



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112495319 B

(45) 授权公告日 2023.07.04

(21) 申请号 202011055170.1

C07K 16/18 (2006.01)

(22) 申请日 2020.09.29

G01N 33/68 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G01N 33/546 (2006.01)

申请公布号 CN 112495319 A

G01N 33/543 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.03.16

审查员 李鹏

(73) 专利权人 海丰生物科技(北京)有限公司

地址 100176 北京市大兴区北京经济技术

开发区经海三路35号院3幢1层、2层、3

层

(72) 发明人 石怀兴 温志国

(74) 专利代理机构 北京华清迪源知识产权代理

有限公司 11577

专利代理师 彭伶俐

(51) Int. Cl.

B01J 13/14 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54) 发明名称

一种环瓜氨酸双微球偶联物及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种环瓜氨酸双微球偶联物及其制备方法与应用,所述方法包括将羧基胶乳微球和氨基微球与环瓜氨酸连接,形成氨基微球-环瓜氨酸-羧基微球偶联物。本发明利用两个粒径接近的微球,先使用羧基微球,再使用氨基微球与CPP抗原进行偶联,以提升检测试剂的灵敏度,同时,可以保持较好的检测线性范围;本发明方法制备的试剂具有较好的稳定性,且试剂的制备工艺简单。

1. 一种环瓜氨酸双微球偶联物的制备方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

步骤一、羧基胶乳微球活化

向20mL 0.05M pH 6.5的MES缓冲液中加入1mL直径为120nm的10%聚苯乙烯胶乳微球,然后加入5mL浓度为1mg/mL的碳化二亚胺水溶液,室温搅拌活化30min,得到活化后的聚苯乙烯胶乳微球;

步骤二、羧基微球与环瓜氨酸肽偶联

将5mg环瓜氨酸肽,用50mL,0.05M pH8.0的MOPS缓冲液稀释,混合均匀,倒入所述活化后的聚苯乙烯胶乳微球胶乳液,室温搅拌0.5h,得到含羧基微球与环瓜氨酸肽偶联物的溶液;

步骤三、氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的制备

将0.5mL 10%的氨基胶乳微球加入到10mL 0.01%的BSA溶液中,混合均匀后,倒入到所述含羧基微球与环瓜氨酸肽偶联物的溶液中,室温继续搅拌3h,得到含氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的溶液;

步骤四、封闭氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物

向所述含氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的溶液中加入2mL 5%BSA搅拌1h,终止反应,得到含稳定的氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的溶液;

步骤五、氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物分离

对所述含稳定的氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的溶液离心分离、清洗,用50mL 50mM pH8.0的MOPS缓冲液洗涤,离心弃去上清,洗涤3次;

步骤六、氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的保存

用保存缓冲液重悬胶乳颗粒使之分散,然后,使用超声粉碎机将其充分分散成稳定的氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的白色胶乳悬浮液,氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的终浓度为0.2%。

2. 权利要求1所述的方法制备得到的环瓜氨酸肽双微球偶联物。

3. 权利要求2所述的环瓜氨酸肽双微球偶联物在如下任一应用,

- (a) 制备结合或分离抗环瓜氨酸肽抗体的产品;
- (b) 制备检测抗环瓜氨酸肽抗体的产品;
- (c) 制备用于诊断类风湿关节炎的产品。

## 一种环瓜氨酸肽双微球偶联物及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种环瓜氨酸肽双微球偶联物及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] RA是最常见的关节炎症性疾病,发达国家成人的发病率是1~2%,病因不明,可发生在任何年龄,但常见35-55岁女性发病,RA属于慢性疾病,以阶段性发着与缓解交替为特征。

[0003] 抗-CCP抗体被发现可用于类风湿关节炎的早期诊断,并对RA病人的关节侵害和放射学损伤具有一定的预测价值。抗CCP抗体可以在RA病人出现明显的关节损伤之前被检测出。一项前瞻性群组研究显示,在没有出现明显的RA临床症状的抗CCP阳性的病人中,约有93%的病人会发展成RA,表明该抗体有非常好的阳性预期值。

