

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680052005.2

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 12 月 31 日

[11] 公开号 CN 101336376A

[22] 申请日 2006.11.29

[21] 申请号 200680052005.2

[30] 优先权

[32] 2005.11.30 [33] US [31] 11/290,036

[86] 国际申请 PCT/US2006/045684 2006.11.29

[87] 国际公布 WO2007/064702 英 2007.6.7

[85] 进入国家阶段日期 2008.7.29

[71] 申请人 SRU 生物系统公司

地址 美国麻萨诸塞州

[72] 发明人 L·马迪森 J·格尔斯滕迈尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 程 淼 付 磊

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 22 页

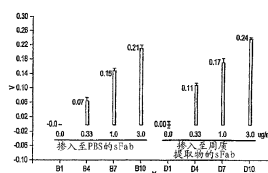
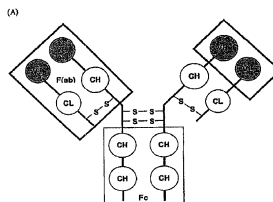
[54] 发明名称

对生物传感器表面上的抗原的实时结合分析

[57] 摘要

本发明提供了用生物传感器检测噬菌体和抗原或者抗原和抗体之间的相互作用的方法。

(A) 完整的 IgG 和抗体结构域, (B) F(ab) 和 (C) scFv, 其中 V 表示可变区, C 表示恒定区, H 表示重链, L 表示轻链, 以及 S-S 表示二硫键。在 (C) 的情况下, VI 和 VII 之间的线是 IgG 中并非天然存在的重组接头。



1. 检测结合伴侣与噬菌体的结合的方法，所述方法包括：
 - (a) 在生物传感器上固定粗制噬菌体制剂、未经浓缩的噬菌体制剂、非均匀噬菌体制剂、浓缩噬菌体制剂或其组合；
 - (b) 使所述生物传感器与所述结合伴侣相接触；
 - (c) 检测所述结合伴侣与固定在所述生物传感器上的噬菌体的结合。
2. 如权利要求1所述的方法，其中所述结合伴侣是小分子、碳水化合物、聚合物、肽、可溶性蛋白、细胞受体、细胞受体的抗原模拟物、细胞、哺乳动物细胞或哺乳动物细胞表面蛋白。
3. 如权利要求1所述的方法，其中所述噬菌体制剂和抗原不包括可检测标记。
4. 如权利要求1所述的方法，其中噬菌体制剂是噬菌体展示库。
5. 如权利要求1所述的方法，其中所述噬菌体制剂是被动固定在所述生物传感器上的。
6. 如权利要求1所述的方法，其中通过噬菌体外壳蛋白特异性抗体或噬菌体外壳蛋白特异性抗体片段将所述噬菌体制剂固定在所述生物传感器上。
7. 如权利要求6所述的方法，其中所述抗体或抗体片段通过与结合在所述生物传感器上的蛋白相结合而固定在所述生物传感器上。
8. 如权利要求6所述的方法，其中所述抗体或抗体片段包括标签。
9. 如权利要求8所述的方法，其中所述抗体或抗体片段通过所述标签的特异性抗体固定在所述生物传感器上。
10. 如权利要求1所述的方法，其中所述生物传感器是比色共振反射生物传感器或基于倏逝波的生物传感器。
11. 如权利要求1所述的方法，其中所述噬菌体制剂被固定在所述生物传感器表面上的一处或多处，固定在孔中，或者孔中的一处或多处。
12. 确定抗体群中抗体的表位分类的方法，所述方法包括：
 - (a) 将展示噬菌体、抗体或抗体片段固定在生物传感器上；
 - (b) 在适于结合伴侣与所述展示噬菌体、抗体或抗体片段相结合的

条件下使所述生物传感器与所述结合伴侣相接触，所述结合伴侣特异性地与固定在所述生物传感器之上的所述展示噬菌体、抗体或抗体片段相结合；

(c) 使所述抗体群与所述生物传感器相接触；

其中，所述抗体群与所述结合伴侣相结合产生的可检测信号指示出在所述抗体群中而非所述被固定的展示噬菌体、抗体或抗体片段中存在不同表位分类。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述抗体群包括噬菌体克隆。

14. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述抗体群包括抗体片段、完整抗体、展示完整抗体的噬菌体、展示抗体片段的噬菌体。

15. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述抗体群包括来自杂交瘤的抗体。

16. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述抗体群包括来自噬菌体展示筛选的抗体。

17. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述展示噬菌体是粗制噬菌体制剂、未经浓缩的噬菌体制剂、浓缩噬菌体制剂或非均匀噬菌体制剂。

18. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述结合伴侣是小分子、碳水化合物、聚合物、肽、可溶性蛋白、细胞受体、细胞受体的抗原模拟物、哺乳动物细胞或哺乳动物细胞表面蛋白。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其中所述哺乳动物细胞表面蛋白是膜相关蛋白、单跨膜蛋白、多跨膜蛋白或蛋白通道。

20. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述生物传感器是比色共振反射生物传感器或基于倏逝波的生物传感器。

21. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述抗体群、结合伴侣和固定的展示噬菌体、固定抗体或固定抗体片段不含可检测标记。

对生物传感器表面上的抗原的实时结合分析

优先权

本申请要求于 2005 年 11 月 30 日递交的美国系列号 No. 11/290,036 的优先权, No. 11/290,036 要求于 2004 年 1 月 16 日递交的美国系列号 No. 10/399,940 的优先权, No. 10/399,940 为于 2001 年 10 月 23 日递交的 PCT/US01/45455 的继续申请, PCT/US01/45455 为于 2001 年 8 月 15 日递交的 U.S. 09/930,352(现在的专利号为 No. 7,094,595)的部分继续申请, U.S. 09/930,352 要求于 2001 年 7 月 3 日递交的美国系列号 No. 60/303,028、于 2001 年 4 月 12 号递交的美国系列号 No. 60/283,314 和于 2000 年 10 月 30 日递交的美国系列号 No. 60/244,312 的优先权。本申请还要求于 2003 年 1 月 16 日递交的 PCT/US03/01298 的优先权, PCT/US03/01298 为于 2002 年 1 月 28 日递交的美国系列号 No. 10/059,060 的继续申请, No. 10/059,060 为于 2001 年 8 月 15 日递交的美国系列号 No. 09/930,352(现在的专利号为 No. 7,094,595)的部分继续申请。本申请还要求于 2003 年 1 月 16 日递交的 PCT/US03/01298 的优先权, PCT/US03/01298 为于 2002 年 1 月 28 日递交的美国系列号 No. 10/058,626 的继续部分申请, No. 10/058,626 为于 2001 年 8 月 15 日递交的美国系列号 No. 09/930,352(现在的专利号为 No. 7,094,595)的部分继续申请。

技术领域

本发明涉及包括检测与抗体、抗体片段或噬菌体特异性结合的抗原的生物传感器和方法的领域。

背景技术

检测噬菌体与哺乳动物细胞之间结合的能力是发现治疗性和诊断性抗体的主要部分。鉴别潜在的治疗性和诊断性抗体的典型路线包括: (1) 可溶性蛋白或细胞相关蛋白(以可溶性形式或在细胞上表达的形式)的噬菌体展示和噬菌体淘选试验; (2) 对可溶性蛋白进行的噬菌体 ELISA (对于细胞目标—所述细胞相关蛋白的肽或蛋白模拟物); (3) 所

述噬菌体基因组中的展示基因通过分子生物学技术亚克隆到表达可溶性抗体片段的质粒中；(4) 所述抗体片段随后进行表达和纯化；(5) 一旦经纯化，测试抗体片段在 ELISA、FACS、Guava 或 FMAT 中的细胞功能性结合；(6) 分析所述主要抗体片段(Lead antibody fragment)的结合动力学；和(7) 然后将所述最主要的抗体 (top antibody lead) 克隆到完整的抗体表达载体中进行大规模生产，动力学分析和体内有效性模型。

用于噬菌体和与细胞相关的蛋白目标的功能性结合分析的典型试验包括完整的哺乳动物细胞或细菌细胞的酶联免疫吸附试验(ELISA)、流式细胞术 (荧光激活细胞分类仪, FACS)、Guava 微型流式细胞术产品(Guava Technologies, Hayward, CA)以及荧光微量分析技术 (FMAT)。ELISA 具有较高的噬菌体背景结合，这是因为细胞很复杂且噬菌体具有非特异性结合的趋势。在 ELISA 中的背景结合由于结合信号的倍增而加强。细胞 ELISA 同样因为在步骤间需要许多清洗步骤而较难，如果所述细胞为非粘附性的而在每次清洗间需要离心旋转，则所述清洗步骤将是非常繁琐的。通常粘附性细胞必须固定，从而在手动清洗或者洗板机清洗时，保持所述细胞吸附在所述 ELISA 板上。所述固定可改变细胞上所述蛋白的天然表位。在 FAC 和 Guava 中的噬菌体结合同样困难，这是因为每个噬菌体克隆需要经过纯化得到信号所需的足够噬菌体。

目前，大多数研究者花费大量时间和精力克隆噬菌体上的片段和/或完整 IgG 展示，以研究与细胞的功能性结合。花费在鉴别潜在治疗性抗体上的时间越多，则有效的治疗性抗体进入医学临床所需时间越长。因此，在所述噬菌体展示领域需要鉴别抗体与哺乳动物细胞功能性结合的快速路径。

发明内容

本发明的一个实施方案提供了检测结合伴侣与噬菌体结合的方法。所述方法包括在生物传感器上固定粗噬菌体制剂(preparation)、未经浓缩的噬菌体制剂、非均匀噬菌体制剂或其组合，并使所述生物传感器与所述结合伴侣相接触。检测所述结合伴侣与固定在所述生物传感器上的噬菌体的结合。所述结合伴侣可以是小分子、碳水化合物、

聚合物、肽、可溶性蛋白、细胞受体、细胞受体的抗原模拟物、细胞、哺乳动物细胞或哺乳动物细胞表面蛋白。所述噬菌体制剂和抗原并非必须包括可检测标记。所述噬菌体制剂可以是噬菌体展示库。所述噬菌体制剂可被动固定在所述生物传感器上或者通过对噬菌体外壳蛋白具有特异性的抗体固定在所述生物传感器上。通过与结合在所述生物传感器上的蛋白质相结合可以将所述抗体或抗体片段固定在所述生物传感器上。如果所述抗体或抗体片段带有标签，则可通过对所述标签具有特异性的抗体将所述抗体或抗体片段固定在所述生物传感器上。所述生物传感器可以是比色共振反射生物传感器或基于倏逝波的生物传感器 (evanescent wave-based biosensor)。

本发明另一实施方案提供了确定抗体群中抗体的表位分类(epitope classes)的方法。所述方法包括将展示噬菌体、抗体或抗体片段固定到生物传感器，并在适于结合伴侣(binding partner)与所述展示噬菌体、抗体或抗体片段相结合的条件下使所述生物传感器与所述结合伴侣相接触，所述结合伴侣特异性地与固定在所述生物传感器之上的所述展示噬菌体、抗体或抗体片段相结合。使所述抗体群与所述生物传感器相接触。所述抗体群与所述结合伴侣相结合产生的可检测信号指示出在所述抗体群中而不是所述被固定的展示噬菌体、抗体或抗体片段中存在不同表位分类。所述抗体群、结合伴侣和被固定的展示噬菌体、被固定的抗体或被固定的抗体片段并不必然包括可检测标记。所述抗体群包括噬菌体克隆、抗体片段、完整抗体、展示完整抗体的噬菌体(phage displaying a full antibody)、展示抗体片段的噬菌体、来自杂交瘤的抗体和来自噬菌体展示筛选的抗体。所述展示噬菌体可以是经纯化的噬菌体制剂、粗制噬菌体制剂、未经浓缩的噬菌体制剂或者非均匀噬菌体制剂。所述结合伴侣可以是小分子、碳水化合物、肽、可溶性蛋白、细胞受体、细胞受体的抗原模拟物、哺乳动物细胞或哺乳动物细胞表面蛋白。所述哺乳动物细胞表面蛋白可以是膜相关蛋白(membrane-associated protein)、单跨膜蛋白(single transmembrane protein)、多跨膜蛋白(multi-transmembrane protein)或蛋白通道。所述生物传感器可以是比色共振反射生物传感器(colorimetric resonant reflectance biosensor)或基于倏逝波的生物传感器。

因此，本发明提供了诸如溶解低浓度结合伴侣、对蛋白亲和力排

序、分析含有复杂混合物的样品以及进行解离速率排序分析等的方法。

附图说明

图 1A ~ C 描述了抗体和抗体片段、F(ab)和 scFv。图 1A 显示了完整的 IgG 抗体和所述 IgG 的结构域。图 1B 显示了 F(ab)。图 1C 显示了 scFv。

图 2 显示了 GA3 BIND® 生物传感器上的细菌病毒的滴定。

图 3A ~ B 显示了从 TIO BIND® 生物传感器上的周质提取物俘获 F(ab)。图 3A 显示了 sF(ab)特异性俘获表面的形成和 sF(ab)的俘获。图 3B 显示了在图 3A 中记录的 sFab 的俘获的示意图。

