



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102037018 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 02

(21) 申请号 200980118370. 2

(22) 申请日 2009. 05. 19

(30) 优先权数据

61/054633 2008. 05. 20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 11. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2009/059228 2009. 05. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/142221 JA 2009. 11. 26

(83) 生物保藏信息

PTA-9167 2008. 04. 23

PTA-9168 2008. 04. 23

PTA-9967 2009. 04. 16

(73) 专利权人 大塚制药株式会社

地址 日本东京都

专利权人 学校法人东京理科大学

(72) 发明人 东隆亲 泷泽寿男

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 杨宏军

(51) Int. Cl.

C07K 16/42(2006. 01)

C12N 5/12(2006. 01)

C12N 15/06(2006. 01)

C12P 21/08(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1711476 A, 2005. 12. 21, 全文.

A. Mares et al. A direct non-competitive idiometric enzyme immunoassay for serum oestradiol. 《Journal of Immunological Methods》. 1995, 第 181 卷 (第 1 期), 83-90.

EDWIN F. ULLMAN et al. Anti-immune complex antibodies enhance affinity and specificity of primary antibodies. 《PNAS》. 1993, 第 90 卷 1184-1189.

审查员 钟辉

权利要求书1页 说明书18页 附图24页

(54) 发明名称

识别结合了抗原的抗体与没有结合抗原的抗体的结构变化的抗体及其获得方法

(57) 摘要

本发明涉及一种识别第一抗体的抗体,所述抗体特异性地识别游离第一抗体及抗原结合第一抗体中的一方,详细而言,上述特异性识别抗体为特异性地识别、结合抗原结合第一抗体的抗体(Domino 抗体),或者为特异性地识别、结合游离第一抗体的抗体(解锁抗体)。

1. 一种获得解锁抗体的方法,包括如下步骤:

- (a) 使用抗原免疫第一宿主,
- (b) 从所述第一宿主中分离至少 1 种能够与所述抗原结合的第一抗体,
- (c) 从分离的第一抗体中获得抗体链或其片段,
- (d) 使用所述抗体链免疫第二宿主,
- (e) 从所述第二宿主的脾细胞中获得至少 1 种杂交瘤,所述杂交瘤产生单克隆抗体,以及
- (f) 从所得杂交瘤产生的单克隆抗体中选择解锁抗体,

其中,所述解锁抗体特异性地识别不与所述抗原结合的第一抗体,且能够从具有高度亲和性的结合了抗原的抗体中提取抗原或抗体,并且,所述抗体链为轻链。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述第二宿主是小鼠、大鼠、兔子、仓鼠或猕猴。

识别结合了抗原的抗体与没有结合抗原的抗体的结构变化的抗体及其获得方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种识别结合了抗原的抗体与没有结合抗原的抗体的结构变化的抗体及其获得方法。

背景技术

[0002] 抗体是以识别抗原的特异性和结合力进行描述的。已经开发了单克隆技术,抗体的蛋白质化学分析及应用技术获得了显著进步。

[0003] 目前,抗体与抗原结合反应的热力学分析和测定能够简便地进行,但尚未有关于随着抗原结合的抗体的立体结构变化的详细报道。其原因在于在蛋白质立体结构分析中广泛使用的 X 射线晶体解析难以应用于抗体之类的巨大蛋白质,大多抗原·抗体复合体的结构解析,使用通过酶消化得到的抗体的 Fab 片段进行(非专利文献 1)。上述解析表明,因抗原的结合而在抗原结合部位的氨基酸残基上发生数埃的结构变化,但根据片段的结构解析无法判断该变化是否被传达到距离结合部位一定空间的恒定域(Constant domain)中。另一方面,抗原·抗体复合体具有游离抗体不具备的如补体级联活化之类的效应子功能。这暗示了由抗原结合引起的抗体结构变化可以被补体结合的恒定域诱导,但可以解释为由于补体级联也被抗体的凝集物活化,所以复合体的效应子功能是由凝集引起的。另一方面,Azuma 等人详细地分析了来自金黄色葡萄球菌的蛋白质 A 与抗体的结合反应,结果发现结合了抗原的抗体及没有结合抗原的抗体对蛋白质 A 的反应性不同(非专利文献 2、3)。但是,通过蛋白质 A 检测到的游离抗体与抗原·抗体复合体的结构差别小,难以用 ELISA 等检测该差别。

[0004] 非专利文献 1:Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. James M. Rini, Ursula Schulze-Gahmen, Ian A. Wilson. Science, 255 :959-965(1992)

[0005] 非专利文献 2:Evidence of allosteric conformational changes in the antibody constant region upon antigen binding. Masayuki Oda, Haruo Kozono, Hisayuki Mori, and Takachika Azuma. International Immunology, 15 :417-426(2003).

[0006] 非专利文献 3:Conformational changes in the antibody constant domains upon hapten-binding. Takuma Sagawa, Masayuki Oda, Misayuki Morii, Hisao Takizawa, Haruo Kozono, and Takachika Azuma. Molecular Immunology, 42 :9-18(2005)

发明内容

[0007] 如上所述,现有技术中尚无辨别游离抗体与结合抗原的抗体的方法,因此必须预先分离反应液中的游离抗体和复合体,然后用针对抗体的抗体(抗抗体)检测形成复合体的抗体。进而,因为限定了蛋白质 A 等抗体结合蛋白质的结合部位,所以对检测在抗体的恒定域发生的结构变化有限制。

[0008] 本发明目的在于提供一种使在抗体的恒定域发生的结构变化容易的抗体及制作方法。

[0009] 本发明提供了以下抗体及其获得方法。

[0010] 项 1. 一种识别第一抗体的抗体, 所述抗体特异性地识别游离第一抗体及抗原结合第一抗体中的一方。

[0011] 项 2. 如项 1 所述的抗体, 其中, 上述特异性识别抗体特异性地识别、结合抗原结合第一抗体 (Domino 抗体 (Domino antibody))。

[0012] 项 3. 如项 1 所述的抗体, 其中, 上述特异性识别抗体特异性地识别、结合游离第一抗体 (解锁抗体 (Antibody unlocking antibody))。

[0013] 项 4. 如项 1 ~ 3 中任一项所述的抗体, 其中, 上述特异性识别抗体, 识别选自第一抗体的轻链部分或轻链部分的部分肽、Fd (重链可变区 +CH1 区) 及其部分肽中的任一个。

[0014] 项 5. 一种杂交瘤, 所述杂交瘤产生项 1 ~ 4 中任一项所述的抗体。

[0015] 项 6. 如项 5 所述的杂交瘤, 其中, ATCC 的保藏编号为 PTA-9167 或 PTA-9168。

[0016] 项 7. 一种获得 Domino 抗体或解锁抗体的方法, 其特征在于, 以 γ -球蛋白作为抗原进行免疫, 从所得杂交瘤产生的单克隆抗体中选择 Domino 抗体或解锁抗体。

[0017] 项 8. 如项 7 所述的方法, 其中, 上述抗原为 γ -球蛋白的轻链或其片段。

[0018] 项 9. 一种获得 Domino 抗体的方法, 包括: 使半抗原抗体捕捉半抗原或抗原后, 将半抗原或抗原通过化学方法固定或结合到抗体上, 制备抗原不与抗体解离的抗原抗体复合物, 然后所述该复合物进行免疫, 得到 Domino 抗体。

[0019] 根据本发明, 能够辨别游离的抗体和结合抗原的抗体。

附图说明

[0020] [图 1-L1] 表示通过 L 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0021] [图 1-L2] 表示通过 L 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0022] [图 2-L3] 表示通过 L 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0023] [图 2-L4] 表示通过 L 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0024] [图 3-L5] 表示通过 L 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0025] [图 3-L6] 表示通过 L 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0026] [图 4-L7] 表示通过 L 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0027] [图 4-L8] 表示通过 L 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0028] [图 5-L9] 表示通过 L 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0029] [图 5-L10] 表示通过 L 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0030] [图 6-F1] 表示通过 F 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0031] [图 6-F2] 表示通过 F 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0032] [图 7-F3] 表示通过 F 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0033] [图 7-F4] 表示通过 F 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0034] [图 8-F5] 表示通过 F 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0035] [图 8-F6] 表示通过 F 系列抗体的分析方法得到的结果。

[0036] [图 9-F7] 表示通过 F 系列抗体的分析方法得到的结果。

- [0037] [图 9-F8] 表示通过 F 系列抗体的分析方法得到的结果。
- [0038] [图 10-F9] 表示通过 F 系列抗体的分析方法得到的结果。
- [0039] [图 10-F10] 表示通过 F 系列抗体的分析方法得到的结果。
- [0040] [图 11] 表示关于抗 -NP 抗体 ((E11))+NP-CGG 的免疫流程,以 100u1/ 小鼠 / 注射的方式注射 100 μ g 带有 NP14-CGG((Ab : Ag = 3 : 1/ 摩尔比)) 的 E11。在图 11 中, CFA :完全弗氏佐剂 (Complete Freund' s adjuvant) ;CGG :鸡 γ -球蛋白 (Chicken gamma globulin) ;NP :4- 羟基-3- 硝基苯基乙酰基 (4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl)
- [0041] [图 12] 采用酵母细胞表面显示的 mAb#0806-12 的表位作图。C λ 1 为表位。
- [0042] [图 13]NP-Ag 存在下或不存在下的抗 -NP mAb 与抗 λ 1mAb #0806-12 的结合特性 (样品 :9T13mAb、9T13mAb+NP-Cap 或 9T13mAb+DNP-Cap)。在图 13 中,
- [0043] 9T13 :抗 -NP 抗体 /IgG1. 1
- [0044] 感应晶片 :CM5
- [0045] 流速 :10ml/min
- [0046] 运行缓冲液 :PBS (0. 005% Tween20)
- [0047] 配体 :抗 -E11mAb (#0806-12) , 2000RU
- [0048] 分析物浓度 :9T13mAb (200nM)
- [0049] 9T13mAb (200nM) +NP-Cap (1mM)
- [0050] 9T13mAb (200nM) +DNP-Cap (1mM)
- [0051] 注射时间 :3min
- [0052] 再生 :10mM Gly-HCl (pH 1. 6) 10ml $\times$ 4 次
- [0053] [图 14] 表示 Domino 抗体。
- [0054] [图 15] 表示解锁抗体。

具体实施方式

[0055] 在本说明书中,所谓“第一抗体”,是指被特异性识别抗体识别的抗体,所述特异性识别抗体能够特异性地识别本发明的游离第一抗体和抗原结合第一抗体中的一方。第一抗体识别抗原,上述抗原可以是抗体,也可以不是抗体。“第一抗体”包含游离第一抗体和抗原结合第一抗体两者。

[0056] 在本说明书中,所谓“特异性地识别游离第一抗体和抗原结合第一抗体中的一方”,是指特异性识别并结合不与抗原结合的第一抗体(游离第一抗体)和与抗原结合的第一抗体(抗原结合第一抗体)中的任一方,与另一方完全不结合或实质上不结合。例如,与不被本发明的特异性识别抗体识别的另一方的游离第一抗体或抗原结合第一抗体的结合,显示出与被第一抗体识别的抗原等对抗体识别无关的抗原同等的水平(自然本底值)。

[0057] “游离第一抗体”,是指不与抗原结合的第一抗体,“抗原结合第一抗体”,是指结合了抗原的第一抗体。

[0058] 本发明的特异性识别抗体(特异性地识别游离第一抗体和抗原结合第一抗体中的一方),包含 Domino 抗体及解锁抗体(AUA) 两者。

[0059] 在本说明书中,所谓的“Domino 抗体”,是指特异性地识别与抗原结合的第一抗体的抗体。Domino 抗体为识别一次抗体、二次抗体等抗体的抗体,被 Domino 抗体识别的抗体

可以为与抗体的复合体（例如二次抗体、三次抗体等），也可以为与抗体以外的抗原结合的抗体（例如一次抗体）中的任一种。将针对第一 Domino 抗体 (Domino I antibody) 的第二 Domino 抗体 (Domino II antibody) 与针对第二 Domino 抗体的第三 Domino 抗体 (Domino III antibody) 组合使用时，由于第二 Domino 抗体、第三 Domino 抗体依次与抗原结合第一抗体结合，所以在本说明书中将上述抗体命名为 Domino 抗体（图 14）。

[0060] “解锁抗体”，是指特异性地识别不与抗原结合的游离的第一抗体的抗体。由于能够从具有高度亲和性的结合了抗原的抗体中提取（解锁）抗原或抗体，所以被命名为解锁抗体。本发明的优选解锁抗体为能够从结合了抗原的抗体中提取（解锁）抗原或抗体的抗体。

[0061] 所谓“抗体”的术语被最广义地使用，包括单克隆抗体（包含全长单克隆抗体或完整单克隆抗体）、多克隆抗体、多价抗体、多重特异性抗体（例如双重特异性抗体），还包括抗体片段只要其显示所期望的生物活性即可。

[0062] 除非另有说明，在整个说明书中，所谓“多价抗体”用于表示含有 3 个或 3 个以上抗原结合部位的抗体。多价抗体优选通过进行基因操作而具有 3 个或 3 个以上抗原结合部位，通常不是天然序列 IgM 或 IgA 抗体。

[0063] “抗体片段”包括保持有与抗原结合能力的抗体的一部分。该定义中所包括的抗体片段的例子包括：(i) 具有 VL、CL、VH 及 CH1 结构域的 Fab 片段；(ii) Fab' 片段，即，在 CH1 结构域的 C 末端具有一个或者多个半胱氨酸残基的 Fab 片段；(iii) 具有 VH 及 CH1 结构域的 Fd 片段；(iv) Fd' 片段，即，在 CH1 结构域的 C 末端具有一个或多个半胱氨酸残基，和 VH 及 CH1 结构域；(v) 具有抗体的单臂 VL 及 VH 结构域的 Fv 片段；(vi) 由 VH 结构域构成的 dAb 片段 (Ward 等, Nature 341, 544-546 (1989))；(vii) 分离得到的 CDR 结构域；(viii) F(ab')₂ 片段；(ix) 单链抗体分子（例如单链 Fv、scFv）(Bird 等, Science 242 :423-426 (1988)；及 Huston 等, PNAS (USA) 85 :5879-5883 (1988))；(x) 具有 2 个抗原结合部位的“双抗体 (diabodies)”，包含在同一多肽链中与轻链可变区 (VL) 结合的重链可变区 (VH)（例如参见欧洲专利公报第 404097 号；国际公开第 93/11161 号；及 Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :6444-6448 (1993))；(xi) “线形抗体”，即，包含与互补的轻链多肽共同形成一对抗原结合结构域的一对串联 Fd 片段 (VH-CH1-VH-CH1) (Zapata 等, Protein Eng. 8(10) : 1057-1062 (1995)；及美国专利第 5641870 号)。

[0064] 此处使用的所谓“单克隆抗体”的术语，是指实质上由均匀的抗体群得到的抗体。即，除了少量存在的可自然发生的突变之外，构成群的各抗体相同。单克隆抗体是高度特异性的，针对单一的抗原部位。进而，与多克隆抗体制备物不同，各单克隆抗体对抗原的单一决定簇，所述多克隆抗体制备物典型地包括针对不同决定簇（表位）的不同抗体。“单克隆”的修饰语并不是指抗体必须用某种特定的方法生产。例如本发明中使用的单克隆抗体，可以采用最初记载在 Kohler 等, Nature, 256 :495 (1975) 中的杂交瘤法制备，或者可以采用重组 DNA 法制备（例如参见美国专利第 4816567 号）。另外“单克隆抗体”还可以采用例如 Clackson 等, Nature, 352 :624-628 (1991) 或 Marks 等, J. Mol. Biol. 222 :581-597 (1991) 中记载的技术，从噬菌体抗体库中分离。

[0065] 此处所述的单克隆抗体，特别包括“嵌合”抗体，另外只要显示出所期望的生物活性则也包括这些抗体的片段，所述“嵌合”抗体中，重链及 / 或轻链的一部分与来自特定种

类、或属于特定抗体类型或亚型的抗体的对应序列同一或同源,另一方面,链的其余部分与来自其他种类、或属于其他抗体类型或亚型的抗体的对应序列同一或同源(美国专利第 4816567 号;及 Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855(1984))。

[0066] 非人(例如小鼠)抗体的“人源化”型为包含来自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。其中大部分,人源化抗体为人免疫球蛋白(受体抗体),所述人免疫球蛋白中来自受体的高频可变区的残基被来自非人物种的高频可变区的残基(供体抗体)取代,所述非人物种例如为小鼠、大鼠、兔子或具有所期望的特异性、亲和性及能力的非人灵长类。在某些情况下,人免疫球蛋白的构架区(FR)的残基被对应的非人残基取代。进而,人源化抗体也可以含有在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。上述修饰用于进一步精炼抗体的特性。通常人源化抗体中实质上全部地含有至少 1 个、典型地含有 2 个可变结构域,所述可变结构域中全部或实质上全部的高频可变环对应于非人免疫球蛋白的部分,全部或实质上全部的 FRs 为人免疫球蛋白序列。人源化抗体,根据情况也可以包含免疫球蛋白恒定结构域(Fc),典型地至少包含人免疫球蛋白的一部分。对于更详细的情况,参见 Jones 等, *Nature* 321:522-525(1986); Riechmann 等, *Nature* 332:323-329(1988); 及 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)。

