



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104718453 B

(45)授权公告日 2017.03.08

(21)申请号 201380051645.1

G01N 33/84(2006.01)

(22)申请日 2013.10.03

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104718453 A

WO 2009022001 A1,2009.02.19,
EP 0213093 A1,1987.03.04,
WO 9110911 A1,1991.07.25,
CN 101583872 A,2009.11.18,
CN 101097217 A,2008.01.02,
James S. Bourdage 等.An Affinity
Capture Elution (ACE) assay for detection
of anti-drug antibody to monoclonal
antibody therapeutics in the presence of
high levels of drug.《Journal of
Immunological Methods》.2007,第327卷10-17.
Aaron Patton 等.An acid dissociation
bridging ELISA for detection of
antibodies directed against therapeutic
proteins in the presence of antigen.
《Journal of Immunological Methods 》.2005,
第304卷189-195. (续)

(43)申请公布日 2015.06.17

(30)优先权数据
1251116-8 2012.10.03 SE
1350373-5 2013.03.25 SE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.04.01

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/SE2013/051161 2013.10.03

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/055025 EN 2014.04.10

(73)专利权人 GYROS专利公司
地址 瑞典乌普萨拉

(72)发明人 M·因加纳斯 P·莱赫托宁

审查员 周洋

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277
代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)

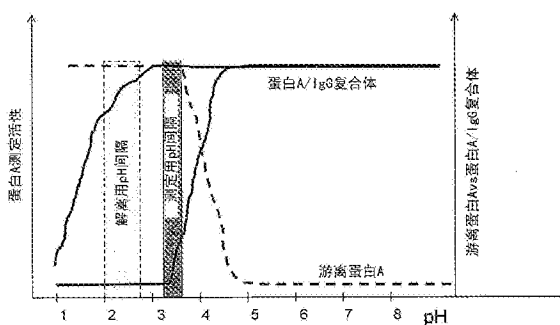
权利要求书1页 说明书13页 附图9页

(54)发明名称
酸性条件下分析物测定用方法和试剂盒

体的结合以定量测定所述样品中的分析物。

(57)摘要

公开了一种通过免疫测定来定量测定流体样品中分析物的方法,所述免疫测定包括将所述分析物与能够特异性结合所述分析物的配体结合,其中至少部分所述分析物作为分析物复合体存在。所述方法包括下述步骤:a)使所述样品处于第一酸性pH,从而至少实质上解离存在的任何分析物复合体并将实质上所有分析物以游离形式提供,b)将所述第一酸性pH升高至第二酸性pH,其中防止复合体的再形成,但其中允许分析物与所述配体的结合,和c)测定分析物与所述配



CN 104718453 B

[接上页]

(56)对比文件

Denise Sickert 等.Improvement of drug tolerance in immunogenicity testing by acid treatment on Biacore.《Journal of Immunological Methods》.2008,第334卷29-36.

Holly W. Smith 等.Detection of

antibodies against therapeutic proteins in the presence of residual therapeutic protein using a solid-phase extraction with acid dissociation (SPEAD) sample treatment prior to ELISA.《Regulatory Toxicology and Pharmacology》.2007,第49卷230-237.

1. 一种通过包括将分析物结合至能够特异性结合所述分析物的配体的免疫测定来定量测定流体样品中所述分析物的方法,其中至少部分所述分析物作为分析物复合体存在,和其中所述方法包括下述步骤:

a)使所述样品处于第一酸性pH,从而至少实质上解离存在的任何分析物复合体并将实质上所有分析物以游离形式提供,所述第一酸性pH在约1.5至约3.2的范围内,

b)将所述第一酸性pH升高至第二酸性pH,其中防止复合体的再形成,但其中允许分析物与所述配体的结合,所述第二酸性pH在约2.7至约4.5的范围内,和

c)测定分析物与所述配体的结合以定量测定所述样品中的所述分析物,其中所述分析物为蛋白A或其衍生物,和其中所述样品包含IgG。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述配体为抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中将所述配体固定化至固体支承体。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二酸性pH选自在约2.8至约4.5的范围内。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述第一酸性pH选自在约2.3至约2.5的范围内和/或所述第二酸性pH选自在约2.8至约3.2的范围内。

6. 根据权利要求4所述的方法,其中所述第二酸性pH选自在约3.0至约3.2的范围内。

7. 根据权利要求1所述的方法,其包括当测定所述分析物的浓度时使用响应相对于分析物浓度的标准曲线,其中所述标准曲线使用包含分析物和能够与所述分析物复合的至少一种物质的样品制备。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法在微流体系统中进行。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述微流体系统包含在可旋转盘中。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中流体输送通过离心力完成。

11. 一种试剂盒,其用于进行分析物的免疫测定,所述分析物至少部分以复合体形式存在于流体样品中,所述试剂盒包括:

检测剂,其能够结合至所述分析物,

第一酸性缓冲液,其具有在约1.5至约3.2范围内的pH,和

第二酸性缓冲液,其具有在约2.7至约4.5范围内的pH,

其中所述分析物为蛋白A。

12. 根据权利要求11所述的试剂盒,其中所述分析物能够结合至固定化于固相的配体,和其中所述试剂盒还包括针对所述分析物的捕获剂,其中所述捕获剂能够结合至所述固相。

13. 根据权利要求11或12所述的试剂盒,其中所述捕获剂是生物素化的,且所述配体为亲和素或链霉亲和素。

酸性条件下分析物测定用方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及流体样品中分析物总浓度的测定,其中分析物可至少部分为复合体形式,典型地作为免疫复合体。更具体地,本发明涉及其中预形成的分析物复合体在测定分析物之前解离的测定方法,以及用于进行该方法的试剂盒。

背景技术

[0002] 为了可靠地进行免疫测定,不受限制地接近于靶分子,或者说分析物上的所选表位,如由所选抗体限定的,是定量测定分析物所必需的。如果能够在生理条件下彼此相互作用的两种以上的不同蛋白质已形成复合体,则较低浓度的组分将取决于两种反应物的相互作用性质和浓度而部分地与配对物的复合形式出现。由于用于测定的某些表位可能被隐藏在复合体中,这可证明特别是对浓度较低的配对物的定量是不利的。

[0003] 某些类型的蛋白质可形成同-多聚体(homo-multimer),例如成原纤维的蛋白(fibrillating proteins),其中测定必需的关键表位不会完全易接近于蛋白聚集体。如果单体具有有限数目的表位,则这可能导致当多聚化倾向于发生时低估单体蛋白浓度(1)。

[0004] 为了保持稳态,可以预定比例在活性酶及其抑制剂之间形成蛋白复合体,使酶的精确定量复杂化。这可导致在免疫测定中难以接近某些表位,并因而免疫测定可产生不准确的浓度估计(2)。

[0005] 由于如心肌细胞(3)或肿瘤细胞(4)的细胞损伤造成的在较长一段时间内的细胞内蛋白间歇式释放可产生对细胞内蛋白的免疫应答。这些可在后期导致由靶分子和自身抗体组成的免疫复合体的形成。考虑到免疫系统的放大性质,可形成与靶蛋白相比相对浓度高得多的抗体,导致免疫复合体的形成,而使靶蛋白的精确定量复杂化。

[0006] 上述实例代表靶分析物的定量可产生与真实靶分析物值有显著偏差的状况,通常大大低估了真实的浓度。

[0007] 再者,在生物化学纯化过程中可发生类似的现象。近年来,全新种类的治疗,重组单克隆抗体,已引进用于治疗各种病况,例如炎症疾病、癌症和感染(5)。许多初始治疗性单克隆抗体通过采用亲和层析、离子交换层析和可能的凝胶过滤的连续纯化步骤从细胞培养物中纯化(6)。相当常见的亲和纯化步骤基于IgG与来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的蛋白A(proteinA)之间的相互作用。固定至适当树脂的蛋白A用作含单克隆抗体的细胞培养物的捕获剂。该步骤在富集期望分子方面非常有效,同时来自细胞培养物的污染物显著减少。

[0008] 不幸的是,在该过程中用于纯化的配体可从树脂中浸出(leach),并以成为纯化物质的杂质告终。浸出可由于所用解离条件而发生,例如配体通过来自细胞培养物的组分的蛋白质水解裂解,而且所用树脂的性质、固定化学和与亲和树脂制造相关的其它方面,以及反应物之间的生物特异性相互作用中涉及的力,都可能导致配体在某种程度上的浸出。无论涉及何种特定机理,配体可污染亲和树脂上的待纯化产物。依赖于杂质配体的特定的生物学性质,施用根据这些原理纯化的、可能含有具生物学活性杂质的治疗性蛋白质,可诱导

非期望的副作用,例如过敏性休克或补体激活,增加治疗的风险概况(risk-profile)。

[0009] 由葡萄球菌(staphylococci)产生的天然蛋白质A主要以两种不同的方式与免疫球蛋白相互反应:

[0010] • 典型相互作用,涉及人IgG的Fc部分(7)。

[0011] • 替代相互作用,涉及免疫球蛋白,不考虑免疫球蛋白类别(8),属于重

[0012] 链可变区的V_HIII(9)基因。

[0013] 天然蛋白A具有五个免疫球蛋白结合结构域(10),每个结构域可分别独立地与IgG部分Fc γ 和Fab相互作用。这产生IgG和蛋白A之间的多重相互作用的可能性,甚至以等摩尔比例形成沉淀(7)。然而,还可能在反应物所占比例非常不同的条件下,涉及多种复合体形成中潜在的相互作用,而形成异质性复合体。

[0014] 天然蛋白A已使用重组技术修饰(11)。一个实例是,当天然葡萄球菌蛋白A或该分子的重组形式,即多聚体形式的片段Z(11),或MabSelect SuRe™配体(GE Healthcare Life Sciences,Uppsala,Sweden),即为改进在重复的就地清洗(cleaning-in-place)步骤中的稳定性而对碱耐受性进行了修饰(12)(在层析介质MabSelect SuRe™中固定于琼脂糖上)的蛋白A衍生分子蛋白A,在纯化过程中用作配体。因此,在纯化步骤期间,一旦在连续的纯化过程中缓冲条件达到允许蛋白A与IgG之间的复合体形成的pH,天然蛋白A或其重组亲缘体(recombinant relatives)可分别从树脂中浸出并与洗脱的IgG形成复合体。在中性pH下对蛋白A相对于以ppm表达的IgG的量进行定量,这一尝试可能受到蛋白A上相关表位有限的可接近性的影响。这可能导致低估蛋白A的真实浓度。为了避免患者暴露于浸出的蛋白A的过高浓度下,这些水平应小于12-14ppm(13)。

