稀释作用的稀释液,利用所述稀释液将所述异源交联物的浓度稀释至为 5 ~ 25  $\mu\text{g/ml}$ ,这样就制备出替代病人阳性血液的质控品,其中所述稀释液可选自小牛血清或胎牛血清,优选为小牛血清。

[0040] 优选地,本发明所述异源交联物在  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存在一种冻存液中,所述冻存液包括稳定剂,甘油,防腐剂。其中所述稳定剂选自 BSA 或明胶,优选浓度为 1%;所述甘油,优选为 50% 甘油;所述防腐剂选自叠氮钠或硫柳汞,优选浓度为 0.01%。在所述冻存液中,所述异源交联物终浓度为 2 ~ 5mg/ml,优选为 4mg/ml。

[0041] 当让两种异源的抗体发生交联反应时,可选择很多交联剂,如 SPDP、O-PDM、DTNB、AMSA、MHS 或 GMBS,以及本领域技术人员所知的其他交联剂。本发明利用交联剂 SPDP 和还原剂二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT),制备出小鼠抗 II 型单纯疱疹病毒单克隆抗体(anti-HSV-II McAb)和健康的未感染 HSV-II 的人 IgG 的异源交联物、小鼠抗 I 型单纯疱疹病毒单克隆抗体(anti-HSV-I McAb)和健康的未感染 HSV-I 的人 IgG 的异源交联物、小鼠抗风疹病毒单克隆抗体(anti-RV McAb)和健康的未感染 RV 的人 IgG 的异源交联物、小鼠抗人巨细胞病毒单克隆抗体(anti-HCMV McAb)和健康的未感染 HCMV 的人 IgG 的异源交联物以及小鼠抗弓形虫单克隆抗体(anti-TOXO McAb)和健康的未感染 TOXO 的人 IgG 的异源交联物。类似地,利用 SPDP 交联剂和 DTT 也可制备其他的非人的病原体抗体与健康的未感染病原体的人抗体之间的异源交联物。

[0042] 实施例 1

[0043] 利用 SPDP 交联剂(购买自 Thermo Scientific 公司,产品编号 21857)制备小鼠 anti-HSV-II McAb 和健康的未感染 HSV-II 的人 IgG 的异源交联物作为病人阳性血液中 HSV-II 抗体替代物,过程如下:

[0044] (1)将 5mg 小鼠 anti-HSV-II McAb 溶解于交联缓冲液(0.1M 磷酸钾, 0.1M NaCl, pH7.5)中,搅拌加入 50  $\mu\text{l}$  SPDP 交联剂(3.2mg/ml,溶解于无水乙醇中),室温下反应 2 个小时后,装入透析袋,用还原缓冲液(0.1M 乙酸钠, 0.1M NaCl, pH4.5)透析,换液四次;

[0045] (2)将 5mg 健康的未感染 HSV-II 的人 IgG 溶解于交联缓冲液中,搅拌加入 50  $\mu\text{l}$  SPDP 交联剂,室温下反应 2 个小时后,装入透析袋,用交联缓冲液透析,换液四次;

[0046] (3)在(1)中加入 30  $\mu\text{l}$  DTT (1M,溶解于 0.01M 乙酸钠溶液,pH5.2),室温反应 30 分钟后,装入透析袋,用交联缓冲液透析,换液四次;

[0047] (4)将(2)、(3)中的处理物混合,在  $4^{\circ}\text{C}$  下反应 15 个小时;

[0048] (5)往(4)中加入 0.4mg 碘乙酰胺封闭剂,反应 30 分钟以封闭未反应的活性基团,然后装入透析袋,用交联缓冲液透析,换液四次;

[0049] (6)将(5)中的产物装载到 HiLoad 16/60 Superdex 200 PG 凝胶过滤柱(购买自 GE Healthcare)中,以交联缓冲液进行洗脱,并利用 HD-3 紫光分析仪实时检测洗脱产物在 280nm 波长时的吸光值,同时用 XWT-S 小型记录仪绘制层析图谱,按峰收集洗脱产物;

[0050] (7)获得含有四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物,作为病人阳性血液中 HSV-II 抗体的替代物。其中每个四聚体形式的异源交联抗体分子是指利用 SPDP 和 DTT