[0067] “人抗体”,是具有与由人产生的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列的抗体,及/或是使用此处公开的用于制造人抗体的任一种技术制造的抗体。人抗体可以通过使用本技术领域公知的各种技术制备。在其中的一个实施方式中,人抗体选自噬菌体库,此处噬菌体库表达人抗体(Vaughan 等, *Nature Biotechnology*, 14:309-314(1996); Sheets 等, *PNAS*, (USA) 95:6157-6162(1998); Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381(1991); Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581(1991))。另外,人抗体可以如下产生,即,将人免疫球蛋白导入转基因动物,例如内源性免疫球蛋白基因部分或完全不被活化的小鼠中。在暴露时,观察人抗体的产生,在包括基因重排、装配及抗体谱的所有方面与在人中呈现出的情况十分相似。上述获得方法例如记载在美国专利第 5545807 号;第 5545806 号;第 5569825 号;第 5625126 号;第 5633425 号;第 5661016 号,及以下的科学文献: Marks 等, *Bio/Technology*, 10:779-783(1992); Lonberg 等, *Nature*, 368:856-859(1994); Morrison 等, *Nature*, 368:812-13(1994); Fishwild 等, *Nature Biotechnology*, 14:845-51(1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14:826(1996); Lonberg 及 Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93(1995)。或者,人抗体也可以通过生产针对靶抗原的抗体的人 B 淋巴细胞的无限增殖化进行制备(上述 B 淋巴细胞可以从个体回收,也可以在体外被免疫)。参见例如 Cole 等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss. p. 77(1985); Boerner 等, *J. Immunol.*, 147(1):86-95(1991); 及美国专利第 5750373 号。

[0068] “疾病”,是通过用抗体治疗得到益处的所有症状。其中包括慢性及急性的疾病或疾病,所述疾病或疾病包括使哺乳动物罹患问题疾病的原因的病理状态。此处,在由本发明的抗体治疗的疾病的非限定的例子中,包括良性及恶性肿瘤;白血病及淋巴恶性肿瘤;神经元、神经胶质、星形细胞、下丘脑及其他腺体、巨噬菌体、上皮、间质及囊胚腔的疾病;及炎症、血管形成及免疫性疾病。

[0069] 所谓“治疗的有效量”的术语,是指对治疗哺乳动物的疾病或疾病有效的药剂量。

[0070] “治疗”,是指治疗处置及预防或保护的方法两者。需要治疗的对象中包括已经罹

患疾病的以及应预防疾病的。

[0071] 所谓“标记物”的用语,在此处使用时是指与多肽(例如抗原或抗体)直接或间接地连接的能够检测到的化合物或组合物。标记物可以检测其本身(例如放射性同位素标记物或荧光标记物),或在酶标记物时,也可以催化能够检测到的基质化合物或组合物的化学变化。

[0072] 此处使用时,所谓“细胞”、“细胞株”及“细胞培养”的术语可相互交换使用,全部术语均包括子代。因此,所谓“转化体”及“转化细胞”的用语,包括最初的对象细胞,及与经历几次传代培养无关、从最初的对象细胞中诱导得到的细胞。

[0073] 单克隆抗体的制备

[0074] 本技术领域已熟知制备和表征抗体的方法。如下对本发明中使用的用于生产抗体的示例的技术进行说明。在抗体的生产中使用的抗原,可以是抗体或其中一个部分,可以优选举出抗体的轻链或其片段。

[0075] 制备本发明抗体的方法的特征在于使用轻链。一般认为只识别抗体的复合体、不识别游离的抗体的 Domino 抗体能够通过将抗原抗体复合体给予宿主来制备,但本发明人在实际使用上述方法时,只能得到识别游离抗体及复合化抗体两方的抗体。另一方面,通过使用轻链生产抗体,可以得到特异性地识别抗原抗体复合体的 Domino 抗体,或特异性地识别游离抗体的解锁抗体。

[0076] 或者,半抗原或抗原被半抗原抗体捕捉后,将半抗原或抗原通过化学方法固定或结合到抗体上,制备抗原不与抗体解离的抗原抗体复合物后,对该复合物进行免疫,可以得到 Domino 抗体。作为半抗原,可以举出睾酮、雌二醇、雌三醇、皮质醇等类固醇激素;具有单硝基苯基、二硝基苯基、三硝基苯基、荧光素基等的化合物(例如 2,4-二硝基苯酚(DNP));以地高辛、低分子药物为代表的低分子物质,这些物质通过给予小鼠等哺乳动物从而能诱导针对这些物质的抗体。半抗原抗体是特异性地识别这些半抗原的抗体。半抗原或抗原与抗体的化学固定或结合,可以使用交联剂,例如戊二醛、甲醛、多聚甲醛等二醛类、及甲苯-2,4-二异氰酸酯等二异氰酸酯类进行。

[0077] 本发明的 Domino 抗体及解锁抗体可以使用轻链或其片段,利用在 Kohler 等, Nature, 256:495(1975)中最初记载的杂交瘤法制作,或可以利用重组 DNA 法(美国专利第 4816567 号)制作。

[0078] 在本发明的优选实施方式中,Domino 抗体及解锁抗体可以通过杂交瘤法制作,即,取得被 Domino 抗体或解锁抗体识别的抗体的轻链,以该轻链为免疫源将其给予宿主(小鼠、大鼠、兔子、仓鼠、猕猴等)。例如,如上所述地对宿主进行免疫,导出淋巴细胞,所述淋巴细胞产生或能够产生与免疫中使用的轻链或其片段特异性地结合的抗体。作为其他方法,也可以在体外对淋巴细胞进行免疫。接着,使用如聚乙二醇等适当的融合剂使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103 页(Academic Press, 1986))。

[0079] 另外,已经阐述该单克隆抗体的制备的特征为使用轻链作为抗原,但在抗原为 H 链及包含 H 链可变区及 C1H 区的 H 链片段时,同样地也可以取得目标抗体产生的杂交瘤。

[0080] 即,抗体在二价的 Fab 部分捕捉抗原, Fab 由轻链(VL+CL)及重链的 Fd(重链可变区 VH+CH1 区)构成。Fab 中的轻链(VL+CL)及 Fd(VH+CH1)是功能上对称的一对蛋白质,在

该一对蛋白质的 VL 中存在被分开的 3 个区域（高变区），在 VH 上同样地在与 VL 对应的位置也存在被分开的 3 个区域（高变区），用上述部分捕捉抗原。

[0081] Domino 抗体和解锁抗体可以通过免疫 L 链得到，表示如果抗体捕捉抗原，则在抗体的 Fab 部分的 L 链上发生结构变化。因此，如果改变表达，则呈现出 L 链结构变化的抗体成为 Domino 抗体和解锁抗体。没有人相信如上所述通过抗体的抗原结合反应能够引起 L 链上的结构变化、并且可以取得能够识别该结构变化部分的抗体。本发明是基于这些知识而完成的。

[0082] 如上所述，着眼于抗体的 Fab 时，L 链与 H 链为功能上对称的一对蛋白质。捕捉抗原的部分还存在于几乎相同的位置、相同长度的区域中的各三处。由于此次通过取得 Domino 抗体、解锁抗体来推断在 L 链上的结构变化，所以认为在成为对象的另一对蛋白质、重链 Fd 上，也会产生由捕捉抗原引起的同样的结构变化。即，认为如果对重链的 Fd 部分或其片段进行免疫，实施同样的筛选方法，则可以得到 Domino 抗体及解锁抗体。

[0083] 但是，轻链的免疫在以下方面优异，即

[0084] (i) 首先经过 Fab、F(ab')₂ 的纯化对 Fd 进行纯化。在这方面，轻链一方的纯化简单，在产量方面有利；

[0085] (ii) 轻链一方在物性方面易于处理。H 链为疏水性蛋白质，纯化时易于沉淀。

[0086] 但是，上述 H 链的缺点可以通过以下方法避免，例如 1) 用经化学合成的 Fd 的部分肽免疫；2) 在大肠杆菌或酵母中得到只包含 Fd 的重组蛋白；3) 使用缺少特定的 Fd 部分的 KO 小鼠对其进行免疫；等。

[0087] 将如上所述制备的杂交瘤细胞接种到适当的培养基上并使其增殖，所述培养基优选含有抑制不融合的亲代骨髓瘤细胞的增殖或存活的一种或多种物质。例如，如果亲代骨髓瘤细胞缺失次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT)，则用于杂交瘤的培养基，可以典型地含有阻碍 HGPRT 缺失细胞增殖的物质，即次黄嘌呤、氨基蝶呤及胸腺嘧啶核苷 (HAT 培养基)。

[0088] 优选的骨髓瘤细胞为一种能够有效地融合、且支援由被选择的抗体生产细胞引起的抗体的稳定的高水平生产、对如 HAT 培养基的培养基敏感的细胞。其中，优选的骨髓瘤细胞株为小鼠骨髓瘤株，例如由能购自 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA 的 MOPC-21 及 MPC-11 小鼠肿瘤、及能购自 American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA 的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞诱导得到的骨髓瘤株。另外，还公开了人骨髓瘤及小鼠-人异种骨髓瘤细胞株也可用于产生人单克隆抗体 (Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0089] 为了抗原的单克隆抗体（游离抗体或结合了抗原的抗体）的产生，对培育杂交瘤细胞的培养基进行分析。优选由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体 (Domino 抗体及解锁抗体) 的结合特异性，通过免疫沉淀或体外结合检测，例如放射免疫测定法 (RIA) 或酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定。

[0090] 鉴定出杂交瘤细胞产生了所期望的特异性、亲和性、及 / 或活性的抗体作为 Domino 抗体或解锁抗体后，可以采用有限稀释法对该克隆进行亚克隆，利用标准方法使其增殖 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103 页 (Academic

Press, 1986))。适于上述目的的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外,杂交瘤细胞,可以在动物中作为腹水肿瘤在体内使其增殖。

[0091] 由亚克隆分泌的单克隆抗体,利用例如蛋白质 A-琼脂糖凝胶、羟基磷灰石色谱法 (Hydroxyapatite chromatography)、凝胶电泳、透析、或亲和色谱法之类常用的免疫球蛋白纯化法,从培养基、腹水、或血清中适当地分离。

[0092] 编码单克隆抗体的 DNA,根据常规方法(例如通过使用能够与编码单克隆抗体的重链及轻链的基因特异性地结合的寡核苷酸探针)被迅速分离,并确定序列。杂交瘤细胞为上述 DNA 的优选供给源。一旦被分离,将 DNA 导入表达载体中,接着将其转染到如不这么做就不生产免疫球蛋白蛋白质的大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞之类的宿主细胞中,在重组宿主细胞中能够实现单克隆抗体的合成。以下更加详细地说明抗体的重组生产。

[0093] 在进一步的实施方式中,抗体或抗体片段可以使用 McCafferty 等, Nature, 348 :552-554(1990) 中记载的技术从生产的抗体噬菌体库中分离。Clackson 等, Nature, 352 :624-628(1991) 及 Marks 等, J. Mol. Biol., 222 :581-597(1991) 公开了使用噬菌体库的小鼠及人抗体的分离。其他文献公开了由链改组引起的高亲和性 (nM 范围) 人抗体的生产 (Marks 等, Bio/Technology, 10 :779-783(1992)); 并且作为用于构筑非常大的噬菌体库的对策公开了组合感染及体内重组 (Waterhouse 等, Nuc. Acids. Res., 21 :2265-2266(1993))。因此,上述技术能够可行地替代针对单克隆抗体分离的传统单克隆抗体杂交瘤法。

[0094] DNA 还可以通过以下方式修饰:例如取代人重链及轻链恒定结构域的编码序列来代替相同的小鼠序列(美国专利第 4816567 号;Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81 :6851(1984)),或在免疫球蛋白编码序列上共价结合非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或一部分。

[0095] 典型地,上述非免疫球蛋白多肽被置换为抗体的恒定结构域,或被置换为抗体的一个抗原结合部位的可变结构域,制作包含两个抗原结合部位的嵌合二价抗体,所述两个抗原结合部位中的一个对抗原具有特异性,另一个对不同抗原具有特异性。

[0096] 人源化及人抗体

[0097] 人源化抗体中导入来源于非人的一个或多个氨基酸残基。上述非人氨基酸残基,常常被称作“移入”残基,该“移入”残基典型地可由“移入”可变结构域得到。人源化本质上可以通过采用下述方法实施,即,将啮齿类 CDRs 或 CDR 序列取代为与人抗体对应的序列,利用 Winter 与共同研究者的方法 (Jones 等, Nature, 321 :522-525(1986); Riechmann 等, Nature, 332 :323-327(1988); Verhoeyen 等, Science, 239 :1534-1536(1988))。因此,上述“人源化”抗体为嵌合抗体,所述嵌合抗体中,与完整的人可变结构域相比实质上少的部分,被来源于非人物种的对应的序列取代(美国专利第 4816567 号)。实际上,人源化抗体典型地为几个高频可变区残基及根据情况几个 FR 残基被来自啮齿类抗体的类似部位的残基取代的人源化抗体。

[0098] 为了降低抗原性,制作人源化抗体时使用的人的轻重两个可变结构域的选择是非常重要的。所谓“最佳匹配方法”中,针对已知的人可变结构域序列库整体,筛选啮齿动物抗体的可变结构域的序列。接着,接受以与啮齿动物最近的人序列作为人源化抗

体的人构架区 (FR) (Sims 等, J. Immunol., 151 :2296(1993) ;Chothia 等, J. Mol. Biol., 196 :901(1987))。其他方法使用特定的构架区,该特定的构架区由轻链或重链的特定亚组的全部人抗体的共有序列诱导得到。在几个不同的人源化抗体中可以使用同样的框架区 (Carter 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :4285(1992) ;Presta 等, J. Immunol., 151 :2623(1993))。

[0099] 进而,保持对抗原的高亲和性和其他优选的生物学性质、对抗体进行人源化是重要的。为了实现上述目标,优选的方法中,使用亲代及人源化序列的三维模型,通过亲代序列及各种概念的人源化产物的分析步骤,来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常可以购买到,是本领域技术人员所熟知的。注解、并显示选择的候补免疫球蛋白序列的推测三维立体构象结构的计算机程序可以购买到。通过研究上述显示内容,可以进行候补免疫球蛋白序列的功能中残基的可能作用的分析,即影响候补免疫球蛋白与抗原的结合能力的残基的分析。如上所述,例如可以从受体及移入序列中选择、并组合 FR 残基,使得针对靶抗原的亲合性提高,实现所期望的抗体特性。通常,CDR 残基直接且最实质地影响抗原结合性。

[0100] 作为其他方法,可以制作在无内源性免疫球蛋白产生的条件下通过免疫可以产生人抗体的总抗体谱的转基因动物(例如小鼠)。例如有记载表明,嵌合及生殖系统突变体小鼠中抗体重链结合区 (J_H) 基因的同型接合除去导致内源性抗体生成的完全抑制。上述生殖系统突变体小鼠中人生殖系统免疫球蛋白基因序列的转移导致给予抗原时人抗体的产生。例如参见 Jakobovits 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551(1993) ;Jakobovits 等, Nature 362 :255-258(1993) ;Bruggerman 等, Year in Immuno., 7 :33(1993) ;及 Duchosal 等 Nature 355 :258(1992)。人抗体也能够由噬菌体显示库诱导 (Hoogenboom 等, J. Mol. Biol., 227 :381(1991) ;Marks 等, J. Mol. Biol., 222 :581-597(1991) ;Vaughan 等 Nature Biotech 14 :309(1996))。

[0101] 抗体片段

[0102] 已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统的方法是通过完整抗体的蛋白分解性消化诱导生成上述片段(例如参见 Morimoto 等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24 :107-117(1992) 及 Brennan 等, Science, 229 :81(1985))。但是,目前上述片段能通过重组宿主细胞直接生成。例如抗体片段能够从在上述内容中已经探讨过的抗体噬菌体库中分离。作为其他方法, Fab'-SH 片段能够从大肠杆菌中直接回收,使其通过化学方法结合形成 $F(ab')_2$ 片段 (Carter 等, Bio/Technology 10 :163-167(1992))。其他方法中,能够由重组宿主细胞培养直接分离 $F(ab')_2$ 片段。用于生成抗体片段的其他方法对于本领域技术人员来说是公知的。其他实施方式中,选择抗体为单链 Fv 片段 (scFv)。参见国际公开第 93/16185 号。

[0103] 期望针对效应子功能改变本发明的抗体,提高抗体的效果。例如,将半胱氨酸残基导入 Fc 区,由此可以在该区域形成链间二硫键。如上所述生成的同型二聚体抗体 (Homodimeric antibody),可能具有提高了的内源化能力及 / 或性能增加的补体介导的细胞凋亡及抗体依存性细胞毒性 (ADCC)。参见 Caron 等, J. Exp. Med. 176 :1191-1195(1992) 及 Shopes, B. J. Immunol. 148 :2918-2922(1992)。另外,抗肿瘤活性提高的同型二聚体抗体,可以使用 Wolff 等, Cancer Research 53 :2560-2565(1993) 中记载的异源二官能度交联剂制备。或者,对抗体进行加工,使其具有 2 个 Fc 区,由此也可以提高补体溶解及 ADCC

能力。参见 Stevenson 等, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)。

[0104] 另外, 此处公开的抗体也可以以免疫脂质体的形式使用。含有抗体的脂质体可以采用本技术领域中公知的方法, 例如记载在 Epstein 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985); Hwang 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030 (1980); 及美国专利第 4485045 号及同 4544545 号中的方法进行制备。美国专利第 5013556 号公开了循环时间增加的脂质体。