[0015] 两种不同的原理已应用于破坏蛋白A-IgG复合体,以便使蛋白A可被接近而定量:

[0016] • 在辅助变性过程的化合物的存在下,存在于用于定量蛋白A的样品中的IgG组分的热变性(14)。蛋白A被认为抵抗来自此类处理的变性。一旦复合体中的IgG组分变性,该过程将释放蛋白A部分用于精确定量(15)。

[0017] • 样品的酸处理,以解离预形成的复合体并在酸性条件下进行免疫测定(16;WO 91/10911)。这里,用于免疫测定的免疫试剂必须耐受所选的酸性条件。一方面,最佳地,所选pH应定量解离蛋白A和IgG之间的复合体(即,从Fc和/或Fab区解离蛋白A),同时,另一方面,该测定仍是功能性的,已证实结合是难以满足的。

[0018] 在许多情况下,热变性并不可行。一个实例是当使用以GyroLab™系统(Gyros AB,Uppsala,Sweden)为代表型号的一种分析系统,其中测定在设置于可旋转的压缩盘(compact disk,CD)中的微流体结构中进行。首先,样品的热处理将必须在CD和仪器外进行,因为其中没有可用的加热机构。其次,可能在CD内部的热处理将破坏CD中包含的重要功能,还潜在地产生与基于微流体的测定原理不相容的蛋白聚集体。当加热在CD外进行时,可能的是,可能形成蛋白颗粒,伴随堵塞微结构的危险,除非采取适当的预防措施。

[0019] WO 2008/033073 A1公开了一种测定流体样品中分析物总浓度的方法,其中至少部分分析物作为与分析物-结合物质的复合体存在。该方法包括下列步骤:a)使样品处于可减少分析物与分析物-结合物质之间结合亲和力,足以实质上使任何分析物复合体解离,并将实质上所有的分析物以游离形式提供的条件,b)使样品处于恢复分析物与分析物-结合物质之间结合亲和力的条件,和c)在结合亲和力已恢复后即刻,并且在发生分析物的任何

实质上的再复合之前,测定样品中游离分析物的浓度。在一个实施方案中,该方法在使用无标记的检测,例如表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)等的流动系统中进行。

[0020] WO 2009/022001 A1公开了一种基于表面等离子体共振的方法用于检测针对治疗性药物的抗药物抗体(ADAs)。在待分析的患者样品中在药物存在下的药物干扰通过酸化样品(pH 2.5或3)来克服,然后在分析前中和样品。

[0021] 本发明的目的为提供用于定量样品中总分析物,包括复合形式的分析物的方法,该方法基于通过酸处理的复合体解离,且对于各种分析物和捕获剂,特别是抗体,通常是起作用的。

发明内容

[0022] 上述目的通过下述改进的方法来实现,所述方法中,不同的酸性pH一方面用于解离流体样品中预形成的复合体(如蛋白A-IgG复合体),另一方面进行免疫测定,也就是在该pH下很大程度上防止复合体再形成,且在该pH下甚至在大量配混组分的存在下捕获分子(典型地为抗体)也足够地有活性,从而对分析物产生剂量响应。

[0023] 在一个方面,本发明由此提供通过免疫测定来定量测定流体样品中的分析物的方法,所述免疫测定包括使分析物结合至能够特异性结合该分析物的配体,其中至少部分分析物作为分析物复合体存在,和其中所述方法包括下列步骤:

[0024] a)使所述样品处于第一酸性pH,从而至少实质上解离存在的任何分析物复合体并将实质上所有分析物以游离形式提供,

[0025] b)将第一酸性pH升高至第二酸性pH,其中(至少很大程度上)防止复合体的再形成,但其中允许分析物与配体的结合,和

[0026] c)测定分析物与配体的结合以定量测定样品中的分析物。

[0027] 本文使用的术语“分析物复合体”包括与特异性以及非特异性结合物质的复合体,而且还包括分析物的多聚体,例如二聚体或三聚体。

[0028] 配体可例如为抗体。本文使用的术语“抗体”将在广义上解释,是指免疫球蛋白,该免疫球蛋白可为天然或者部分或全部合成生产的,并且还包括活性片段,包括Fab抗原-结合片段、一价片段和二价片段。该术语还涵盖具有与免疫球蛋白结合结构域同源的结合结构域的任何蛋白质。此类蛋白质可衍生自天然来源,或者部分或全部合成生产。示例性抗体为免疫球蛋白同种型和Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dAb和Fd片段。

[0029] 典型地,该配体固定化至固体支承体。

[0030] 在一个实施方案中,分析物选自蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L或其衍生物(包括天然变体和重组生产的蛋白质或多肽),并且样品包含IgG。

[0031] 在另一实施方案中,第一酸性pH选自在约1.5至约3.2(特别是1.5至3.2)的范围内,第二酸性pH选自在约2.7至约4.5(特别是2.7至4.5)的范围内,更优选约2.8至约4.5(特别是2.8至4.5)。第二酸性pH可选自在例如约3.0至约4.5(特别是3.0至4.5)的范围内。

[0032] 在一个实施方案中,第一酸性pH选自在约2.3至约2.5(特别是2.3至2.5)的范围内,和/或第二酸性pH选自在约2.8至约3.2(特别是2.8至3.2)的范围内。可选地,第二酸性pH选自在约3.3至约3.5(特别是3.3至3.5)或约3.0至约3.2(特别是3.0至3.2)的范围内。

- [0033] 该方法可在微流体系统(microfluidic system)中方便地进行。
- [0034] 另一方面,本发明提供用于进行分析物免疫测定的试剂盒,所述分析物至少部分以复合体形式存在于流体样品中,所述试剂盒包括:
- [0035] -检测剂,其能够结合至分析物,
- [0036] -第一酸性缓冲液,其优选具有在约1.5至约3.2范围内的pH,和
- [0037] -第二酸性缓冲液,其具有高于第一酸性缓冲液的pH,优选在约2.7至约4.5范围内的pH。
- [0038] 在一个试剂盒实施方案中,分析物能够结合至固定化于固相的配体,且该试剂盒还包括针对分析物的捕获剂,其中所述捕获剂能够结合至固相。
- [0039] 优选地,捕获剂是生物素化的,且配体为亲和素(avidin)或链霉亲和素(streptavidin)。
- [0040] 其它优选的实施方案在从属权利要求中描述。
- [0041] 本发明更完整的理解,及其进一步的特征和优势,将通过参考下列详细说明和附图来获得。
- [0042] 为简单简洁起见,术语“MabSeIect SuRe™配体”将在下文中常称作“MabSeIect SuRe”。

附图说明

- [0043] 图1为用于进行本发明方法的实施方案的微结构的平面图。
- [0044] 图2为分别用于蛋白A/IgG复合体解离和释放的蛋白A的分析的pH间隔的图解。
- [0045] 图3为用于MabSeIect SuRe™配体在IgG以5mg/ml存在下自动化酸解离和分析的方法的图解。
- [0046] 图4为以叠加格式表示的测定下述标准曲线的剂量响应关系的图:(1)MabSeIect SuRe仅在缓冲液中;(2)MabseIect SuRe+5mg/ml的hIgG,在pH2.5和3.5下处理后;(3)(对照)MabSeIect SuRe+5mg/ml hIgG,在pH 2.5下解离并在pH 8.0下测定;和(4)(对照)MabSeIect SuRe,5mg/ml的hIgG,没有解离,在pH 7.4下测定。
- [0047] 图5为示出MabSeIect SuRe在5mg/ml的hIgG的存在下的标准曲线的图。
- [0048] 图6为示出MabSeIect SuRe在5mg/ml的hIgG的存在下的标准曲线的图。
- [0049] 图7为示出天然蛋白A在5mg/ml的多克隆人IgG的存在下的标准曲线的图(复合体解离的pH为2.3,分析的pH为3.3)。
- [0050] 图8为示出两种不同分子形式的蛋白A[天然(1)和MabSeIect SuRe(2)]在5mg/ml浓度的多克隆人IgG(Octagam™)存在下的叠加标准曲线的图。
- [0051] 图9为示出MabSeIect SuRe在不同浓度Humira™(治疗性单克隆抗体)的存在下的叠加格式标准曲线的图。(1)为MabSeIect SuRe仅在缓冲液中;(2)为MabSeIect SuRe在10mg每ml的Humira™中;(3)为MabSeIect SuRe在5mg每ml的Humira™中;和(4)为MabSeIect SuRe在2mg每ml的Humira™中。
- [0052] 图10为示出(1)仅在缓冲液中;(2)在5mg每ml的Herceptin™(治疗性单克隆抗体)的存在下;(3)在5mg每ml的Humira™的存在下的残余MabSeIect SuRe的叠加格式标准曲线的图。

[0053] 图11为示出MabSeIect SuRe在5mg/ml的Humira™的存在下的标准曲线的图。

具体实施方式

[0054] 如上所述,本发明基于为解离样品中预形成的复合体和进行免疫测定而采用不同的酸性pH的原理,且更具体地是通过:首先为了有效的复合体解离而使用相对低的pH,并随后在酸性的较高pH下进行测定,在该pH下很大程度上防止复合体的恢复,同时捕获剂(典型地为抗体)对于待定量分析物的有效捕获足够地有活性。

[0055] 所述方法可用多种多样的测定系统和测定格式(assay formats)进行。

[0056] 优选地,一种包括了含有固定化的分析物特异性的配体的固体支承体表面的异相测定系统用来测量分析物浓度;该测量通过直接地或间接地检测分析物(直接测定,包括夹心测定;或置换测定)或分析物的可检测类似物(竞争测定)在固体支承体表面的结合量来进行。固体支承体表面可具有多种形状,如同其本身在本领域中已知的一样,并可例如为填充床(packed bed)中的颗粒,典型地设置在微流体槽或腔中;或可为例如微孔或流动室或槽等的杯(cuvette)或孔的表面区域。

[0057] 虽然本发明的方法通常可应用于多种多样的分析物和分析物复合体,在下文中将主要就液体样品中在IgG的存在下对蛋白A和蛋白A衍生物的定量,以及就在微流体系统(特别是上述GyroLab™平台)中进行测定来进行描述。

[0058] 可预期通过本发明的方法测定的至少部分以复合体的形式存在时的其它分析物的实例包括:

