



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110998323 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201880054607.4

(22)申请日 2018.08.24

(30)优先权数据

62/552,557 2017.08.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.02.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/047897 2018.08.24

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2019/046118 EN 2019.03.07

(71)申请人 安捷伦科技有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 A·M·詹森 T·B·雅各布森

J·奎纳乌

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 罗天乐

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/49(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

权利要求书2页 说明书18页 附图12页

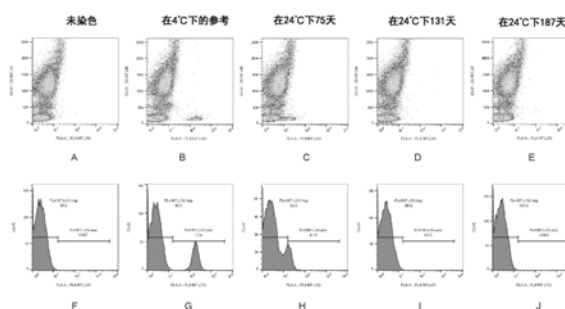
(54)发明名称

用于含有PERCP的抗体制剂的稳定化的组合
物

(57)摘要

本公开涉及可用于流式细胞术分析的制剂
和方法。本发明的制剂和方法涉及使用PerCP来
稳定在流式细胞术中使用的荧光染料,从而允许
在升高的温度下和/或在长时段内使用和储存制
剂。

如果不添加PerCP, CD19/PerCP-Cy5.5稳定性测试失败



1. 一种稳定的制剂,其包含 (a) 至少一种包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合剂,和 (b) 非缀合的多甲藻素叶绿素蛋白复合物 (PerCP) 或其片段或变体,其中所述制剂具有至少约0.1 μ g/mL的总PerCP浓度。

2. 权利要求1的制剂,其中所述缀合的荧光染料是PerCP串联荧光染料。

3. 权利要求2的制剂,其中所述缀合的荧光染料是多甲藻素叶绿素蛋白花菁5.5 (PerCP-Cy5.5)。

4. 权利要求1的制剂,其中所述缀合的荧光染料是PerCP。

5. 权利要求1-4中任一项的制剂,其中所述非缀合的PerCP或其片段或变体的浓度为至少约50 μ g/mL。

6. 权利要求1-5中任一项的制剂,其中所述带标记的结合剂包含抗CD19抗体、抗CD34抗体或抗MPO抗体。

7. 权利要求1-6中任一项的制剂,其中非缀合的PerCP或其片段或变体与带标记的结合剂的比率为至少约2:1。

8. 权利要求1-7中任一项的制剂,其中所述非缀合的PerCP是全长PerCP。

9. 权利要求1-8中任一项的制剂,其中所述非缀合的PerCP或其片段或变体是未附接且未结合至另一化学模块的多甲藻素叶绿素蛋白复合物。

10. 权利要求1-9中任一项的制剂,其中,与不具有非缀合的PerCP或其片段或变体的制剂相比,所述制剂具有更高的稳定性。

11. 权利要求1-10中任一项的制剂,其中所述制剂的荧光强度在约20 $^{\circ}$ C的温度下经过约1天至约180天变化约25%或更小。

12. 权利要求1-11中任一项的制剂,其中在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约10 $^{\circ}$ C时,带标记的结合剂具有约25%或更小的荧光强度变化。

13. 一种使用流式细胞术分析样品的方法,所述方法包括:使包含细胞的样品与包含 (a) 至少一种包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合剂,和 (b) 非缀合的PerCP或其片段或变体的制剂接触,从而形成分析样品,并使用流式细胞术分析所述分析样品;

其中所述制剂具有至少约0.1 μ g/mL的总多甲藻素叶绿素蛋白复合物 (PerCP) 浓度。

14. 权利要求13的方法,其中所述缀合的荧光染料是PerCP串联荧光染料。

15. 权利要求14的方法,其中所述缀合的荧光染料是多甲藻素叶绿素蛋白花菁5.5 (PerCP-Cy5.5)。

16. 权利要求13的方法,其中所述缀合的荧光染料是PerCP。

17. 权利要求13-16中任一项的方法,其中所述制剂具有至少约75 μ g/mL的PerCP或其片段或变体总浓度。

18. 权利要求13-17中任一项的方法,其中所述方法进一步包括基于所述荧光染料的荧光发射来分选细胞组合物中的细胞。

19. 权利要求13-18中任一项的方法,其中所述带标记的结合剂包含抗CD19抗体、抗CD34抗体或抗MPO抗体。

20. 权利要求13-19中任一项的方法,其中所述细胞是人血细胞。

21. 权利要求13-20中任一项的方法,其中所述接触在至少约20 $^{\circ}$ C的温度下进行。

22. 一种试剂盒,其包含 (a) 至少一种包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合

剂,和 (b) 非缀合的PerCP或其片段或变体。

23. 权利要求22的试剂盒,其中缀合的荧光染料是多甲藻素叶绿素蛋白花菁5.5 (PerCP-Cy5.5),并且所述试剂盒被储存在至少约20℃的温度下。

用于含有PERCP的抗体制剂的稳定化的组合物

优先权声明

[0001] 本申请主张2017年8月31日提交的第号62/552,557美国临时申请的优先权并要求其权益,兹将该申请的全部内容通过提述并入本申请。

发明领域

[0002] 本公开涉及包含稳定的结合剂的制剂、方法和试剂盒。

背景

[0003] 流式细胞术是一种强大的用于表征单个细胞的特性以及鉴定异质混合物中细胞的类型的方法。通常通过从细胞培养物或组织样品制备悬浮液,并在管或微量滴定板中将细胞与未标记或荧光染料标记的抗体温育,将细胞染色。将悬浮液引入流式细胞仪中,并用激光束照射细胞流。检测由细胞与激光束之间的相互作用引起的荧光发射和光散射,并且基于测得的荧光发射和/或散射来量化细胞的一个或多个特征。

[0004] 流式细胞术还允许基于测得的光学特性来鉴定、量化、分开和/或分离单个细胞。这种方法称为免疫表型分型,可用于分析异质混合物中的多个细胞群。免疫表型分型可以通过将能够与细胞标志物结合的抗体引入包含所述细胞标志物的细胞,并使用流式细胞术检测任何产生的荧光或散射来完成。如果细胞标志物在多于一种细胞类型中表达,则可以将多种抗体添加到异质混合物中以有效区分各个群。在这样的情况下,将每种抗体与一种不同的荧光染料缀合,从而允许同时检测多个标志物。例如,可以将与第一荧光染料缀合的抗体和与第二荧光染料缀合的抗体添加至异质混合物中,并通过流式细胞术进行分析以检测、测量和分选两个不同的细胞群。在流式细胞术过程中多种荧光染料的使用被称为多色流式细胞术。在一些情况下,例如当相似标记的抗体识别不同细胞类型上的表位时,多色流式细胞术利用在一种或多种抗体上的同一种荧光染料。

[0005] 在流式细胞术方法中可以使用各种类型的荧光染料。例如,可以将通常为有机化合物或蛋白质的单荧光染料与结合剂缀合。在流式细胞术中使用的典型单荧光染料包括异硫氰酸荧光素(FITC)、R-藻红蛋白(R-PE)、别藻蓝蛋白(APC)和多甲藻素叶绿素蛋白复合物(PerCP)。还可以将其中两种荧光染料彼此附接的串联荧光染料与抗体缀合。串联荧光染料包括荧光染料供体和荧光染料受体。当供体被光激发时,它发出能量,所述能量被转移到受体上。第二荧光染料达到激发态,并产生可检测和测量的荧光发射。典型的供体包括PerCP、R-PE和APC,而典型的受体包括ALEXAFLUOR®荧光染料和花菁荧光染料。串联荧光染料通常提供比单荧光染料更高的亮度。然而,串联荧光染料通常是光敏感的,在细胞标记和流式细胞术分析过程中需要减少或最小化曝光量。

[0006] 多甲藻素叶绿素蛋白复合物(PerCP)是类胡萝卜素-蛋白复合物,最早在100年前被公开。PerCP的多甲藻素分子吸收蓝-绿波长(470至550nm)的光,并以高效率将能量转移至叶绿素分子。PerCP具有极高的消光系数、高的量子效率和大的斯托克斯位移。PerCP蛋白通常用于荧光免疫标记应用,比如荧光激活细胞分选(FACS)。PerCP和相关缀合物的特性使这些复合物可用于具有FITC、PE和其他荧光染料的多色分析。

[0007] PerCP可以单独使用,也可用于串联荧光染料中。例如,可以将PerCP附接到花菁(例如Cy5.5)上,以形成PerCP-Cy串联荧光染料(例如PerCP-Cy5.5)。可以用标准的488nm激光激发PerCP的花菁串联(例如PerCP-Cy5.5)。例如,PerCP-Cy5.5在694nm波长处具有最大的荧光发射,而在677nm波长处具有非缀合的PerCP。对于免疫表型分析,可以将PerCP-Cy模块连接至与期望靶标特异性地结合的抗体。然而,使用PerCP荧光染料的缺点是其固有的不稳定性。通常将PerCP制剂储存在低于8°C的温度下,以保持稳定性。使用PerCP制剂或运输PerCP制剂时必须格外小心,因为所述制剂在较高温度下会分解。如果PerCP制剂运输延迟,或者意外地未冷藏PerCP制剂,导致温度升高,则PerCP荧光染料迅速衰减。由于PerCP荧光染料是以已知和标记浓度的液体制剂形式提供给客户的,因此任何荧光染料的降解都可能导致实验误差。这种情况使得需要新的批次,可能会引起医学诊断或预后延迟。

[0008] 因此,需要用于增强PerCP荧光染料的稳定性的新制剂和方法。理想地,这样的制剂和方法在流式细胞术分析中增强PerCP荧光染料的稳定性,而不干扰荧光染料的荧光性质。

发明概述

[0009] 在一个实施方案中,本公开提供了稳定的制剂。所述稳定的制剂包含(a)至少一种包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合剂,和(b)非缀合的多甲藻素叶绿素蛋白复合物(PerCP)或其片段或变体,其中所述制剂具有至少约0.1 μ g/mL的总PerCP浓度。在一些实施方案中,缀合的荧光染料是PerCP串联荧光染料。在一些实施方案中,缀合的荧光染料是多甲藻素叶绿素蛋白花菁5.5(PerCP-Cy5.5)。在一些实施方案中,缀合的荧光染料是PerCP。在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体的浓度为至少约50 μ g/mL。在一些实施方案中,所述抗体是抗CD19抗体、抗CD34抗体或抗MPO抗体。在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体与带标记的结合剂的比率为至少约2:1。在一些实施方案中,非缀合的PerCP是全长PerCP。在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体是未附接或未结合至另一化学模块的多甲藻素叶绿素蛋白复合物。在一些实施方案中,该制剂与不具有非缀合的PerCP或其片段或变体的制剂相比具有更好的稳定性。在一些实施方案中,所述制剂的荧光强度在约20°C的温度下经过约1天至约180天变化约25%或更小。在一些实施方案中,当制剂的温度升高至少约10°C时,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,带标记的结合剂具有约25%或更小的荧光强度变化。

[0010] 在另一个实施方案中,本公开提供了使用流式细胞术分析样品的方法。所述方法包括使包含细胞的样品与包含(a)至少一种包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合剂,和(b)非缀合的多甲藻素叶绿素蛋白复合物(PerCP)或其片段或变体的制剂接触,从而形成分析样品,并使用流式细胞术分析所述分析样品。所述制剂具有至少约0.1 μ g/mL的总PerCP浓度。在一些实施方案中,缀合的荧光染料是PerCP串联荧光染料。在一些实施方案中,缀合的荧光染料是多甲藻素叶绿素蛋白花菁5.5(PerCP-Cy5.5)。在一些实施方案中,缀合的荧光染料是PerCP。在一些实施方案中,所述制剂具有至少约75 μ g/mL的PerCP或其片段或变体总浓度。在一些实施方案中,所述方法进一步包括基于荧光染料的荧光发射来分选细胞组合物中的细胞。在一些实施方案中,所述抗体是抗CD19抗体、抗CD34抗体或抗MPO抗体。在一些实施方案中,所述细胞是人血细胞。在一些实施方案中,所述接触在至少约20°C的温度下进行。

[0011] 在另一个实施方案中,本公开提供了用于在流式细胞仪中分析细胞的试剂盒。所述试剂盒包含 (a) 至少一种包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合剂,和 (b) 非缀合的多甲藻素叶绿素蛋白复合物 (PerCP) 或其片段或变体。在一些实施方案中,缀合的荧光染料是多甲藻素叶绿素蛋白花菁5.5 (PerCP-Cy5.5),并且所述试剂盒被储存在至少约20°C的温度下。

[0012] 在另一个实施方案中,本公开提供了使至少一种带标记的结合剂稳定的方法。所述方法包括将非缀合的多甲藻素叶绿素蛋白复合物 (PerCP) 或其片段或变体添加至包含结合模块和缀合的荧光染料的至少一种带标记的结合剂,从而形成稳定的制剂。所述稳定的制剂具有至少约0.1 μ g/mL的总PerCP浓度。

[0013] 在另一个实施方案中,本公开提供了可以与流式细胞术一起使用的稳定的珠子制剂。所述稳定的珠子制剂包含 (a) 至少一种PerCP标记的或PerCP-Cy5.5标记的珠子, (b) 非缀合的PerCP或其片段或变体,和 (c) 液体,其中所述制剂具有至少约为0.1 μ g/mL的总PerCP浓度。

[0014] 结合所附权利要求书,根据以下详细说明,本发明制剂和方法的这些和其他特征和优点将显而易见。

定义的术语

[0015] 应当理解,本文中使用的术语是仅仅出于描述具体实施方案的目的,而不意图限制。所定义的术语是对如本教导的技术领域中通常理解和接受的定义的术语的技术和科学含义的补充。

[0016] 术语“荧光染料”是指能够通过比色法或荧光测定法检测到的模块。术语“缀合的荧光染料”是指已经缀合(例如,连接或共价结合至)于结合模块的荧光染料。

[0017] 术语“稳定的”是指其中化合物或组合物的荧光性质不会很大变化的化合物或组合物。在一些实施方案中,当温度变化时,稳定的化合物或组合物的荧光强度变化约25%或更小、约10%或更小、约5%或更小、约1%或更小、或约0.1%或更小(例如,约40°C、约30°C、约20°C、约10°C或约5°C的温度升高)。