[0105] 特别有用的脂质体可以使用含有卵磷脂、胆固醇及经 PEG 衍生化的磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂质组合物, 通过反相蒸发法进行制备。脂质体通过规定孔径的过滤器被挤出, 得到具有所期望的直径的脂质体。如 Martin 等, *J. Biol. Chem.* 257:286-288 (1982) 所述, 本发明的抗体的 Fab' 片段可以通过二硫交换反应与脂质体配对。根据情况, 在脂质体内可以包含化疗剂 (阿霉素等)。参见 Gabizon 等, *J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989)。

[0106] 抗体的共价键修饰属于本发明的范围。如果合适, 它们可以通过化学合成, 或通过抗体的酶或化学切割得到。抗体的共价键修饰的其他类型, 通过使用有机衍生物剂与抗体的靶氨基酸区域反应, 导入到分子中, 所述有机衍生物剂能够与选择的侧链或 N 或 C 末端残基反应。

[0107] 共价键修饰包括通过化学或酶的方法使糖苷与抗体偶合。在不需要具有用于 N- 或 O- 结合糖基化的糖基化能力的宿主细胞中产生抗体的方面, 这些步骤是有利的。根据使用的偶合方式, 可以将糖 (类) 连接到 (a) 精氨酸及组氨酸; (b) 游离的羧基; (c) 游离的巯基, 例如半胱氨酸的巯基; (d) 游离的羟基, 如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的羟基; (e) 苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸之类芳香族残基或 (f) 谷氨酰胺的酰胺基。上述方法记载在 1987 年 9 月 11 日公开的国际公开第 87/05330 号、以及 Aplin 及 Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 259-306 页 (1981) 中。

[0108] 抗体中存在的所有碳水化合物部分的除去, 可以通过化学法或酶法完成。在化学法去糖基化中, 需要将抗体暴露在三氟甲磺酸化合物或等价化合物中。通过该处理, 能够将除去结合糖 (N-乙酰基葡萄糖胺或 N-乙酰基半乳糖胺) 之外的大部分或全部的糖切割、且保持抗体完整。Hakimuddin 等, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987)、及 Edge 等, *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981) 公开了化学法去糖基化。抗体上的碳水化合物部分的酶法切割, 如 Thotakura 等, *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987) 所述, 可以通过使用各种内糖苷酶及外糖苷酶实现。

[0109] 抗体的共价键修饰的其他类型, 包括采用美国专利第 4640835 号、第 4496689 号、第 4301144 号、第 4670417 号、第 4791192 号或第 4179337 号中记载的方法, 将抗体连接到各种非蛋白质样聚合物中的一个上, 例如聚乙二醇、聚丙二醇、或聚氧乙烯。

[0110] 本发明的抗体可以通过重组进行制备。

[0111] 为了重组生成抗体, 将编码该抗体的核酸分离, 进而为了克隆 (DNA 扩增) 或表达, 插入能够复制的载体内。编码单克隆抗体的 DNA 被立即分离, 使用常规方法 (例如, 使用能够与编码抗体的重链及轻链的基因特异性地结合的寡核苷酸探针) 确定序列。大多数载体可以购买到。作为载体成分, 通常并不限于这些, 包括下述一个或多个: 信号序列、复制起始点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子, 及转录终止序列。

[0112] 本发明中使用的抗体的治疗制剂, 通过将任意成分的药学上允许的载体、赋形剂

或稳定剂与具有期望纯度的抗体混合 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 版, Oslo, A 编 [1980]), 以冻干制剂或水溶液的形态制备并用于保存。典型地, 为了使制剂等张, 在载体中使用适当量的制药上可允许的盐。能够允许的载体、赋形剂或稳定剂, 在使用的给予量及浓度下对细胞无毒, 包括: 磷酸、柠檬酸及其他有机酸等的缓冲液; 含有抗坏血酸及蛋氨酸的抗氧化剂; 防腐剂 (例如十二烷基二甲基苄基氯化铵; 氯化六甲双铵; 苯扎氯铵; 苄索氯铵; 苯酚、丁基或苄基醇; 对羟基苯甲酸烷基酯类, 例如羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯; 儿茶酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 及间甲酚); 低分子量 (残基数小于 10 个) 的多肽; 血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白等蛋白质; 聚乙烯吡咯烷酮等亲水性聚合物; 甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸等氨基酸; 葡萄糖、甘露糖或糊精等单糖类、二糖类及其他碳水化合物; EDTA 等螯合剂; 蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇等糖类、钠等的成盐反荷离子 (salt-forming counter-ions); 金属络合物 (例如 Zn-蛋白质络合物); 及 / 或 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG) 等非离子型表面活性剂。优选的冻干抗体制剂如作为参考此处引入的国际公开第 97/04801 号所示。

[0113] 另外, 制剂可以含有一个以上具有必须能够治疗的特定功能的活性化合物, 优选具有相互无不良影响的互补活性的化合物。另外, 活性成分可以被例如利用凝聚法或界面聚合制备的微囊、例如各种羟甲基纤维素或明胶-微囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊、胶体状药物递送系统 (例如脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米粒子及纳米胶囊) 或珠滴乳液捕捉。Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 版, Oslo, A. 编 (1980) 中公开了上述技术。

[0114] 用于体内给予的制剂必须经过灭菌。通过灭菌过滤膜的过滤可以容易地实现上述灭菌。

[0115] 也可以制备缓释制备物。缓释制备物适当的例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质, 该基质为膜或微囊等成型品的形状。缓释基质的例子包括: 聚酯、水凝胶 (例如聚(甲基丙烯酸-2-羟乙基酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸 (美国专利第 3773919 号)、L-谷氨酸及 L-谷氨酸- γ -乙基酯的共聚物、非降解性乙烯-乙酸乙烯、降解性乳酸-乙醇酸共聚物, 例如 LUPRON DEPOT™ (由乳酸-乙醇酸共聚物及醋酸亮丙瑞林 (Leuprorelin Acetate) 组成的可注入的微球), 及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物可以释放分子 100 天以上, 特定的水凝胶在较短的时间内释放蛋白质。

[0116] 被封入的抗体长时间残留在体内时, 暴露在 37℃ 下的水分中, 结果有可能变性或聚集, 使生物活性消失、改变免疫原性。可以根据相关的机制, 设计出用于稳定化的合理的对策。例如可以根据有关的机制, 设计出用于得到稳定性的合理的处置措施。例如, 如果已知聚集机制为通过硫-二硫化物交换而在分子间形成 S-S 键, 则可以通过改变巯基残基, 由酸性溶液冷冻干燥, 调整水分量, 使用适当的添加物, 开发特定的聚合物基质组合物, 实现稳定化。

[0117] 用量及给予

[0118] 本发明的抗体, 按照公知的方法, 例如可以通过利用作为大丸剂或经过一定时间连续注射的静脉、肌肉、腹腔内、脑室内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、经口、局部、或吸入途径给予人患者。优选静脉或皮下给与抗体。

[0119] 根据疾病的类型及严重程度, 例如无论为一次或多次分别给予时, 还是通过连续

注射时,约 $1\mu\text{g/kg}$ 至 50mg/kg (例如 $0.1\text{--}20\text{mg/kg}$) 的抗体均是对患者的初期候补给予量。典型的 1 日的用量依赖于上述因素,在约 $1\mu\text{g/kg}$ 至约 100mg/kg 或其以上的范围内。经过数日或其以上重复给予时,根据状况,持续治疗直到产生对疾病症状所期望的抑制效果。但是,其他用量计划也是有用的。优选的实施方式中,以约 5mg/kg 至约 15mg/kg 范围内的用量每 2 至 3 周给予本发明的抗体。通过常用的技术及分析方法可以容易地监测本发明的疗法。

[0120] 本发明的抗体,可以以单独的抗体的形式给予,也可以与其他抗体药物组合并给予。

[0121] 由于本发明的抗体能够区识别游离第一抗体及抗原结合第一抗体,所以在 ELISA 等免疫学的测定法中 useful。

[0122] 材料的保藏

[0123] 下面 3 个杂交瘤细胞株按照布达佩斯条约的规定被保藏在美国弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心 (American Type • Culture Collection) (ATCC) 中:

[0124] (1) 保藏人识别参考名:杂交瘤细胞株 F-1A

[0125] ATCC 专利保藏命名:PTA-9167

[0126] ATCC 收到培养物的日期:2008 年 4 月 23 日;

[0127] (2) 保藏人识别参考名:杂交瘤细胞株 L-6A

[0128] ATCC 专利保藏命名:PTA-9168

[0129] ATCC 收到培养物的日期:2008 年 4 月 23 日;

[0130] (3) 保藏人识别参考名:杂交瘤细胞株 0806-12

[0131] ATCC 专利保藏命名:PTA-9967

[0132] ATCC 收到培养物的日期:2009 年 4 月 16 日。

[0133] 虽然本发明是基于抗体完成的,但本发明的对象也可以为核酸(适体)或肽来代替抗体。即,识别能够识别抗原的抗体的适体及肽,与识别能够识别抗原的适体的抗体和适体及肽具有相同定义。需要说明的是,目标分子的适体可以通过 SELEX 法取得,目标分子的肽可以通过噬菌体库取得。

[0134] 实施例

[0135] 以下,用本发明的实施例详细地说明,但实施例只是示例,并不限制本发明的范围。

[0136] 实施例 1

[0137] Domino 抗体及解锁抗体的产生

[0138] 作为抗原的大鼠单克隆抗体的制作

[0139] 按照常规方法构筑抗 FITC 大鼠单克隆抗体 #55(IgG2a κ)。另一方面,按照常规方法独立地构筑抗 FITC 大鼠单克隆抗体 #7(IgG2a κ)。详细而言,使用 FITC 标记试剂盒 (Dojindo, Kumamoto, Japan) 利用 FITC 标记鸡 γ -球蛋白 (CGG) (Rockland Immunochemicals, Inc., PA, USA) 及牛血清白蛋白 (BSA) (Sigma, Mo, USA)。将 FITC 标记 CGG ($80\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ in PBS) 与等容量的佐剂即 Titer Max Gold (CytRx Corp, GA, USA) 混合,制备乳剂,对 7 周龄的 Fischer 大鼠 (♀) 每两周 3 次腹腔给予该乳剂进行免疫。进而两周后,腹腔内给予等量的不含佐剂的 FITC 标记 CGG ($80\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ in PBS) 进行免疫,3 天

后,从大鼠摘除脾,分离脾细胞,按照常规方法,使用聚乙二醇,将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞(P3U1)融合,使用 HAT 培养基作为细胞选择培养基,将融合后的细胞接种到 10 块 96 孔板上。14 天后,收集各孔的培养上清,使用涂布有 FITC 标记 BSA、且用 BSA 封闭的 ELISA 板,选出产生抗 FITC 抗体的骨髓瘤。重复上述融合两次,从各融合中分别构筑抗 FITC 大鼠单克隆抗体 #55(IgG2a κ)、抗 FITC 大鼠单克隆抗体 #7(IgG2a κ) 产生的杂交瘤。大量培养各杂交瘤,使用 HiTrap ProteinG HP (GE Healthcare, NJ, USA) 柱从其培养上清液中纯化大鼠单克隆抗体。

[0140] 轻链的纯化

[0141] 从通过上述操作得到的抗 FITC 大鼠单克隆抗体 #55 中纯化轻链。轻链的分离纯化法基于 Azuma、T 等,PNAS(1981)78pp569-573 进行。即,将经纯化的 #55 抗体溶解在最终浓度为 0.01M 二硫苏糖醇、0.2M Tris-HCl(pH8.2) 中。在 37℃ 下,加热溶液 30 分钟。反应后恢复至室温(静置约 10 分钟),加入碘乙酰胺使最终浓度为 0.3M,静置 30 分钟,进行烷基化反应。重链及轻链的分离使用 HPLC。烷基化反应后,将烷基化 #55 用于溶解有 5M Guanidine-HCl 的 PBS(PH 7.2) 经过平衡的柱子,得到轻链成分。将混入了重链的成分再次用于 HPLC,得到轻链级分。将轻链成分相对于 PBS 进行透析后,分成小部分冷冻保存。

[0142] 轻链的免疫及杂交瘤的制备

[0143] 将 #55 的轻链(30 μ g/100 μ l in PBS) 与等容量的佐剂 Titer Max Gold(CytRx Corp, GA, USA) 混合,制备乳剂,对 7 周龄的 Balb/c 小鼠(♀) 每两周三次腹腔内注射上述乳剂进行免疫。进而两周后,腹腔内注射等量的不含佐剂的 #55 的轻链(80 μ g/100 μ l in PBS),3 天后,从小鼠摘除脾,分离脾细胞,按照常规方法,使用聚乙二醇,将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞(P3U1) 融合,使用 HAT 培养基作为细胞选择培养基,将融合后的细胞接种到 10 块 96 孔板上(L 系列)。

[0144] 抗体的分析方法

[0145] 14 天后,收集各孔的培养上清,使用以下 3 种 ELISA 板进行分析:(i) 涂布有 FITC 标记 BSA、且用 BSA 封闭的板;(ii) 在涂布有 FITC 标记 BSA、且用 BSA 封闭的板上,以 100 μ l/孔添加 #7 抗体(1 μ g/ml in PBS),在 4℃ 下反应一夜,清洗后得到的板;(iii) 以 100 μ l/孔涂布 #7 抗体(1 μ g/ml in PBS)、且用 BSA 封闭的板。即,将 100 μ l 各杂交瘤的培养上清用于上述三种板,在室温下静置 2 小时。将板清洗后,在室温下将各板与 HRP 标记抗小鼠 IgG(大鼠 IgG 非交差)(Jackson Laboratories) 反应 1 小时后,清洗板,添加 100 μ l 显色液即 TMB 基质溶液(KPL 公司,MD, USA),反应 10 分钟后,用 50 μ l 2N 硫酸停止显色,用平板读取器(Plate reader) 读取 450nm 处的波长。

[0146] 结果的判断

[0147] 比较板(ii) 与(iii) 的 OD,将产生与任一个板均发生强烈反应的抗体的杂交瘤判定为产生目标抗体的杂交瘤。适当使用板(i) 也可以进行分析,确认与 BSA 或 BSA-FITC 不反应。

[0148] 其他方法

[0149] 理论上,抗体 A 识别蛋白质 B 作为抗原时,可以将该抗原抗体复合物(A-B) 给予小鼠等动物对其进行免疫,获得识别抗体 A 的结构变化的抗体,所述抗体 A 的结构变化是在抗体 A 识别抗原 B 时产生的,所述复合物也可以使用交联剂固定,使得抗体 A 的结构变化在在

生物体内长时间保存。

[0150] 然而,免疫动物的血清中出现的多种抗体包括:与抗体的结构变化无关的、与抗体 A 反应的抗体;与抗原 B 反应的抗体;识别 A-B 结合体的抗体等,可以推断,如目标抗体那样,识别伴有 A-B 结合的抗体 A 结构变化的抗体,出现频率极低。

[0151] 因此,考察了进一步简单化免疫原及免疫方法、有效地得到该抗体的方法。荧光物质 FITC(异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate))与在弱碱性溶液下与带电的蛋白质的氨基反应,形成硫脲键,可以容易地标记蛋白质。另外,已知 FITC 为能够得到高亲和性抗体的半抗原。本发明人等利用上述性质,首次得到了两种高亲和性的抗 FITC 抗体(上述 #55(IgG2a κ)、#7(IgG2a κ))。

[0152] FITC 捕捉 #55 的制备

[0153] 1) 向溶解在 PBS(pH6.8) 的纯化 #55 抗体中,加入溶解在 DMSO 中的 FITC,使摩尔比约为 1 : 5。立即加入预先用 PBS(pH6.8) 平衡化的脱盐用 PD-10 柱(GE Healthcare Bio-Science Corp,NJ,USA),分离得到高分子量级分。立即加入 0.5 体积的 1M 碳酸钠缓冲液(pH8.3),使其为弱碱性。在室温下避光放置 1 小时。用分光光度计测定波长 280nm 及 495nm,由计算式导出 FITC 分子相对于 1 分子抗体的结合数,确认了抗体分子:FITC 大致为 1 : 2。一般认为,通过该过程,与对于 FITC 的抗亲和性抗体 #55 结合的 FITC,在与抗体结合的附近与带电的氨基酸形成共价键,使 FITC 稳定地持续结合。

[0154] FITC 捕捉 #55 的免疫及杂交瘤的制备

[0155] 将 FITC 捕捉 #55(30 μ g/100 μ l in PBS) 与等体积的佐剂 Titer Max Gold(CytRx Corp,GA,USA) 混合,制备乳剂,对 7 周龄 Balb/c 小鼠(♀)每两周三次腹腔内给予上述乳剂进行免疫。进而,两周后腹腔内给予等量的不含佐剂的 FITC 捕捉 #55(80 μ g/100 μ l in PBS) 进行免疫,3 天后,从小鼠摘除脾,分离脾细胞,按照常规方法,使用聚乙二醇,将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞(P3U1)融合,使用 HAT 培养基作为细胞选择培养基,将融合后的细胞接种到 10 块 96 孔板上(F 系列)。

[0156] 抗体的分析方法

[0157] 14 天后,收集各孔的培养上清液,使用以下 3 种 ELISA 板进行分析:(i) 涂布有 FITC 标记 BSA 涂层、且用 BSA 封闭的板;(ii) 在涂布有 FITC 标记 BSA、且用 BSA 封闭的板上,以 100 μ l/孔添加 #7 抗体(1 μ g/ml in PBS),在 4℃ 下反应一夜,清洗后得到的板;(iii) 以 100 μ l/孔涂布 #7 抗体(1 μ g/ml in PBS)、且用 BSA 封闭的板。即将 100 μ l 各杂交瘤的培养上清用于上述三种板,在室温下静置 2 小时。将板清洗后,在室温下将各板与 HRP 标记抗小鼠 IgG(大鼠 IgG 非交差)(Jackson Laboratories)反应 1 小时后,清洗板,添加 100 μ l 显色液即 TMB 基质溶液(KPL 公司,MD,USA),反应 10 分钟后,用 50 μ l 2N 硫酸停止显色,用平板读取器读取 450nm 处的波长。