将 3 个小鼠 anti-HSV-II McAb 分子与 1 个健康的未感染 HSV-II 的人 IgG 分子,或者 2 个小鼠 anti-HSV-II McAb 分子与 2 个健康的未感染 HSV-II 的人 IgG 分子,或者 1 个小鼠 anti-HSV-II McAb 分子与 3 个健康的未感染 HSV-II 的人 IgG 分子交联在一起所形成的。在所形成的每个四聚体形式的异源交联抗体分子中,对应于结构式 1、2 和 3 的 Ab1 是小鼠 anti-HSV-II McAb, Ab2 为健康的未感染 HSV-II 的人 IgG, L 为结构式 4(a) 所示,即 [0051]



[0052] 实施例 2 小鼠 anti-HSV-II McAb 和健康的未感染 HSV-II 的人 IgG 的异源交联物替代性、质控品稳定性和冻存稳定性实验

[0053] 将实施例 1 中制备出的小鼠 anti-HSV-II McAb 和健康的未感染 HSV-II 的人 IgG 的异源交联物作为病人阳性血液中 HSV-II 抗体的替代物,开展实验。

[0054] (一) 制备质控品。依次配制出四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比在 50%、70%、90% 和 100% 时的异源交联物作为病人阳性血液中 HSV-II 抗体的替代物。当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比为 50%、70% 或 90% 时,剩余 50%、30% 或 10% 的异源交联物包括由小鼠 anti-HSV-II McAb 和人 IgG 形成的二聚体形式的异源交联抗体和 / 或三聚体形式的异源交联抗体,但不包括未发生交联的小鼠 anti-HSV-II McAb 和健康的未感染 HSV-II 的人 IgG。利用实施例 1 中的交联缓冲液进行稀释,使这些异源交联物的初始浓度均为 0.5mg/ml,并利用小牛血清进行 20 倍稀释至 25  $\mu$ g/ml,就制备出替代病人 HSV-II 抗体阳性血液的质控品。

[0055] (二) 利用间接 ELISA 法进行检测,具体过程如下:

[0056] (1) 包被:用包被缓冲液(将 1.59g 碳酸钠、2.93g 碳酸氢钠溶解于 1000ml 双蒸水,同时将 pH 调至 9.6,配置成包被缓冲液)稀释 II 型单纯疱疹病毒抗原,使得抗原浓度为 1  $\mu$ g/ml;加入 100  $\mu$ l 稀释后的抗原溶液到酶标板各孔中,并用塑料薄膜盖住酶标板,在 4 $^{\circ}$ C 过夜,次日,弃去孔内溶液;加入 200  $\mu$ l 洗涤溶液(将 0.5ml Tween 20 加入到 1000ml 包被缓冲液中)洗涤酶标板,重复 3 次;

[0057] (2) 封闭:加入 200  $\mu$ l 封闭溶液(1g BSA 溶解于 100ml 洗涤溶液中)到酶标板孔中,并用塑料薄膜盖住酶标板,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时后,弃去孔内溶液;加入 200  $\mu$ l 洗涤溶液洗涤酶标板,重复 3 次;

[0058] (3) 加入质控品:依次往酶标板上不同的孔中加入(一)中制备出的质控品 100  $\mu$ l 以及病人阳性血液标准品 100  $\mu$ l,其中每种质控品应重复加入一次,即加到两个相邻的孔中,每孔均为 100  $\mu$ l,并用塑料薄膜盖住酶标板,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟后,弃去孔内溶液,加入 200  $\mu$ l 洗涤溶液洗涤酶标板,重复 5 次;

[0059] (4) 加入酶标二抗:加入酶标二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG)工作液 100  $\mu$ l 到酶标板的各孔中,并用塑料薄膜盖住酶标板,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟后,弃去孔内溶液,加入 200  $\mu$ l 洗涤溶液洗涤酶标板,重复 5 次;

[0060] (5) 检测:加入显色液 A (含柠檬酸 35.8g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  9.34g/L, 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  660  $\mu$ l) 和显色液 B (含 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 0.2g/L, 二甲基亚砷 5ml/L, 6N HCl 1ml/L) 各 50  $\mu$ l,并用塑料薄膜盖住酶标板,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟后,加入终止溶液(2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

