

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94193177.3

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

G01N 33 / 53

[43]公开日 1996 年 8 月 28 日

[22]申请日 94.6.22

[30]优先权

[32]93.7.2 [33]US[31]08 / 086,423

[86]国际申请 PCT / US94 / 07087 94.6.22

[87]国际公布 WO95 / 01568 英 95.1.12

[85]进入国家阶段日期 96.2.26

[71]申请人 美国生物遗传科学公司

地址 美国纽约州

[72]发明人 P · E · 加根 V · A · 普罗皮斯

J · R · 普莱森斯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 钟守期 姜建成

权利要求书 4 页 说明书 71 页 附图页数 9 页

[54]发明名称 可溶性纤维蛋白多聚体的免疫测定

[57]摘要

本发明涉及一种生产单克隆抗体的方法。该方法使用一种免疫的无菌动物。本发明还提供将得自免疫的无菌动物的这种单克隆抗体和多克隆抗体用于体外的和体内的临床诊断和治疗的方法。本发明还提供一种纤维蛋白特异性的单克隆抗体。

# 权利要求书

---

1. 一种用于在体外测定血浆纤维蛋白原水平的免疫测定法，包含将所述血浆纤维蛋白原与一种单克隆抗体接触，其改进包含应用的所述单克隆抗体是一种纤维蛋白原特异性单克隆抗体。

2. 权利要求1的方法，其中所述纤维蛋白原特异性单克隆抗体是具有由杂交瘤ATCC HB 9740产生的单克隆抗体的鉴定特性的一种单克隆抗体。

3. 一种在体外检出哺乳动物样品中可溶性交联的纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的纤维蛋白多聚体的方法，包括将样品与一种可检出可溶性交联的DesAABB纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB纤维蛋白多聚体的物质接触，并且该物质不检出：(a)纤维蛋白原，(b)纤维蛋白原降解产物，(c)DesAA纤维蛋白单体，(d)DesAA纤维蛋白多聚体，(e)DesAABB单体，(f)交联的纤维蛋白原，(g)DesAA纤维蛋白单体-纤维蛋白原复合物和(h)纤维蛋白降解产物。

4. 权利要求3的方法，其中该物质由至少一种能与可溶性交联的DesAABB纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB纤维蛋白多聚体形成复合物的抗体所组成，其中该抗体不与：(a)纤维蛋白原，(b)纤维蛋白原降解产物，(c)DesAA纤维蛋白单体，(d)DesAA纤维蛋白多聚体，(e)DesAABB单体，(f)交联的纤维蛋白原，(g)DesAA纤维蛋白单体-纤维蛋白原复合物和(h)纤维蛋白降解产物交叉反应。

5. 权利要求4的方法，其中该抗体选自由多克隆抗体，单克隆

抗体，嵌合抗体，单链抗体，和Fab 片段组成的组中。

6 . 权利要求 4 的方法，其中至少两种不同的抗体用作该物质。

7 . 权利要求 4 的方法，其中的抗体能与被MH 1 识别的抗原决定基结合。

8 . 权利要求 4 的方法，其中的抗体为MH 1 。

9 . 权利要求 3 的方法，其中可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体被测定。

1 0 . 权利要求 4 的方法，其中可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体被测定。

1 1 . 权利要求 3 的方法，其中的哺乳类样品为人的样品。

1 2 . 权利要求 9 的方法，进一步包含为达到选自由血栓形成病情诱因的评价，血栓形成病情的诊断和血栓形成病情的监测组成的组中的目的而进行测定。

1 3 . 权利要求 1 0 的方法，进一步包含为达到选自由血栓形成病情诱因的评价，血栓形成病情的诊断和血栓形成病情的监测组成的组中的目的而进行测定。

1 4 . 权利要求 9 的方法，它进一步包含为达到选自由心肌梗塞诱因的评价，心肌梗塞的诊断和心肌梗塞监测组成的组中的目的而进行测定。

1 5 . 权利要求 1 0 的方法，它进一步包含为达到选自由心肌梗塞诱因的评价，心肌梗塞的诊断和心肌梗塞监测组成的组中的目的而进行测定。

1 6 . 权利要求 9 的方法，它进一步包含为达到选自由深静脉血栓形成诱因的评价，深静脉血栓形成诊断和深静脉血栓形成监测组成的组中的目的而进行测定。

1 7 . 权利要求 1 0 的方法，它进一步包含为达到选自由深静脉血栓形成诱因的评价，深静脉血栓形成的诊断和深静脉血栓形成监测组成的组中的目的而进行测定。

1 8 . 权利要求 9 的方法，它进一步包含为达到选自由肺栓塞诱因评价，肺栓塞诊断和肺栓塞监测组成的组中的目的而进行测定。

1 9 . 权利要求 1 0 的方法，它进一步包含为达到选自由肺栓塞诱因评价，肺栓塞诊断和肺栓塞监测组成的组中的目的而进行测定。

2 0 . 权利要求 9 的方法，它进一步包含为达到选自由播散性血管内凝血诱因评价，播散性血管内凝血诊断和播散性血管内凝血监测组成的组中的目的而进行测定。

2 1 . 权利要求 1 0 的方法，它进一步包含为达到选自由播散性血管内凝血诱因评价，播散性血管内凝血诊断和播散性血管内凝血监测组成的组中的目的而进行测定。

2 2 . 权利要求 9 的方法，它进一步包含为达到选自由中风诱因评价，中风诊断和中风监测组成的组中的目的而进行测定。

2 3 . 权利要求 1 0 的方法，它进一步包含为达到选自由中风诱因评价，中风诊断和中风监测组成的组中的目的而进行测定。

2 4 . 权利要求 9 的方法，它进一步包含为达到选自由心房纤颤导致的心内血栓形成诱因评价，心房纤颤导致的心内血栓形成诊断和心房纤颤导致的心内血栓形成监测组成的组中的目的而进行测定。

2 5 . 权利要求 1 0 的方法，它进一步包含为达到选自由心房纤颤导致的心内血栓形成诱因评价，心房纤颤导致的心内血栓形成诊断和心房纤颤导致的心内血栓形成监测组成的组中的目的而进行测定。

2 6 . 一种体外检测方法，供在哺乳类样品中检出那些与MH 1 抗体形成一种复合物的种类，该方法不检出不与MH 1 抗体交叉反应的种

类，该方法包含将哺乳类样品与一种能与和MH 1 抗体形成复合物的种类交叉反应而不与和MH 1 抗体无交叉反应的种类交叉反应的物质接触并检出该交叉反应的种类。

2 7 . 权利要求 2 6 的方法，其中该物质为MH 1 。

2 8 . 权利要求 2 6 的方法，其中与MH 1 抗体形成复合物的种类被测定。

2 9 . 一个供测定可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体总量的试剂盒，它包含：

( a ) 含可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体的已测定量的标准品；和

( b ) 检出可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体的工具。

3 0 . 按照权利要求 2 9 的试剂盒，其中供测定可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体的工具为一种抗体。

3 1 . 按权利要求 2 9 的试剂盒，其中该抗体为MH 1 。

# 说明书

---

## 可溶性纤维蛋白多聚体的免疫测定

### 1. 本发明的领域

本发明涉及一种生产单克隆抗体的方法。该方法使用一种免疫的无菌动物。本发明还提供将得自免疫的无菌动物的这种单克隆抗体和多克隆抗体用于体外和体内临床诊断和治疗的方法。本发明还提供纤维蛋白特异性的单克隆抗体。

### 2. 本发明的背景

公认Kohler 和Milstein 发明了成功地导致第一个产单克隆抗体杂交瘤形成的技术 (G. Kohler 和C. Milstein, 1975, Nature 256, 495-497; 1976, Eur. J. Immunol. 6, 511-519)。通过将抗体形成细胞 (脾 B-淋巴细胞) 与骨髓瘤细胞 (骨髓原发肿瘤的恶性细胞) 融合, 他们从单个融合细胞杂种 (称为杂交瘤或克隆) 产生了一个杂种细胞系。该杂交瘤遗传了淋巴细胞和骨髓瘤细胞系两者的某些特征。杂交瘤可象淋巴细胞一样分泌单一类型的免疫球蛋白; 而且, 杂交瘤细胞象骨髓瘤细胞一样具有无限的细胞分裂的潜力。这两种特性的结合提供了优于传统的抗血清的明显的优越性。

从被接种的动物取得的抗血清是多克隆抗体的可变混合物, 不能完全一样地再次产生。单克隆抗体是单一类型的高度特异性的免疫球蛋白。由一个杂交瘤分泌的单一类型的免疫球蛋白对一种并只对一种位于抗原上的抗原决定簇, 或抗原决定基具有特异性。抗原为一种具

有大量抗原决定簇的复杂分子。例如，如果抗原为一种蛋白质，一个抗原决定簇可以是整个蛋白质分子中很多的肽序列（通常 6 - 7 个氨基酸长；M. Z. Atassi, 1980, Molec. Cell. Biochem. 32, 21-43）中的一个。因此，针对一个抗原产生的单克隆抗体互相之间可以完全不同，取决于诱导它们产生的决定簇。但对任一给定的杂交瘤，它所产生的所有抗体是相同的。而且，杂交瘤细胞系在体外和体内易于繁殖，并产生极其高浓度的单克隆抗体。

单克隆抗体可用作检测其抗原的探针。因此，单克隆抗体已被用于体外诊断，例如，放射免疫测定法和酶联免疫测定法（ELISA），也用于体内诊断，例如，用放射性标记的单克隆抗体进行体内显像。另外，单克隆抗体可用作将药物运送至该抗体的抗原的载体。

但是，在单克隆抗体能用于这样的目的前，该单克隆抗体能与所关心的抗原（即靶抗原）结合这一点是非常重要的。这一步骤的实现是通过筛选所形成的杂交瘤以确定哪一个杂交瘤（如果有的话）产生能与靶抗原结合的单克隆抗体。这一筛选步骤可以是非常冗长乏味的，因为可能要筛选大量的（例如可能是数千的）单克隆抗体，而后才有一个产生能结合靶抗原的抗体的杂交瘤被确定。因而，需要一种增加杂交瘤产生抗靶抗原的抗体的可能性的生产单克隆抗体的方法。

### 3. 本发明的概要

本发明提供一种生产抗一种抗原的单克隆抗体的方法，包含：

（a）用所述抗原免疫无菌动物，以使产抗体细胞产生抗所述抗原的抗体，

（b）从所述无菌动物取出至少一部分所述产抗体细胞，

（c）通过将一种所述产抗体细胞与一种永生细胞融合形成杂交瘤，其中所述杂交瘤能产生抗所述抗原的单克隆抗体，

(d) 繁殖所述杂交瘤，和

(e) 收获由所述杂交瘤产生的单克隆抗体。

本发明还提供使用来自无菌动物的单克隆抗体或多克隆抗体的方法。本发明还提供一种纤维蛋白特异性的单克隆抗体和使用这样一种单克隆抗体的方法。

#### 附图的简要描述

##### 图 1 ( A )

通过亲和层析法确定MH 1 与DesAABB 纤维蛋白单体的免疫反应性。

##### 图 1 ( B )

使用纤维蛋白原特异性抗体45 J 证实Sepharose DesAABB 纤维蛋白单体基质结合能力的对照实验。

##### 图 2

在使用MH 1 对可溶性DesAABB 纤维蛋白多聚体的体外测定中非交联DesAABB 纤维蛋白多聚体和交联DesAABB 纤维蛋白多聚体的免疫反应性。

##### 图 3

通过血浆纤维蛋白原的类凝血酶处理的DesAABB 纤维蛋白形成。

##### 图 4

在使用MH 1 对可溶性DesAABB 纤维蛋白多聚体的体外测定系统中可溶性DesAA 纤维蛋白多聚体的免疫反应性。

##### 图 5

MH 1 抗体与活化的XIII 因子 (XIIIa 因子) (处理的纤维蛋白原) 的免疫反应性。

##### 图 6

使用可溶性纤维蛋白MH 1 分析对可溶性DesAABB 纤维蛋白多聚体体

外形成的测定。

图 7

通过使用Sephrose-MHI 柱从血浆中纯化可溶性纤维蛋白的证明。

图 8

在有胸痛和已证实的心肌梗塞病人的血中对可溶性DesAABB 纤维蛋白多聚体的测定。

#### 4. 本发明的详细描述

##### 4. 1. 无菌动物

本发明涉及使用无菌动物以产生单克隆抗体。无菌动物最早在 19 世纪的后期产生，并且从那以后已被广泛应用。

无菌动物是一种不带所有可检测到的生命相关形式，包括细菌，病毒，真菌，原虫，和其它腐生或寄生形式的限菌动物。限菌动物是通过无菌的剖腹产术或卵的无菌孵育得到的动物或种系。在隔离室条件下用无菌技术培养并持续维持，其中只要出现任何相关的动物区系或菌丛的成份，完全可用可接受的现行方法予以限定。（应指出所有的小鼠均携带一种潜伏的致白血病的病毒，因此，除去该致白血病的病毒以外为无菌的小鼠应被认为是符合本发明目的的无菌动物。）

无菌体系的本质在于提供抗不需要的微生物性入侵者的屏障。除包围动物的塑料，金属，橡胶和玻璃的物理屏障外，该体系还需要操作的屏障，包括空气过滤，食物和水的灭菌，戴手套的操作，这些形成屏障体系的一个组成部分。另外，进入隔离室的全部供应品应在灭菌条件下进行。

相信任何无菌动物均可用于本发明。最普通的无菌动物是小鼠，猪，大鼠，兔，豚鼠，山羊，绵羊，灵长类和家禽，优选小鼠，特别是Balb/c 小鼠。

## 4. 2. 无菌动物的生产、照料和维持

已有大量的出版物涉及无菌动物的生产，照料和维持。例如，Wostmann, B. S., Ed., 限菌动物：实验动物的繁殖、照料和处理标准及准则，国家研究委员会，国家科学学会，华盛顿，D. C. 1970；Coates, M. E., 等., 研究中的无菌动物，Academic Press, 伦敦，1968；及Pleasants, J. R., 限菌动物学，实验动物科学手册，1卷，Melby, E. C., 等Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 117, (1974) 其内容通过参考文献形式在本文中引用。

下面是源于Wostmann, B. S. ed., (1970) 限菌动物 实验动物的繁殖，照料和处理标准及准则，国家研究委员会，国家科学学会，华盛顿，D. C. 描述的无菌大鼠和小鼠的产生，照料和维持的文章的概要。应该指出，这种产生，照料和维持对其它动物是类似的。

### 室环境

设备、器材，和科学管理过程的设计和操作应为动物提供最大的环境控制和提供最理想的舒适程度和康乐。笼，给食器和给水器应设计和装配成为动物提供最大程度的舒适，使食物和水容易得到，并使清洁和消毒易行而有效。

合乎广泛的无菌工作要求的地面设计应包括：

1. 一个装配和消毒隔离室的工作区，
2. 一个维持装有动物的隔离室的区，和
3. 一个供常规监测限菌动物环境的实验室区。

地面设计中还可包括一个办公室和饮食—准备区。

维持限菌动物的隔离室内环境应符合为室养的传统实验室啮齿动物所建立的标准。其结构应为防昆虫的，并且墙和地面应是防潮的。照明应是均匀的，全年中具有相同的明暗周期。通风设备应能迅速去

除由化学消毒产生的任何烟气，并且按下面的具体描述控制气候。

温度。普遍接受的 $21^{\circ} - 27^{\circ}\text{C}$  ( $70^{\circ} - 80^{\circ}\text{F}$ ) 的动物室温可能需要向下调整，以保持隔离室温度在 $22^{\circ}$  和  $26^{\circ}\text{C}$  ( $72^{\circ}$  和  $78^{\circ}\text{F}$ ) 之间。

湿度。相对湿度 (RH) 应保持在人舒适的百分之40-60 的水平。然而，当使用室内空气为隔离室通风时，推荐百分之40-50 的RH。

通风。室内的空气交换应足够快速去除化学消毒期间产生的烟气。推荐每小时进行10到15次空气交换。应备有带新鲜空气通风装置的头罩，以保护暴露于危险水平的化学烟气中的人员。

无菌设备 (见Sacquet, E. 1968, 设备设计和管理：维持无菌动物的一般技术, P. 1-22, M. E. Coates [ed]. 研究中的无菌动物。Academic Press, 伦敦; Trexler, P. C. 1968. 设备设计和管理：无菌动物的运输和设备设计的当前进展, 选自M. E. Coates [ed]. 研究中的无菌动物。Academic Press, 伦敦, 第23-35页。)

完全排除环境中的微生物需要一种绝对的屏障。隔离室的成功操作依靠一直维持该屏障。有两大类隔离室可以得到，金属的和塑料的。一些金属单元制造成可经受 $20\text{psi}$  ( $1406\text{ g/cm}^2$ ) 的内部蒸气压。

(见Reyniers, J. A. 1959. 饲养无菌动物的装置的设计和操作系统。Ann. N. Y. Acad. Sci. 78: 47; Miyakawa, M. 1959. Miyakawa 遥控无菌培养单元。Ann. N. Y. Acad. Sci. 78: 37)。其它的隔离室一般是置于一个大的高压灭菌器中进行最初的灭菌 (见Gustafsson, B. E. 1959. 培养无菌动物的轻量不锈钢系统。Ann. N. Y. Acad. Sci. 78: 17)。

弹性薄膜隔离室 (见Trexler, P. C. 和L. I. Reynolds. 1957.