[0059] -肌钙蛋白(Troponin)I,其在肌钙蛋白I分析中从IgG自身抗体中解离。

[0060] -筛查癌症时的抗体检测中针对癌抗原的自身抗体解离。

[0061] -当测定淀粉样蛋白β时淀粉样蛋白β的均聚物(聚集体和原纤维(fibrils))的解离。

[0062] -在通过免疫化学法测定酶中酶/酶抑制剂的解离,例如金属蛋白酶/TIMP抑制的解离。

[0063] 如背景技术部分所提及的,曾提议使用选择的酸性pH用于复合体解离并在同一pH下进行免疫测定。根据本发明人的经验,至少以在目前测定中使用的可用的免疫试剂,将单个选定的pH用于解离和定量难以完全消除预形成的蛋白A-IgG复合体的无效解离引起的定量影响。

[0064] 然而,还注意到,在某些情况下,选择的免疫测定用pH对于防止复合体形成是有效的,例如当IgG和蛋白A溶液在混合前被酸化时,该情况当然与真实分析情况相差甚远。然而,该观察符合在一方面处于解离预形成的复合体所需的条件,另一方面处于防止复合体再形成所需的条件下,展现出“滞后效应”的基本生物化学原理(17)。因此,与防止新复合体形成相比,需要更多的能量来解离预形成的复合体。

[0065] 本发明基于将上述观察转为实践,即,在第一低pH下定量解离复合体,并在第二酸性的较高pH下进行测定,这是很吸引人的,所述第二较高酸性pH与所用抗体的功能性质相符,但选择其以便防止复合体的再形成(至少防止至很大程度上(substantial degree))。应强调的是,对于大多数抗体,在温和酸性pH如3.5下进行免疫测定仍非常需要。本发明利用见于展示出天然亲和性的分子之间相互作用的滞后效应,和使用免疫测定对至少一种配

对物进行定量。

[0066] 现将利用GyroLab™免疫测定平台(Gyros AB,Uppsala,Sweden)的背景下描述本发明的方法。该GyroLab™系统或工作站(workstation)使用具有多种微流体结构的压缩盘(CD)。对于这种微流体分析技术更详细的信息,可参见例如WO 99/058245、WO 02/074438A2、WO 02/075312A1、WO 03/018198A1、WO 2004/083108A1和WO 2004/083109A1(相关公开内容引入于此以作参考)。

[0067] 图1说明GyroLab™CD的一种微结构,CDMX1,其包含两个液体入口(1)、两个体积限定单元(2)、溢流槽(overflow channel)(3)、混合室(4)、强制指状阀(enforced finger valve)(5),和捕获柱(capture column)(6),在捕获柱中发生反应并且捕获柱包含偶联有配体的珠,这里配体典型地为要与生物素化的捕获抗体偶联的链霉亲和素(链霉亲和素-生物素相互作用在本发明方法中使用的酸性pH下是稳定的)。疏水屏障(hydrophobic barrier)(未示出)将混合室(4)与捕获柱(6)分隔。用于进行免疫测定的试剂和缓冲液导入左侧入口(1),用于样品预处理的样品和试剂导入右侧入口(1)。混合室(4)位于捕获柱(6)的上游,即CD的旋转将使液体从混合室(4)流向捕获柱(6)。

[0068] 旨在用于预处理样品的等份样品和缓冲液可以顺序地按份加入混合室(4),在CD内体积限定后的一份典型地为200nL。大体上,可添加可与微流体原理相容的任何类型的液体。通过首先导入样品,样品随后与具有适当缓冲容量的所选酸缓冲液混合,从而彻底改变混合物的pH,使蛋白A和IgG的预形成的复合体有效解离。在下一步骤中,添加另一缓冲液,旨在以向中性pH的方向升高pH,但仅升至完全防止复合体再形成的pH,该pH可由免疫测定耐受。典型地,旨在有效解离的缓冲液将产生1.5至3.2的终pH,而意欲制备分析用样品的缓冲液将产生2.7至4.5的终pH,更具体为2.8至4.5,如3.0-4.5,依赖于反应物的性质、反应物的浓度和用于测定的试剂对酸性pH的耐受性。这些原理图示于图2中,图2示出用于蛋白A/IgG复合体解离和在防止蛋白A-IgG复合体再缔合的温和酸性pH下蛋白A分析释放出的蛋白A的示例性pH间隔。

[0069] 酸缓冲液添加的解离效果通常非常迅速。在蛋白A-IgG系统中,似乎解离在产生终pH为2.5的1-5min后是定量的。下一步骤将样品pH调整至测定用的运行条件也是非常迅速的。

[0070] 分析步骤通过增加CD的旋转速度来起始,以克服从捕获柱(6)分隔混合室(4)的疏水屏障的阻力(图1)。捕获柱由适当的捕获抗体功能化,捕获柱可能必须用与样品相同的缓冲组合物预洗涤以防止蛋白A-IgG复合体的任何瞬时再形成。一旦样品通过捕获柱处理,其可能必须在与样品相同的pH下用酸缓冲液洗涤2-4次,以防止现在捕获于柱上的蛋白A与存在于处理过程中使用的微流体通道中的任何残余IgG之间的蛋白A-IgG复合体的再形成。最终,在添加检测剂之前,捕获柱的pH升高至中性,以促进夹心式免疫测定的形成。该过程以检测前必需的柱洗涤来结束。

[0071] 实验部分

[0072] 材料与试剂制备

[0073] 捕获抗体

[0074] 多克隆鸡抗蛋白A抗体购自Cygnus Technologies, Southport, NC, U.S.A. (www.cygnustechnologies.com)。使用EZ-Link Sulpho NHS-LC-Biotin(21338, Thermo

Scientific, Rockford, IL, USA-www.piercenet.com)根据制造商的说明用生物素标记等份的抗体。使用Rexxip™ ADA缓冲液(Gyros AB, Uppsala, Sweden)。

[0075] 针对蛋白A的生物素化的小鼠单克隆抗体购自Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A. (cta no B3150; www.sigmaaldrich.com)。

[0076] 提供专有的针对蛋白A且设计为维持低pH条件的多克隆抗体。使用EZ-Link Sulpho NHS-LC-Biotin(21338, Thermo Scientific)用生物素标记等份的抗体。

[0077] 检测抗体

[0078] 对在上述标题“捕获抗体”下描述的等份的来自Cygnus Technologies的抗蛋白A抗体和专有的抗蛋白A抗体用荧光团分别使用Alexa Fluor™ 647(A20186, Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.)根据制造商的说明进行标记。使用Rexxip™ ADA缓冲液(Gyros AB, Uppsala, Sweden)。

[0079] IgG

[0080] 用于静脉内给药的多克隆人IgG(hIgG), Octagam™(Octapharma AB, Stockholm Sweden), 50mg/ml, 按处方购自药房。该制品通过醇分级来纯化且从未与蛋白A或蛋白A的任何衍生物接触。

[0081] Humira™(治疗性抗体, 由Abbott Laboratories销售, Abbott Park, Illinois, USA)按处方购自药房。

[0082] Herceptin™(治疗性抗体, 由F. Hoffmann-La Roche Ltd销售, Basel, Switzerland)按处方购自药房。

[0083] 缓冲液

[0084] 缓冲液由固体化学品在适当的缓冲容量和pH下制备。

[0085] 蛋白A

[0086] 蛋白A(天然, 17-0872-05)及其衍生物(MabSelect SuRe™配体, 28-4018-60)购自GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden(www.gelifesciences.com)。

[0087] CD

[0088] CDMX1(P0020026), 也称为“GyroLab ADA CD”, 来自Gyros AB, Uppsala, Sweden (www.gyros.com)。柱状填充物为(15µm)链霉亲和素衍生的Dynospheres™(Invitrogen Dynal A.S., Oslo, Norway)。

[0089] 样品制备

[0090] 标准曲线通过蛋白A在PBS中的5mg/ml多克隆IgG(pH7.4)中稀释, 使蛋白A和IgG之间形成复合体来制备。

[0091] 质量控制(QC)样品是在5mg/ml的多克隆或单克隆IgG的存在下, 以已知浓度的蛋白A制备成的不同的稀释液。

[0092] GyroLab™法

[0093] 在分析之前用于样品的自动酸解离的方法开发于CDMX1中。该用于在5mg/ml的IgG存在下自动酸解离和分析MabSelect SuRe™配体的方法示于图3中, 其中两栏表示分析之前在捕获柱上和样品中的处理。W=柱洗涤, C=捕获剂, S=样品, 1=酸解离1, 2=酸解离2, SA=样品施加在捕获柱上, 和D=检测剂。箭头表示不同的处理步骤如何互连。

[0094] 实验实质上如图3中概述的进行, 但使用三种不同的对蛋白A的捕获抗体, 也就是,

分别为商购鸡多克隆抗体,商购小鼠单克隆抗体,和专有的多克隆抗体,样品中浓度变化的IgG和蛋白A或蛋白A衍生物(MabSeIect SuRe),以及变化的捕获柱的洗涤处理。结果示于下文。

[0095] 实验

[0096] 如下文将要描述的,实验如上文概述的使用CDMX1进行,阐明使用不同pH的原理,一方面解离样品中预形成的蛋白A-IgG复合体,另一方面下述pH下进行免疫测定,在该pH下很大程度上防止复合体再形成,且在该pH下捕获抗体足够有活性,在5mg/ml的IgG的存在下产生对MabSeIect SuRe™配体的剂量响应。

[0097] 所得数据表明蛋白A衍生物MabSeIect SuRe可在亚ppm(sub-ppm)水平下在5mg/ml的IgG浓度下测定。因此,用于MabSeIect SuRe的测定从约1ng/ml向上跨至产生约0.2ppm(w/w)的灵敏度。

[0098] 现将描述使用上述三种不同捕获抗体的实验。

[0099] 鸡多克隆抗蛋白A抗体作为捕获和检测抗体(pH2.5下解离和pH3.5下捕获)

[0100] MabSeIect SuRe

[0101] 早期有迹象显示,由庞大的过量IgG的存在造成的某些微小残余影响与MabSeIect SuRe™配体相比稍微影响回收结果。这见于图4中比较曲线1和2。图4阐明测定如方法部分所述的仅含MabSeIect SuRe™配体(1)、和pH2.5和3.5下处理后的MabseIect SuRe+5mg/ml的hIgG(2)的标准曲线的剂量响应关系。作为对照,含5mg/ml hIgG的MabSeIect SuRe的标准曲线在pH2.5下进行解离,但测定在pH8.0下中和后进行(3),最后,MabSeIect SuRe在5mg/ml的hIgG下的标准曲线(剂量响应曲线)不进行解离并在pH7.4下运行测定(4)。

