

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07K 16/24
C12P 21/08 C12N 15/06
G01N 33/577
//(C12P21/08,C12R1 : 91)



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 96192592.2

[45] 授权公告日 2004 年 6 月 30 日 [11] 授权公告号 CN 1155619C

[22] 申请日 1996. 1. 16 [21] 申请号 96192592. 2
[30] 优先权
[32] 1995. 1. 17 [33] JP [31] 4995/1995
[86] 国际申请 PCT/JP1996/000050 1996. 1. 16
[87] 国际公布 WO1996/022309 日 1996. 7. 25
[85] 进入国家阶段日期 1997. 9. 16
[71] 专利权人 麒麟麦酒株式会社
地址 日本东京
[72] 发明人 宫崎洋
审查员 颜 丛

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 罗 宏 温宏艳

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 3 页

[54] 发明名称 抗 - TPO 单克隆抗体
[57] 摘要

本发明涉及一种针对人血小板生成素(TPO)的单克隆抗体,一种纯化TPO的方法,该方法包括采用该抗体通过亲和层析从一种含有TPO的物质中分离TPO,以及采用该抗体用于免疫化学定量或检测TPO的方法。通过采用抗-TPO的单克隆抗体可以纯化,检测或定量不同类型的人的TPO分子。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

5 1.一种针对人血小板生成素的单克隆抗体，其中所述抗体是在CHO细胞中表达的可识别的人TPO，包含显示在SEQ ID NO: 1中的氨基酸序列，并且与人EPO没有反应性。

2.按照权利要求1的抗体，其中所述抗体是在CHO细胞中表达的可识别的人TPO，包含显示在SEQ ID NO: 1中位点1至163的氨基酸序列，并且与人EPO没有反应性。

10 3.按照权利要求1的抗体，其中所述抗体是在大肠杆菌中表达的可识别的人TPO，包含显示在SEQ ID NO: 1中的氨基酸序列，并且与人EPO没有反应性。

4.按照权利要求1的抗体，其中所述抗体是在大肠杆菌中表达的可识别的人TPO，包含显示在SEQ ID NO: 1中位点1至163的氨基酸序列，并且与人EPO没有反应性。

15 5.按照权利要求1的抗体，其中所述抗体是选自下列的可识别的氨基酸序列：显示在SEQ ID NO: 1中的氨基酸序列8-28、47-62和108-126。

20 6.按照权利要求1的抗体，其中所述抗体是选自下列的可识别的氨基酸序列：显示在SEQ ID NO: 1中的氨基酸序列8-28、47-62和108-126，并且与人EPO无反应性。

7.一种纯化TPO的方法，该方法包括采用一种按照权利要求1-6中任何一项的单克隆抗体通过亲和层析从一种含有TPO的物质中分离TPO。

25 8.一种用免疫化学方法定量或检测TPO的方法，其特征在于使用了按照权利要求1-6中任何一项的单克隆抗体。

9.根据权利要求8的方法，该方法包括将该单克隆抗体与一种含有TPO的样品接触以定量或检测所形成的免疫复合物。

抗 - TPO 单克隆抗体

发明背景

5 发明领域:

本发明涉及一种用于检测, 纯化或定量 TPO 的抗 - TPO 单克隆抗体。

相关领域的公开:

人 TPO (血小板生成素) 是一种作为细胞因子受体超家族成员之一的 Mpl 的配体被克隆的蛋白 (de sauvage 等人, 自然 (伦敦), 第 369 期, 533 - 565 页 (1994); Bartley, T. D. 等人, 细胞, 第 77 期, 1117 - 1124 页 (1994))。这些 Mpl 配体中的每一种均能在血小板减少动物 (人, 小鼠, 狗) 的血清与血浆中检测到, 并且已经证实它们涉及巨核细胞与血小板的生成。

15 为了开发一种用于治疗血小板减少的治疗剂, 本发明人通过使用如所表明的一种活性已经从血小板减少的大鼠的血浆中提纯出大鼠 TPO, 其中该活性刺激了从大鼠骨髓中被高度纯化的巨核细胞前体细胞中巨核细胞的生成, 并且已经成功地在其部分氨基酸序列的基础上克隆大鼠 TPO cDNA 与人 TPO cDNA 并通过重组 DNA 技术大量地得到了均一的人 TPO (H. Miyazaki 等人, Exp. Hematol., 第 22 期, 第 838 页
20 (1994))。已经发现所得到的 TPO 具有与上面所提到的作为人 Mpl 配体得到的因子同样的氨基酸序列 (参见下面显示的序列表中的 SEQ ID NO: 1)。

在本文中, 需要检测、纯化或者定量 TPO 的高级方法以便于通过重组 DNA 技术大量生产均一的人 TPO, 测定所制备的 TPO 或者开发作为
25 药物的 TPO。

发明概述

本发明人已经研究了制备用于检测、纯化或定量 TPO 的抗 - TPO 单克隆抗体, 并且已经发现了杂交瘤生产出可以识别 h6T(1-163) 的单克隆抗体, 该杂交瘤是通过把骨髓瘤细胞与从一种已经用在大肠杆菌中表达的人 TPO 突变体 (称作 “h6T(1-163)”) 免疫接种的动物中得到的产生抗体的细胞进行融合得到的, 一种具有显示在 SEQ ID NO: 1 中的氨基
30

酸序列并且在 CHO 细胞（称作“CHO(1-332)”）中进行表达的人 TPO 蛋白，另一种具有显示在 SEQ ID NO: 1 中位点 1 至 163 的氨基酸序列并且在 CHO 细胞（称作“CHO(1-163)”）中进行表达的人 TPO 蛋白等等，以及这些单克隆抗体可以用于纯化和定量人 TPO 蛋白。

- 5 h6T(1-163)具有对应于显示在 SEQ ID NO: 1 中的氨基酸序列位点 1 至 163 的氨基酸序列（SEQ ID NO: 2），只是该氨基酸残基 Ser¹与 Ala³分别被 Ala 与 Val 所取代而且 Met 与 Lys 残基被附加结合的 N - 末端上。在下面显示的实施例 1 中将详细地说明生产 h6T(1-163)的方法。

