

[19]中华人民共和国国家知识产权局

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

G01N 33/577

G01N 33/563

G01N 33/573

# [12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 92104212.4

[45]授权公告日 1999年12月22日

[11]授权公告号 CN 1047666C

[22]申请日 92.4.25 [24]颁证日 99.9.25

[21]申请号 92104212.4

[30]优先权

[32]91.4.26 [33]GB [31]9108954.0

[32]92.4.1 [33]GB [31]9207192.7

[73]专利权人 活跃表面有限公司

地址 英国埃文布里斯托尔

[72]发明人 B·J·兰德尔

审查员 王 奕

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图页数 5 页

[54]发明名称 从抗体上释放抗原的免疫检测方法

[57]摘要

本发明涉及抗体,特别是涉及使用单克隆、双或三特异性抗体的诊断和治疗方法。本发明还提供了一种方法,其中第一抗原与第一抗体抗原结合位点的结合导致第二抗原从相邻第二抗体抗原结合位点释放。

ISSN 1000-8-4274

## 权 利 要 求 书

---

1. 一种从抗体上释放抗原的体外方法，其中第一抗原与第一抗体抗原结合位点的结合导致第二抗原从相邻第二抗体抗原结合位点上释放。  
5
2. 根据权利要求 1 的方法，其中第一和第二抗体抗原结合位点是由同一抗体提供的。
3. 根据权利要求 2 的方法，其中抗体是双特异性、三特异性或其他多特异性抗体。
- 10 4. 根据权利要求 1 的方法，其中第一和第二抗体抗原结合位点是由各自的第一和第二抗体提供的。
5. 根据权利要求 1-4 的方法，其中第一和第二抗体抗原结合位点是由以 20-100 $\mu\text{g/ml}$  的蛋白质浓度结合到一表面上的抗体或第一和第二抗体提供的。
- 15 6. 根据权利要求 5 的方法，其中抗体以约 50-100 $\mu\text{g/ml}$  的蛋白质浓度结合到表面上。
7. 根据权利要求 5 或 6 的方法，其中所述表面是微量滴定板的小井。
8. 根据权利要求 1 的方法，其中第二抗原以无活性形式结合到第二抗体抗原结合位点上，或因结合到该位点上而失活，并在第一抗原结合到第一抗体抗原结合位点后以活性形式释放。  
20
9. 根据权利要求 1 的方法，其中第二抗原由第二抗原结合位点上释放后，所释放的第二抗原或第二抗原的反应产物结合到第三抗原结合位点上，此结合引起结合的第三抗原由相邻的第四抗体抗原结合位点上释放。  
25
10. 根据权利要求 1 的方法，其中第一和第二种酶以活性形式分别由第一和第二抗原结合位点释放，两种已释放的酶一起催化在彼此存在下进行的反应。
- 30 11. 根据权利要求 1-6、8-10 的方法，其中提供第一和第二抗原结合位点的抗体结合到生物传感器的表面上，作为该生物传感器的生物传感元件。

12. 一种用于权利要求 9 的方法的试剂盒, 该试剂盒包括:  
第一抗体, 该抗体具有分别针对诊断标志物和酶或其他可检测  
诊断指示剂的第一和第二抗原结合位点, 结合于该抗体后使酶  
或其他可检测诊断标志物失活; 第二抗体, 该抗体具有酶或其  
其他可检测诊断标志物或酶或其他可检测诊断标志物的反应产物  
5 或由其催化的反应的反应产物的第一抗原结合位点, 以及药物  
或其他治疗剂的第二抗原结合位点, 其中诊断标志物与第一抗  
体的结合引起结合的酶或其他可检测标志物以活性形式释放,  
然后酶或其他可检测诊断标志物或其反应产物结合到第二抗体  
10 上, 从而引起结合的药物或其他治疗剂从第二抗体上释放。

13. 根据权利要求 12 的试剂盒, 其中药物或其他治疗剂以  
无活性形式结合到第二抗原结合位点上, 或因与该位点结合而  
失活。

14. 一种确定样品中是否存在抗原的免疫检测法, 该方法  
15 包括: 使样品与具有抗原和酶结合位点的多特异性抗体接触,  
酶与抗体的结合使酶失活, 其中抗原与抗体的结合导致酶以活  
性形式从抗体上释放; 检测所释放的酶的活性用以指示样品中  
是否存在抗原。

15. 根据权利要求 14 的免疫检测法, 其中抗体是双特异性  
20 抗体。

16. 根据权利要求 14 或 15 的免疫检测法, 其中酶通过其  
活性位点结合到抗体上。

17. 根据权利要求 14 或 15 的免疫检测法, 其中抗原是肺  
表面活性脱辅基蛋白 A。

18. 根据权利要求 14 或 15 的方法, 其中酶是 $\beta$ -半乳糖苷  
25 酶、葡萄糖氧化酶、脲酶、碳酸酐酶或辣根过氧化物酶。

19. 根据权利要求 18 的免疫检测法, 其中抗体是由细胞系  
GAL30.19 产生的, 该细胞系保藏于中国典型培养物保藏中心,  
保藏登记号为 CCTCC - C29002。

20. 根据权利要求 14 或 15 的免疫检测法, 其中提供第一  
30 和第二抗原结合位点的抗体结合到生物传感器的表面上, 作为  
该生物传感器的生物传感元件。

21. 一种试剂盒，该试剂盒包括一种多特异性抗体以及结合到抗体上的药物或其他治疗剂，其中所述抗体具有针对作为指示疾病或微生物的标志物之第一抗原的第一抗原结合位点，以及针对药物或其他治疗剂的第二抗原结合位点，其中第一抗原与第一抗原结合位点的结合导致治疗剂由第二结合位点上释放。

## 说明书

---

### 从抗体上释放抗原的免疫检测方法

本发明涉及从抗体上释放抗原的体外方法，以及用于该方法的试剂盒。

基于单克隆的抗体检测法还没有达到其全部的检测能力，因为它们通常必须在实验室中由训练有素的操作者完成。即使简单的检测法也需要洗涤步骤和多次手工添加试剂。为此有必要建立一种有广泛实用价值的一步骤系统。

也已发现单克隆抗体可用于治疗疾病。例如，已将单克隆抗体结合物用于定位和治疗体内肿瘤、用连接到抗体蛋白上的蓖麻蛋白及放射性碘等毒性剂破坏肿瘤。

已由单克隆抗体技术发展了双特异性抗体，如在双特异性免疫球蛋白的例子中，每种双特异性抗体均有两个不同特异性的抗原结合位点。可通过融合两个分别分泌抗不同有用抗原之单克隆抗体的不同杂交瘤，以形成单一的杂合杂交瘤或“融合瘤”（“fusoma”）（有时也称为“多瘤”）（“polydoma”）来产生双特异性抗体（Songsivilai, S and Lachmann P. J. (1990), Clin. Exp. Immunol. 79, 315 and Suresh MR et al. (1986) Proc. Natl. Sci. USA 83, 7989 and GB2169921A)。可用标准 HAT 选择法或引入可选择的药物抗性来除去亲代杂交瘤（De Lau B. M. et al (1989) J. Immunol. Methods 117, 1)。所产生的第一个双特异性抗体已被用于常规免疫检测（Milstein C., and Cuello A. C.,

(1983) Nature 305, 537). 通过将单克隆抗体分泌细胞与来自免疫小鼠的脾细胞融合而产生这些抗体。第一结合位点是对所研究的抗体特异的。第二个酶结合位点是对标记酶特异的。免疫分析证明, 提高检测法的敏感性, 将降低信噪比, 简化了染色过程, 并保存了超微结构。

