



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107748262 A

(43)申请公布日 2018.03.02

(21)申请号 201710616063.3

(22)申请日 2017.07.26

(71)申请人 东曜药业有限公司

地址 215024 江苏省苏州市工业园区长阳街120号

(72)发明人 刘西燕 艾洪新 朱文娟 龙水清

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务有限公司 32103

代理人 范晴

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

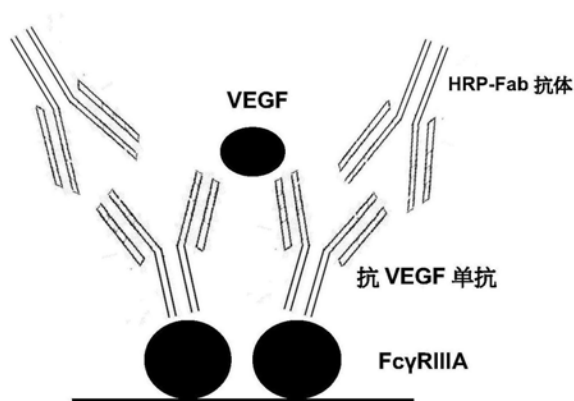
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种Fc $\gamma$ R IIIA受体的ELISA检测方法

(57)摘要

本发明要求保护一种Fc $\gamma$ R IIIA受体的ELISA检测方法,其包括在酶标板上包被Fc $\gamma$ R IIIA受体的包被步骤、封闭、样品配制、二抗孵育、底物显色的步骤,且所述样品配制步骤为:抗VEGF单抗与抗原混匀后,静置一个小时形成免疫复合物。利用本发明检测方法能在体外快速、直接检测出抗VEGF单抗与Fc $\gamma$ R IIIA受体结合活性,且成本较低,实验操作方便,重复性好,结果判断客观、灵敏度高。为抗VEGF单抗的一致性评价及临床药效及药代动力学研究也提供了参考信息。



1. 一种Fc  $\gamma$  RIIIA受体的ELISA检测方法,其特征在于,其包括在酶标板上包被Fc  $\gamma$  RIIIA受体的包被步骤、封闭、样品配制、二抗孵育、底物显色的步骤,其中,所述样品配制步骤为:抗VEGF单抗与抗原混匀后,静置一个小时形成免疫复合物。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述抗VEGF单抗与抗原的摩尔比在0.1~10:1之间。

3. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述抗VEGF单抗与抗原的摩尔比在0.5~5:1之间。

4. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,将所述的免疫复合物进行梯度稀释,加入包被好Fc  $\gamma$  RIIIA的酶标板上进行孵育。

5. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述抗VEGF单抗为贝伐珠单抗。

## 一种Fc $\gamma$ RIIIA受体的ELISA检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种Fc $\gamma$ RIIIA (CD16) 受体的ELISA检测方法。

### 背景技术

[0002] 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF),是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子,可在体内诱导血管新生。VEGF由不同肿瘤细胞分泌,也可在发育中的正常细胞及组织中表达,在体内调节血管的通透性,为血管形成过程中的多种细胞提供一个纤维网络;在体外能促进基质的降解以及内皮细胞的增殖、迁移、运动和血管腔样结构的形成,并可动员骨髓来源的内皮祖细胞。VEGF是诱导肿瘤血管形成的作用最强、特异性最高的血管生长因子。所以理论上来说,采用不同方法来干预或抑制血管内皮生长因子可以抑制肿瘤的生长。

[0003] 单抗的功效不仅依赖于其抗体结合区域(Fab),同时其可结晶区域(Fc)也发挥着重要作用。Fab能够特异地识别肿瘤相关抗原(TAA),从而调控TAA相关的下游信号通路。Fc能够发挥一系列效应功能如ADCC、ADCP和CDC,进一步提升单抗的功效,尤其是Fc $\gamma$ RIII与药物的ADCC活性直接相关,ADCC是抗体依赖细胞介导的细胞毒作用,当IgG抗体通过Fab段与靶细胞(病毒感染的细胞及肿瘤细胞)表面抗原决定簇特异性结合后,其Fc段可与有Fc $\gamma$ R的杀伤细胞(NK细胞、单核-巨噬细胞、中性粒细胞)等效应细胞结合,触发效应细胞的杀伤活性,直接杀伤靶细胞(病毒感染的细胞及肿瘤细胞)。

