



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110376369 A

(43)申请公布日 2019.10.25

(21)申请号 201910696013.X

(22)申请日 2019.07.30

(71)申请人 重庆派金生物科技有限公司

地址 400700 重庆市北碚区丰和路106号

(72)发明人 白艳敏 刘日勇 陈清 何云凤

付志成 范开

(74)专利代理机构 重庆中之信知识产权代理事

务所(普通合伙) 50213

代理人 罗庆

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

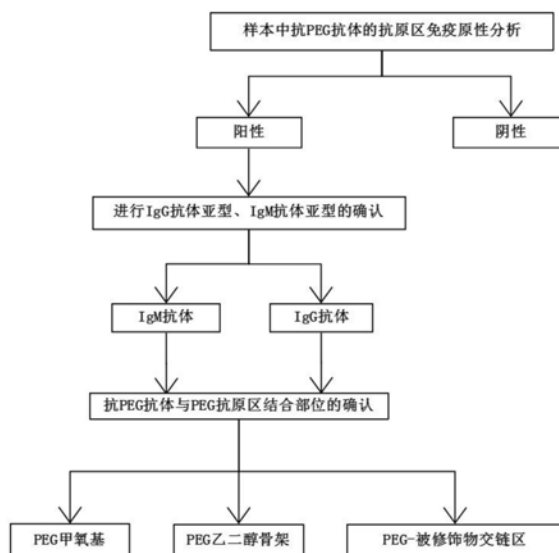
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法

(57)摘要

本发明涉及一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,其包括以下步骤,S1检测抗PEG总抗体;S2检测抗PEG抗体类别;S3检测PEG抗原区类别;所述PEG抗原区包括PEG甲氧基、PEG乙二醇骨架、PEG-被修饰物交链区。本发明通过依次分析样本中的IgG抗体和IgM抗体类别、以及PEG抗原区类别,达到了全面评价PEG抗原区的免疫原性的目的。



1. 一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,其特征在于:包括以下步骤,

S1检测抗PEG总抗体,采用第一间接ELISA方法检测样本中抗PEG总抗体,得到抗体阳性的总抗阳性样本;

S2检测抗PEG抗体类别,采用第二间接ELISA方法检测阳性样本中的IgG抗体亚型和IgM抗体亚型,得到IgG抗体阳性或IgM抗体阳性的抗体阳性样本;

S3检测PEG抗原区类别,采用针对不同PEG抗原区的特异性ELISA方法和第三阳性质控,检测并分析抗体阳性样本的PEG抗原区类别;

其中,所述PEG抗原区包括PEG甲氧基、PEG乙二醇骨架、PEG-被修饰物交链区。

2. 根据权利要求1所述的一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,其特征在于:所述S3中,第三阳性质控为抗PEG甲氧基抗体、抗PEG乙二醇骨架抗体和抗PEG-被修饰物交链区抗体。

3. 根据权利要求2所述的一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,其特征在于:所述S3中,特异性ELISA方法包括用于检测PEG抗原区与抗PEG抗体的结合位点的第三间接ELISA方法和竞争ELISA方法,且第三间接ELISA方法和竞争ELISA方法同步进行。

4. 根据权利要求3所述的一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,其特征在于:所述第三间接ELISA方法的具体实现方式为,分别以mPEG、不含甲氧基的PEG、不含甲氧基的PEG-赖氨酸为第三抗原包被于酶标板上,加入由HRP-IgG抗体或HRP-IgM抗体组成的第三酶标物,通过第三酶标物与IgG抗体-PEG抗原区或IgM抗体-PEG抗原区桥联并形成的第一抗原区样本,使用显色底物液催化第一抗原区样本显色。

5. 根据权利要求3所述的一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,其特征在于:所述竞争ELISA方法的具体实现方式为,使用mPEG-BSA作为第四抗原包被于酶标板中,在抗体阳性样本中加入mPEG、不含甲氧基的PEG、PEG-赖氨酸,以中和抗体阳性样本中的部分或全部抗PEG抗体,加入由HRP-IgG抗体或HRP-IgM抗体组成的第四酶标物,通过第四酶标物与IgG抗体-PEG抗原区或IgM抗体-PEG抗原区桥联并形成的第二抗原区样本,使用显色底物液催化第二抗原区样本显色。

6. 根据权利要求1所述的一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,其特征在于:所述S1中,第一间接ELISA方法的具体实现方式为,使用抗PEG多抗作为第一阳性质控,使用mPEG-BSA作为第一抗原包被于酶标板中,加入由Protein G-HRP或Protein A-HRP组成的第一酶标物,通过第一酶标物与抗PEG抗体-PEG抗原区桥联并形成的总抗阳性样本,使用显色底物液催化总抗阳性样本显色。

7. 根据权利要求1所述的一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,其特征在于:所述S2中,第二间接ELISA方法的具体实现方式为,使用抗PEG单抗作为第二阳性质控,使用mPEG-BSA作为第二抗原包被于酶标板中,加入由抗PEG二抗-HRP组成的第二酶标物,通过第二酶标物与总抗阳性样本桥联并形成的抗体阳性样本,使用显色底物液催化抗体阳性样本显色。

8. 根据权利要求7所述的一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,其特征在于:所述抗PEG单抗为IgG单抗和IgM单抗,所述抗PEG二抗-HRP为IgG抗体-HRP和IgM抗体-HRP。

9. 根据权利要求7所述的一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,其特征在

于:采用所述第二间接ELISA方法检测IgE抗体和IgA抗体,所述抗PEG单抗为IgE单抗和IgA单抗,所述抗PEG二抗-HRP为IgE抗体-HRP和IgA抗体-HRP。

10.根据权利要求4-9任一所述的一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,其特征在于:所述显色底物液为TMB底物液或鲁米诺化学发光底物液。