[0158] 结果的判定

[0159] 比较板(ii)及(iii)的 OD,将产生与任一个板均发生强烈反应的抗体的杂交瘤判定为产生目标抗体的杂交瘤。适当使用板(i)也可以进行鉴定,确认与 BSA 和 BSA-FITC 不反应。

[0160] 根据上述抗体的鉴定方法得到的结果如图 1~图 10 所示。

[0161] 另外,图中产生目标抗体的孔用字母 A(Domino 抗体)或 S(解锁抗体)表示。由 L

系列得到显示 6 种 Domino 抗体 (L-1A ~ 6A) 及 3 种解锁抗体 (L-1S ~ 3S) 的反应性的克隆, 由 F 系列得到显示 1 种 Domino 抗体 (F-1A) 的反应性的克隆。

[0162] 进行产生目标抗体的杂交瘤的克隆化, 在 2008 年 4 月 23 日, 将得到的产生 Domino 抗体 (F-1A, L-6A) 的杂交瘤保藏在 ATCC, 给与以下 ATCC 编号。

[0163] (1) 保藏人识别参考名: 杂交瘤细胞株 F-1A

[0164] ATCC 专利保藏命名: PTA-9167

[0165] (2) 保藏人识别参考名: 杂交瘤细胞株 L-6A

[0166] ATCC 专利保藏命名: PTA-9168

[0167] [实施例 2]

[0168] 抗 λ 1 轻链单克隆抗体的制作及分析

[0169] 为了开发出检测抗原抗体反应的分子, 已经尝试了制作识别抗体的结构变化的单克隆抗体 (mAb)。作为策略, 选择对半抗原即 NP ((4- 羟基 -3- 硝基苯基) 乙酰基) 具有特异性的 mAb 作为模型抗体。上述尝试基于下述推测, 即, 因 SJL 小鼠存在于 λ 1 轻链恒定域的 1 个碱基的变异, 所以在血清中几乎不能检测到 λ 1 轻链, 因此通过给予 SJL 小鼠具有 λ 1 轻链的抗 NP mAb 并进行免疫, 可以对 mAb 克隆进行分离, 所述 mAb 克隆与 λ 1 轻链结合作为抗原表位, 且能够检测抗原抗体反应。使用亲和力高的 E11 (IgG2a/ λ 1) 作为抗 NP mAb, 与 NP14-CGG 以 3 : 1 的摩尔比混合, 在使其形成抗体抗原复合体的状态下进行免疫。详细的免疫流程如图 11 所示。每 2 周 4 次免疫, 然后, 摘除脾脏, 通过与骨髓瘤细胞 SP2/0 株细胞融合来制备杂交瘤。通过使用培养上清的 ELISA, 以与 E11 的结合能力为指标, 筛选出对分泌有用的 mAb 的杂交瘤。

[0170] 得到的克隆中, 大量培养抗体产生量多的克隆 #0806-12, 使用 E11 与琼脂糖微球共价键合的柱子, 进行亲和纯化。为了确认 mAb#0806-12 的表位, 制备在表面表达 E11 的各 Ig 结构域 (VH、CH1、CH2、CH3、VL、CL 结构域) 的酵母株, 用经生物素化的 #0806-12 及链霉抗生物素蛋白 -PE 对酵母表面染色, 用 FACS 进行分析, 结果 #0806-12 只与表达了 CL 结构域的酵母株结合。由此可知, Ab#0806-12 结合 λ 1 轻链恒定域作为表位 (图 12)。

[0171] 将产生目标抗体的杂交瘤克隆化, 在 2009 年 4 月 16 日, 将得到的产生解锁抗体 (0806-12) 的杂交瘤保藏在 ATCC, 给与以下 ATCC 编号。

[0172] 保藏人识别参考: 杂交瘤细胞株 0806-12

[0173] ATCC 专利保藏命名: PTA-9967

[0174] 使用 Biacore 分析 mAb#0806-12 是否能够检测抗原抗体反应。采用胺偶合法在 Biacore CM5 传感芯片上固定约 2000RU 经纯化的 mAb#0806-12, 考察与抗 NP mAb 即 9T13 (IgG1/ λ 1) 的结合 (图 13)。此时, 对预先混合有作为抗原的 NP-Cap (1 μ M)、或者不是抗原而是与 NP-Cap 结构类似的 DNP-Cap (1 μ M, 2, 4- 二硝基苯基) 的样品进行分析, 结果只在引起抗原抗体反应的样品 (9T13+NP-Cap) 中, 发现 RU 值的显著减少 (在样品注入 180 秒后 RU 值约减少到 1/6)。

[0175] 以上结果表明, 此次得到的抗 λ 1 轻链单克隆抗体 #0806-12, 与具有 λ 1 轻链的抗 NP mAb 特异性地结合, 该抗 NP mAb 与 NP 抗原结合时亲和力显著减少, 因此能够辨别抗原抗体反应。

[0176] 产业上的可利用性

[0177] A. 识别能够识别抗原的抗体的抗体的应用例

[0178] 1) 作为测定方法的手段

[0179] (i) 生物传感器:微量抗原的检测(实现超灵敏性)

[0180] 例如,存在大鼠单克隆抗体(A),该单克隆抗体(A)只识别结合了抗原的小鼠抗体。另外,还存在只在大鼠抗体识别抗原时反应的仓鼠单克隆抗体(B)。通过改变抗体的识别部位(Fc部分、轻链)和抗体的种类,由此进行组装,以进行上述链反应。即,表明能够将非常小的信号显著扩增,可以提供高灵敏度的传感器。

[0181] (ii) 作为不需要清洗的 ELISA

[0182] 例如在识别抗原的一次抗体上用荧光蛋白质 CFP 标记,例如用其他种类的荧光蛋白质 YFP 标记该抗体。向存在抗原的溶液中添加一定量的一次抗体和该抗体,根据该抗原量观察荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer:FRET)。

[0183] 该测定法不需要纯化抗原,不需要标记抗原,存在与抗原反应的一次抗体时,可以应用于到任何测定。

[0184] 2) 作为药品

[0185] (i) 抗体药品通用的增强子抗体

[0186] 作为药品已被认可、实用的药品抗体,在体内与抗原结合时可能引起 ADCC 反应和 CDC 反应时,该抗体可以增强上述反应。例如给予识别癌抗原的抗体药品,给予的一部分抗体到达病巢部位。因此,给予该抗体时,该抗体在病巢部位与结合了抗原的药品抗体反应、并结合。

[0187] 该抗体也可以标记抗癌剂和放射活性,可以广泛用作抗体药品的增强剂。只要该抗体为能够反应的人抗体,则不论药品的种类如何上述抗体都可以用作增强剂。另外,只与结合了抗原的药品抗体反应,因此即使给予过剩量与也是安全的。

[0188] (ii) 感染时、患癌时获得的自然抗体的增强剂

[0189] 在异物(病毒、细菌)入侵时,另外在肿瘤发病、增殖时生物体发生大量应答,发挥排除异物和抑制肿瘤增殖的作用。即,通常认为虽然这种应答也许并不充分,但在上述应答时,生成了针对异物和肿瘤的抗体。因此,为了增强捕捉异物和肿瘤细胞的抗体,可以通过给予该抗体来辅助生物体的反应。即,虽然在上述(i)中将本发明的抗体用来增强给予的药品,但该情况下该抗体也可以用作更有效的球蛋白制剂来增强生物体内的自然免疫力。

[0190] 3) 作为医疗器械

[0191] (i) 抗原抗体复合体除去柱

[0192] 可以将该抗体固定在柱上进行使用。已知在某些疾病中大量的免疫复合体与疾病的发展(例如慢性类风湿性关节炎、SLE等)有关。该抗体柱作为体外循环柱能够从患者的血液循环中除去结合了抗原的免疫复合抗体。另外,与免疫复合体无关的抗体不吸附在该柱上,返回体内。即,该柱的特征在于,可以只除去引起病情恶化的免疫复合体。

[0193] (ii) 微量毒物除去柱

[0194] 与上述(i)同样地,该抗体也可以用于除去误进入体内的毒物。上述情况下,预先准备与毒物结合的抗体。与和毒物结合的抗体反应的该抗体与柱结合。为了除去毒物,向混入了毒物的体内静脉注射与毒物结合的一次抗体。柱立即有效地只除去体外循环开始时与毒物结合的抗体。

[0195] 另外,由于抗体无嗅无味,容易溶解在水中,所以为了除去混入自来水、饮用水等中的毒物,在饮料水中滴入与毒物结合的一次抗体,之后通过固定了该抗体的过滤器进行解毒。

[0196] 同样的应用也可以应用于除去空气中的毒物。

[0197] B. 作为识别不识别抗原的抗体的抗体(解锁抗体)的应用例,推断具有高亲和性的该抗体具有从识别抗体的抗体中分离抗原的功能。

[0198] 1) 作为药品

[0199] (i) 作为抗过敏药品

[0200] 如果使用在 IgE 不与抗原结合的状态下与 IgE 强烈反应的该抗体,则即使 IgE 与作为抗原的过敏原结合,通过该抗体结合,也可以从 IgE 抗体分离抗原,从而可以抑制结合了过敏原(抗原)的 IgE 引起过敏性反应。

[0201] (ii) 作为抗体药品通用的紧急用休克应对抗体

[0202] 从与上述同样的观点考虑,为了应对因给予抗体而引起的休克,有时期望解除抗体结合。今后开发、且经过临床试验的抗体很可能导致发生如下事件,例如在英国进行的给予对抗性抗体的 Tegenero 临床试验。一般认为该抗体可以解除给予的抗体与抗原的结合,显示摆脱休克症状的效果。

[0203] (iii) 由特异抗体的出现产生的疾病的治疗药

[0204] 本应用基本上与上述两点相同。可以举出,将该抗原注射到体内,针对通过上述 A. 3) (i) 中的体外循环而除去的抗原抗体复合体,在体内进行抗原及抗体分离。

[0205] 保藏编号:

[0206] PTA-9167

[0207] PTA-9168

[0208] PTA-9967

[0209]

0-1	样式 PCT/RO/134 (SAFE)	JPO-PAS 0316
0-1-1	关于该保藏的微生物或其他生物材料的内容(PCT 规则 13.2), 根据右述完成。	
0-2	国际申请号	
0-3	申请人或代理人的文件编号	PO9-39

[0210]

1	下述内容与发明的详细说明中记载的微生物或生物材料有关。	
1-1	说明书中位置	说明书第 20 页第 7~19 行
1-3	保藏内容	
1-3-1	保藏机构名称	ATCC 美国典型培养物保藏中心
1-3-2	保藏机构地址	美国弗吉尼亚州 20110-2209 马纳萨斯 10801 University Boulevard
1-3-3	保藏日期	2008 年 04 月 23 日 (23.04.2008)
1-3-4	保藏编号	ATCC PTA-9167
1-5	适用上述内容的指定国	全部指定国
2	下述内容与发明的详细说明中记载的微生物或生物材料有关。	
2-1	说明书中位置	说明书第 20 页第 7~19 行
2-3	保藏内容	
2-3-1	保藏机构名称	ATCC 美国典型培养物保藏中心
2-3-2	保藏机构地址	美国弗吉尼亚州 20110-2209 马纳萨斯 10801 University Boulevard
2-3-3	保藏日期	2008 年 04 月 23 日 (23.04.2008)
2-3-4	保藏编号	ATCC PTA-9168
2-5	适用上述内容的指定国	全部指定国
3	下述内容与发明的详细说明中记载的微生物或生物材料有关。	
3-1	说明书中位置	说明书第 20 页第 7~19 行
3-3	保藏内容	
3-3-1	保藏机构名称	ATCC 美国典型培养物保藏中心
3-3-2	保藏机构地址	美国弗吉尼亚州 20110-2209 马纳萨斯 10801 University Boulevard
3-3-3	保藏日期	2009 年 04 月 16 日 (16.04.2009)
3-3-4	保藏编号	ATCC PTA-9967
3-5	适用上述内容的指定国	全部指定国

[0211] 受理部门记入栏

[0212]

0-4	该页与国际申请同时受理 (是/否)	
0-4-1	有权限的人员	

[0213] 国际事务局记入栏

[0214]

