

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380108725.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 12 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100570365C

[22] 申请日 2003. 11. 13

[21] 申请号 200380108725.2

[30] 优先权

[32] 2002. 11. 14 [33] US [31] 60/426,245

[86] 国际申请 PCT/EP2003/012710 2003. 11. 13

[87] 国际公布 WO2004/044582 英 2004. 5. 27

[85] 进入国家阶段日期 2005. 7. 13

[73] 专利权人 斯克里普斯研究所

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 P·温特沃斯 R·A·勒纳

[56] 参考文献

US2002/0031522A1 2002. 3. 14

US5846959A 1998. 12. 8

Decreased plasma superoxide scavenging activity in immunological disorders – carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge – 132) as a promoter of prednisolone. L. Pronai, S. Arimori. Biotherapy, Vol. 4. 1992

Luminol – dependent chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by immune complexes. Kee Cheung, Anna C. Archibald, Michael F. Robinson. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., Vol. 62 No. 4. 1984

审查员 张 建

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

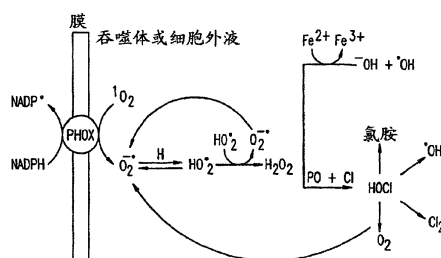
权利要求书 2 页 说明书 73 页 附图 26 页

[54] 发明名称

抗体或嗜中性粒细胞介导的臭氧产生

[57] 摘要

本发明提供了检测能够产生活性氧类的抗体和嗜中性粒细胞的方法。



1. 测定免疫应答中的抗体的方法，其包括：对从施用了活性氧类的化学探针的哺乳动物获得的样品分析化学探针的氧化产物，其中活性氧类是臭氧。

2. 权利要求 1 的方法，其中化学探针是能够被氧化并产生可检测氧化产物的烯烃。

3. 权利要求 1 的方法，其中化学探针是 3-乙烯基-苯甲酸、4-乙烯基-苯甲酸、靛蓝胭脂红、均二苯代乙烯或胆固醇。

4. 权利要求 1 的方法，其中活性氧类是抗体产生的臭氧。

5. 权利要求 1 的方法，其中样品是体液。

6. 权利要求 5 的方法，其中体液是全血、血清、血浆、滑膜液、淋巴液、尿液、唾液、粘液或眼泪。

7. 权利要求 1 的方法，其中样品是组织样品。

8. 权利要求 1 的方法，其中化学探针的氧化产物通过高压液相色谱法、质谱法、紫外光分光光度法、可见光分光光度法、液相色谱法、气相光谱测定法或液相色谱结合质谱法进行测定。

9. 嗜中性粒细胞活性的体外测定法，其包括：(a)活化从哺乳动物获得的嗜中性粒细胞样品中的嗜中性粒细胞；和(b)观察是否能够在嗜中性粒细胞样品中检测到活性氧类，其中活性氧类是臭氧。

10. 权利要求 9 的方法，其中活性氧类是嗜中性粒细胞产生的臭氧。

11. 权利要求 9 的方法，其中活性氧类是抗体产生的臭氧。

12. 权利要求 9 的方法，其中活性氧类用化学探针进行检测。

13. 权利要求 12 的方法，其中化学探针是能够被氧化并产生可检测氧化产物的烯烃。

14. 权利要求 12 的方法，其中化学探针是 3-乙烯基-苯甲酸、4-乙烯基-苯甲酸、靛蓝胭脂红、均二苯代乙烯或胆固醇。

15. 权利要求 13 的方法，其中对化学探针的氧化产物进行检测以确

定嗜中性粒细胞样品中是否存在活性氧类。

16. 权利要求 13 的方法，其中氧化产物通过高压液相色谱法、质谱法、紫外光分光光度法、可见光分光光度法、液相色谱法、气相光谱测定法或液相色谱结合质谱法进行检测。

17. 鉴定能够调节嗜中性粒细胞活性的试剂的方法，其包括：(a)将从哺乳动物获得的嗜中性粒细胞样品暴露于测试试剂；(b)活化嗜中性粒细胞样品中的嗜中性粒细胞；和(c)定量嗜中性粒细胞样品所产生的活性氧类的量，其中活性氧类是臭氧。

18. 权利要求 17 的方法，其中该方法进一步包括定量未暴露于测试试剂但来自相同哺乳动物的嗜中性粒细胞样品所产生的活性氧类的量。

19. 权利要求 17 的方法，其中嗜中性粒细胞样品是体液。

20. 权利要求 19 的方法，其中体液是全血、滑膜液或淋巴液。

21. 权利要求 17 的方法，其中嗜中性粒细胞样品是组织样品。

22. 权利要求 17 的方法，其中活性氧类是嗜中性粒细胞产生的臭氧。

23. 权利要求 17 的方法，其中活性氧类是抗体产生的臭氧。

24. 权利要求 17 的方法，其中活性氧类的量用化学探针进行定量。

25. 权利要求 24 的方法，其中化学探针是能够被氧化并产生可检测氧化产物的烯烃。

26. 权利要求 24 的方法，其中化学探针是 3-乙烯基-苯甲酸、4-乙烯基-苯甲酸、靛蓝胭脂红、均二苯代乙烯或胆固醇。

27. 权利要求 24 的方法，其中对化学探针的氧化产物进行定量。

28. 权利要求 27 的方法，其中氧化产物是通过高压液相色谱法、质谱法、紫外光分光光度法、可见光分光光度法、液相色谱法、气相光谱测定法或液相色谱结合质谱测定法进行定量的。

抗体或嗜中性粒细胞介导的臭氧产生

政府支持

致力于本发明的研究得到来自国立卫生研究所，GM43858，PO1CA277489 的资助。因此，美国政府可以享有本发明中的某些权利。

发明领域

本发明总体上涉及通过检测抗体介导的或嗜中性粒细胞介导的活性氧类的产生而在体内或体外检测免疫或炎性反应的领域。本发明还提供了通过检测嗜中性粒细胞-介导的活性氧类的产生而检测嗜中性粒细胞活化的方法。本发明还涉及鉴定能够调节免疫反应或调节嗜中性粒细胞活化的试剂的方法。

背景

整个上世纪的研究已经形成了关于抗体在免疫系统中的作用的一致认识。该认识的本质是抗体分子不产生任何可检测的产物。相反，抗体分子已经被当作一种结合分子，它仅标记其靶标或者仅活化其它分子或生物系统以应答抗原-抗体复合体。因此，已经认为抗体自身不具有任何催化活性而仅用来标记外源物质以通过补体级联反应和/或吞噬作用进行去除 (Arlaud 等, Immunol. Today, **8**, 106-111 (1987); Sim 和 Reid, Immunol. Today, **12**, 307-311 (1991))。

而且，尽管嗜中性粒细胞炎性反应对于破坏侵入机体的细菌是必需的，但不适当的嗜中性粒细胞活化还能够引起几个问题。例如，如果嗜中性粒细胞在吸引至肺时是严格接触过抗原的，它们能够将破坏性酶类释放入肺组织。这能够导致成人呼吸窘迫综合征(ARDS) (Weiland 等, Amer. Rev.

Respir. Dis., 133:218-225, 1986; Idell 等, Am. Rev. Respir. Dis., 132:1098-1105, 1985)。每年有 150,000 到 200,000 个美国人患有 ARDS, 即使是最好的临床设施死亡率仍为 50-80%(Balk 和 Bone, 1983)。ARDS 起因于细菌感染, 血压突然严重下降(休克), 以及对身体的多种其他损伤。

因此, 需要改进的方法从而使能够快速并有效地检测嗜中性粒细胞活化、炎性反应和其他免疫反应。

发明概述

本发明提供了利用新近发现的抗体和嗜中性粒细胞还原单线态氧为活性氧类的能力的方法。根据本发明, 当暴露于单线态氧($^1\text{O}_2^*$)时, 抗体和嗜中性粒细胞能够产生臭氧(O_3)和其它活性氧类。抗体实现此种转换不需要免疫系统的其它任何成分, 也就是不需要补体级联反应或吞噬作用。而且, 根据本发明, 由抗体包被的哺乳动物白细胞诸如嗜中性粒细胞也能够产生臭氧。

因此本发明提供了基于直接检测活性氧类的经改进测定方法, 该活性氧类是通过抗体催化和嗜中性粒细胞催化的反应产生的。

在一个实施方案中, 本发明提供了测定哺乳动物中免疫反应或炎性反应的方法, 包括: (a)施用活性氧类的适当化学探针; (b)从哺乳动物获得样品; 和(c)分析样品中化学探针的氧化产物。

在另一个实施方案中, 本发明提供了嗜中性粒细胞活化的体外测定方法, 包括: (a)从哺乳动物获得嗜中性粒细胞样品; (b)活化嗜中性粒细胞样品中的嗜中性粒细胞; 和(c)观察在嗜中性粒细胞样品中是否能够检测到活性氧类。

也在另一个实施方案中, 本发明提供了鉴定能够调节嗜中性粒细胞活性的试剂的方法, 其包括: (a)从哺乳动物获得嗜中性粒细胞样品; (b)将嗜中性粒细胞样品暴露于测试试剂; (c)活化嗜中性粒细胞样品中的嗜中性粒细胞; 和(d)定量嗜中性粒细胞样品所产生的活性氧类的数量。

能够被检测的活性氧类包括任何抗体或嗜中性粒细胞所产生的活性氧

类。例子包括,但不限于,超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($OH^{\cdot}$)、氢过氧自由基(peroxy radical)、过氧化氢(H_2O_2)或臭氧(O_3)。此种强活性氧类的存在预示着增强的体液免疫反应(例如增加的循环抗体)或增强的细胞或组织相关的炎症反应(例如嗜中性粒细胞活化)。

附图简述

图1说明氧依赖的吞噬细胞杀微生物作用。标出了 1O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 的互变。该活性也是抗体固有能力。

图2说明参与除臭剂红(amplex red)测定的化学转化步骤。抗体(在该图式附图中鉴定为 IgG)将 1O_2 转化为 $O_2^{\cdot-}$, $O_2^{\cdot-}$ 能够自发形成过氧化氢。存在辣根过氧化物酶时,过氧化氢脱乙酰化并氧化除臭剂红底物,从而产生在587nm处发射荧光的分子。

图3显示存在(□)或缺乏(Δ)鼠单克隆抗体 IgG EP2-19G2 (20 μM)时在 PBS (pH 7.4)中 H_2O_2 产生的最初时间过程。误差线表示数据偏离平均值的范围。

图4显示紫外线照射后鼠抗体 1D4 Fab 片段单晶体的荧光显微照片和使用除臭剂红试剂检测 H_2O_2 。

图5说明抗体-介导的活性氧类催化作用的时间过程和所需要的反应条件。图5A提供了当存在(O)或缺乏(♦)31127抗体(马 IgG, 20 μM)时,使用血卟啉(40 μM)和可见光在 PBS (pH 7.4)中形成 H_2O_2 的时间过程。图5B提供了当存在1127抗体(马 IgG, 6.7 μM)时,在无添加物的 PBS (pH 7.4) (□)或含 NaN_3 的 PBS (pH 7.4) (O, 100 μM)或 PBS (pH 7.4)的 D_2O 溶液(◇)中使用血卟啉(40 μM)和可见光产生 H_2O_2 的时间过程。图5C说明了抗体蛋白质浓度(31127, 马 IgG)对 H_2O_2 形成速率的影响。图5D说明氧浓度对通过31127抗体(马 IgG, 6.7 μM)的 H_2O_2 产生速率的影响。全部点为至少两次重复测定的平均值。误差线是实验测量值偏离平均值的范围。

图6是显示所测得的一组蛋白质的最初 H_2O_2 形成速率的条形图并与抗体相比较(数据来自表1)。全部点为至少两次重复测定的平均值。误

差线是实验测量值偏离平均值的范围。OVA, 鸡蛋卵清蛋白; SOD, 超氧化物歧化酶。

图 7A 说明在 PBS (pH 7.4) 中马 IgG (6.7 μM) 的紫外线照射下的 H_2O_2 的形成速率。图 7 B 说明马 IgG 在 326 nm (激发=280 nm) 下的荧光发射, 同时测量 H_2O_2 形成。

图 8 表明抗体在多种条件下的 H_2O_2 的产生。

图 8 A 说明通过免疫球蛋白和非免疫球蛋白的 H_2O_2 的产生。测定是通过对透照灯(Fischer Biotech)上的密封玻璃瓶管内磷酸缓冲盐(PBS) [10 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl (pH 7.4)] 中的单种抗体/蛋白质样品(100 μL , 6.7 μM) 在 20EC 的环境氧条件下进行近紫外照射(312 nm, 800 $\mu\text{W cm}^{-2}$) 来实现的。在整个测定过程中以一定的时间间隔取出各等份(10 μL)。通过除臭剂红方法测定 H_2O_2 浓度。每个数据点报道为至少两次重复测量的平均值 $\pm$ SEM: ●多克隆(poly)免疫球蛋白(Ig) G, 人; ○ poly-IgG, 马; □ poly-IgG, 绵羊; ▽单克隆(m) IgG (WD1-6G6), 鼠; △ poly-IgM, 人; ◇ mIgG (92H2), 鼠; ■ β -半乳糖苷酶(β -gal); ▲ 鸡卵清蛋白(OVA); ▼ α -乳清蛋白(α -lact); ◆牛血清清蛋白(BSA)。

图 8B 说明通过绵羊-IgG (6.7 μM , 200 μL) 长期产生 H_2O_2 。在 96-孔石英板的一个密封孔内的 PBS 中近紫外照射 8 小时。 H_2O_2 浓度如图 8A 所述进行测定。

图 8 C 表明过氧化氢酶随着时间对抗体催化的 H_2O_2 产生的影响。鼠单克隆抗体 PCP-21H3 (IgG) (6.7 μM , 200 μL) 溶液, 在 96-孔石英板的一个密封孔内的 PBS 中被照射 510 分钟。通过除臭剂红方法测定 H_2O_2 并且然后通过加入固化于 Eupergit C 上的过氧化氢酶(10 mg, 288 mU) 将 H_2O_2 破坏掉。通过过滤将过氧化氢酶去除并将抗体溶液再次照射 420 分钟。形成速率(0-510 分钟) = 0.368 $\mu\text{M 分钟}^{-1}$ ($r^2 = 0.998$); 形成速率(511-930 分钟) = 0.398 $\mu\text{M 分钟}^{-1}$ ($r^2 = 0.987$)。

图 8D 表明 H_2O_2 浓度对马 poly-IgG 抗体催化的最大形成速率百分比的影响。此图可以确定 H_2O_2 对马 poly-IgG 光致 H_2O_2 产生的 IC_{50} 。用多

种浓度 H_2O_2 (0-450 μM) 孵育马 IgG 溶液 (6.7 μM) 并且如图 8A 中所述测定 H_2O_2 的起始形成速率。该图是 H_2O_2 形成速率对 H_2O_2 浓度的曲线图并显示 IC_{50} 为 225 μM 。

图 8 E 表明 H_2O_2 对 H_2O_2 的抗体光致产生的长期抑制作用和去除 H_2O_2 后其活性的完全重建。分析涉及马 poly-IgG (6.7 mM 在 PBS pH 7.4 中) 在 H_2O_2 (450 μM) 存在下的持续 360 分钟的起始 U.V. 照射。 H_2O_2 随后被过氧化氢酶(固定化于 Eupergit C)去除并且 poly-IgG 样品用 UV 线再次进一步照射 480 分钟。在每个测定中的 H_2O_2 的形成用除臭剂红测定法进行测定。

图 8 F 表明过氧化氢酶对 H_2O_2 产生的影响。如图 8 C 所述 $\alpha\beta$ -TCR (6.7 μM , 200 μL) 溶液被照射 360、367 和 389 分钟。测定了每次照射所产生的 H_2O_2 并且如图 8 C 所述将产生的 H_2O_2 破坏掉。形成速率(0-360 分钟) = 0.693 μM 分钟⁻¹ ($r^2 = 0.962$)。在发展曲线中高于 200 μM 的曲率与预期的被 H_2O_2 的抑制一致(见后); 形成速率(361-727 分钟) = 0.427 μM 分钟⁻¹ ($r^2 = 0.987$); 形成速率(728-1117 分钟) = 0.386 μM 分钟⁻¹ ($r^2 = 0.991$)。

图 9 表明天然 4C6 Fab(彩图中的亮蓝和粉红)和 H_2O_2 存在时的 4C6 Fab(彩图中的深蓝和红色)叠置。

对于图 9 A, 将天然 4C6 晶体在 4 mM H_2O_2 中浸泡 3 分钟, 并且立即速冻以在 SSRL BL 9-1 上收集数据。在 H_2O_2 存在时清楚地保存了二级和三级结构的整体结构完整性(RMSD $\text{C}\alpha = 0.33$ Å, 侧链 = 0.49 Å)。在 CNS 中计算 RMSD。

图 9B 说明苯甲酸结合到 Fab 4C6。高分辨率 X 射线结构显示 Fab 4C6 可与苯甲酸进行交叉反应。有和没有 H_2O_2 的 4C6 结合位点的叠置表明甚至结合位点内的侧链构象也是保守的(在彩图中亮色和暗色侧链分别对应+和- H_2O_2)。而且, 苯甲酸的清晰电子密度表明 Fab 4C6 的结合特性在 4mM H_2O_2 中保持不变。电子密度图是在 1.5σ 处所描绘的 $2f_0 - f_c\sigma$ 加权图, 并且在 Bobscript 中产生图。

图 10A 显示在二极管阵列 HP8452A 分光光度计于 Abs_{max} 280 nm 处测量的马多克隆 IgG 的吸收光谱。

图 10 B 提供了马多克隆 IgG 的作用光谱, 在波长 260 和 320 nm 之间的作用光谱表明 H_2O_2 形成的最大活性在 280 nm 处。重复进行测定并且该测定涉及将抗体溶液[6.7 μM 溶于 PBS (pH 7.4)]加入到石英管中, 然后将该石英管放置于 SLM 荧光分光光度计的氙弧灯和单色器所产生的光束中 1 小时。通过除臭剂红测定法测量 H_2O_2 浓度。

图 11A 说明随着时间由色氨酸(20 μM)产生 H_2O_2 。产生条件和测定步骤如图 8A 所述。

图 11 B 提供了氯离子对抗体-介导的光致 H_2O_2 产生的影响。将绵羊 poly-IgG ■ (6.7 μM , 200 μL)或马 poly-IgG ▲ (6.7 μM , 200 μL)的溶液冷冻干燥至干燥并且然后将其溶于去离子水或 NaCl (水溶液)中, 以至于氯离子的终浓度为 0-160 mM。然后将样品在 20 EC 环境氧条件下于透照灯(800 $\mu\text{W cm}^{-2}$)的密封玻璃管内进行照射并重复。在整个测定过程中取出多个等份(10 μL)并通过除臭剂红测定法测定 H_2O_2 浓度。 H_2O_2 形成速率描绘为每种抗体样品对[NaCl]的平均值 $\pm$ S.E.M.。

图 11C 说明在含 EDTA 缓冲液中透析对抗体-介导的光致产生 H_2O_2 的影响。将在含 EDTA (20 mM)的 PBS 中透析之前和之后的两个抗体制剂即鼠单克隆抗体 PCP21H3 和马多克隆 IgG 的 H_2O_2 光产生进行比较。产生条件和测定步骤如图 8A 所述。每个数据点报道为至少重复测量的平均值 $\pm$ SEM: [●透析之前鼠 mIgG PCP21H3; ■ 透析之后鼠 mIgG PCP21H3; ▲透析之前马 poly-IgG; ◆ 透析之后马 poly-IgG]。

图 12 提供了用含 ^{16}O 的 H_2O_2 或用含 ^{18}O 的 H_2O_2 对底物三羧乙基膦 (TCEP)的氧化作用的质谱。ESI (阴极)质谱被作为 H_2O_2 氧化作用后的 TCEP [(M-H) $^-$ 249]及其氧化物[(M-H) $^-$ 265 (^{16}O)和(M-H) $^-$ 267 (^{18}O)]的质谱。

图 12A 提供了在 H_2^{18}O (98 % ^{18}O) PB 中 $^{16}\text{O}_2$ 有氧条件下照射绵羊 poly-IgG (6.7/ μM)后 TCEP 及其氧化物的质谱。产生了含 ^{16}O 的 TCEP (在 265 处较大的峰)和含 ^{18}O 的 TCEP (在 267 处较小的峰)的混合物。

图 12B 提供了在 $\text{H}_2^{16}\text{OPB}$ 中富含 $^{18}\text{O}_2$ (90 % ^{18}O)有氧条件下照射绵羊

poly-IgG (6.7 μ M)后 TCEP 及其氧化物的质谱。产生了含 ^{16}O 的 TCEP (在 265 处较小的峰)和含 ^{18}O 的 TCEP (在 267 处较大的峰)的混合物。

图 12C 提供了在 $\text{H}_2^{16}\text{OPB}$ 中 $^{16}\text{O}_2$ 有氧条件下进行 poly-IgG 照射后 TCEP 及其氧化物的质谱。测定条件和步骤如方法和材料(实施例 II)中所述除了由 H_2^{16}O 替换 H_2^{18}O 。仅观察到含 ^{16}O 的 TCEP(在 265 处的大峰)。

图 12D 提供了在 20EC 于 $\text{H}_2^{18}\text{OPB}$ 中缺氧条件下(脱气并在氩气条件下)照射绵羊 poly-IgG (6.7 μ M)和 $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ (200 μ M)后 TCEP 及其氧化物的质谱。TCEP 的加入如方法和材料(实施例 II)中所述。仅观察到含 ^{16}O 的 TCEP(在 265 处的大峰)。

图 12E 提供了在 $\text{H}_2^{18}\text{OPB}$ 中 $^{16}\text{O}_2$ 有氧条件下照射 3-甲基吲哚(500 μ M)后 TCEP 及其氧化物的质谱。仅观察到含 ^{16}O 的 TCEP(在 265 处的大峰)。测定条件和步骤如方法和材料(实施例 II)中所述,除了由于 3-甲基吲哚的分子量太小而不进行大小排除过滤之外。因此,将 TCEP 加入至含 3-甲基吲哚的 PB 溶液中。

图 12F 提供了在 $\text{H}_2^{18}\text{OPB}$ 中 $^{16}\text{O}_2$ 有氧条件下照射 β -gal (50 μ M)后 TCEP 及其氧化物的质谱。仅观察到含 ^{16}O 的 TCEP(在 265 处的大峰)。测定条件和步骤如方法和材料(实施例 II)中所述。

图 13 显示如材料和方法(实施例 II)中所述的抗体 4C6 内的 Xe 结合位点。

图 13A 提供了彩图中以粉色的轻链和蓝色的重链表示的 Fab 4C6 Ca 示踪的标准侧视图。使用在 5σ 处描绘的最初 F_0 - F_c 电子密度图显示三个结合的氙原子(彩图中的绿色)。

图 13B 提供了保守的氙位点 1 周围的 Fab 4C6 和 2C $\alpha\beta$ TCR (PDB/TCR)的覆盖面图。 V_L (彩图中的粉色)和侧链(彩图中的黄色)的示踪骨架 C_α 与 2C $\alpha\beta$ TCR 相应的 V_α (彩图中的红素和金色)是重叠的(使用 Insight2000 产生的图)。

图 14 图解说明通过抗体杀死细菌。

图 14A 提供了显示在不同实验条件下大肠杆菌 XL1- blue 和 O112a,c

菌株的存活率的柱形图。存活率报道为恢复的菌落形成单位(CFU)，以实验开始($t=0$ 分钟)处的 CFU 的百分数表示。黑色柱和浅灰色柱对应相同实验条件，除了浅灰色组(2, 4, 6, 8, 10 和 12)暴露于可见光(2.7 mW cm^{-2})60 分钟，而黑色组(1, 3, 5, 7, 9 和 11)放置于黑暗 60 分钟。细菌细胞密度为大约 10^7 个细胞/mL。所报道的每个数据点是在以下条件下大肠杆菌 XL1-blue(组 1-6)和 O112a,c(组 7-12)的平均值 $\pm$ S.E.M. ($n=6$)。组 1-2 XL1-blue 细胞置于 PBS 中, pH 7.4, 4°C 。组 3-4 HPIX ($40 \mu\text{M}$)，PBS 中的 XL1-blue 细胞, pH 7.4, 4°C 。组 5-6 XL1-blue-特异单克隆抗体(25D11, $20 \mu\text{M}$)、血卟啉 IX ($40 \mu\text{M}$)、XL1-blue 细胞置于 PBS, pH 7.4, 4°C 。组 7-8 O112 a,c 细胞置于 PBS, pH 7.4, 4°C 。组 9-10 HPIX (40°M)，O112 a,c 细胞置于 PBS, pH 7.4, 4°C 。组 11-12 O112a,c-特异单克隆抗体(15404, $20 \mu\text{M}$)、血卟啉 IX ($40 \mu\text{M}$)、O112 a,c 细胞置于 PBS, pH 7.4, 4°C 。

图 14B 图解说明抗体浓度对大肠杆菌 O112a,c 存活率的影响。所用抗体为 O112a,c-特异单克隆抗体 15404。所报道的每个数据点是平均值 $\pm$ S.E.M ($n=3$)。对应 50 %细胞杀伤(EC_{50})的 15404 抗体浓度为 $81 \pm 6 \text{ nM}$ 。

图 14C 图解说明照射时间对大肠杆菌 XL1-blue-特异鼠单克隆抗体 12B2 的杀菌作用的影响。该图提供了当存在血卟啉 IX ($40 \mu\text{M}$)和 12B2 ($20 \mu\text{M}$)时大肠杆菌 XL1-blue 的存活率与照射时间(2.7 mW cm^{-2})的关系。所报道的每个数据点是平均值 $\pm$ S.E.M ($n=3$)。对应 50 %细胞杀伤的照射时间为 30 ± 2 分钟。

图 14D 说明抗体驱动杀菌作用对血卟啉 IX 浓度的依赖性。所用抗体为大肠杆菌 XL1-blue-特异鼠单克隆抗体 25D11。该图提供了暴露于一定血卟啉 IX 浓度范围与大肠杆菌 XL1-blue 的存活率的关系。使用了以下条件：XL1-blue 细胞置于 PBS, pH 7.4, 4°C ，黑暗 60 分钟($>$)。XL1-blue 细胞置于 PBS, pH 7.4, 4°C ，白光(2.7 mW cm^{-2}) (Δ)。25D11 ($20 \mu\text{M}$)，XL1-blue 细胞置于 PBS, pH 7.4, 4°C ，黑暗 60 分钟($\diamond$)。25D11 ($20 \mu\text{M}$)，XL1-blue 细胞置于 PBS, pH 7.4, 4°C 白光(2.7 mW cm^{-2})照射 60 分钟($\diamond$)。

图 15 提供了大肠杆菌 O112a,c 细胞暴露于置于 PBS 中的抗原特异的

鼠单克隆 IgG (15404, 20 μM)、血卟啉 IX (40 μM)并可见光 4 $^{\circ}\text{C}$ 照射 1 小时(< 5 % 存活)后, 大肠杆菌 O112a,c 细胞的电子显微镜照片。为了看到抗体吸附的位点, 在完成杀菌测定之后加入金标记的山羊抗鼠抗体。观察到抗原非特异性抗体的杀菌活性潜能与抗原特异性抗体非常相似。一般在该测定系统中 20 μM 抗体 (非特异) 杀菌率为 > 95 % 。

图 16A-C 提供了大肠杆菌 XL-1 blue 细胞暴露于 PBS 中的非特异性鼠单克隆 IgG 抗体(84G3, 20 μM)、血卟啉 IX (40 μM)并可见光 4 $^{\circ}\text{C}$ 照射 1 小时(1 %存活)后, 大肠杆菌 XL-1 blue 细胞的电子显微镜照片。图 16A 中的箭头指向细胞膜与细胞质内含物的初步分离。图 16D 提供了血清型大肠杆菌 O112a,c 细胞暴露于 PBS 中的抗原特异的鼠单克隆 IgG (15404, 20 μM)、血卟啉 IX (40 μM)并可见光室温照射 1 小时(< 5 % 存活)后, 血清型大肠杆菌 O112a,c 细胞的电子显微镜照片。使用本领域中可用的方法进行金标记。

图 17A 说明了过氧化氢酶对抗体针对大肠杆菌 XL1-blue 的杀菌作用的影响[报道为恢复的菌落形成单位(CFU), 以实验开始($t=0$ 分钟)时 CFU 的百分数表示]。过氧化氢酶将 H_2O_2 转化为水(H_2O)和分子氧(O_2)。每组用白光(2.7 mW cm^{-2}) 4 $^{\circ}\text{C}$ 照射 60 分钟。细菌细胞密度为 $\sim 10^7$ 个细胞/mL。实验组(1- 7)处理如下: 组 1 大肠杆菌 XL1-blue 细胞和血卟啉 IX (40 μM) 置于 PBS (pH 7.4)。组 2 大肠杆菌 XL1-blue 细胞和非特异鼠单克隆抗体 84G3 (20 μM)置于 PBS (pH 7.4)。组 3 大肠杆菌 XL1-blue 细胞、血卟啉 IX (40 μM) 和单克隆抗体 84G3 (20 μM)置于 PBS (pH 7.4)。组 4 大肠杆菌 XL1-blue 细胞、血卟啉 IX (40 μM)、单克隆抗体 84G3 (20 μM)和过氧化氢酶(13mU/mL)置于 PBS (pH 7.4)。组 5 大肠杆菌 XL1-blue 细胞和特异兔多克隆抗体(20 μM) 置于 PBS (pH 7.4)。组 6 大肠杆菌 XL1-blue 细胞、血卟啉 IX (40 μM)和特异兔多克隆抗体(20 μM) 置于 PBS (pH 7.4)。组 7 大肠杆菌 XL1-blue 细胞、血卟啉 IX (40 μM)、特异兔多克隆抗体(20 μM)和过氧化氢酶(13mU/mL)置于 PBS (pH 7.4)。每个点报道为多次实验($n=6$)的平均值 $\pm$ S.E.M.。符号**表示在相同时间点相对对照 p 值 < 0.01。在任意

黑暗对照中均没有观察到杀菌活性(数据未显示)。

图 17B 说明 H_2O_2 对大肠杆菌 XL1-blue 和 O112a,c 血清型的浓度依赖性毒性。垂直带阴影的线是使用上述用于图 14 和 Hofman 等, *Infect. Immun.* 68, 449 (2000) 中的条件在 60 分钟的孵育过程中通过抗体产生的预期 H_2O_2 的浓度。 $35 \pm 5 \mu\text{M}$ H_2O_2 的值是由至少两次重复的 12 个不同单克隆抗体的测定所确定的平均值。

图 18 说明存在或缺乏过氧化氢酶时在 u.v. 照射(312 nm , 0.8 mW cm^{-2}) PBS (pH 7.4) 中的抗体期间自靛蓝胭脂红 1 (1 mM) 光致产生磺酸靛红 2 的过程。Steinbeck 等, *J. Biol. Chem.* 267, 13425 (1992)。每个点报道为至少两次重复测定的平均值 $\pm$ S.E.M.。使用 Graphpad Prism v.3.0 软件进行线性回归分析。在以下条件下观察了磺酸靛红 2 (ν) 的形成速率: 绵羊多克隆 IgG (20 μM) ($\bullet$) $\nu = 34.8 \pm 1.8 \text{ nM/分钟}$; 鼠单克隆抗体 33F12 (20 μM) ($\square$) $\nu = 40.5 \pm 1.5 \text{ nm/分钟}$; 绵羊多克隆 IgG (20 μM) 和可溶过氧化氢酶(13 mU/mL) (Δ) $\nu = 33.5 \pm 2.3 \text{ nM/分钟}$; 鼠单克隆抗体 33F12 (20 μM) 和可溶过氧化氢酶(13 mU/mL) (∇) $\nu = 41.8 \pm 1.2 \text{ nM/分钟}$ 。

图 19A-C 提供了在不同条件下室温于 H_2^{18}O ($> 95\%^{18}\text{O}$) 磷酸盐缓冲液(PB, 100 mM, pH 7.4) 中靛蓝胭脂红 1 (1 mM) 氧化期间所产生的磺酸靛红 2 [(MH)- 226, (M-H)- 228 (^{18}O) 和 (M-H)- ($2 \times ^{18}\text{O}$)] 的电喷射离子化作用(阴极)质谱。图 19A 提供了在通过化学臭氧分解作用 5 分钟氧化靛蓝胭脂红 1 (600 μM 于 PB 中) 期间所产生的磺酸靛红 2 的质谱。图 19B 提供了在通过用白光(2.7 mW cm^{-2}) 照射血卟啉 IX (40 μM) 和绵羊 poly-IgG (20 μM) 4 小时氧化靛蓝胭脂红 1 期间所产生的磺酸靛红 2 的质谱。图 19C 提供了通过用白光(2.7 mW cm^{-2}) 照射血卟啉 IX (40 μM) 4 小时氧化靛蓝胭脂红 1 期间所产生的磺酸靛红 2 的质谱。

图 20A 说明通过用 PBS (pH 7.4) 中的肉豆蔻酸佛波酯(1 $\mu\text{g/mL}$) 在 37°C 活化人嗜中性粒细胞(PMN, 1.5×10^7 个细胞/mL) 而氧化靛蓝胭脂红 1 (30 μM) ($>$) 和形成 2 ($\square$) 的时间过程。使用未活化的 PMN 时无靛蓝胭脂红 1 氧化作用发生(数据未显示)。如前所述制备嗜中性粒细胞。次氯酸(HOCl)

是已知的由嗜中性粒细胞所产生的氧化剂。在我们的实验中，PBS (pH 7.4) 中的 NaOCl (2 mM) 氧化 1 (100 μ M) 但不断裂 1 的双键以产生磺酸靛红 2。

图 20B 说明在图 20A 中所述条件下，通过活化人嗜中性粒细胞氧化靛蓝胭脂红 1 期间所产生的磺酸靛红 2 的阴离子电喷射质谱。

发明详述

本发明涉及抗体和嗜中性粒细胞具有中途拦截单线态氧并将其转化为活性氧类的能力的发现。根据本发明，此类活性氧类是免疫活化、炎症反应或嗜中性粒细胞活化的指示剂。由抗体和嗜中性粒细胞所产生的活性氧类的例子包括，但不限于，臭氧(O_3)、超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2) 或羟自由基($OH^{\cdot}$)。

抗体和嗜中性粒细胞转化单线态氧为活性氧类的能力提供了一种用于检测免疫活化、炎症反应或嗜中性粒细胞活化的方法。因此，本发明提供了用于检测免疫活化、炎症反应或嗜中性粒细胞活化的多种体外或体内方法。也考虑了用于鉴定能够调节免疫系统和/或嗜中性粒细胞活化的因子的方法。

定义

缩略语：(HP) 血卟啉；(PBS) 磷酸缓冲盐；(OVA) 鸡蛋卵清蛋白；(SOD) 超氧化物歧化酶；(PO) 过氧化物酶；(phox) 吞噬细胞氧化酶；(HRP) 辣根过氧化物酶；(MS) 质谱分析；(AES) ICP-原子发射光谱法；(MS) 质谱；(QC) 量子化学。

此处术语“试剂”用于指化学化合物，化学化合物的混合物，生物大分子，或由生物材料诸如细菌、植物、真菌或动物（尤其是哺乳动物）的细胞或组织制备的提取物。通过此处所述的筛选测定法对试剂作为抗体或嗜中性粒细胞调节剂的潜在活性进行了评价。