[0004] Fc $\gamma$ Rs主要包括Fc $\gamma$ RI (CD64)、Fc $\gamma$ RII (CD32) 以及Fc $\gamma$ RIII (CD16)。在这三种受体类型中,Fc $\gamma$ RI与抗体的结合力最强,Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII与抗体的结合力相对较弱。

[0005] Fc $\gamma$ RIII的结构特征:50~70kDa糖蛋白,属Ig超家族成员,有2个C2结构,基因染色体位于1q23~24。识别Fc $\gamma$ RIII代表性的McAb有HUNK2、Leu11、3G8、Gran1和B73.1等。Fc $\gamma$ RIII结合人IgG、IgG3,为低亲和力受体。可分为Fc $\gamma$ RIIIA和Fc $\gamma$ RIIIB两种异型。①Fc $\gamma$ RIIIA,穿膜结构,主要分布于巨噬细胞、NK细胞和嗜酸性粒细胞,巨噬细胞表达高水平,而单核细胞表达水平较低。②Fc $\gamma$ RIIIB,通过GPI“锚”在中性粒细胞表面,每个人中性粒细胞表达10万~20万血液中可溶性的Fc $\gamma$ RIIIB,中性粒细胞激活剂短时间处理后可明显降低Fc $\gamma$ RIIIB的表达水平,可能与通过激活内源性蛋白酶切除GPI连接分子有关。

[0006] 因此,抗体与Fc受体结合能力检测技术的创新与改进就显得尤为重要。近年来,生物膜干涉技术(biolayerinterferomeory,BLI)、biacore技术等被用于Fc受体结合活性的测定,虽然简便快捷,但需要价格昂贵的大型设备,不利于普通实验室、小型生物公司的技术研发及产品质量的跟踪监测。而酶联免疫吸附测定法(ELISA)方法,因其操作简单、快速、敏感性高、特异性强、设备要求简单,因此在实验室广泛应用。

### 发明内容

[0007] 本发明针对现有技术的抗VEGF单抗与Fc $\gamma$ RIIIA受体的的结合能力较弱,用普通

的ELISA方法做出的ELISA曲线不稳定。本发明创造性的将夹心法ELISA进行扩展,将受体-抗体-二抗的形式发展成受体-免疫复合物-二抗的形式,旨在提高抗体与Fc $\gamma$ RIIIA的结合活性,提高Elisa检测方法的灵敏度、稳定性,能够得到完整的四参数曲线。创新性的利用夹心ELISA方法检测抗VEGF单抗与Fc $\gamma$ RIIIA受体的结合能力,使抗体样品体外与Fc $\gamma$ RIIIA受体的结合活性的检测更加简单易行。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明提供的技术方案为一种用ELISA方法检测抗VEGF单抗与Fc $\gamma$ RIIIA受体的结合活性,即一种Fc $\gamma$ RIIIA受体的ELISA检测方法,其包括在酶标板上包被Fc $\gamma$ RIIIA受体的包被步骤、封闭、样品配制、二抗孵育、底物显色的步骤,且所述样品配制步骤为:抗VEGF单抗与抗原混匀后,静置一个小时形成免疫复合物。

[0009] 本发明优选的技术方案中,抗VEGF单抗与抗原的摩尔比在0.1~10:1之间;优选地,所述抗VEGF单抗与抗原的摩尔比在0.5~5:1之间,更优选地,抗VEGF单抗与抗原的摩尔比在1~3:1之间。

[0010] 本发明优选的技术方案中,将所述的免疫复合物进行梯度稀释,加入包被好Fc $\gamma$ RIIIA的酶标板上进行孵育。

[0011] 本发明优选的技术方案中,所述抗VEGF单抗为贝伐珠单抗(Avastin)。

[0012] 本发明优选的技术方案中,所述抗VEGF单抗的分子式及分子量为:  
C<sub>6638</sub>H<sub>10160</sub>N<sub>1720</sub>O<sub>2108</sub>S<sub>44</sub> 149kDa,其轻链氨基酸序列如下:

[0013] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS  
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA  
SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFN RGEC;

[0014] 重链的氨基酸序列为:

[0015] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVWG

[0016] INTYTGEPTY AADFRRFTF SLDTKSTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAKYP

[0017] HYYGSSHWF DVWGQGLVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC

[0018] LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH  
KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV  
DVSIEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL

[0019] NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYP  
SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS

[0020] CSVMEALHN HYTKSLSLS PGK。

[0021] 本发明利用夹心ELISA方法检测抗VEGF单抗与Fc $\gamma$ RIIIA受体的结合能力,是一种创新的做法。利用本专利检测方法能在体外快速、直接检测出抗VEGF单抗与Fc $\gamma$ RIIIA受体结合活性,且成本较低,实验操作方便。为抗VEGF单抗的一致性评价及临床药效及药代动力学研究也提供了参考信息。本发明抗VEGF抗体Fc $\gamma$ RIIIA受体结合活性检测方法是基于ELISA方法,利用平行曲线(四参数曲线)模型测定相对活性。

## 附图说明

[0022] 图1为Fc $\gamma$ RIIIA受体与抗VEGF单抗结合活性检测方法检测原理图。

[0023] 图2为Fc  $\gamma$  RIIIA与抗VEGF单抗结合曲线图。

[0024] 图3A为抗VEGF单抗的轻链氨基酸序列图;图3B为抗VEGF单抗的重链氨基酸序列图。

### 具体实施方式

[0025] 以下结合具体实施例对上述方案做进一步说明。应理解,这些实施例是用于说明本发明而限于限制本发明的范围。实施例中采用的实施条件可以根据具体厂家的条件做进一步调整,未注明的实施条件通常为常规实验中的条件。

[0026] 介绍和概述

[0027] 本发明通过举例而非给出限制的方式来进行说明。应注意的是,在本公开文件中所述的“一”或“一种”实施方式未必是指同一种具体实施方式,而是指至少有一种。

[0028] 下文将描述本发明的各个方面。然而,对于本领域中的技术人员显而易见的是,可根据本发明的仅一些或所有方面来实施本发明。为说明起见,本文给出具体的编号、材料和配置,以使人们能够透彻地理解本发明。然而,对于本领域中的技术人员将显而易见的是,本发明无需具体的细节即可实施。在其他例子中,为不使本发明费解而省略或简化了众所周知的特征。

[0029] 将各种操作作为多个分立的步骤而依次进行描述,且以最有助于理解本发明的方式来说明;然而,不应将按次序的描述理解为暗示这些操作必然依赖于顺序。

[0030] 将根据典型种类的反应物来说明各种实施方式。对于本领域中的技术人员将显而易见的是,本发明可使用任意数量的不同种类的反应物来实施,而不只是那些为说明目的而在这里给出的反应物。此外,也将显而易见的是,本发明并不局限于任何特定的混合示例。

[0031] 实验材料及器材

[0032] 基本型漩涡混合器、酶标仪(厂家:Molecular Devices,型号:Spectra Max M2e)、酶标板(购自:Corning)、微孔板恒温振荡器、洗板机(购自:Thermo)

[0033] 实验试剂:

[0034] 磷酸盐缓冲液(PBS溶液)、样品稀释液/洗液、封闭液、显色液TMB、终止液(1M硫酸)、抗原rhVEGF165、Fc  $\gamma$  RIIIA

[0035] 实施实例1:以单个样品为例,阐述步骤如下:

[0036] 采用直接ELISA法检测样品中单克隆抗体与FCGRIIIA的结合活性。以固定量的FCGRIIIA包被微孔板,辣根过氧化物酶标记的抗人IgG(Fab Specific)为二抗,直接测定不同浓度的样品和工作对照品与抗原的结合活性,形成受体-单抗+抗原-酶标抗体复合物。经过彻底洗涤后加底物四甲基联苯胺(TMB)显色。TMB在辣根过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在硫酸的作用下转化成最终的黄色。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度(OD值)。通过数据处理软件对结果绘图,根据参考品及供试品的EC50值计算供试品与受体的结合活性。