0-5	该页被国际事务局受理的日期	
0-5-1	有权限的人员	

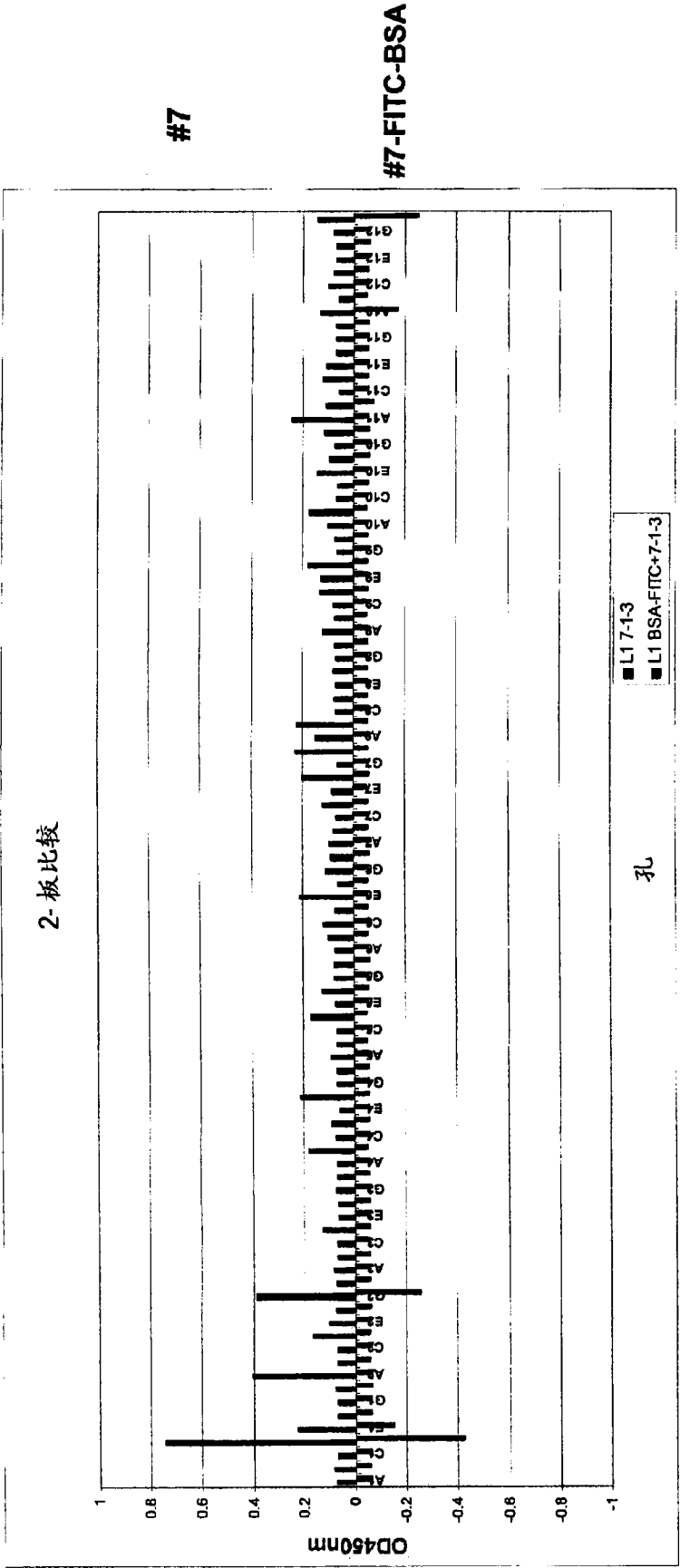


图 1-L1

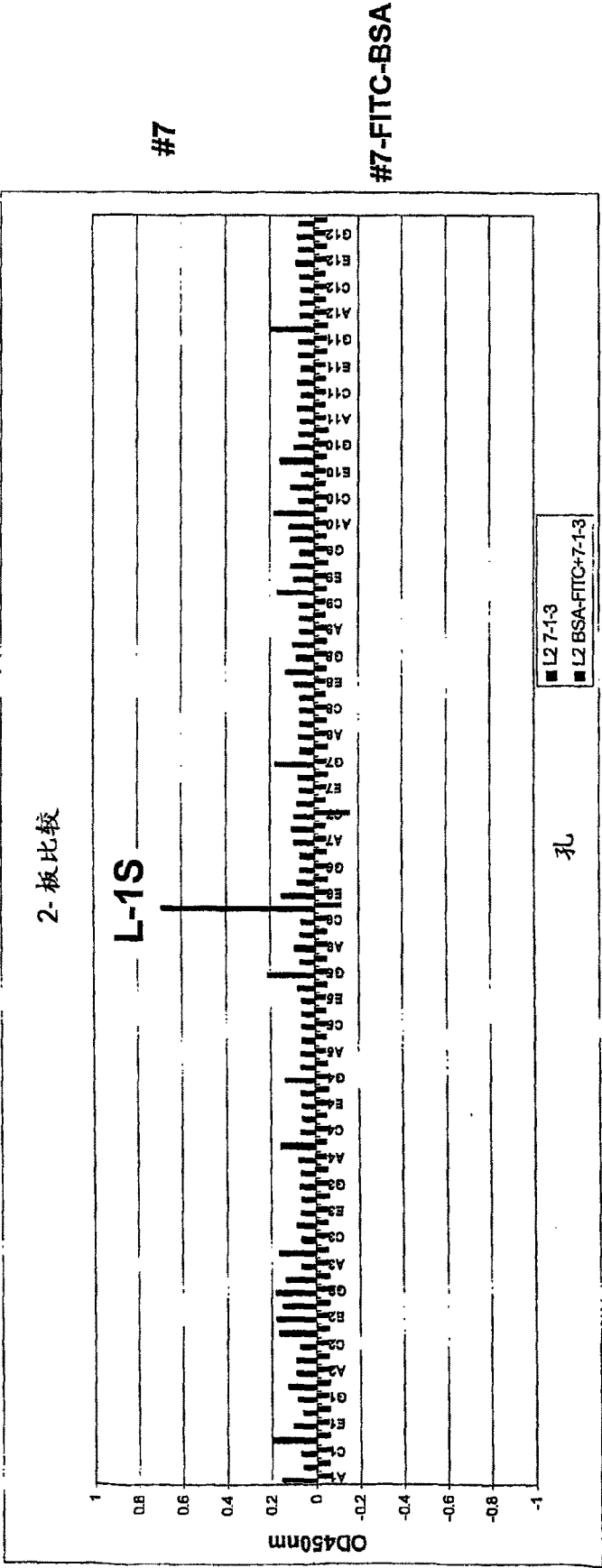


图 1-L2

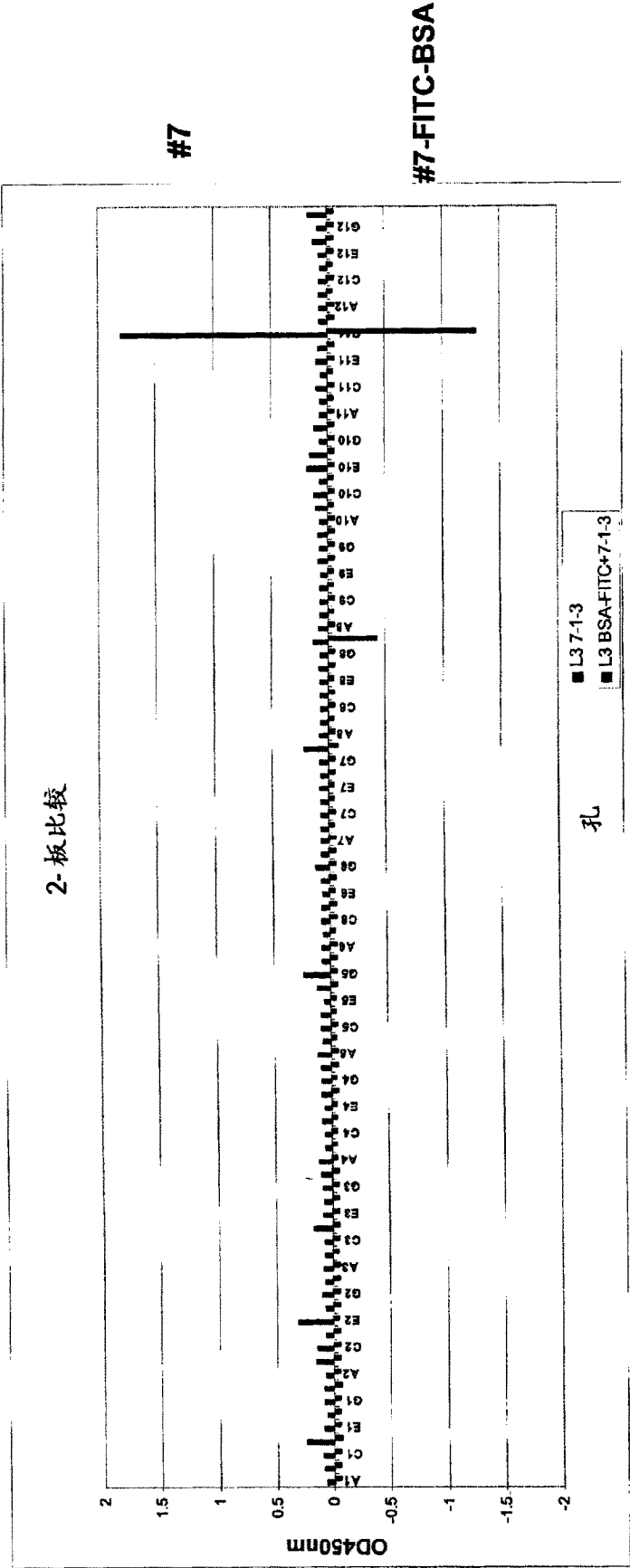


图 2-L3

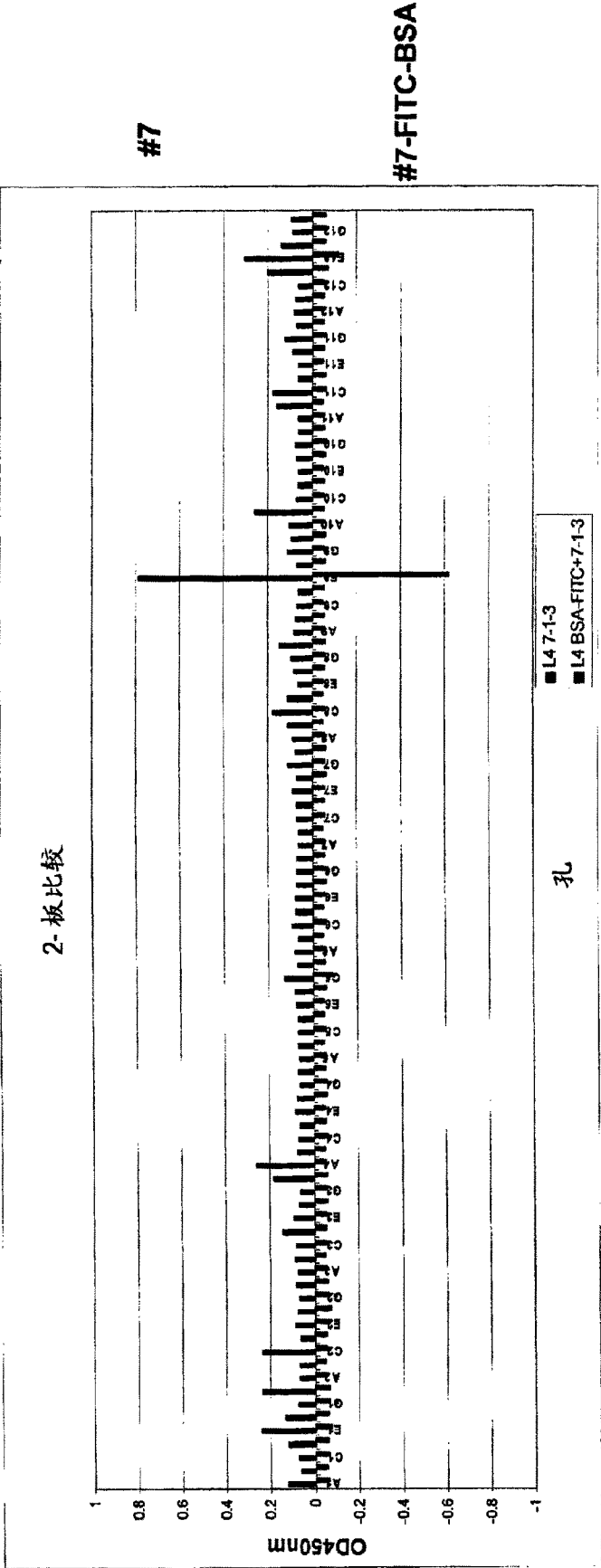


图 2-L4

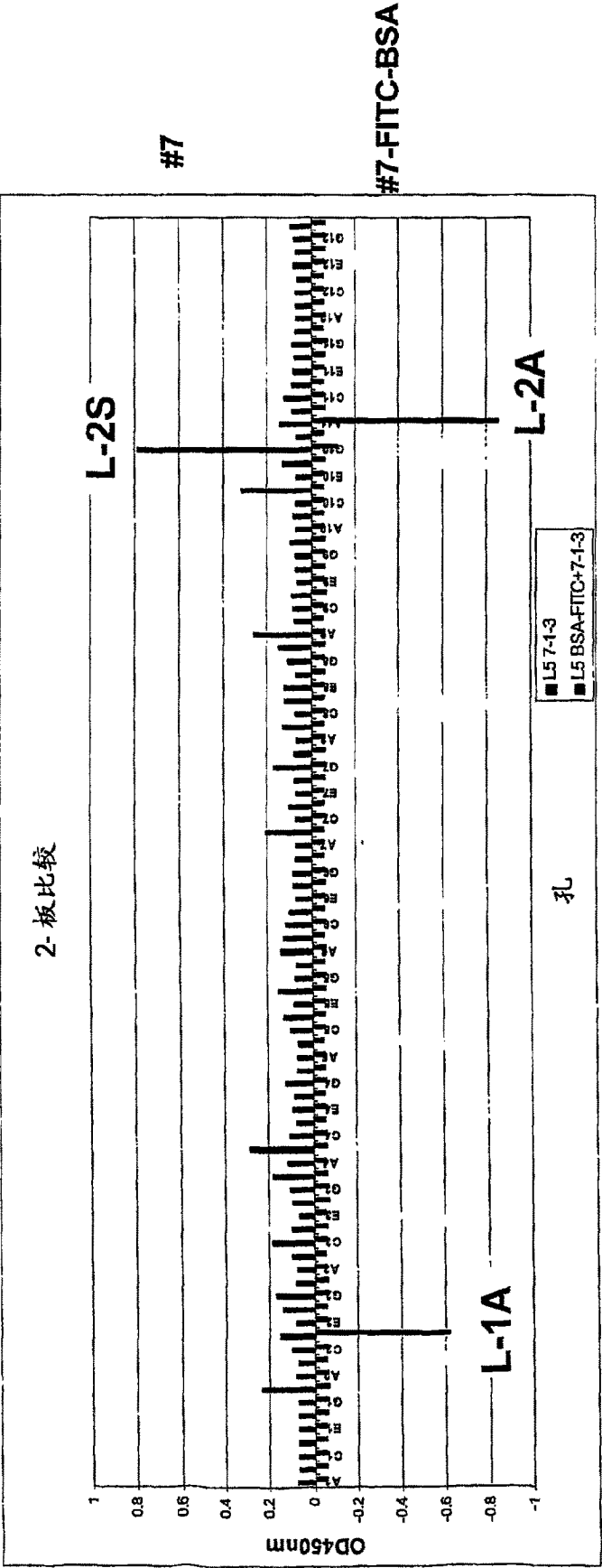


图 3-L5

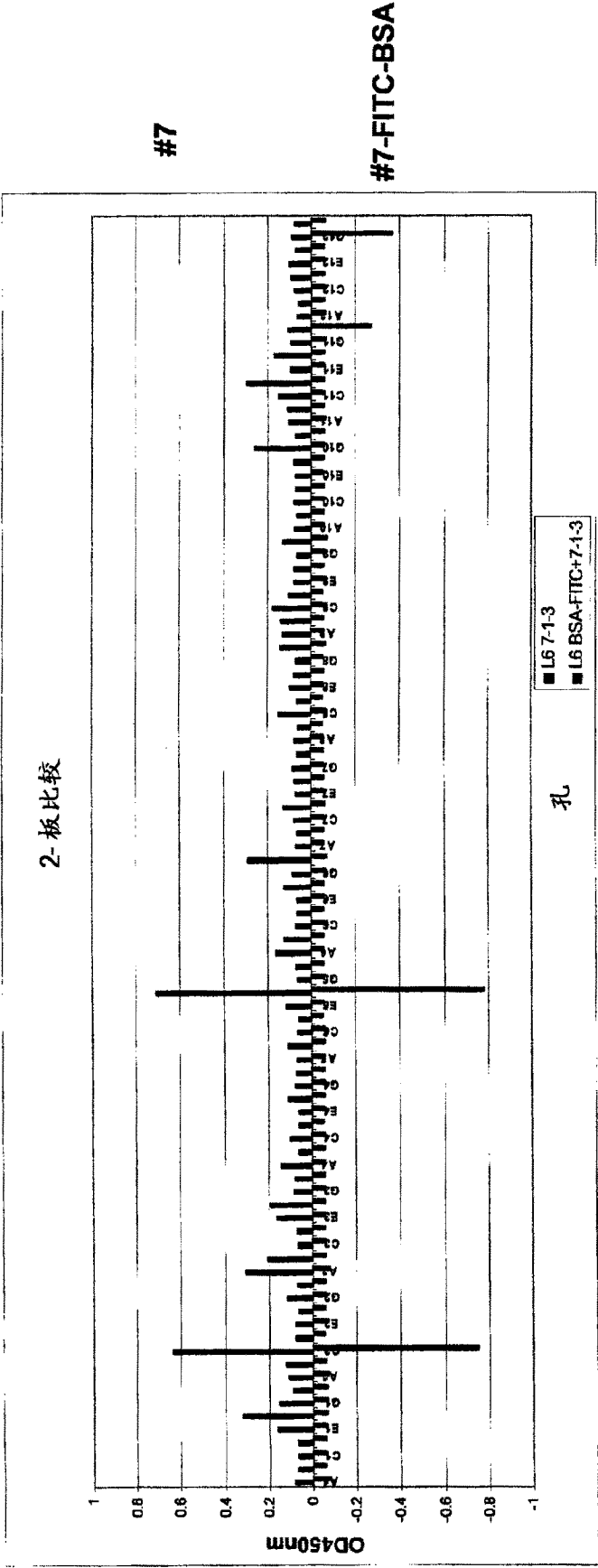


图 3-L6

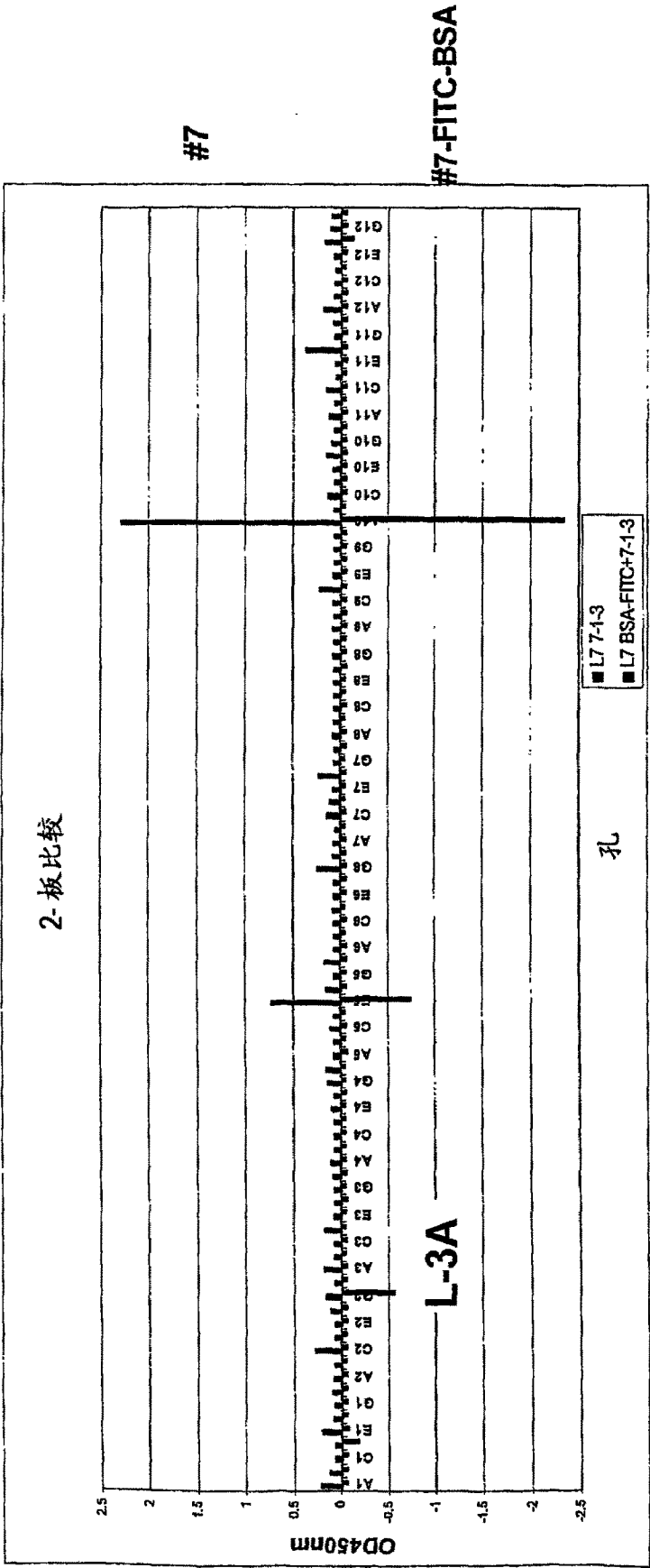