[0018] 术语“结合模块”是指能够与靶标结合的模块。非限制性实例包括抗体或核酸探针。

[0019] 术语“带标记的”是指附接有荧光染料的模块(例如,抗体)。

[0020] 术语“PerCP的总浓度”或“多甲藻素叶绿素蛋白复合物的总浓度”或“总PerCP浓度”是指制剂中PerCP或其片段或变体的总量(摩尔或质量)除以制剂总体积。PerCP的总量是非缀合的PerCP和/或其片段或变体的量与带标记的结合剂中PerCP的量之和。

[0021] 术语“非缀合的多甲藻素叶绿素蛋白”或“游离PerCP”在本文中可互换使用,指未与抗体或核酸探针结合的多甲藻素叶绿素蛋白复合物或其片段或变体。

[0022] 如在说明书和所附权利要求书中使用的,除了它们的普通含义外,术语“实质的”或“基本上”还意味着在本领域普通技术人员可接受的限度或程度内。例如,“实质取消”意味着本领域技术人员认为取消是可接受的。

[0023] 如在说明书和所附权利要求书中使用的,除了其普通含义外,术语“大致”和“大约”还意味着在本领域普通技术人员可接受的限度或量之内。术语“大约”通常指的是指示数值的正或负15%。例如,“大约10”可以指示8.5到11.5的范围。例如,“大致相同”表示本领域

域普通技术人员认为所比较的事项相同。

[0024] 在本公开中,数值范围包括定义该范围的数字。在本公开中,无论在实施方案被描述为“包括”特定特征的何处,本公开还考虑了“基本上由该特征组成”或“由该特征组成”的其他实施方案。应当认识到,出于说明的目的,可以延伸或扩展化学结构和化学式。

[0025] 除非另外定义,本文中使用的全部技术术语和科学术语具有与本公开所属领域的从业人员通常所理解的相同的含义。

附图简述

[0026] 当结合附图阅读以下详细说明时,能最好地理解本文的教导。这些特征不一定是按比例绘制的。

[0027] 图1A-1J是显示抗CD19/PerCP-Cy5.5这种结合剂的加速稳定性测试的流式细胞术数据的图,该结合剂包含抗人CD19抗体和与之缀合的荧光染料PerCP-Cy5.5。图1A-1E显示了用抗CD19/PerCP-Cy5.5处理的血液的流式细胞术侧向散射图。图1F-1J显示了在抗CD45/太平洋蓝散点图上门控的淋巴细胞的图。

[0028] 图2A-2D是显示储存在4°C和37°C的抗CD19/PerCP-Cy5.5的短时稳定性测试的流式细胞术数据的直方图。

[0029] 图3A-3H显示在不存在和存在非缀合的PerCP的条件下来自经染色血液的淋巴细胞的直方图。图3A-3D显示了来自抗CD19/PerCP-Cy5.5染色的血液的淋巴细胞的直方图,图3E-3H显示了来自抗CD3/PerCP(一种与PerCP缀合的抗人CD3抗体)染色的血液的淋巴细胞的直方图。

[0030] 图4A-4H是显示用于以各种浓度将血液染色的、包含抗CD19/PerCP-Cy5.5 (50µg/mL) 和非缀合的PerCP (130µg/mL) 的制剂的稳定性测试的流式细胞术数据的直方图。图4A-4D显示了使用50µg/mL抗CD19/PerCP-Cy5.5和130µg/mL非缀合的PerCP的结果,图4E-4H显示了使用稀释4倍的相同试剂(12.5µg/mL抗CD19/PerCP-Cy5.5,补充有32.5µg/mL非缀合的PerCP)的结果。

[0031] 图5A-5H是显示包含抗CD34/PerCP-Cy5.5的制剂在不存在和存在非缀合的PerCP的条件下的稳定性测试的流式细胞术数据的直方图,所述抗CD34/PerCP-Cy5.5包含抗人CD34抗体和与之缀合的荧光染料PerCP-Cy5.5。在测试之前,将抗CD34/PerCP-Cy5.5缀合物在37°C下以50µg/mL的试剂浓度与或不与130µg/mL的游离PerCP(颜色较浅的峰)温育3天。将参考样品(颜色较深的峰)在4°C下温育。温育后,在分别存在130µg/mL和32.5µg/mL非缀合的PerCP(+PerCP)的情况下、或在不存在非缀合的PerCP(-PerCP)的情况下,以130µg/mL(图5A-5D)和12.5µg/mL(图5E-5H)的浓度测试所述试剂。

[0032] 图6A-6H是显示包含抗CD34/PerCP-Cy5.5的制剂在不存在和存在非缀合的PerCP的条件下的稳定性测试的流式细胞术数据的直方图。图6A-6H的实验是图5A-5H的实验的重复。

[0033] 图7A-7H是显示包含抗MP0/PerCP-Cy5.5的制剂在不存在和存在非缀合的PerCP的条件下的稳定性测试的流式细胞术数据的直方图,所述抗MP0/PerCP-Cy5.5包含抗人MP0抗体和与之缀合的荧光染料PerCP-Cy5.5,其中血样是从两个单独的供体(即供体1和供体2)获得的。在分别存在130µg/mL和32.5µg/mL非缀合的PerCP(+PerCP)的条件下或在不存在非缀合的PerCP(-PerCP)的条件下,以50µg/mL(图7A-7D)和12.5µg/mL(图7E-7H)的浓度测试

抗MP0/PerCP-Cy5.5缀合物。在测试之前,在添加或不添加130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 非缀合的PerCP(较浅颜色的阴影)的条件下,将试剂以50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度在37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育三天。将相似的试剂在4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存并用作参考(颜色较深的阴影)。

[0034] 图8A-8H是显示包含抗MP0/PerCP-Cy5.5的制剂在不存在和存在非缀合的PerCP的条件下的稳定性测试的流式细胞术数据的直方图,其中血样是从两个不同供体(即供体3和供体4)获得的。在分别存在130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和32.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 非缀合的PerCP(+PerCP)的条件下或在不存在非缀合的PerCP(-PerCP)的条件下,以50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图8A-8D)和12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图8E-8H)的浓度测试抗MP0/PerCP-Cy5.5缀合物。图8A-8H的实验是图7A-7H的实验的重复。

[0035] 图9A-9H是显示包含多克隆F(ab')₂兔抗人 λ 轻链/PerCP-Cy5.5的制剂在不存在和存在非缀合的PerCP的条件下的稳定性测试的流式细胞术数据的直方图,所述多克隆F(ab')₂兔抗人 λ 轻链/PerCP-Cy5.5包含与荧光染料PerCP-Cy5.5缀合的多克隆F(ab')₂兔抗人 λ 轻链。以150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图9A和9E)、75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图9B和9F)、37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图9C和9G)、18.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图9D和9H)的浓度测试了多克隆F(ab')₂兔抗人 λ 轻链/PerCP-Cy5.5缀合物。在无游离PerCP(图9A-9D)和有90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 游离PerCP(图9E-9H)的条件下测试了多克隆F(ab')₂兔抗人 λ 轻链/PerCP-Cy5.5缀合物。将多克隆F(ab')₂兔抗人 λ 轻链/PerCP-Cy5.5缀合物在37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育3天(浅灰色),并与在4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存的参考(深灰色)进行比较。

[0036] 图10A-10H是显示包含抗小鼠单克隆抗人CD22/PerCP-Cy5.5(同种型IgG1 κ)的制剂在不存在和存在非缀合的PerCP的条件下的稳定性测试的流式细胞术数据的直方图,所述小鼠单克隆抗人CD22/PerCP-Cy5.5包含与荧光染料PerCP-Cy5.5缀合的小鼠单克隆抗人CD22。以100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图10A和10E)、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图10B和10F)、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图10C和10G)和12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图10D和10H)的浓度测试了小鼠单克隆抗人CD22/PerCP-Cy5.5缀合物。在无游离PerCP(图10A-10D)和有130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 游离PerCP(图10E-10H)的条件下测试了小鼠单克隆抗人CD22/PerCP-Cy5.5缀合物。将小鼠单克隆抗人CD22/PerCP-Cy5.5缀合物在37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育3天(浅灰色),并与在4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存的参考(深灰色)进行比较。

[0037] 图11A-11H是显示包含抗小鼠单克隆抗人CD1a/PerCP-Cy5.5(同种型:IgG2a κ)的制剂在不存在和存在非缀合的PerCP的条件下的稳定性测试的流式细胞术数据的直方图,所述小鼠单克隆抗人CD1a/PerCP-Cy5.5包含与荧光染料PerCP-Cy5.5缀合的小鼠单克隆抗人CD1a。以100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图11A和11E)、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图11B和11F)、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图11C和11G)和12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图11D和11H)的浓度测试了小鼠单克隆抗人CD1a/PerCP-Cy5.5缀合物。在无游离PerCP(图11A-11D)和有130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 游离PerCP(图11E-11H)的条件下测试了小鼠单克隆抗人CD1a/PerCP-Cy5.5缀合物。将小鼠单克隆抗人CD1a/PerCP-Cy5.5缀合物在37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育3天(浅灰色),并与在4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存的参考(深灰色)进行比较。

[0038] 图12A-12H是显示包含抗小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5(同种型:IgG2b κ)的制剂在不存在和存在非缀合的PerCP的条件下的稳定性测试的流式细胞术数据的直方图,所述小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5包含与荧光染料PerCP-Cy5.5缀合的小鼠单克隆抗人CD7。以100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图12A和12E)、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图12B和12F)、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图12C和12G)和12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图12D和12H)的浓度测试了小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5缀合物。在无游离PerCP(图12A-12D)和有130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 游离PerCP(图12E-12H)的条件下测试了小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5缀合物。将小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5缀合物在37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育3天(浅灰

色),并与在4°C下储存的参考(深灰色)进行比较。

发明详述

[0039] 在描述各个实施方案之前,应该理解本公开的教导并不限于所描述的具体实施方案,正因为如此,当然可以改变。还应当理解,本文中使用的术语是仅仅出于描述具体实施方案的目的,而不意图限制,因为本发明教导的范围仅由所附权利要求书限定。

[0040] 如本文中公开的,提供了许多数值范围。应当理解的是,还具体公开了在该范围的上限和下限之间的以下限的单位的十分之一为间隔(除非上下文明确地另行指明)的各居间值。在所陈述范围中的任何陈述值或居间值与在该陈述范围中的任何其他的陈述值或居间值之间的各个较小范围涵盖在本发明范围内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在所述范围,并且在极限值任一者、两者都不、或两者都被包括在这些较小范围中的各个范围也涵盖在本发明范围内,受限于陈述范围中的任何明确排除的极限值。当陈述范围包括极限值之一或两者时,排除这些被包括的极限值的任一者或两者的范围也包括在本发明中。

[0041] 除非另外定义,本文中使用的全部技术术语和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管可以在本发明教导的实践或测试中使用类似于或等同于本文所述那些的任何方法和材料,但目前描述了一些示例性的方法和材料。

[0042] 本文中提及的所有专利和出版物都通过提述明确地以其全文并入本文。任何出版物的引用是因为其公开在申请日之前,并且不应被解释为承认本权利要求书没有资格先于这样的出版物。此外,提供的出版日期可能与可被独立证实的实际出版日期不同。

[0043] 如在说明书和所附权利要求中使用的,术语“一个”、“一种”和“该”包括单数和复数指示物,除非上下文另外明确地指示。因此,例如,“模块”包括一个模块和多个模块。

[0044] 对于本领域技术人员在阅读本公开内容后将显而易见的是,本文中描述和展示每个单独的实施方案具有离散的部件和特征,其可以容易地与任何其他几个实施方案的特征分离或组合,而不脱离本发明教导的范围或精神。任何叙述的方法可以按照叙述的事件的顺序或以逻辑上可能的任何其他顺序进行。

[0045] 提供了增加带标记的结合剂的稳定性的制剂和方法。包含非缀合的多甲藻素叶绿素蛋白复合物(PerCP)或其片段或变体以及包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合剂(例如与荧光染料缀合的抗体)的制剂,与不具有非缀合的PerCP的制剂相比,具有增加的稳定性。出乎意料地发现,制剂中具有一定浓度或高于一定浓度的PerCP或其片段或变体可增加带标记的结合剂的稳定性。足够浓度的非缀合的PerCP或其片段或变体的存在导致带标记的结合剂具有增加的温度稳定性。通常在2-8°C的温度下储存PerCP制剂。本发明制剂的一些实施方案的优点在于,它们可以在高于8°C的温度下(例如,在室温下)储存,而带标记的结合剂没有显著降解。因此,本公开制剂的一些实施方案可以在使用前很早准备。本发明制剂的一些实施方案的另一个优点是带标记的结合剂可以处于低浓度而不损害稳定性。本发明的制剂和方法可以采用多种多样的荧光染料,包括单一的或串联的荧光染料(例如,单一或串联PerCP)。包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合剂可以用来检测多种细胞靶标。

[0046] 在一个实施方案中,本公开提供了稳定的制剂。所述稳定的制剂包含(a)至少一种包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合剂,和(b)非缀合的多甲藻素叶绿素蛋白

复合物(PerCP)或其片段或变体,其中所述制剂具有至少约0.1 μ g/mL的总PerCP浓度。

[0047] 在另一个实施方案中,本公开提供了稳定化至少一种带标记的结合剂的方法。所述方法包括将非缀合的PerCP或其片段或变体添加至包含结合模块和缀合的荧光染料的至少一种带标记的结合剂,从而形成稳定的制剂。所述稳定的制剂具有至少约0.1 μ g/mL的总PerCP浓度。

[0048] 在一些实施方案中,所述荧光染料是单荧光染料。在一些实施方案中,所述荧光染料是串联荧光染料。

[0049] 在一些实施方案中,荧光染料包含PerCP或其片段或变体、基本上由PerCP或其片段或变体组成、或由PerCP或其片段或变体组成。在一些实施方案中,所述荧光染料是包含PerCP的串联荧光染料。在一些实施方案中,所述荧光染料是包含PerCP-花菁的串联荧光染料。在一些实施方案中,所述花菁选自异硫花菁(isothiocyanine)、苯并吡啶二碳菁(benzindodicarbocyanine)、吡啶碳菁(indocarbocyanine)、苯并吡啶碳菁(benzindocarbocyanine)、吡啶二碳菁(indodicarbo-cyanine)、吡啶三碳菁(indotricarbocyanine)、苯并吡啶二碳菁(benzindo-dicarbocyanine)、噻唑橙、噻唑黄、CYA((3-(ϵ -羧基-戊基)-3'乙基-5,5'-二甲基氧杂碳菁))和份菁(merocyanine)。在一些实施方案中,花菁选自Cy5、Cy5.5、Cy3、Cy 3.5、Cy 7和Cy7.5。在一些实施方案中,所述荧光染料是PerCP-Cy5.5。

