(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102046815 A
(43)申请公布日 2011.05.04

(21)申请号 200980121159.6
(22)申请日 2009.06.01
(30)优先权数据
0801304-7 2008.06.02 SE
0950272-5 2009.04.24 SE
(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.12.01
(86)PCT申请的申请数据
PCT/SE2009/050637 2009.06.01
(87)PCT申请的公布数据
WO2009/148395 EN 2009.12.10
(71)申请人 通用电气健康护理生物科学股份公司
地址 瑞典乌普萨拉
(72)发明人 P·博格 A·弗罗斯特尔-卡尔森 M·哈马莱南 A·拉森
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 朱海煜 王忠忠
(51)Int.Cl.
C12Q 1/70(2006.01)
G01N 21/55(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/569(2006.01)

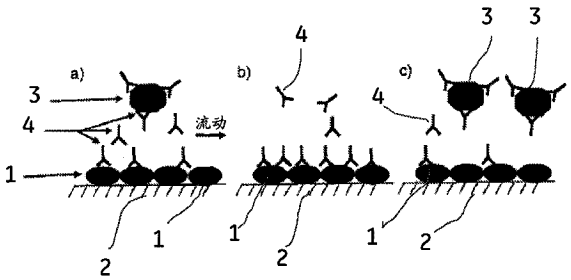
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 7 页

(54)发明名称

用于病毒检测的方法

(57)摘要

一种确定病毒或其抗原在样本中的浓度的方法，包括步骤：提供具有固定到其的病毒抗原或病毒抗原类似物的传感器表面，将该样本与已知量的对该病毒抗原的抗体进行混合以获得对该抗原的抗体在该样本混合物中的预定浓度，将该样本混合物与该传感器表面接触以将在该混合物中的自由抗体结合到该传感器表面，测量该传感器表面对自由抗体结合的响应，以及从通过测量包含该预定浓度抗体和不同浓度病毒的混合物所获得的响应而准备的校准曲线来确定该病毒或抗原在该样本中的浓度。



CN 102046815 A

1. 一种确定病毒或其抗原在样本中的浓度的方法，包括步骤：

提供具有固定到其的病毒抗原或病毒抗原类似物的传感器表面，

将所述样本与已知量的对所述病毒抗原的抗体混合以获得在所述样本混合物中的预定浓度的对所述抗原的抗体，

将所述样本混合物与所述传感器表面接触以将所述混合物中的自由抗体结合到所述传感器表面，

测量所述传感器表面对自由抗体结合的响应，以及

从校准曲线确定病毒或抗原在样本中的浓度，该校准曲线通过测量对于混合物所获得的响应来准备，该混合物包含预定浓度抗体和不同浓度病毒或病毒抗原。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中多个分析循环采用中间再生来在所述传感器表面上执行，并且对每个分析循环计算虚拟校准曲线。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中计算校准曲线包括：

使用循环数作为 x 和响应作为 y 将所述曲线中的已知浓度中的每个拟合到双指数方程，

使用这些方程用于计算每个循环的虚拟校准曲线以及，

从该特定循环的虚拟校准曲线确定所述病毒或抗原在所述样本中的浓度。

4. 如权利要求 1、2 或 3 所述的方法，其中确定至少两个、优选地至少三个不同的病毒或病毒抗原在样本中的浓度，并且其中样本和对相应病毒抗原具有选择性的抗体的混合物在单独分析循环中连续地与传感器表面接触，所述传感器表面具有一个不同的固定到其的抗原或类似物。

5. 如权利要求 1、2 或 3 所述的方法，其中确定至少两个、优选地至少三个不同的病毒或抗原在样本中的浓度，并且其中样本和对相应病毒抗原具有选择性的抗体的混合物与具有分离的感测区域的传感器表面接触，所述感测区域具有固定到其的相应抗原或类似物。

6. 如权利要求 1、2 或 3 所述的方法，其中确定至少两个、优选地至少三个不同的病毒或抗原在样本中的浓度，并且其中样本和对相应病毒抗原具有选择性的抗体的混合物与传感器表面接触，所述传感器表面包括固定到相同感测区域的相应抗原的混合。

7. 如权利要求 1、2 或 3 所述的方法，其中确定至少两个、优选地至少三个不同的病毒或病毒抗原在样本中的浓度，并且其中样本和对相应病毒抗原具有选择性的抗体的混合物在单个分析循环中与具有分离的感测区域的传感器表面接触，所述感测区域具有固定到其的相应抗原或类似物。

8. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的方法，其中对所述病毒的抗体包括对所述病毒或病毒抗原的血清。

9. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法，其中所述病毒是流感病毒。

10. 如权利要求 4 至 9 中任一项所述的方法，其中所述不同的病毒从流感病毒类型和亚型选择。

11. 如权利要求 1 至 10 中任一项所述的方法，其中所述病毒抗原包括血凝素。

12. 如权利要求 1 至 11 中任一项所述的方法，其中所述样本从流感疫苗生产得到。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述样本从多价流感疫苗得到。

14. 如权利要求 11 至 13 中任一项所述的方法，其中所述固定的血凝素是流感病毒类型

或亚型的多个不同菌株的属。

15. 如权利要求 11 至 13 中任一项所述的方法，其中所述固定的血凝素从流感病毒类型或亚型的至少 2 个不同菌株得到。

16. 如权利要求 13、14 或 15 所述的方法，其中所述多价流感疫苗是三价的并且从流感 A/H1N1、A/H3N2 和 B 菌株得到。

17. 如权利要求 1 至 16 中任一项所述的方法，其中在所述传感器表面上的结合相互作用通过质量感测、优选地隐失波感测、特别地表面等离子体振子共振 (SPR) 来检测。

18. 一种确定病毒或病毒抗原在多价流感疫苗中的含量的方法，包括步骤：

将每个病毒类型或亚型的血凝素固定在生物传感器感测表面的相应分开的感测区域上，

将所述疫苗的样本与对所述疫苗中的所述病毒类型或亚型中的每个的固定浓度的抗血清混合，

在单个分析循环中，使所述混合物与所述传感器表面接触以使自由抗血清结合到相应感测区域并且测量在每个感测区域处对所述结合的响应，以及

从对于不同的病毒类型或亚型的校准曲线确定每个病毒类型或亚型或其抗原在所述样本中的含量。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其中校准曲线的准备包括步骤：

a) 通过对于所述不同的病毒类型或亚型，将对每个病毒类型或亚型的固定浓度的标准抗血清与预定量病毒或病毒抗原进行混合来准备校准物混合物，

b) 使所述传感器表面与所述混合物接触以使自由抗血清结合到相应感测区域并且测量在每个感测区域处的响应，

c) 对包含对于所述不同的病毒类型或亚型的不同量病毒或病毒抗原的混合物重复步骤 a) 和 b)，以及

d) 计算每个病毒类型或亚型的校准曲线。

用于病毒检测的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及在含病毒或病毒来源介质中病毒或病毒抗原的检测和定量化，特别地涉及在疫苗制造和工艺开发中病毒抗原浓度的确定。

背景技术

[0002] 流感病毒一般基于它们的核蛋白质和基质蛋白质抗原之间的抗原区别分为三个类型 A、B 和 C。流感 A 病毒以两个主要表面糖蛋白血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA)（其表现为在病毒体的表面上的刺突）为基础进一步分为亚型。

[0003] 宿主细胞的感染以病毒 HA 与细胞上的唾液酸结构 (sialic structure) 的结合开始，使病毒颗粒粘附到细胞表面并且引起病毒摄取。RNA 和病毒蛋白质被复制并且组合成新病毒颗粒，其从细胞芽生。子代病毒颗粒通过在病毒上的酶 NA 分裂末端唾液酸残基 (terminal sialic residue) 而从细胞表面释放。

[0004] 当前，有 15 个不同的 HA 亚型 (H1-H15) 和 9 个不同的 NA 亚型 (N1-N9)。流感 A 病毒的亚型根据它们的 HA 和 NA 表面蛋白质命名，例如 H1N1、H1N2、H3N2、H5N1。流感 B 病毒和流感 A 的亚型进一步表征为菌株 (strain)，例如 B Malaysia、H3N2 Heijing、H1N1 Taiwan。

