



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102472747 B

(45) 授权公告日 2015.04.29

(21) 申请号 201080030495.2
 (22) 申请日 2010.07.07
 (30) 优先权数据
 61/223,984 2009.07.08 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2012.01.06
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2010/041146 2010.07.07
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02011/005818 EN 2011.01.13
 (73) 专利权人 伯乐实验室公司
 地址 美国加利福尼亚州
 (72) 发明人 高谦
 (74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
 公司 11021
 代理人 王旭
 (51) Int. Cl.
 G01N 33/53(2006.01)
 G01N 33/553(2006.01)
 (56) 对比文件
 US 5891647 A, 1999.04.06, 参见第 2 栏

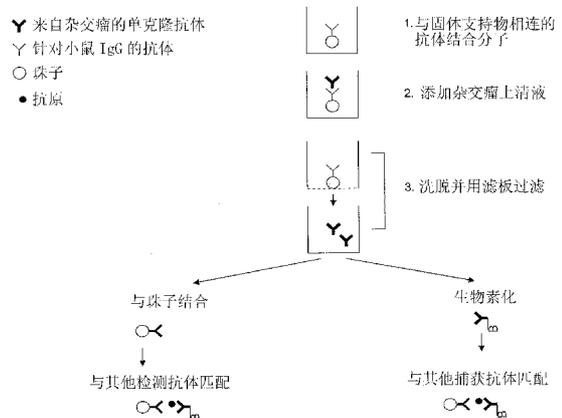
27-38 行, 第 7 栏 29-41 行, 权利要求 9.
 US 6770445 B1, 2004.08.03, 全文.
 US 2007/0237713 A1, 2007.10.11, 全文.
 CN 1446050 A, 2003.10.01, 全文.
 C. Akhouni et al. Production and
 characterization of monoclonal and
 polyclonal antibodies to human α 2-HS:
 development of a two-site ELISA test.
 《Journal of Immunological Methods》. 1994, 第
 172 卷 191 页右栏第 6- 倒数第 8 行, 192 页左栏第
 8 行至 193 页左栏第 2 行.

审查员 王在竹

权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称
 单克隆抗体的纯化

(57) 摘要
 本发明提供用于有效地纯化单克隆抗体以及
 鉴定夹心免疫测定中相容的抗体对的方法和组合
 物。



1. 一种在建立产生自非克隆杂交瘤培养物的杂交瘤克隆前鉴定用于在夹心免疫测定中使用的单克隆抗体对的方法,所述方法按以下顺序包括:

(a) 使系列不同杂交瘤培养物上清液与系列抗体结合分子在允许所述上清液中的抗体与所述抗体结合分子结合的条件下接触,其中所述抗体结合分子与固体支持物连接;

(b) 从所述固体支持物分离所述上清液的未结合的组分;

(c) 改变所述固体支持物周围的溶液条件,由此将所述抗体从所述抗体结合分子上洗脱下来,

(d) 从包含所洗脱的抗体的溶液中分离所述固体支持物,从而制成包含来自所述杂交瘤的抗体的系列洗脱液,

(e) 所述抗体连接到固体支持物上或被生物素化;并且

(f) 在存在与抗原结合的第二抗体的条件下,确定所述系列洗脱液中的第一抗体与所述抗原结合的能力,由此鉴定用于在夹心免疫测定中使用的单克隆抗体对,

其中步骤 (f) 包括进行夹心免疫测定,其中在所述免疫测定中第一抗体的等分试样用作捕获抗体,来自所述系列洗脱液的第二抗体的等分试样用作一级检测抗体;或

其中步骤 (f) 包含进行夹心免疫测定,其中在所述免疫测定中来自所述系列洗脱液的第一抗体用作不同的捕获抗体,第二抗体用作一级检测抗体;或

其中步骤 (f) 包含进行夹心免疫测定,其中在所述免疫测定中来自所述系列洗脱液的第一抗体用作不同的一级检测抗体,第二抗体用作捕获抗体。

2. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (d) 包括过滤包含洗脱的抗体和所述固体支持物的溶液,以致所述抗体流过滤器,其中所述固体支持物被所述滤器截留。

3. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (d) 包括磁力分离所述固体支持物与包含洗脱的抗体的溶液。

4. 权利要求 1 的方法,其中在步骤 (a) 和 (e) 中所述固体支持物是珠子。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述珠子是琼脂糖珠、聚苯乙烯珠或磁珠。

6. 权利要求 4 的方法,其中所述珠子是顺磁性珠。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体结合分子选自由以下各项组成的组:抗体、蛋白 A、蛋白 G 和抗原。

8. 权利要求 1 的方法,其中以多孔形式进行步骤 (a)-(d),以致不同的孔包含来自不同杂交瘤的不同抗体。

9. 权利要求 2 的方法,其中所述过滤包括真空辅助的过滤。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述捕获抗体与步骤 (e) 的固体支持物相连。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述一级检测抗体被生物素化。

12. 权利要求 1 的方法,所述方法进一步包括由确定产生与所述抗原结合的第一抗体或第二抗体的杂交瘤建立杂交瘤克隆。

13. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (f) 包括进行夹心免疫测定,其中在所述免疫测定中第一抗体的等分试样用作捕获抗体,来自所述系列洗脱液的第二抗体的等分试样用作一级检测抗体。

14. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (f) 包含进行夹心免疫测定,其中在所述免疫测定中来自所述系列洗脱液的第一抗体用作不同的捕获抗体,第二抗体用作一级检测抗体。

15. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (f) 包含进行夹心免疫测定,其中在所述免疫测定中来自所述系列洗脱液的第一抗体用作不同的一级检测抗体,第二抗体用作捕获抗体。

单克隆抗体的纯化

[0001] 对相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2009 年 7 月 8 日提交的美国临时专利申请号 61/223,984 的优先权利益,所述申请通过引用结合。

[0003] 发明背景

[0004] 单克隆抗体是这样的蛋白,所述蛋白在它们与目标分子上的特异位点的反应中具有高的特异性和灵敏性。单克隆抗体通常由与来源于多发性骨髓瘤的细胞融合的脾细胞(杂交瘤)的体细胞克隆来产生(Kohler 和 Milstein, Nature(自然)256(5517):495(1975))。

[0005] 发明简述

[0006] 本发明提供在建立杂交瘤克隆前鉴定用于在夹心免疫测定(sandwich immunoassay)中使用的单克隆抗体对的方法。在一些实施方案中,所述方法按以下顺序包括:

[0007] (a) 使系列不同杂交瘤培养物上清液与系列抗体结合分子在允许所述上清液中的抗体与所述抗体结合分子结合的条件下接触,其中所述抗体结合分子与固体支持物连接;

[0008] (b) 从所述支持物分离上清液的未结合的组分;

[0009] (c) 改变所述固体支持物周围的溶液条件,由此将抗体从所述抗体结合分子上洗脱下来,

[0010] (d) 从包含所洗脱的抗体的溶液中分离所述固体支持物,从而制成系列包含来自杂交瘤的抗体的洗脱液;并且

[0011] (e) 在存在与抗原结合的第二抗体的条件下,确定所述系列洗脱液中的第一抗体与所述抗原结合的能力,由此鉴定用于在夹心免疫测定中使用的单克隆抗体对。

[0012] 在一些实施方案中,步骤(d)包括过滤包含所述洗脱抗体和所述固体支持物的溶液,以致所述抗体流过滤器,其中所述支持物被过滤器截留。因此,所述系列洗脱液是系列“滤出液”。

[0013] 在一些实施方案中,步骤(d)包括磁力分离所述固体支持物与包含所述洗脱抗体的溶液。

[0014] 在一些实施方案中,从非克隆杂交瘤培养物产生杂交瘤克隆。

[0015] 在一些实施方案中,所述固体支持物是珠子(bead)。在一些实施方案中,所述珠子是琼脂糖珠、聚苯乙烯珠、磁珠或顺磁性珠。

[0016] 在一些实施方案中,所述抗体结合分子选自由以下各项组成的组:抗体、蛋白 A、蛋白 G 和抗原。

[0017] 在一些实施方案中,以多孔形式进行步骤(a)-(d),以致不同的孔包含来自不同杂交瘤的不同抗体。

[0018] 在一些实施方案中,所述过滤包括真空辅助的过滤(vacuum-assisted filtering)。

[0019] 在一些实施方案中,在步骤(d)后,所述抗体连接到固体支持物上或被生物素化。

[0020] 在一些实施方案中,步骤(e)包括进行夹心免疫测定,其中在所述免疫测定中,将来自所述系列的抗体用作不同的捕获抗体而将第二抗体用作一级检测抗体。在一些实施方案中,所述捕获试剂与固体支持物相连。在一些实施方案中,所述一级检测抗体被生物素化。

[0021] 在一些实施方案中,步骤(e)包括进行夹心免疫测定,其中在所述免疫测定中,将来自所述系列的抗体用作不同的一级检测抗体而将第二抗体用作捕获抗体。在一些实施方案中,所述捕获试剂与固体支持物相连。在一些实施方案中,所述一级检测抗体被生物素化。

[0022] 在一些实施方案中,步骤(e)包括进行夹心免疫测定,其中在所述免疫测定中,将来自所述系列的抗体的第一等分试样(aliquot)用作捕获抗体而将来自所述系列的抗体的第二抗体等分试样用作一级检测抗体。在一些实施方案中,所述捕获试剂与固体支持物相连。在一些实施方案中,所述一级检测抗体被生物素化。

[0023] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括由确定产生与所述抗原结合的第一抗体或第二抗体的杂交瘤建立杂交瘤克隆。

[0024] 回顾本申请的其余部分,将理解其他方法和组合物也是本发明的一部分。

[0025] 定义

[0026] “抗体”是指免疫球蛋白、复合物(composite)或其片段形式。该术语可以包括但不限于来源于人或其他哺乳动物细胞系的IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类的多克隆或单克隆抗体,其包括天然的或遗传修饰的形式,诸如人源化的、人的、单链的、嵌合的、合成的、重组的、杂合的、突变的、嫁接的和体外制备的抗体。“抗体”也可以包括复合物形式,所述复合物形式包括但不限于包含免疫球蛋白结构部分的融合蛋白。“抗体”也可以包括抗体片段诸如Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb、Fc和其他组合物,尤其是保持抗原结合功能的那些。

[0027] 短语“特异性结合”是指这样的结合反应,在所述结合反应中结合对的两个成员(例如,抗体和包含该抗体目标表位的分子)彼此结合的亲和性比所述成员对异质混合物(例如,杂交瘤培养物上清液或其他蛋白的混合物)其他组分的亲和性强至少100倍。