[0102] 发现,上述指出的问题能够潜在地通过将IgG并入MabSeIect SuRe标准品中来解决。当尝试了该方法时,对于大部分试验的MabSeIect SuRe/IgG比例,偏离的回收数据恢复至预期水平,如以下图5和表1所示。

[0103] 图5示出在5mg/ml的hIgG的存在下MabSeIect SuRe的标准曲线。捕获柱在捕获步骤之前使用甘氨酸-柠檬酸盐缓冲液(pH3.5)洗涤,并在分析过程结束之前在使用PBS中和柱之前进一步洗涤两次。

[0104] 表1示出当使用图5中的标准曲线时QC样品的平均偏差(average bias)。

[0105] 表1

[0106]

QC样品	n	IgG含量(mg/ml)	MabSeIect SuRe(ng/ml)	平均偏差(%)
QC1	3	5	1	34.1
QC2	3	5	2.5	0.3
QC3	3	5	5	-4.1
QC4	3	5	10	-0.8

[0107] 在进一步稍微修正方法后,避免捕获柱在捕获步骤之前单独酸化,并在捕获后前2次洗涤中使用中性pH,稍微改进了平均偏差,如以下图6和表2所示。

[0108] 图6示出MabSeIect SuRe在5mg/ml的hIgG的存在下的剂量响应曲线。捕获柱在整个过程中保留在PBS(pH7.4)中。

[0109] 表2示出当使用图6中的标准曲线时QC样品的平均偏差。

[0110] 表2

[0111]

QC样品	n	IgG含量(mg/ml)	MabSeIect SuRe(ng/ml)	平均偏差(%)
QC1	3	5	1	18.5
QC2	3	5	2.5	0.4
QC3	3	5	5	-6.7
QC4	3	5	10	-8.5

[0112] 小鼠单克隆抗蛋白A抗体作为捕获抗体和鸡多克隆抗蛋白A抗体作为检测抗体(pH2.3下解离和pH3.3下捕获)

[0113] 天然蛋白A

[0114] 使用与上述相同的原理步骤分析天然蛋白A的可能性也被提升。在该情况下,包含天然蛋白A的标准曲线在30-0.12ng/ml的范围内在5mg/ml的多克隆人IgG的存在下制备。解离步骤在pH2.3下进行,分析步骤在pH3.3下进行。在所有其它方面,遵循与分析MabSeIect SuRe配体相同的原理。来自本实验的数据示于下图7和表3。

[0115] 图7示出天然蛋白A在5mg/ml的多克隆人IgG的存在下的剂量响应曲线。所选的用于蛋白A-IgG复合体解离的pH为2.3,所选的用于分析的pH为3.3。

[0116] 表3示出测定中采用pH2.3下的解离和pH3.3下的分析在5mg/ml的多克隆人IgG的存在下包含不同浓度的天然蛋白A的QC样品的分析。可以看出,从蛋白A浓度超过2.5ng/ml起,偏差在±20%内蛋白A。

[0117] 表3

[0118]

QC样品	n	IgG含量(mg/ml)	蛋白A(ng/ml)	平均偏差(%)
QC1	3	5	1	-70.9
QC2	3	5	2.5	11.2
QC3	3	5	5	8.1
QC4	3	5	10	-11.2

[0119] 专有的多克隆抗蛋白A抗体作为捕获抗体和检测抗体(pH2.5下解离和pH2.8下捕获)

[0120] MabSeIect SuRe

[0121] 实质上对应于上述那些的实验在CDMX1中进行,使用专有的捕获多克隆抗体代替商购的鸡多克隆抗体,按照如图3所示的步骤,即在pH2.5和pH2.8下处理等。

[0122] 图8示出(1)蛋白A和(2)MabSeIect SuRe在5mg/ml浓度的人多克隆IgG(Octagam™)存在下的标准曲线的叠加图。

[0123] 图9示出(1)MabSeIect SuRe仅在缓冲液中;(2)MabSeIect SuRe在10mg/ml的Humira™(治疗性单克隆抗体)中;(3)MabSeIect SuRe在5mg/ml的Humira™中;和(4)MabSeIect SuRe在2mg/ml的Humira™中的标准曲线的叠加图。

[0124] 使用图9中的标准曲线,为得到MabSeIect SuRe在CDMX1中的浓度,对在不同浓度Humira™中制备的包含不同浓度MabSeIect SuRe的QC样品进行分析。测定了与期望浓度相关的平均偏差。结果示于下表4。

[0125] 表4

<i>Humira™</i>						
	MabSelect SuRe ($\mu\text{g/L}$)	IgG 含量 (g/L)	n	MabSelect SuRe 测量 浓 度 ($\mu\text{g/L}$)	浓度 CV (%)	平均偏差 (%)
QC1	2	0	2	2.1	4.1	5.9
		2	2	1.7	17.0	-12.8
		5	2	2.1	7.8	3.9
		10	2	2.3	3.9	15.3
QC2	5	0	2	4.4	3.4	-11.9
		2	2	4.3	3.2	-13.8
		5	2	5.2	5.6	4.2
		10	2	5.9	9.7	18.1
QC3	10	0	2	8.9	1.9	-10.9
		2	2	9.2	0.1	-8.3
		5	2	8.9	4.5	-10.5
		10	2	9.6	6.8	-4.2
QC4	20	0	2	17.7	9.7	-11.7
		2	2	15.3	9.3	-23.4
		5	2	16.8	8.5	-16.0
		10	2	19.7	2.1	-1.3

[0127] CV=差异系数(coefficient of variation)

[0128] 图10示出(1)仅在缓冲液中;(2)在5mg/ml的Herceptin™的存在下;(3)在5mg/ml的Humira™的存在下的残余MabSelect SuRe的标准曲线的叠加图。

[0129] 使用图10中的标准曲线,定量包含5mg/ml的重组抗体(分别为Herceptin™和Humira™)的样品中残余MabSelect SuRe。结果示于下表5。

[0130] 表5

[0131]

	n	IgG 含量 (g/L)	缓冲液中		Herceptin™中		Humira™中	
			测量浓度 MabSelect SuRe (μg/L)	浓度 CV (%)	MabSelect SuRe 测量 浓度(μg/L)	浓度 CV (%)	测量浓度 MabSelect SuRe (μg/L)	浓度 CV (%)
样品 A	2	5	2.0	2.5	1.3	25.8	2.2	2.2
样品 B	2	5	4.4	11.0	3.4	5.7	4.6	8.5
样品 C	2	5	6.5	1.2	4.7	1.8	5.3	0.3

[0132] 样品中未知浓度MabSeIect SuRe的测定

[0133] 提供受到残余MabSeIect SuRe污染的包含IgG(Humira™)的样品。首先将样品通过将其稀释至5g/L的浓度来标准化。然后使用上文概述的涉及pH 2.5下酸解离和pH 2.8下捕获的步骤来分析样品的蛋白A。剂量响应相对于MabSeIect SuRe浓度的标准曲线如图11所示制备。接着使用标准曲线测定并通过补偿稀释因子来计算原始样品中残余MabSeIect SuRe的浓度。报告重复测定的精度(CV%)。结果示于下表6。

[0134] 表6

	n	IgG 含量 (g/L)	稀释至 IgG 浓 度 (g/L)	对稀释进行补偿后 的 MabSelect SuRe 测量浓度(μg/L)	浓度 CV (%)
样品 A	2	10	5	4.6	16.6
样品 B	2	10	5	17.8	0.4
样品 C	2	10	5	49.9	3.6
样品 D	2	20	5	4.6	17.8
样品 E	2	20	5	16.5	8.3
样品 F	2	20	5	55.6	5.7
样品 G	2	40	5	3.8	27.5
样品 H	2	40	5	18.5	10.2
样品 I	2	40	5	45.6	9.7

[0135] 结论

[0136] 如上所述,可在大浓度IgG的存在下将MabSeIect SuRe™配体,即来自免疫球蛋白的亲的和层析的潜在浸出物精确定量的完全自动的微流体步骤已成功实施。

[0137] 进一步阐明了该步骤可在包含微流体结构的CD中进行,各自具有在捕获柱上游的混合室,其中样品用不同缓冲液在不同pH下的预处理可以标准化方式进行。

[0138] 该步骤,取决于特定的设置,耗时平均约1小时。

[0139] 在5mg/ml的IgG(w/w)的存在下,可被检测的MabSeIect SuRe™配体的相对浓度在0.2-0.5ppm的范围内,是远低于杂质的调节可接受水平(13)的相对浓度。