供饲养和使用无菌动物的弹性薄膜装置。Appl. Microbiol. 5: 406) 是现在使用最广泛的单元。它通常由弹性的薄层乙烯基制成, 必须经过化学灭菌, 并很容易地适合特殊的用途。另一类型, 由大的尼龙管制成, 在每一端系住, 可在高压灭菌器中灭菌。(见Lev, M. 1962. 一种用于在无菌条件下培养动物的可高压灭菌的塑料单元。J. Apple. Bacteriol 25: 30)。还发展了有机玻璃隔离室和可贮存的弹性薄膜单元。其中很多都很轻, 可在架上堆放2个或3个的高度, 这一特性节省了地面空间。

一种消毒食物和供给物的特殊气缸被普遍用于热敏感的隔离室。应设计有一个大的滤过区以易化高度真空的高压灭菌器中的空气抽出(见Trexlor, P. C. 1963. 一种控制污染的隔离室系统。Lab. Anim. Care. 13: 572)。作为选择, 气缸可装有一个通向大气的排气管以供消毒过程中排除空气和浓缩物, 而不需要一个真空装置。(见Jaworski, N. E. 和C. E. Miller. 1963. 提供无菌隔离室的气缸技术的改进。Lab. Anim. Care. 13: 591)。

### 灭菌

所有在隔离室中使用的设备, 食物, 铺垫物, 水, 和空气必须绝对灭菌。所使用的方法和条件决定于每一物品的特性。

高压蒸气是最公知的灭菌方法。它特别适合热稳定的多孔的物品。每一个可想得到的能聚藏微生物的区域必须与蒸气能直接接触。处理时间与所使用温度相关。推荐对装载物的最不易接近部分(包裹的中心)应在121℃(250 °F)处理至少15分钟。经过仔细的测试后可使用更高温度和更短处理时间以确保无菌性。饮食, 铺垫物, 和其它材料的标准包裹大小和密度是首要的, 以保证蒸气穿透时间是不变的和可预测的。

干热用于对隔离室空气供给的灭菌（见Miyakawa, M. 1959. Miyakawa 遥控无菌培养单元。Ann. N. Y. Acad. Sci. 78: 37; Gustafsson, B. E. 1959. 培养无菌动物的轻量不锈钢系统。Ann. N. Y. Acad. Sci. 78: 17）。

过醋酸（ $\text{CH}_3\text{COOOH}$ ）被广泛用于热敏感的，非多孔的材料，特别是弹性薄膜单元。该酸以百分之二的溶液应用，并加有润湿剂（清洁剂）。（见Trexler, P. C., and L. I. Reynolds. 1957. 供培养和使用无菌动物的弹性薄膜装置。Appl. Microbiol. 5: 406）。其它化学药品可用于特殊场合，例如，用于导入由于子宫切除术取得的新生动物的液体放泄弯管中的次氯酸盐、碘附，或季铵化合物，或用于在孵育前灭菌条件下输入卵的 $\text{HgCl}_2$ 。

氧化乙烯（ETO）可用于消毒不可湿的热敏感物品。灭菌时间取决于温度，湿度，压力，和ETO的浓度。ETO可与铺垫物和饮食成分发生化学反应而产生毒性的或不希望的化合物。因为其易燃性和毒性危险，为灭菌而常规使用ETO应限于商业可得的气体混合物，其中含不超过百分之20的ETO。

玻璃纤维滤器通常用于空气供给的灭菌。它们应起到绝对滤器的作用。

对液体可使用膜滤过以避免热处理，前提是这些膜是绝对滤器，例如，一个把直径大于0.22 微米的颗粒排除在外的滤器。

$\gamma$ 射线或电子束源的照射可用于为食物或其它特殊物品灭菌。使用的剂量范围从2.5 至  $6 \times 10^6$  拉德。

### 内部环境

温度。隔离室内部温度是室环境的一个功能并且应维持在 $22^\circ$  和  $26^\circ\text{C}$ （ $72^\circ - 78^\circ\text{F}$ ）之间。

湿度。在超载，通风不充分，或兼有两种情况时，隔离室将发生水分凝聚。进入隔离室的空气应低于百分之50的RH并优选高于百分之40的RH。

空气供给。隔离室应有每小时12至20次的空气交换并有3—5英寸（8—13厘米）水柱的正压。空气可由中心来源或由每个单元单独的鼓风机供给。对于中心空气供给系统推荐涡轮型空气压缩机，因为油活塞类型使油雾化进入空气供给线路。

空气弥散隔离室（见Trexler, P. C. 1968. 设备设计和管理：无菌动物的运输和设备设计的当前进展。选自M. E. Coates [ed] . 研究中的无菌动物。Academic Press, 伦敦, 第23—35页）在发生动力故障时不会出现通气减少。但是，这一类型的缺点是每小时空气交换少和缺乏有助于在屏障发生小的破裂时防止污染的保护性正压。

紧急保护设施。必须提供在动力故障或机械故障情况下维持隔离室内空气压力的足够的防备措施，使空气供给中断不超过几分钟。无支持的薄膜隔离室塌陷可最终导致动物窒息，但更直接的危险是动物可能触及并破坏薄膜或手套。这一点可以通过用橡胶塞子塞住空气导管暂时予以防止。单独的隔离室空气供给的运转只需要一个紧急动力供给。中心空气系统应有第二个涡轮压缩机供备用空气供给。

推荐用图记录温度和压力。应在中心空气系统中加入一个听觉视觉警报系统，在不论是由于动力故障还是由于机械故障引起的管道内压力下降时启动。类似的警报系统可指示空气供给的温度的希望的波动。对单独的隔离室空气系统，推荐对室内环境进行连续的图表监测。

#### 笼和内部装备

装备。隔离室的基本装备清单可包括带保险盖的笼，水瓶和食物漏斗，橡胶手套的保护性布手套，一个额外的门垫圈或帽封闭环，长

的橡胶头的镊子，止血器，剪刀，手巾，纱布棉球，一个 2 夸特的装器械的罐，一个带盖的 4 夸特食物罐，匙，培养管，纸包，和装脏的铺垫物的防潮包。

笼应由平滑的耐蚀材料制成。它们应对液体不可渗透并容易灭菌。认为可接受的材料包括塑料，不锈钢，和玻璃。电镀的金属受腐蚀，建议不使用它是因为微量金属污染可影响实验结果。

笼的尺寸通常受进出口的大小的限制。一只雌性小鼠和铺垫物所需的最小面积是 50 英寸<sup>2</sup>（970 厘米<sup>2</sup>）。在很多情况下每只动物可能需要更多的空间。

表 1 列出按体重分组对于小鼠和大鼠每只动物所推荐的地面空间。

表 1 对笼养的小鼠和大鼠所推荐的每只动物地面空间总量

| 分类号 | 重量 (克)  | 每只动物空间,<br>英寸 <sup>2</sup> (厘米 <sup>2</sup> ) | 每笼最大总数 |
|-----|---------|-----------------------------------------------|--------|
| 小鼠  |         |                                               |        |
| 1   | 小于10    | 6 (40)                                        | 40     |
| 2   | 10-15   | 8 (50)                                        | 30     |
| 3   | 15-25   | 12 (75)                                       | 20     |
| 4   | 大于25    | 15 (95)                                       | 16     |
| 大鼠  |         |                                               |        |
| 1   | 小于50    | 15 (95)                                       | 50     |
| 2   | 50-100  | 17 (110)                                      | 50     |
| 3   | 100-150 | 19 (125)                                      | 40     |
| 4   | 150-200 | 23 (150)                                      | 40     |
| 5   | 200-300 | 29 (185)                                      | 30     |
| 6   | 大于300   | 40 (260)                                      | 25     |

### 多方面的建议

推荐对微小泄露进行氟利昂试验以确保屏障系统的完整性。

每一单元应配备其自己的操作记录以保存一份从该单元装配和灭菌开始每一与之有关的步骤的按年月次序排列的记录。这种记录很方便地保存在通过隔离室号码识别的金属图表夹中。它们还应包括常规维持, 如手套更换的记录。繁殖工作记录可保存在同样的图表夹中。

由于隔离室中可用的空间有限，推荐对食物和铺垫物，以及对由灭菌通道连接的隔离室之间的动物运输使用纸制的和可折叠的容器。

在隔离室内不应使用乙醚，因为在发生静电火花时它可能爆炸。推荐氟烷（溴氯三氟乙烷）作为挥发性的，不可燃的麻醉剂。

### 食物，铺垫物和水

#### 一般建议

应提供商业生产的饮食的完全配方，列出所有成分和它们的浓度，包括防腐剂，抗氧化剂和其它添加剂。生产的日期应能清楚地识别。制造者应保证该食物：

1. 自然存在的激素活性在正常可接受的限度内。
2. 无包含药物，激素，抗生素，或任何其它可造成异常生理状态或干扰研究过程的物质和添加剂。
3. 基于统计学上选择的样品，无沙门氏菌。
4. 无啮齿动物和体外寄生虫污染。
5. 无所有可能含病原菌的未煎熬的肉碎片或鱼肉。

#### 食谱含量的增加

无菌动物的食谱必须包含多于正常需要的某些营养素以补偿维生素（特别是某些B族维生素和维生素A和D）和蛋白质的营养价值（可得到的赖氨酸，蛋氨酸，精氨酸和色氨酸的减少）的加热灭菌损失。它们还应提供需要的营养成分，这些营养成分在普通的动物中可通过胃肠道内的微生物合成得到（见Reddy, B.S., B. S. Wostmann, 和J. R. Pleasants. 1968. 无菌动物营养充分的食谱，选自M. E. Coates [ed] 研究中的无菌动物. Academic Press, 伦敦. 第87-111页）。这样的食谱的一个例子是L-485，一种已被广泛测试的便宜的食谱（见Kellogg, T. F., 和B. S. Wostmann. 1969. 大鼠和

小鼠贮存食谱L-485. Lab. Anim. Care.) 而且可商业化地生产 (见表 2)。应考虑添加特定的氨基酸而不是增加总蛋白质含量作为补偿蛋白质质量损失的一个方法。增加食谱的总蛋白质含量将导致水份消耗和排出增加, 导致潮湿的状况从而限制了在一个给定大小的隔离室中可居住的动物数量。

表 2  
大鼠和小鼠的食谱L-485 的成分

| 成分                                   | 每公斤总量 |
|--------------------------------------|-------|
| 食谱                                   |       |
| 磨碎的黄玉米 (玉米)                          | 590 g |
| 大豆油粗粉 (粗蛋白质50%)                      | 300   |
| 苜蓿粗粉 (已脱水: 7%蛋白质)                    | 35    |
| 玉米油 (精炼 1 次)                         | 30    |
| NaCl                                 | 10    |
| CaHPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O | 10    |
| CaCO <sub>3</sub>                    | 5     |
| 赖氨酸 (饲料级)                            | 5     |
| 蛋氨酸 (饲料级)                            | 5     |
| B. H. T. (丁基化羟基甲苯)                   | 0.125 |
| 微量矿物质混合物                             | 0.25  |

表 2 ( 续 )

| 成分                               | 每公斤总量     |
|----------------------------------|-----------|
| 维生素混合物                           |           |
| A                                | 26,000 IU |
| D <sub>3</sub>                   | 1,000 IU  |
| E ( 一种生育酚乙酸盐 )                   | 225 mg    |
| K <sub>3</sub> ( 甲萘醌 )           | 90        |
| 核黄素                              | 30        |
| 泛酸                               | 285       |
| 尼克酸                              | 65        |
| 氯化胆碱                             | 2,000     |
| B <sub>12</sub> ( 0.1% 的甘露醇研制剂 ) | 2         |
| 盐酸硫胺                             | 65        |
| 盐酸吡哆醇                            | 20        |
| 叶酸                               | 10        |
| 对氨基苯甲酸                           | 50        |
| 微量矿物质混合物 ( 商用 )                  |           |
| 锰的氧化亚锰形式                         | 65 mg     |
| 铁的碳酸亚铁形式                         | 20        |
| 铜的氧化铜形式                          | 2         |
| 锌的氧化锌形式                          | 15        |
| 碘的碘酸钙形式                          | 1.5       |
| 钴的碳酸钴形式                          | 0.6       |

蒸气灭菌（见Reddy, B. S., B. S. Wostmann, 和J. R. Pleasants. 1968. 无菌动物营养充分的食谱, 选自M. E. Coates [ed]。研究中的无菌动物。Academic Press, 伦敦. 第87-111页）。

实际的过程决定于所能得到的装备。三个因素具有普遍的重要性。

1. 灭菌前的真空, 只要可能, 至少20英寸汞柱将有助于蒸气穿透在高压灭菌器或通向大气的气缸中的食物。当提供的气缸不通向大气时, 推荐28英寸汞柱或更高的真空。

2. 使用能保证完全灭菌的最短的灭菌阶段, 并按照装备情况和技术熟练情况决定增加安全性的余地。在食谱内部核心测到的温度应达到至少121°C (250 °F)。在此温度实际灭菌阶段应持续至少15分钟。灭菌温度更高, 则灭菌时间可相对更短。

3. 灭菌后真空将加速食物温度的下降。这可避免不必要的对营养成分的热破坏。然而, 装置的设计和效果必须足以避免在这一操作阶段的泄漏。

在食物的蒸气灭菌中, 目标是避免灭菌不彻底和过分延长加热时间造成的不必要的营养破坏两种情况。尽管一些营养素的损失是不可避免的, 但通过控制下述两点能取得更可接受的结果:

(a) 技术程序例如温度, 灭菌前和灭菌后真空时间, 和食物团的大小。

(b) 食物的水含量。水含量的增加导致灭菌后更佳的B族维生素回收（见Zimmerman, D. R., 和B. S. Wostmann, 1963. 无菌动物用灭菌食物中的维生素稳定性. J. Nutr. 79: 318）。对固体食物, 推荐高达百分之25的水分含量, 或高至被证实与食物的贮存质量相适合的程度。随食物中水含量的变化, 应对食物达到灭菌温度的速度进行新的测试。

照射灭菌 (见Reddy, B. S., B. S. Wostmann, 和J. R. Pleasants. 1968. 无菌动物的营养充分食物。选自M. E. Coates [ed] . 研究中的无菌动物。Academic Press, 伦敦: 第87-111 页; Ley, F. J., J. Bleby, M. E. Coates, 和J. S. Paterson. 1969. 使用 $\gamma$ 照射对实验动物食物的灭菌。Lab. Anim. 3 : 221 )

技术和剂量测定取决于设备和照射的类型。尽管通常认为照射灭菌造成更小的营养成分损失, 但在目前仍推荐用蒸气进行食物灭菌。

### 无菌的测试

为监测用任何特定灭菌程序得到的无菌性, 推荐使用脂肪嗜热杆菌芽孢试纸条。该试纸条应埋在食物的中心。另外, 隔离室及其动物应进行定期的微生物学监测。这种监测对检测由于隔离室屏障的破裂, 或对隔离室或其内容物灭菌不充分所导致的偶然污染是必须的。这可按照Wostmann, B. S. Ed. Gnotobiotics: Standards and Guidelines for the Breeding Care and Management of Laboratory Animals, 国家研究委员会, 国家科学学会, 华盛顿, D. C 1970 28-39 页中所述完成。

### 灭菌中营养成分损失的估计

作为对重要营养成分损失的一个有用的检验, 推荐对酸可提取的硫胺进行测定作为加在食物中的硫胺的回收的指标 (见Wostmann, B. S. 和P. L Knight 1960. The effect of methyl alcohol on the conversion of thiamine to thiochrome. Experientia 16: 500 )。小于百分之25的回收率表示食物的总的营养质量严重受损。如果设备适当并且仔细, 应达到百分之50或更高的回收率。

### 固体食物的贮藏

由于无菌实验总体来说的高花费, 应特别仔细不能使用营养价值

明显下降的食物。推荐 (a) 未灭菌的食物总是贮藏于冰箱中，并不能长于 1 个月，和 (b) 已灭菌的食物在隔离室内的贮藏时间应为 1 周或更短而决不能超过 10 天。

### 铺垫物

铺垫物应至少每周更换 1 次。推荐铺垫物材料应易于灭菌并且不易被动物吃掉。在灭菌过程中它不应产生毒性化合物。推荐无尘的白松木片屑（锯屑）和刨花。椴木和杨木刨花或压碎的玉米棒子也可接受。建议不使用硅藻土产品，雪松，含树脂的木材，和硬木。在可能形成有害化合物的问题得到澄清以前不应采用氧化乙烯灭菌。

### 水

饮用水必须经过灭菌。可在与单元相连接的方形包装瓶，MaSon 罐，或桶中用高压灭菌。在每个容器中应留有一个小的空气空间。

### 限菌动物剖腹产产生的原则

任何剖腹产手术成功关键部分在于使妊娠达到足期。这一点对于孕期短的动物特别确实，其胎儿在分娩前最后 24 小时内体重可增加百分之 20。按时间安排的交配理所当然地是成功的，但对于产大量幼仔的动物（大鼠和小鼠）在行手术前先等待雌性动物产出第一个幼仔是有助的。对于豚鼠，最满意的方法是通过测量耻骨的开放选择行手术的雌鼠（见 Philips, B. P., P. A. Wolfe, 和 H. A. Gordon, 1959. Studies on rearing the guinea Pig germfree. Ann. N. Y. Acad. Sci. 78: 183）。

经剖腹产产生的幼仔必须在它们呼吸第一口空气前被送入无菌环境中。它们可经子宫切除直接从母体取出，通过切开的灭菌屏障膜进入一个灭菌的隔离室，或通过子宫切除，通过一个杀菌的放泄弯管进入一个灭菌的隔离室。剖腹产手术前对雌鼠的常规的外科手术准备包

括去除腹毛和清洁并消毒手术部位。对大鼠和小鼠麻醉的完成优先通过将颈椎进行脱位完成，虽然也可使用腹中线局部麻醉或全身麻醉而不产生严重水平的胎儿机能低下和死亡率。对豚鼠，通常在前诱导后和在局部麻醉下实施手术。

通过屏障膜运送经子宫切除得到的幼仔需要特殊的隔离室设备。Reyniers 不锈钢手术单位（见Reyniers, J. A. 1965. Germfree life methodology (gnotobiotics) and experimental nutrition. P. 458-466 页。Proc. 3rd Internat. Congr. Biochem., 布鲁塞尔。）具有将单元分成上下室的水平金属间隔物。间隔物包含盖有一个维持上面室的完整性的迈拉塑料薄膜的圆形孔。将准备行手术的雌性置于下面室中，腹部紧压在迈拉上。所有手术器械均置于上面室中，手术在这个灭菌区内实施。用电烙器或手术刀透过塑料和皮肤作一个切口。优选自灭菌的电烙器刀片作皮肤切口。将皮肤的边缘和迈拉夹在一起并翻转。将一块灭菌的布单置于腹部上，盖住皮肤的切缘，并在打开腹腔前将温的消毒剂（氯化苯甲烃铵 1 : 1000）施用于暴露的筋膜。必须给予极度的小心以避免切入肠管。在腹壁和内脏之间插入一把镊子或止血钳可能有帮助。然后打开子宫，取出幼仔。将胎膜去除，并将脐带夹住和切断。将幼仔轻柔地弄干并按摩以刺激呼吸。然后将它们转移至培养单位进行代乳或人工喂养。可用另一块迈拉紧盖在手术孔上并对多至 5 或 6 个雌性重复这个过程而无严重的污染危险。剖腹产还可使用一个塑料隔离室或手套包作为一个手术单元来完成。将隔离室底部的外表面预先灭菌，并与动物的腹部相接触，从而起到上述迈拉片同样的作用。手术之后塑料屏障上的切口可用灭菌的胶带闭合并在另一只妊娠的雌性上重复这个手术过程。

当使用塑料隔离室时，通过子宫切除得到的幼仔的运送更普遍

(见Foster, H. 1959. A procedure for obtaining nucleus stock for a pathogen-free animal colony. Lab. Anim. Care 9: 135)。将子宫无菌下暴露并紧贴子宫颈前方钳夹。将切除的子宫通过一个液体的杀菌的放泄弯管转移入无菌单位。一进入隔离室,即将幼仔尽可能地接生以避免胎液的吸入。通常它们在脐带被钳夹和切断前就已被弄干并很好地呼吸。然后将幼仔交给代乳母亲或人工喂养。

子宫切除可成功地用于小鼠,大鼠,和猪。然而,对于豚鼠,优选子宫切除,因为如果在从母体血供的切断到送入隔离室之间时间过去达两分钟,则出现很高的死亡率。

### 限菌群体的繁殖系统

#### 近交系

在传统的繁殖群体中使用的通常的兄弟×姐妹交配系统也可用于限菌群体。

#### 非近交种

真正的随机繁殖包括一些同胞兄妹或第一代表兄妹的交配。虽然在非近交群中通常避免这种交配,但所产生的该交配系统未将近交率最大程度地减小。可使用任何最小近交的系统(见Falconer, D. C. 1967. Genetic aspects of breeding methods. P 72-96 The UFAQ handbook on the care and management of laboratory animals, 3rd ed. E and S Livingstone, Ltd., 伦敦; 国家研究委员会, 实验动物资源研究所。1969. A guide to genetic standards for laboratory animals. 国家科学学会, 华盛顿, D. C.)。

#### 可比较的常规的和限菌的群体

如果为比较的目的需要维持常规群体和限菌群体两者,可通过将剖腹产产生的幼仔从常规群的有效繁殖种群引导为限菌群维持它们相

似的遗传学组成。这似乎是为那些最强调生产非限菌大鼠和小鼠但是带有阻止建立可简化微生物监测的微生物谱系不利之处的生产者选择的方法。理想地，这可通过使用经特定交配得到的幼仔作为常规群体的繁殖种并使用得自这些交配的每一个的下代幼仔作为限菌群体的繁殖种而做到。如果这个过程每二代或第三代予以效仿，两个群体的遗传学组成将保持非常相似，当然，前提是，每一群体中使用同样的交配系统。