图 4A ~ D 显示了从 TIO BIND® 生物传感器上的周质提取物俘获 scFv。图 5A 显示了 scFv 特异性俘获表面的形成和含有 6 × His 和 c-myc 标签的 scFv 的俘获。图 4B 显示了掺入(spiked)PBS 和周质提取物的经纯化的 scFv 的俘获。图 4C 显示了在图 4B 中记录的 scFv 的俘获的示意图。图 4D 显示了在图 4B 中记录的 scFv 的俘获的示意图。

图 5A ~ C 显示了从 SA1 BIND® 生物传感器上的周质提取物俘获 scFv。图 5A 显示了表达 6 × his 标签的蛋白的特异性俘获表面的形成。图 5B 显示了掺入 PBS 和周质培养物的 scFv 的俘获。图 5C 显示了掺入 PBS 和周质提取物的经纯化的 scFv 的 scFv 俘获的示意图。

图 6A ~ C 显示了从 GA1 BIND® 生物传感器上的周质提取物俘获 scFv。图 6A 显示了用于含有 c-myc 标签的蛋白的特异性俘获表面的形成。图 6B 显示了掺入 PBS 和周质提取物的经纯化的 scFv 的俘获。图 6C 显示了从 PBS 和周质提取物中俘获 scFv 的示意图。

图 7A ~ E 显示了采用抗-Fc TIO BIND® 生物传感器从杂交瘤上清液中俘获 IgG。图 7A 显示了特异性小鼠 IgG 俘获表面的形成。图 7B 显示了特异性小鼠 IgG 俘获表面的形成。图 7C 显示了从杂交瘤培养基俘获 IgG。图 7D 显示了抗原、亲代细胞系和表达抗原的细胞系结合俘获在生物传感器表面上的 IgG 的图示。图 7E 显示了抗原、亲代细胞系和表达抗原的细胞系结合俘获在生物传感器表面上的 IgG 的列表图示，并将该结合归一化为在生物传感器表面上俘获的 IgG 的量。

图 8A ~ E 显示了采用抗-Fc TIO BIND® 生物传感器从血清中俘获 IgG。图 8A 显示了特异性小鼠 IgG 结合表面的形成。图 8B 显示了从

血清中俘获 IgG。图 8C 显示从血清中俘获 IgG。图 8D 显示了在图 8B 中记录的 sFab 的俘获的示意图。图 8E 显示了在图 8C 中记录的 sFab 的俘获的示意图。

图 9A~C 显示了采用 GA1 BIND® 生物传感器在血清中的药物—抗药物试验。图 9A 显示了用于 IgG、抗药物的俘获的表面的形成。图 9B 显示了在 20 $\mu\text{g/ml}$ 药物表面从 PBS、11%和 30%血清中俘获所述抗药物。图 9C 显示了在 0 $\mu\text{g/ml}$ 药物表面从 PBS、11%和 30%血清中俘获所述抗药物。

图 10A~C 显示了采用抗-Fc TIO BIND® 生物传感器从血清中俘获 IgG。图 10A 显示了用于抗药物俘获的药物表面的形成。图 10B 显示了在 50 $\mu\text{g/ml}$ 药物表面从 PBS、11%和 30%血清中俘获所述抗药物。图 10C 显示了在 0 $\mu\text{g/ml}$ 药物表面从 PBS、11%和 30%血清中俘获所述抗药物。

图 11A~D 显示了在抗-FC TIO BIND® 生物传感器上抗体分级 (binning) 的终点分析和夹心式抗体对的鉴别。图 11A 显示小鼠 IgG 特异性表面的形成。图 11B 显示层 1(抗体)的俘获。图 11C 显示层 2(通过抗体对抗体)的俘获。图 11D 显示层 3(抗体对抗体-抗原复合物)的俘获。

具体实施方式

生物传感器

在一个实施方案中，本发明的方法包括生物传感器的用途，所述生物传感器尤其可用于检测无机或有机材料诸如蛋白、DNA、小分子、病毒、细胞和细菌，而无需可检测标记如荧光或放射性标记。大量适宜的生物传感器可以使用在本发明的方法中，包括但不限于光子晶体生物传感器 (例如，比色共振反射生物传感器、银纳米颗粒阵列生物传感器)、干涉测量生物传感器 (例如，RIFS，双偏振干涉仪、哈特曼干涉仪)、MEMS 生物传感器 (例如，悬臂、共振膜)、声学生物传感器 (例如，石英谐振器)、微波生物传感器 (例如，介电波谱)、表面等离子体共振 (SPR) 生物传感器 (例如，kreitchman SPR 生物传感器、成像 SPR 生物传感器、光栅耦合成像 SPR 生物传感器)、波导生物传感器 (例如，入射光栅耦合器生物传感器、啁啾波导光栅生物传感器)，基于倏逝波的生物传感器和任何加入有光波导的生物传感器，正如在美国专

利 4,815,843、美国专利 5,071,248 和美国专利 5,738,825 所描述, 将其以引用的方式整体引入。

本发明的方法尤其可应用于药物研究(例如, 初筛、高通量筛选、复筛、质量控制、细胞毒性、临床试验评价)、生命科学研究(例如, 蛋白质组学、蛋白相互作用分析、DNA-蛋白相互作用分析、酶-底物相互作用分析、细胞-蛋白相互作用分析)、诊断测试(例如蛋白存在、细胞鉴别)和环境检测(病毒和孢子的检测和鉴别)领域。

之前的专利申请和公开文本描述了比色共振反射生物传感器表面联合高分辨率成像装置是如何采用仅有纳升的样品材料, 用作在单个表面上平行进行多个生物化学测试的平台, 参见例如美国专利公开文本 No. 2002/0168295、2002/0127565、2004/0132172、2004/0151626、2003/0027328、2003/0027327、2003/017581、2003/0068657、2003/0059855、2003/0113766、2003/0092075、2003/0026891、2003/0026891、2003/0032039、2003/0017580、2003/0077660、2004/0132214。

比色共振反射生物传感器包括亚波长结构表面。亚波长结构表面是一类能模拟薄膜涂层效果的衍射光器件。参见例如 Peng & Morris, "Resonant scattering from two-dimensional gratings," *J. Opt. Soc. Am. A*, Vol. 13, No. 5, p. 993, May 1996; Magnusson, & Wang, "New principle for optical filters," *Appl. Phys. Lett.*, 61, No. 9, p. 1022, August, 1992; Peng & Morris, "Experimental demonstration of resonant anomalies in diffraction from two-dimensional gratings," *Optics Letters*, Vol. 21, No. 8, p. 549, April, 1996。本发明的光子晶体生物传感器的光栅具有相比入射光的波长而言较短的光栅周期, 因此除所述反射和透射零级之外没有其他衍射级次被允许。光子晶体生物传感器包括光栅, 它由具有高介电常数的介电材料构成或者涂覆, 夹在基底层与填充所述光栅槽的覆盖层之间。任选地, 不使用覆盖层。所述光栅结构选择性地耦合具有窄带波长的光。该高度选择性的耦合条件可对反射辐射谱产生共振光栅效应, 从而产生窄带的反射或透射波长。所述光栅的深度或周期小于所述共振光线效应的波长。

比色共振反射生物传感器结构的反射或透射颜色可以通过加入分子而改变。所加入的分子增加了通过所述生物传感器结构的入射辐射

的光路长度，并因此改变了发生最大反射或透射时的波长。

当用白光照射时，比色共振反射生物传感器仅仅反射单波长或窄带波长。当分子粘附在所述生物传感器表面时，由于耦合入所述光栅的光的光路发生变化，所反射的波长(颜色)发生偏移。通过固定分子，诸如与生物传感器表面的特异性结合物质，无需使用任何种类的可检测标记诸如荧光探针或颗粒标记即可检测互补结合伴侣分子。可以用浸在液体的或者干燥的生物传感器表面进行所述检测技术。

当用平行白光和反射光照射比色共振反射生物传感器时，仅有窄带的波长或者单带的波长被反射。所述窄带波长被描述为波长“峰”。当分子沉积在所述生物传感器表面或者从此移除时，“波长峰值”(PWV)发生变化。读出仪器指出平行白光在所述生物传感器表面上的不同位置，并收集平行反射光。所收集的光集中进入波长分光计以进行PWV检测。

基于倏逝波的生物传感器可包括由基材支撑的波导膜；在所述波导膜(和任选地作为所述基材的一部分)之间是衍射光栅。参见例如美国专利 No. 4,815,843。低 k 介电材料，诸如低 k 纳米孔材料可用于衍射光栅或联合的低 k 纳米孔材料和基材。波导包括波导膜和基材。所述波导膜可以是例如氧化锡、五氧化钽、硫化锌、二氧化钛、氮化硅或其组合，或者聚合物诸如聚苯乙烯 (polystyrene) 或聚碳酸酯。衍射光栅位于波导膜和基材的交界处或者在波导膜内。衍射光栅包括低 k 材料诸如低 k 纳米孔材料。波导膜的折射率高于相邻介质(即基材和测试样品)的折射率。基材可以是例如塑料、玻璃或环氧树脂。特异性结合物质可以固定在波导膜的表面上并将测试样品添加到所述表面上。通过全内反射激光在所述波导膜内传播。分子与之结合所导致的所述波导膜的折射率变化可以通过观察发射的向外耦合的光的角度变化而检测。

本发明的生物传感器包括内表面例如装有液体的容器的底表面。装有液体的容器可以是例如微量滴定板孔、试管、培养皿或微流通道。本发明的一个实施方案是装入任何类型的微量滴定板的生物传感器。例如，生物传感器可以通过将所述反应容器的壁组装覆盖所述共振反应表面从而装在微量滴定板的底表面，由此每个反应“点”可暴露于不同的测试样品。因此，每个单独的微滴定板孔可用作独立的反应容

器。因此，独立的化学反应可在相邻的孔之间进行而不发生反应液体的相互混合，并且化学上不同的测试溶液可加到不同孔中。

药物高通量筛选实验室、分子生物学研究实验室和诊断测试实验室的最常见的测试形式是微量滴定板。所述板是标准尺寸的塑料盒，含有网格排列的 96、384 或者 1536 个孔。由于这些板的标准机械构造，可设计液体分配、自动板处理和检测系统与该通用形式共同运作。本发明的生物传感器可装入标准微量滴定板的底表面。由于所述生物传感器表面可大面积制造，并且由于所述读出系统并不与所述生物传感器表面发生物理接触，因此可以限定任何数量的独立生物传感器面积，其仅仅受到所述照射光学器件的聚焦分辨率和能横扫所述生物传感器表面而对所述照射/检测探针进行扫描的 x-y 范围的限制。

噬菌体制剂

噬菌体是细菌病毒并且是种特异性的。对于该具体讨论，对两种大肠杆菌噬菌体 M13 和 λ 进行了讨论。在其他细菌噬菌体和/或哺乳动物病毒的情况下应用相同的前提。噬菌体群，尤其是非均匀的，粗制的和/或未经浓缩的噬菌体群，诸如噬菌体展示库可用在本发明的方法中。非均匀的噬菌体制剂包括含有一种或多种类型的噬菌体的制剂，例如噬菌体展示库，其中每种噬菌体展示出不同结合分子。粗制噬菌体制剂是在由噬菌体感染的细菌所生长的培养基中含有一种或多种类型的噬菌体的制剂。在 M13 的情况下，所述噬菌体经膜融合且所述细胞没有溶解。在 λ 的情况下，所述细胞被溶解，则所述培养基将含有细胞组分。在此情况下，所述粗制噬菌体制剂将通过离心过滤细菌细胞和膜组分。粗制噬菌体制剂在培养基组分和分泌的细胞代谢副产物的存在下，含有低浓度的一种或多种类型的噬菌体。

未经浓缩的噬菌体制剂是其中所述噬菌体并未沉淀的噬菌体制剂。当噬菌体被沉淀时，移除培养基并将所述噬菌体重新悬浮在确定的缓冲液诸如 PBS 中。在 M13 噬菌体的纯化过程中，噬菌体通常用 PEG 溶液沉淀一次或两次并保存在 PBS 甘油中。在所述过程中，所述噬菌体再次悬浮于较培养基初始体积更小体积的缓冲液中。通常 1~2 升的培养基将再次悬浮于最终体积为约 2~5 ml 的 PBS 中，提供经纯化并浓缩的噬菌体储备物。

噬菌体的固定

噬菌体制剂被固定在生物传感器上。噬菌体制剂可被动地固定于生物传感器表面。噬菌体表面可以被封闭, 并就与所述被固定的噬菌体相结合对抗原(例如小分子、碳水化合物、聚合物、肽、可溶性蛋白、细胞受体的抗原模拟物或哺乳动物细胞)进行筛选。抗原特异性地与噬菌体的结合可通过由该结合事件产生的信号变化而进行测量, 通常通过光学、电子或视觉手段。与噬菌体结合的抗原可通过所述噬菌体的浓度、抗原的解离速率和噬菌体功能性地结合细胞的能力进行评定。