[0028] “固体支持物”是指具有一个或多个刚性或半刚性表面的材料或材料组。在一些实施方案中,所述固体支持物采用以下形式:薄膜或膜、珠子、瓶、盘、纤维、编织纤维、成形聚合物、颗粒和微粒,其包括但不限于微球体。固体支持物能够例如由以下材料形成:天然材料的惰性固体支持物,诸如玻璃和胶原蛋白,或合成材料,诸如丙烯酰胺、纤维素、硝化纤维素、硅橡胶、聚苯乙烯、聚乙烯乙酸乙烯酯(polyethylene vinyl acetate)、聚丙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯、聚硅酸盐、聚环氧乙烷、聚碳酸酯、特氟隆(teflon)、碳氟化合物、尼龙、聚酞、聚乙醇酸、聚乳酸、聚原酸酯、聚富马酸丙二醇酯(polypropylfumarate)、糖胺聚糖和聚氨基酸。经常地,一些官能团,例如,自然地存在于载体表面上的羧酸(-COOH)、游离胺(-NH₂)和巯基(-SH)能够用于肽连接。在没有天然可用的这样的官能团的情况下,所需的官能团,诸如羧酸基团或已知为结合相互作用的配偶体的结构部分(诸如能够与生物素结合的抗生物素蛋白)可以与这种固体支持物结合。在一些实施方案中,所述固体支持物是羧化乳胶或磁性微球体。

[0029] 附图简述

[0030] 图1提供了本发明实施方案的示意图。

[0031] 详述

[0032] I. 引言

[0033] 本发明提供用于纯化来自杂交瘤或其他抗体溶液（包括但不限于多克隆抗体溶液）的抗体并在之后鉴定与相同抗原结合并且对于例如夹心免疫测定有用的抗体对的有效方法。夹心免疫测定有若干不同的形式，但是共同的主题是两种不同抗体（“抗体对”）与相同抗原的结合。抗体对通常结合不同的表位并且因此对于与抗原结合彼此间不具有显著的竞争性。本发明提供以下有效方法：所述方法在不需大体积或大量的抗体或很多纯化步骤的情况下选择在夹心免疫测定中很好地充当抗体对的单克隆抗体。

[0034] 本发明提供这样的方法，所述方法涉及使抗体溶液（包括但不限于杂交瘤培养物上清液）中的抗体与固体支持物可逆结合，使结合的抗体和固体支持物与上述上清液的其他组分分离，以及随后在洗脱条件下使所述抗体与上述固体支持物分离，从而制备系列包含不同经纯化抗体的溶液。后面的分离步骤能够包括但不限于过滤上述固体支持物（例如，珠子）或磁分离。显著地，本发明的抗体纯化方法能够应用于杂交瘤形成的很早期（例如，在建立杂交瘤克隆前），因此允许在需要杂交瘤克隆步骤前筛选抗体和鉴定所需的杂交瘤。此方法因此极大地减小了在筛选前克隆大量杂交瘤所典型包括的劳动。

[0035] 可以将经纯化抗体的溶液划分为若干部分，以致用第一修饰修饰一部分中的抗体而用第二修饰修饰第二部分中的抗体。然后可以采用夹心免疫测定进行不同抗体间的配对比较 (pair-wise comparison)，其中所述抗体对中的一个具有第一修饰而所述对的另一个抗体具有第二修饰。可选地，根据本发明的方法能够进行 10s、100s、1000s 或更多的配对比较。此方法因此允许在系列中进行不同抗体的配对比较，从而鉴定在夹心免疫测定中有用的抗体对和提供上述抗体的对应杂交瘤。

[0036] II. 抗体纯化

[0037] 本方法允许以快速并且有效的方法纯化抗体从而产生能够直接用于缀合以及可选地用于随后的配对比较的经纯化的抗体。在一些实施方案中，所述抗体纯化自多克隆抗体或其他抗体来源。显著地，本发明在从小体积来源平行地纯化大量不同抗体方面尤其有用。因此，在一些实施方案中，本发明对于纯化和筛选来自杂交瘤的抗体的结合性质尤其有用。

[0038] 已知多种方法并且可以将其用于产生杂交瘤或其他产生抗体的细胞。参见，例如，Harlow, Antibodies (抗体), Cold Spring Harbor Press (冷泉港出版社), N. Y. (1989)。在一些实施方案中，可以将来自免疫小鼠的脾细胞和淋巴结细胞分离并融合到合适的永生细胞系（诸如小鼠骨髓瘤细胞系），从而生成产生针对抗原的单克隆抗体的杂交瘤。然后，可以筛选所得的杂交瘤对抗原特异抗体的生产。例如，可以用 50% PEG (w/v) 将来自免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液融合到 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞 (ATCC, CRL1581) 上。可以将细胞以大约 1×10^5 个 / 孔涂板于平底微量滴定板 (microtiter plate) 中，随后在除常用试剂外还包含 10% 胚胎克隆血清、50rigen Hybridoma Cloning Factor (杂交瘤克隆因子) (IGEN) 和 1xHAT (Sigma) 的选择培养基中培育两周。在大约两周后，可以在其中用 HT (Sigma) 替代了 HAT 的培养基中培养细胞。

[0039] 可选地，本发明方法中使用的杂交瘤已经经过预先选择以用于产生针对所需靶标的抗体。因此，在一些实施方案中，已知本方法中全部或大部分的杂交瘤与特定抗原结合。

