



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116148479 A

(43) 申请公布日 2023.05.23

(21) 申请号 202211574983.0

(22) 申请日 2017.02.24

(30) 优先权数据

1603291.4 2016.02.25 GB

62/368,606 2016.07.29 US

(62) 分案原申请数据

201780013491.5 2017.02.24

(71) 申请人 拜恩顶赛集团有限公司

地址 英国西米德兰郡伯明翰市

申请人 马约医学教育与研究基金会

(72) 发明人 大卫·L·默里 斯蒂芬·哈丁

大卫·R·巴尼奇

格雷格·沃利斯 约翰·米尔斯

杰米·阿什比

(74) 专利代理机构 北京三高永信知识产权代理  
有限责任公司 11138

专利代理师 唐述灿

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 27/62 (2021.01)

G01N 1/34 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

权利要求书2页 说明书13页 附图9页

(54) 发明名称

质谱法试剂盒

(57) 摘要

一种抗免疫球蛋白特异性抗体(或其片段),所述抗体或其片段在所述抗体或其片段的至少一条重链或其片段与至少一条轻链或其片段之间包含一个或多个非二硫化物交联。一种纯化抗免疫球蛋白特异性抗体(或其片段)的方法,所述抗体或其片段在所述抗体或其片段的至少一条重链或其片段与至少一条轻链或其片段之间包含一个或多个非二硫化物交联。此外,本发明还涉及了一种定量来自受试者的样品中的受试者分析物或分析物的片段的量的方法。

1. 一种纯化或表征免疫球蛋白的方法,包括:  
使含有免疫球蛋白的样品与抗体或片段接触,所述抗体或片段在所述抗体或片段的至少一条重链或其片段和至少一条轻链或其片段之间包含一个或更多个非二硫化物交联;  
使免疫球蛋白与所述抗体或片段结合;  
将未结合的物质从与所述抗体或片段结合的免疫球蛋白中洗去;以及  
从所述抗体或片段中除去结合的免疫球蛋白,以产生纯化的免疫球蛋白或片段。
2. 根据权利要求1所述的方法,还包括通过质谱法表征所述纯化的免疫球蛋白。
3. 一种用于质谱法的免疫球蛋白纯化和测定试剂盒,包括抗体(或片段)和一种或多种质谱标准品,所述抗体或片段在所述抗体或片段的至少一条重链或其片段和至少一条轻链或其片段之间包含一个或更多个非二硫化物交联。
4. 一种定量来自受试者的样品中的受试者分析物或分析物片段的量的方法,包括:
  - (i) 向所述样品中添加预定量的一种或多种对照分析物或其片段,其可与等同的受试者分析物或片段区分开;
  - (ii) 测量所述样品中所述受试者分析物或片段的相对量以及所述对照分析物或片段的量;以及
  - (iii) 比较受试者分析物或片段的相对量与对照分析物或片段的相对量,以定量原始受试者样品中分析物或片段的量。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述分析物是免疫球蛋白或其片段。
6. 根据权利要求4或5所述的方法,其中在定量之前在至少一个纯化步骤中纯化所述受试者分析物如免疫球蛋白或片段,并且在该纯化步骤之前,在样品中添加预定量的对照分析物,例如免疫球蛋白或片段。
7. 根据权利要求4至6之一所述的方法,其中通过质谱法确定受试者分析物和对照分析物的量,例如免疫球蛋白或片段的量。
8. 根据权利要求4至7之一所述的方法,其中所述受试者免疫球蛋白或片段是完整的免疫球蛋白、重链、 $\kappa$ 轻链或 $\lambda$ 轻链、Fc片段或Fab片段。
9. 根据权利要求4至8之一所述的方法,其中与所述受试者免疫球蛋白或其片段相比,所述对照免疫球蛋白在一条或多条重链、 $\kappa$ 轻链或 $\lambda$ 轻链中的N末端或C末端上包含多个氨基酸,或者所述对照蛋白质是单克隆抗体或其片段。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述 $\kappa$ 和/或 $\lambda$ 轻链是游离 $\kappa$ 或游离 $\lambda$ 轻链。
11. 根据权利要求9或10所述的方法,其中与所述受试者免疫球蛋白或其片段相比,所述多个氨基酸位于C末端。
12. 根据权利要求5至11之一所述的方法,其中对照免疫球蛋白包含两种或更多种完整免疫球蛋白、游离 $\kappa$ 轻链或游离 $\lambda$ 轻链。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者患有B细胞相关疾病。
14. 一种制备用于分析质谱法的样品的方法,包括:
  - (i) 提供来自受试者的样品,所述样品包含免疫球蛋白或其片段;
  - (ii) 向所述样品中添加预定量的具有预定分子量的对照免疫球蛋白或片段;
  - (iii) 使用抗免疫球蛋白抗体或片段通过免疫纯化将所述对照免疫球蛋白或片段与所述免疫球蛋白或片段共纯化,所述抗体或片段在所述抗体或片段的至少一条重链或其片段

和至少一条轻链或其片段之间包含一个或更多个非二硫化物交联;并且可选地

(iv)将共纯化的样品置于质谱靶上。

15.根据权利要求14所述的方法,其中所述对照免疫球蛋白或片段具有比通过质谱法测量的目标免疫球蛋白或片段更高或更低的分子量。

16.根据权利要求14或15所述的方法,其还包括使包含共纯化样品的靶进行质谱以分析所述样品的步骤。

17.一种测定试剂盒,其包括抗体或片段,所述抗体或片段在所述抗体或片段的至少一条重链或其片段与至少一条轻链或其片段之间包含一个或更多个非二硫化物交联,和质谱标准品的免疫球蛋白或片段。

18.根据权利要求17所述的测定试剂盒,其包含质谱靶。

19.根据权利要求1至2或14至16之一所述的方法,或根据权利要求3、17或18之一所述的试剂盒,其中所述抗体或片段是多克隆抗体或其片段。

20.根据权利要求1至3或14至19之一所述的方法或试剂盒,其中所述抗体或其片段是抗游离轻链类特异性、抗重链类特异性、抗重链亚类特异性、抗重链类-轻链类特异性、或抗轻链类特异性。

21.一种抗免疫球蛋白特异性抗体(或其片段),其特征在于,所述抗体或其片段在所述抗体或其片段的至少一条重链或其片段与至少一条轻链或其片段之间包含一个或更多个非二硫化物交联。

22.根据权利要求21所述的抗体或片段,其是抗游离轻链特异性、抗重链类特异性、抗重链亚类特异性、抗重链类-轻链类特异性、或抗轻链类特异性。

23.根据权利要求21或22所述的抗体或片段,其中所述交联包含双马来酰亚胺或硫醚键。

24.根据权利要求21至23之一所述的抗体或片段,其附接于载体。

25.根据权利要求21至24之一所述的抗体或片段,其中所述抗体或片段是单克隆抗体或片段或者多克隆抗体或其片段。

26.根据权利要求21至25之一所述的抗体或片段,其中所述抗体是抗体的片段并且是F(ab')<sub>2</sub>片段。

27.根据权利要求21至26之一所述的抗体或片段,其用于纯化一种或多种免疫球蛋白。

28.一种诊断或预后B细胞相关疾病或其他免疫相关疾病的方法,包括使用抗体、采用根据前述权利要求中任一项的测定试剂盒的方法来纯化或表征免疫球蛋白。

## 质谱法试剂盒

[0001] 本申请是申请号为201780013491.5的中国专利申请的分案申请。申请号为201780013491.5的中国专利申请是国际申请PCT/GB2017/050489的中国国家阶段申请,该国际申请PCT/GB2017/050489要求于2016年2月25日提交的英国申请GB 1603291.4的优先权权益,以及于2016年7月29日提交的美国申请US 62/368,606的优先权权益。

[0002] 本发明涉及抗免疫球蛋白特异性抗体(或其片段),其在抗体的至少一条重链和至少一条轻链之间包含一个或更多个非二硫化物交联(non-disulphide cross-link)。其在从样品中分离或纯化免疫球蛋白中特别有用。还提供对照免疫球蛋白以掺入样品中以用作质谱法中的标准品。

[0003] 抗体分子(也称为免疫球蛋白)具有双重对称性,通常由两条相同的重链和两条相同的轻链构成,每条链含有可变区和恒定区。重链和轻链的可变结构域组合形成抗原结合位点,因此两种链都导致抗体分子的抗原结合特异性。抗体的基本四聚体结构包含通过二硫键共价连接的两条重链。每条重链又通过二硫键与轻链附接。这产生了基本为“Y”形的分子。

[0004] 重链是抗体中发现的两种链中较大的一种,与较小的轻链(25,000Da)相比,典型的分子量为50,000至77,000Da。

[0005] 存在五种主要类别的重链,其为 $\gamma$ 、 $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 和 $\epsilon$ ,它们分别是IgG、IgA、IgM、IgD和IgE的组成重链。IgG是正常人血清的主要免疫球蛋白,占总免疫球蛋白库的70至75%。这是二次免疫应答的主要抗体。它形成两个重链加两个轻链的单个四聚体。

[0006] IgM约占免疫球蛋白库的10%。该分子与J链一起形成五个基本4链结构的五聚体。各个重链的分子量约为65,000Da,整个分子的分子量约为970,000Da。IgM主要局限于血管内池并且是主要的早期抗体。

[0007] IgA代表人血清免疫球蛋白库的15至20%。超过80%的IgA作为单体出现。然而,一些IgA(分泌型IgA)以二聚体形式存在。

[0008] IgD占总血浆免疫球蛋白的不到1%。在成熟B细胞的表面膜上发现IgD。

[0009] IgE虽然在正常血清中很少,但在嗜碱性粒细胞和肥大细胞的表面膜上发现。它与哮喘和花粉症等变应性疾病有关。

[0010] 除了所述五种主要类别之外,还有四个IgG亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。另外,IgA有两个亚类(IgA1和IgA2)。

[0011] 存在两种类型的轻链:Lambda ( $\lambda$ ) 和Kappa ( $\kappa$ )。在人中产生的 $\kappa$ 分子大约是 $\lambda$ 分子的两倍,但在一些哺乳动物中这是非常不同的。每条链在单条多肽链中含有约220个氨基酸,折叠成一个恒定结构域和一个可变结构域。浆细胞产生五种重链类型中的一种,连同 $\kappa$ 或 $\lambda$ 分子。与重链合成相比,通常存在约40%过量的游离轻链产生。在轻链分子不与重链分子结合的情况下,它们被称为“游离轻链分子”。 $\kappa$ 轻链通常作为单体发现。 $\lambda$ 轻链倾向于形成二聚体。

[0012] 存在许多增殖性疾病与抗体产生细胞相关。

[0013] 在许多这样的增殖性疾病中,浆细胞增殖以形成相同浆细胞的单克隆肿瘤。这导

致产生大量相同的免疫球蛋白,并且被称为单克隆丙种球蛋白病。

[0014] 在英国,诸如骨髓瘤和原发性系统性淀粉样变性(AL淀粉样变性)的疾病分别占癌症死亡的约1.5%和0.3%。多发性骨髓瘤是继非霍奇金淋巴瘤后第二常见的血液恶性病。在高加索种群中,发病率约为每年每百万人中40人。常规地,多发性骨髓瘤的诊断基于骨髓中过量单克隆浆细胞,血清或尿液中单克隆免疫球蛋白以及相关器官或组织损伤如高钙血症、肾功能不全、贫血或骨病变的存在。骨髓的正常浆细胞含量为约1%,而在多发性骨髓瘤中,含量通常大于10%,经常大于30%,但可能超过90%。

[0015] AL淀粉样变性是一种蛋白质构象病症,其特征在于单克隆游离轻链片段积累成为淀粉样沉积物。通常,这些患者呈现心脏或肾衰竭,但也可能涉及外周神经和其他器官。