如此处所用的术语“有效量”、“有效降低量”、“有效改善量”、“有效杀菌量”、“有效组织损伤抑制量”、“治疗有效量”等等术语是

鉴定足以获得预期生物学效应例如疾病、失调、病症等等的治疗或疾病、失调、病症等等的症状的减轻的量。在治疗方法中抗体的此种有效量是导致降低、逆转、改善或抑制微生物感染的量。

“工程抗体分子”是已经通过重组技术所产生的多肽。此类分子可包括能够催化从单线态氧产生至少一种活性氧类的活性中心。此类工程抗体分子可具有包含于多肽结构内的活性引哚基。此种分子的引哚基可以作为色氨酸残基存在。工程抗体分子还可以包含非天然氨基酸和连接体以及模拟肽。工程抗体分子还包括进行了修饰以去除活性中心以致于其基本上不能够产生活性氧类的抗体。

如此处所使用，术语“表位”意思是指抗原中能与抗体的互补位结合的任何抗原决定簇。表位决定簇通常由诸如氨基酸或糖侧链分子的化学活性表面基团组成并且通常具有特异的三维结构特性以及特异的电荷特性。抗原可包括多肽、脂肪酸、脂蛋白、脂类、化学品、激素等等。在一些实施方案中，抗原包括，但不限于，来自诸如细菌的微生物或者诸如人免疫缺陷病毒、流感病毒、疱疹病毒、乳头瘤病毒、人T-细胞白血病病毒等等病毒的蛋白质。在其它实施方案中，抗原包括，但不限于，表达于癌细胞例如肺癌、前列腺癌、结肠癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、膀胱癌、骨癌、白血病、淋巴瘤、脑癌等等的蛋白质。本发明抗原还包括化学品例如乙醇、四氢大麻酚、LSD、海洛因、可卡因等等。

术语“调节”是指增强或抑制本发明抗体或工程抗体分子的功能特性的能力。此种调节可以增加或降低通过抗体、嗜中性粒细胞或工程抗体分子所产生的至少一种活性氧类。

“非天然”氨基酸包括D-氨基酸和天然情况下不存在的氨基酸，以4-羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰蛋氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟赖氨酸和其它此类氨基酸和亚氨基酸为例进行说明。

术语“模拟肽”或“肽模拟物”描述肽类似物，例如那些通常作为非肽药物用于制药工业的肽类似物，其特性与模板肽的特性相似。(Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15: 29 (1986)和 Evans 等, J. Med. Chem., 30:1229

(1987))。通常,模拟肽与示例多肽(即具有生物化学特性或药理学活性的多肽)在结构上是相似的,但具有一个或多个通过本领域已知的方法任选地由连接键例如--CH₂NH--、--CH₂S--、--CH₂--CH₂--、--CH=CH--(顺式或反式)、--COCH₂--、--CH(OH)CH₂--和--CH₂SO--所替换的肽键。肽模拟物较天然多肽具有的优点可以包括生产更加经济、更大的化学稳定性、可改变的特异性、降低的抗原性和增强的药理学特性,例如半寿期、吸收、潜能和效力。

如此处所使用,术语“可药用”、“生理可耐受”及其它们的语法学上的变体,当它们指组合物、载体、稀释剂和试剂时,可互换使用并代表能够施用至或于哺乳动物且不产生诸如恶心、头晕、胃不舒服等等的不良生理效应的物质。

术语“蛋白质”和“多肽”用于描述天然蛋白质、肽、蛋白质片段或者蛋白质或多肽的类似物。这些术语可互换使用。

如此处所使用术语“活性氧类”意思是指抗体产生的氧类。这些活性氧类可以具有一个或多个不成对电子,或者因为它们易于与其它分子发生反应而是有活性的。此种活性氧类包括但不限于超氧自由基、过氧化氢、羟自由基、氢过氧自由基、臭氧和其它短寿命的与臭氧有着相同化学标记的三氧加合物。

抗体的催化活性

根据本发明,所有的抗体具有先前未认识的抗体分子自身内在的化学潜能。所有研究的抗体,不管其来源或抗原特异性,能够转化单线态氧为诸如臭氧(O₃)、超氧自由基(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)、氢过氧自由基或羟自由基的活性氧类。因此更全面地认识到抗体是一种值得注意的衍接分子,其正在被发展成为具有在脊椎动物防御外来入侵者的前沿所发生的靶向和催化两种功能。

从单线态氧产生活性氧类的能力存在于完整的免疫球蛋白和诸如 Fab、F(ab')₂ 和 Fv 片段的抗体片段(见实施例)。这种活性不存在于包括 RNaseA、超氧化剂歧化酶和可以被氧化的包曼-毕尔克(Bowman-Birk)

抑制剂蛋白质在内的其它分子(实施例1和表1)。同样,该活性与分子中二硫化物的存在无关,纵使此种二硫化物充分富有能够被氧化的电子(Bent等, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**:2612-2619 (1975))。

如果抗体是变性的则抗体从单线态氧产生活性氧类的能力将消失。这表明抗体的三维结构与产生过氧化物的还原过程有关。

以一种有效并且长期的方式从单线态氧产生活性氧类的能力存在于免疫球蛋白和T细胞受体(实施例II,表1F)。T细胞受体享有一个与抗体相似排列的免疫球蛋白折叠结构域(Garcia等, *Science*, **274**:209 (1996))。然而,拥有这种结构基序对于赋予蛋白质产生过氧化氢的能力方面似乎不是必需的。 β_2 -巨球蛋白是具有这种结构基序的免疫球蛋白超家族的一员,不能够产生过氧化氢(Welinder等, *Mol. Immunol.*, **28**:177 (1991))。

结构研究还表明,在T细胞受体中发现的保守的色氨酸残基存在于与在抗体中发现的结构域相似的结构域中。在抗体和T细胞受体中高度保守的保守色氨酸残基周围的序列和结构表明这些周围的结构也可能在允许从单线态氧至活性氧类的催化作用中起着作用。

此外,根据本发明,当被活化时嗜中性粒细胞能够产生活性氧类。抗体和嗜中性粒细胞的催化活性能够被用作检测免疫反应、炎症反应和嗜中性粒细胞的活化。

用于检测免疫和炎症反应的方法

本发明提供了用于检测基于体液和细胞的免疫和炎症反应的方法。该方法利用新发现的抗体和嗜中性粒细胞还原单线态氧为活性氧类的能力。

在一个实施方案中,本发明提供了用于测定哺乳动物内免疫反应或炎症反应的方法,其包括:(a)施用用于活性氧类的化学探针;(b)从哺乳动物中得到样品;和(c)分析样品中化学探针的氧化产物。

在另一个实施方案中,本发明提供了用于测定嗜中性粒细胞活化的体外测定方法,包括:(a)从哺乳动物中得到嗜中性粒细胞样品;(b)在嗜中性粒细胞样品中活化嗜中性粒细胞;和(c)观察嗜中性粒细胞样品中活性氧类是否被检测到。

也在另一个实施方案中,本发明提供了用于鉴定能调节嗜中性粒细胞活性的试剂的方法,其包括:(a)从哺乳动物中得到嗜中性粒细胞样品;(b)将嗜中性粒细胞样品暴露于受试试剂;(c)在嗜中性粒细胞样品中活化嗜中性粒细胞;和(d)定量由嗜中性粒细胞样品产生的活性氧类的量。

这些测定方法易于实施因为对于这些测定方法的基本要求包括用于活性氧类的化学探针和受试者或受试样品。在一些情况下,可以通过使用作为抗体介导活性氧类产生的底物的单线态氧源来增强活性氧类的产生。然而,单线态氧能够体内产生,因此施用单线态氧源可能没有必要。

能提供单线态氧源的分子包括那些不需要其它因子或诱导物而能够产生单线态氧的分子和当暴露于诱导物后能够产生单线态氧的“敏化剂”分子。不需要其它因子或诱导物而能够产生单线态氧的分子的例子包括但不限于内过氧化物。在一些实施方案中,所使用的内过氧化物可以是蒽-9,10二丙酸内过氧化物。敏化剂分子的例子包括,但不限于蝶呤、黄素、血卟啉、四(4-磺化苯基)卟啉、二吡啶基钌(II)复合体、玫瑰红染料、醌、若丹明染料、酞菁、竹红菌甲素(hypocrellin)、玉红花青苷(rubrocyanin)、喹哪啶蓝(pinacyanol)或别花青苷(allocyanin)。

当暴露于诱导物时敏化剂分子可以被诱导产生单线态氧。一种此种的一类诱导物是光。根据敏化剂的类型和结构,此种光可以是可见光、紫外光或红外线。

使用本发明方法可以检测到的活性氧类包括任何抗体产生的氧类和任何嗜中性粒细胞产生的氧类。此种活性氧类的例子包括,但不限于,超氧自由基(O_2^-)、羟自由基($OH^\bullet$)、氢过氧自由基、过氧化氢(H_2O_2)或臭氧(O_3)。此种强大的活性氧类的存在预示着增强的体液免疫反应(例如增强的循环抗体)或增强的细胞或组织相关的炎症反应(例如嗜中性粒细胞的活化)。可以被检测的免疫和炎症反应的类型在下面有更详细的讨论。

因此本发明提供了用于检测抗体的方法。所有的抗体分子属于一种叫作免疫球蛋白的血浆蛋白质家族。它们基本的结构单元为免疫球蛋白折叠或结构域,在免疫系统和其它生物识别系统中的许多分子中以多种形式被

采用。典型的免疫球蛋白具有四条多肽链，包含称为可变区的抗原结合区，并且包含称为恒定区的非可变区域。

使用本发明的方法可以检测任何抗体。此外，抗体可以是只要能够催化产生活性氧类的多种形式中的任何一种，包括整个免疫球蛋白、Fv、Fab、F(ab')₂ 或其它片段、或包括可变结构域互补决定区(CDR)的单链抗体或其它形式。如此处所使用所有这些术语均归于广义的术语“抗体”内。本发明意在检测任何类型的抗体并且不限于那些能够识别特异抗原并与其起免疫反应的抗体。然而，对于一些应用，抗体或它们的片段对于抗原是免疫特异性的。

如本发明所使用术语“抗体”包括完整的分子还有它们的片段，诸如能够结合到抗原表位的 Fab, F(ab')₂ 和 Fv。这些抗体片段保留了与它们的抗原或受体选择性结合的一些能力并且定义如下：

(1) Fab, 该片段包含抗体分子的单价抗原结合片段，能够通过用木瓜蛋白酶消化整个抗体产生，消化后得到完整的轻链和重链的一部分；

(2) Fab', 抗体分子的一种片段，能够通过对整个抗体用胃蛋白酶处理，然后通过还原产生，得到完整的轻链和重链的一部分；从每一个抗体分子可以得到两个 Fab' 片段；

(3) F(ab')₂, 经用胃蛋白酶处理整个抗体但随后不进行还原处理所得到的抗体片段；F(ab')₂ 是通过二硫键结合在一起的两个 Fab' 片段的二聚体；

(4) Fv, 定义为包含作为两条链表达的轻链可变区和重链可变区的遗传工程片段；和

(5) 单链抗体 (“sFv”), 定义为包含轻链可变区，重链可变区，并用一个适当的多肽接头连接在一起的、作为遗传学融合单链分子的遗传工程分子。

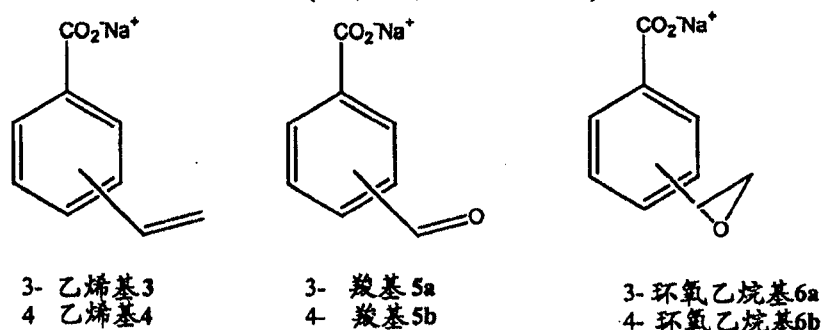
可以检测到任何哺乳动物或鸟类物种的抗体或来源于哺乳动物或鸟类物种的任何样品的抗体。此种哺乳动物和鸟类包括人、狗、猫和家畜，例如马、牛、绵羊、山羊、鸡、火鸡等等。来源于此种哺乳动物和鸟类的样品可以得到用于测试。此种样品可以是，例如，组织样品或诸如全血、血

清、血浆、滑膜液、淋巴、尿、唾液、粘液或眼泪的体液。

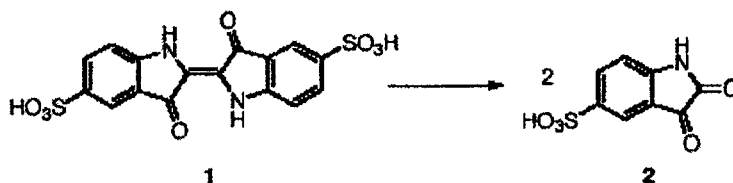
用于活性氧类的化学探针

通过抗体和嗜中性粒细胞产生的活性氧类可以用化学探针来检测。用于活性氧类的化学探针包括任何天然或合成的、含有能够被氧化的烯烃并产生可检测的氧化产物的化合物。用于活性氧类的化学探针的例子包括 3-乙烯基苯甲酸、4-乙烯基苯甲酸、靛蓝胭脂红、均二苯代乙烯、胆固醇等等。当氧化后此种化学探针产生诸如酮、醛、醚的氧化产物和相关产物。

例如, 3-乙烯基苯甲酸(3)和 4-乙烯基苯甲酸(4)化学探针和通过它们与活性氧类反应产生的氧化产物(5a, 5b, 6a 和 6b)的结构描述如下:



另一个用于活性氧类的有用的化学探针的例子是靛蓝胭脂红(1), 活性氧类可以将其转化为环 α -酮酰胺(磺酸靛红, 2)。这些化合物显示如下。



在一些实施方案中, 可以选择本领域的一种技术来检测特定的活性氧类, 例如, 臭氧。例如通过使用靛蓝胭脂红可以检测臭氧并将其与其它活性氧类区分开来。靛蓝胭脂红被臭氧 (O_3) 的裂解可以使用同位素的方法与被 $^1\text{O}_2^*$ 的裂解相区别。例如, 当臭氧是氧化剂时 ^{18}O 掺入到环 α -酮酰胺2的内酰胺羰基。当 $^1\text{O}_2^*$ 是氧化剂时没有发生此种 ^{18}O 掺入到环 α -酮酰胺2的内酰胺羰基。

化学探针的氧化产物可以通过使用高压液相色谱法、质谱测定法、紫外分光光度法、可见分光光度法、液相色谱法、气相色谱法、液相色谱质

谱联用法、诸如荧光显微镜或荧光光谱测定法的荧光方法来检测。如实施例所述开展了可仿效的测定方法。

因此, 在一些实施方案中将化学探针施用于哺乳动物, 并收集哺乳动物体液的样品以确定化学探针的氧化产物是否已经产生。如果此种氧化产物已经产生, 哺乳动物可能发生了炎性反应或增强的免疫反应。在其它实施方案中, 将化学探针加入到来源于哺乳动物体液的体外测定中并且测定该测试混合物以了解化学探针的氧化产物是否存在。此种体外测定法对于例如确定是否体液存在增强了的活化嗜中性粒细胞的水平是有用的。

单线态氧的内源性产生

最近公开的抗体的化学势在体内的作用依赖于关键底物 $^1\text{O}_2^*$ 的可得性。然而, $^1\text{O}_2^*$ 会在多种生理事件中产生并且在体内也是可得的。参见 J. F. Kanofsky *Chem.-Biol. Interactions* 70, 1 (1989) 以及其中的参考文献。例如, 包括再灌注会产生 $^1\text{O}_2^*$ 。X. Zhai 和 M. Ashraf *Am. J. Physiol.* 269 (*Heart Circ. Physiol.* 38) H1229 (1995)。在吞噬作用过程中嗜中性粒细胞的活化也产生 $^1\text{O}_2^*$ 。J. R. Kanofsky, H. Hoogland, R. Wever, S. J. Weiss *J. Biol. Chem.* 263, 9692 (1988); Babior 等, *Amer. J. Med.*, 109:33-34 (2000)。通过照射存在于卟啉症患者皮肤中的无金属卟啉前体也产生单线态氧($^1\text{O}_2$)。

此外, 底物 $^1\text{O}_2^*$ 可以通过吞噬作用或再灌注入足以使抗体产生可检测水平活性氧类的量的方式产生。例如, 吞噬体的体积大约 1.0×10^{-15} 升。因此, 此处所鉴定的反应不需要高度有效, 因为在如此小的体积内仅有几百个分子具有微摩尔浓度。实际上, 吞噬体内 $^1\text{O}_2^*$ 的浓度计算为高达摩尔浓度。E. P. Reeves 等, *Nature* 416, 291 (2002)。关于抗体分子的数量, 通过用细菌和荧光标记抗体进行滴定和免疫金研究能够得出相同的估计 (图 2)。这些分析表明大约有 10^5 个抗体分子结合到每个细菌上并且此数量将相当于吞噬体中毫摩尔的抗体浓度。因此, 通过甚至最保守的估计, 吞噬体内 $^1\text{O}_2^*$ 和抗体的浓度也远远超过那些用于此处所提供的作为例证的实施例中的量。

单线态分子氧($^1\text{O}_2$)也可以在杀微生物过程中以直接和间接方式产生。

单线态分子氧($^1\text{O}_2$)可以直接通过例如黄素蛋白氧化酶的作用产生(Allen, R. C., Stjernholm, R. L., Benerito, R. R. 和 Steele, R. H., 著者 Cormier, M. J., Hercules, D. M. 和 Lee, J. (Plenum, New York), 498-499 页 (1973); Klebanoff, S. J. 在《在寄主抗性中的吞噬细胞》(National Institute of Child Health and Human Development, Orlando, FL) (1974))一书中。作为选择, $^1\text{O}_2$ 可以在杀微生物过程中间接产生, 例如象在吞噬体发现的那样在低 pH 的溶液中 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 的非酶歧化作用 (Stauff, J., Sander, U. 和 Jaeschke, W., 化学发光和生物发光, 著者, Williams, R. C. 和 Fudenberg, H. H. (Intercontinental Medical Book Corp., New York), 131-141 页 (1973); Allen, R. C., Yevich, S. J., Orth, R. W. 和 Steele, R. H., Biochem. Biophys. Res. Commun., 60, 909-917 (1974))。

因为 $^1\text{O}_2$ 具有如此高的反应性, 因此以前认为它在氧清除剂的级联反应中是一个终点。然而, 已经发现抗体和嗜中性粒细胞可以中途拦截 $^1\text{O}_2$ 并且有效地将其还原成活性氧类, 因此提供了一种用于体内检测免疫反应、炎症反应和嗜中性粒细胞活化的手段。

免疫反应和炎症反应

引起免疫反应和炎症反应的原因通常分为感染的和非感染的。人免疫系统中主要的对抗感染和疾病的细胞是血液循环中的白细胞(白血球)。白细胞是骨髓产生的, 其中所述骨髓产生嗜中性粒细胞、血小板、红细胞、淋巴细胞和其它白细胞。大约 50-65% 的白细胞是“嗜中性粒细胞”。当造血系统功能正常时, 血小板和嗜中性粒细胞快速增殖并高速率周转, 而不像淋巴细胞和红细胞那样长寿命。

在免疫反应过程中, B 淋巴细胞的激活和分化导致了能够通过本发明方法检测到的高亲和抗原特异性抗体的分泌。抗体的产生常常与感染有关。根据本发明任何类型的感染均可被检测。通过本发明的方法可以检测涉及细菌和病毒以及其它寄生虫的感染性疾病。可以检测的感染实体的例子包括微生物、病毒、寄生虫等等。可以检测的微生物包括, 但不限于, 诸如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella*

typhi)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、大肠杆菌 O157:H7、痢疾志贺氏菌、铜绿假单胞菌、洋葱假单胞菌 (*Pseudomonas cepacia*)、霍乱弧菌、幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*)、金黄色葡萄球菌的多抗性菌株、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 的万古霉素抗性菌株或粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 的万古霉素抗性菌株的微生物。

可以检测的病毒感染包括,但不限于,诸如甲型肝炎病毒 (hepatitis A virus)、乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus)、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus)、人免疫缺陷症病毒 (human immunodeficiency virus) (HIV)、痘病毒 (poxviruses)、疱疹病毒 (herpes viruses)、腺病毒 (adenoviruses)、乳多空病毒 (papovaviruses)、细小病毒 (parvoviruses)、呼肠孤病毒 (reoviruses)、环状病毒 (orbiviruses)、细小核糖核酸病毒 (picornaviruses)、轮状病毒 (rotaviruses)、甲病毒 (alphaviruses)、风疹病毒 (rubiviruses)、A 型和 B 型流感病毒 (influenza virus type A and B)、黄病毒 (flaviviruses)、冠形病毒 (coronaviruses)、副粘病毒 (paramyxoviruses)、麻疹病毒 (morbilliviruses)、肺病毒 (pneumoviruses)、弹状病毒 (rhabdoviruses)、狂犬病病毒 (lyssaviruses)、正粘液病毒 (orthomyxovirus)、布尼亚病毒 (bunyaviruses)、白蛉病毒 (phleboviruses)、纳伊罗病毒 (nairoviruses)、嗜肝 DNA 病毒 (hepadnaviruses)、沙粒病毒 (arenaviruses)、逆转录病毒 (retroviruses)、肠病毒 (enteroviruses)、鼻病毒 (rhinoviruses) 或线状病毒 (filovirus) 的病毒感染。

炎性反应是血管化的组织对局部损伤的反应。这种损伤可以有多种原因,包括感染和直接的物理损伤。当遭受损伤后,凝固系统和纤溶酶系统与适当的神经系统反应一起开始启动以产生有利于免疫激活的初期反应。提高的血流量、毛细血管渗透性和包括补体级联反应中的那些趋化因子调节嗜中性粒细胞迁移至损伤位点。嗜中性粒细胞是参与急性炎性反应的主要细胞类型,而淋巴细胞和巨噬细胞在慢性炎性反应中更普遍。

可以认为炎性反应是有益的,因为没有它感染不能够被制止,伤口永远不能愈合,并且发生组织和器官的永久性损伤和接下来死亡。

然而，炎症反应也是潜在有害的。在炎症反应过程中活化的嗜中性粒细胞释放多种降解酶包括蛋白水解酶和氧化酶到周围的细胞外环境中。嗜中性粒细胞释放的物质会导致潜在有害的副反应。虽然循环的嗜中性粒细胞的半寿期为 6-8 小时，活化细胞的血管外存活可以接近四天。活化的嗜中性粒细胞的数量和它们活化的程度与组织损伤直接相关。在体内，当嗜中性粒细胞死亡后，它们被组织吞噬细胞识别和吞噬，这是一个炎症反应消退的重要过程。在体外，经过几天的阶段后嗜中性粒细胞经历自发的凋亡，可以通过细胞因子或调节剂对其凋亡进行增强或抑制。对濒死的嗜中性粒细胞的吞噬作用现在被公认为是消退炎症反应的主要方式(J. Savill, *J. Leukoc. Biol.*, 61:375, 1997)。

其中嗜中性粒细胞在组织损伤中起作用的非感染性疾病包括痛风、类风湿性关节炎、关节炎、免疫血管炎、嗜中性粒细胞皮肤病、肾小球肾炎、炎症肠病、心肌梗塞、ARDS（成人呼吸窘迫综合征）、哮喘、肺气肿和恶性肿瘤。炎症反应导致了心肌梗塞、局部缺血再灌注损伤、超敏反应、肾病、异常平滑肌紊乱、肝病、癌细胞的增殖、接受放射治疗的癌症病人的炎症反应、血管炎、肾小球性肾炎、系统性红斑狼疮、成人呼吸窘迫综合征、局部缺血疾病、心脏病、中风、肠局部缺血、再灌注损伤、血色沉着病、获得性免疫缺陷综合征、肺气肿、器官移植、胃溃疡、高血压、先兆子痫、神经性疾病（多发性硬化症、阿尔茨海默氏疾病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化和肌肉萎缩症）、酒精中毒和吸烟相关的疾病相关的病理。

在美国每年有数百万的人进行针对上述疾病的治疗。然而，在一种适当的治疗采用之前，必须检测炎症反应并且分类为感染性的或者非感染性的。

免疫反应调节剂的筛选

本发明还提供了用于鉴定能够调节嗜中性粒细胞活性的试剂的方法。此种方法包括步骤(a)从哺乳动物中得到嗜中性粒细胞样品；(b)将嗜中性粒细胞样品暴露于测试试剂；(c)激活嗜中性粒细胞样品中的嗜中性粒细胞；和(d)定量嗜中性粒细胞样品产生的活性氧类的数量。

其它实施方案包括对由嗜中性粒细胞样品产生的信号同适当的对照进行比较。此种适当的对照可以是没有暴露于测试试剂的同一类型嗜中性粒细胞样品的对照样品。使用这种类型的对照有利于分析测试试剂是否对嗜中性粒细胞的活化有任何影响。

在其它实施方案中，方法还包括将嗜中性粒细胞样品与能够从分子氧产生单线态氧的试剂相接触。此种方法还包括照射样品混合物、化学探针和产生单线态氧的试剂。嗜中性粒细胞上的抗体可以通过抗体还原单线态氧为过氧化物或过氧化氢或臭氧。

照射步骤可以用红外线、紫外线或可见光来完成，其选择依赖于所用的敏化剂。

用此处所述的方法可以检测所形成的活性氧类。

在本发明的一个其它的筛选方法中，也考虑了用于实现与抗原发生抗体免疫反应性的免疫测定法的方法。该方法包含步骤：

A. 在单线态氧产生介质中使固定有组合物的底物，该组合物包含含有抗原或抗体的第一种试剂，与包含能与第一种试剂反应以产生固定化的抗原-抗体复合物的抗原或抗体的第二种组合物相接触，其中在氧存在时抗体能够从单线态氧产生过氧化物或过氧化氢；和

B. 检测抗体产生的活性氧类，从而检测抗体与抗原的免疫反应性。

反应和检测方法如此处所述。在一方面，第一组合物是抗原并且第二组合物是抗体。在相反方面，第一组合物是抗体而第二组合物是抗原。

本发明进一步考虑了用于实施检测抗体对抗原免疫反应性的免疫测定法的相似方法，此处的抗原是固定化的并且与抗体组合物相接触。

此类免疫测定方法是对那些周知的评价抗原-抗体免疫反应性和鉴定抗原和/或抗体的方法的改进。本方法优于先前其它免疫测定方法的优点在于本方法除去了至少一个方法步骤和/或加入了二级标记的免疫反应性分子，标记是放射活性化合物或者是酶的化合物。

在本发明中，最低需求是单线态氧、抗体试剂、抗原试剂、和能与从抗体产生的活性氧类进行反应的化学探针。一种可以被使用的此种反应物

是 AMPLEXTM Red。它是 Molecular Probes(Eugene, Oregon)出售的商业可得的试剂,用于在免疫测定法中与抗体产生的过氧化氢进行反应。它是以试剂盒出售的,该试剂盒提供了使用用于测定的荧光微孔板或荧光计测量过氧化氢的一步荧光法。测定法基于使用对过氧化氢高度敏感和稳定的探针 10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪对过氧化氢进行检测。在辣根过氧化物酶存在的情况下,AMPLEXTM Red 试剂与过氧化氢以 1:1 的化学计量进行反应以产生高荧光的试卤灵,这提供了一种检测机制检测在 200 微升体积内的少至 10 皮摩尔的过氧化氢。

相反,现有的免疫测定技术,包括放射免疫测定法(RIA)、酶-免疫测定法(EIA)和经典的酶联免疫吸附测定(ELISA),都需要使用如 RIA 中的放射性标记的免疫反应性分子或额外标记的免疫反应性分子。本发明既不需要潜在有害的放射性同位素以标记分子,也不需要通常称为二级抗体的额外免疫反应性试剂,其中所述的二级抗体通常与酶连接,以允许检测与一级抗体及抗原形成的复合体。在最后一测定法中,二级抗体与所形成的抗原-抗体复合体的反应(通常通过抗一级抗体的特异性免疫反应性)是通过对所偶联的酶特异的产生颜色的底物溶液来测定的。概括而言,在本发明中,抗体介导的过氧化氢的产生用不需要放射性试剂、不需要额外的试剂和/或混合步骤、而具有高检测能力的方法进行测定,这些额外的试剂和/或混合步骤在例如美国专利 3,905,767; 4,016,043; USRE032696 和 4,376,110 中被应用,此处对其公开进行引用作为参考。

治疗方法

本发明提供了当其产生被认为是正当时,例如用于抑制微生物感染、促进创伤愈合、溶解细菌、清除病毒、靶向癌细胞用于氧化剂诱导的裂解等等过程,而产生氧化剂的方法。例如,本发明提供了抗体介导的活性氧类的产生以抗击细菌感染或病毒感染。活性氧类作为抗微生物剂来消灭细菌或病毒。因此,为了增强这种过程,人们可以使用本发明的方法以提供抗体组合物到该区域导致局部活性氧类浓度提高。

本发明包括的治疗方法基于使用能从单线态氧产生活性氧类的抗体,包

括 1)抑制微生物的增殖,或靶向和杀死病人体内微生物,当抗体识别微生物表达的抗原并与其起免疫反应时,2)抑制癌细胞的增殖或靶向和杀死病人体内癌细胞,当抗体识别癌细胞表达的抗原并与其起免疫反应时,3)抑制病人体内与嗜中性粒细胞介导的炎症反应相关的组织损伤,例如当炎症反应起因于细菌感染或病人患有自身免疫性疾病时,4)增强病人体内吞噬细胞的杀菌效果,5)促进具有开放性创伤的病人伤口的愈合,当臭氧、过氧化物或过氧化氢刺激成纤维细胞的增殖和/或免疫反应进一步包括淋巴细胞的增殖时,6)刺激细胞增殖,例如刺激病人伤口的成纤维细胞增殖,和相似情形。

在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗微生物感染和其它疾病的治疗方法,这些方法得益于诸如超氧自由基、羟自由基、臭氧或过氧化氢的活性氧类增强的产生。此种方法在正当需要此种活性氧类产生的情况下能够使用任何抗体产生活性氧类。

本发明还涉及包括经过改变含有一个额外还原中心的工程抗体在内的工程分子的用途,该还原中心的存在提供了当希望产生活性氧类时,从单线态氧产生活性氧类的额外能力。当需要增强活性氧类产生时,与具有两个保守的色氨酸残基的非工程抗体相比,使用具有两个以上还原中心的工程分子是恰当的。

在另一个方面,抗体可以是如上面所提供的或可选择地从递送进入细胞的表达载体表达的重组抗体。在本文中表达载体还可以表达敏化剂分子(见下)。

在一个实施方案中,本发明涉及用于抑制微生物生长的方法,其中将微生物与含有能从单线态氧产生此种活性氧类的抗体的组合物相接触。该方法对于非特异或者免疫特异(抗原结合)的完整抗体或抗体片段是成功的。此类抗体片段包括单链抗体及此处所述的工程分子和抗体。然而,当需要对抗微生物的局部活性时,抗体可以是对微生物相关的抗原特异的。例如,抗体可以选择性地结合微生物表面的抗原。

抗体组合物可以在体内递送到受到微生物感染或其它疾病或能够从暴

露于活性氧类而受益的其它疾病的受试者中。优选的体内递送方法包括静脉内给药、局部给药、吸入给药、插管给药、腔内给药、肌肉内给药、经皮给药、皮下给药或通过含有抗体的脂质体给药。

细胞表面可作为例证的抗体浓度范围为 1-5 微摩尔。然而，浓度会依赖所希望的结果而变化，此时所提供抗体的量是足以得到预期生理效应即活性氧类或它的衍生氧化物的产生而产生氧化应激的抗体的量。用抗体组合物进行治疗性处理的剂量和时间与下面描述的用于抗氧化剂的剂量和时间相一致。

本发明方法进一步考虑了在产生抗体介导的活性氧类或其衍生氧化物的方法中将抗体-抗原复合物暴露于紫外线、红外线或可见光的照射下。为了增强活性氧类的产生，光敏剂，也作为敏化剂提到，产生活性氧类的量可以在此处所述的治疗方法中使用。如此处所定义，敏化剂是能够诱导或增加单线态氧浓度的任何分子。敏化剂可以在照射存在的情况下使用，此种照射过程包括暴露于紫外线、红外线或可见光下足以活化敏化剂的一段时间。作为例证的时间和条件在实施例中进行描述。

敏化剂的活性氧类产生量是足以得到预期生理效应即在正当需要此种活性氧类和其衍生物多种情况下通过抗体介导从单线态氧产生活性氧的敏化剂的量。在一些实施方案中，敏化剂被偶联到抗体上。偶联有敏化剂的抗体通常能够结合到抗原上，即抗体仍保留有效的抗原结合位点，从而允许发生抗原识别和结合。

作为例证的敏化剂包括但不限于蝶呤、黄素、血卟啉、四(4-磺化苯基)卟啉、二吡啶基钌(II)复合体、玫瑰红染料、醌、若丹明染料、酞菁、竹红菌甲素。

在进一步的实施方案中，通过施用增强单线态氧产生的方法来增强活性氧类的产生。还原的单线态氧是活性氧类或其衍生氧化物的来源。一种增强单线态氧产生的方法是包括对产生单线态氧有用的任何分子、化合物或试剂在内的前体药物。如此处所描述，此种前体药物在将抗体施用于预期靶细胞、组织或器官施用或将抗体与其相接触的同时，或在此种施用或

接触之后,进行施用。当前体药物的施用在抗体的施用之后时,抗体已经有机会与其靶抗原进行免疫反应并形成抗体-抗原复合物。增强单线态氧产生的方法于是在抗体-抗原识别位点增强诸如过氧化氢、臭氧、超氧自由基或它们的衍生氧化物的活性氧类的产生。该实施例具有特别的优点,例如,在预期的位点或位置产生治疗用预期的过氧化物、臭氧或过氧化氢的增强的局部积累的能力。

优选的前体药物是,例如,浓度大约1微摩尔至大约50微摩尔的内过氧化物。在抗体-抗原复合物位点所能达到的优选的内过氧化物浓度为大约10微摩尔。

本发明中的抗体的抗原靶可以是本领域技术人员所知的或可得到的任何抗原。抗原可以是存在于细胞、组织或器官内的任何抗原,在那里活性氧类的存在和抗体介导的产生该性活氧簇的过程是所期望的。抗原可以存在于溶液中,例如,在细胞外液中。抗原可以是,例如,蛋白质、多肽、脂肪酸、低密度脂蛋白、与炎症反应相关的抗原、癌细胞抗原、细菌抗原、病毒抗原或相似分子。

抗原相关的细胞包括但不限于微生物、内皮细胞、间质细胞、上皮细胞、肌肉细胞、吞噬细胞、血细胞、树突细胞、结缔组织和神经系统细胞。

因此,例如,可以用本发明的抗体治疗下列靶微生物有机体的感染:气单胞菌属(*Aeromonas* spp.)、芽胞杆菌属(*Bacillus* spp.)、拟杆菌属(*Bacteroides* spp.)、弯曲杆菌属(*Campylobacter* spp.)、梭菌属(*Clostridium* spp.)、肠杆菌属(*Enterobacter* spp.)、肠球菌属(*Enterococcus* spp.)、埃希氏菌属(*Escherichia* spp.)、腹螺菌属(*Gastrospirillum* sp.)、缠绕杆菌属(*Helicobacter* spp.)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella* spp.)、沙门氏菌属(*Salmonella* spp.)、志贺氏菌属(*Shigella* spp.)、葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、弧菌属(*Vibrio* spp.)、耶尔森氏菌属(*Yersinia* spp.)等等。使用本发明的抗体能够治疗的感染包括那些与葡萄球菌感染(金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*))、斑疹伤寒(伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*))、食物中毒(诸