备选地,由所述杂交瘤制备的抗体的亲和性或靶标是未知的。在后一种情况中,相比如果已知杂交瘤产生与目的抗原结合的抗体,通常将筛选显著更大量的额外的杂交瘤。如果需要,可以使用用于初始鉴定产生与抗原结合的抗体的杂交瘤的筛选方法。如上所讨论的,本方法的优势是直到在筛选抗体的反应性后不需要产生杂交瘤克隆(即,克隆细胞群体)。这消除了产生和筛选大量克隆杂交瘤品系的步骤,因为筛选可以在克隆品系形成前发生。一旦确定特定的杂交瘤上清液包含目的抗体(例如,通过使用本文中描述的筛选方法),则可以由产生阳性上清液的那些杂交瘤产生杂交瘤克隆。

[0040] 理想地,可以根据本发明的方法平行地筛选多个杂交瘤培养物上清液(或其他抗体溶液)。因此,在一些实施方案中,杂交瘤培养在多孔容器中或以其他方式平行生长,从而使平行地操作许多混合物变得容易。最初,使包含抗体的杂交瘤上清液(或其他抗体溶液)的等分试样接触与固体支持物相连的第一试剂,其中所述第一试剂对所述抗体具有亲和性(即,特异地结合所述抗体)。所述固体支持物可以包括但不限于珠子或微粒,或能够悬浮在溶液中但不通过如下所述的滤器的其他固体支持物。这种试剂可以包括例如,对杂交瘤的来源物种特异的另一种抗体(例如,在非小鼠动物中产生的抗小鼠抗体)。备选地,在一些实施方案中,对所述抗体具有亲和性的第一试剂选自由以下各项组成的组:蛋白 A、蛋白 G 和抗原或其他包含表位的分子。在后一种情况中,所述抗原可以是夹心免疫测定最终针对的抗原。

[0041] 在允许上清液中的抗体与第一试剂结合的条件下使与固体支持物相连的第一试剂与杂交瘤上清液(或其他抗体溶液)接触足够长的时间。然后,可以通过利用能够使固体支持物与不与第一试剂结合的溶液组分分离的方法使上清液的其他非抗体组分与结合到第一试剂的抗体分离。可选地,使用真空抽滤来使所述固体支持物(以及其结合的第一试剂和与抗体)与上清液的非抗体组分分离。滤板,例如在本领域中已知的那些,可以用于这种分离。

[0042] 已知许多分离溶液组分的方法。物理分离方法可以包括,例如,离心从而使固体支持物(例如,珠子)沉淀,随后移去上清液以及在维持所述抗体与第一试剂结合的条件下可以可选地采用一或多步漂洗。在一些实施方案中,固体支持物将包含磁体或磁性材料。在这些可选的实施方案中,可以使用磁力来将固体支持物固定到容器上,从而允许在不去除固体支持物的情况下方便地去除上清液和可选的漂洗液。尽管在例如美国专利公布 2005/0266462 中描述了磁性固体支持物,但是本领域技术人员将理解其他磁性制剂也是可能的。

[0043] 如果需要,可以在基本上不将抗体从第一试剂上洗脱下来的溶液中将所述抗体/第一试剂/固体支持物可选地漂洗一次或多次,从而去除残留的杂交瘤上清液。

[0044] 在可选的漂洗步骤后,使结合到与固体支持物相连的第一试剂上的抗体经受使所述抗体从第一试剂洗脱下来的条件。取决于第一试剂和它与目标抗体的相互作用,这样的条件可以变化。在一些实施方案中,所述洗脱条件包括升高的温度(相对于之前的漂洗条件)和/或 pH 的变化(例如,降低 pH),并因此减少所述抗体和第一试剂间的结合。如果降低 pH 从而洗脱所述抗体,则随后可以可选地添加中和溶液,从而保护所述抗体免遭长时间的酸暴露。

[0045] 在所述抗体从第一试剂洗脱后,使包含所述抗体和第一试剂的溶液与固体支持物

分离。在一些实施方案中,过滤包含被洗脱抗体和固体支持物的溶液,即,可以过滤所述溶液以除去与固体支持物相连的第一试剂。通过选择阻碍固体支持物通过而允许被洗脱的抗体通过的滤器,使所述抗体能够与第一试剂分离,由此从杂交瘤纯化所述抗体。可以如在本领域中已知的那样使用多种过滤设备。在一些实施方案中,使用多孔滤板从而平行地分别过滤多种不同抗体。已知多种滤板并且可以商购,例如,从Pall Corp.、Millipore、Quality Scientific Plastics等商购。

[0046] 可选地,可以使用其他方法来使包含被洗脱抗体的溶液与固体支持物分离。例如,可以采用磁分离方法。

[0047] 在一些实施方案中,将滤板用于捕获固体支持物而使被洗脱的抗体通过到收集储器或管中。例如,在一些实施方案中,滤板是底部结合有玻璃纤维或其他类型滤膜的多孔(例如,96孔)板。将包含第一试剂(和固体支持物)和抗体(连接的或被洗脱的)的混合物应用于所述滤板,可选地在允许所述抗体从第一试剂洗脱下来(如果还未被洗脱)的条件下,以致固体支持物被截留在所述膜上或膜中。可选地,可以应用真空抽滤来使包含被洗脱抗体的溶液从所述滤器穿过。然后收集基本上不含第一试剂和固体支持物的被洗脱抗体。可选地,在允许组织单独抗体的多孔微量滴定盘或其他收集储器中收集来自不同杂交瘤的不同抗体,以便一旦发现特定抗体具有所需的反应性,任何人可以鉴定并使用该生产杂交瘤。