[0016] 存在许多可以通过患者血流或甚至尿液中单克隆免疫球蛋白的存在来鉴定的其他疾病。其包括浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤,这是一种在骨髓外产生的浆细胞肿瘤,可以在任何器官中发生。当存在时,所述单克隆蛋白通常是IgA。多发性孤立性浆细胞瘤可伴有或不伴有或多发性骨髓瘤。Waldenström的巨球蛋白血症(Waldenström's macroglobulinaemia)是一种低度淋巴组织增生性病症,与单克隆IgM的产生有关。美国每年约有1,500例新病例,英国约有300例。血清IgM定量对于诊断和监测都很重要。B细胞非霍奇金淋巴瘤在英国导致所有癌症死亡的约2.6%,并且使用标准电泳方法已经在约10至15%的患者的血清中鉴定出单克隆免疫球蛋白。初步报告表明,60至70%的患者尿液中可检测到单克隆游离轻链。在B细胞慢性淋巴细胞白血病中,已经通过游离轻链免疫测定鉴定了单克隆蛋白。

[0017] 此外,还有所谓的MGUS病症。其为重要性不明确的单克隆丙种球蛋白病。该术语表示在没有多发性骨髓瘤、AL淀粉样变性、Waldenström巨球蛋白血症等证据的个体中未预期地出现的单克隆完整免疫球蛋白。MGUS可在50岁以上的人口中占1%,70岁以上占3%,而在超过80岁中占10%。其中大多数是IgG或IgM相关的,但是更罕见的为与IgA相关或双克隆。虽然大多数患有MGUS的人死于不相关的疾病,但MGUS可能转变为恶性单克隆丙种球蛋白病。

[0018] 在上文强调的疾病的至少一些病例中,疾病呈现异常浓度的单克隆免疫球蛋白或游离轻链。当疾病产生浆细胞的异常复制时,随着该“单克隆”增殖并出现在血液中,其通常导致该类细胞产生更多免疫球蛋白。

[0019] 免疫固定电泳使用针对免疫球蛋白分子的沉淀抗体。虽然这提高了测试的灵敏度,但由于存在沉淀抗体,它不能用于定量单克隆免疫球蛋白。免疫固定电泳也很难进行,并且解释可能是困难的。毛细管区带电泳在许多临床实验室中用于血清蛋白分离,并且能够检测大多数单克隆免疫球蛋白。然而,与免疫固定相比,毛细管区带电泳未能检测到5%样品中的单克隆蛋白。这些所谓的“假阴性”结果涵盖低浓度的单克隆蛋白。

[0020] 已经产生了总 $\kappa$ 和 $\lambda$ 的测定。然而,总 $\kappa$ 和总 $\lambda$ 检测对于检测单克隆免疫球蛋白或游离轻链过于不敏感。这是由于多克隆结合轻链的高背景浓度干扰了这种测定。

[0021] 最近,已开发出一种灵敏的测定,其可以分别检测游离的 $\kappa$ 轻链和游离 $\lambda$ 轻链。该方法使用针对游离 $\kappa$ 轻链或游离 $\lambda$ 轻链的多克隆抗体。在WO 97/17372中,还讨论了作为许多不同可能的特异性之一产生这种抗体的可能性。该文献公开了使动物耐受以使其产生比现有技术可产生的更具特异性的期望抗体的方法。游离轻链测定使用抗体结合游离 $\lambda$ 轻链或游离 $\kappa$ 轻链。通过浊度法(nephelometry)或比浊法(turbidimetry)测定游离轻链的浓度。这涉

及将测试样品添加到在反应容器或比色皿中的含有适当抗体的溶液中。光束通过比色皿，随着抗原-抗体反应的进行，穿过比色皿的光随着不溶性免疫复合物的形成而散射增多。在浊度法中，通过测量远离入射光的角度的光强度来监测光散射，而在比浊法中，通过测量入射光束强度的降低来监测光散射。首先测定一系列已知抗原的校准物(即游离 $\kappa$ 或游离 $\lambda$ )浓度以产生测量的光散射相对于抗原浓度的校准曲线。

[0022] 已发现这种形式的测定法可成功检测游离轻链浓度。此外，该技术的灵敏度非常高。

[0023] 游离轻链(free-light chain, FLC)、重链或亚类、或与重链类或亚类结合的轻链类型的数量或类型的表征在多种疾病中是重要的，包括B细胞疾病，例如多发性骨髓瘤，和其他免疫介导的疾病，如肾病。

[0024] 整体并入本文的W02015/154052公开了使用质谱法(mass spectrometry, MS)检测免疫球蛋白轻链、免疫球蛋白重链或其混合物的方法。将包含免疫球蛋白轻链、重链或其混合物的样品免疫纯化并进行质谱分析以获得样品的质谱。这可用于检测患者样品中的单克隆蛋白。它还可用于指纹、同种型和识别单克隆抗体中的二硫键。

[0025] 例如，MS用于通过质量和电荷分离样品中的 $\lambda$ 和 $\kappa$ 链。它还可以用于检测免疫球蛋白的重链组分，例如通过使用还原剂减少重链和轻链之间的二硫键。MS也在W0 2015/131169中有描述，其全部内容通过引用并入本文。

[0026] 在诊断程序中纯化样品中的免疫球蛋白通常使用抗全抗体(anti-whole antibody)，例如抗IgG或抗IgA抗体，或抗游离轻链抗体，例如抗 $\kappa$ 或抗 $\lambda$ 轻链抗体。

[0027] 该技术的问题在于来自纯化抗体本身的轻链或重链可以释放到待测样品中。这种污染会影响样品后续表征的准确性。

[0028] 如上所述，抗体的重链和轻链通常通过二硫键连接在一起。这些键相对较弱并且可以被破坏以使重链和轻链彼此释放。

[0029] W02006/099481A描述了在多种大分子中使用链内和链间硫醚交联，所述大分子包括多肽例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fab、F(ab)和F(ab')<sub>2</sub>片段，单链抗体，人抗体，协调或嵌合抗体以及表位结合片段。该文献描述了交联的目的是增强抗体或片段的稳定性以及药理学和功能特性。特别地，目的是交联例如不同单克隆抗体的重链和轻链，如抗病毒抗原抗体，包括抗RSV抗体。所述目的是改善抗体的药理学性质。

[0030] W000/44788描述了使用硫醚来交联不同特异性的不同抗体分子，目的是产生改进的治疗剂。类似地，W091/03493中显示了具有不同特异性的双特异性或三特异性F(ab)<sub>3</sub>或F(ab)<sub>4</sub>缀合物。

[0031] 已经在具有提高的储存水平的治疗性抗体中观察到硫醚(Zhang Q等JBC manuscript(2013)M113.468367)。轻链-重链二硫化物(LC214-HC220)可以转化为硫醚键。观察到一种IgG1k治疗性抗体当在血液中循环时在该位置处以每天0.1%的速率转化为硫醚。还观察到内源性抗体在健康人受试者中形成。Zhang等人在体外重复了硫醚的形成。这用于帮助评估硫醚键对治疗性单克隆抗体安全性的影响。

[0032] 与Zhang认为交联形成存在问题相反，申请人已经认识到，对于某些用途，交联抗体的形成可具有意料不到的优点。

[0033] 申请人已经认识到减少来自纯化抗体的污染量是有益的，例如从完整免疫球蛋白

白、F(ab)或F(ab')<sub>2</sub>片段释放的游离轻链,或从珠释放的纳米抗体。

[0034] 本发明提供:

抗免疫球蛋白特异性抗体(或其片段),其特征在于抗体(或其片段)在所述抗体(或其片段)的至少一条重链(或其片段)与至少一条轻链(或其片段)之间包含一个或更多个非二硫化物交联。除了天然重链-轻链二硫化物交联之外或代替天然重链-轻链二硫化物交联,还可以提供相邻重链之间的交联。

[0035] 交联通常是在同一抗体的链之间的分子内。

[0036] 交联通常包含硫醚键。

[0037] 硫醚交联包含硫醚键。这是抗体残基之间的连接,其中所述连接具有单个硫键而不是二硫键(disulphate bond)。即,硫醚交联不包括包含多于一个硫原子的连接,例如本领域技术人员熟悉的二硫桥。相反,硫醚交联包含桥接大分子残基的单个硫键。一个或更多个另外的非硫原子可另外形成所述连接。

[0038] 通过硫醚交联连接的残基可以是天然残基或非天然残基。如本领域技术人员将认识到的,硫醚交联的形成可导致残基中原子的损失。例如,在两个半胱氨酸残基的侧链之间形成硫醚交联可导致残基中硫原子和氢原子的损失,但本领域技术人员将认识到所产生的硫醚交联使半胱氨酸残基连接。

[0039] 硫醚交联可以连接抗体的任何两个残基。可以从例如以下选择一种或更多种残基:半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、甲硫氨酸和酪氨酸。可从半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、甲硫氨酸和酪氨酸中选择两个残基。更典型地,两个残基是半胱氨酸残基。通常,在重链和轻链之间仅有一个硫醚交联。或者,可以使用两个、三个或更多个硫醚交联。抗体的重链对或其片段也可以通过一种或更多种非二硫化物交联(例如硫醚键)连接。

[0040] 硫醚交联描述于例如W02006/099481和Zhang等(2013) J. Biol. Chem. vol 288 (23), 16371-8以及Zhang&Flynn(2013) J. Biol. Chem, vol 288 (43), 34325-35中,其通过引用并入本文。

[0041] 可以使用膦类(phosphine)和亚磷酸盐/酯(phosphite)。在此,“膦”是指含有至少一个具有通式R<sub>3</sub>P的官能单元的任何化合物(其中P=磷而R=任何其他原子)。在亚磷酸盐/酯中,R位置特别地被氧原子占据。含有R<sub>3</sub>P的化合物可作为强亲核试剂,可以攻击二硫键。这可以导致二硫化物的减少,然而在一些条件下,也可能导致硫醚键形成。

[0042] 化合物包括:

三(二甲氨基)膦(CAS号1608-26-0)

三(二乙氨基)膦(CAS号2283-11-6)

亚磷酸三甲酯(CAS号121-45-9)

三丁基膦(CAS号998-40-3)

[0043] 参考文献:Bernardes等,(2008) Angew. Chem. Int. Ed., vol 47, 2244-2247,通过引用并入本文。

[0044] 交联还可以包含交联剂,例如马来酰亚胺交联剂,其与游离硫醇反应以交联至抗体分子的链。如W000/44788中所述,可以使其在硫醇基团的一侧上结合,并且额外地在另一部分如赖氨酸羧基上结合。

[0045] 可以使用双官能交联剂,其包含通过接头连接在一起的两个反应性部分,尤其是

柔性接头。接头可包含在链中共价结合在一起的一个或多个碳,例如取代或未取代的烷基。接头尤其是C1至C10,最通常是C2至C6或C3至C6接头。申请人已经发现,含有C2至C6的交联剂,例如 $\alpha,\alpha'$ -二溴-间二甲苯、BMOE(双马来酰亚胺基乙烷)或BMB(双马来酰亚胺丁烷),特别适用于相对高水平的交联蛋白回收。

[0046] 双马来酰亚胺是同双官能的巯基反应性交联剂

[0047] 这是充分表征的一类交联剂,其含有通过烃或其他接头连接的两个马来酰亚胺基团。马来酰亚胺基团与通过还原二硫化物暴露的游离巯基自发反应,在每个巯基上形成不可还原的硫醚键,从而共价交联剩余的两个胱氨酸。

[0048] 化合物包括:

[0049] 双(马来酰亚胺)乙烷(CAS号5132-30-9);

[0050] 1,4-双(马来酰亚胺)丁烷(CAS号28537-70-4)。

[0051] 参考文献:

Auclair等(2010)Strategies for stabilizing superoxide dismutase(SOD1), the protein destabilized in the most common form of familial amyotrophic lateral sclerosis.Proc Natl Acad Sci U S A,vol1107(50)-第21394-9页。

Geula等(2012)Structure-based analysis of VDAC1 protein:defining oligomer contact sites.J Biol Chem,vol 287(3),475-85。

Kida等(2007)Two translocating hydrophilic segments of a nascent chain span the ER membrane during multispanning protein topogenesis.J Cell Biol,vol 171(7),第1441-1452页,均通过引用并入本文。

[0052]  $\alpha,\alpha'$ -二溴-间二甲苯是同双官能巯基反应性交联剂,其也可以使用。

[0053] 二溴-间二甲苯(CAS号626-15-3)是二烷基卤化物类化合物的成员,并且充当与游离巯基反应的同双官能交联剂。

[0054] 参考文献:

[0055] Jo等,(2012)Development of $\alpha$ -Helical Calpain Probes by Mimicking a Natural Protein-Protein Interaction,J Am Chem Soc.,col 134(42)-17704-13页,通过引用并入本文。