[0004] 目前,测定抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体常用的方法有免疫层析法、ELISA法、化学发光法、胶乳免疫比浊法等。其中,免疫层析法检测速度快,但其准确度和重复性不佳;ELISA法操作繁琐,检测时间长;化学发光法检测的准确度和重复性好,但耗时而且价格昂贵,对设备的要求较高;胶乳免疫比浊法操作简单、使用方便,但现有的免疫比浊法检测试剂盒存在灵敏度和稳定性较差,线性范围比较窄的缺点。为提高灵敏度和线性,现多采用大粒径微球和小粒径微球混合的方法,但大微球的生产工艺比较难控制,其试剂稳定性也难于优化。也有采用增加CCP在微球的偶联量来实现灵敏度的提升,但由于空间位阻的影响,能够发挥作用的CCP的量是有限的,即使CCP的偶联量增加,但在微球表面的有效标记量未必有明显的改变甚至是更少了。

[0005] 综上所述,现有检测方法中,其通过采用大粒径微球或者额外制备辅助偶联物提高灵敏度和线性。其存在着制备工艺繁琐、制备效率低、制造成本高的缺陷。

### 发明内容

[0006] 为此,本发明提供一种环瓜氨酸肽双微球偶联物及其制备方法与应用。

[0007] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0008] 一种环瓜氨酸肽双微球偶联物的制备方法,所述方法包括将羧基胶乳微球和氨基微球与环瓜氨酸肽连接,形成氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物。

[0009] 本发明的一个实施例中,所述羧基微球与所述环瓜氨酸肽连接过程为:将活化后的羧基微球与0.05M MOPS缓冲液稀释的环瓜氨酸肽溶液混合均匀,室温搅拌0.5h,得到羧基微球与环瓜氨酸肽偶联物;其中,所述羧基微球为聚苯乙烯胶乳微球。

[0010] 本发明的一个实施例中,所述聚苯乙烯胶乳微球的活化方法为:在20mL0.05M MES缓冲液中加入1mL直径为120nm的10%聚苯乙烯胶乳微球,再加入5mL浓度为1mg/mL碳化二亚胺水溶液,室温搅拌30min,得到活化后的聚苯乙烯胶乳微球。

[0011] 本发明的一个实施例中,所述羧基微球与环瓜氨酸肽偶联物加入到氨基微球溶液

中均匀混合,搅拌,得到含氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的溶液。

[0012] 本发明的一个实施例中,所述氨基微球溶液是将0.5mL 10%的氨基胶乳微球加入到10mL 0.01%的BSA溶液混合形成。

[0013] 本发明的一个实施例中,所述方法还包括:向所述含氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的溶液中加入2mL 5%BSA搅拌1h,进行封闭,得到含稳定的氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的溶液。

[0014] 本发明的一个实施例中,将所述含稳定的氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的溶液用pH8.0的MOPS缓冲液洗涤,离心,弃去上清,得到氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物。

[0015] 本发明还提供上述所述的方法制备得到的环瓜氨酸肽双微球偶联物。

[0016] 上述所述的环瓜氨酸肽双微球偶联物在如下任一应用,(a)制备结合或分离抗环瓜氨酸肽抗体的产品;(b)制备检测抗环瓜氨酸肽抗体的产品;(c)制备用于诊断类风湿关节炎的产品。也属于本发明的保护范围。

