



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107748253 A

(43)申请公布日 2018.03.02

(21)申请号 201710616069.0

(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 朱文娟 艾洪新 龙水清 刘西燕

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 范晴

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

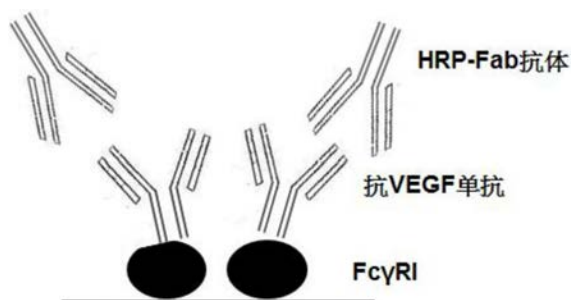
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种Fc γ RI受体的ELISA检测方法

(57)摘要

本发明要求保护一种Fc γ RI-CD64受体的ELISA检测方法,其包括在酶标板上包被Fc γ RI-CD64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;对免疫复合物进行梯度稀释加入包被好Fc γ RI-CD64的酶标板上孵育。与常规的ELISA方法相比,本方法为抗VEGF单抗与Fc γ RI-CD64结合活性的评估提供了一种新的分析方法。



1. 一种Fc γ RI受体的ELISA检测方法, 其特征在于, 其包括在酶标板上包被Fc γ RI-CD64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。

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, 对所述免疫复合物进行梯度稀释, 加入包被好Fc γ RI-CD64的酶标板上孵育。

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 γ RI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 γ RI (CD64) 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] 治疗性单克隆抗体被广泛用于肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病等治疗。单抗除具有特异性高、不良反应小和作用机制明确等特点外,半衰期长也是其独特的优势。当前的治疗性单抗大多为免疫球蛋白G(immunoglobulin G,IgG),已成为一种应对癌症及自身免疫性疾病的重要治疗手段。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,同时Fc还能结合FcRn从而延长单抗药品的半衰期。

[0004] 随着对单抗药效要求不断提高,选择合适的IgG亚型以及Fc区域改造是当今单抗研发的一个热点。体内许多细胞表面具有不同类Ig Fc的受体,通过Fc受体与Ig Fc的结合,参与Ig介导的生理功能或病理损伤过程。目前已鉴定明确属于CD抗原的Fc受体有Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32a,b,c)、Fc γ RIII (CD16a,b,c)。

[0005] Fc γ RI (CD64) 是大小为70kDa的穿膜糖蛋白,属Ig超家族成员,胞膜外区有3个C2结构,基因染色体定位于1q23~24。识别CD64的代表性McAb有McAb22、McAb32.2、197和10.1等。Fc γ RI (CD64) 是高亲和力受体,Kd值为 10^{-8} ~ 10^{-9} M,主要与人的单体IgG1、IgG3以及小鼠IgG2a和IgG3结合。与人IgG4结合的亲和力明显降低,与IgG2则无结合能力。Fc γ RI (CD64) 主要分布于单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等,但表达水平各不相同。Fc γ RI (CD64) 位点数:15000~40000/每个单核细胞,>50000/巨噬细胞,<1000/新鲜中性粒细胞。IFN- γ 可刺激单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞表达Fc γ RI (CD64) 水平增加5~10倍,G-CSF也有这种促进作用。

[0006] 近年来,生物膜干涉技术(biolayerinterferometry,BLI)、biacore技术等被用于Fc γ RI (CD64) 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] 本发明所要解决的技术问题是本发明创新性的利用夹心ELISA方法检测抗VEGF单抗与Fc γ RI (CD64) 受体的结合能力,使抗体样品体外与Fc γ RI (CD64) 受体的结合活性的检测能够更加简单易行。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 γ RI (CD64) 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。

[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 γ RI-CD64受体的结合活性,即一种Fc γ RI-CD64受体的ELISA检测方法,其包括在酶标板上包被Fc γ RI-CD64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;。与常规的ELISA方法相比,本方法为抗VEGF单抗与Fc γ RI (CD64) 结合活性的评估提供了一种新的分析方法。

[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,对免疫复合物进行梯度稀释,加入包被好Fc γ RI-CD64的酶标板上孵育。

[0011] 所述抗VEGF单抗包括但不限于为贝伐珠单抗BEVACIZUMAB (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:
C₆₆₃₈H₁₀₁₆₀N₁₇₂₀O₂₁₀₈S₄₄ 149kDa,其轻链氨基酸序列如下:

[0013] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF
TSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGGGTKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK;

[0014] 重链的氨基酸序列为:

[0015] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY
AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAKYP HYYGSSHWYF DVWGQGTLLT VSSASTKGPS
VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK
TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLDSDGSF
FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKQKSLSL PGK。

[0016] 本发明的一种重组人源化抗VEGF单克隆抗体是一种治疗性单克隆抗体制品,它可特异性结合血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF),并阻断VEGF的生物学活性,以抑制血管生成,从而达到抗肿瘤作用。采用重组DNA技术通过中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary,CHO)细胞表达系统生产的重组人源化单克隆IgG1抗体,包含93%的人源单抗序列和7%的可结合人VEGF的鼠源单抗互补决定区序列,重链由453个氨基酸组成,轻链由214个氨基酸组成,分子量大约为149kDa。

[0017] 本公司抗VEGF抗体Fc γ RI (CD64) 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

[0018] 图1为Fc γ RI (CD64) 受体与抗VEGF单抗结合活性检测方法检测原理图。

[0019] 图2为Fc γ RI (CD64) 与抗VEGF单抗结合曲线图。

[0020] 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

[0021] 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并不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。

[0022] 介绍和概述

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 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。

[0027] 实验材料及器材

[0028] 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)

[0029] 实验试剂:

[0030] 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 γ RIIA (H131)、Fc γ RIIA (R131)、Fc γ RIIB

[0031] 供试样品:所有供试品均由东曜药业有限公司提供。

[0032] 实施实例:以单个样品为例,阐述步骤如下:

[0033] 标准品与样品稀释:

[0034] 用样品稀释液将贝伐珠单抗先稀释到1~3 μ g/mL,再梯度稀释8~11个浓度。

[0035] 实验步骤:

[0036] (1)用100 μ l 1~5 μ g/ml抗原包被液加入酶标板各孔;用封口膜封口后,置于2~8 $^{\circ}$ C条件下孵育16~20小时。

[0037] (2)取出酶标板弃掉包被液后,用300 μ l洗液洗板机洗板2遍,将板在滤纸上拍干。

[0038] (3) 在每个孔中加入100 μ 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。

[0039] (4) 从微孔板振荡器上取下微孔板,倾倒内容物,拍干。每孔加300 μ l洗液洗板机清洗,拍干,重复4次。

[0040] (5) 对于包被好的微孔板,分别在工作孔中加梯度稀释的供试品100 μ l。用封口膜封口后,在室温条件下200rpm振摇孵育1~2h。

[0041] (6) 从微孔板振荡器上取下微孔板,倾倒内容物,拍干。每孔加300 μ l洗液洗板机清洗,拍干,重复6次。

[0042] (7) 每孔中加入100 μ l 5000~10000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。

[0043] (8) 从微孔板振荡器上取下微孔板,倾倒内容物,拍干。每孔加300 μ l洗液洗板机清洗,拍干,重复6次。

[0044] (9) 每个工作孔中分别加100 μ 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。

[0045] (10) 每孔分别加100 μ 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。

[0046] (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。

[0047] (12) 利用SOFTMAX软件进行曲线拟合计算,得到曲线方程。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。