[0050] 在一些实施方案中,荧光染料在一定的波长具有最大荧光发射,该波长不同于PerCP或其片段或变体的最大荧光发射。例如,包含与花菁串联的PerCP或其片段或变体的荧光染料在不同于单独的PerCP或其片段或变体的最大荧光发射的波长具有最大荧光发射。

[0051] PerCP包含与多甲藻素、叶绿素和脂质结合的多甲藻素叶绿素蛋白。PerCP蛋白可以以下列形式存在:具有两个单体的同二聚体形式,从同二聚体形式通过基因重复而生成的单体形式,或者由三个拷贝的单体PerCP生成的三聚体形式。在一些实施方案中,所述制剂包含非缀合的PerCP或包含同二聚体形式的PerCP蛋白的缀合的荧光染料。在一些实施方案中,所述制剂包含非缀合的PerCP或包含单体形式的PerCP蛋白的缀合的荧光染料。在一些实施方案中,所述制剂包含非缀合的PerCP或包含三聚体形式的PerCP蛋白的缀合的荧光染料。在一些实施方案中,所述制剂包含非缀合的PerCP或包含PerCP蛋白的缀合的荧光染料,所述PerCP蛋白为同二聚体形式、单体形式、三聚体形式或其组合。在一些实施方案中,同二聚体、单体和三聚体形式由不同基因表达。

[0052] PerCP蛋白可以各种同工型或变体形式存在。例如,PerCP蛋白可具有不同的长度、序列或折叠结构。在一些实施方案中,所述制剂包含非缀合的PerCP或包含PerCP蛋白的缀合的荧光染料,所述PerCP蛋白包括一种或多种PerCP蛋白变体。

[0053] 在一些实施方案中,所述PerCP包括PerCP片段。在一些实施方案中,所述制剂包含非缀合的PerCP或包含至少一个PerCP蛋白片段的缀合的荧光染料。在一些实施方案中,所述制剂包含非缀合的PerCP或缀合的荧光染料,所述缀合的荧光染料包含与PerCP蛋白具有实质序列同一性但与PerCP蛋白不完全相同的片段。在一些实施方案中,所述片段包含全长PerCP蛋白序列的至少约60%、至少约75%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、至少约99.5%或至少约99.9%。然而,PerCP片

段可以具有与本文所述的用途一致的任何长度。

[0054] 在一些实施方案中,PerCP包括具有相对于野生型PerCP蛋白的至少一个氨基酸缺失、插入或取代的PerCP变体。在一些实施方案中,PerCP变体具有与野生型PerCP蛋白的氨基酸序列的至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%或大于95%的氨基酸同一性。然而,PerCP变体可具有与本文所述的用途一致的与野生型PerCP蛋白的任何程度的氨基酸同一性。在一些实施方案中,可以使用具有默认参数的BLASTP确定氨基酸同一性的程度。

[0055] 在一些实施方案中,非缀合的PerCP或缀合的荧光染料包含全长PerCP蛋白。

[0056] 在PerCP或其片段或变体中,多甲藻素与叶绿素的摩尔比可以变化。在一些实施方案中,多甲藻素与叶绿素的摩尔比为约1:1至约6:1。在一些实施方案中,多甲藻素与叶绿素的摩尔比为约3:1至约6:1。在一些实施方案中,多甲藻素与叶绿素的摩尔比为约3:1至约4:1。在一些实施方案中,多甲藻素与叶绿素的摩尔比为约4:1。在一些实施方案中,多甲藻素与叶绿素的摩尔比为约6:1。在一些实施方案中,多甲藻素与叶绿素的摩尔比为约3:1。

[0057] 在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体是未附接或结合至另一化学模块的多甲藻素叶绿素蛋白复合物或其片段或变体。在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体是未共价附接至另一化学模块的多甲藻素叶绿素蛋白复合物或其片段或变体。

[0058] 非缀合的PerCP或其片段或变体可以按照任何适合的量使用。在一些实施方案中,所述制剂包含浓度为至少约0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的非缀合的PerCP或其片段或变体。因此,在一些实施方案中,所述制剂包含浓度为至少约0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或至少约200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的非缀合的PerCP或其片段或变体。在一些实施方案中,所述制剂包含浓度为约0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的非缀合的PerCP或其片段或变体。在一些实施方案中,所述制剂包含浓度为约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的非缀合的PerCP或其片段或变体。在一些实施方案中,所述制剂包含浓度为约25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的非缀合的PerCP或其片段或变体。在一些实施方案中,所述制剂包含浓度为约50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的非缀合的PerCP或其片段或变体。

[0059] 在一些实施方案中,所述结合模块是抗体。所述抗体可以是抗人、抗小鼠、抗大鼠、抗山羊或抗非人灵长类动物抗体。

[0060] 在一些实施方案中,所述结合模块是单克隆、多克隆、合成或重组抗体。在一些实施方案中,所述结合模块是IgG、IgM、IgA、IgD或IgE抗体。在一些实施方案中,所述结合模块是嵌合或人源化抗体。

[0061] 在一些实施方案中,抗体选自抗CD19、抗CD34、抗CD45、抗CD1a、抗CD8、抗CD2、抗CD3、抗CD4、抗CD5、抗CD7、抗CD 9、抗CD10、抗CD11a、抗CD11b、抗CD11c、抗CD13、抗CD14、抗CD15、抗CD16、抗CD16b、抗CD18、抗CD19、抗CD20、抗CD22、抗CD23、抗CD24、抗CD25、抗CD27、抗CD28、抗CD30、抗CD33、抗CD34、抗CD35、抗CD36、抗CD38、抗CD39、抗CD41、抗CD42b、抗CD43、抗CD45、抗CD45RO、抗CD45RA、抗CD48、抗CD 49d、抗CD50、抗CD52、抗CD53、抗CD54、抗

CD55、抗CD55、抗CD56、抗CD57、抗CD59、抗CD61、抗CD64、抗CD66、抗CD68、抗CD71、抗CD73、抗CD79 α 、抗CD82、抗CD87、抗CD90、抗CD117、抗CD142、抗CD236、抗CD239、抗CD240、抗CD241和抗CD242抗体。

[0062] 在一些实施方案中,抗体是抗MPO抗体。

[0063] 在一些实施方案中,结合模块是亲和素或链霉亲和素,并且这些实施方案适合与缀合至生物素的一级抗体(生物素化抗体)一起使用。

[0064] 本公开的制剂和方法特别有用于使包含低浓度的带标记的结合剂的制剂稳定。在一些实施方案中,带标记的结合剂以小于约200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度存在于溶液中。因此,在一些实施方案中,带标记的结合剂以小于约200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、小于约175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、小于约150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、小于约125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、小于约100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、小于约75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、小于约50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或小于约25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度存在于溶液中。在一些实施方案中,带标记的结合剂以约0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度存在于溶液中。在一些实施方案中,带标记的结合剂以约1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度存在于溶液中。在一些实施方案中,带标记的结合剂以约0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度存在于溶液中。在一些实施方案中,带标记的结合剂以约0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度存在于溶液中。然而,可以按照任何适合的浓度使用本公开的带标记的结合剂。

[0065] 可以按照使带标记的结合剂稳定所需的任何适合的比率使用非缀合的PerCP或其片段或变体以及带标记的结合剂。在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体与带标记的结合剂的比率为约0.1:1至约100:1。在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体与带标记的结合剂的比率为约0.1:1至约20:1。因此,在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体与带标记的结合剂的比率为约0.1:1至约20:1、约0.5:1至约20:1、约1:1至约20:1、约1:1至约15:1、约1:1至约10:1、约1:1至约8:1、约1:1至约5:1或约2:1至约8:1。在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体与带标记的结合剂的比率为至少约1:1。因此,在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体与带标记的结合剂的比率为至少约1:1、至少约1.5:1、至少约2:1、至少约2.5:1、至少约3:1、至少约3.5:1、至少约4:1、至少约4.5:1、至少约5:1、至少约6:1、至少约7:1或至少约8:1。

[0066] 在一些实施方案中,所述制剂具有至少约0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PerCP或其片段或变体总浓度。因此,在一些实施方案中,所述制剂具有至少约0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、至少约175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或至少约200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PerCP或其片段或变体总浓度。在一些实施方案中,所述制剂具有约0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PerCP或其片段或变体总浓度。在一些实施方案中,所述制剂具有约25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PerCP或其片段或变体总浓度。在一些实施方案中,所述制剂具有约50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PerCP或其片段或变体总浓度。在一些实施方案中,所述制剂具有约100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PerCP或其片段或变体总浓度。

[0067] 在一些实施方案中,所述制剂是溶液。在一些实施方案中,所述制剂是水溶液。在一些实施方案中,所述制剂是包含有机溶剂的溶液。

[0068] 本公开制剂可包含另外的组分。在一些实施方案中,所述制剂包含缓冲剂、防腐

剂、表面活性剂或其组合。在一些实施方案中,防腐剂包括异噻唑啉酮。在一些实施方案中,防腐剂包括叠氮盐。在一些实施方案中,防腐剂包括碱金属或碱土金属的叠氮化物。在一些实施方案中,防腐剂包括叠氮化钠。

[0069] 在一些实施方案中,所述制剂含有包含Tris/HCl的缓冲液。在一些实施方案中,所述制剂含有包含氯化钠的缓冲液。在一些实施方案中,所述制剂含有包含牛血清白蛋白的缓冲液。在一些实施方案中,所述制剂包含约0.01M至约0.2M Tris/HCl、约0.01M至约0.4M氯化钠、约0.1mM至约100mM叠氮化钠以及约0.1%至约5%的牛血清白蛋白。

[0070] 在一些实施方案中,所述制剂含有包含Tris/HCl、NaCl、叠氮化钠和牛血清白蛋白的缓冲液。在一些实施方案中,所述制剂包含约0.02M至约0.08M Tris/HCl、约0.05M至约0.2M氯化钠、约5mM至约25mM叠氮化钠以及约0.5%至约2%的牛血清白蛋白。在一些实施方案中,所述制剂具有约6.5至约7.5的pH。

[0071] 在一些实施方案中,所述制剂包含至少两种带标记的结合剂。在一些实施方案中,所述制剂包含至少三种带标记的结合剂。在一些实施方案中,所述制剂包含至少四种带标记的结合剂。在一些实施方案中,所述制剂包含至少五种带标记的结合剂。在这样的实施方案中,各种带标记的结合剂的荧光染料可以相同或不同。

[0072] 在一些实施方案中,所述制剂包含至少一种带标记的结合剂和非缀合的PerCP或其片段或变体,并且相比于不具有非缀合的PerCP或其片段或变体的制剂具有更好的稳定性。

[0073] 在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约10°C持续35-150天,例如从约4°C到约14°C持续35-150天时,带标记的结合剂具有约25%或更小的荧光强度变化。在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约20°C持续7-180天,例如从约4°C至约24°C持续7-180天或20-75天时,带标记的结合剂具有约25%或更小的荧光强度变化。在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约30°C持续1-10天,例如从约4°C至约37°C持续1-10天或1-3天时,带标记的结合剂具有约25%或更小的荧光强度变化。

[0074] 在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约10°C持续35-150天,例如从约4°C到约14°C持续35-150天时,带标记的结合剂具有约20%或更小的荧光强度变化。在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约20°C持续7-180天,例如从约4°C至约24°C持续7-180天或20-75天时,带标记的结合剂具有约25%或更小的荧光强度变化。在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约30°C持续1-10天,例如从约4°C至约37°C或更高持续1-10天或1-3天时,带标记的结合剂具有约20%或更小的荧光强度变化。

[0075] 在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约10°C持续35-150天,例如从约4°C到约14°C持续35-150天时,带标记的结合剂具有约10%或更小的荧光强度变化。在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约20°C持续7-180天,例如从约4°C至约24°C持续7-180天或20-75天时,带标记的结合剂具有约10%或更小的荧光强度变化。在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约30°C持续1-10天,例如从约4°C

至约37℃或更高持续1-10天或1-3天时,带标记的结合剂具有约10%或更小的荧光强度变化。

[0076] 在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约10℃持续35-150天,例如从约4℃到约14℃持续35-150天时,带标记的结合剂具有约5%或更小的荧光强度变化。在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约20℃持续7-180天,例如从约4℃至约24℃持续7-180天或20-75天时,带标记的结合剂具有约5%或更小的荧光强度变化。在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约30℃持续1-10天,例如从约4℃至约37℃或更高持续1-10天或1-3天时,带标记的结合剂具有约5%或更小的荧光强度变化。

[0077] 在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约10℃持续35-150天,例如从约4℃到约14℃持续35-150天时,带标记的结合剂具有约1%或更小的荧光强度变化。在一些实施方案中,当制剂的温度升高至少约20℃持续7-180天,例如从约4℃至约24℃持续7-180天或20-75天时,带标记的结合剂具有约1%或更小的荧光强度变化。在一些实施方案中,在非缀合的PerCP或其片段或变体存在下,当制剂的温度升高至少约30℃持续1-10天,例如从约4℃至约37℃或更高持续1-10天或1-3天时,带标记的结合剂具有约1%或更小的荧光强度变化。

[0078] 在一些实施方案中,所述制剂在约20℃的温度下持续至少约180天是稳定的,其中荧光强度变化约25%或更小。在一些实施方案中,所述制剂在约20℃的温度下持续至少约180天是稳定的,其中荧光强度变化约20%或更小。在一些实施方案中,所述制剂在约20℃的温度下持续至少约180天是稳定的,其中荧光强度变化约10%或更小。在一些实施方案中,所述制剂在约20℃的温度下持续至少约180天是稳定的,其中荧光强度变化约5%或更小。因此,在一些实施方案中,所述制剂在约20℃的温度下持续至少约180天、至少约150天、至少约120天、至少约100天、至少约90天、至少约80天、至少约75天、至少约70天、至少约60天、至少约50天、至少约45天、至少约40天、至少约30天、至少约25天、至少约20天、至少约15天、至少约10天、至少约7天、至少约5天、至少约4天、至少约3天、至少约2天、或至少约1天是稳定的,其中荧光强度变化约25%或更小、约20%或更小、约10%或更小或约5%或更小。