[0005] HA 和 NA 都携带抗原决定基 (antigenic epitope)。提出的预防 HA 和 NA 的抗体减小人和动物中传染或疾病的风险。尽管第一个流感疫苗包含灭活或杀死的整体病毒颗粒，商业上可用的流感疫苗通常是两种类型，“裂解疫苗”和“亚单位疫苗”。

[0006] 裂解疫苗通过采用乙醚或洗涤剂的纯化病毒颗粒的裂变 (disintegration) 并且然后洗涤剂与大块病毒脂质材料的去除来制备。裂解疫苗由此基本包含与整体病毒疫苗相同的成分并且处于相同的比例。在另一方面，在亚单位疫苗中，表面糖蛋白 HA 和 NA 分别纯化然后组合成疫苗。

[0007] 流感病毒可以采用两个不同的方式改变，通过“抗原性漂移”和通过“抗原性转换”。抗原性漂移产生可能不被身体的免疫系统认出的新病毒菌株，而抗原性转换是流感 A 病毒中的突然重大变化，导致新血凝素和神经氨酸酶蛋白质并且产生新流感 A 亚型。在大多数年份中，流感疫苗中的三个病毒菌株中的一个或两个被更新以跟上正传播的流感病毒的变化。

[0008] 流感病毒通常是多价的 (multivalent、polyvalent)，即，疫苗从相同种类的病毒的一个或多个菌株的培养来制备。当前，流感 A/H1N1、A/H3N2 和流感 B 菌株典型地包括在每年的流感疫苗中。

[0009] 疫苗预防流感的效力主要由免疫原 HA 在疫苗中的量决定。疫苗中的 HA 浓度典型地通过单径向免疫扩散 (SRID) 测定确定。在 SRID 中，流感病毒粒子由洗涤剂破裂，并且跟从整个病毒或纯化病毒抗原扩散进入包含特定抗血凝素（抗 HA）抗体的琼脂糖凝胶中。该所得的抗原 / 抗体反应或区域（通过染色可见）直接与在制备中的 HA 抗原的数量成比例。然而，SRID 测定具有许多缺点。除具有高检测极限（大约 20μg/ml）与高变动（大约 10％）外，它是费力的并且具有低处理能力。尽管存在它的短处，然而，SRID 仍然是由欧洲

药典和 WHO 推荐并且由流感疫苗评价的监管机构批准的方法。由于该方法差的精确度，疫苗剂量通常由制造商“过量灌装”。

[0010] 用于流感病毒定量化的其他方法包括反相高效液相色谱法 (RP-HPLC)。

[0011] 并且基于生物传感器的方法已经开发用于包括流感病毒的病毒的检测。

[0012] EP0276142 A1 公开用于在涂敷金的衍射光栅上使用表面等离子体振子共振 (SPR) 检测流感 A 病毒的方法。对于流感 A 病毒的分离决定子 (determinant) 的单克隆抗体固定在金表面上，并且施加并且培养病毒。对于流感 A 病毒决定子的单克隆抗体然后用该表面培养，并且当第二抗体结合到流感病毒颗粒时获得的增强响应被检测。

[0013] JP3054467A 公开通过压电振动器测量病毒浓度，其中压电振动器的电极涂有对病毒的表面抗原的抗体。当抗原结合到电极时，振动器的振动频率变得更低。

[0014] Shofield, D. J. 和 Dimmock, N. J., J. Virol. Methods 62(1996)33-42 公开用于流感病毒检测的 SPR 生物传感器仪器的使用。用于捕获流感病毒的单克隆抗体偶联于涂有羧化葡聚糖的传感器芯片。流感病毒然后注入仪器流动系统以接触该传感器芯片，并且监测与固定抗体的结合亲和力。

[0015] Boltovets, P. M 等, J. Virol. Methods 121(2004)101-106 公开使用表面等离子体振子共振 (SPR) 通过检测在预培养步骤期间形成的病毒抗原和抗体之间的复合物与具有固定蛋白质 A 的 SPR 传感器表面的结合来检测植物病毒。

[0016] Jie Xu 等, Analytical and Bioanalytical Chemistry 389,4(2007)1193-1199 公开用于检测禽流感的干涉生物传感器免疫测定。整个病毒颗粒由在波导表面上的抗原特定（血凝素）抗体（多克隆和单克隆两者）捕获，并且测量由该结合引起的屈光变化 (refraction change)。测试了三个流感病毒亚型（两个 H7 和一个 H8)。

[0017] 然而，所有这些其他方法都苦于相当大的缺点。因此需要有用于在粗制的以及在纯化样本中准确确定流感病毒的浓度（具体地 HA 浓度）的改进的方法和手段。

发明内容

[0018] 本发明的一个目的是提供用于检测和定量化病毒（特别是流感病毒）的方法，其没有现有技术方法的缺点，并且其特别具有高精确度、高检测范围，并且比标准 SRID 测定更不费力。

[0019] 本发明的另一个目的是提供适合在疫苗生产中定量化在过程样本和最终疫苗样本两者中的病毒或病毒抗原的方法。

[0020] 这些目的以及其他目的和优势用根据权利要求 1 的方法获得。

[0021] 根据本发明的方法基于生物传感器技术和抑制型测定形式的使用。

[0022] 大体上，确定病毒或病毒抗原在样本中的浓度的方法包括步骤：

[0023] 提供具有固定到其的病毒抗原或病毒抗原类似物的传感器表面，

[0024] 将该样本与已知量的对该病毒抗原的抗体混合以获得对该抗原的抗体在样本混合物中的预定（总）浓度，

[0025] 将样本混合物与传感器表面接触以将混合物中的自由抗体结合到传感器表面，

[0026] 测量传感器表面对自由抗体结合的响应，以及

[0027] 从校准曲线确定病毒或抗原在样本中的浓度，该校准曲线通过测量对于混合物所

获得的响应来准备，该混合物包含预定浓度抗体和不同浓度病毒或病毒抗原。

[0028] 优选的，用中间再生在传感器表面上执行多个分析循环，并且对每个分析循环计算虚拟校准曲线。这通过下列完成：

[0029] 使用循环数作为 x 和响应作为 y 将曲线中的已知浓度中的每个拟合到双指数方程，

[0030] 使用这些方程用于计算每个循环的虚拟校准曲线，以及

[0031] 从该特定循环的虚拟校准曲线确定病毒或抗原在样本中的浓度。

[0032] 病毒抗原可以是内部抗原，或优选地病毒的表面抗原。可选地，病毒抗原是整个病毒颗粒。病毒抗原类似物可例如是合成肽。

[0033] 优选地，样本包含多个不同的病毒或病毒类型，其由该方法同时确定。

[0034] 如本文使用的术语“抗体”指免疫球蛋白，其可以是天然的或部分或完全合成地产生并且还包括活性片段，其包括 Fab 抗原结合片段、单价片段和二价片段。该术语还涵盖具有与免疫球蛋白结合域同源 (homologous) 的结合域的任何蛋白质。这样的蛋白质可以从天然源得到，或部分或完全合成地产生。示范性抗体是免疫球蛋白同型抗原和 Fab、Fab’、$F(ab')_2$、scFv、Fv、dAb 和 Fd 片段。

[0035] 典型地，抗体是病毒或病毒抗原的血清。

[0036] 在一个实施例中，传感器芯片具有多个感测区域，并且对于相应病毒或病毒类型特定的病毒抗原或类似物固定在分离的感测区域上。样本与固定量的对一个病毒的抗体混合，混合物然后仅与具有对该抗体特定的抗原的感测区域接触，或（假如该抗体不与其他抗原或类似物交叉反应）与所有感测区域接触，并且检测响应。这对其他抗体和感测区域连续地重复。

[0037] 在另一个实施例中，传感器芯片具有单个感测区域，或仅使用具有多个感测表面的传感器芯片的单个感测区域。在该情况下，病毒抗原或类似物共同固定在单个感测区域上，样本与固定量的相应抗体混合（一次一个），并且相应混合物与该感测区域连续地接触。

[0038] 然而，在优选实施例中，假如抗体是选择性的，其缺乏对其他病毒或抗原的交叉反应性，所有不同的抗体与样本混合，其然后与具有多个感测区域（每个具有相应固定的病毒抗原或类似物）的传感器芯片接触，并且检测不同感测区域的响应。传感器表面可备选地包括固定到相同感测区域的相应抗原的混合。这样，在样本中的所有病毒或病毒抗原可在单个分析循环中检测。