已发现双特异性抗体在新的利用击靶效应物毒素的治疗方法中有广泛使用, 这些毒素一直结合在抗体上, 进而结合到肿瘤上 (Corvalan JPF et al, (1987), Cancer Immunol. Immunother. 24, 133), 使胞毒性杀伤细胞上的细胞抗原交联到肿瘤靶上 (Nitta T, et al, (1990), Lancet 335, 268, Farger MW and Guyre PM, Tibtech 9, 375—380 (1991))。后一篇文章中评述了生产双和三特异性抗体的其他方法, 如化学键合法。

WO90/07714 中公开了一种通过将酶结合到抗热变性之双特异性抗体上以稳定酶的免疫检测法。

WO91/09134 公开了一种能够与酶和人肿瘤细胞结合的双特异性抗体, 所说的酶可将无活性的抗肿瘤前体药物转化成其活性形式。给肿瘤病人联合使用包含抗体和抗原免疫复合物及无活性的前体药物, 以在产生最小付作用的情况下选择性地杀死肿瘤细胞。酶以其活性形式一直结合在抗体上。另外还公开了生产多瘤的方法。

本发明的目的是提供一种比常规免疫检测法有更少步骤, 优选只有 1 个反应步骤的免疫检测方法。

根据本发明的一个方面, 提供了一种将抗原结合到一个抗体抗原结合位点上, 以引起第二种抗原从相邻第二个抗体抗原结合位点释放的方法。虽然不希望被有关理论所束缚, 但申请

人相信引进抗原和结合抗原之间的空间位阻引起了从第二个抗体结合位点释放结合抗原。可由同样的多特异性抗体或物理上相邻的不同抗体提供第一和第二抗体抗原结合位点。术语“多特异性的”包括了所有有1个以上结合位点的抗体，如双特异性和三特异性抗体。通过使另一个分子结合到第一个位点而从第二个位点释放结合的分子可称为抗体介导的信号转导。本文中所用的术语“抗体”包括 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE 等免疫球蛋白，以及具有天然存在的抗体或由重组 DNA 技术或其他任何方法产生之抗体抗原结合特性的其他蛋白质。

我们已惊奇地发现，当与标准抗体浓度（一般是 1—5 $\mu$ g/ml）相比，我们以很高浓度，例如大于 10—100 $\mu$ g/ml 的浓度在微量滴定板上包被抗体时，抗体分子便能够以彼此十分接近的方式排布，在这种抗原结合到一个抗体抗原结合位点上的情况下即可释放出结合到相邻第二个抗体抗原结合位点上的另一个抗原。在一优选实施方案中，一种免疫检测法包括使抗体以大于大约 20 $\mu$ g/ml 更好大于 50 $\mu$ g/ml 的蛋白质浓度结合到某一表面上。

第二抗原可以以无活性形式被第二个抗体抗原结合位点结合，并以活性形式释放，以使第一抗原结合到第一个抗体抗原结合位点上。第二抗原可以是药物或其他治疗剂，或酶。酶例如可以是  $\beta$ -半乳糖苷酶或脲酶。

已报导单克隆抗体可阻断肿瘤治疗剂的作用。例如抗体 No-1 可中和 mitozantrone（一种强有力的抗肿瘤药）的胞毒性作用（Flavell SU, Flavell DJ (1981), Br. J. Haematol 73, 330—3）。根据本发明的双特异性抗体，具有一个抗药物的位点而使该药

物失活，进而可在分子的表达位点（即双特异性抗体之第二抗原位点所针对的位点）上释放活性药物。

从第二个抗原结合位点释放抗原可导致被释放的抗原、或其反应产物之一（例如，如果它是一种酶或其他催化分子）、或由之催化之反应的反应产物结合于相邻抗体上的第三个位点，进而引起由相邻第四个抗原结合位点释放已结合的第三个抗原。

一个诊断型多特异性抗体可借助级联反应诱导第二个“治疗”型多特异性抗体中之治疗剂的释放，其中诊断指示剂结合到第一个抗体的第一个结合位点上，可导致在第二个结合位点结合于第一个酶上的某一酶释放，所释放的酶或其反应物之一结合到第二个抗体上，且这一次级结合过程其后又导致被第二个抗体结合之治疗剂的释放。最好是结合酶的反应产物，因为这样将产生初始结合信号的放大。在也以级联作用方式工作的用于诊断/治疗目的的多特异性抗体中，第一个抗原结合位点可针对诊断标记，第二个是抗指示剂酶的，且第三个抗原结合位点携带无活性形式的治疗剂。值得提到的是，可以修剪抗体以适于这一应用。例如可以经特征性的十个不同的反应步骤来使用 IgM 抗体。

在一优选实施例中，一个抗原结合位点可以通过在或接近指示剂/治疗活性位点处，如催化酶或为治疗药物发挥作用所必需之分子部分的活性位点上的分子结合来抓住无活性形式的诊断或治疗剂。在一诊断方法中，第二个抗原结合位点是抗所试验之分子的，但它是疾病或微生物等的指示标志。在此标志存在下，由于两个相靠近之不同抗体抗原结合位点的空间位阻，而

使呈无活性形式的因子以活性形式释放。在一治疗应用中，结合的无活性因子可因诊断分子或其他被试抗原或携带于待对抗之细菌、病毒或其他微生物上之分子或其他抗原的存在而被释放。

本发明抗体的进一步的诊断应用包括：

检测羊水、咽分泌物、肠道分泌物、血液、组织切片中的 SP—A。

预测呼吸窘迫综合症、RDS 的危险性，如测知没有 SP—A 或其水平低则表示危险。

监测患有 RDS 的婴幼儿、患有成人 RDS 的成年人的肺功能情况。SP—A 水平增加表示肺功能正常。

从不同的抗体上释放两种不同的结合分子，只有当两种被释放的分子都存在时才会发生反应。反应产物可结合到另一激发底物释放的抗体，如与另一抗体结合的治疗或诊断分子上。在一治疗应用中，可释放两种前体药物、只有当两者都存在时它们才可变成用于治疗的有活性的药物形式。例如，在治疗肺肿瘤时，第一种双特异性抗体具有抗肺表面活性脱辅基蛋白 A (“SP—A”，其可被大多数肺肿瘤细胞表达) 的第一个抗原结合位点，以及抗前体药物 A 的第二个抗原结合位点。第二种双特异性抗体具有抗转铁蛋白受体 (指示快速恶性生长) 和第二种前体药物 (前体药物<sup>B</sup>) 的第一个抗原结合位点，

其中结合的前体药物 A 和 B 产生一种有活性的抗肿瘤复合物。在用含有已结合了前体药物 A 和 B 之两种抗体的混合体治疗肺肿瘤病人时，将会在 SP—A 和转铁蛋白受体存在下释放出前体药物 A

和 B, 以形成有活性的抗肿瘤复合物。在诊断应用中, 两种不同诊断型抗原的存在可激发级联的酶反应, 只有当检测到两个诊断型抗原决定基时才产生出可检测的诊断指示剂产物。例如, 可以使用两种具有分别对抑制素 A 和 B 链特异之第一个抗原结合位点和分别对辣根过氧化物酶和葡萄糖氧化酶特异之第二个抗原结合位点的双特异性抗体。在抑制素 A 和 B 链存在下, 葡萄糖被葡萄糖氧化酶转化产生过氧化物, 然后后者又被过氧化物酶转化, 同时伴随可很容易检测的邻苯二胺底物转化。相比之下, 常规抗原俘获法中则必须在得到阳性结果前检测两个不同的抗原位点。