[0079] 在一些实施方案中,所述制剂在约20℃的温度下持续约1天至约180天是稳定的,其中荧光强度变化约25%或更小。在一些实施方案中,所述制剂在约20℃的温度下持续约1天至约180天是稳定的,其中荧光强度变化约20%或更小。在一些实施方案中,所述制剂在约20℃的温度下持续约1天至约180天是稳定的,其中荧光强度变化约10%或更小。在一些实施方案中,所述制剂在约20℃的温度下持续约1天至约180天是稳定的,其中荧光强度变化约5%或更小。因此,在一些实施方案中,所述制剂在约20℃的温度下持续约1天至约180天、约1天至约150天、约1天至约120天、约1天至约100天、约1天至约80天、约1天至约60天、约1天至约45天、约1天至约30天、约1天至约14天、约1天至约7天、约1天至约4天、约7天至约180天、约14天至约180天、或约30天至约180天是稳定的,其中荧光强度变化约25%或更小、约20%或更小、约10%或更小、或约5%或更小。

[0080] 在一些实施方案中,所述制剂包含非缀合的PerCP或其片段或变体以及包含PerCP-花菁(例如,PerCP-Cy5.5)缀合的荧光染料的带标记的结合剂。在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体以及缀合的荧光染料的PerCP或其片段或变体是从同一个

物种分离的。在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体以及缀合的荧光染料的PerCP或其片段或变体是从不同物种分离的。在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体以及缀合的荧光染料的PerCP或其片段或变体在结构上不同。在一些实施方案中,非缀合的PerCP或其片段或变体以及缀合的荧光染料的PerCP或其片段或变体在结构上相同。

[0081] 在一些实施方案中,荧光染料与链霉亲和素或亲和素缀合。在一些实施方案中,将包含链霉亲和素缀合的PerCP或串联PerCP的带标记的结合剂与生物素化一级抗体联合使用。

[0082] 在另一个实施方案中,本公开提供了使用流式细胞术分析样品的方法。所述方法包括使包含细胞的样品与包含 (a) 至少一种包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合剂,和 (b) 非缀合的PerCP或其片段或变体的制剂接触,从而形成分析样品,并使用流式细胞术分析所述分析样品。所述制剂具有至少约0.1 μ g/mL的总PerCP浓度。

[0083] 样品可以包括任何细胞类型或制备品。在一些实施方案中,样品是细胞培养物。在一些实施方案中,样品是细胞悬液。例如,细胞悬液的细胞可以源自实体组织。

[0084] 在一些实施方案中,样品包含血细胞。在一些实施方案中,样品包含人血细胞。在一些实施方案中,样品包含白细胞,比如淋巴细胞。在一些实施方案中,样品包含骨髓细胞。在一些实施方案中,样品包含源自淋巴器官(例如淋巴结或脾脏)的白细胞。在一些实施方案中,样品包含工程化的细胞,例如用于治疗或诊断目的的工程化细胞。在一些实施方案中,样品包含CAR-T细胞。

[0085] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括基于荧光染料的荧光发射来分选细胞组合物中的细胞。在一些实施方案中,所述方法进一步包括使用荧光激活细胞分选(FACS)进行细胞分选。

[0086] 在一些实施方案中,将待分析的细胞固定以阻止代谢过程并使细胞质和细胞核可与结合剂接触,然后用至少一种带标记的结合剂染色。

[0087] 在一些实施方案中,带标记的结合剂是识别一级抗体的二级抗体。

[0088] 本公开的本发明制剂和方法解决了在升高的温度下储存时荧光染料的信号强度侵蚀问题。本公开的制剂和方法为在不同温度下处理和储存制剂提供了可能。在一些实施方案中,使所述制剂在至少约10 $^{\circ}$ C的温度下与样品接触。因此,在一些实施方案中,使所述制剂在至少约10 $^{\circ}$ C、至少约15 $^{\circ}$ C、至少约20 $^{\circ}$ C、至少约25 $^{\circ}$ C、至少约30 $^{\circ}$ C、至少约35 $^{\circ}$ C、至少约40 $^{\circ}$ C或至少约40 $^{\circ}$ C的温度下与样品接触。

[0089] 在一些实施方案中,所述方法是多色流式细胞术方法。

[0090] 可以改变操作流式细胞仪的方法以及分析如此获取的数据的方法,并且这样的改变在本领域中是已知且常见的。

[0091] 在另一个实施方案中,本公开提供了可以与流式细胞术一起使用的稳定的珠子制剂。所述稳定的珠子制剂包含 (a) 至少一种PerCP标记的或PerCP-Cy5.5标记的珠子, (b) 非缀合的PerCP或其片段或变体,和 (c) 液体,其中所述制剂具有至少约为0.1 μ g/mL的总PerCP浓度。在一些实施方案中,液体是水性液体。在一些实施方案中,液体是有机溶剂。在一些实施方案中,稳定的珠子是Cal iBRITE珠子。在一些实施方案中,所述珠子是乳胶珠子。在一些实施方案中,所述珠子是聚甲基甲基丙烯酸酯珠子。在一些实施方案中,所述制剂包含叠氮盐。

[0092] 在另一个实施方案中,本公开提供了用于在流式细胞仪中分析细胞的试剂盒。所述试剂盒包含(a)至少一种包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合剂,和(b)非缀合的PerCP或其片段或变体。

[0093] 在一些实施方案中,所述试剂盒包含在分开的容器中的组分(a)和(b)。因此,在一些实施方案中,所述试剂盒包含在第一容器中的至少一种包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合剂以及在第二容器中的非缀合的PerCP或其片段或变体。

[0094] 在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含适合于例如流式细胞术的一种或多种另外的化合物。在一些实施方案中,所述试剂盒包含缓冲剂、防腐剂、表面活性剂或其组合。在一些实施方案中,所述另外的化合物被提供在同一个或分开的容器中。

[0095] 在一些实施方案中,所述试剂盒包括关于使用试剂盒的组分的说明书。在一些实施方案中,所述试剂盒包括关于混合分开的组分、针对组分和/或混合物的适合条件和/或用于混合组合物的适合容器的说明书。

[0096] 在一些实施方案中,所述试剂盒包括包含制剂的“预混合”容器,所述制剂包含(a)至少一种包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合剂,和(b)非缀合的多甲藻素叶绿素蛋白复合物或其片段或变体。

实施例1

[0097] 这个实施例展示了温度和储存对带标记的结合剂稳定性的影响。

[0098] 使用加速稳定性测试检验了与PerCP-Cy5.5缀合的抗CD19抗体(即,抗CD19/PerCP-Cy5.5, DAKO)在升高的温度下的稳定性。用抗CD19/PerCP-Cy5.5将健康供体的血液在抗凝剂EDTA的存在下染色。将100 μ L血液等分试样与抗CD19/PerCP-Cy5.5混合,并在黑暗中以2-8 $^{\circ}$ C下温育30分钟。将2mL部分的FACS裂解液(BD Biosciences)与血细胞组合物混合,并在黑暗中以环境温度下温育10分钟。将处理过的血细胞在环境温度下以300xg离心5分钟。除去上清液。将细胞在2mL PBS中洗涤,离心,并重悬于0.4mL PBS中。使用Navios流式细胞仪(Beckmann Coulter)分析样品。将细胞用抗CD45/太平洋蓝(DAKO)共染色。在侧向散射/太平洋蓝散点图上对淋巴细胞设置门控。

[0099] 将结果与未处理的细胞和在4 $^{\circ}$ C下用抗CD19/PerCP-Cy5.5处理的细胞进行比较。将细胞用25 μ g/mL在24 $^{\circ}$ C下储存75、131和187天的抗CD19/PerCP-Cy5.5溶液处理(图1E)。

[0100] 实验图显示在图1A-1J中。图1A-1E显示了用在4 $^{\circ}$ C下或在24 $^{\circ}$ C下储存指定天数的抗CD19/PerCP-Cy5.5处理的血液的流式细胞术侧向散射图。图1G-1J显示了在抗CD45/太平洋蓝散点图上设置门控的淋巴细胞的直方图。如图1B和1G所示,当用在4 $^{\circ}$ C下储存的抗CD19/PerCP-Cy5.5处理细胞时,直方图上的抗CD19阳性和CD19阴性淋巴细胞得到良好的分离。图1C和1H显示抗CD19/PerCP-Cy5.5在24 $^{\circ}$ C下储存75天导致CD19阳性和CD19阴性淋巴细胞峰的分​​离不充分,表现为峰的合并。图1D、1E、1I和1J显示了直方图中的CD19阳性淋巴细胞峰的消失。结果表明,抗CD19/PerCP-Cy5.5在升高的温度下经过长时间是不稳定的。

实施例2

[0101] 这个实施例展示了温度和浓度对带标记的结合剂的短期稳定性的影响。

[0102] 使用短期稳定性测试检验了抗CD19/PerCP-Cy5.5在升高的温度下的稳定性。实验之前,将来自DAKO的抗CD19/PerCP-Cy5.5和来自BD Biosciences的抗CD19/PerCP-Cy5.5以215 μ g/mL和25 μ g/mL的浓缩物在4 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C下储存2.5天。使用实施例1的程序,将健康供体

的血液染色,与抗CD19/PerCP-Cy5.5一起储存,并通过流式细胞术进行分析。

[0103] 淋巴细胞的直方图显示在图2A-2D中,其中在4°C和37°C下的实验信号叠加。图2B和2C显示,与浓制剂相比,用稀制剂(即25 μ g/mL抗CD19/PerCP-Cy5.5)温育后,中位荧光强度具有更大的降低;所述浓制剂是在浓缩制剂(215 μ g/mL抗CD19/PerCP-Cy5.5)中37°C下温育,并在流式细胞术测试之前稀释至25 μ g/mL。如图2D所示,对于从另一供应商获得的抗CD19/PerCP-Cy5.5也观察到信号降低,这表明所观察到的抗CD19/PerCP-Cy5.5的稳定性与来源无关。这些结果表明,PerCP-Cy5.5缀合物的稳定性依赖于制剂的浓度。

实施例3

[0104] 这个实施例展示了在根据本公开的一个实施方案的不同浓度的非缀合的PerCP存在下,结合剂-单荧光染料缀合物和结合剂-串联荧光染料缀合物的稳定性。

[0105] 检验了在非缀合的PerCP存在下,抗CD19/PerCP-Cy5.5和一种与PerCP缀合的抗CD3抗体(即,抗CD3/PerCP)的稳定性。在实验之前,在非缀合的PerCP存在下,将抗CD19/PerCP-Cy5.5(25 μ g/mL)和抗CD3/PerCP(25 μ g/mL)在4°C和37°C下储存2周。非缀合的PerCP(来自Prozyme公司的PhycoPro™(PB40),分离自甲藻纲物种)以不同的浓度(即0、75、100和200 μ g/mL)使用。使用实施例1的程序,用储存的荧光染料分别处理健康供体的血细胞,并通过流式细胞术进行分析。使用FACSCanto II流式细胞仪(BD Biosciences)。

[0106] 淋巴细胞的直方图显示在图3A-3H中,其中将使用4°C和37°C下储存的制剂的实验的信号叠加。图3A-3D显示了来自抗CD19/PerCP-Cy5.5染色的血液的淋巴细胞的直方图,而图3E-3H显示了来自抗CD3/PerCP染色的血液的淋巴细胞的直方图。

[0107] 如图3A所示,当使用储存在37°C的抗CD19/PerCP-Cy5.5缀合物时,CD19阳性和CD19阴性淋巴细胞之间的分离发生变化。图3E显示使用在37°C下储存的抗CD3/PerCP缀合物导致CD3阳性淋巴细胞的信号消失。然而,当每种荧光染料在75 μ g/mL的非缀合的PerCP存在下保存时,抗CD19/PerCP-Cy5.5和抗CD3/PerCP两者的直方图在4°C和37°C都是相似的,如图3B和3F所示。图3C、3D、3G和3H表明,将PerCP的浓度增加到100 μ g/mL和200 μ g/mL导致抗CD19/PerCP-Cy5.5和抗CD3/PerCP两者的稳定性进一步增加。不希望受任何特定理论的束缚,认为非缀合的PerCP可能使抗体-PerCP缀合物的PerCP蛋白稳定,因为抗CD19/PerCP-Cy5.5和抗CD3/PerCP两者在非缀合的PerCP存在下都显示出增加的稳定性。

实施例4

[0108] 这个实施例展示了具有根据本公开的实施方案的不同浓度的带标记的结合剂和非缀合的PerCP的制剂的稳定性。

[0109] 检验了具有不同浓度的抗CD19/PerCP-Cy5.5和非缀合的PerCP(来自Prozyme公司的PhycoPro™(PB40),分离自甲藻纲物种)的制剂的稳定性。使用两个不同的供体(即,供体1和供体2)的血液进行测试。使用实施例1中公开的程序,用抗CD19/PerCP-Cy5.5处理细胞,并通过流式细胞术进行分析。

[0110] 使用转运模拟检验了非缀合的PerCP对抗CD19/PerCP-Cy5.5转运的影响。对于转运模拟方案,将抗CD19/PerCP-Cy5.5样品在-20°C冷冻16-24小时,在4°C解冻2-8小时,在-20°C冷冻16-24小时,在4°C解冻2-8小时,在37°C温育16-24小时,然后在25°C温育7天。

[0111] 淋巴细胞的图显示在图4A-4H中。图4A-4D显示了使用50 μ g/mL抗CD19/PerCP-Cy5.5和130 μ g/mL非缀合的PerCP的结果,图4E-4H显示了使用12.5 μ g/mL抗CD19/PerCP-

Cy5.5和32.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 非缀合的PerCP的结果。结果表明,所测试的制剂在升高的温度下具有良好的稳定性。结果还表明,所测试的制剂的稳定性足以在环境温度下运输。

