



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108699127 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201680082977.X

(22)申请日 2016.12.28

(30)优先权数据

62/274,115 2015.12.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/068901 2016.12.28

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/117236 EN 2017.07.06

(71)申请人 西门子医疗保健诊断公司

地址 美国纽约州

(72)发明人 S.林 K.奥塞-夸彭 O.库赖施

S.辛哈 M.史密斯

S.迪夫兰西斯科 R.斯皮尔斯

D.拉瓦尔 D.霍瓦内奇-伯恩斯

R.欧文斯

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 梁谋 周李军

(51)Int.Cl.

G07K 14/65(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/487(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

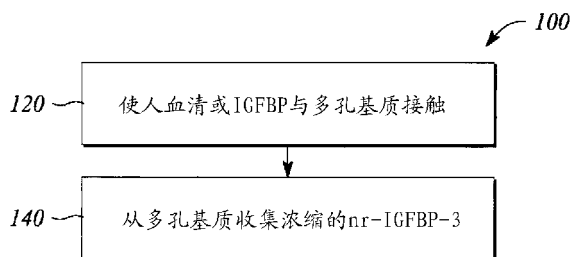
权利要求书2页 说明书27页 附图5页

(54)发明名称

非重组人胰岛素-样生长因子结合蛋白浓缩物

(57)摘要

人胰岛素-样生长因子(IGF)结合蛋白储备溶液和制备它们的方法包括在水性缓冲介质中的非重组人IGF结合蛋白-3(nr-IGFBP-3)。所述储备溶液中的nr-IGFBP-3的浓度是在约16微克/毫升( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )至约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内。包括nr-IGFBP-3的校准物集合的试剂盒。所述校准物的集合包括在约0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内的不同浓度的nr-IGFBP-3,其被构造成包括患者样品的免疫测定中的IGFBP-3分析物水平的可疑范围。



1. 一种人胰岛素-样生长因子 (IGF) 结合蛋白储备溶液, 其包含:  
在水性缓冲介质中的非重组人 IGF 结合蛋白-3 (nr-IGFBP-3), 其具有在约 16 微克/毫升 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 至约 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内的 nr-IGFBP-3 浓度。
2. 权利要求 1 的人 IGF 结合蛋白储备溶液, 其中所述 nr-IGFBP-3 浓度是在约 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  至约 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的范围内。
3. 包含权利要求 1 的人 IGF 结合蛋白储备溶液的校准标准品集合, 其中所述集合的每种校准标准品具有不同的 nr-IGFBP-3 浓度, 所述集合中的校准标准品的不同 nr-IGFBP-3 浓度是在约 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  至约 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的范围内。
4. 权利要求 1 的人 IGF 结合蛋白储备溶液, 其中所述人 IGF 结合蛋白储备溶液不包括重组 IGF 结合蛋白。
5. 权利要求 1 的人 IGF 结合蛋白储备溶液, 其中所述 nr-IGFBP-3 的水性缓冲介质不包括重组 IGFBP-3。
6. 用于 IGFBP-3 分析物免疫测定的校准物集合, 所述集合的每种校准物包含用人血清稀释剂稀释的权利要求 1 的人 IGF 结合蛋白储备溶液, 其中所述集合的校准物的 nr-IGFBP-3 浓度是不同的, 所述不同的 nr-IGFBP-3 浓度被构造成包括患者样品中的 IGFBP-3 分析物水平的可疑范围。
7. 权利要求 6 的校准物的集合, 其中所述人血清稀释剂是基本上不含有 IGF 结合蛋白的酸处理过的、木炭吸附的人血清。
8. 一种试剂盒, 其包含人胰岛素-样生长因子 (IGF) 结合蛋白的校准物集合, 所述集合的每种校准物包含含有非重组人 IGF 结合蛋白 3 (nr-IGFBP-3) 的水溶液, 其中所述集合的每种校准物中的 nr-IGFBP-3 浓度是不同的, 所述集合中的 nr-IGFBP-3 的不同浓度是在约 0.5 微克/毫升 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 至约 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的范围内。
9. 权利要求 8 的试剂盒, 其中所述校准物集合中的 nr-IGFBP-3 的不同浓度范围被构造成包括患者样品中的 IGFBP-3 分析物和 IGF-1 分析物中的一种或两种的浓度的可疑范围, 所述集合中的校准物是具有在约 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  至约 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内的 nr-IGFBP-3 浓度的人 IGF 结合蛋白储备溶液的不同稀释液。
10. 权利要求 8 的试剂盒, 其中所述集合的每种校准物进一步包含人血清稀释剂, 所述人血清稀释剂包含基本上不含有 IGF 结合蛋白的酸处理过的、木炭吸附的人血清, 所述人血清稀释剂的量被构造成将所述 nr-IGFBP-3 稀释至不同的 nr-IGFBP-3 浓度范围。
11. 权利要求 8 的试剂盒, 其中所述校准物的集合不包括重组人 IGF 结合蛋白。
12. 一种形成非重组人胰岛素-样生长因子 (IGF) 结合蛋白 3 (nr-IGFBP-3) 在水溶液中的浓缩物的方法, 所述方法包括:  
使人血清和来自人血清的 IGF 结合蛋白之一的水溶液与多孔基质接触; 和  
从所述多孔基质收集水溶液中浓缩的 nr-IGFBP-3, 在水溶液中的收集的 nr-IGFBP-3 具有在约 16 微克/毫升 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 至约 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内的浓度。
13. 权利要求 12 的形成 nr-IGFBP-3 浓缩物的方法, 其中所述多孔基质是超滤盘、过滤膜和基于琼脂糖的树脂中的一种或多种。
14. 权利要求 12 的形成 nr-IGFBP-3 浓缩物的方法, 所述方法进一步包括提供人血清的水溶液, 其中所述提供人血清的水溶液包括将人血清与第一缓冲溶液混合, 且其中使所述

人血清的水溶液与所述多孔基质接触包括：

将所述第一缓冲溶液中的人血清应用于含有用第二缓冲溶液平衡过的基于琼脂糖的树脂的色谱柱以从所述人血清中的其它血清蛋白分离nr-IGFBP-3；

用第三缓冲溶液从所述基于琼脂糖的树脂洗脱nr-IGFBP-3；和

将所述第三缓冲溶液中的洗脱的nr-IGFBP-3用交换缓冲液应用于过滤膜，以对水溶液中的nr-IGFBP-3进行缓冲液交换和浓缩。

15. 权利要求12的形成nr-IGFBP-3浓缩物的方法，所述方法进一步包括提供IGF结合蛋白的水溶液，其中提供IGF结合蛋白的水溶液包括：

将所述人血清与饱和的抗-离液盐溶液混合以形成混合物；

从所述混合物分离所述IGF结合蛋白；和

在缓冲溶液中重构分离的IGF结合蛋白，和

其中使IGF结合蛋白的水溶液与所述多孔基质接触包括将缓冲溶液中的重构的IGF结合蛋白用交换缓冲液应用于过滤膜和超滤盘中的一种或两种以对水溶液中的nr-IGFBP-3进行缓冲液交换和浓缩。

16. 权利要求15的形成nr-IGFBP-3浓缩物的方法，其中所述饱和的抗-离液盐溶液包含在水中的抗-离液硫酸盐。

17. 权利要求15的形成nr-IGFBP-3浓缩物的方法，其中所述饱和的抗-离液盐溶液包含在磷酸钠溶液中的硫酸铵盐。

18. 权利要求12的形成nr-IGFBP-3浓缩物的方法，其中使人血清和来自人血清的IGF结合蛋白之一的水溶液与多孔基质接触包括使用缓冲液交换溶液的切向流过滤。

19. 权利要求12的形成nr-IGFBP-3浓缩物的方法，所述方法进一步包括用浓缩的nr-IGFBP-3溶液制备校准物的集合，所述集合的每种校准物中的nr-IGFBP-3的浓度是不同的，所述集合中的nr-IGFBP-3的不同浓度是在约0.5 $\mu$ g/ml至约16 $\mu$ g/ml的范围内，所述校准物的集合被构造成校准患者样品中的IGFBP-3和IGF-1中的一种或两种的测量。

20. 权利要求19的形成nr-IGFBP-3浓缩物的方法，其中制备所述校准物的集合包括用不同量的酸处理过的和木炭吸附的基本上不含有IGF结合蛋白的人血清稀释剂稀释所述浓缩的nr-IGFBP-3溶液。

## 非重组人胰岛素-样生长因子结合蛋白浓缩物

### [0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求于2015年12月31日提交的美国临时申请号62/274,116的优先权,其通过引用整体并入本文。

### [0002] 关于联邦资助的研究或开发的声明

不适用

### 背景

胰岛素-样生长因子(IGF)(例如,IGF-1和IGF-2)属于参与细胞生长调节的蛋白激素家族。肝分泌IGF-1,例如,作为生长激素(GH)刺激的结果。IGF的作用通过与胰岛素-样生长激素结合蛋白(IGFBP)的结合来介导。存在六种对IGF-1和IGF-2具有高亲和力的IGF结合蛋白(例如,IGFBP-1至IGFBP-6),其中IGFBP-3是最占优势的。IGFBP促进IGF的作用的调节,以便实现以下一种或两种:在某些情形下抑制IGF作用,和在其它情形下促进IGF作用。具体地,IGF-1以1:1摩尔比结合IGFBP-3。看起来IGFBP-3的生成与IGF-1一样取决于生长激素GH,而相反,IGFBP-1生成受肽激素胰岛素调节。

[0003] IGFBP-3将在血流中的IGFBP-3的稳定复合物内的IGF(例如,IGF-1或IGF-2)和酸不稳定的亚基(ALS)蛋白(也是GH依赖性的)运输至身体组织,且IGFBP-3具有循环功能、细胞外功能和细胞内功能。例如,IGFBP-3可以结合来自不同细胞类型的IGF;可以阻断IGF向IGF受体的接近;可以与细胞表面处的蛋白相互作用;和可以结合细胞核中的激素受体。

[0004] 为了表征健康和疾病的目的,监测人体中的IGF水平。例如,在结构上与胰岛素类似的IGF-1在儿童期生长中起重要作用。在儿童期发育中监测IGF的水平有助于表征发育是否是正常的。在其它例子中,IGF在监测糖尿病中和可能在监测老化和癌症中起重要作用。因此,通过血清免疫测定监测人类中的IGF的水平、特别是IGFBP-3水平会为监测儿童和成年人提供重要的诊断工具。

[0005] 将来自人血清的患者样品的免疫测定的关于IGFBP-3水平的结果与一组已知IGFBP-3浓度的校准物或标准品进行对比。例如,在多种浓度制备IGFBP-3校准标准品,所述浓度包括在患者样品中预见到的IGFBP-3分析物的可疑目标浓度范围。使用校准物来校准免疫测定设备,包括、但不限于,IMMULITE®系统和CENTAUR®系统,例如,二者来自Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.,使得可以准确地测量人患者中的IGFBP-3分析物水平。

[0006] 尽管IGFBP-3在人血清中是相对丰富的,但是已经发现为了制备用于免疫测定的校准标准品集合而以足够浓度从人血液中分离IGFBP-3是有问题的和困难的。相反,人IGFBP-3的重组形式已经用于制备患者样品的免疫测定所用的校准标准品。

[0007] 不幸的是,人IGFBP-3的商购可得重组形式是昂贵的,且可能不具有IGFBP-3的纯人形式所具有的结构完整性。因此,在免疫测定校准标准品中使用人IGFBP-3的重组形式的负面影响可能是比仅仅成本问题更显著的。

### [0008] 发明概述

在某些实施方案中,根据本文描述的原理,提供了一种人胰岛素-样生长因子(IGF)结合蛋白储备溶液。所述人胰岛素-样生长因子(IGF)结合蛋白储备溶液包含在水性缓冲介质

中的非重组人IGF结合蛋白-3 (nr-IGFBP-3),其具有在约16微克/毫升( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )至约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内的nr-IGFBP-3浓度。

[0009] 在某些实施方案中,根据本文描述的原理,提供了一种试剂盒,其包含人胰岛素-样生长因子(IGF)结合蛋白的校准标准品集合。所述集合的每种校准标准品包含含有非重组人IGF结合蛋白3 (nr-IGFBP-3)的水溶液。所述集合的每种校准标准品中的nr-IGFBP-3的浓度是不同的,且所述集合中的nr-IGFBP-3的不同浓度是在约0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内。

[0010] 在某些实施方案中,根据本文描述的原理,提供了一种形成非重组人胰岛素-样生长因子(IGF)结合蛋白3 (nr-IGFBP-3)在水溶液中的浓缩物的方法。所述方法包括:使人血清和来自人血清的IGF结合蛋白之一的水溶液与多孔基质接触,和,在接触所述多孔基质以后,收集水溶液中浓缩的nr-IGFBP-3,其中所述水溶液中收集的nr-IGFBP-3具有在约16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内的浓度。

[0011] 附图简述

参考以下结合附图的详细描述,可以更容易地理解根据本文描述的原理的实施方案和实施例的不同特征,其中相同的附图标记表示相同的结构元件,且其中:

图1A解释了根据符合本文描述的原理的一个实施方案,在一个实施例中形成非重组人胰岛素-样生长因子(IGF)结合蛋白3 (nr-IGFBP-3)在水溶液中的浓缩物的方法的程序框图。

[0012] 图1B解释了根据符合本文描述的原理的一个实施方案,在一个实施例中在图1A的方法中使人血清的水溶液与多孔基质接触的过程的程序框图。

[0013] 图2解释了根据符合本文描述的原理的一个实施方案,在一个实施例中提供来自人血清的IGF结合蛋白的溶液的程序框图。

[0014] 图3解释了根据符合本文描述的原理的一个实施方案,在一个实施例中制备基本上不含有胰岛素-样生长因子(IGF)结合蛋白的人血清稀释剂的方法的程序框图。

[0015] 图4解释了根据符合本文描述的原理的一个实施方案,在一个实施例中以相对光单位(RLU)表示的相对于IMMULITE® 赋值标准品的来自原型CENTAUR® XP测定的硫酸铵沉淀的nr-IGFBP-3剂量响应的图。

[0016] 图5解释了根据符合本文描述的原理的一个实施方案,在一个实施例中对比来自原型CENTAUR® XP测定的硫酸铵沉淀的nr-IGFBP-3校准标准品的剂量值(完全曲线)和IMMULITE® 赋值标准品的图。

[0017] 图6解释了根据符合本文描述的原理的一个实施方案,在一个实施例中对比来自原型CENTAUR® XP测定的硫酸铵沉淀的nr-IGFBP-3校准标准品的剂量值(2-点计算)和IMMULITE® 赋值标准品的图。

[0018] 图7解释了根据符合本文描述的原理的一个实施方案,在一个实施例中来自酸处理过的、木炭吸附的人血清的血清蛋白('0D280')和nr-IGFBP-3的洗脱特性的条形图。

[0019] 图8解释了根据符合本文描述的原理的一个实施方案,在一个实施例中在原型CENTAUR® XP测量的结果与用酸处理过的、木炭吸附的人血清稀释过的样品的计算结果之间的线性关系的图。

[0020] 某些实施例和实施方案具有其它特征,所述其它特征是以下情况之一或二者:除

了上面提及的附图中所述的特征之外,和替代上面提及的附图中所述的特征。在下面参考上面提及的附图详述了这些和其它特征。

[0021] 发明详述

符合本文描述的的原理的实施方案和实施例提供了人胰岛素-样生长因子(IGF)结合蛋白的储备溶液,其包含人IGF结合蛋白-3的非重组形式(nr-IGFBP-3)在水性介质中的浓缩物。所述储备溶液中的nr-IGFBP-3浓缩物具有足以制备IGFBP-3分析物患者样品的免疫测定的校准标准品集合的浓度。短语‘足以制备校准标准品集合的浓度’是指,所述储备溶液中的nr-IGFBP-3的浓度至少与特定测定的nr-IGFBP-3校准标准品(‘校准物’)的最高浓度一样高。