可由下列途径提供第一和第二个抗体抗原结合位点: (i) 在免疫检测中, 用两种高浓度, 即超过  $20\mu\text{g}/\text{ml}$ , 且较好是  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  的单克隆抗体的混合物包被表面, (ii) 除分泌双特异性抗体外还分泌亲本单克隆抗体的融合瘤, 以及 (iii) 纯化到均质程度的或以化学修饰法产生的, 有不同抗原之结合位点的双特异性抗体。(i) 被认为是细胞间转导, 而 (iii) 可被看作细胞内转导, (ii) 则包括细胞间和细胞内转导。

可由两种预存在的单克隆抗体的混合物, 或用以标准方法如亲和层析 (使用蛋白 A 或蛋白 G) 或离子交换或凝胶过滤法分离的分泌免疫球蛋白加工未纯化的双特异性抗体, 以经济地实现诊断用细胞间信号传送。

细胞内抗体信号传送需要纯化到均质性的双和三特异性免疫球蛋白。可使用抗多抗原位点的亲和基质, 通过连续亲和层析步骤得到纯化到均质性的免疫球蛋白。因此, 可使用固相化酶、治疗药物或诊断分子, 以层析或离子交换法纯化多特异性

抗体。

可使用固相化抗个体基因型抗体基质完成高效亲和层析，其中固相抗体识别纯化到均质性之多特异性抗体的个体基因型抗原决定基。

本发明的另一个方面提供了一种检测样品中是否存在抗原的免疫检测法，该方法包括使样品与具有抗原和酶之结合位点的多特异性抗体接触，其中酶与抗体结合使酶失活，抗原与抗体结合导致被结合的酶以活性形式由抗体上释放，并检测被释放之活性酶的活性，用以指示样品中是否存在抗原。因此本发明的这个方面提供了一种包括单一反应步骤的简单的免疫检测方法。

虽然不拘泥于有关理论问题，但申请人相信是引进抗原与被结合酶之间的空间位阻引起了酶从抗体上释放。因此一般是基于酶的大小来选择酶，以便与所研究的抗原间形成空间位阻。所用抗体应以足够稳定的方式结合酶，以确保在没有抗原时，仍保持结合状态。酶最好是通过其活性位点与抗体结合。

例如，抗原可以是 SP-A，早产儿体内缺乏之即表明有呼吸窘迫综合症的危险 (Hallman et al., (1988), Am. J. Obs. Gynecol. 158, 153)。这种呼吸道病变影响 2% 的新生儿，而且在出生一周内它是引起正常产新生儿死亡的最常见原因。

酶例如可以是  $\beta$ -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、脲酶、碳酸酐酶或辣根过氧化物酶，所有这些酶都已充分定性并且很容易检测到。

本发明的另一个方面提供了具有抗原和酶之结合位点的多特异性抗体，其中酶通过与抗体结合而失活，并通过抗原与抗

体结合而以活性形式由抗体上释放出来。抗体最好是双特异性的。

根据本发明的另一个方面，提供了一种检测哺乳动物体液中 SP-A 的方法，该方法包括使样品与具有 SP-A 和酶结合位点的多特异性抗体接触，酶与抗体结合可使酶失活，其中 SP-A 与抗体结合导致酶从抗体上以活性形式释放，然后检测被释放之活性酶，以其作为样品中存在 SP-A 的特征。酶可以是  $\beta$ -半乳糖苷酶。

本发明的另一个方面提供了一种确定样品中是否存在抗原的免疫检测法，该方法包括使样品与具有抗原和第一种酶之结合位点的第一种双特异性抗体接触，第一种酶的反应产物作为在第二个位点上催化一很易检测之反应的第二种酶的底物，所述反应指示样品中抗原的存在。第一种酶可以是葡萄糖氧化酶。第二种酶可以是辣根过氧化物酶。

本发明的任何诊断方法均可安排在生物传感器中完成，其中将多特异性抗体用作生物传感器的生物学感受元件。迄今已将单克隆抗体用于电极生物传感器以检测人促性腺激素 (Robinson G. A. et al., (1987), Biosensors 3, 147) 及食品中的金黄色葡萄球菌 (Mirhabibollahi B, et al., (1990) J. Appl. Bacteriol. 68, 577)。然而，一般性应用证明，必须在检测结合抗体的抗原之前除去不可能用作检测物的抗体，另外还存在酶更新的问题。因本发明的方法使用整合酶，故可将双特异性抗体直接掺入电极和半导体转换器中。例如氧电极或离子选择性场效应转换器 (ISFET) 可包括结合了葡萄糖氧化酶的双特异性抗体；或尿素电极，或化学敏感性场效应转换器 (HEMFET) 可包

括结合了脲酶的双特异性抗体。

以下借助实施例描述可用于本发明方法中的酶和多特异性抗体制剂。

$\beta$ -半乳糖苷酶是一种已明确鉴定的酶，其活性可以很容易地检测。

葡萄糖氧化酶是以低成本从黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 中分离的，分子量为 196KD。葡萄糖氧化酶是一种富含甘露糖的糖蛋白，因此可以通过甘露糖碳水化合物链交联，以增加结合之无活性酶的局部浓度 (Kozulio B. et al. (1987), Appl. Biochem. Biotechnol. 15, 265)。可通过化学反应来控制葡萄糖氧化酶聚合体的大小。可将葡萄糖氧化酶用作氧电极的酶组分。

可从刀豆中以低成本分离脲酶，该酶为 590KD 的六聚体，在每个 96KD 亚基上各有一个活性位点。脲酶被用作尿素电极的酶组分。

碳酸酐酶是一种具有 29KD 相对低分子量的单体酶。碳酸酐酶催化二氧化碳水合反应及碳酸氢盐脱水反应，并可以低成本从人红血细胞中分离到。

辣根过氧化物酶具有已明确鉴定的血红素位点 (La Mar GN, et al (1980) J. Biol. Chem. 255, 6646)。辣根过氧化物酶可用于两位点免疫检测方法中，其中葡萄糖氧化酶在第一个位点，辣根过氧化物酶在第二个位点，以产生酶级联反应，葡萄糖氧化酶产生的过氧化氢用作辣根过氧化物酶的底物。

下面借助实施例并参考附图 1—6 描述本发明抗体的制备及其应用。附图中：

图 1 图解说明本发明之抗体的效能；

图 2 说明本发明抗体的应用，

图 3 图解说明从本发明抗体上释放之酶的活性；

图 4 图解说明从本发明抗体上释放之酶的活性；

图 5 图解说明从本发明抗体上释放之酶的活性。

图 1 中所示免疫球蛋白 G 型的双特异性抗体包含第一和第二结合位点 12 和 14，应用中分别结合第一和第二抗原 16 和 18。第一个抗原 16 结合到第一个抗原结合位点 12 上，导致从第二个结合位点 14 释放已结合的第二个抗原 18。

在图 2 i) 所示的诊断应用中，双特异性抗体 20 具有分别针对所研究之分析物 20，即 SP-A 和针对酶 28 即  $\beta$ -半乳糖苷酶的第一和第二抗原结合位点 22、24，其中酶具有容易检测的底物转化活性。当在第二个结合位点 24 上例如通过该位点或其相邻活性位点或通过改变活性位点的构型而结合到抗体上时，酶即被失活。