[0048] III. 确定抗体结合的方法

[0049] 在如上所述的收集经纯化的来自杂交瘤的抗体后,可以在它们一起用于夹心免疫测定的相容性方面比较收集的抗体对。可选地,可以在没有插入步骤的情况下使用如上所述纯化的抗体的等分试样,并且将它们制备成用于在免疫测定中使用,例如,将所述抗体与固体支持物或可检测标签诸如生物素相连。

[0050] 夹心免疫测定是指对目标分子的测定,其中捕获抗体与固体表面相连,可能包含靶标的混合物与第一抗体接触,漂洗,然后与一种或多种进一步的检测试剂接触,从而检测结合到捕获抗体的靶标的存在或量。在本发明的方法中,一级检测试剂,即与被捕获的目标分子结合的试剂,也是抗体,例如是纯化自杂交瘤的抗体,可选地如上所述。因此,本发明允许选择用于针对目标分子进行的夹心免疫测定的相容抗体对,其中所述对的一个成员是捕获抗体而所述对的第二成员是一级检测抗体。

[0051] 本发明可以利用上述抗体纯化方法并且使用这样纯化的抗体来确定免疫测定中的相容抗体对。在一些实施方案中,使用一种捕获抗体并在免疫测定中将其与如上所述纯化自杂交瘤的充当一级检测抗体的多种不同抗体配对。备选地,在一些实施方案中,在夹心免疫测定中,将如上所述纯化自不同杂交瘤的多种不同捕获抗体与一种一级检测抗体配对。可选地,可以将如上述纯化的多种抗体用作捕获抗体和一级检测抗体来鉴定最佳结合对。

[0052] 在一些实施方案中,捕获抗体与固体支持物相连。在本发明的一些实施方案中,采用经纯化的来自杂交瘤的抗体的等分试样并将其与固体支持物相连,从而形成系列与固体支持物结合的不同抗体。可以使用多种不同固体支持物,包括但不限于珠子,可选地磁珠,或如上所述的其他固体支持物。在一些实施方案中,所述固体支持物包括聚苯乙烯(polystyrene)。可选地,将不同抗体与不同固体支持物相连,所述固体支持物例如可以通

过流式细胞仪辨别（例如由于与这种支持物相连的标签的尺寸而被流式细胞仪辨别）的固体支持物。参见，例如，美国专利号 7, 271, 009 ;6, 872, 578 ;和 WO 02/075311。

[0053] 在本领域中已知用于将抗体与固体表面相连的众多方法。作为一个实例，可以使用连接剂（包括但不限于 N- 羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysulfosuccinimide) (NHSS) 可选地与 1- 乙基 -3-[3- 二甲基氨基丙基] 碳二亚胺盐酸盐 (EDC)) 将抗体与固体支持物相连。

[0054] 在一些实施方案中，采用经纯化的来自杂交瘤的抗体的第二等分试样并将其用作免疫测定中的一级检测抗体。在一些实施方案中，将来自所述等分试样的抗体与直接或间接可检测的标签相连从而形成一级检测抗体。直接可检测标签是直接产生信号的试剂。例如，荧光标签是直接可检测的。可选地，将所述抗体与间接可检测标签例如亲和试剂相连。亲和试剂包括但不限于生物素，抗生物素蛋白或链霉抗生物素。

[0055] 可以确定在夹心免疫测定中发挥作用的两个不同抗体的相容性，例如，通过在结合有一种或系列可选地来源于杂交瘤的一级检测抗体的夹心免疫测定中使用一种或系列捕获抗体（例如，如上所述的）。所述测定可以包括，例如，使已知量的目标抗原与捕获抗体（其与固体支持物相连）在允许该靶标与所述捕获抗体结合的条件下接触，可选地从固体支持物上洗去过量的靶标，然后使一级检测抗体与结合的靶标接触。一级检测抗体的存在、不存在或量将表明所述捕获抗体和一级检测抗体的相容性。可能发生问题，例如，当两种抗体竞争结合相同的表位时或当捕获抗体的结合不允许一级检测抗体目标表位的可用性。因此，通过在夹心免疫测定中将一种或多种候选捕获抗体与一种或多种候选一级检测抗体比较，能够快速并且有效地鉴定哪个抗体对是相容的以及可选地，哪对是“最好的”，即，提供最佳检测或对所述靶标量的准确确定。

[0056] 已知众多夹心免疫测定并且可以将其用于确定两种抗体的相容性。在典型的微量滴定板夹心免疫测定中，将单克隆捕获抗体吸附到塑料微量滴定板上。当将测试样品添加到所述板时，该板上的抗体将与来自所述样品的目标抗原结合，并且将其留在板中。当在下一步中添加多克隆抗体时，它也与目标抗原（其已经与所述板上的单克隆抗体结合）结合，由此形成两种不同抗体间的抗原‘夹心’。然后通过本领域中已知的任何方法测量此结合反应。

[0057] 对于免疫学和免疫测定的步骤的综述，参见 Basic and Clinical Immunology (基础和临床免疫学) (Stites&Terr 编辑，第 7 版，1991)。此外，可以若干配置中的任一种执行本发明的免疫测定，所述若个配置在 Enzyme Immunoassay (酶免疫测定) (Maggio 编辑，1980) ;和 Harlow & Lane, 见上中得到详尽综述。