[0017] 本发明的环瓜氨酸肽(cyclic citrullinated peptide,CCP)双微球偶联物,原理是应用两种粒径相近、表面基团分别为羧基和氨基的胶乳微球偶联CCP抗原,因为CCP抗原同时具有氨基和羧基的特性,先用羧基微球与CCP抗原偶联,抗原和碳化二亚胺均过量,活化过程结束后,已偶联或未偶联的CCP抗原在过量碳化二亚胺的作用下,就能够和后加入的氨基胶乳微球和BSA进行反应,同时过量的碳化二亚胺能同时作用于BSA,控制连接到羧基微球上的氨基微球的量,防止过多连接产生沉淀,偶联反应结束后会形成羧基微球-抗原、氨基微球-抗原、氨基微球-抗原-羧基微球共三种形式的偶联物,这样就能明显提高试剂灵敏度,但又不降低试剂检测范围。

[0018] 本发明具有如下优点:

[0019] 本发明环瓜氨酸肽双微球偶联物的制备方法是利用两个粒径接近的微球,先使用羧基微球,再使用氨基微球与CPP抗原进行偶联,以提升检测试剂的灵敏度;同时,可以保持较好的检测线性范围;同时,本发明方法制备的试剂具有较好的稳定性,且试剂的制备工艺简单。

## 具体实施方式

[0020] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0021] 实施例1、本发明的环瓜氨酸肽双微球偶联物的制备方法

[0022] 本实施例的环瓜氨酸肽双微球偶联物的制备方法包括以下步骤:

[0023] 步骤一、羧基胶乳微球活化

[0024] 向20mL 0.05M pH 6.5的MES缓冲液中加入1mL直径为120nm的10%聚苯乙烯胶乳微球,然后加入5mL浓度为1mg/mL的碳化二亚胺水溶液,室温搅拌活化30min,得到活化后的聚苯乙烯胶乳微球,其中,乳胶微球的粒径范围为80-200nm;

[0025] 步骤二、羧基微球与环瓜氨酸肽偶联

[0026] 将5mg环瓜氨酸肽,用50ml,0.05M pH8.0的MOPS缓冲液稀释,混合均匀,倒入上述活化后的聚苯乙烯胶乳微球胶乳液,室温搅拌0.5h,得到含羧基微球与环瓜氨酸肽偶联物的溶液。

[0027] 步骤三、氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的制备

[0028] 将0.5mL 10%的氨基胶乳微球加入到10mL 0.01%的BSA溶液中,混合均匀后,倒入到上述含羧基微球与环瓜氨酸肽偶联物的溶液中,室温继续搅拌3h,得到含氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的溶液。

[0029] 步骤四、封闭氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物

[0030] 向含氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的溶液中加入2mL 5%BSA搅拌1h,终止反应,得到含稳定的氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的溶液。

[0031] 步骤五、氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物分离

[0032] 对含稳定的氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的溶液离心分离、清洗,用50mL 50mM pH8.0的MOPS缓冲液洗涤,离心弃去上清,洗涤3次。

[0033] 步骤六、氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的保存

[0034] 用保存缓冲液重悬胶乳颗粒使之分散,然后,使用超声粉碎机将其充分分散成稳定的氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的白色胶乳悬浮液,氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的终浓度为0.2%。

[0035] 其中,氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的保存缓冲液的配方如表1所示。

[0036] 表1

组分	浓度值	浓度值范围
MOPS 缓冲液	50 mM	10-200 mM
蔗糖	50 g/L	10-100 g/L
[0037] 丙三醇	50 g/L	10-100 g/L
BSA	0.5 g/L	0.1-2 g/L
NaN <sub>3</sub>	1 g/L	0.5-2 g/L
pH 值	8.0	7.0-8.5

[0038] 实施例2、抗环瓜氨酸肽抗体胶乳免疫比浊检测试剂盒

[0039] 取本发明实施例1制备的环瓜氨酸肽双微球偶联物作为试剂盒的试剂二组分,搭配主要由缓冲液组成的试剂一组分(表2)和校准品组分,组合成检测试剂盒,给检测试剂盒可对环瓜氨酸肽抗体进行定量检测。