如 O157:H7 的大肠杆菌)、杆菌性痢疾(痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*))、肺炎(铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和/或洋葱假单胞菌)、霍乱(霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*))、溃疡(幽门螺旋杆菌)和其它相关的感染。大肠杆菌血清型 O157:H7 涉及腹泻、出血性结肠炎、溶血性尿毒性综合征(HUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP)的发病机理。本发明的抗体对于耐药的和多药耐药的细菌菌株,例如金黄色葡萄球菌的多抗药性菌株和屎肠球菌和粪肠球菌的万古霉素抗性菌株,也是有效的。

本发明的抗微生物组合物对于抗病毒也是有效的。本发明的抗微生物组合物对于抗病毒也是有效的。术语“病毒”指的是 DNA 和 RNA 病毒、类病毒和朊病毒。病毒包括包膜和无包膜病毒,例如,甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人免疫缺陷病毒、痘病毒、疱疹病毒、腺病毒、乳多空病毒、细小病毒、呼肠弧病毒、环状病毒、细小核糖核酸病毒、轮状病毒、甲病毒、风疹病毒、A 型流感病毒、B 型流感病毒、黄病毒、冠状病毒、副粘病毒、麻疹病毒、肺病毒、弹状病毒、狂犬病病毒、正粘液病毒、布尼亚病毒、白蛉病毒、纳伊罗病毒、嗜肝 DNA 病毒、沙粒病毒、逆转录病毒、肠病毒、鼻病毒或线状病毒。

可受益于在细胞、组织或器官以及细胞外区室中活性氧类产生或增强的其它治疗性疾病对本领域普通技术人员是熟知的。例如此类疾病进一步描述于 McCord, Am. J. Med., 108:652-659 (2000), 其所公开的内容此处引用作为参考。

使用本领域技术人员可得到的方法可以对针对这些微生物品种的抗微生物活性进行评价。抗微生物活性通过例如鉴定本发明的抗体阻止特定微生物物种生长的最低抑菌浓度(MIC)而进行确定。在一个实施方案中,抗微生物活性是当使用标准剂量或剂量反应方法测量时能够杀死 50%微生物的抗体的量。

评估用此处所述的抗体治疗微生物感染时治疗有效剂量的方法包括测定抗体制备物的最低抑菌浓度,在此浓度下基本上没有微生物能够体外生长。此种方法允许计算单位体积中为了抑制微生物生长或杀死 50%微生物

所需要的大约抗体量。例如，通过标准的微稀释法能够测定此种数量。例如，制备了一系列含有相同体积培养基和基本上相同量的微生物的微生物培养管，并且加入一份抗体。每一份包含不相同量的抗体于相同体积的溶液中。将微生物培养相应于一至十代的时间段并且测定培养基中微生物的数量。

培养基的光密度值也能够用于评价是否已经发生了微生物生长—如果光密度没有明显的增加，则没有发生明显的微生物生长。然而，如果光密度增加了，就已经发生了微生物的生长。为了确定当暴露于抗体之后有多少微生物细胞仍然活着，可以在抗体加入的时刻（时间 0）和此后有规律的间隔取出一小份培养基。将小份涂布微生物培养板，将平板在易于微生物生长的条件下进行培养，当出现克隆时，计算那些克隆数量。

组合物

本发明的抗体、敏化剂或化学探针可以制剂成多种可接受的组合物。此类药物组合物可以以各种适合于所选择的施用途径，即口服或肠胃外施用，通过静脉内注射、肌肉注射、局部或皮下途径的形式施用于哺乳动物宿主，例如人类患者。

当抗体、敏化剂和化学探针足够碱或足够酸以致形成稳定无毒的酸或碱盐时，将此类抗体、敏化剂和化学探针作为盐进行施用是适当的。可药用盐的例子是由能形成生理上可接受阴离子的酸形成的有机酸加成盐，例如甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、醋酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐和 α -甘油磷酸酯。也可以形成合适的无机盐，包括盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、重碳酸盐和碳酸盐。

使用本领域熟知的标准程序，例如用诸如胺的足够碱的化合物与提供可生理用阴离子的适当酸进行反应，可以得到可药用盐。也可以得到碱金属（例如钠、钾或锂）或碱土金属（例如钙）的羧酸盐。

从而，本发明的抗体、敏化剂和化学探针可以进行全身性的施用，例如与诸如惰性稀释药或可同化可食用的载体的可药用赋形剂组合口服。它们可以包封在硬的或软的明胶胶囊外壳中，可以压制成片剂，或直接掺入

到病人的食物中。对于口服治疗给药，抗体、敏化剂和化学探针可以与一种或多种赋形剂结合并以可吸收的片剂、含片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、混悬液、糖浆剂、糯米纸囊剂等等形式使用。此种组合物和药剂应该包含至少 0.1% 的活性成分。组合物和制剂的百分比当然是可变的并且方便的在特定单位剂型重量的大约 2% 至大约 60% 之间。在此种治疗上有用的组合物中氧化剂和氧清除剂的量是那些可以得到有效剂量水平的量。

片剂、锭剂、丸剂、胶囊剂等等还可以包含以下可以加入的成分：诸如西黄蓍胶、阿拉伯树胶、玉米淀粉或明胶的粘合剂；诸如磷酸氢二钙的赋形剂；诸如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸等等的崩解剂；诸如硬脂酸镁的润滑剂；和诸如蔗糖、果糖、乳糖或天冬酰苯丙氨酸甲酯的甜味剂或诸如薄荷、冬青油或樱桃调味料的调味剂。当单位剂型是胶囊时，除了上述类型的物质外，它可以含有诸如植物油或聚乙二醇的液态载体。其它多种物质可以作为包衣存在或改变固体单位剂型的物理形状。例如，可以将片剂、丸剂或胶囊剂用明胶、蜡、虫胶或糖等等包衣。糖浆或酏剂可包含活性化合物、作为甜味剂的蔗糖或果糖、作为防腐剂的羟苯甲酸甲酯和羟苯甲酸丙酯、诸如樱桃或橙香味的染料和调味料。当然，用于制备任何单位剂型的任何材料都应当是可药用的并且所使用的量基本上是无毒的。此外，活性成分可以掺入到持续释放的制剂或设备中。

对于创伤的治疗，可以采用对受试者的创伤进行局部应用。含有抗体的组合物可以直接应用于伤口或者先施用于绷带上然后应用于伤口上。受益于在细胞、组织、器官或细胞外区室中产生或提高的过氧化物、臭氧或过氧化氢的其它治疗疾病对于本领域普通技术人员是可知的并且已被 McCord, *Am. J. Med.*, **108**:652-659 (2000) 进行了综述，此处对其公开引用作为参考。

抗体、敏化剂和化学探针还可以通过灌注或注射从静脉内或腹膜内给药。抗体、敏化剂和化学探针的溶液用水来制备，任选地与无毒的表面活性剂混合。分散体还可以制备在甘油、液体聚乙二醇、醋酸甘油和它们的混合物中和油中。在通常的储存和使用条件，这些制剂可以包含阻止微生

物生长的防腐剂。

适于注射或灌注的药物剂型包括包含抗体、敏化剂和化学探针的无菌水溶液或分散剂或无菌粉剂，这些抗体、敏化剂和化学探针适于临时制备无菌注射或灌注溶液或分散剂，任选地用脂质体包封。在所有情况下，在制造和储存的条件下最终的剂型应该是无菌的、流质的和稳定的。液态载体或媒介物可以是包含例如，水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等等）、植物油、无毒的甘油酯和它们的适当的混合物的溶剂或液体分散介质。其适当的流动性可以通过，例如，脂质体的形成、在分散剂中维持所需颗粒大小、或者使用表面活性剂来维持。通过多种抗菌剂和抗真菌剂，例如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、三梨酸、硫柳汞等等阻止微生物的活动。在许多情况下，优选的包括等渗试剂，例如糖、缓冲液或氯化钠。通过在可注射的组合物中使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶产生对可注射组合物的延长吸收。

通过将抗体、敏化剂或化学探针以需要的量掺入到恰当的具有，如果需要，上述列举的其它成分的溶剂中，然后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。至于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，该技术能够得到氧化剂和氧清除剂加上存在于先前过滤灭菌溶液中的任何附加需要的成分的粉末。

对于局部施用，可以将抗体、敏化剂或化学探针以纯化形式即为液体时进行应用。然而，它们通常需要作为组合物或制剂与可以是固体或液体的皮肤可接受的载体组合在一起被施用于皮肤上。

有用的固体载体包括诸如滑石粉、粘土、维晶纤维素、二氧化硅、氧化铝等等细微的固体。有用的液体载体包括水、醇类或乙二醇或水-醇/乙二醇混合物，本发明的组合物可以以有效水平溶解于或分散，任选地借助于无毒的表面活性剂，于其中。为了优化用于特定用途的特性可以添加例如香味的佐剂和额外的抗微生物剂。最终的液体组合物可以从用于浸透绷带和其它敷料的吸收剂垫中应用，或使用泵型或气雾剂型喷雾器喷雾于受影响区域。

为了直接施用于使用者的皮肤，诸如合成聚合物、脂肪酸、脂肪酸盐和酯、脂肪醇、修饰的纤维素或修饰的矿物材料的增稠剂也可以与液体载体一起使用以形成可以被涂开的糊剂、凝胶、软膏等等。

用于递送本发明的抗体、敏化剂或化学探针到皮肤的皮肤病用组合物的例子在本领域是熟知的；例如，参见 Jacquet 等(美国专利号 4,608,392), Geria (美国专利号 4,992,478), Smith 等(美国专利号 4,559,157) 和 Wortzman (美国专利号 4,820,508)。

本发明抗体、敏化剂或化学探针的有用的剂量可以通过比较它们的体外活性和在动物模型内的体内活性来决定。在小鼠和其它动物的有效剂量外推至人的方法是本领域熟知的；例如，参见美国专利号 4,938,949。

通常，在例如洗剂的液体组合物中本发明的抗体、敏化剂或化学探针的浓度可以大约 0.1-25 重量%，优选的大约 0.5-10 重量%。在诸如凝胶或粉末的半固体或固体组合物中浓度大约 0.1-5 重量%，优选的大约 0.5-2.5 重量%。

用于治疗所需要的抗体、敏化剂或化学探针、或活性盐或它们的衍生物的量不但随着所选定的特定盐而变化，而且随着给药途径、被治疗病情的性质和病人的年龄和病情而变化并且最终由主管医师或临床医师作出判断。

然而，一般而言，适宜的剂量会在从大约 0.5 到大约 100 毫克/公斤范围内，即从每天大约 10 到大约 75 毫克/公斤体重，例如每天 3 到大约 50 毫克/公斤受试者体重，优选地在 6-90 毫克/公斤/天范围内，最优选地在 15-60 毫克/公斤/天范围内。

抗体、敏化剂或化学探针方便地以单位剂型施用；例如，含有 5-1000 毫克，方便地 10-750 毫克，最方便地 50-500 毫克活性成分/单位剂型。

理想地，抗体、敏化剂或化学探针的施用应达到抗体、敏化剂或化学探针的血浆浓度峰值从大约 0.005 到大约 75 μM ，优选地，大约 0.01-50 μM ，最优选地，大约 0.1-大约 30 μM 。这可以通过，例如，静脉内注射 0.05-5% 的抗体、敏化剂或化学探针的溶液，任选地以盐形式注射，而达到，或者

作为含有大约 1-100 毫克抗体、敏化剂或化学探针的大丸剂而口服达到。通过连续输注以提供大约 0.01-5.0 毫克/公斤/小时或者通过周期性灌注大约 0.4-15 毫克/公斤抗体、敏化剂或化学探针来维持预期的血液浓度水平。

目的剂量可以方便地以单一剂量呈现或者作为以适当的间隔施用例如每天 2、3、4 或更多亚剂量的分份剂量呈现。亚剂量本身可以进一步再分，例如，分成许多个个别宽松间隔给药，例如从吸入器多次吸入或向眼应用多滴滴剂。

本发明的治疗组合物、包括工程抗体和包含用于促进抗体活性的此处所述的额外还原中心的其它分子在内的抗体以与剂量制剂相一致的模式和治疗有效剂量进行施用。施用的量和周期依赖于接受治疗的受试者、受试者身体利用有效成分的能力和所期望达到的治疗效果的程度。需要施用的有效成分的精确的量依赖于从业者的判断并且对每一个个体都是特殊的。然而，用于不同类型应用的适宜剂量范围依赖于给药途径。对于给药的适宜方案也是可变的，但是典型的是初次给药后接着在一定时间间隔重复剂量给药以致于达到治疗处理所期望的结果。

本发明的治疗组合物包含可药用的载体和抗体、敏化剂或化学探针。在一个优选的实施方案中，当为了治疗目的施用于哺乳动物或病人时治疗组合物不具有免疫原性。

包含溶解或分散于其中的活性成分的药物组合物制剂是本领域众多周知的并且不需要根据剂型加以限制。一般此类组合物制备成可注射的液体溶液或混悬液，然而，也可以制备成适用于溶液或混悬液的在使用前溶于液体的固体形式。制剂也可以是乳化的。

可以将活性成分与可药用的且与活性成分相容的赋形剂相混合，并且以适宜的量用于此处所述的治疗方法。合适的赋形剂是，例如，水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。此外，如果期望，组合物可以含有微量辅助物质诸如湿润剂或乳化剂、pH 缓冲剂等等，以增强活性成分的效力。

本发明的治疗组合物可以包括其中的可药用盐组分。可药用盐包括与诸如盐酸或磷酸的无机酸或诸如乙酸、酒石酸、扁桃酸等等的有机酸形成

的酸加成盐（与多肽的游离氨基形成）。与游离羧基形成的盐还可以从例如钠、钾、铵、钙或氢氧化铁的无机碱，和诸如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等等的有机碱得到。

可药用载体在本领域是熟知的。作为例证的液体载体是除了活性成分和水外不含其它物质的水溶液，或含有诸如在生理 pH 值的磷酸钠的缓冲液、生理盐水或两者例如磷酸缓冲盐水的水溶液。更进一步，液体载体可以包含一种以上缓冲盐、以及诸如氯化钠和氯化钾的盐、右旋糖、聚乙二醇和其它溶质。

液体组合物还可以包含除了水外的并且与水不相容的液相。此种额外液相的例子是甘油、例如棉子油的植物油和水-油乳剂。

通过参考下面的非限定性实施例来进一步详细描述本发明。当用它们的某些优选的实施方案作为参考进行详细描述本发明时，可以认识到修改和变异是处于所描述和要求保护的精神和范围内的。

实施例 I

具有内在破坏抗原能力的抗体材料和方法

抗体：下面完整抗体均从 PharMingen 获得：49.2 (小鼠 IgG_{2b} κ), G155-178 (小鼠 IgG_{2a} κ), 107.3 (小鼠 IgG₁ κ), A95-1 (大鼠 IgG_{2b}), G235-2356 (仓鼠 IgG), R3-34 (大鼠 IgG κ), R35-95 (大鼠 IgG_{2a} κ), 27-74 (小鼠 IgE), A110-1 (大鼠 IgG₁ λ), 145-2C11 (仓鼠 IgG1 κ), M18-254 (小鼠 IgA κ) 和 MOPC-315 (小鼠 IgA λ)。下面抗体从 Pierce 获得：31243 (绵羊 IgG), 31154 (人 IgG), 31127 (马 IgG) 和 31146 (人 IgM)。

下面的 F(ab')₂ 片段从 Pierce 获得：31129 (兔 IgG), 31189 (兔 IgG), 31214 (山羊 IgG), 31165 (山羊 IgG) 和 31203 (小鼠 IgG)。A 蛋白, G 蛋白, 胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶抑制剂 (包曼-毕尔克抑制剂), β-乳球蛋白 A, α-乳清蛋白, 肌红蛋白, β-半乳糖苷酶, 鸡卵清蛋白, 抑酶肽, 胰蛋白酶原, 凝集素 (花生), 凝集素 (Jacalin), 牛血清白蛋白, 超氧化物歧化酶和过氧化氢酶从 Sigma 获得。核糖核酸酶 I A 从 Amersham Pharmacia 得到。以下的免疫球蛋白是使用杂交瘤技术内部获得：OB2-34C12 (小鼠 IgG₁

κ), SHO1-41G9 (小鼠 IgG₁ κ), OB3-14F1 (小鼠 IgG_{2a} κ), DMP-15G12 (小鼠 IgG_{2a} κ), AD1-19G1 (小鼠 IgG_{2b} κ), NTJ-92C12 (小鼠 IgG₁ κ), NBA-5G9 (小鼠 IgG₁ κ), SPF-12H8 (小鼠 IgG_{2a} κ), TIN-6C11 (小鼠 IgG_{2a} κ), PRX-1B7 (小鼠 IgG_{2a} κ), HA5-19A11 (小鼠 IgG_{2a} κ), EP2-19G2 (小鼠 IgG₁ κ), GNC-92H2 (小鼠 IgG₁ κ), WD1-6G6 (小鼠 IgG₁ κ), CH2-5H7 (小鼠 IgG_{2b} κ), PCP-21H3 (小鼠 IgG₁ κ) 和 TM1-87D7 (小鼠 IgG₁ κ). DRB 多克隆(人 IgG)和 DRB-b12 (人 IgG)由 Dennis R. Burton (Scripps 研究所)提供. 1D4 Fab (结晶的) 由 Ian A. Wilson (Scripps 研究所) 提供。

所有的测定方法都是在 PBS (10 mM 磷酸盐/160 mM 氯化钠, pH 7.4) 中进行的。根据需要, 商品化的蛋白质溶液样品在 PBS 中进行透析。除臭剂红过氧化氢测定试剂盒(A-12212)从 Molecular Probes 得到。

抗体/蛋白质照射。除非特别说明, 测定溶液 (100 μl, 6.7 μM 蛋白质溶于 PBS, pH 7.4) 加入到玻璃瓶中, 用螺旋帽密封并用紫外(312 nm, 8000 μWcm⁻² Fischer-Biotech 透照灯) 或可见光进行照射。

过氧化氢的定量测定。将一份 (20 μl) 从蛋白质溶液中取出并加入到含有反应缓冲液 (80 μl) 的 96-孔微孔板 (Costar) 的一个孔中。然后加入工作液 (100 μl/400 μM 除臭剂红试剂 1/2 单位/毫升辣根过氧化物酶) 并且在暗处孵育 30 分钟。然后使用 CytoFluor 微孔板阅读仪 (4000 型, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA; 激发/发射: 530/580 nm) 测定孔中组分的荧光。使用标准曲线确定过氧化氢的浓度。所有实验重复进行, 并且形成速率以至少两次测量的平均值来提供。

敏化作用和猝灭测定。将溶于 PBS(pH 7.4, 4% 二甲基甲酰胺)中 31127 溶液 (100 μl 马 IgG, 6.7 μM) 和血卟啉 IX (40 μM) 放置于近光带处。如此处所描述对过氧化氢浓度进行测定。测定还在 D₂O 中有 NaN₃ (100 mM) 或 PBS 存在的情况下进行。

氧依赖。使用冻/融方法在氩环境下将溶于 PBS (pH 7.4) 中的 31127 (1.6 ml, 马 IgG, 6.7 μM) 溶液严格除气。通过注射器将一份 (100 μl) 导入已

经用适当 O₂/Ar 混合物 (0-100%) 清除的用隔封闭的玻璃瓶中。用 Orion 862A 溶解氧测量计测定溶解氧含量。将这些溶液剧烈涡旋混匀, 放置 20 分钟, 然后再次涡旋混匀。在实验过程中使用含必需 O₂/Ar 混合物的注射器以维持大气压。用气体密闭的注射器取出一份 (20 µl) 并用此处所述的方法测定过氧化氢的浓度。用酶动力学 (Enzyme Kinetics) v1.1 计算机程序 (用于确定参数 V_{max} 和 K_m) 将三次单独实验取得的数据进行比较和分析。

使用化学 ¹O₂ 源, 在黑暗中由抗体产生过氧化氢。将溶于 PBS (pH 7.4) 中的绵羊 IgG 31243 (100 µl, 20 µM) 溶液和 3,3N-(1,4-亚萘基) 二丙酸二钠 (25 mM 溶于 D₂O) 内过氧化物置于黑暗的温室中 (37°C) 30 分钟。用此处所述的方法测定过氧化氢浓度。

通过 Fab1D4 晶体的过氧化氢形成。将 1D4 Fab 片段的晶体混悬液 (2 µl) 用 PBS (198 µl, pH 7.4) 进行稀释并轻轻地涡旋混匀。离心之后, 将上清液取出, 并且进一步重复 2 次洗涤步骤。然后将所剩余的晶体混悬液用 PBS, pH 7.4 (100 µl) 进行稀释, 并且加入到石英 ELISA 板的一个孔中。在紫外线照射 30 分钟后, 加入除臭剂红工作溶液 (100 µl), 并且在荧光显微镜上察看混合物。

抗体荧光与过氧化氢形成。将溶于 PBS (pH 7.4) 的 31127 (1.0 ml 马 IgG, 6.7 µM) 溶液置于石英容器中并且用紫外光照射 40 分钟。以 10 分钟的间隔, 用 SPF-500C 荧光分光光度计 (SLM-Aminco, Urbana, IL; 激发/发射, 280/320) 测定溶液的荧光。在同一时间点, 取出一份 (20 µl) 溶液, 并且用此处所述的方法测定过氧化氢的浓度。

通过过氧化氢酶对过氧化氢的消耗。将 EP2-19G12 溶液 (100 µl 小鼠 IgG, 以 20 µM 的浓度溶于 PBS, pH 7.4) 用紫外光照射 30 分钟, 在此时间之后用结合试验 (stick test) (EM Quant Peroxide Test Sticks) 确定过氧化氢的浓度为 2 毫克/升。加入过氧化氢酶 [1 µl, Sigma, 3.2 M (NH₄)₂SO₄, pH 6.0], 并且 1 分钟后发现 H₂O₂ 的浓度达到 0 毫克/升。

变性。将 Eppendorf 管中的 IgG 19G12 (100 µl, 6.7 µM) 加热至

100EC 2 分钟。将最终的溶液转移至玻璃的、螺口小瓶中并且用紫外线照射 30 分钟。30 分钟后测定 H_2O_2 的浓度。

结果和讨论

通过一组完整免疫球蛋白和抗体片段的过氧化氢起始形成速率的测量值收集于表 1。据信 Ig -产生的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 可以发生自发歧化作用变成 H_2O_2 ，然后 H_2O_2 和 N-乙酰基-3,7-二羟基吩嗪 1 (除臭剂红) 作为协同底物被辣根过氧化酶利用，以产生高荧光的 9-羟基-3-异吩噻唑酮 2 (最大激发 563 nm, 最大发射 587 nm) (图 2) (Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N. 和 Haugland, R. P., *Anal. Biochem.*, 253, 162-168 (1997))。为了证实对缓冲液的照射不能够产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 并且抗体不是简单地充当蛋白质歧化酶而起作用 (Petyaev, I. M. 和 Hunt, J. V., *Redox Report*, 2, 365-372 (1996))，将过氧化物歧化酶在 PBS 中被照射。在这些条件下，过氧化氢的产生速率与单独 PBS 照射情况下的相同。

表 1. 通过免疫球蛋白产生过氧化氢*

条目	克隆	来源	同种型	形成速率, $\text{H}_{\text{nmol/分钟/毫克}}$
1	CH25H7	小鼠	IgG2b, κ	0.25
2	WD16G6	小鼠	IgG1, κ	0.24
3	SHO-141G9	小鼠	IgG1, κ	0.26
4	OB234C12	小鼠	IgG1, κ	0.22
5	OB314F1	小鼠	IgG2a, κ	0.23
6	DMP15G12	小鼠	IgG2a, κ	0.18
7	AD19G1	小鼠	IgG2b, κ	0.22
8	NTJ92C12	小鼠	IgG1, κ	0.17
9	NBA5G9	小鼠	IgG1, κ	0.17
10	SPF12H8	小鼠	IgG2a, κ	0.29
11	TIN6C11	小鼠	IgG2a, κ	0.24
12	PRX1B7	小鼠	IgG2a, κ	0.22
13	HA519A4	小鼠	IgG1, κ	0.20
14	92H2	小鼠	IgG1, κ	0.41

条目	克隆	来源	同种型	形成速率, ^H nmol/分钟/毫克
15	19G2	小鼠	IgG1, κ	0.20
16	PCP-21H3	小鼠	IgG1, κ	0.97
17	TM1-87D7	小鼠	IgG1, κ	0.28
18	49.2	小鼠	IgG2b, κ	0.24
19	27-74	小鼠	IgE, 标准同种型	0.36
20	M18-254	小鼠	IgA, κ	0.39
21	MOPC-315	小鼠	IgA, λ	0.39
22	31203	小鼠	F(ab') ₂	0.21
23	b12	人	IgG	0.45
24	多克隆	人	IgG	0.34
25	31154	人	IgG	0.18
26	31146	人	IgM	0.22
27	R3-34	大鼠	IgG1, κ	0.27
28	R35-95	大鼠	IgG2a, κ	0.17
29	A95-1	大鼠	IgG2b	0.15
30	A110-1	大鼠	IgG1, λ	0.34
31	G235-2356	仓鼠	IgG	0.24
32	145-2C11	仓鼠	IgG, gp 1, κ	0.27
33	31243	绵羊	IgG	0.20
34	31127	马	IgG	0.18
35	多克隆	马	IgG	0.34
36	31229	兔	F(ab') ₂	0.19
37	31189	兔	F(ab') ₂	0.14
38	31214	山羊	F(ab') ₂	0.24
39	31165	山羊	F(ab') ₂	0.25

* 测定条件在材料和方法中描述。

^H 至少 2 次测定的平均值。在 PBS 中 H₂O₂ 的背景形成速率是 0.005 nmol/分钟并且在有 SOD 存在时在 PBS 中 H₂O₂ 的背景形成速率是 0.003nmol/分钟。

至于在环境条件下(275 μM) PBS 中的氧浓度,对于超过 10%的反应过氧化氢形成速率是线性的。在得到足够氧的情况下,每个蛋白质分子可以产生至少 40 当量 H_2O_2 而活性上或结构片段上没有明显的减少。在存在或缺乏抗体 19G2 时过氧化氢形成的起始时间过程的例子示于图 3A。随后通过加热使得蛋白质变性该活性丧失了。

表 1 中的数据显示抗体从 $^1\text{O}_2$ 产生 H_2O_2 的普遍的能力。好像多种物种共享此种功能并且该种能力不依赖于所研究重链和轻链组分或抗原特异性。

对于完整抗体的过氧化氢形成的起始率是高度保守的,在整组中变化从 0.15 纳摩尔/分钟/毫克[克隆 A95-1(大鼠 IgG2b)] 到 0.97 纳摩尔/分钟/毫克(克隆 PCP-21H3, 鼠单克隆 IgG)。虽然可得到的信息更加局限于组分抗体片段,该活性好像在 Fab 和 F(ab')_2 片段中均存在。

如果该活性是由于污染造成的,那么活性将存在于从不同来源得到的所有抗体或抗体片段。然而,为了进一步排除污染,从中得到高分辨率 X-射线结构(在 1.7 D)的鼠抗体 1D4 Fab 晶体被用来研究它们产生 H_2O_2 的能力(图 4)。在这些晶体中清晰地观察到了 $^1\text{O}_2$ 的还原。

对此种抗体转化的研究支持单线态氧作为中间体被还原。无论是存在还是不存在紫外线照射,抗体在缺氧条件下不会发生过氧化氢的形成。而且,在环境有氧条件下而没有照射时过氧化氢的产生不会发生。在水溶液中存在已知的 $^3\text{O}_2$ 的光敏剂血卟啉 (HP) (Kreitner, M., Alth, G., Koren, H., Loew, S. 和 Ebermann, R., *Anal. Biochem.*, 213, 63-67 (1993))的情况下用可见光照射抗体导致过氧化氢的形成(图 5A)。所观察到的形成速率曲线存在弯曲是因为在测定混合物中存在氧的消耗。对光激发的 HP 和氧的相互作用会导致 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 的形成(Beauchamp, C. 和 Fridovich, I., *Anal. Biochem.*, 44, 276-287 (1971); Srinivasan, V. S., Podolski, D., Westrick, N. J. 和 Neckers, D. C., *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 6513-6515 (1978))的担心可以通过使用只有敏化剂的适当背景实验而大大消除(数据示于图 5A)。使用 HP 和可见光使得 H_2O_2 有效形成再次肯定了 $^1\text{O}_2$ 的中间体地位并且表明对

于 Ig 实现该还原功能而言紫外线照射不是必需的。

此外,将绵羊抗体 31243 在黑暗中 37°C 条件下与 $^1\text{O}_2$ 的化学源[内过氧化物 3N,3N-(1,4-亚萘基) 二丙酸盐]进行孵育导致过氧化氢的形成。

通过可见光下的马 IgG 和 HP (40 μM)的 H_2O_2 的形成速率随着 D_2O 存在而增加并且随着 $^1\text{O}_2$ 淬灭剂 NaN_3 (40 mM)存在而降低(图 5B)(Hasty, N., Merkel, P. B., Radlick, P. 和 Kearns, D. R. *Tetrahedron Lett.*, 49-52 (1972))。已知用 D_2O 替代 H_2O 会通过对于 $^1\text{O}_2$ 增加大约 10 倍的寿命而促进 $^1\text{O}_2$ 介导的过程(Merkel, P. B., Nillson, R. 和 Kearns, D. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 1030-1031 (1972))。

过氧化氢形成速率与 IgG 浓度在 0.5 和 20 μM 之间成比例但是在较高浓度时开始弯曲(图 5C)。由于存在反应的可能,蛋白质溶液中 $^1\text{O}_2$ 的寿命预期低于在纯水之中的。因此可以认为所观察到的弯曲可能是由于与抗体发生反应而使得 $^1\text{O}_2$ 寿命降低造成的。

很明显,氧浓度对所观察到的 H_2O_2 产生速率的影响表明大约 200 μM 氧的明显饱和状态(图 5D)。因此,还原机制可能涉及抗体分子中一个或多个氧结合位点。通过对原始形成速率数据进行非线性回归处理并且通过拟合 Michaelis-Menten 方程,得到 $K_{m\text{app}}(\text{O}_2)$ 为 187 μM 和 V_{maxapp} 为 0.4 纳摩尔/分钟/毫克。这种抗体的速率等同于所观察到的线粒体酶在体内还原分子氧的速率。

抗体还原 $^1\text{O}_2$ 的机制仍处于被确定中。然而,因为在含有 EDTA (4 mM) 的 PBS 中彻底透析之后抗体的活性保持不变所以金属介导的氧化还原过程的参与被大大降低了。这是抗体自身氨基酸组成的内在能力。芳香族氨基酸例如色氨酸(Trp)可以通过电子转移被 $^1\text{O}_2$ 氧化(Grossweiner, L. I., *Curr. Top. Radiat. Res. Q.*, 11, 141-199 (1976))。此外,二硫化物富含能够被氧化的足够的电子(Bent. D. V. 和 Hayon, E., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 2612-2619 (1975))。因此,这里存在一种潜在的可能性,即色氨酸残基和/或所有抗体同源的链内或链间二硫键负责 $^1\text{O}_2$ 的还原。为了研究抗体的这种能力在什么程度上被其它蛋白质所共享和调查还原的机制,研究了一组

其它蛋白质(图6)。

与抗体相反,虽然其它蛋白质能转化 $^1\text{O}_2$ 成为 $\text{O}_2^{\cdot-}$,但这决不是一个普遍的特性。不含有 Trp 残基而含有几个二硫键的 RNA 酶 A 和超氧化物歧化酶不能够还原 $^1\text{O}_2$ 。相似地,含有七个二硫键而不含有 Trp 残基的包曼-毕尔克抑制剂(Voss, R.-H., Ermler, U., Essen, L.-O., Wenzl, G., Kim, Y.-M. 和 Flecker, P., *Eur. J. Biochem.*, 242, 122-131 (1996); Baek, J. 和 Kim, S., *Plant Physiol.*, 102, 687 (1993))不能够还原 $^1\text{O}_2$ 。相反,只含有 2 个 Trp 残基的鸡卵清蛋白(Feldhoff, R. 和 Peters, T. J., *Biochem. J.*, 159, 529-533 (1976))是最有效的还原 $^1\text{O}_2$ 的蛋白质之一。

考虑到当变性后抗体活性会丧失,好像关键残基在蛋白质的位置比它们的绝对数量更关键。因为为了促进结构的稳定性,蛋白质中大多数芳香族残基普遍地埋藏在内部(Burley, S. K. & Petsko, G. A., *Science*, 229, 23-28 (1985)),所以用荧光淬灭实验以表面和隐蔽的残基相对贡献的方式探究了还原过程的性质。通过吸收紫外线,特别是有致敏剂例如分子氧或臭氧存在的情况下,蛋白质中的芳香族氨基酸被修饰了(Foote, C. S., *Science*, 162, 963-970 (1968); Foote, C. S., *Free Radicals Biol.*, 2, 85-133 (1976); Gollnick, K., *Adv. Photochem.*, 6, 1-122 (1968))。通过[2 + 2]环加成作用色氨酸与 $^1\text{O}_2$ 发生反应产生 N-甲酰犬尿氨酸或犬尿素,已知它们都能明显淬灭所埋藏色氨酸残基的发射光(Mach, H., Burke, C. J., Sanyal, G., Tsai, P.-K, Volkin, D. B. 和 Middaugh, C. R.蛋白质和多肽的形成和递送,著者 Cleland, J. L. 和 Langer, R. (美国化学会, Denver, CO) (1994))。在 40-分钟的照射过程中,马 IgG 的内在荧光快速淬灭到其原始数值的 30%,然而过氧化氢的产生自始至终是线性的($r^2 = 0.998$) (图 7)。如果单线态氧的还原是由于抗体色氨酸残基,那么暴露于溶剂中的色氨酸好像比隐藏色氨酸残基的贡献程度要小。这种因素有助于解释为什么这种能力在抗体中是高度保守的。在多于 99%的已知抗体中,存在 2 个色氨酸残基,并且都是深埋在内部的:色氨酸 36 和色氨酸 47(Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. 和 Foeller, C.,与免疫有关蛋白质的序列(U.S.