采用特异性抗体固定可以将噬菌体制剂固定在生物传感器表面。结合噬菌体外壳蛋白的抗体能固定于生物传感器表面。抗体或者通过特异性表面诸如蛋白 A 或者蛋白 A 加上抗-Fc 表面被动地固定在生物传感器表面。所述表面可由封闭剂进行封闭。噬菌体与表面的特异性地结合可通过由该结合事件产生的信号变化而进行测量, 通常通过光学、电子或视觉手段。在噬菌体(病毒)上的展示物可以是肽、小蛋白和/或抗体片段或者不存在。随后同源配体的结合可通过由该结合事件产生的信号变化而进行测量, 通常通过光学、电子或视觉手段。配体可以是例如小分子、碳水化合物、聚合物、肽、可溶性蛋白、细胞受体的抗原模拟物或细胞表面上的蛋白。在细胞表面上表达的蛋白可以是例如膜相关蛋白、单跨膜或多跨膜蛋白或蛋白通道。

通过与生物传感器表面相结合的抗原可以将噬菌体制剂固定在生物传感器表面。以被动的或者特异性表面诸如不干扰被筛选的所希望的结合表位的抗原, 从而将抗原(诸如小分子、碳水化合物、聚合物、肽、可溶性蛋白或细胞受体的抗原模拟物)固定在生物传感器表面。抗原表面可以被封闭。噬菌体制剂特异性地与抗原结合可以通过由该结合事件产生的信号变化而进行测量, 通常通过光学、电子或视觉手段。在噬菌体上的展示物可以是例如肽、小蛋白和/或抗体片段。与抗原相结合的噬菌体可以通过抗原的浓度和噬菌体的解离速率进行评定。

抗体片段(和蛋白)通过融合在其 N-端或 C-端区域的生物素或蛋白质标签(多组氨酸、c-myc 或 FLAG、MBP、GST 等)被特异性捕获于生物传感器的表面。依据针对所述标签的抗体可以在生物传感器表面形成特异性表面。作为另外一种选择, 抗体片段可以通过恒定区(CH1)

被特异性地俘获。利用抗- λ 、抗- κ 、抗- λ 和抗- κ 的混合物和/或抗 F(ab')₂ 抗体,依据针对该区域的抗体可在生物传感器上形成特异性表面。该表面可以被封闭。抗体片段特异性地与抗体结合可以通过由该结合事件产生的信号变化而进行测量,通常通过光学、电子或视觉手段。抗体片段的固定可来自于纯的或粗制的(全细胞提取物、周质提取物,或用过的培养基)样品。随后同源配体的结合可通过由该结合事件产生的信号变化而进行测量,通常通过光学、电子或视觉手段。所述配体可以是例如小分子、碳水化合物、聚合物、肽、可溶性蛋白、细胞受体的抗原模拟物或细胞表面上的蛋白。在细胞表面上表达的蛋白可以是例如膜相关蛋白、单跨膜或多跨膜蛋白或蛋白通道。

虽然对于特异性结合物质或结合伴侣而言无需包含可检测标记,但可检测标记可用于检测生物传感器表面上的特异性结合物质或结合伴侣。当本发明的特异性结合物质和结合伴侣不具有检测标记时,它们仍然可以包含其它类型的标记和标志,用于测试灵敏度的增强,特异性结合伴侣与生物传感器表面的固定,特异性结合物质与其结合伴侣的结合或杂交的增强,或者其他目的。

分子可以被固定在生物传感器表面上,因此它们将不会被冲洗步骤冲洗掉,并因此与测试样品中的分子的结合将不会受到生物传感器表面的阻碍。已实现分子与例如用于多类微阵列和生物传感器的玻璃的共价结合的几种不同类型的表面化学方法。这些相同的方法可容易地适用于本发明的生物传感器。

通过物理吸附(即没有使用化学接头)或者通过化学结合(即使用化学接头)可以将一种或多种类型的分子结合在生物传感器表面上。化学结合可形成分子在生物传感器表面上的更强结合,并提供所述表面结合分子的确取向和构象。

其他类型的化学结合包括例如胺活化、醛活化和镍活化。这些表面可用于将几种不同类型的化学接头结合在生物传感器表面上。胺表面可用于结合几种类型的接头分子,而醛表面可用于直接结合蛋白而无需其他的接头。镍表面可用于结合已嵌入组氨酸("his")标签的分子。采用镍活化表面检测"his-标签的"分子在本领域广为人知(Whitesides, *Anal. Chem.* 68, 490, (1996))。

特异性结合物质在塑料、环氧树脂或高折射率材料上的固定可基

本按照所描述的在玻璃上的固定而进行。然而，在酸洗步骤将破坏特异性结合物质所固定的材料时，可省略酸洗步骤。

抗原

例如通过物理吸附或通过化学结合可以将一种或多种特异性结合物质固定在生物传感器表面。特异性结合物质可以是例如有机分子诸如核酸、多肽、抗原、多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体 (scFv)、F(ab)片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、小有机分子、细胞、病毒、噬菌体、细菌、聚合物、肽溶液、单链或双链 DNA 溶液、RNA 溶液、含有来自于组合化学库的化合物的溶液，或生物样品；或无机分子。生物样品可以是例如血液、血浆、血清、胃肠分泌物、组织或肿瘤匀浆、滑液、粪便、唾液、痰、囊液、羊水、脑脊液、腹腔液、肺灌洗液、精液、淋巴液、泪液或前列腺液。优选地，抗体、抗体片段、抗原或噬菌体被固定在生物传感器上。该特异性结合物质可以如此处所描述直接固定，或者通过特异性表面间接固定。例如，含有蛋白质标签(例如组氨酸、c-myc 或 FLAG、MBP、GST 等)的抗体或蛋白可通过与所述标签结合的抗体固定在生物传感器上。结合伴侣是与特异性结合物质特异性地结合的物质。结合伴侣可以是如以上对于特异性结合物质所描述的任何类型的样品或分子。

方法

本发明的方法可用于例如：通过从小鼠和噬菌体展示技术筛选杂交瘤、人类抗体，筛选 mRNA T7 噬菌体展示库开发治疗性和诊断性抗体；和用于滴定细菌病毒以及哺乳动物病毒的不含有哺乳动物的和细菌的细胞的系统。在此文档中将讨论结合分子，尤其是抗体片段和/或完整抗体，例如图 1。

病毒和噬菌体的应用

本发明的方法可用于滴定病毒。通常，病毒的滴定要求分别用于哺乳动物病毒和细菌病毒的活体哺乳动物细胞和细菌细胞。死亡或缓慢生长的细胞的循环被计数。采用本发明的方法，与哺乳动物病毒或细菌病毒结合的抗体粘附在生物传感器上，并通过抗体和外壳蛋白的

相互作用检测完整蛋白的稀释度。此外，采用 GA3 高密度戊二醛生物传感器通过噬菌体的直接固定可滴定 M13 噬菌体，参见图 2。用 PBS 使 GA3 生物传感器水化 30 分钟，然后从每毫升 $1.0 \times 10^{14} \sim 1.3 \times 10^{11}$ 个嗜菌斑 1:2 系列稀释来制备在 20%甘油中的纯化 M13，并将其加入在 20%甘油和 PBS 中的传感器上。噬菌体溶液与传感器温育 2 小时。未结合的噬菌体被冲洗掉，记录通过噬菌体外壳蛋白上的游离胺固定的噬菌体的量的终点读数。

本发明的方法也可用于以哺乳细胞病毒为中心的生物学研究（受体结合、进入细胞、中和抗体的筛选等）。例如，病毒被固定在生物传感器上，并就抗体或蛋白增加或减少病毒与哺乳动物细胞融合的能力对其进行筛选。

本发明的方法也可用于检测毒素、病毒和其他生物恐怖剂。例如，可以用噬菌体展示库针对目标诸如已知的毒素、病毒或其他生物恐怖剂或由其衍生的抗原进行淘选。这些库可以展示肽、抗体片段、蛋白骨架或蛋白结构域。在所述淘选过程中，就结合目标的能力而富集噬菌体。在噬菌体的筛选阶段，鉴别出先导候选物。在此点，本发明的方法可用于通过将噬菌体固定在生物传感器上从而检测毒素、病毒或其他生物恐怖剂。这将替代合成肽或进行在噬菌体上展示的蛋白或抗体片段的分子克隆的繁琐工作。

本发明的方法可用于筛选大量阳性结合的潜在结合展示噬菌体（在噬菌体淘选或选择试验之后）。由于形成特异性结合表面的能力，噬菌体可从确定的或不确定的溶液诸如细菌提取物和用过的培养基中特别地取出，并被固定在生物传感器上。

当采用噬菌体展示技术鉴别治疗性或诊断性抗体时，本发明的方法也可用于在筛选的噬菌体水平早期对抗体亲合性进行评定。例如，展示抗体片段的噬菌体可以直接或者通过与外壳蛋白结合的抗体固定在生物传感器上。每孔中所固定的噬菌体的量的信号被记录。展示在噬菌体上的抗体的抗原被加入，并记录信号。抗原的信号/孔除以噬菌体的信号/孔可以确定评定等级。通过该计算，抗原信号被归一化为每个测试（孔）中的噬菌体单位。无需使用分子生物学技术来克隆抗体片段的基因，即可就其单价亲和性对噬菌体上的抗体片段进行评定。该技术能对抗体片段进行评定而无需克隆基因、表达抗体片段、纯化抗体

片段，然后评定与抗原的结合。

本发明的方法可用于确定噬菌体上的展示物与相应抗原的解离速率。例如，噬菌体被固定在生物传感器上，清洗，然后抗原结合。在每次清洗步骤后，读取生物传感器。如果抗原从生物传感器上的噬菌体上释放，则信号将会有损失。在多次清洗中检测生物传感器，并将解离速率计算为信号相对时间的损失。

采用该技术，通过将细胞组分结合在生物传感器上，然后加入与细胞组分相对应的蛋白伴侣或含有DNA序列的噬菌体可以鉴别结合伴侣。测试样品，诸如含有结合伴侣的细胞裂解物可加到本发明的生物传感器上，然后清洗去掉未结合的物质。与生物传感器相结合的结合伴侣随后从生物传感器上洗脱下来并通过例如质谱进行鉴定。噬菌体DNA展示库可加到本发明的生物传感器上，随后清洗去掉未结合的物质。与生物传感器相结合的各个噬菌体颗粒可被分离，并且随后这些噬菌体颗粒中的插入物可被测序以确定结合伴侣的特性。抗体可以阵列形式固定在生物传感器上，然后与含有结合伴侣诸如蛋白的所研究测试样品相接触。仅有与固定在生物传感器上的抗体特异性地结合的蛋白依然结合在生物传感器上。这样的方法基本上是大规模形式的酶联免疫吸附试验；然而，酶或荧光标记的使用并非必需。

本发明的方法提供了较传统噬菌体展示和噬菌体淘选方案更好的几个优点，包括例如：(1) 固定于生物传感器的噬菌体上的展示物与细胞或其他结合伴侣之间的无标记和直接的结合并不会受到蛋白标记和第二信号的放大的影响；(2) 从粗制样品中的噬菌体特异性抽取(即噬菌体在生物传感器上的固定)和无需过分清洗的细胞或其他结合伴侣的结合更快速地检测哺乳动物细胞的功能性结合；和(3) 高通量，因此提供了最有效的和快速的噬菌体筛选方法。

此外，采用噬菌体展示确定抗体与哺乳动物细胞的功能性结合的传统方案需要大量时间和工作去克隆与片段和/或完整IgG结合的噬菌体上的展示物以研究与细胞的功能性结合。本发明的方法不再需要纯化噬菌体从而简化了所述方法，并可按照本文所述的高通量筛选处理。因此，此处描述的本发明的方法提供了允许研究者直接从噬菌体淘选试验转向测试哺乳动物细胞上的展示物(功能性抗原)的功能性活性的益处。尤其是，由于本发明的方法是高通量的，因而细胞结合可在第

一结合试验而非常规研发途径中的后续步骤中得到研究。由于与细胞的结合是鉴别治疗性抗体的关键测试，因此本发明的方法使研究者能更早地获得关键信息，从而加速治疗性发现。在许多情况下，本发明的方法可使发现研究人员在鉴定治疗性抗体方面节省最高达三个月至六个月。

对于上述应用，尤其是蛋白质组学应用，选择性结合诸如来自本发明生物传感器上的测试样品的结合伴侣等物质的能力，以及从所述生物传感器的独特位置选择性地移除所结合的材料进行进一步分析的能力是具有优势的。本发明的生物传感器也能通过测量光的反射波长的偏移，检测和量化结合在生物传感器阵列独特位置的样品中的结合伴侣的量。此外，在一个独特生物传感器位置的波长偏移能与位于其他独特生物传感器位置的阳性对照和阴性对照相比较，从而确定结合在生物传感器阵列独特位置处的结合伴侣的量。