[0022] 符合本文描述的的原理的实施方案和实施例还提供了包含nr-IGFBP-3的不同浓度的校准标准品集合,其被构造成包括在患者样品中预见到的IGFBP-3分析物的可疑目标浓度范围。在某些实施例中,人患者样品中的IGFBP-3分析物水平可以在从低至约0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (其中在测定中的定量限度(LOQ)小于约0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )到高至约16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内。但是,人血清通常具有约4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的nr-IGFBP-3的范围,这是不足以制备校准标准品来包括人患者中的可疑范围的浓度。根据本文描述的原理,所述IGF结合蛋白储备溶液具有在约16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内的nr-IGFBP-3浓度。

[0023] 此外,从IGF结合蛋白储备溶液制备包括患者样品IGFBP-3分析物的可疑浓度范围的校准标准品集合。所述集合的校准标准品具有在约0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内的不同nr-IGFBP-3浓度。通过形成nr-IGFBP-3在水溶液中的浓缩物的方法来制备所述IGF结合蛋白储备溶液。所述方法包括:使人血清或来自人血清的IGF结合蛋白的水溶液与多孔基质接触,和从所述多孔基质收集水溶液中浓缩的nr-IGFBP-3,其中所述浓缩的水溶液中的nr-IGFBP-3具有在约16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内的浓度。使人血清或来自人血清的IGF结合蛋白的水溶液与多孔基质接触被构造成执行缓冲液交换和浓缩nr-IGFBP-3溶液。在所述方法的某些实施例中,接触所述水溶液还提供以下一种或多种:将nr-IGFBP-3或IGF结合蛋白与溶液中的其它血清蛋白分离,将nr-IGFBP-3或IGF结合蛋白溶液脱盐,纯化和富集所述nr-IGFBP-3溶液。

[0024] 所述储备溶液中浓缩的nr-IGFBP-3处于与在人患者中所见相同的天然异质形式。‘天然异质形式’是指,来自人血清的nr-IGFBP-3被糖基化且可能具有几种形式,包括所述nr-IGFBP-3可以形成以下一种或多种:与IGF-1、IGF-2或ALS的二元复合物,与IGF-1或IGF-2和ALS的三元复合物,且可以不与这些中的任一种形成复合物。根据本文描述的原理,代表nr-IGFBP-3的天然异质形式的所有这些形式与在内源性人血清中发现的相同。nr-IGFBP-3的天然异质形式的名义分子量可以在例如约25千道尔顿(kDa)至约155 kDa的范围内。

[0025] IGFBP-3的重组形式在结构上以重要方式不同于来自人血液的nr-IGFBP-3。由于重组IGFBP-3形式的结构差异,在环境温度和和普通实验室的不同温度范围下,与内源性人来源相比,当使用IGFBP-3的重组来源时可以观察到剂量回收的显著偏差。通过本文中的定义,‘重组IGFBP-3’既不结合胰岛素-样生长因子(例如,IGF-1或IGF-2),又不结合酸不稳定的亚基(ALS)。此外,IGFBP-3的重组形式缺乏在人血液中的nr-IGFBP-3中所见的糖基化。重组IGFBP-3基本上是‘裸’形式。来自人血液的nr-IGFBP-3是如上所述的天然异质形式,其模仿人患者中的IGFBP-3,因为nr-IGFBP-3可以包括约150 kDa的三元复合物中的结合的IGF、

ALS和糖基化单元中的每一种,或可以与结合的IGF或ALS形成二元复合物,或可以没有与IGF或ALS形成复合物。

[0026] 本发明的发明人已经发现,重组IGFBP-3形式在通常与免疫测定温度条件有关的环境温度(即,约18摄氏度(°C)至约30°C)范围内具有温度偏倚,这可能对免疫测定准确度是有害的(如在下面的实施例部分中进一步提供的)。短语‘环境温度偏倚’是指,在样品中的重组IGFBP-3的测量浓度可能是不同的(取决于做出测量的实验室的温度)。

[0027] 例如,重组IGFBP-3的样品可以在24°C(即,环境温度)测量为3µg/ml。但是,如果将在其中使用或测量重组IGFBP-3的环境的温度变成低于或高于约24°C(例如,约18°C或约30°C),那么相同重组IGFBP-3样品的浓度也变成大于或小于在24°C环境测得的3µg/ml。来自人血液的nr-IGFBP-3以及人患者样品中的IGFBP-3分析物不具有该温度偏倚。这样,当考虑免疫测定和校准标准品时,观察到的重组IGFBP-3的温度偏倚是显著的。人患者样品中的IGFBP-3分析物水平的免疫测定测量的准确度取决于在执行所述免疫测定的温度范围内在所述免疫测定中使用的校准标准品和对照的准确度。

[0028] 此外,本文中使用的‘医学决策池’或(‘MDP’)被宽泛地定义为这样的校准标准品集合:其具有疑似在患者样品中测量的分析物的低(或最低)浓度范围。‘定量限制’(‘LOQ’)被宽泛地定义为可以可靠地测量的、疑似在患者样品中发现的分析物的最低浓度。例如,患者样品中的IGFBP-3分析物浓度的LOQ约等于或小于0.1µg/ml。

[0029] 此外,本文中使用的冠词‘一个/种’意图具有它在专利领域中的普通含义,即‘一个/种或多个/种’。例如,‘一种蛋白’是指一种或多种蛋白,且因此,‘所述蛋白’是指本文中的‘所述一种/多种蛋白’。并且,在本文中对‘顶’、‘底’、‘较上’、‘较下’、‘上’、‘下’、‘前’、‘后’、‘第一’、‘第二’、‘左’或‘右’的任何提及不意图成为本文中的限制。在本文中,当应用于值时,术语‘约’通常是指在用于产生所述值的设备的容许范围内,或可以是指±10%,或±5%,或±1%,或这些百分比值中的任意值之间的范围,除非另外明确地说明。此外,在本文中,如本文中使用的术语‘基本上’是指大多数,或几乎全部,或全部,或在约51%至约100%的范围内的量。此外,本文中的实施例意图仅仅是示例性的,并且为了讨论目的且不是作为限制而呈现。

#### [0030] 人IGF结合蛋白储备溶液

根据本文描述的原理的一些实施方案,提供了人IGF结合蛋白储备溶液,其包含在水性缓冲介质中的来自人血液的nr-IGFBP-3。所述IGF结合蛋白储备溶液具有nr-IGFBP-3的浓度,该浓度足以制备用于患者样品中的IGFBP-3分析物的免疫测定的校准标准品集合。具体地,所述IGF结合蛋白储备溶液中的nr-IGFBP-3的浓度足以制备包括人患者样品中的IGFBP-3分析物水平的可疑范围的校准标准品集合。在某些实施例中,所述IGF结合蛋白储备溶液具有在约16µg/ml至约40µg/ml范围内的nr-IGFBP-3的浓度。应当理解,所述nr-IGFBP-3处于如上所述的天然异质形式,且因此,在所述储备溶液中可能存在特定百分比的与IGF-1或IGF-2结合的总nr-IGFBP-3,例如,在1:1复合物中。

[0031] 在某些实施例中,所述IGF结合蛋白储备溶液中的nr-IGFBP-3浓度是在约16µg/ml至约38µg/ml、或约16µg/ml至约36µg/ml、或约16µg/ml至约34µg/ml、或约16µg/ml至约32µg/ml、或约16µg/ml至约30µg/ml的范围内。在某些实施例中,所述IGF结合蛋白储备溶液中的nr-IGFBP-3浓度是在约18µg/ml至约40µg/ml、或约20µg/ml至约40µg/ml、或约22µg/ml至

约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约26 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内。在某些实施例中,所述IGF结合蛋白储备溶液中的nr-IGFBP-3浓度是在约20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约36 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内,或大于20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 且小于40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在某些实施例中,所述IGF结合蛋白储备溶液中的nr-IGFBP-3浓度等于约25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或约35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在一个实施例中,所述IGF结合蛋白储备溶液中的nr-IGFBP-3浓度等于约30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0032] 如上所述,所述IGF结合蛋白储备溶液中的nr-IGFBP-3浓度足以制备校准标准品集合,其包括具有不同nr-IGFBP-3浓度的校准标准品,其中所述集合的校准标准品包括一系列nr-IGFBP-3浓度,所述浓度包括患者样品中的IGFBP-3分析物的可疑浓度范围。具体地,所述校准标准品集合包含用水性介质(例如,但不限于,水性缓冲介质、人血清或它们的组合或混合物,例如)稀释的IGF结合蛋白储备溶液。所述IGF结合蛋白储备溶液的稀释物被构造成提供所述集合的每种校准标准品中的nr-IGFBP-3的不同浓度。在某些实施例中,所述集合中的校准标准品的不同nr-IGFBP-3浓度是在约0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内。在下面进一步描述了所述校准标准品集合。

[0033] 根据本文中的不同实施方案,从人血清制备IGF结合蛋白储备溶液,并从所述人血清衍生出所述IGF结合蛋白储备溶液中的nr-IGFBP-3的水性缓冲介质。在某些实施例中,IGF结合蛋白储备溶液和nr-IGFBP-3的水性缓冲介质中的一种或两种不包括重组IGF结合蛋白。短语‘不包括重组IGF结合蛋白’是指,所述储备溶液或所述水性缓冲介质不包含重组IGF结合蛋白,或例如,约0%的重组IGF结合蛋白。在某些实施例中,可以在包含例如校准标准品集合的试剂盒中包括重组IGFBP-3参比对照。重组IGFBP-3参比对照(其可以是非-世界卫生组织(WHO)材料),可以得自英国国家生物标准品和对照研究所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)。

#### [0034] nr-IGFBP-3校准标准品集合和包含其的试剂盒

根据本文描述的原理的一些实施方案,提供了一种试剂盒,其包含用于人患者IGFBP-3分析物水平的免疫测定的校准物(例如,校准标准品或对照)的集合。所述集合的校准物是包含nr-IGFBP-3的水溶液,所述nr-IGFBP-3的浓度不同于在所述集合的其它校准物中的nr-IGFBP-3的浓度。所述集合中的校准物的不同浓度被构造成包括患者样品中的IGFBP-3分析物的可疑浓度范围。

[0035] 在某些实施例中,所述集合中的校准物的不同nr-IGFBP-3浓度是在约0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约18.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内以包括患者样品中的IGFBP-3分析物的可疑浓度范围。在某些实施例中,所述集合中的校准物的不同nr-IGFBP-3浓度是在约0.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约18.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约0.45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约18.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约0.55 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约18.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约0.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约18.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约18.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内,以包括患者样品中的IGFBP-3分析物的可疑浓度范围。在某些实施例中,所述集合中的校准物的不同nr-IGFBP-3浓度是在约0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约17.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约16.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约16.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约15.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约15.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约14.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约13.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内,以包括人患者样品中的IGFBP-3分析物的可疑浓度范围。此外,所述集合的一些单独校准物可以代表MDP标准品,例如,具有约0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或约6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的nr-IGFBP-3浓度的校准物可以被命名为MDP标准品。

[0036] 在某些实施例中,所述校准物的集合包括具有在约16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内的nr-IGFBP-3浓度的人IGF结合蛋白储备溶液的不同稀释液。在某些实施例中,所述人IGF结合蛋白储备溶液基本上类似于如上所述的人IGF结合蛋白储备溶液。用人血清稀释剂稀释所述人IGF结合蛋白储备溶液以达到所述校准物的集合的nr-IGFBP-3的不同浓度范围,其被构造成包括患者样品的免疫测定中的IGFBP-3分析物的可疑浓度范围。例如,所述校准物的集合可以具有包括约0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约16.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或约0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约14.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的一系列不同浓度,其中约0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 可以接近LOQ。短语‘人血清稀释剂’表示包含蛋白质内容物的溶液及其浓缩物,其尽可能接近或基本上等同于在人血清中所发现的。例如,使用尽可能接近人血清的人血清稀释溶液制备MDP标准品。

[0037] 短语‘水性缓冲介质’表示这样的水性介质:其可能仅仅是水或可能包括0.1至约40体积%的共溶剂,例如,水可混溶的有机溶剂,例如,醇、醚或酰胺。所述介质的pH通常是在约4至约11的范围内,或例如,在约5至约10的范围内,或在约6.5至约9.5的范围内,或在约7.0至约9.0的范围内。在加工过程中可以使用不同的缓冲剂来达到期望的pH和维持所述pH。示例性的缓冲剂包括、但不限于:例如,硼酸盐、磷酸盐、碳酸盐、Tris (即,三(羟基甲基)氨基-甲烷)、巴比妥、PIPES (即,哌嗪-N,N-双(2-乙磺酸))、HEPES (即,4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、MES (即,2-(N-吗啉代)-乙磺酸)、ACES (即,N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸)、MOPS (即,3-(N-吗啉代)丙烷磺酸)、N,N-双(2-羟基乙基)甘氨酸(即,N,N-双(2-羟基乙基)-甘氨酸)或这些中的两种或更多种的组合或混合物。

[0038] 在某些实施例中,所述集合的校准物进一步包含基本上不含有IGF结合蛋白的人血清稀释剂以稀释该校准物的nr-IGFBP-3的水溶液。在其它实施例中,所述集合的每种校准物进一步包含基本上不含有IGF结合蛋白的人血清稀释剂以将nr-IGFBP-3的水溶液稀释至所述集合的不同nr-IGFBP-3校准物浓度。短语‘基本上不含有IGF结合蛋白’是指,所述人血清稀释剂已经被改变成含有就开始人血清而言小于约2%(按体积计)的IGF结合蛋白,或就开始人血清而言小于约1.5%、或小于约1%、或约0%(按体积计)的IGF结合蛋白。例如,双重木炭吸附过的(stripped)和去脂质化的人血清,或例如,DDC MASS SPEC GOLD<sup>®</sup>血清(来自Golden West Biologicals, Inc., Temecula, CA),可以用作基本上不含IGF结合蛋白的人血清稀释剂。

[0039] 根据本文描述的原理的一个实施方案,在下面进一步描述了制备基本上不含有IGF结合蛋白的人血清稀释剂的方法。在其它实施例中,所述人血清稀释剂包括IGF结合蛋白,且所述人血清可以是例如粗血浆或粗血清或经加工的血浆或经加工的血清。用作含有IGF结合蛋白的人血清稀释剂的人血浆或血清可以得自例如Bioresource Technologies (BRT), Weston, FL。

[0040] 此外,在某些实施例中,尽管所述免疫测定试剂盒可能包括重组IGFBP-3参比对照,但是所述校准标准品集合中的校准物不包括重组IGF结合蛋白。换言之,用于确定患者样品免疫测定中的nr-IGFBP-3的水平校准标准品集合包括仅来自人血清的nr-IGFBP-3。

#### [0041] 形成nr-IGFBP-3在水溶液中的浓缩物的方法

根据本文描述的原理的一些实施方案,提供了形成人IGF结合蛋白储备溶液的方法,所述储备溶液包含nr-IGFBP-3在水溶液中的浓缩物。图1A解释了根据本文描述的原理的一个