[0040] 实施例3、制备用于诊断类风湿关节炎的产品及应用其对类风湿关节炎疾病患者的检测

[0041] 取类风湿关节炎疾病患者的血清样本,利用本发明实施例2制备的抗环瓜氨酸肽抗体胶乳免疫比浊检测试剂盒,检测患者样本中的抗环瓜氨酸肽抗体的水平,用于类风湿关节炎的辅助诊断。

[0042] 1、反应试剂的配制

[0043] 试剂一(R1)的配制,如表2所示,R1试剂的组成配方。

[0044] 表2

	组分	浓度值	浓度值范围
[0045]	Tris 缓冲液	50 mM	10-200 mM
	NaCl	300 mM	50-400 mM
	BSA	0.5 g/L	0.1-5 g/L
	促聚剂	5 g/L	1-50 g/L
[0046]	曲拉通 X-100	1 g/L	0.1-5 g/L
	NaN <sub>3</sub>	1 g/L	0.5-2 g/L
	pH	8.0	6.5-8.5

[0047] 试剂二(R2)的配制:

[0048] 按照实施例1中进行氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的制备,最终0.2%的偶联物即为试剂二(R2)。

[0049] 2、将实施例1制备得到,氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物的上机测试,其中,测试条件如表3所示。

[0050] 表3

	标本量 (S)	sample volume	μl	5
	试剂一 (R1)	reagent 1	μl	150
	S+R1 在 37℃ 保温 300 秒后, 记录吸光度值 A1 后, 加入 R2 试剂			
	试剂二 (R2)	reagent 2	μl	50
[0051]	S+R1+R2 在 37℃ 保温 2.5 分钟, 记录吸光度值 A2			
	主波长	main wavelength	nm	546
	副波长	sub wavelength	nm	800
	反应类型	reaction type	终点法	
	反应方向	reaction direction	(+) 升反应	

[0052] 测试方案,测试试剂的定量限LOQ(limit of Qunantitation),是反映试剂灵敏度的一个指标,通过测试LOQ可以判断检测试剂的灵敏度的大小。

[0053] 3、选择市场上的现有Anti-CCP产品,该产品中含有用于检测的聚苯乙烯微球与CCP的偶联物,和本发明的实施例1制备的氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物检测试剂,分别测试1、3、5U/mL的三个浓度样本,每个浓度样本测试20次,计算CV, CV低于20%的最

小浓度,即为LOQ值。在实施例1的步骤三中将氨基微球用步骤一中的羧基微球进行替代,制备了不添加氨基微球的对照组试剂。在该试验中作为对照一并进行了测试。

[0054] 表4

U/mL	1			3			5		
	试剂	本发明	市售产品	加羧基 基微球	本发明	市售 产品	加羧基 基微球	本发明	市售 产品
1	0.67	N/A	N/A	3.05	1.83	2.25	5.15	4.51	5.62
2	0.96	N/A	N/A	3.17	2.16	2.77	5.14	4.97	4.65
3	1.01	N/A	N/A	2.61	2.72	2.88	4.98	4.72	4.74
4	1	N/A	N/A	2.98	1.81	2.79	5.13	5.21	5.09
5	1.03	N/A	N/A	3.15	3.13	1.53	5.07	4.69	5.43
6	0.87	N/A	N/A	2.92	3.01	2.43	5.19	4.21	4.41
7	0.71	N/A	N/A	2.59	3.05	2.6	5.03	5.2	5.57
8	1.1	N/A	N/A	2.91	2.65	2.6	5.09	5.12	5.54
9	1.07	N/A	N/A	2.51	2.46	2.89	5.06	5.21	5.45
10	0.71	N/A	N/A	2.99	2.73	2.55	5.19	3.93	5.77
11	0.81	N/A	N/A	2.6	2.63	1.63	5.06	5.49	4.63
12	0.94	N/A	N/A	3.09	2.9	2.69	5.16	4.54	4.79
13	0.74	N/A	N/A	2.71	2.73	2.98	5.11	3.95	5.37
14	1.08	N/A	N/A	2.57	3.03	1.56	5.18	4.41	4.67
15	0.88	N/A	N/A	2.72	2.5	2.15	5.07	4.4	5.22
16	0.89	N/A	N/A	2.88	2.61	2.72	5.01	4.9	4.35
17	0.82	N/A	N/A	3.18	2.19	2.03	5.13	4.84	5.57
18	0.84	N/A	N/A	2.64	2.94	3.2	5.15	4.81	4.97
19	1.05	N/A	N/A	2.94	1.87	2.05	4.98	5.37	4.89
20	0.96	N/A	N/A	2.72	2.38	3.07	4.98	5.5	4.3
MEAN	0.907	N/A	N/A	2.8465	2.5665	2.4685	5.093	4.799	5.0515
SD	0.1339	N/A	N/A	0.2215	0.4143	0.5016	0.0707	0.4724	0.4702
CV	14.8%	N/A	N/A	7.8%	16.1%	20.3%	1.4%	9.8%	9.3%