一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫分析方法的技术领域,尤其是涉及一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法。

背景技术

[0002] 聚乙二醇是重复化学结构 $[H_0-(CH_2-CH_2-O)_n-H]$ 的多聚物,自1970s年代起,因其低毒性、良好的生物相容性和两亲性被广泛应用于生物医药、食品和化妆品中,经聚乙二醇修饰的蛋白、酶或多肽,可起有效的稳定作用,并明显延长药物半衰期、减弱蛋白药物的免疫原性;目前越来越多的PEG修饰蛋白药物处于临床前及临床研究阶段。

[0003] 但是,近几年越来越多的研究表明:PEG和PEG修饰蛋白药物在动物体内或人体内均可以产生抗PEG抗体。并且Johan J.F.Verhoef.的一项研究指出,PEG一端甲氧基、聚乙二醇骨架、PEG与蛋白交链区都可能产生免疫原性。

[0004] 例如,南加利福尼亚大学Jonathan Armstrong一项研究表明:约50%的病人在PEG修饰的天冬酰胺酶给药后产生了抗PEG抗体,且达到一定的抗体滴度后引起药物清除加快,从而影响疗效产生不良反应。同时,PEGinesatide由于严重的过敏反应从市场上撤出,而该过敏反应很可能与PEG有关。另外,在PEG化尿酸酶(PEG Loticase)三期临床试验中,32%的病人检测出抗PEG抗体,值得注意的是,抗PEG抗体滴度强弱与药物清除有关;其中,病人一般是较高滴度的IgG抗体和IgM抗体的病人,且高滴度IgM抗体的病人出现较早。在过去的十几年间陆续报道,抗PEG抗体的产生可以引发药物的清除加快(ABC)现象,且ABC现象出现的主要因素为IgM抗体的产生。

[0005] 由于正常人和25%以上未经PEG修饰药物治疗的病人体内也会产生抗PEG抗体,该部分人若使用PEG修饰药物的治疗可能会降低药效,因此针对PEG本身的免疫原性的检测分析非常重要。

[0006] Myler H,Hruska M W,Srinivasan S,et al.Anti-PEG antibody bioanalysis:a clinical case study with PEG-IFN- λ -1a and PEG-IFN- α 2a in naive patients.Bioanalysis,2015,7 (9):1093-1106的文献中采用半定量的免疫检测手段检测PEG的免疫原性,在PEG-IFN- λ -1a和PEG-IFN- α 2a临床I期,采用Bridging免疫分析法和直接法的MSD电化学发光法检测抗PEG IgG/IgM抗体.Saifer M G P,Williams L D,Sobczyk M A,et al.Selectivity of binding of PEGs and PEG-like oligomers to anti-PEG antibodies induced by methoxyPEG-proteins.Molecular Immunology,2014,57 (2):236-246的文献中采用竞争ELISA法检测抗PEG抗体.Foehr E D.Assays for detection of phenylalanine ammonia-lyase and antibodies to phenylalanine ammonia-lyase.2017的文献中采用间接ELISA方法检测IgG抗体和IgM抗体。

[0007] 通过采用现有的PEG的免疫原性检测手段,只能初步区别患者体内IgG抗体和IgM抗体,且目前尚未查阅到抗原性分析方法,因此难以进一步对PEG一端甲氧基、聚乙二醇骨架、PEG与蛋白交链区等抗原区进行检测分析,难以全面评价PEG抗原区的免疫原性,有待改

进。

发明内容

[0008] 本发明要解决的问题是针对现有技术中所存在的上述不足而提供一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,其通过分析样本中的抗聚乙二醇抗体类别和与该抗体特异性结合的抗原区类别,达到了全面评价PEG抗原区的免疫原性的目的。

[0009] 本发明的上述发明目的是通过以下技术方案得以实现的:

[0010] 一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,包括以下步骤,

[0011] S1检测抗PEG总抗体,采用第一间接ELISA方法检测样本中抗PEG总抗体,得到抗体阳性的总抗阳性样本;

[0012] S2检测抗PEG抗体类别,采用第二间接ELISA方法检测阳性样本中的IgG抗体亚型和IgM抗体亚型,得到IgG抗体阳性或IgM抗体阳性的抗体阳性样本;

[0013] S3检测PEG抗原区类别,采用针对不同PEG抗原区的特异性ELISA方法和第三阳性质控,检测并分析抗体阳性样本的PEG抗原区类别;

[0014] 其中,所述PEG抗原区包括PEG甲氧基、PEG乙二醇骨架、PEG-被修饰物交链区。

[0015] 本发明进一步设置为:所述S3中,第三阳性质控为抗PEG甲氧基抗体、抗PEG乙二醇骨架抗体和抗PEG-被修饰物交链区抗体。

[0016] 本发明进一步设置为:所述S3中,特异性ELISA方法包括用于检测PEG抗原区与抗PEG抗体的结合位点的第三间接ELISA方法和竞争ELISA方法,且第三间接ELISA方法和竞争ELISA方法同步进行。

[0017] 本发明进一步设置为:所述第三间接ELISA方法的具体实现方式为,分别以mPEG、不含甲氧基的PEG、不含甲氧基的PEG-赖氨酸为第三抗原包被于酶标板上,加入由HRP-IgG抗体或HRP-IgM抗体组成的第三酶标物,通过第三酶标物与IgG抗体-PEG抗原区或IgM抗体-PEG抗原区桥联并形成的第一抗原区样本,使用显色底物液催化第一抗原区样本显色。