实施方案,在一个实施例中形成nr-IGFBP-3在水溶液中的浓缩物的方法100的程序框图。所述方法100包括使人血清或来自人血清的IGF结合蛋白的水溶液与多孔基质接触120;和从所述多孔基质收集140水溶液中浓缩的nr-IGFBP-3。水溶液中浓缩的nr-IGFBP-3具有在约16微克/毫升( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )至约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内的浓度。所述人血清包括、但不限于来自Bioresource Technology, Inc., Weston, FL的经加工的血清。例如,所述人血清可以是来自多个人个体的人血清的混合物。在形成nr-IGFBP-3浓缩物的方法100中,使人血清或来自人血清的IGF结合蛋白的水溶液与多孔基质接触120被构造成缓冲液交换和浓缩nr-IGFBP-3溶液,如下面进一步描述的。使人血清或来自人血清的IGF结合蛋白的水溶液与多孔基质接触120进一步被构造成促进以下一项或多项:将浓缩的nr-IGFBP-3水溶液脱盐、富集和纯化。在某些实施例中,形成nr-IGFBP-3在水溶液中的浓缩物的方法100被构造成促进nr-IGFBP-3浓缩物的大规模批处理。

[0042] 在根据本文描述的原理的一些实施例中,所述多孔基质可以是固体或半固体材料,且可以包含有机或无机的不溶于水的物质。所述多孔基质可以具有许多形状中的任一种,例如,管状(例如,柱、中空纤维、螺旋缠绕和中空细纤维)、痕迹蚀刻的、或平面或扁平表面(例如,带、盘、薄膜、膜和平板)。所述多孔基质可以从多种材料制成,所述材料可以是天然存在的或合成的、聚合的或非聚合的、纤维的或非纤维的。在某些实施例中,所述多孔基质的孔的大小可以是基于蛋白的名义分子量限制(NMWL)或名义分子量截止值(NMWC)。

[0043] 例如,可以使用在约25 kDa至约175 kDa的范围内的NMWL或NMWC。在某些实施例中,所述多孔基质的NMWL或NMWC可以在约26 kDa至约175 kDa、或约27 kDa至约175 kDa、或约28 kDa至约175 kDa、或约29 kDa至约175 kDa、或约30 kDa至约175 kDa、或约40 kDa至约175 kDa的范围内。在某些实施例中,所述多孔基质的NMWL或NMWC可以在约25 kDa至约170 kDa、或约25 kDa至约165 kDa、或约25 kDa至约160 kDa、或约25 kDa至约155 kDa、或约25 kDa至约150 kDa的范围内。在一个实施例中,所述多孔基质的NMWL或NMWC可以在约30 kDa至约150 kDa的范围内。

[0044] 在某些实施例中,所述多孔基质是过滤装置的部分,其中使样品与所述过滤装置的多孔基质接触以基于所述样品中的成分的大小或分子量将所述样品的靶向成分(例如,蛋白)与其它成分分离,其中所述靶向成分优先保留在所述多孔基质上或穿过所述多孔基质,并然后收集。过滤技术包括、但不限于例如微滤、超滤或横向流或切向流过滤(TFF)。超滤的一个例子包括来自EMD Millipore Corporation, Billerica, MA的AMICON® Stirred Cell,其配有30 kDa NMWL超滤盘(ULTRACEL® 纤维素膜)和蓄池。横向流或切向流过滤(TFF)的一个例子包括来自Scilog, Inc., Middleton, WI的TFF System(例如,PureTec TFF System),其配有具有OMEGA™ 聚醚砜(PES)膜(30 kDa NMWC)的TFF CENTRAMATE™ 盒(来自Pall Corporation, Port Washington, NY)。在其它实施例中,所述多孔基质包括以下一种或两种:在色谱柱中的基于琼脂糖的树脂,和本文描述的过滤装置之一。所述基于琼脂糖的树脂多孔基质促进疏水相互作用、离子交换和亲和色谱法中的一种或多种以分离样品中的成分,如在下面进一步描述的。

[0045] 使来自人血清的IGF结合蛋白的水溶液与多孔基质接触

在形成浓缩物的方法100的某些实施例中,所述方法100进一步包括提供110来自人血清的IGF结合蛋白的水溶液,即,在使所述水溶液与所述多孔基质接触120之前。图2解释了

根据本文描述的原理的一个实施方案,在一个实施例中提供110来自人血清的IGF结合蛋白的水溶液的程序框图。如在图2中所示,提供110来自人血清的IGF结合蛋白的水溶液包括将所述人血清与抗-离液盐在水性溶剂(例如,水)中的饱和盐溶液混合112,以形成包括来自人血清溶液的沉淀的IGF结合蛋白(IGFBP)的混合物。在根据本文描述的原理的方法中使用的抗-离液盐是这样的盐:其基于抗-离液盐的离子强度而促进来自溶液的沉淀蛋白的功能。

[0046] 例如,霍夫迈斯特系列的离子会提供这样的溶液中的离子的相对强度:其通过增加所述溶液内的疏水效应而促进沉淀。一般而言,抗-离液盐,诸如硫酸铵,例如,通过除去高度结构化的水层而暴露蛋白的疏水区域,所述水层在溶液中经常覆盖所述疏水区域。所以,蛋白分子上的疏水部分变得可用于更容易地与在邻近蛋白分子上发现的疏水部分相互作用。在某些实施例中,所述疏水部分可以与在多孔基质内部或表面上发现的疏水配体相互作用。另外,抗-离液盐可以屏蔽所述蛋白上的带电荷基团,其中所述带电荷基团有助于将蛋白在溶液中保持分开,从而降低蛋白的溶解度。总之,这些效应导致蛋白聚集体的形成和蛋白的最终沉淀(即,‘盐析’),而不造成无法弥补的蛋白变性。

[0047] 将不同蛋白的溶解度降低至不同的程度,取决于根据霍夫迈斯特系列的盐的抗-离液强度和它的浓度。按照盐析蛋白的能力的强度的递减次序的霍夫迈斯特系列包括阴离子: $F^- \approx SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > 乙酸根 > Cl^- > NO_3^- > Br^- > ClO_3^- > I^- > ClO_4^- > SCN^-$ ;且包括阳离子: $NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Li^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+} > 胍阳离子$ 。这样,认为硫酸铵( $(NH_4)_2SO_4$ )是强抗-离液剂,而氯化钠( $NaCl$ )具有比硫酸铵更少的抗-离液强度和效应,例如,对于大规模处理,将血清蛋白、特别是IGFBP沉淀出溶液。在某些实施例中,在混合112中用在饱和盐溶液中以沉淀出蛋白的抗-离液盐可以是,但不限于,例如,硫酸铵、硫酸钾、硫酸钠、硫酸镁、磷酸钠、乙酸铵或这些中的两种或更多种的组合或混合物。

[0048] 在某些实施例中,所述混合物中人血清的量与饱和盐溶液的量是约等体积,或约1比约1的比率(即,‘1:1比率’)。在其它实施例中,所述混合物中人血清和饱和盐溶液按体积计的量可以是不同的,且可以取决于以下一项或多项:所述盐的抗-离液强度,抗-离液盐浓度,批处理的大小或规模,和样品或批次的温度,作为示例且不作为限制。

[0049] 在某些实施例中,所述抗-离液盐的饱和盐溶液可以包括、但不限于硫酸钠水溶液或硫酸铵水溶液,或在某些实施例中,硫酸钠在磷酸钠水溶液中的溶液,或硫酸铵在磷酸钠水溶液中的溶液。所述饱和盐溶液的浓度是足以从人血清溶液沉淀出IGF结合蛋白的浓度。在某些实施例中,所述饱和盐溶液的浓度可以在约0.25克/毫升(g/ml)至约1.0 g/ml、或约0.25 g/ml至约0.9 g/ml、或约0.25 g/ml至约0.8 g/ml的范围内。在某些实施例中,所述饱和盐溶液的浓度可以在约0.3 g/ml至约1.0 g/ml、或约0.35 g/ml至约1.0 g/ml、或约0.4 g/ml至约1.0 g/ml、或约0.45 g/ml至约1.0 g/ml、或约0.5 g/ml至约1.0 g/ml、或约0.55 g/ml至约1.0 g/ml的范围内,在某些实施例中。在某些实施例中,所述饱和盐溶液的浓度可以在约0.3 g/ml至约0.8 g/ml的范围内。

[0050] 在包含抗-离液盐在磷酸钠水溶液中的溶液的饱和盐溶液的实施例中,在所述抗-离液盐的饱和盐溶液中使用的磷酸钠溶液的浓度可以是在约30毫摩尔的(mM)至约60 mM、或约35 mM至约60 mM、或约40 mM至约60 mM、或约45 mM至约60 mM、或约50 mM至约60 mM的范围内。在某些实施例中,在所述饱和盐溶液中使用的磷酸钠溶液的浓度可以是在约30 mM

至约58 mM的范围内,或约30 mM至约56 mM的范围内,或约30 mM至约54 mM的范围内,或约30 mM至约52 mM的范围内,或约30 mM至约50 mM的范围内,或约30 mM至约45 mM的范围内,或约40 mM至约50 mM的范围内,或约45 mM至约55 mM的范围内。

[0051] 在某些实施例中,所述磷酸钠溶液的pH可以是在约7.0至约8.4的范围内,或约7.2至约8.4、或约7.4至约8.4、或约7.6至约8.4的范围内。在某些实施例中,所述磷酸钠溶液的pH可以是在约7.0至约8.2的范围内,或约7.0至约8.0、或约7.0至约7.8、或约7.0至约7.6的范围内。在一个实施例中,所述磷酸钠溶液的浓度是约50 mM,具有约7.4的pH。

[0052] 此外,所述磷酸钠溶液中的抗-离液盐的浓度可以在约25%至约75%的盐重量:溶液体积(即,‘重量:体积’)范围内,或例如约30%至约75%、或约35%至约75%、或约40%至约75%、或约45%至约55%的重量:体积。在某些实施例中,所述磷酸钠溶液中的抗-离液盐的浓度可以在约25%至约70%、或约25%至约65%、或约25%至约60%、或约25%至约55%、或约25%至约50%的重量:体积范围内。在一个实施例中,所述饱和盐溶液包含硫酸铵作为约50 mM磷酸钠溶液中的抗-离液盐,具有约50%重量:体积的硫酸铵浓度。

[0053] 如在图2中进一步解释的,提供110 IGF结合蛋白的水溶液进一步包括从所述混合物分离114沉淀的IGF结合蛋白。可以分离114沉淀的IGF结合蛋白,包括:将人血清在饱和盐溶液中的混合物离心;和从沉淀的IGF结合蛋白(例如,其可以呈沉淀物的形式,其与所述溶液分离)除去包含饱和的抗-离液盐溶液的上清液。可以将多种离心设备用于从所述混合物分离114沉淀的IGF结合蛋白,包括、但不限于,来自Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA的SORVALL™离心机,或来自Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, IN的ADVANTI™离心机。

[0054] 此外,如在图2中所示,提供110 IGF结合蛋白的水溶液进一步包括通过将沉淀物溶解在水性缓冲溶液中来重构116分离的IGF结合蛋白沉淀物。重构116的IGF结合蛋白(IGFBP)沉淀物或沉淀是提供110的IGFBP溶液,其在图1A的形成浓缩物的方法100中与多孔基质接触120。可以将多种缓冲溶液用于重构116分离的IGF结合蛋白沉淀或沉淀物,包括、但不限于,磷酸盐缓冲盐水溶液(PBS)或包括叠氮化钠的PBS溶液。在某些实施例中,所述水性缓冲溶液包含具有约0.05%至约15%的叠氮化钠重量:溶液体积(‘重量:体积’)的范围的PBS,或具有约0.06%至约15%叠氮化钠、或约0.08%至约15%叠氮化钠、或约0.10%至约15%叠氮化钠、或约0.05%至约13%叠氮化钠、或约0.05%至约12%叠氮化钠、或约0.05%至约10%叠氮化钠的重量:体积范围的PBS。在一个实施例中,所述水性缓冲溶液包含具有约0.09%叠氮化钠的重量:体积的PBS,其用于溶解所述沉淀以提供110 IGF结合蛋白的水溶液。

[0055] 在包括提供110的来自人血清的IGF结合蛋白(IGFBP)的溶液的实施方法中,如上面关于图2所述,在接触120中使用的多孔基质是过滤膜,包括、但不限于,例如超滤盘、切向流过滤(TFF)膜或它们的组合。所述超滤盘可以是在例如过滤装置中,诸如本文描述的来自EMD Millipore Corp.的AMICON® Stirred Cell。所述TFF膜可以是例如单向通行过滤系统或横向流过滤系统的膜,且可以是如本文中所述的来自Scilog, Inc.的TFF System,或来自例如Membrane Specialists, Hamilton, OH或EMD Millipore Corp.。在某些实施例中,在提供110的溶液中的重构116的IGFBP沉淀物可以进一步包含在混合112过程中也沉淀的其它血清蛋白。在接触120过程中,所述多孔基质将滤出提供110的IGFBP溶液中的血清蛋白,其具有符合以下一项或两项的分子量:大于或小于所述多孔基质就nr-IGFBP而言的

NMWC或NMWL。此外,从所述多孔基质收集140的水溶液中的浓缩的nr-IGFBP-3也可以包括一些血清蛋白(例如,具有与nr-IGFBP-3基本上类似的分子量的蛋白,包括其它IGF结合蛋白),其在接触120过程中没有被所述多孔基质过滤。由于nr-IGFBP-3是在人血清中发现的最丰富的IGF结合蛋白,仅仅为了本文中讨论简洁起见,在这些实施方案中收集140的蛋白浓缩物将被称作‘nr-IGFBP-3’,理解为,浓缩的nr-IGFBP-3溶液也可能包含其它蛋白。此外,收集140的nr-IGFBP-3浓缩物具有如上所述的天然异质形式。

[0056] 此外,在这些实施方案中,使提供110的IGFBP溶液与多孔基质接触120包括:将所述IGFBP溶液应用于所述多孔基质,和用水性缓冲溶液冲洗所述多孔基质以过滤和缓冲液交换IGFBP溶液并将IGFBP溶液浓缩成nr-IGFBP-3浓缩物。在某些实施例中,用于冲洗所述多孔基质和提供缓冲液交换的水性缓冲溶液包括、但不限于PBS或包括叠氮化钠的PBS。例如,使用含有叠氮化钠的PBS(例如,含有约0.09%叠氮化钠的重量:体积的PBS)缓冲液交换收集130的nr-IGFBP-3。在某些实施例中,用于冲洗所述多孔基质和提供缓冲液交换的水性缓冲溶液基本上类似于如上所述的用于重构116 IGF结合蛋白沉淀物的水性缓冲溶液和浓度范围。

#### [0057] 使人血清的水溶液与多孔基质接触

再次参考图1A,在根据本文中的原理的其它实施方案中,形成nr-IGFBP-3在水溶液中的浓缩物的方法100包括使人血清的水溶液与多孔基质(其包含基于琼脂糖的树脂)接触120。图1B解释了根据本文描述的原理,在一个实施例中在图1A的方法中使人血清的水溶液与多孔基质接触120的过程的程序框图。在这些实施方案中,将人血清与第一缓冲溶液混合。所述第一缓冲溶液可以含有缓冲液,包括、但不限于,具有基本上中性的pH缓冲能力(具体地,在7-9的pH范围内)的上述缓冲液中的任一种。接触120在第一缓冲溶液中的人血清包括将所述第一缓冲溶液中的人血清应用122于已经用第二缓冲溶液平衡过的色谱柱中的基于琼脂糖的多孔基质,所述第二缓冲溶液也具有中性缓冲能力,具体地,在7-9的pH范围内。