50  $\mu$  l, 用酶标仪读取 450nm 和 630nm 波长时的吸光度值 (A450/A630), 并进行校正, 即 A450 值减去 A630 值 ( $OD_{450\ 630}$ )。实验结果如表 1 所示。

[0061] 病人阳性血液标准品是指对收集的病人阳性血清经过多重筛选, 把含有干扰性物质的血清剔除, 从而避免出现假阳性, 主要用于评价实验结果的有效性、稳定性和可比性。

[0062] 若要使所制备出的质控品能够替代病人 HSV-II 抗体阳性血液, 业内推荐标准: 在相同条件下利用本实施例中的间接 ELISA 法测得病人阳性血液标准品和所制备出的质控品的  $OD_{450\ 630} > 0.8$ , 最佳为 2.0。由表 1 可知, 当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比分别为 50%、70%、90% 和 100% 时, 所制备出的质控品  $OD_{450\ 630}$  都远大于 0.8, 符合业内推荐标准, 与病人阳性血液标准品相比, 性能相当甚至更好, 因此可替代病人阳性血液标准品。当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比越高时,  $OD_{450\ 630}$  越高, 这种质控品的替代性越好, 并且当所制备出的质控品  $OD_{450\ 630} > 2.0$  时, 这就表明所制备出的质控品还应进一步稀释, 从而减少所制备出的质控品在每次检测时的用量。另外, 每种质控品是由所制备出的异源交联物利用小牛血清进行稀释而产生的, 这就表明包含四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物作为病人阳性血液中 HSV-II 抗体替代物, 可以很好地替代病人阳性血液中的 HSV-II 抗体。

[0063] 表 1. 小鼠 anti-HSV-II McAb 和人 IgG 的异源交联物替代性实验

[0064]

四聚体形式的 异源交联抗体所占 质量比	$OD_{450-630}$ (重复 1)	$OD_{450-630}$ (重复 2)	病人阳性血液 标准品
50%	1.612	1.648	1.667
70%	1.684	1.734	
90%	1.847	1.872	
100%	2.023	1.942	

[0065] 选择四聚体形式的异源交联抗体在实施例 1 中所制备出的异源交联物中所占的质量比为 90% 的异源交联物作为病人阳性血液中 HSV-II 抗体替代物, 所述异源交联物经小牛血清稀释 20 倍至 25  $\mu$  g/ml 而制备出质控品, 从中选择三个不同批次的质控品作为病人阳性血液替代物开展实验, 以评估不同批次质控品之间的差异, 仍然选择间接 ELISA 方法开展实验, 结果如表 2 所示。

[0066] 表 2. 质控品批间差评估表

[0067]

不同批次的 异源交联物	OD <sub>450-550</sub>		
	重复 1	重复 2	重复 3
Lot 1	1.853	1.899	1.875
Lot 2	1.847	1.872	1.861
Lot 3	1.837	1.848	1.856

[0068] 由表 2 中的数据计算批间 CV=1.09%，远小于 5%，可知不同批次的替代病人阳性血液的质控品之间的差异非常小，说明本发明的质控品具有非常好的批间稳定性和一致性，因此能够有效地降低因为批间差异引起的检测误差。

[0069] 将四聚体形式的异源交联抗体在实施例 1 中所制备出的异源交联物中所占质量比为 50%、70%、90% 和 100% 时的异源交联物都利用实施例 1 中的交联缓冲液稀释至 0.5mg/ml，取 0.5ml 稀释后的异源交联物溶液，放于 1ml 离心管中，分别在 -20℃ 和 4℃ 下保存一个月后，用交联缓冲液稀释 100 倍，仍然利用间接 ELISA 法检测这些异源交联物的稳定性。实验结果表明本发明所制备出的含有四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物作为病人阳性血液中 HSV-II 抗体替代物，具有非常好的稳定性。

[0070] 此外，以四聚体形式的异源交联抗体在实施例 1 中制备出的异源交联物中所占的质量比 90% 时为例进行冻存稳定性测试。将三个不同批次的所述异源交联物加入到适量冻存液中至终浓度均为 5mg/ml，其中这种冻存液包括 50% 甘油、1% 的 BSA 和 0.01% 的硫柳汞，然后分别取 0.1ml 加入所述异源交联物的冻存液，装入三个不同的 0.5ml 的离心管中，将这三个离心管放置在 -20℃ 的冰箱中保存 4 个月，4 个月取出这三个离心管，待冻融后，将每个离心管中的溶液用交联缓冲液稀释至 25 μg/ml，仍然利用间接 ELISA 法检测，结果如表 3 所示：