IgG 和抗体片段的应用

本发明的方法可用于从复杂培养基诸如例如周质提取物、杂交瘤上清液、血浆或血清中俘获抗体和抗体片段。参见例如图 3 ~ 图 10。通过替代以下实例中的兔抗小鼠 Fc、兔抗人 Fc、兔抗人 F(ab')₂ 或兔抗小鼠-F(ab')₂ 对以下特异性表面进行修饰以俘获完整 IgG 或 F(ab)。以下步骤是用于在图 3 中所描述的掺入 PBS 和周质培养物的 sF(ab)的俘获的步骤。用于 sFab 的特异性俘获表面在 SRU BIND® TIO 生物传感器上形成，图 3(A)。水化的 TIO BIND®生物传感器用溶于 PBS 的 20 µg/ml 蛋白 A 包被 30 分钟、清洗并记录沉积的蛋白 A 的量的终点读数。用 1%牛奶对所述生物传感器封闭 30 分钟、清洗并记录沉积的牛奶的量的终点读数。然后将 20 µg/ml 的特异性俘获试剂兔抗小鼠 F(ab')₂ 特异性 IgG 进行温育 30 分钟、清洗并记录沉积的兔抗小鼠 F(ab')₂ 特异性 IgG 的量的终点读数。剩余的蛋白 A 位点用 50 µg/ml 的兔 IgG 封闭 30 分钟。此时，形成针对小鼠 sF(ab)的特异性俘获表面。在此实例中，0.33、1.0 和 3.0 µg/ml 经纯化的多克隆小鼠 sF(ab)被掺入到 PBS 中和不表达 sF(ab)的大肠杆菌周质制剂中，图 3(A) 和 4(B)。

图 4 显示了从 TIO BIND®生物传感器上的周质提取物俘获 scFv。水化的 TIO BIND®生物传感器用溶于 PBS 的 20 µg/ml 蛋白 A 包被 30

分钟、清洗并记录沉积的蛋白 A 的量的终点读数。然后用 1%牛奶对所述生物传感器封闭 30 分钟、清洗并记录沉积的牛奶的量的终点读数。然后，将 20 $\mu\text{g/ml}$ 的特异性俘获剂兔抗小鼠-Fc 温育 30 分钟、清洗并记录沉积的兔抗小鼠 Fc 特异性 IgG 的量的终点读数。形成两种俘获抗体表面，(1) 25 $\mu\text{g/ml}$ 抗-his 和 25 $\mu\text{g/ml}$ 抗-cmyc 和 (2) 50 $\mu\text{g/ml}$ 抗-cmyc，温育 30 分钟、清洗并记录沉积的俘获抗体的量的终点读数。此时，形成 scFv 俘获表面，图 4(A)。纯化的 scFv (5 $\mu\text{g/ml}$) 掺入 PBS 和不含编码 svFv 的质粒的大肠杆菌周质提取物。所述 scFv 温育小时、清洗并记录沉积的 scFv 的量的终点读数。scFv 的量列在图 4(B) 中并图示在图 4(C) 和 4(D) 中。

图 5 显示了从 SA1 BIND® 生物传感器上的周质提取物俘获 scFv。水化的 SA1 BIND® 生物传感器抗生蛋白链菌素与 50 $\mu\text{g/ml}$ 生物素-抗-his 温育一小时、清洗并记录沉积的生物素-抗-his 的量的终点读数，图 5(A)。每毫升八微克的 scFv 掺入 PBS 和不含编码 scFv 的质粒的大肠杆菌的周质提取物。将所述 scFv 温育 1 小时、清洗并记录沉积的 scFv 的量的终点读数。scFv 的量列在图 5(B) 中并图示在图 5(C) 中。

图 6 显示了从 GA1 BIND® 生物传感器上的周质提取物俘获 scFv。水化的 GA1 BIND® 生物传感器戊二醛与 50 $\mu\text{g/ml}$ 抗-cmyc 温育一小时、清洗并记录沉积的抗-cmyc 的量的终点读数，图 6(A)。每毫升两百微克的中性抗生物素蛋白 (neutravidin) 与所述 BIND® 生物传感器温育 1 小时以封闭任何残余的戊二醛活性基团、清洗并记录沉积的中性抗生物素蛋白的量的终点读数。每毫升五微克的 scFv 掺入 PBS 和不含编码 scFv 的质粒的大肠杆菌的周质提取物。将所述 scFv 温育 1 小时、清洗并记录沉积的 scFv 的量的终点读数。scFv 的量列在图 6(B) 中并图示在图 6(C) 中。

在图 7 中，通过杂交瘤技术形成的小鼠 IgG 从杂交瘤上清液中俘获，然后测试其结合可溶性抗原和在细胞上表达的抗原的能力。在 SRU BIND® TIO 生物传感器上形成小鼠 IgG 的特异性俘获表面，图 7(A) 和 7(B)。水化的 TIO BIND® 生物传感器用溶于 PBS 的 20 $\mu\text{g/ml}$ 蛋白 A 包被 30 分钟、清洗并记录沉积的蛋白 A 的量的终点读数。用 1%牛奶对所述生物传感器封闭 30 分钟、清洗并记录沉积的牛奶的量的终点读数。然后，用 20 $\mu\text{g/ml}$ 的特异性俘获剂兔抗小鼠-Fc 特异性 IgG 温育

30 分钟、清洗并记录沉积的兔抗小鼠 Fc 特异性 IgG 的量的终点读数。剩余的蛋白 A 位点用 50 $\mu\text{g/ml}$ 兔 IgG 封闭 30 分钟。此时形成小鼠 IgG 的特异性俘获表面。板 15 用于测试表达抗原的转染细胞系和亲代细胞系的结合。板 16 用于测试抗原结合。图 7(C)显示了测量来自板 15 和板 16 上的杂交瘤上清液的小鼠 IgG 的俘获的偏移值 (nm)。图 7(D)显示了与 BIND® 生物传感器上的俘获 IgG 相结合的抗原和细胞。图 7(E)显示了所述抗原和细胞结合的偏移(nm)以及抗原信号除以 IgG 信号的比率和细胞结合信号除以 IgG 信号的比率。这些比率可用于评定所述 IgG。抗体 22、25、26、28、30、31、34、36 和 37 可分类为抗原结合剂 (抗原结合除以 IgG 结合), 且 37 具有最高的抗原亲和性, 比率为 0.13。抗体 22、25 和 26 具有相似的亲和性并构成第二类结合剂, 比率为 0.10。剩余的抗体 (28、30、31、34 和 36) 具有低很多的亲和性, 其比率少于 0.04。在抗体 30 的情况下, IgG 也可被分类为通用细胞结合剂, 其亲代细胞系除以 IgG 的比率为 0.11 且抗原呈递细胞除以 IgG 的比率为 0.16。第二细胞结合分类对在细胞上表达的抗原具有特异性, 正如抗体 25 和 26 一样, 这两种抗体其抗原呈递细胞除以 IgG 的比率分别为 0.49 和 0.30, 亲代细胞系除以 IgG 的比率分别 0.00 和 0.01。其余的抗体是非细胞结合剂, 其亲代细胞系除以 IgG 和抗原呈递细胞除以 IgG 的结合比率小于 0.04。

图 8 显示了采用抗-Fc TIO BIND® 生物传感器从血清中俘获抗体。在 SRU BIND® TIO 生物传感器上形成小鼠 IgG 的特异性俘获表面, 图 8(A)。水化的 TIO BIND® 生物传感器用溶于 PBS 中的 20 $\mu\text{g/ml}$ 蛋白 A 包被 30 分钟、清洗并记录沉积的蛋白 A 的量的终点读数。然后用 1% 牛奶对所述生物传感器封闭 30 分钟、清洗并记录沉积的牛奶的量的终点读数。然后用 20 $\mu\text{g/ml}$ 的特异性俘获剂兔抗-小鼠-Fc 温育 30 分钟、清洗并记录沉积的兔抗-小鼠 Fc 的量的终点读数。剩余的蛋白 A 位点用 50 $\mu\text{g/ml}$ 兔 IgG 封闭 30 分钟。此时形成小鼠 IgG 的特异性俘获表面。图 8 (B)和(C) 显示了掺入 PBS 和 5%、10%、20%、40%和 100% 血清的小鼠 IgG 的俘获 (0.1 $\mu\text{g/ml}$ ~ 6.4 $\mu\text{g/ml}$ 系列稀释)。图 8(D)和 8(E) 是图 8(B)和 8(C)中的列表数据的图示。

图 9 显示了采用 GA1 BIND® 生物传感器的血清药物—抗药物试验。IgG 是治疗性抗体药物的模拟物, 抗-药物是 F(ab')₂, 它被掺入 PBS

和小鼠血清以模拟使用 GA1 BIND®生物传感器在来自于临床分离物的人血清中发现的。水化的 GA1 BIND®生物传感器与 20 µg/ml IgG 温育 1 小时、清洗并记录沉积在所述表面上的 IgG 的量的终点读数。通过将所述传感器与 100 µg/ml 非免疫兔 IgG 温育 2 小时，保留在所述 GA1 BIND®生物传感器表面上的游离醛被固定。所述 IgG (药物) : rIgG 表面同样被来自 Pierce 的 START Block 封闭 1 小时。图 9(A)显示了药物特异性表面的形成的偏移 (nm)。通过将所述抗药物 1:3 系列稀释入 PBS 或 11%和 30%小鼠血清，在所述生物传感器上形成 0 ~ 7.1 µg/ml 的抗药物滴定曲线。抗-药物与 20 µg/ml (图 9(B)) 和 0 µg/ml 的药物表面 (图 9(C)) 的结合以图例进行表示。相比 PBS，在 11%血清中俘获了相同量的抗药物。在 30%血清中俘获更少量的抗-药物，但所述抗药物是可以检测到的。

图 10 显示了采用抗 TIO BIND® 生物传感器的血清中的药物-抗药物试验的开发。IgG 是治疗性抗体药物的模拟物，抗-药物是 F(ab')₂，它被掺入 PBS 和小鼠血清以模拟在来自于临床分离物的人血清中发现的 IgG。图 10(A)显示了在用于俘获小鼠 IgG 的特异性表面形成中所测量的偏移。水化的 TIO BIND® 生物传感器用 20 µg/ml 蛋白 A 包被。百分之一的牛奶用于封闭未被蛋白 A 填充的 TIO 上任何剩余的结合位点。在牛奶封闭步骤以后，所述表面与 20 µg/ml 兔抗-人-Fc 进行温育。50 µg/ml 的兔 IgG 用于封闭未被兔抗-小鼠-Fc 填充的任何蛋白 A 结合位点。在该试验阶段，每种试剂与所述表面温育 30 分钟，清洗所述表面并记录沉积在所述表面上的每种试剂的量的终点读数。每毫升五十微克的药物 (IgG)与所述特异性表面温育 1 小时、清洗并记录沉积在所述表面上的每种药物的量的终点读数。通过将抗药物 1:3 系列稀释入 PBS 或 11%和 30%小鼠血清，在所述生物传感器上形成 0 ~ 7.1 µg/ml 的抗药物滴定曲线。抗-药物与 50 µg/ml 和 0 µg/ml 药物表面的结合分别显示在图 10(B)和 11(C)。在 11%和 30%血清中俘获更少量的抗-药物，但所述抗药物是可以检测到的。

在抗体筛选内表位分类的确定

在抗体筛选(抗体或抗体片段)或噬菌体筛选中的表位分类可以采用本发明的方法进行确定。在实例中，待分类的结合分子可以是抗体

或展示噬菌体或二者的组合。第一结合分子被动地或者特异性地固定在生物传感器上。优选地,生物传感器包括微量滴定板的底表面。该表面由封闭剂封闭。抗原(诸如碳水化合物、聚合物、肽、可溶性蛋白或细胞受体的抗原模拟物)被展示噬菌体、抗体或抗体片段表面特异性地俘获。待分类的各个噬菌体克隆、抗体或抗体片段加入到孔中。当固定在孔中的展示噬菌体、抗体或抗体片段结合至与待分类的噬菌体、抗体或抗体片段相同的表位内时,则将没有可检测到的信号,这是由于所述结合位点已被固定的噬菌体、抗体或抗体片段所填充。当固定在孔中的展示噬菌体、抗体或抗体片段识别与待分类的噬菌体、抗体或抗体片段不同的表位结合位点,那么可检测的信号将被记录。

图 11 显示了采用比色共振反射生物传感器用于表位作图的单克隆抗体结合目标肽的终点分析。图 11(A)显示了在用于俘获小鼠 IgG 的特异性表面形成中所测量的偏移。水化的 TIO BIND® 生物传感器用 20 µg/ml 蛋白 A 包被。所述蛋白 A 用作可特异性俘获小鼠 IgG 的兔抗-小鼠-Fc 的俘获表面。百分之一的牛奶用于封闭未被蛋白 A 填充的 TIO 上任何剩余结合位点。在所述牛奶封闭步骤以后,所述表面与 20 µg/ml 兔抗-小鼠-Fc 进行温育。50 µg/ml 的兔 IgG 用于封闭未被兔抗-小鼠-Fc 填充的任何蛋白 A 结合位点。在该试验阶段,每种试剂与所述表面温育 30 分钟,清洗所述表面并记录沉积在所述表面上的每种试剂的量的终点读数。在图 11(B)中,记录了四种小鼠 IgG 被蛋白 A:牛奶:兔抗-小鼠-Fc:兔 IgG 表面俘获。每毫升 10 微克的 IgG 与所述特异性表面温育 30 分钟。为确保第二层小鼠 IgG 通过抗原而不是兔抗-小鼠-Fc 结合,来自 Pierce 的非免疫小鼠 IgG 以 50 µg/ml 加入以填充任何未被占据的兔抗-小鼠-Fc 结合位点,图 11(A)。图 11(C) 记录了当加入抗原来俘获小鼠 IgG 时所测量的偏移。Ab-4 不结合抗原,所述 4 种 IgG 可分类为抗原结合剂 (Ab-1、Ab-2 和 Ab-3)和抗原非结合剂 (Ab-4)。所述抗原结合抗体也可通过将所述 BIND®生物传感器测量的抗原偏移除以所述抗体偏移而进行评定。Ab-2 具有最高的抗原亲和性,比率为 0.56。Ab-3 具有比 Ab-1 略高的抗原亲和性,每抗体偏移的抗原结合比率分别为 0.38 和 0.35。图 11(D)显示了通过在层 1 和层 3 加入相同小鼠 IgG 而形成的图表。如果在同一孔中的两种 IgG 结合了抗原的相同区域,则没有被检测的信号。例如可以将相同抗体分两次加入到同一孔中。自身