[0058] 在一些实施方案中，免疫测定的固体支持物是一种或多种珠子，所述一种或多种珠子可选地由流式细胞仪检测。在一些实施方案中，当使用多种捕获抗体时，将可由流式细胞仪辨别的不同珠子或其他微粒与不同的捕获抗体相连。这种技术在例如美国专利号 7, 271, 009 ;6, 872, 578 ;和 W002/075311 中得到描述并且可以作为 Bio-Plex™ 系统从 Bio-Rad (Hercules, CA) 购买。可由流式细胞仪辨别的方面包括但不限于颗粒的尺寸和质量或颗粒上标签的荧光波长。

[0059] 免疫测定也常常使用标签试剂，所述标签试剂特异地与由抗体和抗原形成的复合物结合并给其加标签。标签试剂本身可以是抗体 / 抗原复合物包含的结构部分中的一

个。因此,标签试剂可以是与目的蛋白结合的带标签的多肽或带标签的(例如,被生物素化的)抗体。备选地,标签试剂可以是第三结构部分,诸如与抗体/抗原复合物特异性结合的二级抗体(二级抗体典型地对第一抗体所来自的物种的抗体是特异的)。也可以将能够与免疫球蛋白恒定区特异性结合的其他蛋白诸如蛋白 A 或蛋白 G 用作标签试剂。这些蛋白展示与来自多个物种的免疫球蛋白恒定区的强的非免疫原反应性(参见,例如, Kronval 等, J. Immunol. (免疫学杂志) 111 :1401-1406(1973); Akerstrom 等, J. Immunol. (免疫学杂志) 135 :2589-2542(1985))。可以用可检测的结构部分修饰标签试剂,所述可检测的结构部分诸如生物素,另一个分子诸如抗生物素蛋白或链霉抗生物素可以与生物素特异性结合。多种可检测的结构部分是本领域技术人员所熟知的。

[0060] 免疫测定包括非竞争性测定和竞争性测定。在竞争性测定中,通过测量从由样品中存在的未知多肽结合的抗体置换(通过竞争被赶走)的已知的、添加的(外源的)目标多肽的量间接测量在样品中存在的多肽的量。

[0061] 在所述测定中使用的特定标签或可检测的基团不是本发明的关键方面,只要它不显著干扰在该测定中使用的抗体的特异性结合。可检测基团可以是具有可检测的物理或化学性质的任何物质。在免疫测定领域这种可检测的标签已经被很好的开发并且,通常,可以将在这种方法中有用的几乎任何标签应用于本发明。因此,标签是可由以下方法检测的任何组合物:分光法、光化学方法、生化方法、免疫化学方法、电学方法、光学方法或化学方法。本发明中有用的标签包括磁珠、荧光染料(例如,荧光素异硫氰酸酯、德克萨斯红、罗丹明等)、放射性标签、酶(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和其他在 ELISA 中通常使用的酶)以及比色标签诸如胶体金或有色玻璃或塑料珠(例如,聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等)。

[0062] 可以根据本领域中广为人知的方法直接或间接地将标签与测定的所需组分(例如,一级检测抗体)连接。如上所示,可以使用多种标签,其中对标签的选择取决于所需的灵敏度、与化合物缀合的容易性、稳定性要求、可用的装置和处理规定。

[0063] 非放射性标签通常通过间接方法连接。通常,配体分子(例如,生物素)与所述分子共价结合。然后所述配体与另一个分子(例如,链霉抗生物素)结合,所述另一个分子本身是可检测的或共价地结合到信号系统,诸如可检测的酶、荧光化合物或化学发光化合物。所述配体和它们的靶标可以以任何合适的组合与识别目的多肽的抗体或识别与所述多肽结合的抗体的二级抗体一起使用。

[0064] 所述分子也可以直接与信号产生化合物结合,例如,通过与酶或荧光团结合。作为标签的目的酶将主要是水解酶,尤其是磷酸酶、酯酶和糖苷酶,或氧化酶(oxidotases),尤其是过氧化物酶。荧光化合物包括荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹酰、7-羟基香豆素(umbelliferone)等。化学发光化合物包括荧光素和 2,3-二氢酞嗪二酮(2,3-dihydrophthalazinedione),例如,鲁米诺。对于可以使用的多种标签或信号产生系统的综述,参见美国专利号 4,391,904。

[0065] 检测标签的方法是本领域技术人员所熟知的。因此,例如,当标签是放射性标签时,检测的方式包括闪烁计数器或如在放射自显影中的感光胶片。当标签是荧光标签时,可以通过用合适波长的光激发荧光染料并检测所获得的荧光来检测它。荧光可以通过感光胶片通过使用电子探测器诸如电荷耦合器件(CCD)或光电倍增管等在视觉上检测。同样地,酶标签可以通过给所述酶提供合适的底物并检测所得的反应产物进行检测。最后,简单的

比色标签可以通过观察与所述标签关联的颜色进行检测。因此,在多种试纸条 (dipstick) 测定中,缀合的金通常表现出粉色,而不同的缀合的珠子表现出珠子的颜色。

[0066] 一些测定形式不需要使用被标记的组分。例如,可以使用凝集测定来检测目标抗体的存在。在此情况中,包含目标抗体的样品使抗原包被的颗粒凝集。在此形式中,不需要给组分加标签并且通过简单的目视检查检测目标抗体的存在。

实施例

[0067] 提供以下实施例用于举例说明,而非限制所要求的发明。

[0068] A. 试剂和材料

[0069] 1. 抗小鼠 IgG 琼脂糖 :Sigma A6531

[0070] 2. 漂洗缓冲液 :0.1M PB(pH7.4)、0.5M NaCl

[0071] 3. 洗脱缓冲液 :0.5M 乙酸 (pH 2.4)