[0071] 表 3. 小鼠 anti-HSV-II McAb 和人 IgG 的异源交联物 -20℃ 下冻存稳定性实验

[0072]

不同批次异源交联 物(质量比为 90%)	OD <sub>450-550</sub>	
	重复 1	重复 2
Lot 1	1.803	1.840
Lot 2	1.815	1.836
Lot 3	1.797	1.827

[0073] 由表 3 中的数据可知，与在同样的检测条件下获得的冻存前的数据(参见表 2)相比，这三个不同批次的异源交联物的检测效价在冻存液中 -20℃ 下保存 4 个月后均无显著降低，因此其作为病人阳性血液中 HSV-II 抗体替代物，具有非常好的冻存稳定性。

[0074] 实施例 3 小鼠 anti-HSV-I McAb 和健康的未感染 HSV-I 的人 IgG 的异源交联物替代性实验

[0075] 利用 SPDP 交联剂制备小鼠 anti-HSV-I McAb 和健康的未感染 HSV-I 的人 IgG 的异源交联物作为病人阳性血液中 HSV-I 抗体替代物,除了用小鼠 anti-HSV-I McAb 替换小鼠 anti-HSV-II McAb 之外,具体过程与实施例 1 中的一样。

[0076] 利用实施例 3 制备出的小鼠 anti-HSV-I McAb 和健康的未感染 HSV-I 的人 IgG 的异源交联物作为病人阳性血液中 HSV-I 抗体的替代物开展实验。依次配制出四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比在 50%、70%、90% 和 100% 时的异源交联物。当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比为 50%、70% 或 90% 时,剩余 50%、30% 或 10% 的异源交联物包括由小鼠 anti-HSV-I McAb 和健康的未感染 HSV-I 的人 IgG 形成的二聚体形式的异源交联抗体和 / 或三聚体形式的异源交联抗体,但不包括未发生交联的小鼠 anti-HSV-I McAb 和健康的未感染 HSV-I 的人 IgG。利用实施例 1 中的交联缓冲液稀释,使这些异源交联物的初始浓度均为 0.5mg/ml,并利用小牛血清进行 100 倍稀释至 5  $\mu$ g/ml 而制备出质控品,然后利用间接 ELISA 法检测进行检测(具体步骤参照实施例 2)。实验结果如表 4 所示。

[0077] 若要使所制备出的质控品能够替代病人 HSV-I 抗体阳性血液标准品,业内推荐标准:在相同条件下利用实施例 2 中的间接 ELISA 法测得病人阳性血液标准品和所制备出的质控品的  $OD_{450\ 630} > 1.5$ ,最佳为 2.0 ~ 2.5。由表 4 可知,当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比分别为 50%、70%、90% 和 100% 时,所制备出的质控品  $OD_{450\ 630}$  都远大于 1.5,符合业内推荐标准,与病人阳性血液标准品相比,性能相当甚至更好,因此可替代病人阳性血液标准品。当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比越高时, $OD_{450\ 630}$  越高,这种质控品的替代性越好,并且当所制备出的质控品  $OD_{450\ 630} > 2.5$  时,这就表明所制备出的质控品还应进一步稀释,从而减少所制备出的质控品在每次检测时的用量。另外,每种质控品是由所制备出的异源交联物利用小牛血清进行稀释而产生的,这就表明包含四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物作为病人阳性血液中 HSV-I 抗体替代物,可以很好地替代病人阳性血液中的 HSV-I 抗体。

[0078] 表 4. 小鼠 anti-HSV-I McAb 和人 IgG 的异源交联物替代性实验

[0079]

四聚体形式的 异源交联抗体 所占质量比	$OD_{450\ 630}$ (重复 1)	$OD_{450\ 630}$ (重复 2)	病人阳性血液 标准品
50%	2.426	2.476	2.432
70%	2.646	2.597	
90%	2.855	2.894	
100%	3.012	2.986	