[0039] 在要定量化的样本中的病毒或病毒抗原优选地是不同的流感病毒类型或其的抗原，优选地血凝素。

[0040] 固定的血凝素可以是流感病毒类型或亚型的若干菌株的属或从流感病毒类型或亚型的至少 2 个不同菌株得到。

[0041] 一般，在生物传感器测定中，当分析物（这里是样本中的自由抗体）已经结合到在传感器表面上的固定配体（这里是病毒抗原或类似物）时，结合的抗体通过合适的流体处理而释放以准备用于与新样本接触的表面，称为再生的过程。通常，传感器表面可以经受相当大量的分析循环。然而，许多配体（例如病毒抗原）常常具有差的稳定性，其使表面的分析物结合能力随循环数而减小，并且可妨碍配体对于定量目的的使用。尽管结合能力上的

较少减小常常可以通过频繁校准补偿，这显著减小处理能力。

[0042] 本发明的方法因此包括规格化步骤，其中每个分析循环使用虚拟校准曲线评价（即每个循环获得唯一的校准曲线），从而最小化在漂移期间频繁校准的需要并且显著提高定量测量的质量。

[0043] 本发明的更完整理解以及其的另外的特征和优势将通过参考下列详细说明和图获得。

附图说明

[0044] 图 1 是在样本中具有不同的病毒浓度的三个情况 (a-c) 的在传感器表面上抑制型病毒测定的示意图示；

[0045] 图 2 是与图 1 相似的示意图示，其中三个不同的病毒抗原固定到传感器表面上相应分开的点，以及对于每个抗原特定的三个不同的抗体用于定量化；

[0046] 图 3 是示出在传感器表面上具有固定流感病毒抗原的抑制型测定中测量的相对响应 / 稳定性与不同流感病毒 / 抗血清混合物的浓度的关系的图。

[0047] 图 4 是示出对于多个不同的流感病毒抗血清 (influenza virus anti-sera) 与具有固定流感病毒抗原的传感器表面的结合的所测量的相对响应与分析循环数的关系的图。

[0048] 图 5 是示出在具有固定病毒抗原的传感器表面上运行的抑制型测定中对于在四个普通校准的病毒对照样本的七个浓度的基于作为 x 的循环数和作为 y 的测量响应的拟合规格化曲线的图。这些规格化曲线用于每个循环的虚拟浓度的预测。这些虚拟浓度然后用于使用虚拟浓度作为 x 和已知浓度作为 y 的循环特定校准曲线的构建。

[0049] 图 6 是示出在具有固定病毒抗原的传感器表面上运行的抑制型测定中对于以不同循环数、采用四个普通校准的两个不同的对照样本浓度的所计算的浓度与分析循环数的关系的图。

[0050] 图 7 是示出每个循环的虚拟校准曲线（根据图 5）应用于如在图 6 中对于两个对照样本浓度的相同原始数据的图。

[0051] 图 8 是与图 7 相似的图，示出对照样本的测量的结合数据和由虚拟校准曲线对每个循环规格化的对应数据。

[0052] 图 9A-C 示出在用于同时检测三个不同病毒类型的测定中准备的校准曲线。

具体实施方式

[0053] 如上文提到的，本发明涉及使用生物传感器技术和抑制型测定形式的样本介质中的至少一个病毒或病毒抗原的检测和定量化的方法。

[0054] 首先，关于生物传感器技术，生物传感器大体上限定为使用与固态物理化学换能器直接结合的用于分子识别的部件（例如具有固定抗体的层），或具有与该换能器结合的可移动载体珠 / 颗粒的装置。尽管这样的传感器典型地基于检测固定层的质量、折射率或厚度的变化的无标记技术，也存在依赖于一些种类的标记的生物传感器。用于本发明的目的的典型传感器包括但不限于质量检测方法，例如光学方法和压电或声波方法，其包括例如表面声波 (SAW) 和石英晶体微天平 (QCM) 方法。代表性的光学检测方法包括检测质量表面浓度的那些方法，例如反射光学方法等，其包括外部和内部反射方法，其可以是角度、波

长、偏振或相位分辨型的，例如隐失波椭圆光度法 (evanescent wave ellipsometry) 和隐失波光谱学 (EWS，或内部反射光谱学)（其两个都可包括通过表面等离体振子共振 (SPR) 的隐失场增强）、布儒斯特角屈光计检查法 (Brewster angle refractometry)、临界角屈光计检查法、受抑全反射 (FTR)、散射全内反射 (STIR)（其可包括散射增强标记）、光学波导传感器、外部反射成像、基于隐失波成像（例如临界角分辨成像、布儒斯特角分辨成像、SPR 角分辨成像等）。此外，可能提到基于例如表面增强拉曼光谱学 (SERS)、表面增强共振拉曼光谱学 (SERRS)、隐失波荧光 (TIRF) 和磷光的光度测定和成像 / 显微术方法（“本身”或与反射方法结合），以及波导干涉仪、波导泄漏模式光谱学、反射干涉光谱学 (RIfS)、透射干涉量度法、全息光谱学和原子力显微术 (AFR)。

[0055] 基于 SPR 以及包括 QCM 的其他检测技术的生物传感器系统例如是商业上可获得的，两者例如具有一个或多个流动池 (flow cell) 的流通系统和如基于试管的系统。具有多个感测表面和流动系统的示范性 SPR- 生物传感器包括 Biacore™ 系统 (GE Healthcare，乌普萨拉，瑞典）和 ProteOn™ XPR36 系统 (Bio-Rad 实验室）。这些系统准许实时监测结合的配体和感兴趣的分析物之间的表面结合相互作用。在该上下文中，“配体”是具有对给定分析物的已知或未知亲和力的分子并且包括固定在表面上的任何捕获或捕捉试剂，而“分析物”包括与其的任何特定结合搭配物。

[0056] 关于 SPR 生物传感器，SPR 的现象是众所周知的。可以说当光在某些条件下在不同折射率的两个介质之间的界面处反射时 SPR 出现，并且该界面涂敷有金属膜，典型地银或金。在 Biacore™ 系统中，介质是样本和传感器芯片的玻璃，其通过微流体流动系统与样本接触。金属膜是在芯片表面上的薄金层。SPR 使反射光的强度在特定反射角处降低。该最小反射光强度的角度随反射光的相反侧（在 Biacore™ 系统中的样本侧）上的表面附近的折射率而变化。来自该系统的输出是“传感图”，其是检测器响应作为时间的函数的图。

[0057] Biacore® 仪器和 SPR 现象的技术方面的详细论述可在美国专利号 5,313,264 中找到。关于生物传感器感测表面的基质涂层的更详细信息在例如美国专利号 5,242,828 和 5,436,161 中给出。另外，与 Biacore® 仪器连同使用的生物传感器芯片的技术方面的详细论述可在美国专利号 5,492,840 中找到。上文提到的美国专利的全部内容通过引用结合于此。

[0058] 尽管在接着的示例中，本发明在 SPR 光谱学（更具体地 Biacore™ 系统）的上下文中说明，要理解本发明不限于该检测方法。相反，可采用任何基于亲和力的检测方法，其中分析物结合到固定在感测表面上的配体，假如可以测量在感测表面处的变化，其是分析物与其上的固定配体的结合的定量指示。

[0059] 现在说明检测和定量化测定。一般，在抑制型测定（也叫做溶液竞争）中，已知数量的检测分子（这里是抗体）与样本（这里是病毒）混合，并且测量自由检测分子在混合物中的数量。更具体地，在本生物传感器上下文中用于浓度测量的抑制型测定可典型地包括下列步骤：

[0060] 1. 作为配体，分析物或其衍生物附着到传感器表面。

[0061] 2. 恒定浓度（其可以是已知或未知的）的检测分子添加到不同浓度的校准物溶液（分析物）。

[0062] 3. 该混合物与传感器表面接触（在流动系统中在表面上注入）并且测量响应。

[0063] 4. 计算校准曲线。

[0064] 5. 然后通过将样本（分析物）与恒定浓度的检测分子混合进行测量，样本与传感器表面接触（在流动系统中在表面上注入）并且测量响应。

[0065] 6. 该校准曲线用于计算样本中的分析物浓度。自由检测分子的数量与分析物在样本中的浓度逆相关。

[0066] 7. 表面再生并且可以注入新样本。

[0067] 在本发明的方法中，配体是病毒抗原，优选地表面抗原（或可选地整个病毒），而分析物是该抗原的抗体。该抗体可以是多克隆的（例如血清）或单克隆的。由于抑制型测定形式，避免大病毒颗粒到表面的扩散影响。