实施例5

[0112] 这个实施例展示了具有根据本公开的实施方案的不同浓度的带标记的结合剂和非缀合的PerCP的制剂的稳定性。

[0113] 检验了与PerCP-Cy5.5缀合的抗CD34抗体(即,抗CD34/PerCP-Cy5.5)在升高的温度下的稳定性。实验之前,将抗CD34/PerCP-Cy5.5制剂在4 $^{\circ}\text{C}$ 或37 $^{\circ}\text{C}$ 下保存3天。使用抗CD34/PerCP-Cy5.5对70%KG1a(CD34阳性)和30%U937(CD34阴性)细胞的细胞悬液进行表面染色。在存在130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和32.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 非缀合的PerCP(+PerCP)(来自Prozyme公司的PhycoProTM(PB40),分离自甲藻纲物种)的条件下,或在不存在非缀合的PerCP(-PerCP)的条件下,分别以50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度测试了抗CD34/PerCP-Cy5.5缀合物。对于每个样品,将含有100万个细胞的100 μL 细胞悬液与制剂混合,并在黑暗中以2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下染色30分钟。加入2mL的FACS裂解液(BD Biosciences)。将样品混合并且在环境温度下在黑暗中温育10分钟。将细胞在环境温度下以300 $\times\text{g}$ 离心5分钟。除去上清液,将细胞在2mL PBS中洗涤一次,离心,然后重悬于0.4mL PBS中。使样品在Navios流式细胞仪(Beckmann Coulter)上运行。每个实验另外重复三次。

[0114] 实验直方图显示在图5A-6H中。用不含非缀合的PerCP的制剂染色的CD34阳性细胞的中位荧光强度降低。相比之下,当制剂在4 $^{\circ}\text{C}$ 和37 $^{\circ}\text{C}$ 下储存时,在非缀合的PerCP存在下用抗CD34/PerCP-Cy5.5染色的细胞提供了相似的图。结果表明,非缀合的PerCP增加了抗CD34/PerCP-Cy5.5的稳定性。

实施例6

[0115] 这个实施例展示了具有根据本公开的实施方案的不同浓度的带标记的结合剂和非缀合的PerCP的制剂的稳定性。

[0116] 检验了与PerCP-Cy5.5缀合的抗MPO抗体(即,抗MPO/PerCP-Cy5.5)在升高的温度下的稳定性。使用抗MPO/PerCP-Cy5.5将来自四名健康供体的血液染色。在存在130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 非缀合的PerCP(+PerCP)(来自Prozyme公司的PhycoProTM(PB40),分离自甲藻纲物种)的条件下或在不存在非缀合的PerCP(-PerCP)的条件下,以50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度测试了抗MPO/PerCP-Cy5.5缀合物。在使用前,在具有或不具有非缀合的PerCP的条件下将试剂以50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度在4 $^{\circ}\text{C}$ 或37 $^{\circ}\text{C}$ 下储存3天。对于每个样品,使用细胞内染色程序将血液染色。对于每个样品,将50 μL 血液与100 μL IntraStain试剂A(DAKO)混合,并在环境温度下固定15分钟。使用EGTA作为抗凝剂。加入2mL PBS,并将细胞在环境温度下以300 $\times\text{g}$ 离心5分钟。除去上清液。将细胞重悬,并在100 μL IntraStain试剂B(DAKO)中使质膜透化。加入染色制剂,并将细胞在环境温度下在黑暗中温育15分钟。加入2mL PBS,将细胞离心,重悬于0.4mL PBS中,并在Navios流式细胞仪(Beckmann Coulter)上进行分析。将细胞用CD45/太平洋蓝(DAKO)共染色,并在侧向散射/太平洋蓝散点图上对粒细胞设置门控。

[0117] 粒细胞的实验直方图显示在图7A-8H中,其中将来自4 $^{\circ}\text{C}$ 和37 $^{\circ}\text{C}$ 下的制剂的实验的信号叠加。对于用不含非缀合的PerCP的制剂染色的MPO阳性细胞,四个供体样品表现出中位荧光强度降低。相比之下,对于在4 $^{\circ}\text{C}$ 和37 $^{\circ}\text{C}$ 下储存的制剂,在非缀合的PerCP存在下用抗MPO/PerCP-Cy5.5染色的细胞提供了相似的直方图。结果表明,非缀合的PerCP可增加抗

MP0/PerCP-Cy5.5的稳定性。

实施例7

[0118] 这个实施例描述了使用根据本公开的实施方案的非缀合的PerCP片段或其变体的程序。

[0119] 可以从多种生物中提取物中分离出PerCP的天然存在的变体和片段,这些生物包括虫黄藻(碎碟物种)、强壮前沟藻(Plymouth 450)、涡鞭毛藻(Cachonina niei)、多边膝沟藻(Gonyaulax polyedra)、薄甲藻物种、Amphidinium rhyncephaleium和华丽裸甲藻(Gymnodinium splendens)。例如,具有可变氨基酸序列的PerCP复合物可以在双鞭毛藻类比如强壮前沟藻中发现。还可以使用体外重建系统产生PerCP变体,如Schulte等人(Eur. J. Cell Biol. 2010, 89, 990-997)所述,将其通过提述并入本文。在一些实施方案中,可以通过使用标准遗传工程技术来改变PerCP DNA序列,以编码PerCP蛋白的片段或变体来制备PerCP的片段或变体。例如,在一些实施方案中,可以使用体外合成,例如化学DNA合成或酶介导的DNA合成,来制备编码PerCP的片段或变体表达的修饰序列。可以通过使用选择来产生所需片段的扩增引物来酶促产生编码PerCP片段的序列。在一些实施方案中,可以利用诱变或用含有所需突变的引物扩增,来产生变体蛋白。在一些实施方案中,PerCP的片段或变体可以使用用于重组表达的非藻类宿主例如大肠杆菌来制备,如Miller等人所述(Photosynthesis Research, 2005, 86, 229-240),其通过引用并入本文。在一些实施方案中,PerCP的片段或变体可以通过使用标准基因工程技术来制备。PerCP片段或变体对结合剂稳定性的影响可使用以下方法中描述的任何方法进行评估。

[0120] 可以通过组合一种或多种包含结合模块和缀合的荧光染料的带标记的结合剂以及非缀合的PerCP片段或变体来形成制剂。例如,抗CD19/PerCP-Cy5.5可与非缀合的PerCP片段或变体组合。可以按照任何适合的浓度使用PerCP片段或变体。例如,所述制剂可以包含浓度为约25 μ g/mL至150 μ g/mL的PerCP片段或变体。所述制剂可在形成后立即使用或储存延长的时段。例如,所述制剂可储存至多180天。所述制剂在使用前可以在任何适合的温度下储存。例如,所述制剂在使用前可以在大于约4 $^{\circ}$ C(例如,约4 $^{\circ}$ C至约40 $^{\circ}$ C)的温度下储存。

[0121] 包含非缀合的PerCP片段或变体以及一种或多种带标记的结合剂的制剂可以用于任何适合的分析过程中。例如,所述制剂可以用于流式细胞术方法中。在此类场合,使包含一个或多个细胞的样品与包含非缀合的PerCP片段或变体以及一种或多种带标记的结合剂的制剂接触。使用流式细胞术分析所述分析样品。例如,使细胞悬液与包含非缀合的PerCP片段或变体以及一种或多种带标记的结合剂的制剂接触,然后将细胞染色。可以将裂解液添加至分析样品,并且可以温育分析样品。可以使分析样品在流式细胞仪上运行,从而生成多个直方图来提供与细胞的一个或多个参数有关的信息或数据。

实施例8

[0122] 这个实施例展示了具有根据本公开的实施方案的不同浓度的带标记的结合剂和非缀合的PerCP的制剂的稳定性。

[0123] 用不同浓度的多克隆F(ab')₂兔抗人 λ 轻链/PerCP-Cy5.5和CD19/FITC试剂将血液染色。首先在前/侧向散点图上对淋巴细胞设置门控。在FITC/侧向散点图上将B细胞作为CD19阳性淋巴细胞设门。图9描绘了B细胞的PerCP-Cy5.5直方图。

[0124] 图9A-9H是显示在包含多克隆F(ab')₂兔抗人 λ 轻链/PerCP-Cy5.5的制剂在不存在

和存在非缀合的PerCP的条件下的稳定性测试的流式细胞术数据的直方图,所述多克隆F(ab')₂兔抗人λ轻链/PerCP-Cy5.5包含与荧光染料PerCP-Cy5.5缀合的多克隆F(ab')₂兔抗人λ轻链。以150μg/mL(图9A和9E)、75μg/mL(图9B和9F)、37.5μg/mL(图9C和9G)和18.6μg/mL(图9D和9H)的浓度测试了多克隆F(ab')₂兔抗人λ轻链/PerCP-Cy5.5缀合物。在无游离PerCP(图9A-D)和有90μg/mL游离PerCP(图9E-9H)的条件下测试了多克隆F(ab')₂兔抗人λ轻链/PerCP-Cy5.5缀合物。将多克隆F(ab')₂兔抗人λ轻链/PerCP-Cy5.5缀合物在37°C下温育3天(浅灰色),并与在4°C下储存的参考(深灰色)进行比较。添加90μg/mL游离PerCP的试剂(图9E-9H)在37°C的稳定性高于未添加游离PerCP的试剂(图9A-9D)。

实施例9

[0125] 这个实施例展示了具有根据本公开的实施方案的不同浓度的带标记的结合剂和非缀合的PerCP的制剂的稳定性。

[0126] 用不同浓度的小鼠单克隆抗人CD22/PerCP-Cy5.5(同种型IgG1κ)试剂将血液染色。在前/侧向散点图上对淋巴细胞设置门控。图10包括从血液获得的淋巴细胞的PerCP-Cy5.5直方图,所述血液用小鼠单克隆抗人CD22/PerCP-Cy5.5(同种型IgG1κ)染色,其为在4°C下的参考(深灰色)或在37°C下储存三天的试剂(浅灰色)。试剂没有添加游离PerCP(图10A-10D)或含有130μg/mL的游离PerCP(图10E-10H)。

[0127] 图10A-10H是显示包含抗小鼠单克隆抗人CD22/PerCP-Cy5.5(同种型IgG1κ)的制剂在不存在和存在非缀合的PerCP的条件下的稳定性测试的流式细胞术数据的直方图,所述小鼠单克隆抗人CD22/PerCP-Cy5.5包含与荧光染料PerCP-Cy5.5缀合的小鼠单克隆抗人CD22。以100μg/mL(图10A和10E)、50μg/mL(图10B和10F)、25μg/mL(图10C和10G)和12.5μg/mL(图10D和10H)的浓度测试了小鼠单克隆抗人CD22/PerCP-Cy5.5缀合物。在无游离PerCP(图10A-10D)和有1300μg/mL游离PerCP(图10E-10H)的条件下测试了小鼠单克隆抗人CD22/PerCP-Cy5.5缀合物。将小鼠单克隆抗人CD22/PerCP-Cy5.5缀合物在37°C下温育3天(浅灰色),并与在4°C下储存的参考(深灰色)进行比较。添加130μg/mL游离PerCP的试剂(图10E-10H)在37°C的稳定性高于未添加游离PerCP的试剂(图10A-10D)。

实施例10

[0128] 这个实施例展示了具有根据本公开的实施方案的不同浓度的带标记的结合剂和非缀合的PerCP的制剂的稳定性。

[0129] 将HPB-ALL(CD1a阳性)和Daudi(CD1a阴性)细胞的混合物用不同浓度的小鼠单克隆抗人CD1a/PerCP-Cy5.5染色。在前向散点图/侧向散点图上对细胞设置门控,并在侧向散点图(H)/侧向散点图(A)上以单线态进一步进行门控。在染色程序之前,将试剂在37°C下储存3天(浅灰色),将参考试剂在4°C下储存(深灰色)。试剂无游离PerCP添加(图11A-11D)或含有130μg/mL的游离PerCP(图11E-11H)。

[0130] 图11A-11H是显示包含抗小鼠单克隆抗人CD1a/PerCP-Cy5.5(同种型:IgG2ακ)的制剂在不存在和存在非缀合的PerCP的条件下的稳定性测试的流式细胞术数据的直方图,所述小鼠单克隆抗人CD1a/PerCP-Cy5.5包含与荧光染料PerCP-Cy5.5缀合的小鼠单克隆抗人CD1a。以100μg/mL(图11A和11E)、50μg/mL(图11B和11F)、25μg/mL(图11C和11G)和12.5μg/mL(图11D和11H)的浓度测试了小鼠单克隆抗人CD1a/PerCP-Cy5.5缀合物。在无游离PerCP(图11A-11D)和有130μg/mL游离PerCP(图11E-11H)的条件下测试了小鼠单克隆抗人

CD1a/PerCP-Cy5.5缀合物。将小鼠单克隆抗人CD1a/PerCP-Cy5.5缀合物在37°C下温育3天(浅灰色),并与在4°C下储存的参考(深灰色)进行比较。添加130µg/mL游离PerCP的试剂(图11E-11H)在37°C的稳定性高于未添加游离PerCP的试剂(图11A-11D)。

实施例11

[0131] 这个实施例展示了具有根据本公开的实施方案的不同浓度的带标记的结合剂和非缀合的PerCP的制剂的稳定性。

[0132] 用不同浓度的小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5试剂将血液染色。在前/侧向散点图上对淋巴细胞设置门控。图12包括用小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5染色的淋巴细胞的PerCP-Cy5.5直方图,所述小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5为在4°C下的参考(深灰色)或在37°C下储存三天的试剂(浅灰色)。试剂无游离PerCP添加(图12A-12D)或含有130µg/mL游离PerCP(图12E-12H)。

[0133] 图12A-12H是显示包含抗小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5(同种型:IgG2bκ)的制剂在不存在和存在非缀合的PerCP的条件下的稳定性测试的流式细胞术数据的直方图,所述小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5包含与荧光染料PerCP-Cy5.5缀合的小鼠单克隆抗人CD7。以100µg/mL(图12A和12E)、50µg/mL(图12B和12F)、25µg/mL(图12C和12G)和12.5µg/mL(图12D和12H)的浓度测试了小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5缀合物。在无游离PerCP(图12A-12D)和有130µg/mL游离PerCP(图12E-12H)的条件下测试了小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5缀合物。将小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5缀合物在37°C下温育3天(浅灰色),并与在4°C下储存的参考(深灰色)进行比较。添加130µg/mL游离PerCP的试剂(图11E-11H)在37°C的稳定性高于未添加游离PerCP的试剂(图11A-11D)。