- 10 因此，本发明提供了一种针对人 TPO 的单克隆抗体，它也提供了一种用于纯化 TPO 的方法，该方法包括采用一种抗 - 人 TPO 单克隆抗体通过亲和层析从含有 TPO 的物质中分离 TPO。本发明进一步提供了一种用于免疫化学定量或检测 TPO 的方法，该方法包括使用一种抗 - 人 TPO 单克隆抗体。

附图简要说明

- 15 图 1 为一幅表明在 450/570nm 下吸光度随 CHO(1-163)或 CHO(1-332)的剂量而变化的附图。

图 2 为一幅表明在 450/570nm 下吸光度随 CHO(1-163), CHO(1-332), MKT(L-163)或 MKT(1-332)的含量（或浓度）而变化的附图。

- 20 图 3 为一幅表明本发明的单克隆抗体与 CHO(1-332)以及重组的人促红细胞生成素的反应活性，它们是通过 A450/A570 的吸光度的比值进行比较的。

发明详述

本发明在下面将进行更为详尽的描述。

本发明的单克隆抗体可以按下面的方式进行生产。

- 25 （1）制备免疫接种的动物细胞

- 30 采用人 TPO 对小鼠，大鼠或其类似物免疫接种，从中可以制备脾细胞。例如，人 TPO 可以通过采用重组 DNA 技术在大肠杆菌中生产（参见实施例 1）。免疫接种通常是通过向小鼠，大鼠或兔子经皮下、静脉或腹膜内给药来实现的，给药量为结合了一种合适辅剂的 5 至 100 微克的人 TPO/动物，或者按一种爪垫给药的方式来实现。免疫接种可以每隔合适的时间，优选每隔 1 至 2 周的时间（在爪垫给药的情况下为 2 至 3 天）进行一次或多次。

测定在免疫接种动物的血清中抗体对抗原的滴度并且在此基础上把显示有足够高的抗体滴度的动物用作产生抗体细胞的来源。优选为在最后的免疫接种后 3 - 4 天所得到的产生抗体的细胞。

许多已知的技术, 诸如放射免疫测定 (RIA), 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 及其类似的测定可以用作测定一种抗体滴度的方法, 并且在本发明中通常采用 ELISA。

(2) 制备骨髓瘤细胞

作为骨髓瘤细胞, 通常希望使用从小鼠中得到的已建立的细胞, 例如象 P3-X63-Ag8-U1 (P3-U1) [微生物学与免疫学中的流行课题, 81, 1-7 (1978)], P3-NSI/I-Ag4.1 (NS-1) [欧洲免疫学杂志, 6, 511-519(1976)], SP2/O-Ag14 (SP-2) [自然, 276, 269-270 (1978)], P3-X63-Ag8.653 (653) [免疫学杂志, 123, 1548-1550 (1979)], P3-X63-Ag8 (X63) [自然, 256, 495-497 (1975)]及其类似物的具有 8 - 氮鸟嘌呤 - 抗性小鼠 (BALB/c 来源) 的骨髓瘤细胞系。这些细胞系继代培养在一种合适的培养基之内或之上, 这些培养基诸如 8 - 氮鸟嘌呤培养基[8 - 氮鸟嘌呤加上常规培养基, 即补充有谷氨酰胺 (1.5mM), 2 - 巯基乙醇 ($5 \times 10^{-5}M$), 庆大霉素 (10 微克/毫升)与胎牛血清 (FCS; 10%)的 RPMI 1640 培养基]; IMDM (Iscove 改良的 Dulbecco's 培养基); 或 Dulbecco's MEN, 并且在进行细胞融合之前它们最后在常规培养基之内或之上继代培养 3 至 4 天以便于在融合时可以得到 2×10^7 或更多的融合细胞。

(3) 细胞融合

在小鼠的情况下, 例如将 5 至 10 微克的人 TPO/动物向已经按步骤 (1) 的方式进行免疫接种的小鼠经腹膜内或皮下给药, 并且在 3 - 4 天后切去小鼠的脾脏以获得脾细胞。象在步骤 (2) 中所制备的骨髓瘤细胞一样, 把如此得到的脾细胞也用培养基或 PBS 充分地洗涤, 在将这两种细胞以脾细胞比骨髓瘤细胞大约为 5-10:1 的比例进行混合后, 然后使之离心。弃去所得到的上清液, 而且充分地分散沉淀的细胞, 并且当向该悬浮液中加入溶于类似 DMEM 的培养基的聚乙二醇 (PEG: 分子量为 1,000 至 4,000) 溶液的同时于 37 °C 下搅拌该细胞 1 至 2 分钟直至脾细胞的数量变为每 0.1-1.0 毫升悬浮液有 10^8 个细胞为止, 另外再持续搅拌 1 至 2 分钟。在搅拌后, 将 1 至 3 毫升的培养基加入到悬浮液中, 与此同时搅拌 1 至 3 分钟并且随后缓慢地加入 7 至 10 毫升同样的培养

基。在 37℃ 下保留该悬浮液 5 至 10 分钟，然后离心。弃去所得到的上清液，并且将残留的细胞再悬浮于 FCS - 补充培养基中并进行离心。重复该步骤二或三次。将该细胞慢慢地悬浮在 50 至 200 毫升 FCS - 补充培养基中，并且以孔体积一半的量向一块培养平板的孔中分配该悬浮液，采用一个 3-7 % 的二氧化碳温育箱在 35 至 38℃ 下培养该悬浮液 10 至 18 小时。向该培养平板的孔中以孔体积一半的量分配 HAT 培养基(在常规培养基中含有次黄嘌呤 (10^{-6} 至 10^{-3} M)，氨基蝶呤 (10^{-8} 至 10^{-7} M) 与胸苷 (10^{-6} 至 10^{-4} M))，并且持续该培养 10 至 30 小时。此后，在 1 到 4 天的时间里每隔 10 至 30 小时除去一半体积的培养上清液的液体并且代之以同样体积的新鲜 HAT 培养基，采用一个 3-7 % 的二氧化碳温育箱在 35 至 38℃ 下培养该细胞 10 至 14 天。

当在孔中观察到呈一个集落形式生长的杂交瘤时，除去在孔中一半体积的上清液液体并且代之以同样体积的 HT 培养基（不含氨基蝶呤的 HAT 培养基），并且随后在 1 到 3 天的时间里每隔 10 至 30 小时进行 HT 培养基对上清液液体的替换。在 HT 培养基中培养 3 至 4 天后，从该培养物中取出一部分培养上清液并且通过酶免疫测定方法来测定该上清液的抗 - TPO 抗体的滴度。