[0058] 所述基于琼脂糖的树脂可以包括、但不限于疏水相互作用色谱法(HIC)树脂诸如丁基琼脂糖、苯基琼脂糖或辛基琼脂糖,离子交换树脂诸如SP-琼脂糖或Q-琼脂糖,或亲和色谱法树脂诸如肝素琼脂糖。例如,根据本文描述的原理可以使用这些中的任一种或两种或更多种的组合或混合物。在某些实施例中,所述基于琼脂糖的树脂选自HIC柱中的丁基琼脂糖和苯基琼脂糖。将所述基于琼脂糖的树脂填充在色谱柱中并使用上述第二缓冲溶液平衡。

[0059] 所述第一缓冲溶液和所述第二缓冲溶液可以具有相同的成分(尽管以不同的浓度),或可以是不同的缓冲溶液。在某些实施例中,所述第一缓冲溶液和所述第二缓冲液各自包括、但不限于例如含有磷酸盐的缓冲液、含有硫酸铵的缓冲液、Tris、或Tris和硫酸铵或磷酸铵的混合物。在某些实施例中,所述第一缓冲溶液和所述第二缓冲溶液是例如Tris和抗-离液盐(诸如硫酸铵)的水溶液。所述第一缓冲溶液和所述第二缓冲溶液各自具有这样的浓度:其被构造成保持溶液中的血清蛋白,特别是人血清中的IGF结合蛋白(即,不会盐析所述蛋白)。此外,所述第一缓冲溶液和所述第二缓冲溶液的浓度各自被构造成使不同血清蛋白(例如,使它们更离子性的)的溶解度比IGF结合蛋白和具体地nr-IGFBP-3的溶解度增加更多。这是因为,该实施方案靶向除去的大多数杂质是来自nr-IGFBP-3的人血清白蛋白和许多其它血清蛋白。这样,被靶向分离和除去的大多数人血清白蛋白和许多其它血清

蛋白将穿流基于琼脂糖的柱并允许大量琼脂糖树脂能力结合目标血清蛋白,即,nr-IGFBP-3。

[0060] 缓冲溶液的选择及其浓度可能取决于包括、但不限于以下一项或多项的因素:例如,使用的基于琼脂糖的树脂的选择,使用的色谱法的类型,要从人血清分离出的蛋白,在色谱柱中洗脱的批大小,和抗-离液盐强度。在某些实施例中,所述人血清溶液是所述人血清和所述第一缓冲溶液的约1:1体积比的混合物。在这些实施例中,所述第一缓冲溶液的浓度是用于平衡基于琼脂糖的柱的第二缓冲溶液的浓度的约2倍。所述第二缓冲溶液具有更低的抗-离液强度,使得被靶向从接触I20的溶液除去的人血清的级分将保持未结合(‘未结合的级分’)和洗涤穿过色谱柱,而接触I20的溶液的其它级分将结合(‘结合的级分’)至基于琼脂糖的树脂直到随后除去。这样,结合的级分将基本上仅包括IGF结合蛋白,和具体地,与其它血清蛋白分离的nr-IGFBP-3。

[0061] 在某些实施例中,与人血清溶液混合的第一缓冲溶液包含Tris和硫酸铵( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )盐的水溶液。第一缓冲溶液中的Tris和硫酸铵浓度在室温可以是在约30 mM至约70 mM Tris和约0.5 M至约2.0 M硫酸铵的范围内。在某些实施例中,第一缓冲溶液中的Tris和硫酸铵浓度在室温可以是在约35 mM至约70 mM Tris和约0.6 M至约2.0 M硫酸铵、或约40 mM至约70 mM Tris和约0.7 M至约2.0 M硫酸铵、或约45 mM至约70 mM Tris和约0.8 M至约2.0 M硫酸铵、或约50 mM至约70 mM Tris和约1.0 M至约2.0 M硫酸铵的范围内。在某些实施例中,第一缓冲溶液中的Tris和硫酸铵浓度在室温可以是在约30 mM至约65 mM Tris和约0.5 M至约1.8 M硫酸铵、或约30 mM至约60 mM Tris和约0.5 M至约1.5 M硫酸铵、或约30 mM至约55 mM Tris和约0.5 M至约1.0 M硫酸铵、或约30 mM至约50 mM Tris和约0.5 M至约0.75 M硫酸铵的范围内。

[0062] 也包含Tris和硫酸铵盐的水溶液的第二缓冲溶液将具有在所述第二缓冲溶液中的各种浓度,所述浓度在室温可以是在约18 mM至约35 mM Tris和约0.3 M至约1.0 M硫酸铵、或约20 mM至约35 mM Tris和约0.35 M至约1.0 M硫酸铵、或约22 mM至约35 mM Tris和约0.4 M至约1.0 M硫酸铵、或约25 mM至约35 mM Tris和约0.5 M至约1.0 M硫酸铵的范围内。在某些实施例中,所述第二缓冲溶液中的Tris和硫酸铵浓度在室温可以是在约15 mM至约32 mM Tris和约0.25 M至约0.9 M硫酸铵、或约15 mM至约30 mM Tris和约0.25 M至约0.75 M硫酸铵、或约15 mM至约27 mM Tris和约0.25 M至约0.5 M硫酸铵、或约15 mM至约25 mM Tris和约0.25 M至约0.37 M硫酸铵的范围内。

[0063] 在某些实施例中,所述第一缓冲溶液和所述第二缓冲溶液的pH是在约pH 7.0至约9.0、或约pH 7.5至约9.0、或约7.8至约9.0、或约pH 8.0至约9.0、或约pH 7.5至约8.7、或约pH 7.5至约8.5、或约pH 7.5至约pH 8.3的范围内。在一个实施例中,使用的基于琼脂糖的树脂是用于蛋白分离的HIC柱中的苯基琼脂糖,且所述第一缓冲液和所述第二缓冲液各自包含Tris和硫酸铵的混合物。所述第一缓冲溶液具有约50 mM Tris和约0.7 M硫酸铵的浓度,具有约8.1的pH,且所述第二缓冲溶液具有约25 mM Tris和约0.35 M硫酸铵的浓度,具有约8.1的pH。在某些实施例中,所述第一缓冲溶液的浓度是所述第二缓冲溶液的浓度的2倍。

[0064] 在某些实施例中将所述色谱柱构造成使用疏水相互作用色谱法(HIC)从人血清(包括从人血清中的其它蛋白,诸如血清白蛋白,例如)分离nr-IGFBP-3。这样,也可以将所

述色谱柱构造成实现以下一项或两项:纯化nr-IGFBP-3和富集nr-IGFBP-3。关于HIC和基于琼脂糖的树脂多孔基质的应用的其它信息参见美国专利号7,307,148,其通过引用整体并入本文。

[0065] 在某些实施例中,将第一缓冲溶液中的人血清应用122于色谱柱包括以在约1.0毫升/分钟(ml/min)至约5.0 ml/min范围内的速率将所述溶液应用于第二缓冲液平衡过的基于琼脂糖的树脂多孔基质。在某些实施例中,可以在约1.4 ml/min至约5.0 ml/min、或约1.8 ml/min至约5.0 ml/min、或约2.0 ml/min至约5.0 ml/min范围内的速率应用122在第一缓冲液中的人血清的溶液。在某些实施例中,所述第一缓冲溶液中的人血清的应用122速率是在或约1.0 ml/min至约4.6 ml/min、或约1.0 ml/min至约4.2 ml/min、或约1.0 ml/min至约3.8 ml/min、或约1.0 ml/min至约3.6 ml/min范围内。在一个实施例中,将在第一缓冲液中的人血清的溶液以约3.0 ml/min的速率应用122于所述色谱柱的多孔基质。接触120人血清溶液进一步包括用第二缓冲溶液洗涤应用122的人血清溶液的穿过色谱柱的未结合的级分以从所述柱除去未结合的级分。

[0066] 此外,如在图1B中所示,在这些实施方案中,使第一缓冲液中的人血清的溶液与多孔基质接触120进一步包括用第三缓冲溶液洗脱124在第一缓冲溶液中的应用122的人血清的结合的级分。如上所述,在这些实施方案中,结合的级分基本上仅包括IGF结合蛋白,具体地,与人血清的其余部分分离的nr-IGFBP-3,所述其余部分包括在第一缓冲溶液中的应用122的人血清的未结合的级分中的其它血清蛋白。此外,在结合的级分中的nr-IGFBP-3具有如上所述的天然异质形式。

[0067] 所述第三缓冲溶液与所述第一缓冲溶液和所述第二缓冲溶液之一或二者的不同之处在于,它含有极少至无抗-离液盐(例如,基本上0%抗-离液盐)。例如,所述第三缓冲溶液可以含有缓冲液,包括、但不限于,上述缓冲液中的任一种,或具有在约pH 7至约pH 9之间的缓冲能力的另一种缓冲液。在某些实施例中,所述第三缓冲液包含不含硫酸铵盐的Tris,以便从基于琼脂糖的柱洗脱124 nr-IGFBP-3的结合的级分。

[0068] 在某些实施例中,所述第三缓冲溶液包含Tris(且无抗-离液盐),其浓度在约15 mM至约35 mM、或约15 mM至约30 mM、或约15 mM至约27 mM、或约15 mM至约25 mM、或约20 mM至约30 mM的范围内。所述第三缓冲溶液的pH是在例如约pH 7.5至约8.6的范围内。在某些实施例中,所述第三缓冲溶液的pH是在约pH 7.6至约8.6、或约pH 7.7至约8.6、或约pH 7.5至约8.4、或约pH 7.5至约8.3、或约pH 7.5至约8.2的范围内。在一个实施例中,所述第三缓冲溶液具有约25 mM Tris的浓度和约8.1的pH。在某些实施例中,所述第一缓冲溶液、所述第二缓冲溶液和所述第三缓冲溶液各自的pH不小于pH 7.0,或不小于pH 7.4,或不小于pH 7.6,或不小于pH 7.8,或不小于pH 8.0。

[0069] 再次参考图1B,在某些实施例中,使人血清的水溶液与多孔基质接触120可以进一步包括将第三缓冲溶液中的洗脱的nr-IGFBP-3用缓冲液交换溶液应用126于过滤系统或装置的多孔基质,以过滤、缓冲液交换和浓缩应用126的nr-IGFBP-3溶液。所述缓冲液交换溶液包括、但不限于例如PBS或与叠氮化钠混合的PBS。所述缓冲液交换溶液可以基本上类似于上述的缓冲液交换溶液和浓度范围。

[0070] 在应用126第三缓冲溶液中的洗脱124的nr-IGFBP-3中使用的过滤系统包括、但不限于上述过滤系统中的任一种。在某些实施例中,可以使用AMICON® Stirred Cell超滤系

统、TFF System和另一种微滤、超滤或横向流过滤系统中的一种或多种。此外,所述过滤膜可以包括使用约10 kDa至约20 kDa的NMWL或NMWC膜以过滤、缓冲液交换和浓缩溶液中的nr-IGFBP-3。在某些实施例中,取决于使用的过滤系统,可以使nr-IGFBP-3溶液与缓冲液交换溶液一起在连续步骤中或以连续方式在过滤膜上面经过以促进浓缩水溶液中的nr-IGFBP-3。例如,TFF系统以连续方式供给126洗脱的nr-IGFBP-3溶液以缓冲液交换和浓缩nr-IGFBP-3溶液。

[0071] 再次参考图1A,如上所述,形成nr-IGFBP-3的浓缩物的方法100进一步包括从使用的过滤系统的多孔基质收集140水溶液中的浓缩的nr-IGFBP-3。通过根据本文描述的实施方案的形成浓缩物的方法100制备的浓缩的nr-IGFBP-3水溶液具有约16微克/毫升( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )至约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度范围。本文描述的形成nr-IGFBP-3的浓缩物的方法100被构造造成有助于制备nr-IGFBP-3浓缩物的大规模批次。在某些实施例中,浓缩的nr-IGFBP-3溶液可以基本上类似于上述的人IGF结合蛋白储备溶液。这样,通过本文的形成浓缩物的方法100制备的浓缩的nr-IGFBP-3溶液可以是在上面关于人IGF结合蛋白储备溶液描述的任何浓度范围内。具体地,所述浓缩的nr-IGFBP-3水溶液与在人血清中发现或从其分离的nr-IGFBP-3的量相比显著地更浓缩,所述量通常在约3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内。

[0072] 通过本文的方法100制备的浓缩的nr-IGFBP-3溶液的浓度范围足以制备具有不同浓度的nr-IGFBP-3校准物的集合,其被构造造成包括人患者样品的IGFBP-3分析物免疫测定中的IGFBP-3分析物的可疑浓度范围。在某些实施例中,所述集合的每种校准物中的nr-IGFBP-3的浓度是不同的,且所述校准物集合中的nr-IGFBP-3的不同浓度是在约0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内。在某些实施例中,所述nr-IGFBP-3校准物的集合基本上类似于上述的校准标准品集合。这样,不同校准物中的nr-IGFBP-3的浓度范围可以是在上面关于校准标准品集合所述的任何浓度范围内。

[0073] 在某些实施例中,所述集合中的不同的nr-IGFBP-3校准物可以包含以下一种或多种:0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、4.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、7.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、9.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、12.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物、14.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物和16.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nr-IGFBP-3校准物。所述校准物的集合中的nr-IGFBP-3浓度被构造造成包括人患者样品中的IGFBP-3分析物水平的可疑浓度范围。在某些实施例中,所述集合中的不同的nr-IGFBP-3校准物可以包括或进一步包括这样的校准物:其具有落在上面列出的任何浓度值之间的nr-IGFBP-3的浓度。此外,在某些实施例中,不同的更低浓度的nr-IGFBP-3校准物可能提供所述校准物的集合的MDP标准品。

[0074] 由于nr-IGFBP-3三元复合物包含结合的IGF-1或IGF-2和ALS和糖基化的单元,还在本文描述的原理的一些实施方案的范围内的是,制备不同的nr-IGFBP-3校准标准品以促进在人患者样品的免疫测定中测量IGF-1或IGF-2分析物水平。在某些实施例中,如上所述从IGF结合蛋白储备溶液制备的nr-IGFBP-3校准物的集合进一步促进IGF-1或IGF-2分析物水平的测量,其可以在约20纳克/毫升( $\text{ng}/\text{ml}$ )至约375  $\text{ng}/\text{ml}$  IGF-1或IGF-2范围内。例如,

与nr-IGFBP-3形成复合物的IGF-1或IGF-2的量基本上直接成比例。这样,使用本文描述的nr-IGF结合蛋白储备溶液,可以制备IGF-1或IGF-2校准标准品的集合。例如,具有不同浓度的IGF-1或IGF-2(其包括约100 ng/ml至约750 ng/ml的患者样品中的IGF-1或IGF-2水平的可疑范围)的IGF-1或IGF-2校准标准品的集合可以用具有在约5 $\mu$ g/ml至40 $\mu$ g/ml范围内的不同nr-IGFBP-3浓度的对应nr-IGFBP-3校准物集合(其来自具有约16 $\mu$ g/ml至约40 $\mu$ g/ml的浓度范围的IGF结合蛋白储备溶液)制备。

[0075] 进一步,如上所述,将nr-IGFBP-3校准物用人血清稀释。在某些实施例中,可能合乎需要的是,获得基本上不含IGF结合蛋白的人血清作为稀释剂来促进实现校准标准品和对照中的nr-IGFBP-3的靶水平。在某些实施方案中,短语‘基本上不含IGF结合蛋白的’是指,人血清中的IGF结合蛋白的量实质上低于LOQ,其可以设定在约100 ng/ml或约200 ng/ml。在某些实施方案中,如本文中定义的,所述基本上不含IGF结合蛋白的人血清含有不超过约5%(按体积计)、或不超过约2%、或不超过约0.20 $\mu$ g/mL或约0%的IGF结合蛋白。