如果不添加PerCP，CD19/PerCP-Cy5.5稳定性测试失败

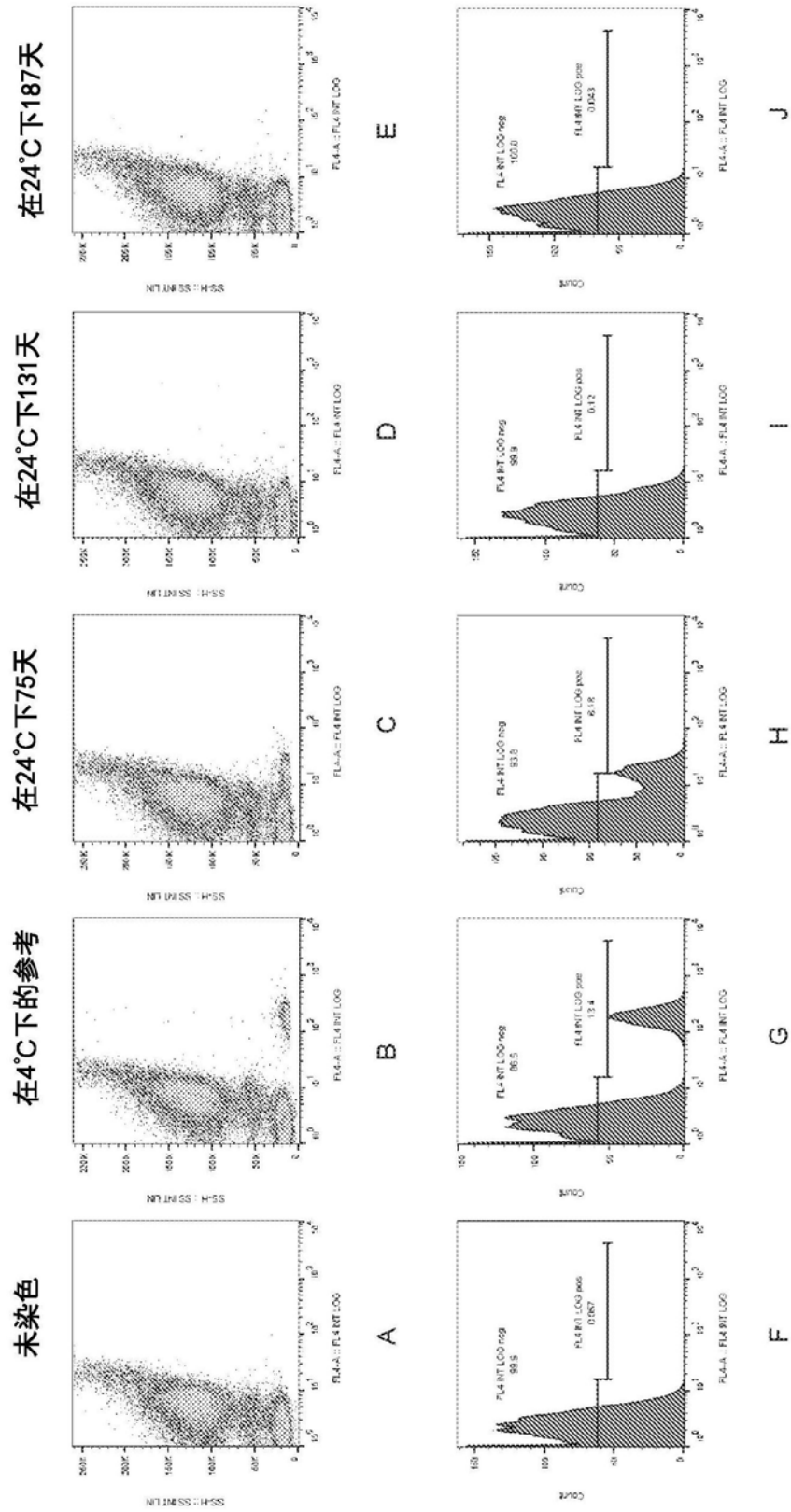


图1

在37°C下的稳定性取决于试剂浓度

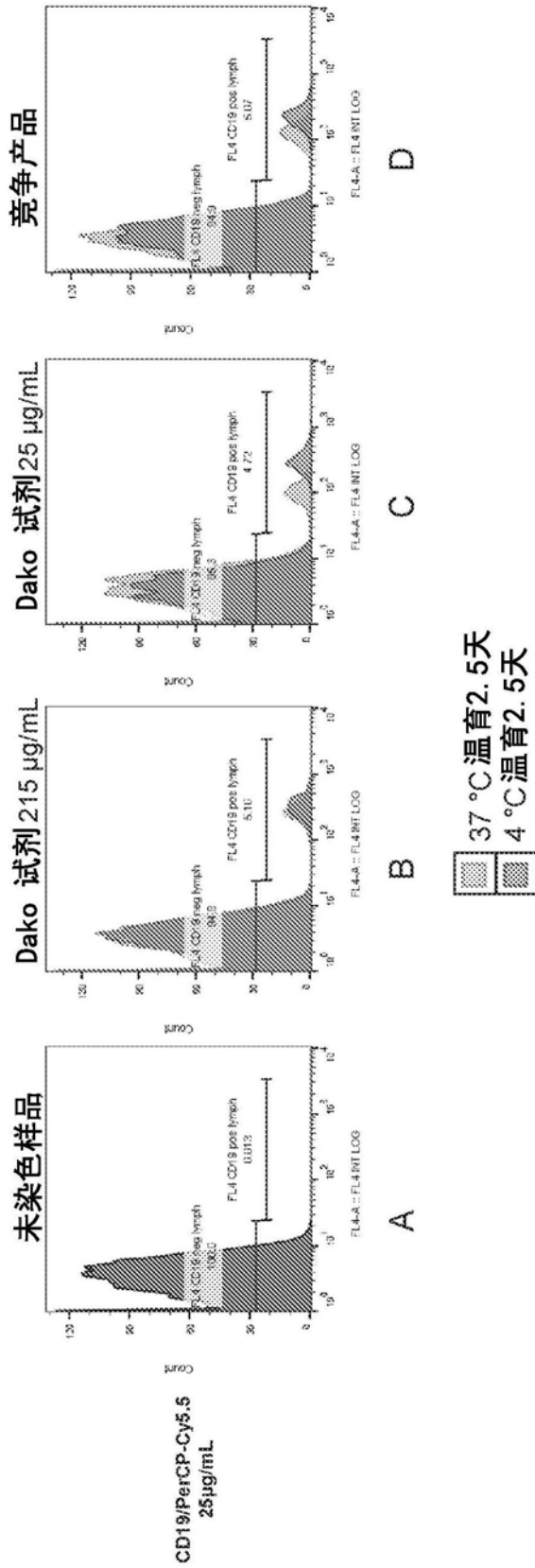


图2

游离PerCP 使PerCP-Cy5.5和PerCP缀合物两者稳定

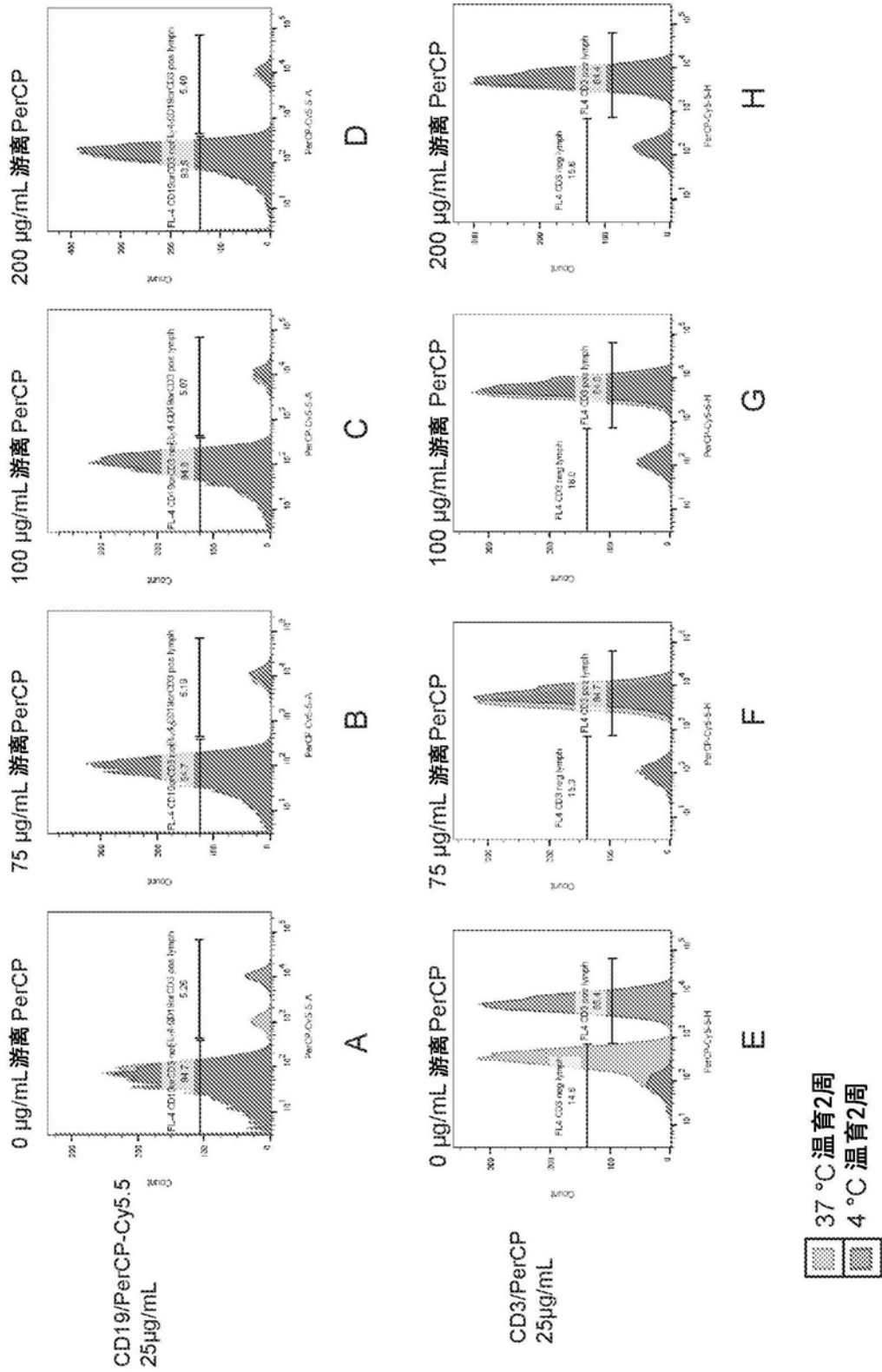


图3

CD19/PerCP-Cy5.5: 当添加游离PerCP时, 在37°C下5周之后的稳定性

-----50 µg/mL + 130 µg/mL PerCP-----

供体 1

供体 2

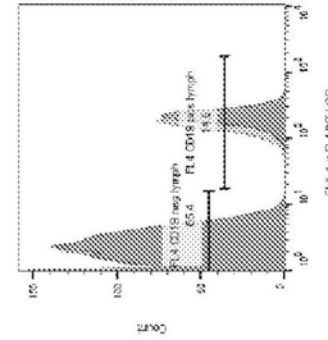
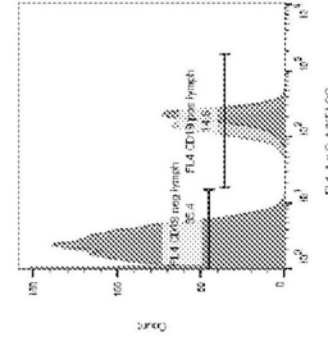
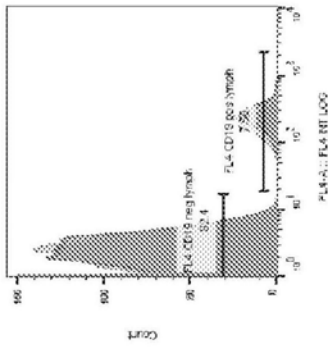
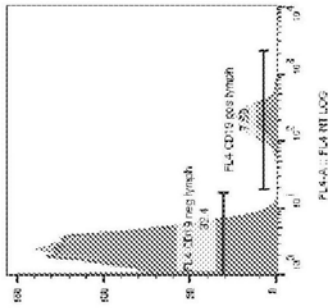
在37°C下的稳定性

在37°C下的稳定性

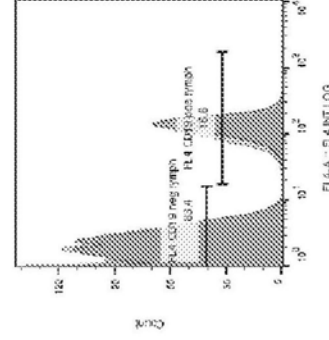
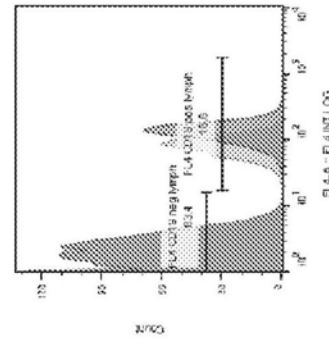
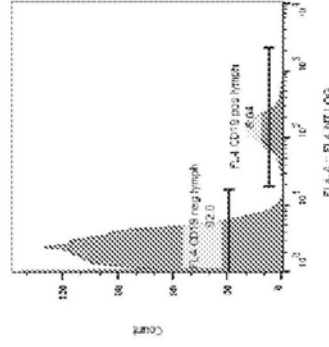
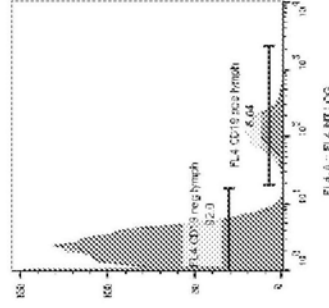
转运模拟