将由上面的抗体滴度测定来确定其特异抗体产率的杂交瘤转移到另一块平板上进行克隆。可以通过一种经有限稀释来稀释该杂交瘤从而在一个孔中含有一个单一的杂交瘤细胞的方法，一种从软琼脂培养基中分离集落的软琼脂方法，一种采用显微操作器挑取单一的杂交瘤细胞的方法，或者一种采用细胞分选仪分离单一的杂交瘤细胞的“分选仪克隆”方法，并且优选为简单或易于操作的有限稀释方法来进行这种克隆。对于确定抗体滴度所在的孔而言，例如通过有限稀释方法重复该克隆 2 至 4 次，并且筛选表明具有一个稳定的抗体滴度的克隆作为产生抗 - TPO 抗体的杂交瘤细胞系。

(4) 制备单克隆抗体

以常规培养基代替 HT 培养基来培养在上面步骤 (3) 中得到的杂交瘤。采用旋动或滚瓶实现大规模培养。例如通过把从大规模培养中得到的上清液液体进行凝胶过滤以收集并纯化 IgG 组分便可以得到抗 - 人 TPO 单克隆抗体。

在另一方面，当免疫接种的动物为小鼠时，可以在属于同品系（例如 Balb/c 或 Nu/NU）的其它小鼠的腹腔内培育该杂交瘤。在这种情况下，当把在上面的步骤（3）中得到的产生抗 - TPO 单克隆抗体的杂交瘤通过腹膜内注射以 4×10^4 - 10^7 细胞/动物的剂量向经降植烷 - 处理的雌性小鼠（4 至 8 周龄）给药时，在给药后 2 至 3 周该杂交瘤引起腹水肿瘤。当从每只小鼠中收集该腹水液体并通过离心除去任意一种固体成分时，它便可以用作检测或定量和纯化人 TPO 的一种单克隆抗体。如果需要进一步的纯化，可以使用 DEAE-Sepharose 柱，蛋白 A-Sepharose 柱或者类似柱从离心过的上清液中收集 IgG 组分。

10 通过 Ouchterlony 方法（免疫学实验介绍，生物学实验方法 15，由 Gakkai Shuppan 中心出版，东京，日本，第 74 页，1981）或 EIA 进行该抗体的同种型或亚类的鉴定。

通过 Folin-Lowry 方法并且通过在 280nm 下的吸光度 [$1.4(OD_{280})$ =免疫球蛋白 1 毫克/毫升] 来计算蛋白质的含量。

15 制备本发明的单克隆抗体的方法将在下面的实施例中进行描述，其中发现从杂交瘤细胞系 L3-1 与 L4-1 所得到的单克隆抗体（命名为 L3-1 与 L4-1）分别属于 IgG2a 和 IgG2b 亚类。

在下面的实施例中描述了所得到的单克隆抗体 L3-1 与 L4-1 的抗原特异性。

20 本发明的单克隆抗体可以在亲和色谱中用作分离和纯化人 TPO 的配体。根据采用象 CNBr - 活化的 Sepharose 4B（pharmacia 精细化学制品厂）的凝胶载体或膜载体的多种蛋白质固定化技术可以制备在亲和色谱中有用的固定化单克隆抗体。为了采用固定化的单克隆抗体纯化人 TPO，在一个柱中装填该抗体并且将含有人 TPO 的溶液加入柱中。此后，未结合的物质被洗出并且将结合到该柱上的 TPO 进行洗脱，例如采用可以含有氯化钠，丙酸，二氧杂环己烷，乙二醇，离液盐，guanidine 的盐酸化物，尿素或类似物的甘氨酸 - 盐酸缓冲溶液（pH2.5）洗脱。

本发明的单克隆抗体可以用于检测人 TPO，例如通过象固相夹心方法的酶免疫测定方法来测定。

30 根据本发明的一个具体的实施方案，本发明的检测或定量方法包括将抗 - TPO 单克隆抗体与含有 TPO 的样品接触以检测或定量所形成的免疫复合物。

固相夹心方法是通过下面的步骤进行的。

固相夹心方法是一种非竞争性固相酶免疫测定方法，其中一个抗原采用两种不同的可以识别同一抗原不同表位的抗体来检测或定量。即，在第一步把识别 TPO 的抗体固定化在固相上，之后在第二步通过形成一种 TPO 与固定化在固相上的抗体的免疫复合物而将 TPO 吸附在该固相上。在第三步，通过 TPO 与一个被标记的抗体或抗体片段的反应来检测或定量 TPO，其中该抗体或抗体片段可以识别一个 TPO 表位而不是识别由在第一步中采用的抗体可识别的表位。被标记的抗体或其片段可以通过采用诸如辣根过氧化物酶的一种酶直接以马来酰亚胺 - 铰链（hinge）方法或类似方法，或者间接以亲和素 - 生物素方法或类似方法标记该抗体或其片段来制备。

实施例

现给出下面的实施例以便于更为详细地说明本发明。

实施例 1 制备抗原蛋白 h6T(1-163)

将显示在序列表（SEQ ID NO: 3）中编码 h6T(1-163)的 DNA 进行化学合成并且克隆到已经用 XbaI 和 Hind III 消化的 pCFM536（ATCC No.39934; JP-A-60-501988）中[采用事先以 pMW1（ATCC No.39933）转化的大肠杆菌 JM109 作为宿主]。把如此得到的克隆命名为 pCFM536/h6T(1-163)，并且采用含有这一表达载体的大肠杆菌菌株作为用于 h6T(1-163)表达的转化体。

表达质粒 pCFM536 的表达受一个 λ PL 启动子的控制，其中该启动子在一个 cI857 阻抑基因的控制之下。将上述转化体于 30 °C 下在 60 毫升补充有 50 微克/毫升 α - 氨基苄青霉素与 12.5 微克/毫升四环素的 LB 培养基中振荡培养过夜，并且将 25 毫升该培养物加入到 1,000 毫升补充有 50 微克/毫升 α - 氨基苄青霉素的 LB 培养基中并在 30 °C 下振荡培养直至在 A600 下的 OD 达到 1.0 至 1.2 为止。接下来，加入大约 330 毫升预热至 65 °C 的 LB 培养基以便于最终的温度变为 42 °C，并且于 42 °C 下持续该振荡培养 3 小时以诱导 h6T(1-163)的表达。