样品中的分析物 26 结合到第一个结合位点 22 上，使已结合的酶释放到培养基中，这样其活性即可很容易地得以检测，以指示分析物的存在。

在图 2 ii) 所示的诊断应用中，双特异性抗体 30 具有分别针对肿瘤细胞 36 表面上的抗原和针对抗肿瘤药物 38 的第一和第二抗原结合位点。当第二个结合位点 34 结合到抗体上时药物被失活。抗原 36 结合到第一结合位点 32 上，即可使已结合的药物 38 以活性形式从中释放，而用于对抗表达抗原 36 的肿瘤细胞。

在图 2 iii) 所示的联合的诊断/治疗应用中，使用了两种不同的双特异性抗体。

抗体 40 对由肿瘤细胞携带的抗原 44 和以无活性形式结合的酶 46 具有特异性。抗体 42 对抗肿瘤药物 48 和酶 46 或酶反应产物有特异性。抗原 44 结合到抗体上，导致酶 46 以活性形式释放。被释放之酶的活性很容易被检测出来。然后酶 46 或其反应产物之一结合到第二个抗体 42 上，从而释放出活性形式的药物 48，以杀死表达抗原 44 的肿瘤细胞。

可用杂交瘤细胞融合技术制备双特异性抗体。分离并鉴定分泌第一种单克隆抗体的杂交瘤细胞。然后通过在不同的选择培养基中生长而使亲代细胞系产生药物抗性。可通过有不同药物抗性之亲代细胞系之间或药物抗性杂交瘤与免疫小鼠之脾细胞间的细胞融合，将这些药物抗性克隆用于生产双特异性抗体。在进行细胞融合和选择之后，根据是否产生有所需反应活性的抗体来筛选培养物。克隆所选择的培养物并用免疫检测法证实其双特异性免疫球蛋白的分泌能力。

为了用于本发明，用蛋白 A 亲和层析法富集所分泌的免疫球蛋白。然后使富集的抗体经受连续的亲和层析步骤，以分离同源双特异性免疫球蛋白。

### 双特异性抗体的制备

#### A) 制备分泌适当单克隆抗体的杂交瘤

可用融合瘤技术方便地制备双特异性抗体。

首先，分离分泌抗所研究的酶和抗胞毒性药物氨甲喋呤单克隆抗体的细胞系。

将氨甲喋呤与卵清蛋白相偶联以提高抗原（酶）制剂的免疫原性。为了免疫，使用天然形式的酶和与钥孔血蓝蛋白形成的结合物，以提高免疫原性。监测被免疫 BALB/C 小鼠的血清

反应，并对由免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合而制得有适当反应性的杂交瘤。用酶联免疫吸附法 (ELISA) 初步筛选抗氨甲喋呤结合物之靶抗原的杂交瘤。然后根据阻断酶介导之底物转化反应的能力，筛选由分泌抗酶抗体之克隆的杂交瘤产生的单克隆抗体。有阻断这些反应之能力的单克隆抗体可通过结合或接近活性位点达到这一目的。根据它们阻断氨甲喋呤之胞毒性效应的能力筛选氨甲喋呤反应性抗体。

然后在毒性培养基中培养产生适当单克隆抗体的杂交瘤，以分离适于融合瘤生产的药物抗性克隆。

利用两种可选择标志发展适于融合瘤生产的适当药物抗性克隆。在  $5\mu\text{g/ml}$  6-巯基鸟嘌呤中培养杂交瘤，以选择次黄嘌呤鸟苷磷酸核糖基转移酶缺陷型变种。

为了诱导巯基鸟嘌呤抗性，将  $4 \times 10^7$  个杂交瘤细胞分散于含有  $\alpha$  MEM 培养基 (Stanners CP, Eliceri G. and Green H (1971), *Nature, New Biol.* 230, 52) 的  $6 \times 48$  小井组织培养板中，其中上述培养基中添加了 10% (V/V) 热灭活的胎牛血清 (FCS)、20% (V/V) 得自 J774 巨噬细胞系的条件培养基 (Cancer Research (1977) 37, 546) 和  $5\mu\text{g/ml}$  6-巯基鸟嘌呤 (Sigma A4660)。约 3 周后，可以看见克隆化生长的药物抗性克隆。用吸管抽吸这些克隆并再次培养之。然后在标准的 HAT 选择系统 (Littlefield J. W. (1964) *Science* 145, 709) 中选择这些变种。

同时在渐增浓度的强心糖苷乌本苷 (其可抑制哺乳动物浆膜的钠钾 ATP 酶) 中选择药物抗性细胞。在乌本苷存在下，野生型细胞不能存活，而抗性克隆则可在 180 倍以上高浓度的药物中生长 (Mankovitz R et al., (1974) *Cell* 3, 221)。

为了诱导乌本苷抗性，培养  $2 \times 10^4$  个杂交瘤细胞，然后在含 10% (V/V) FCS，并有从  $1 \mu\text{M}$  到  $0.5 \text{mM}$  渐增浓度乌本苷 (sigma 03125) 的  $\alpha$ -MEM 培养基中再汇合培养之。

为了诱导双药物抗性 (即抗乌本苷和抗巯基乌本苷抗性)，先在上述渐增浓度的乌本苷中培养细胞。一旦能在  $0.5 \text{mM}$  乌本苷培养基中生长之后，即按上述方法诱导抗 6-巯基乌本苷抗性。

克隆抗 6-巯基乌本苷和乌本苷的杂交瘤，准备用于融合瘤生产。

#### b) 融合瘤生产

在一系列细胞融合实验中，通过常规技术产生分泌双特异性抗体的融合瘤，以选择能产生获得了酶反应性能力并且有识别目的抗原之第二抗体结合位点之双功能抗体的融合瘤细胞。融合瘤是从“酶反应性细胞”，即免疫小鼠的脾细胞或杂交瘤，以及从“抗原反应性细胞”衍生来的。抗原反应性细胞的例子包括产生抗体 A15、识别 43KD 卵清蛋白、KLH1、识别 800KD 钥孔贼血蓝蛋白的抗体及可与人肺表面活性脱辅基蛋白 A (SP-A) 反应的 AD4 和 E8 (Randle BJ et al., (1992), 待出版)。一般认为抗体 E8 与 Kurokiy 等人 (Am. J. Pathol. 1986, 124, 25-33) 所述的抗体 PE10 相似。以下列三个连续步骤进行细胞融合实验：

1、使具有抗原反应性或酶反应性的巯基鸟嘌呤抗性、HAT 敏感性杂交瘤与具有酶反应性或由 HAT 选择之抗原反应性的免疫小鼠脾细胞融合。

2、使有抗原或酶反应性的巯基鸟嘌呤抗性杂交瘤与具有由乌本苷巯基鸟嘌呤培养基选择之抗原或酶反应性的乌本苷抗性

杂交瘤融合。

3、使具有抗原或酶反应性的巯基鸟嘌呤/乌本苷双抗性杂交瘤与具有在 HAT 乌本苷培养基中选择之抗原或酶反应性的野生型杂交瘤融合。

用标准技术进行细胞融合。将巯基鸟嘌呤抗性杂交瘤与免疫小鼠的脾细胞以 1:10 的细胞比例混合 (系列 1), 并在含 50% (W/V) 聚乙二醇 1500 的无血清培养基中保温 75 秒钟以制备融合瘤细胞。定时加入含有血清的生长培养基来终止细胞融合过程。然后再将融合瘤加在多小井平板中, 达到 800 份分离的培养物, 并在 HAT 选择培养基培养两周。