- [0141] 主要的解离和分析步骤还与在5mg/ml的多克隆人IgG中的天然蛋白A相容。
- [0142] 试剂盒组成-用于残余蛋白A的测定
- [0143] 用于在IgG的存在下进行残余蛋白A(或MabSeIect SuRe)的分析的示例性试剂盒包括下列试剂A至I。提供试剂A、B和C作为原液(stock solutions),意欲分别用稀释试剂G、H和I稀释。整个试剂盒由9种不同类型的液体组成,足以应对5个GyroIab™ADA CDs(Gyros AB),产生240个数据点(48个/CD)。
- [0144] 试剂A:捕获剂,生物素化的抗蛋白A抗体,625μg/ml。
- [0145] 试剂B:检测剂,荧光团标记的抗蛋白A抗体,200nM。
- [0146] 试剂C:天然蛋白A,1000μg/L。
- [0147] 试剂D:酸解离缓冲液1,0.25M甘氨酸-HCl,pH 2.5。
- [0148] 试剂E:酸解离缓冲液2,0.1M柠檬酸盐缓冲液,pH 3.4。
- [0149] 试剂F:酸性洗涤缓冲液,一份试剂D混有一份试剂E。
- [0150] 试剂G(2小瓶):中性洗涤缓冲液并用于稀释捕获剂A。
- [0151] 试剂H(2小瓶):样品稀释缓冲液,Rexxip™ADA(P0020027,Gyros AB),用于稀释样品。
- [0152] 试剂I:检测抗体缓冲液,Rexxip™F(P0004825,Gyros AB),用于稀释检测剂B(0.5ml)。
- [0153] 要注意的是,当样品体积为200nI时,添加200nI 0.1M柠檬酸盐缓冲液pH3.4,至200nI样品和200nI酸解离缓冲液1(pH2.5)的混合物,给出终pH为2.8。
- [0154] 本发明不限于上述优选的实施方案。可使用各种替代物、修饰和等价物。因此,上述实施方案不应视为限定本发明的范围,本发明的范围是由所附权利要求限定的。
- [0155] 参考文献
- [0156] 1.RandaII SIemmon J.,Meredith J.,Guss V.,Andreasson U.,Andreasen N.,Zetterberg H.,Blennow K.Measurement of Ab1-42in cerebrospinal fluid is influenced by matrix effects.J.Neurochem.212,325-333,2012.
- [0157] 2.Murphy G.,Nagase H.Progress in matrix metalloproteinase research.Mol.Aspects.Med.29,290-308,2008.
- [0158] 3.LindahI B.,Venge P.,Eggers KM.,Gedeborg R.,Ristiniemi N.,Wittfooth S.,Pettersson K.Autoantibodies to cardiac troponin in acute coronary syndromes.Clin.Chim.Acta.411,1793-1798,2010.
- [0159] 4.Reuschenbach M.,von Knebel Doeberitz M.,Wentzensen N.A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens.Cancer Immunol.Immunother.58,1535-1544,2009.
- [0160] 5.Saurabh Aggarwal.What's fueling the biotech engine-2010 to 2011.Nat.Biotechnol.29,1083-1089 doi:10.1038/nbt.2060,2012.
- [0161] 6.Chon JH.,Zarbis-Papastoitsis G.Advances in the production and downstream processing of antibodies.New Biotechnology,28,458-463,2011.
- [0162] 7.Forsgren A, Sjöquist J."Protein A"from Staphylococcus aureus.I.Pseudo-immune reaction with g-gIobulin.J.Immunol.97,822-827,1966.

- [0163] 8. Inganäs M. Comparison of mechanisms of interaction between protein A from *Staphylococcus aureus* and human monoclonal IgG, IgA and IgM in relation to the classical Fc γ and alternative F(ab')₂ protein A interactions. *Scand. J. Immunol.* 13(4), 343-52, 1981.
- [0164] 9. Starovasnik MA, O'Connell MP, Fairbrother WJ, Kelley RF. Antibody variable region binding by *Staphylococcal* protein A: Thermodynamic analysis and location of the Fv binding site on the E-domain. *Protein Science* 8, 1423-1431, 1999.
- [0165] 10. Nilsson B., Moks T., Jansson B., Abrahamson L., Elmiad A., Holmgren E., Henrichson C., Jones TA., Uhlen M. A synthetic IgG-binding domain based on *staphylococcal* protein A. *Protein Eng.* 1, 107-113, 1987.
- [0166] 11. Jansson B., Uhlen M., Nygren P-Å. All individual domains of *staphylococcal* protein A show Fab binding. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 20, 69-78, 1998.
- [0167] 12. Hober S., Johansson HJ. Mutant protein. US patent application publication US 2006/0194950 A1.
- [0168] 13. FDC Reports, The Gold Sheet, 38, 1-31, 2004.
- [0169] 14. Steindl F., Armbruster C., Hahn R., Armbruster C., Katinger HWD. A simple method to quantify *staphylococcal* protein A in the presence of human or animal IgG in various samples. *J. Immunol. Meth.* 235, 61-69, 2000.
- [0170] 15. Zhu-Shimoni J., Gunawan F., Thomas A., Vanderlaan M., StuItz J. Trace level analysis of leached protein A in bioprocess samples without interference from large excess of rhMab IgG. *J. Immunol. Meth.* 341, 59-67, 2009.
- [0171] 16. Berglund A, Inganäs M. Method for determining certain bacterial polypeptides and antibodies directed against them. US Patent No. 4,752,571, 1988.
- [0172] 17. van Oss CJ, Absolom DR., Grossberg AL., Neumann AW. Repulsive van der Waals Forces. I. Complete Dissociation of Antigen-Antibody Complexes by Means of Negative van der Waals Forces. *Immunol. Comm.*, 8, 11-29, 1979.