[0018] 本发明进一步设置为:所述竞争ELISA方法的具体实现方式为,使用mPEG-BSA作为第四抗原包被于酶标板中,在抗体阳性样本中加入mPEG、不含甲氧基的PEG、PEG-赖氨酸,以中和抗体阳性样本中的部分或全部抗PEG抗体,加入由HRP-IgG抗体或HRP-IgM抗体组成的第四酶标物,通过第四酶标物与IgG抗体-PEG抗原区或IgM抗体-PEG抗原区桥联并形成的第二抗原区样本,使用显色底物液催化第二抗原区样本显色。

[0019] 本发明进一步设置为:所述S1中,第一间接ELISA方法的具体实现方式为,使用抗PEG多抗作为第一阳性质控,使用mPEG-BSA作为第一抗原包被于酶标板中,加入由Protein G-HRP或Protein A-HRP组成的第一酶标物,通过第一酶标物与抗PEG抗体-PEG抗原区桥联并形成的总抗阳性样本,使用显色底物液催化总抗阳性样本显色。

[0020] 本发明进一步设置为:所述S2中,第二间接ELISA方法的具体实现方式为,使用抗PEG单抗作为第二阳性质控,使用mPEG-BSA作为第二抗原包被于酶标板中,加入由抗PEG二抗-HRP组成的第二酶标物,通过第二酶标物与总抗阳性样本桥联并形成的抗体阳性样本,使用显色底物液催化抗体阳性样本显色。

[0021] 本发明进一步设置为:所述抗PEG单抗为IgG单抗和IgM单抗,所述抗PEG二抗-HRP为IgG抗体-HRP和IgM抗体-HRP。

[0022] 本发明进一步设置为:采用所述第二间接ELISA方法检测IgE抗体和IgA抗体,所述抗PEG单抗为IgE单抗和IgA单抗,所述抗PEG二抗-HRP为IgE抗体-HRP和IgA抗体-HRP。

[0023] 本发明进一步设置为:所述显色底物液为TMB底物液或鲁米诺化学发光底物液。

[0024] 综上所述,本发明的有益技术效果为:

[0025] 1. 本发明通过依次分析样本中的IgG抗体和IgM抗体类别、以及PEG抗原区类别,达到了全面评价PEG抗原区的免疫原性的目的;

[0026] 2. 本发明优选采用mPEG-BSA,克服了mPEG难以包被到酶标板上的缺点,同时也将PEG的抗原表位更多地暴露出来;

[0027] 3. 本发明优选采用第三间接ELISA方法和竞争ELISA方法检测PEG抗原区的结合位点,有利于提高检测的准确度,从而更全面地检测PEG抗原区的结合位点。

附图说明

[0028] 图1是本发明的mPEG-20KD-NH₂琼脂糖填料偶联效果检测电泳图,其中,1为marker,2为偶联前样品,3为偶联后样品。

[0029] 图2是本发明的ADI琼脂糖填料偶联效果检测电泳图,其中,1为偶联后样品,2为偶联前样品,3为marker。

[0030] 图3是本发明的抗PEG-被修饰物交链区抗体的纯化检测电泳图,其中,1为ProteinA柱上样液,2为ProtienA洗脱液2,3为ProtienA洗脱液1,4为ProtienA穿透液,5为PEG亲和柱穿透液,6为PEG亲和柱洗脱液,7为ADI亲和柱穿透液,8为ADI亲和柱洗脱液,9为ADI亲和柱洗脱浓缩液,10为marker。

[0031] 图4是本发明的抗原区分析方法的流程示意图。

[0032] 图5是本发明的不同PEG竞争剂在不同浓度下与抗PEG抗体特异性结合的结合位点的吸光度检测图。

具体实施方式

[0033] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与作用更加清楚及易于了解,下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步阐述:

[0034] 制备例

[0035] 抗PEG-被修饰物交链区抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0036] S1抗血清的制备,得到抗血清粗品;

[0037] S2抗血清的纯化,得到抗PEG-被修饰物交链区抗体;

[0038] S3抗PEG-被修饰物交链区抗体的检测,检测抗PEG-被修饰物交链区抗体的滴度。

[0039] (1) 抗血清的制备的具体步骤

[0040] 选用mPEG-20KD修饰的精氨酸脱亚胺酶(以下称为PA20)作为抗原免疫2只新西兰大耳白兔。首次免疫时,将1mg的PA20与弗氏完全佐剂1:1等体积混合,置于均质仪混匀10s/次,直至完全“油包水”状态(取一滴乳剂滴于水面,乳剂不扩散),得第一乳剂。二、三次加强免疫时,取0.5mg的PA20与弗氏不完全佐剂1:1等体积混合制备第二乳剂。采用第一乳剂和第二乳剂,每隔2周经背部、大腿部多点皮下注射给药。在免疫前、第三次免疫后2周均耳缘静脉采血0.5mL-1mL,1500g,4℃离心10min分离血清,血清抗体滴度分别为1:1250000、1:

625000,采全血分离抗血清粗品,并混合冻存于-20℃以下保存。

[0041] (2) 抗血清的纯化的具体步骤

[0042] 1. PEG亲和柱和ADI亲和柱的制备

[0043] 参照图1和图2,取mPEG-20KD-NH₂和精氨酸脱亚胺酶(以下称为ADI)各50mg,分别用5mL的0.2mol/L的Na₂CO₃(pH=8.9)溶解混匀。分别取5mL琼脂糖亲和填料,用10-15个柱体积的预冷的1mmol/L的HCl清洗后分别加入mPEG-20KD-NH₂溶液和ADI溶液,室温震荡反应2.5h,去除上清液,流出液电泳检测偶联率。DDW(超纯水)洗净填料后加入0.1mol/L的Tris-HCl溶液(PH=8.5)中放置2h,封闭介质上没有反应的基团,然后用DDW清洗填料后备用。