#### [0076] 制备基本上不含IGF结合蛋白的人血清的方法

根据本文描述的原理,在一个实施例中,在图3中解释了制备基本上不含有IGF结合蛋白的人血清稀释剂的方法200。制备基本上不含IGF结合蛋白的人血清稀释剂的方法200包括将人血清与有机酸(诸如乙酸或柠檬酸)或氨基酸(例如,甘氨酸)或无机酸(诸如盐酸)混合210;和用所述酸处理220所述混合物以将pH调至例如小于约pH 3.5,但是不小于pH 2.0。例如,在处理220过程中可以将所述混合物调至约pH 3.0的pH。过度酸处理以将pH降低至小于pH 2.0可能导致例如严重的蛋白聚集。

[0077] 制备基本上不含IGF结合蛋白的人血清稀释剂的方法200还包括将酸处理过的人血清混合物应用230到木炭过滤器上。所述木炭过滤器可以是例如来自EMD Millipore的MILLISTAK+<sup>®</sup>木炭筒过滤器。在某些实施例中,可以将酸处理过的混合物以约1.5 ml/min、或约2.0 ml/min、或约2.5 ml/min、或约3.0 ml/min的速率加载到木炭过滤器上。制备基本上不含IGF结合蛋白的人血清稀释剂的方法200进一步包括从所述木炭过滤器收集240流出物。所述收集240的流出物是酸处理过的混合物的未结合的级分,其是基本上不含IGF结合蛋白的人血清。

[0078] 在某些实施例中,方法200进一步包括将收集240的流出物的pH调至例如在约pH 7.25至约pH 7.50的范围内,并对调过pH的收集240的流出物执行缓冲液交换。在某些实施例中,如上所述,使用在PBS缓冲溶液(例如,PBS和叠氮化钠的溶液)中的多孔基质诸如AMICON<sup>®</sup> Stirred Cell或TFF System执行缓冲液交换。所述缓冲液交换的流出物会提供基本上不含有IGF结合蛋白的人血清稀释剂,例如,用于制备如本文中所述的nr-IGFBP-3校准标准品。

#### [0079] 在其中可以利用校准物的测定的一般描述

以下讨论是作为例证且不是限制。本组合物可以用在其中采用校准物的用于确定IGF和IGFBP-3的任何测定中。可以在不分离(均匀的)或分离(异质的)任何测定组分或产品的情况下执行测定。异质测定经常包括一个或多个分离步骤,且可以是竞争性的或非竞争性的。免疫测定可以包括标记的或未标记的试剂。包括未标记的试剂的免疫测定经常包含根据本文描述的原理形成相对大的复合物,其包括从免疫原性缀合物制备的一种或多种抗体。这样的测定包括,例如,免疫沉淀素和凝集方法和用于检测抗体复合物的对应光散射技

术(例如,浊度法和比浊法)。标记的免疫测定包括、但不限于例如化学发光免疫测定、酶免疫测定、荧光偏振免疫测定、放射免疫测定、抑制测定、诱导的发光测定和荧光氧传输测定。在所述测定中,将结果与校准物集合对比,并确定样品中的分析物的浓度。

[0080] 要试验的样品是可能含有IGF和IGFBP-3中的一种或两种的任何样品,包括、但不限于,生物学材料,例如,身体流体和身体组织,其得自哺乳动物(包括人类、禽类、爬行动物和其它脊椎动物)的身体。例如,身体流体包括,例如,全血、血浆、血清、淋巴流体或脐带血。

[0081] 通过在测定介质中组合用于进行所述测定的样品和试剂,进行所述测定。这些测定试剂的性质和量取决于正在执行的测定的性质。例如,用于夹心免疫测定的测定试剂包括至少两种抗体,其中至少一种被标记。对于竞争性免疫测定,所述测定试剂包括至少一种抗体和一种分析物类似物,所述分析物类似物通常与所述分析物的差别在于包含标记。所述测定介质是在中等pH的水性缓冲介质,且通常是提供最适测定灵敏度的介质。所述水性介质可以是单独的水,或可以包括0.1至约40体积%的共溶剂,例如,水可混溶的有机溶剂,例如,醇、醚或酰胺。例如,所述介质的pH经常是在约4至约11的范围内,或在约5至约10的范围内,或在约6.5至约9.5的范围内。

## 实施例

[0082] 除非另有说明,否则在下面实验中的材料可以购自Sigma-Aldrich Chemical Corporation (St. Louis MO)。本文中公开的份数和百分比是按重量:体积,除非另外指出。

### [0083] 实施例1: 通过硫酸钠沉淀来富集nr-IGFBP-3

通过将60克(g)硫酸钠(Sigma-Aldrich,目录号(cat no.) 238597,分子量(mw)等于142.04,在20°C在水中的溶解度等于19.5 g/100 ml水)与200 ml水在室温混合2小时,制备饱和硫酸钠溶液。通过用0.2微米( $\mu\text{m}$ )过滤器过滤,除去未溶解的硫酸钠盐。将来自Bioresource Technology的高度归一化的人血清(‘BRT’或‘BRT1’)(200 ml)(目录号H1090,批号1407033)穿过0.2 $\mu\text{m}$ 过滤器过滤并将其温热至室温。

[0084] 在低速混合器上在室温将饱和硫酸钠溶液(200 ml)与等体积的BRT1混合1小时以避免起泡。将25 ml的等分试样倒入Falcone试管中,并使用Thermo Fisher SORVALL™离心机(ST40R型)在4°C在3,000  $\times g$  (即,其中 $g = 9.8$ 米/平方秒( $\text{m/s}^2$ )是地球重力引起的加速度)离心1小时。然后将来自每个试管的上清液用真空抽吸器小心地除去,并将剩余的沉淀溶解在PBS/0.09%叠氮化钠中。将再溶解的或重构的沉淀(大约200 ml)放入配有30千道尔顿(KDa) NMWL超滤盘(Millipore目录号PLTK06210)和RC800小型蓄池(Millipore目录号5123)的200 ml AMICON® Stirred Cell (8200型, Millipore, 目录号6028),并缓冲液交换进PBS/0.09%叠氮化钠中。在收集大于或等于1000 ml (5倍溶解沉淀的溶液)的PBS/0.09%叠氮化钠流出物废物以后完成缓冲液交换。

[0085] 使用AMICON® Stirred Cell将AMICON® Stirred Cell中的溶液进一步浓缩至10-15 ml,并通过CENTAUR® XP原型IGFBP-3测定系统(Siemens Healthcare GmbH)(具有通过IMMULITE® 2000 Immunoassay System (Siemens Healthcare GmbH)赋予的标准值)测量nr-IGFBP-3浓度。将nr-IGFBP-3浓缩物与BRT1以1:1或不同比例混合,以构建在2.5%基于牛血清白蛋白(BSA)的基础集合中的七种标准品(在下文中被称作‘BL5U’标准品)的第一集

合。

[0086] 表1列出了硫酸钠沉淀的BL5U标准品‘S01-S07’，其具有血清中的每种BL5U标准品的赋值剂量值，其中S01是没有加入nr-IGFBP-3的‘空白标准品’，并进一步列出了为每种BL5U标准品测得的相对光单位(RLU)和每种BL5U标准品的信噪比(S/N)。RLU表示为七种BL5U标准品通过原型CENTAUR®系统测量的来自nr-IGFBP-3的比化学发光。将空白标准品S01的S/N指定为等于1.0，且BL5U标准品S02-S07中的每一种的S/N等于它们的测量的RLU除以空白标准品RLU。使用BL5U低剂量校准物‘BL5U Low Cal’和BL5U高剂量校准物‘BL5U High Cal’来使用2-点数据拟合校准程序计算‘未知’患者样品中的nr-IGFBP-3的剂量值。

[0087] 表1表明，作为抗-离液剂的硫酸钠盐能够使nr-IGFBP-3从来自人血清的溶液沉淀出(与其它血清蛋白一起)，尽管与当将硫酸铵盐用作抗-离液剂时相比具有更低的沉淀收率，如在下面表3中关于实施例2所示。表1也表明，原型CENTAUR® IGFBP-3测定(ADVIA)能够以剂量依赖性的方式检测nr-IGFBP-3，其中BL5US06(在8.6µg/ml)和BL5US07(15.3µg/ml)具有远远大于在开始BRT人血清(即约4.0-4.5µg/ml)中的nr-IGFBP-3剂量。因此，抗-离液盐诸如硫酸钠的应用能够通过使分析物从溶液沉淀出(与其它血清蛋白一起)而从人血清浓缩nr-IGFBP-3，随后重新溶解沉淀的分析物，然后使用超滤或甚至TFF进行浓缩和缓冲液交换。但是，使用硫酸钠盐作为抗-离液剂的沉淀的/重新溶解的nr-IGFBP-3的最终收率随着沉淀反应的规模(批大小)(即，BRT人血清+浓缩的抗-离液盐溶液的开始体积)的增加而减小。

[0088] 表1: 使用IMMULITE®-赋值标准品的BL5U RLU信号与噪音(S/N)比率

标准样品	剂量/值(µg/ml)	RLU	S/N
BL5US01	0.0	8901	1.0
BL5US02	0.4	162535	18.3
BL5US03	0.7	286781	32.2
BL5US04	2.1	664339	74.6
BL5US05	4.9	1195997	134.4
BL5US06	8.6	1691969	190.1
BL5US07	15.3	2273676	255.4

BL5U Low Cal = 0.38µg/ml, BL5U High Cal = 9.00µg/ml

RLU = 相对光单位。

[0089] 实施例2: 通过硫酸铵沉淀来富集nr-IGFBP-3

实施例2A:通过将160 g硫酸铵(Sigma-Aldrich, 目录号2939, 分子量等于132.14, 在20℃在水中的溶解度等于75.4 g/100 ml水)与200 ml水混合并将其在室温混合2小时, 制备饱和硫酸铵溶液。将所述硫酸铵溶液穿过0.2µm过滤器过滤以后, 将200 ml所述溶液与等体积的BRT(其也预先温热至室温)混合。剩余的操作与在实施例1中描述的操作相同。

[0090] 实施例2B:将400 ml BRT与等体积的实施例2A饱和硫酸铵溶液一起使用, 并遵循在实施例1中描述的操作。将富集的nr-IGFBP-3浓缩物合并, 并制成七种标准品(在下文中被称作‘BL7’)(编号为S01-S07)和低值和高值校准物(它们也通过IMMULITE® 2000 IGFBP-3测定系统赋值)的第二集合。首先使用IMMULITE® IGFBP-3测定(即, 合适的预测

(predicate)装置)将BL7S07赋值。然后使用不含nr-IGFBP-3的缓冲液连续稀释BL7S07。使用Low Cal和High Cal 2-点数据拟合校准程序,将‘BL7 Low Cal’和‘BL7 High Cal’值用于计算在‘未知’患者样品中发现的nr-IGFBP-3浓度的剂量值。

[0091] 表2列出了BL7标准品‘S01-S07’,其具有血清中的每种BL7标准品的赋值剂量值,其中S01是没有加入nr-IGFBP-3的‘空白标准品’,且进一步列出了每种BL7标准品的测量的RLU和每种BL7标准品的S/N。还为BL7 Low Cal和BL7 High Cal列出了低剂量值和高剂量值。图4解释了根据符合本文描述的原理的一个实施方案,在一个实施例中以相对光单位(RLU)表示的相对于IMMULITE®赋值标准品的来自原型CENTAUR® XP测定的硫酸铵沉淀的nr-IGFBP-3剂量响应的图。该图是使用IMMULITE® 2000预测(predicate)系统赋值的硫酸铵沉淀的BL7标准品的主要曲线。

[0092] 表2:使用IMMULITE®-赋值标准品和校准物的BL7 RLU S/N比率

名称	RLU	剂量	S/N
BL7S01	11794	0	1.0
BL7S02	114280	0.48	9.7
BL7S03	217043	0.967	18.4
BL7S04	435323	2.545	36.9
BL7S05	799241	5.765	67.8
BL7S06	1149399	11.45	97.5
BL7S07	1463532	17.72	124.1
BL7 Cal L		0.48	
BL7 Cal H		11.00	

剂量值以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 为单位。

[0093] 表2和图4的数据表明,硫酸铵盐(作为比硫酸钠更强的抗-离液剂)会在开始BRT人血清的更大规模提供沉淀的nr-IGFBP-3的改善收率。图4显示了相对于使用原型ADVIA CENTAUR® IGFBP-3测定产生的剂量曲线的来自表2的RLU值。在大规模量的BRT人血清(1升或更大)上使用硫酸铵盐作为抗-离液剂允许制备这样的标准品和校准物(例如,S06、S07和高校准物BL7 Cal H):其在硫酸铵沉淀和过滤方法(即,超滤或TFF方法)之前具有比BRT人血清的开始样品中的nr-IGFBP-3(即约 $4.0\text{--}4.5\mu\text{g}/\text{ml}$ )高得多的nr-IGFBP-3浓度(即,分别 $11.45\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $17.72\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $11.0\mu\text{g}/\text{ml}$ )。

[0094] 在本文中还指出,原型ADVIA CENTAUR® IGFBP-3测定会在CENTAUR®系统上提供人血清样品的稀释物,其包含未知浓度的nr-IGFBP-3,不具有手工稀释。这样,产生标准品(诸如BL7S06和BL7S07)、High Cal校准物和甚至高MDP样品等的的能力,该途径允许实验室操作人员操作nr-IGFBP-3标准品、校准物、MDP等,与实验室操作人员可以操作未知患者样品基本上相同的方式,同时例如覆盖试验性ADVIA CENTAUR® IGFBP-3测定的基本上整个工作范围。

[0095] 图5和6解释了分别使用CENTAUR®完全曲线方法和2-点数据拟合校准方法,在CENTAUR® XP和IMMULITE® 2000剂量值之间的方法对比数据。具体地,图5和6显示了当在包含未知浓度的nr-IGFBP-3的人血清的相同样品上试验时(其中样品大小是 $n = 32$ 个人血清样品),原型ADVIA CENTAUR® IGFBP-3测定相对于预测(predicate)装置IMMULITE® 2000 IGFBP-3测定的方法对比数据。对于原型ADVIA CENTAUR® IGFBP-3测定,使用全曲线计算来计算nr-IGFBP-3的浓度值(图5),或对于图6,使用低校准物(BL7 Cal L =  $0.48\mu\text{g}/\text{ml}$ )和高

校准物 (BL7 Ca1 H = 11.00 $\mu$ g/ml) 使用2-点校准。使用硫酸铵作为抗-离液沉淀剂并在BRT人血清上使用超滤或TFF方法产生在图5-6中的标准品BL7S01至BL7S07。

**[0096] 实施例3A-3B: 使用在磷酸钠溶液中的硫酸铵的nr-IGFBP-3富集的放大**

将饱和硫酸铵溶液与等体积的BRT1血清混合用于沉淀。将该过程从100 ml放大至1000 ml人血清。为饱和硫酸铵溶液使用磷酸钠水溶液 (约50-52 mM)。表3总结了基于原型CENTAUR® IGFBP-3结合测定的收率。将各1升的BRT1人血清用不同的设备处理, 如下面关于实施例3A和实施例3B所述。

**[0097] 实施例3A:**

使用在上面实施例1中描述的设备处理人血清。

**[0098] 实施例3B:**

将人血清用在磷酸钠溶液中的50%饱和硫酸铵沉淀, 并使用来自Beckman Coulter的ADVANTI™离心机 (J-20XPI型) 离心; 通过Scilog的切向流过滤器 (TFF) 完成向PBS/叠氮化钠中的缓冲液交换, 所述切向流过滤器配有来自Pall Corporation, Port Washington, NY的TFF盒 (目录号OS030T12)。在AMICON® Stirred Cell上完成约800 ml至200 ml的最终减小。在表3中总结了来自实施例1、2和3A-B的收率的详细总结。