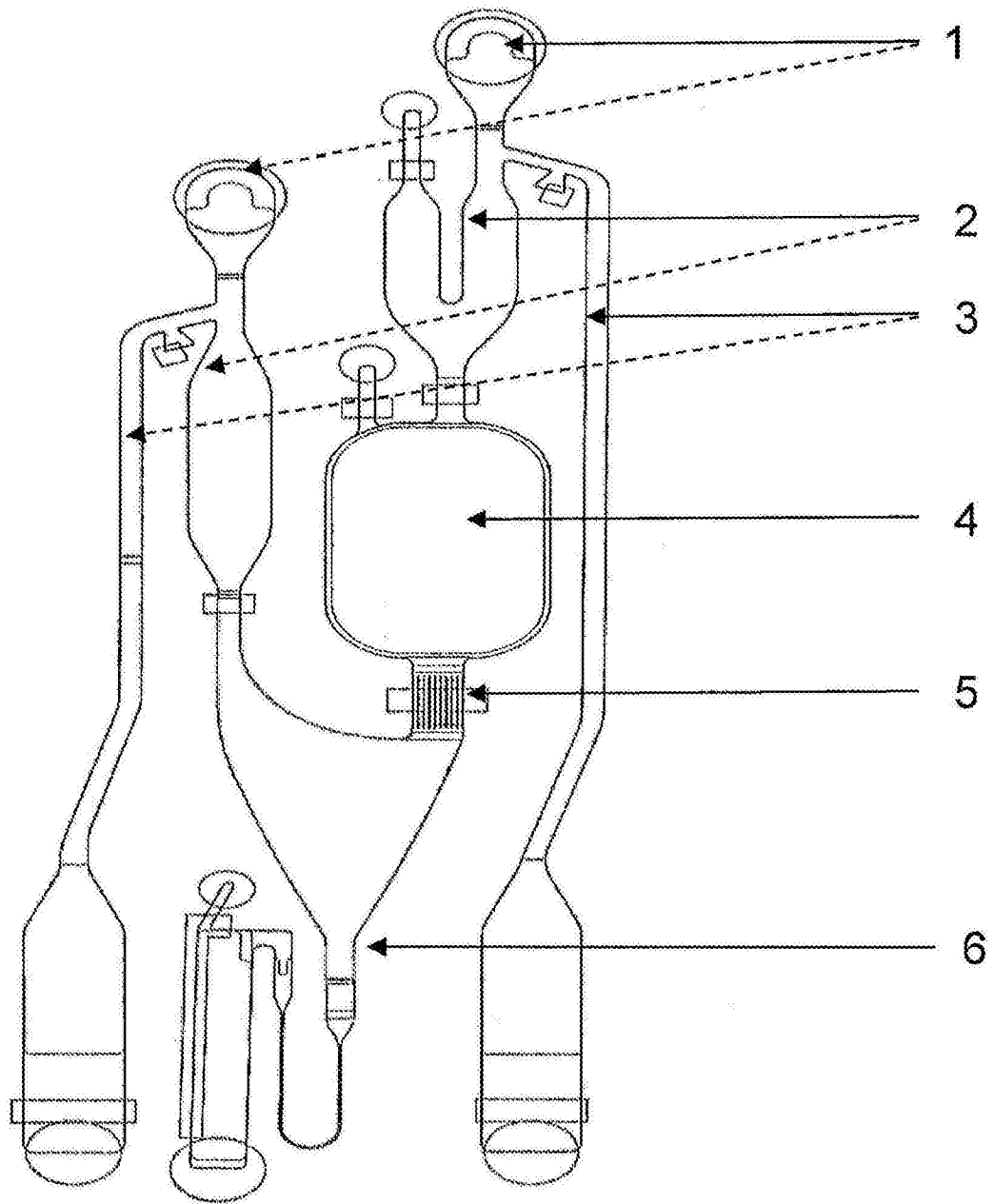


图1

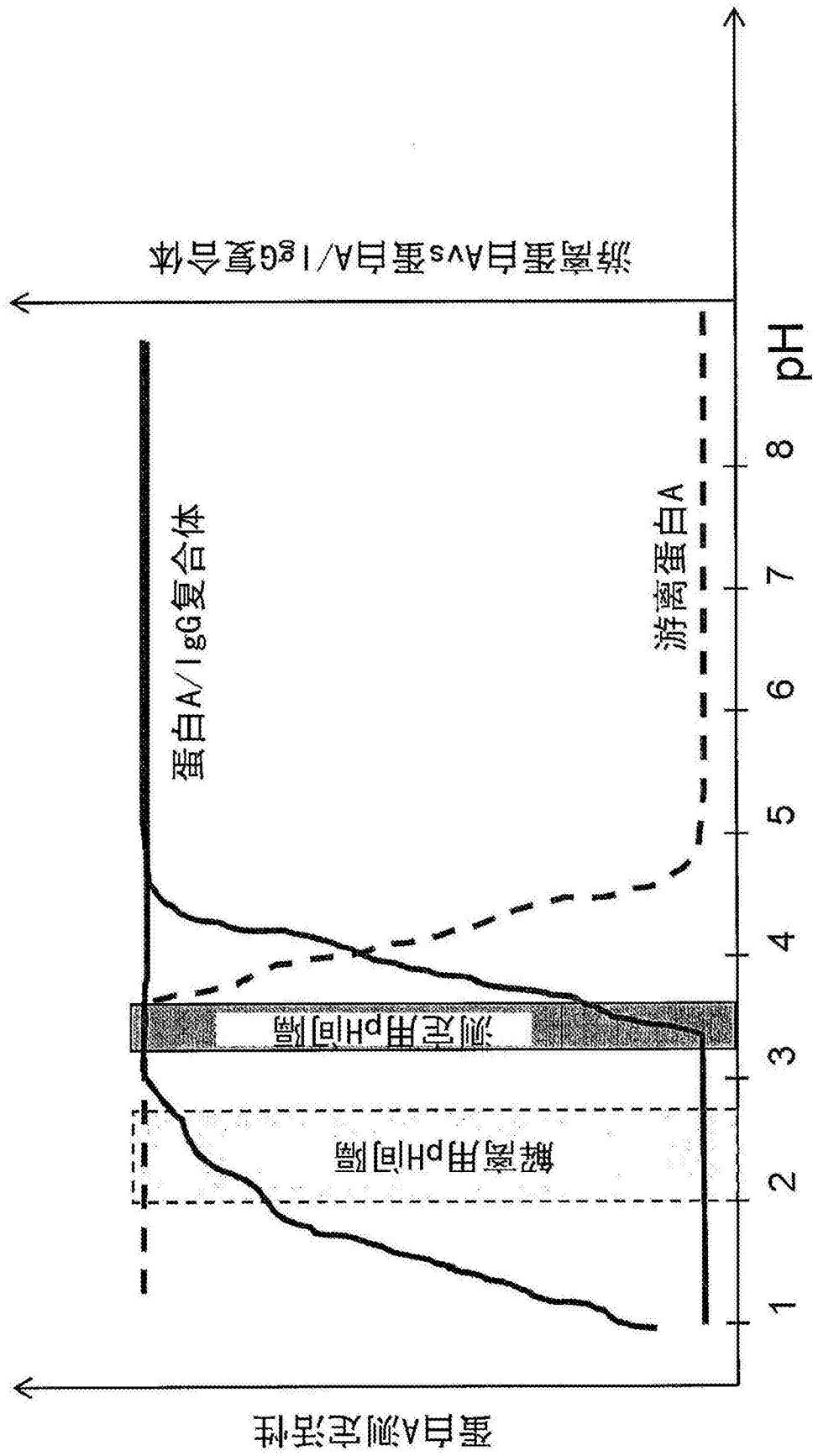


图2

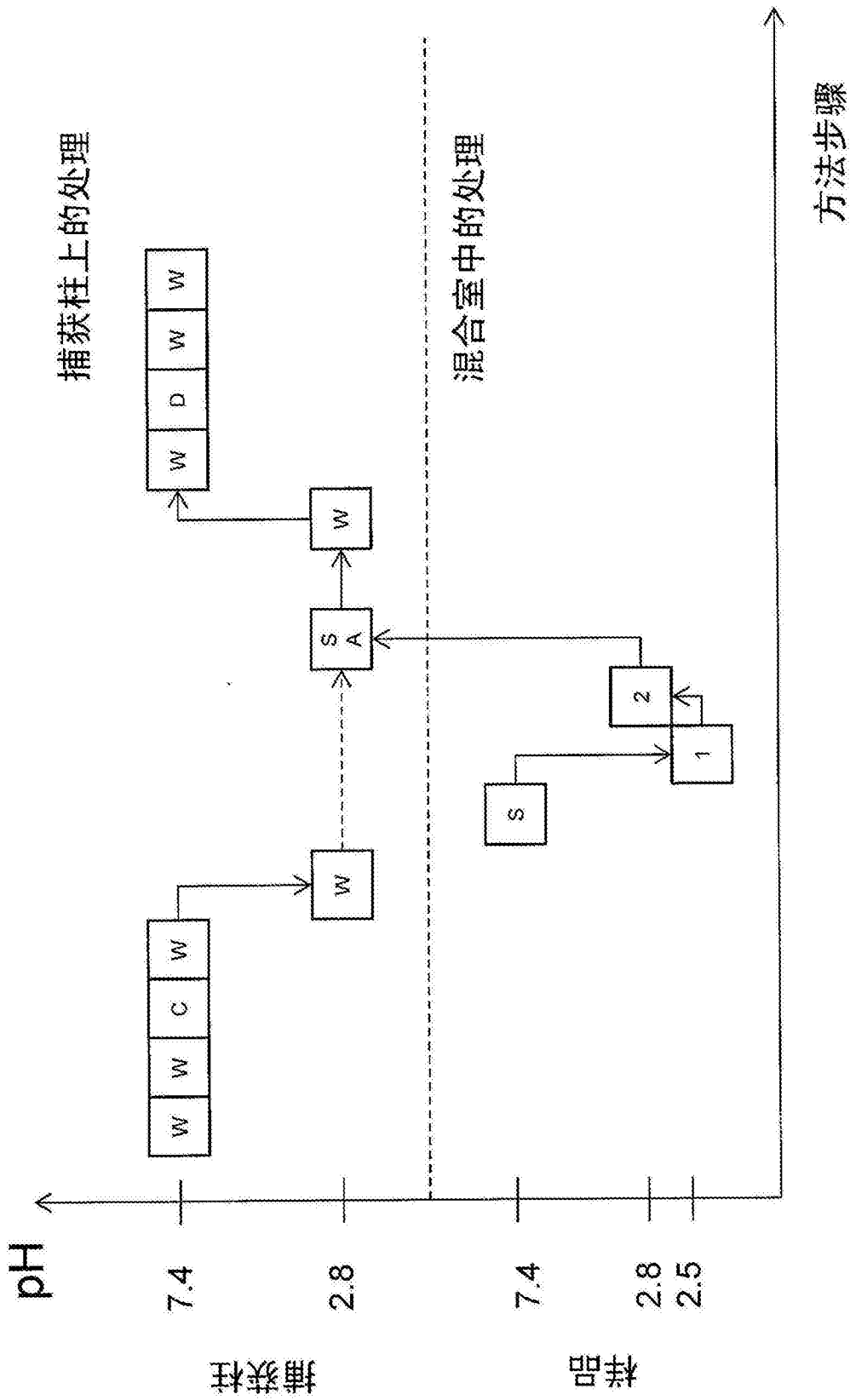


图3

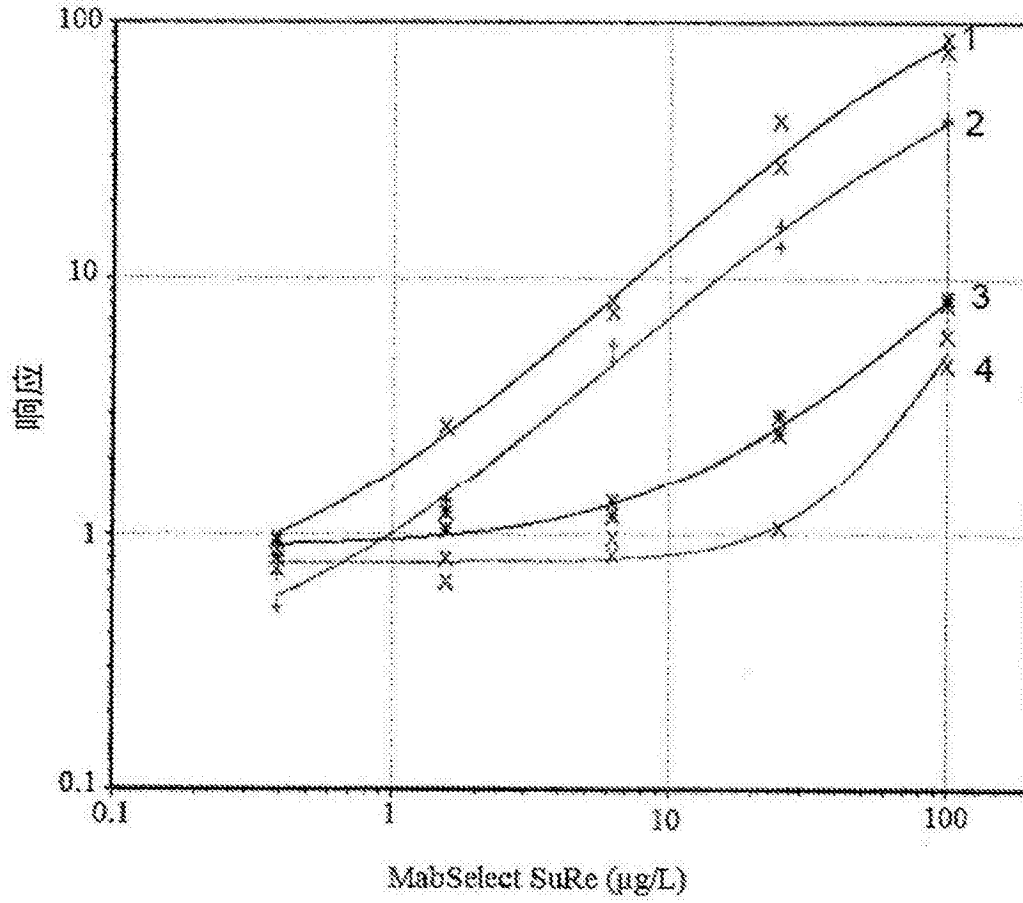


图4

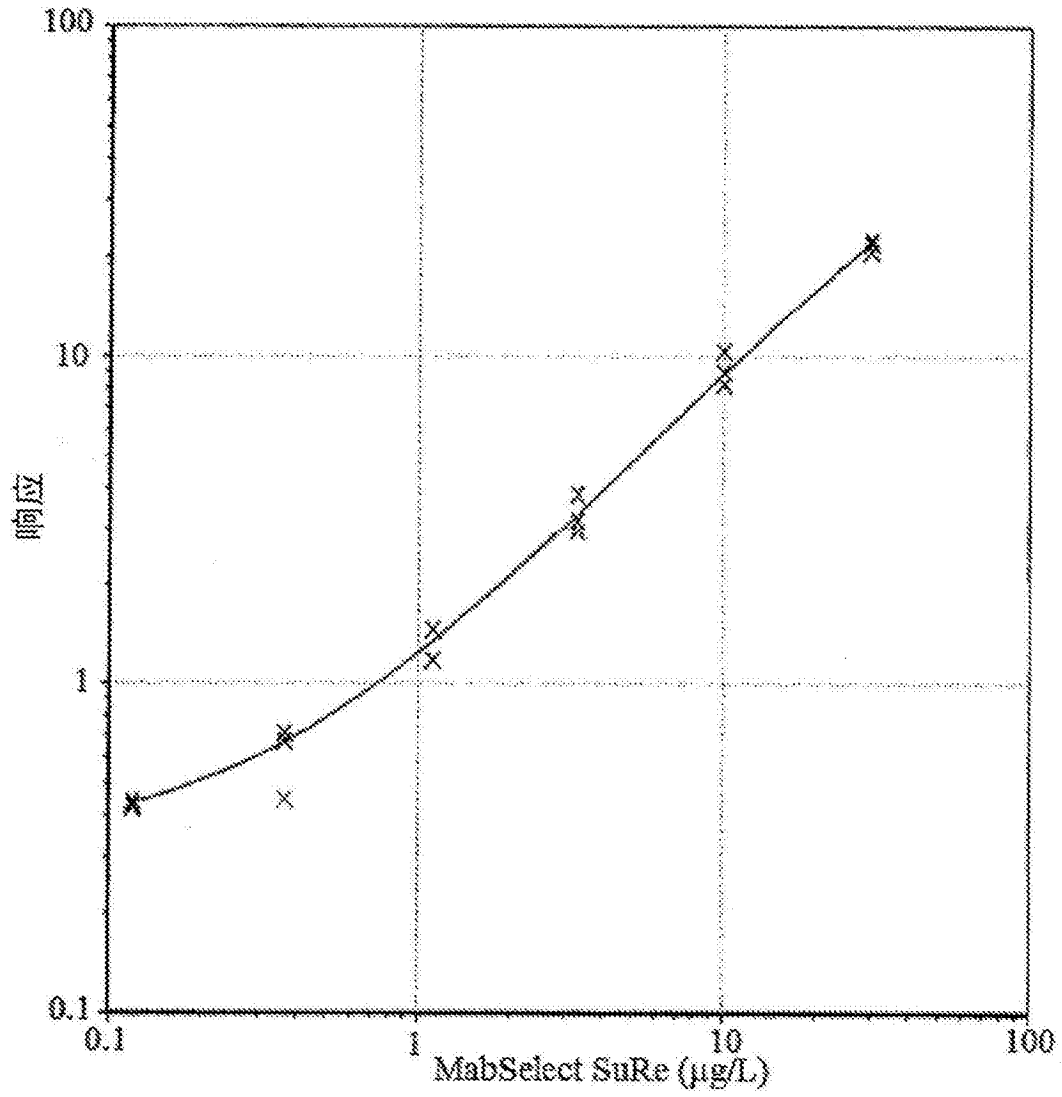


图5

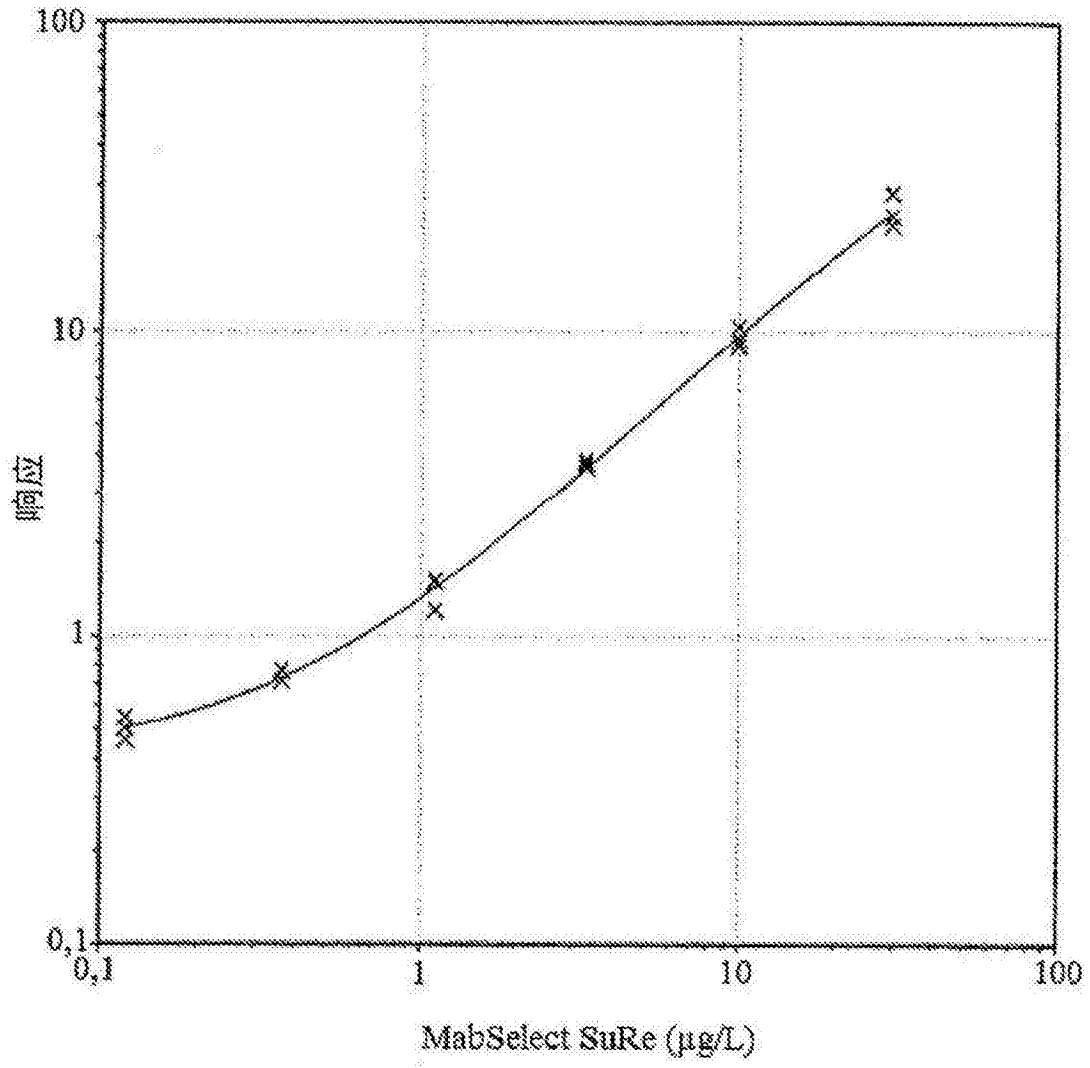


图6

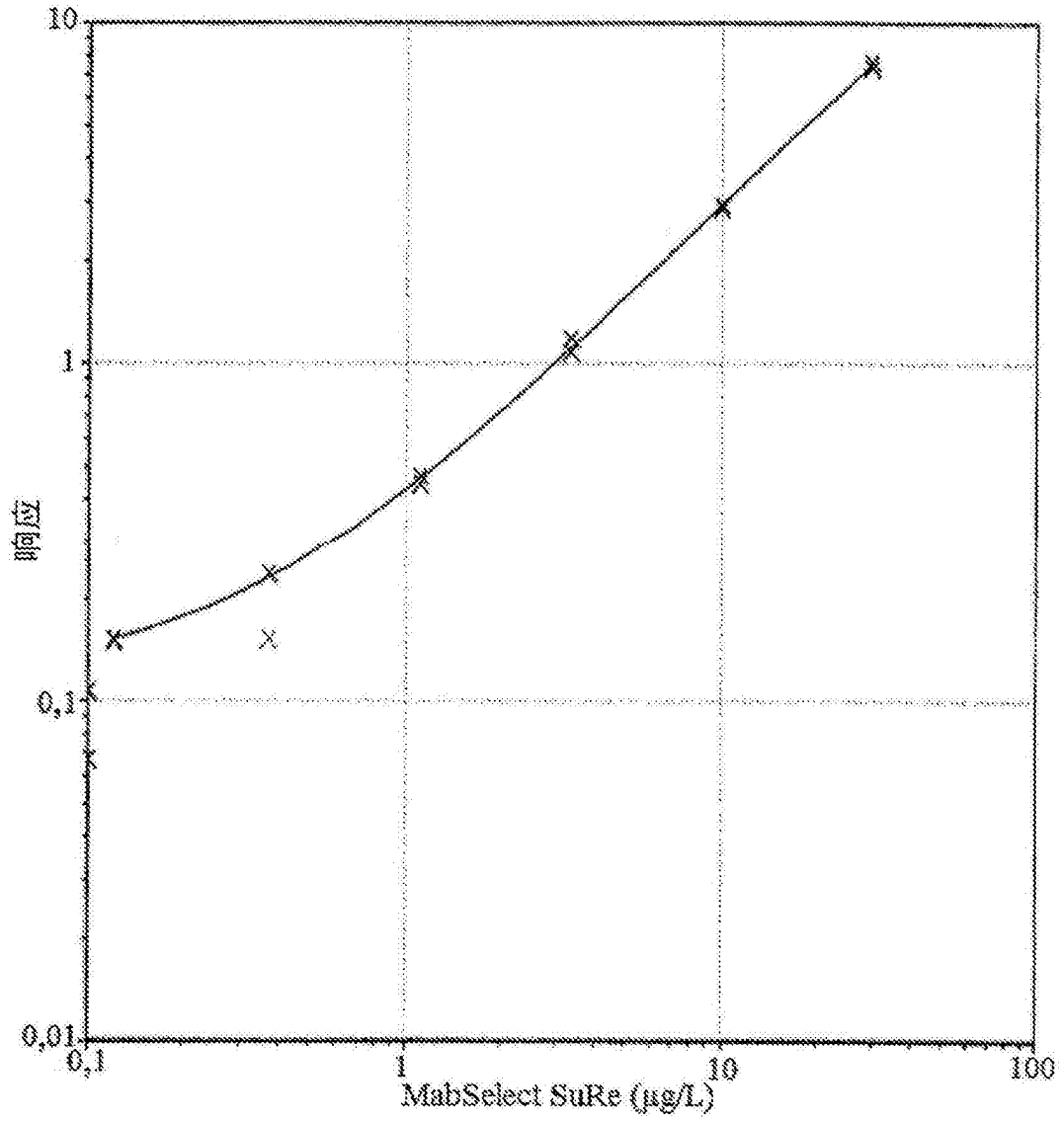


图7

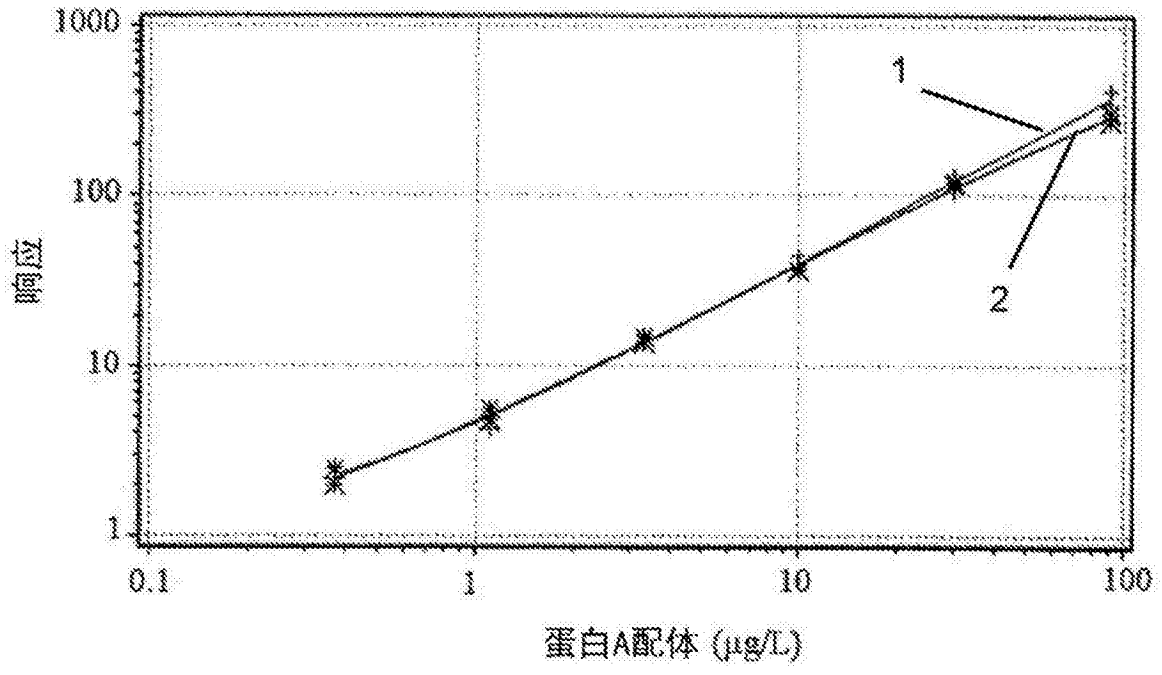


图8

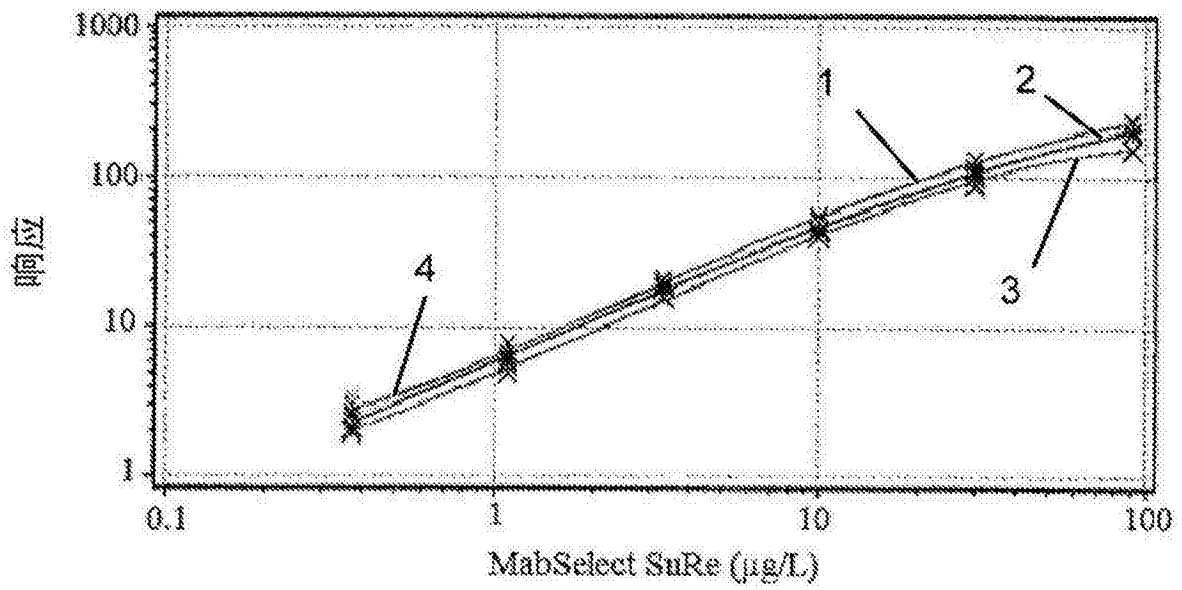


图9