[0068] 为了没有任何对其限制的说明的目的，本发明将在下面关于确定至少一个流感病毒在样本中的浓度并且更特别地在三价流感疫苗中的三个不同病毒类型的血凝素 (HA) 的浓度描述。参照在附图中的图 1 至 9。

[0069] 如在图 1a 中示意描绘的，由标号 1 标明的纯化病毒 HA 固定在生物传感器传感器表面 2 上。使病毒颗粒 3 和含抗血清的抗体 4 的混合物作为液流在传感器表面 2 上通过。如在图 1a 中图示的，抗体 4 可以结合到病毒颗粒或结合到固定的 HA 抗原或在溶液中是自由的。结合到传感器表面增加来自传感器表面的响应信号。

[0070] 图 1b 图示当在样本中没有病毒存在时的情况。最大数量的抗体 4 然后结合到在传感器表面上的 HA 抗原 1，导致高响应信号。

[0071] 在图 1c 中，在另一方面，高浓度的病毒颗粒 3 导致低量自由抗体 4，并且因此测量到低响应信号。从而，在样本中病毒的浓度越高，到表面 HA 的结合抗体的数量越低，导致较低的响应水平。

[0072] 如果传感器表面具有或能够提供多个分离的感测区域或“点”，例如三个或更多等，例如如在图 2 中示意图示的可固定三个不同 HA 的，其中对于病毒类型 / 亚型 A/H1N1、A/H3N2 和 B（其典型地使用在当前流感疫苗中）特定的 HA 固定到在传感器表面上的相应点。

[0073] 如将在下文证明的，不同病毒抗血清到 HA 的结合是选择性的，即在不同的病毒类型或亚型之间没有交叉反应性。由于该选择性，在样本中的两个或更多不同的病毒成分（例如多价疫苗）可同时确定。

[0074] 现在将描述应用于包含三个上文提到的病毒类型 / 亚型 A/H1N1、A/H3N2 和 B 的样本的本发明的示范性方法实施例。

[0075] 来自三个不同病毒类型的 HA 固定在传感器表面上的三个不同点上。

[0076] 然后执行校准过程。由每个病毒类型的固定浓度的标准抗血清构成的校准物与包含要测量的浓度范围的不同已知浓度的病毒（或病毒抗原）混合。该校准物然后注入（分别或所有三个类型一起）在传感器表面点上并且测量响应。然后从测量结果计算校准曲线。

[0077] 病毒 HA 的样本含量的测量然后通过将每个病毒与固定浓度的抗血清混合（一次一个，或优选地与所有三个抗血清）执行。该样本在传感器表面上注入并且测量自由抗血清浓度。校准曲线用于样本中病毒抗原浓度的计算。

[0078] 然后再生表面（即，结合抗体通过使表面与合适的再生溶液接触而从固定 HA 分离），并且新的样本可以在表面上通过。

[0079] 通过如上文优选的使样本与所有三个抗血清混合并且在所有三个点上注入样本，来自三个不同的病毒类型 / 亚型的 HA 的浓度可以在单个分析循环中分析。因此可开发可以同时测量多价（例如三价的）流感疫苗的所有病毒成分的测定。

[0080] 如将在下文示出的，已经发现在流感病毒亚型的不同菌株对该亚型的菌株的血凝素之间有可观的交叉反应性。因此可能可以开发常见病毒菌株中每个的一般测定。这样的测定从而可以具有用于测量在流感疫苗中的病毒抗原含量的一般用途（不考虑其病毒菌株的每年变化的组合）。

[0081] 在上文描述的测定中，高质量分析结果的前提是固定在传感器表面上的配体 (HA) 的恒定结合能力和在表面上注入的校准物的高稳定性。一般，结合能力的较少减小常常可以通过频繁校准补偿。然而，频繁校准减小了处理能力并且由于试剂消耗而增加成本。

[0082] 根据本发明，已经想出其中每个分析循环使用“虚拟”校准曲线评价的方法，从而最小化在漂移期间频繁校准的需要并且显著提高使用生物传感器系统（例如上文提到的 Biacore™ 系统等）定量测量的质量。尽管该方法基本上一般可应用于任何配体，并且可在各种不同测定形式中使用，其除其他之外包括直接结合测定、抑制测定和夹心测定，该方法在本病毒检测上下文中具有特定关联，因为像 HA 的病毒抗原通常显出引起在传感器表面上漂移的显著不稳定性。

[0083] 当传感器表面的结合能力减小时，对照物的测量 / 计算的浓度作为在新的校准运行执行前执行的分析循环的数目（或循环数）的函数而增加，因为在抑制型测定形式中校准曲线将结合能力减小解释为样本中 HA 浓度增加。该漂移随分析循环增加的数目而增加，并且常常是指数的。在本方法中，分析循环包括在具有固定 HA 的传感器表面上使病毒和检测抗体的混合物通过，然后使表面再生以使它为下一个分析循环准备的步骤。

[0084] 根据本发明，新的校准例程可以采用不同的方式设计。

[0085] 在一个变化形式中，来自校准运行的原始数据用于每个分析循环的虚拟浓度的预测，后跟循环特定校准曲线的计算和样本 / 对照物的浓度预测。

[0086] 在另一个变化形式中，校准方程对真实校准中的每个来计算，后跟每个分析循环的特定校准系数的预测。这些系数然后用于样本和对照物的浓度预测。

[0087] 上文提到的第一个方法将在示例 4 和 5 中更详细地描述，以及第二变化形式在下文示例 6 中。

[0088] 用于执行例如多价流感疫苗的分析的本发明的方法的测定套件可包括目标流感病毒类型 / 亚型的血凝素（或血凝素类似物）、病毒类型 / 亚型的标准血清和病毒标准，并且可选地还有传感器芯片。

[0089] 在下列示例中，本发明的各种方面为了说明和非限制的目的更具体地公开。

[0090] 示例

[0091] 仪器

[0092] 使用 Biacore™T100(GE Healthcare，乌普萨拉，瑞典）。该仪器（其基于在传感器芯片上的金表面处的表面等离体振子共振 (SPR) 检测）使用微流体系统（集成微流体控盒 (cartridge)-IFC) 用于使样本并且使缓冲液一个接一个或连续地通过四个分别检测的流动池（叫做 Fc1 至 Fc4)。该 IFC 通过在 Biacore™T100 仪器内的对接机构被压入与传感器芯片接触。

[0093] Series CM5(GE Healthcare,乌普萨拉,瑞典)用作传感器芯片,其具有涂敷金(大约 50nm)表面,其具有羧甲基改性葡聚糖聚合物的共价键联的水凝胶基质(大约 100nm)。

[0094] 来自该仪器的输出是“传感图”,其是检测器响应(采用“共振单位”RU 测量)作为时间的函数的图。1000RU 的增加对应于在传感器表面上大约 1ng/mm^2 的质量增加。

[0095] 示例 1:流感病毒 A/H3N2/Wyoming(怀俄明州)、A/H3N2/New York 和 B/Jilin 的测定

[0096] 材料

[0097] 血凝素 (HA)A/H3N2/,Wyoming/3/2003、Wisconsin 和 New York 来自美国梅里登 Protein Sciences 公司。

[0098] HA A/H1N1,New Caledonia/20/99 来自以色列 ProsPec,Rehovot。

[0099] HB/Jilin 来自美国圣地亚哥 Gen Way Biotech 公司。

[0100] 血清以及病毒菌株来自英国哈福德郡的波特斯巴 NIBSC- 国家生物学标准和管制所。

[0101] 测定和样本缓冲液:HBS-EP+,GE Healthcare。

[0102] 表面活性剂 P20:GE Healthcare。

[0103] 方法

[0104] HA(H3N2、H1N1 和 B) 固定到在 Biacore T100 的三个相应流动池中的 CM5 传感器,其使用如下胺偶联 (amine coupling):

[0105] H3N2/Wyoming 和 Wisconsin:在 10mM 磷酸盐缓冲液中 10μg/ml,pH7.0,0.05%表面活性剂 P20,7 分钟。