**[0099]** 表3表明, 原型CENTAUR® IGFBP-3结合测定被构造成支持更大规模的批大小处理, 具有一致的或逐渐增加的更高百分比的nr-IGFBP-3收率 (实施例3A-3B在1000 ml BRT体积)。进一步, 表3表明, 用于沉淀nr-IGFBP-3的更强抗-离液剂 (即, 硫酸铵) 产生了比硫酸钠更高的收率, 与更大规模处理相容, 并较好地执行 (以沉淀出nr-IGFBP-3), 不论是在水中混合, 还是在磷酸钠水溶液中混合并使用超滤系统或TFF系统过滤/缓冲液交换。nr-IGFBP-3的收率在实施例3B中最高, 所述实施例3B使用在磷酸钠溶液中的硫酸铵, 将1升人血清 (1:1比率) 用于沉淀, 并将TFF系统用于nr-IGFBP-3的分离、缓冲液交换和浓缩。

**[0100] 表3: 硫酸钠和硫酸铵沉淀以后的收率百分比**

实施例	BRT1 体积 (ml)	沉淀剂	溶剂/缓冲液	BRT1 输入, ( $\mu$ g)	收率( $\mu$ g)	%收率
1	200	硫酸钠	水	900	423	47%
2A	200	硫酸铵	水	784	538	69%
2B	400	硫酸铵	水	1568	1136	72%
3A	1000	硫酸铵	51 mM 磷酸钠, pH 7.4	5480	4055	74%
3B	1000	硫酸铵	52 mM 磷酸钠, pH 7.4	5480	4165	76%

**[0101] 实施例4: 使用疏水相互作用色谱法 (HIC) 纯化和富集nr-IGFBP-3**

使用苯基琼脂糖6FF使用在HIC色谱柱中的基于琼脂糖的树脂的多孔基质进行实施例4。在玻璃漏斗中将在20%乙醇中的25 ml苯基琼脂糖6FF (GE Life Sciences, Marlborough, MA, 目录号17-0973-10) 交换进水中, 然后填充进XK16/20柱 (GE Life Sciences, 目录号28-988937) 中, 并将所述凝胶用100 ml缓冲液A: 含有0.35 M硫酸铵缓冲液 (pH 8.1) 的25 mM Tris (pH 8.1): (即, 上述的‘第二缓冲溶液’) 平衡。将25 ml高度归一化的人血清 (BRT1, Bioresource Technology, 目录号H1090, 批号1407033) 穿过0.2微米过

滤器过滤并与25 ml缓冲液B(50 mM Tris (pH 8.1), 0.7 M硫酸铵缓冲液)(即,上述的‘第一缓冲溶液’) 在室温混合10 min。将50 ml血清混合物以约3 ml/min应用于所述柱,并将未结合的级分用100 ml缓冲液A洗涤。然后应用100 ml缓冲液C: 25 mM Tris (pH 8.1) (即,上述的‘第三缓冲溶液’),以洗脱结合的nr-IGFBP3。

[0102] 通过紫外可见分光光度计测量280 ml输入BRT1(在缓冲液C中1:100稀释)的量和未结合的和洗脱的级分在缓冲液C中的1:10稀释液,并通过CENTAUR® IGFBP-3原型测定来测量nr-IGFBP-3的剂量( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。通过配有连续流小型蓄池的AMICON® Stirred Cell将洗脱的级分进一步缓冲液交换进PBS/0.09%叠氮化钠中。最后,将缓冲液交换的nr-IGFBP-3的体积减小至10 ml。

[0103] 通过苯基琼脂糖6FF从共116.75 $\mu\text{g}$ 输入nr-IGFBP-3洗脱共103.6 $\mu\text{g}$  nr-IGFBP-3。在缓冲液交换以后使用苯基琼脂糖6FF来自HIC色谱法的收率百分比(%)是89%。遵循来自GE Healthcare Life Sciences的卖方说明书71-5002-39 AC以再生苯基琼脂糖。

[0104] 实施例5: 使用重组人IGFBP-3的环境/温度影响

使用重组人IGFBP-3作为校准标准品的研究:

预期免疫测定方法在 $24^{\circ}\text{C} \pm 6^{\circ}\text{C}$ 的正常实验室条件下会递送可靠的结果。通过将高剂量和低剂量值的差异除以在 $18^{\circ}\text{C}$ 、 $24^{\circ}\text{C}$ 和 $30^{\circ}\text{C}$ 的剂量值,计算偏倚。设定典型规范,例如,使得所述偏倚不会大于10%(对于单个样品)或15%(对于几个样品的平均值)。表4、5和6总结了以下样品的IGFBP-3测定的偏倚表:根据本文实施例1制备的nr-IGFBP-3样品(‘BL5U’), BRT1(目录号H1090,批号1407033,来自Bioresources Technology, Inc.的高度归一化的人血清),和使用来自R and D Systems, Inc., Minneapolis, MN(目录号675-B3-025)和Peprtech, Rocky Hill, NJ(目录号100-08)的市售重组IGFBP-3(r-IGFBP-3)的样品,其中使用分别在 $18^{\circ}\text{C}$ 、 $24^{\circ}\text{C}$ 和 $30^{\circ}\text{C}$ 储存曲线的完全曲线分析。

[0105] 表5-7表明,在许多情况下,来自R and D Systems和Peprtech的r-IGFBP-3样品在至少约 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 的靶范围内过度恢复(over-recover),并且与BRT1和BL5U样品中的nr-IGFBP-3相比更大。

[0106] 表5: 使用在 $18^{\circ}\text{C}$ 的储存曲线来自R & D Systems(‘RnDBRTeE2’)和Peprtech(‘PepBRTeE2’)完全曲线分析的nr-IGFBP-3样品(‘BL5U’)、BRT1人血清和r-IGFBP-3样品的CENTAUR® XP环境影响表

样品	18℃ AF10015B 剂量	24℃ AF09915A 剂量	30℃ AF10315A 剂量	最高剂 量	最低剂 量	%偏差
BL5US01	0.00	.	0.00	0.00	0.00	
BL5US02	0.44	0.41	0.47	0.47	0.41	13.5%
BL5US03	0.86	0.84	0.93	0.93	0.84	11.5%
BL5US04	2.51	2.49	2.75	2.75	2.49	10.6%
BL5US05	5.36	5.40	5.91	5.91	5.36	10.3%
BL5US06	9.72	9.31	10.80	10.80	9.31	16.0%
BL5US07	16.07	16.07	17.64	17.64	16.07	9.8%
BL5L01	0.43	0.40	0.45	0.45	0.40	12.8%
BL5H01	9.96	9.88	11.09	11.09	9.88	12.3%
BRT1	4.57	4.75	5.17	5.17	4.57	12.6%

Peprotech r-IGFBP3							
靶标		18℃	24℃	30℃			
1µg/mL	PepBRTeE2_01	2.55	2.40	2.60	2.60	2.40	8.3%
4µg/mL	PepBRTeE2_04	14.94	13.41	15.65	15.65	13.41	16.7%
8µg/mL	PepBRTeE2_08	56.89	45.62	61.13			
12µg/mL	PepBRTeE2_12	238.25	141.03	197.25			
RnD Systems r-IGFBP3							
靶标		18℃	24℃	30℃			
1µg/mL	RnDBRTeE2_01	1.12	1.04	1.17	1.17	1.04	12.0%
4µg/mL	RnDBRTeE2_04	5.26	4.81	5.63	5.63	4.81	17.1%
8µg/mL	RnDBRTeE2_08	12.53	11.42	13.91	13.91	11.42	21.9%
12µg/mL	RnDBRTeE2_12	23.22	19.25	24.25			

[0107] 表6: 使用在24℃的储存曲线来自R & D Systems (‘RnDBRTeE2’)和Peprotech (‘PepBRTeE2’)完全曲线分析的nr-IGFBP-3样品 (‘BL5U’)、BRT1人血清和r-IGFBP-3样品的CENTAUR® XP环境影响表

样品	18℃	24℃	30℃	最高剂 量	最低剂 量	%偏差	
	AF10015B 剂量	AF09915A 剂量	AF10315A 剂量				
BL5US01	0.02	0.00	0.02	0.02	0.00		
BL5US02	0.46	0.44	0.49	0.49	0.44	12.8%	
BL5US03	0.89	0.86	0.96	0.96	0.86	11.2%	
BL5US04	2.54	2.52	2.78	2.78	2.52	10.6%	
BL5US05	5.41	5.45	5.98	5.98	5.41	10.3%	
BL5US06	9.85	9.43	10.96	10.96	9.43	16.2%	
BL5US07	16.41	16.41	18.05	18.05	16.41	10.0%	
BL5L01	0.45	0.42	0.47	0.47	0.42	12.1%	
BL5H01	10.10	10.01	11.26	11.26	10.01	12.5%	
BRT1	4.62	4.80	5.22	5.22	4.62	12.6%	
Peprotech r-IGFBP3							
靶标		18℃	24℃	30℃			
1µg/mL	PepBRTeE2_01	2.58	2.43	2.63	2.63	2.43	8.2%
4µg/mL	PepBRTeE2_04	15.23	13.65	15.97	15.97	13.65	17.0%
8µg/mL	PepBRTeE2_08	61.06	48.29	65.94			
12µg/mL	PepBRTeE2_12	320.26	167.79	251.21			
RnD Systems r-IGFBP3							
靶标		18℃	24℃	30℃			
1µg/mL	RnDBRTeE2_01	1.15	1.07	1.19	1.19	1.07	11.7%
4µg/mL	RnDBRTeE2_04	5.31	4.86	5.69	5.69	4.86	17.1%
8µg/mL	RnDBRTeE2_08	12.75	11.59	14.17	14.17	11.59	22.2%
12µg/mL	RnDBRTeE2_12	23.92	19.73	25.01			

[0108] 表7: 使用在30℃的储存曲线来自R & D Systems (‘RnDBRTeE2’)和Peprotech (‘PepBRTeE2’)完全曲线分析的nr-IGFBP-3样品(‘BL5U’)、BRT1人血清和r-IGFBP-3样品的CENTAUR® XP环境影响表

样品	18℃ AF10015B 剂量	24℃ AF09915A 剂量	30℃ AF10315A 剂量	最高剂 量	最低剂 量	%偏倚
BL5US01	0.00	.	0.00	0.00	0.00	
BL5US02	0.41	0.39	0.44	0.44	0.39	13.3%
BL5US03	0.80	0.78	0.86	0.86	0.78	11.3%
BL5US04	2.29	2.27	2.51	2.51	2.27	10.5%
BL5US05	4.86	4.89	5.36	5.36	4.86	10.2%
BL5US06	8.79	8.42	9.77	9.77	8.42	16.1%
BL5US07	14.57	14.57	16.01	16.01	14.57	9.9%
BL5L01	0.40	0.37	0.42	0.42	0.37	12.6%
BL5H01	9.01	8.93	10.03	10.03	8.93	12.3%
BRT1	4.15	4.31	4.68	4.68	4.15	12.4%

Peprotech r-IGFBP3							
靶标		18℃	24℃	30℃			
1µg/mL	PepBRTeE2_01	2.33	2.19	2.37	2.37	2.19	8.2%
4µg/mL	PepBRTeE2_04	13.53	12.14	14.18	14.18	12.14	16.8%
8µg/mL	PepBRTeE2_08	53.93	42.63	58.25			
12µg/mL	PepBRTeE2_12	298.98	150.92	230.31			
RnD Systems r-IGFBP3							
靶标		18℃	24℃	30℃			
1µg/mL	RnDBRTeE2_01	1.04	0.96	1.08	1.08	0.96	11.8%
4µg/mL	RnDBRTeE2_04	4.76	4.36	5.10	5.10	4.36	16.9%
8µg/mL	RnDBRTeE2_08	11.34	10.32	12.60	12.60	10.32	22.0%
12µg/mL	RnDBRTeE2_12	21.17	17.48	22.13			

[0109] 使用硫酸钠或硫酸铵沉淀的校准标准品的研究:

作为对比,将BL5U标准品(使用实施例1中的操作制备)和BL6标准品(硫酸铵沉淀的nr-IGFBP-3)的温度敏感性研究以及使用CENTAUR® XP System ED在18℃、24℃和30℃使用所述标准品的样品回收率与患者样品(‘GALO’)和IMMULITE®测定对照样品(‘Imm0028K’)一起总结在表8、9和10中。

[0110] 表8:使用BL5U校准物、BL6校准物、患者样品和IMMULITE®对照样品(具有在18℃的主要曲线储存曲线)的CENTAUR® XP System ED环境影响表

Centaur ED	在 18℃ 储存					
	18℃	24℃	30℃	Max	Min	% 偏倚
样品	剂量	剂量	剂量			
BL5US01	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BL5US02	0.37	0.33	0.33	0.37	0.33	14%
BL5US03	0.74	0.69	0.70	0.74	0.69	6%
BL5US04	2.17	2.13	2.20	2.20	2.13	3%
BL5US05	4.65	4.62	4.95	4.95	4.62	7%
BL5US06	8.93	8.83	9.24	9.24	8.83	5%
BL5US07	15.12	15.06	16.08	16.08	15.06	7%
BL5L01	0.37	0.32	0.32	0.37	0.32	14%
BL5H01	8.78	8.61	9.56	9.56	8.61	11%
BL6S01	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BL6S02	0.34	0.30	0.28	0.34	0.28	19%
BL6S03	0.73	0.67	0.66	0.73	0.66	10%
BL6S04	2.02	1.96	2.08	2.08	1.96	6%
BL6S05	4.56	4.37	4.81	4.81	4.37	10%
BL6S06	9.43	9.29	9.40	9.43	9.29	2%
BL6S07	16.62	16.59	16.79	16.79	16.59	1%
BL6L01	0.36	0.30	0.28	0.36	0.28	25%
BL6H01	9.73	9.09	9.41	9.73	9.09	7%
Imm0028K1	0.91	0.86	0.89	0.91	0.86	5%
Imm0028K2	3.73	3.68	3.87	3.87	3.68	5%
GAL026	2.47	2.49	2.56	2.56	2.47	3%
GAL028	4.39	4.30	4.57	4.57	4.30	6%
GAL029	5.38	5.39	5.68	5.68	5.38	5%
GAL036	4.56	4.58	4.61	4.61	4.56	1%
GAL038	4.38	4.27	4.37	4.38	4.27	3%
GAL039	2.81	2.77	2.83	2.83	2.77	2%
GAL040	4.14	4.03	4.39	4.39	4.03	9%
GAL041	3.88	4.01	4.14	4.14	3.88	7%
GAL042	3.67	3.63	3.83	3.83	3.63	5%
GAL043	2.53	2.56	2.68	2.68	2.53	6%
GAL044	4.06	4.18	4.43	4.43	4.06	9%
GAL045	4.41	4.34	4.56	4.56	4.34	5%

[0111] 表9:使用BL5U校准物、BL6校准物、患者样品和IMMULITE® 对照样品(具有在24℃的主要曲线储存曲线)的CENTAUR® XP System ED环境影响表