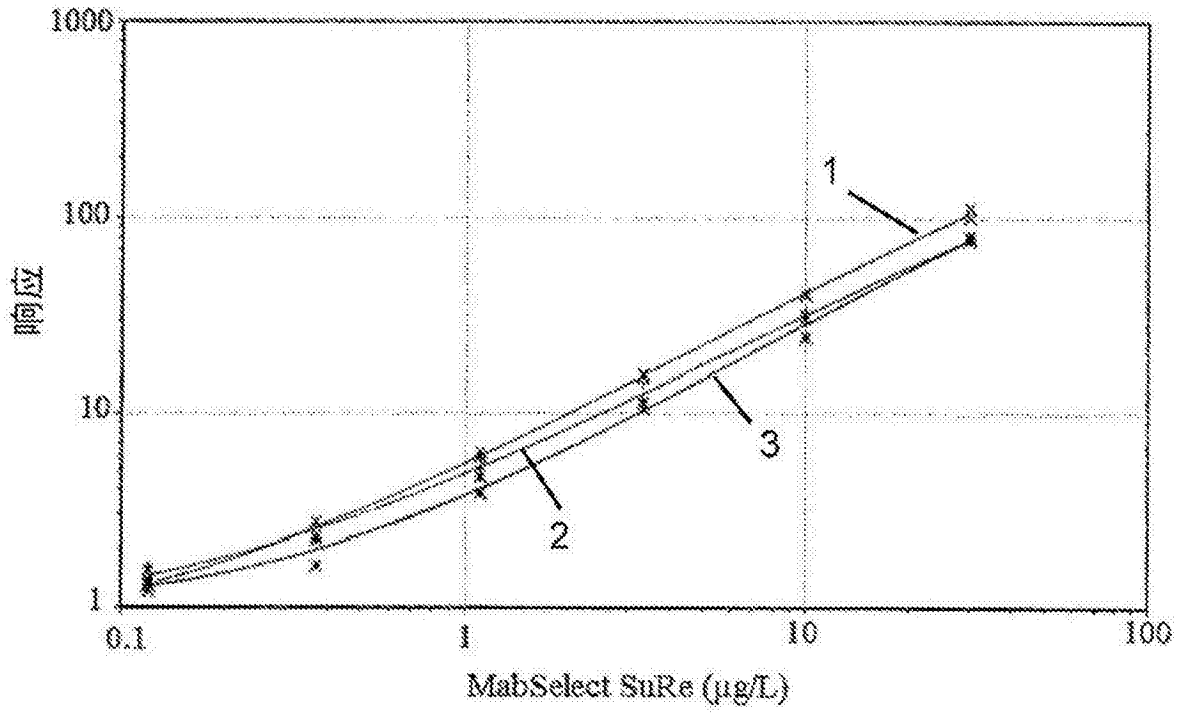


图10

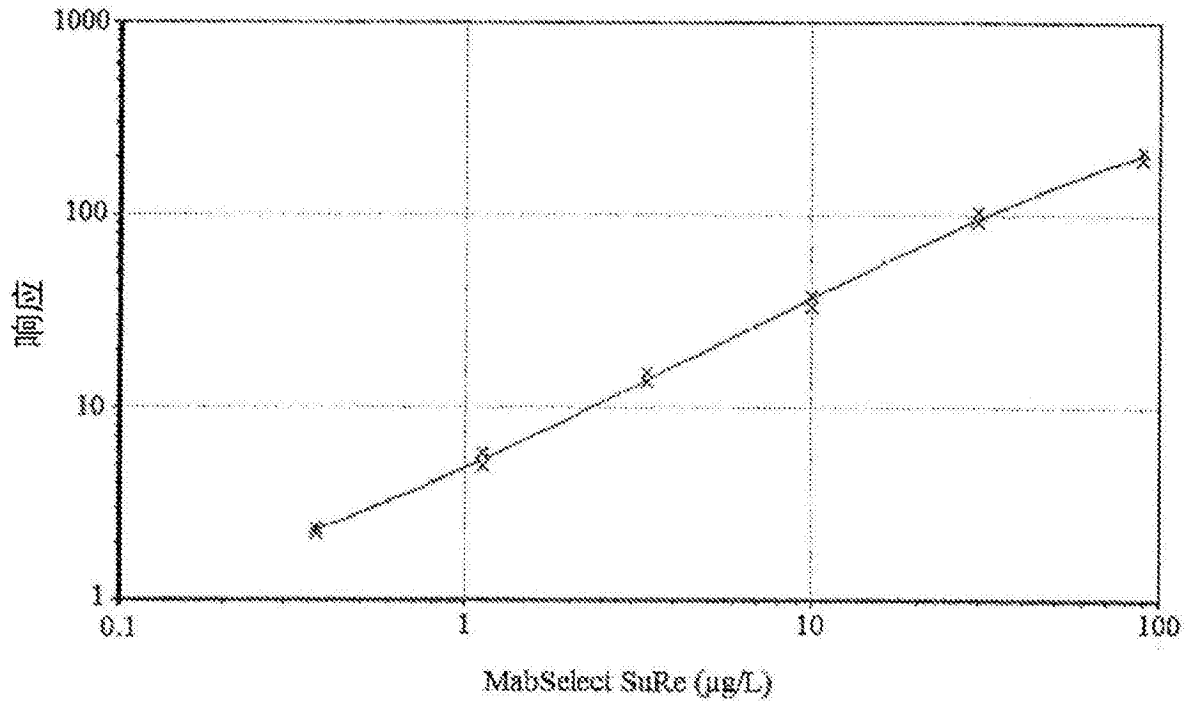


图11

专利名称(译)	酸性条件下分析物测定用方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN104718453B	公开(公告)日	2017-03-08
申请号	CN201380051645.1	申请日	2013-10-03
[标]申请(专利权)人(译)	GYROS专利公司		
申请(专利权)人(译)	GYROS专利公司		
当前申请(专利权)人(译)	GYROS专利公司		
[标]发明人	M因加纳斯 P莱赫托宁		
发明人	M·因加纳斯 P·莱赫托宁		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/84		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/5306 G01N33/5375 G01N2333/195		
代理人(译)	刘新宇		
审查员(译)	周洋		
优先权	1251116 2012-10-03 SE 1350373 2013-03-25 SE		
其他公开文献	CN104718453A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了一种通过免疫测定来定量测定流体样品中分析物的方法，所述免疫测定包括将所述分析物与能够特异性结合所述分析物的配体结合，其中至少部分所述分析物作为分析物复合体存在。所述方法包括下述步骤：a)使所述样品处于第一酸性pH，从而至少实质上解离存在的任何分析物复合体并将实质上所有分析物以游离形式提供，b)将所述第一酸性pH升高至第二酸性pH，其中防止复合体的再形成，但其中允许分析物与所述配体的结合，和c)测定分析物与所述配体的结合以定量测定所述样品中的分析物。