[0056] 替选的巯基反应性交联化合物形成稳定的硫醚键

[0057] 已知至少有六类试剂与游离巯基反应并产生不可还原的共价交联产物。这些化合物对巯基的特异反应性不同,并且一些在某些条件下会与水、胺和羧基反应。此外,这些化合物中的许多具有庞大的接头基团,这可能限制它们在受限空间环境中交联的能力。下面的列表给出了每个类的一些示例,但更详细的列表和参考文献在下面给出:

[0058] Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking,Wong,S:ISBN 0-8493-5886-8,通过引用并入本文。

[0059] 双马来酰亚胺

[0060] 双(马来酰亚胺基)己烷、N-N'-亚甲基双马来酰亚胺、双(N-马来酰亚胺甲基)醚、N,N'-(1,3-亚苯基)双马来酰亚胺、双(N-马来酰亚胺基)-4,4'-联苳、萘-1,5-二马来酰亚胺。

[0061] 卤代乙酰衍生物

[0062] 1,3-二溴丙酮、N,N'-双(碘乙酰基)多亚甲基二胺、N,N'-二(溴乙酰基)苯肼、1,2-二(溴乙酰基)氨基-3-苯肼(1,2-Di(bromoacetyl)amino-3-phenylhydrazine)、 $\gamma$ -(2,4-二硝基苯基)- $\alpha$ -溴乙酰基-L-二氨基丁酸溴乙酰基-酰肼。

[0063] 二烷基卤化物

[0064]  $\alpha,\alpha'$ -二溴-对二甲苯磺酸、 $\alpha,\alpha'$ -二碘-对二甲苯磺酸、二(2-氯乙基)硫化物、三(2-氯乙基)胺、N,N-双( $\beta$ -溴乙基)苄胺。

[0065] 2,4-s-三嗪(2.4 s-Triazines)

[0066] 二氯-6-甲氧基-s-三嗪、2,4,6-三氯-s-三嗪(氰尿酸)、2,4-二氯-6-(3'-甲基-4-氨基苯胺基)-s-三嗪、2,4-二氯-6-氨基-s-三嗪。

[0067] 氮丙啶类

[0068] 2,4,6-三(乙撑亚胺)-s-三嗪(2,4,6-Tri(ethyleneimido)-s-triazine);N,N'-乙烯亚胺基-1,6-二氨基己烷(N,N'-Ethyleneiminoyl-1,6-diaminohexane)、三[1-(2-甲基氮丙啶)]-氧化膦(Tri[1-(2-methylaziridenyl)]-phosphine oxide)。

[0069] 双环氧化物

[0070] 1,2:3,4-二环氧丁烷、1,2:5,6-二环氧己烷、双(2,-环氧丙基)醚、1,4-丁二醇二环氧甘油醚(1,4-Butadioldiglycidoxyether)。

[0071] 交联可以取代一个或更多个天然存在的二硫键,或者替代地,可以除二硫键之外产生交联。

[0072] 通常,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的抗体是交联的。已经使用例如双马来酰亚胺观察到70%-80%的交联效率。可以进一步纯化交联的抗体以产生更高水平的交联,例如通过添加还原剂以破坏剩余的非交联抗体的二硫键,并使用例如凝胶电泳分离。

[0073] 抗体或片段可以是抗游离轻链特异性的(例如抗 $\kappa$ 游离轻链或抗 $\lambda$ 游离轻链)、抗重链亚类特异性的、抗重链型特异性的或抗重链类-轻链型特异性的。

[0074] 重链类可以是IgG、IgA、IgM、IgD或IgE,通常是IgG或IgA。

[0075] 重链亚类包括IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0076] 抗体可以是物种特异性的,例如抗人或抗马或抗羊或抗猪。抗体可以在软骨鱼类、绵羊、山羊、马、兔、牛、骆驼科如美洲驼、大鼠或小鼠中培养。

[0077] 本发明的抗体或片段能够特异性结合免疫球蛋白。

[0078] 通常,抗体或片段与支持体附接。这可以是例如本领域通常已知的用于蛋白质纯化(例如抗体或片段的免疫纯化)的任何合适的色谱支持体。其包括:磁珠、琼脂糖树脂和其他本领域通常知晓的支持体。抗体与支持体的共价和非共价附接通常是本领域已知的。这可以通过例如使抗体上的游离胺基与用诸如溴化氰、N-羟基琥珀酰亚胺(磺基-NHS)或三氟代乙烷磺酰氯(tresyl chloride)等试剂活化的支持体反应来实现。水溶性碳二亚胺、EDC,可用于使用磺基-NHS形成具有羧酸酯基团的活性酯官能团。在本领域中,还使用生物素化的抗体或支持体结合至另一种支持体或抗体上的对应链霉亲和素部分。

[0079] 抗体或其片段可以是单克隆抗体。替代地,抗体或片段可以是多克隆抗体或片段。

[0080] 可以提供具有不同特异性的抗体或片段的混合物。

[0081] 例如,抗体片段可以是F(ab')<sub>2</sub>片段。

[0082] 本发明的抗体或片段可用于纯化一种或更多种免疫球蛋白,或用于去除可能污染质谱分析的不期望的蛋白质。因此,本发明的另一方面提供了纯化或表征免疫球蛋白的方法,其包括使含有免疫球蛋白的样品与根据本发明的抗体或片段接触,使免疫球蛋白与抗体或片段结合;将未结合的物质从与抗体或片段结合的免疫球蛋白中洗去;以及从抗体或片段中移出或洗脱结合的免疫球蛋白,以产生纯化的免疫球蛋白。该纯化的免疫球蛋白可以被进一步表征,例如,使用质谱法。

[0083] 样品可以是体液或组织的样品。这包括例如全血、血清、血浆、脑脊液或尿液。

[0084] 还提供了用于纯化用于质谱法的免疫球蛋白的测定试剂盒。其通常包含根据本发明的抗体或片段和一种或更多种质谱标准品。这些标准品提供了内部标准,以指示通过质谱法检测的分析物的大小。

[0085] 申请人还认识到,在待测试的受试者样品内的合适标准品(在本文中也称为对照)将提供内部标准量的免疫球蛋白,针对该标准量的免疫球蛋白可以定量来自受试者样品的免疫球蛋白的量。此外,如果在定量前的免疫球蛋白的纯化期间将该标准品置于来自受试者的样品内,则可以考虑由于纯化过程引起的免疫球蛋白的任何变化或损失。

[0086] 此外,样品内对照的存在还有助于去除由样品本身在点到质谱靶上时引起的误差。例如,在MALDI-TOF MS中,通常将样品点在靶上并干燥。免疫球蛋白在干燥样品上的分布不均匀。对照的存在确保当通过激光电离时,将相当的待测免疫球蛋白和对照样品从激光电离的区域移出。传统上,计算机使用中值峰强度,这导致了不准确性。该对照去除了一些不准确性,并有助于产生定量而非定性的免疫球蛋白测量。

[0087] 因此,本发明提供了一种定量来自受试者的样品中的受试者分析物或分析物片段的量的方法,其包括:

[0088] (i) 向样品中添加预定量的一种或更多种对照分析物或片段,其可与等同的受试者分析物或片段区分开;

[0089] (ii) 测量样品中受试者分析物或片段的相对量以及对照分析物或片段的量;以及

[0090] (iii) 比较受试者分析物或片段的相对量与对照分析物或片段的相对量,以定量原始受试者样品中分析物或片段的量。

[0091] 可以使用两种或更多种不同的对照分析物。其可以是不同浓度的,以提高目标分析物的定量准确度。

[0092] 潜在地,用于定量分析物的定量技术可以是本领域通常知晓的用于定量免疫球蛋白及其片段的任何合适技术。然而,最常检测到免疫球蛋白或片段。可以使用质谱法测量分析物。通过使用质谱法,对照分析物通常可与受试者分析物区分开。

[0093] 在一个或更多个步骤(例如纯化步骤)之前,可以将对照分析物添加到来自包含受试者分析物的受试者样品中,以充当内部对照,同时准备受试者样品用于随后的分析物检测。

[0094] 这使用例如更高或更低分子量形式分析物的和/或与受试者中测定的分析物具有不同电荷的分析物。这可以是例如免疫球蛋白或免疫球蛋白的片段。然而,潜在地,任何分析物(包括蛋白质、肽、核酸或糖蛋白)都可为分析物。通常,分子量高于500Da、或高于100Da、高于1500Da、高于5kDa、最通常高于10kDa。对照分析物可以通过具有不同的电荷或分子量以使对照分析物偏离等同受试者分析物所观察到的分析物峰来检测,从而可以分别

测量对照和受试者分析物。

[0095] 例如,如果免疫球蛋白是完整的免疫球蛋白,则对照免疫球蛋白可以是更高或更低分子量形式的完整免疫球蛋白。例如,如果被定量的受试者中的免疫球蛋白是 $\lambda$ 或 $\kappa$ 轻链,则在对照中使用更高或更低分子量的 $\lambda$ 或 $\kappa$ 轻链。检测到的对照完整免疫球蛋白或重链可以是与被定量的受试者相同类别的免疫球蛋白(例如IgA、IgD、IgE、IgM或IgG)。

[0096] 更高或更低分子量或电荷的对照意味着在许多测定中,所观察到的对照分析物(例如免疫球蛋白或片段)位置相对于受试者分析物或片段而言移位。这允许例如确定和测量对照的单独的峰或位置。由于在添加到样品之前预先确定了对照分析物或片段的量,那么如果确定了受试者分析物或片段的量并将其与已知量的对照分析物或片段进行比较,则可以定量受试者分析物或片段。由于一些技术例如MS也使用电荷来帮助检测分析物,所以也可以改变电荷。

[0097] 对照可以是单克隆完整免疫球蛋白、重链、 $\kappa$ 轻链或 $\lambda$ 轻链、Fc片段或Fab片段。根据定义,这样的单克隆蛋白是来源于产生单一形式蛋白质之克隆细胞的蛋白质。因此,可以使用所述蛋白质,因为它具有预定的分子量并且将在质谱图上的预定峰处检测到。在从患者检测到的蛋白质是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段的情况下,由于这些免疫球蛋白或片段的不同免疫球蛋白和不同抗原结合结构域之间的高度可变性,这些蛋白质在性质上可能是多克隆的,并因此在相对较低的浓度下会分别具有很多不同的分子量。因此,多克隆蛋白质的质谱法产生一系列来自受试者的通过质谱法检测的不同大小的免疫球蛋白。使用预定大小的单克隆蛋白质或片段在来自受试者的蛋白质范围内产生确定的峰,其易于区分并可用作对照。当检测到的蛋白质是单克隆免疫球蛋白时,由于单个单克隆蛋白质的独特性质,这将易于与对照区分。

[0098] 受试者可以是患有浆细胞相关疾病的患者,例如单克隆丙种球蛋白病。其包括MGUS、AL淀粉样变性、骨髓瘤(如多发性骨髓瘤)、浆细胞瘤, Waldenström 巨球蛋白血症和淋巴瘤(如B细胞非霍奇金淋巴瘤)。

[0099] 可以使用两种或更多种不同的对照分析物来同时检测来自相同样品的两种或更多种不同的分析物。

[0100] 本文使用的MS包括例如液相色谱-质谱(LC-MS)、与四极杆飞行时间质谱偶联的微流液相色谱电喷雾电离(微LC-ESI-Q-TOF MS)。这可以包括例如使用正离子模式。

[0101] 替代地,质谱技术包括基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)。也可以使用轨道阱质谱仪(orbitrap mass spectrometer)。

[0102] 例如,对照分子量或电荷大小的提高意味着与等同受试者的免疫球蛋白或片段相比,分析物(例如免疫球蛋白或片段)的质谱读数中的峰发生移位。

[0103] 对照免疫球蛋白或片段可以是完整的免疫球蛋白(具有一条或更多条轻链附接到一条或更多条重链)、重链、 $\lambda$ 轻链或 $\kappa$ 轻链,例如 $\lambda$ 游离轻链或 $\kappa$ 游离轻链。还可以检测诸如Fc或Fab片段的抗体片段。

[0104] 由于分析物(如免疫球蛋白)中的一个或多个氨基酸的保守替换,对照分析物(如免疫球蛋白)与受试者分析物(如免疫球蛋白)相比,可具有更高的分子量。

[0105] 保守的氨基酸替换的例子包括:

残基	保守替换	残基	保守替换
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu; Val		

[0106] 与这种保守取代相关的一个问题是与受试者免疫球蛋白的结构相比，它们可能影响对照免疫球蛋白的结构。这可以是，例如，通过免疫球蛋白的折叠，或者仅仅是由于向构成免疫球蛋白表面上的表位的蛋白质链添加一个或更多个不同的侧基。

[0107] 通常，在测定如上所述的分析物如免疫球蛋白之前，将分析物(例如来自样品的免疫球蛋白)纯化至某种程度。

[0108] 来自受试者的样品可能是组织或生物流体的样品。生物流体可以是例如血液、血清、血浆、尿液、唾液或脑脊髓液。最典型地，样品是血液、血清或血浆。生物样品可以来自具有分析物例如免疫球蛋白的受试者，其包括但不限于哺乳动物，例如人、狗、猫、灵长类动物、啮齿动物、猪、绵羊、牛或马。

[0109] 可以处理样品以去除可能干扰例如质谱技术的组分。例如，可以将样品离心、过滤或进行色谱技术以除去干扰组分，例如从一个或多个细胞或组织碎片中除去干扰组分。例如，可以使用常规凝血技术处理全血样品以去除红细胞和白细胞以及血小板。样品也可以去蛋白化。例如，可以使用常规试剂如乙腈、KOH、NaOH使血浆样品的血清蛋白沉淀出来，任选地随后离心样品。例如，可以使用标准方法将免疫球蛋白从样品中分离或富集在样品中。这样的方法包括，例如，从样品中除去一种或更多种非免疫球蛋白污染物。替选地，可以使用免疫纯化、离心、过滤、水过滤、透析、离子交换色谱、尺寸排阻色谱、蛋白A/G亲和色谱、亲和纯化、沉淀、凝胶电泳、毛细管电泳或化学分馏来富集或纯化样品。

[0110] 通常，在至少一种或那些纯化技术之前将对照分析物添加到样品中。即，在进行样品内免疫球蛋白的纯化或浓缩之前，例如通过上述方法，将其包含在受试者分析物样品中。这通常在使用用于检测分析物例如免疫球蛋白的质谱法以及其他技术之前，例如通过LC-MS、orbitrap MS或MALDI-TOF MS。将其掺入样品中的优点是对照分析物通过样品的纯化过程充当内部对照。将已知量的对照分析物或片段添加到样品中，这可以用作阳性对照以确认纯化步骤已经成功，或者用于鉴定在受试者样品中分析物的纯化过程中发生问题的位置。

[0111] 由于对照免疫球蛋白通常在受试者免疫球蛋白的纯化过程中使用，所以在免疫球蛋白或片段的链中使用保守氨基酸替换，可以影响对照免疫球蛋白或片段相比于受试者免

疫球蛋白或片段的纯化方式。例如,在使用亲和纯化步骤(例如免疫纯化)的情况下,免疫球蛋白结构方面的细微差别可能影响与受试者免疫球蛋白共纯化的能力。

[0112] 因此,与等同的受试者免疫球蛋白相比,最典型地,对照免疫球蛋白在免疫球蛋白的N末端或更通常在C末端包含多个额外的氨基酸。即通常,与等同的受试者免疫球蛋白或片段相比,存在5、10、15、20或更多的额外氨基酸以增加免疫球蛋白或片段的分子量。

[0113] 在一个实施方案中,等同的分析物例如免疫球蛋白或片段是指当待检测的样品是完整的分析物如免疫球蛋白时,将额外增加的分子量或电荷提供至在完整的分析物上,例如提供至从替选来源而非受试者中纯化的免疫球蛋白。例如,其可以是多克隆或单克隆免疫球蛋白或者多克隆免疫球蛋白。例如,待检测的完整免疫球蛋白或重链免疫球蛋白是IgA、IgG、IgM、IgD或IgE时,对照的完整免疫球蛋白或重链来自与待检测的受试者免疫球蛋白或重链相同的免疫球蛋白类型,即IgA、IgG、IgM、IgD或IgE。

[0114] 类似地,在样品中检测到 $\kappa$ 轻链或 $\lambda$ 轻链的情况下,对照免疫球蛋白使用较大分子量的 $\kappa$ 轻链或 $\lambda$ 轻链。

[0115] 含有另外氨基酸或实际上是保守氨基酸的对照分析物可以重组产生。例如,编码诸如免疫球蛋白重链或轻链的蛋白质的核酸序列可以具有添加到N末端或C末端编码区的多个密码子,以提高在合适的宿主细胞内重组产生氨基酸的数目,所述宿主细胞例如为原核细胞或更典型为真核宿主细胞或无细胞系统。所述氨基酸可以是,例如,任何合适的天然或非天然氨基酸,但通常是丙氨酸,例如,以产生聚丙氨酸C或N末端。

[0116] 重组抗体或其片段的产生通常是已知的。参见例如Frenzel A.等的综述(Frontiers in Immunology (2013), 4, 文章217)以及Stech M.和Kubick S. (Antibodies (2015), 4, 12-33), 其通过引用并入本文。

[0117] 可以将多种不同的对照分析物(例如免疫球蛋白或片段)添加到来自受试者的样品中。例如,可以测量来自受试者的样品的游离 $\kappa$ 轻链和游离 $\lambda$ 轻链。因此,对照免疫球蛋白或片段将包括对照游离 $\lambda$ 轻链和对照游离 $\kappa$ 轻链。类似地,如果要测量重链完整免疫球蛋白或重链,则对照可另外包含合适的对照重链或对照完整免疫球蛋白。

[0118] 替选地,对照可以是单克隆抗体或片段,其具有预设的比待测定的免疫球蛋白部分更高或更低的分子量。单克隆抗体的产生通常是已知的。例如,可以基于其分子量选择市售的单克隆抗体作为对照。例如,它可以被协调以允许其与来自人的样品的抗体共纯化。

[0119] 对照可以与如上定义的双联抗体一起使用。

[0120] 因此,本发明的另一方面提供了一种制备用于质谱法的样品的方法,其包括:

[0121] (i) 提供来自受试者的样品,其包含一种或更多种分析物,所述分析物通常是免疫球蛋白或片段;

[0122] (ii) 向样品中添加预定量的一种或更多种对照分析物或其片段,通常是免疫球蛋白或其片段;

[0123] (iii) 使用如上定义的双联抗体或片段,从受试者和对照分析物(通常是免疫球蛋白或片段)共纯化至少一部分分析物(通常是免疫球蛋白或片段);并且可选地

[0124] (iv) 将一部分共纯化分析物(例如免疫球蛋白或片段)置于质谱靶上。

[0125] 然后可以将质谱靶放置在质谱仪中并使用质谱仪进行分析。靶通常是放置样品的基底,然后放置在质谱仪中以使样品进行质谱分析。

- [0126] 还提供了其中包含一种或更多种对照分析物或其片段的质谱仪。
- [0127] 样品、质谱仪、免疫球蛋白和对照可如本文所定义。
- [0128] 提供了包含如本文所定义的交联抗体或片段和如本文所定义的对照分析物(例如免疫球蛋白或片段)的测定试剂盒。试剂盒可另外包含质谱靶和/或可提供缓冲剂或盐。
- [0129] 还提供了包括使用测定试剂盒的进行质谱分析的方法。
- [0130] 还提供了诊断B细胞相关疾病或其他免疫相关疾病的方法,其包括使用本发明的抗体、本发明的方法和/或根据本发明的测定试剂盒来纯化和表征免疫球蛋白。
- [0131] B细胞相关疾病包括,例如,完整免疫球蛋白多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)、轻链MM、非分泌性MM、AL淀粉样变性、轻链沉积疾病、冒烟型MM、浆细胞瘤和MGUS(重要性不明确的单克隆丙种球蛋白病)的诊断。其也可以用于诊断其他B细胞恶液质或诊断或预测许多其他病症,例如W02013/088126中描述的PTLD,或者癌症、糖尿病、心脏病或肾病(W02011/095818, W02013/050731, EP1870710, W02011/107965),通过引用并入本文。
- [0132] 通过来自患者的样品的抗体鉴定和表征还可用于表征许多其他疾病。其包括:类风湿性关节炎、乳糜泻、格雷夫斯病(Graves' disease)、恶性贫血、Sjögren综合征和系统性红斑狼疮。
- [0133] 现在将参考以下附图仅示例性地描述本发明:
- [0134] 图1显示考马斯蓝染色的凝胶,说明在抗游离 $\kappa$ F(ab')<sub>2</sub>和抗游离 $\lambda$ F(ab')<sub>2</sub>抗体片段中形成硫醚键。F(ab')<sub>2</sub>分子的交联轻链和重链的形成在SDS-PAGE凝胶图像中显示(箭头在约50kDa)。交联度在7天时更高。
- [0135] 图2显示了经处理(以诱导硫醚键形成)和未经处理的抗游离 $\kappa$ F(ab')<sub>2</sub>片段的考马斯蓝染色凝胶。(NR)非还原样品(R)还原样品。还显示了对每个条带中的结构的解释。
- [0136] 图3类似地显示了抗游离 $\lambda$ F(ab')<sub>2</sub>抗体片段。
- [0137] 图4显示了硫醚交联和非交联的抗游离 $\kappa$ 和抗游离 $\lambda$ F(ab')<sub>2</sub>抗体与游离轻链(FLC)和正常人血清(NHS)的结合活性。
- [0138] 图5显示了通过还原考马斯蓝染色的SDS-PAGE测量的双马来酰亚胺基乙烷(BMOE)对抗 $\lambda$ 总F(ab')<sub>2</sub>抗体的交联。
- [0139] 图6显示了双马来酰亚胺基乙烷(BMOE)交联之前和之后抗 $\lambda$ 总F(ab')<sub>2</sub>抗体与IgG $\lambda$ 的结合。
- [0140] 图7显示了用2mM双马来酰亚胺基乙烷(BMOE)交联的抗游离 $\lambda$ F(ab')<sub>2</sub>(10 $\mu$ M)和用4mM BMOE交联的抗游离 $\kappa$ 全分子(10 $\mu$ M),如通过还原考马斯蓝染色的SDS-PAGE所测量的。还原SDS-PAGE泳道的扫描密度测定表明,抗游离 $\lambda$ 的交联效率>70%,抗游离 $\kappa$ 的交联效率>90%。
- [0141] 图8显示了未经处理的和用双马来酰亚胺基乙烷(BMOE)交联的抗游离 $\kappa$ 全分子与游离 $\kappa$ 轻链的结合。还显示了与IgG、IgA和IgM的交叉反应性。
- [0142] 图9显示了未经处理的和用双马来酰亚胺基乙烷(BMOE)交联的抗游离 $\lambda$ F(ab')<sub>2</sub>与游离 $\lambda$ 轻链的结合。还显示了与IgG、IgA和IgM的交叉反应性。
- [0143] 图10显示了在没有先前的样品添加情况下,用含有50mM三(2-羧乙基)膦(TCEP)的5%乙酸洗脱的抗IgG3缀合的琼脂糖(黑线)和硫醚交联的抗IgG3缀合的琼脂糖(灰线)的MALDI质谱。显示了 $\lambda$ 轻链(L)、 $\kappa$ 轻链(K)、IgG重链(G)和IgA重链(A)的质量/电荷范围。

[0144] 图11显示了与含有升高的IgG3的人血清孵育并用含有50mM TCEP的5%乙酸洗脱后,抗IgG3缀合的琼脂糖凝胶(黑线)和硫醚交联的抗IgG3缀合的琼脂糖凝胶(灰线)洗脱液的MALDI质谱。显示了 $\lambda$ 轻链(L)、 $\kappa$ 轻链(K)、IgG重链(G)和IgA重链(A)的质量/电荷范围。

[0145] 图12显示了在没有先前样品添加的情况下,用含有50mM TCEP的5%乙酸洗脱的抗游离 $\kappa$ 缀合的琼脂糖(黑线)和BMOE交联抗游离 $\kappa$ 缀合的琼脂糖(灰线)的MALDI质谱。

[0146] 图13显示了在没有先前样品添加的情况下,用含有50mM TCEP的5%乙酸洗脱的抗游离 $\lambda$ 缀合的琼脂糖(黑线)和BMOE交联的抗游离 $\lambda$ 缀合的琼脂糖(灰线)的MALDI质谱。