[0057] 由表4的数据可以看出,同时使用本发明的实施例1制备的氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物,LOQ值可以达到1U/mL,仅使用羧基微球或者市售产品的试剂LOQ值>3U/mL。

[0058] 4、将低值和高值样本按比例混合成7个浓度水平,每个浓度测试3次计算均值,计算线性相关系数r和偏差。

[0059] 表5

		市售产品						
NO.	level1	level2	level3	level4	level5	level6	level7	
1	2	3	5.11	20.78	59.09	80.72	99.51	
2	1.3	1.3	3.70	22.24	59.25	82.04	97.93	
3	1.1	1.55	4.98	22.70	59.83	81.66	101.23	
[0060] 均值	1.47	1.95	4.60	21.91	59.39	81.47	99.56	
稀释比例	0	0.025	0.05	0.20	0.60	0.80	1.00	
r	0.9996							
回归值:	0.597	2.509	5.394	20.4756	60.6940	80.8032	99.8200	
绝对偏差	0.87	-0.56	-0.80	1.43	-1.30	0.67	-0.26	
相对偏差	145.8%	-22.3%	-14.8%	7.0%	-2.15%	0.83%	-0.26%	
[0061] 表6								
		本发明						
NO.	level1	level2	level3	level4	level5	level6	level7	
1	0.51	2.5	5.11	20.22	58.35	80.52	99.00	
[0062] 2	0.3	2.41	4.70	20.04	58.63	80.20	98.93	
3	0.52	2.31	4.98	19.89	59.01	79.50	98.28	
均值	0.44	2.41	4.93	20.05	58.66	80.07	98.74	
稀释比例	0	0.025	0.05	0.20	0.60	0.80	1.00	
r	0.9999							
[0063] 回归值:	0.234	2.403	4.887	19.8010	59.5717	79.4570	98.9940	
绝对偏差	0.21	0.00	0.04	0.25	-0.91	0.62	-0.26	
相对偏差	89.6%	0.1%	0.9%	1.3%	-1.52%	0.78%	-0.26%	

[0064] 由表5和表6可知,本发明在低值部分的线性要优于市面上出售的产品,且可以测到100的高值,线性良好。

[0065] 5、将市售产品和本发明的实施例1制备的氨基微球-环瓜氨酸肽-羧基微球偶联物,分别放入37℃的烘箱中进行加速,在第3天和第7天分别测试两个质控样本,计算测值偏差。

[0066] 表7

产品	质控品测试均值				7d 偏差
	0 d	37°C 3d	37°C 7d		
[0067] 市售产品	5.32	3.1	2		-62.4%
	80.84	76.5	75.32		-6.8%
本发明	5.06	4.85	4.7		-7.1%
	80.47	79.1	81.2		0.9%

[0068] 由表7可知,本发明实施例1制备的氨基微球-环瓜氨酸-羧基微球偶联物试剂加速7天后,质控测值偏差较市售产品明显要小,本发明实施例1制备的试剂稳定性更好。

[0069] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范畴。