图 4-L7

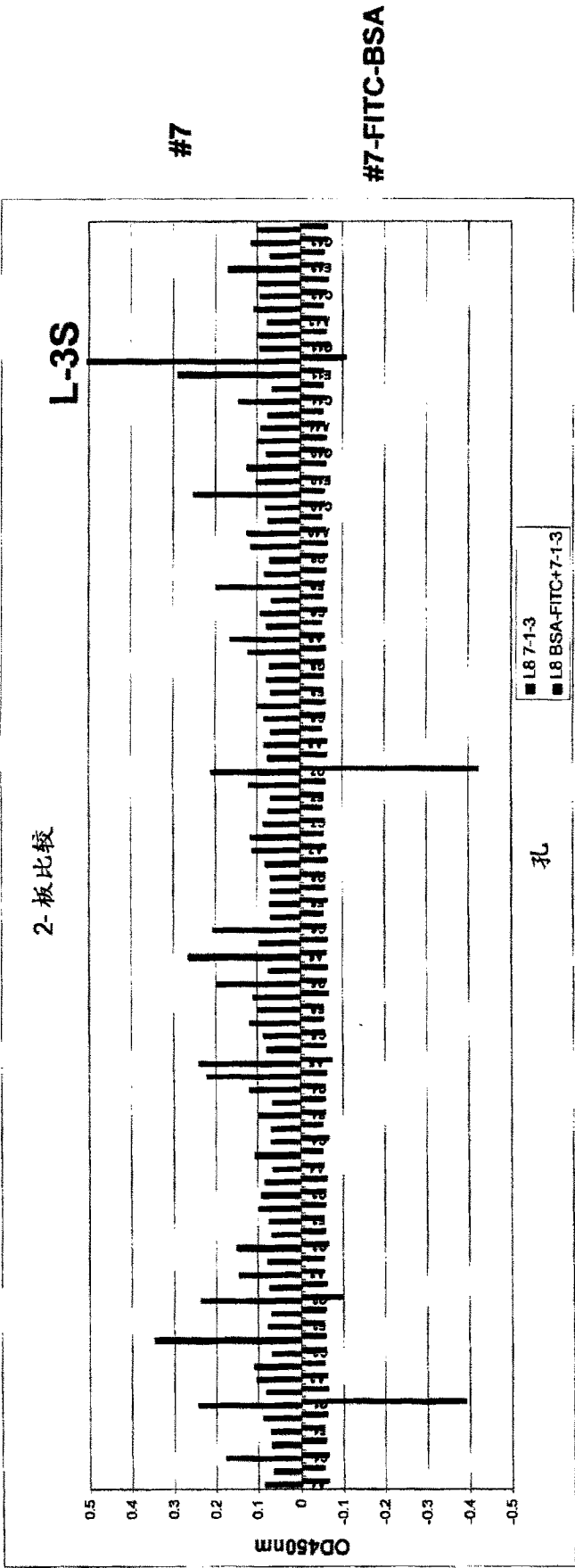


图 4-L8

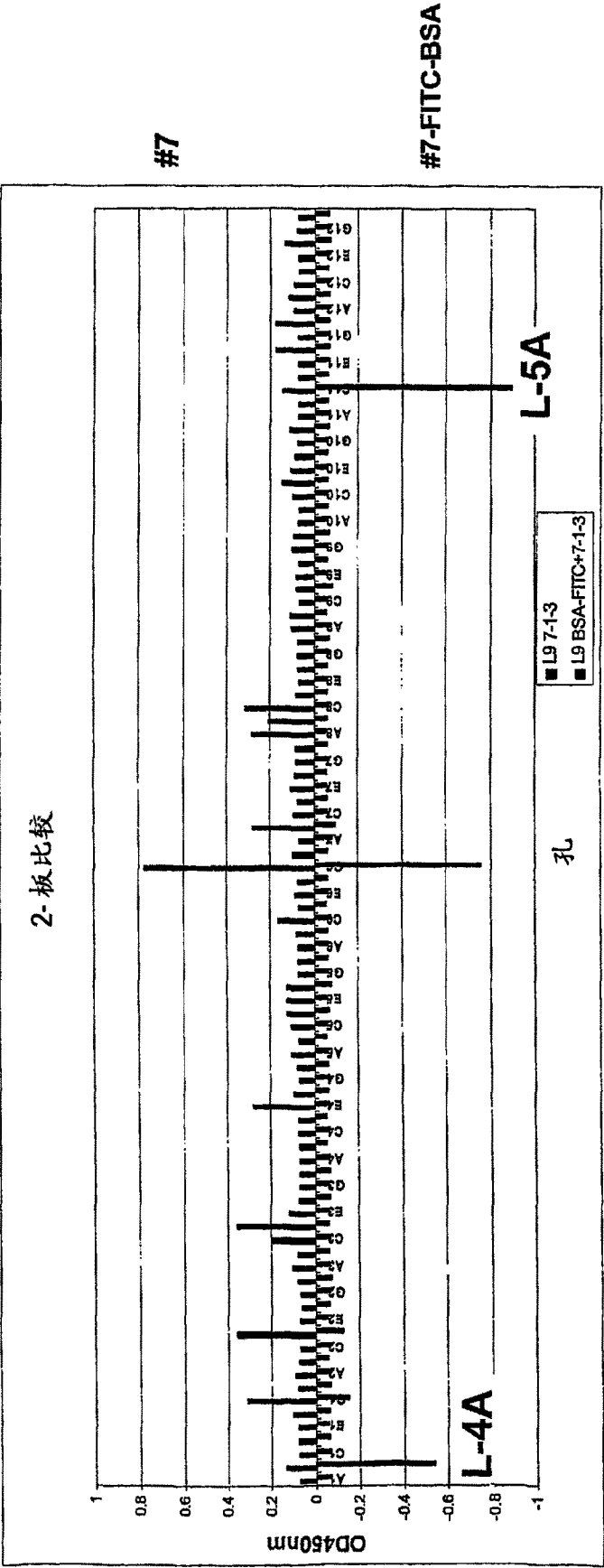


图 5-L9

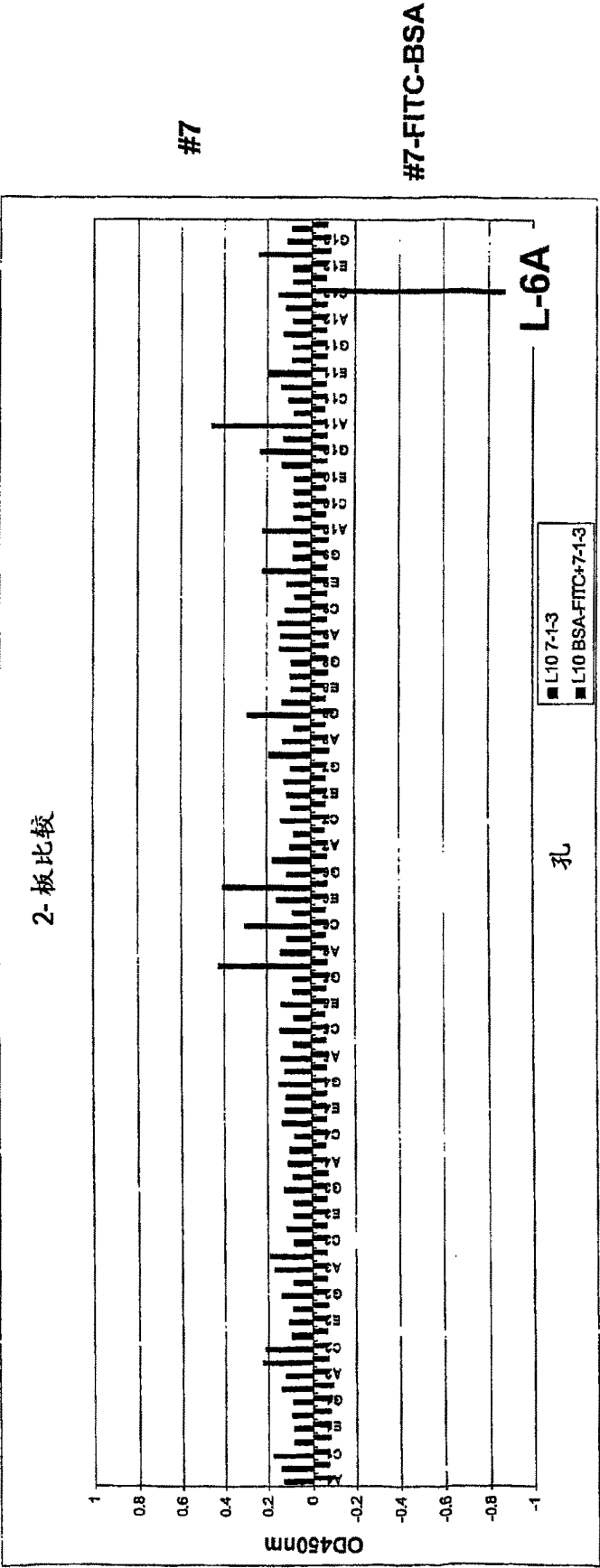


图 5-L10

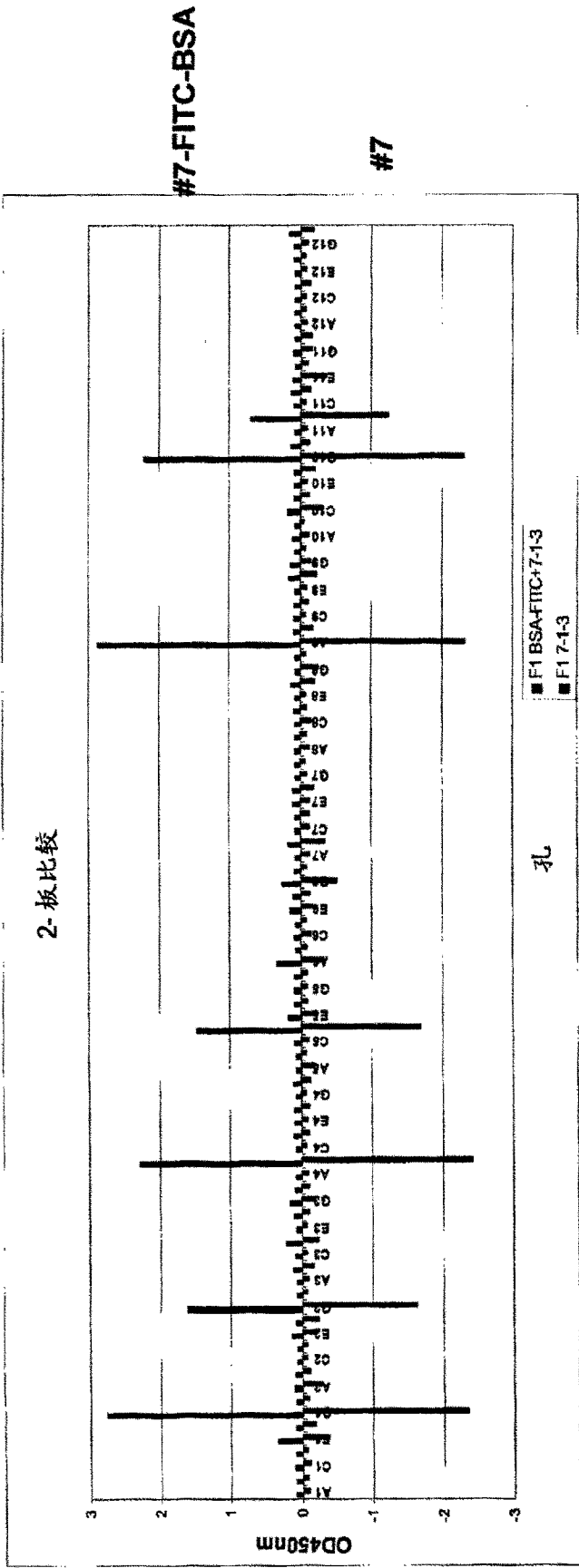


图 6-F1

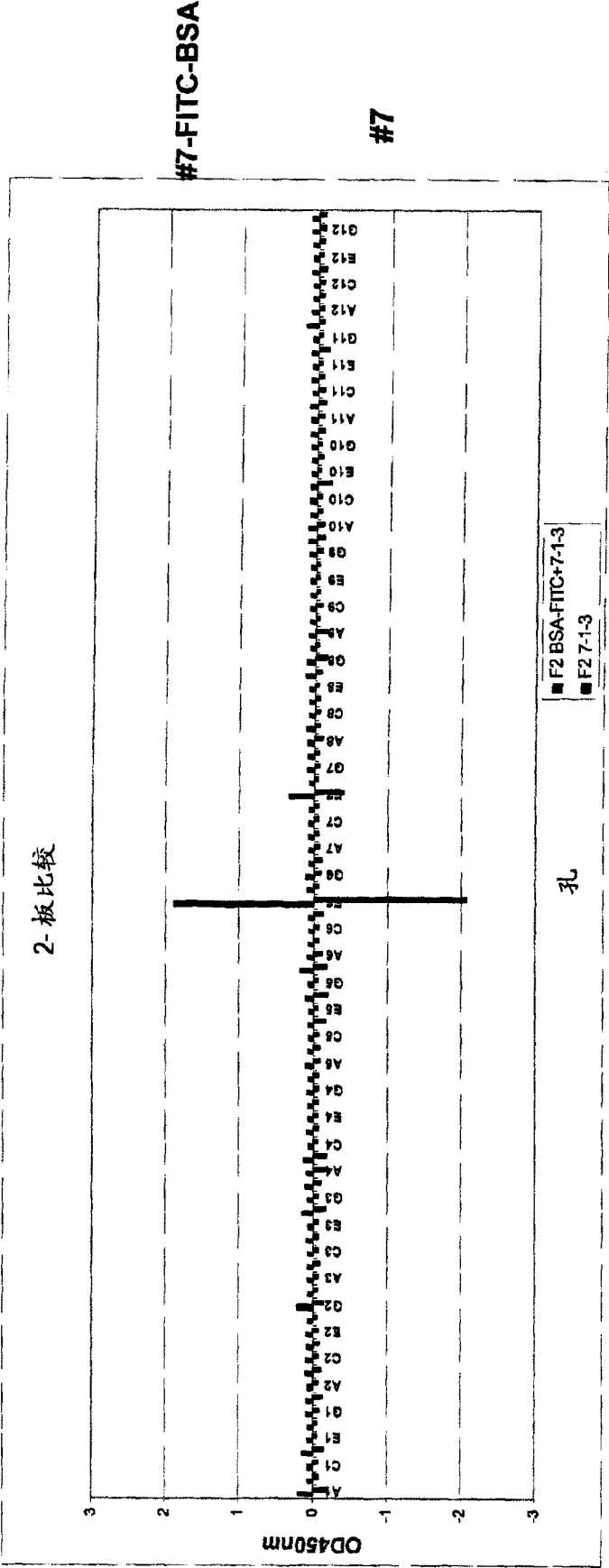


图 6-F2

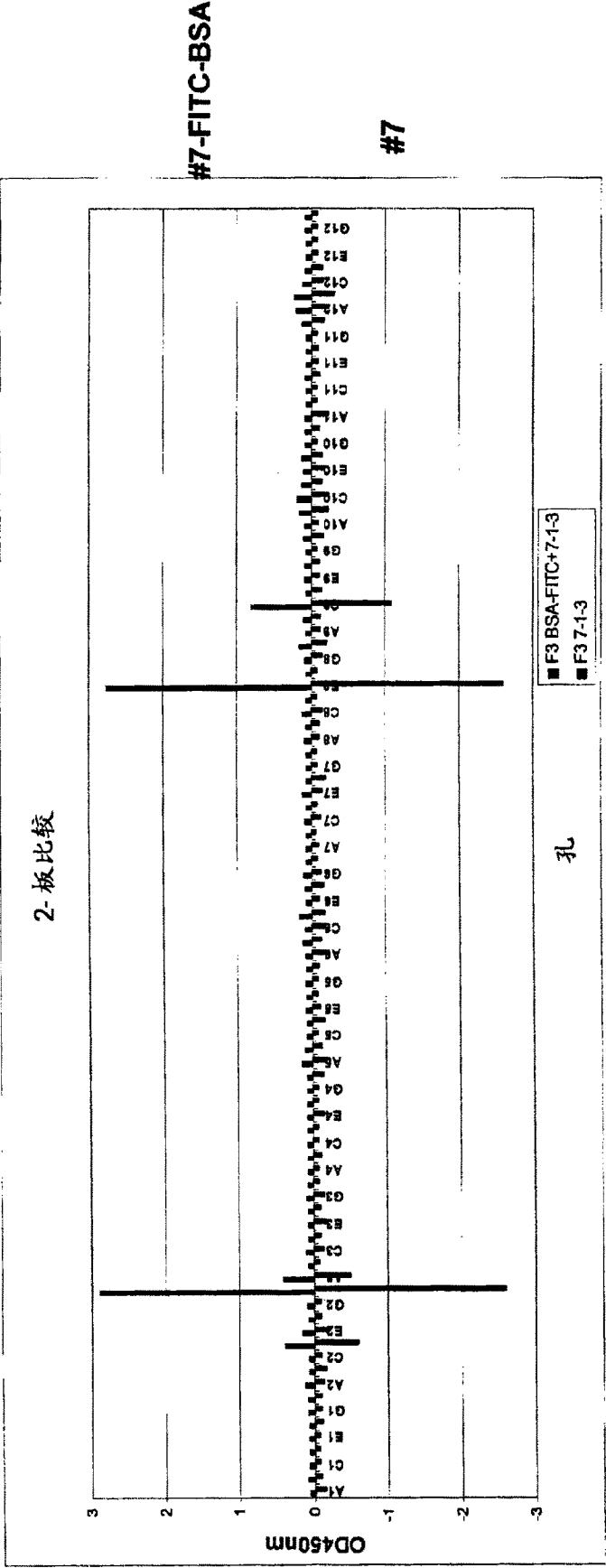


图 7-F3

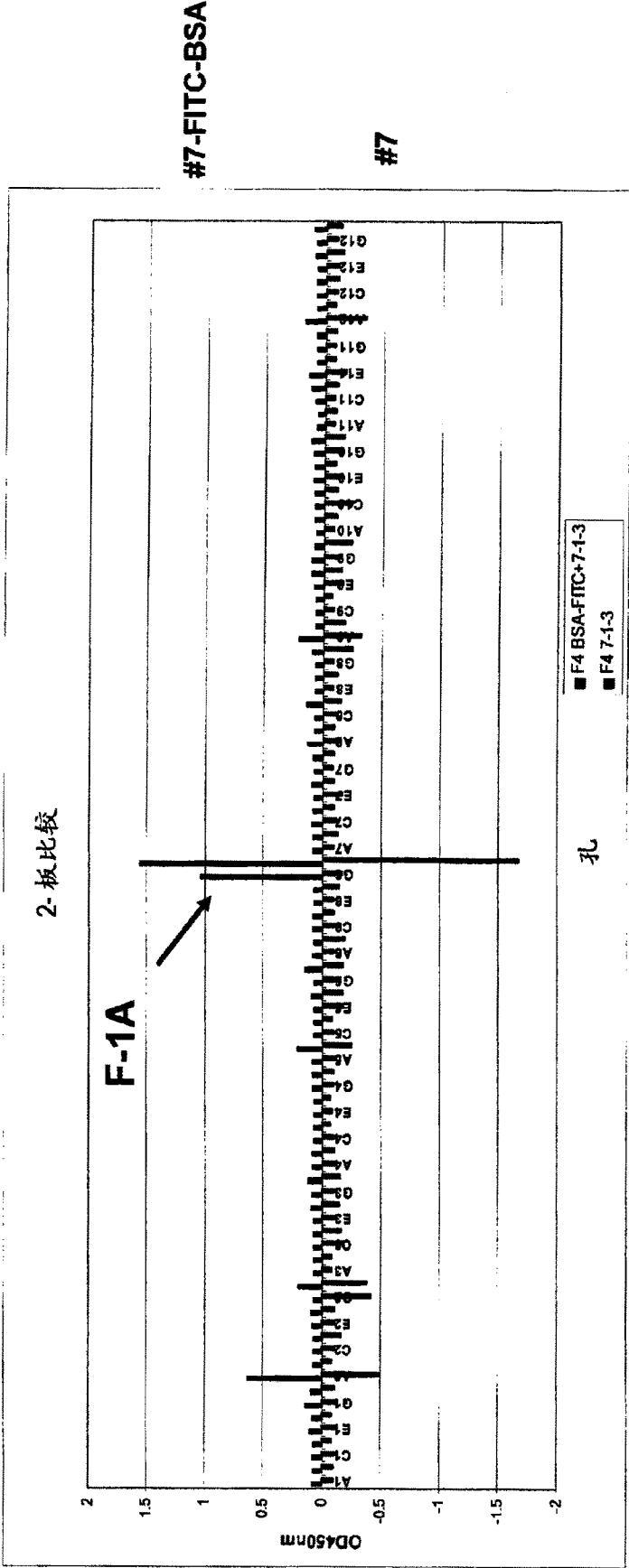


图 7-F4