竞争导致在对角线上不能观察到信号：Ab-1 和 Ab-1 得到 0.016 nm；Ab-2 和 Ab-2 得到 0.063 nm；以及 Ab-3 和 Ab-3 得到 0.050 nm。Ab-1 和 Ab-3 属于同一结合类别，并且由于 Ab-1 和 Ab-3 得到 0.033 nm 偏移，而相反取向的 Ab-3 和 Ab-1 得到 0.024 nm 偏移，因而不能用作夹心式配对。如果一个孔内的两种 IgG 能同时结合抗原，则它们属于不同的结合类别并可用作夹心式配对。Ab-2 属于第二结合类别并可用作 Ab-1 和 Ab-3 的夹心式伴侣：Ab-1 和 Ab-2 为 0.138；Ab-2 和 Ab-1 为 0.150；Ab-3 和 Ab-2 为 0.203；以及 Ab-2 和 Ab-3 为 0.212。在所固定的第一和/或第二抗体是噬菌体上的展示物或者可溶性抗体(纯化或粗制样品)时，该技术能适用。组合包括噬菌体：噬菌体、噬菌体：抗体片段、抗体片段：噬菌体、抗体片段：抗体片段、完整抗体：噬菌体、噬菌体：完整抗体、完整抗体：完整抗体、抗体片段：完整抗体和抗体：抗体片段。这也可以用于杂交瘤和噬菌体展示筛选以及其他宿主诸如小鼠中制得的人抗体。

在本文中任何地方所引用的所有专利、专利申请以及其他科学或技术著作以引用的方式整体引入。此处所描述的方法和组合物作为优选实施方案的典型代表是示例性的，且并非旨在限制本发明的范围。其中的变化和其他用途对于本领域技术人员而言是显而易见的，并包括在本发明的精神之中。此处经说明性地描述的本发明可合适地在缺乏此处未明确公开的任何一种或多种要素、一种或多种限制的情况下付诸实施。因此，例如，在此处每种情况下，任一术语“包括”、“基本由...组成”和“由...组成”可由另两个术语中的任一个替换而保留了其普通含义。已采用的术语和表达方式是用作描述性术语，而非限制性的，并且没有任何意图在使用这些术语和表达方式时排除任何已显示的和已描述的等同特征或者其一部分，但应当意识到在所宣称的本发明的范围内可作出各种修改。因此，应当理解虽然已经通过实施方案和可选的特征详细公开了本发明，但此处所公开的概念的修改和变化也应被视为在所述描述和所附权利要求所界定的本发明的范围之内。

此外，当本发明的特征和方面根据马库什分类或其他替代性分类进行描述时，本领域技术人员将认识到本发明也因此可根据所述马库什分类或其他分类的任何独立成员或成员亚分类进行描述。

(A) 完整的IgG和抗体结构域, (B) F(ab)和(C) scFv, 其中V表示可变区, C表示恒定区, H表示重链, L表示轻链, 以及S-S表示二硫键。在(C)的情况下, VL和VH之间的线是IgG中并非天然存在的重组接头。

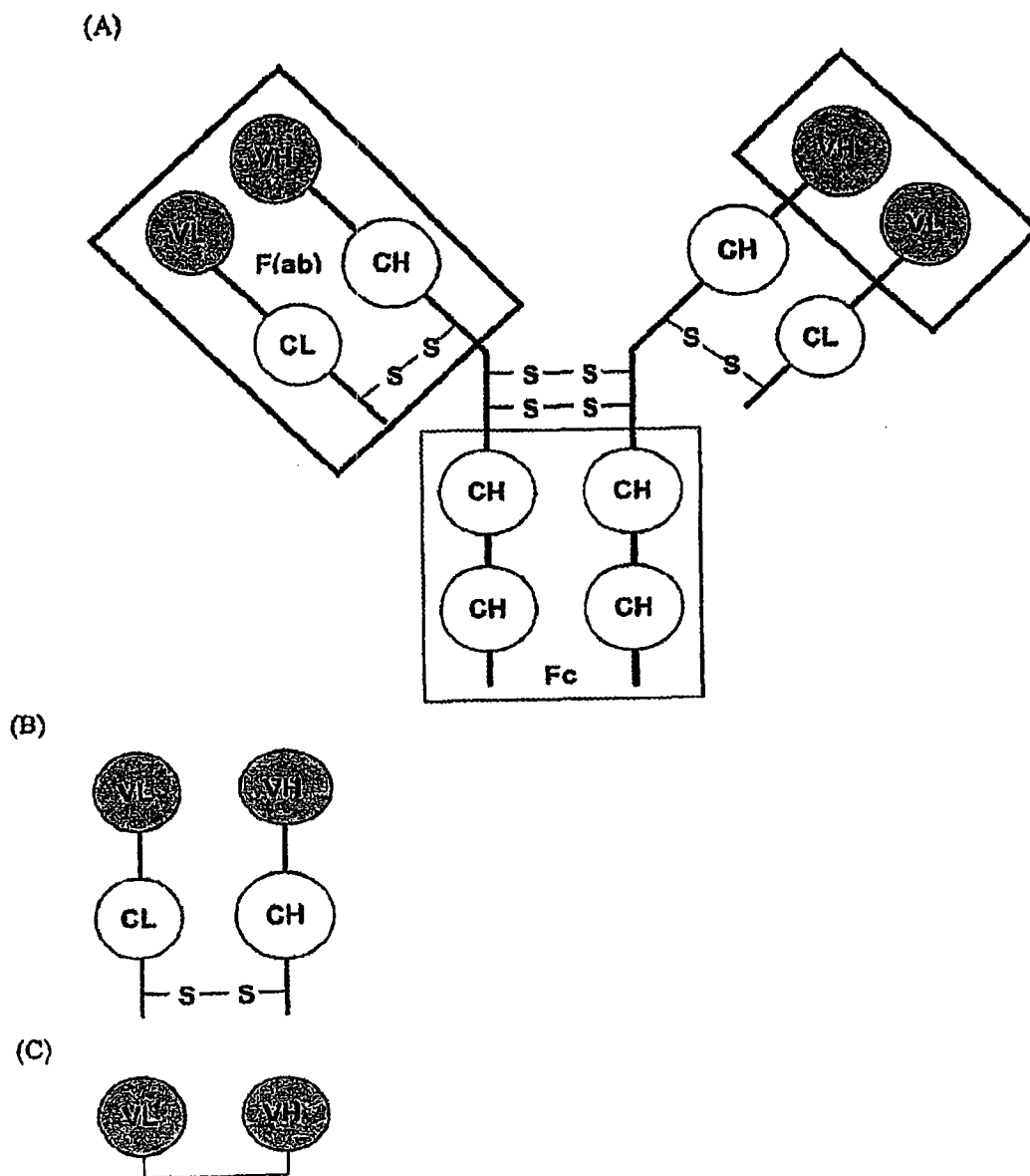


图 1

在GA3 BIND®生物传感器上的细菌病毒的滴定

N=2	噬菌体浓度 (pfu/ml)	偏移 (nm)	SD	%CV
20%甘油中的 储存噬菌体稀 释在20%甘油中	1.0e14	5.285	0.008	0.16
	3.3e13	4.027	0.006	0.15
	1.1e13	2.518	0.083	3.3
	3.6e12	1.052	0.066	6.3
	1.2e12	0.400	0.037	9.3
	4.0e11	0.150	0.004	2.8
	1.3e11	0.036	0.005	12.7
20%甘油中的 储存噬菌体 稀释在PBS中	1.0e14	5.440	0.038	0.71
	3.3e13	4.215	0.001	0.03
	1.1e13	2.523	0.145	5.7
	3.6e12	1.128	0.035	3.1
	1.2e12	0.488	0.048	9.9
	4.0e11	0.150	0.008	5.1
	1.3e11	0.038	0.007	19.6

图 2

掺入PBS和由大肠杆菌制备的周质提取物的F(ab)的俘获的对比

(A) sF(ab)特异性俘获表面的形成和sF(ab)的俘获

样品	Δ PWV	SD	%CV	N
蛋白A	0.336	0.016	4.9	48
1%牛奶	0.661	0.023	3.4	48
兔抗小鼠F(ab') ₂	0.799	0.039	4.9	48
在PBS中的0.33 μ g/ml sFab	0.066	0.014	18.5	3
在PBS中的1.0 μ g/ml sFab	0.150	0.010	6.3	3
在PBS中的3.0 μ g/ml sFab	0.211	0.008	3.5	3
在周质提取物中的0.33 μ g/ml sFab	0.110	0.005	4.8	3
在周质提取物中的1.0 μ g/ml sFab	0.172	0.012	6.4	3
在周质提取物中的3.0 μ g/ml sFab	0.238	0.009	3.6	3

图 3

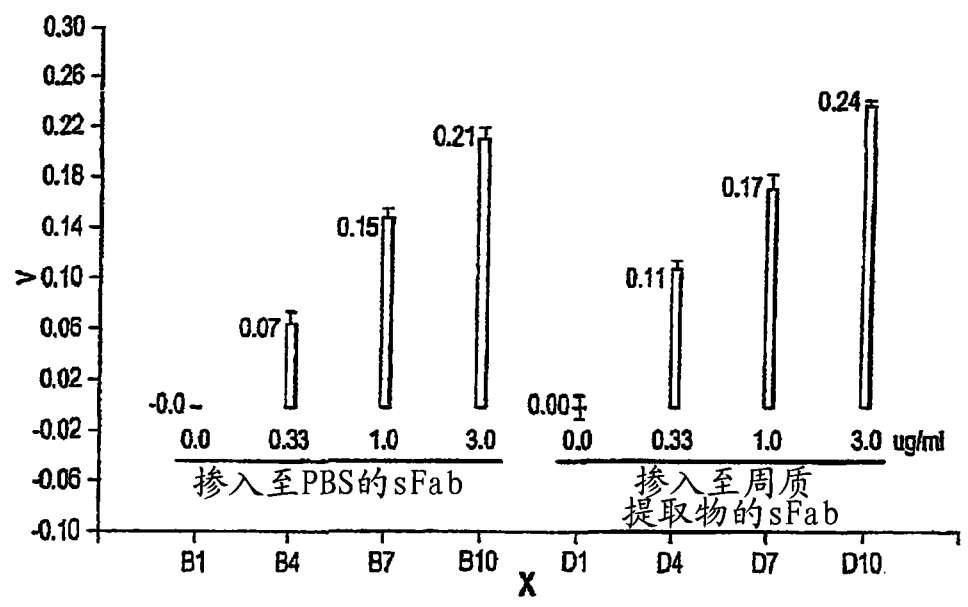


图 3B

在TIO BIND® 生物传感器上从周质提取物俘获ScFv

(A) sF(ab)特异性俘获表面的形成和含有6×His和c-myc标签的scFv的俘获

样品	偏移	SD	CV%	N
蛋白A	0.629	0.020	3.1	96
牛奶	0.945	0.019	2.0	96
兔抗-小鼠-Fc	0.712	0.070	9.8	96
抗-His&抗-cmyc	0.652	0.021	3.2	48
抗-cmyc	0.653	0.018	2.8	48

(B) 掺入PBS和周质提取物的纯化scFv的俘获

掺入PBS的纯化scFv (n=3)						
scFv (5 ug/ml)	混合物俘获Ab			抗-cmyc俘获Ab		
	偏移 (nm)	SD	%CV	偏移 (nm)	SD	%CV
#1	0.051	0.007	13.7	0.238	0.116	49
#2	0.256	0.005	1.9	0.241	0.017	7.1
#3	0.148	0.006	4.1	0.104	0.008	5.6
#4	0.131	0.008	6.4	0.123	0.017	13.5
#5	0.281	0.012	4.2	0.212	0.005	2.4
掺入周质提取物的纯化scFv (n=3)						
scFv (5 ug/ml)	混合物俘获Ab			抗-cmyc俘获Ab		
	偏移 (nm)	SD	%CV	偏移 (nm)	SD	%CV
#1	0.231	0.006	2.5	0.201	0.017	8.5
#2	0.250	0.004	1.6	0.228	0.030	13.3
#3	0.146	0.002	1.2	0.078	0.021	27
#4	0.102	0.005	5.2	0.033	0.016	48
#5	0.447	0.008	1.3	0.395	0.003	0.8