[0106] H3N2/New York:在 10mM 马来酸盐缓冲液中 10μg/ml,pH6.5,0.05%表面活性剂 P20,7 分钟。

[0107] B/Jilin:在 10mM 马来酸盐缓冲液中 5μg/ml,pH6.5,0.05%表面活性剂 P20,20-30 分钟。

[0108] 固定水平是 5000-10000RU。

[0109] 基于 SRID 滴定、使用稀释因子来稀释对相应病毒菌株的血清,如供应商所建议的那样,例如对于 SRID 的 7μl 血清稀释到 1ml 对应于 Biacore T100 中的 x200 稀释。(进行稀释以获得大约 500-1500RU),注入时间是 5 分钟。

[0110] 执行三到十次具有血清的启动循环。

[0111] 校准曲线用病毒抗原 (HA) 准备,首先如由供应商推荐的在 MQ 中稀释 (HA 然后采用等分试样保持冷冻),然后在血清中进一步稀释到典型地 0.1-15μg/ml。

[0112] 标准和样本具有 400s 注入时间。

[0113] 采用 20-50mM HCl,0.05%表面活性剂 P20,30s(后跟 30s 稳定化)来执行再生。

[0114] 示例 2:相同病毒亚型的不同菌株的检测的通用性

[0115] H3N2 菌株 Wyoming HA 固定到 CM5 传感器芯片并且表面与不同的病毒 / 抗血清组合接触:来自 Wyoming 的病毒 / 抗血清 (W/W);来自 New York 的病毒 / 抗血清 (N.Y./N.Y.);Wyoming 病毒和来自 New York 的血清 (W/N.Y.);New York 病毒和来自 Wyoming 的血清 (N.Y./W)。运行关于相应组合的校准曲线。结果在图 3 中示出。从图中,在不同病毒

菌株之间存在交叉反应性是清楚的。Wyoming HA 和病毒 / 抗血清因此可以用于 New York 菌株的定量分析，并且反之亦然。

[0116] 示例 3 :抗血清到不同流感病毒类型 / 亚型 HA 的结合的选择性

[0117] 对流感病毒 A/H3N2、A H1N1 和 B 的不同菌株的 27 个不同的抗血清在固定的 H3N2 Wyoming HA 上注入并且检测其结合。结果以及使用的菌株的列表在图 4 中指示。如从图明显的，所有 H3N2 抗血清结合具有高于 100RU 的信号，而所有 H1N1 和 B 抗血清具有低于 50RU 的信号。这指示若干病毒菌株可同时定量化并且 H3N2 的测量需要一个或仅少数 HA 的。

[0118] 示例 4 :虚拟校准过程

[0119] 许多测定循环（大约 100 个）在 Biacore T100 和 CM5 传感器芯片上运行，在此期间四个普通校准用对照样本的七个不同浓度执行 (0.156、0.31、0.625、1.25、2.5、5 和 10μg/ml)。函数 y(x) = a*exp(-b*x)+c*exp(-d*x)+e（使用循环数作为 x，响应作为 y 和 a、b、c、d 以及 e 作为拟合参数）对七个不同浓度中的每个来拟合。该结果在图 5 中示出，其中顶部曲线代表对照物的最低浓度（即，最高响应 - 抑制测定）并且底部曲线代表最高（即最低响应）。方程然后用于每个循环的虚拟响应的计算。这些响应然后用于每个循环的校准曲线的计算，这些用于在确切该循环运行的样本和对照物的预测，如下文参照图 6 和 7 描述的。

[0120] 图 6 图示在 2 个对照物 (1.0μg/ml 和 0.5μg/ml) 的计算浓度上的漂移。运行很多测定循环并且四个中间校准在由双虚线箭头指示的循环数处执行。在每个校准后的 3(2) 个对照物的浓度针对前面最靠近的校准曲线计算。如由虚线箭头指示的，随与校准的距离增加，在计算的浓度方面存在系统性增加。该计算浓度的增加是由于来自对照样本的减小的信号。这进而由于表面的结合能力作为循环数的函数的减小引起，校准曲线将其解释为增加的浓度。该结合能力的减小在图 3 和图 4 中也是可见的。

[0121] 上文描述的虚拟校准方法到图 6 中的原始数据的应用给出在图 7 中示出的 0.5 和 1.0μg/ml 对照物的浓度估计，这在对照样本浓度预测方面具有可重复性的相当大的提高。

[0122] 示例 5 :通过虚拟校准程序使结合数据规格化

[0123] HA 重组蛋白质 HB/Jilin、H1N1/New Caledonia 和 H3N2/Wyoming 被固定。获得校准曲线。稀释样本并且测量和重新计算在 0.5-15μg/ml 之间的浓度。为了避免响应漂移，结果使用在上文的示例 4 中概述的规格化程序规格化，每个循环获得唯一的校准曲线。图 8 示出在对照样本 (5μg/ml 的 B/Jiangsu/10/2003) 规格化之前和之后的结果，给出 250RU 的响应，CV = 1.2%。

[0124] 示例 6 :三个不同病毒类型的同时检测

[0125] 三个流动池固定有三个不同的重组流感病毒 HA 蛋白质 :H1N1/New Caledonia、H3N2/Wisconsin 和 B/Jilin。

[0126] 来自三个流感菌株 (H1N1/New Caledonia、H3N2/Wisconsin 和 B/Malaysia) 的病毒标准被稀释并且混合在一起，使得每个标准的最终浓度是 16μg/ml。校准曲线然后做成是从 16μg/ml 到 0.5μg/ml 的 2 倍连续稀释 (2-fold serial dilution)。

[0127] 要分析的三个疫苗 (H1N1、H3N2 和 B) 被稀释 8、16、32 和 64 倍。

[0128] 三个血清（来自 NIBSC 的 H1N1/New Caledonia、H3N2/Wisconsin 和 B/Malaysia) 被稀释到给出 500-700RU 响应的浓度并且混合在一起。

[0129]

	与 ag 先前混合	最后稀释

[0130] H1N1/New Caledonia 60x 稀释 180x

[0131] H3N2/Wisconsin 70x 稀释 210x

[0132] B/Malaysia 20x 稀释 60x

[0133] 要分析疫苗，标准和疫苗的复制品使用在“方法建立器 (Method Builder)”中创建的方法首先与血清溶液混合并且然后允许流过所有流动池。

[0134] 来自“方法建立器”的一般方法：

[0135] 启动 (7 个循环，缓冲液代替样本，接着再生，2 小时)

[0136] 校准曲线 1(14 个循环)

[0137] 样本 (12 个循环)

[0138] 校准曲线 2(14 个循环)

[0139] 样本 (12 个循环)

[0140] 校准曲线 3(14 个循环)。

[0141] 结果然后关于三个校准曲线规格化。这通过执行校准曲线到四参数回归曲线 (方程 1)(其常规与 Biacore® 系统一起用于确定浓度) 的四参数拟合来进行以确定四个系数：

[0142]
$$Response = R_{high} - \frac{(R_{high} - R_{low})}{1 + \left(\frac{X}{A_1}\right)^{A_2}} \qquad (1)$$

[0143] 其中 R_{high} 是在低病毒浓度的响应，R_{low} 是在低病毒浓度的响应，A_1(EC50) 和 A_2(Hill slope) 是拟合参数并且 X 是病毒的浓度。

[0144] 然后四个系数中的每一个在不同浓度获得的值针对分析循环数来绘制，由此获得每个系数的方程。使用用上文的方程 1 获得的系数，计算规格化的浓度。

[0145] 结果

[0146]

表面 HA	样本	浓度 (μg/ml)	Std dev	CV%
B	疫苗 1	102.9	1.07	1.0
	疫苗 2	30.9	0.30	1.0
	疫苗 3	27.8	0.44	1.6
H1N1	疫苗 1	37.4	0.05	0.1
	疫苗 2	34.9	0.04	0.1
	疫苗 3	30.5	0.10	0.3
H3N2	疫苗 1	36.2	0.02	0.1
	疫苗 2	27.8	0.06	0.2
	疫苗 3	37.7	0.12	0.3