[0147] 图14显示了通过骆驼科抗 $\kappa$ 缀合的琼脂糖从人血清中共纯化的重组游离 $\kappa$ 轻链(rKappa)和内源IgG $\kappa$ 的MALDI质谱(A)。计算出的 $\kappa$ 轻链峰面积(GK)、rKappa和GK/rKappa比的变异系数示于(B)中。

[0148] 通过碱处理将硫醚键引入抗体F(ab')<sub>2</sub>片段中

[0149] 可以在升高的温度下在碱性环境中诱导抗体二硫键向硫醚键的转化。这种键的形成通常是本领域已知的,例如在Zhang等IgG1 IgG1 Thioether Bond formation in vivo. JBC, 288:16371-16382, 2013; Zhang和Flynn Cysteine racemization IgG heavy and light chains, JBC, 288:34325-34335, 2013中。

[0150] 研究了市售的Freelite™ F(ab')<sub>2</sub>抗体,以观察是否可以将碱诱导的硫醚键引入片段中。这些抗体结合游离 $\lambda$ 或游离 $\kappa$ 轻链。图1至4中显示的数据表明,通过用50mM甘氨酸-NaOH、在pH 9于50℃处理,可以将硫醚交联引入F(ab')<sub>2</sub>片段中。7天后,与未处理的F(ab')<sub>2</sub>相比,观察到约20%的交联效率(图1至3)。

[0151] 在碱处理0和7天后,通过ELISA评估抗游离 $\kappa$ 和抗游离 $\lambda$ 抗体的结合活性(图4)。将抗体包被在ELISA板上,并呈现纯化的 $\kappa$ 轻链、纯化的 $\lambda$ 轻链或正常人血清。通过使用四甲基联苯胺(TMB)显色底物和与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗轻链抗体测量450nm处的吸光度来检测结合活性。虽然ELISA活性有所降低,但如图4所示,经处理的抗体中的活性仍然存在。

[0152] 抗 $\lambda$ 总F(ab')<sub>2</sub>片段的双马来酰亚胺乙烷(BMOE)交联

[0153] 研究抗 $\lambda$  F(ab')<sub>2</sub>抗体以观察抗体链是否可通过BMOE交联。用1mM(TCEP)还原抗 $\lambda$  F(ab')<sub>2</sub>片段。使用Hi-Trap脱盐柱除去TCEP,并将还原的抗 $\lambda$ 总F(ab')<sub>2</sub>以100至500倍摩尔过量的BMOE交联,然后通过考马斯蓝染色SDS-PAGE在还原条件下进行分析。图5显示了BMOE可以交联F(ab')<sub>2</sub>片段,效率超过50%。此外,所得抗体链交联对还原条件具有抗性。

[0154] 用多克隆IgG $\lambda$ 包被ELISA板,并将经BMOE处理的或未经处理的抗总 $\lambda$  F(ab')<sub>2</sub>结合到板上。通过使用抗绵羊-HRP和TMB底物在450nm处的光吸收测量抗全 $\lambda$ 的结合活性。在产生>50%BMOE交联的条件下(图5),抗总 $\lambda$ 抗体保留超过70%的IgG $\lambda$ 结合活性(图6)。

[0155] BMOE交联的抗游离 $\lambda$ 和抗游离 $\kappa$ 抗血清

[0156] 研究市售的Freelite™抗体以观察抗体链是否可通过BMOE处理进行交联。全分子抗游离 $\kappa$ 和F(ab')<sub>2</sub>抗游离 $\lambda$ 分别用1.5mM和1.0mM TCEP还原。使用Hi-Trap脱盐柱除去TCEP,分别以400倍和200倍摩尔过量的BMOE交联抗游离 $\kappa$ 和抗游离 $\lambda$ 抗体。在还原条件下通过考马斯蓝染色的SDS-PAGE分析样品。如图7所示,对于F(ab')<sub>2</sub>或全分子形式的抗体,BMOE交联效率超过50%。

[0157] 进行活性ELISA测定,其中将经BMOE处理的和未经处理的抗体包被在ELISA板上,

并提供纯化的免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM、游离 $\kappa$ 、游离 $\lambda$ )。通过使用抗轻链-HRP和TMB底物测量450nm处的吸光度来检测结合活性。图8至9中的结果显示交联的抗血清仍然保持特异性抗原结合活性。

[0158] 硫醚交联稳定琼脂糖缀合的抗IgG3抗体

[0159] 未经处理的和硫醚交联(通过碱处理)的抗IgG3抗体与琼脂糖树脂共价缀合,并且在未添加先前样品的情况用含有50mM TCEP的5%乙酸处理。通过MALDI-TOF MS分析洗脱的上清液(图10)显示硫醚交联的抗体释放的物质少于未经处理的抗体,从而证明抗体稳定性提高。抗IgG3结合活性如图11所示,其中每种琼脂糖树脂与含有升高的IgG3的人血清一起孵育,并用含有50mM TCEP的5%乙酸洗脱。相对于未经处理的抗体,MALDI-TOF MS分析表明硫醚交联的抗IgG3抗体具有相似或更高的结合活性,如通过对应于人IgG $\lambda$ 链的峰面积所测量的。

[0160] BMOE交联稳定抗游离 $\kappa$ 和抗游离 $\lambda$ 抗体

[0161] 在用TCEP还原并在Hi-Trap脱盐柱上脱盐后,FreeLite™抗 $\kappa$ 和抗 $\lambda$ 抗体不经处理或用BMOE交联。将抗体与琼脂糖树脂缀合,在未添加先前样品的情况下用含有50mM TCEP的5%乙酸处理,并通过MALDI-TOF MS分析上清液。如图12至13所示,从BMOE交联抗体释放的抗体片段明显更少,表明抗体稳定性显著提高。

[0162] 抗体稳定性的提高降低了来自纯化抗体物质的交叉污染。当用于纯化和分离例如来自患者的免疫球蛋白样品时,这提高了进一步表征步骤的准确性。

[0163] 可以通过质谱法将对照分析物与受试者分析物区分开

[0164] 用已知量和已知质量的重组 $\kappa$ 轻链(对照 $\kappa$ 链)补充人血清。使用与骆驼科抗 $\kappa$ 抗体缀合的市售琼脂糖从血清中共纯化内源和对照 $\kappa$ 链,并通过MALDI-TOF MS分析洗脱的上清液(图14)。如图14A所示,由于其相对分子量的差异,对照 $\kappa$ 链可与内源 $\kappa$ 链区分开。

[0165] 对照分析物可用于提供关于受试者分析物的定量信息

[0166] 从人血清中共纯化内源 $\kappa$ 链和对照 $\kappa$ 链,点样至两个96-靶板上,并通过MALDI-TOF MS分析(图14B)。确定对应于每个 $\kappa$ 链的峰面积,并用于计算每个平板和涵盖两个平板的192个重复的变异系数(%CV)。图14B显示了当相对于对照 $\kappa$ 峰面积表示192个重复的对应内源性 $\kappa$ 的峰面积时,计算的%CV小于10%。这表明本发明的实质性诊断潜力。该图说明内部对照分析物可用于确定受试者分析物相对于对照分析物的丰度,因此可提供关于受试者分析物的定量和定性信息。该观察结果还表明,对照分析物可用于验证纯化程序的成功性,并用于最小化由例如MALDI靶点的差异电离所引起的数据收集中的错误。