转运模拟

1:1



1:4



37°C 5周或转运

 4°C

图4

在细胞上测试新制剂中的CD34/PerCP-Cy5.5的稳定性

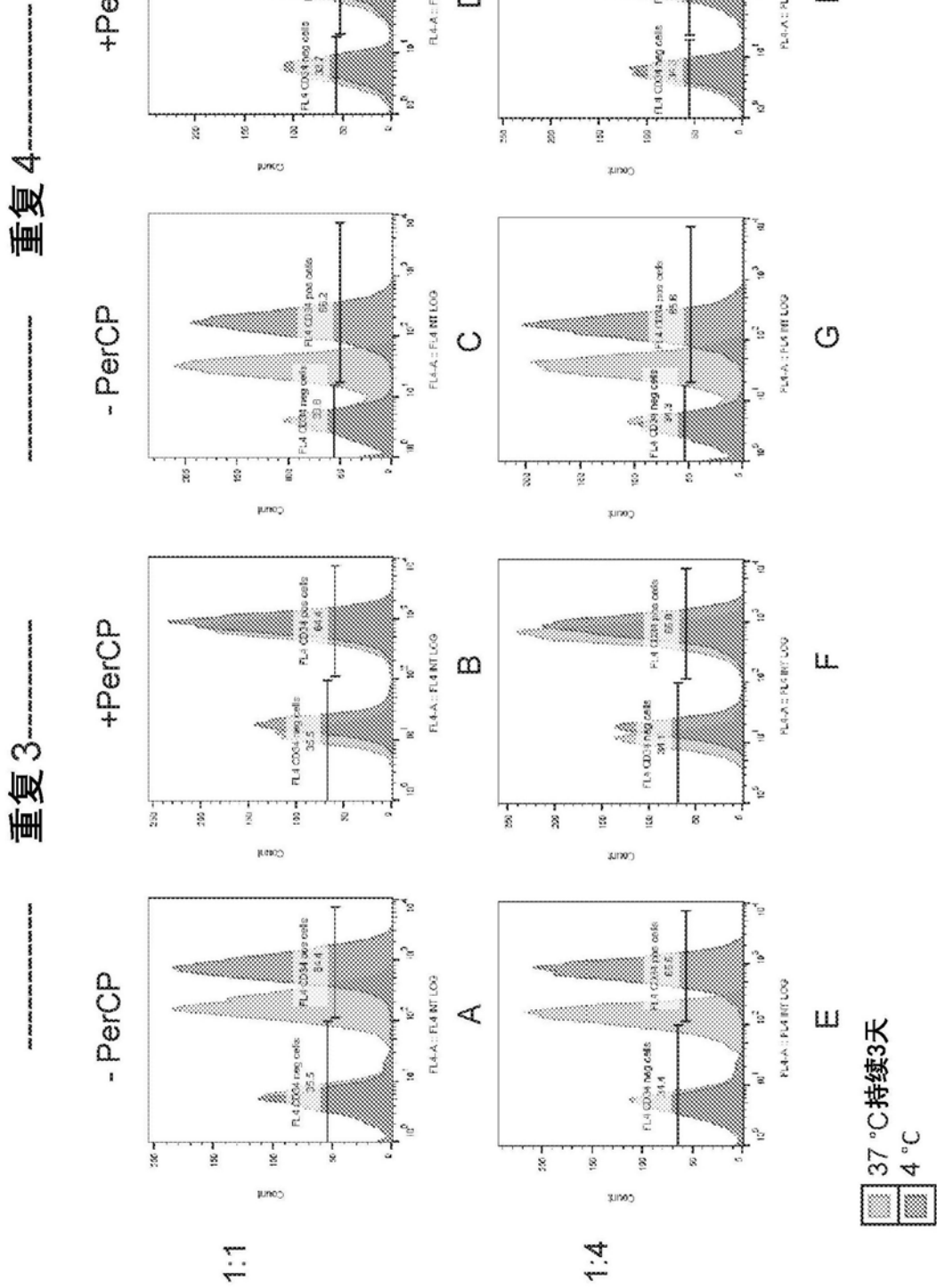


图6

在4名供体上测试新制剂中的MPO/PerCP-Cy5.5的稳定性

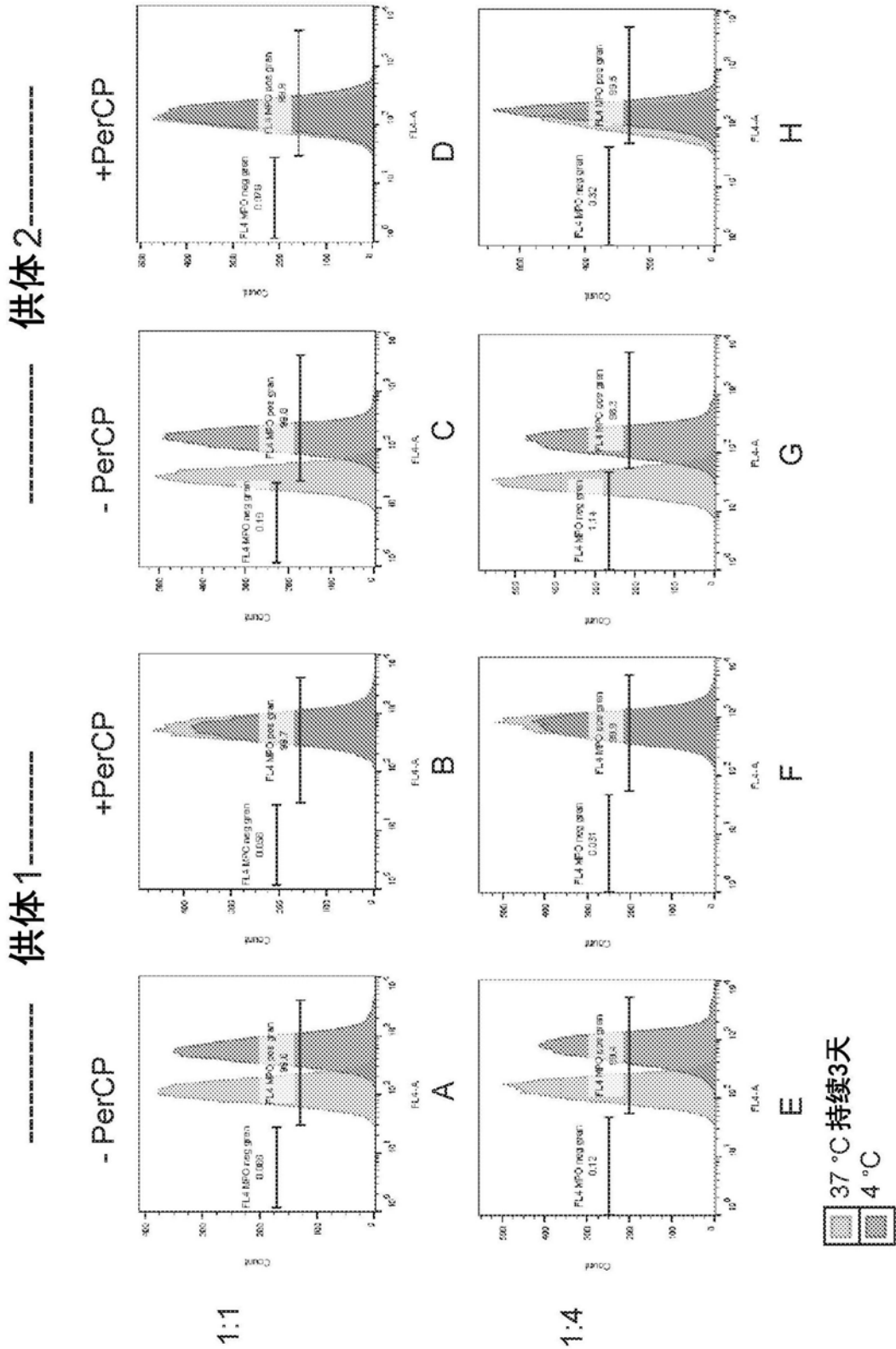


图7

在4名供体上测试新制剂中的MPO/PerCP-Cy5.5的稳定性

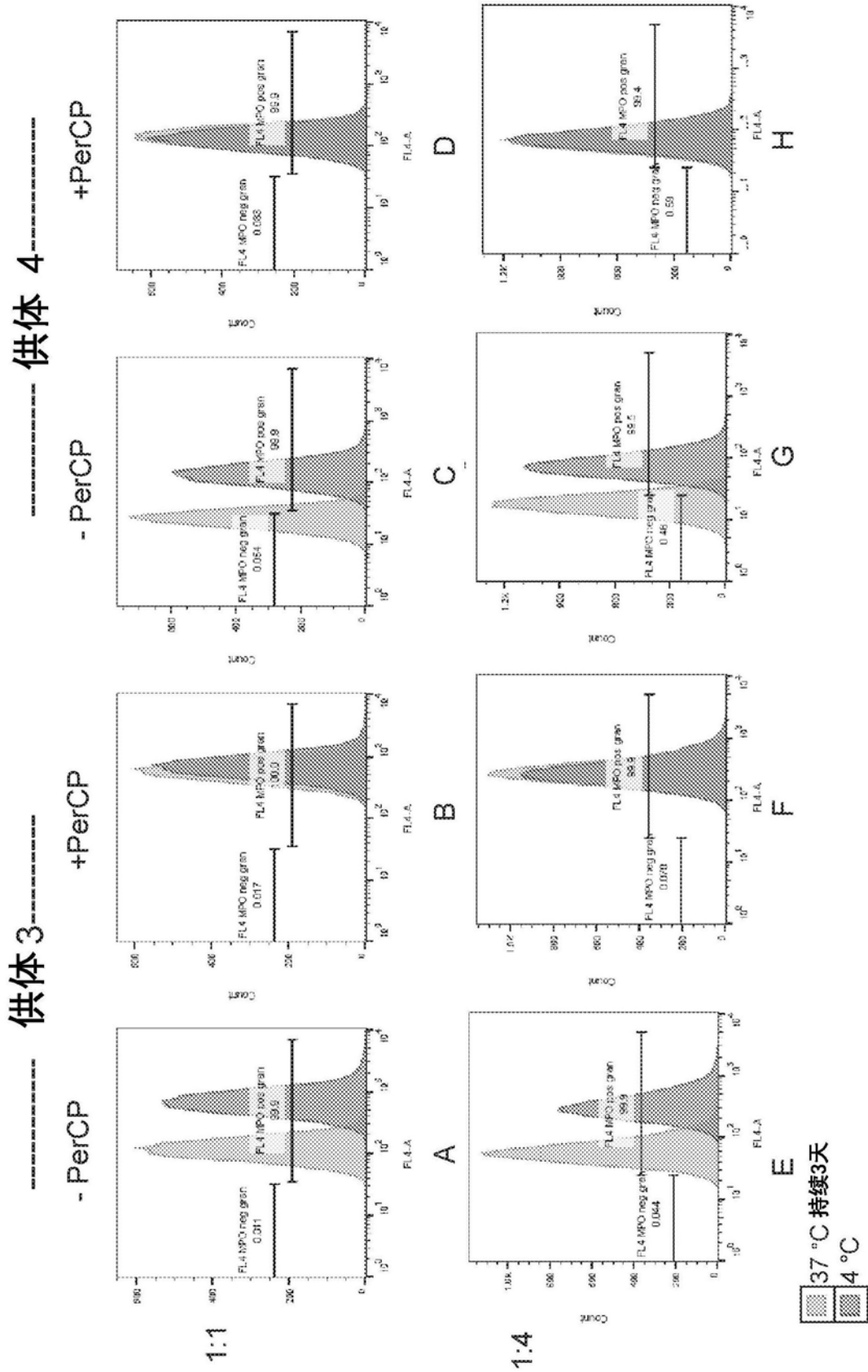


图8

与储存在4°C下的参考相比的在37°C下储存3天的多克隆F(ab')₂兔抗人λ轻链/PerCP-Cy5.5的稳定性测试。添加90 μg/mL游离PerCP的试剂比没有游离PerCP的试剂热稳定性更好。

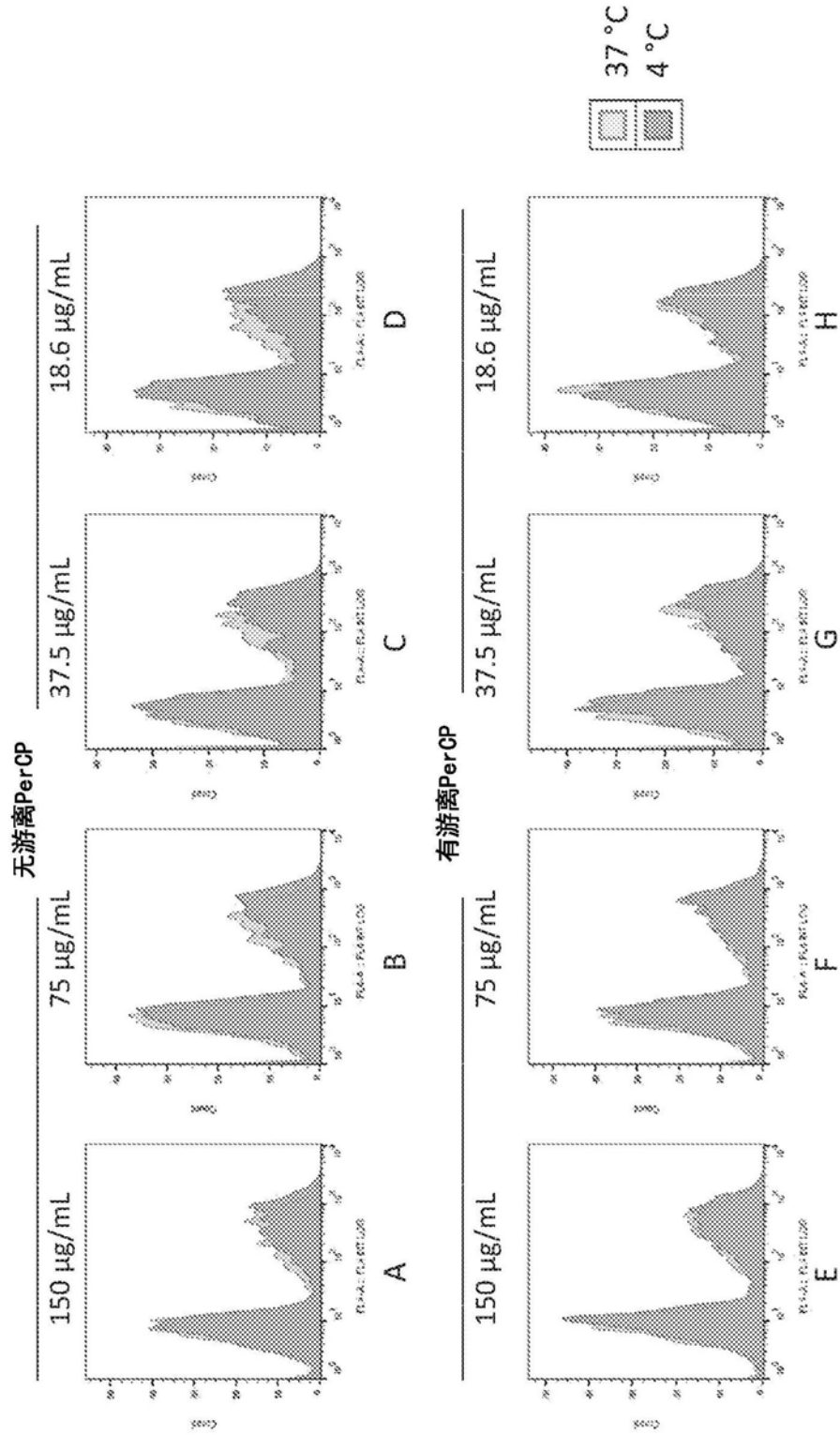


图9

与储存在4°C下的参考相比的在37°C下储存3天的小鼠单克隆抗体CD22/PerCP-Cy5.5的稳定性测试。
添加130 μg/mL游离PerCP的试剂比没有游离PerCP的试剂热稳定性更好。