Department of Health and human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) (1991))。

在整个自然界,生物体自身通过产生相对简单化学物质的方式进行防御。在单分子水平,这种机制被认为随着在脊椎动物中免疫系统的出现而大部被抛弃。据认为一旦靶向设施得到进化则杀灭机制就移到别处。当前的结果使得对于一些分子内的杀灭作用进行重新认识。在一定意义上,这种化学免疫系统,除了加入了更加复杂和多样的靶向成分外,类似于低等生物体内的纯化学防御机制。

考虑到理想的杀灭系统必须使用宿主分子并以降低自身损伤的局部方式进行的这样一种限制,人们很难想象到比 $^1\text{O}_2$ 更公正的选择。因为既然存在了该反应分子,一个要问的重要问题就是抗体对其进一步转化的优点是什么。关键的问题是通过将暂时的单线态氧(寿命 4 μs)转化成更稳定的 $\text{O}_2^{\bullet-}$,它现在才能接近过氧化氢和它能产生的所有毒性产物。此外,超氧化物是唯一一个等同于氧清除级联反应中残留的分子氧。因此,这种“再循环”可能作为加强杀微生物过程的关键机制。单分子氧的另一个益处是它只存在于当宿主受到攻击时,因此使它成为“事件-触发的”底物。并且由于存在用于抵御的使用附属系统的可选择的途径,在许多情况下免疫系统的这种化学武器功能可能是沉默的。然而,这就是说这里会有很多疾病状态,此种状态下发现抗体和单线态氧是并列的,从而导致了细胞和组织的损伤。考虑到人类多种事件导致单线态氧的产生,抗体对其的激活可能导致从自身免疫到再灌注损伤和动脉粥样硬化的很多种疾病(Skepper 等, Microsc. Res. Tech., 42, 369-385 (1998))。

实施例 II

抗体催化水的氧化

方法和材料

结晶学:使用标准程序用木瓜蛋白酶消化 IgG 4C6 并且将 Fab' 片段进行纯化(Harlow 和 Lane)。将 Fab' 从 13-18% PEG 8 K, 0.2 M ZnAc, 0.1 M 二甲砷酸盐, pH 6.5 中进行结晶。将晶体在氩气存在下 200 psi 加压 2 分

钟(Soltis 等, *J. Appl. Cryst.*, 30, 190, (1997))并且随后用液氮瞬间冷却。在 SSRL BL9-2 上以 2.0 Å 的分辨率收集数据。使用坐标通过分子置换从天然 4C6 结构中计算结构, 并且氩原子位点从不同 Fourier 图上的强峰中鉴定出来。在 CNS(Brünger 等, *Acta. Crystallogr.*, D54, 905 (1998))中做出精细结构至最终 $R = 23.1\%$ 和 $R_{\text{free}} = 25.7\%$ 。当将它们的 B 值固定于高出环境蛋白质的 B 值 50%之后两个氩原子的占据位点被精确定下来。在 Bobscript (R.M. Esnouf, *Acta Crystallogr.*, D55, 938 (1999))中产生图。

Kabat 数据库扫描: 为了决定在它们的结构中 Trp, Tyr, Cys, Met 的数目分析了人和小鼠序列的 Kabat 数据库。如果有太多的残基删除或缺少片段则淘汰该序列。这允许对可得的 3894 序列的 2068 条进行高度确定性分析。数值报道为 C_H , V_H , C_L 和 V_L (κ 和 λ) 区域: Trp 15.5 (14-31), Tyr 30.4 (13-47), Cys 19.3 (15-29), Met 11.6 (7-32), His 13.3 (8 -28)的括弧内范围的平均总数。总计= 90.1 (49-167)。

电感耦合等离子体原子发射光谱学 : 在 Varian, Axial Vista Simultaneous ICP-AES 光谱仪上进行 mAb PCP21H3 的电感耦合等离子体原子发射光谱(ICP-AES)实验。将小鼠单克隆抗体(PCP21H3)完全透析入含有 20 mM EDTA 的磷酸钠缓冲盐水(PBS, 50 mM pH 7.4)中。在典型的测定中, 将 300 μL 10.5 % HNO_3 溶液加入到 100 μL 10 mg/mL 的抗体溶液中并在 70°C 孵育 14 小时。然后用 MQH_2O 将该溶液稀释至 2 mL 并且然后对照标准进行分析。ICP-AES 分析结果报道为百万分之几($\mu\text{g/mL}$): Ag 0.0026 (每个抗体分子 0.0072 个原子); Al 0.0098 (每个抗体分子 0.113 个原子); As 0.0062 (每个抗体分子 0.025 个原子); Ba 在检测水平以下; Ca 0.0355 (每个抗体分子 0.266 个原子)。

所观察的高 Ca 浓度是用于我们测定系统的磷酸盐缓冲系统的污染的结果。为了观察 Ca(II) 对抗体-介导的 H_2O_2 速率的影响, 使用图 8A 图解说明中概括的测定过程通过加入多种浓度的 CaCl_2 (0 - 100 μM)进行抗体样品的照射。发现该过程不依赖于 Ca(II) 浓度; Cd 0.0007 (每个抗体分子 0.0187 个原子); Ce 0.0012 (每个抗体分子 0.003 个原子); Co 0.0013 (每个抗

体分子 0.007 个原子); Cr 0.0010 (每个抗体分子 0.006 个原子); Cu 0.0014 (每个抗体分子 0.007 个原子); Fe 0.0089 (每个抗体分子 0.048 个原子); Gd 0.0008 (每个抗体分子 0.001 个原子); K 0.0394 (每个抗体分子 0.302 个原子); La 0.0007 (每个抗体分子 0.002 个原子); Li 0.0013 (每个抗体分子 0.056 个原子); Mg 0.0027 (每个抗体分子 0.033 个原子); Mn 0.0007 (每个抗体分子 0.004 个原子); Mo 0.0023 (每个抗体分子 0.007 个原子); Na 102.0428 (每个抗体分子 1332 个原子); Ni 0.0007 (每个抗体分子 0.004 个原子); P 14.3521 (每个抗体分子 138.9 个原子); Pb 低于检测水平; Rb 0.0007 (每个抗体分子 0.002 个原子); Se 低于检测水平; V 0.0109 (每个抗体分子 0.019 个原子); W 0.0119 (每个抗体分子 0.019 个原子); Zn 0.0087 (每个抗体分子 0.040 个原子)。

氧同位素实验: 在典型的实验中, 将抗体 (6.7 μM , 100 μL) 或非免疫球蛋白的蛋白质 (50 μM , 100 μL) 在 PB (160 mM 磷酸盐, pH 7.4) 中的溶液冷冻干燥并且然后溶于 H_2O_2 (100 μL , 98 %) 中。在 MS 中要将氯化钠排除以使信号抑制降至最低。在 MS 测定中, 为了产生可检测数量的 H_2O_2 , 有必要使用较高浓度的非免疫球蛋白蛋白质。在密封石英试管内饱和 $^{16}\text{O}_2$ 需氧条件下用 UV-透照灯 20EC 照射蛋白质溶液 8 小时。8 小时后使用除臭剂红测定法测定 H_2O_2 浓度 (Zhou 等, *Anal. Biochem.*, 253, 162 (1997))。然后通过离心过滤样品使其通过 microcon (大小排阻过滤器) 以去除蛋白质并重新测定 H_2O_2 浓度。加入 TCEP (新鲜制备的 20 mM 于 H_2^{18}O 中的原液) (约相对 H_2O_2 2 mol 当量) 并将其静置于 37°C 15 分钟, 这段时间后全部 H_2O_2 已经进行了反应。每个测定之前新鲜制备 H_2^{18}O 中的 TCEP 溶液, 因为 ^{18}O 慢慢掺入 TCEP 的羧酸 (超过几天的时间)。在测定时间过程期间, 由于该途径而没有 ^{18}O 掺入发生。而且, 没有 ^{18}O 从 H_2^{18}O 掺入 ^{16}O 氧化膦。249 m/z 处的峰是 TCEP 的 (M-H)⁻。由于在测定中使用了相对 H_2O_2 过量的 TCEP (两倍), 在所有 MS 中均观察到 249 处的峰。

将来自蛋白质样品的重复比率的 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 冷冻干燥在一起是合理的 ($\pm 10\%$)。然而, 在冷冻干燥过程中去除蛋白质结合水分子的问题意味着来自不

同批的冷冻干燥样品之间所观察到的比率可能是变化的,变化多至 2:1 到 4:1 (当从 H_2^{16}O 冷冻干燥时)。因此,如下严格的冷冻干燥和除气操作是重要的。在这方面,由于相对易于去除蛋白质结合氧分子, $^{18}\text{O}_2$ 和 H_2^{16}O 实验呈现出远低于测定间的变异性。

来自不同物种的抗体在实验系统给出了相似比率,描述如下: $^{16}\text{O}:^{18}\text{O}$:
WD1-6G6 mIgG (鼠) 2.1:1; poly-IgG (马) 2.2:1; poly-IgG(绵羊) 2.2:1;
EP2-19G2 mIgG (鼠) 2.1: 1; CH2-5H7 mIgG (鼠) 2.0:1; poly-IgG (人)
2.1:1。比率基于两次重复实验的平均值,除了 poly-IgG (马)以外,该值是
10 次测量的平均值。所有测定和条件如上所述。

在典型的实验中,将绵羊或马 poly-IgG ($6.7\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{L}$)的 PB ($160\ \text{mM}$ 磷酸盐; pH 7.4)溶液在氩条件下脱气 30 分钟。然后用 $^{18}\text{O}_2$ (90 %)饱和该溶液并按如上所述进行照射。然后如文中所述进行测定和操作。

通过血卟啉 IX 的 $^3\text{O}_2$ 致敏作用测定 H_2O_2 的产生与 $^1\text{O}_2$ 形成效率的关系:测定法是 H. Sakai 和共同研究者, Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng., 2371, 264 (1995)所研发的方法的修改方法。简而言之,使用透照灯的白光照射在 PBS ($50\ \text{mM}$, pH 7.4)溶液中的马 poly-IgG ($1\ \text{mg/mL}$)和血卟啉 IX ($40\ \mu\text{M}$)。取出等份($50\ \mu\text{L}$)并同时测定 H_2O_2 和 3-氨基邻苯二甲酸的浓度。通过除臭剂红法测定 H_2O_2 的浓度(Zhou 等, Anal. Biochem., 253, 162 (1997))。在使用 Adsorbosphere-C18 柱子的 Hitachi D4000 系列仪器上通过反相 HPLC 测定 3-氨基邻苯二甲酸的浓度, UV 分光光度检测器在 $254\ \text{nm}$ 处,并且乙腈/水(0.1% TFA) 18:82 的流动相流速为 $1\ \text{mL/分钟}$ (鲁米诺保留时间= $7.4\ \text{分钟}$ 且 3-氨基邻苯二甲酸保留时间 $3.5\ \text{分钟}$)。通过与对照样品比较峰高和峰面积进行比较测定鲁米诺和 3-氨基邻苯二甲酸的浓度。实验数据产生了由血卟啉 IX 形成的 $^1\text{O}_2$ 的量(直接与所形成的 3-氨基邻苯二甲酸的量成比率)和由抗体形成的 H_2O_2 的量。在白光下不含血卟啉 IX 的抗体不形成有意义量的 $^1\text{O}_2$ 。

对除臭剂红测定可以测定除了 H_2O_2 之外的蛋白质-过氧化物衍生物的担心减少,因为使用该方法测定的表观 H_2O_2 浓度不依赖于是否从样品中

去除照射的蛋白质(通过大小排阻过滤)。

量子化学方法 :全部 QC 计算是使用 Jaguar [Jaguar 4.0, Schrödinger, 有限公司, Portland, Oregon, 1998. 见 B. H. Greeley, T. V. Russo, D. T. Mainz, R. A. Friesner, J.-M. Langlois, W. A. Goddard III, R. E. Donnelly, J. Chem. Phys., 101, 4028 (1994)]利用密度功能理论(DFT)的 B3LYP flavor 进行的[J. C. Slater 于分子和固体的量子理论, 第 4 卷: 分子和固体的自相一致的场, McGraw Hill, New York, (1974)], 其包括泛化的梯度近似值和精确的互变。6-31G**基础设定用于全部原子。所有几何图完全最适化。计算震动频率以保证每个最小值是真实的局域极小值(仅阳性频率)并保证过渡态(TS)仅具有单一虚频率 (Hessian 阴性特征值)。此类 QC 计算已经证明对于简单有机分子具有~3 kcal/mol 的精确度。非闭合外壳分子例如 O_2 和 3O_2 预期具有较大误差。然而, 此类误差预期是系统的从而 QC 结果的机械函式将是正确的。全部能量学报道为未进行零点能量或温度校正的 kcal/mol。

结果和讨论

抗体能够从单线态分子氧(1O_2)产生过氧化氢(H_2O_2)。然而, 直到此处所报道才知道该过程是催化性的。目前显示抗体作为一类蛋白质是唯一的, 因为当存在任意可辨别的辅因子和电子供体时, 它们能够从 1O_2 产生多至 500 摩尔当量的 H_2O_2 , 而不降低速率。基于同位素掺入试验和动力学数据, 提出了抗体能够促进无先例地将 H_2O 加入 1O_2 产生 H_2O_3 , 作为反应级联中的第一个中间体 H_2O_3 最终导致形成 H_2O_2 。使用氘的 X 射线结晶学研究指出抗体折叠中保守的氧结合位点, 在这里能够起始该化学作用。这些发现暗示出免疫球蛋白针对 1O 的独特保护功能并且提出这样一个问题, 是否需要解毒 1O_2 在免疫球蛋白折叠的进化中起到的决定性作用。

抗体, 不管来源或抗原特异性, 都能够从单线态分子氧(1O_2)产生过氧化氢(H_2O_2)从而潜在调整防御性识别和在相同分子内杀伤(Wentworth 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 10930 (2000))。根据该发现的潜在化学和生物学上的意义, 已经观察了该过程中抗体的机械基础和结构定位。这些

组合的研究揭示,与其它蛋白质相比,抗体可以催化水和单线态氧之间无先例的一组化学反应。

动力学研究:长期 UV 照射研究揭示抗体-介导的 H_2O_2 产生是比非免疫球蛋白蛋白质情况下更加有效的过程(图 8A)。一般,抗体呈现速率开始逐渐降低之前 H_2O_2 形成线性增加至 40 摩尔当量 H_2O_2 (图 8B)。相比之下,非免疫球蛋白蛋白质显示短“脉冲”式 H_2O_2 产生随后随着光氧化作用发生而淬灭(图 8A)。

与其它蛋白质相比,如鼠单克隆 IgG PCP21H3 所示(图 8C)的、如果在测定中使用过氧化氢酶将产生的 H_2O_2 去除,抗体则能够以与实验起始的速率一样的速率重新进行 H_2O_2 的光产生。过氧化氢介导的 H_2O_2 损坏后的这种 H_2O_2 连续线性产生曲线对于所测定的所有抗体是保守的。因此,在过程中积累的 H_2O_2 正在抑制其自身的形成(可逆的)。表观 IC_{50} 估计为 $225\ \mu\text{M}$ (图 8D)。

通过底物、过渡态类似物、或反应产物对酶催化功能的抑制作用通常作为活性位点现象强有力的证据。已经注意到抗体-介导的光致产生 H_2O_2 是使用分子氧可饱和的($K_{\text{mapp}}(\text{O}_2)\ 187\ \mu\text{M}$)(Wentworth 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 10930 (2000))。 H_2O_2 的这种形式产物抑制作用提供了此种结合位点现象的进一步证据。

关于通过抗体光产生 H_2O_2 的早期报道没有使用探测到能够产生的 H_2O_2 最大量(Wentworth 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 10930 (2000))。通过反复循环 UV 照射抗体样品随后通过过氧化氢酶去除产生的 H_2O_2 已经检测了这一问题(图 8C 显示两个此类循环)。在一系列实验中,UV-照射和加入过氧化氢酶的循环进行多至 10 次循环(马 poly IgG 的 PBS 溶液, pH 7.4)。在这些实验期间产生了 > 500 摩尔当量(equiv.)的 H_2O_2 ,而观察到仅轻微降低了初始速率。除了抗体之外,迄今为止所发现的能以此种有效且长期方式产生 H_2O_2 的唯一其它蛋白质是 $\alpha\beta$ T 细胞受体($\alpha\beta$ TCR)(图 8F)。有意思的是, $\alpha\beta$ TCR 的免疫球蛋白折叠结构域享有与抗体相似的排列(Garcia 等, *Science*, 274, 209 (1996))。然而,象 β_2 -微球蛋白所显示

的那样,拥有这种结构基序好像对蛋白质的 H_2O_2 产生能力不是必需的,纵使 β_2 -微球蛋白是免疫球蛋白超家族的一员但它不能够产生 H_2O_2 (Welinder 等, *Mol. Immunol.*, 28, 177 (1991))。

抗体结构对抗 H_2O_2 的氧化效应明显没有活性。当在 H_2O_2 存在下暴露于标准紫外线照射条件下 6 小时 (以足以完全抑制 H_2O_2 产生的浓度),一旦通过过氧化氢酶破坏掉抑制性的 H_2O_2 , 多克隆马 IgG 抗体样品变得完全活化 (图 8 E)。甚至在暴露于 H_2O_2 之后,以一恒定速率、在较长时间段内持续产生 H_2O_2 的能力,揭示抗体的结构折叠对化学品的抗性和其它蛋白质所遭受的光氧化修饰的抗性是明显的,并且是至今未引起注意的。对在标准条件下 UV 照射 8 小时后的抗体样品进行 SDS-PAGE 凝胶分析后显示抗体分子既没有明显的片段化也没有凝聚。

为了确定在 H_2O_2 存在的条件下蛋白质结构没有变化 (它可能促成了 H_2O_2 的明显抑制效应),甚至在侧链位置的水平也没有变化,在存在和不存在 H_2O_2 的情况下测定了 Fab 4C6 的 x-射线晶体结构。之所以选择 Fab 4C6 是因为它的天然晶体的衍射分辨率高于任何其它公开的抗体 (~1.3 D)。对于用 3 mM H_2O_2 浸泡之前和之后 4C6 结构的关键结构参数均方根差 (RMSD) 进行了比较。所用原子的 RMSD = 0.412 D, Ca 原子的 RMSD = 0.327 D, 主链原子的 RMSD = 0.328 D, 侧链原子的 RMSD = 0.488 D。鼠 Fab 4C6 (Li 等, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 3308 (1995)) 的天然结构和 H_2O_2 处理后的结构叠置是可以重叠的,因此强化了抗体折叠对 H_2O_2 稳定性的证据 (图 9)。

将抗体介导的光致产生 H_2O_2 的作用谱和抗体蛋白质对相应的相同波长范围 (260 - 320 nm) 的吸收谱并列列于图 10。两个谱实际上与在蛋白质中色氨酸最大 UV 吸收相同的激发波长时所观察到的 H_2O_2 产生的最大效率是可重叠的。

检测通过马 IgG 产生 H_2O_2 的效率与通过用血卟啉 IX 敏化 $^3\text{O}_2$ ($\phi_A = 0.22$ 在磷酸缓冲液 pH 7.0 中) 和可见光下而导致 $^1\text{O}_2$ 形成效率的关系,表明对于每 275 ± 25 摩尔当量的通过敏化作用产生的 $^1\text{O}_2$, 通过抗体分子产

生1摩尔当量 H_2O_2 (Wilkinson 等, J. Phys. Chem. Ref. Data, 22, 113 (1993); Sakai 等, Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng., 2371, 264 (1995))。

电子源的问题。由抗体介导的从单线态氧产生 H_2O_2 所引出的机制问题不得不严格的划分为两个下列问题：一个是关于该过程中的电子源问题并且另一个是关于该过程的化学机制问题。考虑到从 $^1\text{O}_2$ 到 H_2O_2 的转化过程中需要2摩尔当量电子，每个抗体分子当量能够产生 $> 500 \text{ H}_2\text{O}_2$ 当量的事实提出了一个尖锐的电子储备问题。对于电子来源研究开始于最不同的可能性。通过蛋白质的电子转移极其容易地并且显著大距离地发生 (Winkler 等, Pure & Appl. Chem., 71, 1753 (1999); Winkler, Curr. Opin. Chem. Biol., 4, 192 (2000))。考虑的第二个电子源是涉及到在正常的蛋白质光氧化过程中引用的、一般作为电子供体的残基的集合体。在照射和过氧化氢酶处理的重复循环中通过抗体和 $\alpha\beta$ -TCR 产生的几乎恒定的 H_2O_2 产生速率 (图 8 C 和 8E) 则与此种机制相背，因为能够被氧化的残基变得逐渐耗尽使得在 H_2O_2 的产生中将不得伴随着速率的显著降低。这种速率的降低将进一步加重因为由于蛋白质变得具有更多正电荷使得剩余的未氧化残基的氧化还原电位将不得不提高。

正常的蛋白质光氧化过程是一个复杂的级联过程，该过程导致 $^1\text{O}_2$ 和其它活性氧类(ROS)例如超氧负离子($\text{O}_2^{\bullet-}$)、氢过氧自由基($\text{HO}_2^{\bullet}$)和 H_2O_2 的产生(Foote, Science, 162, 963 (1968))。当前对机制的思考将蛋白质对光氧化的敏感性与多达五种氨基酸：色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr)、半胱氨酸 (和胱氨酸)、蛋氨酸 (Met) 和组氨酸 (His) 联系起来 (Straight 和 Spikes, 在 Singlet O_2 , A.A. Frimer, 著者 (CRC Press, Inc., Boca raton, Florida, 1985), IV9 卷, 91-143 页; Michaeli 和 Feitelson, Photochem. Photobiol., 59, 284 (1994))。通过 Trp 和分子氧光致产生 H_2O_2 是一个已进行很好表征的过程，该过程涉及，至少部分涉及，从 $^1\text{O}_2$ 到能够自发歧化成 H_2O_2 和 $^3\text{O}_2$ 的 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 的形成和还原 (McMormick 和 Thompson, J. Am. Chem. Soc., 100, 312 (1978))。由于色氨酸能够转化为对近 UV ($\lambda_{\text{max}} 320 \text{ nm}$) 敏化剂特别有效的 N,N-甲酰犬尿氨酸(NFK)，因此色氨酸，不论是作为单

个氨基酸还是作为蛋白质的成分,在有氧条件下对近 UV 照射(300-375 nm)特别敏感(Walrant 和 Santus, Photochem. Photobiol., 19, 411 (1974)). 然而,在近 UV 照射(图 11A)过程中 Trp 光氧化伴随着 H_2O_2 的亚化学计量的产生(约 0.5 摩尔当量)(McMormick 和 Thompson, J. Am. Chem. Soc., 100, 312 (1978))并且在光致产生 H_2O_2 中最有效的非免疫球蛋白的蛋白质 β -半乳糖苷酶从其 39 Trp 残基中只产生 5.9 mol 当量的 H_2O_2 (图 8A)(Fowler 和 Zabin, J. Biol. Chem., 253, 5521 (1978)).

对人和小鼠 抗体重链和轻链序列 Kabat 数据库的扫描(对 3894 个序列的 2068 个序列进行了分析)显示在其完整结构中抗体很少有超过 15 个 Trp 残基的(平均值 = 15.5, 范围为 14-31 个 Trp 残基)(Kabat 等, 免疫相关的蛋白质的序列 (US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH, 第 5 版, 1991); Martin, 蛋白质: 结构, 功能和遗传学, 25, 130 (1996)). 实际上, 即使将涉及上文的蛋白质光氧化过程的所有氨基酸全体参与抗体介导的 H_2O_2 产生, 这些残基(平均 = 90.1, 范围为 49-167 个反应残基)还是达不到产生 500 摩尔当量 H_2O_2 的足够数量。

考虑到氯离子是已知的通过蒽醌三激发态而光致产生 H_2O_2 的适宜电子源(Scharf 和 Weitz, Symp. Quantum Chem. Biochem., Jerusalem 12 卷 (Catal. Chem. Biochem.: Theory Exp.), 355-365 页 (1979)), 接下来研究了作为还原等价物的氯离子(以 150 mM 存在于 PBS)的电势。当发现通过免疫球蛋白的 H_2O_2 产生速率不依赖于氯离子浓度时(图 11B), 这种可能性很快就大打折扣。

研究了金属离子的可能的作用。虽然此类离子很难以此种可以作为电子源的数量存在于抗体中, 痕量的它们可能会作为催化氧化还原中心起着中心作用。为了所有的实践目的, 开展了允许在此过程中涉及的微量金属被排除的实验。例如, 在将抗体样品用含 EDTA 的缓冲液完全透析之前和之后抗体介导的光致产生 H_2O_2 的速率没有发生变化(图 11C)。将抗体样品用 EDTA 处理后, ICP-原子发射光谱分析(AES)显示剩余的微量金属离子存在的数量远远低于百万分率。对于该反应中涉及的微量金属, 它

对于所有的抗体都是普遍的因为所分析的所有抗体都有这种内在能力。人们普遍接受结合金属不是抗体的一个内在的特征并且这与我们对抗体晶体还有在 Brookhaven 数据库中可得到的大约 300 种抗体结构的分析相一致。

因此所有的观察强制性的指向了鉴定电子源的需要, 这种电子源并不意味着蛋白质晶体的失活并且解释了高转化数量和因此解释了类似的非限制性的电子源。

对 $^1\text{O}_2$ 的化学电位作了更广的考虑。从先前的报道中可以清楚地推断出在抗体介导的机制中存在分子氧的高能态的参与(Wentworth 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 10930 (2000))。简言之, 抗体介导的光致产生 H_2O_2 速率在 D_2O 中提高了并且在 $^1\text{O}_2$ 猝灭剂叠氮化钠存在的情况下降低了。此外, 抗体还表现出通过使 $^3\text{O}_2$ 在可见光下对血卟啉 IX 敏化, 并且在黑暗中对内过氧化物 3N,3N-(1,4-亚萘基) 二丙酸二钠(一种化学 $^1\text{O}_2$ 源) 敏化而产生 H_2O_2 。 $^1\text{O}_2$ 的参与还与抗体介导的 H_2O_2 产生的作用光谱和抗体成分色氨酸的吸收光谱的紧密相似性相一致(图 10)。

考虑到 $^1\text{O}_2$ 的已知化学作用使其具有作为超-亲电子试剂“二噁乙烯”的化学作用的概念(Foote, Acc. Chem. Res., 1, 104 (1968)), 迄今未知的可能性认为是: 在抗体存在的情况下, 水分子能作为亲核试剂加到 $^1\text{O}_2$ 上并且形成作为中间体的 H_2O_3 。因此, 正在变成被氧化至 H_2O_2 的水能够实现电子源的作用。

为了验证通过 $^1\text{O}_2$ 抗体催化 H_2O 的光氧化的假设, 进行了通过确定 H_2O_2 中氧的来源的氧同位素实验。使用经过修改的标准 H_2O_2 检测方法(Han 等, Anal. Biochem., 234, 107 (1996))测定了 H_2O_2 中 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 的含量。简单的说, 这种方法包括用三羟乙基膦(TCEP)的还原, 然后对相应的氧化膦用质谱(MS)分析(图 12)。

这些实验显示抗体的 UV 照射, 在氧存在时, 导致在从水到 H_2O_2 的过程中有氧的掺入(图 12A 和 12B)。在 H_2^{18}O (98 % ^{18}O)磷酸盐缓冲液(PB)中 $^{16}\text{O}_2$ 浓度饱和的条件下, 绵羊 poly-IgG 被照射后, 在氧化膦的 MS 分析中所观察到 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 比率的相对丰度是 $2.2 \pm 0.2:1$ (图 12A)。当用 H_2^{16}O

PB 中 ^{18}O 富含的分子氧混合物(90 % ^{18}O)进行反向的实验时,观察到了相反的比率($1:2.0 \pm 0.2$) (图 12B)。这些比率的数值呈现出很好的可重复性($+10\%$, $n=10$)并且发现于所研究的所有抗体中。

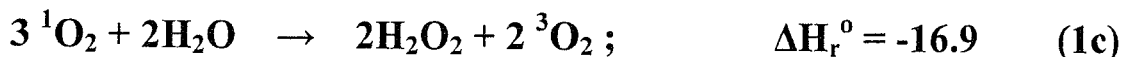
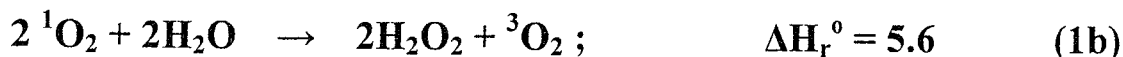
开展了下述的对照实验。首先,在 $^{16}\text{O}_2$ 和 H_2^{16}O 的条件下,照射 poly-IgG (马)产生 $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ (图 12C)。当将 $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ (400 μM 于 PB, pH 7.0) 自身在 H_2^{18}O 中照射 4 小时后没有 ^{18}O 的掺入。这种结果减轻了顾虑,即 ^{18}O 掺入到 H_2O_2 中可能通过酸催化的与水的交换而发生或者通过一种涉及 $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ 的均裂和与来源于水的 $\text{H}^{18}\text{O}^\bullet$ 的重组的机制而发生。为了检查抗体能够催化 $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ 产生和催化其与 H_2^{18}O 发生酸催化交换的可能性,观察了在惰性气体中 UV 照射后的在绵羊 poly-IgG (6.7 μM) 存在的情况下 $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ (200 μM) 在 $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ (98 % ^{18}O) PB 中的同位素交换。观察到只有微量的 ^{18}O 掺入到 $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ 中 (图 12D)。

对 β -半乳糖苷酶 (在产生 H_2O_2 方面最有效的非免疫球蛋白蛋白质) 和 3-甲基吲哚也进行了同位素实验。在该两种情况下,光氧化导致了 ^{18}O 以可以忽略不计的量掺入到 H_2O_2 中 (图 12E 和 12F), 说明在该蛋白质中吲哚环自身和色氨酸残基仅作为 $^1\text{O}_2$ 的还原剂起作用的观点。

这种观点通过观察进一步得到支持,观察发现照射 3-甲基吲哚产生不包括从 H_2^{18}O 而来的氧掺入的 H_2O_2 。用色氨酸进行的相同实验的确发生了以 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 比率为 1.2:1 的交换。这种结果被认为是由于铵作为分子内广义酸起作用,质子化 3'-氢过氧化物的非对映混合物的内部氧。应该注意虽然从化学的观点看是它是有趣的,但它不能解释通过抗体的催化产生 H_2O_2 , 因为它是一个化学当量的过程并且蛋白质中的 Trp 残基不含有游离铵基。

化学机制. 所研究的所有抗体能够通过单线态氧催化水的氧化。对于通过 $^1\text{O}_2$ 进行 H_2O 的氧化过程中反应物和产物的热力学平衡(反应热, $\Delta H_r = +28.1 \text{ kcal/mol}$) (D.R. Lide, 在化学和物理学手册, 第 73 版, (CRC, 1992)) 需要化学计算, 其中在其转化入两个 H_2O_2 分子的过程中, 一个以上的 $^1\text{O}_2$ 分子将不得不参加到每个氧化的水分子中。化学计算假定在涉及从三氧产生单氧之间没有其它光能参与该过程。对假想机械途径的定量化学推理和

热力学考虑一起使得有可能如用方程 1b 或者 c 进行全部化学计算(全部能量是从气相实验生成热计算得到的并报道为 kcal/mol):



最近关于通过铈-介导的氧化还原过程进行金属催化 $^1\text{O}_2$ 和水转化成过氧化氢的过渡态的报道(Detty 和 Gibson, J. Am. Chem. Soc., 112, 4086 (1990)), 为 $^1\text{O}_2$ 和 H_2O 能够被转化为 H_2O_2 的过程提供了实验证据并且, 因此能够克服该过程的能量需求。认为抗体-介导的光氧化过程机理涉及将一分子水加成到一分子 $^1\text{O}_2$ 形成三氧化二氢作为 H_2O_2 形成途径中第一个中间体。抗体作为催化剂的功能将不得不提供特殊分子环境, 该环境将稳定有关其可逆形成的关键中间体并且, 或者, 将通过多渠道化其转化为 H_2O_2 加速中间体的消耗。此种环境的基本特征可以包括在由抗体特异性环境所提供的活化部位所组成的水分子的特殊相互影响因素。

由于 H_2O_3 在生物系统中还未检测到, 其在体内的化学作用相当程度上来自推测, 并且其体外特性已经成为大量实验和理论处理的论题(C. Deby, La Recherche, 228, 378 (1991); Sawyer, 氧化学(Oxford University Press, Oxford, 1991); Cerkovnik 和 Plesnicar, J. Am. Chem. Soc., 115, 12169 (1993); Vincent 和 Hillier, J. Phys. Chem., 99, 3109 (1995); Plesnicar 等, Chem. Eur. J., 6, 809 (2000); Corey 等, J. Am. Chem. Soc., 108, 2472 (1986); Koller 和 Plesnicar, J. Am. Chem. Soc., 118, 2470 (1996); Cacace 等, Science, 285, 81 (1999)). Plesnicar 和其共同研究者们已经表明 H_2O_3 (从臭氧还原产生的) 分解为 H_2O 和 $^1\text{O}_2$ (Koller 和 Plesnicar, J. Am. Chem. Soc., 118, 2470 (1996)). 应用微观可逆性的原则, 推测逆向反应将也是由一个或多个水分子所催化的。为了描绘此过程似乎合理的反应途径和能量学, 如此处所述首先使用了量子化学(QC)方法原理(B3LYP 密度功能理论)。结果说明于方程式 2a-c (全部能量报道为 kcal/mol):



水和 ${}^1\text{O}_2$ 产生 H_2O_3 的直接反应是非常不利的, 它具有 70 kcal/mol 的激活势垒(方程式 2a)。然而, 随着加入第二或第三个水分子, 发现一个协调的过程分别将激活势垒降低至 31.5 和 15.5 kcal/mol。事实上这些加入的水确实具有催化剂的作用(在方程式 2b 中第 2 个水的 H 进入产物 HOOH , 同时用第一个水的 H 代替它)。与水的第一个 HO 键能(119 kcal/mol)和 ${}^1\text{O}_2$ 的键能(96 kcal/mol)相比, 这些势垒是小的。注意到方程式 2b 和方程式 2c 中的逆反应分别仅具有 15.5 或 0 kcal/mol 的势垒, 表明大体积水和富含水的系统中 H_2O_3 是不稳定的。因此, 对于产生和利用 H_2O_3 的抗体结构内最佳位点预期是位于紧靠没有此种水的疏水区的、其中定位有水和水二聚体的位点。

来源于抗体催化的水光氧化的氧化磷内的 ${}^{16}\text{O}/{}^{18}\text{O}$ 比率明显地限制反应过程的选择, 通过该过程这种初级中间物 H_2O_3 将被转化成终产物 H_2O_2 。对化学上参与从 2 摩尔 H_2O 产生 2 摩尔 H_2O_2 并通过此种过程的机理细节的 ${}^1\text{O}_2$ 的分子的数量来初步测定比率。2.2:1 的比率准确地符合从特定机制中预测的值, 在该机制中两分子 ${}^1\text{O}_2$ 和两分子 H_2O 被转化成两分子 H_2O_2 和一分子的分子氧(由于热力学反应其也许是 ${}^3\text{O}_2$)。此种机制的例子是两分子 H_2O_3 到 H_2O_4 和 H_2O_2 的 $\text{S}_{\text{N}}2$ 类型的歧化反应, 然后是前者分解成 H_2O_2 和 ${}^3\text{O}_2$ 。使用量子化学方法(B3LYP 密度功能理论)在系统方法中解决了复杂的问题, 该复杂问题就是对于有或没有 ${}^1\text{O}_2$ 参与的从 H_2O_3 到 H_2O_2 的转化的理论可行反应途径的限定。这些研究表明 H_2O_3 的广泛对接(docking)计算和对于大量蛋白质其形成和转化成 H_2O_2 的过渡态。的确

在抗体(和 $\alpha\beta$ -T 细胞受体)的区域中一个具有分离的水并接近疏水区的区域内存在一个稳定该种类的独特位点。这种广泛的研究表明对于从 H_2O_3 到 H_2O_2 的转化的理论可行化学途径的整个范围的潜在存在。

结合到抗体的氙的结构研究。对于抗体,不论是起源或抗原特异性,或 $\alpha\beta$ -TCR 介导此种反应的保守能力,开展了 X-射线结构研究以寻找这些免疫球蛋白折叠蛋白质内的可能的保守反应位点。对于潜在位点的关键性限制是分子氧($^1\text{O}_2$ 或者三线态氧,具有接近的潜在敏化残基,优选的是色氨酸)和水必须是能够共定位的并且沿着该途径过渡态和中间物在该位点内或其附近必须是稳定的。

有强有力的证据支持 Xe 和 O_2 共定位于蛋白质内相同空穴内的观点(Tilson 等, J. Mol. Biol., 199, 195 (1988); Schoenborn 等, Nature, 207, 28 (1965))。因此,氙气用作重原子示踪物以定位鼠单克隆抗体 4C6 内可能易于进入分子氧的空穴(Li 等, J. Am. Chem. Soc., 117, 3308 (1995))。

已鉴定了三个氙位点(图 13A),并且如在蛋白质中其它氙-结合位点内所观察到的一样全部占据疏水空穴(Scott 和 Gibson, Biochemistry, 36, 11909 (1997); Prangé 等, 蛋白质: 结构和遗传学, 30, 61 (1998))。精细的天然结构和氙-衍生结构的重叠显示除了加入氙以外,在蛋白质骨架或构想侧链内或者结合水分子的位点内几乎不具有可以辨别的改变。