将 0.6 克产生 h6T(1-163)的转化体的冷冻细胞悬浮在 3 毫升水中并且采用一台高压粉碎器粉碎该细胞。通过离心回收被沉淀的组分，借此除去大部分受污染的蛋白质，细胞组分及其类似物。将如此回收的含有 h6T(1-163)的沉淀组分悬浮在 2 毫升水中，并与 0.5 毫升的 1M Tris-HCl

缓冲液 (pH8.5) 和 10 毫升的 10M 尿素混合, 然后在室温下搅拌 5 分钟。向 4 毫升所得到的悬浮液中加入 28 毫升的 20mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.5) 与 8 毫升含有 1M 尿素的 20mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.5), 接下来在 4 °C 下轻度搅拌过夜。通过离心回收被沉淀的组分, 并且在室温下通过加入 200 微升含有 8M 胍, 5 % 乙氰和 0.3%EDTA 的 0.5M Tris-HCl 缓冲液 (pH8.5) 使得如此回收的含有 h6T(1-163)的沉淀组分进行增溶溶解, 然后在加入 20 毫克 DTT 之后使该组分在 60 °C 下经过 1 小时的还原处理。接下来采用一种洗脱溶剂 A (0.1%TFA) 和一种洗脱溶剂 B (含有 0.05%TFA 的 n-PrOH), 将一份 100 微升的该组分加入到一个已用 25 % B 平衡的 Capcell Pak C1 300A (由 Shiseido 生产, 目录 (Ca.) 号.C1 类型: SG300A, ϕ 4.6 $\times$ 150 毫米) 柱中, 然后采用从 25%B 至 40%B 的 50 分钟的线性梯度在 0.4 毫升/分钟的流速下进行展开以回收在从大约 28 % 至大约 30 % n-PrOH 的范围内洗脱的 h6T(1-163)的峰组分。在向该组分加入 100 毫升 50 % 的甘油后, 通过离心 - 蒸发除去 TFA 和 n-PrOH 以制备用作抗原的 h6T(1-163)。

实施例 2 制备产生抗 - 人 TPO 单克隆抗体的杂交瘤

(1) 免疫接种小鼠

将在实施例 1 中得到的 500 微克 h6T(1-163)与 1,000 微升的 RIVI ADJUVANT (由免疫化学研究所生产, 目录号: 52017700) 充分混合以形成一种乳状液。接下来, 在用醚麻醉下向每只 Balb/c 雌性小鼠 (4 周龄) 的爪垫注射 5 微克抗原/只小鼠。每隔 3 天按如上同样的方式重复加强免疫共 8 次。在最后一次加强免疫时, 通过皮下注射以 5 微克/只小鼠的剂量注射人 IL-6。在最后一次加强免疫 3 天后, 采用血细胞比容毛细管从轨道中收集血液, 并且从中分离出血清以便通过酶免疫测定方法来测定血液的抗体滴度及其与 h6T(1-163)的反应性。在接下来的细胞融合中采用表明具有 1:1000 或者更高的抗体滴度以及 TPO 反应性的小鼠的脾细胞。

(2) 制备骨髓瘤细胞系

将骨髓瘤细胞 (P3X63-Ag.8-653) 解冻, 悬浮在添加了 10 % FCS (由 Hyclone 生产, 目录号. A-1115-L) 的 DMEM 培养基中, 然后在 300 $\times$ g 下离心 5 分钟。弃去上清液, 并且将残留的细胞重新悬浮在 10 % FCS/DMEM 中, 并于 37 °C 下在 5 % 的二氧化碳温育箱中进行培养。

(3) 细胞融合

按常规的方式进行细胞融合。简而言之，无菌除去用 h6T(1-163)免疫接种的小鼠的局部（即 腹股沟，肠系膜）淋巴结和脾脏，并且将该淋巴结细胞和脾细胞分别悬浮在 10 % FCS/DMEM 中以制备产生抗体的细胞。接下来，将处在对数生长期的 1 份骨髓瘤细胞与 5 份淋巴结细胞或脾细胞混合，用 DMEM 洗涤以除去血清，然后采用聚乙二醇（PEG 1500，由 Boehringer Mannheim 生产，目录号：783641）使之进行细胞融合。在细胞融合完成后，用含有 10 % FCS 和 10 纳克/毫升的人 IL-6 的 DMEM 调节所得到的细胞至 1×10^6 细胞/毫升，并且将其以一份 100 微升分配至一块 96 - 孔微量滴定板（Nunc-Immuno Plate MaxiSorp™，由 InterMed 生产，目录号：4-42404）的孔中。在 18 小时后，将含有 $2 \times$ HAT（由 SIGMA 生产，目录号：H0262）的 10 % FCS/10 纳克/毫升 - 人 IL-6/DMEM 以 100 微升/孔的量加入孔中，并且于 37 °C 下在一个 5 % 的二氧化碳温育箱中在大约 10 至大约 14 天的期间内培养该细胞。

15 (4) 筛选生产抗 - 人 TPO 单克隆抗体的杂交瘤

产生抗 - 人 TPO 单克隆抗体的杂交瘤是通过一种酶免疫测定方法进行筛选的。用 PBS 调节 h6T(1-163)或 CHO(1-332)至 20 微克/毫升，并且将其以一份 50 微升分配至一块 96 - 孔微量滴定板（Nunc-Immuno Plate MaxiSorp™，由 InterMed 生产，目录号：4-42404）的孔中。当采用一个微量板混合器（微量板混合器 MPM-1，由 Iwaki Glass 生产）振荡该平板时，抗原在每个孔的底部充分分散。用平板密封（由 SUMILON 生产，目录号：MS-30020）密封该平板，并用在 37 °C 下保留该平板 2 小时或者在 4 °C 下保留过夜以便吸附抗原至该平板上。接下来，在用 20mM Tris-HCl/0.5M 氯化钠/0.1% Tween 20 的洗涤缓冲液（pH7.5）洗涤后，向每个孔中加入 300 微升稀释了 4 倍的 Block Ace（由 Dainippon 制药厂生产，目录号：UK-B25），并且用平板密封密封该平板，并在 37 °C 下保留该平板 1 小时或者在 4 °C 下保留过夜。在用洗涤缓冲液洗涤 4 次之后，向每个孔中加入 50 微升杂交瘤克隆的培养上清液液体，并且采用一个微量板混合器振荡该平板并用平板密封进行密封，然后使该平板在 37 °C 下反应小时。在该反应以及随后用洗涤缓冲液洗涤 4 次完成后，向每个孔中加入 50 微升在稀释了 10 倍的 Block Ace 中已按 1:500 稀释的碱性磷酸酶 - 标记的蛋白 A（PIERCE，目录号：32300），并且在一个