图 4A-B

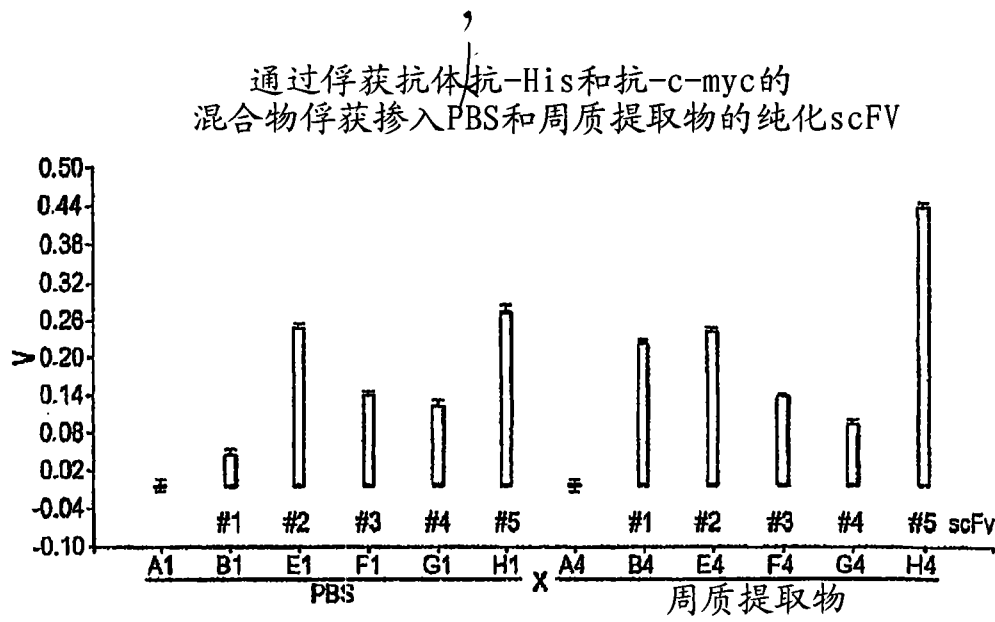


图 4C

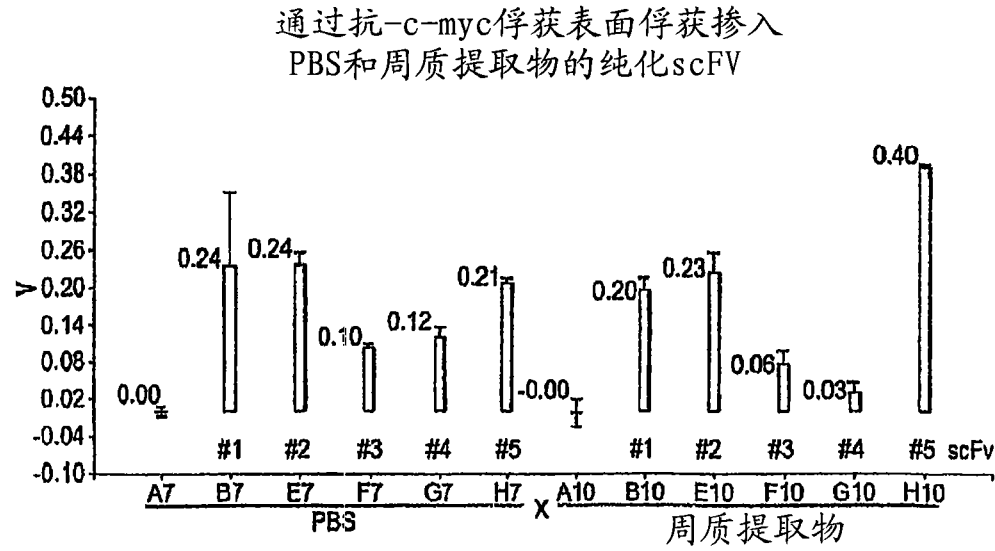


图 4D

在SAI BIND® 生物传感器上从周质提取物俘获ScFv

(A) 表面的形成和scFv的特异性俘获

	偏移	SD	CV%
生物素抗-His	2.290	0.053	2.3

(B) 掺入PBS和周质培养物的scFv的俘获

scFv 8 ug/ml	PBS			周质提取物			N
	偏移	SD	CV%	偏移	SD	CV%	
#1	0.104	0.010	9.4	0.16	0.004	2.2	3
#2	0.091	0.004	4.2	0.33	0.017	5.1	3
#3	0.065	0.004	6.2	0.17	0.006	3.5	3
#4	0.087	0.004	4.8	0.19	0.012	6.1	3

图 5A-B

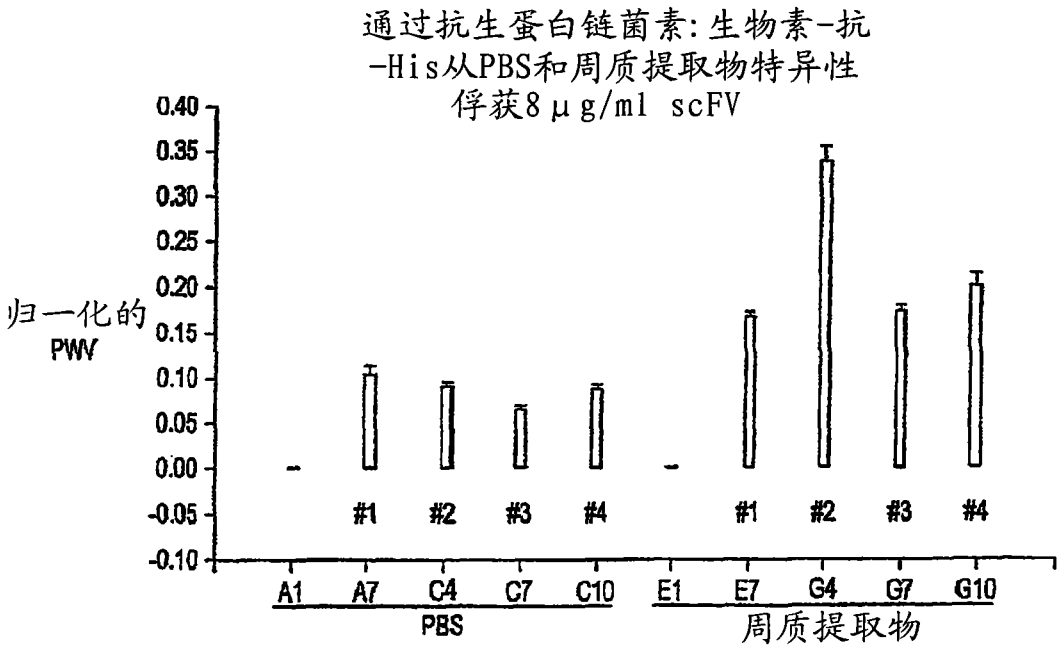


图 50

在GA1 BUSTD® 生物传感器上从周质提取物俘获scFv

(A) scFv俘获表面的形成

	偏移	SD	CV%
抗-c-myc	1.247	0.013	1.1

(B) 掺入PBS和周质提取物的纯化scFv的俘获

	PBS			周质提取物			
ScFv (5 ug/ml)	偏移	SD	CV%	偏移	SD	CV%	N
#1	0.169	0.003	1.5	0.107	0.001	1.2	3
#2	0.182	0.017	9.5	0.180	0.005	2.6	3
#3	0.155	0.005	3.0	0.125	0.005	4.4	3
#4	0.182	0.005	2.9	0.118	0.005	4.4	3
#5	0.154	0.003	1.9	0.229	0.031	13.4	3
#6	0.173	0.011	6.3	0.144	0.011	7.4	3

图 6A-B

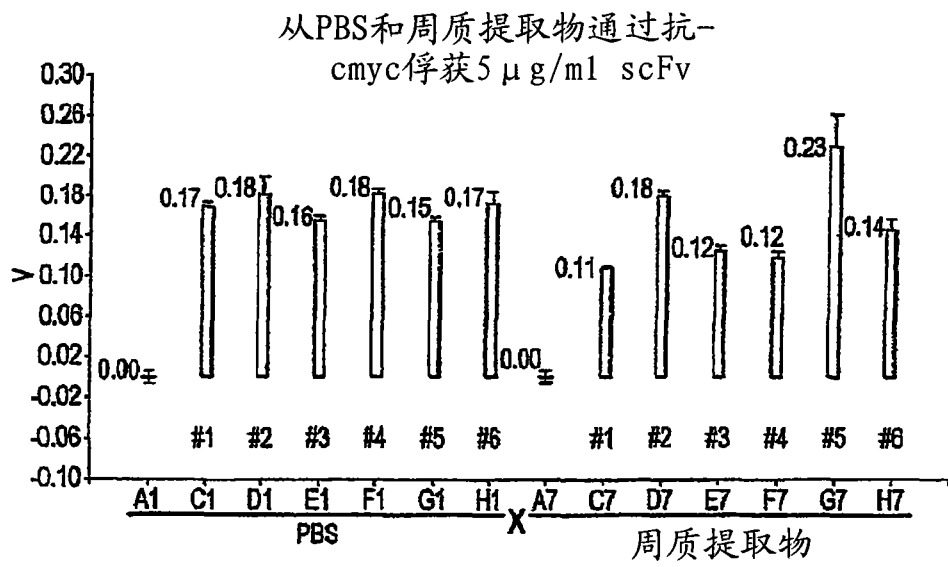


图 6C

采用抗-Fc T10 BIND®生物传感器从杂交瘤上清液俘获IgG

(A) 特异性IgG俘获表面的形成

板15 N=96	蛋白A	1%牛奶	兔抗-小鼠-Fc	兔IgG封闭
偏移 (nm)	0.484	0.944	0.931	0.080
SD	0.017	0.014	0.050	0.017
CV%	3.5	1.5	5.3	20.9

(B) 特异性IgG俘获表面的形成

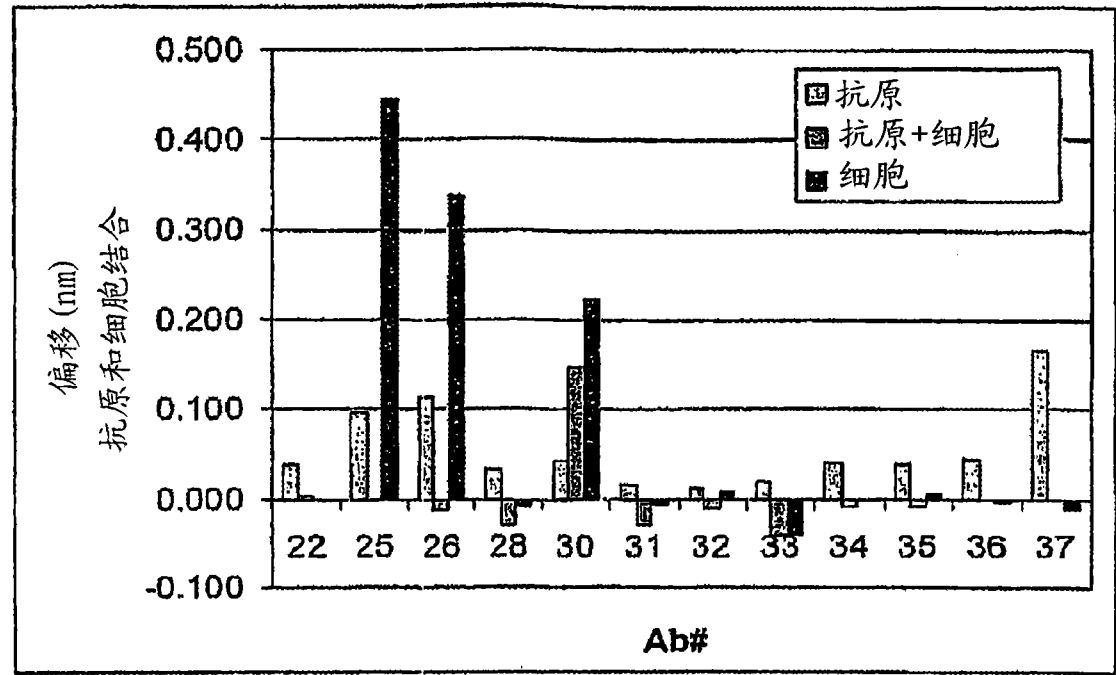
板16 N=96	蛋白A	1%牛奶	兔抗-小鼠-Fc	兔IgG封闭
偏移 (nm)	0.491	0.940	0.927	0.090
SD	0.016	0.017	0.054	0.026
CV%	3.2	1.8	5.8	28.8

(C) 从杂交瘤培养基俘获IgG

	板15 (N=2)			板16 (N=1)
Ab-#	偏移	SD	%CV	偏移
22	0.531	0.124	23.3	0.385
25	0.908	0.174	19.1	0.983
26	1.130	0.096	8.5	1.199
28	1.189	0.143	12.0	0.933
30	1.384	0.195	14.1	1.549
31	0.744	0.141	19.0	0.388
32	0.929	0.026	2.8	0.867
33	1.208	0.094	7.8	1.362
34	1.372	0.062	4.5	1.473
35	1.164	0.086	7.4	1.556
36	1.411	0.066	4.7	1.017
37	0.919	0.077	8.4	1.256