作为选择，从限菌群体的有效繁殖种群得到的幼仔也可用于建立或补充常规群体。如果按照同样的程序进行，则遗传学结果将是一致的。

记录的保存 (见Wolff, G. L. 1967. Practical mating systems and record-keeping in a breeding colony. UFAW handbook on the care and management of laboratory animals, 3rd ed. E. and S Livingstone, Ltd., 伦敦. 97-113 页。)

应为动物和隔离室的维持保留适当的记录。动物的记录应确定操作的有效性和动物的生物学效果。隔离室的记录应按年月顺序记录与隔离室相关的事件以助于污染发生时确定屏障缺口的位置。

#### 4. 3 无抗原动物

在本发明的一项优选实施方案中，优选以化学限定的（CD），低分子量，水溶性，经超滤的食物培育无菌动物。相信通过这样的食物可使动物摄取的营养成份和抗原得到完全的控制。这样的食物通常是完全由可化学限定的成分（如，氨基酸，简单的糖类，脂类，维生素和矿物质）组成。为本发明的目的一种化学限定（CD）的食物包含氨基酸，简单的糖类，脂类，维生素和矿物质而无其它具有分子量大于约10000 道尔顿的成分。因此，CD 食物的所有成分均为低分子量的

并且是动物中自然循环的营养成份，因而，认为这些成分不会刺激免疫反应。最近的文献将以CD 食物喂养的无菌动物称为“无抗原动物”。

另外，优选使用一种滤纸铺垫物，否则该无菌动物可能吃铺垫物而引起免疫反应。据信，吃滤纸铺垫物不导致免疫反应。

对给定物种的特定CD 食物应使用能满足该物种已知营养要求的比例和数量的这种成分。对无菌小鼠优选的CD 食物的成分和制备如下所述：

#### 化学限定食物L489E14Se 的组成和制备

---

| 成分 | 总量(克/100克成分) |
|----|--------------|
|----|--------------|

---

将下列物质加入192ml 70℃的Milli-Q 水中：

|       |      |
|-------|------|
| 亮氨酸   | 1.9  |
| 苯丙氨酸  | 0.74 |
| 异亮氨酸  | 1.08 |
| 甲硫氨酸  | 1.06 |
| 色氨酸   | 0.37 |
| 缬氨酸   | 1.23 |
| 天门冬氨酸 | 0.91 |
| 盐酸精氨酸 | 0.81 |
| 苏氨酸   | 0.74 |
| 盐酸赖氨酸 | 1.77 |
| 盐酸组氨酸 | 0.74 |

| 成分 | 总量(克/100克成分) |
|----|--------------|
|----|--------------|

将该溶液冷却至45℃并加入下列物质：

|                   |       |
|-------------------|-------|
| 甘氨酸               | 0.59  |
| 脯氨酸               | 1.48  |
| 丝氨酸               | 1.33  |
| 丙氨酸               | 0.59  |
| 谷氨酸钠              | 3.40  |
| 盐酸L-酪氨酸乙酯         | 0.62  |
| 葡萄糖酸亚铁            | 0.05  |
| 盐35D <sup>1</sup> | 0.105 |
| 亚硒酸钠 <sup>2</sup> | 0.074 |

将溶液冷却至5℃并加入下述物质：

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| 甘油磷酸钙                     | 5.22   |
| 甘油磷酸镁                     | 1.43   |
| 氯化钙 2 H <sub>2</sub> O    | 0.185  |
| 氯化钠-碘化钾(KI)混合物(含680mg KI) | 0.086  |
| 维生素B混合物111E5 <sup>3</sup> | 0.09   |
| 维生素B 12 <sup>4</sup>      | 1.20mg |
| 氯化胆碱                      | 0.31   |
| 乙酸钾                       | 1.85   |

向108ml 70℃的Milli-Q 水中加入无水的D-葡萄糖 71.28

将两种溶液冷却至5℃，并合并以进行超滤。

- <sup>1</sup> 盐35D混合物的组成在表3中给出
  - <sup>2</sup> 在盐35D中另外加入亚硒酸钠
  - <sup>3</sup> 维生素B混合物111E5的成分在表4中说明
  - <sup>4</sup> 在维生素B混合物111E5中另外加入维生素B-12(见下文的实施例)
- 用这样的组合物随意喂养小鼠或大鼠

#### 脂质补充物LADEK 69E6的组成

| 成分                     | 成年动物每日量*<br>(0.385ml) |
|------------------------|-----------------------|
| 提纯的大豆甘油三酯 <sup>1</sup> | 0.33g                 |
| 棕榈酸视黄酯                 | 6.45mg (11.7 I.U.)    |
| 胆汁骨化醇                  | 0.0288mg (1.15I.U.)   |
| 2 双- $\alpha$ -生育酚     | 3.3mg                 |
| 乙酸 2 双- $\alpha$ -生育酚  | 6.6mg                 |
| 维生素K <sub>1</sub>      | 72mg                  |

\* 授乳的小鼠得到两倍于普通成年鼠的剂量。

- <sup>1</sup> 包含：
- 12% 软脂酸酯
  - 1.5% 硬脂酸酯
  - 24% 油酸酯
  - 55% 亚油酸酯
  - 8% 亚麻油酸酯

关于CD 食物的详细描述见Pleasants, J. R., et al., J. Nutr., 116, 1949-1964 (1986), Pleasants, J., et al., Germfree Research: Microflora Control and Its Application to the Biomedical Sciences, B. S. Wostmann, Ed., p. 87, Liss, New York (1985); Wostmann, B. S., et al., J. Nutr., 112, 552 (1982); and Pleasants, J. R., et al., J. Nutr., 100, 498 (1970), 通过参考文献将其中所公开的内容在本文中引用。

#### 4. 4 生产单克隆抗体

然后将无菌动物用于生产单克隆抗体。无菌系统可用于生产该动物在非无菌状态下可产生的抗任何抗原的单克隆抗体。一个抗原的例举表发表于美国专利3935074。然而, 据信无菌动物提供对抗原的更增强的免疫应答。因而可增加人们找到产生能与抗原的特异性抗原决定基结合的抗体的可能性。这是本发明的一个主要优越性。此外, 据信该无菌系统对产生针对具有众多抗原决定基的抗原的高度特异性抗体特别有用。

可用标准技术免疫该无菌动物。然而, 优选对该无菌动物至少免疫3次, 每次免疫之间至少间隔大约3周, 继以一次融合前的加强注射。认为这种免疫水平的增加可能是必要的, 因为已观察到在常规的两免疫后, 仍然主要是分泌IgM的B-淋巴细胞而不是优选的分泌IgG的B-淋巴细胞。

#### 4. 5. 体细胞

具有产生抗体的潜力的无菌动物的体细胞, 特别是B淋巴细胞, 适合于与B细胞骨髓瘤系融合。优选那些处于分裂中的成浆细胞阶段的抗体产生细胞融合。体细胞可从已接触抗原的无菌动物的淋巴结, 脾脏和外周血得到, 淋巴细胞的选择在很大程度上依赖在特定融合系

统中它们的以经验为依据的用途。然而，通常优选从脾脏得到的体细胞。一旦已接触抗原或被超免疫，无菌动物可被用作产生抗体的淋巴细胞的来源。小鼠淋巴细胞与下文描述的小鼠骨髓瘤系具有高百分比的稳定融合。然而，使用来源于其它无菌动物的产生抗体的细胞也是可能的。特定无菌动物的选择依赖于抗原的选择，因为无菌动物在其B-淋巴细胞库中具有一种能产生抗该抗原的抗体的B-淋巴细胞是极为重要的。

#### 4. 6 永生细胞

从淋巴细胞肿瘤发展出特化的骨髓瘤细胞，供在产生杂交瘤的融合过程中使用（G. Kohler 和C. Milstein, 1976, Eur. J. Immunol. 6: 511-519; M. Schulman 等, 1978, Nature 276: 269-270）。因为至少3个原因发展该细胞系。第一个原因是易化融合的骨髓瘤细胞的选择。通常，通过使用具有酶缺陷的骨髓瘤使它们在某些支持杂交瘤生长的选择性培养基中不能生长来完成这一点。第二个原因产生于淋巴细胞肿瘤细胞产生其自己的抗体的固有的能力。使用单克隆技术的目的是获得能产生所希望的由杂交瘤的体细胞成分遗传学指导的单一的特异性抗体的永生融合杂交细胞系。为消除杂交瘤产生肿瘤细胞抗体，使用不能产生轻链或重链免疫球蛋白的骨髓瘤细胞系或那些在抗体分泌机制方面缺陷者。选择这些细胞系的第三个原因是它们在融合中的适合性和有效性。

几种骨髓瘤细胞系可用于生产融合的细胞杂种，包括NS-1, X63-Ag 8, NIS-Ag4/1, MPC11-45.6TG1.7, X63-Ag8.653, Sp2/0-Ag14, FO, 和S194/5XX0. Bu. 1., 均得自小鼠，而210-. RCY3. Ag1. 2. 3 得自大鼠。（G. J. Hammerling, U. Hammerling 和J. F. Kearny, eds., 1981, Monoclonal antibodies and hybridomas In

J. L. Turk, eds. Research Monographs in Immunology, Vol. 3, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 纽约)。

#### 4. 7 融合

产生抗体的脾或淋巴结细胞与永生细胞的杂合子的生产方法通常包含, 在促进细胞膜融合的一种因素或多种因素(化学的, 病毒的或电的)存在下将体细胞与永生细胞按可从20:1至约1:1的比例混合。经常优选同种的动物作为用于融合过程的体细胞和永生细胞来源。融合方法已由Kohler 和Milstein(1975, Nature 256: 495-497; 1976, Eur. J. Immunol. 6: 511-519), Gefer 等, (1977, Somatic Cell Genet. 3: 231-236)及Kozbor 等, (1983, Immunology Today, 4, 72)进行了描述。这些研究者使用的促进融合试剂分别为Sendai 病毒和聚乙二醇(PEG)。

还可使用最近发展的EBV 转化技术(cole 等, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96 页)。

#### 4. 8 克隆的分离和抗体检测

融合过程产生存活杂种的频率通常很低, 约 $1 \times 10^{-6}$ 至 $1 \times 10^{-8}$ 。由于取得存活杂种的低频率, 取得一种将融合细胞杂种从其余的未融合细胞, 特别是未融合骨髓瘤细胞中选出的方法非常重要。还需要一种从其它所产生的融合细胞杂种中检测所希望的产生抗体的杂交瘤的方法。

通常, 将融合细胞培养于选择性培养基, 例如包含次黄嘌呤, 氨基蝶呤和胸腺嘧啶的HAT 培养基上。HAT 培养允许杂种细胞的增殖而防止在正常情况下将继续无限分裂的未融合骨髓瘤细胞的生长。氨基蝶呤通过抑制四氢叶酸盐的产生而阻断新的嘌呤和嘧啶合成。添加胸

腺嘧啶可从旁路通过嘧啶合成的阻断，而在培养基中加入次黄嘌呤则使被抑制的细胞能使用核苷酸补救途径合成嘌呤。所使用的骨髓瘤细胞为缺乏次黄嘌呤磷酸核糖转移酶（HPRT）因而不能利用补救途径的突变体。在存活的杂种中，B淋巴细胞提供生产这种酶的遗传信息。由于B淋巴细胞本身在培养中只有有限的生存期（近2周），在HAT培养基中能增殖的唯一细胞是由骨髓瘤和脾细胞形成的杂种。

为易化由杂种分泌的抗体的筛选和防止单个杂种生长超过其它杂种，将融合的骨髓瘤和B淋巴细胞的混合物在HAT培养基中稀释并在微滴板的多个孔中培养。2至3周后，当杂种克隆在显微镜下变得可见时，对含杂种克隆的每个孔的上清液进行特异性抗体产物的测定。

该测定必须敏感，简单和快速。测定技术包括放射免疫测定，酶免疫测定，细胞毒性测定和空斑测定法。

#### 4.9 细胞繁殖和抗体产生

一旦所希望的融合细胞杂种被选择并被克隆为单个的抗体-产生细胞系，每一细胞系可按两种标准方法之一繁殖。杂交瘤的样品可注射入用于提供原始融合所用的体细胞和骨髓瘤细胞的组织相容性动物类型中。被注射的动物产生分泌由融合细胞杂种产生的特异性单克隆抗体的肿瘤。可穿刺放出该动物的体液，如血清或腹水，以提供高浓度的单克隆抗体。作为选择，该单个细胞系可在实验室培养器皿中体外繁殖。包含高浓度的单一特异性单克隆抗体的培养液可通过倾析，滤过或离心收获。

#### 4.10 单克隆抗体的应用

由本发明的方法制备的单克隆抗体可用于使用单克隆抗体的任何已知技术或在未来将发展的技术。

单克隆抗体的主要用途是用于免疫测定，这是抗原-抗体相互作

用的测定。这种测定通常是多相的或均相的。在均相免疫测定中免疫反应通常涉及特异性抗体，一种标记的分析物和所研究的样本。从标记物发出的信号直接地或间接地随抗体与标记分析物的结合而改变。免疫反应及其程度的测定均在均相溶液中进行。可采用的免疫化学标记物包括自由基，荧光染料，酶，噬菌体，辅酶，等等。均相免疫分析的主要优越性是特异抗体不必与标记的分析物分离。

在多相免疫测定中，试剂通常为标本，特异性抗体，以及用以产生可检测信号的装置。通常将标本置于支持物上，如平板或玻璃片上，并在液相中与抗体接触。然后将支持物从液相中分离，并应用产生该信号的装置对支持相或液相进行检测可测信号。该信号与标本中分析物的存在相关。用于产生可测信号的装置包括放射活性标记物，荧光剂，酶，等等的应用。多相免疫测定的例子是放射免疫测定，免疫荧光方法，酶联免疫测定法和类似方法。

上述免疫测定技术的更详细的讨论见“Enzyme-Immunoassay,” by Edward T. Maggio, CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla., 1980。还可参见，例如，U. S. Pat. Nos. 3690834; 3791932; 3817837; 3850578; 3853987; 3867517; 3901654; 3935074; 3984533; 3996345 和4098876，该名单并未打算详尽无遗。

单克隆抗体的另一主要用途是体内显像和治疗。可用放射活性化合物标记单克隆抗体，如用放射活性碘，并通过静脉内注射应用于病人。还可使用磁性探针标记该抗体。然后用NMR 将抗原精确定位。当抗体在抗原处定位后，可用发射层面X线照相术和放射核扫描技术检测该抗原，从而确定该抗原的位置。

作为实例，将纯化的单克隆抗体悬浮于合适的载体，如盐水中，加或不加入人白蛋白，制成合适的剂量并通过静脉施用，例如，经过

几小时的连续静脉输注，如Miller 等人，在Hybridomas in Cancer Diagnosis and therapy (1982) 中所述，在本文中通过参考文献引述。

本发明的单克隆抗体可用于治疗。具有适当的生物学性质的抗体直接用作治疗的制剂是有用的。作为选择，抗体可与毒素结合形成免疫毒素或与放射活性物质或药物结合形成放射药物或药物。生产抗体的免疫毒素和放射药物的方法是公知的（见，例如，Cancer Treatment Reports (1984) 68: 317-328）。

还相信从无菌动物得到的多克隆抗体也可用于免疫测定，并且与从常规动物得到的多克隆抗体相比较可提供更好的结果。从无菌动物得到的多克隆抗体的制备可通过使用一种无菌动物（如上文所述）和免疫技术（如上文所述），接着用常规技术将多克隆抗体从动物中分离，例如，通过分离从该动物得到的血清。

### 一种纤维蛋白特异性单克隆抗体

#### 5. 1 背景

止血机制是涉及破裂血管修复损伤的一种复杂的生理反应机制。止血通过损伤血管壁，血小板和促凝血系统的合作的相互作用达到。促凝血系统的作用是提供广泛的纤维蛋白网络以稳定和固定在损伤血管的内膜下结构形成的血小板栓。从循环纤维蛋白原形成不可溶的纤维蛋白基质，是最终导致在所需位点产生大量凝血酶的一个复杂反应过程的结果。凝血是涉及酶原（凝血因子）被顺序激活为活性的酶的酶促反应链的一个放大过程。许多控制纤维蛋白聚合过程的生理机制与血栓形成有关。这些包括凝血酶抑制因子抗凝血酶Ⅲ（ATⅢ），蛋白C，前列环素和纤维蛋白溶解系统的各种成份例如组织纤维蛋白溶酶原活化因子（t-PA）及其快作用抑制因子（PAI）。

由Astrup 在1956 Astrup, T., Blood 11, 781-806 (1956) 中提出的动态平衡假说指出在纤维蛋白形成(凝血)和纤维蛋白溶解(纤溶)之间存在动态平衡。在正常的或健康的状态下, 这些功能是非常均衡的。然而, 当该动态平衡的过程受损时, 则凝血和纤溶分别表现为病理血栓形成和出血。病理性的血栓形成或血栓形成性疾病的临床表现极为多样化, 可包括播散性血管内凝血(DIC), 深静脉血栓形成(DVT), 小动脉和静脉的血栓形成。血栓栓塞和其它血管性疾病(如动脉粥样硬化)的血栓形成性并发症可导致大动脉的闭塞, 引起器官缺血和伴随的危及生命的症状例如脑血管意外(中风), 心肌梗塞, 等。

纤溶过程涉及通过一种称为纤维蛋白溶酶原激活物的因子的作用将一种无活性的酶原, 纤维蛋白溶酶原转化为蛋白水解酶, 纤维蛋白溶酶。生理性纤溶的分子机制不完全知道, 但知道在纤维蛋白形成中纤维蛋白溶酶原与纤维蛋白结合并被纤维蛋白溶酶原激活物(例如t-PA)激活。以此方式纤维蛋白产生过程在血栓中进展, 在血栓中该过程受纤维蛋白溶酶的主要生理性抑制物,  $\alpha_2$  抗纤维蛋白溶酶的保护而不致失活。

纤维蛋白原和纤维蛋白在纤维蛋白溶酶作用下断裂为其降解产物。纤维蛋白原断裂为片段X和Y, 并在纤维蛋白溶酶的进一步作用下, 断裂为片段D和E。纤维蛋白从非交联的纤维蛋白断裂为片段X, Y, D和E, 而从交联的纤维蛋白断裂为交联的D-二聚体, D-D/E复合体, Y二聚体, Y-D-二聚体X寡聚体。

血栓形成性疾病的标记的测定直至最近一直是在放射免疫测定和乳胶凝集反应类型测定中使用多克隆抗体而进行的。Gaffney (Gaffney, P. J., Ann. N. Y. Acad. Sci., 408, 407-423

(1983)) 证实这些测定极不可靠。使用单克隆抗体的更特异和灵敏的免疫测定(如ELISAs)在临床实验室中逐渐成为常规做法。在这些诊断测定中的限制因素是所使用的特定单克隆抗体的特异性和亲合力。对受损的止血机制的任何潜在的标记物的高特异性抗体的产生受标记物和特定标记与其前体的抗原相关性的低水平两者的阻碍,该前体在血浆中通常以更高水平存在:实例是酶与其抑制因子之间形成复合物,例如凝血酶-抗凝血酶III,纤维蛋白溶酶- $\alpha_2$ -抗纤维蛋白溶酶,t-PA-PAI-1。由这种复合物形成而产生的新的抗原性位点的数目极小,使免疫探针(如单克隆抗体)的生产很困难。