[0080] 将四聚体形式的异源交联抗体在实施例 3 中所制备出的异源交联物中所占质量比为 50%、70%、90% 和 100% 时的异源交联物都利用实施例 1 中的交联缓冲液稀释至 0.5mg/ml,取 0.5ml 稀释后的异源交联物溶液,放于 1ml 离心管中,分别在 -20℃ 和 4℃ 下保存一个

月后,用交联缓冲液稀释 100 倍,仍然利用间接 ELISA 法检测这些异源交联物的稳定性。实验结果表明本发明所制备出的含有四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物作为病人阳性血液中 HSV-I 抗体替代物,具有非常好的稳定性。

[0081] 实施例 4 小鼠 anti-RV McAb 和健康的未感染 RV 的人 IgG 的异源交联物替代性实验

[0082] 利用 SPDP 交联剂制备小鼠 anti-RV McAb 和健康的未感染 RV 的人 IgG 的异源交联物作为病人阳性血液中 RV 抗体替代物,除了用小鼠 anti-RV McAb 替换小鼠 anti-HSV-II McAb 之外,具体过程与实施例 1 中的一样。

[0083] 利用实施例 4 制备出的小鼠 anti-RV McAb 和健康的未感染 RV 的人 IgG 的异源交联物作为病人阳性血液中 RV 抗体的替代物开展实验。依次配制出四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比在 50%、70%、90% 和 100% 时的异源交联物。当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比为 50%、70% 或 90% 时,剩余 50%、30% 或 10% 的异源交联物包括由小鼠 anti-RV McAb 和健康的未感染 RV 的人 IgG 形成的二聚体形式的异源交联抗体和 / 或三聚体形式的异源交联抗体,但不包括未发生交联的小鼠 anti-RV McAb 和健康的未感染 RV 的人 IgG。利用实施例 1 中的交联缓冲液进行稀释,使这些异源交联物的初始浓度均为 0.5mg/ml,并利用小牛血清进行 20 倍稀释至 25  $\mu$ g/ml 而制备出质控品,然后利用间接 ELISA 法进行检测(具体步骤参照实施例 2)。实验结果如表 5 所示。

[0084] 若要使所制备出的质控品能够替代病人 RV 抗体阳性血液标准品,业内推荐标准:在相同条件下利用实施例 2 中的间接 ELISA 法测得病人阳性血液标准品和所制备出的质控品的  $OD_{450\ 630} > 2.0$ ,最佳为 2.75。由表 5 可知,当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比分别为 50%、70%、90% 和 100% 时,所制备出的质控品  $OD_{450\ 630}$  都远大于 2.0,符合业内推荐标准,与病人阳性血液标准品相比,性能相当甚至更好,因此可替代病人阳性血液标准品。当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比越高时, $OD_{450\ 630}$  越高,这种质控品的替代性越好,并且当所制备出的质控品  $OD_{450\ 630} > 2.75$  时,这就表明所制备出的质控品还应进一步稀释,从而减少所制备出的质控品在每次检测时的用量。另外,每种质控品是由所制备出的异源交联物利用小牛血清进行稀释而产生的,这就表明包含四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物作为病人阳性血液中 RV 抗体替代物,可以很好地替代病人阳性血液中的 RV 抗体。

[0085] 表 5. 小鼠 anti-RV McAb 和人 IgG 的异源交联物替代性实验

[0086]

四聚体形式的 异源交联抗体 所占质量比	OD <sub>450-630</sub> (重复 1)	OD <sub>450-630</sub> (重复 2)	病人阳性血液 标准品
50%	2.516	2.578	2.564
70%	2.756	2.695	
90%	2.957	2.999	
100%	3.112	3.186	

[0087] 将四聚体形式的异源交联抗体在实施例 4 中所制备出的异源交联物中所占质量比为 50%、70%、90% 和 100% 时的异源交联物都利用实施例 1 中的交联缓冲液稀释至 0.5mg/ml, 取 0.5ml 稀释后的异源交联物溶液, 放于 1ml 离心管中, 分别在 -20℃ 和 4℃ 下保存一个月后, 用交联缓冲液稀释 100 倍, 仍然利用间接 ELISA 法检测这些异源交联物的稳定性。实验结果表明本发明所制备出的含有四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物作为病人阳性血液中 RV 抗体替代物, 具有非常好的稳定性。