在融合两种已有的带不同选择标志的杂交瘤制备融合瘤时 (系列 2), 融合前以 1:1 比例混合细胞。在含 50% (W/V) 聚乙二醇 1500 的无血清培养基中保温 75 秒钟以完成融合过程。经 5 分钟定时加入含血清培养基以终止融合反应。将融合瘤铺敷在多小井平板内的含  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  巯基鸟嘌呤和  $0.5\text{mM}$  乌本苷的选择培养基中, 得到 200 份分离的培养物。含 5%  $\text{CO}_2$  (V/V) 的孵箱中  $37^\circ\text{C}$  保温 2 周后, 检查培养物生长情况。

在双药物抗性杂交瘤与野生型杂交瘤融合时 (系列 3), 融合前以 1:1 的比例混合细胞。在含 50% (W/V) 聚乙二醇 1500 的无血清培养基中保温 75 秒钟完成融合过程。经 5 分钟定时加入含血清培养基以终止反应。将融合瘤铺敷在加入含  $0.5\text{mM}$  乌本苷之 HAT 选择培养基的多小井平板内, 得到 200 份分离的培养物。

然后根据对酶或氨甲喋呤的识别能力筛选培养物。再试验识别选择之抗原的反应性培养物。用酶联免疫吸附法 (ELISA)

筛选分泌能与抗原反应之抗体的培养物。在 0.1M 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 中 (50 $\mu$ g/小井) 4 $^{\circ}$ C 保温过夜, 将抗原以 5—10 $\mu$ g/ml 的浓度固定在 96 小井滴定板各小井的表面上。平板各小井用 100 $\mu$ l 含 10% (V/V) 胎牛血清的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 室温下封闭 2 小时。以双份重复在各小井内加入 50 $\mu$ l 被试培养物上清液, 并在室温下保温 1 小时。用含 0.05% (V/V) 吐温 20 PBS 洗平板, 并使用第二层结合酶的抗小鼠免疫球蛋白抗体检测结合的抗体, 然后检测酶底物转化作用。然后用有限稀释和单细胞操作的标准技术克隆分泌双特异性抗体的培养物, 并培养到产生出毫克量的分泌之免疫球蛋白。然后用离子交换层析鉴定 (Wong JT and Colvin RB (1987) J. Immunol. 139, 1369) 分泌的抗体, 并在纯化后用于实验诊断。在本实施例中, 用亲和层析法纯化免疫球蛋白。

### 检测的准备

经过在 ELISA 包被培养基中保温, 将融合瘤分泌的双特异性免疫球蛋白或富集的免疫球蛋白固定在小井平板上。用含 10% (V/V) FCS 的 PBS 封闭平板。经过加含酶培养基进行保温后, 使抗体挂酶。洗涤除去未结合的酶, 得到抗体酶复合物备用。

为检测抗原, 以两种不同方式使用复合物。加入第一抗原后 15 分钟, 除去上清, 然后检测由复合物上释放的酶活性。其次, 以同时进行的一步骤形式, 在加抗原的同时向复合物中加入酶底物。两种情况下均根据与底物转化相关联的颜色改变直接检测酶活性, 以指示样品中抗原的存在。

例如, 使用以密度依赖性离心法 (Katyal SL and Singh G

(1979) *Lab. Invest.* 40, 562) 纯化的肺表面活性脱辅基蛋白 A 校正该分析法。然后检测早产分娩之羊水液样品中的脱辅基蛋白浓度。

### 证明抗体介导之信号转导的双特异性抗体

融合瘤细胞系 GAL30. 19 分泌与 SP-A 或  $\beta$ -半乳糖苷酶 (得自大肠杆菌) 有反应性的双特异性免疫球蛋白。将 6-巯基鸟苷抗性 D4 杂交瘤 (Randle et al., 1992, 待出版), 即分泌抗 SP-A 抗体的亚克隆 D4tg13, 与用每次  $10\mu\text{g}$   $\beta$ -半乳糖苷酶 (Sigma G5635) 添加明矾佐剂免疫 (每周一次, 共 8 周) 之 BALB/C 雌性小鼠的脾细胞进行细胞融合, 以分离上述细胞系。在细胞融合实验前给予静脉注射  $20\mu\text{g}$   $\beta$ -半乳糖苷酶, 共注射四天。

以标准技术进行细胞融合, 并将所得细胞混合物铺敷在 HAT 选择培养基中。17 天后筛选培养物。得到 41 份融合瘤培养物, 用间接 ELISA 法检测发现其中 41 份分泌与  $\beta$ -半乳糖苷酶反应的抗体。用 Western 免疫印迹法证明 8 份培养物分泌与 SP-A 和  $\beta$ -半乳糖苷酶反应的免疫球蛋白。用有限稀释法克隆这些培养物并选择出 6 个克隆培养物作进一步的研究。现在描述其中一个细胞系 30. 19. GAL 30.19 的样品已于 1992 年 4 月 25 日保藏在中国武汉中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏登记号为 CCTCC - C 92002。

该细胞系常规生长在  $\alpha$ HAT 培养基中, 并在未搅拌的单层培养物生长条件下产生了大约  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  的免疫球蛋白。使用蛋白 A Sepharose 柱 (Sigma P3391), 以标准亲和层析技术分离富集的 GAL30. 19 免疫球蛋白。简单地说, 经加入  $1\text{M}$  Tris-HCl (pH8.

5)将 1.2 升培养物上清调到 pH8.2, 并过 6ml 蛋白 A Spharose 柱。用 10 倍体积的 PBS 洗柱后, 加入 1M Tris-HCl (pH8.5) 调到 pH8.2, 用柠檬酸钠缓冲液 (pH3.5) (0.1M) 洗脱结合的免疫球蛋白。立即用 700 $\mu$ l 1M Tris-HCl (pH8.5) 中和每管 1ml 的洗脱物。用考马斯兰染料结合检测法检测洗脱之各部分的蛋白质浓度, 并用间接 ELISA 法估测抗体浓度。从 1.2 升培养物中分离出 6.05mg 免疫球蛋白。用间接 ELISA 法检测, 最浓管中抗  $\beta$ -半乳糖苷酶的抗体浓度为 1:10<sup>6</sup>, 抗 SP-A 抗体浓度为 1:10<sup>5</sup>。

#### 抗原俘获法以证明对 $\beta$ -半乳糖苷酶和 SP-A 的识别

在抗原俘获 ELISA 试验中可使用富集的 GAL30.19 以检测  $\beta$ -半乳糖苷酶和 SP-A。简单地说, 在 96 小井平底免疫分析平板 (Falcon Cot No. 3912) 中, 每小井加 5 $\mu$ l 溶于碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液 (pH9.6, 每小井 50 $\mu$ l) 的免疫球蛋白, 于 4 $^{\circ}$ C 保温过夜以包被各小井。于室温下用 100 $\mu$ l 含 10% (V/V) FCS 的 PBS 将各小井封闭 2 小时。

#### $\beta$ -半乳糖苷酶抗原俘获

将  $\beta$ -半乳糖苷酶以 50 $\mu$ l 体积, 从 0-100 $\mu$ g/ml 的渐增浓度添加, 并在室温下保温 1 小时。各小井用 200 $\mu$ l 含 0.5% (V/V) 吐温 20 的 PBS 洗两次, 然后加入酶底物、“ $\beta$ -半乳糖苷酶底物缓冲液”以检测结合的  $\beta$ -半乳糖苷酶。在稍微加温同时, 将含有 20.5mg 邻位硝基苯基  $\beta$ -半乳糖苷 (Sigma N-1127; ONPG) 的底物溶解在 1ml 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH7.3) 中。将 832 $\mu$ l ONPG 溶液加到 5 $\mu$ l 含 BSA 和氯化镁的磷酸盐缓冲液中, 其中比例为