图 7A-C

(D) 抗原、抗原+细胞和与俘获在所述生物传感器表面的IgG相结合的细胞的图示



(E) 抗原、抗原+细胞和结合俘获在所述生物传感器表面上的IgG的细胞的列表图示,并将该结合归一化为在所述生物传感器表面上俘获的IgG的量。

Ab #	偏移 (nm)			比率		
	抗原	抗原+细胞	细胞	Ag/IgG	抗原+细胞/IgG	细胞/IgG
22	0.039	0.003	0.001	0.10	0.01	0.00
25	0.096	0.000	0.445	0.10	0.00	0.49
26	0.115	-0.013	0.339	0.10	0.01	0.30
28	0.033	-0.030	0.008	0.04	0.02	0.01
30	0.043	0.148	0.223	0.03	0.11	0.16
31	0.017	-0.028	0.006	0.04	0.04	0.01
32	0.013	-0.010	0.008	0.02	0.01	0.01
33	0.020	-0.039	0.040	0.01	0.03	0.03
34	0.041	-0.008	0.001	0.03	0.01	0.00
35	0.039	-0.007	0.005	0.02	0.01	0.00
36	0.045	-0.001	0.003	0.04	0.00	0.00
37	0.167	-0.001	0.012	0.13	0.00	0.01

图 7D-E

采用抗-Fc T10 BIND® 生物传感器从血清俘获IgG。(N=2)

(A) 特异性IgG结合表面的形成

	偏移	SD	%CV
蛋白A	0.450	0.061	13.5
1%牛奶	0.963	0.031	3.2
抗-Fc	0.697	0.099	14.2

(B) 从血清俘获IgG

[M IgG] (ug/ml)	0%血清			5%血清			10%血清		
	偏移	SD	%CV	偏移	SD	%CV	偏移	SD	%CV
0	0.000	0.018	0.0	0.000	0.011	0.0	0.000	0.002	0.0
0.1	-0.011	0.021	-196.6	0.052	0.018	35.5	0.010	0.014	142.0
0.2	0.002	0.017	983.8	0.046	0.029	63.2	0.017	0.005	28.2
0.4	0.039	0.052	132.8	0.073	0.029	40.2	0.051	0.015	29.0
0.8	0.083	0.037	44.2	0.128	0.025	19.5	0.110	0.002	1.7
1.6	0.247	0.015	5.9	0.240	0.000	0.1	0.225	0.043	19.2
3.2	0.344	0.006	1.8	0.289	0.003	1.0	0.279	0.011	3.8
6.4	0.447	0.027	6.0	0.340	0.021	6.1	0.308	0.001	0.4

(C) 从血清俘获IgG

[M IgG] (ug/ml)	20%血清			40%血清			100%血清		
	偏移	SD	%CV	偏移	SD	%CV	偏移	SD	%CV
0	0.000	0.016	0.0	0.000	0.003	0.0	0.000	0.003	0.0
0.1	0.008	0.003	31.8	0.009	0.005	58.8	0.017	0.013	77.1
0.2	0.042	0.017	40.0	0.018	0.008	33.1	0.040	0.008	19.0
0.4	0.066	0.011	16.1	0.046	0.004	9.3	0.064	0.020	31.9
0.8	0.109	0.034	31.6	0.086	0.019	22.5	0.103	0.029	28.6
1.6	0.183	0.019	10.2	0.154	0.033	21.2	0.170	0.024	14.0
3.2	0.220	0.014	6.1	0.194	0.019	9.8	0.211	0.011	5.3
6.4	0.312	0.015	4.8	0.249	0.026	10.6	0.235	0.010	4.4

图 8A-C

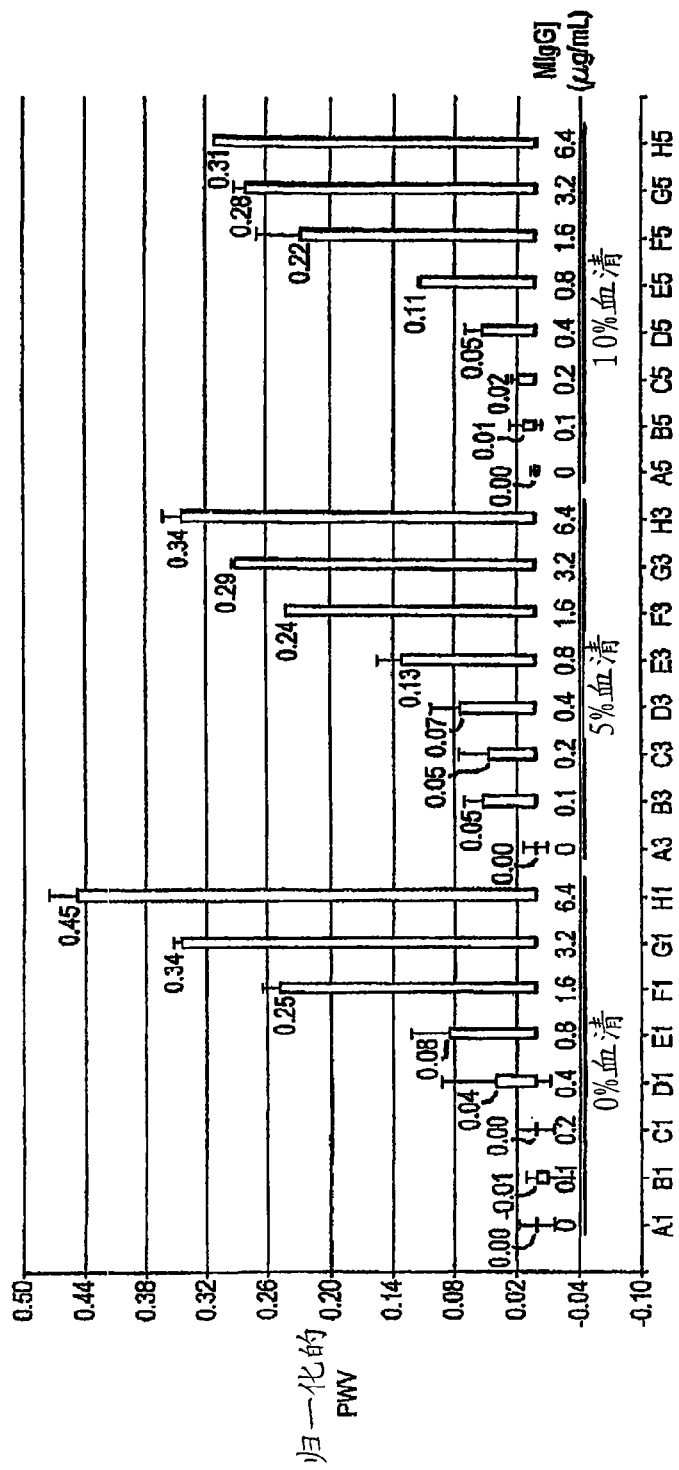


图 8D

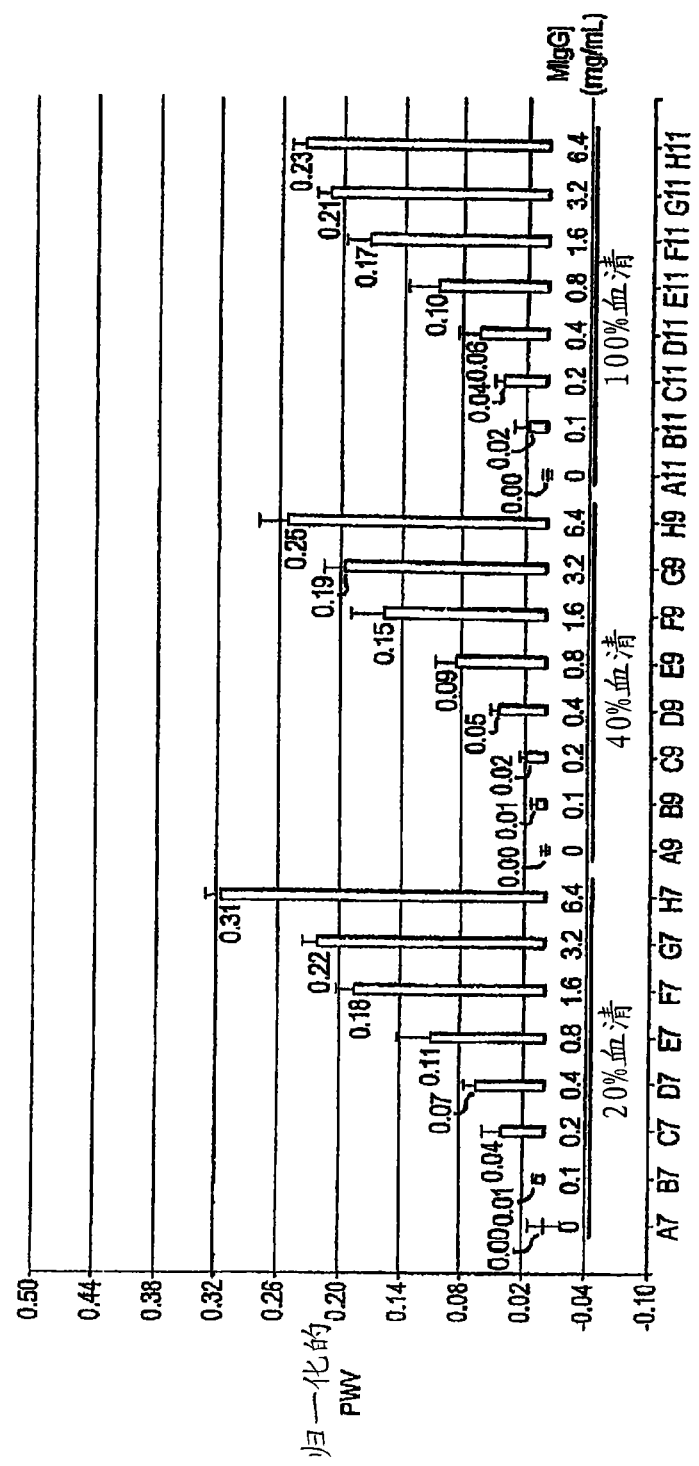


图 8E

使用GA1 BIND®生物传感器在血清中的药物：抗药物试验

(A) 用于俘获IgG的特异性表面的形成

药物为IgG	20 ug/ml 药物 (N=48)	20 ug/ml 药物加上 兔IgG (N=48)	0药物加上 兔IgG (N=48)	20 ug/ml 药物；兔 IgG；START (N=12)	0 ug/ml 药物；兔 IgG；START (N=12)
偏移 (nm)	0.364	0.496	0.773	1.523	1.605
SD	0.032	0.022	0.033	0.085	0.033
CV%	8.8	4.4	4.2	5.6	2.0