同样地,与获得抗纤维蛋白的单克隆抗体有关的主要问题在于纤维蛋白与其生理性前体纤维蛋白原结构和形态的相似性。据估计,当纤维蛋白原转化为纤维蛋白时,其共价结构的保守性大于98%(Plow, E. F., 等, Semin. Thromb. Haemostas, 8, 36(1982)), 并且因而在纤维蛋白分子上只有很小百分比的抗原决定基实际上是新抗原(并且是纤维蛋白独有的)。很多被用来获得纤维蛋白抗体的方法集中于用模仿纤维蛋白上暴露的新抗原性位点的可溶性纤维蛋白片段和合成肽免疫动物。见Hui, K. Y., 等, Science 22, 1129-32(1983), Scheefers-Borchel. V., 等, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 7091-95(1985), Elms, M. J., 等, Thromb. Haemostas, 50, 591-94(1983), 和Kurdryk, B., 等人, Mol. Immunol., 21, 89-94(1984)。然而,据信这些抗体的结合位点在纤维蛋白降解过程中被保留,因而,这些抗体也可与纤维蛋白降解产物结合。

本发明允许人们使用一种完全不同的方法并利用完整的纤维蛋白抗原及无抗原(AF)动物增强的免疫敏感性相结合,以产生一种纤维蛋白特异的单克隆抗体。作为本发明的目的,纤维蛋白特异性单克隆

抗体与纤维蛋白结合，而不与纤维蛋白原、纤维蛋白原降解产物或纤维蛋白降解产物结合。

## 5.2 材料和方法

### 5.2.1. 动物

无菌BALB/cAnN 小鼠得自在威斯康星州大学维持的无菌（GF）群体。该动物在GF 条件下被运送至我们的实验室。无抗原（AF）群体的引入是通过将用天然成分食物 L-485（见Pleasants, J. P., 等, J. Nutr. 116, 1949-1964（1986））喂养的妊娠GF 小鼠移入一个AF 隔离室，在那里该小鼠立即转变为化学限定（CD）AF 食物。它们的从未直接接触过天然成分（NI）食物的后代，从母乳断奶后以CD 食物喂养并被称为第1 AF 代。将AF 小鼠成对交配直至雌鼠明显妊娠；然后将雄性移出以保证从那以后雌鼠将得到其完全的每日脂质补充。幼鼠在24天时断奶。

### 5.2.2. 笼养

AF 繁殖动物被成对笼养于 $28 \times 17.8 \times 12.7\text{cm}$  的标准多碳酸盐鼠笼的一半中。笼底被切掉并替换以一个网状不锈钢底。一片不锈钢的纵行分隔物被栓在塑料笼的末端，向上伸出足够高度至笼外，固定一个不锈钢金属丝的盖。这一通常安在笼内的凹进的盖被颠倒以在假底上方提供更充分的头部空间。合适大小的不锈钢环被焊在盖的顶部以托住60mL 的食物瓶。4个不锈钢杯在末端，假底和顶部的半路被焊在纵行分隔物的边上。（该笼的一张图片发表于CRC Handbook of Immunology in Aging, (Kay, M. M. B. S. Makinodon, T., eds.), 257-297 页, CRC Press, Boca Raton, Fl. (1981) 中 Pleasants, J. R., The germfree system for aging and immunity.）。食物瓶由棕色玻璃制成。食物和水瓶两者都有在中间

钻孔的塑料盖。瓶子被装满并在它们的环中倒置。每日称量脂质补充物放入不锈钢杯中。在每个笼下放一个塑料盘以接废物。

用作铺垫物和可摄入的纤维两种用途的滤纸是Whatman 无灰滤纸41号，作为剪下物购买（Sargent Welch）。用作铺垫物时，该纸被切成条。未切的方块纸被用于清洁隔离室内部。该纸在121℃高压灭菌25分或在塑料包中被照射（4.5 Mrad）。所有的小鼠均得到足够的纸以盖住笼的一端。当变湿，黄或脏时就换纸。

用标准的限菌技术（见Wostann, B. S. Ed., Gnotobiotics Standards and Guide Lines for the Breeding, Care and Management of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C.）将鼠笼维持于一个1.37×0.6×0.6 米的Trexler 型（Trexler, P. C., Lab. Anim. Care, 13, 572-581（1963））的弹性隔离室中。将该隔离室维持于21℃的房间中，按照计划12小时光照12小时黑暗。

一条7.55cm 长2.5cm 直径的聚乙烯管在隔离室的顶端被封口并在顶和底两端用乙烯基塞子关住。这一设置为食物、水和油的灭菌过滤提供了入口。

### 5. 2. 3 食物

表1说明了食物组成和在超滤的Milli-Q 水（Millipore, MA）中溶解各成分的次序。氨基酸和葡萄糖是Sigma 公司组织培养级的。维生素也得自Sigma 公司，除其中纯的棕榈酸视黄酯由Hoffman-La Roche, Inc.（Nutley, NJ）惠赠外。其它试剂均为Fisher 鉴定的或等值物。使用直径为150mm 的Pm 10膜（Amicon）通过Amicon Diaflo TC3 超滤器冷过滤该完全水溶食物。

超滤膜具有10000 道尔顿的分子量截止点。已装配的超滤装置在

使用前将0.15%的次氯酸钠溶液通过之以消毒，继以彻底的洗涤。经超滤的食物在4℃灭菌库中贮存直至使用。使用放在经高压灭菌的压力滤器支撑架中的0.2μm 尼龙（MSI）滤器将食物引入AF 隔离室，其输送管插入一个6号Neoprene 塞子中。为此目的，将上面的Vinyl 塞子从封在隔离室顶部的Tygon 管上移去，用含0.1%烷基-芳香基磺酸盐的2%过醋酸消毒溶液喷洒管的内部。将滤器支撑架塞子插入以代替上面的塞子。20分钟后将下面的塞子移开（在隔离室内部）并在20psi 的氮气下将食物和水过滤入隔离室。

脂质补充的成分在表2中给出。大豆甘油三酯是从甲基酯制得的制剂，这些甲基酯在一定温度范围内真空蒸馏产生从软脂酸酯到亚麻酸酯的酯。然后使这些酯与甘油转酯化以形成混合的甘油三酯。（Nu-Chek Prep, Elysian, MN）。脂溶性维生素在滤入隔离室中前加到甘油三酯混合物中，在此时将其加温至50℃并用食物中水溶性部分所用的同样程序滤入隔离室中。

脂质摄入量测定为0.375ml/日。增加脂质补充大大降低了新生小鼠的死亡率。平均的幼仔大小也增加至常规培养的动物的大小。哺乳的母鼠得到2倍正常量的脂质补充。

表 1

## 化学限定食物L489E1Se 的组成和制备

| 成分 | 总量(克/100克成分) |
|----|--------------|
|----|--------------|

在70℃将下列物质加入192ml Milli-Q 水中：

|       |      |
|-------|------|
| 亮氨酸   | 1.9  |
| 苯丙氨酸  | 0.74 |
| 异亮氨酸  | 1.08 |
| 蛋氨酸   | 1.06 |
| 色氨酸   | 0.37 |
| 缬氨酸   | 1.23 |
| 天门冬酰胺 | 0.91 |
| 盐酸精氨酸 | 0.81 |
| 苏氨酸   | 0.74 |
| 盐酸赖氨酸 | 1.77 |
| 盐酸组氨酸 | 0.74 |

将该溶液冷却至45℃并加入下列物质：

|              |      |
|--------------|------|
| 甘氨酸          | 0.59 |
| 脯氨酸          | 1.48 |
| 丝氨酸          | 1.33 |
| 丙氨酸          | 0.59 |
| 谷氨酸钠         | 3.40 |
| 盐酸 L - 酪氨酸乙酯 | 0.62 |
| 葡萄糖酸铁        | 0.05 |

表 1 ( 续 )

| 成分                          | 总量(克/100克成分) |
|-----------------------------|--------------|
| 盐35D <sup>1</sup>           | 0.105        |
| 亚硒酸钠 <sup>2</sup>           | 0.074        |
| 将溶液冷却至 5 °C 并加入下述物质：        |              |
| 甘油磷酸钙                       | 5.22         |
| 甘油磷酸镁                       | 1.43         |
| 氯化钙 2 H <sub>2</sub> O      | 0.185        |
| 氯化钠 - 碘化钾(KI)混合物(含680mg KI) | 0.086        |
| 维生素 B 混合物111E5 <sup>3</sup> | 0.09         |
| 维生素 B 12 <sup>4</sup>       | 1.20mg       |
| 盐酸胆碱                        | 0.31         |
| 乙酸钾                         | 1.85         |

向108ml 70 °C的Milli-Q 水中加入无水的D-葡萄糖

将两种溶液冷却至 5 °C，并合并以进行超滤。

<sup>1</sup> 盐35D混合物的组成在表 3 中给出

<sup>2</sup> 在盐35D中另外加入亚硒酸盐

<sup>3</sup> 维生素 B 混合物111E 5 的成分(见表 4 )

<sup>4</sup> 在维生素 B 混合物111E 5 中另外加入维生素 B - 12

表 2  
脂质补充物LADEK 69E 6 的成分

| 成分                        | 每日量* (0.375ml)       |
|---------------------------|----------------------|
| 提纯的大豆甘油三酯 <sup>1</sup>    | 0.33g                |
| 棕榈酸视黄酯                    | 6.45mg (11.7 I.U.)   |
| 胆汁骨化醇                     | 0.0288mg (1.15 I.U.) |
| 2 - 双 - $\alpha$ - 生育酚    | 3.3mg                |
| 乙酸 2 - 双 - $\alpha$ - 生育酚 | 6.6mg                |
| 维生素 K <sub>1</sub>        | 72.0mg               |

\* 授乳的小鼠得到两倍于普通成年鼠的剂量。

<sup>1</sup> 包含： 12% 软脂酸酯  
1.5% 硬脂酸酯  
24% 油酸酯  
55% 亚油酸酯  
8% 亚麻油酸酯

表 3  
35D 盐混合物的成分

| 盐                                                                   | 总量 ( 每300ml 食物 ) ( mg ) |
|---------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 二乙酸锰 $4\text{H}_2\text{O}$                                          | 55.4                    |
| 硫酸锌 $\text{H}_2\text{O}$                                            | 40.6                    |
| 二乙酸铜 $\text{H}_2\text{O}$                                           | 3.7                     |
| 三乙酸铬 $\text{H}_2\text{O}$                                           | 2.5                     |
| NaF                                                                 | 2.1                     |
| $\text{SnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                           | 0.37                    |
| $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.37                    |
| $\text{NiCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$                           | 0.37                    |
| 二乙酸钴 $4\text{H}_2\text{O}$                                          | 0.11                    |
| $\text{Na}_3\text{VO}_4$                                            | 0.22                    |
| $\text{Na}_2\text{SeO}_3$                                           | 0.096                   |

表 4  
维生素 B 混合物 111E 5 的成分

| 成分       | 总量 ( mg ) / 300ml 食物 |
|----------|----------------------|
| 盐酸硫胺素    | 1.23                 |
| 盐酸吡哆醇    | 1.54                 |
| 生物素      | 0.25                 |
| 叶酸       | 0.37                 |
| 维生素 B 12 | 0.37                 |
| 核黄素      | 1.85                 |
| 尼克酰胺     | 9.2                  |
| i-肌醇     | 61.9                 |
| 泛酸钙      | 12.3                 |

水是Milli-Q超滤级的并按食物所用的同样的方法滤入隔离室中

#### 5 . 2 . 4 . 微生物学监测

按照Wostann, B. S. ed. (1970) Gnotobiotics Standards and guidelines for the breeding care and management of laboratory animals, National Research Council, National Academy of Sciences, 华盛顿, D. C. 中所陈述的准则测试无抗原系统的微生物污染。简言之, 将用隔离室内的食物和水沾湿的拭子用于取得新从小鼠和从每个笼下积累的废物得到的粪涂片。还从隔离室的墙, 特别是入口周围取得涂片。通常取双份涂片。一套使用革兰氏染色直接在显微镜下检查细菌和真菌。第二套拭子用于检测微生物。培养需经过 3 周时间才能被判定为阴性。

几乎每隔 2 周或在隔离室中放入新动物数天后进行一次微生物学检测。

### 5. 3. 使用无抗原小鼠生产单克隆抗体

上文描述的无抗原小鼠在单克隆抗体的生产中被用作淋巴细胞提供者。所有抗原的溶液均在层流通风橱中无菌条件下制备。

采用下列方案免疫AF 小鼠。将抗原（25-50 微克）溶解于灭菌盐水（100 微升）并用等体积的弗氏完全佐剂（FCA）乳化。在制备乳剂前将干扰素（1000 单位）加入抗原溶液中。所有的免疫均使用灭菌的注射器和针头。经过进入孔将注射器转运至AF 隔离室中，在进入孔通过喷洒过醋酸溶液（2%）对注射器灭菌。使用同样量的抗原并用弗氏不完全佐剂替换FCA 进行加强剂量注射。共给予 3 次加强剂量免疫注射，每一次间隔 3 周。最后一次加强（没有佐剂）在融合前 4 - 7 天给予。所有的免疫注射均经腹膜内给予。在融合的当天将小鼠从隔离室中移出并立即用CO<sub>2</sub> 窒息法处死。将脾取出并使用标准的杂交瘤技术将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞（NS 1）融合。

### 5. 4. 使用无抗原动物系统生产一种纤维蛋白特异性的单克隆抗体

该无抗原系统被用于产生一种纤维蛋白特异性的单克隆抗体。该抗体是高度特异的，不识别纤维蛋白原，纤维蛋白降解产物或纤维蛋白原降解产物。该杂交瘤细胞系经用人纤维蛋白免疫的无抗原BALB/c 小鼠的脾细胞和NS 1 骨髓瘤细胞融合而产生。

#### 5. 4. 1 免疫程序

用33 微克人纤维蛋白制剂对 3 只 8 周大的雌性无抗原小鼠进行免疫。该制剂是按下述制备的纤维蛋白的冷冻粉末样品。

用凝血酶和因子XIIIa 将纤维蛋白原转变为纤维蛋白。然后将纤

纤维蛋白凝块在液氮中冷冻并用机械破裂法使之变成极细的粉末。在盐水中将冷冻破裂的纤维蛋白制成分散体系，得到终浓度为  $1\text{ mg/mL}$  的交联纤维蛋白XL-Fn 的清亮溶液。33 微升的该纤维蛋白抗原用于免疫动物。抗原溶液的体积用灭菌的盐水调至100 微升，然后按上一部分中所述用FCA 乳化。以3 周为间隔使用弗氏不完全佐剂中同样水平的抗原进行两次加强剂量免疫注射。最后一次加强剂量在融合前4 天给予。使用同样水平的抗原而将佐剂替换为盐水。

#### 5. 4. 2 抗体的检测和测定

使用酶联免疫吸附试验（ELISA）进行单克隆抗体的定性和定量测定。使用固定于96孔PVC板（Costar）的人纤维蛋白实施ELISA法。通过将100 微升的纤维蛋白原溶液（Kabi，L级）（ $50\text{ 微克/mL}$  硼酸盐/盐水缓冲液）在  $4^{\circ}\text{C}$  保温过夜制备纤维蛋白包被的测定板。通过用含0.05% Tween 80 的PBS（PBS-Tween）洗涤移去未结合的纤维蛋白原。用100 微升含  $2\text{ mM CaCl}_2$  的凝血酶溶液（10 NIH 单位/ $\text{mL}$ ）在  $37^{\circ}\text{C}$  温育1 小时，使包被在每个塑料孔上的纤维蛋白原转变为纤维蛋白。使用以SDS-PAGE 均质化的抗体制剂建立该抗体的标准校正曲线。

为防止非特异性结合，将纤维蛋白包被的板用PBS 中pH 7.4 的1%的BSA 溶液温育。然后加入含抗体的溶液（100 微升）并在  $37^{\circ}\text{C}$  温育90 分钟。该程序中的每一步之后都用PBS-Tween 充分洗涤各孔。通过加入与稀释于PBS，1% BSA 中pH 8.0 的碱性磷酸酶（Sigma）结合的兔抗小鼠抗体的1000 倍稀释液检测结合的抗体。

#### 5. 4. 3. 杂交瘤的产生—融合

用 $\text{CO}_2$  窒息法将小鼠处死并立即实施脾切除术。将免疫小鼠的脾细胞与融合剂（fuseagent）聚乙二醇4000（3000-7000）融合。将

该细胞在T型瓶中以HAT 选择性培养基培养1周。经过这段时间后将细胞植入 $5 \times 9$  6孔板，其中9 3个孔显示生长，而这其中，1 9个孔是纤维蛋白抗原阳性。这些克隆中的一个，F 492D 8（后来重新命名为MH 1），产生识别纤维蛋白抗原但不与纤维蛋白原交叉反应的抗体。这个特定的克隆，MH 1，通过有限稀释被再克隆3次，第三克隆相以每孔一个细胞进行。一旦该细胞系稳定就使之离开原来的培养基，移至一种无血清培养基中，该细胞系产生抗体的水平约7.5mg/升。

#### 5. 4. 4. 单克隆抗体的纯化

在纯化前，将（4升）组织培养上清液离心以除去细胞碎片并通过一个0.8 微米的尼龙膜过滤以除去任何残余的颗粒物质。使用带有分子量截止点为30000 的YM 型膜（Amicon）的螺旋缠绕超滤系统将杂交瘤上清液在4℃浓缩至500mL 的体积。按照制造商的说明书通过透滤（diafiltration）完成向20mM 2（N-吗啉）磺酸乙烷（MES），pH 6（缓冲液A）的缓冲液交换。在进一步浓缩至终体积为100ml 后，在进一步提纯前将抗体溶液通过0.451 微米的尼龙膜过滤。该浓缩的抗体溶液使用7.75mm $\times$ 10cm ABx 柱（J. T. Baker, Phillipsburg, NJ）在Waters HPLC 色谱仪上用液相色谱法纯化。该柱用缓冲液A平衡，并将样品（100ml）以1.0ml/分的流速上柱。在用缓冲液A充分洗涤后，用从缓冲液A到100%缓冲液B（1 M乙酸钠pH 7）的梯度以1 ml/分将该抗体从柱上洗脱下来。收集各馏分（2 ml）并将那些含MAb（经ELISA 测定）者合并，并用磷酸缓冲盐（PBS）（20mM 磷酸钠，150mM NaCl，pH 7.4）透析，以浓度大于1 mg/ml 在-20℃保存。该ABx 柱的再生通过用100%的缓冲液B洗涤5分钟，继以用1 5个柱体积的缓冲液A再平衡。

## 5.5 纤维蛋白特异性的测定

通过在纤维蛋白和纤维蛋白原包被的微滴板上分别筛选杂交瘤上清液进行纤维蛋白特异性的初步测定。只有那些产生不与纤维蛋白原交叉反应的抗体的细胞系是被接受的。

使用溶液中的纤维蛋白原的竞争试验进行测定，进一步证实纤维蛋白特异性，由此证实该抗体不识别溶液中的纤维蛋白原。

按照上文ELISA 试验中所述将该抗体与溶液中的纤维蛋白原预先温育，进行用于确定抗体的纤维蛋白特异性的竞争试验。简言之，为防止抗体对纤维蛋白原的非特异性结合将杂交瘤上清液在 37℃ 与含 BSA (10mg/ml) 的生理浓度 (4 mg/ml) 的纤维蛋白原温育 30 分钟。然后将纤维蛋白原/抗体溶液转入已用纤维蛋白包被的微滴板的孔中。向纤维蛋白原抑制剂中加入 Gly Pro Arg Pro (GPRP) 以防止纤维蛋白孔中由残余凝血酶引起的可能的纤维蛋白原聚合。然后按照抗体与固相抗原结合的常规ELISA 试验进行测定。在检测MH1 抗体的纤维蛋白特异性的所有实验中均使用第二抗体45J 作为对照。45J 与纤维蛋白和纤维蛋白原交叉反应。