[0037] 对照品与样品稀释:

[0038] (1)用样品稀释液将贝伐珠单抗(Avastin)和对照品分别稀释到10~100 $\mu$ g/ml的浓度。

[0039] (2) 取10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品,向其中加入浓度为0.3~0.5 $\text{mg}/\text{ml}$ 的VEGF165,制成抗VEGF单抗样品:VEGF的摩尔比为0.1:1到10:1之间的混合液,混匀后室温静置1~2小时。

[0040] (3) 将上述混合液梯度稀释8~11个浓度。

[0041] 实验步骤:

[0042] (1) 用100 $\mu\text{l}$  1~3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的FCGR3A (V158) 包被缓冲液加入酶标板各孔;用封口膜封口后,置于2~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育16~20小时。

[0043] (2) 取出酶标板弃掉包被液后,用洗板机每孔加300 $\mu\text{l}$ 洗液(wash buffer)洗板2遍,将板在滤纸上拍干。

[0044] (3) 在每个孔中加入100 $\mu\text{l}$ 封闭液,用封口膜封口后,在室温条件下200rpm在微孔板振荡器上振摇孵育1~2h。

[0045] (4) 从微孔板振荡器上取下微孔板,倾倒内容物,拍干,用洗板机每孔加300 $\mu\text{l}$ 洗液(wash buffer)清洗,拍干,重复2次。

[0046] (5) 对于包被好的微孔板,分别在工作孔中加入3倍梯度稀释的供试品溶液各100 $\mu\text{l}$ 。用封口膜封口后,在室温条件下200rpm振摇孵育1~2h。

[0047] (6) 从微孔板振荡器上取下微孔板,倾倒内容物,拍干,用洗板机每孔加300 $\mu\text{l}$ 洗液(wash buffer)清洗,拍干,重复4次。

[0048] (7) 每孔中加入100 $\mu\text{l}$ 的1000~5000倍稀释的酶标二抗稀释液,用封口膜封口后,在室温条件下200rpm振摇孵育1~2h。

[0049] (8) 从微孔板振荡器上取下微孔板,倾倒内容物,拍干,用洗板机每孔加300 $\mu\text{l}$ 洗液(wash buffer)清洗,拍干,重复4次。

[0050] (9) 每个工作孔中分别加100 $\mu\text{l}$ 的TMB显色液,封口,室温避光孵育20~30分钟,工作孔出现蓝色。

[0051] (10) 每孔分别加100 $\mu\text{l}$ 的终止液,轻敲微孔板混匀,酶反应终止,原来显蓝色的孔将会变成黄色。

[0052] (11) 终止反应半小时内,在450nm波长测吸光值,产生标准溶液和样品溶液的剂量效应曲线。

[0053] (12) 利用SOFTMAX软件进行四参数方程曲线拟合计算。

[0054] 以上所述具体实施例仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进或替换,这些改进或替换也应当视为本发明的保护范围。