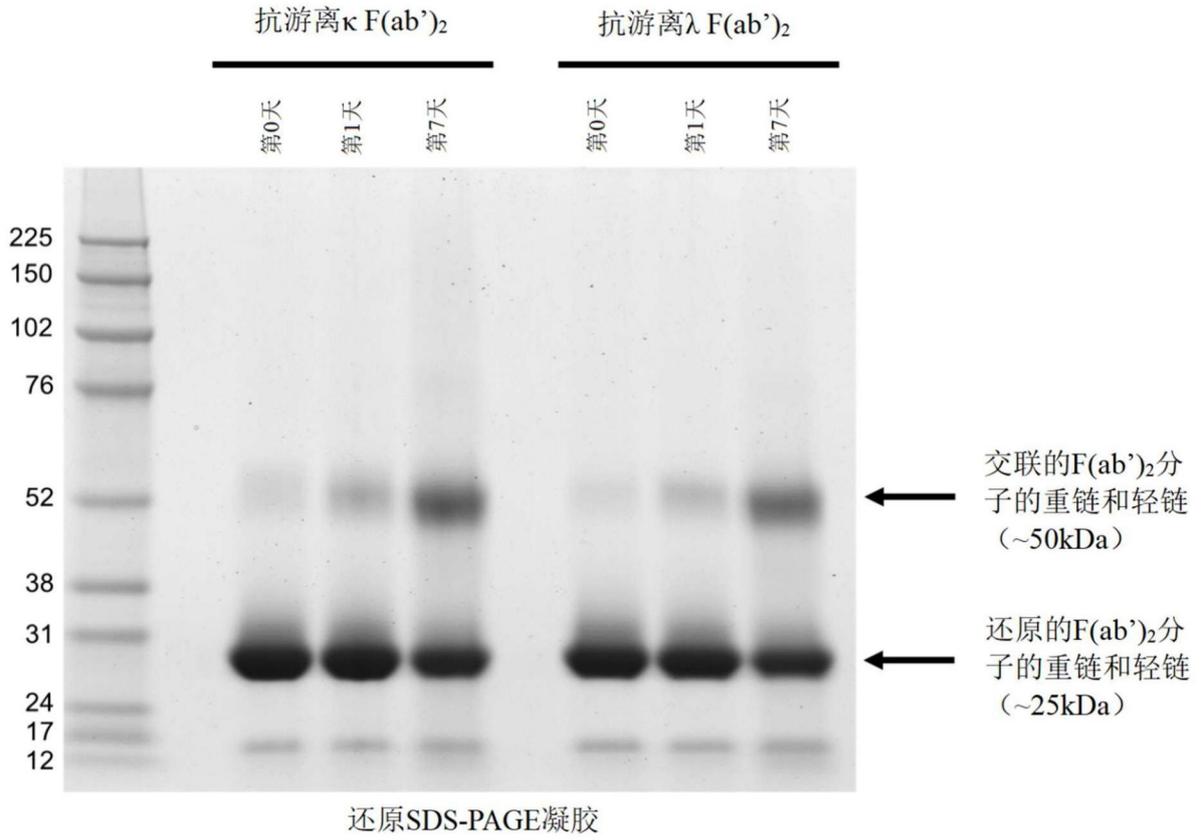


图1

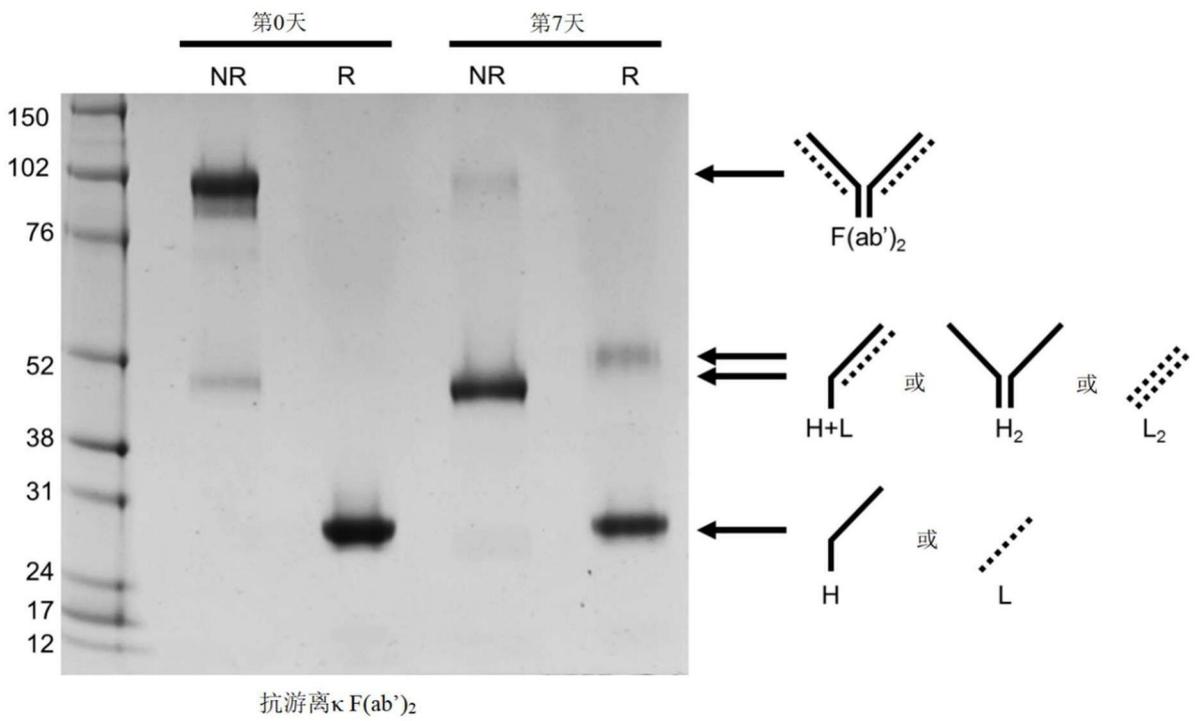


图2

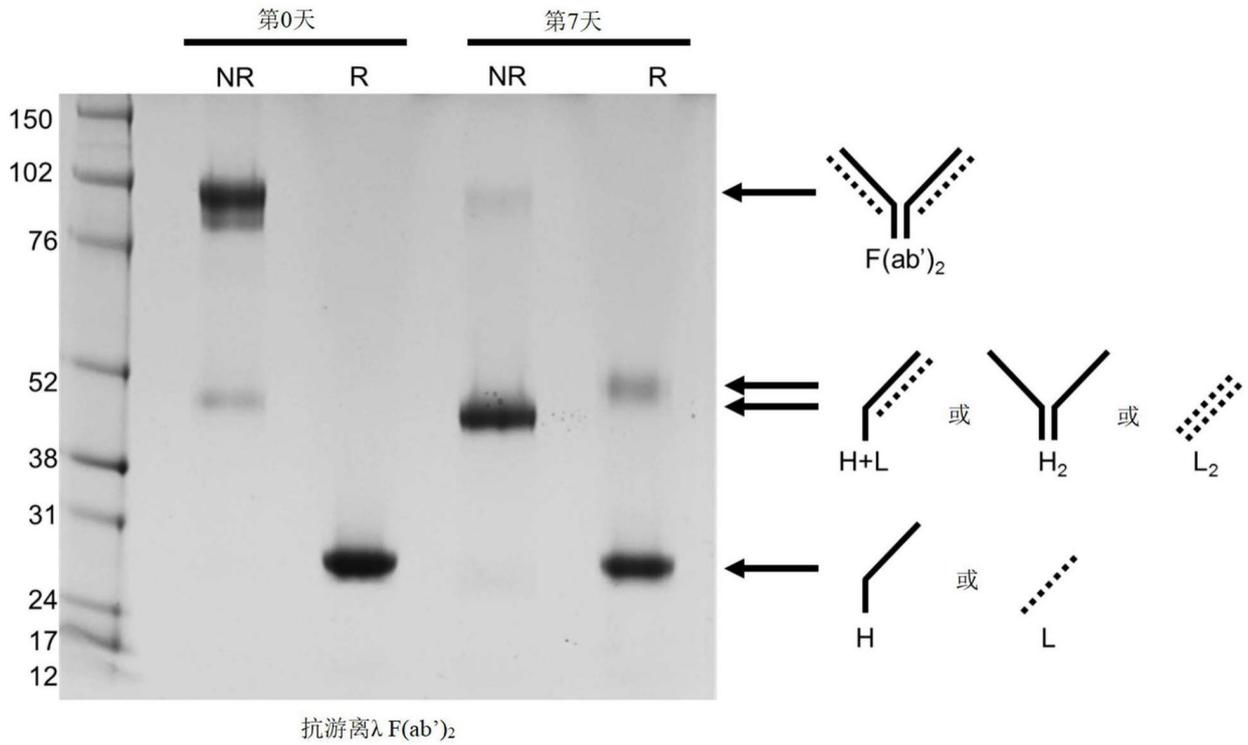


图3

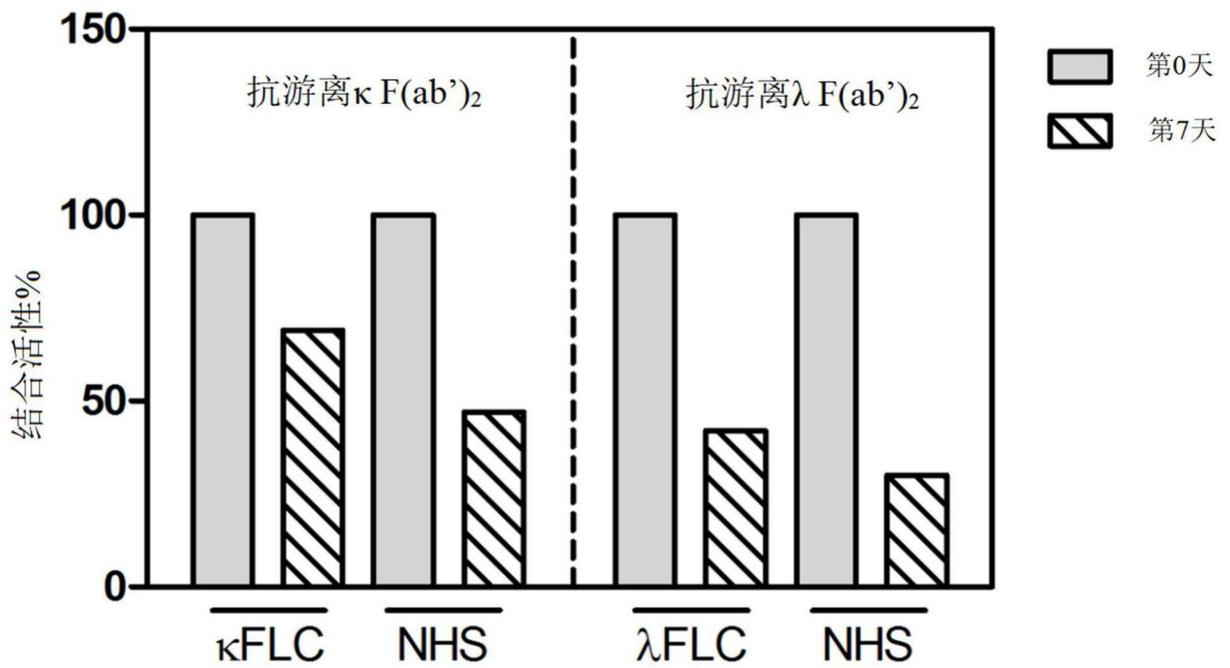
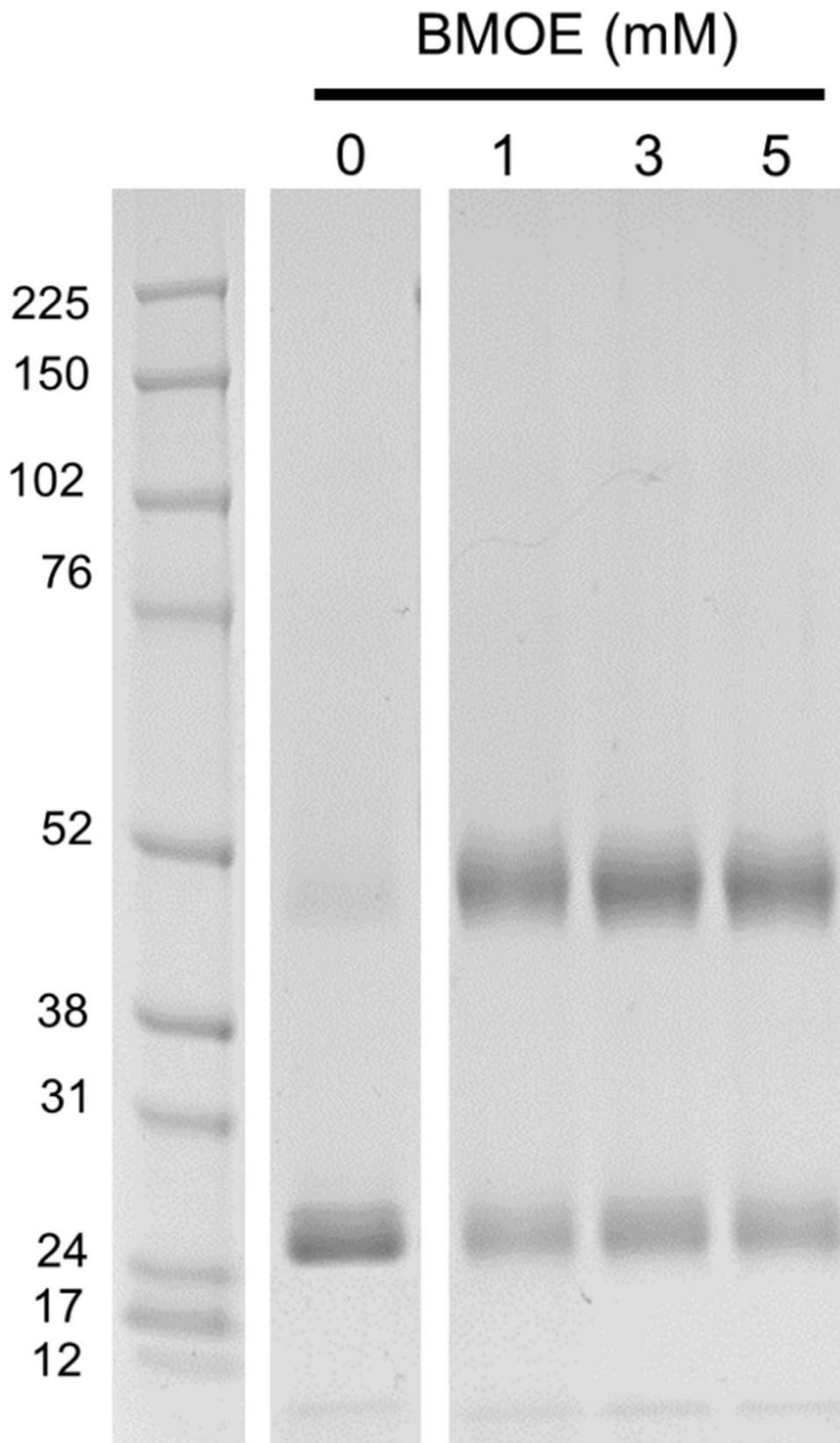