[0044] 2. 抗血清纯化流程

[0045] 参照图3,将得到的抗血清粗品依次经过硫酸铵沉淀、ProteinA柱、PEG亲和柱和ADI亲和柱纯化。柱纯化过程中,先用PBS洗5-6个柱体积,直至流出液的pH中性,然后将抗血清粗品低速循环上样。接着用5-6个柱体积的PBS复平衡。最后用洗脱液0.1mol/L甘氨酸pH3.0溶液洗脱,收集洗脱峰。

[0046] 3. 纯化样品检测

[0047] 经过多次纯化得到的纯化样品在紫外280nm检测,检测出抗PEG-被修饰物交链区抗体的浓度为0.87mg/mL,PBS透析后浓缩至1.5mg/mL,分装保存于-20℃以下,得到抗PEG-被修饰物交链区抗体。

[0048] (3) 抗聚乙二醇-蛋白交链区特异性抗体的检测

[0049] 采用间接ELISA方法,分别包被mPEG-20KD-BSA和ADI1μg/mL,100μL/孔,2℃-8℃过夜。PBST洗板缓冲液各洗三次后,3%BSA(牛血清白蛋白)封闭,250μL/孔,37℃放置2h。将纯化样品1:100、1:500、1:2500、1:12500、1:62500、1:312500稀释,100μL/孔加样,37℃反应1h,PBST洗板3次后,加入山羊抗兔IgG-HRP抗体(1:10000),100μL/孔,37℃反应1h;PBST洗板3次后加入TMB底物液室温显色10min,50μL/孔终止液终止反应,450nm处读数。抗PEG-交链区抗体滴度检测结果见表1。

[0050] 表1

[0051]

	平均 OD450						
	1:100	1:500	1:2500	1:12500	1:62500	1:312500	0
Anti-ADI	2.8088	2.4886	1.9066	1.5624	0.5156	0.1687	0.0634
Anti-PEG	2.4163	1.2297	0.6304	0.3388	0.2681	0.2788	0.0702

[0052] 由表1可知,抗PEG抗体和抗ADI抗体检测结果均为阳性,表明该方法得到的抗PEG抗体可以作为抗聚乙二醇-ADI蛋白交链区特异性抗体检测时的阳性质控。

[0053] 实施例

[0054] 实施例1:PA20家兔体内抗PEG抗体分析研究动物实验方案

[0055] 取6只2.0kg-3.0kg的新西兰兔,其中雌雄各三只,动物编号为:1M01、1M02、1M03、1F01、1F02、1F03。采用1.0mg/kg的PA20肌肉注射给药,每7天一次,共给药5次。每次给药前(0D、7D、14D、21D、28D)耳缘静脉采血约1.0mL/只,不抗凝,待血液凝固后进行离心分离血清,分装保存于-20℃以下,得到30组样本。

[0056] 参照图4,一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法,其用于全面评价上述

动物编号的新西兰兔体内产生的PEG抗体的PEG抗原区免疫原性,其中,PEG抗原区包括PEG甲氧基、PEG乙二醇骨架、PEG-被修饰物交链区。该方法包括以下步骤,

[0057] S1检测抗PEG总抗体,采用第一间接ELISA方法检测样本中抗PEG总抗体,得到抗体阳性的总抗阳性样本;

[0058] S2检测抗PEG抗体类别,采用第二间接ELISA方法检测阳性样本中的IgG抗体亚型和IgM抗体亚型,得到IgG抗体阳性和IgM抗体阳性的抗体阳性样本;

[0059] S3检测PEG抗原区类别,采用针对不同PEG抗原区的特异性ELISA酶联方法和第三阳性质控,检测并分析抗体阳性样本的PEG抗原区类别。

[0060] 在S3中,第三阳性质控为抗PEG甲氧基抗体、抗PEG乙二醇骨架抗体和抗PEG-被修饰物交链区抗体。特异性ELISA方法包括第三间接ELISA方法和竞争ELISA方法。

[0061] 实施例2:检测抗PEG总抗体

[0062] 采用改良的第一间接ELISA方法,将1 μ g/mL的mPEG-20KD-BSA包被于酶标板上,100 μ L/孔,2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C过夜。PBST洗板缓冲液洗板三次后,3%BSA封闭,250 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置2h。采用抗PEG多抗(购于Abcam)作为阳性质控,将其用空白兔血清稀释至500ng/mL、125ng/mL、31.2ng/mL,然后用2%BSA作为稀释液稀释20倍作为强阳性质控、中阳性质控、弱阳性质控。各组阳性质控的OD450nm值的检测结果见表2。

[0063] 表2

[0064]

阳性质控组别	阳性质控浓度 (ng/mL)	OD450nm
强阳性质控	500	1.7958
中阳性质控	125	0.9040
弱阳性质控	31.2	0.2399

[0065] 待测样本为实施例1的不同动物编号的新西兰兔在0D、7D、14D、21D、28D取出的30组样本。上述待测样本用2%BSA稀释20倍,100 μ L/孔加样于酶标板上,37 $^{\circ}$ C反应1h,PBST洗板3次后,加入ProteinG-HRP(1:1000),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C反应1h。PBST洗板3次后加入TMB底物液,室温显色10min后加50 μ L/孔的终止液。取样并在450nm处读数测量OD值,以检测出抗PEG抗体阳性的总抗阳性样本,OD450nm值检测结果见表3。

[0066] 表3

[0067]

动物编号	0D	7D	14D	21D	28D
1M01	0.0493	0.0444	0.0421	0.0531	0.0407
1M02	0.0757	0.5375	0.8115	1.8196	2.6494
1M03	0.0428	0.046	0.5206	1.7322	2.1714

[0068]