### 5.5.1. 测定与纤维蛋白原的交叉反应性

#### 5.5.1.1. 固定的纤维蛋白和纤维蛋白原

细胞系MH1 产生一种与固定于PVC 微滴测定板表面上的纤维蛋白交叉反应的鼠单克隆抗体 (表5)。在同样的测定中该抗体不识别固定于该板上的纤维蛋白原。如表5 中的数据所显示，一旦纤维蛋白原被凝血酶转化为纤维蛋白，其免疫反应性即有显著增高，明确地表明了纤维蛋白分子上新抗原决定基的暴露或形成。对照组抗体45J，却明显地识别当纤维蛋白原转化为纤维蛋白时保守的抗原决定基。

### 5. 5. 1. 2. 纤维蛋白和纤维蛋白原的竞争试验

该抗体，即MH 1 抗体的纤维蛋白特异性在竞争试验中被进一步证实，在该试验中在纤维蛋白包被孔的EILSA 之前将杂交瘤上清液与纤维蛋白原溶液（终浓度为 4 mg/ml）预先温育。因为在这一竞争试验中使用这样高水平的纤维蛋白原（该抗体浓度的500 倍），所以将BSA（终浓度为10mg/ml）加入混合物中。加入肽GPRP 以防止在纤维蛋白包被的孔中由残留的凝血酶引起的纤维蛋白聚合。该测定的结果显示该MH 1 抗体不识别溶液中的纤维蛋白原（表 6）。

假定400ng 的纤维蛋白结合于微滴测定板的每一孔上，则在该特定竞争试验中所使用的纤维蛋白原水平代表超过结合的纤维蛋白抗原的1000 倍。另外，它还代表超过组织上清液中抗体水平的400 倍。

表 5

MH 1 抗体与纤维蛋白原和纤维蛋白抗原的交叉反应性

| 单克隆抗体 | A <sub>405nm</sub> /30 分 |       |
|-------|--------------------------|-------|
|       | 纤维蛋白                     | 纤维蛋白原 |
| MH 1  | .90                      | .025  |
| 45 J  | 1.65                     | 1.50  |

表 6

在纤维蛋白原存在下MH 1 抗体与纤维蛋白的交叉反应性

| 单克隆抗体 | A <sub>405nm</sub> / 30 分 |         |
|-------|---------------------------|---------|
|       | + 纤维蛋白原                   | - 纤维蛋白原 |
| MH 1  | 1.24                      | 1.27    |
| 45 J  | 0.438                     | 1.74    |

## 5. 5. 2. 与纤维蛋白（原）降解产物的交叉反应性测定

将纤维蛋白原与纤维蛋白溶酶在 37 °C 温育 10 分钟至 3 小时制备纤维蛋白原降解产物（FDPs）。通过加入抑肽酶（100 血管舒缓素抑制剂单位 / ml）和 20mM  $\epsilon$ -氨基己酸（EACA）在所希望的时间使纤维蛋白原裂解停止。

通过向含 10mM CaCl<sub>2</sub>，纤维蛋白溶酶原（0.25mg / mL）和尿激酶（50 IU / mL）的 Tris 缓冲盐（TBS, pH 7.4, 50mM Tris, HCl, 150mM NaCl）中的纤维蛋白原溶液（5 mg / mL）中加入凝血酶（4NIH 单位 / mL）制备交联的纤维蛋白降解产物（XLFDPs）。如上文中关于 FDPs 所述，将该混合物在 37 °C 温育并在不同的时间间隔终止该凝血酶消化。

为测定抗体与纤维蛋白降解产物和纤维蛋白原降解产物的交叉反应，将适当的降解产物包被于微滴板上并用常规方法进行 ELISA。如表 7 中的结果所示，MH 1 抗体不与任何血纤维蛋白溶酶产生的纤维蛋白原降解产物交叉反应。如表 8 所示，该抗体不与 XL-纤维蛋白降解

产物交叉反应。用Western 印迹分析试验该抗原的交叉反应也得到同样的结果。

可得到这样的结论，即该抗体识别不在前体分子纤维蛋白原表面上出现或暴露的，完整纤维蛋白分子的抗原决定基。如表 8 中资料所提示的，交联的纤维蛋白经纤维蛋白溶酶消化抗原决定基明显被破坏。

因此，MH 1 抗体是可按如下定义的纤维蛋白特异性单克隆抗体。

为本发明的目的，纤维蛋白特异性单克隆抗体是这样一种单克隆抗体：

1. 如上文所述，在测量与纤维蛋白和纤维蛋白原的交叉反应性的竞争试验中，当纤维蛋白原以超过纤维蛋白1000 倍的量被应用时，该单克隆抗体与纤维蛋白原具有小于大约75%，优选小于大约10%的交叉反应性，
2. 在测量与交联的纤维蛋白和纤维蛋白降解产物的交叉反应性的试验中，如上文所述，该单克隆抗体与被纤维蛋白溶酶消化约 3 小时的纤维蛋白的反应性小于该单克隆抗体与纤维蛋白在时间零点的反应性的大约50%，并优选小于约40%，并且
3. 如上文所述，在测量与纤维蛋白原和纤维蛋白原降解产物的交叉反应性的试验中，该单克隆抗体与被纤维蛋白溶酶消化约 4 小时的纤维蛋白原的反应性不大于该单克隆抗体与纤维蛋白原在时间零点的反应性。

通过测定其对纤维蛋白的亲合性进一步鉴定该MH 1 抗体的特性。使用<sup>125</sup>I 标记的MH 1 抗体以Scatchard 测定法（Frankel 等人，Molecular Immunology, 16, 101-106 (1979)）测定该亲合性。得到的解离常数K<sub>D</sub> 值为 $6.7 \times 10^{-10}$  M。这样的亲合性是t-PA 对纤维蛋白亲合性的约5000 倍。

还用Western 免疫印迹测定法确定了该MH 1 抗体不与纤维蛋白原的A $\alpha$ ，B $\beta$ 或 $\gamma$ 链交叉反应。还用同样的测定方法确定了该MH 1 抗体不与凝血酶处理的纤维蛋白原的A $\alpha$ 或B $\beta$ 链交叉反应。（纤维蛋白原的凝血酶处理导致纤维蛋白肽A和纤维蛋白肽B分别从A $\alpha$ 链和B $\beta$ 链释放，从而形成纤维蛋白的 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链）。

表 7

MH 1 抗体与纤维蛋白原降解产物的交叉反应性

| 纤维蛋白溶酶消化时间（分） | A <sub>405nm</sub> /30 分 |       |
|---------------|--------------------------|-------|
|               | MH 1                     | 45 J  |
| 0             | 0.15                     | 1.037 |
| 10            | 0.10                     | nm    |
| 20            | 0.11                     | 1.02  |
| 40            | 0.11                     | 0.410 |
| 60            | 0.10                     | 0.330 |
| 240           | 0.09                     | 0.300 |

表 8

MH 1 抗体与纤维蛋白降解产物的交叉反应性

| 纤维蛋白溶酶消化时间 (小时) | A <sub>405nm</sub> /30 分 |      |
|-----------------|--------------------------|------|
|                 | MH 1                     | 45 J |
| 0               | 0.890                    | 1.40 |
| 3               | 0.354                    | 1.0  |
| 5               | 0.310                    | 0.77 |

另外，如表 7 中的结果所示，对照组抗体，即 45 J 抗体，与纤维蛋白原结合而不与纤维蛋白原降解产物交叉反应。因此，这样的一种单克隆抗体是一种纤维蛋白原特异性的单克隆抗体并代表本发明的另一方面。该纤维蛋白原特异性单克隆抗体可在任何用于体外测定血浆纤维蛋白原水平的免疫试验中应用。该 45 J 抗体已被进一步鉴定，已被测定到该 45 J 抗原决定基位于纤维蛋白原  $\alpha$  链中从氨基酸 206 至约 424 的区中而最可能位于从氨基酸 207 到约 231 的区中。为本发明的目的，纤维蛋白原特异性单克隆抗体是这样一种抗体：在如上文所述的用于测量与纤维蛋白原和纤维蛋白原降解产物交叉反应性的试验中，该单克隆抗体与被纤维蛋白溶酶消化约 40 分钟的纤维蛋白原的反应性小于该单克隆抗体与纤维蛋白原在时间零点的反应性的约 50%。

使用用纤维蛋白免疫接种的常规的 Balb/c 小鼠用常规技术制备该 45 J 杂交瘤。不过，也可用纤维蛋白原作为抗原。

#### 5. 5. 3. 与非交联的纤维蛋白和非交联的纤维蛋白凝块的交叉反应性的测定

用 ELISA 法已证实抗体 MH 1 不仅与交联的纤维蛋白 (XLFN) 交叉

反应，也与非交联的纤维蛋白（NONXLFN）交叉反应。ELISA 按下述进行：

1. 用100  $\mu$ l 纤维蛋白原溶液（50  $\mu$ g/ml，溶于硼酸盐（pH 8.5）盐水缓冲液中）包被 9 6 孔微滴试验板，在 4  $^{\circ}$ C 过夜。

2. 通过与Tris 缓冲盐（TBS，pH 7.4，50mM Tris HCl，150mM NaCl）中，含 2 mM  $\text{CaCl}_2$  和10mM 半胱氨酸的凝血酶溶液（10NIH 单位/ml）在 37  $^{\circ}$ C 温育 1 小时，在纤维蛋白原包被的孔中形成交联的纤维蛋白。

3. 通过与含终浓度为0.0125M的EDTA 的磷酸盐缓冲液（pH 6.1）中的凝血酶溶液（10 NIH 单位/ml）在 37  $^{\circ}$ C 温育 1 小时在纤维蛋白原包被的孔中形成非交联的纤维蛋白。

4. 通过与抗小鼠碱性磷酸酶共轭物温育测定结合的抗体。通过加入一种碱性磷酸酶底物测定结合的共轭物并在自动板阅读器中在 405nm 处监测产生的比色反应。

该测定的结果在表 9 中显示并可推断该抗体与交联的纤维蛋白的交叉反应性大于它与非交联的纤维蛋白的交叉反应性。最简单的解释是：出现在交联的多聚体结构中的共价交联起到将该抗体识别的构型锁定或冻结的作用。在非交联的种类中虽然也形成该构型，但不被该多聚体的共价结合所固定。

还已证实，该抗体与在体外形成的交联的和非交联的凝块都交叉反应。通过将纤维蛋白原溶液（在Tris（50mM，pH 7.4）盐水中，含  $\text{CaCl}_2$ （2 mM）和半胱氨酸（10mM））与凝血酶（10NIH 单位/ml）在37 $^{\circ}$ C温育 3 小时制备交联的纤维蛋白。通过将含终浓度为0.0125M的EDTA 的磷酸盐缓冲液（pH 6.1）中的纤维蛋白原溶液（3 mg/ml）与凝血酶溶液（10NIH 单位/ml）在 37  $^{\circ}$ C 温育 3 小时形成非交联的

纤维蛋白。在凝块形成后，它们被洗涤并在 37 °C 与 400  $\mu$ l 含  $^{125}$ 碘标记的 MH 1 抗体的 1 % BSA 溶液温育。在不同的时间点取出溶液的小的等分试样并且通过在  $\gamma$  计数器中对该血浆进行计数而测定抗体吸收量。

表 10 显示非交联的和交联的凝块两者的抗体吸收。

表 9

MH 1 抗体与交联的和非交联的纤维蛋白的交叉反应

| 抗体浓度<br>(ng./ml.) | 交联的纤维蛋白<br>(在 405 纳米处的吸收率) | 非交联的纤维蛋白 |
|-------------------|----------------------------|----------|
| 100.000           | 0.764                      | 0.409    |
| 50.000            | 0.460                      | 0.319    |
| 25.000            | 0.305                      | 0.154    |
| 12.500            | 0.174                      | 0.074    |
| 6.250             | 0.069                      | 0.000    |

表 10

MH 1 抗体与交联的和非交联的纤维蛋白凝块的交叉反应

| 纤维蛋白凝块 | 8 小时后标记抗体的吸收百分率 |
|--------|-----------------|
| 交联的    | 79 %            |
| 非交联的   | 76 %            |

### 5.6. 杂交瘤的保藏

MH 1 和 45 J 于 1988 年 6 月 9 日保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC)，登记号分别为 HB 9739 和 HB 9740。ATCC 位于 12301 Parklawn Drive, rockville, MD. 20852。MH 1 抗体是一种有一条 K

轻链的IgG<sub>1</sub> 抗体并且已观察到MH 1 抗体不仅与人纤维蛋白交叉反应而且与兔纤维蛋白交叉反应。

本发明的意图不是将范围局限于保藏的杂交瘤，它们只是用作产生如本文所定义的纤维蛋白特异性单克隆抗体和纤维蛋白原特异性单克隆抗体的杂交瘤的一个示例。任何功能上等价的细胞系均在本发明的范围内。术语“功能上等价”的含义是指抗体能在与MH 1 抗体结合的纤维蛋白抗原决定基的结合中或与45 J 抗体结合的纤维蛋白原抗原决定基的结合中分别与MH 1 抗体或45 J 抗体竞争。另外，该术语还包括如本文所定义的，分别与不同于MH 1 抗体结合的和45 J 抗体结合的抗原决定基结合的纤维蛋白特异性单克隆抗体和纤维蛋白原特异性单克隆抗体。

#### 5 . 7 . 纤维蛋白特异性单克隆抗体的体内诊断的和 治疗的应用

##### 5 . 7 . 1 . 凝血块 / 血管疾病定位

本发明的纤维蛋白特异性单克隆抗体在体内能以纤维蛋白凝块或纤维蛋白的聚合物作为目标。因此，它们可用于人类定位可能的组织或血管损伤并用于监测血管疾病。为此目的特别优选纤维蛋白特异性单克隆抗体，因为这种单克隆抗体不与纤维蛋白原、纤维蛋白降解产物和纤维蛋白原降解产物结合，因而减小了本底，使人们能更确切地定位纤维蛋白凝块或纤维蛋白的聚合物。

为此项应用，优选使用经过纯化的单克隆抗体。优选地，纯化可用HPLC 方法完成。供人类应用的单克隆抗体的纯化也可通过硫酸铵或硫酸钠沉淀继以用盐水透析并滤过灭菌来完成。作为选择，免疫亲和层析技术可用于纯化该单克隆抗体。

纯化的单克隆抗体可用放射性的化合物，例如<sup>123</sup>I，<sup>125</sup>I，<sup>131</sup>I，

$^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  标记, 并通过静脉用于病人。该抗体还可用磁性探针标记。然后可用核磁共振 (NMR) 精确定位凝血块。抗体在凝血块或纤维蛋白聚合物处定位后, 可用发射体层照相术和放射核扫描技术探测它们, 从而为例如被血栓或纤维蛋白包围的肿瘤精确定位。

作为举例阐述, 纯化的单克隆抗体可以合适的剂量悬浮于适当的载体, 如盐水中, 加或不加入白蛋白, 并应用于病人。优选经静脉使用该单克隆抗体, 例如, 持续数小时的连续静脉输注。

#### 5. 7. 2. 用单克隆抗体结合物治疗血管性疾病

本发明的单克隆抗体可与很广范围的药用试剂如细胞毒试剂和溶栓制剂如  $t\text{-PA}$ , 尿激酶链激酶, 和其它能溶解纤维蛋白的蛋白酶联合应用。特别优选这种应用, 因为本发明的纤维蛋白特异性单克隆抗体可使这些试剂的应用非常有效, 因为这些试剂不会与纤维蛋白原, 纤维蛋白降解产物或纤维蛋白原降解产物结合而有所丢失。本主题的各种综述见 Bale 等, 1980, Cancer Research, 40: 2965-2970; Ghose 和 Blair, 1978, J. Natl. Cancer Inst., 61(3): 657-676; Gregoriadis, 1977, Nature, 265: 407-411; Gregoriadis, 1980 Pharmac. Ther., 10: 103-108; 和 Trouet 等, 1980, Recent Results Cancer Res., 75: 229-235。

用于将这些试剂与单克隆抗体分子结合的方法可涉及非共价的或共价的连接。由于非共价键更容易在抗体复合物到达目标位置前断裂, 故优选共价连接。例如在药剂的羧基和抗体分子的氨基之间可形成碳化二亚胺键。可使用双官能团试剂例如二醛 (dioldehydes) 或亚胺酸酯将药物的氨基与抗体分子的氨基相连接。可用 Schiff 碱基反应将药物连接到抗体分子上。该方法涉及含乙二醇或羟基的药物或细胞毒剂的过碘酸盐氧化, 从而形成醛, 随后醛又与抗体分子反应。通过

用该抗体分子的氨基形成Schiff 碱基而发生接合。另外，已将有活性巯基的药物与抗体分子结合。

## 6. 可溶性纤维蛋白的体外检出和测定

### 6. 1. 背景

如上所述，见 5. 1 部分，止血的机制涉及一系列复杂的反应，通过这些反应纤维蛋白原最终被凝血酶转变为纤维蛋白。这些反应的最终结果是血栓（血凝块）的形成。反应的次序可用下列三步过程简单地描述

#### 凝血酶

步骤 1 - 蛋白水解：纤维蛋白原  $\longrightarrow$  纤维蛋白单体 + 纤维蛋白肽 A 和 B

步骤 2 - 聚合：纤维蛋白单体  $\rightleftharpoons$  可溶性纤维蛋白多聚体

步骤 3 - 凝固：可溶性纤维蛋白多聚体  $\rightarrow$  纤维蛋白凝块

纤维蛋白原由三对不同的多肽链： $A\alpha$ ， $B\beta$  和  $\gamma$  组成。见 L. Stryer, Biochemistry, Third Edition p 249, W. H. Freeman and Company 纽约 (1988)。在如上步骤 1 中所示纤维蛋白原转变为纤维蛋白的起始步骤中，纤维蛋白原被凝血酶裂解，从两条纤维蛋白原  $A\alpha$  - 链的氨基末端释放出纤维蛋白肽 A。所产生的单体是 DesAA 纤维蛋白单体。如上在步骤 1 中所示，同时发生，但更慢地，凝血酶还从两条纤维蛋白原  $B\beta$  链的氨基末端裂解出纤维蛋白肽 B。作为纤维蛋白肽释放的结果，新的氨基末端暴露于纤维蛋白  $\alpha$  和  $\beta$  链上。如上所描述，在步骤 1 中形成的分子是纤维蛋白肽 A，纤维蛋白肽 B，纤维蛋白单体 DesAA 纤维蛋白单体，和 DesAABB 纤维蛋白单体，在上文中显示为“纤维蛋白单体”。见 W. Nieuwenhuizen, Blood Coagulation and Fibrinolysis, 4 : 93-96 (1993)。如上在步骤

2 中所示，该纤维蛋白单体随后形成非共价的（非交联的）和共价的（交联的）多聚体以形成可溶性纤维蛋白多聚体。如上在步骤 3 中所示：该可溶性纤维蛋白多聚体随后形成纤维蛋白凝块。

可溶性纤维蛋白被定义为能导致纤维蛋白多聚体形成的来源于纤维蛋白原或纤维蛋白的任何分子种类或具有分子量大于天然纤维蛋白原的分子量并可在血液中保持溶液形式的任何纤维蛋白（原）衍生的分子种类。在上面的步骤 2 中形成的非交联的和交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体是几种可溶性纤维蛋白中的两种并且也是可溶性纤维蛋白多聚体中的两种。此外，术语可溶性纤维蛋白还包括各种其它种类；例如，DesAA 纤维蛋白多聚体，由纤维蛋白单体（DesAA 或DesAABB 纤维蛋白单体）之间相互作用形成的复合物和纤维蛋白原降解产物 X，Y，D 和 E（见上面 5.1 部分中关于这些降解产物的详细描述），再有，例如与纤维蛋白原结合的DesAA 和DesAABB 单体，参见 Nieuwenhuizen, 93-94 页。