Centaur ED	在 24℃ 储存			Max	Min	% 偏差
	18℃	24℃	30℃			
样品	剂量	剂量	剂量			
BL5US01	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BL5US02	0.41	0.37	0.37	0.41	0.37	13%
BL5US03	0.78	0.74	0.75	0.78	0.74	6%
BL5US04	2.21	2.18	2.24	2.24	2.18	3%
BL5US05	4.70	4.67	5.00	5.00	4.67	7%
BL5US06	9.00	8.90	9.30	9.30	8.90	5%
BL5US07	15.19	15.13	16.15	16.15	15.13	7%
BL5L01	0.41	0.36	0.36	0.41	0.36	13%
BL5H01	8.85	8.67	9.62	9.62	8.67	11%
BL6S01	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BL6S02	0.38	0.34	0.32	0.38	0.32	17%
BL6S03	0.77	0.72	0.70	0.77	0.70	9%
BL6S04	2.06	2.00	2.12	2.12	2.00	6%
BL6S05	4.61	4.42	4.86	4.86	4.42	10%
BL6S06	9.50	9.35	9.47	9.50	9.35	2%
BL6S07	16.70	16.67	16.87	16.87	16.67	1%
BL6L01	0.40	0.34	0.32	0.40	0.32	23%
BL6H01	9.80	9.15	9.47	9.80	9.15	7%
Imm0028K1	0.95	0.91	0.93	0.95	0.91	5%
Imm0028K2	3.78	3.73	3.92	3.92	3.73	5%
GAL026	2.52	2.53	2.60	2.60	2.52	3%
GAL028	4.44	4.35	4.62	4.62	4.35	6%
GAL029	5.44	5.44	5.73	5.73	5.44	5%
GAL036	4.61	4.63	4.66	4.66	4.61	1%
GAL038	4.43	4.32	4.42	4.43	4.32	3%
GAL039	2.85	2.81	2.87	2.87	2.81	2%
GAL040	4.19	4.08	4.44	4.44	4.08	9%
GAL041	3.93	4.06	4.19	4.19	3.93	7%
GAL042	3.71	3.68	3.88	3.88	3.68	5%
GAL043	2.58	2.60	2.73	2.73	2.58	6%
GAL044	4.11	4.23	4.48	4.48	4.11	9%
GAL045	4.46	4.39	4.61	4.61	4.39	5%

[0112] 表10:使用BL5U校准物、BL6校准物、患者样品和IMMULITE® 对照样品(具有在30℃的主要曲线储存曲线)的CENTAUR® XP System ED环境影响表

Centaur ED	在 30℃ 储存			Max	Min	% 偏倚
	18℃	24℃	30℃			
样品	剂量	剂量	剂量			
BL5US01	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BL5US02	0.42	0.38	0.37	0.42	0.37	12%
BL5US03	0.77	0.73	0.74	0.77	0.73	6%
BL5US04	2.13	2.10	2.16	2.16	2.10	3%
BL5US05	4.48	4.45	4.76	4.76	4.45	7%
BL5US06	8.50	8.41	8.79	8.79	8.41	4%
BL5US07	14.28	14.23	15.18	15.18	14.23	7%
BL5L01	0.41	0.37	0.37	0.41	0.37	12%
BL5H01	8.36	8.20	9.09	9.09	8.20	11%
BL6S01	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BL6S02	0.38	0.35	0.33	0.38	0.33	16%
BL6S03	0.76	0.71	0.69	0.76	0.69	9%
BL6S04	1.99	1.93	2.05	2.05	1.93	6%
BL6S05	4.39	4.21	4.63	4.63	4.21	10%
BL6S06	8.97	8.83	8.94	8.97	8.83	2%
BL6S07	15.69	15.66	15.85	15.85	15.66	1%
BL6L01	0.40	0.34	0.33	0.40	0.33	21%
BL6H01	9.25	8.65	8.95	9.25	8.65	7%
Imm0028K1	0.93	0.89	0.91	0.93	0.89	5%
Imm0028K2	3.61	3.56	3.74	3.74	3.56	5%
GAL026	2.42	2.43	2.50	2.50	2.42	3%
GAL028	4.23	4.15	4.40	4.40	4.15	6%
GAL029	5.17	5.17	5.45	5.45	5.17	5%
GAL036	4.40	4.41	4.44	4.44	4.40	1%
GAL038	4.22	4.12	4.22	4.22	4.12	2%
GAL039	2.74	2.70	2.75	2.75	2.70	2%
GAL040	4.00	3.89	4.24	4.24	3.89	9%
GAL041	3.75	3.88	4.00	4.00	3.75	6%
GAL042	3.55	3.52	3.70	3.70	3.52	5%
GAL043	2.48	2.50	2.62	2.62	2.48	6%
GAL044	3.92	4.04	4.27	4.27	3.92	9%
GAL045	4.25	4.18	4.39	4.39	4.18	7%

[0113] 实施例6: 使用硫酸铵沉淀的nr-IGFBP-3校准标准品的IGF-1标准品的构建

nr-IGFBP-3复合物的分子量(约150,000)包含与IGF-1和/或IGF-2结合的IGF结合蛋白3以及酸不稳定的区段(ALS)。nr-IGFBP-3分析物水平的测量适用于使用本文描述的IGF结合蛋白储备溶液和nr-IGFBP-3校准标准品的IGF-1分析物水平的测量。在表11中总结了在IMMULITE® 2000上来自实施例2的BL7标准品的nr-IGFBP-3和IGF-1水平。

[0114] 表11: 通过IMMULITE® 2000测量的nr-IGFBP-3和IGF-1的剂量

样品	nr-IGFBP-3 ( $\mu\text{g/ml}$ )	IGF-1 ( $\text{ng/ml}$ )
BL7S01	0	24.2
BL7S02	0.48	36.2
BL7S03	0.967	51.4
BL7S04	2.545	84.8
BL7S05	5.765	141
BL7S06	11.45	226
BL7S07	17.72	363

[0115] 制备基本上不含IGF结合蛋白的人血清的方法

实施例7:酸处理过的木炭吸附的(ATCA)人血清

将高度归一化的血清(BRT1)(来自Bioresource Technology,目录号H1090,批号1407033)穿过0.2 $\mu\text{m}$ 过滤器过滤,并向其中加入0.375 g甘氨酸(Sigma G7407,分子量等于75.07)。将所述溶液用磁力搅拌器混合,并将含有25 mM甘氨酸的溶液的pH用5N HCl缓慢地下调至pH 3.0 $\pm$ pH 0.1,在缓慢速度混合,并在室温在该pH范围维持2小时。同时,用2升去离子水冲洗Millipore MILLISTAK+<sup>®</sup> Pod木炭筒(目录号MCR40027H1,具有270平方厘米( $\text{cm}^2$ )的表面积)。然后将筒中捕集的水用经过滤的室内空气吹干。

[0116] 然后使用MASTERFLEX<sup>®</sup> C/L泵(77122-24型,例如来自Cole-Palmer, IL)将酸处理过的血清以2-3 ml/min的速度加载至木炭筒。将流出物(未结合的级分)收集为级分1。然后将200 ml水泵送穿过并收集为级分2,并通过泵送穿过200 ml水重复该过程,并将洗脱液收集为级分3。将输入BRT1以及酸处理过的、木炭吸附的(ATCA) BRT1的级分1、2和3在来自Agilent Technologies, CA的Varian CARY<sup>®</sup> 50 Conc UV分光光度计上读出,并在CENTAUR<sup>®</sup> XP上测定。

[0117] 图7和表12显示了在280纳米(nm)的光密度('OD280')和来自ATCA BRT1的洗脱级分的IGFBP-3的量( $\mu\text{g/ml}$ )。OD280值解释了稀释因子,没有来自稀释后的非蛋白组分的干扰。用'A280'标记的柱是在280 nm的蛋白吸收,其提供了定量溶液中的蛋白的方式。将级分1和2组合,浓缩至200 ml,然后使用1000 ml PBS/0.9%叠氮化钠缓冲液通过AMICON<sup>®</sup> Stirred Cell(EMD Millipore Corp.)缓冲液交换进PBS/0.9%叠氮化钠中。用酸处理过的、木炭吸附的人血清样品('ATCA-3')的组合的和缓冲液交换的级分1和2进行几个测定,并将测定的结果总结在表13中。

[0118] 表12: 来自木炭筒的洗脱级分的OD280和IGFBP3剂量

	A280	稀释因子	OD280	IGFBP-3 ( $\mu\text{g/ml}$ )
输入	0.9874	100	98.74	4.49
级分1	0.7522	100	75.22	0.19
级分2	0.1174	10	1.174	0.01
级分3	0.072	10	0.72	0.00

[0119] 表13: BRT1和ATCA-3人血清的不同CENTAUR<sup>®</sup> 测定的剂量总结

样品编号	分析物	结合蛋白	ATCA3剂量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	BRT剂量	除去%	仪器
1	IGFBP3	NA	< 0.5	4.36 $\mu\text{g}/\text{ml}$	> 90%	IMMULITE® 2000
2	IGFBP3	NA	0.17	4.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$	96.1%	CENTAUR® XP
3	IGF1	IGFBP3	3.98	110 ng/ml	96.4%	IMMULITE® 2000
4	hGH	hGHBP	0.1	0.63 $\mu\text{g}/\text{ml}$	84.1%	CENTAUR® XP

对于样品编号1:分析灵敏度等于0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

对于样品编号2:未确定LOQ。

对于样品编号3:分析灵敏度等于20 ng/ml。

对于样品编号4:分析灵敏度等于0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0120] 表13提供了在处理之前在BRT1中的IGFBP-3、IGF-1和hGH (人生长激素)的内源水平,其通过使用Siemens测定(在IMMULITE®或CENTAUR®系统上)的分析确定,并与处理后确定的水平对比。

#### [0121] 实施例8:酸处理过的、木炭吸附的(ATCA)人血清的放大制备

以与实施例7中所述相同的方式处理400 ml BRT1人血清,收集未结合至木炭筒的级分(约380 ml),并将除去后的(stripped)血清的pH立即用5 N HCl调至pH 7.4 $\pm$ pH 0.05,但是不同于实施例7,抛弃用水洗涤的级分。然后通过AMICON® Stirred Cell(使用5倍体积的缓冲液)或MINIMATE™ TFF System(来自Pall Corporation,配备10 KDa分子量膜)将在该实施例中的ATCA血清('ATCA-4')的未结合的级分缓冲液交换进PBS/0.9%叠氮化钠中。

#### [0122] 木炭筒的再生:

为了试验Millipore木炭筒的能力,将所述过程用400 ml BRT1人血清再次重复以制备人血清的ATCA样品('ATCA-5'),发现其使木炭筒饱和并产生1.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$  IGFBP-3。类似于在美国专利申请公开号20080286193A1(通过引用并入本文)中描述的操作,使用在20%乙醇中的0.5N NaOH再生木炭筒,然后用水广泛地洗涤,完成制备的简化。向ATCA-5血清中加入25 mM甘氨酸,并将pH下调至pH 3.0 $\pm$ 0.1和在室温混合2小时。然后将酸处理过的血清加载至再生的木炭筒并收集未结合的级分(约360 ml)('ATCA-5A')。缓冲液交换进PBS/0.09%叠氮化钠以后,通过原型CENTAUR®测定来确定ATCA-5A的IGFBP-3剂量。表14总结了根据实施例7-8的3种制品和样品ATCA-5A的结果。

#### [0123] 表14:ATCA人血清制品的总结

材料	开始BRT1 (ml)	IGFBP-3 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
ATCA-3	200	0.17
ATCA-4	400	0.36
ATCA-5	400	1.44
ATCA-5A*	380*	0.17

\* 使用ATCA-5,再次酸处理过,并传递至再生的木炭筒。

#### [0124] 实施例9:IGFBP-3患者样品稀释回收率

对ProMedDx (Norton, MA) 样品ID 10476627(儿科血清样品(年龄14-16),具有在IMMULITE® 2000上7.76 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的IGFBP-3剂量和7.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的CENTAUR®剂量)进行在ATCA-5A人血清中的稀释,并对于稀释的样品制品根据表15在CENTAUR® XP上在原型IGFBP-3试验上运行,其中还提供了测量的和计算的剂量。

[0125] 表15提供了使用ATCA-5A作为稀释剂的稀释系列和儿科样品。以下述方式完成稀释系列：在原型CENTAUR® IGFBP-3测定中测量P1 (ATCA-5) 和P7 (未稀释的儿科样品)的IGFBP-3值。将样品P1和P7以等量(1:1)混合以制备样品P4；将样品P1和P4以1:1混合以制备样品P3；将样品P1和P3以1:1混合以制备样品P2；将样品P3和P7以1:1混合以制备样品P5；并将样品P5和P7以1:1混合以制备样品P6。计算的剂量是从混合预见到的数学剂量(例如,对于样品P4,计算的剂量等于 $P1 + P7$  (即, $0.15 + 7.39 = 7.54$ )除以 $2 = 3.77$ 。测量的剂量是通过在原型IGFBP-3 CENTAUR® 测定中试验所确定的剂量。

[0126] 图8显示了来自表15的原型CENTAUR® XP测量的剂量相对于计算的剂量的线性图。

[0127] 表15: 在ATCA-5A中的IGFBP-3的样品制备和剂量( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

ATCA-5A作为稀释剂	样品制备	计算的剂量	测量的剂量
P1	P1	0.15	0.15
P2	P1+P3	1.05	0.88
P3	P1+P4	1.96	1.74
P4	P1+P7	3.77	3.51
P5	P3+P7	4.67	5.55
P6	P5+P7	6.03	6.44
P7	P7	7.39	7.39

P7: 未稀释的样品

P1: ACTA-5A。

[0128] 因而,已经描述了人胰岛素-样生长因子(IGF)结合蛋白储备溶液和形成浓缩的IGF结合蛋白溶液的方法的实施例和实施方案(其均包括非重组人胰岛素-样生长因子(IGF)结合蛋白3(nr-IGFBP-3)),和包含校准标准品集合的试剂盒,所述校准标准品集合包括不同浓度的nr-IGFBP-3以包括在人患者免疫测定中的IGFBP-3分析物的浓度范围。此外,已经描述了为基本上不含有IGF结合蛋白的校准标准品集合制备人血清稀释剂的方法的实施例和实施方案。应当理解,上述的实施例和实施方案仅仅是代表本文描述的原理的许多具体实施方案和实施例中的一些的示例。显然,本领域技术人员可以容易地设计众多其它安排,而不脱离由下述权利要求限定的范围。