- 微量板混合器上振荡该平板，用平板密封进行密封，然后使该平板在 37℃ 下反应 1 小时，在反应后，用洗涤缓冲液洗涤孔 4 次，向每个孔中加入 100 微升用于碱性磷酸酶的颜色展开试剂盒（Kirkegaard & Perry 实验室，目录号：50-80-00）的颜色形成物，并且在一个微量板混合器上振荡该平板，用平板密封进行密封，然后使该平板在室温下反应。在大约 30 分钟后，采用一个平板读数器（Wellreader SK601，由 Seikagaku Kogyo 生产）测定在 405nm 处的吸光度，从孔中筛选对 h6T(1-163)和 CHO(1-332)均呈阳性的克隆。将如此筛选的克隆扩增并冷冻直至使用。与此同时，通过有限稀释方法进行克隆。采用含有 1×HT（由 SIGMA 生产，目录号：H0137）的 10 % FCS/10 纳克/毫升 - 人 IL-6/DMEM 培养基进行有限稀释，第二次筛选是通过酶免疫测定方法按照与上面相同的方式来进行的。当该克隆被稳定时，在 10 % FCS/DMEM 中继代培养该克隆，扩增该克隆，然后冷冻它们直至使用。

（5）识别 - 人 TPO 单克隆抗体的位点

- 通过以上的方法总共得到了 63 个抗 - 人 TPO 单克隆抗体的克隆。从这些克隆中筛选出了 13 个具有高反应性的克隆，并且通过与在上面的步骤（4）中采用的同样的酶免疫测定方法、采用在显示于 SEQ ID NO:1 中的人 TPO 氨基酸序列的基础上所合成的多种抗原的肽（HT-1, 2, 3, 4, 5 和 6）（参见表 1）测定了它们与 TPO 蛋白反应的区域。结果得到了一个与 HT-1 反应的抗体（抗体 L3-1），一个与 HT-2 反应的抗体（抗体 L4-1），10 个与 HT-3 反应的抗体（抗体 L1-10, S6-27, S3-13, S2-2, L3-15, L2-43, L3-4, L4-13, S4-12 和 S3-52）。

表 1

- 人 TPO（氨基酸位点 8 至 28）肽 HT-1 区域
DLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQ
- 人 TPO（氨基酸位点 47 至 62）肽 HT-2 区域
SLGEWKTQMEETKAQD
- 人 TPO（氨基酸位点 108 至 126）肽 HT-3 区域
LGTQLPPQGRTTAHKDPNA
- 人 TPO（氨基酸位点 172 至 190）肽 HT-4 区域
NELPNRTSGLLETNFTASA

人 TPO (氨基酸位点 262 至 284) 肽 HT-5 区域

SLPPNLQPGYSPSPHTHPPTGQYT

人 TPO (氨基酸位点 306 至 332) 肽 HT-6 区域

PSAPTPTPTSPLLNTSYTHSQNLSQEG

5

保藏机构: 国家生物科学与人体技术研究院, 工业科学与技术机构

地址: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 日本

保藏机构: 中国典型培养物保藏中心

地址: 珞珈山, 武汉 430072, 中国

10

就此而论, 杂交瘤 L4-1 的亚克隆 (L4-1-31) 与杂交瘤 L3-1 的亚克隆 (L3-1-54) 已于 1994 年 12 月 27 日保藏在日本国际贸易与工业部工业科学与技术机构的国家生物科学与人体技术研究院, 保藏号分别为 FERM BP-4956 与 FERM BP-4955, 这些亚克隆也被中国保藏机构 (CCTCC) 所保藏, 保藏号分别为 CCTCC-C95003 与 CCTCC-C95002, 该亚克隆分别命名为小鼠 - 小鼠杂交瘤 L4-1-31 和小鼠 - 小鼠杂交瘤 L3-1-54。

15

(6) 抗 - 人 TPO 单克隆抗体的亚类

通过 EIA 方法 (INNOGENETICS) 测定在上面步骤 (5) 中得到的抗 - 人 TPO 单克隆抗体 L3-1, L4-1, L1-10, S6-27 以及 S3-13 的亚类。将每种培养物的上清液与一种固定化的大鼠抗 - 小鼠 (亚类特异的) 单克隆抗体进行反应, 随后使之与一种碱性磷酸酶 - 标记的大鼠抗 - 小鼠 (κ /轻链特异的) 单克隆抗体进行反应。在反应完成后, 通过加入 BCIP 底物进行颜色展开以测定亚类。结果, 发现抗 - 人 TPO 单克隆抗体 L3-1, L4-1, L1-10, S6-27 以及 S3-13 的亚类分别为 IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG3 和 IgG3。

25

(7) 纯化抗 - 人 TPO 单克隆抗体

将产生抗 - 人 TPO 单克隆抗体的杂交瘤在 1 升补充有 10 毫克牛胰岛素, 10 毫克人运铁蛋白, 20mM 单乙醇胺和 5×10^{-5} M 亚硒酸钠的不含血清的 eRDF 培养基中采用滚瓶 (Falco, 目录号:3000) 大规模培养。当杂交瘤的存活率达到 90 % 或以下时, 进行离心以回收培养上清液, 随后该上清液通过 0.22 微米的膜过滤器过滤。将所得到的培养上清液在