可溶性纤维蛋白多聚体是不可溶性纤维蛋白即凝血块的直接的前体，并且因而认为在即将发生或已存在的血栓形成（血管内血凝块形成）的个体中该可溶性纤维蛋白多聚体的血浆水平是升高的。因而在血液中这些多聚体，特别是DesAABB 可溶性纤维蛋白多聚体的检出和测定对于初期的血凝块形成将是一个有用的指标。见Bang 和Chang, 119-121 页，和Nieuwenhuizen, 94 页，Marder 等，美国专利第 5206140 号。

某些种类的可溶性纤维蛋白已在先被检出或测定，检出使用多种方法包括，例如，纤维蛋白肽 A 的测定，使用抗在纤维蛋白原转变为纤维蛋白时暴露的A $\alpha$  和  $\gamma$  抗原决定基的抗体的测定法（见 Nieuwenhuizen, 94-96 页），和 D-二聚体的测定（Marder 等人，

美国专利第5206140号)。其它用于检出或测定和检出可溶性纤维蛋白的方法包括,在有可溶性纤维蛋白存在的条件下,被纤维蛋白包被的红细胞的凝集作用的测定,凝胶排除层析法,由纤维蛋白溶酶原激活剂t-PA引起的纤维蛋白溶酶原激活的速度增加(见Nieuwenhuizen,第94页),乙醇和硫酸鱼精蛋白凝胶作用,从血浆纯化的纤维蛋白原馏分的N-末端分析, $^{14}\text{C}$ 标记的甘氨酸乙酯的掺入和琼脂糖凝胶层析法(见Bang Chang 第111-118页)。这些检验中没有一种能特异性地检出和测定可溶性交联的和可溶性非交联的纤维蛋白多聚体两种物质。

## 6. 2. 可溶性交联的纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的

### 纤维蛋白多聚体的体外测定

本发明基于一种可在一个测定系统中提供检出和测定可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体的体外测定法的发现。其中多聚体由DesAABB 纤维蛋白单体组成。该测定系统不检出(a)纤维蛋白原,(b)纤维蛋白原降解产物,(c)DesAABB 纤维蛋白单体,(d)DesAA 纤维蛋白多聚体,(e)DesAABB 纤维蛋白单体,(f)交联的纤维蛋白原(因子XIIIa处理的纤维蛋白原),(g)DesAA 纤维蛋白单体-纤维蛋白原复合物和(h)纤维蛋白降解产物)“种类(a)-(h)”。该纤维蛋白原降解产物和纤维蛋白降解产物是如上面的5. 5. 2部分中所述的那些由纤维蛋白溶酶消化纤维蛋白原或纤维蛋白而产生的产物。

据信上述测定法在以血栓形成为特征的症状的临床诊断中特别有用途。

该测定可通过使用体液的任何合适样品来完成,但优选使用哺乳类的血液作为样品。合适的哺乳类包括例如兔,猴,和人,而人是最

优选的。

在这样的体外测定中，可使用不检出种类(a)－(h)的任何已知的或待发展的方法测定可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体。一旦被检出，样品中的可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体即可通过与对照样品比较或使用具有已知的可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体总量的标准品予以测定，该标准品中不含种类(a)－(h)。

应指出，一种检出的方法是指能够用以确定在一个样品中所关心的物质的存在的任何方法。一种优选的检出方法是一种抗可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体的抗体，该抗体不与(a)纤维蛋白原，(b)纤维蛋白原降解产物，(c)DesAA 纤维蛋白单体，(d)DesAA 纤维蛋白多聚体，(e)DesAABB 单体，(f)交联的纤维蛋白原，(g)DesAA 纤维蛋白单体－纤维蛋白原复合物和(h)纤维蛋白降解产物交叉反应。所述抗体可用于样品中可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体总量的检出和测定。这样的抗体包括多克隆和单克隆抗体，优选单克隆的。该抗体可得自任何种类。但是优选该抗体是人或鼠，或兔来源的。另外，该抗体包括但不限于嵌合抗体，单链抗体，和Fab 片段。

作为这样的抗体的例子是在上面的5.5.1－5.5.3部分和5.6部分中描述的单克隆抗体MH1。据信该MH1除具有上述结合特性外，也不与纤维蛋白原－纤维蛋白降解产物复合物结合。MH1的这一特性增加了其作为检出和测定可溶性交联的和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体的方法的有效性。

应指出可使用二种或更多种抗体作为检出的方法。因此，可联合使用几种具有不同特异性的抗体以检出和测定样品中的可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体，其中例如，没有一种抗体可单独与可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体两者形成复合物，而二种或多种抗体则可形成这样的复合物。当然，不应有任何一个抗体可与种类(a) - (h)交叉反应。

还应指出当使用抗体时可能有必要使用一种特异性的抗体。

为产生抗体，可用可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体作为抗原通过注射免疫各种宿主动物，包括但不限于兔，小鼠，大鼠等。可使用，例如，结合于Sepharose MH 1 抗体亲和柱上的MH 1 抗体选择性分离这样的多聚体。这种多聚体可按如下制备：可通过在含柠檬酸的血浆中加入低水平的凝血酶首先在体外制备可溶性纤维蛋白。在加入有效的凝血酶抑制如水蛭素抑制凝血酶活性后，可将血浆样品上样于Sepharose - MH 1 柱。可用本领域中公知的方法将MH 1 抗体与溴化氰活化的Sepharose 4 B (Pharmacia) 连接而制备这种MH 1 柱。见使用预先激活的Sepharose 4 B 制备抗体 - Sepharose 4 B 柱的方法的Pharmacia 产品说明书。首先在磷酸缓冲盐(PBS)存在下将可溶性纤维蛋白上样于Sepharose - MH 1 柱。在与该Sepharose - MH 1 柱结合后，在有(PBS)存在下，与MH 1 - Sepharose 结合的可溶性纤维蛋白可用硫氰酸钠溶液洗脱。在用PBS 透析后，已分离的可溶性纤维蛋白多聚体可保存于-70℃。

各种佐剂可用于与已分离的多聚体结合以增加免疫反应，根据宿主的种类包括但不限于弗氏佐剂(完全的和不完全的)，矿物凝胶如氢氧化铝，表面活性物质如溶血卵磷脂，普卢兰尼克多元醇，多阴离

子，肽，油乳剂，锁眼帽贝血蓝蛋白，二硝基酚，和潜在有用的人类佐剂例如BCG（卡-介二氏杆菌）和棒状杆菌属Parvum。

对可溶性交联的和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体具有特异性但不与种类（a）-（g）交叉反应的单克隆抗体可使用能提供以连续细胞系培养物生产单克隆抗体的任何技术制备。这些包括但不限于最初由Kohler 和Milstein（Nature, 1975, 256: 495-497）描述的杂交瘤技术，最近的人B细胞杂交瘤技术（Kosbor 等，1983, Immunology Today, 4: 72）和EBV-杂交瘤技术（Cole 等，1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96 页）。在本发明的另外一项实施方案中，可使用最近的技术在无菌动物中产生单克隆抗体，见5.2-5.4部分。生产这种抗体的一个实施例是在5.3-5.6部分描述的MH1的生产。

按照本发明，可使用人抗体，该人抗体可使用人杂交瘤（Cote 等，1983, Proc. Natl. acad. Sci. 80: 2026-2030）或通过用EBV病毒在体外转化人B细胞（Cole 等，1985, in, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy Alan R. Liss, 77-96 页）而取得。实际上，按照本发明，可使用将合适的抗原特异性小鼠抗体分子基因与具有合适的生物活性的人抗体分子基因拼接以生产“嵌合抗体”而发展的技术（Morrison et al., 1984, Pro. Natl. Acad. Sci., 81: 6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature, 312: 604-608; Takeda et al., 1985, Nature, 314: 452-454），该抗体也在本发明的范围内。

按照本发明，可采用所述的生产单链抗体的技术（美国专利第4946778号）以产生特异性单链抗体。

在本发明的另一实施方案中使用所述的构建Fab 表达文库的技术 (Huse 等, 1989, Science, 246: 1275-1281), 以便快速和简便地鉴定对可溶性交联的和可溶性非交联的DesAABB 多聚体具有所需特异性的单克隆Fab 片段。

含有可溶性交联的和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体特异性结合位点的抗体片段可用已知技术生产。例如, 该片段包括但不限于: 可通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的 $F(ab')_2$  片段和可通过还原该 $F(ab')_2$  片段的二硫键桥产生的Fab 片段。

本发明的抗体可用于本领域中公知的任何免疫测定系统包括, 但不限于: 放射免疫测定, 酶联免疫吸附测定, “夹心”测定, 沉淀素反应, 凝胶扩散免疫扩散测定, 凝集测定, 荧光免疫测定, 蛋白A 免疫测定和免疫电泳测定, 不可尽举。美国专利第4629783 号及其所引述的各专利也描述了适当的测定法。

该抗体可在用于测定血液或其它体液样品中可溶性交联的和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体的存在的一些不同的免疫测定法中用作基本试剂。一般地说, 该抗体可被用于任何类型的免疫测定法, 不论是定性的还是定量的。这包括非竞争型的双位点夹心测定法和单位点免疫测定法, 和常规的竞争性结合测定法。

为易化检测并为了定量的性质, 特别优选夹心或双柱体测定法, 这两种方法存在相当数量的变异型, 它们均包括在本发明的范围中。

例如, 在典型的前进夹心测定法中, 未标记的抗体固定于固相基质上, 例如, 微滴板孔, 并使待测的样品与结合的分子接触。经过一段适当时间的温育, 且该时间足以使抗体-抗原二元复合物形成, 然后加入用能产生可测信号的报告者分子标记的第二抗体, 继续温育足够的时间使其与抗原在一个不同的位点结合并形成抗体-抗原-标记

抗体的三元复合物。任何未反应的物质均被洗去，该抗原的存在通过信号的观察而确定，并可通过与含已知量抗原的对照样品（标准品）比较而定量。前进夹心测定法的变异型包括同时测定法（该方法中样品和抗体两者同时加到结合的抗体上），或反向夹心测定法，其中标记的抗体和待测样品先结合，温育并加到未标记的表面结合抗体上。这些技术是本领域的技术人员公知的，并且轻微变异的可能性是显而易见的。用于本文的“夹心测定法”意在包括基于基础的双位点技术的所有变异型。

作为一个更特定的实施例，在典型的前进夹心测定法中，将第一抗体共价地或被动地连接于固相支持物上。该固相表面通常为玻璃或多聚体，最常用的多聚体是纤维素，聚丙烯酰胺，尼龙，聚苯乙烯，聚氯乙烯和聚丙烯。该固相支持物可以是以管状，珠状，盘状或微板，或任何适合进行免疫测定的其它表面的形式。该结合程序在本领域是公知的。在结合之后，洗涤该固相抗体复合物，制备测定样品。然后将待测体液的等分试样加在固相复合物上并温育足够长的时间以使存在的任何可溶性非交联DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性关联的DesAABB 纤维蛋白多聚体与对上述蛋白质特异性的抗体的结合。然后向该固相复合物中加入第二抗体并温育另一段足够长的时间以使第二抗体与第一抗体-抗原固相复合物的结合。该第二抗体与一种报告者分子相连接，该报告者分子的可观测信号被用于指示第二抗体与样品中任何抗原的结合。在本发明书中使用的“报告者分子”一词是指一种分子，该分子通过其化学特性提供一种能测定抗原结合的抗体的可被分析检测的信号。测定必须至少是相对可定量的，使能够测定样品中抗体的量，可以绝对的方式计算，或者也可用与含已知正常水平的抗原的标准品（或标准品系列）进行比较来计算。

在这一类型的测定法中最常使用的报告者分子是酶或荧光剂。在酶免疫测定的情况下，通常通过戊二醛或过碘酸盐的方法将酶连接于第二抗体。然后，正如可被很容易地认识到的，存在着许多不同的连接技术，均为本领域的技术人员所公知的。通常使用的酶包括辣根过氧化物酶，葡萄糖氧化酶， $\beta$ -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶，及其它。通常选择被相应的酶水解后产生可观测颜色变化的底物与该特异性酶一起使用。例如，对一硝基苯酚磷酸盐适合与碱性磷酸酶接合物一起使用；对于过氧化物酶接合物，通常使用1, 2-苯二胺或甲苯胺。也可不使用上述的产色底物，而使用产生荧光产物的产荧光底物。在所有这些情况下，均将酶标记的抗体加至第一抗体复合物并使之与该复合物结合，然后洗去多余的试剂。然后向该抗体-抗原-标记抗体的三元复合物中加入含适当底物的溶液。该底物和与第二抗体连接的酶反应，产生定性的可见信号，该可见信号通常可通过分光光度术进一步定量，以对存在于血清样品中的抗原量作出评价。

作为选择，荧光化合物，例如荧光素或碱性蕊香红，可与抗体化学结合而不改变它们的结合力。当用特定波长的光照射激发时，该荧光色素标记的抗体吸收光能，在分子中产生一种激发状态，继以在一个特征性波长处发射出光线。这种发射光呈现特征性的颜色，用光学显微镜可以观测。如同在酶免疫测定(EIA)中，该荧光标记的抗体可与第一抗原复合物结合。洗脱未结合的试剂后，将保留的三元复合物暴露于适当波长的光线中，观测到的荧光表明抗原的存在。免疫荧光和EIA技术两者在本领域均已很好地建立并为本方法所特别优选。然而，其它报告者分子，例如放射性同位素，化学发光的或生物发光的分子也可被使用。熟练的技术人员很容易明白如何改变程序以适合所需的用途。

作为选择，该待测样品，不论是哺乳类血液还是含可溶性非交联的纤维蛋白DesAABB 多聚体和可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体的其它体液，均可被用于单位点免疫测定法，在该测定法中将该样本共价地或非共价地粘连于固相基质上。使未标记的抗体与结合于固相基质上的样品接触。经过一段适当时间的温育，（一段足以使抗体—抗原二元复合物形成的时间），将以能产生可测定信号的报告者分子标记的第二抗体加入并继续温育足够的时间使形成抗原—抗体—标记抗体的三元复合物。对于单位点免疫测定法，该第二抗体可以是能结合可溶性交联纤维蛋白多聚体和可溶性非交联纤维蛋白多聚体特异性抗体的一般抗体（即，抗免疫球蛋白，特别是与报告者分子相连的抗（IgM 和IgG）的动物接种产生的抗体）。

当使用病人的血浆进行检出和测定时，对可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体的体外检出和测定对于取得即将发生的或现存的血栓形成病情的指征特别有用，所述病情是因即将发生的或现存的血栓形成引起的。例如见，W. Nieuwenhuizen, 94 页，Bang 和Chang, 109—122 页和Marder 等，美国专利第5206140 号。这种病情包括，例如，深静脉血栓形成（“DVT”），由于大腿深静脉中血凝块形成而产生的症状；肺栓塞（PE）（当血栓（血凝块）从深静脉脱落并栓塞在肺血管系统时即产生该疾病）；播散性血管内凝血（由于凝血级联的全身性激活而产生的结果（例如在细菌感染中）），心肌梗塞（MI）（由于血栓使向心肌供血的冠状动脉阻塞而产生的结果）；中风；以及作为心房纤颤的结果而形成的心内血栓。使用检出和测定可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体的测定法结合

观察其它的病人症状可诊断血栓形成病情的类型。所使用的症状是那些即将发生的血栓形成病情的临床诊断中常用的。例如，所述的可溶性DesAABB 纤维蛋白多聚体的检出和测定作为对由即将发生的MI 引起的胸痛的病人与由其它疾病引起的胸痛的病人的鉴别诊断的一种方法特别有用。

### 6. 3. 材料和方法的实施例

#### 6. 3. 1. 蛋白

牛血清白蛋白和凝血酶两者购自ICN (Costa Mesa, CA)。水蛭素，辣根过氧化物酶和O - 苯二胺二氢氯化物基质片均购自Sigma Chemical Co (圣路易斯, MO)。人纤维蛋白原 (L 级) 购自Helena Laboratories (Beaumont, TX)。按照Holm 等, Thromb. Res, 37: 165-176 (1985) 中所述将纤维蛋白原用硫酸铵沉淀法进一步纯化。在测定系统中使用的抗 - 纤维蛋白单克隆抗体MH1 按照上面第5部分中所述生产。该抗纤维蛋白原单克隆抗体, 45J, 按照上面第5部分中所述生产。

通过在含溴化钠的50mM 醋酸钠缓冲液 (pH 5.3) 的溶液中溶解非交联的纤维蛋白多聚体制备DesAABB 纤维蛋白单体。

通过将纤维蛋白原或含柠檬酸盐的血浆与低浓度的凝血酶 (0.025 单位/ml) 温育 7 - 8 分钟制备交联的可溶性DesAABB 纤维蛋白多聚体。该反应混合物还包含因子XIIIa。通过在该反应混合物中加入终浓度为10ATU/ml 的水蛭素抑制该反应。

通过将含柠檬酸盐的血浆或纤维蛋白原与含EDTA (12mM 终浓度) 的凝血酶溶液在 37 °C 温育 7 - 8 分钟生产非交联的可溶性DesAABB 纤维蛋白多聚体。通过在该反应混合物中加入终浓度 10ATU/ml 的水蛭素抑制该反应。

### 6. 3. 2. MH 1 和 45 J 辣根过氧化物酶连接物

(根据 Wilson 和 Nakane, Immunofluorescence and Related Staining Techniques, Knapp, 等, (eds) 215-224 页, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 阿姆斯特丹 (1978) 改变.)