在这里已经更加详细地分析了氙 I 结合位点(Xe1 位点),因为在所有抗体和 $\alpha\beta$ TCR 内它都是保守的(图 13B)。Xe1 位于离不变 Trp 距离为 7 Å 的 V_L 的 β -片层之间高度保守区的中间。Xe1 位点夹在两个 β -片层之间,包含 V_L 的免疫球蛋白折叠,大约距离外部分子表面 5 Å。Xe1 位点 2(Xe2)位于抗原结合袋的基底处,正好在几个高度保守的残基上面,这在抗体的重链和轻链之间形成了结构上保守的界面(图 13A)。 $V_L V_H$ 界面内的残基主要是疏水的并且包括保守的芳香族侧链,例如 Trp^{H109}。

Fab 4C6 中用于 Xe1 的接触侧链是 Ala^{L19}、Ile^{L21}、Leu^{L73} 和 Ile^{L75}, 它们是所有抗体中高度保守的脂肪族侧链(Kabat 等,免疫相关的蛋白质的序列分析 (美国卫生和人类服务部, Public Health Service, NIH, 第 5 版,

1991))。因此,在全部所检测抗体的该区域内仅观察到轻微的结构改变。值得注意的是,几个其它高度保守且不变的残基位于该氩位点紧密相邻的位置,包括 Trp^{L35}、Phe^{L62}、Tyr^{L86}、Leu^{L104},以及 Cys^{L23}和 Cys^{L88}之间的二硫键。Trp^{L35}堆叠抵抗二硫键并距氩原子仅 7 Å。在该结构中,由于 Trp^{L35}是 Xe1 最靠近的 Trp,Trp^{L35}可以是假定的分子氧敏化剂。将 2C αβ TCR 结构与全部可获得的 TCR 结构进行比较表明该 Xe1 疏水袋在 TCR 中也是高度保守的(图 5B) (Garcia, Science, 274, 209 (1996))。

人 β₂-微球蛋白,其不产生 H₂O₂,不具有限定抗体 Xe1 结合袋的相同精细结构特征,尽管其总体上的免疫球蛋白折叠。同样,β₂-微球蛋白不含有在抗体和 TCR 中都存在的保守的 Trp 残基。如果 Trp^{L35} (抗体) 或 Trp^{a34} (TCR)是氧敏化剂,在 β₂-微球蛋白中缺乏相应的 Trp 可以与其不催化水的氧化反应的发现相关。

因此,氩实验已经鉴定了至少一个既易进入分子氧也位于不变 Trp 附近的保守区(V_L)内的位点;一个等同的保守位点也可能位于 V_H 折叠内。在 V_H 结构域内通过使 V_L 与 V_H 相关的假性 2 折叠旋转轴几乎可以精确再现 Xe1 位点周围的结构和序列。尽管氩结合位点不定位于该结构域,认为分子氧仍然能够进入相应的 V_H 空穴内。可能还没有发现所提出的重链氩位点,因为仅对结晶施压作用 2 分钟,这 2 分钟时间可能不足以建立完全的平衡,或者仅仅因为与氧比较对于 V_H 侧面上相应的空穴而言氩太大,或者由于晶体的管壳 (crystal packing)。在其它抗体实验中,仅在不对称单元的两个分子中的一个分子内发现了氩结合位点,这表明晶体的管壳能够调节 Xe 进入晶体。对这些位点周围的序列和结构进行的分析显示在抗体和 TCR 中它们都是高度保守的,因此提供了对为什么抗体和 TCR 中的 Ig-折叠能够参与这种不寻常化学作用的一种可能的理解。

因其催化地将 ¹O₂ 转化为 H₂O₂ 的能力,抗体在蛋白质中是独特的。认为该过程参与通过 H₂O₂ 产生相关事件进行杀伤。另外,抗体能够执行使有机体抵抗 ¹O₂ 的功能。这将需要通过过氧化氢酶进一步将过氧化氢加工成水和三线态氧。

实施例III: 抗体的抗微生物活性

本实施例表明针对细菌的抗体能够通过产生活性氧类杀死那些细菌。

材料和方法

抗体和细胞制备

从 Pierce 获得绵羊(31243)和马(31127)多克隆抗体并直接使用, 不进一步纯化。大肠杆菌 O112a,c-特异的鼠单克隆抗体(15404)从 QED biosciences 获得并直接使用, 不进一步纯化。大肠杆菌非特异鼠单克隆抗体 33F12 和 84G3 从 Scripps Hybridoma 实验室获得并在 > 98 % 纯度(基于 SDS-PAGE 分析)时使用。单克隆抗体 33F12 是催化醛醇反应的鼠单克隆 IgG。Wagner 等, Science 270, 1797 (1995)。大肠杆菌 XL1-B 从 Stratagene 获得。大肠杆菌 O112a,c (ATCC 12804)是肠侵袭性大肠杆菌, 能够感染营养不良和免疫功能不佳的个体。L. Siegfried, M. Kmetove, H. Puzova, M. Molokacova, J. Filka, J. Med. Microbiol. 41, 127 (1994)。

以下抗体制备是通过以下方法在室内进行制备的。

大肠杆菌 XL-1 blue 特异的兔多克隆 IgG

在免疫的当天(第 0 天), 将新西兰白兔(2.5 kg)从每只耳朵预先放血 10 ml 并且然后用加热杀死(65 °C, 15 分钟)的化学感受态大肠杆菌 XL-1 (OD₆₀₀=1) (650 µl 和 350 µl 磷酸盐缓冲生理盐水, PBS pH 7.4)进行皮下注射。免疫后 14 天(第 14 天), 白兔以与第一次相同的方式接受第二次注射。免疫后 28 天(第 28 天), 白兔以与第一次和第二次注射相同的方式接受第三次注射。在免疫后 35 天(第 35 天), 将白兔从耳朵放血 50 ml。在免疫后 42 天(第 42 天), 将白兔从耳朵放血 50 ml。

血清允许在室温静置 1-2 小时, 然后放置于 4 °C 过夜并以 2500-3500 转每分旋转 15 分钟。将上清转移至新的园底管(50 ml)中并在 9-10 K 转每分旋转 15 分钟。将这些上清液转移至干净的圆锥形管(50 ml)中并储存于 -10 °C。然后通过 ELISA (见下)测试血清, 1:1 稀释于 PBS 并且然后滤过 0.2 µM 的滤器。测定血清样品的蛋白质浓度(Abs₂₈₀)。然后将血清样品装到蛋白 G 柱子(Amersham Gamma-Bind G, 10 mg 蛋白质/ml 珠子)上。

用 3 倍柱体积的 PBS pH 7.4 洗涤所结合的抗体并且然后 2 倍柱体积的醋酸 (0.1 M, pH 3.0) 进行洗脱。用 Tris 缓冲液 (1 M, pH 9.0) 中和洗脱峰(每 4 ml 级分加 0.5 ml)并且然后透析回 PBS。

大肠杆菌 XL-1 blue 特异的鼠单克隆 IgG

在第 0 天, 129 只 Gix+小鼠(6-8 周, 每组 4 只)接受腹膜内注射加热杀死(65 °C, 15 分钟)的化学感受态大肠杆菌 XL-1, 溶于含 50 μ l 磷酸盐缓冲生理盐水, PBS pH 7.4 的 150 μ l 体积, OD₆₀₀=1。在第 14 天时, 小鼠以与第一次相同的方式接受第二次注射。在第 28 天时, 小鼠以与第一次和第二次注射相同的方式接受第三次注射。在第 35 天时, 将小鼠通过眼球内穿刺取血。

使用标准方法制备了 12 株 XL-1 blue 特异的单克隆抗体。通过硫酸铵沉淀然后通过装入蛋白 G 柱子(Amersham Gamma-Bind G, 10 mg 蛋白质/ml 珠子) 纯化抗体制剂。用 3 倍柱体积的 PBS pH 7.4 洗涤所结合的抗体并且然后 2 倍柱体积的醋酸(0.1 M, pH 3.0)进行洗脱。用 Tris 缓冲液 (1 M, pH 9.0) 中和洗脱峰(每 4 ml 级分加 0.5 ml)并且然后透析回 PBS。

用于确定抗体结合至活的或杀死的大肠杆菌的通用 ELISA 方法

读取大肠杆菌 XL1-blue 冷冻甘油储存液的 OD₆₀₀ 并将活细菌储存液稀释于 PBS 至 OD₆₀₀ = 1.0。将 25 微升一份的细菌放置于 96-孔高结合 (hi-bind) ELISA 板内并使其在 37 °C 过夜干燥。轻轻用 dH₂O 洗板两次。用 BLOTTO (50 μ l/孔)在室温包被板子各孔 30 分钟并且通过震荡去除该包被液。然后将所测定的含抗体的样品稀释于 BLOTTO 并将 25 μ l 该溶液加入每个孔。在保温盒内将板子在 37 °C 孵育 1 小时, 用 dH₂O (10 x)轻轻洗板并在每个孔中加入 25 μ l 溶于 BLOTTO 的第二抗体(HRP-山羊抗兔结合物, 1:2000)。在保温盒内将板子在 37 °C 孵育 1 小时并用 dH₂O (10 x)轻轻洗板。加入显色底物(50 μ l/孔)并于 30 分钟后在 450 nm 读取数值。

死细菌样品也用于 ELISA 分析。以上述相同的方式处理样品, 但在加入并吸附于 ELISA 微孔板之前, 将大肠杆菌加热处死(65 °C, 15 分钟)。

杀菌试验

在典型的实验中, 重复沉淀($3 \times 3,500$ 转每分)大肠杆菌培养物(在对数生长期, $OD_{600} = 0.2-0.3$)并重悬于 PBS (pH 7.4)。然后将 PBS 悬浮的细胞加入玻璃瓶管中并冷却至 4°C 。加入血卟啉 IX ($40 \mu\text{M}$)和抗体 ($20 \mu\text{M}$)并将玻璃瓶管或放置于看片灯上(可见光, 2.8 mW cm^{-2})或放置于 4°C 黑暗并孵育 1 小时。通过琼脂板上菌落形成单位(CFU) 的恢复率测定存活率。每个试验至少重复进行两次。

显微镜研究

如下述制备样品用于电子显微镜观察。用溶于二甲砷酸盐(0.1 M)的多聚甲醛($2 \% \text{ w/v}$)、戊二醛($2.5 \% \text{ w/v}$)在 0°C 固定细胞 1.75 小时然后进行沉淀。将细胞沉淀重悬于溶于二甲砷酸盐(0.1 M)的 OsO_4 ($1 \% \text{ w/v}$), 使其静置 30 分钟并且然后进行沉淀。然后连续用乙醇和环氧丙烷将沉淀脱水, 包埋于树脂并且然后进行切片。用醋酸双氧铀和柠檬酸铅将切片染色。对于金标记研究, 所用步骤如上详述并补充以下步骤。第一, 将样品沉淀并用新鲜的等渗缓冲液洗涤以去除未结合的一级抗体。第二, 将样品重悬于已经用 12 nm 的金颗粒共价修饰的山羊抗小鼠抗体溶液中, 并孵育 90 分钟。

在水溶液条件下 O_3 的分解

通过以下方法测定在所用的水溶液条件下 O_3 的分解速率。将臭氧(通过使氧穿过 Polymetrics 臭氧发生器产生)在室温使其通过石英管(1 cm^2)中的磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH 7.4)溶液进行冒泡 2 分钟。然后在装备有 22°C 恒温箱架的 Hitachi 紫外/可见分光光度计上测定 260 nm ($\epsilon = 2,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)处光密度时间依赖性改变至少 5 个半寿期。参见 Takeuchi 等, Anal. Chim. Acta. 230, 183 (1990)。然后使用 Graphpad Prism V 3.0 软件从 OD 对时间曲线上图解确定 O_3 的半寿期(数据为显示)。通过分光光度计限定测定的灵敏性精确至为 $t = 0$ 时 OD 的 $\pm 0.1 \%$ ($\sim 1 \mu\text{M}$)。

臭氧测定

在典型的实验中, 当存在或缺乏含有或不含过氧化氢酶(13 mU/mL)的

抗体(20 μM)时在透照灯(312 nm, 0.8 mWcm^{-2})上室温照射石英微孔板内的靛蓝胭脂红 1 (1 mM)的 PBS (pH 7.4)溶液(终体积 200 μL), 重复两次。在不同时间点取出样品(20 μL)并浸入磷酸盐缓冲液(100 mM, pH 3.0, 180 μL)淬灭。在微孔板读值器(Spectramax)中测定 610 nm 处的 OD 值。通过 LC-MS (连接到 Hitachi M-8000 离子收集器电喷射质谱仪上的 Hitachi D-7000 HPLC (阴离子检测模式))测定磺酸靛红 2 的产生。LC 条件是球形填料 RP-C18 柱子和乙腈水(30:70)流动相流速 1 mL/分钟。机内分离器用于将 0.2 mL/分钟柱流出物传送入 MS。磺酸靛红 2 RT = 3.4 分钟, [MH]⁻ 226。

对多种活性氧类进行测试以确定靛蓝胭脂红 1 是否能够通过其它活性氧类而不是臭氧转化成为磺酸靛红 2。

表 2: 所观察到的通过不同活性氧类的靛蓝胭脂红 1^a 的氧化作用和 ¹⁸O 同位素掺入 环状 α -酮酰胺 2^b。

氧化剂	反应形成 2	¹⁸ O 掺入 2
O ₃ ^c	是	是
¹ O ₂ ^{*d}	是	否
H ₂ O ₃ ^e	是	否
HO ₂ •/O ₂ • ^{-f}	否	- ^h
H ₂ O ₂ ^g	否	- ^h
HOCl ⁱ	否	- ^h

^a 氧化作用是在所指定的条件下将各个氧化剂加入靛蓝胭脂红 1 (1 mM)的磷酸盐缓冲液(PB, pH 7.4)之前或之后通过室温在微孔板读值器内以下 610 nm 处吸光度的改变进行测定的。

^b¹⁸O 掺入是通过在每种氧化剂特定的条件下用 H₂ ¹⁸O (>95% 标记的)进行 PB (100 mM, pH 7.4)中的靛蓝胭脂红 1 氧化作用和通过阴离子电喷射质谱测定法监测环状 α -酮酰胺 2 的同位素谱确定的。在测定条件下已装入 α -酮酰胺 2 的酰胺羰基的标记物不与水发生互换。

^c 将靛蓝胭脂红 (1, 1 mM)加入到臭氧 (~ 600 μM) PB (100 mM, pH 7.0)溶液中。

^d 通过用可见光(2.7 mW/cm^2)照射血卟啉 IX ($40 \text{ }\mu\text{M}$)溶液和 1 (1 mM)的 PB 溶液 1 小时观察 $^1\text{O}_2^*$ 的作用。

^e 参见参考文献 42。

^f 将溶于 DMSO 的过氧化钾(10 mM)加入 1 的 PB (100 mM , $\text{pH } 7.0$)溶液中以至于最终有机共溶剂为 5 %。

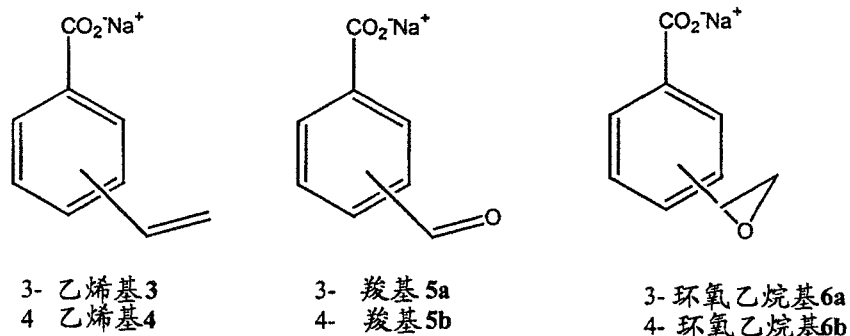
^g PB 中终浓度为 2 mM 。

^h 未检测。

ⁱ 将靛蓝胭脂红 (1, 1 mM)加入到 NaOCl (20 mM)的 PBS ($\text{pH } 7.4$)溶液中并且在完全漂白溶液之后通过 HPLC 测定环状 α -酮酰胺 2 的形成。

初步研究揭示了, 当存在紫外光(312 nm , 0.8 mW cm^{-2})时环状 α -酮酰胺 2 内酰胺羰基氧与水发生快速和可逆的互换。然而, 用白光照射时在实验过程中不发生可辨别的互换。因此, 全部 ^{18}O 同位素掺入试验使用血卟啉 IX ($40 \text{ }\mu\text{M}$)和白光(2.7 mW cm^{-2})作为 $^1\text{O}_2^*$ 来源而进行。

使用以下含有正常碳-碳双键的额外化学探针进行进一步研究。



通过其水溶液溶解度结合易于通过 HPLC 检测而指导探针 3- 和 4-乙烯基苯甲酸 (分别为 3 和 4) 的选择。在典型的实验中, 当存在或缺乏抗体 4C6 或绵羊多克隆抗体 ($20 \text{ }\mu\text{M}$)时, 将 3-乙烯基苯甲酸 3 (1 mM)或 4-乙烯基苯甲酸 4 (1 mM)的 PBS ($\text{pH } 7.4$)溶液在室温进行照射(312 nm , 0.8 mW/cm^2)。定时取出等份($20 \text{ }\mu\text{L}$)并 1:3 稀释于乙腈:水(1:1)。通过反相 HPLC 测定产物组合物。

3-乙烯基苯甲酸 3 (1 mM) PBS ($\text{pH } 7.4$)溶液的室温常规臭氧分解作用导致苯甲醛衍生物 5a 的产生, 同时伴有比率为 $\sim 10:1$ 的小量相应环氧化物

6a 的产生。同样,在上述相同条件下 4 的臭氧分解作用导致以~ 9:1 的比率形成 4-羧基苯甲醛 5b 和对应的环氧乙烷 5b。在典型的实验中,在室温将 3 或 4 (1 mM)的 PBS (pH 7.4)溶液加入到 O_3 PBS (600 μ M)溶液中并使其静置 5-10 分钟。以该种方式而不是通过使 O_3/O_2 混合物穿过反应水溶液进行 3 和 4 的臭氧分解作用以阻止 3 和 4 的进一步氧化作用,进一步氧化会导致芳族环的羟基化作用和片段化。通过反相 HPLC 阐明产物混合物和底物转化。在 Hitachi D-7000 机器上使用 Spherisorb RP-18 柱子进行 HPLC 分析并且流动相为乙腈和水(0.1 % TFA)(30:70)流速为 1 mL/分钟。通过紫外检测(254 nm) (RT 3 = 7.84 分钟; RT 5a = 4.02 分钟; RT 6a = 3.82 分钟; RT 4 = 8.50 分钟; RT 5b = 3.72 分钟; RT 6b = 4.25 分钟)进行定位。通过与标准曲线比较将峰面积转化为浓度。

嗜中性粒细胞上的抗体检测

已知在嗜中性粒细胞的表面具有抗体。荧光激活细胞分选术用于测定在静息或活化条件下每个细胞存在的免疫球蛋白分子的数量。在静息条件下每个细胞大约有 50,000 个抗体分子,当活化后将增加到每个细胞大约 65,000 个抗体分子。

结果

抗体的抗微生物活性

如上所说明,通过经由三氧化二氢(H_2O_3)中间体的过程,抗体可催化从单线态氧($^1O_2^*$)和水产生过氧化氢(H_2O_2)。该实施例中提供的结果说明抗体能够利用该过程有效地杀死细菌。

最初的杀菌研究利用两株革兰阴性菌大肠杆菌菌株(XL1-blue 和 O-112a,c)。大肠杆菌 XL1-B 从 Stratagene 获得。大肠杆菌 O112a,c (ATCC 12804)是能够感染营养不良和免疫反应不佳个体的肠侵袭性大肠杆菌菌株。Siegfried 等, J. Med. Microbiol. 41, 127 (1994)。

$^1O_2^*$ 离子具有杀菌作用。Berthiaume 等, Biotechnology 12, 703 (1994)。然而,通过抗体起始 H_2O_2 产生需要暴露于底物 $^1O_2^*$ 。Wentworth 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 10930 (2000)。因此,仅使用 $^1O_2^*$ 产生系统自身

将不会杀死大肠杆菌。抗体能够利用分别由内源性或外源性敏化剂或化学材料,使用紫外光或白光,或高温分解诸如蒽-9,10-二丙酸内过氧化物,所产生的 $^1\text{O}_2^*$ 。因此,仅通过实验思路例如反应效率和细胞或底物对照射的敏感性可以指导 $^1\text{O}_2^*$ 产生系统的选择。在这些试验中,选择血卟啉 IX (HPIX, 40 μM)作为有效的 $^3\text{O}_2$ 敏化剂。Wilkinson 等, J. Phys. Chem. Ref. Data 22, 113 (1993)。当在磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH 7.4)中在 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 用白光(光通量 2.7 mW cm^{-2})照射 1 小时时,对于两种大肠杆菌血清型($\sim 10^7$ 个细胞/mL)血卟啉 IX 具有可忽略的杀菌活性。

在典型的实验中,通过沉淀(3 x 3,500 转每分)细胞并将其重悬于 PBS (pH 7.4)重复用 PBS 洗涤大肠杆菌培养物(处于对数生长期, $\text{OD}_{600} = 0.2-0.3$)。然后将 PBS 重悬的细胞加入到玻璃瓶管中并冷却至 4°C 。加入血卟啉 IX (HPIX, 40 μM)和抗体 (20 μM)并将玻璃瓶管或放置于看片灯(可见光, 2.8 mW cm^{-2})上或放置于黑暗 4°C 并孵育 1 小时。通过琼脂糖平板上菌落形成单位(CFU)确定存活率。每个试验至少重复进行两次。

将单克隆抗体(20 μM)加入血卟啉 IX 和细菌的混合物导致杀死 > 95 % 的细菌(图 14A)。抗体的杀菌活性是抗体浓度的函数。例如,使用 10 μM 抗原特异性鼠单克隆抗体 15404 能够获得 O112a,c 细胞 > 95 % 的杀伤。这些数据表明杀死 50 % 细胞的有效抗体浓度(EC_{50})是 $81 \pm 6 \text{ nM}$ (图 14B)。对于针对 XL1-blue 大肠杆菌菌株的单克隆抗体(25D11)也观察到相似的浓度对杀伤依赖性,观察到在大约 10 μM 处最大杀伤为 > 95 %。

抗体-介导的杀菌活性作为照射时间的函数而增加(图 14C)并随着增加血卟啉 IX 的浓度而增加(光通量固定于 2.7 mW cm^{-2}) (图 14D)。抗体-介导的细菌杀伤与血卟啉 IX 浓度和光照射成比例关系的观察结果表明在该过程中 $^1\text{O}_2^*$ 和水氧化途径都具有关键作用。关键地是,当缺乏 $^1\text{O}_2^*$ 时,免疫球蛋白对大肠杆菌的存活具有可忽略的影响。

对照显示冷休克和血卟啉 IX 毒性不影响菌落形成单位(CFU)的明显损失。而且,共聚焦显微镜实验显示抗体介导的细菌细胞聚集也不助于抗体处理组中 CFU 的缺乏。细菌细胞的荧光分析表明在血卟啉 IX 处理的大肠

杆菌细胞中膜相关敏化剂的量不通过抗体结合而增加。最后, 由于难以排除微量金属在抗体杀菌作用中的潜在作用, 所以 EDTA (2 mM) 的存在对所使用的测定系统中细菌的存活没有影响。

抗体的杀菌潜能表现为一般现象。进行测试的所有 12 株鼠单克隆抗体 (1 x $\kappa\gamma$ 、7 x $\kappa\gamma$ 2a、3 x $\kappa\gamma$ 2b、1 x $\kappa\gamma$ 3 同种型) 和一株兔多克隆抗体 (滴度 120,000) 样品都是杀菌的。非特异抗体也能够产生杀菌剂。仅 $^1\text{O}_2^*$ 是水氧化途径活化所必需的一此种活化不依赖于抗体-抗原联合体。关于这方面, 研究了对大肠杆菌细胞表面抗原没有特异性的 10 个非特异鼠单克隆抗体、一个非特异绵羊抗体制剂和一个马多克隆 IgG 样品并且全部具有杀菌活性。观察到抗原非特异抗体的杀菌活性潜能与抗原特异性抗体非常相似。在测定系统中一般 20 μM 抗体 (非特异) 具有 > 95 % 的杀菌性。抗体的杀菌作用不仅仅是非特异蛋白质作用, 因为在该测定系统中牛血清白蛋白 (BSA, 20 μM) 呈现出无细菌杀伤性。

为了能够洞察所观察的细菌杀伤的特性, 通过电子显微镜研究了所杀死的细菌的形态学。金标记二级抗体用于使形态学损伤与细菌细胞壁上抗体结合的位点相关。

杀伤与在细菌细胞壁中抗原-抗体联合体位点处孔洞的产生相关 (图 15)。由呈现于细菌样品内的形态学的排列证明该过程表现为一种逐渐的过程。在杀菌途径中具有清楚的阶段, 其中氧化损伤导致细胞壁和质膜对水的渗透性增加。

细菌处于大约 30 大气压的内压力下, 因此膜的任意衰弱都能够导致灾难性的破裂。该过程显示首先在细胞壁和细胞质之间的界面处观察到轻微的破坏 (图 16A), 随着细胞壁从细胞质内含物清楚地分离该破坏变得更加严重 (图 16B)。持续的水流入导致细菌细胞结构严重畸形和残缺 (图 16C), 最终导致在抗体吸附位点处细胞壁和质膜的破裂和细胞质内含物的喷出 (图 16D)。在这方面, 有趣的是所观察到的由抗体-介导的杀伤所诱导的形态学改变与当细菌被吞噬作用所破坏时所见到的改变相似。Hofman 等, *Infect. Immun.* 68, 449 (2000)。

杀菌剂的化学特性

如果 H_2O_2 是抗体催化的水氧化途径的最终产物(Wentworth 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 10930 (2000); P. Wentworth, Jr.等, Science 293, 1806 (2001)), 那么仅 H_2O_2 将可作为杀伤剂。通过过氧化氢酶, 该酶将 H_2O_2 转化为水(H_2O)和分子氧(O_2), 提供针对非特异性抗体杀菌活性的完全保护的观察(图 17A)强化了该结论。

由非特异性抗体所产生的 H_2O_2 的量是 $35 \pm 5 \mu\text{M}$ 。由特异性抗体所产生的 H_2O_2 的量是可变的。距离接近的问题使得直接进行溶液中 H_2O_2 与复杂细菌膜表面上所产生的 H_2O_2 的效果之间的比较。例如, 研究了过氧化氢酶(13 mU/mL)对 11 种大肠杆菌抗原特异性鼠单克隆抗体和 11 种大肠杆菌非特异性鼠单克隆抗体的杀菌活性的保护效应。在所有具有非特异性抗体的情况下, 过氧化氢酶完全减弱了杀菌活性。然而对于抗原特异性抗体, 通过过氧化氢酶保护作用的程度依赖于所使用的单克隆抗体并且在很大范围内变化。因此, H_2O_2 产生(直接产生于细菌膜表面或溶液内)的距离影响由过氧化氢酶所提供的保护的程。因此, 仅将溶液中 H_2O_2 的效应与抗原非特异性抗体所产生的 H_2O_2 进行了比较。

在 4°C 使用可见光(2.7 mW cm^{-2})照射 PBS (pH 7.4)含有血卟啉 IX ($40 \mu\text{M}$)的混合物 1 小时期间由非特异性抗体($20 \mu\text{M}$)所产生的 H_2O_2 的形成平均速率($35 \pm 5 \mu\text{M/小时}$)是高度保守的。该平均值是从 10 种鼠单克隆 IgG 和一种绵羊和一种马多克隆 IgG ($n=12$)确定的。

然而, 当将 H_2O_2 对两种大肠杆菌细胞系的毒性进行定量时, 由非特异性抗体所产生的 H_2O_2 的量 $35 \pm 5 \mu\text{M}$ 单独不能够解释杀菌活性的潜能就变得很明显了(图 17B)。该数值为低于杀死 50 %细菌所必需的量的 1 到 4 个数量级之间, 这取决于细胞系是否分别是 XL1-blue 或 O112a,c。

H_2O_2 与抗体组合和/或 H_2O_2 与血卟啉 IX 组合并不比单独 H_2O_2 对细菌更有毒性。对这些变量进行测定以确定在 H_2O_2 和测定中负责杀菌活性潜能的其他成分之间是否可以发生相互作用。具体而言, 对于针对大肠杆菌 O112a,c 的杀菌活性测试了以下情况的组合:

1. H_2O_2 (2 mM)和非特异性抗体 (20 μM);
2. H_2O_2 (2 mM) 和抗原特异性抗体 (20 μM); 和
3. H_2O_2 (2 mM)和 HPIX (40 μM).

每组使用可见光(2.7 mW cm^{-2}) 4°C 照射 1 小时。对于这些组合的任意一项与单独 H_2O_2 (2 mM)相比没有观察到杀伤的增强。

H_2O_2 对大肠杆菌的毒性低于抗体所产生的毒性的发现使得有必要重复检验使用过氧化氢酶的实验。一种可能性是 H_2O_2 与也由抗体所产生的一些其它种类化学品起反应,产生其它杀菌分子并且因此,通过破坏 H_2O_2 ,过氧化氢酶可阻止其它种类化学品的形成。另一种可能性是处于形成 H_2O_2 途径上的杀菌剂同时也是过氧化氢酶的底物。

进一步实验表明臭氧 (O_3)是由抗体产生的。在所使用的水溶液条件下,臭氧是非常长寿的($t_{1/2} = 66$ 秒)。因此,臭氧是长寿的足以通过诸如靛蓝胭脂红 1 (一种用于检测水溶液系统中 O_3 的敏感试剂)这一化学探针进行检测。Takeuchi 等, *Anal. Chem.* 61, 619 (1989); Takeuchi 等, *Anal. Chim. Acta.* 230, 183 (1990)。水溶液中靛蓝胭脂红 1 的常规臭氧分解作用导致靛蓝胭脂红 1 的特征吸光度($\gamma_{\text{max}} 610 \text{ nm}$, $\epsilon = 20,000 \text{ LM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)的褪色 (bleaching) 和环状 α -酮酰胺 2 的形成(图 18A)。

为了证明臭氧是由抗体产生的,进行了以下实验。在不存在抗体时使用紫外光(312 nm , 0.8 mW cm^{-2})照射靛蓝胭脂红 1 的 PBS (pH 7.4)溶液。没有观察到褪色。然而,当在存在绵羊多克隆抗体 (20 μM)或鼠单克隆抗体 33F12 (20 μM)条件下进行相同实验时观察到靛蓝胭脂红 1 的褪色(图 18B)。电喷射质谱测定法和 HPLC 分析证实在该过程中形成了环状 α -酮酰胺 2。照射(312 nm , 0.8 mW cm^{-2}) 靛蓝胭脂红 1 (1mM) 2 小时后绵羊多克隆抗体和单克隆抗体 33F12 分别产生 4.1 μM 和 4.9 μM 环状 α -酮酰胺 2。抗体介导的靛蓝胭脂红 1 转化为环状 α -酮酰胺 2 的最初速率是线性的,不依赖于抗体制剂(绵羊多克隆 IgG = $34.8 \pm 1.8 \text{ nM / 分钟}$, 33F12 = $40.5 \pm 1.5 \text{ nM / 分钟}$) (图 18B)。

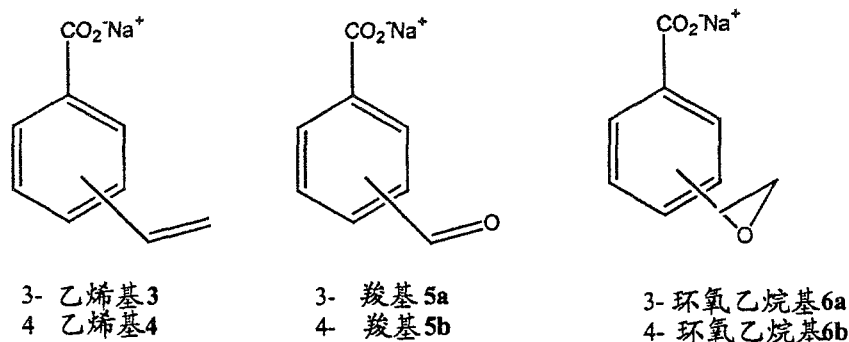
靛蓝胭脂红 1 C=C 双键的氧化断裂是臭氧检测的敏感探针。Takeuchi

等, *Anal. Chem.* 61, 619 (1989); Takeuchi 等, *Anal. Chim. Acta.* 230, 183 (1990)。然而, 此种断裂不是对臭氧特异的。在特定条件下进行使用表 2 中列出的氧化剂的进一步实验以测试那些氧化剂是否也能够氧化靛蓝胭脂红 1。此种实验证实单线态氧($^1\text{O}_2$)能够通过氧化性双键断裂褪色靛蓝胭脂红 1 溶液形成环状 α -酮酰胺 2。当紫外照射时通过抗体产生 $^1\text{O}_2^*$ 。Wentworth 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10930 (2000); Wentworth 等, *Science* 293, 1806 (2001)。因此寻找了由 $^1\text{O}_2^*$ 氧化断裂靛蓝胭脂红 1 形成环状 α -酮酰胺 2 与由 O_3 形成之间的分析差别。

进一步实验显示当臭氧是氧化剂时, 通过观察 ^{18}O 掺入环状 α -酮酰胺 2 的内酰胺羰基能够将通过 O_3 断裂与通过 $^1\text{O}_2^*$ 断裂区别开来。当 $^1\text{O}_2^*$ 是氧化剂时, 不发生此种 ^{18}O 掺入到环状 α -酮酰胺 2 的内酰胺羰基内。因此在含有磷酸盐缓冲液(PB, 100 mM, pH 7.4)的 H_2^{18}O (> 95 % ^{18}O)内进行了同位素掺入实验(表 2 和图 19), 通过使用可见光(2.7 mW cm^{-2})照射血卟啉 IX($40 \mu\text{M}$)产生了 $^1\text{O}_2^*$ 。预实验确定了在 ^{18}O -水中靛蓝胭脂红 1 和 2 都进行缓慢但自发的同位素掺入到中靛蓝胭脂红 1 和 2 的酮-羰基基团, 但是不掺入到 2 的内酰胺羰基基团。因此, 2 质谱中的诊断标记是由对应 ^{18}O 掺入的双同位素掺入到 2 的酮和内酰胺羰基基团内所产生的[M-H]-230 片段。因此, 在氧化产物的质谱中, 当在 H_2^{18}O 中通过化学臭氧分解作用进行靛蓝胭脂红 1 的氧化(图 19B)时, 而不是通过 $^1\text{O}_2^*$ 氧化靛蓝胭脂红 1(图 19C)时, 观察到了质量峰[M-H]-230。参见 Gorman 等, 于 *Singlet Oxygen Chemistry*, 205 (1988)。

当存在绵羊 IgG ($20 \mu\text{M}$)和血卟啉 IX($40 \mu\text{M}$)使用可见光(2.8 mW cm^{-2})照射靛蓝胭脂红 1($100 \mu\text{M}$)时, 形成了氧化产物 2 且其质谱证明水的 ^{18}O 交换入内酰胺羰基(图 19A)。这些数据表明当存在抗体时臭氧是靛蓝胭脂红 1 的氧化剂。

为了进一步证实臭氧是由抗体产生的, 测试了以下额外的包含正常碳-碳双键的化学探针。



在典型的实验中,当存在或缺乏抗体 4C6 或绵羊多克隆抗体 (20 μM) 时在室温照射(312 nm, 0.8 mW/cm^2) 3-乙炔基苯甲酸 3 (1 mM)或 4-乙炔基苯甲酸 4 (1 mM)的 PBS (pH 7.4)溶液。定时取出等份(20 μL)并 1:3 稀释于乙腈:水(1:1)。通过反相 HPLC 确定产物组合物。

当存在绵羊多克隆 IgG (20 μM)时使用紫外光(312 nm, 0.8 mW cm^{-2})照射化合物 3 和 4 (1 mM)溶液,导致分别形成 3-羧基苯甲醛 5a 和 3-环氧乙烷基苯甲酸 6a (比率为 15:1, 3 小时后转化 3 的 1.5 %) 和 4-羧基苯甲醛 5b 和 4-环氧乙烷基苯甲酸 6b (比率为 10:1, 3 小时后转化 4 的 2 %)。当化合物 3 和 4 以常规方式进行臭氧化时也观察到这些产物。而且,这些结果与存在绵羊多克隆抗体或鼠单克隆抗体 33F12 使用紫外光照射靛蓝胭脂红 1 时的那些观察结果相似,其中观察到靛蓝胭脂红 1 的褪色(图 18B)。另外,如果不存在抗体,不能观察到褪色,但存在抗体时观察到指示臭氧的氧化产物。

形成明显对照的是,在相似条件下由血卟啉 IX (40 μM)和可见光(2.7 mW cm^{-2})所产生的 $^1\text{O}_2^*$ 不引起任意可检测的 3 或 4 的氧化。因此,3-乙炔基苯甲醛 3 和 4-乙炔基苯甲醛 4 对臭氧具选择性,并且臭氧必须是通过反应中所存在的抗体产生。

由活化的嗜中性粒细胞产生臭氧的证据

嗜中性粒细胞是宿主抵抗细菌的重要部分并且已知在其细胞表面具有抗体,而且当活化时,产生包括 $^1\text{O}_2^*$ 在内的强氧化剂的混合物。Steinbeck 等, J. Biol. Chem. 267, 13425 (1992); Steinbeck et al., J. Biol. Chem. 268, 15649 (1993)。因此,这些细胞提供了非光化学、生物来源的 $^1\text{O}_2^*$ 和能够

将该底物通过水氧化途径进行加工的抗体。机体的大部分区域不能利用光化学能量。因此,如果嗜中性粒细胞提供细胞来源的 $^1\text{O}_2$,对活化后由抗体包被的嗜中性粒细胞所释放出的氧化剂进行分析能够提供关于由此类抗体所产生的臭氧或 H_2O_2 是否可以具有生理学相关性的指示。

如 M. Markert, P. C. Andrews 和 B. M. Babior *Methods Enzymol.* 105, 358 (1984)所述制备人嗜中性粒细胞。肉豆蔻酸佛波酯($1\text{ }\mu\text{g/mL}$)活化后,嗜中性粒细胞 (1.5×10^7 个细胞/mL)产生将靛蓝胭脂红 1 氧化断裂成磺酸靛红 2(图 19 和图 20B)的氧化剂。虽然次氯酸(HOCl)是已知由嗜中性粒细胞产生的氧化剂,但 PBS (pH 7.4)中 NaOCl (2 mM)的测试表明氧化靛蓝胭脂红 1($100\text{ }\mu\text{M}$)但不断裂靛蓝胭脂红 1 的双键以产生磺酸靛红 2。当在 ^{18}O 水中进行靛蓝胭脂红 1 氧化作用时,发现 50 %的内酰胺羰基氧由 ^{18}O 组成,正如由所分离的断裂产物磺酸靛红 2 的质谱中 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 230 质谱峰的强度所显示(图 20B)。该 ^{18}O 掺入表明臭氧是由抗体包被的嗜中性粒细胞所产生的。

图 20A 图解说明通过已经用 PBS (pH 7.4)中的肉豆蔻酸佛波酯($1\text{ }\mu\text{g/mL}$)在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 活化的人嗜中性粒细胞(PMN, 1.5×10^7 个细胞/mL)氧化靛蓝胭脂红 1($30\text{ }\mu\text{M}$) (>)和形成磺酸靛红 2(□)的时间过程。有意思的是,在嗜中性粒细胞级联反应中观察到来自靛蓝胭脂红 1 的磺酸靛红 2 的几乎 50 %的可能产量(潜在 $60\text{ }\mu\text{M}$ 的 $25.1 \pm 0.3\text{ }\mu\text{M}$),显示了在该氧化途径中负责该转化的氧化剂的有效浓度。

出版物

Allen, R. C., Stjernholm, R. L., Benerito, R. R.和 Steele, R. H., 编著. Cormier, M. J., Hercules, D. M. 和 Lee, J. (Plenum, New York), 498-499 页 (1973).