2. 7ml 0.03M 磷酸盐缓冲液 (pH7. 3):

0. 1ml 0.03M 氯化镁, 加 0. 5% (V/V) 牛血清白蛋白 (BSA)

在抗原俘获法中, GAL30. 19 检测到最少每毫升 5 $\mu$ g 的  $\beta$ -半乳糖苷。

### SP-A 抗原俘获

以 50 $\mu$ l 的体积加入浓度为 5—10 $\mu$ g/ml 的 SP—A 并于室温下保温 1 小时。用 PBS 吐温 20 将各小井洗两次并加入 50 $\mu$ l/小井的 1: 30E8 生物素 (在 PBS 中) 检测结合的 SP—A。与 D4 不同, E8 杂交瘤分泌与 SP—A 之第二个抗原决定基反应的单克隆抗体 (Randle et al, 1982, 待出版)。以大约每分子免疫球蛋白 3 个生物素分子的比例取代 E8 免疫球蛋白 (将 E8—生物素储备液稀释到 1mg/ml)。保温 30 分钟后, 平板用 PBS 吐温洗两次, 然后与加在 PBS 中的 5 $\mu$ l 1: 5000 抗生物素蛋白—碱性磷酸酶 (在 PBS 中 1mg/ml 储备液: Sigma A2527) 4 $^{\circ}$ C 下保温 30 分钟。各小井用 PBS 吐温洗 3 次, 然后根据对位硝基苯基磷酸酯, 六水合二钠 (Sigma 104—105E) 的底物转化检测碱性磷酸酶的存在。简单地说, 每小井内加入浓度为 1mg/ml, 溶于 1M 二乙醇胺缓冲液 (pH9. 8) 中的 50 $\mu$ l 底物, 即“碱性磷酸酶底物”。碱性磷酸酶底物缓冲液包含由 97ml 二乙醇胺、800ml 水、100mg 氯化镁六水合物组成的 10% (V/V) 二乙醇胺缓冲液。加入 1M 盐酸直到 pH 为 9. 8, 然后加水使体积达到 1 升。于 4 $^{\circ}$ C 下暗处储存备用。检测 410nm 处的光密度以确定酶引起的底物转化。使用这一抗原俘获方法, GAL30. 19 最少可检测到每毫升 6. 25 $\mu$ gSP—A。

### GAL30. 19 阻断 $\beta$ -半乳糖苷酶的活性

将 50 $\mu$ l 浓度为 1mg/ml 的富集的 GAL30. 19 免疫球蛋白加到 50 $\mu$ l 浓度为 500 $\mu$ g/ml 的  $\beta$ -半乳糖苷酶溶液 (在 PBS 中) 内。加入 100 $\mu$ l  $\beta$ -半乳糖苷酶底物, 并于 410nm 处监测底物转化。使用 50 $\mu$ l PBS 代替抗体溶液进行平行的对照实验。5 分钟后, 在被检样品中没有抗体存在时酶产物的密度为 0. 920, 样品中有 GAL30. 19 存在时为 0. 597。这一结果证明 GAL30. 19 阻断了  $\beta$ -半乳糖苷酶的酶促活性。

### 纯化双特异性 GA30. 19 免疫球蛋白到均质程度

用连续亲和层析法从富集的抗体中分离同源双特异性免疫球蛋白。所选用的方法是连续亲和层析法。使用载体纯化之 SP-A 的小球基质以亲和层析法分离带有第一抗原位点的免疫球蛋白。使用标准二乙胺缓冲液 (pH11, 1M) 进行洗脱, 并用 Tris-HCl (pH8, 1M) 中和各部分。使用 G25 Sephadex (商品名) 过滤法, 经与 PBS 进行缓冲液交换, 使已中和的部分脱盐。然后对样品进行第二次亲和层析, 其中所用层析凝胶基质为携带  $\beta$ -半乳糖苷酶的小球基质。进行 DEA, 将同源双特异性抗体脱盐并在含 0. 02% 叠氮钠的 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 储存备用。层析后, 2. 7mg 富集的免疫球蛋白产生 0. 38mg 同源免疫球蛋白。最浓部分的抗体滴度分别为 1 : 10<sup>4</sup> ( $\beta$ -半乳糖苷酶) 和 1 : 10<sup>3</sup> (SP-A)。在 10% (W/V) SDS PAGE 中, 于还原条件下对此均质样品进行电泳, 进一步证明 GAL30. 19 之重链和轻链多肽的存在。

### 证实抗体介导的信号转导

已用经过蛋白 A 亲和层析分离的富集的 GAL30. 19 免疫球蛋白和经过在 SP-A Sepharose 及  $\beta$ -半乳糖苷酶 Sepharose 柱

上连续亲和层析得到的均质性免疫球蛋白证明了转导抗体活性。

### 实施例 1: 富集的免疫球蛋白检测法 (见图 3)

用溶于 ELISA 包被缓冲液, 碳酸盐/碳酸氢盐 (pH9.6) 的富集的 GAL30.19 免疫球蛋白溶液 (50 $\mu$ g/ml), 以每小井 50 $\mu$ l 于 40 $^{\circ}$ C 下包被各小孔过夜。在室温下以每小井 100 $\mu$ l 加有 10% (V/V) FCS 的 PBS 将滴定板各小井封闭 2 小时。然后各小井加入 50 $\mu$ l 溶于洗涤缓冲液, 即含 0.5% (W/V) BSA (Sigma A7888) 之 PBS 中的  $\beta$ -半乳糖苷酶 (Sigma G5635) 溶液 (2 $\mu$ g/ml), 于室温下保温 1 小时。保温后用 200 $\mu$ l PBS 吐温 20 (0.05% V/V) 将各小井洗两次, 以从固相化的转导抗体复合物中除去未结合的酶。

然后在一式两个小井内装入 50 $\mu$ l, 从 6.25 至 100 $\mu$ g/ml 渐增浓度的特异性抗原 SP-A、分子量 800KD 的非特异性抗原 KLH, 分子量 1000KD 的非特异性抗原小鼠免疫球蛋白  $\mu$ , IgM (用洗涤缓冲液稀释)。15 分钟后, 除去上清液, 根据  $\beta$ -半乳糖苷酶底物转化来估计酶从复合物上的释放。50 $\mu$ l 试验样品与 50 $\mu$ l  $\beta$ -半乳糖苷酶底物缓冲液保温。测 410nm 处光密度, 确定底物向产物的转化, 从而证明上清液中存在释放的酶。

根据  $\beta$ -半乳糖苷酶催化的底物转化并测产物的 410nm 光密度, 以测定上清液中是否存在由转导复合物上释放的酶。只有存在分子量约 1200KD 的 SP-A, 而不存在有相似分子量的抗原 KLH (800KD) 和 IgM (1000KD) 时, 才能测知有释放的酶。这种效应是可滴定的, 且在有较高浓度 SP-A 时可达到饱和效果。