[0072] 4. 中和缓冲液 :0.2M PB、0.5N NaOH(pH 13)

[0073] 5. 磷酸二氢钠溶液 (100mM NaH_2PO_4 , pH 6.0)

[0074] 6. 0.1M MES 缓冲液 (pH6.0)

[0075] 7. Tris 1 存储缓冲液 (200mM Trisma 碱、0.1% BSA、0.3M NaCl、0.1% Proclin、0.02% 吐温 20、0.1% NaN_3 , pH 7.4)

[0076] 8. Dynal MPC-S 磁珠分离器 (Bynal Biotech, 货号 120-20D)

[0077] 9. 无菌的、具有 O 形圈帽的 2ml 螺帽微离心管 (VWR, 货号 89004-298), 用于珠偶联

[0078] 10. 微量滴定混合器 (IKA Works, Model MTS 2/4 数字式, 货号 3208001)

[0079] 11. 收集管和支架 (QSP Quality Scientific Plastics, 货号 :84501XNBZQ, 支架和 1.2mL 微量滴定管 ;VWR 82006-700)

[0080] 12. Luminex 磁珠 (Luminex MagPlexTM 微球体, 货号 :1mlMC10xxx-01 (其中 xxx 是珠区域数目))

[0081] 13. N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHSS, Pierce, 货号 :24510)

[0082] 14. 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC, Pierce, 货号 :22980)

[0083] 15. 硫代 -NHS- 生物素 (Pierce, 货号 :21217)

[0084] 16. Bio-Plex ProTM 细胞因子试剂盒 10x 96 孔 (Bio-Rad, 货号 :171-304071)

[0085] B. 抗体纯化

[0086] 需要的抗小鼠 IgG 琼脂糖的体积计算如下 :抗小鼠 IgG 琼脂糖的体积 (μL) = 样品数目 $\times 10$ 。

[0087] 漂洗缓冲液的体积计算为 :漂洗缓冲液的体积 (μL) = 样品数目 $\times 40$ 。

[0088] 在干净的管中将计算量的漂洗缓冲液和抗小鼠 IgG 琼脂糖混合。用 100 μL 漂洗缓冲液预湿滤板孔并且随后应用真空除去缓冲液。充分涡旋振荡抗小鼠 IgG 琼脂糖并且将 50 μL 添加到滤板的每个孔中。应用真空除去缓冲液。

[0089] 将 250 μL 漂洗缓冲液添加到每个孔中并且应用真空除去缓冲液。将 250 μL 杂交瘤上清液添加到所述孔中。使所得的混合物以 900 的速度振动 45 分钟。

[0090] 应用真空除去上清液。另外添加 250 μL 上清液,再次振动 45 分钟并且再次应用真空除去上清液。

[0091] 随后,将 250 μ L 漂洗缓冲液添加到每个孔中并且应用真空除去缓冲液。将此步骤再重复两次。

[0092] 将 60 μ L 中和缓冲液添加到每个收集管中。将 60 μ L 洗脱缓冲液添加到每个孔中并且使所述板以设置在 1100 的速度振动 1 分钟。

[0093] 将具有 1.2mL 微量滴定管的 96 孔 QSP(Quality Scientific Plastics, 货号: 84501XNBZQ) 支架放在 Bio-Rad 真空歧管(货号:732-6470)上。将滤板放在 QSP 管的顶部,保证孔底部与管相应地相配。

[0094] 应用真空将抗体收集到收集管中并且立即以 900 的速度振动一分钟从而中和 pH。将二十微升水添加到每个管中并且充分混合。

[0095] 随后可以将来自各纯化的二十微升经纯化的抗体应用于珠结合,而其余(大约 120 μ L)可以用于生物素化。

[0096] C. 经纯化的抗体与聚苯乙烯珠(polystyrene bead)结合

[0097] 需要的珠体积计算如下:需要的珠体积(μ L) = 样品数目 \times 2.2(此计算根据来源于一个样品的 22 次试验,理论上对于 Bio-Plex 运行它将是 1250 个珠/孔)。

[0098] 充分地涡旋振荡所述珠并且吸取磁珠到 2mL 管中。将 150 μ L diH₂O 添加到所述管中并充分混合。应用磁性分离器 30 秒并且随后将溶液除去,理想地不与所述珠接触。将所述管从磁性分离器移走并且添加 80 μ L 100mM 磷酸二氢钠溶液从而重悬珠。

[0099] 制备新鲜的 NHSS 和 EDC 溶液。将一毫克 NHSS 溶解在 20 μ L 100mM 磷酸二氢钠溶液中。将一毫克 EDC 溶解在 20 μ L 100mM 磷酸二氢钠溶液中。

[0100] 将十微升 NHSS 添加到珠溶液中并且充分混合。随后将十微升 EDC 添加到小珠溶液中并且充分混合。随后将小珠在暗处以 900 的速度振动 20 分钟。

[0101] 应用磁性分离器 30 秒并且从所述管中移去溶液。然后将珠子重悬在 150 μ L 0.1M MES 缓冲液(pH 6.0)中。再次应用磁性分离器 30 秒并且从所述管中移去溶液。然后重复 MES 缓冲液漂洗和除去溶液从而更充分地漂洗所述珠。

[0102] 然后按下述将珠子重悬在 0.1M MES 缓冲液(pH 6.0)中:需要的 0.1M MES 的体积(μ L) = 样品的数目 \times 15。