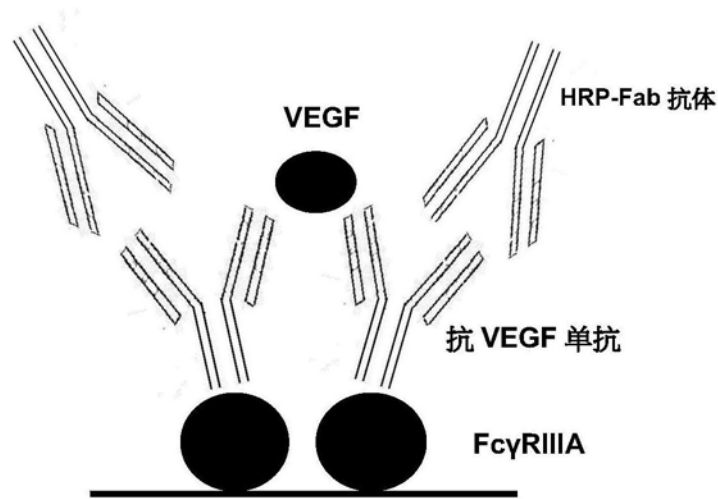


图1

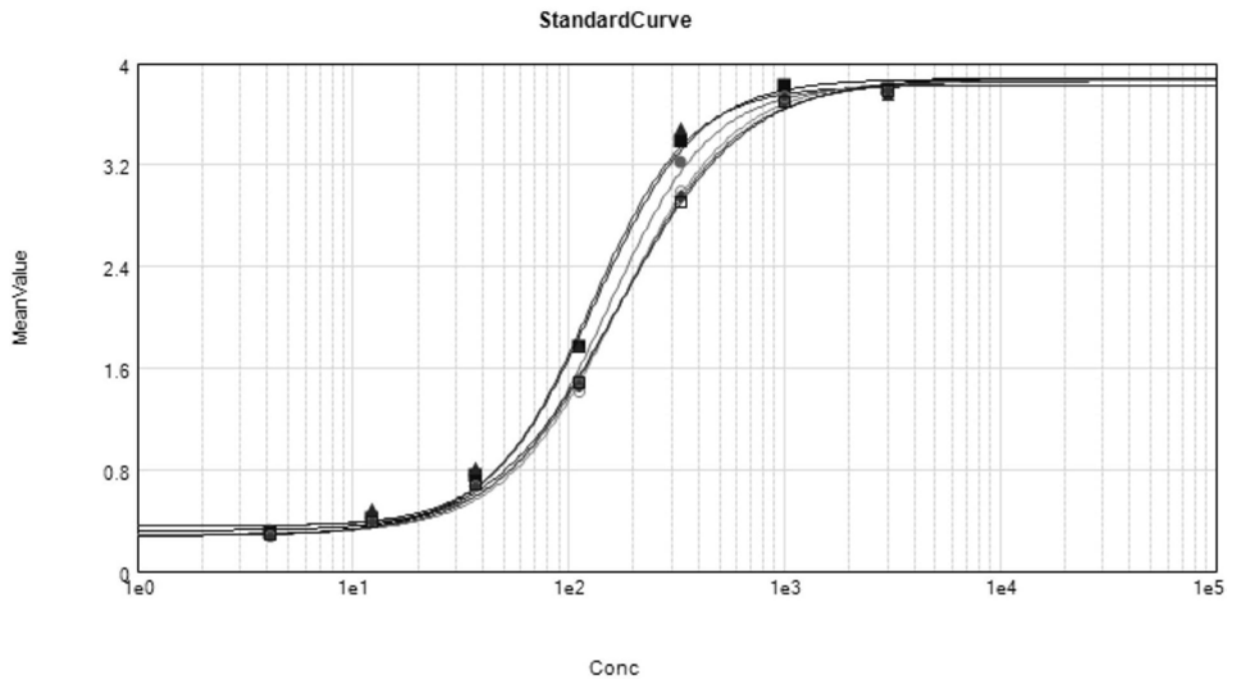


图2

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS  
RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPF  
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKE  
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

图3A

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW  
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAKYF  
HYYGSSHWFY DVWGQGILVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC  
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH  
KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDILMIS RTPEVTCVVV  
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYF  
SDIAVEWESN GQFENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS  
CSVMHEALHN HYTQKLSLSL PGK

图3B

专利名称(译)	一种FcγRIIIA受体的ELISA检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107748262A</a>	公开(公告)日	2018-03-02
申请号	CN201710616063.3	申请日	2017-07-26
[标]发明人	刘西燕 艾洪新 朱文娟 龙水清		
发明人	刘西燕 艾洪新 朱文娟 龙水清		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577 G01N2333/70535 G01N2333/71		
代理人(译)	范晴		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明要求保护一种FcγRIIIA受体的ELISA检测方法，其包括在酶标板上包被FcγRIIIA受体的包被步骤、封闭、样品配制、二抗孵育、底物显色的步骤，且所述样品配制步骤为：抗VEGF单抗与抗原混匀后，静置一个小时形成免疫复合物。利用本发明检测方法能在体外快速、直接检测出抗VEGF单抗与FcγRIIIA受体结合活性，且成本较低，实验操作方便，重复性好，结果判断客观、灵敏度高。为抗VEGF单抗的一致性评价及临床药效及药代动力学研究也提供了参考信息。