在本方法中，GAL30. 19 转导抗体最少可检测到 6. 25 $\mu$ g/ml 的 SP-A。

### 实施例 2: 纯化的双特异性免疫球蛋白检测法

证明在特异性抗原存在下有酶释放 (参见图 4)。

以每小井 50 $\mu$ l 溶于 ELISA 包被缓冲液，碳酸盐/碳酸氢盐 (pH9. 6) 中的纯化的 GAL30. 19 免疫球蛋白溶液 (20 $\mu$ g/ml) 于 4 $^{\circ}$ C 下将各小井包被过夜。在室温下用每小井 100 $\mu$ l 含有 10% (V/V) FCS 的 PBS 将平板各小孔封闭 2 小时。然后各小孔加入 50 $\mu$ l 浓度为 50 $\mu$ g/ml 的  $\beta$ -半乳糖苷酶 (Sigma G5635) 溶液 (溶于洗涤缓冲液，即含有 0. 5% (W/V) 牛血清白蛋白 (Sigma A7888) 的 PBS 中)，于室温下保温 1 小时。保温后用 PBS 吐温将小井洗两次，以除去固相化转导抗体复合物中未结合的酶。

然后将 50 $\mu$ l 每毫升 6. 25—100 $\mu$ g 在洗涤缓冲液中稀释的递增浓度的特异性抗原 SP-A 和有相当分子量的非特异性抗原 KLH 加到一式两个重复小井内。15 分钟后，除去上清，根据  $\beta$ -半乳糖苷酶催化的底物转化率估计酶从复合物中的释放。

简单地说，将 50 $\mu$ l 试验样品与 50 $\mu$ l  $\beta$ -半乳糖苷酶底物缓冲液一起保温。测 410nm 处光密度以检测底物向产物的转化，以指示上清液中是否存在已释放的酶。只有当存在特异性抗原 SP-A，而不存在有相似分子量的抗原 KLH 时才可由转导复合物释放显著量的  $\beta$ -半乳糖苷酶。

### 实施例 3: 证明纯化的双特异性免疫球蛋白检测法一步骤 抗体介导的信号转导 (参见图 5)

按上述方法制备转导抗体复合物，并用 PBS 吐温洗两次，以从平板上洗掉未结合的  $\beta$ -半乳糖苷酶。

制备  $50\mu\text{g}$  在洗涤缓冲液中稀释的有  $6.25-100\mu\text{g}/\text{ml}$  之渐增浓度的特异性抗原 SP-A 和有相似分子量之非特异性抗原 KLH 的溶液，并与  $\beta$ -半乳糖苷酶底物缓冲液混合。然后将  $100\mu\text{l}$  混合的抗原和  $\beta$ -半乳糖苷酶底物样品加到含有固相化转导抗体复合物的小井内。由于酶介导的产物生成时即出现颜色，故测  $410\text{nm}$  光密度即可估计出由复合物释放之  $\beta$ -半乳糖苷酶的酶活性。

在加入样品后 (0') 和 10 分钟 (10') 时立即检测产物生成。在两种情况下，只有存在被 GAL30.19 识别的特异性抗原 SP-A 时，才导致显著的产物生成。这一结果明确显示，对于 GAL30.19 均质性免疫球蛋白，抗原检测可以导致以一步骤方式释放酶，以及产生使无活性结合酶变为能引起底物转化之活性  $\beta$ -半乳糖苷酶的信号转导过程。