[0088] 实施例 5 小鼠 anti-HCMV McAb 和健康的未感染 HCMV 的人 IgG 的异源交联物替代性实验

[0089] 利用 SPDP 交联剂制备小鼠 anti-HCMV McAb 和健康的未感染 HCMV 的人 IgG 的异源交联物作为病人阳性血液中 HCMV 抗体替代物, 除了用小鼠 anti-HCMV McAb 替换小鼠 anti-HSV-II McAb 之外, 具体过程与实施例 1 中的一样。

[0090] 利用制备出的小鼠 anti-HCMV McAb 和健康的未感染 HCMV 的人 IgG 的异源交联物作为病人阳性血液中 HCMV 抗体的替代物开展实验。依次配制出四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比在 50%、70%、90% 和 100% 时的异源交联物。当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比为 50%、70% 或 90% 时, 剩余 50%、30% 或 10% 的异源交联物包括由小鼠 anti-HCMV McAb 和健康的未感染 HCMV 的人 IgG 形成的二聚体形式的异源交联抗体和 / 或三聚体形式的异源交联抗体, 但不包括未发生交联的小鼠 anti-HCMV McAb 和健康的未感染 HCMV 的人 IgG。利用实施例 1 中的交联缓冲液进行稀释, 使这些异源交联物的初始浓度均为 0.5mg/ml, 并利用小牛血清进行 100 倍稀释至 5 μg/ml 而制备出质控品, 然后利用间接 ELISA 法进行检测(具体步骤参照实施例 2)。实验结果如表 6 所示。

[0091] 若要使所制备出的质控品能够替代病人 HCMV 抗体阳性血液, 业内推荐标准: 在相同条件下利用实施例 2 中的间接 ELISA 法测得病人阳性血液标准品和所制备出的质控品的 OD<sub>450-630</sub> > 1.5, 最佳为 2.6。由表 6 可知, 当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比分别为 50%、70%、90% 和 100% 时, 所制备出的质控品 OD<sub>450-630</sub> 都远大于 1.5, 符合业内推荐标准, 与病人阳性血液标准品相比, 性能相当甚至更好, 因此可替代病人阳性血液标准品。当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比越高时, OD<sub>450-630</sub> 越高, 这种质控品的替代性越好, 并且当所制备出的质控品 OD<sub>450-630</sub> > 2.6 时, 这就表明所制备出的质控品还应进一步稀释, 从而减少所制备出的质控品在每次检测

时的用量。另外,每种质控品是由所制备出的异源交联物利用小牛血清进行稀释而产生的,这就表明包含四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物作为病人阳性血液中 HCMV 抗体替代物,可以很好地替代病人阳性血液中的 HCMV 抗体。

[0092] 表 6. 小鼠 anti-HCMV McAb 和人 IgG 的异源交联物替代性实验

[0093]

四聚体形式的 异源交联抗体 所占质量比	OD <sub>450-630</sub> (重复 1)	OD <sub>450-630</sub> (重复 2)	病人阳性血液 标准品
50%	2.335	2.412	2.235
70%	2.515	2.549	
90%	2.802	2.785	
100%	3.001	3.121	

[0094] 将四聚体形式的异源交联抗体在实施例 5 中所制备出的异源交联物中所占质量比为 50%、70%、90% 和 100% 时的异源交联物都利用实施例 1 中的交联缓冲液稀释至 0.5mg/ml,取 0.5ml 稀释后的异源交联物溶液,放于 1ml 离心管中,分别在 -20℃ 和 4℃ 下保存一个月后,用交联缓冲液稀释 100 倍,仍然利用间接 ELISA 法检测这些异源交联物的稳定性。实验结果表明本发明所制备出的含有四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物作为病人阳性血液中 HCMV 抗体替代物,具有非常好的稳定性。

[0095] 实施例 6 小鼠 anti-TOXO McAb 和健康的未感染 TOXO 的人 IgG 的异源交联物替代性实验

[0096] 利用 SPDP 交联剂制备小鼠 anti-TOXO McAb 和健康的未感染 TOXO 的人 IgG 的异源交联物作为病人阳性血液中 TOXO 抗体替代物,除了用小鼠 anti-TOXO McAb 替换小鼠 anti-HSV-II McAb 之外,具体过程与实施例 1 中的一样。