将辣根过氧化物酶 (HRP) ( $RZ > 3$ ) (10mg) 溶于 1 ml 蒸馏水中。加入新制备的 0.1M 过碘酸钠溶液 (0.4ml) 并轻柔地混合 20 分钟。然后使用 Centricon 10 微型浓缩器在 4 °C 将该溶液转移至醋酸钠缓冲液 (1% mM, pH 4.4)。

通过加入 40  $\mu$ l 0.2M 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液 (pH 9.5) 将该溶液的 pH 值升至 9.5。然后立即加入在 2.0ml 0.01M 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液 (pH 9.5) 中的 MH 1 抗体 (20mg)。将这一溶液在室温轻柔混合 2 小时, 随后加入 0.2ml 新制备的硼氢化钠溶液 (4 mg/ml)。该混合物可在 4 °C 保持 2 小时。

最后将该抗体 HRP 连接物在 2 - 8 °C 用 5  $\times$  4 升 PBS 透析。

将该共轭物在 2 - 8 °C 贮存于棕色容器中。

### 6. 3. 3. 血样品

在得到健康志愿者和有 MI 的临床症状, 如严重的胸痛的急诊室病人同意后取得血样品。使用 Vacutainers (Becton Dickinson) 将血样品收集入柠檬酸钠。通过在 2400 RPM 离心 15 分钟分离血浆。该血浆被立即使用或于 -70 °C 冰冻贮存。

### 6. 3. 4. 测定可溶性纤维蛋白的 ELISA 程序

使用夹心类型酶联免疫测定系统测定新鲜和冰冻样品中的可溶性纤维蛋白。本发明中的俘获抗体是抗纤维蛋白 MH 1 抗体。检测 (或标记) 抗体是同样抗体的 HRP 连接物。作为选择, 抗纤维蛋白原抗体

45 J 的HRP 共轭物，可被用作标记抗体。

通过在包被缓冲液（硼酸钠，pH 8.5）中的100  $\mu$ l 单克隆抗体溶液（50  $\mu$ g/mL）在4  $^{\circ}$ C保温12 - 16小时使96孔聚氯乙烯（PVC）微滴板（Costar Cambridge, MA）被单克隆抗体MH1包被。通过用PBS-Tween 溶液洗涤各孔三次将未结合的抗体从板上除去。通过用200  $\mu$ l PBS 中的BSA（1%）溶液（PBS-BSA）在37 $^{\circ}$ C保温1小时将MH1包被的孔用BSA 后包被。通过将板倒置并在纸巾上轻敲除去未结合的BSA。将含可溶性纤维蛋白的含柠檬酸盐的样品（50  $\mu$ l）在MH1-BSA 封闭的孔上在37 $^{\circ}$ C保温30分钟。通过将微滴板倒置和轻敲去除未结合的物质。然后用PBS-Tween 洗涤各孔三次。通过首先将100  $\mu$ l MH1-HRP 共轭物（或抗纤维蛋白（原）抗体，45 J 的HRP 共轭物）的PBS-BSA 溶液在各孔中37 $^{\circ}$ C保温30分钟来检测结合的可溶性纤维蛋白。通过将板倒置和用PBS-Tween 洗涤各孔3次去除未结合的共轭物。通过在室温加入100  $\mu$ l O-苯二胺二氢氯化物溶液10分钟检出该结合的共轭物。通过将（配方）表中的O-苯二胺二氢氯化物溶解于含H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的柠檬酸钠溶液中制备底物溶液。

10分钟后通过加入25  $\mu$ l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液（1M）终止比色反应。每孔中溶液的光吸收率在Thermomax 微滴板阅读器（Molecular Devices, Menlo Park, CA）中490nm 处测定。

### 6.3.5 用于亲和层析的柱的制备

按照下述制备Sephacrose MH1 柱：

称出1g 冰冻干燥的溴化氰活化的Sephacrose 4B（Pharmacia）并悬浮于1 mM HCl 中。将该膨胀的凝胶在烧结玻璃滤器上的1 mM HCl 中洗涤15分钟。

将MH1 抗体（20mg）溶于连接缓冲液（0.1M NaHCO<sub>3</sub>，pH 8.3

含0.5M NaCl)并在带塞容器中与膨胀的凝胶轻柔混合,在室温中2小时或在4℃过夜。

混合后,将凝胶用连接缓冲液洗涤以除去过剩的抗体。通过用0.1M Tris HCl, pH 8.0(或1M氨基乙醇, pH 9.0)在室温处理2小时未封闭的活性位点封闭。然后将该结合抗体的凝胶用0.1M醋酸盐缓冲液(pH 4.0, 含0.5M NaCl)洗涤3次接着用Tris 缓冲液(0.1M, pH 8.0, 含NaCl 0.5M)洗涤3次。将该已连接的抗体在迭氯化钠溶液(0.05%)中在4℃贮存。

Sepharose DesAABB 纤维蛋白单体柱按照下述制备:使用上文所述的制备Sepharose MH 1的程序,在0.1M硼酸盐缓冲液(pH 8.2)中的1M NaBr存在下,将DesAABB 纤维蛋白单体连接于溴化氰活化的Sepharose 4B。

#### 6.3.6 以使用MH 1检出可溶性纤维蛋白的可溶性纤维蛋白的可溶性纤维蛋白多聚体的体外测定法识别的可溶性纤维蛋白的本质鉴定

上面第5.5节中已证实,MH 1抗体不识别纤维蛋白原,即纤维蛋白多聚体的血浆前体。上面第5.5节中还显示,该抗体识别交联的和非交联的纤维蛋白多聚体两者。另外,如上面第5.5节所示,纤维蛋白的纤维蛋白溶酶降解(或导致纤维蛋白多聚结构破坏的任何处理)导致纤维蛋白不能被这些抗体免疫识别。因而,MH 1抗体不识别交联的纤维蛋白的任何已知的纤维蛋白溶酶降解产物。

MH 1抗体只识别DesAABB 纤维蛋白多聚结构而不识别单体的DesAABB 纤维蛋白实体的证据是通过亲和层析法得到。简言之,将0.5mg MH 1抗体通过一个5ml的Sepharose DesAABB 纤维蛋白单体柱。将该柱用平衡缓冲液(0.1M Tris 缓冲的盐水(TBS), pH 8.5)

洗涤。未观察到该抗体对该柱的显著结合。如图 1 A 所示，该抗体在柱的流过物中被洗脱。当该柱被 6 M 盐酸胍洗脱时，小量的结合的蛋白质被回收。通过在 280nm 处监测所有的馏分而检出蛋白质。通过使用纤维蛋白包被的微滴板的固相 ELISA 方法检测该蛋白质的免疫活性来测定抗体。见上文 5. 4. 2 节关于所使用的 ELISA 的详细描述。与柱结合的蛋白质是少量的与 DesAABB 纤维蛋白单体柱结合的污染的可溶性 DesAABB 纤维蛋白多聚体存在的结果。这种污染物存在于用于制备该 DesAABB 纤维蛋白单体柱的起始物质中。为证实该 Sepharose DesAABB 纤维蛋白单体柱能与抗体结合，在对照实验中将一种纤维蛋白原特异性单克隆抗体（Mab）通过该柱。如图 1 B 中所示，该柱与对照 Mab（即抗纤维蛋白原抗体 45 J）结合，并且需用盐酸胍（6 M）处理以洗脱 45 J 抗体。

上述 MH 1 抗体识别交联的和非交联的可溶性 DesAABB 纤维蛋白多聚体的证据在一个实验中得到，在该实验中通过在存在或缺乏 EDTA（EDTA 防止因子 XIIIa 交联 DesAABB 纤维蛋白多聚体）时向含柠檬酸盐的血浆样品中加入凝血酶而产生可溶性 DesAABB 纤维蛋白多聚体。按照 6. 3. 1 节中所述制备交联的和非交联的可溶性 DesAABB 纤维蛋白多聚体，并用 6. 3. 4. 节中所述的 ELISA 法测定它们各自的免疫反应性。如图 2 中所示，在该测定系统中交联的（B）和非交联的（C）纤维蛋白多聚体的免疫反应性无显著差异。

MH 1 抗体不识别可溶性 DesAA 纤维蛋白多聚体的证据在一个实验中得到，在该实验中通过用能从纤维蛋白原分子选择性地裂解纤维蛋白肽 A（FPA）的大具窃腹蛇蛇毒的类凝血酶处理纤维蛋白原或血浆而制备 DesAA 纤维蛋白多聚体。与裂解 FPA 和 FPB 两者的凝血酶相反，类凝血酶不裂解纤维蛋白肽 B（FPB）。FPA 的去除导致 DesAA 纤

维蛋白单体单位的聚合和DesAA 纤维蛋白凝块的形成。图 3 显示当类凝血酶溶液在室温下与纤维蛋白原样品温育 15 分钟时，在340nm 处测定该反应混合物的吸收率所显示的凝块形成。当可溶性DesAA 纤维蛋白多聚体长度和浓度增加时该吸收率随时间而逐渐增加，直至最后形成凝块。在测试MH 1 对DesAA 纤维蛋白的识别试验的实验中，通过将纤维蛋白原样品与类凝血酶（终浓度0.5 单位/mL）在37℃温育而体外产生可溶性desAA 纤维蛋白多聚体。7 分钟后从该类凝血酶处理的样品中取一等分试样并在 6.3.4 节中的ELISA 测定法中测定。如图 4 中所示，这个样品，即样品 C 不显示反应性。从本实验还可推断该测定体系不识别作为可溶性纤维蛋白的另一来源的纤维蛋白原—desAA 纤维蛋白复合物。很明显本实验中产生的反应混合物可包括这种“可溶性纤维蛋白”实体，因为类凝血酶产生与其它desAA 单体或不消化的纤维蛋白原分子自由互相作用的desAA 纤维蛋白单体。由于在加入类凝血酶后在该测定系统中未显示有反应，所以可得出结论：该测定法不能检出这些纤维蛋白原—desAA 纤维蛋白实体。作为阳性对照的样品B，由通过用凝血酶和水蛭素处理血浆样品形成的desAABB 纤维蛋白多聚体组成。未处理的纤维蛋白原，即样本 A，作为阴性对照而加入。

可溶性纤维蛋白复合物还可由于因子XIIIa 使天然纤维蛋白原分子交联形成纤维蛋白原二聚体而产生（Kanaide 等，J. Lab. Clin. Med. 86: 574-579 (1975)）。因子XIIIa (FXIIIa) 处理的纤维蛋白原不被本测定系统检出。在本实验中，将纤维蛋白原包被的微滴板先用凝血酶激活的因子XIIIa 在37℃处理 1 1/2 小时。在抑制残余的凝血酶活性后，将该MH 1 抗体在FXIIIa 处理的孔中温育并用抗小鼠碱性磷酸酶共轭物检出结合的MH 1。通过加入碱性磷酸酶底物检出结

合的抗-小鼠抗体。通过在490nm 处阅读光密度测定结合在孔上的MH 1 的水平。图 5, Fg+FXIIla 标记的样品显示无MH 1 结合于孔上, 说明该抗体不识别交联的纤维蛋白原结构。作为阳性对照, 将纤维蛋白原包被的孔用凝血酶处理以产生DesAABB 纤维蛋白多聚体并用MH 1 抗体测定其免疫反应性, 见表 5, 标记Fg+Thrombin 的样品。

#### 6. 3. 7. 体外测定可溶性DesAABB 纤维蛋白多聚体形成

通过在含柠檬酸盐的血浆样品中加入低水平的凝血酶(0.025NIH 单位/mL)体外产生可溶性DesAABB 纤维蛋白多聚体。该样品在37℃保温。以1分钟的间隔从样品中取出等分试样并通过加入强有力的凝血酶抑制剂水蛭素(终浓度2-ATU/ml)抑制凝血酶的活性。通过在6.3.4. 节中描述的ELISA 程序测定每一等分试样中可溶性DesAABB 纤维多聚体的总量。

如图 6 中所示, 在加入凝血酶于血浆中后, 经过4-5分钟的最初滞后期, 以在490nm 处的吸收率所表示的可溶性纤维蛋白多聚体的量急剧上升。在将凝血酶加入血浆后约7.5 分钟时该可溶性纤维蛋白多聚体水平达到高峰。在9-10分钟后观测到的可溶性纤维蛋白水平的急剧下降与不可溶的纤维蛋白多聚体的凝结和形成(血凝块形成)恰好相符。

#### 6. 3. 8 通过Sephacrose-MH 1 亲和层析法从血浆纯化可溶性纤维蛋白多聚体

将血浆样品与凝血酶(0.025 单位/ml)在37℃保温7分钟。通过加入过量的水蛭素抑制凝血酶活性。将该反应混合物通过Sephacrose-MH 1 柱。起始物质, 通过物(非结合物质), 结合的蛋白质(纯化的蛋白质)(该蛋白质用NaSCN(3)洗脱并用PBS 透析), 均使用6.3.4. 节中的ELISA 测定法测定与MH 1 的免疫反应性。凝

血酶处理的血浆在用水蛭素抑制后（起始物质），从柱上移出和透析后的结合的蛋白质（洗脱物），以及非结合的物质（非结合物）的免疫反应性显示于图 7。该起始物质及经透析的结合的蛋白质与MH 1 有免疫反应性而非结合的物质无。

#### 6. 3. 9 为MI 的诊断在体外检出和测定可溶性交联的和可溶性非交联的纤维蛋白多聚体

使用在上面6. 3. 4 节中所述的ELISA 测定法，用MH 1 作为俘获抗体，测定 36 份不同血浆样品中的可溶性交联的和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体水平。血浆样品被收集后放入抗凝剂并冷冻。解冻的样品被用来检测可溶性交联的和非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体。36 份样品中的十份取自作对照的健康人。健康对照组从健康状况极佳且即使是在运动后也不出现胸痛的实验室人员中征募。所有其它样品均取自当地社区医院急诊室中的病人。所有急诊室病人均被认为是心肌梗塞（MI）的临床症状（胸痛）；15 名被证实患有MI，而其它11 名则均被证实无MI 发生。后一组病人被诊断为多种临床疾病包括心绞痛，焦虑症，肺水肿。血样在病人被收入急诊室后被立即从病人身上抽取。在大多数情况下病人症状的持续时间情况被记录下来。在本研究中所有病人在住院前均经历 1 - 3 小时胸痛。如图 8 所示，所有被证实为心肌梗塞病人的病例中可溶性DesAABB 纤维蛋白多聚体的水平显著高于健康对照者（3 - 30 倍差异）。在有胸痛但无MI 的那些病人中，可溶性DesAABB 纤维蛋白多聚体的水平与健康对照组的水平无显著差异。（可溶性交联的和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体的水平以“可溶性纤维蛋白Elisa 单位水平（ $\times 1000$ ）”表示）。

因此本测定系统的灵敏性为100%（ $n = 36$ ）并且特异性也为

100% (  $n = 36$  ), 即无假阳性和假阴性。因此可以断定本测定系统对于心肌梗塞具有高水平的诊断准确性。

#### 6. 4. 体外测定可溶性交联的纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的纤维蛋白多聚体的试剂盒

应理解本发明不局限于在测定中使用单克隆抗体。而且, 这些抗体用于下述的试剂盒中, 这些试剂盒包括一套标准品, 一种能在表面上固定的第一抗体 (即俘获抗体, 例如MH1) 和一种如上所述用信号产生物标记的第二抗体。这些试剂盒包含以已知总量的可溶性交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体形式存在的标准品。如上面所述可使用MH1 Sepharose 亲合柱通过分离可溶性交联的和可溶性非交联的DesAABB 纤维蛋白多聚体制备这些标准品。该试剂盒还可包括特异的缓冲液, 分离试剂和对照。该试剂盒可包含收集装置或处理被测定样品的化学药品。