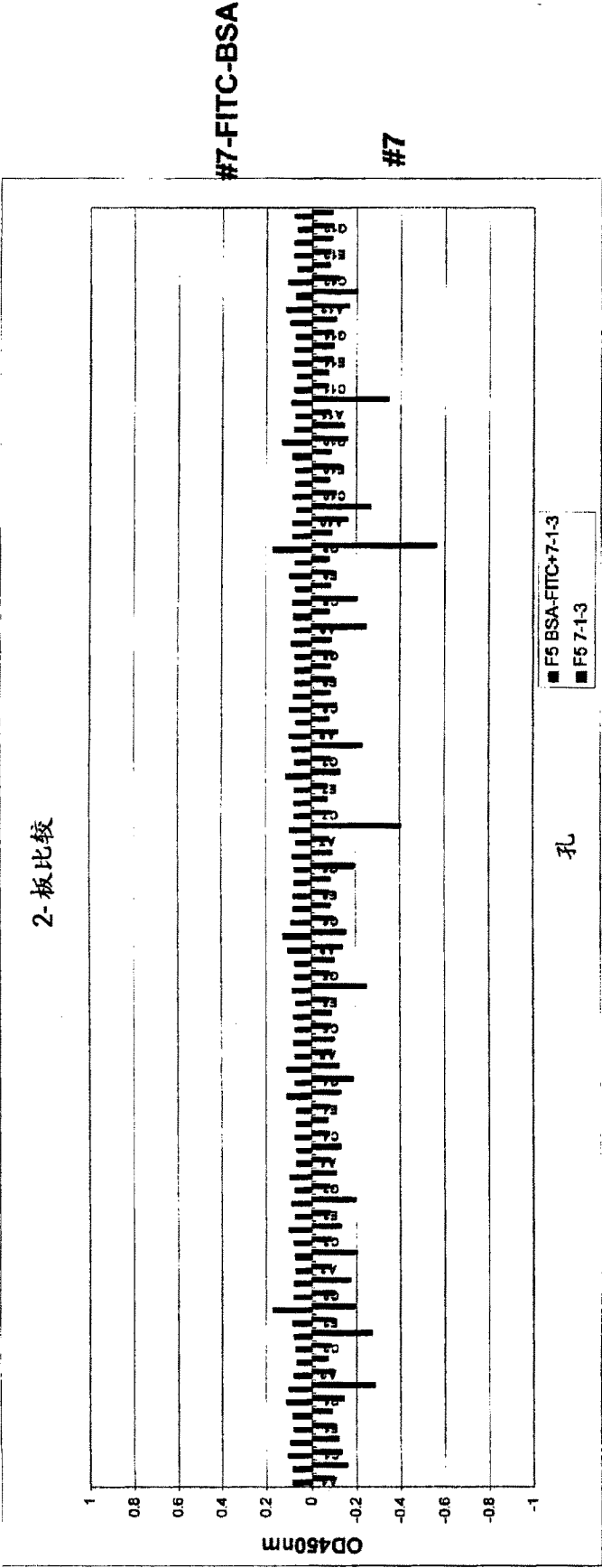


图 8-F5

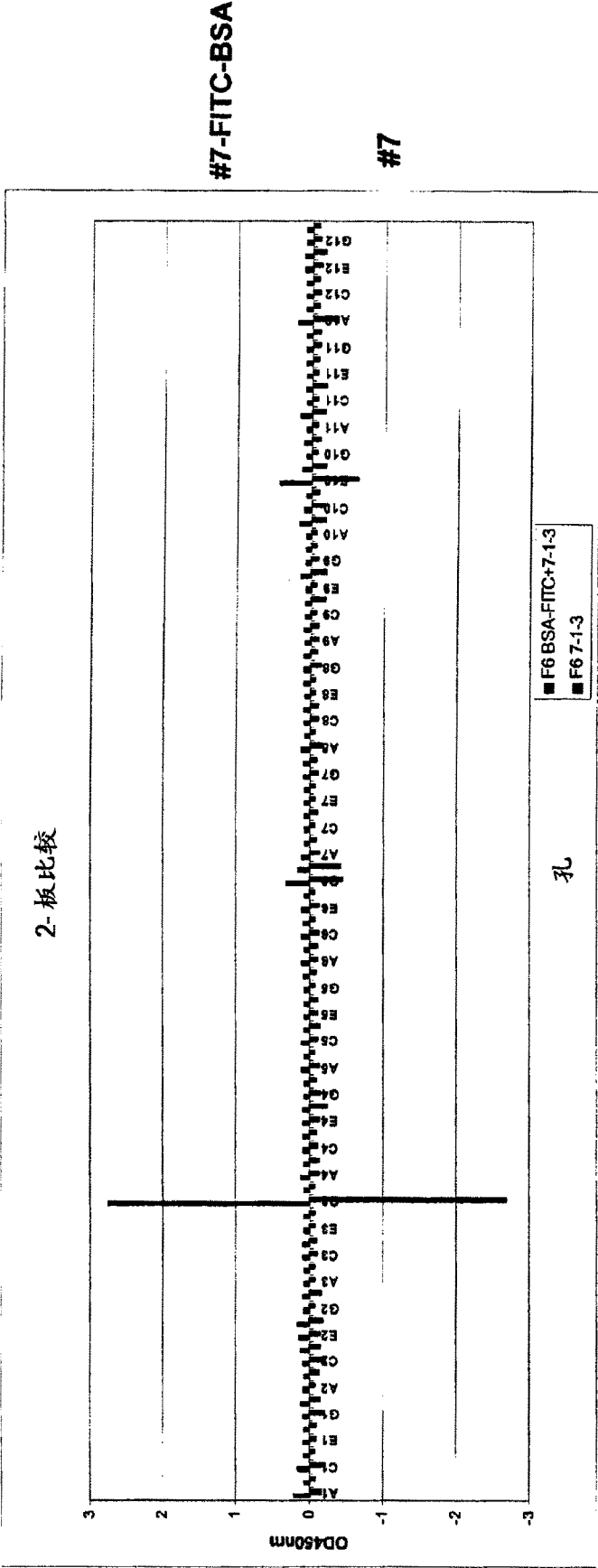


图 8-F6

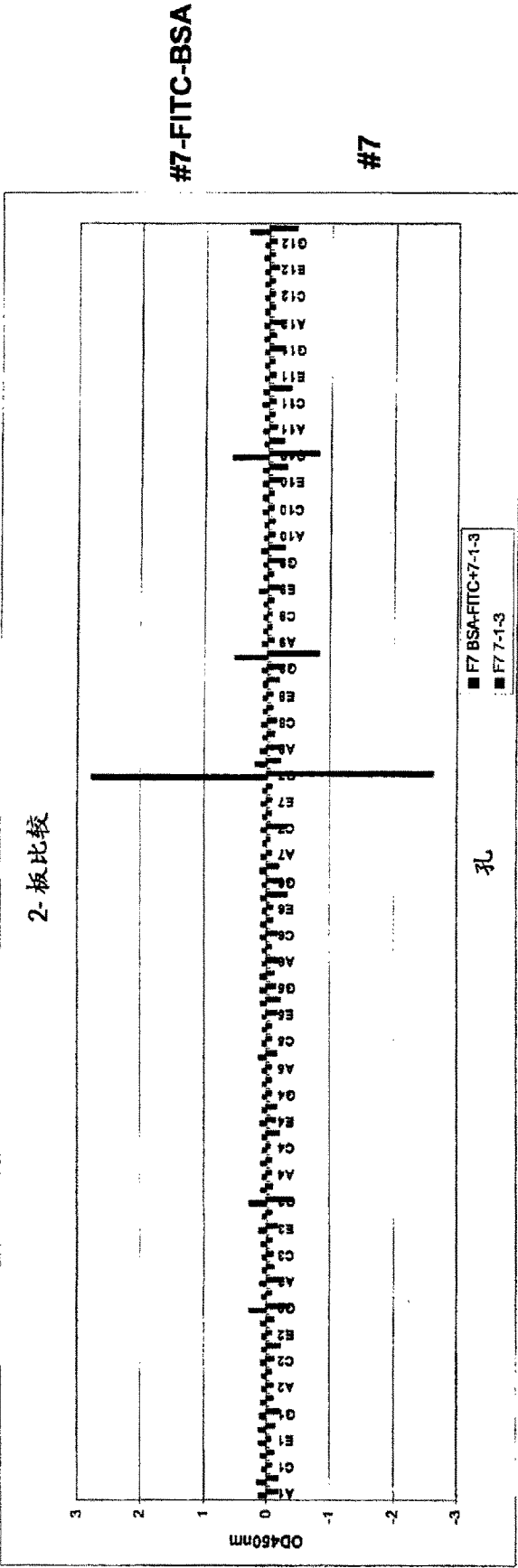


图 9-F7

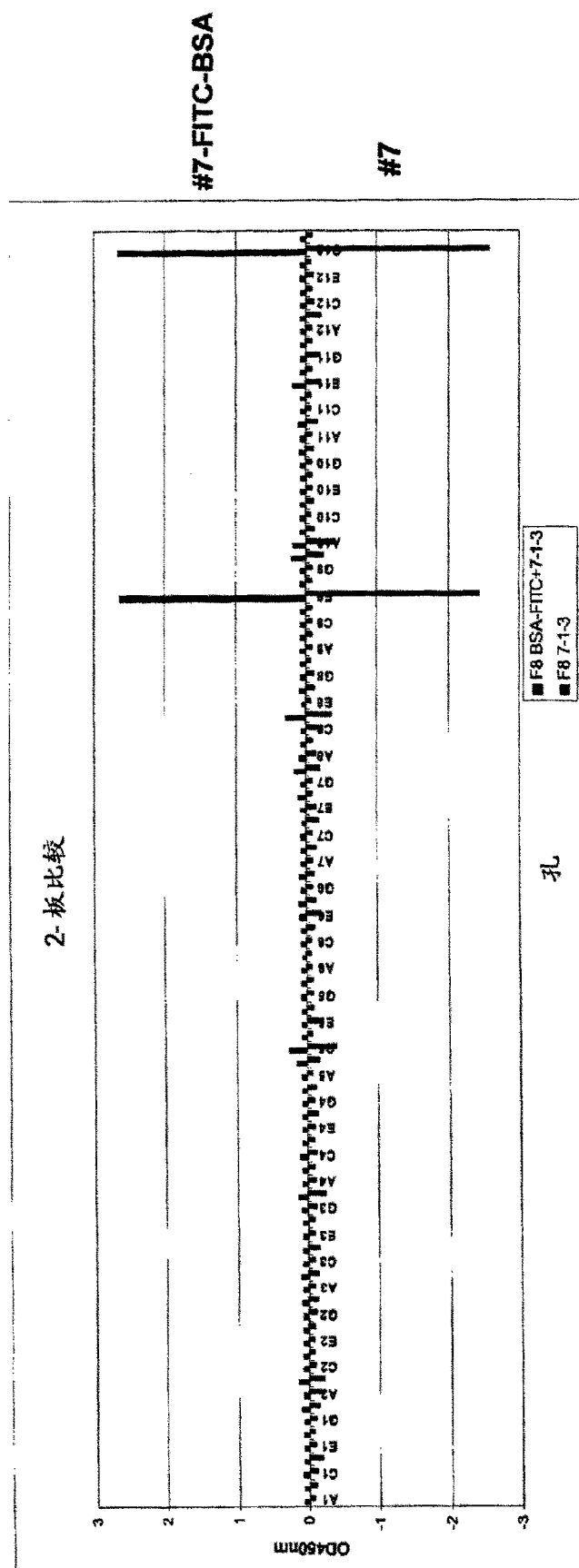


图 9-F8

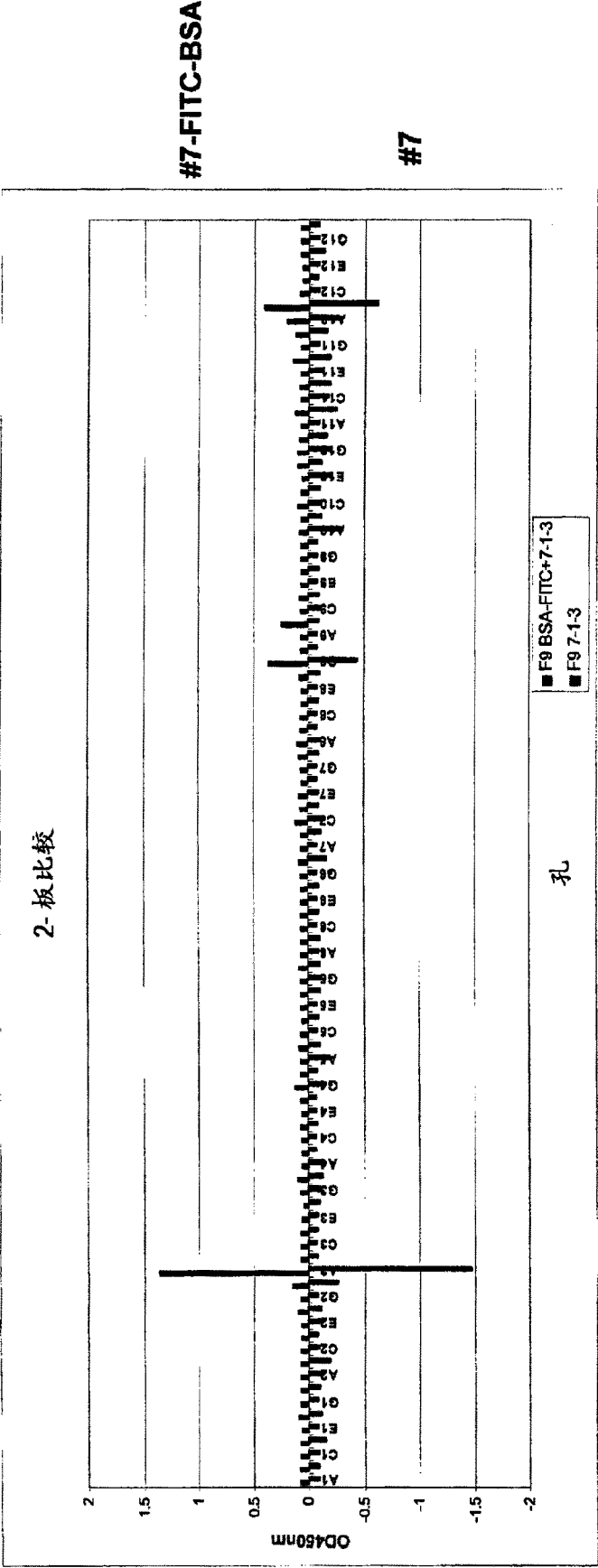


图 10-F9

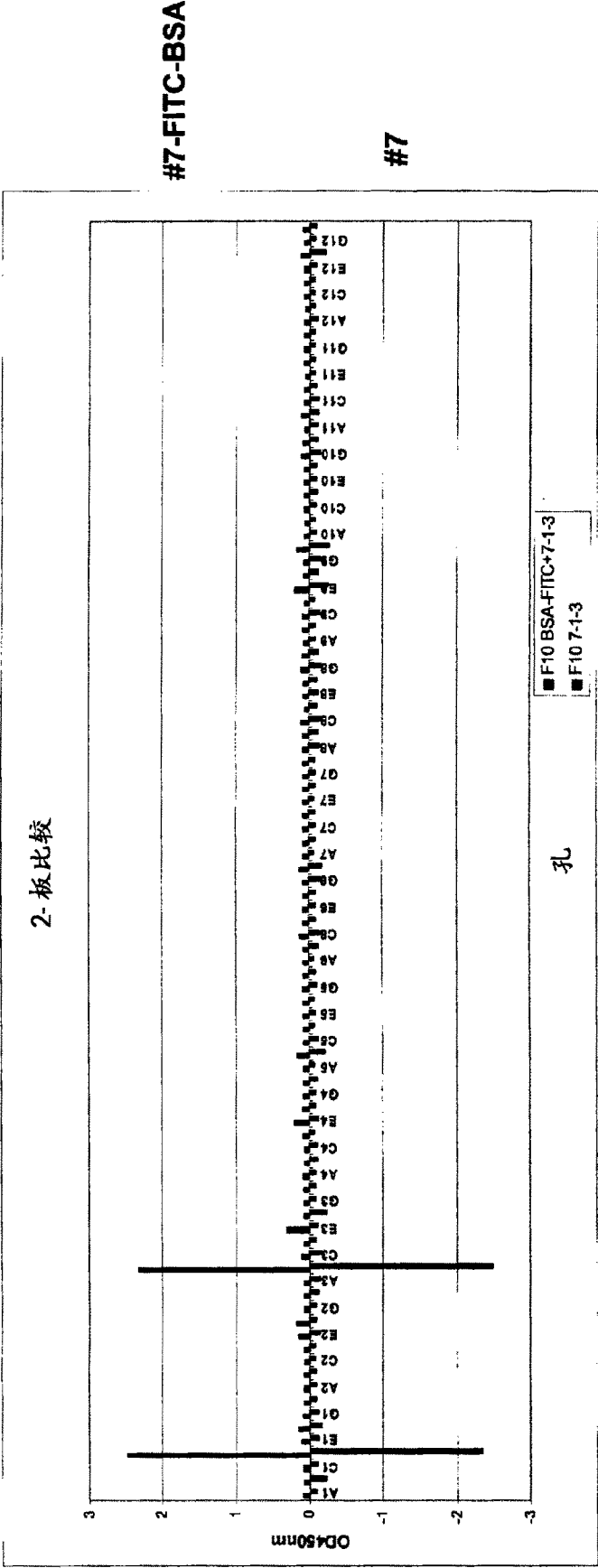


图 10-F10

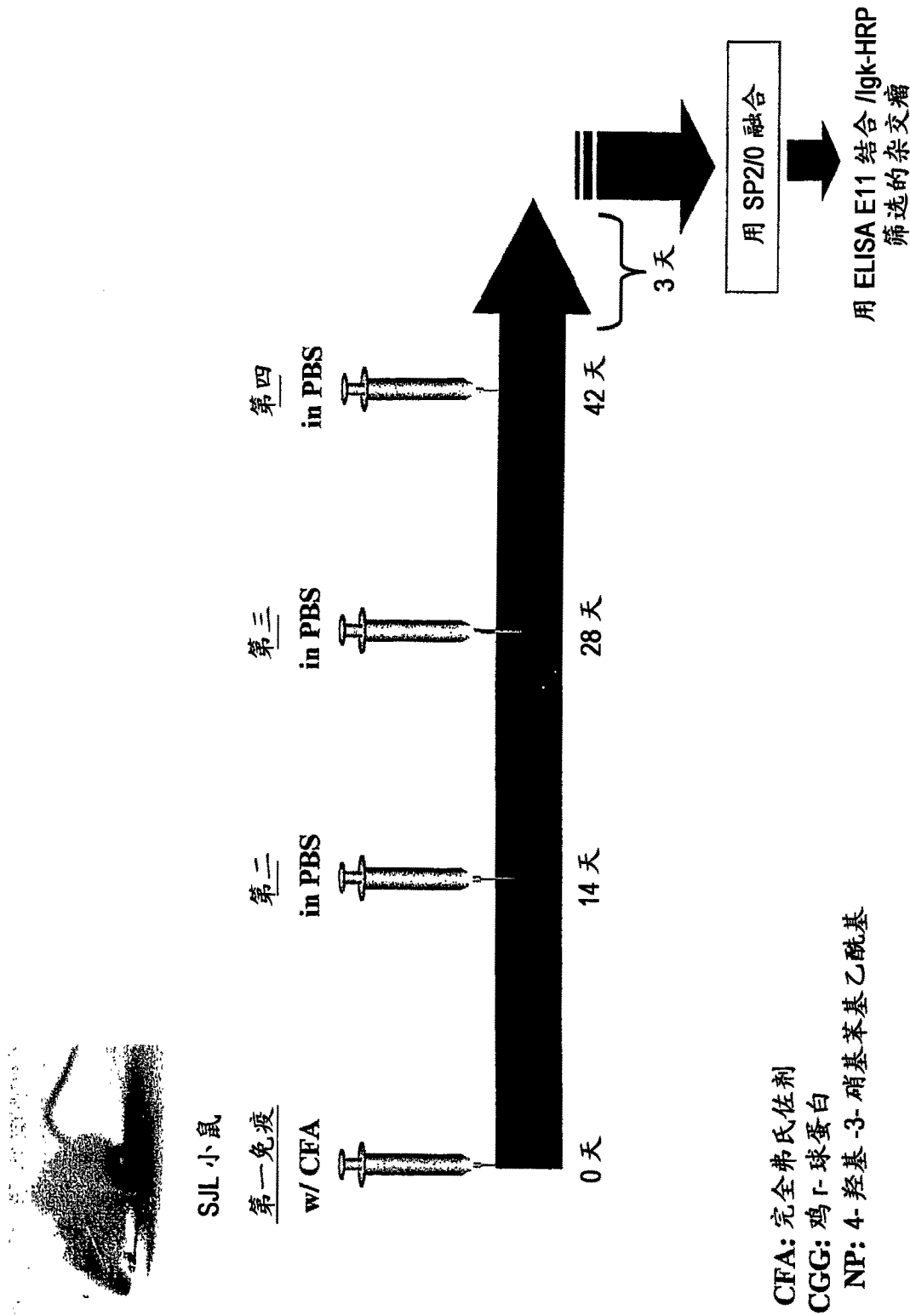


图 11

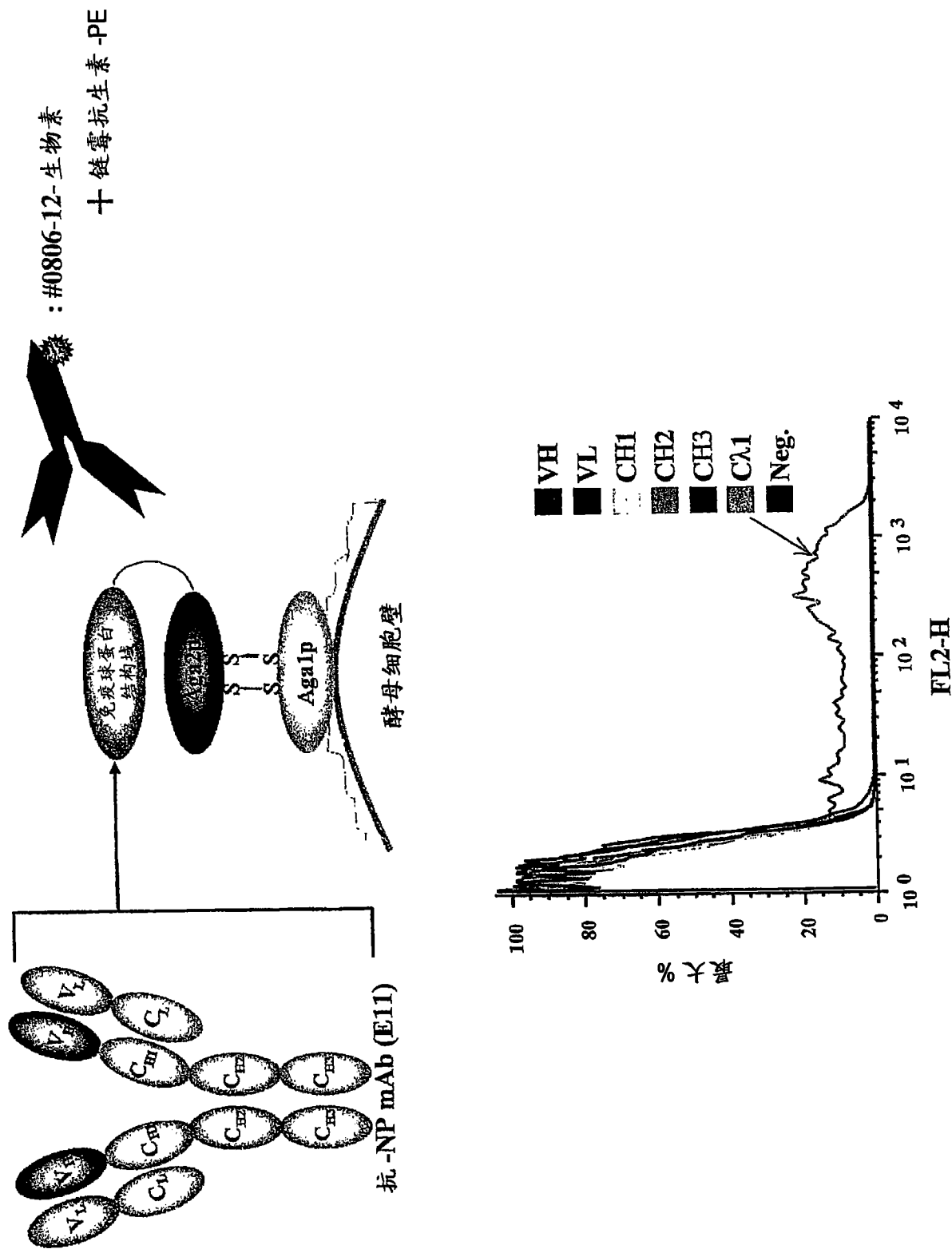