图4



还原SDS-PAGE凝胶

图5

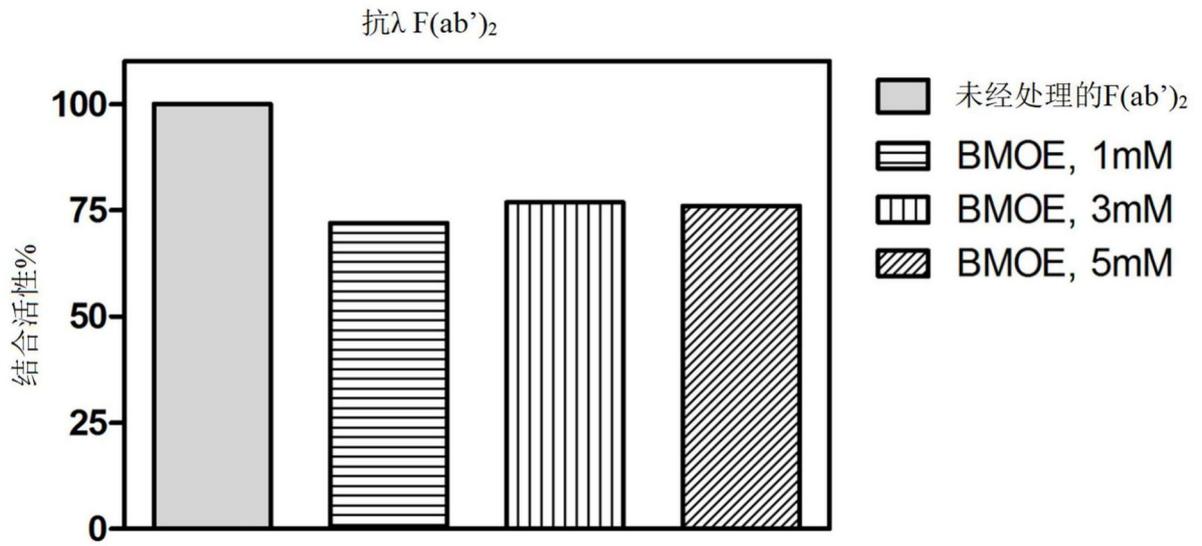


图6

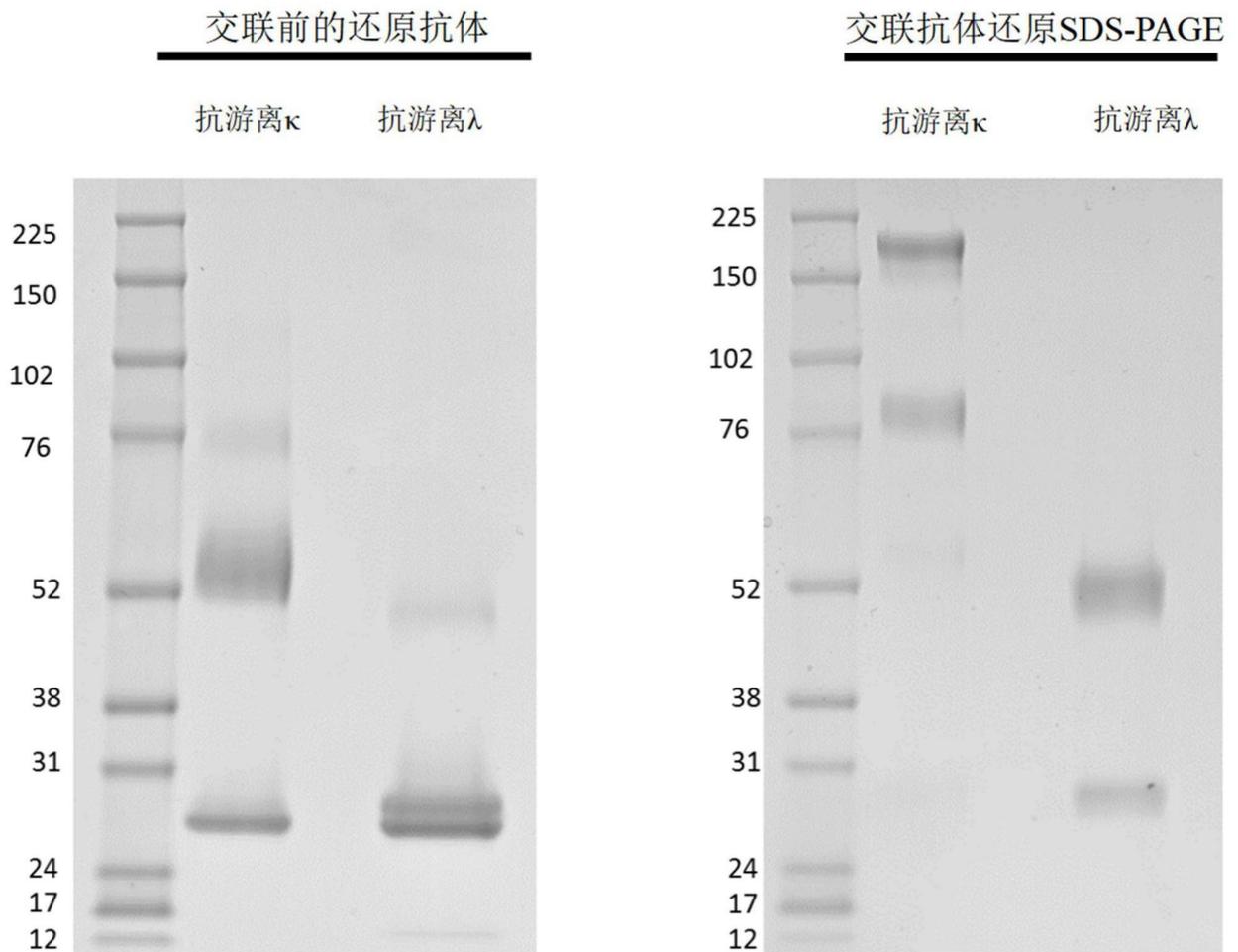
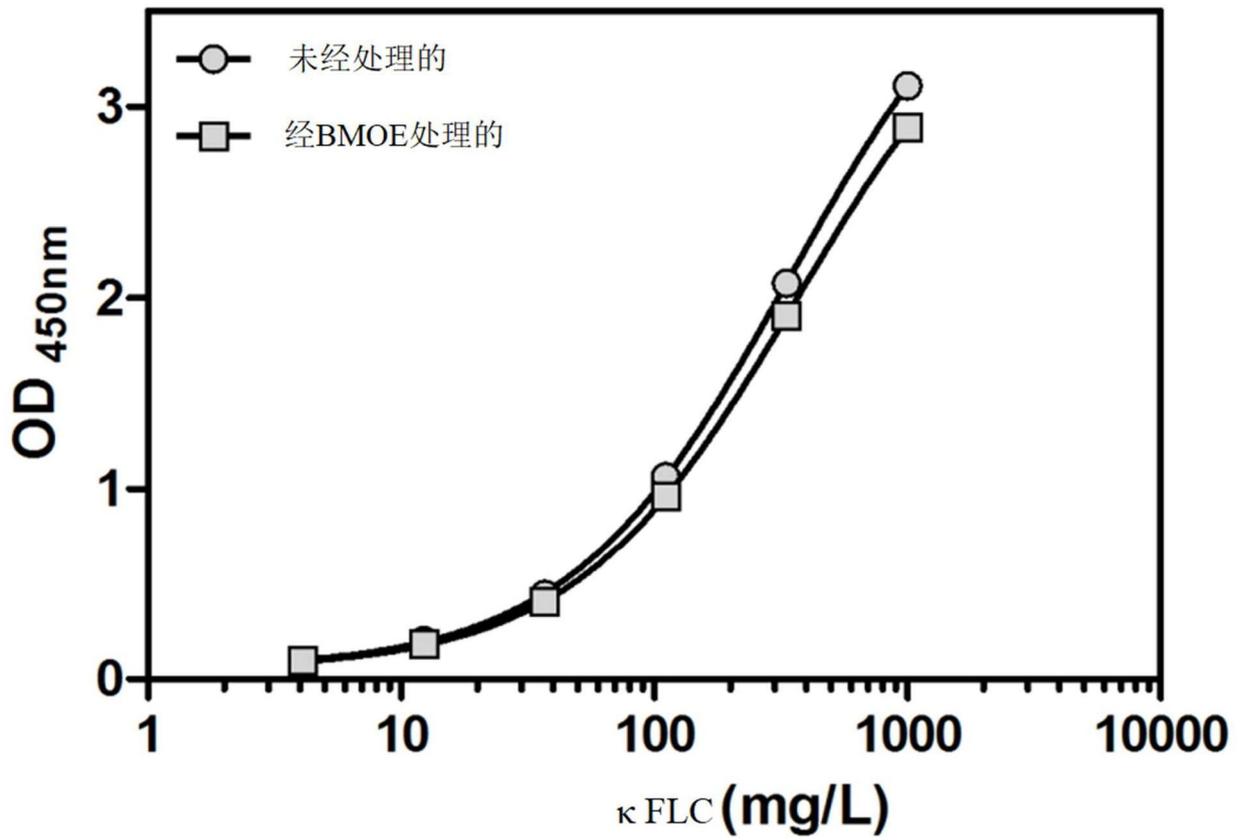
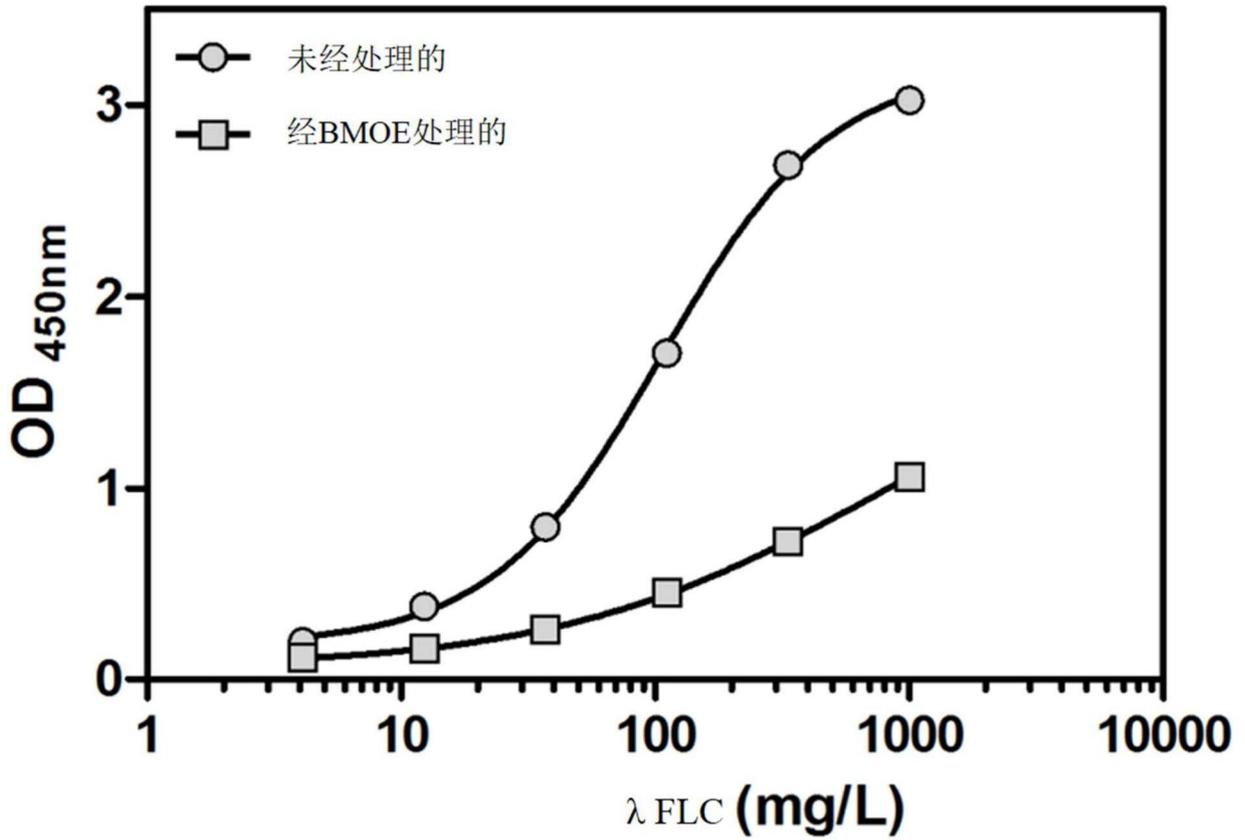


图7



	未经处理的	BMOE交联的
顶部OD	3.11	2.89
底部OD	0.10	0.09
IgG % 交叉反应性	0.057	0.058
IgA % 交叉反应性	0.083	0.086
IgM % 交叉反应性	0.31	0.32

图8



	未经处理的	BMOE交联的
顶部OD	3.02	1.06
底部OD	0.20	0.11
IgG % 交叉反应性	0.16	0.11
IgA % 交叉反应性	0.21	0.14
IgM % 交叉反应性	0.69	0.32