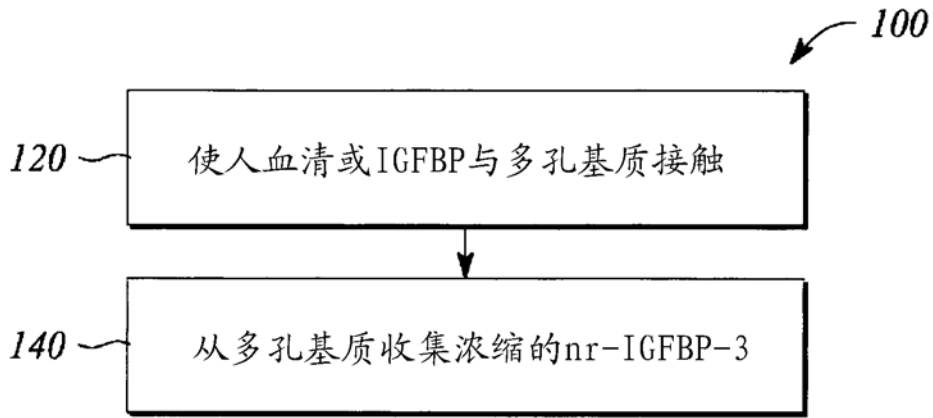


图 1A

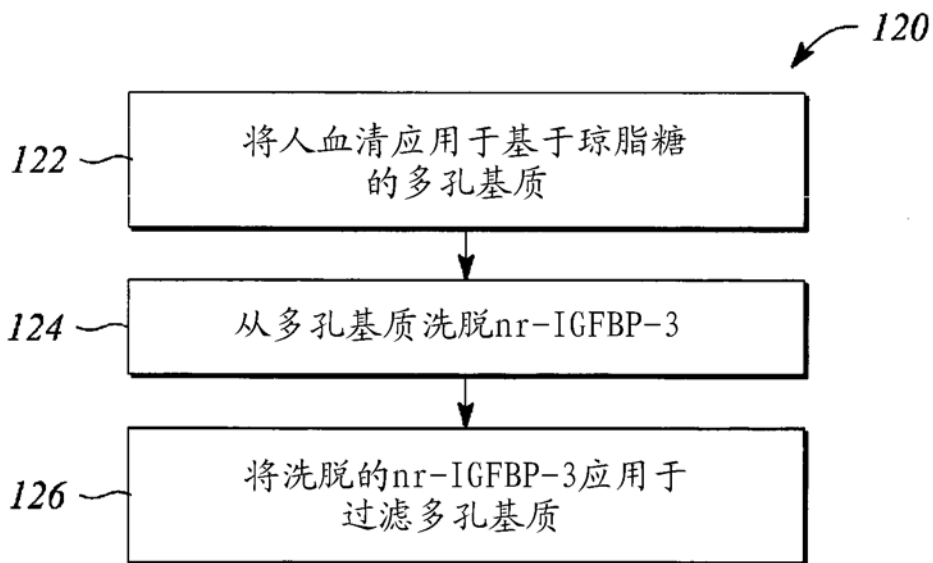


图 1B

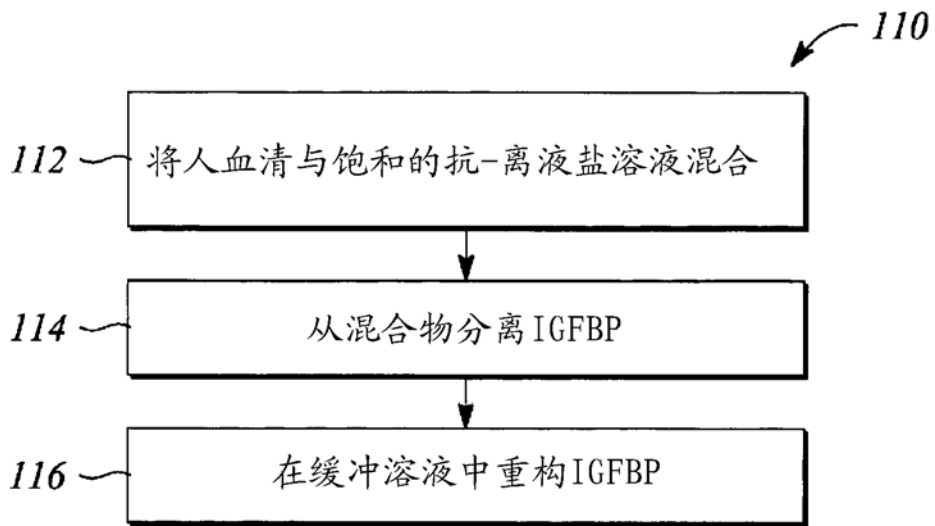


图 2

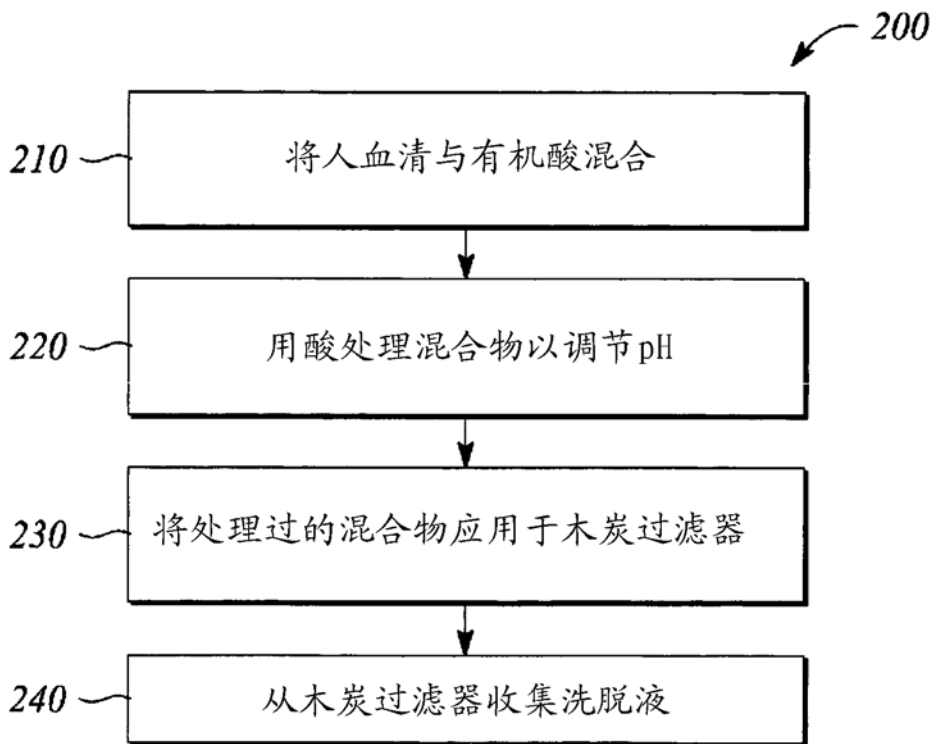


图 3

BL7 RLU剂量应答相对于  
IMMULITE®赋值标准品

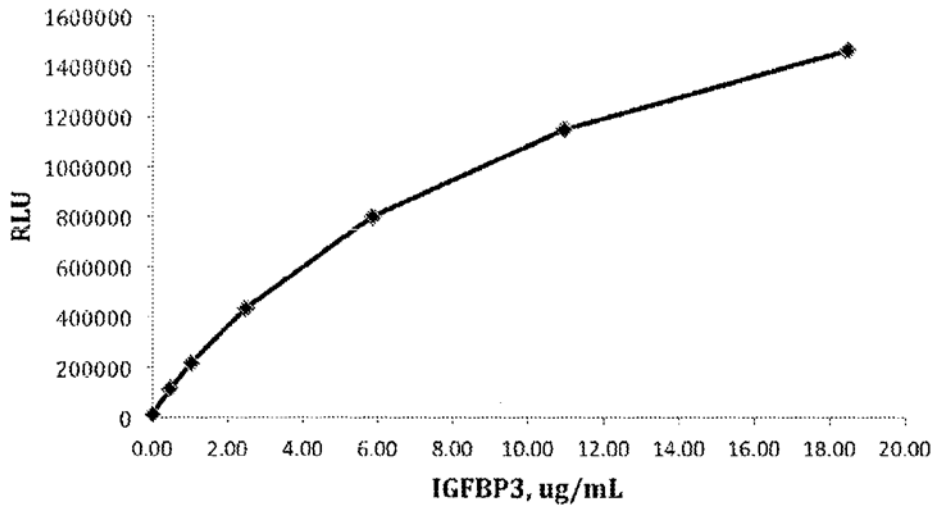


图 4

CENTAUR®完整曲线相对于IMMULITE®  
n=32

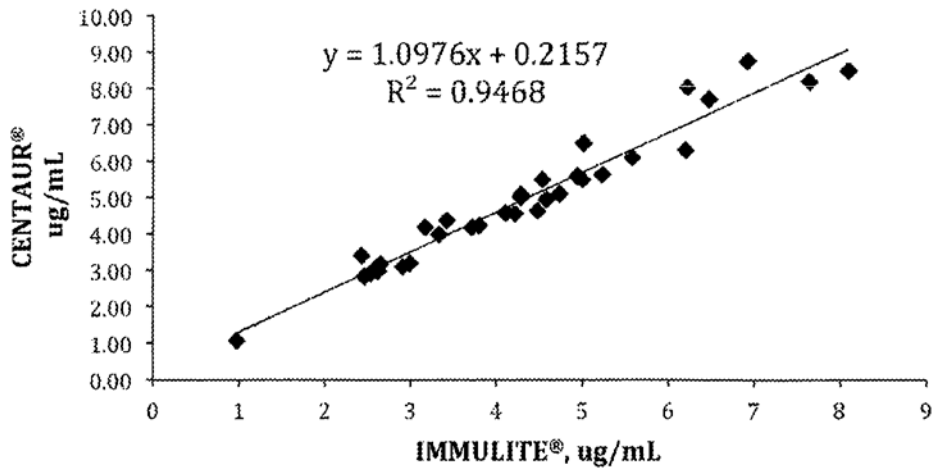


图 5

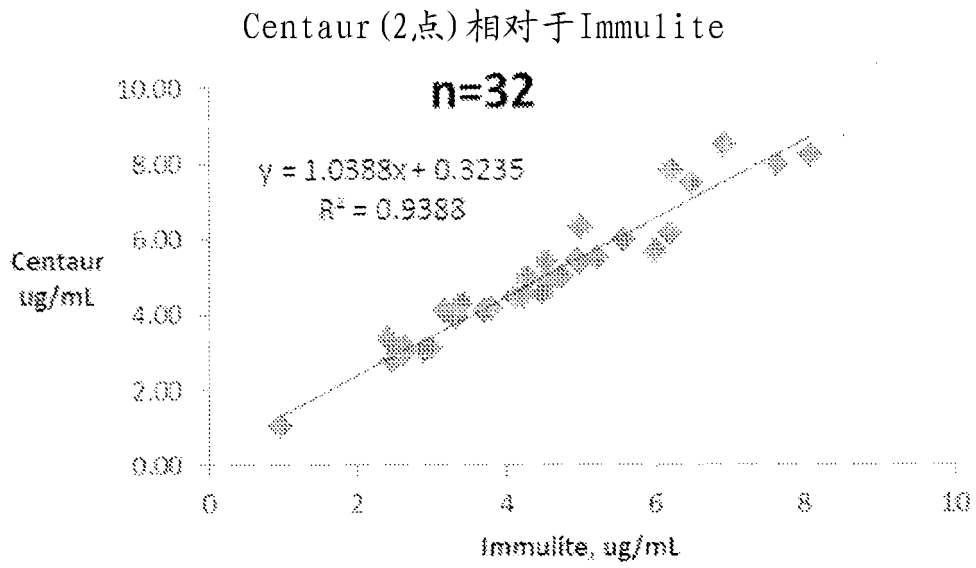


图 6

洗脱概况, OD280和IGFBP3 ug/mL  
(200mL/级分)

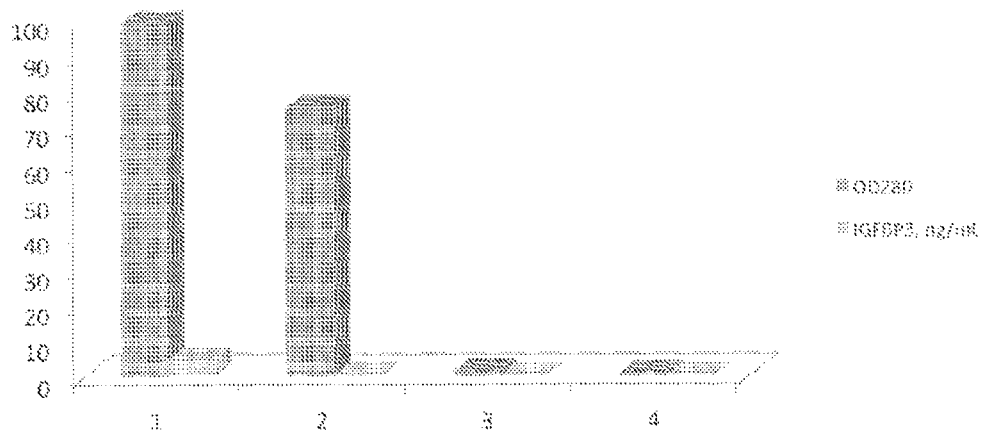


图 7

线性: XP测定值相对于计算值  
ATCA-5A作为样品稀释剂

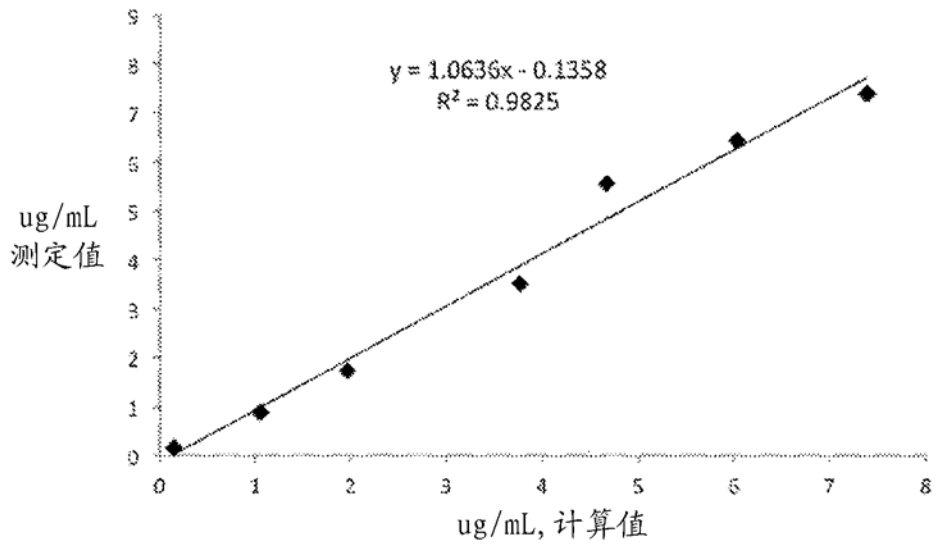


图 8

专利名称(译)	非重组人胰岛素-样生长因子结合蛋白浓缩物		
公开(公告)号	<a href="#">CN108699127A</a>	公开(公告)日	2018-10-23
申请号	CN201680082977.X	申请日	2016-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
当前申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
[标]发明人	S 林 K 奥塞 夸彭 O 库赖施 S 辛哈 M 史密斯 S 迪夫兰西斯科 R 斯皮尔斯 D 拉瓦尔 D 霍瓦内奇 伯恩斯 R 欧文斯		
发明人	S.林 K.奥塞-夸彭 O.库赖施 S.辛哈 M.史密斯 S.迪夫兰西斯科 R.斯皮尔斯 D.拉瓦尔 D.霍瓦内奇-伯恩斯 R.欧文斯		
IPC分类号	C07K14/65 G01N33/68 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/487 G01N33/50		
CPC分类号	G01N33/96 A61K38/00 C07K14/435 C07K14/4743 H04B7/0617 H04L41/0806 H04W24/02 H04W72/046		
代理人(译)	梁谋		
优先权	62/274115 2015-12-31 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

人胰岛素-样生长因子(IGF)结合蛋白储备溶液和制备它们的方法包括在水性缓冲介质中的非重组人IGF结合蛋白-3 (nr-IGFBP-3)。所述储备溶液中的nr-IGFBP-3的浓度是在约16微克/毫升( $\mu\text{g/ml}$ )至约40 $\mu\text{g/ml}$ 范围内。包括nr-IGFBP-3的校准物集合的试剂盒。所述校准物的集合包括在约0.5 $\mu\text{g/ml}$ 至约16 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内的不同浓度的nr-IGFBP-3，其被构造成包括患者样品的免疫测定中的IGFBP-3分析物水平的可疑范围。

100

120

使人血清或IGFBP与多孔基质接触



140

从多孔基质收集浓缩的nr-IGFBP-3