1F01	0.0576	0.0479	0.0635	0.0788	0.0776
1F02	0.0418	0.0451	0.0669	0.0508	0.0656
1F03	0.0481	0.0964	0.0809	0.0720	0.0468

[0069] 由表2和表3可知,空白平均OD值=0.0526,SD=0.0127,按公式Cutoff值=1.645*空白平均OD值+SD,计算得Cutoff值=0.0991。由于OD值高于Cutoff值判定为阳性,可知总

抗阳性样本为1M02-7D、1M02-14D、1M02-21D、1M02-28D、1M03-14D、1M03-21D、1M03-28D。

[0070] 实施例3:检测抗PEG抗体类别

[0071] 采用第二间接ELISA方法,进行IgG抗体亚型和IgM抗体亚型的确认。取实施例2中总抗阳性样本,分别以1:20、1:40、1:80的比例稀释,加入预包被mPEG-BSA的酶标板中。第二阳性质控为抗PEG IgG兔单抗200ng/mL、40ng/mL、8ng/mL和抗PEG IgM小鼠单抗500ng/mL、125ng/mL、31.2ng/mL。各组阳性质控的OD450nm值的检测结果见表4。

[0072] 表4

[0073]

IgM阳性质控浓度 (ng/mL)	OD450nm	IgG阳性质控浓度 (ng/mL)	OD450nm
500	1.6194	200	1.9272
125	0.7584	40	1.0487
31.2	0.3269	8	0.5412

[0074] 37℃反应1h后,用洗板机洗板3次,在酶标板中分别加入山羊抗兔IgG-HRP (1:5000)、山羊抗兔IgM-HRP (购于Abcam,1:40000),100μL/孔,37℃反应1h后,再次洗板3次,加入TMB底物液室温避光反应10min后,加50μL/孔终止液。取样并在450nm处读数测量OD值,以检测出IgG抗体亚型和IgM抗体亚型阳性的抗体阳性样本,OD450nm值检测结果见表5。

[0075] 表5

[0076]

动物 编号	抗体 亚型	样品稀释倍数											
		7D			14D			21D			28D		
		1:20	1:40	1:80	1:20	1:40	1:80	1:20	1:40	1:80	1:20	1:40	1:80
1M02	IgG	1.0911	0.7962	0.3286	1.4595	1.1583	0.8147	2.4627	1.6029	1.1532	2.5449	2.1879	1.6343
	IgM	0.0923	0.0811	0.1056	0.0887	0.0919	0.1042	0.0856	0.0916	0.1057	0.0856	0.0966	0.1209
1M03	IgG	/	/	/	1.1646	0.8232	0.2792	2.0889	1.429	0.8673	2.3708	1.8317	1.352

[0077]

	IgM	/	/	/	0.0799	0.0964	0.0905	0.0949	0.0722	0.0735	0.0817	0.0859	0.0949
--	-----	---	---	---	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

[0078] 由表4和表5可知:IgM抗体均为阴性,IgG抗体均为阳性,说明体内产生的抗PEG抗体均为IgG抗体。

[0079] 实施例4:与实施例3的不同之处在于,第二间接ELISA方法用于检测抗体中的IgE抗体和IgA抗体的类别。

[0080] 采用第二间接ELISA方法,进行IgE抗体亚型和IgA抗体亚型的确认。取实施例2中总抗阳性样本,分别以1:20和1:40稀释,加入预包被mPEG-BSA的酶标板中。第二阳性质控为抗PEG IgE兔单抗200ng/mL、40ng/mL、8ng/mL和抗PEG IgA小鼠单抗500ng/mL、125ng/mL、

31.2g/mL,检测各组阳性质控的OD450nm值。37℃反应1h后,用洗板机洗板3次,在酶标板中分别加入山羊抗兔IgE-HRP (1:5000)、山羊抗兔IgA-HRP,100μL/孔,37℃反应1h后,再次洗板3次,加入TMB底物液室温避光反应10min后,加50μL/孔终止液,取样并在450nm处读数测量OD值。

[0081] 实施例5:第三间接ELISA方法检测PEG抗原区特异性

[0082] 用包被液(50mmol/L碳酸盐,PH9.6)将mPEG-20KD-NH₂、OH-PEG-20KD-NH₂(购于键凯科技)、PEG-20KD-Lys均稀释成10μg/mL,取上述溶液100μL/孔包被于96孔酶标板,2℃-8℃包被过夜。用洗涤缓冲液洗板三次,拍干剩余水分,用2%BSA封闭250μL/孔,37℃作用2h。待测样品1:20、1:40倍稀释,100μL/孔,37℃作用1h。然后洗板5次,取HRP标记抗山羊抗兔IgG抗体(1:10000)、HRP标记山羊抗兔IgG-HRP抗体(1:5000)均以100μL/孔加至酶标板上。37℃孵育1h后,洗涤缓冲液洗板5次,每次60秒,拍干,加TMB底物液A液50μL/孔、B液50μL/孔,室温避光反应10min后,2mol/L硫酸50μL/孔终止反应。取样并在450nm处读数测量OD值,以检测出抗体阳性样本与PEG抗原区的特异性结合位点,OD450nm值检测结果见表6。

[0083] 表6

[0084]

动物 编号	PEG 抗原区	样品稀释倍数							
		7D		14D		21D		28D	
		1:20	1:40	1:20	1:40	1:20	1:40	1:20	1:40
1M02	PEG 甲氧基	0.7123	0.4038	0.7149	0.5175	2.2843	1.3014	1.9842	1.3096

[0085]

1M03	PEG 乙二醇 骨架	0.7995	0.4821	0.9621	0.5089	2.0687	1.4231	1.9451	1.2336
	PEG-被修饰 物交链区	0.8477	0.6057	1.3379	0.9136	2.3774	1.6535	2.4268	1.9441
	PEG 甲氧基	/	/	1.0175	0.6843	1.6014	1.4842	1.9096	1.2524
1M03	PEG 乙二醇 骨架	/	/	0.9379	0.6136	1.7774	1.5535	2.3348	1.7498
	PEG-被修饰 物交链区	/	/	1.081	0.7963	1.6527	1.4683	2.2942	1.5778