说明书附图

图 1

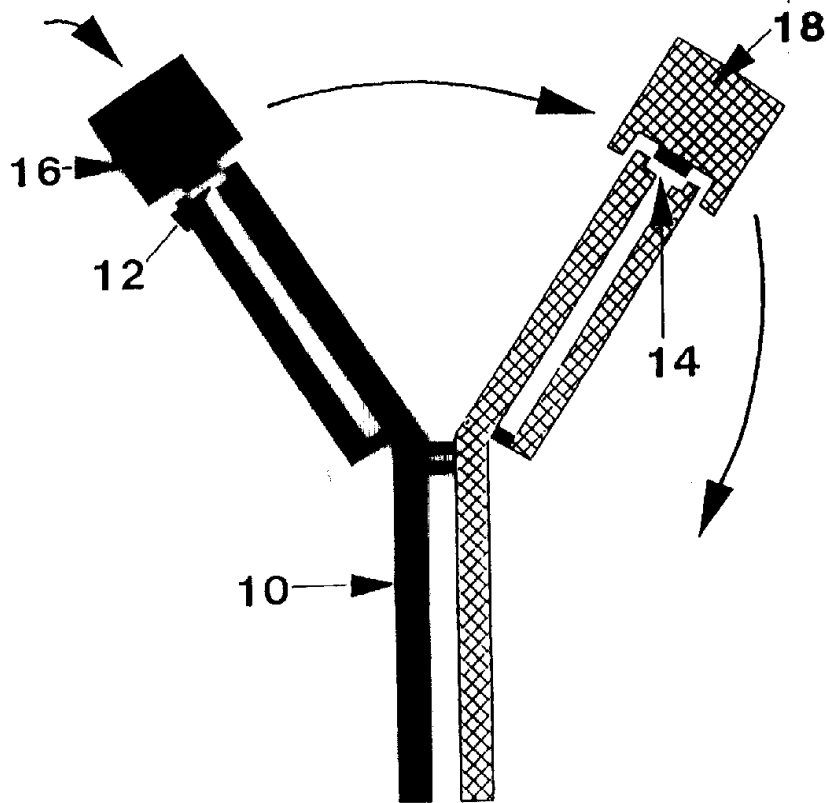


图 2

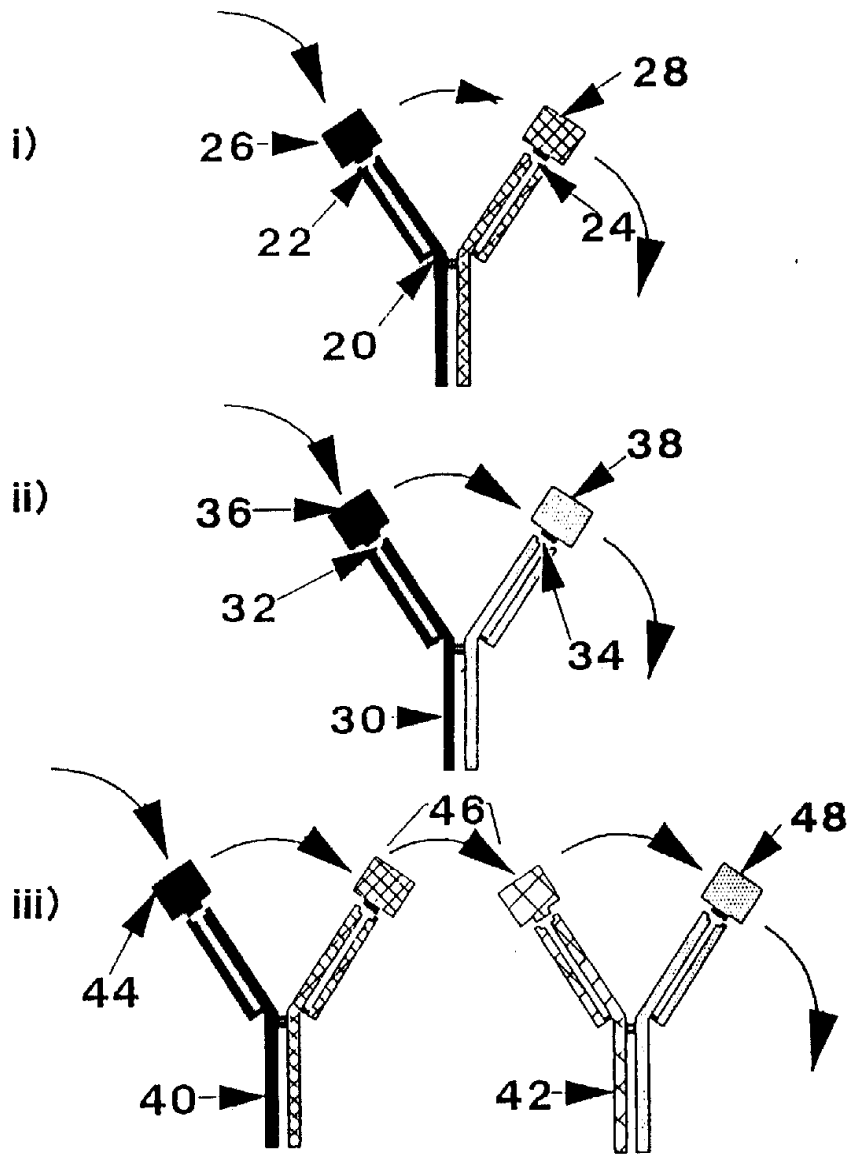


图 3

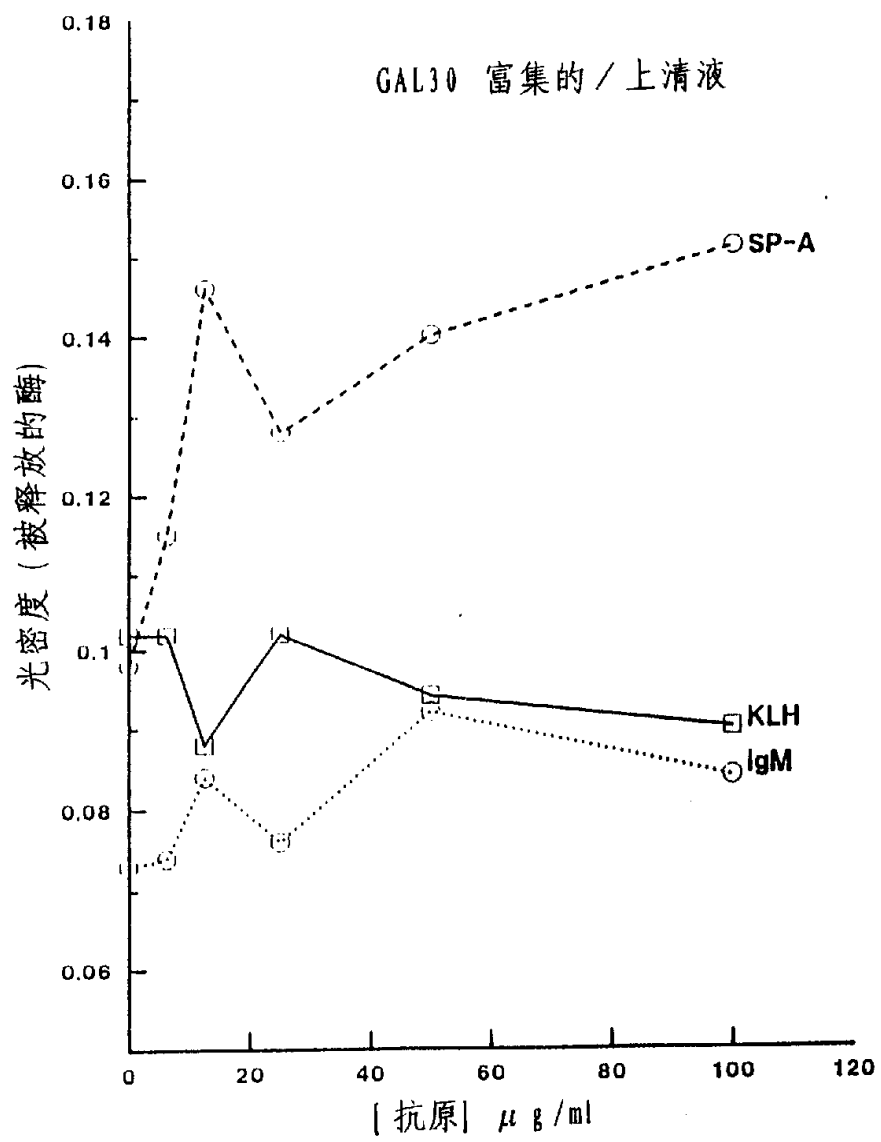


图 4

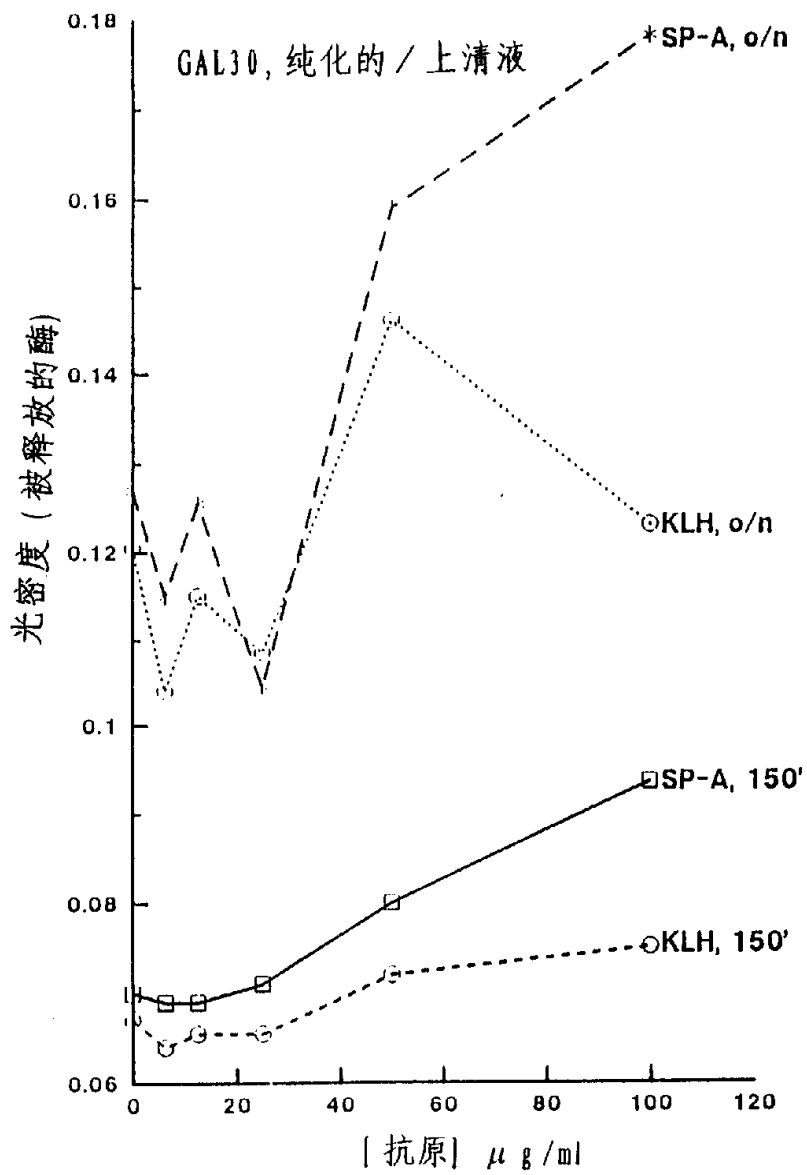


图 5