上面所引述的所有出版物和专利在本文中引用以供参考。

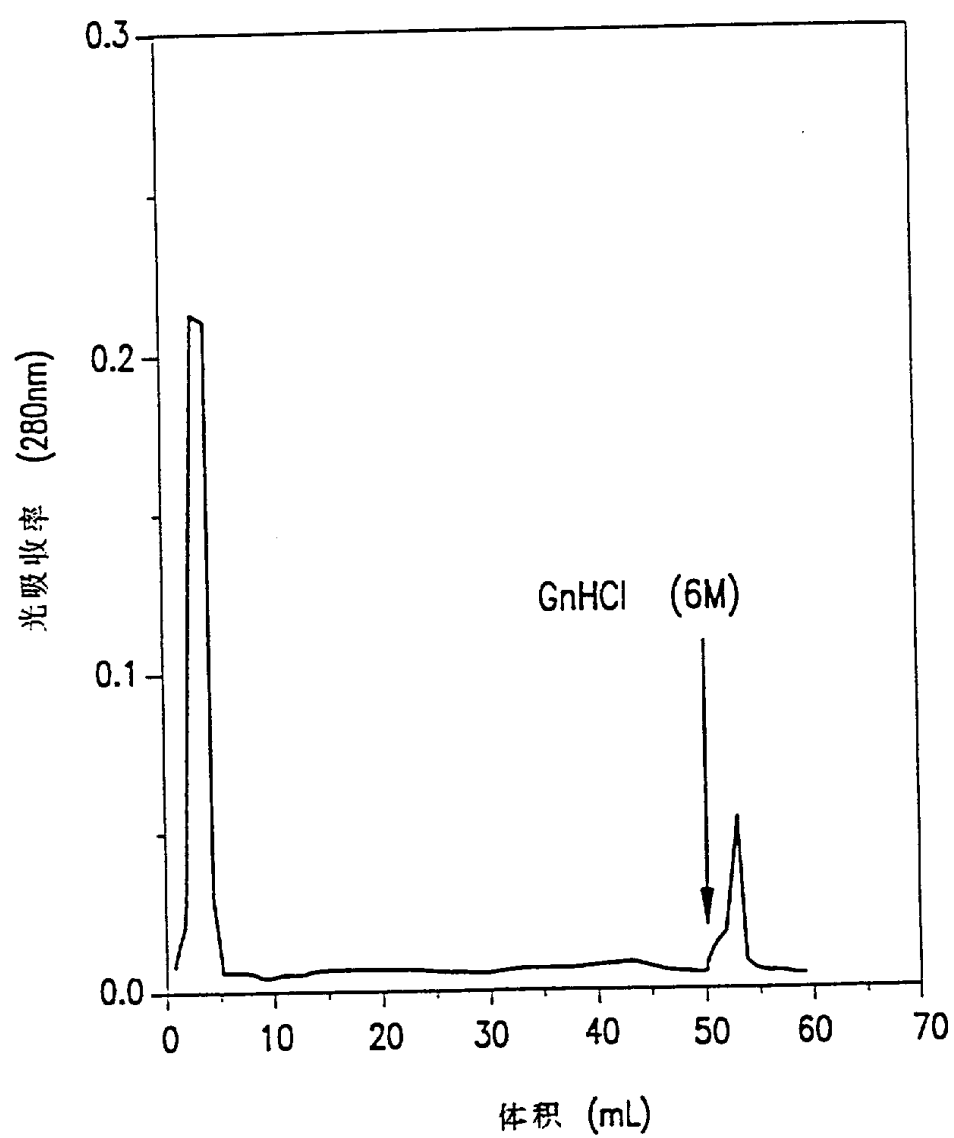


图 1A

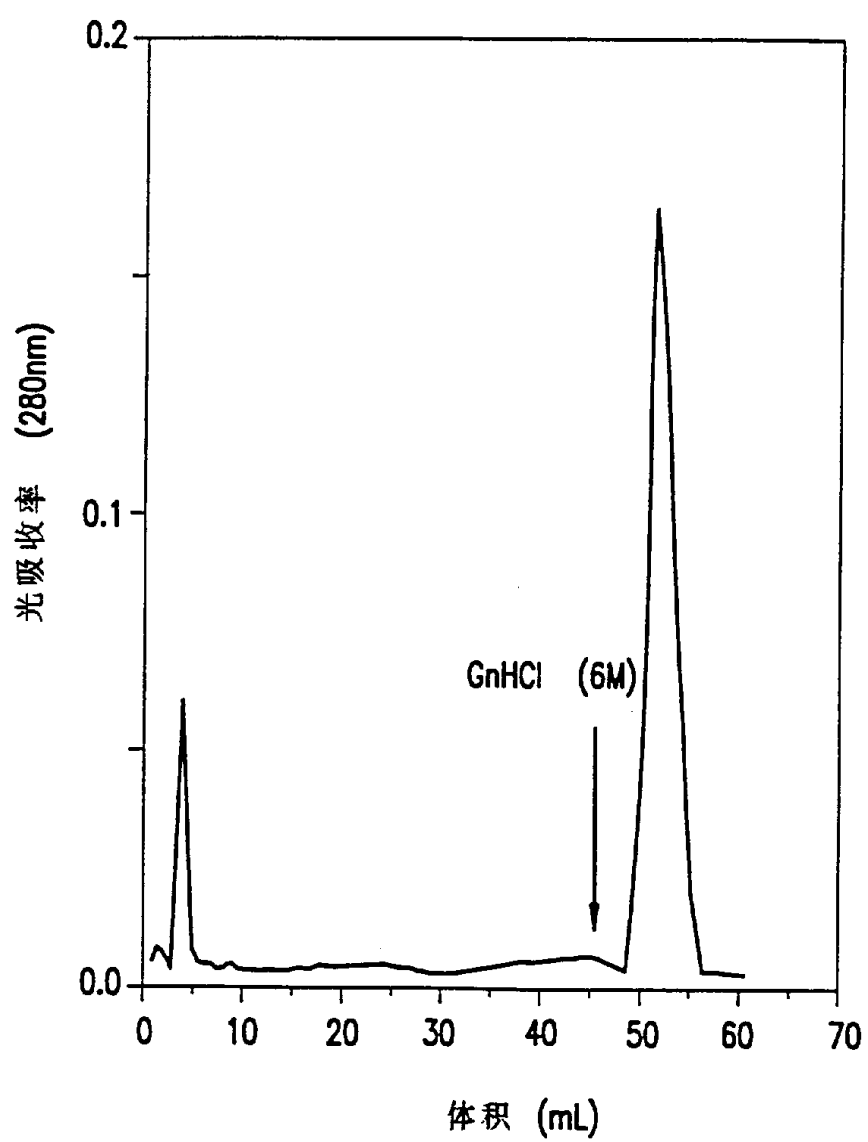


图 1B

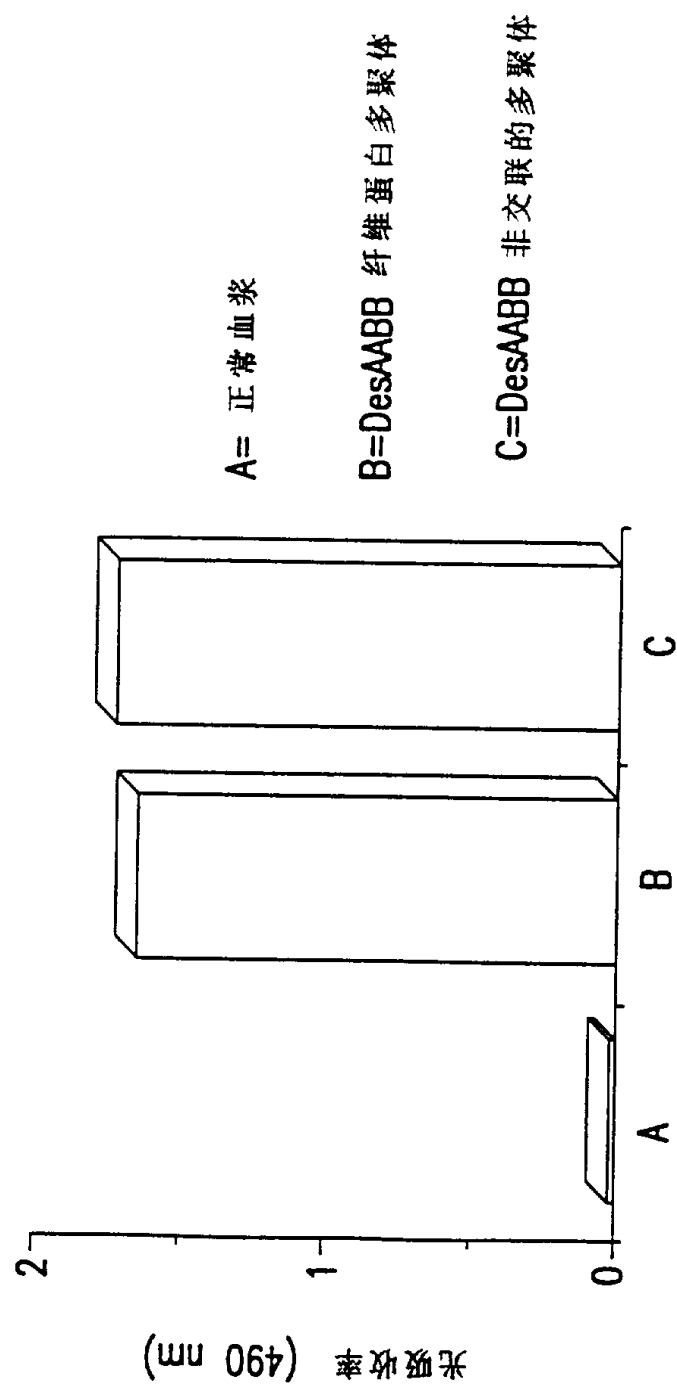


图 2

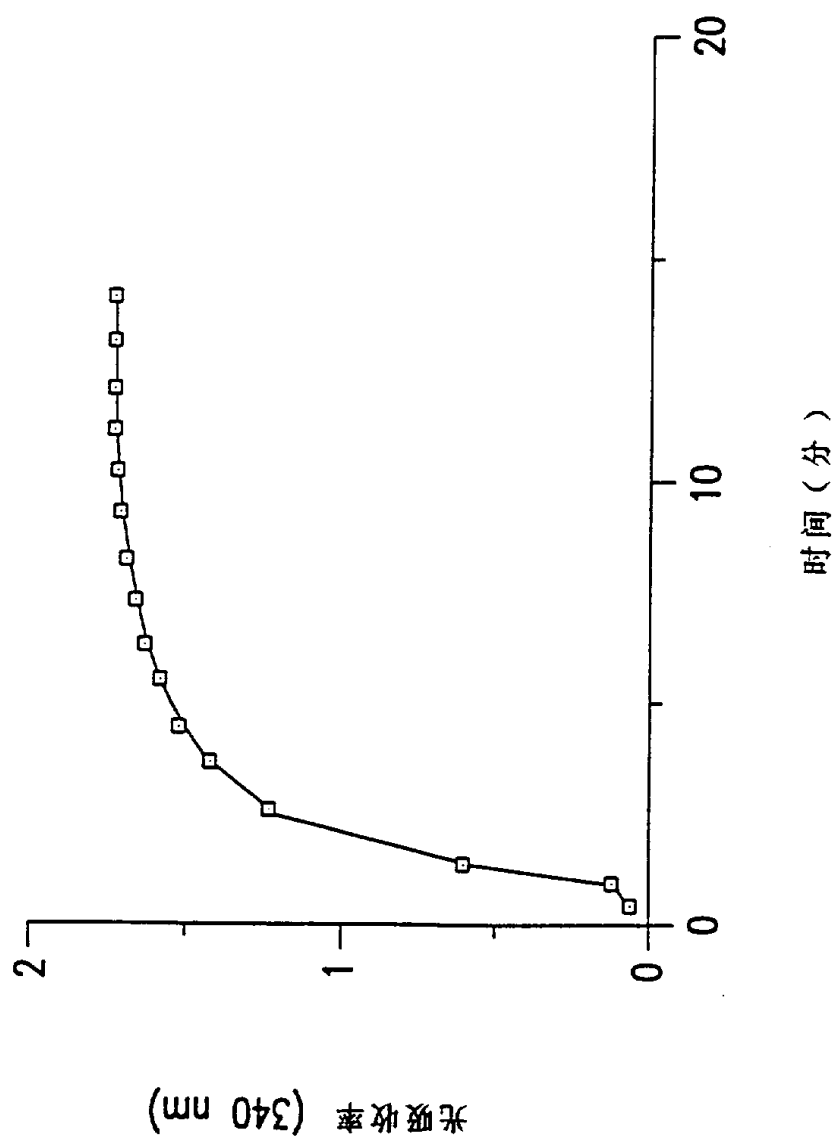


图 3

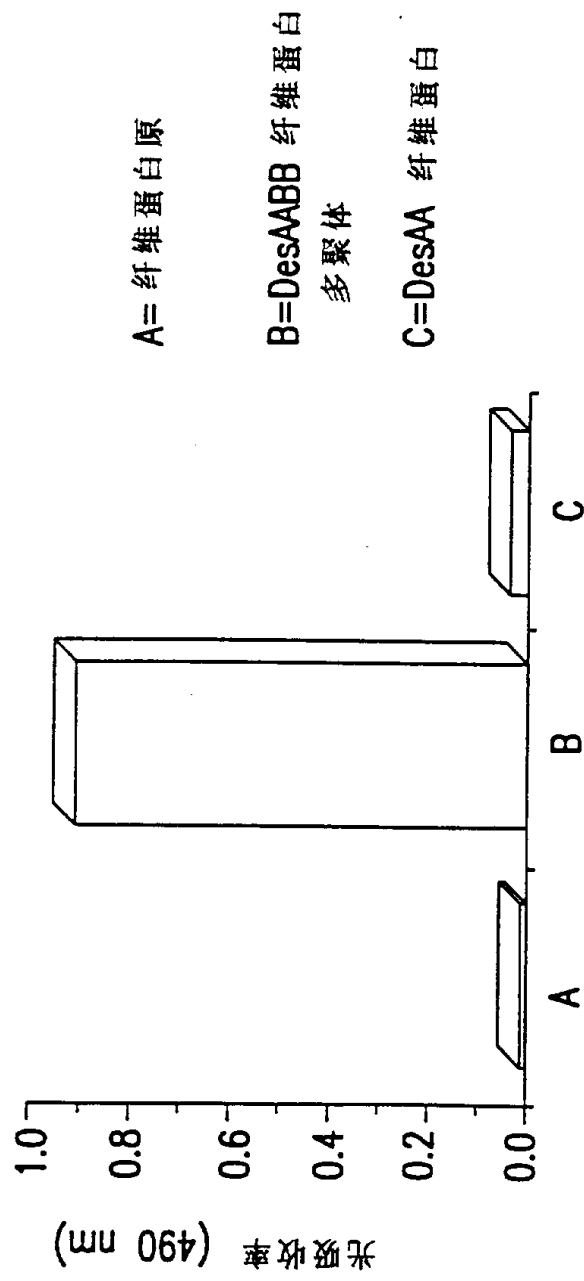


图 4

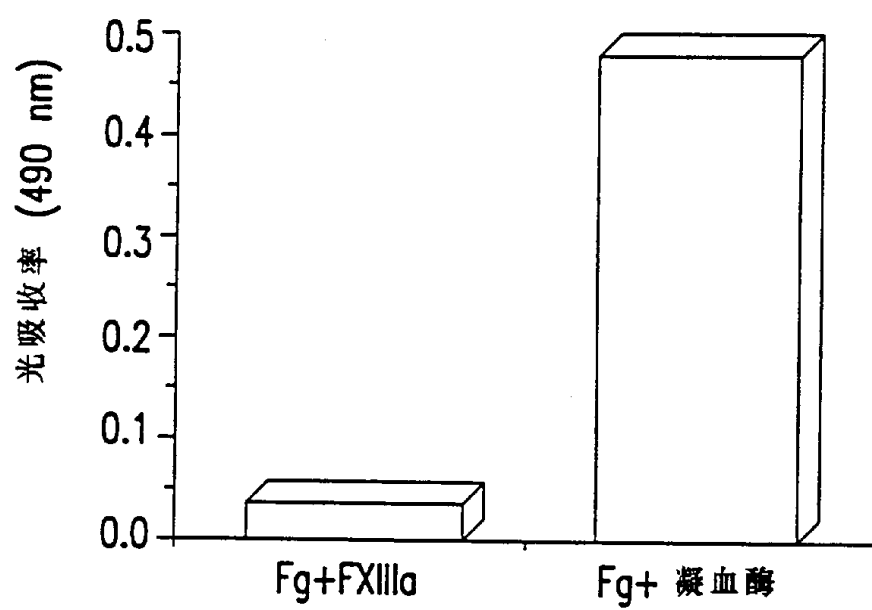


图 5

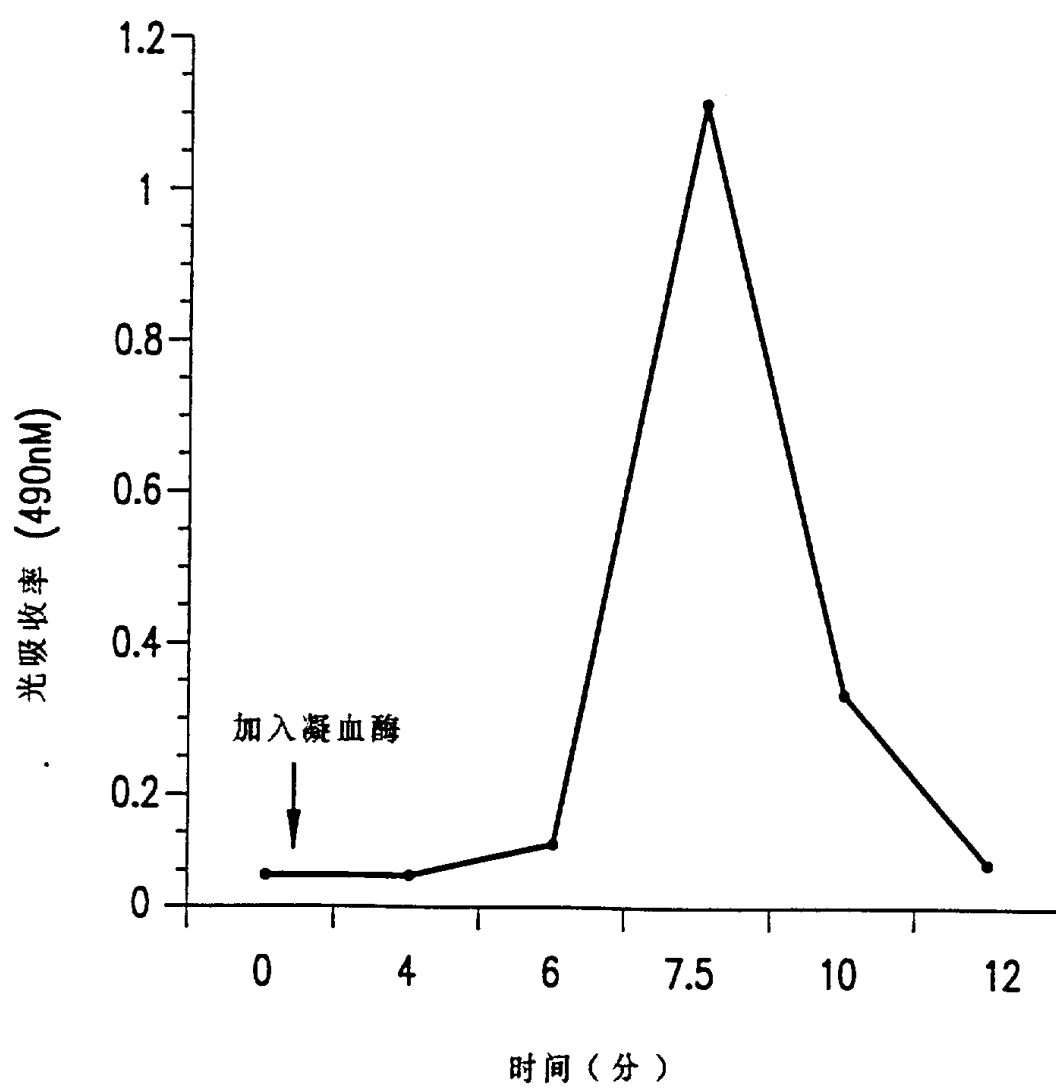


图 6

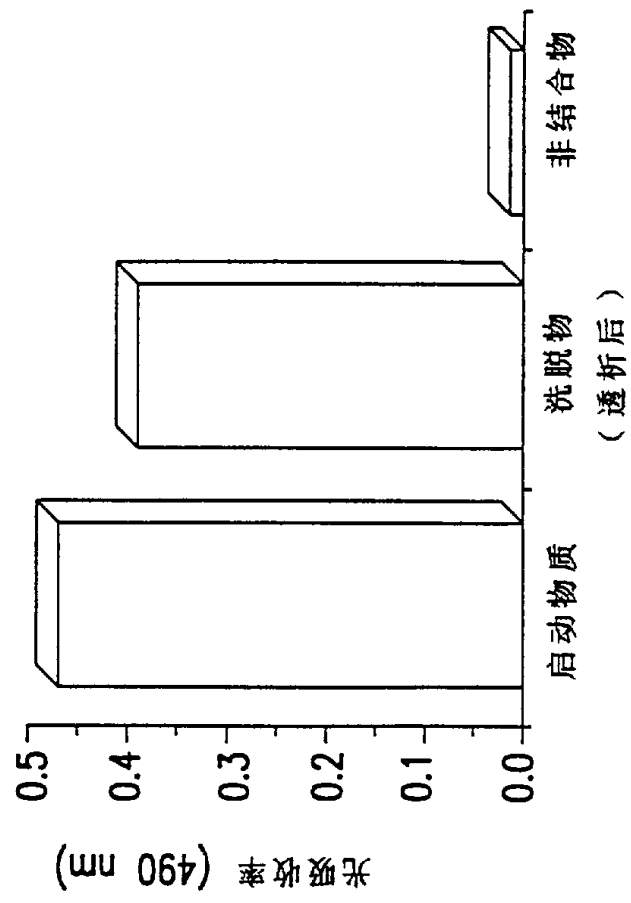


图7

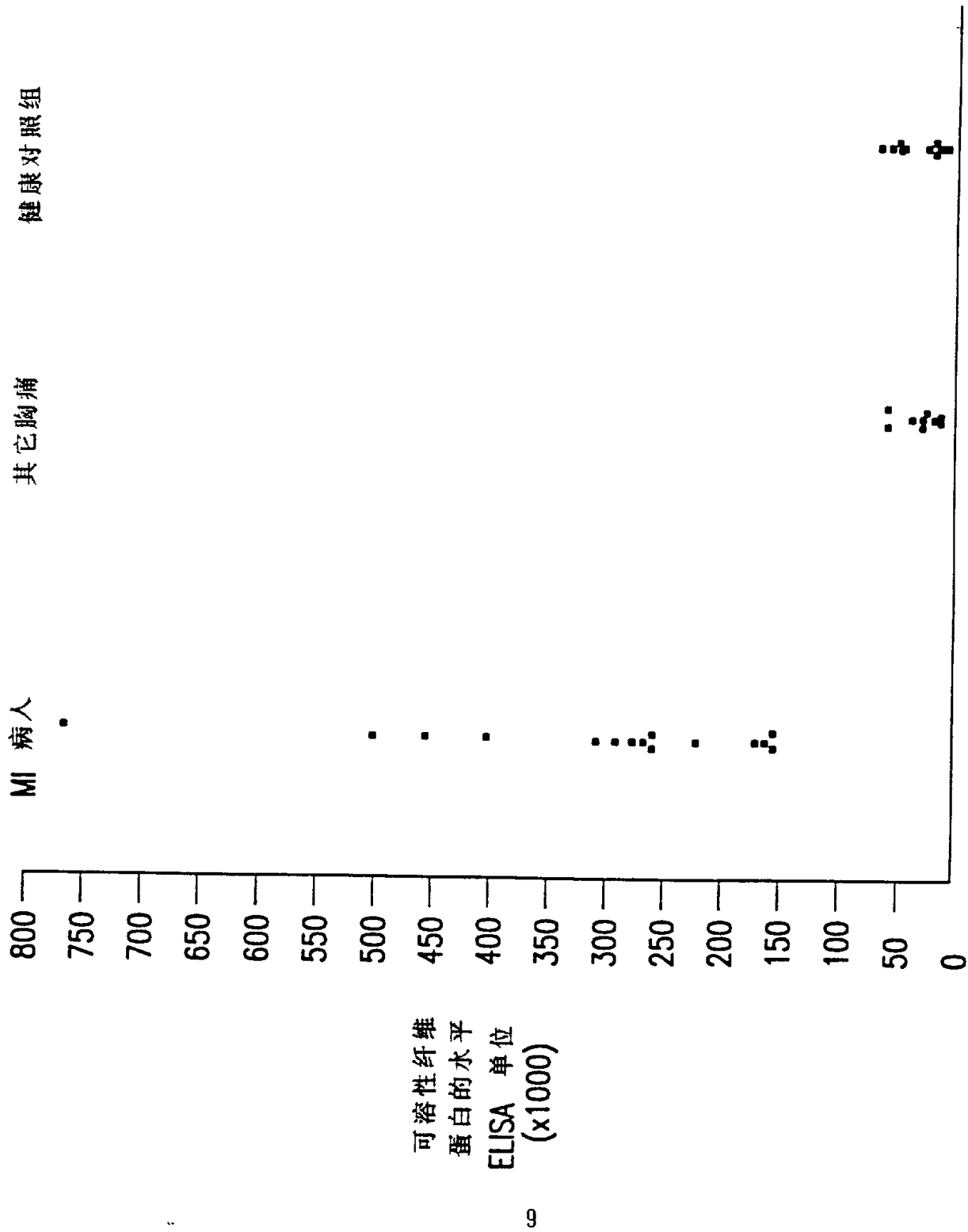


图 8