[0086] 由表6可知,1M02号动物包被甲氧基和骨架检测结果无明显差异,而包被交联区时OD值较高,说明1M02号动物产生的抗PEG抗体特异性结合区主要为PEG骨架部分,同时有少量抗体与交链区结合;1M03号动物包被甲氧基、骨架和交联区时OD值均无明显变化,说明1M03号动物产生的抗体特异性结合区为PEG骨架部分。

[0087] 实施例6:竞争ELISA方法检测PEG抗原区特异性

[0088] 用包被液将mPEG-BSA稀释成1μg/mL,并取上述溶液100μL/孔加入96孔酶标板,2℃-8℃包被过夜。用洗涤缓冲液洗板三次,拍干剩余水分,用2%BSA封闭,250μL/孔,37℃作

用2h。取待测样品1M02-28D和1M03-28D,分别用梯度稀释的mPEG-20KD-NH₂、OH-PEG-20KD-NH₂和PEG-20KD-Lys作为稀释液1:80稀释样品,浓度梯度为:200 μ mol/L、20 μ mol/L、2 μ mol/L、0.2 μ mol/L、0.02 μ mol/L、0 μ mol/L。37℃反应30min后,各取100 μ L/孔加入酶标板中,37℃作用1h后洗板,HRP标记抗山羊抗兔IgG抗体(1:10000)100 μ L/孔加样至酶标板。37℃孵育1h后洗板,加TMB底物液,室温避光反应10min后,加2mol/L硫酸,50 μ L/孔,终止反应。取样并在450nm处读数测量OD值,以检测出抗体阳性样本与PEG抗原区的特异性结合位点,OD450nm值检测结果见表7。

[0089] 表7

[0090]

动物编号	mPEG-20KD-NH ₂ 竞争剂浓度 (μ mol/L)					
	0	0.02	0.2	2	20	200
1M02-28D	1.7349	1.6327	1.4356	0.9239	0.6153	0.5328
1M03-28D	1.4962	1.0168	0.9073	0.6036	0.4249	0.3339
动物编号	OH-PEG-20KD-NH ₂ 竞争剂浓度 (μ mol/L)					
	0	0.02	0.2	2	20	200
1M02-28D	1.7349	1.5631	1.3978	0.9527	0.7626	0.5813
1M03-28D	1.4962	1.1106	0.856	0.5999	0.4873	0.3055
动物编号	PEG-20KD-Lys 竞争剂浓度 (μ mol/L)					
	0	0.02	0.2	2	20	200
1M02-28D	1.7349	1.4178	1.2757	0.8857	0.5709	0.2159

[0091]

1M03-28D	1.4962	1.0409	0.7582	0.5987	0.4165	0.3852
----------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

[0092] 由表7可知,1M02-28D样品在加入不同浓度的mPEG-20KD-NH₂或PEG-20KD-Lys竞争剂时,OD值降低幅度基本一致,加入含交链区竞争剂PEG-20KD-Lys时OD值降低幅度较大,说明样品1M02-28D中抗PEG抗体特异性结合PEG骨架区域,同时含有少量的交链区抗体;样品1M03-28D使用三种PEG竞争剂OD值降低幅度无明显变化,说明其抗PEG抗体的特异性结合区域为PEG骨架区。参照图5,竞争ELISA方法检测结果与第三间接ELISA方法检测结果基本一致。