30

100 毫升/分钟的流速下加到一个已用 0.15M 磷酸缓冲液 (PBS) 平衡的蛋白 A 柱 (由 Fuji 过滤器工业 K.K. 生产, 日本) 中。在培养上清液中的抗体吸附到蛋白 A 上之后, 通过在 100 毫升/分钟的流速下使 PBS 穿过该柱洗去未被吸附的物质直至在 280nm 下的吸附值达到基线为止。在
5 洗去未被吸附的物质之后, 采用 0.1M 的甘氨酸洗脱液 (pH2.5) 洗脱并回收该抗体。所回收的溶液用 0.1M Tris 进行中和, 通过超滤将其调节到一个合适的浓度, 灭菌, 然后在 - 20 °C 下储存。

实施例 3 采用抗 - 人 TPO 单克隆抗体的 ELISA

用 50mM 碳酸盐缓冲液 (pH9.2) 调节作为固相抗体识别 HT-1 区域的抗 - 人 TPO 单克隆抗体 (L3-1 的 L3-1-54 亚类) 至 20 微克/毫升, 并且将其以一份 50 微升分配至一块 96 - 孔微量滴定板 (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp™, 由 InterMed 生产, 目录号: 4-42404) 的孔中。通过采用一个微量板混合器 (微量板混合器 MPM-1, 由 Iwaki Glass 生产) 振荡该平板, 固相抗体在每个孔的底部充分分散。用平板密封 (由 SUMILON 生产, 目录号: MS-30020) 密封该平板, 并且在 37 °C 下保留该平板 2 小时或者在 4 °C 下保留过夜以便吸附该固相抗体至该平板上。在用洗涤缓冲液 (20mM Tris-HCl/0.5 M 氯化钠/0.1% Tween 20 (pH7.5) 洗涤后, 向每个孔中加入 300 微升稀释了 4 倍的 Block Ace (由 Dainippon 制药厂生产, 目录号: UK-B25) , 并且用平板密封密封该平板, 并在 37 °C 下保留该平板 1 小时或者在 4 °C 下保留过夜。在用洗涤缓冲液洗涤 4 次之后, 向每个孔中加入一个 50 微升待检测的样品或者在稀释了 10 倍的 Block Ace 中作为标准稀释的已知浓度的 TPO, 并且在微量板混合器上振荡该平板, 用平板密封进行密封, 然后在 37 °C 下保留该平板 2 小时或者在 4 °C 下保留过夜。在反应后, 用洗涤缓冲液洗
25 涤孔 4 次, 稀释了 10 倍的 Block Ace 将识别 HT-2 区域的生物素 - 标记的抗 - 人 TPO 单克隆抗体 (L4-1 的 L4-1-31 亚类; 第一抗体) 稀释到 500 纳克/毫升, 并且将其以一份 50 微升分配至孔中, 在一个微量板混合器上振荡该平板, 用平板密封进行密封, 然后在 37 °C 下保留该平板 2 小时或者在 4 °C 下保留过夜。在反应后, 用洗涤缓冲液洗涤孔 4 次, 在
30 稀释了 10 倍的 Block Ace 中按 1:2,000 稀释过氧化物酶 - 标记的亲合素 (UltraAvidin™-辣根过氧化物酶, 由 Leinco Technologies 生产, 目录号:A106) , 将其以一份 50 微升分配至孔中, 并且在一个微量板混合器

上振荡该平板，用平板密封进行密封，然后使该平板在 37 °C 下反应 1 小时。在该反应完成并且随后用洗涤缓冲液洗涤 (×4) 后，向每个孔中加入 100 微升的颜色形成物，其中该颜色形成物是通过将一种底物溶液以 1/100 的体积比加入到用于过氧化物酶的颜色展开试剂盒 (SUMILON, 目录号: ML-1120T) 的 TMBZ 颜色形成物中制得的，并且在一个微量板混合器上振荡该平板，用平板密封进行密封，然后使该平板在室温下反应。在大约 20 分钟后，向每个孔中加入 100 微升反应终止溶液，在一个微量板混合器上振荡该平板以终止染色反应。采用一个 ELISA 平板读数器 (Wellreader SK601, 由 Seikagaku Kogyo 生产) 测量在 450nm/570nm 波长处的吸光度。在通过已知浓度的 CHO(1-163) 或 CHO(1-332) 得到的吸收值的基础上绘制标准曲线 (参见图 1)。除了 CHO(1-163) 和 CHO(1-332) 以外，也绘制在大肠杆菌中生产的人 TPO 突变体 (例如 “MKT(1-332)” 和 “MKT(1-163)”) 的另一标准曲线 (参见图 2)。因此，可以定量测定不同种类的 TPO 分子。

MKT(1-332) 具有一个向显示在 SEQ ID NO:1 中的人 TPO 氨基酸序列的 N - 末端加入一个 Met 残基 (在位点 - 2) 与一个 Lys 残基 (在位点 - 1) 的氨基酸序列。MKT(1-163) 具有一个向显示在 SEQ ID NO:1 中的 1-163 氨基酸序列的 N - 末端加入一个 Met 残基 (在位点 - 2) 与一个 Lys 残基 (在位点 - 1) 的氨基酸序列。

此外，采用表明与在 SEQ ID NO:1 中显示的人 TPO 的 N - 末端氨基酸序列具有高同源性的人促红细胞生成素 (hEPO) 检测抗原的特异性。结果发现这一系统能够特异地检测 TPO (参见图 3)。

当采用 L3-1 与 S3-13, S3-13 与 L3-1, 或者 S3-13 与 L4-1 的组合作为一种固相抗体与一种生物素 - 标记的第一抗体的组合进行夹心测定时，也可以在类似于 L3-1-54 与 L4-1-31 组合的情况下进行 TPO 的检测与定量。

正如在上面具体的实施例中说明的，通过使用本发明的单克隆抗体可以检测或定量不同种类的人 TPO 分子。

序列表

SEQ ID NO:1 信息

序列特征:

长度: 332 个氨基酸

5 类型: 氨基酸

最初来源:

人类

序列描述: SEQ ID NO:1

```

10  Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu
    1             5             10             15
    Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val
        20             25             30
    His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu
        35             40             45
15  Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu
    50             55             60
    Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln
    65             70             75             80
    Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln
20             85             90             95
    Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu
        100             105             110
    Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe
        115             120             125
25  Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu
    130             135             140
    Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala
    145             150             155             160
    Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro Asn
30             165             170             175
    Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg Thr
        180             185             190
    Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys Ile
        195             200             205
35  Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly
    210             215             220
    Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu Phe
    225             230             235             240