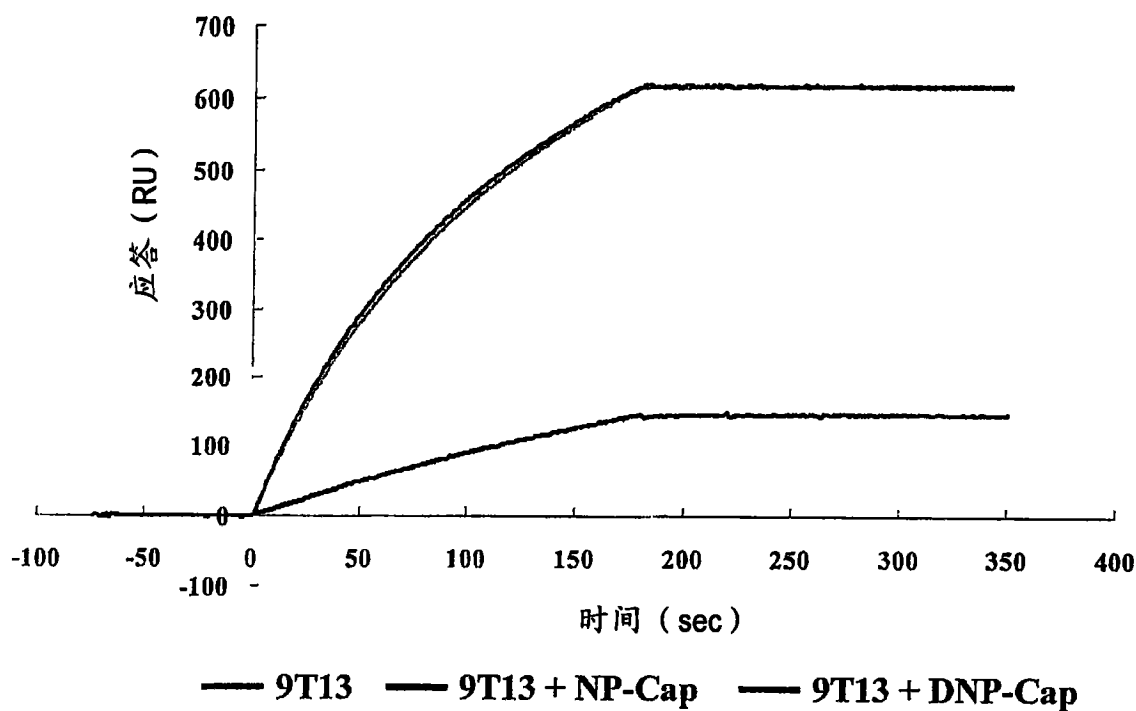


图 12



感应晶片: CM5
流速: 10 μ l/min
运行缓冲液: PBS (0.005% Tween20)
配体: 抗-E11mAb (#0806-12), 2000 RU
分析物浓度: 9T13 mAb (200nM)
 9T13 mAb (200nM) + NP-Cap (1 μ M)
 9T13 mAb (200nM) + DNP-Cap (1 μ M)
注射时间: 3 min
再生: 10mM Gly-HCl (pH 1.6) 10 μ l x 4 times

图 13

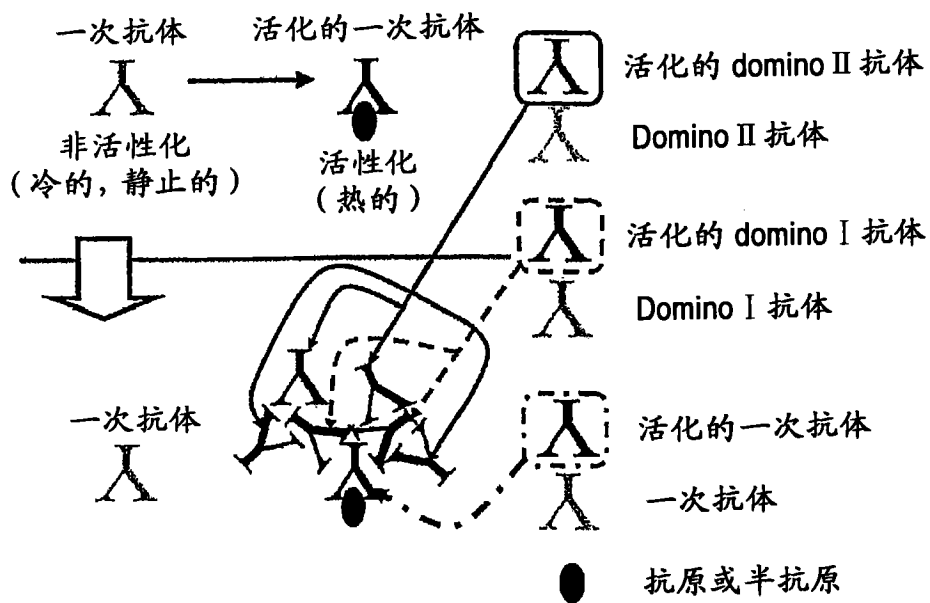


图 14

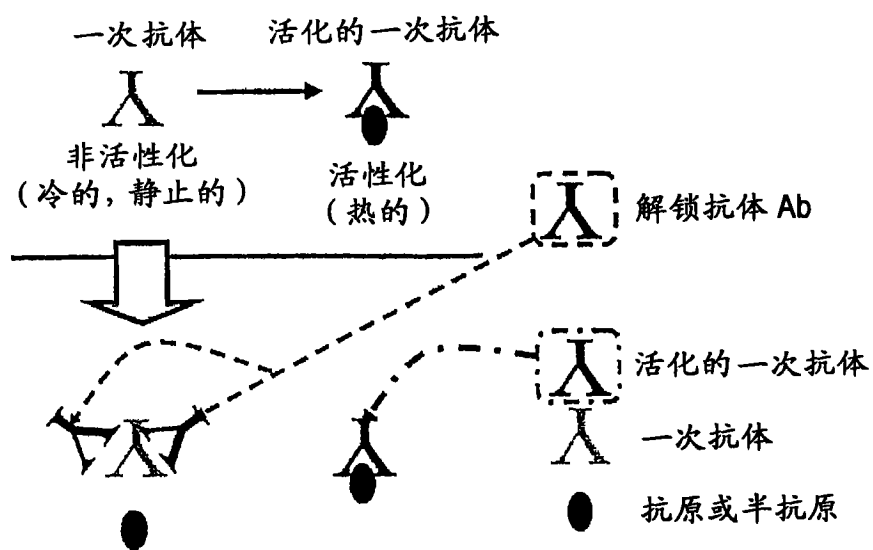


图 15