[0097] 利用制备出的小鼠 anti-TOXO McAb 和健康的未感染 TOXO 的人 IgG 的异源交联物作为病人阳性血液中 TOXO 抗体的替代物开展实验。依次配制出四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比在 50%、70%、90% 和 100% 时的异源交联物。当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比为 50%、70% 或 90% 时,剩余 50%、30% 或 10% 的异源交联物包括由小鼠 anti-TOXO McAb 和健康的未感染 TOXO 的人 IgG 形成的二聚体形式的异源交联抗体和 / 或三聚体形式的异源交联抗体,但不包括未发生交联的小鼠 anti-TOXO McAb 和健康的未感染 TOXO 的人 IgG。利用实施例 1 中的交联缓冲液进行稀释,使这些异源交联物的初始浓度均为 0.4mg/ml,并利用小牛血清进行 20 倍稀释至 20 μg/ml 而制备出质控品,然后利用间接 ELISA 法进行检测(具体步骤参照实施例 2)。实验结果如表 7 所示。

[0098] 若要使所制备出的质控品能够替代病人 TOXO 抗体阳性血液,业内推荐标准:在相同条件下利用实施例 2 中的间接 ELISA 法测得病人阳性血液标准品和所制备出的质控品的 OD<sub>450-630</sub> > 1.5,最佳为 2.4。由表 7 可知,当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源

交联物中所占的质量比分别为 50%、70%、90% 和 100% 时,所制备出的质控品  $OD_{450\ 630}$  都远大于 1.5,符合业内推荐标准,与病人阳性血液标准品相比,性能相当甚至更好,因此可替代病人阳性血液标准品。当四聚体形式的异源交联抗体在所制备出的异源交联物中所占的质量比越高时, $OD_{450\ 630}$  越高,这种质控品的替代性越好,并且当所制备出的质控品  $OD_{450\ 630} > 2.4$  时,这就表明所制备出的质控品还应进一步稀释,从而减少所制备出的质控品在每次检测时的用量。另外,每种质控品是由所制备出的异源交联物利用小牛血清进行稀释而产生的,这就表明包含四聚体形式的异源交联抗体在内的异源交联物作为病人阳性血液中 TOXO 抗体替代物,可以很好地替代病人阳性血液中的 TOXO 抗体。

[0099] 表 7. 小鼠 anti-TOXO McAb 和人 IgG 的异源交联物替代性实验

[0100]

四聚体形式的 异源交联抗体 所占质量比	$OD_{450\ 630}$ (重复 1)	$OD_{450\ 630}$ (重复 2)	病人阳性血液 标准品
50%	1.835	1.796	1.842
70%	1.986	2.032	
90%	2.346	2.405	
100%	2.543	2.602	

[0101] 将四聚体形式的异源交联抗体在实施例 6 中所制备出的异源交联物中所占质量比为 50%、70%、90% 和 100% 时的异源交联物都利用实施例 1 中的交联缓冲液稀释至 0.5mg/ml,取 0.5ml 稀释后的异源交联物溶液,放于 1ml 离心管中,分别在 -20℃ 和 4℃ 下保存一个月后,用交联缓冲液稀释 100 倍,仍然利用间接 ELISA 法检测这些异源交联物的稳定性。实验结果表明本发明所制备出的含有四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物作为病人阳性血液中 TOXO 抗体替代物,具有非常好的稳定性。

专利名称(译)	一种替代病人阳性血液的质控品		
公开(公告)号	<a href="#">CN103383393B</a>	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN201310267569.X	申请日	2013-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	英克隆生物技术(杭州)有限公司		
申请(专利权)人(译)	英克隆生物技术(杭州)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	英克隆生物技术(杭州)有限公司		
[标]发明人	潘剑用 周海涛 闵丹		
发明人	潘剑用 周海涛 闵丹		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	Y02A50/58		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN103383393A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种由两种异源的抗体通过交联反应而获得的包括四聚体形式的异源交联抗体的异源交联物，其中所述四聚体形式的异源交联抗体在所述异源交联物中所占的质量比优选不小于50%，可作为一种病人阳性血液中病原体抗体的替代物，经稀释液稀释后，作为替代病人阳性血液的质控品用于免疫检测试剂盒中。所述异源交联物生产制备简单、成本低，同时具有非常好的安全性和稳定性。此外，不同批次的质控品之间质量稳定，可有效降低检测误差。