```

40

```

Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser Gly
                245                250                255
Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser
5          260          265          270
Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu
          275          280          285
Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro
          290          295          300
10 Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn Thr
   305          310          315          320
Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly
          325          330

```

SEQ ID NO:2 信息

15 序列特征:

长度: 165 个氨基酸

类型: 氨基酸

最初来源:

人类

20 序列描述: SEQ ID NO:2

```

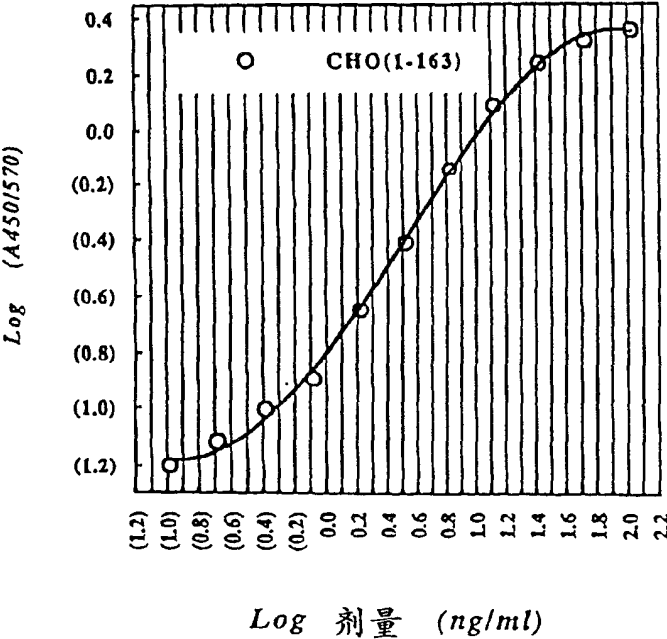
Met Lys Ala Pro Val Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys
-2 -1 1          5          10
Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro
15          20          25          30
25 Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe
   35          40          45
Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp
   50          55          60
Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg
30          65          70          75
Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser
   80          85          90
Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr
   95          100          105          110
35 Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala
   115          120          125
Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu
   130          135          140
Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr
40

```

	145	150	155
	Thr Ala Val Pro Ser		
	160	163	
5	SEQ ID NO:3 信息		
	序列特征:		
	长度: 535 个核苷酸		
	类型: 核酸		
	链: 双链		
10	拓扑结构: 线性		
	分子类型: 合成 DNA		
	最初来源:		
	人类		
	序列描述: SEQ ID NO:3		
15	CTAGAAAAAA CCAAGGAGGT AATAAATA		28
	ATG AAA GCA CCT GTA CCA CCT GCA TGT GAT TTA CGG GTC CTG TCT AAA		76
	Met Lys Ala Pro Val Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys		
	+1 5 10		
20	CTG CTG CGC GAC TCT CAC GTG CTG CAC TCT CGT CTG TCC CAG TGC CCG		124
	Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro		
	15 20 25 30		
	GAA GTT CAC CCG CTG CCG ACC CCG GTT CTG CTT CCG GCT GTC GAC TTC		172
	Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe		
	35 40 45		
25	TCC CTG GGT GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAA GAG ACC AAA GCT CAG GAC		220
	Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp		
	50 55 60		
	ATC CTG GGT GCA GTA ACT CTG CTT CTG GAA GGC GTT ATG GCT GCA CGT		268
	Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg		
30	65 70 75		
	GGC CAG CTT GGC CCG ACC TGC CTG TCT TCC CTG CTT GGC CAG CTG TCT		316
	Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser		
	80 85 90		
	GGC CAG GTT CGT CTG CTG CTC GGC GCT CTG CAG TCT CTG CTT GGC ACC		364
35	Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr		
	95 100 105 110		
	CAG CTG CCG CCA CAG GGC CGT ACC ACT GCT CAC AAG GAT CCG AAC GCT		412
	Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala		
	115 120 125		
40			

	ATC TTC CTG TCT TTC CAG CAC CTG CTG CGT GGC AAA GTT CGT TTC CTG	460
	Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu	
	130 135 140	
5	ATG CTG GTT GGC GGT TCT ACC CTG TGC GTT CGT CGG GCG CCG CCA ACC	508
	Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr	
	145 150 155	
	ACT GCT GTT CCG TCT TAATGAAAGC TT	535
	Thr Ala Val Pro Ser	
	160	

(A)



(B)