[0103] 充分混合珠子并且将 15 μ L 珠悬浮液添加到具有 20 μ L 经纯化抗体(如上所述纯化)的每个管中。用石蜡封口膜(parafilm)密封所述管并且在暗处以 900 的速度振动 1.5 小时。添加 185 微升 Tris 存储缓冲液/管并且将珠子存储于 4 $^{\circ}$ C 的暗处。随后可以将珠子用于夹心或其他免疫测定,例如作为捕获试剂。

[0104] D. 经纯化抗体的生物素化

[0105] 制备十毫摩尔硫代-NHS-生物素。将一毫克硫代-NHS-生物素溶解在 227 μ L diH₂O 中。将 2.4 μ L 硫代-NHS-生物素(10mM)添加到 140 μ L 经纯化的抗体中。生物素的终浓度是 0.2mM。用石蜡封口膜密封所述管并且使其以 900 的速度振动 1.5 小时。将一百微升在 PBS 中的 1% 的 BSA 以及 0.02% Na₂S₂O₃ 添加到各管中,并且将所述管存储于 4 $^{\circ}$ C。

[0106] 随后可以将被生物素化的抗体用于夹心或其他免疫测定,例如作为一级检测抗体和/或捕获抗体。在一些实施方案中,基本如在美国专利号 7,271,009 中所述的进行夹心免疫测定。

[0107] 要理解本文所述的实施例和实施方案只是用于举例说明目的,并且本领域技术人

员将想出根据其的多种改动或变化并且它们将包含在本申请的精神和范围内并且在所附权利要求的范围内。本文中引用的所有出版物、专利和专利申请通过引用完整地结合于此用于所有目的。

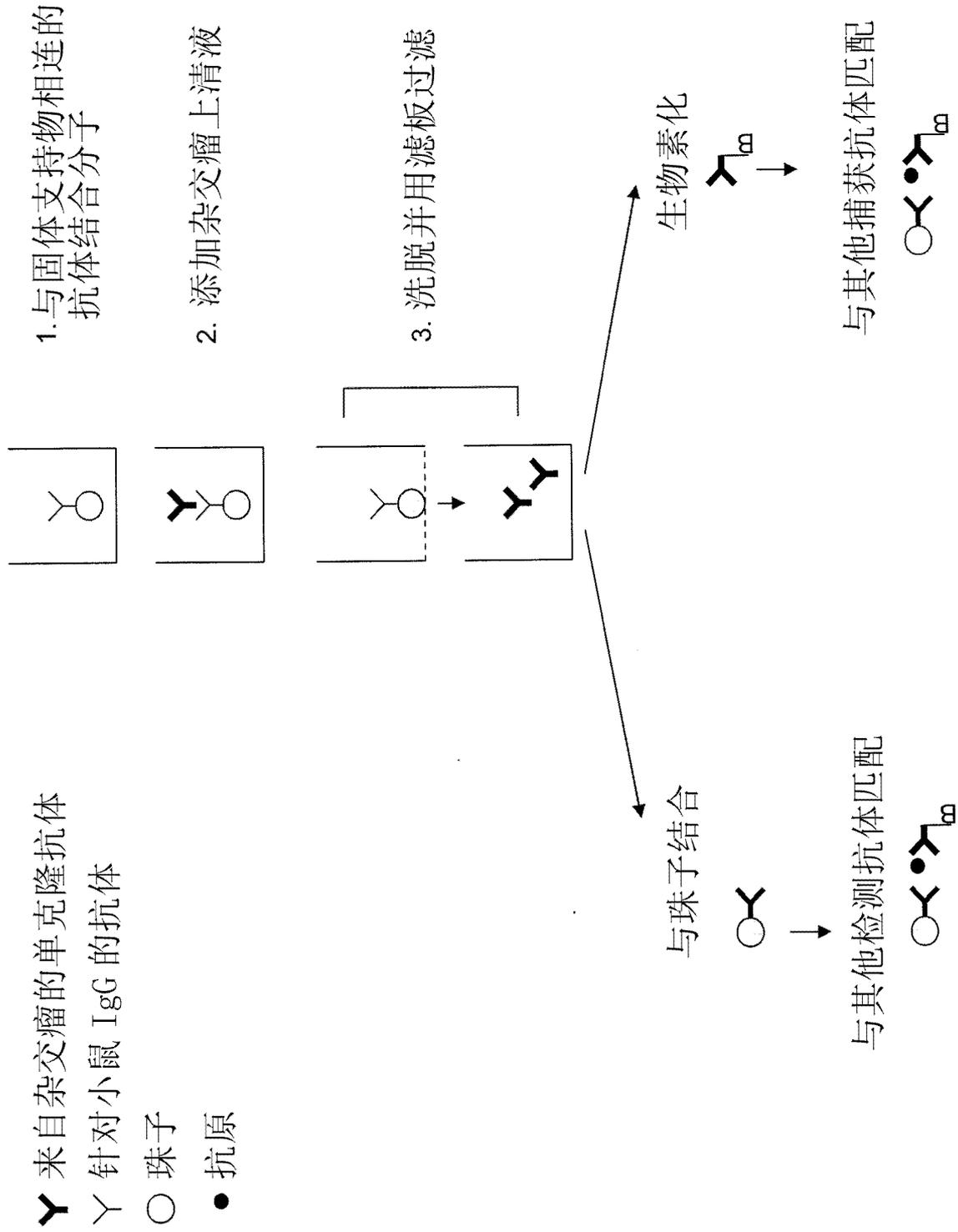


图 1