Allen, R. C., Yevich, S. J., Orth, R. W.和 Steele, R. H., Biochem. Biophys. Res. Commun., 60, 909-917 (1974).

Arlaud, G. J., Colomb, M. G.和 Gagon, J., Immunol. Today, 8,

106-111 (1987).

Baek, J.和 Kim, S., Plant Physiol., **102**, 687 (1993).

Bent. D. V.和 Hayon, E., J. Am. Chem. Soc., **87**, 2612-2619 (1975).

Beauchamp, C. 和 Fridovich, I., Anal. Biochem., **44**, 276-287 (1971).

F. Berthiaume, S. R. Reiken, M. Toner, R. G. Tomkins, M. L. Yarmush *Biotechnology* **12**, 703 (1994).

G. M. Blackburn, A. Datta, H. Denham, P. Wentworth, Jr. *Adv. Phys. Org. Chem.* **31**, 249 (1998).

A. T. Brünger 等, Acta. Crystallogr., **D54**, 905 (1998)

Burley, S. K.和 Petsko, G. A., Science, **229**, 23-28 (1985).

Burton, D. R., Trends Biochem. Sci., **15**, 64-69 (1990).

F. Cacace, G. de Petris, F. Pepi, A. Troiani, Science, **285**, 81 (1999).

V. Cannac-Caffrey 等, Biochimie, **80**, 1003 (1998).

J. Cerkovnik, B. Plesnicar, J. Am. Chem. Soc., **115**, 12169 (1993).

E.J. Corey, Mehrotra, M. M.; Khan, A. U., J. Am. Chem. Soc., **108**, 2472 (1986).

C. Deby, La Recherche, **228**, 378 (1991).

M. Detty, S. L. Gibson, J. Am. Chem. Soc., **112**, 4086 (1990).

R.M. Esnouf, Acta Crystallog., **D55**, 938 (1999)].

Fee, J. A. 氧和氧自由基国际会议, 编辑 Rodgers, M. A. J.和 Powers, E. L. (Academic, San Diego, 和 Austin 的德克萨斯大学), 205-239 页 (1981).

Feldhoff, R.和 Peters, T. J., Biochem. J., **159**, 529-533 (1976).

Foote, C. S. 生物学中的自由基, 编辑 Pryor, W. A. (Academic, New York), 85-133 页 (1976).

C. S. Foote, Science, **162**, 963 (1968).

C. S. Foote, Acc. Chem. Res., **1**, 104 (1968).

A. V. Fowler, I. Zabin, J. Biol. Chem., **253**, 5521 (1978).

- K. C. Garcia 等, Science, **274**, 209 (1996).
- Gollnick, K., Adv. Photochem., **6**, 1-122 (1968).
- A. A. Gorman 和 M. A. J. Rodgers , *Singlet Oxygen Chemistry*, 205 (1988).
- H. Greeley, T. V. Russo, D. T. Mainz, R. A. Friesner, J.-M. Langlois, W. A. Goddard III, R. E. Donnelly, J. Chem. Phys., **101**, 4028 (1994)
- J. C. Slater 分子和固体中的量子理论, 第 4 卷: 分子和固体的自身相容场, McGraw Hill, New York, (1974)
- Grossweiner, L. I., Curr. Top. Radiat. Res. Q., **11**, 141-199 (1976).
- J. Han, S. Yen, G. Han, P. Han, Anal. Biochem., **234**, 107 (1996).
- Hasty, N., Merkel, P. B., Radlick, P. 和 Kearns, D. R. Tetrahedron Lett., 49-52 (1972).
- P. Hofman, M. Piche, D. F. Far, G. Le Negrate, E. Selva, L. Landraud, A. Alliana- Schmid, P. Boquet, B. Rossi, *Infect. Immun.* **68**, 449 (2000).
- E. A. Kabat, T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesman, C. Foeller, 免疫相关蛋白质的序列分析(US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH, ed. 5th, 1991).
- J. R. Kanowsky, Chem. Biol. Interactions, **70**, 1 (1989).
- Kearns, D. R., Chem. Rev., **71**, 395-427 (1971).
- Klebanoff, S. J. , 宿主抗性中的吞噬细胞 (National Institute of Child Health and Human Development, Orlando, FL) (1974).
- Klebanoff, S. J. , 免疫学百科全书, 著者 Delves, P. J. 和 Roitt, I. M. (Academic, San Diego), 1713-1718 页 (1998).
- J. Koller, B. Plesnicar, J. Am. Chem. Soc., **118**, 2470 (1996).
- Kreitner, M., Alth, G., Koren, H., Loew, S. 和 Ebermann, R., Anal. Biochem., **213**, 63-67 (1993).
- T. Li, S. Hilton, K. D. Janda, J. Am. Chem. Soc., **117**, 3308 (1995).
- D.R. Lide, 化学和物理学手册, 第 73 版 (CRC, 1992).

- J. R. Kanofsky, H. Hoogland, R. Wever, S. J. Weiss *J. Biol. Chem.* **263**, 9692 (1988).
- J. F. Kanofsky *Chem.-Biol. Interactions* **70**, 1 (1989)
- Mach, H., Burke, C. J., Sanyal, G., Tsai, P.-K., Volkin, D. B. & Middaugh, C. R., 蛋白质和肽的制剂和递送, 著者 Cleland, J. L. 和 Langer, R. (American Chemical Society, Denver, CO) (1994).
- M. Markert, P. C. Andrews, and B. M. Babior *Methods Enzymol.* **105**, 358 (1984).
- A. C. R. Martin, 蛋白质：结构和功能和遗传学, **25**, 130 (1996).
- J.P. McCormick, T. Thomason, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 312 (1978).
- Merkel, P. B., Nillson, R. 和 Kearns, D. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1030-1031 (1972).
- B. Michaeli, J. Feitelson, *Photochem. Photobiol.*, **59**, 284 (1994).
- Petyaev, I. M. & Hunt, J. V., *Redox Report*, **2**, 365-372 (1996).
- Pierson, R., Young, V., Rees, J., Powell, J., Navaratnam, V., Cary, N., Tew, D., Bacon, P., Wallwork, J.等, *Microsc. Res. Tech.*, **42**, 369-385 (1998).
- B. Plesnicar, J. Cerkovnik, T. Tekavec, J. Koller, *Chem. Eur. J.*, **6**, 809 (2000).
- T. Prangé 等, 蛋白质：结构和功能和遗传学, **30**, 61 (1998).
- E. P. Reeves 等, *Nature* **416**, 291 (2002).
- D.T. Sawyer, 氧化学 (Oxford University Press, Oxford, 1991).
- H.D. Scharf, R. Weitz, *Symp. Quantum Chem. Biochem.*, Jerusalem 第 12 卷 (Catal. Chem. Biochem.: Theory Exp.), 355-365 页 (1979).
- B. P. Schoenborn. H. C. Watson, J. C. Kendrew, *Nature*, **207**, 28 (1965).
- E.E. Scott, Q. H. Gibson, *Biochemistry*, **36**, 11909 (1997).
- L. Siegfried, M. Kmetove, H. Puzova, M. Molokacova, J. Filka, J.

Med. Microbiol. **41**, 127 (1994).

Sim, R. B. 和 Reid, K. B., *Immunol. Today*, **12**, 307-311 (1991).

Skepper, J., Rosen, H. 和 Klebanoff, S. J., *J. Biol. Chem.*, **252**, 4803-4810 (1997).

S. M. Soltis, M. A. B. Stowell. M. C. Wiener, G. N. Phillips Jr, D. C. Rees, *J. Appl. Cryst.*, **30**, 190, (1997)

Srinivasan, V. S., Podolski, D., Westrick, N. J. 和 Neckers, D. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 6513-6515 (1978).

Stauff, J., Sander, U. & Jaeschke, W., *化学发光和生物发光*, 著者, Williams, R. C. 和 Fudenberg, H. H. (Intercontinental Medical Book Corp., New York), 131-141 页 (1973).

R. C. Straight, J. D. Spikes, *单线态 O₂*, A. A. Frimer, 著者. (CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1985), vol. IV9, 91-143 页.

M. J. Steinbeck, A. U. Khan, M. J. Karnovsky *J. Biol. Chem.* **267**, 13425 (1992).

M. J. Steinbeck, A. U. Khan, M. J. Karnovsky *J. Biol. Chem.* **268**, 15649 (1993).

K. Takeuchi, I. Takashi *Anal. Chem.* **61**, 619 (1989).

K. Takeuchi, S. Kutsuna, T. Ibusuki *Anal. Chim. Acta.* **230**, 183 (1990).

R. F. Tilson Jr., U. C. Singh, I. D. Kuntz Jr. P. A. Kollman, *J. Mol. Biol.*, **199**, 195 (1988).

M.A. Vincent, I. A. Hillier, *J. Phys. Chem.*, **99**, 3109 (1995).

Voss, R.-H., Ermler, U., Essen, L.-O., Wenzl, G., Kim, Y.-M. 和 Flecker, P., *Eur. J. Biochem.*, **242**, 122-131 (1996).

J. Wagner, R. A. Lerner, C. F. Barbas, III, *Science* **270**, 1797 (1995).

P. Walrant, R. Santus, *Photochem. Photobiol.*, **19**, 411 (1974).

K. G. Welinder, H. M. Jespersen, J. W.-Rasmussen, K. Skoedt, *Mol. Immunol.*, **28**, 177 (1991).

F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross, J. Phys. Chem. Ref. Data, **22**, 113 (1993).

J. R. Winkler, A. J. Di Bilio, N. A. Farrow, J. H. Richards, H. B. Gray, Pure & Appl. Chem., **71**, 1753 (1999).

J. R. Winkler, Curr. Opin. Chem. Biol., **4**, 192 (2000).

Wentworth, P., Jr. 和 Janda, K. D., Curr. Opin. Chem. Biol., **2**, 138-144 (1998).

A.D. Wentworth, L. H Jones, P. Wentworth, Jr., K. D. Janda, R. A. Lerner, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **97**, 10930 (2000).

P. Wentworth, Jr. 等, *Science* **293**, 1806 (2001).

P. Wentworth, Jr. , *Science* **296**, 2247 (2002).

X. Zhai 和 M. Ashraf, *Am. J. Physiol.* **269** (*Heart Circ. Physiol.* **38**) H1229 (1995).

M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, Anal. Biochem., **253**, 162 (1997).

所有出版物、专利和专利申请此处引用作为参考。虽然在本发明的上述说明书中已经描述了其优选的实施方案，并且为了说明已经描述了一些细节，对于本领域的那些技术人员很明显本发明还允许其它实施方案并且此处所述的某些细节可以在不偏离本发明基本原则的范围内进行相当的改变。