[0147] 根据制造商，在疫苗中的每个菌株的 HA 浓度应该是 30μg/ml，用 SRID 分析。

[0148] 三个校准曲线在图 9 中示出 (在每个图中的上文提到的校准曲线 1 至 3)。

[0149] 从前述，将意识到尽管本发明的特定实施例已经为了说明的目的描述，可以做出

各种修改而不偏离本发明的精神和范围。因此，本发明仅被附上的权利要求来限定。

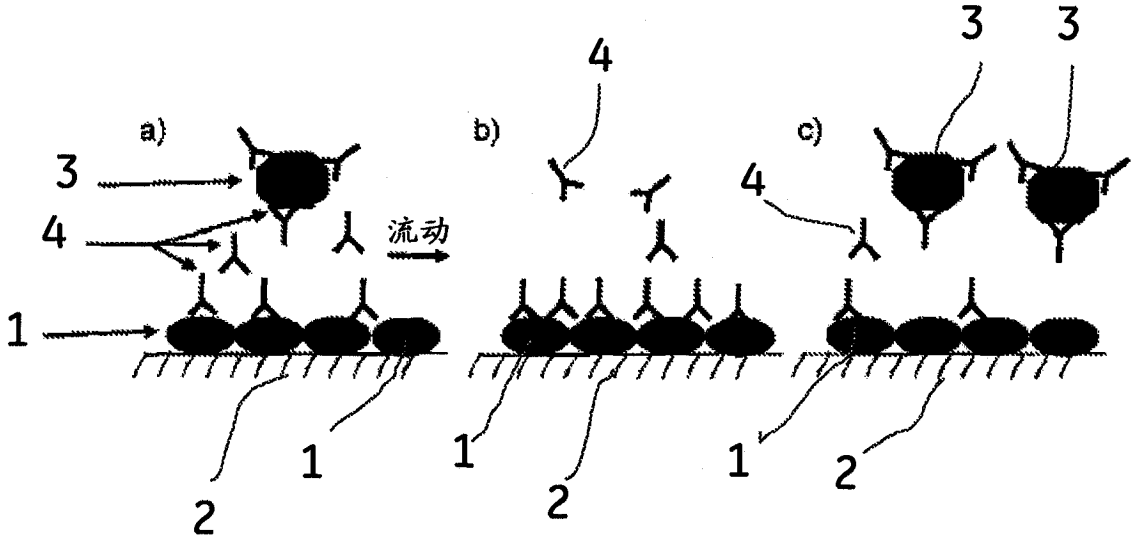


图 1

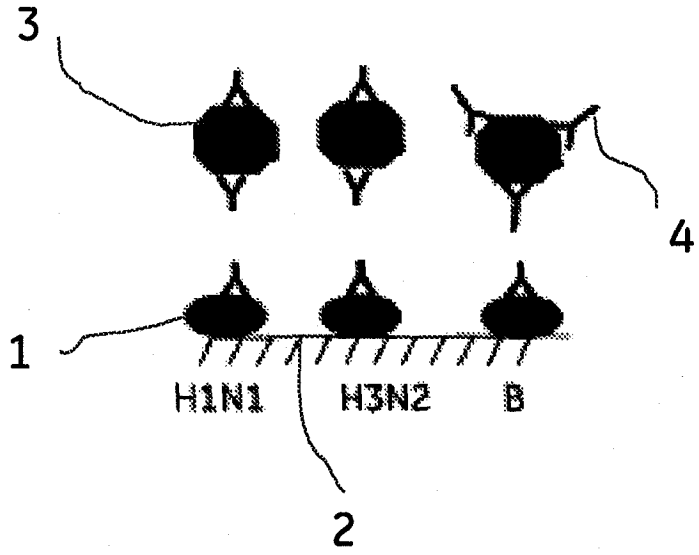


图 2

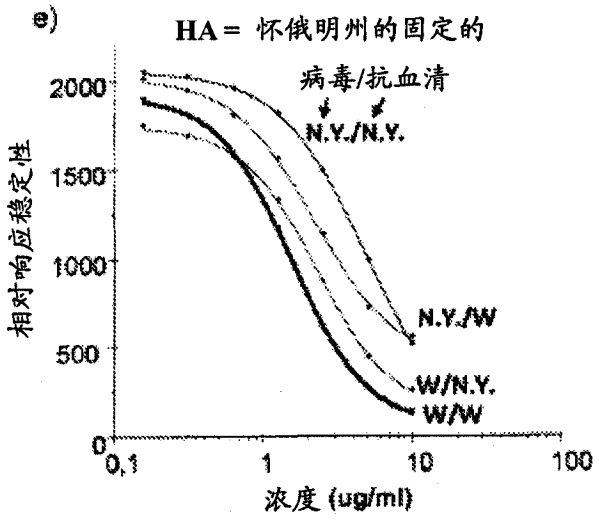

e)
HA= 怀俄明州的固定的
病毒/抗血清
N.Y./N.Y.
N.Y./W
W/N.Y.
W/W
相对响应稳定性
2000
1500
1000
500
0
0,1
1
10
100
浓度 (ug/ml)

图 3

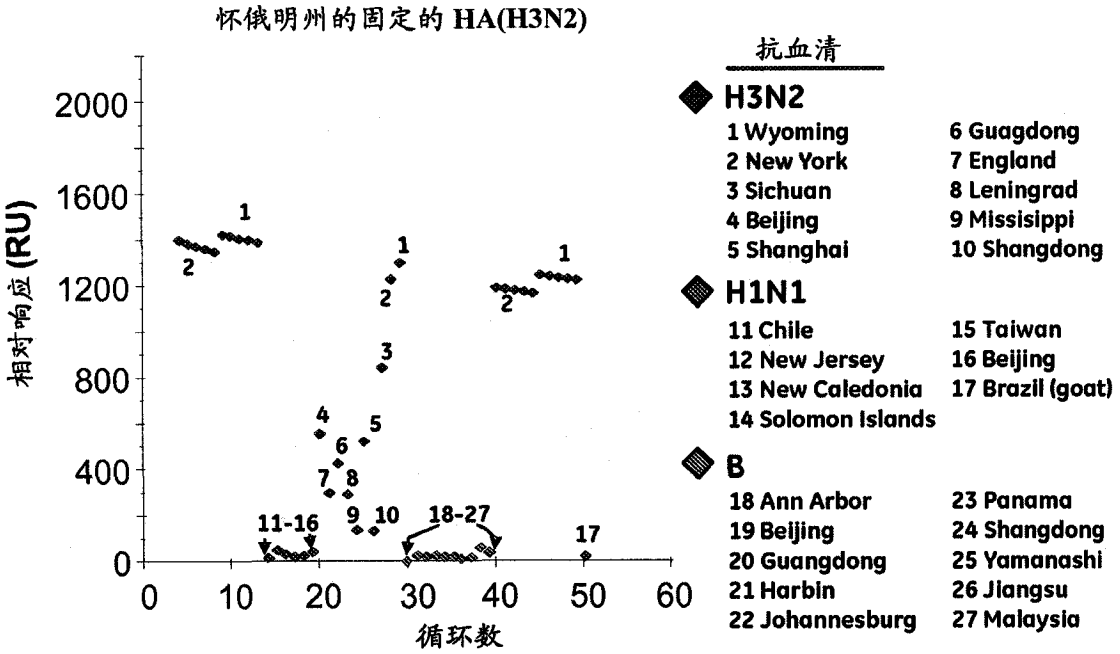

怀俄明州的固定的 HA(H3N2)
相对响应 (RU)
2000
1600
1200
800
400
0
0 10 20 30 40 50 60
循环数
抗血清
H3N2
1 Wyoming
2 New York
3 Sichuan
4 Beijing
5 Shanghai
6 Guagdong
7 England
8 Leningrad
9 Missisippi
10 Shangdong
H1N1
11 Chile
12 New Jersey
13 New Caledonia
14 Solomon Islands
15 Taiwan
16 Beijing
17 Brazil (goat)
B
18 Ann Arbor
19 Beijing
20 Guangdong
21 Harbin
22 Johannesburg
23 Panama
24 Shangdong
25 Yamanashi
26 Jiangsu
27 Malaysia
11-16
18-27