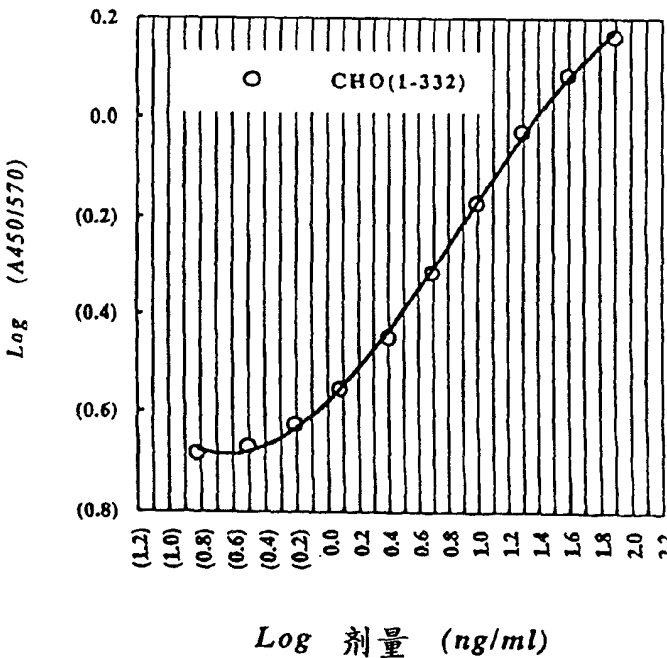


图 1

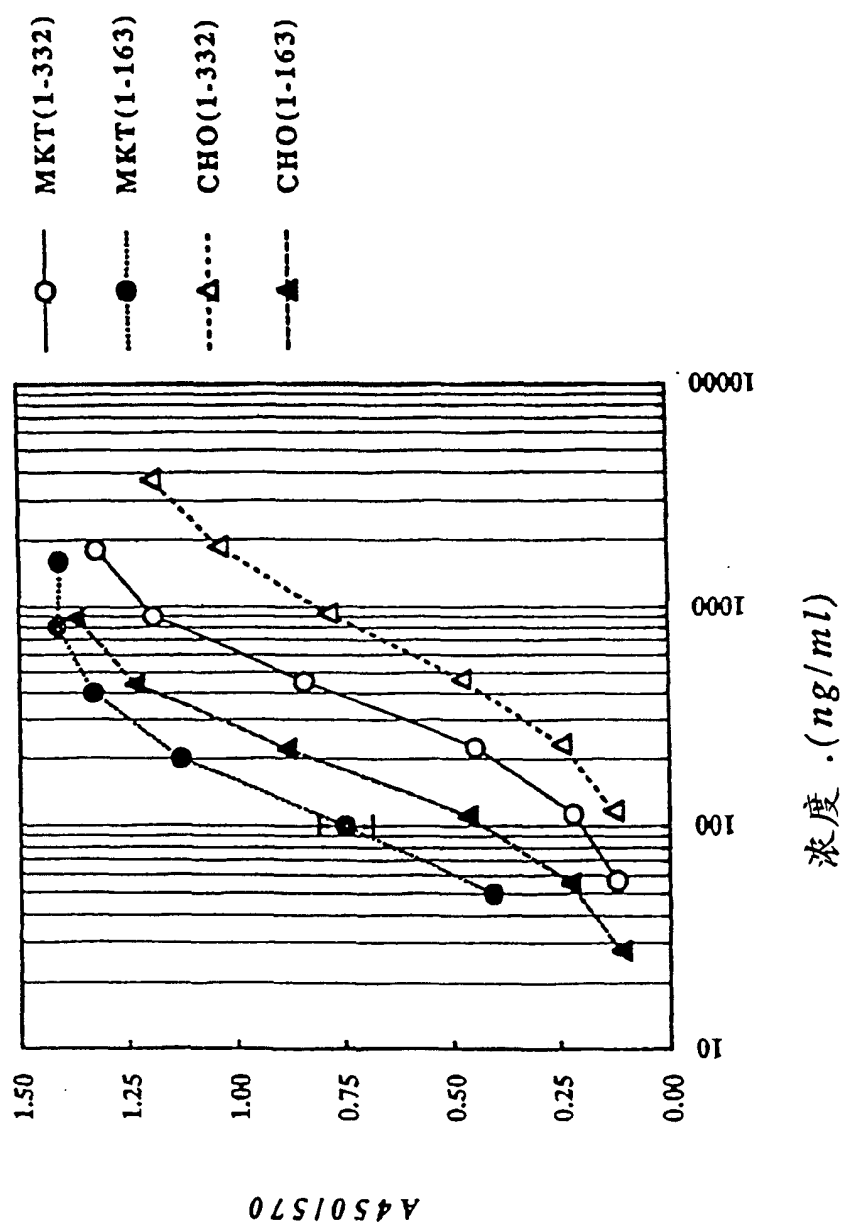


图 2

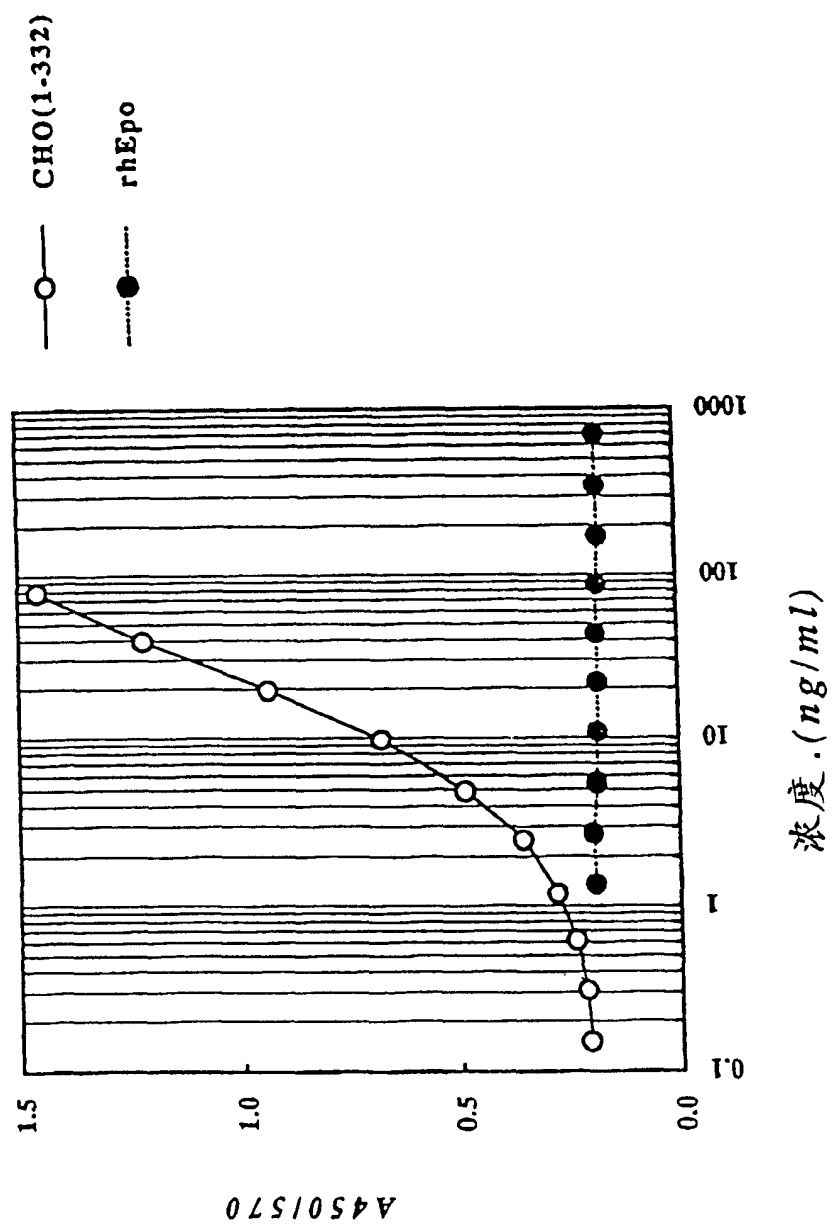


图 3