本发明的以下权利要求试图根据本说明书所给出的上述描述表征本发明的可能要素。

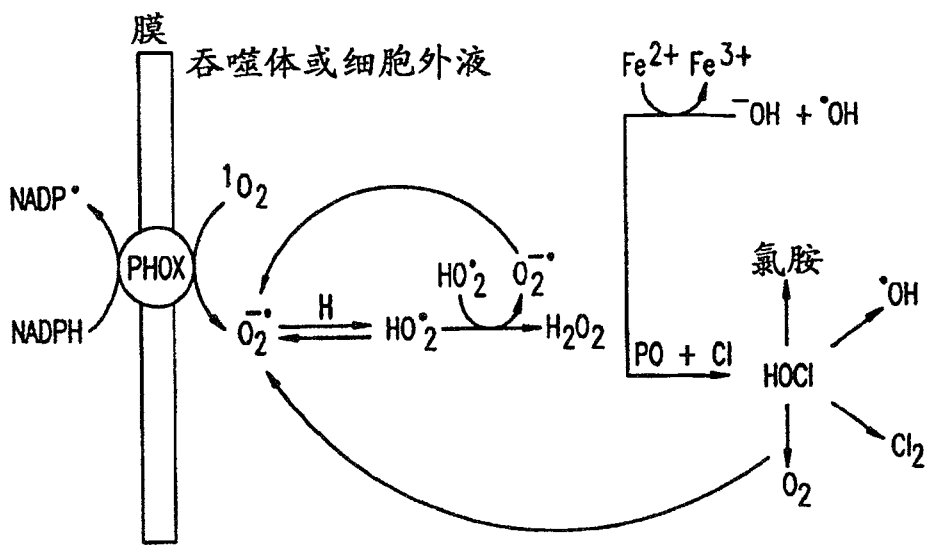


图 1

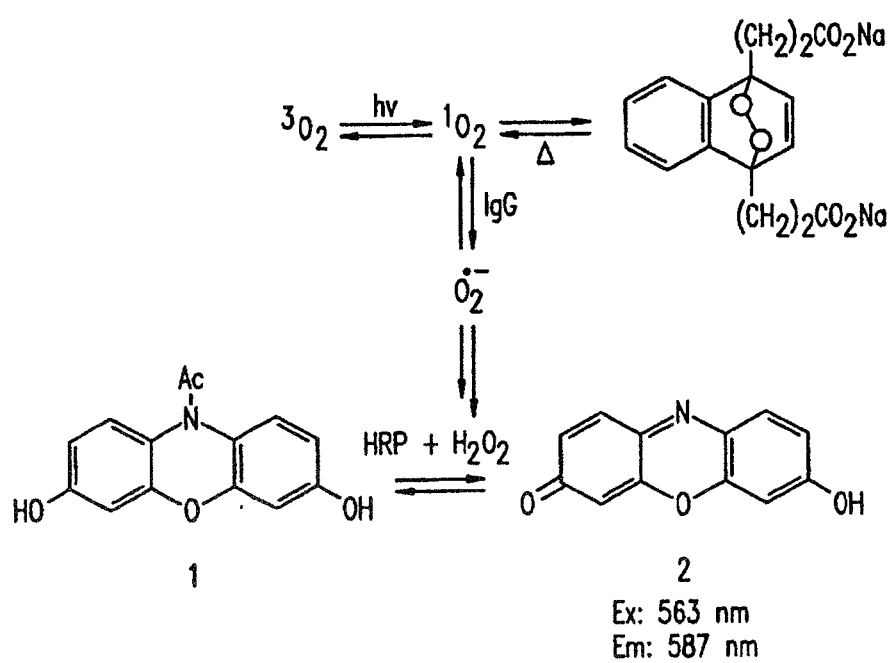


图 2

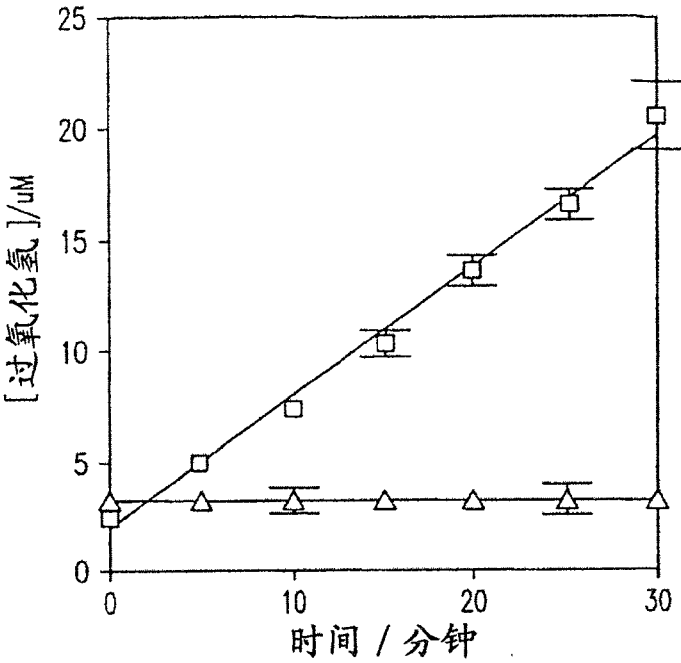


图 3

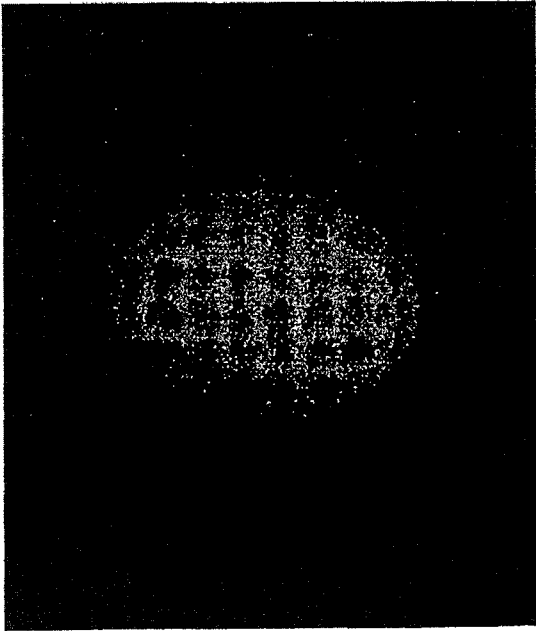


图 4

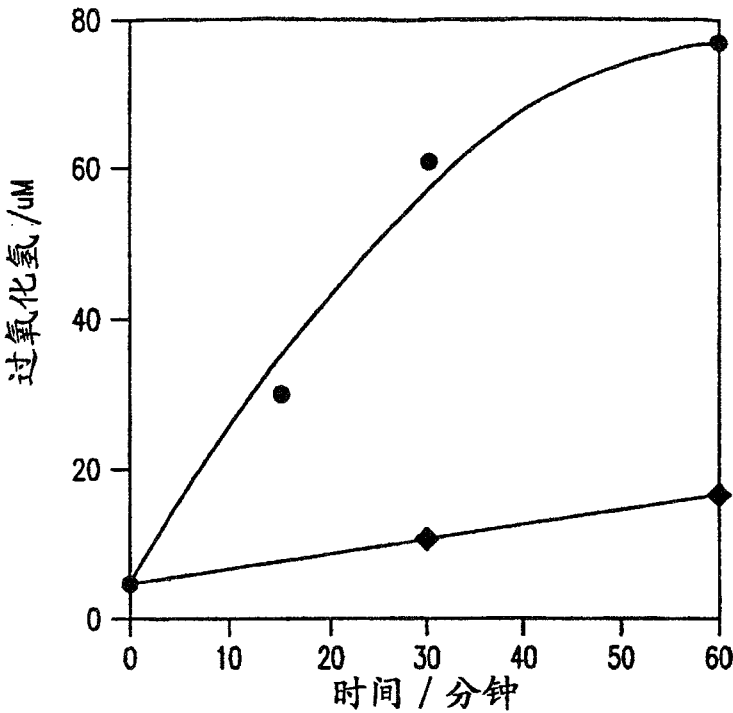


图 5A

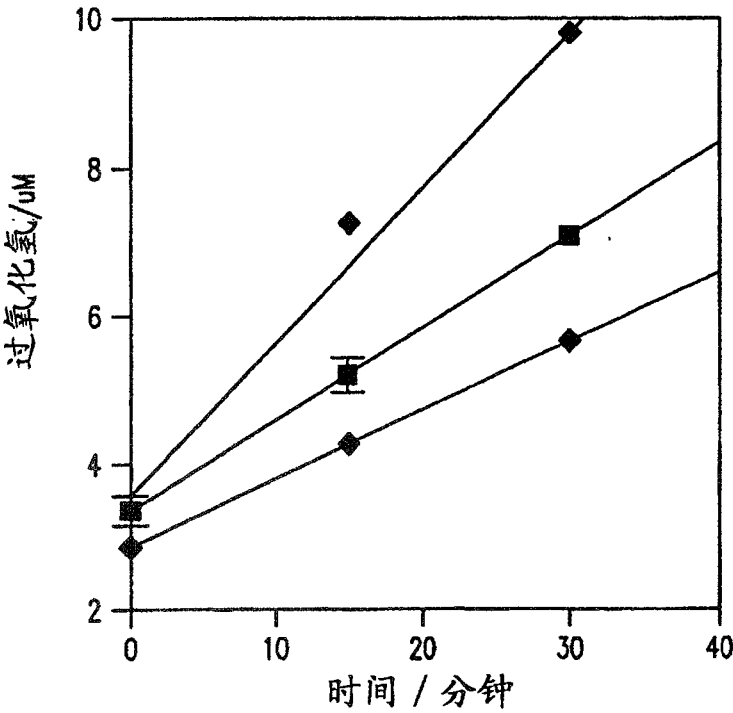


图 5B

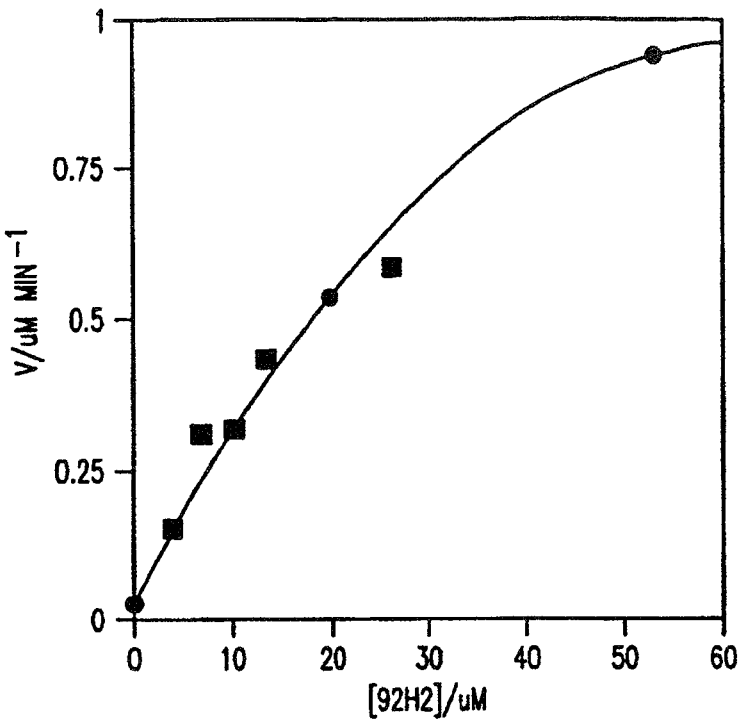


图 5C

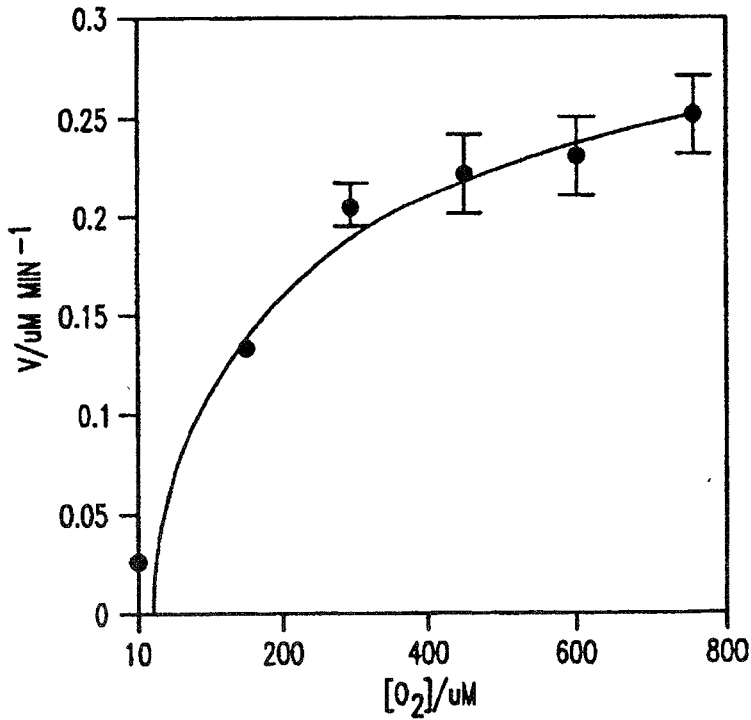


图 5D

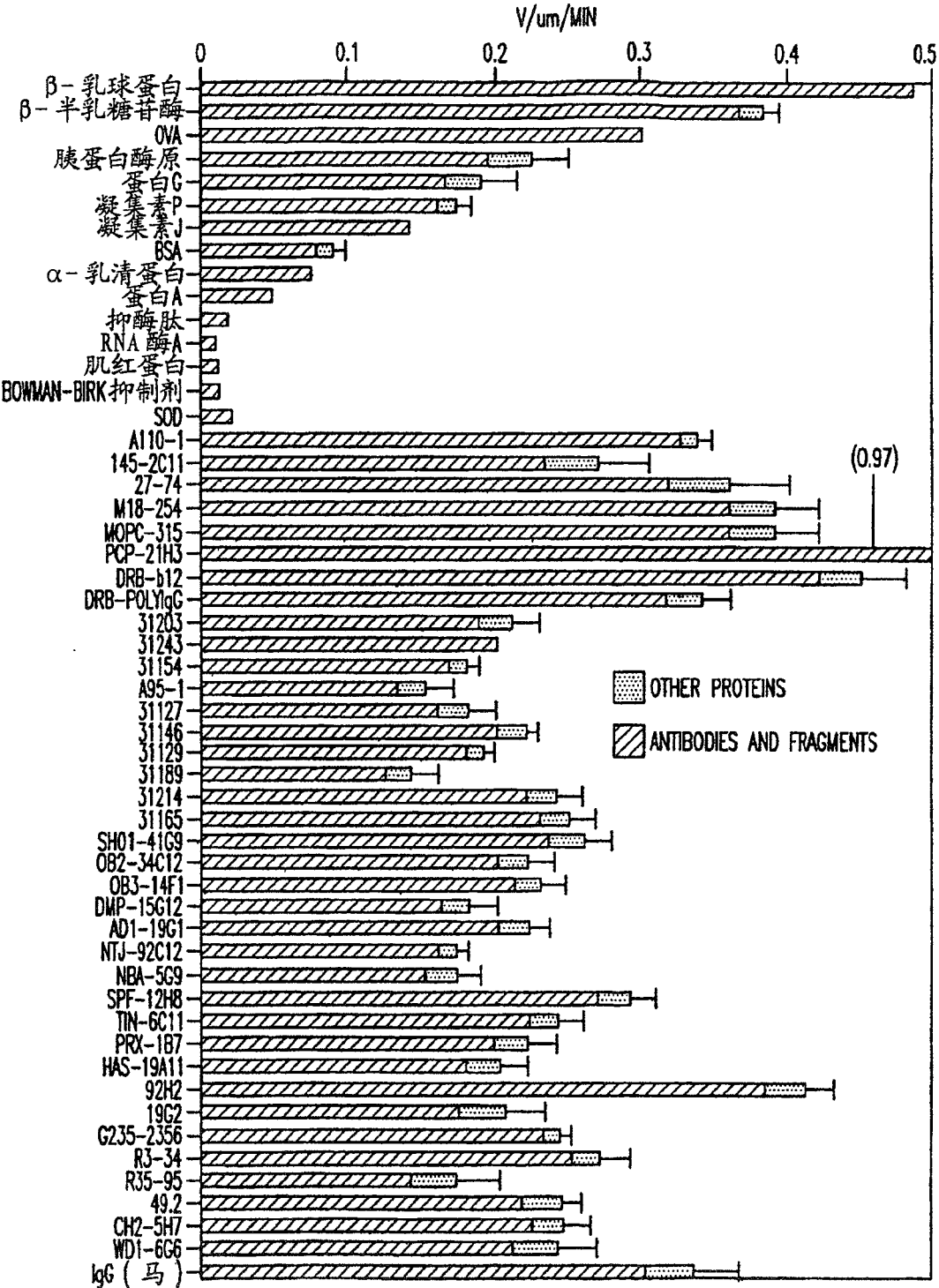


图 6

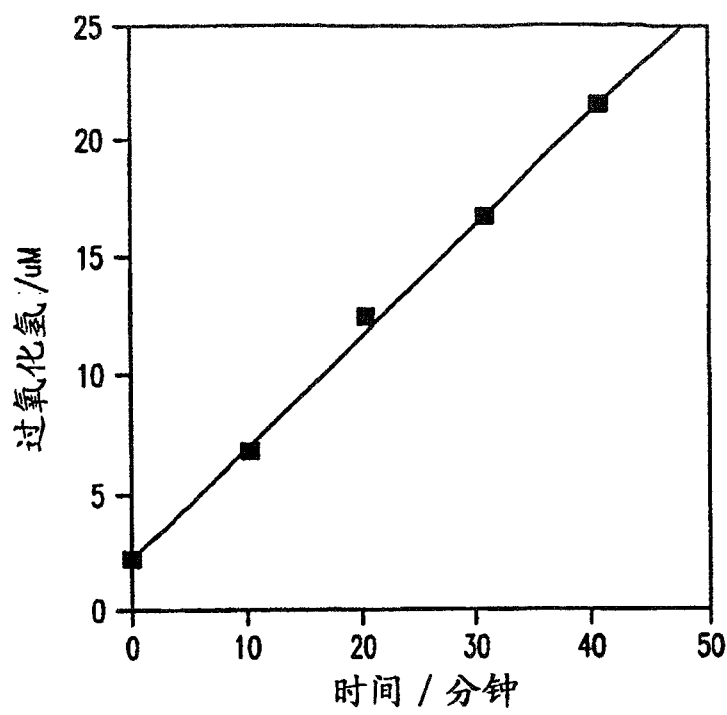


图 7A

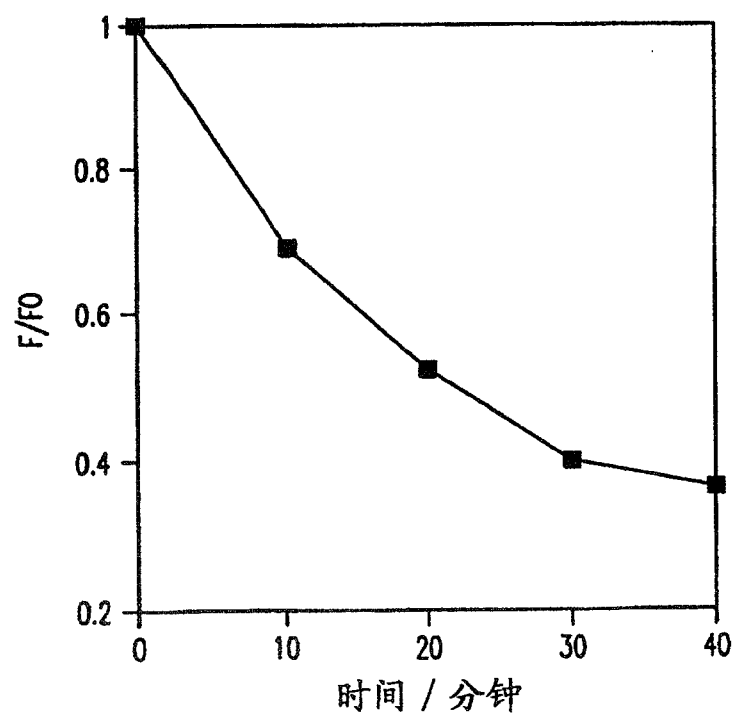


图 7B

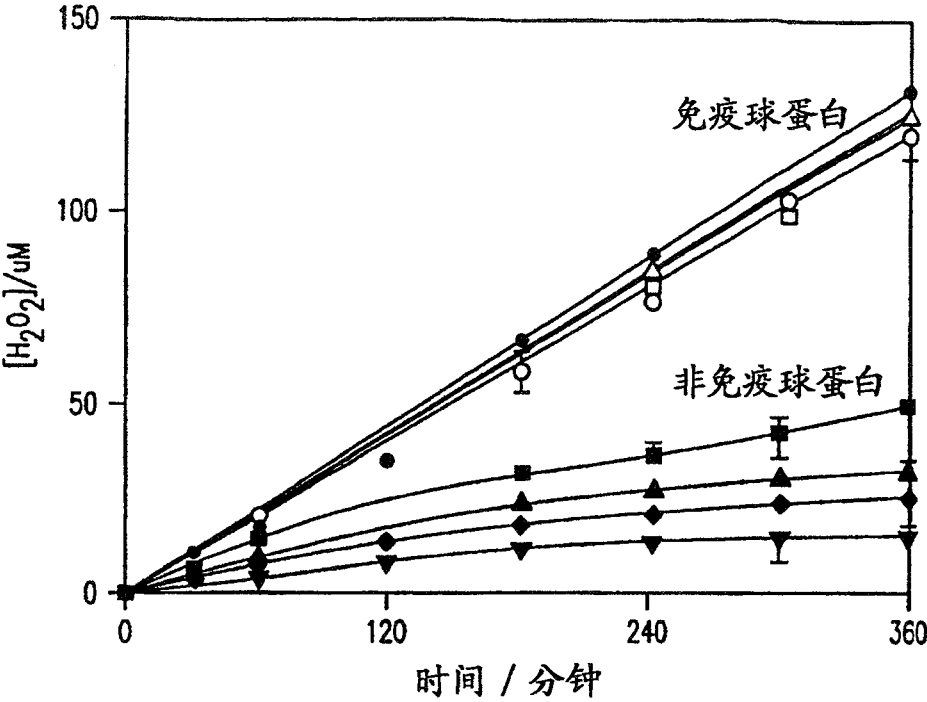


图 8A

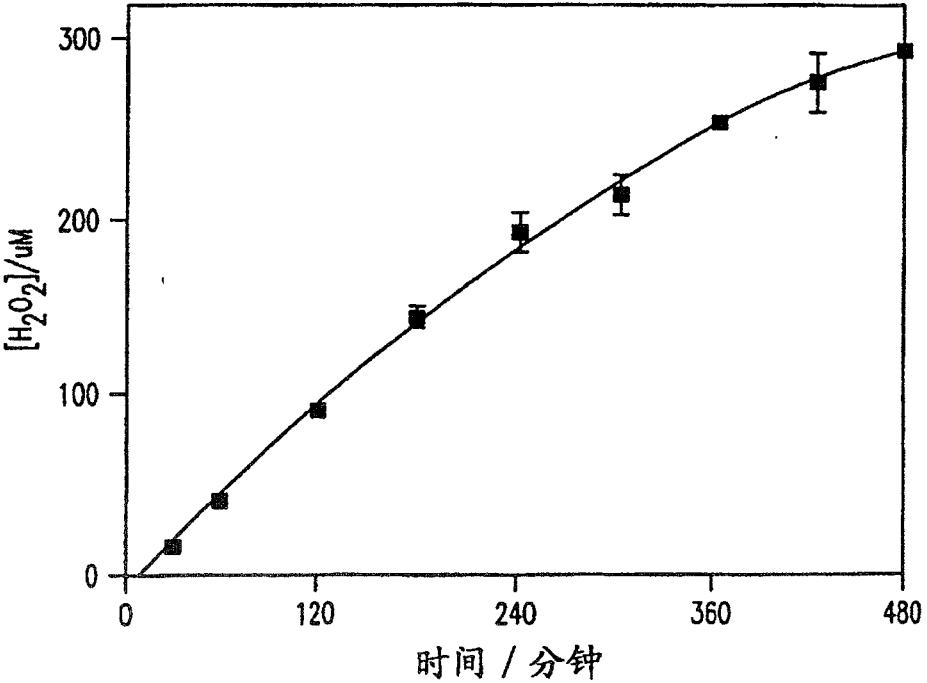


图 8B

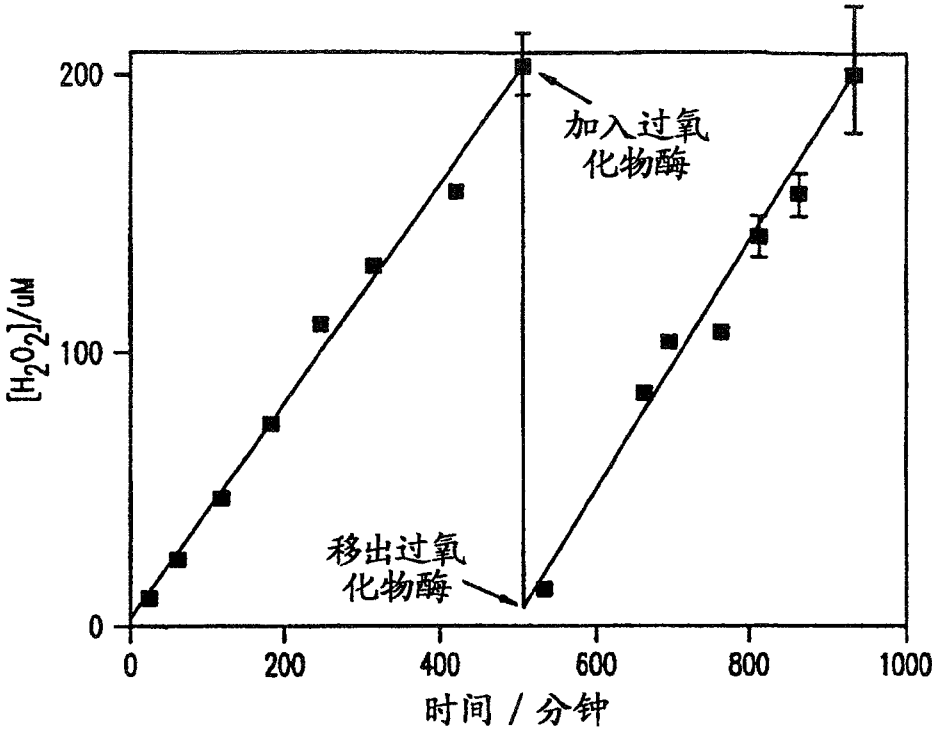


图 8C

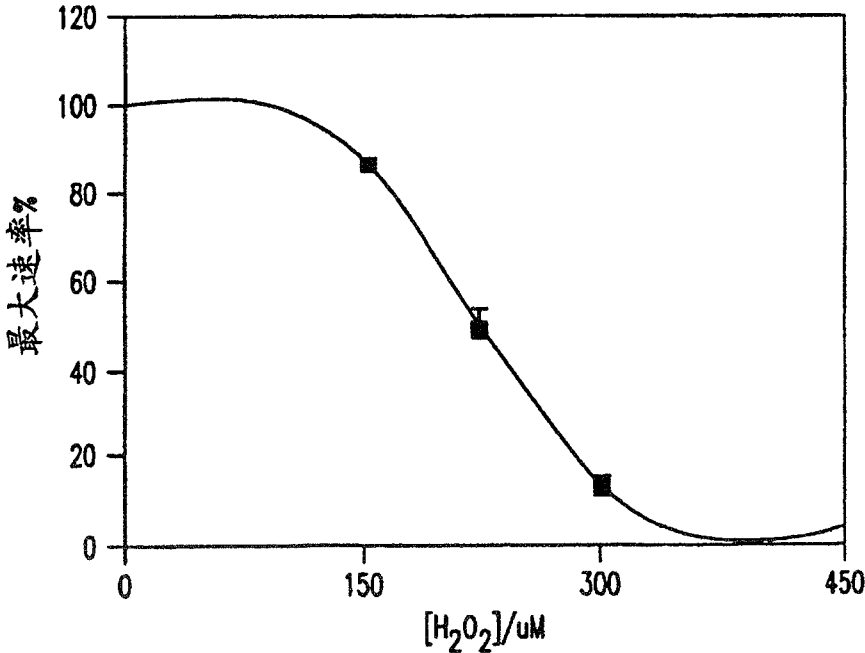


图 8D

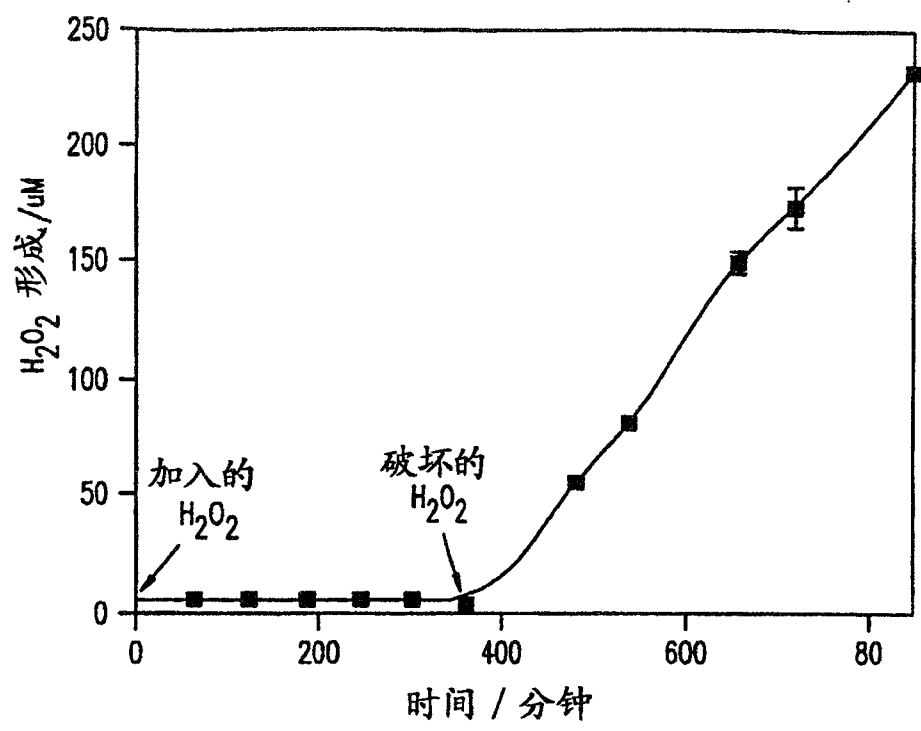


图 8E

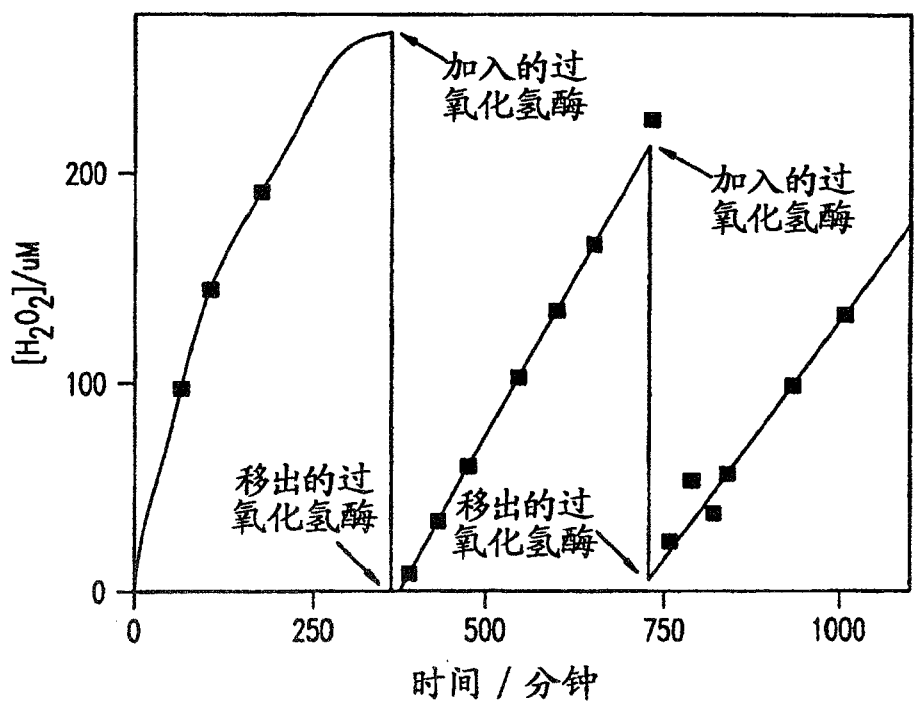


图 8F

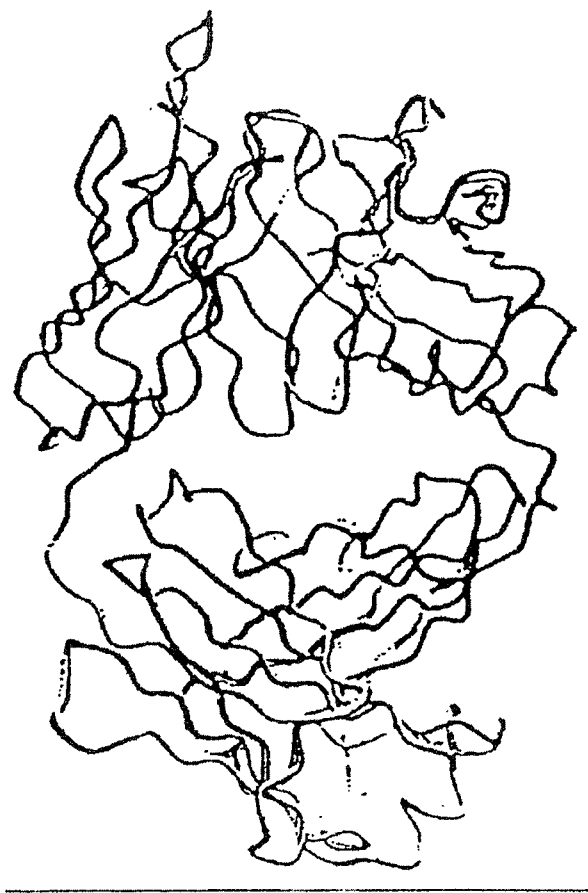


图 9A

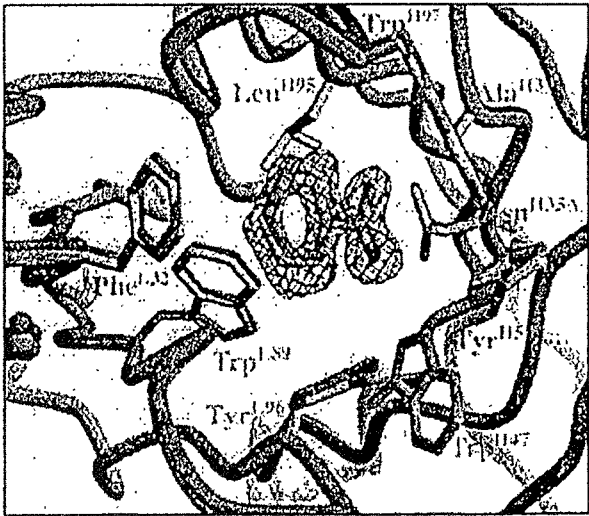


图 9B

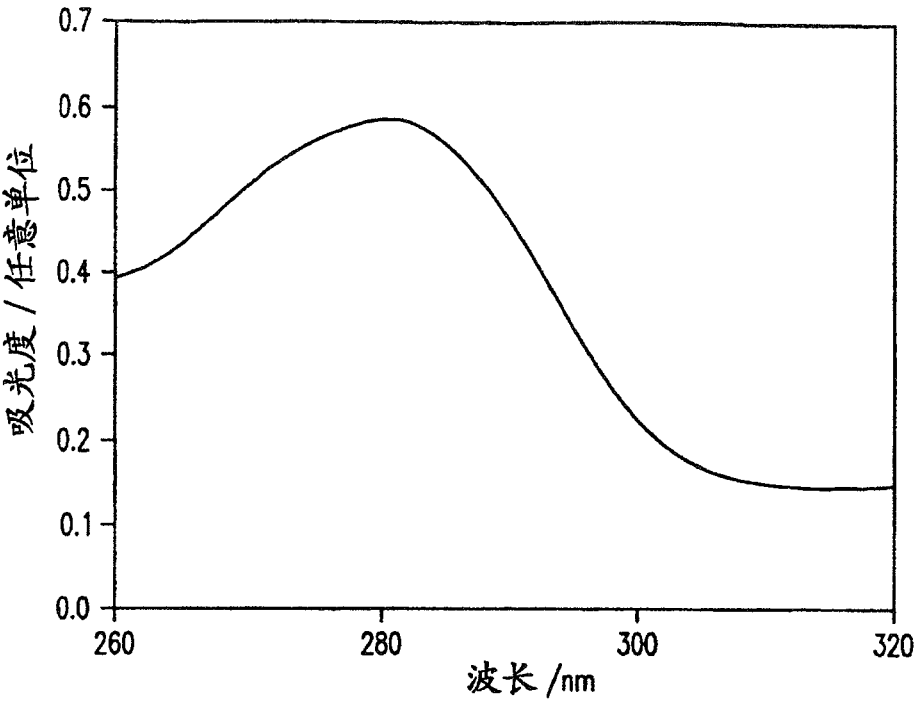


图 10A

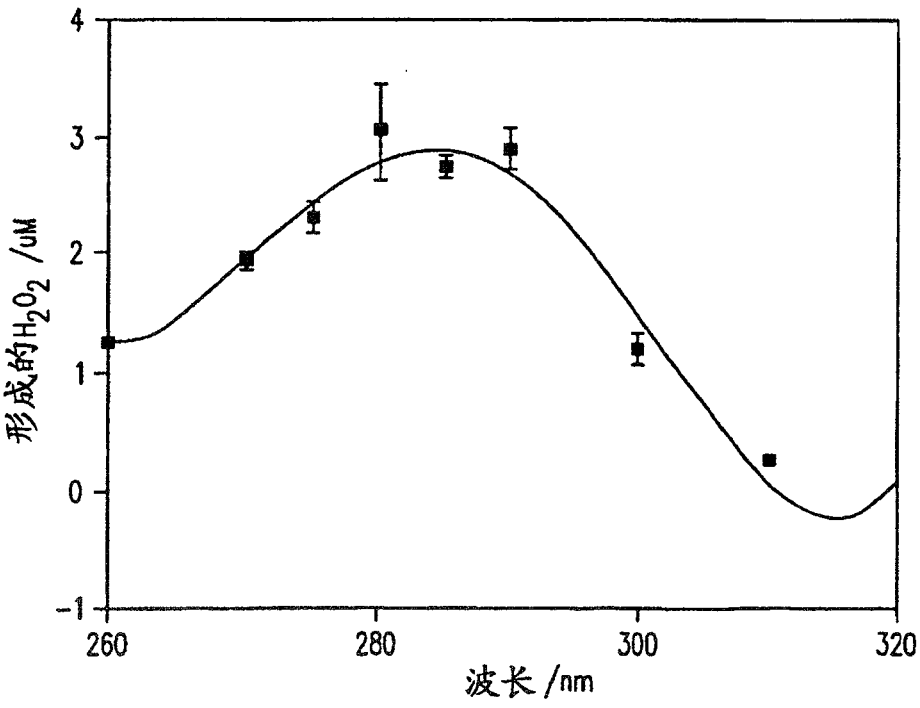
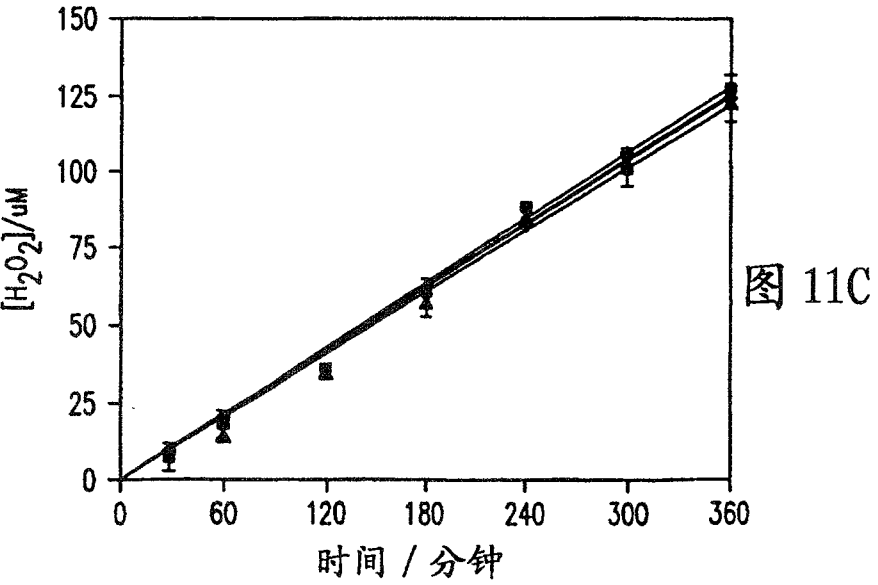
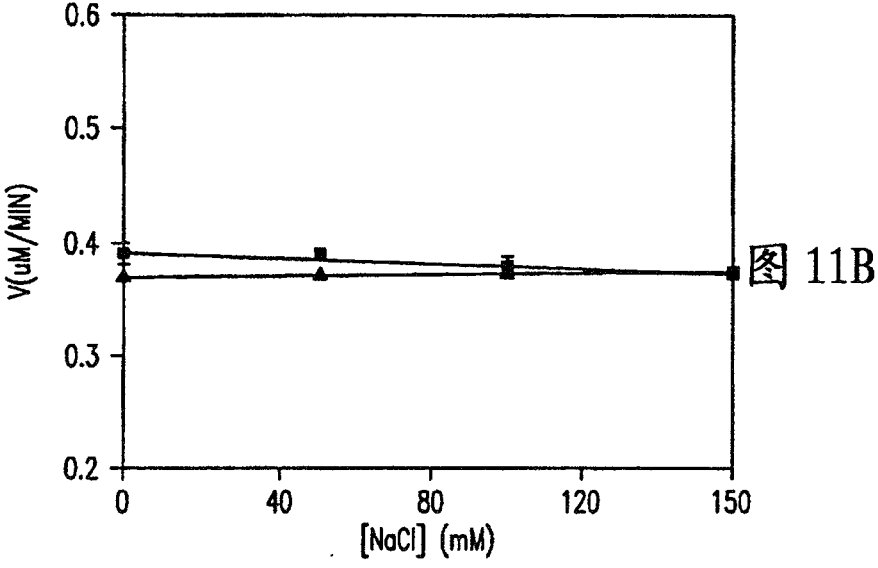
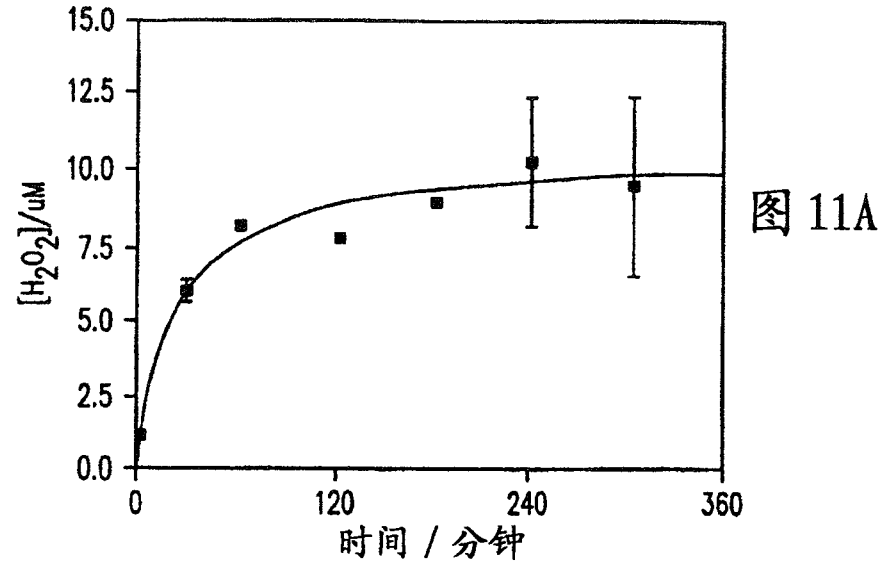