图 4

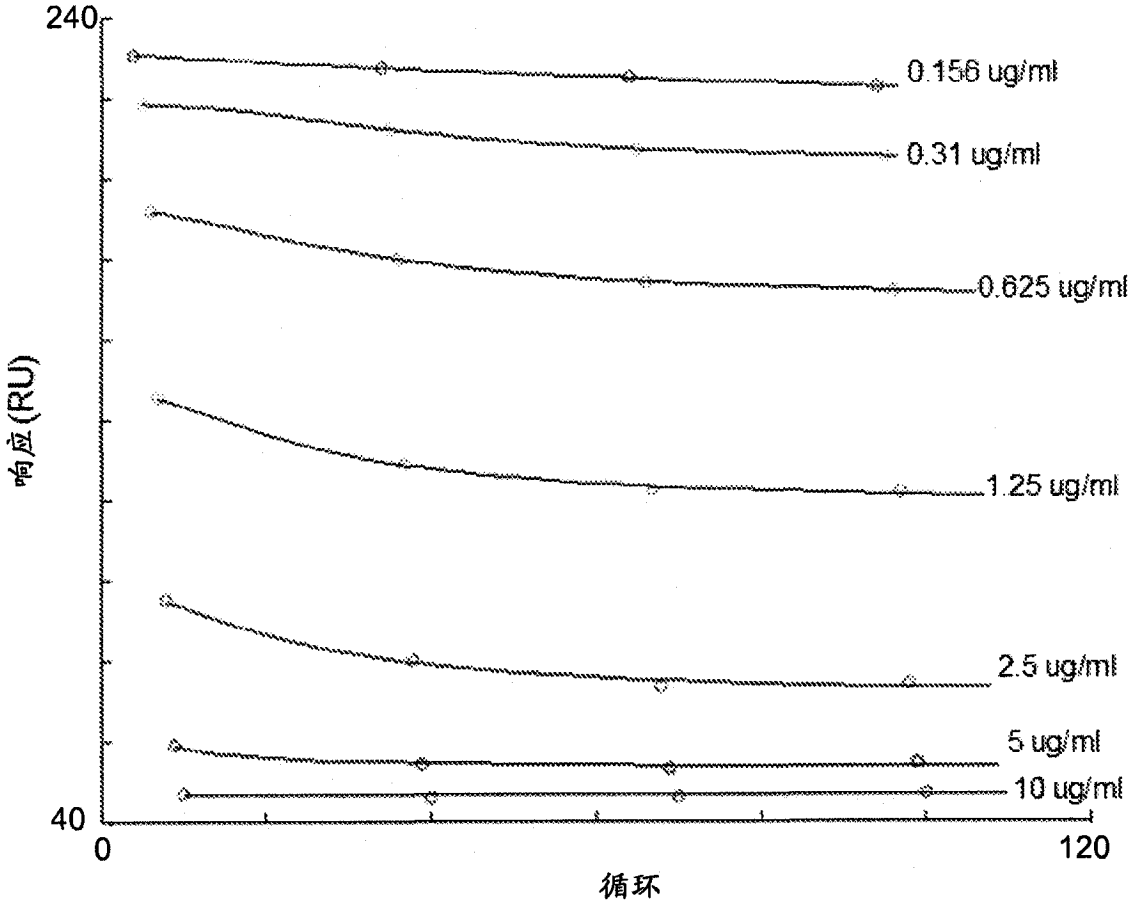

240
40
0
120
响应(RU)
循环
0.156 ug/ml
0.31 ug/ml
0.625 ug/ml
1.25 ug/ml
2.5 ug/ml
5 ug/ml
10 ug/ml

图 5

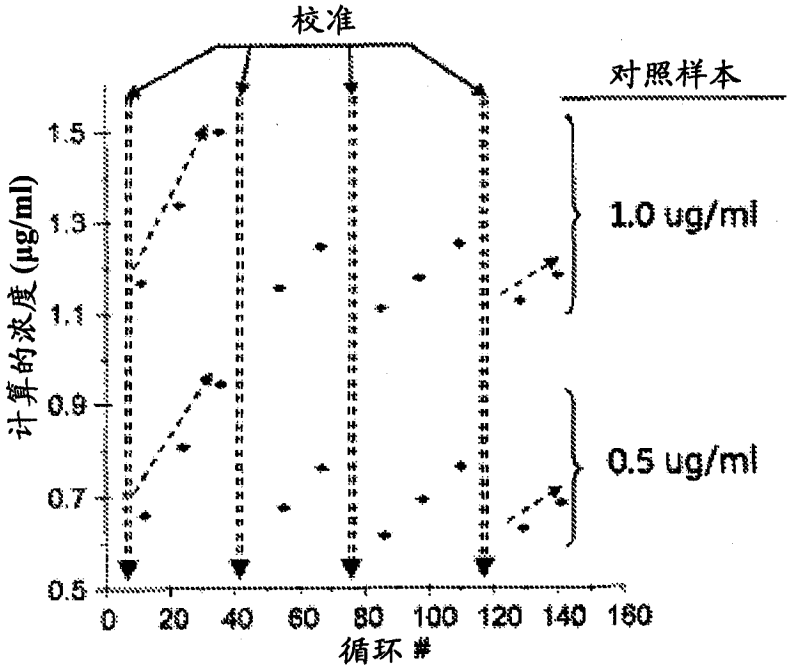


图 6

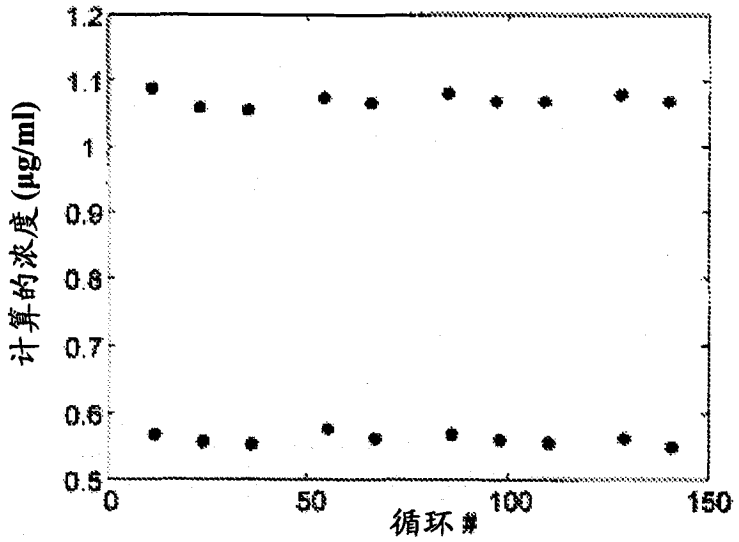


图 7

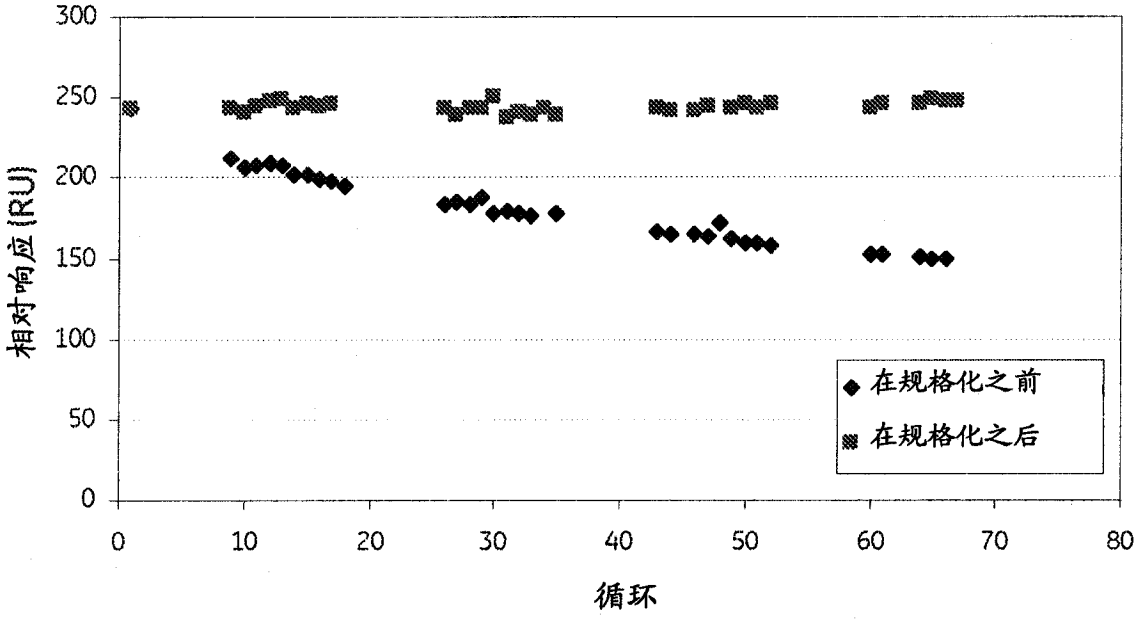

300
250
200
150
100
50
0
相对响应 (RU)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
循环
在规格化之前
在规格化之后