图 9A

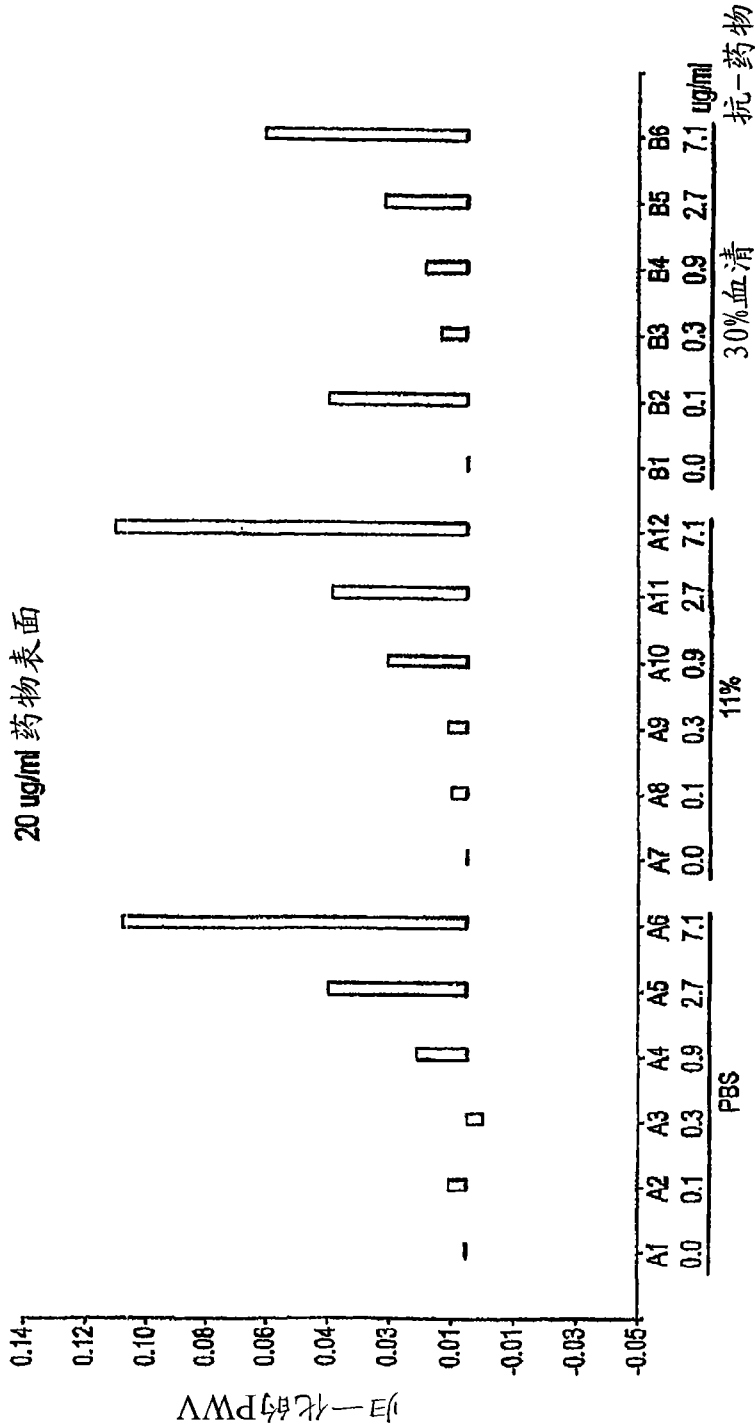


图 9B

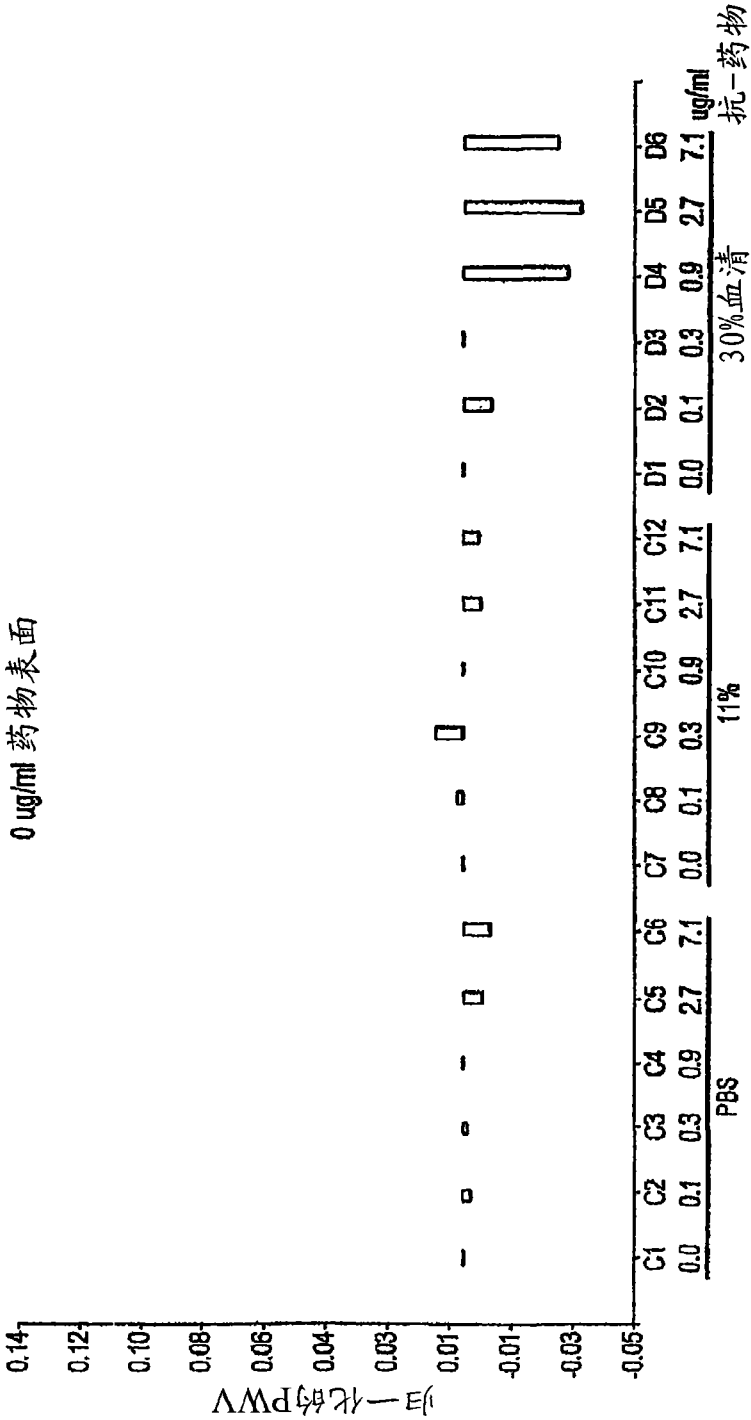


图 9C

使用抗-Fc T10 BIND®生物传感器从血清俘获IgG

(A) 用于俘获抗-药物的药物表面的形成

N = 96	蛋白A	1%牛奶	兔抗-小鼠-Fc	兔IgG封闭	50 ug/ml 药物
偏移 (nm)	0.447	0.976	0.805	0.029	0.805
SD	0.029	0.019	0.082	0.010	0.082
CV%	6.5	2.0	10.2	34.1	10.2

图 10A

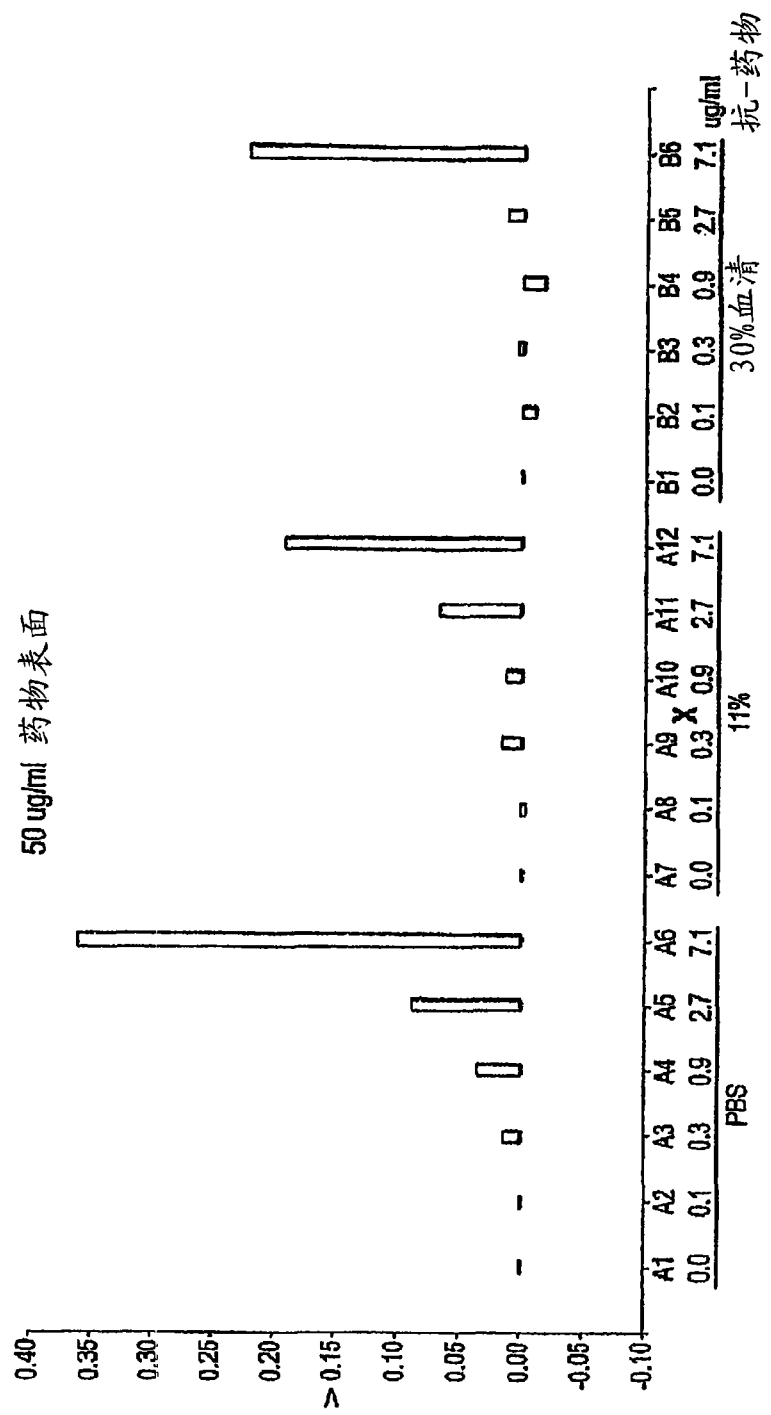


图 10B

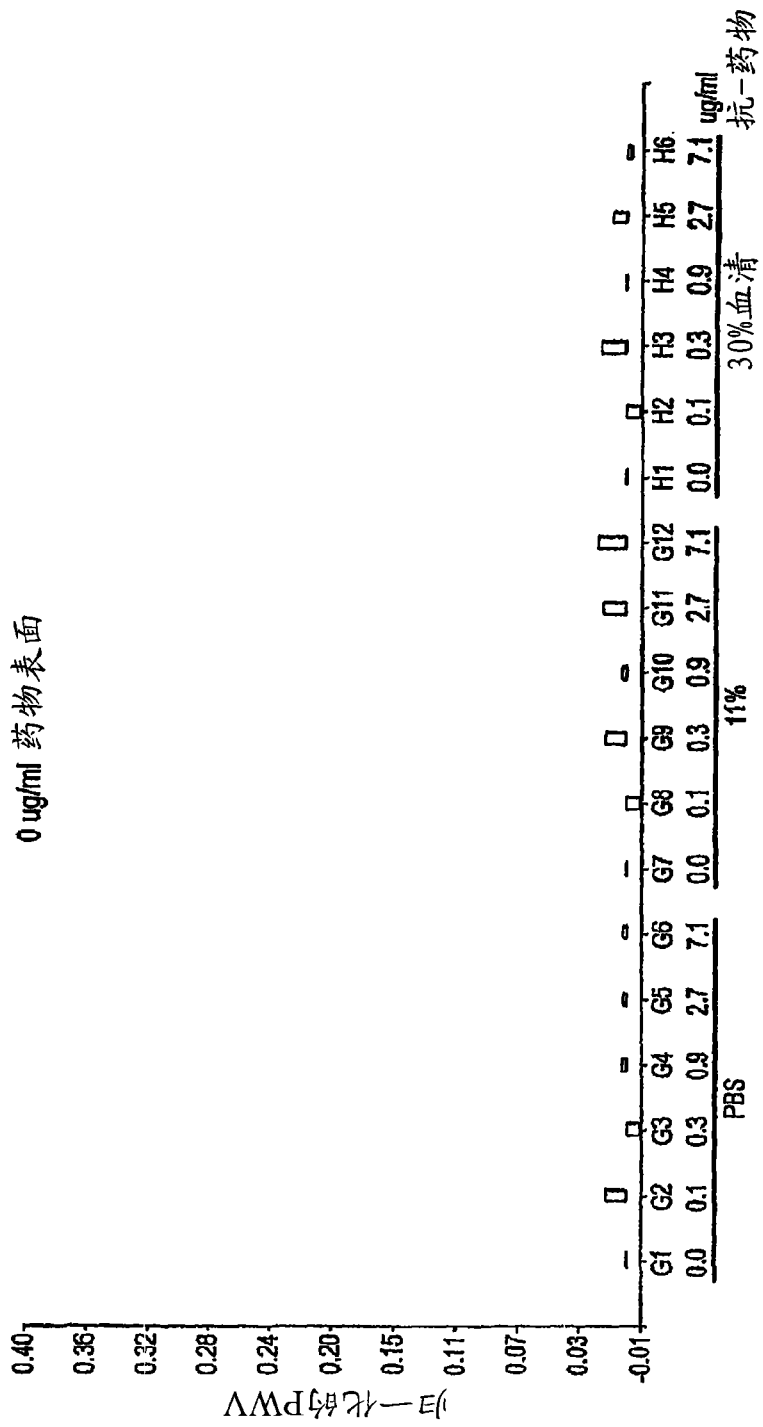


图 10C

抗体分级的终点分析以及抗-Fc TIO BIND®生物传感器上的夹心式抗体对的鉴别

(A) IgG特异性表面的形成

N = 96	蛋白A	1%牛奶	兔抗小鼠Fc	兔IgG封闭	小鼠IgG封闭
偏移 (nm)	0.488	1.040	0.789	0.116	0.422
SD	0.017	0.019	0.061	0.033	0.019
CV%	3.5	1.8	7.7	28.6	4.5

(B) 层1 (抗体) 的俘获

N = 8	Ab-1	Ab-2	Ab-3	Ab-4
偏移 (nm)	0.281	0.219	0.324	0.293
SD	0.011	0.005	0.10	0.010
CV%	4.0	2.2	3.1	3.5

(C) 层2 (抗体对抗原) 的俘获

N = 4	Ab-1	Ab-2	Ab-3	Ab-4
偏移 (nm)	0.173	0.206	0.207	0.046
SD	0.005	0.001	0.004	0.003
CV%	2.9	0.7	2.1	6.0
抗原偏移/抗体偏移 (亲和性)	0.35	0.56	0.38	0.01

(D) 层3 (抗体对抗体-抗原复合物) 的俘获

N = 1	Ab-1	Ab-2	Ab-3	Ab-4
Ab-1	0.016	0.150	0.024	0.005
Ab-2	0.138	0.063	0.203	-0.009
Ab-3	0.033	0.212	0.050	-0.004
Ab-4	-0.009	0.017	-0.012	-0.015

图 11A-D