图 10B



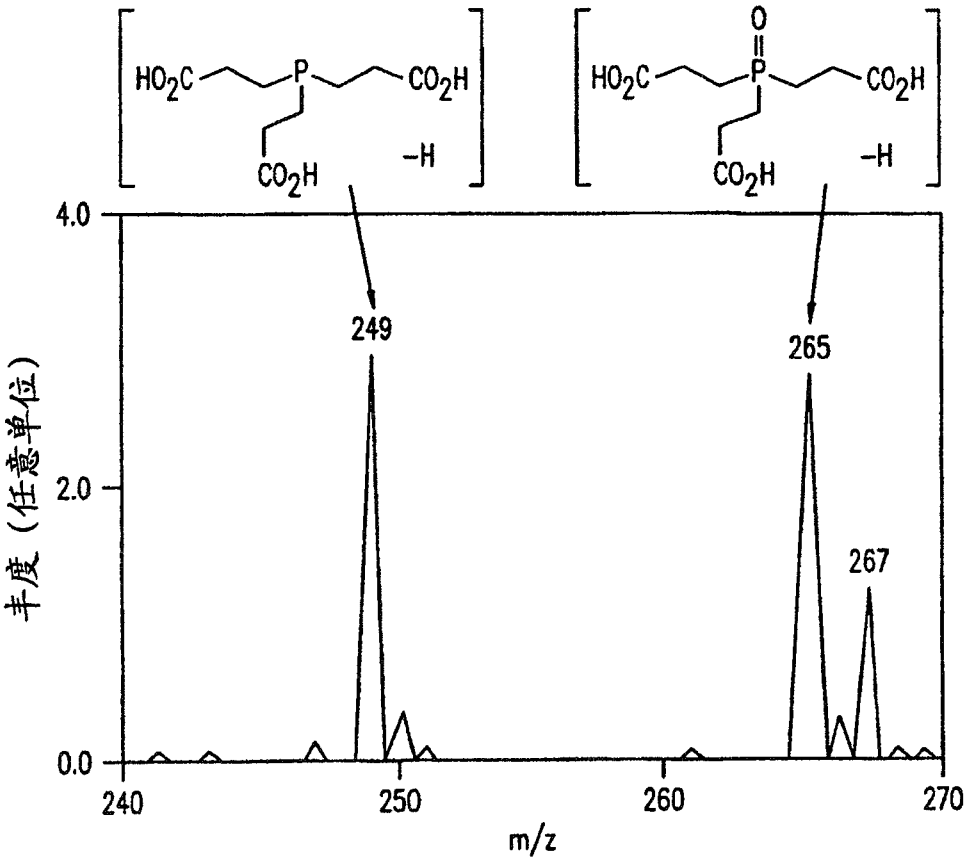


图 12A

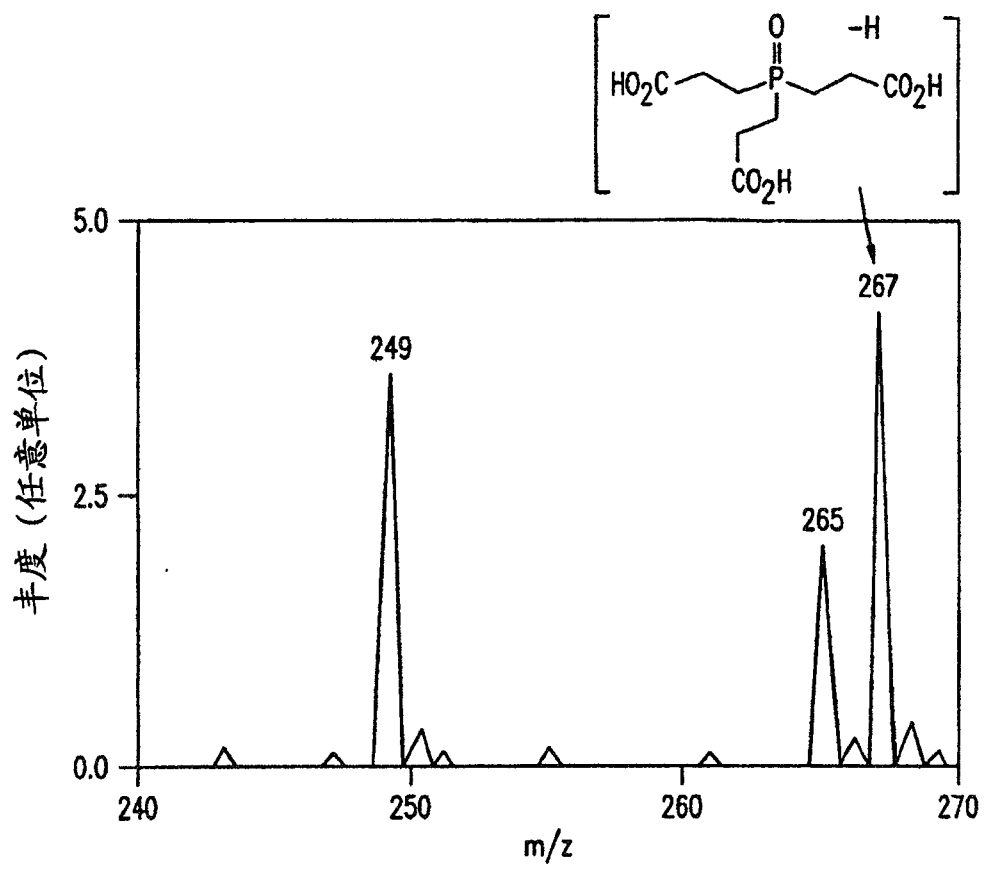


图 12B

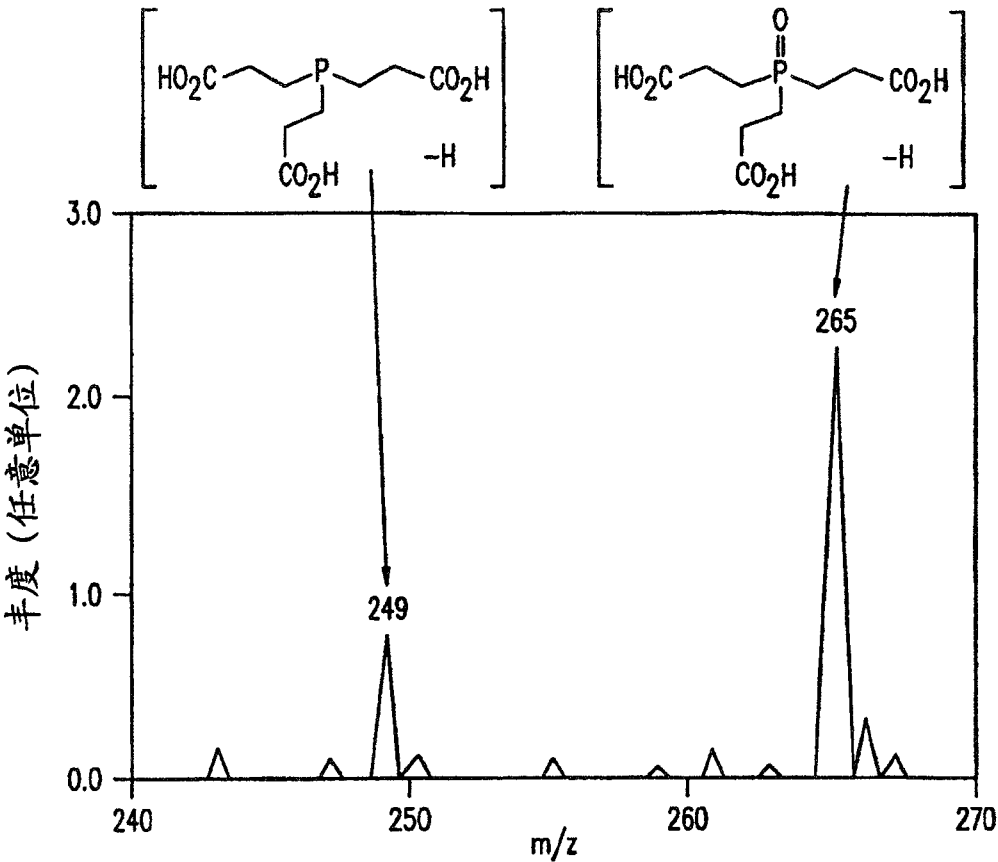


图 12C

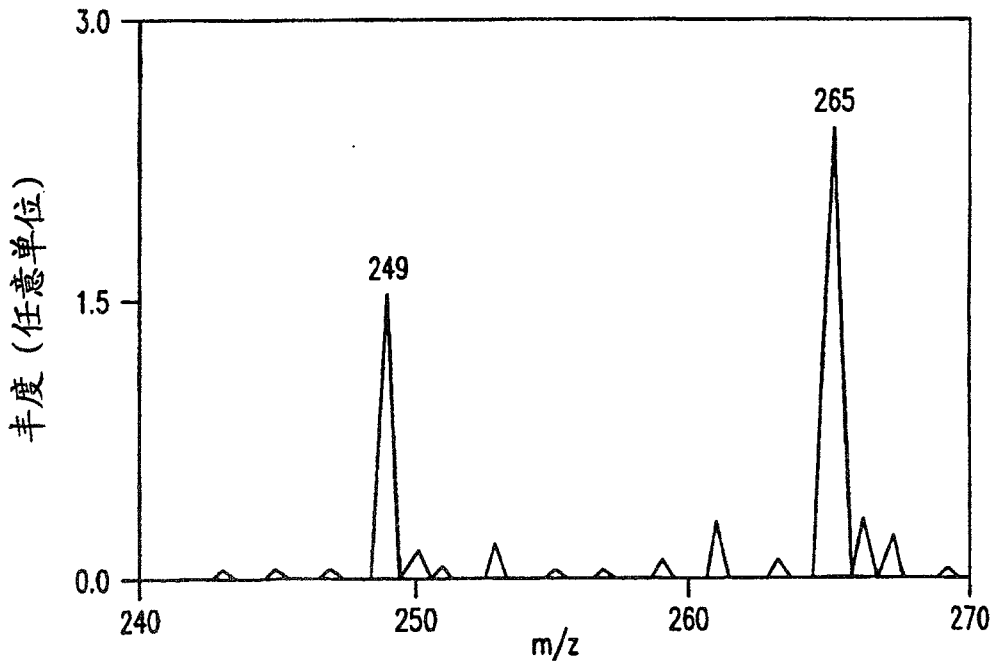


图 12D

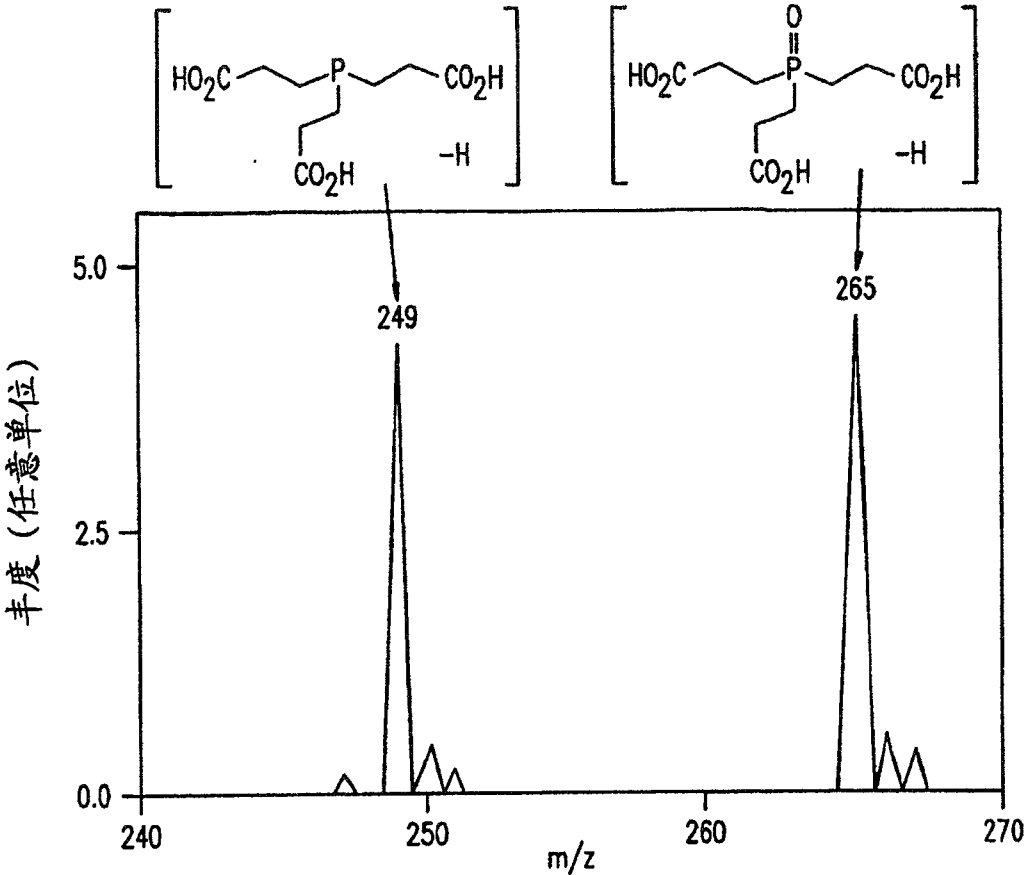


图 12E

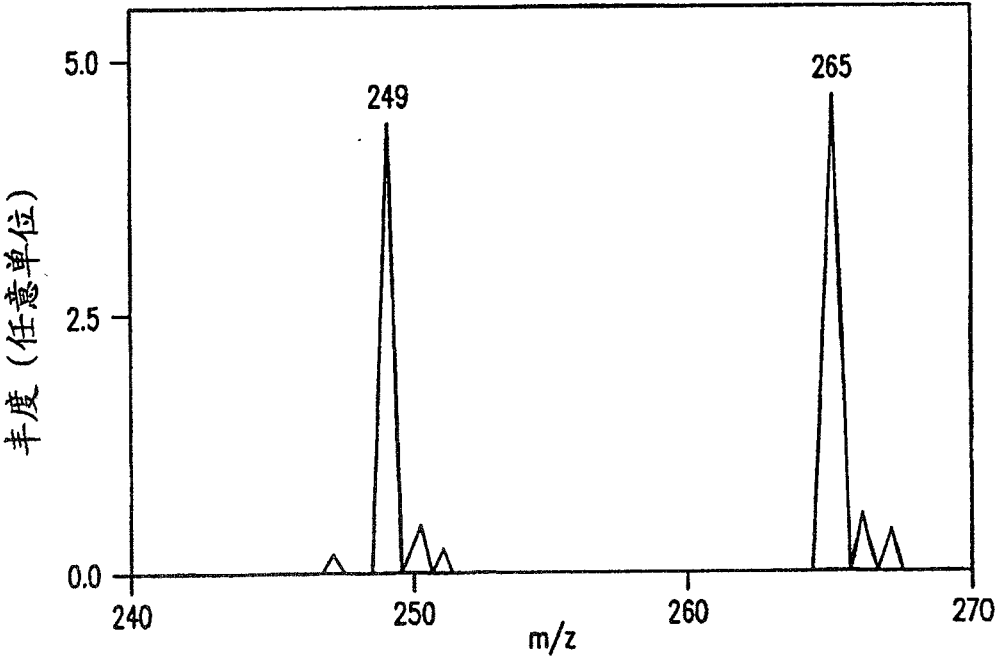


图 12F

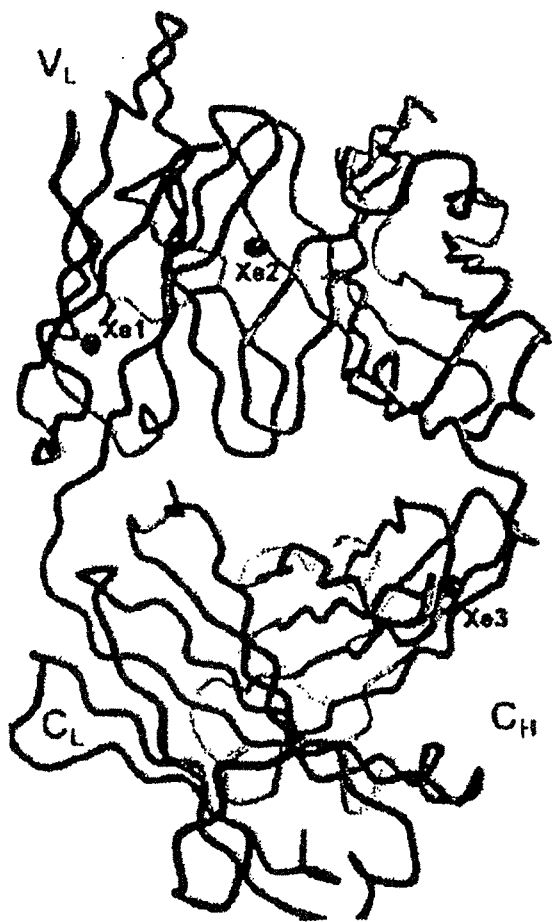


图 13A

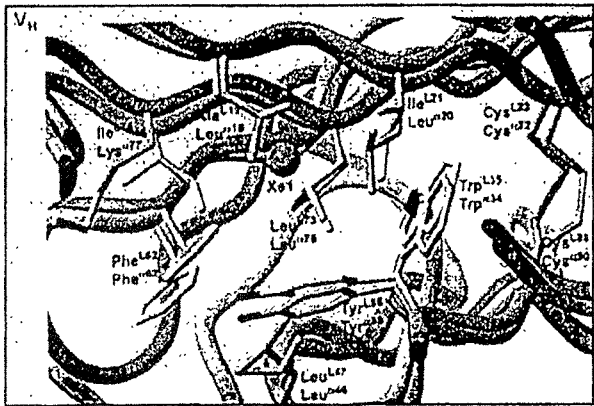


图 13B

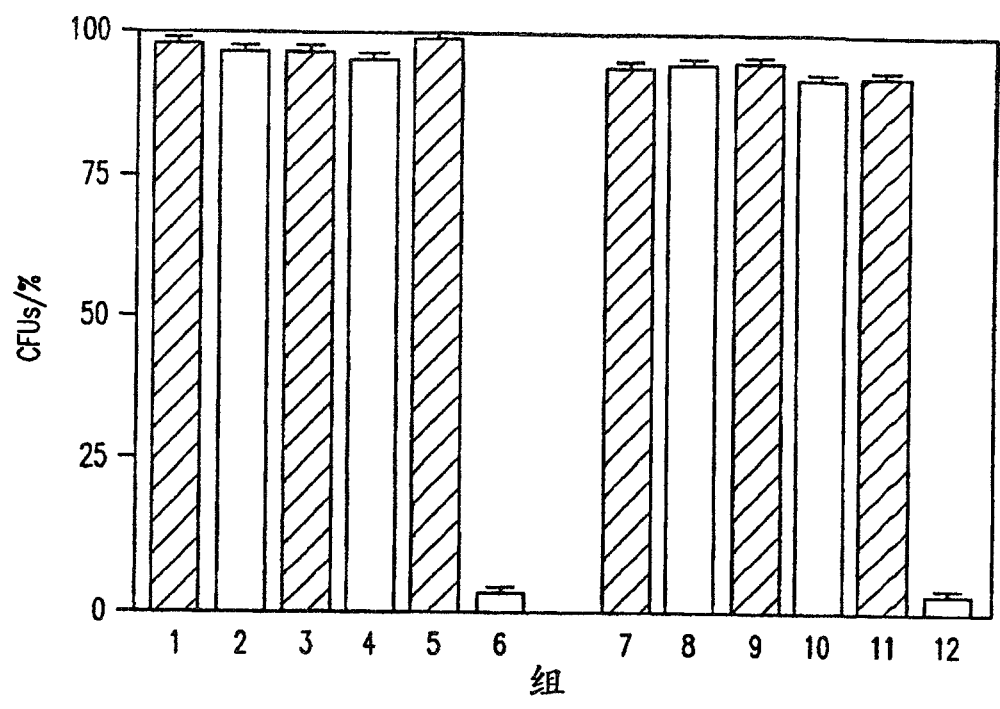


图 14A

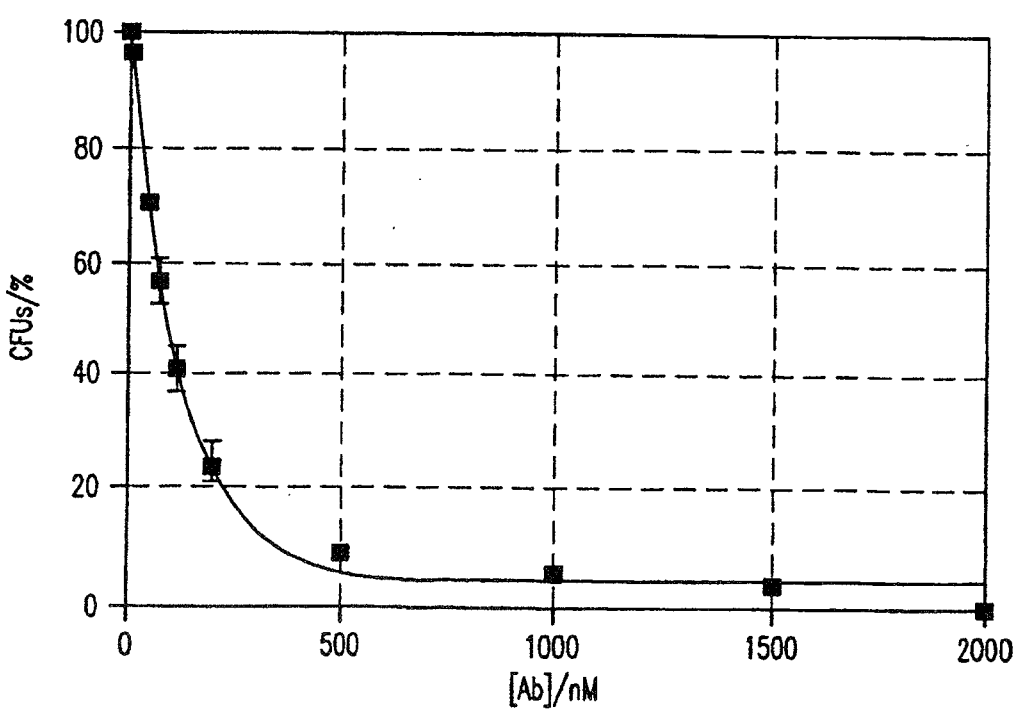


图 14B

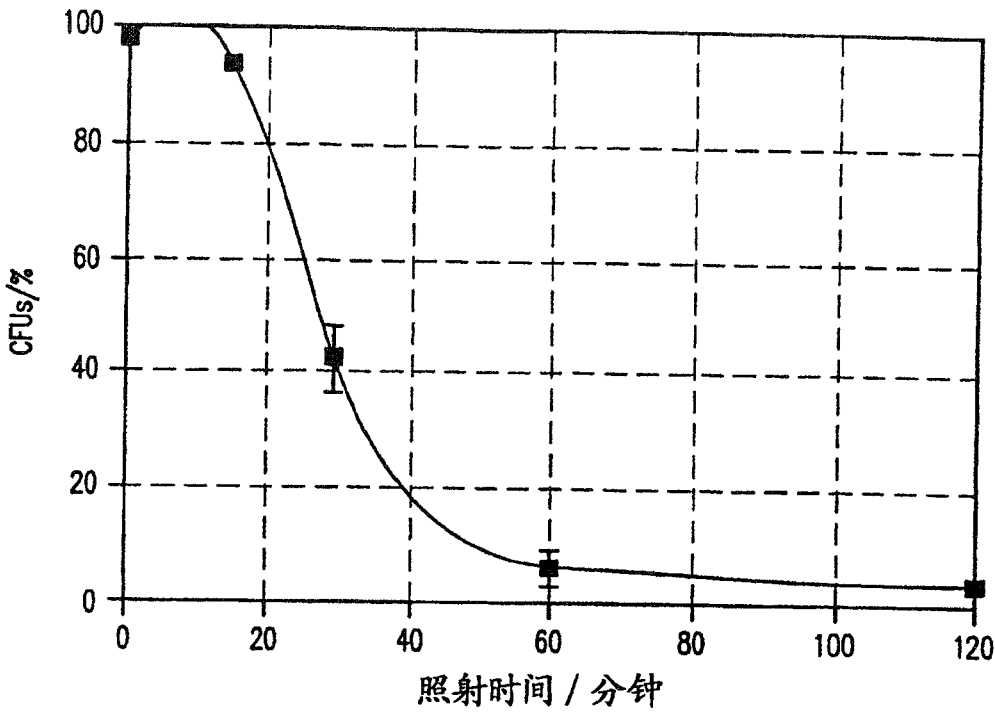


图 14C

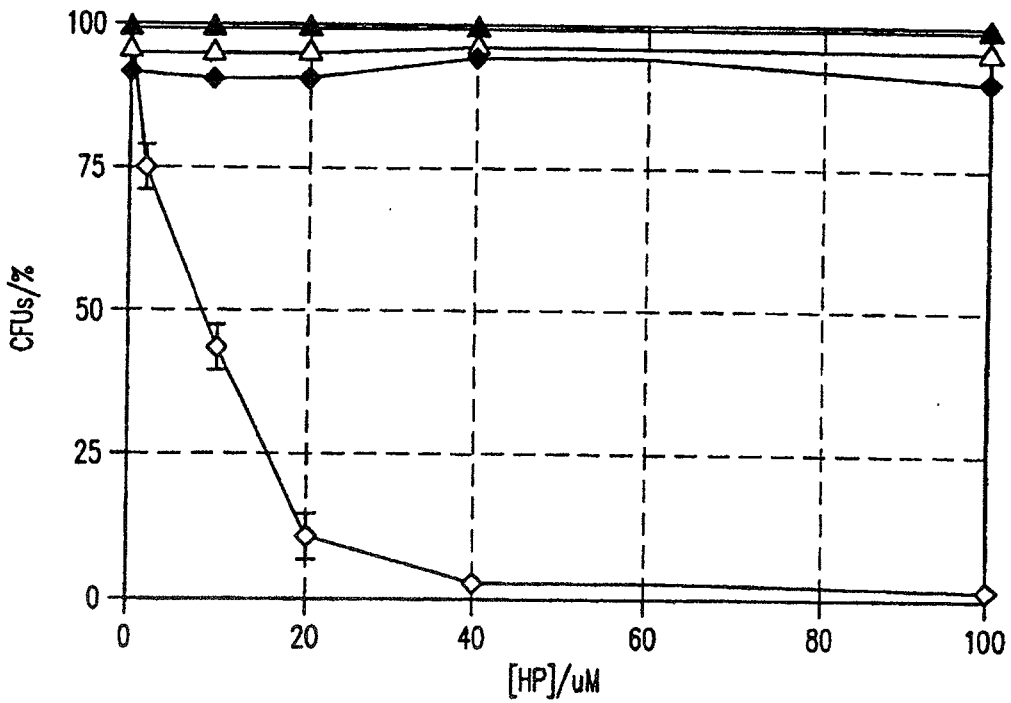


图 14D



图 15



图 16A



图 16B

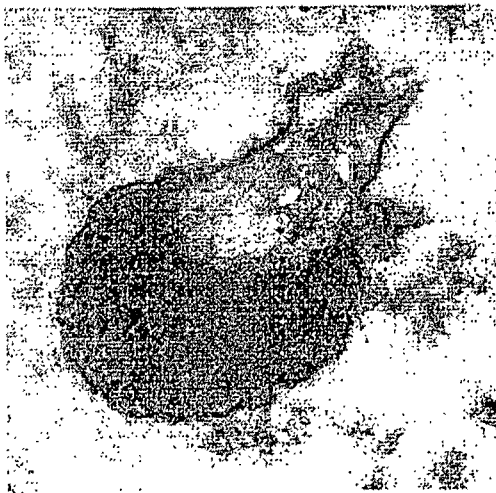


图 16C



图 16D

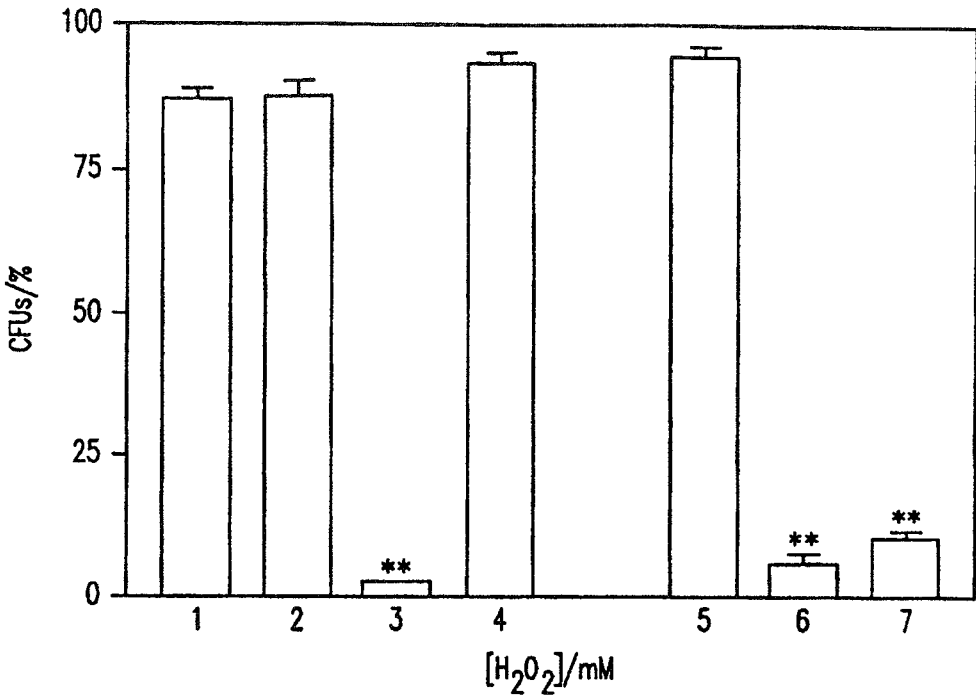


图 17A

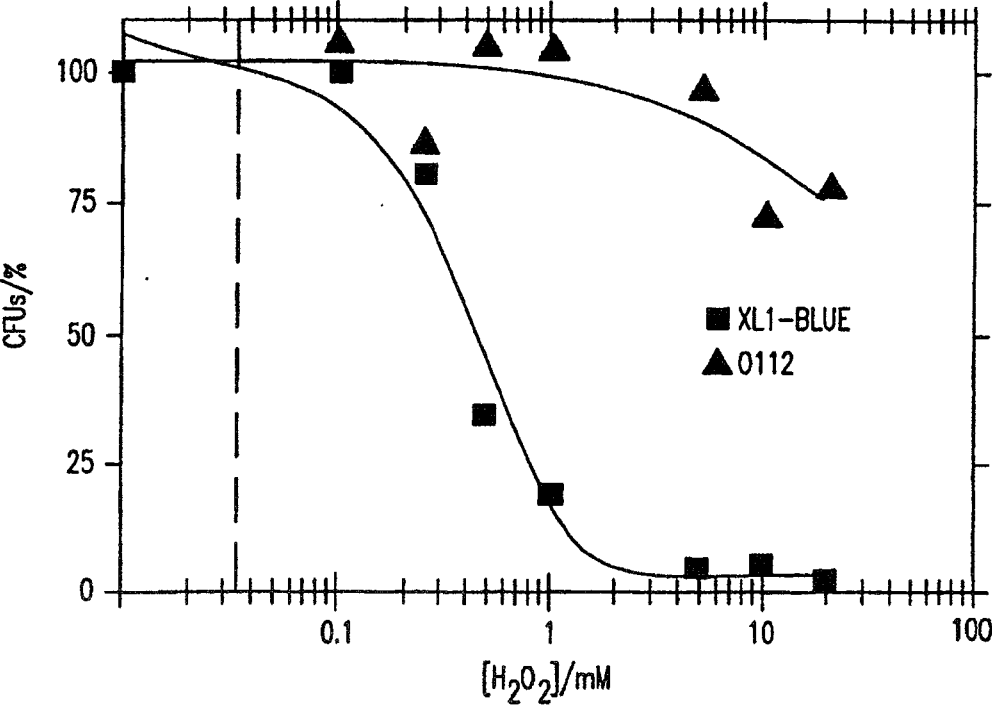


图 17B

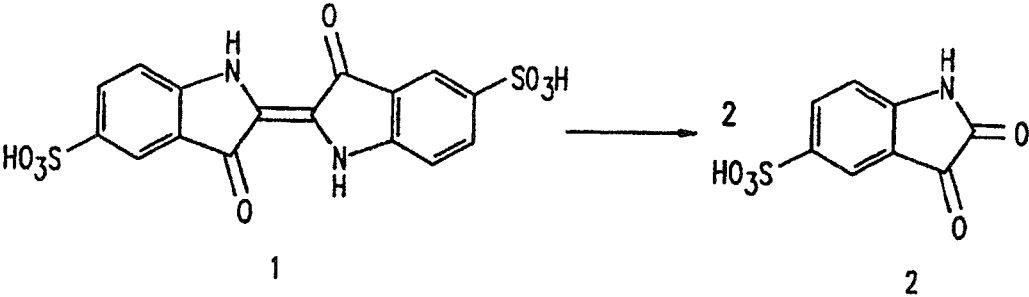


图 18A

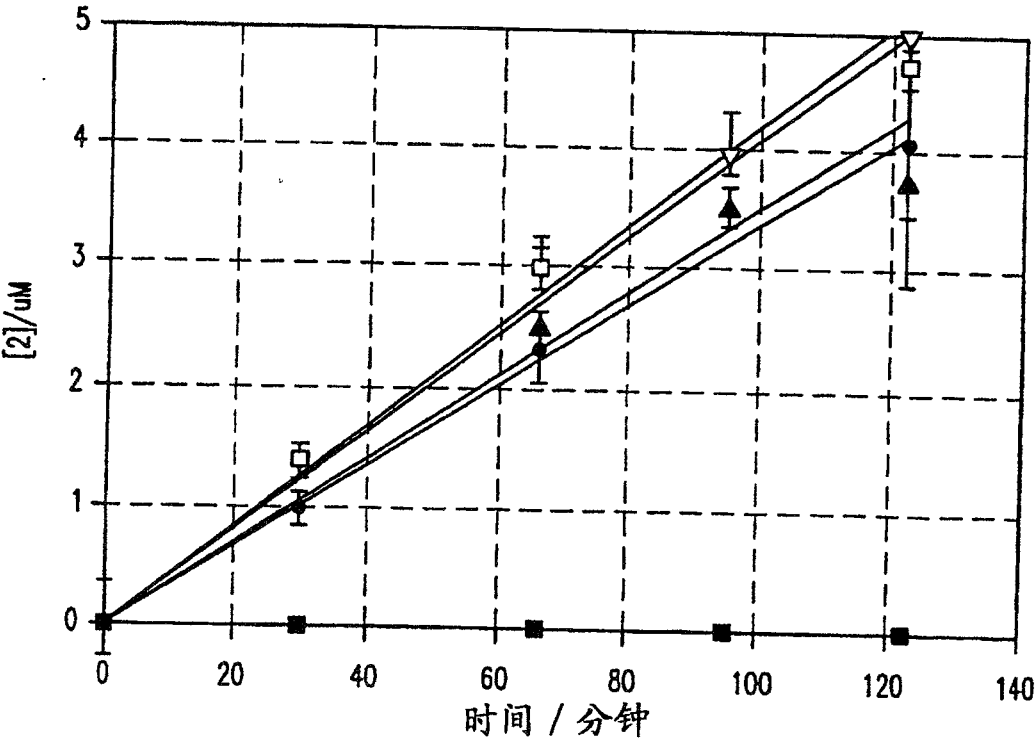


图 18B

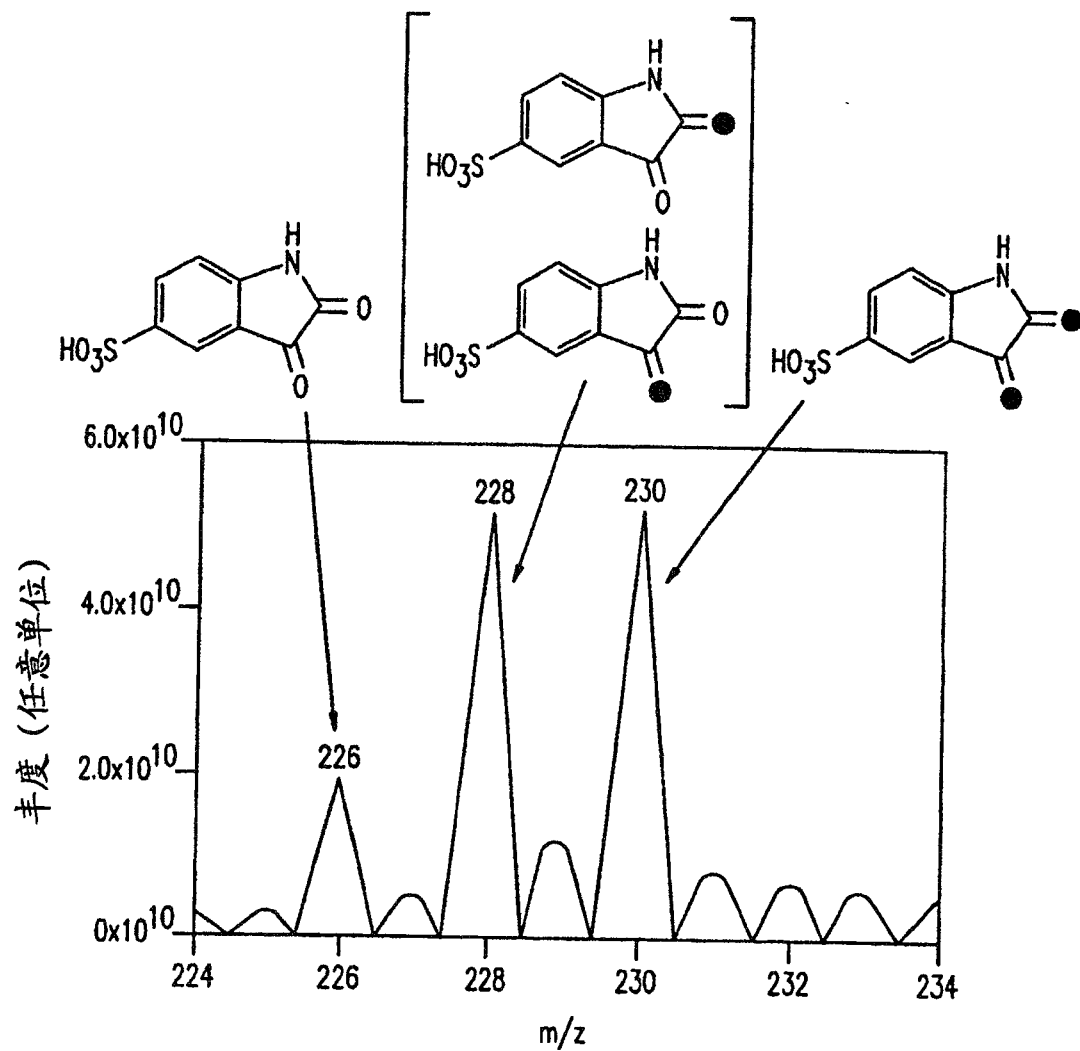


图 19A

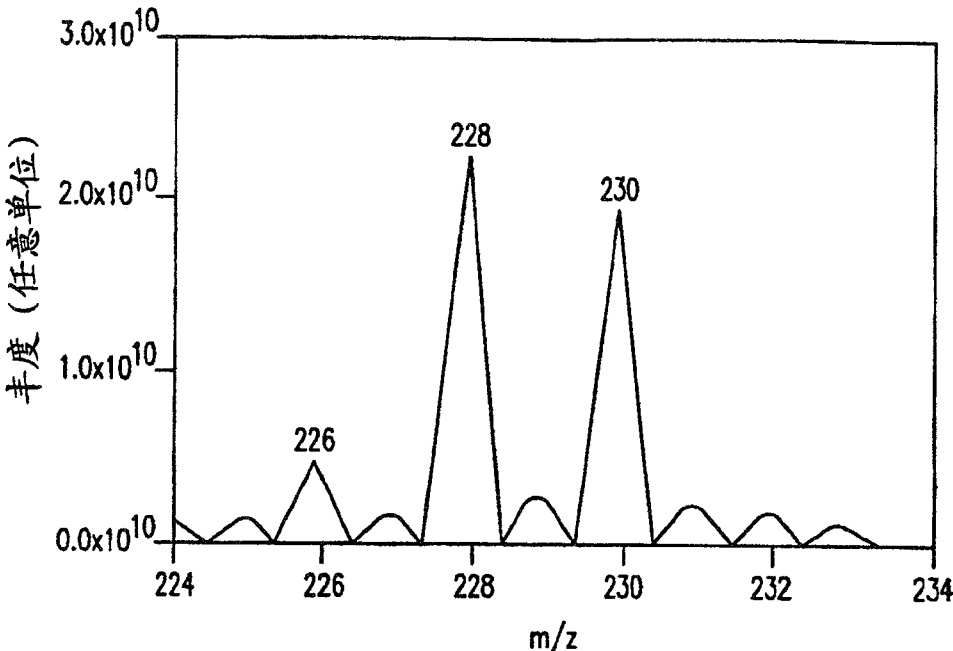


图 19B

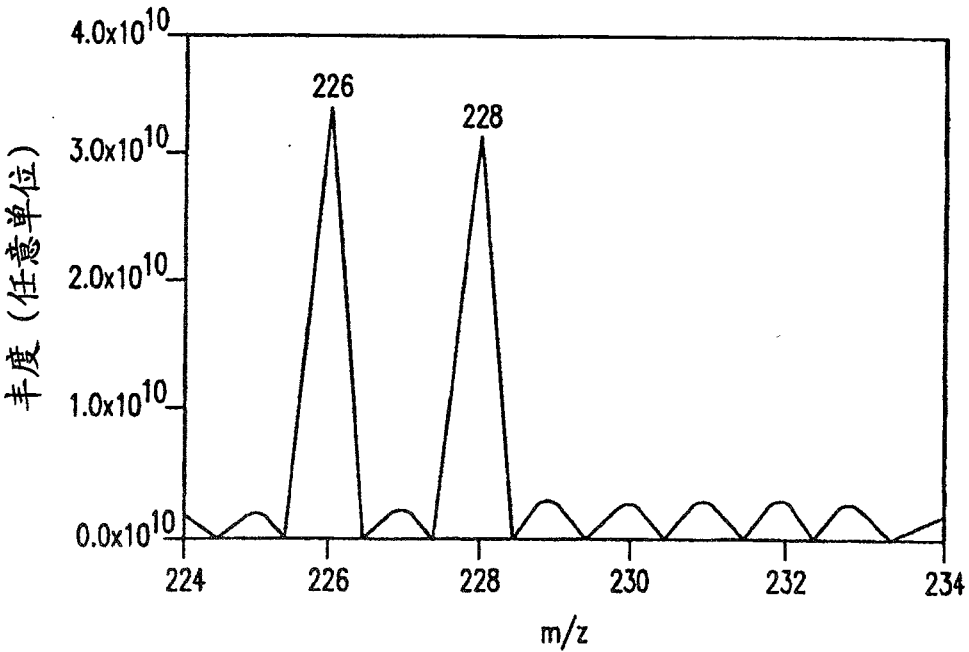


图 19C

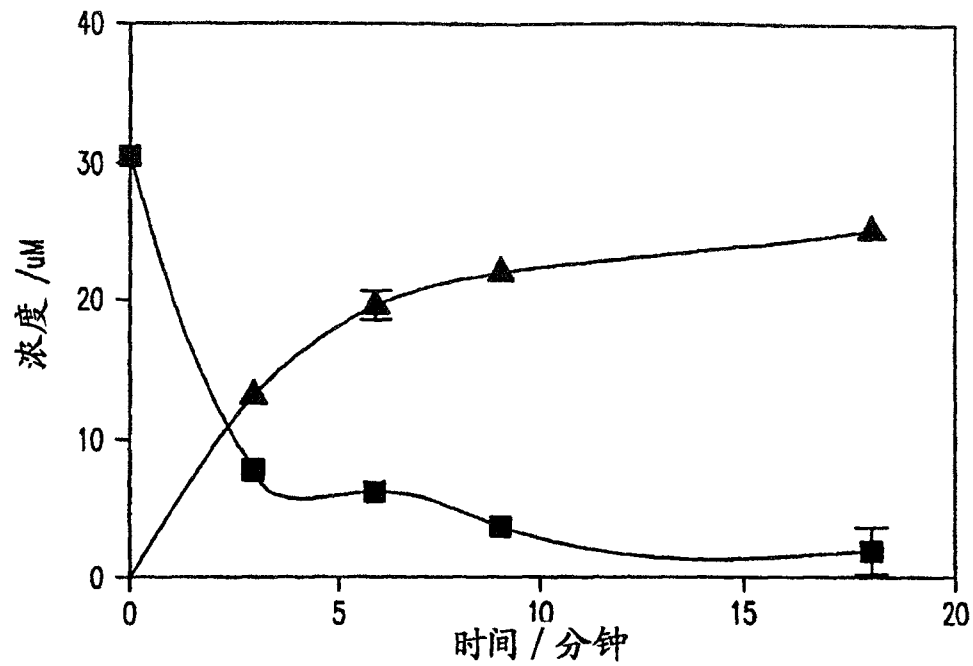


图 20A

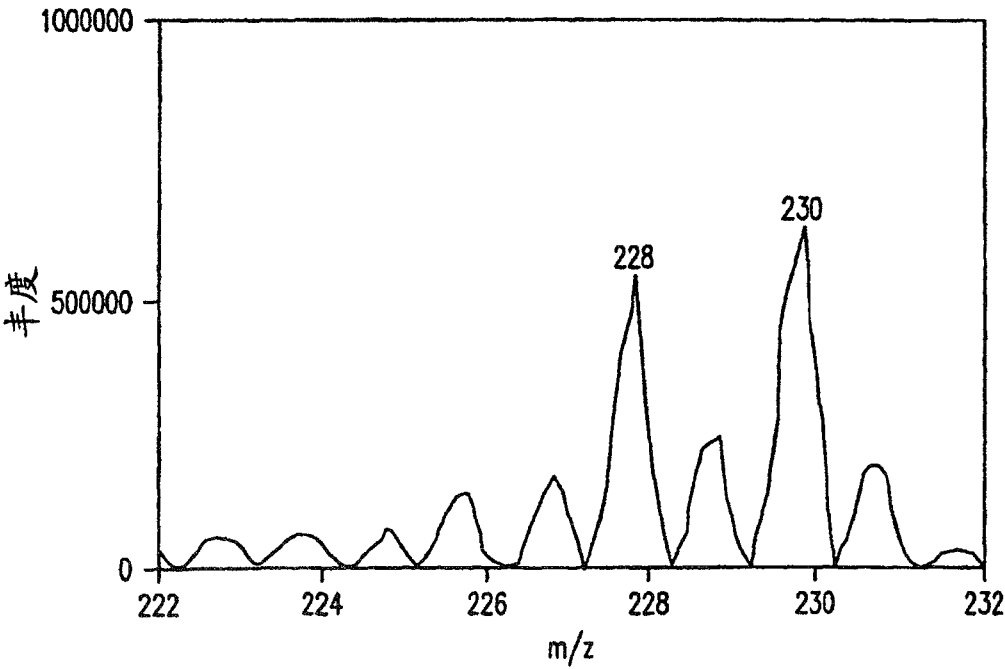


图 20B