图 8

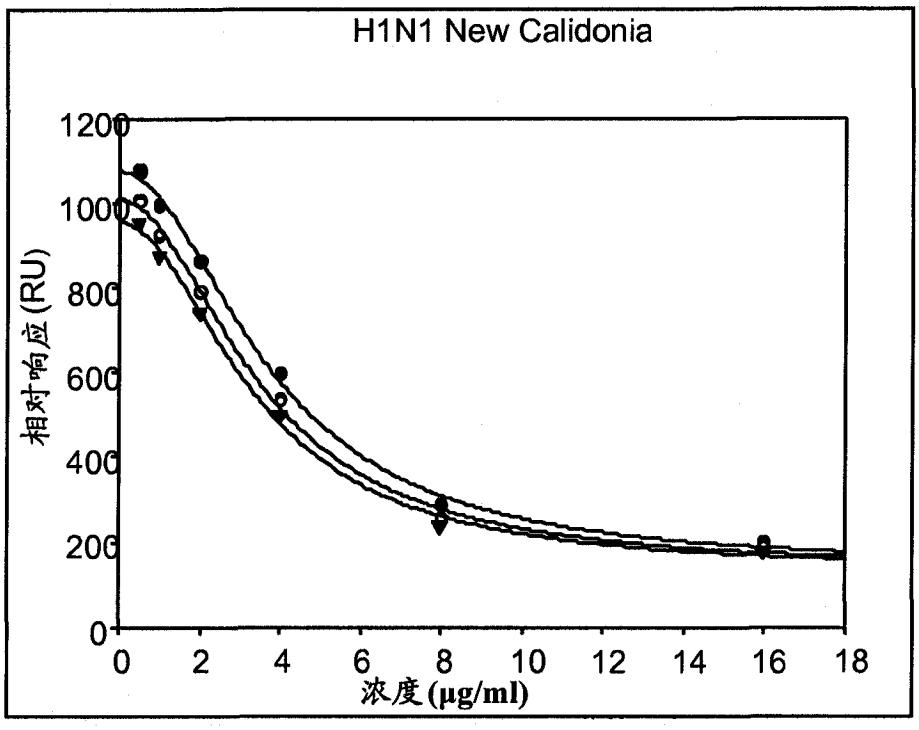

H1N1 New Calidonia
1200
1000
800
600
400
200
0
相对响应 (RU)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
浓度 (µg/ml)

图 9A

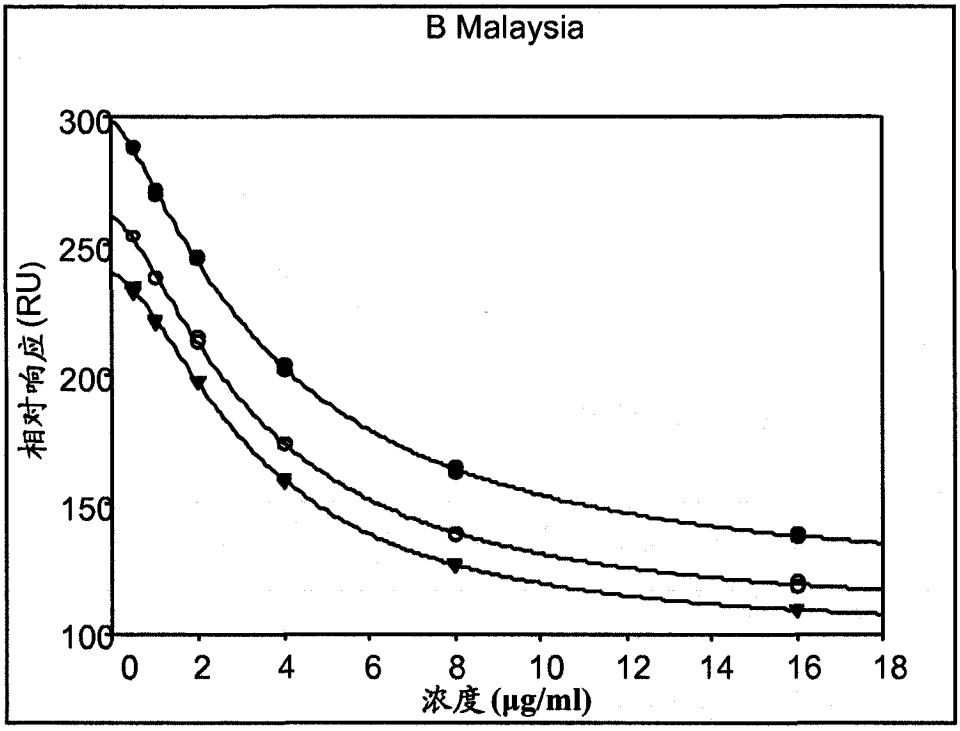

B Malaysia
300
250
200
150
100
相对响应(RU)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
浓度(μg/ml)

图 9B

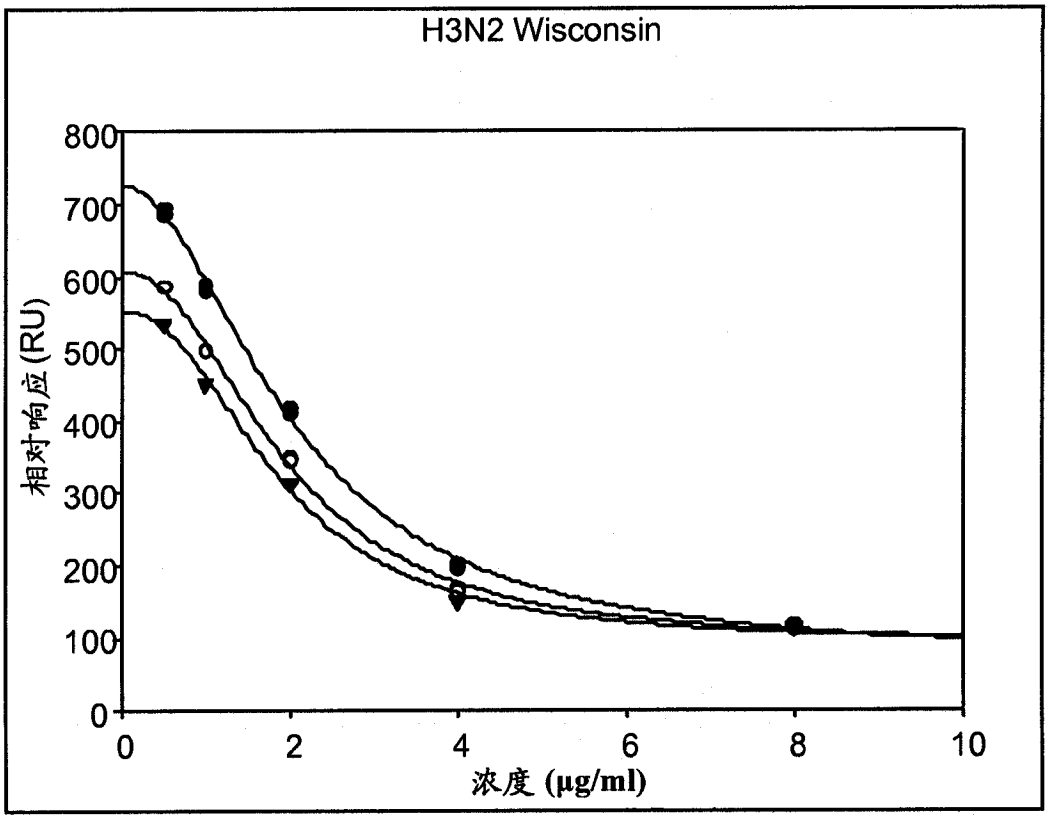

H3N2 Wisconsin
800
700
600
500
400
300
200
100
0
相对响应 (RU)
0
2
4
6
8
10
浓度 (µg/ml)

图 9C