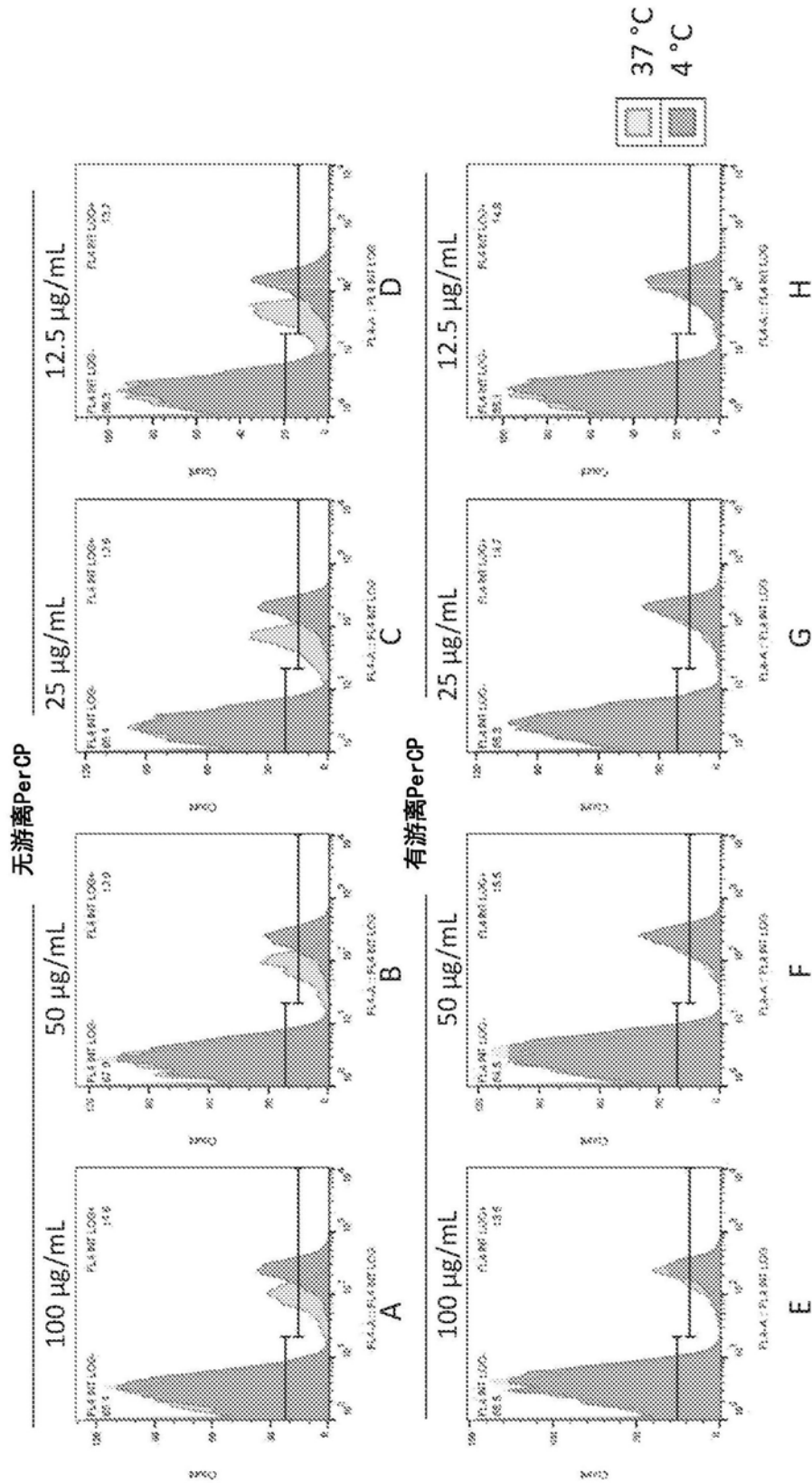


图10

与储存在4°C下的参考相比的在37°C下储存3天的小鼠单克隆抗人CD1a/PerCP-Cy5.5的稳定性测试。
添加130 µg/mL游离PerCP的试剂比没有游离PerCP的试剂热稳定性更好。

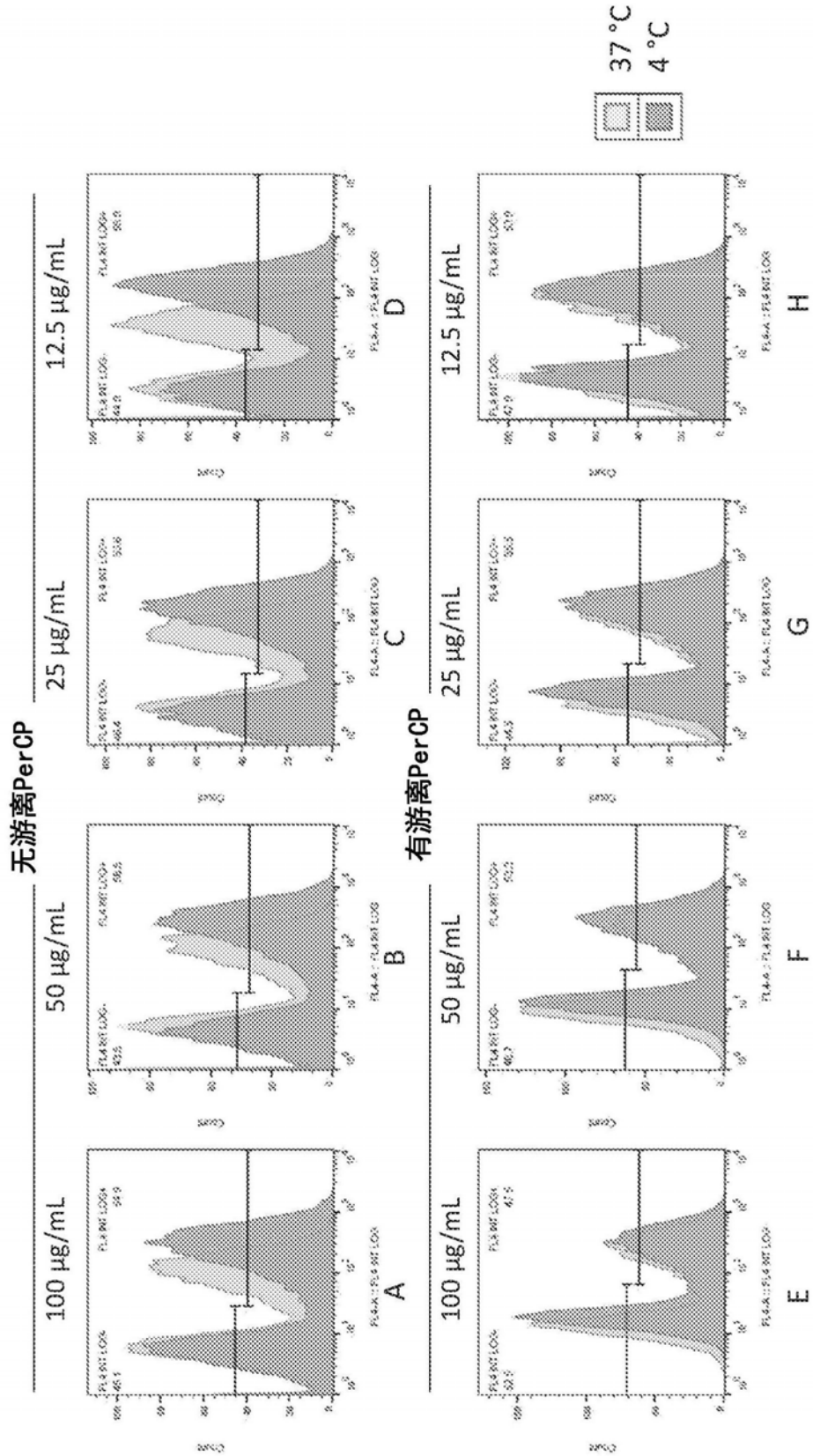


图11

与储存在4°C下的参考相比的在37°C下储存3天的小鼠单克隆抗人CD7/PerCP-Cy5.5的稳定性测试。
添加130 µg/mL游离PerCP的试剂比没有游离PerCP的试剂热稳定性更好。

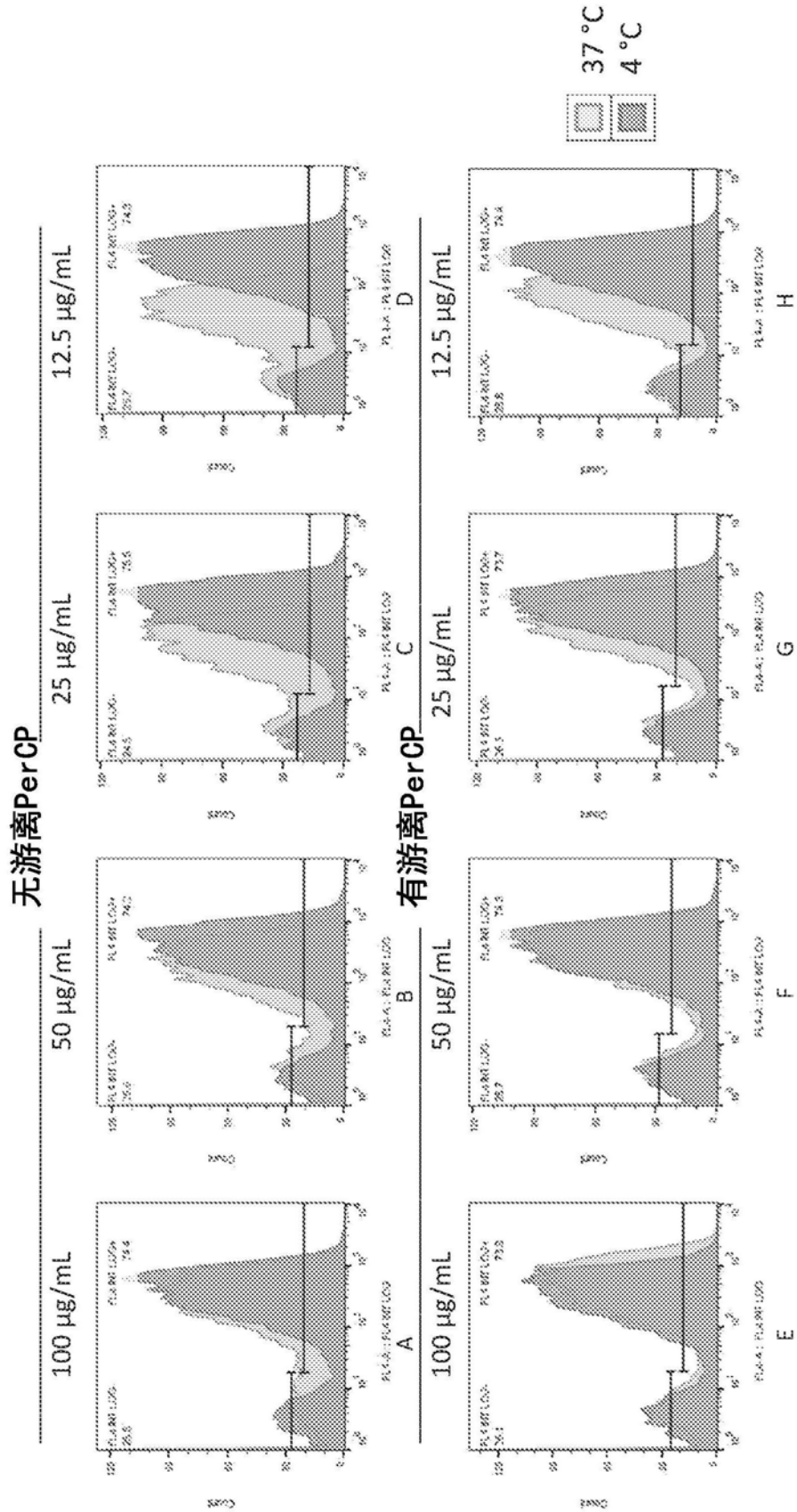


图12

专利名称(译)	用于含有PERCP的抗体制剂的稳定化的组合物		
公开(公告)号	CN110998323A	公开(公告)日	2020-04-10
申请号	CN201880054607.4	申请日	2018-08-24
[标]申请(专利权)人(译)	安捷伦科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	安捷伦科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安捷伦科技有限公司		
[标]发明人	AM詹森		
发明人	A·M·詹森 T·B·雅各布森 J·奎纳乌		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/536 G01N33/49 G01N15/14		
CPC分类号	G01N15/1459 G01N33/5306 G01N33/582 G01N2015/1006 G01N15/14 G01N33/533 G01N33/56966		
代理人(译)	罗天乐		
优先权	62/552557 2017-08-31 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本公开涉及可用于流式细胞术分析的制剂和方法。本发明的制剂和方法涉及使用PerCP来稳定在流式细胞术中使用的荧光染料，从而允许在升高的温度下和/或在长时段内使用和储存制剂。

如果不添加PerCP，CD19/PerCP-Cy5.5稳定性测试失败