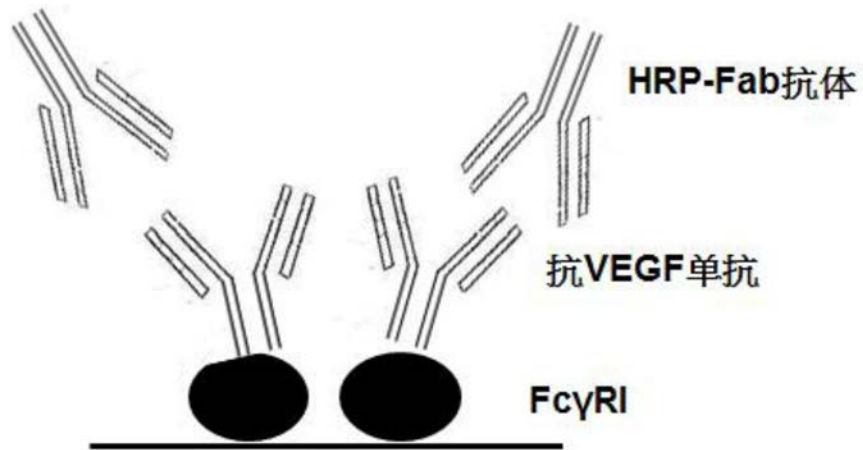


图1

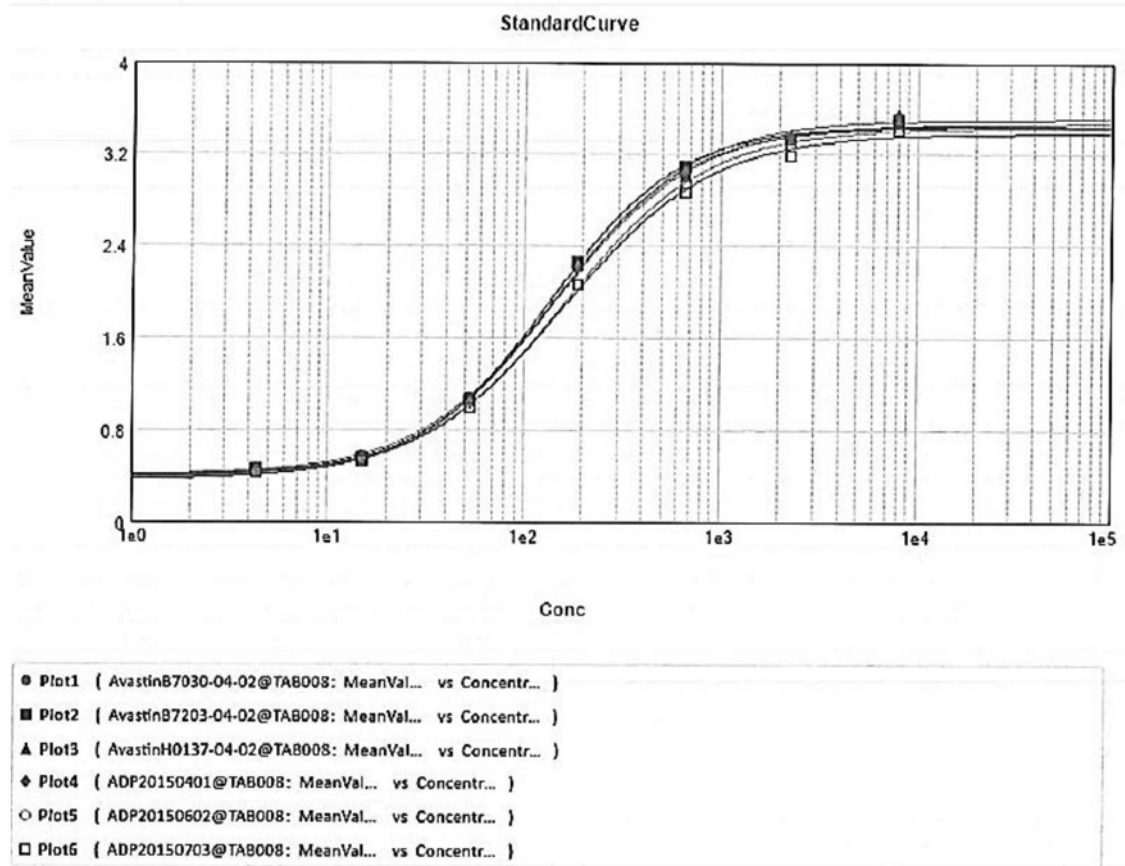
FcγRI(CD64)

图2

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS
RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPF
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKE
STYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG 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 RIPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL
NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYF
SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
CSVMHEALHN HYTQKSLSLG PGK

图3B

专利名称(译)	一种FcγRI受体的ELISA检测方法		
公开(公告)号	CN107748253A	公开(公告)日	2018-03-02
申请号	CN2017110616069.0	申请日	2017-07-26
[标]发明人	朱文娟 艾洪新 龙水清 刘西燕		
发明人	朱文娟 艾洪新 龙水清 刘西燕		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/68 G01N2333/70535		
代理人(译)	范晴		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明要求保护一种FcγRI-CD64受体的ELISA检测方法,其包括在酶标板上包被FcγRI-CD64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;对免疫复合物进行梯度稀释加入包被好FcγRI-CD64的酶标板上孵育。与常规的ELISA方法相比,本方法为抗VEGF单抗与FcγRI-CD64结合活性的评估提供了一种新的分析方法。