[0093] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

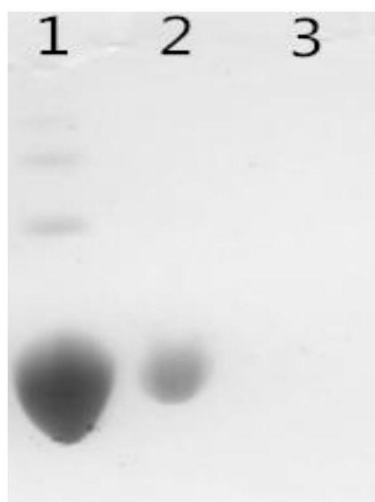


图1

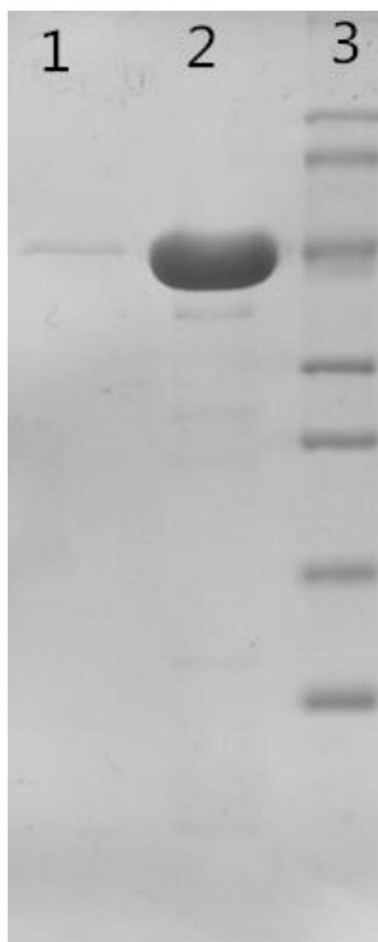


图2

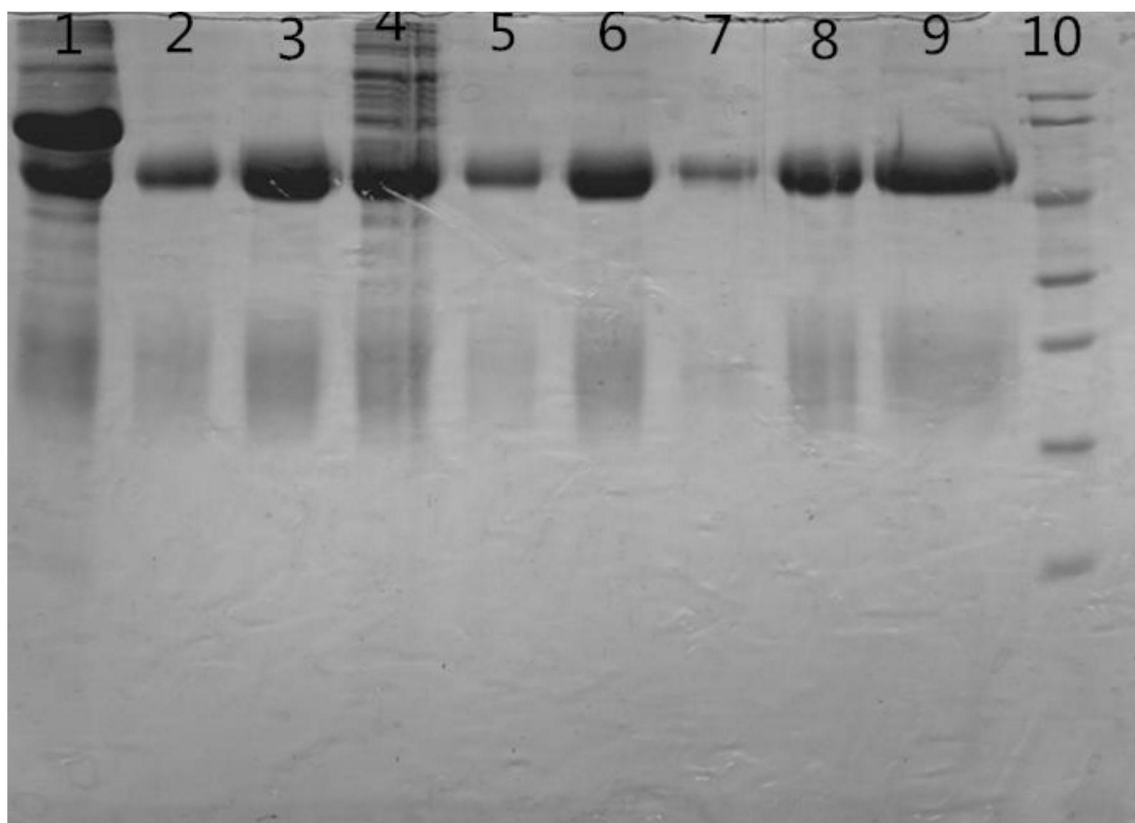


图3

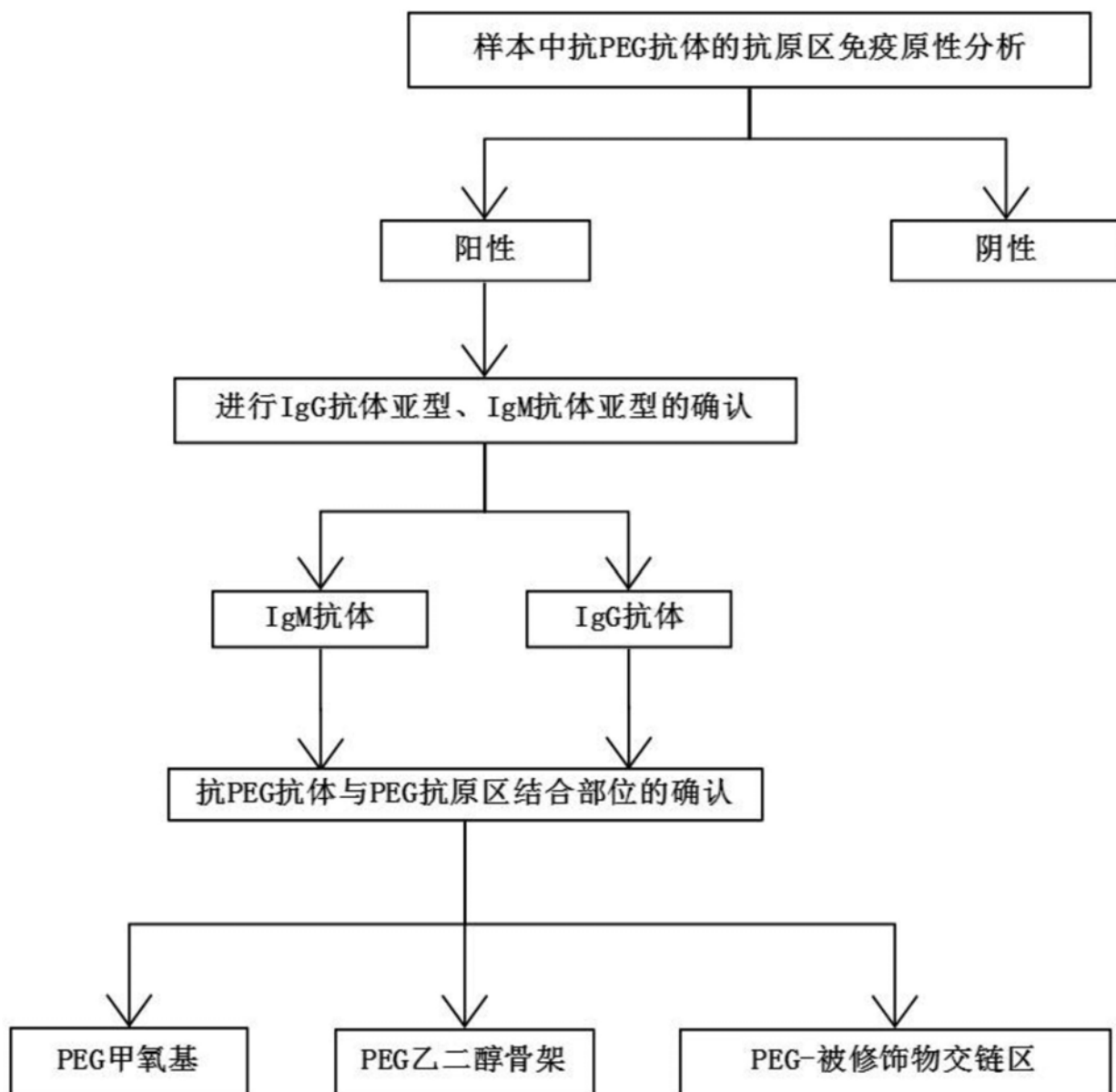


图4

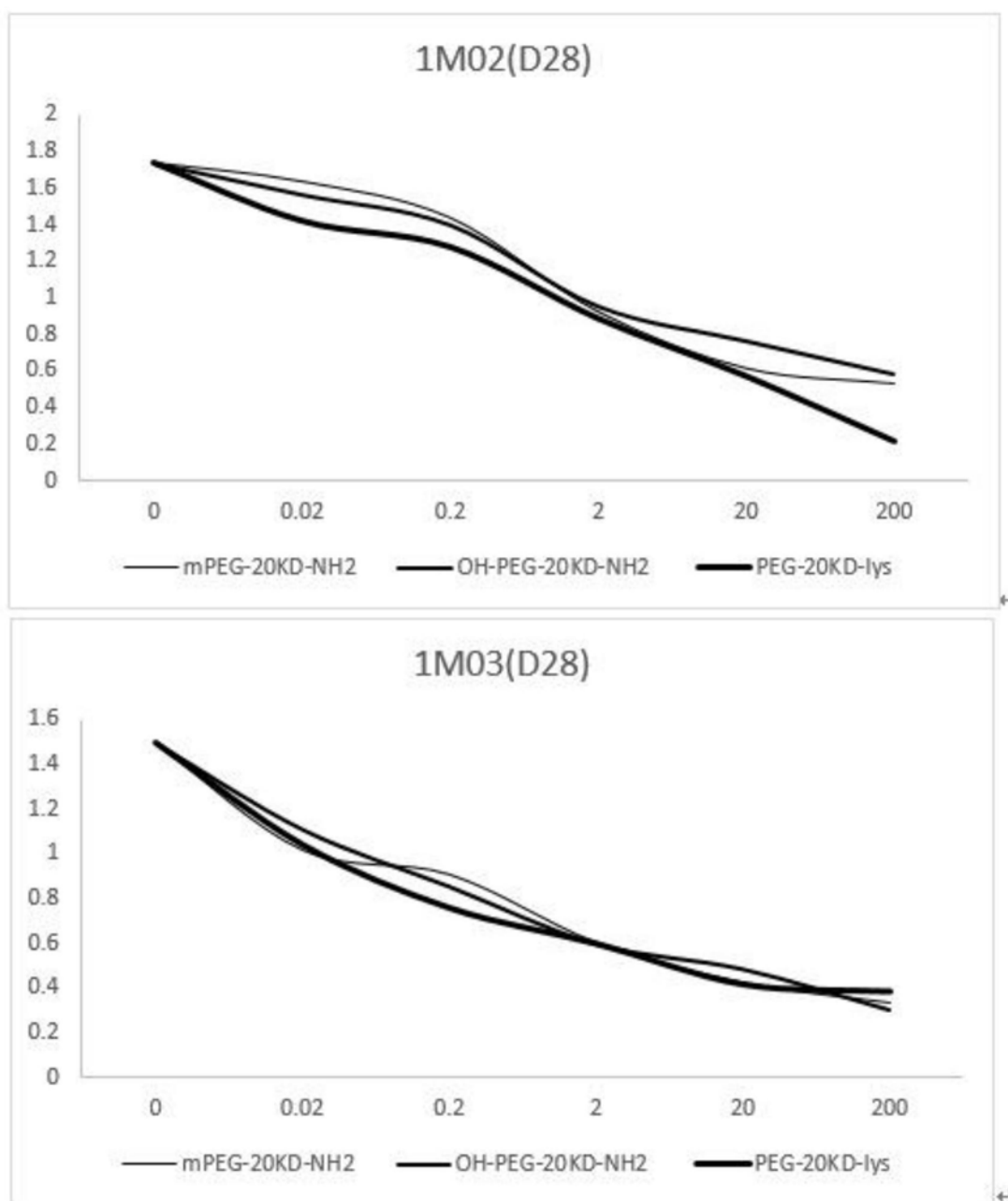


图5

专利名称(译)	一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法		
公开(公告)号	CN110376369A	公开(公告)日	2019-10-25
申请号	CN201910696013.X	申请日	2019-07-30
[标]发明人	白艳敏 刘日勇 陈清 何云凤 付志成 范开		
发明人	白艳敏 刘日勇 陈清 何云凤 付志成 范开		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/5304 G01N33/5306		
代理人(译)	罗庆		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种抗聚乙二醇抗体的抗原区免疫原性分析方法，其包括以下步骤，S1检测抗PEG总抗体；S2检测抗PEG抗体类别；S3检测PEG抗原区类别；所述PEG抗原区包括PEG甲氧基、PEG乙二醇骨架、PEG-被修饰物交链区。本发明通过依次分析样本中的IgG抗体和IgM抗体类别、以及PEG抗原区类别，达到了全面评价PEG抗原区的免疫原性的目的。