图9

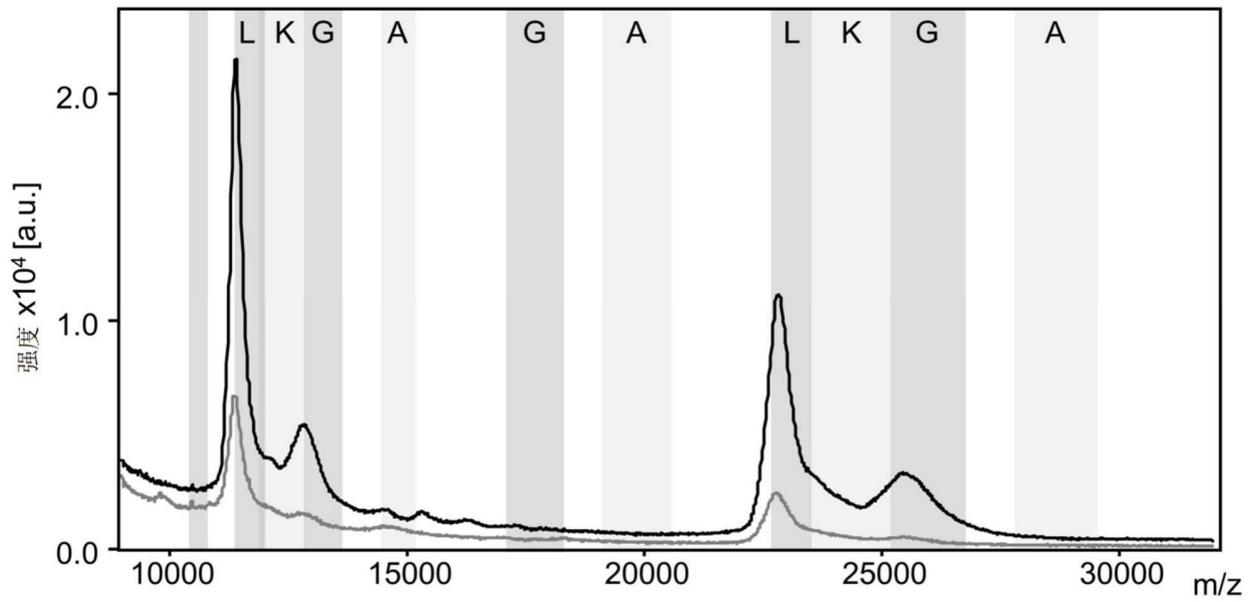


图10

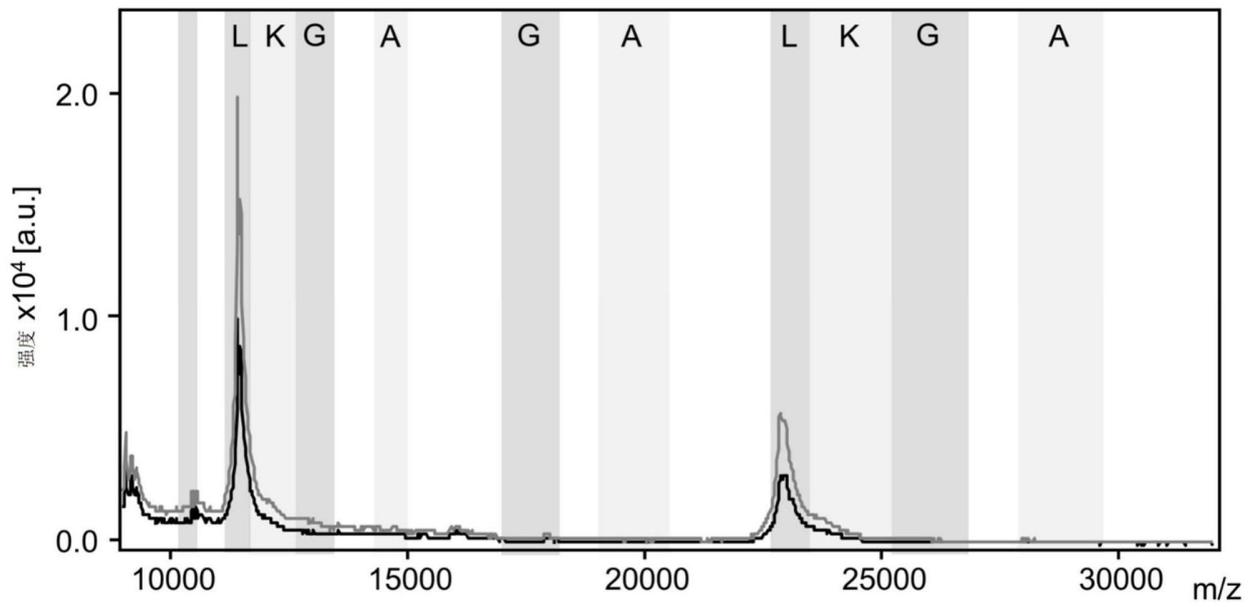


图11

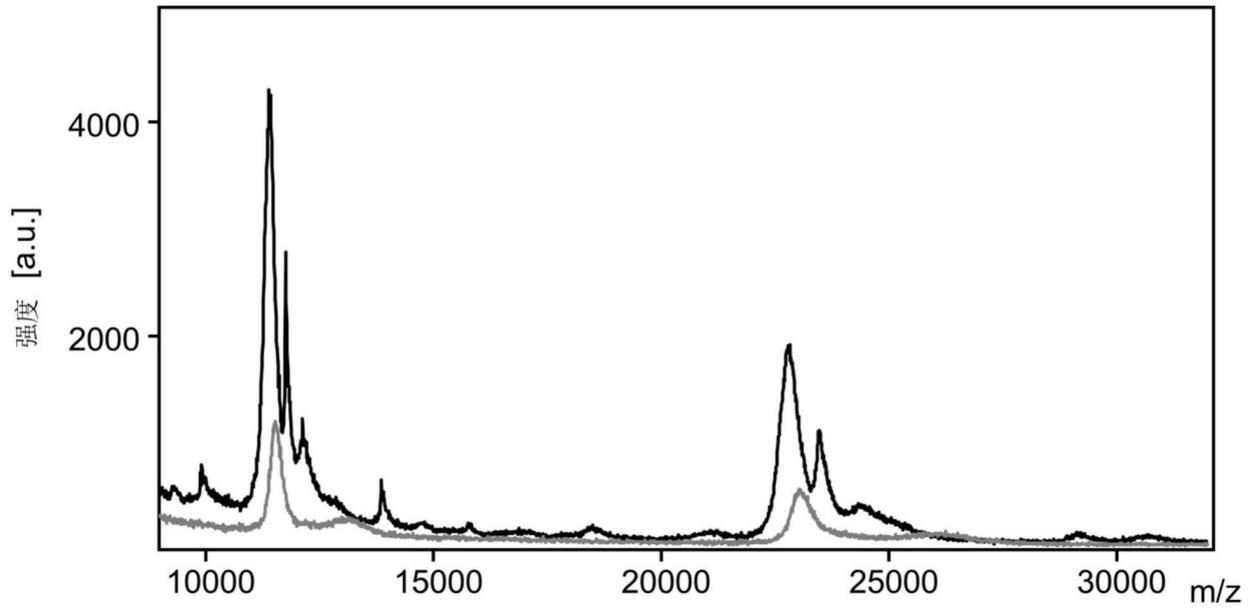


图12

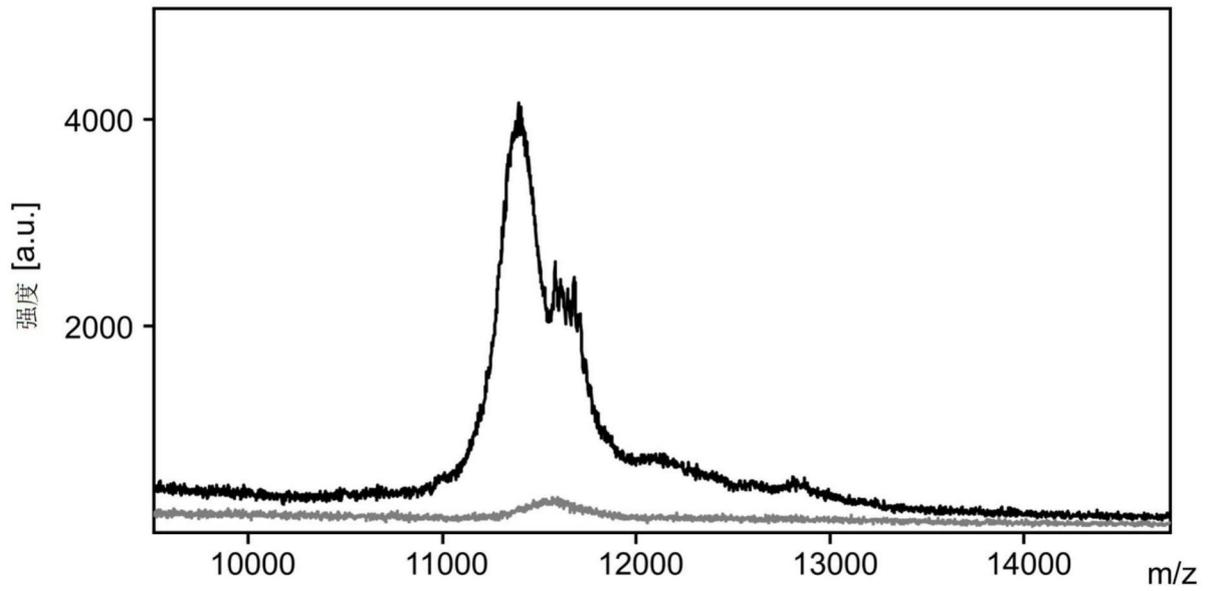
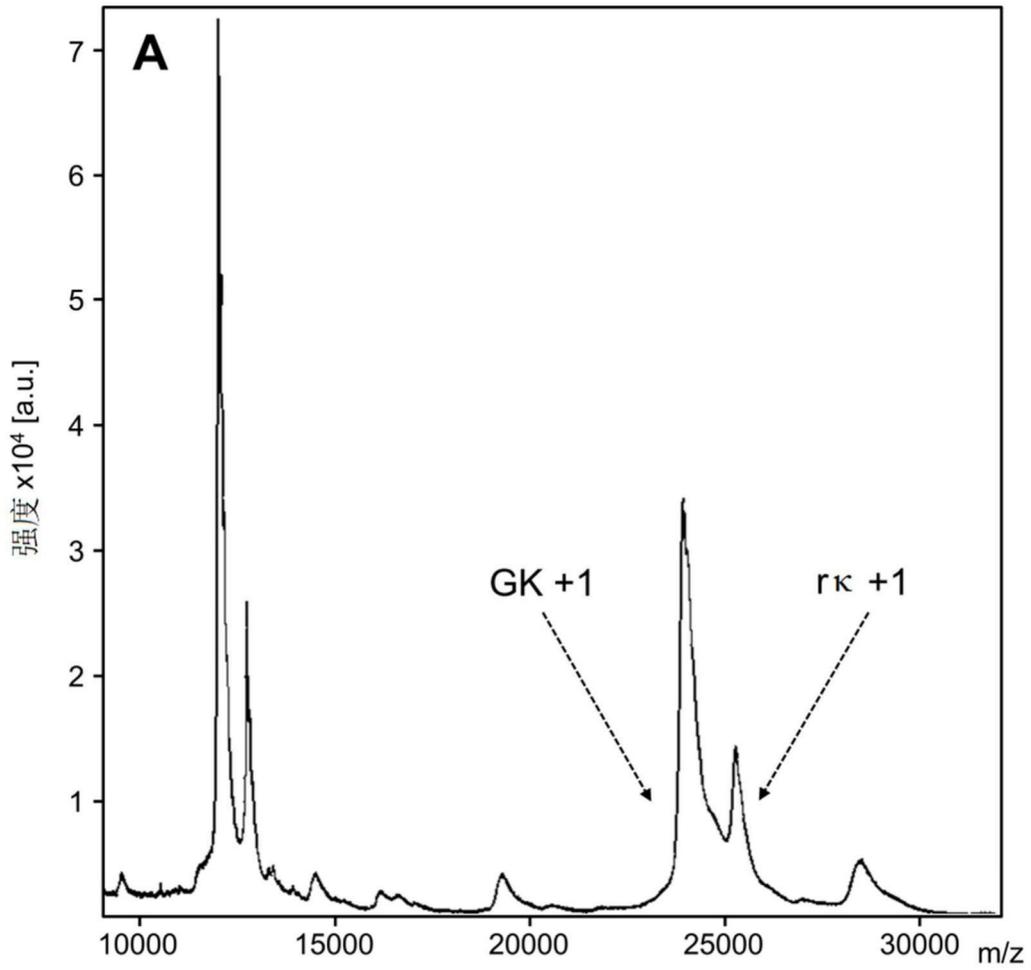


图13



**B**

变异系数 (%; n=96/板)

	GK +1 峰面积	rK +1 峰面积	峰面积比 (GK/rK)
板 #1	35	33	4.3
板 #2	41	39	7.2
板 #1 + 板 #2	38	36	6.4

图14